

Nespecifická mutageneze



Vytváření mutací

Mutanty jsou esenciálním předpokladem pro jakoukoliv genetickou studii, pro strukturu genů, i jejich funkčních závislostí

□ **Nespecifické mutace -**

mutace v mnoha genech a následná selekce mutanty defektní v daném fenotypu

- **předpoklad:** vypracování selekční strategie
- **použití:** při studiu děje, jehož molekulární podstatu neznáme
- **metody:** UV záření, mutagenní látky, inserce transposonů

□ **Specifické mutace -**

cílená změna určitého genu a následné sledování vlivu na fenotyp

- **Předpoklad:** nutná znalost sekvence příslušného úseku DNA
- **použití:** při identifikaci neznámé biochemické funkce sekvenovaného genu (čtecího rámce).
- **metody:** specifické delece a inserce pomocí restričních enzymů, záměny basí metodami cílené mutagenese (site-direct).

Nespecifická mutagenese

- 1. krok – výběr mutačního způsobu
 - typ mutace – výběr mutagenu
- 2. krok – selekční strategie
 - Přímá nebo vnesením selekčního markeru
- 3. krok – lokalizace mutace
 - Genetické metody – komplementace, specifická transdukce
 - Genově inženýrské – příprava genových knihoven,
 - Kombinace obou

Spontánní mutace

Takové, které vznikají nekontrolovaně pod vlivem přírodních vlivů

- Probíhají neustále, ale s malou frekvencí (10^{-9} až 10^{-5})
- **Tautomerními formami bází**
- V důsledku chyb probíhajících při životních pochodech týkajících se genetického materiálu (replikace, methylace adeninu, rekombinace mezi homologními chromozomy, opravou poškozených částí molekul DNA).
- **Pohyblivostí transpozičních elementů.**
- **Vlivem přírodního ionizujícího záření** (fotosyntetické bakterie mají velkou kapacitu mechanismů opravující chyby DNA způsobené UV světlem).
- Vznik revertantů s přibližně stejnou frekvencí
- Vznik pseudorevertantů (stejný fenotyp, ale rozdílný genotyp)

Typy mutagenů

- UV, radiační záření
 - bodové mutace – záměny basí, delece
 - zvýšení pravděpodobnosti vzniku mutace
 - nespecifické, špatně mapovatelné

- Působení mutageny - chemické látky, které způsobují mutace
 - bodové mutace – záměny basí, delece
 - zvýšení pravděpodobnosti vzniku mutace
 - nespecifické, špatně mapovatelné

- Inserce transposonu – inserce, delece, duplikace, inverse
 - možnost vnesení markéru (resistence)
 - snadná mapovatelnost (genetické i fyzikální mapování)

Bodová mutace

Bodová mutace je taková, která vzniká záměnou, delecí nebo inzercí jednotlivých nukleotidů.

Záměny nukleotidů

- **Transice:** purinová báze za purinovou bázi AT \longleftrightarrow GC
- **Transverze:** purinová báze za pyrimidinovou AT \longleftrightarrow CG

Důsledky

- změna na příbuzný kodon:
konzervativní mutace (silent mutation)
polypeptid zůstane stejný, pouze se produkuje s nižší rychlostí
- změna na nepříbuzný kodon:
mutace mění smysl kodonu (missence mutation)
vede ke změně aminokyseliny v místě mutace, závisí na pozici v polypeptidu
 - 1) **v aktivním místě** - změna enzymové aktivity, afinity k substrátu
 - 2) **ve strukturní části** - změna terciární struktury -
pokud je malá, nemá vliv na fenotyp (leaky mutant).
- změna na nesmyslný kodon:
vede k ukončení syntézy polypeptidu (nonsense mutation) -
závisí na pozici mutace v genu a důležitosti enzymu v metabolismu.

Schéma tautomerních forem basí

□ nvbc

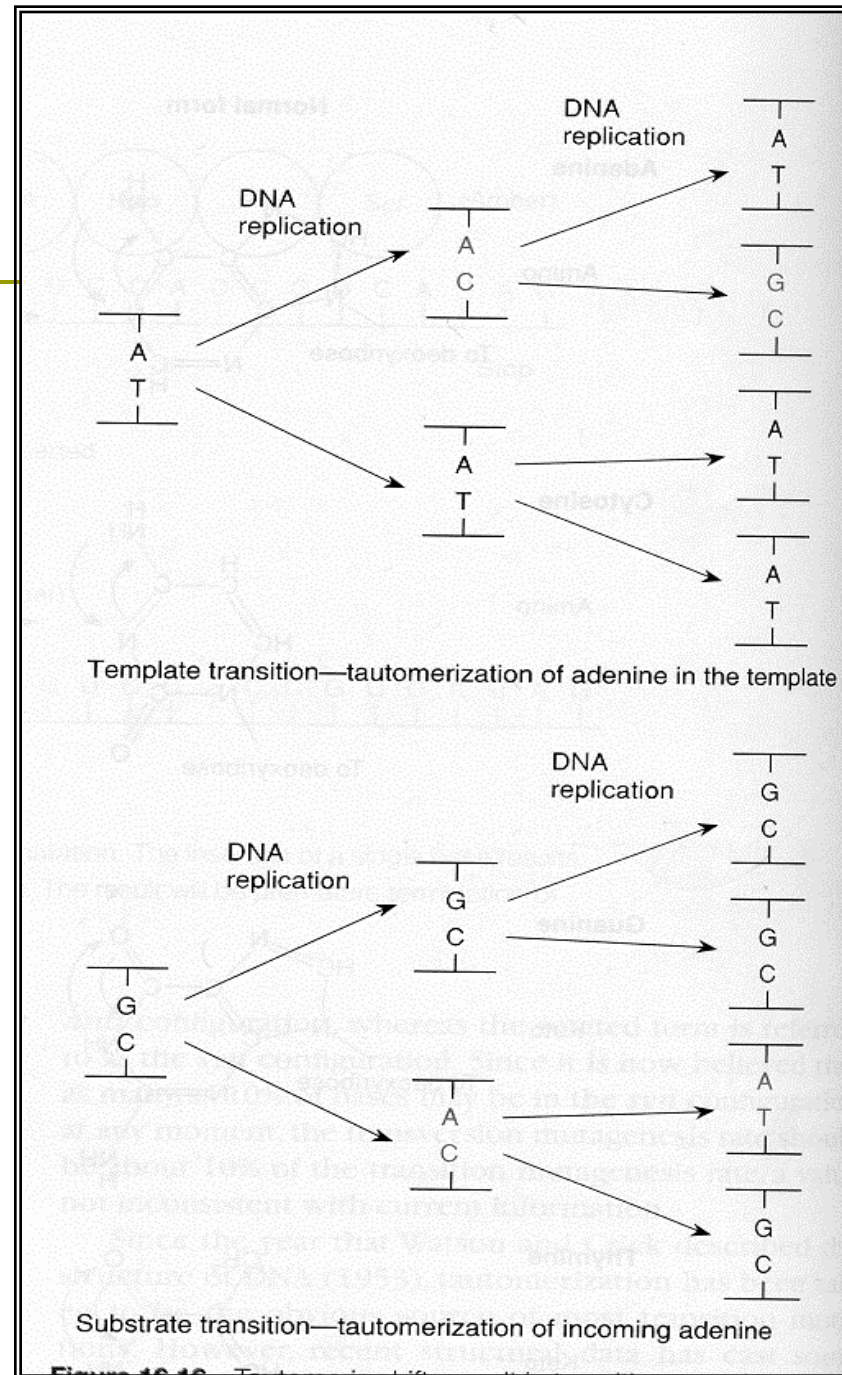
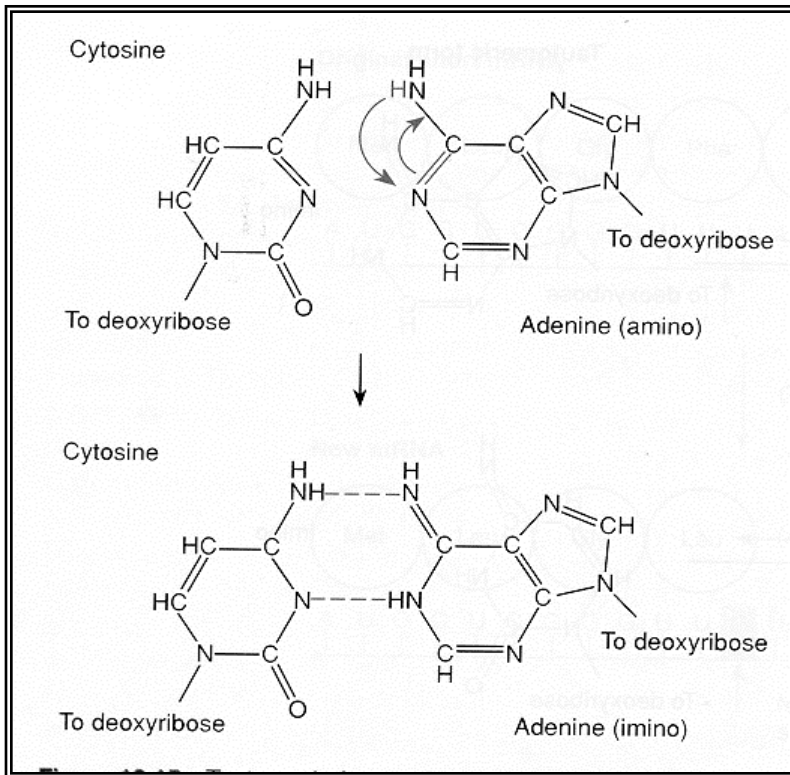


