

# Práce s kvasinkami v laboratoři

- rychle se množící **EUKARYOTNÍ** buňky (90 min/dělení, 25-30°C)
- vytváří kolonie na „jednoduchých“ agarových plotnách (např. YPD)
- na plotně narostou za 2-3 dny a v tekutém YPD médiu přes noc

*YPD – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2%glukosa) + 2-3% agar*

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

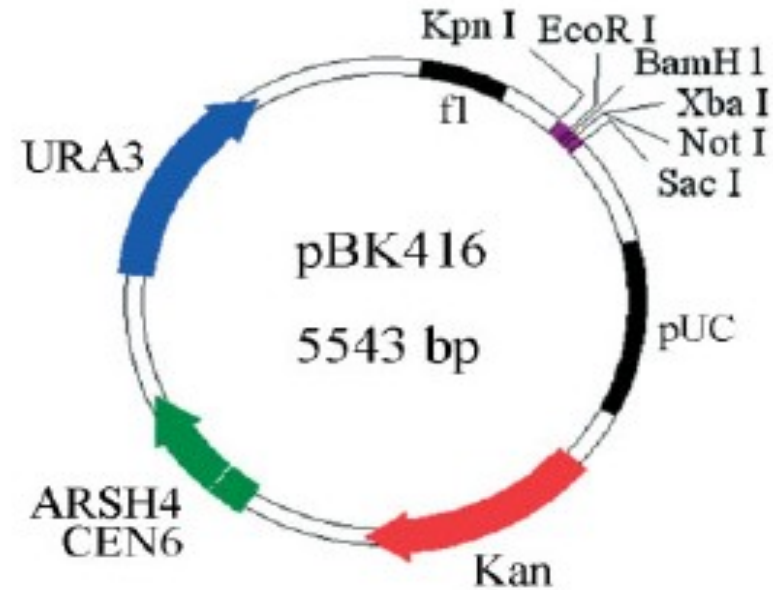
- lze používat klasické mikrobiologické metody (roztírání, kapkování, otiskování ploten)
- do ploten je možné přidávat testovací látky (např. HU, MMS ...)
- mutagenézí lze připravovat teplotně senzitivní mutanty (ts, 37°C) a chladově senzitivní mutanty (cs, 20°C) – např. zastavení buněčného cyklu při 37°C
- do buněk lze transformovat DNA (pomocí octanu litného a tepelného šoku nebo elektroporace)
- lineární DNA se integruje do genomu díky vysoké frekvenci homologní rekombinace (takto lze připravovat deleční a mutantní kmeny)
- plasmidová DNA se replikuje (centromerické a multicopy plasmidy – DNA knihovny)

**W303** – nejčastěji používaný laboratorní kmen

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

# Shuttle vektory

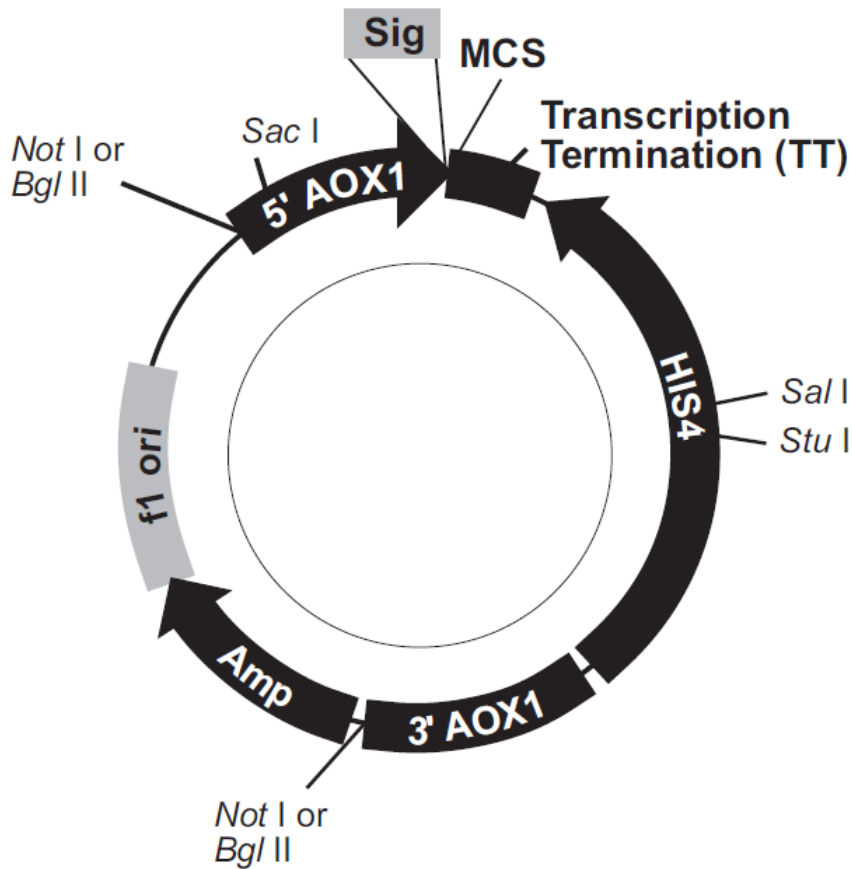
- vychází z 2 $\mu$ m plasmidů nebo centromer (*S.c.*; 2 $\mu$ m přítomné také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilorum*)
- Kvasinková část – marker (URA3 ... kanMX), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 $\mu$ m (60 kopií na haploidní buňku) začátek replikace
- Bakteriální část – Kan resistance, Origin
- Promotor, tag, MCS
  - Kondicionální mutanty (fenotyp-funkce)
  - Nadprodukce (suprese mutací nebo toxicita)



Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot <sup>b</sup>
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) <sup>c</sup>	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) <sup>d</sup> +++ <sup>d</sup>
<i>MET1</i>	Methionin repressed	

*MFA1* - *MATa* haploid specifický

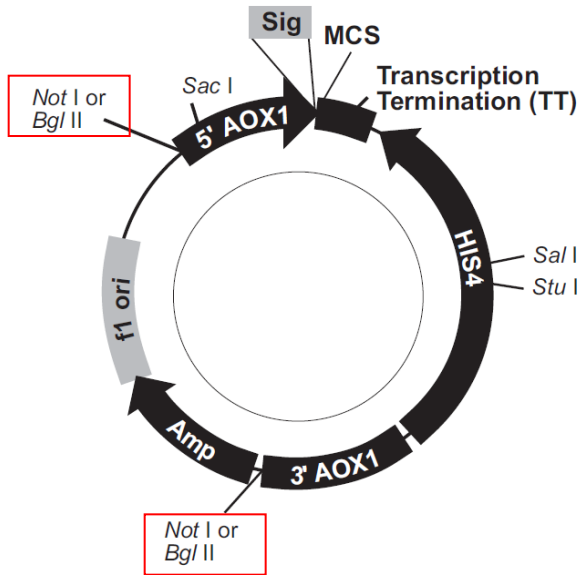
# Integrativní plasmidy



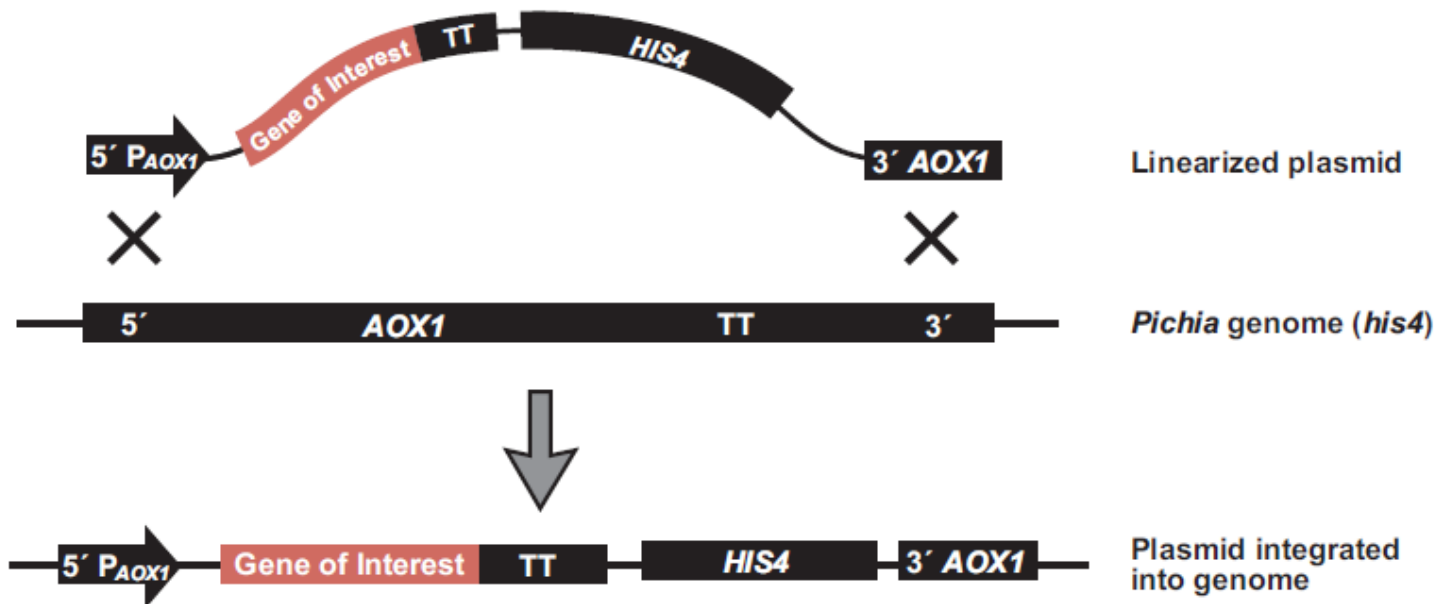
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the AOX1 promoter	Allows methanol-inducible high level expression in <i>Pichia</i> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal protein secretion signal	Targets desired protein for secretion
MCS	Multiple Cloning Site	Allows insertion of your gene into the expression vector
TT	Native transcription termination and polyadenylation signal from AOX1 gene (~260 bp)	Permits efficient transcription termination and polyadenylation of the mRNA
HIS4	<i>Pichia</i> wild-type gene coding for histidinol dehydrogenase (~2.4 kb) and used to complement <i>Pichia his4</i> strains	Provides a selectable marker to isolate <i>Pichia</i> recombinant strains
3' AOX1	Sequences from the AOX1 gene that are further 3' to the TT sequences (~650 bp)	Targets plasmid integration at the AOX1 gene
Amp	Ampicillin resistance gene	Allows selection, replication, and maintenance in <i>E. coli</i>
pBR322 origin	<i>E. coli</i> origin of replication	
f1 origin	Bacteriophage f1 origin of replication (458 bp)	Permits generation of single-stranded DNA for mutagenesis
Not I Bgl II Sac I Sal I Stu I	Unique restriction sites	Permits linearization of vector for efficient integration into the <i>Pichia</i> genome

