

Dědičné změny v genech,
genetické názvosloví,
fenotypy nejčastěji používané v
bakteriální genetice

.

Dědičné změny v genech

- jsou způsobeny mutací, rekombinací nebo transpozicí
- (gen: informační a funkční genetická jednotka obsahující genetickou informaci o primární struktuře buď funkční molekuly translačního produktu (proteinu), nebo funkční molekuly produktů transkripce (tRNA, rRNA, snRNA – malá jaderná, nepodléhající translaci))

Definice mutace

- Dědičná změna genotypu, jejíž molekulární podstatou je nukleotidová substituce, delece nebo inserce.
- (Genotyp: genetická konstituce organismu reprezentovaná souborem alel specificky uspořádaných v jeho genomu)
- (Fenotyp: soubor znaků, kterými se v daném prostředí projevuje genotyp organismu)
- (Genom: Všechny molekuly DNA živé soustavy, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo)

Nukleotidová substituce

- je výměna nukleotidů v jednořetězcových NK nebo
výměna nukleotidových párů v dvouřetězcových NK.
- Probíhá transicí (výměna purinu za purin, pyrimidinu za pyrimidin)
- nebo transverzí (výměna purinu za pyrimidin a naopak).

Delece a inserce

- Je ztráta jednoho nebo více nukleotidů v nukleotidové sekvenci nebo
- vložení jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence.
- Inserční mutace bývají způsobeny insercí mobilního genetického elementu,
- rekombinacemi mezi IS elementy vznikají inverzní mutace a delece

Mutace mohou být

- Spontánní (bez pozorovatelného vlivu mutagenu)
- Indukované (vyvolané mutagenem např. fyzikálním, chemickým)

Základem schopnosti genů mutovat (mutability)

- jsou chemické vlastnosti bazí, v důsledku kterých se mohou **během replikace** vytvářet chybné páry bazí (odchylují se od Watsonových-Crickových párů)
- Tautomerní změny bazí (A se páruje s C místo s T, v dalším replikačním cyklu se C páruje s G a pár AT je nahrazen párem GC)

Na celkový počet správných nukleotidových párů

- připadá podíl asi 10^{-4} až 10^{-5} chybných párů s tautomerními bázemi.
- Vzhledem k nízkým hodnotám rychlosti spontánní mutace tj. 10^{-9} až 10^{-10} se předpokládá, že chybné páry se odstraňují opravnými mechanismy,
- takže pravděpodobnost spontánní mutace se sníží na uvedené hodnoty 10^{-9} až 10^{-10} na nukleotid a replikační cyklus.

Mutační rychlost

- Je pravděpodobnost, se kterou dojde k mutaci
- Záleží na počtu genů, které odpovídají za daný fenotyp - pro fenotyp His⁻ je 1000x vyšší (11 genů) než pro Str^R (1 gen)
- Extrémně vysoká mutační rychlost na určitý fenotyp (vyšší než 10^{-6}) obvykle znamená ztrátu plasmidu, profága nebo inverzi (hot spot místa s určitými sekvencemi, hypermutabilní)

Mutační rychlost

- Se stanovuje fluktuačním testem
- Kultura buněk se připraví ve větším množství
- Rozdělí se do většího počtu frakcí (zkumavek)
- Ponechá se růst do určitého počtu buněk
- A v každé frakci se sleduje počet mutantů

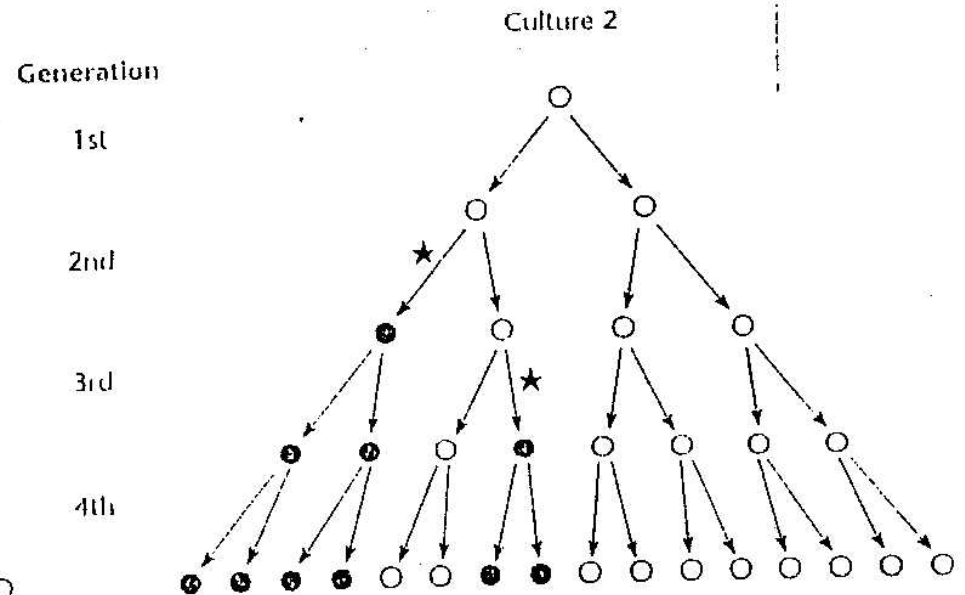
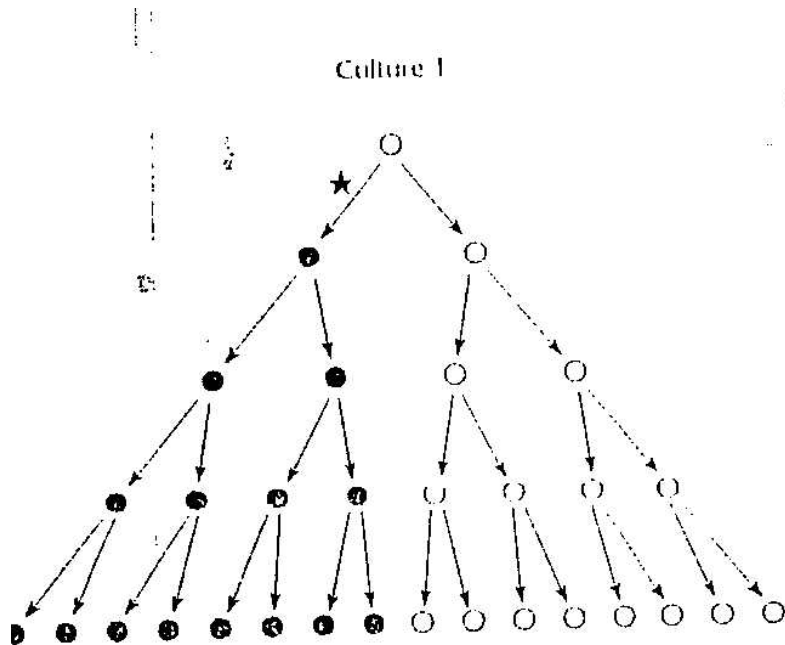
Mutační rychlost

