

# Souhrn 4. přednášky

- Genetické metody
  - Plasmidy
  - Integrace
  - Tetrádová analýza
  - Syntetická letalita, suprese
  - Teplotně sensitivní mutanty

# Osnova 5. přednášky

- Genetické metody
  - mutageneze/“screen“
  - komplementace
  - identifikace
- Buněčný cyklus
  - Průběh a regulace BC
  - Synchronizace buněk
  - mechanismy regulace párování
  - Homothalické kmeny

## Studium:

- metabolických drah (*URA, GAL ...*)
- ... flokulace, aglutinace (*FLO, AGA ...*)
- ... sekrece, endocytózy, morfogeneze (*SEC, END ... ORB*)
- ... mechanismu párování (*STE ...*)
- ... vlivu záření na buňky ... *rad* mutanty (např. *RAD21, RAD51*)
- ... buněčného cyklu (*CDC ...*)



## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

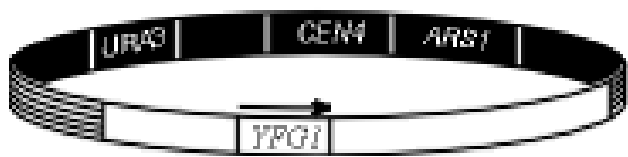
Isolate Ura<sup>+</sup> transformants and score for Yfg<sup>+</sup>



Yfg<sup>+</sup>

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

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (sekvenace genomové kopie – identifikace mutace)

## Mutant Isolation

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



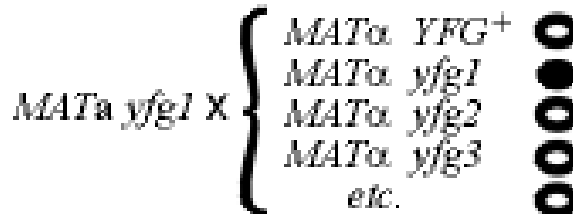
Detection of Yfg<sup>-</sup>



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>



Křížení – ověření - jedna mutace

- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl.)

- epistase – funkční vztah mezi mutantami (dvojitě mut.)

## Meiotic Analysis

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



Isolate a diploid strain and Sporulate



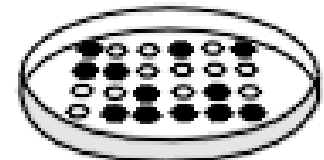
Digest ascus walls



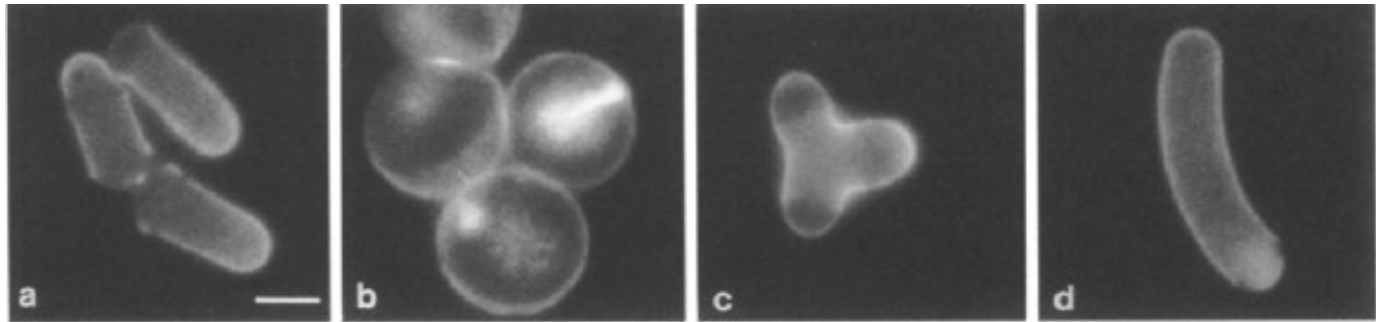
Dissect 4 spores of each tetrad



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



- 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)

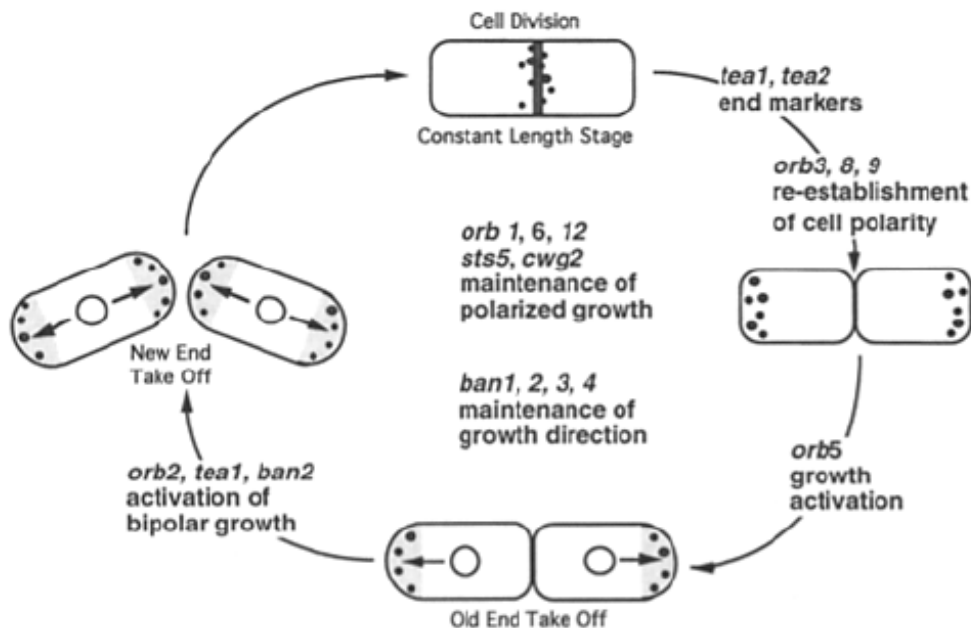


Table I. *orb* Genes

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>ll</sup>	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1</i> <sup>+</sup> , <i>pyp1</i> <sup>+</sup> , <i>ras1</i> <sup>+</sup>

# 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 (např. *CDC28*). Také sledoval citlivost kvasinek na poškození DNA radiací. Zjistil, že BC je při poškození DNA zastaven – aby získal čas na opravu DNA

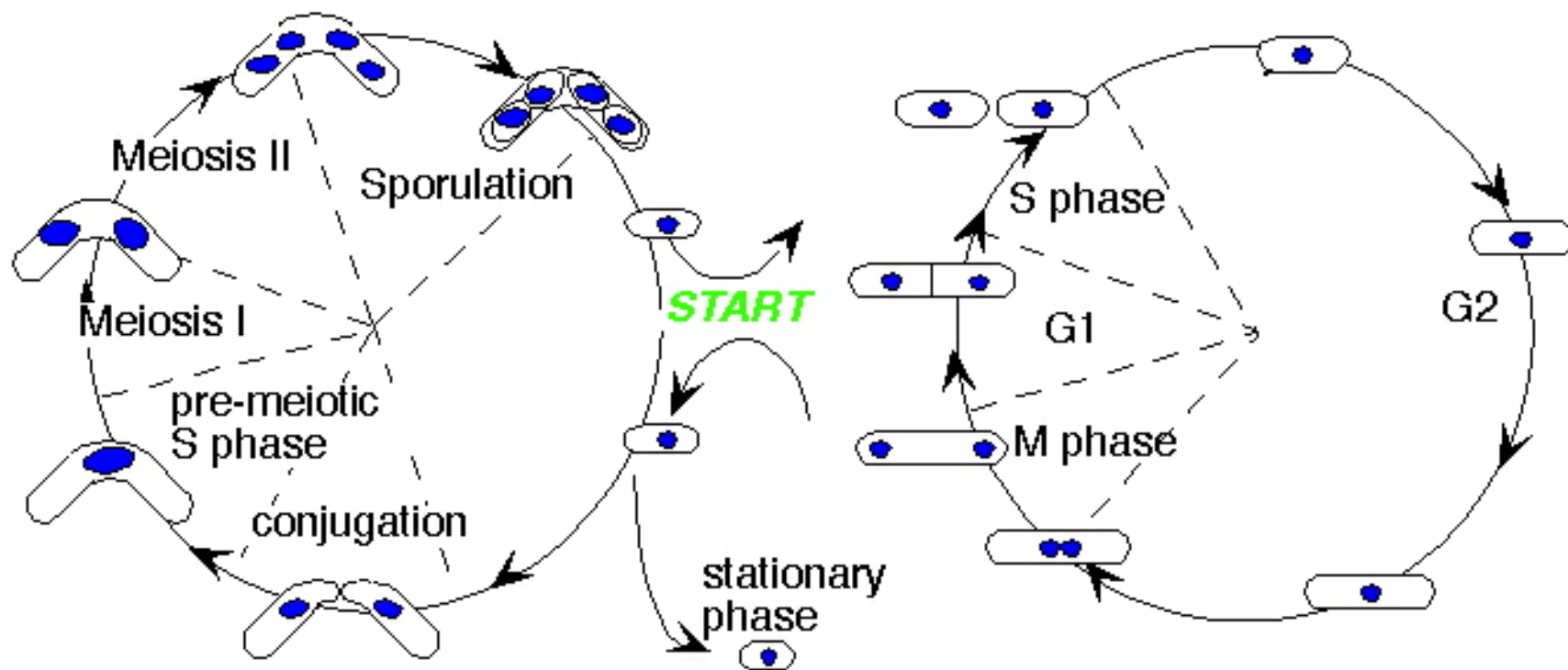
**Paul Nurse** studoval buněčný cyklus na *S. pombe*. V 70. letech objevil gen *cdc2*, který je zodpovědný za regulaci většiny fází BC. V roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



