

Osnova

1.přednáška

Trochu historie

Základní charakteristika kvasinek

Podmínky růstu

Přirozený výskyt

Morfologie kvasinek

Identifikace kvasinek

Význam

praktický – výroba piva, vína, etanolu a pekařského droždí (*S. cerevisiae*) ...

lékařský – 15 druhů je potenciálními lidskými patogeny (*Candida albicans*) ...

výzkumný – *S. cerevisiae* a *S.pombe* jsou modelovými organismy

Osnova

2.Přednáška

Kvasinka jako modelová buňka/organismus

Srovnání *S.cerevisiae* a *S. pombe*

Výhody

Nomenklatura, auxotrfie

Vektory

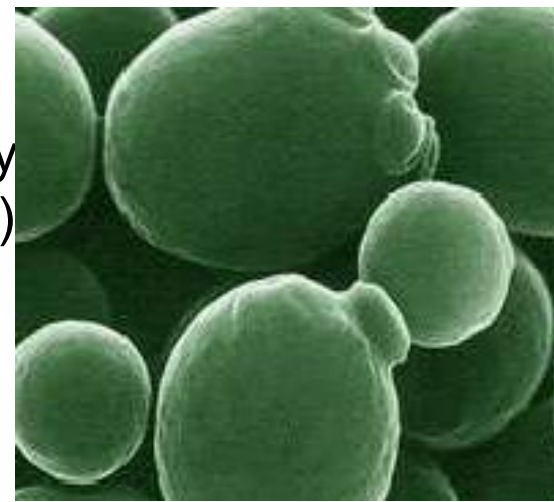
Genetické manipulace

Techniky

Fenotyp

Saccharomyces cerevisiae

- oválné, množí se pučením – >diploidní i haploidní buňky
- (rostou) většinou v G1 fázi (zatímco pombe je v G2 fázi)
- Genom 12 Mbp na 16-ti chromosomech
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Kóduje cca 6 275 genů (5 800 je funkčních)
- 120 kopií rRNA, 262 tRNA
- Geny reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- <5% genů obsahuje introny (0.5% genomu), 3% transposony (46% u člověka)



Schizosaccharomyces pombe

- podlouhlé, množí se dělením - většinou haploidní buňky
- Pouze 3 kondenzované chromozomy (13 Mbp)
- Velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace
- Má geny pro heterochromatin (*S.c.* nemá)
- Asi 4800 kodujících genů (nejméně u eukaryot)
- z nichž 43% má introny
- 50 genů má homologie s geny lidských nemocí



<http://www.yeastgenome.org/>

<http://www.sanger.ac.uk/modelorgs/yeast.shtml>

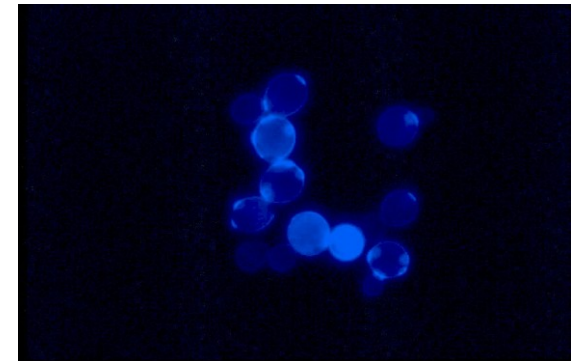
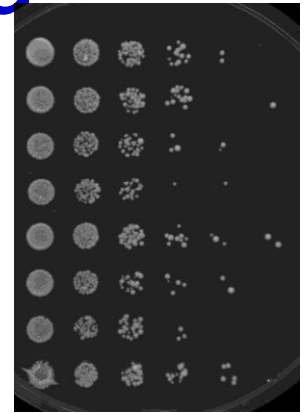
Výhody kvasinkového modelu

- Rychle se množí **EUKARYOTNÍ** mikroorganismy (90 min/dělení, 25-30 C)
- Vytváří kolonie na plotnách - mikrobiologické metody (otiskování ploten, kapkový test =>toxiny v plotnách – HU, MMS ...)
- Stabilní haploidní i diploidní formy
- Haploidní buňky lze křížit na diploidní (heterozygotní mutanty)
- Diploidní buňky lze sporulovat a využít pro genetickou analýzu (tetrádová analýza)
- Lze transformovat DNA (plasmidy i lineární)
- Centromerické a multicopy plasmidy
- Vysoká frekvence homologní rekombinace (lineární DNA)
- Lze připravovat deleční a mutantní kmeny
- Vydrží v >15% glycerolu na -70 C „indefinitely“

- Techniky barvení (cytoskelet, stěna ... + GFP *in vivo*)

- *S.c.* má kompaktní genom – knihovny s genomovou DNA (ne cDNA)
- Kompletně osekvenovaný genom (genomové aplikace)
- EuroFan projekt – delece všech *S.c.* genů (+GFP, +2-hybrid)
- Mikročipy - expresní profily za různých podmínek

- Řada životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)

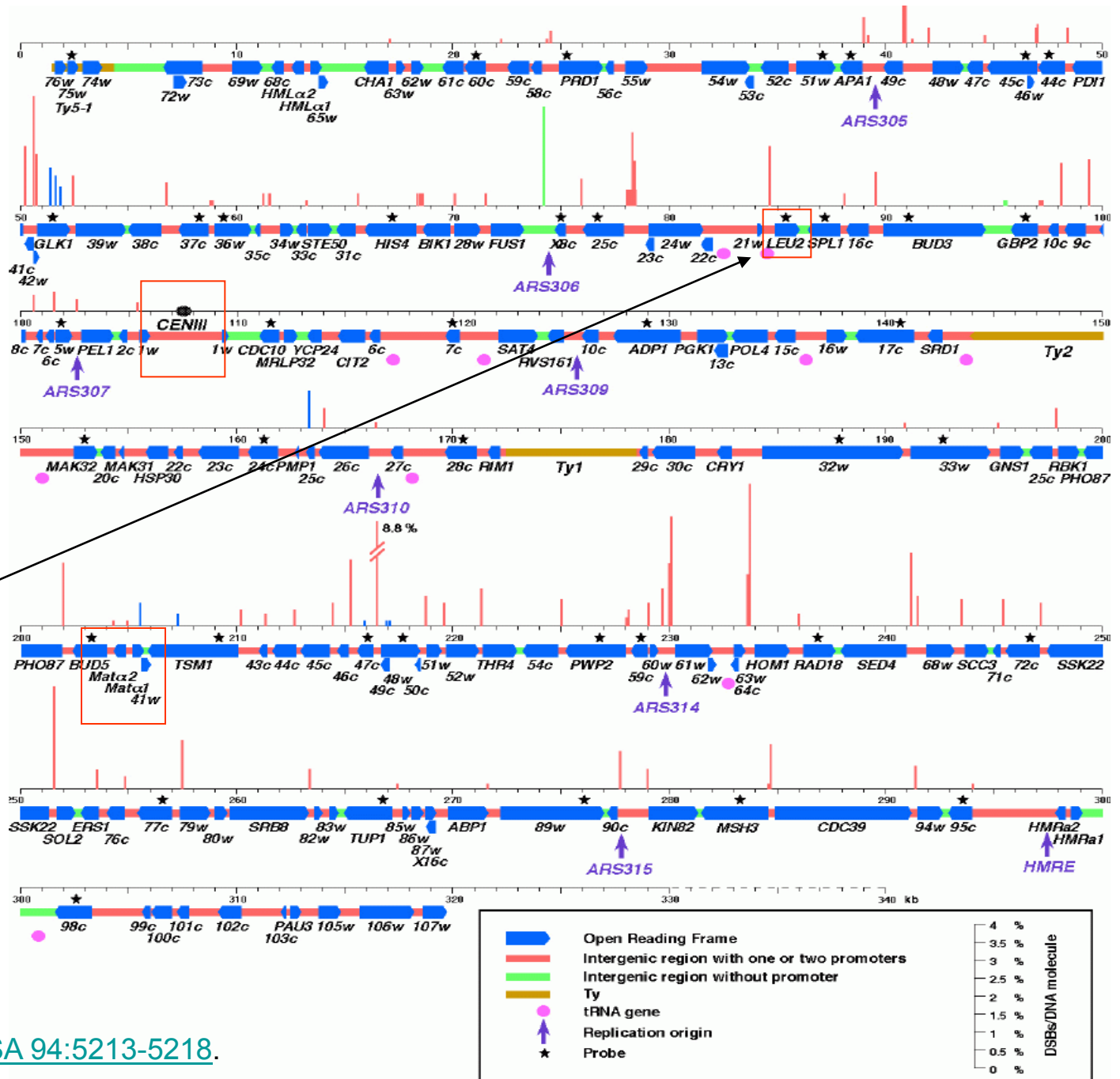


F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002):
http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/StartedYeast.html

Chromosom III
(nejmenší)
CEN, ARS, TEL, Ty1-5
obsahuje MAT lokus

Nomenklatura pro S.c.:
YCRXXw:
Y=yeast
C= 3. chromosom
R= pravé raménko
XX=pořadové číslo
w/c=Watson/Crick

LEU2 – gen
Leu2p - protein
leu2-Δ1 – delece
leu2-1 – mutance
LEU2::HIS3 – inzerce
HIS3 genu v lokusu
LEU2



Laboratorní kvasinkové kmeny

S288C – 1. osekvenovaný kmen

Genotype: *MAT α SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1*

Notes: Strain used in the systematic sequencing project, the sequence stored in SGD. S288C does not form pseudohyphae. In addition, since it has a mutated copy of [HAP1](#), it is not a good strain for mitochondrial studies. S288C strains are *gal2*- and they do not use galactose anaerobically.

References: [Mortimer and Johnston](#) (1986) Genetics 113:35-43.

Sources: [ATCC:204508](#)

W303 – nejčastěji používaný laboratorní kmen

Genotype: *MAT α /MAT α leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*

Notes: W303 also contains a *bud4* mutation that causes haploids to bud with a mixture of axial and bipolar budding patterns. In addition, the original W303 strain contains the *rad5-535* allele.

References: W303 constructed by Rodney Rothstein (see [detailed notes](#) from RR).

Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
CG-1945	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

Allele	Reverts?	Notes	Molecular description ^a	Reference
<u>ade2-101</u>	yes	ochre mutation, red colonies	G to T transversion at nucleotide 190, changing amino acid 64 from a Glu to a Stop	<u>Gai and Voytas, 2005</u>
<u>can1-100</u>	yes	ochre mutation	AAA-to-TAA ochre nonsense change at codon 47	Rodney Rothstein, <u>Personal communication to SGD.</u>
<u>his3delta200</u>	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during transformation. Note that this deletion damages the <u>PET56</u> promoter. See <u>Zhang et al., (2003)</u> for a discussion of this issue.	1 kb deletion, (-205 to 835)	<u>Struhl 1985; Fasullo and Davis 1988; Siram et al. YGM RNA processing mtg 1993</u>
<u>leu2-3,112</u>	no	double mutant	GTC-to-GTT silent change at codon 56, GTT-to-GCT missense change at codon 69, G insertion at nucleotide 249, G insertion at nucleotide 792, GTT-to-GTC silent change at codon 299, GAC-to-AAC missense change at codon 300.	<u>Hinnen et al. 1978;</u> <u>Gaber and Culbertson 1982;</u> <u>Meira LB et al., 1995;</u> Rodney Rothstein, <u>Personal communication to SGD.</u>
<u>trp1-1</u>	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber nonsense change at codon 83	<u>McDonald, et al. 1997</u>
<u>ura3-52</u>	no	-	Ty1 insertion (transcribing left to right) at pos. 121	<u>Rose and Winston 1984</u>

Auxotrofie

marker	aktivita	auxotrofie	pozn.
<i>ADE2</i>	phosphoribosylamino-imidazole-carboxylase	Ade-	vyžaduje adenin k růstu, červené kolonie (metabolit)
<i>HIS3</i>	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	His-	vyžaduje histidin k růstu, inhibitor 3-aminotriazol (3-AT)
<i>LEU2</i>		Leu-	vyžaduje leucin k růstu
<i>LYS2</i>	α -aminoadipate reductase	Lys-	vyžaduje lysin k růstu, inhibitor α-aminoadipic acid (aAA)
<i>TRP1</i>		Trp-	vyžaduje tryptofan k růstu
<i>URA3</i>	orotidine-5'phosphate decarboxylase	Ura-	vyžaduje uracil k růstu, * 5-fluoro-orotic acid (FOA)

