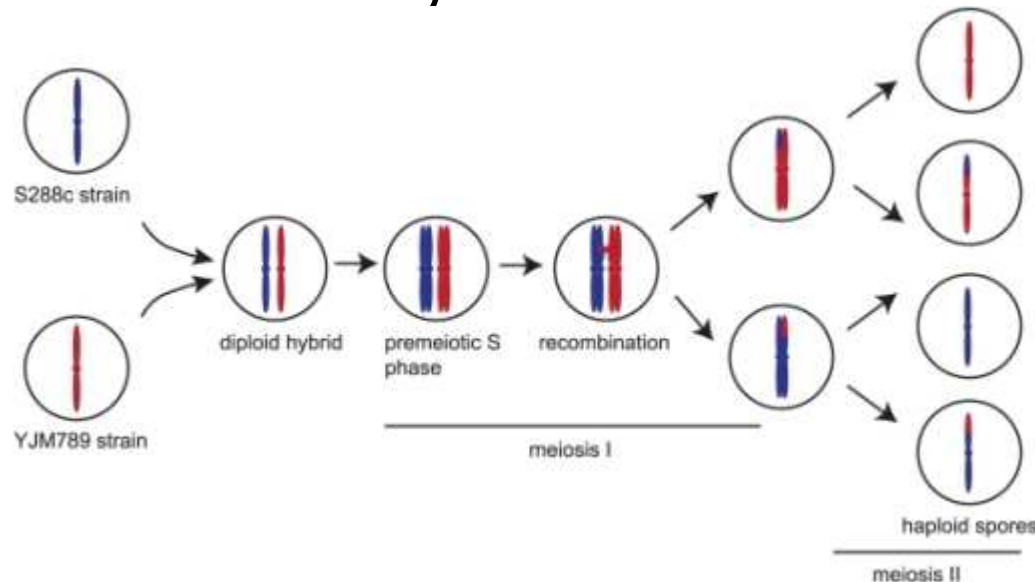


# Souhrn 4. přednášky

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



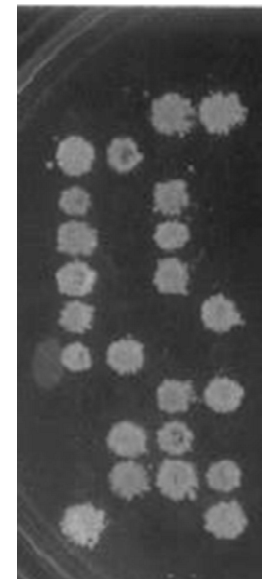
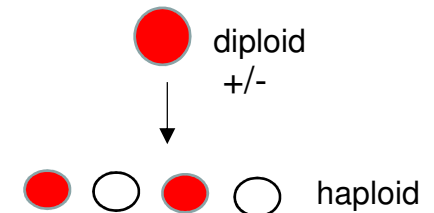
Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy, proteinové komplexy, evoluce biologických systémů ... připravovány nové kmeny pro biotechnologie ... řešeny otázky týkající se zdraví člověka

# Osnova 5. přednášky

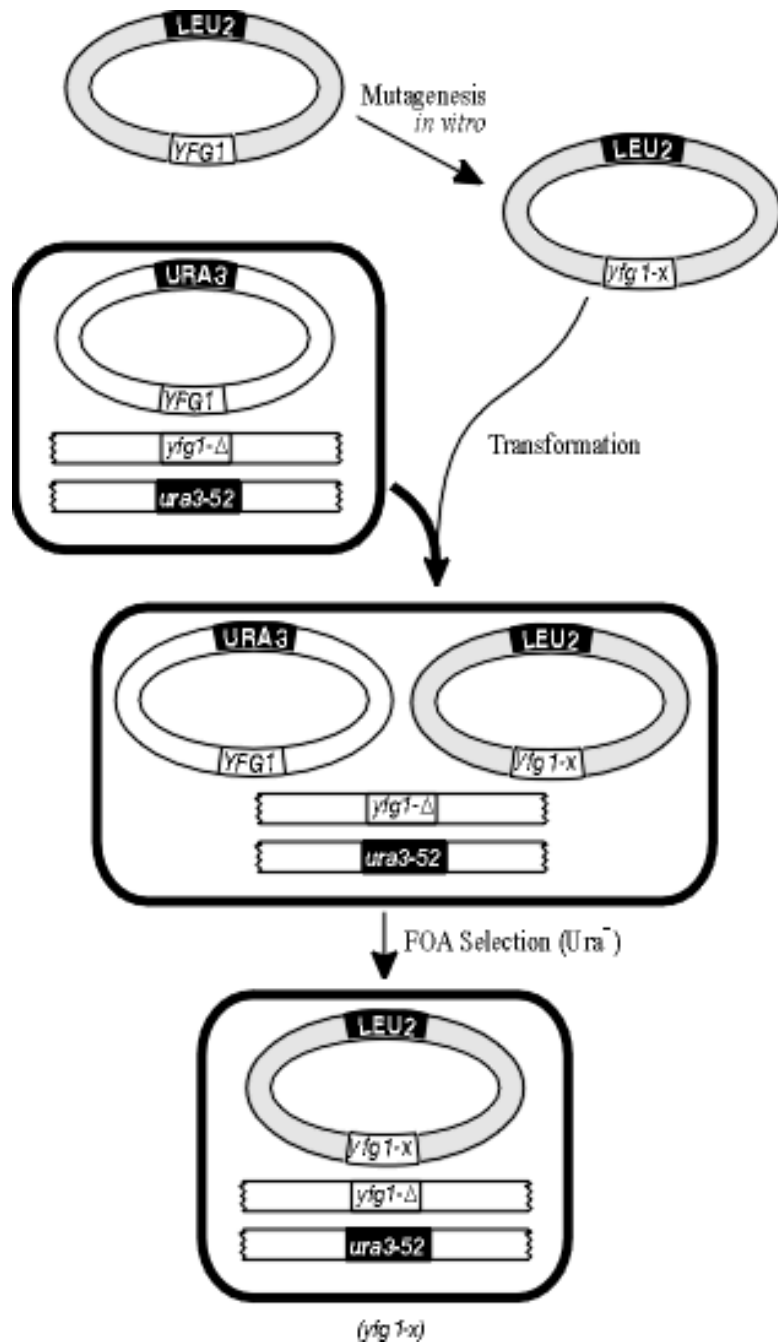
- Genetické metody
  - analýza esenciálních genů (ts mutanty)
  - mutageneze (“screen“)
  - genetické interakce
- Buněčný cyklus
  - průběh a regulace BC
  - synchronizace buněk
  - mechanismy regulace párování
  - homothalické kmeny

# Esenciální geny

- **ne-esenciální gen** – lze přímo deletovat/odstranit v genomu haploidní buňky (předchozí přednáška)
- **esenciální gen**
  - **Tetrádová analýza** – ověření
  - **plasmid shuffling** - buňky potřebují funkční gen aspoň za určitých podmínek (kondicionální exprese)
  - **hypomorfní mutanty** - buňky potřebují aspoň „částečně“ funkční gen
  - **ts mutanty** - kondicionální mutanty



# Plasmid shuffling



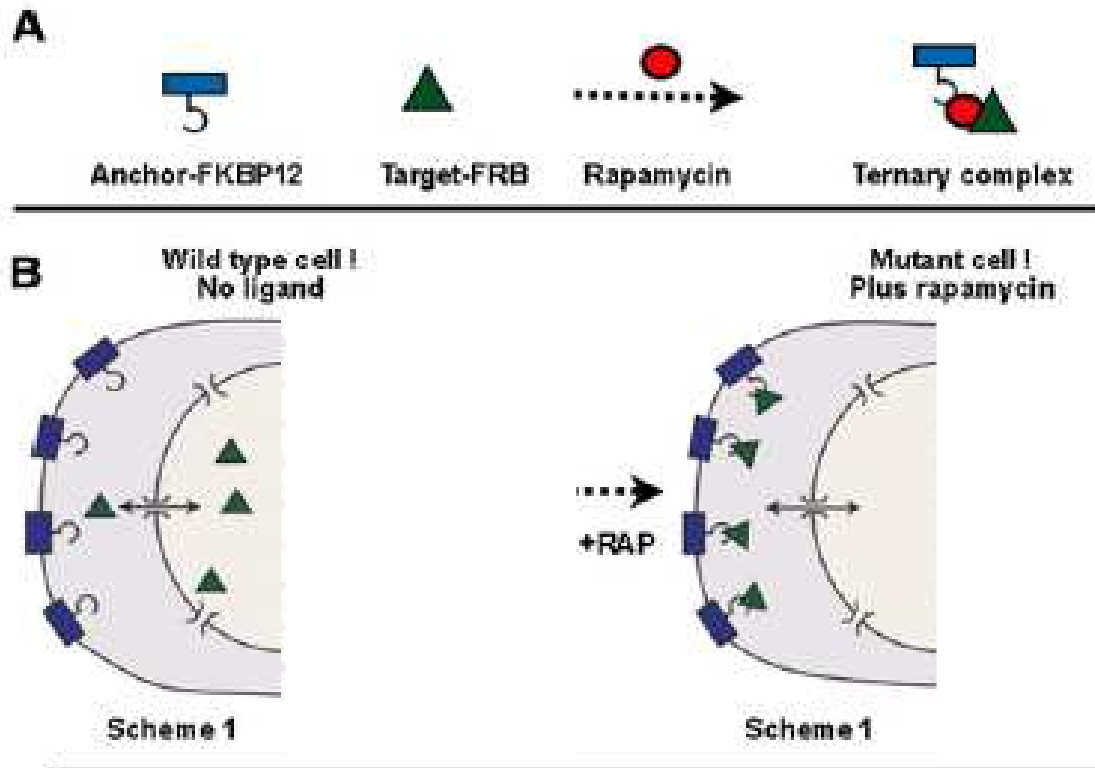
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na *URA3* plasmidu, který lze odstranit (pomocí FOA) – analýza terminálního fenotypu

Na dalším plasmidu může být vnesena mutovaná verze *yfg1* – její efekt se projeví až po odstranění plasmidu s divokou kopií genu (pomocí FOA)

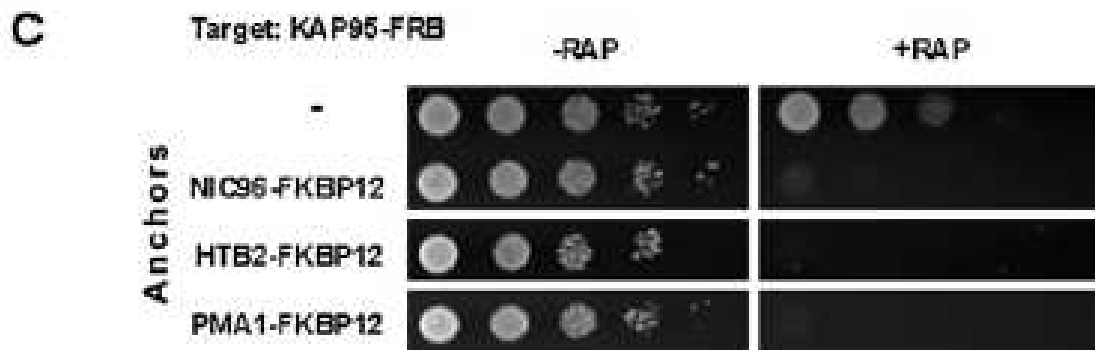
Lze připravit hypomorfní mutanty (včetně ts)

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)

# Rychlé vyřazení proteinu z funkce

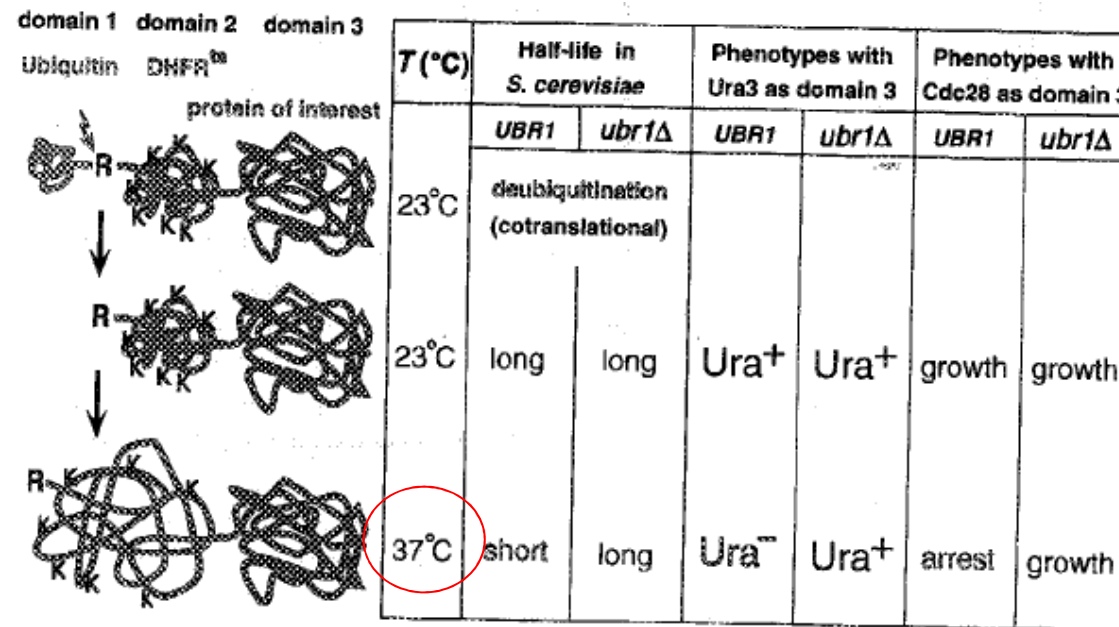


protein je cíleně relokizován tj. vyřazen z funkce (např. transkripční faktor je pomocí rapamycinového systému „vytažen“ z jádra – transkripce nebude spouštěna)



# ts mutanty

- **ts mutanty** jsou výhodné pro studium funkce esenciálních genů – mutanty jsou funkční 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



- ubikvitinace „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**)

# Izolace mutant

3.

## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

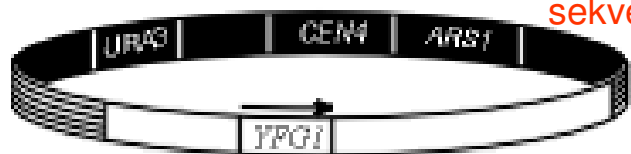
Isolate *Ura*<sup>+</sup> transformants and score for *Yfg*<sup>+</sup>



Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

Recover the YCp-*YFGI*<sup>+</sup> plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (mutant+delece) X supresor na plasmidu

nyní NGS

PCR genom sekvenace

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



1.

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



*Yfg*<sup>-</sup>

2.

## Complementation

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

- MATa YFG*<sup>+</sup>
- MATa yfg1*
- MATa yfg2*
- MATa yfg3*
- etc.

