Základy genetiky prokaryotické buňky

Chromozomová (jaderná) DNA

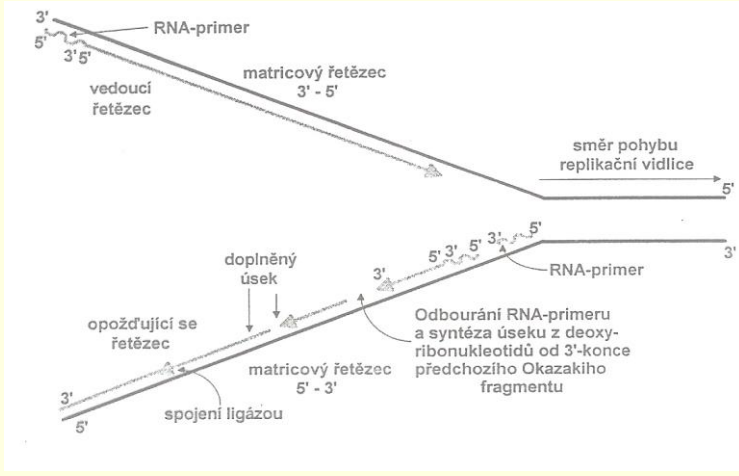
- U prokaryot (bakterie, archaea) dvouřetězcová většinou kružnicová
- U eukaryot dvouřetězcová lineární
- U DNA-virů dvouřetězcová lineární, jednořetězcová lineární nebo jednořetězcová kružnicová
- Extrachromozomální DNA - plazmidová, chloroplastová a mitochondriová DNA jsou většinou kružnicové

Replikace nukleových kyselin

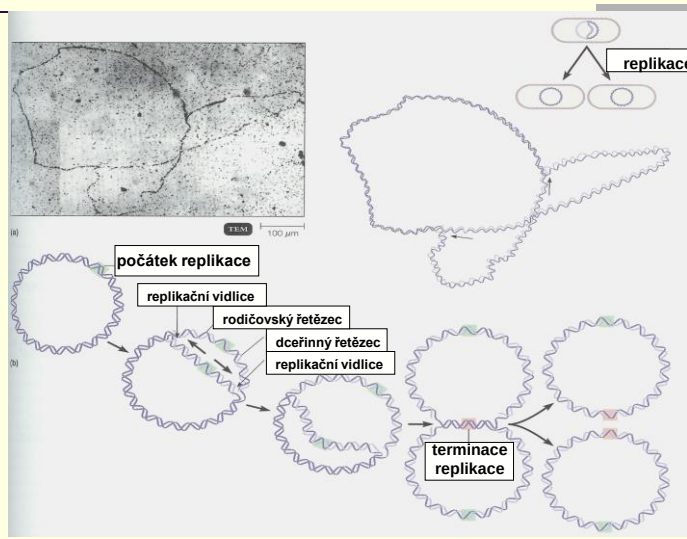
- Replikace – tvorba kopií molekul nukleových kyselin zajišťujících přenos genetické informace z DNA do DNA nebo z RNA do RNA

Semidiskontinuální syntéza DNA

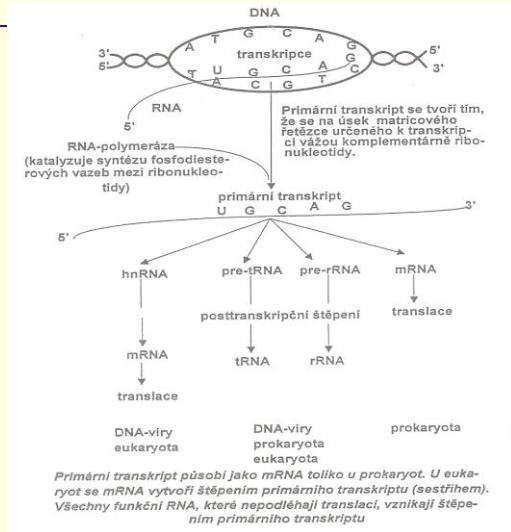
Replikace chromozómové DNA



Replikace plazmidové DNA



Základní schéma transkripce



u DNA-virů,
prokaryot,
eukaryot

Primární transkript - hnRNA - heterogenní nukleární RNA, **prekurzorová RNA** nebo také **pre-RNA**

Dědičnost, proměnlivost a přenos znaků u mikroorganizmů

- **dědičnost** – proces, kterým je v procesu reprodukce předáván genetický materiál na potomstvo

  (vertikální přenos – mezi generacemi;

  horizontální přenos – mezi jedinci téže generace – u bakterií)

- **dědičné znaky** – vlastnosti organizmu vzniklé expresí genů (dědí se informace o znaku, ne znak)

Genetická informace

- Genetická informace je obsažena ve sledu (pořadí) nukleotidů – nukleotidových sekvencích funkčních typů nukleových kyselin

Základní pojmy

- Gen – informační a funkční genetická jednotka obsahující genetickou informaci

  Gen obsahuje genetickou informaci o primární struktuře buď

  * funkční molekuly translačního produktu (polypeptidu, proteinu)
  * funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA atd.) nepodléhající translaci
  * nebo má regulační funkci

