# Мутации

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 приобретается 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 $His^-$ - ауксотрофы.

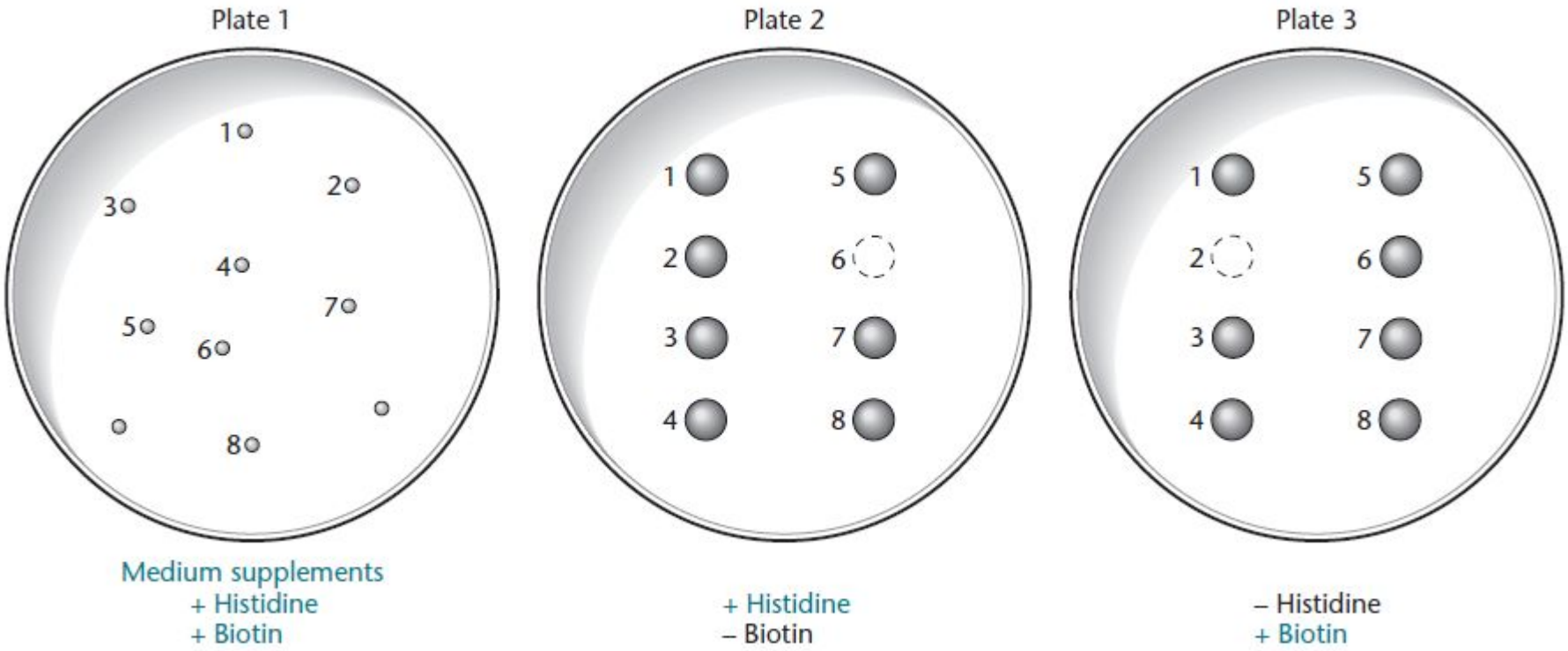
**Катаболические мутанты** - мутантные бактерии, не способные использовать для роста какое-либо вещество, которое используется бактериями в норме при его поступлении извне.
Бактерии с фенотипом $Mal^-$ не способны расти на средах, в которых единственным источником углерода является сахар мальтоза, и 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 $His^-$ - 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

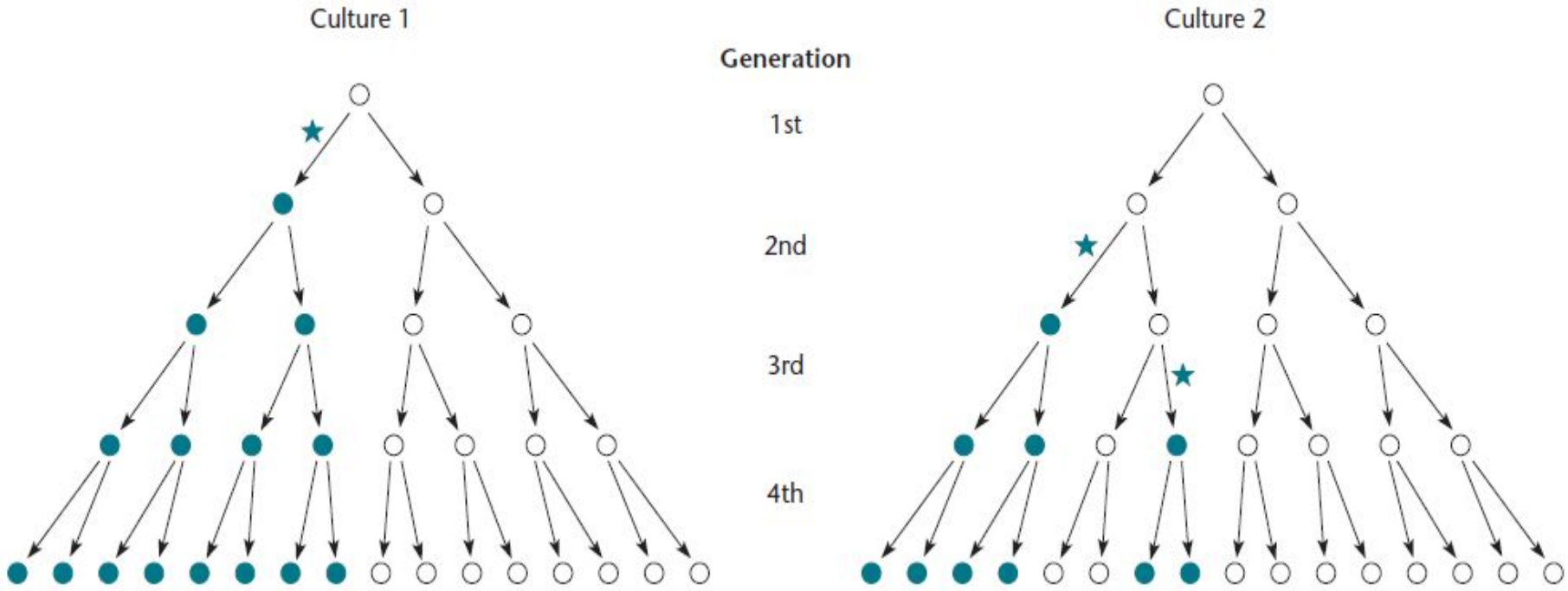



Аналогичным образом можно изолировать и катаболические, и температуро-чувствительные мутанты.

