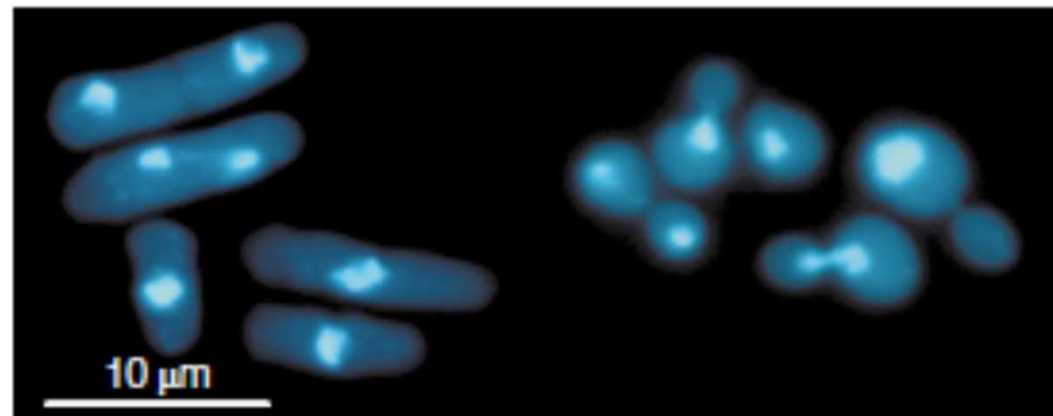


16.09.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
23.09.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
30.09.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
07.10.2021	8-9.30hod	C02-211	Dr. Spirek	Mitochondrie, chromosomy
14.10.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
21.10.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
28.10.2021				
04.11.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
11.11.2021	8-9.30hod	C02-211	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
18.11.2021	8-9.30hod	C02-211	prof. Svoboda	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
25.11.2021	8-9.30hod	C02-211	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
02.12.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Organizace genomu a evoluce kvasinek
09.12.2021	8-12hod	B07-2.17	Svoboda+Paleček	Cvičení k přednáškám
16.12.2021	9-12hod	A2-2.11	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky

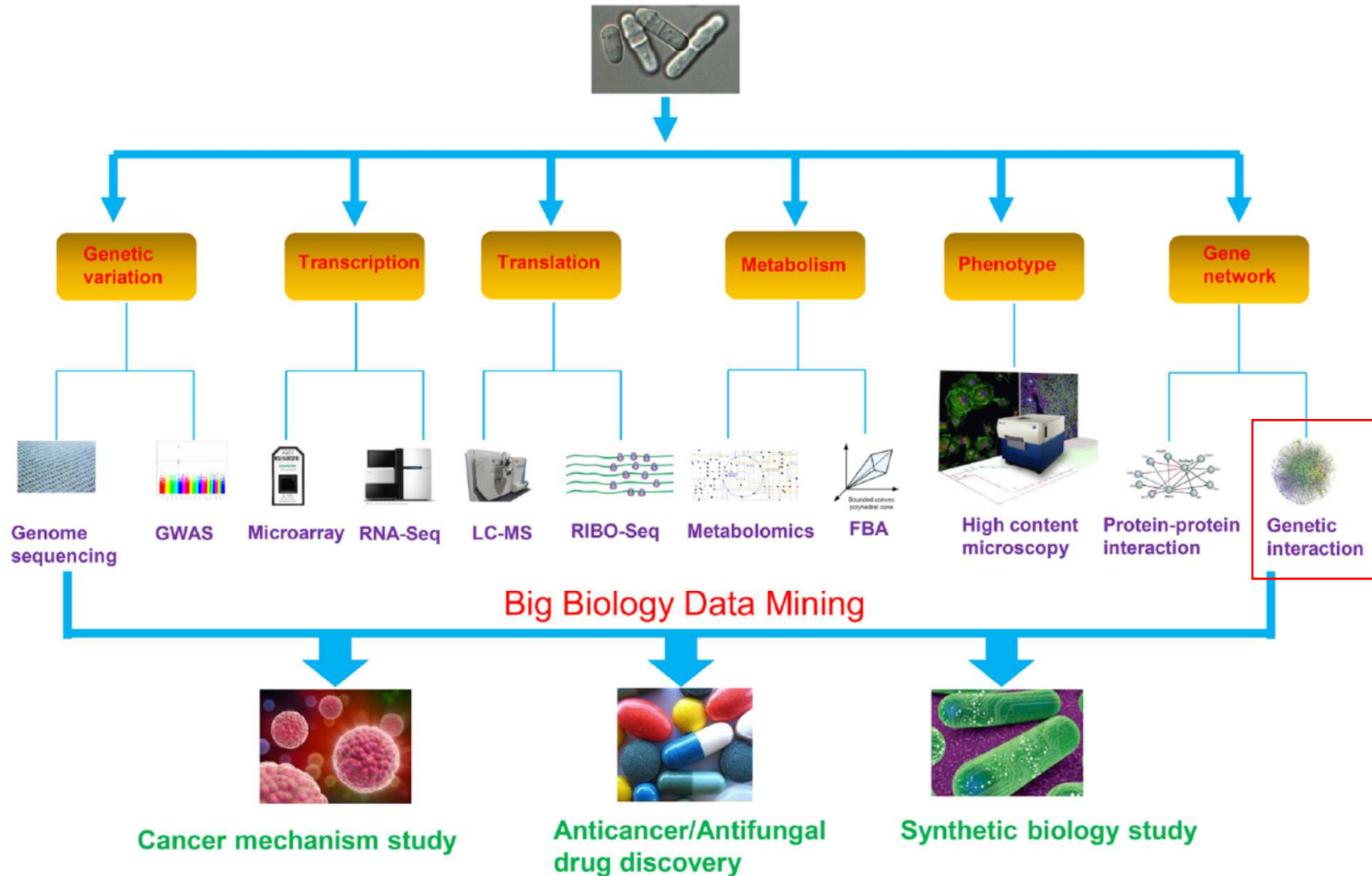
Osnova 4. přednášky

GENETIKA

- Plasmidy
- Integrace do genomu
- Nadprodukce, delece
- Tetrádová analýza
- Syntetická letalita, suprese
- Teplotně-sensitivní mutanty



- obecnější poznání (buněčných/molekulárních procesů)
- aplikační účely (biotechnologie)



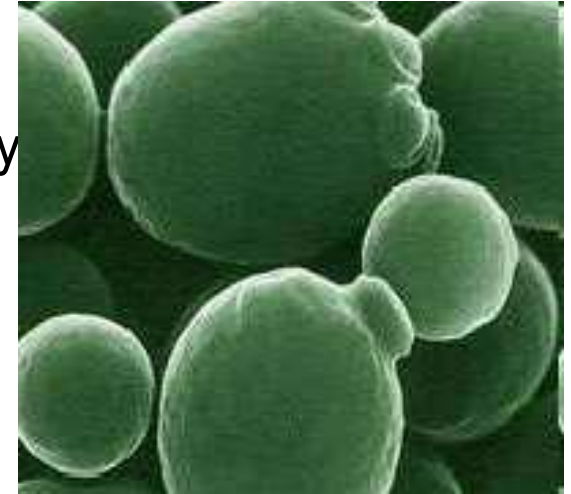
kvasinkové modely

- Rychle se množící **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 a mutantní kmeny**
- Vydrží v >15% glycerolu na -70°C „indefinitely“
- *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)**



Saccharomyces cerevisiae

- oválné, množí se pučením – >diploidní i haploidní buňky
- většina v G1 fázi (zatímco pombe je v G2 fázi)
- Genom 12 Mbp na 16-ti chromosomech
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Kóduje cca 6 500 genů
- 120 kopií rRNA (chr XII), 262 tRNA
- Geny reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- <5% genů obsahuje introny (0.5% genomu), 3% transposony (46% u člověka)



Schizosaccharomyces pombe

- podlouhlé, množí se „polcením“ - většinou haploidní buňky
- má blíže k vyšším eukaryotům (metazoa)
- pouze 3 kondenzované chromozomy (13 Mbp)
- velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace
- tvorba spindlu až v mitóze
- asi 4800 kodujících genů (nejméně u eukaryot)
- z nichž 43% má introny
- má geny pro heterochromatin, RNA interferenci (S.c. nemá)



S. cerevisiae kompaktní genom

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 ately)

LEU2::HIS3 – inzerce

genu HIS3 v lokusu

genu LEU2

Nomenklatura pro S.p.:

SPAXXXX:

SP=S. pombe

A= 1. chromosom

...

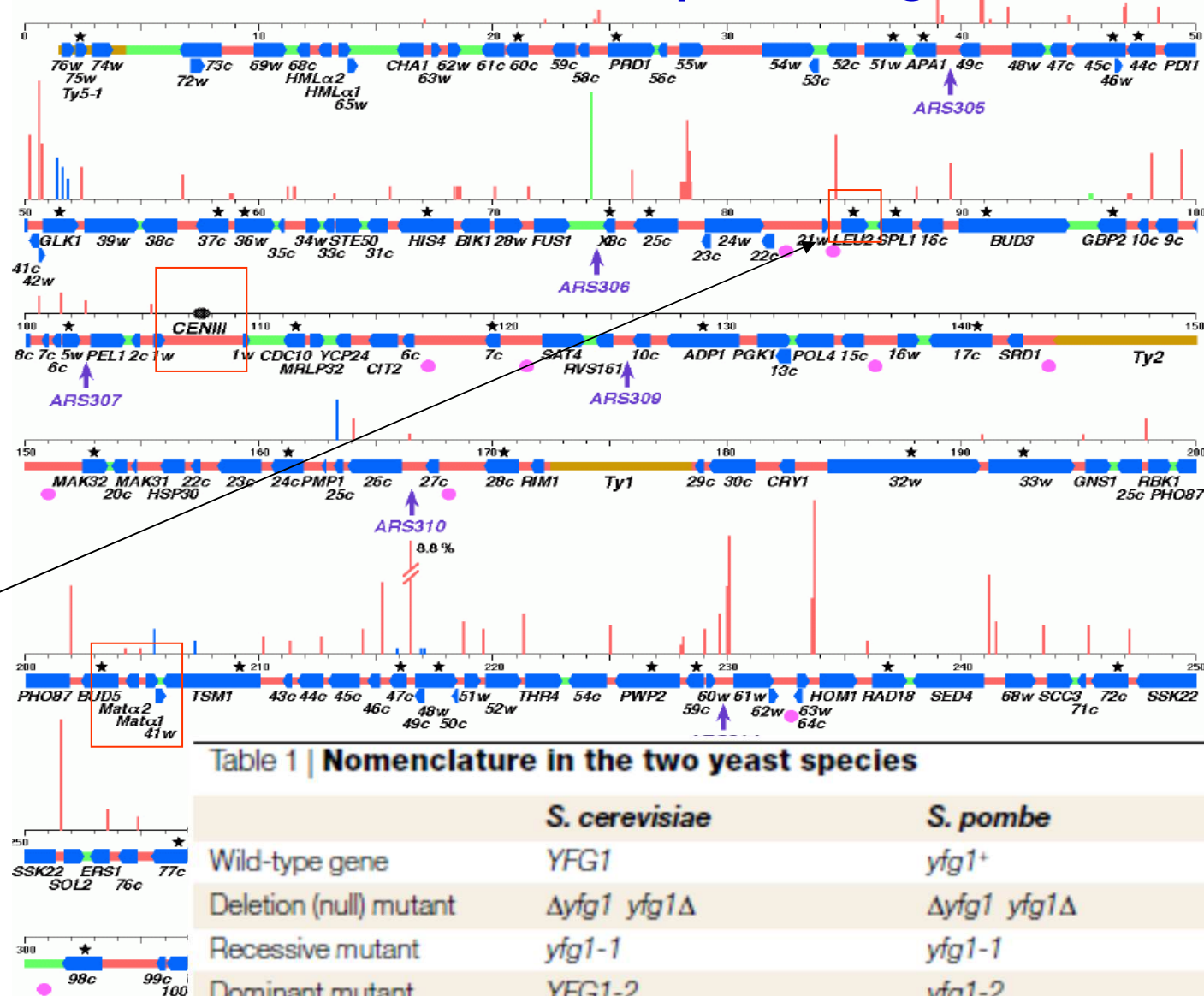


Table 1 | Nomenclature in the two yeast species

	S. cerevisiae	S. pombe
Wild-type gene	YFG1	yfg1 ⁺
Deletion (null) mutant	Δyfg1 yfg1Δ	Δyfg1 yfg1Δ
Recessive mutant	yfg1-1	yfg1-1
Dominant mutant	YFG1-2	yfg1-2
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