Figure 10-10 Tautomeric transitions of DNA bases during replication

Posunové mutace (frameshift)

Mutace způsobené inzercí a delecí nukleotidů

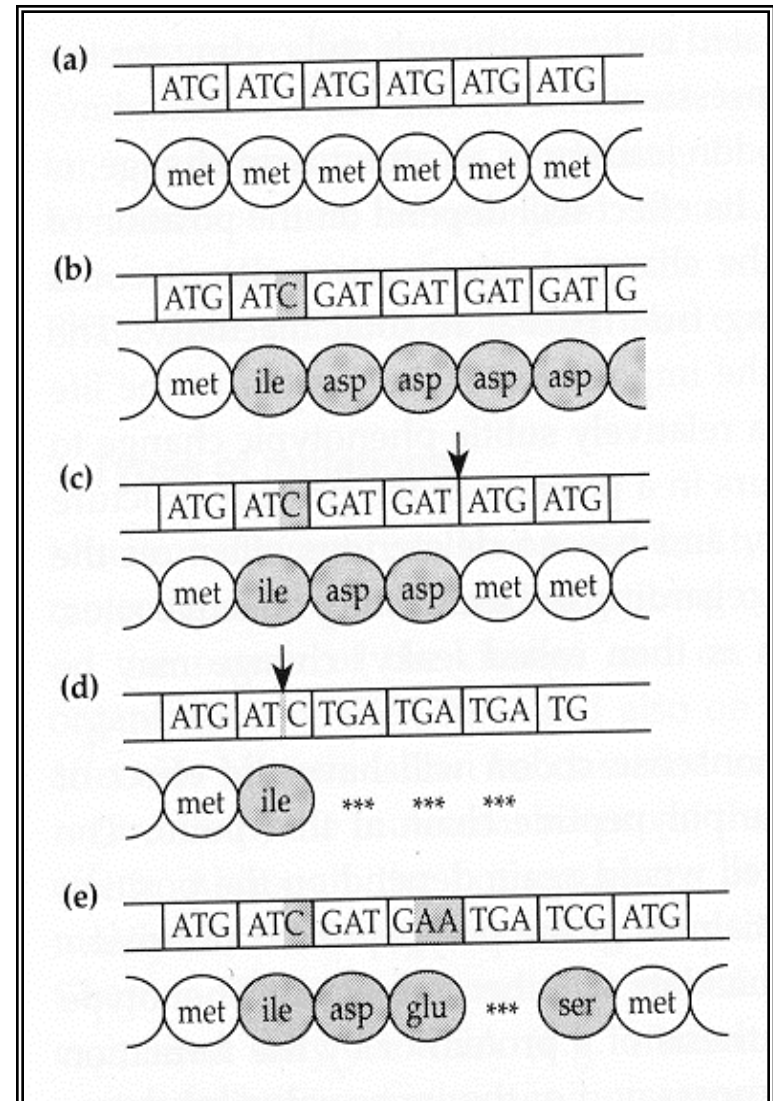
spontání – „slippage“ DNA –

- v místech krátkých repetitivních sekvencí

Důsledky

- Posun v čtecím rámci
nefunkční protein s jinou primární sekvencí aa,
závisí na poloze v genu
- Vznik terminačního (stop) kodonu po
směru exprese (downstream) od mutace.
zkrácený protein, funkčnost závisí na poloze v
genu

- a) sekvence divokého kmene
- b) inserce jedné base
- c) inserce jedné base následující
delecí druhé base
- d) delece dvou basí
- e) inserce tří basí



Indukované mutace

Mutagenní je taková látka, která může vyvolat mutaci, obvykle je to chemická látka, která mění strukturu basí.

Specifická záměna basí (specific misspairing)

□ Deaminační činidla:

- modifikují base *in situ* v molekule DNA,
- ty jsou pak špatně rozpoznány DNA polymerázou,
- při následné replikaci vznikají mutace.

Př.: **kyselina dusitá:** adenin se deaminuje na hypoxantin (A-T se mění na G-C),
cytosin se deaminuje na uracil (ten páruje s A místo G(G-C na A-T)).
ung –uracile–N- glycosylase

□ Alkylační činidla:

- kovalentně vážou na base alkylové zbytky
- znemožní tím přesné čtení a párování,
- při replikaci dochází k náhodnému párování.

Př.: **sulfonáty** (methyl-methyl sulfonát, ethyl-methyl sulfonát, nitroso guanidin)

Indukované mutace - pokračování

Analogy basí: vyvolávají transici

- 5-bromouracil (5BU)
 - pyrimidinový analog,
 - inkorporován místo thyminu,
 - v tautomerní enol formě se páruje s guaninem,
 - tautomerizace častější než u thyminu

- 2-aminopurine(2AP)
 - purinový analog,
 - inkorporován místo adeninu,
 - v tautomerní formě se páruje s cytosinem.
 - Př.: deriváty akridinu (akridinová oranž, proflavin),

Indukované mutace - pokračování

- **Interkalační činidla** (intercalating agents):
vkládají se mezi base a při replikaci způsobují posun basí, delecí či adicí jiné base. (ethidium bromid, proflavin, akridinová oranž)
- **Cross-linking agents:**
 - kovalentně spojují dvě base na opačných řetězcích
 - porušují dvoušroubovicovou strukturu
 - znemožňují rozplétání DNA a tím replikaci
 - mutace vzniká v souvislosti s opravným zásahem.Př.: mytomicyn, psoraleny. Tyto látky mívají vysoký letální účinek.
- **Ionizační záření:**
 - působí přímo na DNA nebo nepřímo prostřednictvím excitace elektronů jiných molekul, které interagují s DNA
 - způsobuje trhání DNA působením na fosfáto-deoxyribosovou vazbu podle intenzity vznikají přerušení jak jednořetězcová, tak dvouřetězcová.
- **UV záření:** (254 nm)
 - je absorbováno většinou purinových i pyrimidinových basí.
 - hlavní efekt - vytváření thyminových dimerů.
 - vedle sebe i na opačných řetězcích (crosslink)
 - mutace vznikají v procesu oprav nebo pokud se neopraví vznikají transice, transverze i posuny basí.

