

# Мутаци и

Основа генетики вот уже более полувека – мутационный анализ. Генетики либо вносят мутации в определенные гены и детектируют изменения фенотипа, либо наоборот, детектируют необычный фенотип и пытаются найти, какие именно мутации его вызвали.

Говорить о мутациях нам придется много, поэтому необходимо сначала разобраться с соответствующей номенклатурой и дать определения некоторым понятиям.

## Номенклатура бактериальных генов

Названия бактериальных генов записываются тремя латинскими прописными буквами. Обычно три эти буквы имеют какое-то отношение к функции гена. Например, *ssb* – ген, кодирующий Single Strand Binding protein, а *lig* – ген, кодирующий ДНК-лигазу.

В случае если несколько генов кодируют белки с родственными функциями или белки, участвующие в одном метаболическом процессе, к их названиям могут добавляться заглавные буквы. Например, гены *hisA* и *hisB* кодируют ферменты, принимающие участие в многоступенчатом процессе биосинтеза гистидина.

## Номенклатура фенотипов

$His^+$  означает, что данный бактериальный штамм может расти на среде без гистидина. Имеется в виду, что с генами семейства *his* у него все в порядке.

$His^-$  означает, что данный бактериальный штамм не может расти на среде без гистидина. У такого штамма имеется мутация в каком-то из генов семейства *his*, в результате чего гистидин не может синтезироваться бактериальной клеткой и должен поступать извне, чтобы бактерия могла жить.

$Rif^s$  означает, что данный бактериальный штамм чувствителен к антибиотику рифампицину (s от sensitive).

$Rif^r$  означает, что данный бактериальный штамм устойчив к антибиотику рифампицину (r от resistant). Надо полагать, что у такого штамма мутация в гене *rpoB*, кодирующем бета-субъединицу РНК-полимеразы. Мутация делает невозможным связывание рифампицина, в результате чего бактерией приобретает устойчивость к антибиотику.

**Ауксотрофные мутанты, или ауксотрофы** – мутантные бактерии, не способные расти и вообще жить, если извне в них не поступает какой-либо компонент, в норме синтезирующийся самой бактерией.

Бактерии с фенотипом  $\text{His}^-$  - ауксотрофы.

**Катаболические мутанты** - мутантные бактерии, не способные использовать для роста какое-либо вещество, которое используется бактериями в норме при его поступлении извне.

Бактерии с фенотипом  $\text{Mal}^-$  не способны расти на средах, в которых единственным источником углерода является сахар мальтоза, и поэтому относятся к катаболическим мутантам.

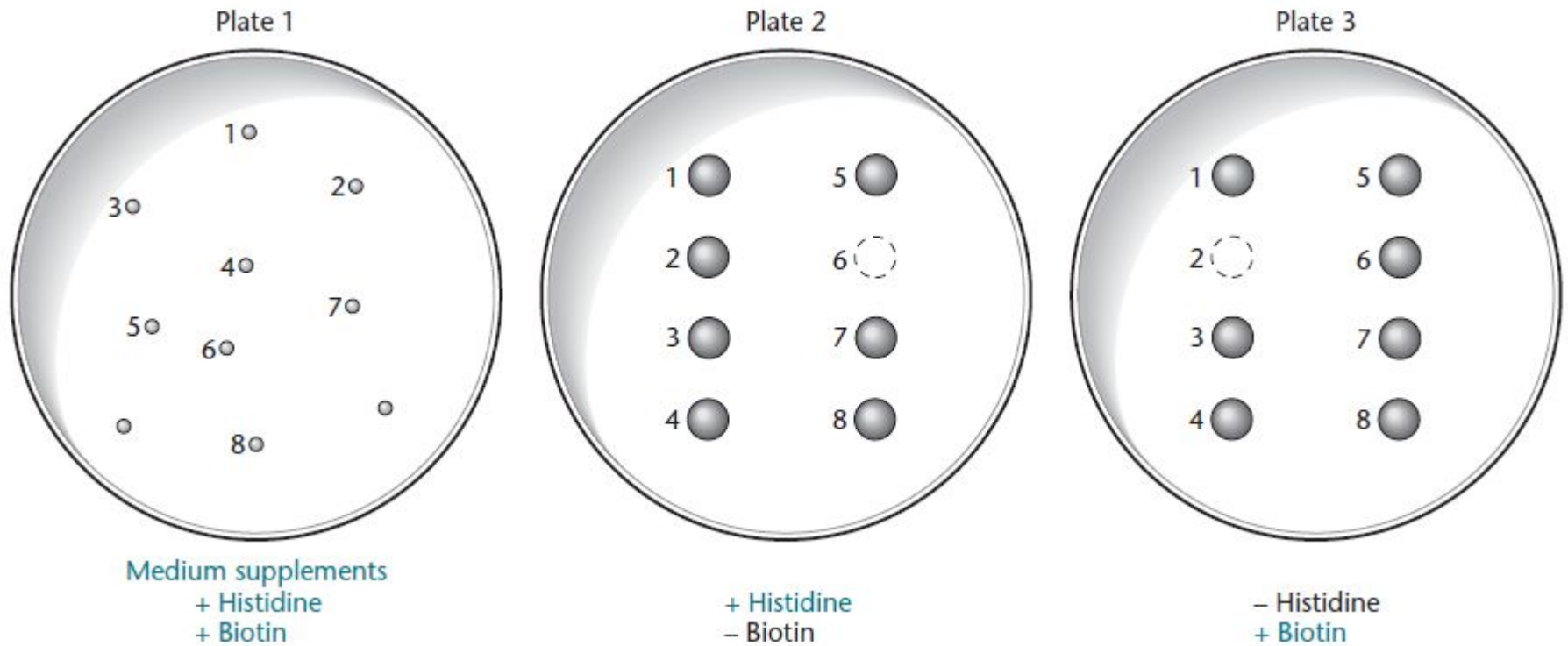
**Летальные мутации** – мутации, приводящие к безусловной гибели бактериальной клетки. Поскольку такие мутации невозможно изучать (кроме самого факта их летальности), о них мы говорить практически не будем.

**Условно летальные мутации** – мутации, приводящие к гибели бактериальной клетки только в каких-либо определенных условиях.

Мутация, приводящая к фенотипу  $\text{His}^-$  - условно летальная. Добавьте в среду гистидина, и бактерии с таким фенотипом будут отлично себя чувствовать.

**Температуро-чувствительные мутации** приводят к тому, что при неоптимальной для бактерии (непермиссивной) температуре она не может расти, а при оптимальной (пермиссивной – может).