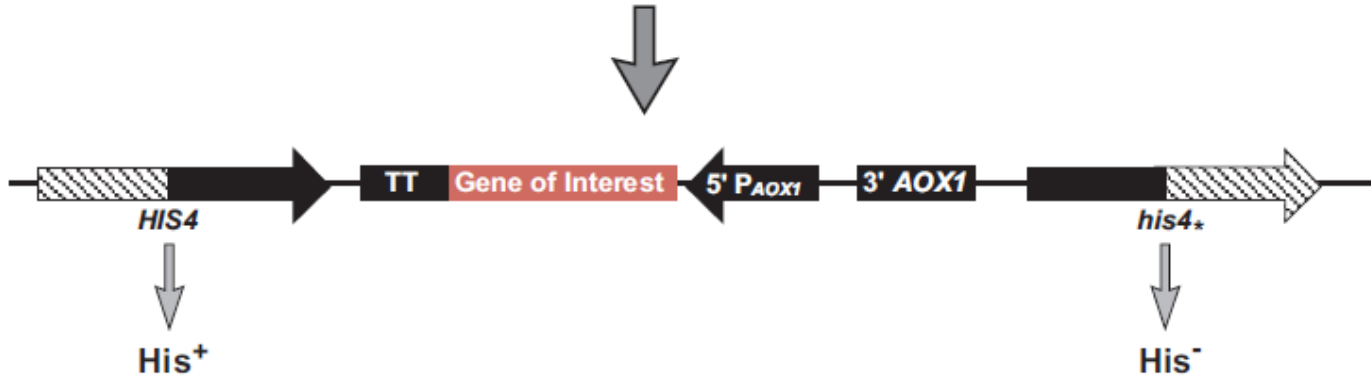
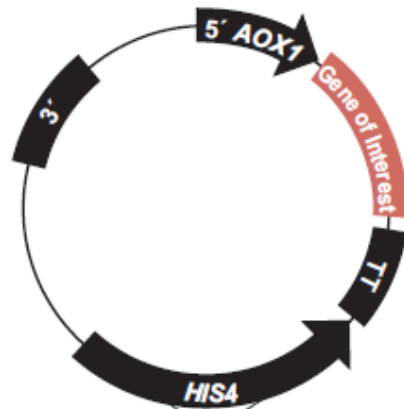
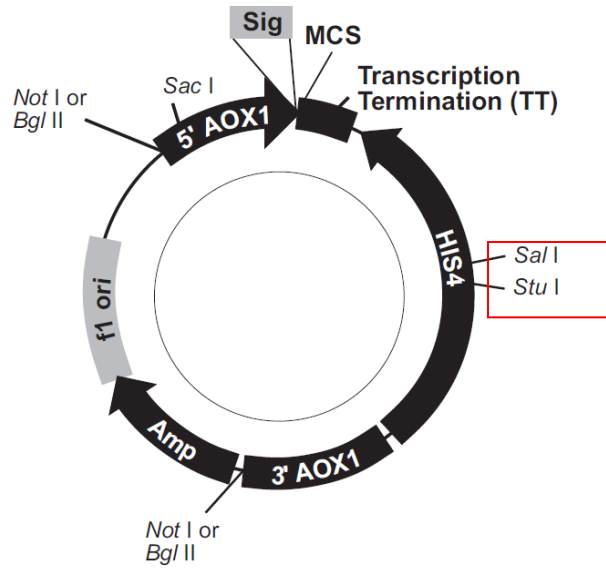
# Integrace I.



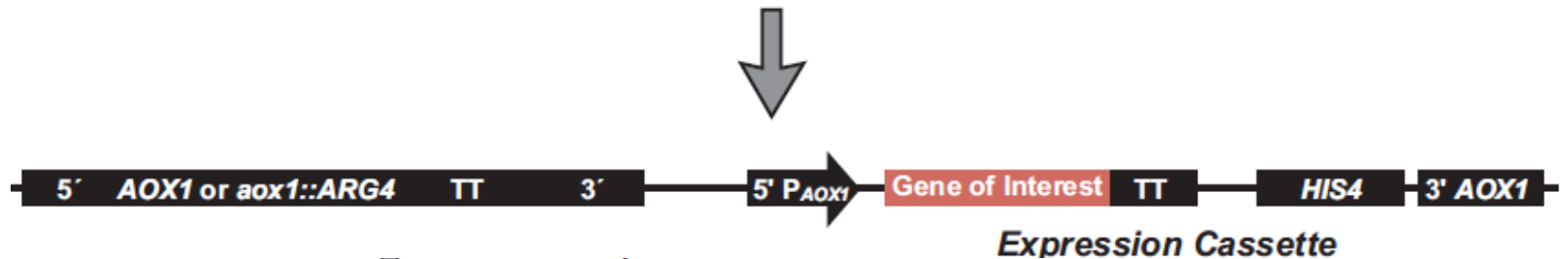
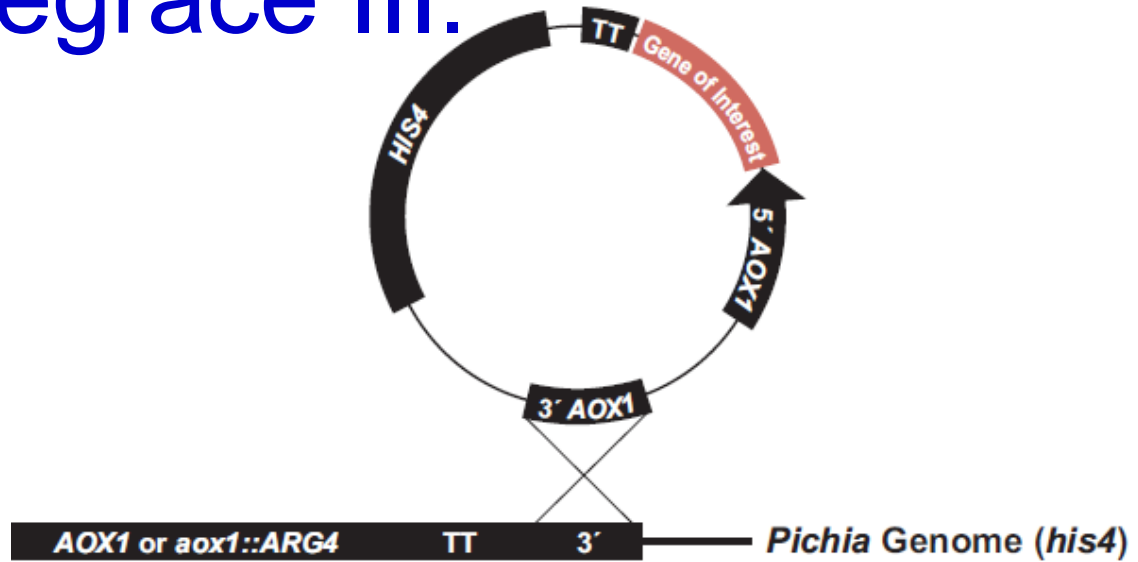
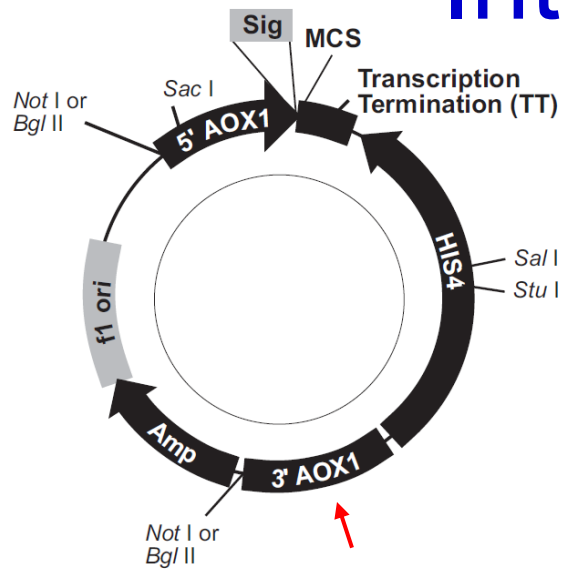
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4* )
- exprese z AOX1 promotoru



