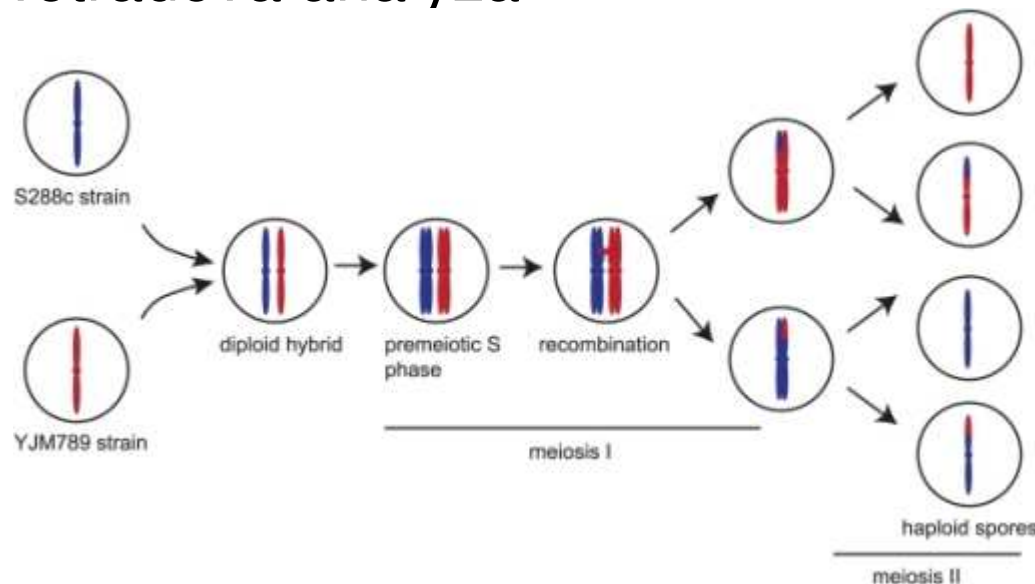


# Souhrn 4. přednášky

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

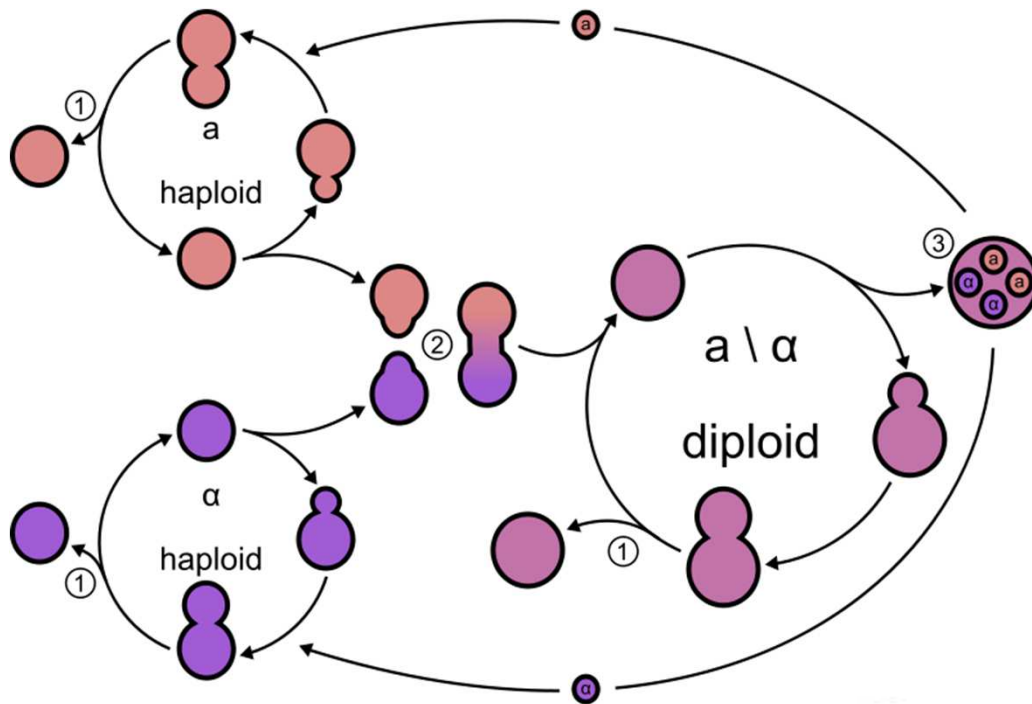


Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy, proteinové komplexy, evoluce biologických systémů ... připravovány nové kmeny pro biotechnologie ... řešeny otázky týkající se zdraví člověka

# 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

# Životní cyklus *S. cerevisiae*

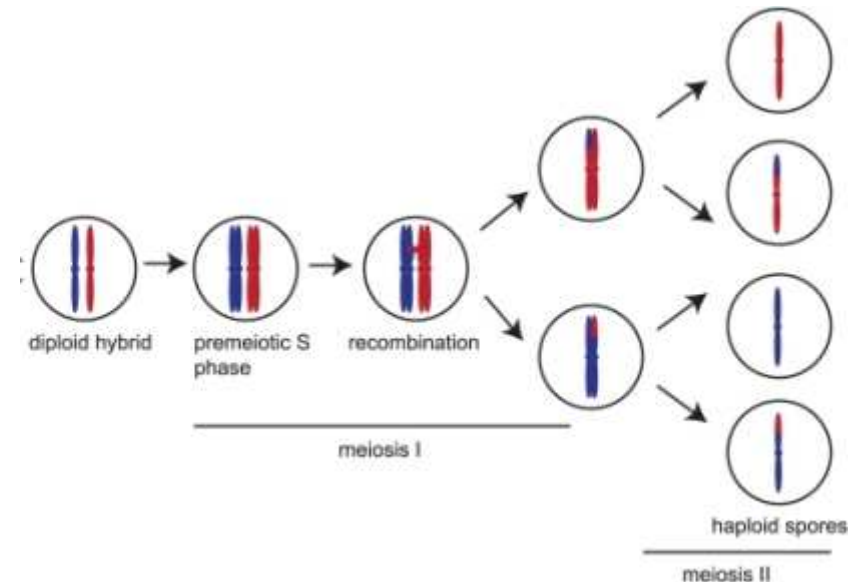


- delecii či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

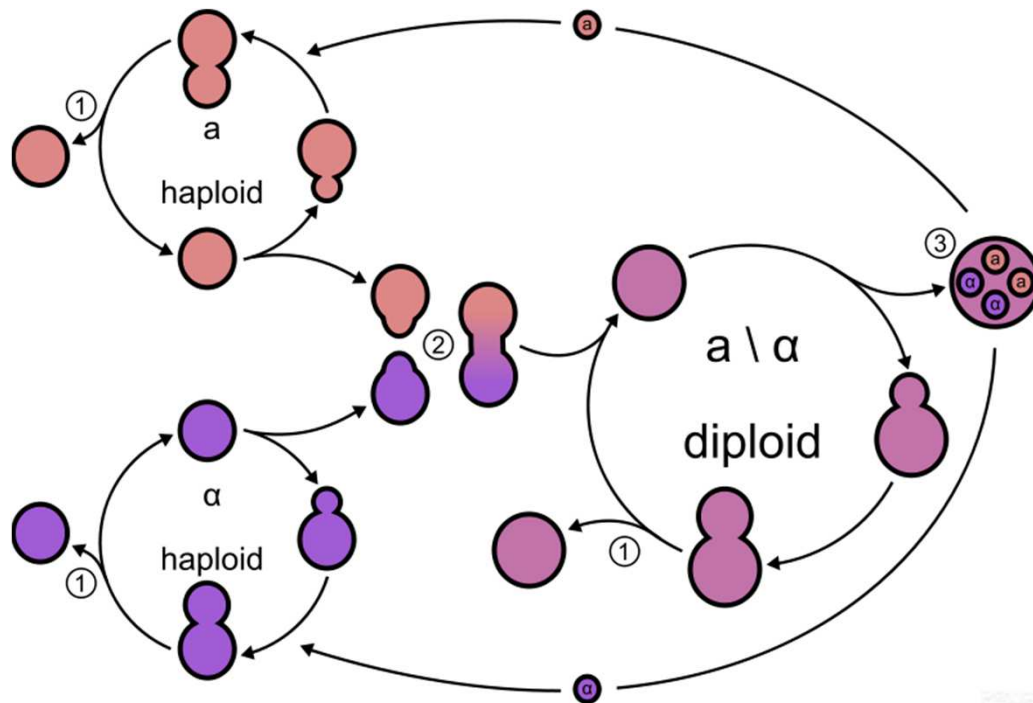
- v haploidní buňce hrozí suprese defektu proto je lépe používat diploidní buňky (druhá kopie zůstává nezměněná)

- lze připravit dvojitého mutantu křížením haploidních mutantů a poté sporulací diploida

- delece esenciálního genu lze provést pouze v diploidní buňce (haploidní nepřežije)  
 - po iniciaci sporulace dojde k meiotickému dělení ( $2n \rightarrow 4n \rightarrow 4 \times 1n$ ) a vzniknou 4 haploidní buňky (lze rozdělit mikromanipulátorem – tetrádová analýza)



# Životní cyklus *S. cerevisiae*



- 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

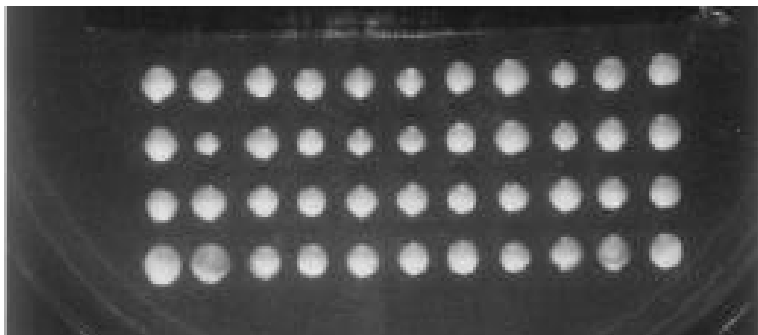
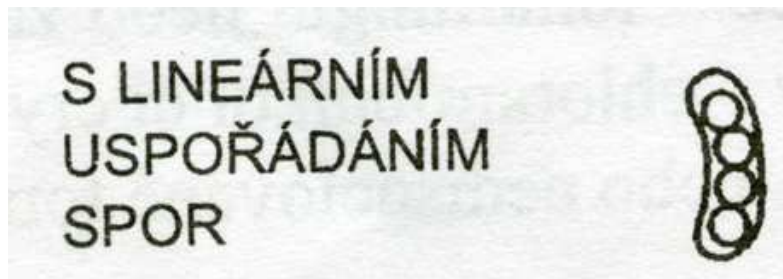
S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR



# Tetrádová analýza

(*S. pombe*)

spory přeneseny tenkou jehlou a  
rozmístěny v pravidelných  
odstupech



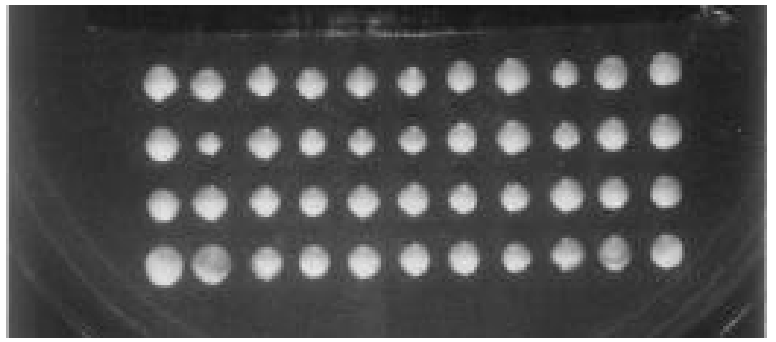
YPD



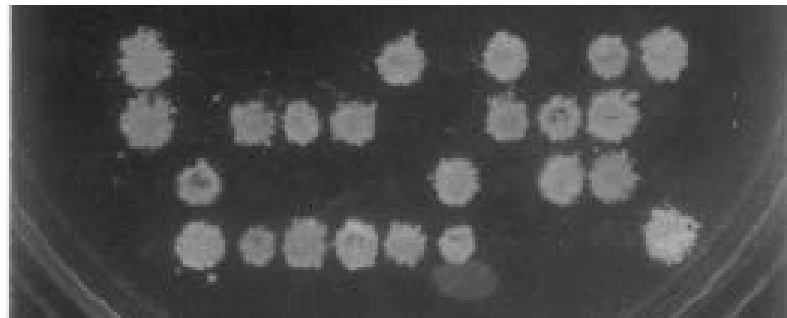


# Tetrádová analýza

2 spory/kolonie normální  
 +  
 2 spory/kolonie mutantní

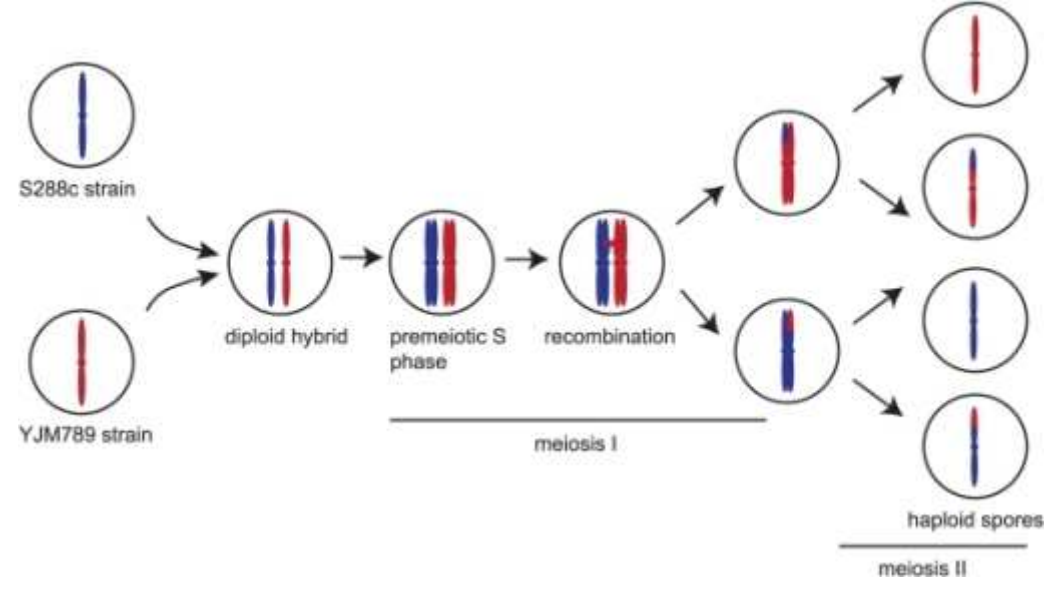


YPD



Selektivní médium (SD-ura ... testy)

a a A A  
 A A a a  
 A a A a  
 A a A a  
 . . . .