# Изоляция условно-летальных ауксотрофных мутантов

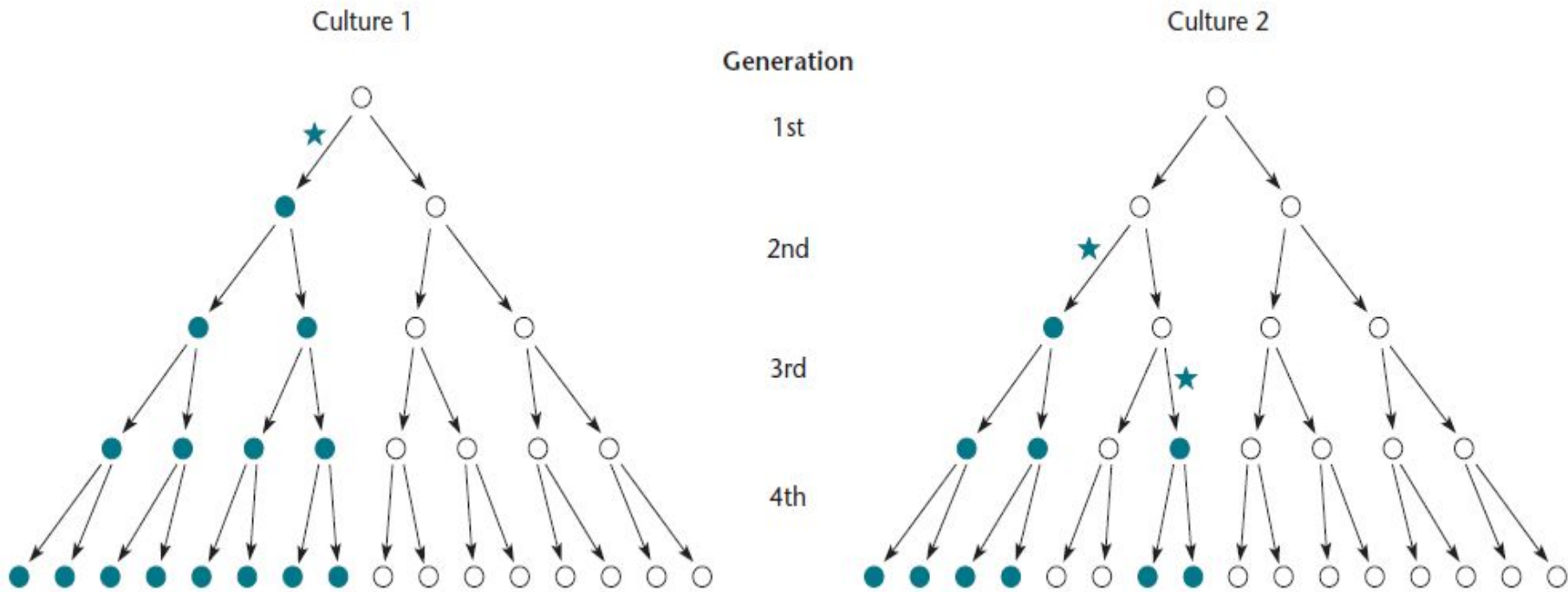


Аналогичным образом можно изолировать и катаболические, и температурочувствительные мутанты.

**Мутации устойчивости** приводят к тому, что мутанты способны расти в присутствии вещества, которое для нормальной бактерии является токсическим и приводит к ее гибели.

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

# Важнейшее свойство бактериальных мутаций – их **клональность**.



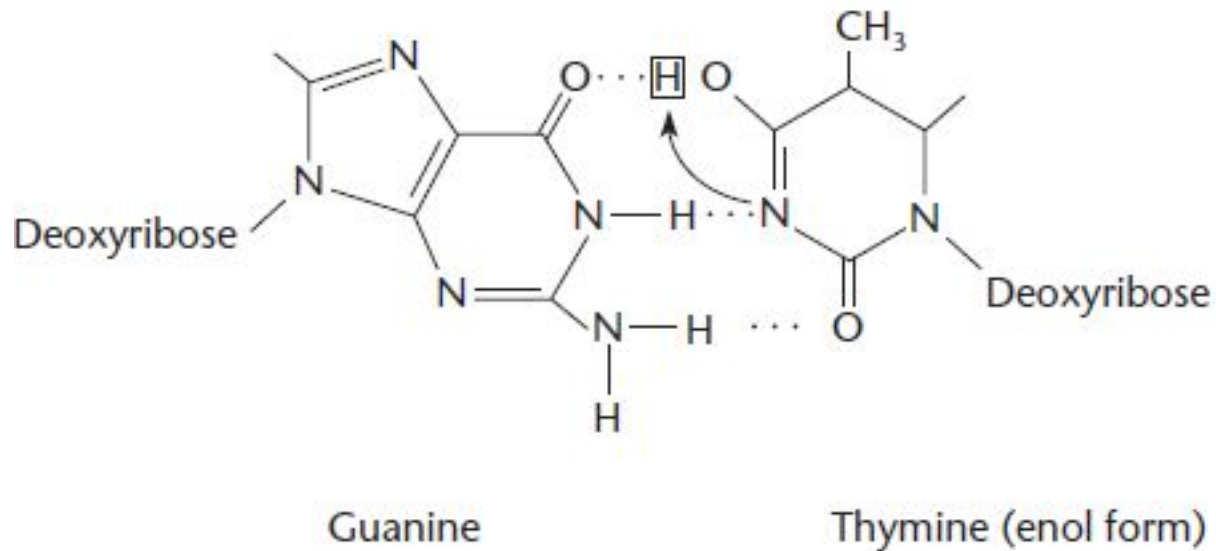
Если в бактериальной клетке случилась мутация, то все ее потомки будут также содержать данную мутацию (если выживут). Это позволяет легко отбирать мутантные бактерии в виде клонов на чашках Петри с агаризованными средами.

# Типы мутаций

1. Замена, делеция или вставка пары оснований (точечная мутация)
2. Делеция
3. Дупликация тандемных повторов
4. Инверсия
5. Вставка

# Замена пары оснований

Может случаться из-за ошибок репликации, радиационного повреждения, химических воздействий.



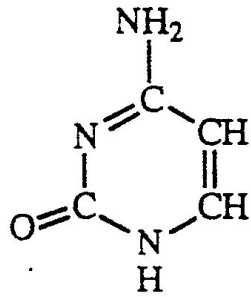
Спаривание гуанина с альтернативной енольной формой тимина, являющееся распространенной причиной ошибочного встраивания Т напротив G при репликации.



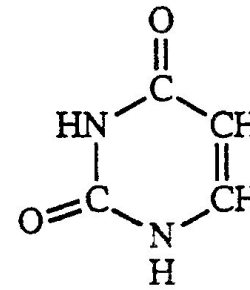
# Дезаминирование

## ЦИТОЗИНА

Происходит спонтанно с достаточно высокой частотой, особенно при повышенных температурах, с образованием урацила.

