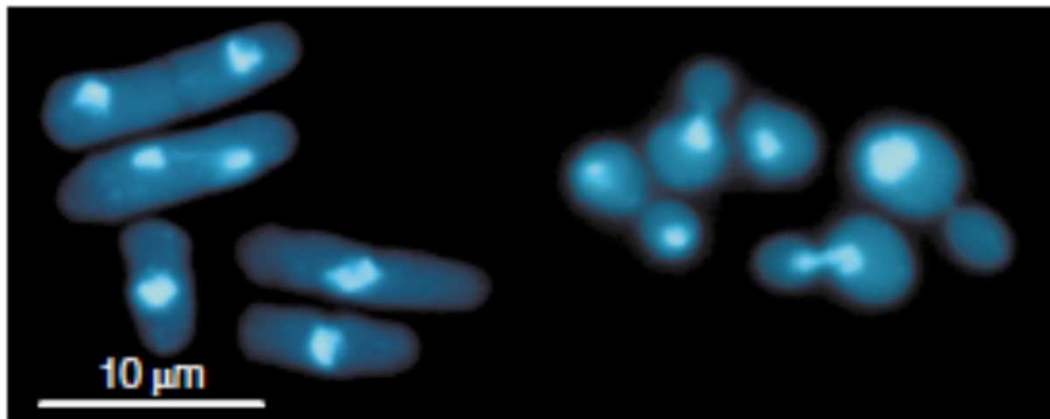
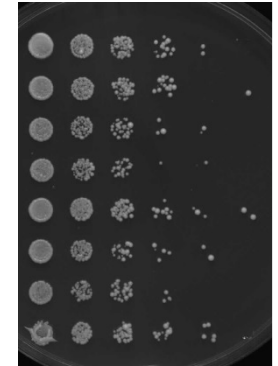


Osnova 4. přednášky

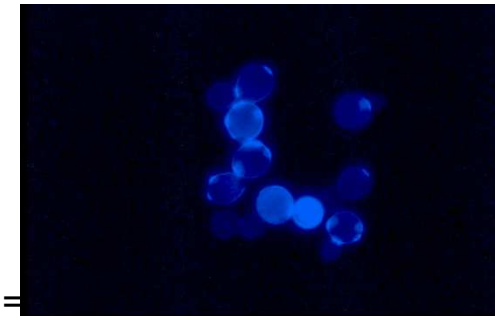
- Genetické metody
 - Plasmidy
 - Integrace
 - Teplotně-sensitivní mutanty
 - Tetrádová analýza
 - Syntetická letalita, suprese



Výhody kvasinkového modelu



- Rychle se množí 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 = phaloidin, 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)



Nevýhoda – malé buňky, malé orgány (např. nejsou vidět chromosomy – SMC)

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 – mutace
(identifikační číslo alely)
LEU2::HIS3 – inzerce
HIS3 genu v lokusu
LEU2

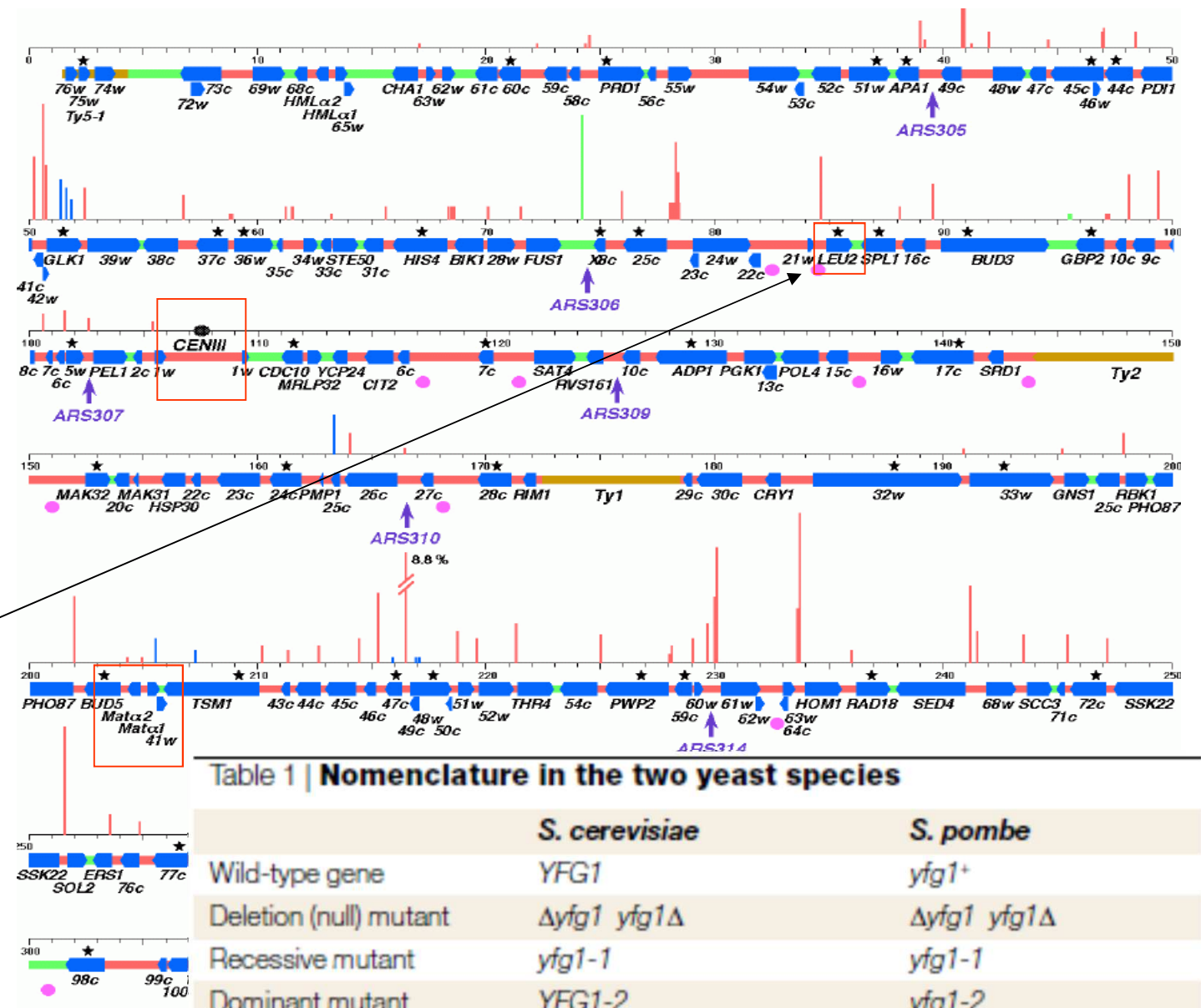


Table 1 | Nomenclature in the two yeast species

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Wild-type gene	<i>YFG1</i>	<i>yfg1+</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.

Forsburg: NRG, 2001
Baudat a Nicolas, PNAS, 1997

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.

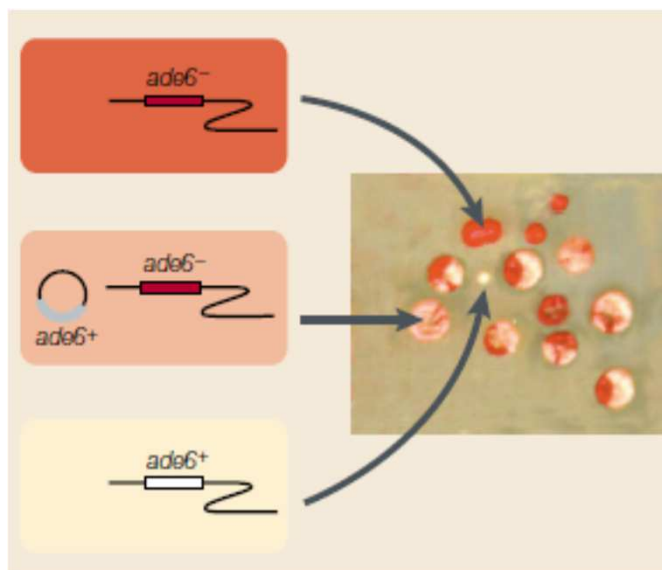
References: W303 constructed by Rodney Rothstein

Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní
systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-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⁻, gal80Δ, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-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^r2, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

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



Genotype

References

MAT α , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*,
gal4 Δ , *gal80 Δ* , *LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*,
GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

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

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*,
leu2-3, 112, *gal4 Δ* , *met⁻*, *gal80 Δ* ,
URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

Harper *et al.*, 1993

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*,
trp1-901, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh^{r2}*,
LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,
URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ

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

2μ (2 micron), an endogenous plasmid DNA molecule found in some yeast cells, with a circumference of 2μ ; 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 μ m plasmidů nebo centromer (*S.c.*; 2 μ m přítomné také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilum*)
- Kvasinková část – marker (URA3, NAT ...), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 μ m (~50 kopii 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 ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	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) ^d +++ ^d
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>CUP1</i>	Indukovány mědí	
<i>MFA1</i>	MATa specifický (haploid specifický)	

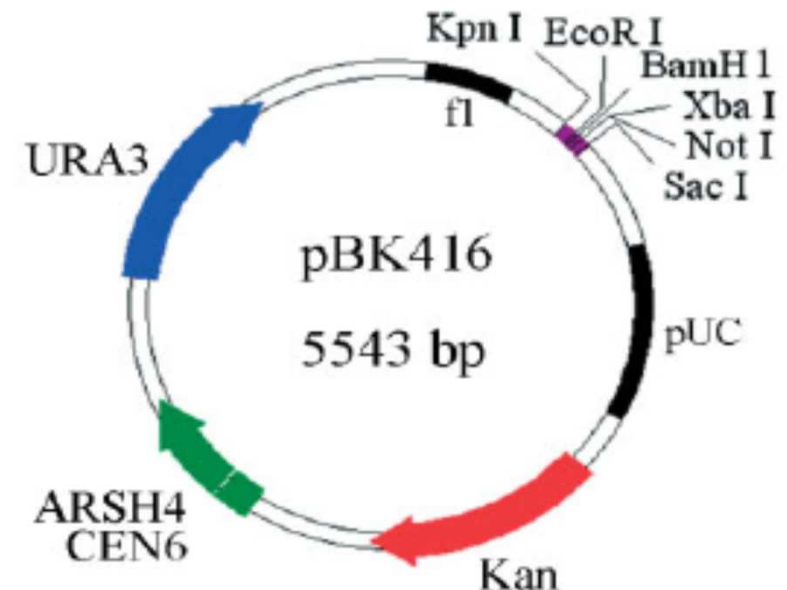


Table 1. Summary of pFA6 derivatives for genomic FLAG- and PK-tagging and gene deletion useful in *S. pombe*

