

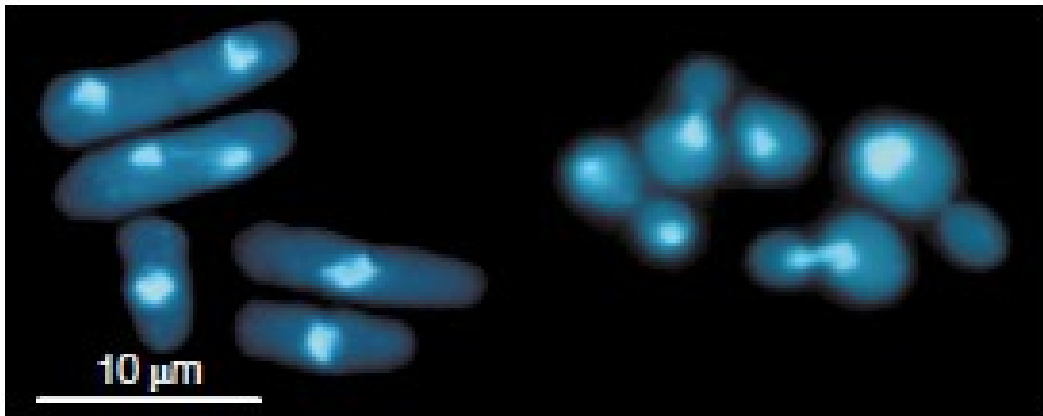
# Souhrn 3. přednášky

- Diagnostické metody
- Analytické metody



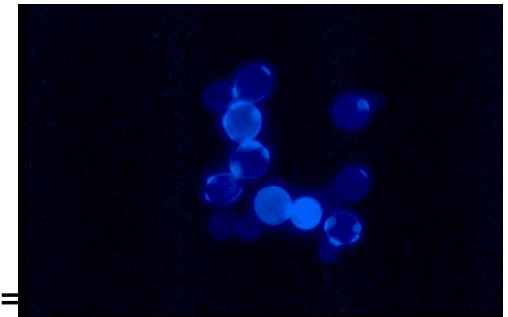
# Osnova 4. přednášky

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



# 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 (např. aktinový cytoskelet = phalloidin, buněčná stěna = + GFP *in vivo*)
- Techniky synchronizace buněk
- 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)



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  
*leu2Δ* – delece  
*leu2-1* – mutance  
(identifikační číslo alely)  
*LEU2::HIS3* – inzerce  
*HIS3* genu v lokusu  
*LEU2*

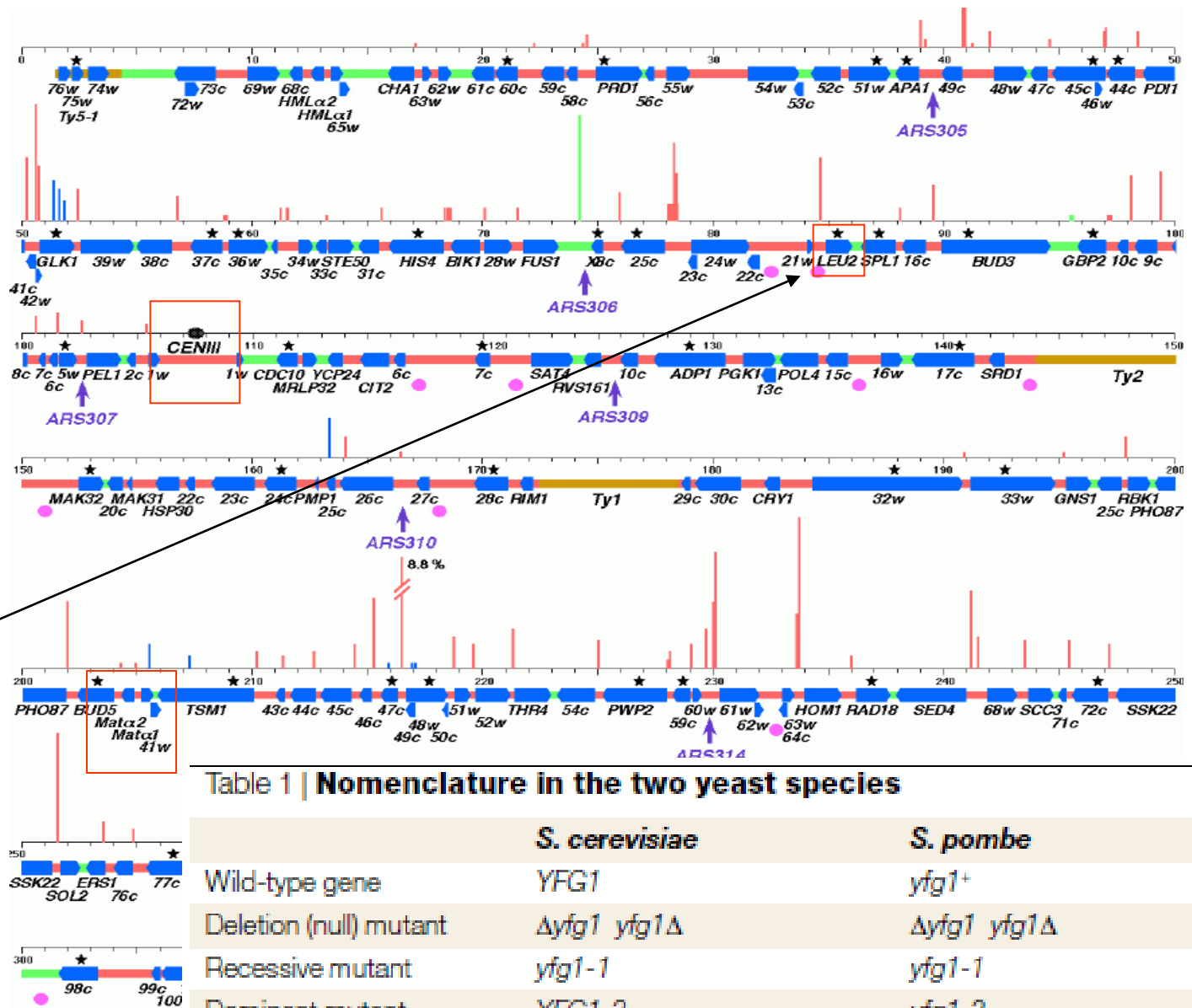


Table 1 | Nomenclature in the two yeast species

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Wild-type gene	<i>YFG1</i>	<i>yfg1<sup>+</sup></i>
Deletion (null) mutant	$\Delta yfg1$ <i>yfg1Δ</i>	$\Delta yfg1$ <i>yfg1Δ</i>
Recessive mutant	<i>yfg1-1</i>	<i>yfg1-1</i>
Dominant mutant	<i>YFG1-2</i>	<i>yfg1-2</i>
Protein	Yfg1 YFG1p	Yfg1 yfg1p

Yfg typically means 'your favourite gene'. The 'p' designation for proteins (for example, Yfg1p) is occasionally used. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

# Laboratorní kvasinkové kmeny

**S. pombe – „501“**

**Genotype:** *h- ura4-Δ18 leu1-32 ade6-704*



IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

**S. Cerevisiae – „S288C“ – 1. osekvenovaný kmen**

**Genotype:** *MATα 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:** *MATa/MATα 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.

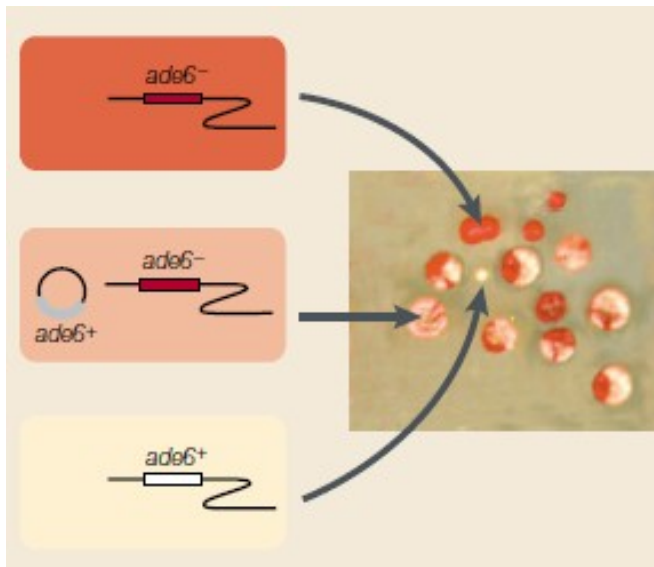
**References:** W303 constructed by Rodney Rothstein

**Sources:** [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní  
systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-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<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-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, cyh<sup>r</sup>2, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3 :: GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

Allele	Reverts?	Notes	Molecular description <sup>a</sup>	Reference
<a href="#">ade2-101</a>	yes	ochre mutation, <b>red colonies</b>	G to T transversion at nucleotide 190, changing amino acid 64 from a Glu to a <b>STOP</b>	<a href="#">Gai and Voytas, 2005</a>
<a href="#">his3-200</a>	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during transformation.	1 kb <b>deletion</b> , (-205 to 835)	<a href="#">Struhl 1985</a> ; <a href="#">Fasullo and Davis 1988</a>
<a href="#">leu2-3,112</a>	no	double mutant	GTT-to-GCT missense change at codon 69, G insertion at nucleotide 249, G insertion at nucleotide 792, GAC-to-AAC missense change at codon 300.	<a href="#">Hinnen et al. 1978</a> ; <a href="#">Gaber and Culbertson 1982</a> ;
<a href="#">trp1-1</a>	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber ( <b>STOP</b> ) nonsense change at codon 83	<a href="#">McDonald, et al. 1997</a>
<a href="#">ura3-52</a>	no	-	<b>Ty1 insertion</b>	<a href="#">Rose and Winston 1984</a>



## Genotype

*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*,  
*gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*,  
*GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*,  
*URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

*MATα*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*,  
*leu2-3, 112*, *gal4Δ*, *met-*, *gal80Δ*,  
*URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

*MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*,  
*trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh<sup>r</sup>2*,  
*LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*,  
*URA3 :: GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-lacZ*

## References

James et al., 1996;  
A. Holtz, unpublished

Harper et al., 1993

Feilotter et al., 1994;  
C. Giroux, pers. comm.

# Selekce

Table 2 | **Corresponding tools in the two yeast species**

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
<b>Regulated promoter</b>	<i>GAL</i> (galactose regulated)	<i>nmt</i> (thiamine regulated)
<b>Plasmid replication origins</b>	<i>ARS1</i> or $2\mu$	<i>ars1</i>
<b>Auxotrophic markers</b>		
Uracil, orotidine 5'-phosphate decarboxylase Select against with 5-FOA	<i>URA3</i>	<i>ura4<sup>+</sup></i>
Leucine, $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase	<i>LEU2</i>	<i>leu1<sup>+</sup></i>
Adenine, phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase Accumulates red colour	<i>ADE2</i>	<i>ade6<sup>+</sup></i>

$2\mu$  (2 micron), an endogenous plasmid DNA molecule found in some yeast cells, with a circumference of  $2\mu$ ; 5-FOA, 5'-fluoro-orotic acid. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

Forsburg: NRG, 2001

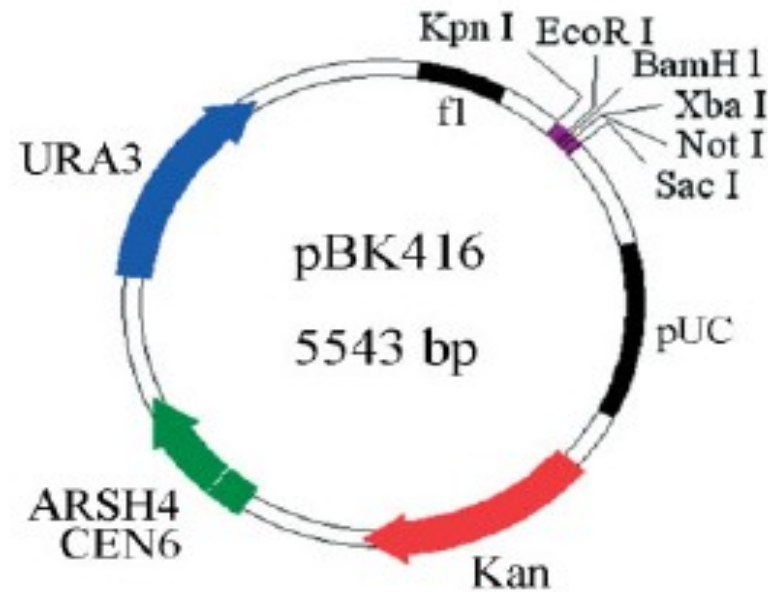
- **geneticin** (G418) – podobný kanamycinu (mistranslace)
- **nourseothricin** (NAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje NAT)
- **hygromycin B** – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygrosopicus*), rezistence kódována *hph* genem z *Klebsiella pneumoniae*
- **phleomycin** – interkaluje se do DNA a způsobuje DSB (zlomy, glycopeptid z *Streptomyces verticulus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*