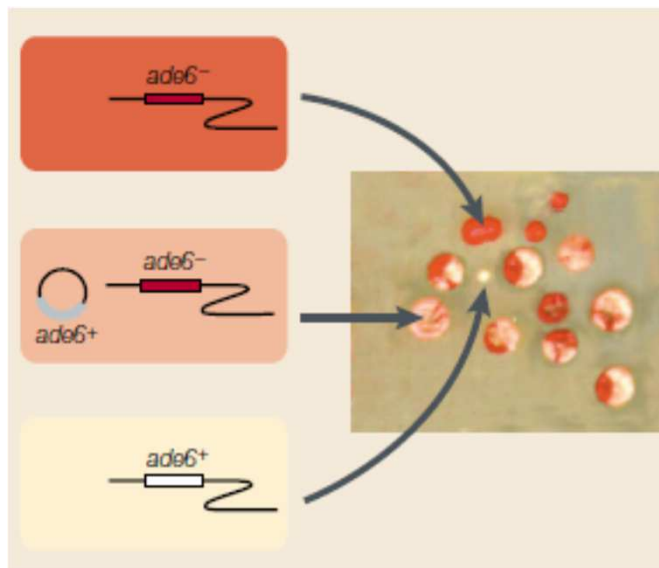
Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

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 (mistranlace)
- **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 kopií na haploidní buňku) segregace (uchycení chromosomu) a začátek replikace
- Bakteriální část – Kan resistance, replikace
- Promotor, tag, MCS
 - Kondicionální mutanty (fenotyp-funkce)
 - Nadprodukce (suprese mutací, toxicita, **biotechnologie**)

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>	Cu induced	
<i>MFA1</i>	MATa specific (haploid specific)	

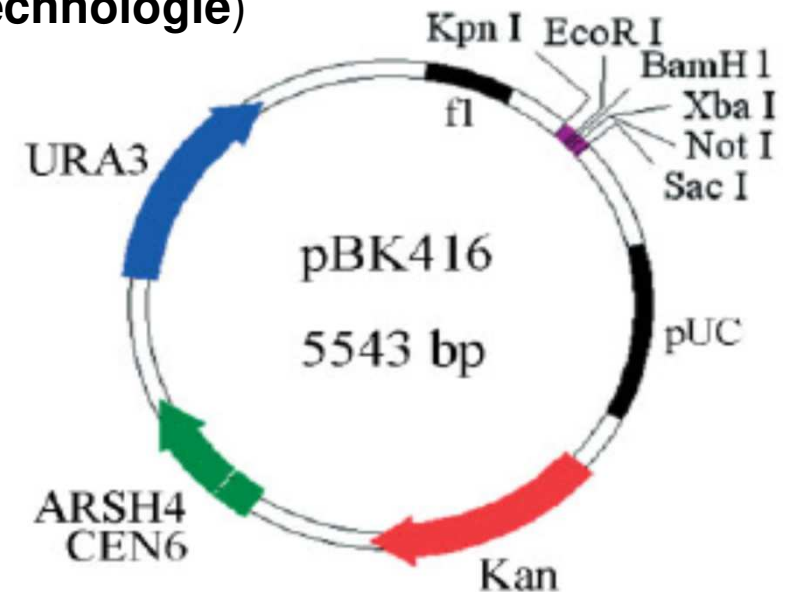


TABLE 2 | Metabolic engineering of yeast to improve the production of fatty acid-derived biofuels.

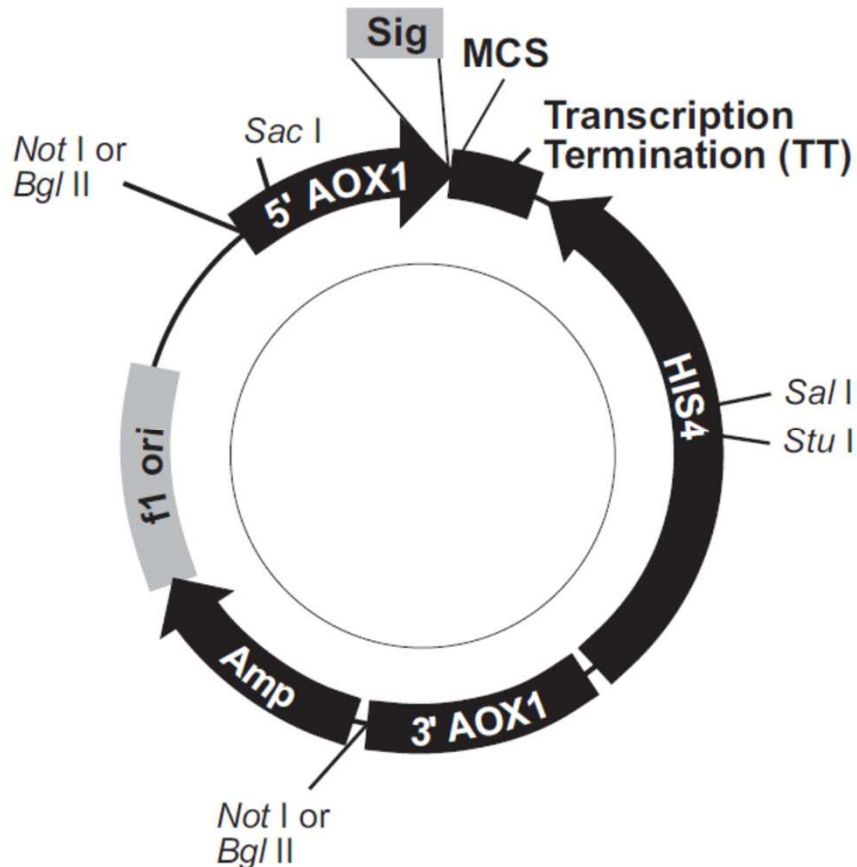
Strategies	Target	Strain	Genetic manipulation	Titer/achievement	References
Improving precursor supplement	FFA (C16: 66.3%, C18: 21.1%)	BY4727	Overexpression of <i>TesA</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , and <i>FAS2</i>	0.4 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FFA (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>Mus musculus ACOT5</i>	0.493 g/L	Chen et al., 2014b
	FFA (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>Mus musculus ACL</i> . Deletion of <i>IDH1</i> and <i>IDH2</i>	0.13 g/L*	Tang et al., 2013
	FFA (C16, C18)	YPH499	Deletion of <i>FAA1</i> and <i>ADH1</i>	0.14 g/L	Li et al., 2014
	FFA (C16, C18)	CEN.PK2	Overexpression of the reversed β -oxidation pathway and <i>SeAcsl641P</i> . Deletion of <i>ADH1</i> , <i>ADH4</i> , <i>GPD1</i> , and <i>GPD2</i>	0.011 g/L	Lian and Zhao, 2015
	TAL	BY4741	Overexpression of the <i>Gerbera hybrid</i> 2-pyrone synthase (2-PS)	2.2 g/L	Cardenas and Da Silva, 2014
	Fatty alcohol (C16: 91.1%; C18: 8.9%)	BY4742	Overexpression of mouse <i>FAR</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i>	0.086 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FAEE (C16, C18)	BY4742	Overexpression of <i>AbWS</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , and <i>FAS2</i> . Deletion of <i>POX1</i>	0.005 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FAEE (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>WS2</i> . Deletion of <i>FAA2</i> , <i>ACB1</i> , <i>PXA2</i>	0.025 g/L	Thompson and Trinh, 2014
	FAEE (C16, C18)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> . Deletion of <i>ARE1</i> , <i>DGA1</i> , <i>ARE2</i> , <i>LRO1</i> , and <i>POX1</i>	0.017 g/L	Valle-Rodríguez et al., 2014
	FAEE (N/A)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> , <i>ADH2</i> , <i>ALD6</i> , and <i>SeAcsl641P</i>	0.002 g/L*	de Jong et al., 2014
	FAEE (C16, C18)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> , <i>ACB1</i> , and <i>GAPN</i>	0.048 g/L	Shi et al., 2014a
	FAEE (C16, C18)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> and phosphoketolase pathway	0.026 g/L*	de Jong et al., 2014
	FAEE (C4–C10)	CEN.PK113	Overexpression of the reversed β -oxidation pathway and <i>EEB1</i> or <i>EHT1</i>	0.75 g/L	Lian and Zhao, 2015
	FAEE (Medium chain)	CEN.PK2	Overexpression of <i>AbWS</i> , <i>GUP1</i> , <i>GCY1</i> , and <i>DAK1</i> . Deletion of <i>FPS1</i> , and <i>GPD2</i>	0.52 g/L	Yu et al., 2012
	Alkane (Very long chain)	INVSc1	Overexpression of <i>SUR4^{F262A,K266L}</i> and <i>A. thaliana CER1</i> and <i>CER3</i>	Trace	Bernard et al., 2012

