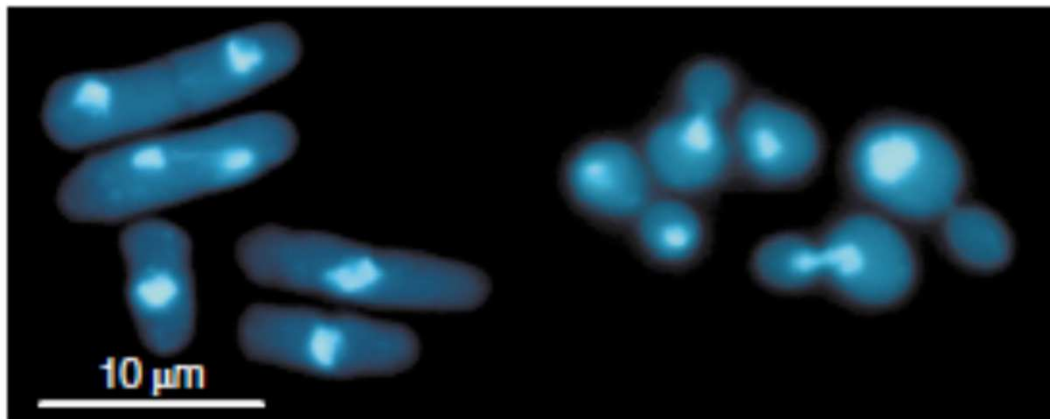


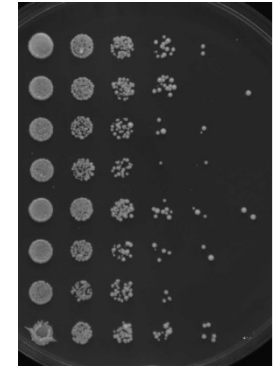
21.09.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
28.09.2017				volno
05.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
12.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
19.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
26.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
02.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
09.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
16.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
23.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
30.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Organizace kvasinkového chromatinu a evoluce
07.12.2017	9-12hod	A2-2.11	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky
14.12.2017	8-12hod	A7-2.17	Svoboda+Paleček	Cvičení k přednáškám

Osnova 4. přednášky

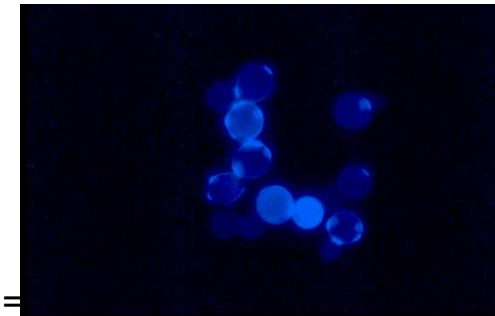
- Genetické metody
 - Plasmidy
 - Integrace do genomu
 - Teplotně-sensitivní mutanty
 - Tetrádová analýza
 - Syntetická letalita, suprese



Výhody kvasinkového modelu



- Rychle se množí EUKARYOTNÍ mikroorganismy (90 min/dělení, 25-30°C)
- Vytváří kolonie na plotnách - mikrobiologické metody (otiskování ploten, kapkovací 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, inzerční 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 organely (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

Nomenklatura pro *S.p.*:
SPAXXXX:
SP=*S. pombe*
A= 1. chromosom
...

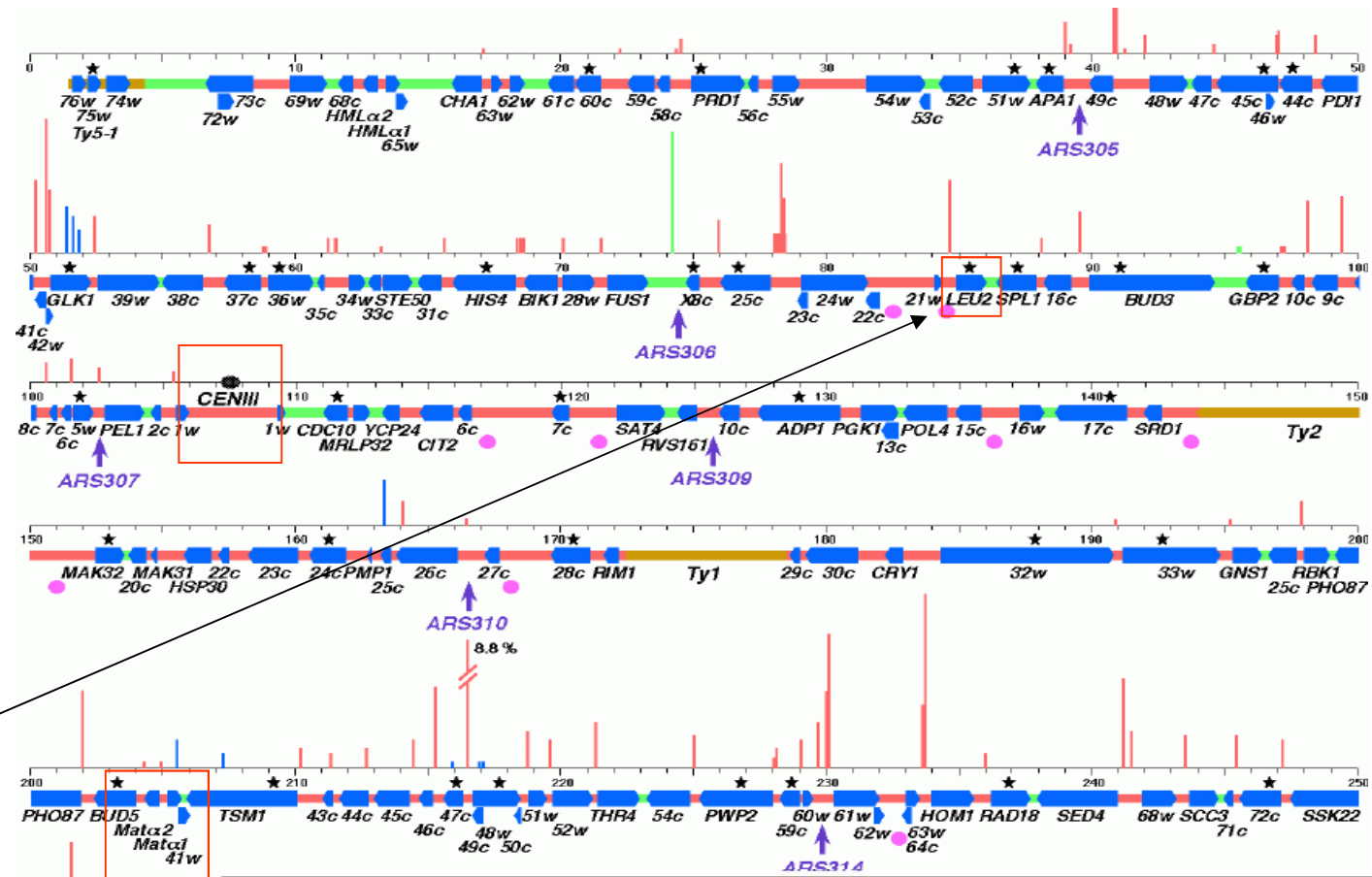


Table 1 | Nomenclature in the two yeast species

	<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

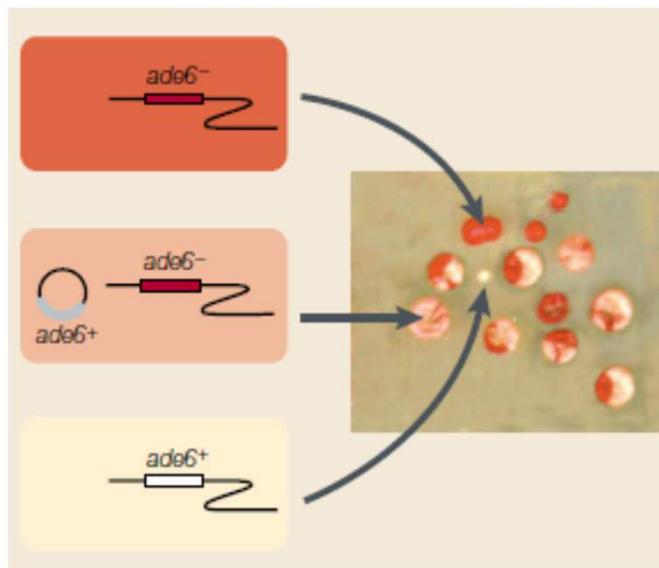
Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

auxotrofie – využívána pro selekci

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)	

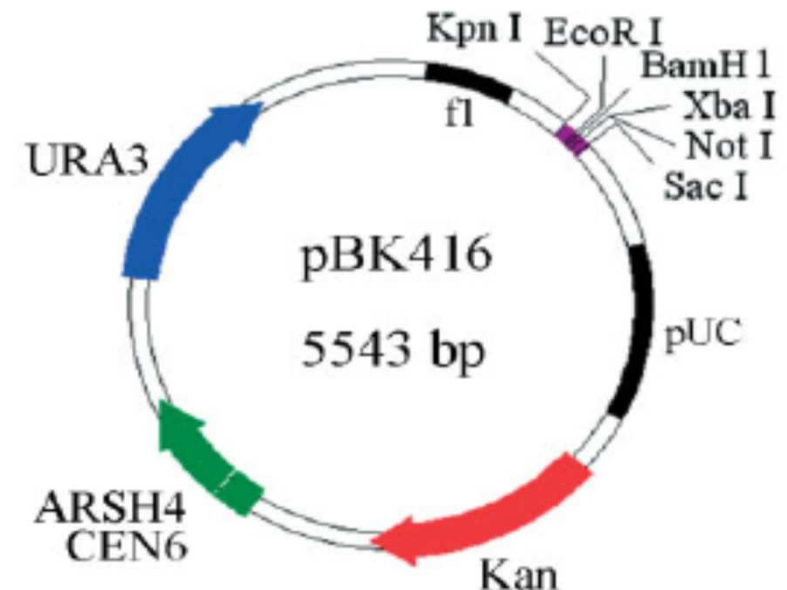


Table 1. Summary of pFA6 derivatives for genomic FLAG- and PK-tagging and gene deletion useful in *S. pombe*

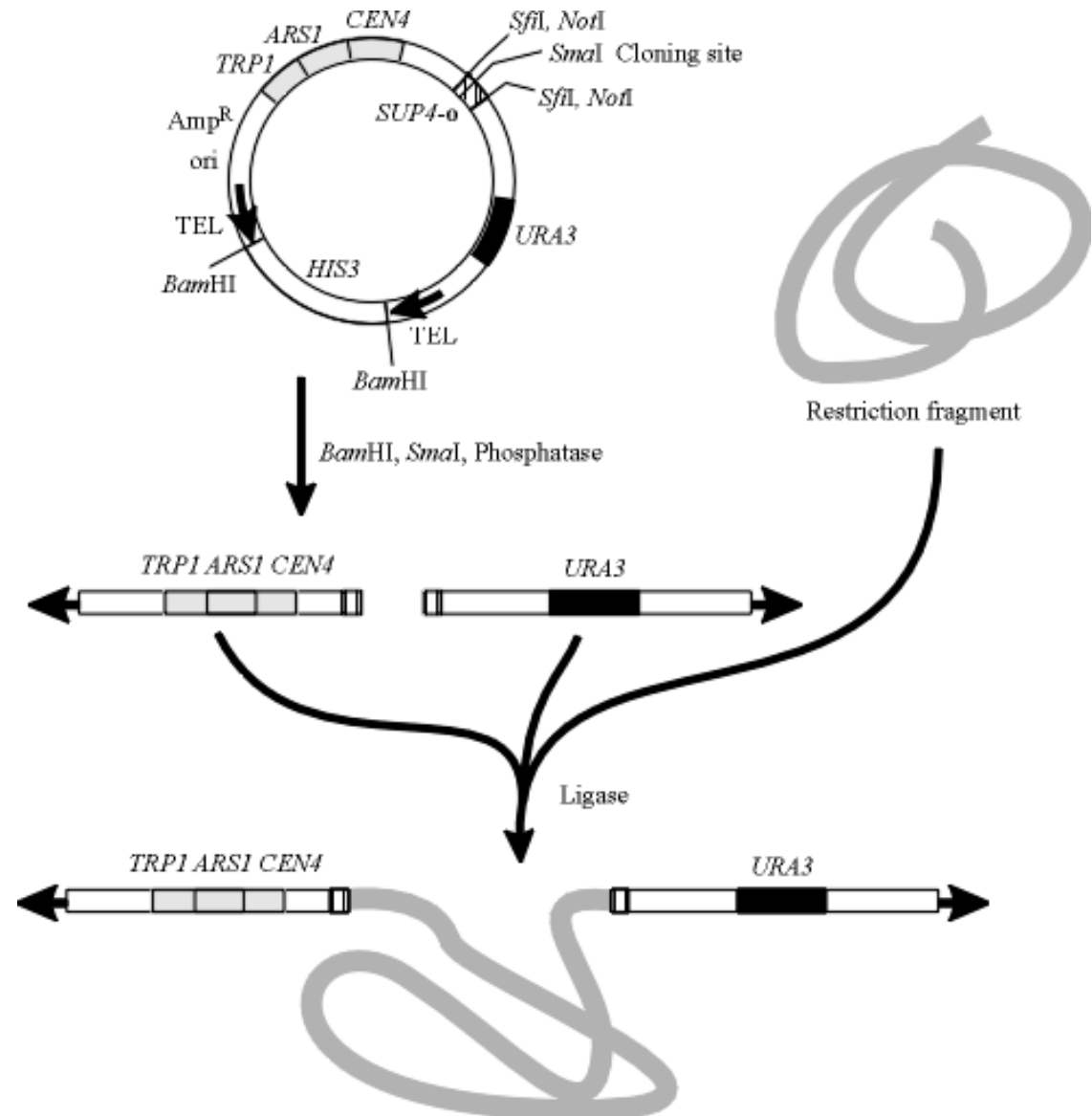
Vector name		Comments	Markers	Sources	
PK-tagging vectors	pFA6a-6xGLY-V5-(marker)	C-terminal G6-1PK(V5)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i>	(8) (8)	
	pFA6a-12PK-(marker)	C-terminal 12PK(V5)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>LEU2MX6</i> <i>ura4MX6</i>	This study This study This study 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 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 *urg1* promoter.