# 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, NAT ...), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 $\mu$ m (~50 kopií na haploidní buňku) začátek replikace
- Bakteriální část – Kan resistance, replikace
- Promotor, tag, MCS
  - Kondicionální mutanty (fenotyp-funkce)
  - Nadprodukce (suprese mutací nebo toxicita)

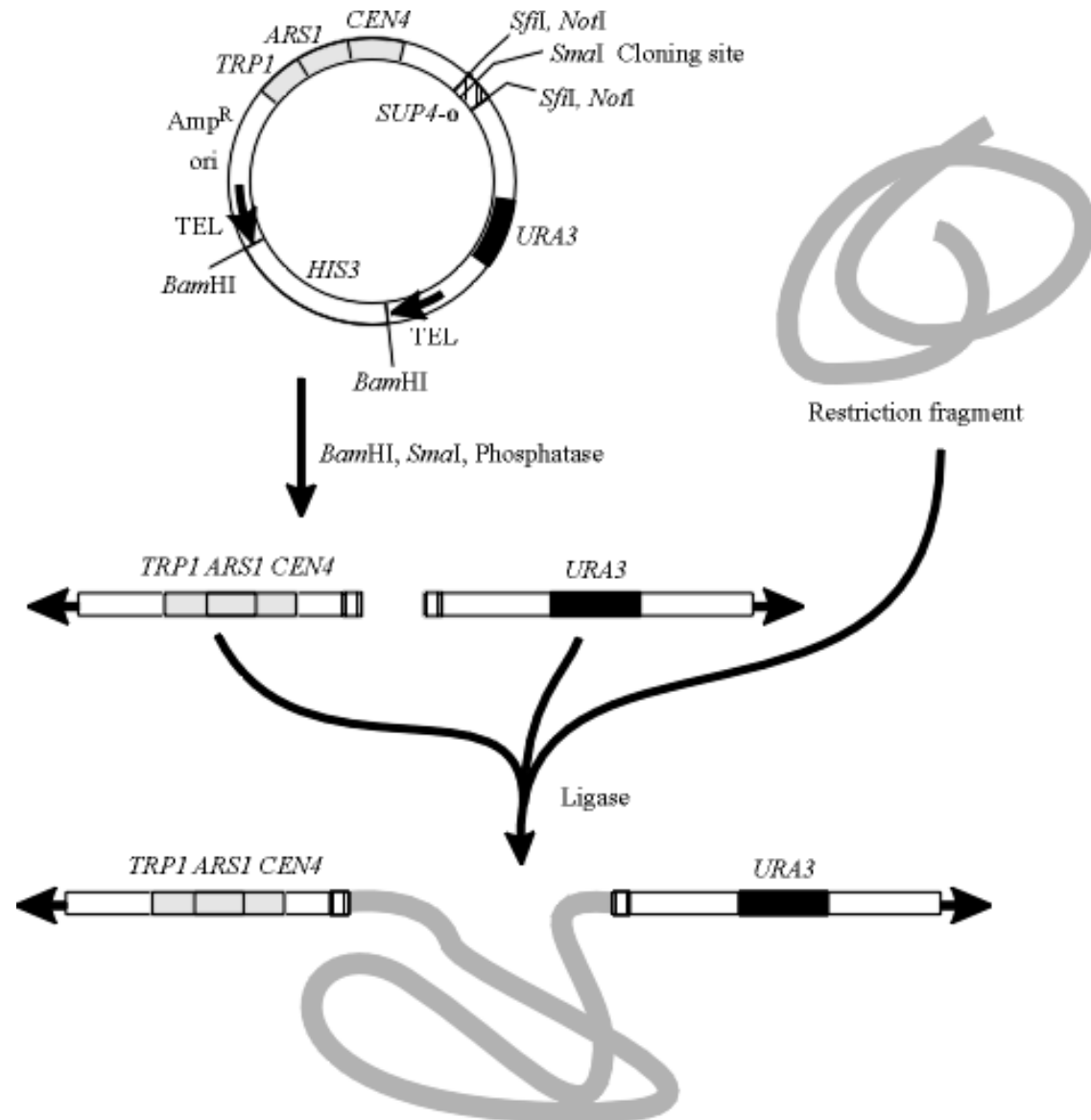
Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot <sup>b</sup>
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) <sup>c</sup>	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not detectable)
<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	
<i>CUP1</i>	Indukovaný mědí	
<i>MFA1</i>	MATa specifický (haploid specifický)	





# YAC (yeast artificial chromosome)

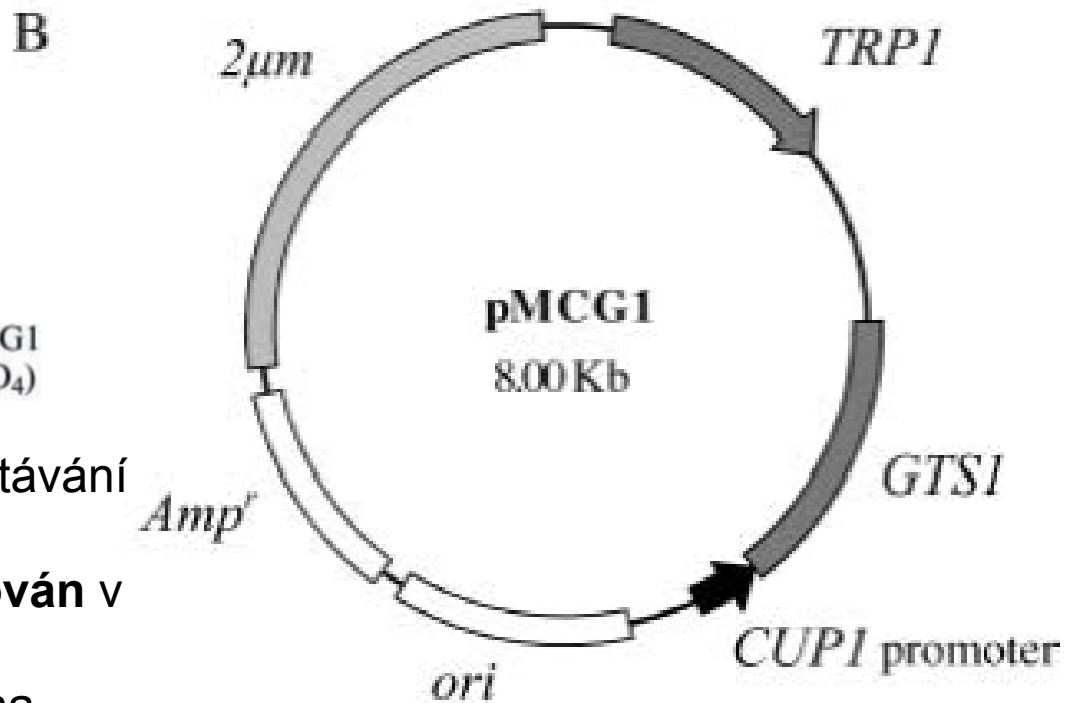
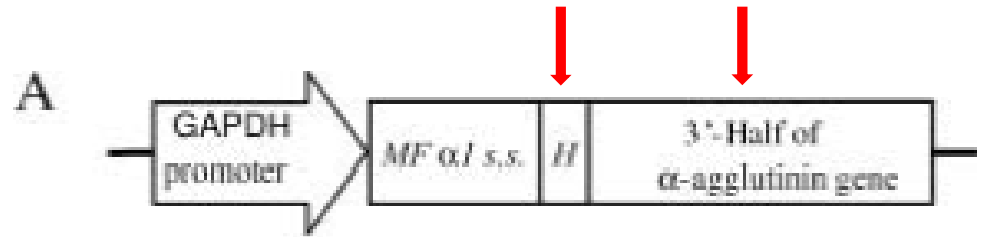
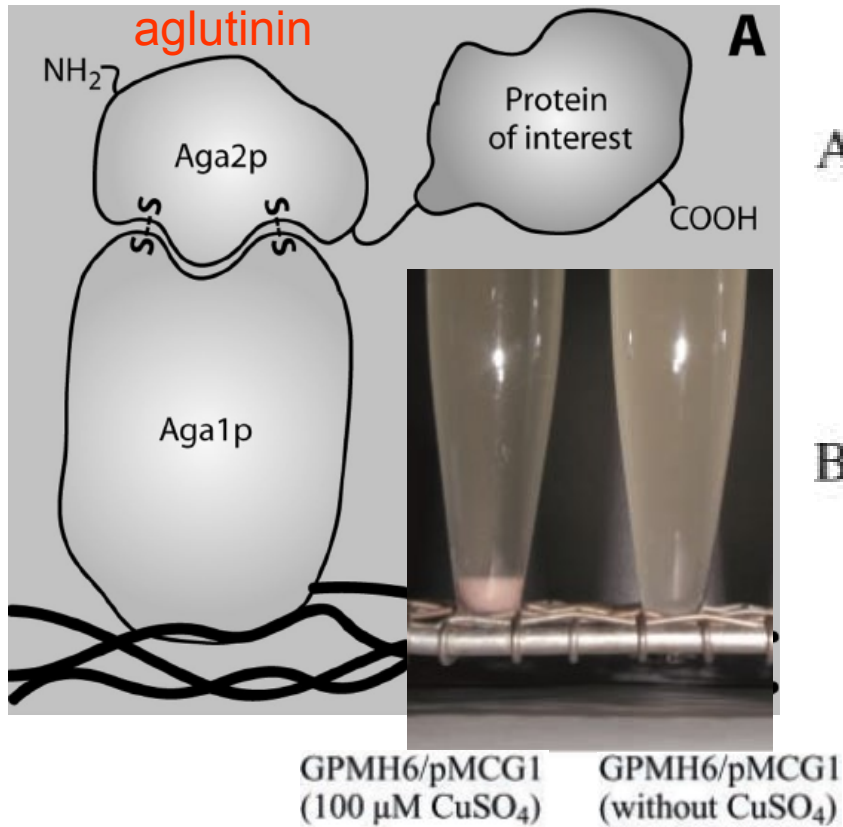
- Bakteriální část – Amp resistance, počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert např. lidská genová banka pro HuGO 80000 klonů YAC (270kbp)
- Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- Výzkum savčích telomer a centromer
- Pomocí transfekce, lipofekce nebo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



# Transformační protokol

- Exponenciální kultura
- Opláchnout vodou a TE/LiAc roztokem
- Rozsuspendovat v TE/LiAc roztoku a přidat DNA (plasmidová/cirkulární i lineární DNA)
- Přidat TE/LiAc/PEG4000 roztok
- 30 minut na 30°C a poté teplotní šok při 42°C (15min)
- Stočit a pelet rozsuspendovat v TE roztoku
- Rozetřít na selektivní plotnu

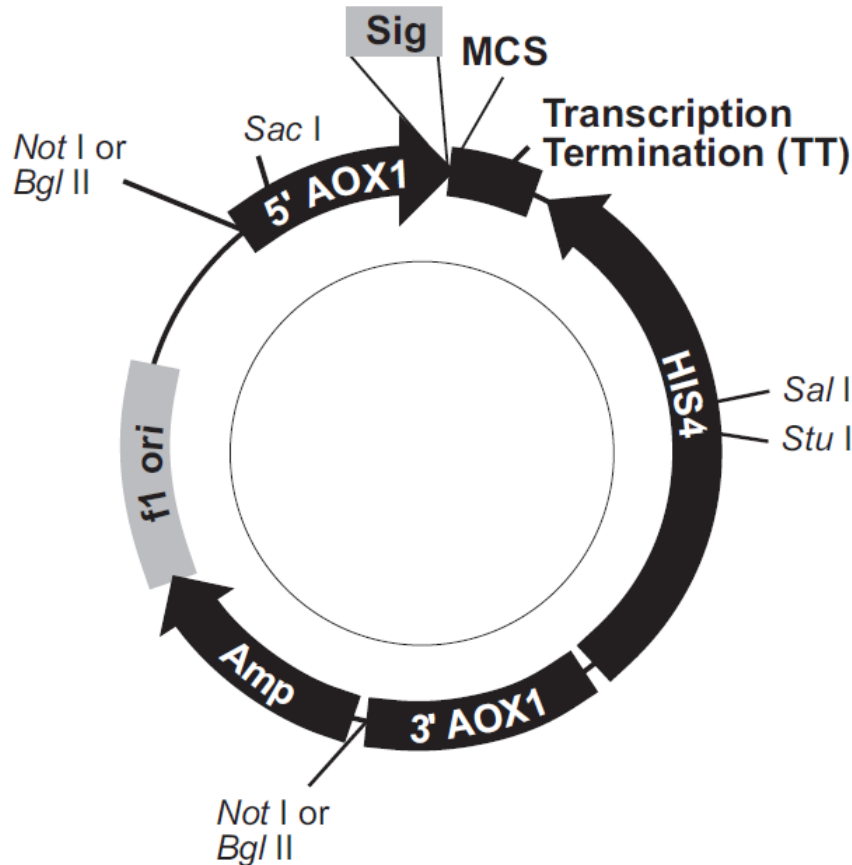
# Yeast surface display



- využití i pro biotechnologie – vychytávání těžkých kovů (dekontaminace)
- 6xHis-Aga2 (vychytání Cu) **integrován** v genomu
- CUP1-GTS1 (indukce aglutinace) na **plasmidu**