Křížení – ověření - jedna mutace, meioticky defekt

- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl

## Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATa YFG*<sup>+</sup>



Isolate a diploid strain and Sporulate



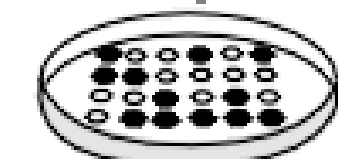
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

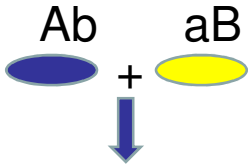


Score for *Yfg*<sup>+</sup> and *Yfg*<sup>-</sup>

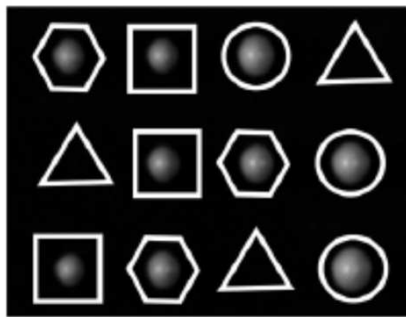


Počet mutací

- jedna mutace (segregace fenotypu)
- rozdělení do komplementačních skupin
- genetické vztahy mezi mutantami



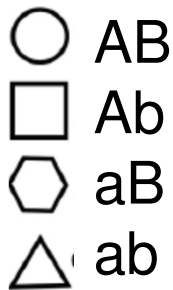
Genetické interakce (genetické vztahy)  
(terádová analýza)



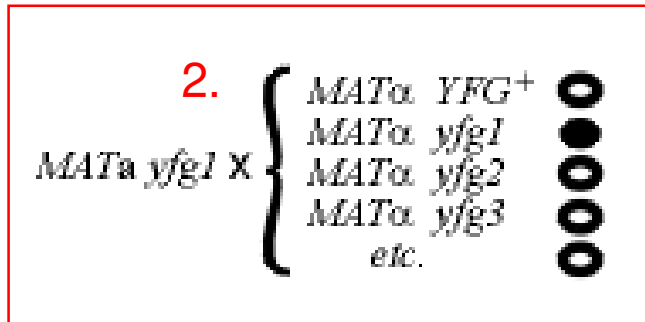
aB Ab AB ab

ab Ab aB AB

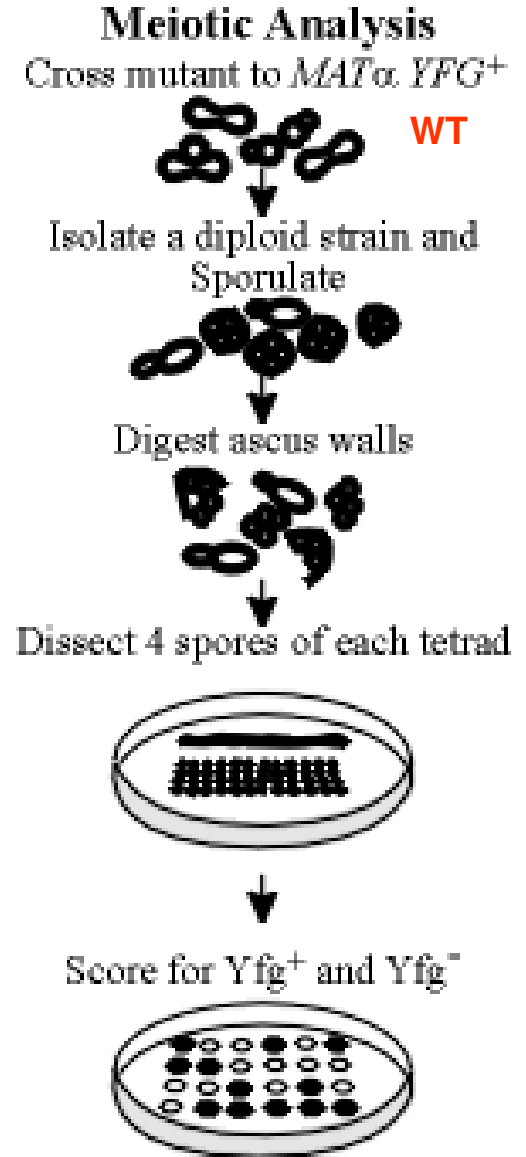
Ab aB ab AB



kombinace těchto mutací je synteticky letální



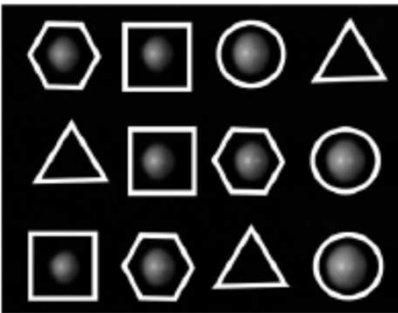
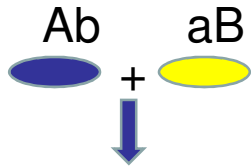
Komplementační skupiny (diploid)



Segregace (počet) mutací (terádová analýza)



# Dvojité mutanty – funkční příbuznost



aB Ab AB ab

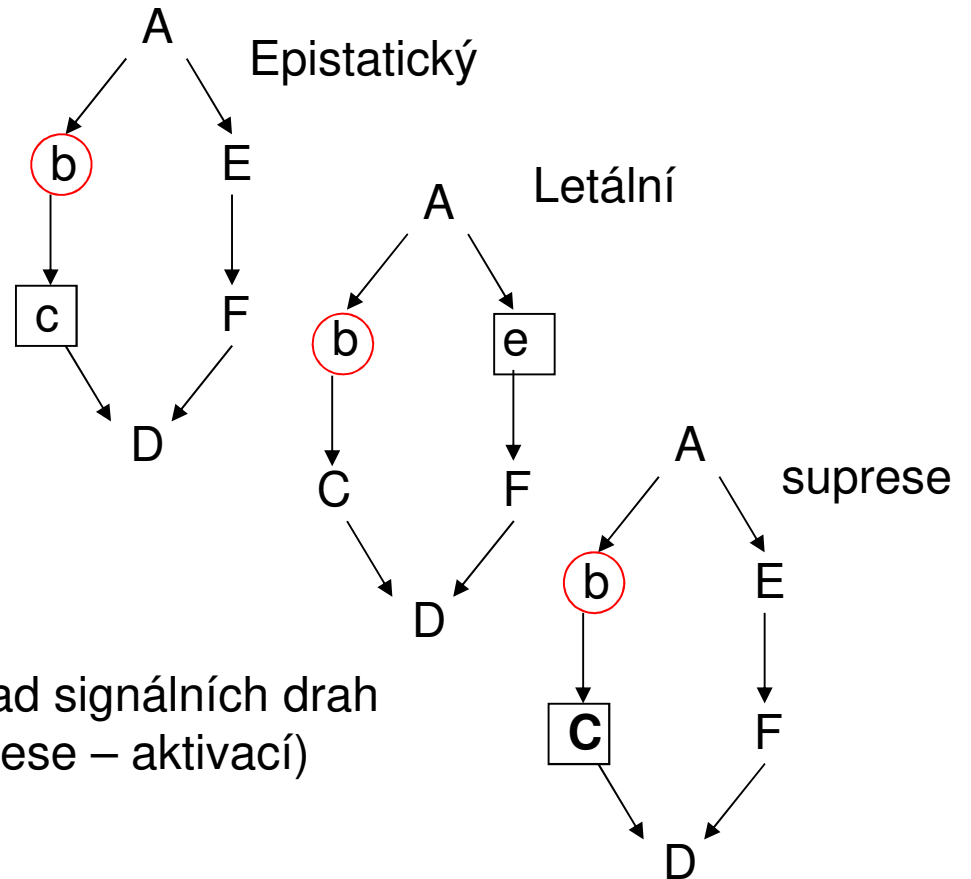
ab Ab aB AB

Ab aB ab AB

- AB
- Ab
- ⬡ aB
- △ ab

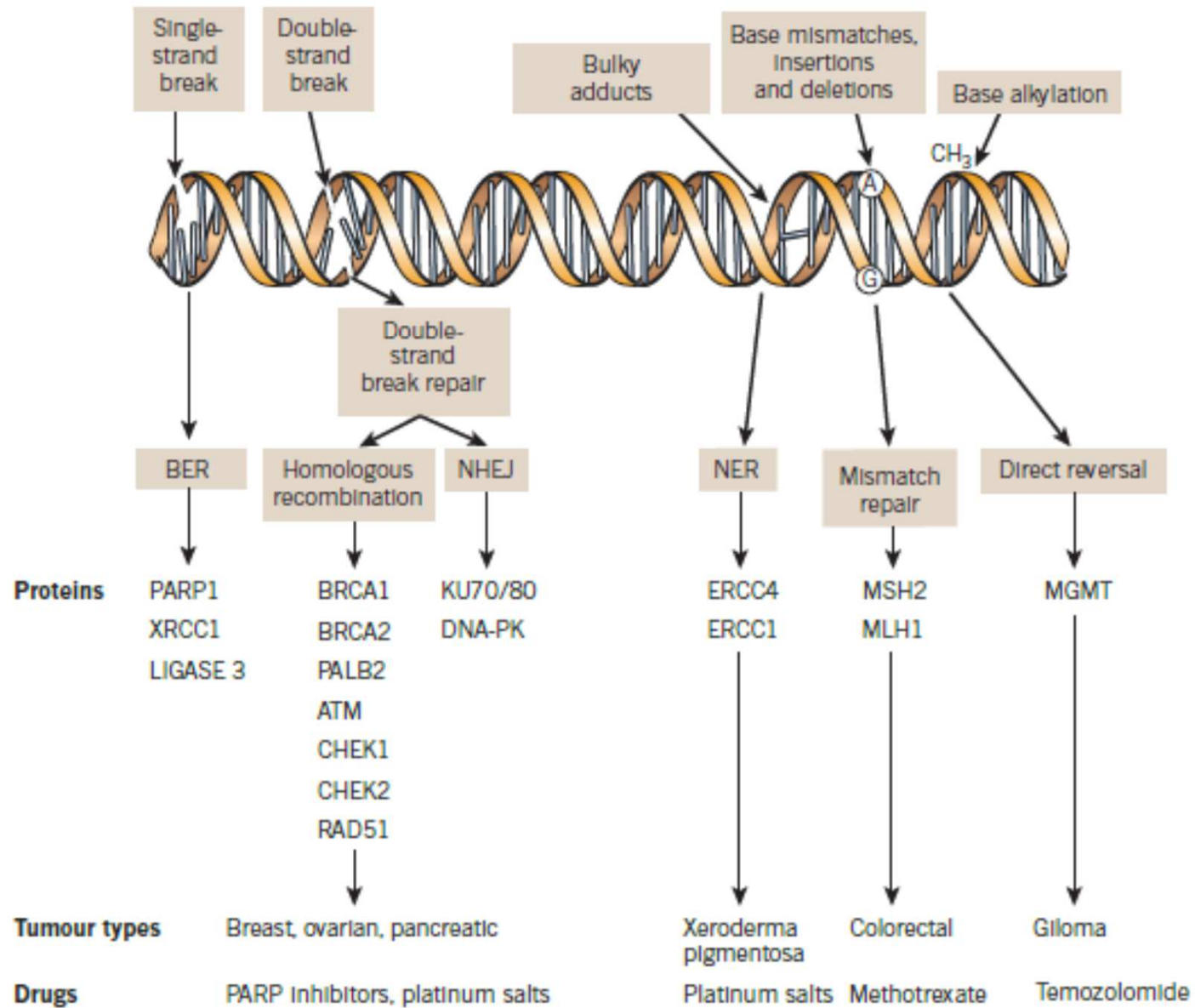
kombinace těchto mutací je synteticky letální

stejný fenotyp – epistatický (funkčně příbuzné geny)  
 aditivní až letální fenotyp - paralelní dráha, redundance  
 suprese fenotypu - mutace může napravit původní defect



Příklad signálních drah (suprese – aktivací)

# Syntetická letalita v léčbě rakoviny



# Izolace mutant

3.

## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

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



Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

Recover the YCp-YFGI<sup>+</sup> plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (mutant+delece) X supresor na plasmidu

nyní NGS

PCR genom sekvenace

*MATa yfg1* X

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



1.

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



Yfg<sup>-</sup>

2.

## Complementation

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

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

Křížení – ověření - jedna mutace, meioticky defekt

- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl

## Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATa YFG+*



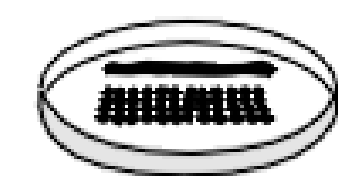
Isolate a diploid strain and Sporulate



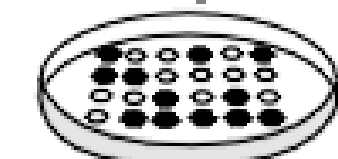
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad



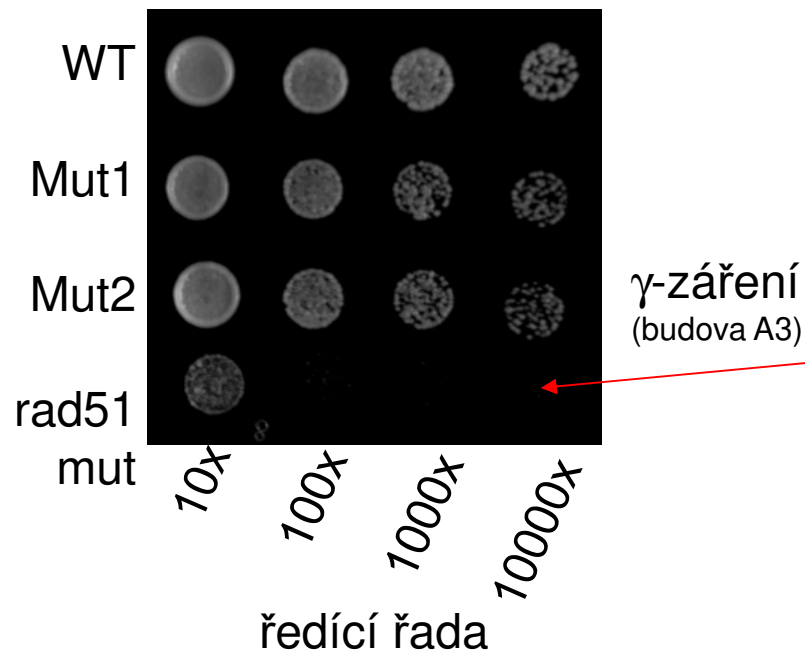
Score for Yfg<sup>+</sup> and Yfg<sup>-</sup>



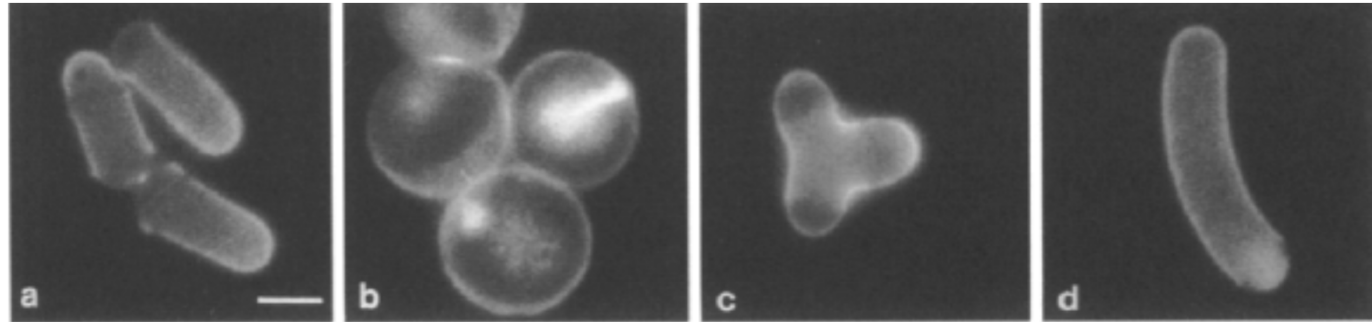
Počet mutací

- 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



- mutagenese *S. pombe* – hledání ts mutant (55 000 kolonii) s defektní morfologií – našli 64 kmenů (3 druhy defektu: 51 kulatých=*orb*, 8 tip elongation aberrant=*tea*, 5 banana=*ban*)



- z 51 *orb* mutant křížených s WT segregovalo 43 v poměru 2:2 tj. jeden gen (8 sterilních), „linkage analysis“ mezi mutantami ukázala 12 *orb* genů (skupin – Tab. I) ... aktinový cytoskelet (polarizovaný růstu)

