

# 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 His<sup>-</sup> - 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<sup>-</sup> не способны расти на средах, в которых единственным источником углерода является сахар мальтоза, и поэтому относятся к катаболическим мутантам.

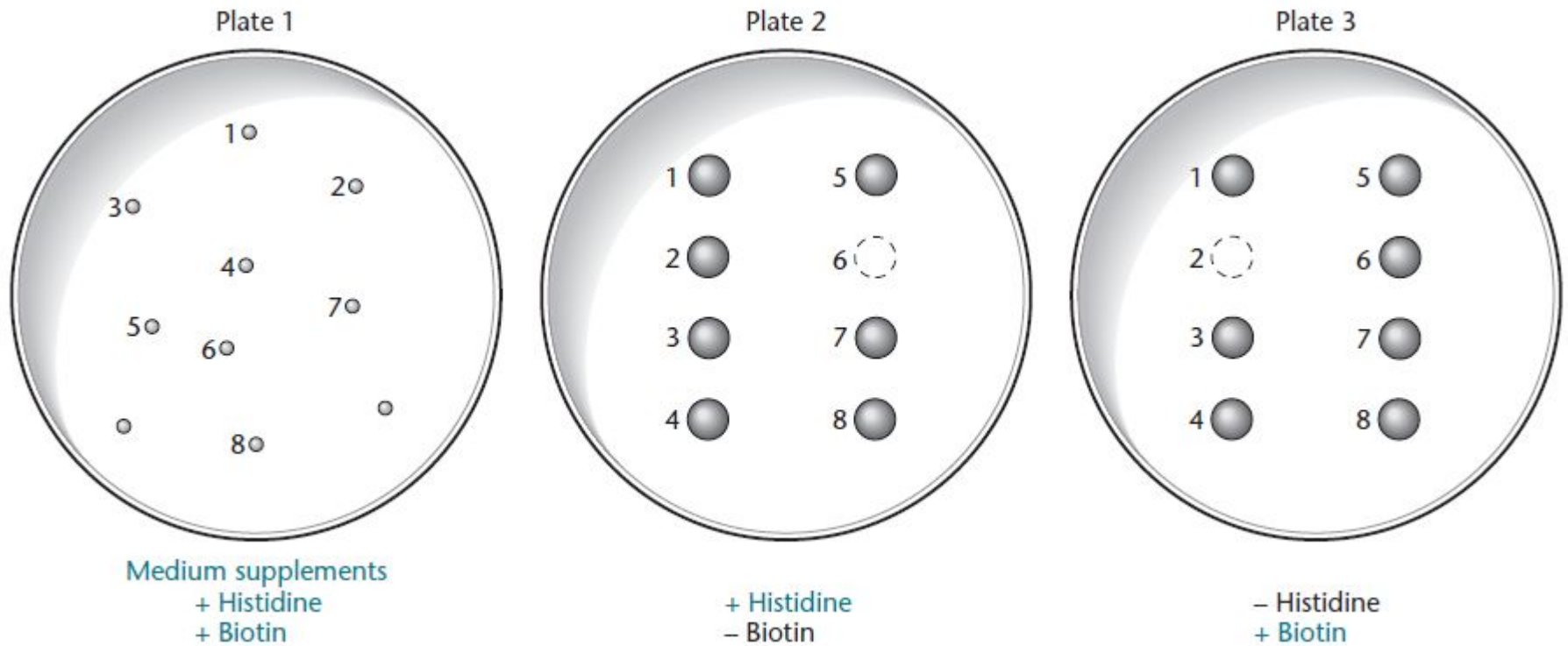
**Летальные мутации** – мутации, приводящие к безусловной гибели бактериальной клетки. Поскольку такие мутации невозможно изучать (кроме самого факта их летальности), о них мы говорить практически не будем.

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

Мутация, приводящая к фенотипу His<sup>-</sup> - 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

