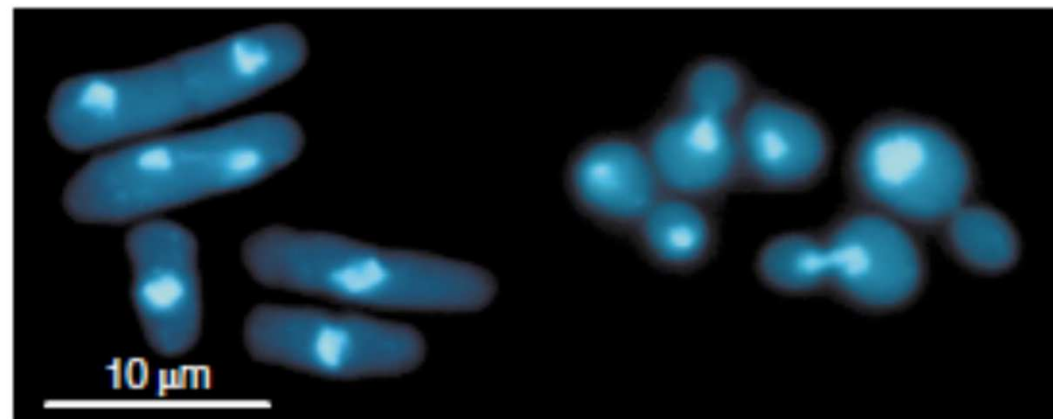


# Souhrn 4. přednášky

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

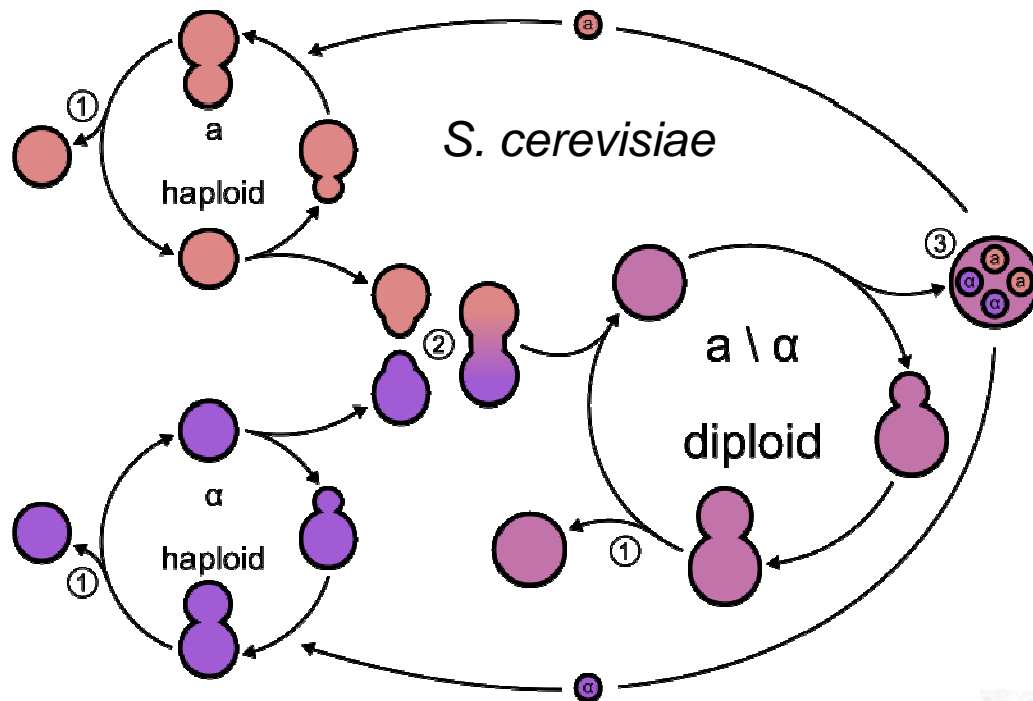


Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy, proteinové komplexy, evoluce biologických systémů ... připravovány nové kmeny pro biotechnologie ... řešeny otázky týkající se zdraví člověka

# Osnova 5. přednášky

- Genetické metody
  - tetrádová analýza
  - syntetická letalita, epistase, suprese
  - mutageneze/“screen“
- Buněčný cyklus
  - průběh a regulace BC
  - synchronizace buněk
  - mechanismy regulace párování
  - homothalické kmeny

# Životní cyklus kvasinek



- 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 dvojitého 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

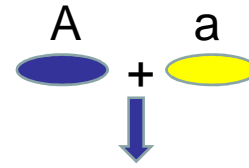
S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR



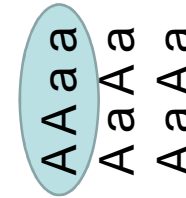
# Tetrádová analýza



vřecko  
4 spory



křížení  
haploidní buňky  
1 gen



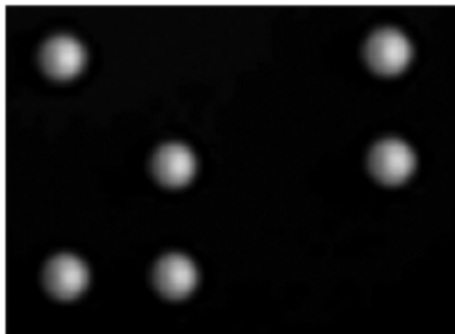
segregace 2:2  
Mendlovy zákony



esenciální gen



integrace

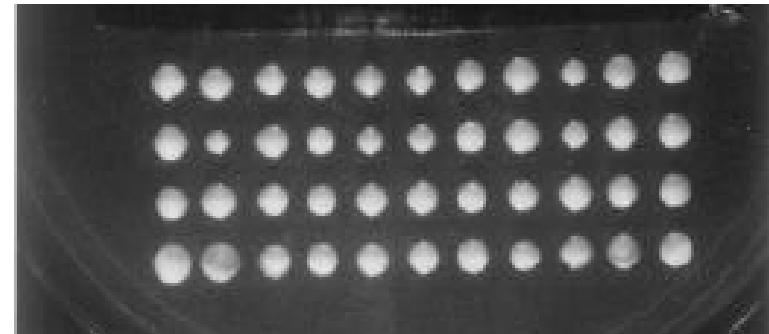


A a a A

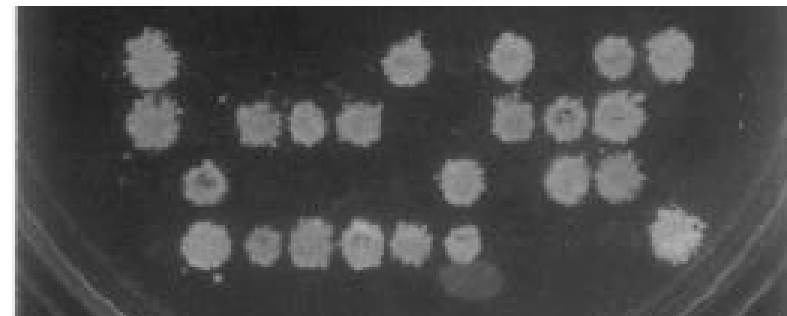
a A a A

A A a a

neesenciální gen



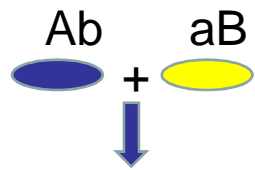
YPD



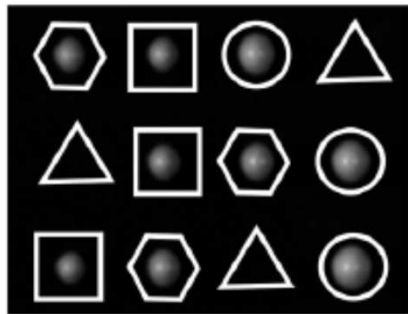
Selektivní médium  
(SD-ura ... testy)

# Tetrádová analýza

Analýza genetických interakcí  
(funkčních vztahů)



křížení  
haploidní buňky  
2 geny



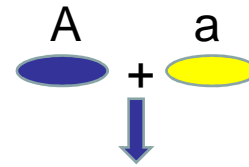
aB Ab AB ab

ab Ab aB AB

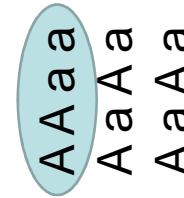
Ab aB ab AB

- AB
- Ab
- ⬡ aB
- △ ab

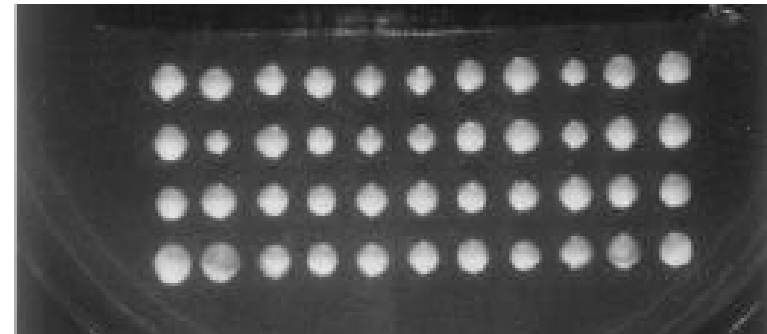
kombinace těchto  
mutací je synteticky  
letální



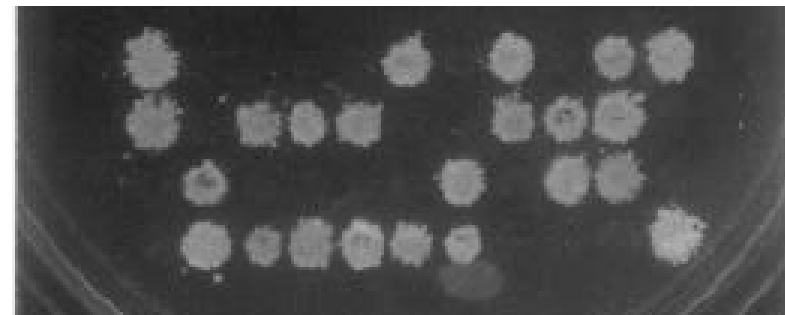
křížení  
haploidní buňky  
1 gen



segregace 2:2  
Mendlovy zákony



YPD



Selektivní médium  
(SD-ura ... testy)

