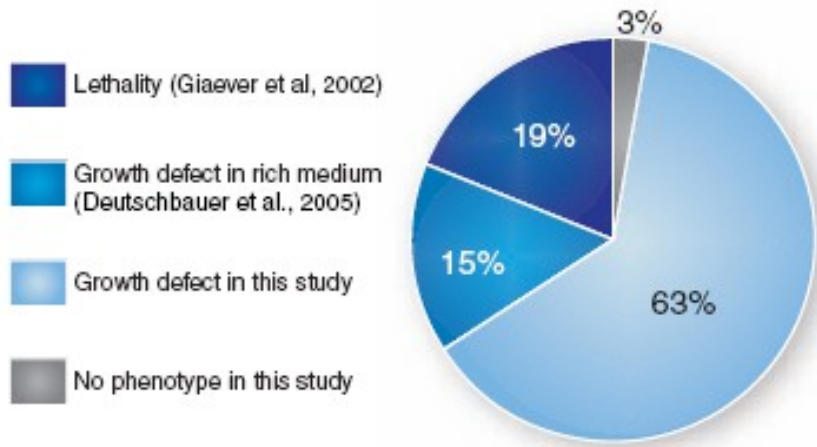
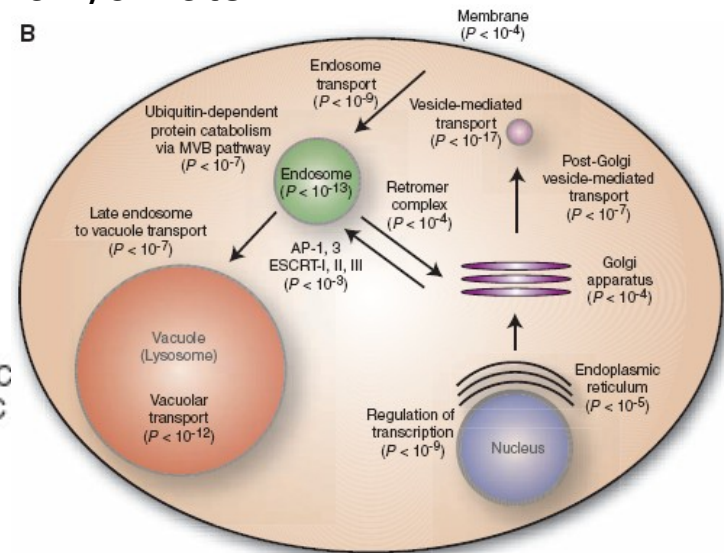
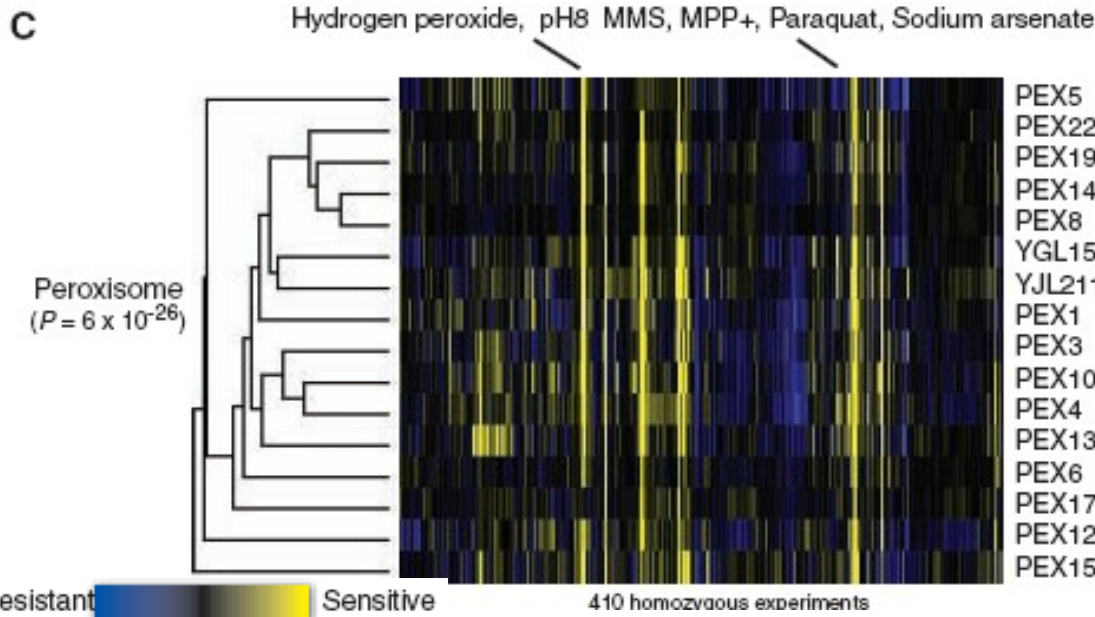


~ 6000 heterozygotních delečních kmenů  
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)  
 (neesenciální – růst za specifických podmínek nebo redundantní procesy)



- 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

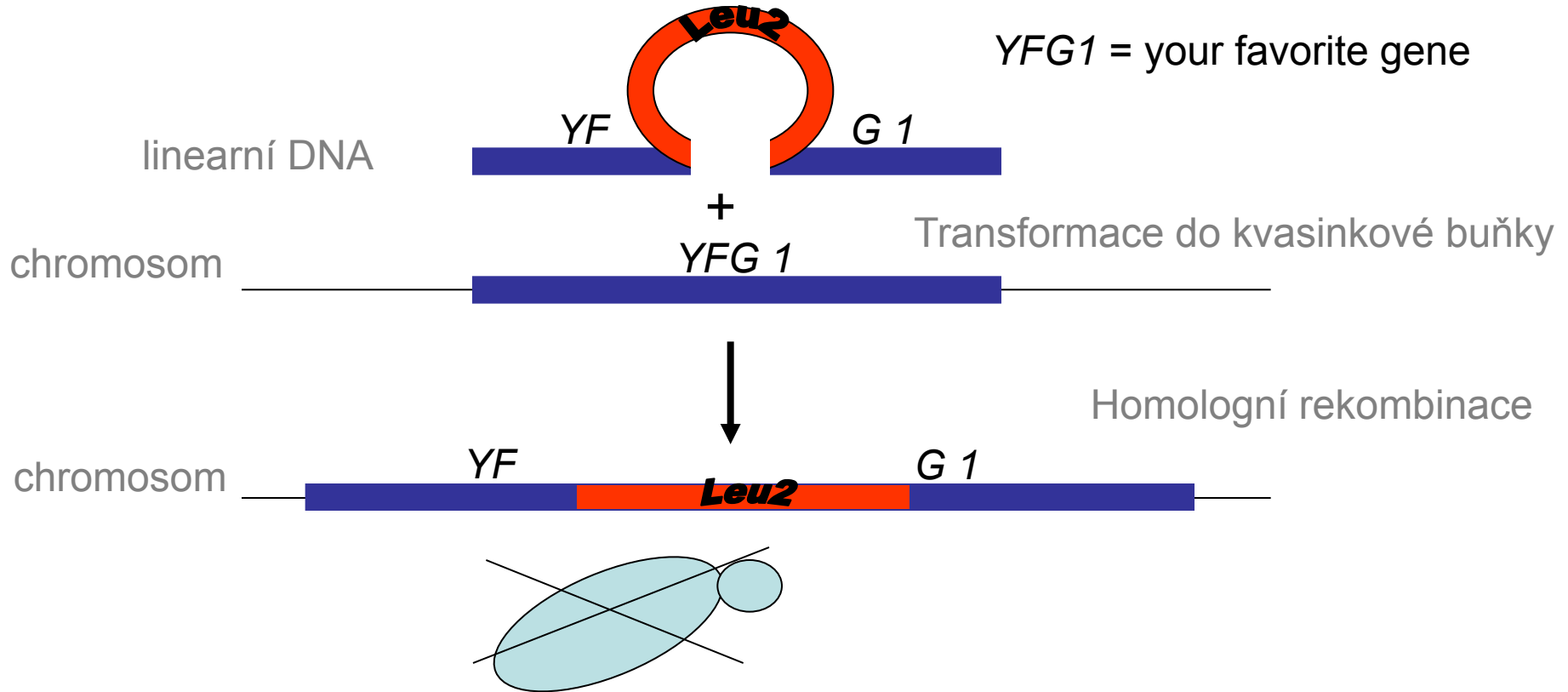
- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti



Science 320 (2008), p.362

# Příprava mutant

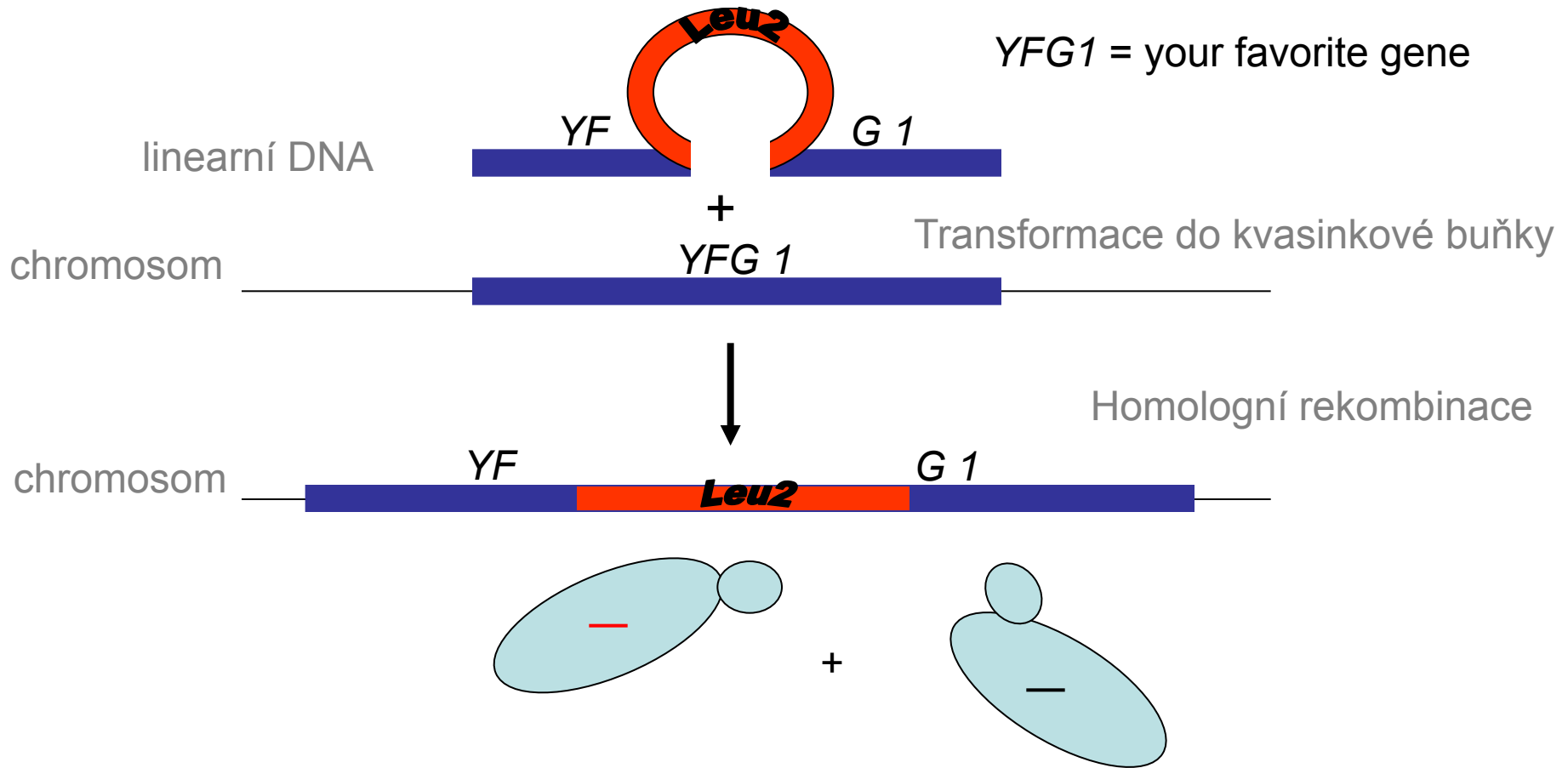
- Studium funkce genu – fenotyp delece či mutace
  - esenciální/nezbytný gen = smrt – plasmid nebo mutanty



-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

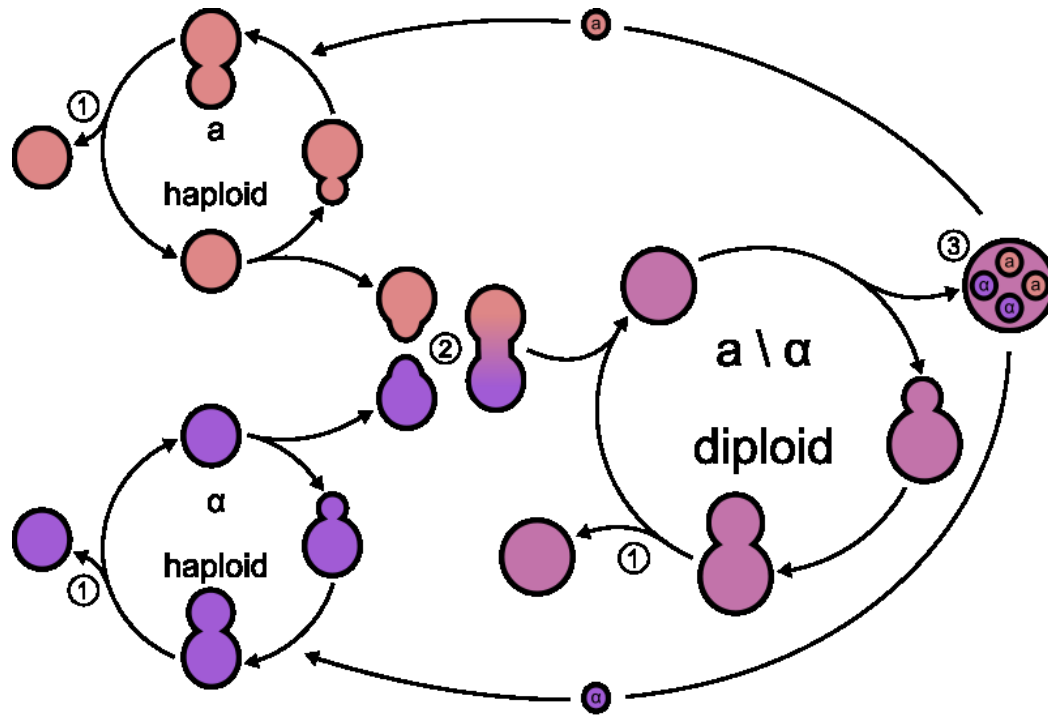
# Příprava mutant

- Studium funkce genu – fenotyp delece či mutace
  - neesenciální – křížení tj. hledání funkčně příbuzných genů



- Křížením a následnou tetrádovou analýzou lze získat informace o vztazích mezi geny

# Životní cyklus *S. cerevisiae*



- Deleci či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

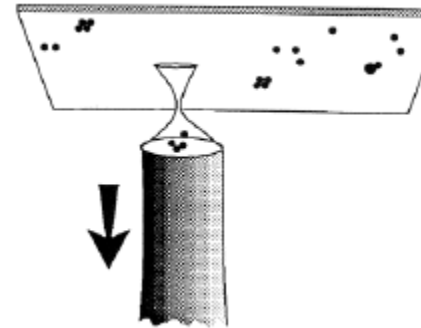
- v haploidní buňce hrozí suprese defektu proto je lépe používat diploidní buňky (druhá kopie zůstává nezměněná)

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

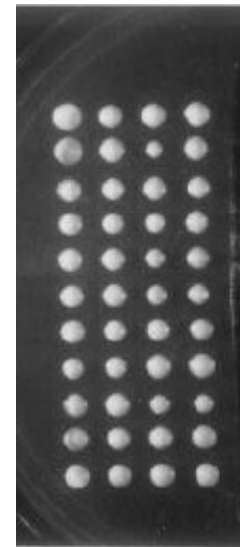
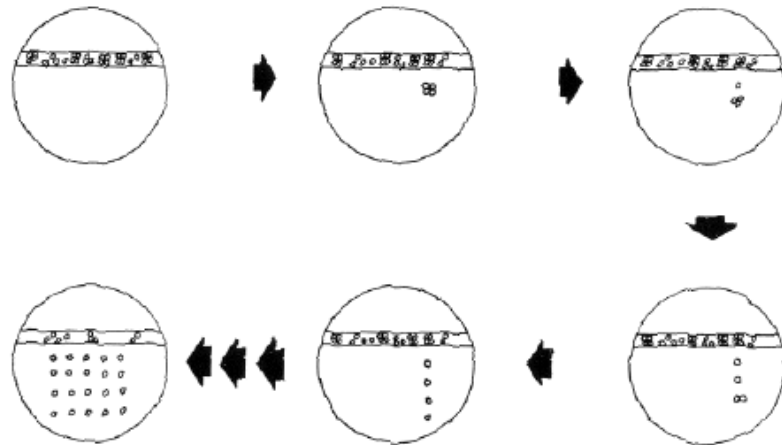
- pouzdro spory je třeba rozrušit a pomocí mikromanipulátoru získat jednotlivé haploidní buňky (lze provést i tzv. random sporulation)