# Mendelův základní pokus

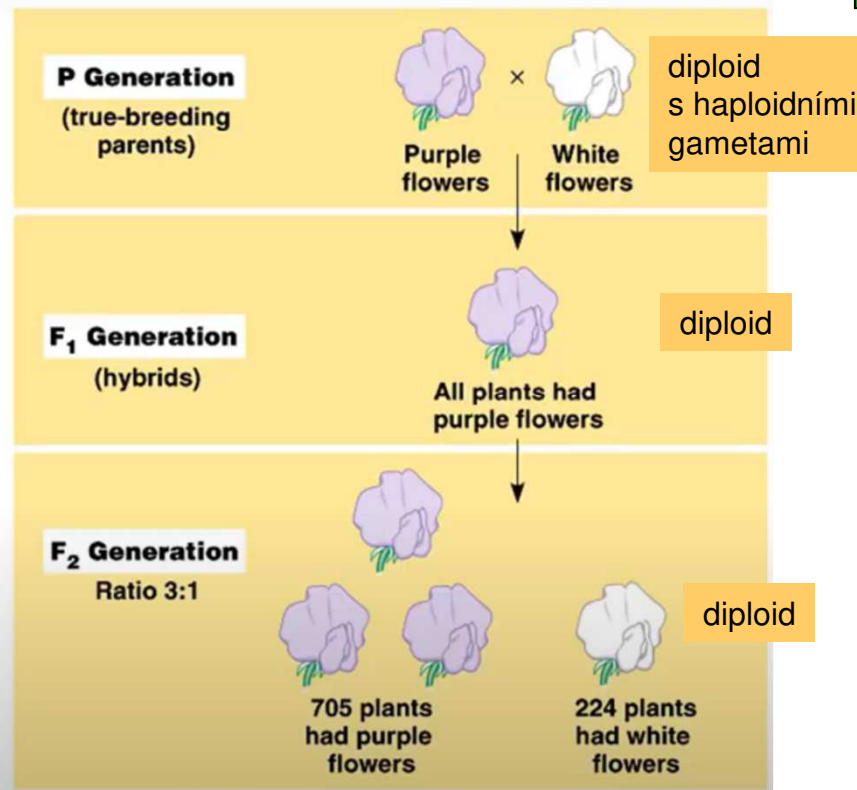
s hrachem (diploidní)

s kvasinkami (haploidní)

P generace =  
parentální, rodičovská

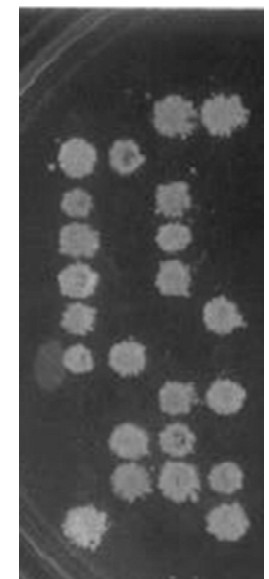
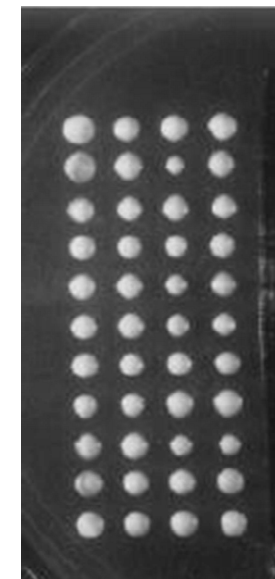
F<sub>1</sub> generace = první  
filiální generace (filius  
= syn)

F<sub>2</sub> generace = druhá  
filiální generace



kontrola

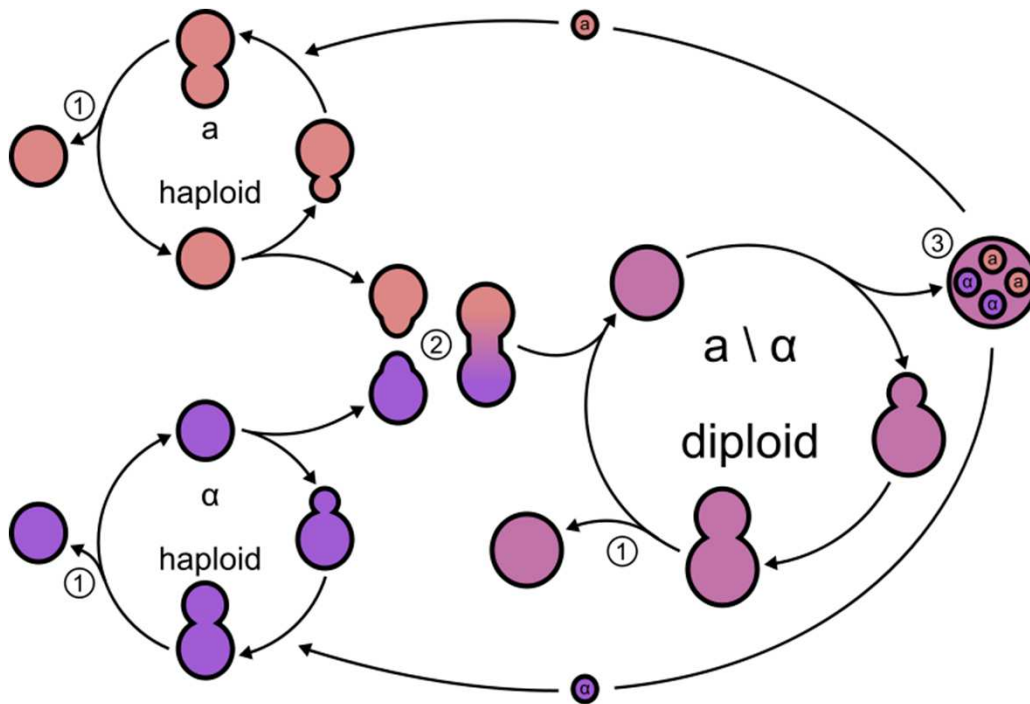
bez uracilu



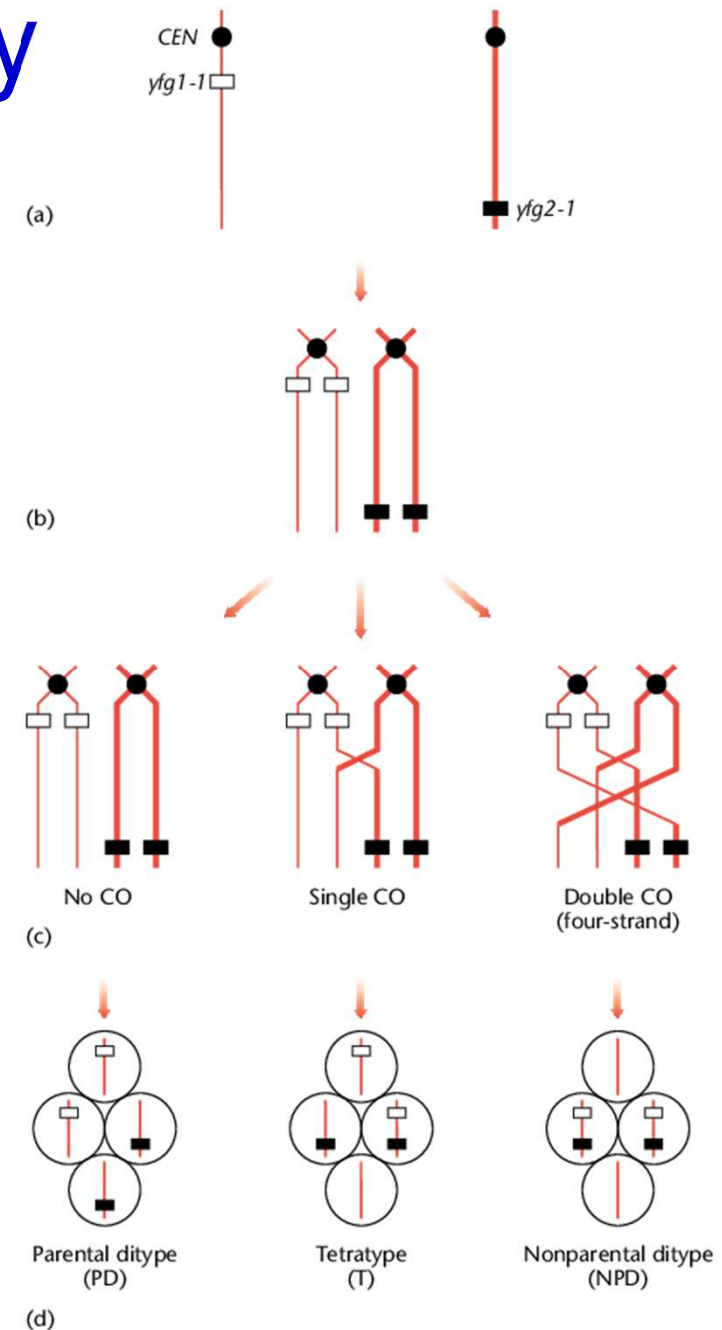
Jak by dopadl Mendelův pokus s URA3?

s ade2 by byly červené

# Křížení - dvojité mutanty



- lze připravit dvojitého mutantu křížením haploidních mutantů a poté sporulací diploida
- frekvence typů závisí na vzájemné pozici genů – různé chromosomy => nezávislá segregace vs stejný chromosom (Morganovy zákony – čím blíže, tím méně cross-over)





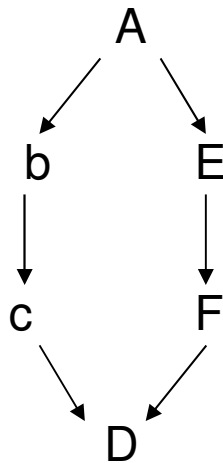
# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

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

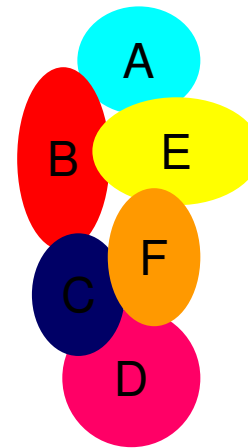
- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

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

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



metabolické ... dráhy

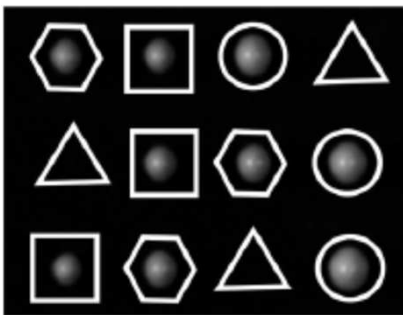
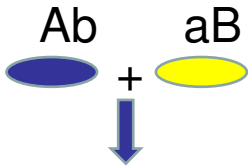


proteinový komplex

Mutagenese pomocí EMS ... 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 ...

