

15.09.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
22.09.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
29.09.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Mitochondrie, chromosomy
06.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
13.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
20.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
27.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
03.11.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
10.11.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
17.11.2021				státní svátek
24.11.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
01.12.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Organizace genomu a evoluce kvasinek
08.12.2021	8-12hod	B07-2.17	Paleček+Špirek	Cvičení k přednáškám
15.12.2021	9-12hod	C02-211	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky

- Odpověď na otázku – rezistence!

- **nourseothricin** (NAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje NAT)

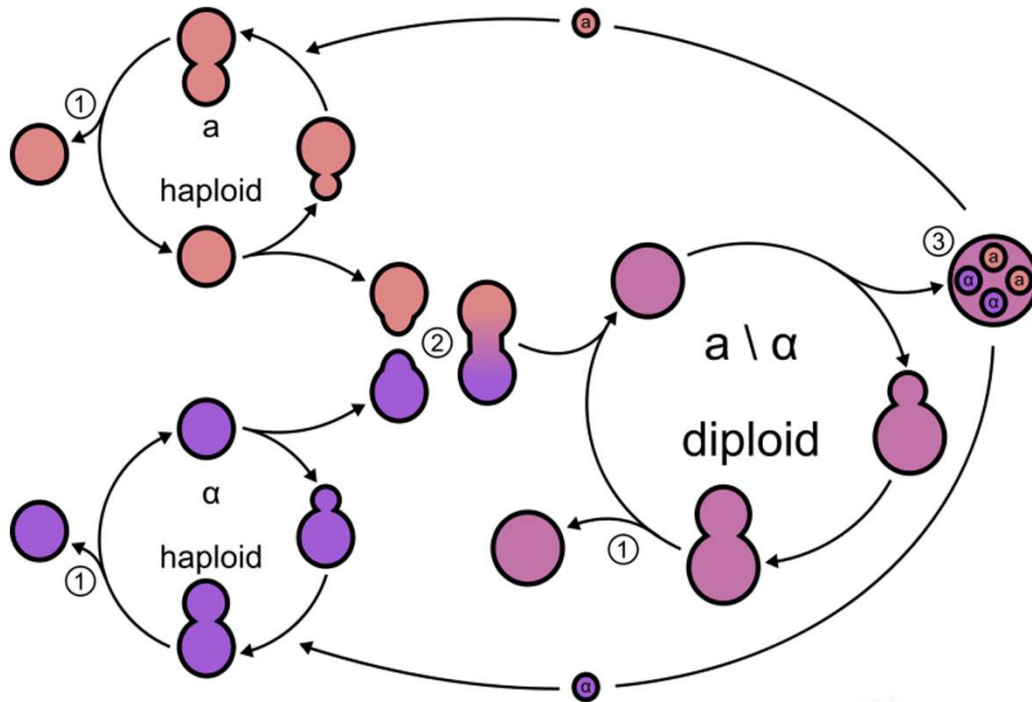
- **hygromycin B** – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygrosopicus*), rezistence kódována *hph* genem z *Klebsiella pneumoniae*

- **phleomycin** – interkaluje se do DNA a způsobuje DSB (zlomy, glycopeptid z *Streptomyces verticulus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*

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*

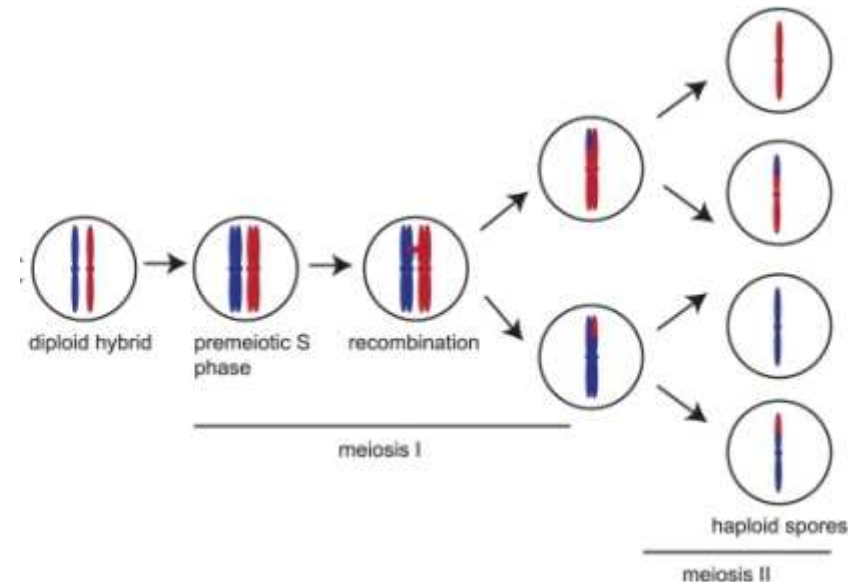


- delecii či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

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

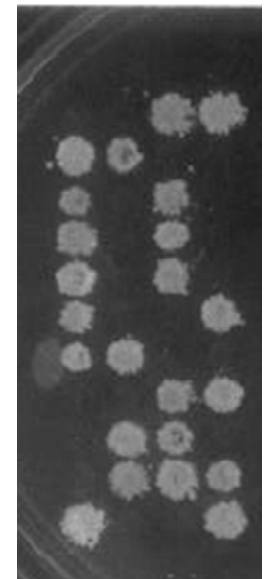
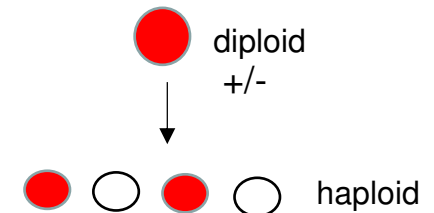
- lze připravit dvojitého mutantu křížením haploidních mutantů a poté sporulací diploida

- 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)

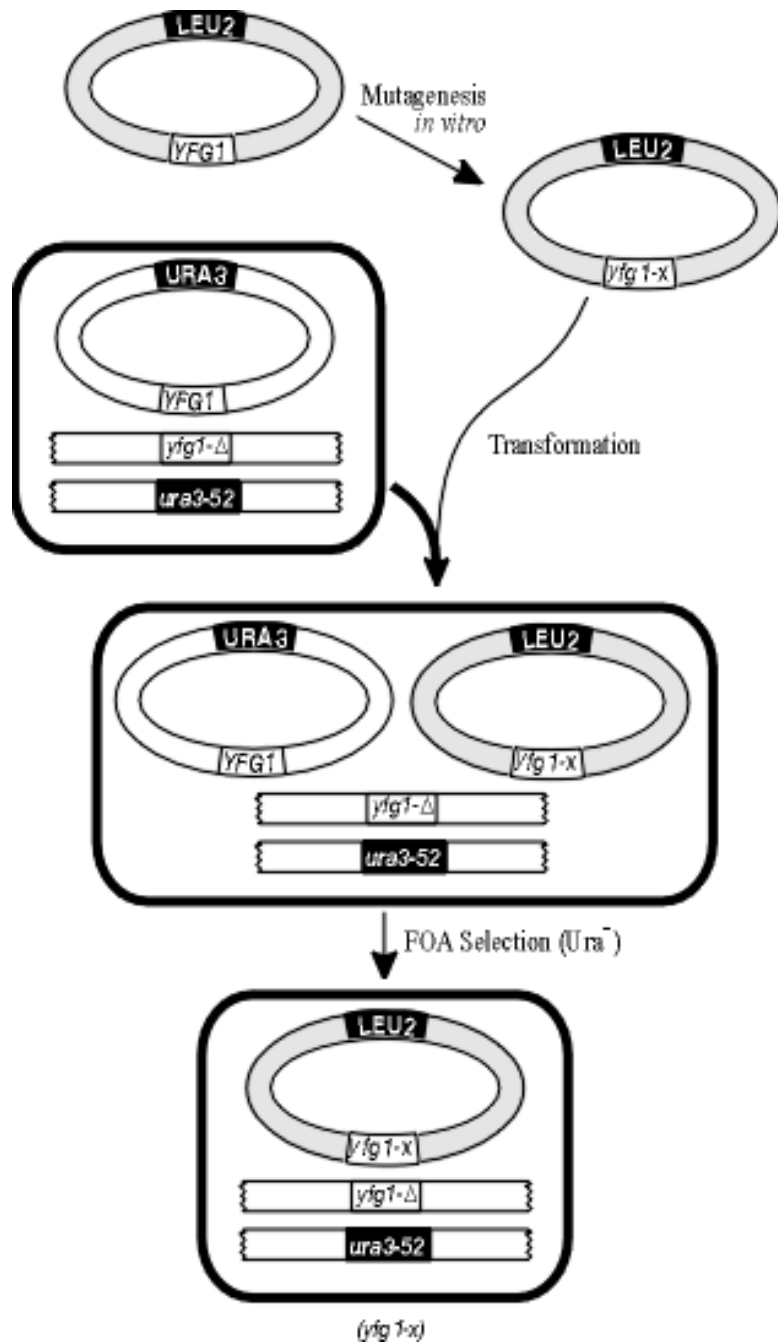


Esenciální geny

- **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 „divoká“ kopie genu např. na *URA3* plasmidu, který lze odstranit (pomocí *FOA*) – analýza terminálního fenotypu

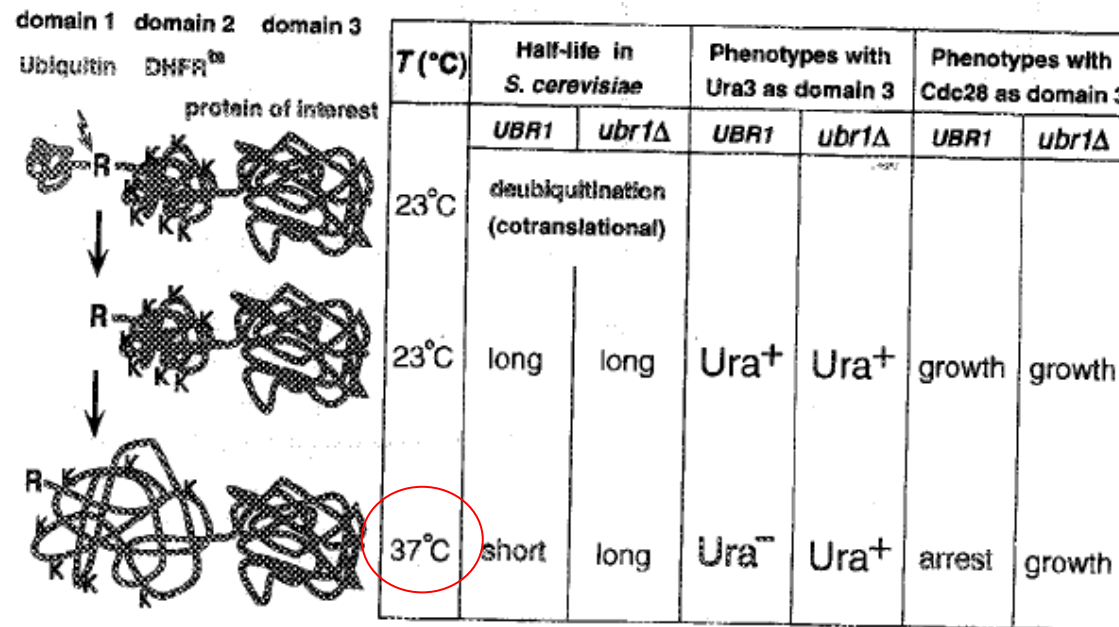
Na dalším plasmidu může být vnesena mutovaná verze *yfg1* – její efekt se projeví až po odstranění plasmidu s divokou kopií genu (pomocí *FOA*)

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)

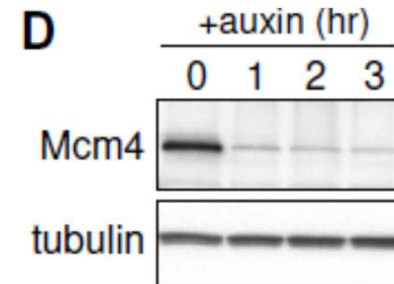
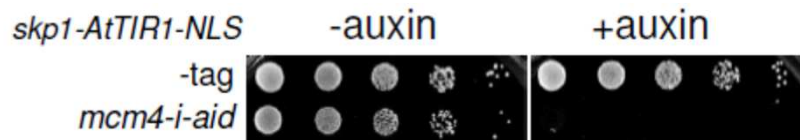
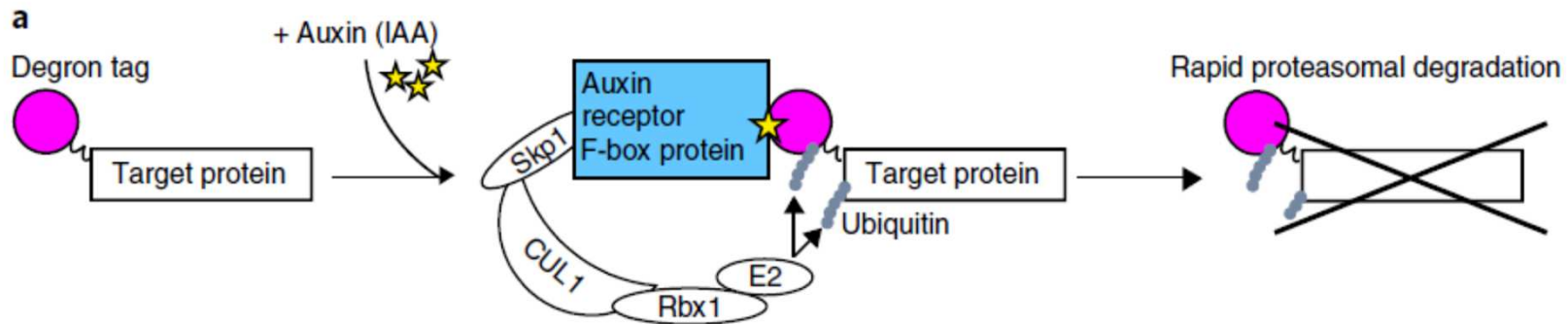
ts mutanty