YAC (yeast artificial chromosome)

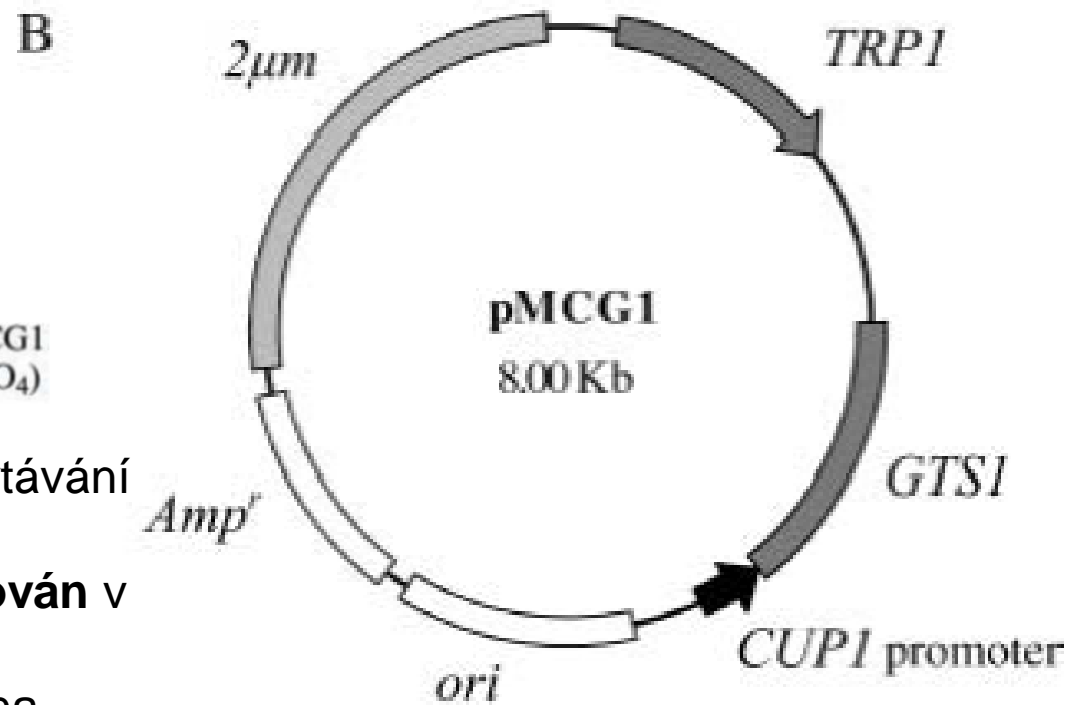
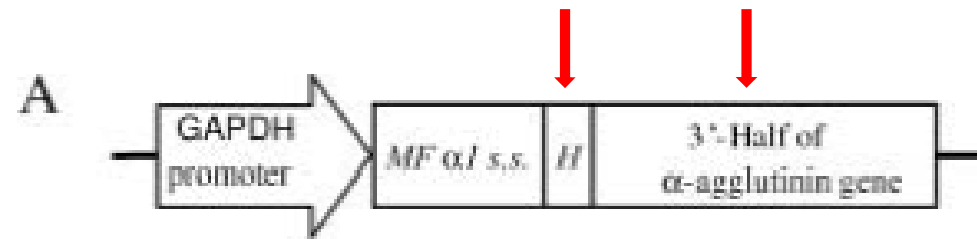
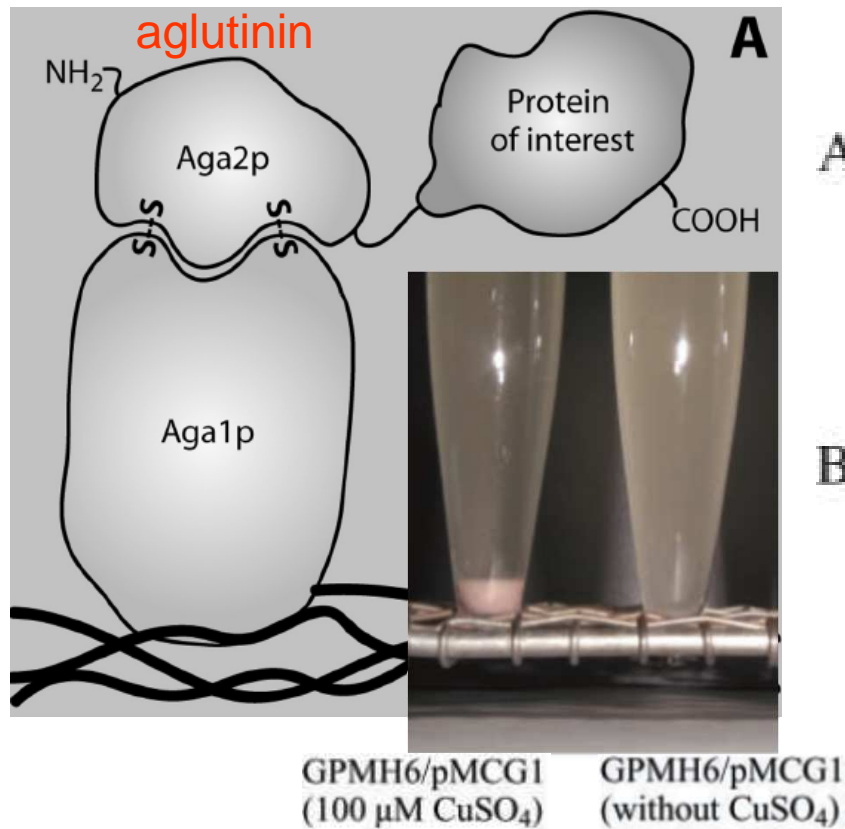
- Bakteriální část – Amp resistance, počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert např. lidská genová banka pro HuGO 80000 klonů YAC (270kbp)
- Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- Výzkum savčích telomer a centromer
- Pomocí transfekce, lipofekce nebo 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

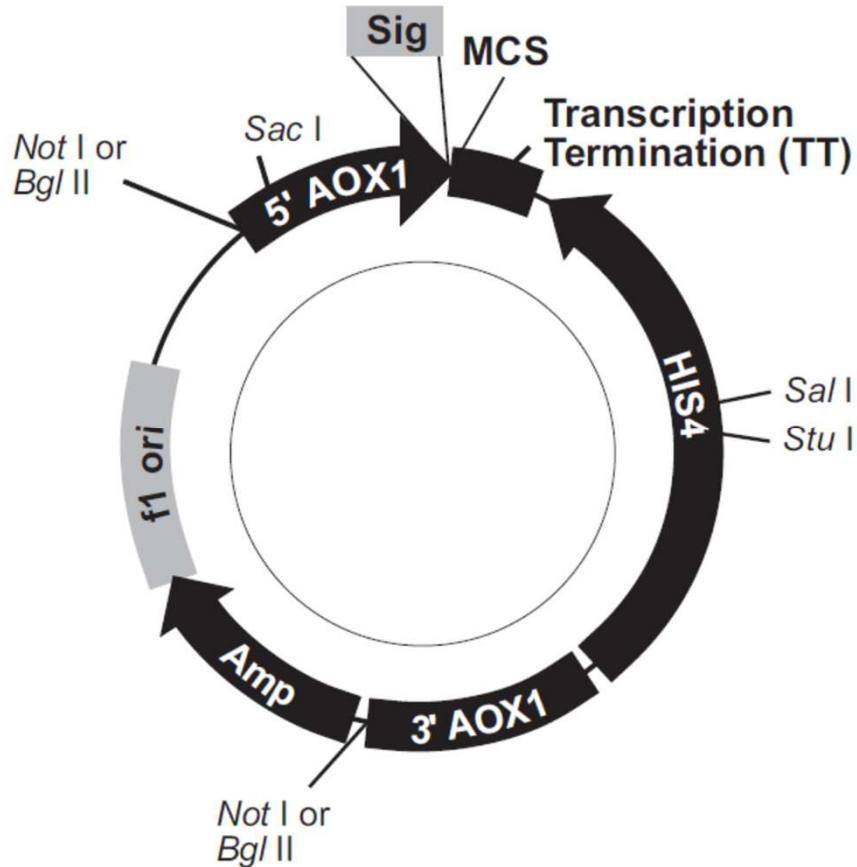
Yeast surface display



- 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

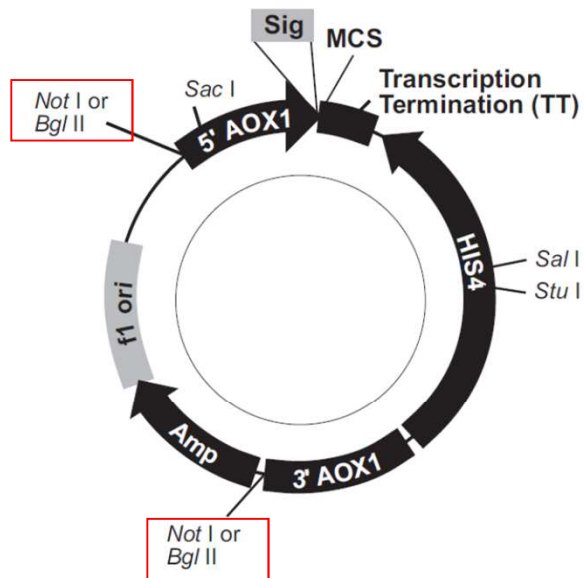


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)