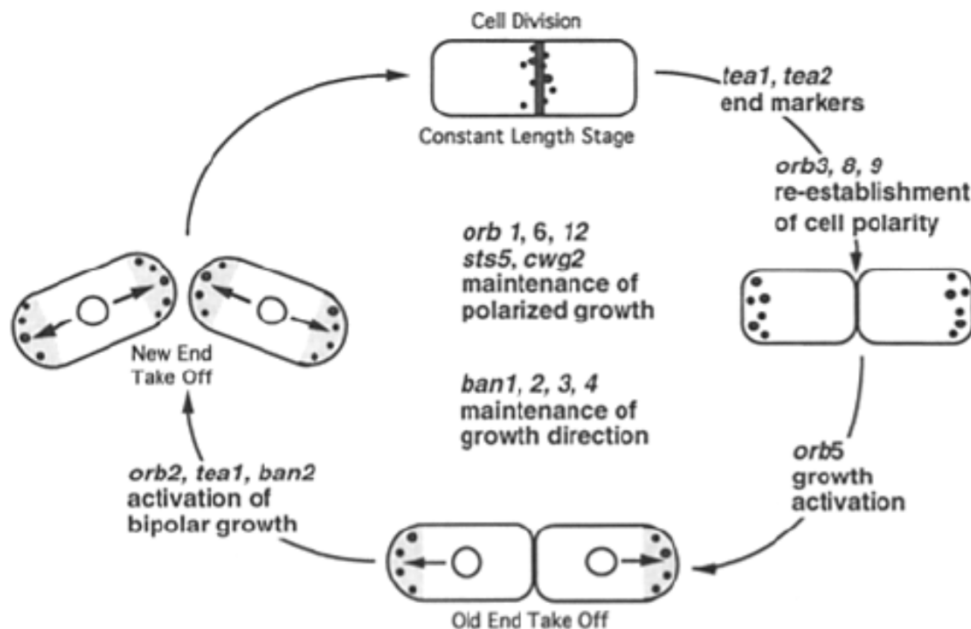


Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage*	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 <sup>†</sup> )	<i>orb2, orb6</i>		
<i>orb2</i>	2 (4 <sup>†</sup> )	<i>orb1, orb6</i>		
<i>orb3</i>	1 (1 <sup>†</sup> )			
<i>orb4</i>	12 (1 <sup>†</sup> )		<i>sts5</i> <sup>§</sup>	<i>pck1<sup>+</sup>, pyp1<sup>+</sup></i>
<i>orb5</i>	2 (2 <sup>†</sup> )			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2</i> <sup>l</sup>	
<i>orb8</i>	6	<i>orb9, orb11</i>		
<i>orb9</i>	1	<i>orb8, orb11</i>		
<i>orb10</i>	4			
<i>orb11</i>	2	<i>orb8, orb9</i>	<i>cwg1</i> <sup>ll</sup>	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1<sup>+</sup>, pyp1<sup>+</sup>, ras1<sup>+</sup></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

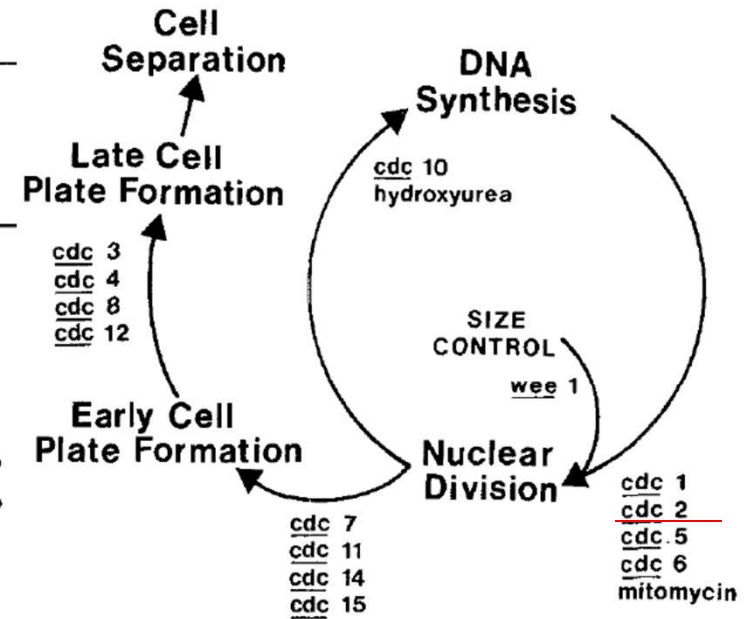
**Paul Nurse** studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



**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

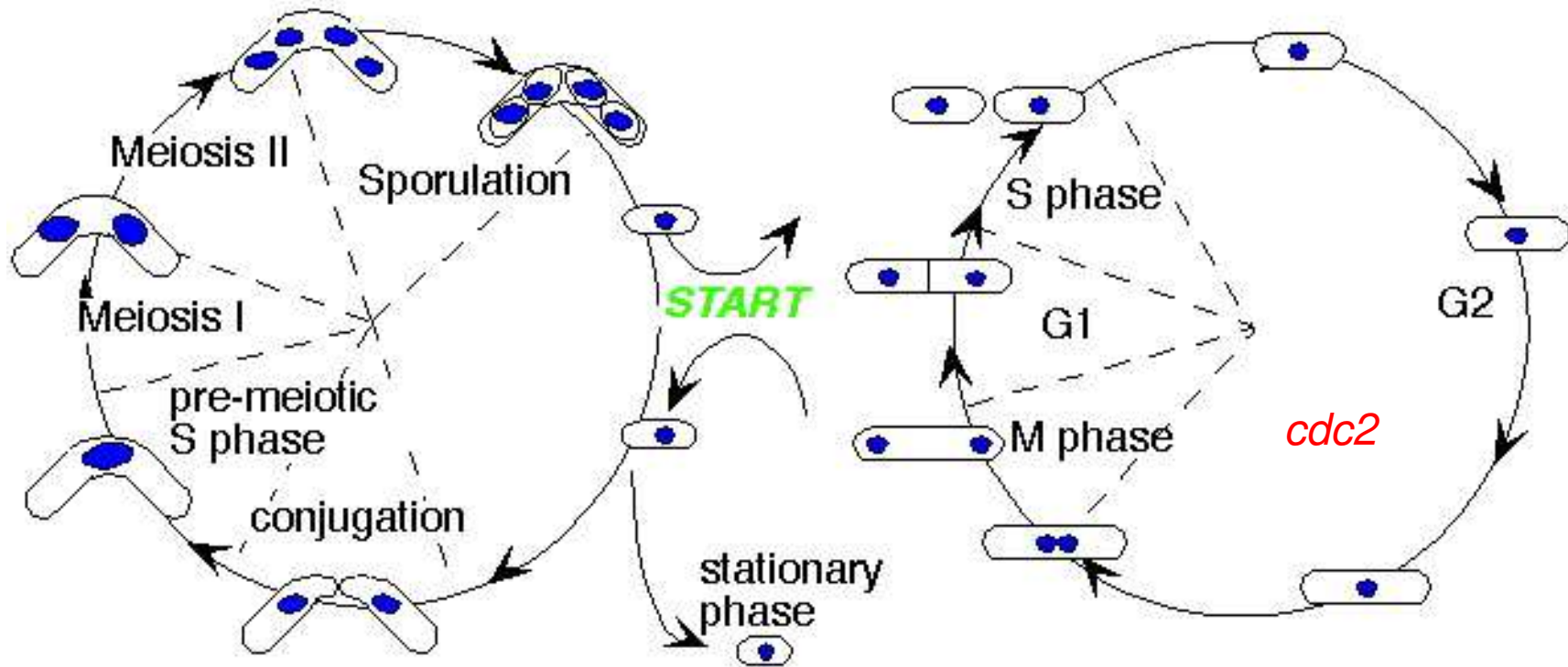
Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C <sup>a</sup>	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky <sup>b</sup>
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky <sup>b</sup>
„	121	0.38	32.1	„	
<i>cdc 10</i>	129	–0.10	20.3	DNA Synthesis	
„	28	–0.10	–	„	
<i>cdc 13</i>	117	0.64	30.5	Nuclear division	Forms multiple cell plates
–	22	0.88	33.1	„	Sterile



Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC ...

# Buněčný cyklus *S. pombe*

*S. pombe* má **rovnocenné dělení** - vznikají buňky stejné velikosti – hned vstupují do S fáze (jsou dostatečně velké) – pro vstup do mitozy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)