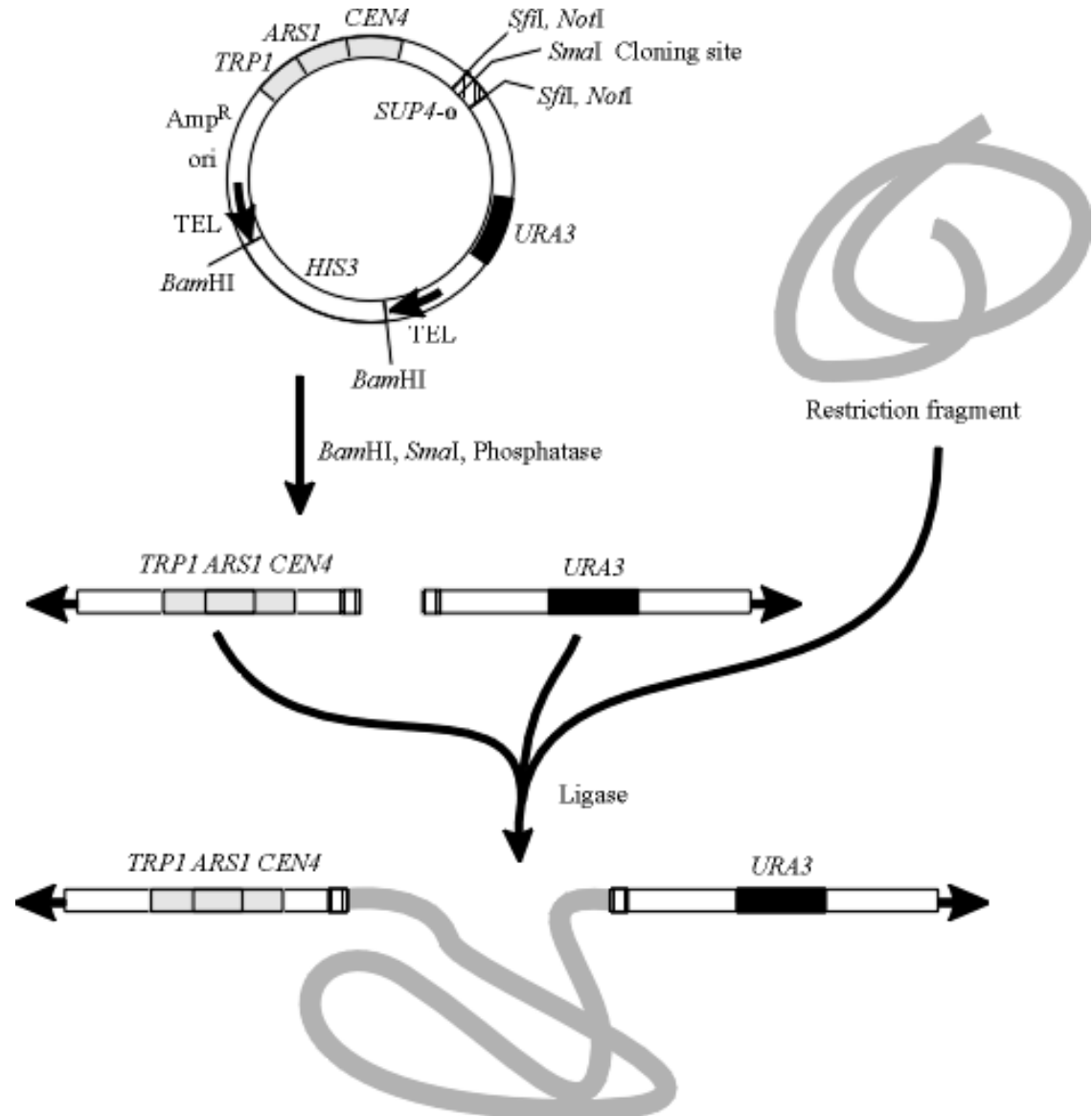
Vector name		Comments	Markers	Sources	
PK-tagging vectors	pFA6a-6xGLY-V5-(marker)	C-terminal G6-1PK(V5)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i>	(8) (8)	
	pFA6a-12PK-(marker)	C-terminal 12PK(V5)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>LEU2MX6</i> <i>ura4MX6</i>	This study This study This study This study This study	
	pFA6a-3FLAG-(marker)	C-terminal 3FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i>	(4) (4) (4) (4)	
	pFA6a-6xGLY-3FLAG-(marker)	C-terminal G6-3FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i> <i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i>	(8) (8) (8) (8)	
FLAG-tagging vectors	pFA6a-(marker)-Pnut1-3FLAG*	N-terminal 3FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i> <i>his3MX6</i>	(4) (4) (4) (4) (4)	
	pFA6a-(marker)-Pur1-3FLAG**	N-terminal 3FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i>	(4) (4) (4) (4)	
	pFA6a-G9/G11-5FLAG-(marker)	C-terminal G9/G11-5FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>KanMX6</i>	This study	
	pFA6a-GFP(S65T)-(marker)	C-terminal GFP(S65T)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i> <i>ura4MX6</i>	(2.15) (10) (10.16) This study This study	
	pFA6a-(marker)-Pnut1-GFP(S65T)*	N-terminal GFP(S65T)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>natMX6</i>	(2) (16)	
GFP-tagging vectors	pFA6a-mRFP-(marker)	C-terminal mRFP-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>uraMX6</i>	(10) (10) (10) This study	
	Disruption plasmids	pFA6a-(marker)	For gene deletion	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i> <i>ura4MX6</i> <i>his3MX6</i> <i>LEU2MX6</i>	(2) (9.10) (9.10) (9.10) This study This study This study

*Expressed under the control of the *nut1* promoter; *P3nut1* and its weaker derivatives *P41nut1* and *P81nut1* are available.

**Expressed under the control of the *ura1* promoter.

YAC (yeast artificial chromosome)

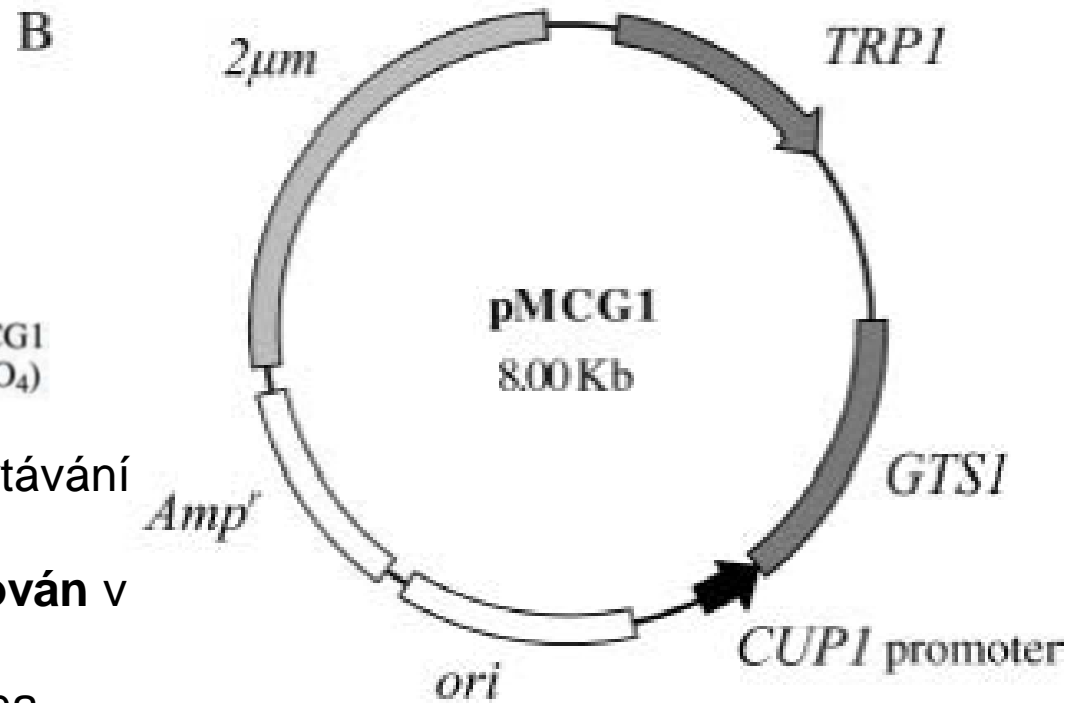
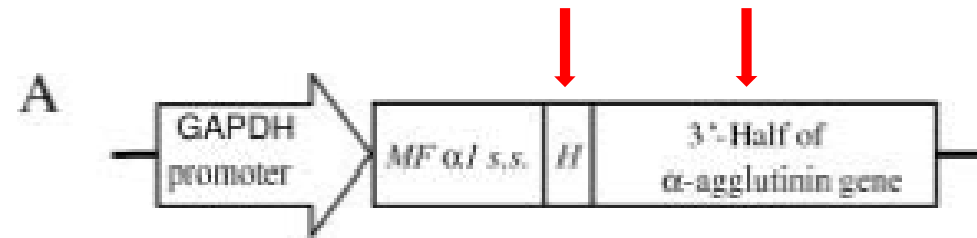
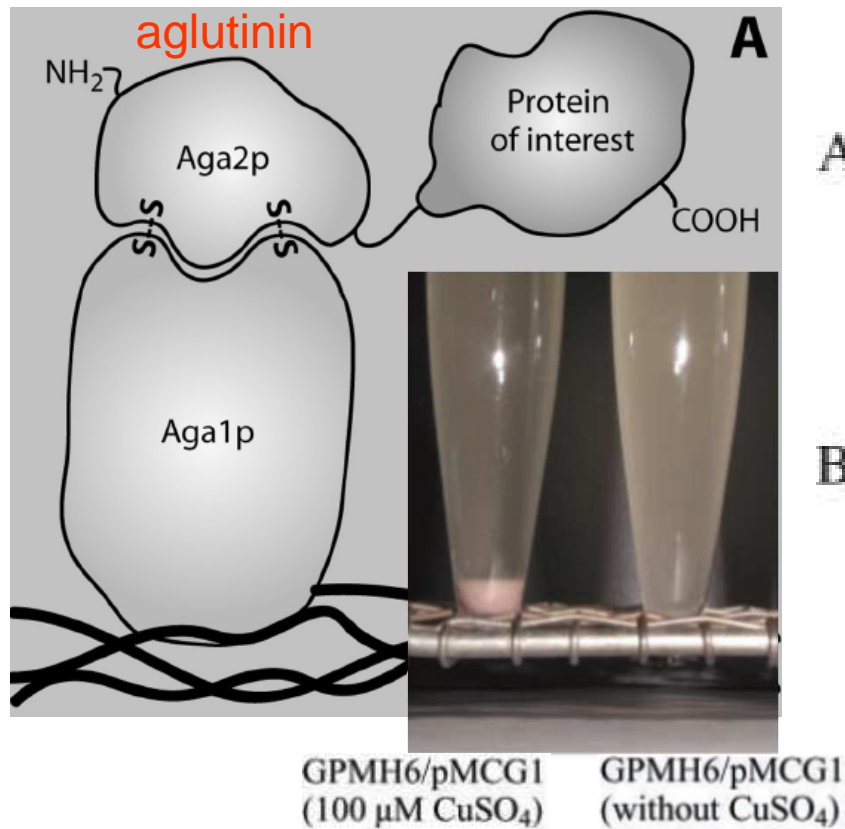
- Bakteriální část – Amp resistance, počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert např. lidská genová banka pro HuGO 80000 klonů YAC (270kbp)
- Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- Výzkum savčích telomer a centromer
- Pomocí transfekce, lipofekce nebo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

