

# 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**
  - haploidní genom (malá velikost)
  - velký počet potomstva za krátkou dobu
  - snadný přenos genů mnoha způsoby
  - snadná selekce
  
- **Způsoby mutageneze**
  - klasická mutageneze (chemomutageny, fyzikální faktory)
  - transpozonová mutageneze (biologické mutageny)
  - mutátorové kmeny (mutace v reparačních mechanismech)
  - mutageneze *in vitro*
  - editace genomů (např. 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<sup>R</sup>**)
  - delece =  $\Delta$
  - inzerce =  $::$
  - plazmid, profág = *E. coli* (RP4,  $\phi$ 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)
- **supresenzitivní (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**

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

Table 16. Genotypes of Frequently Used Bacterial Strains.

Strain	Genotype
C600 (1)	F <sup>-</sup> , <i>thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ<sup>-</sup></i>
C600Hfl (1)	F <sup>-</sup> , <i>thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ<sup>-</sup>, hflA150, [chr:Tn10]</i>
DH1 (2)	F <sup>-</sup> , <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, relA 1<sup>-</sup>, λ<sup>-</sup></i>
DH5α	F <sup>-</sup> , <i>φ80d, lacZΔM15, endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1, d<sup>-</sup>, gyrA96, Δ(lacZYA-argF), U169<sup>-</sup></i>
DH5αF'	<i>φ80d, lacZΔM15, endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1, d<sup>-</sup>, gyrA96, Δ(lacZYA-argF), U169</i>
HB101 (3)	F <sup>-</sup> , <i>hsdS20 (r<sub>s</sub><sup>-</sup>, m<sub>s</sub><sup>-</sup>), supE44, recA13, ara14, proA2, rpsL20 (str<sup>r</sup>), xyl-5, mlt-5, supE44, λ<sup>-</sup></i>
JM83 (4)	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL, φ80, lacZΔM15</i>
JM101 (4)	<i>thi, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
JM103 (2)	<i>endA1, hsdR, supE, sbcB15, thi-1, strA, Δ(lac-pro), [F', traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
JM105 (4)	<i>endA1, thi, rpsL, sbcB15, hsdR4, Δ(lac-pro), [F', traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
JM107 (4)	<i>endA1, thi, syrA96, hsd17, λ<sup>-</sup>, relA1, supE44, Δ(lac-pro), [F', traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
JM108 (4)	<i>endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-pro)</i>
JM109 (4)	<i>endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44, λ<sup>-</sup>, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
JM109 (DE3) (4)	<i>endA1, recA1, syrA96, thi, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15], 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<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
LE392 (5)	F <sup>-</sup> , <i>hsdR574 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, supF58 lacY1, or Δ(lac1ZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55, λ<sup>-</sup></i>

Strain	Genotype
KW251	F <sup>-</sup> , <i>supE44, galK2, galT22, metB1, hsdR2, mcrB1, mcrA<sup>-</sup>, argA81: Tn10, recD1014</i>
NM522 (6)	<i>supE, thi, Δ(lac-proAB), Δhsd5 (r<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>), [F', proAB, lacI<sup>o</sup>ZΔM15]</i>
NM538 (7)	<i>supF, hsdR (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>)</i>
NM539 (7)	<i>supF, hsdR (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) (P2)</i>
RR1 (3)	F <sup>-</sup> , <i>hsdS20 (r<sub>s</sub><sup>-</sup>, m<sub>s</sub><sup>-</sup>), supE44, ara14, proA2, rpsL20 (str), xyl-5, mlt-5, supE44, λ<sup>-</sup></i>
X1776 (3)	F <sup>-</sup> , <i>tonA53, dapD8, minA1, glnV44, (supE44), Δ(gal-uvrB) 40, λ<sup>-</sup>, 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<sup>-</sup>, m<sup>+</sup>), 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<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>)</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)		$\lambda$ 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	$\beta$ -D-galactosidase
<i>leuA</i>	Leucine	$\alpha$ -Isopropylmalate synthase
<i>leuB</i>	Leucine	$\beta$ -Isopropylmalate dehydrogenase
<i>metA</i>	Methionine	homoserine transsuccinylase
<i>metB</i>	Methionine	cystathionine $\alpha$ -synthase
<i>mitA</i>	Mannitol	Mannitol-specific enzyme II of phosphotransferase system
P2 (2)		$\lambda$ phages containing the <i>red</i> and <i>gam</i> genes of $\lambda$ are growth inhibited by P2 lysogens
<i>proA</i>	Proline	$\alpha$ -glutamyl phosphate reductase
<i>proB</i>	Proline	$\alpha$ -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 $\phi$ 80
<i>tonB</i>	T-one	uptake of chelated iron and cyanobalamin
<i>xylA</i>	Xylose	D-xylose isomerase
Miscellaneous		
F <sup>-</sup>	host does not contain an episome	
F <sup>'</sup>	host contains episome with stated features	
$\lambda$ <sup>-</sup>	bacteriophage lambda DNA is not integrated into genome of bacterial host	

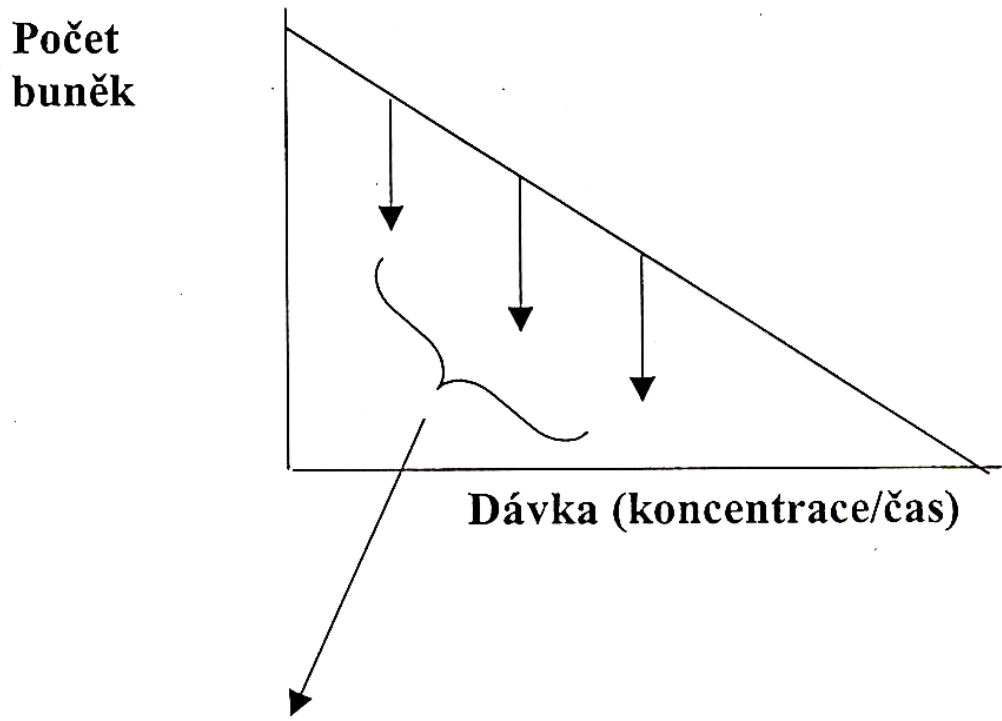
**References:**

- 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.