- $a = (-\ln p_0) / N$, kde
- a ...mutační rychlost,
- p_0 ...frakce kultur, ve kterých se neobjevily mutace,
- N ...počet buněk v kultuře
- (nedá se snadno stanovit)

Frekvence mutací

- Je velmi nepřesná hodnota, ale velmi snadno stanovitelná
- Rovná se počtu mutantů/ celkový počet buněk
- Je používána jako první přiblížení

Fluktuační test bere v úvahu, v které generaci došlo k mutaci na rozdíl od frekvence mutací



▪

- Obr. od č. 13 do konce převzato ze Snyder a Chapmann 1997

Typy mutací – obr.

- Bodová (záměna nukleotidu a tím i AK)
- Posunová (změna čtecího rámce delecí nebo insercí 1 nebo 2 nukleotidů))
- Nesmyslná (vznikne nesmyslný kodon)
- Inverse, duplikace, delece (rekombinace mezi IS sekvencemi)
- Supresorová mutace (mutace v antikodonu tRNA, páruje se s nesmyslným kodonem)

Vznik bodové mutace

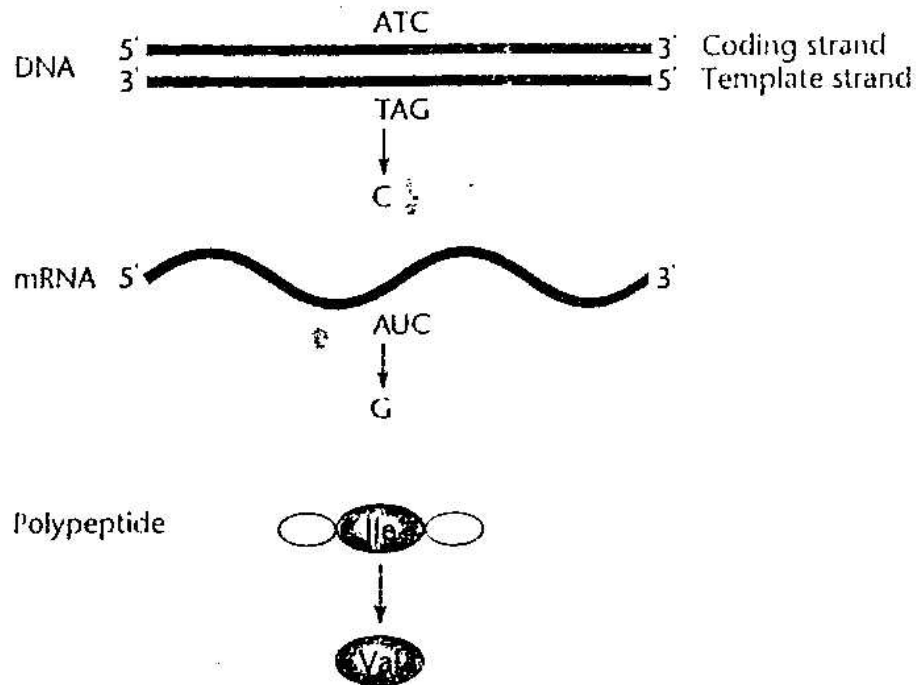


Figure 3.12 A mutation that changes T to C in the DNA template strand will result in an A-to-G change in the mRNA. The mutant codon GUC will be translated as valine.