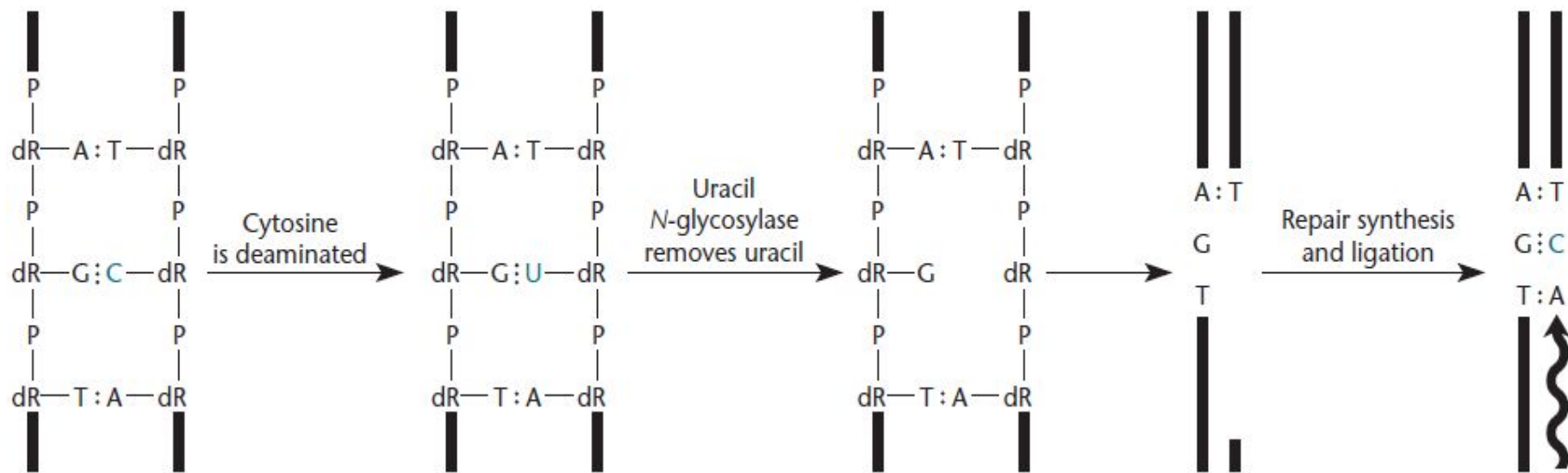


Cytosine  
(4-amino-2-oxypyrimidine)



Uracil  
(2,4-dioxypyrimidine)

# Удаление урацила из ДНК, где он совершенно не нужен



# Последствия замены пары оснований

Такие мутации фенотипически проявляются нечасто, поскольку с высокой вероятностью происходят в некодирующих участках генома.

Если они случаются в генах РНК, они также могут никак не проявиться, а могут сделать соответствующую РНК нефункциональной, нарушив участок связывания с чем-либо или делая невозможным принятие должной вторичной структуры.

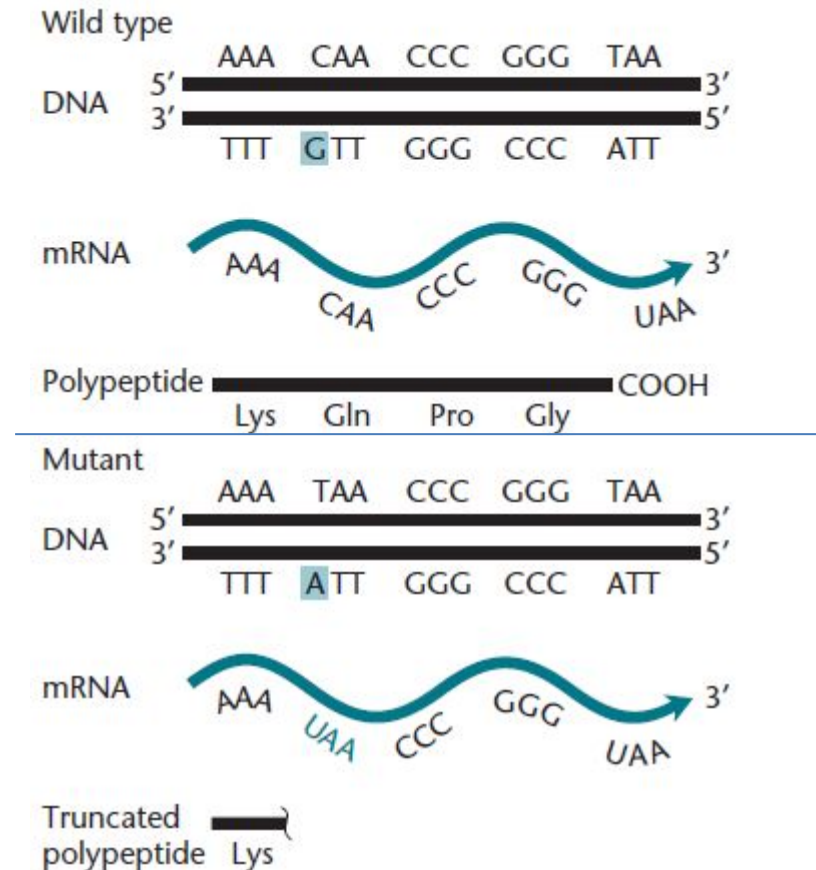
Замены пары оснований в белковых генах подразделяются на три типа:

1. Не меняющие аминокислотную последовательность белка и, соответственно, не имеющие фенотипических проявлений
2. Миссенс-мутации (меняющие одну аминокислоту на другую)
3. Нонсенс-мутации (меняющие кодон, кодирующий аминокислоту, на стоп-кодон).

