

VÝZNAM MUTAGENEZE U BAKTERIÍ

- Vyhledání genu a stanovení jeho funkce
- Praktické využití modifikovaných kmenů ve výzkumu
- Využití v biotechnologiích, fermentace, produkce cizorodých látek aj

- **Výhody mikroorganismů při mutagenezi**
 - vysoká přirozená variabilita
 - haploidní genom (malá velikost)
 - velký počet potomstva za krátkou dobu
 - snadný přenos genů
 - snadná selekce

- **Způsoby mutageneze**
 - **klasická mutageneze (chemomutageny, fyzikální faktory)**
 - transpozonová mutageneze (biologické mutageny)
 - mutátorové kmeny (mutace v reparačních mechanismech)
 - mutageneze *in vitro*
 - *CRISPR/Cas*

NOMENKLATURA

- **Genotyp:** třípísmenový kód (zkratka) psaný kurzívou
- **Gen** je označen zkratkou *trpA*, alely *trpA1*
 - a) **Standardní alely** se označují znaménkem +, např. *trp+*
 - b) **Mutantní alely** se označují znaménkem -, např. *trp-*
- **Fenotyp:** Velké písmeno na začátku ne kurzívou, např. Trp. Standardní fenotyp se označí +, např. Trp+, mutantní Trp-. Symbol není vždy totožný s označením genotypu. Např. fenotyp Nif- může mít podstatu v *nifX-* nebo *nodX-* (různé geny týkající se odlišných procesů).
- **Rezistence:** r (R), s (S), uváděné jako exponenty (**Tet^R**)
 - delece = Δ
 - inzerce = ::
 - plazmid, profág = *E. coli* (RP4, ϕ 80)

TcR x TetR

ZÁKLADNÍ TYPY MUTACÍ U BAKTÉRIÍ

- se změnou v morfologii kolonií
- se změnou citlivosti (k antibiotikům, toxickým látkám, záření, fágům aj.)
- v požadavcích na růstové faktory (auxotrofní)
- se změnou v produkci látek (např. pigmentů)
- supresorsenzitivní (citlivé k supresorům)
- supresorové (vedoucí ke vzniku supresorů)
- ovlivňující reparační a rekombinační schopnosti
- vedoucí ke vzniku mutátorových kmenů
- se změnou citlivosti k teplotě – vysoké nebo nízké (teplotně senzitivní)

Mutace letální x kondicionálně (podmíněně) letální

Typ mutace	Podstata změny	Detekce mutant
Ztráta pohyblivosti	Ztráta bičíku, nefunkční bičík	Kompaktní kolonie namísto plochých
Ztráta kapsuly	Ztráta nebo modifikace povrchových kapsulárních struktur	Malé drsné kolonie namísto velkých a hladkých kolonií
Drsné kolonie	Ztráta nebo změna lipopolysacharidové vnější vrstvy	Nepravidelné granulární kolonie namísto hladkých lesklých kolonií
Změna ve výživě	Ztráta enzymu biosyntetické dráhy	Neschopnost růstu na mediu postrádajícím daný růstový faktor
Zkvašování cukrů	Ztráta enzymu katabolické dráhy	Nedochází ke změně barvy v mediu obsahujícím cukr a pH indikátor
Rezistence k antibiotiku	Zábrana vstupu do buňky, změna cílové molekuly (složky ribozomu), detoxikace antibiotika	Růst na mediu obsahujícím inhibiční koncentraci antibiotika
Rezistence k fágu	Ztráta receptoru	Růst v přítomnosti fága
Citlivost k teplotě	Změna struktury esenciálního proteinu	Neschopnost růstu při zvýšené teplotě
Citlivost k chladu	Změna struktury esenciálního proteinu	Neschopnost růstu při nízké teplotě

Table 16. Genotypes of Frequently Used Bacterial Strains.

Strain	Genotype
C600 (1)	F ⁻ , <i>thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ⁻</i>
C600Hfl (1)	F ⁻ , <i>thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ⁻, hflA150, [chr:Tn10]</i>
DH1 (2)	F ⁻ , <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA 1⁻, λ⁻</i>
DH5α	F ⁻ , <i>φ80d, lacZΔM15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, d⁻, gyrA96, Δ(lacZYA-argF), U169⁻</i>
DH5αF'	<i>φ80d, lacZΔM15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, d⁻, gyrA96, Δ(lacZYA-argF), U169</i>
HB101 (3)	F ⁻ , <i>hsdS20 (r_s⁻, m_s⁻), supE44, recA13, ara14, proA2, rpsL20 (str^r), xyl-5, mlt-5, supE44, λ⁻</i>
JM83 (4)	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL, φ80, lacZΔM15</i>
JM101 (4)	<i>thi, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15]</i>
JM103 (2)	<i>endA1, hsdR, supE, sbcB15, thi-1, strA, Δ(lac-pro), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15]</i>
JM105 (4)	<i>endA1, thi, rpsL, sbcB15, hsdR4, Δ(lac-pro), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15]</i>
JM107 (4)	<i>endA1, thi, syrA96, hsd17, λ⁻, relA1, supE44, Δ(lac-pro), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15]</i>
JM108 (4)	<i>endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-pro)</i>
JM109 (4)	<i>endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15]</i>
JM109 (DE3) (4)	<i>endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15], λ(DE3)</i>
JM110 (4)	<i>rpsL, thr, leu, thi, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^oZΔM15]</i>
LE392 (5)	F ⁻ , <i>hsdR574 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, supF58 lacY1, or Δ(lac1ZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55, λ⁻</i>

Strain	Genotype
KW251	F ⁻ , <i>supE44, galK2, galT22, metB1, hsdR2, mcrB1, mcrA⁻, argA81: Tn10, recD1014</i>
NM522 (6)	<i>supE, thi, Δ(lac-proAB), Δhsd5 (r⁻, m⁻), [F', proAB, lacI^oZΔM15]</i>
NM538 (7)	<i>supF, hsdR (r_k⁻, m_k⁺)</i>
NM539 (7)	<i>supF, hsdR (r_k⁻, m_k⁺) (P2)</i>
RR1 (3)	F ⁻ , <i>hsdS20 (r_s⁻, m_s⁻), supE44, ara14, proA2, rpsL20 (str), xyl-5, mlt-5, supE44, λ⁻</i>
X1776 (3)	F ⁻ , <i>tonA53, dapD8, minA1, glnV44, (supE44), Δ(gal-uvrB) 40, λ⁻, min82, rfb-2, gyrA25, thyA142, oms-2, metC65, oms-1, (tte-1), Δ(bioH-asd) 29, cyc82, cycA1, hsdA2</i>
Y1088 (8)	<i>Δ(lacU169), supE, supF, hsdR (r⁻, m⁺), metB, troR, tonA21, proC::Tn5 (pMC9)</i>
Y1089 (8)	<i>Δ(lacU169), proA+, Δ(lon), araD139, strA, hflA150 [chr::Tn10], (pMC9)</i>
Y1090 (8)	<i>Δ(lacU169), proA+, Δ(lon), araD139, strA, supF, [trpC22::Tn10], (pMC9), (r_k⁻, m_k⁺)</i>

References:

- Jendrisak, J., Young, R.A., and Engel, J. (1987) in: *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Eds. Berger, S. and Kimmel, A., Academic Press, 359-371.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **F126B166**, 557-580.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) in: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103-119.
- Murray, N. (1977) *Mol. Gen. Genet.* **150**, 53-58.
- Gough, J. and Murray, N. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 1-19.
- Frischauf, A., et al. (1983) *J. Mol. Biol.* **170**, 827-842.
- Huynh, T., Young, R.A., and Davis, R. (1985) in: *DNA Cloning Volume 1*, Eds. Glover, D., IRL Press Ltd, 56-110.

Důležité genotypy:

- auxotrofie
- suprese
- restrikce
- lacZ
- přítomnost plazmidů
- přítomnost profágů
- přítomnost Tn a IS
- reparace
- rekombinace
- rezistence k fágům

Table 15. Descriptions of Common Host Mutations.

Gene symbol	Mnemonic	Phenotypic trait affected
<i>araA</i>	Arabinose	L-Arabinose isomerase
<i>araC</i>	Arabinose	regulatory gene: activator and repressor protein
<i>dapD</i>	Diaminopimelate	Succinyl-diaminopimelate aminotransferase
<i>endA</i>		DNA specific endonuclease
<i>galK</i>	Galactose	galactokinase
<i>galU</i>	Galactose	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase
<i>gyrA</i>	Gyrase	subunit A, resistance or sensitivity to nalidixic acid
<i>Hfl</i> (1)		λ phages with a normal repressor (<i>ci</i>) gene are inhibited from the lytic cycle. The lysogeny frequency is greatly enhanced
<i>hisS</i>	Histidine	Histidyl-tRNA synthetase
<i>lacI</i>	Lactose	regulator gene; repressor protein of <i>lac</i> operon
<i>lacY</i>	Lactose	galactoside permease
<i>lacZ</i>	Lactose	β -D-galactosidase
<i>leuA</i>	Leucine	α -Isopropylmalate synthase
<i>leuB</i>	Leucine	β -Isopropylmalate dehydrogenase
<i>metA</i>	Methionine	homoserine transsuccinylase
<i>metB</i>	Methionine	cystathionine α -synthase
<i>mitA</i>	Mannitol	Mannitol-specific enzyme II of phosphotransferase system
P2 (2)		λ phages containing the <i>red</i> and <i>gam</i> genes of λ are growth inhibited by P2 lysogens
<i>proA</i>	Proline	α -glutamyl phosphate reductase
<i>proB</i>	Proline	α -glutamyl kinase

Gene symbol	Mnemonic	Phenotypic trait affected
<i>recA</i>	Recombination	general recombination, repair of radiation damage and induction of phage lambda
<i>recB</i> and <i>recC</i>	Recombination	recombination and repair of radiation damage exonucleaseV subunit
<i>recE</i>	Recombination	locus of <i>rac</i> prophage exonuclease VIII
<i>recF</i>	Recombination	recombination and repair of radiation damage
<i>relA</i>	Relaxed	regulation of RNA synthesis: stringent factor, ATP:GTP 3' pyrophosphotransferase
<i>rpsL</i>	Ribosomal protein, small	30S ribosomal subunit protein S12
<i>supB</i> , <i>supC</i> , <i>supG</i> , <i>supL</i> , <i>supM</i> , <i>supN</i> , and <i>supO</i>	Suppressor	suppressors of ochre (UAA) and amber (UAG) mutations
<i>supD</i> , <i>supE</i> , and <i>supF</i>	Supressor	supressor of amber mutations
<i>thiA</i>	Thiamine	Thiamine thiazole requirement
<i>tonA</i>	T-one	outer membrane protein receptor for ferrichrome, colicin M, and phages T1, T5, and ϕ 80
<i>tonB</i>	T-one	uptake of chelated iron and cyanobalamin
<i>xylA</i>	Xylose	D-xylose isomerase
Miscellaneous		
F ⁻	host does not contain an episome	
F [']	host contains episome with stated features	
λ ⁻	bacteriophage lambda DNA is not integrated into genome of bacterial host	

References:

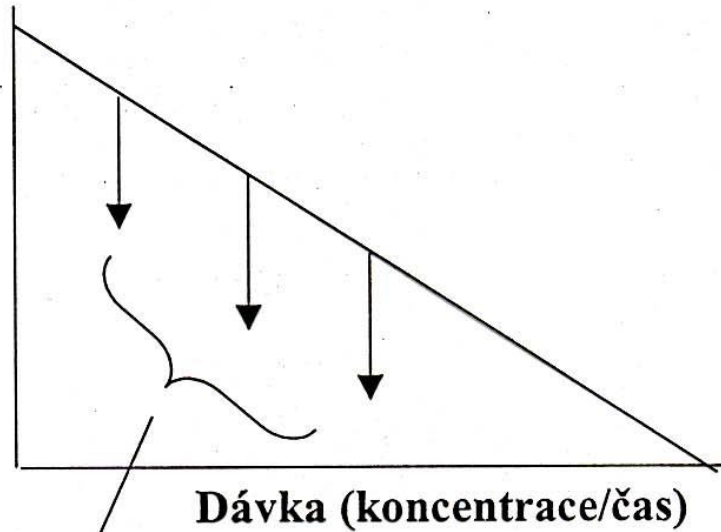
- Hoyt, A., (1982) *Cell* **31**, 565-569.
- Kaiser, K. and Murray, N. in *DNA Cloning* Vol. 1, Eds. Glover, D., IRL Press Ltd. 1-47.

Table IIIA. Mutagens Used for Bacteria

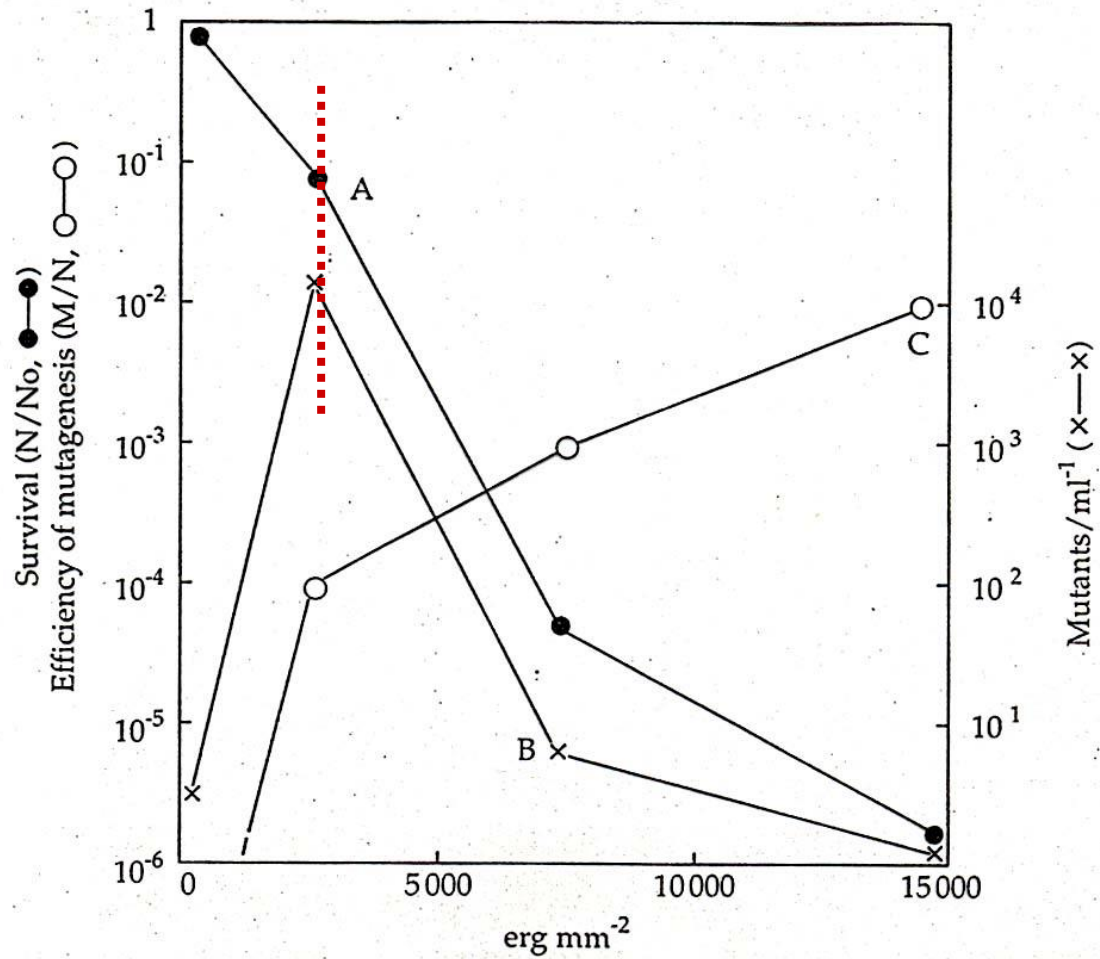
Mutagen	Apparent <i>in vivo</i> specificity	Additional advantages	Disadvantages
2-AP (2-aminopurine)	transitions A:T \rightleftharpoons G:C		in some cases a weak mutagen
5-BU (5-bromouracil)	transitions A:T \rightleftharpoons G:C		must depress normal thymine incorporation; weak mutagen
NH ₂ OH (hydroxylamine)	transitions A:T \rightleftharpoons G:C		in some cases a weak mutagen
Sodium bisulfite	specific transition G:C \rightarrow A:T		weak mutagen
Mutator gene (<i>mutT</i>)	specific transversion A:T \rightarrow C:G	no treatment required	genetic construction required
EMS (ethylmethane sulfonate)	transitions and transversions	powerful mutagen	dangerous to handle
NG (nitrosoguanidine)	transitions and transversions; induces small deletions at low rate	very powerful mutagen	dangerous to handle; frequent secondary mutations
ICR 191	frameshifts; small insertions and deletions	powerful mutagen	compound difficult to obtain
Nitrous acid	transitions and probably transversions; deletions		high amount of killing required for good mutagenesis
UV (ultraviolet radiation)	transitions and probably transversions; deletions; possibly stimulates insertions and chromosomal rearrangements		high amount of killing required for good mutagenesis; certain strains too sensitive
Mu-1 phage <i>a datsi</i> <i>transposony</i>	insertions; some deletions	random induction of non-leaky, polar, non-reverting mutations	
Spontaneous (no mutagen)	transitions; transversions; insertions; deletions (frameshifts)	wide spectrum of mutations; no complications due to secondary mutations	low level of mutants; many siblings in each culture