Genetický kód

- **Systém pravidel determinujících způsob přepisu pořadí nukleotidů do pořadí aminokyselin v peptidickém řetězci**

Genetický kód

- Základní jednotkou genetického kódu je

kodon

tj. pořadí nukleotidů kódující určitou aminokyselinu v peptidickém řetězci

Genetický kód

- Genetický kód je tripletový
- Je sestaven ze 64 kodonů
- Je degenerovaný (jedna aminokyselina je kódována několika kodony)
- Aminokyseliny kóduje pouze 61 kodonů
- Schopnost kodonu kódovat aminokyselinu se označuje jako smysl kodonu

Genetický kód

Kodony					
První nukleotid (5´konec)	Druhý nukleotid				Třetí nukleotid (3´konec)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	N	N n.Secys	A
	Leu	Ser	N	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met n.I	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

N – nesmyslný kodon I – iniciační kodon

Genetický kód

- Některé kodony jsou nesmyslné
  - * UAA - ochre
  - * UAG - amber

    signalizují ukončení syntézy polypeptidu (terminační kodony)
  - * UGA - opal je bifunkční

    - terminační kodon
    - kodon pro selenocystein

Gen

- Lokus - umístění genu kódujícího daný enzym metabolické dráhy na různých místech chromozomu (u eukaryot)
- Geny na chromozomu jsou seřazeny lineárně, to umožňuje sestavení genetické mapy
- Vždy několik kopií životně důležitých genů – na různých chromozomech (eukaryota) nebo na různých místech chromozomu (prokaryota)

Genom – souhrn všech genů buňky nebo viru

- U eukaryot jsou geny lokalizovány v různých organelách → jádro, mitochondrie nebo chloroplasty (případně plazmidy)
- U prokaryot jsou geny lokalizovány na chromozomové DNA a plazmidech

Genotyp

- Souhrn všech genů představujících genetickou informaci
  * nesených na chromozomální i extrachromozomální DNA
- Projev genotypu (potenciál pro projev v podobě znaků) je závislý na podmínkách vnějšího prostředí

Fenotyp

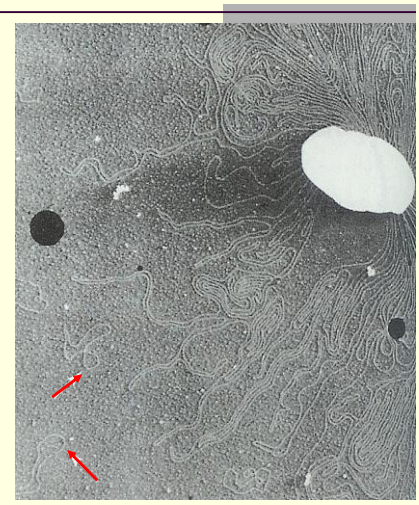
- Projev genotypu za daných vnějších podmínek
- Znamená to, že daný genotyp se může v různých podmínkách projevit různě

Fenotyp

- Pokud je změna vnějších podmínek tak intenzivní, že vede k nápadné změně fenotypu, označuje se tato změna jako modifikace fenotypu
- Modifikace se projevuje u převážné části mikrobiální populace
- Modifikace je jev reverzibilní. Po odeznění podmínek vyvolávajících změnu, se vrací populace do "normálního" stavu

Plazmidy

- Samostatný replikon tvořený dsDNA (cirkulární nebo lineární)
- Některé plazmidy jsou **epizomální** (v procesu **integrace** se plazmid stane součástí chromozomu)
- **Nenese informace o dělení buňky**
- Nese informace o specifickém fenotypovém projevu



plazmid

Plazmidy

- Každý plazmid obsahuje
  - * lokus ori – počátek replikace
  - * lokus inc – místo pro připojení na biologickou membránu při replikaci

Plazmidy

- Plazmid je
  - * jednokopiový – pouze jedna kopie DNA v buňce
  - * vícekopiový – několik kopií téhož plazmidu v buňce

Plazmidy

- Plazmid je
  - * kompatibilní – dva různé plazmidy v jedné buňce mají odlišný lokus inc, mohou se replikovat současně
  - * inkompatibilní – mají stejný lokus inc, nemohou se replikovat současně

Plazmidy

- Plazmid je
  - * konjugativní – jsou přenášeny konjugací, obsahují geny tra – transferové geny (označované i jako fertilitní faktor) zodpovědné za syntézu sexuálních pilusů, a průběh konjugace
  - * nekonjugativní – neobsahují geny tra, do recipientních buněk mohou být přeneseny transformací nebo transdukcí

Plazmidy u bakterií

Plazmidy se u bakterií vyskytují velice často – málo druhů bez plazmidů

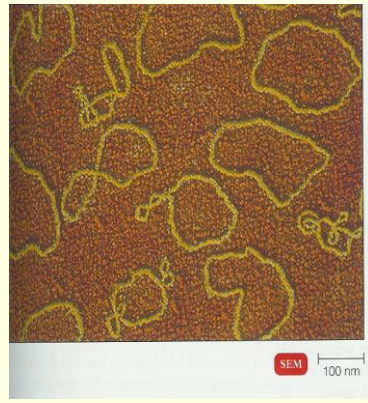
- Plazmidy F a F´ - konjugativní plazmidy u *E.coli* K12
  * F faktor (fertilitní faktor)
  * Jsou zodpovědné za průběh konjugace
  * Jsou zodpovědné za syntézu sexuálních pilusů