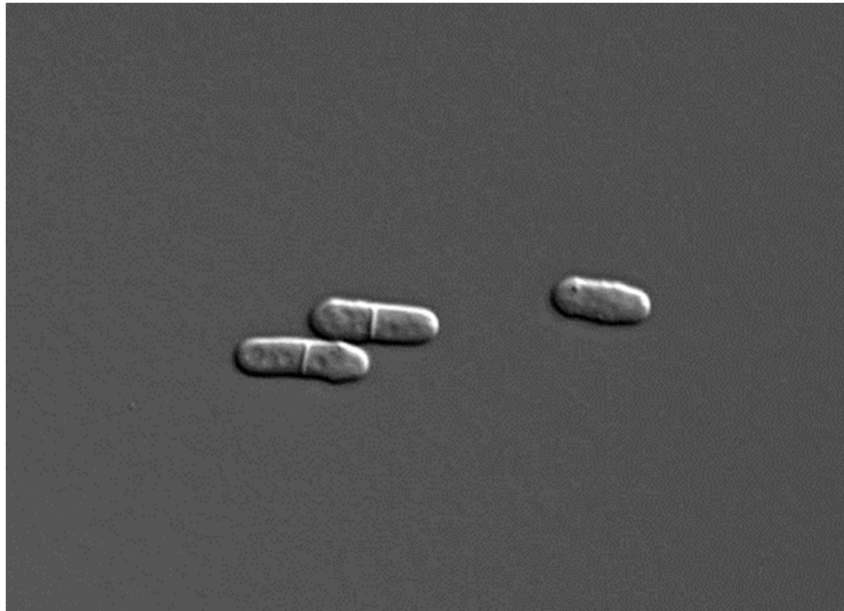
*Meiotic cycle*

*Vegetative (mitotic) cycle*

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



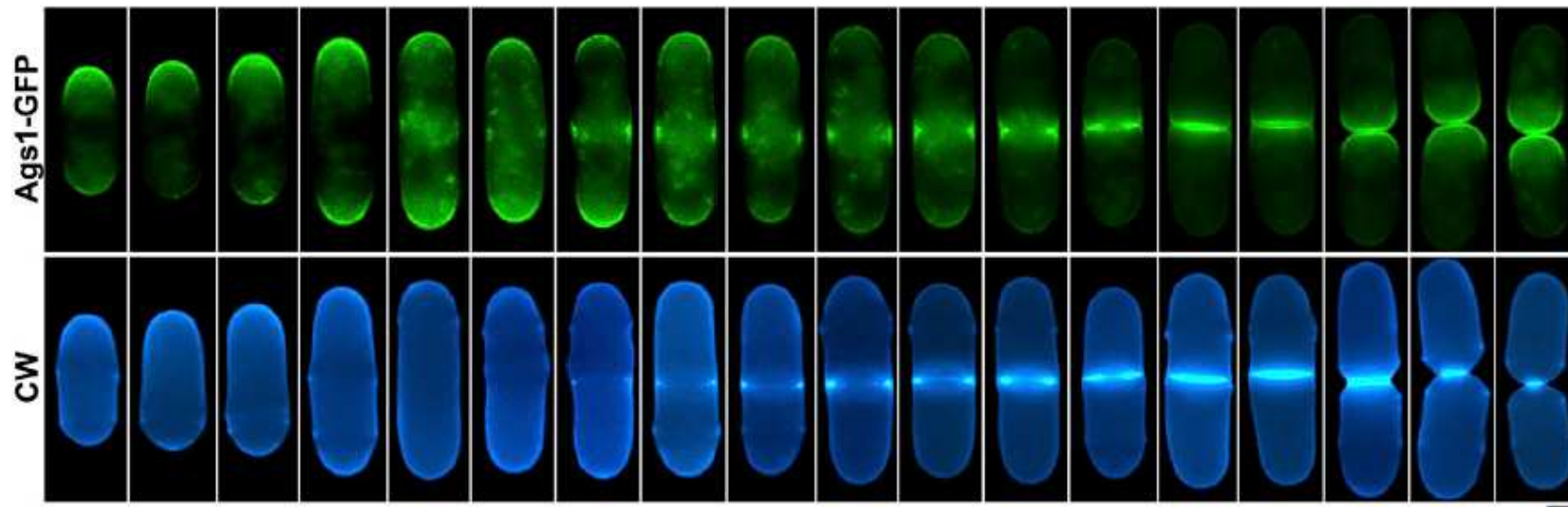
# *S. pombe*



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

- Více prof. Svoboda

Cortes et al, JCB, 2012

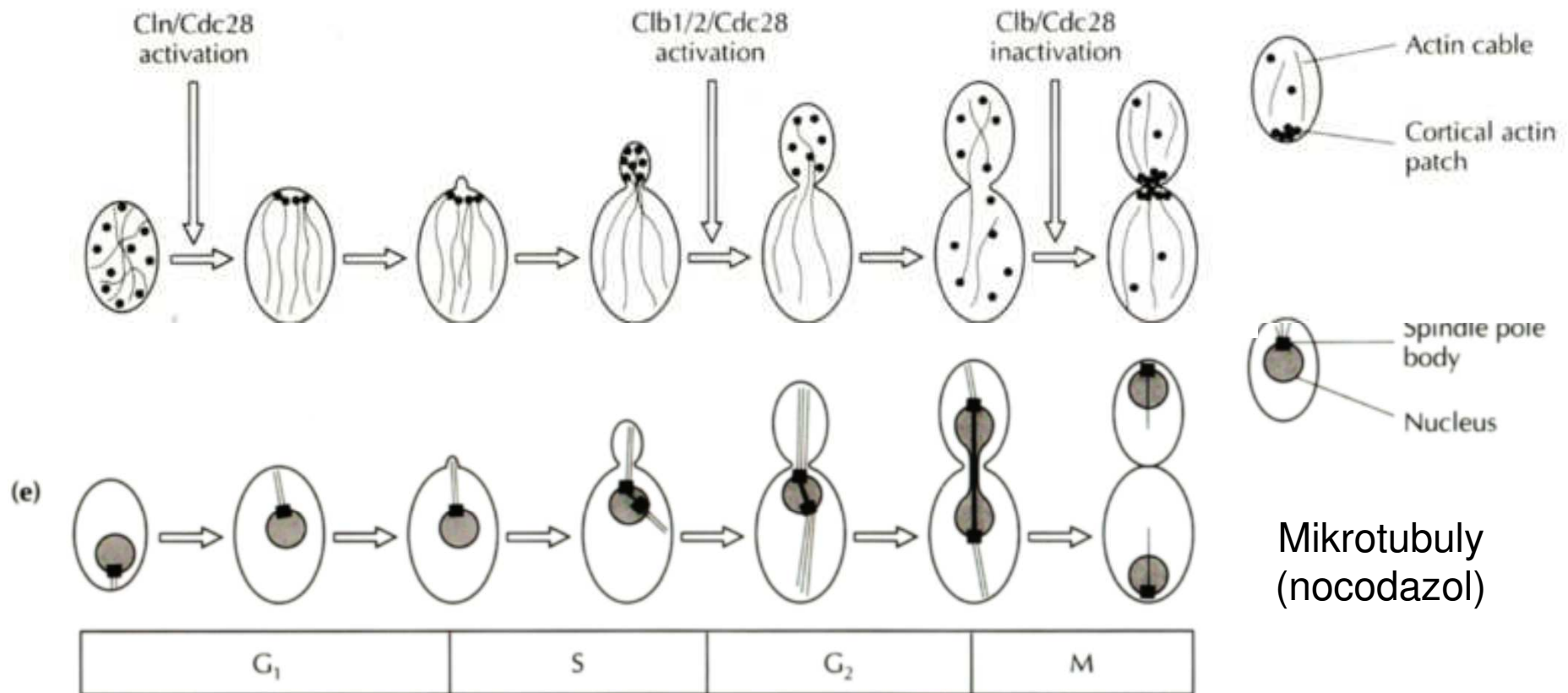


# *S. cerevisiae*



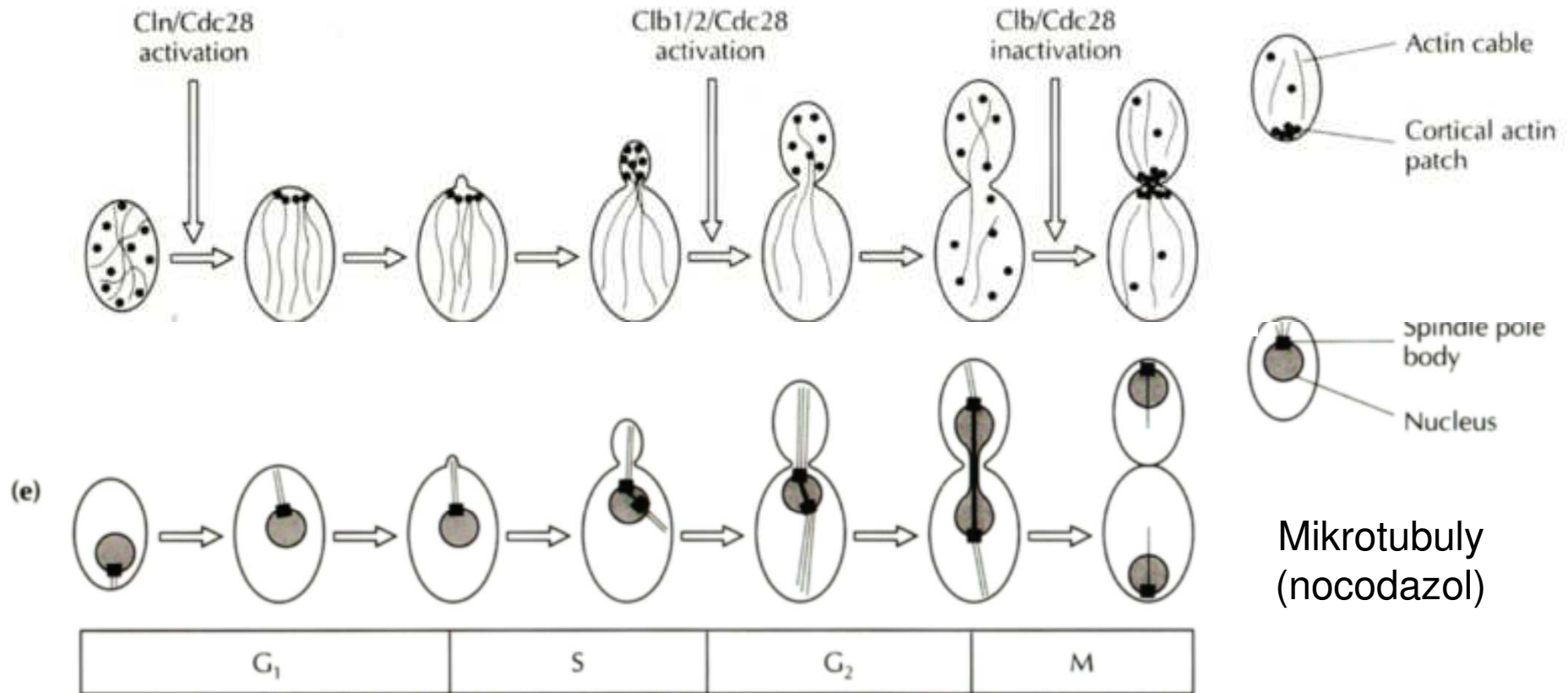
pučení ... párování (shmoo)

# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G<sub>2</sub> fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy) - mikrotubuly
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G<sub>1</sub>
- oddělená dceřiná buňka je menší než mateřská – **nerovnocenné dělení**– pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G<sub>1</sub> fáze

# Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



- v úseku A jsou buňky „nedorostlé“ – elutriace (centrifugace dle velikosti buněk) – tzv. **G<sub>0</sub> synchronizace**

- v úseku B se rozhoduje o konjugaci - za přítomnosti alfa-faktoru (krátký syntetický peptid) dochází k zastavení buněčného cyklu – **G<sub>1</sub> synchronizace**

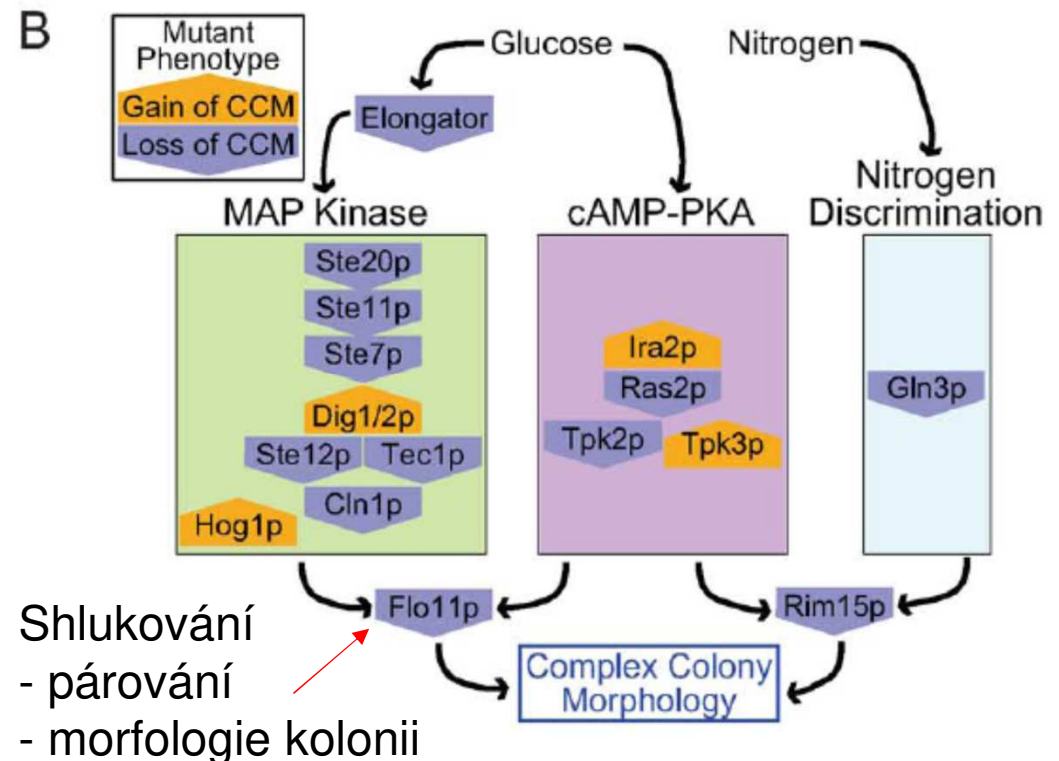
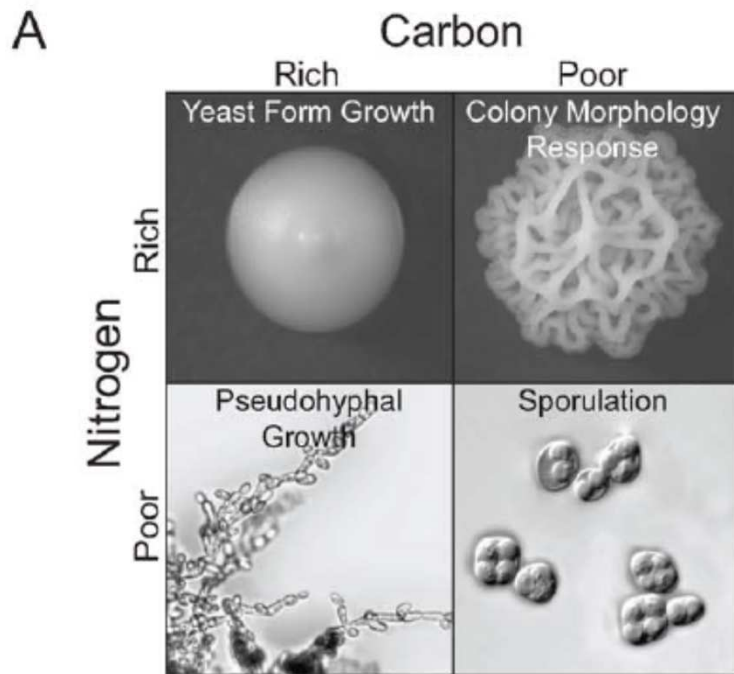
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

- nocodazol blokuje polymeraci tubulinu – schází mikrotubuly pro mitózu – **G<sub>2</sub> 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 meiosis/sporulaci
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují

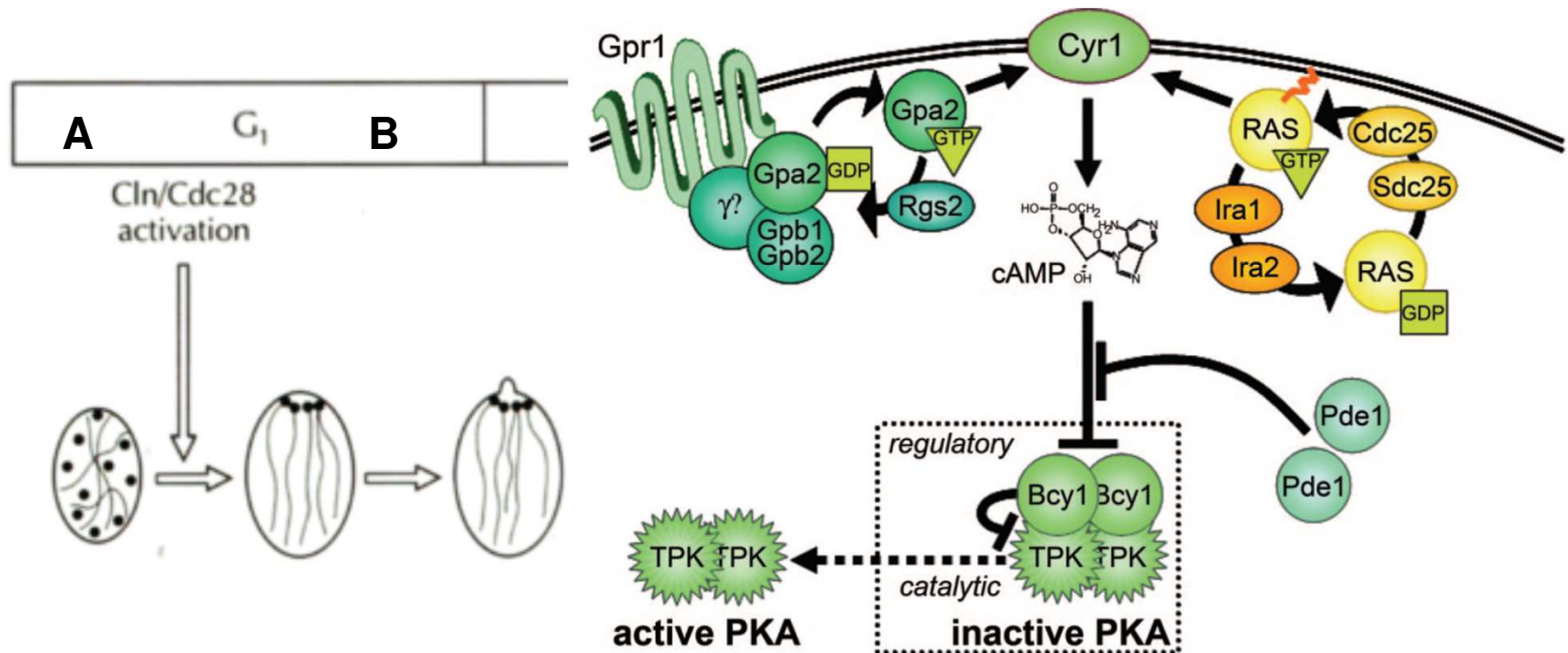


Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

# G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

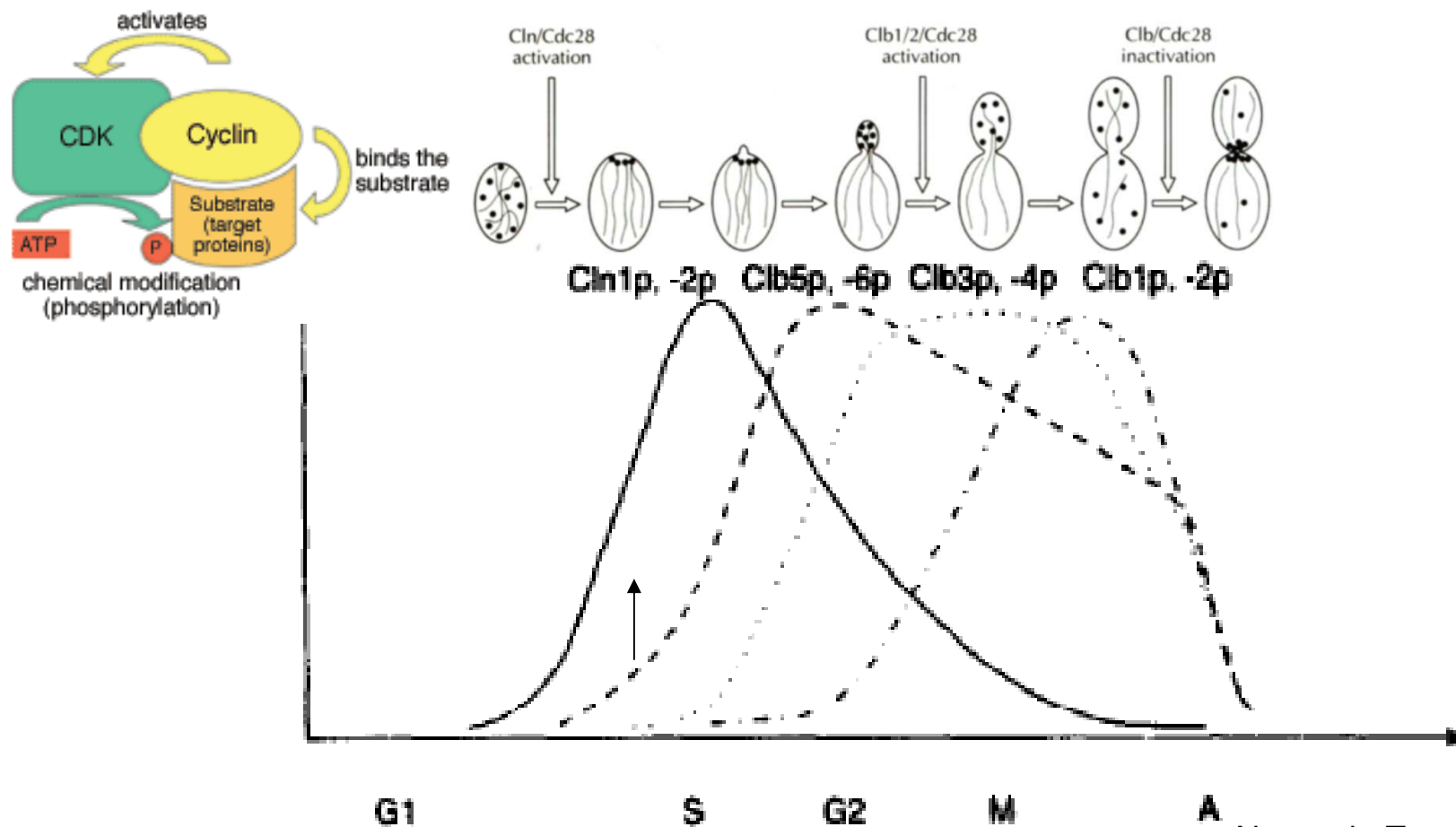
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