**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.

# 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)

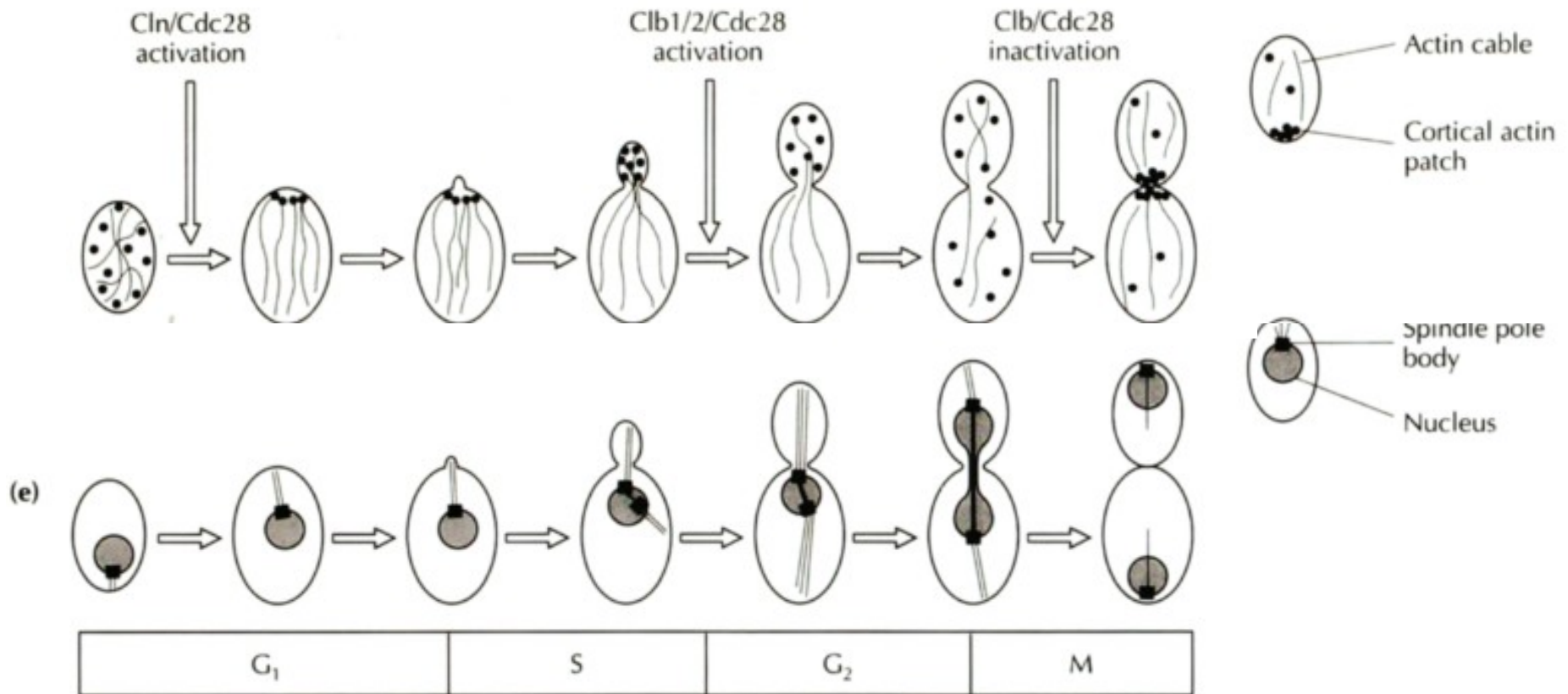


*Meiotic cycle*

*Vegetative (mitotic) cycle*

- nestálé diploidní buňky vstupují do meiosis hned po konjugaci
- pro konjugaci je kritická G1 fáze jako u *S. cerevisiae*

# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*

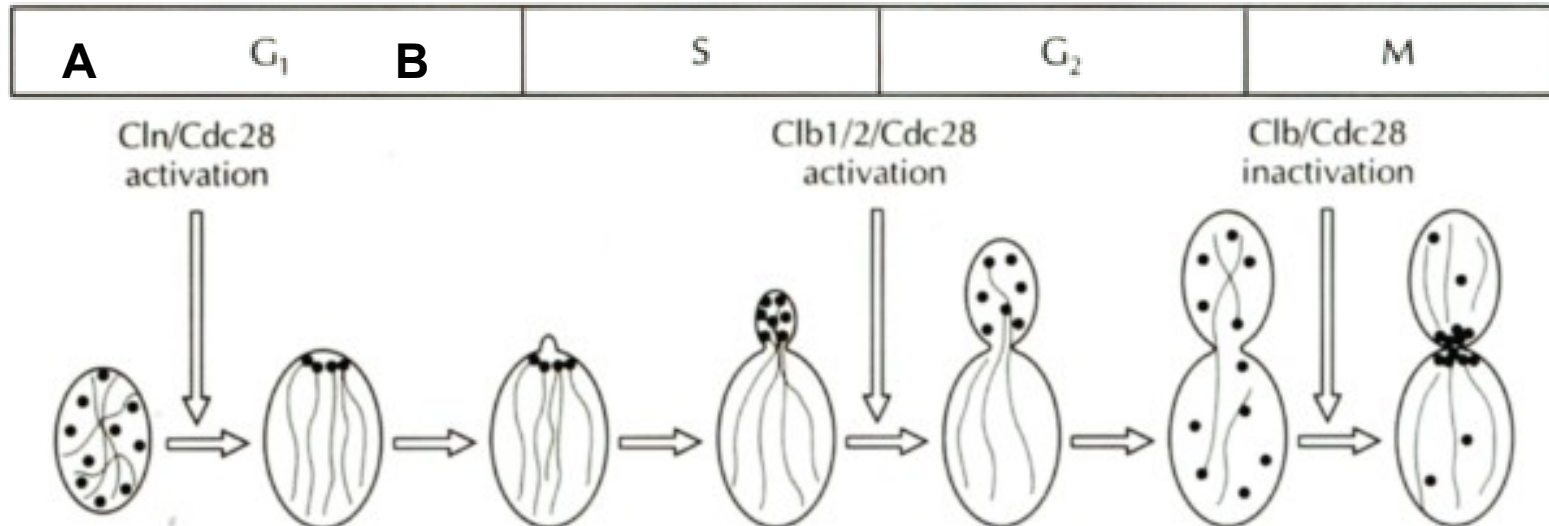


- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G<sub>2</sub> fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G<sub>1</sub>
- Oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G<sub>1</sub> fáze