**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**.



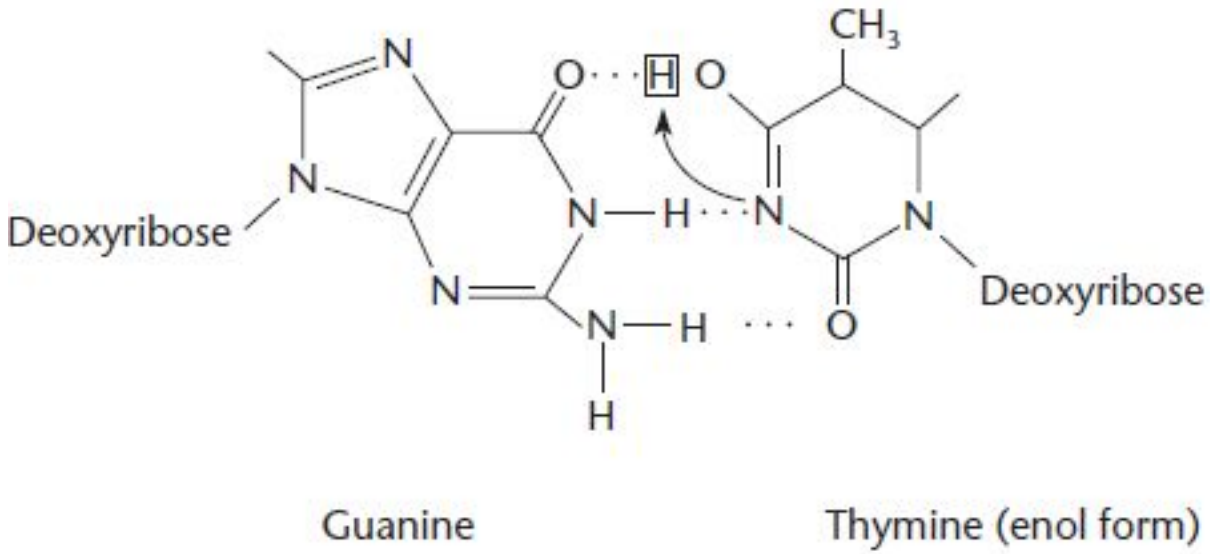

Если в бактериальной клетке случилась мутация, то все ее потомки будут также содержать данную мутацию (если выживут). Это позволяет легко отбирать мутантные бактерии в виде клонов на чашках Петри с агаризованными средами.

# Типы мутаций

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

# Замена пары оснований

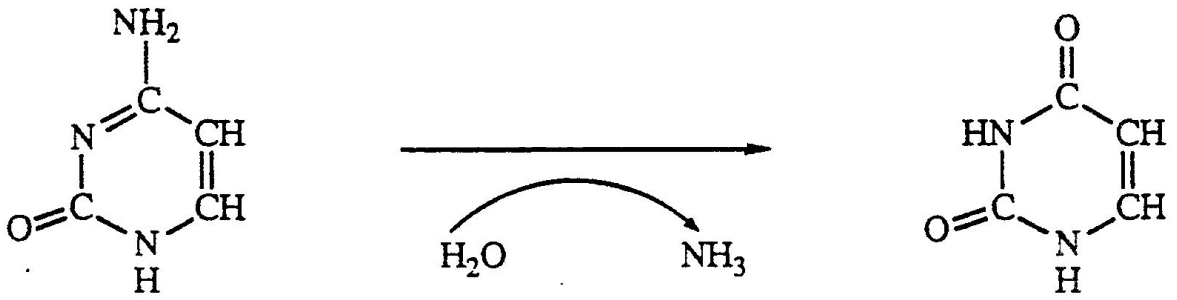
Может случаться из-за ошибок репликации, радиационного повреждения, химических воздействий.




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

# Дезаминирование цитозина

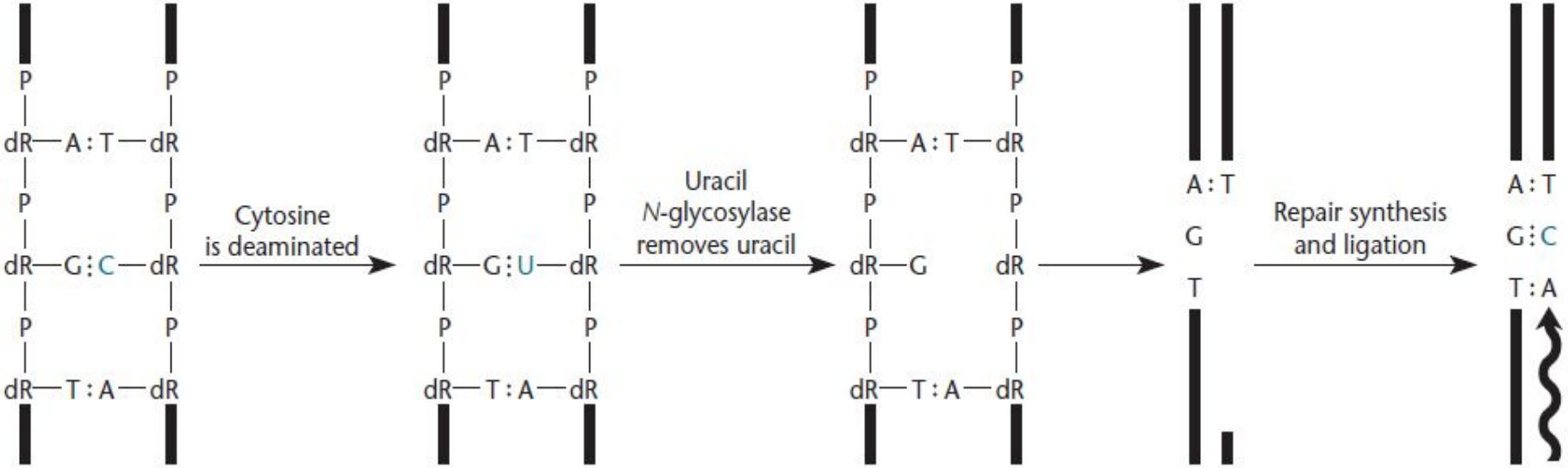
Происходит спонтанно с достаточно высокой частотой, особенно при повышенных температурах, с образованием урацила.