- exprese z *AOX1* promotoru v *P.pastoris*

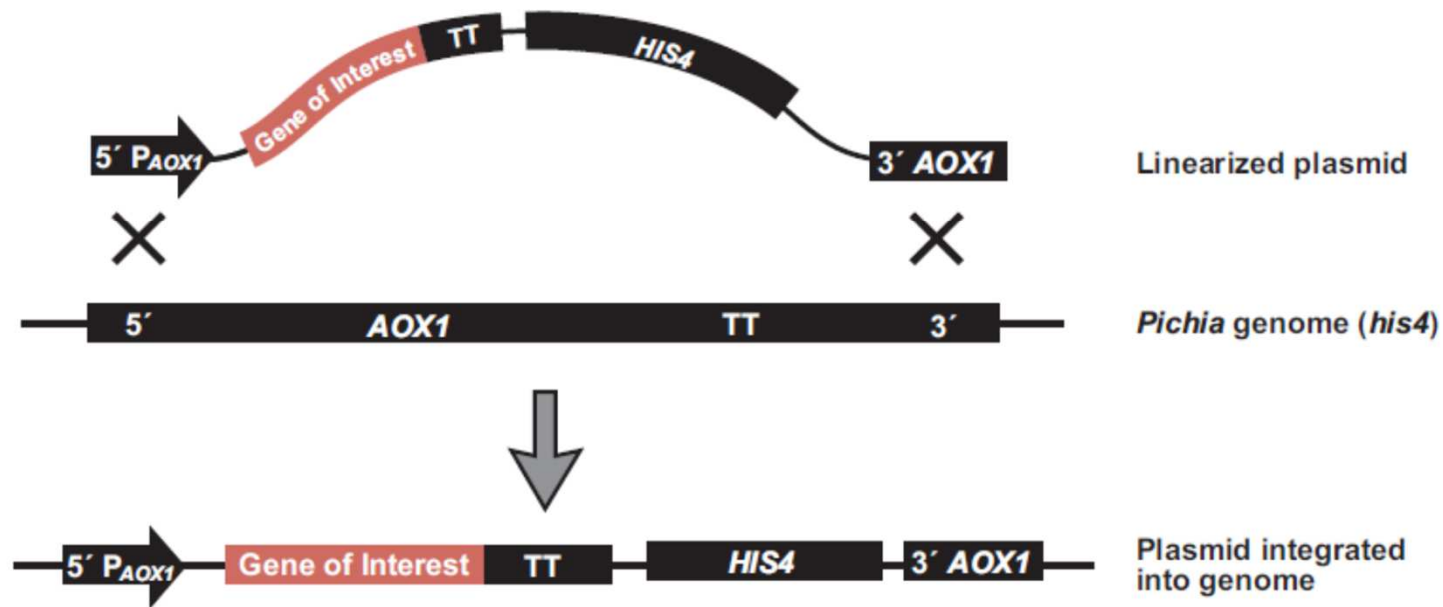
Feature	Description	Benefit
5' <i>AOX1</i>	An ~1000 bp fragment containing the <i>AOX1</i> promoter	Allows methanol-inducible high level expression in <i>Pichia</i> Targets plasmid integration to the <i>AOX1</i> locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal protein secretion signal	Targets desired protein for secretion
MCS	Multiple Cloning Site	Allows insertion of your gene into the expression vector
TT	Native transcription termination and polyadenylation signal from <i>AOX1</i> gene (~260 bp)	Permits efficient transcription termination and polyadenylation of the mRNA
<i>HIS4</i>	<i>Pichia</i> wild-type gene coding for histidinol dehydrogenase (~2.4 kb) and used to complement <i>Pichia his4</i> strains	Provides a selectable marker to isolate <i>Pichia</i> recombinant strains
3' <i>AOX1</i>	Sequences from the <i>AOX1</i> gene that are further 3' to the TT sequences (~650 bp)	Targets plasmid integration at the <i>AOX1</i> gene
Amp pBR322 origin	Ampicillin resistance 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</i> II <i>Sac</i> I <i>Sal</i> I <i>Stu</i> I	Unique restriction sites	Permits linearization of vector for efficient integration into the <i>Pichia</i> genome

Integrace I.

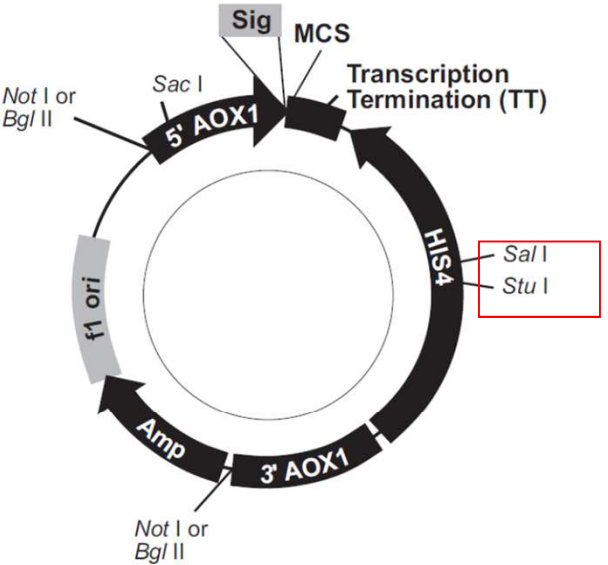


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru
- integrace do AOX1 lokusu

- **mechanismus homologní rekombinace**

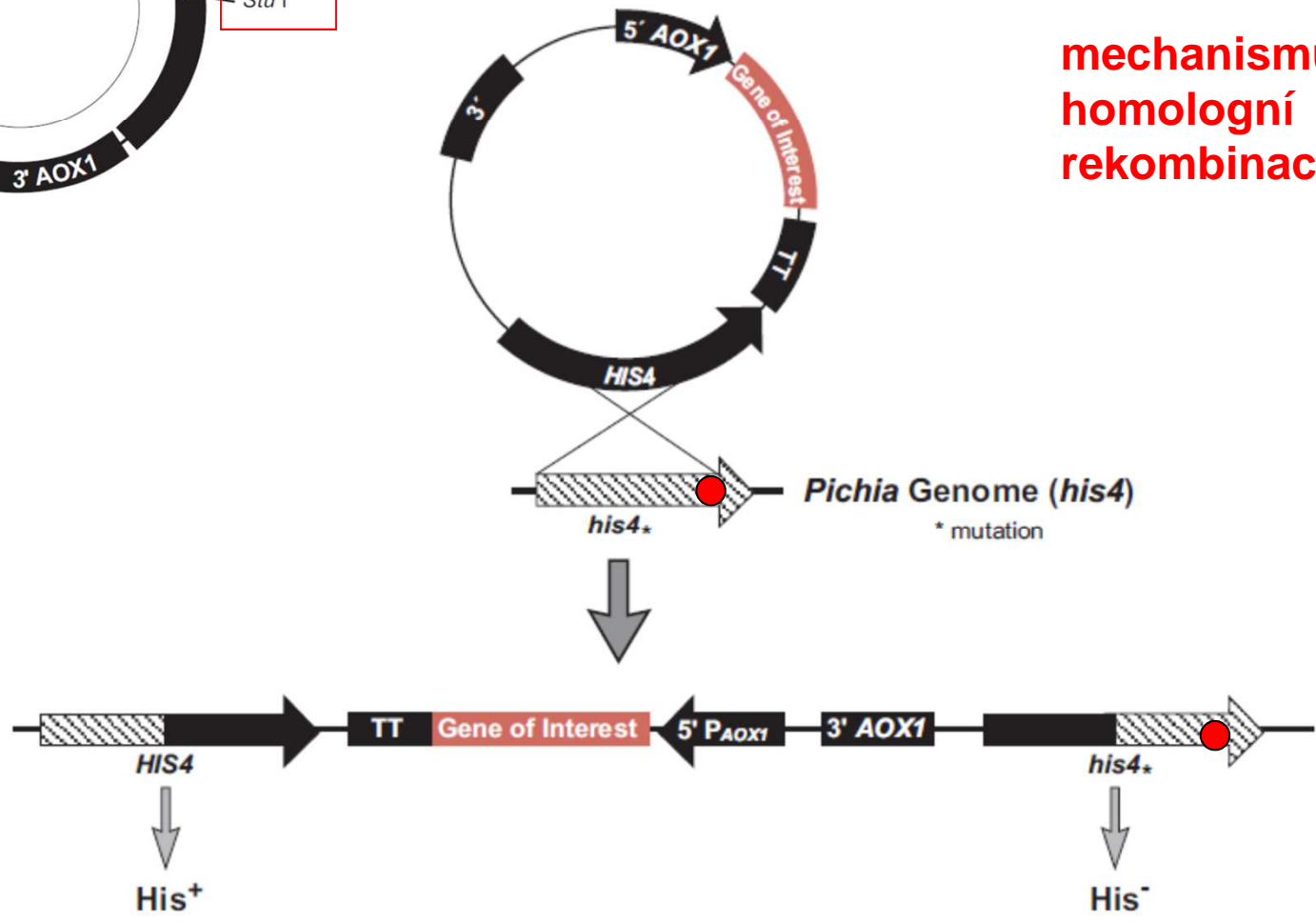


Integrace II.



- integrace do *his4* lokusu

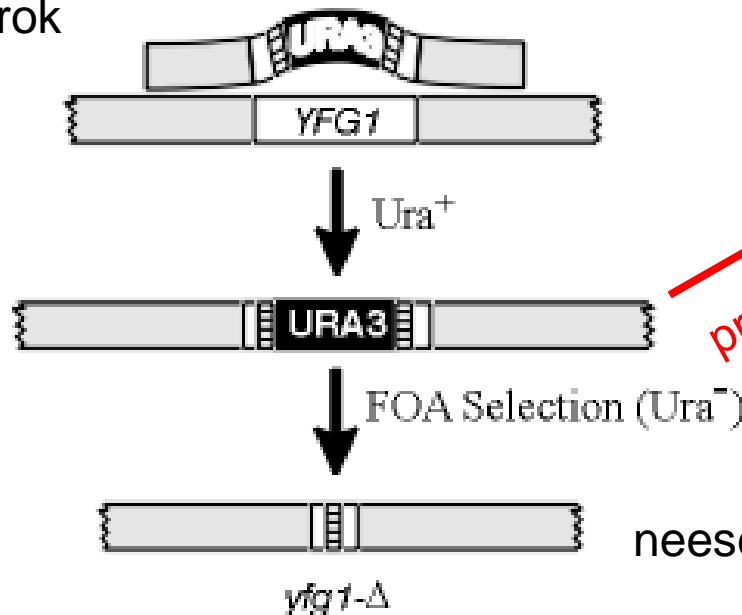
**mechanismus
homologní
rekombinace**



Integrace: disrupce/delece genu

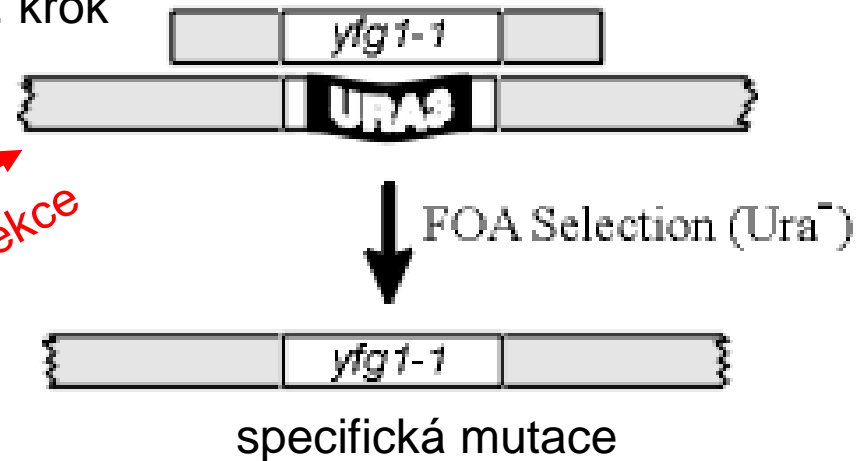
- Studium funkce genu – fenotyp (1. delece, 2. mutace)
 - nezbytný/esenciální gen => buňky potřebují gen např. na plasmidu (plasmid shuffling)
 - životaschopné – mutace lze přímo integrovat do genomu
 - mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“ – dále lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami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

1. krok



2. krok

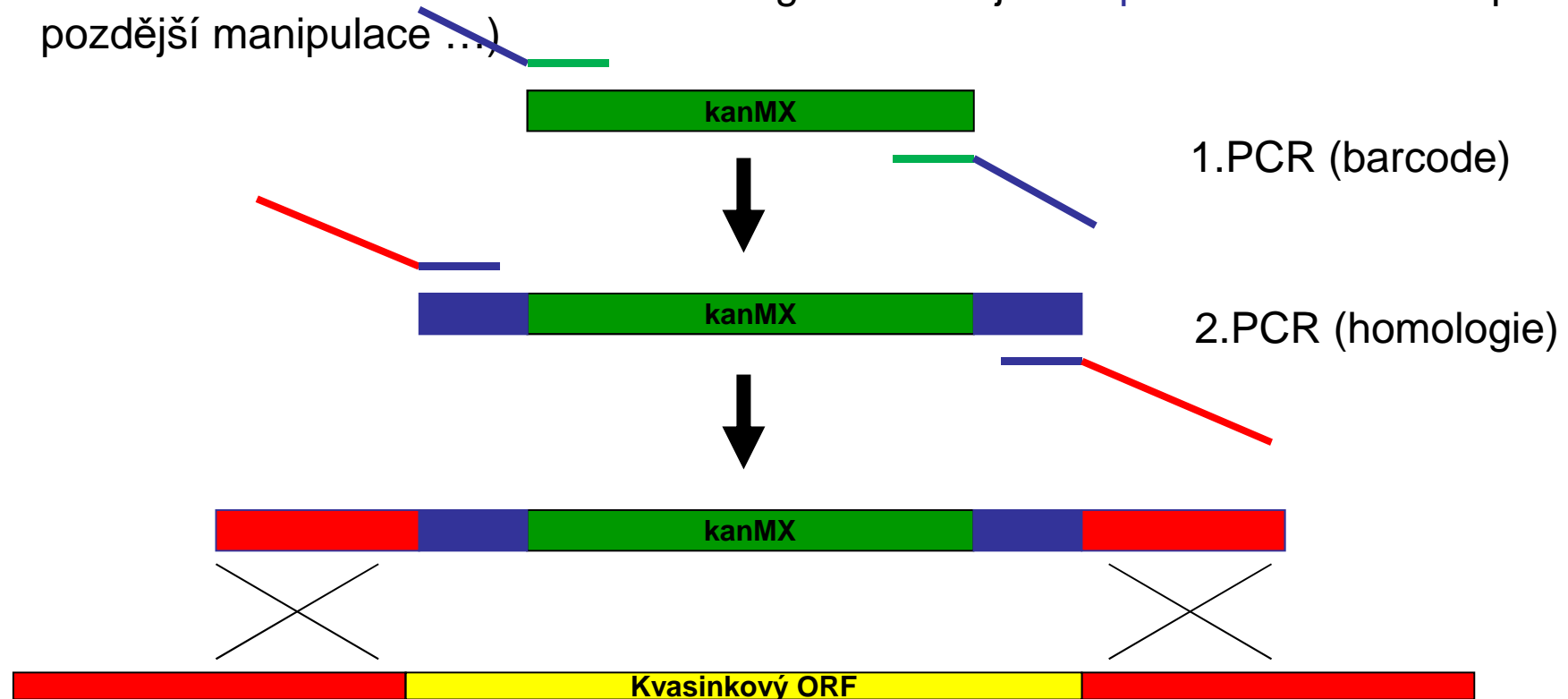
protiselekce



- 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

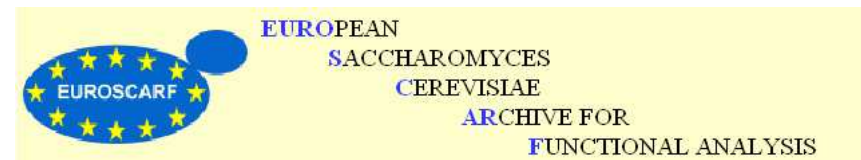
- pro rekombinaci stačí pouze **krátká homologie** (50-100nt pro S.c.)
- místo integrativních plasmidů = oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé postačí (při 2 krokové PCR se kromě dlouhé homologie vnesou ještě **specifické sekvence** pro pozdější manipulace ...)



