

ZÁKLADY BAKTERIÁLNÍ GENETIKY

Zdroj rozmanitosti mikrorganismů

- Různé sekvence nukleotidů v DNA kódují různé proteiny
 - Různé proteiny vedou k různým organismům s různými vlastnostmi
- Exprese genetické informace je regulována, takže jednotlivé geny jsou funkční v závislosti na podmínkách prostředí

Uložení genetické informace

- Chromozomy
- Plasmidy

Plasmidy

- Množí se nezávisle na chromozomech
- Pouze intracelulární forma
- Obvykle kruhové, ale i lineární
- Většina bakterií obsahuje jeden nebo dva stejné plasmidy (low-copy plasmid), některé více než 100 (high-copy plasmid)
- Velikost od několika genů až po několik set
 - Obvykle méně než 5% velikosti chromozomu
- Některé bakterie mohou obsahovat několik různých plasmidů
 - Geneticky různé
 - Nekompatibilní skupiny
- Episomy
 - Plasmidy, které se mohou integrovat do chromozomu

Plasmidy

- Plasmidy nesou geny nutné k vlastní replikaci
- Vlastnosti kódované plasmidy jsou pro bakterie užitečné, ale ne nezbytné (rezistence k antibiotikům, tvorba antibiotik, tvorba tumorů u rostlin, metabolické schopnosti, fixace dusíku atd.)
- Většina plasmidů se množí pouze v jednom druhu
- Konjugativní plasmid
 - Nese všechny informace nutné k přenosu konjugací
- Nekonjugativní plasmid
 - Nemá tyto informace, ale může být přenesen konjugací, pokud stejná buňka obsahuje také konjugativní plasmid

Základní pojmy

- **Genotyp**
 - Celková genetická konstituce organismu
 - Kompletní sekvence chromosomu(ů) a plasmidu(ů)
- **Genom**
 - Genetická informace obsažená v DNA genotypu
- **Fenotyp**
 - Charakteristiky projevované organismem v daném prostředí
- Změna genotypu může vést ke změně fenotypu
- Změny genotypu jsou vzácné, zahrnují změnu v sekvenci nukleotidů DNA, stabilní
- Změny fenotypu jsou běžné a snadno reverzibilní

Modifikace genů - mutace

- Dědičná změna nukleotidové sekvence v genomu organismu
- Mutace může nastat
 - Záměnou jednoho nukleotidu druhým (bodová)
 - Změna pozice vodíkového atomu v bázi (tautomerní posun) způsobí změnu vazebných vlastností
 - Odstraněním nebo přidáním nukleotidu
 - Posun čtecího rámce
 - Změna kodónů a aminokyselin
 - Možné i delece a inserce stovek a tisíců párů bází
 - Translokací (přesun sekvence)
 - Inverzí (obrácení sekvence)
- Mutant

Učebnice Madigan a kol., obr. 11.6, str. 288

Důsledky bodové mutace

Učebnice Madigan a kol., obr. 11.7, str. 289

Delece a inserce

Mutagenese

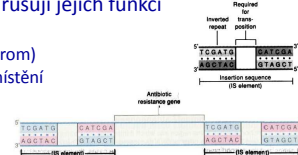
- Proces vytváření mutací
- Frekvence 10^{-4} - 10^{-12}
- Mutageny
 - Činidla zvyšující frekvenci mutací 10 až 1000x
 - Chemická činidla
 - Transpozony (mobilní elementy)
 - Radiace
- Mutace
 - Spontánní
 - Vliv záření, kyslíkových radikálů
 - Chyby při replikaci
 - Indukované

Chemické mutageny

- Změna tvorby vodíkových vazeb
- HNO_2 (deaminace A a C)
- Alkylační činidla
 - Přidávají alkylovou skupinu k bázi a mění tím její schopnost tvořit vodíkové vazby
- Analoga bází
 - Podobají se chemickou strukturou přirozeným bazím a mohou být začleněny do DNA
 - Tvoří jinak vodíkové vazby a zvyšuje se tak možnost nesprávného párování při následné syntéze komplementárního řetězce
- Interkalační činidla
 - Molekuly s třemi benzenovými jádry, které se vloží mezi báze obou vláken a oddálí tak přilehlé báze
 - Při replikaci pak dojde k vložení dalších bází do volného místa vedoucího k přidání bází

Mobilní elementy

- Speciální segmenty DNA, které se mohou přemísťovat z jednoho místa na druhé ve stejné nebo jiné molekule DNA
- Vkládají se do genů a narušují jejich funkci
- Inzerční sekvence
 - Obrácená repetice (palindrom)
 - Pouze gen nutný pro přemístění
 - Transposasa
- Transpozony
 - Obsahuje další geny
- Transpozice (přemístění)
 - Místně specifická rekombinace
 - Transposasa rozpoznává palindromové sekvence a cílovou sekvenci