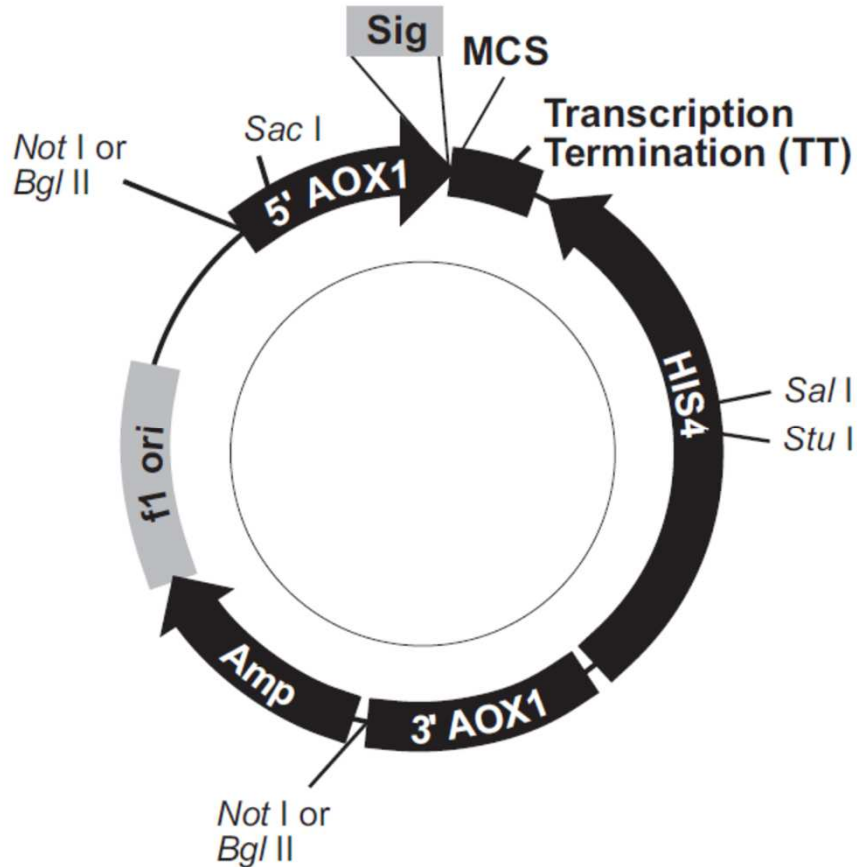
Yeast surface display



- 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 μ m části

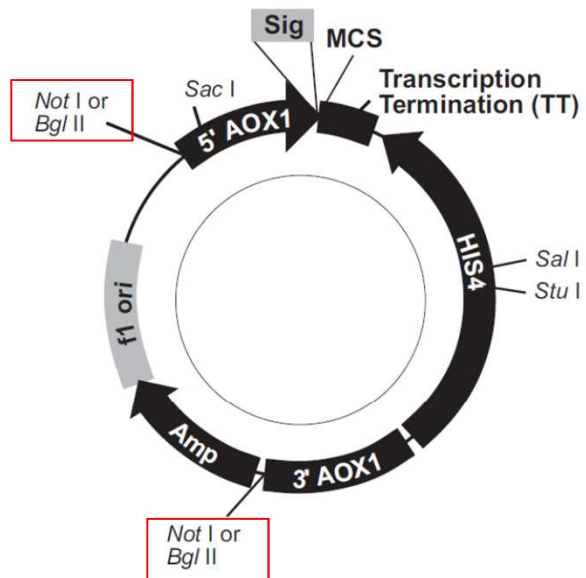


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotyp: *his4*)

- exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

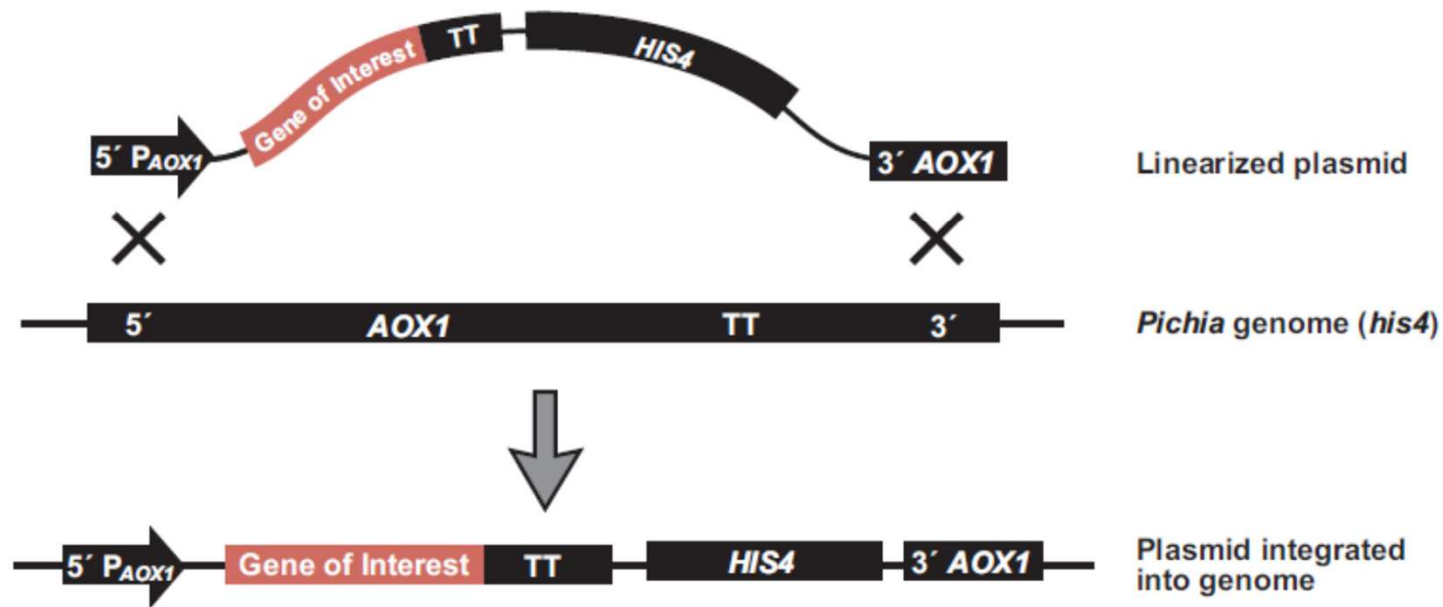
Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression in <i>Pichia</i></u> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal <u>protein secretion</u> signal	Targets desired 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 gene</u> <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
Not I Bgl II Sac I Sal I Stu I	Unique restriction sites	Permits <u>linearization of vector</u> for efficient <u>integration into the <i>Pichia</i> genome</u>

Integrace I.

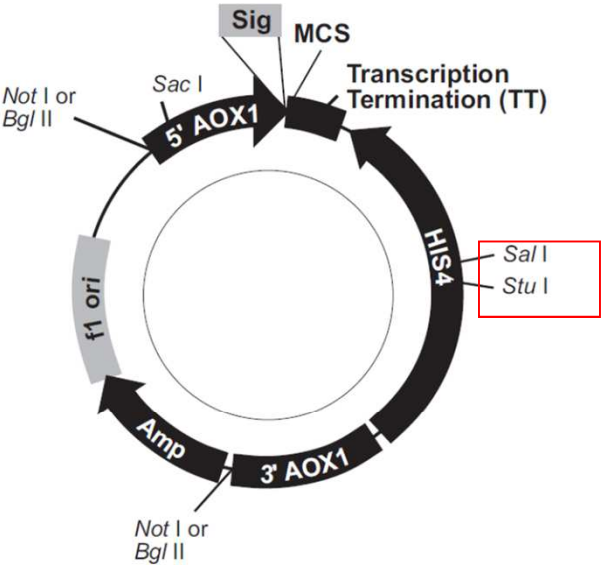


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru
- integrace do AOX1 lokusu

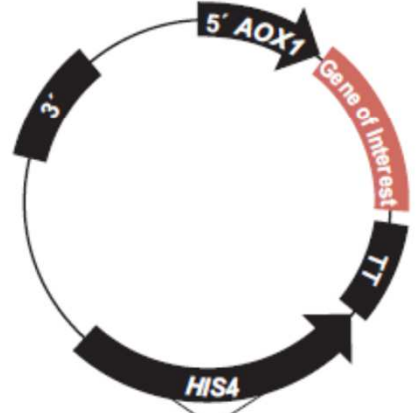
- **mechanismus homologní rekombinace**



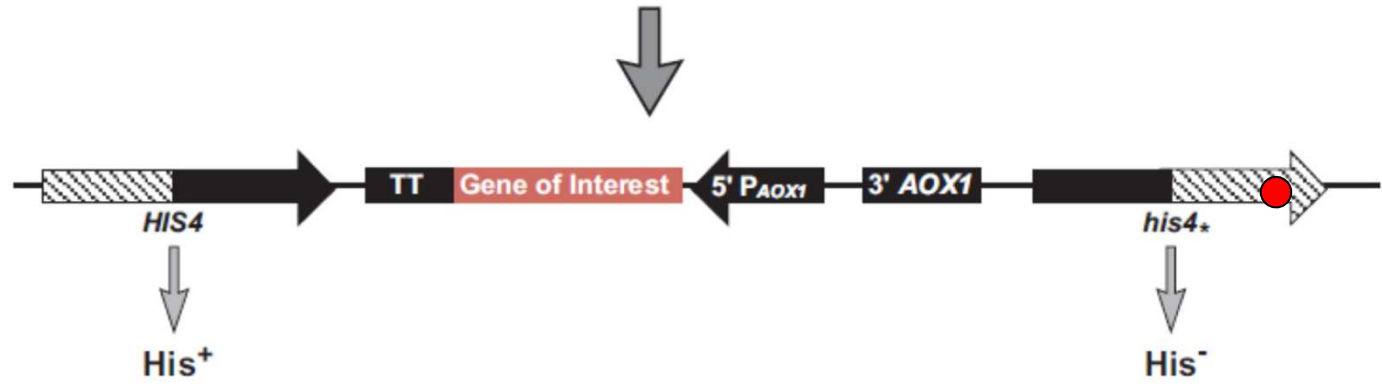
Integrace II.