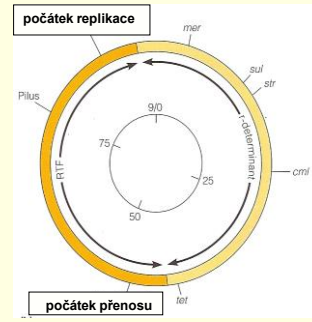
F´ vznikl chybným vyčleněním F z chromozomu

R - plazmidy

- R faktory jsou zodpovědné za rezistenci k
  * antibiotikům
  * těžkým kovům
  * buněčným toxinům
- Objeveny byly v Japonsku v r. 1950 při epidemii dyzenterie
- Jeden plazmid může nést informaci o rezistenci k několika látkám – vznik polyrezistentních kmenů

R - plazmidy



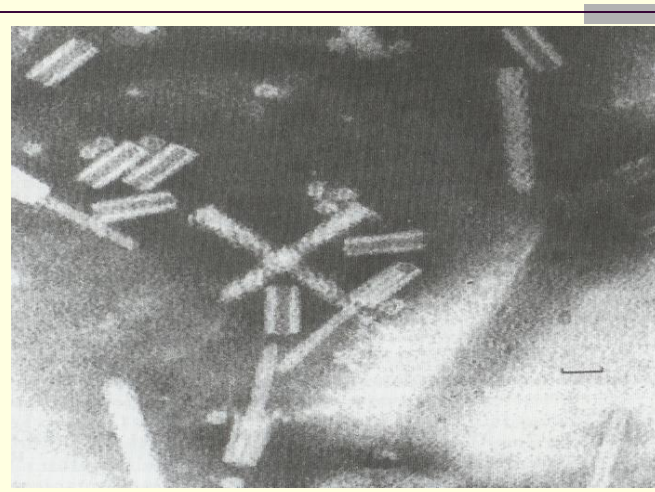


R plazmid *Bacteroides fragilis* kódující rezistenci ke clindamycinu

Bakteriocinové faktory

- **Bakteriocin** – bílkovina usmrcující citlivé kmeny téhož druhu nebo jiných druhů
- Bakteriociny působí na cytoplazmatickou membránu nebo na syntézu bílkovin. Mohou také blokovat vazebná místa na buněčné stěně (receptory)
- **Col plazmidy** – informace o syntéze kolicinů
- **Ti-plazmidy** *Agrobacterium tumefaciens* – produkty jejich genů vyvolávají tvorbu nádorů u dvouděložných rostlin, vektor pro cílený přenos genů do buněk rostlin – transgenní rostliny

Bakteriocin

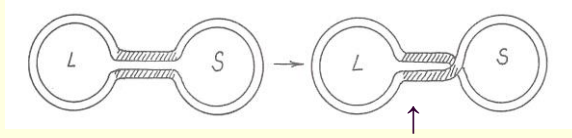


Pyocin R - *Pseudomonas aeruginosa*

Plazmidy kvasinek

- Dosud popsány u některých druhů rodu
  Saccharomyces, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Candida a Zygosaccharomyces
- Nejlépe prostudovaným je plazmid označený **2µm**
  Saccharomyces cerevisiae
- Vyskytuje se v nukleoplazmě v 60-100 kopiích na diploidní buňku
- Plazmid 2µm se používá v genovém inženýrství jako vektor pro klonování
- Význam není zatím popsán

Plazmid 2μm u *Saccharomyces cerevisiae*



Překřížení

ds cirkulární DNA

obvodová délka 2μm

6,3 kb

Změna genetické informace

- Mutace
- Rekombinace

Mutace

- **Kvalitativní nebo kvantitativní změna v genetické informaci organizmu, jeho genotypu**
- **Náhodné a neusměrněné změny genotypu**
  - * spontánní – vznikají samovolně a s malou frekvencí (chyba při replikaci DNA nebo skrytý vliv prostředí, frekvence 10^{-7} – 10^{-10})
  - * indukované – vznikají po působení fyzikálních nebo chemických faktorů – mutagenů
- Molekulový princip spontánních i indukovaných mutací je stejný

Mutace

- Genové – změny v genetické informaci, které proběhly v rámci genu a nenarušily celistvost stavby chromozomu
- Chromozomové – vedou ke zlomům a přestavbám struktury chromozomu
- Genomové – změny v počtu chromozomů