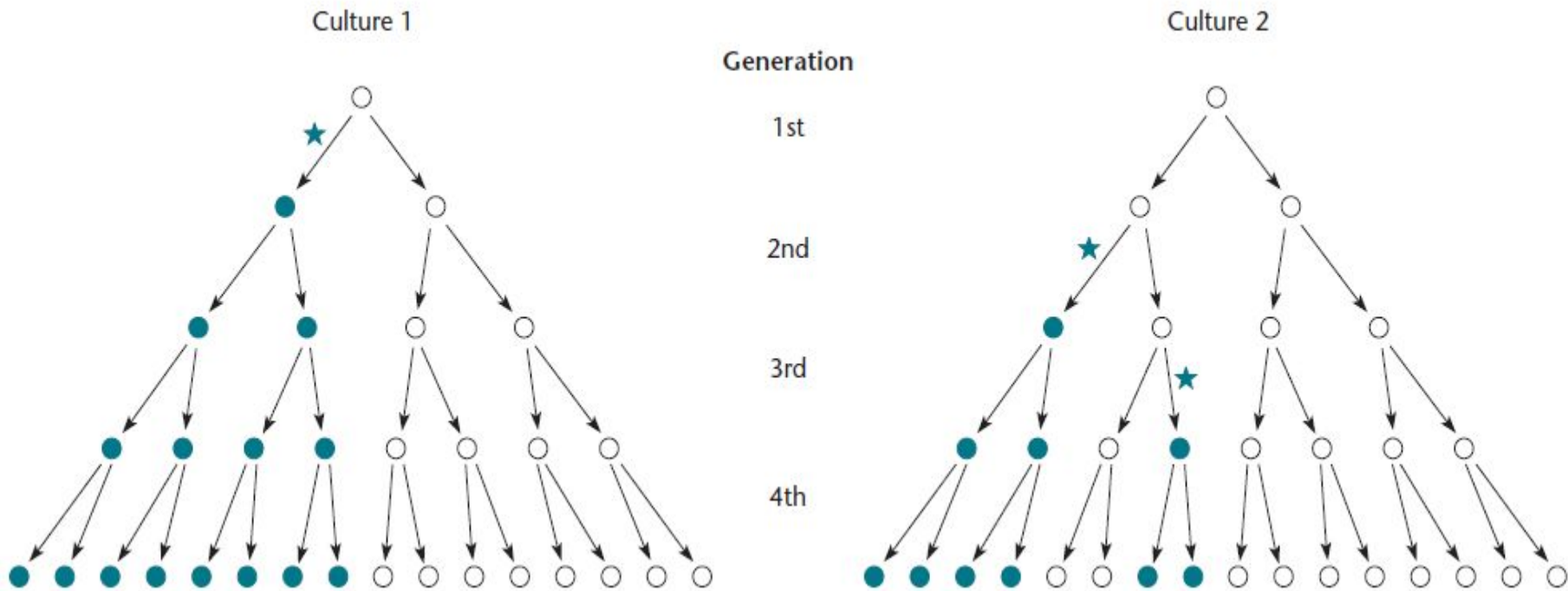


Аналогичным образом можно изолировать и катаболические, и температурочувствительные мутанты.

**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**.



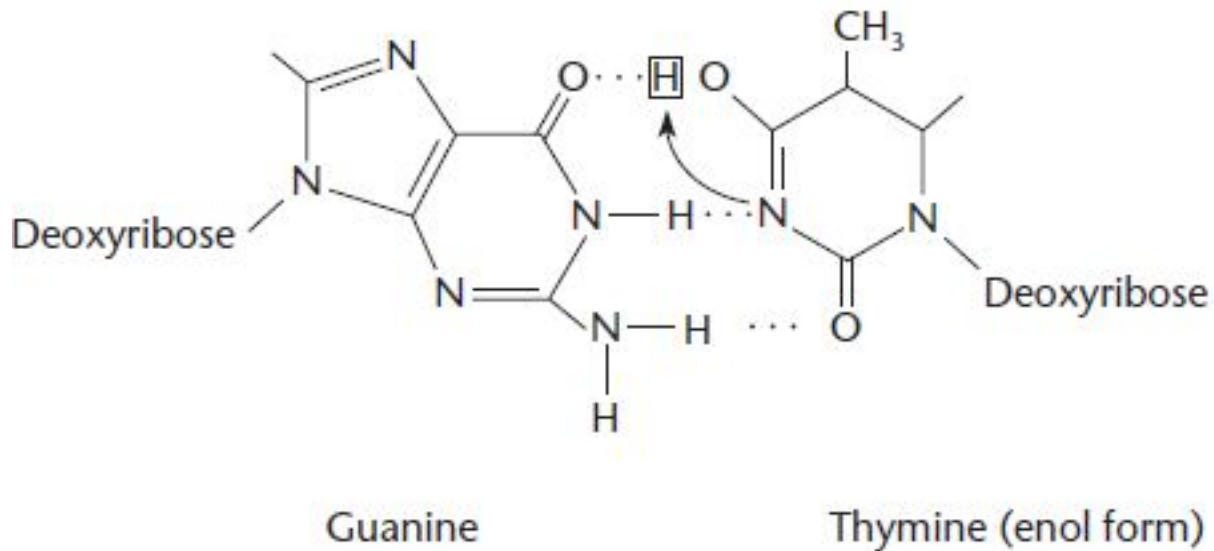
Если в бактериальной клетке случилась мутация, то все ее потомки будут также содержать данную мутацию (если выживут). Это позволяет легко отбирать мутантные бактерии в виде клонов на чашках Петри с агаризованными средами.

# 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.



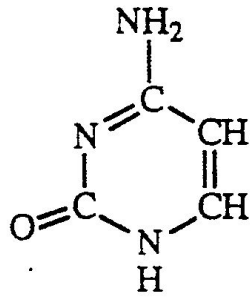
Спаривание гуанина с альтернативной енольной формой тимина, являющееся распространенной причиной ошибочного встраивания Т напротив G при репликации.



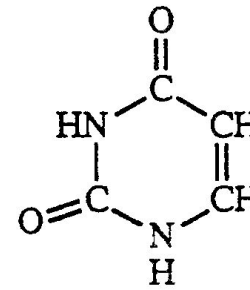
# Дезаминирование

## ЦИТОЗИНА

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

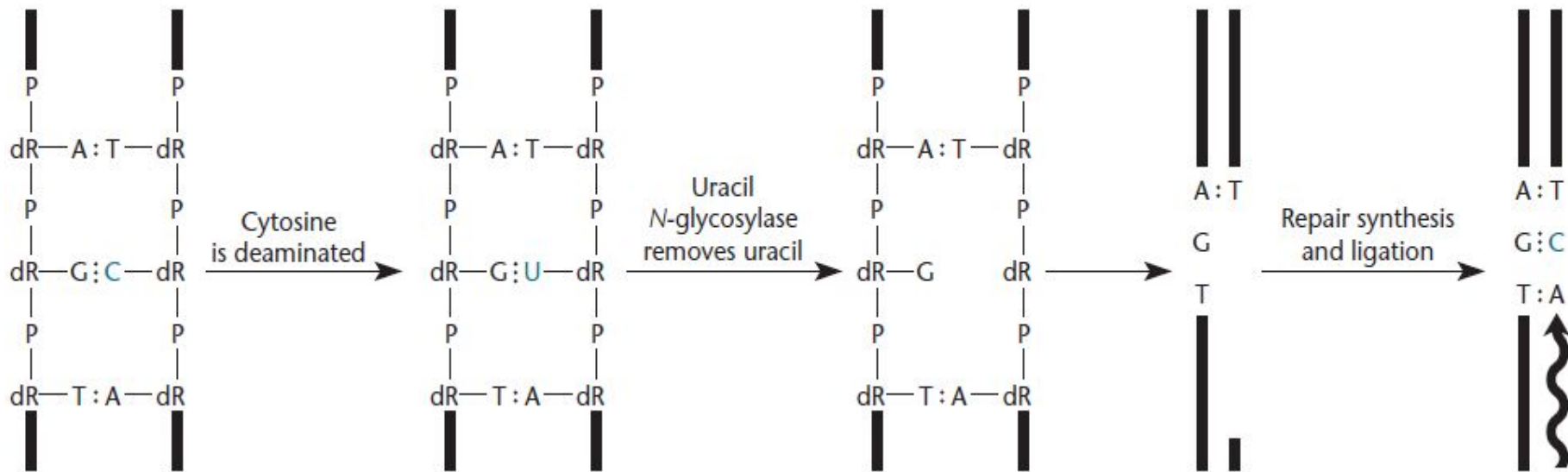


Cytosine  
(4-amino-2-oxypyrimidine)



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.