FOA je přeměňován Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil. *URA3+* buňky nerostou, zatímco *ura3-* buňky jsou resistantní (další způsob selekce – zpětná)

KanMX – obdoba anti-bakteriálního antibiotika kanamycinu

Laboratorní podmínky

25-30 °C (*S.c.* i *S.p.* – rostou i při 15 °C a přežívají krátkodobě i 50 °C),

teplotně senzitivní mutanty (*ts*, 37 °C)

chládově senzitivní mutanty (*cs*, 20 °C),

YPD – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2% glukosa)

SD – minimální (syntetické) médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids - **aminokyseliny se přidávají dle selekce**, 20g/l dextrose (2% glukosa)

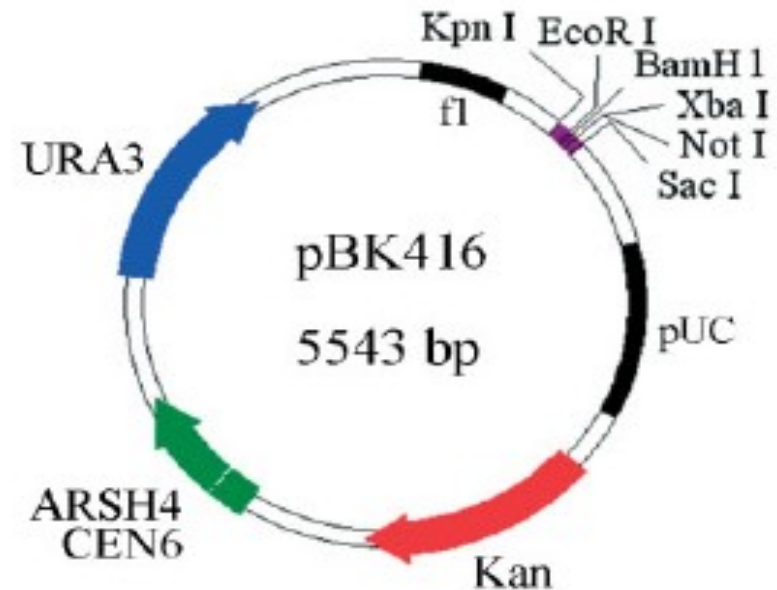
Transformace – metoda elektroporace

- octan litny/PEG metoda

Shuttle vektory

- Bakteriální část – Amp resistance, Origin
- Kvasinková část – marker (+KanMX), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 μ m (20 kopií na buňku) začátek replikace
- Promotor, tag, MCS
 - Kondicionální mutanty (fenotyp-funkce)
 - Nadprodukce
 - Suprese mutací (funkční homologie)

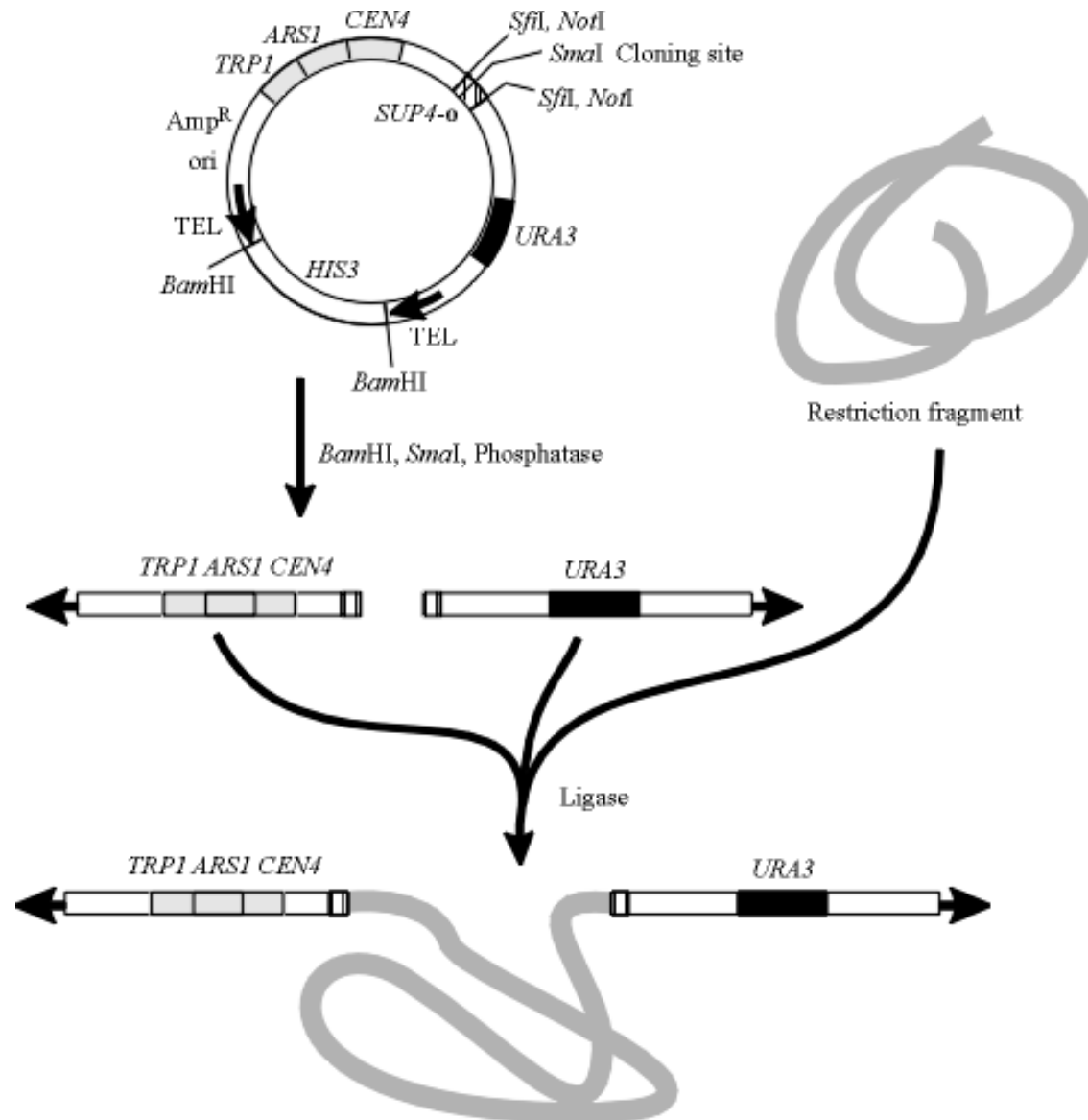
Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not detectable)
<i>ADH1</i> (700 bp)	Constitutive/high	+++
<i>GAL1</i> (full-length)	Repressed by glucose; induced (high-level) by galactose	(not detectable) ^d +++ ^d
<i>GAL1</i> (minimal)	Not regulated by glucose or galactose	(no data)



MFA1 - *MATa* haploid specifický

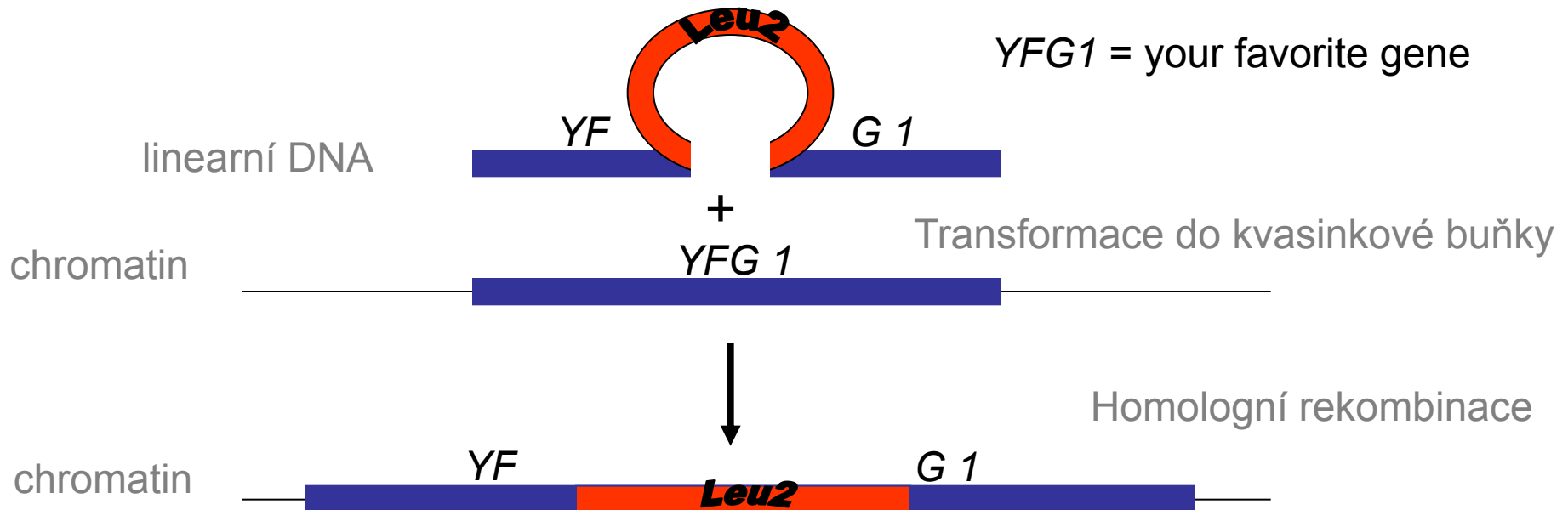
YAC (yeast artificial chromosome)

- Bakteriální část – Amp resistance, Ori počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert
- Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- Výzkum savčích telomer a centromer
- Použity i v savčích buňkách pro výzkum nesestřihnutých genů (dlouhé regulační úseky)



Genetické manipulace - disrupce genu

- Studium funkce genu – fenotyp delece či mutace
 - Nezbytný gen = smrt – plasmid nebo mutanty
 - Přežívají – křížení tj. hledání funkčně příbuzných genů
 - Studium funkčních homologií – dvojité mutanty (synthetic lethal x epistatic)



- Selekcce na SC-Leu plotnách
- Ověřit pomocí PCR nebo Southern blotu

Delece genu – PCR

74 mer UPTAG primer

..ATC U1 TAG 1 U2



D2 TAG 2 D1 TAA...