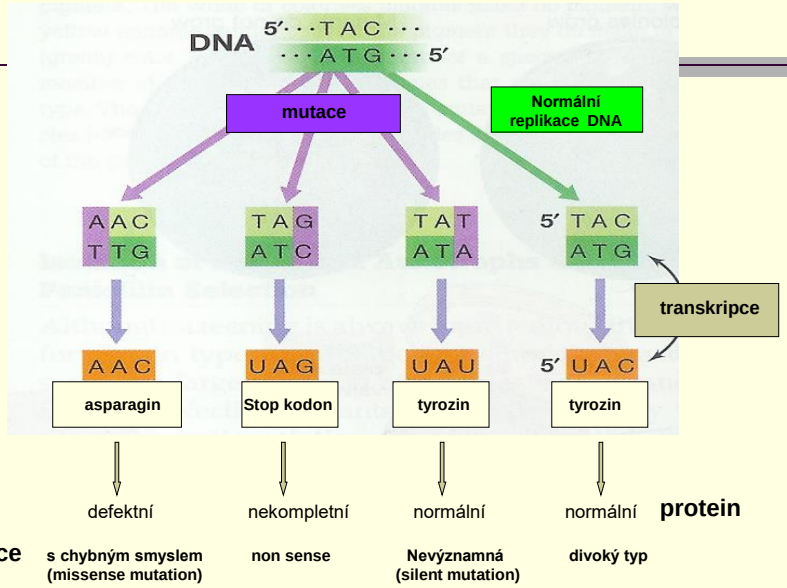
Mutace genové

- **Tranzice** – výměna purinové baze za purinovou
- **Transverze** – výměna purinové baze za pyrimidinovou
- **Inzerce** – vsunutí nové báze
- **Delece** – ztráta jedné baze

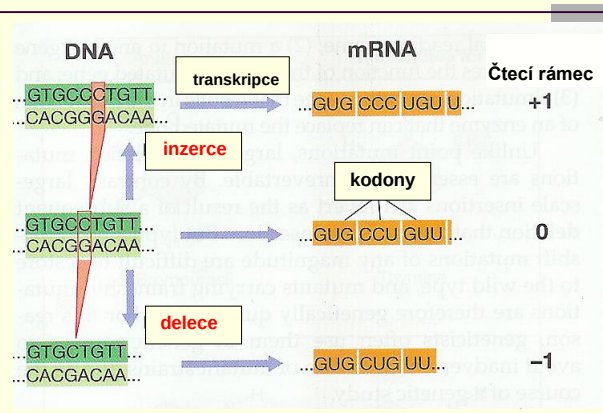
Mutace genové

- Jednobodové mutace
- Vícebodové mutace
- Mutace měnící smysl kódu
- Mutace měnící čtení kódu
- Vzájemná nezávislost mutací – mutace v kterémkoliv bodě genu probíhá nezávisle na mutacích v jiných bodech genu

Mutace genové – tranzice a transverze



Mutace genové – inzerce, delece



Použití alkylačních činidel, např. akridinová barviva, změna smyslu, ale i celého čtecího rámce

Mutace chromozomové

- Dochází ke ztrátám nebo přemístění větších „bloků“genetických informací (odpovídající větším skupinám genů), u eukaryot

ABCDE	původní stav
ABC	koncová deficience
ABE	interkalární delece
ABEDC	inzerce
ABCDEKLM	translokace
ABCBCDE	duplikace
ABCCBBCDE	triplikace

Mutace genomové

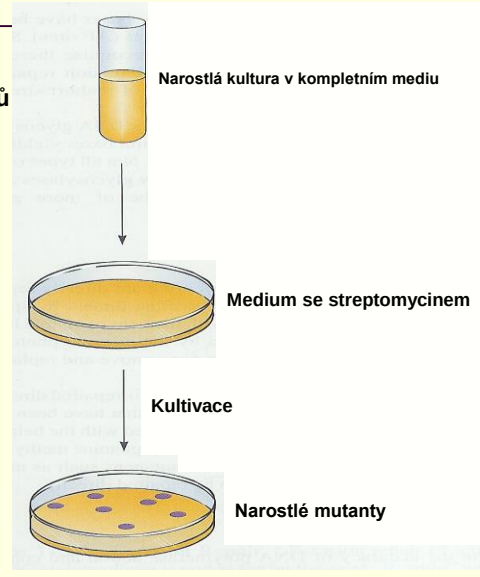
- Aneuploidie - ztráta nebo nadbytečná přítomnost některých jednotlivých chromozomů
  - * monozomie – ztráta jednoho chromozomu z některého z chromozomových párů
  - * trizomie – přítomnost tří homologických chromozomů namísto párového uspořádání (u člověka trizomie chromozomu 21 – Downova choroba – „mongolizmus“)
- Polyploidie – početní změny celistvých chromozomů (využití ve šlechtitelství)
- Jen u eukaryot

Mutační rychlost

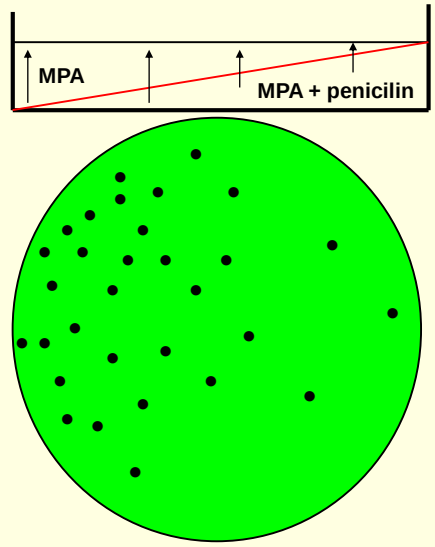
- Pro buňku platí konstantní pravděpodobnost, že bude v daném znaku mutovat v daném čase
- Předpokladem pro kvantitativní stanovení je, že část ploten bude bez mutantů
- Část ploten bez mutantů naznačuje, že v této kultuře nedošlo k mutaci