Stanovení křivky přežití bakteriálních buněk po působení mutagenu

Počet
buněk



Stanovení počtu mutant v jednotlivých intervalech působení mutagenu



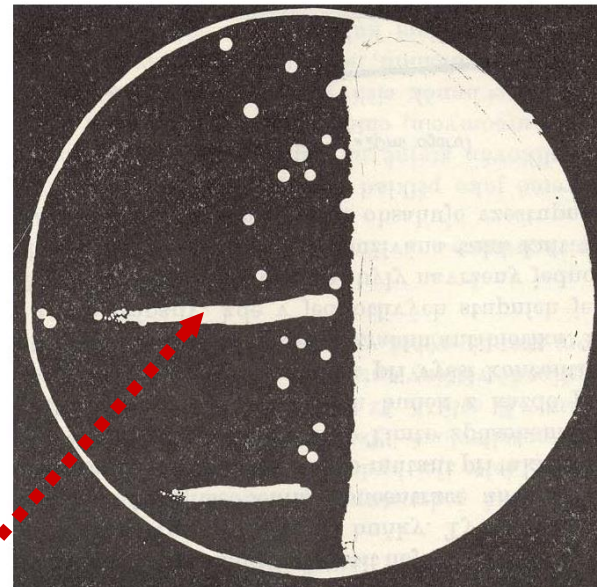
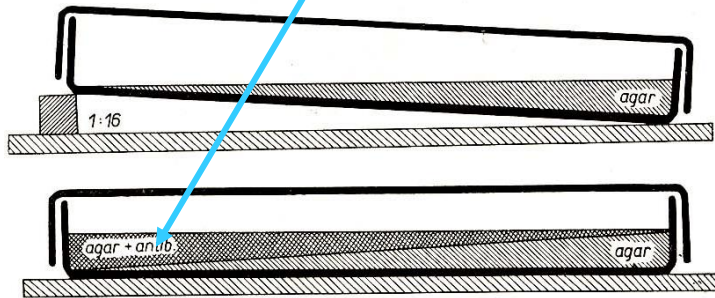
Závislost počtu mutant na dávce záření (koncentraci mutagenu)

POSTUPY PŘI IZOLACI MUTANT

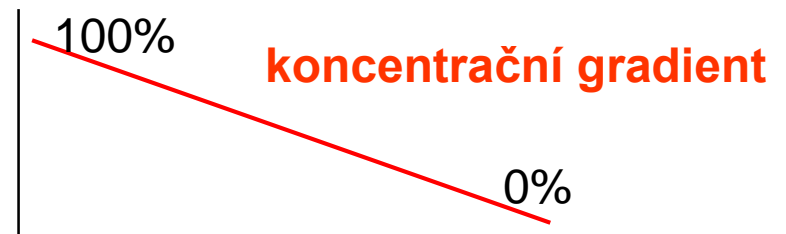
- **Skríning** (vyhledání mutant na základě pozorovatelné změny fenotypu: Růst na indikátorových mediích (utilizace cukrů – tvorba kyselin – změna pH – změna barvy) – podobně jako při odlišování druhů nebo kmenů)
- **Obohacování** (zvyšování počtu mutant)
 - penicilinová metoda.
 - inkorporace radioaktivního prekurzoru (radioaktivní sebevražda)
 - 5-BU + UV
- **Selekce** (růst za podmínek, při nichž roste jen mutanta, buňky standardního typu nepřežívají nebo nerostou /**pozitivní (přímá) selekce**/, nebo nerostou mutanty, ale buňky standardního typu ano /**negativní (nepřímá) selekce**/ - např. rezistence/citlivost k vnějším faktorům)
- **Replikování (razítkování)** (přenos kolonií na medium s odlišným složením: chybění živin n. růstových faktorů (aminokyseliny, vitamíny, atd) přítomnost inhibitorů růstu (antibiotika, bakteriofágy, +/- teplota aj)

IZOLACE MUTANT REZISTENTNÍCH K ANTIBIOTIKU NA GRADIENTNÍCH PLOTNÁCH

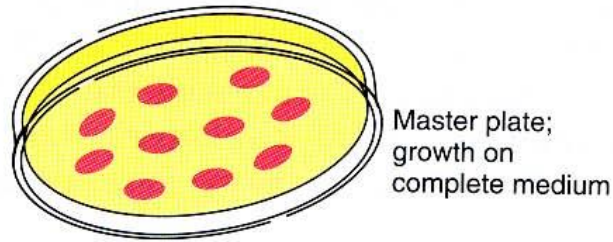
antibiotikum



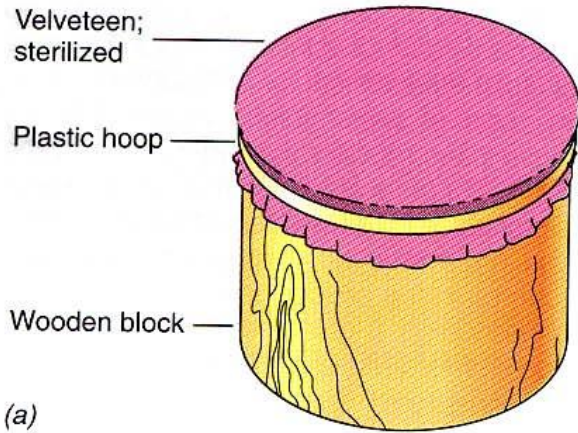
Izolace vícestupňových mutant



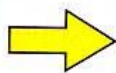
Razítkování (Replikování)



Press plate
onto velveteen



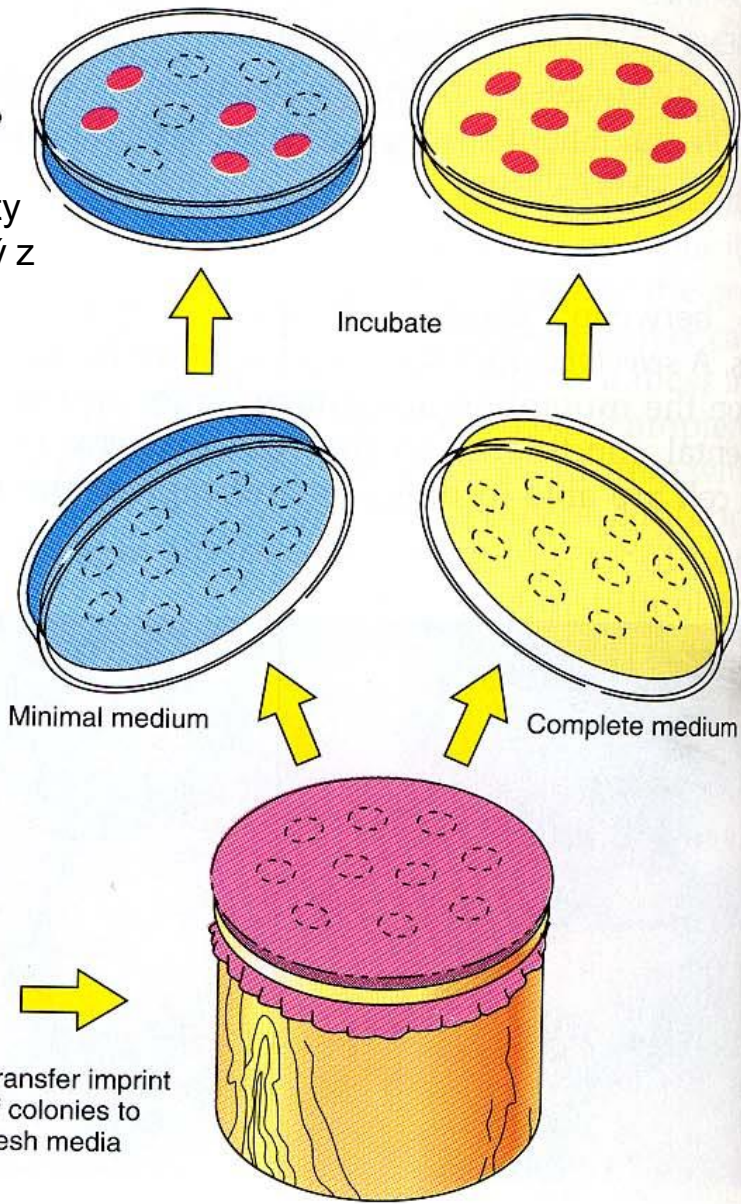
Velveteen with
imprint of all
colonies



Transfer imprint
of colonies to
fresh media

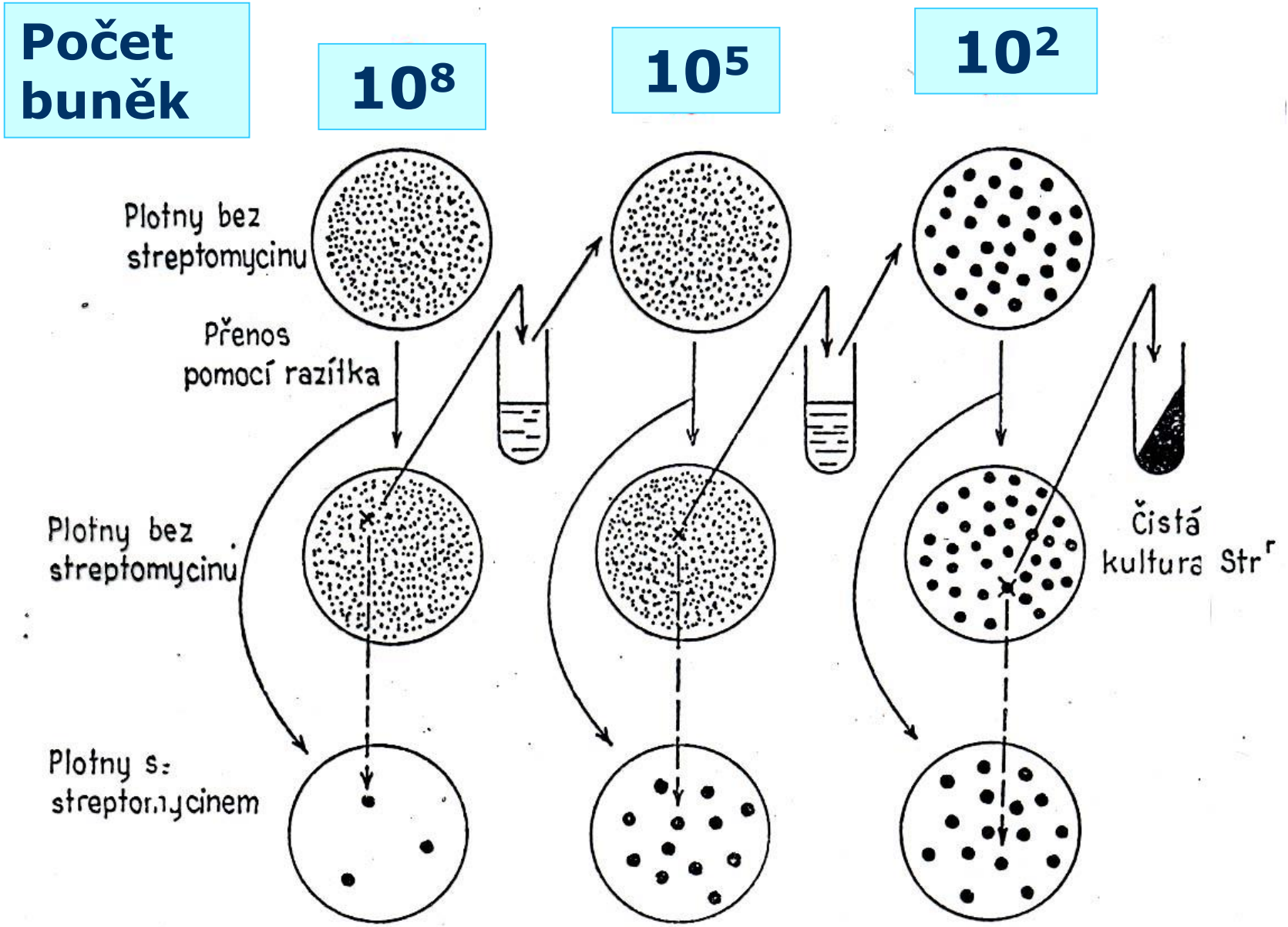
Auxotrofní mutanty
vyžadující některý z
růstových faktorů

Mutants do
not grow



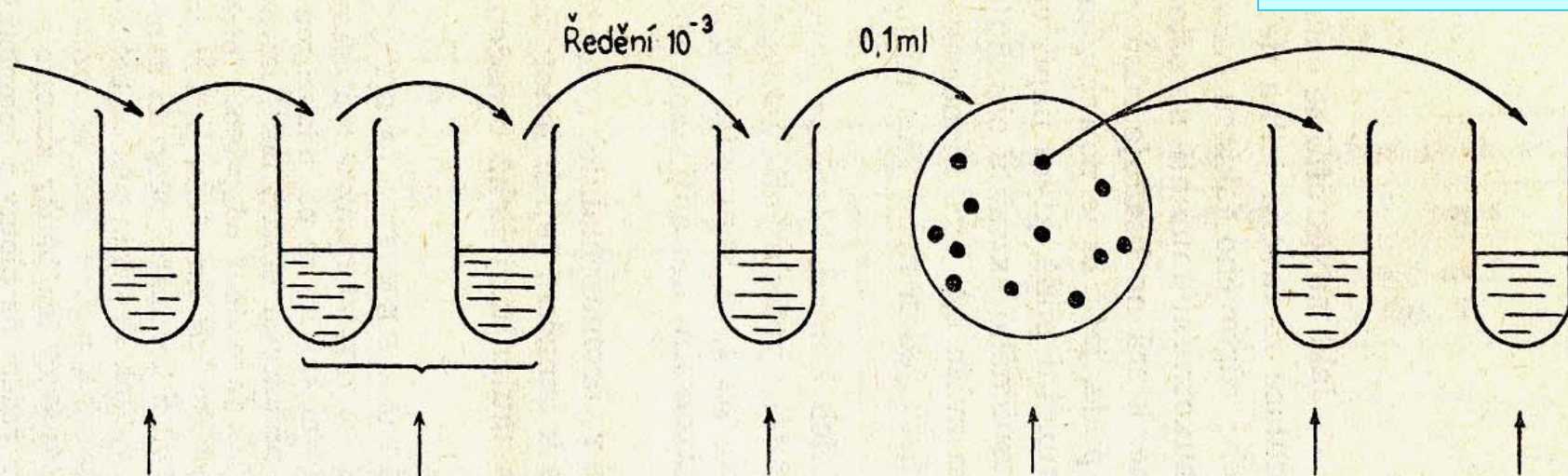
(a)

Postup při nepřímé selekci mutant razítkovou metodou



Izolace auxotrofních mutant penicilínovou metodou

auxanografie



Ozářená suspenze buněk prototrofního kmene se kultivuje v kompletní půdě 24 hodin.

Buňky vyrostlé v kompletní půdě se několikrát promyjí ve fyziologickém roztoku.

Zředěné inokulum promytých buněk se naočkuje do minimální půdy, která obsahuje 100 až 300mj. penicilinu v 1ml. V této půdě přežijí jen auxotrofní mutanti.

Z minimální půdy se provede rozsev na plotnu z kompletní půdy.

Kompletní půda

Minimální půda

Tatáž kolonie se naočkuje do kompletní i minimální půdy. Jestliže vyroste jen v kompletní půdě, znamená to, že představuje klon auxotrofního mutantu. Dalšími testy se zjistí, za přítomnosti které aminokyseliny roste na minimální půdě.

Prototrofy rostou a tudíž hynou, auxotrofní mutanty nerostou a přežívají (negativní selekce)

FENOTYPOVÉ ZDRŽENÍ
(recesivní mutace)

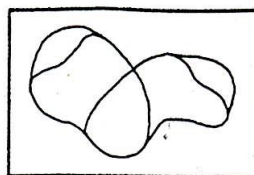
STAV DNA V BUŇCE

SEGREGAČNÍ LAG
(dominantní mutace)

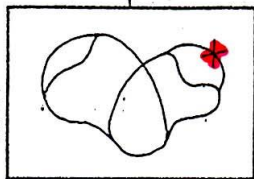
**Prodleva v čase
před tím, než
je mutace
detekovatelná**

**Doba, která je
nutná k tomu,
aby mutace byla
na všech kopiích
chromozomu**

Mutantní fenotyp se neprojevuje,
jelikož cytoplazma ještě obsahuje
produkt genu standardního typu.