UAG – amber

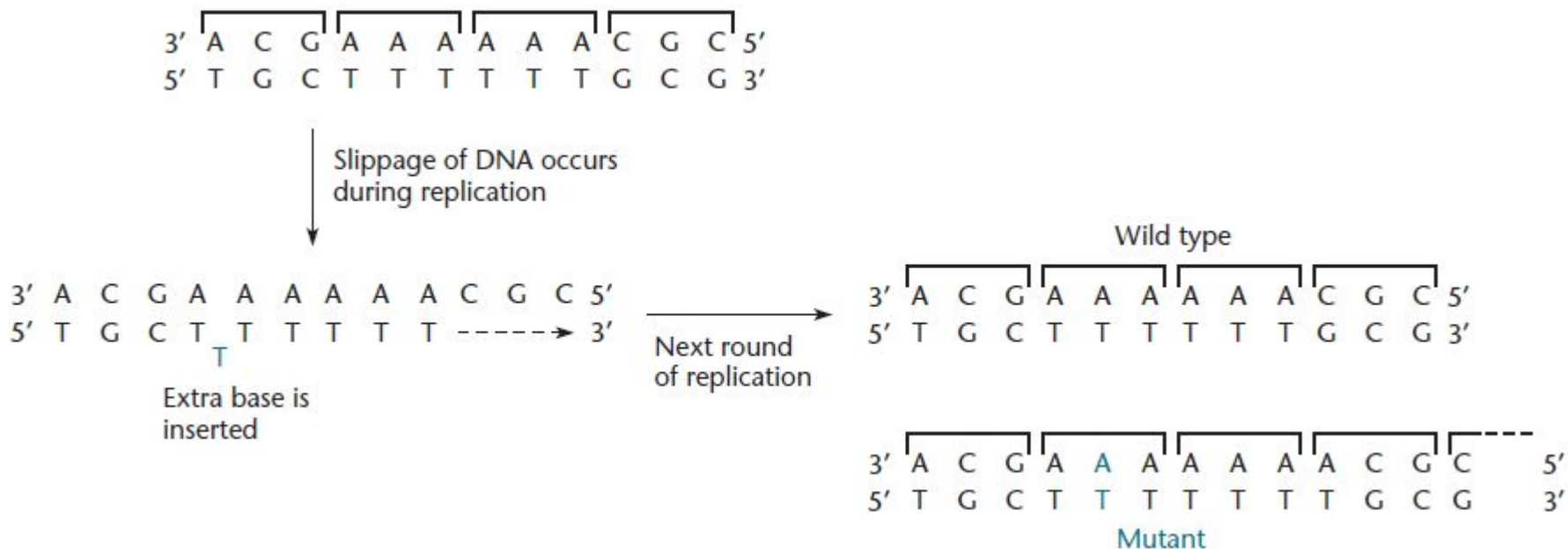
UAA – ochre

UGA – opal



# Делеция или вставка пары оснований

Основная причина – наличие гомополимерных участков в составе ДНК.

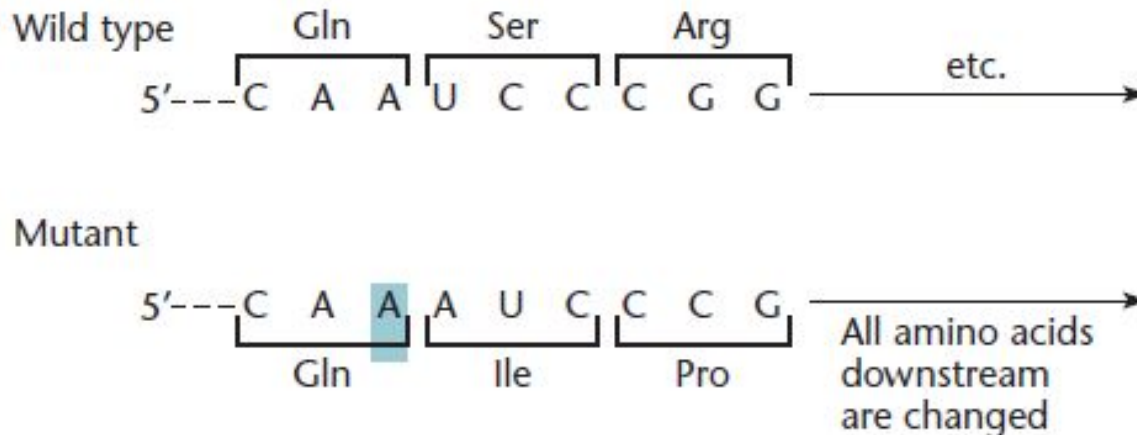


ДНК-полимераза плохо умеет считать повторяющиеся нуклеотиды и может вставить один лишний или пропустить один нужный.

# Последствия делеции или вставки пары оснований

Некодирующие участки генома или гены РНК – аналогично заменам пары оснований.

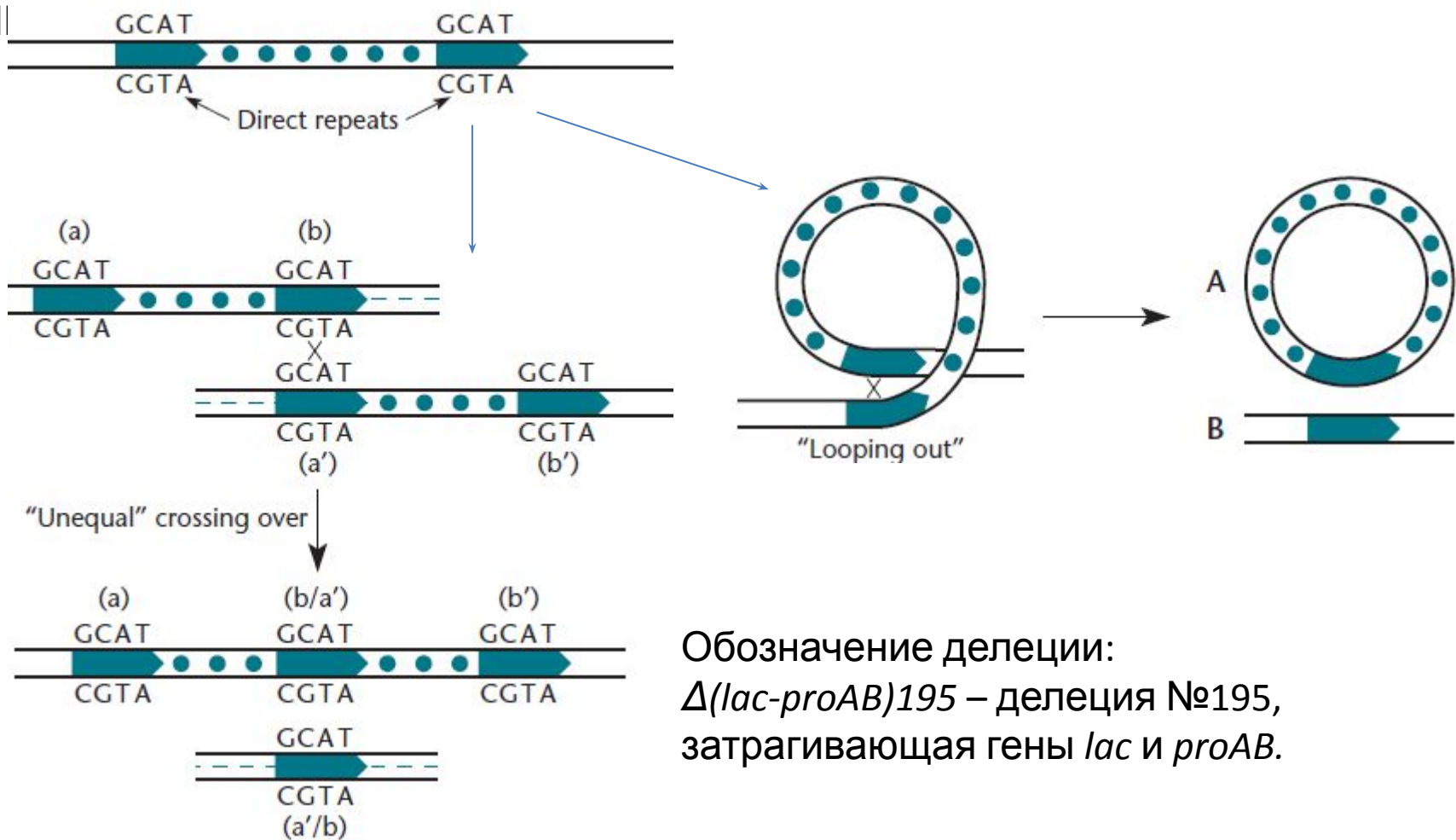
Если делеция или вставка пары оснований происходит в белок-кодирующем гене, следствием этого является **сдвиг рамки считывания**.