# Dvojité mutanty – funkční příbuznost



aB Ab AB ab

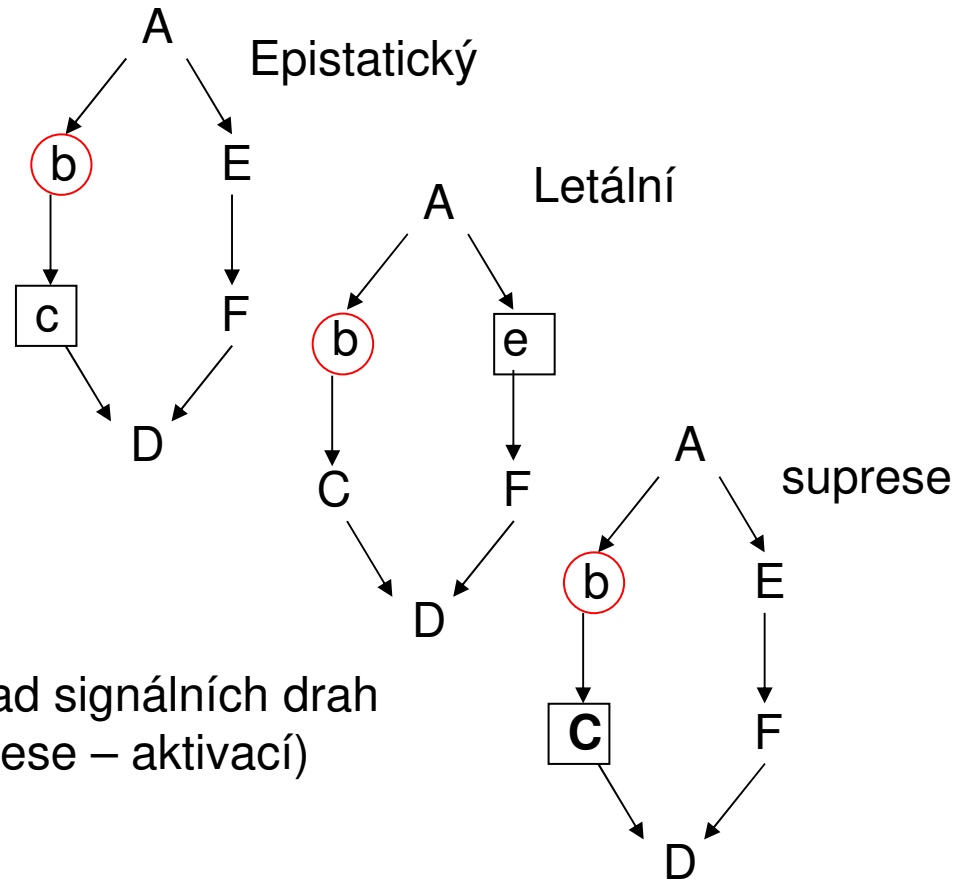
ab Ab aB AB

Ab aB ab AB

- AB
- Ab
- ⬡ aB
- △ ab

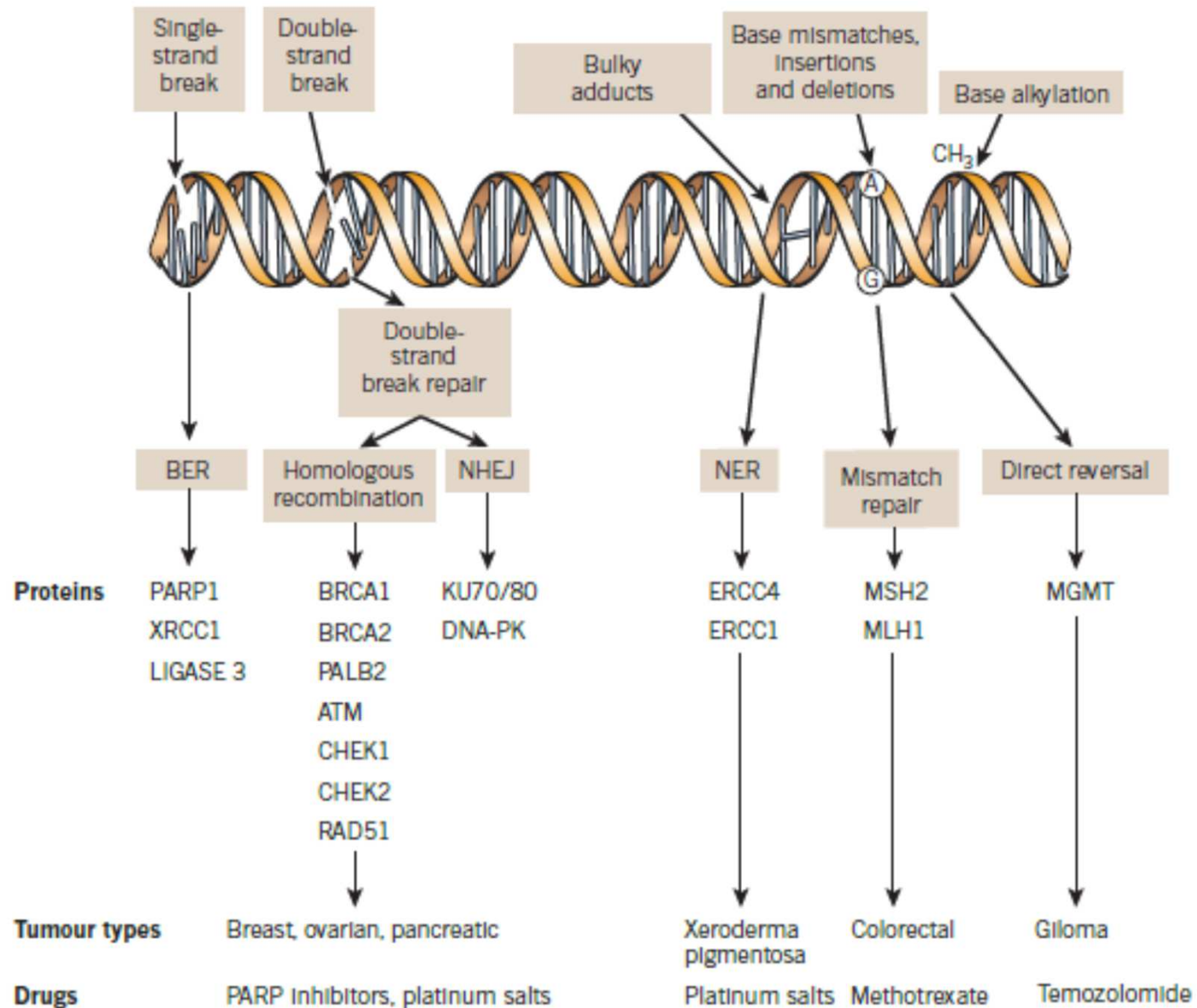
kombinace těchto mutací je synteticky letální

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



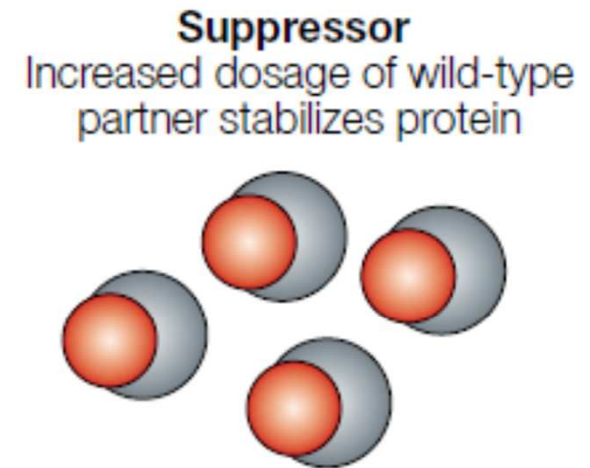
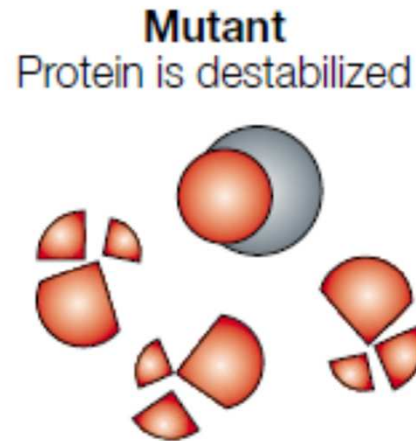
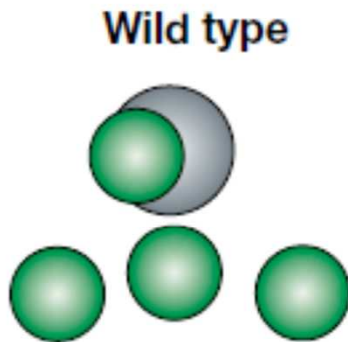
Příklad signálních drah (suprese – aktivací)

# Syntetická letalita v léčbě rakoviny

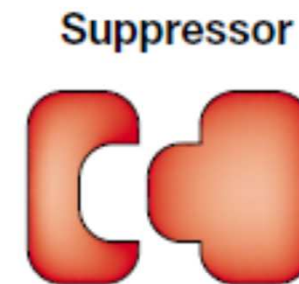
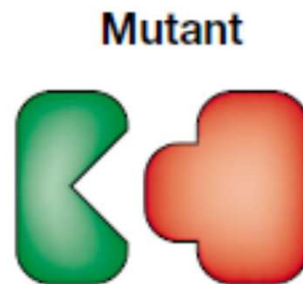
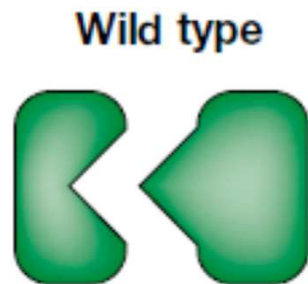


# Supresory

## a Dosage suppressor: rescues in high copy

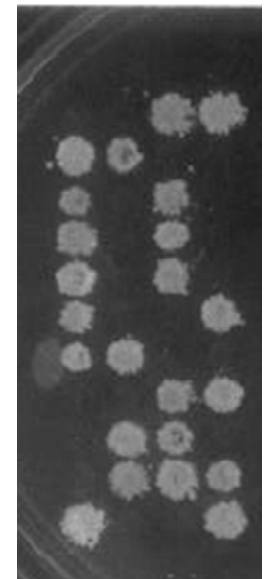
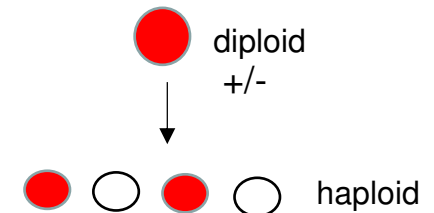


## b Interaction suppressor: allele specific, gene specific



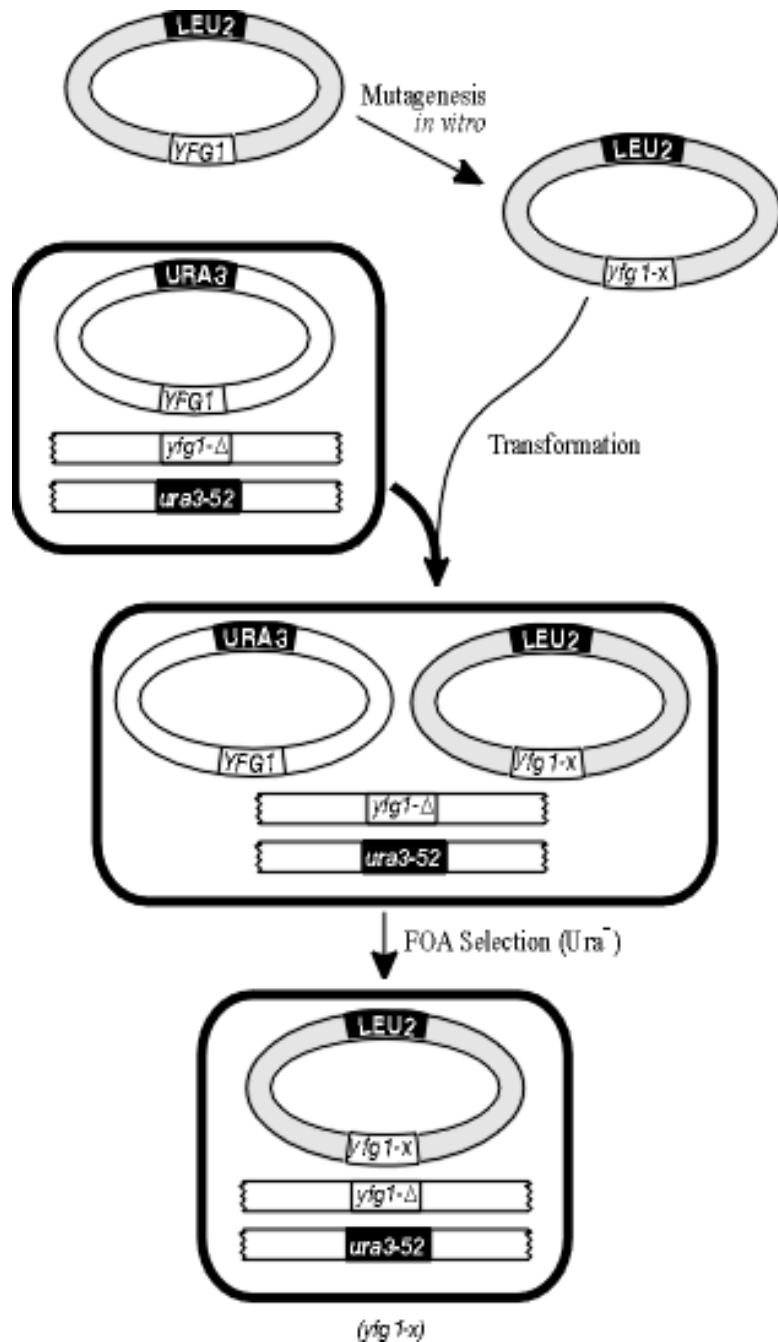
# Esenciální geny

- **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



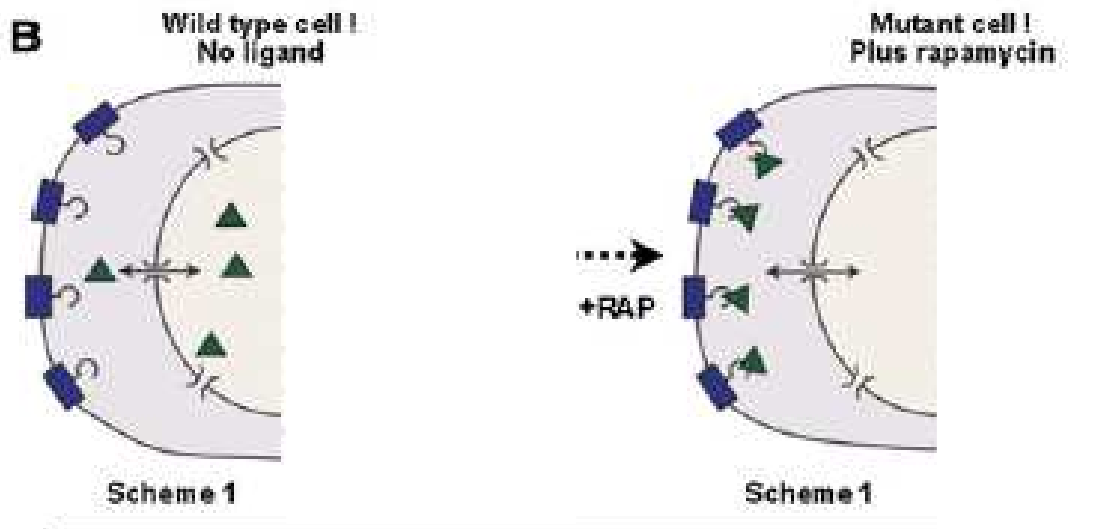
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na *URA3* plasmidu, který lze odstranit (pomocí *FOA*) – analýza terminálního fenotypu