74 mer DOWNTAG primer

Round 1 PCR

Amplifikace kazety

UP_45 primer



DOWNTAG_45 primer

Round 2 PCR

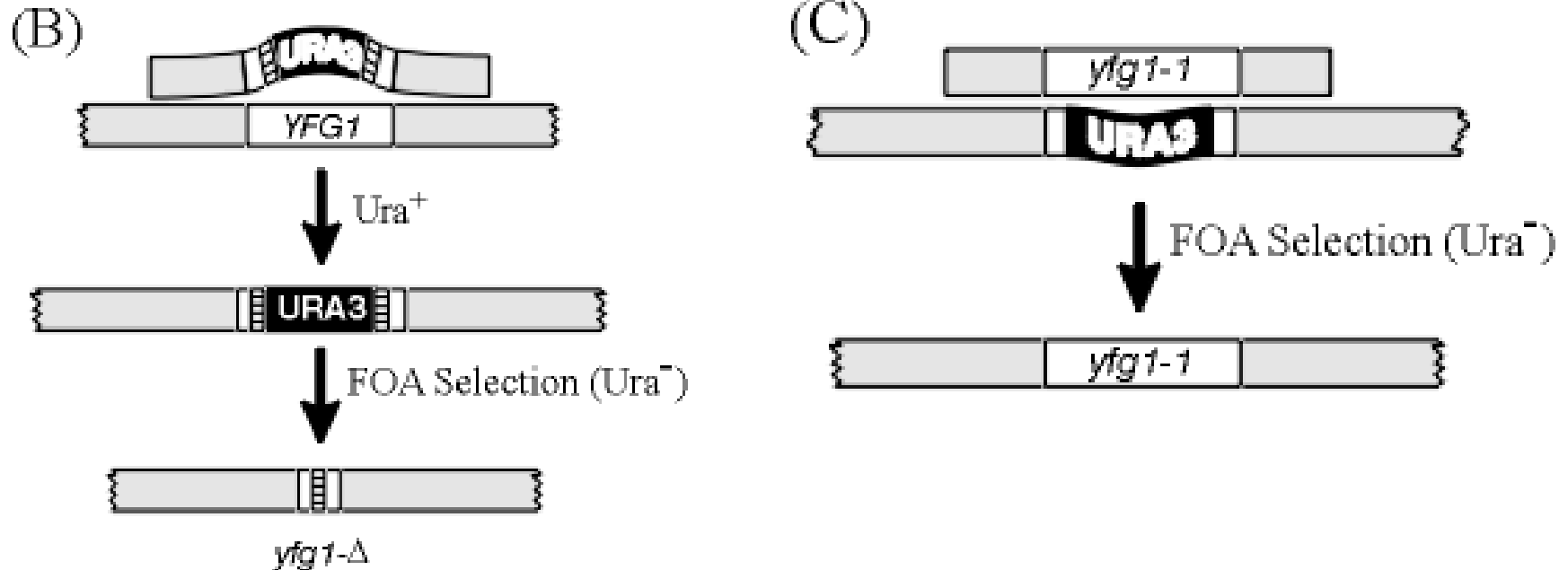
Homologní sekvence



Chromosomal integration by homologous recombination

Výhody použití *URA3*

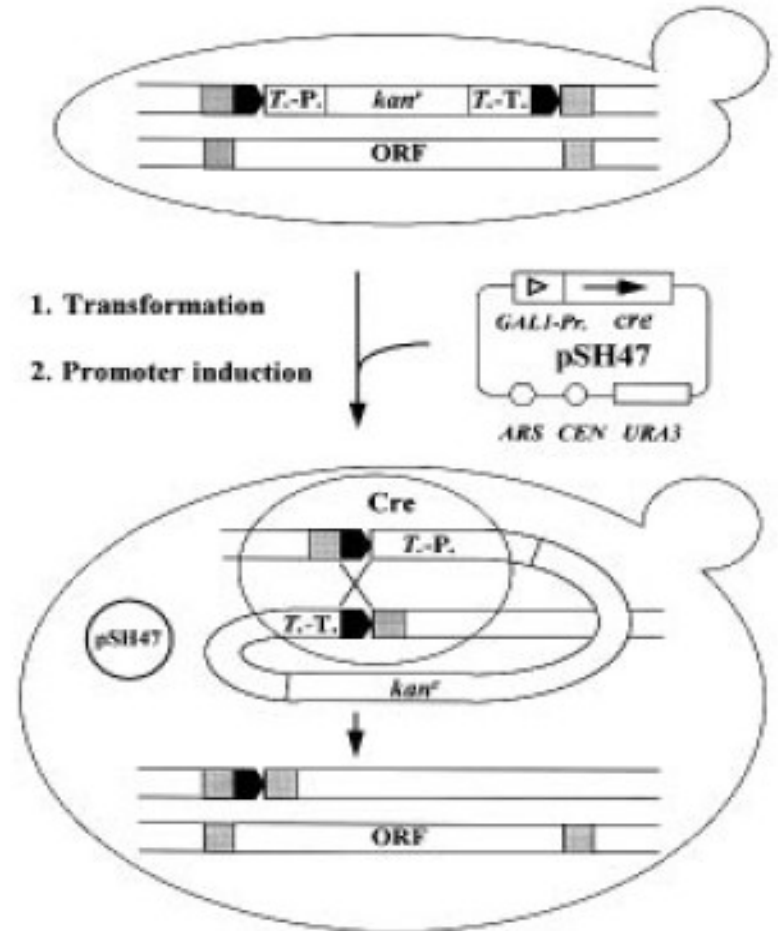
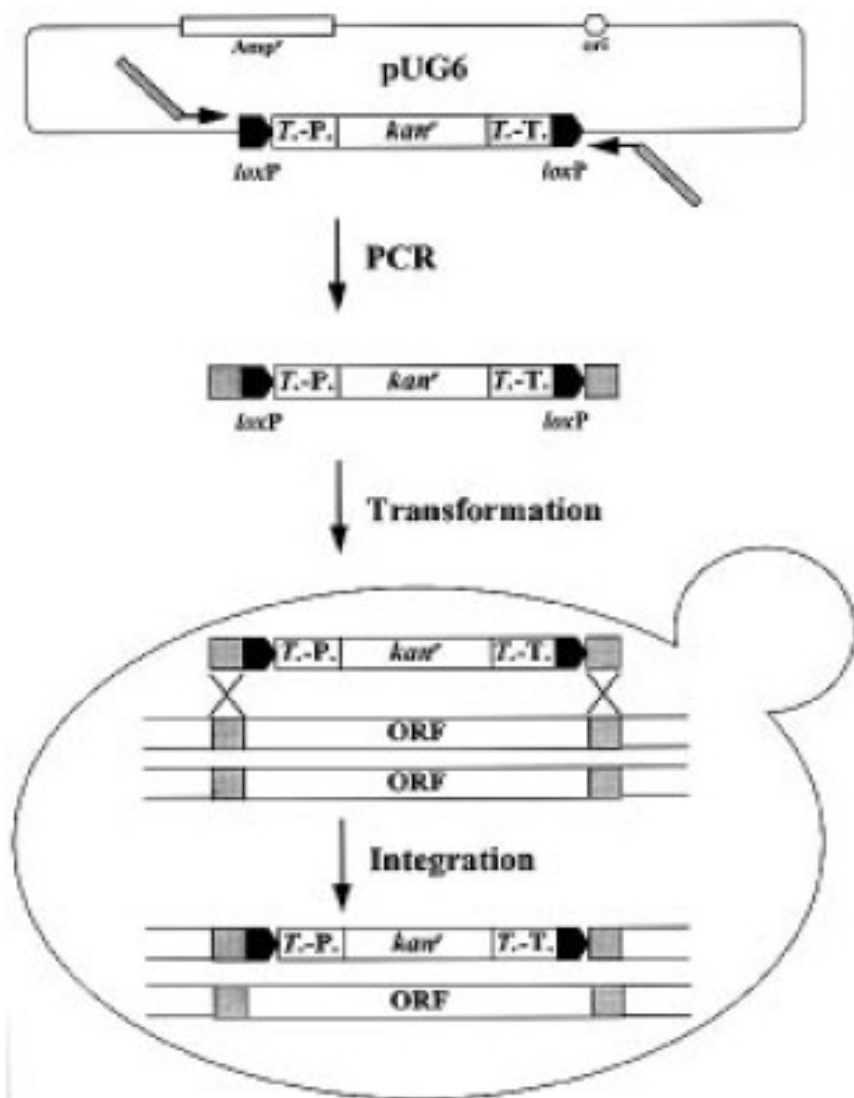
- Využití inhibitoru FOA pro „odlěčení“ *URA3* markeru



FOA je přeměňován Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil. *URA3*⁺ buňky nerostou, zatímco *ura3*⁻ buňky jsou resistantní (další způsob selekce – zpětná)

- Buňky se stávají *ura*⁻, takže *URA3* marker lze využít několikrát

Cre rekombinasa



Postup lze použít několikrát
NAR 24 (1996) 2519–2524

Delece genu – transposony

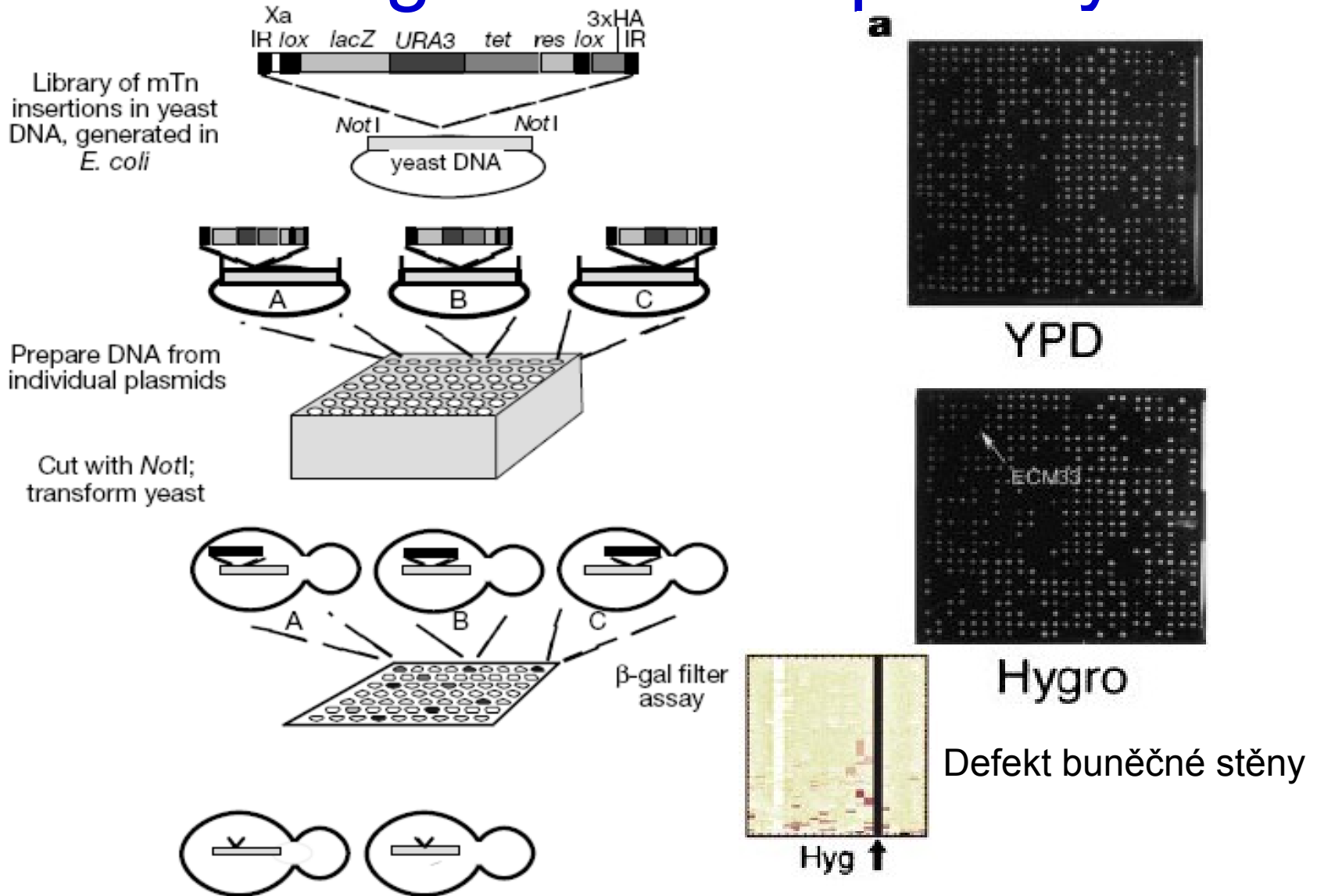
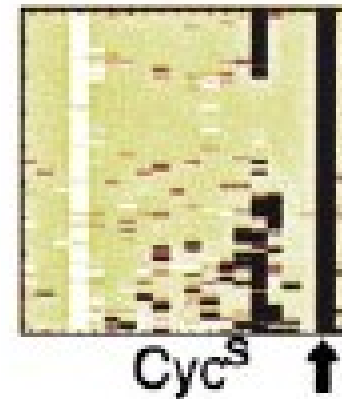
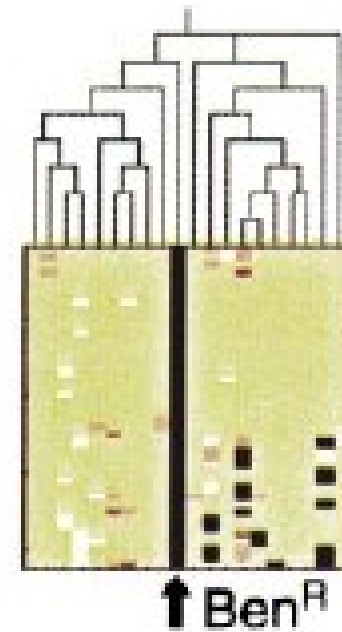
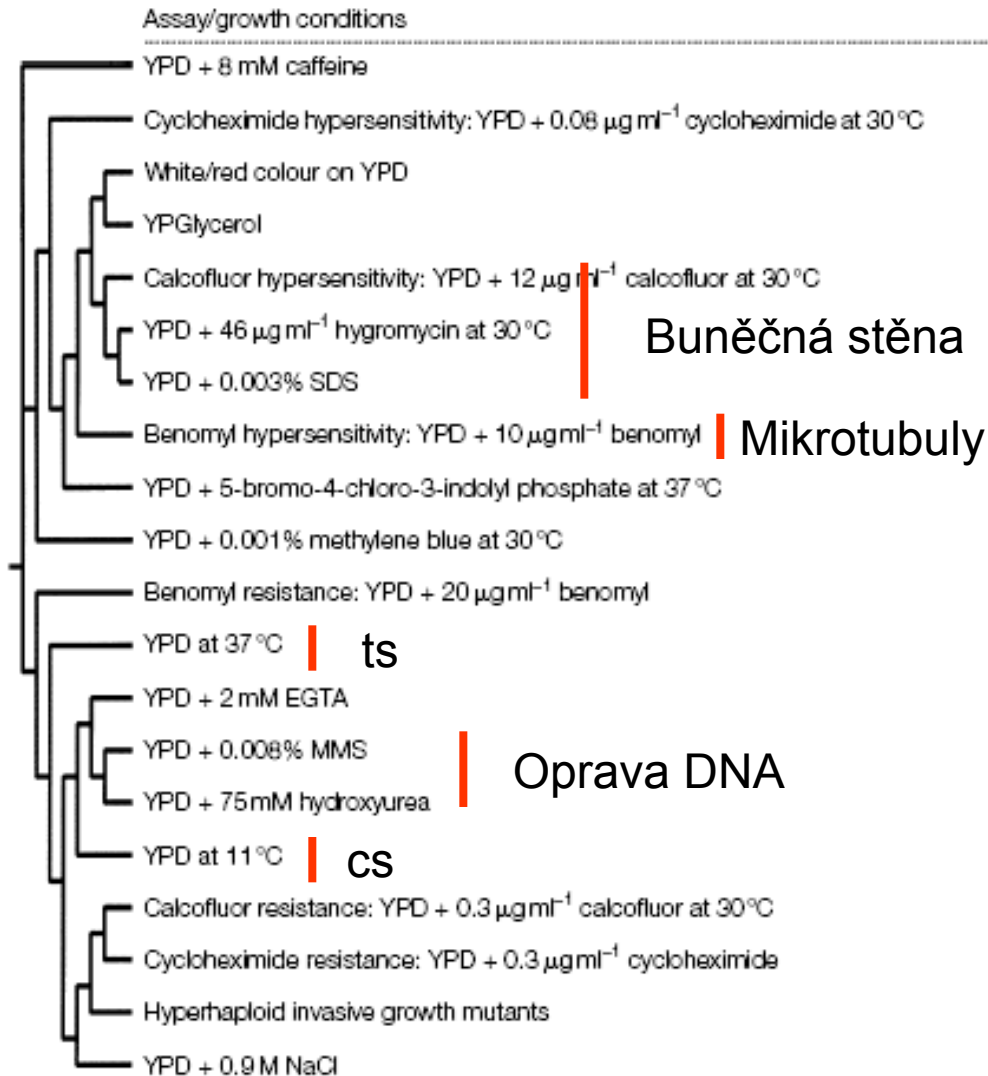