- **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)



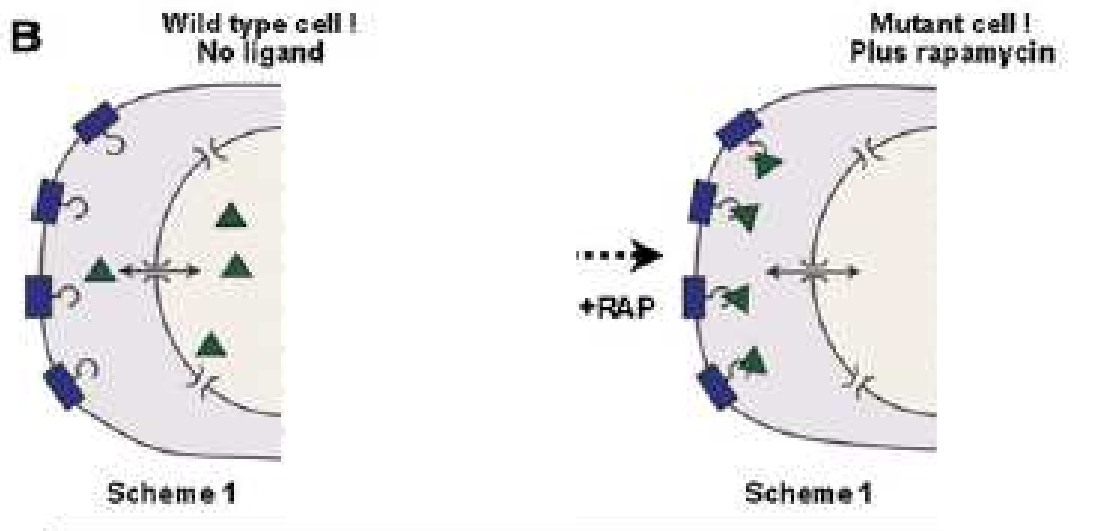
- ubikvitinace „označuje“ proteiny pro proteasom (degradaci)
- ts alela DHFR je degradována (nestabilní protein – strukturní mutace)
- fůze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fůze s CDC28 – kvasinky arestují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

Rychlé vyřazení proteinu z funkce - degradace

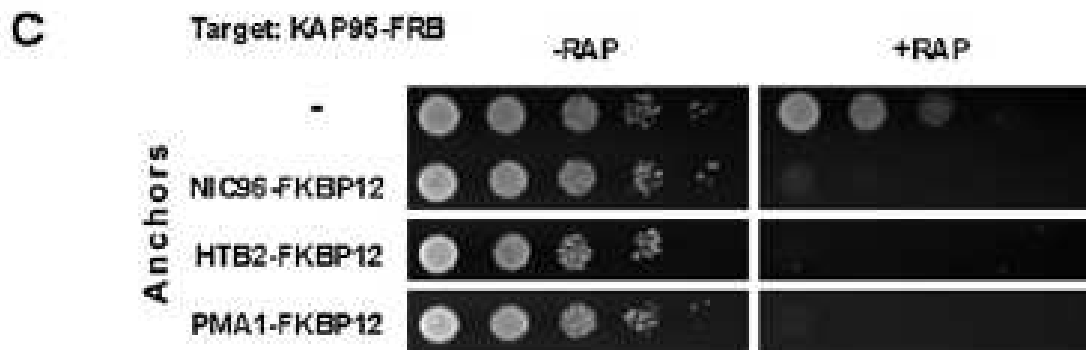


protein je cíleně degradován (vyřazen z funkce)

Rychlé vyřazení proteinu z funkce - relokalizace



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



Izolace mutant

3.

Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

Recover the YCp-*YFGI*⁺ 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



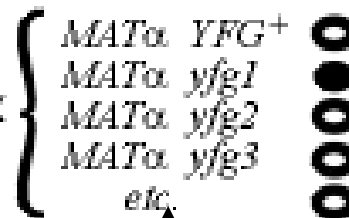
1. Detection of Yfg⁻ *ura, ts, rad ...*



Yfg⁻

2. Complementation

Cross the Yfg⁻ *MATa* mutant to *MATα* tester strains. Isolate diploid strains. Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



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

Počet mutací

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATα YFG+*



Isolate a diploid strain and Sporulate



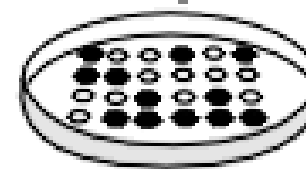
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

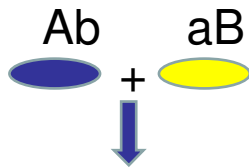


Score for Yfg⁺ and Yfg⁻

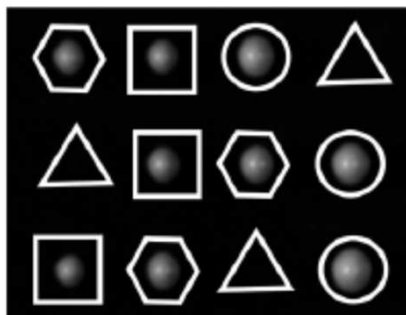


- jedna mutace (segregace fenotypu)
- rozdělení do komplementačních skupin
- genetické vztahy mezi mutantami

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



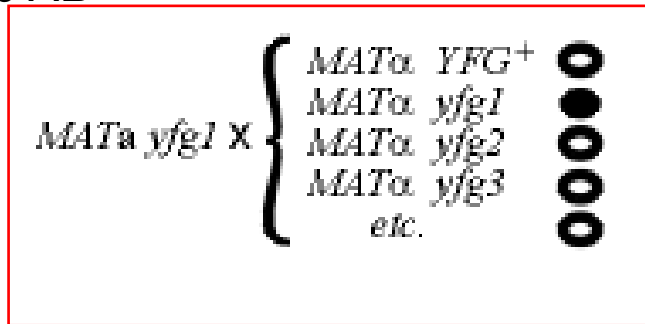
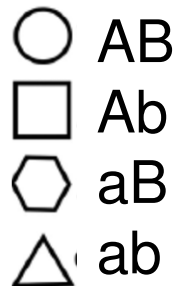
Genetické interakce (genetické vztahy)
(terádová analýza)



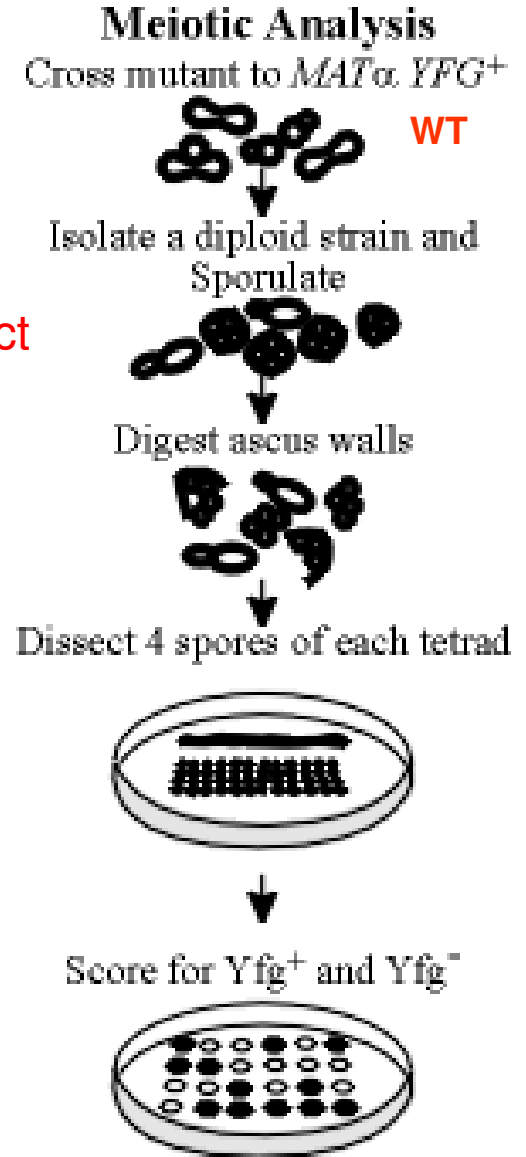
aB Ab AB ab

ab Ab aB AB kombinace těchto mutací je synteticky letální

Ab aB ab AB

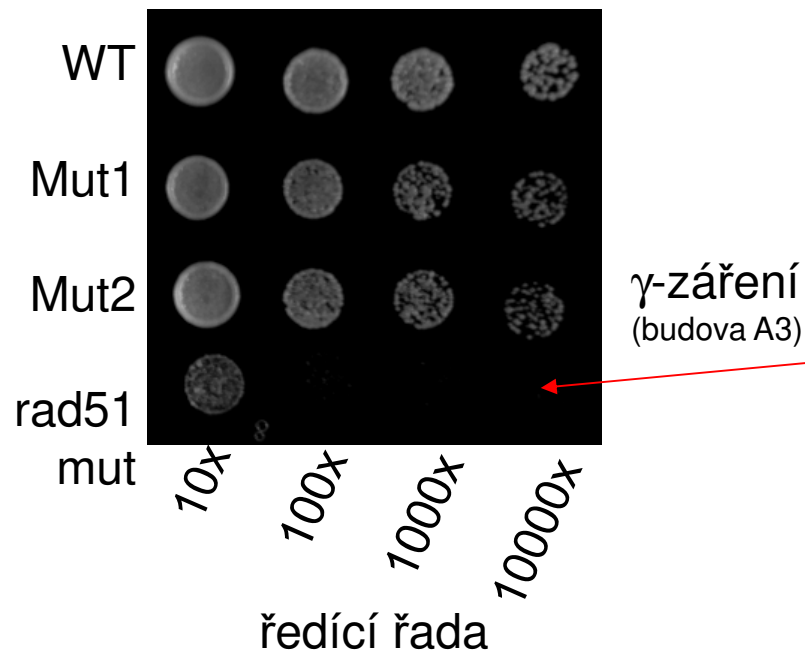


Komplementační skupiny (diploid)



Segregace (počet) mutací (tetrádová analýza)

- 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 ...***)



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

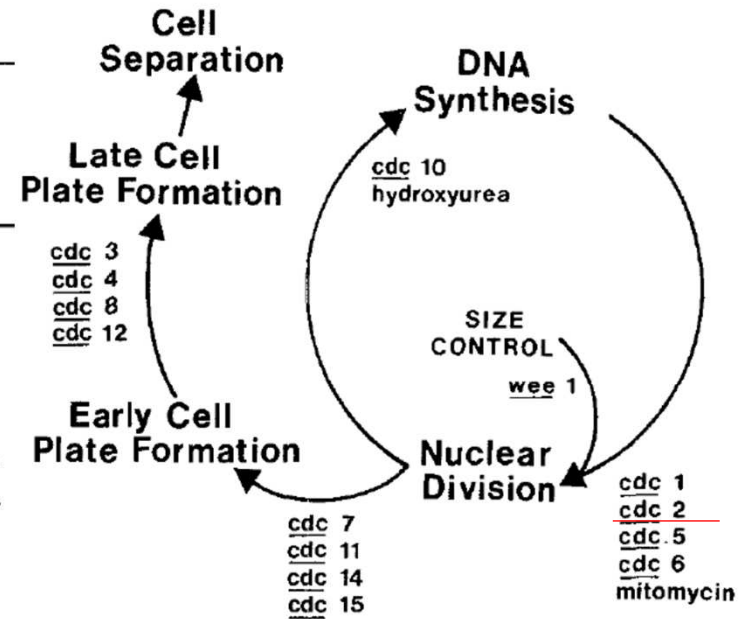
Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



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

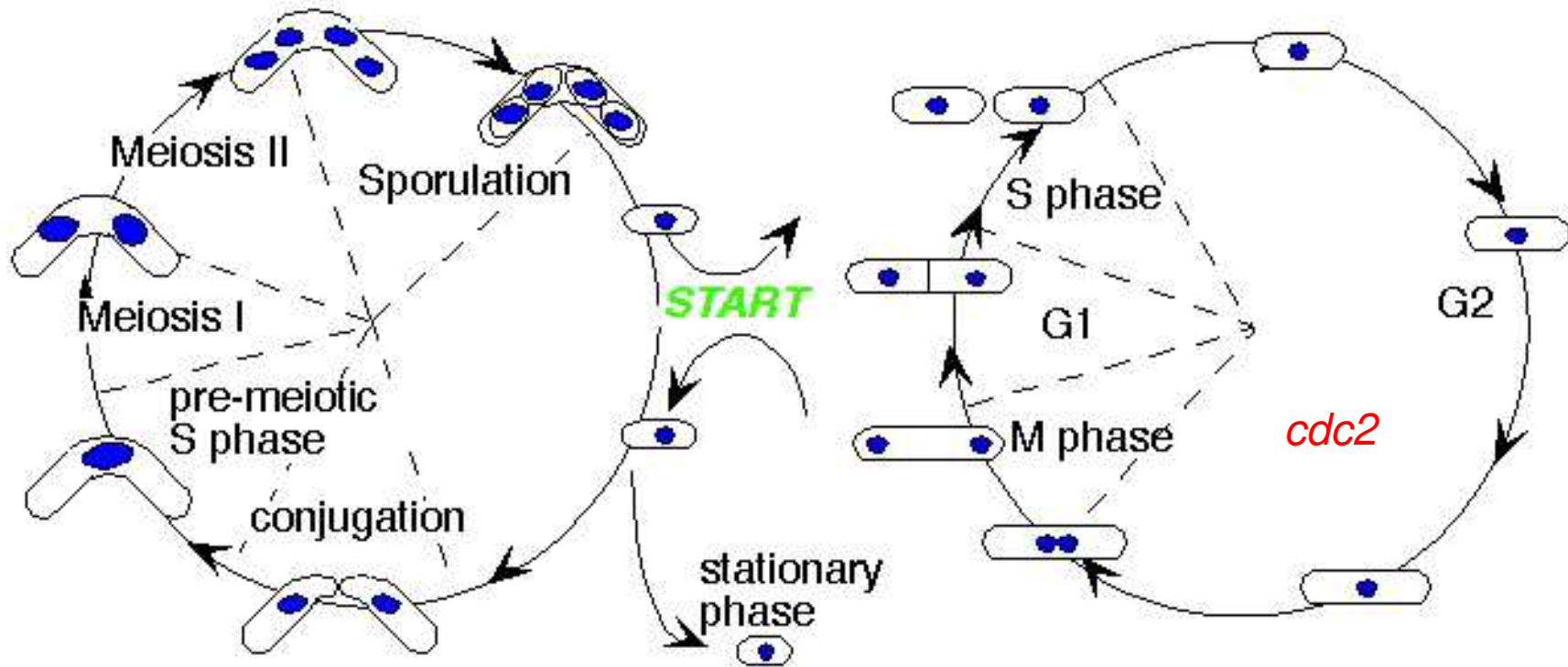
Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C ^a	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky ^b
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky ^b
„	121	0.38	32.1	„	
<i>cdc 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)

