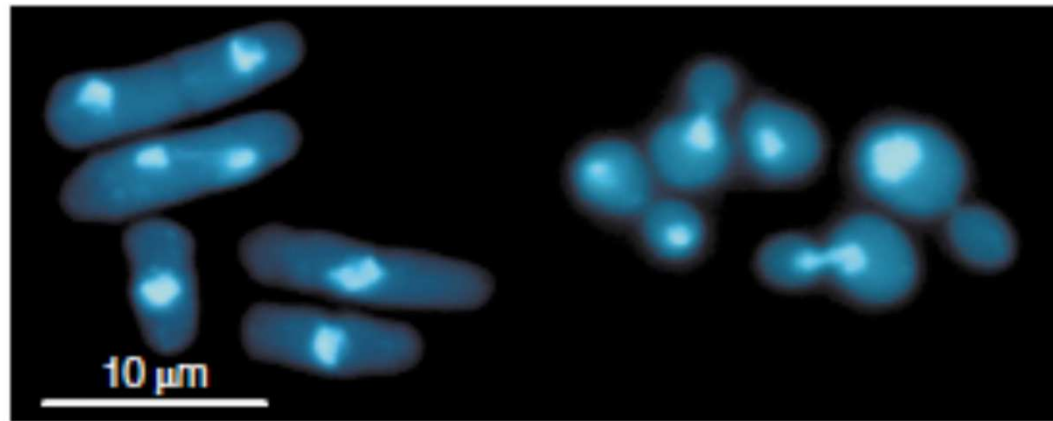


Souhrn 4. přednášky

- Genetické metody
 - Plasmidy (kvasinkové elementy)
 - Integrace (plasmidy, PCR, kazety)
 - Analýza funkce ne-esenciálních genů
 - 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

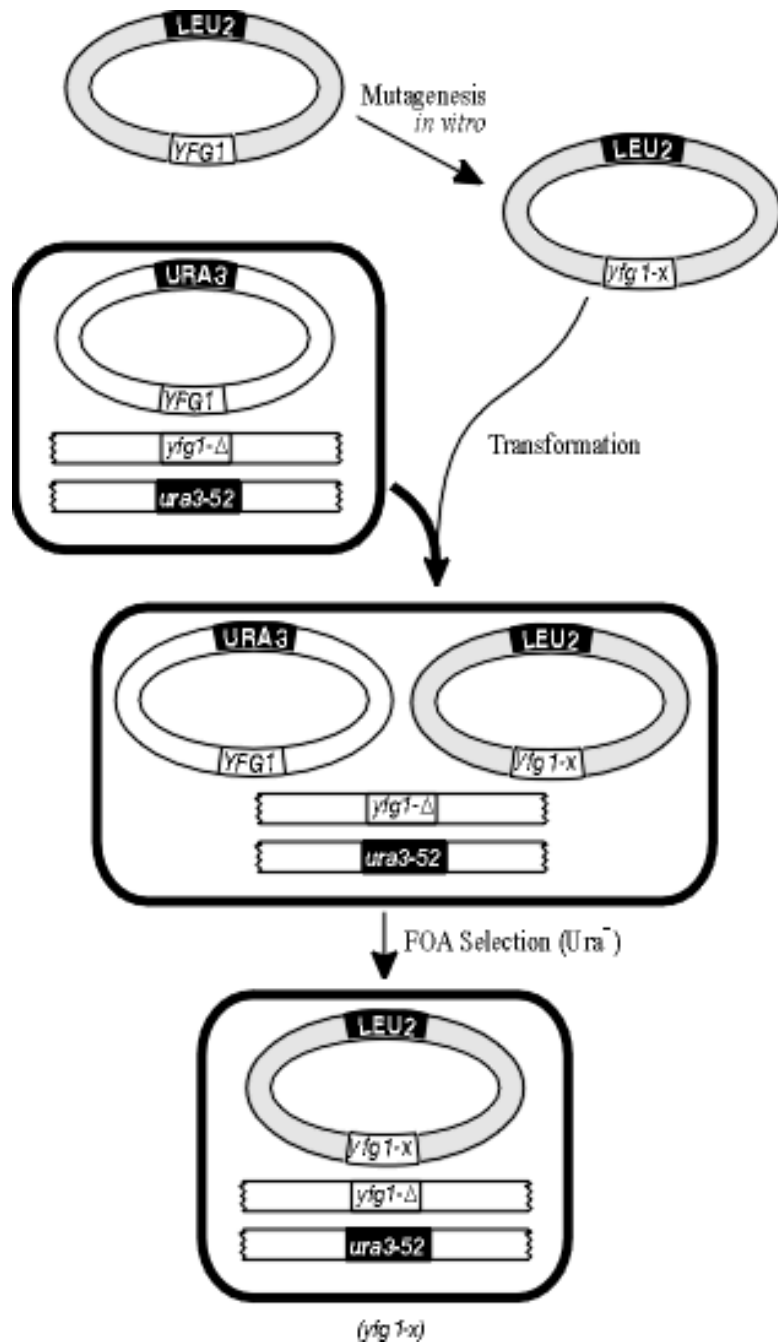
Osnova 5. přednášky

- Genetické metody
 - analýza esenciálních genů (ts mutanty)
 - tetrádová analýza
 - genetické interakce
 - mutageneze/“screen“
- Buněčný cyklus
 - průběh a regulace BC
 - synchronizace buněk
 - mechanismy regulace párování
 - homothalické kmeny

Delece/mutace genu

- Studium funkce genu – delece nebo mutace genu
 - **esenciální gen** => buňky potřebují gen např. na plasmidu
 - **plasmid shuffling**
 - => buňky potřebují funkční gen aspoň za určitých podmínek (kondicionální exprese nebo kondicionální mutanty – **ts mutanty**)
 - => buňky potřebují aspoň „částečně“ funkční gen – **hypomorfní mutanty**
- **ne-esenciální gen** – lze přímo integrovat do genomu (předchozí přednáška)
- deleční/mutantní kmeny se testují na životaschopnost ... za různých podmínek – dále je lze křížit s funkčně podobnými geny/mutantami a hledat jejich funkční vztahy (synthetic lethal x epistatic x suprese)

Plasmid shuffling



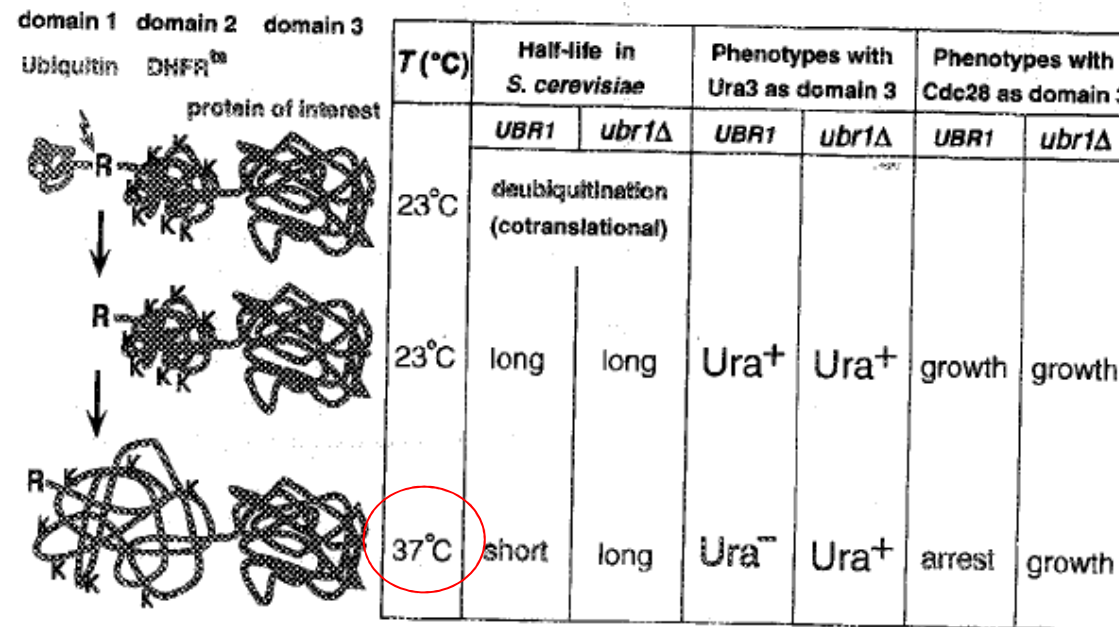
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na *URA3* plasmidu, který lze odstranit (pomocí *FOA*) – analýza terminálního fenotypu