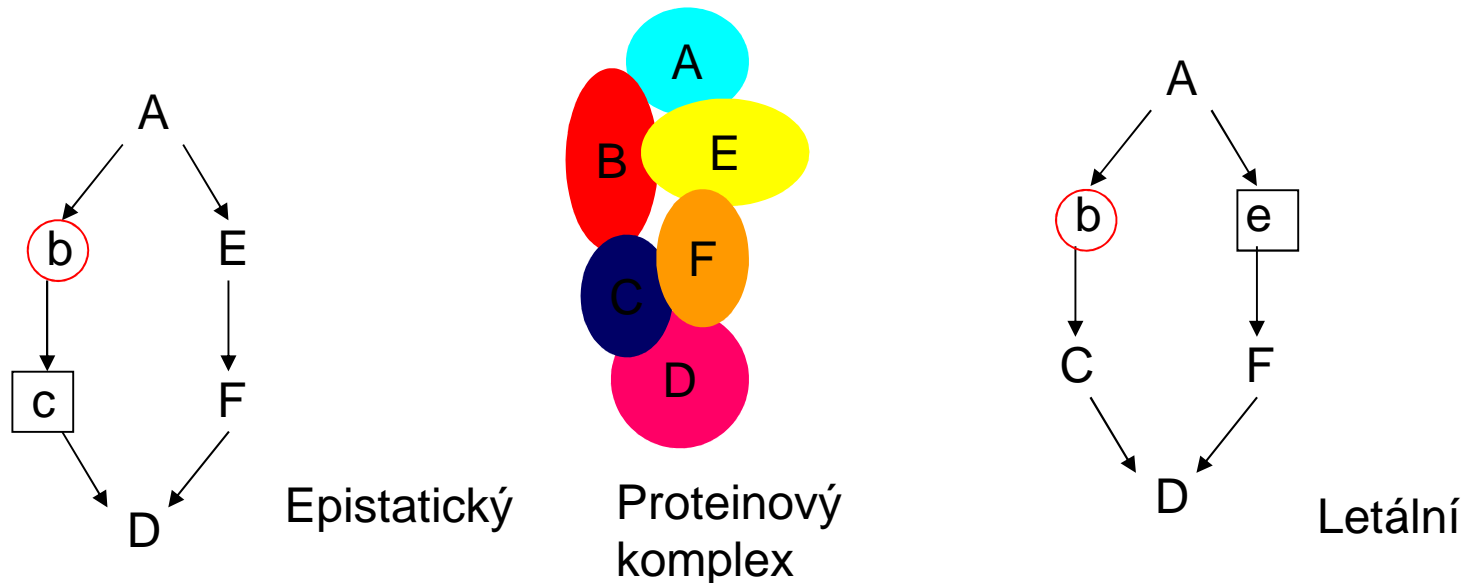
# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

haploid x haploid => diploid – stejný fenotyp - identický gen

- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

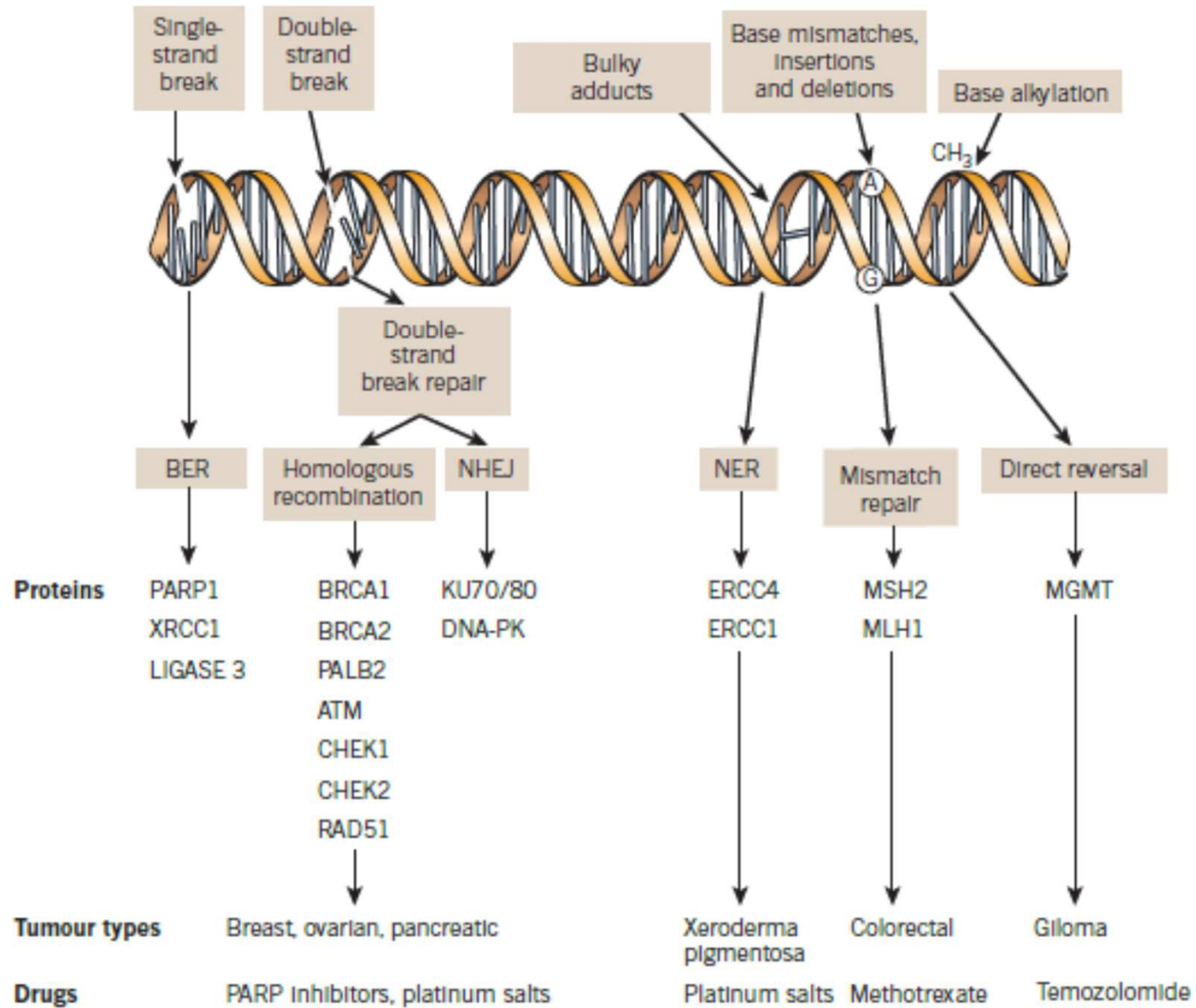
sporulace => haploid – stejný fenotyp – epistatický (funkčně příbuzné geny)

- 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*)

# Syntetická letalita

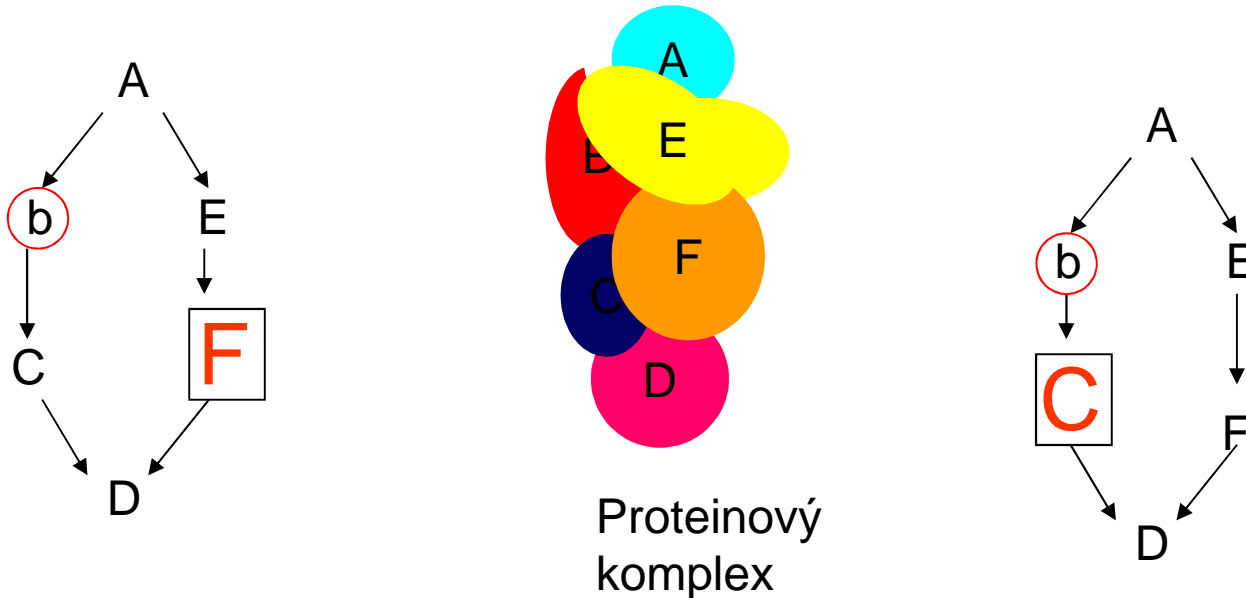


nádorové buňky mají často mutované geny pro opravu DNA – inhibitor vyřadí další dráhu

# Supresory

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

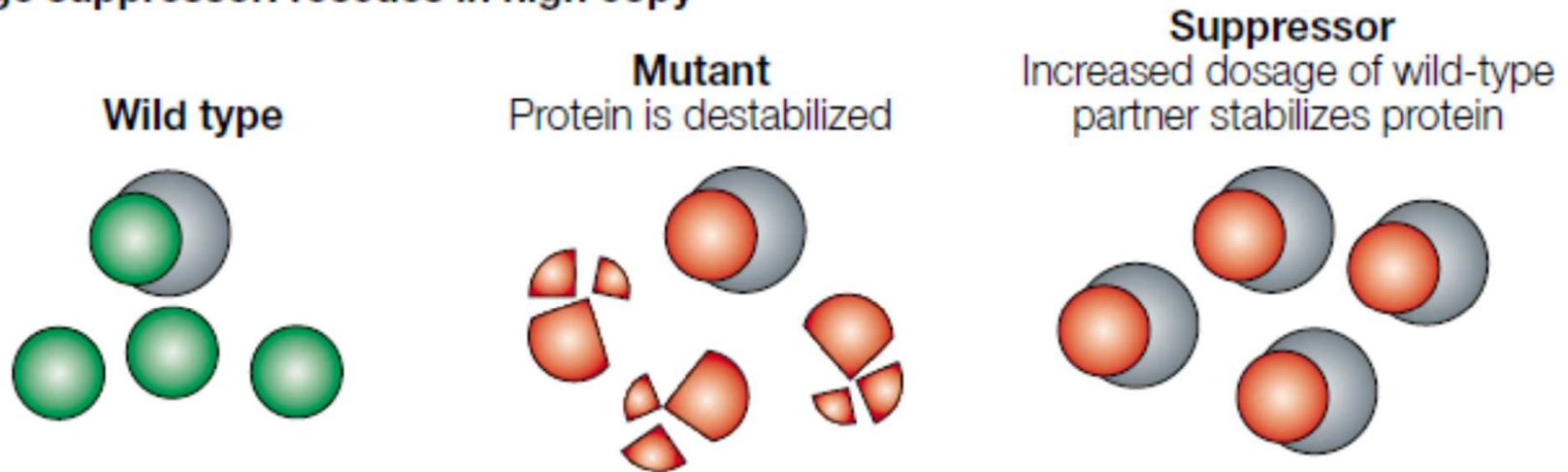
- mutace sousedního (protein) zesílí oslabenou interakci
- nadprodukce proteinu z paralelní dráhy
- nadprodukce proteinu z téže dráhy