FFA- free fatty acids, FAEE - fatty acid ethyl esters

Sheng, Front in Microb, 2015

Nadprodukce - integrativní plasmidy

- nemají CEN/2 μ m části

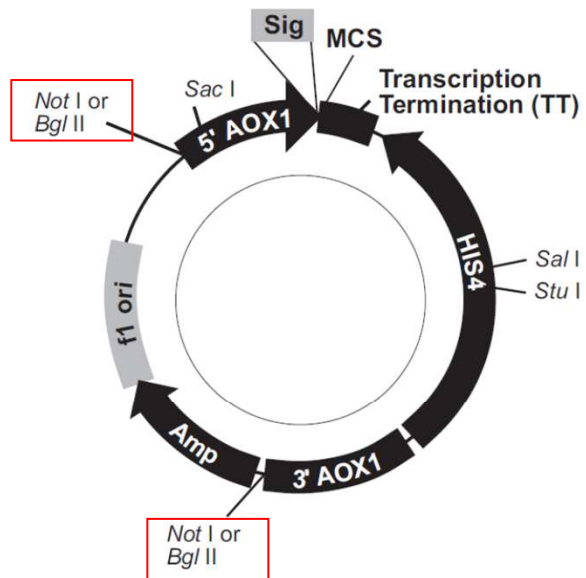


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)

- exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression in <i>Pichia</i></u> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal <u>protein secretion</u> signal	Targets desired protein for secretion
MCS	<u>Multiple Cloning Site</u>	Allows insertion of your gene into the expression vector
TT	Native <u>transcription termination and polyadenylation signal</u> from AOX1 gene (~260 bp)	Permits efficient <u>transcription termination and polyadenylation of the mRNA</u>
HIS4	<i>Pichia</i> wild-type gene coding for histidinol dehydrogenase (~2.4 kb) and used to complement <i>Pichia his4</i> strains	Provides a <u>selectable marker</u> to isolate <i>Pichia</i> recombinant strains
3' AOX1	Sequences from the AOX1 gene that are further 3' to the TT sequences (~650 bp)	Targets plasmid integration at the AOX1 gene
Amp pBR322 origin	<u>Ampicillin resistance gene</u> <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
<u>Not I</u> <u>Bgl II</u> <u>Sac I</u> <u>Sal I</u> <u>Stu I</u>	Unique restriction sites	Permits <u>linearization of vector</u> for efficient <u>integration into the <i>Pichia</i> genome</u>

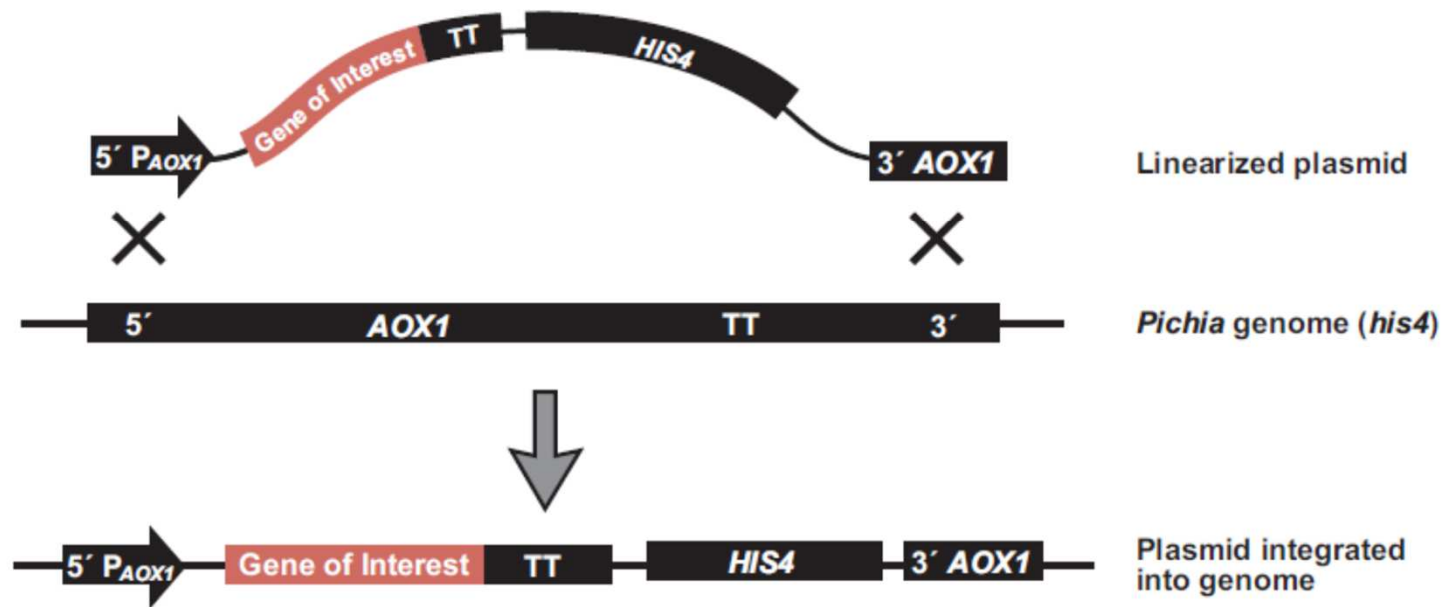
Integrace I



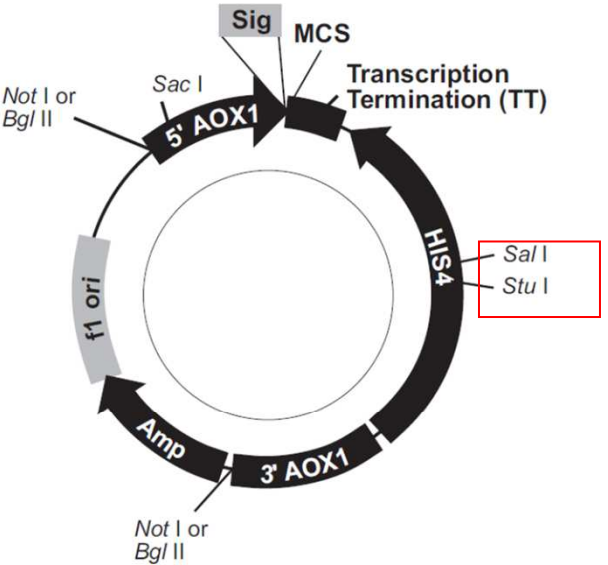
- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru

- integrace do AOX1 lokusu

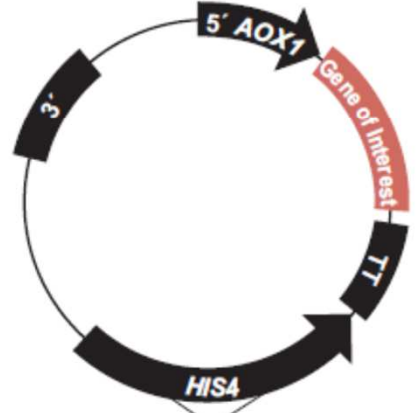
- **mechanismus homologní rekombinace**



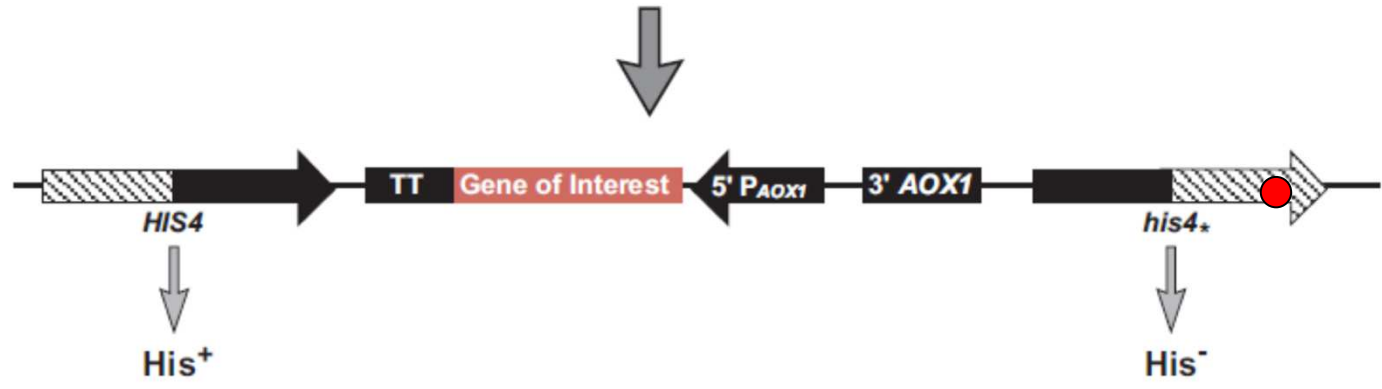
Integrace II.



- integrace do *his4* lokusu

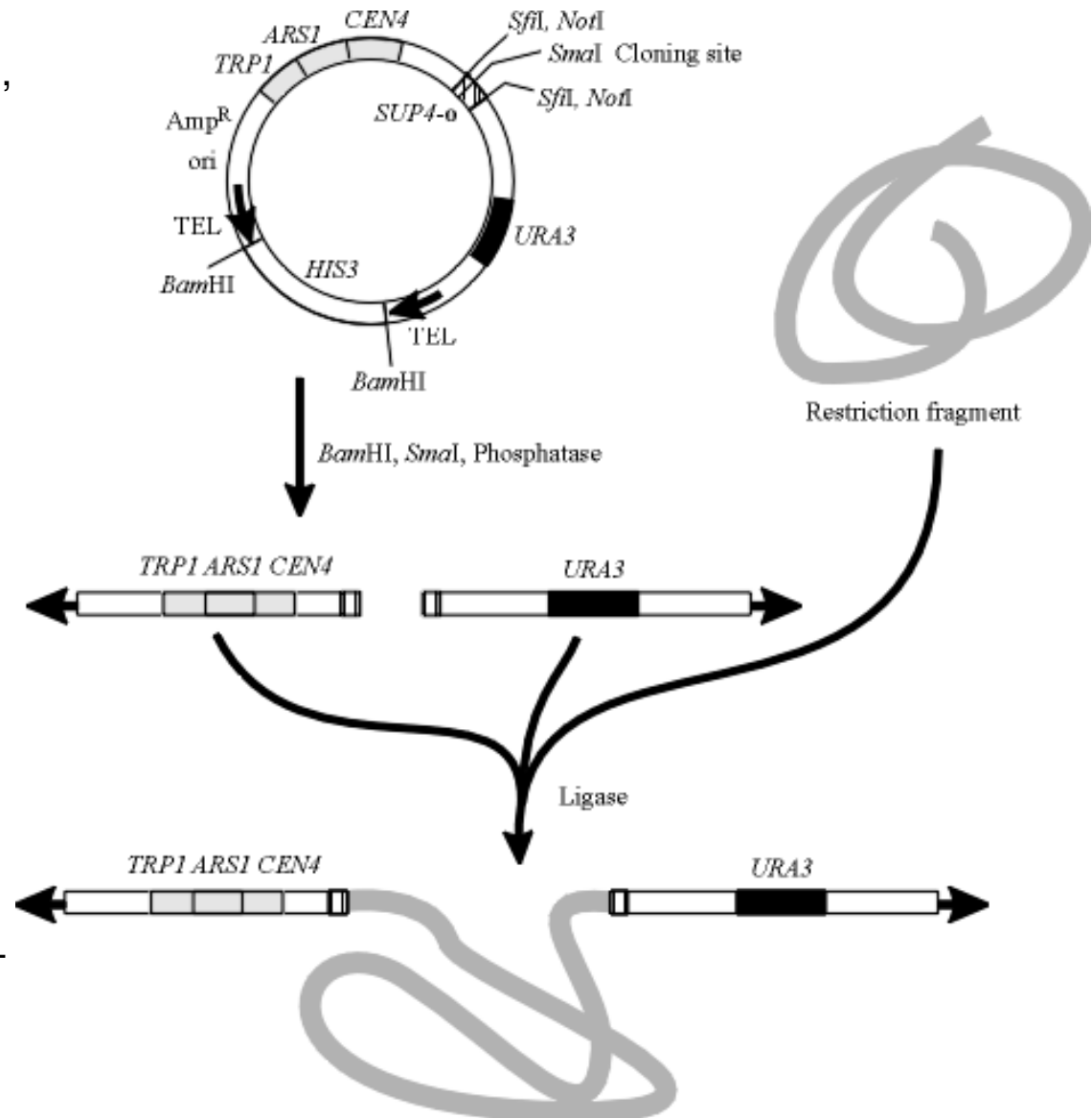


**mechanismus
homologní
rekombinace**



YAC (yeast artificial chromosome)