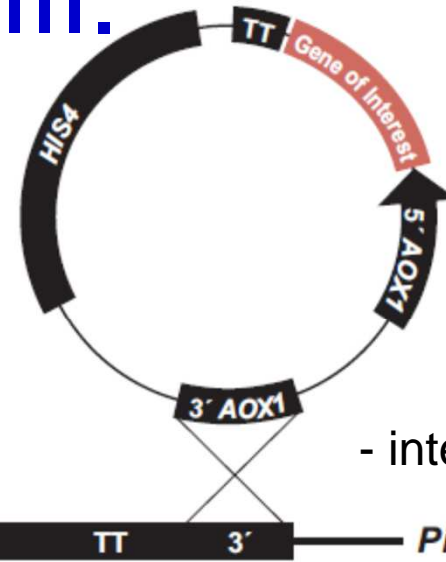
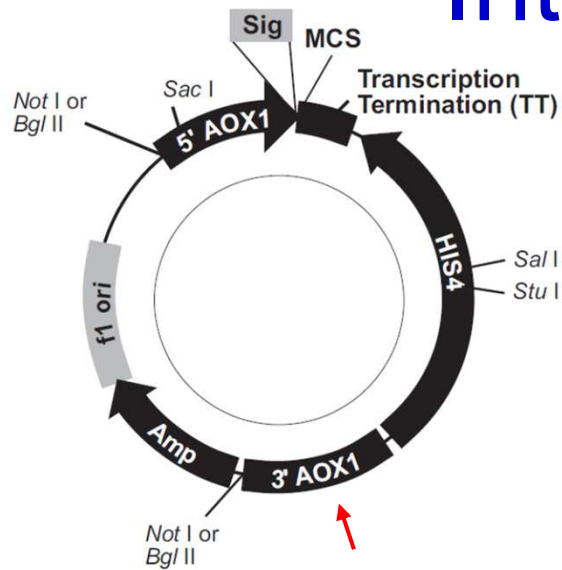
- integrace do *his4* lokusu



mechanismus homologní rekombinace

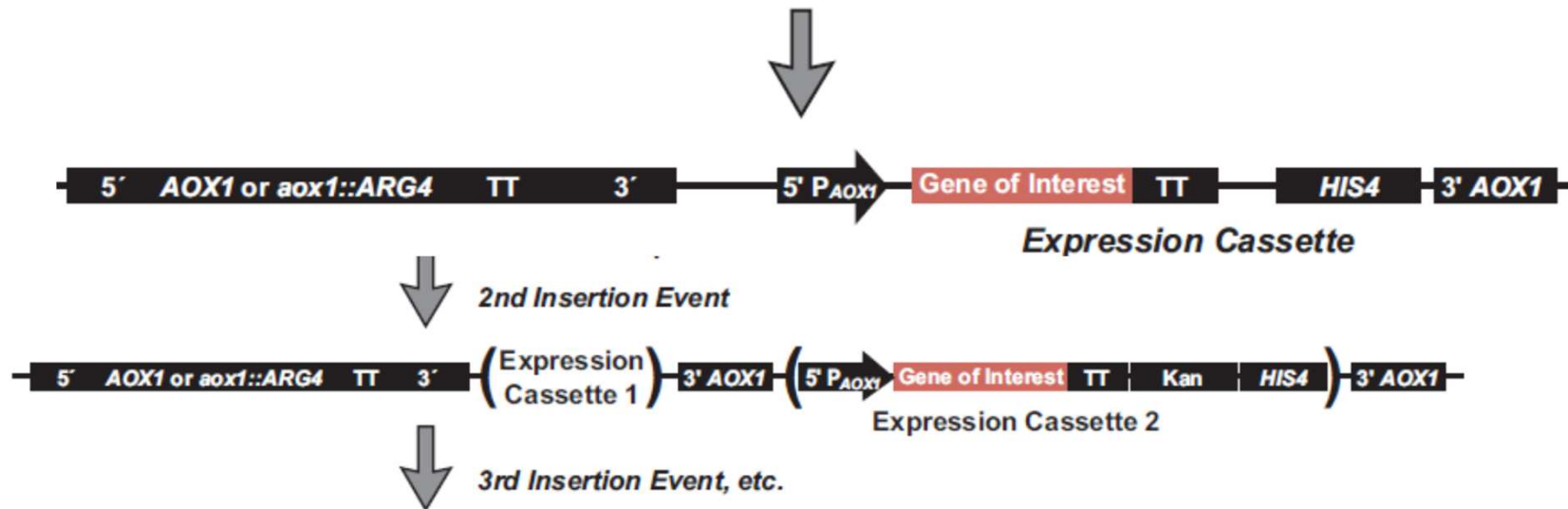


Integrace III.



mechanismus
homologní
rekombinace

- integrace do AOX1 lokusu

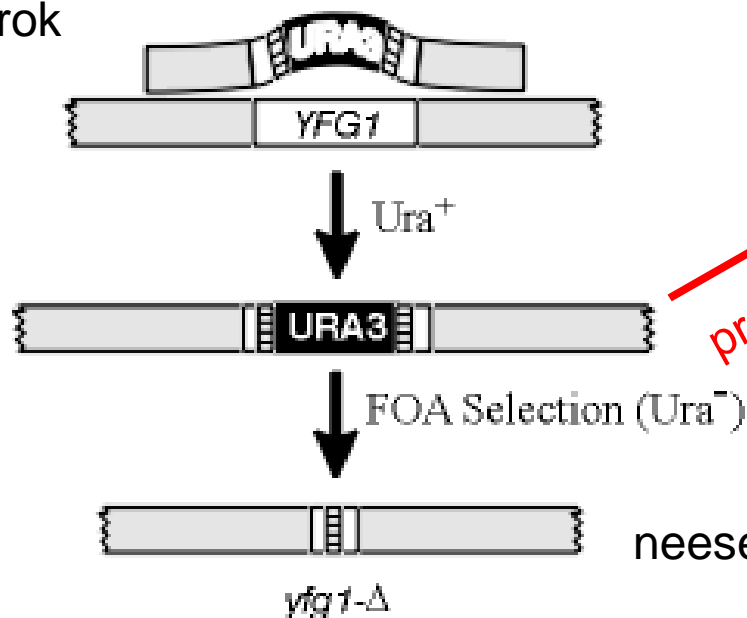


u *Pichia pastoris* dochází u 1-10% transformantů k vícenásobné integraci – vyšší exprese
Pomocí jiného markeru lze integrovat další kazetu

Disrupce/delece genu

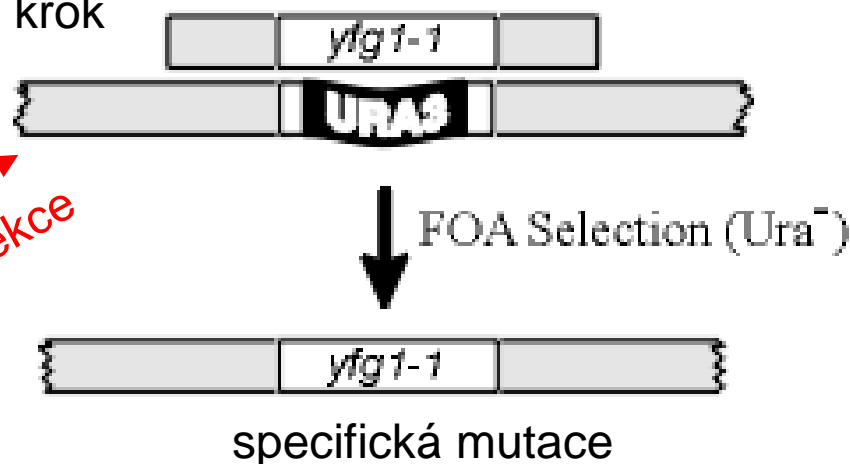
- Studium funkce genu – fenotyp (1. delece, 2. mutace)
 - nezbytný/esenciální gen => buňky potřebují gen např. na plasmidu (plasmid shuffling)
 - životaschopné – mutace lze přímo integrovat do genomu
 - mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“ – dále lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami a hledat jejich funkční vztahy (synthetic lethal x epistatic x suprese)

