Osnova 5. přednášky

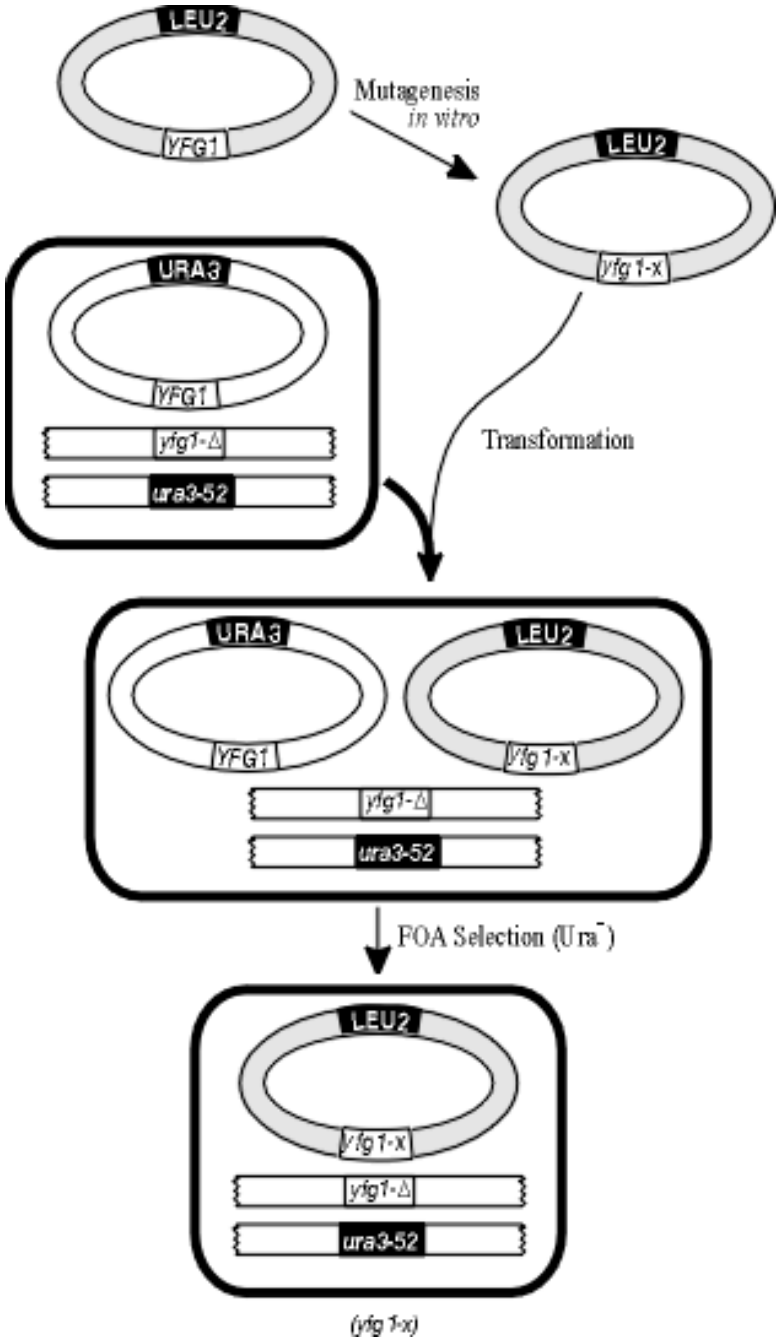
- Genetické metody
  - analýza esenciálních genů (ts mutanty)
  - tetrádová analýza
  - genetické interakce
  - mutageneze/“screen“
- Buněčný cyklus
  - průběh a regulace BC
  - synchronizace buněk
  - mechanismy regulace párování
  - homothalické kmeny

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 deletovat v genomu haploidní buňky (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

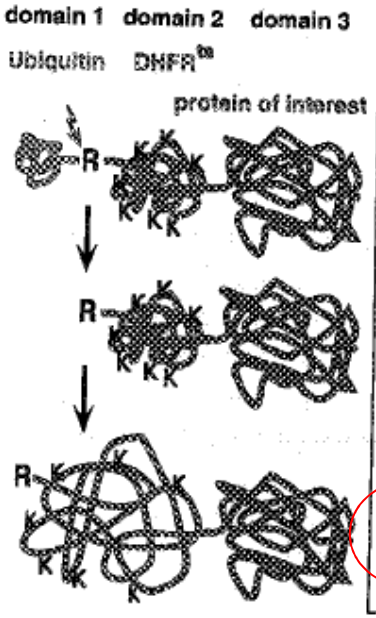
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na URA3 plasmidu, který lze odstranit (pomocí FOA) – analýza terminálního fenotypu

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 kolonii 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 permisivní (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

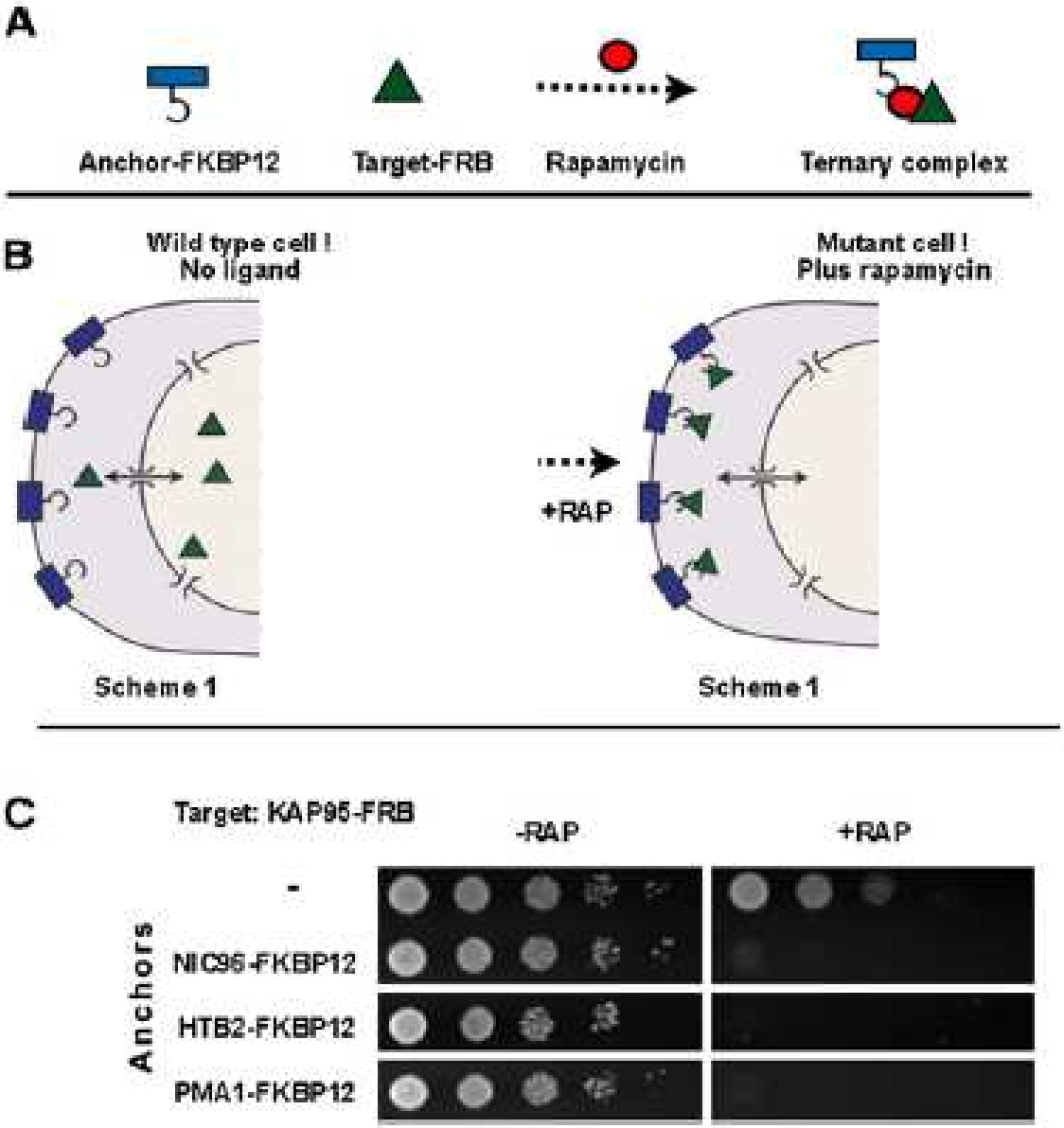


T (°C)	Half-life in *S. cerevisiae*		Phenotypes with Ura3 as domain 3		Phenotypes with Cdc28 as domain 3	
	UBR1	*ubr1Δ*	*UBR1*	*ubr1Δ*	*UBR1*	*ubr1Δ*
23°C	deubiquitination (cotranslational)					
23°C	long	long	Ura^+	Ura^+	growth	growth
37°C	short	long	Ura^-	Ura^+	arrest	growth