Sporulation medium	Components	Composition
Presporulation <sup>d</sup>	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 <sup>b</sup>	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 <sup>f</sup>	1% Potassium acetate 2% Bacto-agar Distilled water	10 g 20 g 1000 ml

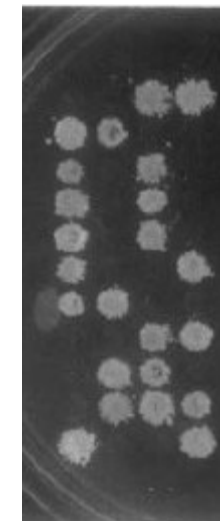
# Tetrádová (genetická) analýza



Esenciální gen



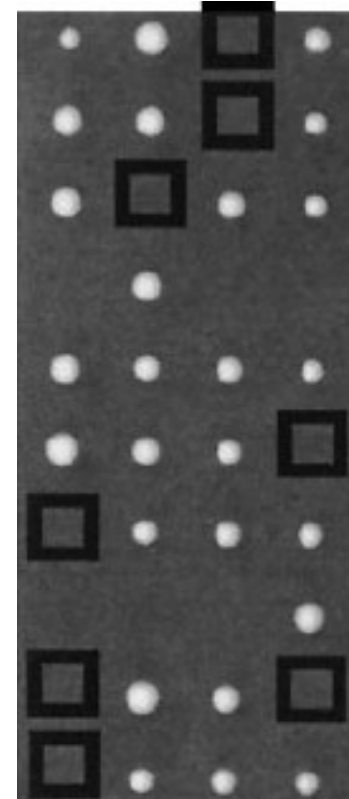
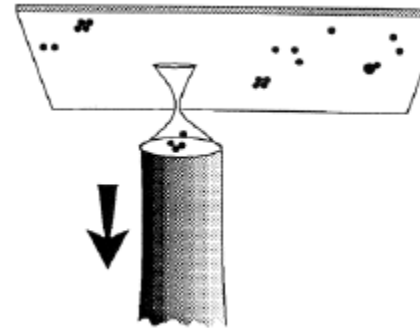
YPD



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

A a A A  
A A a a  
A a A a  
...

# Tetrádová (genetická) analýza



Synteticky letální

Ab aB Ab aB  
Ab AB aB ab

...

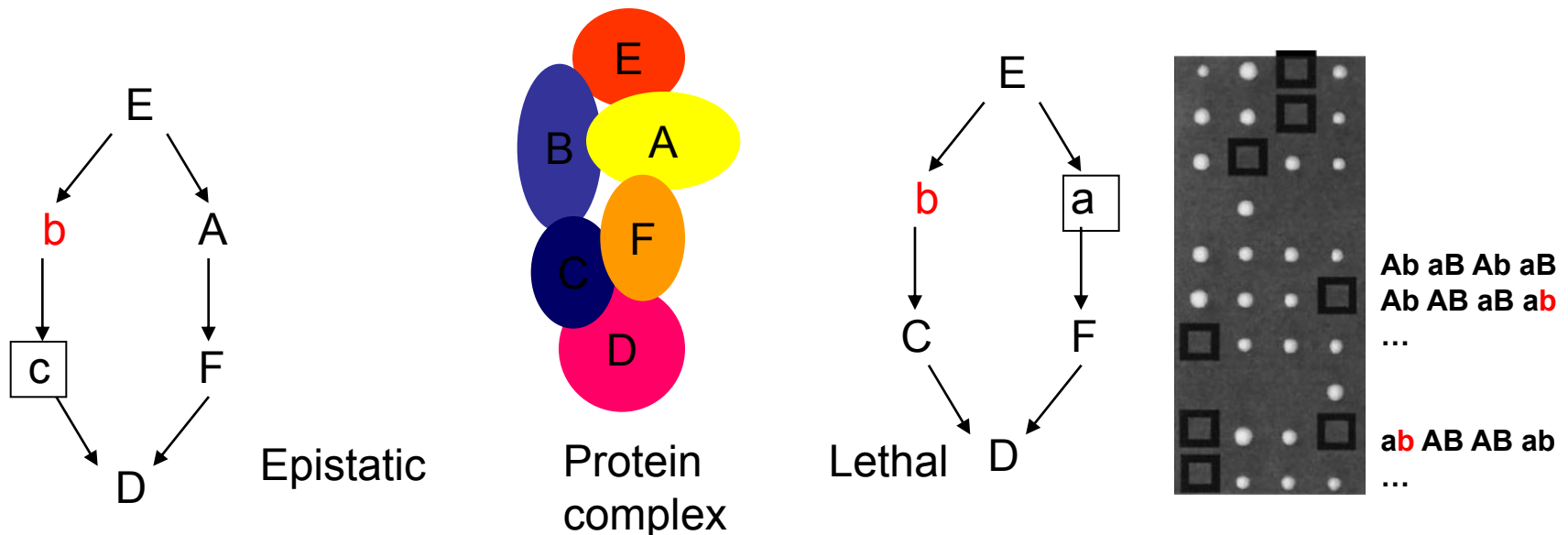
ab AB AB ab

...

# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

Křížení haploidních kmenů (cílené na určité již známé geny/mutanty) a následá tetrádová analýza nebo mutageneze haploidního kmene pomocí hydroxylaminu (hledání příbuzného genu) ...

Po křížení může mít výsledný haploidní kmen buď stejný fenotyp (epistatic, **bc**) jako původní kmen nebo aditivní (neschopný růstu – synteticky letální, **ab**)



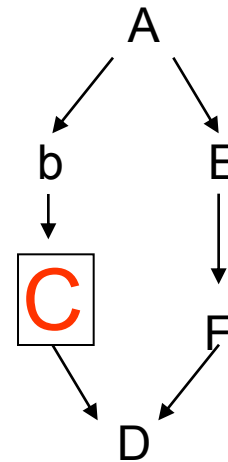
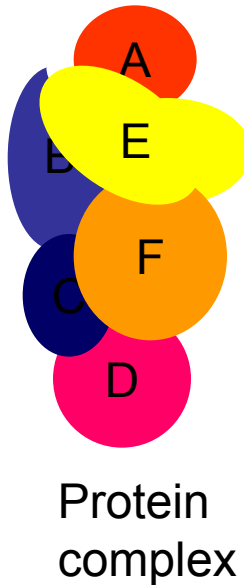
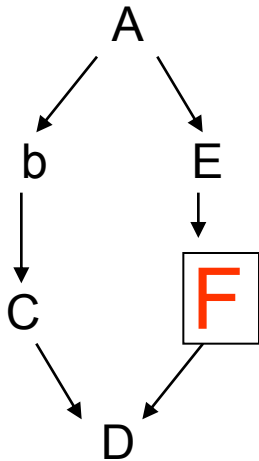
Hledání (screening) letálního mutanta – mutageneze kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA)

# Supresory

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

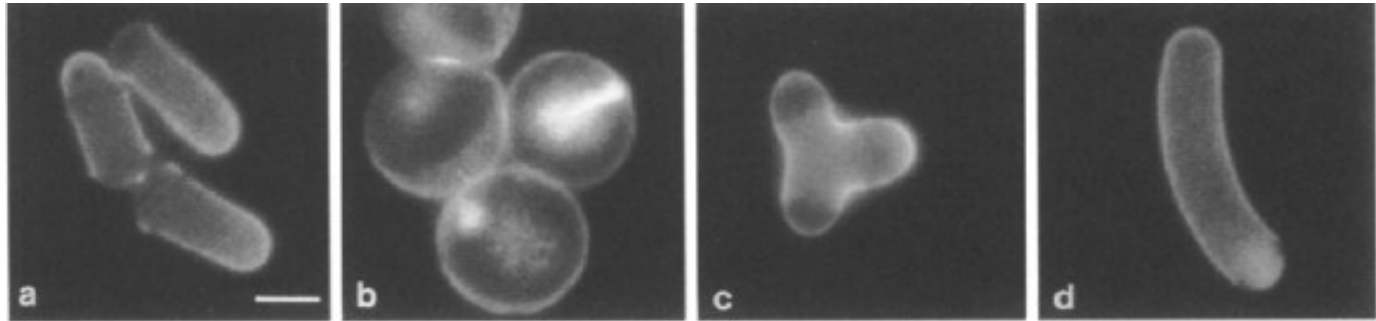
interakci

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





- 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) ... vztahy mezi nimi (**synthetic lethality**) a známými geny (**multicopy suppressor**)

Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage <sup>+</sup>	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 <sup>+</sup> )	<i>orb2, orb6</i>		
<i>orb2</i>	2 (4 <sup>+</sup> )	<i>orb1, orb6</i>		
<i>orb3</i>	1 (1 <sup>+</sup> )			
<i>orb4</i>	12 (1 <sup>+</sup> )		<i>sts5<sup>8</sup></i>	<i>pck1<sup>+</sup>, pyp1<sup>+</sup></i>
<i>orb5</i>	2 (2 <sup>+</sup> )			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2<sup>l</sup></i>	
<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<sup>ll</sup></i>	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1<sup>+</sup>, pyp1<sup>+</sup>, ras1<sup>+</sup></i>

## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

Transform a *MAT $\alpha$  yfg1 ura3-52* strain with a YCp50 library.