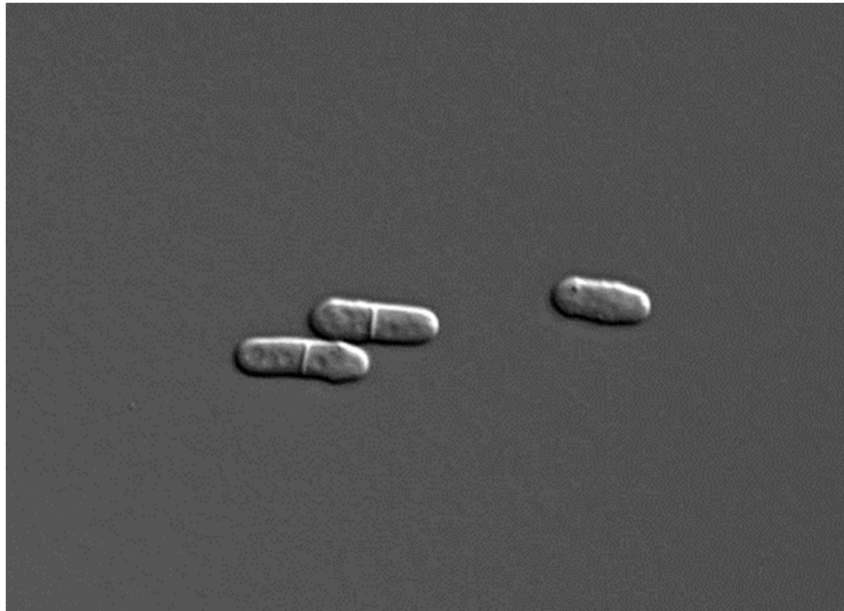


Meiotic cycle

Vegetative (mitotic) cycle

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

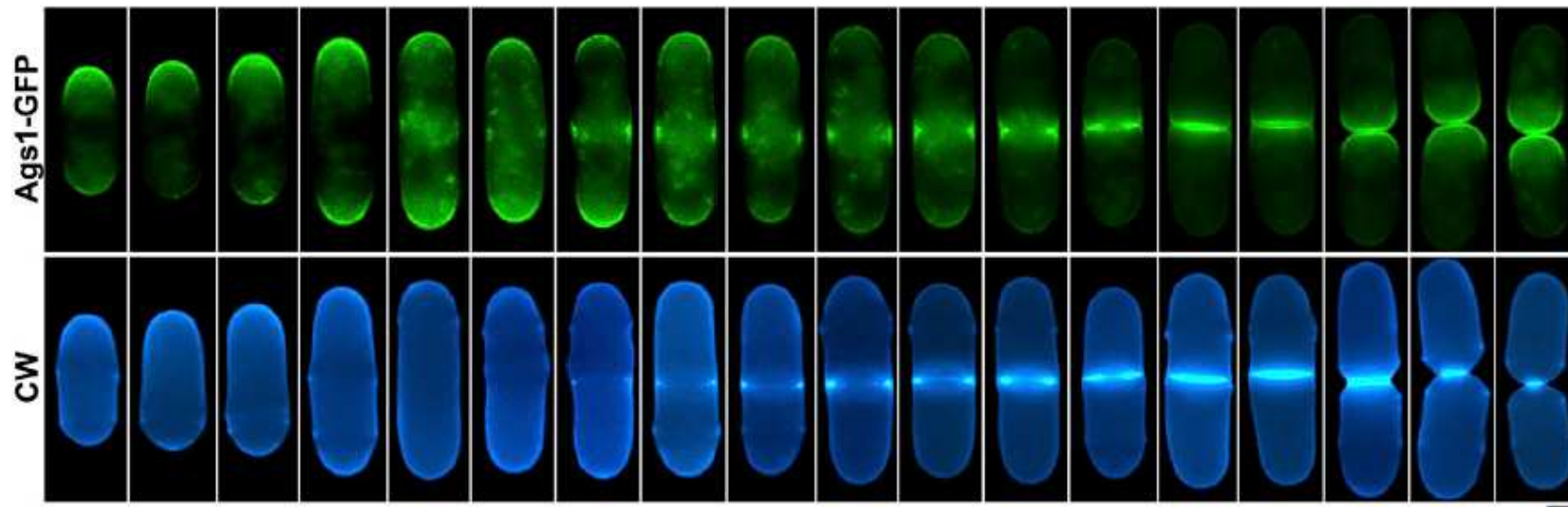
S. pombe



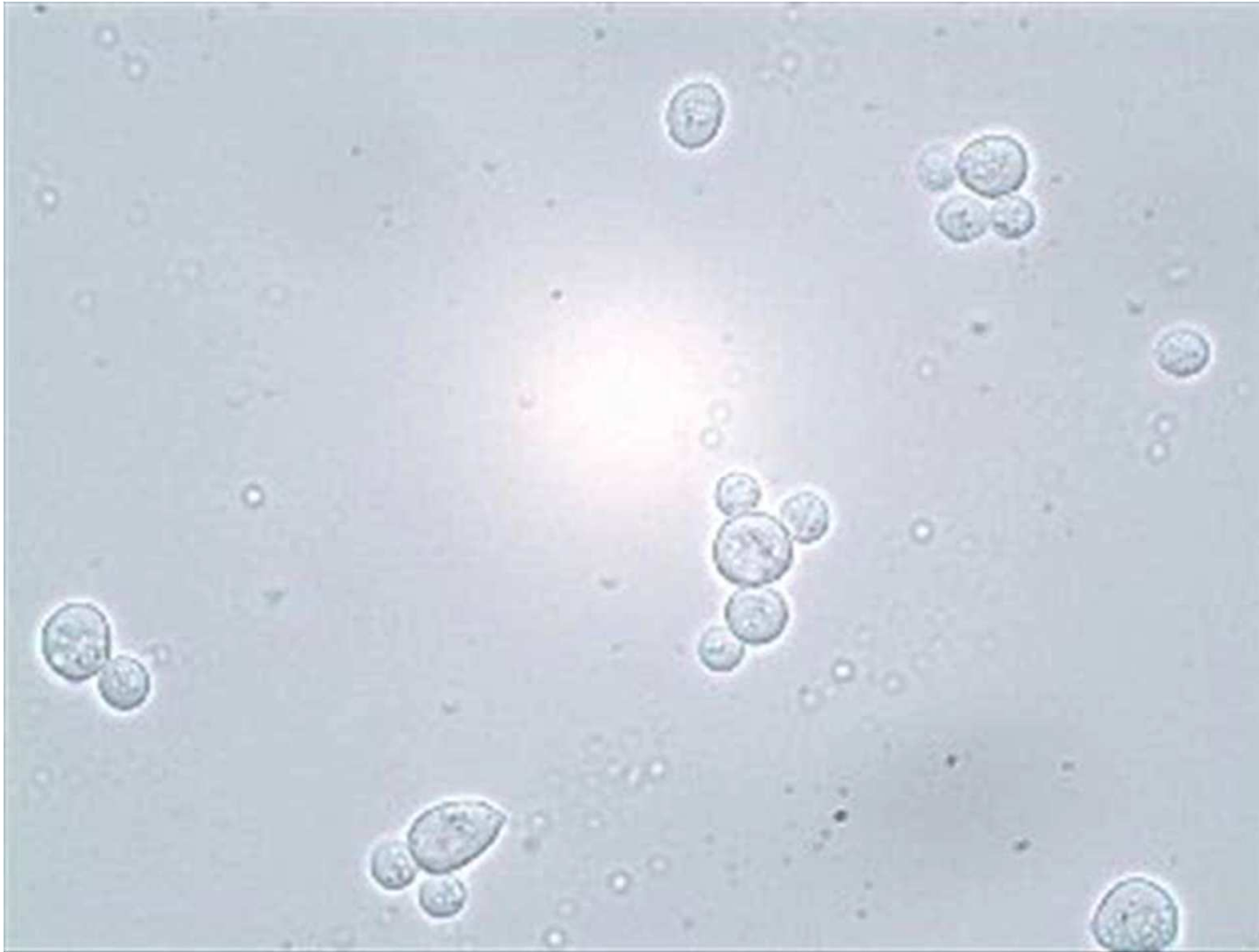
sekrece ... aktinový cytoskelet
jsou důležité pro procesy
polarizace ... v průběhu
buněčného cyklu ...
mating/fusion ...

