

# MUTAGENEZE INDUKOVANÁ TRANSPOZONY (TRANSPOZONOVÁ MUTAGENEZE)

**Nejrozšířenější použití transpozonů je mutagenéza za účelem lokalizace genů a jejich charakterizace.**

## **Výhody:**

1. vyšší frekvence mutace než při klasické mutagenézi
2. úplná blokáda transkripce a translace zasažených genů – dosažení plně mutantního fenotypu
3. silný polární účinek (zejména na operony)
4. ve většině případů jen jediná mutace na buňku (inzerce jediného transpozonu)
5. možnost přímé selekce mutant (geneticky podle markeru na transpozonu, nebo s využitím sekvence transpozonu jako sondy)

Inzerce transpozonu pro účely mutagenézy **nemohou být směřovány do určitého genu**. Technika využívá jen skutečnosti, že inzerční místa transpozonu jsou víceméně náhodná. Požadované mutace jsou skrínovány mezi větším počtem inzerčních mutant normálním způsobem.

## **Vlastnosti transpozonu vhodného pro mutagenézu:**

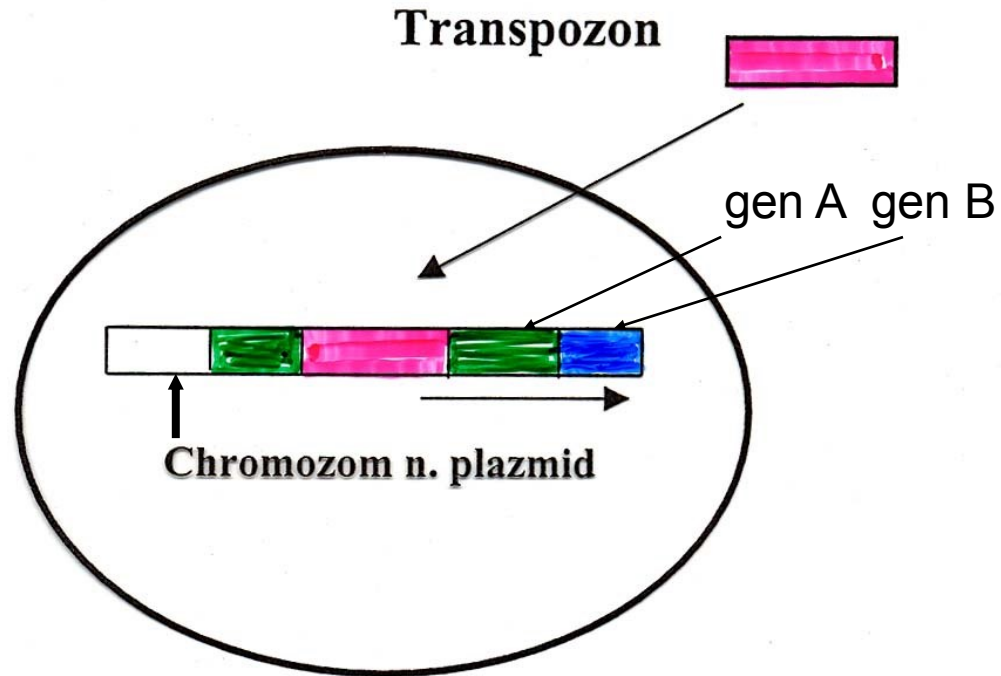
- a) začleňování do náhodných míst (Tn5, Tn7, Mu)
- b) stabilita inzerce (odstranění genu pro transponázu)

# Charakteristika mutací způsobených transpozony

- 1. Transpozony mohou být začleněny do velkého počtu různých míst na bakteriálním chromozomu a plazmidech (prakticky v každém genu nebo v jeho blízkosti).
- 2. Geny se začleněným transpozonem ztrácejí plně svou funkci (nulové mutace).
- 3. Fenotyp inzerčních mutací je doprovázen rezistencí k antibiotikům podmíněnou genem na transpozonu (snadná selekce mutace v novém hostiteli selekcí AntR).
- 4. Inzerční mutanty lze po transpozonové mutagenézi detekovat s vysokou frekvencí (kmeny s více mutacemi jsou vzácné).
- 5. Inzerční mutace revertují přesnou excizí transpozonu, doprovázenou ztrátou transpozonu (frekvence zpětné mutace je ale velmi nízká).

- 6. Inzerce v operonech jsou silně polární. Lze určit, zda geny jsou součástí operonu (a jejich pořadí).
- 7. Transpozony mohou vyvolat delece v okolí svého začlenění. Lze tak připravit deleční mutanty vhodné pro mapování genů.
- 8. Transpozony představují přenosné oblasti homologie. Lze pomocí nich vnést do genomu další genetické elementy rekombinací.
- 9. Inzerce se při genetickém mapování chovají jako bodové mutace (transdukční křížení).
- 10. Lze získat specifické inzerce poblíž genu zájmu, nikoliv v něm samém (vnesení promotorů a dalších sekvencí na transpozonu – **reportérové geny**)

# Mutace vyvolané transpozony



1. Inzerční inaktivace genu, do něhož se transpozon začlenil (negativní mutace) – změna fenotypu
2. Nabytí rezistence k antibiotiku (pozitivní mutace) – změna fenotypu
3. Polární mutace ovlivňující expresi sousedních genů – změna fenotypu
4. Označení místa, do něhož se transpozon začlenil

# SITUACE VHODNÉ PRO VYUŽITÍ TRANSPOZONOVÉ MUTAGENEZE

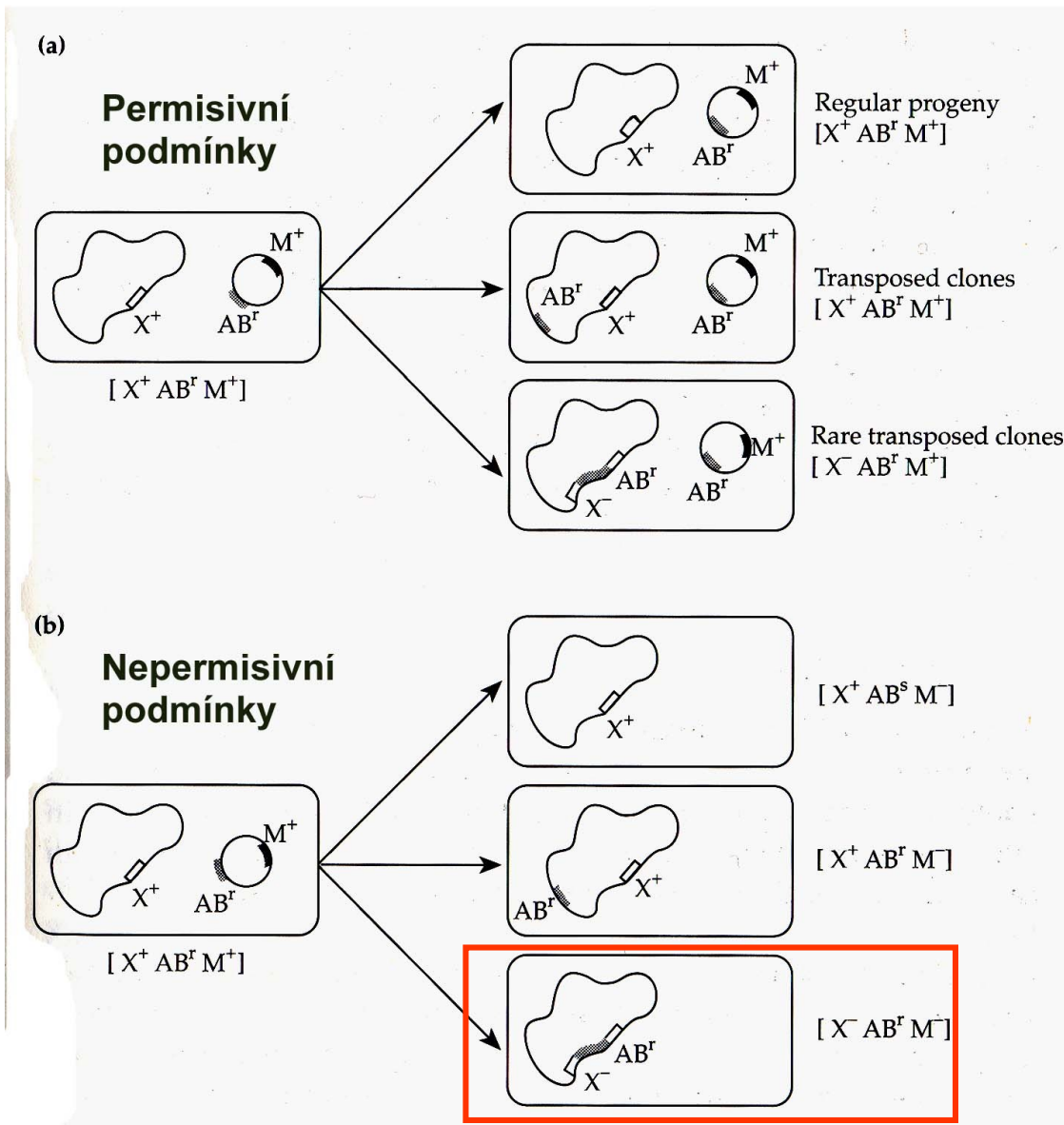
- a. hledaná mutace má obtížně selektovatelný fenotyp
  - snížení počtu klonů, které nutno prověřit (mutanty Nif- deficientní v symbióze s rostlinou: genotyp může být *nod-* nebo *nif-*)
  - identifikace genů, které jsou zapínány při poškození DNA nebo po vystavení buněk specifickým faktorům (transpozony s reportérovými geny)
- b. studovaný druh (kmen) je klasické mutageně nepřístupný
  - mutanty v metabolických drahách, např. auxotrofní
- c. kmen má několik podobných aktivit, znemožňujících přímý skrínig na fenotyp
  - gen je nejdříve klonován v jiném hostiteli (*E. coli*) a po mutageně je přenesen do původního kmene, kde se alely zamění homologní rekombinací („reverzní genetika“ - u druhů dosud geneticky málo prostudovaných)