1. krok



2. krok

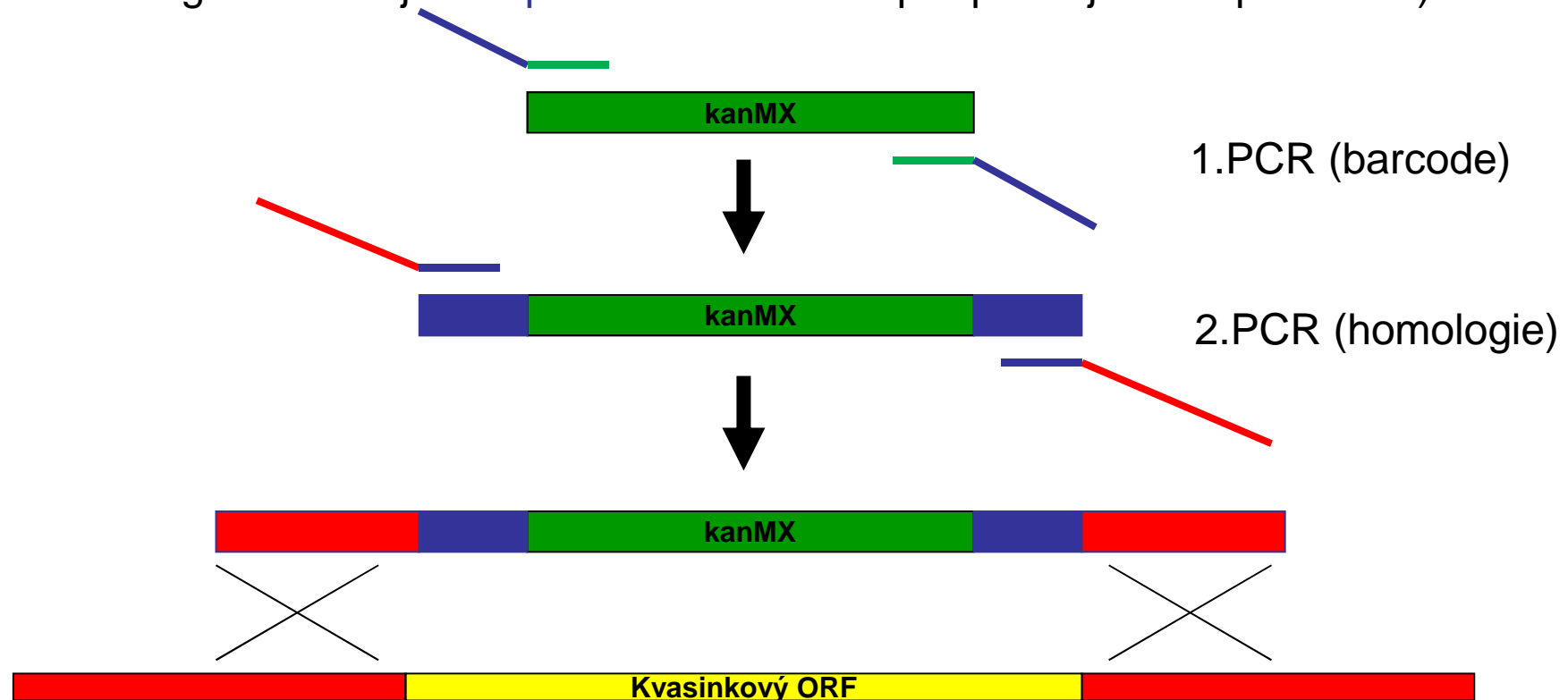
protiselekce



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

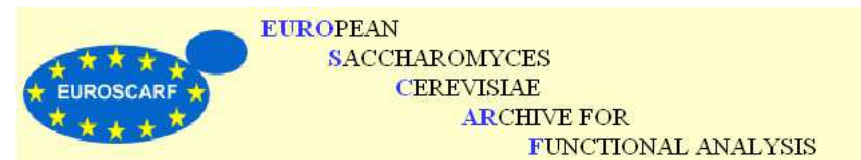
Delece genu - PCR

- 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

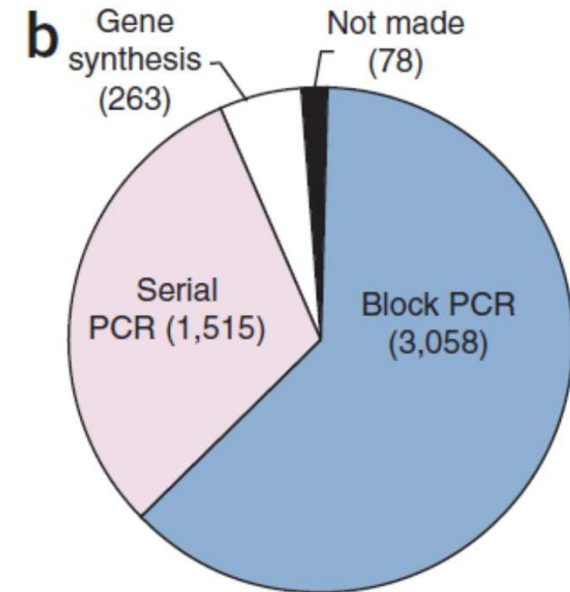
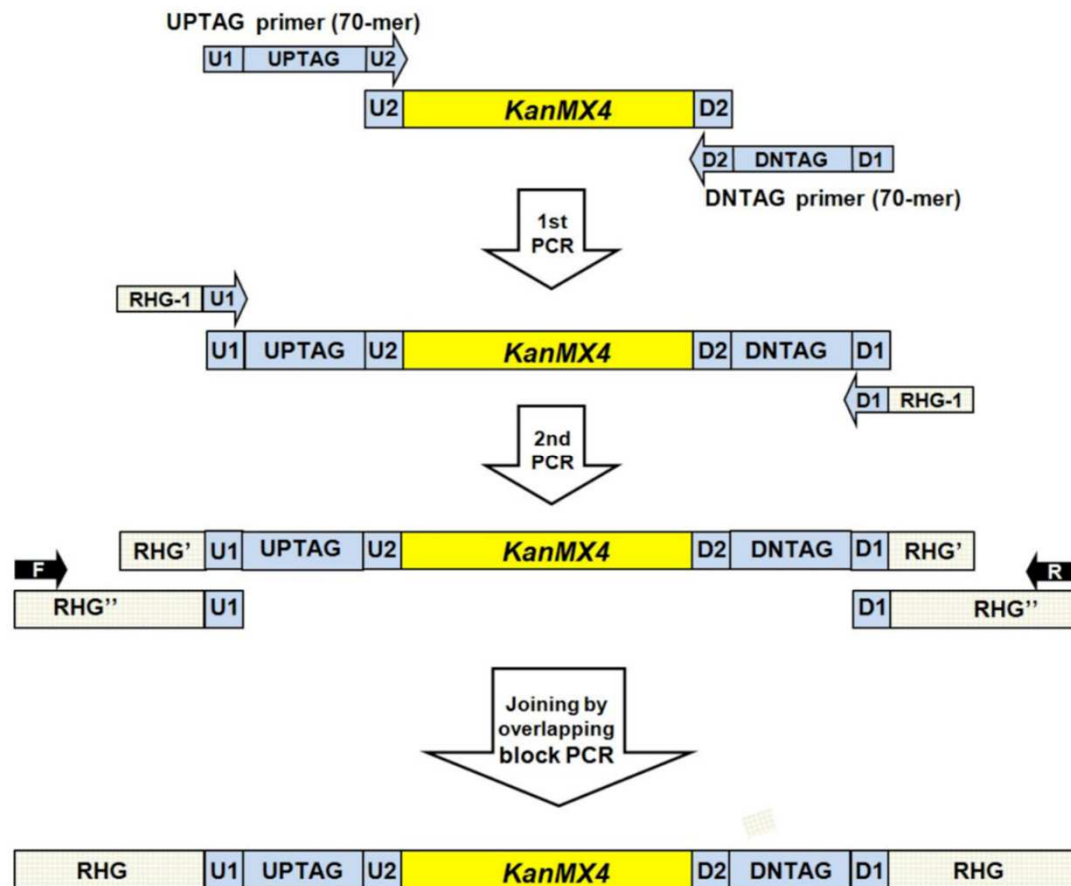
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>



Deleční knihovna – *S. pombe*

Rozdíly *S.cerevisiae* x *S. pombe*:

Organizace buněčného cyklu, intronů, heterochromatinu, centromer a replikačních počátků (*S. pombe* = „mikrosavec“)



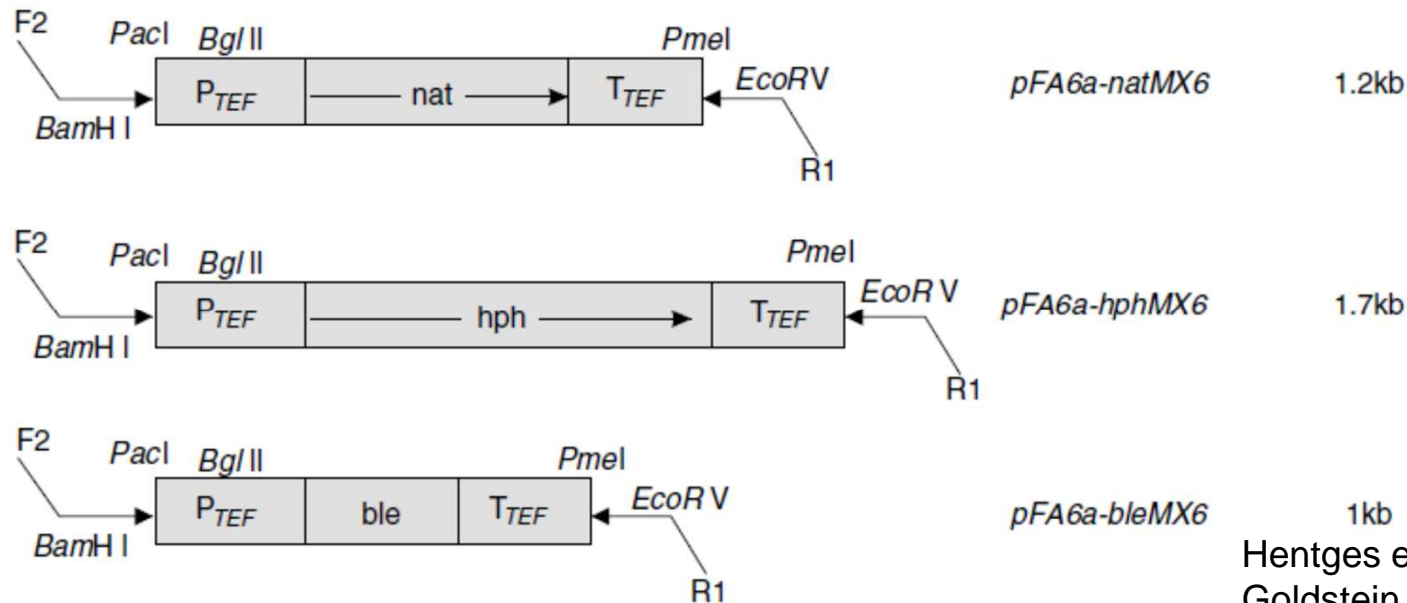
- *S. pombe* potřebuje delší homologii (seriál PCR = 40-80bp; block PCR = 80-350bp)
- deleční knihovna od Bioneer (Korea, 25 000\$)

Kim et al, Nat Biotech (2010)

MX6 kazety

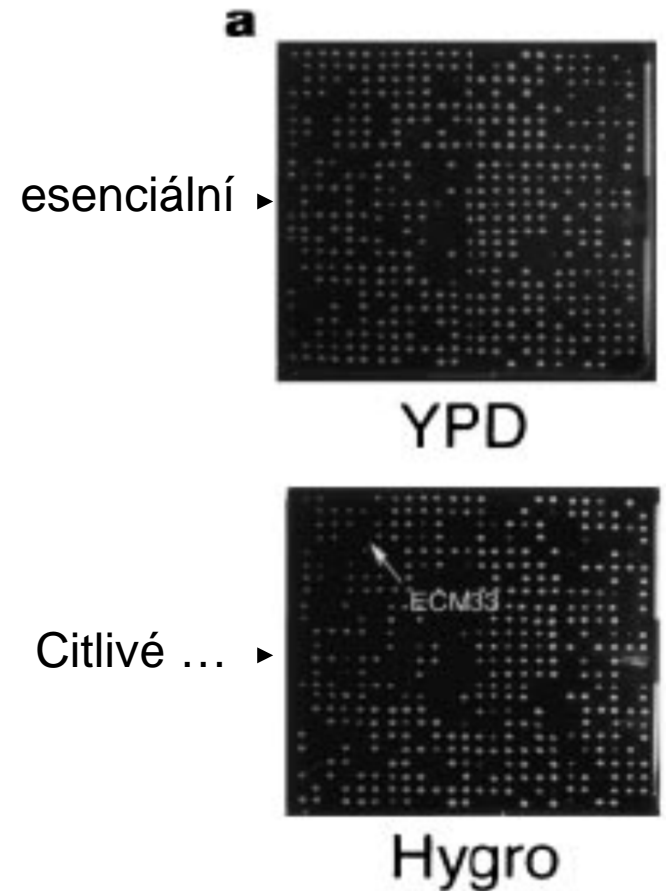
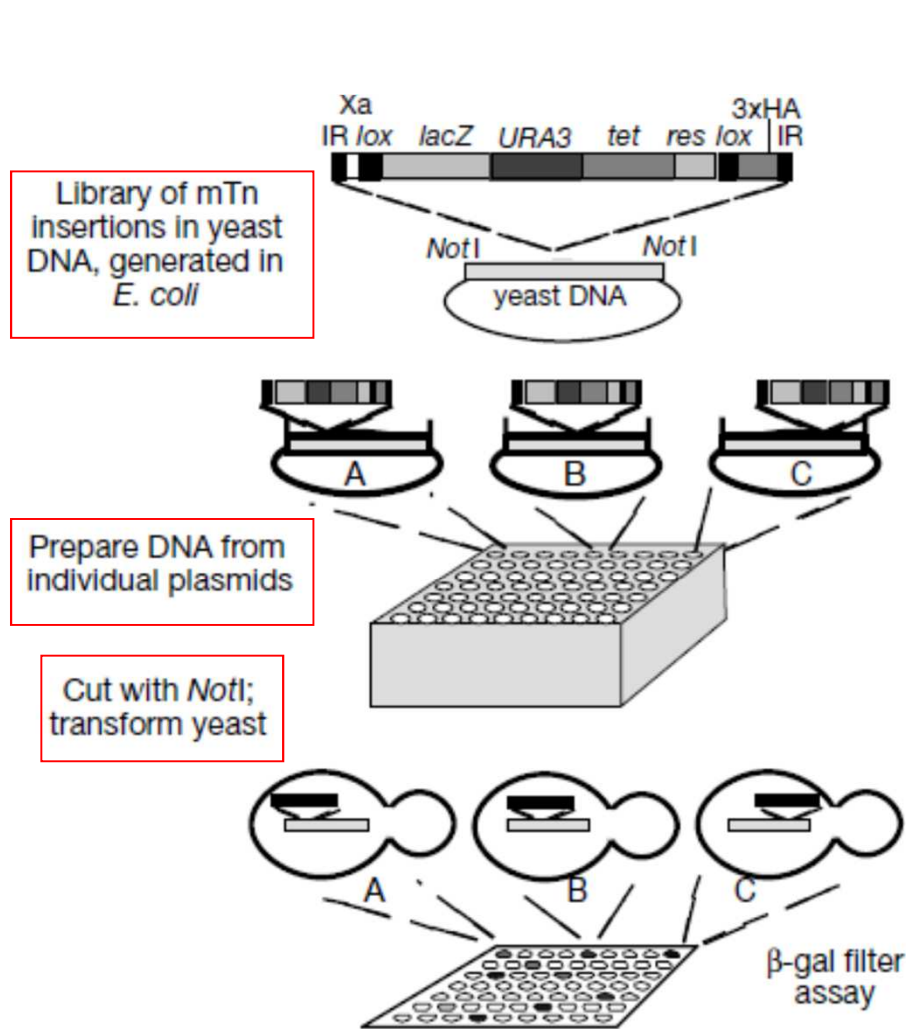
- nourseothricin (NAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje NAT)
- hygromycin B – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygroscopicus*), rezistence kódována *hph* 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