# Integrace II.



# Integrace III.



↓ 2nd Insertion Event



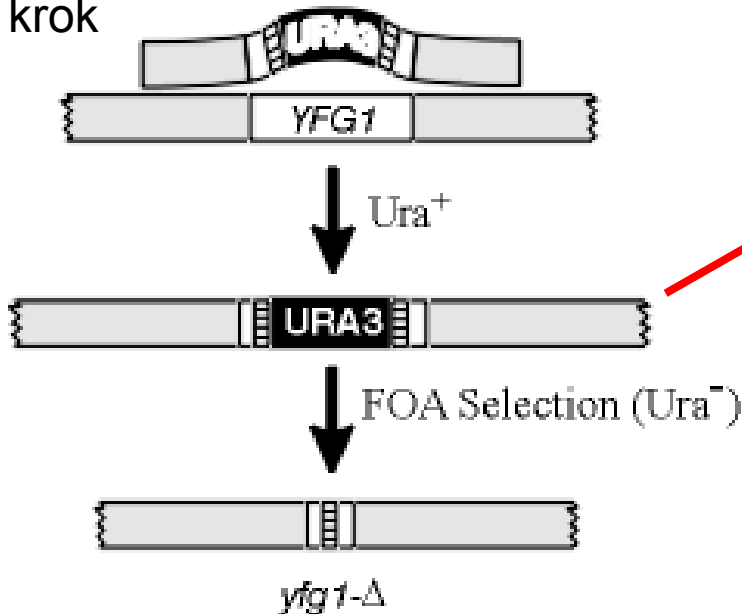
↓ 3rd Insertion Event, etc.

u *Pichia pastoris* dochází u 1-10% transformantů k vícenásobné integraci – vyšší exprese  
Pomocí jiného markeru lze integrovat další kazetu

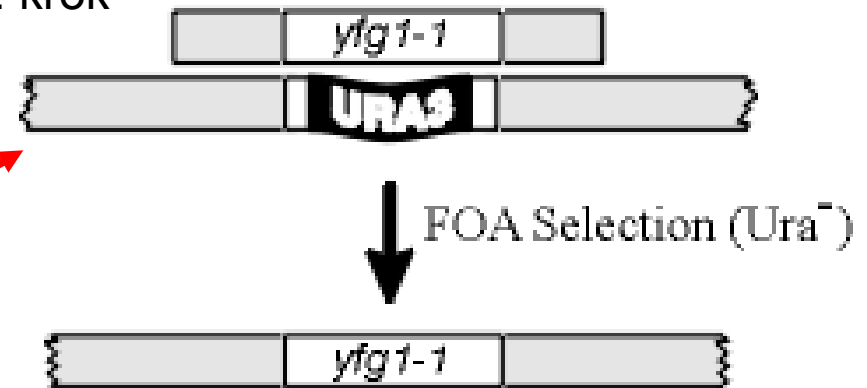
# Disrupce/delece genu

- Studium funkce genu – fenotyp (1. delece, 2. mutace)
  - nezbytný/esenciální gen => buňky potřebují gen např. na plasmidu (plasmid shuffling)
  - životaschopné – mutace lze přímo integrovat do genomu
- mutantní kmeny lze křížit a hledat funkční příbuznost s jinými geny (synthetic lethal x epistatic)

1. krok

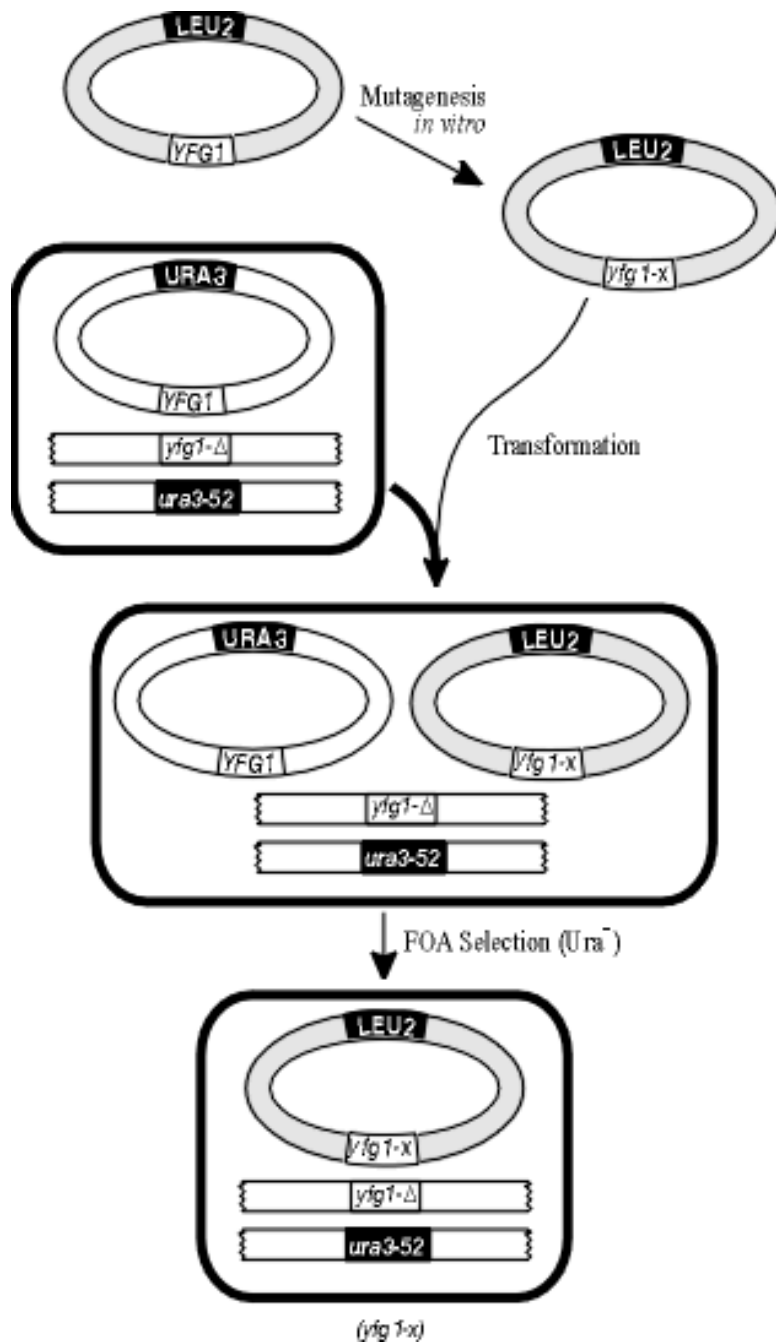


2. krok



- Využití inhibitoru FOA pro „odlčení“ URA3 markeru (FOA je přeměňována Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil => URA3<sup>+</sup> buňky nerostou, zatímco *ura3*<sup>-</sup> buňky jsou resistantní)
- Buňky se stávají *ura*<sup>-</sup>, takže URA3 marker lze využít několikrát