# SEBEVRAŽEDNÉ VEKTORY

## Vektory používané pro dopravení transpozonu do buněk, v nichž mají navodit mutaci

- A. Vektory odvozené od fága lambda obsahující mutace *sus* - replikují se v buňkách *E. coli* obsahujících supresory; v buňkách *sup*- se chovají sebevražedně
- B. Vektory odvozené z promiskuitních plazmidů (konjugativních nebo mobilizovatelných) – po přenosu do cílové buňky se nereplikují
- C. Vektory s *ts* mutacemi v replikačním aparátu (při vyšší teplotě se nereplikují)
- D. Inkompatibilní plazmidy: první plazmid nese transpozon, po přenosu je z buňky vytěsněn druhým plazmidem

# Použití sebevražedných vektorů k přenosu transpozonů



**Vysvětlivky:**

**AB<sup>r</sup>** = ANT rezistence na T

**M** = marker na vektoru

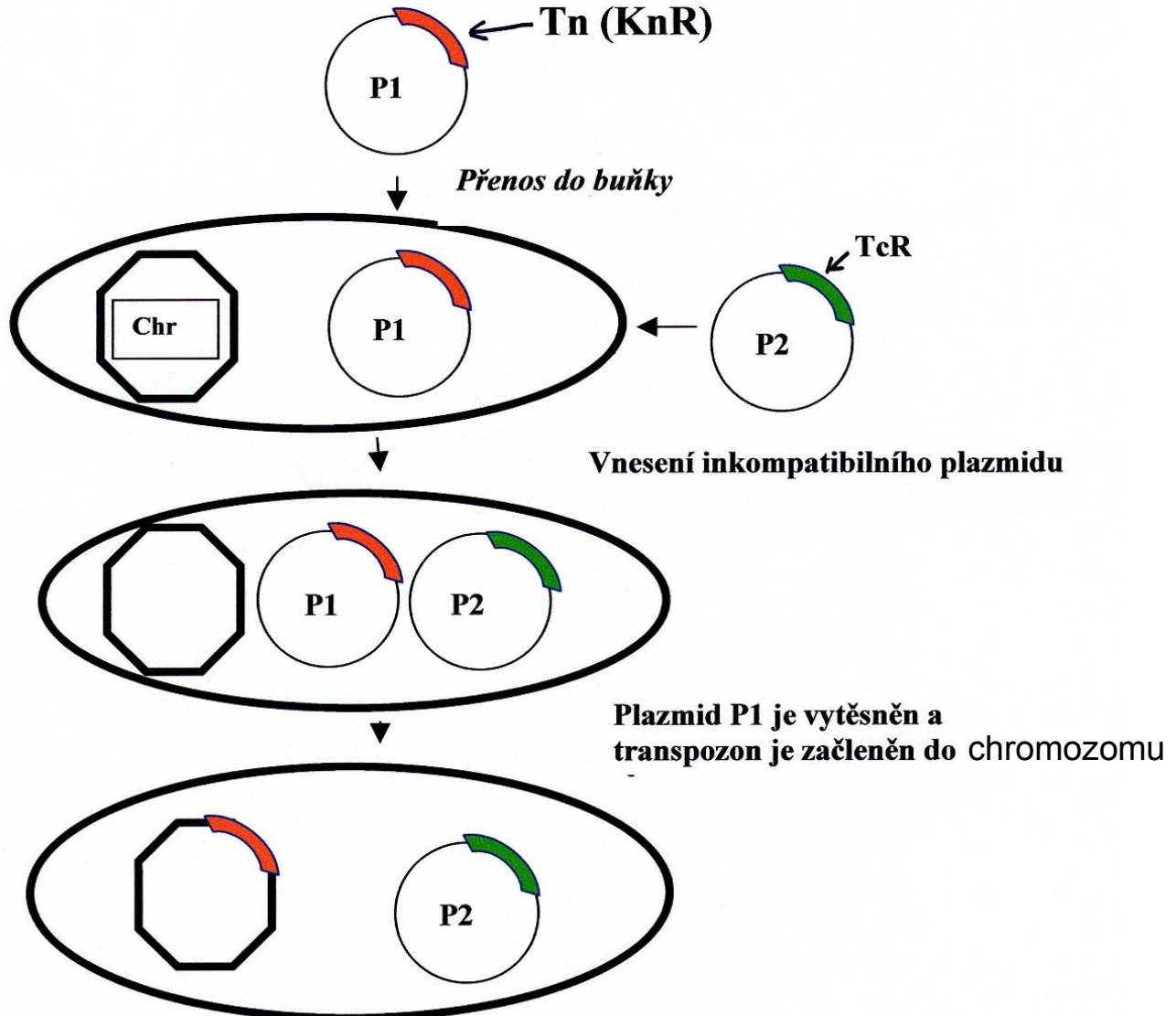
**X** = gen, který má být mutován

vektor se vyředil

Tn začleněný mimo gen X

Tn začleněný do genu X

# Využití inkompatibility pro vnášení transpozonů do chromozomu



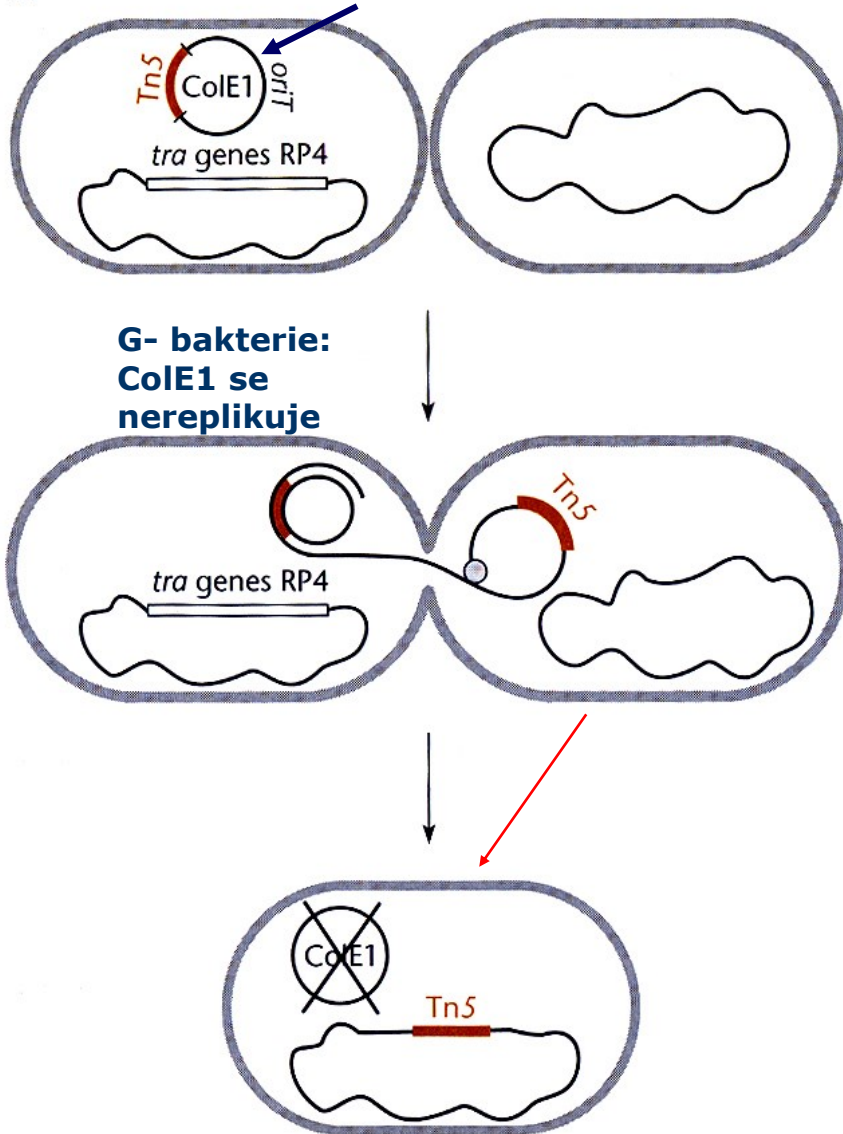
**selekcce s  
využitím  
markerů  
antibiotikové  
rezistence  
nesených na  
plazmidu a na  
transpozonu**