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

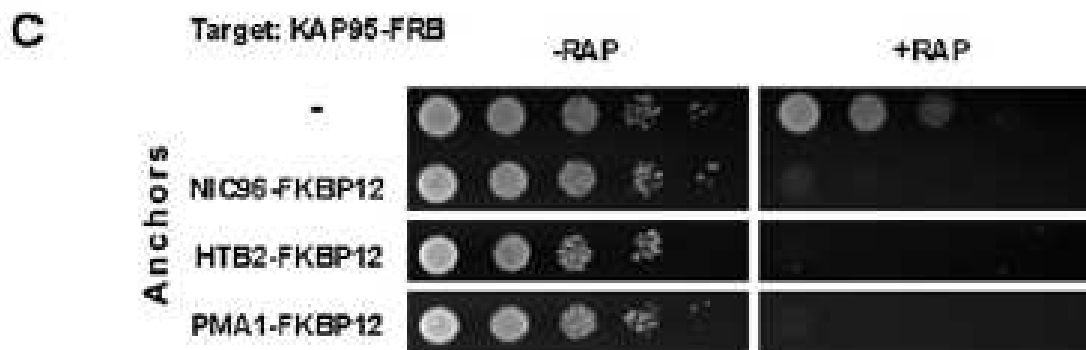
Lze připravit hypomorfní mutanty (včetně *ts*)

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)

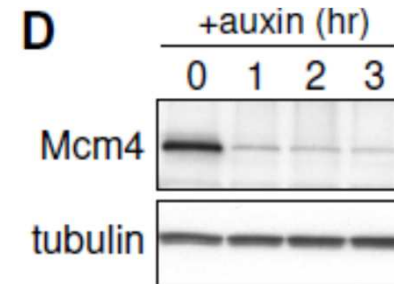
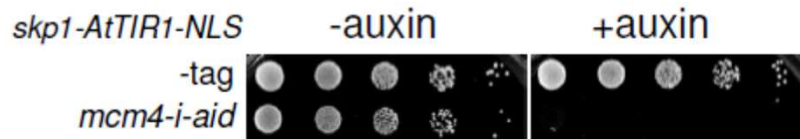
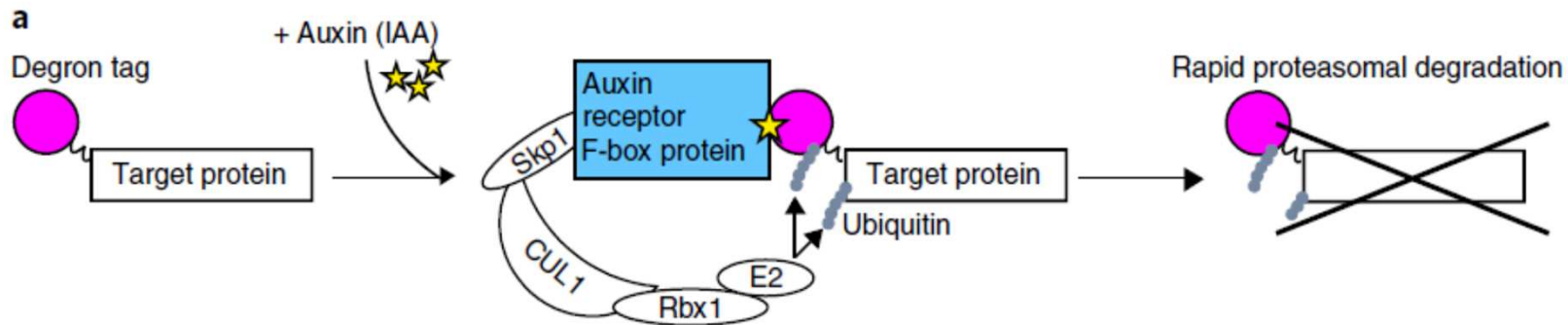
# Rychlé vyřazení proteinu z funkce - relokace



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



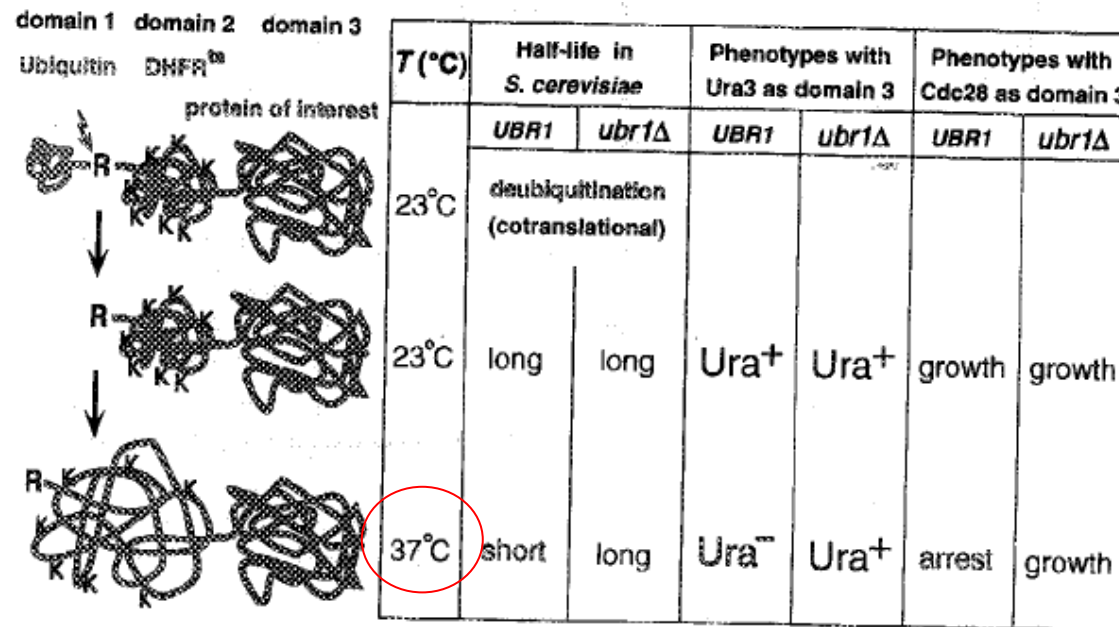
# Rychlé vyřazení proteinu z funkce - degradace



protein je cíleně degradován (vyřazen z funkce)

# 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.

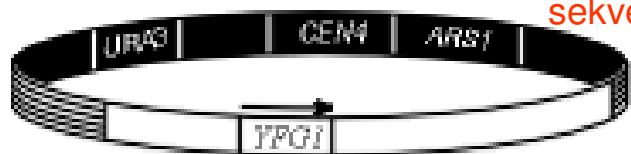
Isolate *Ura<sup>+</sup>* transformants and score for *Yfg<sup>+</sup>*



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



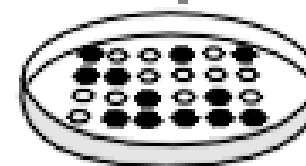
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad



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

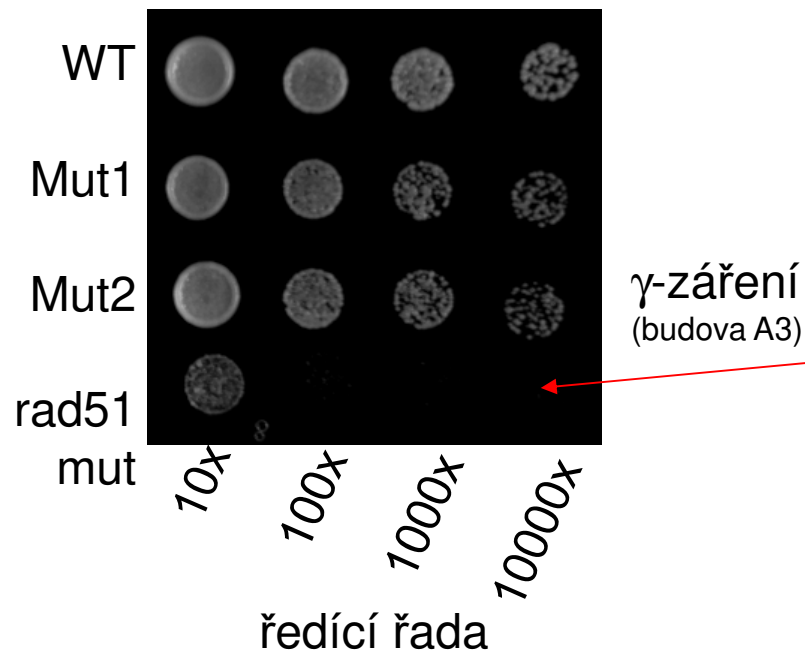


Počet mutací

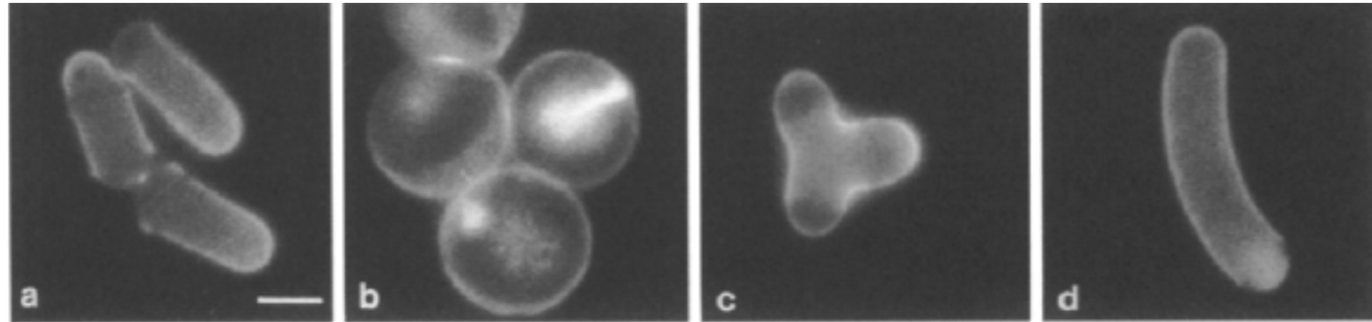


- Studium metabolických drah (*URA, GAL ...*)
- ... flokulace, aglutinace (*FLO, AGA ...*)
- ... **sekrece**, endocytózy, morfogeneze (*SEC, END ... ORB*)
- ... mechanismu párování (*STE ...*)
- ... vlivu záření na buňky ... *rad* mutanty (např. *RAD21*, *RAD50*, ***RAD51***)
- ... buněčného cyklu (***CDC ...***)

**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 růst)

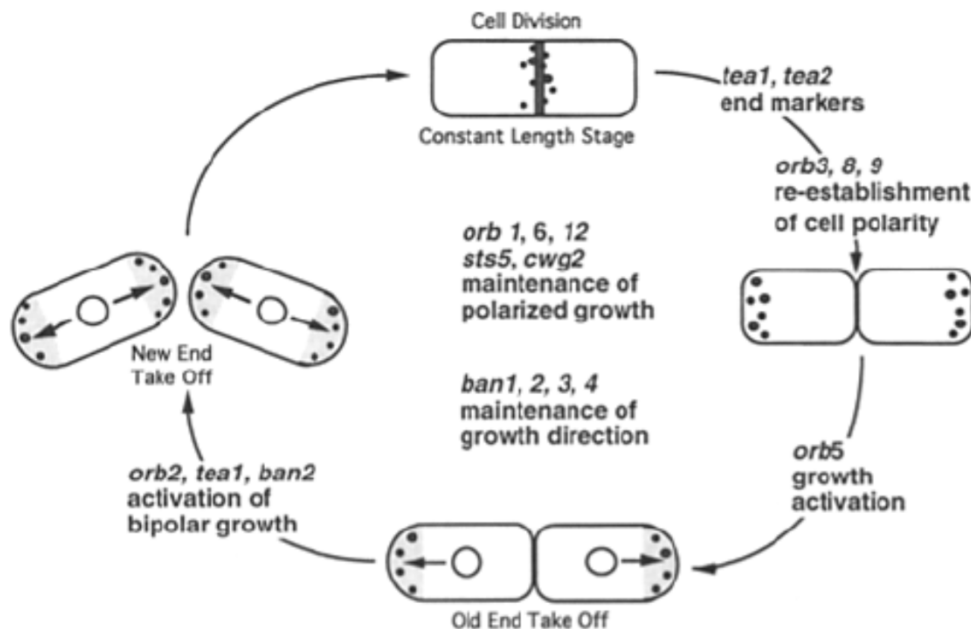


Table I. *orb* Genes

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</i> <sup>+</sup> , <i>pyp1</i> <sup>+</sup>
<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</i> <sup>+</sup> , <i>pyp1</i> <sup>+</sup> , <i>ras1</i> <sup>+</sup>

# 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

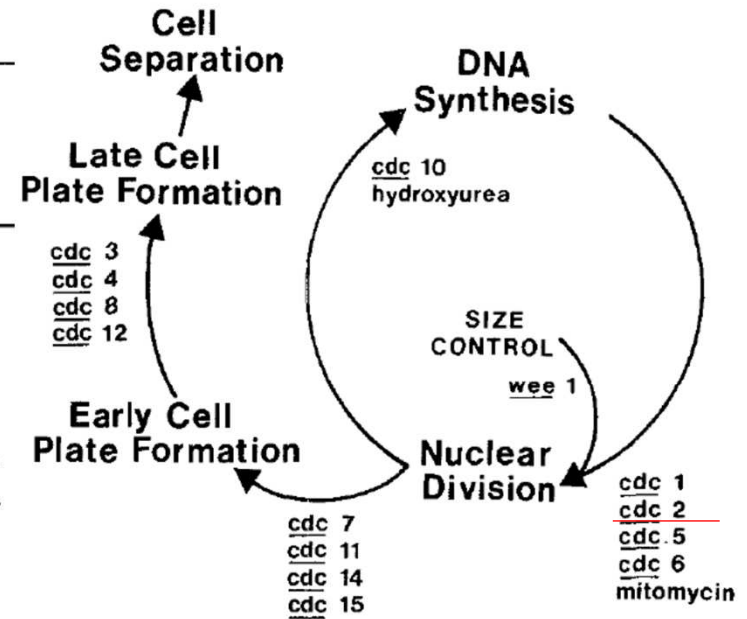
**Paul Nurse** studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