Izolace mutantů – selektivní medium

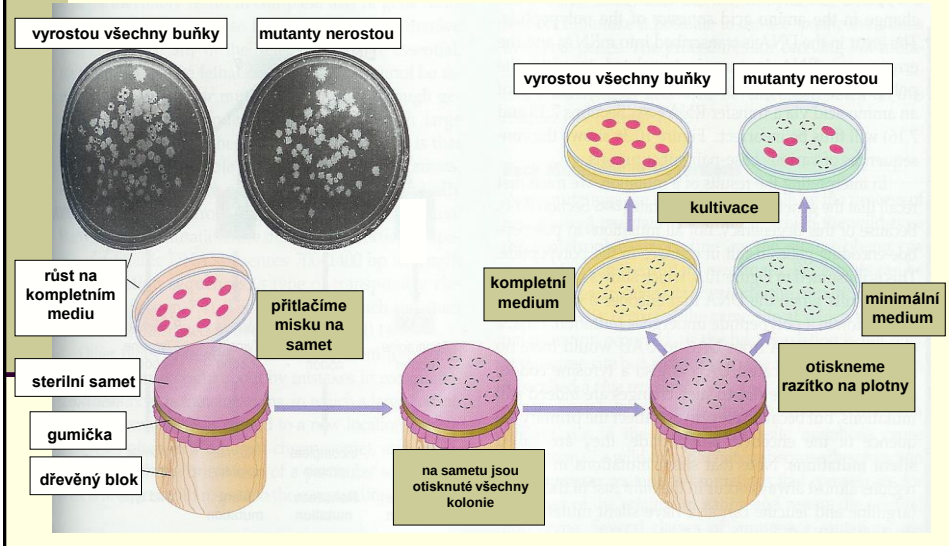
Izolace spontánních mutantů



Izolace mutantů–metoda gradientních ploten



Izolace mutantů – replika ploten



Mutageny

- Změna ve struktuře bazí

Kyselina dusitá – oxidativně deaminuje baze (adenin na hypoxantin – párování s cytozinem,cytozin na uracil – párování s adeninem; AT↔GC)

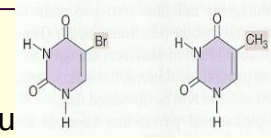
Hydroxylamin – reaguje pouze s pyrimidiny; transice pouze ve směru GC→AT

Alkylační činidla – do bází inkorporují alkylovou skupinu CH_3- , CH_3CH_2- , …(yperit, dimetyl-, dietylsulfonát, metyl- , etylmetanosulfonát, …) – změněnou bázi DNA polymeráza nerozeznává

Vyvolávají změny, i když se DNA nereplikuje

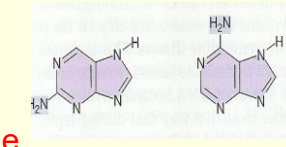
Mutageny

- Změny vyvolané analogy bazí



5-bromuracil	analog tyminu
5-bromdeoxyuridin	analog tyminu
2-aminopurin	analog adeninu

- Vyvolávají (mutace AT↔GC)



Vyvolávají změny, když se DNA replikuje

Mutageny

- Změny vyvolané ionizujícím zářením

Ionizující záření (RTG, záření γ, tok protonů, neutronů a elektronů) vyvolává rupturu chromozomu nebo změny v bazích.

V přítomnosti kyslíku se vytvářejí radikály, které zvyšují frekvenci zlomů, zabraňují opětovnému spojování chromozomu

Mutageny

- Změny vyvolané UV zářením
- Dimerizace dvou sousedních tyminů na stejném řetězci (tyminy jsou spojeny cyklobutanovým kruhem). Dimery jsou stabilní
- Pokud není provedena oprava, je změna letální

Opravy mutací

- **Reverze** – reverzní mutace (revertanti)

Pokud mutant vznikl bodovou mutací, může revertovat na divoký typ tranzicí nebo tranzverzí

Mutace z divokého typu na mutantní je obvykle rychlejší

Pravděpodobnost, že obě mutace proběhnou ve stejné buňce, je nepatrná (je součinem pravděpodobností obou mutací $10^{-8} \times 10^{-8} = 10^{-16}$)

Opravy mutací

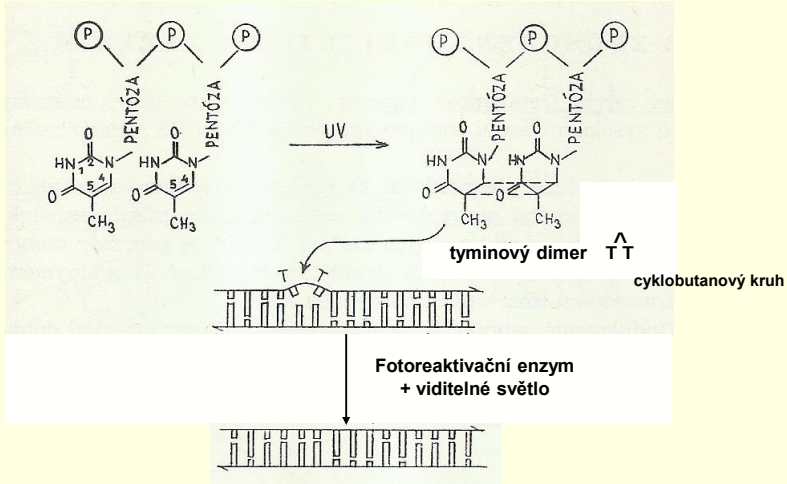
- **Fotoreaktivace**

Fotoreaktivační enzym (fotolyáza) – po aktivizaci intenzivním viditelným světlem štěpí nebo monomerizuje tyminové dimery – reakce probíhá v jediném enzymovém stupni . Vyznačuje se vysokou specifitou – působí pouze na pyrimidinové dimery