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 kolonií bílé (bez *Ade3p* enzymu je metabolická dráha blokována dříve než vzniká červený metabolit)

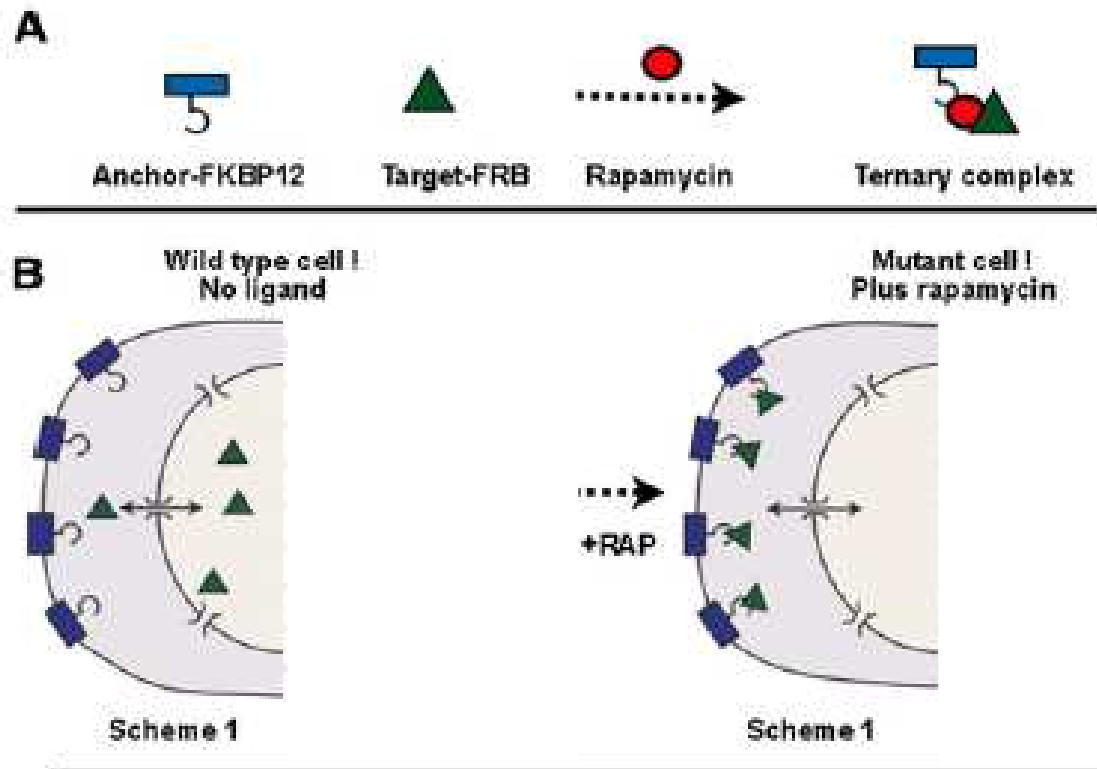
Analýza esenciálních genů: ts mutanty

- **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

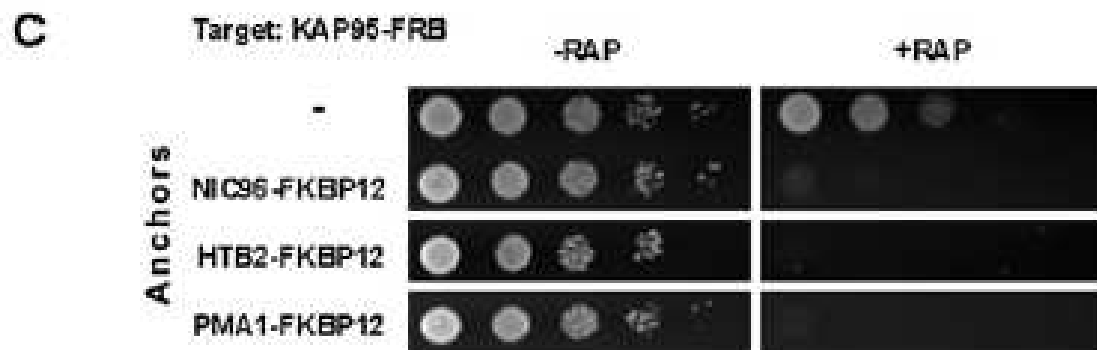


- ubiquitinace „označuje“ proteiny pro proteasom (degradaci)
- ts alela DHFR je degradována (nestabilní protein – strukturní mutace)
- fúze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fúze s CDC28 – kvasinky arestují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

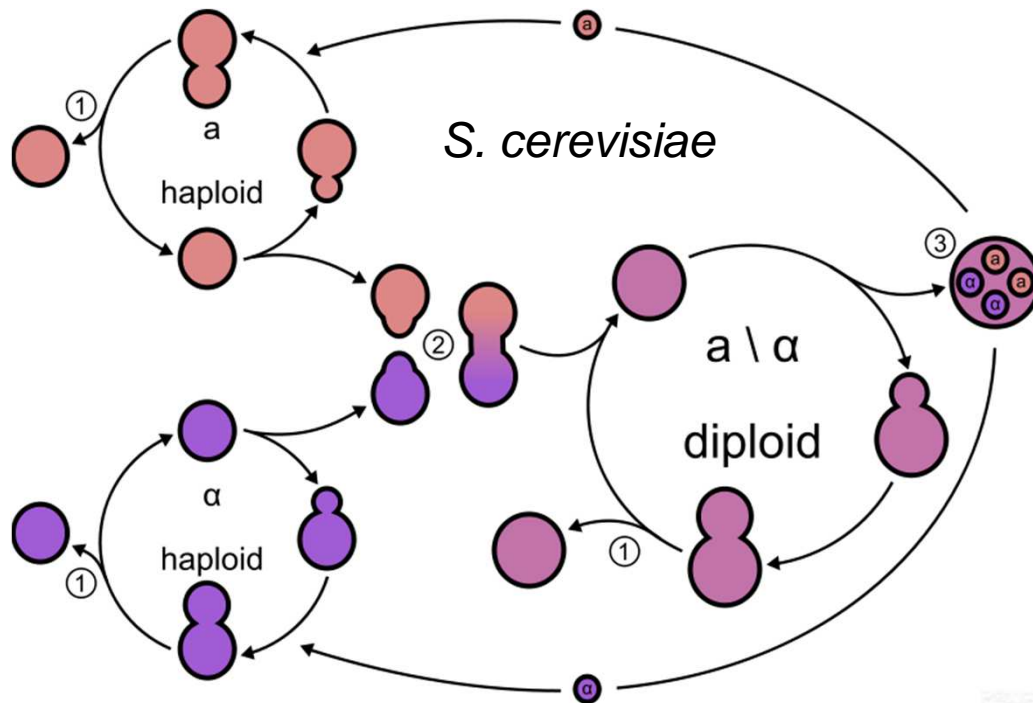
Rychlé vyřazení proteinu z funkce



protein je cíleně relokizován tj. vyřazen z funkce (např. transkripční faktor je pomocí rapamycinového systému „vytažen“ z jádra – transkripce nebude spouštěna)