Соответственно, аминокислотная последовательность белка начиная с какого-то момента становится совершенно неправильной. В подавляющем большинстве случаев такие белки нефункциональны.

# Делеции и

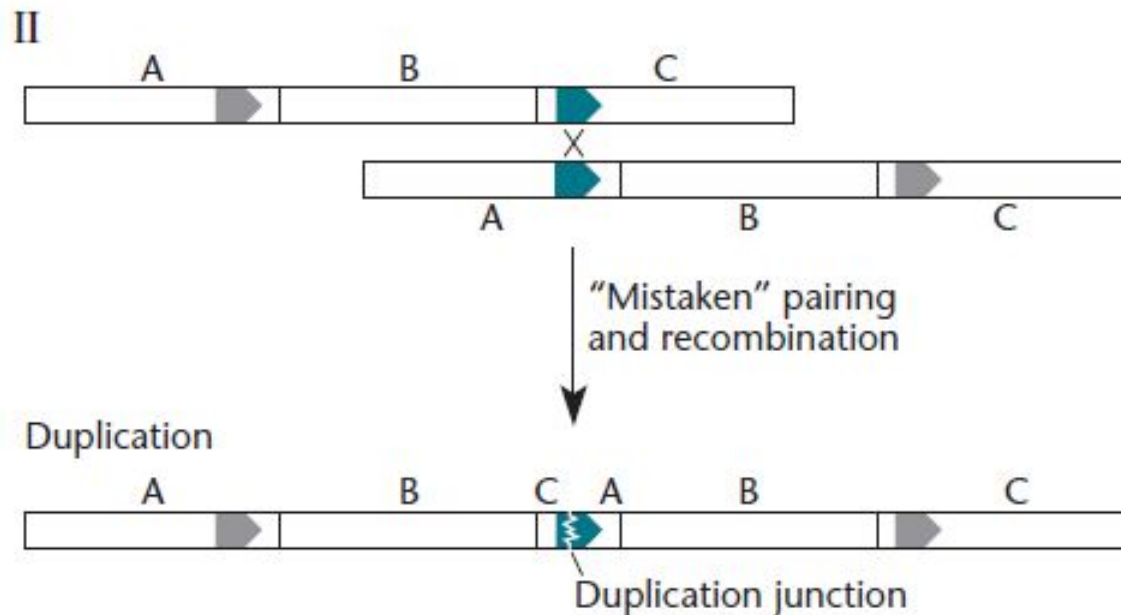
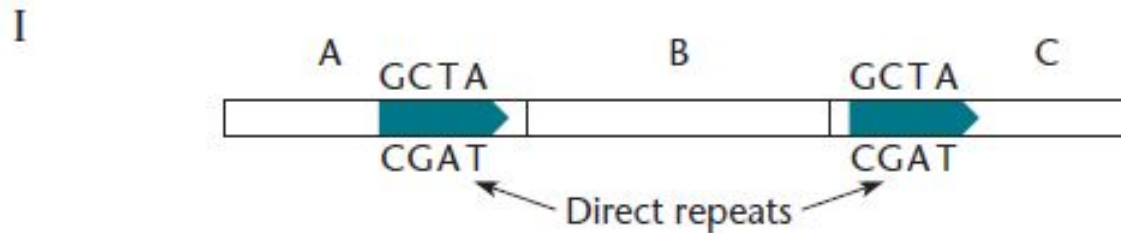
Спонтанно происходят достаточно редко. Основная причина – эктопическая рекомбинация, то есть рекомбинация, происходящая не там, где нужно. Условием эктопической рекомбинации является наличие ПРЯМЫХ повторов в ДН



Обозначение делеции:  
 $\Delta(lac-proAB)195$  – делеция №195,  
затрагивающая гены *lac* и *proAB*.

# Дубликации тандемных повторов

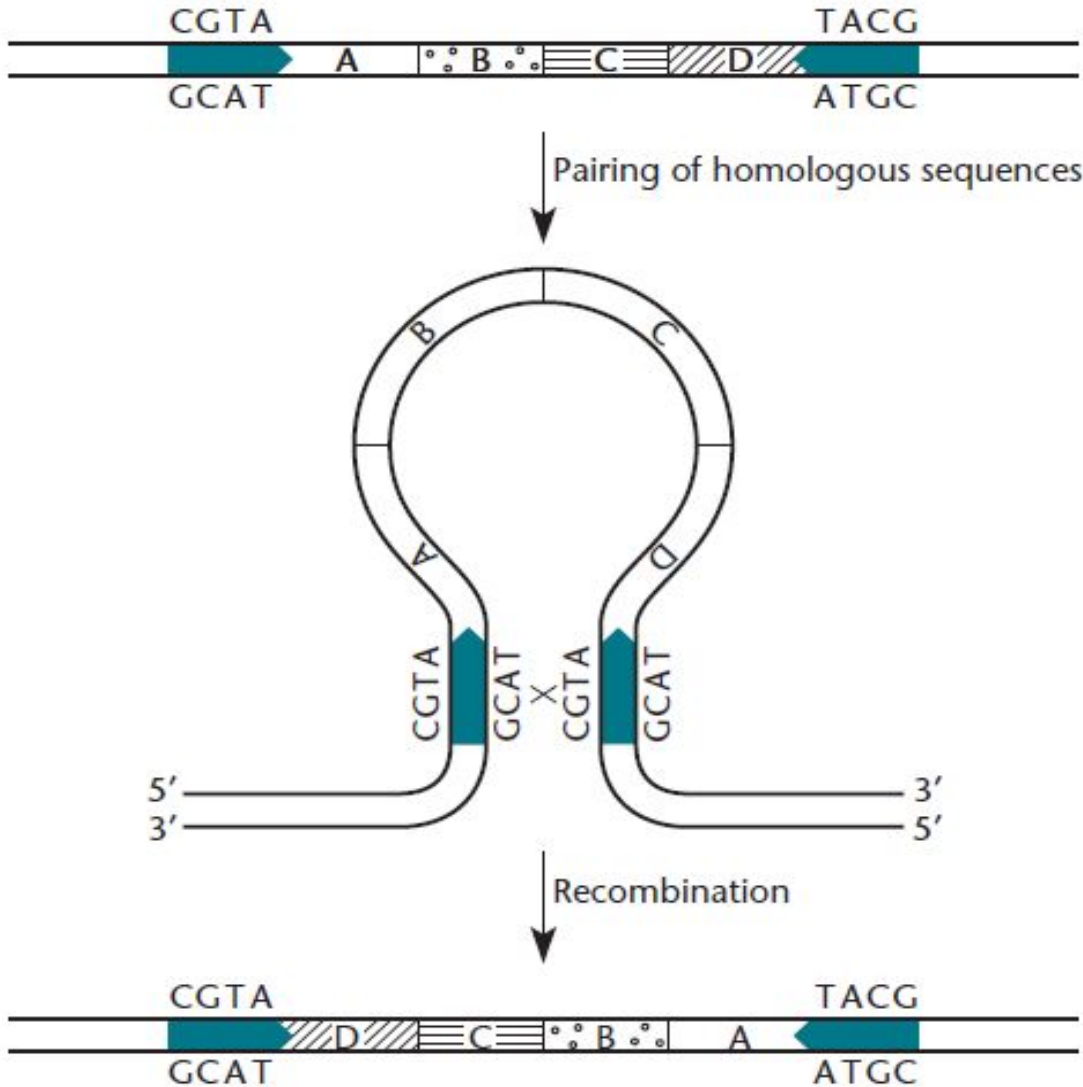
Происходят одновременно с делециями и по тому же механизму. Однако же именно дубликация тандемных повторов, в отличие от делеции, может не приводить к появлению фенотипа!