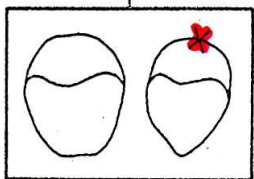


Mutace probíhá v částečně
zreplikované DNA



Projeví se mutantní fenotyp

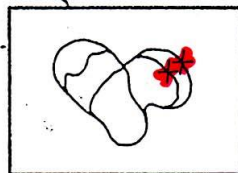
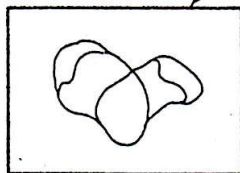
Dokončení replikace



GENERACE

1

První dělení buňky

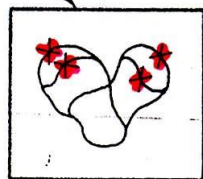
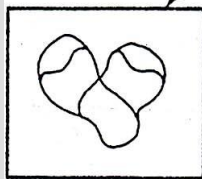


2

Buňky standardního typu

Druhé buněčné dělení

Mutantní fenotyp se
projeví teprve poté, až je
produkt standardního
genu dostatečně
naředěn nebo vyplaven z
cytoplazmy



Ke zvýšení počtu
mutantních buněk
dochází po dalším
dělení

Buňky standardního typu

Mutantní buňky

3

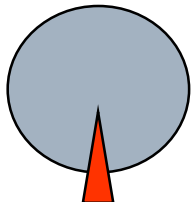
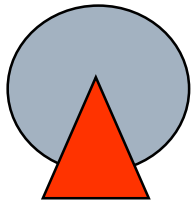
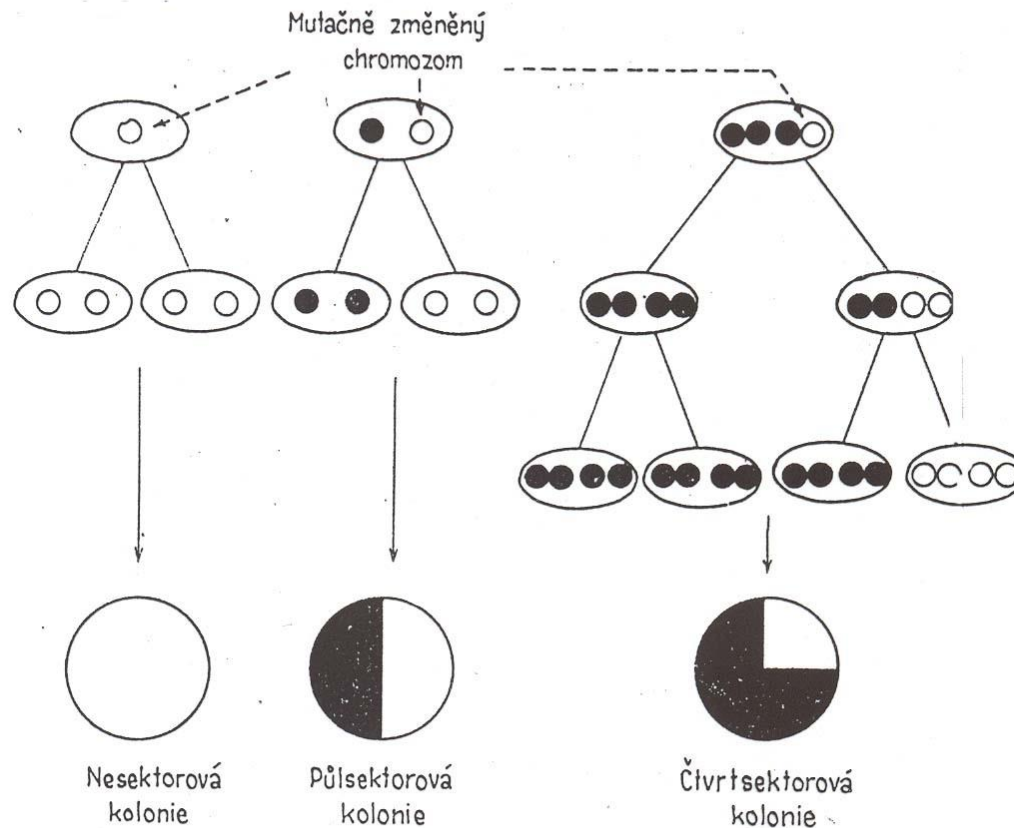
VZNIK SEKTOROVÝCH KOLONIÍ JAKO DŮSLEDEK SEGREGAČNÍHO LAGU

Počet chromozomů na buňku

1

2

4



Jaderná segregace a vznik sektorových kolonií.

Izolace supresorsenzitivních mutant

Tyto mutanty mají nesmyslný kodon v některém z genů. Vyskytují se v množství 1-1,5% mezi mutanty jakéhokoliv znaku. Detekují se tak, že se do mutantů vnese transdukujícím fágem alela supresorového genu (sup-) – lze vnést též na plazmidu.

Jestliže se kolonie **mutant daného znaku** (tj. různých mutant v tomto znaku, nejen sus!) přerazítkují na selektivní plotny s fágem, který obsahuje supresor, **vyrostou jen ty, které nesou mutaci podmíněnou vznikem nesmyslného kodonu, nikoliv ty, které mají jiný defekt v příslušném genu.**

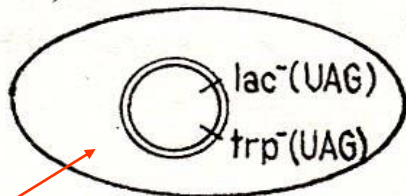
Další typy supresorových mutací:

Sense-mutace (aa1 → aa2)

Mutace ribozomových proteinů: snížené rozpoznání nebo polohování kodonu na mRNA na ribozomu

IZOLACE SUPRESORPOZITIVNÍCH MUTANT (Su+) (supresorových)

dvojnásobný mutant



Tato buňka obsahuje kodóny amber v genech lac a trp

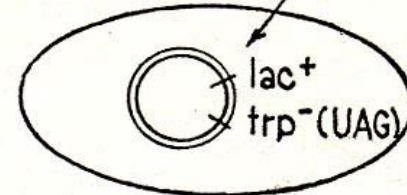
Důkaz: vnesení fága se Su+, reverze fenotypu

jednostupňová reverze

Mutace v genu sup (gen pro tRNA)

Důkaz: vnesení fága se sus, který na tomto kmeni poroste

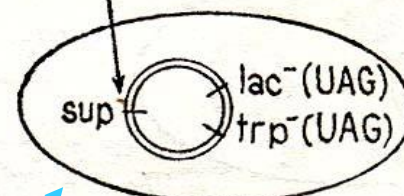
Reverze kodónu UAG



10⁻⁸

Su⁻ Lac⁺ Trp⁻
(Su⁻ Lac⁻ Trp⁺)

Vznik nové supresorové alely



10⁻¹⁶

Su⁺ Lac⁺ Trp⁺

Buňka vlevo má amber mutaci v genech lac a trp. Vpravo jsou znázorněny dva typy revertantů Lac⁺. Jeden se vytvořil vznikem nové supresorové alely a druhý vznikl reverzí v kodónu amber.

Flukтуаční test odpovídá na otázku, zda jsou mutace přítomny u organismu před jeho vystavením určitému faktoru, a nebo vznikají až po vystavení buněk tomuto faktoru?

TEORETICKÉ PŘEDPOKLADY FLUKTUAČNÍHO TESTU (LURIA A DELBRÜCK 1943)

- Pravděpodobnost mutace je velmi nízká, ale stejná pro každou buňku (10^{-6} - 10^{-10} buněk/generaci)
- Uvažujeme-li určitou kulturu, pocházející z jedné buňky, pak na konci kultivace bude počet mutant odrážet dobu, ve které mutace vznikla (tj. ve které generaci). Vzhledem k nízké pravděpodobnosti mutace lze předpokládat, že i počty mutant v jednotlivých klonech budou rozděleny podle Poissonovy řady - to proto, že záleží na generaci, ve které k mutaci došlo. Proto se budou významně lišit počty mutant v jednotlivých kulturách a v kultuře, kde byly buňky pěstovány dohromady.
- Při fyziologické adaptaci reagují buňky na přítomnost látky v prostředí - to působí jako indukční agens, které indukuje adaptivní odpověď (např. tvorbu enzymů apod). Počet reagujících buněk z různých kultur (klonů) je zhruba stejný. **Změna fenotypu se nedědí, dědí se jen schopnost se adaptovat.**

Flukтуаční test

Změna znaku
StrS → StrR

Mutace?

Adaptace?

Stejný počet buněk

Zásobní kultura
Str^S

Bujónová kultura

zředěno na $1 \cdot 10^3$ buněk/ml

Kontrola: důkaz citlivosti
výchozí kultury ke
streptomycinu

10ml

0,5 ml
v každé
zkumavce
20x

0,5 ml na každou
plotnu se strep-
tomycinem
20x

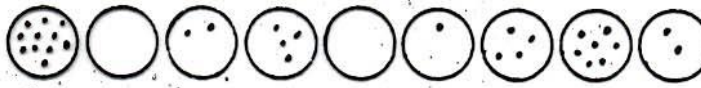
Inkubace 24-36 hod.

Počet kolonií
na plotně bez
streptomycinu

Agarová plotna
se streptomycinem

Obsah zkumavek vylit na
plotny se streptomycinem

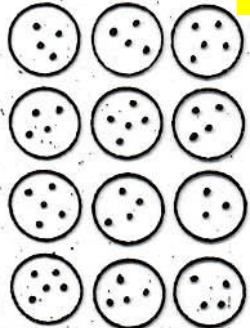
Rozsev pro stanovení
celkového počtu buněk



Průkazné rozdíly v počtech
kolonií na jednotlivých plotnách

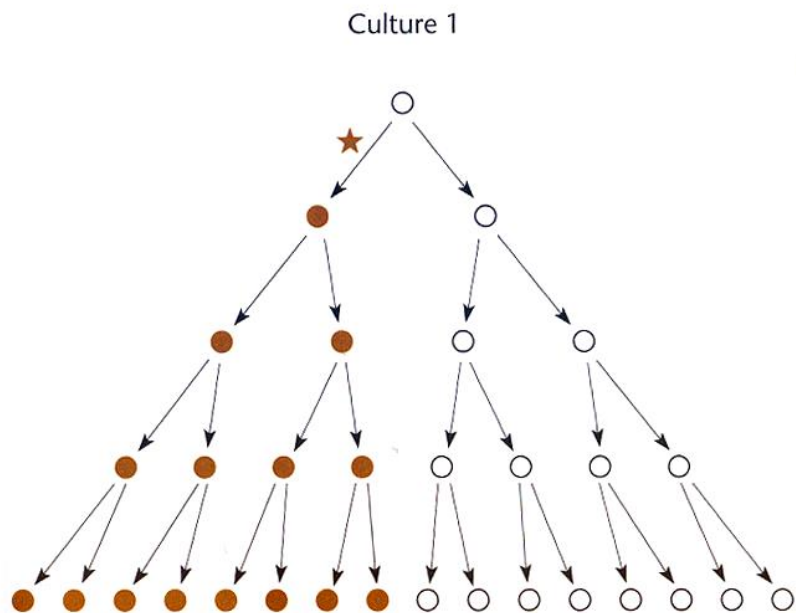
Výpočet chi-kvadrátu a stanovení průkaznosti rozdílů

Přibližně stejné
počty kolonií

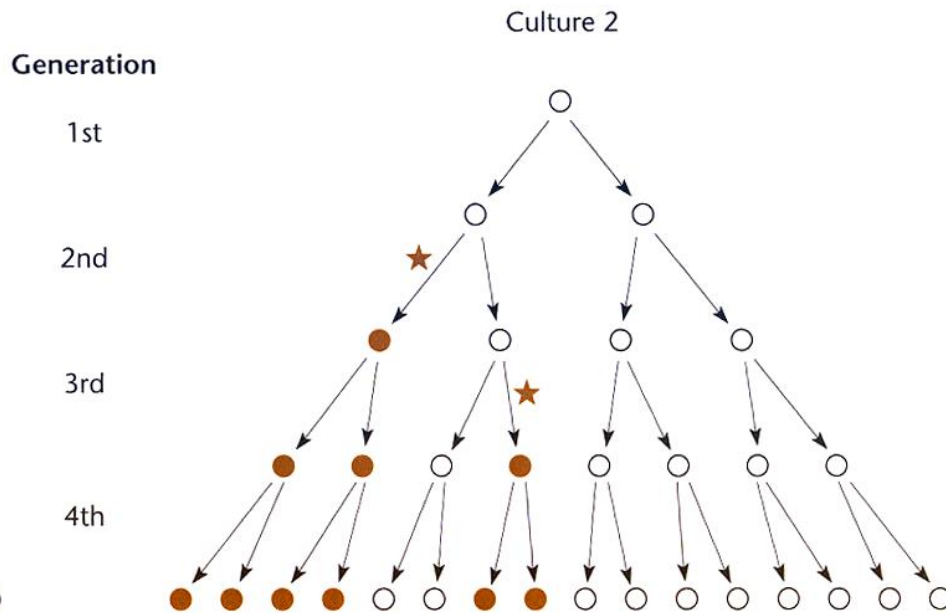


Závislost konečného počtu mutantů na době, v níž mutace proběhla

★ = mutace



jedna mutace: celkem 8 kolonií



dvě mutace: celkem 6 kolonií

Počty rezistentních bakterií z nerozdělené kultury a samostatných kultur

Alikvoty z nerozdělené kultury		Samostatné kultury	
Aliquot no.	No. of resistant bacteria	Culture no.	No. of resistant bacteria
1	14	1	1
2	15	2	0
3	13	3	3
4	21	4	0
5	15	5	0
6	14	6	5
7	26	7	0
8	16	8	5
9	20	9	0
10	13	10	6
		11	107
		12	0
		13	0
		14	0
		15	1
		16	0
		17	0
		18	64
		19	0
		20	35

PROVEDENÍ FLUKTUAČNÍHO TESTU

- **Má se rozhodnout, zda rezistence ke streptomycinu je výsledkem adaptace nebo mutace (zda jsou mutanty přítomny v kultuře před vystavením buněk selekčnímu agens nebo se objevují až poté)**
 - 1. Ověří se, zda je výchozí kultura citlivá k streptomycinu
 - 2. Řada zkumavek s médiem bez streptomycinu se naočkuje malým a stejným množstvím buněk
 - 3. Stejné množství buněk se naočkuje do Erlenky s objemem, který je součtem objemů v jednotlivých zkumavkách
 - 4. Kultury se ponechají inkubovat 24 hod
 - 5. Kultury se vysejí ve stejném množství na plotny se streptomycinem
 - 6. Vyhodnotí se počty kolonií na jednotlivých plotnách a srovnají se
 - 7. Vypočte se χ^2 a stanoví se, zda existují průkazné rozdíly v počtech kolonií na plotnách
 - 8. Průkazný rozdíl v počtu kolonií na plotnách z jednotlivých kultur ve srovnání s počty na plotnách z jedné kultury svědčí o tom, že rezistence ke streptomycinu vznikla mutací.