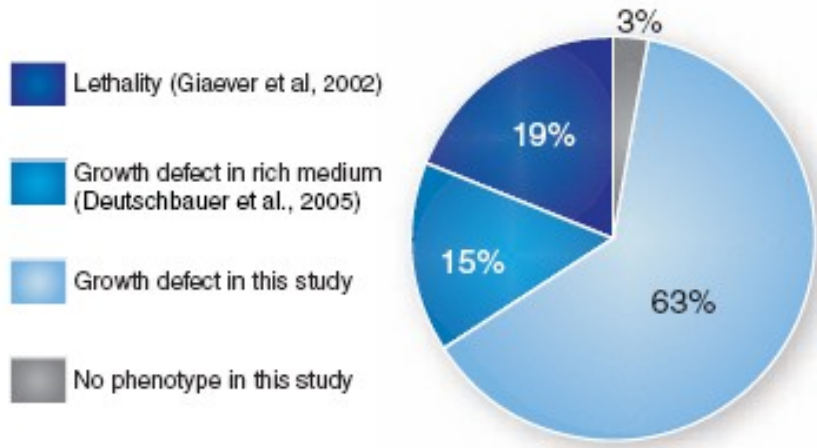
Figure 1 The mTn insertion project. Most steps were performed using a Robbins Hydra 96-channel dispenser; all strains are maintained in a 96-well format.

Testy fenotypu-funkce



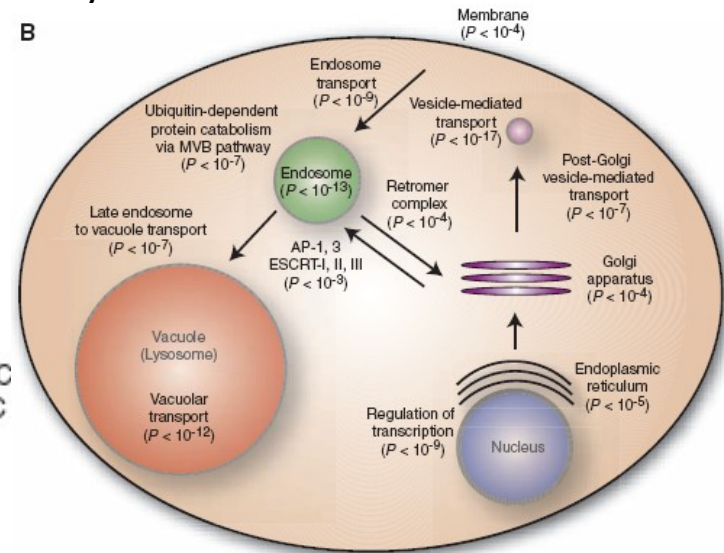
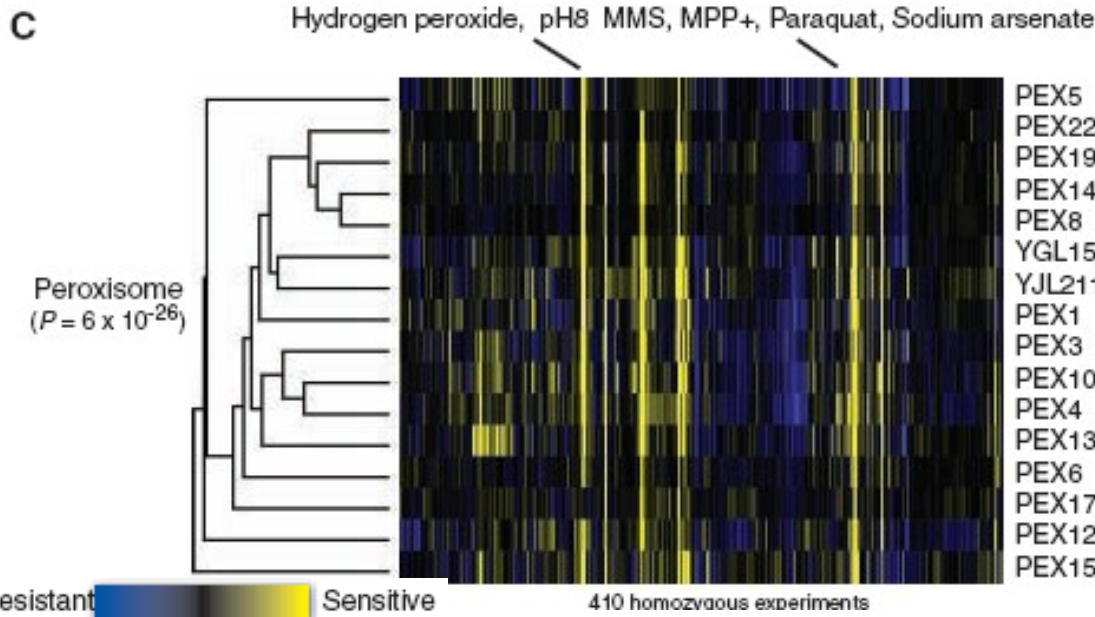
Systematicky provedeno v rámci projektu EuroFan

~ 6000 heterozygotních delečních kmenů
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)
 (neesenciální – růst za specifických podmínek nebo redundantní procesy)



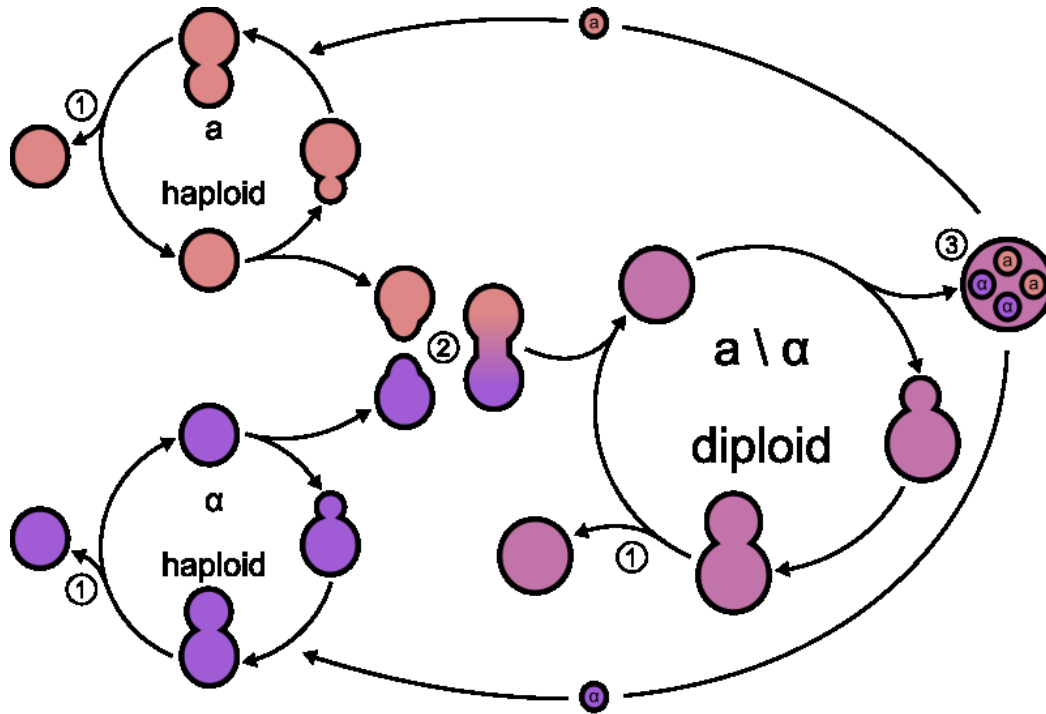
- Testováno ~400 malých molekul a stresových podmínek (-aa ...)
- Celkem provedeno ~ 6 milionů testů
- multidrug resistance (MDR) pokud byl gen potřebný pro resistenci vůči >20% z testovaných látek

- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti



Science 320 (2008), p.362

Životní cyklus *S. cerevisiae*



- Deleci či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

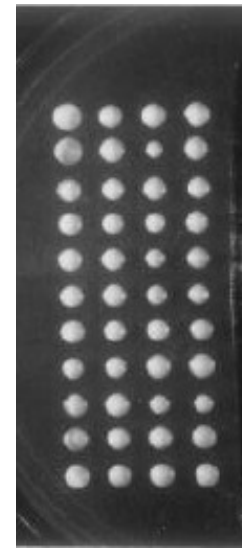
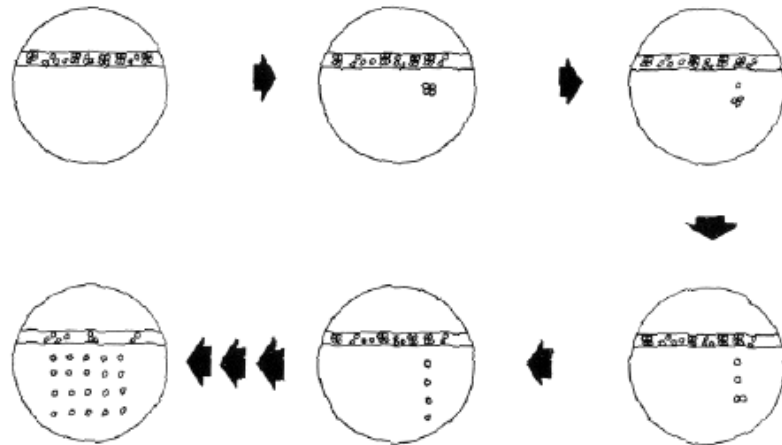
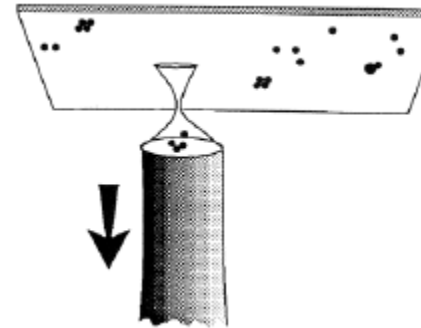
- v haploidní buňce hrozí suprese defektu proto je lépe používat diploidní buňky (druhá kopie zůstává nezměněná)

- lze připravit dvojitýho mutantu křížením haploidních mutantů a poté sporulací diploida

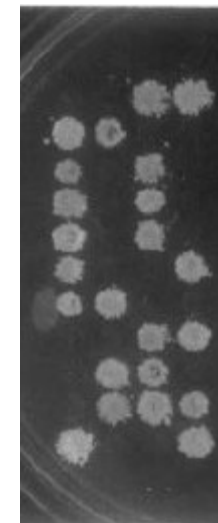
- pouzdro spory je třeba rozrušit a pomocí mikromanipulátoru získat jednotlivé haploidní buňky (lze provést i tzv. random sporulation)

Sporulation medium	Components	Composition
Presporulation ^d	0.8% Bacto-yeast extract 0.3% Bacto-peptone 10% Dextrose 2% Bacto-agar Distilled water	0.8 g 0.3 g 10 g 2 g 100 ml
Sporulation ^b	1% Potassium acetate 0.1% Bacto-yeast extract 0.05% Dextrose 2% Bacto-agar Distilled water	10 g 1 g 0.5 g 20 g 1000 ml
Minimal sporulation ^f	1% Potassium acetate 2% Bacto-agar Distilled water	10 g 20 g 1000 ml

Tetrádová analýza



YPD



AAaa

Selektivní médium
(SD-Trp ... testy)
Segregace 2:2

Příprava mutant

- Studium funkce genu – fenotyp delece či mutace
 - Nezbytný gen = smrt – plasmid nebo mutanty
 - Přežívají – křížení tj. hledání funkčně příbuzných genů
 - Studium funkčních homologií – dvojité mutanty (synthetic lethal x epistatic)

-V případě esenciálních genů je diploid transformován plasmidem s exprimovatelným wt genem – po jeho vypnutí se sleduje „terminální fenotyp“

-Pro sledování terminálního fenotypu jsou však lepší „kondicionální mutanty“ tj. teplotně (nebo chladově) sensitivní mutanty

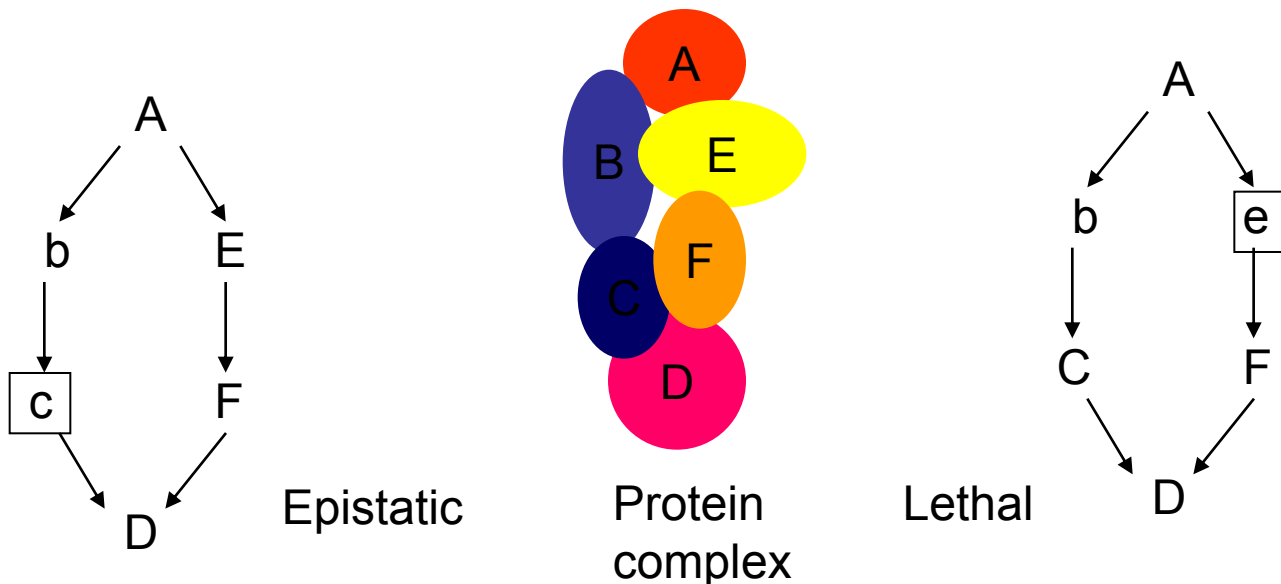
-Mutagenese (většinou náhodná) a následná selekce markeru či fenotypu (např. ***cdc mutanty***, mutace metabolických drah)

Dvojité mutanty – funkční příbuznost

Mutagenese pomocí hydroxylaminu ...

stejný fenotyp - diploid - identický gen
- haploid – epistatický (funkčně příbuzné)

Aditivní až letální – haploid – paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu



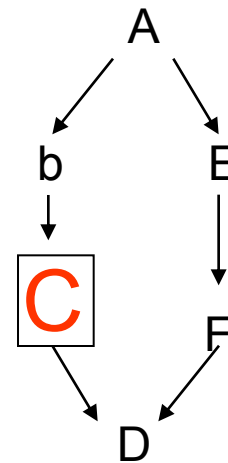
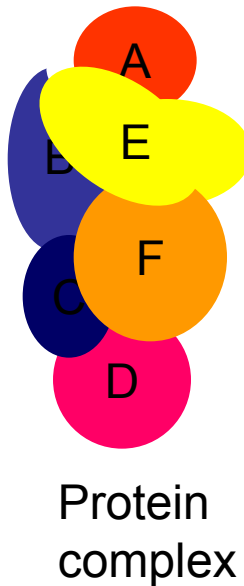
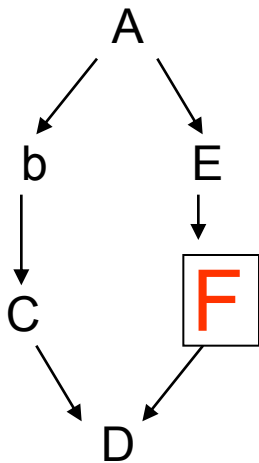
Hledání (screening) letálního mutanta – mutagenese kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA)

Supresory

Supresory potlačují původní fenotyp – mutace téhož genu „napraví“ původní

interakci

- mutace sousedního (protein) zesílí oslabenou interakci
- nadprodukce proteinu z paralelní dráhy
- nadprodukce proteinu z téže dráhy



Cloning the Wild-type Gene by Complementation

Transform a *MAT α yfg1 ura3-52* strain with a YCp50 library.

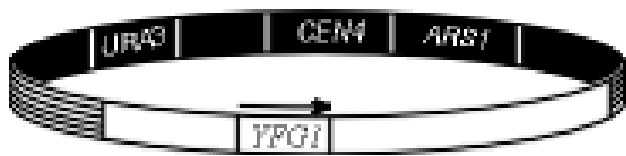
Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



Yfg⁺

Recover the YCp-*YFG1*⁺ plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Mutant Isolation

Mutagenesis of a haploid *MAT α* strain



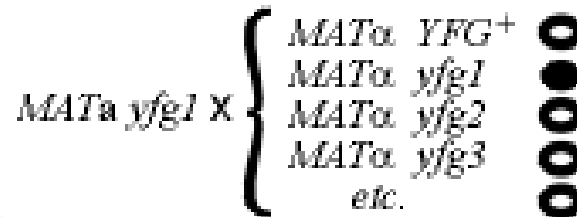
Detection of Yfg⁻



Yfg⁻

Complementation

Cross the Yfg⁻ *MAT α* mutant to *MAT α* tester strains. Isolate diploid strains. Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



Meiotic Analysis

Cross mutant to *MAT α YFG⁺*



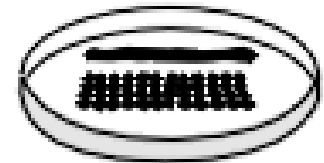
Isolate a diploid strain and Sporulate



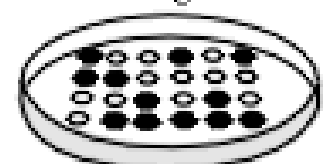
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

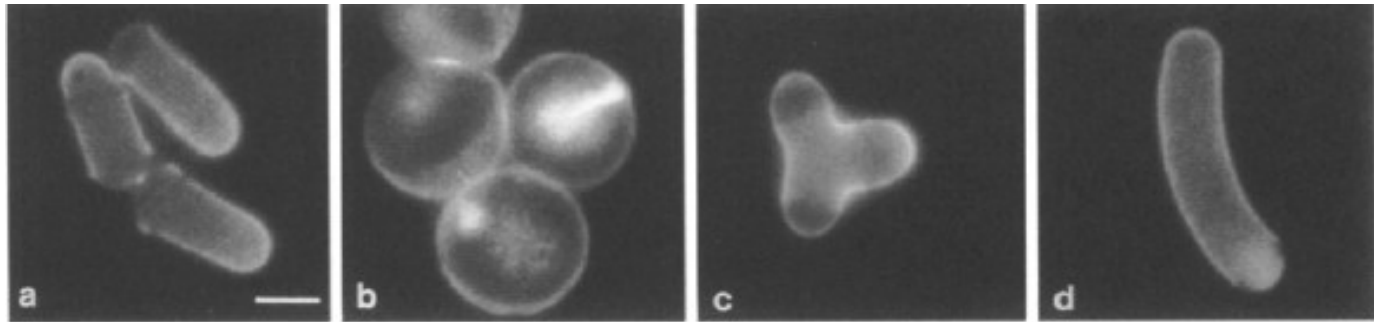


Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



Křížení – ověření - jedna mutace
- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl.)
Ověření pravosti (mutant+delece)

- mutagenese *S. pombe* – hledání ts mutant (55 000 kolonii) s defektní morfologií – našli 64 kmenů (3 druhy defektu: 51 kulatých=*orb*, 8 tip elongation aberrant=*tea*, 5 banana=*ban*)



- z 51 *orb* mutant křížených s WT segregovalo 43 v poměru 2:2 tj. jeden gen (8 sterilních), „linkage analysis“ mezi mutantami ukázala 12 *orb* genů (skupin – Tab. I) ... aktinový cytoskelet (polarizovaný růstu)