# Integrativní plasmidy

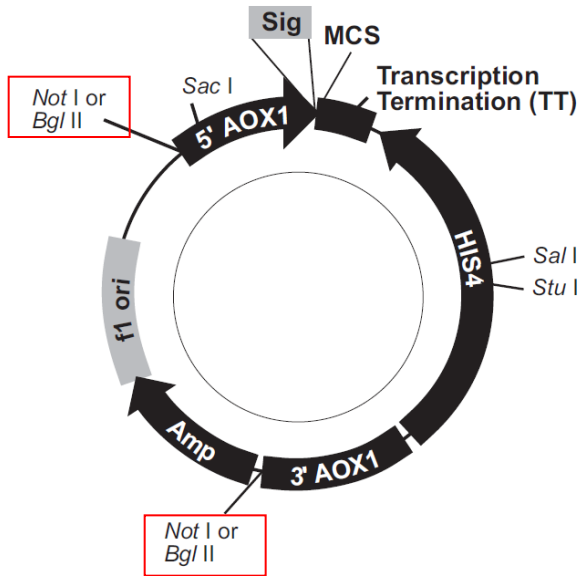
- nemají CEN ani 2 $\mu$ m části



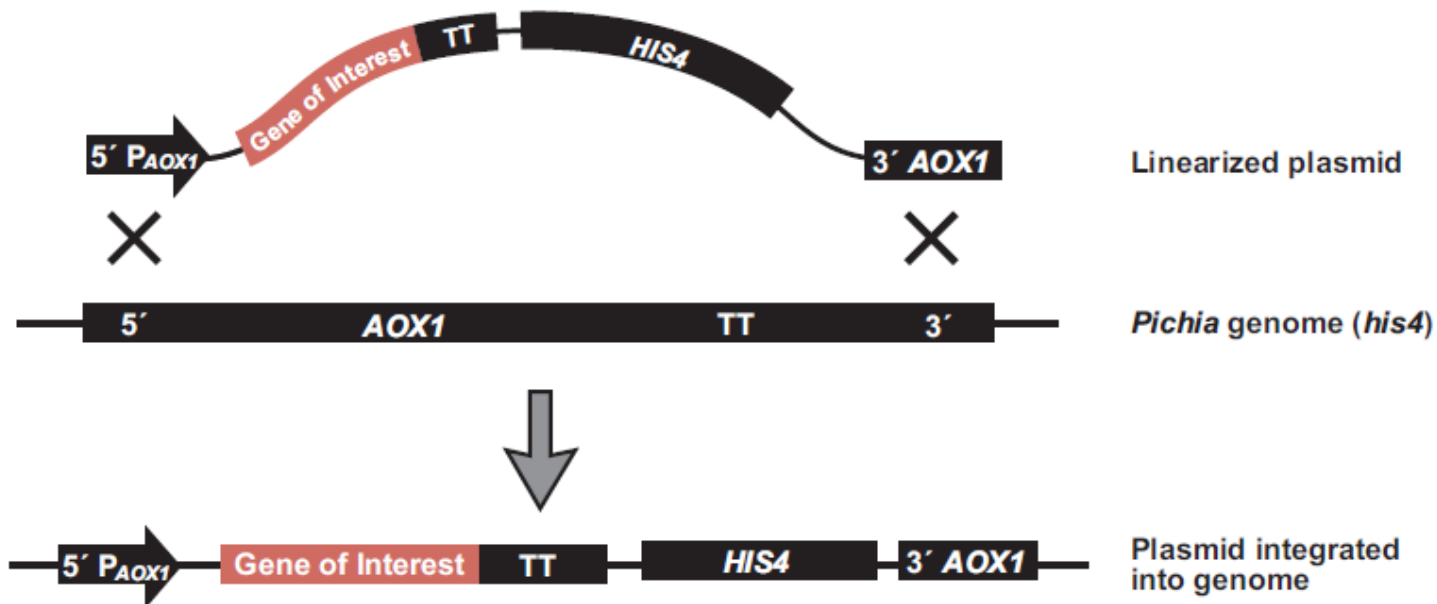
- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)  
 - exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression</u> in <i>Pichia</i> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal <u>protein secretion</u> signal	Targets desired protein for secretion
MCS	<u>Multiple Cloning Site</u>	Allows insertion of your gene into the expression vector
TT	Native <u>transcription termination</u> and polyadenylation signal from AOX1 gene (~260 bp)	Permits efficient <u>transcription termination and polyadenylation</u> 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 <u>selectable marker</u> 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 pBR322 origin	<u>Ampicillin resistance</u> gene <i>E. coli</i> origin of replication	Allows selection, replication, and maintenance in <i>E. coli</i>
f1 origin	Bacteriophage f1 origin of replication (458 bp)	Permits generation of single-stranded DNA for mutagenesis
<i>Not I</i> <i>Bgl II</i> <i>Sac I</i> <i>Sal I</i> <i>Stu I</i>	Unique restriction sites	Permits <u>linearization of vector</u> for efficient integration into the <i>Pichia</i> genome

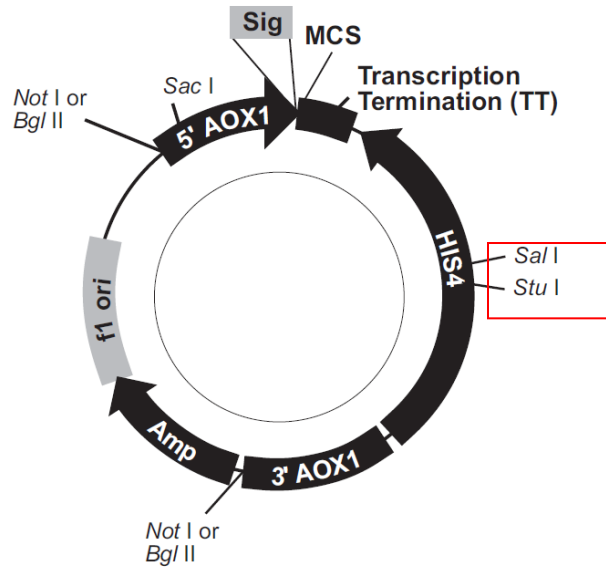
# Integrace I.



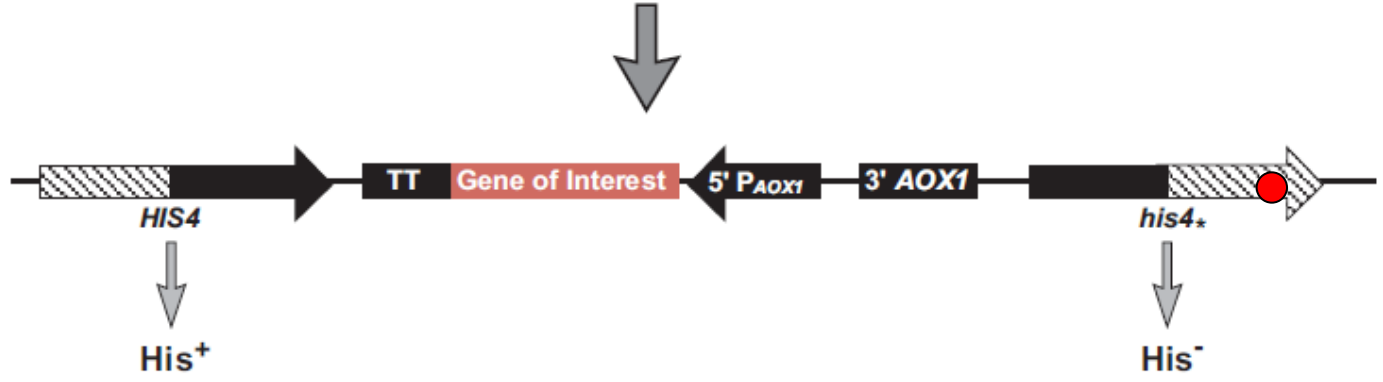
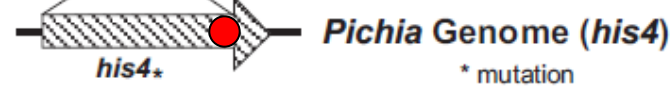
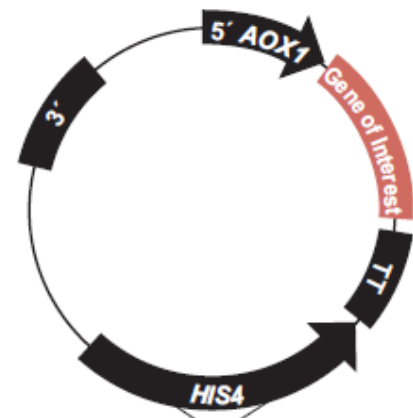
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru
- integrace do AOX1 lokusu



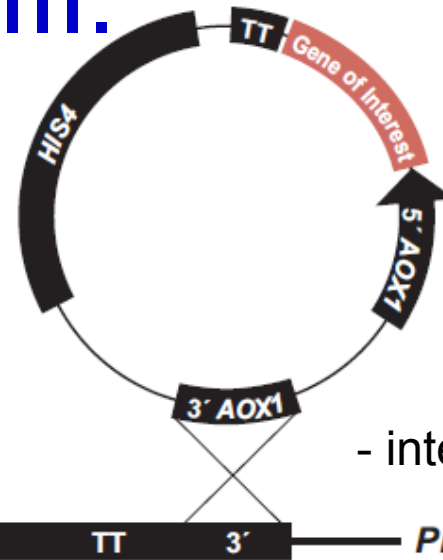
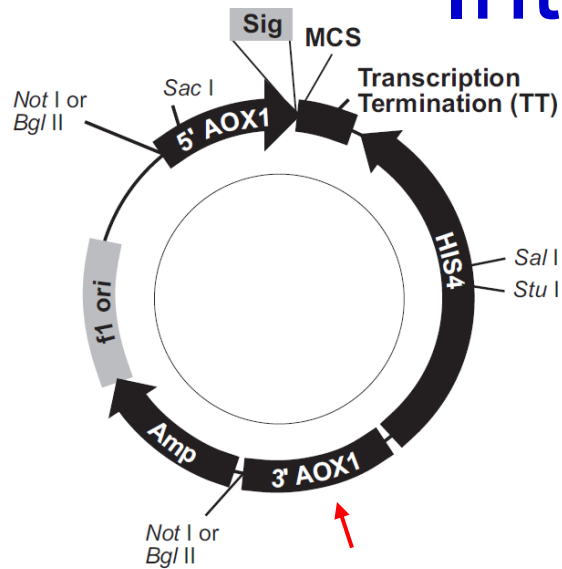
# Integrace II.



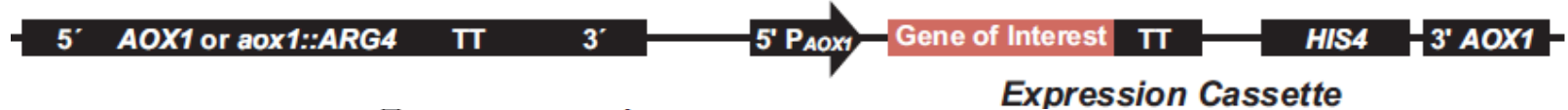
- integrace do *his4* lokusu



# Integrace III.



- integrace do AOX1 lokusu



↓  
2nd Insertion Event



↓  
3rd Insertion Event, etc.