- Bakteriální část – Amp resistance, počátek replikace
- Kvasinková část – markery (TRP1, URA3), CEN4+ARS1, **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)

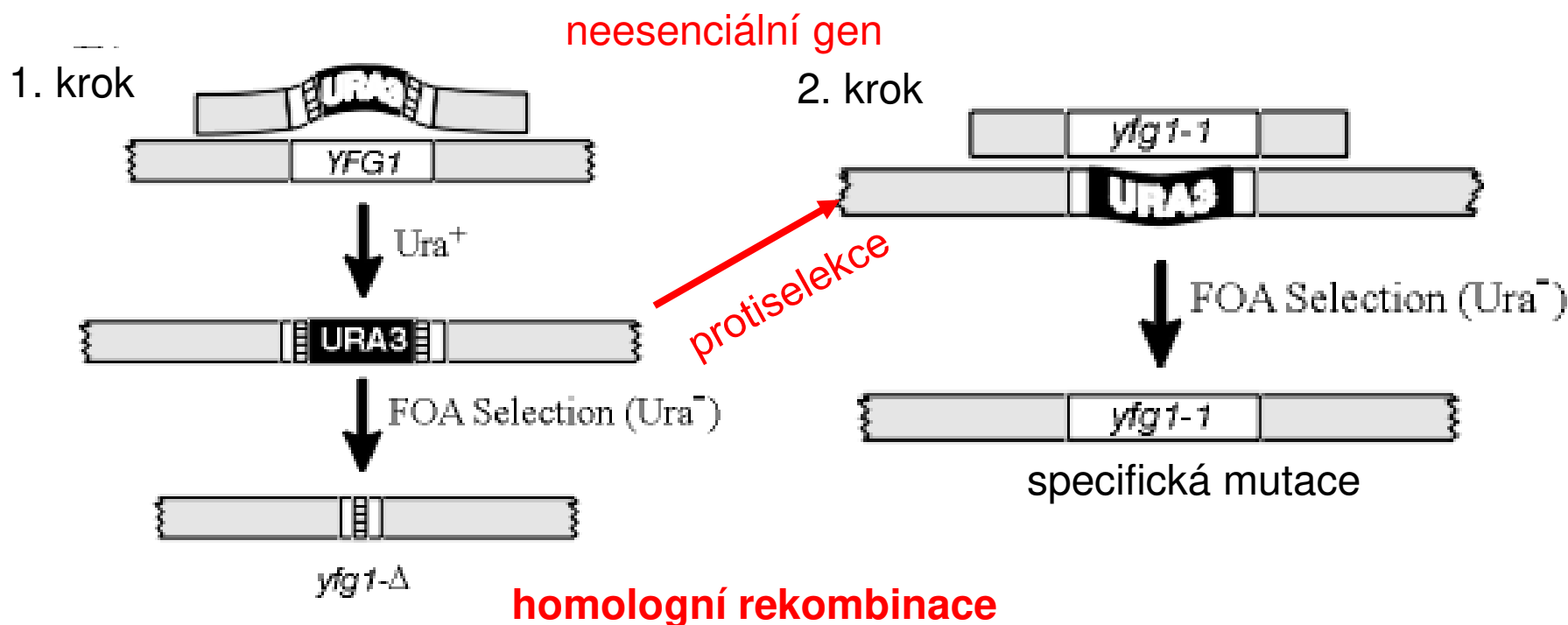


Transformační protokol

- Exponenciální kvasinková 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

Integrace: disrupce/delece genu

- studium funkce genu – fenotyp (delece/mutace)
- biotechnologie (přesměrování metabolických drah)
 - **životaschopné** – mutace lze přímo integrovat do genomu
 - **esenciální gen** => buňky potřebují gen např. na plasmidu (plasmid shuffling)

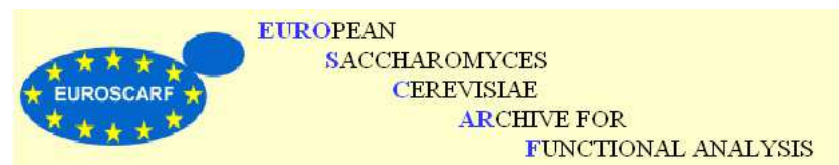


Využití inhibitoru FOA pro „odlěčení“ URA3 markeru (FOA je přeměňována Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil => $URA3^+$ buňky nerostou, zatímco $ura3^-$ buňky jsou „rezistentní“) - opět ura^- , takže URA3 marker lze znovu využít

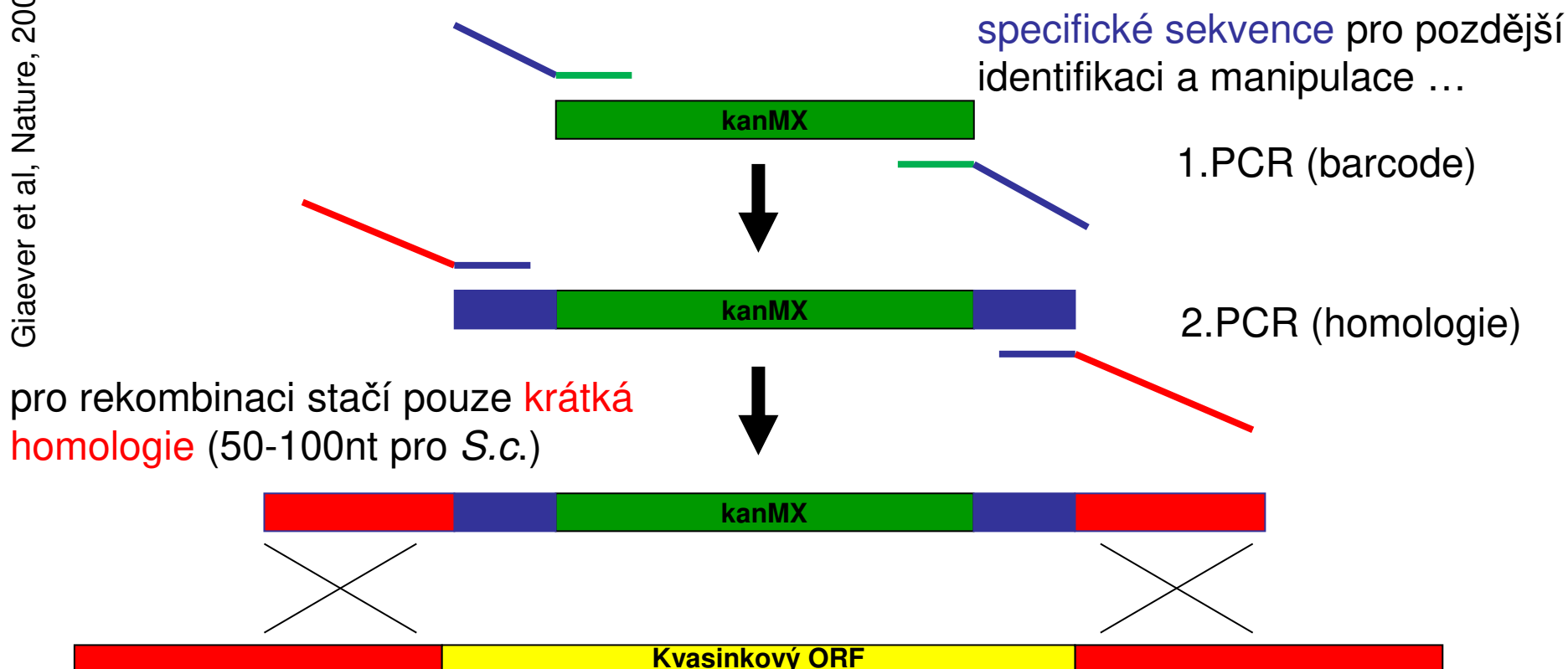
Delece genu - PCR

- studium funkce genu – fenotyp
 - **esenciální gen vs životaschopné**
- systematicky provedeno na všech ~6500 genech v rámci projektu EuroFan
- kmeny lze získat z archivu EUROSCARF