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

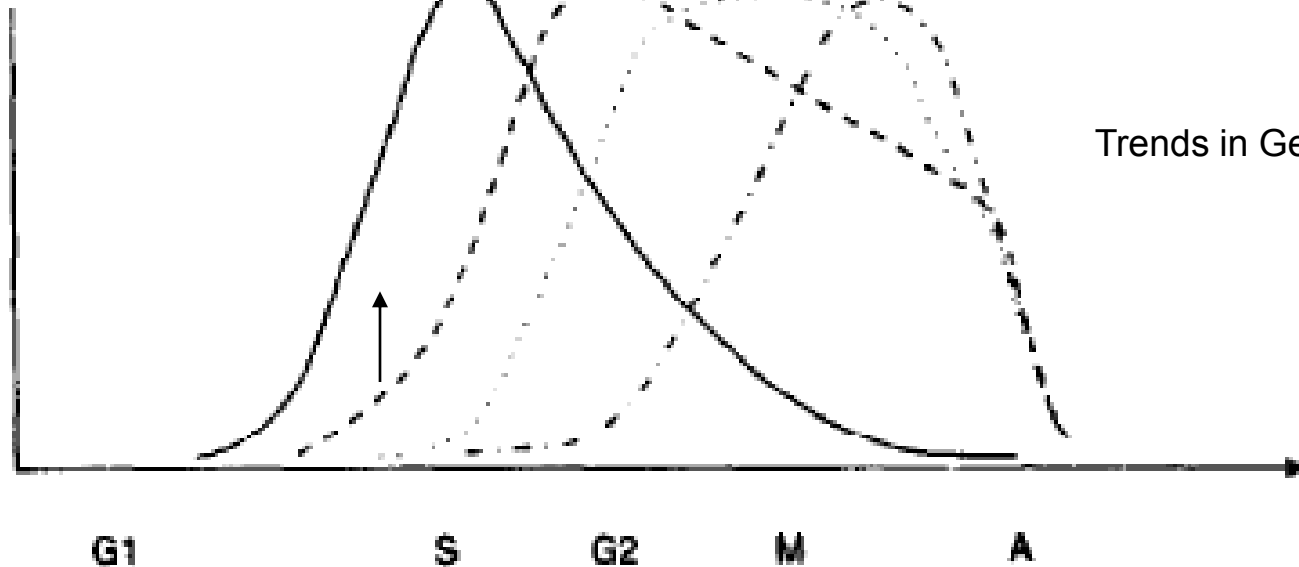
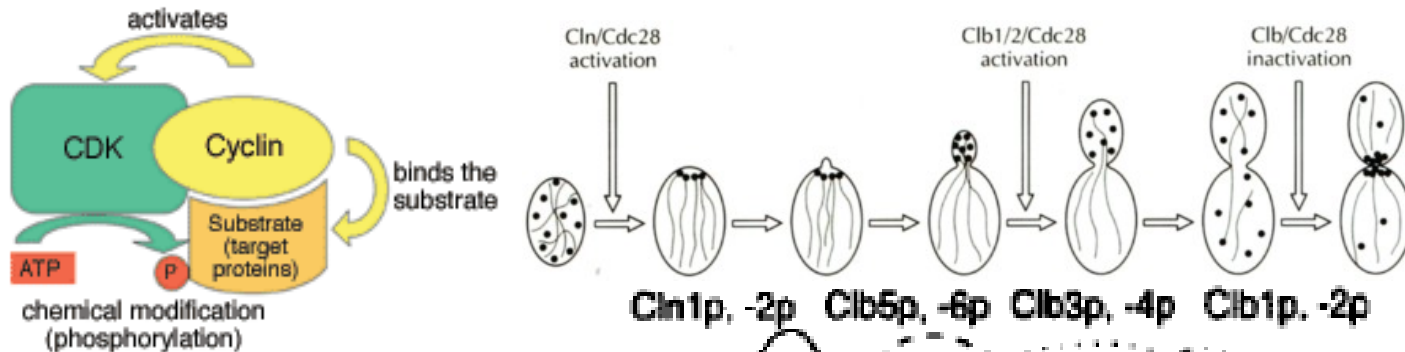
- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
  - haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
  - diploidní buňky (při nedostatku N a C) zastavují v G1 a zahajují sporulaci
  - při vyčerpání živin z média přechází z G1 do stacionární fáze
  - nedostatek 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 (zastavení 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 je klíčový *CDC28* (tj. CDK1) a příslušné cykliny



# CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

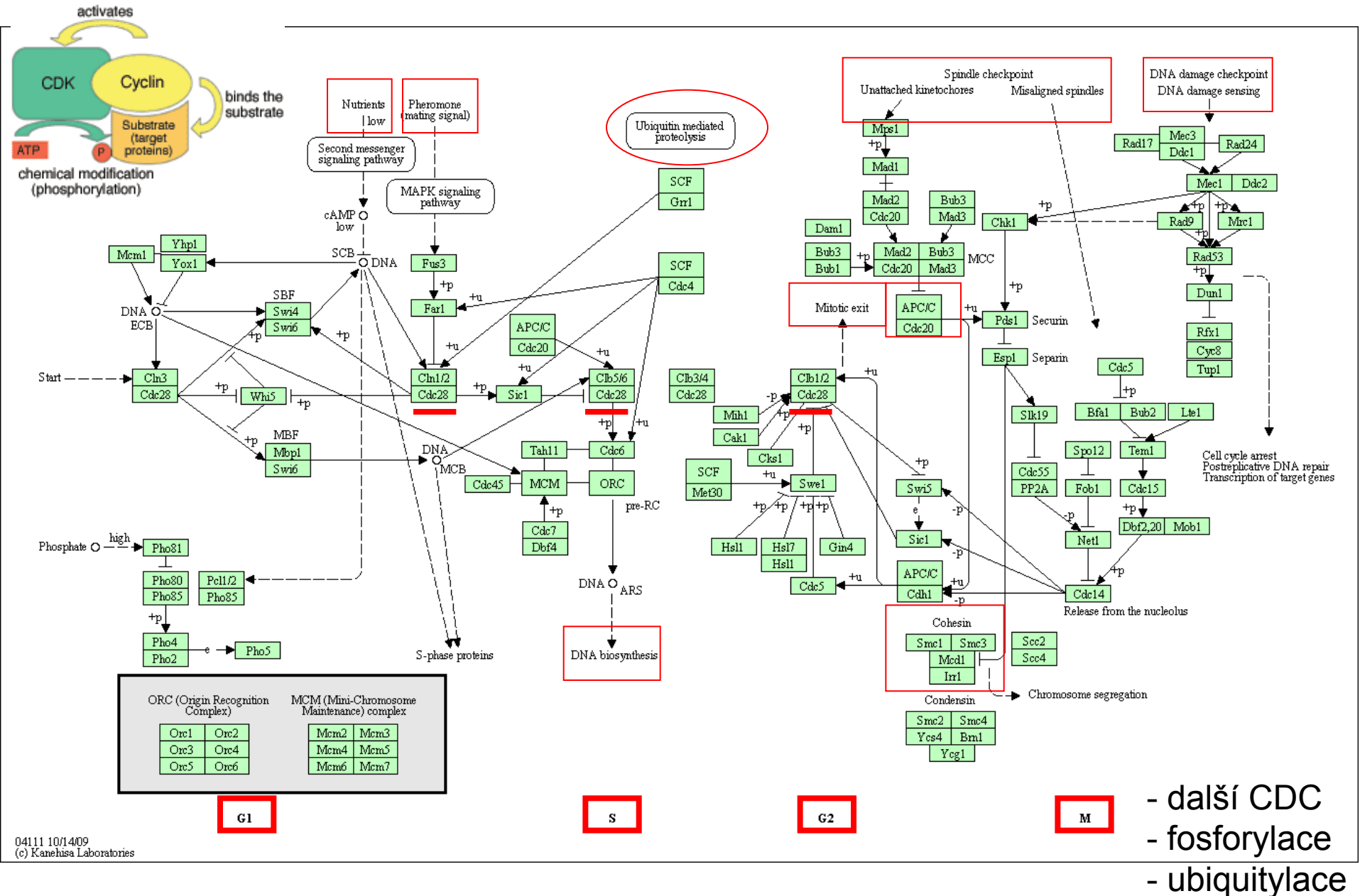
Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká aktivní komplex:

- 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* a jejich degradace



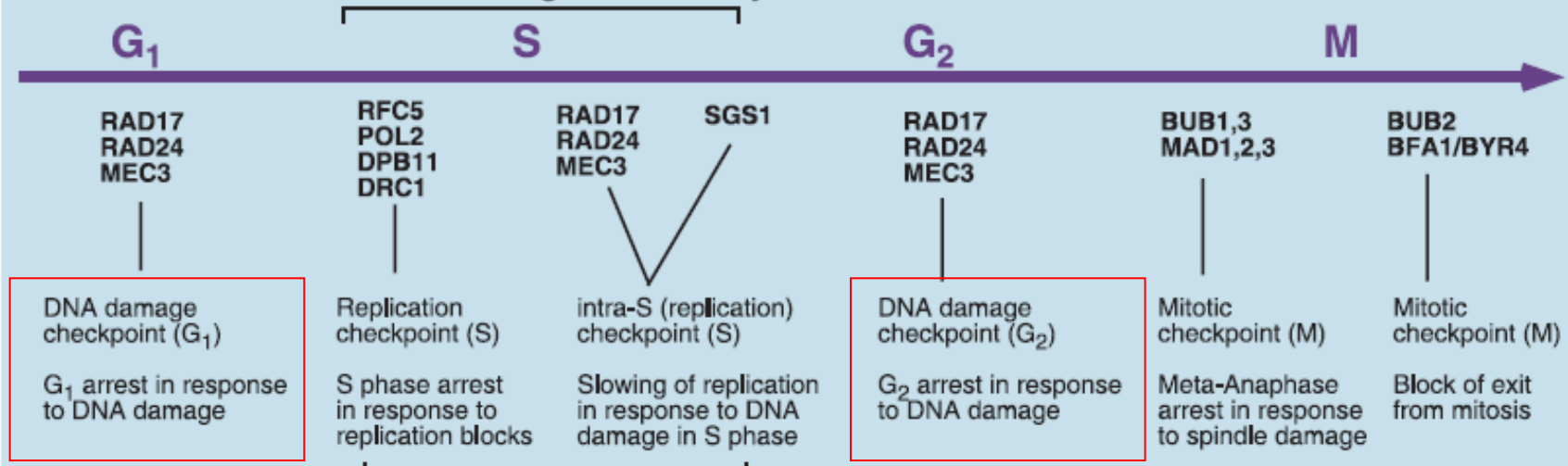
Trends in Genet 12 (1998)

# Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



- další CDC  
 - fosforylace  
 - ubiquitylace

Maintenance of genome stability



DNA damage checkpoint (G<sub>1</sub>)  
G<sub>1</sub> arrest in response to DNA damage

DNA damage checkpoint (G<sub>2</sub>)  
G<sub>2</sub> arrest in response to DNA damage

Transducer and effector functions

- MEC1
- TEL1
- MRE11-RAD50-XRS2
- RAD9
- RAD53
- DUN1
- RAD55
- PDS1

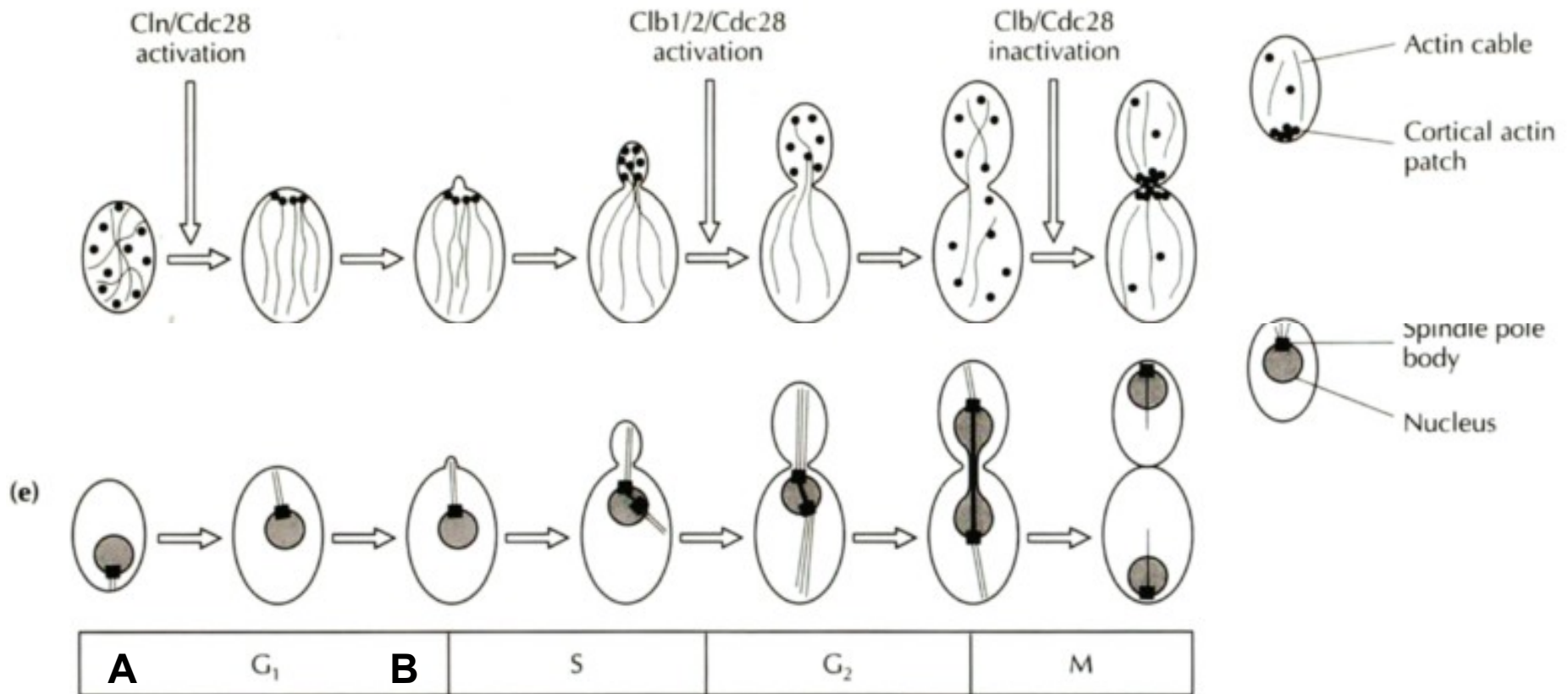
Human homologs		
Yeast	Human	Cancer syndrome
MEC1/TEL1	ATR/ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11	MRE11	Ataxia telangiectasia-like disorder
XRS2	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
RAD53/DUN1	hCHK2	Li-Fraumeni syndrome
SGS1	BLM/WRN/RTS	Bloom, Werner & Rothmund-Thomson syndromes

Kolodner et al, Science (2002)

Checkpoints slouží buňce ke kontrole úplnosti či správnosti průběhu určité části buněčného cyklu či procesu – např. buňka nemůže nechat neopravené dvouřetězcové zlomy DNA nebo jiná poškození DNA (podle fáze buněčného cyklu opravuje různými mechanismy)