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

Dohmen et al.: Science, 1994

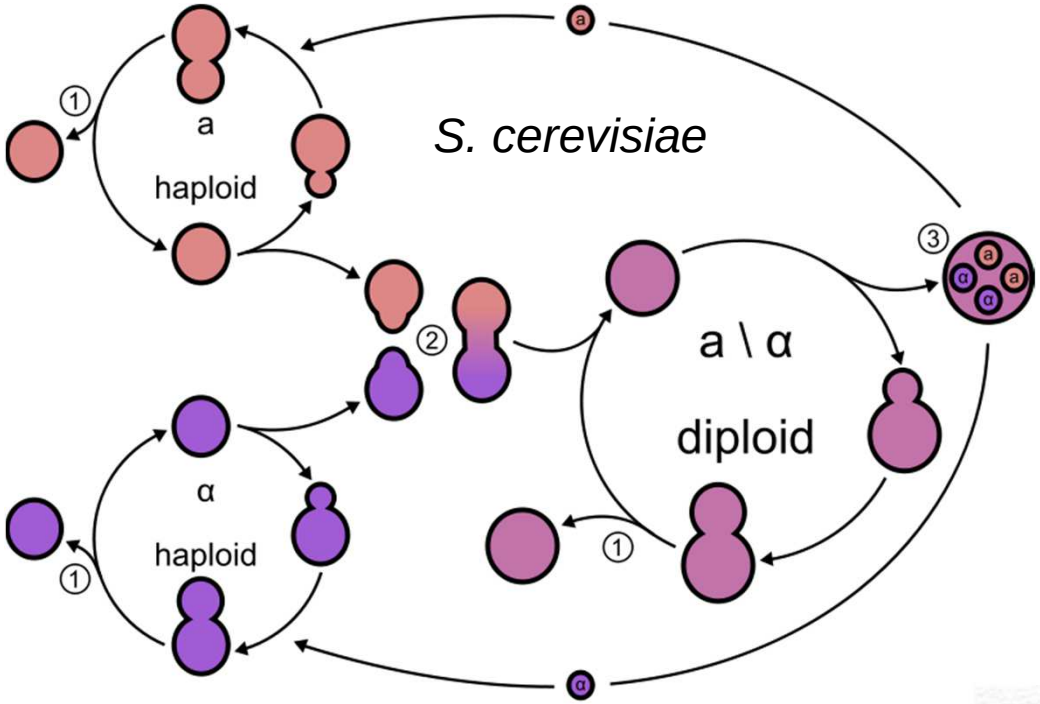
Rychlé vyřazení proteinu z funkce



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

Haruki et al, Mol Cell, 2008

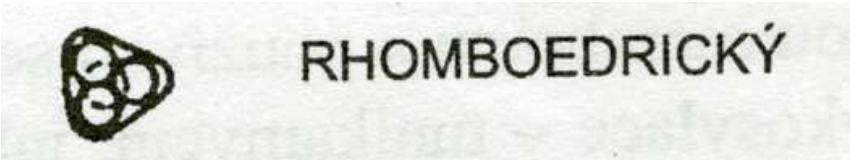
Životní cyklus kvasinek

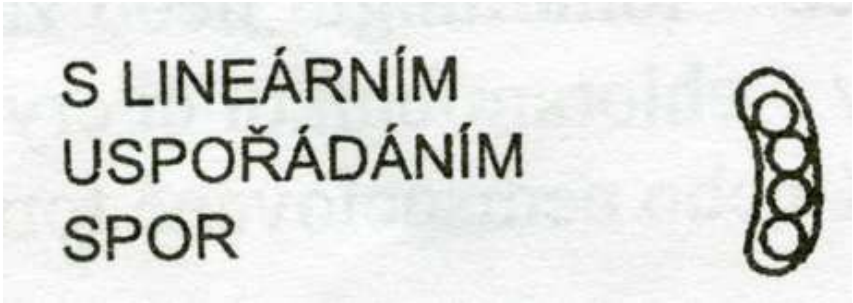


- Deleci či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

- v haploidní buňce hrozí suprese defektu proto je lépe používat diploidní buňky (druhá kopie zůstává nezměněná)

- lze připravit dvojitého mutanta křížením haploidních mutant 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)

Tetrádová analýza

vřecko
4 spory

A + a

křížení
haploidní buňky
1 gen

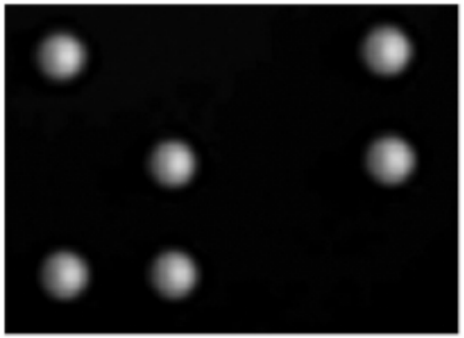
A A a a
A a A a
A a A a

segregace 2:2
Mendlovy zákony

. .

esenciální gen

integrace

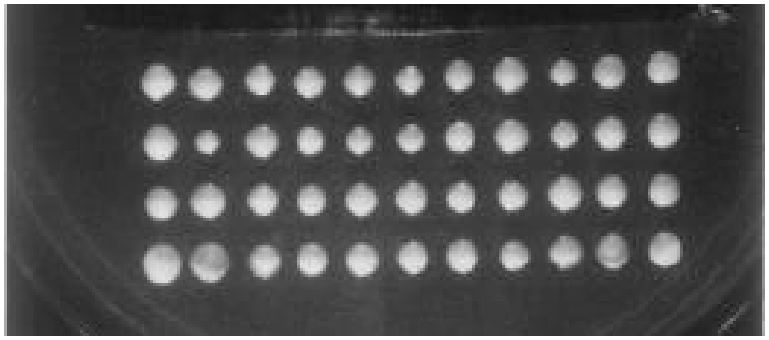


A a a A

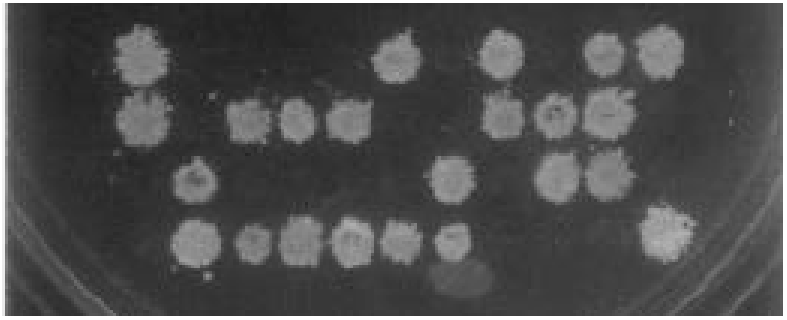
a A a A

A A a a

neesenciální gen



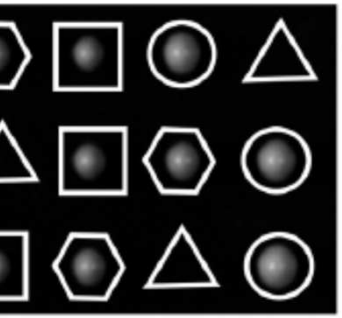
YPD



Selektivní médium
(SD-ura ... testy)

Tetrádová analýza

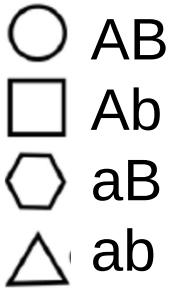
Analýza genetických interakcí
(funkčních vztahů)



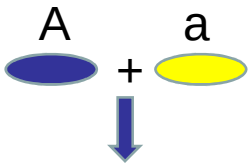
aB Ab AB ab

ab Ab aB AB

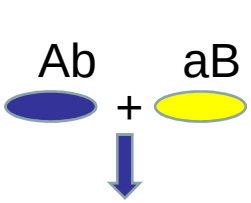
Ab aB ab AB



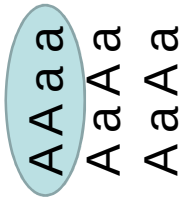
kombinace těchto
mutací je synteticky
letální



křížení
haploidní buňky
1 gen

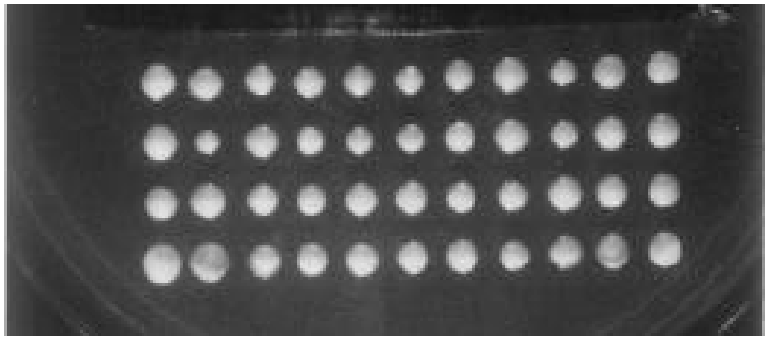


křížení
haploidní buňky
2 geny

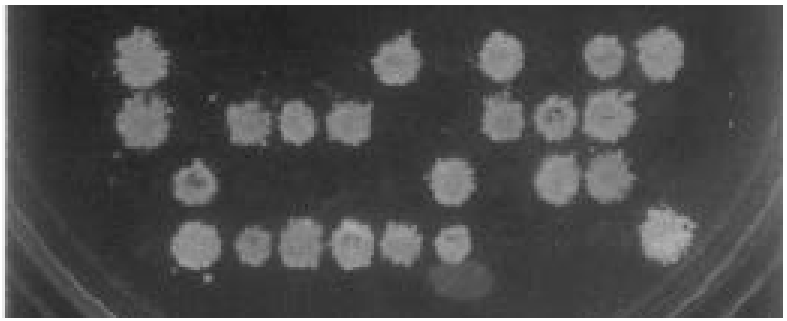


segregace 2:2
Mendlovy zákony

. . .