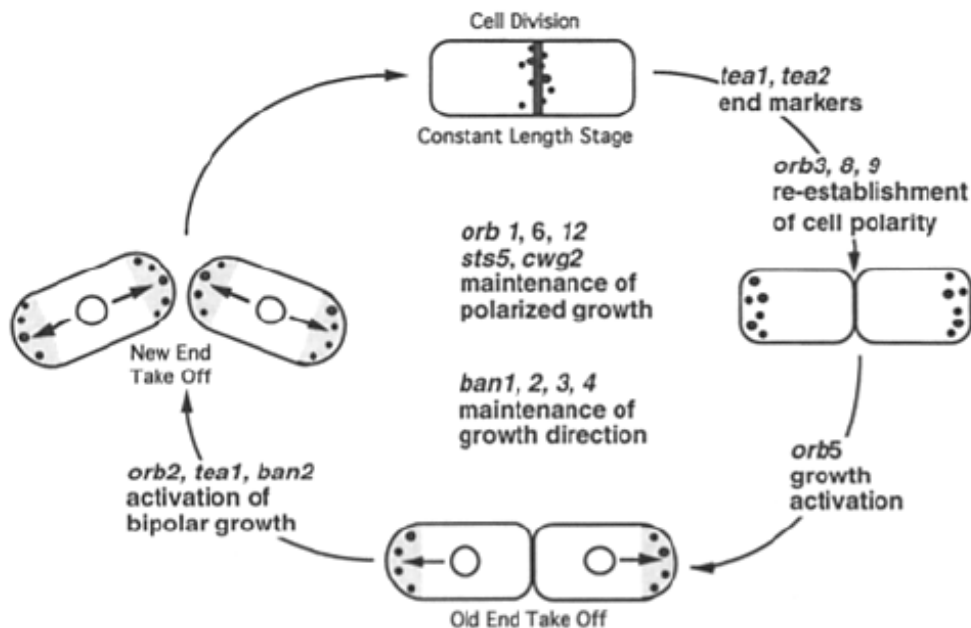
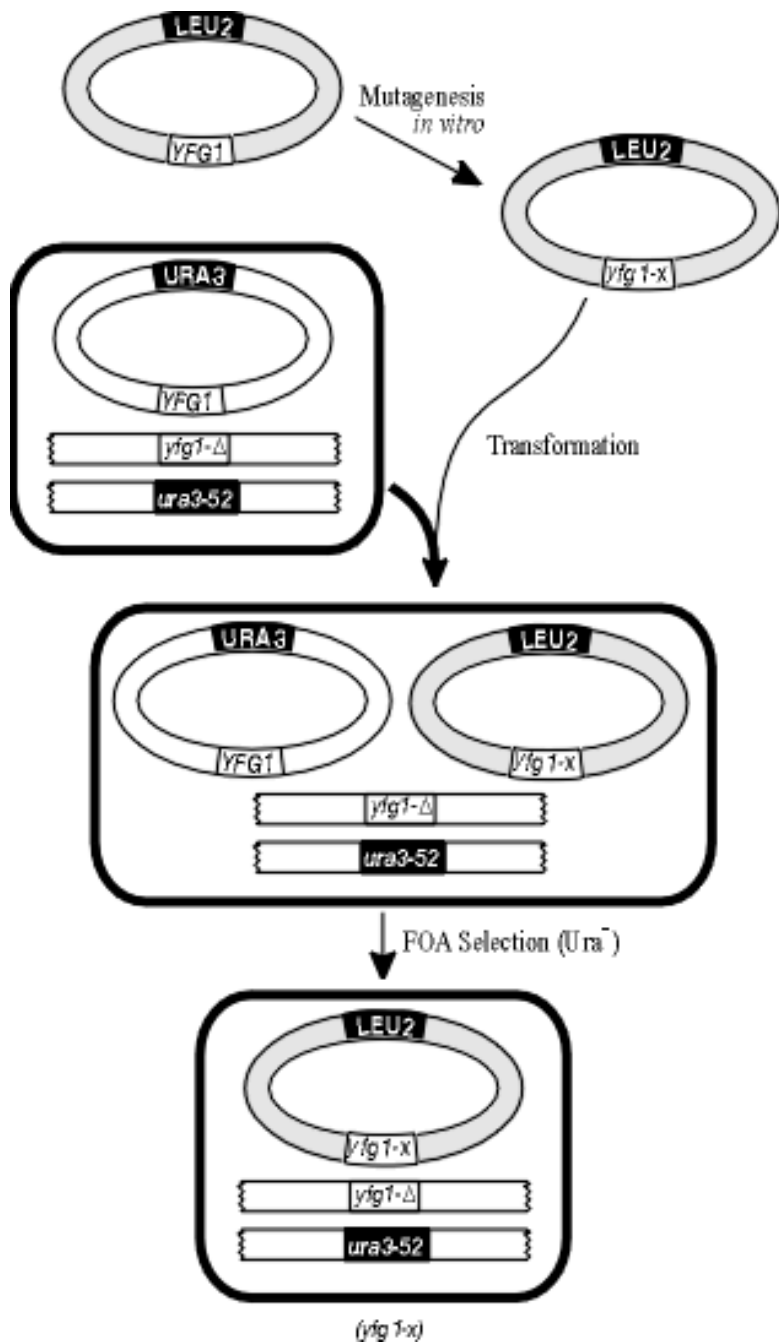


Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage*	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 [±])	<i>orb2, orb6</i>		
<i>orb2</i>	2 (4 [±])	<i>orb1, orb6</i>		
<i>orb3</i>	1 (1 [±])			
<i>orb4</i>	12 (1 [±])		<i>sts5</i> [§]	<i>pck1⁺, pyp1⁺</i>
<i>orb5</i>	2 (2 [±])			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2</i> ^l	
<i>orb8</i>	6	<i>orb9, orb11</i>		
<i>orb9</i>	1	<i>orb8, orb11</i>		
<i>orb10</i>	4			
<i>orb11</i>	2	<i>orb8, orb9</i>	<i>cwg1</i> ^{li}	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1⁺, pyp1⁺, ras1⁺</i>



Při studiu známého genu používáme cílené mutagenese (např. pomocí PCR)

Plasmid shuffling

Testování *yfg1*- mutant

Podobně lze použít *ade2*, *ade3* systém s *YFG1* wt genem na *ADE3* plasmidu, který je červený – po ztrátě *ADE3* plasmidu jsou sektory kolonii bílé (mutace *ade3* enzymu blokuje metabolickou dráhu před *ade2* a nevzniká červený metabolit)

Je ovšem lepší mutantu integrovat do chromosomu než testovat plasmidovou kopii

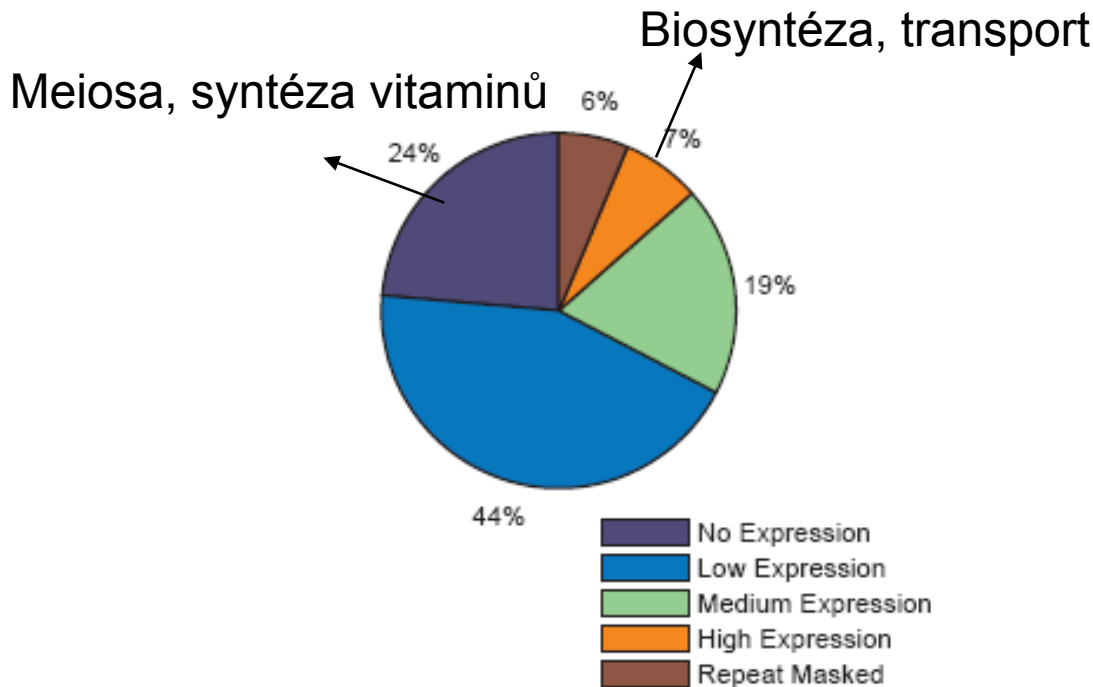
„Transcriptional landscape of the yeast genome“

-Obvykle se geny identifikují podle (dlouhé) sekvence bez stop kodonů, konzervované sekvence, cDNA sekvencování, mikroarray analýzy

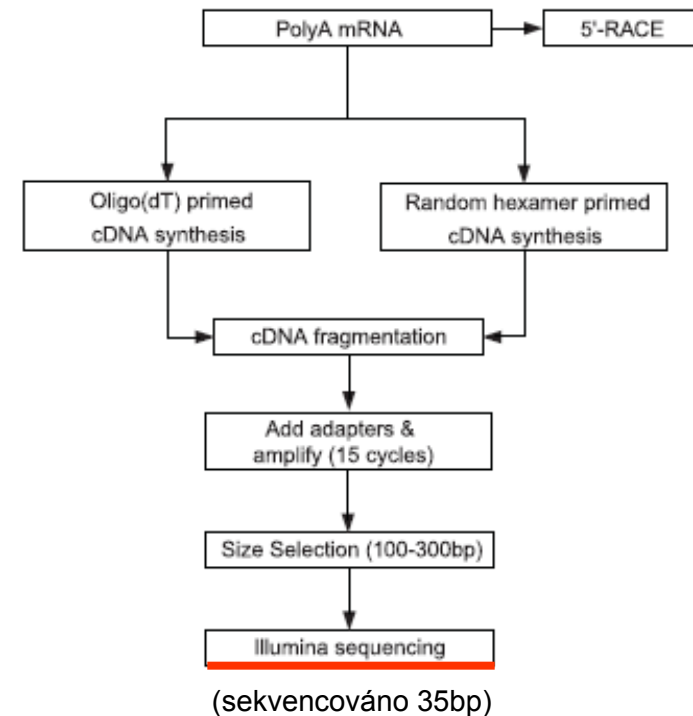
- neodhalí krátké čtecí rámce, hranice genů

-HT sekvencování RNA tzv. RNA-Seq (přes cDNA, S.c.)