# Plasmid shuffling



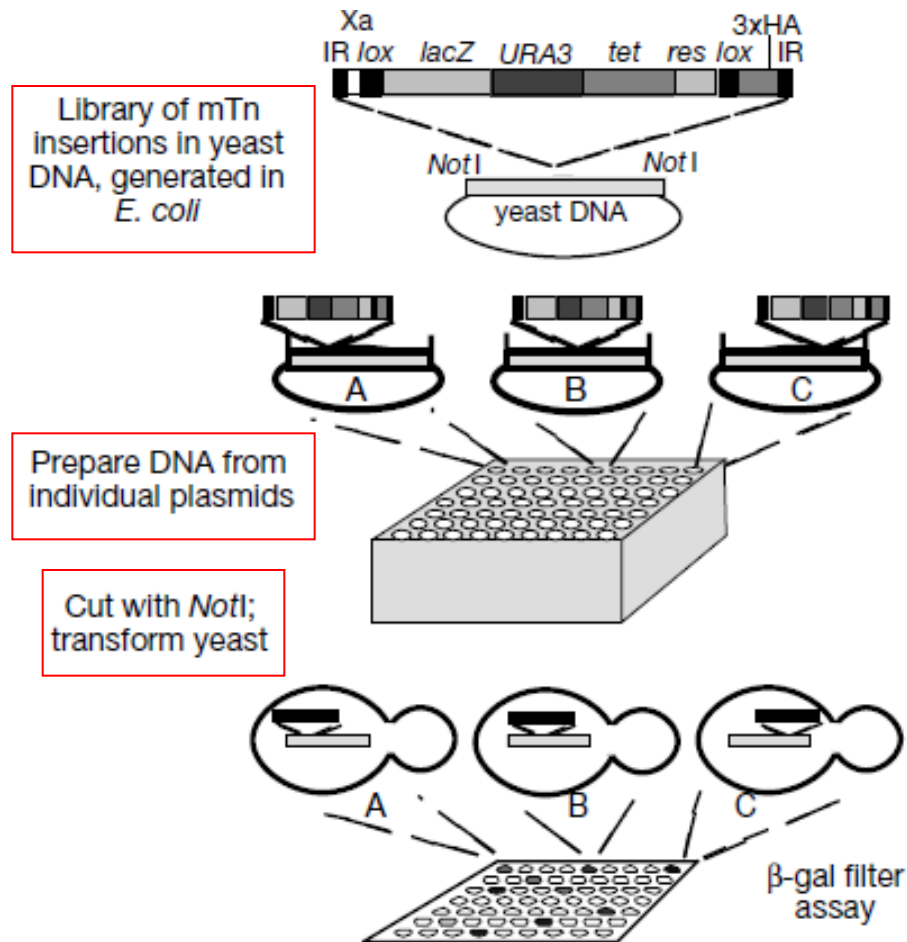
Pokud je *YFG1* esenciální musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na plasmidu

Na dalším plasmidu může být vnesena mutovaná verze *yfg1* – její efekt se projeví až po odstranění plasmidu s divokou kopií genu (pomocí FOA)

Podobně lze použít *ade2*, *ade3* systém s *YFG1* wt genem na plasmidu s *ADE3* (kolonie jsou červené díky *ade2* mutaci) – po ztrátě plasmidu jsou sektory kolonii bílé (bez Ade3p enzymu je metabolická dráha blokována dříve než vzniká červený metabolit)

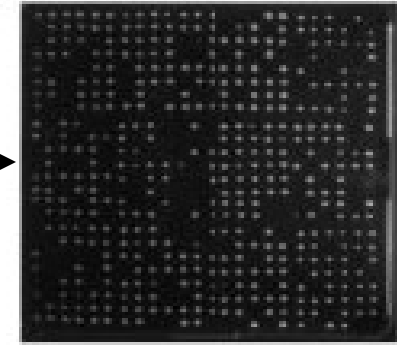


# Delece genu pomocí transposonů



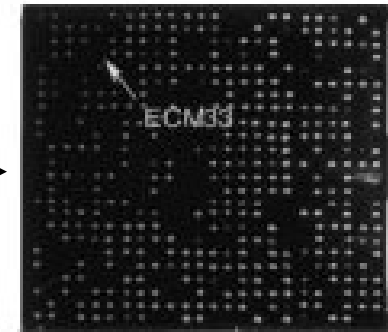
esenciální ▶

a



YPD

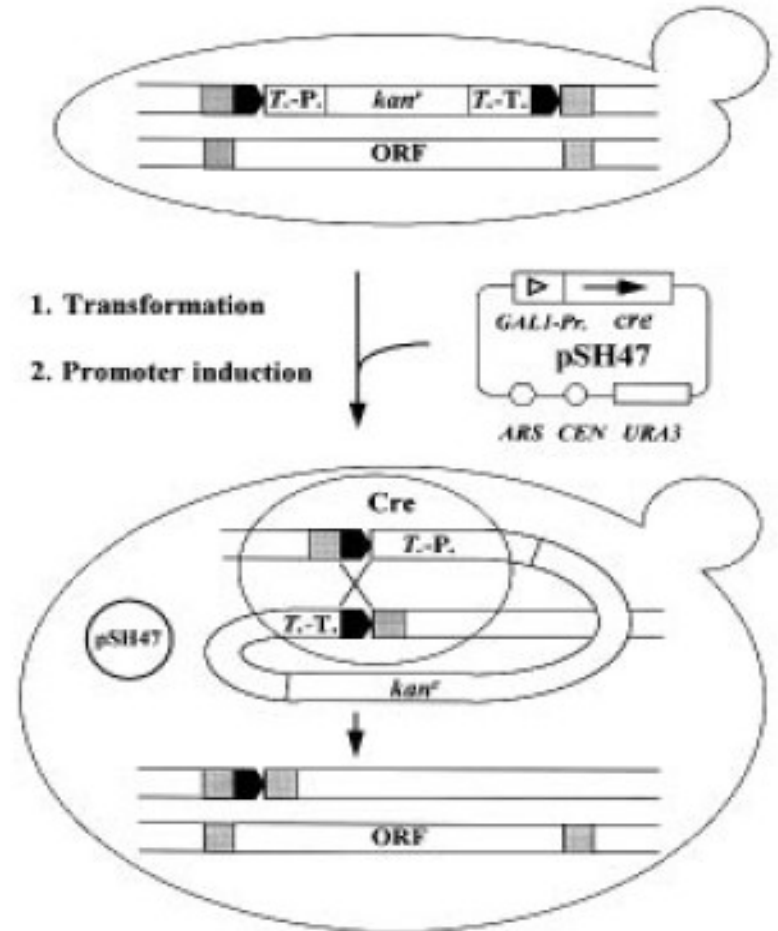
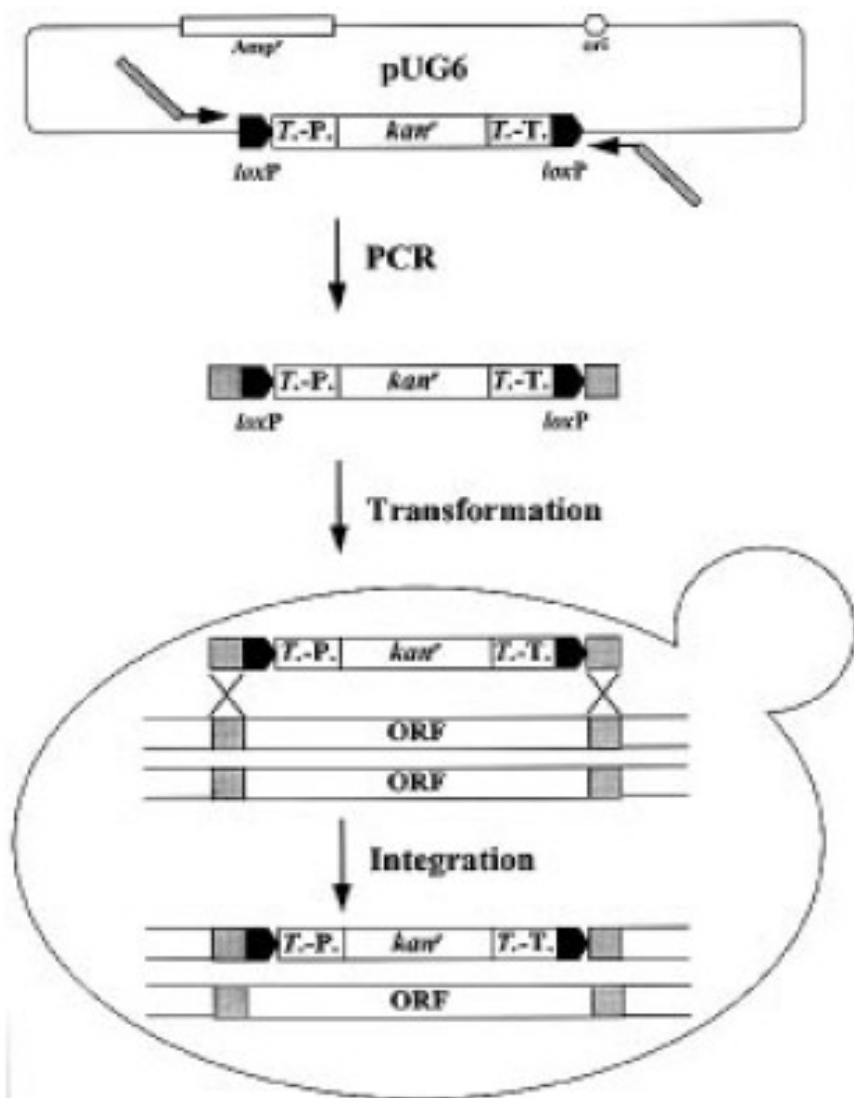
Citlivé ... ▶