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

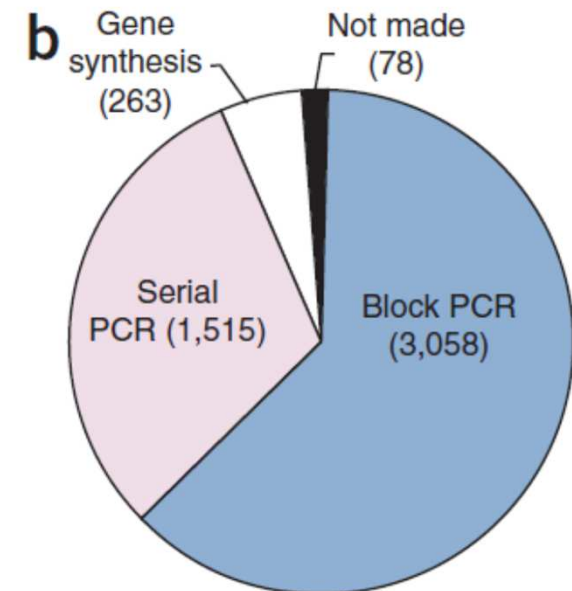
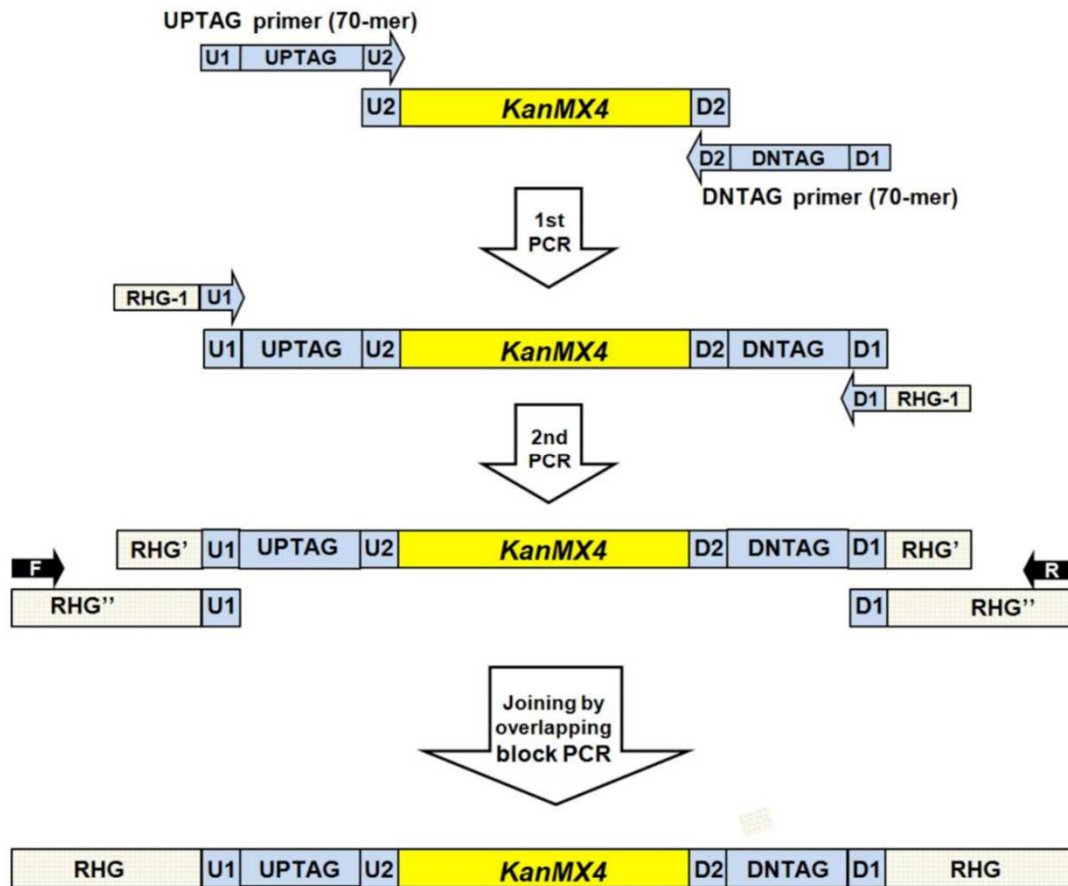
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>

Giaever et al, Nature, 2002



Deleční knihovna – *S. pombe*

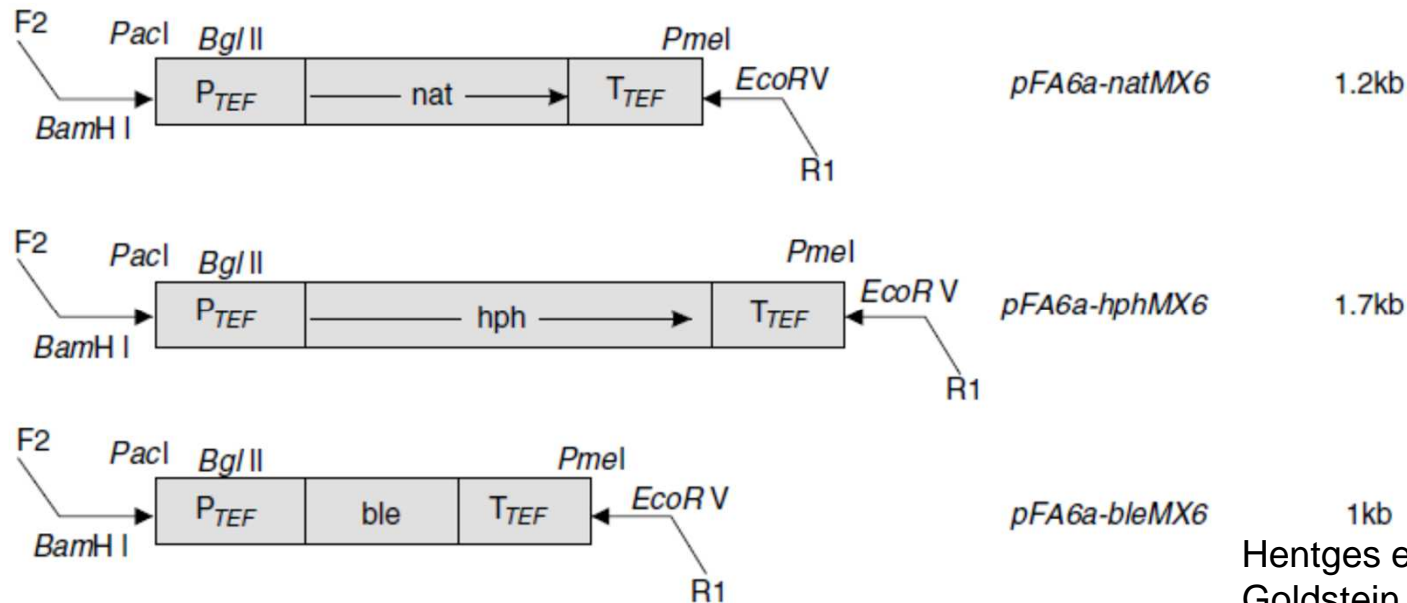
- *S. pombe* potřebuje delší homologii (serial PCR = 40-80bp; block PCR = 80-350bp)
- deleční knihovna od Bioneer (Korea, 25 000\$)



MX4/6 kazety

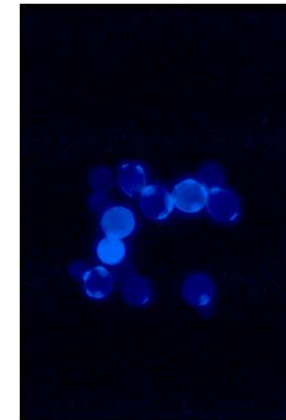
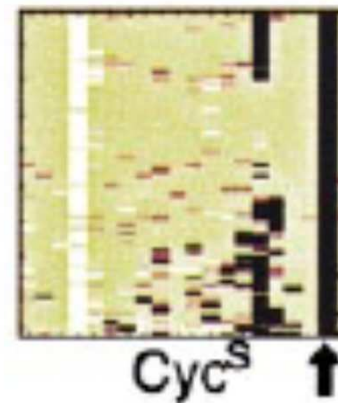
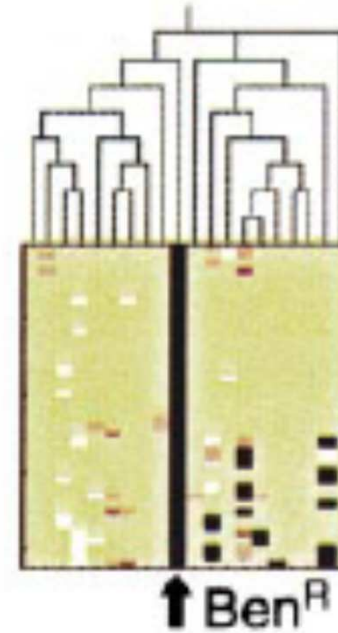
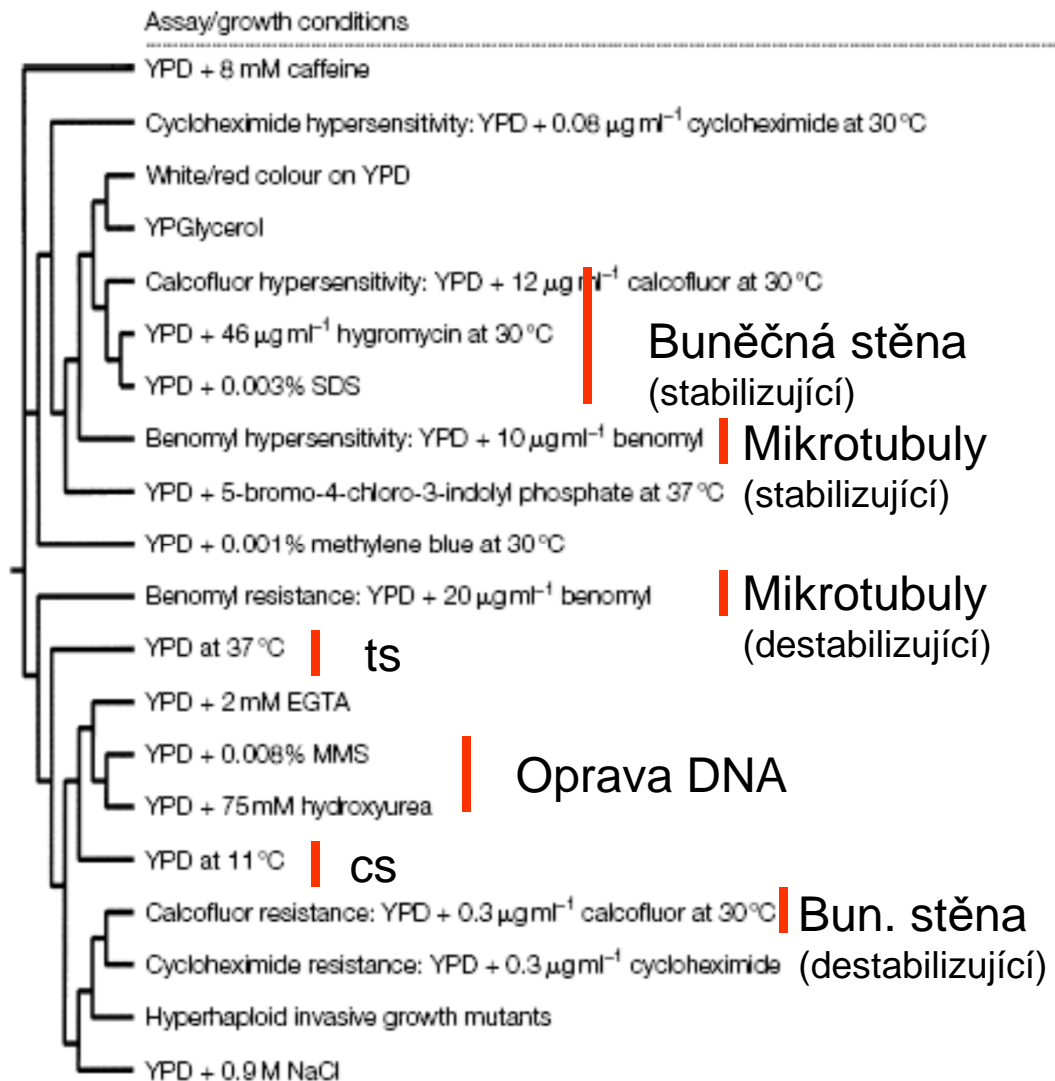
- nourseothricin (NAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje NAT)
- hygromycin B – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygroscopicus*), rezistence kódována *hph*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