Cytosine
(4-amino-2-oxopyrimidine)

Uracil
(2,4-dioxopyrimidine)

# 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.

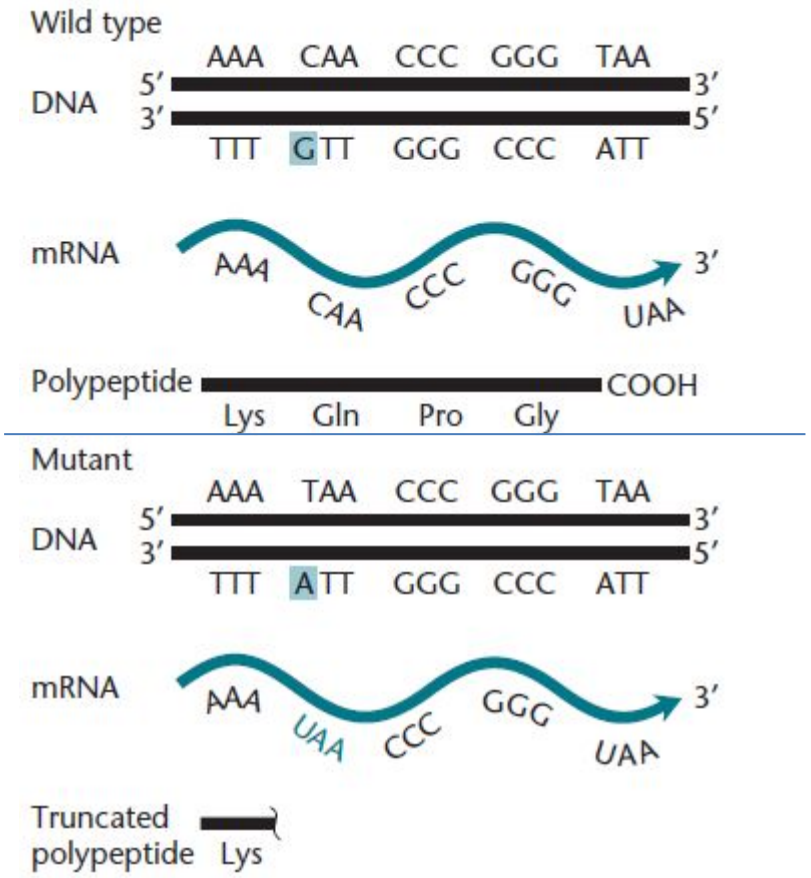
Замены пары оснований в белковых генах подразделяются на три типа:

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

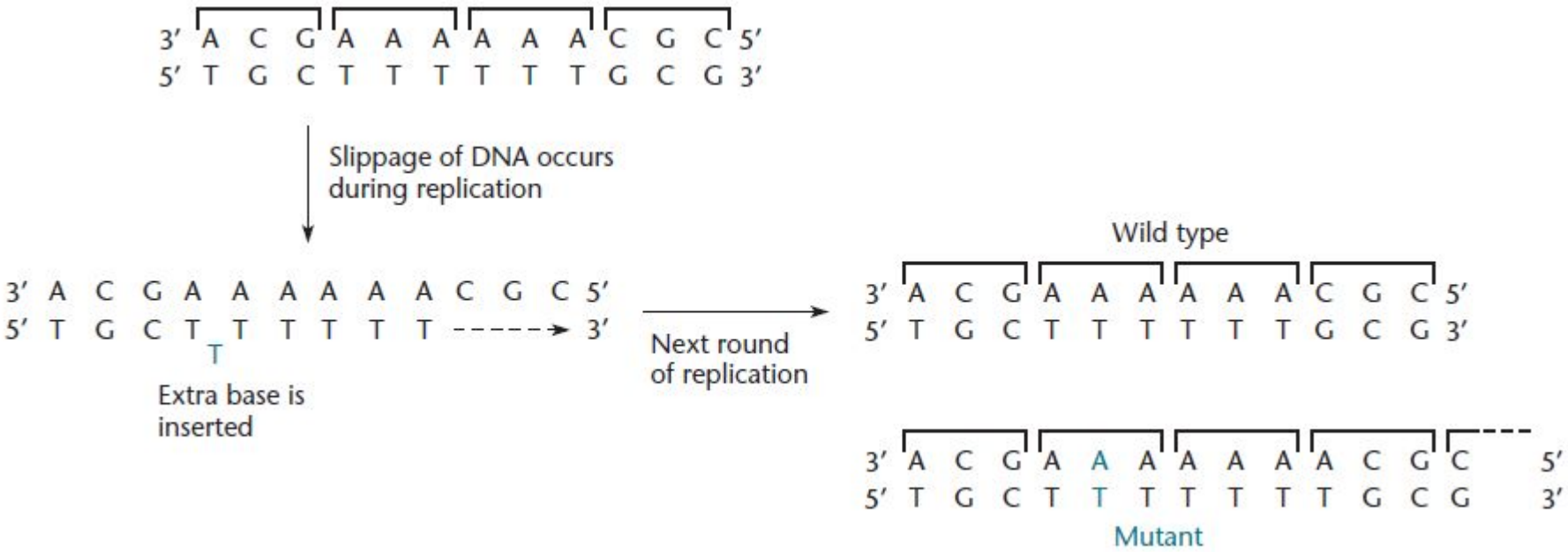
   UAA – ochre

   UGA – opal



# Делеция или вставка пары оснований

Основная причина – наличие гомополимерных участков в составе ДНК.

