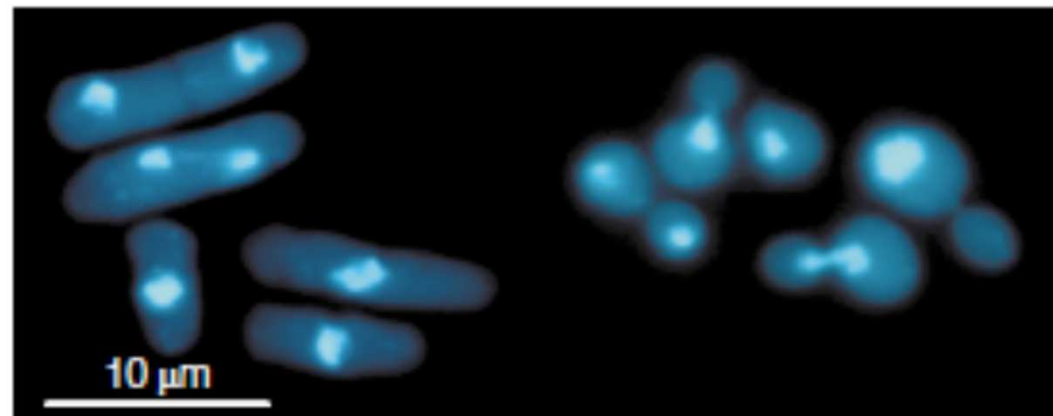


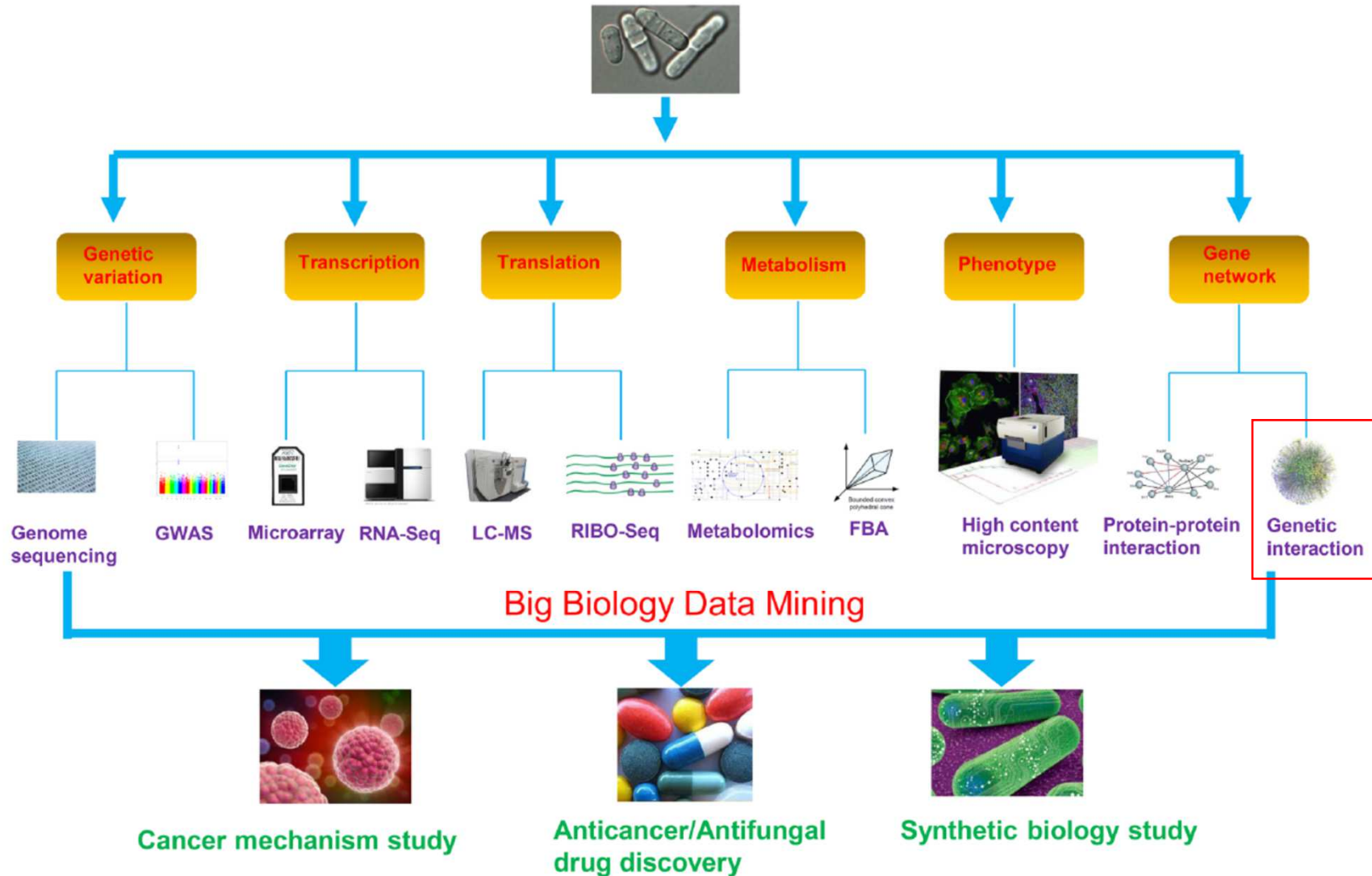
# Osnova 4. přednášky

## GENETIKA

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



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



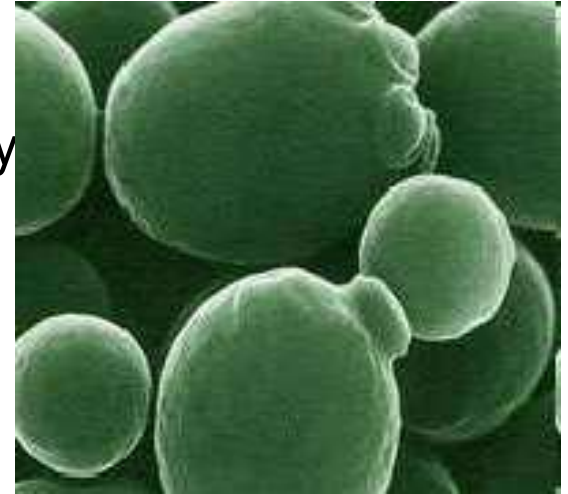
# kvasinkové modely

- 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

...