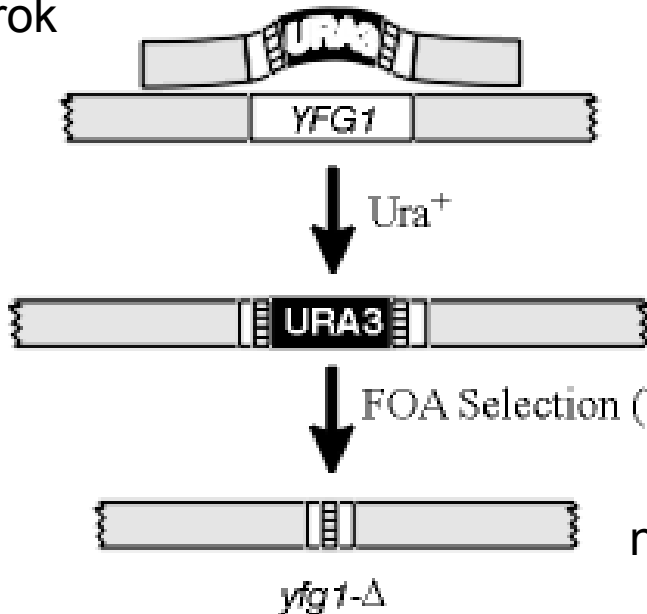
u *Pichia pastoris* dochází u 1-10% transformantů k vícenásobné integraci – vyšší exprese  
Pomocí jiného markeru lze integrovat další kazetu



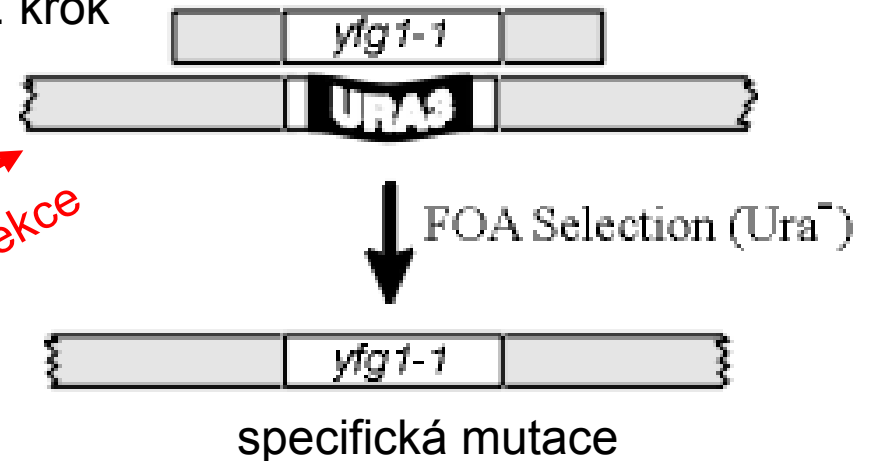
# Disrupce/delece genu

- 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 se testují na citlivost k různým „toxinům“ – dále lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami a hledat jejich funkční vztahy (synthetic lethal x epistatic x suprese)

1. krok



2. krok

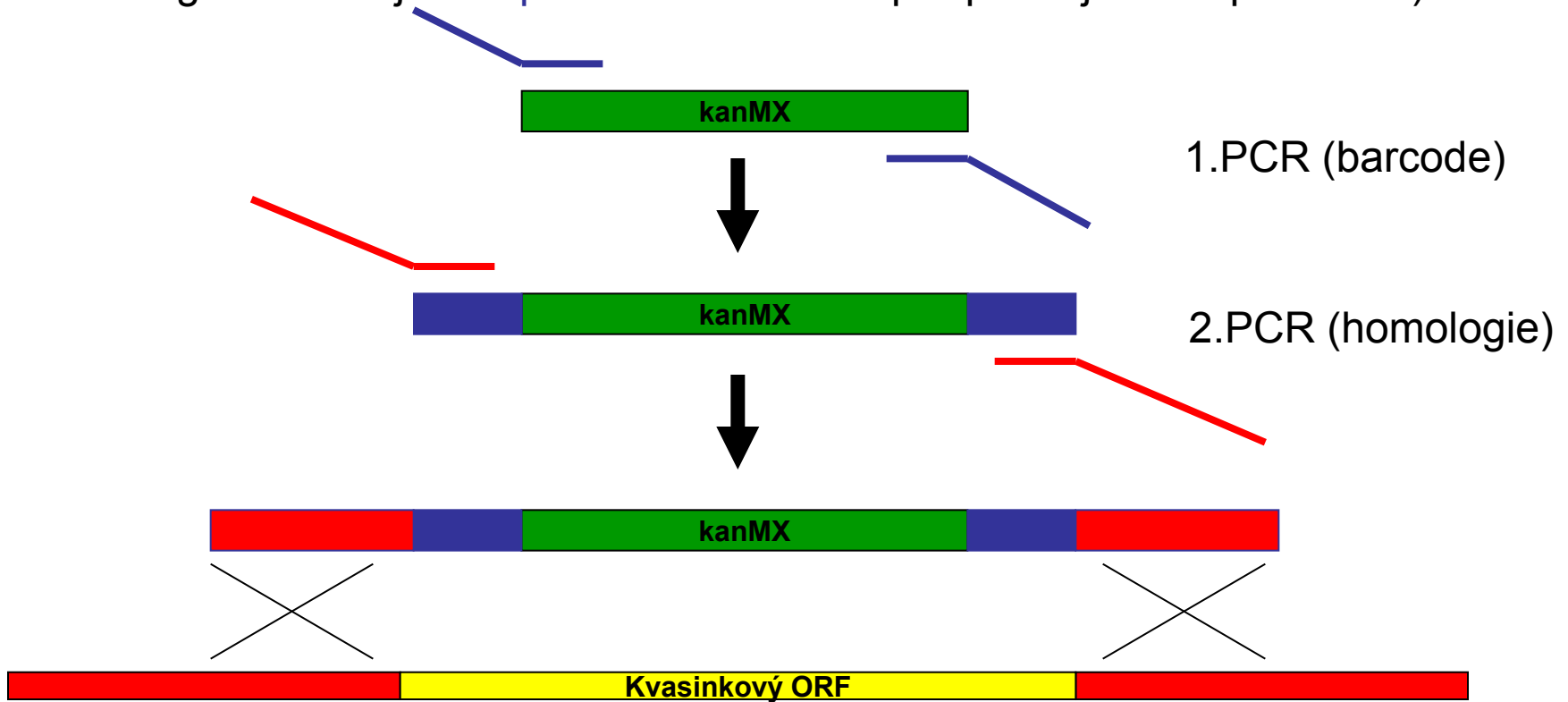


protiselekce

- 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

# Delece genu - PCR

- pro rekombinaci stačí pouze **krátká homologie** (50-100nt pro S.c.)
- oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé postačí (při 2 krokové PCR se kromě dlouhé homologie vnesou ještě **specifické sekvence** pro pozdější manipulace ...)



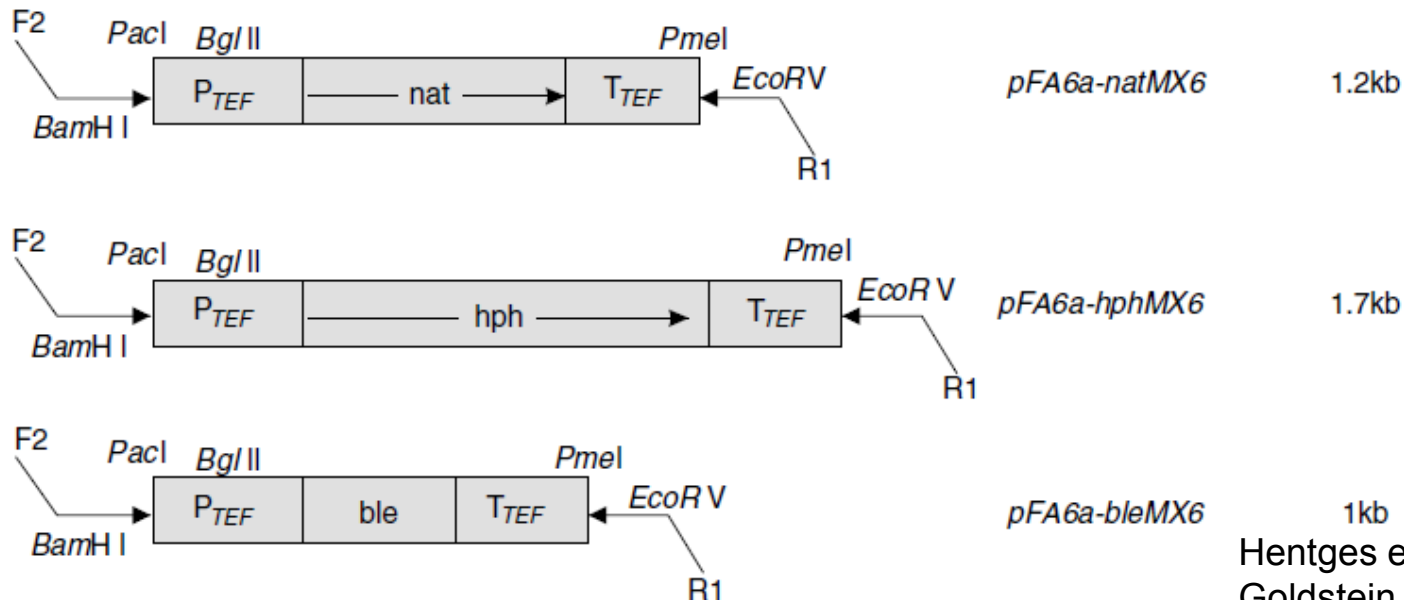
- systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- kmeny lze získat z archivu EUROSCARF

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>

# MX6 kazety

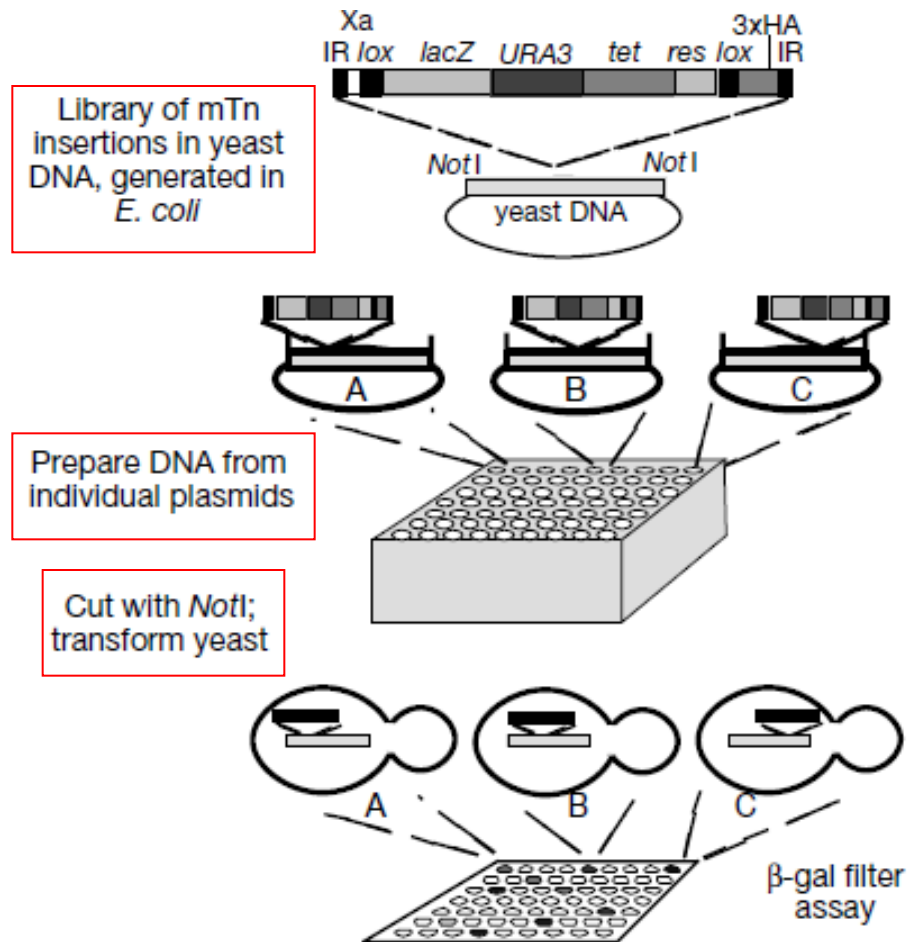
- nourseothricin (NAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje NAT)
- hygromycin B – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygrosopicus*), rezistence kódována *hph* genem z *Klebsiella pneumoniae*
- phleomycin – interkaluje se do DNA a způsobuje DSB (zlomy, glycopeptid z *Streptomyces verticulus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*)

Společná struktura kazety – možnost záměny kazet (pro genetické studie – křížení)