YPD

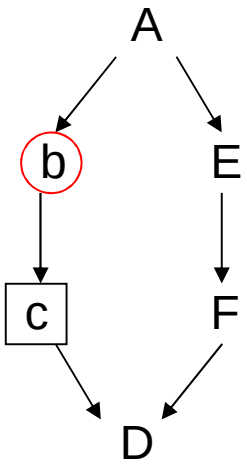


Selektivní médium
(SD-ura ... testy)

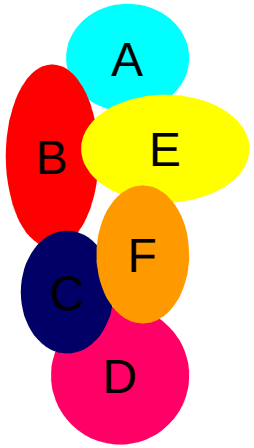
Dvojité mutanty – funkční příbuznost

haploid x haploid => diploid – stejný fenotyp - identický gen (komplementační skup.)
- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

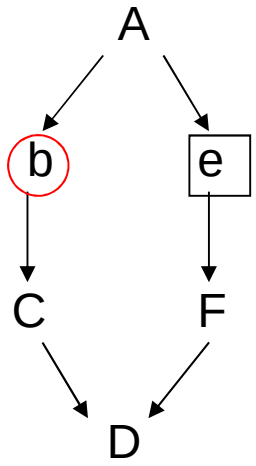
sporulace => haploid – stejný fenotyp – epistatický (funkčně příbuzné geny)
- aditivní až letální (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)
- suprese (mutace může napravit původní defect, eliminace toxicity …)



Epistatický



Proteinový komplex

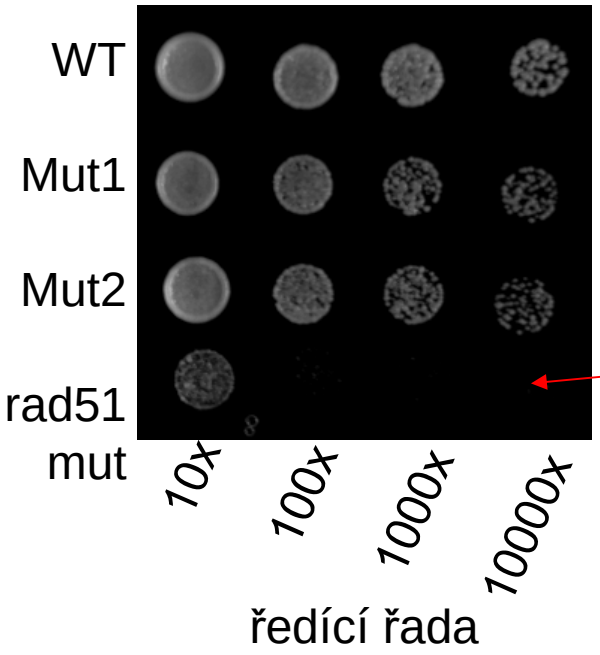


Letální

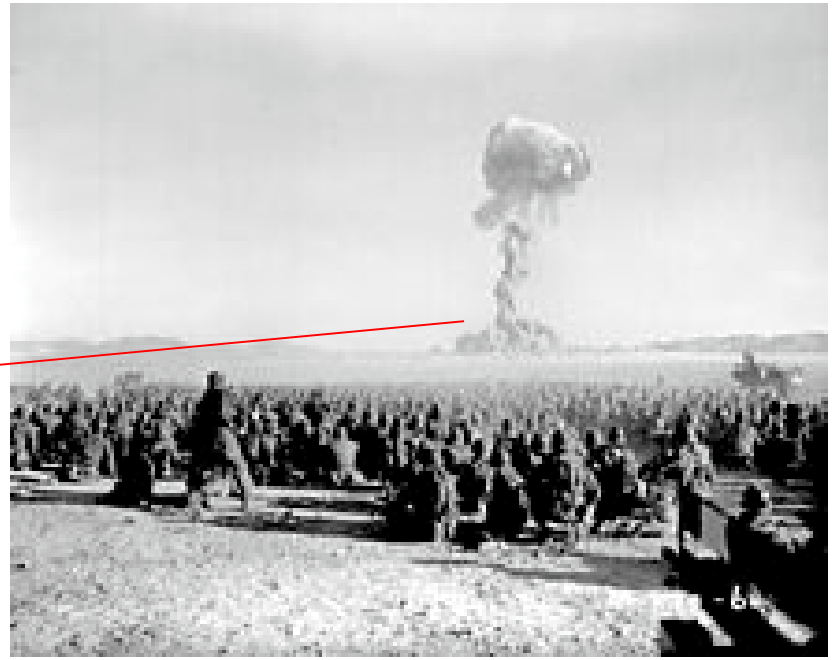
Mutageneze pomocí hydroxylaminu … hledání (screening) letálního mutanta – mutageneze kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA – viz *plasmid shuffling*)

- 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. *RAD*21, *RAD50*, ***RAD51***)
- … buněčného cyklu (***CDC*** …)

sec mutanty



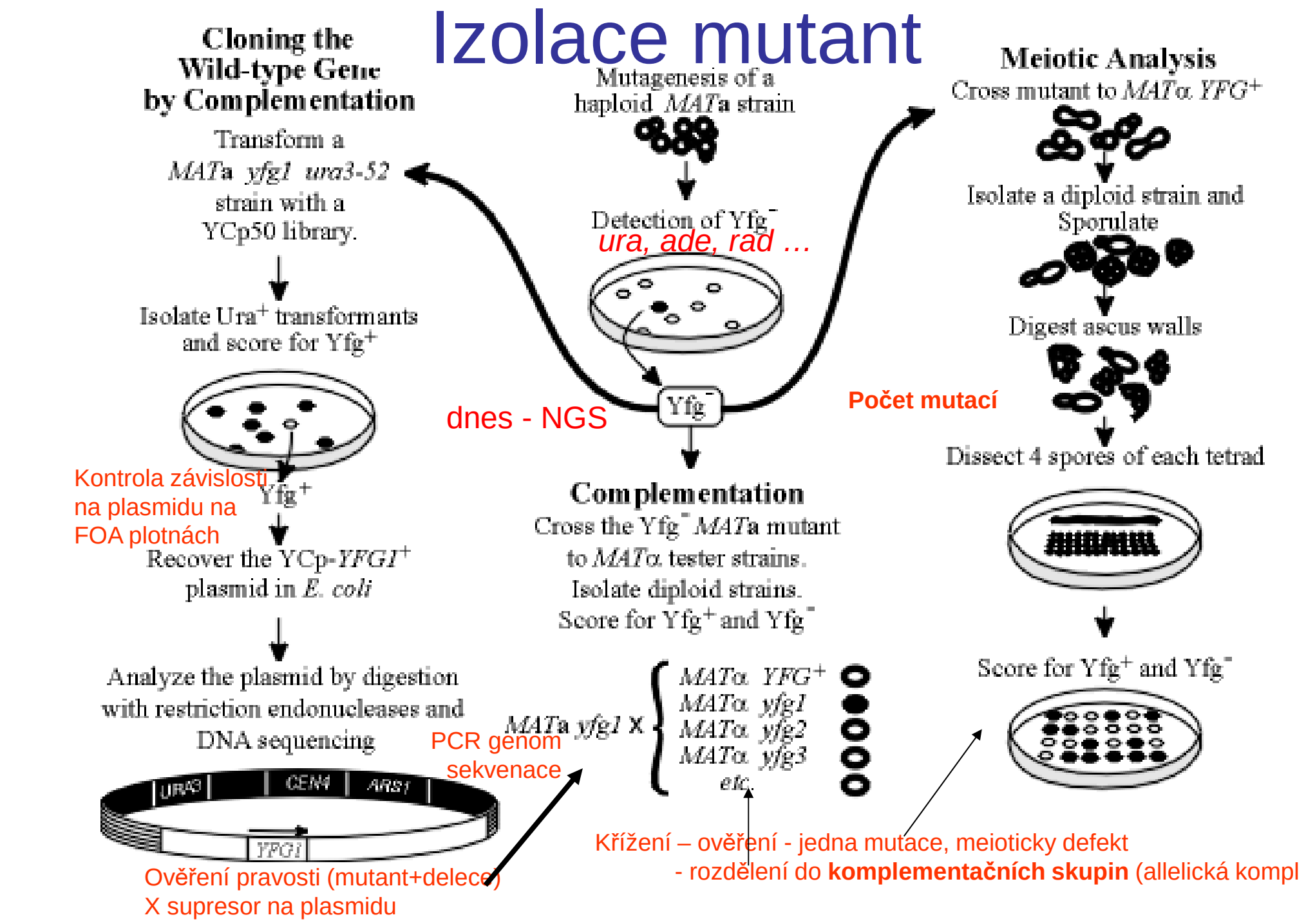
γ-záření
(budova A3)