- Více v dalších přednáškách

# Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



tzv. **G<sub>0</sub> synchronizace**

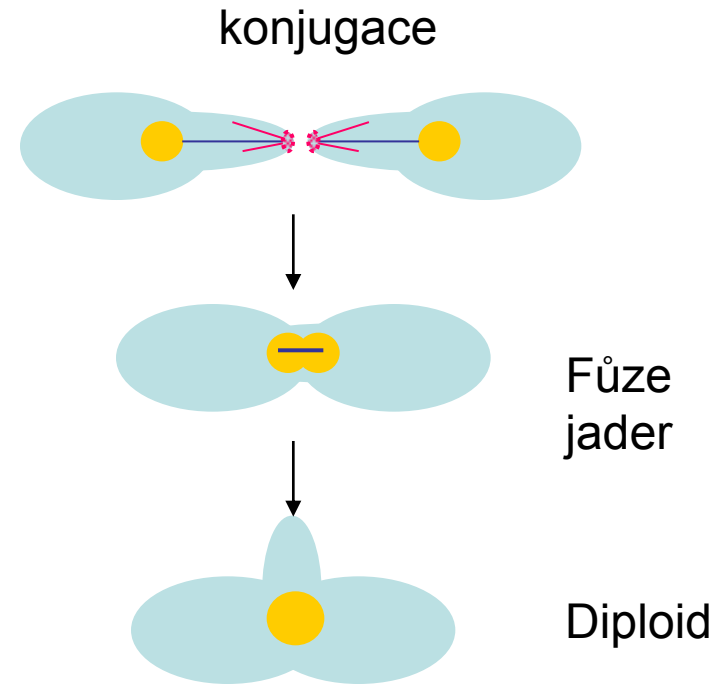
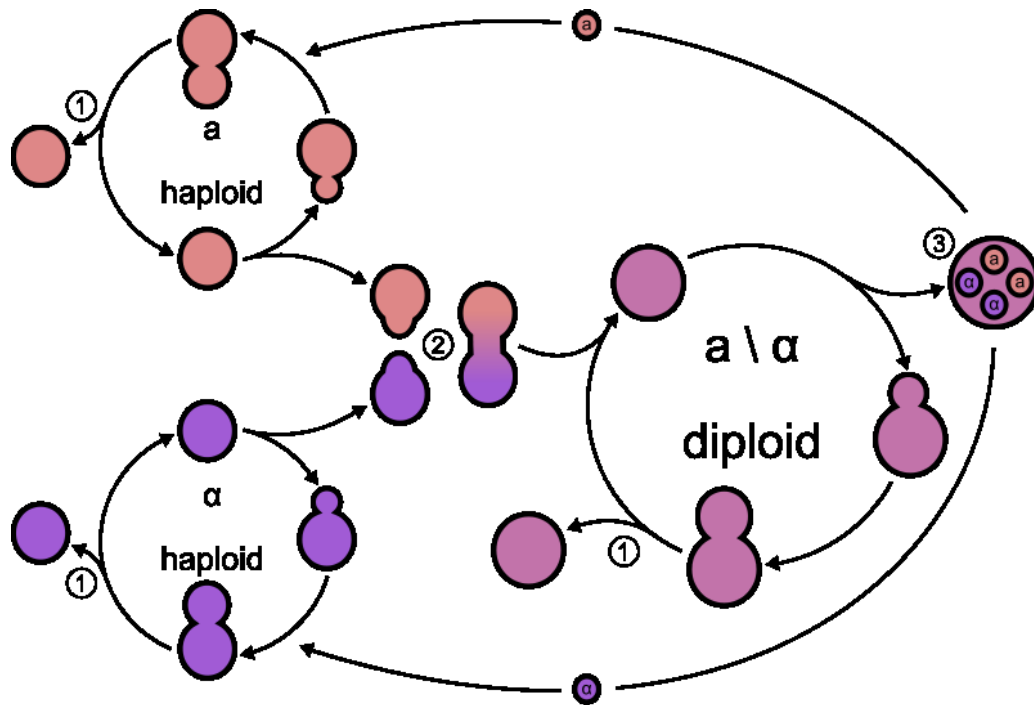
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci - za přítomnosti alfa-faktoru dochází k zastavení buněčného cyklu – **G<sub>1</sub> synchronizace**

- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

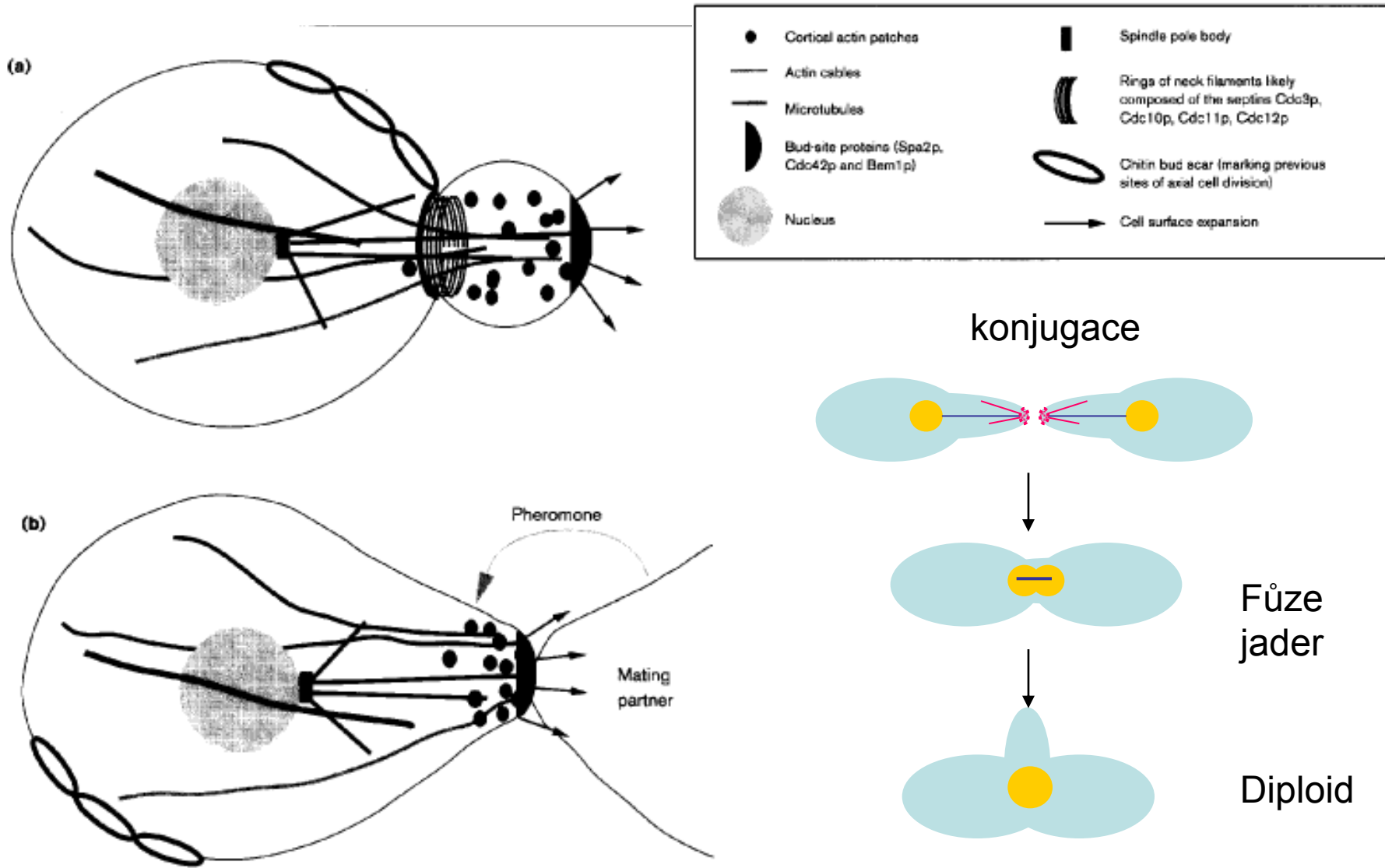
- nocodazol blokuje polymeraci tubulinu – schází mikrotubuly pro mitózu – **G<sub>2</sub> synchronizace**