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

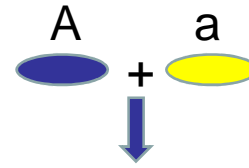
S LINEÁRNÍM
USPOŘÁDÁNÍM
SPOR



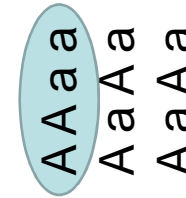
Tetrádová analýza



vřecko
4 spory



křížení
haploidní buňky
1 gen



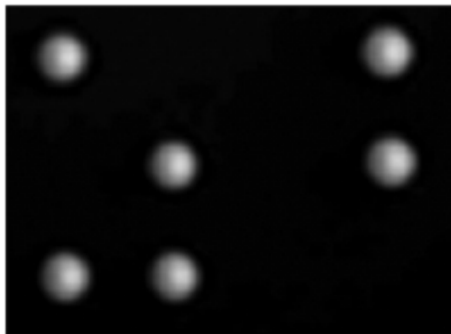
segregace 2:2
Mendlovy zákony



esenciální gen



integrace

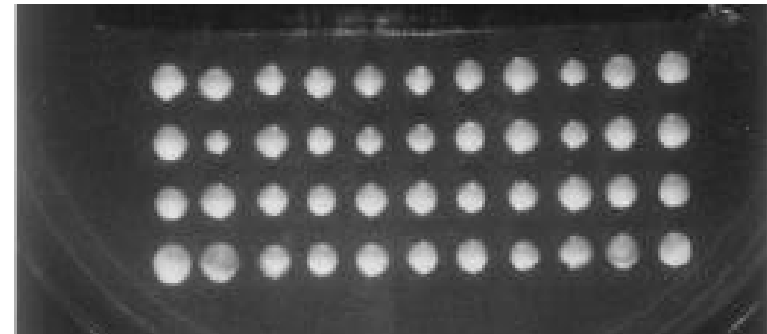


A a a A

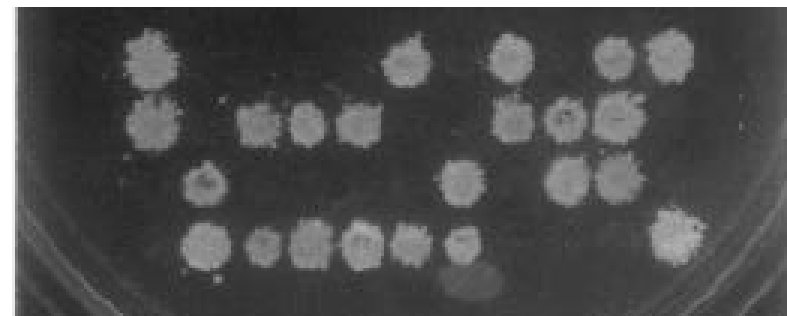
a A a A

A A a a

neesenciální gen



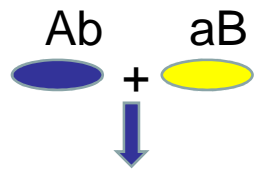
YPD



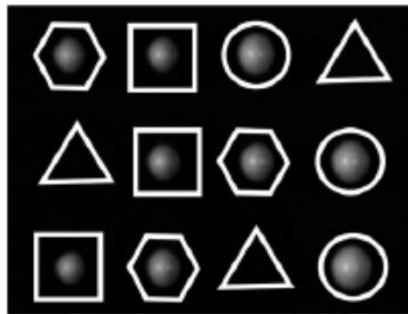
Selektivní médium
(SD-ura ... testy)

Tetrádová analýza

Analýza genetických interakcí
(funkčních vztahů)



křížení
haploidní buňky
2 geny



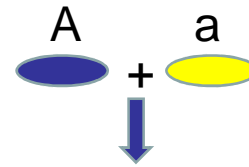
aB Ab AB ab

ab Ab aB AB

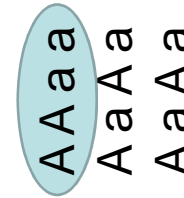
Ab aB ab AB

- AB
- Ab
- ⬡ aB
- △ ab

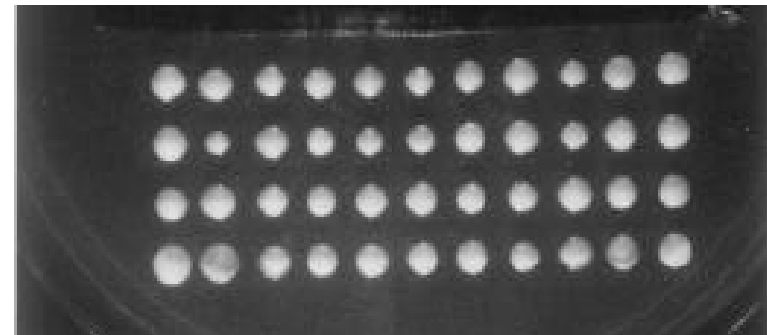
kombinace těchto
mutací je synteticky
letální



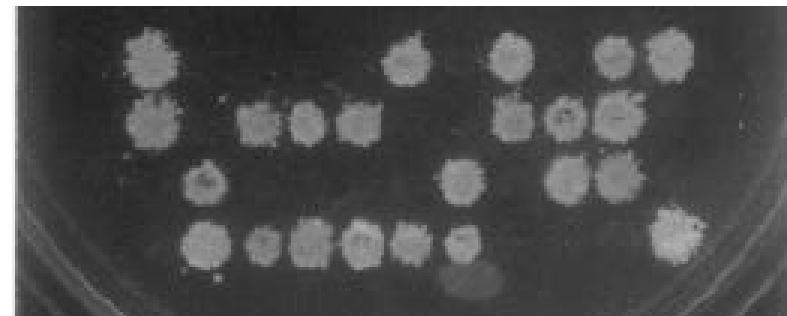
křížení
haploidní buňky
1 gen



segregace 2:2
Mendlovy zákony



YPD



Selektivní médium
(SD-ura ... testy)

Dvojité mutanty – funkční příbuznost

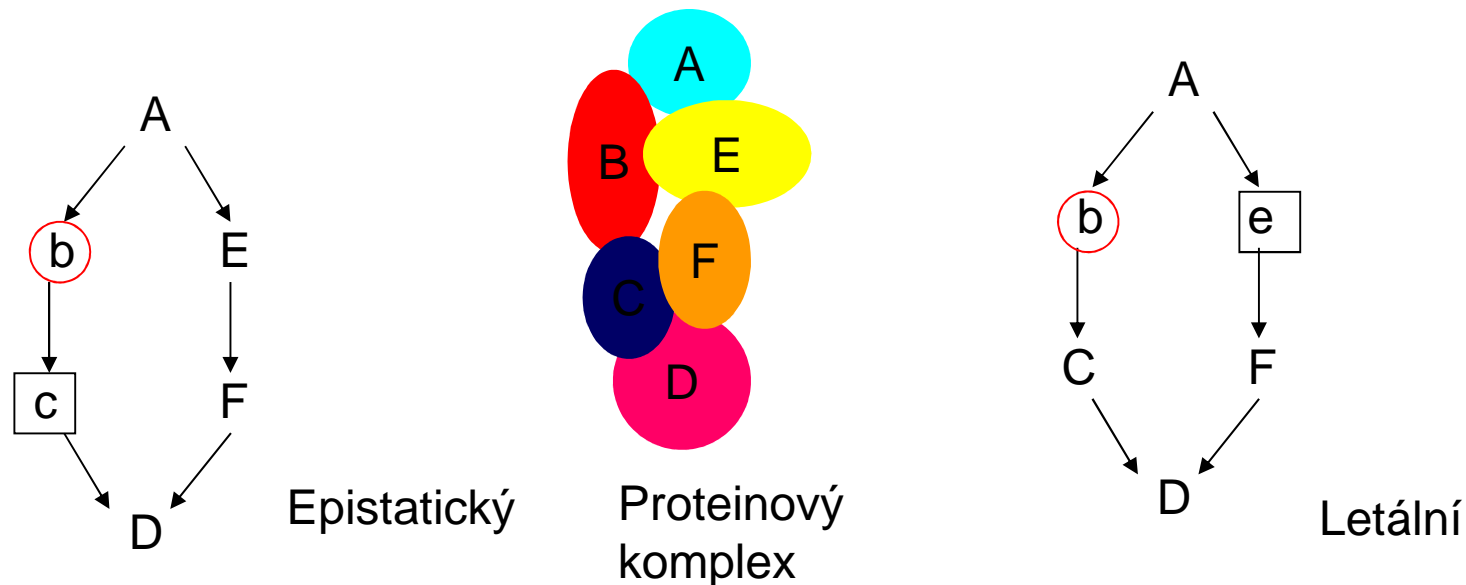
haploid x haploid => diploid – stejný fenotyp - identický gen

- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

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

- aditivní až letální (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)