**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

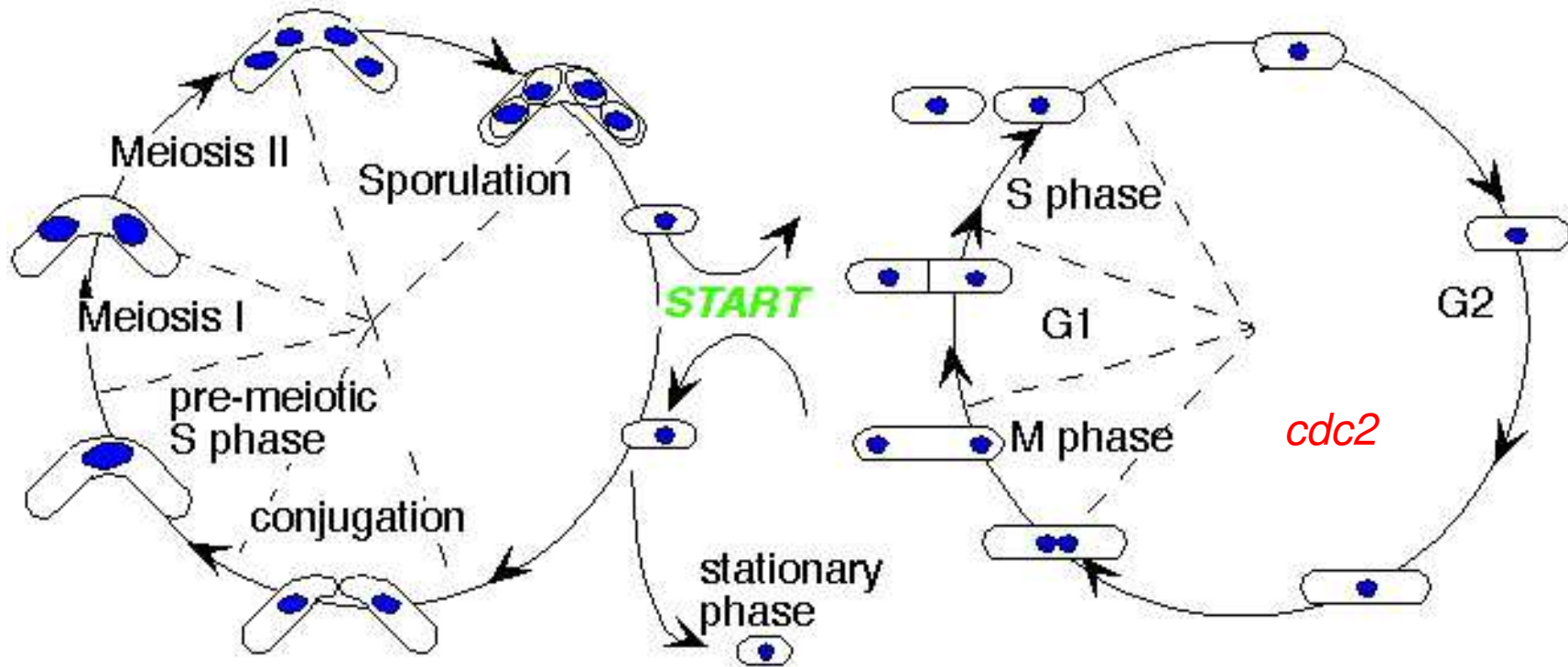
Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C <sup>a</sup>	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky <sup>b</sup>
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky <sup>b</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)



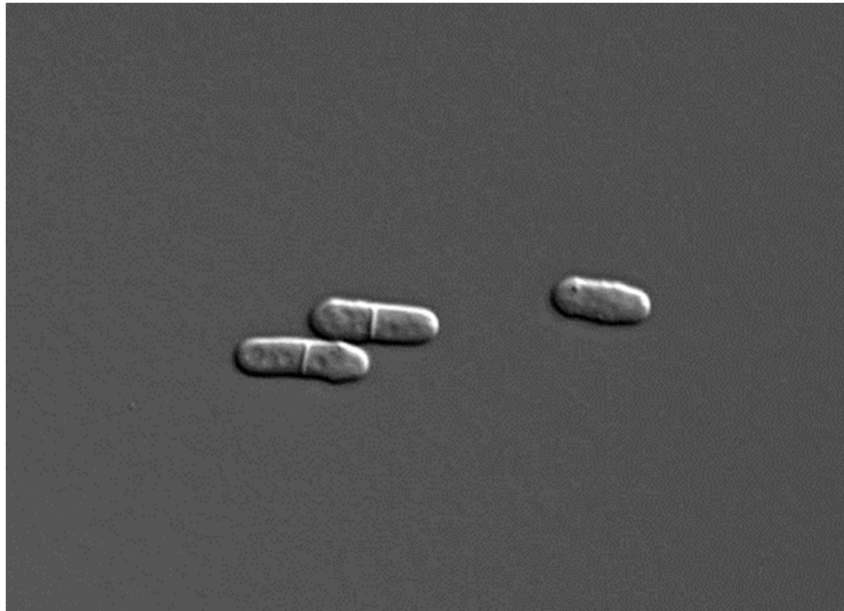
*Meiotic cycle*

*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*



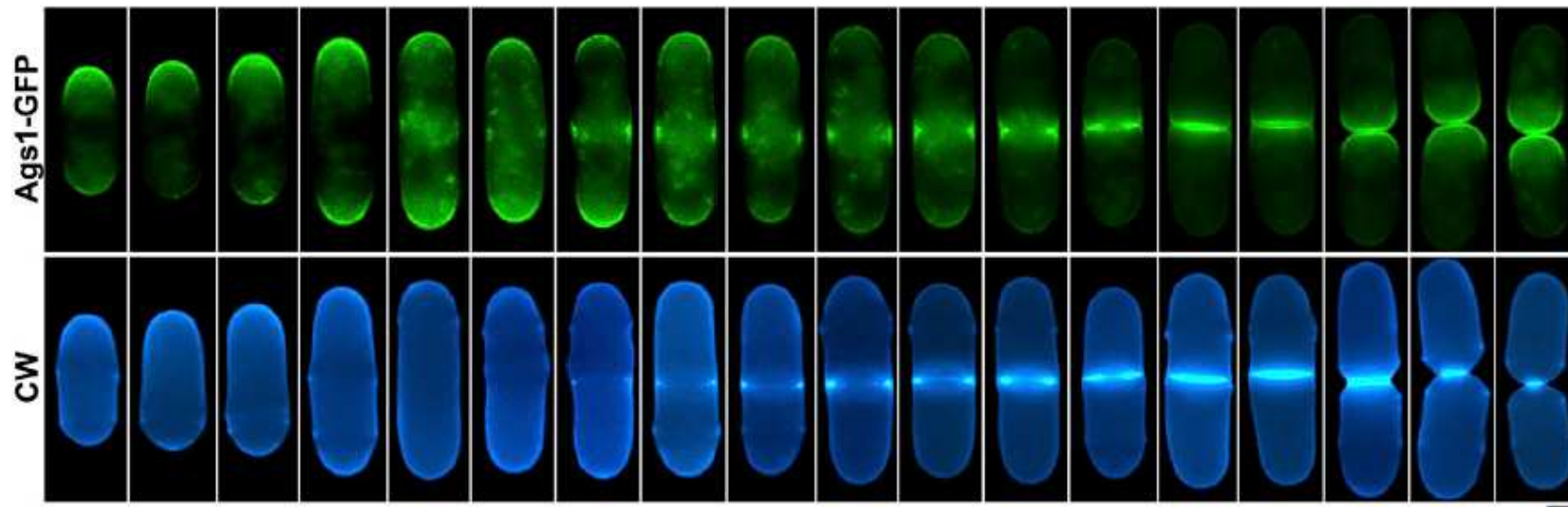
# *S. pombe*



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

- Více prof. Svoboda

Cortes et al, JCB, 2012

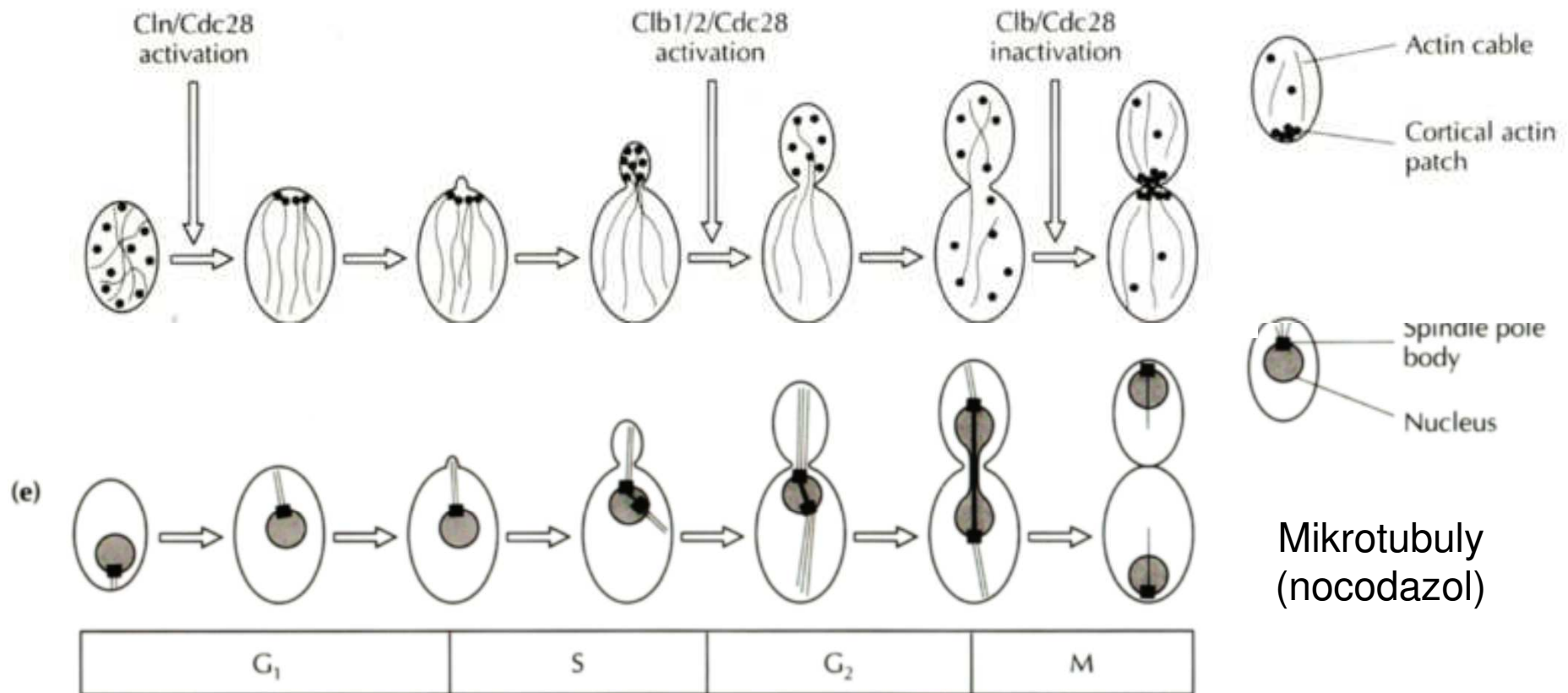


# *S. cerevisiae*



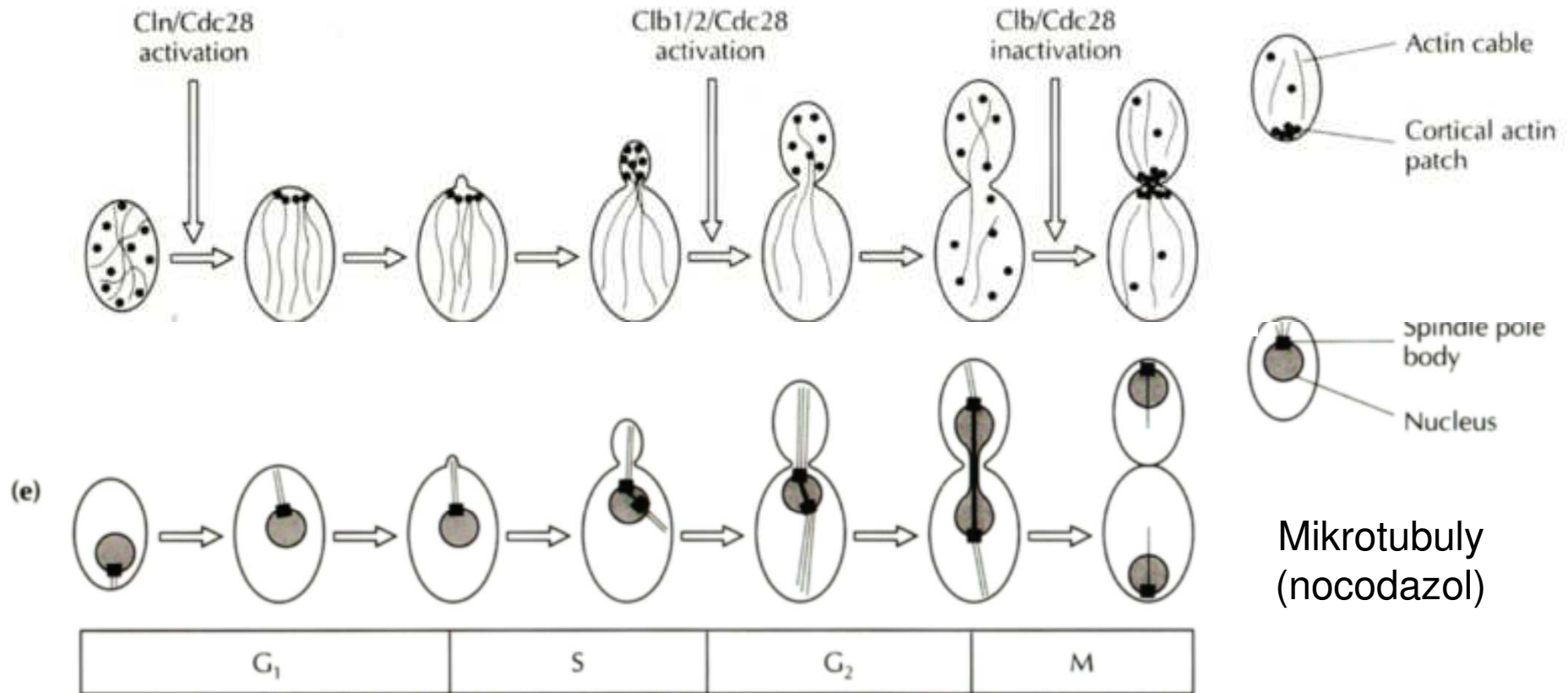
pučení ... párování (shmoo)