Hygro

Defekt buněčné stěny

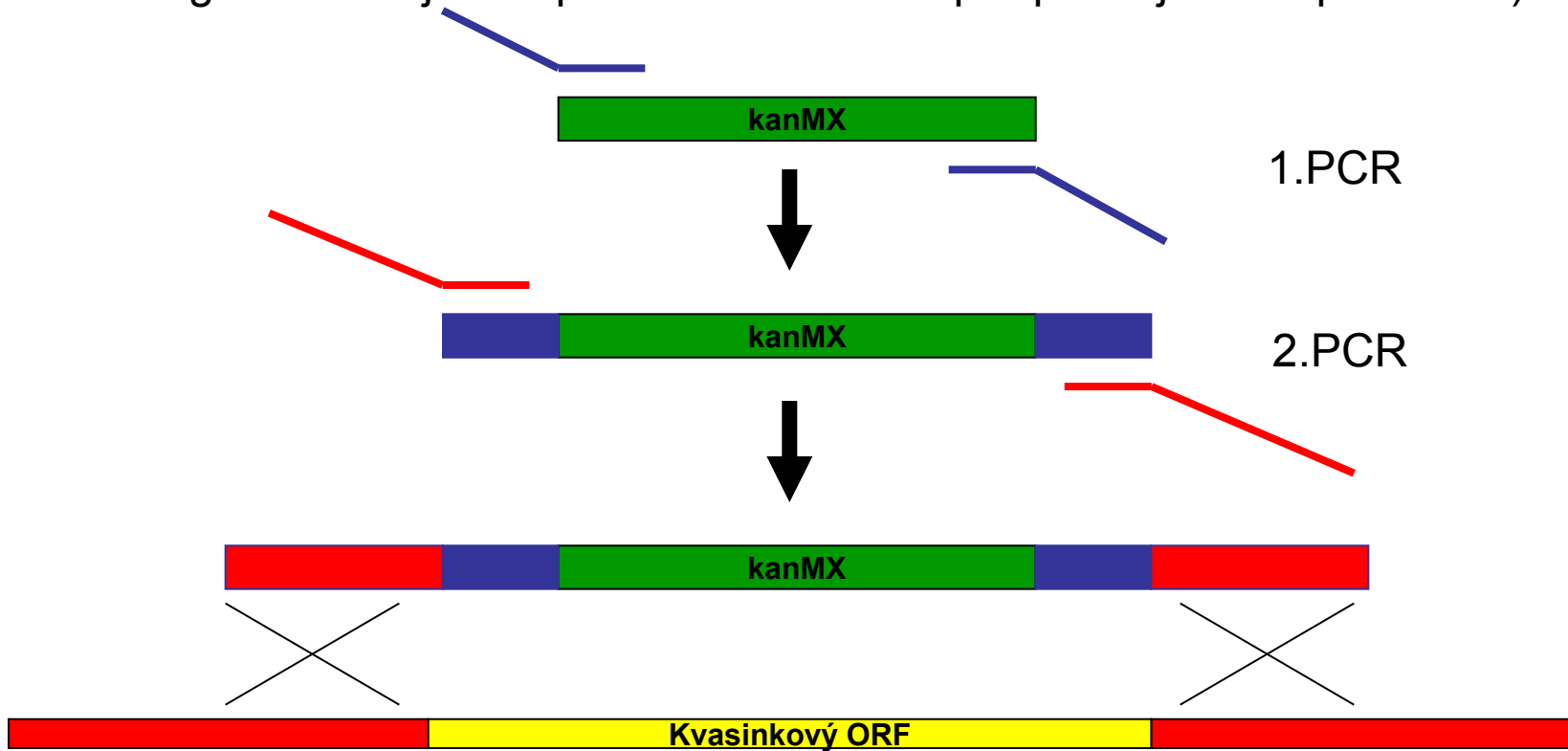
# Cre rekombinasa



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

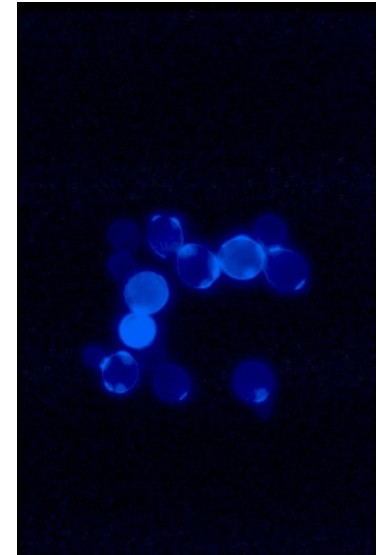
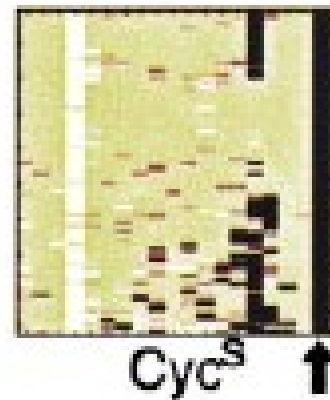
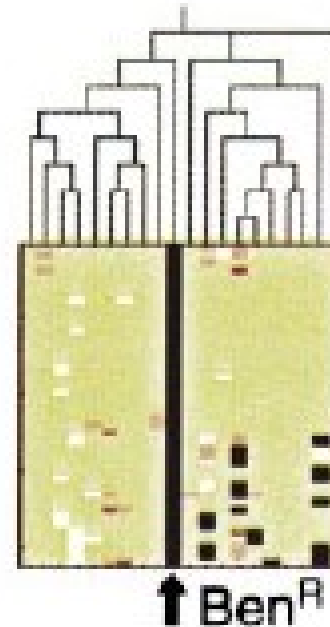
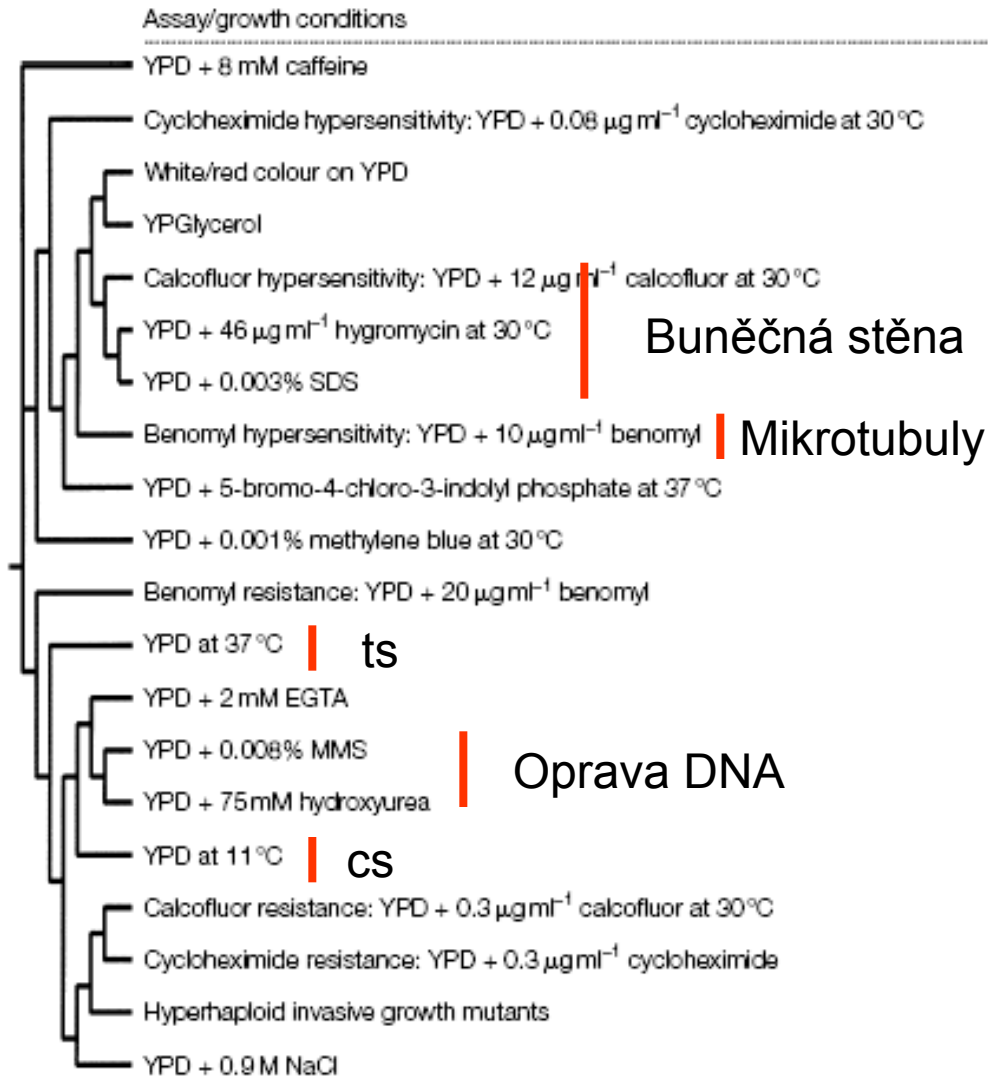
# Delece genu - PCR

- pro rekombinaci stačí pouze krátká homologie (50nt)
- oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé postačí (při 2 krokové PCR se kromě dlouhé homologie vnesou ještě specifické sekvence pro pozdější manipulace ...)