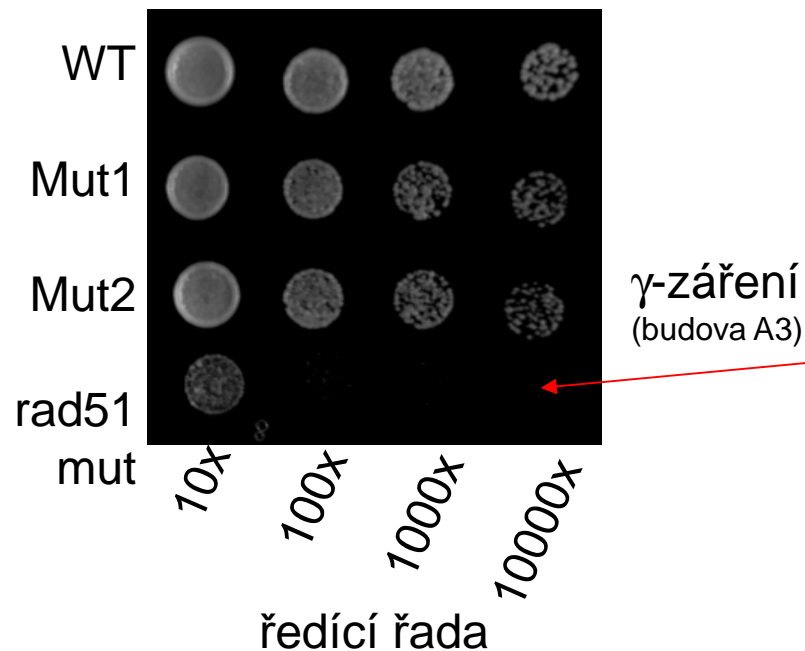
- suprese (mutace může napravit původní defekt ...)



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

- 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 ^a	Reference
<i>ade2-101</i>	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
<i>his3-200</i>	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during transformation.	1 kb deletion , (-205 to 835)	Struhl 1985 ; Fasullo and Davis 1988
<i>leu2-3,112</i>	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 ;
<i>trp1-1</i>	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber (STOP) nonsense change at codon 83	McDonald, et al. 1997

Izolace mutant

Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

Recover the YCp-*YFGI*⁺ 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⁻ *ura, ade, rad ...*



Yfg⁻

Complementation

Cross the Yfg⁻ *MATa* mutant to *MATα* tester strains. Isolate diploid strains. Score for Yfg⁺ and Yfg⁻

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

PCR genom sekvenace

Křížení – ověření - jedna mutace, meioticky defekt

- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl)

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATα YFG+*



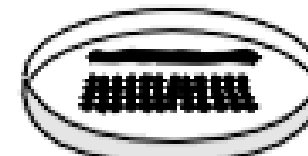
Isolate a diploid strain and Sporulate



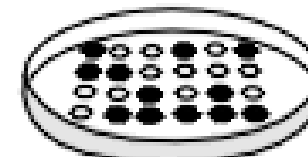
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

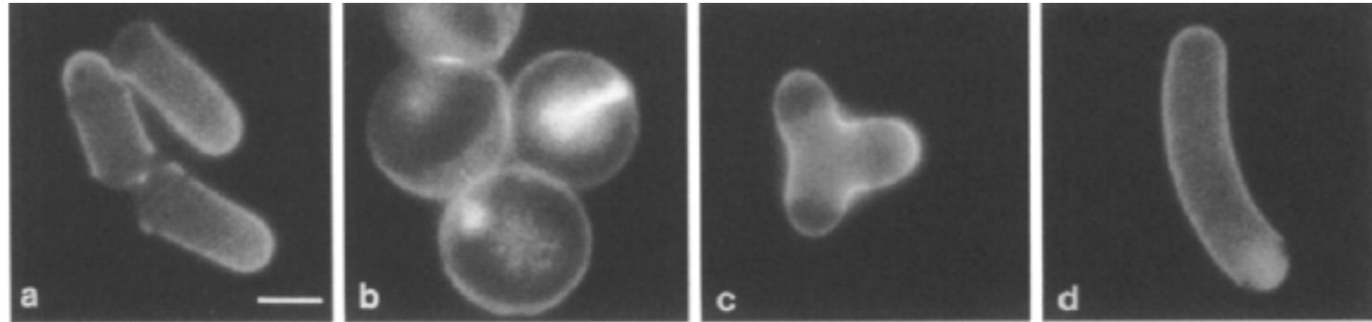


Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



Počet mutací

- 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)

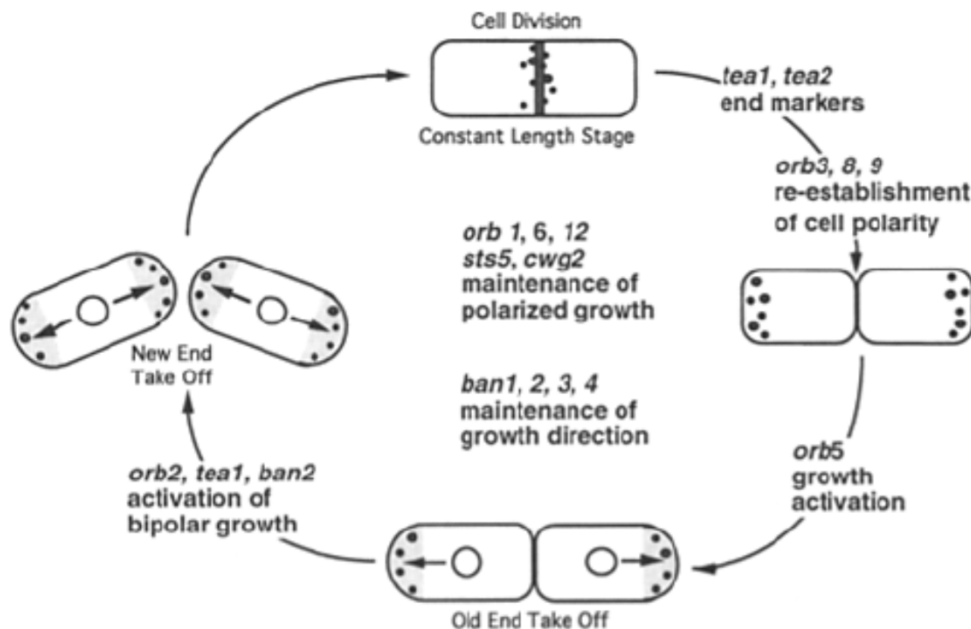


Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage*	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 ⁺)	<i>orb2, orb6</i>		
<i>orb2</i>	2 (4 ⁺)	<i>orb1, orb6</i>		
<i>orb3</i>	1 (1 ⁺)			
<i>orb4</i>	12 (1 ⁺)		<i>sts5</i> ^h	<i>pck1</i> ⁺ , <i>pyp1</i> ⁺
<i>orb5</i>	2 (2 ⁺)			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2</i> ^l	
<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> ^h	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1</i> ⁺ , <i>pyp1</i> ⁺ , <i>ras1</i> ⁺

Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

Leland Hartwell začal studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*.
- izoloval mutantní kvasinky s mutovaným genem - >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

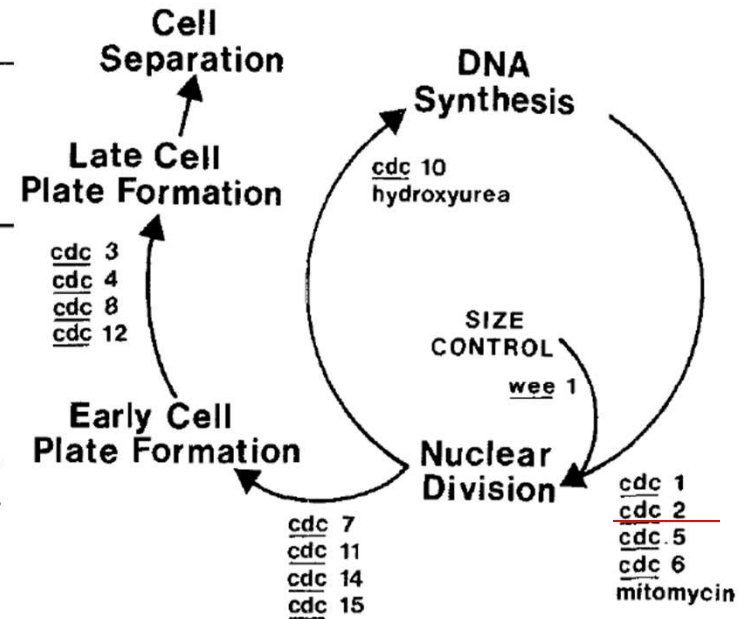
Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