- Více Dr. Špirek

Cortes et al, JCB, 2012

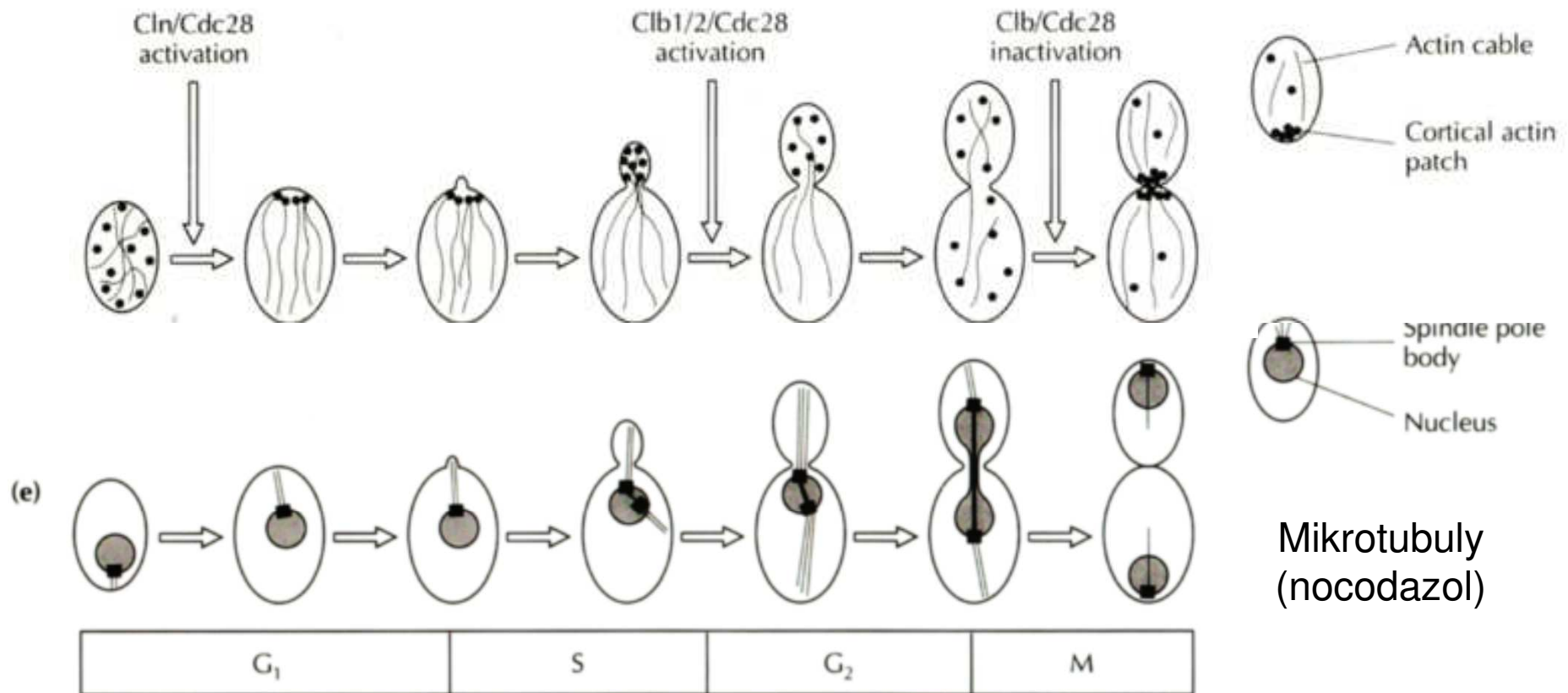


S. cerevisiae



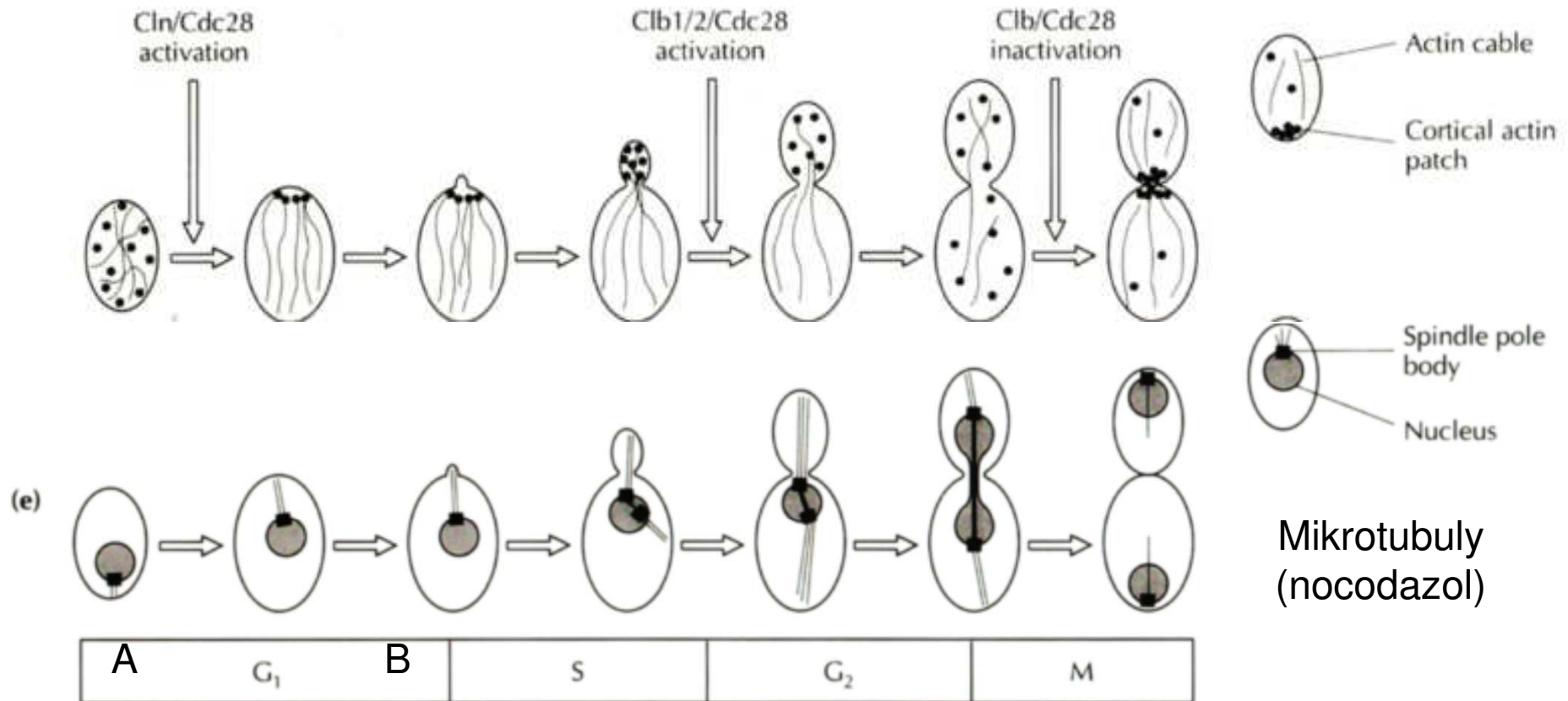
pučení ... párování (shmoo)

Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do 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

Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



- 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**

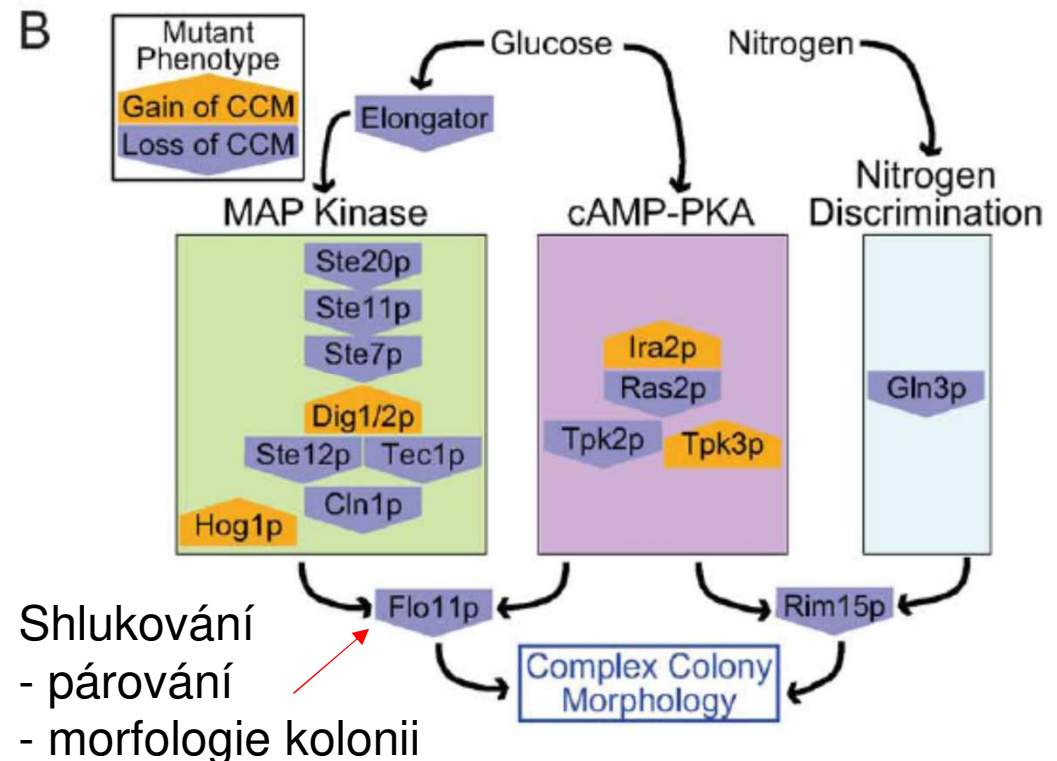
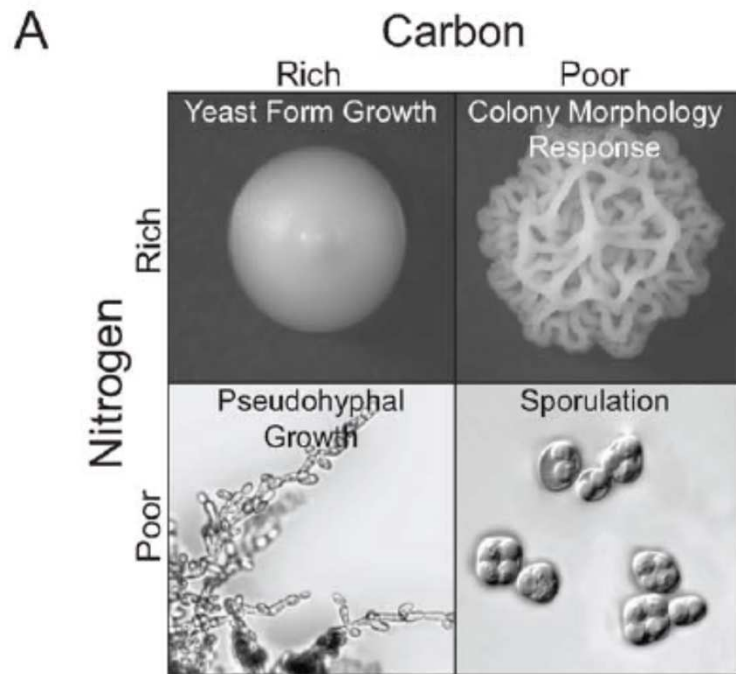
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

- 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 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 meiosu/sporulaci
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují

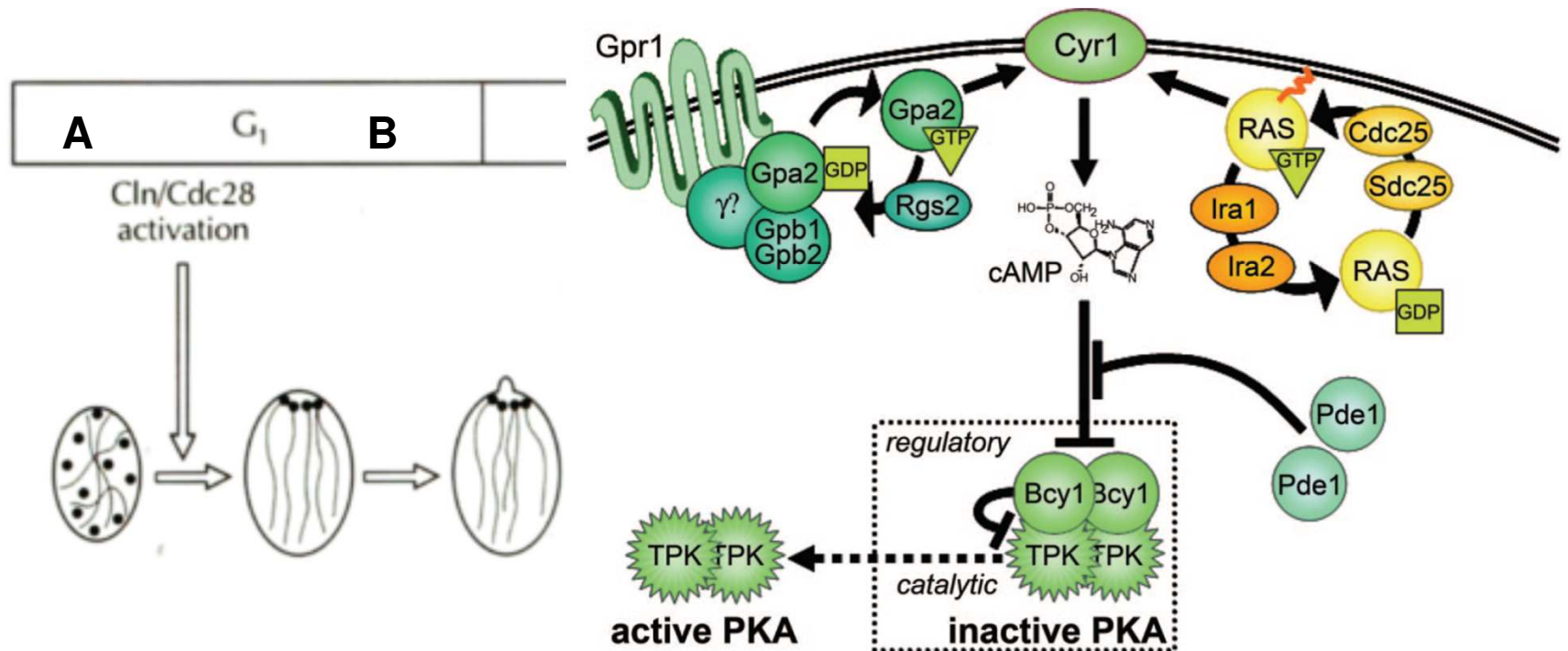


Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

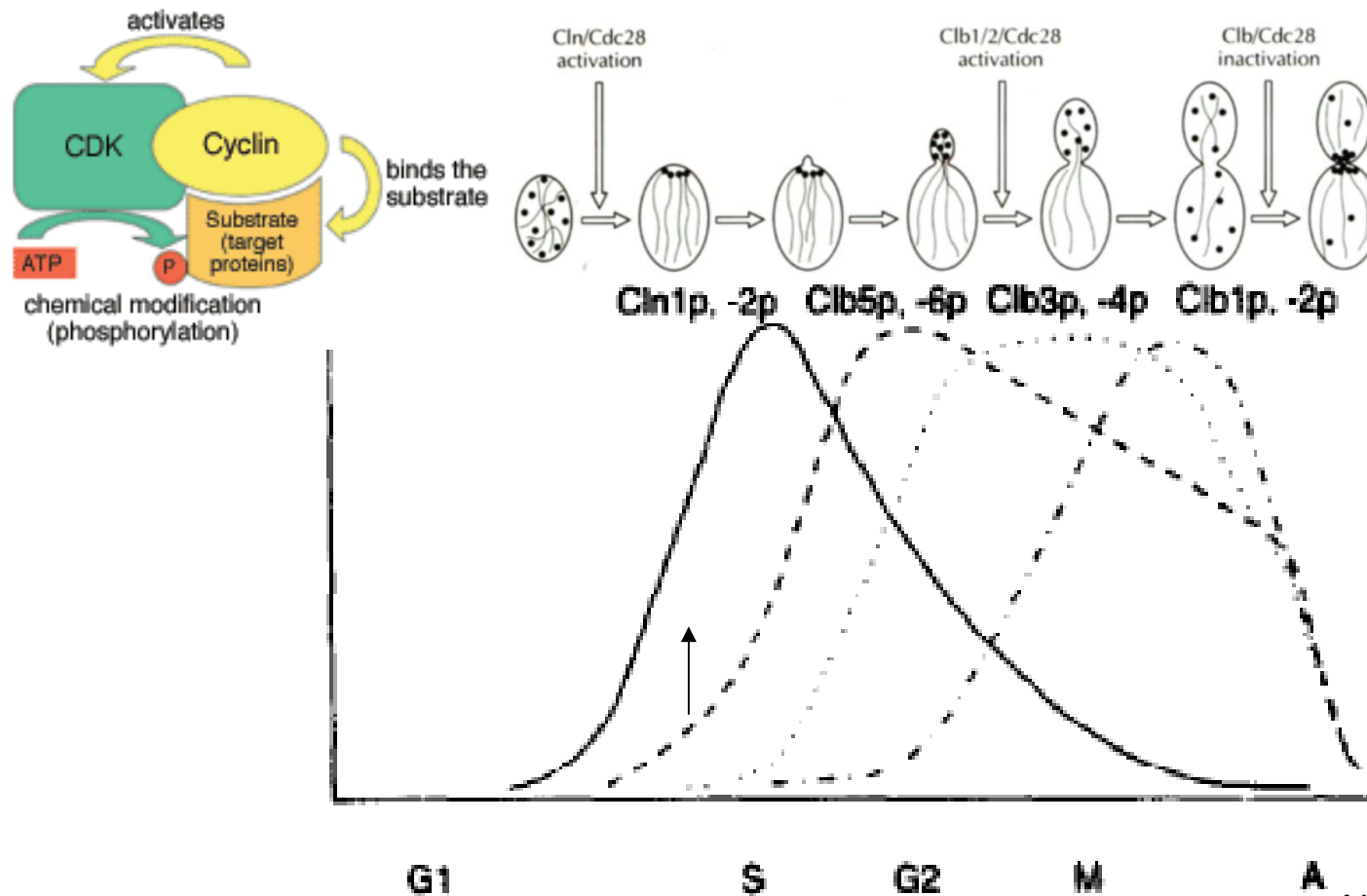
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