BODOVA

Vznik nesmyslné mutace

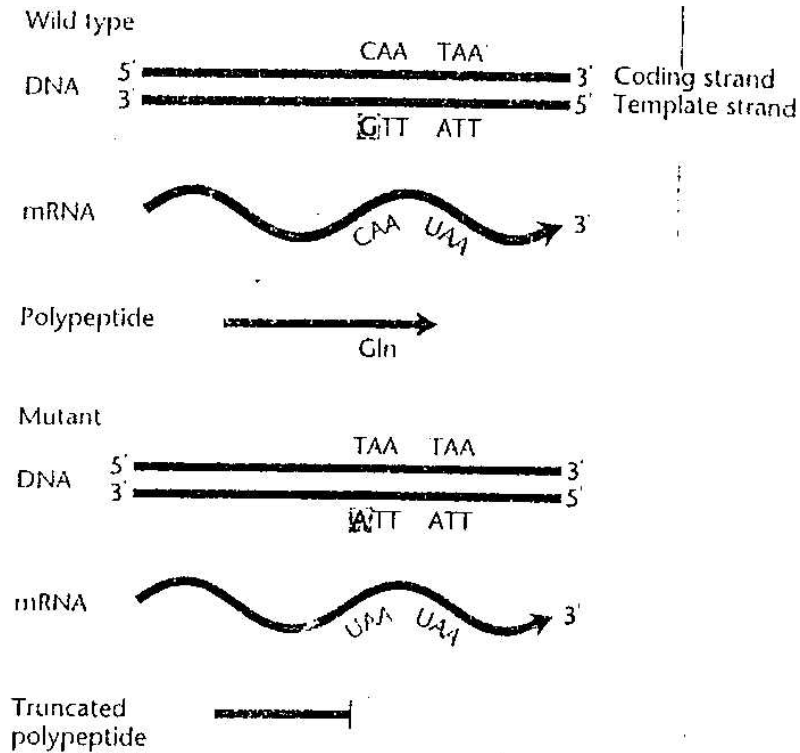


Figure 3.13 Nonsense mutation. Changing codon CAA, encoding glutamine (Gln), to UAA, a nonsense codon, causes truncation of the polypeptide gene product.

NE SMYSLNÁ!