# Mutageny používané u bakterií

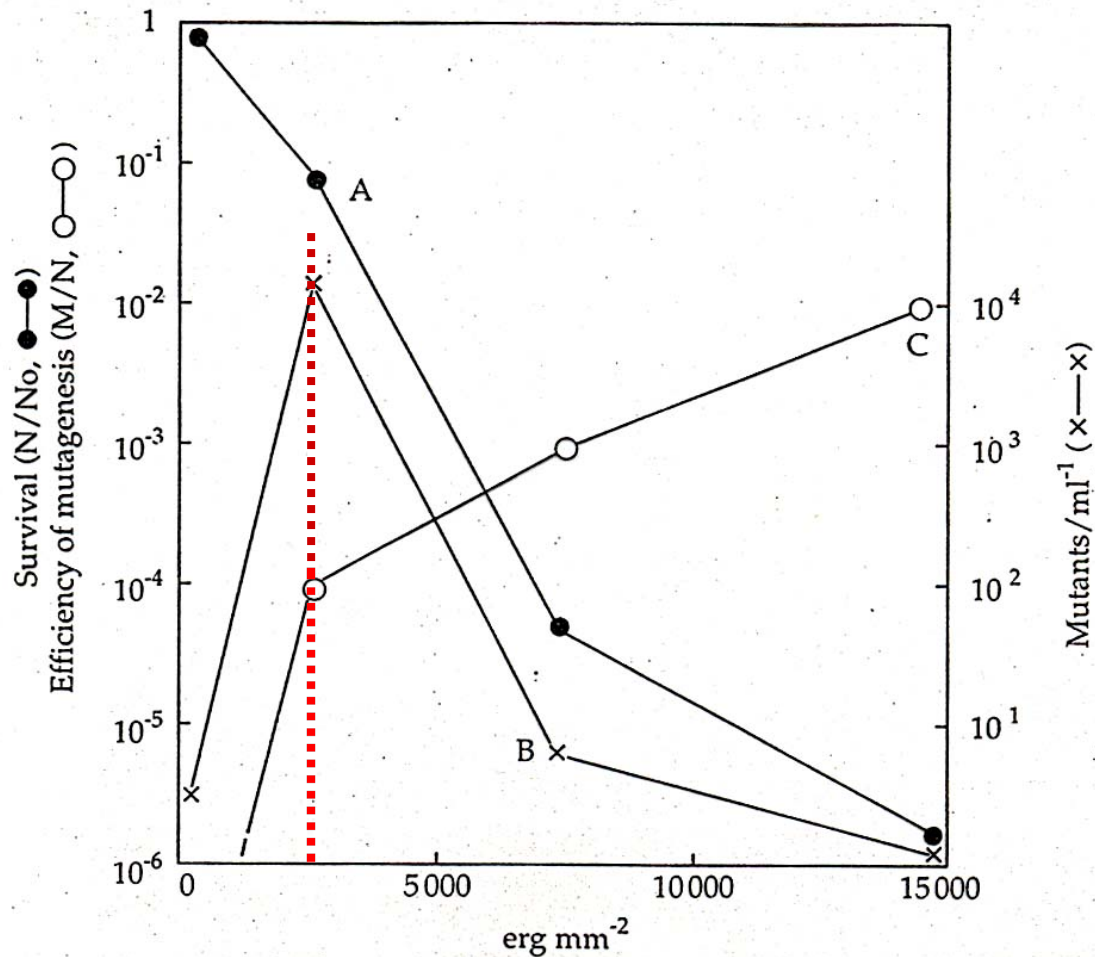
Mutagen	Apparent <i>in vivo</i> specificity	Additional advantages	Disadvantages
2-AP (2-aminopurine)	transitions A:T $\rightleftharpoons$ G:C		in some cases a weak mutagen
5-BU (5-bromouracil)	transitions A:T $\rightleftharpoons$ G:C		must depress normal thymine incorporation; weak mutagen
NH <sub>2</sub> 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
Fág Mu a další transpozony	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



Stanovení počtu mutant v jednotlivých intervalech působení mutagenu





Závislost počtu mutant na dávce záření (koncentraci mutagenu)

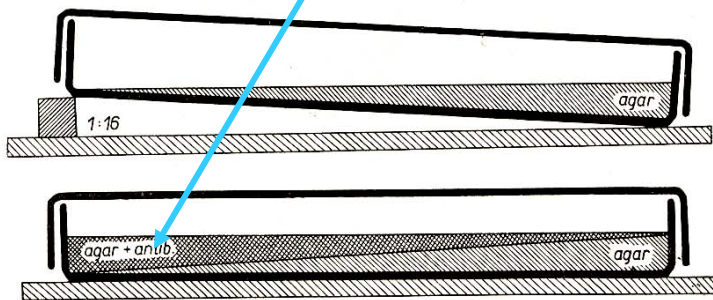
..... Optimální koncentrace mutagenu, kdy vzniká nejvyšší počet mutant

# POSTUPY PŘI IZOLACI MUTANT

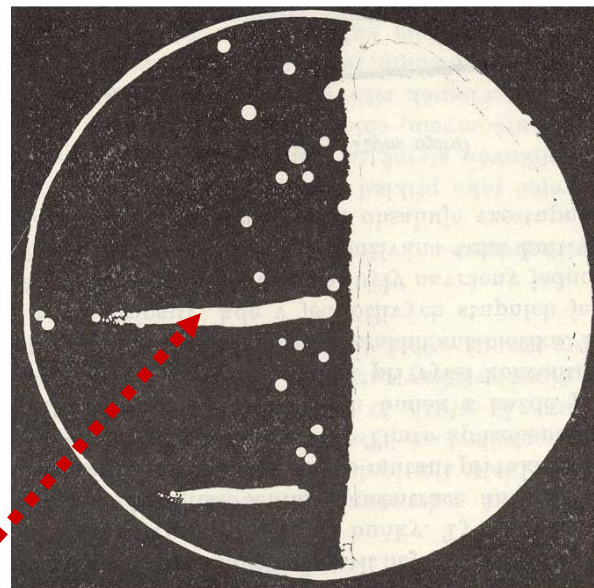
- **Skríning** - vyhledání mutant na základě pozorovatelné změny fenotypu: Růst na indikátorových mediích (utilizace cukrů → tvorba kyselin → změna pH – změna barvy) – podobně jako při odlišování druhů nebo kmenů
  
- **Obohacování** (zvyšování počtu mutant)
  - penicilinová metoda
  - inkorporace radioaktivního prekurzoru (radioaktivní sebevražda)
  - 5-BU + UV-záření
  
- **Selekce**
  - a) pozitivní (přímá) selekce** (růst za podmínek, při nichž roste jen mutanta, buňky standardního typu nepřežívají nebo nerostou)
  - b) negativní (nepřímá) selekce** (nerostou mutanty, ale buňky standardního typu ano)
  
- **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

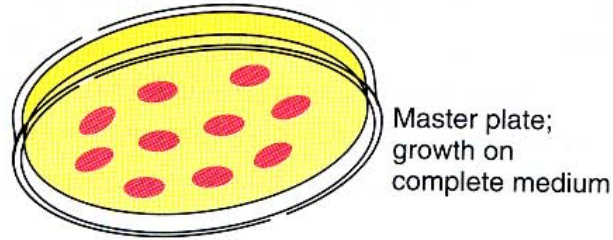
antibiotikum



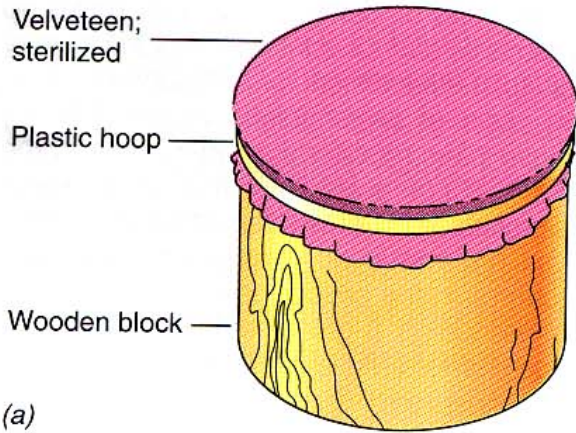
Izolace vícečetných mutant



# Razítkování (Replikování)



Press plate onto velveteen



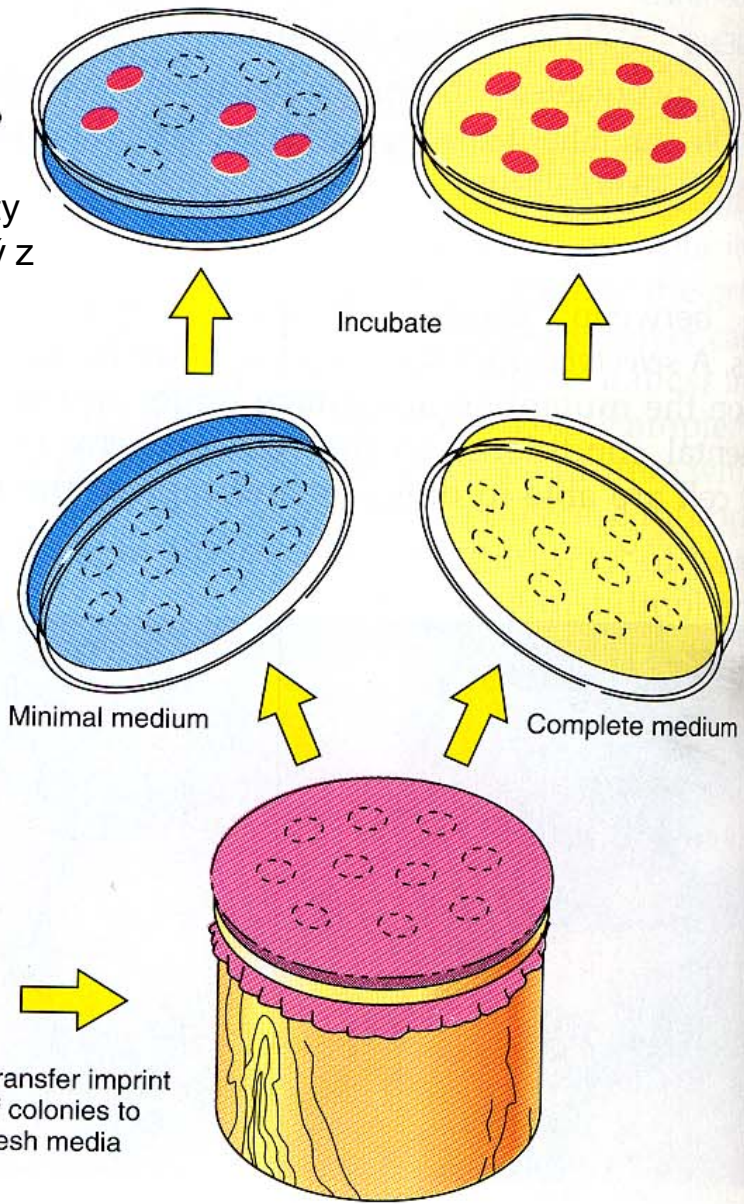
Velveteen with imprint of all colonies

Transfer imprint of colonies to fresh media

Auxotrofní mutanty vyžadující některý z růstových faktorů

Mutants do not grow

Incubate



(a)