REPARACE MUTAČNĚ POŠKOZENÉ DNA

- **A. Přímé reparace**
 - 1. fotoreaktivace
 - 2. dealkylace

- **B. Nepřímé reaparace**
 - 1. Excizní reparace
 - bázová
 - nukleotidová
 - řízená metylací
 - 2. rekombinační /postreplikační/
 - 3. reaparace kroslinků

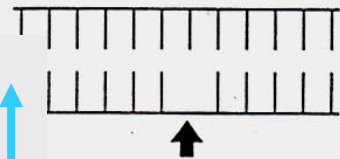
- **C. Inducibilní reparace**
 - 1. SOS-odpověď
 - 2. adaptivní odpovědi
 - na alkylační poškození
 - na environmentální stres

Genetický aparát pro reparaci DNA

- velmi konzervativní
- asi 100 genů
- distinktní dráhy,
které se mohou
prolínat

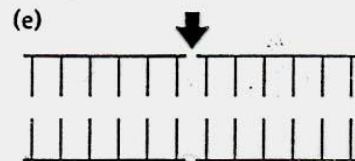
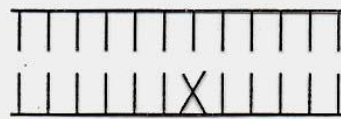
TYPY REPAROVATELNÝCH POŠKOZENÍ NA DNA

(a) **AP-místo**



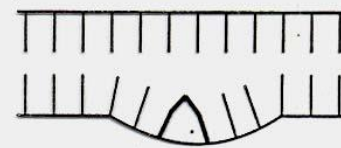
Jednořetězcový
zlom

(b) **Chybná báze**

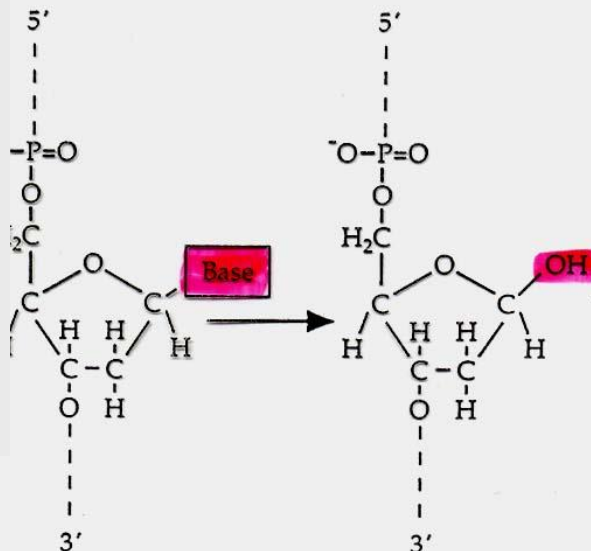


dvouřetězcový
zlom

(c) **Tyminový dimer**



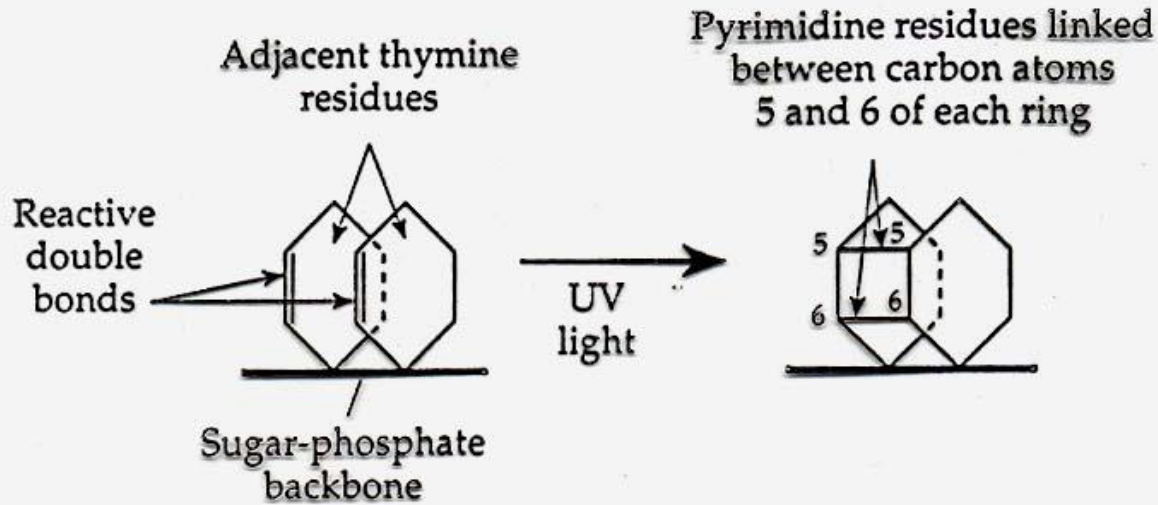
Kroslink



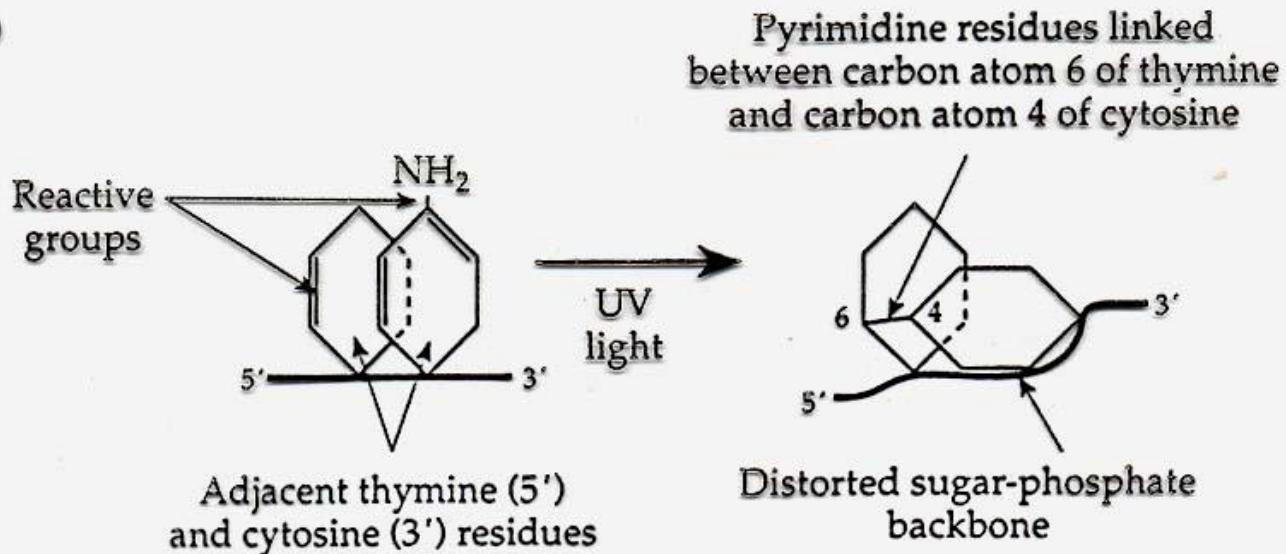
**Vznik AP míst =
nejčastější spontánní
mutace (depurinace je
100x častější než
depyrimidinace)**

Vznik pyrimidinových dimerů vlivem UV-záření

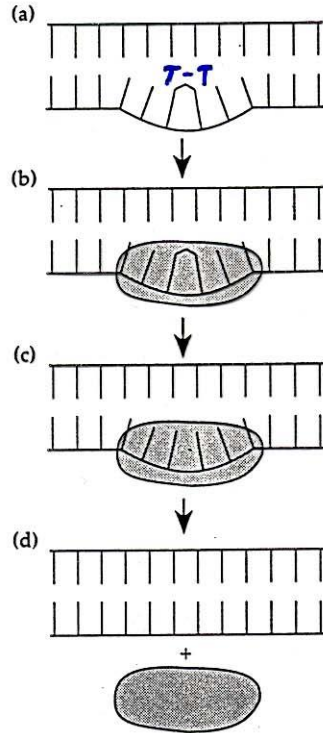
(a)



(b)



STÁDIA FOTOREAKTIVACE



DNA obsahující dimer
(dsDNA, ssDNA)

Vazba fotolyázy v místě
dimeru (6-7 bp)

Monomerizace dimeru za
přítomnosti světla (365-400 nm)

uvolnění fotolyázy

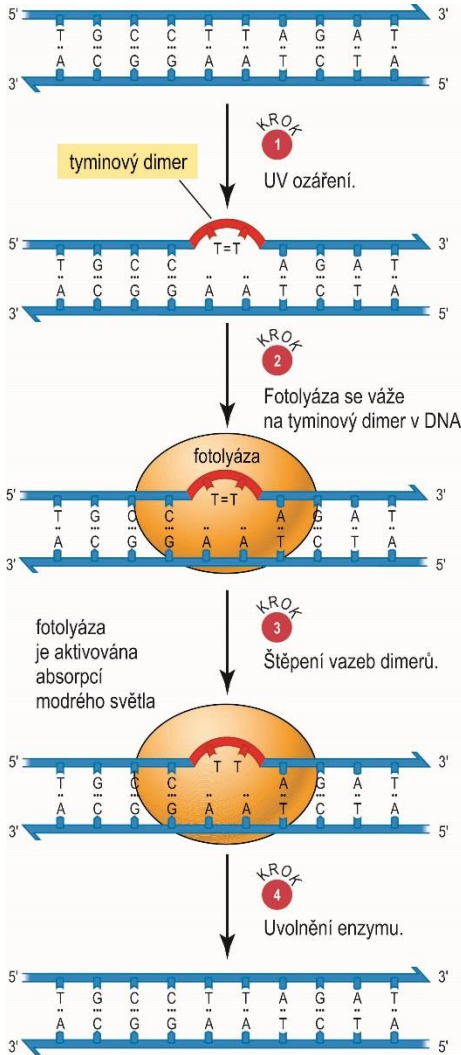
fotolýza

FADH₂

Folát/deazaflavin

zachycení světla

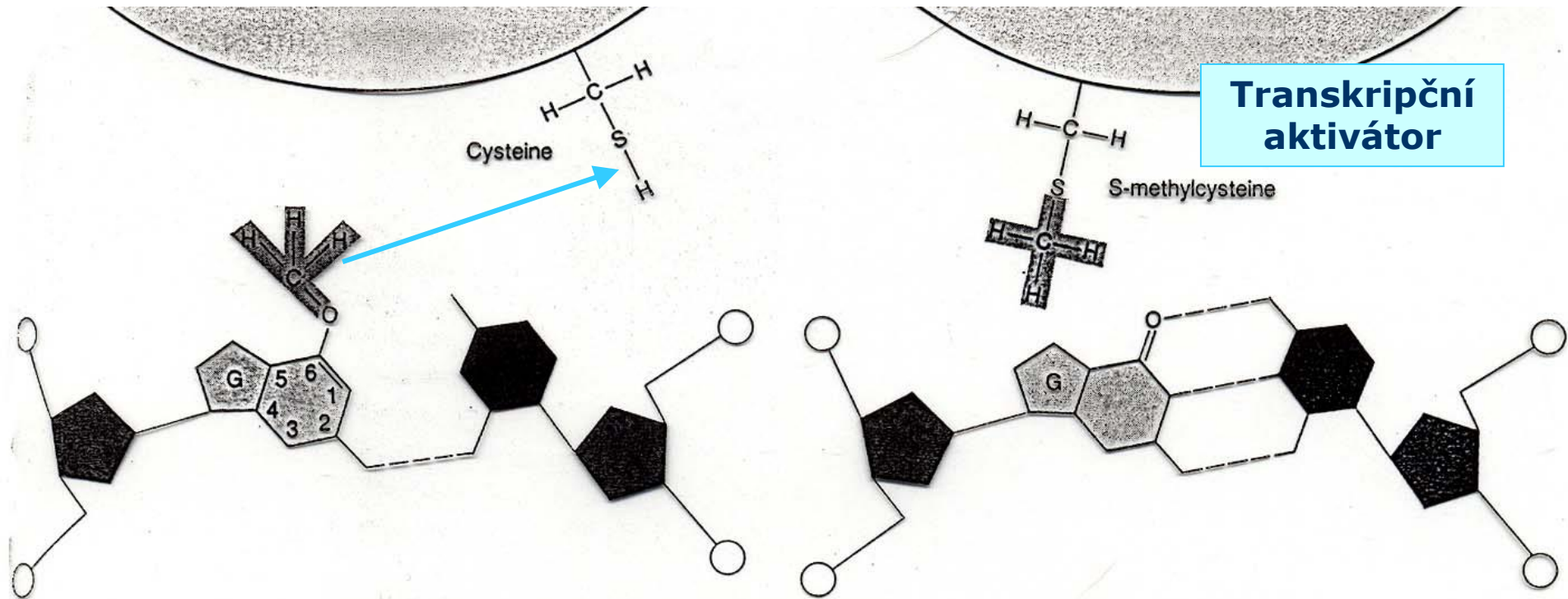
Fotorektivace



Alkyltransferáza: ⁶O-Metylguanin-DNA-metyltransferáza (⁶O-MGT= Ada-protein)

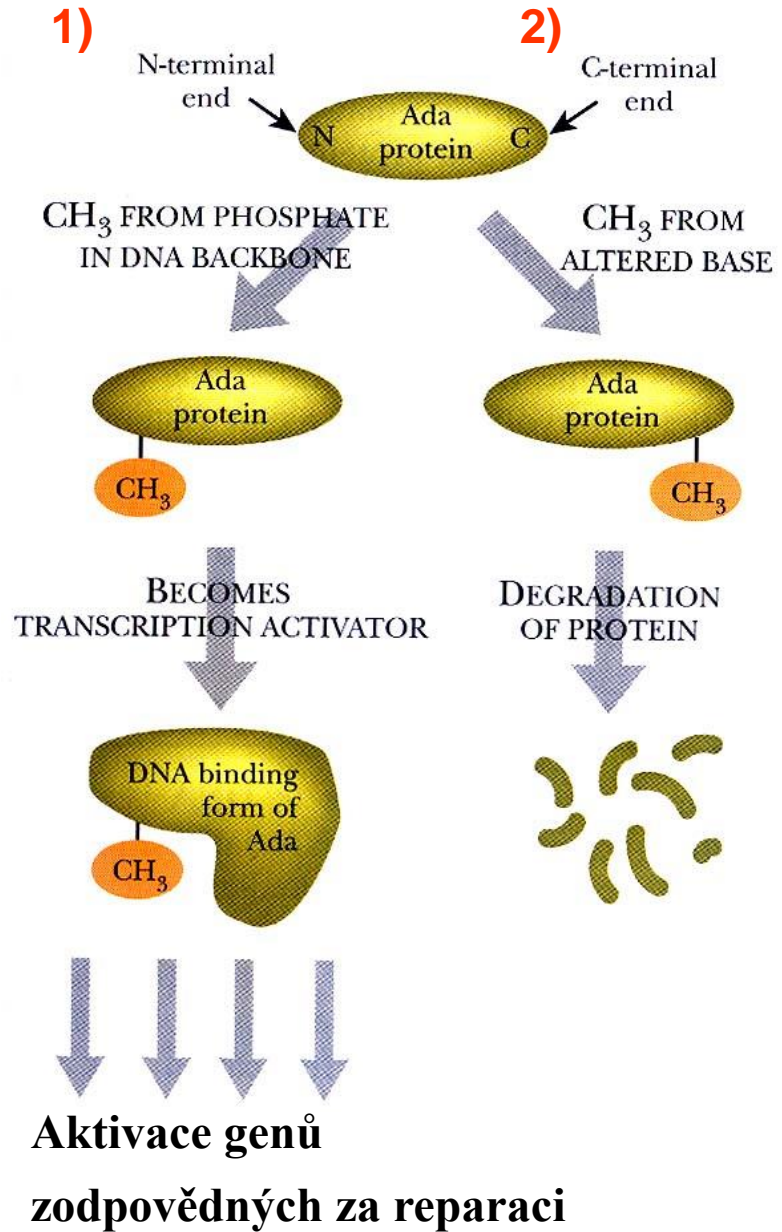
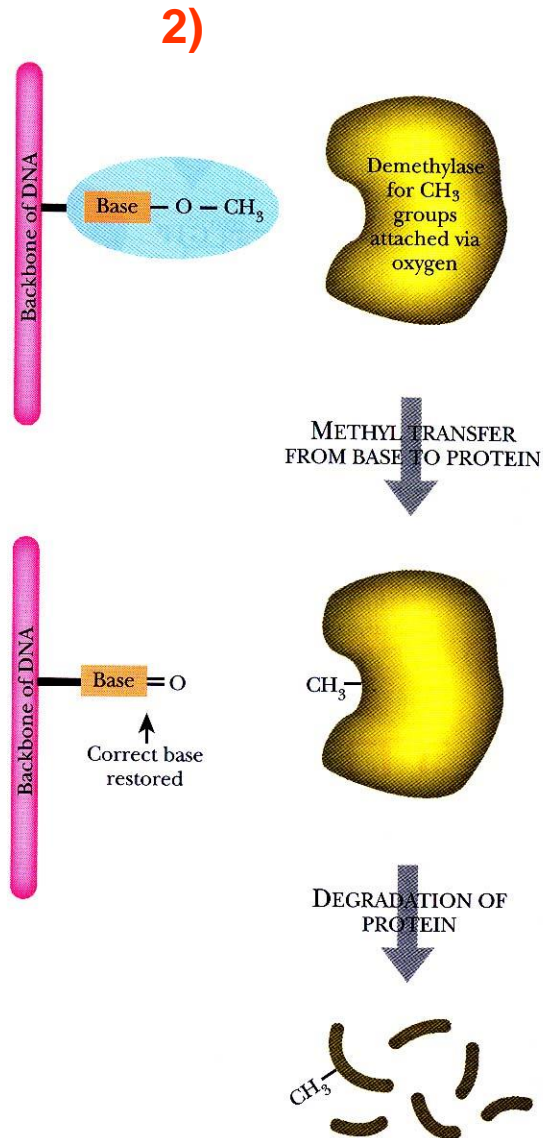
nemetylovaná forma