Vznik inverzní mutace

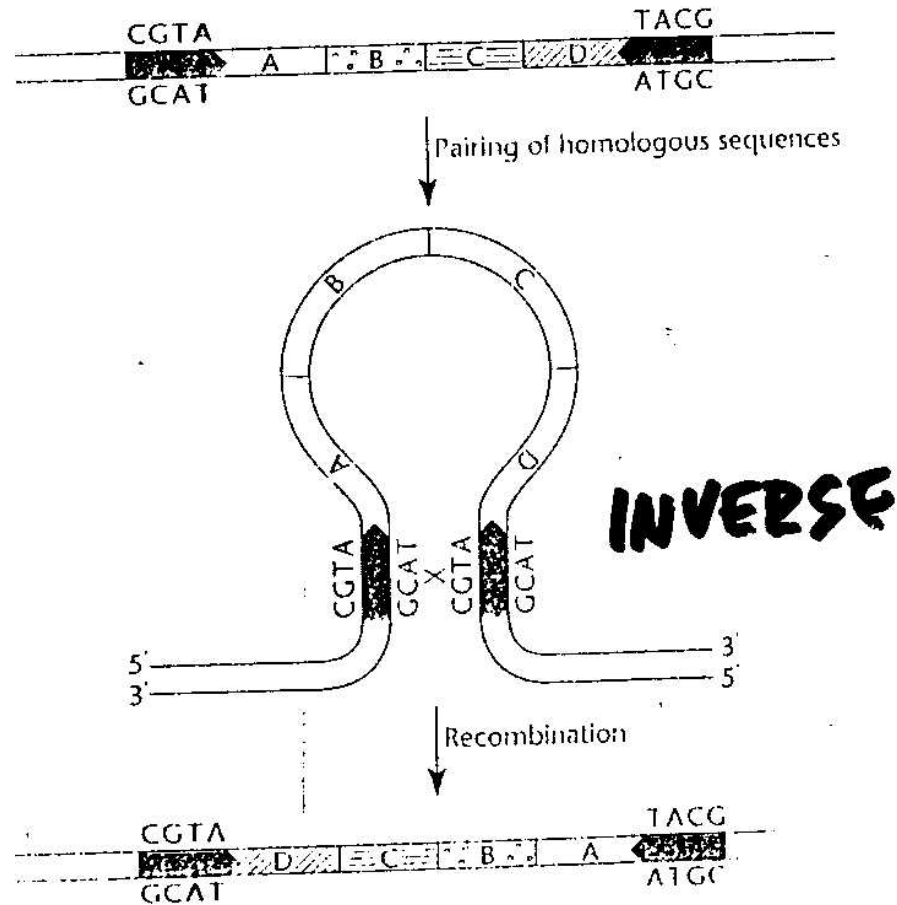


Figure 3.17 Recombination between inverted repeats

Vznik posunové mutace

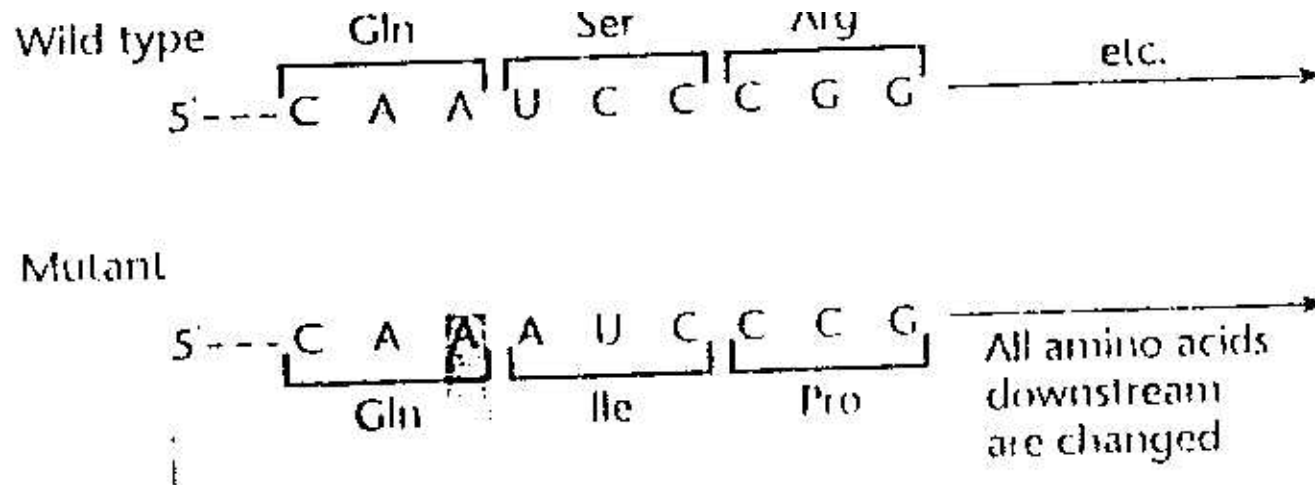


Figure 3.14 Frameshift mutation. The wild-type mRNA is translated glutamine (Gln)-serine (Ser)-arginine (Arg)- etc. Addition of an A (boxed) would shift the reading frame, so that the codons would be translated glutamine (Gln)-isoleucine (Ile)-proline (Pro)-, etc., with all downstream amino acids being changed.

POSHNOVA!

Vznik duplikace a delece

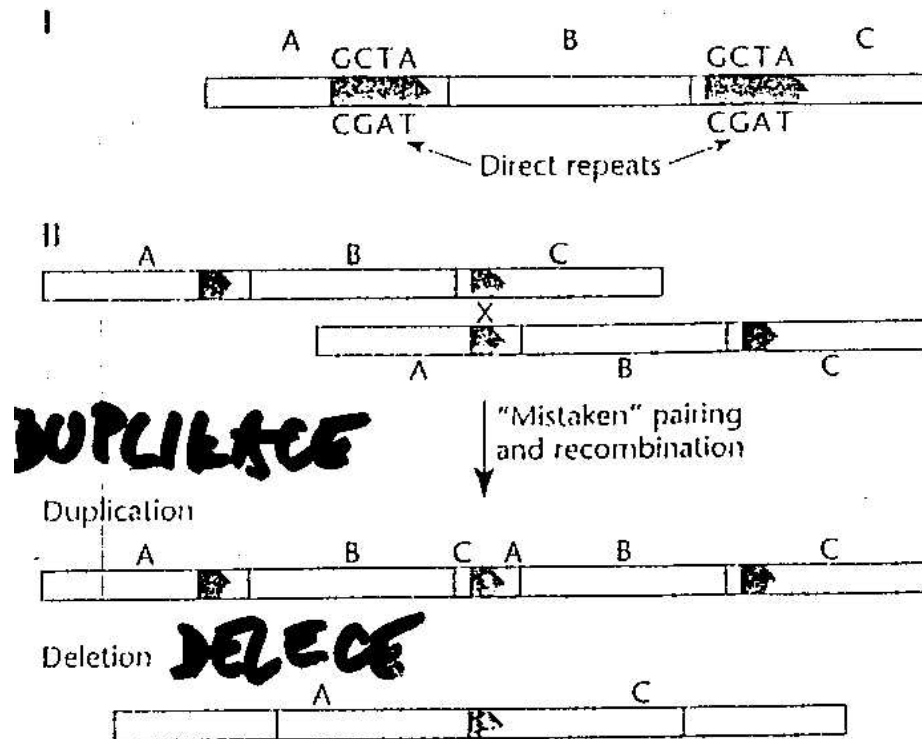
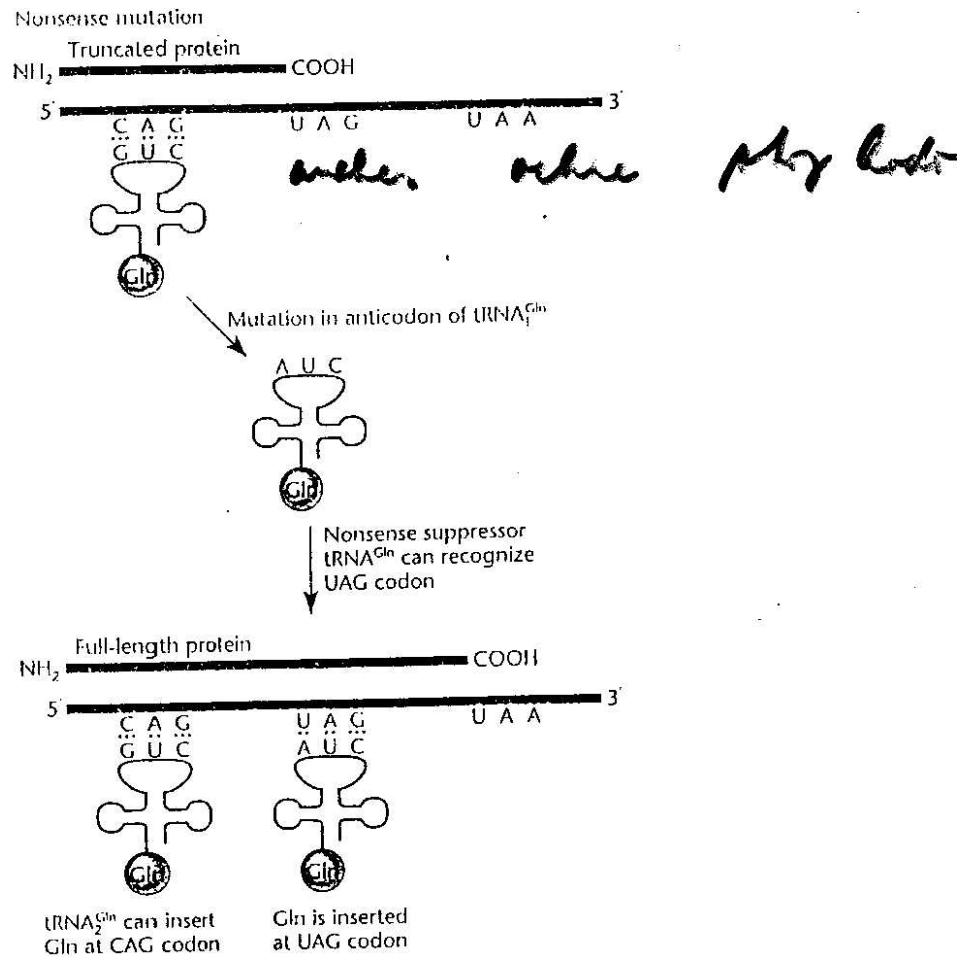