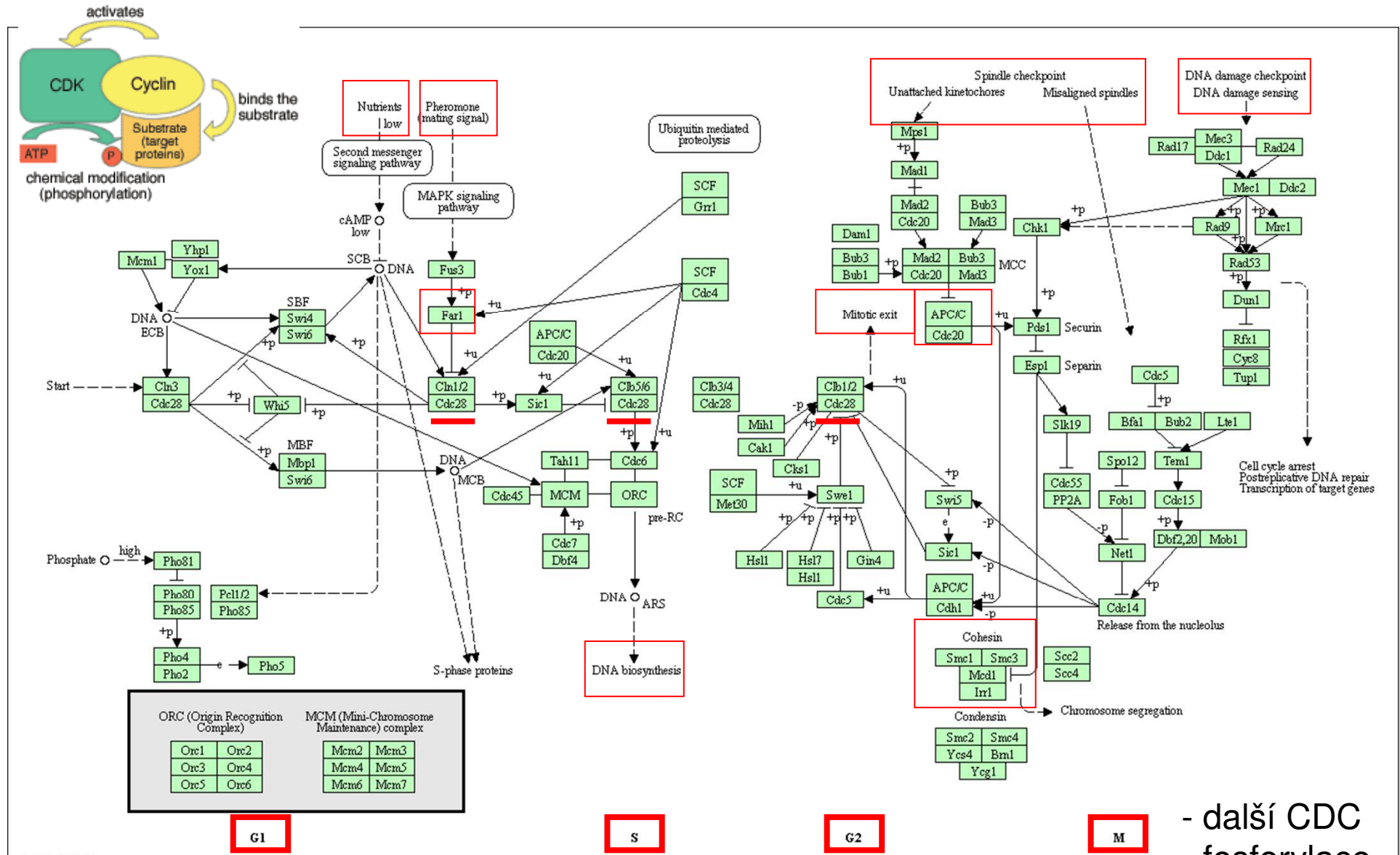
CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakcí fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká **aktivní kinasový komplex**:

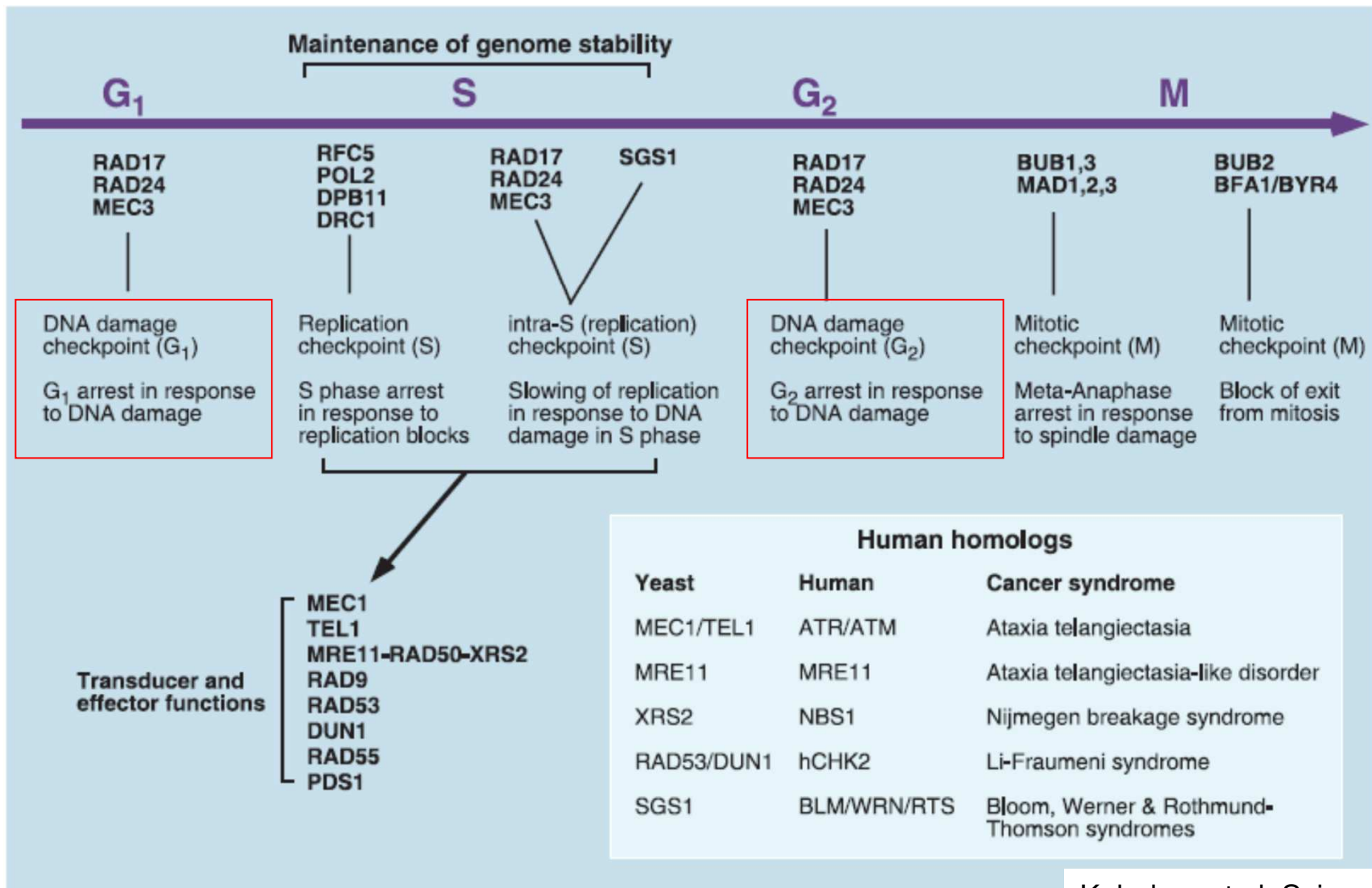
- v G1 fázi *Cln1p* a *Cln2p* (CLN3 mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *Clb5p* a *Clb6p* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se účastní *Clb3p* a *Clb4p*
- mitózu ukončují *Clb1p* a *Clb2p* a jejich degradace



Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



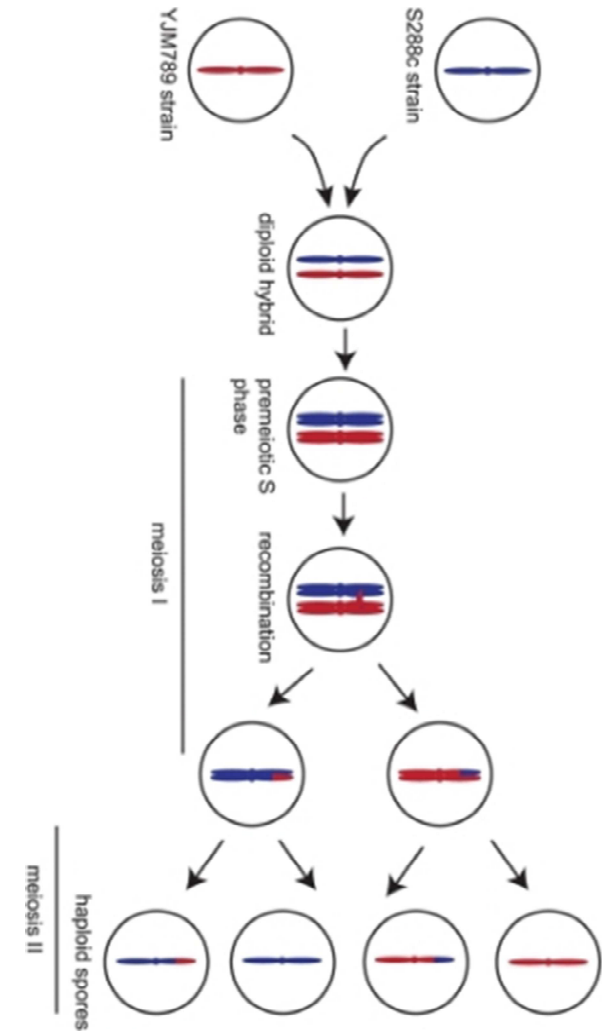
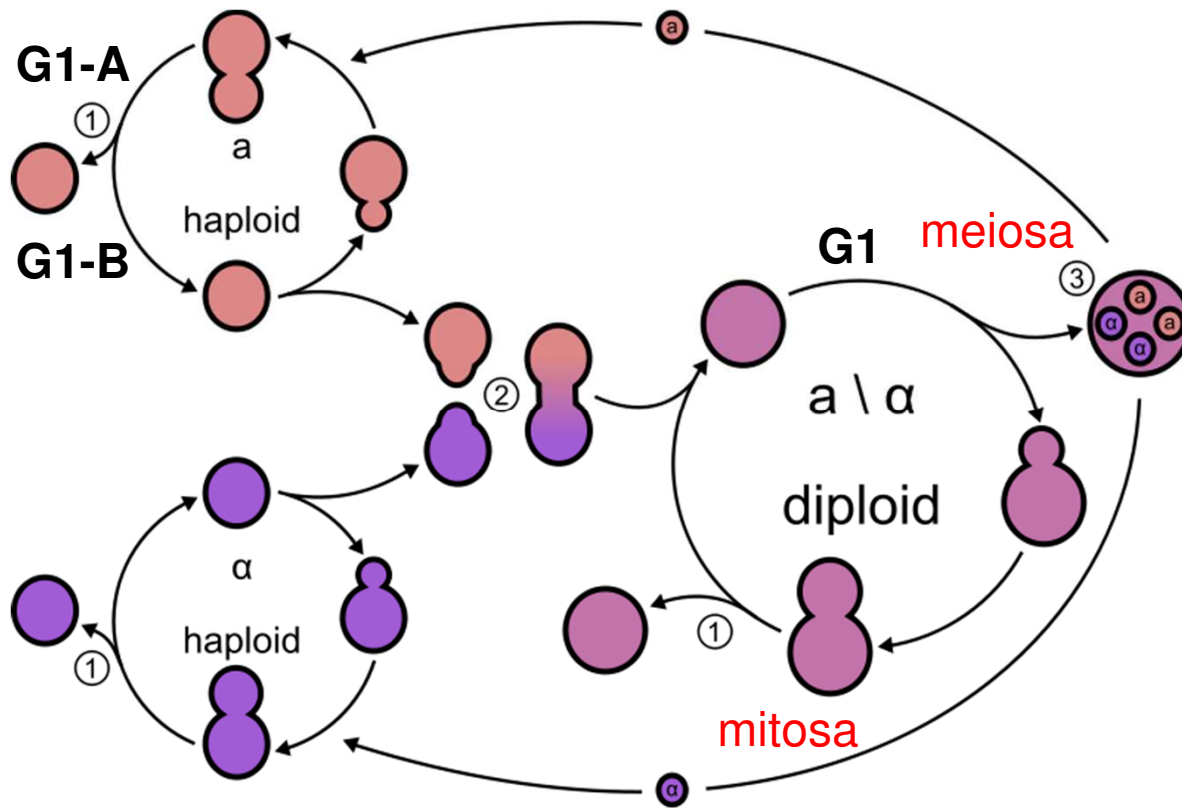
- další CDC
- fosforylace
- ubiquitylace