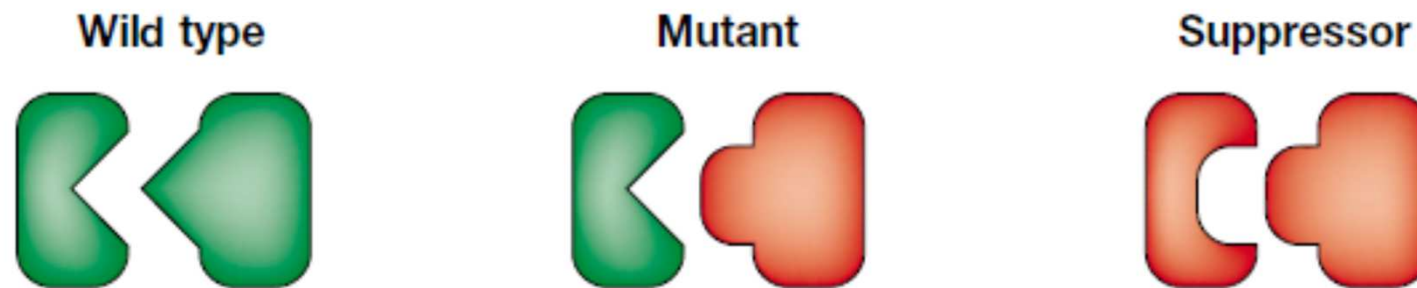


# Supresory

## a Dosage suppressor: rescues in high copy



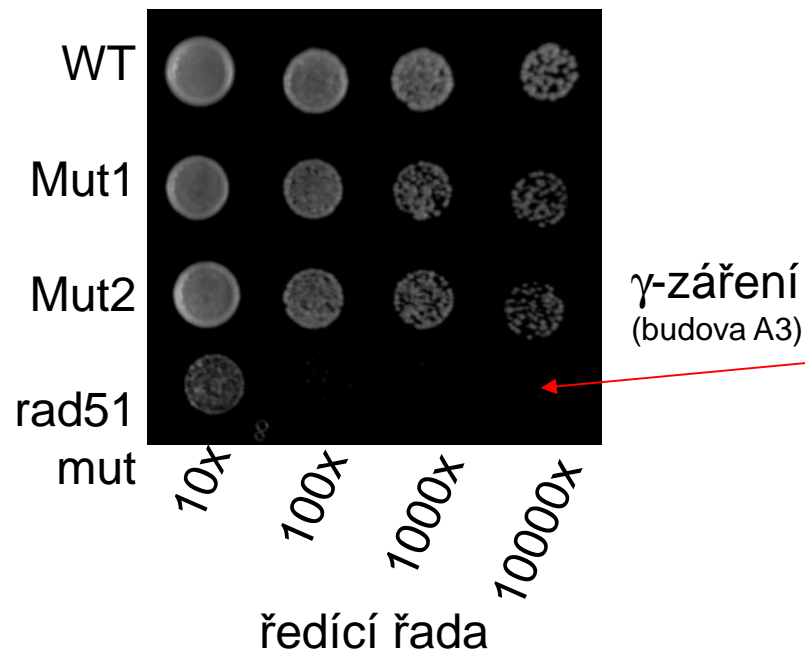
## b Interaction suppressor: allele specific, gene specific



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

- 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*, *RAD50*, ***RAD51***)
- ... buněčného cyklu (***CDC*** ...)

**sec**  
mutanty



- 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, RAD50, RAD51*)
- ... buněčného cyklu (***CDC*** ...)

Allele	Reverts?	Notes	Molecular description <sup>a</sup>	Reference
<a href="#"><i>ade2-101</i></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="#"><i>his3-200</i></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="#"><i>leu2-3,112</i></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="#"><i>trp1-1</i></a>	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber ( <b>STOP</b> ) nonsense change at codon 83	<a href="#">McDonald, et al. 1997</a>

# Izolace mutant

## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

Transform a *MATa yfg1 ura3-52* strain with a YCp50 library.

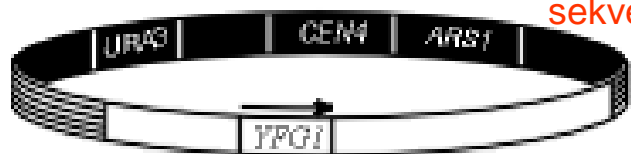
Isolate Ura<sup>+</sup> transformants and score for Yfg<sup>+</sup>



Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

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) X supresor na plasmidu

dnes - NGS

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



Detection of Yfg<sup>-</sup> *ura, ade, rad ...*



Yfg<sup>-</sup>

Počet mutací

## Complementation

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

- MATa YFG+*
- MATa yfg1*
- MATa yfg2*
- MATa yfg3*
- etc.

PCR genom sekvenace

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

## Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATa YFG+*



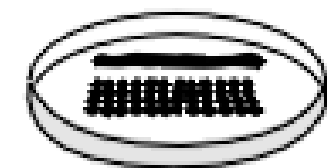
Isolate a diploid strain and Sporulate



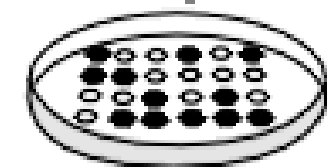
Digest ascus walls



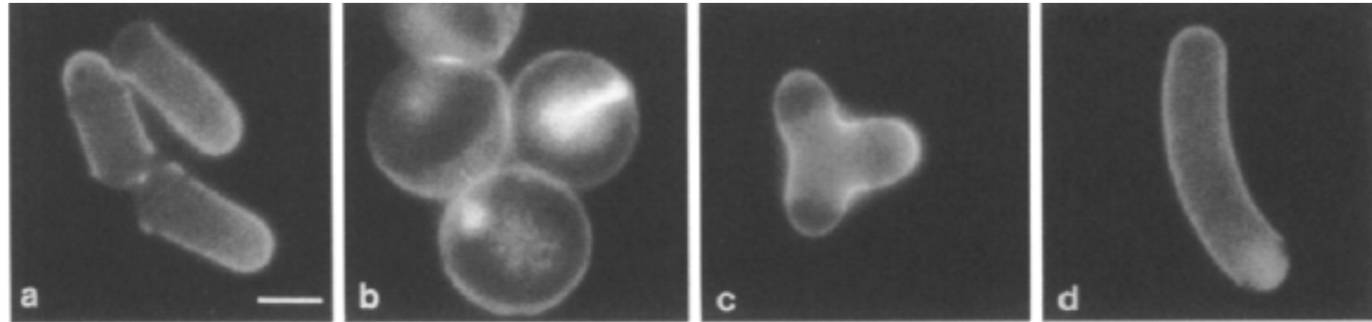
Dissect 4 spores of each tetrad



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)

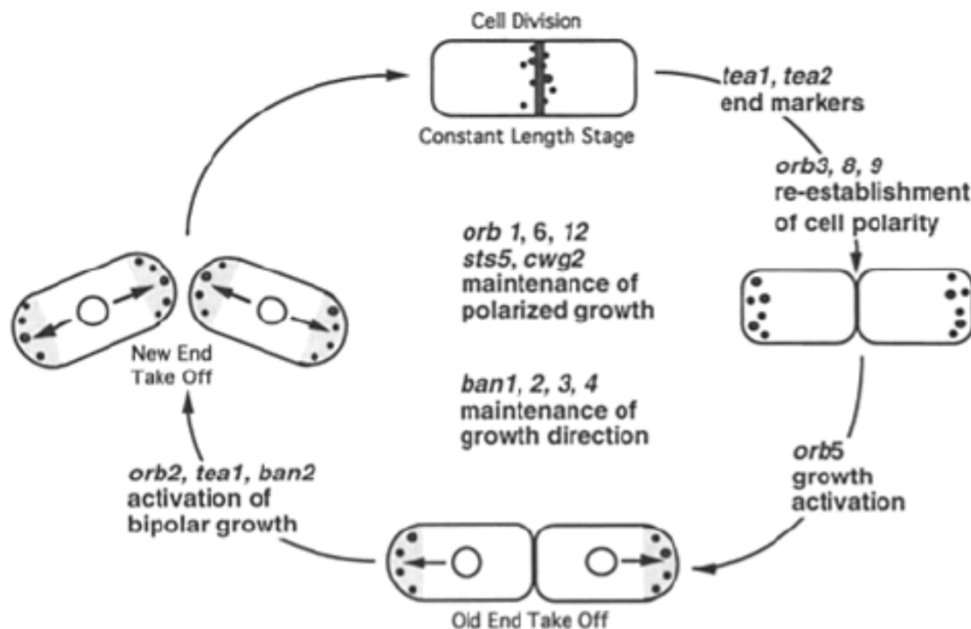


Table I. *orb* Genes

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>h</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>h</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 (BC). 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 (ubikvitinace) během určité části buněčného cyklu. Cykliny se váží na CDK a regulují jejich aktivitu.

# Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C <sup>a</sup>	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<i>cdc 2</i>	33	0.78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky <sup>b</sup>
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky <sup>b</sup>
„	121	0.38	32.1	„	
<i>cdc 10</i>	129	–0.10	20.3	DNA Synthesis	
„	28	–0.10	–	„	
<i>cdc 13</i>	117	0.64	30.5	Nuclear division	Forms multiple cell plates
–	22	0.88	33.1	„	Sterile

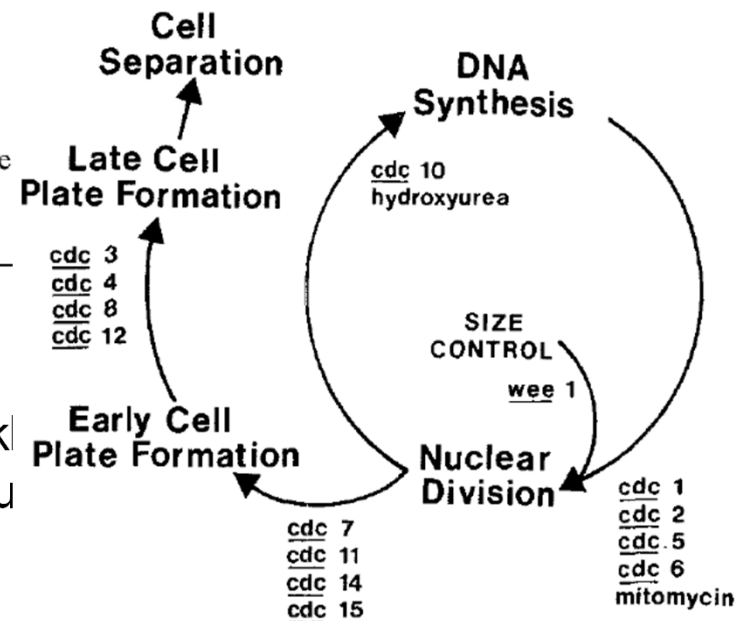
řetech na *S. cerevisiae*.