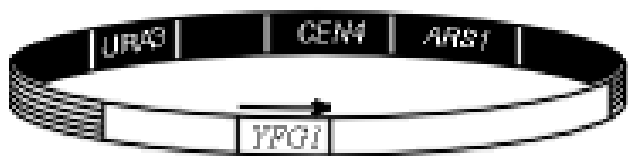
Isolate Ura<sup>+</sup> transformants and score for Yfg<sup>+</sup>



Yfg<sup>+</sup>

Recover the YCp-*YFGI*<sup>+</sup> plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (mutant+delece)

## Mutant Isolation

Mutagenesis of a haploid *MAT $\alpha$*  strain



Detection of Yfg<sup>-</sup>



Yfg<sup>-</sup>

## Complementation

Cross the Yfg<sup>-</sup> *MAT $\alpha$*  mutant to *MAT $\alpha$*  tester strains. Isolate diploid strains. Score for Yfg<sup>+</sup> and Yfg<sup>-</sup>

*MAT $\alpha$  yfg1* X

- MAT $\alpha$  YFG<sup>+</sup>* ○
- MAT $\alpha$  yfg1* ●
- MAT $\alpha$  yfg2* ○
- MAT $\alpha$  yfg3* ○
- etc. ○

Křížení – ověření - jedna mutace, meioticky defekt - rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl.)