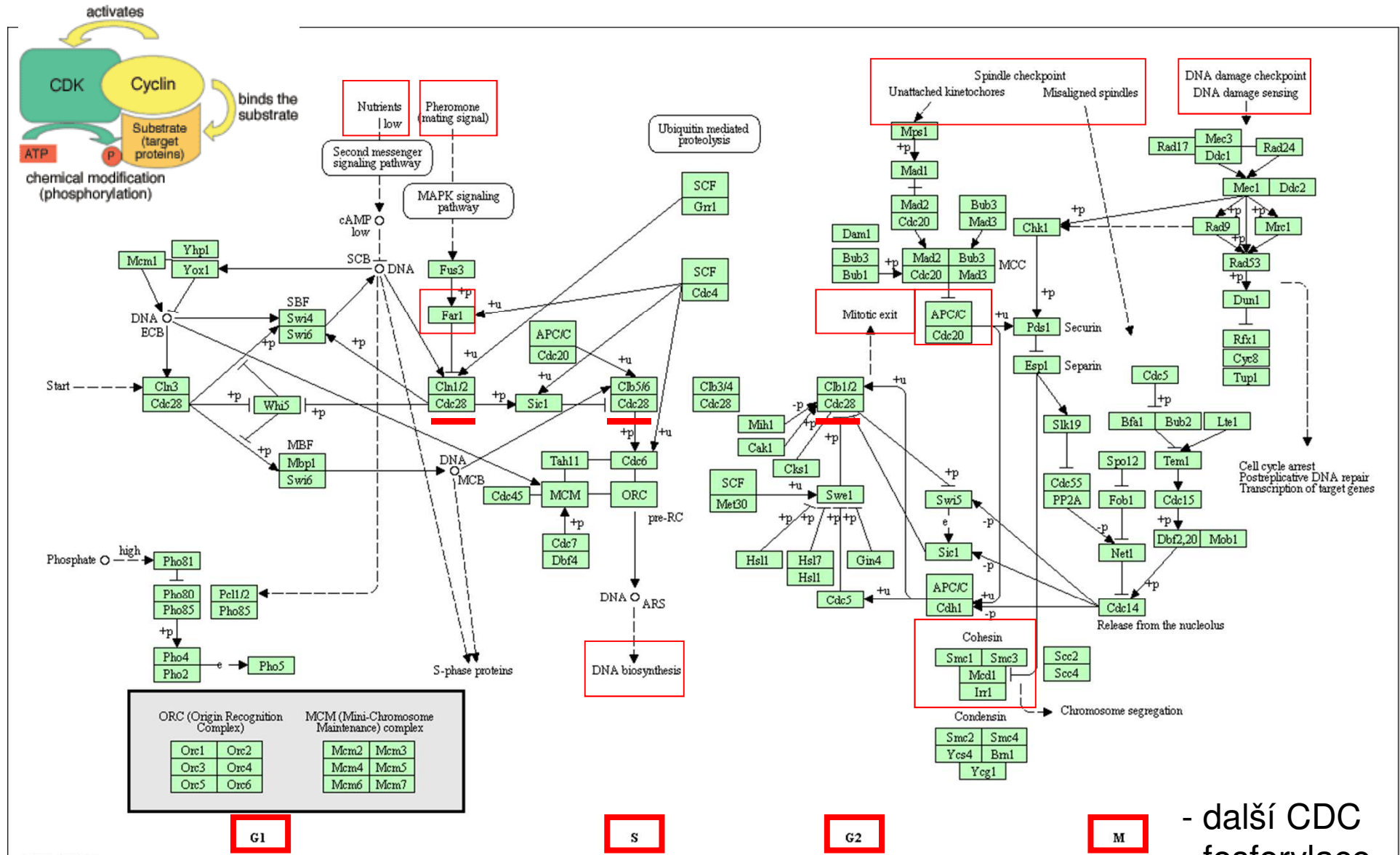
# *CDC28* a cykliny u *S. cerevisiae*

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

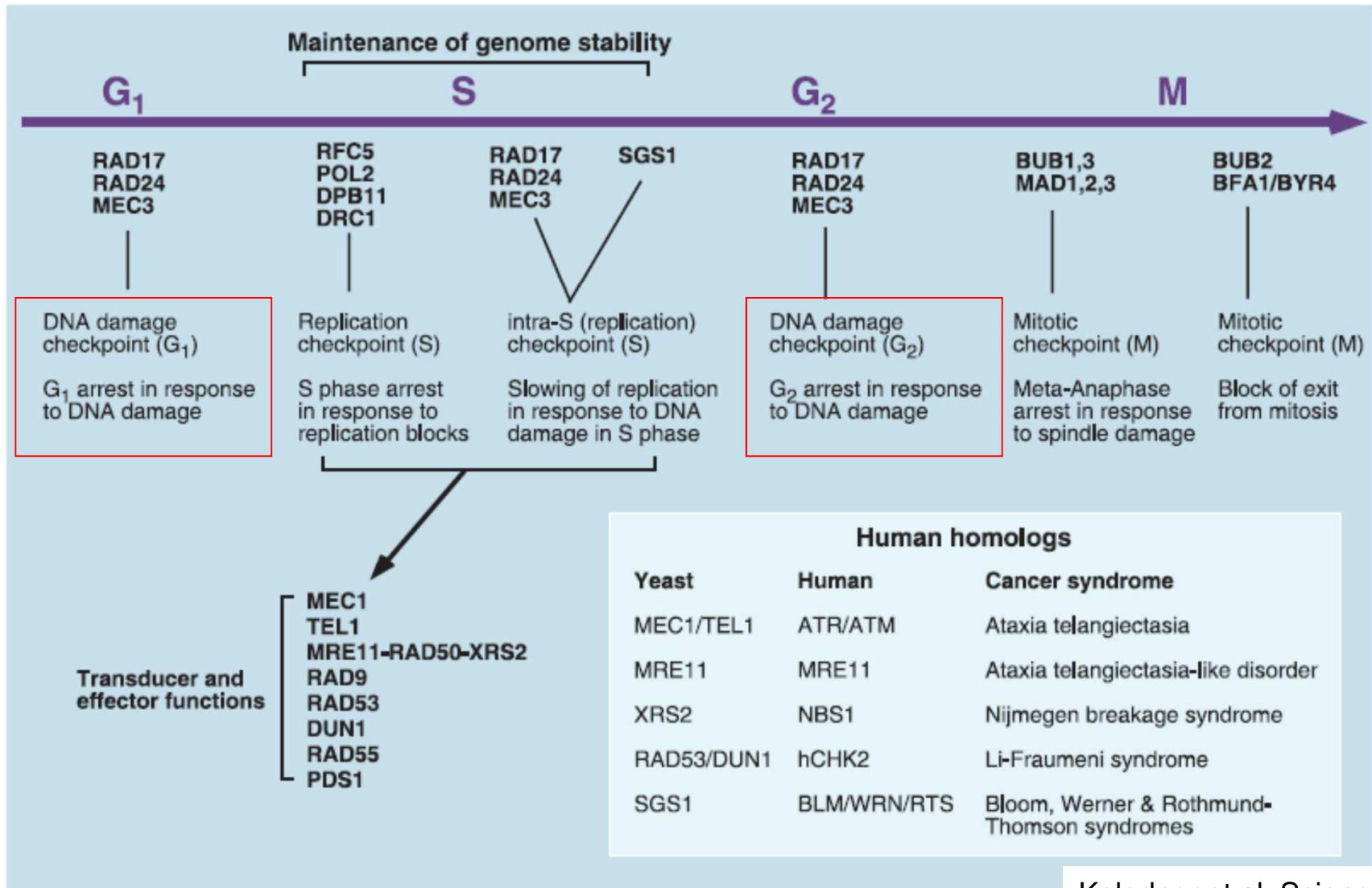


# Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



- další CDC  
- fosforylace  
- ubiquitylace

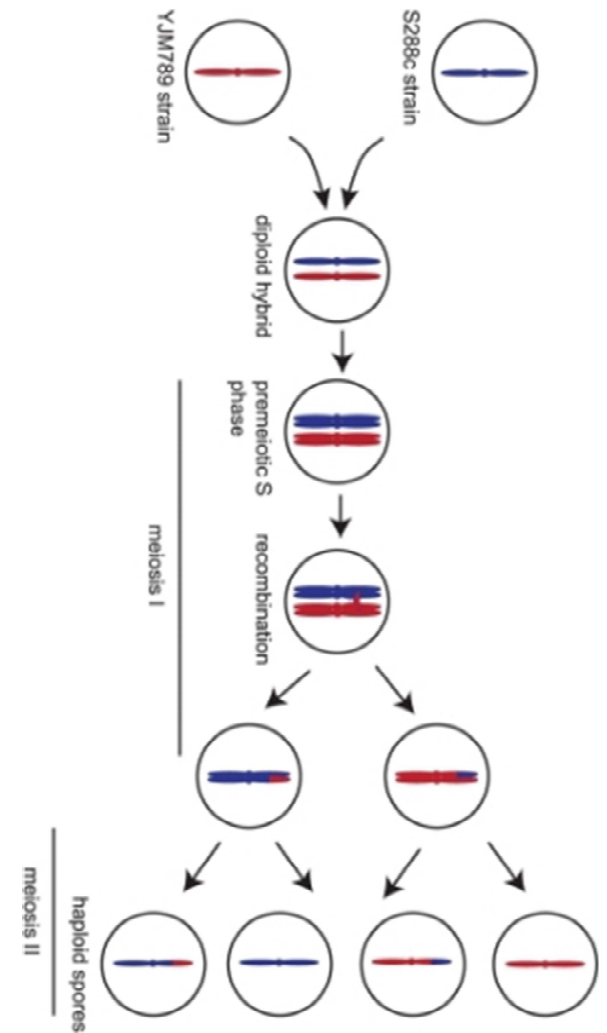
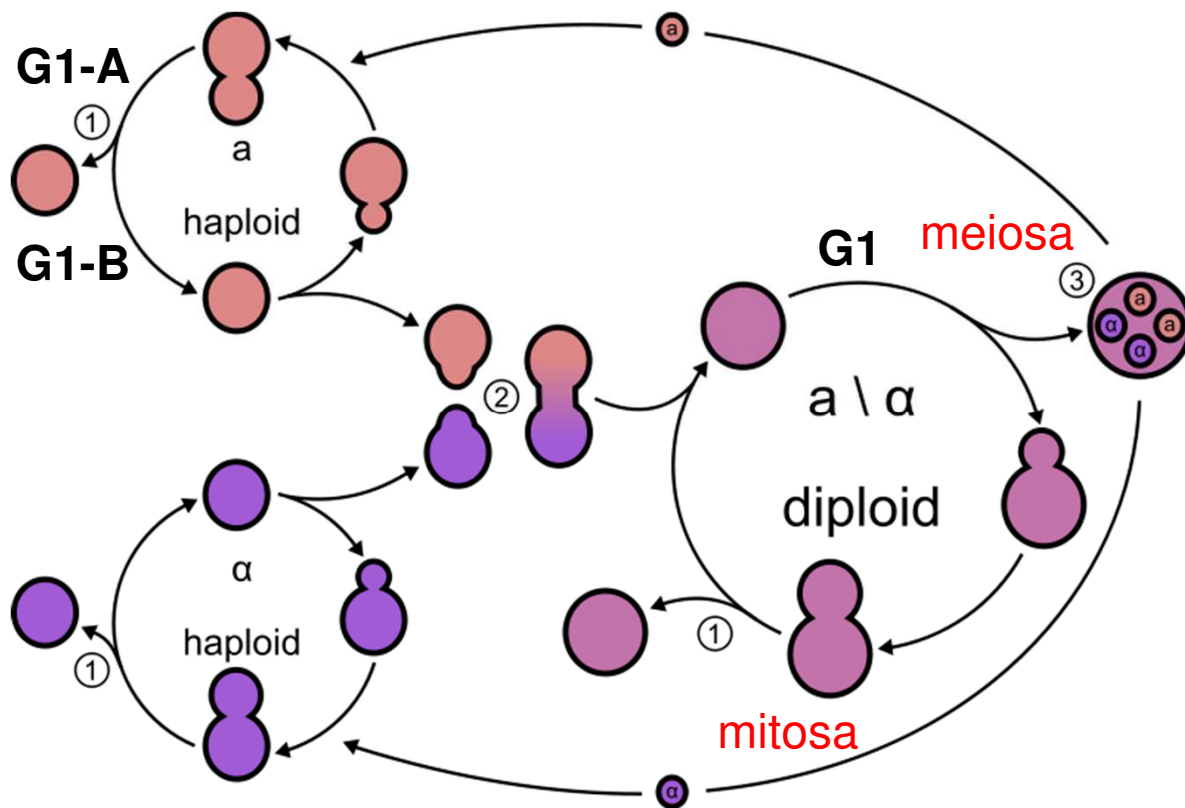




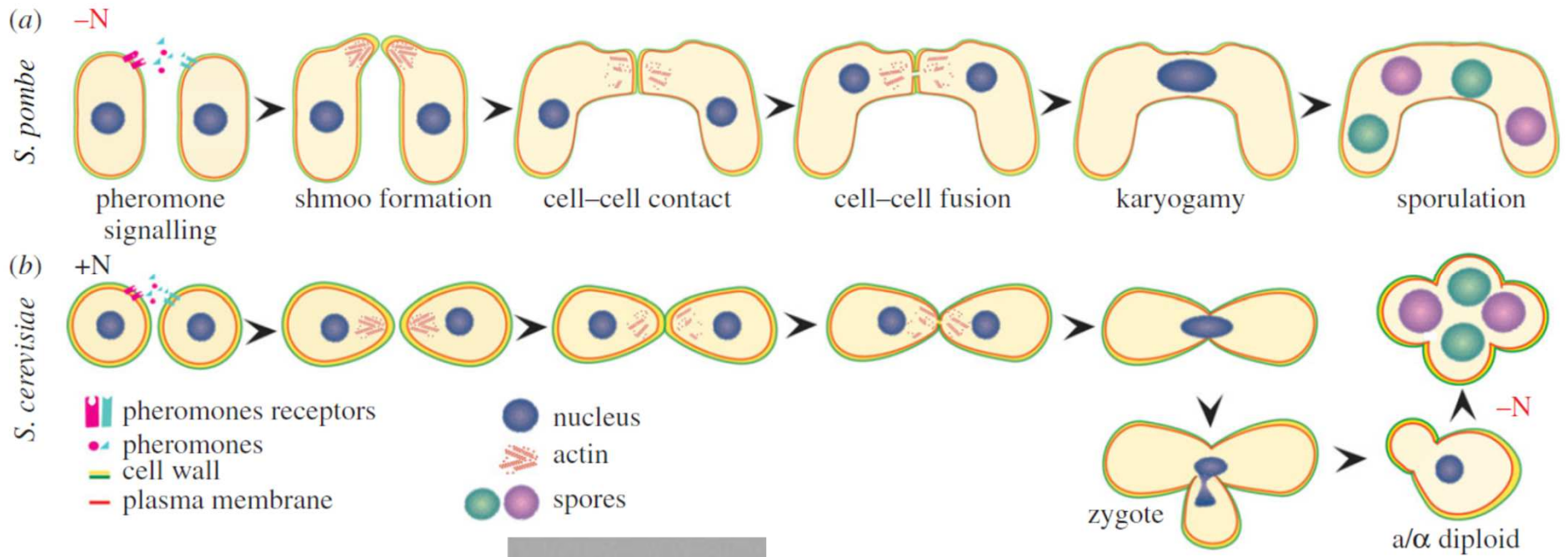
Kolodner et al, Science (2002)

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)