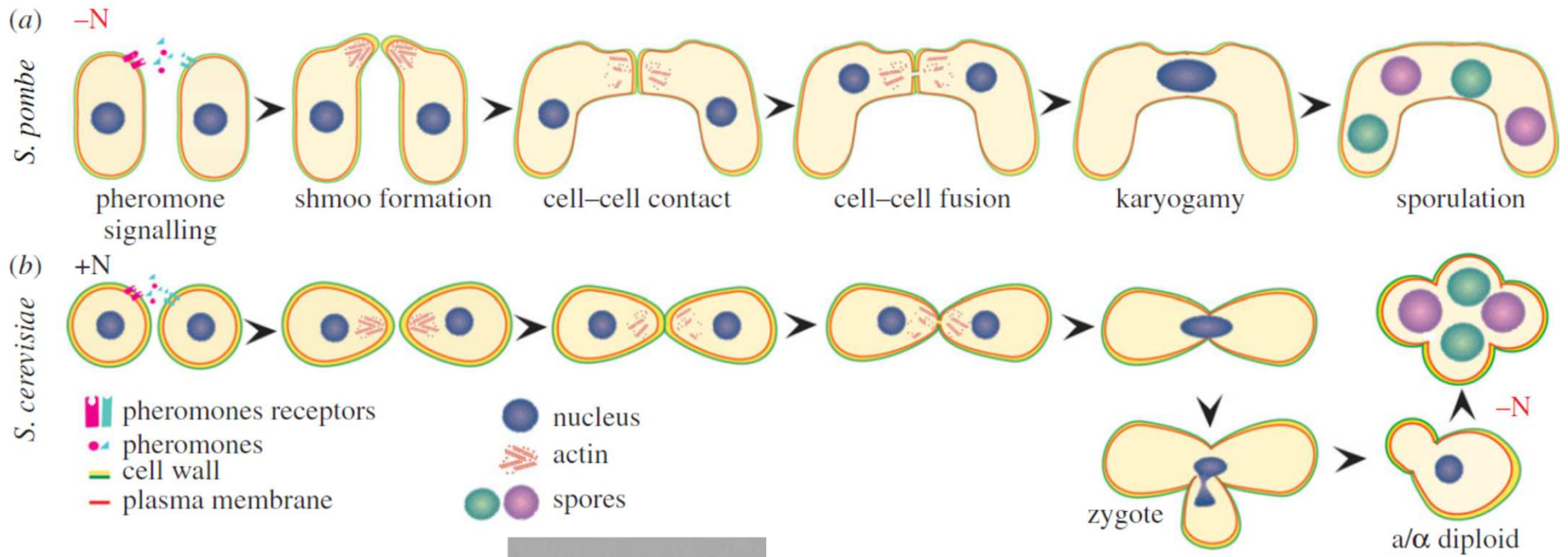
Kolodner et al, Science (2002)

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)

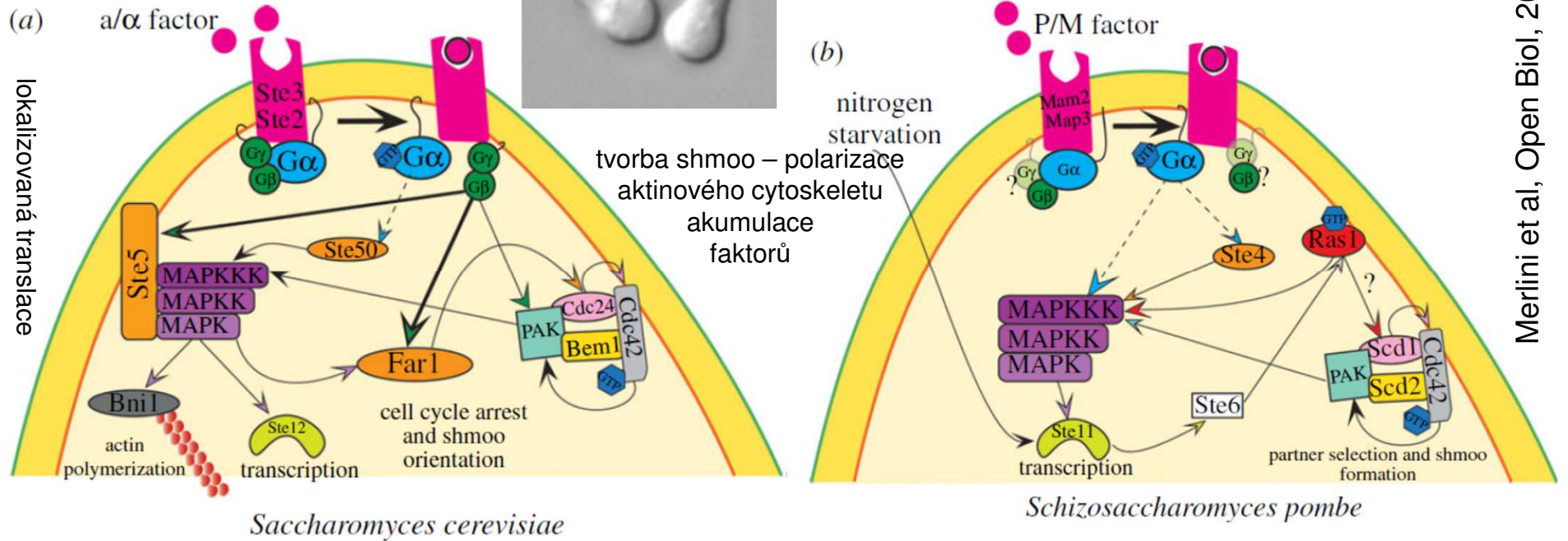
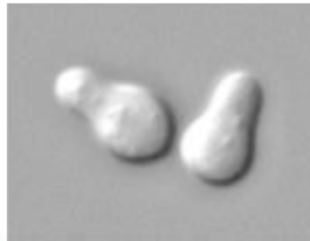
Párování/mating kvasinkových buněk



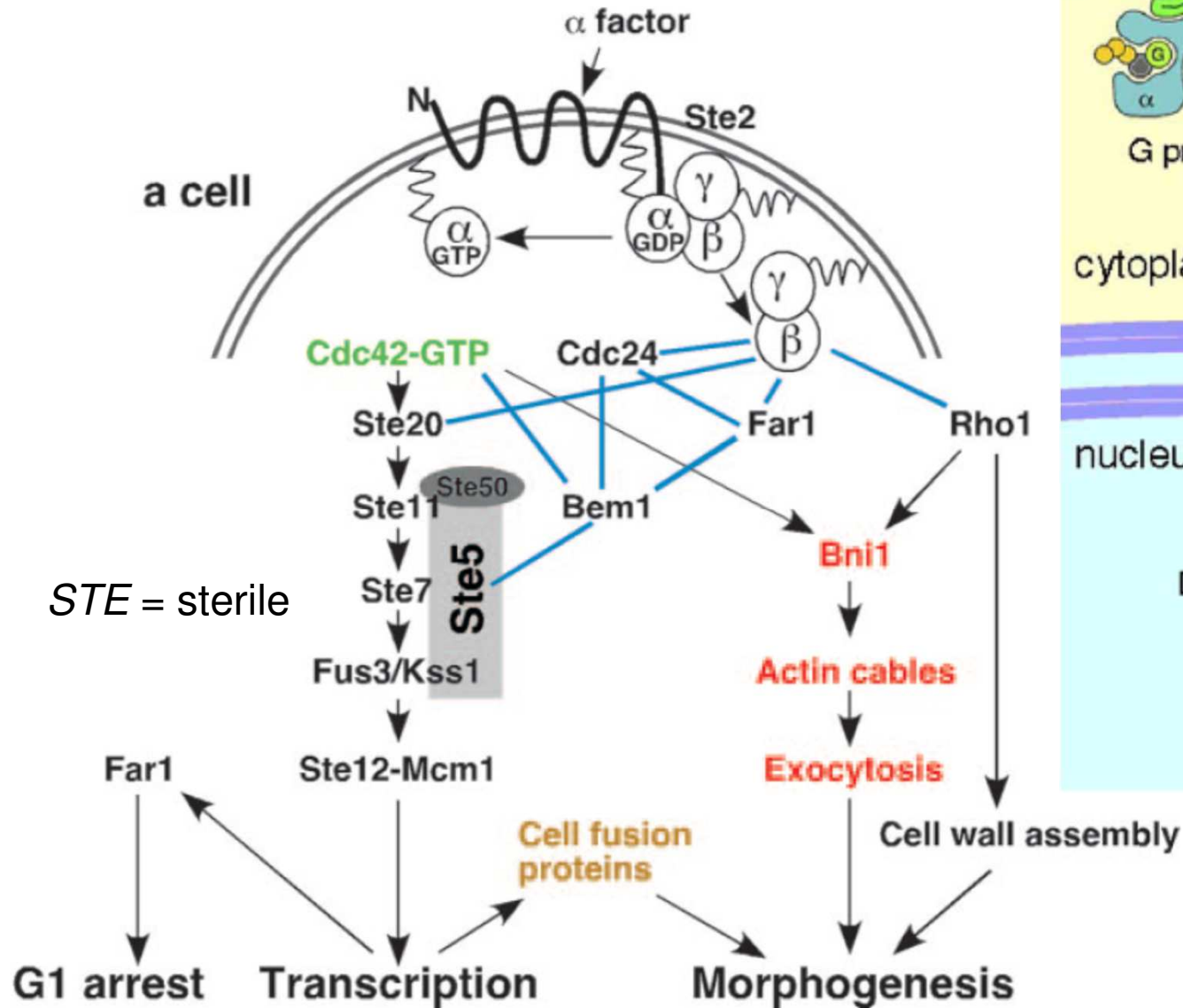
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují ... meiotické dělení
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii



STE = sterile

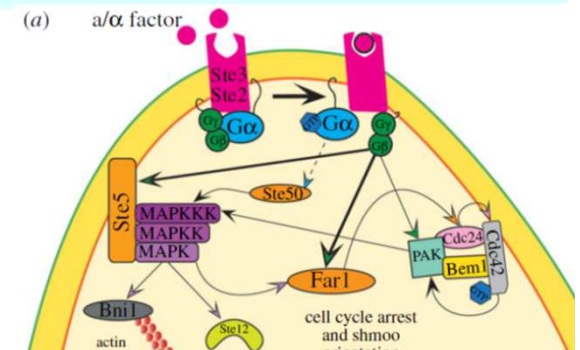
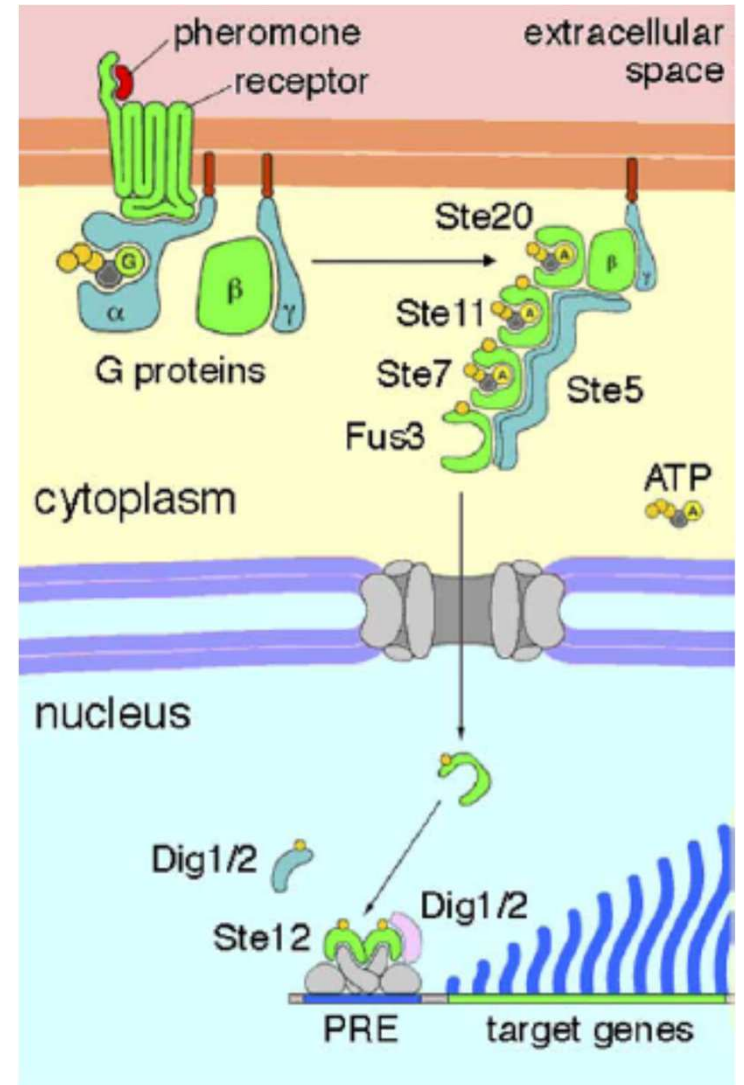