- 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. *RAD*21, *RAD50*, ***RAD51***)
- … buněčného cyklu (***CDC*** …)

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

Izolace mutant



Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

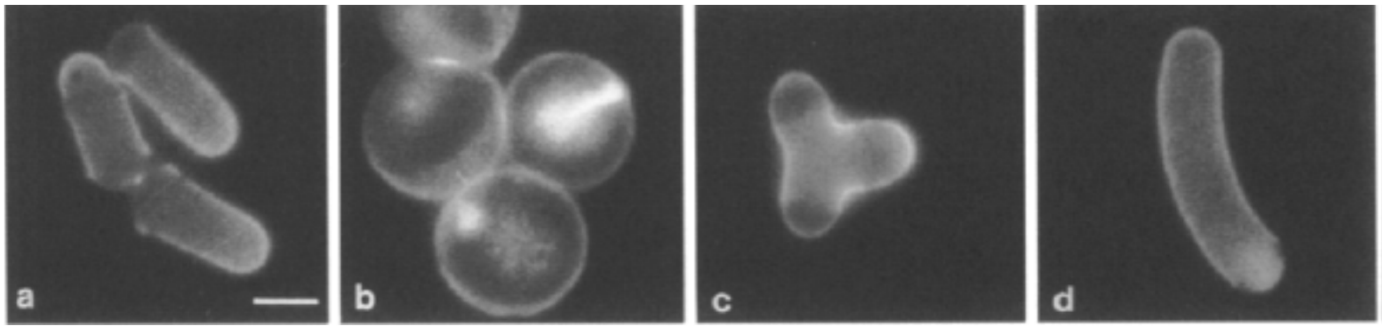
Počet mutací

PCR genom sekvenace

Ověření pravosti (mutant+delece)
X supresor na plasmidu

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

- 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)

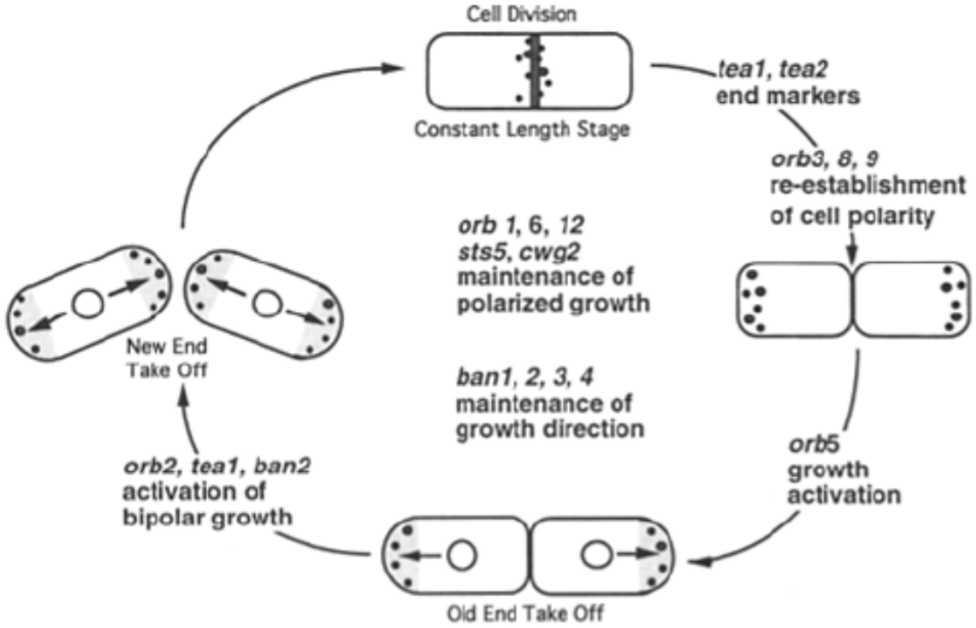


Table I. orb Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage*	Multicopy suppression
orb1	6 (3‡)	*orb2, orb6*		
orb2	2 (4‡)	*orb1, orb6*		
orb3	1 (1‡)			
orb4	12 (1‡)		*sts5*§	*pck1*$^+$, *pyp1*$^+$
orb5	2 (2‡)			
orb6	4	*orb1, orb2*		
orb7	1		*cwg2*‖	
orb8	6	*orb9, orb11*		
orb9	1	*orb8, orb11*		
orb10	4			
orb11	2	*orb8, orb9*	*cwg1*‖	
orb12	2			*pck1*$^+$, *pyp1*$^+$, *ras1*$^+$

Verde, Mata, Nurse, JCB, 1995

Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

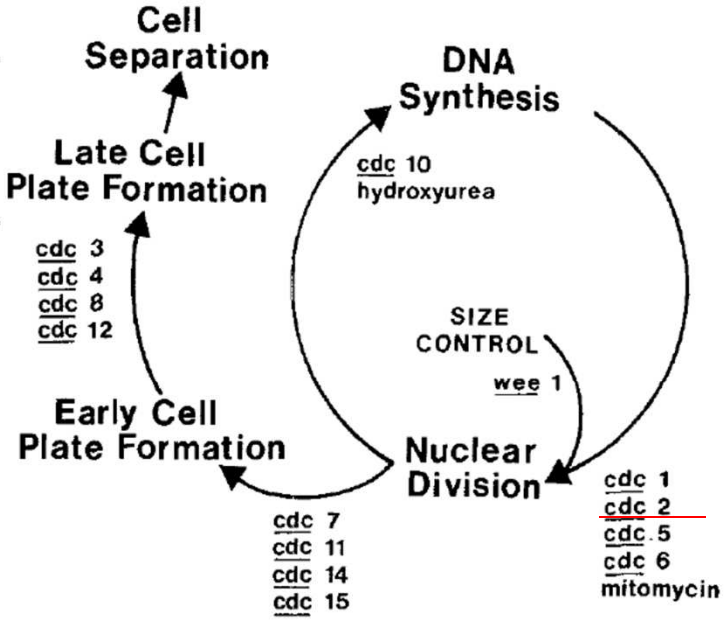
Leland Hartwell začal studovat buněčný cyklus v 60.letech na *S. cerevisiae.* - izoloval mutantní kvasinky s mutovaným genem - >100 genů kontrolujících buněčný cyklus (např. *CDC28*) - také sledoval citlivost kvasinek na poškození DNA radiací - zjistil, že BC je při poškození DNA zastaven – aby získal 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	Tran-sition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C[a]	Defect	Notes
cdc 1	7	0.69	32.6	Nuclear division	
,,	18	0.74	30.1	,,	
cdc 2	33	0,78	30.2	,,	
,,	56	0.69	–	,,	
,,	130	0.74	–	,,	
cdc 5	120	0.79	31.1	,,	leaky[b]
cdc 6	23	0.44	–	,,	leaky[b]
,,	121	0.38	32.1	,,	
cdc 10	129	–0.10	20.3	DNA Synthesis	
,,	28	–0.10	–	,,	
cdc 13	117	0.64	30.5	Nuclear division	Forms multiple cell plates
–	22	0.88	33.1	,,	Sterile