# Postup při nepřímé selekci mutant razítkovou metodou

Počet buněk

$10^8$

$10^5$

$10^2$

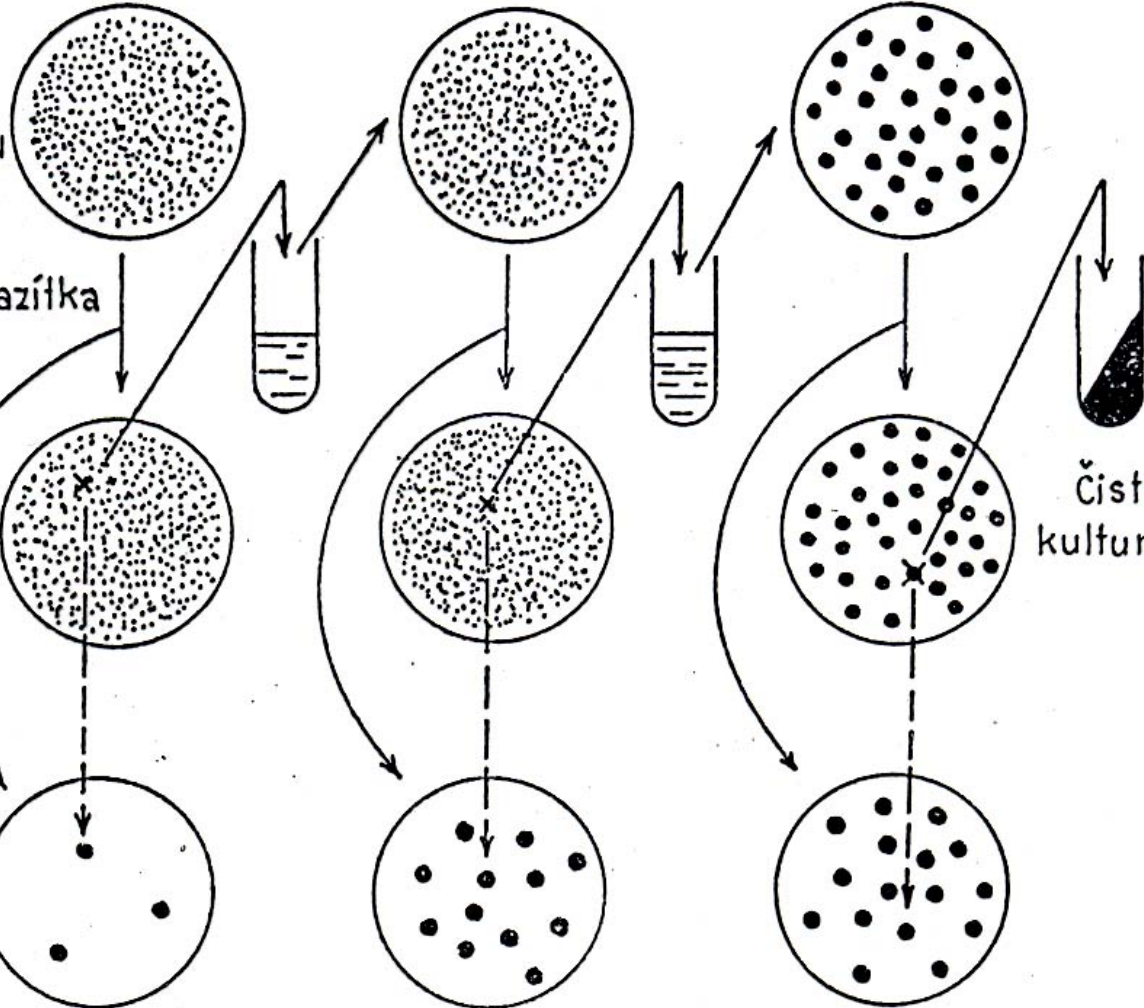
Plotny bez streptomycinu

Přenos pomocí razítka

Plotny bez streptomycinu

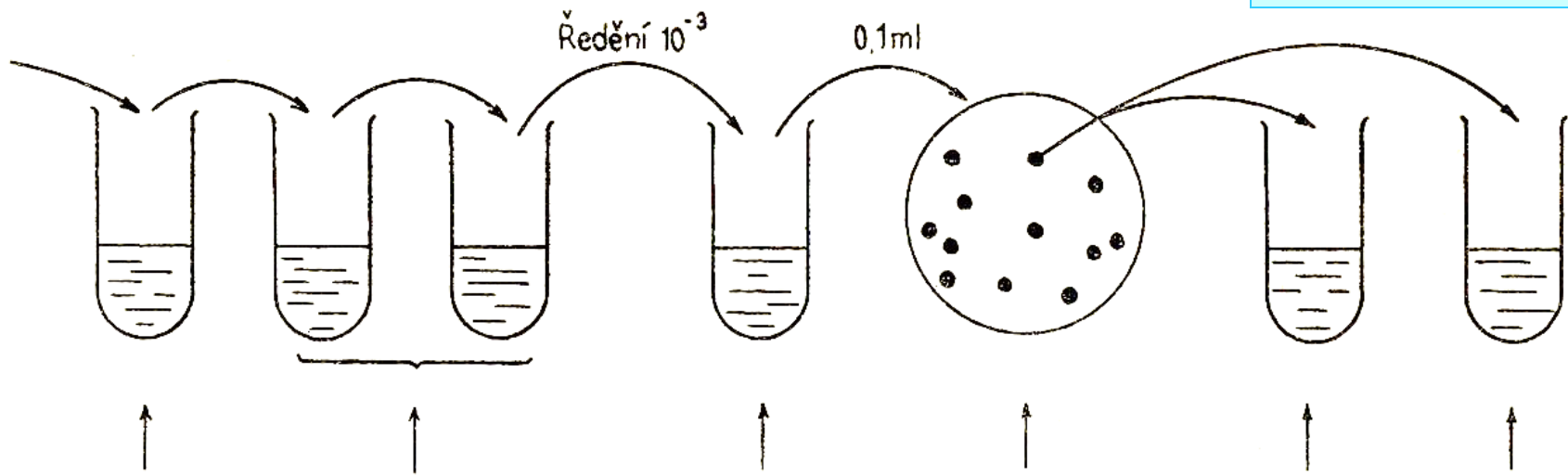
Plotny se streptomycinem

Čistá kultura Str<sup>r</sup>



# 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. Jestli že 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.

Projeví se mutantní fenotyp

Dokončení replikace

**GENERACE**

**1**

První dělení buňky

**2**

Buňky standardního typu

Druhé buněčné dělení

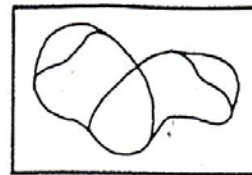
Mutantní fenotyp se projeví teprve poté, až je produkt standardního genu dostatečně naředěn nebo vyplaven z cytoplazmy

Ke zvýšení počtu mutantních buněk dochází po dalším dělení

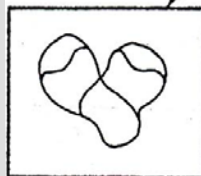
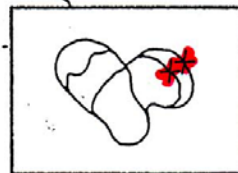
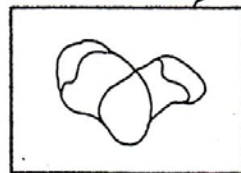
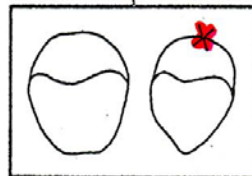
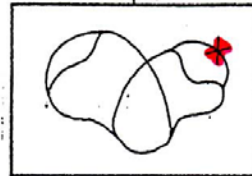
**3**