- ts mutanty různých *CDC* genů – různé fáze buněčného cyklu

# Životní cyklus *S. cerevisiae*



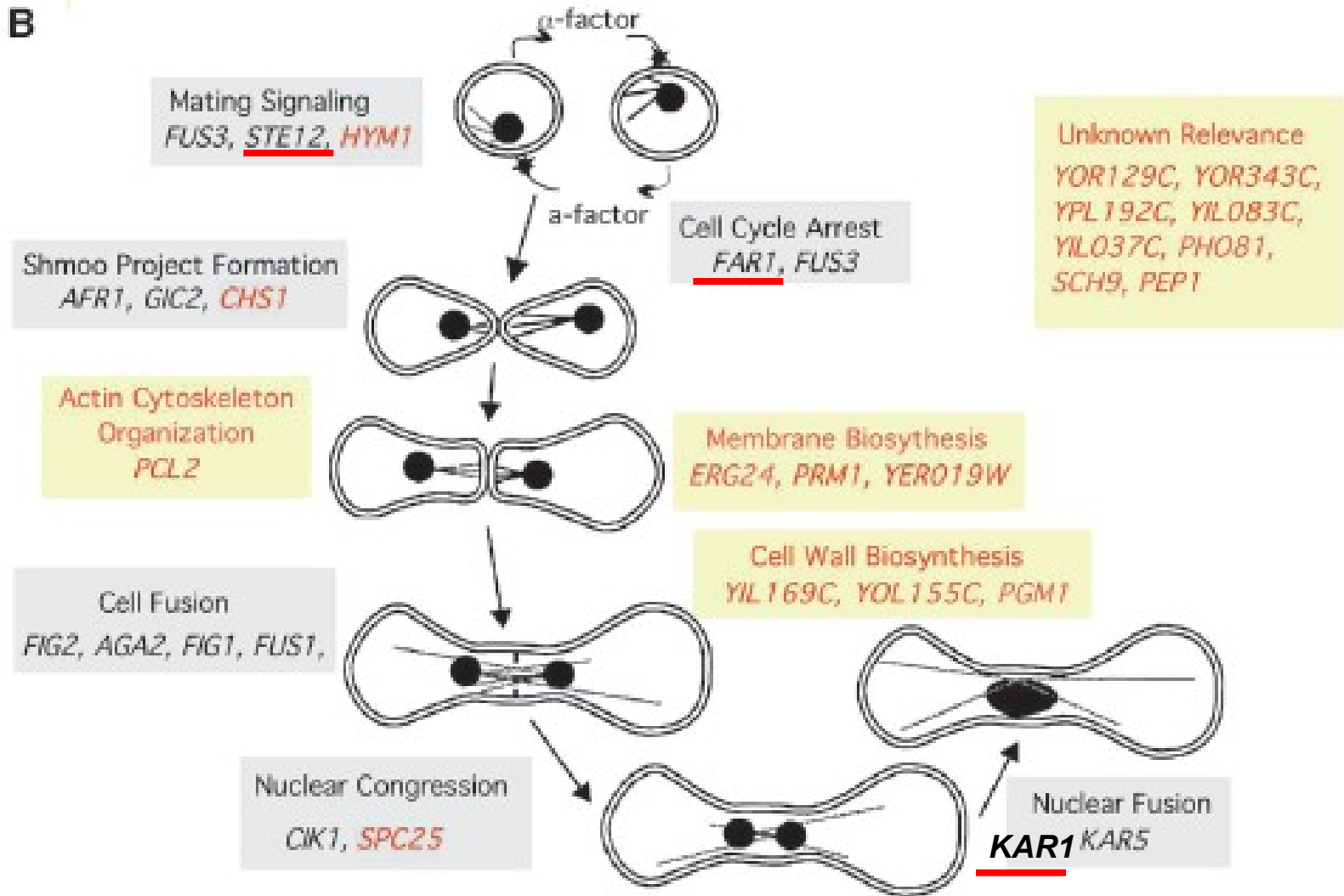
# Párování *S. cerevisiae*



Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

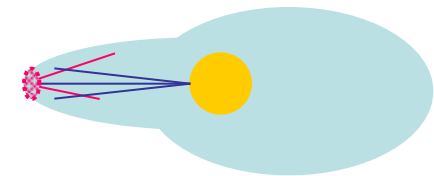
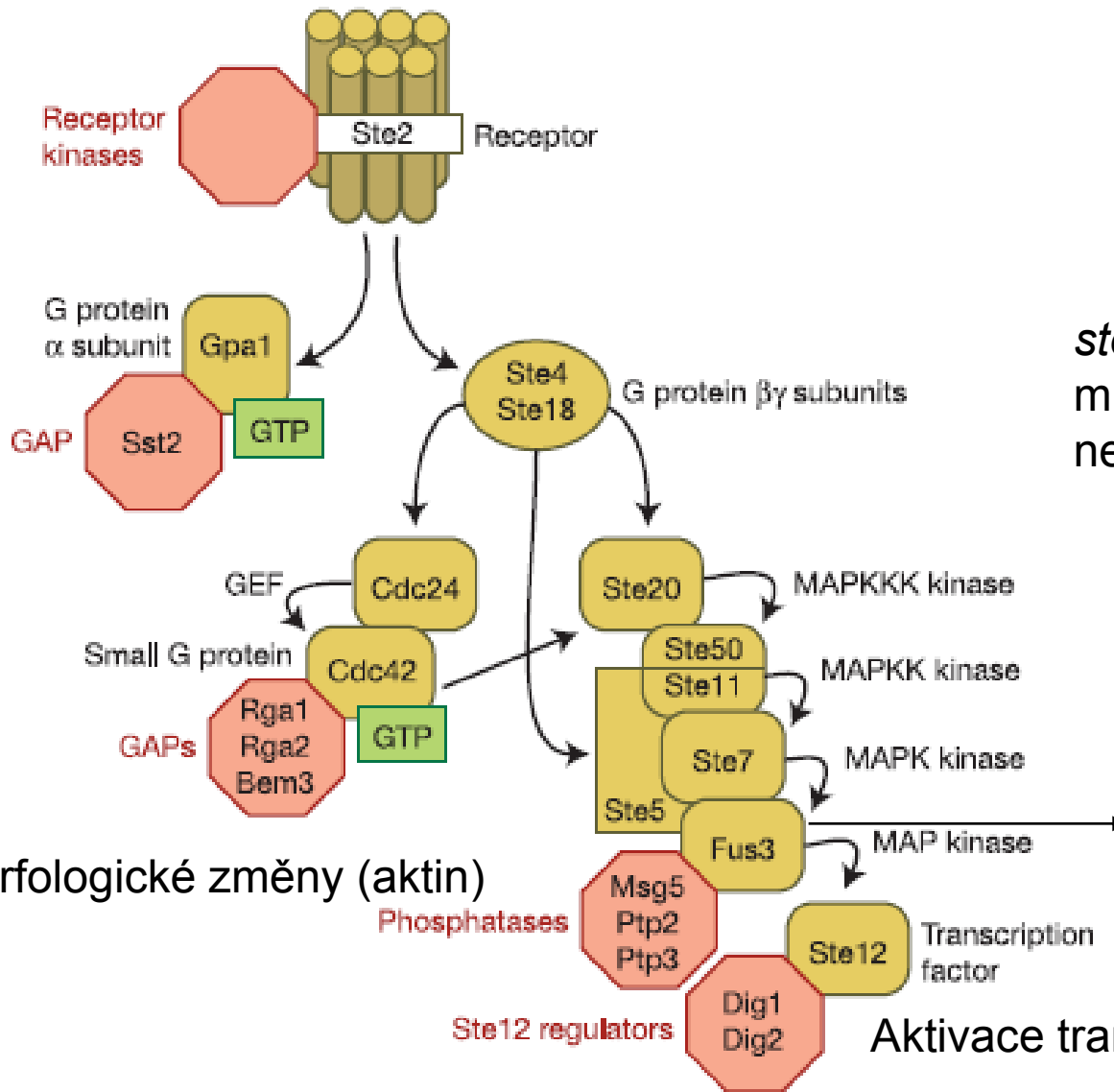
Vybudování buněčné stěny přemostující „shmoo“ výběžky

# Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu





# Signální dráha – $\alpha$ faktor



*ste* mutanty (získané mutagenézí) – sterilní, neschopné párování

# Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

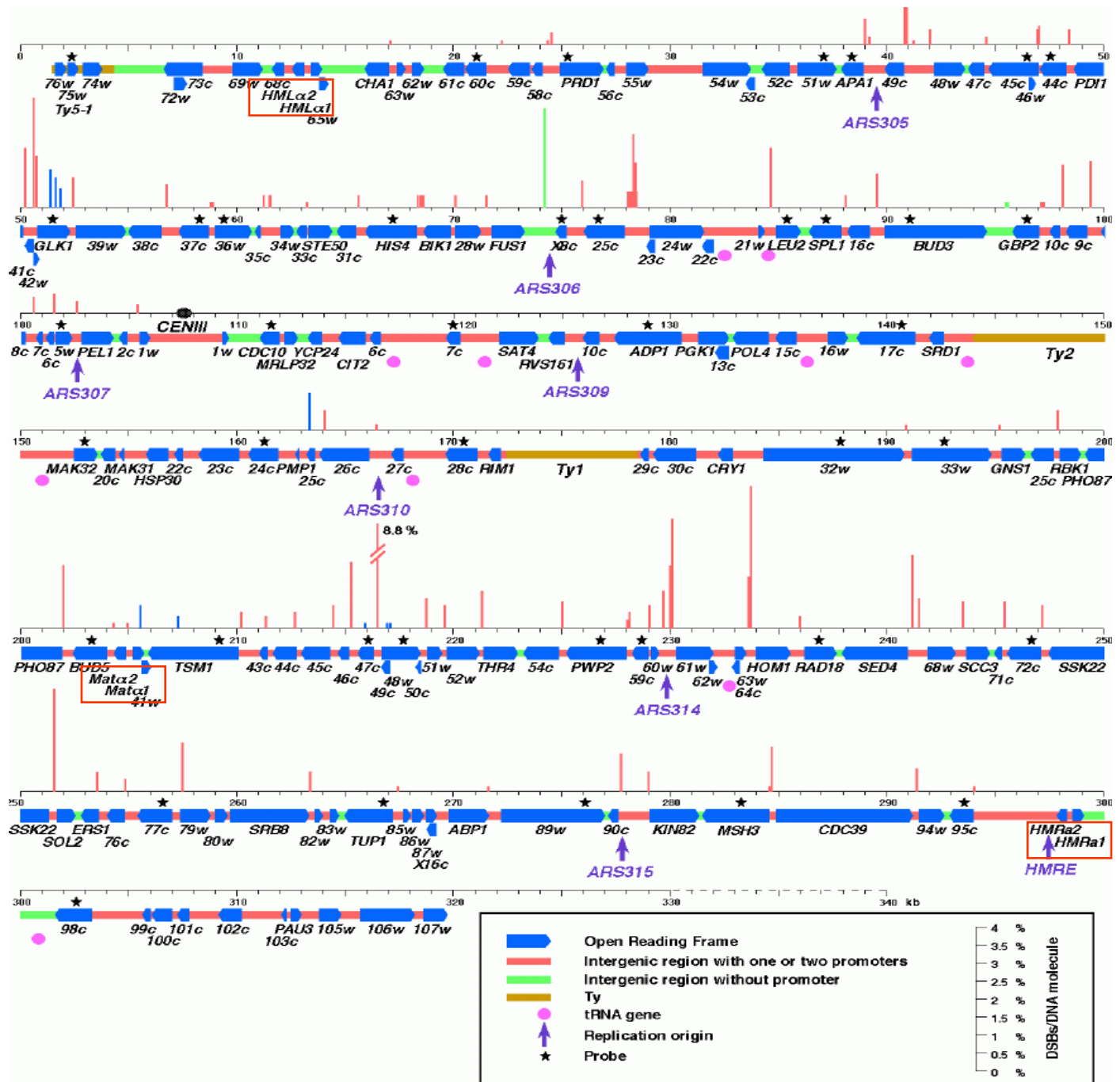
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT  $\alpha$  (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

Co  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2 + \alpha 1$ ,  $\alpha 2$  kódují? (transkripční faktory)

HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické – stabilní  
Homothalické – přepínají párovací typ



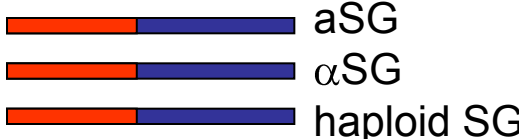
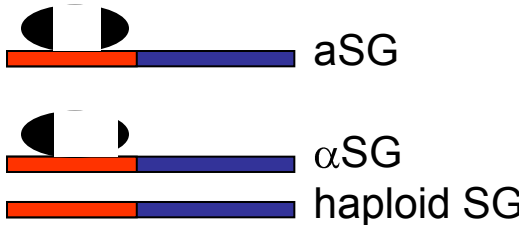
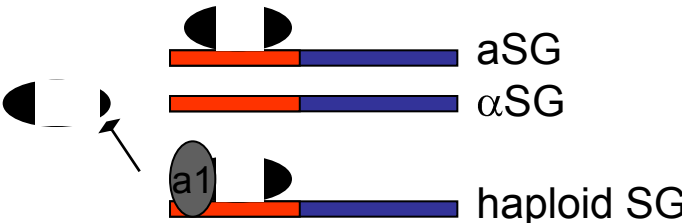
# Regulace transkripce v haploidních buňkách

a1, a2 +  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 kódují transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

a-spec.= *MFA*1,2 (a-feromon), *STE*2 ( $\alpha$ -receptor), *STE*6, 14 (úprava a sekrece feromonu)

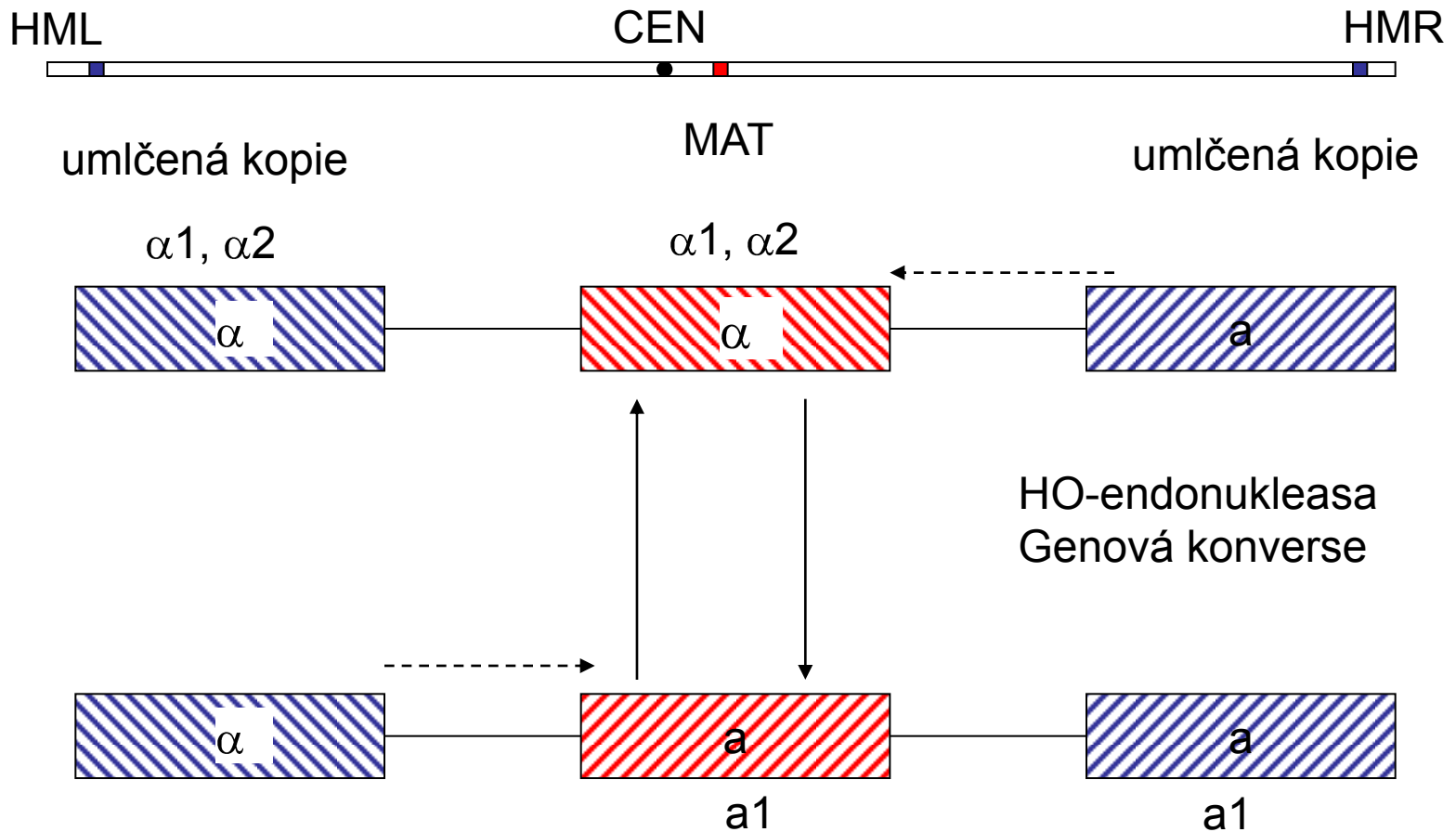
$\alpha$ -spec.= *MF* $\alpha$ 1,2 ( $\alpha$ -feromon), *STE*3 (a-receptor), *STE*13, *KEX*2 (proteasy)

haploid spec.= *STE*4,18 (podjednotky G-proteinu), *RME*1 (inhibitor meiosis)

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	
$\alpha$ 1, $\alpha$ 2	$\alpha$ haploid	
$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a1, a2	diploid	