ý gen kontrolující buněčný

oným způsobem více než 100

aké sledoval citlivost kvasinek

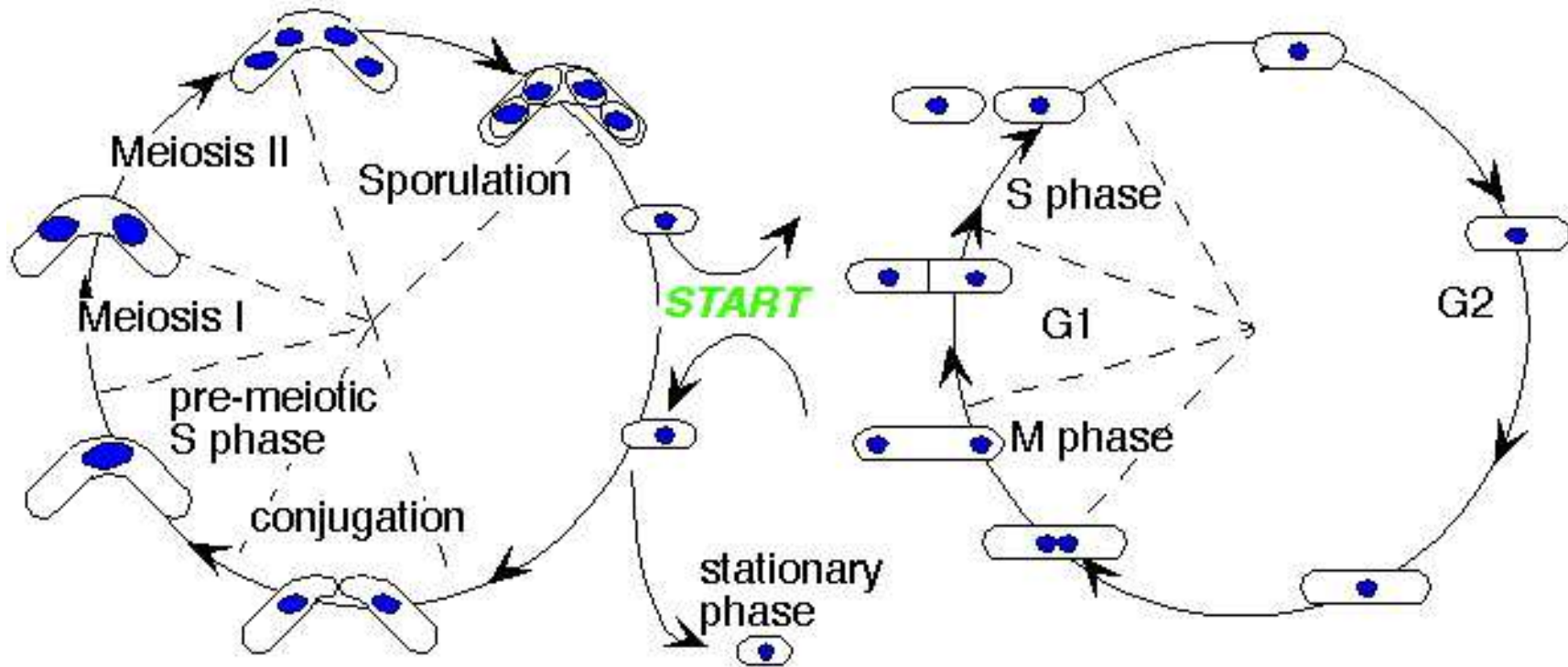
ení DNA zastaven – aby získal



Tim Hunt na začátku 80. let objevil první cyklin – cykly syntetizovány a odbourávány (ubikvitinace) během u  
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 mitozy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)



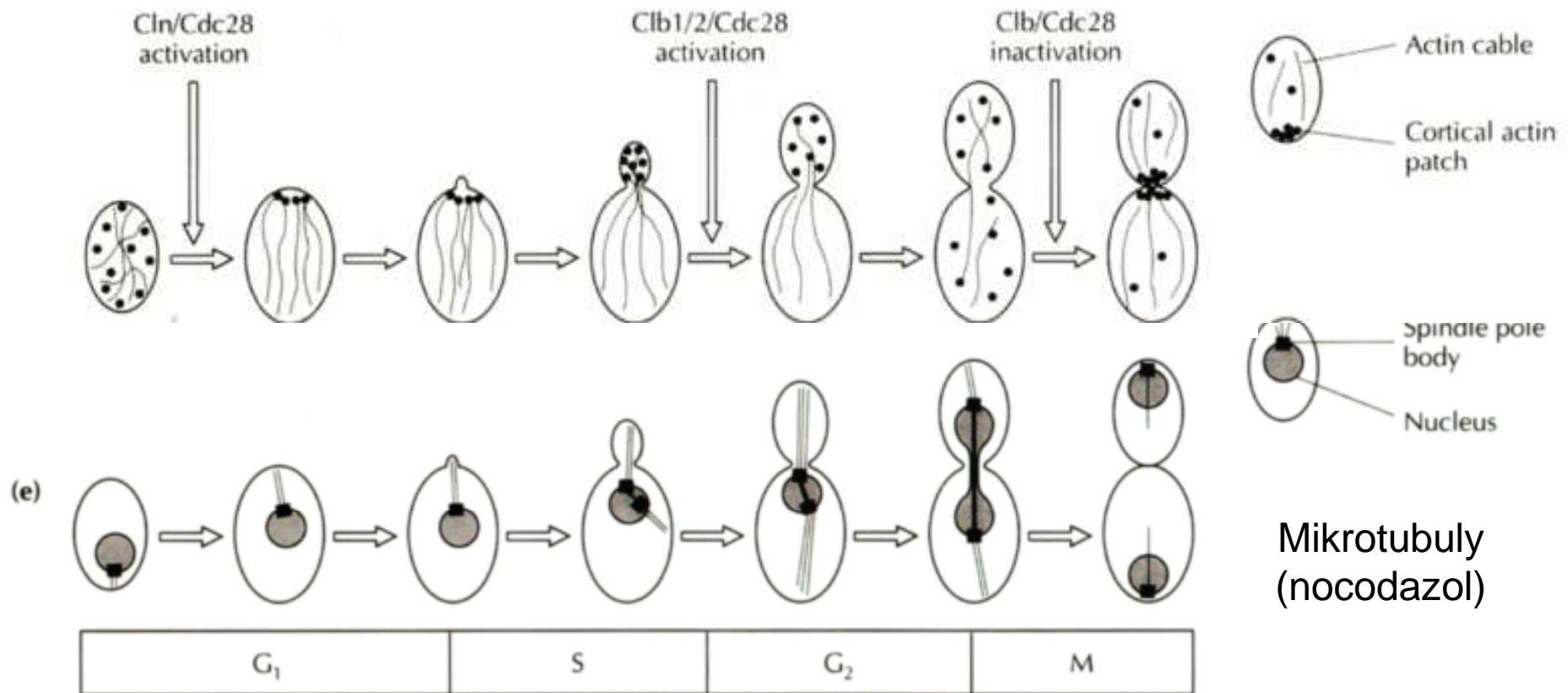
*Meiotic cycle*

*Vegetative (mitotic) cycle*

- nestálé diploidní buňky vstupují do meiosy hned po konjugaci ([ade6-M210xade6-M216](#))
- pro konjugaci je kritická G1 fáze jako u *S. cerevisiae*



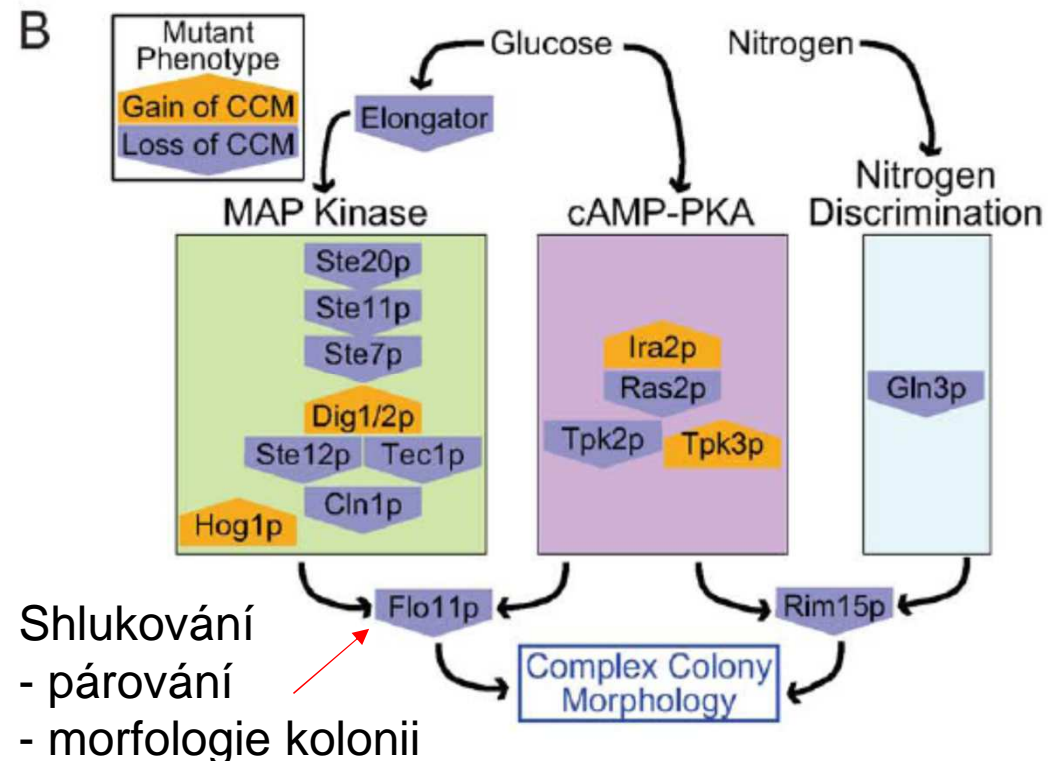
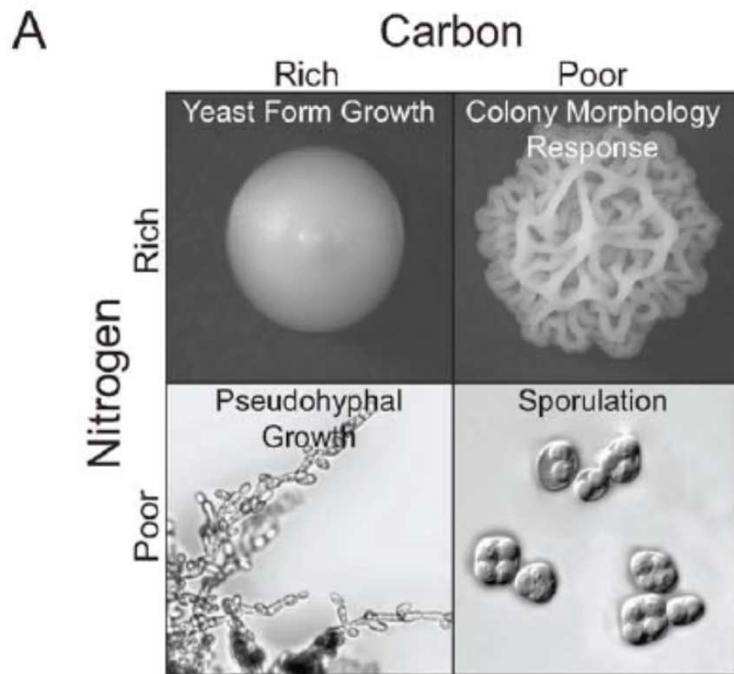
# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- 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) - mikrotubuly
- 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
- při nedostatku živin aretuje v G1 nebo posléze přechází do stacionární fáze (vyčerpání živin)
- nedostatek dusíku – růst pseudohyf
- při nedostatku N a C (diploidní buňky) zastavují v G1 a zahajují sporulaci
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují



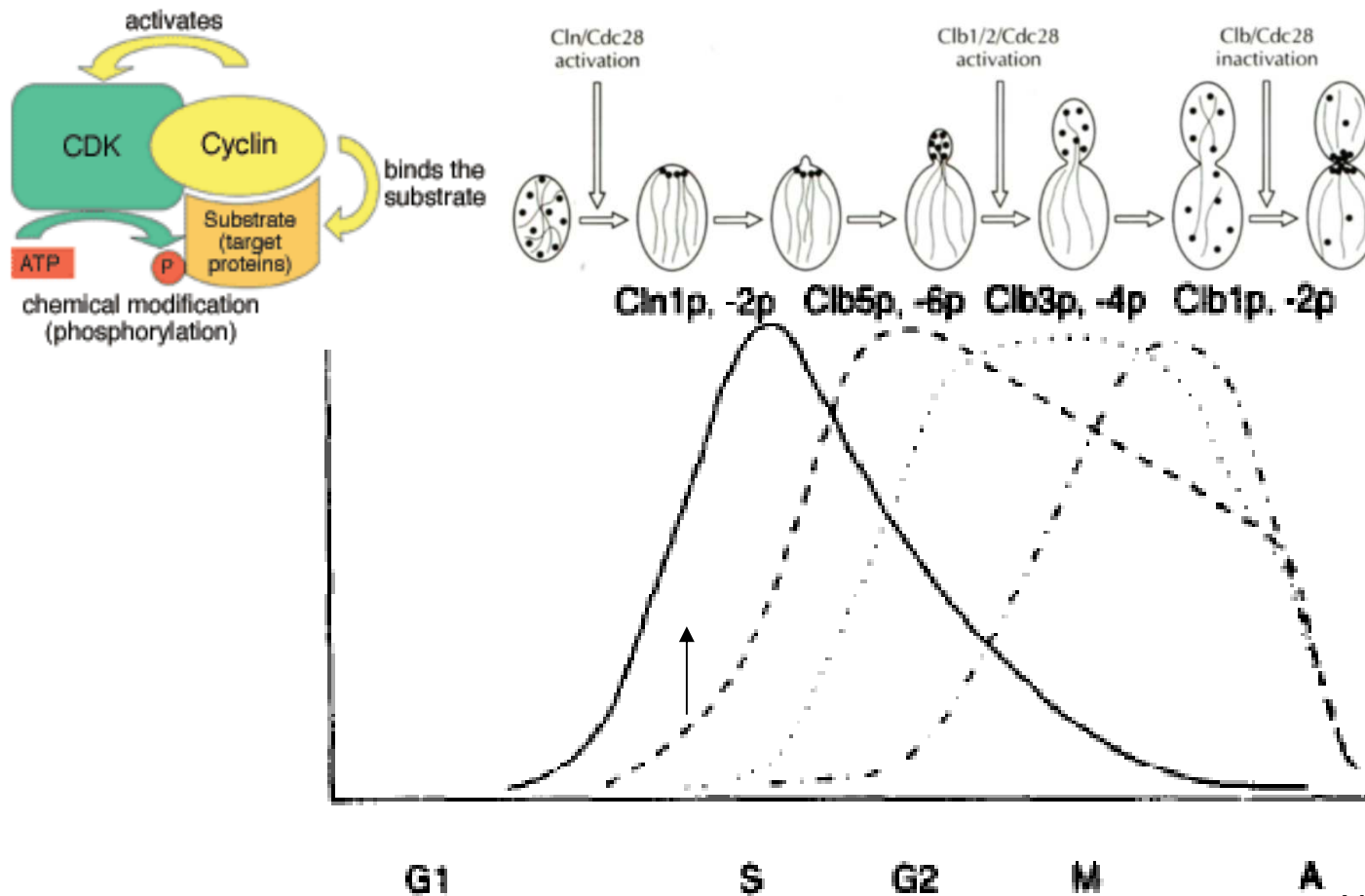
Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)



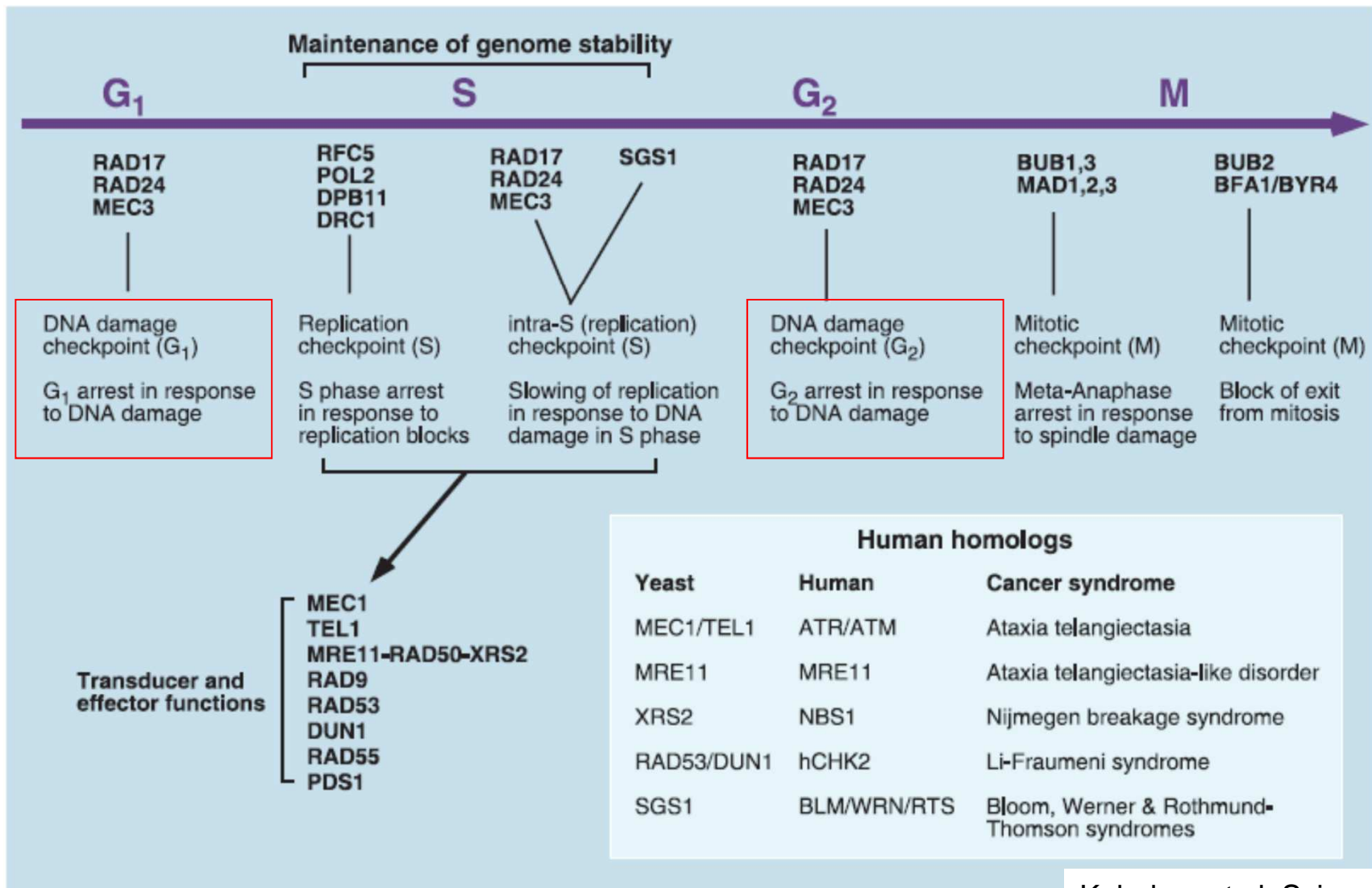
# CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká aktivní komplex:

- v G1 fázi *Cln1p* a *Cln2p* (CLN3 mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *Clb5p* a *Clb6p* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se účastní *Clb3p* a *Clb4p*
- mitózu ukončují *Clb1p* a *Clb2p* a jejich degradace



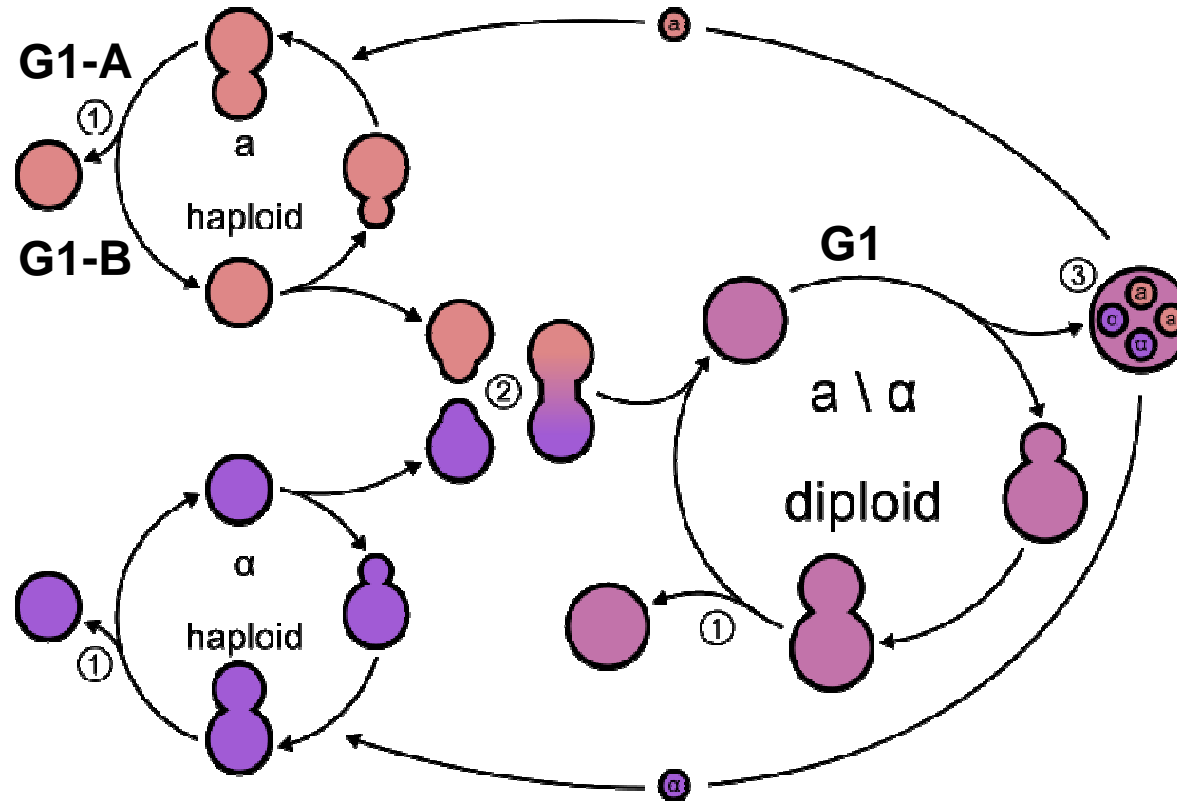




Kolodner et al, Science (2002)