Efektivnost mutací

- **Měřena**
jako poměr mutovaných klonů po aplikaci mutagenu, který závisí na reaktivitě agens s cílovou částí DNA, a na koncentraci obou.
- **Dávka mutagenu**
může být měřena v souvislosti s jeho koncentrací nebo délkou času, kterému je organismus vystaven.
- **Efektivnost mutagenu**
závisí na charakteru poškození DNA (způsobu působení) a schopnosti buňky reparace a reprodukce.

$$E_M = \frac{M/ml}{N/ml}$$

E - efektivnost

M/ml - koncentrace žádané mutanty

N/ml - koncentrace živých organismů
po aplikaci mutagenu

Efektivnost mutací - pokračování

Množství mutagenu by mělo být optimalizováno tak,

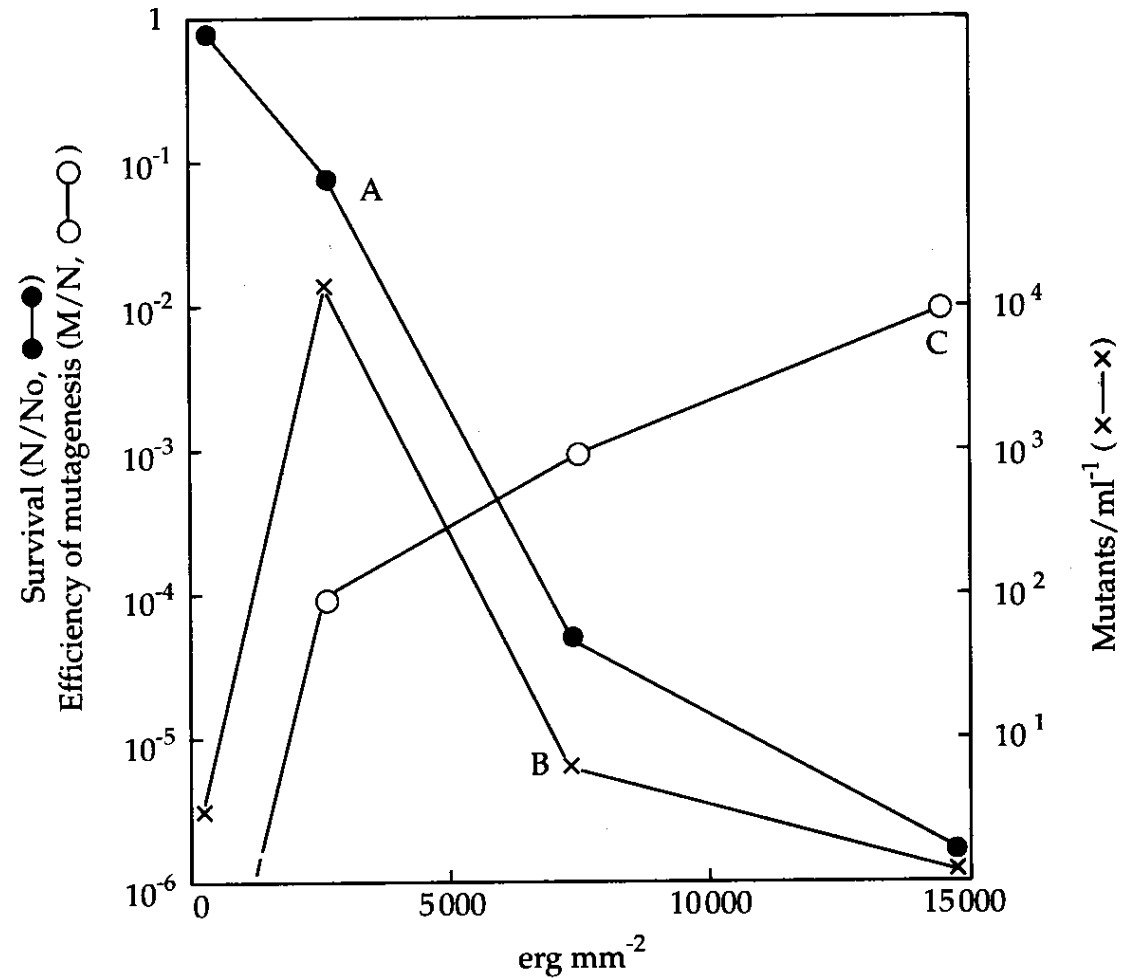
- aby nevznikala více jak jedna mutace na buňku.
- aby nedocházelo k snížení počtu mutant

Faktory ovlivňující účinek mutagenu:

- existence více jak jedné kopie DNA v rychle rostoucích buňkách - mohou být různě zasaženy, to způsobuje lag v křivce přežitých buněk
- reparační mechanismy buňky - mohou být různé u různých organismů i mutagenů.
- některé struktury DNA podléhají snáze mutaci než ostatní (např. repetice basí - hot spots)
Hot spots pro bodové mutace mohou vznikat na místech kde replikační/opravné enzymy dělají chyby, nebo jsou zřídka opravované. Též dlouhé repetice jsou náchylné k duplikacím a delecím.
- alkylační činidla jsou velmi efektivní (10²-10⁴-násobná stimulace ve srovnání se spontánními mutacemi)
- analogy basí a mutageny způsobující posun basí jsou méně efektivní (10¹-10² násobná stimulace).

Efektivnost mutací - graf

- A) Počet živých buněk po mutagenezi
- B) Počet mutantů
- C) Efektivnost mutageneze



Použití transposonů k mutagenезi

Kdy použít transposony k mutagenезi

- obtížně selektovatelný fenotyp
- pokud klasickými metodami nelze izolovat žádaného mutanta
- pokud chceme selektovat na společné regulační stimuly
- pokud chceme generovat delece
- k vytváření knihoven sekvenčně definovaných inserčních mutant pro úplnou fenotypickou analýsu
- vytváření značených knihoven, ke screeningu regulace komplexních či esenciálních fenotypů
 - A. mutagenese a screening daného fenotypu – fenotypové knihovny
 - B. mutagenese a screening exprese daného proteinu (screening genů se stejným regulačním stimulem).
 - C. identifikaci esenciálních genů (Genome-wide genetic fingerprinting)
 - D. vytváření úplných knihoven sekvenčně definovaných mutant

Použití transposonů v genetice – nespecifická mutageneze

- Výhody transposonů v nespecifické mutagenezi
 - vyšší frekvence mutageneze než u ostatních metod
 - pravděpodobnost je úměrná velikosti genu
 - nevytváří leaky mutanty, vždy přerušení transkripce
 - často pouze jedna transpozice na buňku - nevytváří se vícečetné mutanty
 - snadná izolace mutant pomocí genetického markeru v transposonu – různé Ab markery, restriční místa
 - široké spektrum hostitelů
 - při transpozici do promotoru změna regulace
 - možnost inserce mobilního promotoru
 - snadná lokalizace mutace jak metodami genetického i fyzikálního mapování

Použití transposonů v genetice –

nespecifická mutageneze

- Požadavky na výběr transposonu
 - náhodnost transpoziční inserce
 - stabilita mutace (G^- - Tn5, Tn10, Mu, G^+ - Tn917)
 - obsah mobilního promotoru (antibiotiková resistance, reportérový gen)
 - příprava vhodných derivátů –
 - mini transposony od kompositních Tn10
 - indukce transponasy
 - různé at markery
 - fúze s lacZ atd.
 - různé vlastnosti vektorů