Buňky standardního typu

Mutantní buňky



Mutace probíhá v částečně zreplikované DNA



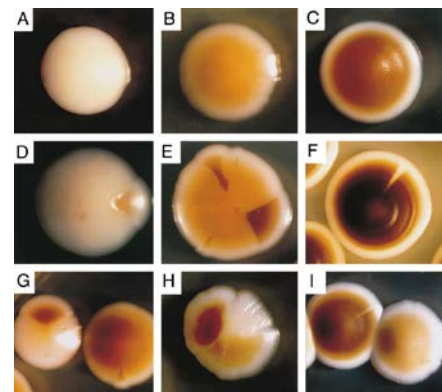
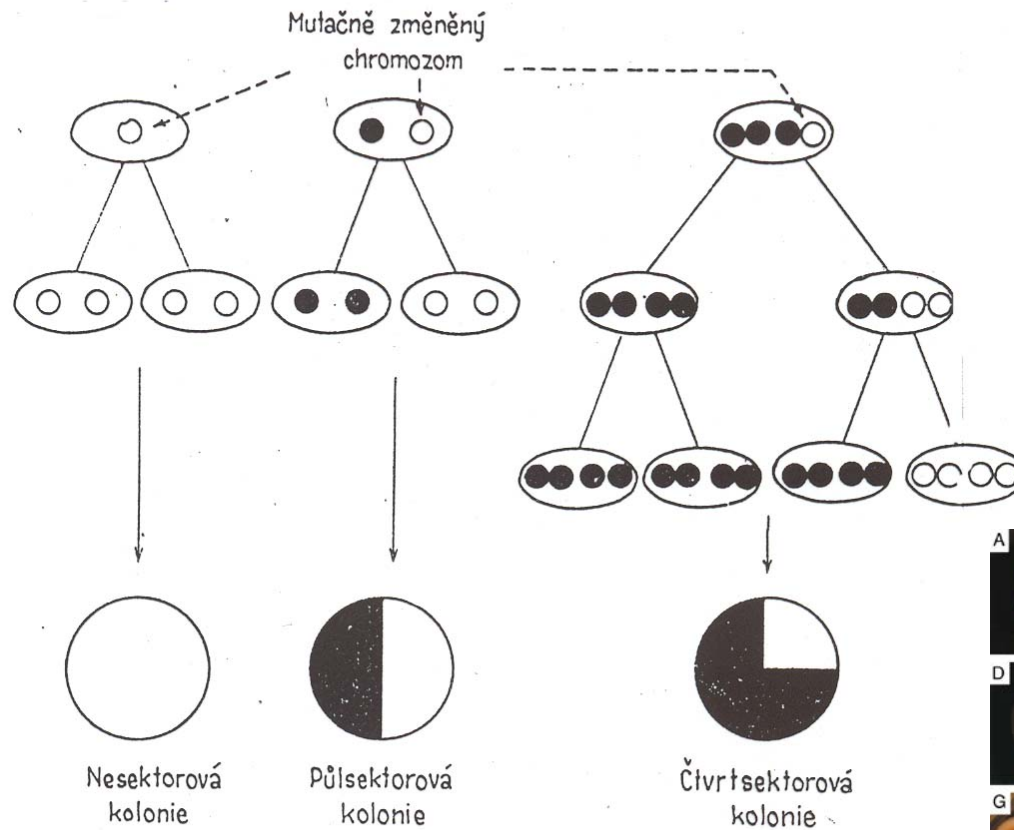
# VZNIK SEKTOROVÝCH KOLONIÍ JAKO DŮSLEDEK SEGREGAČNÍHO LAGU

Počet chromozomů na buňku

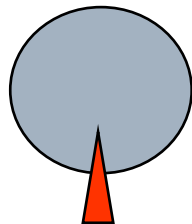
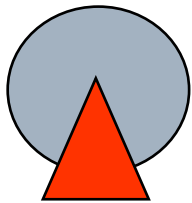
1

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 způsobenou vznikem nesmyslného kodonu (tj. supresorsenzitivní mutaci), nikoliv ty, které mají jiný typ mutace v příslušném genu.**

**Další typy supresorových mutací:**

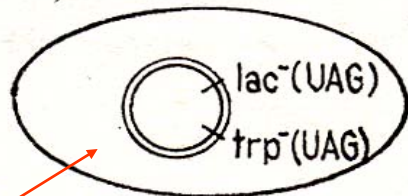
**Sense-mutace (aa1 → aa2)**

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

# IZOLACE SUPRESORPOZITIVNÍCH MUTANT (Su+) (supresorových)

**Su – fenotyp, sup - genotyp**

**dvojnásobný mutant**



Tato buňka obsahuje kodóny amber v genech lac a trp

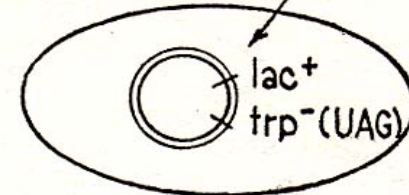
**Důkaz: vnesení fága se Su+, reverze fenotypu**

**jednostupňová reverze**

**Mutace v genu sup  
(gen pro tRNA)**

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

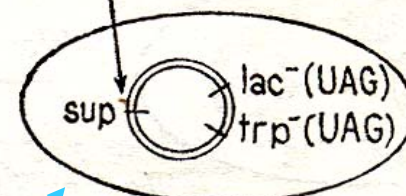
Reverze kodónu UAG



**10<sup>-8</sup>**

**Su<sup>-</sup> Lac<sup>+</sup> Trp<sup>-</sup>**  
(Su- Lac- Trp+)

Vznik nové supresorové alely



**10<sup>-16</sup>**

**Su<sup>+</sup> Lac<sup>+</sup> Trp<sup>+</sup>**

Buňka vlevo má amber mutaci v genech lac a trp. Vpravo jsou znázorněny dva typy revertantů Lac<sup>+</sup>. 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.**

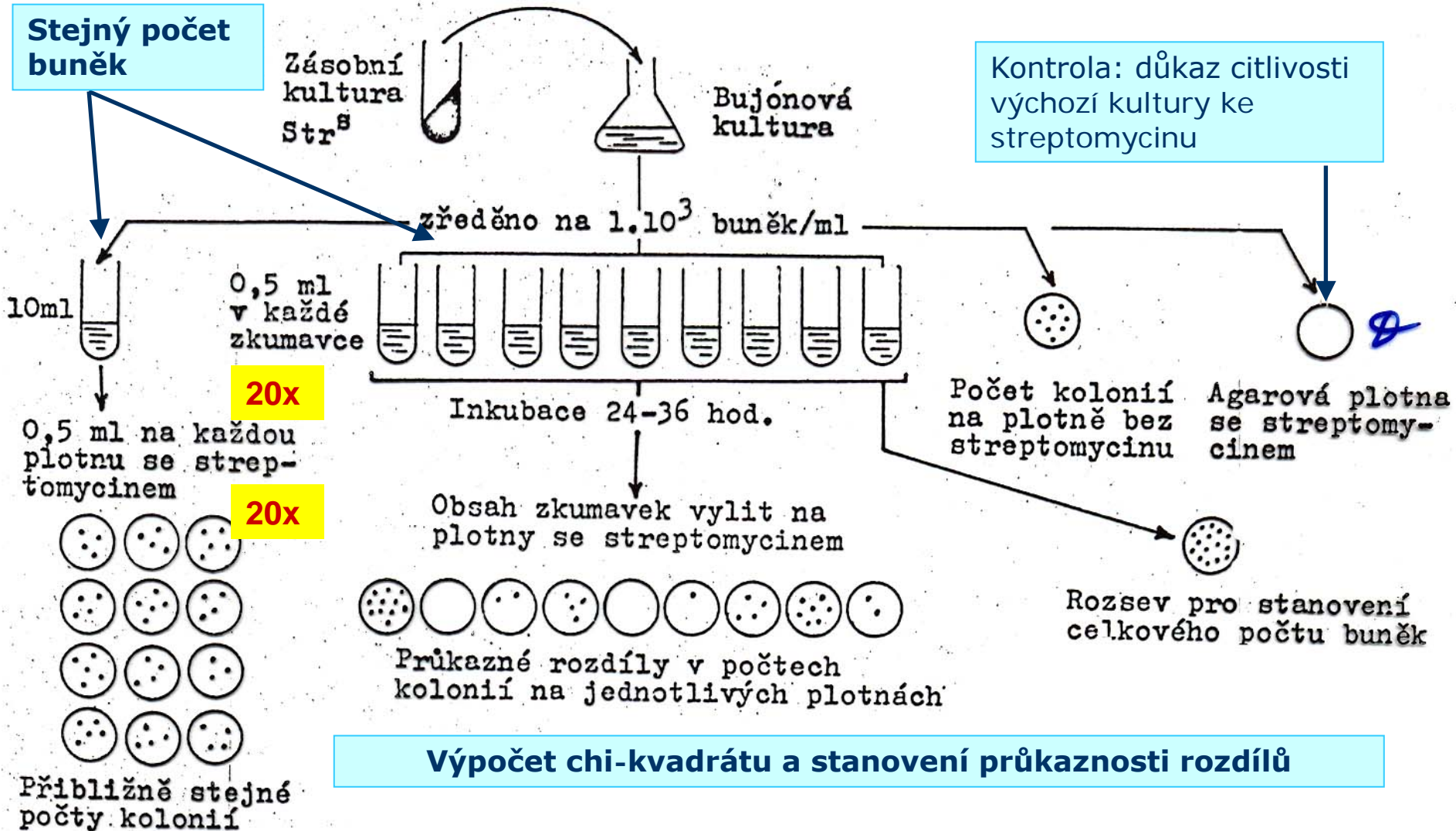
# Fluktuální test

Změna znaku  
Str<sup>S</sup> → Str<sup>R</sup>

Mutace?