- 75% genomu je exprimováno

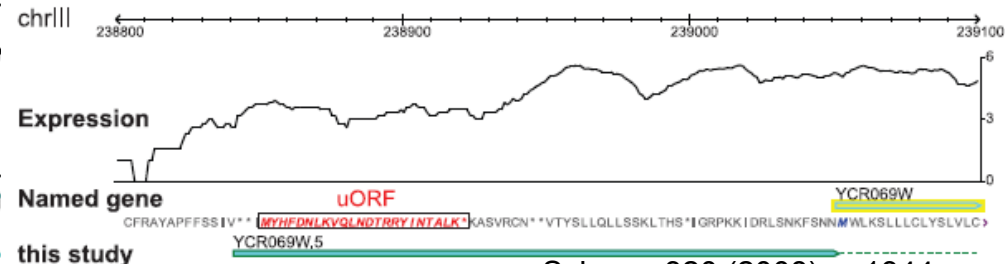
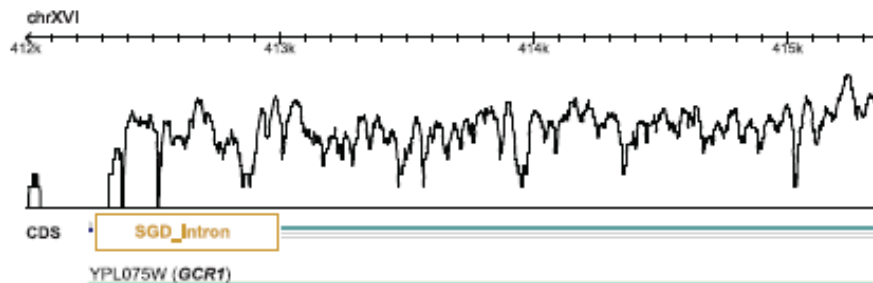
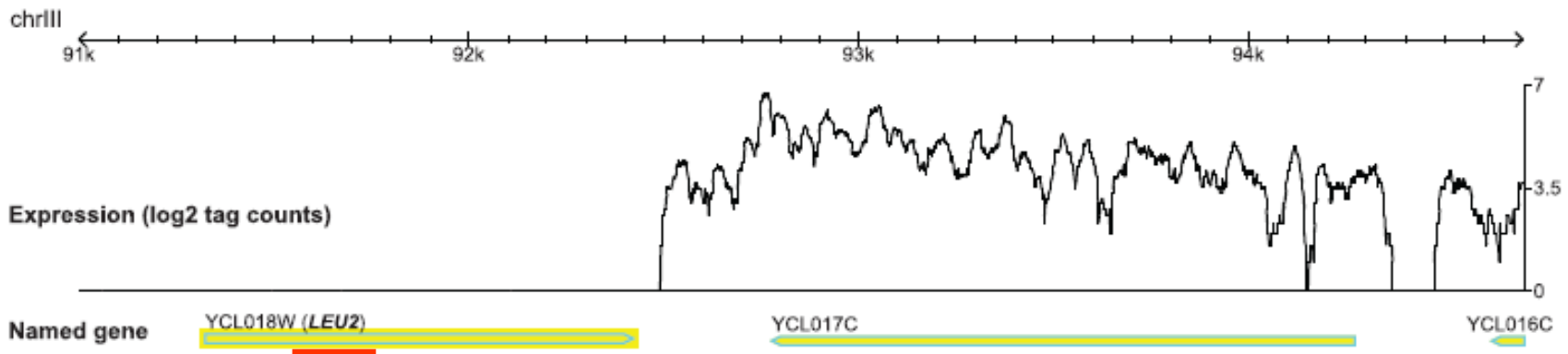


Experimental pipeline



Analýza ORF-transkribce

- průměrná zjištěná délka 5'UTR (untranslated regions) je 50bp (od 0 do 990bp)
 - 35 genů delších a 29 genů kratších než se doposud myslelo
 - metoda také ukázala (ne)existenci některých intronů předpovězených podle GT-AG/AC hranic
- průměrná délka 3'UTR je 104bp (od 0 do 1460bp) – ale často heterogenní (variabilita v polyA processing)
- identifikovali 321 upstream ORFs (uORFs), které by mohli regulovat expresi



Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

Leland Hartwell začal studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*. Podařilo se mu izolovat kvasinky, které měly mutovaný gen kontrolující buněčný cyklus. V následujících letech identifikoval podobným způsobem více než 100 genů kontrolujících buněčný cyklus. Také sledoval citlivost kvasinek na poškození DNA radiací. Zjistil, že BC je při poškození DNA zastaven – aby získal čas na opravu DNA

Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe*. V 70. letech objevil gen *cdc2*, který je zodpovědný za regulaci většiny fází BC. V roce 1987 izoloval odpovídající lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).

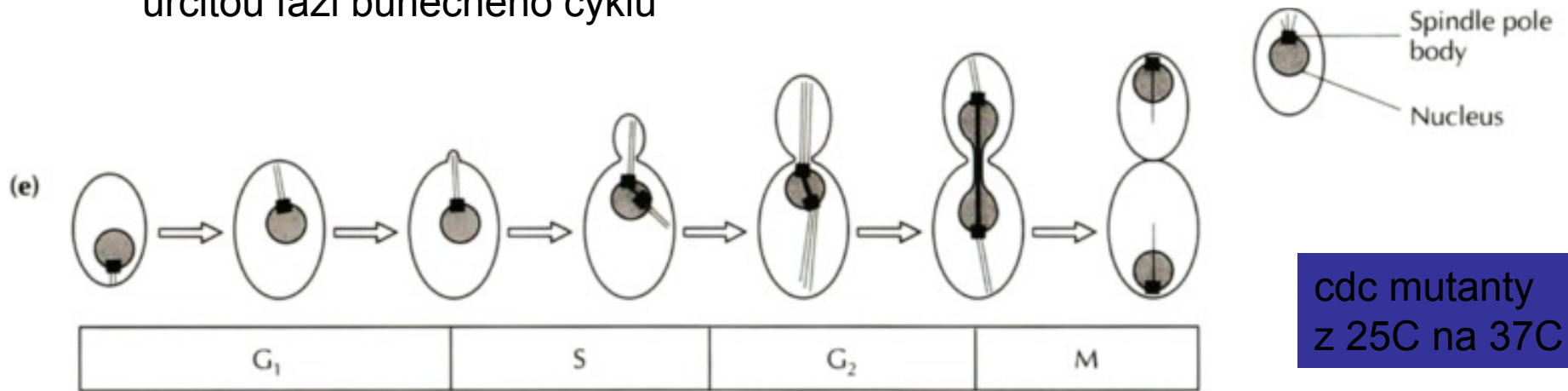
V květnu 2008 měl přednášku v Brně, v rámci Mendlových seminářů



Tim Hunt na začátku 80. let objevil první cyklin – cykliny jsou proteiny, které jsou syntetizovány a odbourávány během určité části buněčného cyklu. Cykliny se váží na CDK a regulují jejich aktivitu.

Buněčný cyklus *S. cerevisiae*

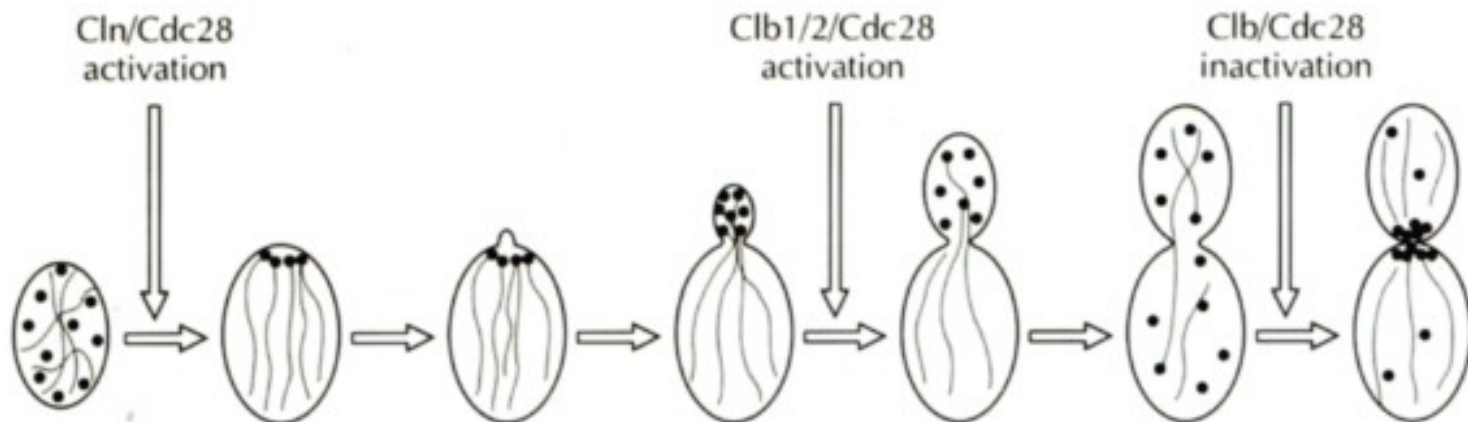
- Generovali teplotně-citlivé mutanty, z kterých vybírali kmeny zastavující v určité fázi buněčného cyklu (*cdc* = „cell division cycle“ mutanty)
- Výběr dle morfologických (diagnostických) znaků charakteristických pro určitou fázi buněčného cyklu



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G₁
- Oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G₁ fáze (*S.pombe* má rovnocenné dělení – velikost se kontroluje v G₂ fázi => nejdelší je G₂ fáze)

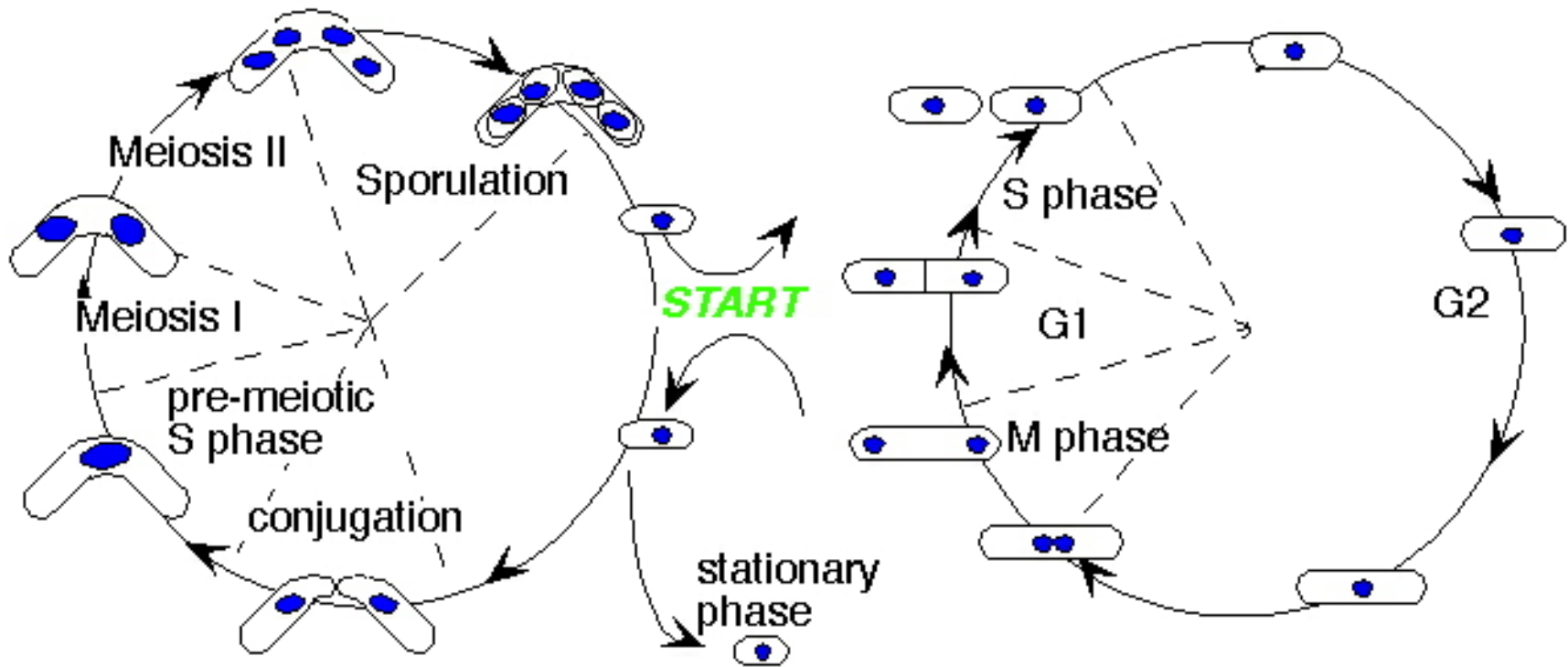
Klíčovým mezníkem BC u *S. cerevisiae* je START, kdy se rozhoduje o přechodu z G1 do S fáze

- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
 - haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
 - diploidní buňky (při nedostatku N a C) zastavují v G1 a zahajují sporulaci
 - při vyčerpání živin z média přechází z G1 do stacionární fáze
-
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
 - v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
 - v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (nemůže být zvolena alternativa přechodu do stacionární fáze)
-
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy)
 - pro úsek B (a další „checkpoints“) je klíčový *CDC28* (tj. CDK1) a příslušné cykliny