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 ^a	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky ^b
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky ^b
„	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

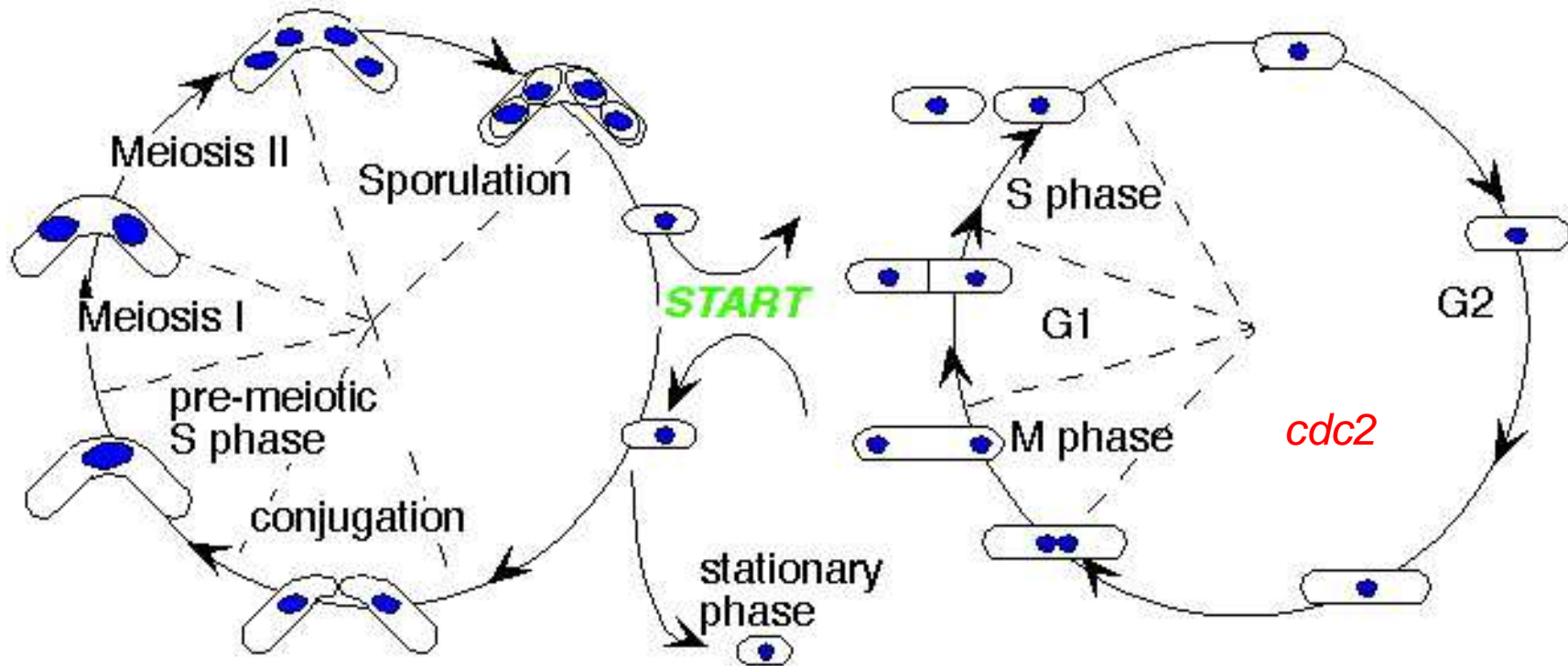


Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).

Nurse et al, MGG, 1976

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

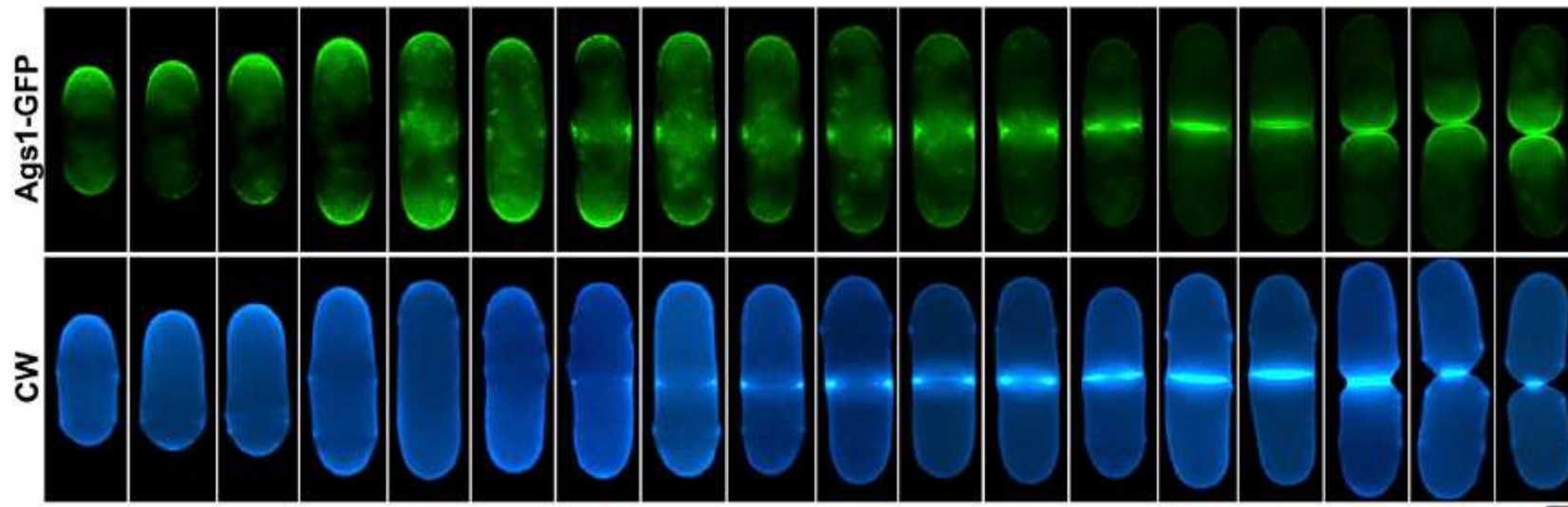
- nestálé diploidní buňky vstupují do meiosis hned po konjugaci (*ade6-M210xade6-M216*)
- pro konjugaci je kritická G1 fáze jako u *S. cerevisiae*