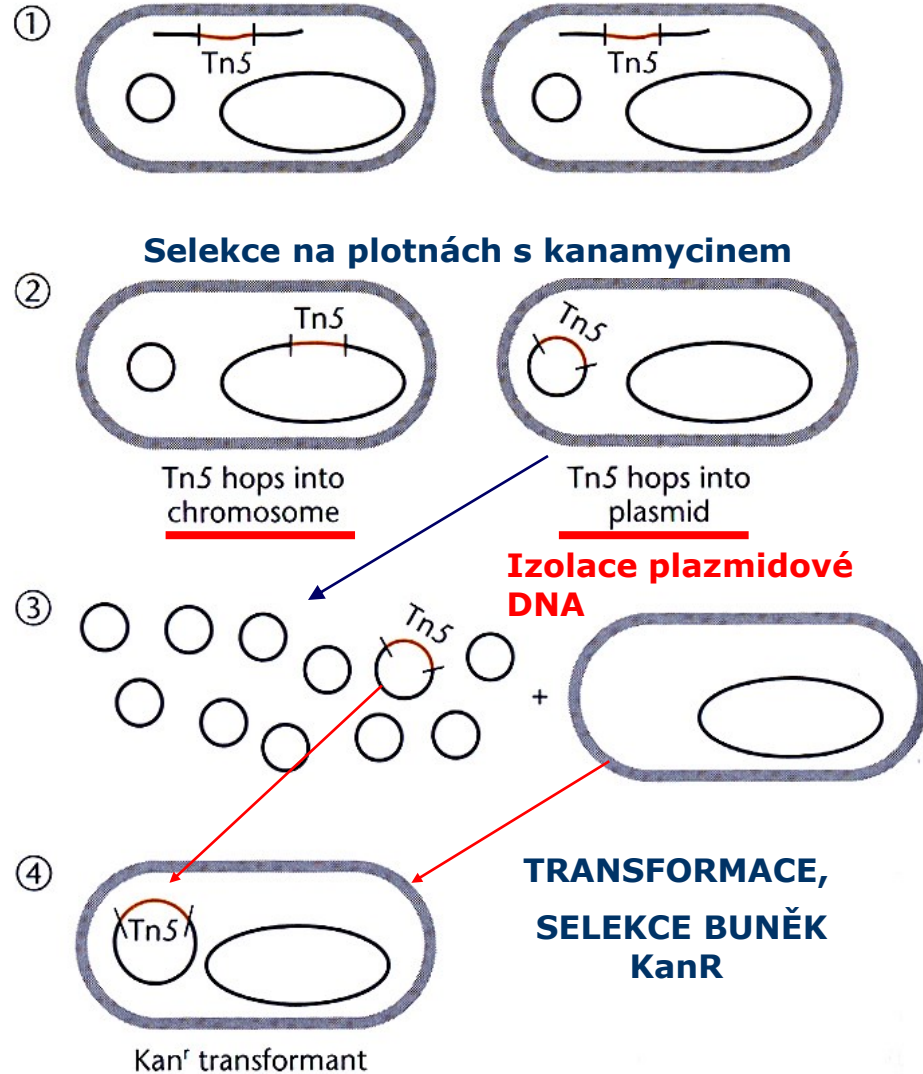
# MUTAGENEZE POMOCÍ TRANSPOZONU Tn5

## Sebevražedný mobilizovatelný ColE1

A

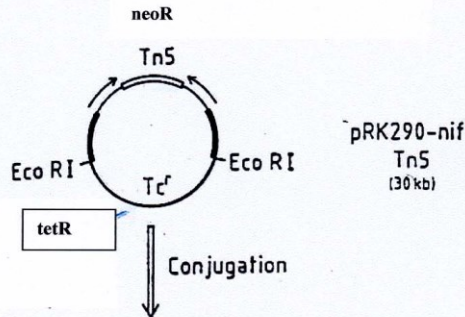


## Náhodná mutagenese plazmidů - Vnesení Tn5 do buňky na sebevražedném vektoru

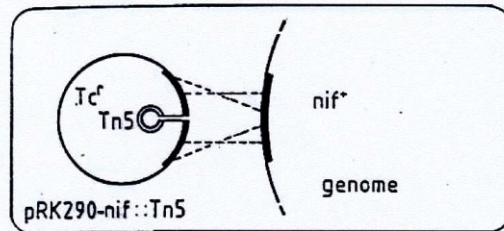


Vytváření mutací na plazmidu nebo v klonované DNA<sup>9</sup>

**1. Klonování genu nif v *E. coli*, provedení mutagenézy (gen je přerušen transpozonem)**

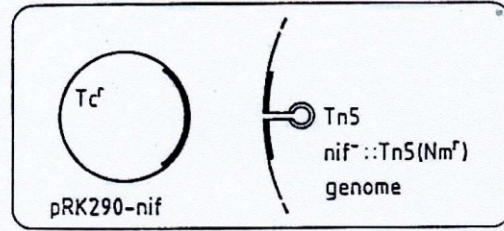


Gen nif se začleněným transpozonem Tn5 naklonovaný v pRK290 (konjugativní plazmid) v *E. coli*



Přenesení rekombinantního vektoru z *E. coli* do *R. meliloti*, kde dojde k rekombinaci mezi geny nif (Tn) a nif<sup>+</sup>

Homologous recombination between *R. meliloti*-DNA on plasmid with genome

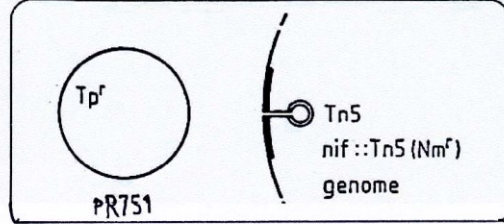


Chromozom *R. meliloti* nyní obsahuje inaktivovaný gen nif

- 1) pR751(Tp<sup>r</sup>)
- 2) Selection for Tp<sup>r</sup>-Nm<sup>r</sup>
- 3) Test for Tc<sup>S</sup>

Vytěsnění plazmidu pRK290-nif+ plazmidem pR751 (TpR)

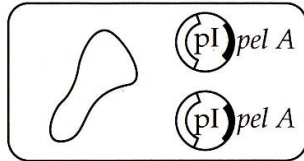
**Analýza projevu inaktivního genu nif**



Buňky rezistentní k trimetorpinu a neomycinu, senzitivní k tetracyklinu

# Izolace mutanty v genu pro pektátlyázu (pelA ) Erwinia chrysanthemi

(a)



*E. coli* pI*pelA*<sup>+</sup>

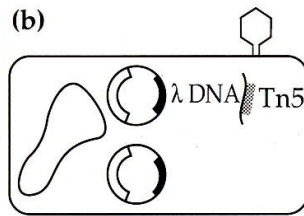
Klonování genu *pelA* z erwinie do *E. coli*, selekce fenotypu PelA+

## vysokokopiový plazmid (pBR322)

mutageneze transpozonem Tn5 (Km<sup>r</sup>) neseným fágem lambda

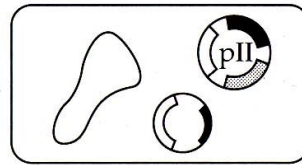
**Lambda  
„Hopper“**

(b)

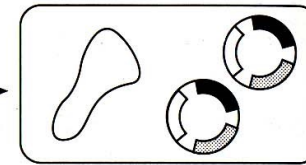


*E. coli*

[ Km<sup>r</sup> ]

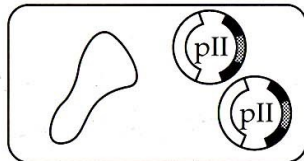


[ Km<sup>r</sup> ]



*E. coli* pelA<sup>+</sup> Tn5 Km<sup>r</sup>

(c)



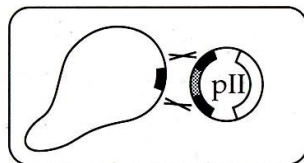
*E. coli* pIIpelA<sup>-</sup> :: Tn5 Km<sup>r</sup>

**Selekce klonu v němž se Tn5 začlenil do plazmidu (pII) (vysoká konc. kanamycinu)**

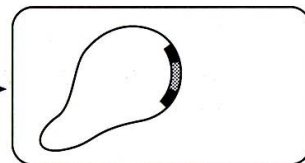
(eliminace buněk, v nichž je Tn5 začleněn do chromozomu)

**Selekce klonu PelA- (inzerce Tn5 do pelA)**

(d)



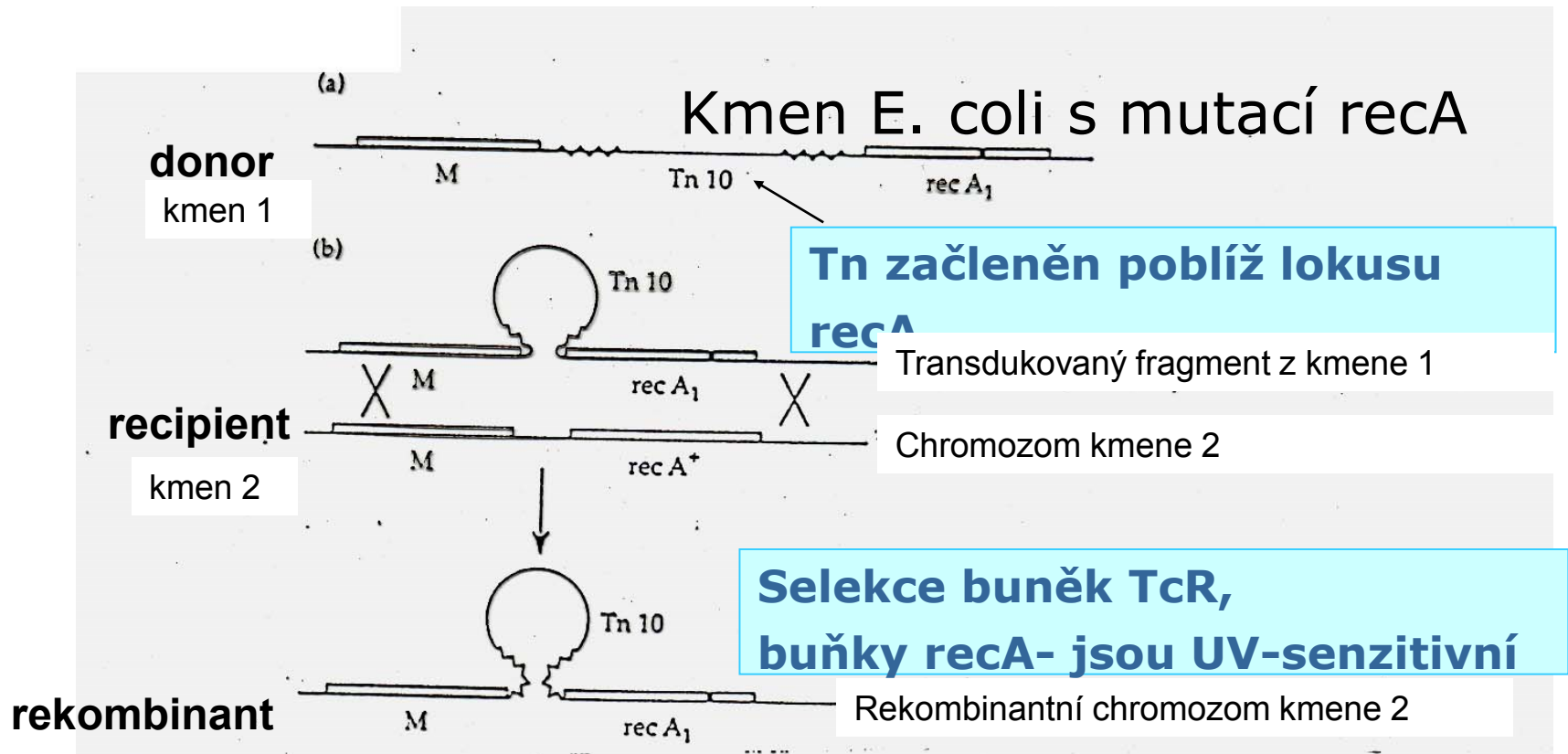
*E. chrysanthemi*  
*pelA*<sup>+</sup>



*E. chrysanthemi*  
*pelA*<sup>-</sup> :: Tn5 Km<sup>r</sup>

přenos plazmidu pII do erwinie, pII se vyředí (neschopen replikace), selekce klonů KmR (tj těch, v nichž došlo k homologní rekombinaci a geny *pelA*<sup>+</sup>/*pelA*<sup>-</sup> se zaměnily)

# PŘENOS ALELY *recA*- PO OZNAČENÍ TRANSPOZONEM



Obr. 13.3. Příprava kmene *recA*<sub>1</sub> (*E. coli*).

a) mapa transdukující DNA P1 z lyzátu kmene 1, nesoucího kopii Tn10 poblíž *recA*<sub>1</sub>.

b) transdukce do kmene 2 (*recA*<sup>+</sup>), selekce na rezistenci k tetracyklinu. Mezi klony Tc<sup>R</sup> lze vyhledat rekombinanty kmene 2, v nichž došlo k výměně alely *recA*<sub>1</sub>.