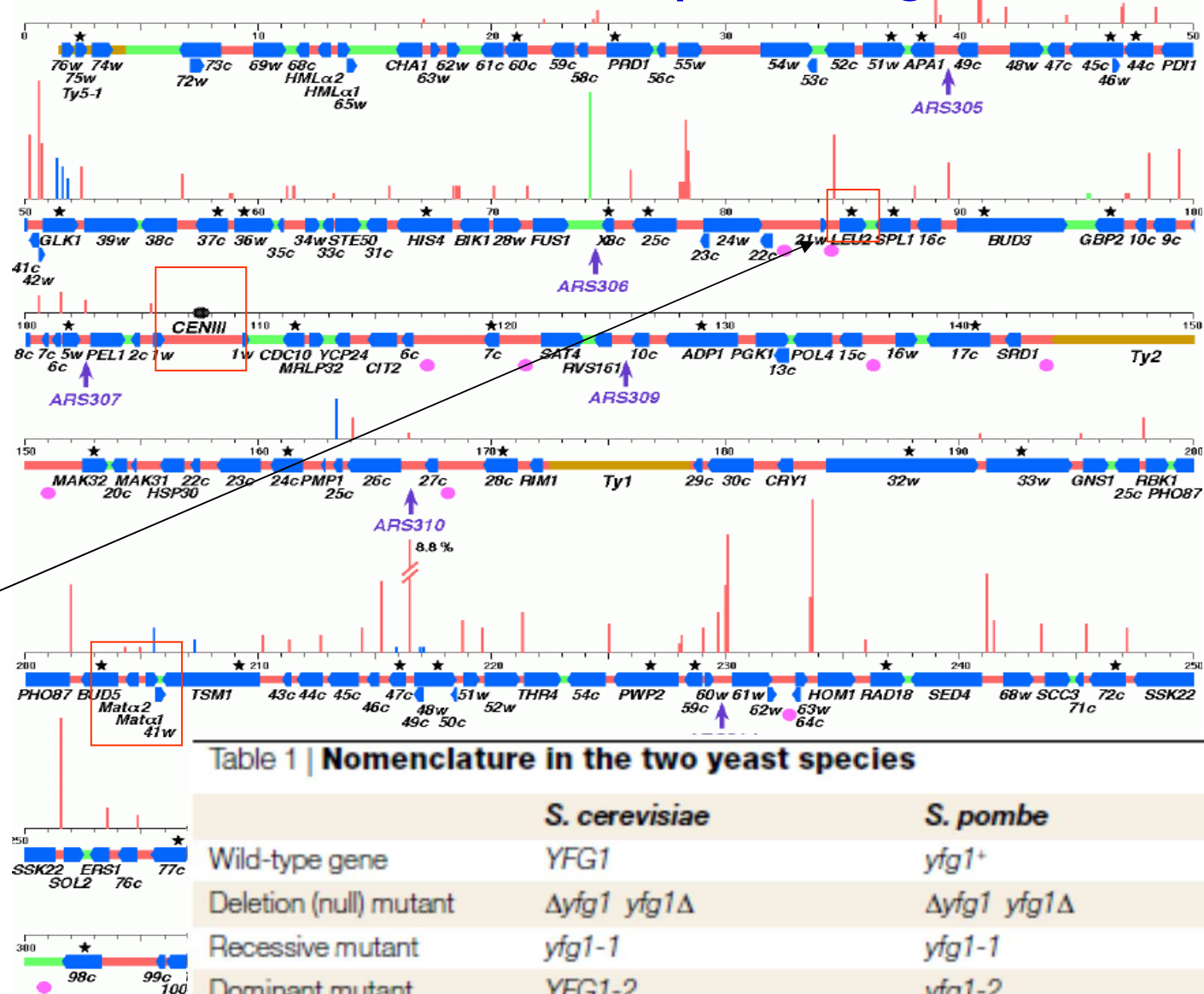


Table 1 | Nomenclature in the two yeast species

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Wild-type gene	<i>YFG1</i>	<i>yfg1<sup>+</sup></i>
Deletion (null) mutant	$\Delta yfg1$ <i>yfg1Δ</i>	$\Delta yfg1$ <i>yfg1Δ</i>
Recessive mutant	<i>yfg1-1</i>	<i>yfg1-1</i>
Dominant mutant	<i>YFG1-2</i>	<i>yfg1-2</i>
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](#)

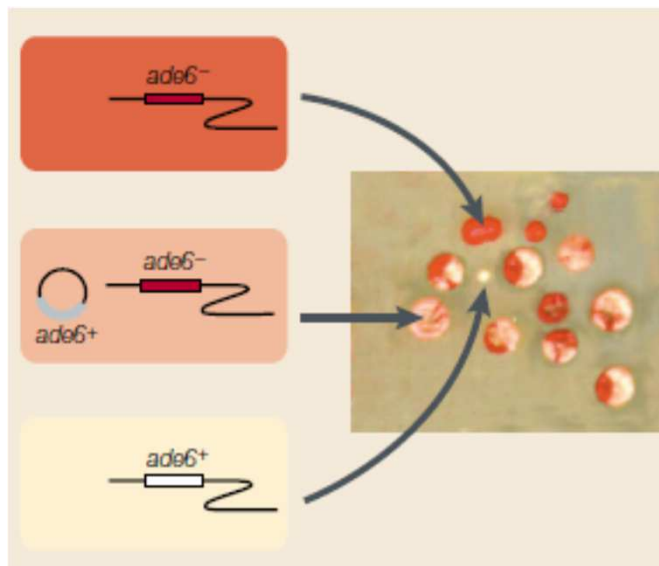
**auxotrofie – využívána pro selekci**

Dvojhybridní systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-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<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-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<sup>r</sup>2, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3 :: GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.