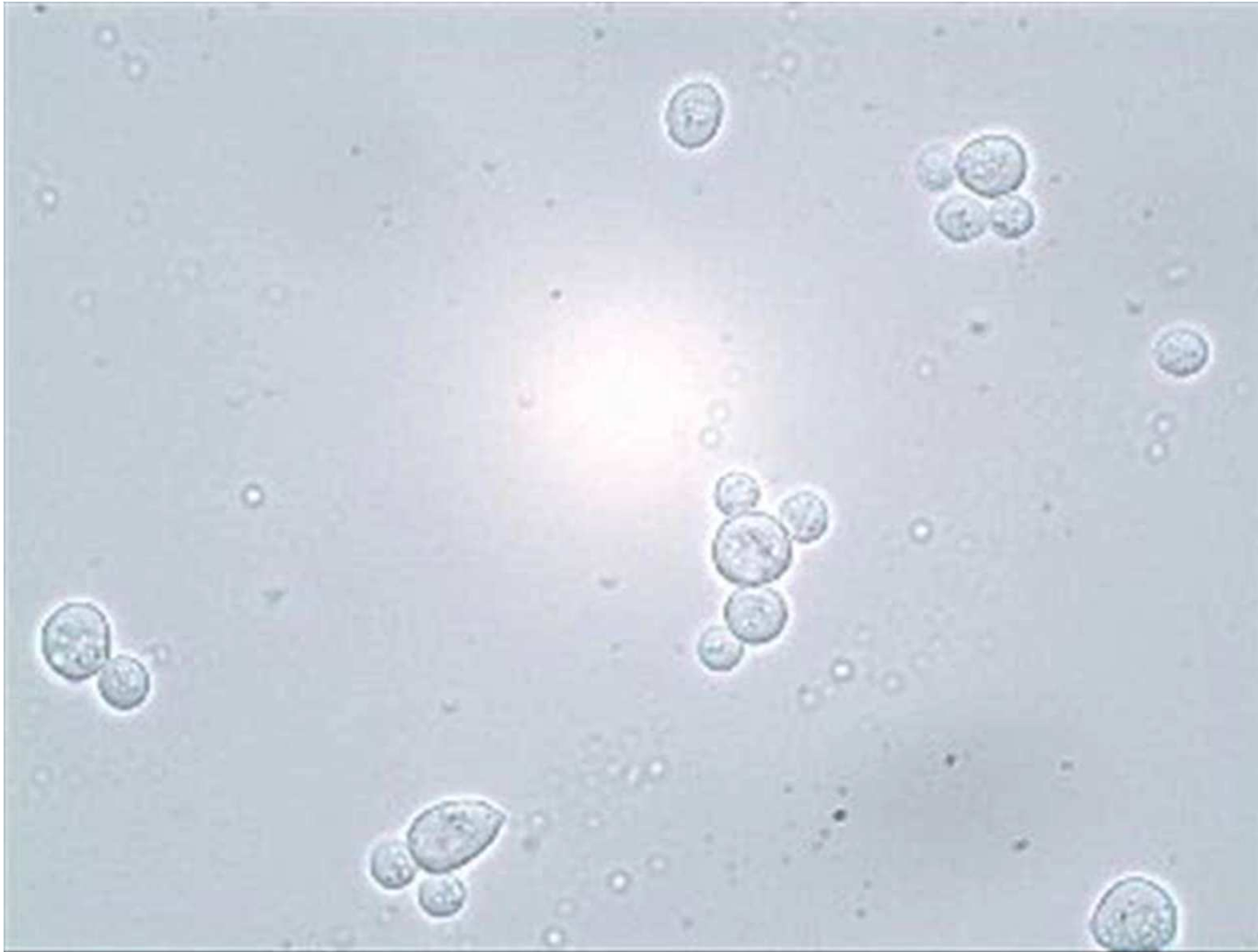
sekrece ... aktinový cytoskelet
jsou důležité pro procesy
polarizace ... v průběhu
buněčného cyklu ...
mating/fusion ...

- Více prof. Svoboda

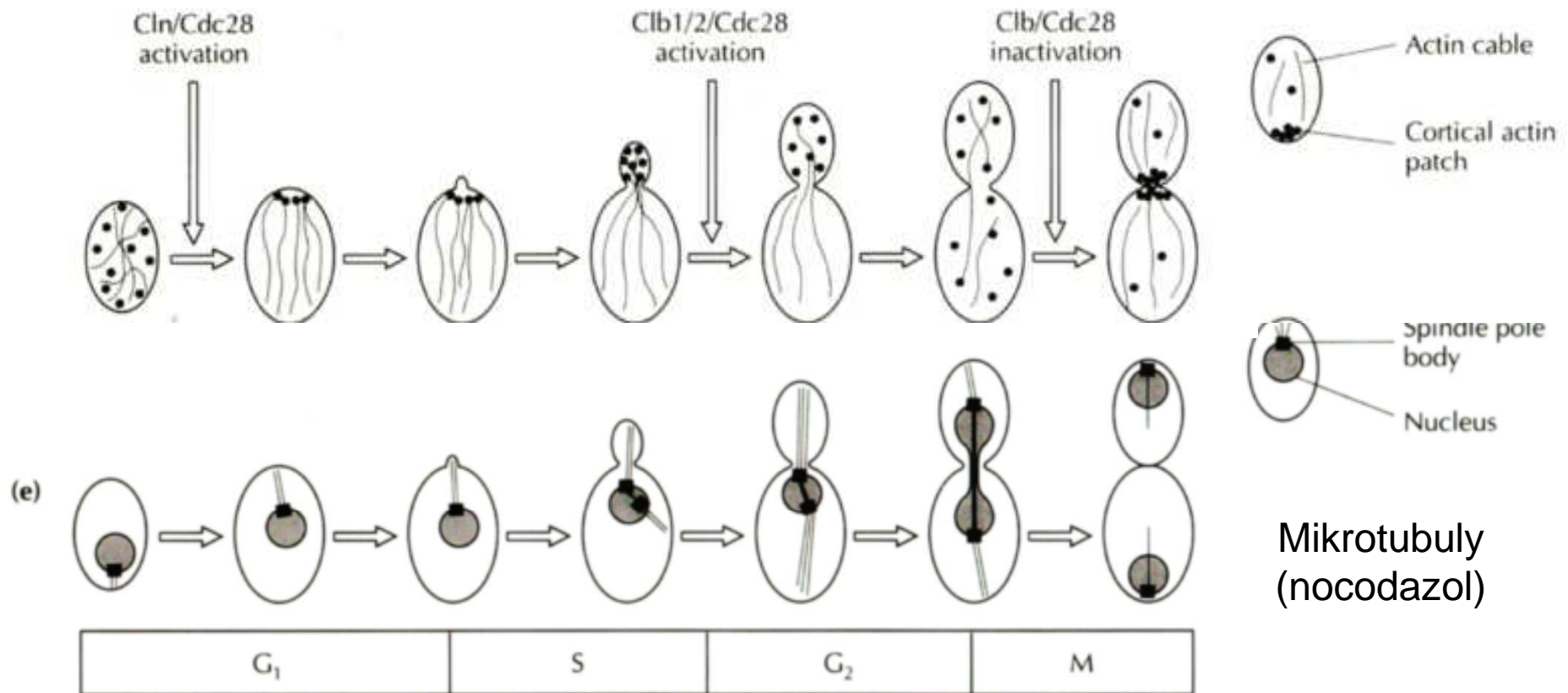
Cortes et al, JCB, 2012



S. cerevisiae

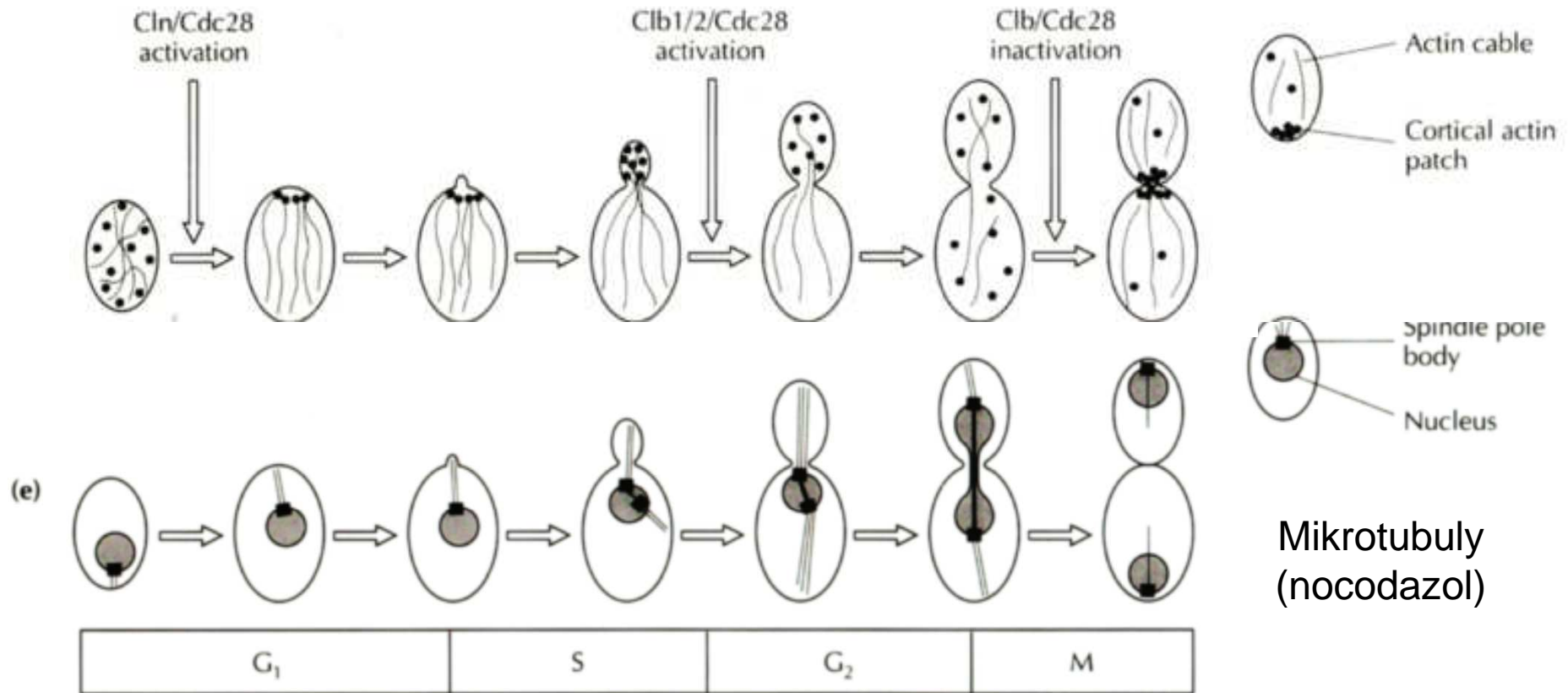


Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy) - mikrotubuly
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G₁
- oddělená dceřiná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G₁ fáze