## Meiotic Analysis

Cross mutant to *MAT $\alpha$  YFG<sup>+</sup>*



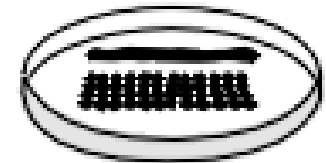
Isolate a diploid strain and Sporulate



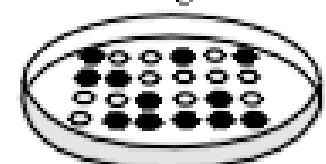
Digest ascus walls

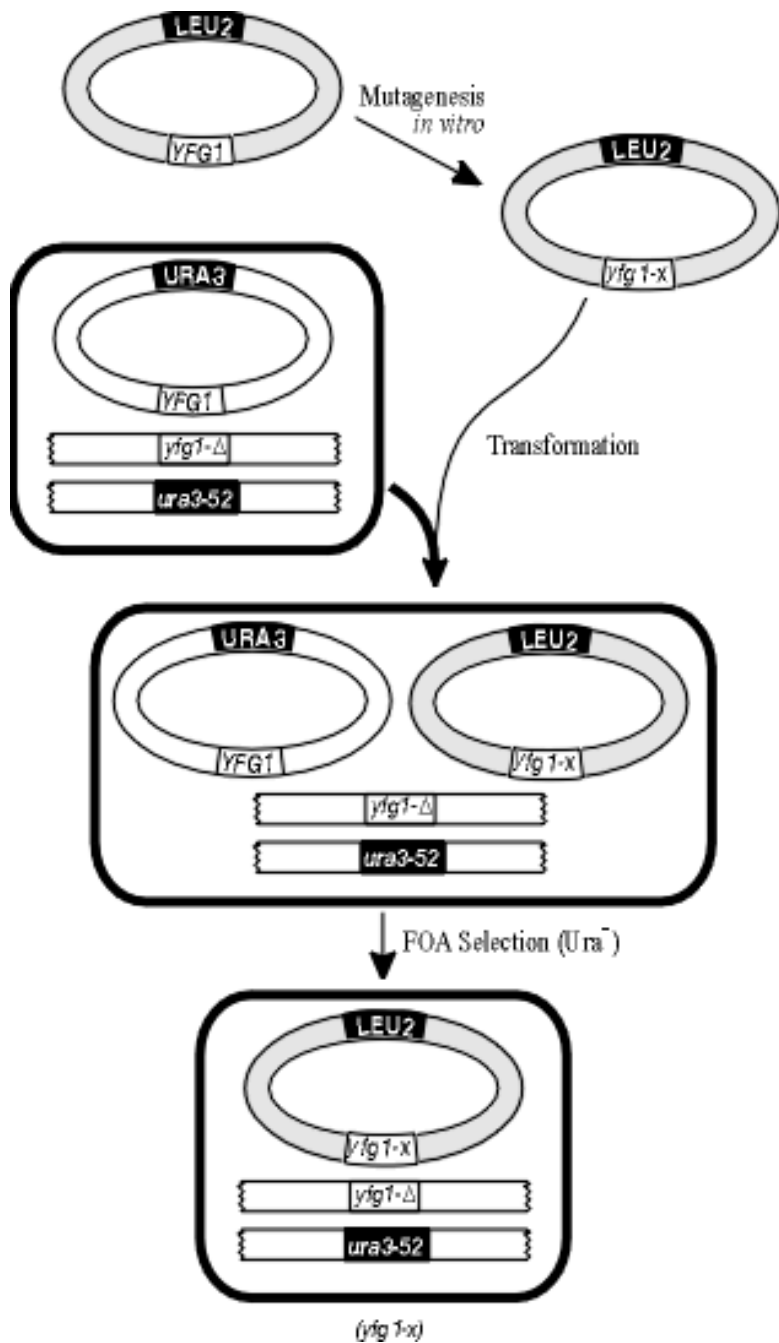


Dissect 4 spores of each tetrad



Score for Yfg<sup>+</sup> and Yfg<sup>-</sup>





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

# Plasmid shuffling

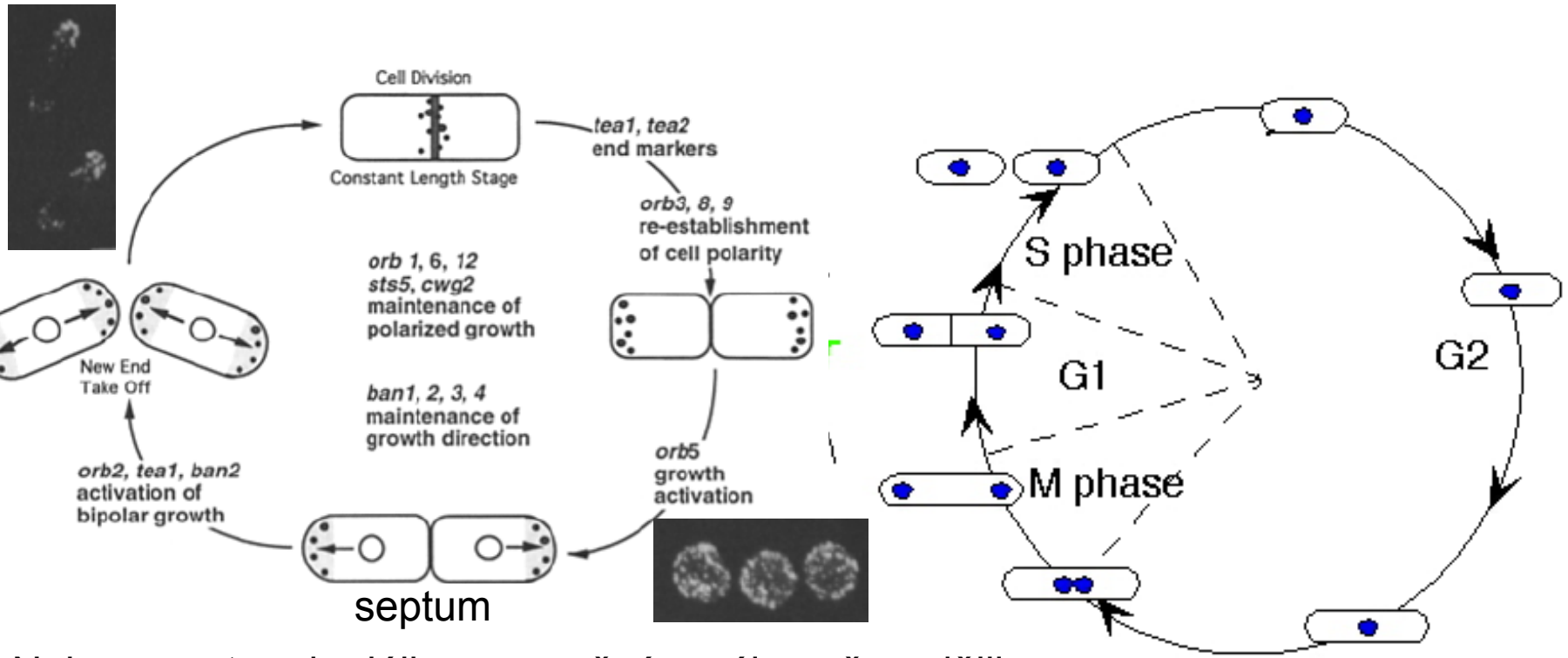
Testování *yfg1*- mutant

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

# Buněčný cyklus *S. pombe*

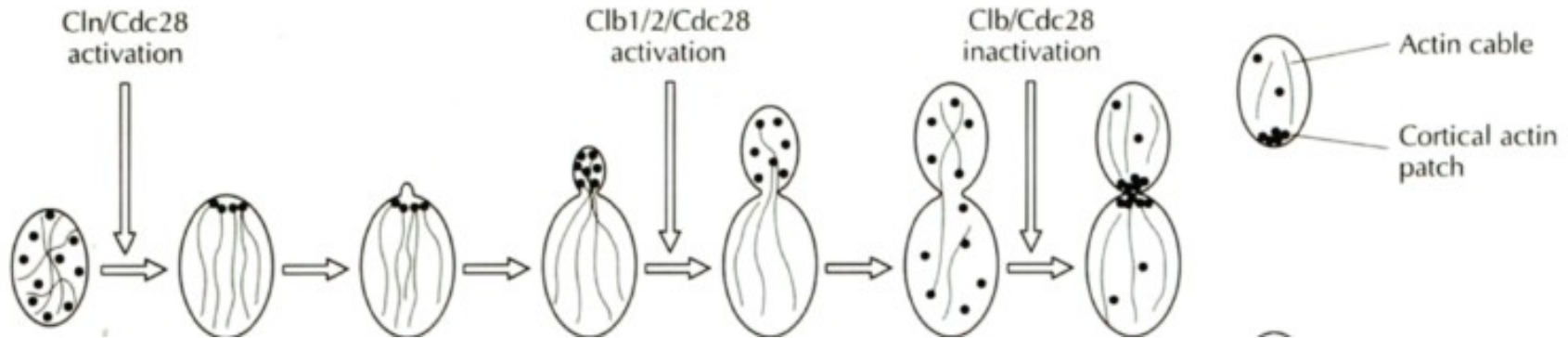
*S. pombe* má rovnocenné dělení - vznikají buňky stejné velikosti – hned vstupují do S fáze (jsou dostatečně velké) – pro vstup do mitózy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)



Nejprve rostou do délky na opačném pólu než se dělily

*Vegetative (mitotic) cycle*

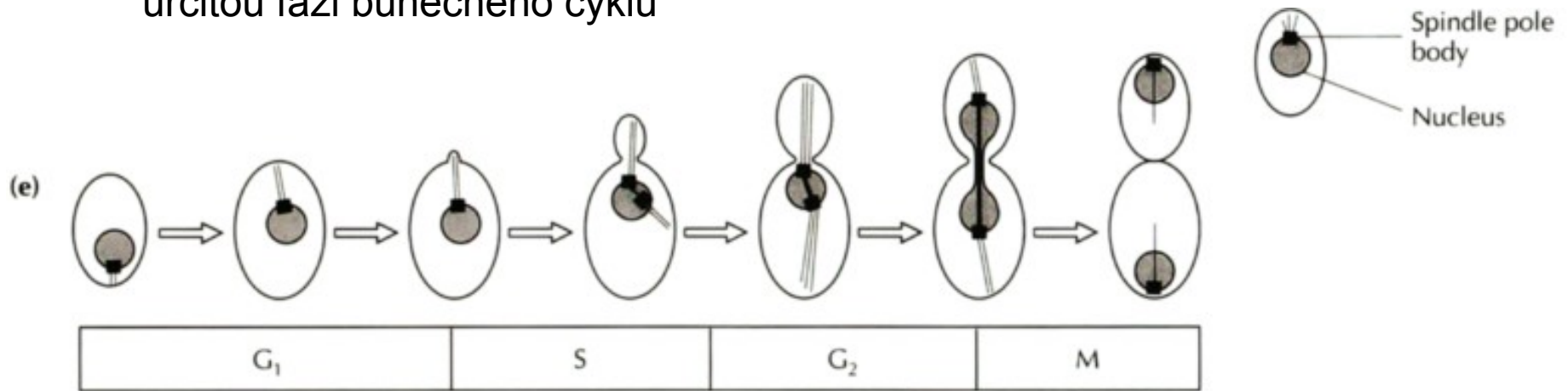
# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- 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)

# 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 G<sub>2</sub> fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G<sub>1</sub>
  
- Oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G<sub>1</sub> fáze (*S.pombe* má rovnocenné dělení – velikost se kontroluje v G<sub>2</sub> fázi => nejdelší je G<sub>2</sub> fáze)

# Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

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

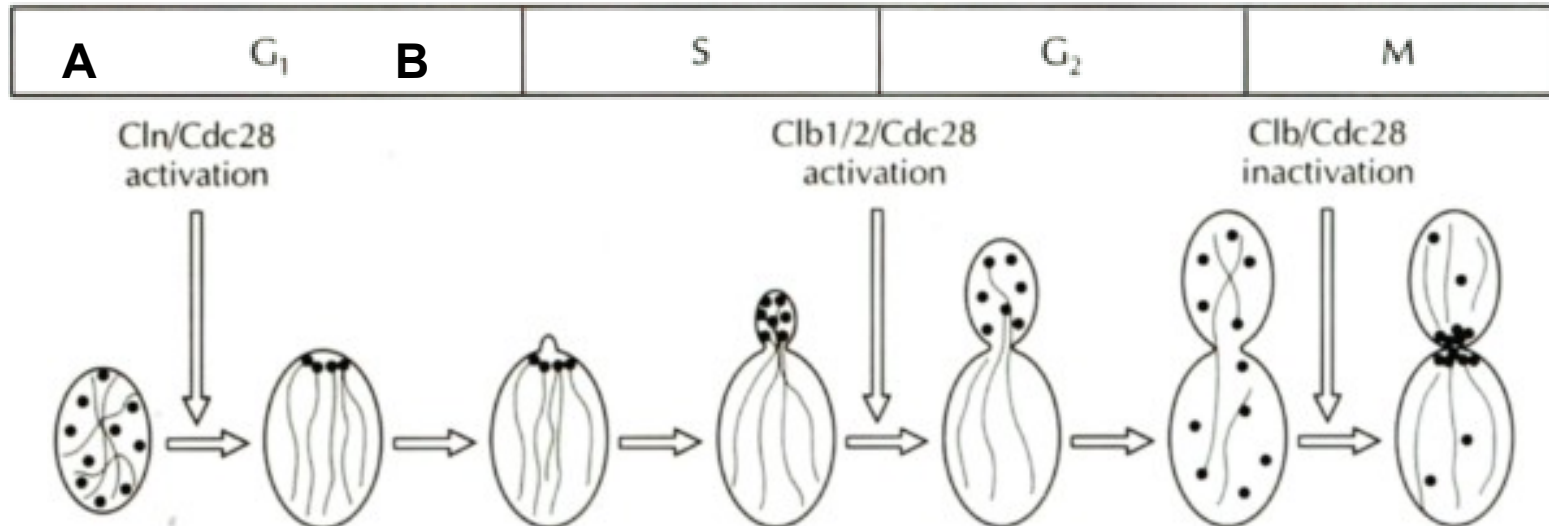
**Paul Nurse** studoval buněčný cyklus na *S. pombe*. V 70. letech objevil gen *cdc2*, který je zodpovědný za regulaci většiny fází BC. V roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



**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.

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
  - nedostatek dusíku – růst pseudohyf
- 
- 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 (arest pomocí alfa-faktoru, 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

