

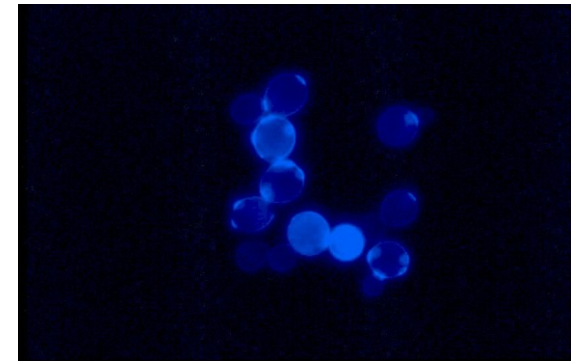
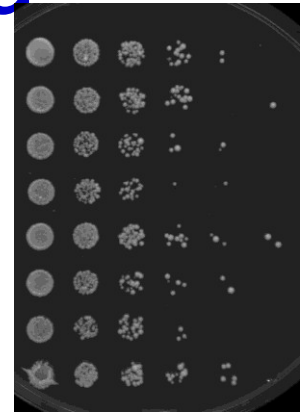
Výhody kvasinkového modelu

- Rychle se množící **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

Laboratorní kvasinkové kmeny

S288C – 1. osekvenovaný kmen

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

Tento kmen byl použit při systematickém sekvenování (1996). S288C netvoří pseudohyfy. Má zmutovanou kopii [HAP1](#), a není tedy vhodný např. pro studie mitochondrií. S288C kmen je *gal2*- a nevyužívá galaktosu anaerobně.

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

Sources: [ATCC:204508](#)

W303 – nejčastěji používaný laboratorní kmen

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

W303 dále nese *bud4* mutaci která způsobuje výskyt haploidů se smíšeným typem pučení – axialní i bipolární. Přítomna *rad5-535* allele.

References: Rodney Rothstein.

Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATa, 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>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh2, 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)

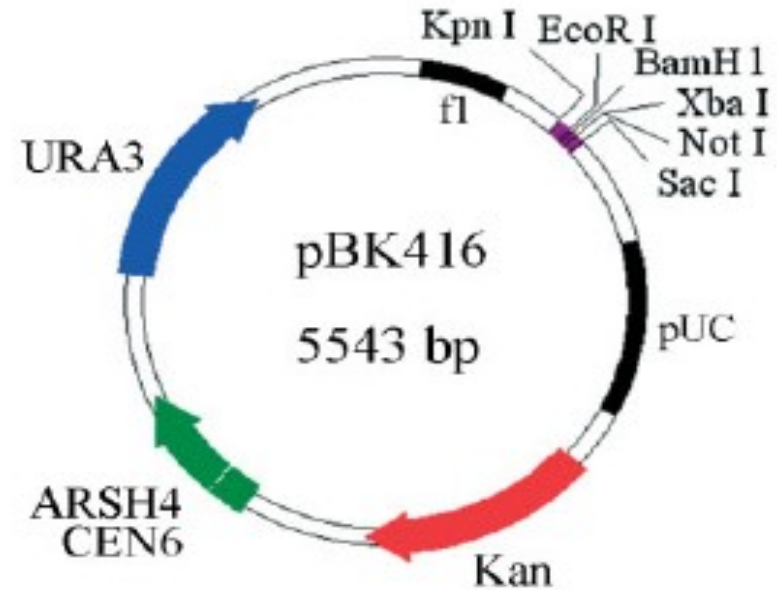
FOA je přeměňován Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil. *URA3+* buňky nerostou, zatímco *ura3-* buňky jsou resistantní (další způsob selekce – zpětná)

KanMX – obdoba anti-bakteriálního antibiotika kanamycinu

Shuttle vektory

- Bakteriální část – Kan 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)