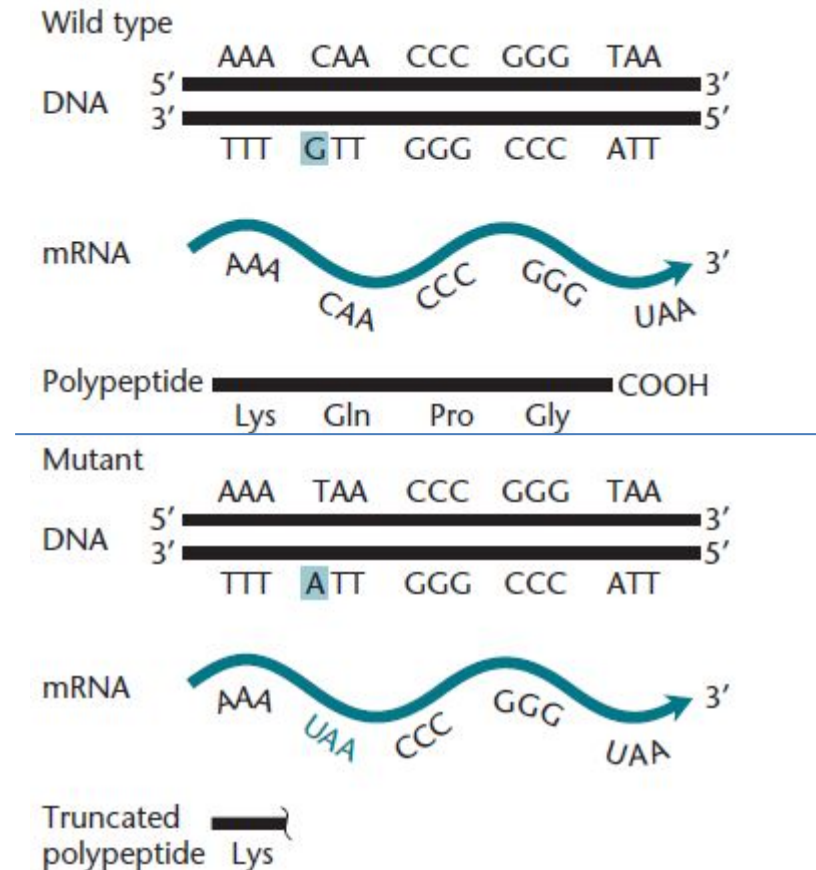
Замены пары оснований в белковых генах подразделяются на три типа:

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

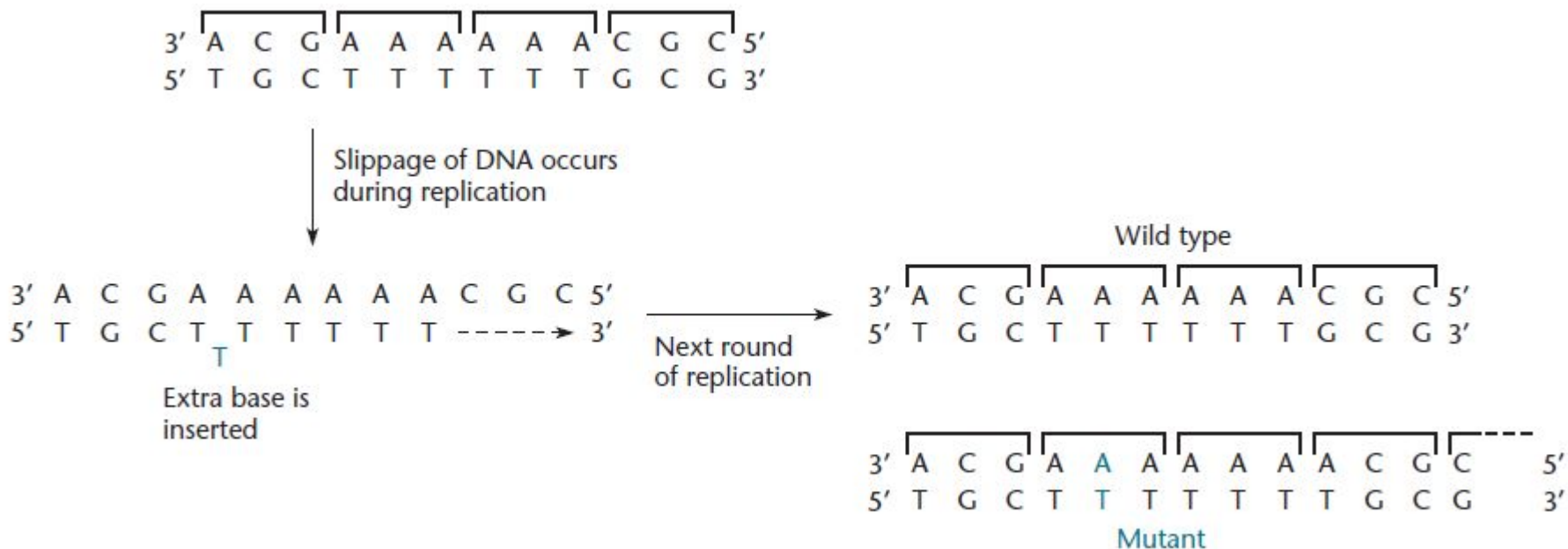
UAA – ochre

UGA – opal



# Делеция или вставка пары оснований

Основная причина – наличие гомополимерных участков в составе ДНК.