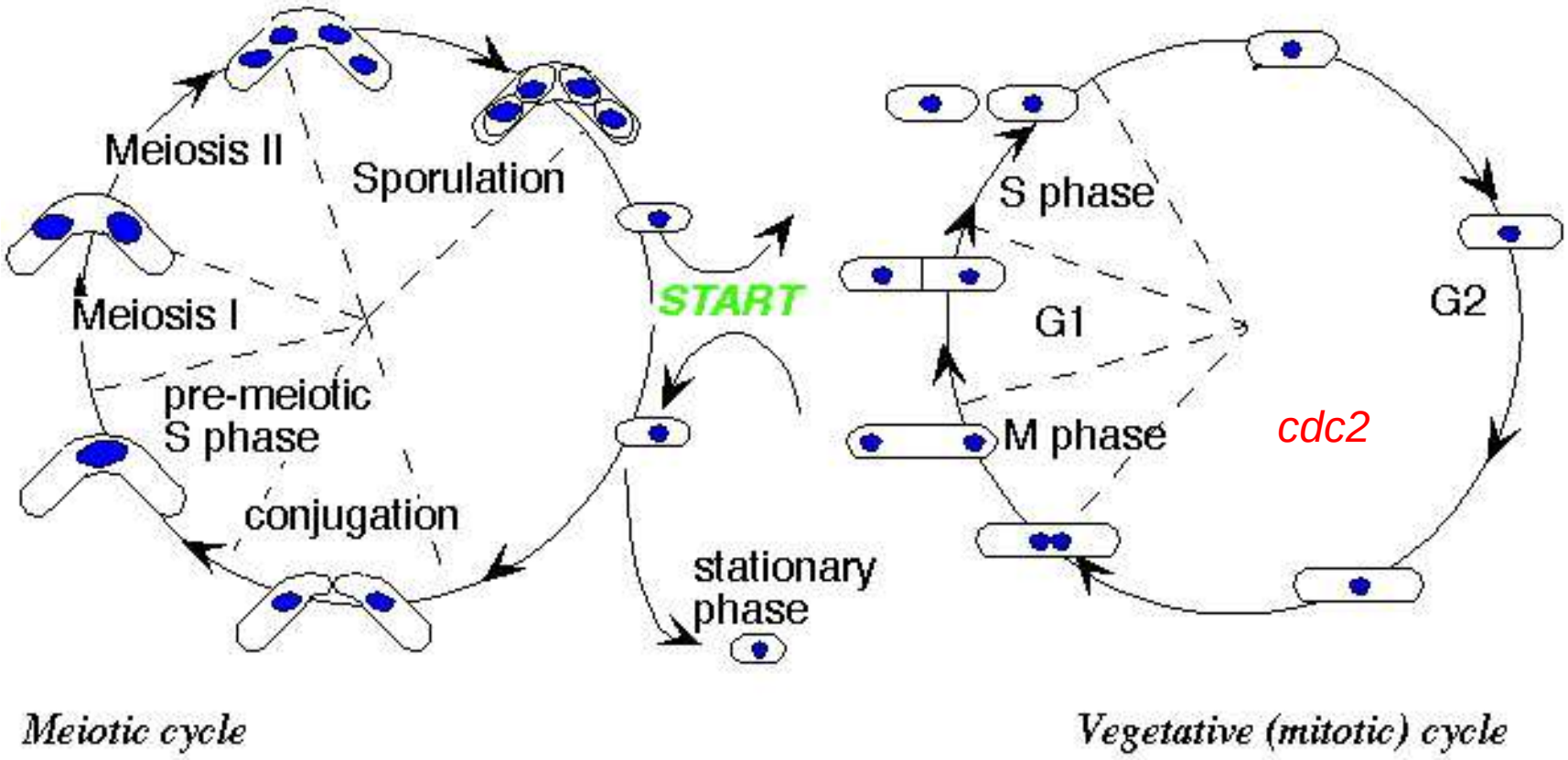


Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe - v* 70. letech objevil gen *Cdc2 (*homolog *CDC28)* - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).

Nurse et al, MGG, 1976

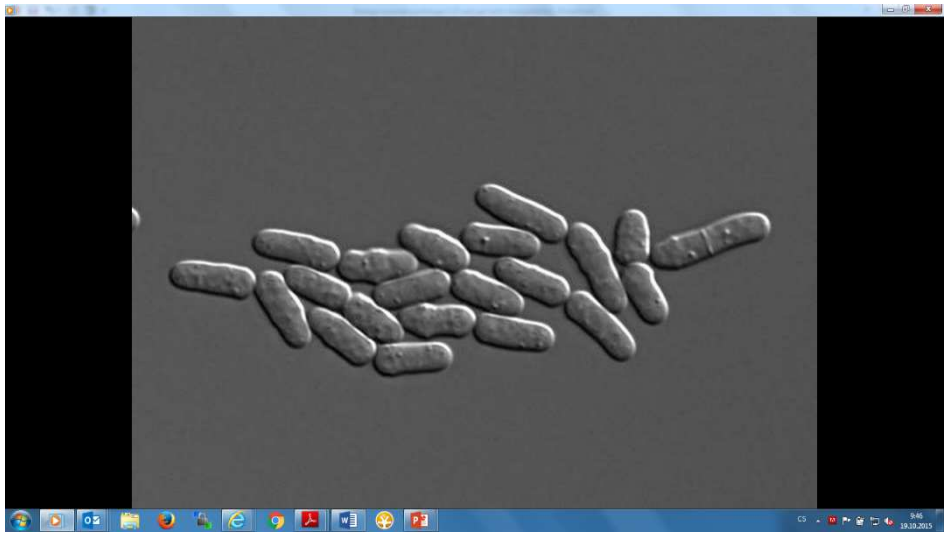
Buněčný cyklus *S. pombe*

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)



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

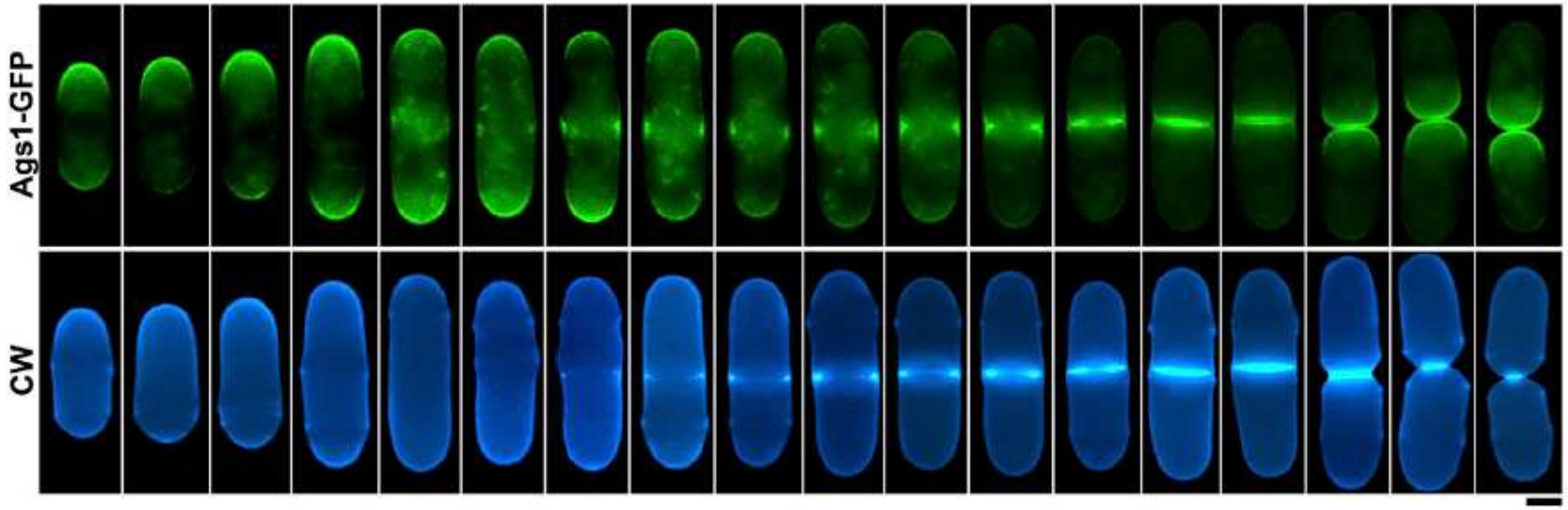
Hoffmann a spol, Genetics, 2015
http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1



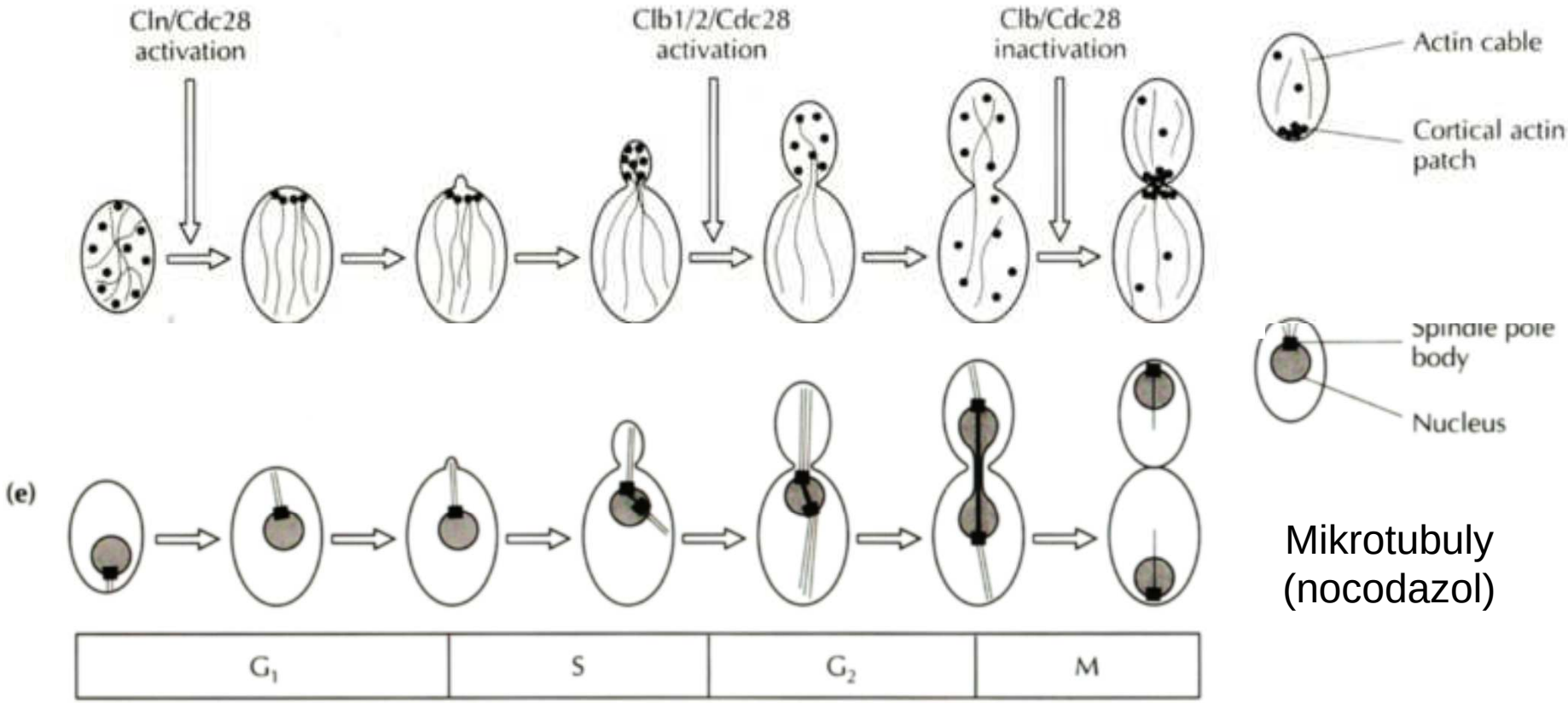
sekrece … aktinový cytoskelet jsou důležité pro procesy polarizace … v průběhu buněčného cyklu … mating/fusion …