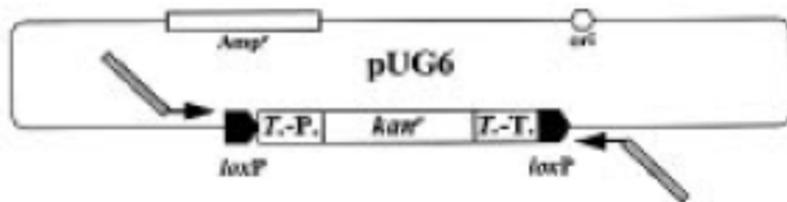


Defekt buněčné stěny

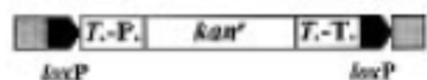
Cre rekombinasa

Watson et al, Gene, 2008

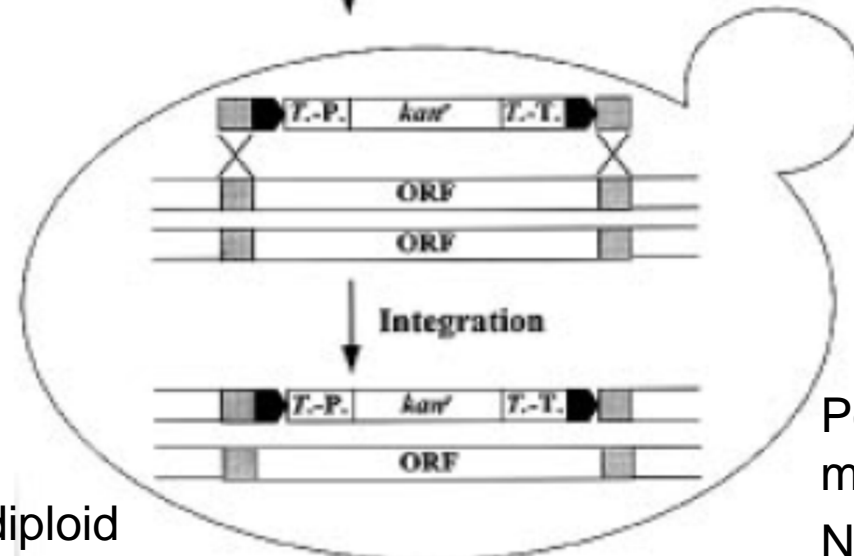
ESSENTIAL



PCR



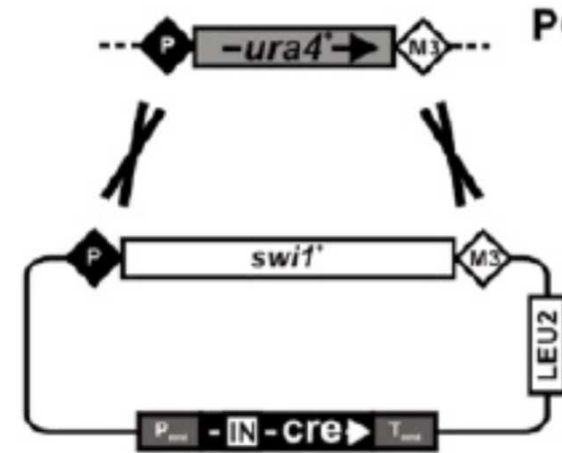
Transformation



diploid

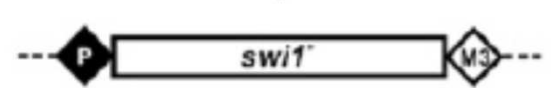
Guldener et al, NAR (1996)

NON-ESSENTIAL CPT^S



PCR product size
2.2 kb

+Cre



CPT^R
PCR product size
3.6 kb

Postup lze použít několikrát se stále stejným markerem

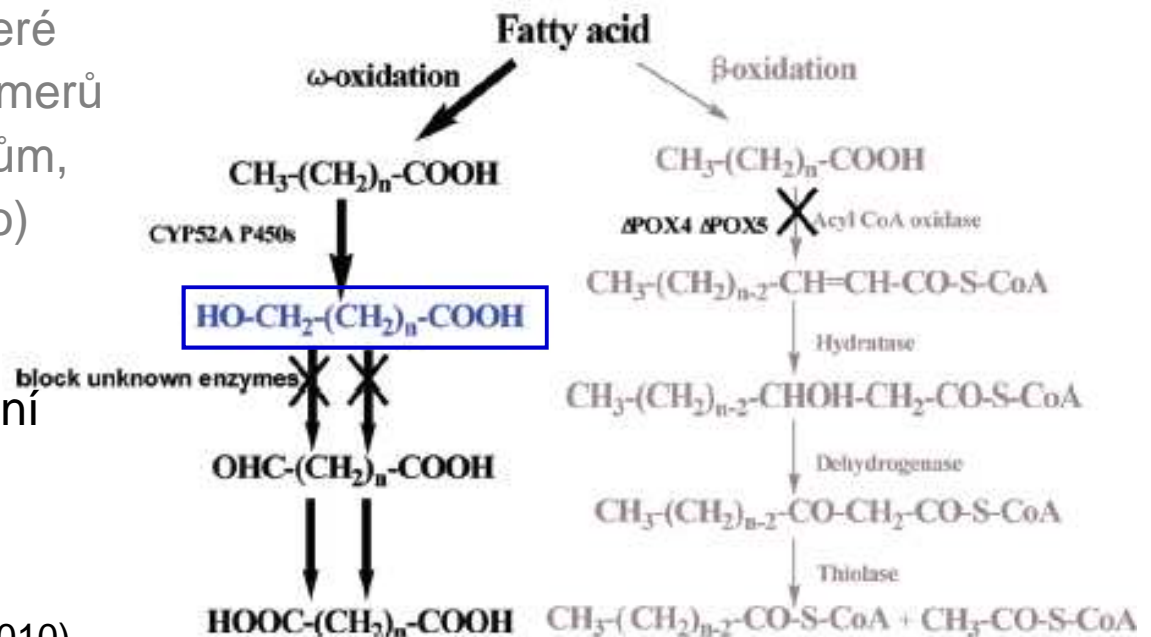
Nevýhoda pro genetické studie (marker nekosegreguje s mutací)

Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (Δ POX4, Δ POX5) není schopen β -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- pomocí flp rekombinasy odstranili geny oxidás (4 alkohol oxidásy) a dehydrogenás (6 alkohol dehydrogenás), aby eliminovali ω -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat

ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)

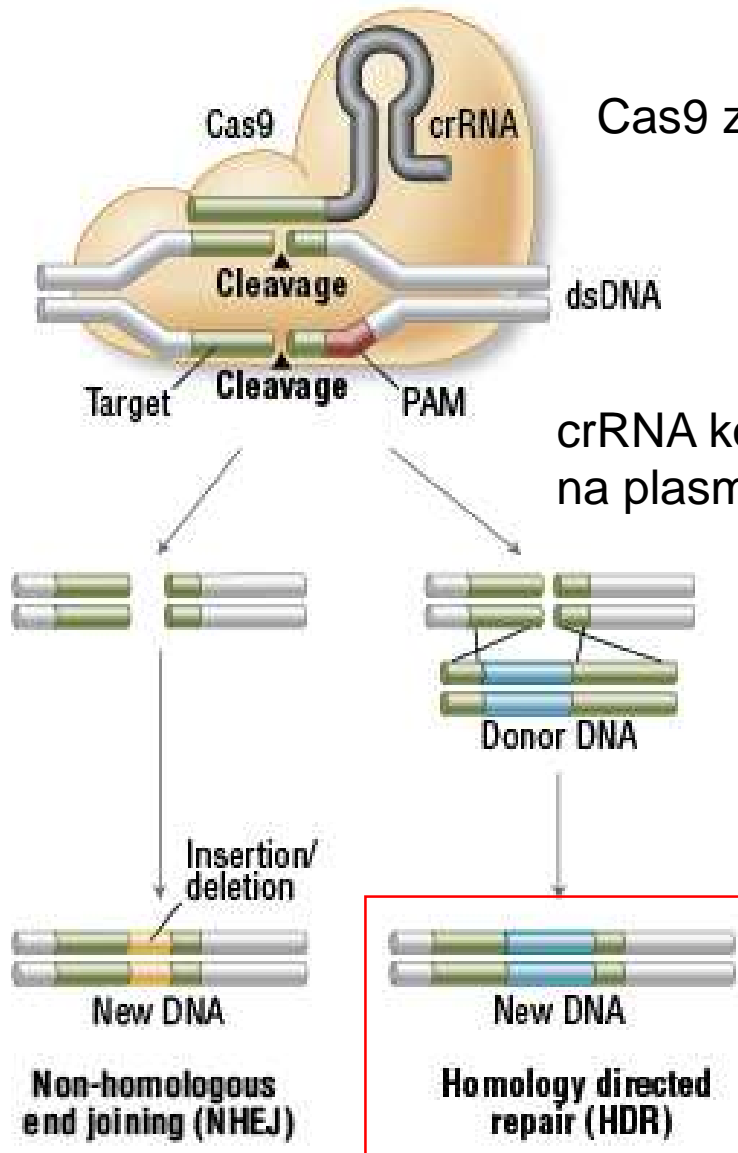
- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...