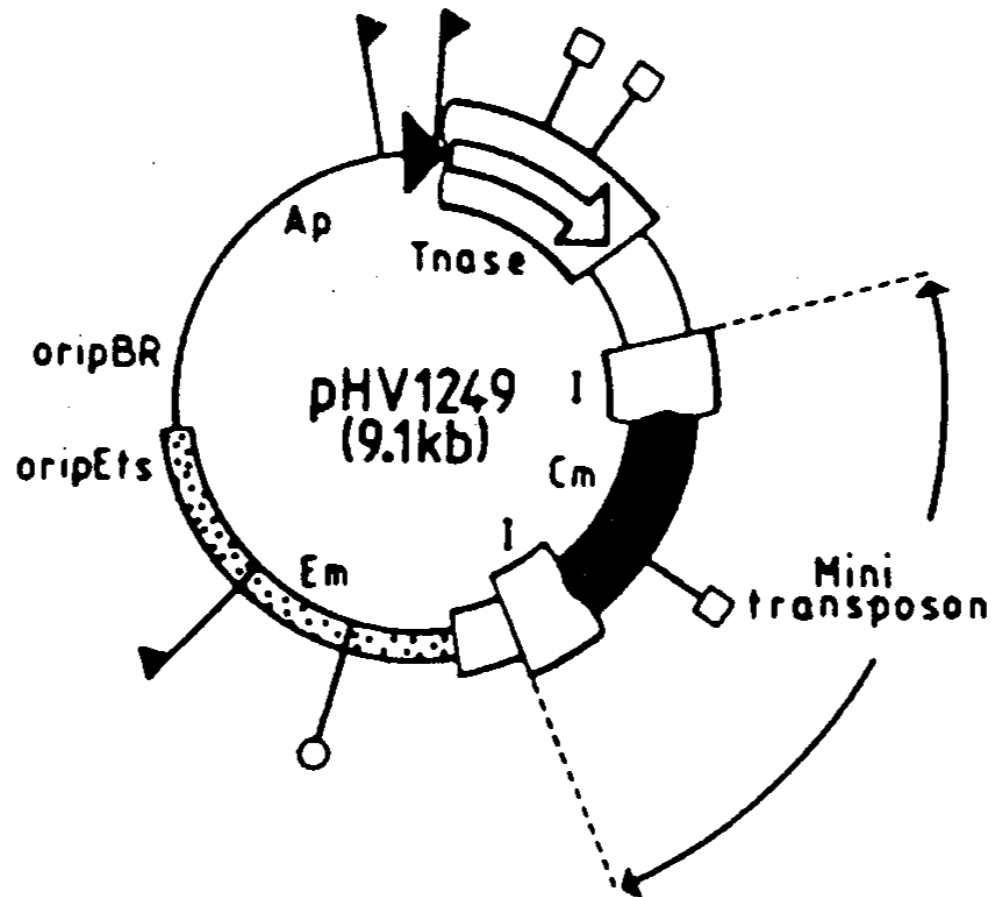
Použití transposonů v genetice

Doprava transposonu

- sebevražedné plazmidy
 - nereplikující se konjugativní plazmidy
 - rekombinantní plazmidy obsahující *tra* funkci z promiskuitních plazmidů
 - *ori* naopak striktně z *E. coli*
 - mohou se přenést konjugací, ale v hostiteli jiném než *E. coli* se nemohou replikovat
 - nestabilní plazmidy
 - postupně se vpraví do cílové buňky dva plazmidy se stejné inkompatibilní skupiny
 - první nese transposon a jeden marker
 - druhý bez transposonu s druhým markerem
 - selektuje se na markery z transposonu a druhého plazmidu
- sebevražedné fágy
 - derivát lambda fága (*E. coli*)
 - nesoucí dvě amber mutace zabraňující jak lysogenizaci tak lytické fázi
 - v hostiteli se silným supresorem přežívá a množí se
 - do ostatních pouze přenese genom s transposonem

Použití transposonů v genetice

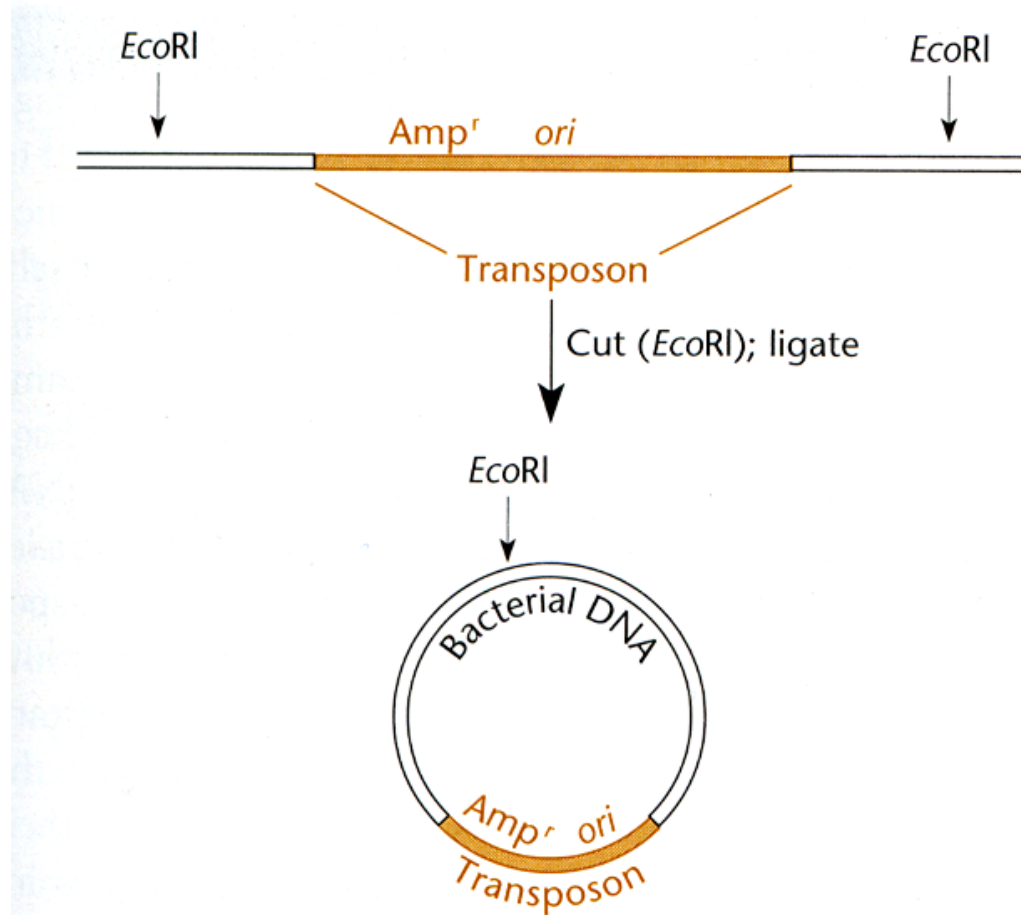
- pHV1249 pro *Bacillus*
- dva oriV –
 - *E.coli*
 - *B.subtilis* (termolabilní)
- tři selekční markery
 - Cat – v Tn
 - Ery – mimo Tn
 - Ap – mimo Tn selekce pouze v *E.coli*
- gen pro transponasu mimi IR
- promotor transponasy z *B.subtilis*
- v miniTn unikátní restriční místo



Vyhledávání mutace - klonování

- Rekombinantní metody -
 - restrikce chromosomální DNA mutanty (enzym neštěpící transposon)
 - ligace do vhodného vektoru
 - izolace insertů s transposonem (antibiotiková resistance, hybridizace)
 - sekvenace
 - komplementace popř. porovnání sekvence s WT
- Inversní PCR -
 - restrikce chromosomální DNA mutanty
 - ligace
 - PCR s primery transposonu
 - při vhodné délce proběhne inversní PCR
- Speciální konstrukce transposonu - obsahuje ori
 - po restrikci a ligaci chDNA, úseky s transposonem jsou schopné replikace

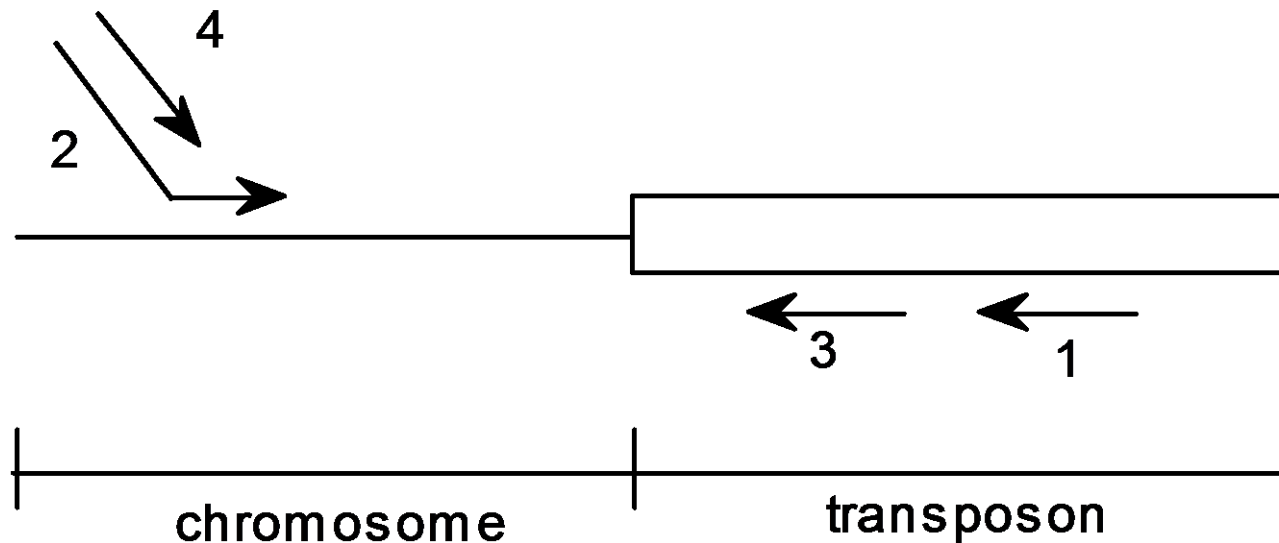
Vyhledávání mutace



Vyhledávání mutant - PCR

Geny se stejným genetickým okolím

- esenciální mutace
- geny se stejnou regulací



Použití transposonů – příklad

□ Otázka:

- Isolovali jste kmen *Pseudomonas putida*, který je schopen růst na herbicidu 2,4-dichlorofenoxyoctové kyselině (2,4-D) jako zdroji C. Navrhněte postup klonování genu pro utilizaci 2,4D
 - Při použití transposonové mutageze
 - Komplementací s divokým kmenem

□ Odpověď:

- Transposonová mutageneze
 - Vpravit sebevražedný vektor nesoucí Tn5 do *P. putida*
 - Selektovat transkonjuganty na komplexním mediu s antibiotikem
 - Přerazítkovat na minimální medium s 2,4-D jako jediným zdrojem C
 - Vybrat kolonie, které nejsou schopny využít 2,4-D a izolovat chDNA
 - Vytvořit knihovnu a selektovat ji na antibiotickou resistenci
 - Resistentní klon obsahuje Tn5 a část genu pro utilizaci 2,4-D.

Použití transposonů – příklad

□ Odpověď:

■ Komplementace s divokým kmenem

- Připravit knihovnu do vektoru s širokým rozhráním hostitelů
- Vpravit knihovnu do mutantního kmene
- Selektovat klony, které jsou schopny využít 2,4-D na minimálním mediu
- Klon obsahující plazmid, který komplementoval schopnost využití 2,4-D obsahuje gen pro jeho využití.

Vytváření genových fúzí

- Transkripční fúze
 - Jeden gen je fúsován (přiřazen) k promotoru druhého genu – oba geny jsou transkribovány do jedné mRNA ale vytvářejí dva proteiny.
 - Deriváty transposonů obsahují reportérový gen (*lac*, *lux*, GFP atd.) s vlastní oblastí iniciace translace.
- Translační fúze
 - ORF dvou proteinů jsou fúzovány dohromady a vytvářejí jeden společný ORF – vznik jednoho fúzního proteinu.
 - Deriváty transposonů obsahují reportérový gen (*lac*, *lux*, GFP atd.) ale bez oblasti iniciace translace.
- Nejvíce používané jsou deriváty Mu fága
 - Široké spektrum hostitele u G- bakterií (*Erwinia*, *Citrobacter*, *E.coli*)
 - *Mud*(*Amp^r*, *lac*) derivát – je odstraněna většina genů s výjimkou konců fága a genu pro transponázu, *lacZ* je bez promotoru
 - Po inserci ve správné orientaci downstream k promotoru – dochází k aktivaci reportérového genu.
 - Studium inducibilních genů

Genové fúze – reportérové geny

- Reportérové geny – geny jejichž aktivita je snadno detekovatelná a kvantifikovatelná
- Transkripční fúze
- Vlastnosti
 - **Detekovatelnost** – nesmí interferovat s genetickým pozadím ani prostředím
 - **Citlivost** – záleží na typu experimentu – strukturní geny x regulační geny, kultivace v tekutém mediu, pevné půdy, enviromentální pokusy – nejcitlivější i jedna buňka
 - **Spolehlivá kvantifikace**
 - **Specifická aktivita**
 - **Schopnost reagovat na změny transkripce** – kompromis mezi citlivostí a stabilitou. Stabilní reportéry nereagují na oscilující změny transkripce

Genové fúze – reportérové geny

- **lacZ** – β –galaktozidáza – štěpí laktozu na glukosu a galaktozu
 - Stanovení kolorimetricky – v tekutém mediu i na pevném (x-gal, ONPG)
 - Fluorescentní nebo luminiscentní stanovení (Bronstein I., et al. 1994, Anal Biochem. 219, 169.)
 - Studium regulací v jedno druhových kulturách – některé bakterie mají β –galaktozidázovou aktivitu (mutanty), sensitivní k pH a vyšší teplotě
 - (Atlas R.M. et al. BioTechniques. 12,706. Burlage, R.S. et al. Annu. Rev. Microbiol. 48,291.)
 - nevhodný k měření rychlých změn v transkripci
- **gusA** – (uidA) – β –glucuronidase - štěpí široké spektrum glucuronidů
 - Chromogenní substrát – X-gluc, p-nitrophenyl β -D-glucuronidide
 - Též fluorescentní pigment –
 - Použití převážně u patogenních rostlinných virů, symbioty rostlin (tam kde nelze lacZ),
 - U enviromentálních bakteriálních populací též omezeno

Genové fúze – reportérové geny

- ***xylE*** – catechol-2,3-oxygenasa – přeměna catecholu na 2-hydroxymuconic semialdehyd –
 - žlutý pigment – spektrofotometrické stanovení
 - Nalezen u Pseudomonad – nevyskytuje se nikde jinde
 - Nevýhoda – stabilita závislá na fyziologickém stavu bakterie a dostupnosti kyslíku

- **Bioluminescence** – *luxCDABE* operon z *Vibrio fischeri*
 - Světlo emitující reakce (*luxAB*) – v přítomnosti alifatického aldehydu (substrát, *luxCDE*) a zdroje redukčních ekvivalentů – FMNH₂ a O₂
 - Aerobní prostředí, aktivně rostoucí buňky
 - Vhodný pro studium genové exprese *in situ*
 - Minimální pozadí
 - Kvantifikace luminometrem nebo protony měřící přístroje
 - Stabilní reportér – není vhodný pro rychlé změny transkripce

Genové fúze – reportérové geny

- **Fluorescentní proteiny** – Errampalli 1999, J. Microbiol. Methods 35, 187,
 - **GFP** – green fluorescent protein – jellyfish *Aequorea victoria* – absorbuje fialové světlo při maximu 395 nm a emituje zelené světlo s maximem 509 nm – první používaný
 - Kvantifikace fluorescenční spektroskopií a konfokální laserovou mikroskopií
 - Použití pro jednotlivou buňku – lokalizace proteinů
 - Vhodný pro nerostoucí buňky
 - Odolný proti mnoha denaturantům, proteazám, odolný proti teplotě (65 °C), formaldehydu
 - Vhodný pro elektronovou mikroskopii
 - **Barevné varianty** – rozdílné excitační a emisní vlnové délky
 - Možnost použít několik najednou pro různé geny – metoda FRET
 - Žlutý (513,527) , tyrkysový (453,501), modrý (385,445),
 - Modifikované GFP – red shifted S65T (395, 490) – více fluorescentní i odolný

Genové fúze – reportérové geny

- **Nestabilní varianty GFP –**
 - obsahují N-terminální peptid - AANDENYLAA – označení pro proteasy
 - Alterace 3 aa na C – konci LVA, AAV, ASV – stabilita v *E. coli* – 40, 60, 100 min.
 - Snižuje se citlivost – dobrý kompromis mezi citlivostí a schopnosti reagovat na změny transkripce
- Obecně bakteriální buňky tolerují nízké koncentrace GFP
- Některé kmeny vysoké hladiny netolerují – degradace konstruktů – důvod neznámý
 - použití k lokalizaci
- RFP – red - izolovaný z mořských korálů
 - „Divoký“ protein – fluorescenční aktivita až po několika hodinách po transkripci
- *cat* – resistance k chloramfenikolu – chloramphenicol acetyl transferasa