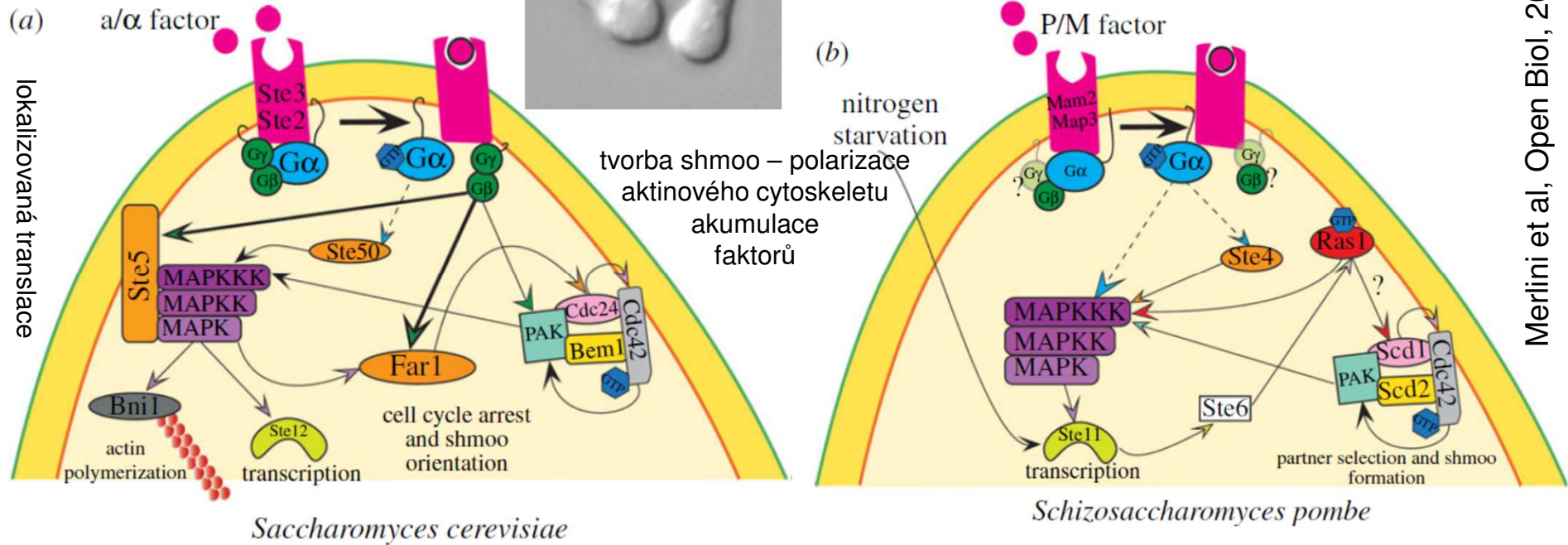
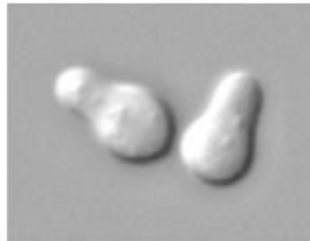
# Párování/mating kvasinkových buněk

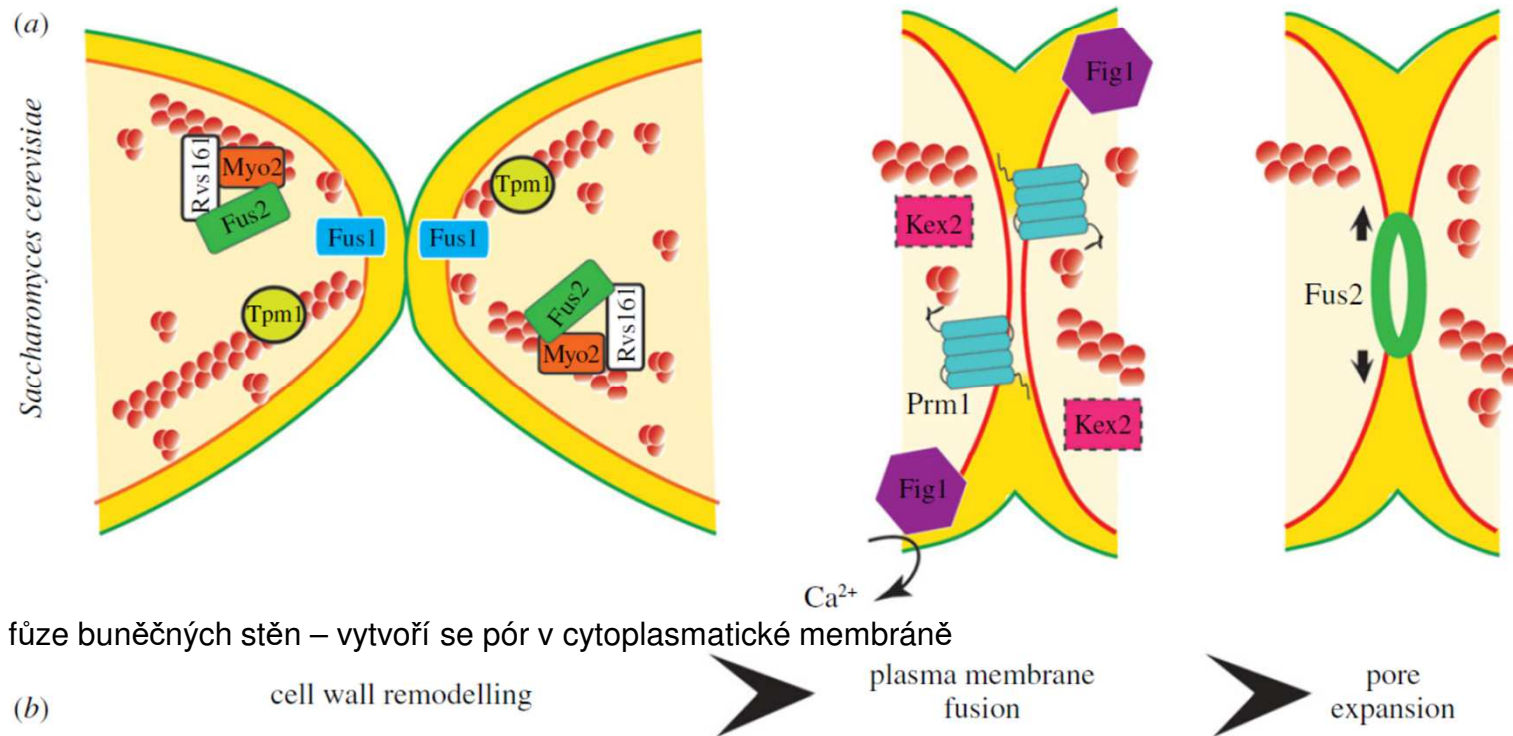
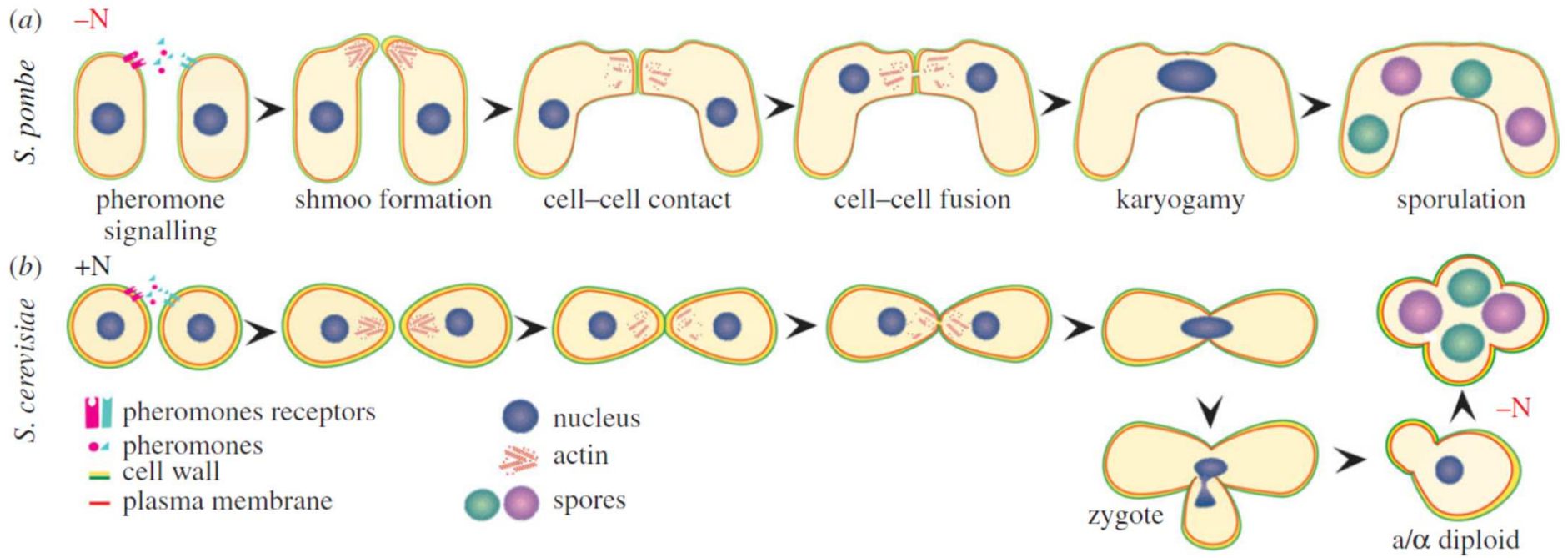


- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují ... meiotické dělení
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii



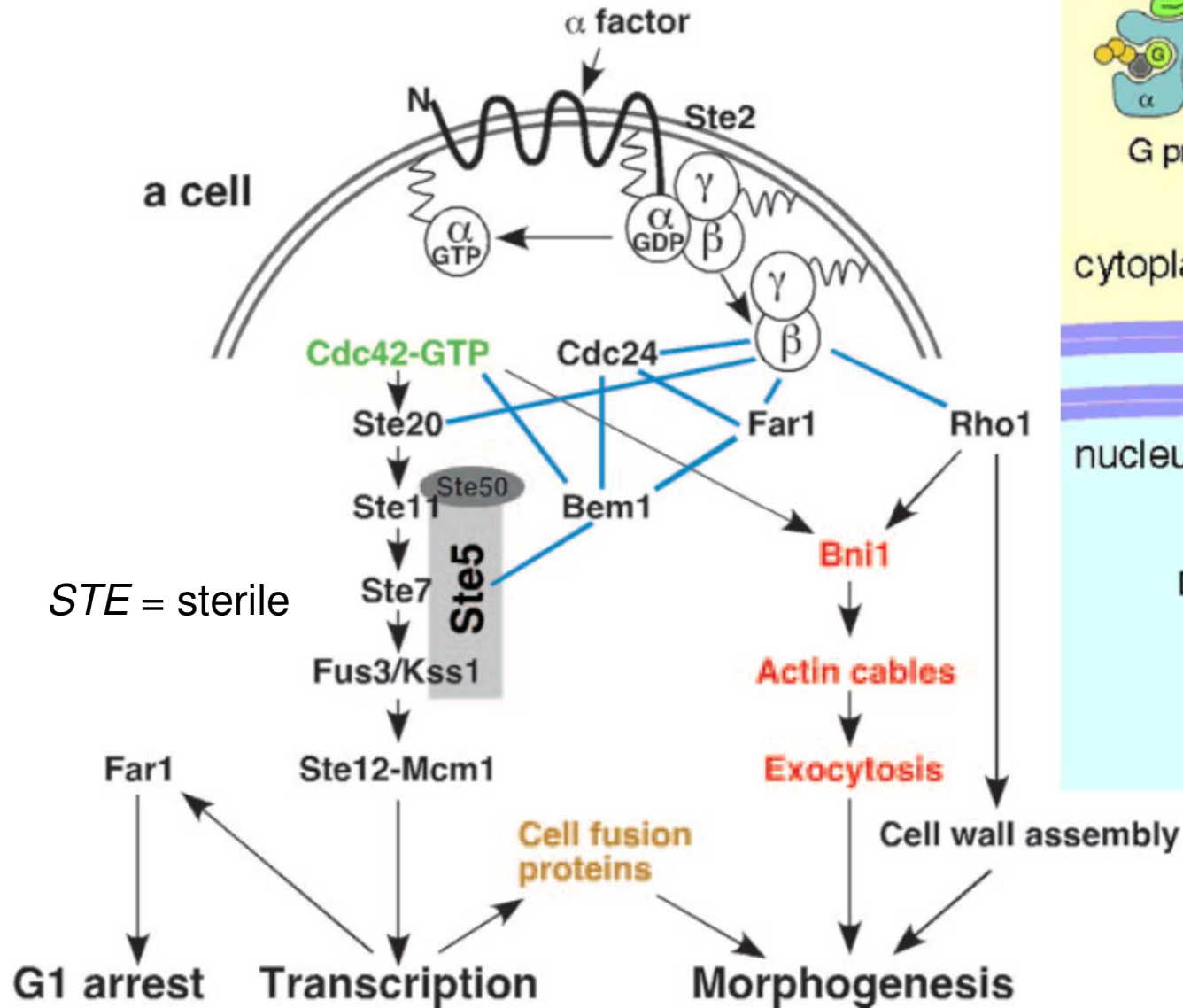
**STE = sterile**





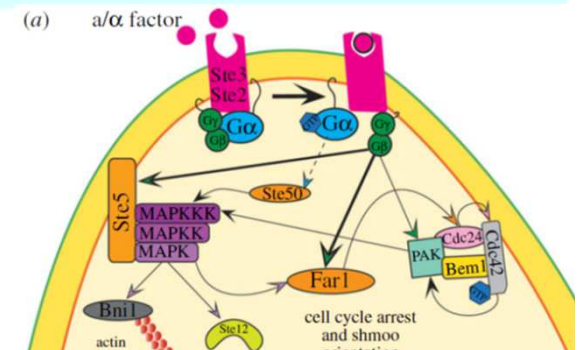
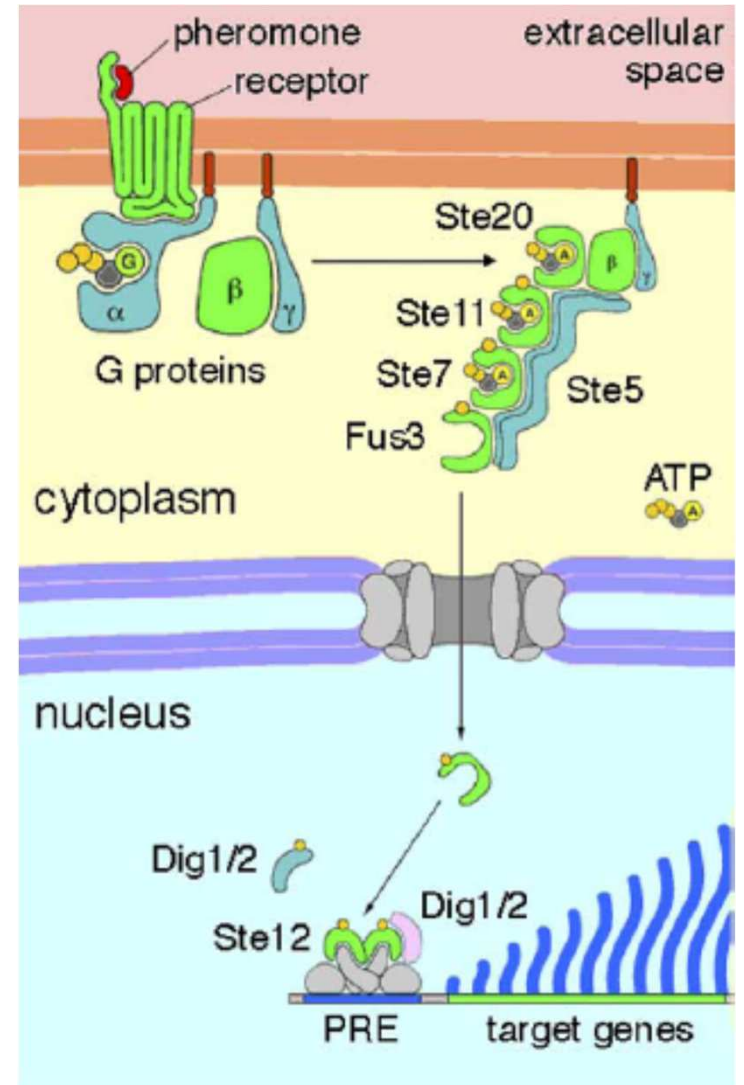
Merlini et al, Open Biol, 2013