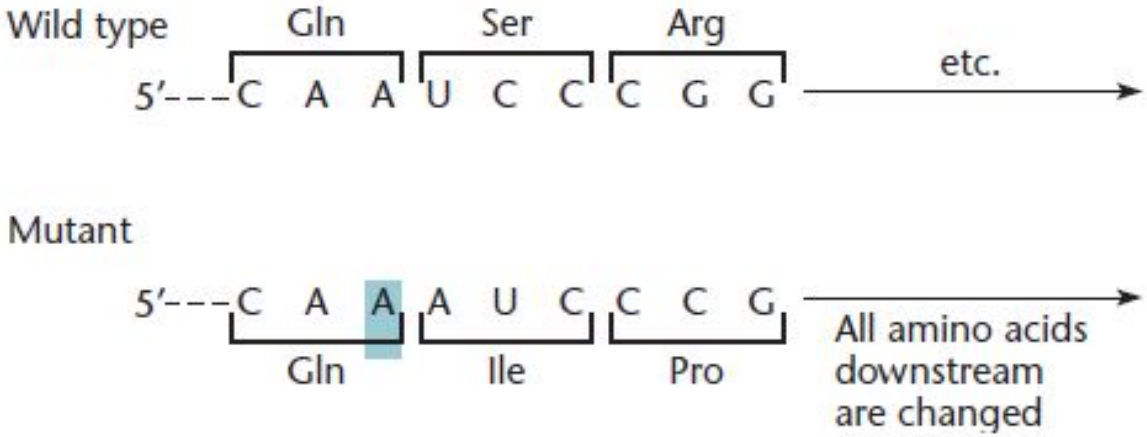



ДНК-полимераза плохо умеет считать повторяющиеся нуклеотиды и может вставить один лишний или пропустить один нужный.

# Последствия делеции или вставки пары оснований

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

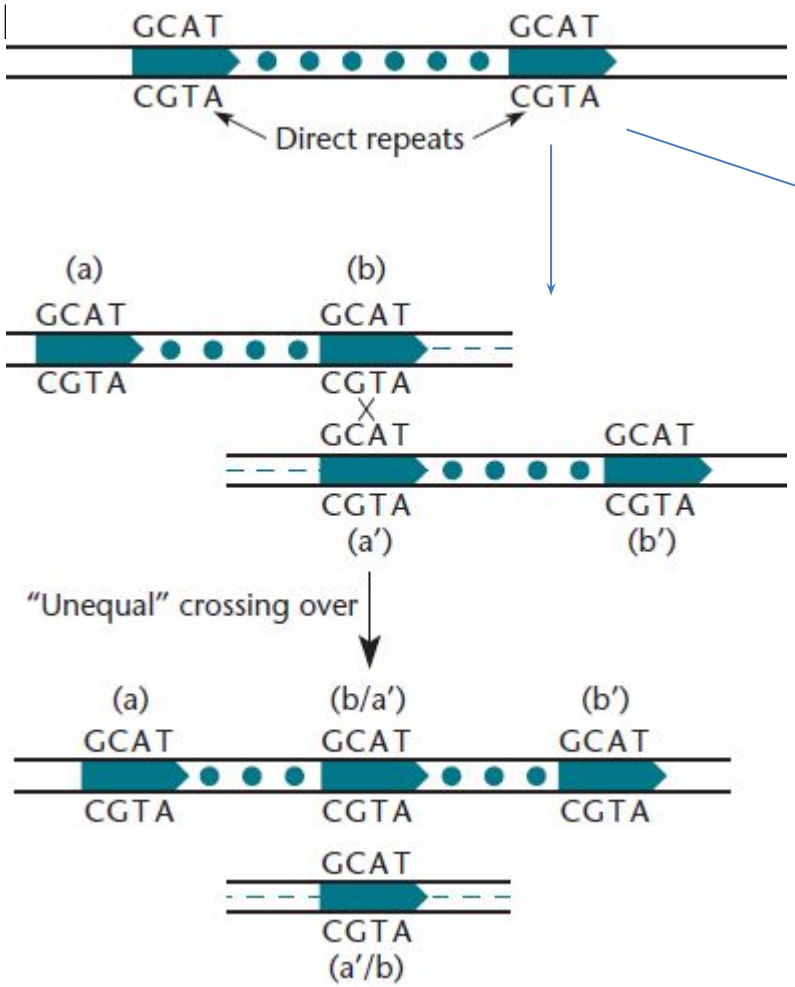
Если делеция или вставка пары оснований происходит в белок-кодирующем гене, следствием этого является **сдвиг рамки считывания**.

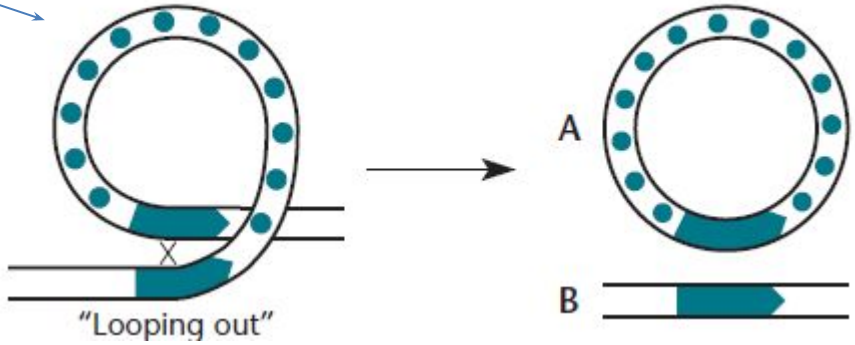



Соответственно, аминокислотная последовательность белка начиная с какого-то момента становится совершенно неправильной. В подавляющем большинстве случаев такие белки нефункциональны.