# STANOVENÍ FYZICKÉ LOKALIZACE GENŮ NA REPLIKONECH A MAPOVÁNÍ GENŮ

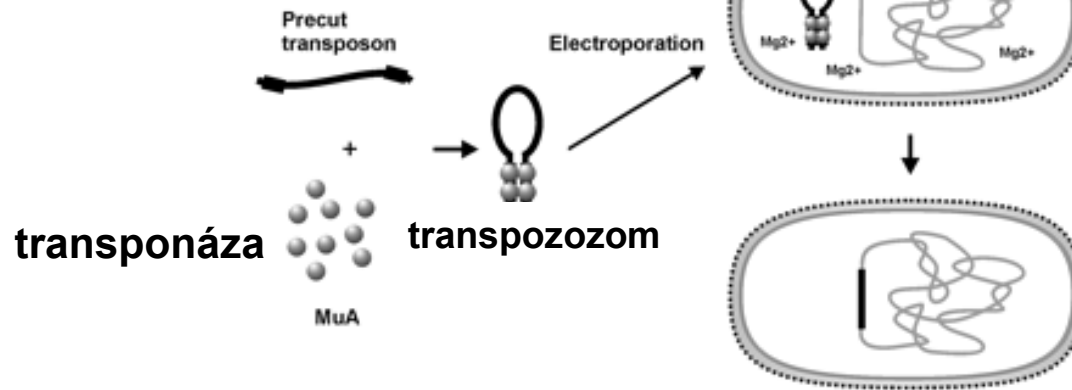
**Zjištění, zda geny s určitou funkcí jsou umístěny na plazmidu nebo na chromozomu nebo zda jsou distribuovány na více replikonech není snadná úloha. „Transpozon targeting“ (cílené začlenění transpozonů) do genů napomáhá v řešení těchto úloh, jak dokresluje tento příklad:**

- Předpokládalo se, že funkce (geny) týkající se onkogeneze u rostlin infikovaných *A. tumefaciens* se nacházejí na Ti plazmidu. Bylo izolováno 37 inzerčních mutant Tn5 v kmenech obsahujících Ti plazmid a vykazujících změněnou virulenci. V každém z mutantních kmenů byly transpozony fyzicky lokalizovány na replikonech.
- Plazmidová a chromozomová DNA z těchto mutant byla separována za užití standardních technik (rozdíl ve velikosti a nebo GC obsahu). Každá DNA byla hybridizována se značeným Tn5. Dvanáct mutací bylo chromozomálních a 25 nesených na plazmidu.

# TRANSPOZONOVÁ MUTAGENEZE *IN VITRO*

- **Nevýhody mutagenese *in vivo*:**
  - částečná životaschopnost sebevražděných vektorů --- falešně pozitivní výsledky
  - omezená velikost cílového genu --- nutný rozsáhlý skrining nebo selekce mutant
  - u některých bakteriálních druhů nejsou k dispozici vhodné transpozony
  
- **Průběh mutagenese *in vitro*:**
- **Výchozí předpoklad: transponáza je schopna provést většinu reakcí též *in vitro***
  - k cílové DNA je přidána donorová DNA s transpozonom a enzym transponáza
  - lze použít mutovanou transponázu se zvýšenou účinností transpozice
  - lze použít transpozony postrádající gen pro transponázu (stabilní inserce)
  - cílovou DNA mohou být replikony nebo lineární úseky DNA, které lze pak zavést do buněk, kde se rekombinací začlení do chromozomu
  
- **Použití transpozomů**
- **Transpozom : transponon, na nějž byl *in vitro* navázán enzym transponáza**
  
- Transpozom se připraví *in vitro* v prostředí bez Mg-iontů, čímž dojde k rozštěpení donorové DNA, ale transponáza zůstává přichycena na koncích. Tento meziprodukt - transpozom - se do buněk přenesou elektroporací, v nichž transponáza katalyzuje transpozici transpononu do cílového místa. Enzym je brzy rozložen, takže k další transpozici nemůže docházet. Následně proběhne selekce pro vyhledání žádaných klonů.

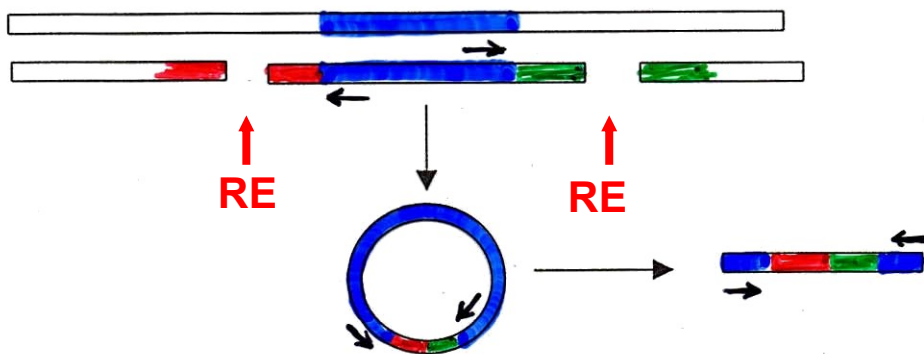
Transpozon vyštěpený  
z donorové molekuly  
pomocí vhodné RE



***In vivo* integrace Mu-transpozozomu sestaveného *in vitro*. Tetramer transponázy MuA a konce mini-Mu-transpozozonu vytvoří *in vitro* stabilní komplex protein–DNA. Po přenosu do buňky elektroporací se za přítomnosti Mg-iontů transpozozon začlení do chromozomu bakterie.**

## Využití Tn pro izolaci genů

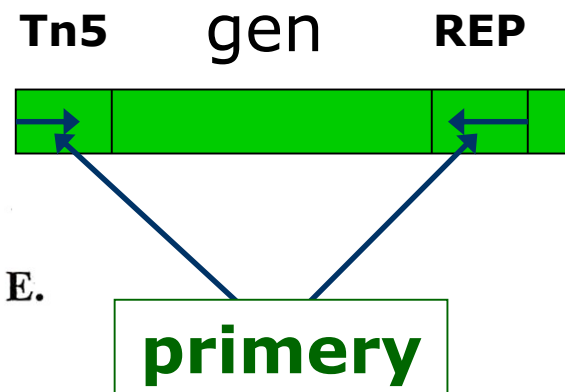
**Inverzní PCR.** Transpozon nese na svých koncích místa pro připojení PCR-primerů orientovaných do okolní sekvence. Štěpením chromozomové DNA RE (neštěpící Tn), ligací fragmentů vzniká „plazmid“, PCR amplifikuje sekvenci chromozomu obklopující transpozon.



### Varianta PCR bez klonování a ligace

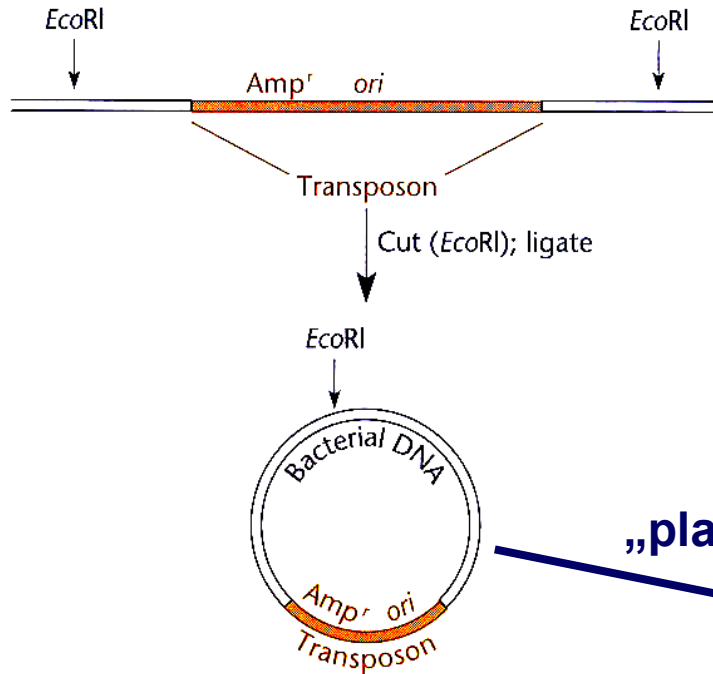
- jeden primer je odvozen z Tn5, druhý je komplementární k REP (repetitivní extragenové palindromy), které se nacházejí v počtu 500 kopií mezi chromozomovými geny u *E. coli* a dalších bakteriích (~ 1% genomu).