Ultrafialové záření

- Způsobuje dimerizaci sousedních pyrimidinových bazí na stejném vlákně DNA
 - DNA vlákno je zdeformováno, nemůže se přizpůsobit dvoušroubovici a DNA je poškozena
 - Zvyšuje se pravděpodobnost, že polymerasa udělá chybu
- Hlavní mutagenní účinek však plyne ze snahy o opravu poškození SOS systémem

Oprava poškozené DNA

- **SOS systém**
 - Indukovatelný enzymový systém DNA replikace, který obejde poškozené místo
 - Řada chyb a proto další mutace
- **Fotoreaktivace**
 - Viditelné světlo indukuje enzym, který přeruší kovalentní vazbu thyminů
- **Obnova vyříznutím**
 - Vyříznutí poškozené DNA z jednoho řetězce a syntéza komplementárního řetězce
- Další mechanismy opravy

Frekvence mutací

- Pravděpodobnost, že při dělení buňky v daném genu nastane mutace
- 10^{-4} až 10^{-12} na jedno dělení buňky
- Jednotlivé geny mutují nezávisle na sobě
- Mutace jsou stabilní
- Příležitostně se nukleotid může změnit zpět
 - Revertace
- U prokaryotních buněk jsou mutace pozorovány rychle, protože obsahují pouze jeden nebo dva identické chromosomy

Detekce a izolace mutantů

- **Přímá selekce**
 - Izolace tzv. selektovatelných mutantů
 - Přímá metoda
- **Třídění (screening)**
 - Izolace tzv. neselektovatelných mutantů
 - Nepřímá metoda

Detekce a izolace mutantů

- **Selektovatelná mutace**
 - Mutace uděluje organismu výhodnou vlastnost, kterou lze využít pro jeho izolaci
 - Mutant roste na pevném médiu, na kterém mateřský organismus neroste
 - Mutant přeroste mateřský organismus
 - Např. organismy rezistentní k antibiotikům
 - Izolace na médiu obsahujícím antibiotikum
 - Selektace umožňuje izolaci jediného mutantu z populace mateřského organismu
- **Neselektovatelná mutace**
 - Detekce zkoumáním rozdílných vlastností kolonií
 - Mohou být viditelné na první pohled
 - Např. ztráta pigmentace, tvorba zvrásněných kolonií, ztráta schopnosti růst bez růstového faktoru, citlivost na teplotu, ztráta motility

Třídění a nepřímá selekce

- **Využitelné pro izolaci nutričně defektivních mutantů**
 - **Auxotrof**
 - Mutant s požadavky na výživu, neschopen syntézy sloučeniny nutné pro růst
 - **Prototrof**
 - Mateřský organismus od kterého byl odvozen auxotrof, syntetizuje všechny sloučeniny nutné pro růst
- **Mutant neroste na médiu, na kterém roste mateřský organismus, vyžaduje určitý růstový faktor**
 - Neexistuje přímá metoda pro izolaci
 - Mutant musí být identifikován pomocí screeningu
 - Zdlouhavé
 - „Replica plating“ (metoda razítka)
 - Nepřímá selekce pomocí penicilinu
 - Obohacení kultury o mutantní organismus

Izolace nutričních auxotrofů metodou replica plating

Učebnice Madigan a kol., obr. 11.15, str. 287
(vysvětluje postup metody třídění otiskem misky)

Izolace auxotrofů pomocí penicilinové selekce

- Základní předpoklad: penicilin zabíjí pouze množící se buňky
- Předběžná inkubace směsné kultury na minimálním médiu s penicilinem
 - Mutant neroste na minimálním médiu
 - Mateřský organismus by rostl, ale je usmrcen penicilinem
- Následuje odstranění penicilinu a přenos na médium obsahující růstový faktor (kompletní médium)
 - Vykultivované kolonie reprezentují mutantní organismus a mateřské buňky, které přežily kontakt s penicilinem
- Negativní selekce
 - Selektace proti mateřskému organismu nikoli selektace mutantního

Testování mutagenní aktivity látek

- Mutagenní látka je potenciálně karcinogenní
- Amesův test
 - Stanovení frekvence reverze His⁻ buněk na His⁺ buňky *Salmonelly* v přítomnosti i nepřítomnosti testované chemické látky na médiu neobsahujícím vyžadovanou živinu (His)
 - Mutagenní látka zvyšuje počet reverzí
 - Pozorujeme růst kolonií na minimálním médiu
 - Médium obsahuje enzymy z krysích jater
 - Některé látky nejsou karcinogenní samy o sobě, ale až po metabolizaci v živočišném organismu, primárně v játrech



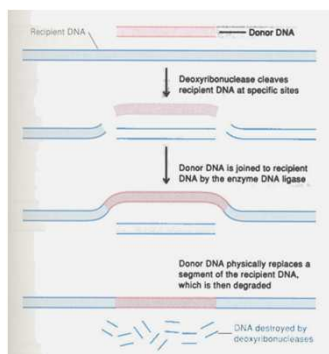
Amesův test

Přenos genů

- Genetická informace buňky může být změněna přenosem skupiny genů z jiné buňky

Přenos genů mezi bakteriemi

- Transformace
 - DNA je přenesena jako prostá DNA
- Transdukce
 - Bakteriální DNA je přenesena bakteriálním virem
- Konjugace
 - DNA je přenesena mezi bakteriemi, které jsou ve vzájemném kontaktu
- Je přenesen pouze krátký úsek DNA
- Homologní rekombinace
 - Fyzická výměna genů mezi genetickými elementy, která nastává v důsledku homologie DNA sekvencí ze dvou různých zdrojů