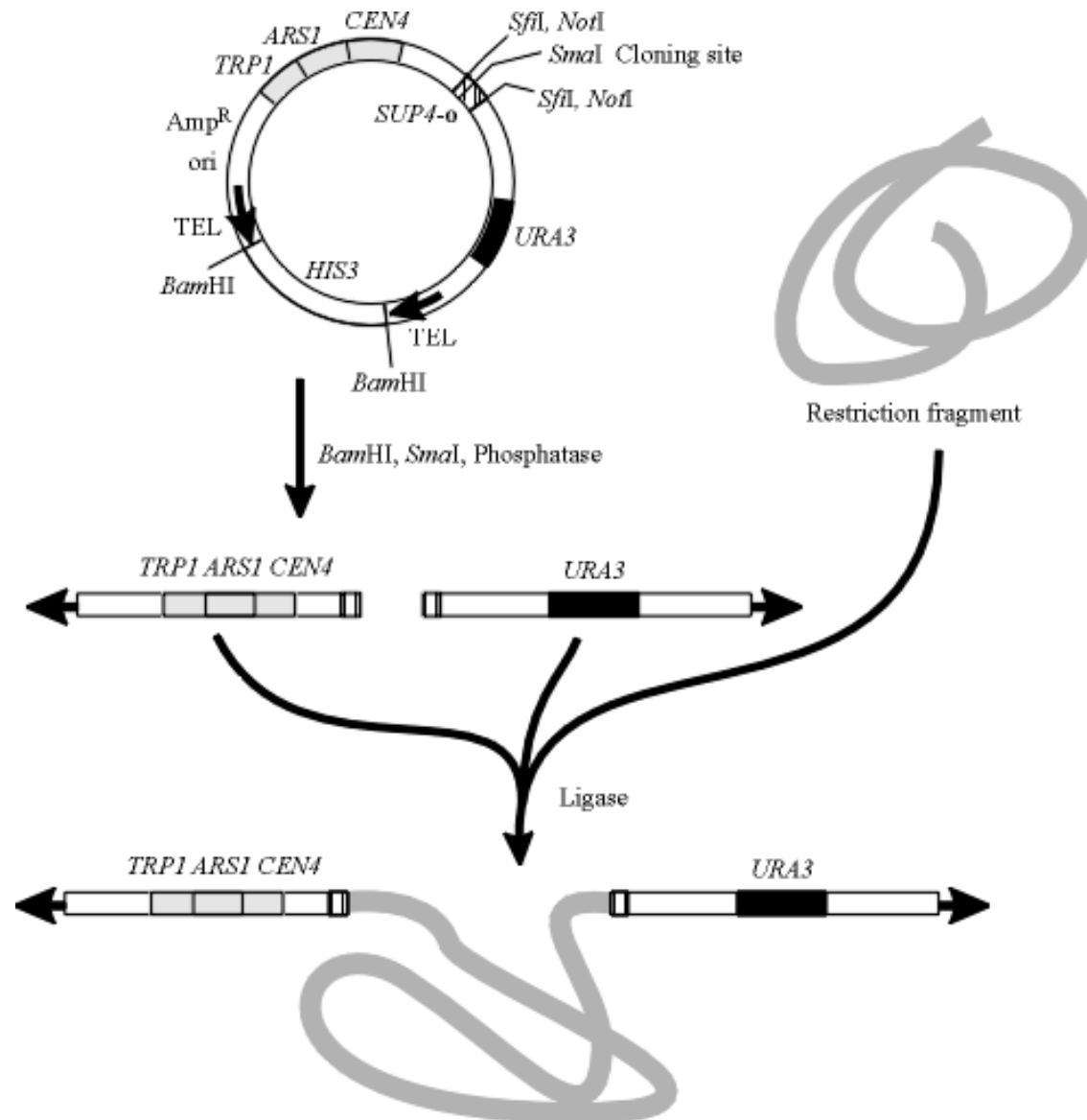
Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not 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