Adaptace?

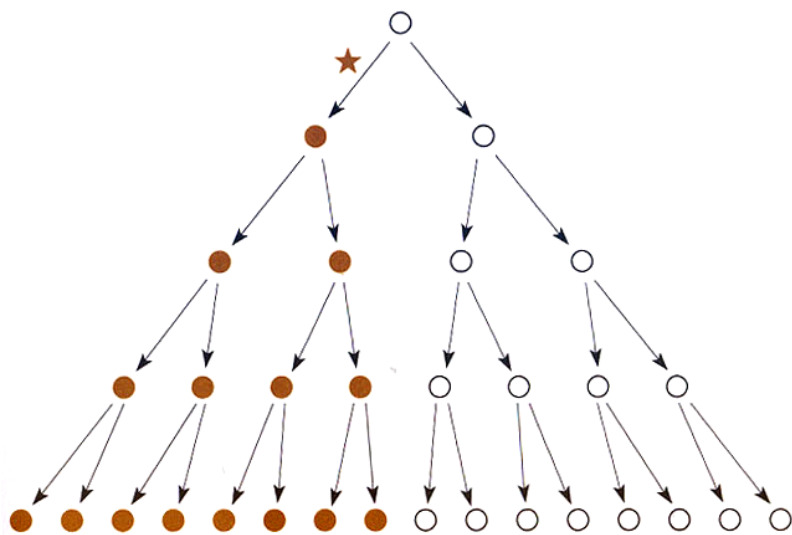
Stejný počet buněk



# Závislost konečného počtu mutantů na době, v níž mutace proběhla

★ = mutace

Culture 1



**jedna mutace: celkem 8 kolonií**

Generation

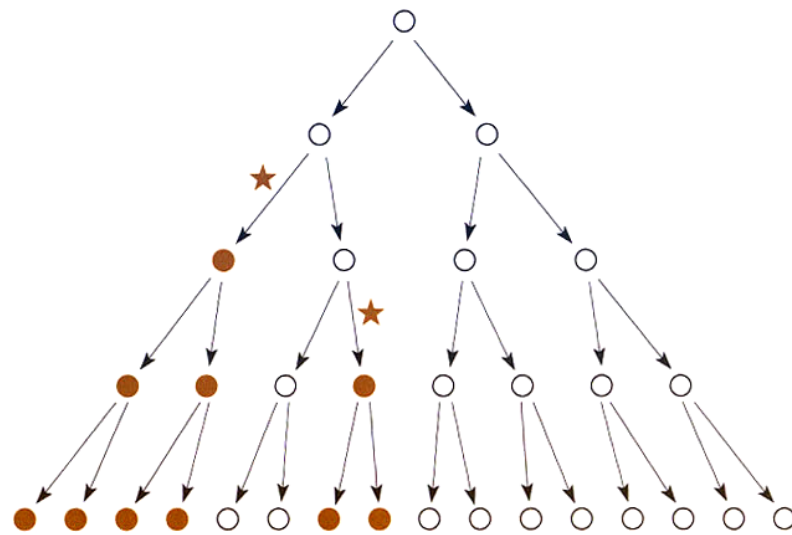
1st

2nd

3rd

4th

Culture 2



**dvě mutace: celkem 6 kolonií**

## Počty rezistentních bakterií z nerozdělené kultury a samostatných kultur

<b>Alikvoty z nerozdělené kultury</b>		<b>Samostatné kultury</b>	
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  $\chi^2$  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