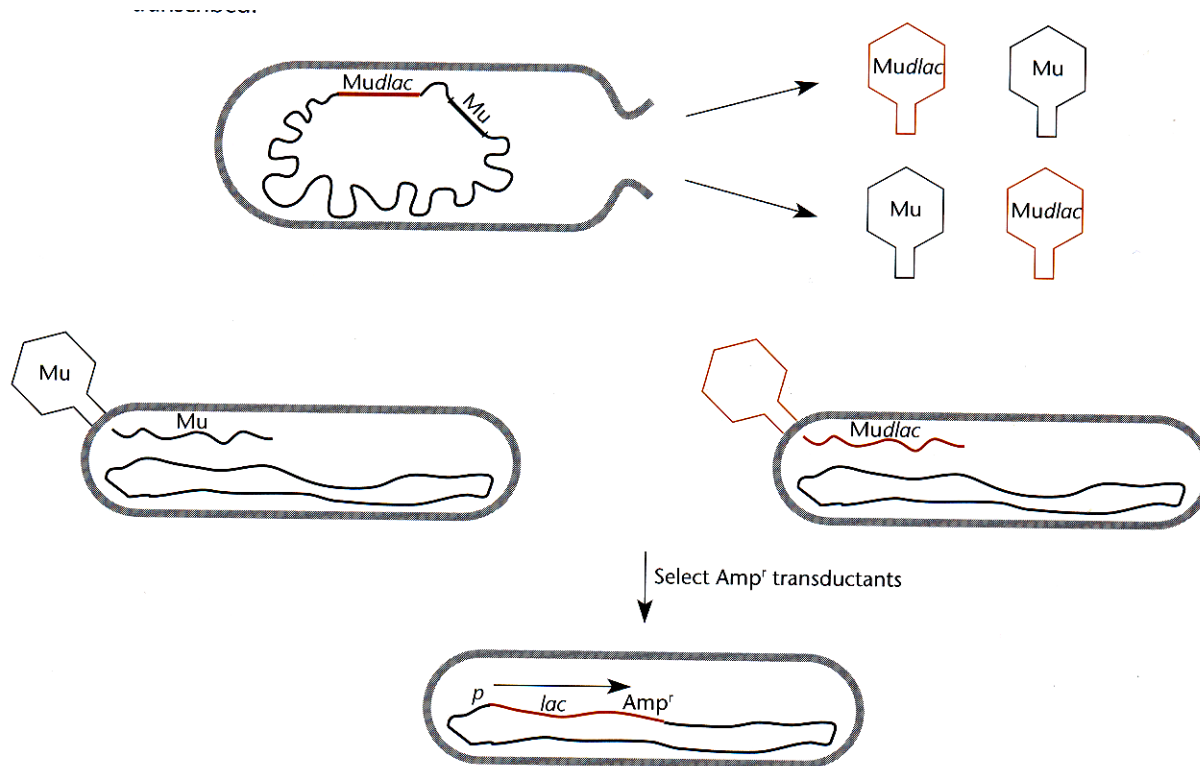
Značení proteinů

□ Typy značek

- Translační fúze s epitopy – komerčně dostupné protilátky (Sigma, Roche)
 - FLAG – arteficielní 8 aa zbytek
 - HA – 9 aa zbytek odvozený od chřipkového hemaglutininu
 - C-Myc 10 aa zbytek odvozený od lidského c-myc onkogenu
- Fluorescenční značky – k lokalizaci a dynamice proteinů v živých buňkách – fluorescenční mikroskopie
 - CFP – kyan fluorescentní protein
 - GFP – zelený fluorescentní protein
 - YFP – yellow fluorescentní protein

Vytváření genových fúzí

- Použití derivátů Mu fága s reportérovým genem (lacZ)



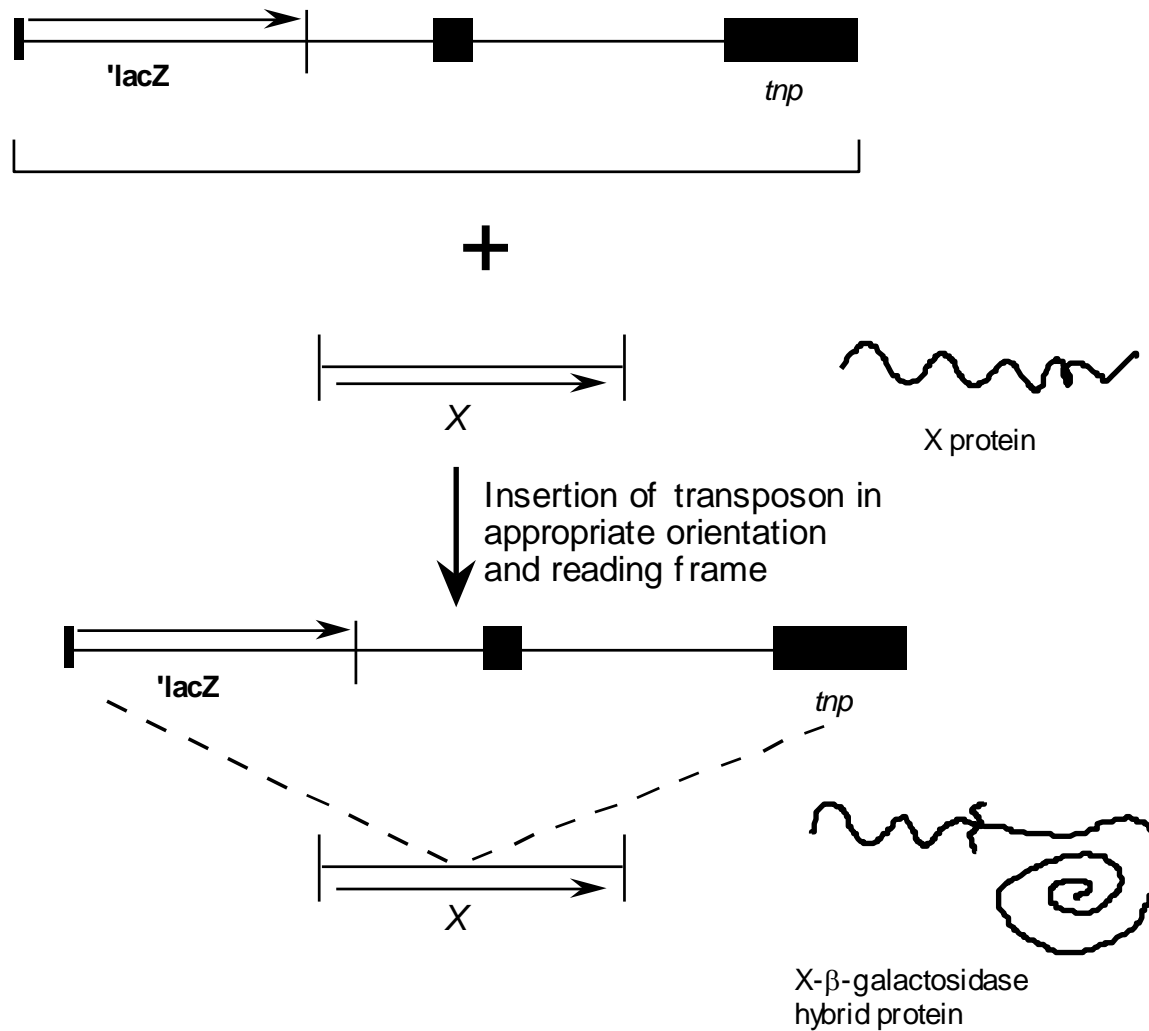
Bakteriofág Mu - vybrané vektory

Some useful Mud vectors

	NAME	SIZE (Kb)	USE (Reference)
	MudI (aka Mud1)	37.2	Original operon fusion phage (Casadaban and Cohen, 1979)
	MudII301 (aka Mud2)	35.6	Similar to Mud1 but forms gene fusions (Casadaban and Chou, 1984)
	MudI 1734 (aka MudJ)	11.3	Operon fusion mini-Mud deleted for transposition functions (Beatriz et al., 1984)
	MudII 1734 (aka MudK)	9.7	Gene fusion mini-Mud deleted for transposition functions (Beatriz et al., 1984)
	Mud5005	7.9	In vivo cloning vector (Castilho et al., 1993)

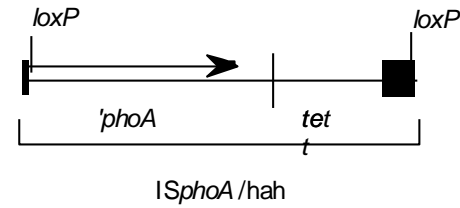
- tpn^+ indicates the Mud carries the Mu A^+B^+ genes required for transposition.
- $c(TS)$ is a temperature-sensitive mutation in the Mu c gene required for repression of transposition.
- Mud1, Mud2, MudJ, and MudK all lack transcriptional start site (i.e. promoter) for the *lac* operon.
- P_X indicates the promoter for gene *X*.
- *ZYA* indicates the *lac* operon; '*ZYA*' indicates that the *lacZ* gene is lacking translational start sites.
- '*trp*' is a short region from the *E. coli trp* operon which provide translational start sites for the *lacZ* gene.
- Ori is the origin of replication from the multicopy plasmid pMB9.
- aka means "also known as".