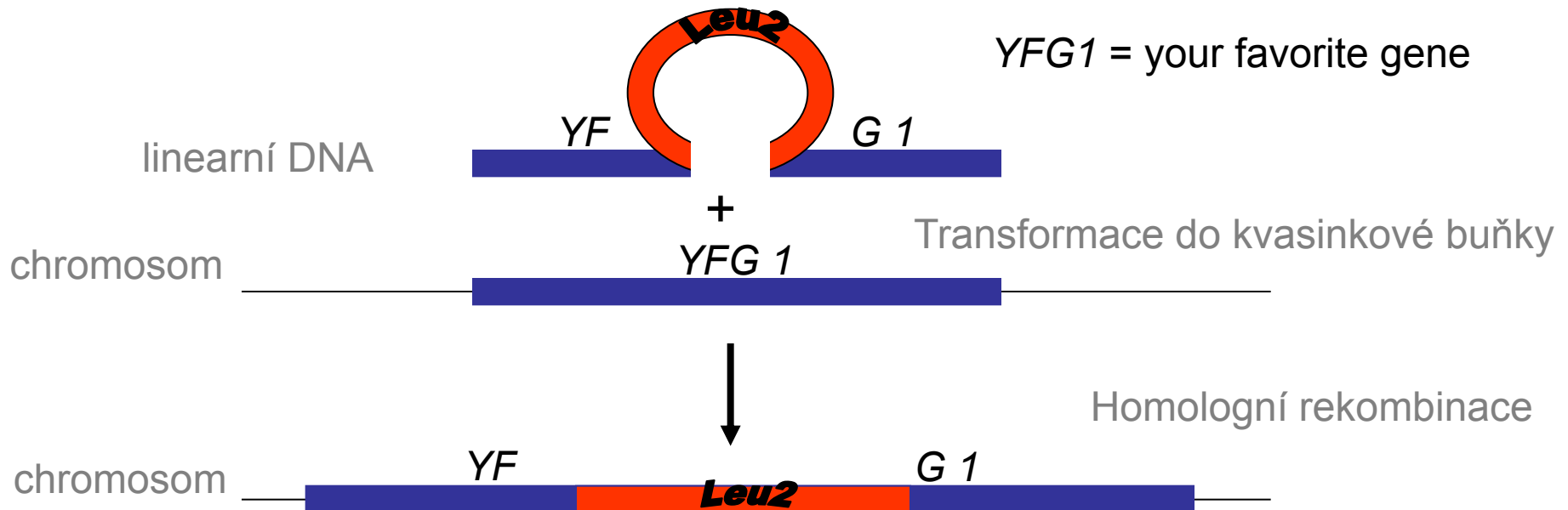
YAC (yeast artificial chromosome)

- Bakteriální část – Amp resistance, Ori počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert např. lidská genová banka pro HuGO 80000 klonů YAC (270kbp)
- 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

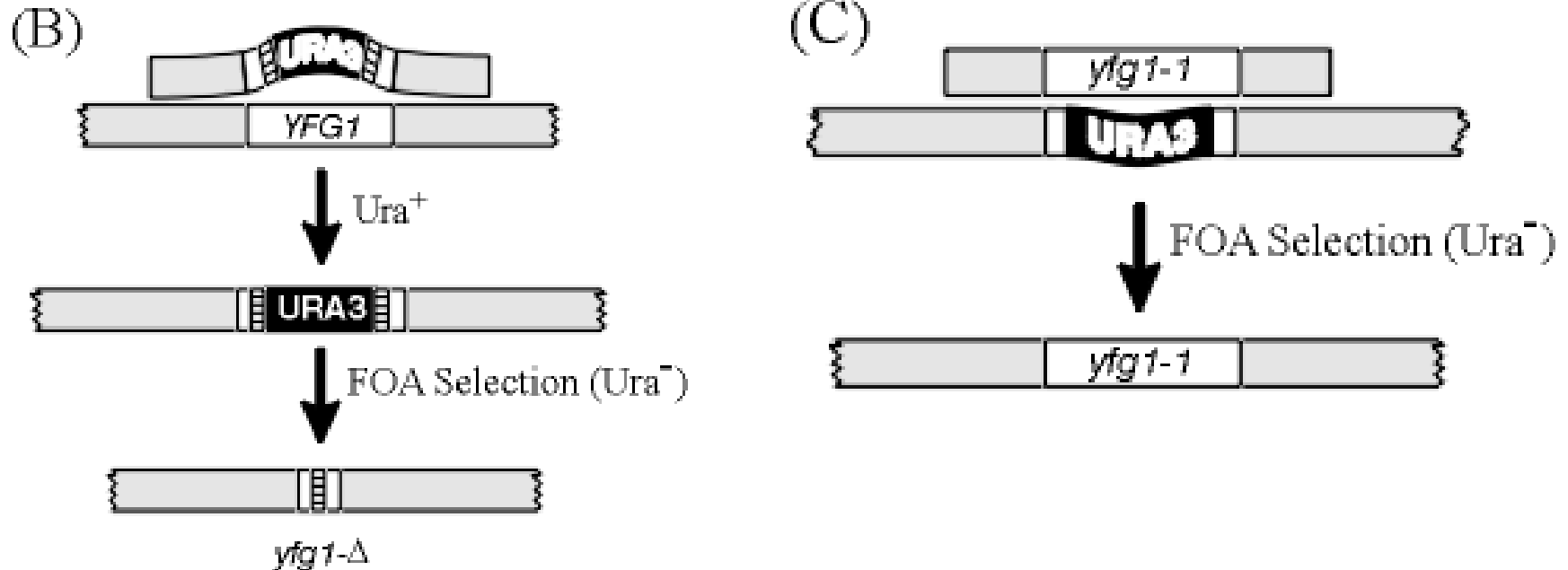
- Studium funkce genu – fenotyp delece či mutace
 - Nezbytný gen = smrt – plasmid nebo mutanty
 - Přežívají – křížení tj. hledání funkčně příbuzných genů
 - Studium funkčních homologií – dvojité mutanty (synthetic lethal x epistatic)