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**

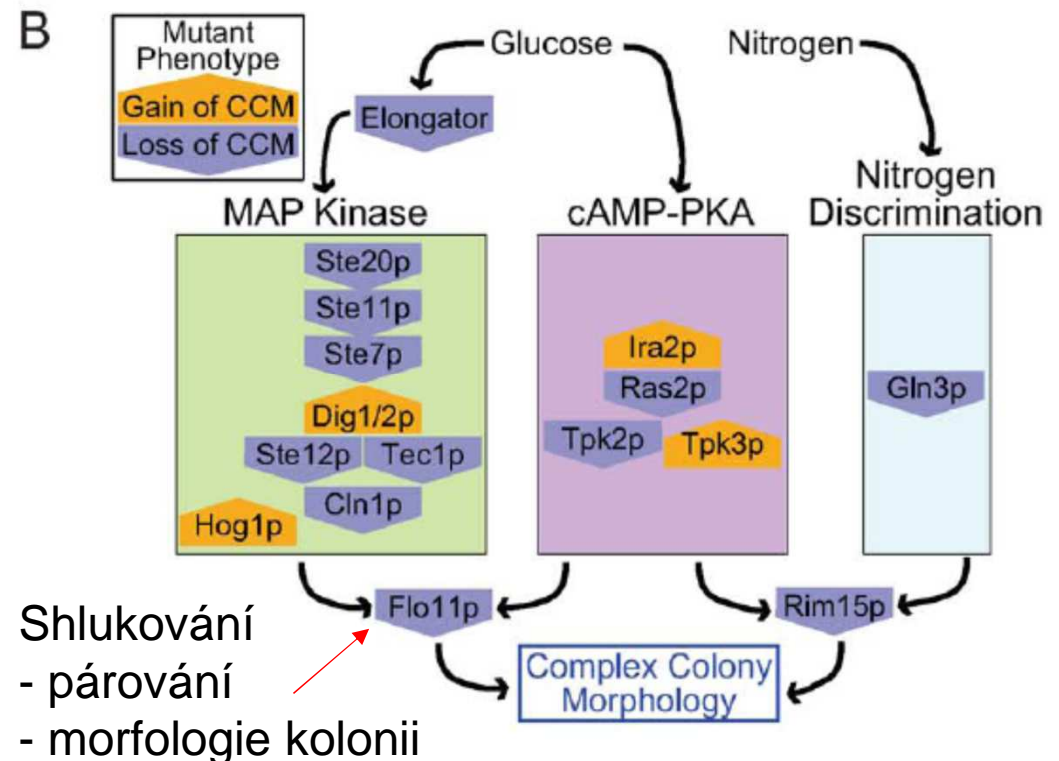
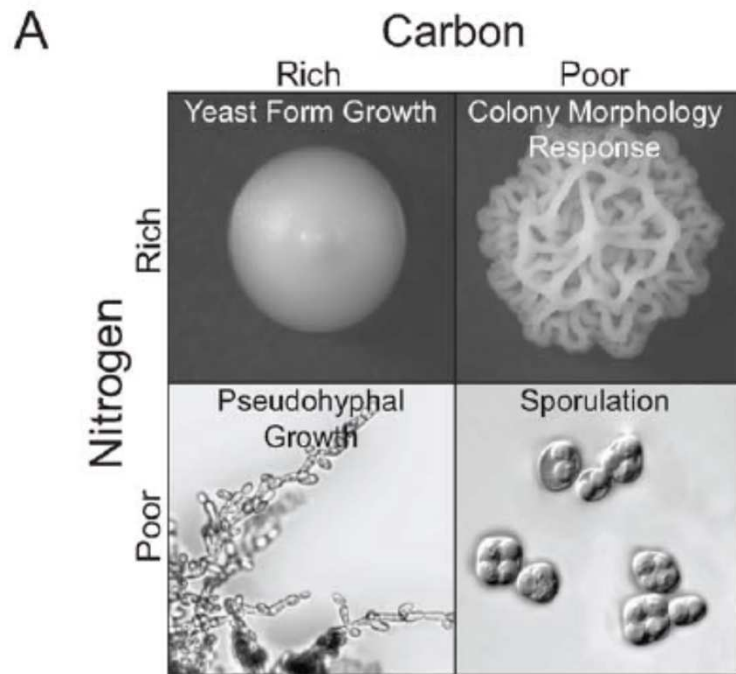
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