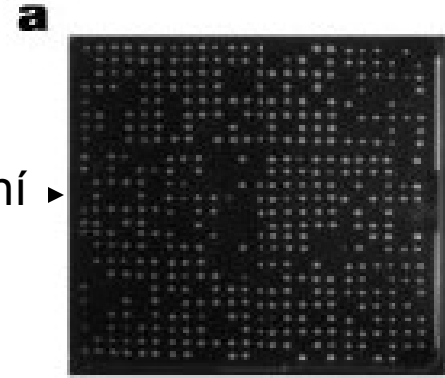


Hentges et al.: Yeast, 2005  
Goldstein et al.: Yeast, 1999

# Delece genu pomocí transposonů

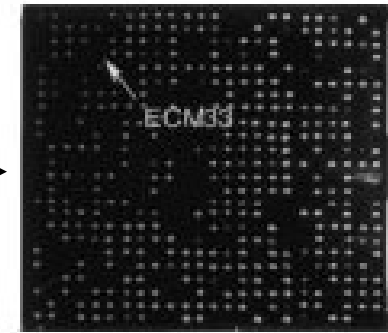


esenciální ▶



YPD

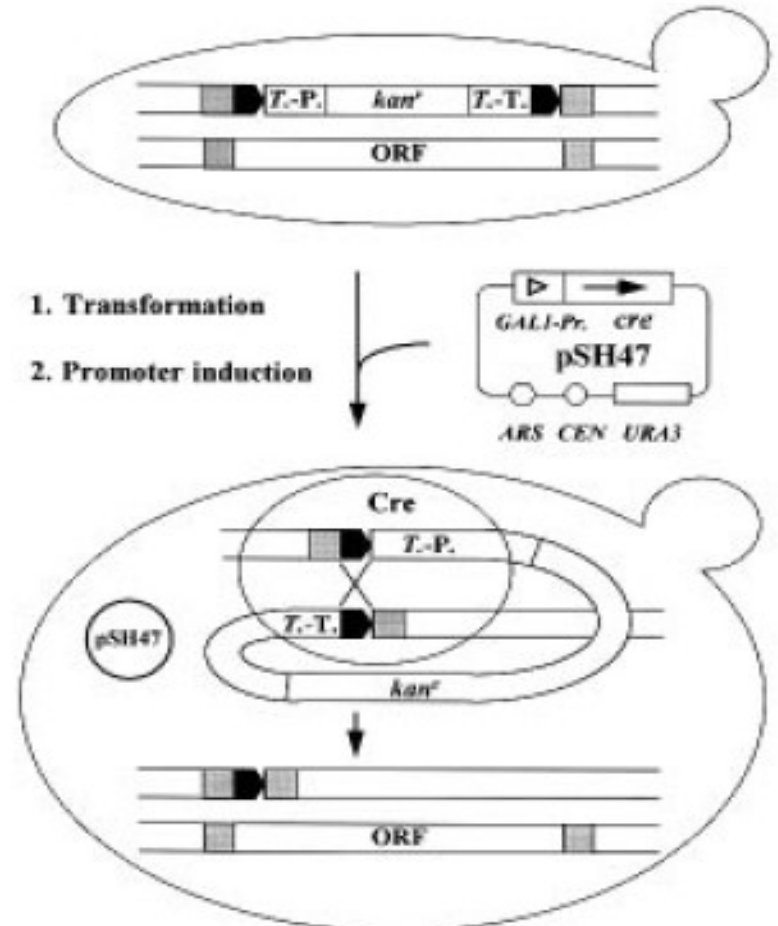
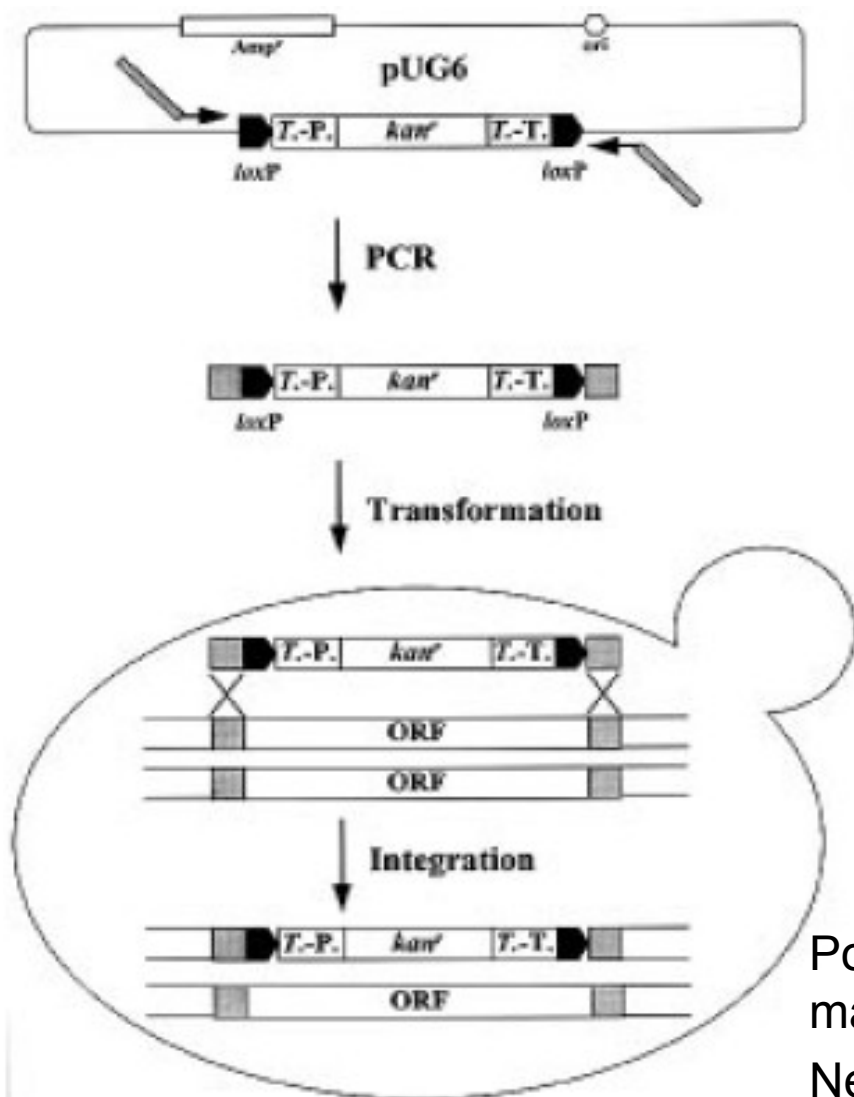
Citlivé ... ▶



Hygro

Defekt buněčné stěny

# Cre rekombinasa

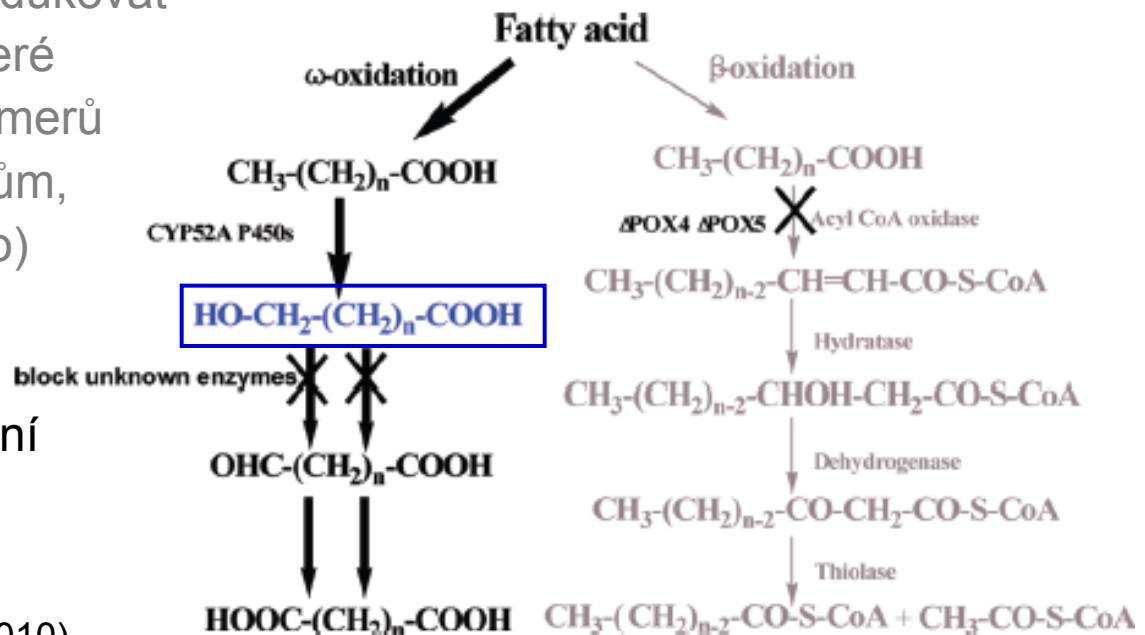


Postup lze použít několikrát se stále stejným markerem

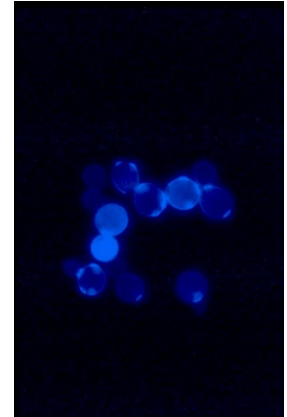
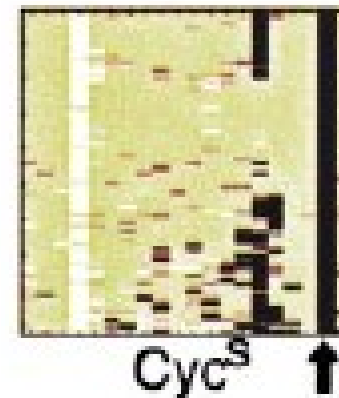
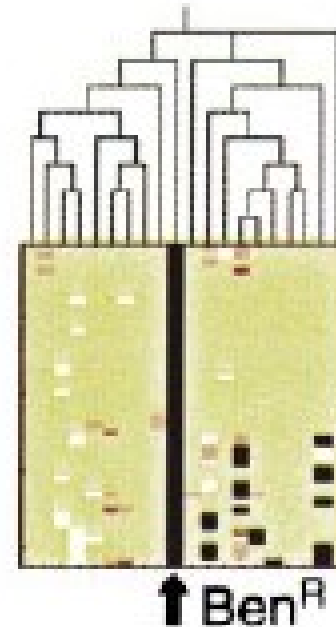
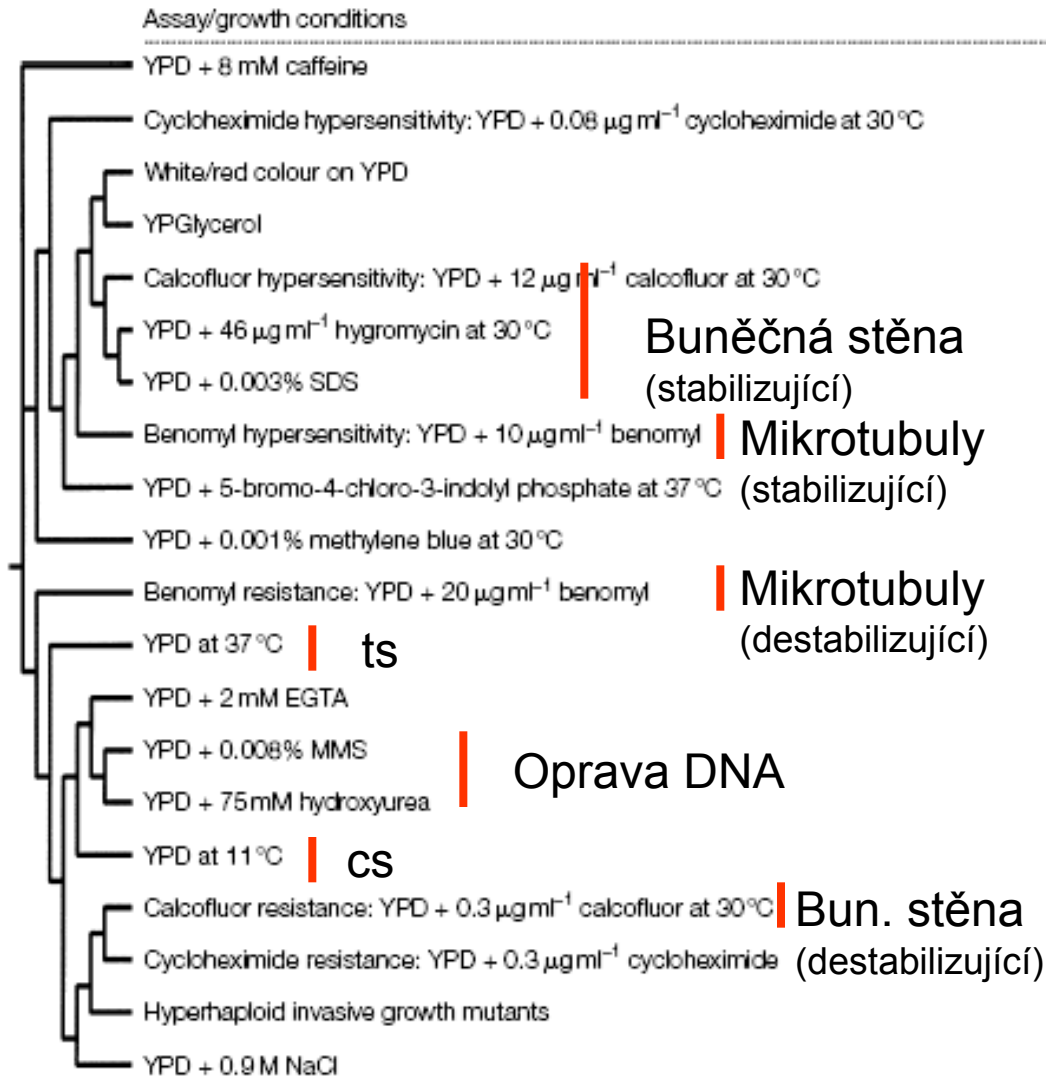
Nevýhoda pro genetické studie (marker nekosegreguje s mutací)

# Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen ( $\Delta$ POX4,  $\Delta$ POX5) není schopen  $\beta$ -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- další mutagenézí (pomocí flp rekombinasy – viz genetika) odstranili geny dalších oxidás (4 alkohol oxidázy) a dehydrogenás (6 alkohol dehydrogenás) aby eliminovali  $\omega$ -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)
- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...