Použití transposonů - vytváření hybridních proteinů

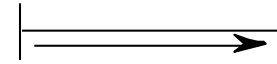


Použití transposonů -

vytváření inserčních tagů do proteinů



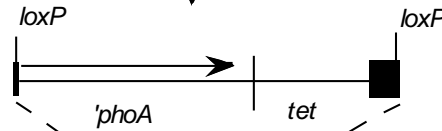
+



X protein

X

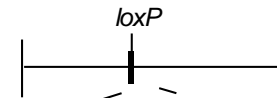
Step 1:
Transposition



X-alkaline phosphatase
hybrid protein

X

Step 2:
Site-specific
recombination



X protein with
63 residue
insert

SDSYTQVASWTEPFPFPSIQGDLITSYNVCYTKLLIKHHHHHH YPYDVPDYA RDPRSDQETVxx

P
T
A

A
D
E
G

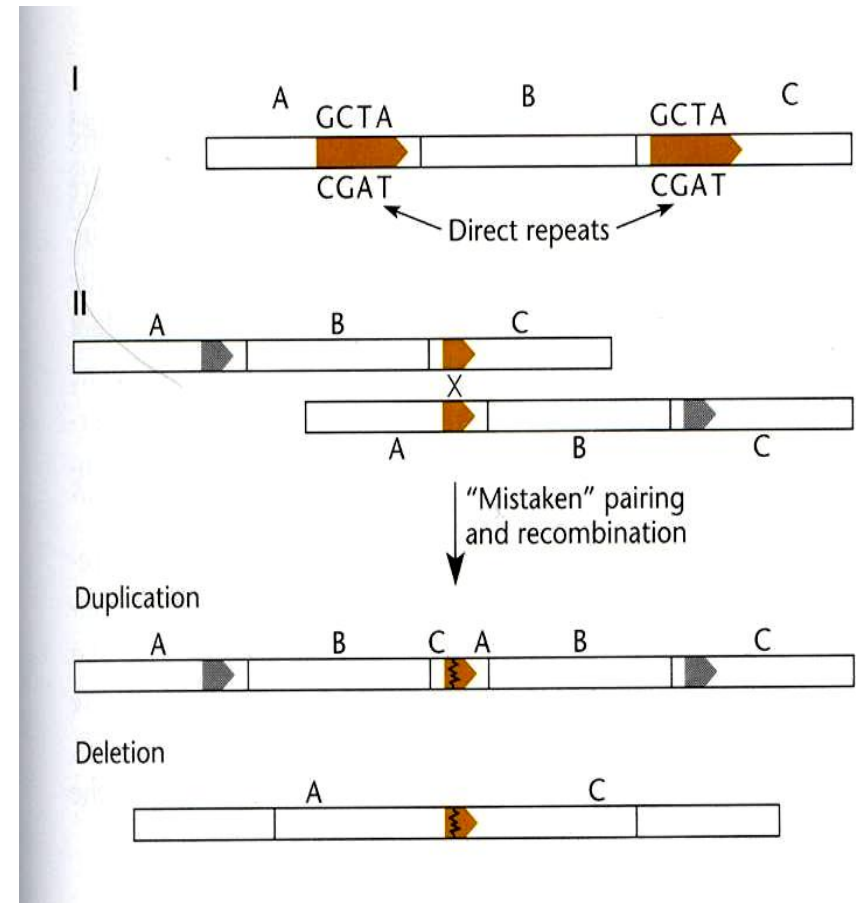
Genetický fingerprinting – vyhledávání esenciálních genů

- Vytvořit populaci se saturovaným množstvím insercí v chromosomu
 - Nechat růst v bohatém komplexním mediu (LB) – vyrostou všechny mutanty mimo esenciálních – ztráta mutant s inaktivací esenciálních genů
 - Identifikace genů v přeživších populacích
 - Identifikace genů bez inserce – esenciální geny
-
- Gerdes et al, J. Bacteriol. 184, 4555 (2002)

Použití transposonů - delece, duplikace,

Duplikace a delece genů

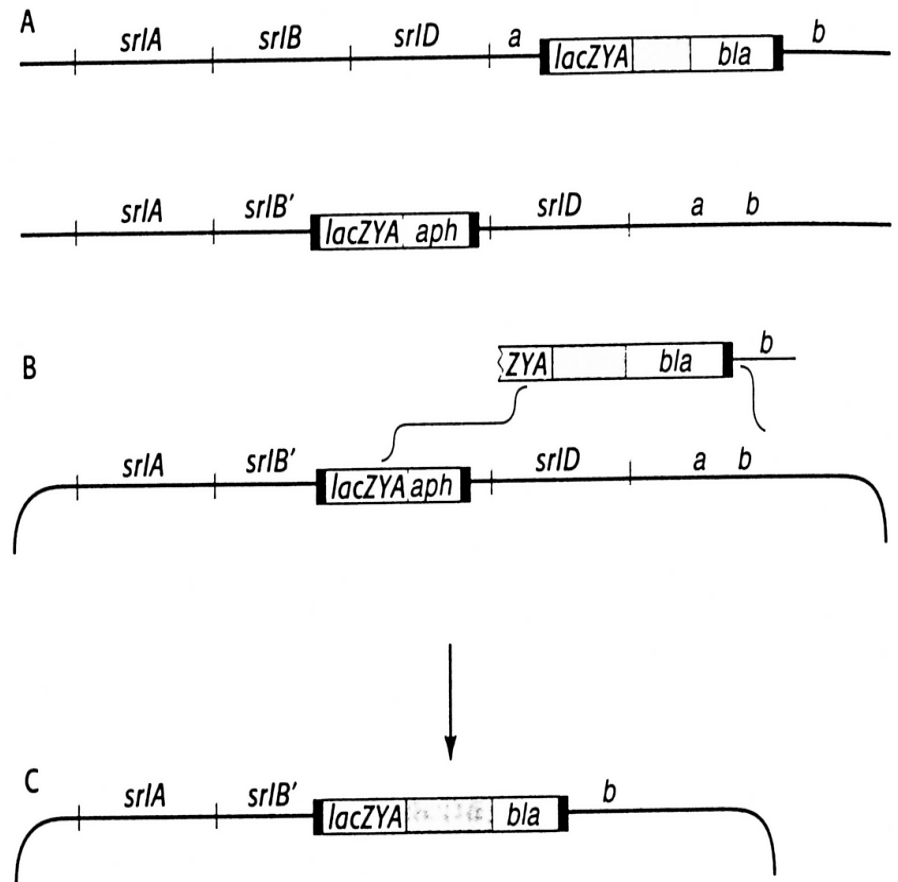
- Vznikají rekombinací mezi přímými repeticemi na jiném vlákně DNA
 - vznik duplikace genu mezi repeticemi na jednom vlákně
 - současně dojde k deleci genu mezi repeticemi na druhém vlákně
 - fenotypově se nerozezná, pouze projevuje-li se duplikace genu
 - duplikace jsou nestálé a dochází k rekombinaci a obnovení původního stavu



Příprava delecí - transposony

Př.: Delece v *srl* operonu

- Rekombinací mezi dvěma Mud inserčními mutanty
 - Podmínkou jsou dva různé použité Mud – různé selekční markery
 - Křížení těchto dvou kmenů
 - Transdukce P22 na jednom kmeni (Amp^R) **A**
 - Infekce druhého kmene (Km^R)
 - Rekombinace – selekce na $\text{Amp}^R \text{Km}^S$ **B**
 - Levá část delece je určena začátkem inserce v kmeni Km , pravá část koncem inserce Amp kmene



Archaea - Genetické přístupy

1. Většina archaea vyžadují extrémní růstové podmínky
 - Není růst v koloniích
 - Klonování
 - Screening mnoha klonů
 - Jiná stavba buněk
 - Nefungují antibiotika působící na bakteriální buněčnou stěnu
2. Transkripce a translace více podobná eukaryím
 - Markery a plazmidy používané v bakteriální genetice nejsou transkribovány a translatovány – nereplikují se