Allele	Reverts?	Notes	Molecular description <sup>a</sup>	Reference
<a href="#"><u>ade2-101</u></a>	yes	ochre mutation, <b>red colonies</b>	G to T transversion at nucleotide 190, changing amino acid 64 from a Glu to a <b>STOP</b>	<a href="#"><u>Gai and Voytas, 2005</u></a>
<a href="#"><u>his3-200</u></a>	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during transformation.	1 kb <b>deletion</b> , (-205 to 835)	<a href="#"><u>Struhl 1985</u></a> ; <a href="#"><u>Fasullo and Davis 1988</u></a>
<a href="#"><u>leu2-3,112</u></a>	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.	<a href="#"><u>Hinnen et al. 1978</u></a> ; <a href="#"><u>Gaber and Culbertson 1982</u></a> ;
<a href="#"><u>trp1-1</u></a>	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber ( <b>STOP</b> ) nonsense change at codon 83	<a href="#"><u>McDonald, et al. 1997</u></a>
<a href="#"><u>ura3-52</u></a>	no	-	<b>Ty1 insertion</b>	<a href="#"><u>Rose and Winston 1984</u></a>



### Genotype

### References

*MAT $\alpha$* , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*,  
*gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*,  
*GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*,  
*URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

James *et al.*, 1996;  
A. Holtz, unpublished

*MAT $\alpha$* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*,  
*leu2-3, 112*, *gal4 $\Delta$* , *met<sup>-</sup>*, *gal80 $\Delta$* ,  
*URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

Harper *et al.*, 1993

*MAT $\alpha$* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*,  
*trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh<sup>r2</sup>*,  
*LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*,  
*URA3 :: GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-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>
<b>Regulated promoter</b>	<i>GAL</i> (galactose regulated)	<i>nmt</i> (thiamine regulated)
<b>Plasmid replication origins</b>	<i>ARS1</i> or $2\mu$	<i>ars1</i>
<b>Auxotrophic markers</b>		
Uracil, orotidine 5'-phosphate decarboxylase Select against with 5-FOA	<i>URA3</i>	<i>ura4<sup>+</sup></i>
Leucine, $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase	<i>LEU2</i>	<i>leu1<sup>+</sup></i>
Adenine, phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase Accumulates red colour	<i>ADE2</i>	<i>ade6<sup>+</sup></i>

$2\mu$  (2 micron), an endogenous plasmid DNA molecule found in some yeast cells, with a circumference of  $2\mu$ ; 5-FOA, 5'-fluoro-orotic acid. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

Forsburg: NRG, 2001

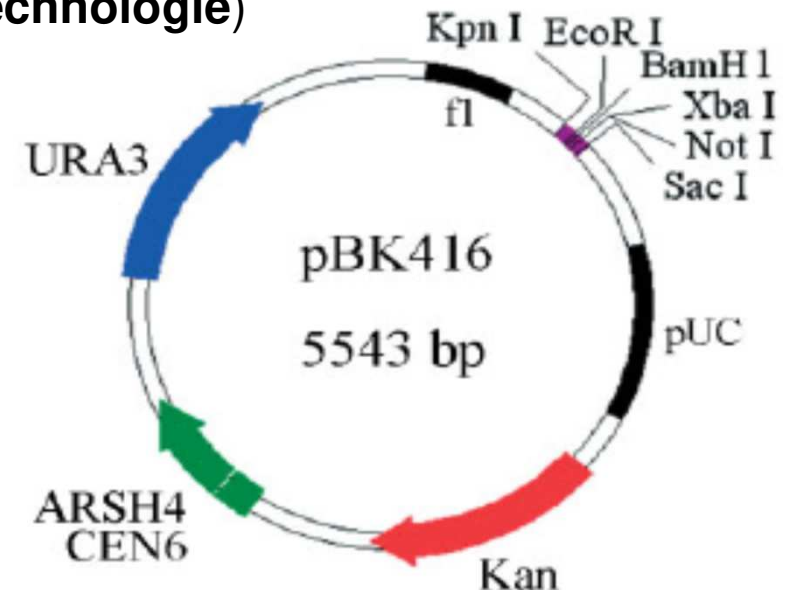
- **geneticin** (G418) – podobný kanamycinu (mistranlace)
- **nourseothricin** (NAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje NAT)
- **hygromycin B** – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid 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 $\mu$ m plasmidů nebo centromer (*S.c.*; 2 $\mu$ m přítomné také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilum*)
- Kvasinková část – marker (URA3, NAT ...), **CEN-ARS** (1 kopie) nebo 2 $\mu$ 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 <sup>b</sup>
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) <sup>c</sup>	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) <sup>d</sup> +++ <sup>d</sup>
<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.**