# Делеци
# 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

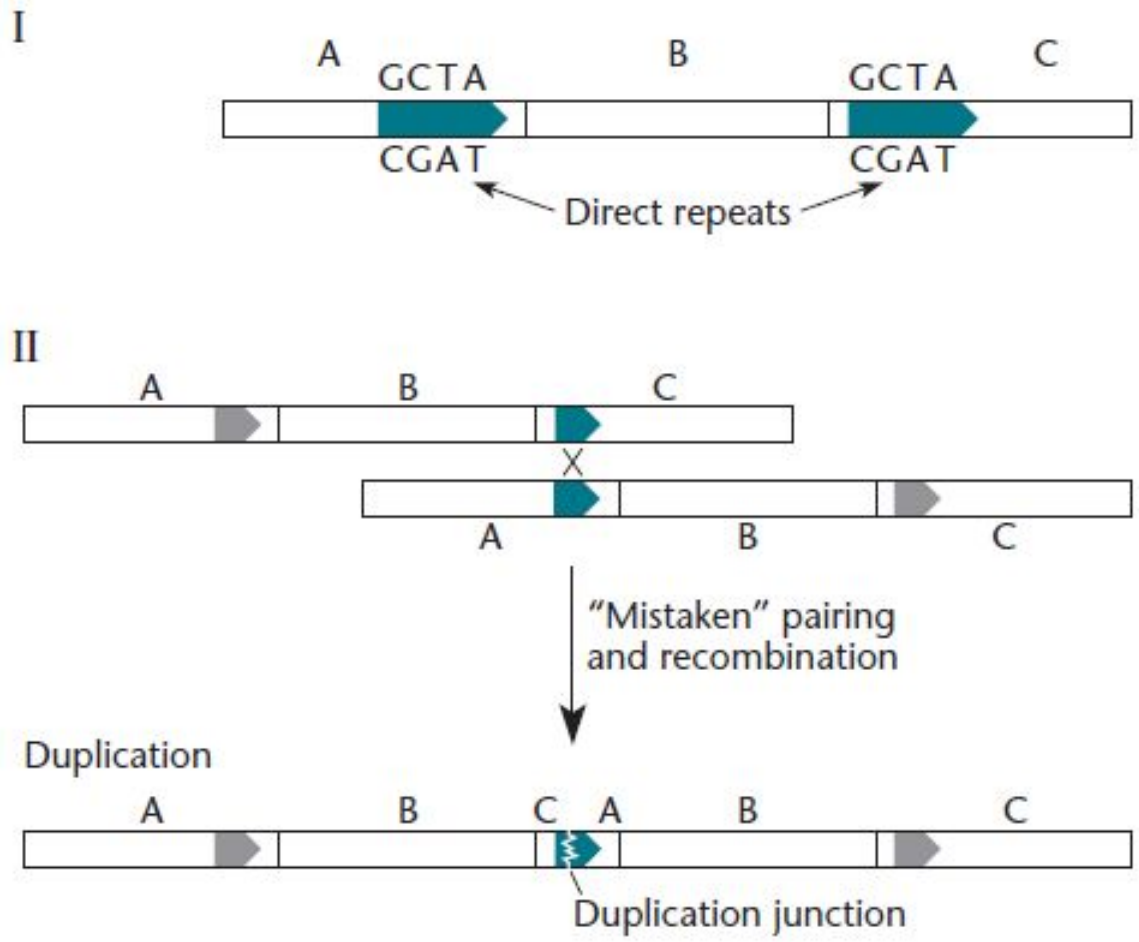



Обозначение делеции:
*Δ(lac-proAB)195* – делеция №195, затрагивающая гены *lac* и *proAB.*

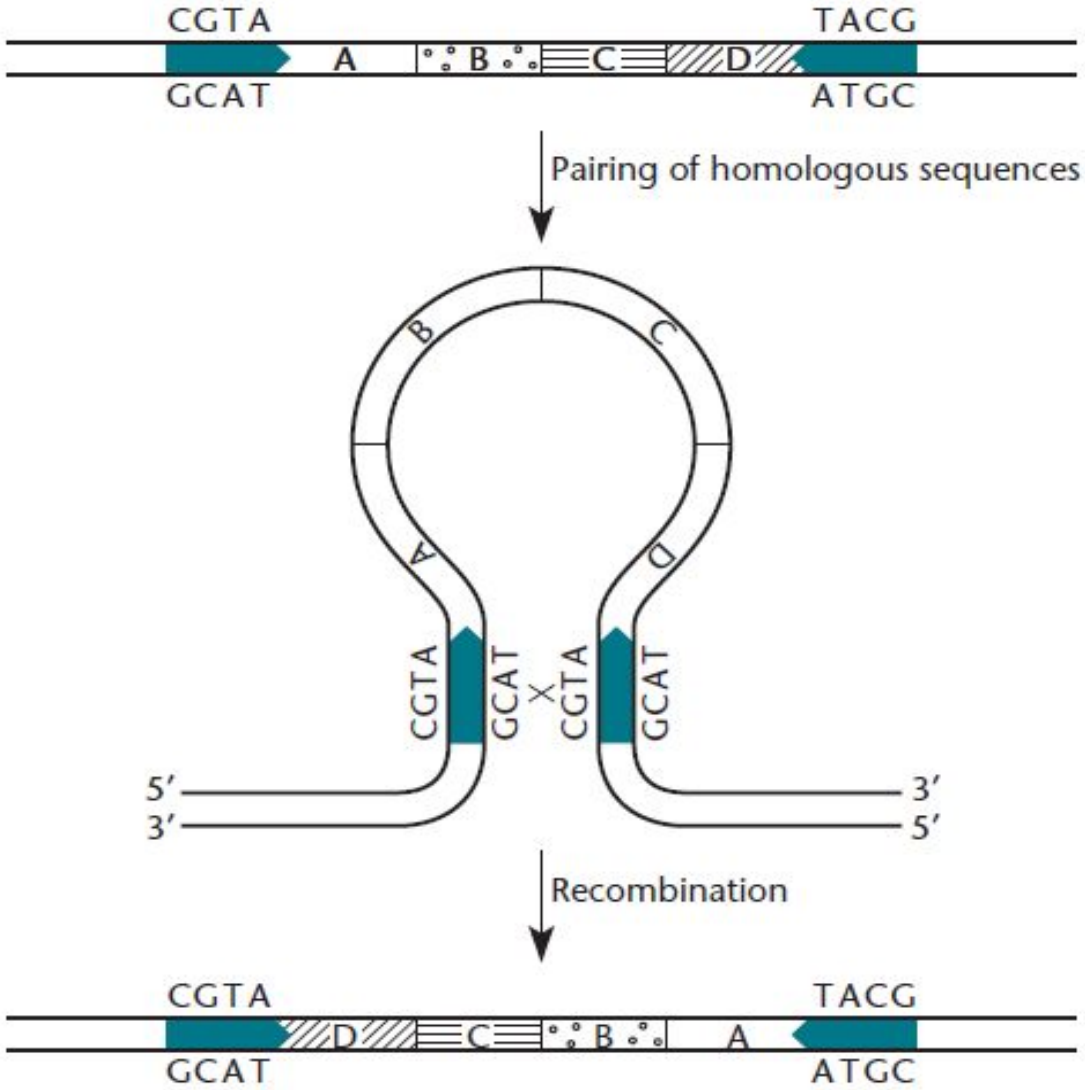
# Дупликации тандемных повторов

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



# Инверсии

Происходят аналогично делециям, но при наличии ИНВЕРТИРОВАННЫХ повторов




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

# Вставки

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

Обозначение вставок:
*galK35::*Tn*5* – 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 *his3*Ω::*kan* (Ω как знак генно-инженерной манипуляции; сегодня этой омегой пользуются только тру 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**.