Po amplifikaci je amplifikován jediný úsek genomové DNA, z něhož lze připravit sondy a vyhledat gen, který je poblíž transpozonu **(nebo do něhož se Tn začlenil)**





# Klonování (vyprošťování) genů mutovaných transpozony



## Využití

Klonování dosud neznámých genů, jejichž mutace vedou ke změně fenotypu, zvláště u bakterií, které se obtížně kultivují nebo udržují v laboratoři (analýza projevu genů se provádí po přenosu do *E. coli*)

„plasmid rescue“ – vyproštění genu

Přenos do *E. coli*



Příprava sondy pro vyhledání wt genu v původním hostiteli

**Figure 9.21** Cloning genes mutated by insertion of a transposon. A transposon used for mutagenesis of a chromosome contains a plasmid origin of replication (*ori*), and the chromosome is cut with the restriction endonuclease *EcoRI* and religated. If the ligation mix is used to transform *E. coli*, the resulting plasmid in the *Amp<sup>r</sup>* transformants will contain the sequences that flanked the transposon insertion in the chromosome. Chromosomal sequences are shown in black, and transposon sequences are shown in gold.

# MODIFIKACE TRANSPOZONŮ ROZŠIŘUJE MOŽNOSTI JEJICH POUŽITÍ

- 1. Náhrada genů pro **rezistence k antibiotikům**: deriváty Tn5 nesoucí sadu různých rezistencí k antibiotikům. Jsou vhodné v kmenech, kde rezistence ke kanamycinu není účinně exprimována.
- 2. Přidání **oriV** z plazmidu Sel01 do Tn5 přeměnila tento transpozon na plazmid, který se může replikovat v *E. coli*.
- 3. Zavedení **oriT (mob)** sekvence z RK2 dovoluje mobilizaci chromozomu, do něhož je modifikovaný transpozon inzertován, za předpokladu, že v donorové buňce je přítomen pomocný konjugativní plazmid RK2. Možnost křížení kmenů konjugací.
- 4. Do blízkosti konců transpozonu lze zavést *in vitro* sekvence odpovídající **místům pro RE**. Jestliže je takto modifikovaný transpozon integrován do plazmidu, který tato restrikční místa nemá, představují pak koncové sekvence transpozonu jedinečná místa pro klonování a restrikční mapování.
- 5. **Fyzikální separaci transponázového genu** od zbytku elementu se vytváří minitranspozon. Když jsou tyto dvě části přítomny ve stejné buňce (na stejném nebo různých vektorech), exprese transponázy (obvykle pod kontrolou jiného, inducibilního promotoru) dovoluje transpozici minitranspozonu do cílového místa nebo míst - transponovaný element (minitranspozon) v místě začlenění se sám nemůže dále transponovat a tak představuje stabilní marker a irreverzibilní mutaci.

TABLE 4. Examples of Genetically Engineered Transposons

Element	Marker(s)	Size (kb)	Special feature(s)	Use
Tn3- <i>ApKm</i>	ApKm	11.7	Carries replication region of R1	Mobile origin of replication
Tn1725	Cm	8.9	Tn1722 with Cm <sup>r</sup> determinant of plasmid Sa; <i>EcoRI</i> sites in both IR sequences	Tn-mutagenesis; Tn can be excised to leave 35 bp insert with <i>EcoRI</i> site
Tn1732	Km	6.7	Tn1722 with Km <sup>r</sup> determinant of Tn2680	As for Tn1725
Tn1737Km	Km ( <i>lac</i> )	9.8	Tn1722 with Km <sup>r</sup> determinant and promoterless <i>lacZ</i> gene at one end	Promoter probe; β-galactosidase production requires external promoter; type I operon fusions formed
Tn1737Cm	Cm ( <i>lac</i> )	11.1	Tn1722 with Cm <sup>r</sup> determinant and promoterless <i>lacZ</i> gene at one end	Promoter probe; alternative to Tn1737Cm.
Tn5- <i>lac</i>	Km ( <i>lac</i> )	12	Tn5 with promoterless <i>lacZ</i> gene replacing most of IS50L	Promoter probe; type I operon fusions formed
Tn50R <i>Flac</i>	Km ( <i>lac</i> )		Tn5 with <i>lacZ</i> gene lacking transcription and translation signals replacing most of IS50L	Generates protein fusions; can be used to investigate translation control of gene expression
Tn <i>phoA</i>	Km ( <i>phoA</i> )	7.7	Tn5 with alkaline phosphatase gene ( <i>phoA</i> ) lacking transcription and translation signals replacing most of IS50L	Generates protein fusions; used to study structure of membrane proteins and mechanisms of secretion of exported proteins
Tn5 <i>oriT</i>	Km ( <i>oriT</i> )	6.5	Tn5 with conjugal transfer origin from RK2	Mobile transfer origin; chromosome insertions generate conditional Hfr strains (require IncP plasmid for transfer)
Tn5 <i>luxAB</i>	Km ( <i>lux</i> )		Tn5 with <i>luxAB</i> genes lacking transcription signal replacing most of IS50L	Promoter probe; alternative to Tn5/ <i>lac</i> ; operon fusions detected by bioluminescence
Tn10 <i>kan</i>	Tc	8.2	Carries Km <sup>r</sup> determinant of Tn5	Alternative to Tn10
MupApl	Ap	37.5	Mu derivative formed by acquisition of Tn3 followed by deletion of nonessential Mu and Tn3 sequences	Plaque forming, marked alternative to Mu
Mud11	Ap ( <i>lac</i> )	37	Derivative of Mu with promoterless <i>lacZ</i> gene near S end of phage	Forms type I operon fusions to express β-galactosidase activity
Mud1770-1	ApKm ( <i>lac</i> )		Derivative of Mud11 with Km <sup>r</sup> gene	As Mud11 with alternative selection
Mud11678	Ap ( <i>lac</i> )		Mini Mu, i.e., deleted derivative of Mud1770-1	As Mud11, but insertion smaller
Tn917 <i>cam</i>	EryCm	6.5	Contains promoterless <i>cat</i> gene as a promoter probe	Forms type I operon fusions to express Cm resistance

Data from Berg et al. (1989).

**Table 3. Tn5 derivatives carrying portable promoters, alternative marker genes, and useful sites**

<b>použití</b>	<b>Designation in original reference</b>	<b>Antibiotic resistance and novel sequences</b>	<b>Length (kb)</b>
Outward reading promoters	Tn5-tac1	Km <sup>r</sup> , <i>ptac</i>	4.6
	Tn5-B50	Tc <sup>r</sup> , <i>pnpIII</i>	5.0
	Tn5-B60	Km <sup>r</sup> , <i>ptac</i>	5.0
	Tn5-B61	Gm <sup>r</sup> , <i>ptac</i>	5.5
Replication/mobilization origins	TnV	Km <sup>r</sup> , <i>ori</i> pSC101	~6
	Tn5- <i>oriT</i>	Km <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RK2)	6.5
	Tn5-Mob	Km <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RP4)	7.8
	Tn5-B11	Gm <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RP4)	8.4
	Tn5-B12	Gm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RP4)	10.2
	Tn5-B13	Tc <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RP4)	9.4
Sequencing primer sites	Tn5seq1	Km <sup>r</sup> , pT7, pSP6	3.2
	Tn5 <i>supF</i>	<i>supF</i>	0.3
Novel antibiotic resistance genes	Tn5-Tc2	Tc <sup>r</sup>	5.1
	Tn5-Cm	Cm <sup>r</sup>	3.9
	Tn5-Gm	Gm <sup>r</sup>	7.5
	Tn5-Tp	Tp <sup>r</sup>	5.2
	Tn5-Sm	Sm <sup>r</sup>	5.2
	Tn5-Ap	Ap <sup>r</sup>	5.0
	Tn5.7	Tp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	7.6
	Tn5-233	Gm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	6.6
	Tn5-235	Km <sup>r</sup> , <i>'lacZY</i>	10.0
	Tn5-GmSpSm	Gm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	6.8
	Tn5-751	Km <sup>r</sup> , Tp <sup>r</sup>	9.0
	Mini-Tn5 Sm/Sp	Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	2.1
	Mini-Tn5 Tc	Tc <sup>r</sup>	2.2
	Mini-Tn5 Cm	Cm <sup>r</sup>	3.5
	Mini-Tn5 Km	Km <sup>r</sup>	2.3
	Other marker genes	Tn5 <i>Bgl</i> <sup>+</sup> <sup>a</sup>	Km <sup>r</sup> , <i>bgl</i>
Tn5 <i>Amy</i> <sup>+</sup> <sup>b</sup>		Km <sup>r</sup> , <i>amy</i>	8.7
Tn5- <i>tox</i> <sup>c</sup>		Km <sup>r</sup> , <i>tox</i>	10.5
Tn5-Lux <sup>d</sup>		Km <sup>r</sup> , <i>luxAB</i>	6.6
Mini-Tn5 <i>bar</i> <sup>e</sup>		<i>bar</i>	2.5
Mini-Tn5 <i>mer</i> <sup>f</sup>		<i>mer</i>	4.5
Mini-Tn5 <i>ars</i> <sup>g</sup>		<i>ars</i>	5.0
Restriction mapping		Tn5 <i>cos</i>	Km <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>
Plasmid curing	Tn5- <i>rpsL</i>	Km <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup>	7.6
	Tn5-B12S	Km <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> , <i>sacBR</i>	9.9
	Tn5-B13S	Km <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , <i>sacBR</i>	13.2
Multiple unique restriction sites	Tn5-K20	Km <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	9.5
	Tn5-K28	Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	7.4

<sup>a</sup>*Bgl*<sup>+</sup>, ability to ferment cellobiose.

<sup>b</sup>*Amy*<sup>+</sup>, ability to degrade starch.

<sup>c</sup>*tox*, delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*.

<sup>d</sup>Lux, bioluminescence.

<sup>e</sup>*bar*, resistance to the herbicide bialaphos; vector designated as pUT/PTT by Herrero et al. (48).

<sup>f</sup>*mer*, resistance to mercuric salts and organomercurial compounds; vector designated as pUT/Hg by Herrero et al. (48).

<sup>g</sup>*sars*, resistance to arsenite; vector designated as pUT/Ars by Herrero et al. (48).