metylovaná forma



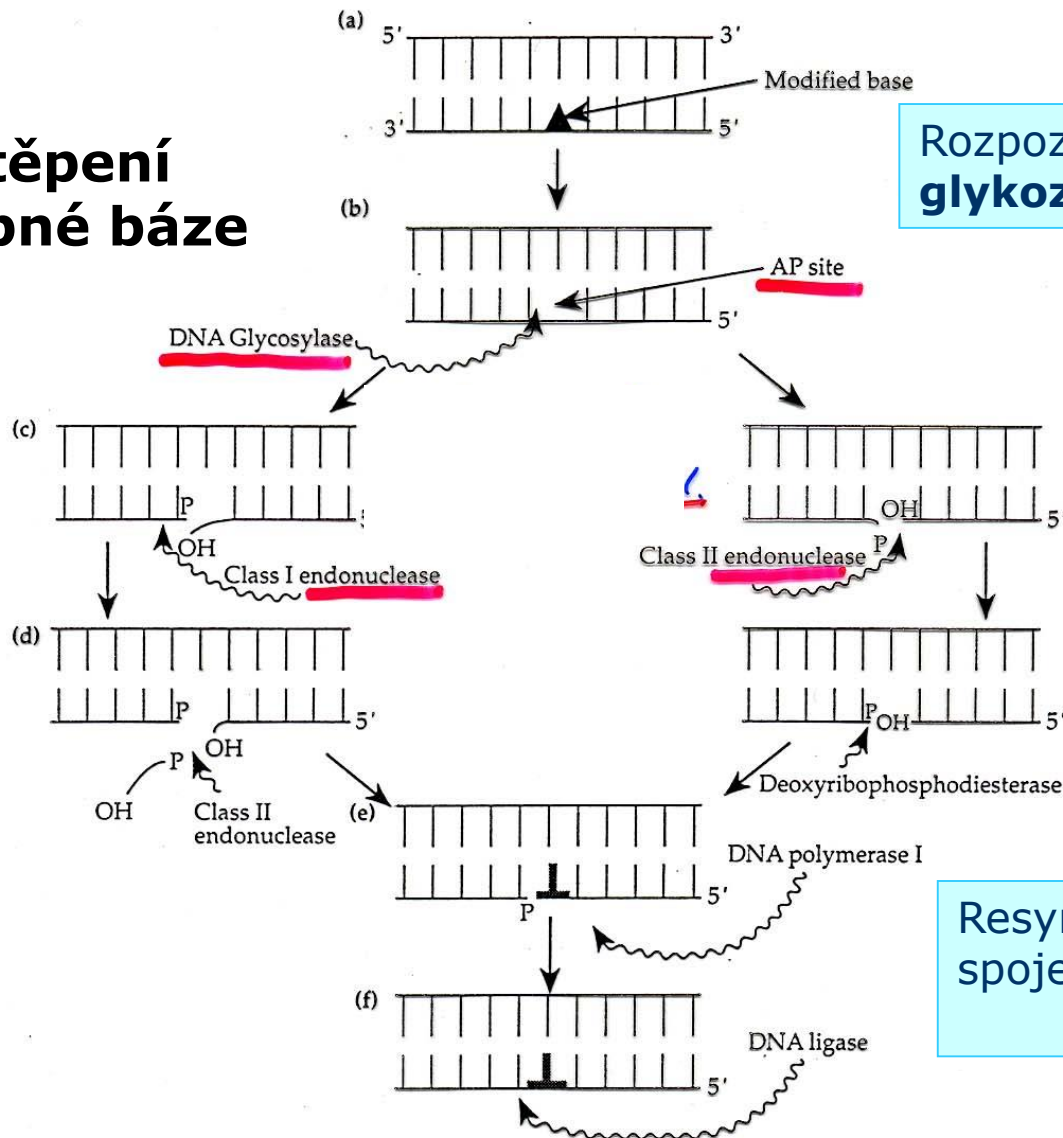
Přímá náprava poškození DNA (metylace G) alkyltransferázou. Metylace guaninu nitrozoguanidinem, který připojuje metylové skupiny na různá místa v DNA, včetně na kyslík v poloze 6 guaninu. To přeruší vodíkovou vazbu mezi guaninem a cytozinem. Reparaci zprostředkuje alkyltransferáza, která na sebe prostřednictvím svého cysteinu naváže metylovou skupinu, čímž se guanin vrátí do původního stavu

Dvojitá úloha proteinu Ada při reparaci alkylované DNA



BÁZOVÁ EXCIZNÍ REPARACE

Vyštěpení chybné báze



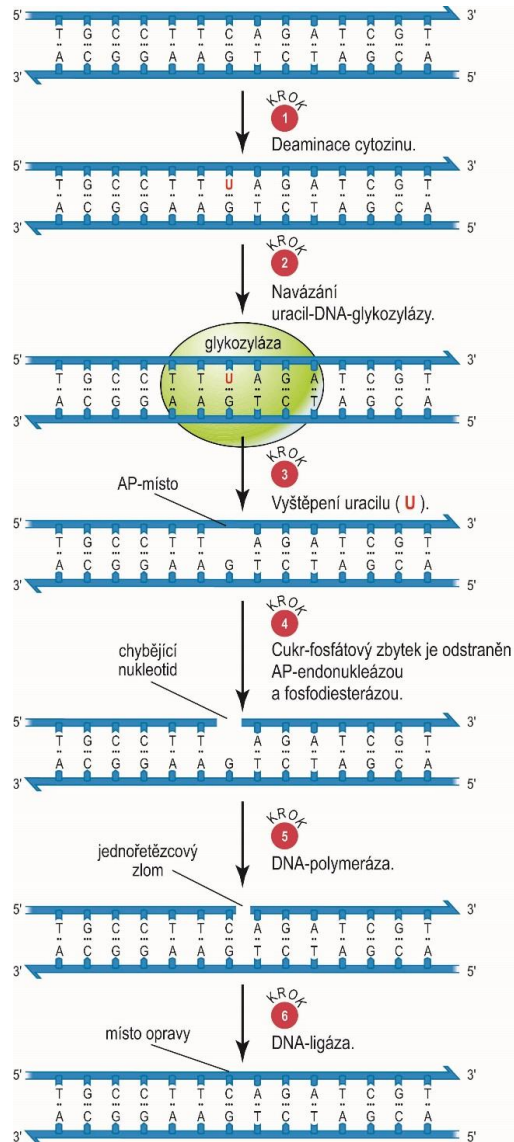
Rozpoznání chybné báze
glykozlázou, vznik AP-místa

Přerušení cukr-
fosfátových vazeb
AP-endonukleázami

Odstranění dR
s chybějící bází

Resyntéza chybějícího úseku,
spojení mezery DNA-ligázou

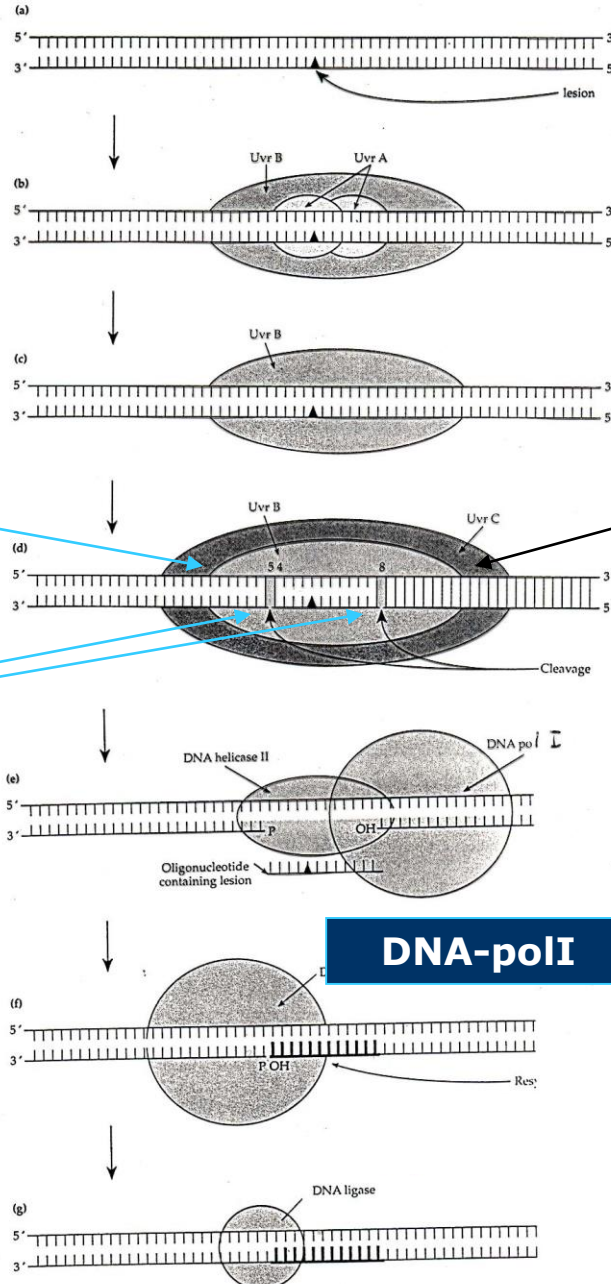
BÁZOVÁ EXCIZNÍ REPARACE



DNA-GLYKOZYLAZY PŮSOBÍCÍ NA POŠKOZENÉ DNA

Enzyme	Substrate	Products
Ura-DNA glycosylase	DNA containing uracil	Uracil + AP sites
Hmu-DNA glycosylase	DNA containing hydroxymethyluracil	Hydroxymethyluracil + AP sites
5-mC-DNA glycosylase	DNA containing 5-methylcytosine	5-methylcytosine + AP sites
Hx-DNA glycosylase	DNA containing hypoxanthine	Hypoxanthine + AP sites
Thymine mismatch-DNA glycosylase	DNA containing G-T mispairs	Thymine + AP sites
MutY-DNA glycosylase	DNA containing G-A mispairs	Adenine + AP sites
3-mA-DNA glycosylase I	DNA containing 3-methyladenine	3-Methyladenine + AP sites
3-mA-DNA glycosylase II	DNA containing 3-methyladenine, 7-methylguanine, or 3-methylguanine	3-Methyladenine, 7-methylguanine, or 3-methylguanine + AP sites
FaPy-DNA glycosylase	DNA containing formamidopyrimidine moieties, or 8-hydroxyguanine	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamido-pyrimidine and 8-hydroxy-guanine + AP sites
5,6-HT-DNA glycosylase (endonuclease III)	DNA containing 5,6 hydrated thymine-moieties	5,6-Dihydroxydi-hydrothymine or 5,6 dihydrothymine + AP sites
PD-DNA glycosylase	DNA containing pyrimidine dimers	Pyrimidine dimers in DNA with hydrolyzed 5' glycosyl bonds + AP sites

NUKLEOTIDOVÁ EXCIZNÍ REPARACE (SHORT PATCH REPAIR)



DNA obsahující poškození (T-T, chybný pár bazí aj)

Vazba UvrA2B1 } **SOS**
 disociace UvrA

vytvoření preincizního komplexu

vazba UvrC
 vytvoření incizního komplexu štěpení
 cukr-fosfátové kostry

vyštěpení krátkého oligonukleotidu o
 délce 11-13 b

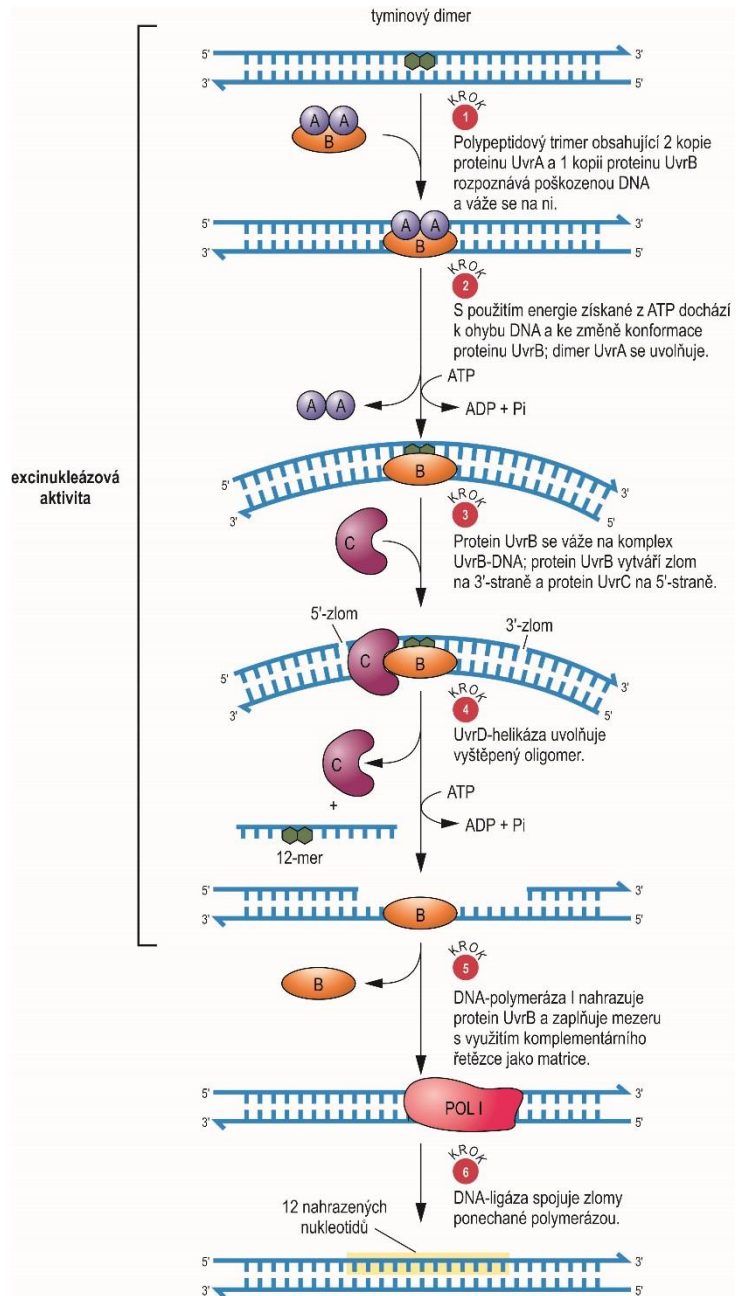
resyntéza chybějícího úseku DNA - jako
 templát slouží řetězec bez poškození