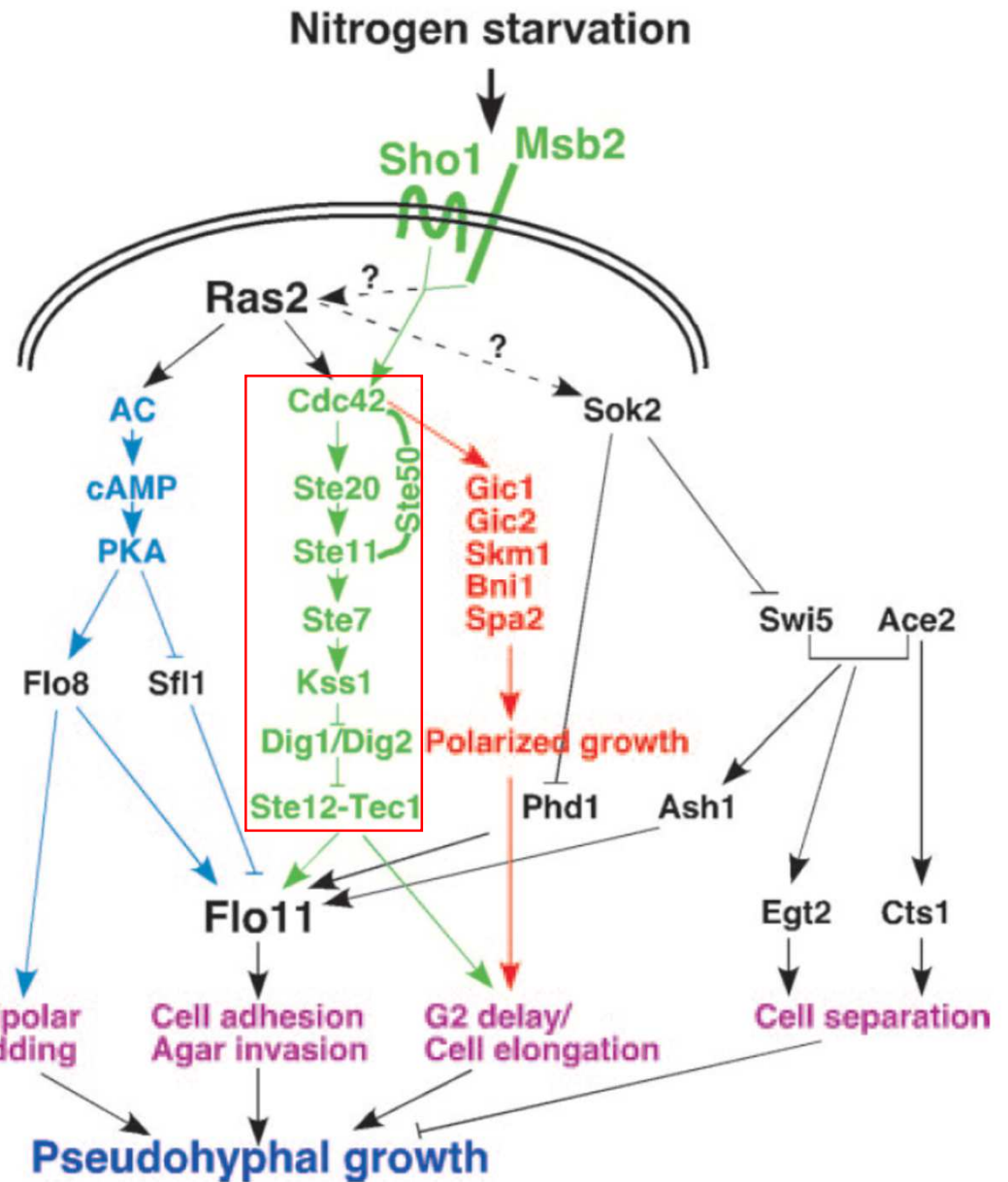
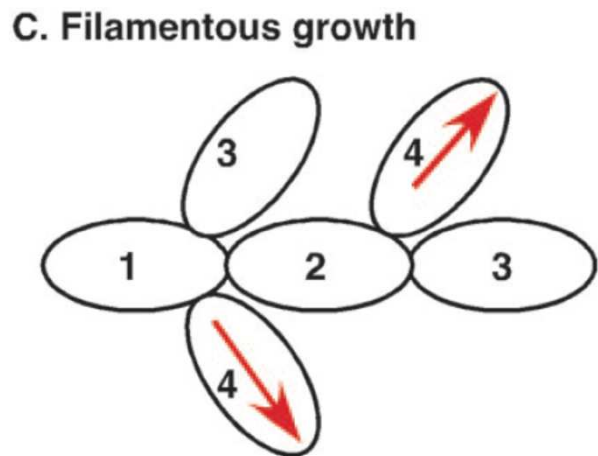
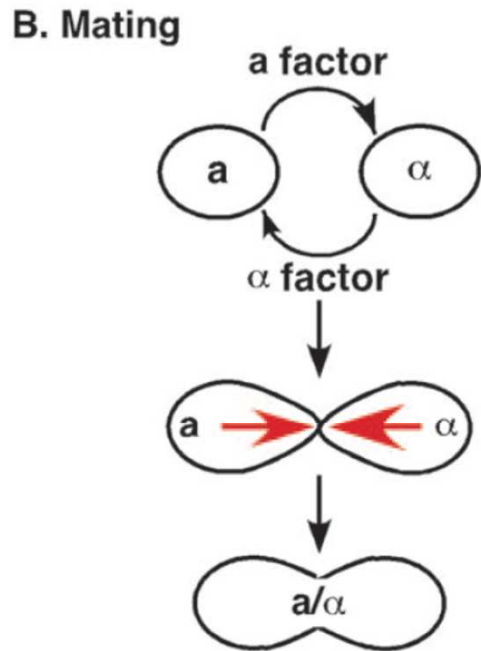
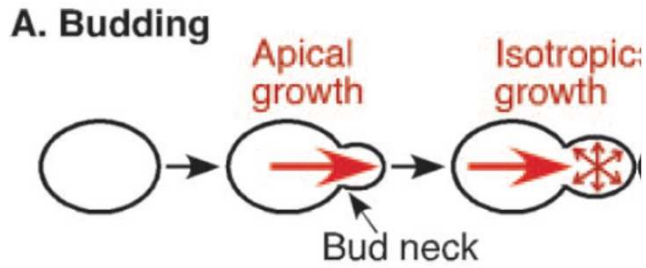
# Signální dráha – $\alpha$ faktor



transkripce ... příště

Park at al, MMBR, 2007  
Wang et al., Nature, 2004





buňka využívá podobné „nástroje“ pro jiné programy (vláknitý růst)

# Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

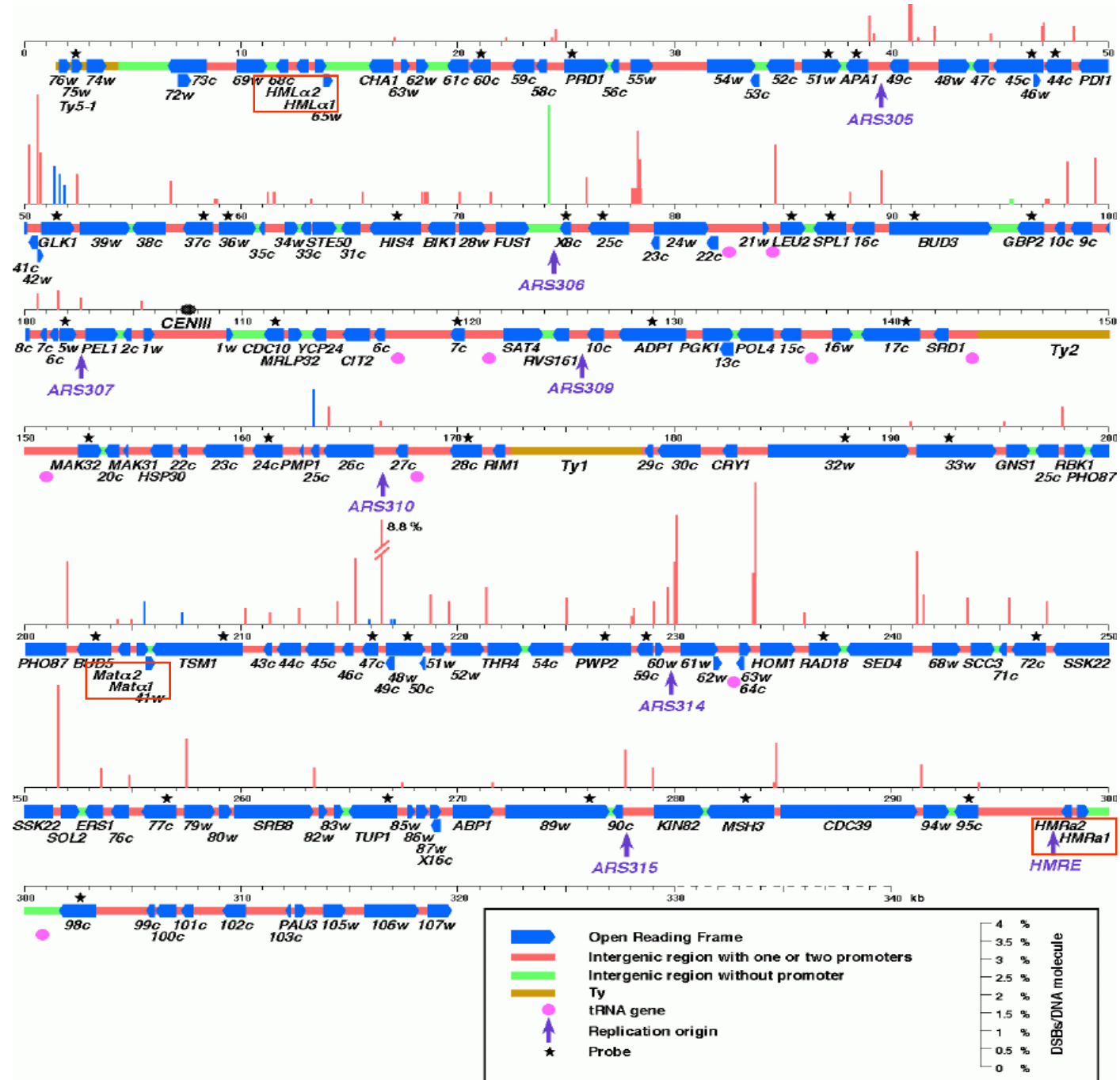
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT  $\alpha$  (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

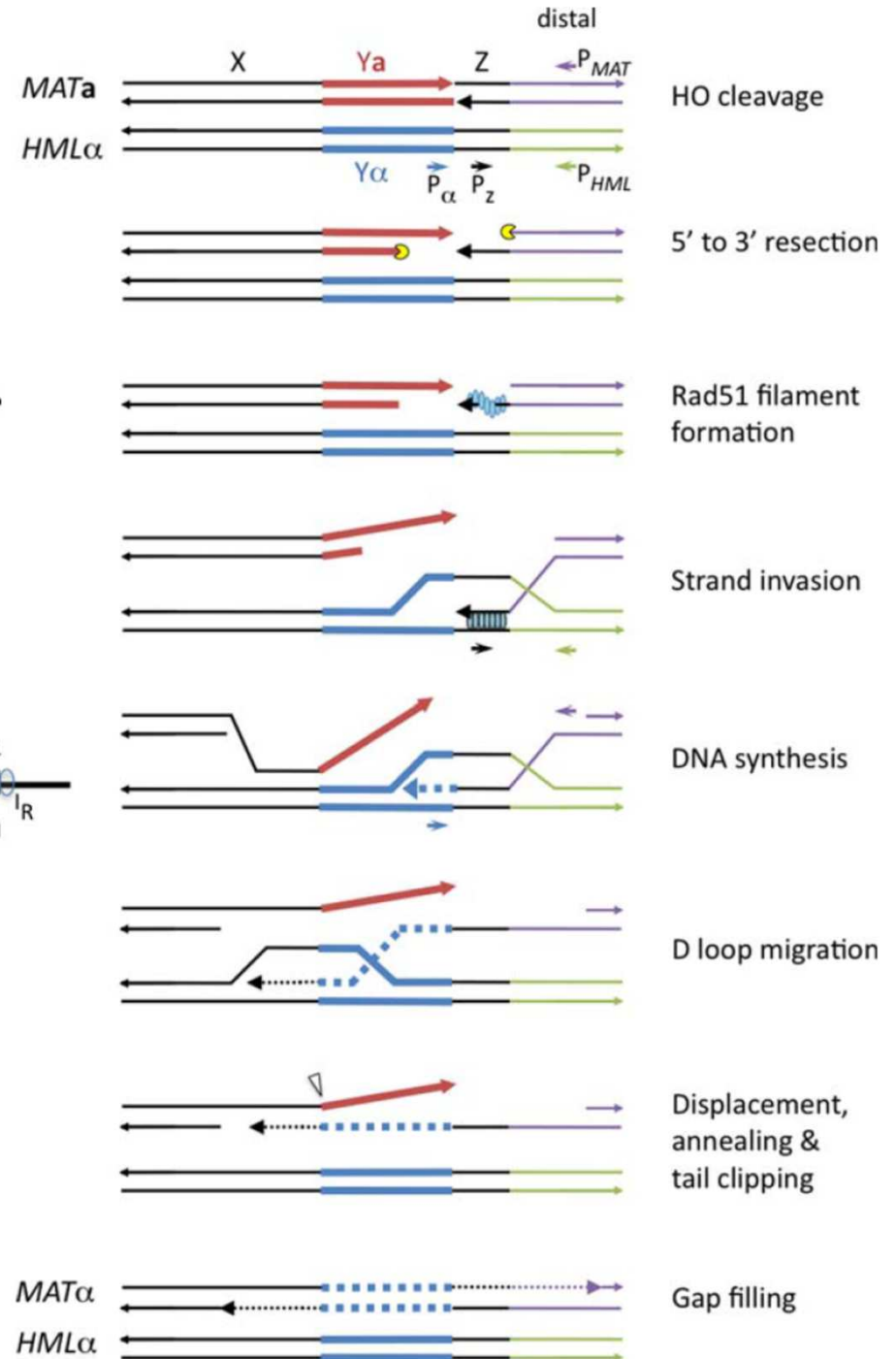
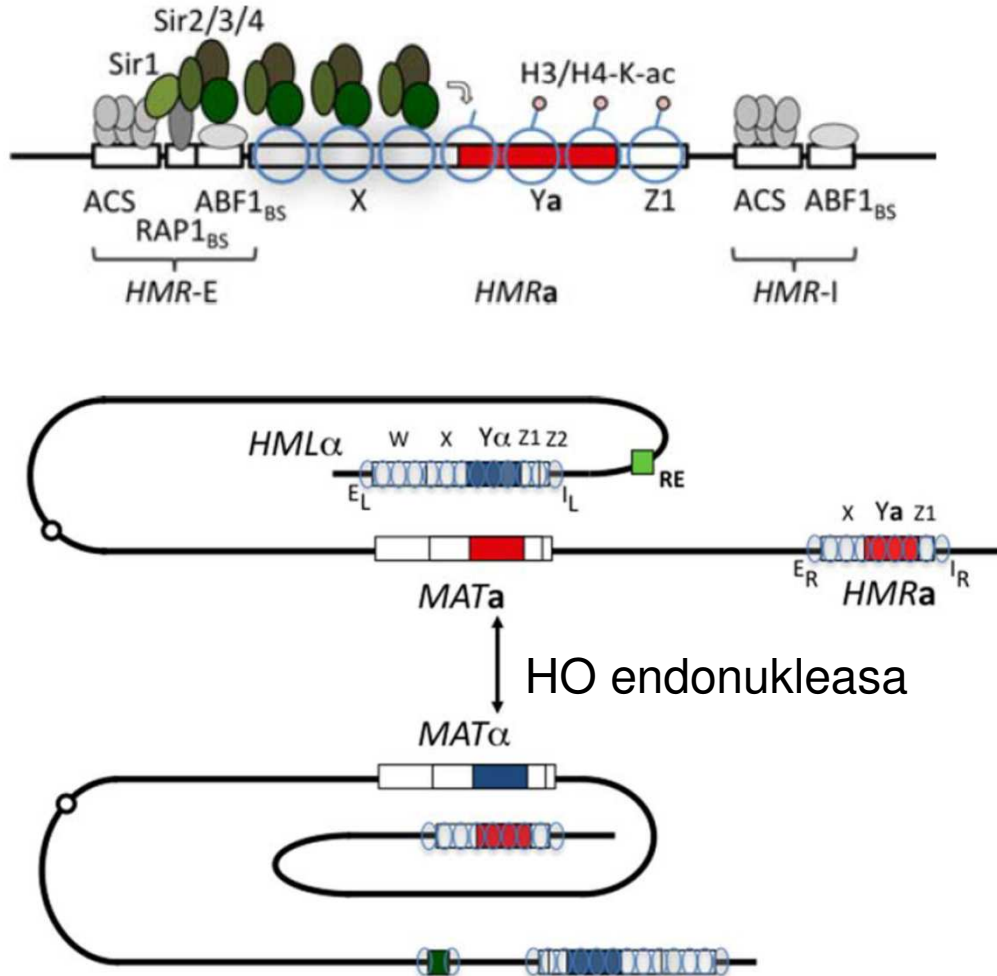
Co  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2 + \alpha 1$ ,  $\alpha 2$  kódují? (transkripční faktory)