K fotoreaktivaci dochází také na RNA, která byla poškozena UV světlem

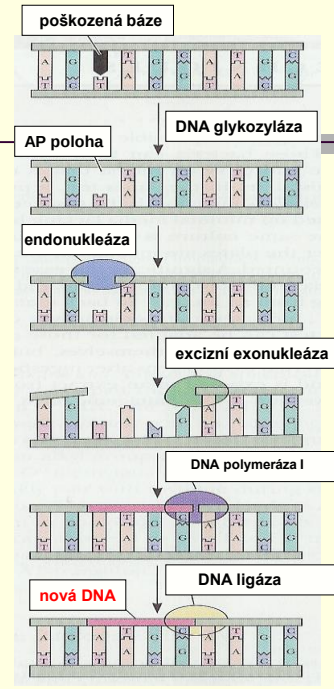
Opravy mutací

Fotoreaktivace



Opravy mutací

- **Excizní oprava**

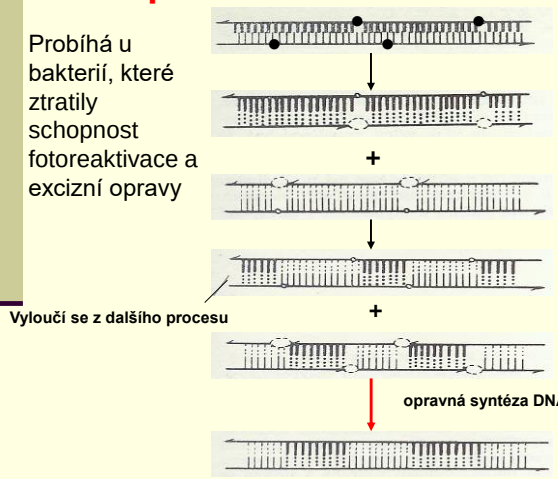


Probíhá i ve tmě, multienzymový komplex
AP – DNA glykozyláza odstraní
poškozenou bázi
excizní exonukleáza odstraní několik
nukleotidů

Opravy mutací

- **Postreplikační rekombinační oprava**

Probíhá u bakterií, které ztratily schopnost fotoreaktivace a excizní opravy



Mutace z hlediska jejich fenotypového projevu

- Morfologické mutanty – změněný tvar buňky kolonií (M→S→R)
- Fyziologické mutanty – rezistence k antibiotikům, dezinfekčním látkám, bakteriofágům, ztráta schopnosti konjugace, sporulace, ts-mutanty, …
- Biochemické mutanty – jediným fenotypovým projevem je změna metabolizmu
  - mutanty se změnou strukturního genu – změna enzymaticky aktivní bílkoviny
  - regulační mutanty – změněná regulace metabolizmu (mutace regulátorového genu, promotoru, operátoru, inzerce transpozonu, ..)

Změna genetické informace

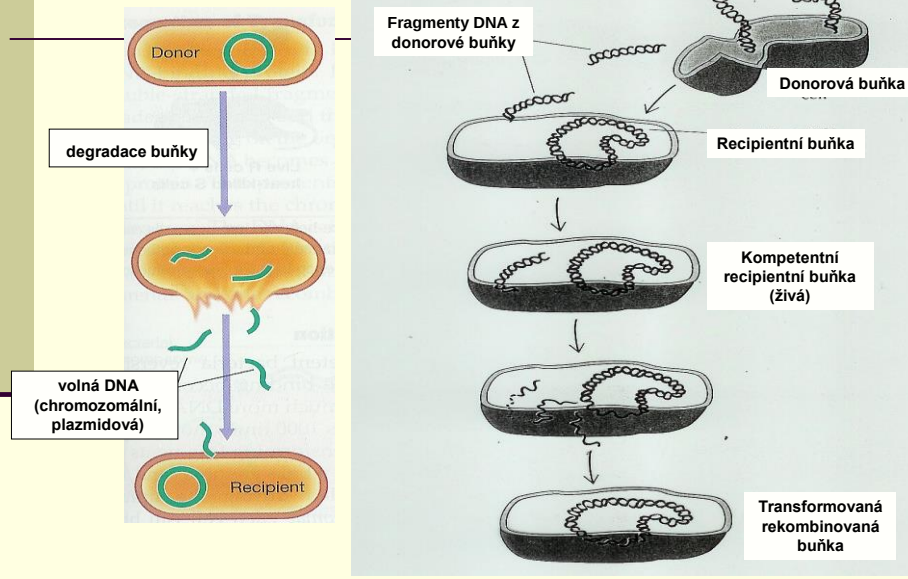
- Mutace
- Přenos znaků (rekombinace)
  - * u prokaryot
  - * u eukaryot