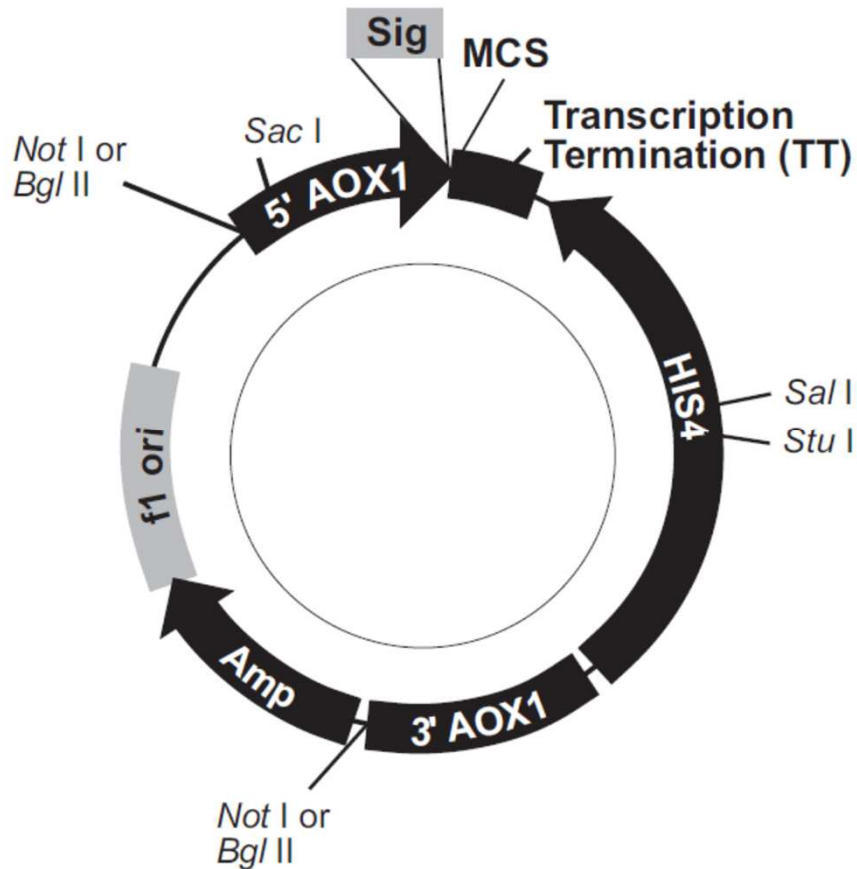
Strategies	Target	Strain	Genetic manipulation	Titer/achievement	References
Improving precursor supplement	FFA (C16: 66.3%, C18: 21.1%)	BY4727	Overexpression of <i>TesA</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , and <i>FAS2</i>	0.4 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FFA (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>Mus 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 $\beta$ -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 $\beta$ -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<sup>F262A,K266L</sup></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 $\mu$ m části

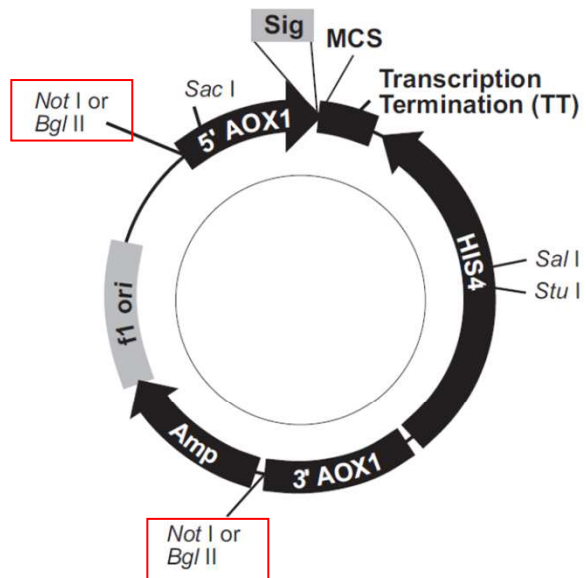


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)

- 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
Not I Bgl II Sac I Sal I Stu I	Unique restriction sites	Permits <u>linearization of vector</u> for efficient <u>integration into the <i>Pichia</i> genome</u>