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)

# Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



- v úseku A jsou buňky „nedorostlé“ – elutriace (centrifugace dle velikosti buněk) – tzv. **G0 synchronizace**

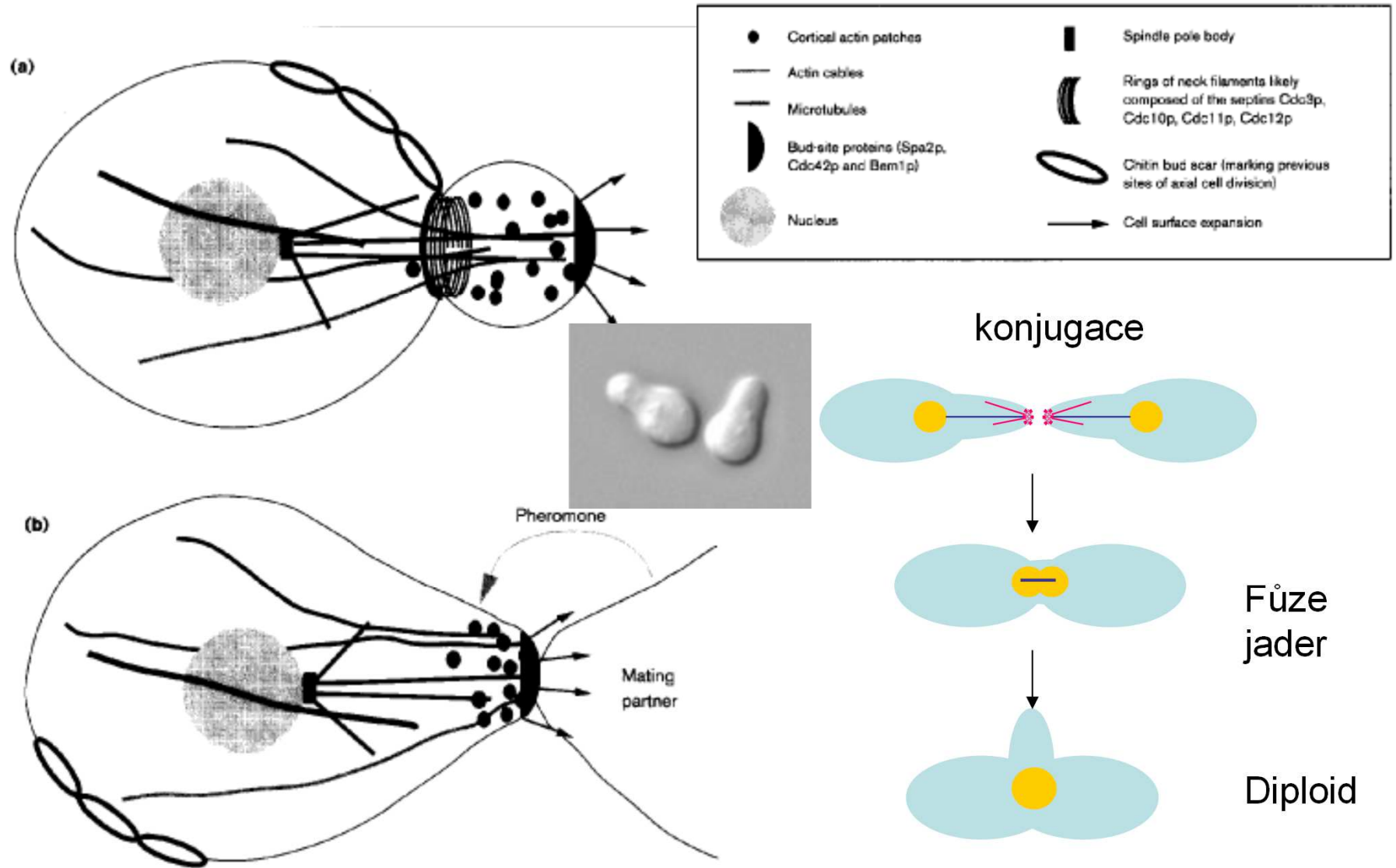
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci - za přítomnosti alfa-faktoru (krátký syntetický peptid) dochází k zastavení buněčného cyklu – **G1 synchronizace**

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

- nocodazol blokuje polymeraci tubulinu – schází mikrotubuly pro mitózu – **G2 synchronizace**

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

# Párování *S. cerevisiae*



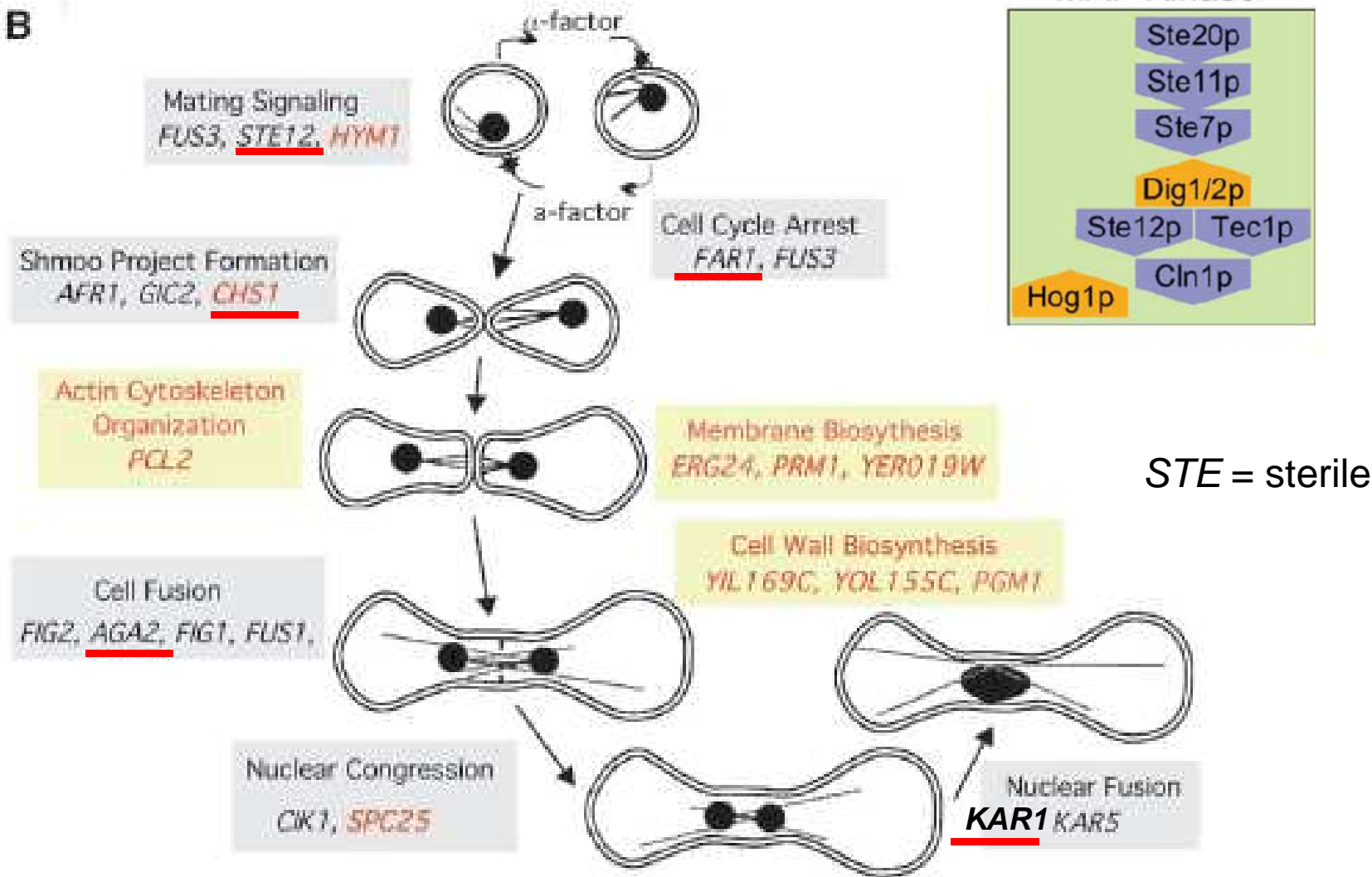
Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