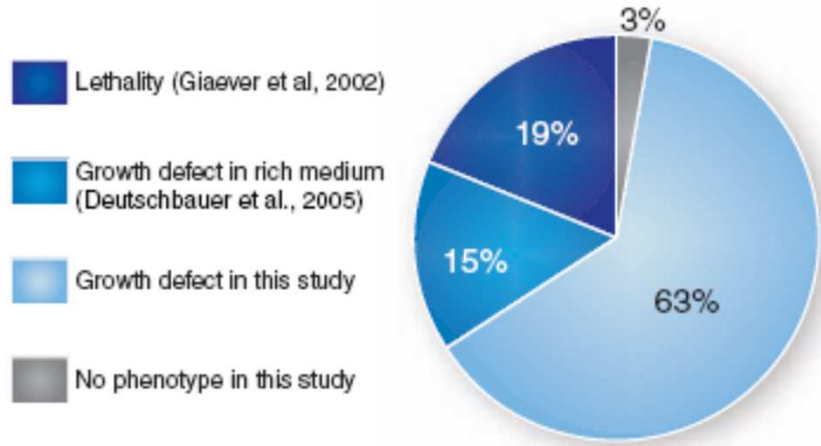
Hentges et al.: Yeast, 2005
Goldstein et al.: Yeast, 1999

EuroFan projekt - testy fenotypu



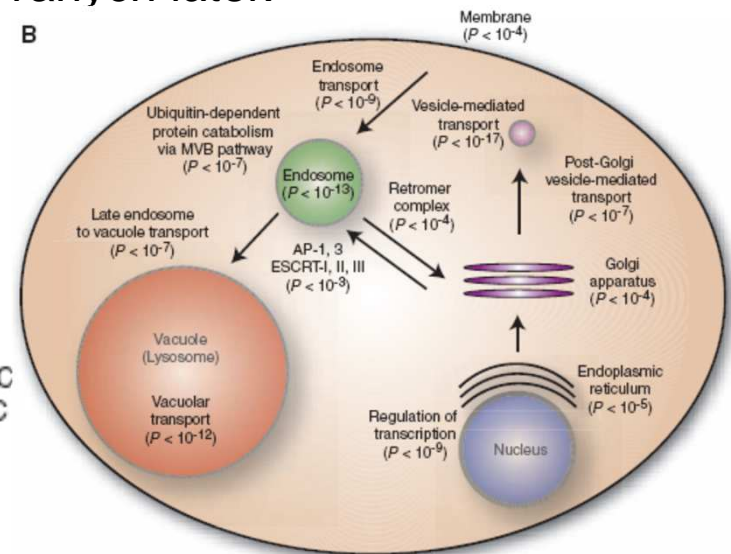
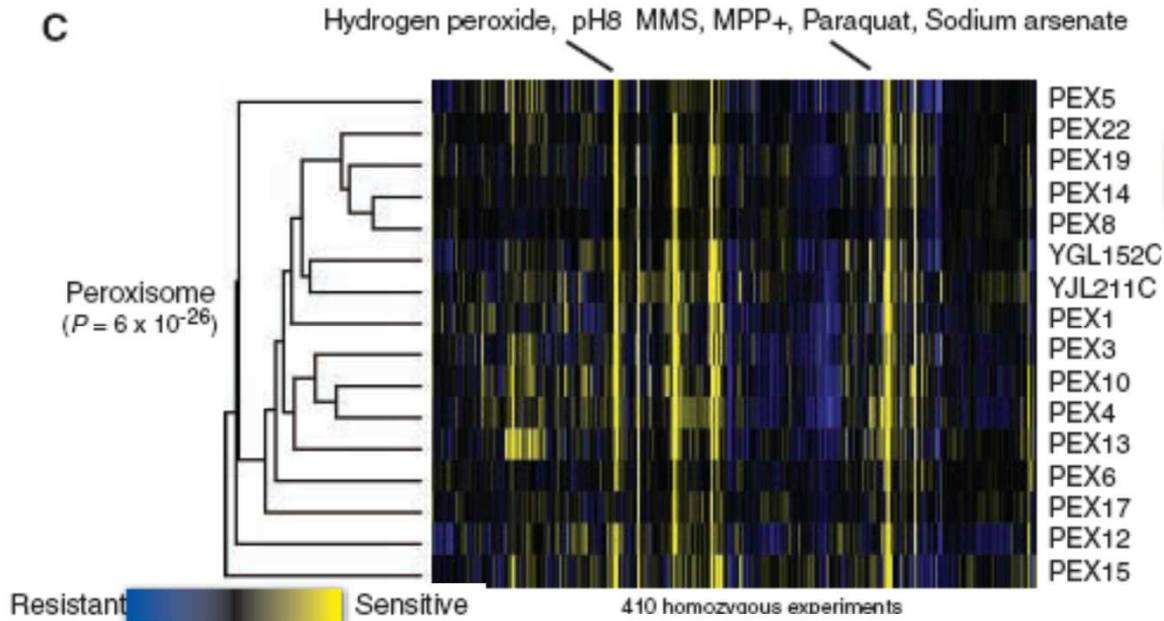
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů – anotace v databázích (genová ontologie)

~ 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



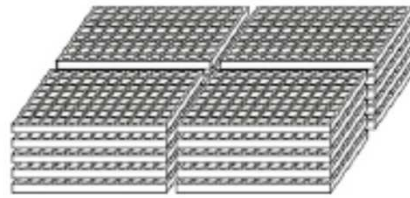
Geny/Proteiny peroxisomu

Hillenmeyer et al, Science, 2008

1 Cell growth & sample preparation



Prototrophic strains
all gene deletions



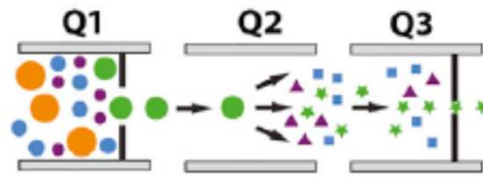
Exponential growth
minimal media



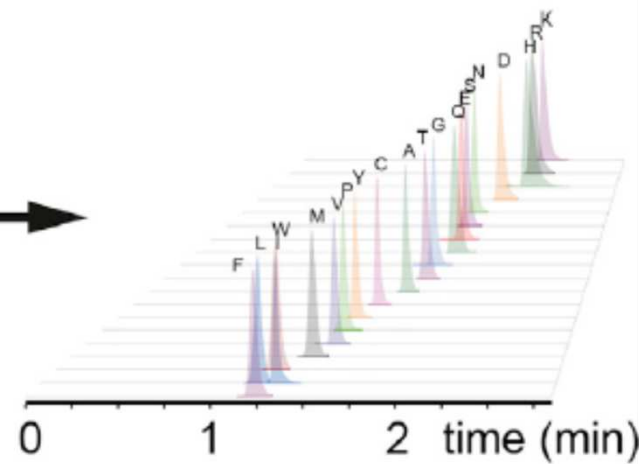
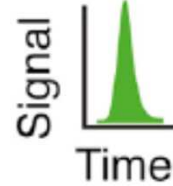
Metabolite
extraction

- deleční knihovna testována na AMK metabolismus (změna koncentrace AMK)

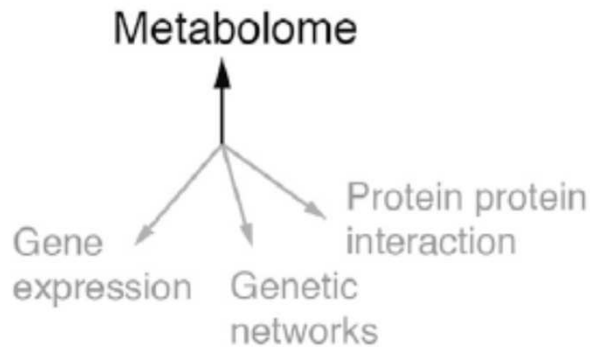
2 Amino acid analysis



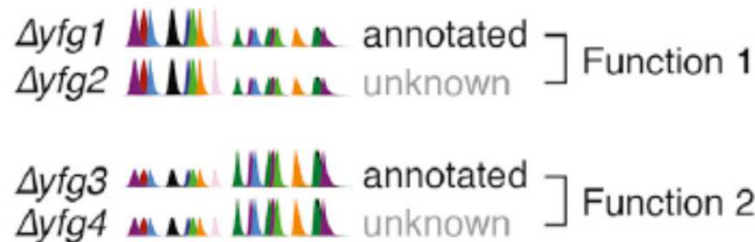
LC-Selective Reaction Monitoring



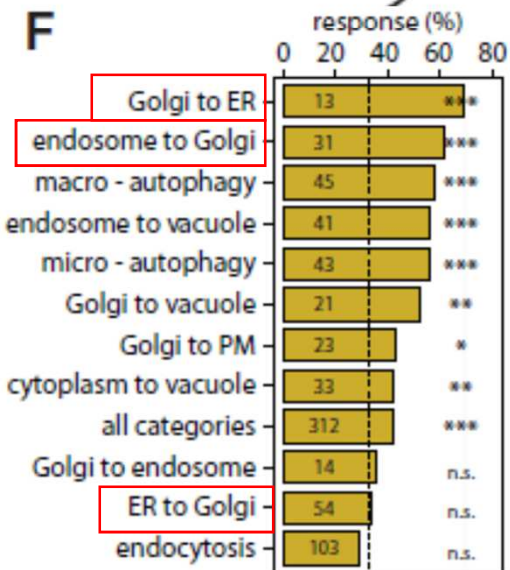
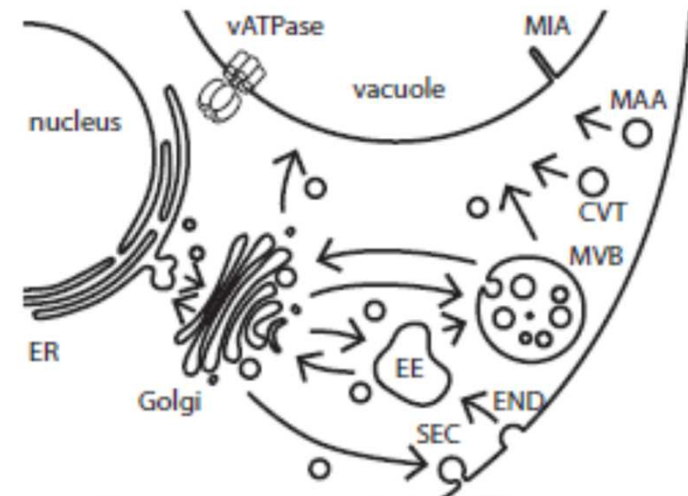
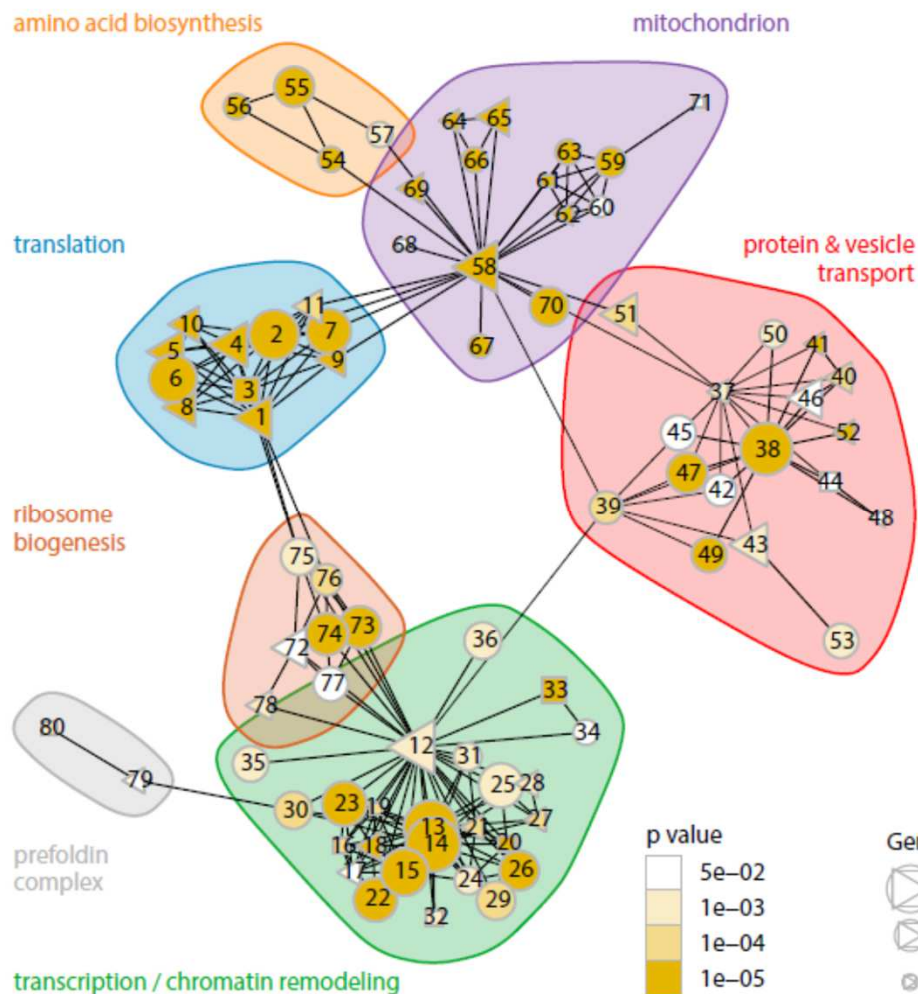
3 Function & physiology