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

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

Delece genu – transposony

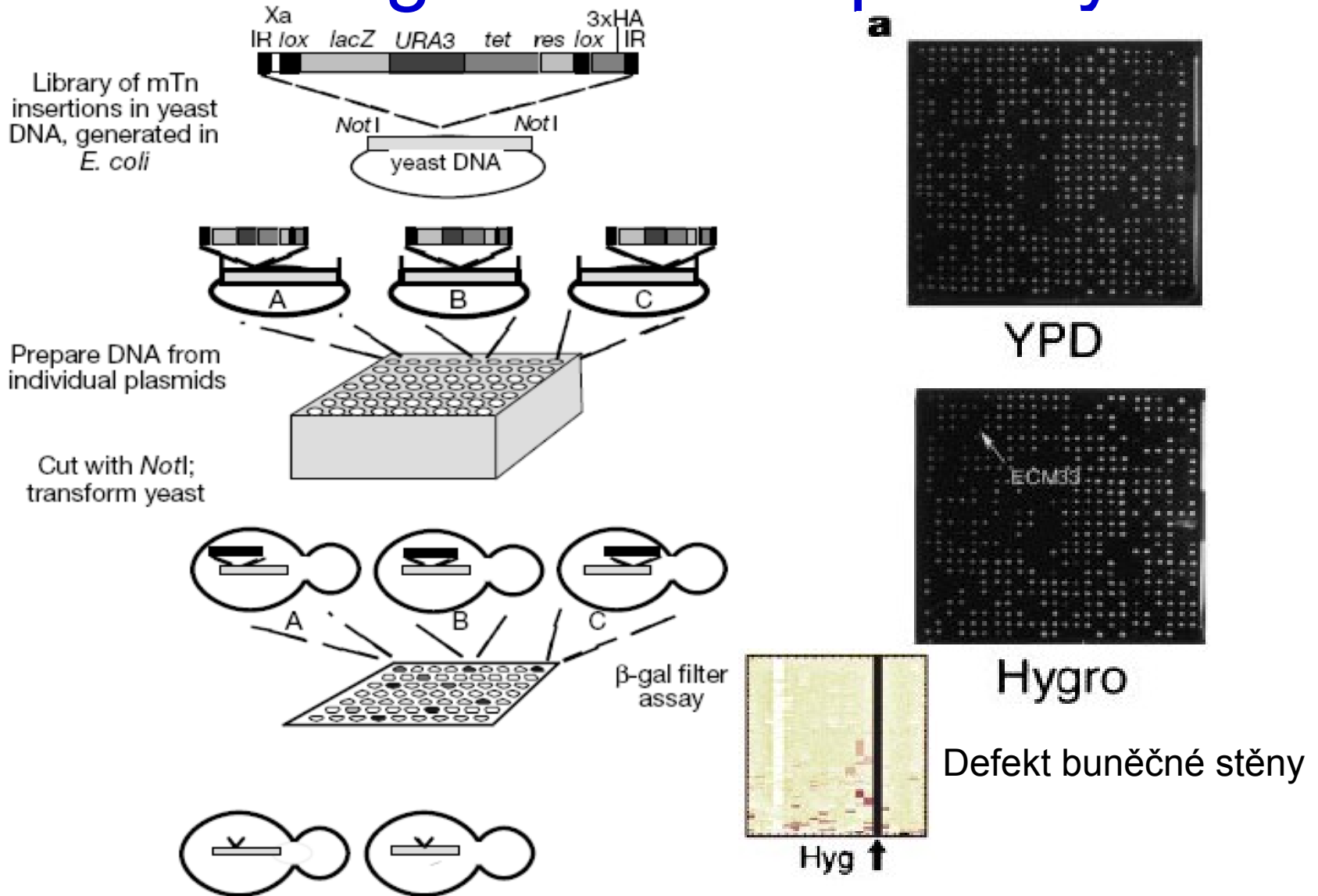
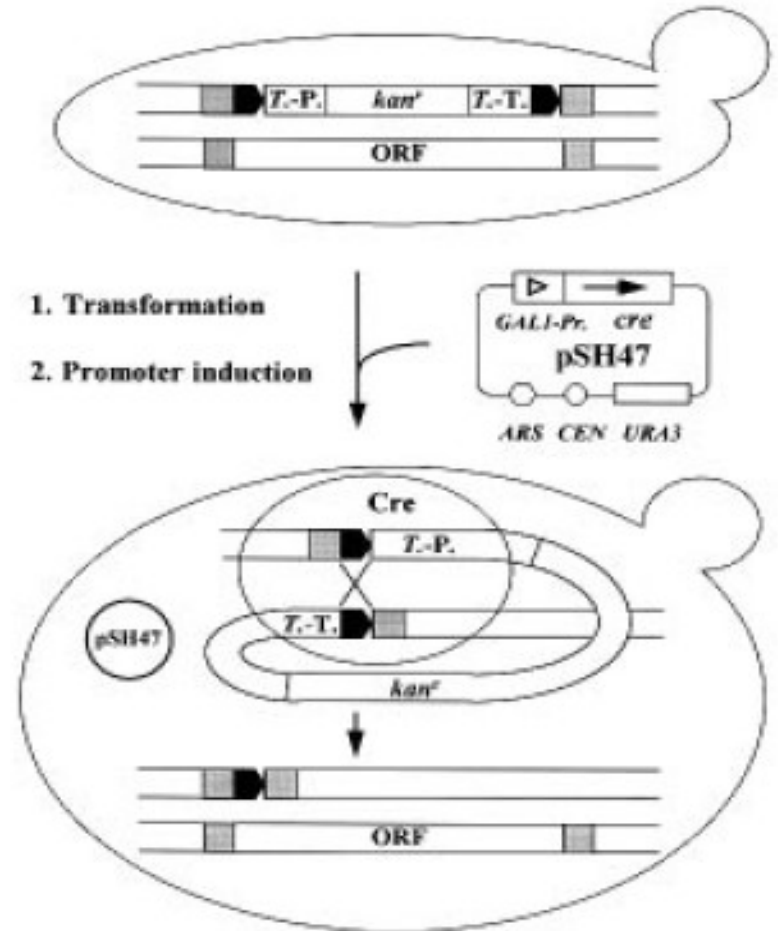
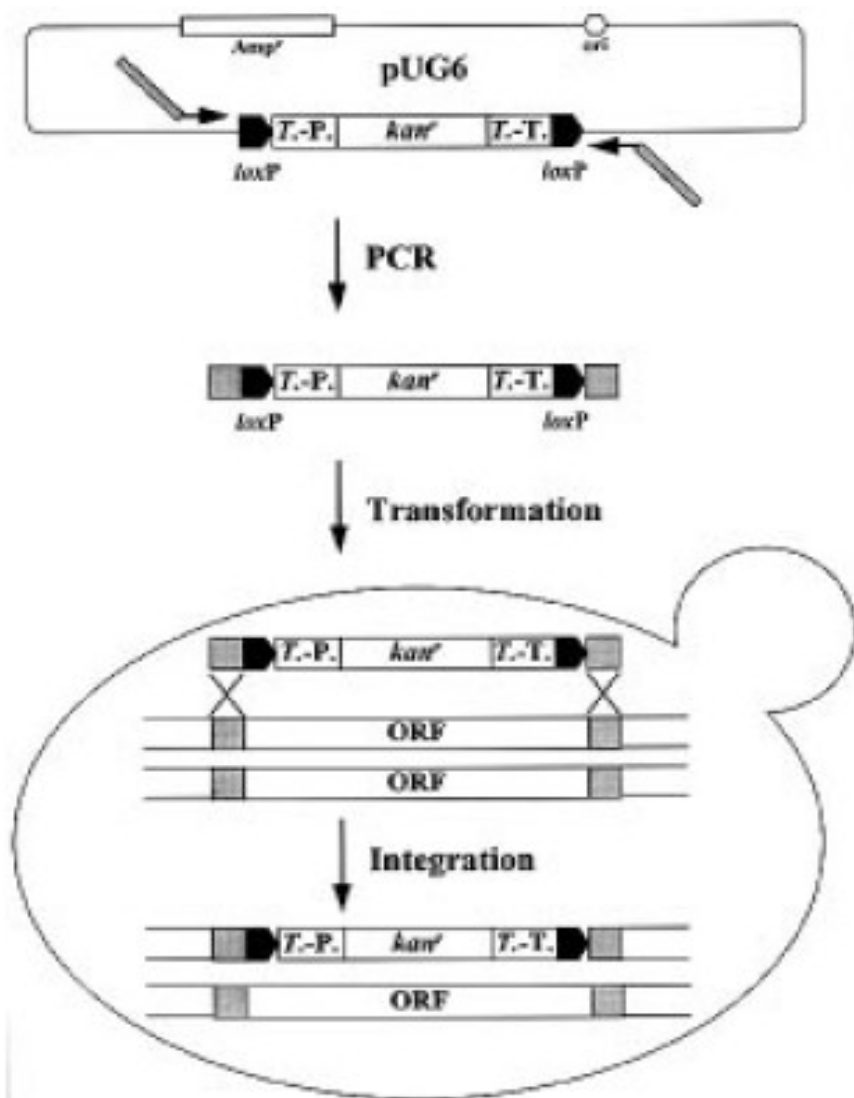