# BAKTERIOFÁG Mu - GENETICKÁ MAPA

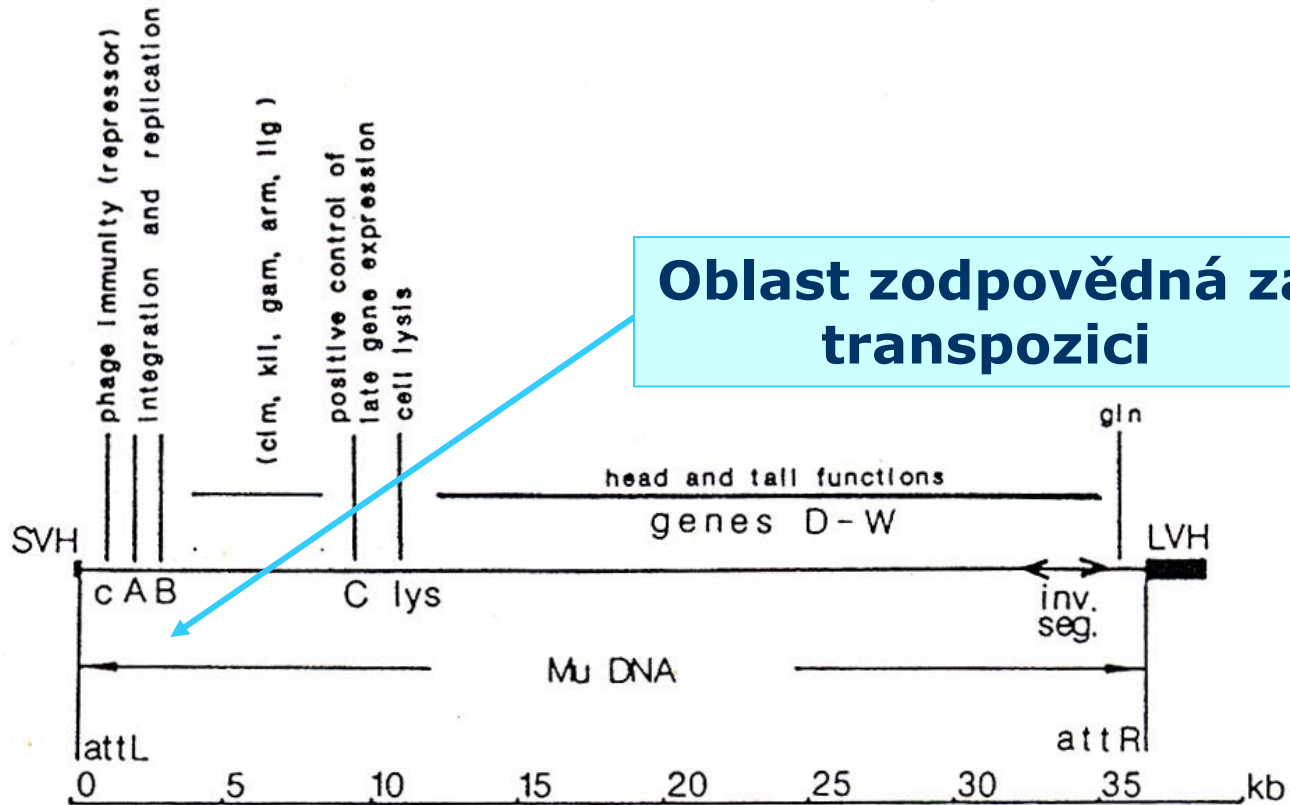


Fig. 12. A schematic representation of bacteriophage Mu. SVH, short (150 bp), variable host sequence; LVH, long (approx. 1.5 kb), variable host sequence; *attL*, *attR*, ends of Mu required for transpositional integration and replication; *inv. seg.*, 3 kb invertible segment (also called G-loop) determining tail-fiber production and, hence, phage host range; *gln*, gene for invertase that mediates inversion of *inv. seg.*

**Fág Mu infikuje široké spektrum G- bakterií**

# MINITRANSPOZONY = INZERČNĚ-DELEČNÍ DERIVÁTY FÁGA Mu

Table 5.1 Properties of Commonly Used Mud Derivatives

Element <sup>a</sup>	AKA <sup>b</sup>	Fusion <sup>c</sup>	kb <sup>d</sup>	Marker <sup>e</sup>	Genes <sup>f</sup>	Reference
Mud1(Ap <sup>r</sup> , lac)	Mud1	O	37.2	Ap	cts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup>	1
Mud301(Ap <sup>r</sup> , lac)	Mud2	G	35.6	Ap	cts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup>	2
Mud1-8	MudA	O	37.2	Ap	cts A(Am) B(Am)	3
Mud2-8	MudB	G	35.6	Ap	cts A(Am) B(Am)	3
MudI1734	MudJ	O	11.3	Km	cts Δ(AB)	4
MudII1734	MudK	G	9.7	Km	cts Δ(AB)	4

<sup>a</sup>Original designation.

<sup>b</sup>"Also known as"; alternate designation.

<sup>c</sup>O, operon (transcriptional) fusion; G, gene (translational; protein) fusion.

<sup>d</sup>Length of element DNA in kilobases.

<sup>e</sup>Selectable antibiotic resistance marker

<sup>f</sup>Genotype of repressor (*c*) and transposase (AB) genes.

# GENOVÉ FÚZE *IN VIVO*

- **Využití modifikovaných transpozonů pro přípravu genových fúzí**
- **Mud(ApR, lacZ) je modifikovaný fág Mu, u něhož byly deletovány geny pro lytické funkce a nahrazeny genem bla (AmpR) (**selekce**) z Tn3 a lacZ (**reportér**) z E. coli K12. Byly připraveny dvě serie Mud (Ap, lacZ):**
- 1 . U první serie byly zachovány translační signály (rbs) genu *lacZ*, ale byl deletován promotor tohoto genu. Gen *lacZ* může být exprimován, když se Mud inzertuje distálně od jiného promotoru ve správné orientaci. Pozorování změn hladiny exprese  $\beta$ -galaktozidázy po změnách podmínek prostředí umožňuje studovat způsob regulace daného genu (nebo operonu). Tento způsob, zvaný **operonové fúze**, byl intenzívně využíván při studiu exprese genů, jejichž fenotyp se obtížně monitoruje.

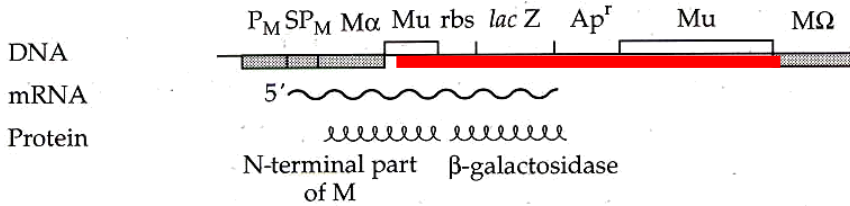
# GENOVÉ FÚZE *IN VIVO*

- 2. U druhé serie Mud je gen *lacZ* zbaven místa rbs a též prvních nukleotidů kódující sekvence. Gen může být exprimován jen tehdy, když je transpozon Mud inzertován ve správném čtecím rámci ve směru transkripce od kompletních expresních signálů jak pro transkripci, tak pro translaci (promotor a rbs). Transpozon v tomto případě navozuje **translační (genové) fúze**.
- 3. Pro vyhledávání genů, jejichž produkty jsou **exportovány do periplazmy nebo do prostředí**, byl zkonstruován **TnPho**. Tento transpozon nese gen **pho, který kóduje alkalickou fosfatázu** (protein *E. coli* exportovaný do periplazmatického prostoru). Je aktivní jen jako dimer. Translací vzniká dlouhý prekurzor se signálním peptidem, který je při transportu do periplazmatického prostoru odštěpen. **Selekce pomocí XP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát)**



**M = gen, do něhož se Mu začlenil**

(a) (i)

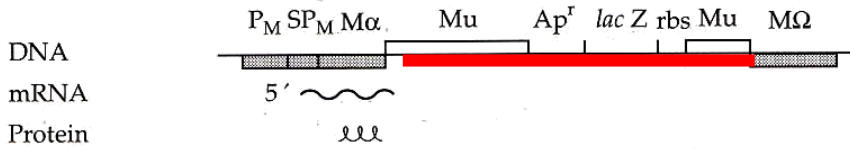


operonová fúze pomocí Mud

**Transkripční (operonová) fúze**

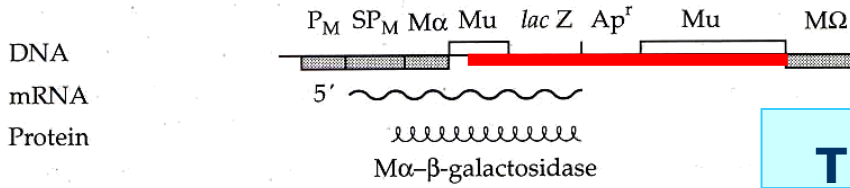
jeden transkript, dva produkty

(ii)



operonová fúze pomocí Mud (v obrácené orientaci)

(b)

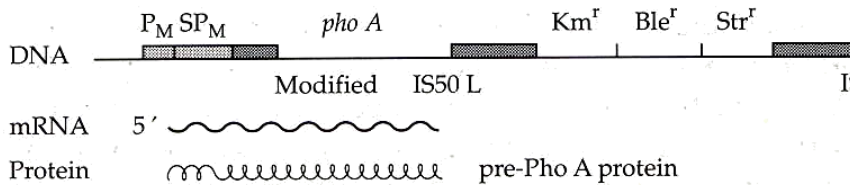


genová fúze (vznik fúzního proteinu)

**Translační (proteinová) fúze**

jeden transkript, jeden produkt

(c)



TnPhoA  
M = sekretovaný protein

**MudI = operonové fúze, MudII = genové fúze** 25

- **Reportérové transkripční (operonové) a translační (genové) fúze mají řadu využití, např. mohou být použity ke stanovení, zda regulace genové exprese probíhá na transkripční nebo translační úrovni.**
  
- **Když je gen regulován na transkripční úrovni,** bude  $\beta$ -galaktozidáza exprimována jak v případě operonových tak i genových fúzí a indukována nebo reprimována v podobném rozsahu jako gen, do něhož je transpozon začleněn.
  