4 Gene functional annotation

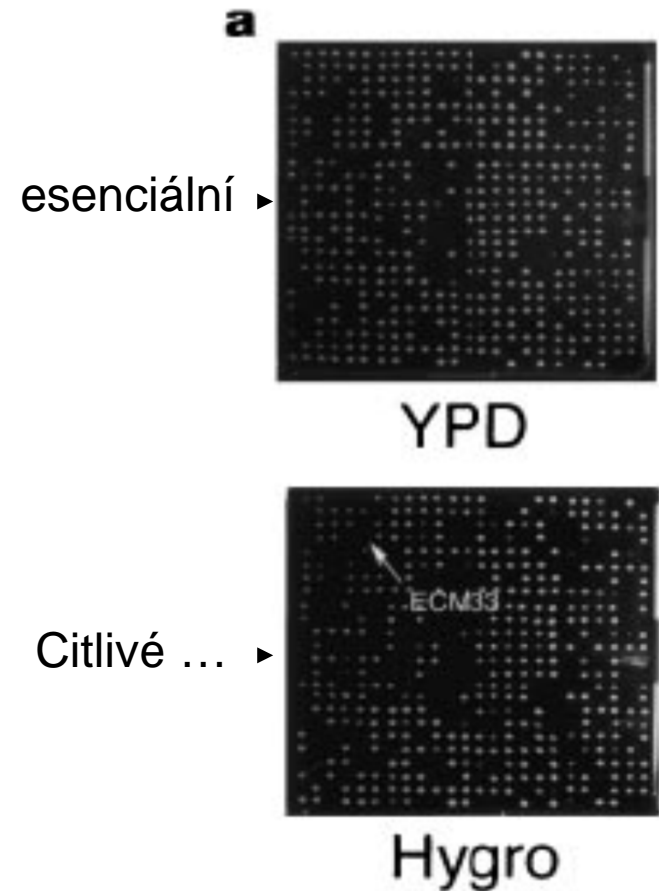
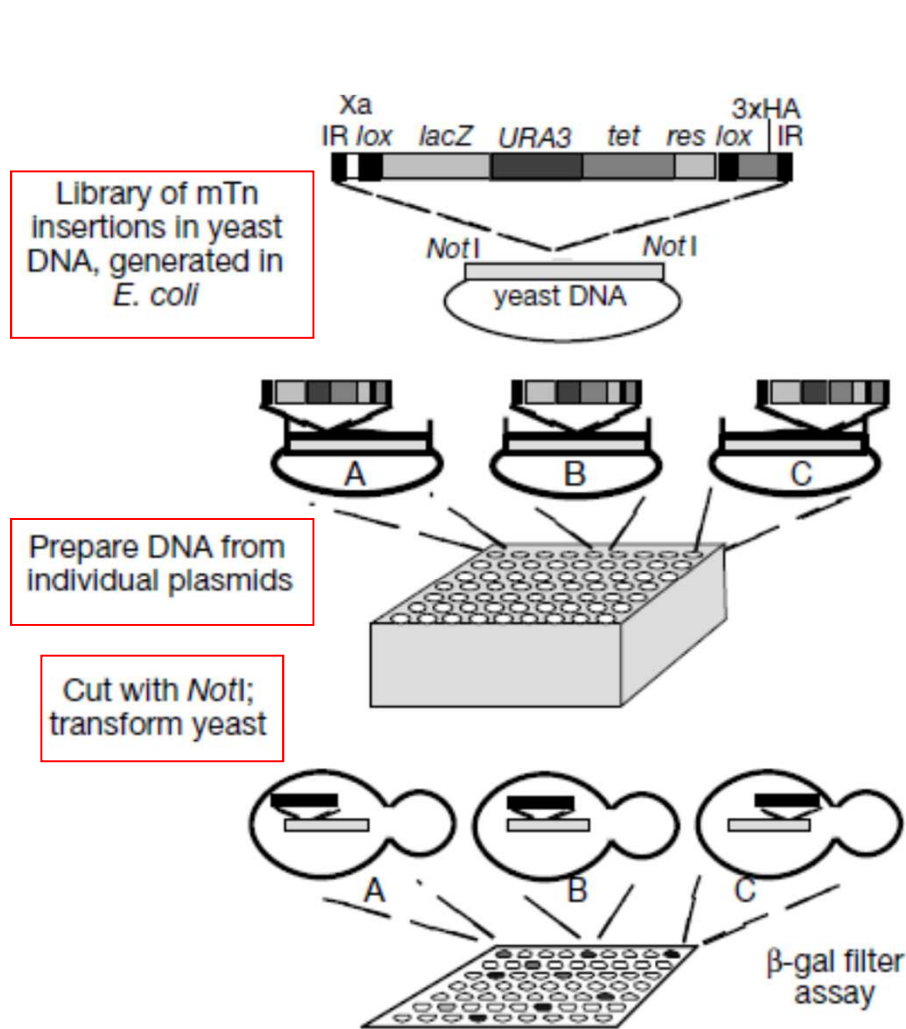


vztah genom-metabolom



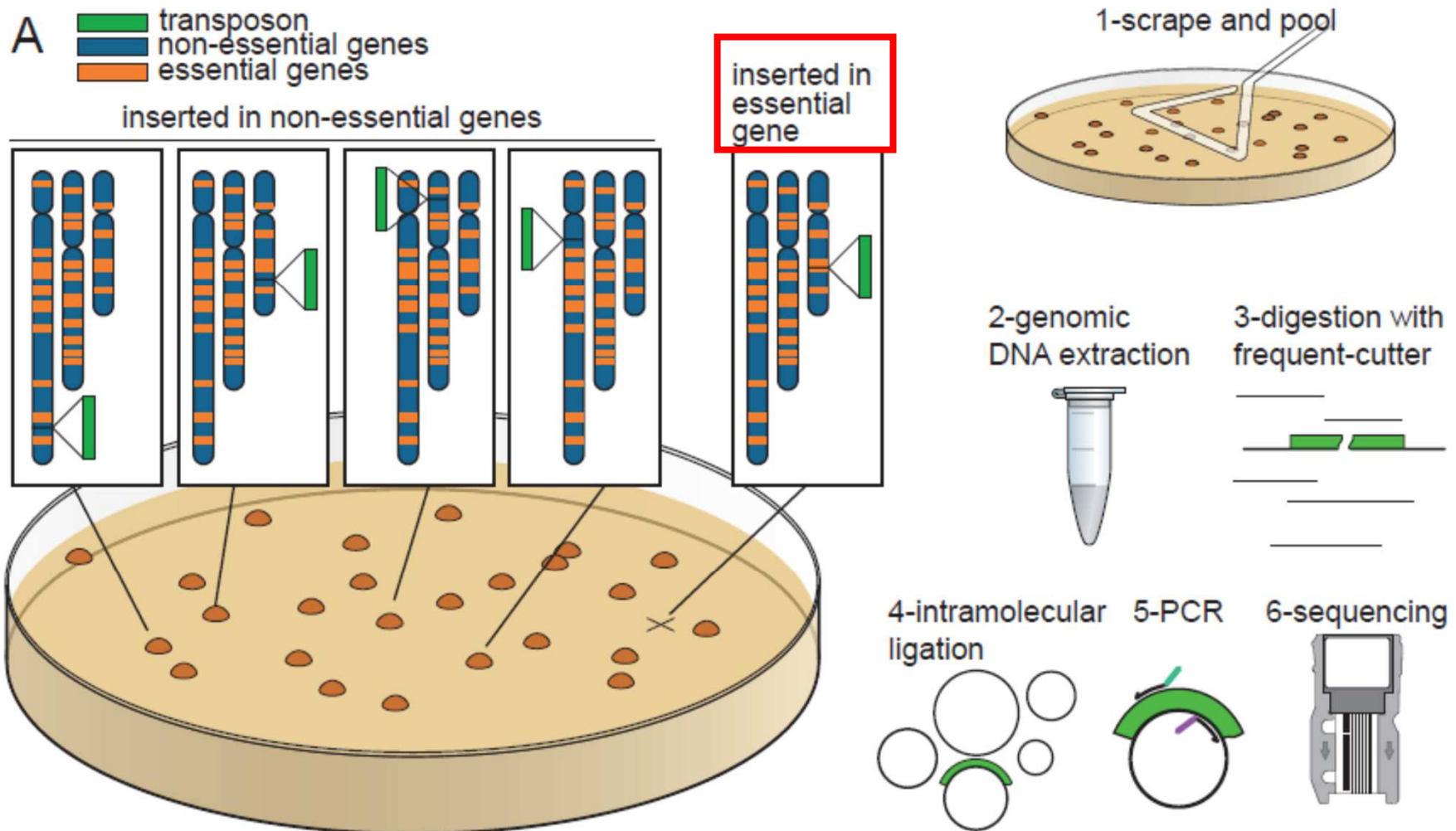
- transport proteinů a váčků (Golgi/ER ... degradace proteinů a recyklace AMK) má zřejmý vztah k hladině AMK – překvapivě velký vliv má struktura chromatinu