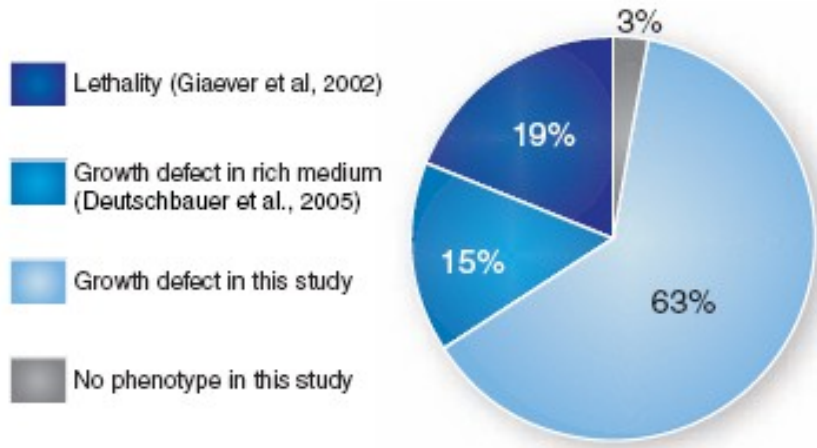
- systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- kmeny lze získat z archivu EUROSCARF

# Testy fenotypu-funkce



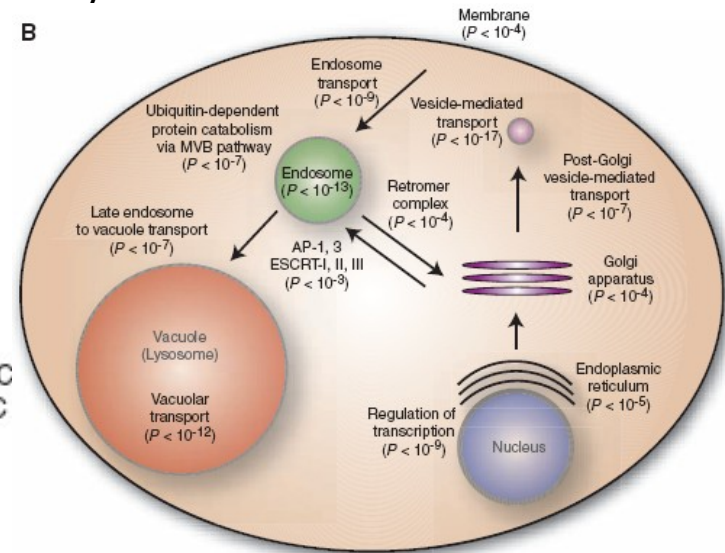
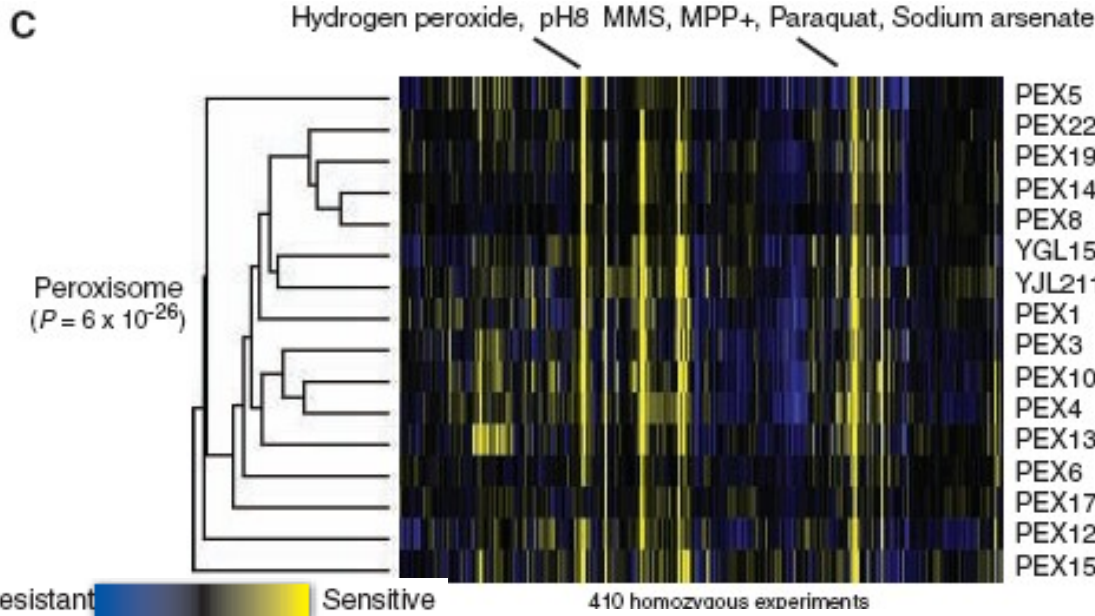
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů – anotace v databázích

~ 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

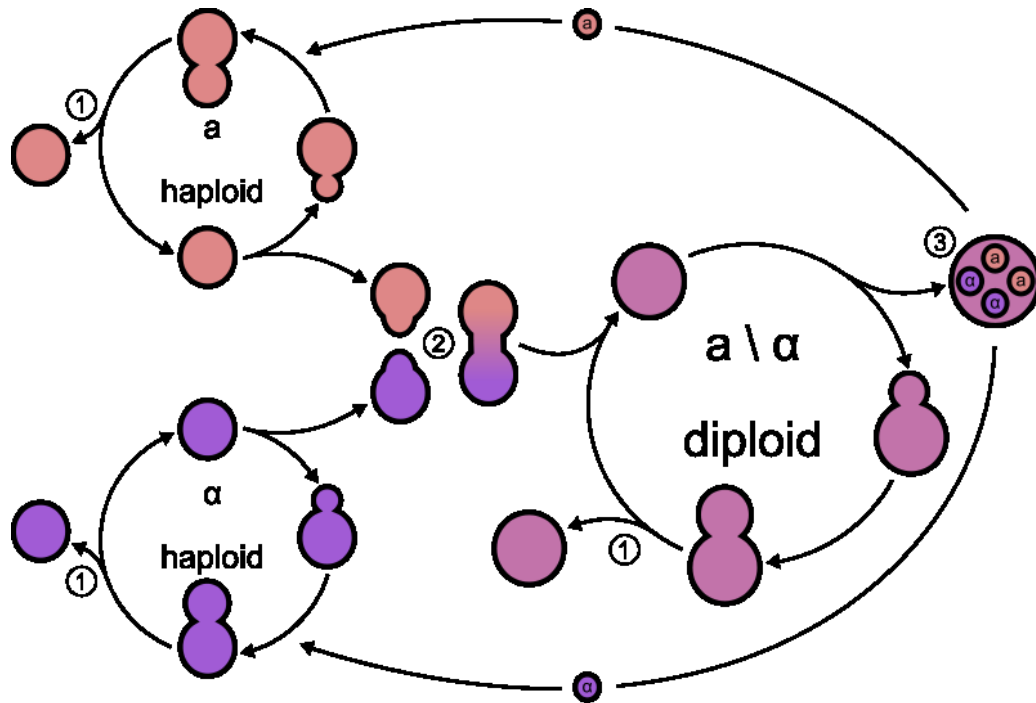
- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti



Science 320 (2008), p.362



# 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 dvojitý mutant 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)
- u *S. pombe* jsou diploidní buňky nestálé a okamžitě sporulují (pouzdro se rozpadá samo)

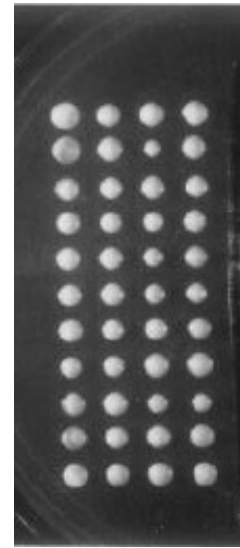
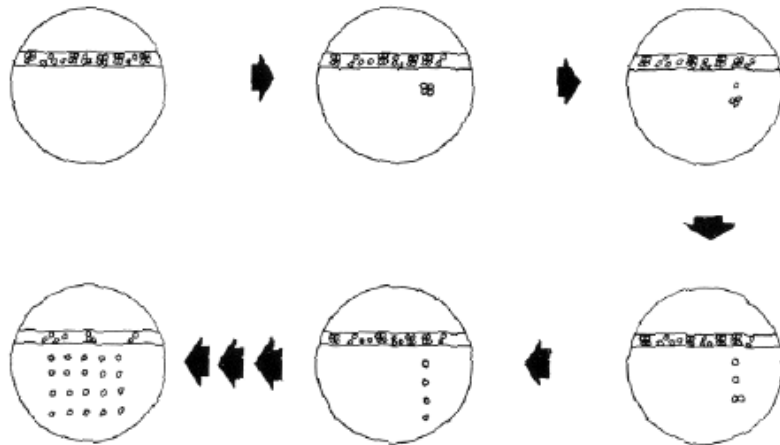
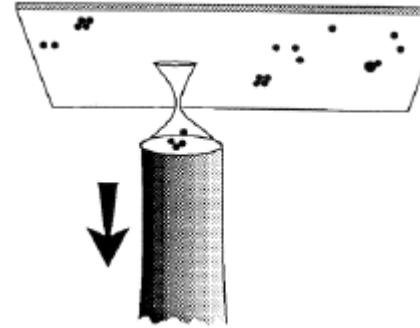