# Инверси

и

Происходят аналогично делециям, но при наличии ИНВЕРТИРОВАННЫХ повторов



Обозначение инверсий:  
 $IN(purB-trpA)_3$  – инверсия  
№3, затрагивающая гены  
*purB* и *trpA*.



# Вставк и

Чаще всего происходят вследствие активности мобильных элементов генома. Об этом мы поговорим позже.

Обозначение вставок:

*galK35::Tn5* – транспозон Tn5 вставился в ген *galK* в положение №35.

Вставки – мощнейший инструмент генной инженерии. Допустим, вам требуется инактивировать ген *his3*. Чтобы иметь возможность просто и быстро детектировать инактивацию, вы не просто вырезаете его из генома, а вставляете прямо в его последовательность ген устойчивости к канамицину, *kan*. Полученный вами штамм будет расти на среде с канамицином, и это будет однозначным указанием на то, что ген *his3* инактивирован.

Такая вставка обозначается как *his3Ω::kan* (Ω как знак генно-инженерной манипуляции; сегодня этой омегой пользуются только три олдскульные микробиологи).

Вследствие высокой скорости мутагенеза у бактерий, эффект мутаций в их геноме часто сводится на нет при помощи последующих мутаций.

Если компенсирующая мутантный фенотип мутация является строго обратной исходной мутации, то есть восстанавливает исходную последовательность ДНК, такая мутация называется **реверсивной мутацией**, или **реверсией**.

Если компенсирующая мутантный фенотип мутация происходит в любом другом месте бактериального генома, кроме того, где имеет место исходная мутация, такая мутация называется **супрессионной, или супрессорной, мутацией**.

Организмы с любым типом компенсаторной мутации называются **ревертантами**.

Если в случае реверсии с механизмами все ясно, то с супрессией нам нужно разобраться поподробней.

### Супрессия



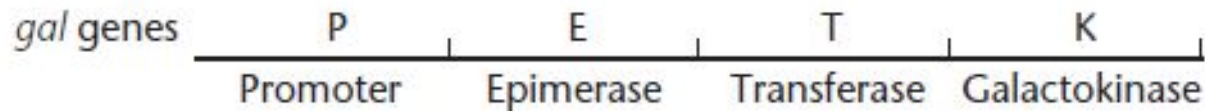
#### **Интрагенная** (в том же гене)

- Обратный сдвиг ORF,
- Замена другой аминокислоты, восстанавливающая активность белка

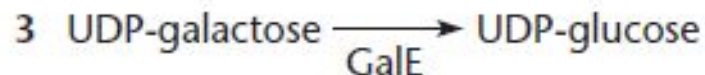
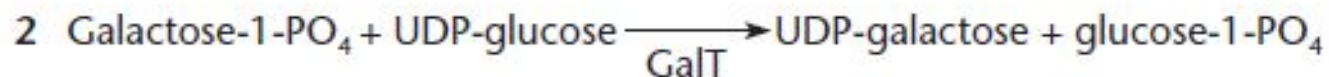
#### **Интергенная** (в другом гене)

- Появление белка, который:
- восстанавливает активность мутантного белка,
  - начинает выполнять функцию мутантного белка,
  - сводит на нет дисфункцию, вызванную

Классический пример интергенной супрессии: мутация в одном гене галактозного оперона супрессирует мутацию в другом гене этого же оперона



Pathway



Мутация в гене *galE* приводит к накоплению токсичных промежуточных продуктов и гибели клеток на среде с галактозой.

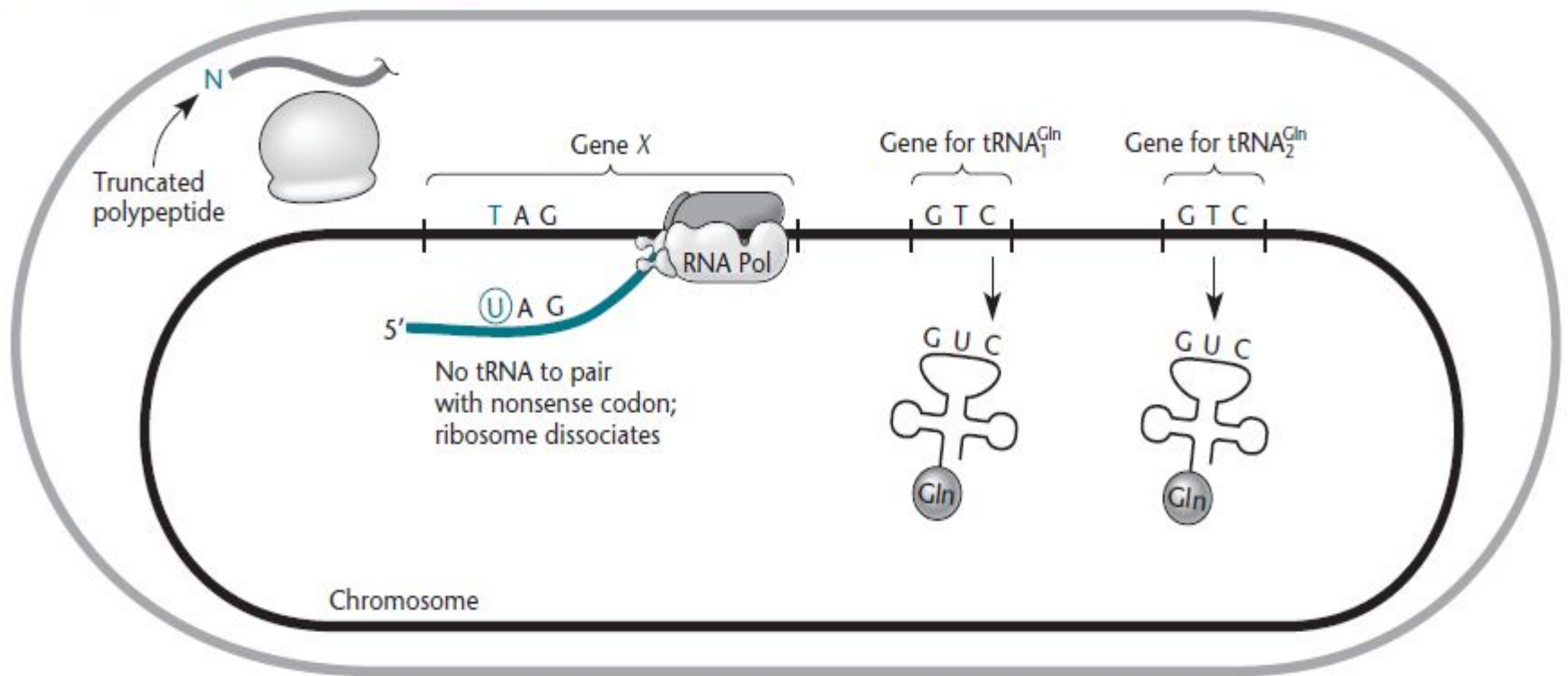
Супрессорная мутация в гене *galK* приводит к тому, что токсичные продукты просто не образуются. Таким образом, клетки не гибнут в присутствии галактозы, хотя и не могут утилизировать ее (фенотип Gal<sup>-</sup>).