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

Heterothalické – stabilní  
Homothalické – přepínají párovací typ



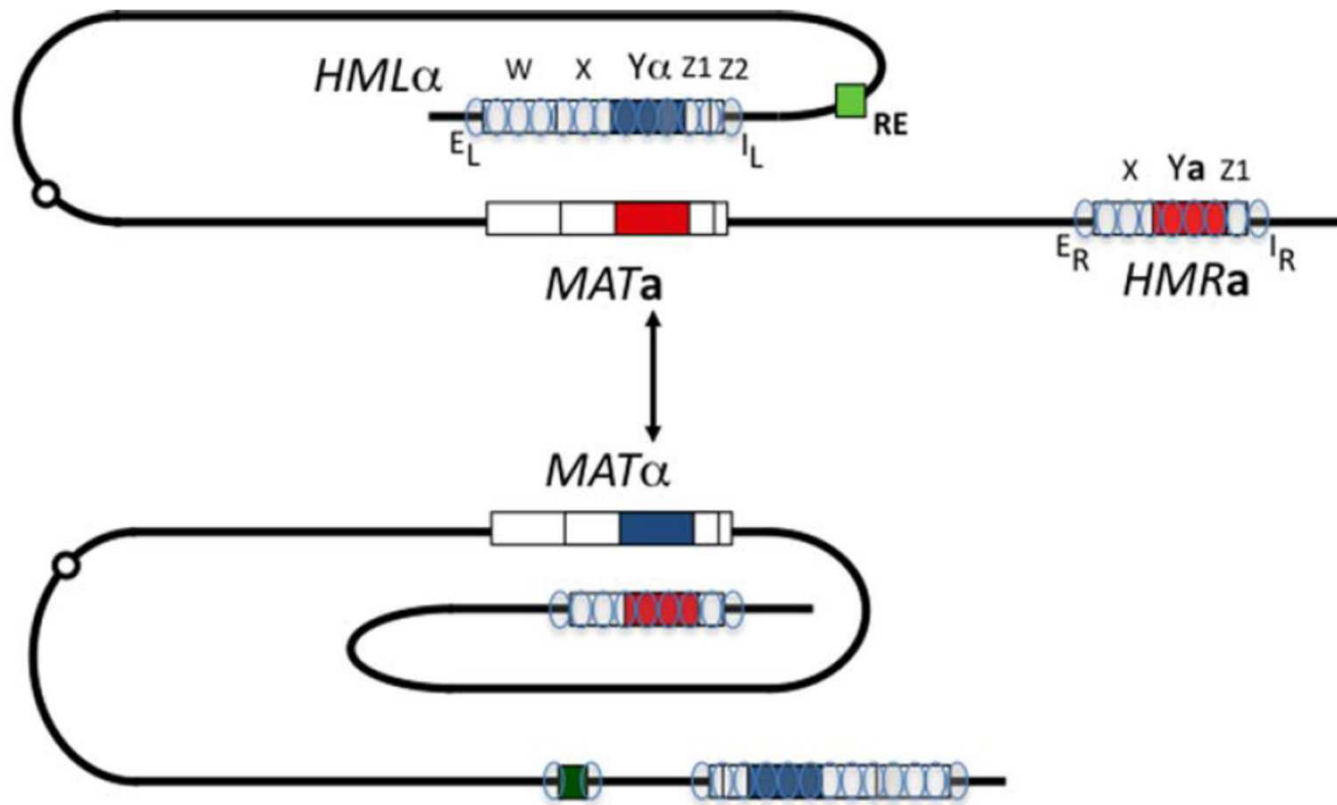
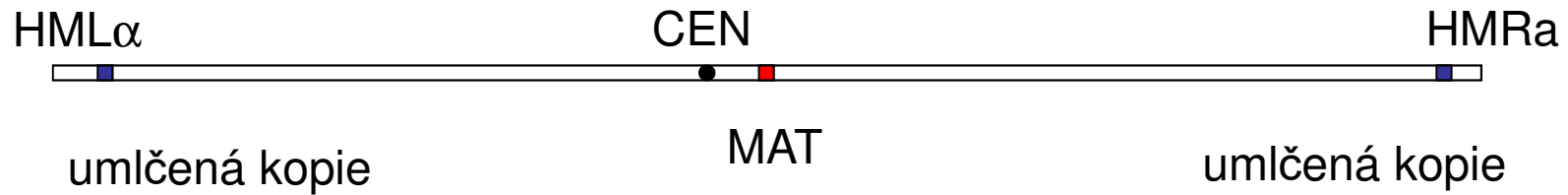
# Přepínání párovacího typu





# Přepínání párovacího typu

Chromosom III



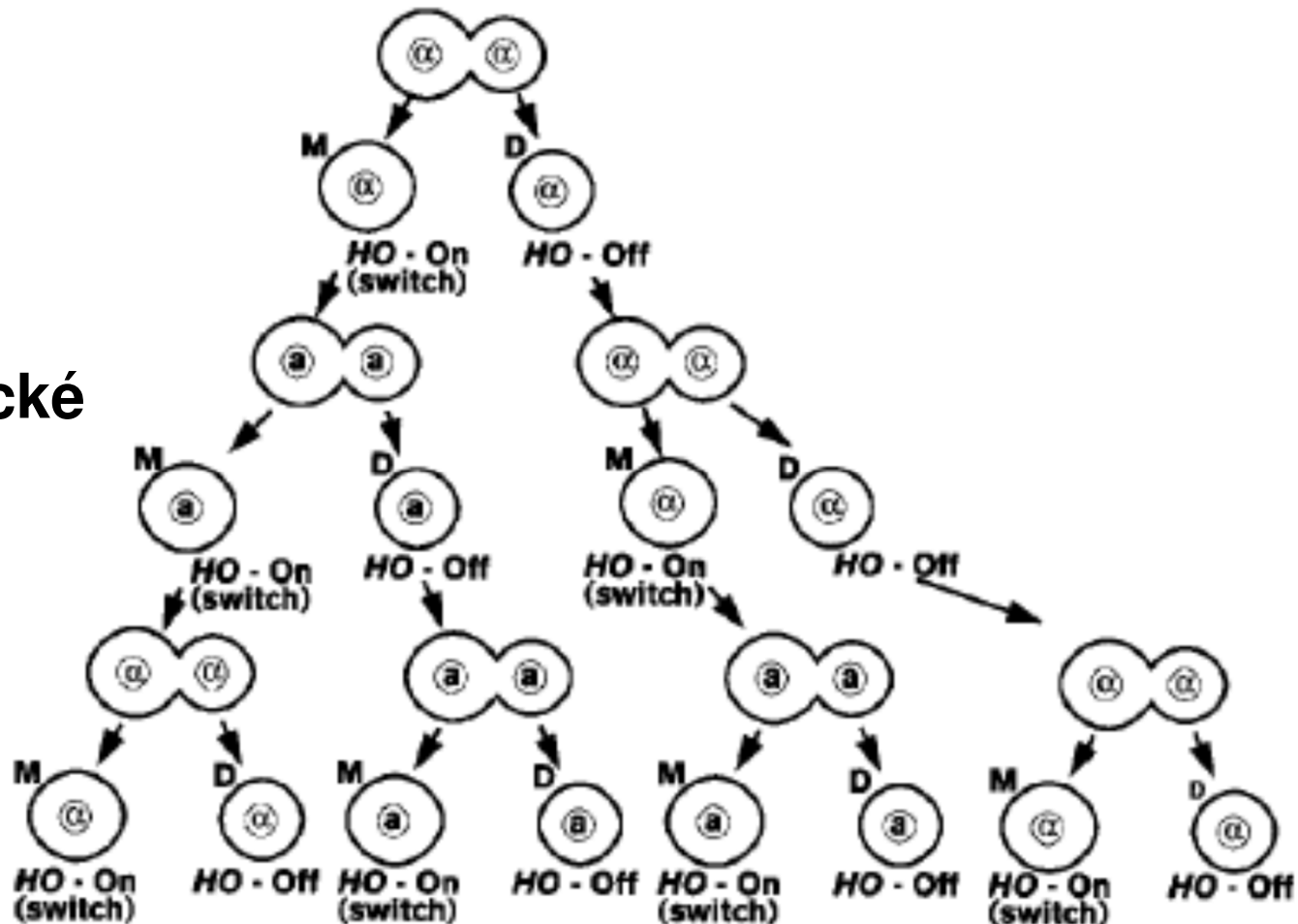
HO endonukleasa štěpí specifické sekvence v MAT lokusu - homologní rekombinace - záměna kopií  
Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

# Přepínání párovacího typu

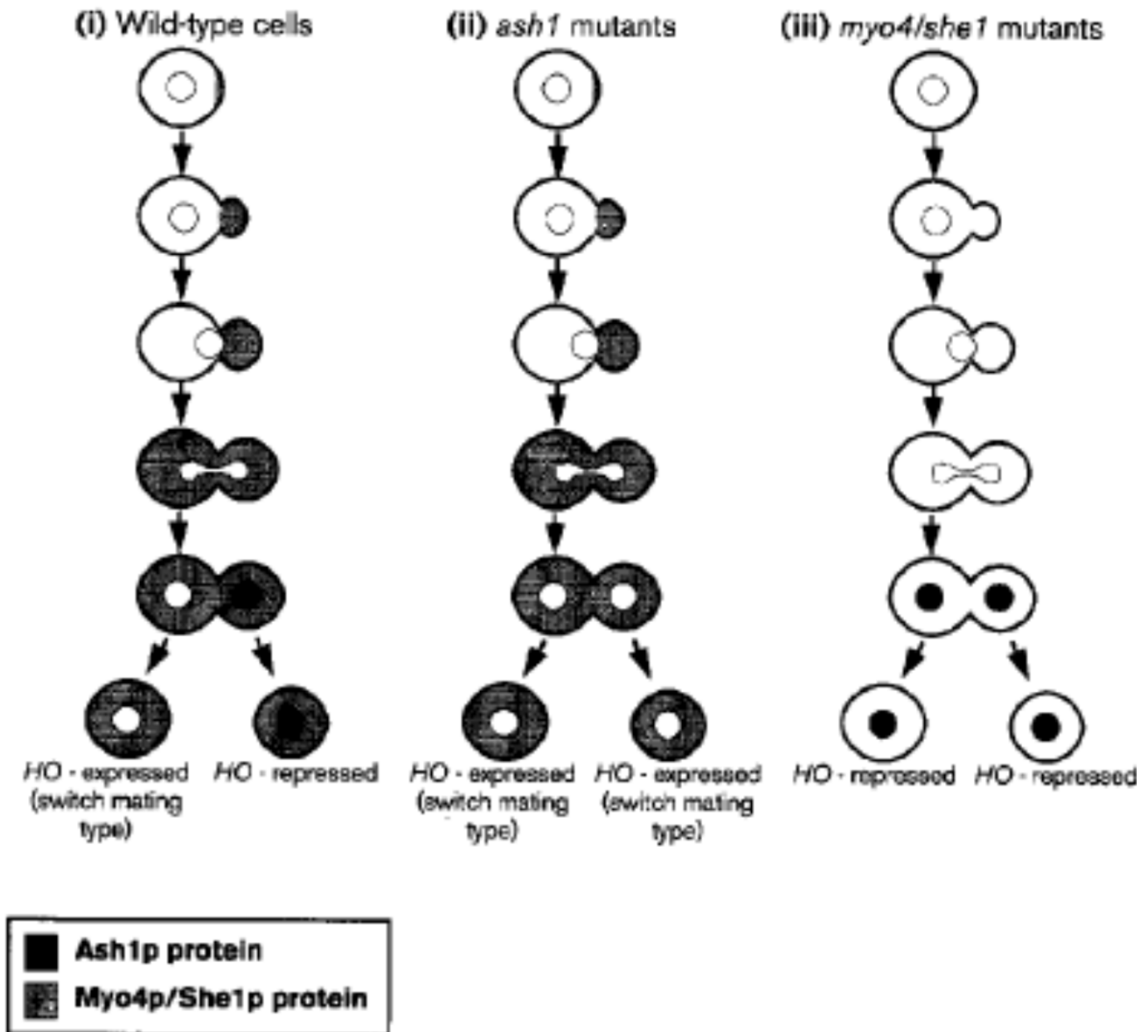
Homotalické - HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Heterotalické – nemají funkční HO endonukleasu

**homotalické**



# Asymetrická lokalizace Ash1p



- Ash1p represor je asymetricky lokalizován do dceřiné buňky, kde blokuje transkripci *HO*-endonukleasy

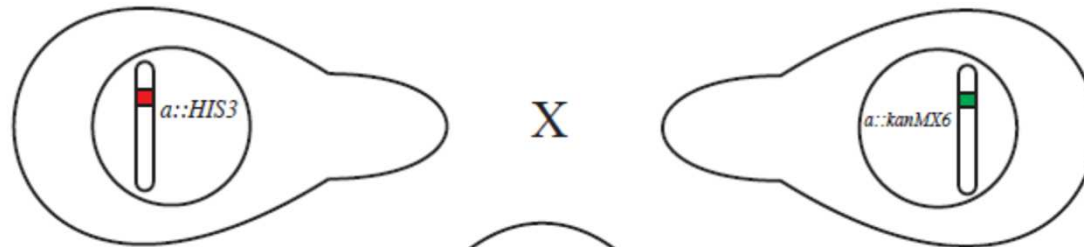
- Není do ní sekretován, ale dochází k expresi (translaci) asymetricky lokalizované mRNA

- (translace RNA na specializovaných ribozomech asociovaných s cytoskeletem

# Příprava aneuploidních buněk

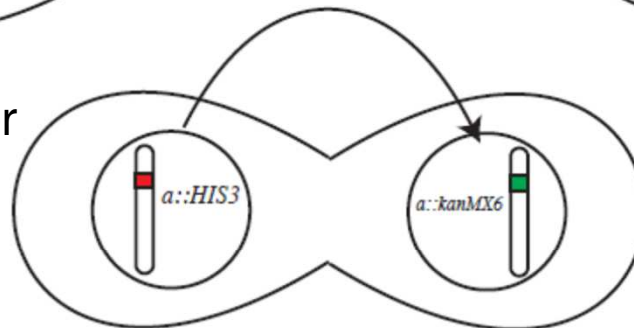
*MAT $\alpha$ , kar1 $\Delta$ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3*

*MAT $\alpha$ , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100*



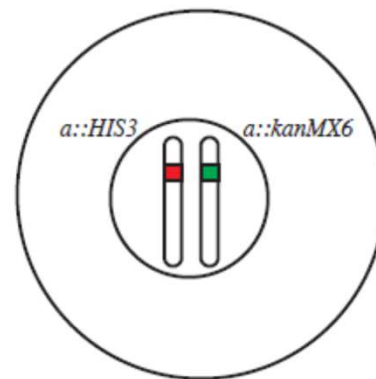
*KAR1* gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

*a::HIS3 + a::kanMX6* => *a::*specifické promotory - rezistence pouze v (a) haploidních buňkách



Select for: Can<sup>R</sup>, -His and Kan<sup>R</sup>

Studium vlivu aneuploidie na buňku (u člověka se podílí na kancerogenezi, aneuploidie v 90% lidských nádorů)



# Aneuploidie způsobuje genomovou nestabilitu - rakovina

- aneuploidie ve >90% rakovinných buněk
- je genomová nestabilita důsledkem aneuploidie nebo je aneuploidie důsledkem genomové nestability?