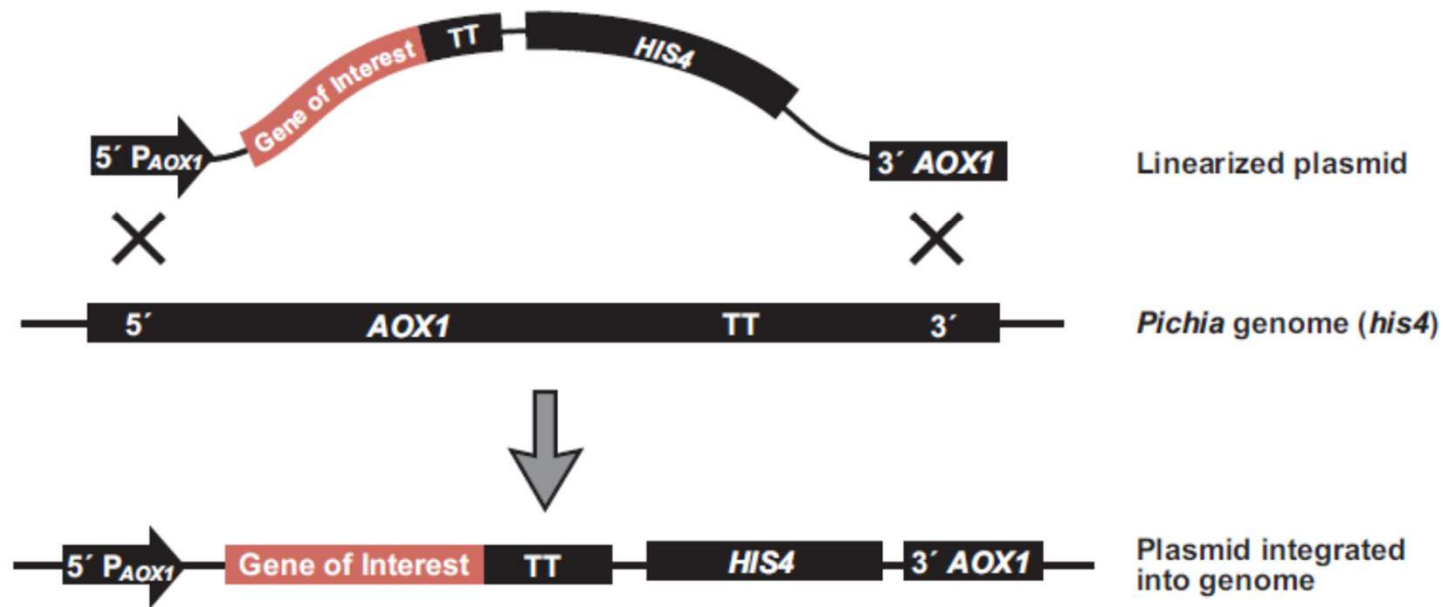
# Integrace I



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

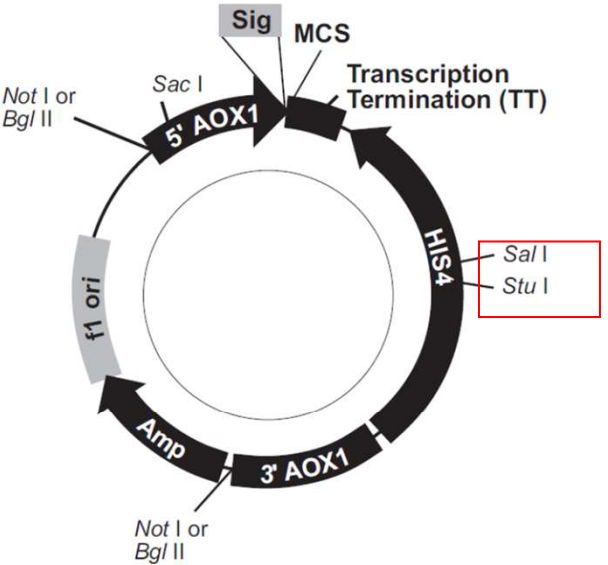
- integrace do AOX1 lokusu

- **mechanismus homologní rekombinace**

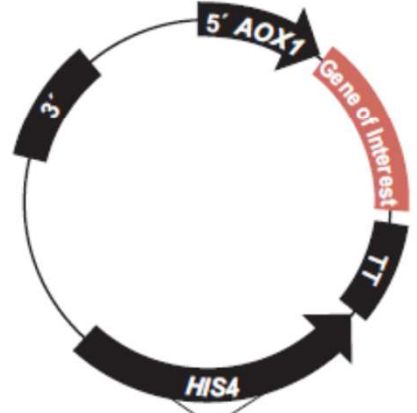




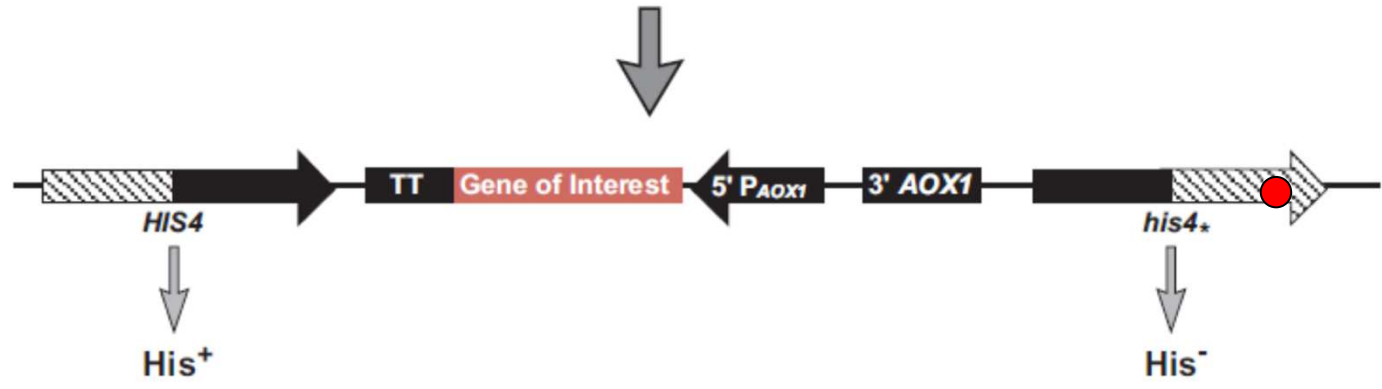
# Integrace II.



- integrace do *his4* lokusu



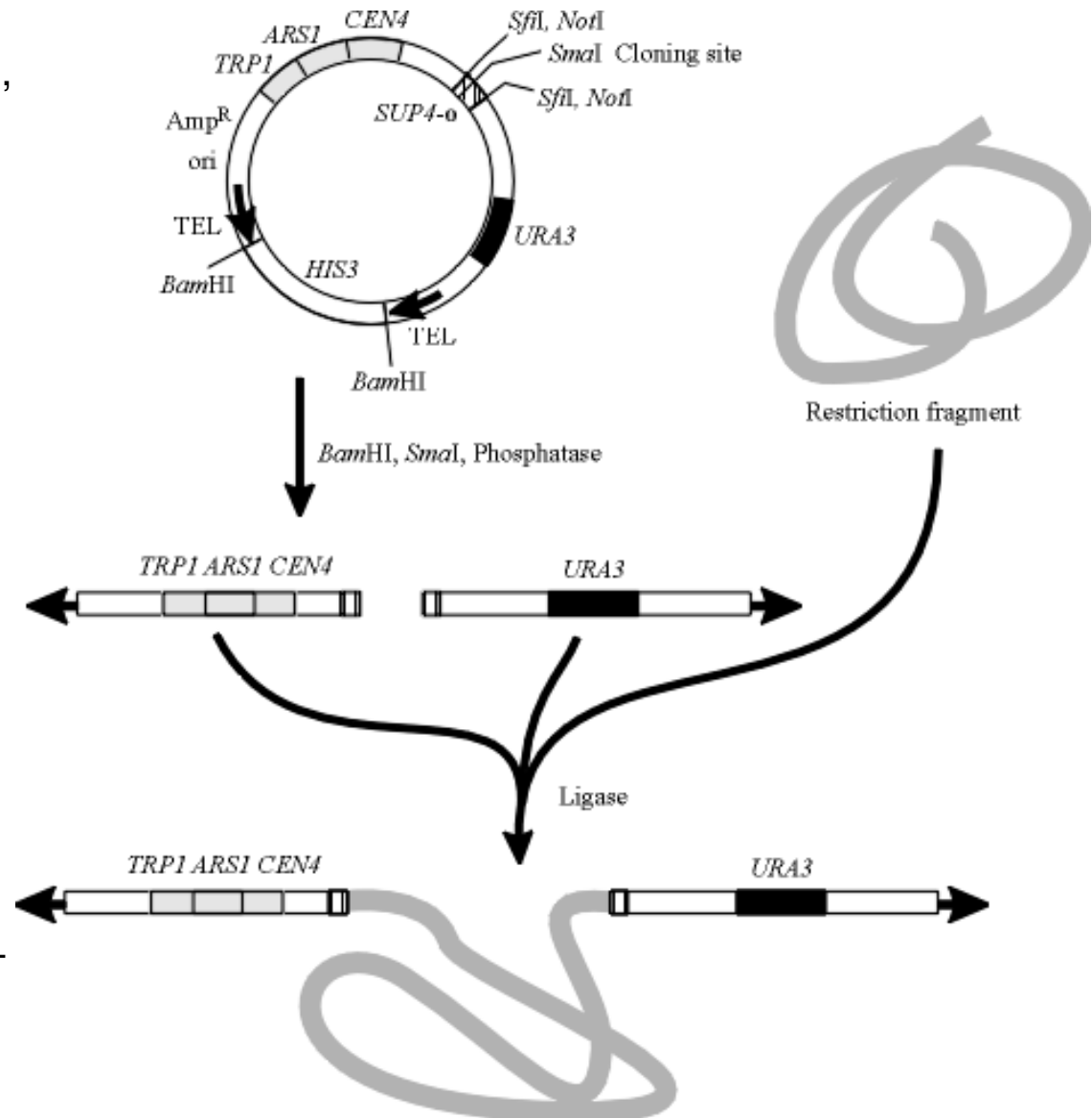
**mechanismus  
homologní  
rekombinace**