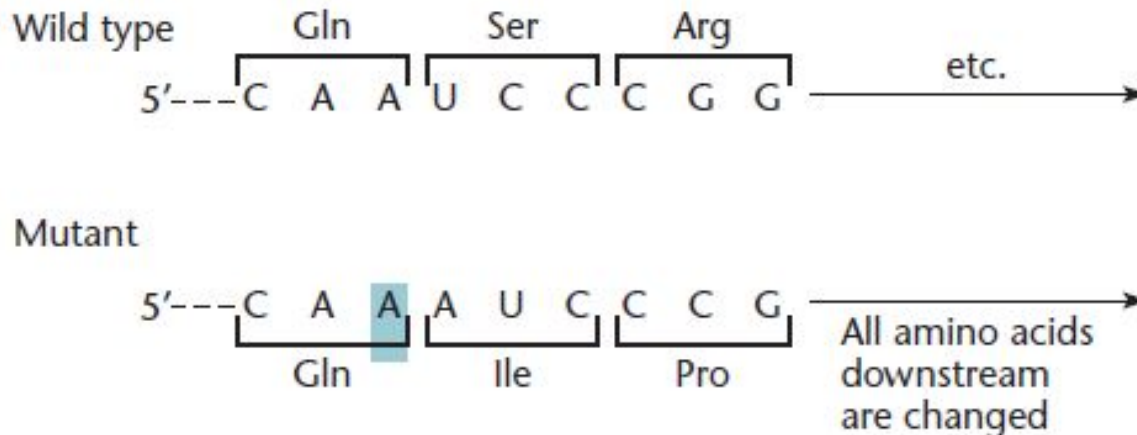


ДНК-полимераза плохо умеет считать повторяющиеся нуклеотиды и может вставить один лишний или пропустить один нужный.

# Последствия делеции или вставки пары оснований

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

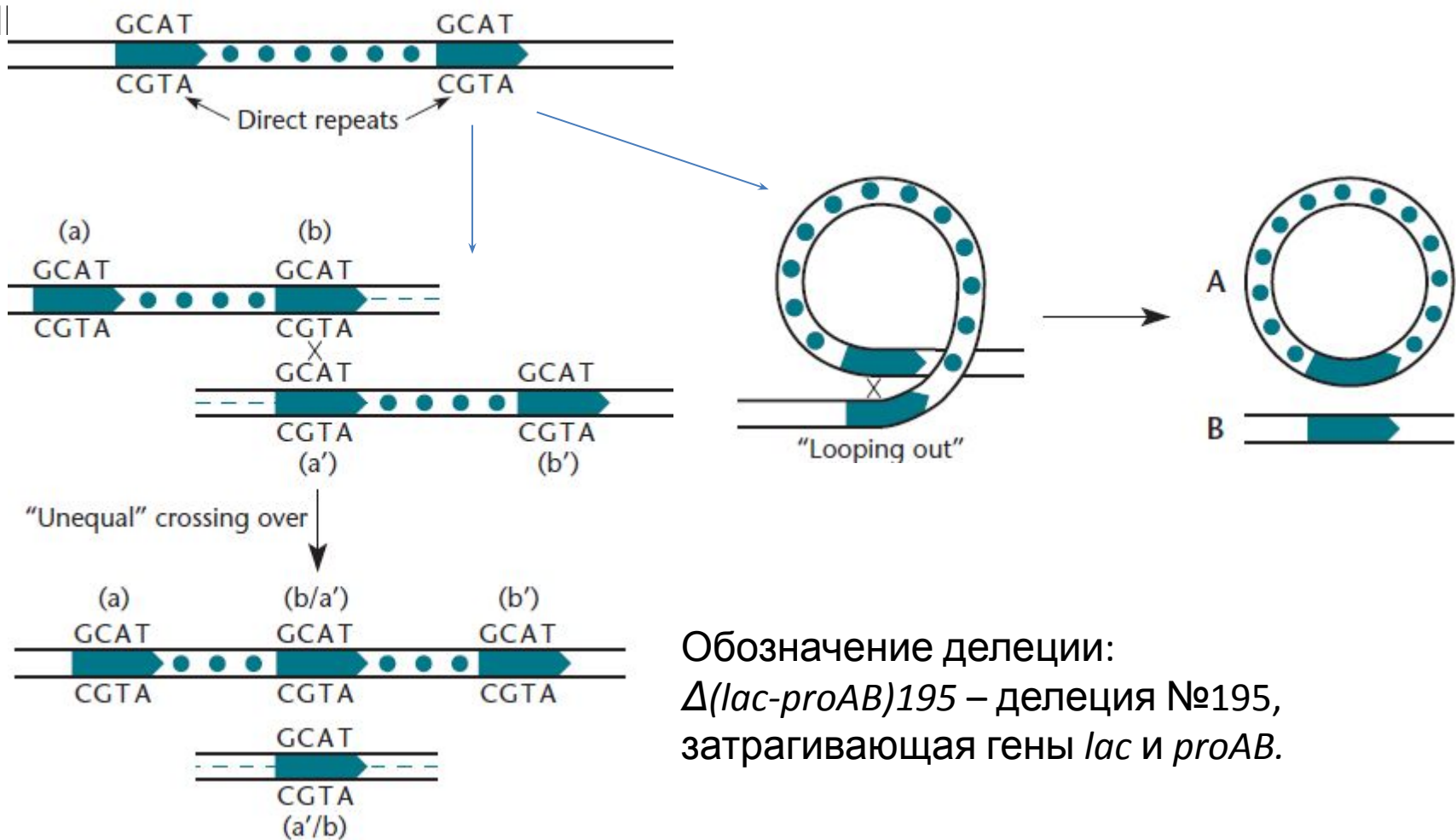
Если делеция или вставка пары оснований происходит в белок-кодирующем гене, следствием этого является **сдвиг рамки считывания**.