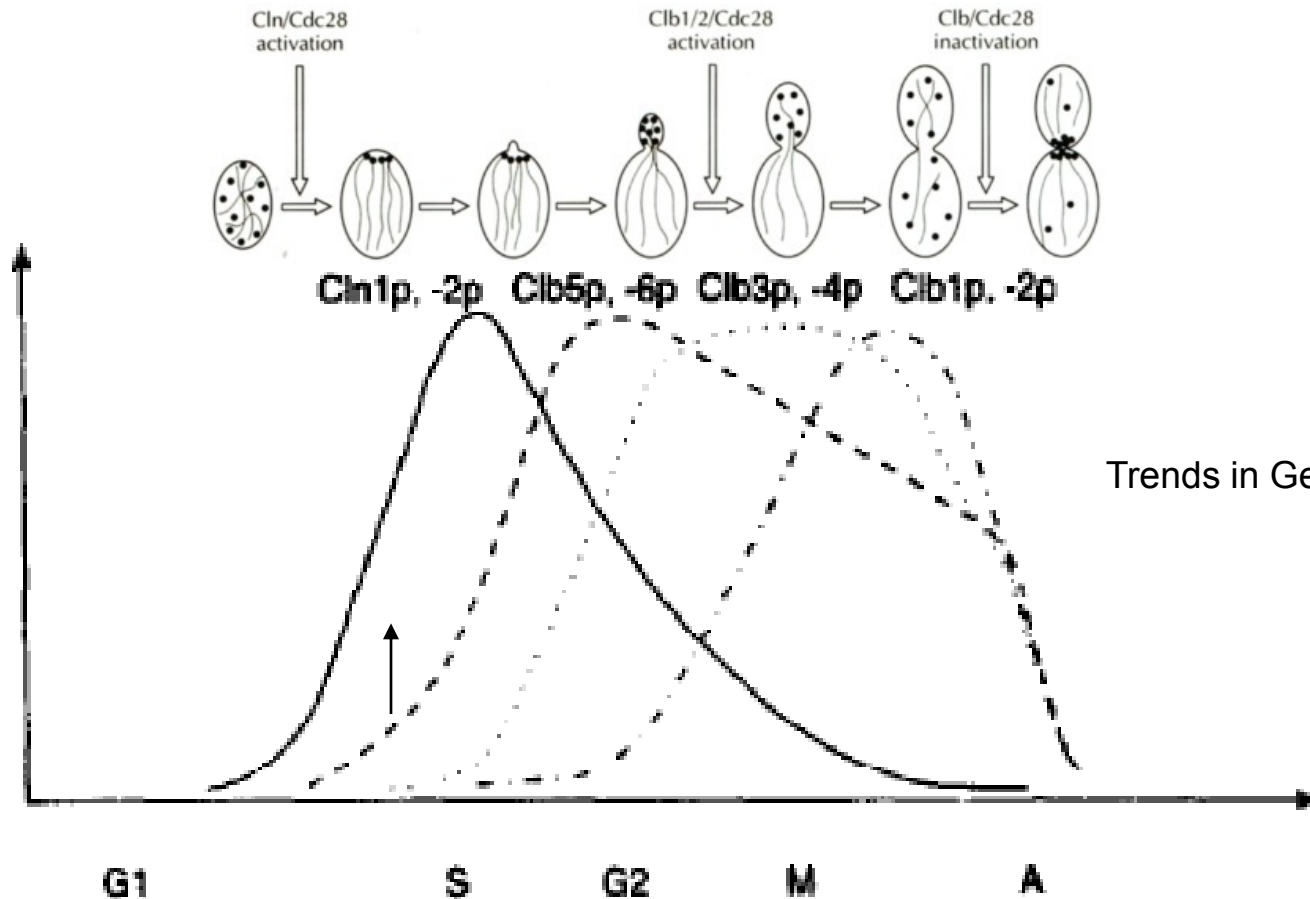




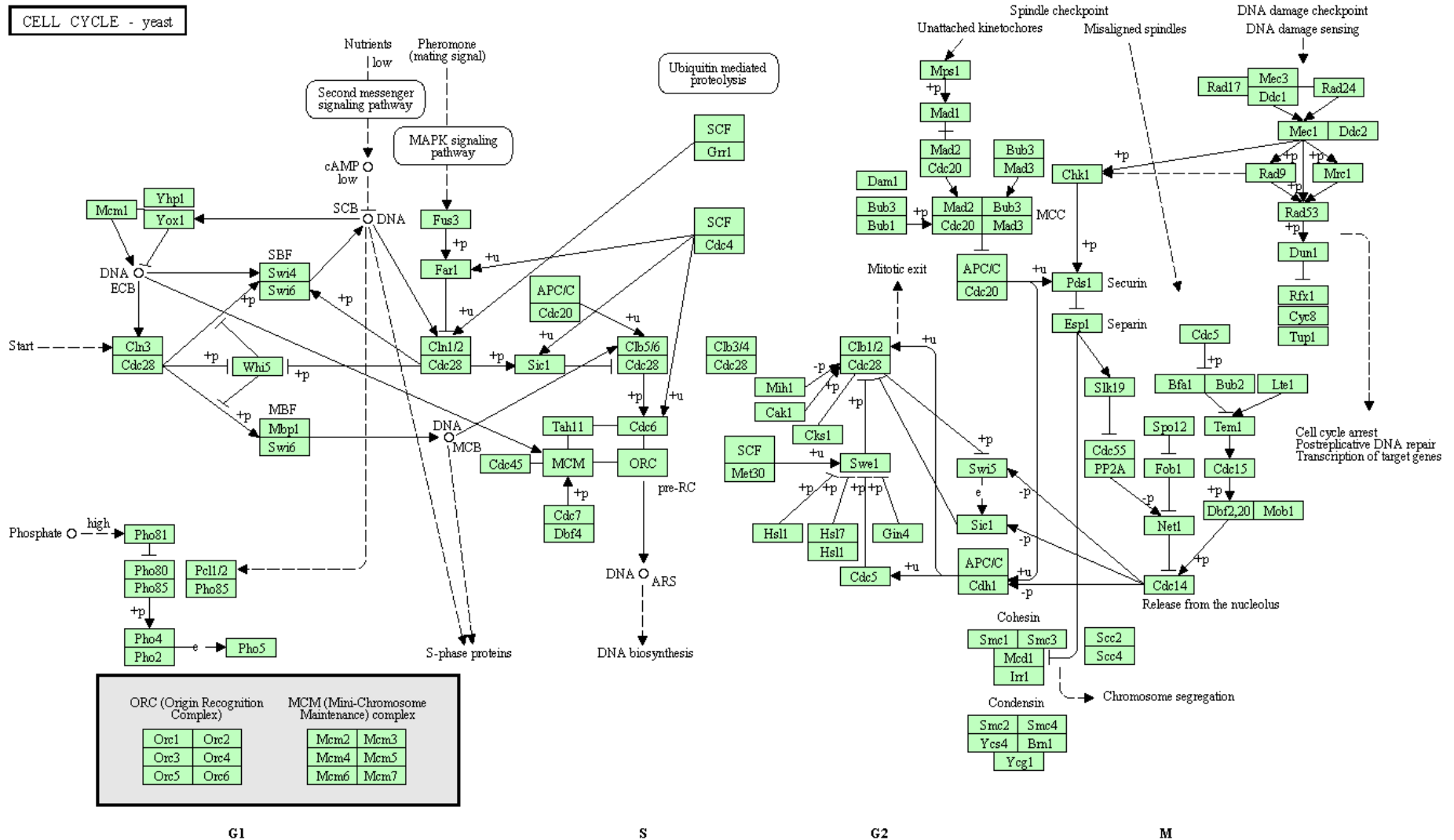
# *CDC28* a cykliny u *S. cerevisiae*

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*



CELL CYCLE - yeast



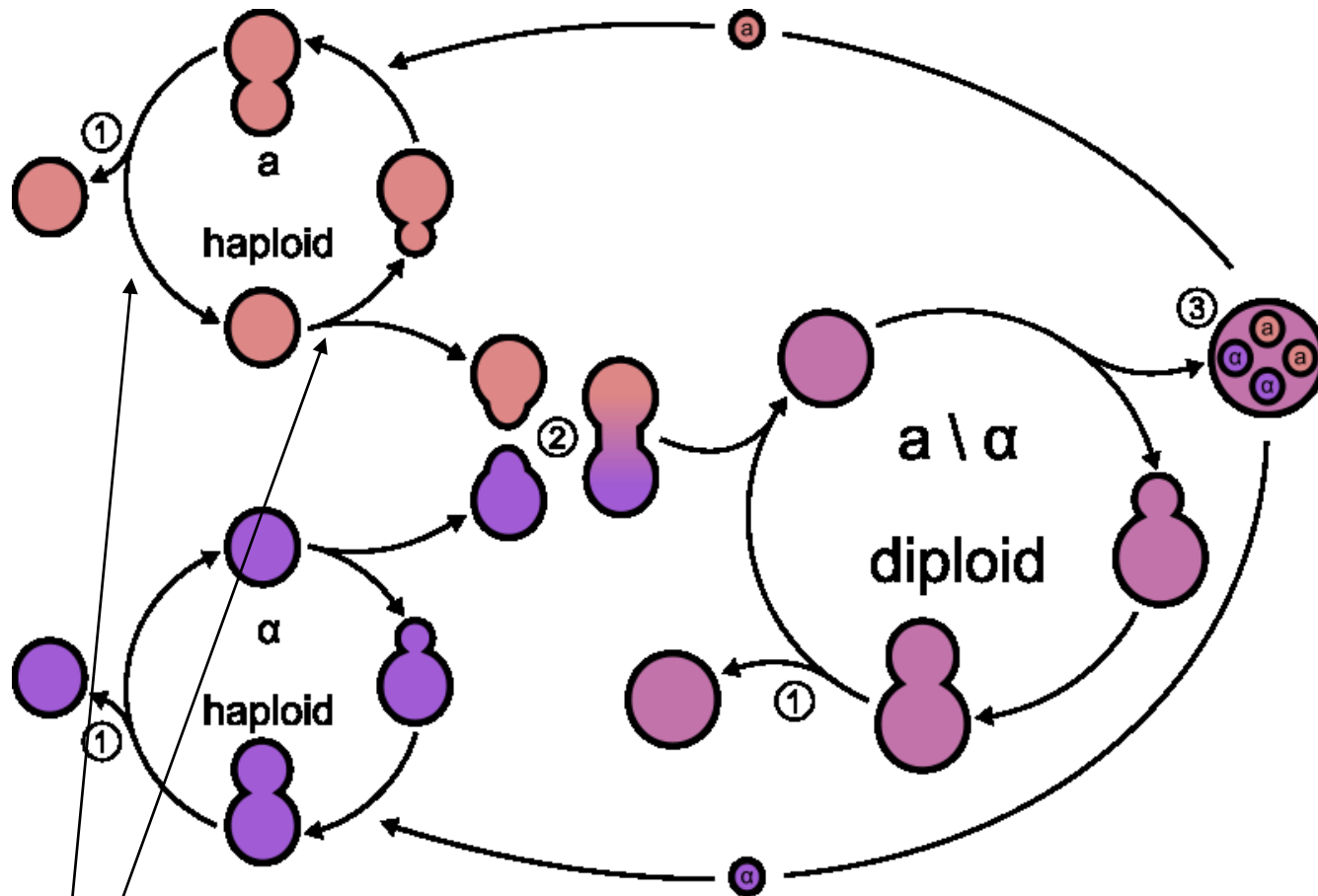
G1

S

G2

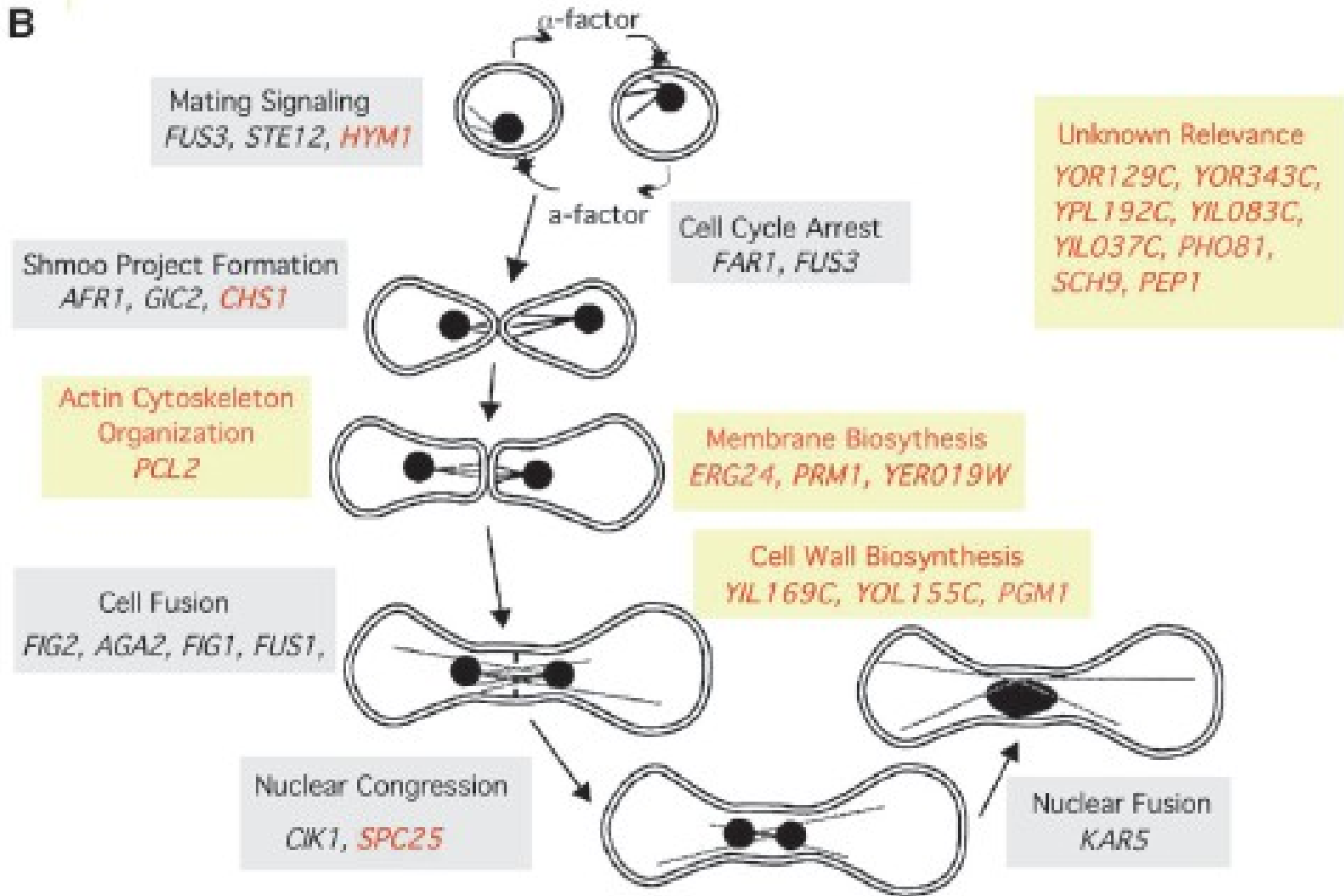
M