spojení mezery DNA-ligázou

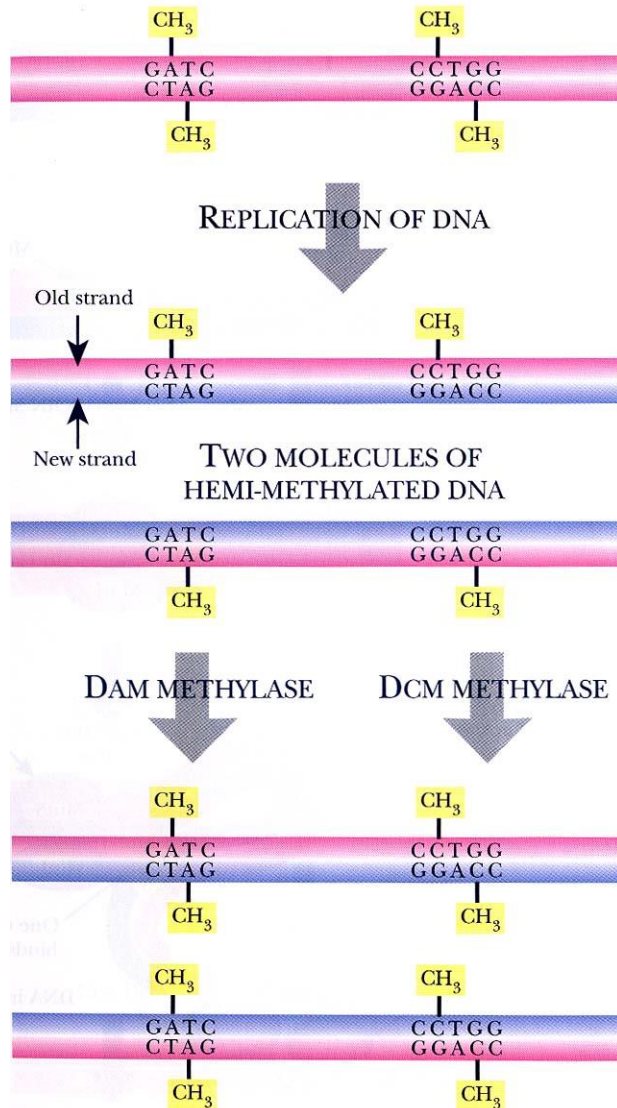
**UvrABC
 excinukleáza**

4-5b -x-- 8b

DNA-pol I



Methylace DNA místně-specifickými metylázami

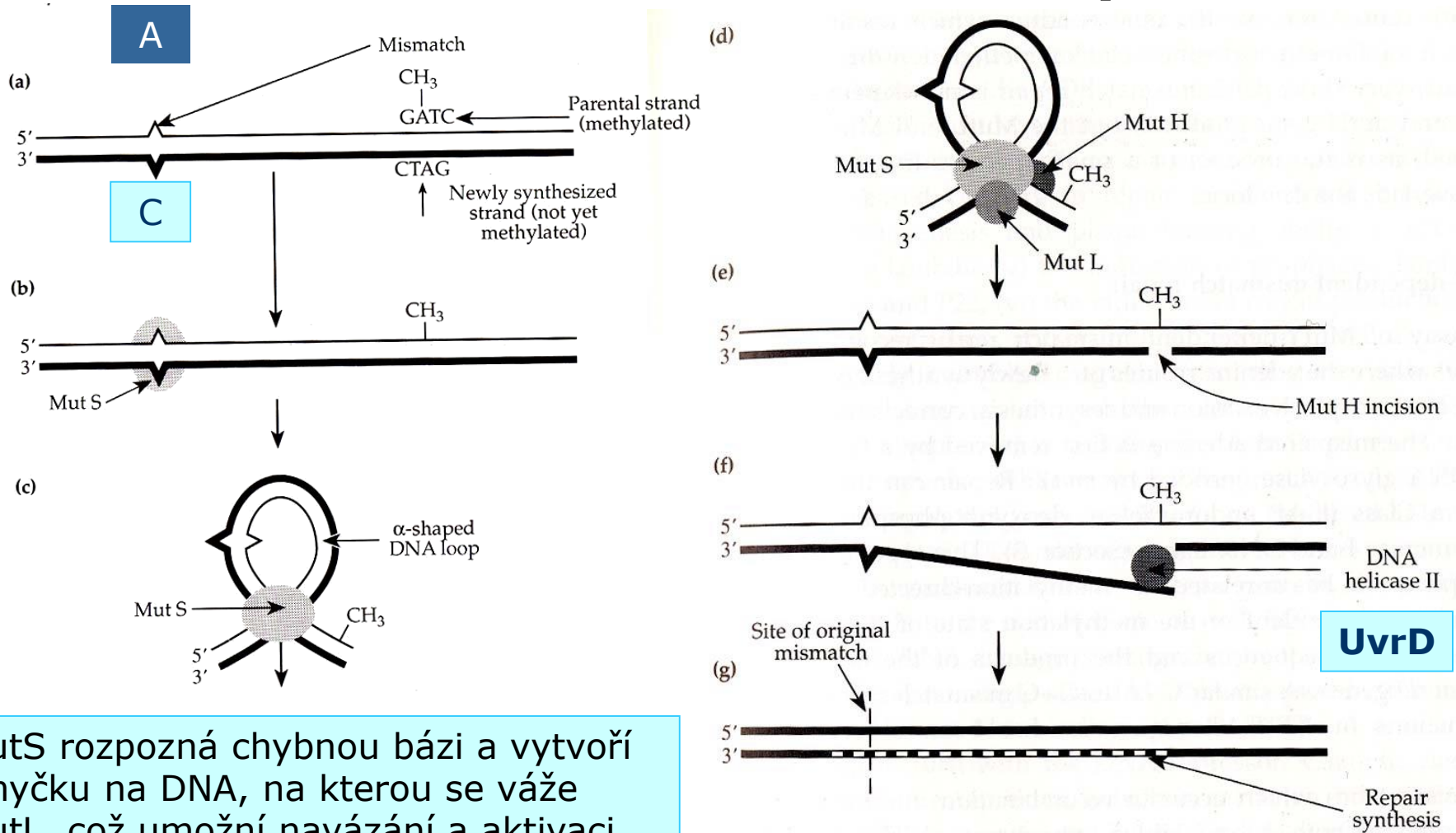


Rodičovská molekula

Dceřiné molekuly DNA
krátce po replikaci

Plně metylované dceřiné
molekuly DNA

REPARACE ŘÍZENÁ METYLACÍ (REPARACE NA DLOUHOU VZDÁLENOST)



MutS rozpozná chybnou bázi a vytvoří smyčku na DNA, na kterou se váže MutL, což umožní navázání a aktivaci MutH, která štěpí G v GATC - poté DNA-helikáza odmotá jednořetězec a ten je nahrazen reparační syntézou

A-C → A-T

DNA polymeráza III

POSTREPLIKAČNÍ REKOMBINAČNÍ REPARACE

Vznik mezery při syntéze DNA

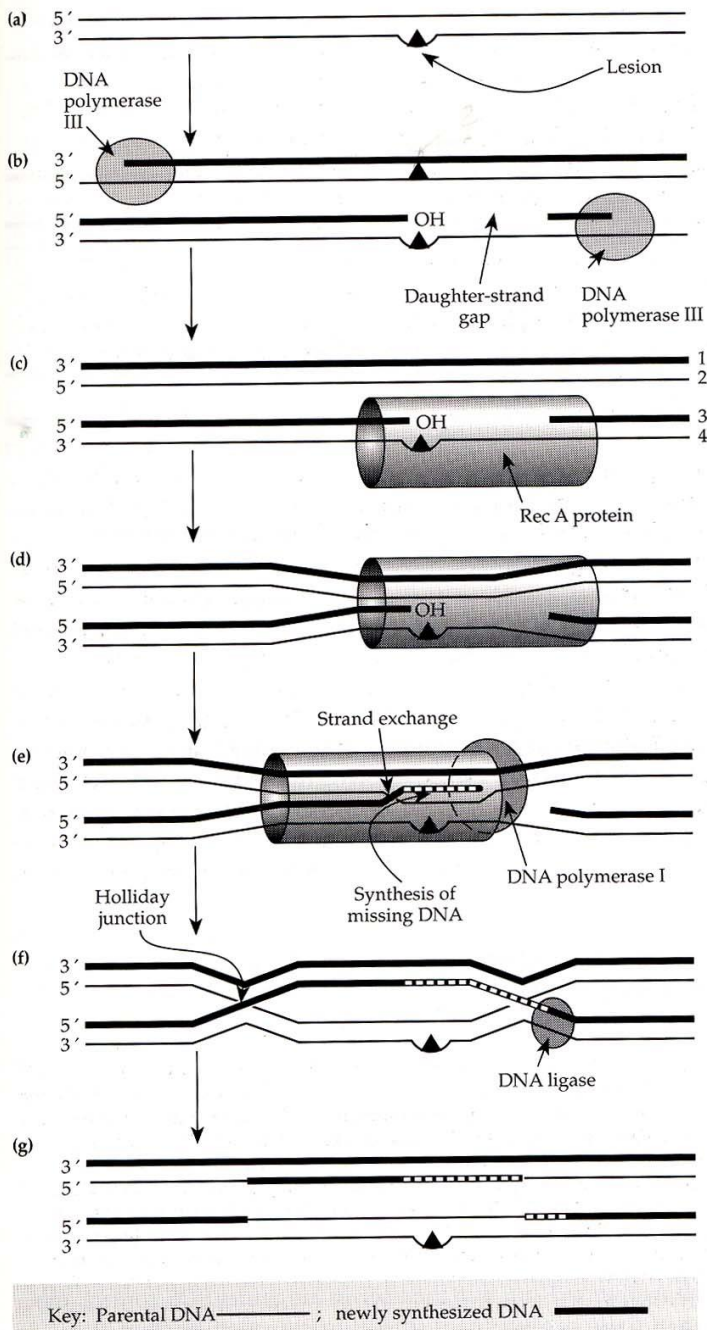
vazba proteinu RecA

navození homologního párování
neporušeného a porušeného řetězce

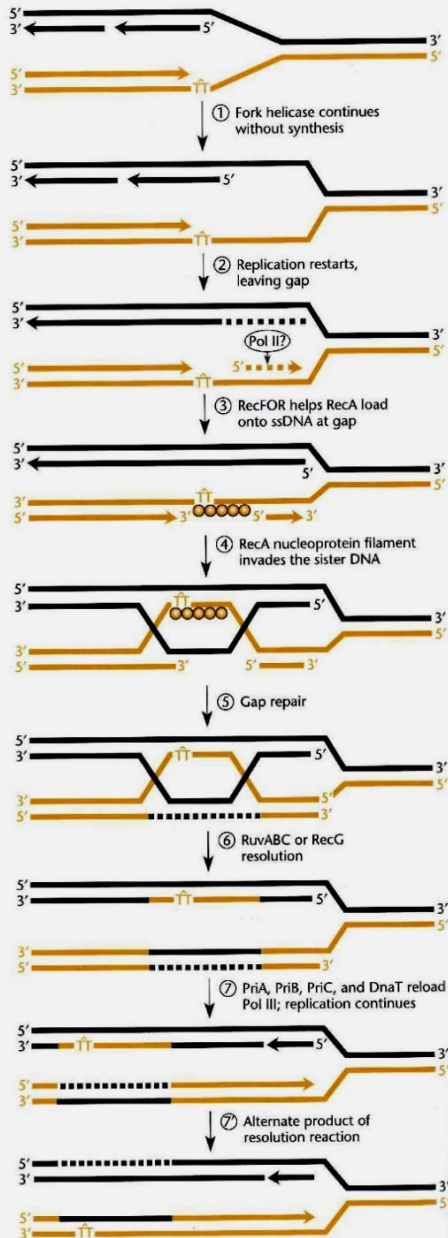
reparační syntéza DNA podle sesterského
řetězce

rekombinace homologních řetězců

poškození zůstává v jedné z molekul a je
opraveno později



Model replikativní reparace



Helikáza vytváří vidlici, ale syntéza DNA neprobíhá

Replikace opět probíhá za vzniku mezery na řetězci, na němž je poškození

Proteiny RecFOR napomáhají navázat protein RecA na řetězec s mezerou

RecA nukleoproteinový filament se váže na sesterskou DNA

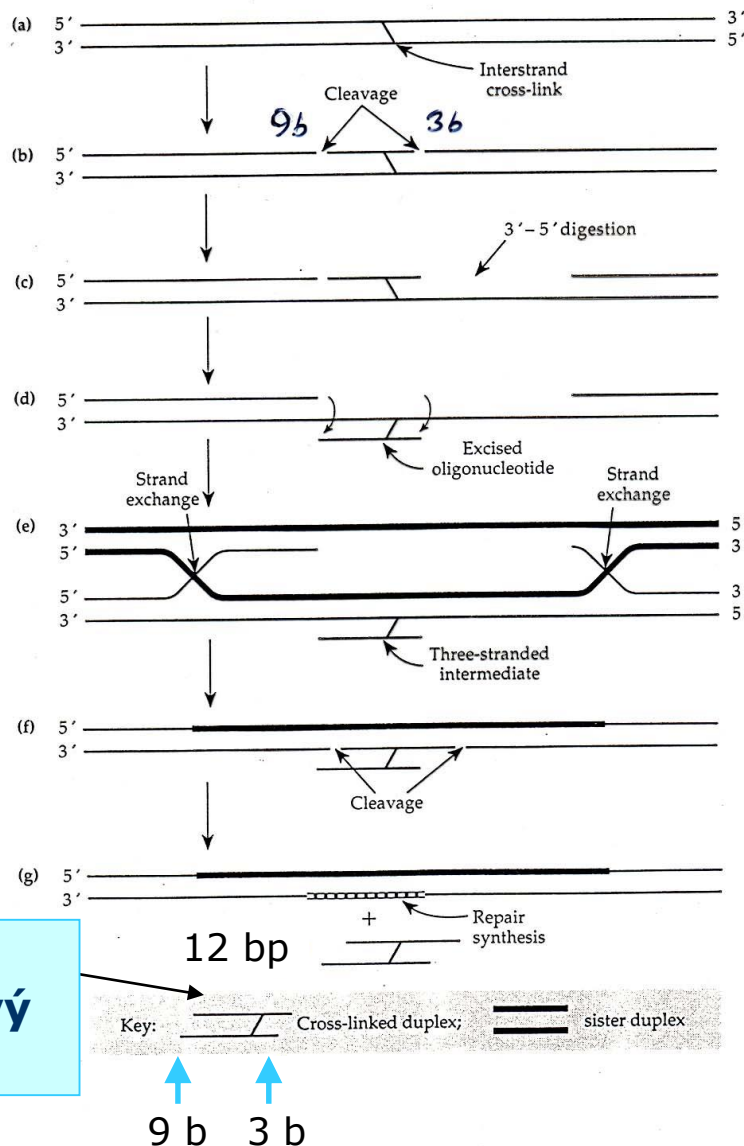
Mezera se zaplní

Proteiny RecABC nebo RecG rozloží rekombinovanou strukturu

Proteiny PriABC a DnaT opět připojí PolIII, replikace pokračuje

Produkt rozkladu, nesoucí poškození

REPARACE MEZIŘETĚZCOVÝCH SPOJENÍ (CROSS-LINK)



Vyštěpený dvouřetězcový fragment

DNA obsahující cross-link

Komplex UvrABC (endonukleáza) rozštěpí cukr-fosfátovou kostru na jednom řetězci po obou stranách

DNA-polymeráza I rozšíří mezeru svou 5'-3' exonukleázovou aktivitou

Za účasti RecA dojde k výměně řetězců ze sesterského duplexu (rekombinační reparační náhrada)

Komplex UvrABC vyštěpí oligonukleotid obsahující cross-link

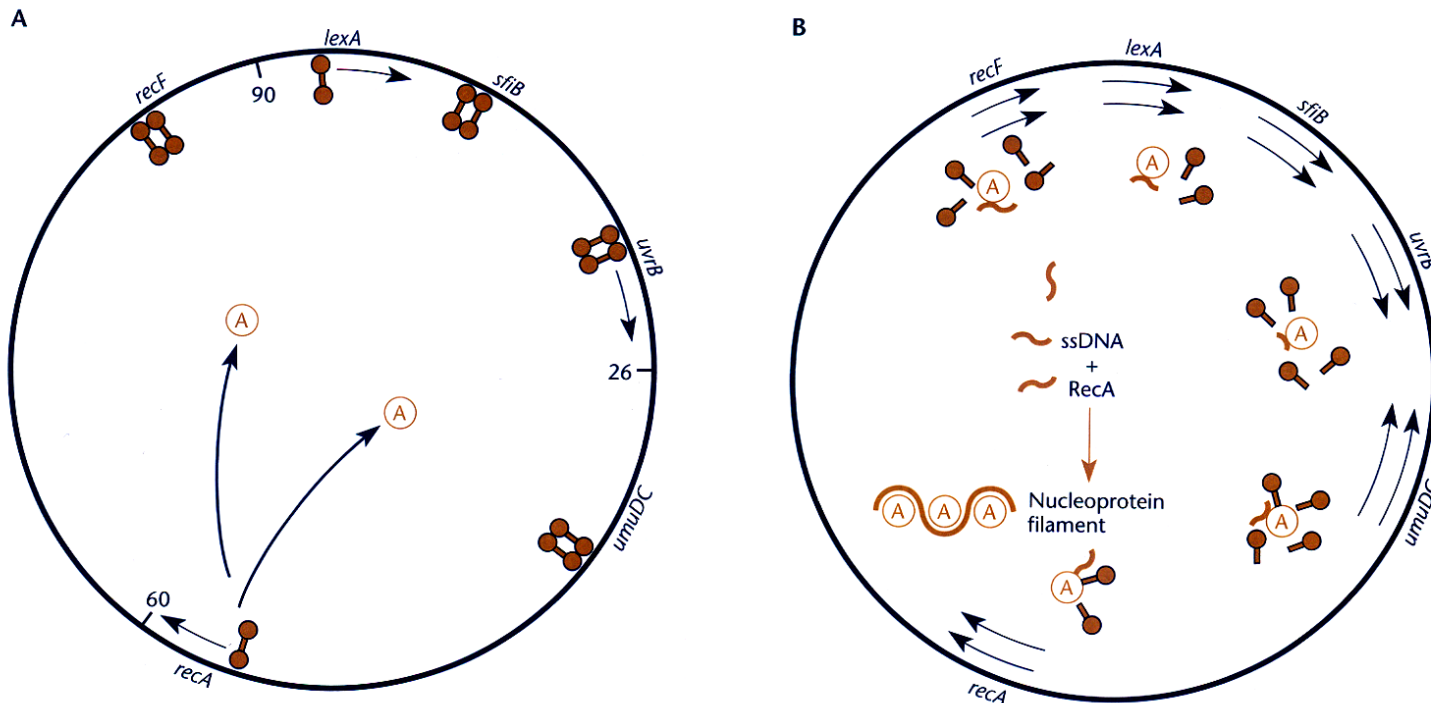
Mezera je zaplněna podobně jako při nukleotidové excizní reparaci (DNA-polI, DNA-helikáza, DNA-ligáza)