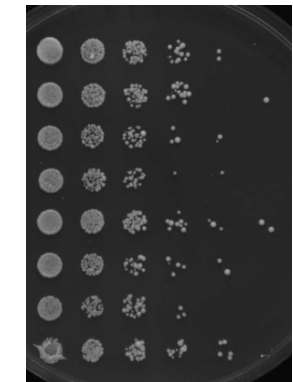
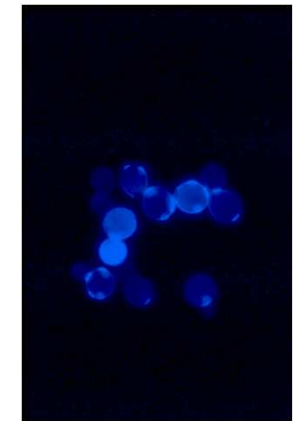
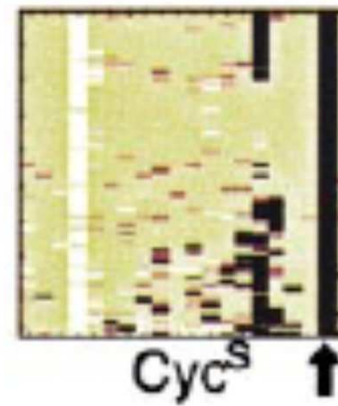
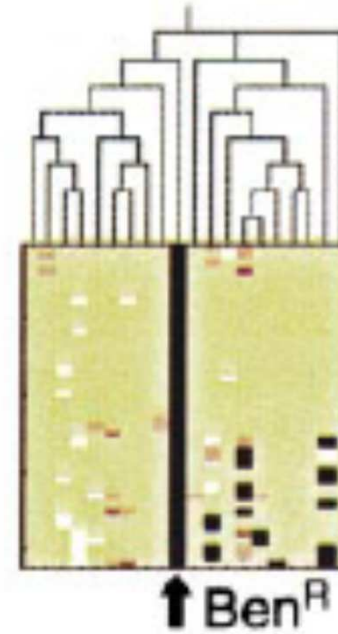
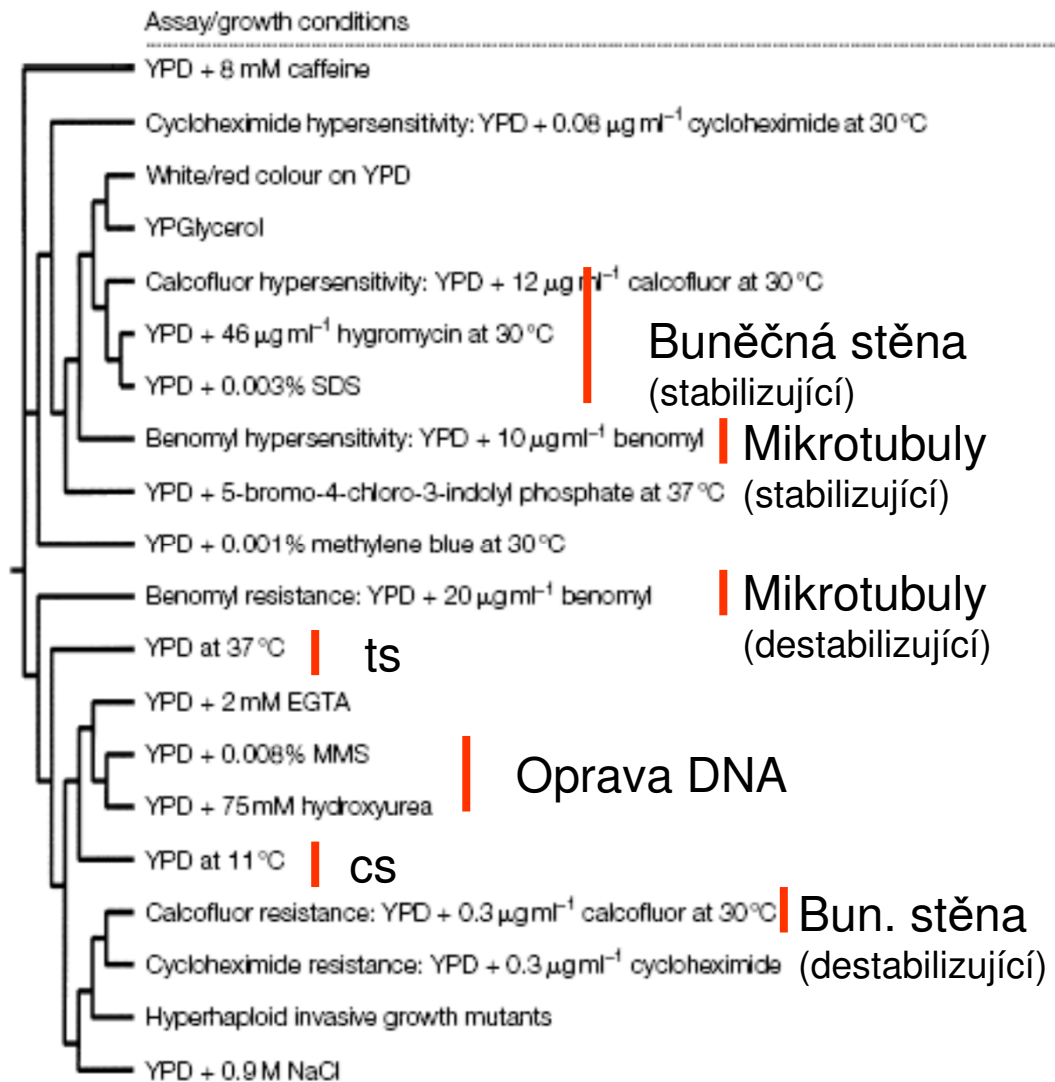
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>



Giaever et al, Nature, 2002

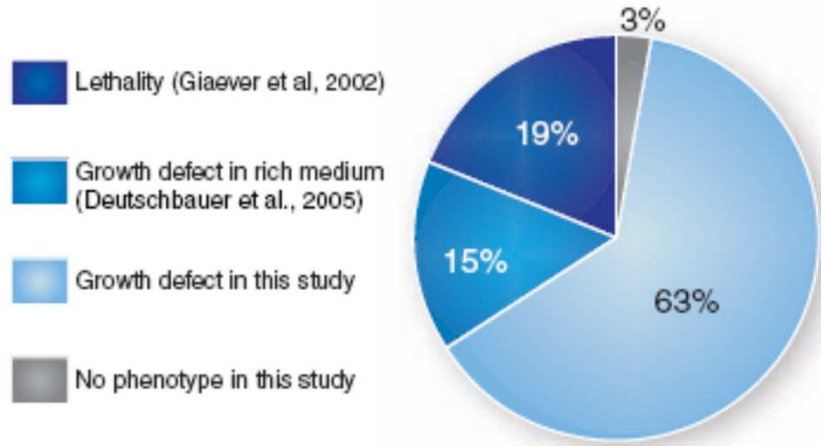


EuroFan projekt - testy fenotypu



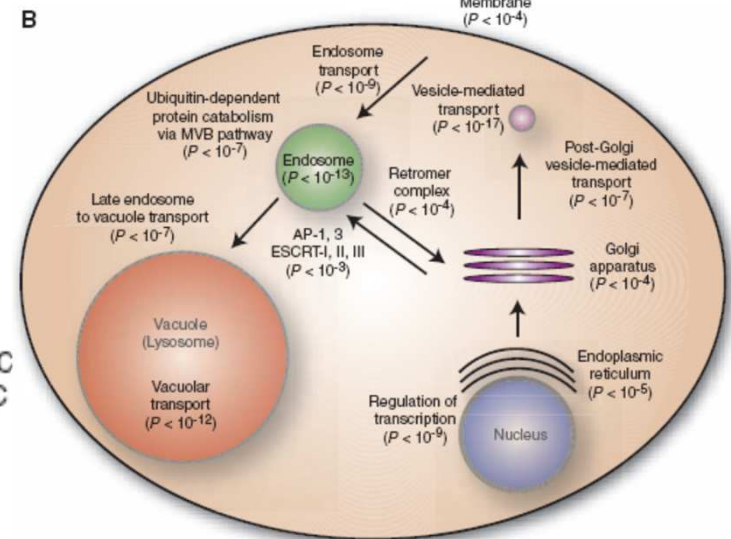
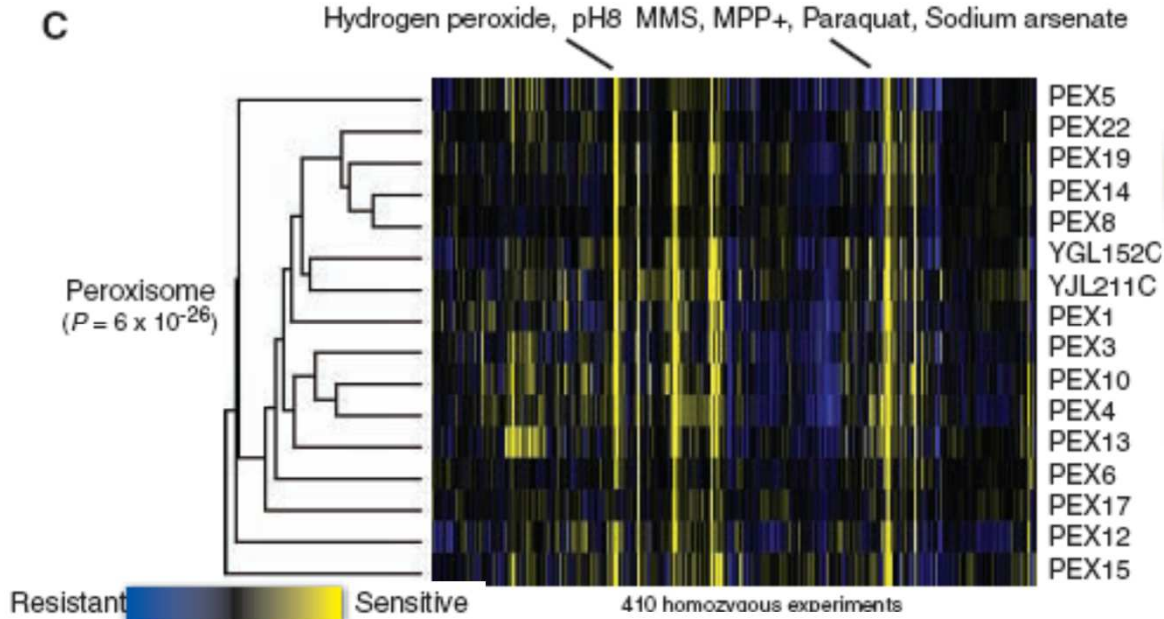
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů – anotace v databázích (genová ontologie)

~ 6000 heterozygotních delečních kmenů
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)
 (neesenciální – pro 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