Figure 1 The mTn insertion project. Most steps were performed using a Robbins Hydra 96-channel dispenser; all strains are maintained in a 96-well format.

Cre rekombinasa



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

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

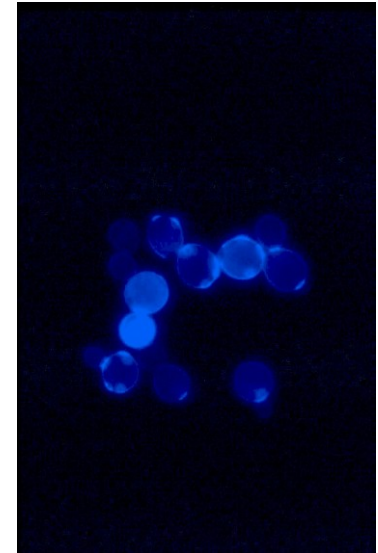
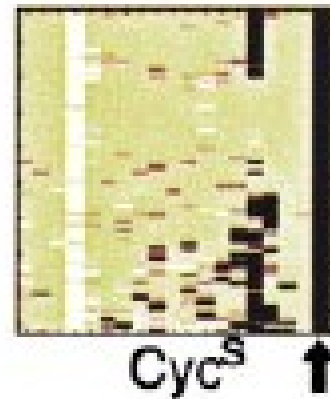
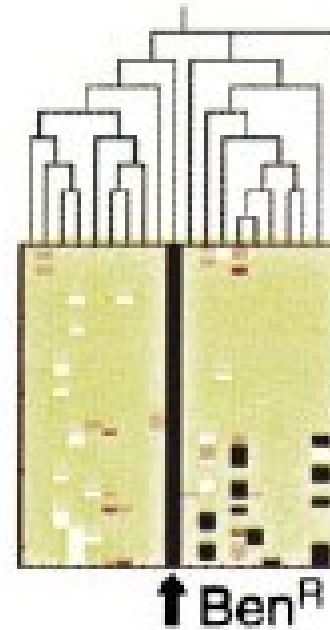