SOS-ODPOVĚĎ

geny din = damage induced, SOS-genes (31 genů u E. coli)

- 1. Indukce SOS mutageneze
- 2. Excizní reparace dlouhých úseků
- 3. Zvýšená schopnost reparace ds zlomů
- 4. Indukce profágů (lambda, P22, f80)
- 5. Indukce tvorby kolicinů
- 6. Zmírnění restrikce
- 7. Inhibice buněčného dělení

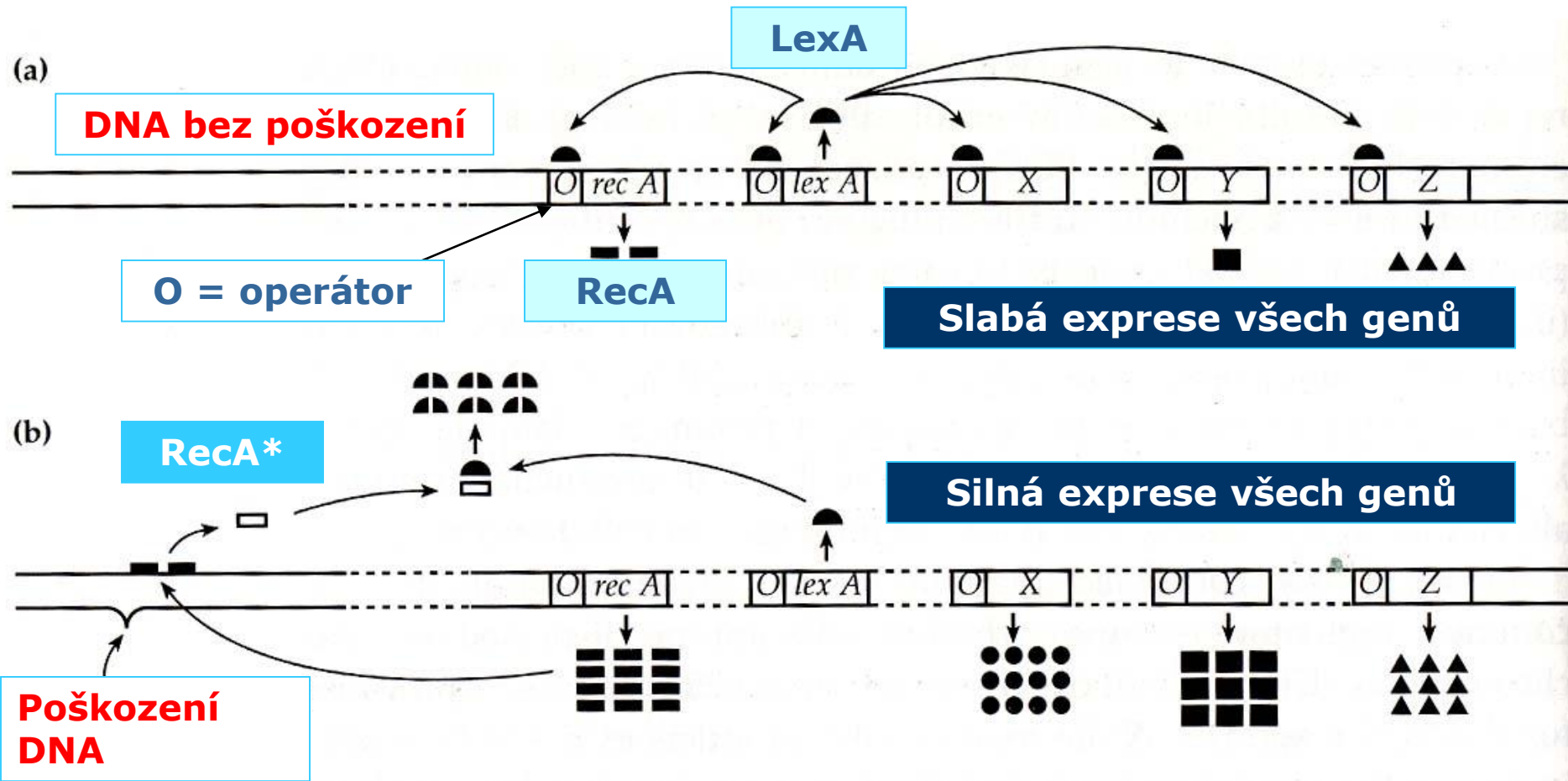
SOS-odpověď u *E. coli*



Neindukovaný stav: represor LexA se váže na operátory asi 30 SOS-genů a reprimuje jejich expresi

Po indukci: ssDNA se váže na RecA za tvorby **nukleoproteinového filamenta**, které váže LexA a štěpí ho, což vede k expresi SOS-genů

PRŮBĚH SOS-REPARACE

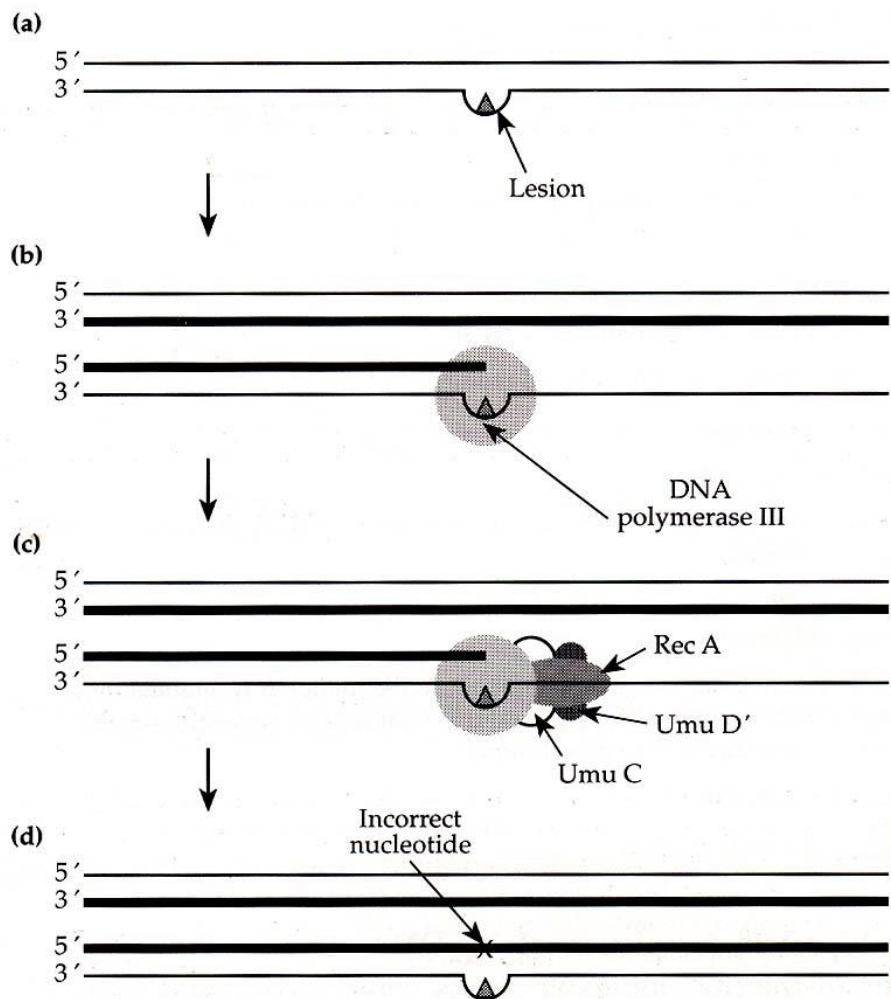


Key: Proteins

● Lex A;	■ Rec A;	● X;	■ Y;	▲ Z;
■ inactive	} Rec A protease;	● inactive	} Lex A repressor.	
□ activated		● activated		

LexA = dimer, podrobující se autokatalytickému štěpení za účasti RecA* (koproteáza)
helikální filament RecA-DNA

SOS-MUTAGENEZE (ERROR-PRONE = CHYBY NAVOZUJÍCÍ) - POSLEDNÍ ZÁCHRANA



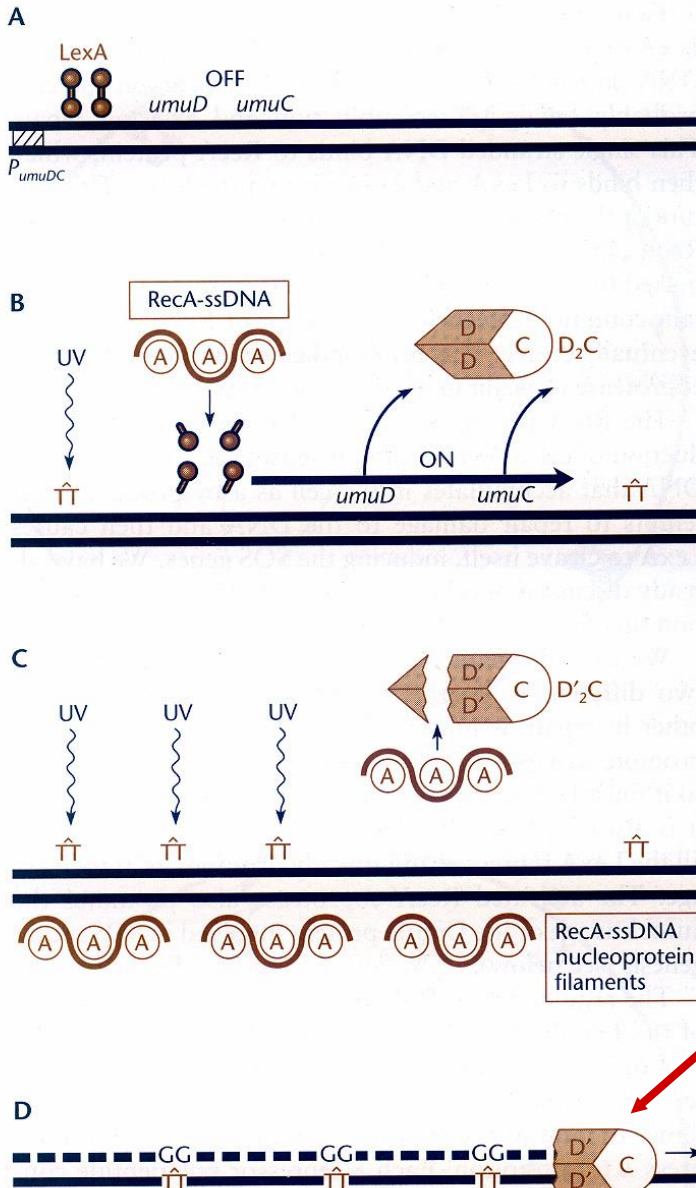
umu = **UV**-indukovaná **mutageneze**

DNA-polIII vytváří komplex s proteiny UmuC, UmuD a RecA, čímž dochází k inhibici opravy čtení

UmuD se působením RecA mění na UmuD', reakce je však pomalejší než štěpení LexA a proto je přednostně indukována standardní SOS-odpověď - ke štěpení UmuD dochází až při vysoké hladině RecA

Mutace fága lambda

Regulace SOS-mutageneze u *E. coli*

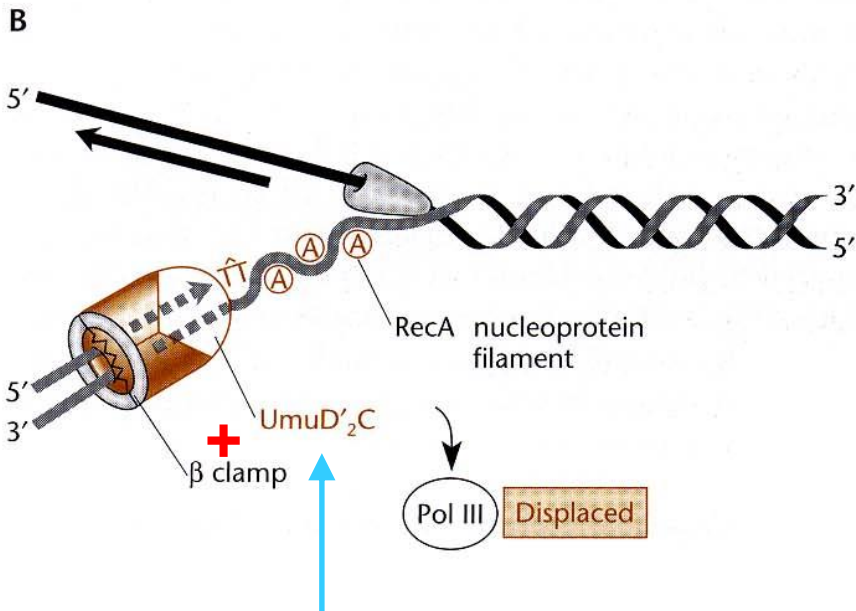
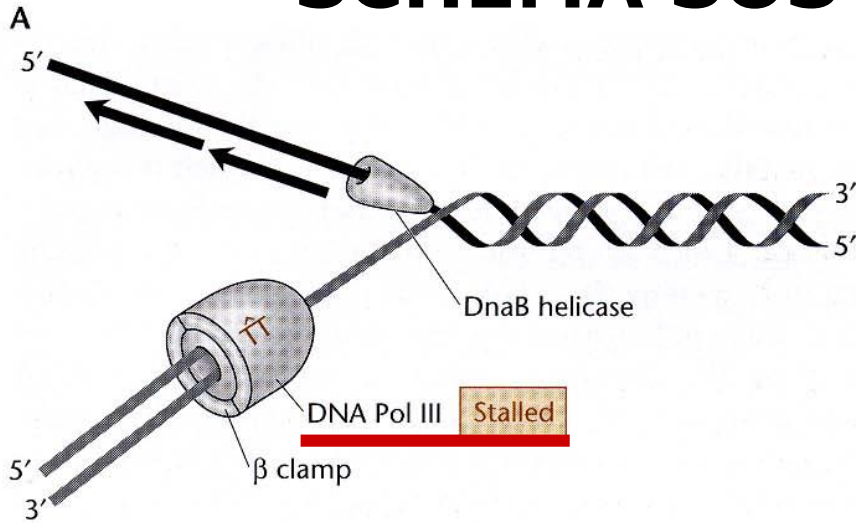


Před poškozením reprimuje LexA transkripci SOS-genů včetně operonu *umuDC*

Po mírném poškození DNA se RecA váže na ssDNA za tvorby RecA-nukleoproteinového filamenta, které se váže na LexA a ten je štěpen – dochází k expresi všech SOS-genů včetně *umuDC* (trimer UmuD₂C)

Po vysokém poškození se nahromadí RecA-np filamenta, která pak navodí štěpení UmuD a vytvoří se UmuD'₂C. **UmuC vázaný na UmuD'₂ je mutagenní polymeráza, která je schopná replikovat místa s poškozením za vzniku chyb (vkládá náhodně nukleotidy).**

SCHÉMA SOS MUTAGENEZE

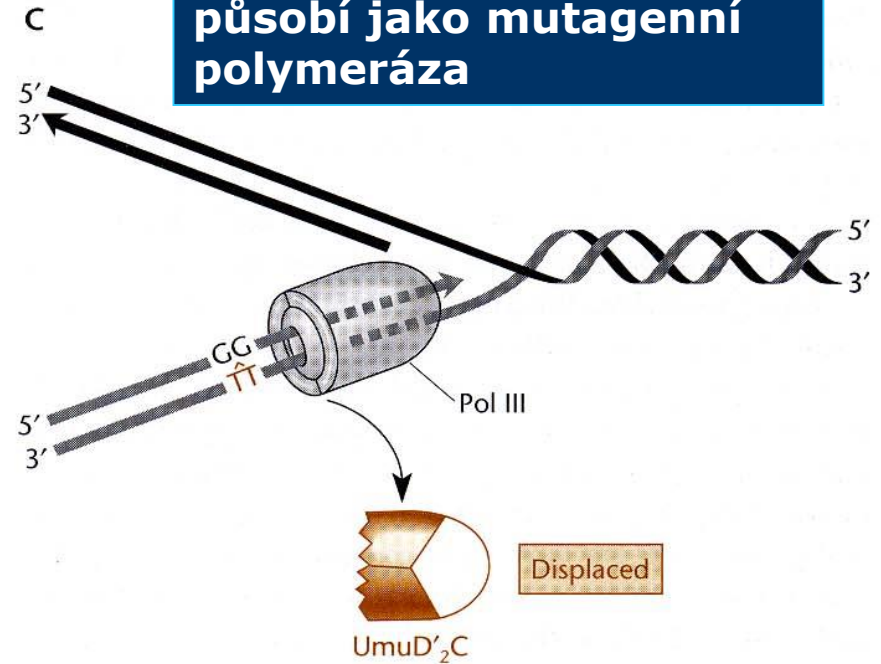


DNA-polymeráza V

Silné poškození DNA
RecA-ssDNA (RecA*)