# Нонсенс- супрессия

Супрессия нонсенс-мутации посредством мутации в гене тРНК, благодаря которой ее антикодон становится комплементарен стоп-кодону, образовавшемуся в результате нонсенс-мутации.

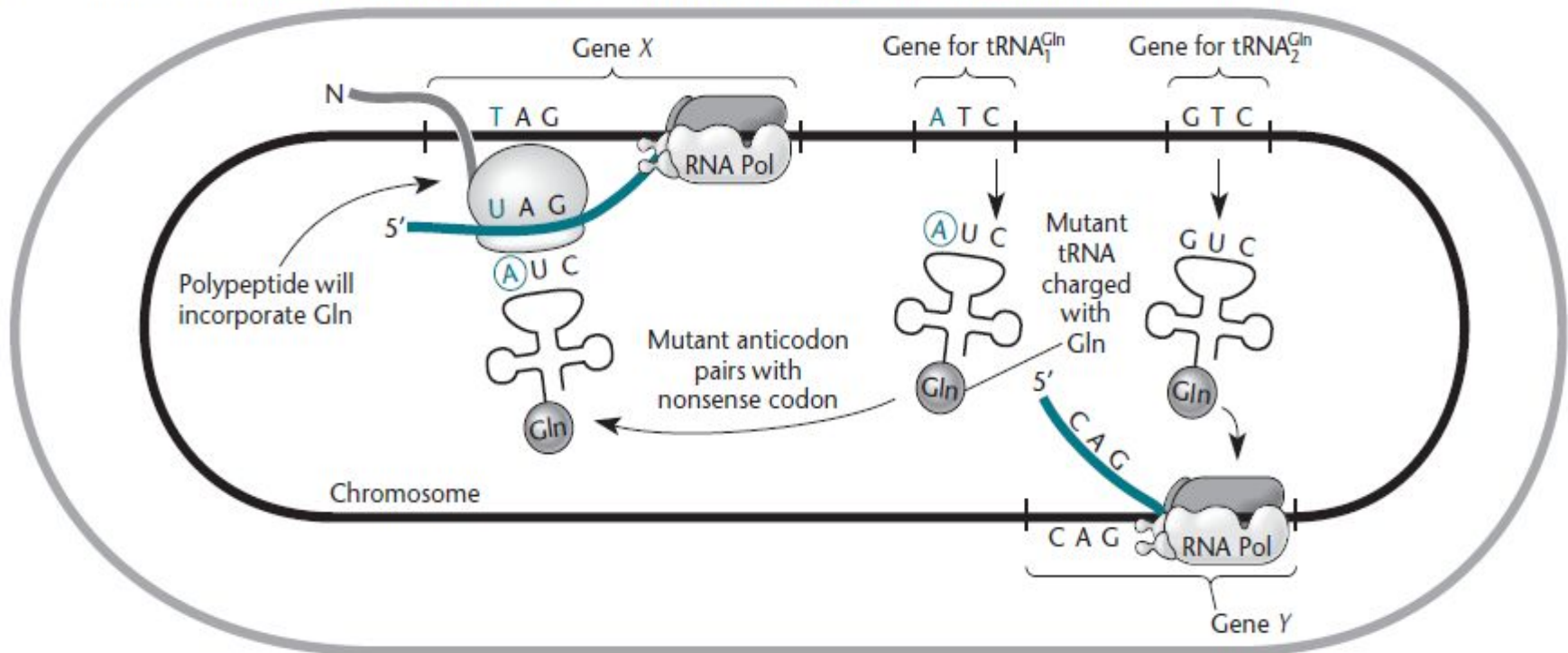
Вот нонсенс-мутация:

B Mutant A with nonsense mutation in gene X



## А вот нонсенс- супрессия:

C Mutant B with **nonsense mutation** in gene X and **nonsense suppressor mutation** in gene for tRNA<sup>Gln</sup><sub>1</sub>



- Последовательность белка будет другой, одна аминокислота заменится
- Супрессорная тРНК будет работать и на правильных стоп-кодонах, но это не очень страшно: с ними все равно будет чаще связываться фактор терминации RRF.