- **Jestliže je gen regulován na úrovni translace,** nebude v případě operonové fúze  $\beta$ -galaktozidáza ani indukována ani reprimována, ale v případě genové fúze bude exprese  $\beta$ -galaktozidázy regulována.

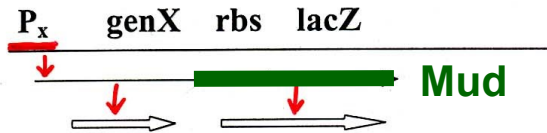
A. Operonové fúze. U tohoto typu Mud-vektoru mají geny lac svůj vlastní start translace (RBS, AUG) a proto je exprese lacZ přímo úměrná transkripci z promotoru mutovaného genu, avšak translace lacZ je nezávislá na mutovaném genu. Jsou vytvářeny dva samostatné proteiny: N-terminální část produktu mutovaného genu a produkt genu lacZ (B-galaktosidáza).

B. Genové fúze. U tohoto typu Mud vektorů nemají geny lac své vlastní místo startu translace, takže exprese genu lacZ je určena jak transkripcí tak translací mutovaného genu. Při genové fúzi se tvoří hybridní protein s N-terminální částí mutovaného genu kovalentně navázanou na C-konec B-galaktosidázy.

# Využití transpozonových fúzí ke sledování způsobu regulace genů

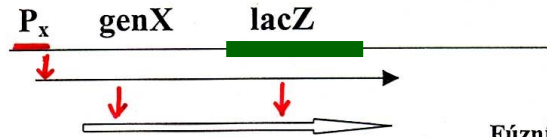
**Exprese lacZ je řízena signály pro transkripci genu X**

## A. Regulace genu X na úrovni transkripce



Transkripční fúze

MudI



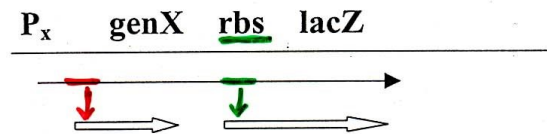
Translační fúze

Fúzní protein

MudII

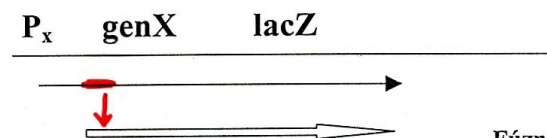
= indukce a represe genu lacZ bude v obou případech probíhat stejně

## B. Regulace genu X na úrovni translace



Transkripční fúze

= tvorba B-galaktosidázy nebude indukována ani reprimována



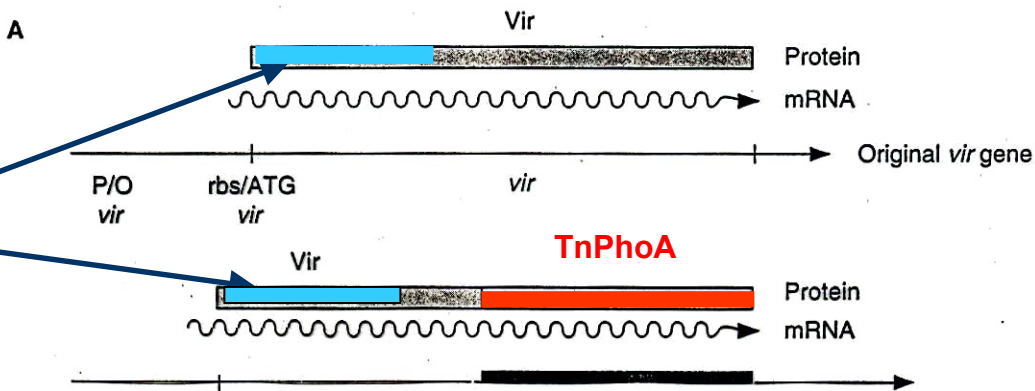
Translační fúze

Fúzní protein

**Tvorba galaktosidázy je ovlivněna translačními signály genu X**

= tvorba fúzního proteinu a tedy i aktivita B-galaktosidázy budou ovlivněny translačními signály působícími na gen X

## Signální sekvence genu *vir*



## Sekretovaný fúzní protein

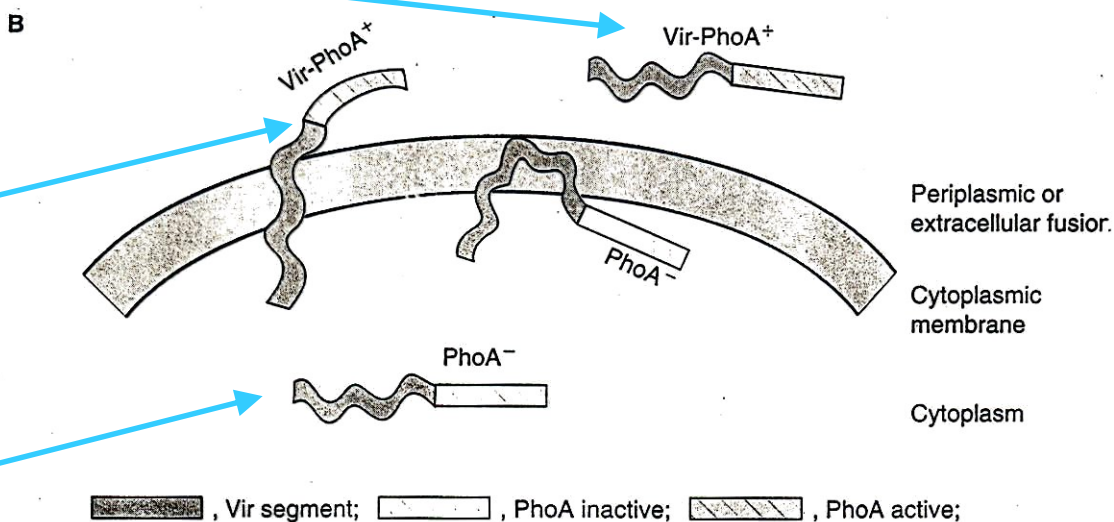
- *pho* je aktivní

## periplazmatický fúzní protein

- *pho* je aktivní

## cytoplazmatický fúzní protein

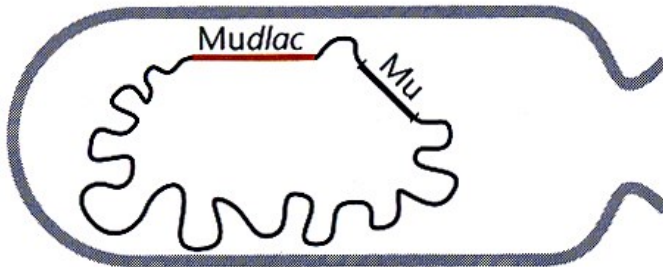
- *pho* je inaktivní



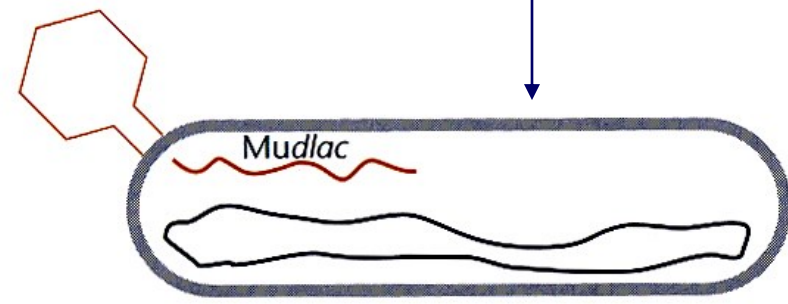
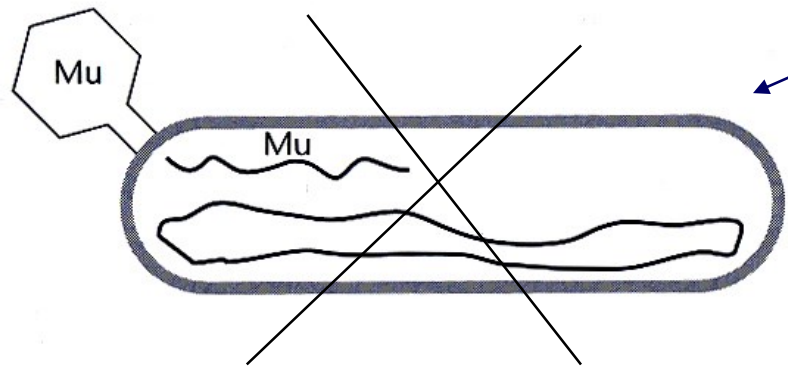
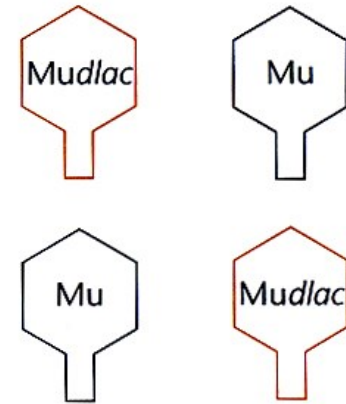
**Figure 6-8** Using protein fusions with alkaline phosphatase (PhoA fusions) to identify genes encoding bacterial surface or extracellular proteins. A, PhoA translational fusion. B, Various types of PhoA fusions. PhoA is active outside the cytoplasm (PhoA<sup>+</sup>) and inactive inside the cytoplasm (PhoA<sup>-</sup>).