UmuD \rightarrow UmuD'

Komplex UmuD'₂C
působí jako mutagenní
polymeráza



TLS = translesion synthesis

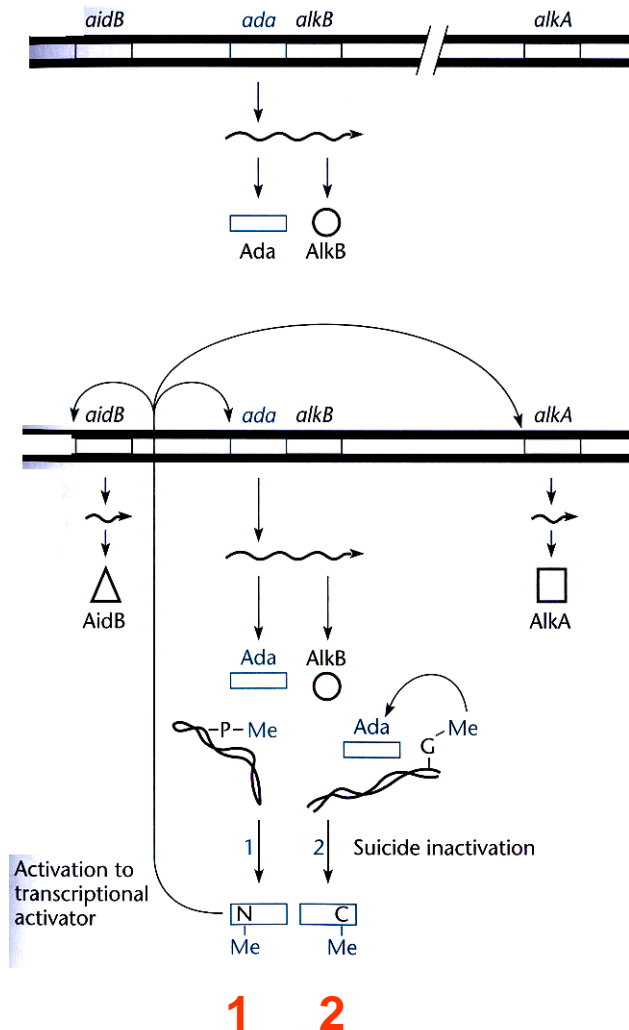
Další mutagenní polymerázy u bakterií

Polymeráza IV – produkt genu *dinB* u *E. coli* (jeden z SOS genů)

- Je příbuzná proteinu UmuC
- gen *dinB* je regulován represorem LexA
- při replikaci vytváří chyby i na nepoškozené DNA
- vytváří mutace v DNA infikujících fágů lambda
- **untargeted mutagenesis (UTM)** – důsledek působení mutagenních DNA-polymeráz

Biologická funkce?? – umožňuje replikaci DNA poškozené jinými typy poškození než těmi, která způsobuje UV

Regulace adaptivní odpovědi na alkylaci DNA

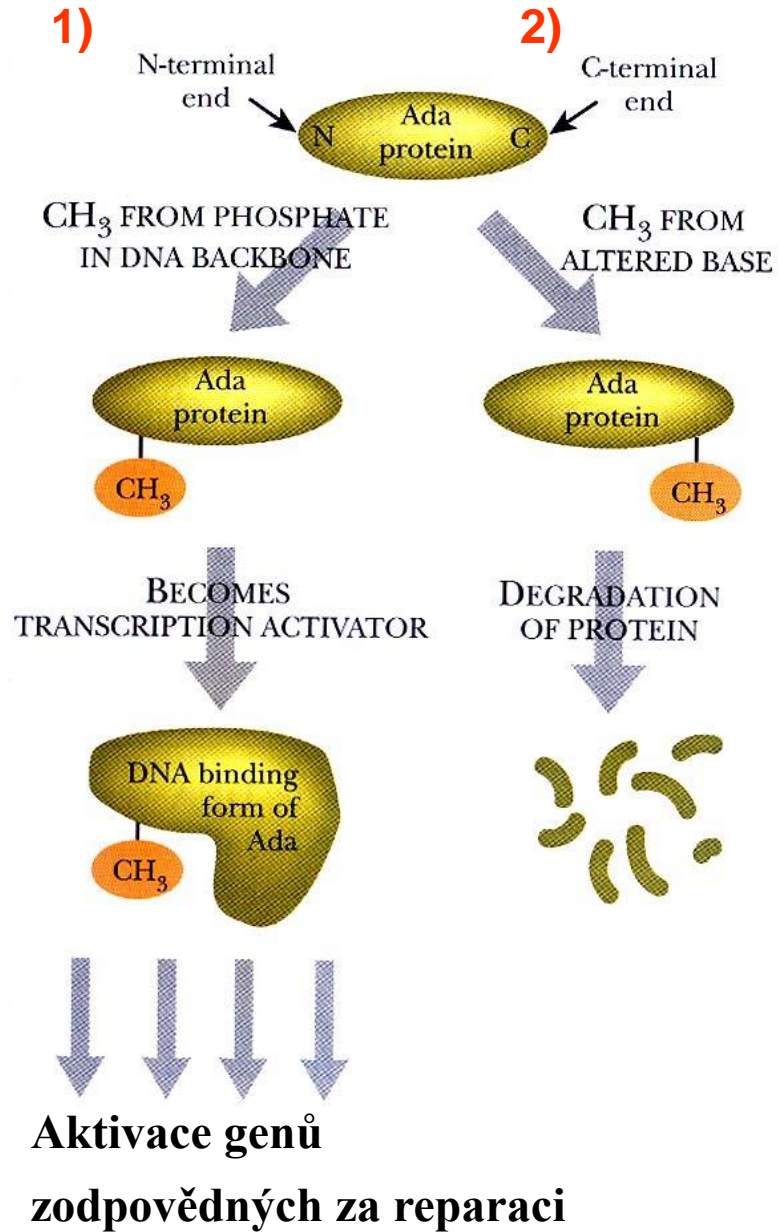
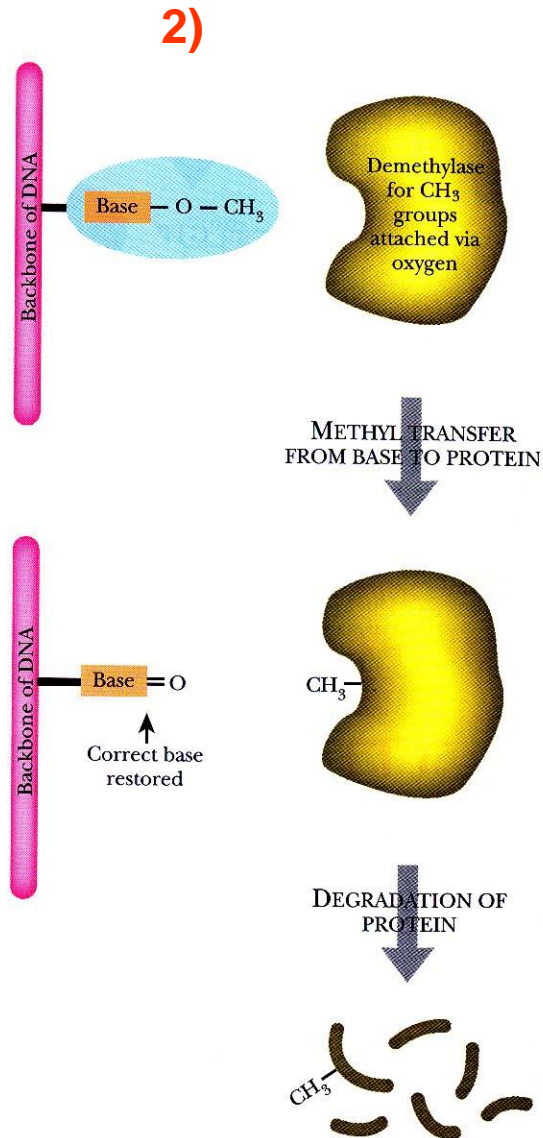


V buňce bez poškození se nachází jen několik molekul Ada proteinu. Po poškození DNA alkylační látkou přenáší Ada protein (metyltransferáza) alkylové skupiny z metylovaných fosfátů DNA na aminokyseliny umístěné na N- konci své vlastní molekuly, čímž se konvertuje na transkripční aktivátor (1), nebo přenáší alkylové skupiny z metylovaných bází na aminokyseliny na svém C-konci, což vede k inaktivaci Ada-proteinu (2).

Ke vzniku (1) dochází jen při silném poškození DNA, při nízkém poškození jsou pouze odnímány metylové skupiny z bází a protein Ada se inaktivuje.

biochemické funkce *alkB* a *aidB* zbývá objasnit

Dvojitá úloha proteinu Ada při reparaci alkylované DNA



Adaptivní odpovědi na environmentální stres

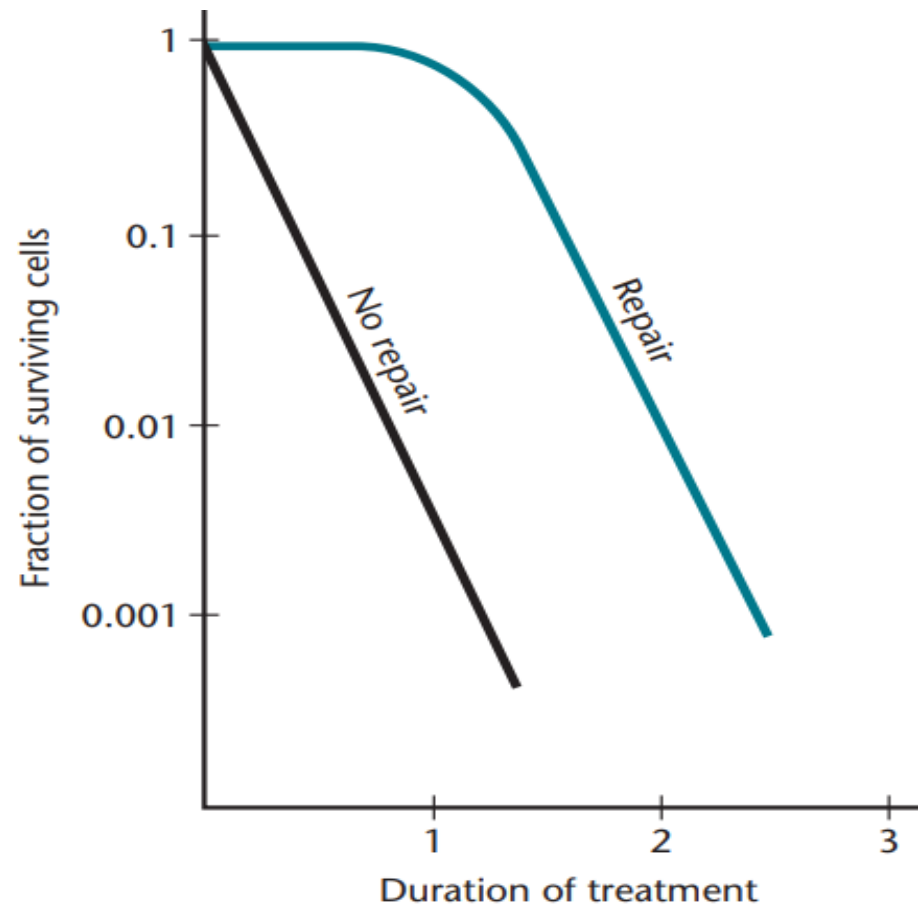
- Vystavení *E. coli* netoxickým koncentracím peroxidu vodíku vede ke zvýšení následné schopnosti korigovat DNA poškození způsobované vyššími dávkami této látky.
- Adaptace k oxidativnímu stresu je nezávislá jak na alkylačním poškození, tak SOS odpovědi, a nevyžaduje *ada*, *lexA* nebo *recA* proteiny.
- V přítomnosti peroxidu je indukováno nejméně 30 proteinů ze dvou regulonů. OxyR funguje jako pozitivní regulátor devíti genů, z nichž čtyři byly identifikovány: kataláza/peroxidáza, glutationreduktáza, mangan superoxiddismutáza, a NAD(P)H-dependentní alkyhydroperoxidreduktáza.

Mutátorové kmény u *E. coli*

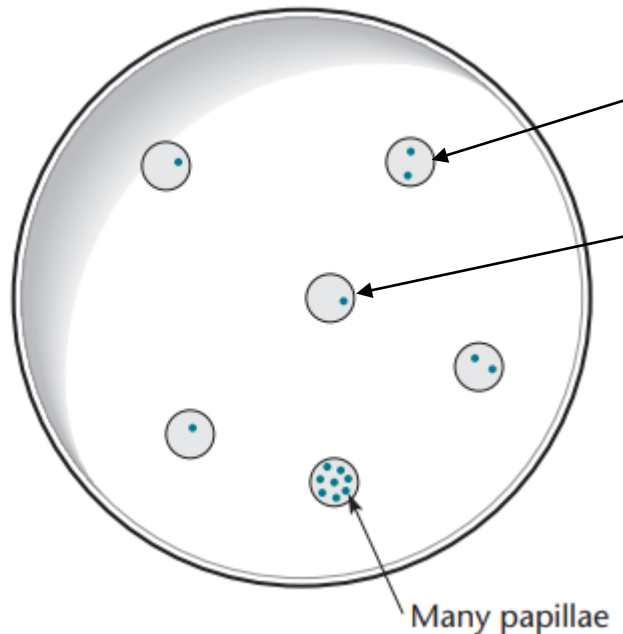
Locus	Map position (min)	Specificity	Strength	Defect (if known)
<i>mutT</i>	2	A:T → C:G transversions	Moderate	Prevents incorporation of A:8-oxodG mispairs by hydrolyzing 8-oxodGTP
<i>mutH</i>	61	G:C → A:T and A:T → G:C transitions; frameshifts	Strong	Lacks methyl-directed mismatch repair system
<i>mutL</i>	95	G:C → A:T and A:T → G:C transitions; frameshifts	Strong	Lacks methyl-directed mismatch repair system
<i>mutS</i>	59	G:C → A:T and A:T → G:C transitions; frameshifts	Strong	Lacks methyl-directed mismatch repair system
<i>uvrD</i> (<i>mutU</i>)	86	G:C → A:T and A:T → G:C transitions; frameshifts	Strong	Lacks helicase II and the methyl-directed mismatch repair system
<i>mutD</i>	5	All base substitutions; frameshifts	Very strong	Altered ε subunit of DNA polymerase III
<i>mutY</i>	64	G:C → T:A transversions	Moderate	Lacks glycosylase that corrects G:A and 8-oxodG: mispairs
<i>mutM</i>	82	G:C → T:A transversions	Moderate	Fapy glycosylase (8-oxodG glycosylase)
<i>mutA</i>	95	A:T → T:A, G:C → T:A, and A:T → C:G transversions	Moderate	
<i>mutC</i>	42	A:T → T:A, G:C → T:A, and A:T → C:G transversions	Weak/moderate	
<i>dam</i>	74	G:C → A:T and A:T → G:C transitions; frameshifts	Moderate	Lacks DNA adenine methylase
<i>ung</i>	56	G:C → A:T transitions	Weak/moderate	Lacks uracil-DNA glycosylase
<i>sodA</i>	88		Weak	Lacks superoxide dismutase, manganese
<i>oxyR</i>	89		Weak	Lacks positive regulator of oxidative damage genes
<i>polA</i>	87	Frameshifts; deletions	Weak/moderate	Lacks DNA polymerase I

Důkaz přítomnosti a působení reparačních mechanismů

Přežívání buněk jako funkce doby a koncentrace působení mutagenu. Ohyb na křivce vpravo ukazuje na přítomnost reparačního mechanismu.



Izolace kmenů *mut* (mutátorů), u nichž jsou mutovány geny pro reparační systémy. V těchto kmenech vznikají mutace s abnormálně vysokou frekvencí.



Kolonie tvořené buňkami s funkčními geny *mut* – reverze mutace v genu *lacZ* probíhá vzácně, kolonie jsou bílé, modrých papil je málo

Kolonie tvořené buňkami s mutovanými geny *mut* – reverze v genu *lacZ* jsou časté, modrých papil je mnoho

Kolonie obsahující papily (sektory) v důsledku vzniku mutantů *mut*. Na plotny s X-Gal jsou vysety buňky kmene s mutací v genu *lacZ* (tyto tvoří bílé kolonie). Revertanty mutace *lacZ* vytvářejí modré papily, přičemž mutant *mut* vytváří větší počet papil než standardní buňky v důsledku zvýšené frekvence vzniku spontánních mutací (nedochází k jejich reparaci).