- Více prof. Svoboda

Cortes et al, JCB, 2012



Buněčný cyklus *S. cerevisiae*

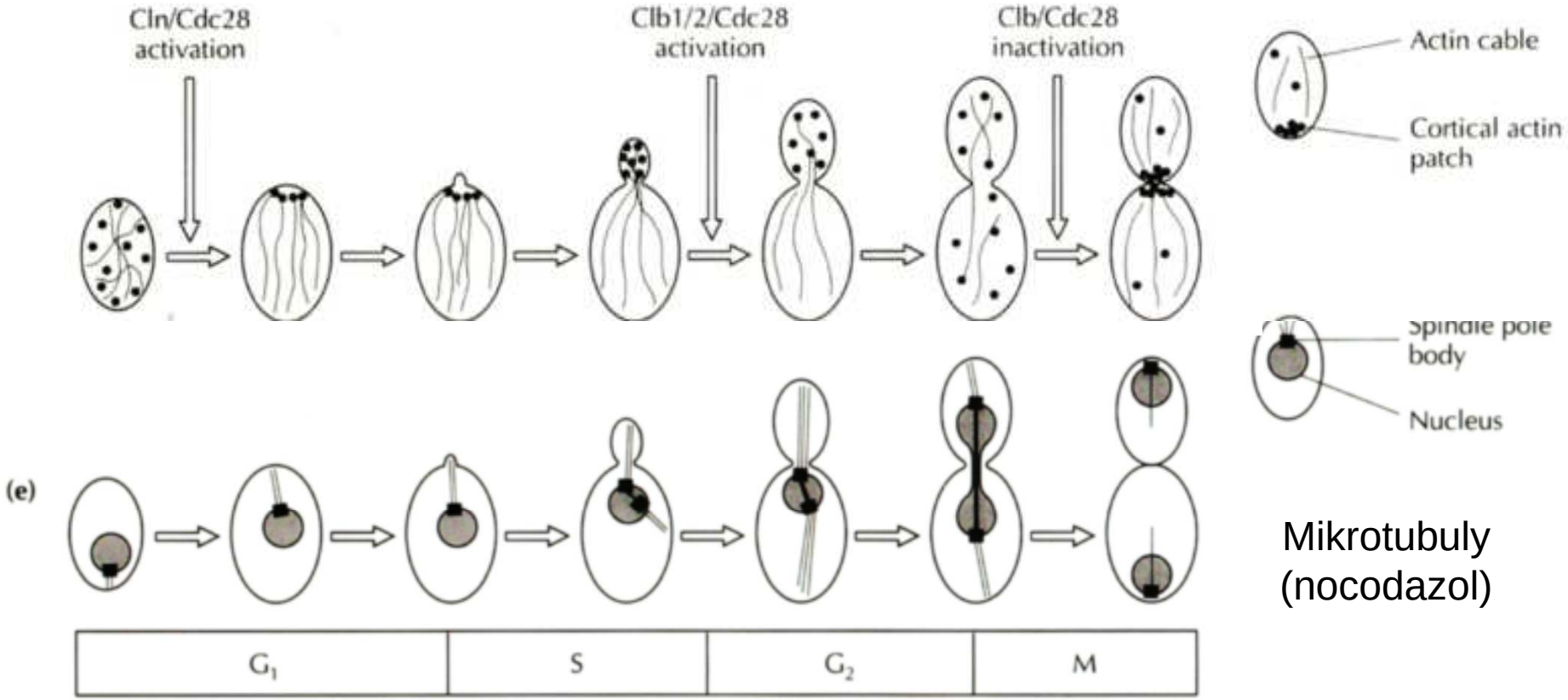


Mikrotubuly (nocodazol)

- 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

Curr Opin Gen Dev 5 (1995)

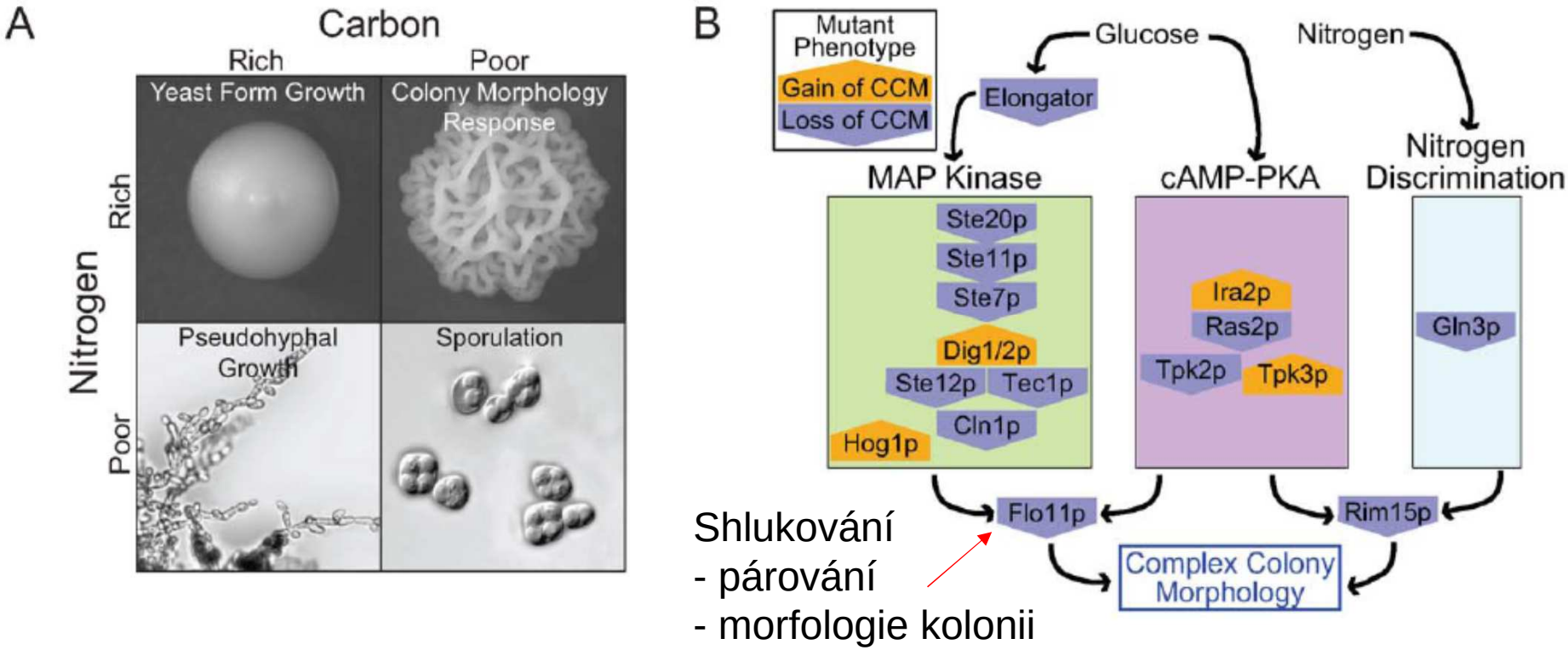
Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



Mikrotubuly (nocodazol)

- 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 arestuje 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