# 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**

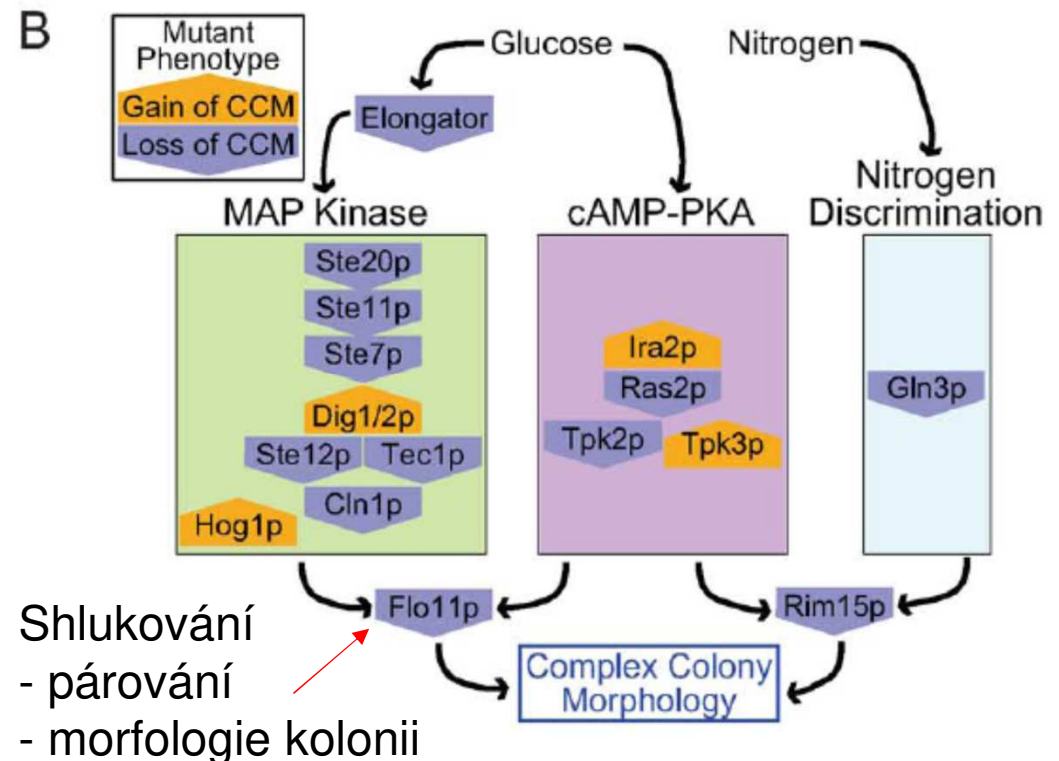
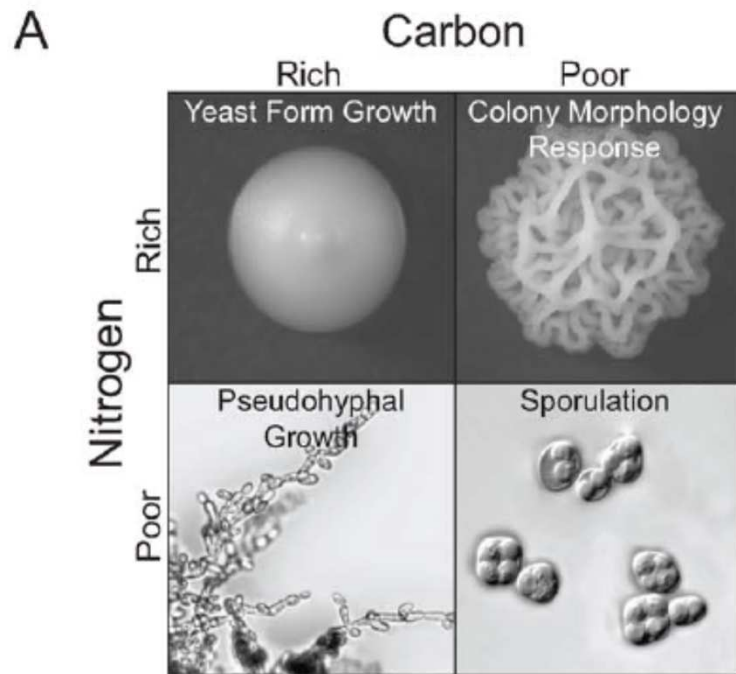
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

- 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



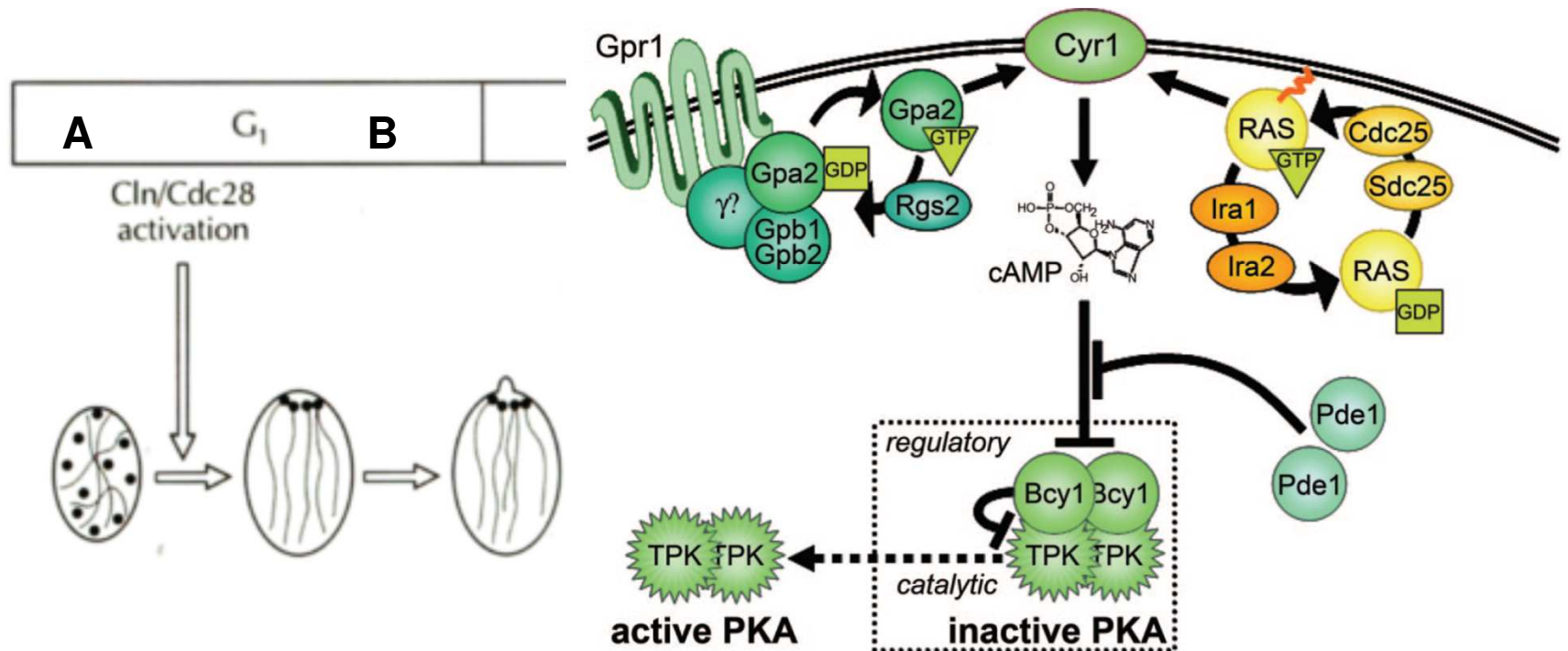
Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)



# G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

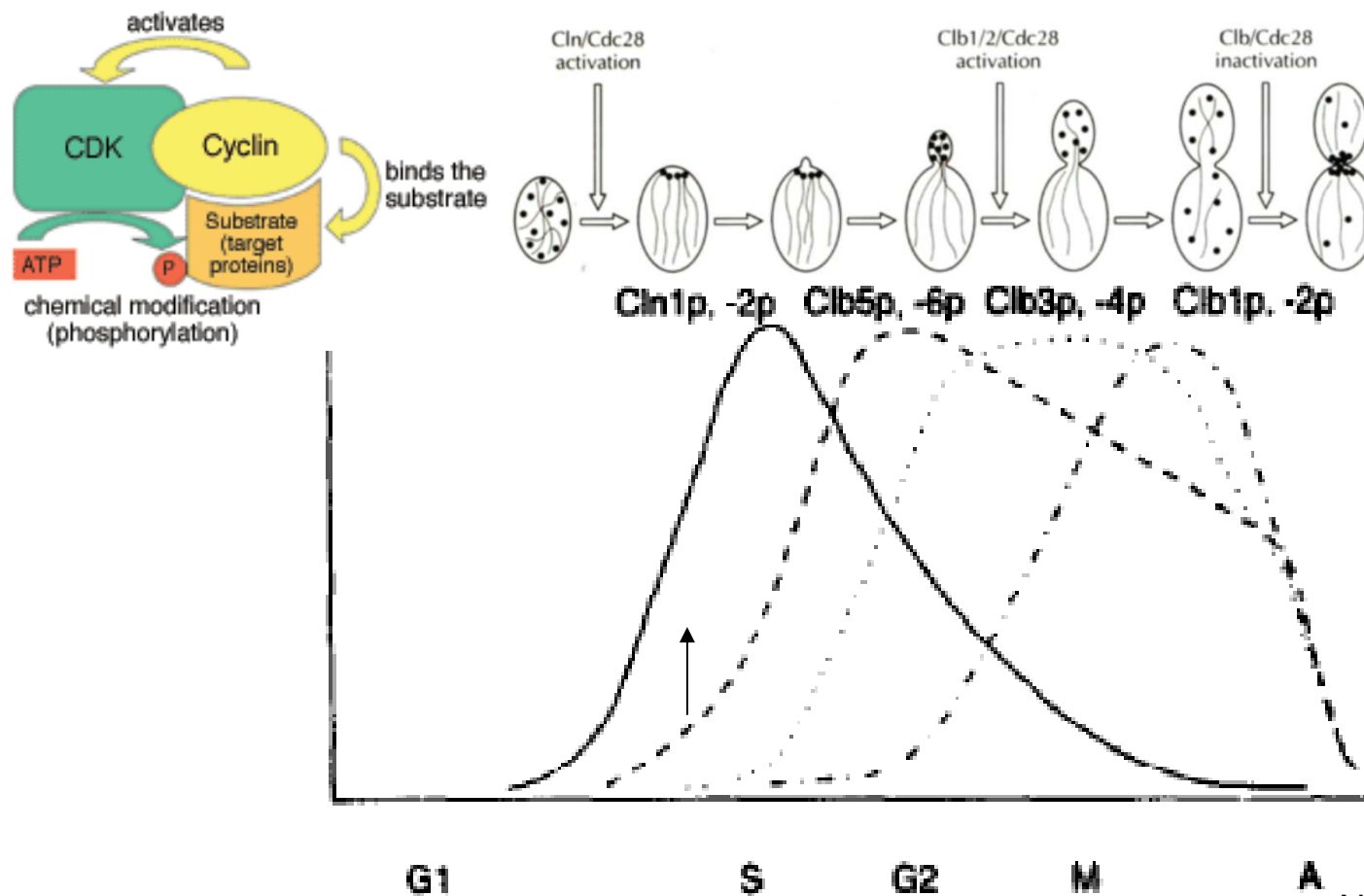
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