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

# Делеции и

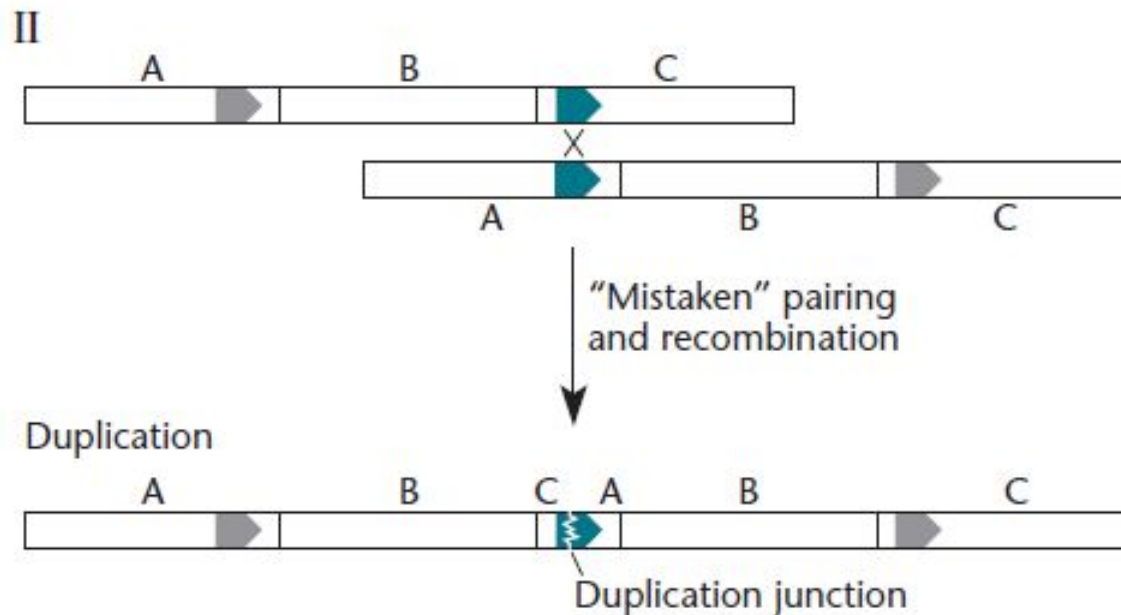
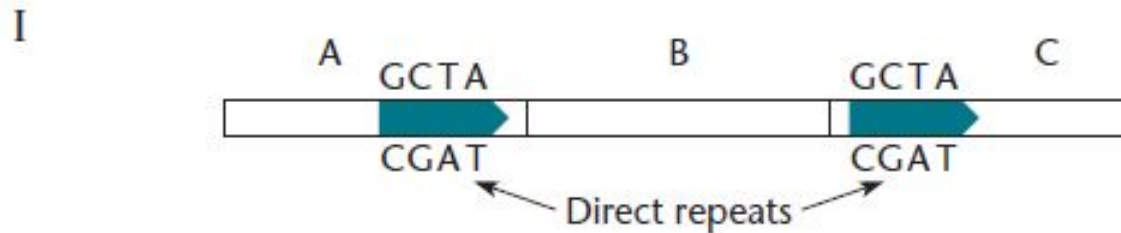
Спонтанно происходят достаточно редко. Основная причина – эктопическая рекомбинация, то есть рекомбинация, происходящая не там, где нужно. Условием эктопической рекомбинации является наличие ПРЯМЫХ повторов в ДН



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

# Дубликации тандемных повторов

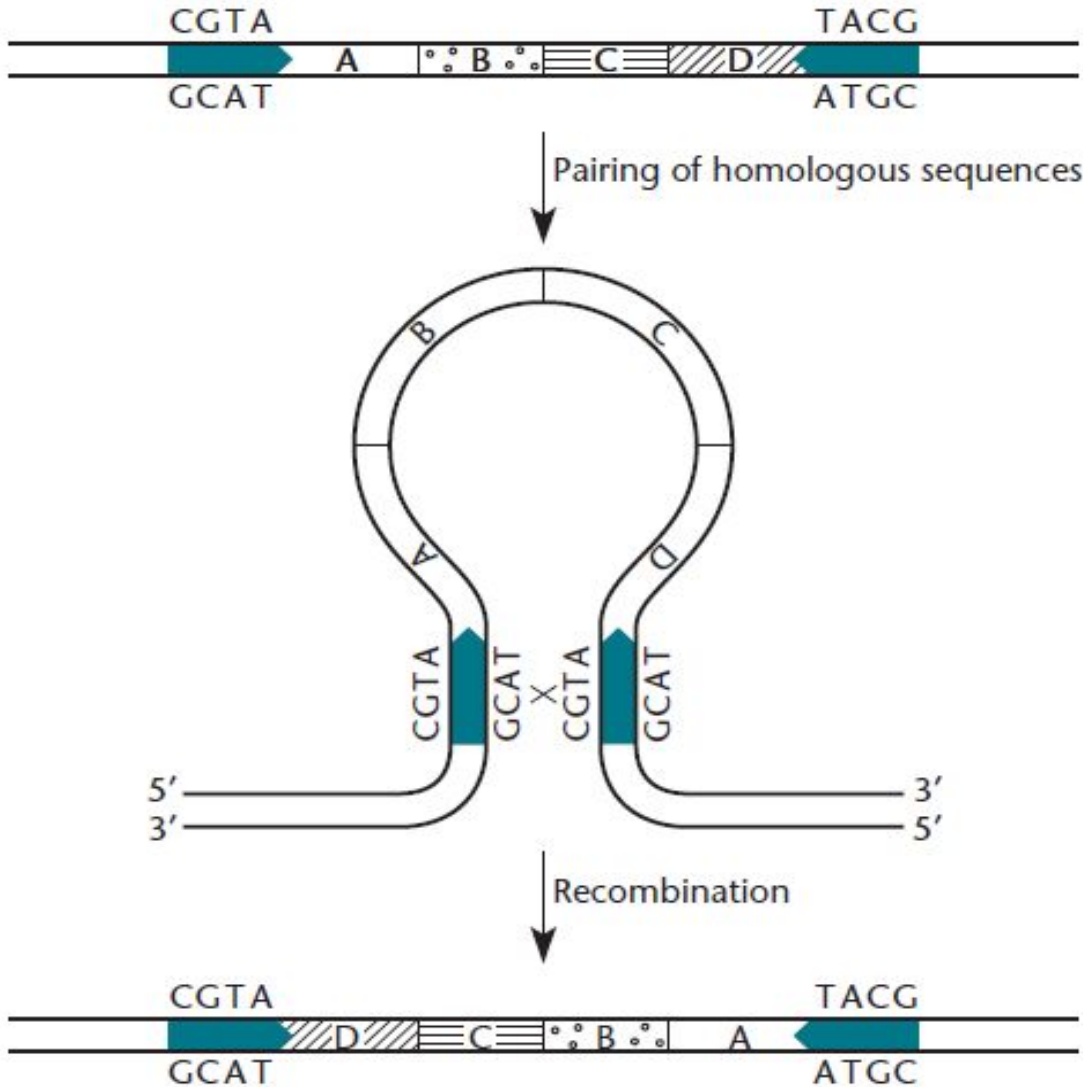
Происходят одновременно с делециями и по тому же механизму. Однако же именно дубликация тандемных повторов, в отличие от делеции, может не приводить к появлению фенотипа!