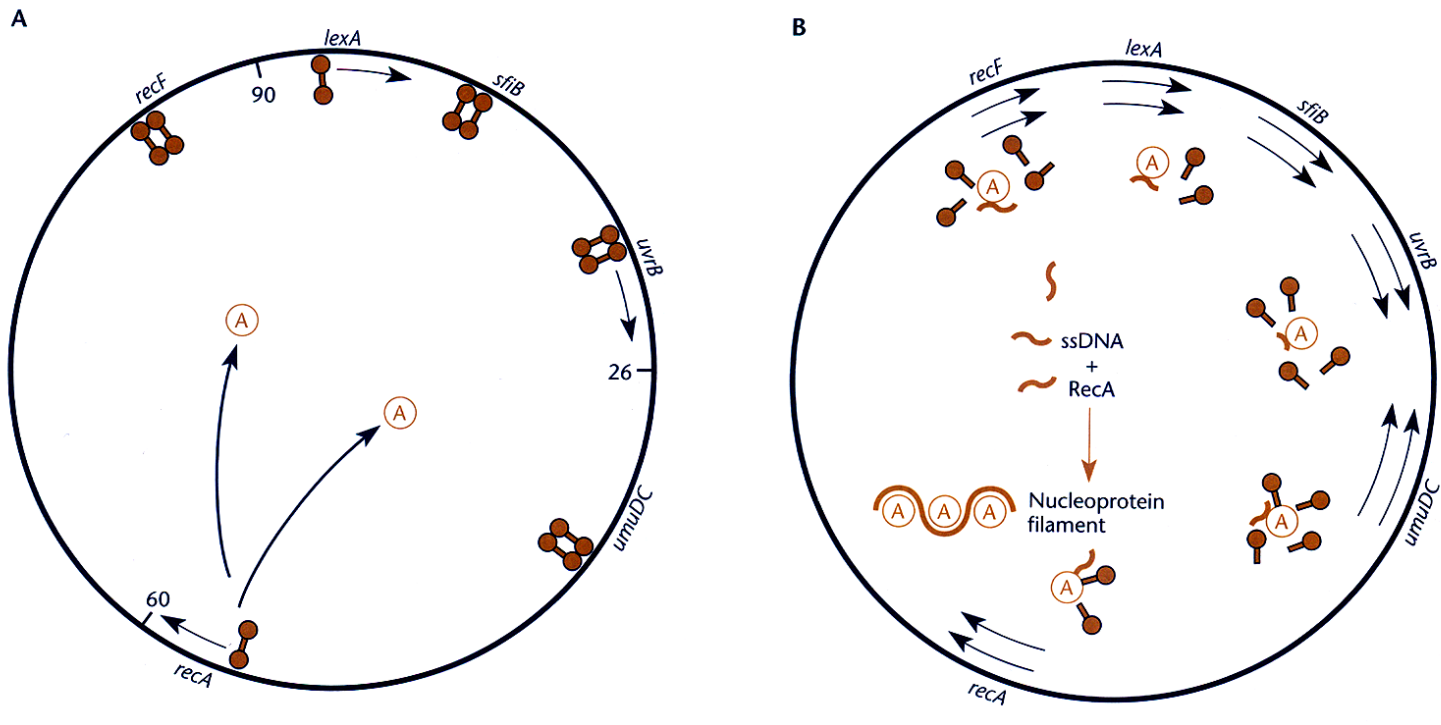


# SOS-ODPOVĚĎ

*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

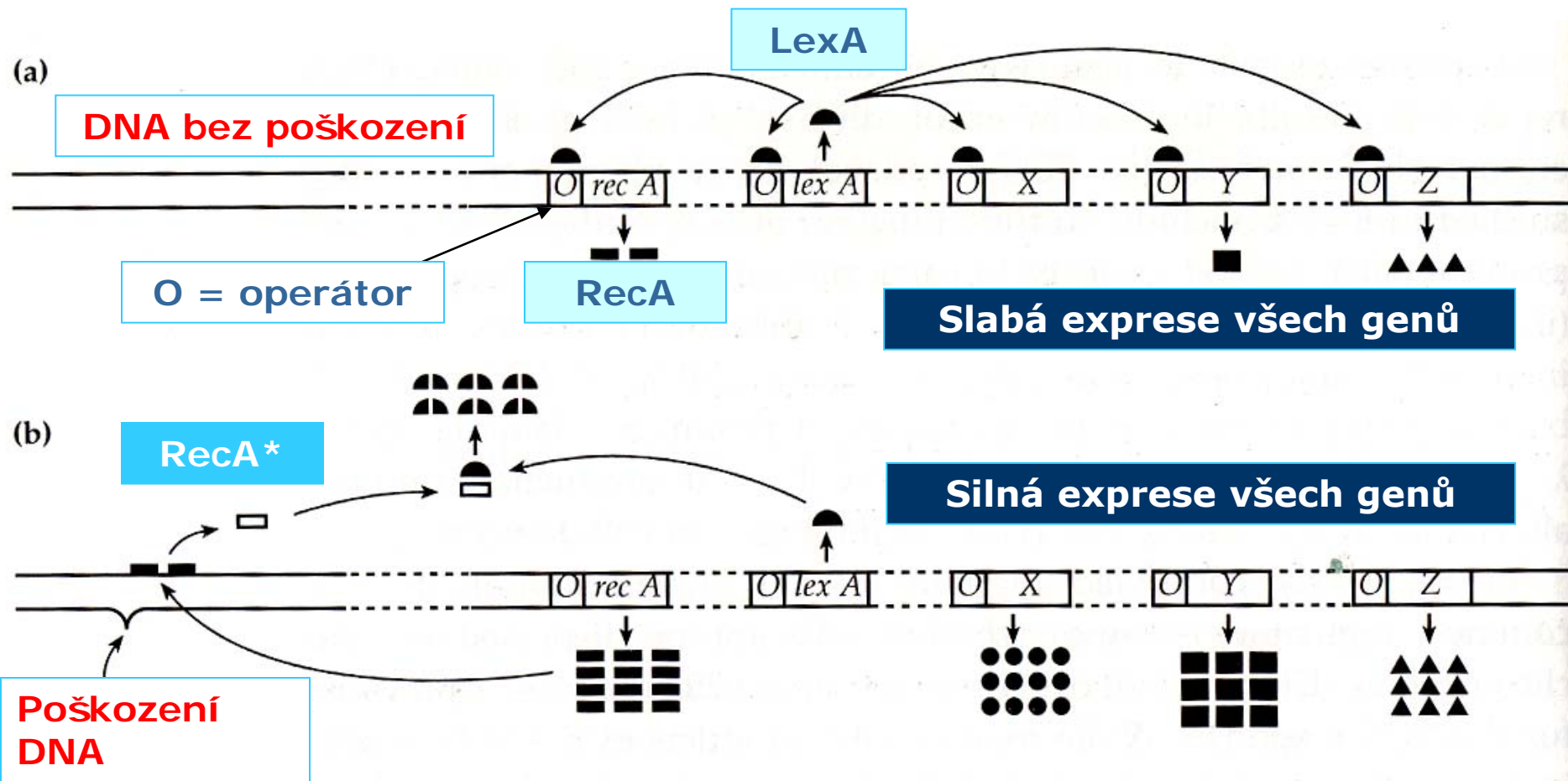
# SOS-odpověď u *E. coli*



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



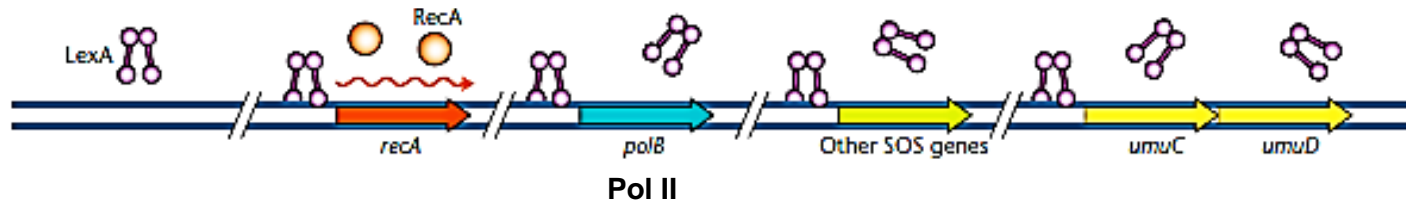
Key: Proteins

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

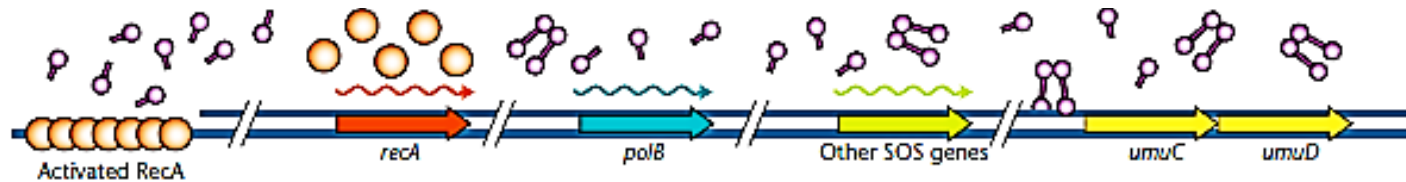
**LexA = dimer, podrobující se autokatalytickému štěpení za účasti RecA\* (koproteáza)**  
**helikální filament RecA-DNA**

# Regulace SOS odpovědi u *E. coli*

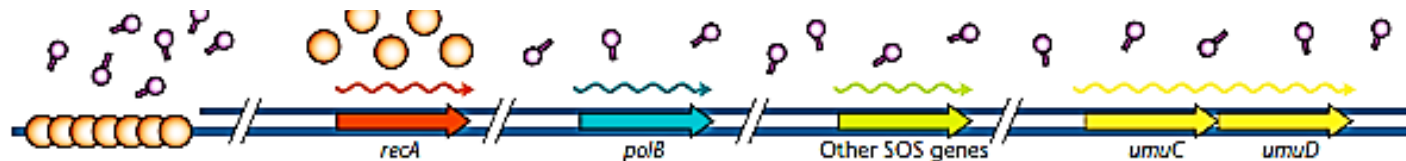
**A** DNA bez poškození, geny SOS regulonu nejsou exprimovány, RecA se vytváří v nízké hladině



**B** ssDNA signalizuje poškození, RecA se aktivuje, geny SOS regulonu jsou exprimovány



**C** S pokračujícím poškozením jsou indukovány další geny SOS včetně *umuC* a *umuD*

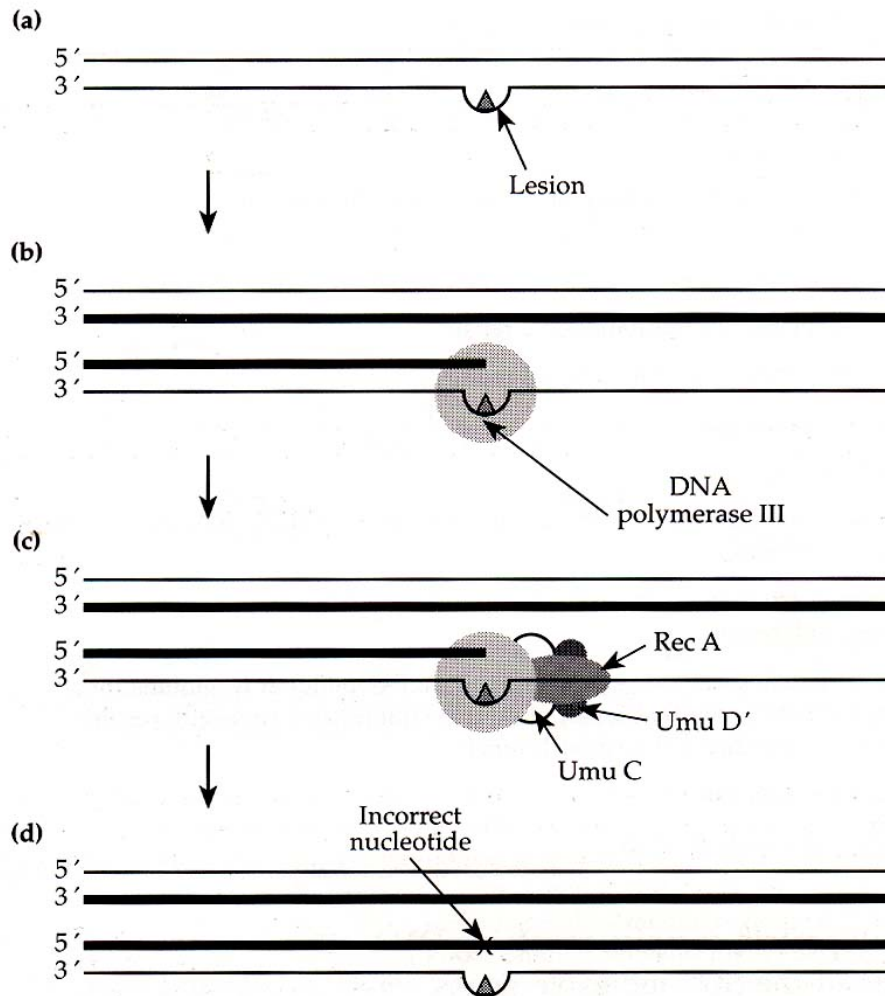


**D** Po reparaci poškození nově vytvářený LexA opět reprimuje SOS regulon



Vazebné boxy pro LexA v promotorech jednotlivých operonů jsou podobné, ale ne stejné, vážou LexA s různou intenzitou a v různém množství a zapínání a exprese genů tak koreluje s intenzitou poškození DNA