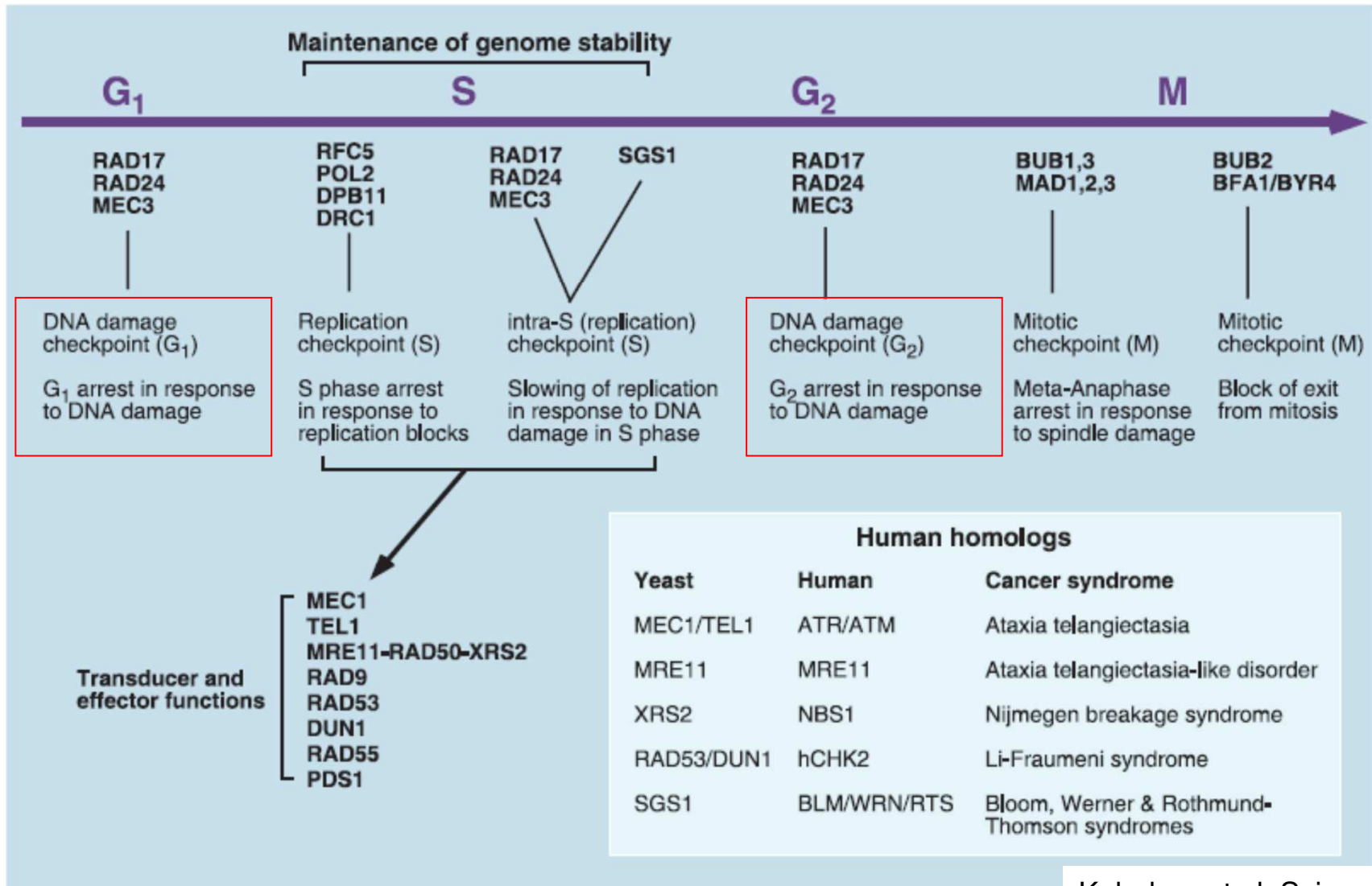
# CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakcí fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká **aktivní kinasový 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



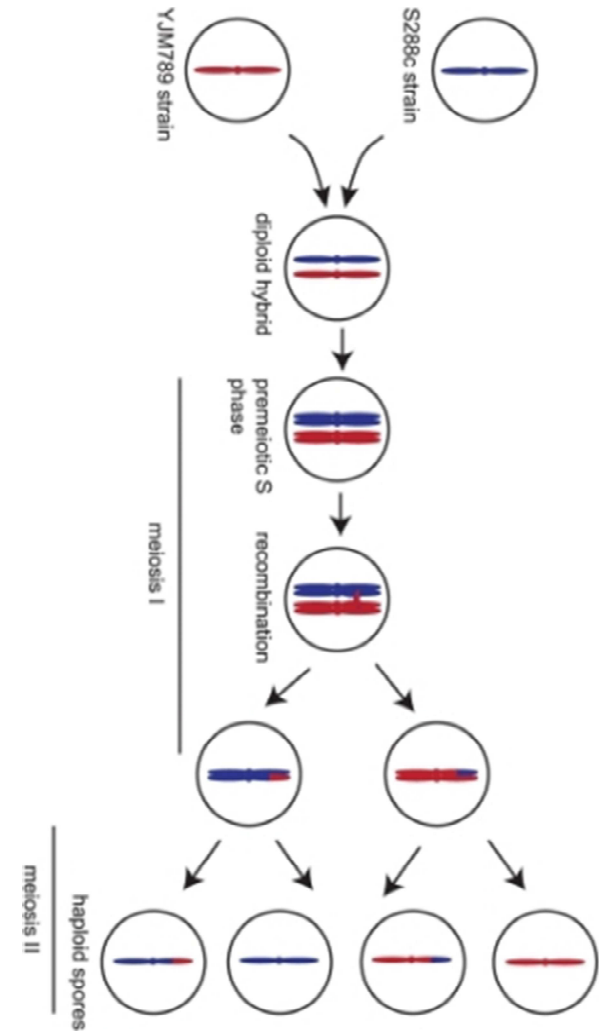
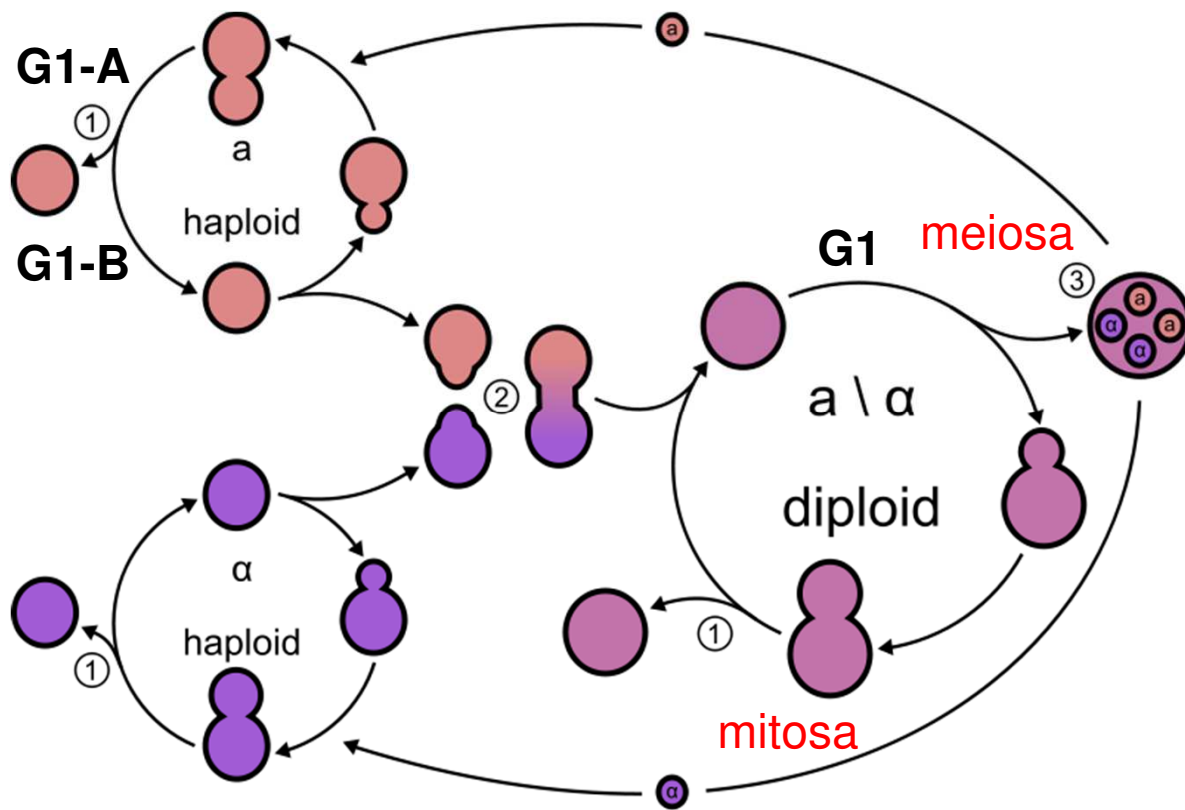




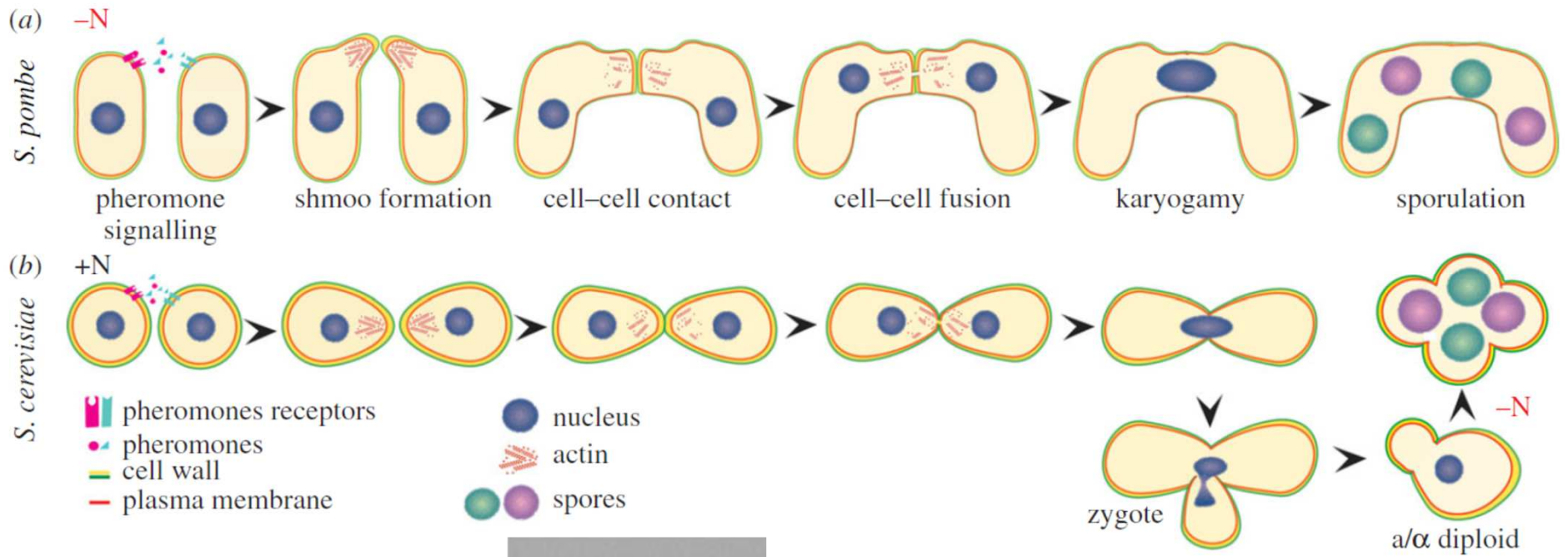
Kolodner et al, Science (2002)

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)

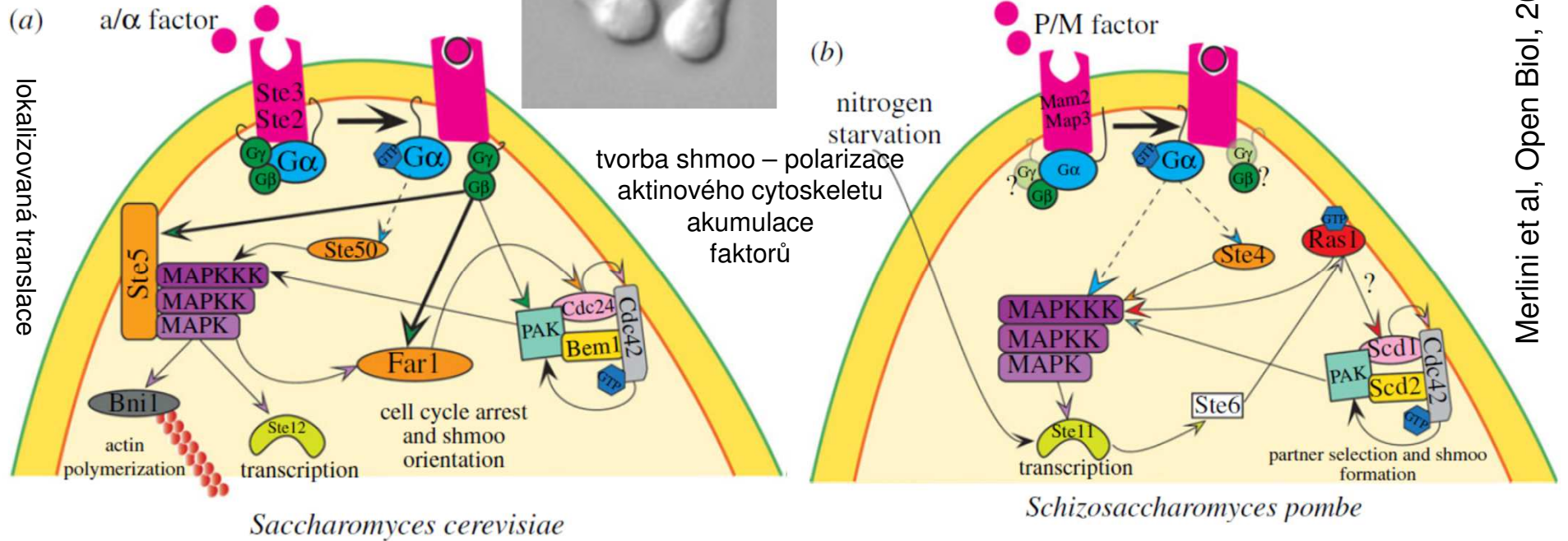
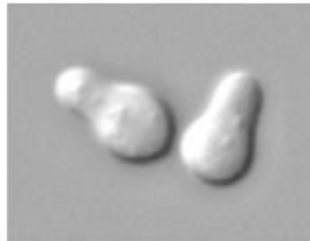
# Párování/mating kvasinkových buněk