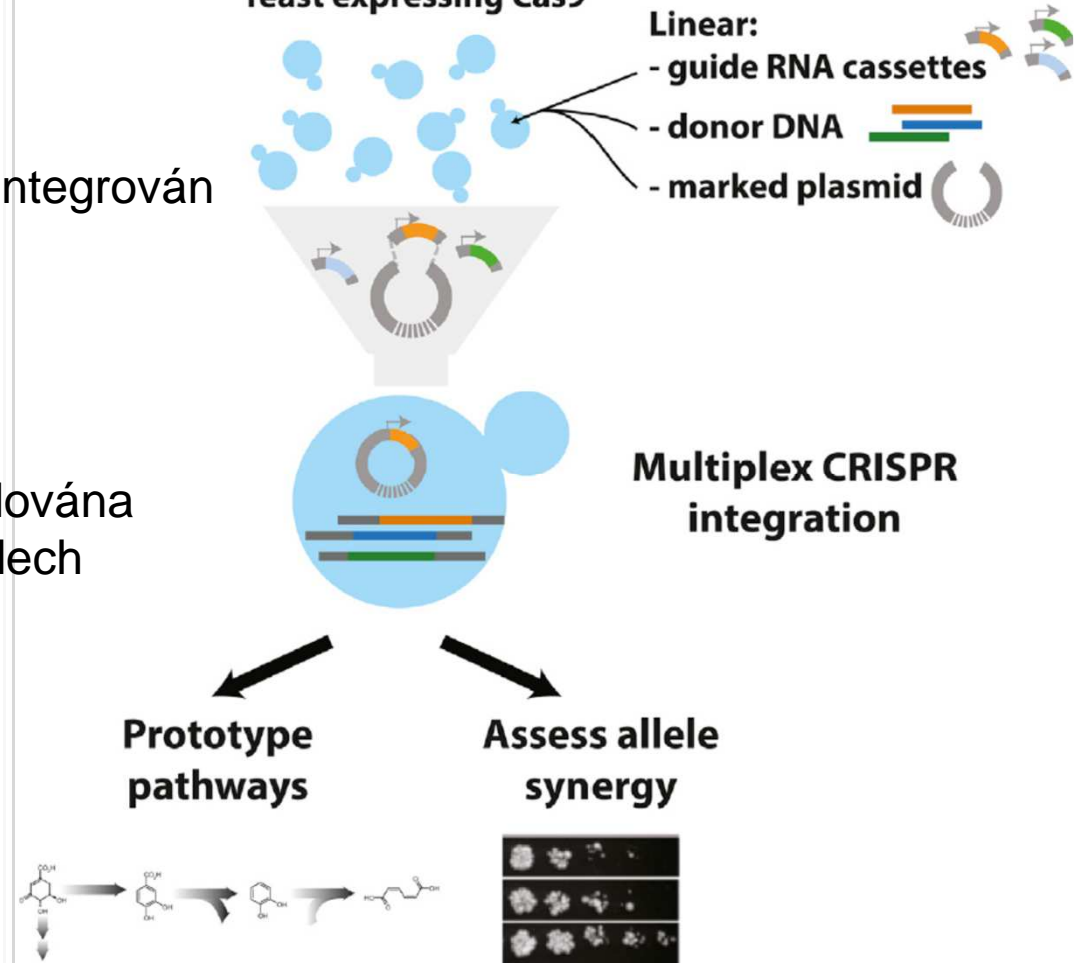
Lu et al., JACS (2010)

CRISPR-Cas9

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



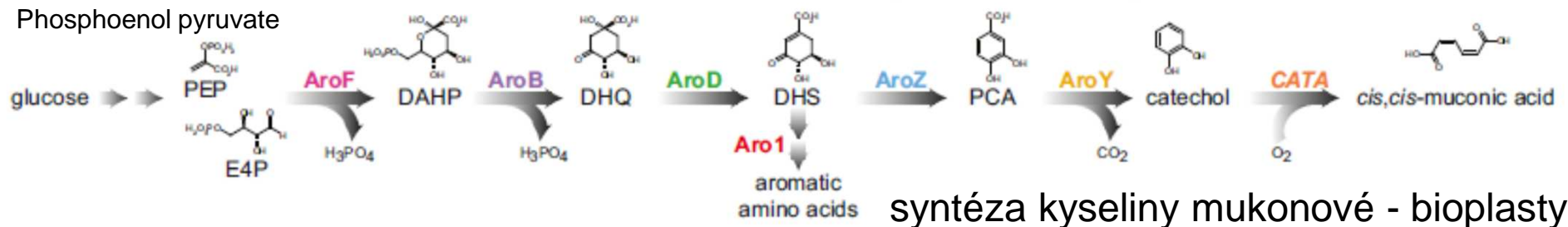
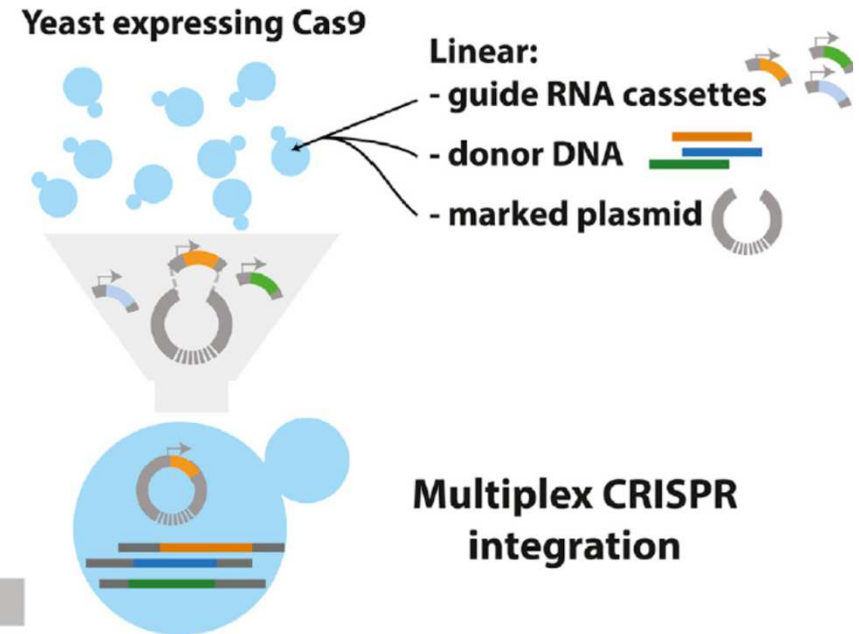
Yeast expressing Cas9



6 integrací do 3 lokusů (po dvou) – nová metabolická dráha



AroY v pěti kopiích – zvýšilo výtěžek



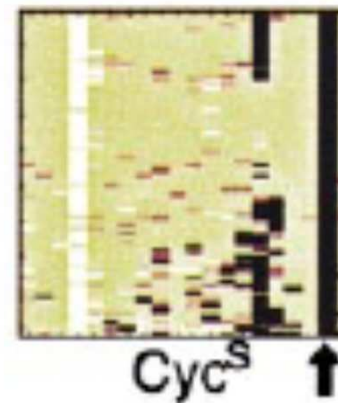
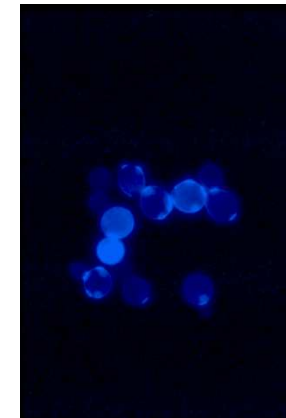
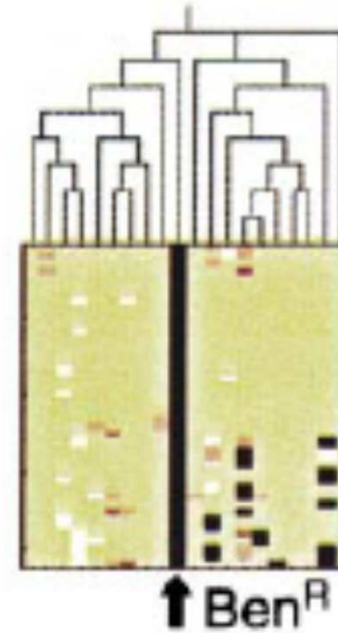
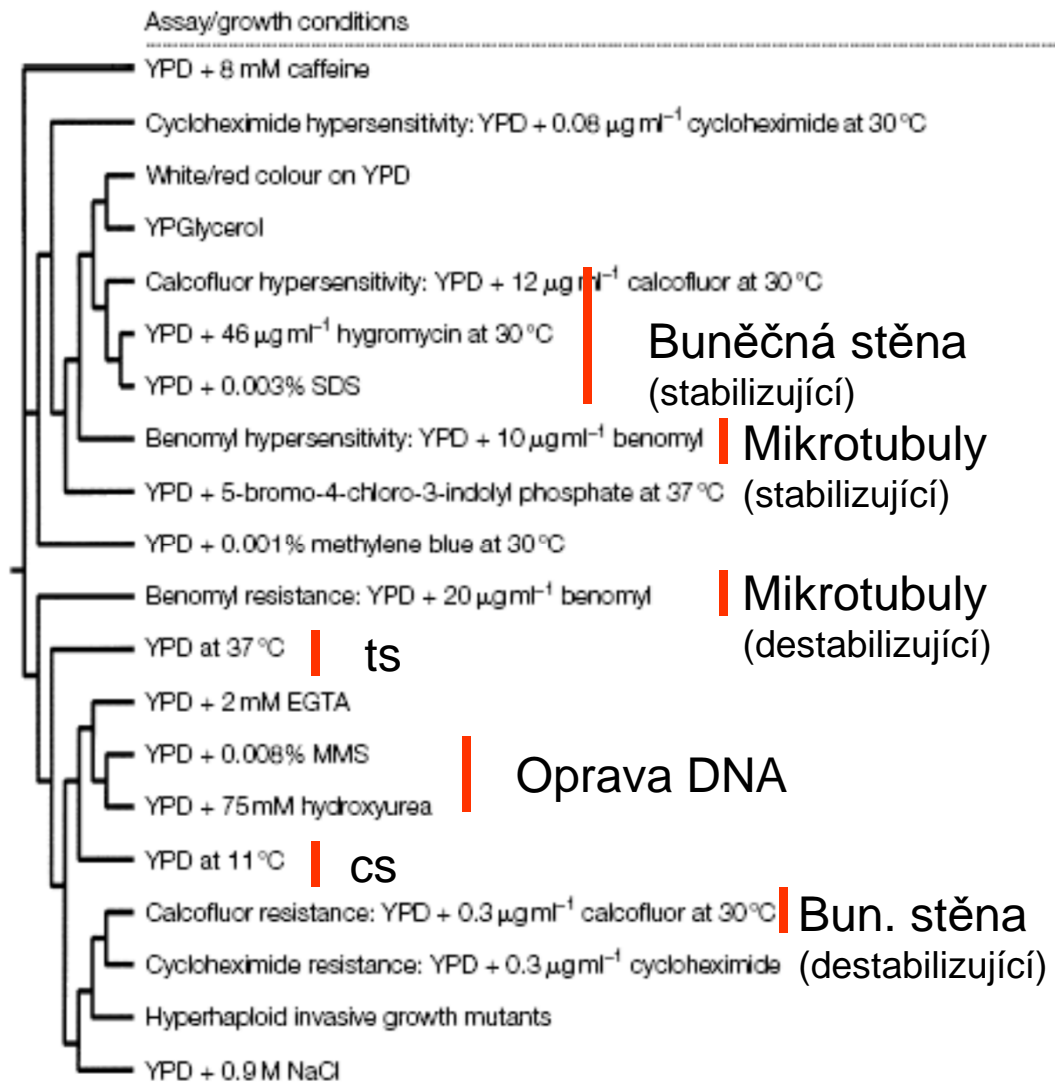
zablokování tvorby aromatických AMK - ARO1 – na bohatém médiu roste biomasa, ale na minimálním médiu bez aromatických AMK se spouští tato dráha