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



Key: Parental DNA — ; newly synthesized DNA —

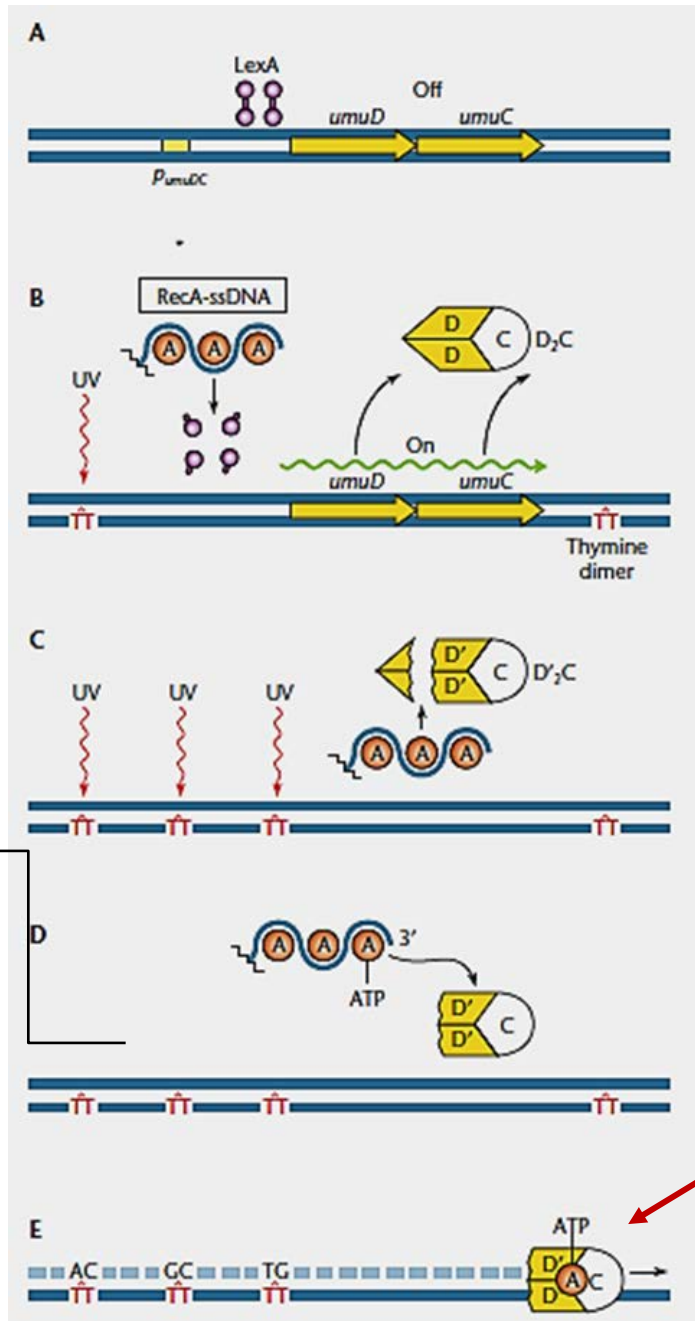
**umu** = UV-indukovaná mutagenese

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*

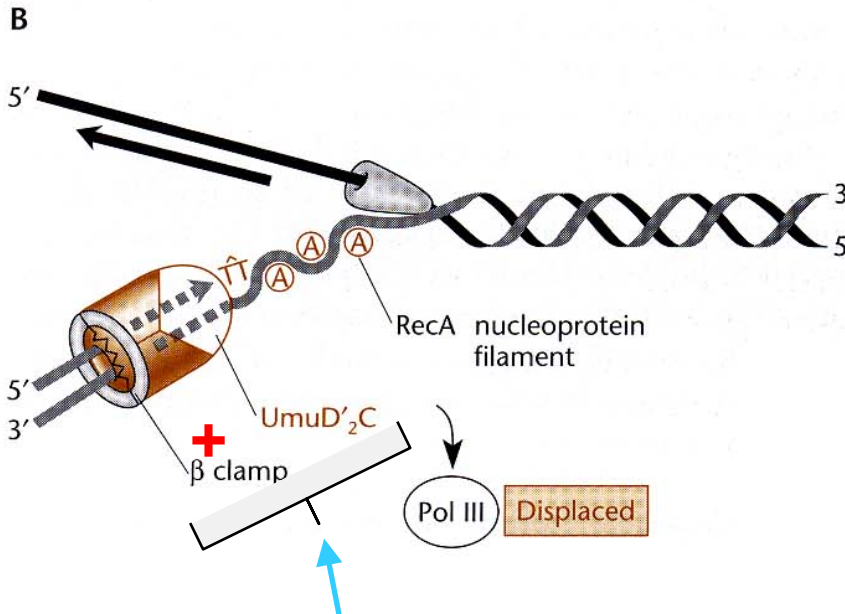
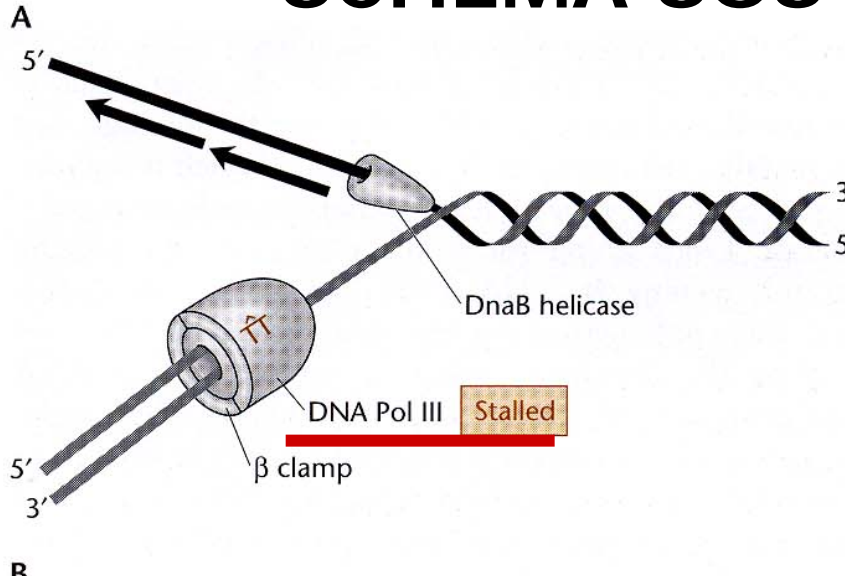


Před poškozením reprimuje LexA transkripci SOS-genů včetně operonu *umuDC*

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  $UmuD_2C$ )

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 → UmuD'

Komplex UmuD'<sub>2</sub>C  
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

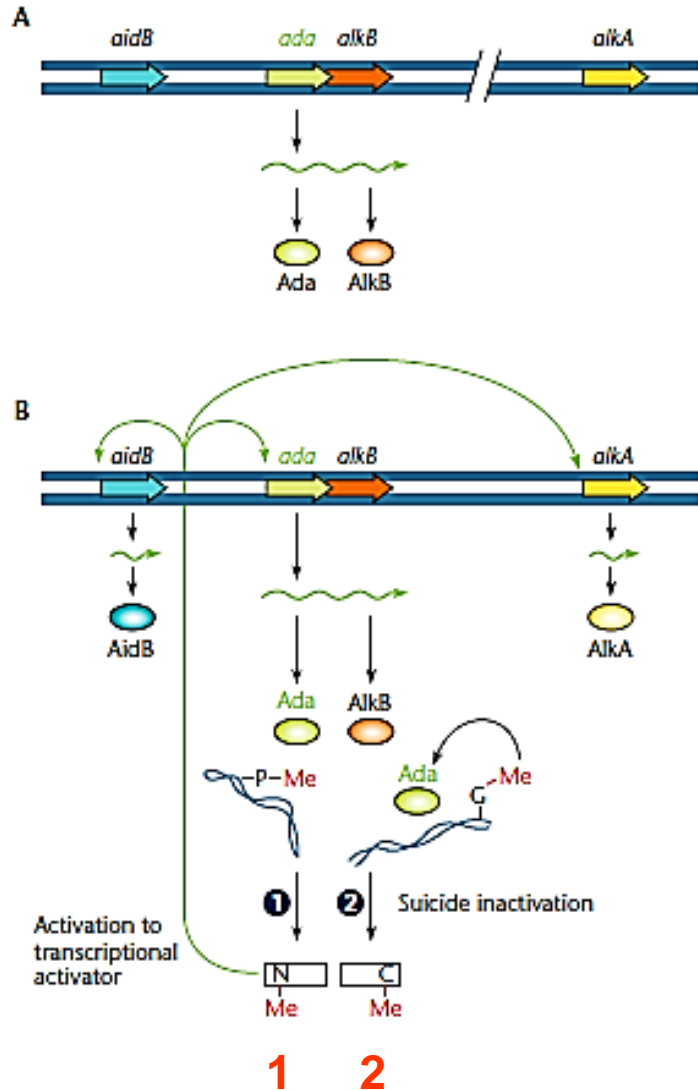
**Biologická funkce??** – umožňuje replikaci DNA poškozené jinými typy poškození než těmi, která způsobuje UV



## 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.
- 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 alkylhydroperoxidreduktáza.
- Adaptace k oxidativnímu stresu je nezávislá jak na alkylačním poškození, tak SOS odpovědi, a nevyžaduje proteiny Ada, LexA nebo RecA.