Figure 3.18 Formation of tandem duplication mutations by recombination between directly repeated sequences on different DNA molecules. A deletion, the reciprocal recombinant, is created at the same time as the duplication. The symbol ξ designates the duplication junction.

Supresorová mutace



Geny se mutacemi mění

- Na různé mutantní formy
- Variace genu se nazývají alely

Většina mutací

- je škodlivá tj. inaktivuje genový produkt příp. se zastavuje nebo snižuje jeho syntéza.
- Alely, které těmito mutacemi vznikají, jsou obvykle recesivní
- Alela recesivní koduje nefunkční protein
- Alela standardní, která převažuje v přírodní populaci, je většinou dominantní tj. koduje funkční polypeptid nebo se přepisuje do rRNA nebo tRNA

Mutace letální a neúplné

- Mutace letální jsou neslučitelné s životem buňky
- Neúplné mutace (leaky) znamená, že si genový produkt ponechává určitou aktivitu

Co do směru účinku mutací je nutno rozeznávat

- Původní mutaci tj. mutaci, kterou se standardní alela mění v mutantní
- Zpětnou mutaci neboli reverzi tj. mutaci, kterou se mutantní alela mění částečně nebo úplně ve standardní alelu
- Pravá reverze vede k obnovení původní nukleotidové sekvence

Organismus nesoucí mutantní alelu

- Se nazývá mutant
- Mutantní alela se obvykle projeví ve fenotypu
- Fenotyp: soubor znaků, kterými se v daném prostředí projevuje genotyp organismu.
- (Genotyp: genetická konstituce organismu reprezentovaná souborem alel specificky uspořádaných v jeho genomu).

Projev

- standardní alely ve fenotypu se označuje jako fenotyp standardní
- mutantní alely ve fenotypu se označuje jako fenotyp mutantní

Určité mutantní alely

- se ve fenotypu neprojevují.
- Jsou výsledkem tzv. tiché mutace
- např. změna kodonu za jiný kodon pro tutéž AK nebo
- změna nukleotidu, při které dochází ke změně smyslu kodonu, neprojeví se však ve funkci kódovaného polypeptidu.