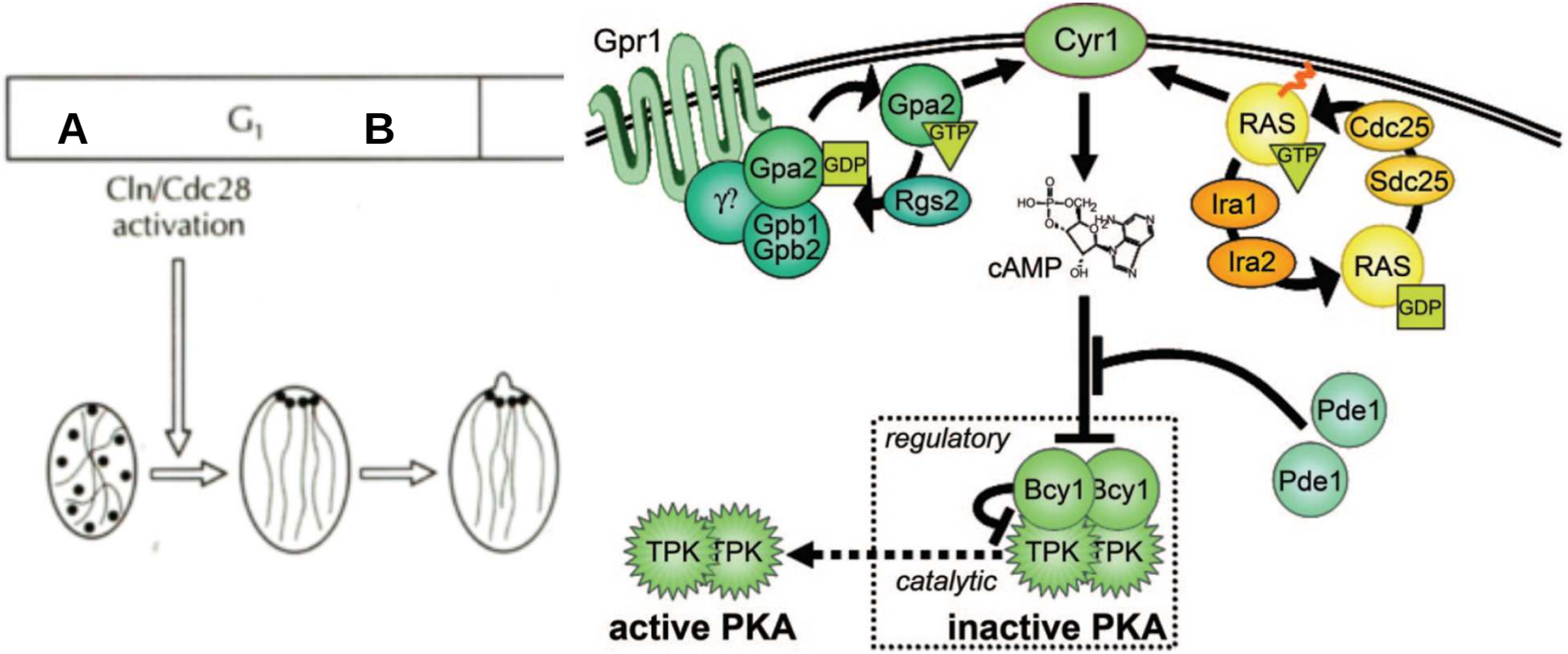


Shlukování
- párování
- morfologie kolonií

Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

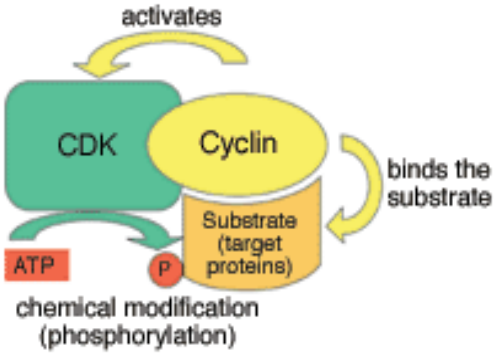
G1 fáze - *S. cerevisiae*

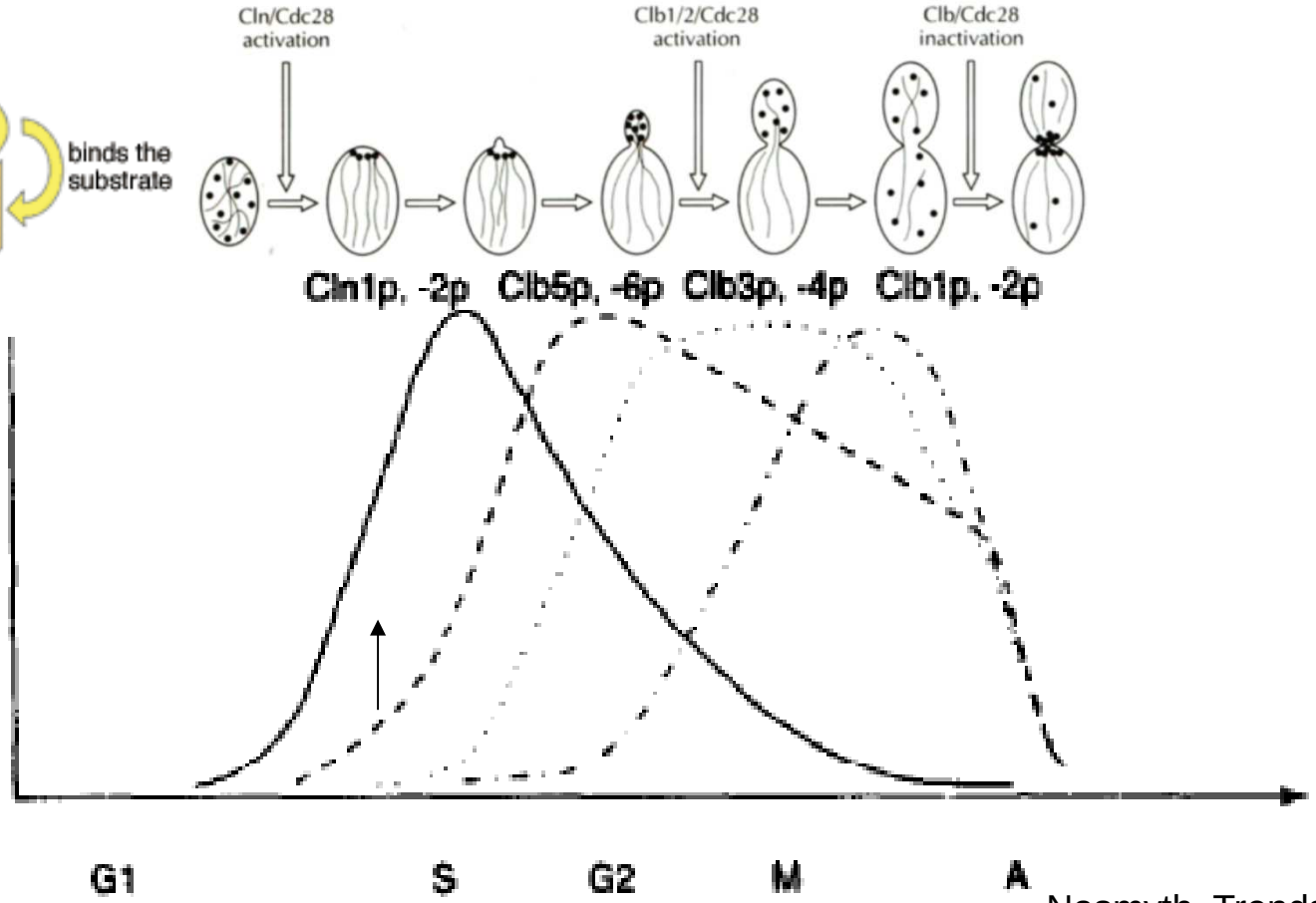
Klíčovým mezníkem BC u *S. cerevisiae* je START, kdy se rozhoduje o přechodu z G1 do S fáze:
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty 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*

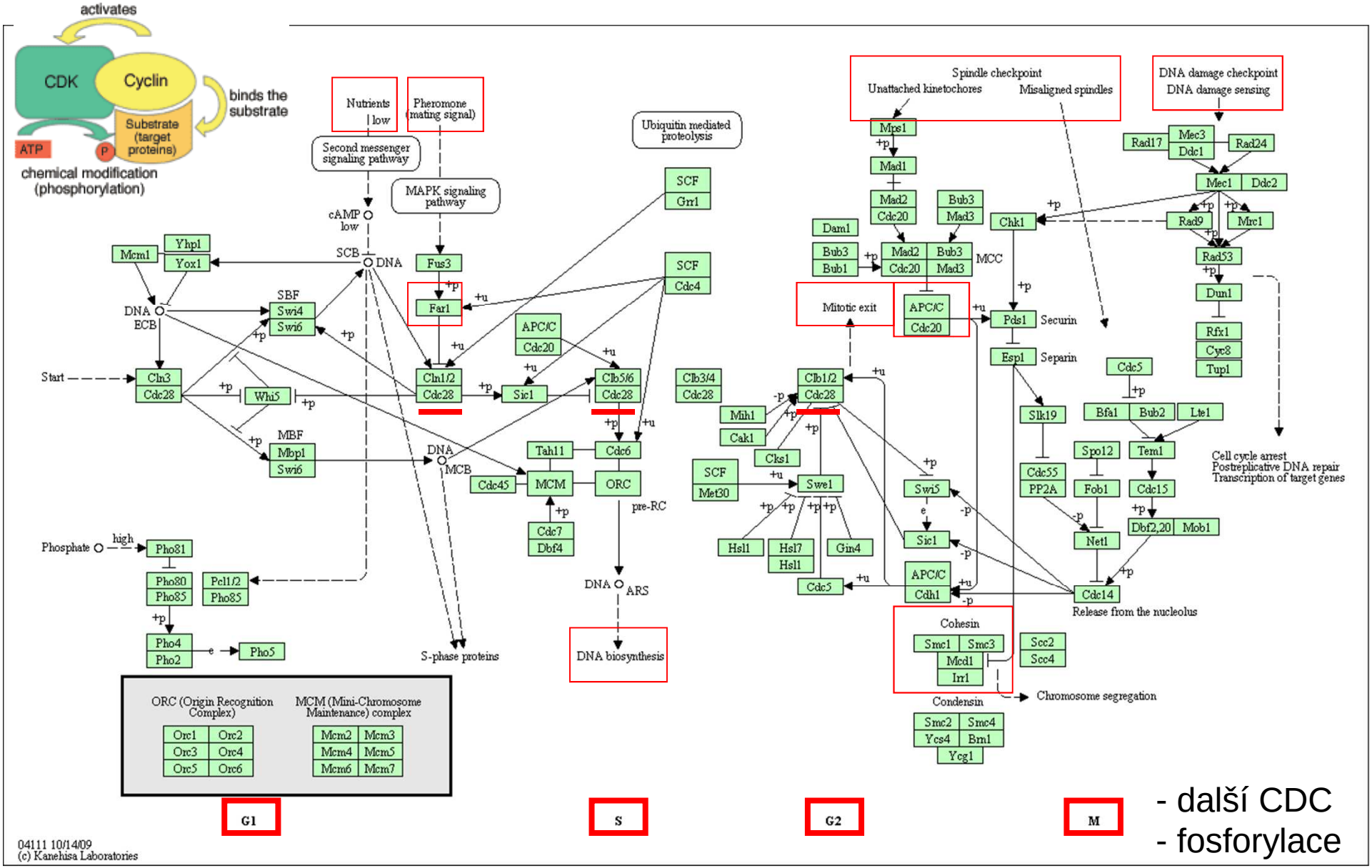
Interakcí fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká aktivní komplex:
- v G1 fázi *Cln1p* a *Cln2p* (CLN3 mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *Clb5p* a *Clb6p* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se účastní *Clb3p* a *Clb4p*
- mitózu ukončují *Clb1p* a *Clb2p* a jejich degradace