Obecný mechanismus integrace donorové DNA do genomu příjemce

Transformace

- Pokud je bakteriální buněčná stěna narušena, chromozomální DNA se rozpadne
- Tato DNA může projít skrze buněčnou stěnu a cytoplasmatickou membránu recipientní buňky a být integrována do jejího chromozomu
- Přirozená kompetence
 - DNA vstoupí do recipientní buňky za určitých růstových podmínek
 - Kompetentní buňka
 - *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*
- Umělá kompetence
 - Otvory v buněčné stěně jsou vytvořeny uměle (např. elektroporací, pomocí chemických sloučenin)
 - *E.coli*

Transdukce

- Přenos bakteriální DNA pomocí bakteriofága
- Obecná transdukce
 - Defektní virové částice náhodně zabudují fragmenty chromozomální DNA
 - Virulentní i temperovaný fág (při lytickém cyklu)
- Specializovaná transdukce
 - DNA temperovaného fága se nesprávně vyřízne z chromozomu hostitele a přenesení do další buňky i sousedící geny hostitele
- *E.coli*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*

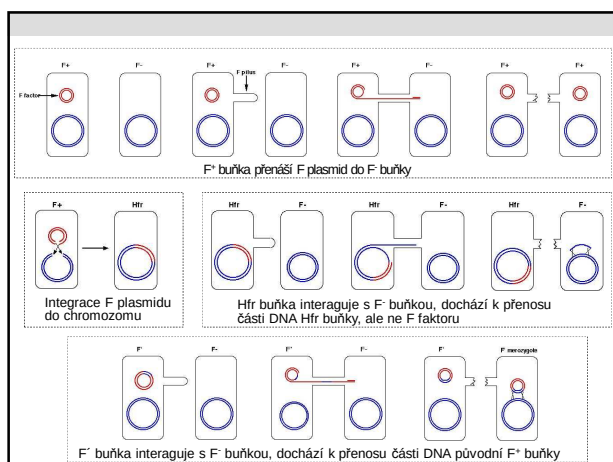
Učebnice Madigan a kol., obr. 11.17, 11.18, str. 300, 301

Konjugace

- Přenos plasmidu (F plasmid) z buňky do buňky
- Donorová a recipientní buňka
- Přenos pouze v jednom směru z donoru na recipienta
- Vyžaduje fyzický kontakt buněk
- *E. coli*, řada G^- bakterií, známo i u G^+ (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*)
- Donor obsahuje F plasmid
 - F^+ buňka
 - Nese genetickou informaci pro přenos DNA a syntézu pohlavního vlákna
 - Není přítomen v recipientní buňce (F^- buňka)
 - Vznikají dvě F^+ buňky

Konjugace

- Příležitostně se F plasmid integruje do chromozomu (vznik Hfr buňky)
- Integrované F faktory jsou příležitostně vyříznuty z bakteriálního chromozomu
 - Při správném vyříznutí vzniká znovu F^+ buňka
 - Někdy plasmid nese i kus chromozomální DNA (F' buňka)
- Hfr i F' buňky mohou konjugovat s F^- buňkou



Přenos genů v jedné bakterii

- Transpozony (mobilní elementy)
- Transpozony se mohou přemístit z místa na chromozomu do plasmidu, který může být přenesen konjugací do jiných buněk

Restrikce a modifikace DNA

- Recipientní buňky přijmou obecně DNA pouze ze stejného druhu bakterií
- Pokud do buňky vstoupí cizorodá DNA, je degradována pomocí **restrikčních endonukleas**
 - Reaguje se specifickými krátkými sekvencemi v cizí DNA a štěpí ji na těchto místech
 - Enzymy v různých organismech rozeznávají a štěpí různé sekvence
- Zamezení destrukce vlastní DNA
 - Modifikační enzymy (např. metylace určitých bazí v rozpoznávané sekvenci zabrání štěpení endonukleasou)

Význam přenosu genů pro bakterie

- Konjugace a transformace nastává pouze u několika druhů bakterií
- Nejrozšířenější mechanismus přenosu genů je transdukce
- Přenos genů poskytuje mikroorganismu nové genetické informace, které mu umožní přežít v měnícím se prostředí

Význam přenosu genů pro mikrobiální genetiku

- Umožňuje mapování genů na bakteriálním chromozomu analýzou jejich přenosu z jedné buňky do druhé
 - Čím blíže jsou geny na chromozomu, tím vyšší je pravděpodobnost jejich společného přenosu
- Důležitá součást technologie genového inženýrství
 - Využití pro zavedení genů do bakterií