# IZOLACE (příprava) GENOVÝCH FÚZÍ PO NÁHODNÉM ZAČLENĚNÍ Mud(Amp<sup>R</sup>; lac)

Buňka kmene obsahující Mud/lac a Mu (pomocný fág)

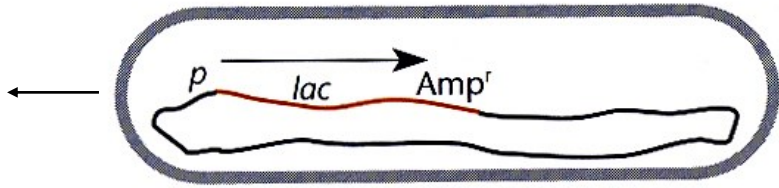


Indukce profágů, vznik smíšeného fágového potomstva



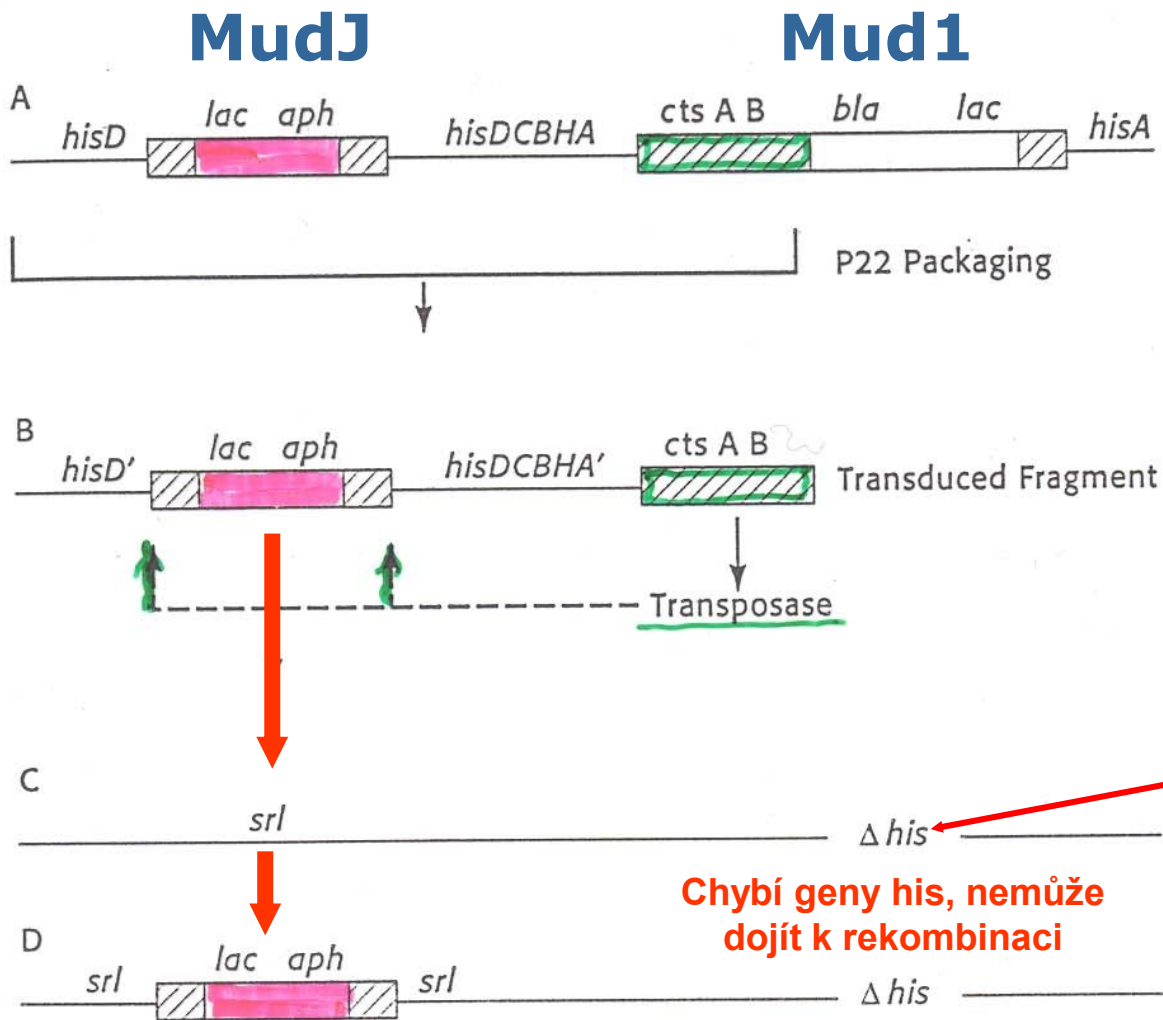
Select Amp<sup>r</sup> transductants

Buňky rostou na Amp a mohou exprimovat  $\beta$ -galaktozidázu



Na plotnách s X-gal se selektují klony s Mud začleněným za promotor specificky regulovaného genu

# DOČASNÁ CIS-KOMPLEMENTACE; ZPŮSOB, JAK ZAČLENIT TRANSPOZON STABILNĚ DO REPLIKONU



Kmen *Salmonella typhimurium*

zdroj MudJ

Nespecifická transdukce pomocí fága P22

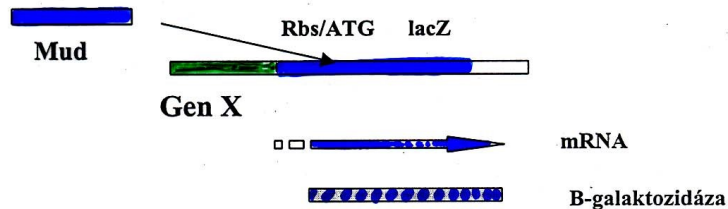
Chromozom recipienta

Chybí geny *his*, nemůže dojít k rekombinaci

stabilní začlenění

Frekvence mutací v konkrétním genu 1:3 000

# Vyhledání neznámého genu, jehož regulace je specificky řízena



Tvorba B-galaktozidázy je regulována signály řídicími normálně tvorbu produktu genu X

Vnesení Mud do buňky a jeho náhodné začlenění do genu X

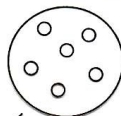
LacZ AntR



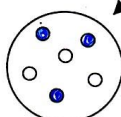
Zavedení transpononu do buněk



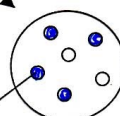
Výsev buněk na medium obsahující antibiotikum pro selekci buněk se začleněným transpononem



Razítkování na plotny s X-gal



Vysoká konc. Fe



Nízká konc. Fe (indukující podmínky)

Hledaný gen je exprimován jen při nízké koncentraci Fe

Kolonie vybraná pro další analýzu

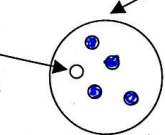
vyběr klonů, které vykazují změnu v regulaci a expresi lacZ za různých podmínek (např. různá konc. Fe, různá teplota)

Růst buněk za přítomnosti různých indukčních agens

Mud je začleněn do genu, který je aktivován jen při nízké koncentraci Fe

Mutagenese (Che n. Tn)

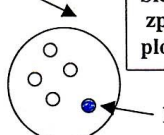
Možná ztráta aktivátoru



Nízká konc. Fe

Sledování pozměněného způsobu regulace na plotnách s X-gal

Objasnění způsobu regulace



Možná ztráta represoru

Vysoká konc. Fe

Klonování neporušeného genu, jehož exprese je ovlivněna změnou podmínek

KLONOVÁNÍ



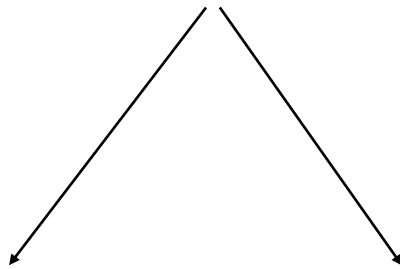
# Identifikace genů *din* aktivovaných po poškození DNA

*din* = *damage inducible*

1. Přenos Mud (AmpR, lacZ) do *E. coli* (na fágovém vektoru)

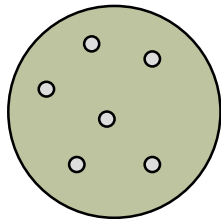


2. Izolace transduktantů AmpR

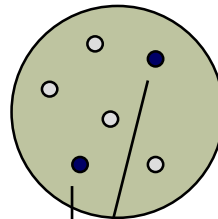


Razítkování jednotlivých transduktantů na plotny s X-gal (A) a na plotny s X-gal + činidlem poškozujícím DNA (B)

A



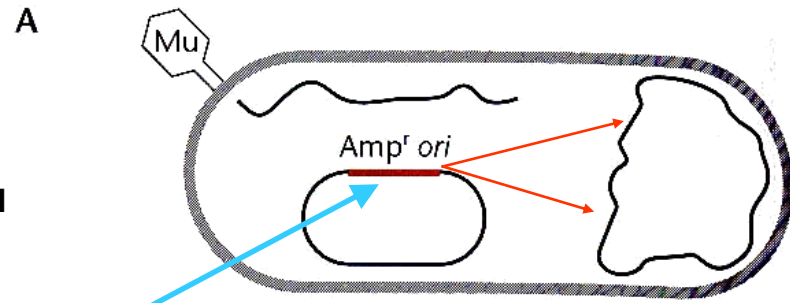
B



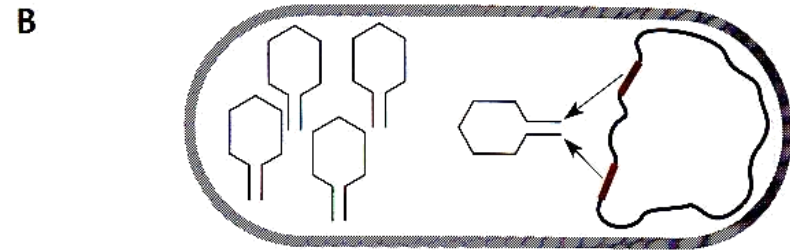
Modré kolonie = transpozon se začlenil do genu aktivovaného po poškození DNA

# KLONOVÁNÍ *IN VIVO* POMOCÍ MINI-MU

**A. Po infekci buněk pomocným fágem Mu se mini-Mu z plazmidu transponuje do náhodných míst na chromozomu.**



**B. Do fágových hlav jsou zabalovány dva sousední mini-Mu spolu s částí chromozomu (*klonování in vivo*)**



**C. Po přenosu do další buňky dochází k rekombinaci mezi mini-Mu za tvorby kružnicové DNA, která má charakter plazmidu, v němž je „naklonován“ úsek chromozomu mezi oběma Mini-Mu**