# 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



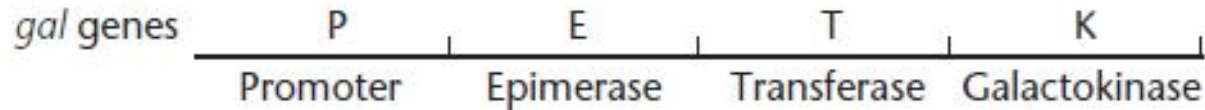
#### **Интрагенная** (в том же гене)

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

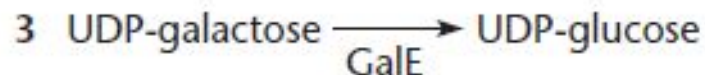
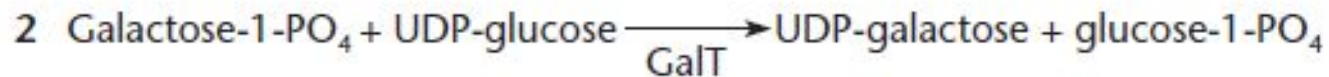
#### **Интергенная** (в другом гене)

- 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.

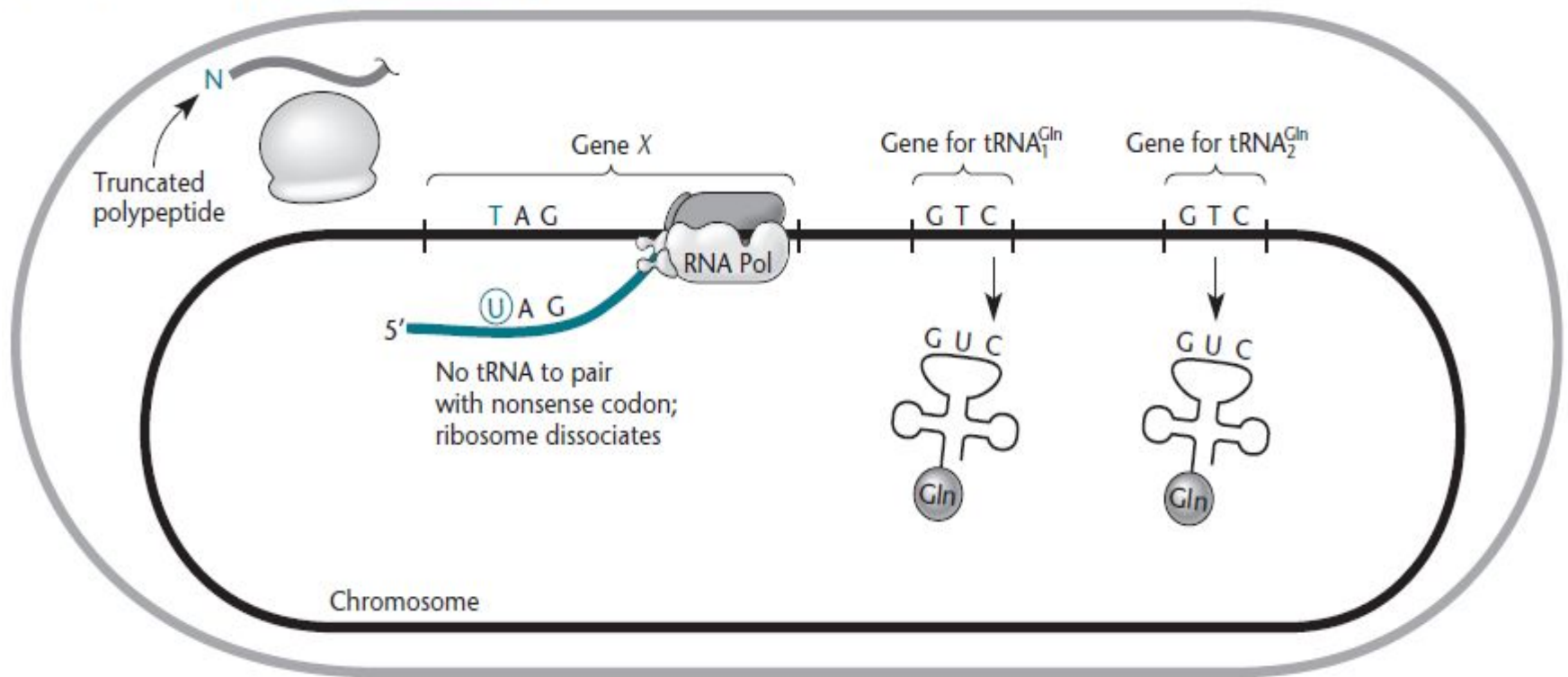
Супрессорная мутация в гене *galK* приводит к тому, что токсичные продукты просто не образуются. Таким образом, клетки не гибнут в присутствии галактозы, хотя и не могут утилизировать ее (фенотип Gal<sup>-</sup>).