# Přepínání párovacího typu

Chromosom III



HO endonukleasa rozeznává a štípe specifické sekvence

Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

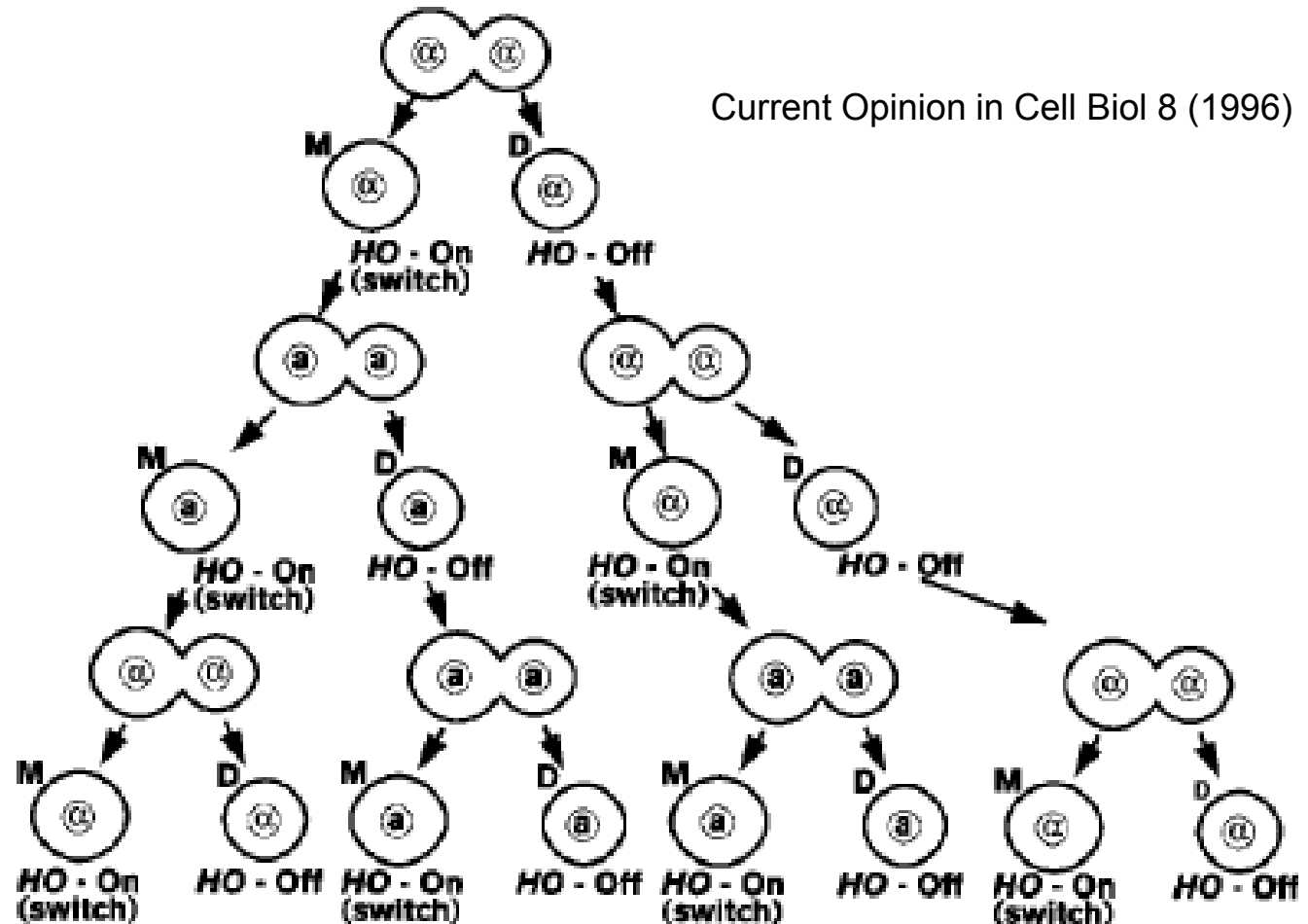
# Přepínání párovacího typu

DNA z MAT lokusu je HO endonukleasou vystřižena a na její místo se překopíruje sekvence z kazety opačného páru

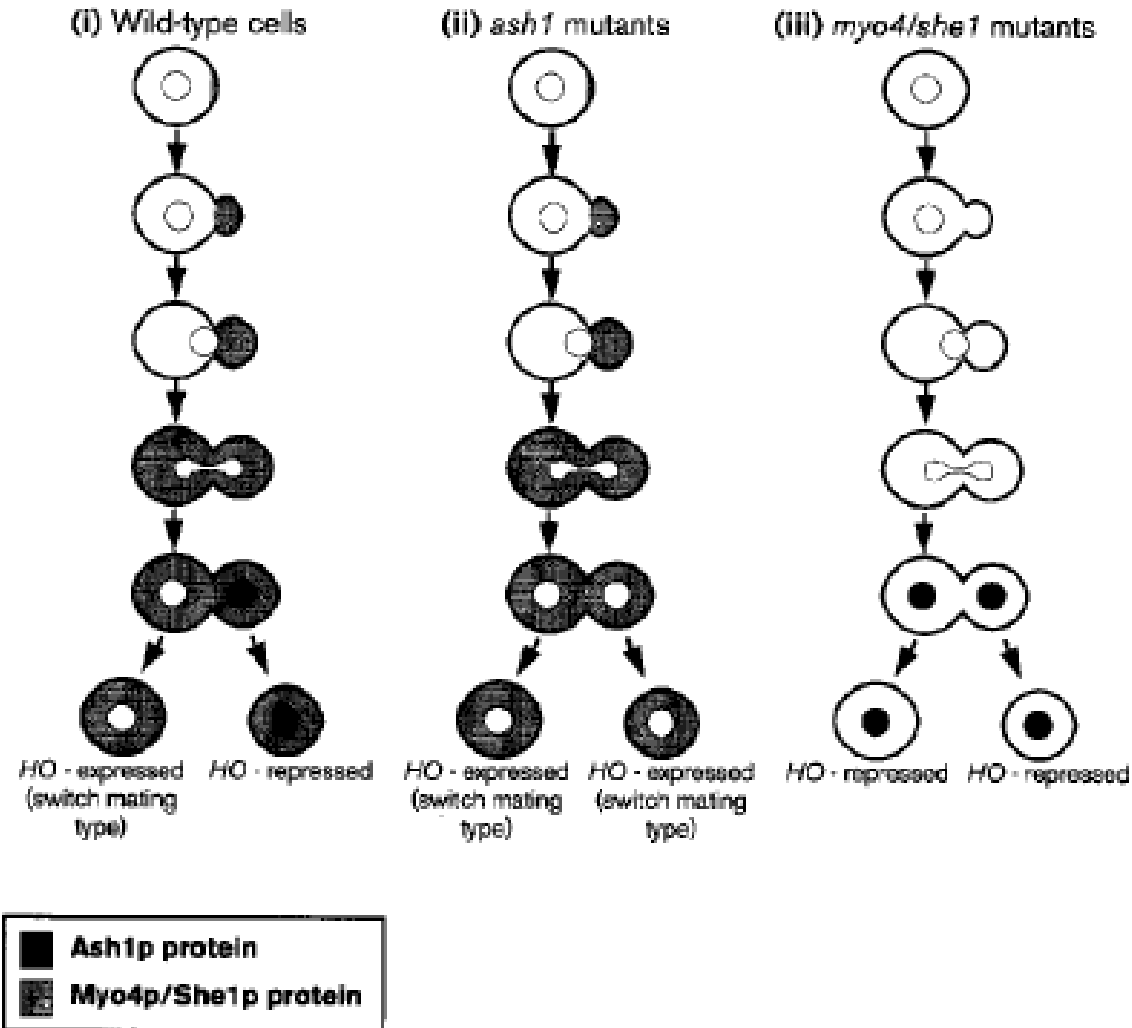
- HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Current Opinion in Cell Biol 8 (1996)

homothalické



# Asymetrická lokalizace Ash1p



- Ash1p represor je asymetricky lokalizován do dceřiné buňky, kde blokuje transkripci *HO*-endonukleasy

- Není do ní sekretován, ale dochází k expresi (translaci) asymetricky lokalizované mRNA

- (translace RNA na specializovaných ribozomech asociovaných s cytoskeletem