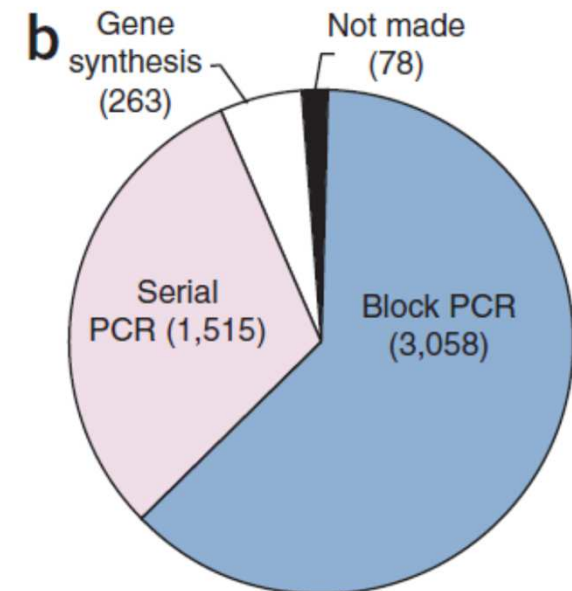
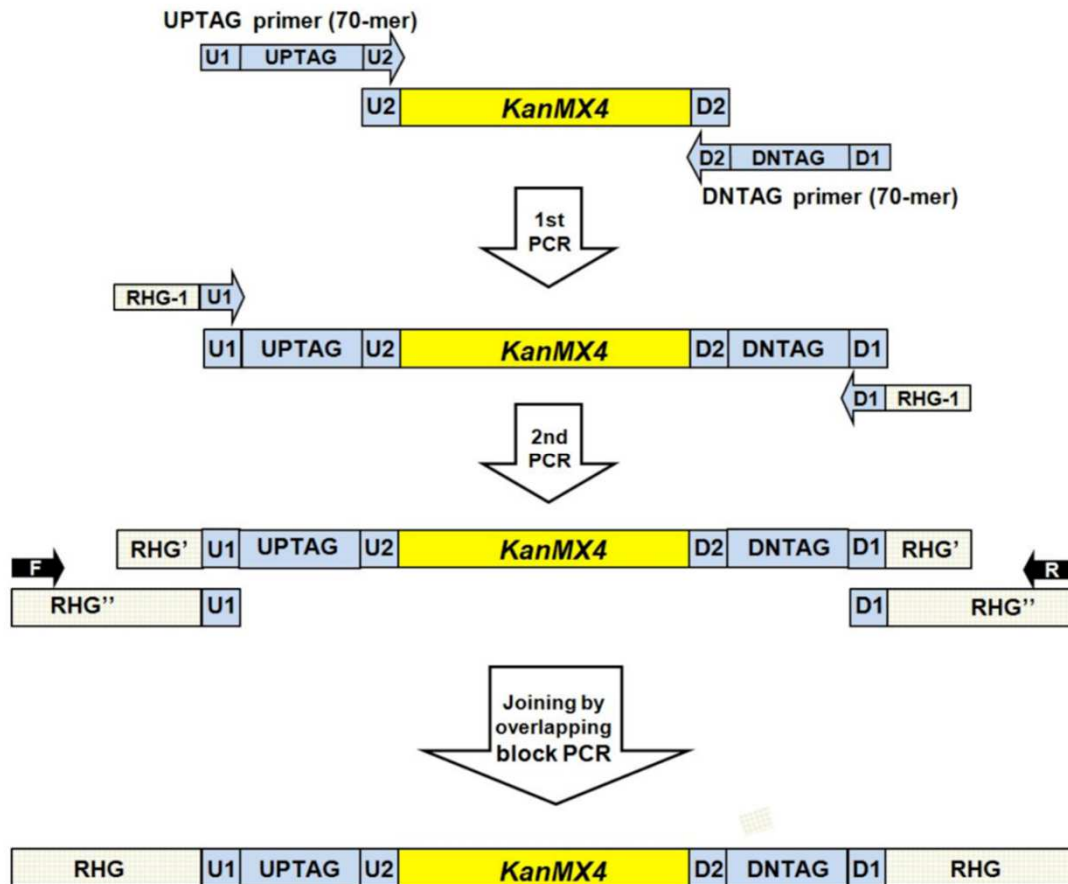


Geny/Proteiny peroxisomu

Hillenmeyer et al, Science, 2008

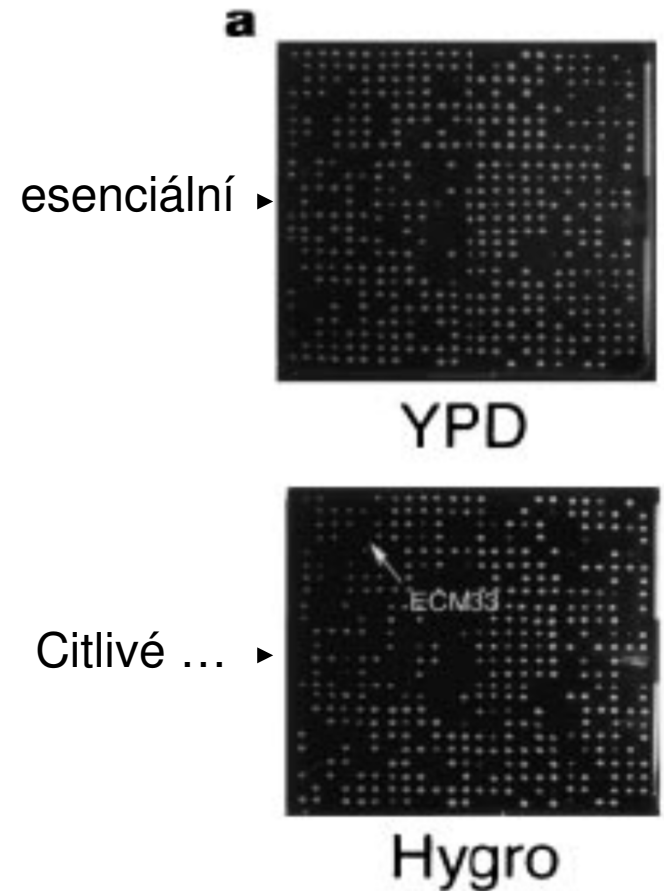
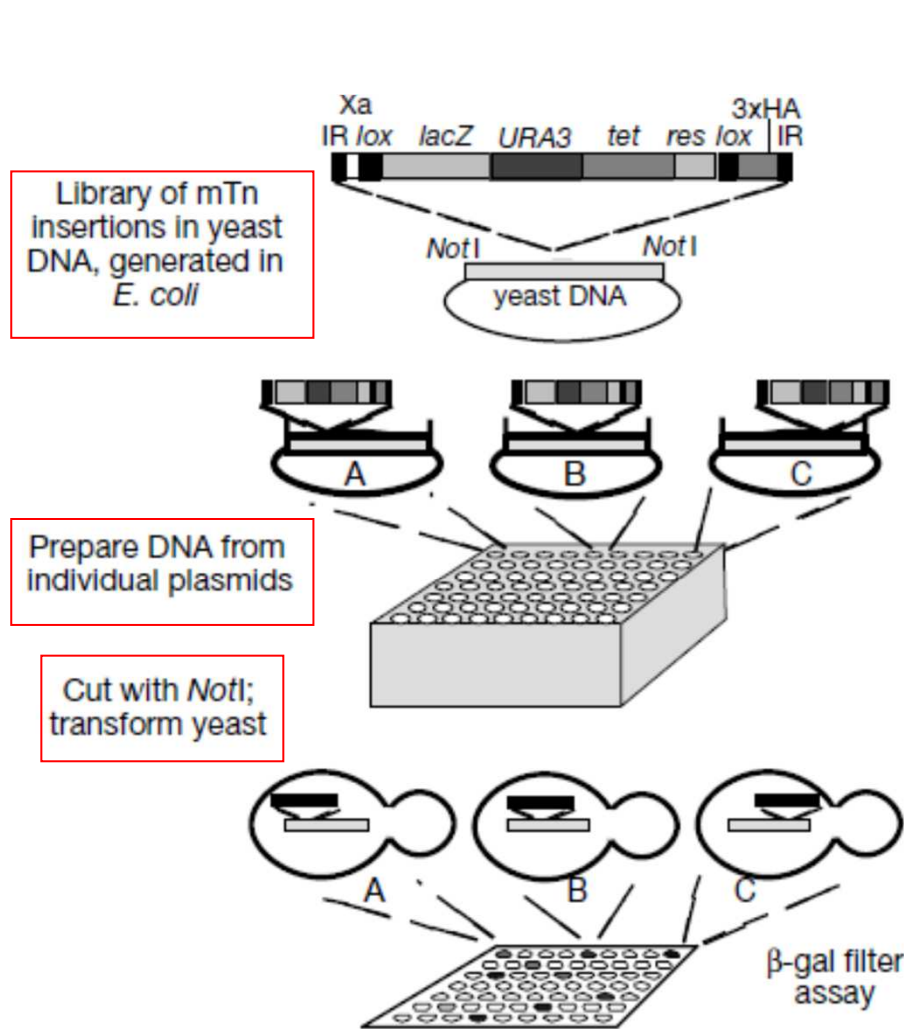
Deleční knihovna – *S. pombe*

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



- individuální vědecké studie ...