# Нонсенс- супрессия

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

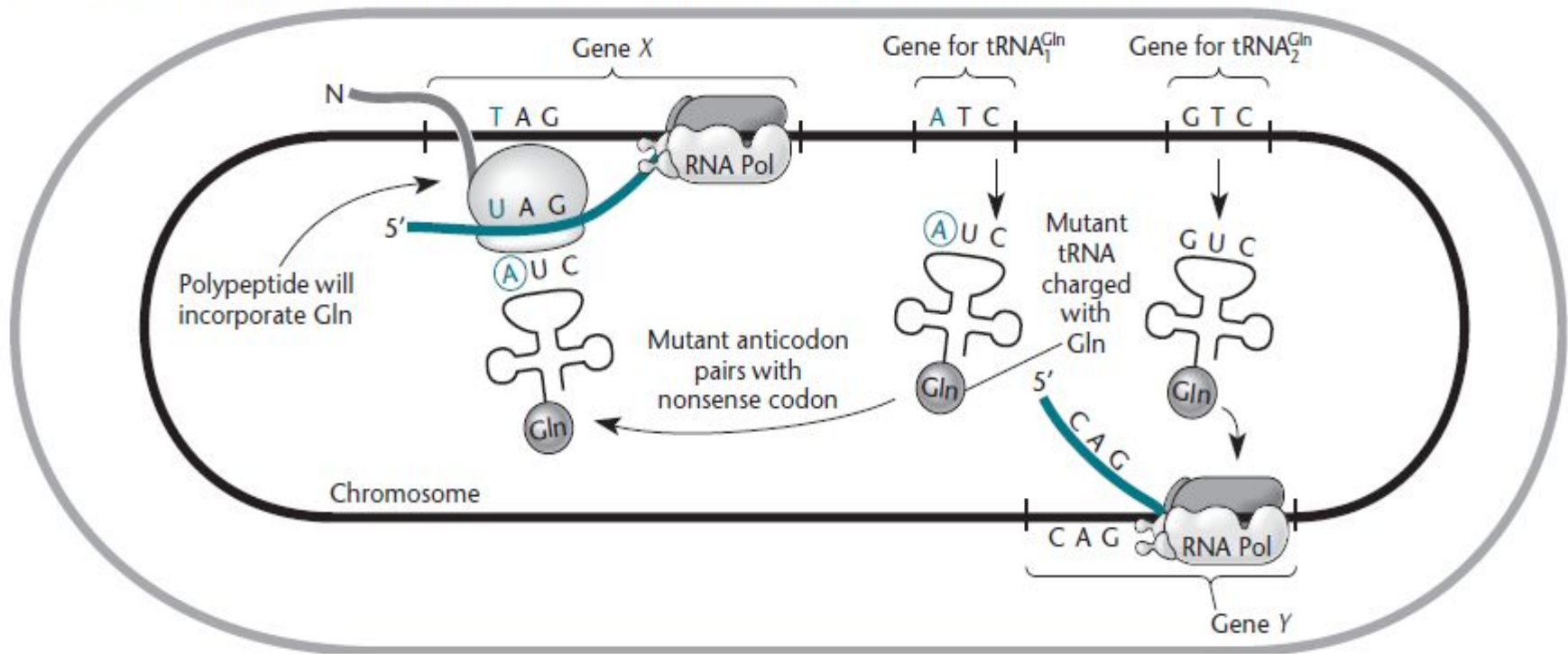
Вот нонсенс-мутация:

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>



- 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.