# Párování *S. cerevisiae*

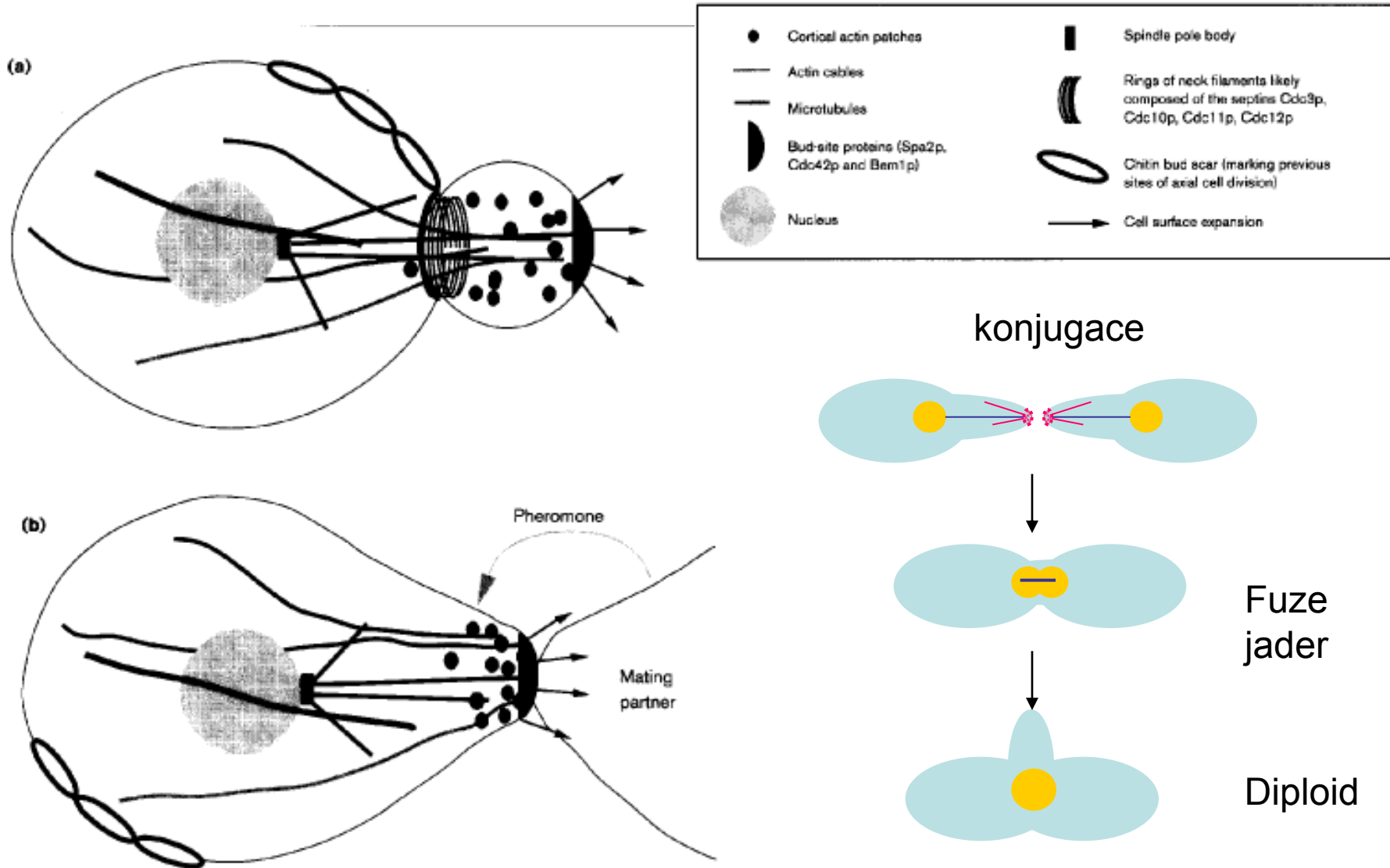


- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci (za přítomnosti alfa-faktoru dochází k zastavení buněčného cyklu)
- α-feromon se používá k synchronizaci buněk v G1 (elutriace pro buňky v G0, HU pro S fázi, nocodazol pro G2)

# Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu

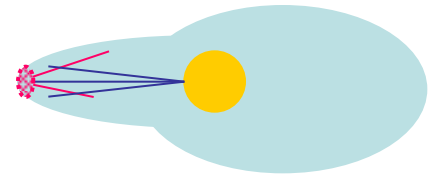
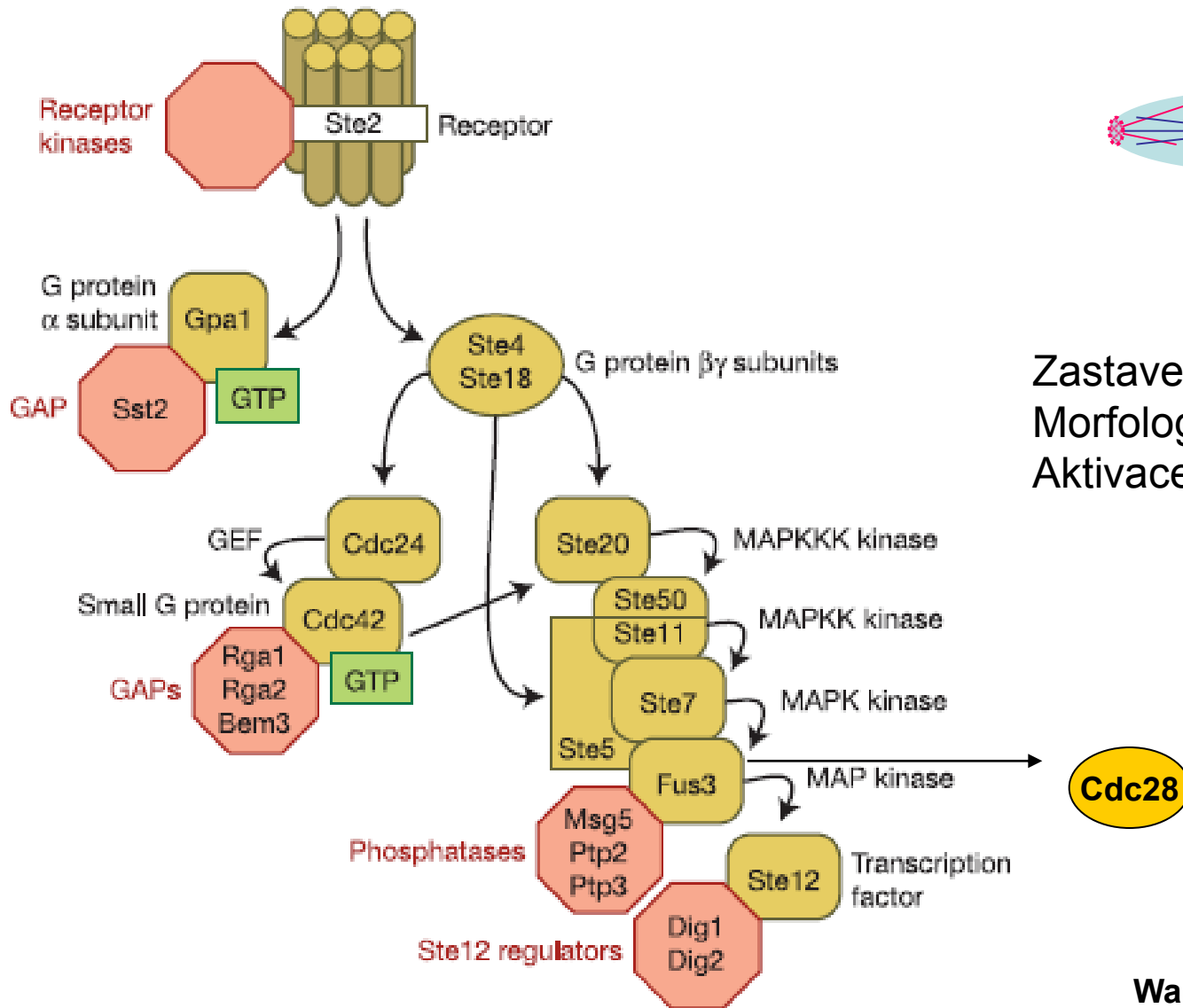


# Párování *S. cerevisiae*



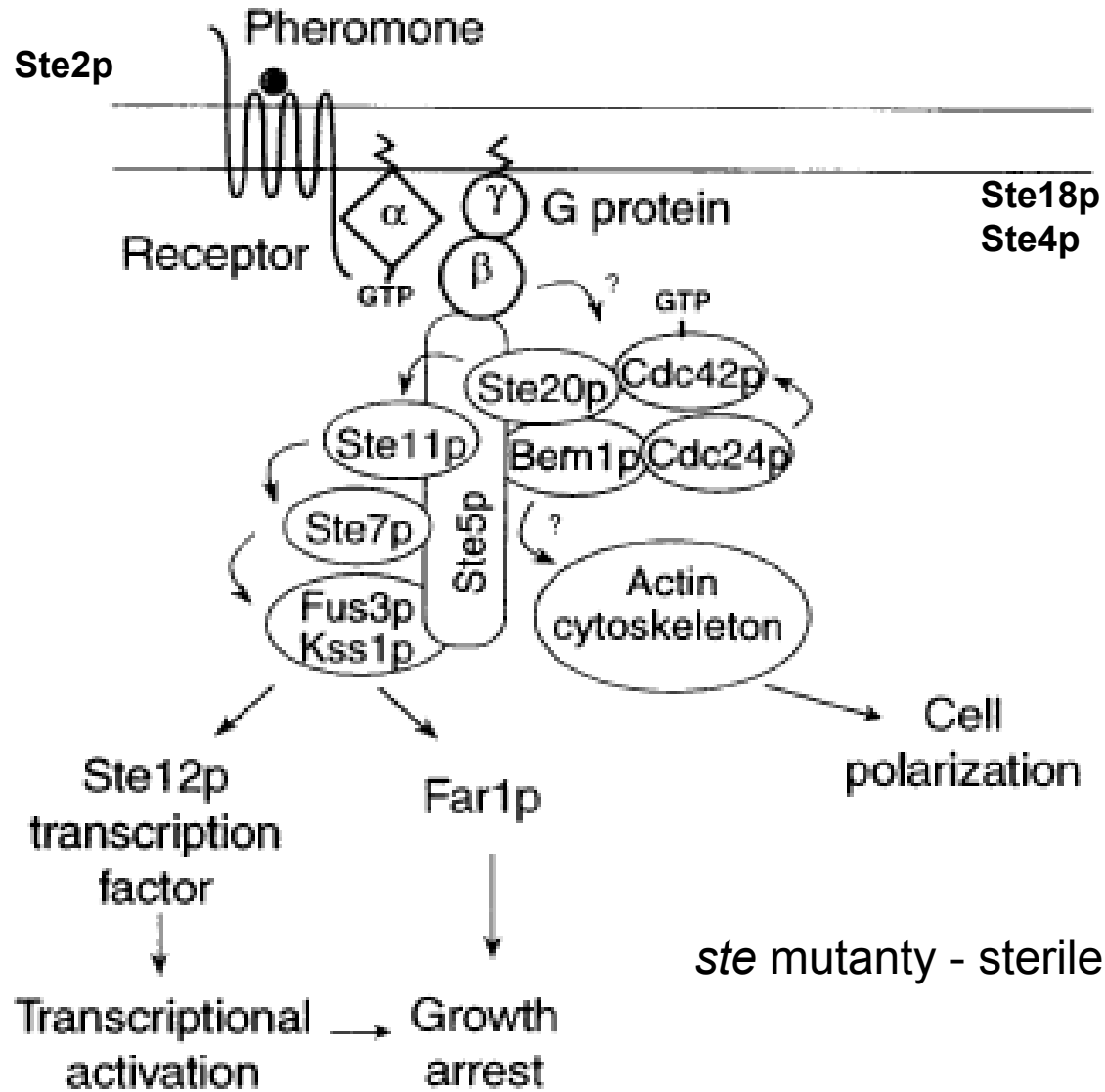
Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

# Signální dráha – $\alpha$ faktor



Zastavení buněčného cyklu  
Morfologické změny (aktin)  
Aktivace transkripce

# Signální feromonová dráha



# ChIP on CHIP se Ste12p transkripčním faktorem

A