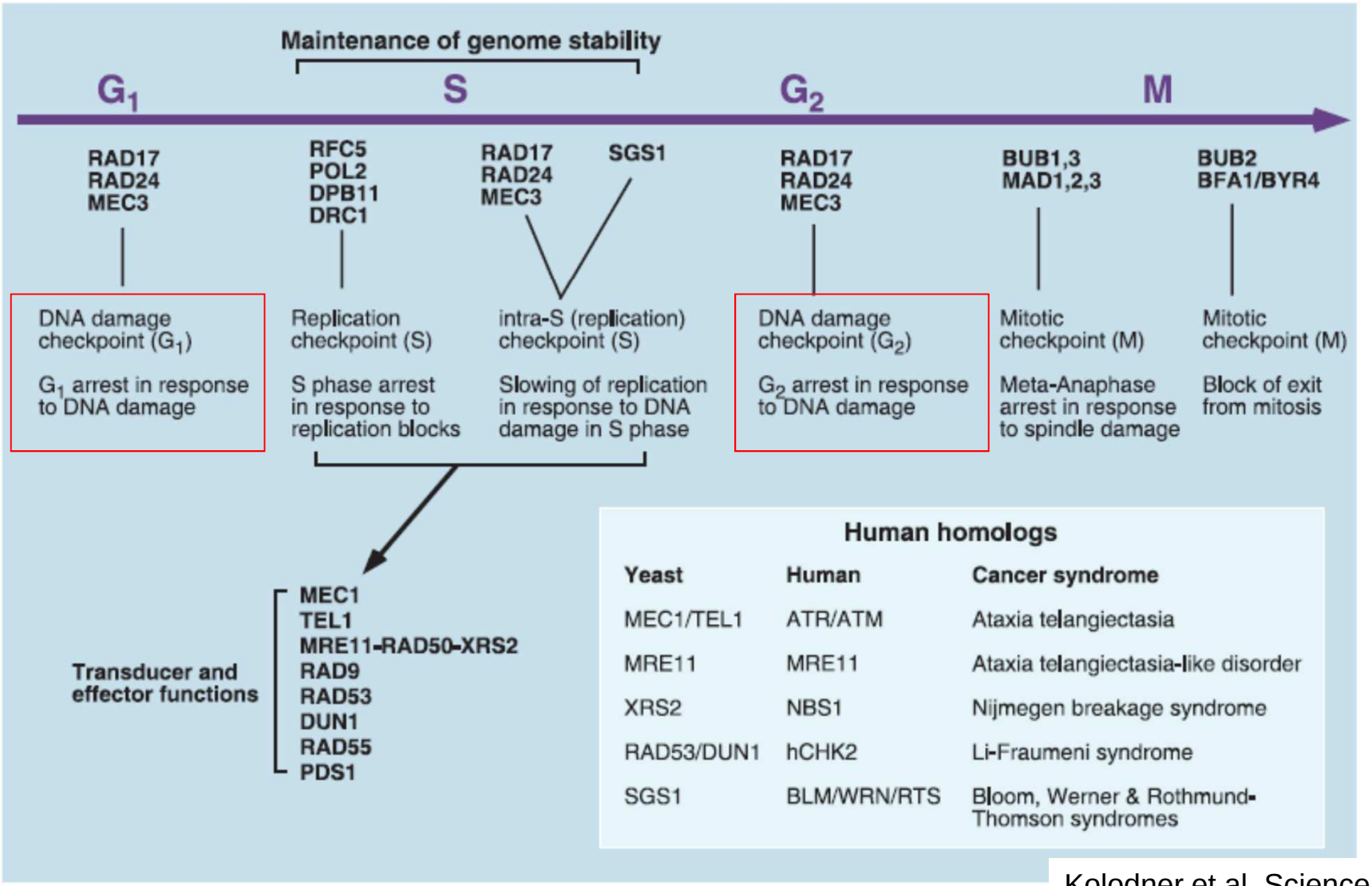


Nasmyth, Trends in Gen, 1998

Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



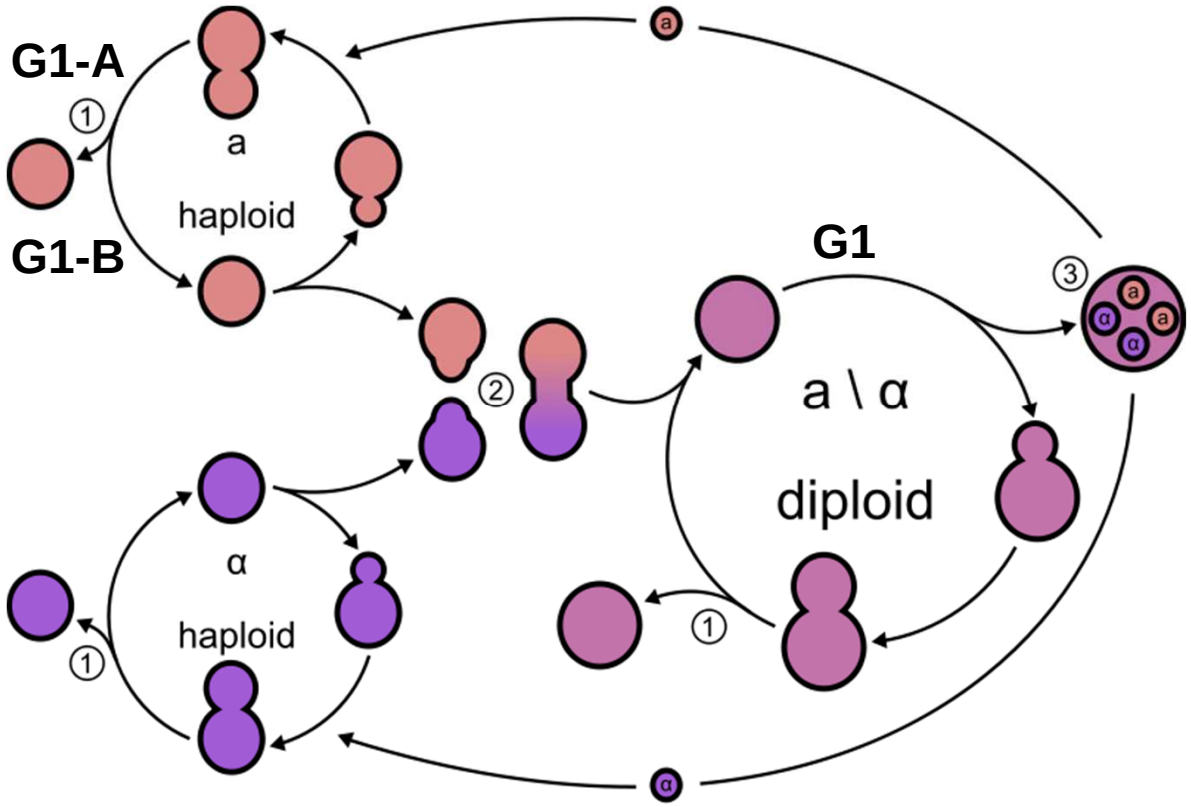
- další CDC
- fosforylace
- ubiquitylace



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)

Páření/mating kvasinkových buněk



- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)

- páření doprovázeno zásadními změnami v morfologii