Genetické názvosloví

- Označování genů
- Označování mutací
- Označování mutantních organismů
- Označování a příklady genotypů některých kmenů *E.coli*
- Označování fenotypů

Označování genů

- *his*

kurzíva, 3 malá latinská písmena, zkráceně označují funkci genového produktu, je-li znám (enzym nezbytný pro biosyntézu histidinu)

- Enzym se stejnou funkcí může být kódován více geny - *hisA*, *hisB* atd. velká písmena označují jednotlivé geny
- . Lze připsat znaménko minus (-) nebo slovo mutace např. *hisA*⁻, *hisA* mutace
- . Podobně označení *hisA*⁺ označuje standardní formu genu *hisA*, který koduje funkční genový produkt

Označování bodových mutací

- V jediném genu může dojít ke stovkám mutací, označují se číslem
- *hisA4* ... gen *hisA* s mutací č. 4 tj. *his A4* alela genu
- Může se psát také *hisA4⁻* nebo *hisA4* mutace (mutace vede k inaktivaci genového produktu)
- *hisA4⁺* ... znamená standardní alelu genu, která koduje funkční genový produkt (může vzniknout reverzní mutací)

Označování delečních mutací

- Před názvem genu a číslem alely se používá řecké písmeno Δ (delta). Uvádí se poslední známý gen, který byl deletován.
- $\Delta(lac-proAB)195\dots$ delece č.195 oblasti DNA od genu *lac* až po geny *proAB* chromosomu *E. coli* (rozsah delece je znám)
- $\Delta his8\dots$ delece celého *his* operonu *E. coli*, včetně delece sousedních genů, celkový rozsah delece není přesně znám (tak tomu u delecí bývá)
- (když známe sekvenci genomu, tak známe i přesný rozsah delece)

Označování inserčních mutací

- Uvede se název genu, dvě dvojtečky a označení inserčního elementu např.
- *galK::Tn5* ... inserce transpozonu Tn5 do genu *galK*
- Více insercí do stejného genu označíme čísla např.
- *galK35::Tn5* ... inserce č.35 transpozonu Tn5 do genu *galK*
- Je-li inserce provedena technikami rekombinantní DNA lze použít symbol Ω (omega)
- pBR322 Ω ::KanR...inserce genu pro kanamycin rezistenci do plasmidu pBR322
- Inserce cizorodé DNA v plasmidu lze označit
pUC19::HRS60, pUC19::dim1

Označování inverzních mutací

- Mutace s geny v opačné orientaci než standardní se označují velkými písmeny IN a závorkou, v níž jsou uvedeny geny, u nichž došlo k inverzi a číslo mutace např.
- IN(*purB-trpA*)₃ ... inverse č.3, u níž invertovaná oblast začíná v blíže neidentifikovaném místě genu *purB* a končí v blíže neidentifikovaném místě genu *trpA*

Označování mutantních organismů

- *Escherichia coli* AB2497, *Escherichia coli* AB2498, *Escherichia coli* JRS154, *Salmonella typhimurium* LT2-18, *Salmonella typhimurium* LB5000
- Rodové a druhové jméno, zkratka autora
- Nesmí odrážet fenotyp ani mít vztah k genu, o němž předpokládáme, že je mutován
- (aby se zabránilo nedorozumění v případě přenosu genu do jiného kmene)
- Mutantní organismus vznikl mutací ze standardního organismu (wild type, w.t., divoký typ)

Mutantní kmeny

- Odvozené z kmene *Escherichia coli* K-12
- Přes 100 kmenů používaných v genetice
- Barbara J. Bachmann, Pedigree of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, Bacteriol. Rev. 36 (4), 525-557, 1972
- Kmeny Y (Ymel), C (C600), AB, W,...

Sbírkové organismy se označují písmeny a číslem sbírky

- CCM (*Bifidobacterium sp.*CCM3761)
- CCDM (*Lactobacillus casei* CCDM211)
- DSM (*Clostridium tyrobutyricum* DSM2637^T)
- T označuje kmen typový
- *Bifidobacterium longum ssp. infantis* ATCC.....
- sci.muni.cz/ccm

Kmen (strain)

- Jsou buňky určitého druhu a stejného původu
- (např. sbírkový kmen *B. pseudocatenulatum* CCM3761, kmen izolovaný z GIT *Lactobacillus paracasei* RL13, kmen izolovaný z přírody)
- ! Izoláty mohou obsahovat více druhů
- Mohou představovat standardní organismy (w.t.), z nichž byly odvozeny mutanti – např. *E.coli* K12 w.t.

Označování genotypů bakteriálních kmenů

- *E. coli* K-12 (λ)F+ (wild type) (kmen divokého typu)
- *E. coli* Ymel (*mel1*, *supE57*, *supF58*)
- *E. coli* C (wild type, w.t.)
- *E. coli* C600 (*supE44 hsdRthi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21*)
- *E. coli* CSH18 (*supE44 thi* Δ (lac-pro) F (*ProAB+* *lacZ-*))

Supresorové tRNA u *E. coli*

Suppressor name	tRNA	Anticodon change	Suppressor type
<i>supE</i>	tRNA ^{Gln}	CUG- <u>C</u> UA	Amber
<i>supF</i>	tRNA ^{Tyr}	<u>G</u> UA-CUA	Amber
<i>supB</i>	tRNA ^{Gln}	UUG- <u>U</u> UA	Ochre/amber
<i>supL</i>	tRNA ^{Lys}	UUU- <u>U</u> UA	Ochre/amber

Příklady genotypů kmenů *E.coli*

- Používaných v genových manipulacích

Názvy genů *E.coli* K-12

- Najdeme v publikované genetické mapě
- B.J. Bachman, Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8, Microbiol. Rev. 54(2), 130-197, 1990