- 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

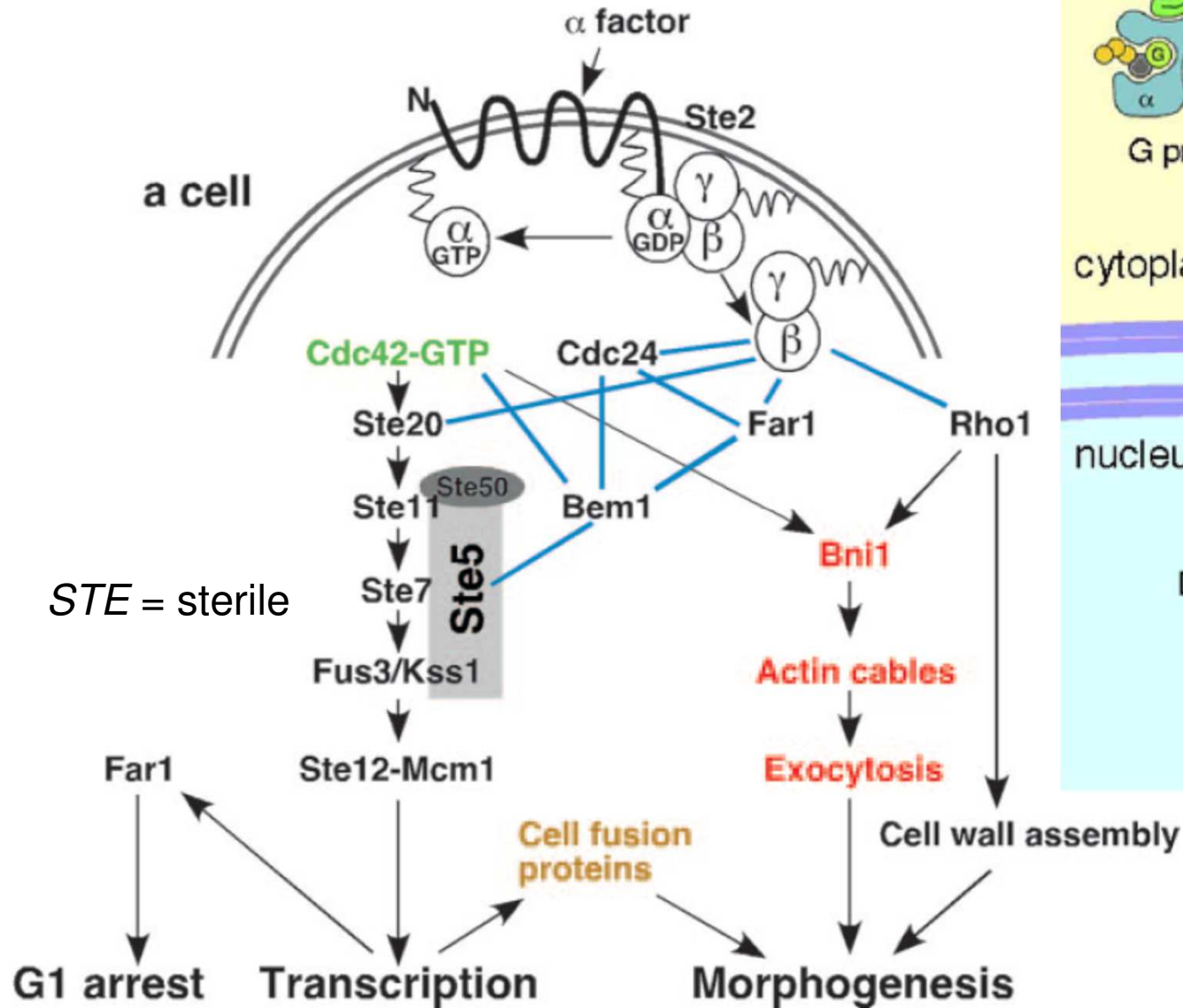


**STE = sterile**



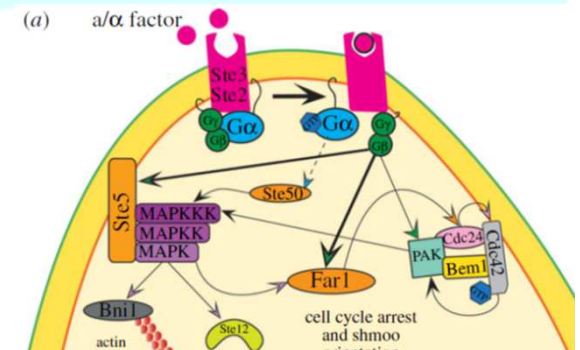
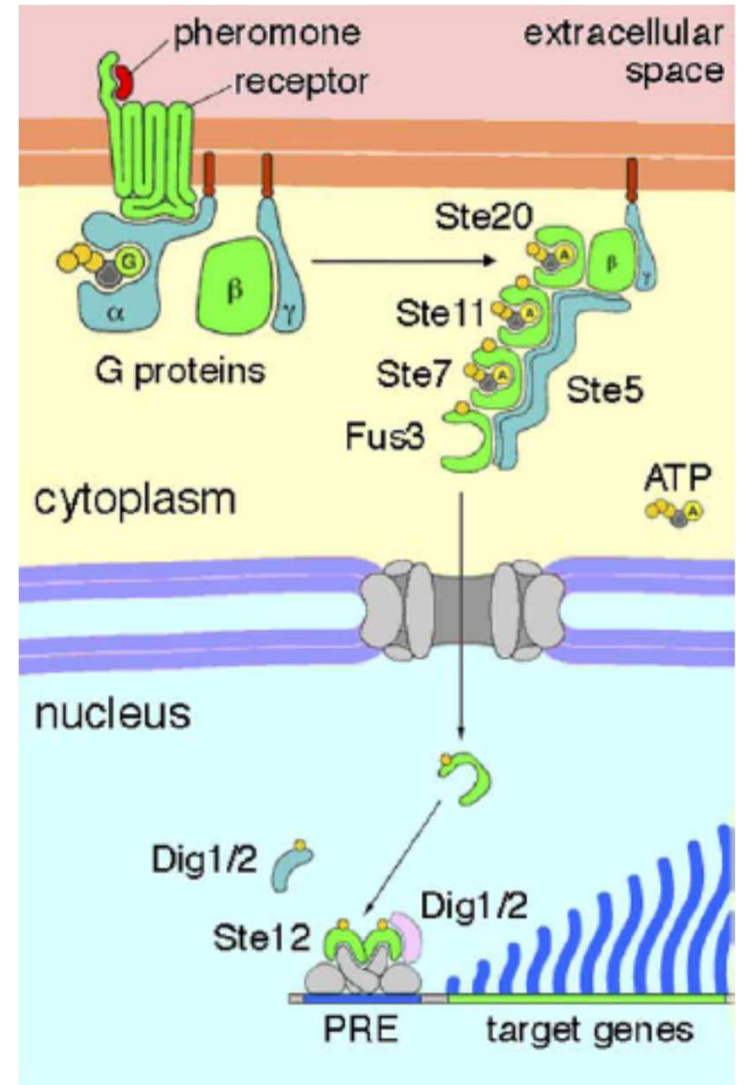


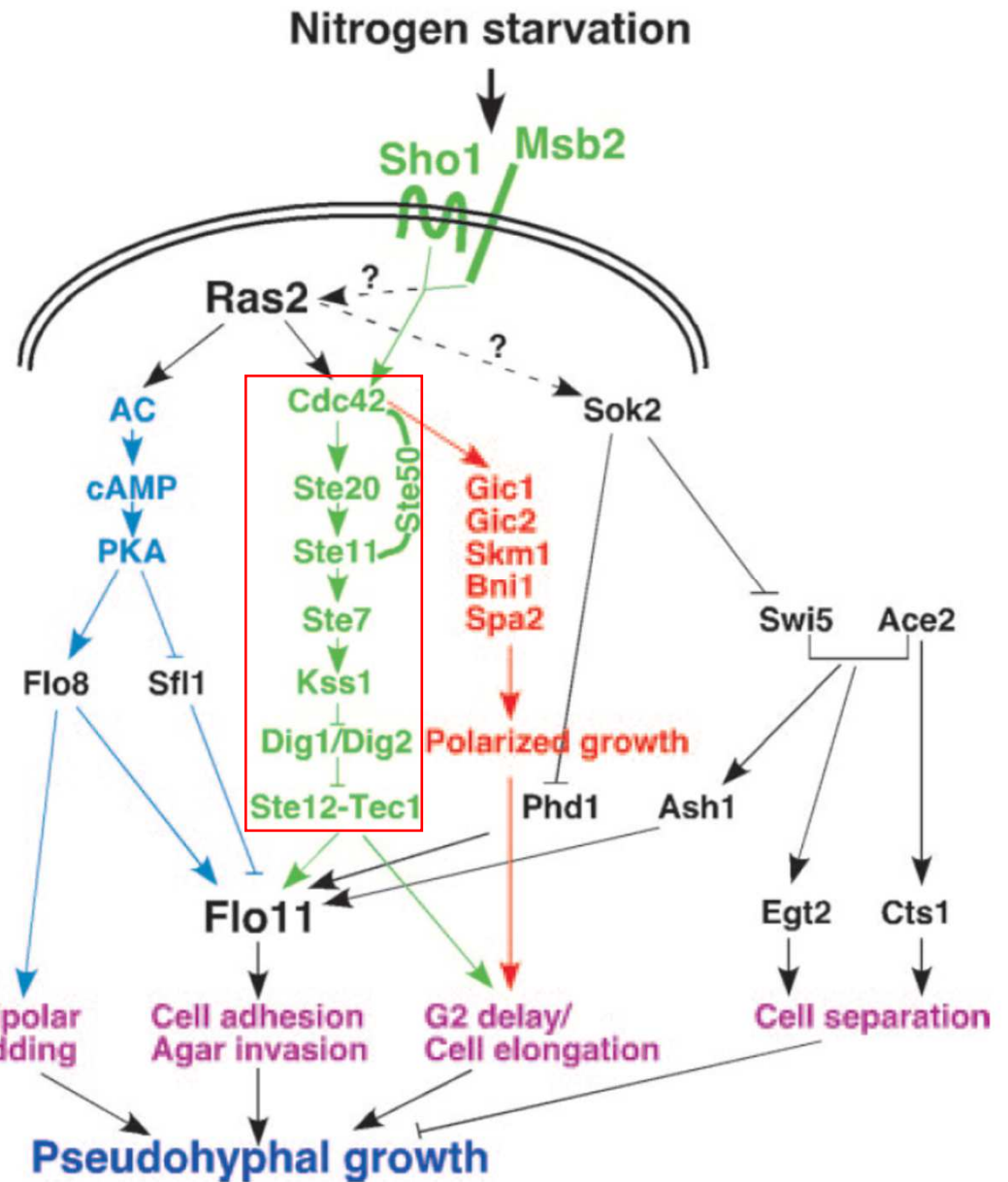
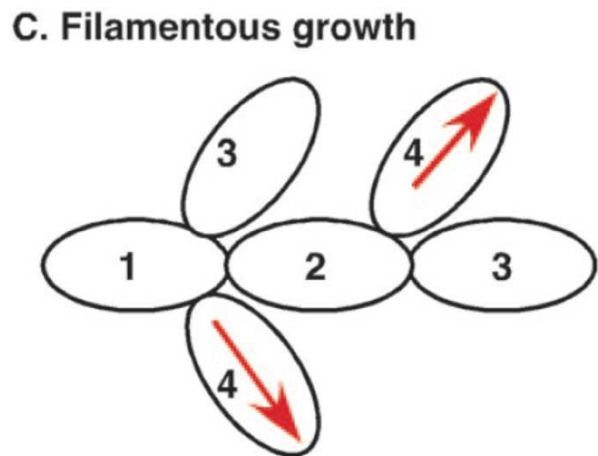
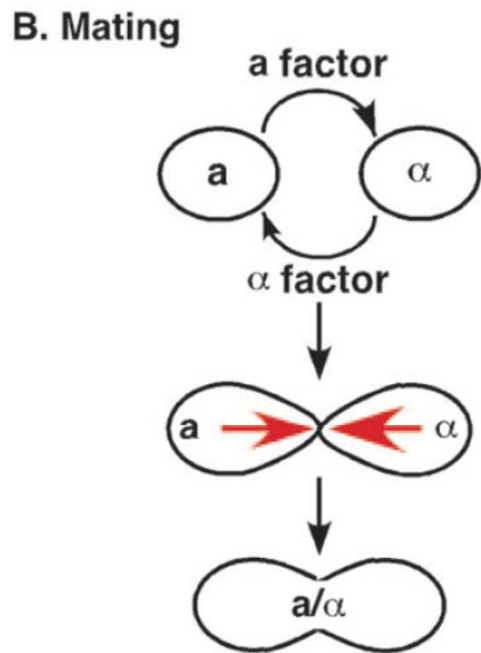
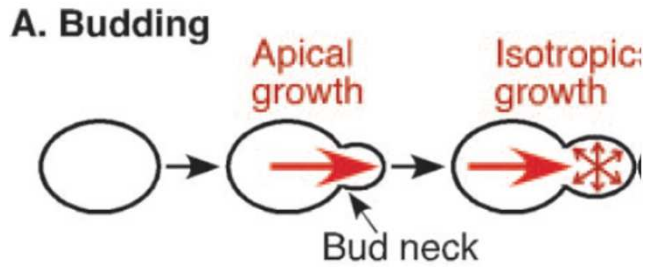
# Signální dráha – $\alpha$ faktor



transkripce ... příště

Park et 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