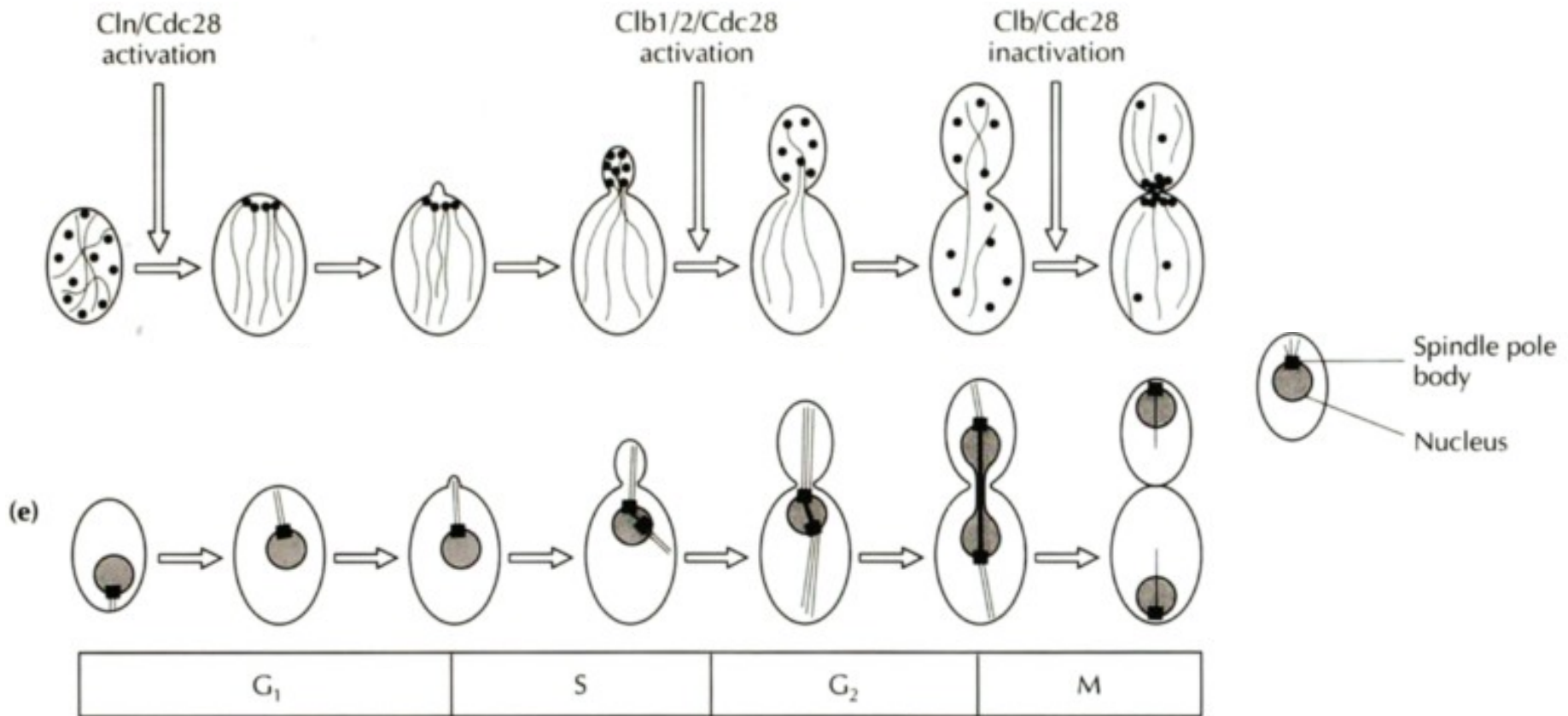
Buněčný cyklus *S. pombe*

S. pombe má rovnocenné dělení - velikost se kontroluje v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze



Meiotic cycle

Vegetative (mitotic) cycle

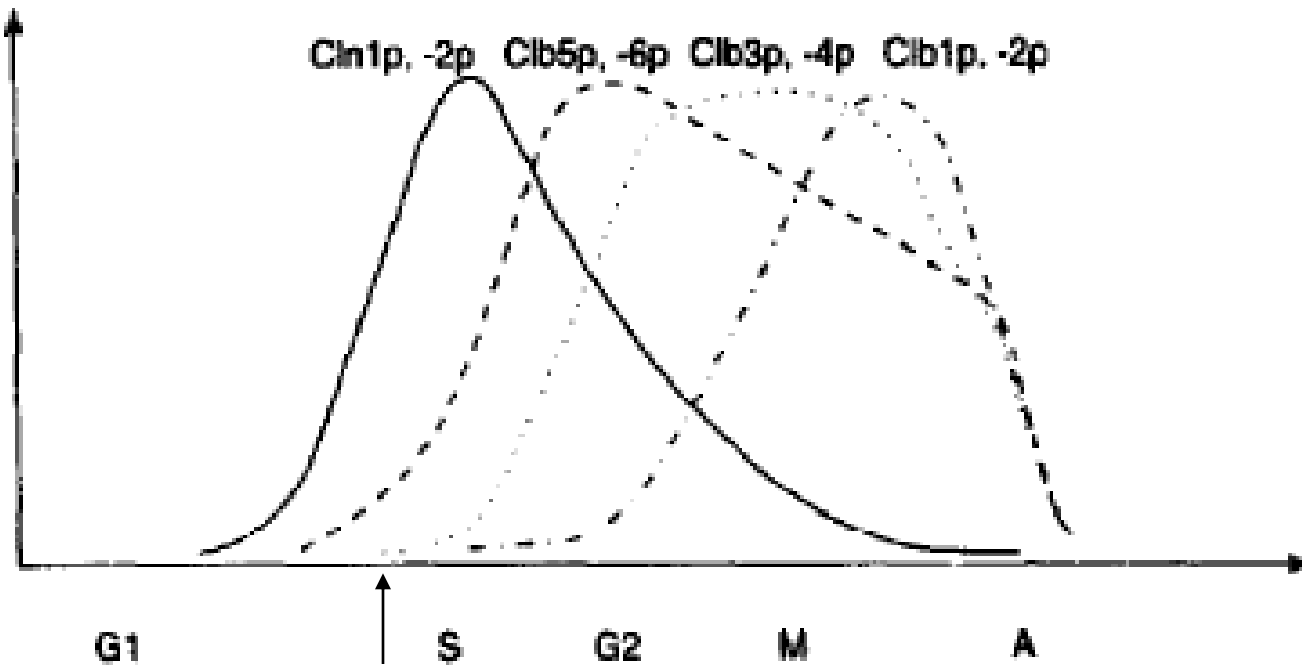


- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G₁

CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem (defosforylace) vzniká aktivní komplex:

- v G1 fázi *CLN1* a *CLN2* (*CLN3* mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *CLB5* a *CLB6* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se účastní *CLB3* a *CLB4*
- mitózu ukončují *CLB1* a *CLB2*



Mating – konjugace – zastevní v G1 fázi – feromony opačného MAT typu

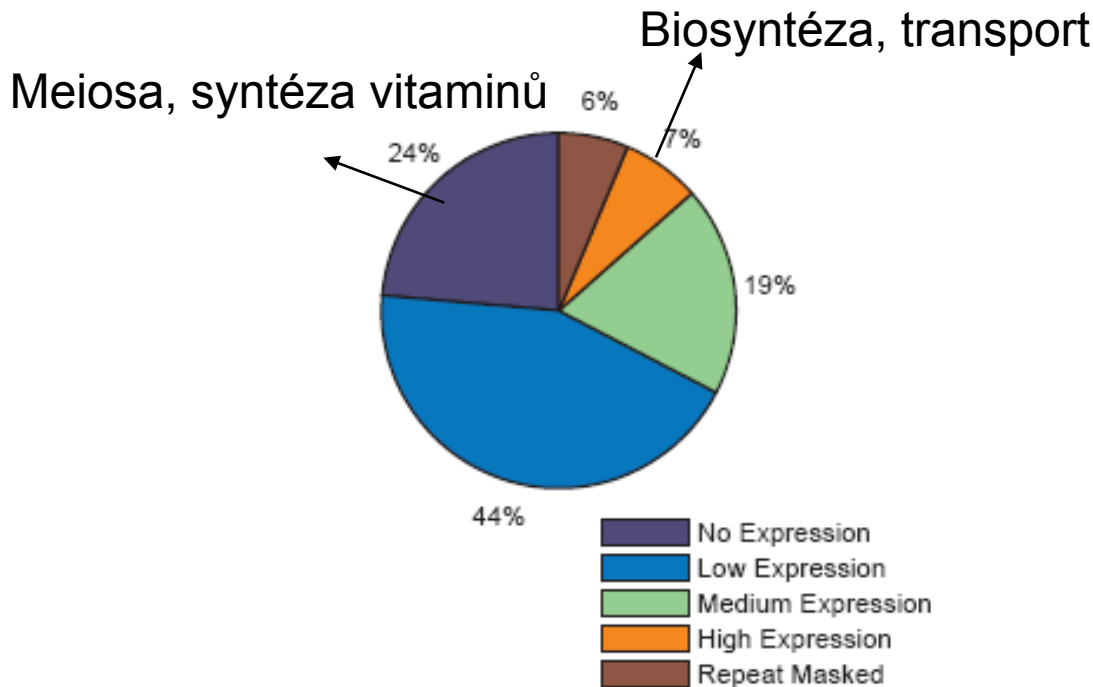
„Transcriptional landscape of the yeast genome“

-Obvykle se geny identifikují podle (dlouhé) sekvenční bez stop kodonů, konzervované sekvenční, cDNA sekvenčování, mikroarray analýzy

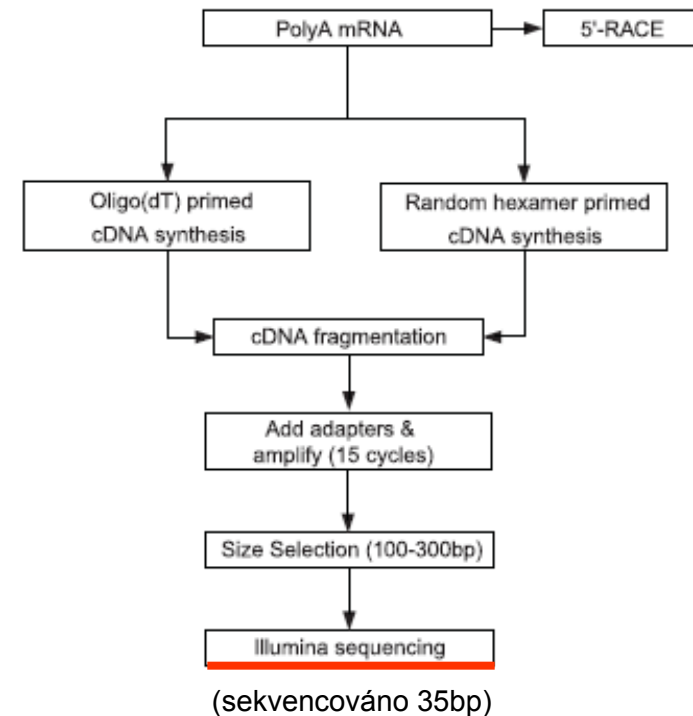
- neodhalí krátké čtecí rámce, hranice genů

-HT sekvenčování RNA tzv. RNA-Seq (přes cDNA, S.c.)

- 75% genomu je exprimováno



Experimental pipeline



Analýza ORF-transkribce

- průměrná zjištěná délka 5'UTR (untranslated regions) je 50bp (od 0 do 990bp)
 - 35 genů delších a 29 genů kratších než se doposud myslelo
 - metoda také ukázala (ne)existenci některých intronů předpovězených podle GT-AG/AC hranic
- průměrná délka 3'UTR je 104bp (od 0 do 1460bp) – ale často heterogenní (variabilita v polyA processing)
- identifikovali 321 upstream ORFs (uORFs), které by mohli regulovat expresi