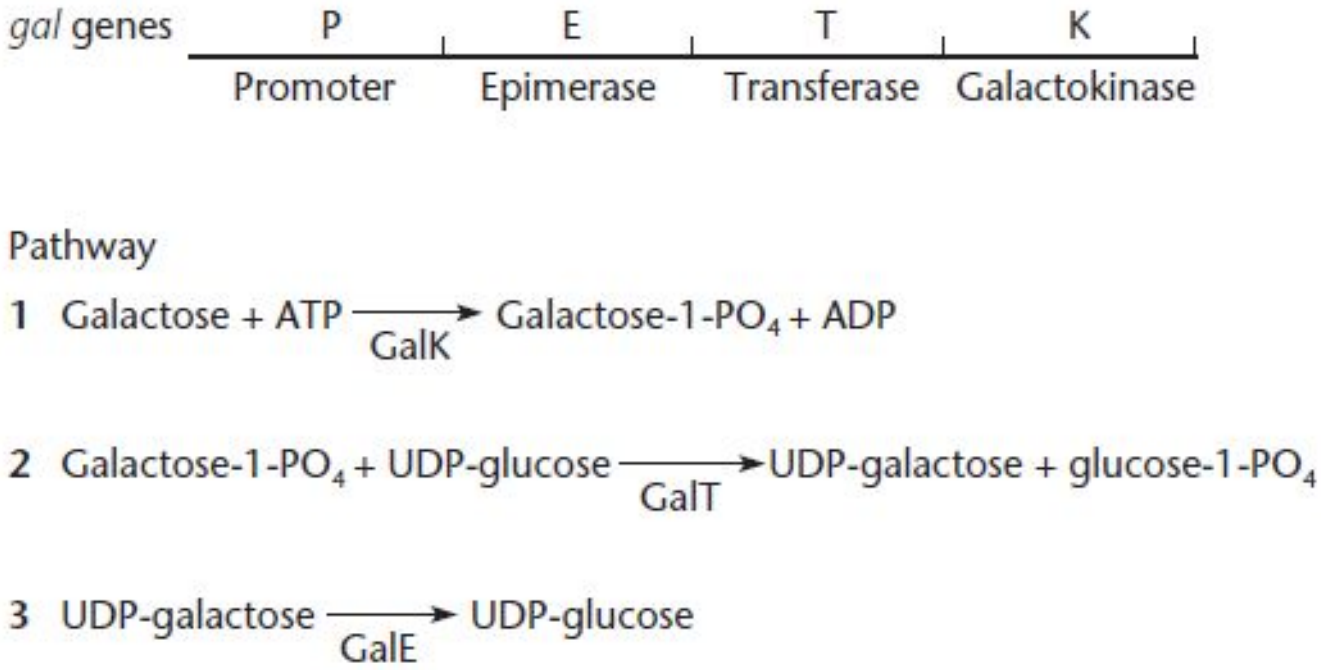
Если в случае реверсии с механизмами все ясно, то с супрессией нам нужно разобраться поподробней.