Archaea - Genetické přístupy

1. Nové systémy – posledních 20 let

- Fúze archaea promotorů s rekombinantními geny
- Isolace archaea plazmidů –
 - příprava podvojných plazmidů
- Kultivační podmínky umožňující růst v koloniích
 - Halofilní euryarcheota – standartní agarové plotny s přidavkem 12-25% NaCl a Mg⁺
 - Anaerobní methanogeny – přísně anaerobní podmínky – v uzavřených boxech – standartní agar
 - Hypertermofilní metanogeny – speciální nádobí i komponenty pevných médií
- Typické systémy pro transfer genů
 - Pružný parakrystalický protein a glycoproteinová S- vrstva
 - Rigidní formy obsahující pseudomureinovou monovrstvu
 - heteropolysacharidová vrstva s chemickými vlastnostmi chondroitinu

Archaea - Genetické přístupy - transformace

- Systémy pro S - vrstvu -
 - Příprava sféroplastů -
 - rozrušení S vrstvy přidavkem EDTA
 - Transformace
 - Regenerace sféroplastů přidáním divalentních kationtů
- Rigidní buněčná stěna – Methanosarcina
 - Růst v nízkých koncentracích solí – jednovrstvený růst – sféroplasty jako u S –vrstev
 - Methanothermobacter – pseudomurein
 - Sféroplasty inkubací s pseudomurein endopeptidasou

Table 2. Gene transfer methods for archaea

Type	Method	Species	Reference
Transformation	Polyethylene glycol (PEG)-mediated	<i>Haloferax volcanii</i> , <i>Haloarcula</i> spp., <i>Halobacterium</i> spp., <i>Methanococcus</i> <i>maripaludis</i> , <i>Pyrococcus abyssi</i>	24–26, 67, 109
		<i>Methanococcus voltae</i> , <i>Sulfolobus</i> spp.	22, 83, 98
	Electroporation	<i>Methanosarcina</i> spp.	73
	Liposome-mediated	<i>Methanosarcina</i> spp.	73
Transduction	CaCl ₂ with heat shock	<i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i>	2
	ΨM1-mediated	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	71
Conjugation	Cell mating	<i>Haloferax volcanii</i> , <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	39, 92
	Plasmid mediated	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	97

Archaea - Genetické přístupy

- **Markery – vybrány z archaea i bakterií**
 - **Halofily – většina heterologních proteinů je denaturována**
 - Mevinolin - rezistence k 3-hydroxyl-3methyl glutaryl koenzymu A reduktáze inhibitoru – inhibuje syntézu isoprenoidní lipidickou část řetězce u archaea
 - Novobiocin – rezistence ke gyrase inhibitoru
 - Anisomycin, sparsomycin, thiostrepton – inhibitory proteinů
 - Spontáně izolované mutanty rezistentní k 5-fluoroorotic kyselině
 - Auxotrofní mutanty – histidin, leucin, thymidin, tryptofan
 - **Metaogeny – jsou sensitivní k antibiotikům které inhibují syntézu proteinů**
 - Puromycin, neomycin, pseudomycin
 - Puromycin transacetylase ze *Streptomyces alboniger* –
 - rezistence k puromycinu
 - Promotor z methyl coenzym M reduktázy z *Methanosarcina*
 - Spontání mutace v isoleucin t-RNA –rezistence k pseudomycinu
 - **Hypertemofily**
 - Hygromycin – hygromycin fosfotransferáza z *E. coli* s promotorem pro *S. solfataricus* aspartát aminotransferáza

Archaea - Genetické přístupy

- Vektory –
 - halofily, metanogeny a nemetanogenní hypertermofily
 - Podvojně plazmidy – *E. coli*
- Halofily
 - pHV2 – miniplazmid – 2 ori (pHV a R6K), mevinolin, ampicilin
- Metanogeny
 - pC2A - 2ori – pV2A a ColE1) puromycin, ampicilin
- Hypertermofily
 - pGT5 –
 - pEXSs – ori z fága SVV1 - hygromycin

Archaea - Genetické přístupy

- Nespecifická mutageneze –
 - UV a chemicky – snadná izolace x obtížná lokalizace
 - Transpozony –
 - mariner deriváty se selekcí a ori archaea i *E. coli*
 - Lokalizace – restrikce chromozomu a ligace do *E. coli* plazmidů
 - Tepelný šok, fixace dusíku, struktura buněčné stěny

Archaea - Genetické přístupy

Knock out systémy

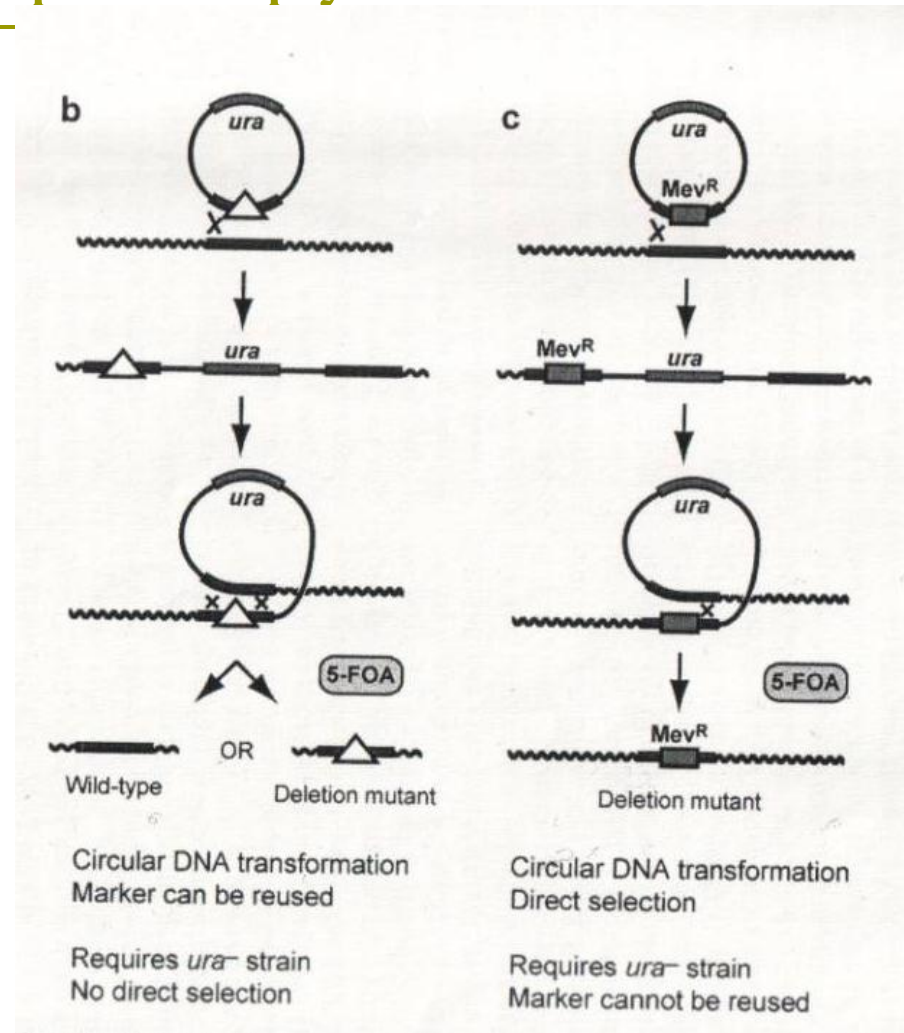
Dvoustupňový systém –

Transformace
nereplikujícího se
cirkulárního plazmidu
Ztráta markeru

Halofilní bakterie –

obnovení uracilové
auxotrofie - vyžaduje
ura auxotrof

Mevinolin – *mevR* –
přímá selekce



Archaea - Genetické přístupy

- Reportérové geny –
 - Halofilní bakterie - salt tolerantní β – galaktozidáza
 - Modifikovaný derivát GFP
 - Bakteriorodopsin – bop gen na plazmidu v bop- mutantu
 - purpurové zbarvení kolonií
 - Metanogenní bakterie –
 - β – galaktozidáza, β – glucuronidaza z E. coli
 - Trehaláza – Bacillus subtilis
 - Vždy archaea promotory a terminátory