Přenos znaků u prokaryot

- **Rekombinace**

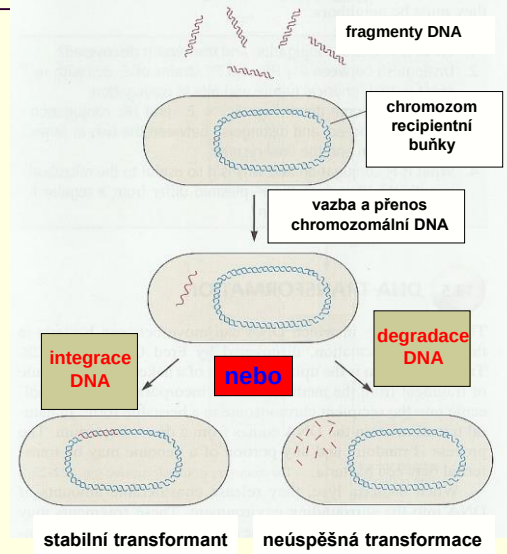
* transformace – přenos izolované DNA do recipientní buňky
* transdukce – přenos DNA z donorové buňky do recipientní pomocí bakteriofága
* konjugace - přenos DNA z donorové buňky do recipientní konjugačním můstkem

Transformace

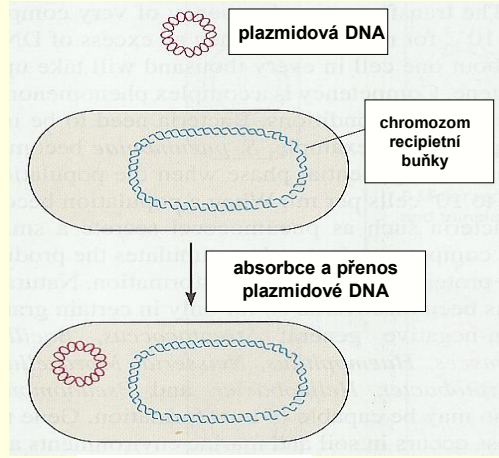


Transformace –

vznik rekombinantního transformanta



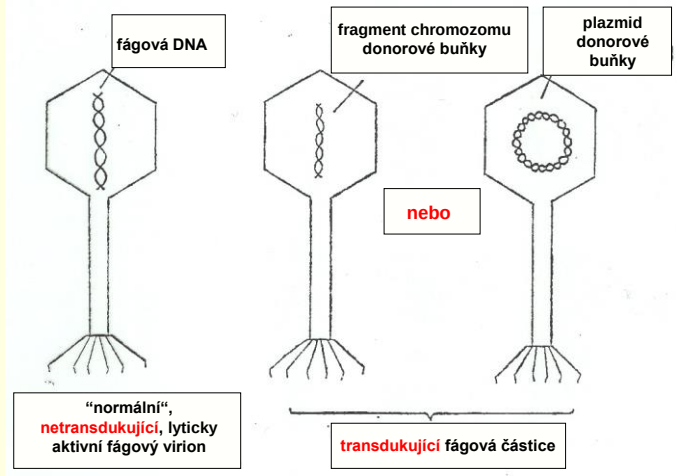
Transformace –
vznik plazmidového transformanta



plazmidový transformant

Transdukce

přenos DNA donorové buňky do recipientní bakteriofágem

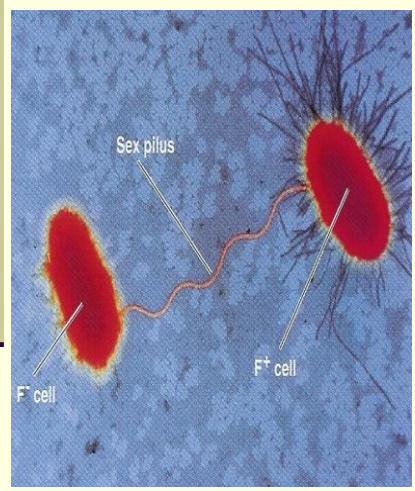


Transdukce

- Pro transdukci je používán pouze temperovaný bakteriofág

- Transdukce nespecifická – je přenášen jakýkoliv úsek DNA hostitelské buňky (fragment chromozomu nebo plazmid)
- Transdukce specifická – je přenášen určitý úsek DNA hostitelské buňky (fág λ *E.coli* přenáší pouze gen gal nebo bio)