**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

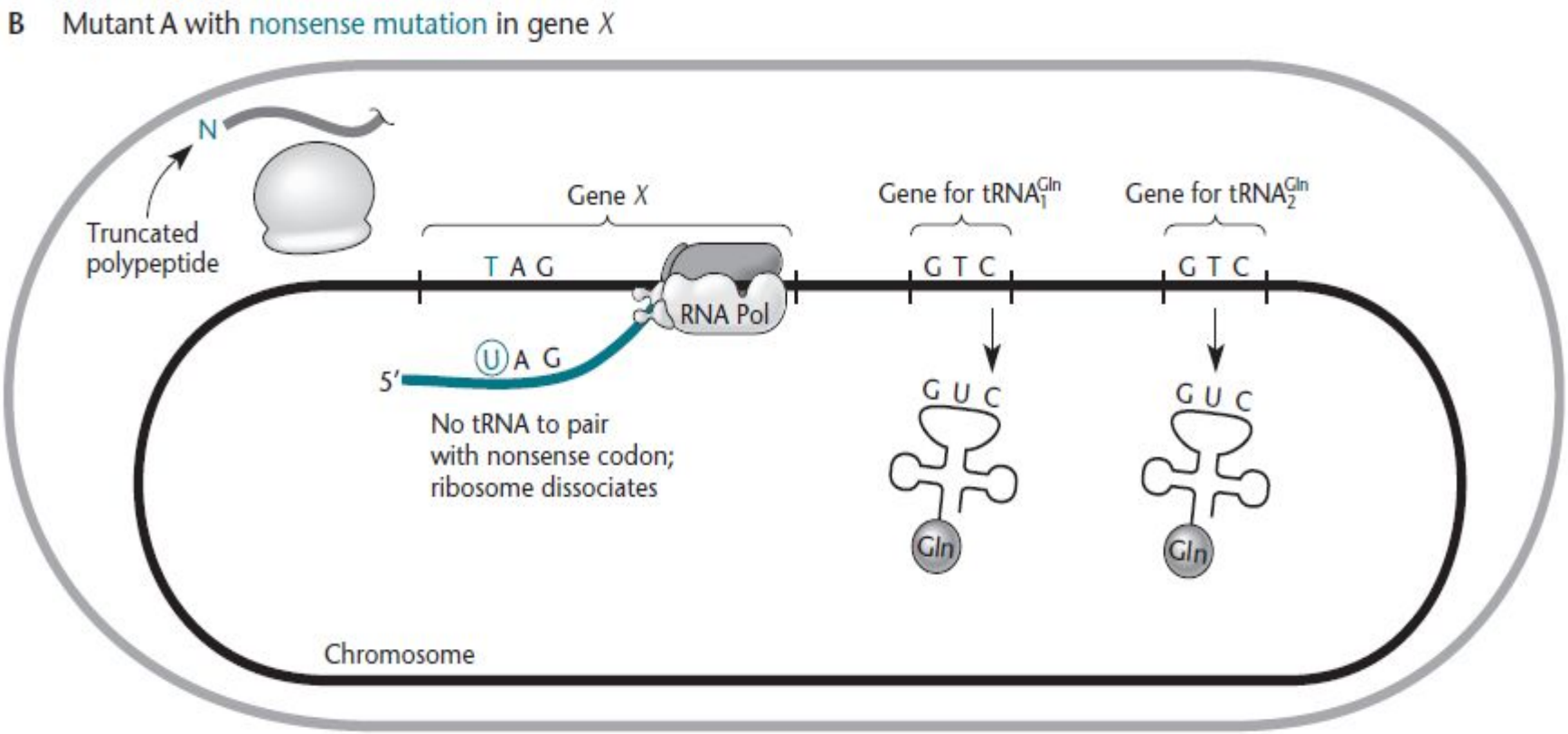



Мутация в гене *galE* приводит к накоплению токсичных промежуточных продуктов и гибели клеток на среде с галактозой.
Супрессорная мутация в гене *galK* приводит к тому, что токсичные продукты просто не образуются. Таким образом, клетки не гибнут в присутствии галактозы, хотя и не могут утилизировать ее (фенотип Gal-).

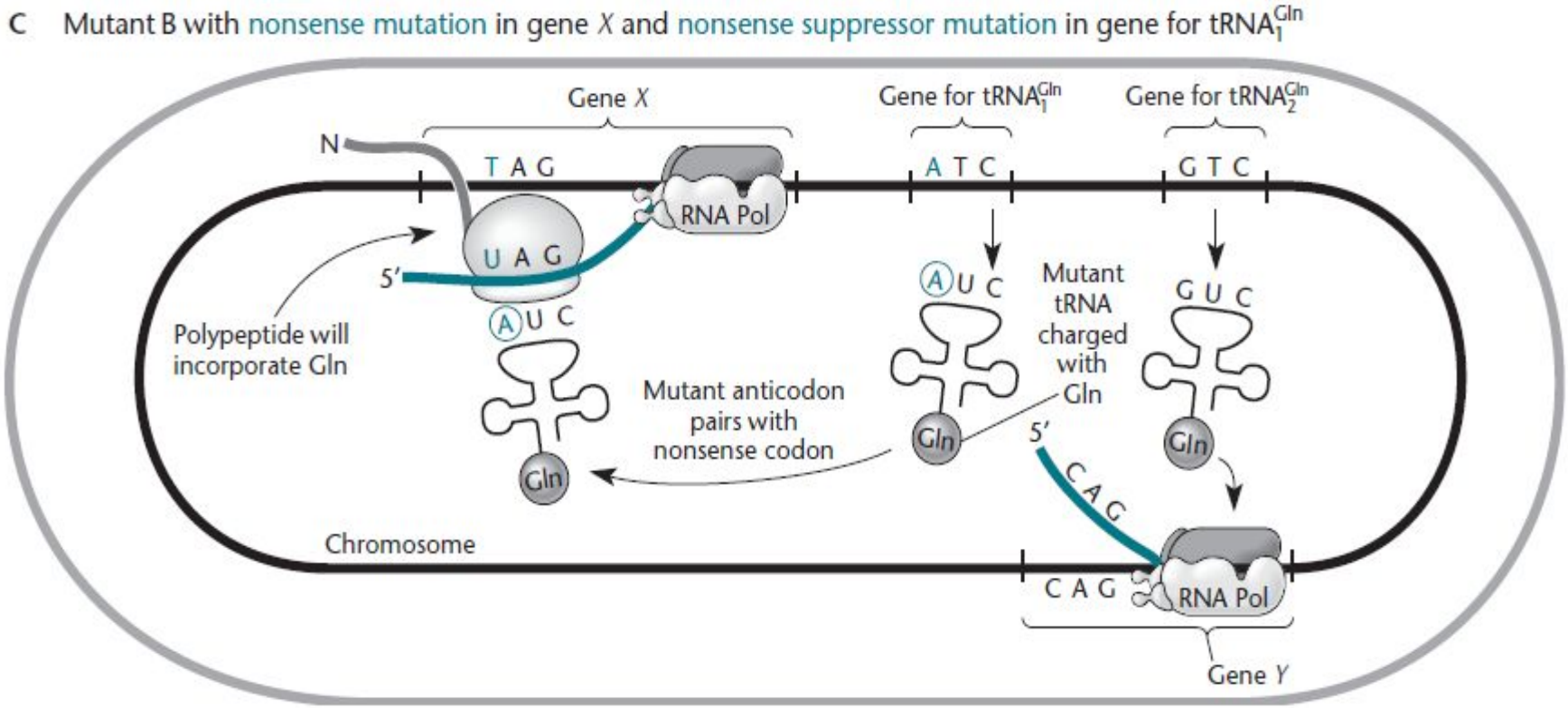
# Нонсенс-супрессия

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

Вот нонсенс-мутация:



А вот нонсенс-супрессия:




-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.