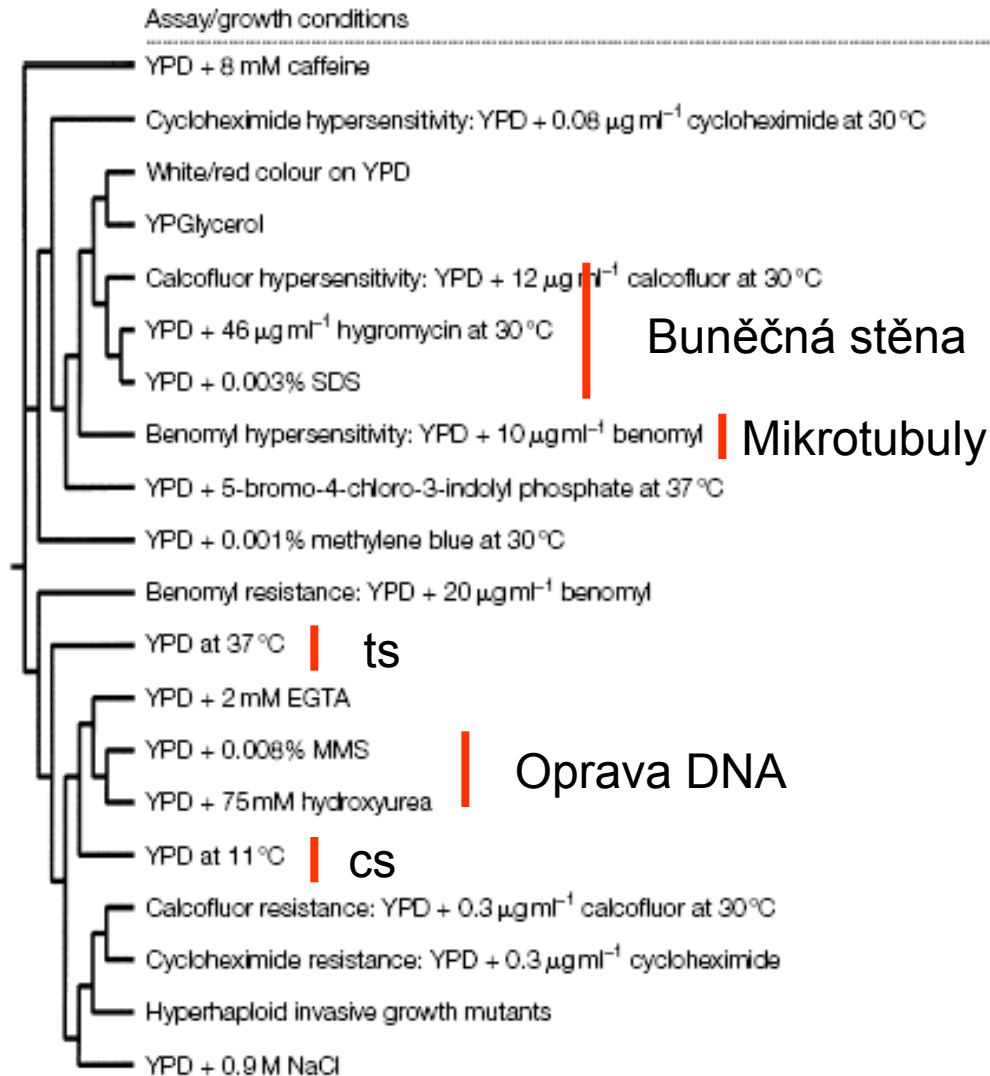
Round 2 PCR

Homologní sekvence



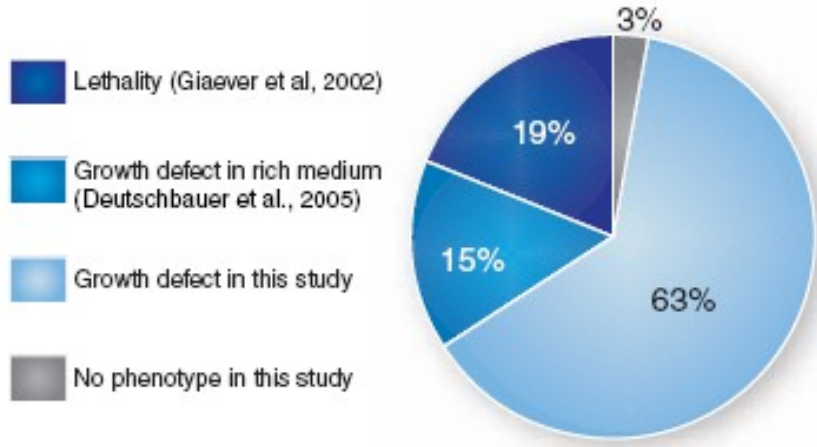
Chromosomal integration by homologous recombination

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 ~ 6milionů testů
 - multidrug resistance (MDR) pokud byl gen potřebný pro resistenci vůči >20% z testovaných látek

- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti