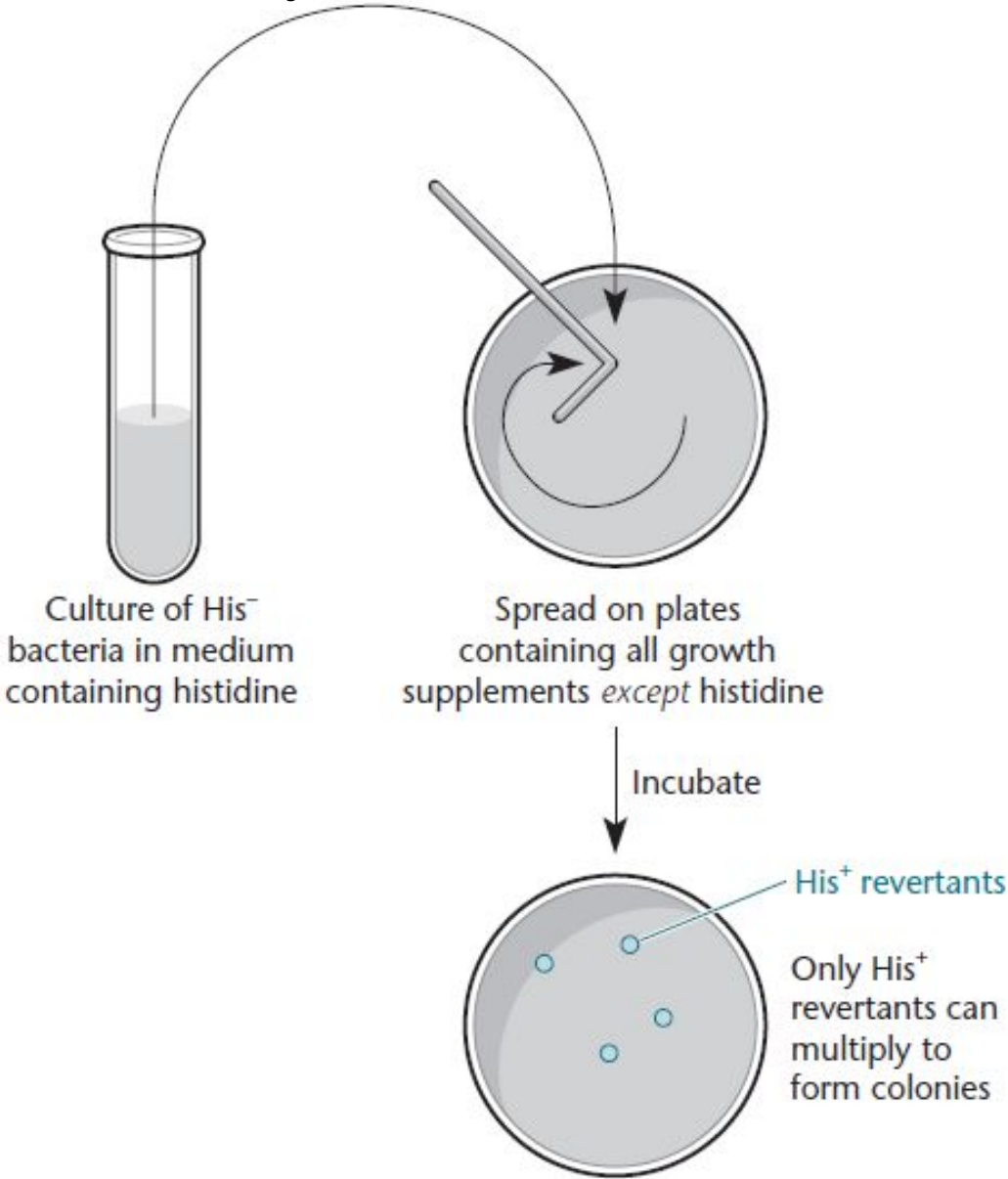
# Анализ бактериальных мутаций

Бактерии – удобнейший генетический объект! Поэтому мутационный анализ бактерий до сих пор остается крайне актуальным и используется огромным количеством научных коллективов.

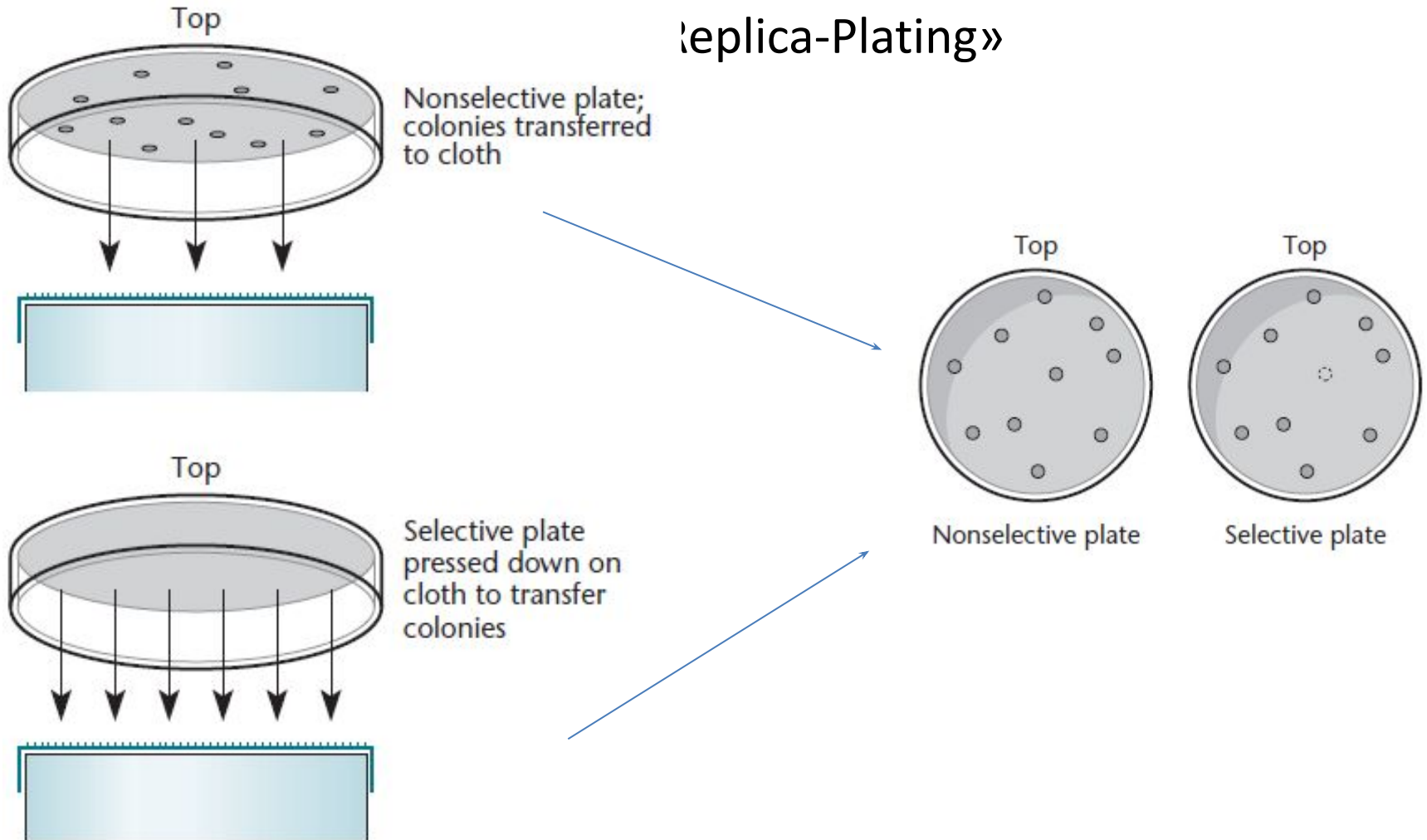
- Бактерии – гаплоидные организмы, а это означает, что любая мутация моментально закрепляется в последующих поколениях (в лабораторных условиях, и если она не летальная, конечно).
- У бактерий отсутствует половое размножение, поэтому в норме две дочерние бактериальные клетки генетически идентичны родительской бактерии.
- У бактерий крайне высока скорость образования мутаций, особенно под селективным давлением, поэтому получать бактериальных ревертантов быстро и просто.

Это позволяет с удивительной легкостью изолировать и анализировать бактериальных мутантов.

# Селекция мутантов



# Скрининг мутантов без селекции «replica-Plating»



Существует громадное множество методов генетического/мутационного анализа бактерий, но рассказывать о них можно только в рамках отдельного курса...