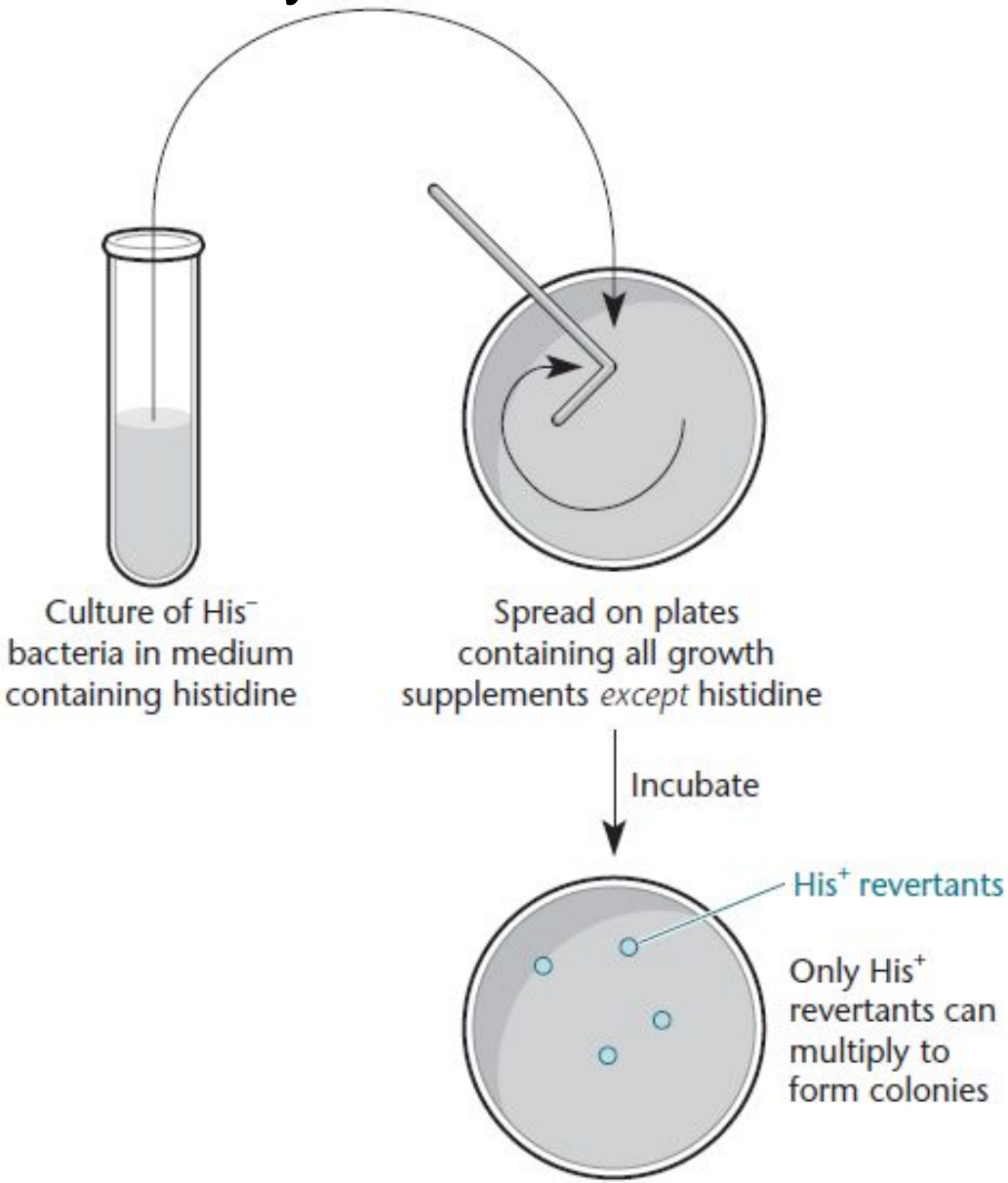
-Бактерии – гаплоидные организмы, а это означает, что любая мутация моментально закрепляется в последующих поколениях (в лабораторных условиях, и если она не летальная, конечно).

-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.

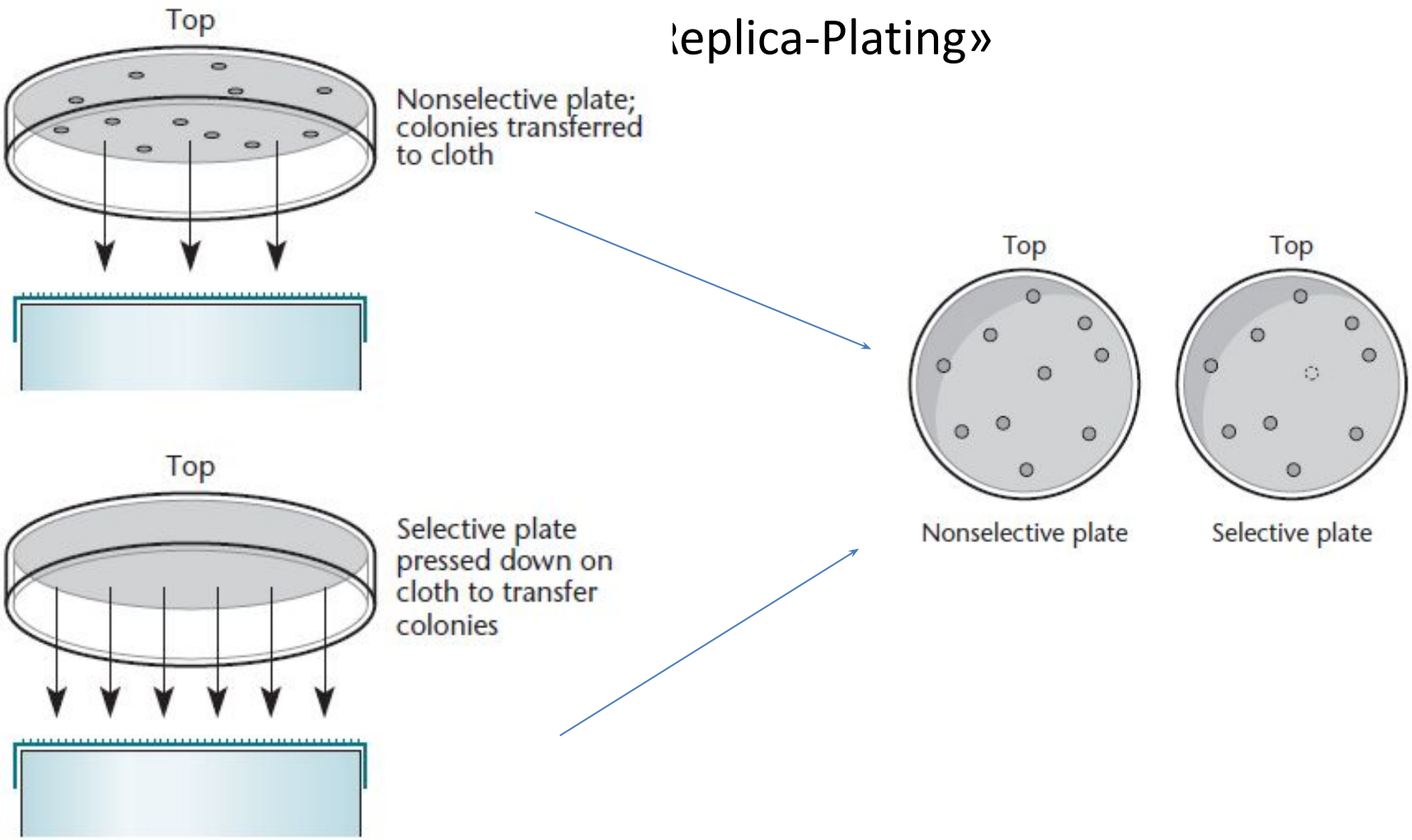
Это позволяет с удивительной легкостью изолировать и анализировать бактериальных мутантов.

# 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…