Vybudování buněčné stěny přemostující „shmoo“ výběžky

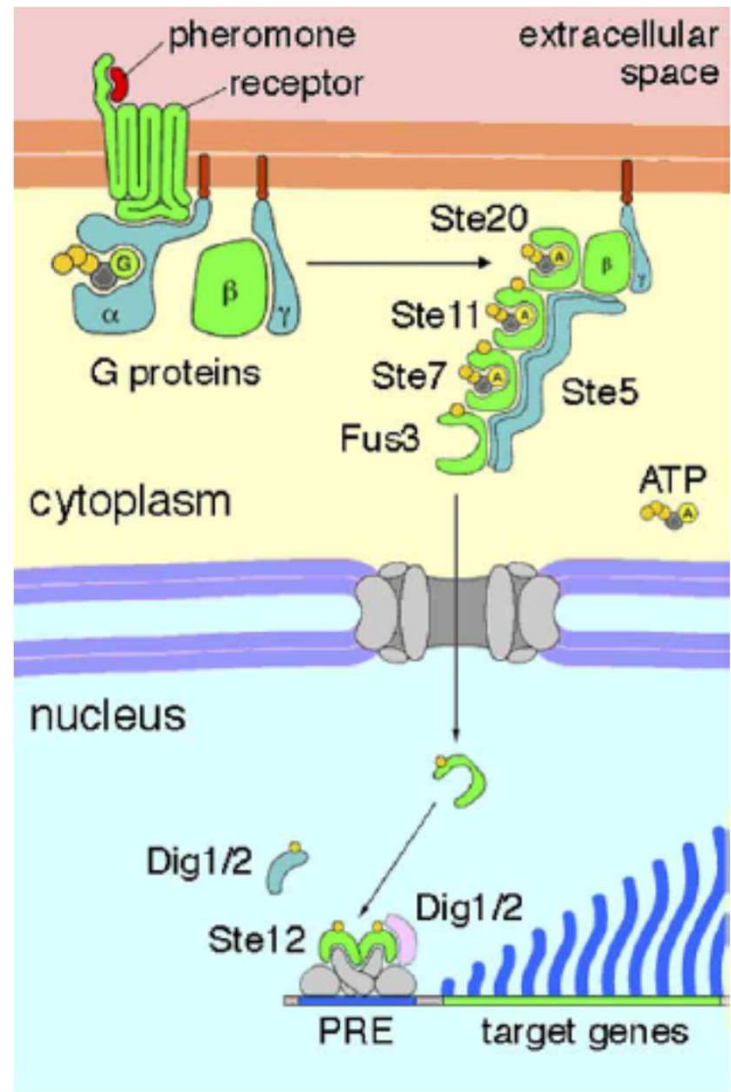
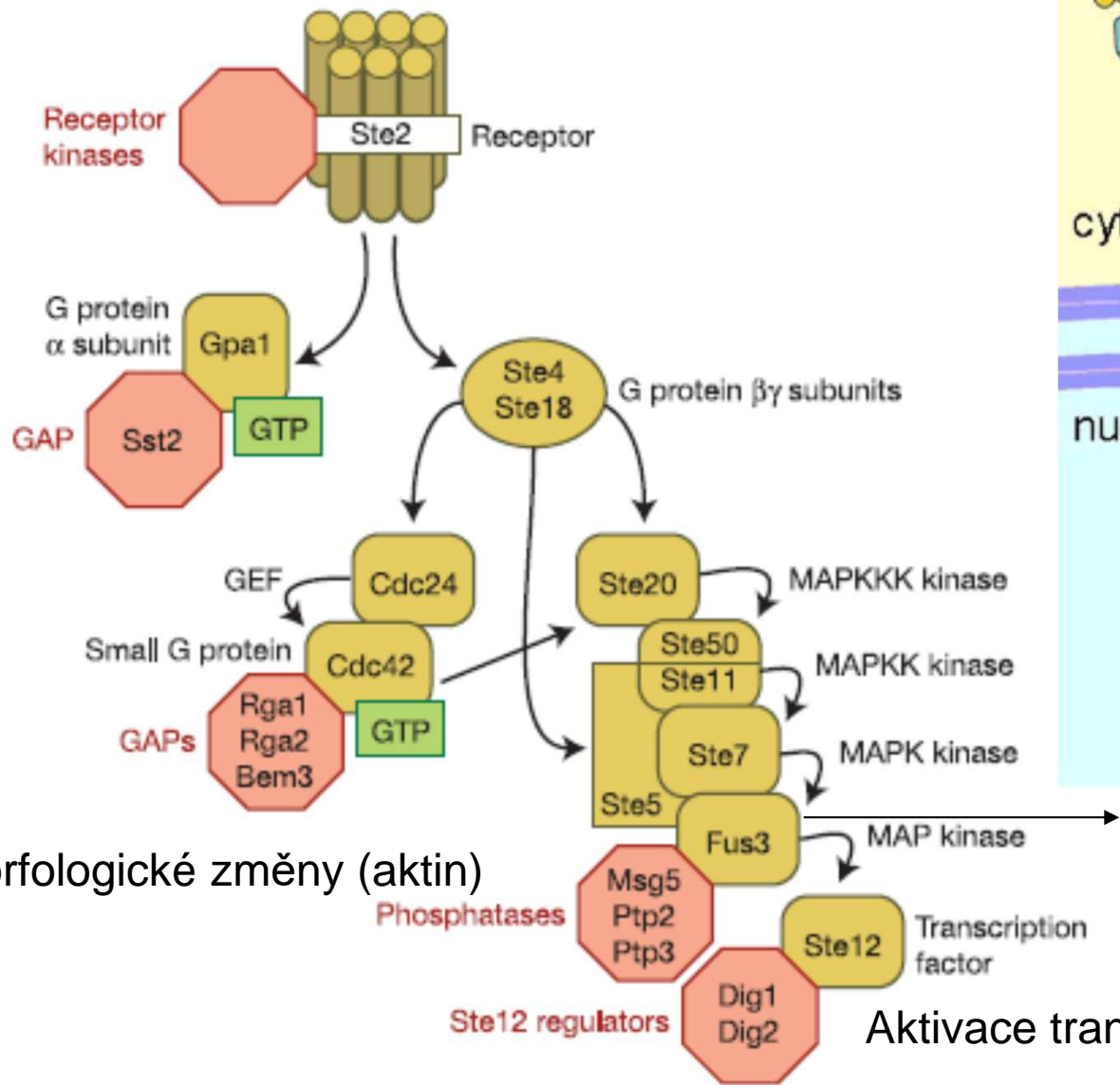


# Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu

**B**



# Signální dráha – $\alpha$ faktor














# Regulace transkripce v haploidních buňkách (konstitutivní)

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

a-spec.= *MFA1,2* (a-feromon), *STE2* ( $\alpha$ -receptor), *STE6*, 14 (úprava a sekrece feromonu)

$\alpha$ -spec.= *MF $\alpha$ 1,2* ( $\alpha$ -feromon), *STE3* (a-receptor), *STE13*, *KEX2* (proteasy)

haploid spec.= *STE4,18* (podjednotky G-proteinu), *RME1* (inhibitor meiosy), *HO*, *NEJ1*, *LIF1*

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	 aSG ON
		 $\alpha$ SG OFF
		 haploid SG ON
<hr/>		
$\alpha$ 1, $\alpha$ 2	$\alpha$ haploid	 aSG OFF
		 $\alpha$ SG ON
		 haploid SG ON
<hr/>		
$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF  $\alpha$ SG OFF  haploid SG OFF

# Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

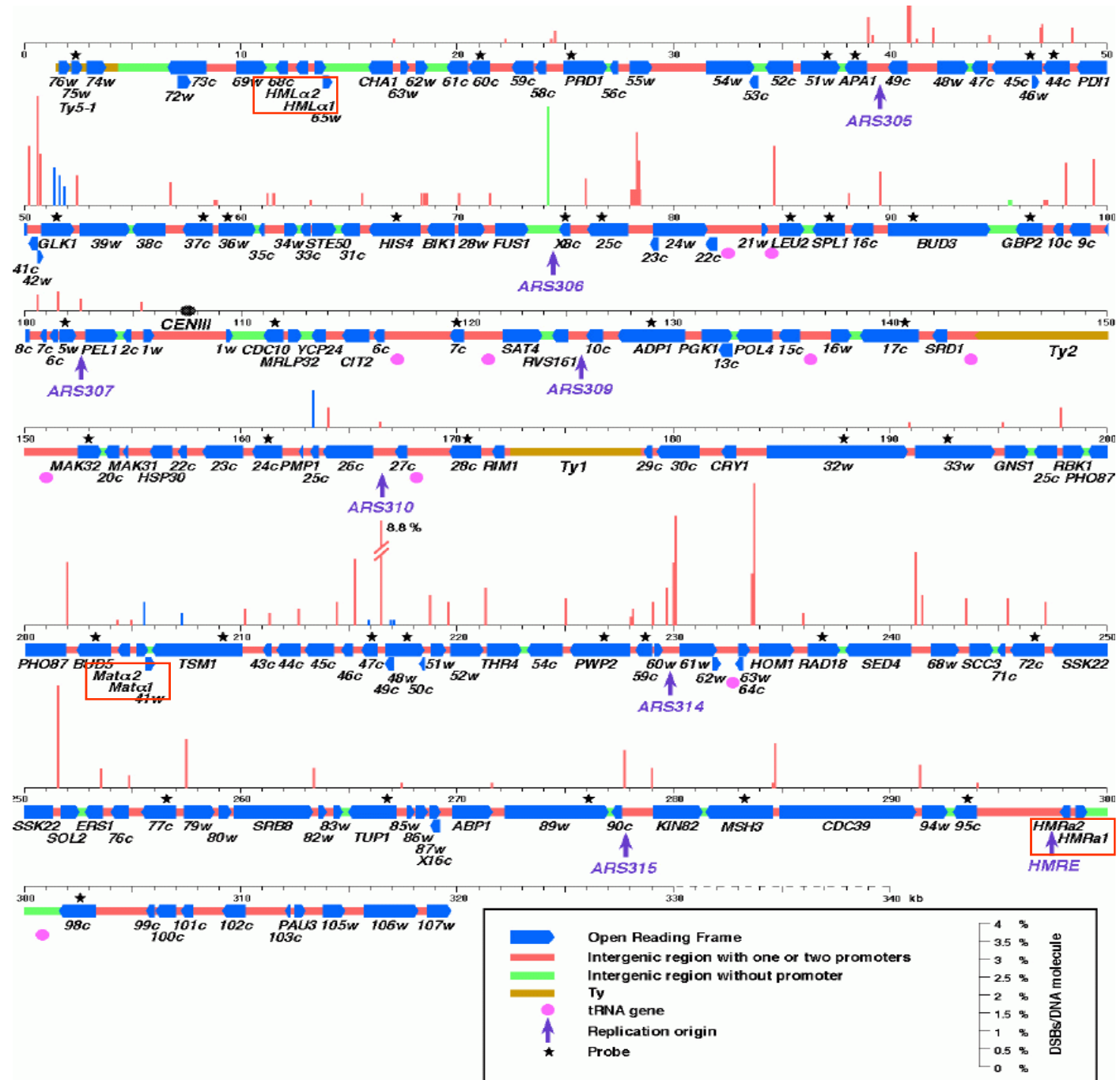
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT  $\alpha$  (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