# Regulace adaptivní odpovědi na alkylyaci 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).

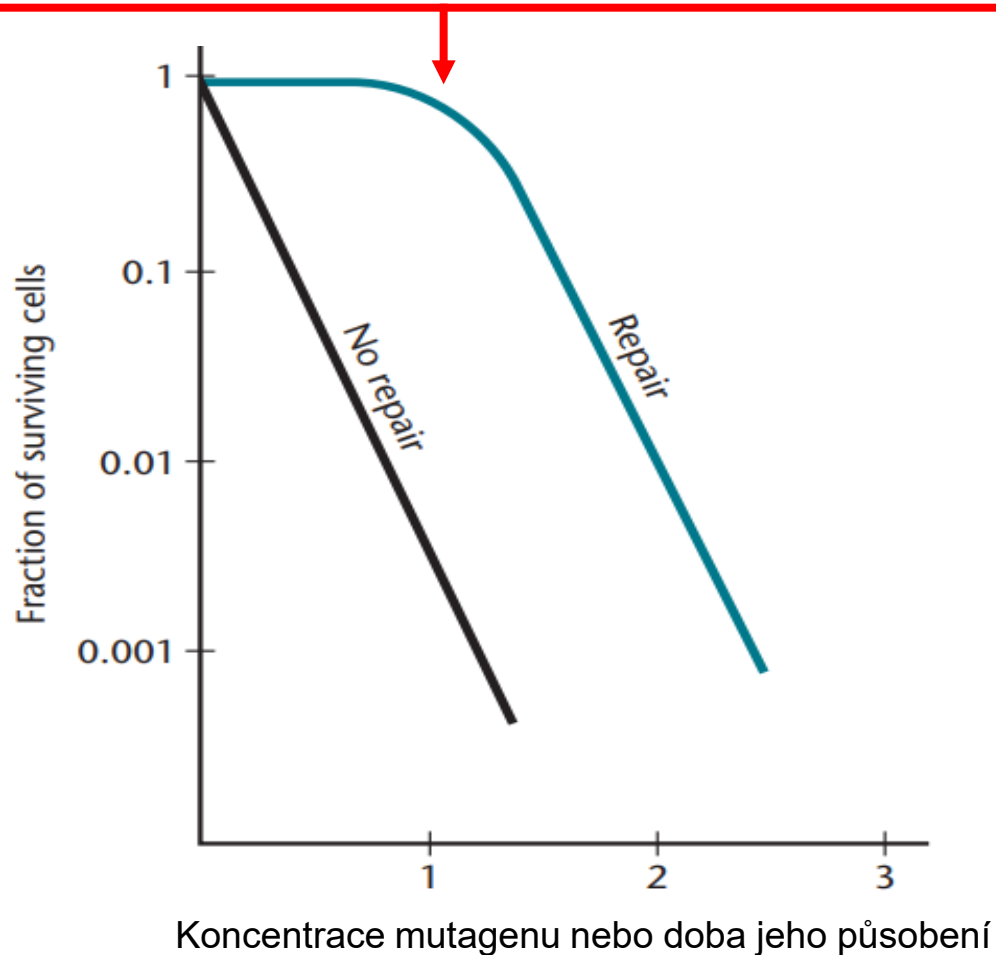
**Ke vzniku (1) dochází jen při silném poškození DNA, při nízkém poškození jsou pouze odnímány metylové skupiny z bází a protein Ada se inaktivuje.**

*biochemické funkce alkB a aidB zbývá objasnit*

## Důkaz přítomnosti a působení reparačních mechanismů

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

---

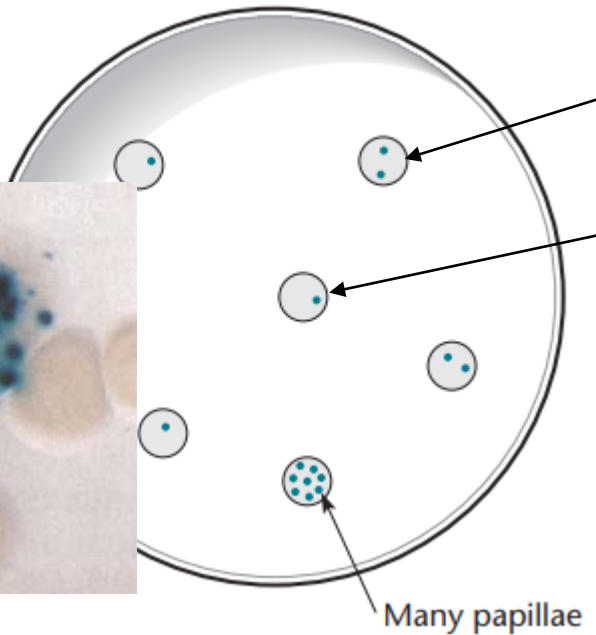


# Mutátorové kmeny u *E. coli*

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

Mutátorové kmeny se používají k vytváření náhodných mutací, mutanty se následně selektují podle změny fenotypu sledovaného znaku

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



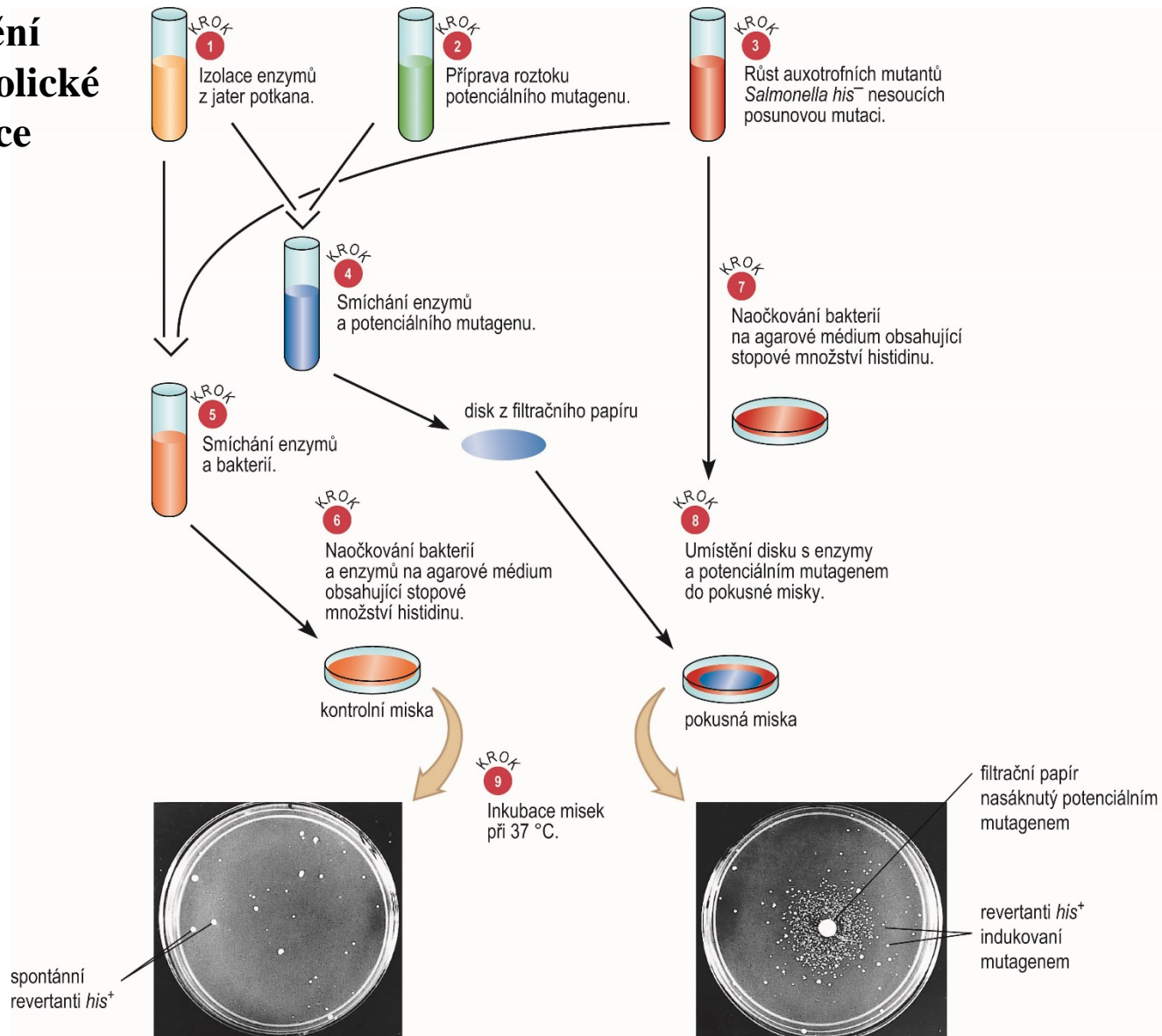
Kolonie tvořené buňkami s funkčními geny *mut* – reverze mutace v genu *lacZ* probíhá vzácně, kolonie jsou bílé, modrých papil je málo

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

Kolonie obsahující papily (sektory) v důsledku vzniku mutant *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).

# Amesův test na mutagenitu

## Zajištění metabolické aktivace



# Provedení Amesova testu