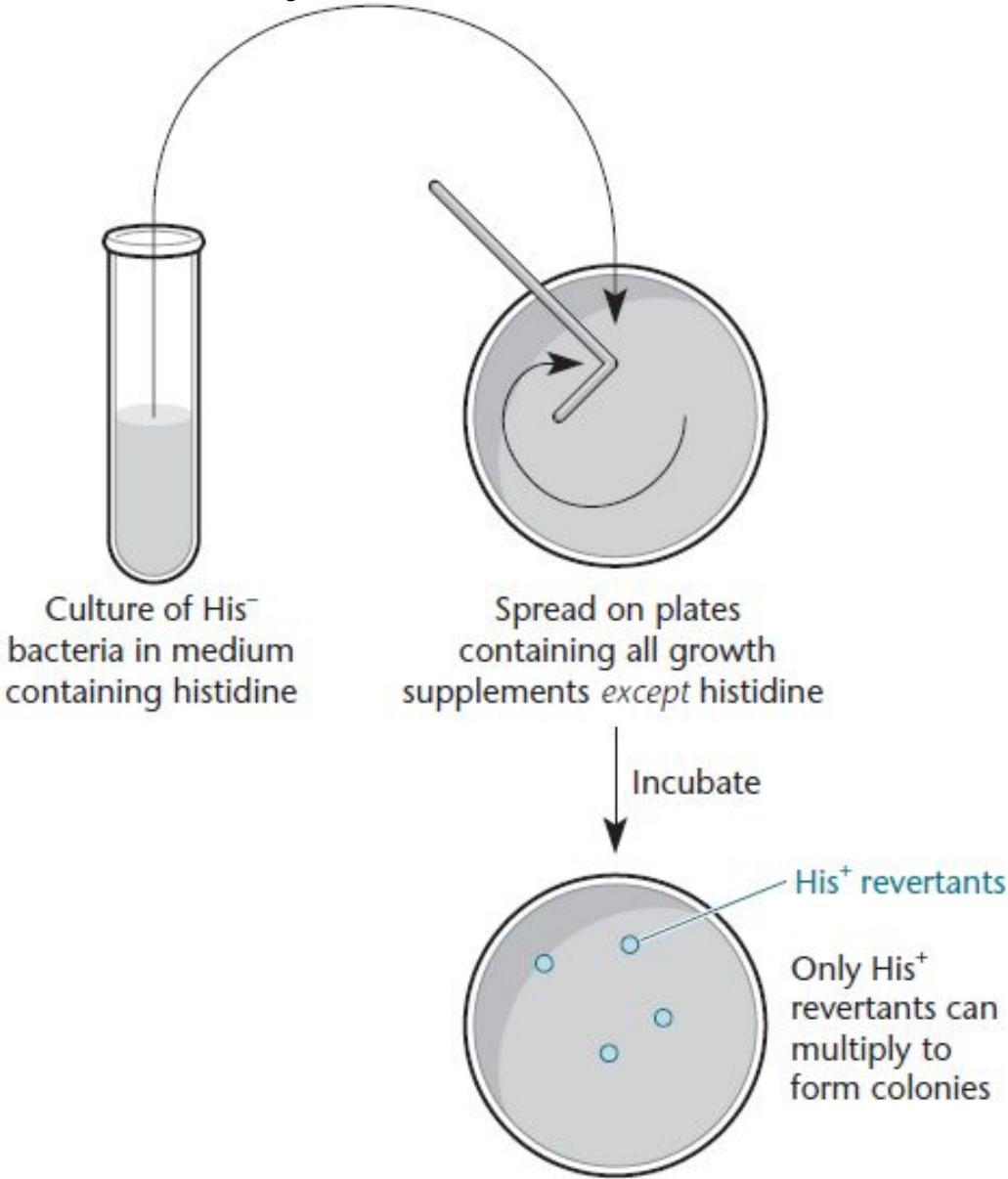
# Анализ бактериальных мутаций

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

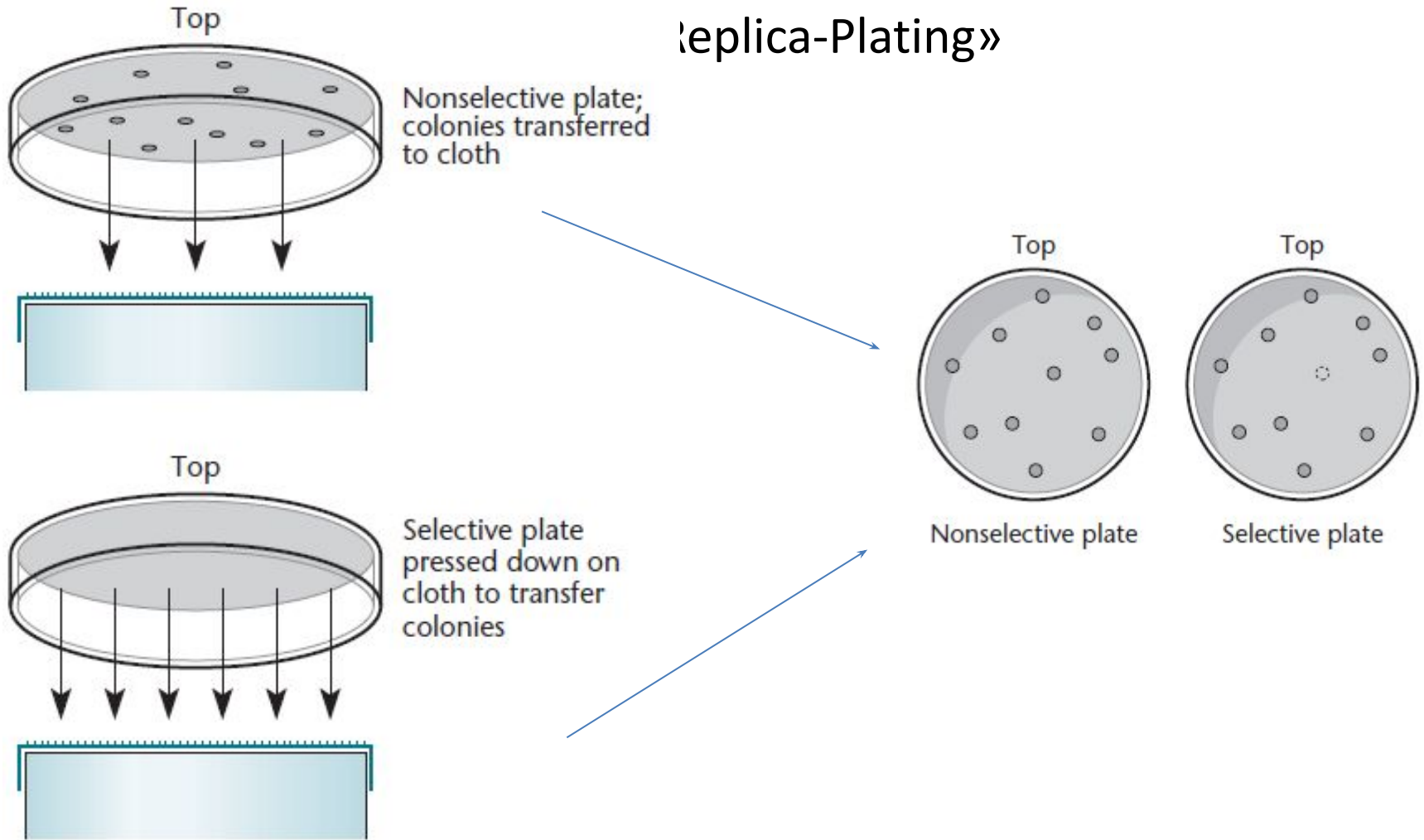
- Бактерии – гаплоидные организмы, а это означает, что любая мутация моментально закрепляется в последующих поколениях (в лабораторных условиях, и если она не летальная, конечно).
- У бактерий отсутствует половое размножение, поэтому в норме две дочерние бактериальные клетки генетически идентичны родительской 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...