Fenotypy se označují

- Třemi písmeny a první písmeno je velké, nepíší se kurzívou
- Např. His⁻, His⁺, Rif^R, Rif^S
- Např. His⁻ označuje fenotyp s mutovaným genem *his*, buňky nerostou na půdě bez aminokyseliny histidinu, protože ho nejsou schopny syntetizovat
- Rif^R označuje rezistenci k antibiotiku rifampicinu, vzniká mutací v genu *rpoB*, jež kóduje subjednotku RNA polymerázy

Fenotypy používané v bakteriální genetice

- Nejčastěji takové, co se snadno rozpoznají
- Užitečné jsou auxotrofní mutanty
- Podmíněně letální mutanty
- Resistentní mutanty
- Charakterizace kolonií

Auxotrofní mutanty, auxotrofy

- Neschopné syntetizovat nějakou aminokyselinu, vitamin, růstový faktor nebo využívat nějakou látku např. cukr
- Ten musí být přidán do media
- His⁻, Bio⁻, Mal⁻ mutanty nesyntetizují histidin, biotin, nevyužívají maltózu jako zdroj energie
- Izolují se pomocí bakteriologického razítka
- (porovnáním růstu za selektivních a neselektivních podmínek)
- (prototrofní bakterie rostou na syntetickém médiu)

Izolace auxotrofních mutantů

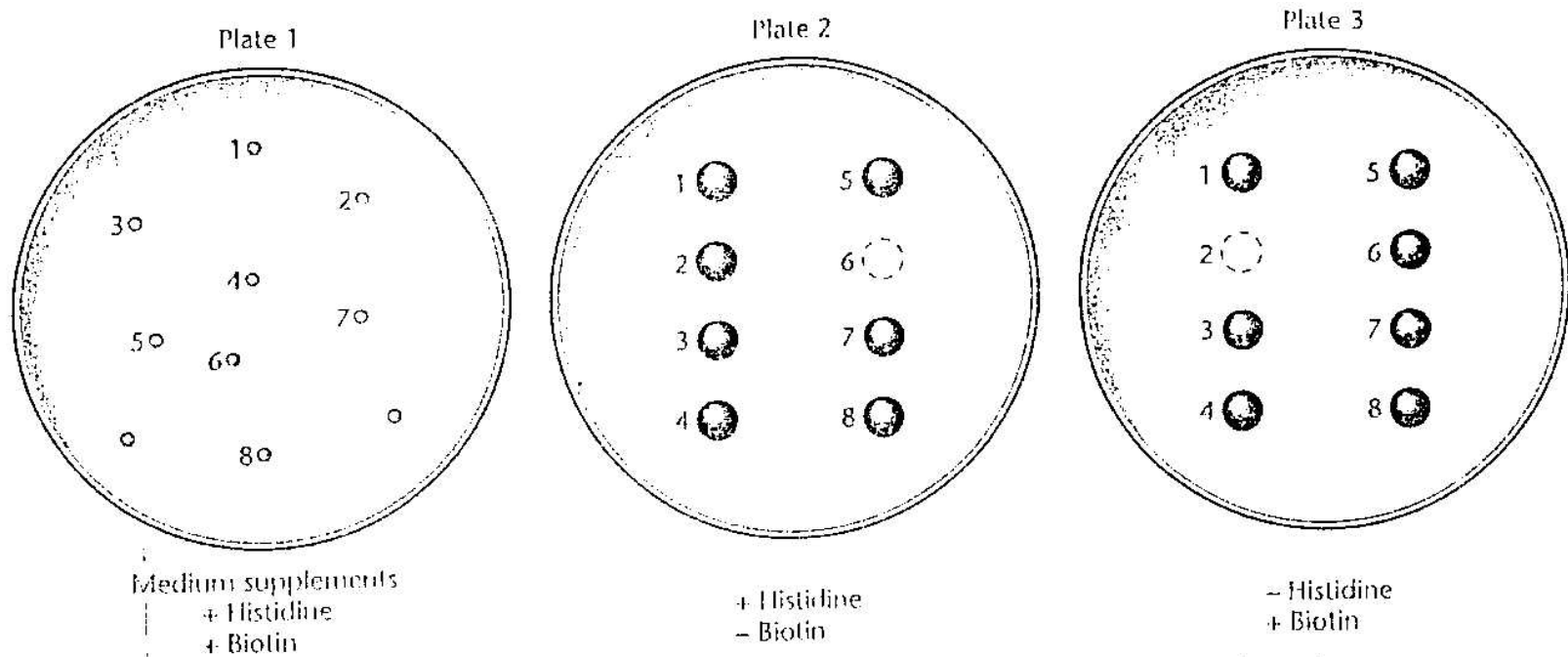
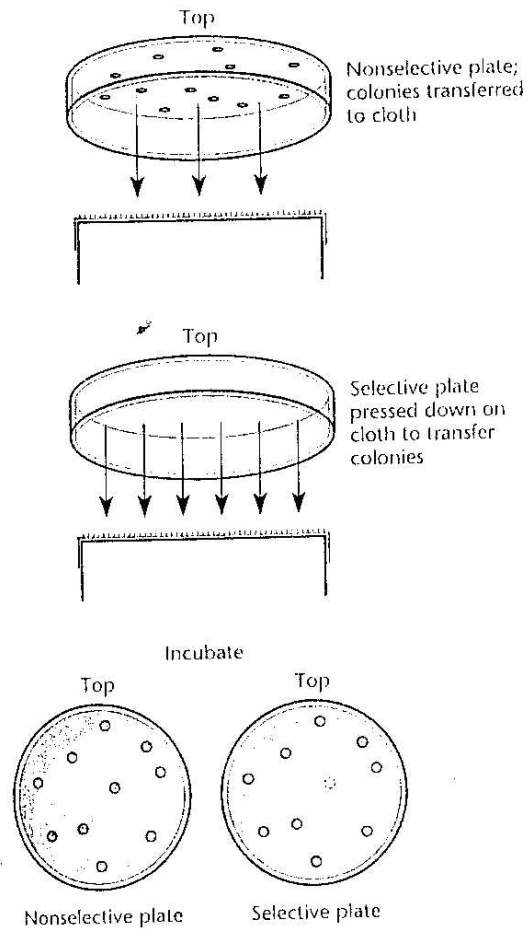