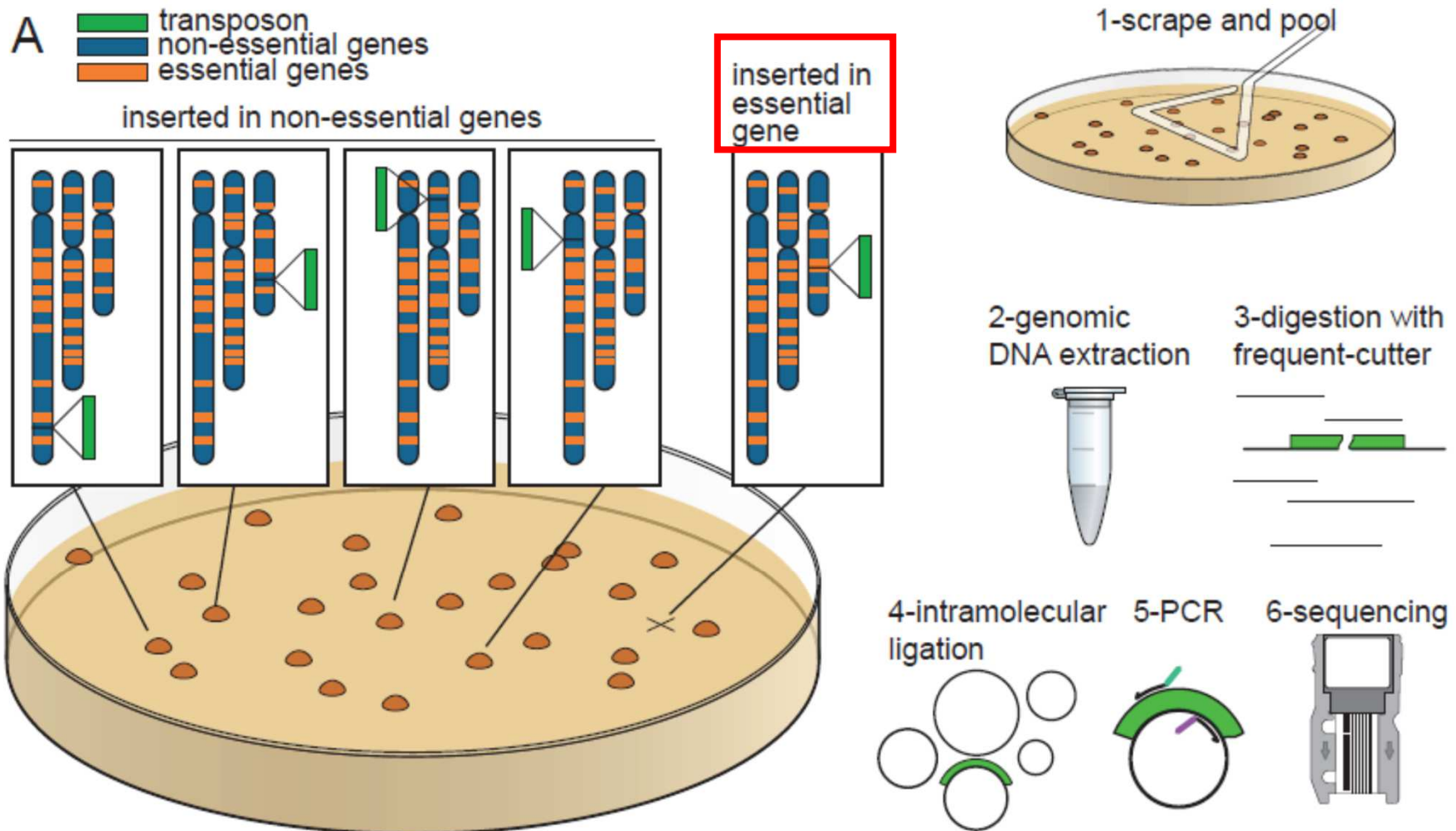
Delece genu pomocí transposonů



Defekt buněčné stěny

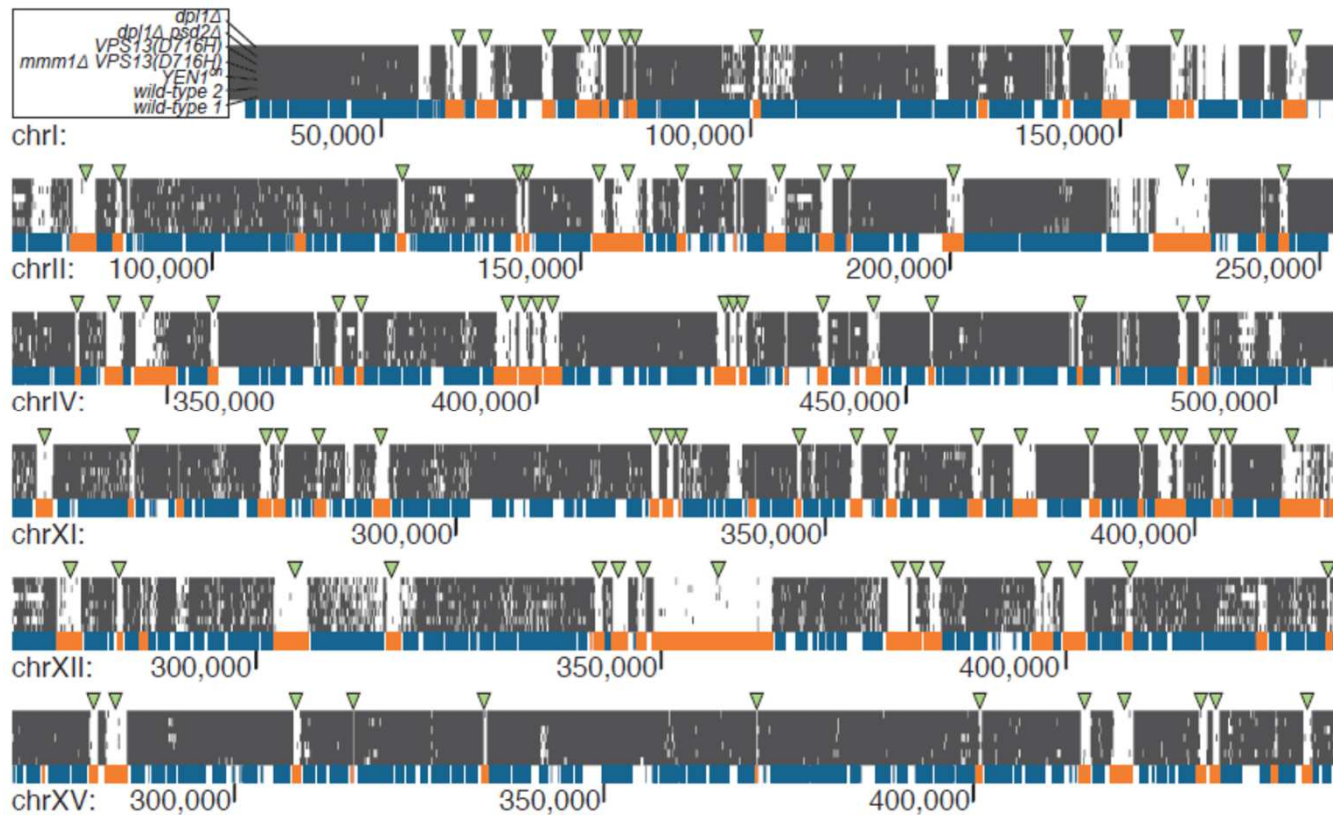
- knihovna konstruktů s náhodnými integracemi

Saturated Transposon Analysis in Yeast (SATAY)



Michel et al, eLife, 2017

- generováno 1.000.000 klonů – 300.000 inzercí (vysoké pokrytí na 6.000 genů)
- cirkulární DNA použita pro NGS sekvenování (MiniDs transposon-specifické primery)
- inzerce každých 40bp (preferenčně v nucleosom-free oblastech)
- každý transposon sekvenován 20x ...



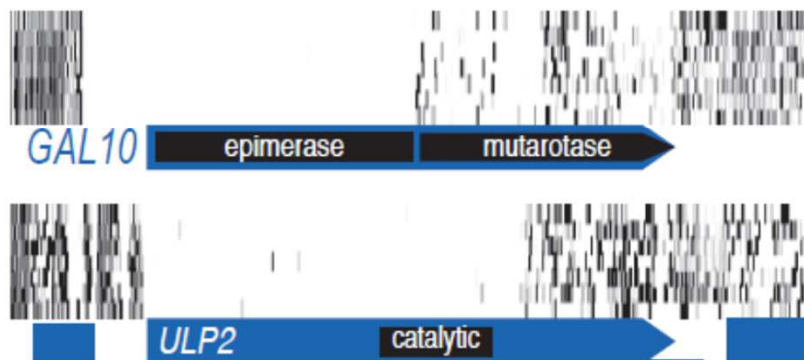
- inserce chyběly v **esenciálních genech** (zelené šipky)

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

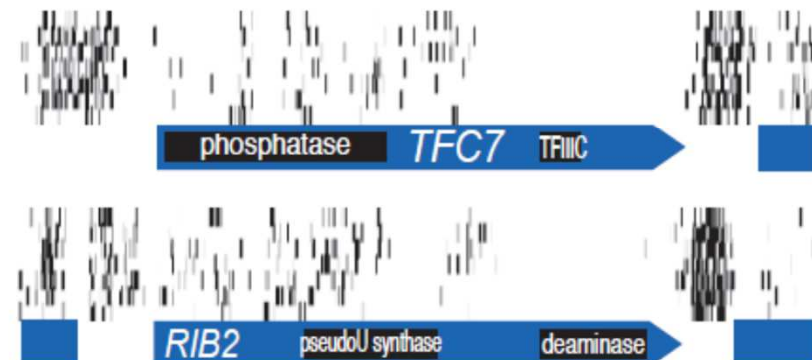
- rozlišení na úrovni domén (GAL10 – dvě domény z nichž esenciální je pouze první ...)

- C-koncové, ale i N-koncové delece

A C-terminal truncations



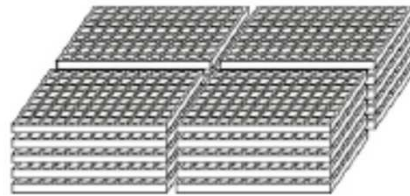
B N-terminal truncations



1 Cell growth & sample preparation



Prototrophic strains
all gene deletions



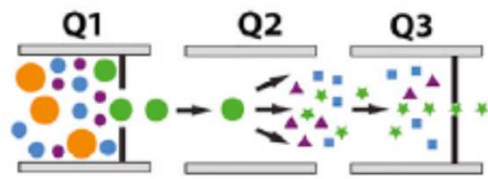
Exponential growth
minimal media



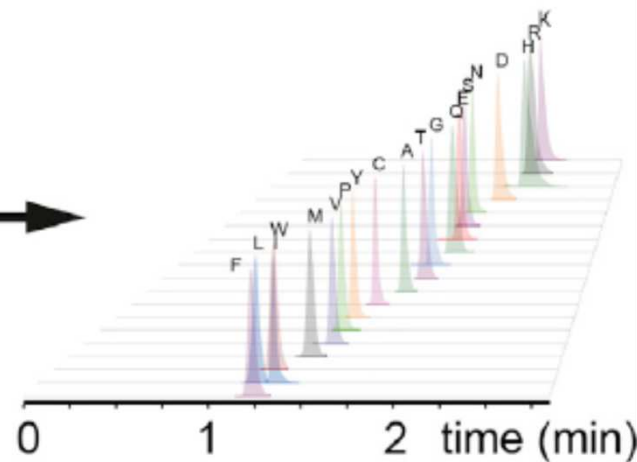
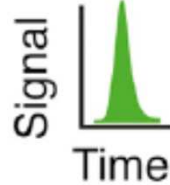
Metabolite
extraction