# 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)

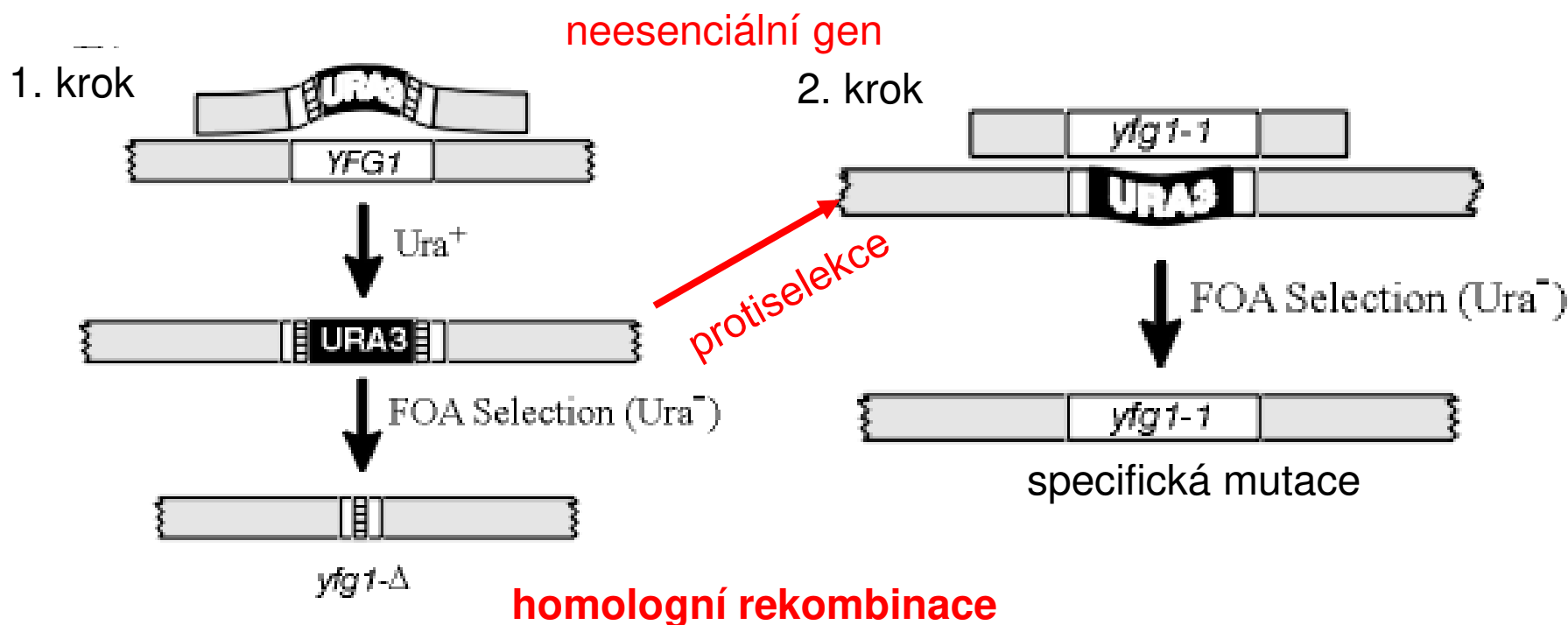


# Transformační protokol

- 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)

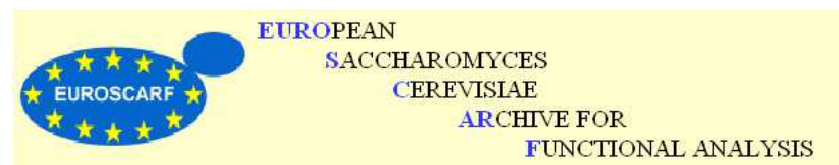


Využití inhibitoru FOA pro „odlěčení“ URA3 markeru (FOA je přeměňována Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil =>  $URA3+$  buňky nerostou, zatímco  $ura3-$  buňky jsou „rezistentní“) - opět  $ura-$ , takže URA3 marker lze znovu využít