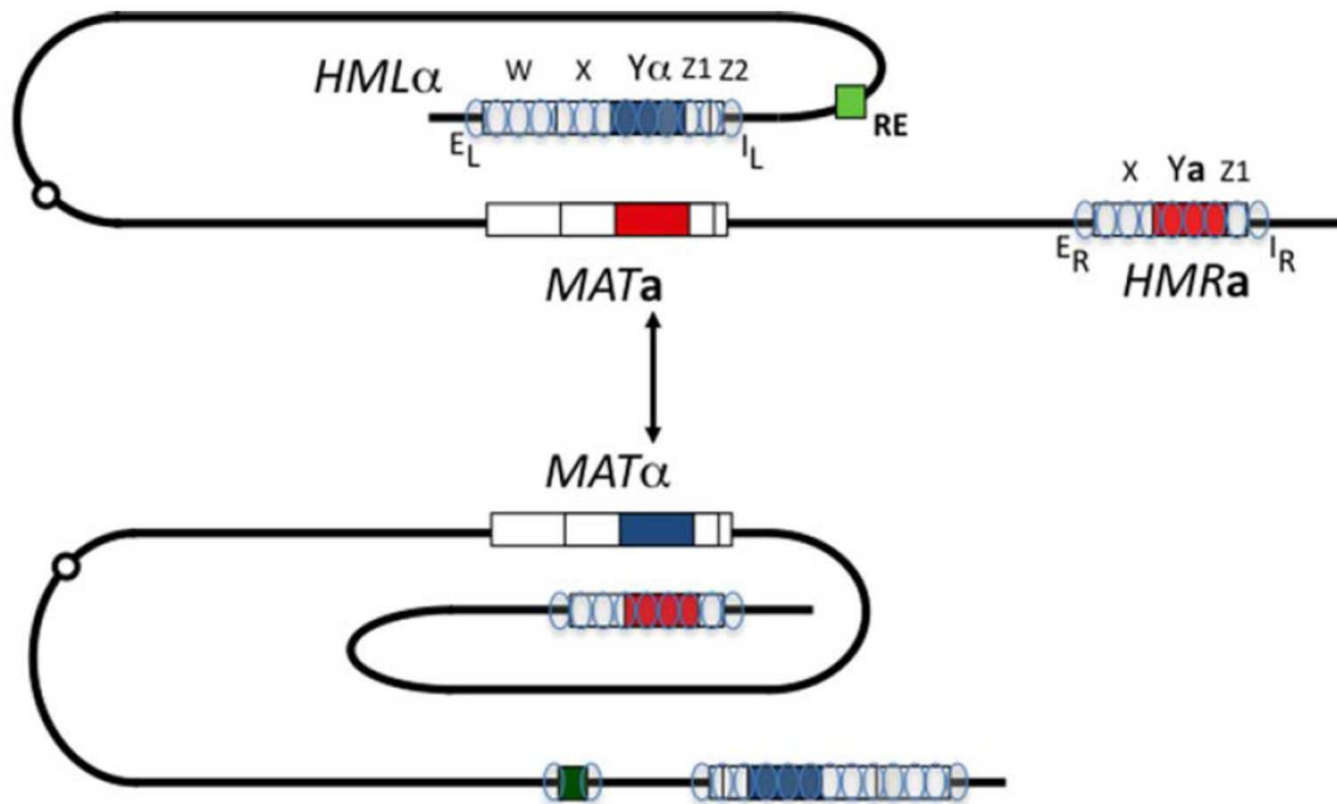
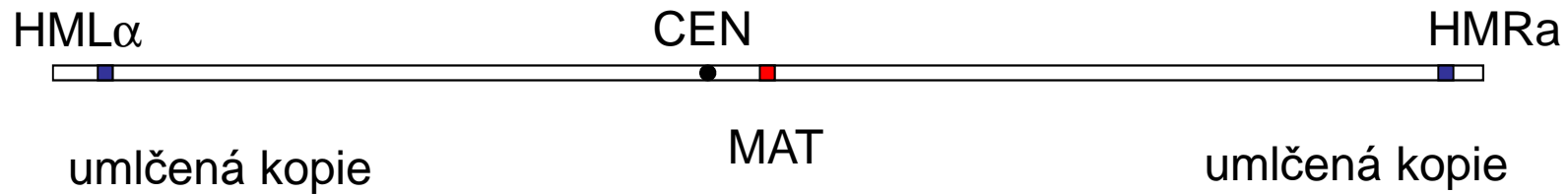
HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické – stabilní  
Homothalické – přepínají párovací typ



# Přepínání párovacího typu

Chromosom III



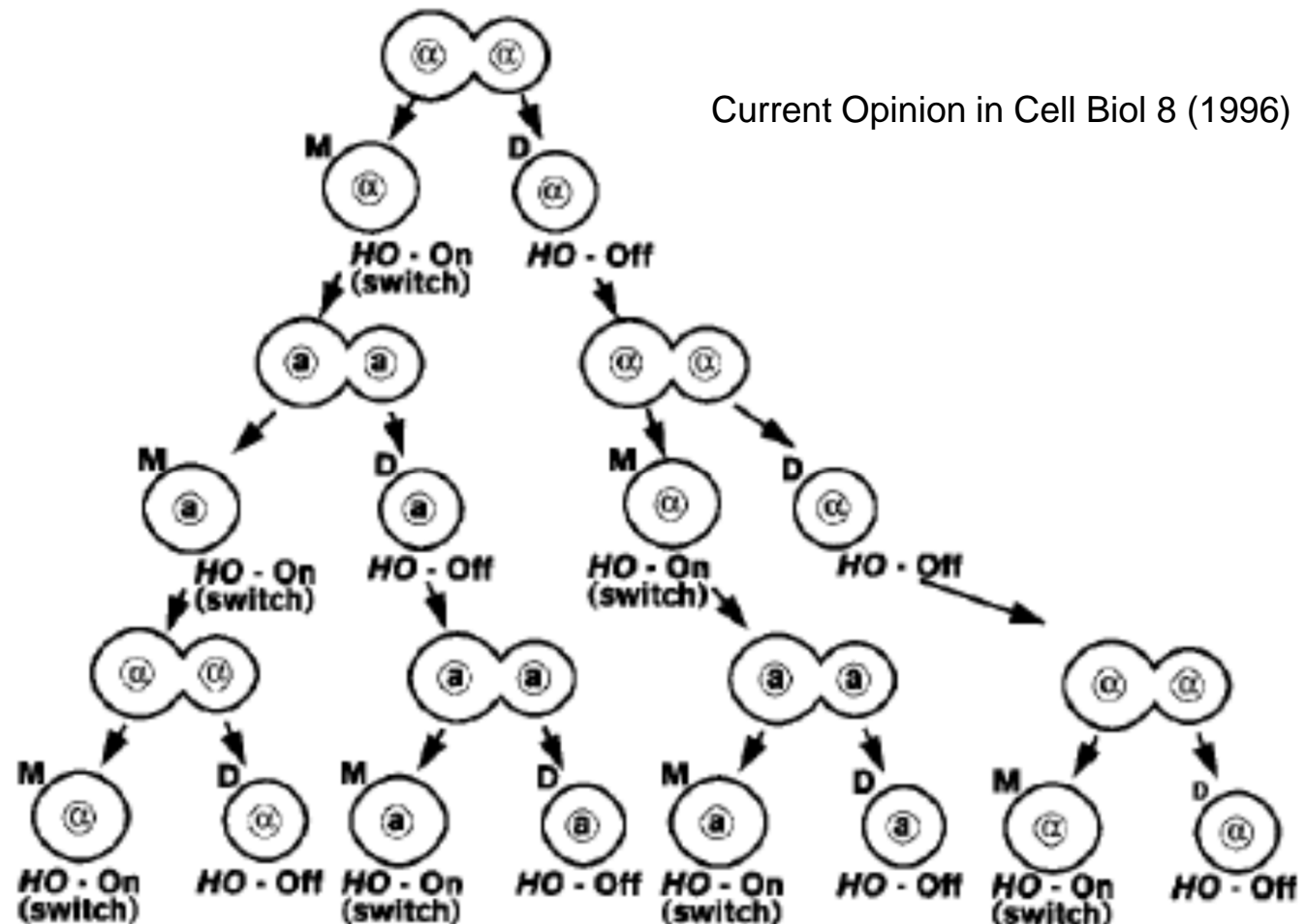
HO endonukleasa rozeznává a štípe specifické sekvence  
Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

# Přepínání párovacího typu

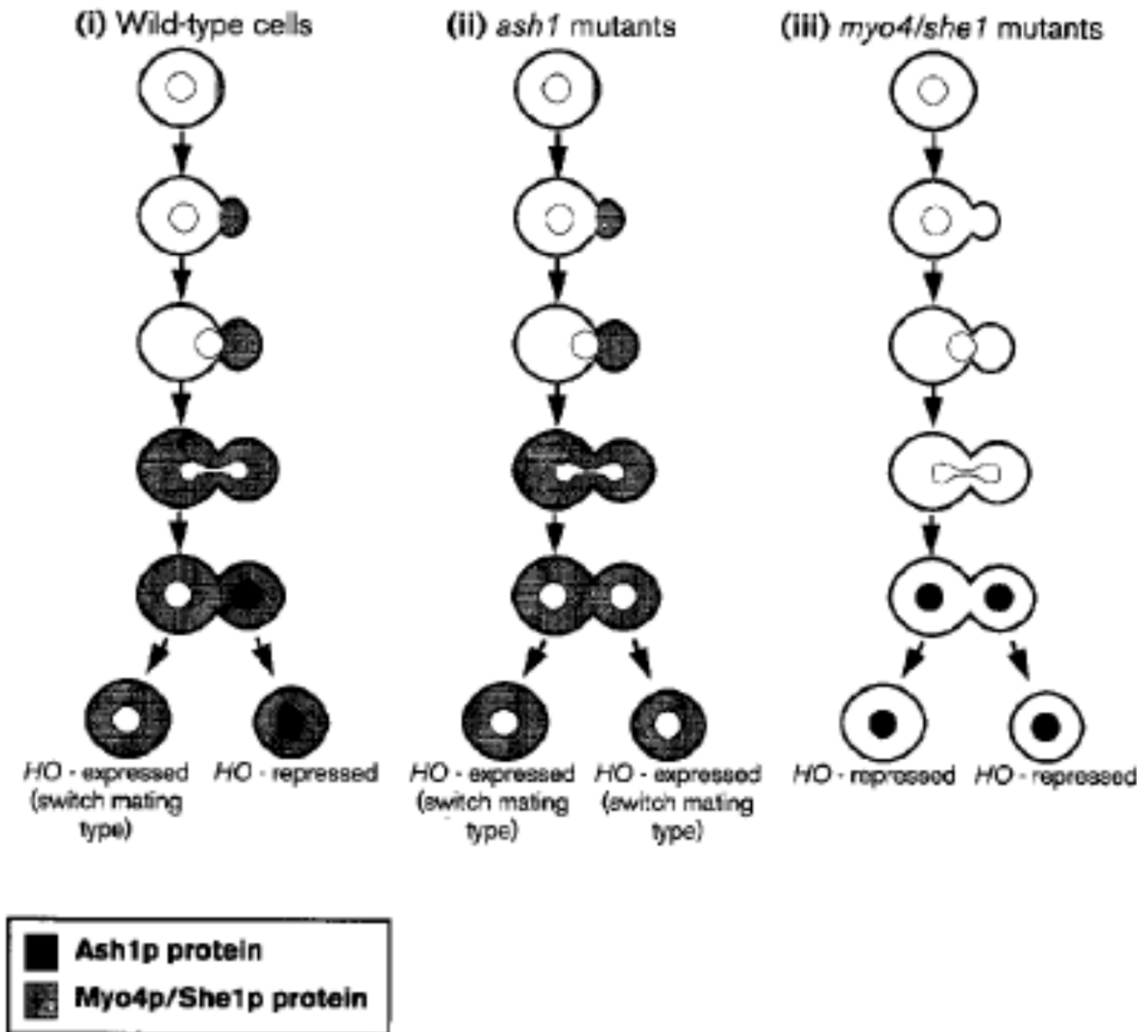
DNA z MAT lokusu je HO endonukleasou vystřižena a na její místo se překopíruje sekvence z kazety opačného páru

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

homotalické



# 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