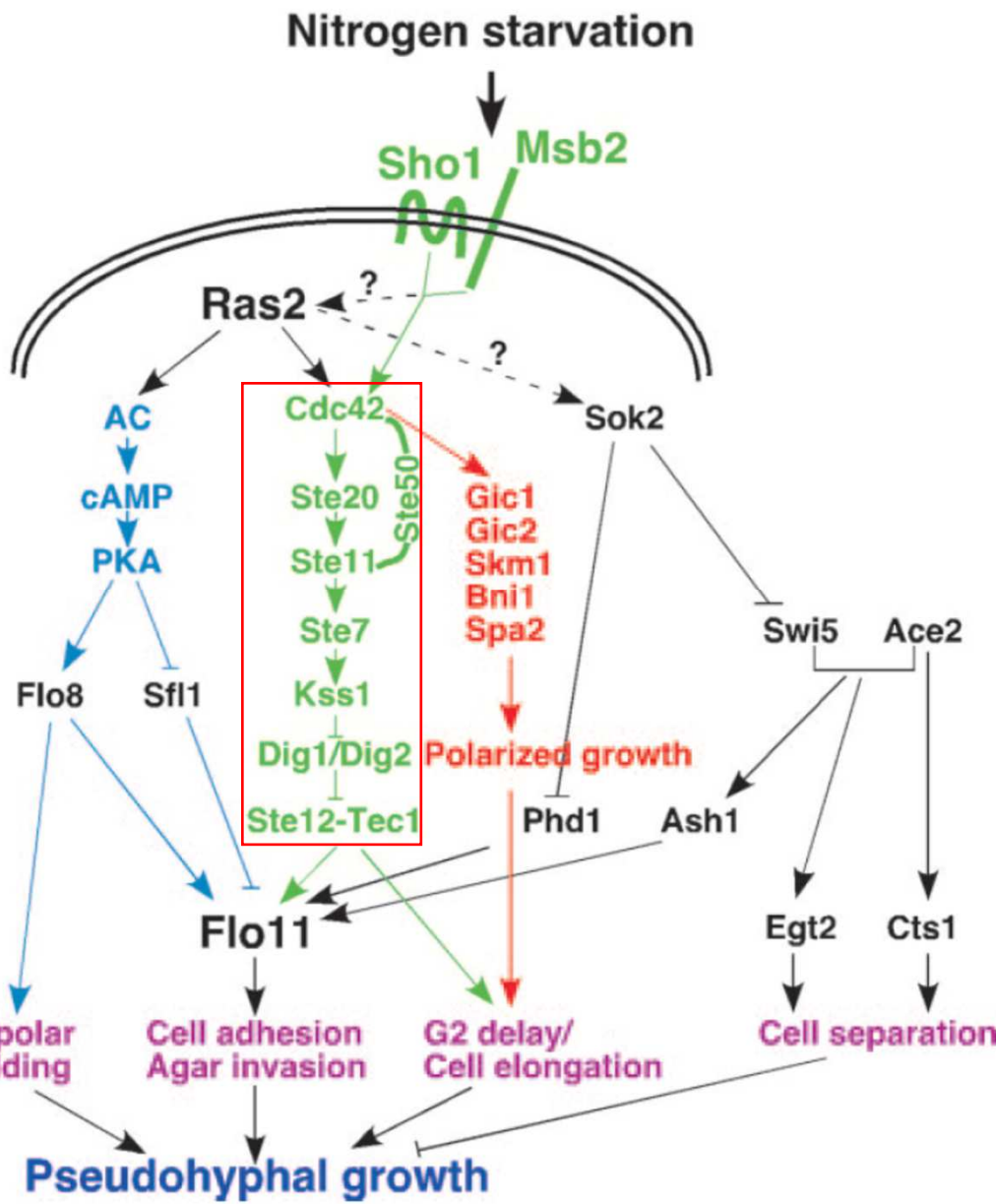
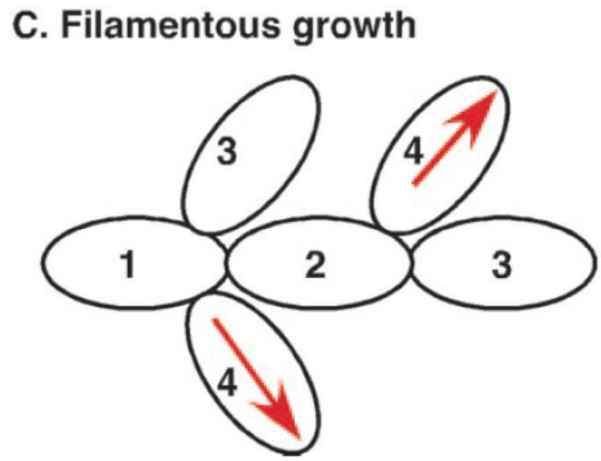
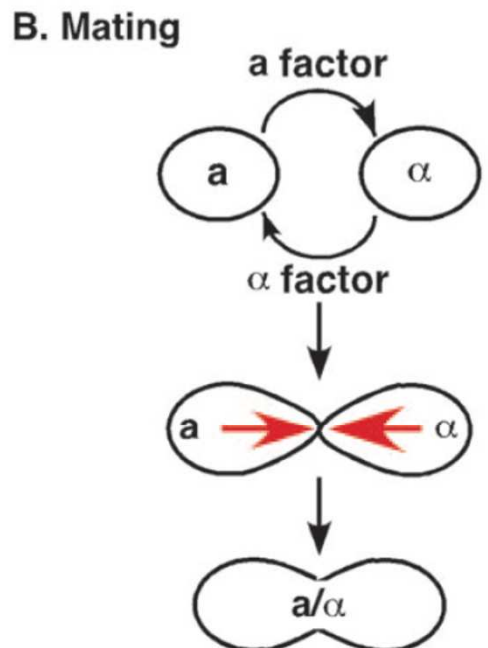
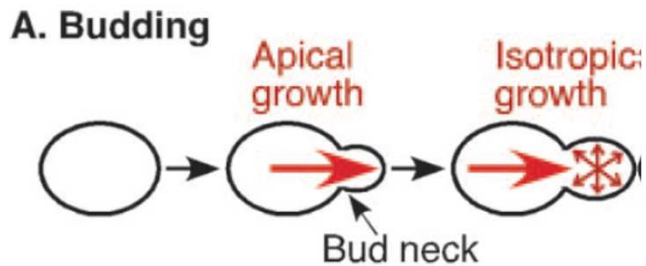
Signální dráha – α faktor



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:

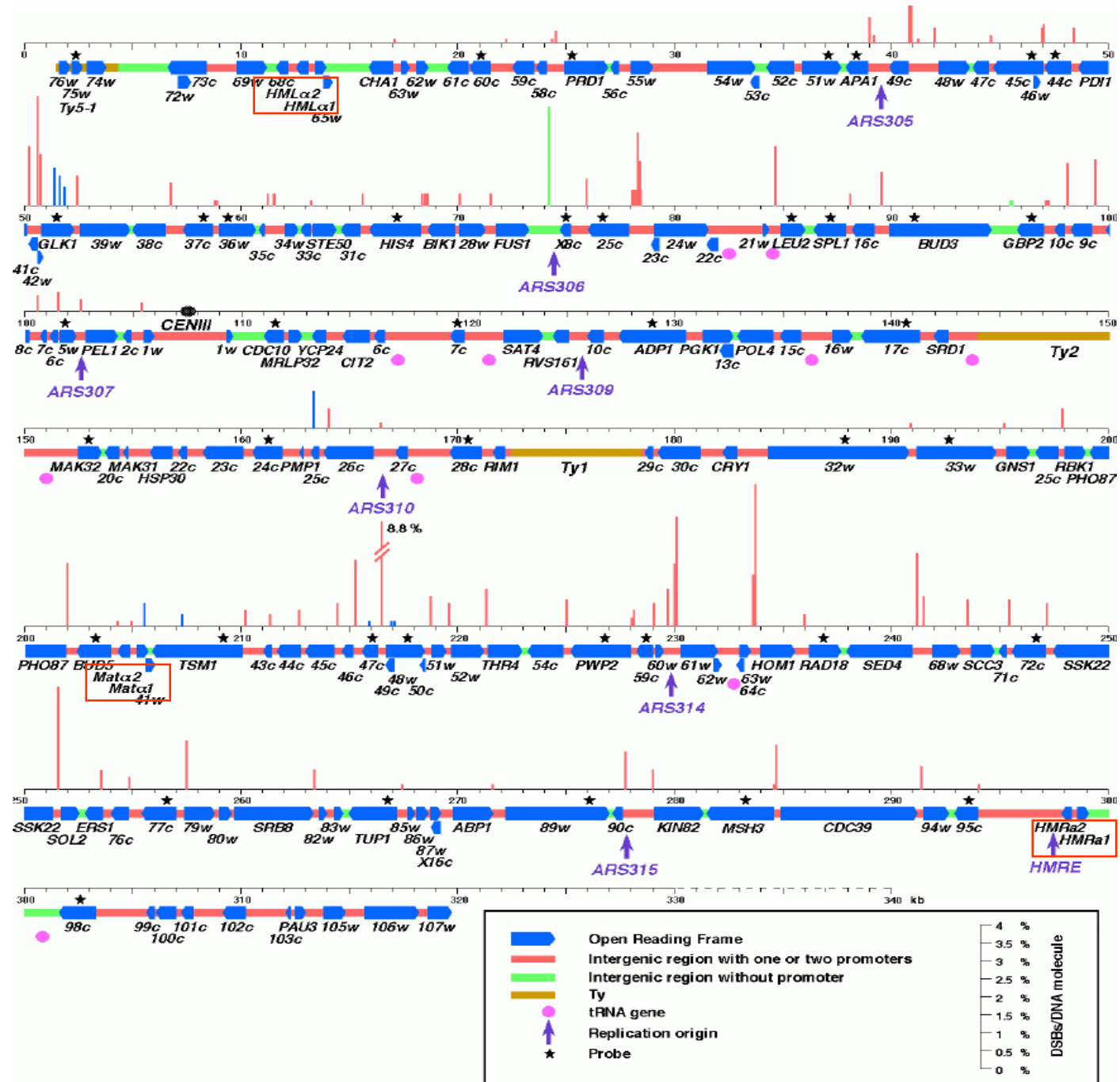
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

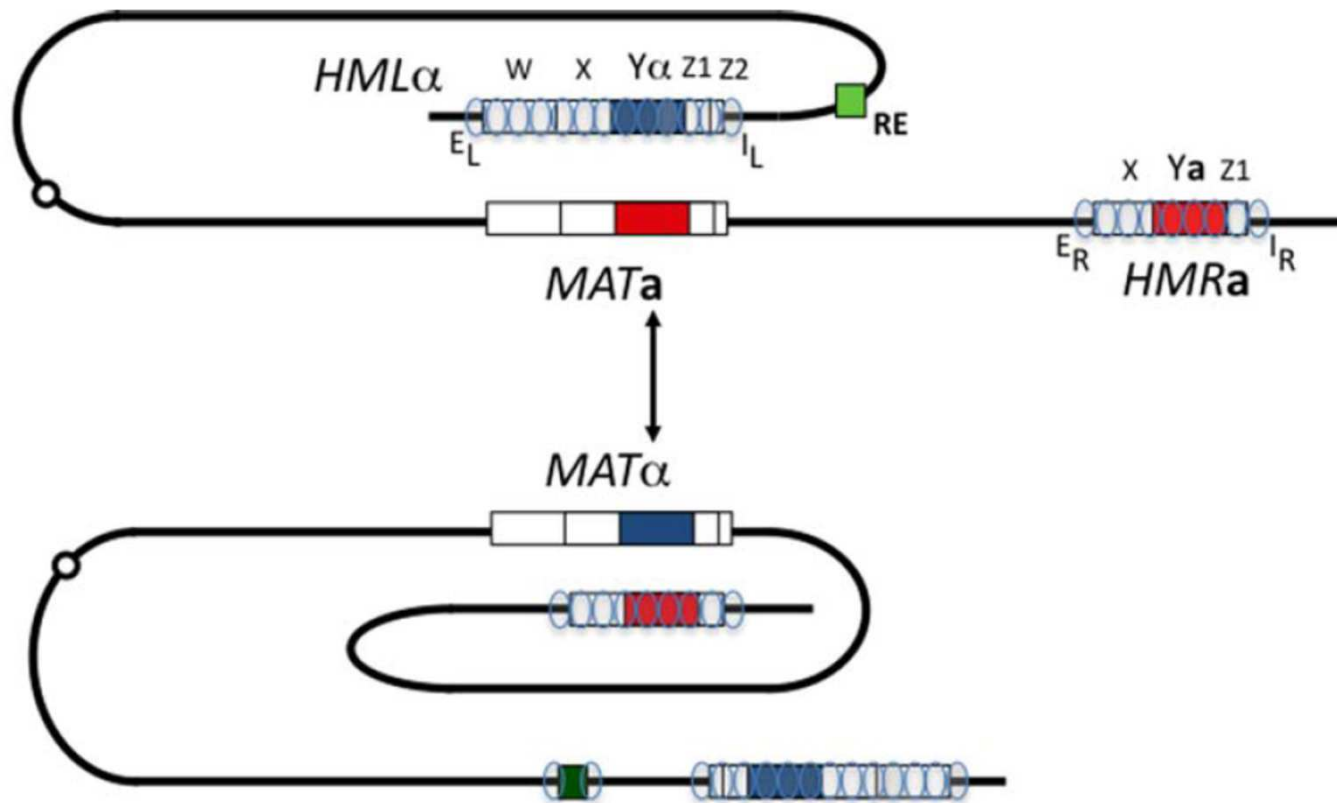
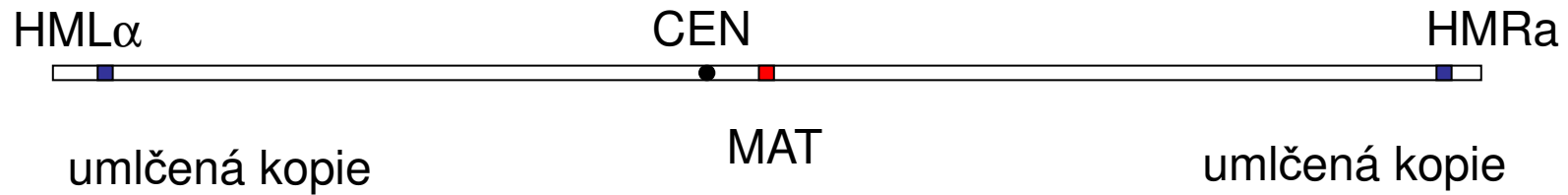
HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické – stabilní
Homothalické – přepínají párovací typ