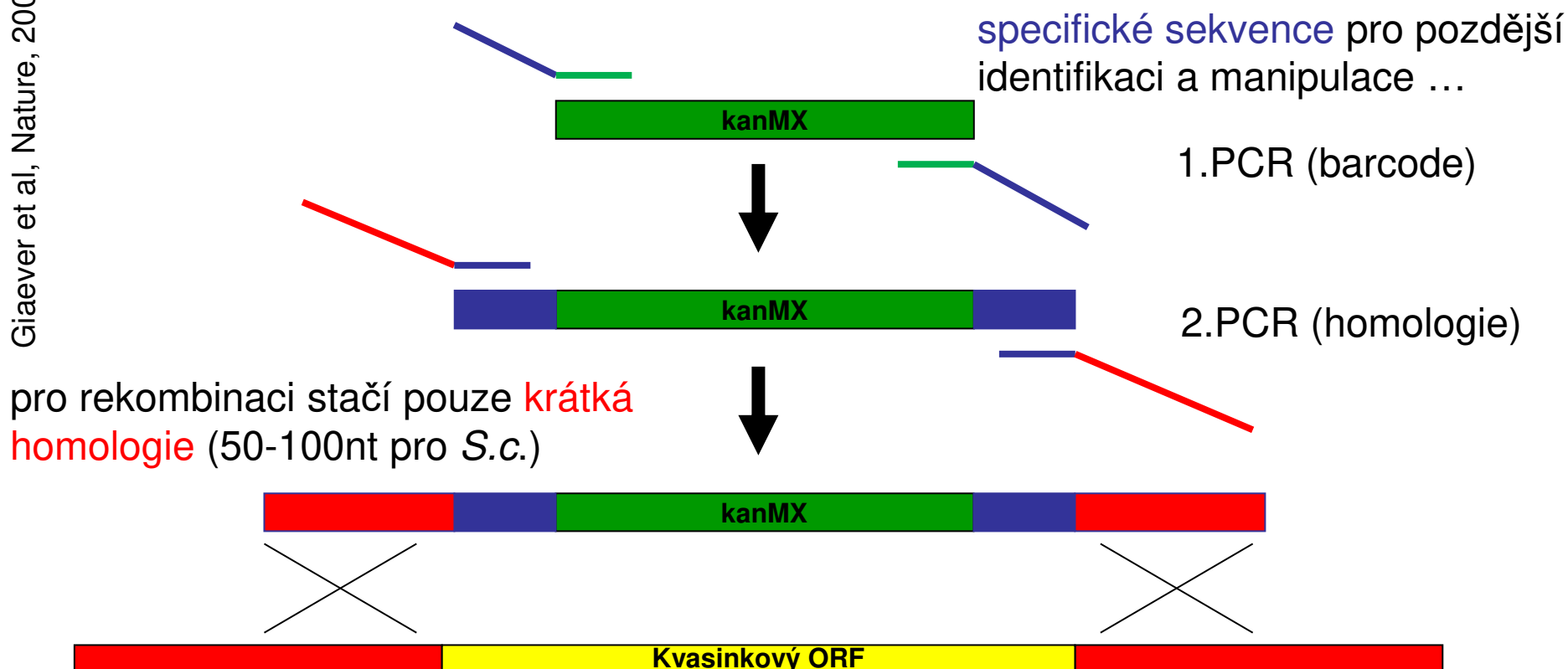
# Delece genu - PCR

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

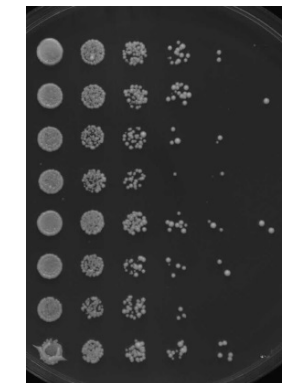
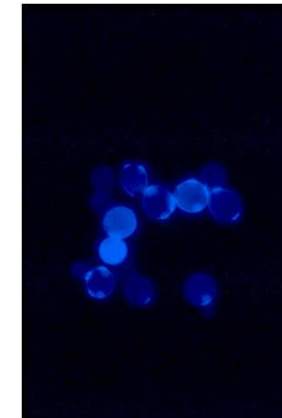
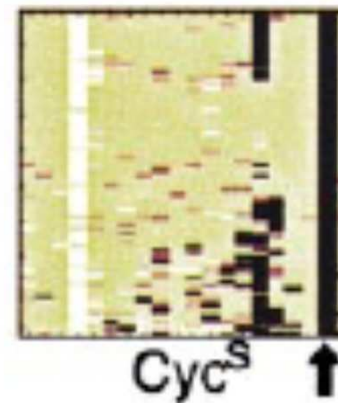
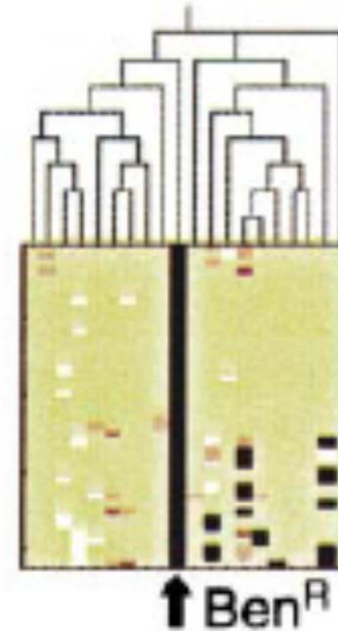