Delece genu pomocí transposonů



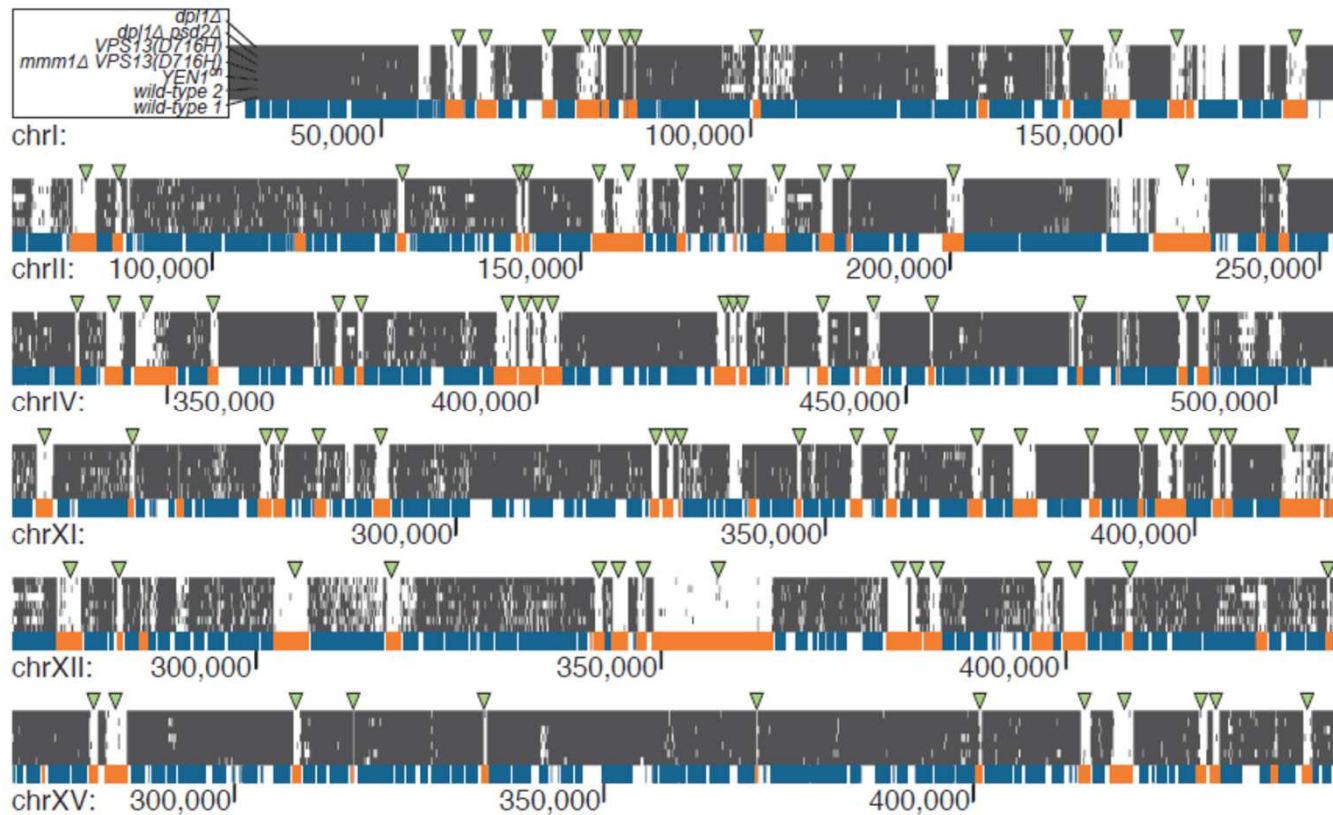
Defekt buněčné stěny

Saturated Transposon Analysis in Yeast (SATAY)



Michel et al, eLife, 2017

- generováno 1000000 klonů – 300000 inzercí (vysoké pokrytí na 6000 genů)
- cirkulární DNA použita pro NGS sekvenování (MiniDs transposon-specifické primery)
- inzerce každých 40bp (preferenčně v nucleosom-free oblastech)
- každý transposon sekvenován 20x ...



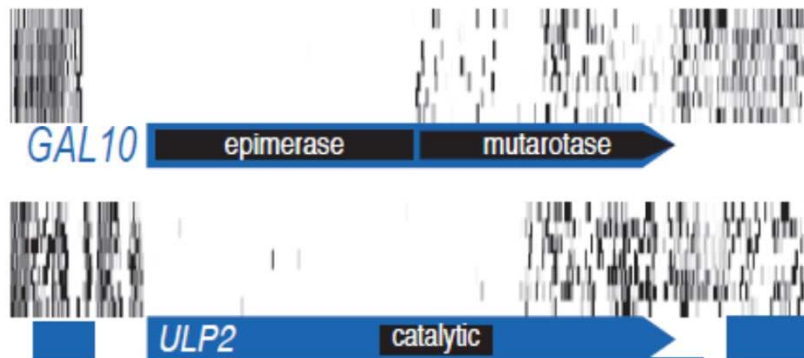
- inserce chyběly v **esenciálních genech** (zelené šipky)

- charakterizace GO, drug screening, syntetická letalita, ...

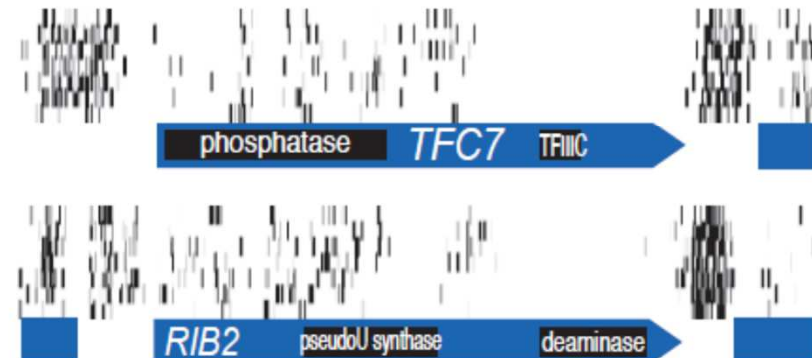
- rozlišení na úrovni domén (GAL10 – dvě domény z nichž esenciální je pouze první ...)

- C-koncové, ale i N-koncové delece

A C-terminal truncations

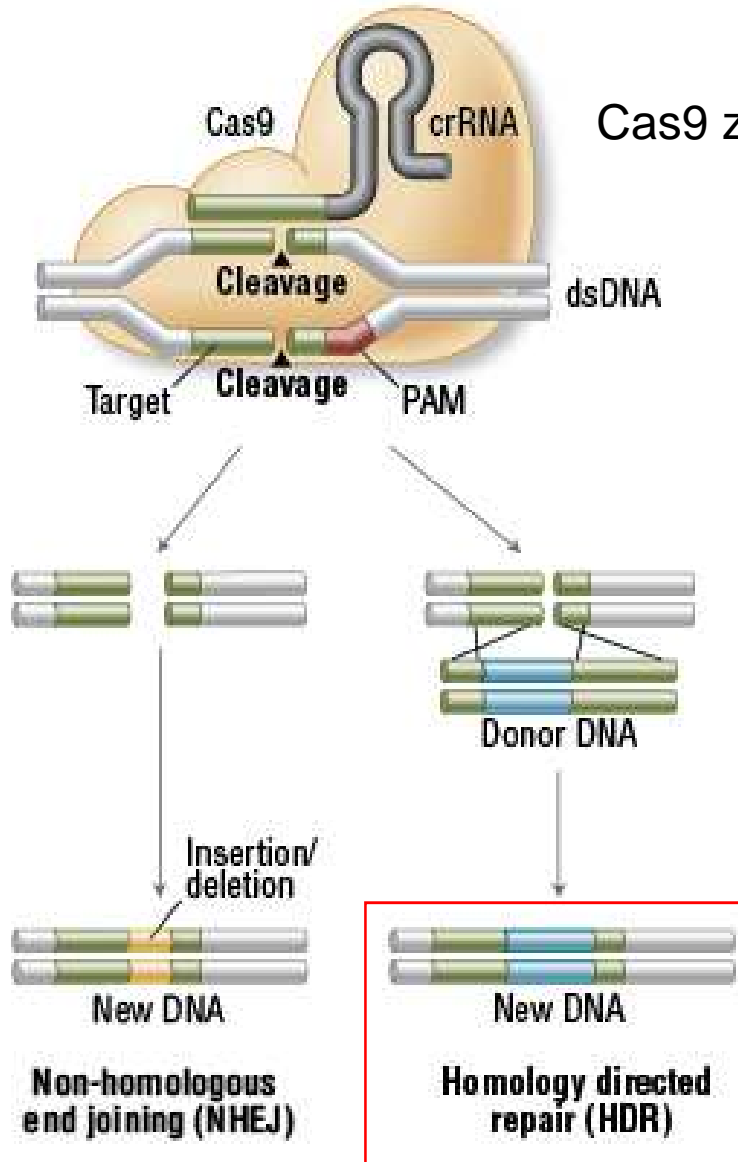


B N-terminal truncations

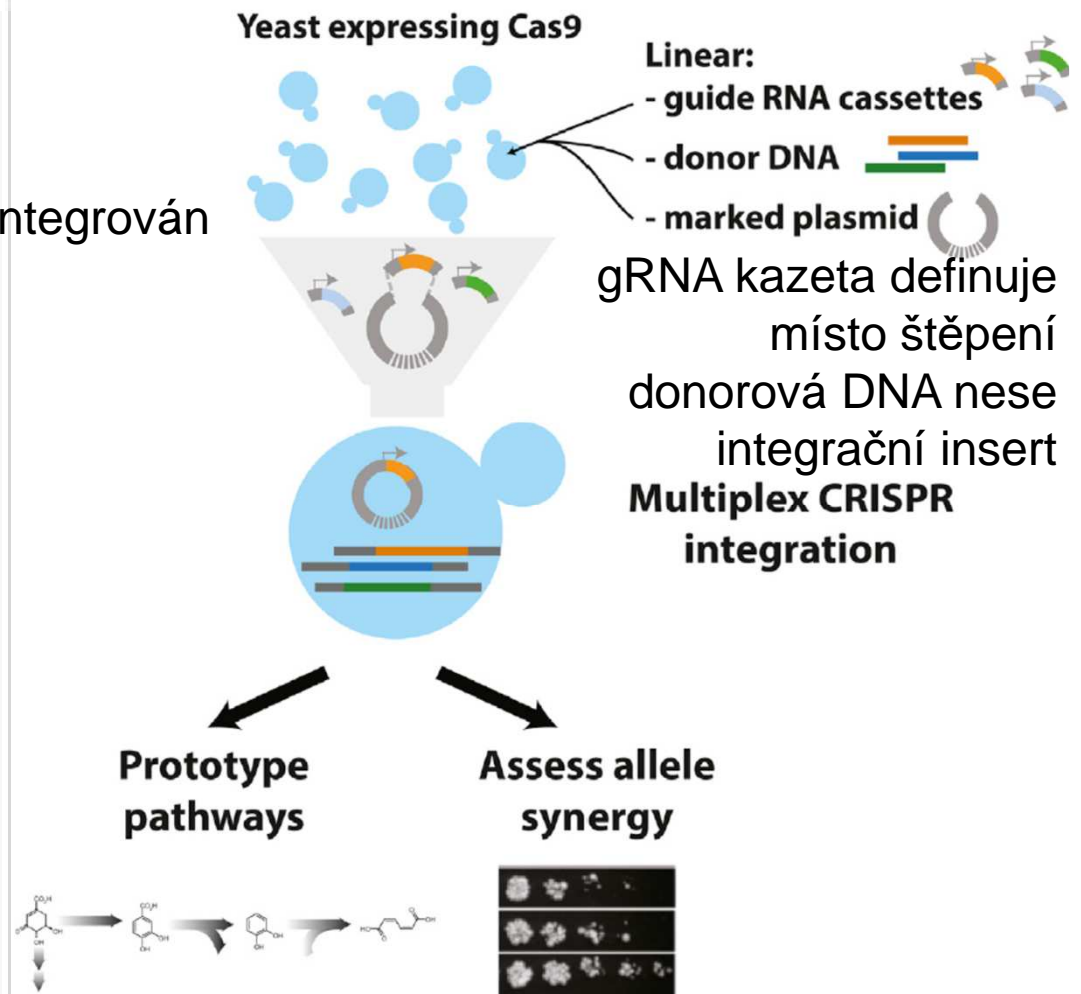


Integrace: inserce genu (CRISPR-Cas9)

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



Horwitz et al, Cell Syst, 2015



K integraci u kvasinek není nutný CRISPR

- účinná homologní rekombinace
- CRISPR zvyšuje účinnost mnohonásobné integrace (řízené štěpení DNA)

6 integrací do 3 lokusů (po dvou)

nová metabolická dráha



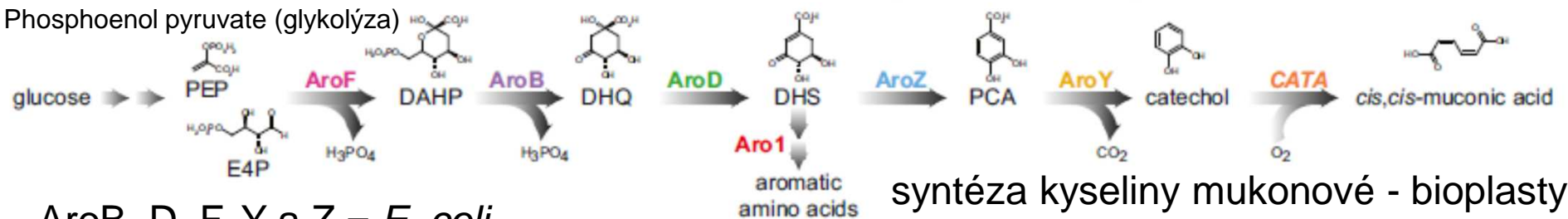
lokusy: GAL80, HO, ARO1 (vyřazení ARO1)