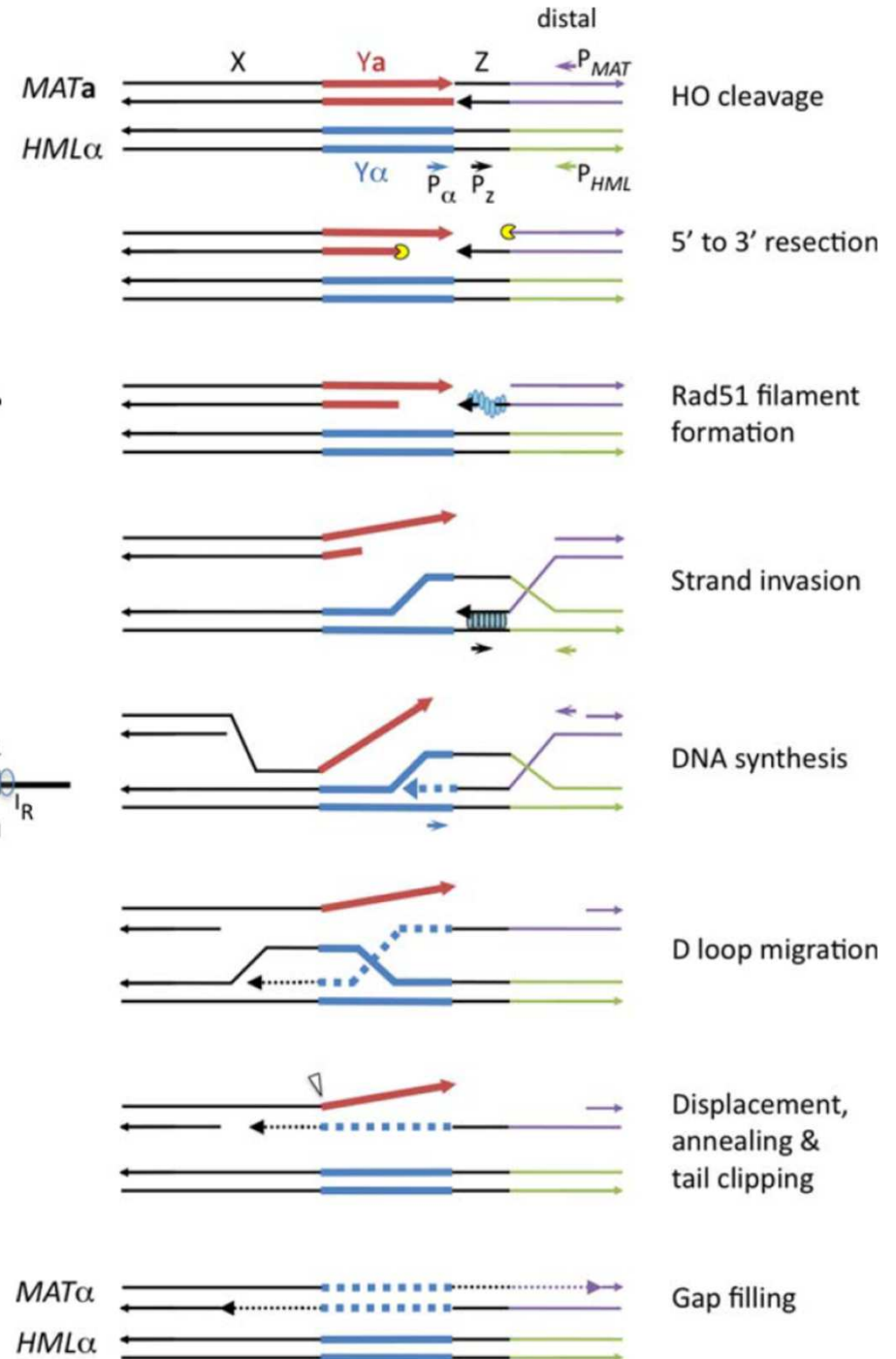
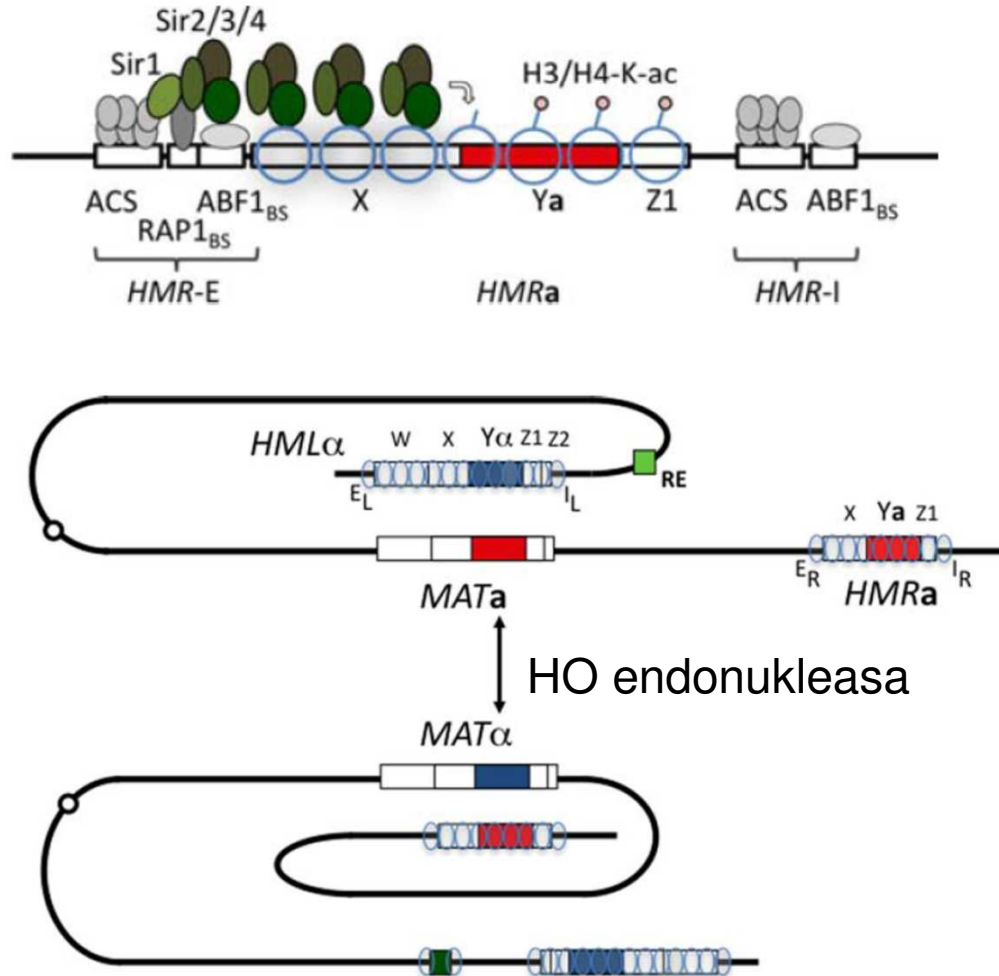
Přepínání párovacího typu

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

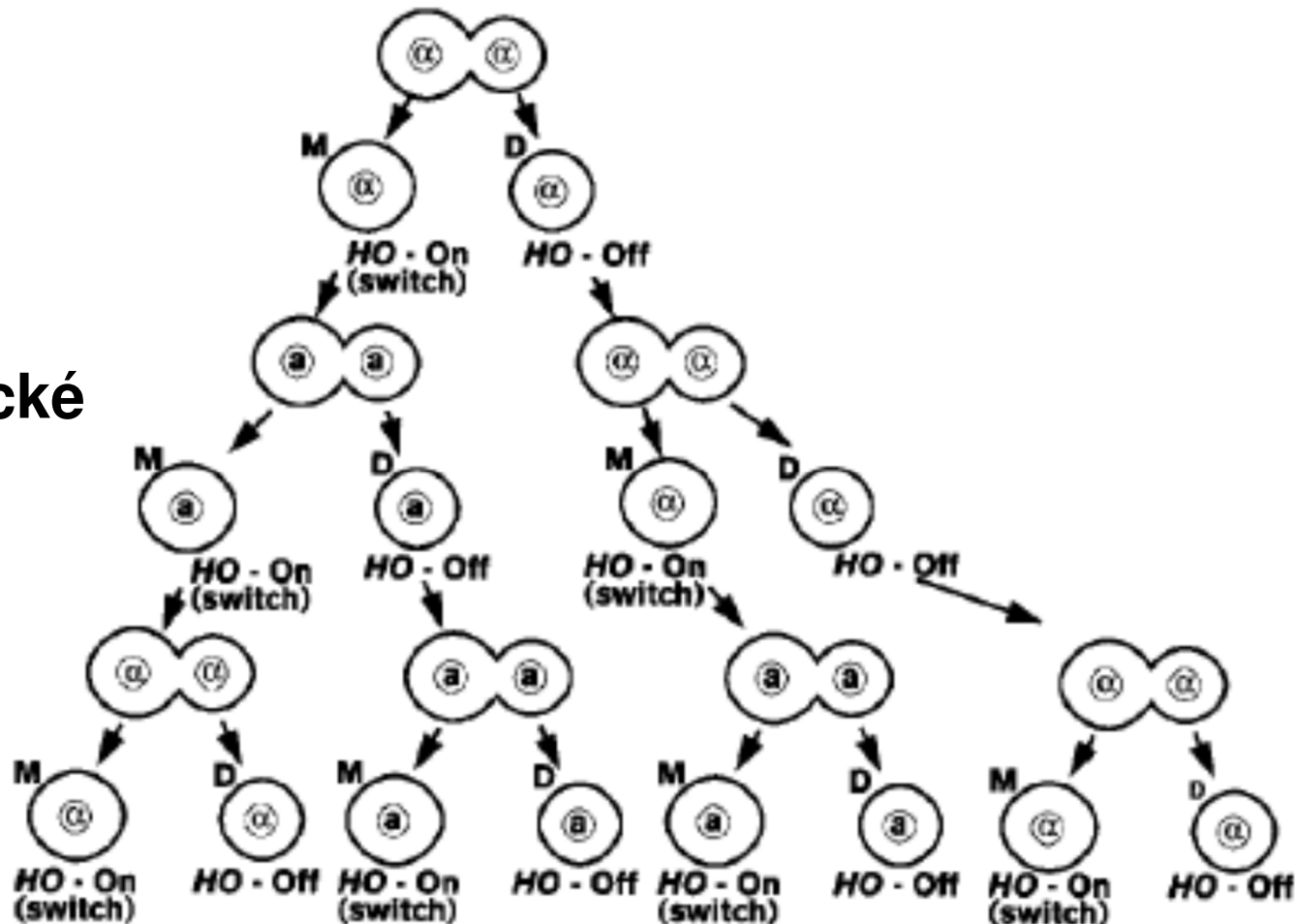


Přepínání párovacího typu

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

Heterotalické – nemají funkční HO endonukleasu

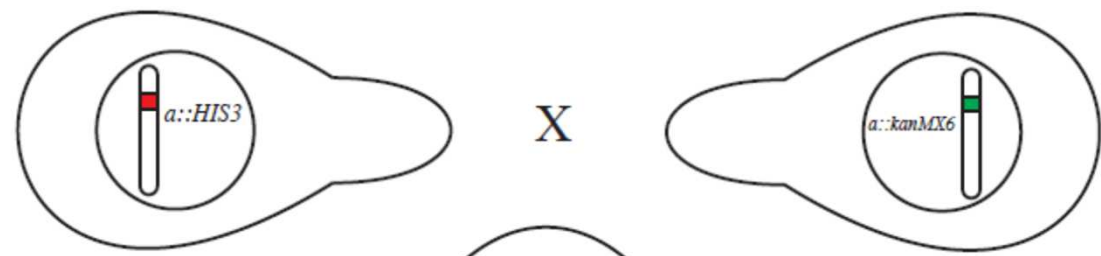
homotalické



Příprava aneuploidních buněk

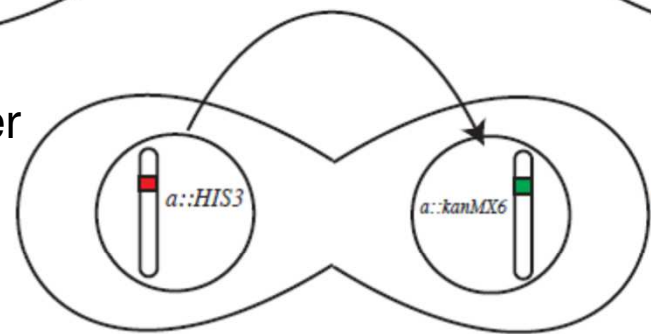
MAT α , kar1 Δ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3

MAT α , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100

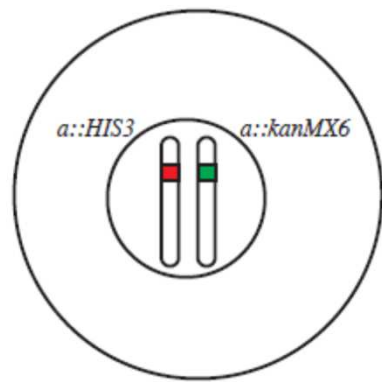


KAR1 gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

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



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?