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

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

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

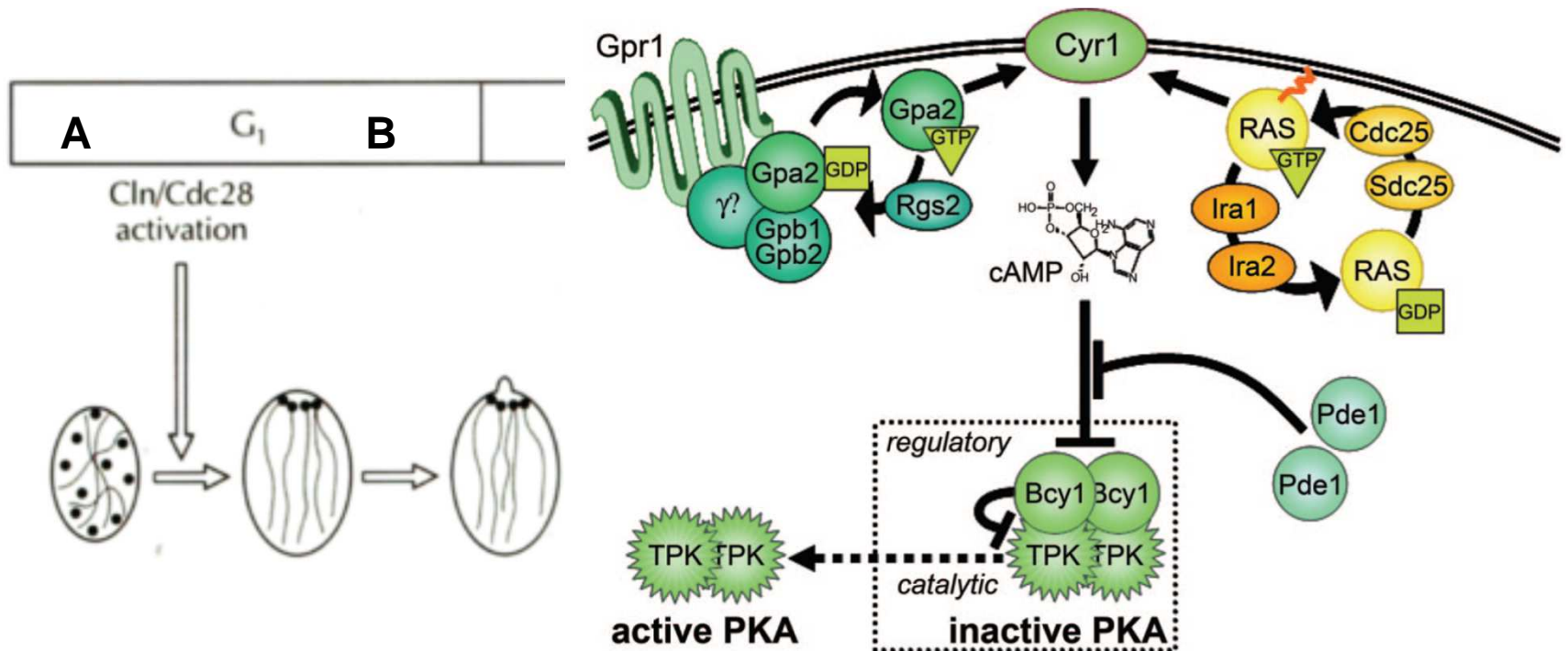


Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

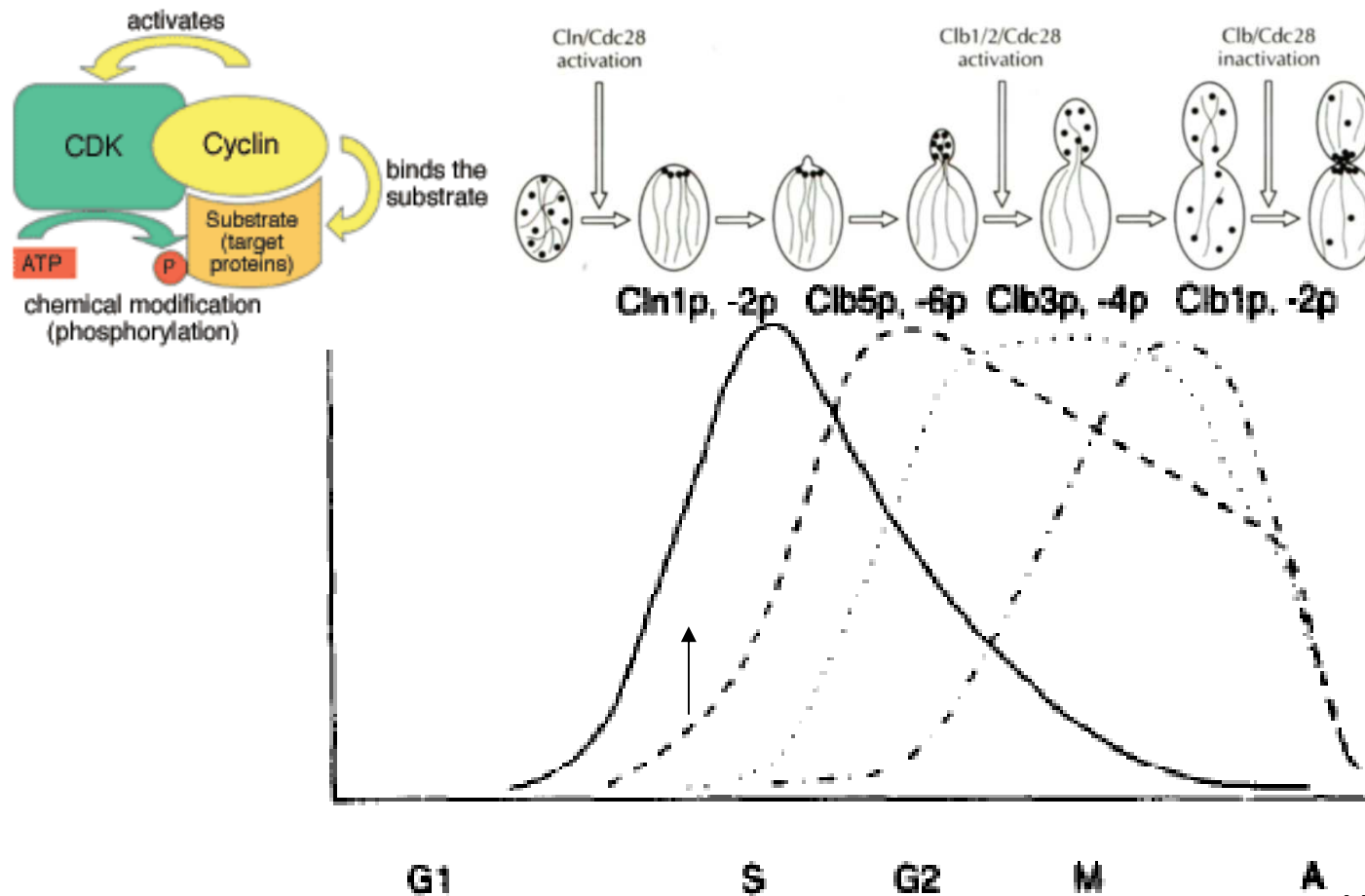
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru, nemůže být zvolena alternativa přechodu do stacionární fáze)
- pro úsek B (a další „checkpoints“) je klíčový *CDC28* (tj. CDK1) a příslušné cykliny



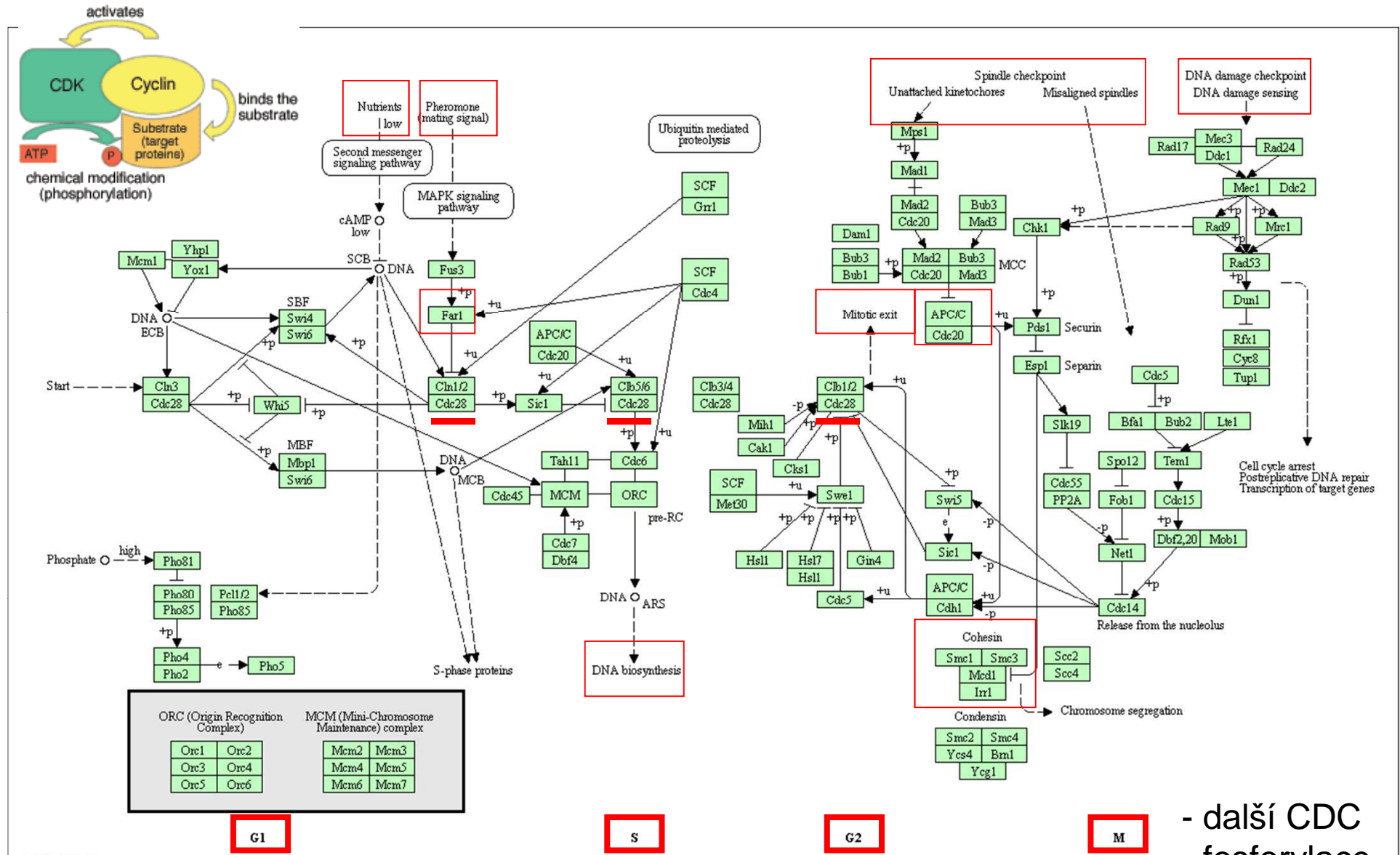
CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká aktivní komplex:

- v G1 fázi *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



Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



- další CDC
- fosforylace
- ubiquitylace