AroY v pěti kopiích – zvýšilo výtěžek

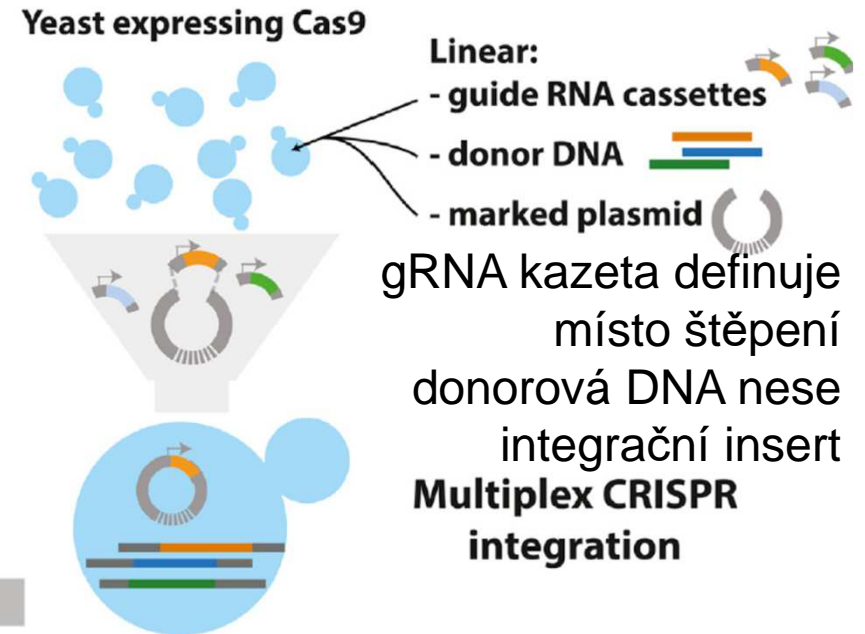


Phosphoenol pyruvate (glykolýza)



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

CATA = *C. albicans*

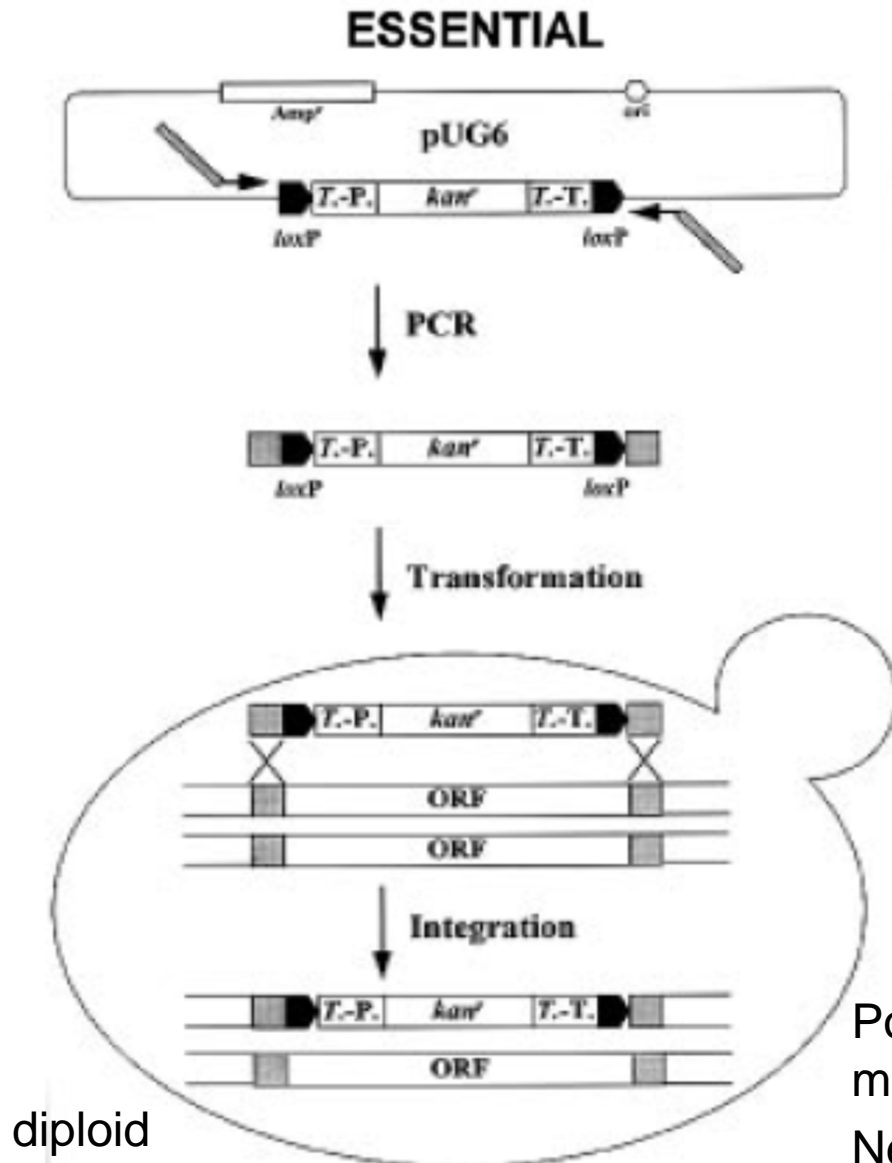


syntéza kyseliny mukonové - bioplasty

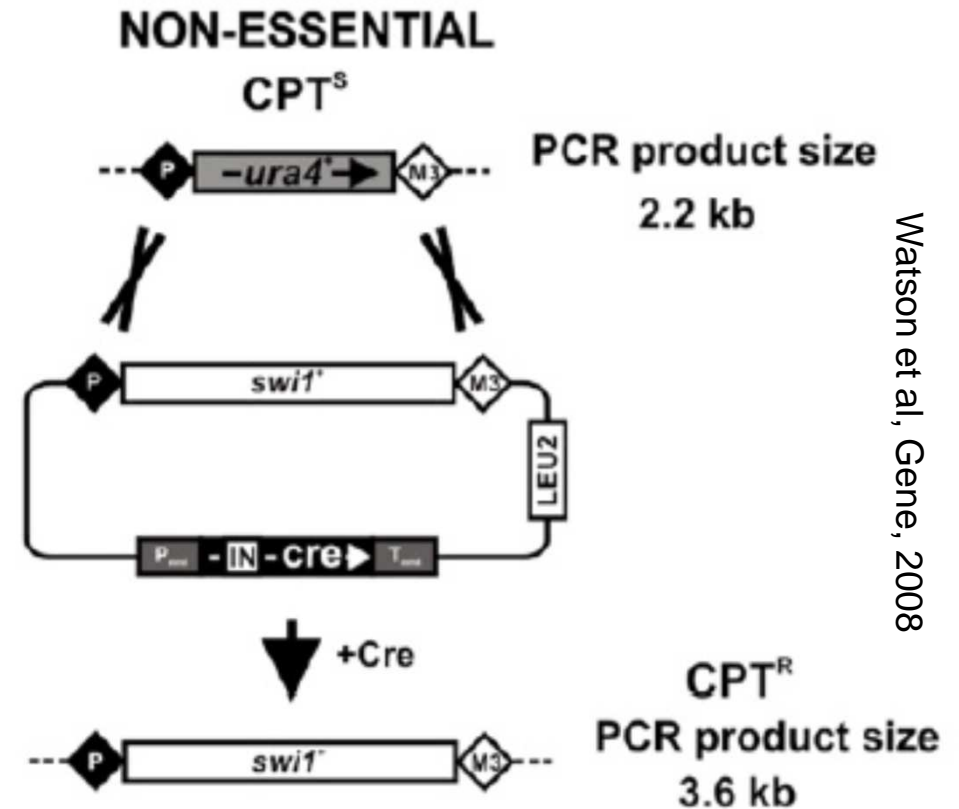
Horwitz et al, Cell Syst, 2015

delece ARO1 blokuje tvorbu aromatických AMK (dráha vede na kys. mukonovou) a nutí buňky do této dráhy – v biotechnologickém procesu nejdříve na bohatém médiu roste biomasa – poté se na minimálním médiu (bez aromatických AMK) spouští tato dráha

Cre rekombinasa



Guldener et al, NAR (1996)



Watson et al, Gene, 2008

Postup lze použít několikrát se stále stejným markerem

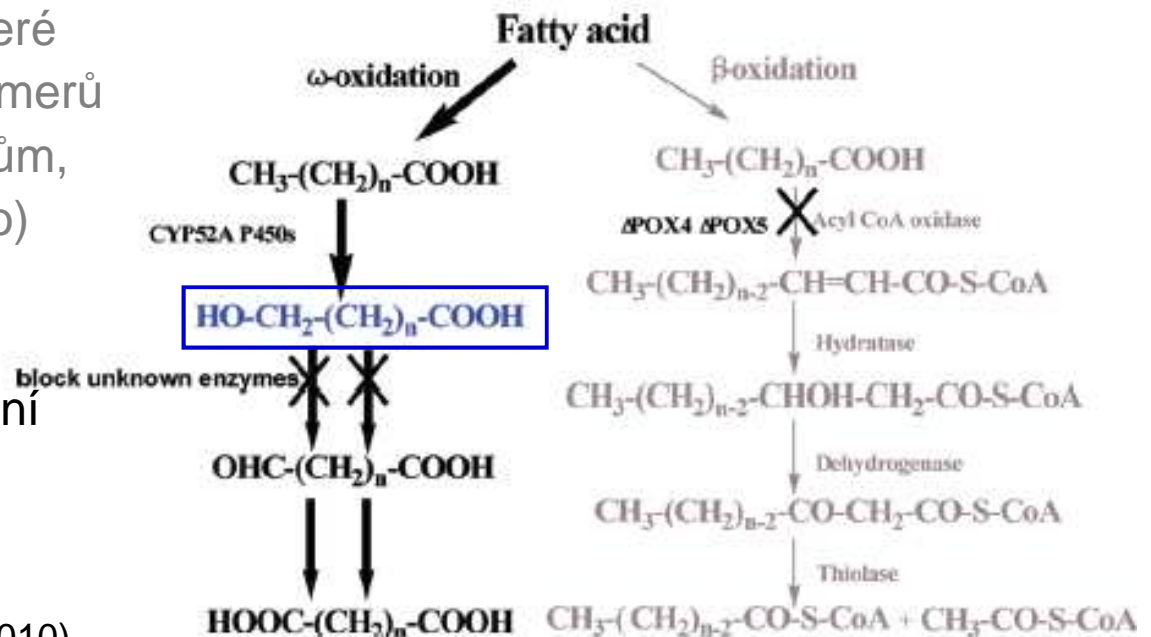
Nevýhoda pro genetické studie (marker nekosegreguje s mutací)

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)

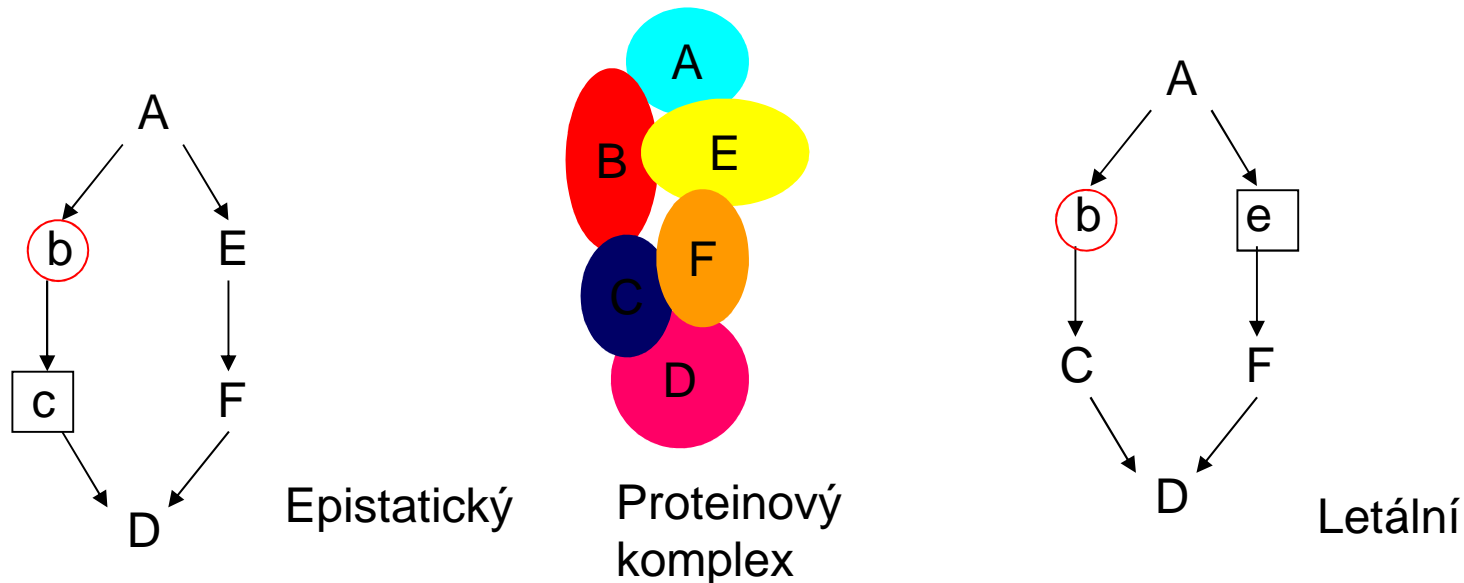
Dvojité mutanty – funkční příbuznost

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 (nedojde k produkci toxického produktu)

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