AroB, D, F, Y a Z = E. coli

CATA = C. albicans

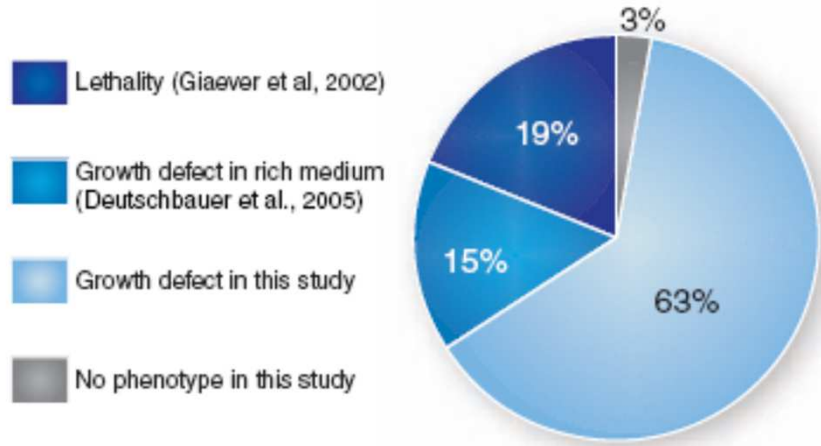
integrace do neutrálního HO lokusu nebo odstranění ARO1 a GAL80

EuroFan projekt - testy fenotypu



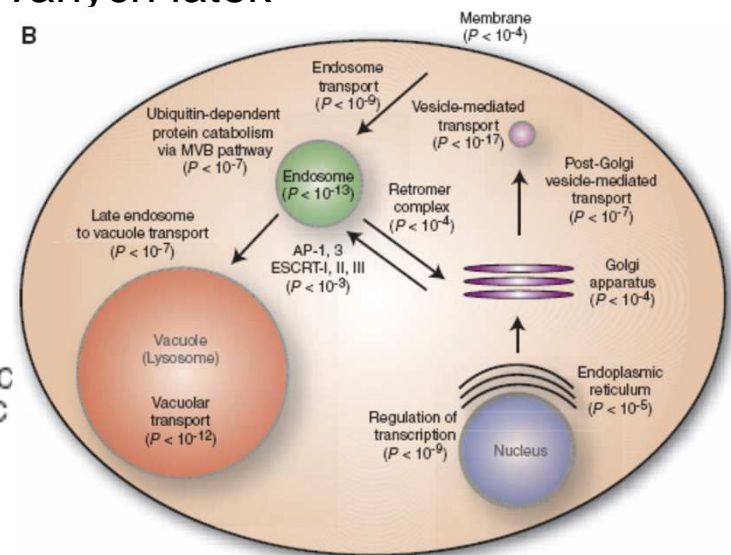
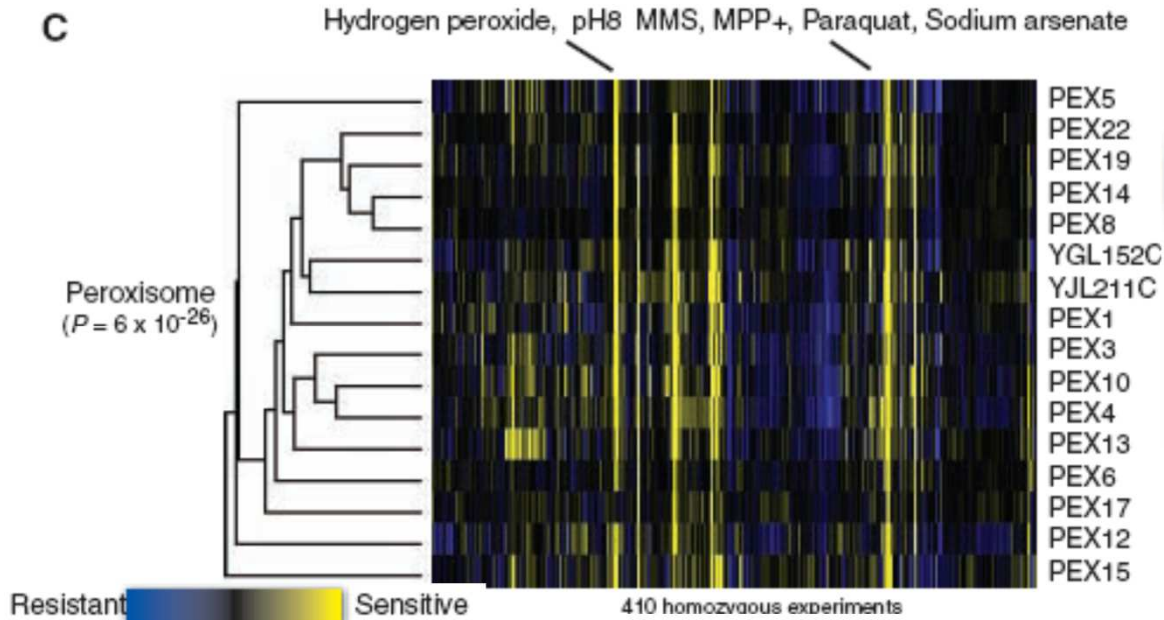
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů – anotace v databázích (genová ontologie)

~ 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

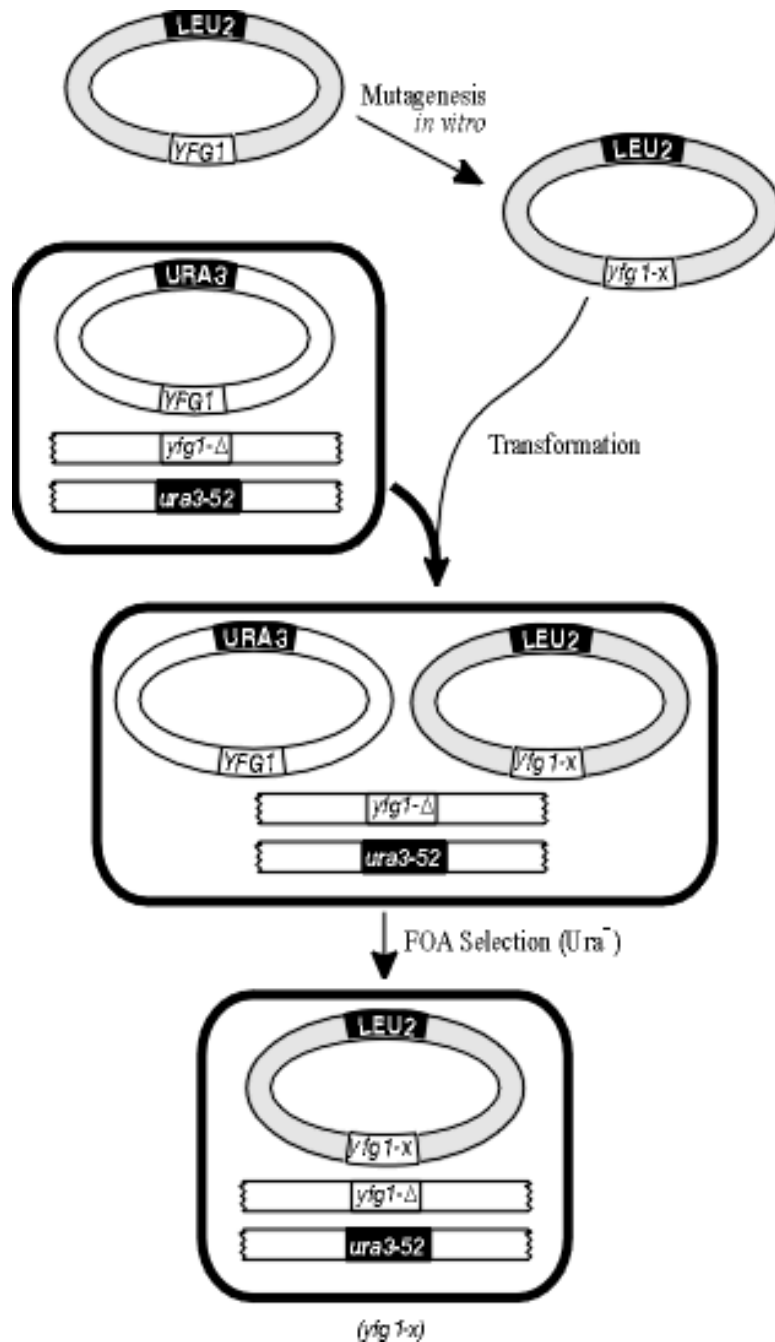
- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti



Geny/Proteiny peroxisomu

Science 320 (2008), p.362

Plasmid shuffling



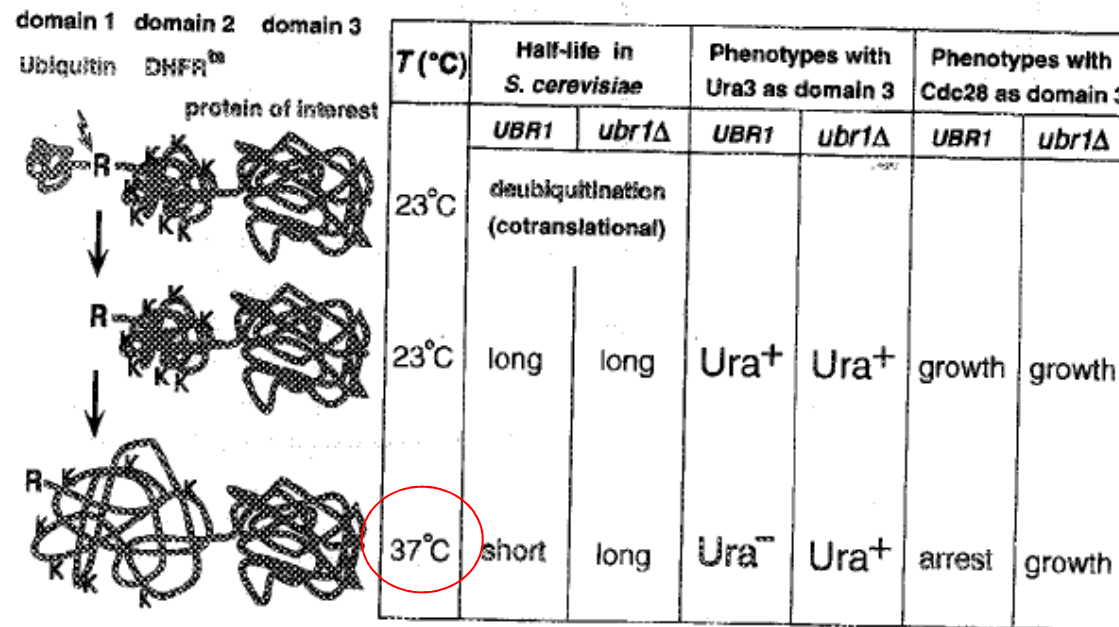
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na plasmidu

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 esenciálních genů – 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)

Rychlé vyřazení proteinu z funkce