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

2 Amino acid analysis

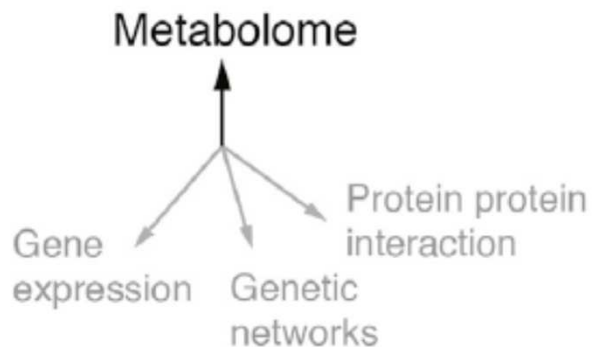


LC-Selective Reaction Monitoring

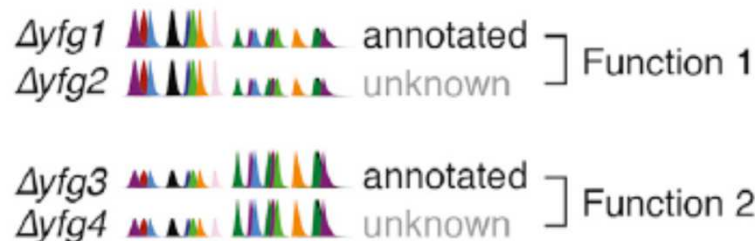


- analýza vztahu
genom-metabolom

3 Function & physiology

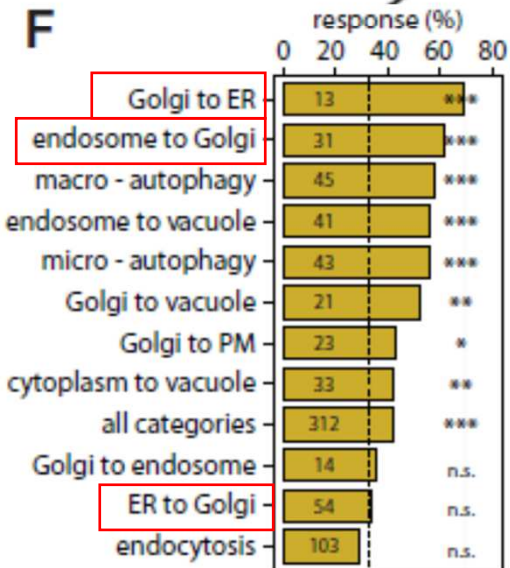
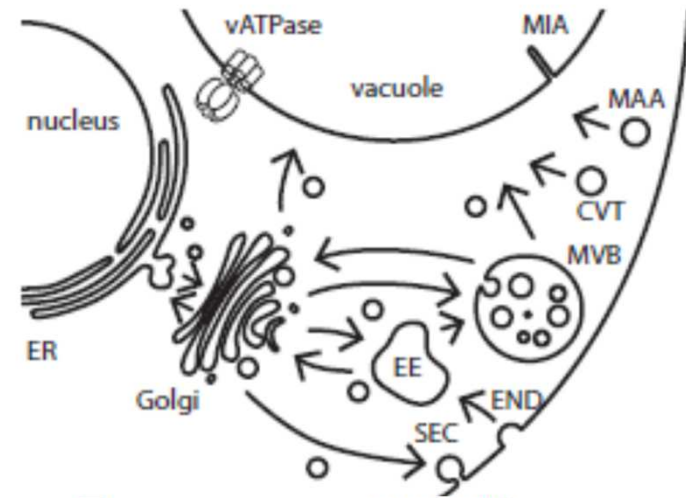
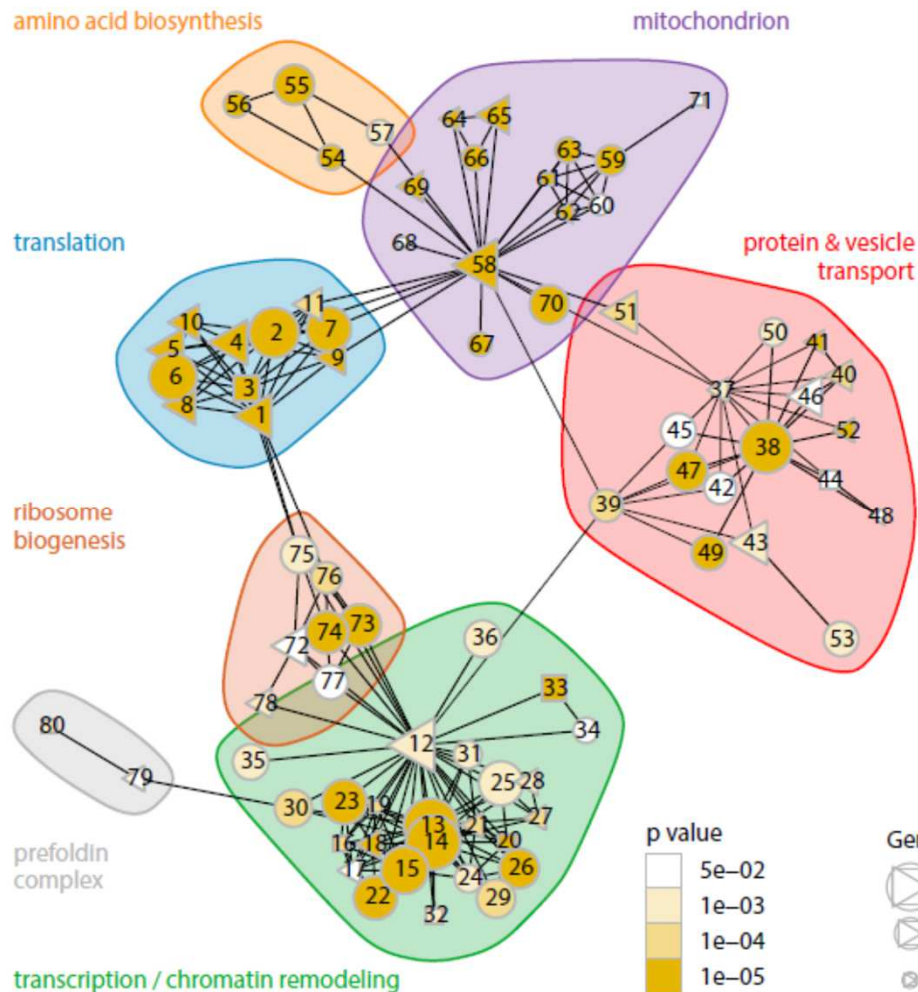


4 Gene functional annotation



Mulleder et al, Cell, 2016

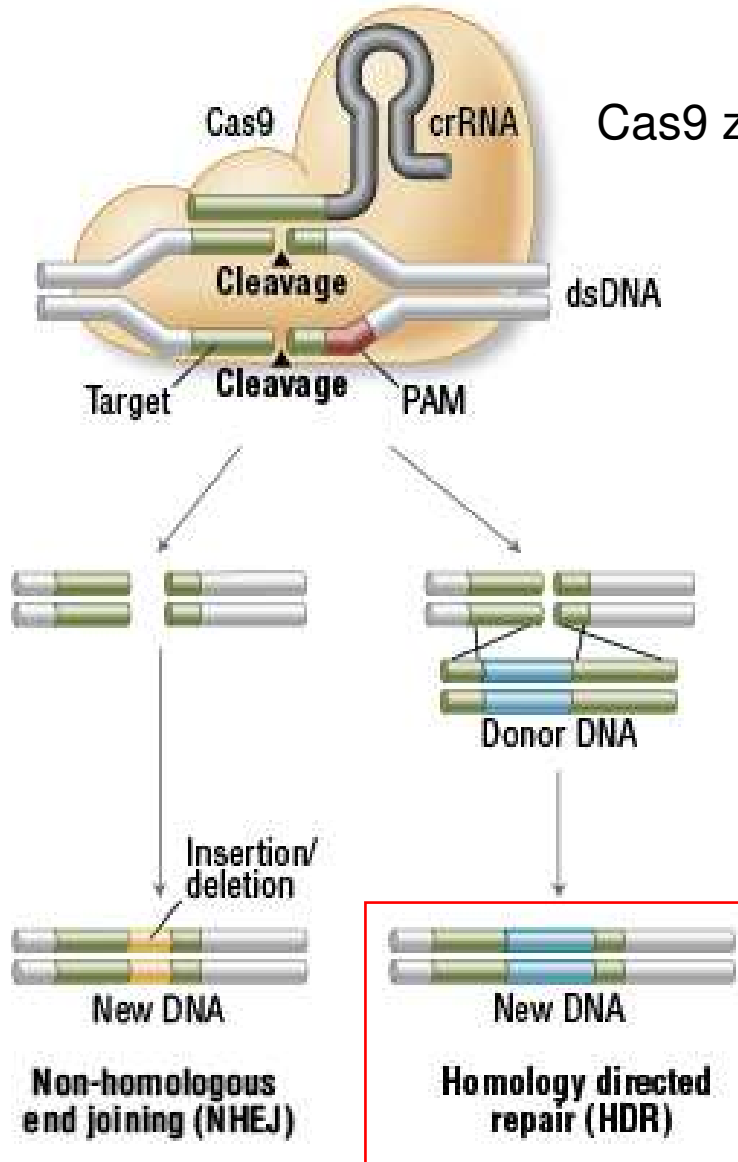
vztah genom-metabolom



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

Integrace: inserce genu (CRISPR/Cas9)

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



Yeast expressing Cas9

Linear:

- guide RNA cassettes

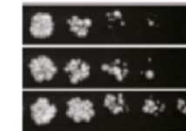
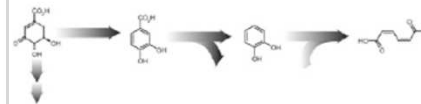
- donor DNA

- marked plasmid

sgRNA kazeta definuje místo štěpení
donorová DNA nese integrační insert
Multiplex CRISPR integration

Prototype pathways

Assess allele synergy



- CRISPR zvyšuje účinnost integrace a nezanechává „stopy“

6 integrací do 3 lokusů (po dvou)

nová metabolická dráha



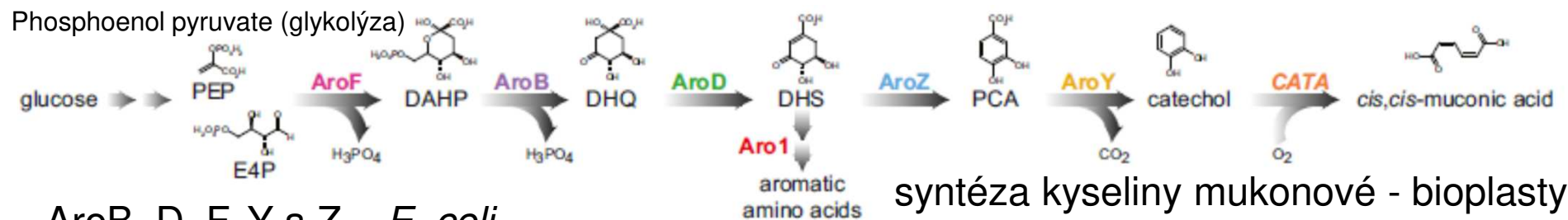
lokusy: GAL80, HO, ARO1



AroY v pěti kopiích – zvýšilo výtěžek



- sgRNA kazeta
definuje místo štěpení
- donorová DNA nese
homologní integrační
insert



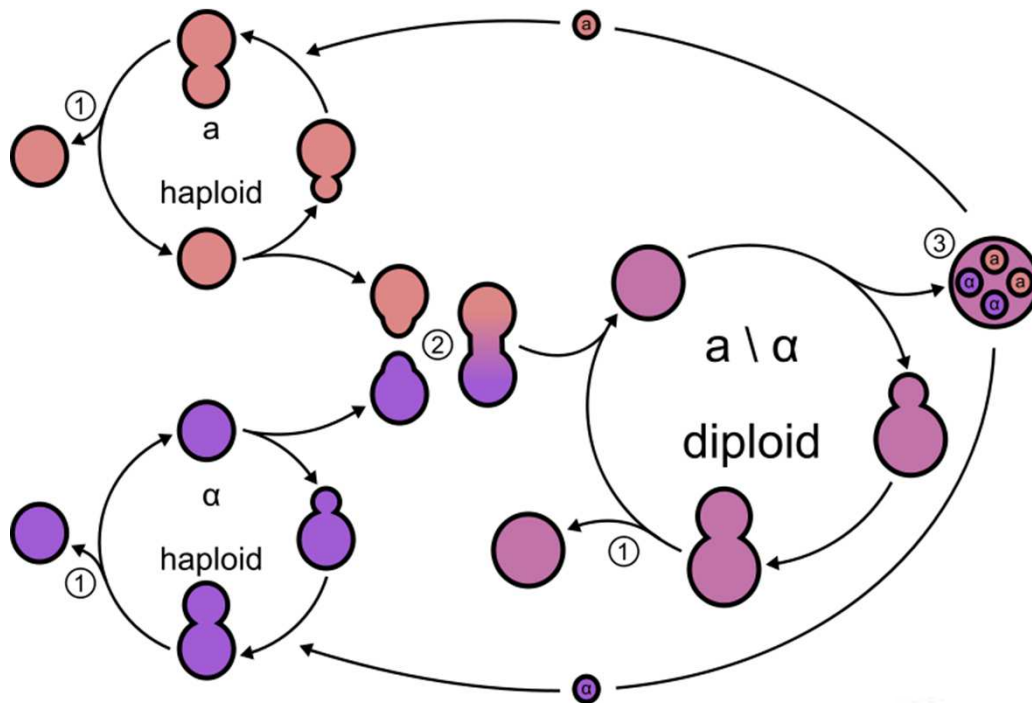
syntéza kyseliny mukonové - bioplasty

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

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

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

- 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)