RHOMBOEDRICKÝ

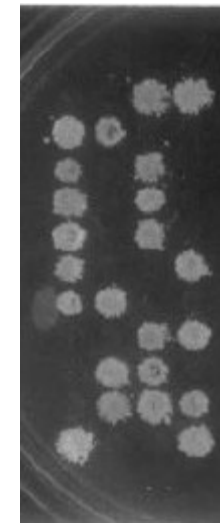
S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR



# Tetrádová analýza



YPD



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

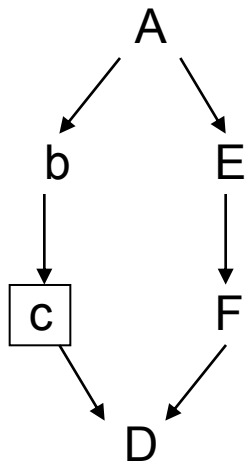
AAaa

# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

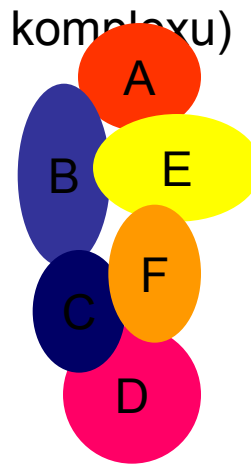
Mutagenese pomocí hydroxylaminu ...

haploid x haploid => diploid – stejný fenotyp - identický gen  
- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

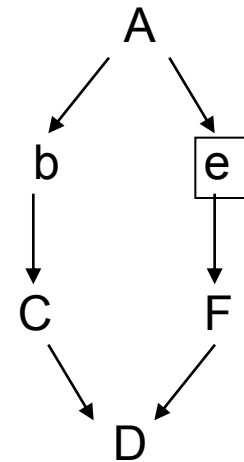
sporulace => haploid – stejný fenotyp – epistatický (funkčně příbuzné geny)  
- aditivní až letální (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)



Epistatický



Proteinový komplex



Letální

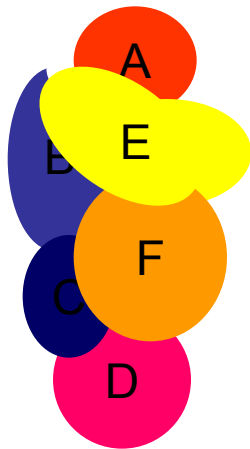
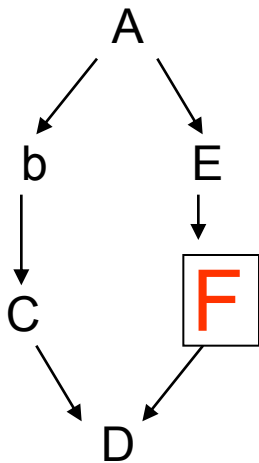
Hledání (screening) letálního mutanta – mutagenese kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA)



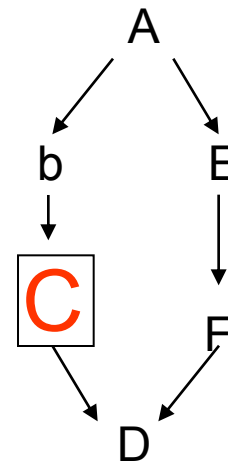
# Supresory

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

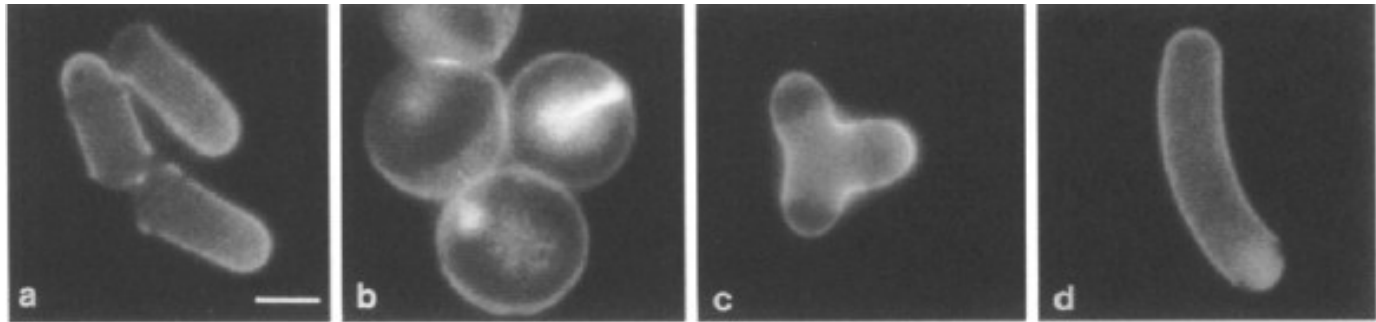
- mutace sousedního (protein) zesílí oslabenou interakci
- nadprodukce proteinu z paralelní dráhy
- nadprodukce proteinu z téže dráhy



Proteinový komplex



- 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)

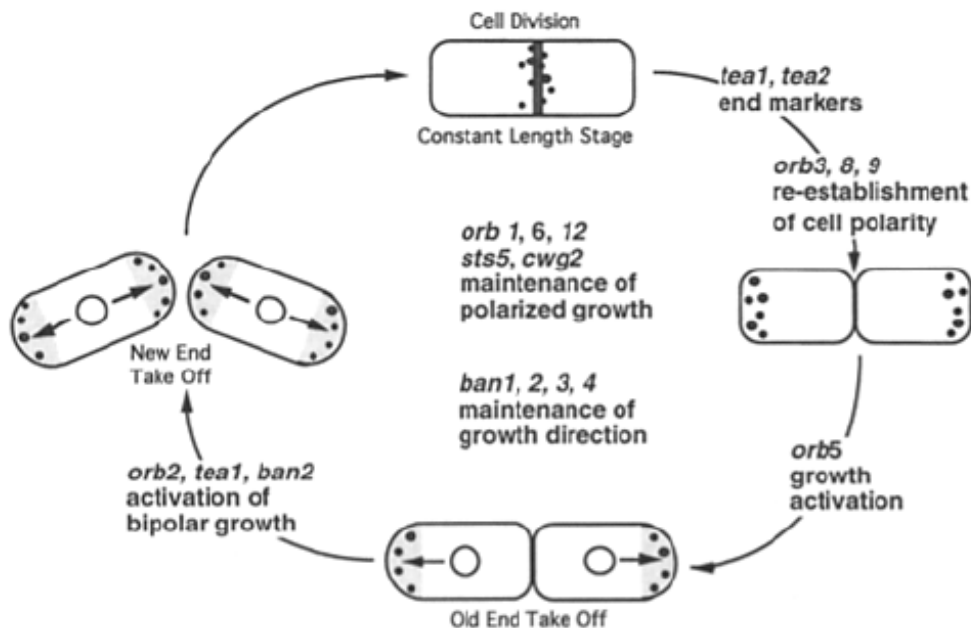


Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage*	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 <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</i> <sup>§</sup>	<i>pck1</i> <sup>+</sup> , <i>pyp1</i> <sup>+</sup>
<i>orb5</i>	2 (2 <sup>±</sup> )			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2</i> <sup>l</sup>	
<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> <sup>li</sup>	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1</i> <sup>+</sup> , <i>pyp1</i> <sup>+</sup> , <i>ras1</i> <sup>+</sup>

## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

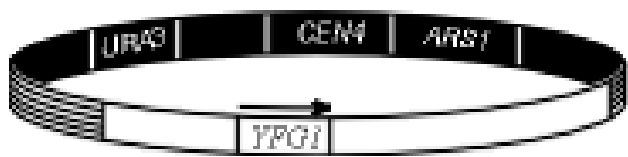
Isolate Ura<sup>+</sup> transformants and score for Yfg<sup>+</sup>



Yfg<sup>+</sup>

Recover the YCp-*YFG1*<sup>+</sup> plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing

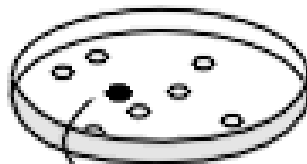


## Mutant Isolation

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



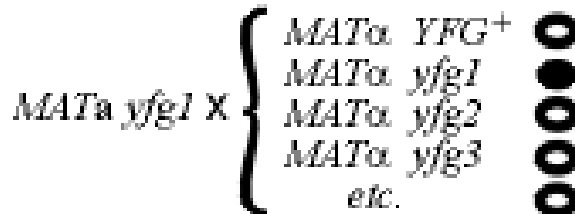
Detection of Yfg<sup>-</sup>



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>



## Meiotic Analysis

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



Isolate a diploid strain and Sporulate



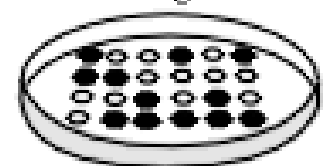
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad



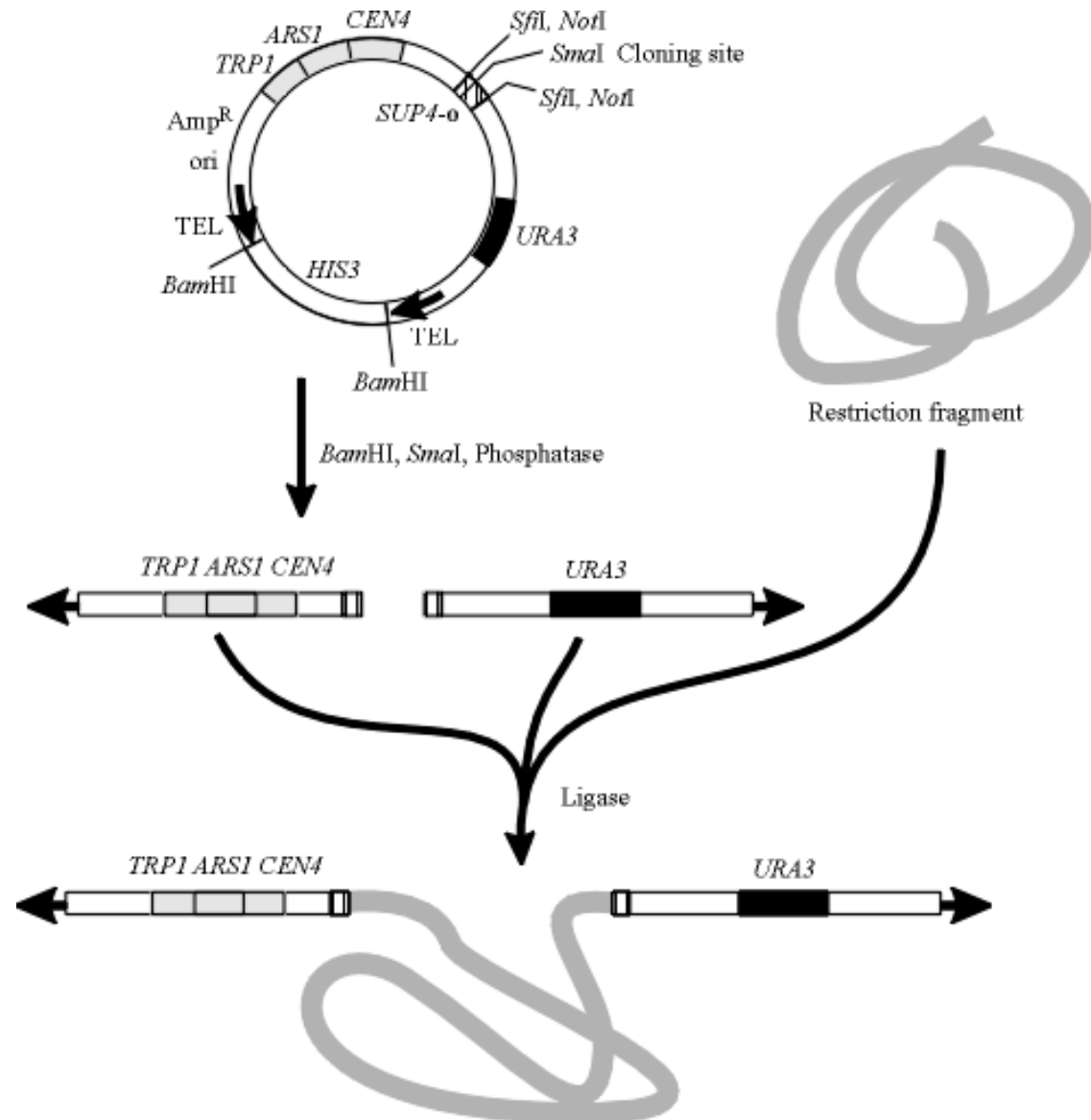
Score for Yfg<sup>+</sup> and Yfg<sup>-</sup>



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

# YAC (yeast artificial chromosome)

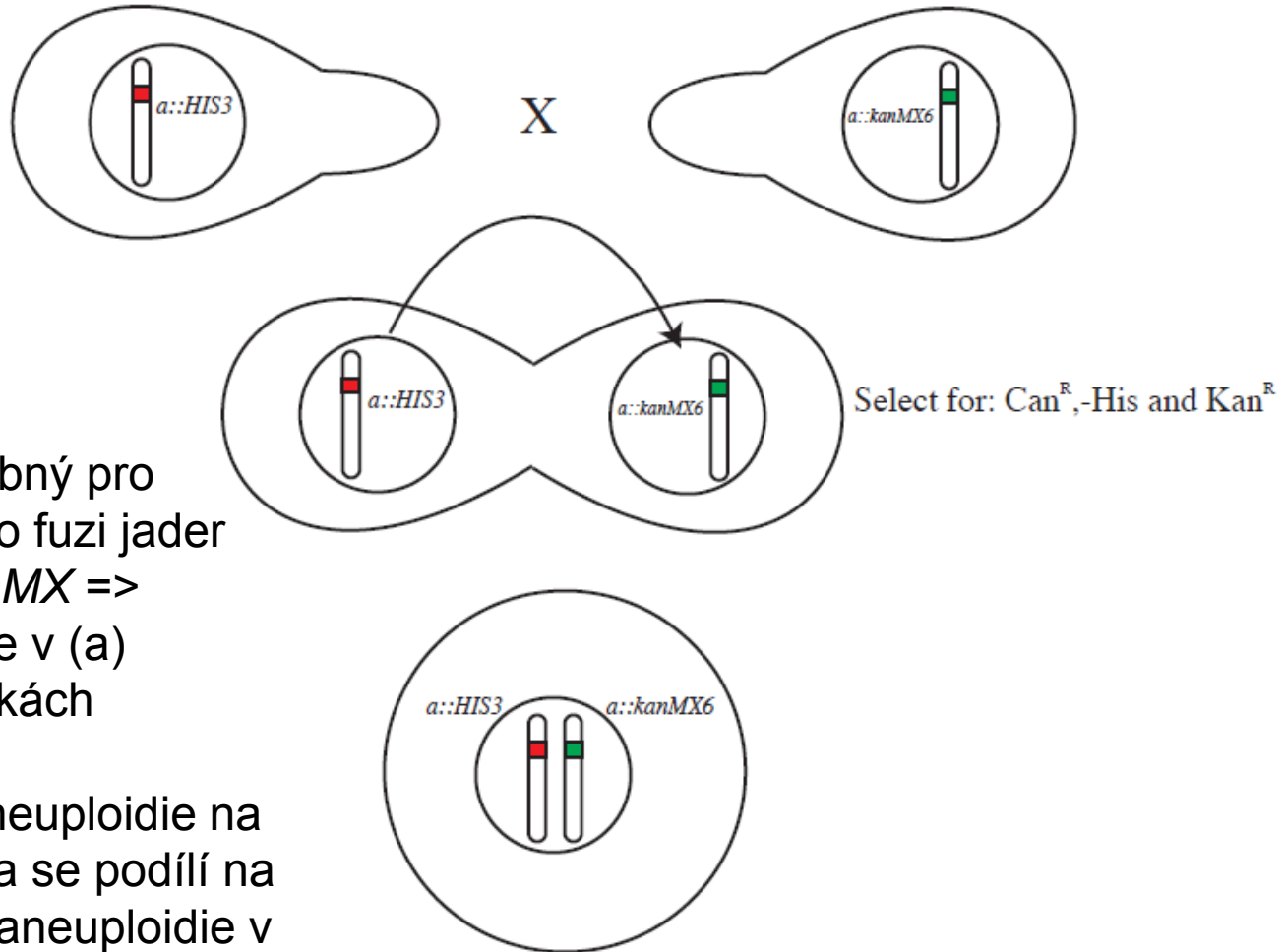
- Bakteriální část – Amp resistance, Ori počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert např. lidská genová banka pro HuGO 80000 klonů YAC (270kbp)
- Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- Výzkum savčích telomer a centromer
- Pomocí transfekce, lipofekce nebo elektroporace lze dostat YAC i do savčích buněk – náhodně se integrují do genomu - výzkum nesestříhnutých genů (dlouhé regulační úseky)



# Příprava aneuploidních buněk

*MAT $\alpha$ , kar1 $\Delta$ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3*

*MAT $\alpha$ , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100*



*KAR1* gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader  
*a::HIS3* + *a::kanMX* => rezistence pouze v (a) haploidních buňkách

Studium vlivu aneuploidie na buňku (u člověka se podílí na kancerogenezi, aneuploidie v 90% lidských nádorů)