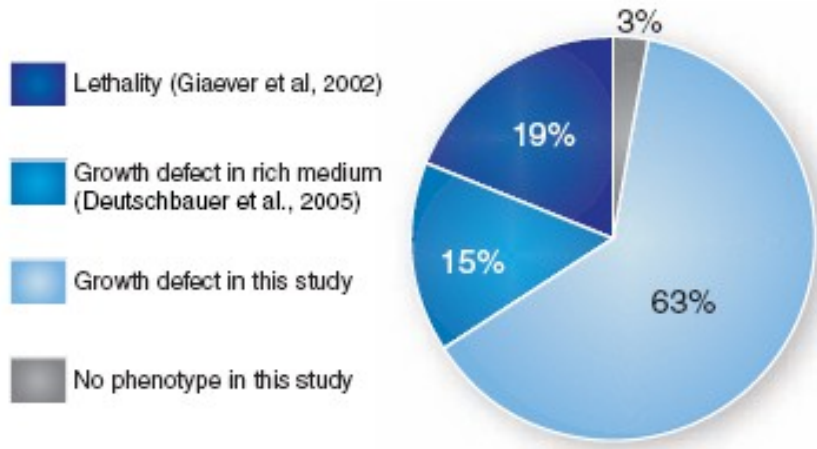
# EuroFan projekt - testy fenotypu



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

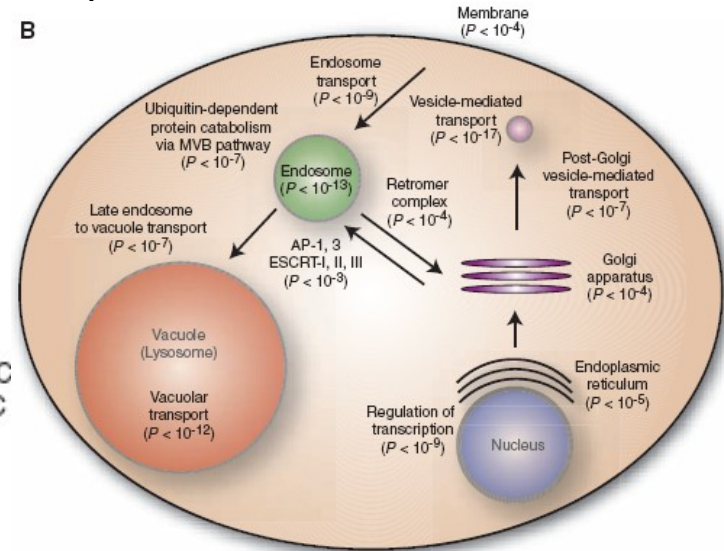
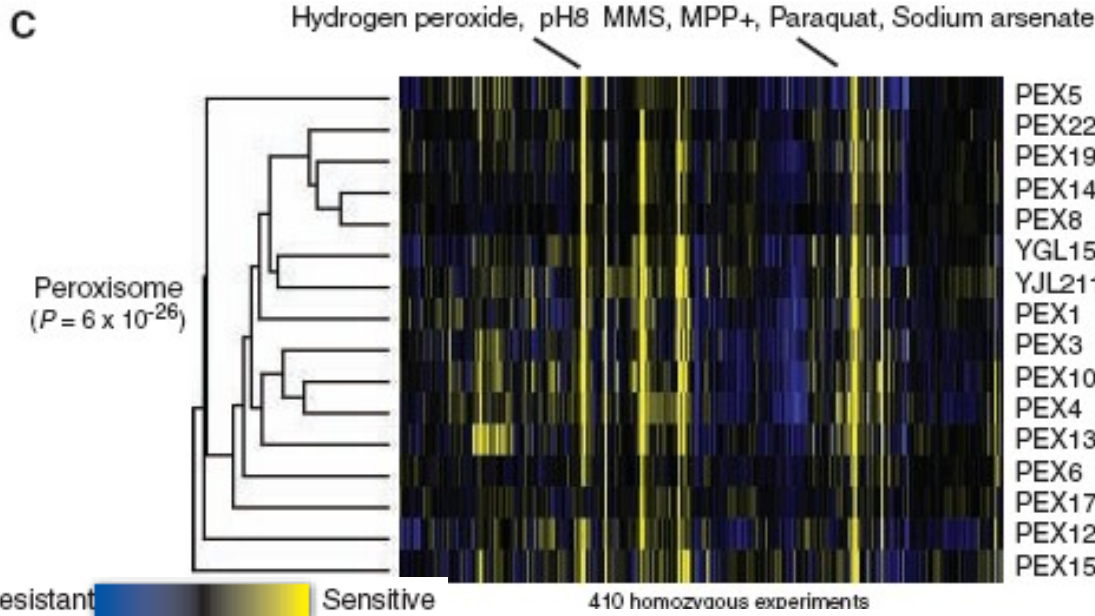


~ 6000 heterozygotních delečních kmenů  
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)  
 (neesenciální – růst za specifických podmínek nebo redundantní procesy)



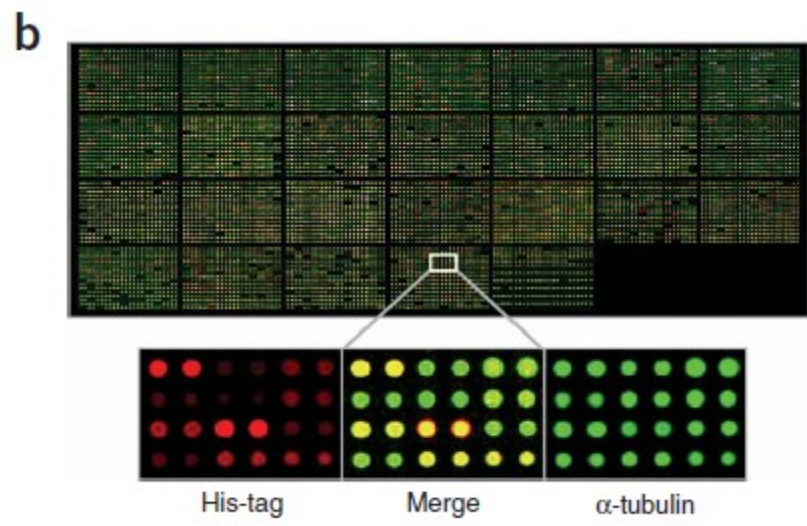
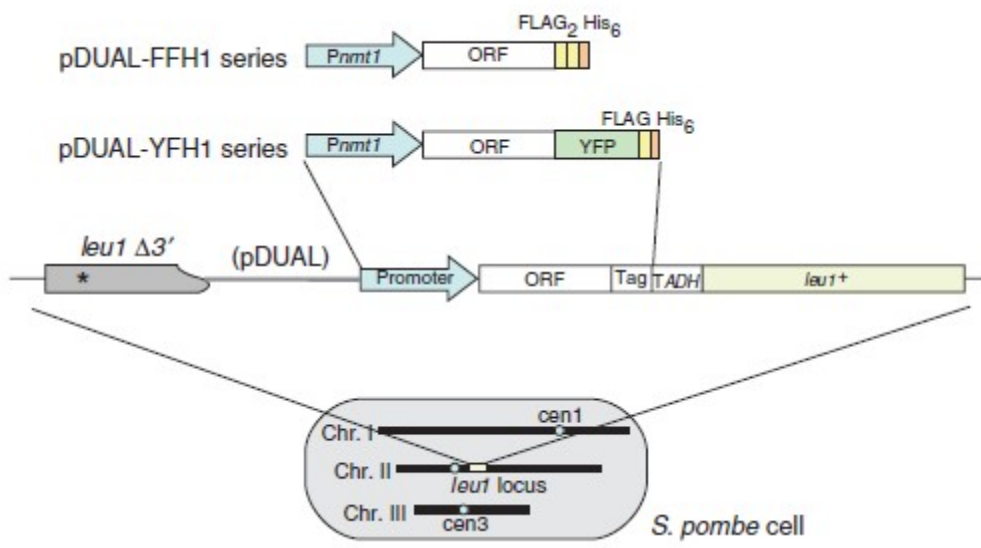
- Testováno ~400 malých molekul a stresových podmínek (-aa ...)
- Celkem provedeno ~ 6milionů testů
- multidrug resistance (MDR) pokud byl gen potřebný pro resistenci vůči >20% z testovaných látek

- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti

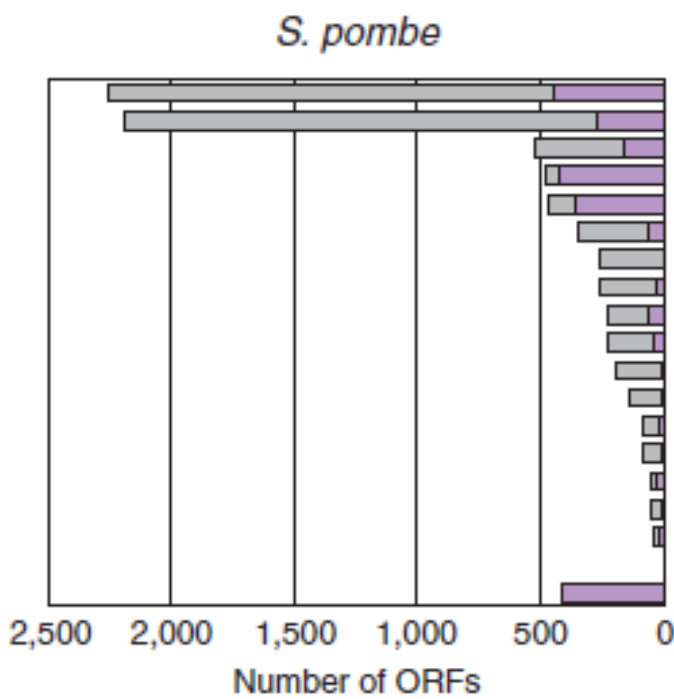


Geny/Proteiny peroxisomu

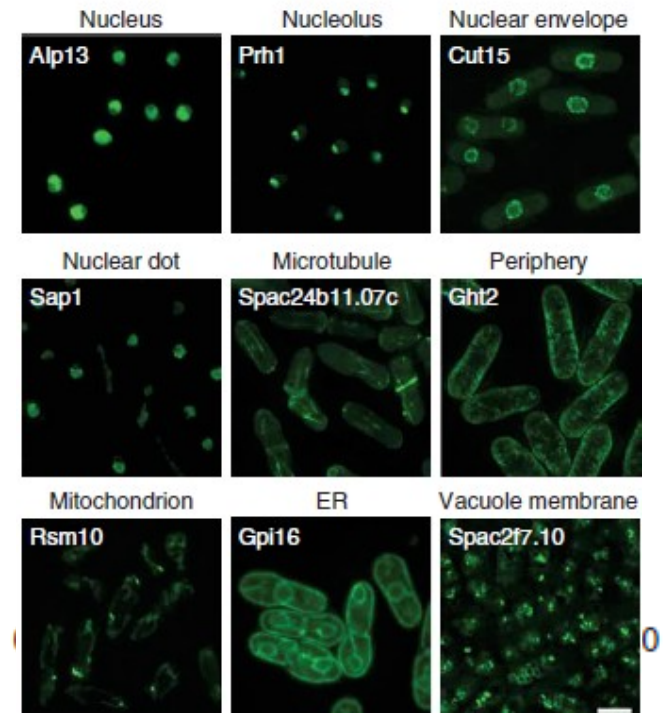
Science 320 (2008), p.362



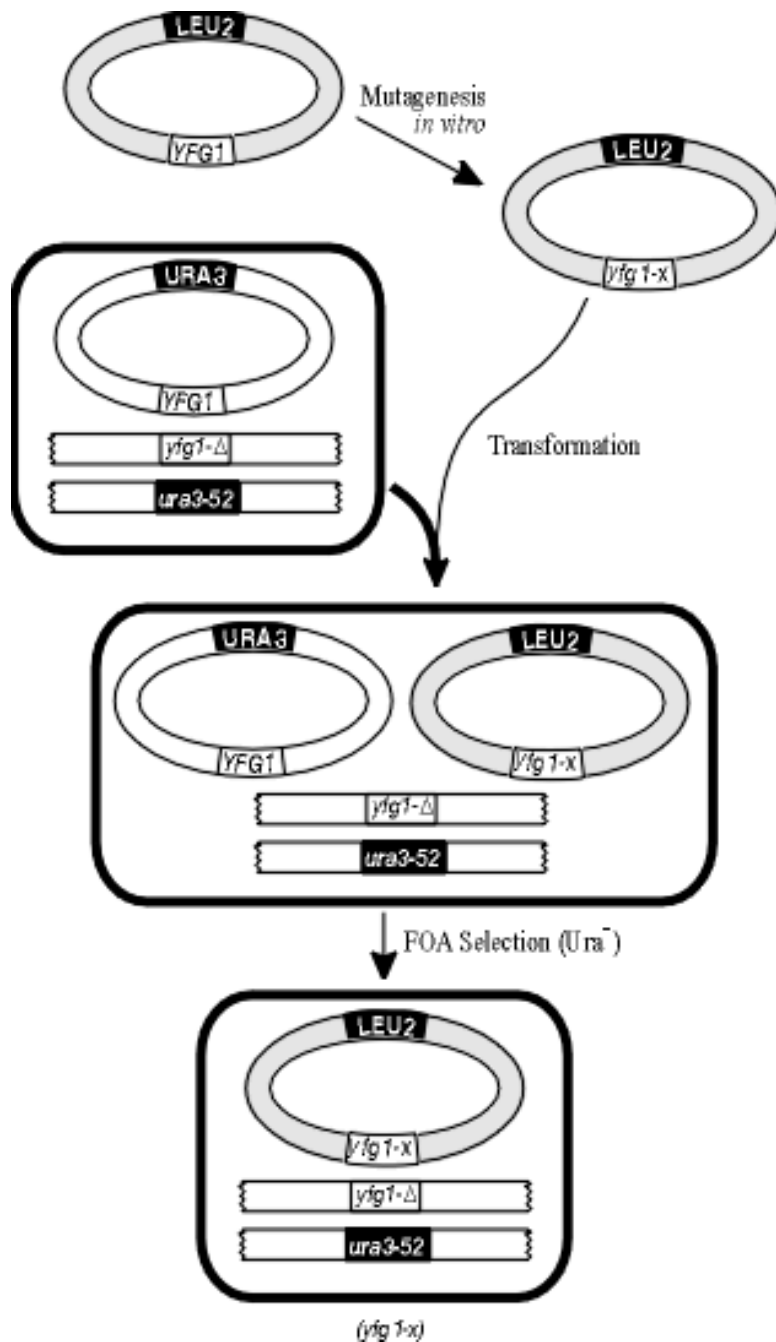
# Určení lokalizace



- Categories
- This study/Yeast study
- Cytosol/cytoplasm
  - Nucleus
  - Cytoplasmic dot/punctate
  - Mitochondrion
  - ER
  - Periphery
  - Septum/bud neck
  - Nuclear dot
  - Golgi
  - Nucleolus
  - SPB
  - Cell tip
  - Nuclear envelope/nuclear periphery
  - Microtubule
  - Ambiguous
  - Vacuole membrane
  - Vacuole
  - Endosome
  - No apparent signal



# Plasmid shuffling



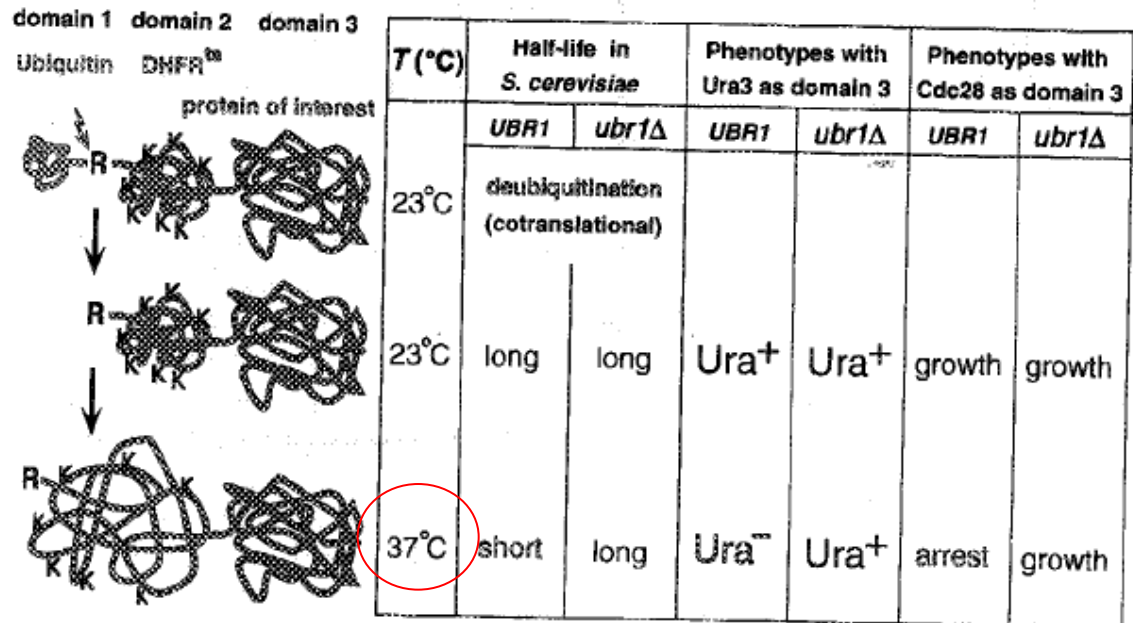
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na plasmidu

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)

# ts mutanty

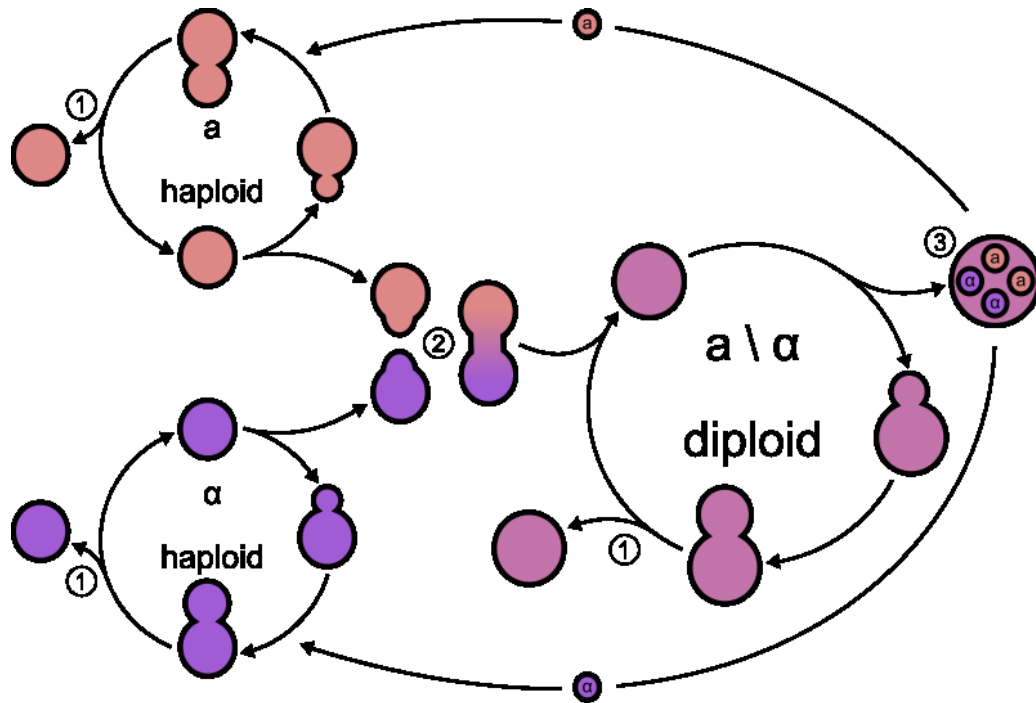
- ts mutanty jsou výhodné pro studium funkce genu – mutanty jsou normální na permissivní (25°C) teplotě, ale nemohou dokončit buněčný proces vyžadující aktivní protein za restriktivní teploty (37°C)
- ts mutanty = většinou nestabilní proteiny, které se při zvýšené teplotě denaturují/ztrácí aktivitu a jsou degradovány



- ubiquitinace „označuje“ proteiny pro proteasom (degradaci)
- ts alela DHFR je degradována (nestabilní protein – strukturní mutace)
- fúze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fúze s CDC28 – kvasinky arestují v G1 fázi)



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



RHOMBOEDRICKÝ

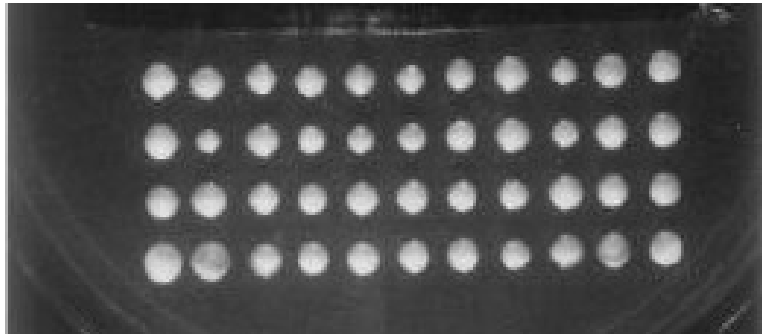
S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR



Více o BC a párování příště

# Tetrádová analýza

genetické vztahy  
křížení dvou mutant



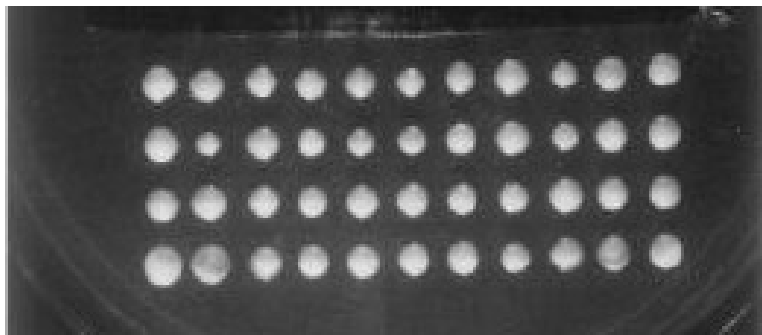
# Tetrádová analýza

genetické vztahy  
křížení dvou mutant

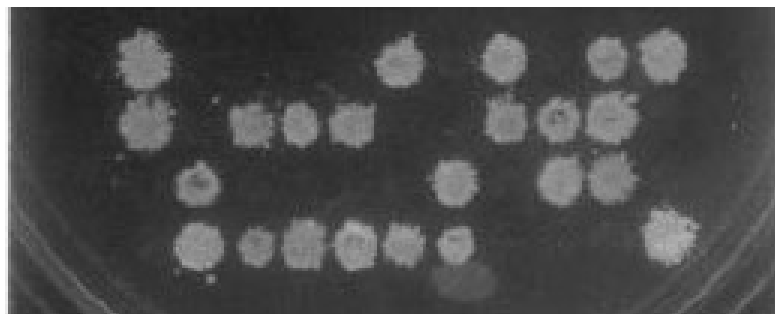
AAa a  
AaA a  
AaA a

Segregace 2:2  
Mendlovy zákony ...

. . .