Figure 3.1 Detection of auxotrophic mutants. Colonies were scraped with a loop from plate 1 and transferred onto plates 2 and 3. Colony 6 contains bacteria that cannot multiply without biotin and so are Bio^- . The bacteria in colony 2 are His^- .

Podmíněně letální mutanty

- Teplotně nebo na chlad sensitivní mutanty (protein funkční za permissivní teploty např. 30°C, nefunkční za nepermissivní teploty např. 42°C)
- (Za vyšší teploty může protein částečně nebo úplně denaturovat, být přístupný proteázám, nevytvářet komplex apod.)

Isolace teplotně sensitivních mutantů pomocí bakteriologického razítka



Mutanty nesoucí nesmyslné mutace

- Jsou rovněž podmíněně letální
- Nesou mutace, které vedou ke změně kodonu na jeden ze tří nesmyslných kodonů (UAA, UAG, UGA – amber, ochre, opál)
- V místě vzniku nesmyslného kodonu se zastaví translace genu, což vede ke vzniku neúplného proteinu
- Syntéza proteinu se může dokončit, když má buňka supresor (supresorovou mutaci)

Rezistentní mutanty

- Odolné vůči látce, která buňku usmrcuje nebo inhibuje její růst
- Vysévají se na misku s touto látkou
- Např. mutanty rezistentní na antibiotikum
- Mutanty rezistentní k bakteriofágům

Příklady rezistentních mutací

Substance	Toxicity	Resistance mutation
Bacteriophage T1	Infects and kills	Inactivates <i>tonB</i> outer membrane protein; phage cannot absorb
Streptomycin	Binds to ribosomes; inhibits translation	Changes ribosomal protein S12 so that it no longer binds
Chlorate	Converted to chlorite, which is toxic	Inactivates nitrate reductase, which converts chlorate to chlorite
High concentrations of valine, no isoleucine	Feedback inhibits acetolactate synthetase; starves for isoleucine	Activates a valine-insensitive acetolactate synthetase

Buňky rezistentní k fágové infekci

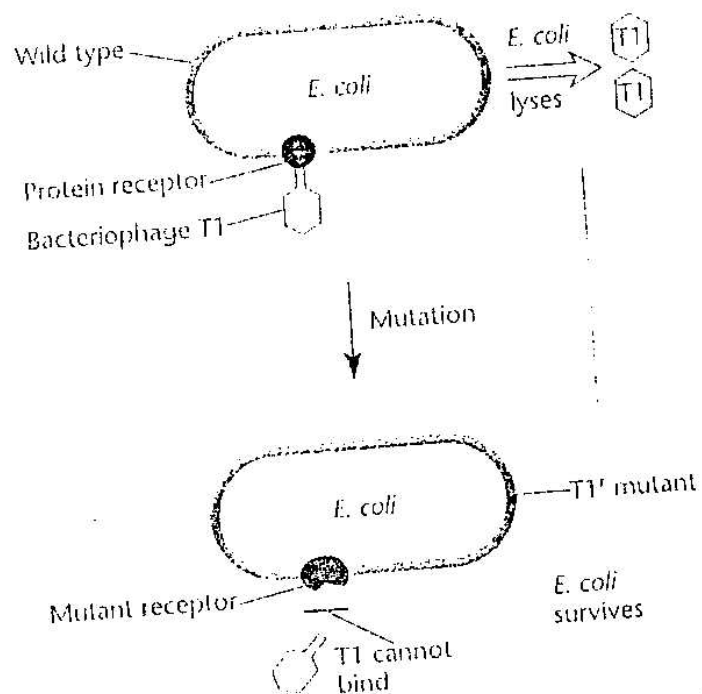


Figure 3.4 When bacteriophage T1 infects wild-type *E. coli*, it binds to a receptor in the outer membrane, protein TonB (Table 3.1). After phage replication, the *E. coli* cell is lysed and new phage are released. A mutation in the *tonB* gene results in an altered (mutant) receptor to which T1 can no longer bind or eliminates the receptor, and so the cells survive.

Užitečným fenotypem je

- Charakterizace kolonií narostlých na agarových miskách
- Zabarvení kolonií (mutant tvoří bezbarvé kolonie)
- Velikost a tvar kolonie