Konjugace

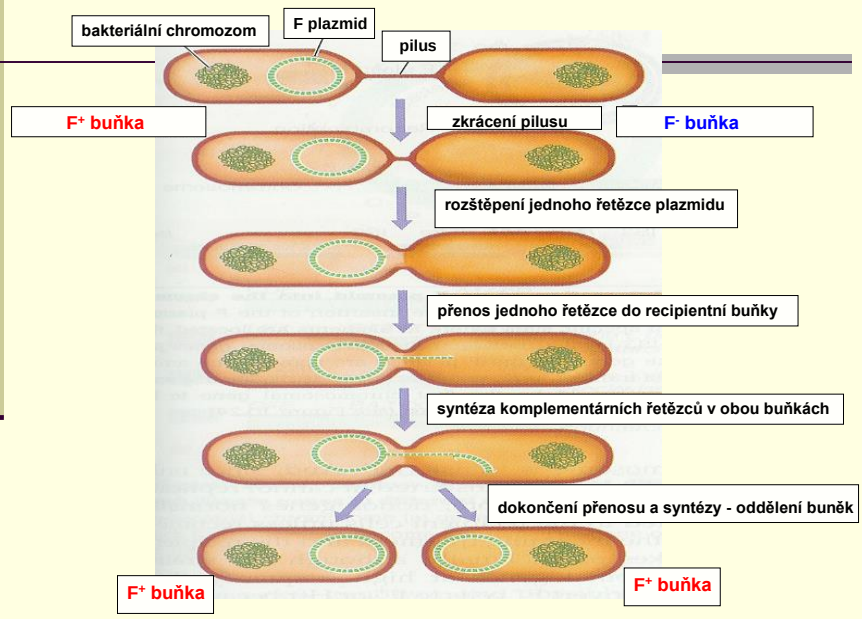


- Tvorbu sexuálního pilusu kóduje gen nesený na plazmidu F (buňky F^+) – fertilitní faktor – gen tra - konjugativní plazmid
- Výsledkem konjugace je

* plazmidový transkonjugant

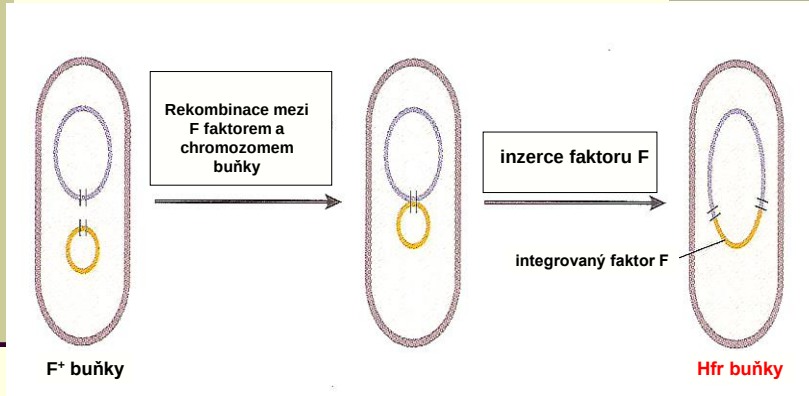
* rekombinantní transkonjugant

Vznik plazmidového transkonjuganta



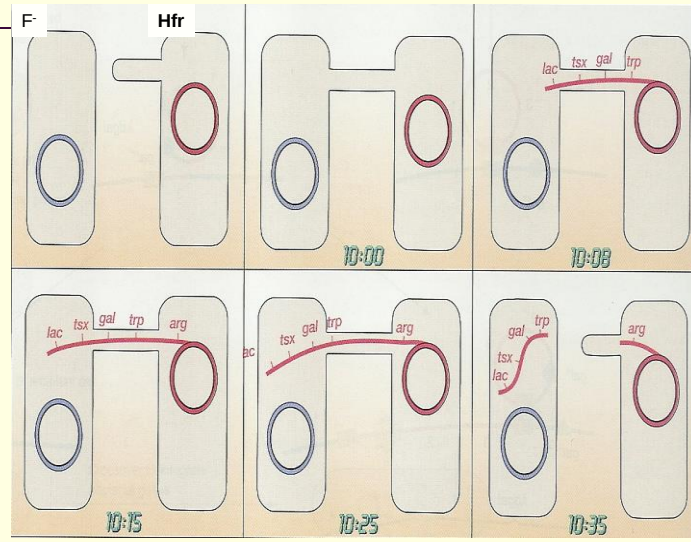
Vznik rekombinantního transkonjuganta

Vznik buněk Hfr

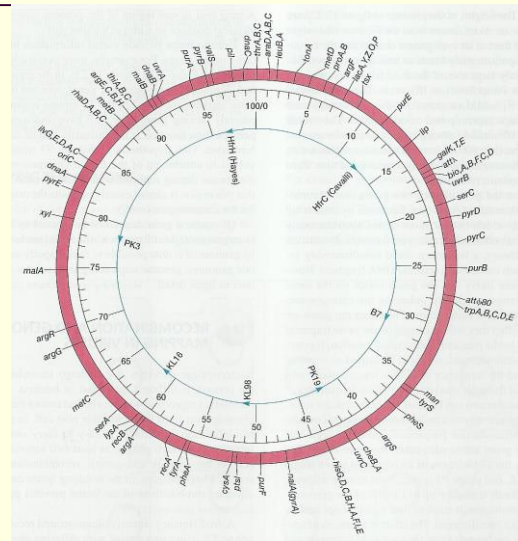


Hfr buňky vznikají inzercí plazmidu F do chromozomu donorové buňky

Mapování chromozomu–přerušovaná konjugace



Kruhový chromozom *E.coli*



Důkaz kruhového chromozomu *E.coli*

Konjugací různých kmenů Hfr s buňkami F^- byl prokázán kruhový chromozom a měl „délku“ asi 100 minut