YPD



Selektivní médium  
(SD-ura ... testy)



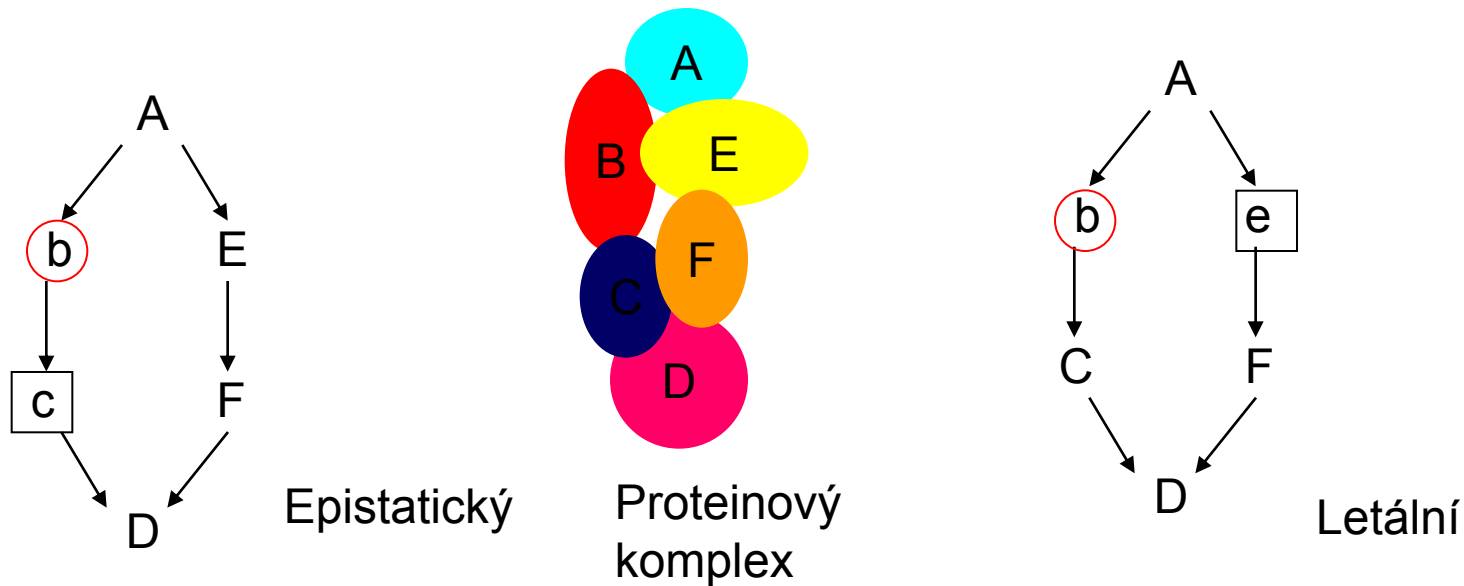
# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

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)



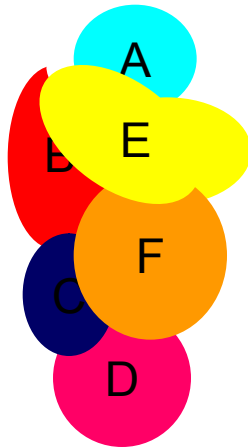
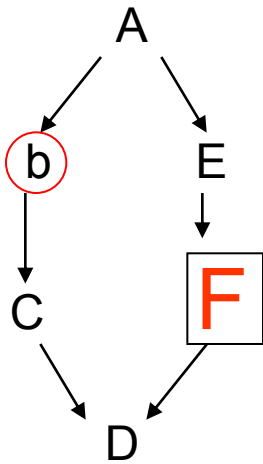
Mutagenese pomocí hydroxylaminu ... hledání (screening) letálního mutanta – mutagenese kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA – viz *plasmid shuffling*)

Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy ... proteinové komplexy ...

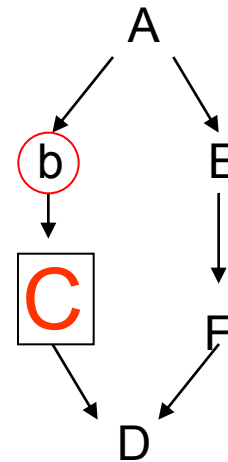
# Supresory

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



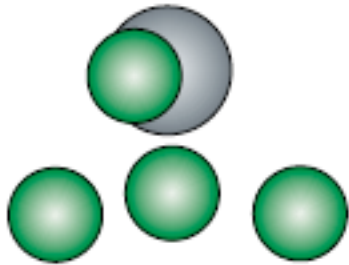
Proteinový komplex



# Supresory

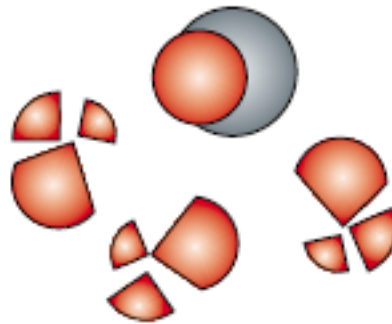
## a Dosage suppressor: rescues in high copy

Wild type



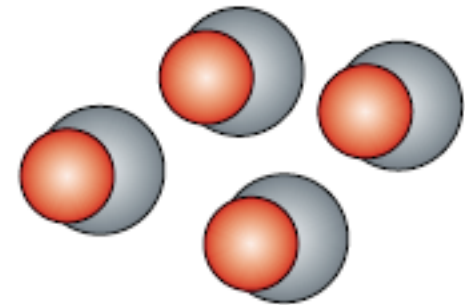
Mutant

Protein is destabilized



Suppressor

Increased dosage of wild-type partner stabilizes protein



## b Interaction suppressor: allele specific, gene specific

Wild type



Mutant

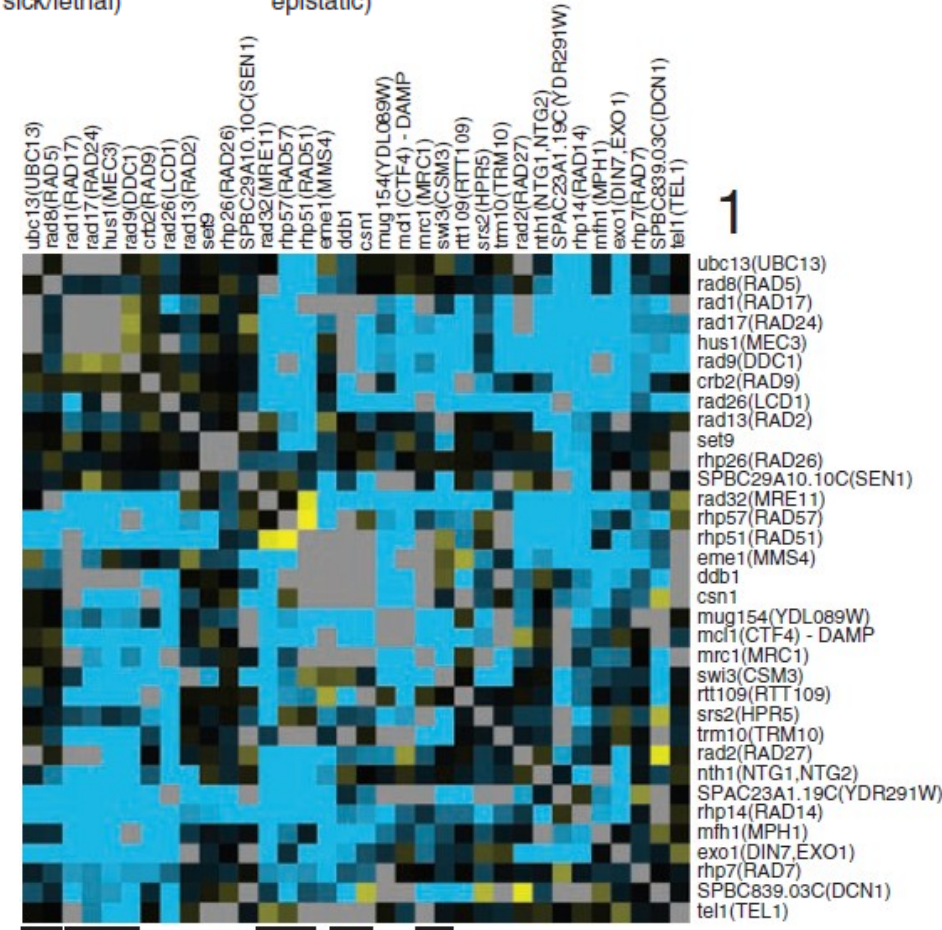


Suppressor

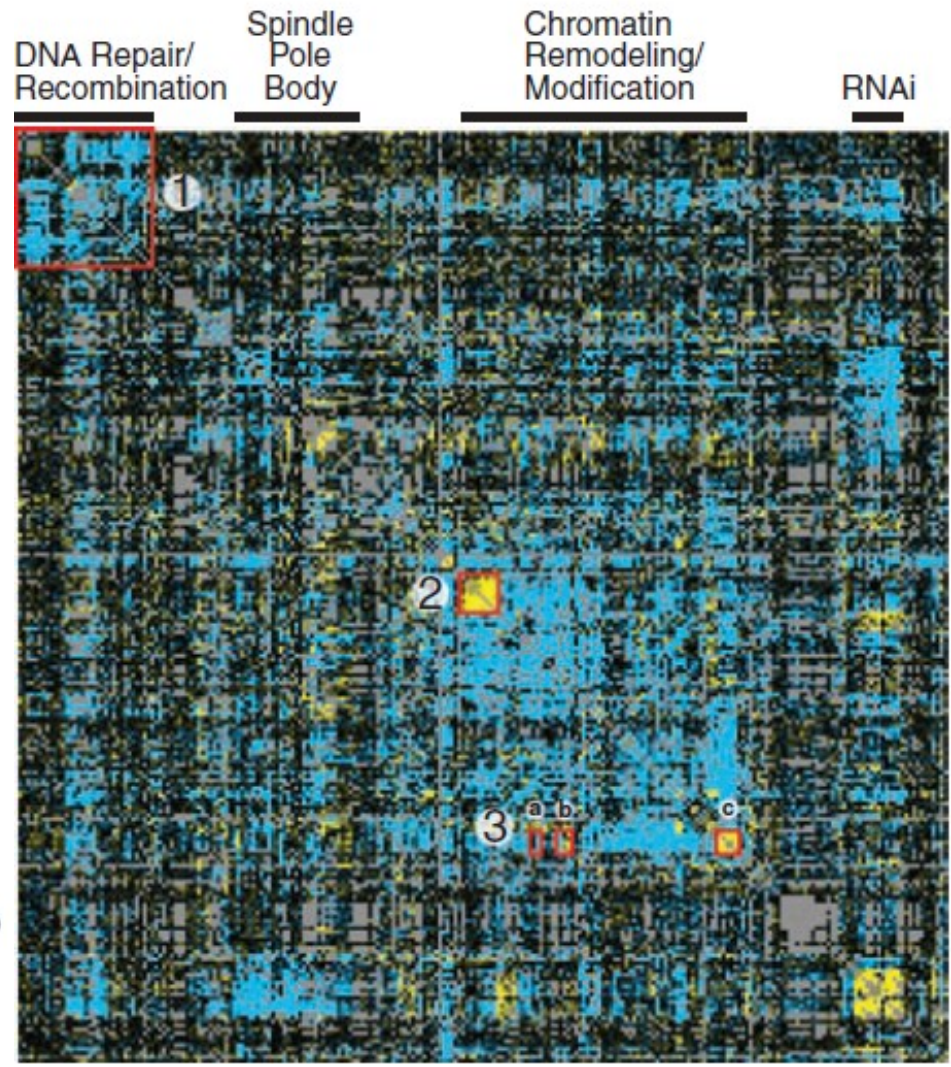




negative interactions (synthetically sick/lethal)      positive interactions (suppressive/epistatic)



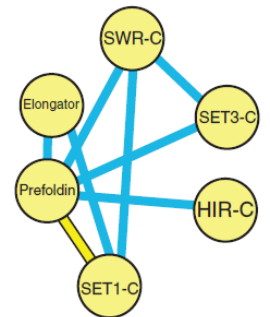
Post-ative epair    9-1-1 Complex    HR machinery    PCU4-C    Csm3-C



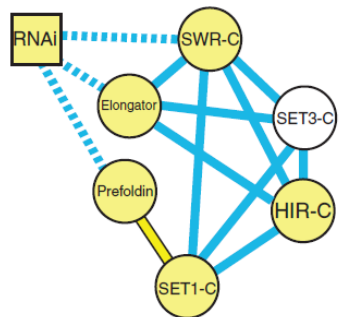
High-throughput křížení  
Srovnání funkčních modulů  
(proteinových komplexů) u *S.c.* a *S.p.*

Roguev et al, Science, 2008

*S. cerevisiae*



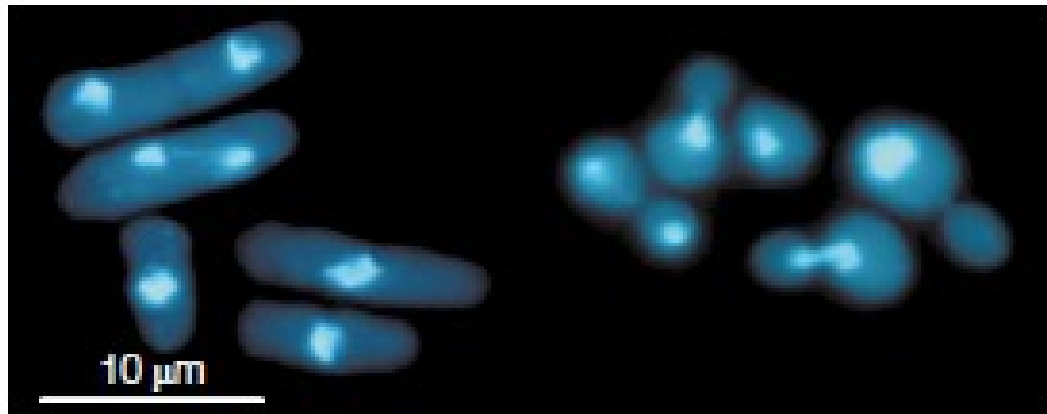
*S. pombe*





# Souhrn 4. přednášky

- Genetické metody
  - Plasmidy (kvasinkové elementy)
  - Integrace (plasmidy, PCR, kazety)
  - Teplotně-sensitivní mutanty (esenciálních genů)
  - Tetrádová analýza
  - Syntetická letalita, epistase, suprese



Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy, proteinové komplexy, evoluce biologických systémů ... připravovány nové kmeny pro biotechnologie ... řešeny otázky týkající se zdraví člověka