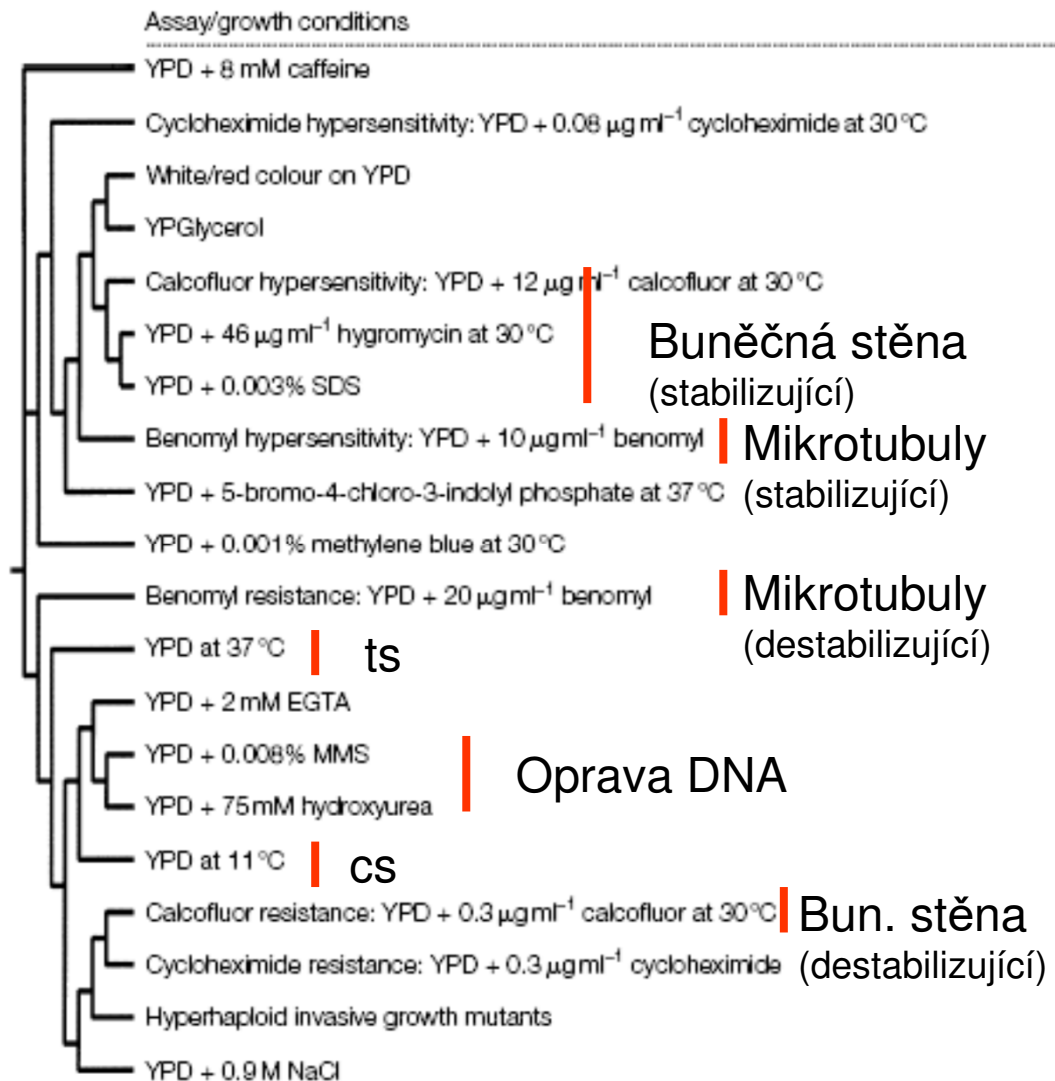
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>



Giaever et al, Nature, 2002



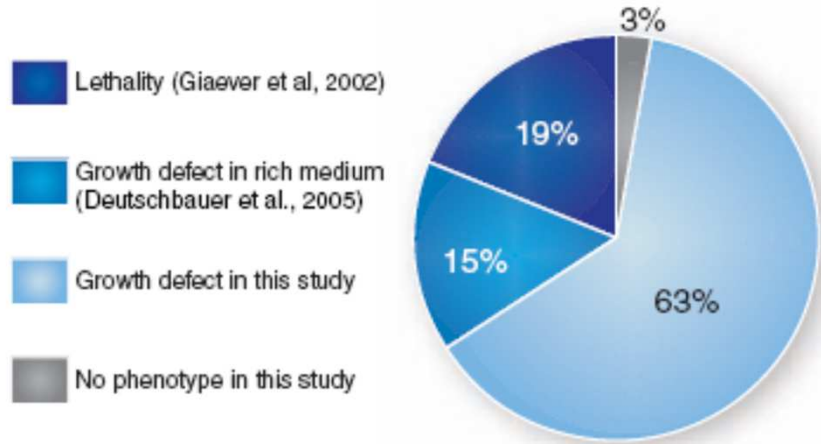
# EuroFan projekt - testy fenotypu



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

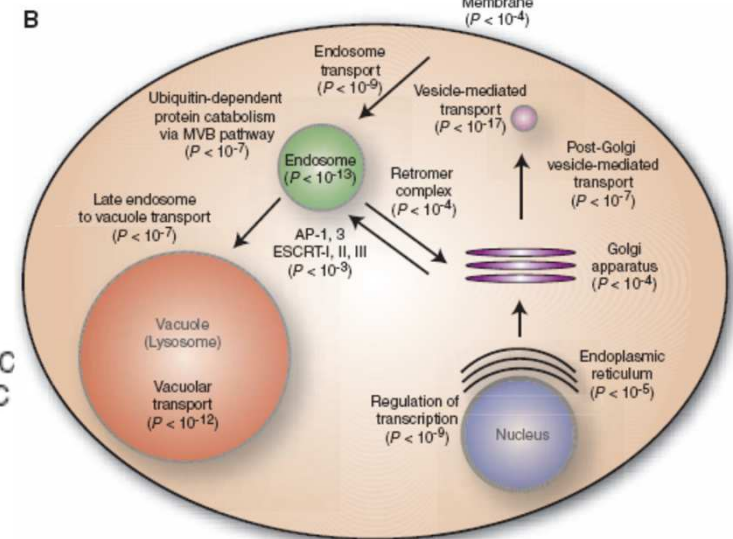
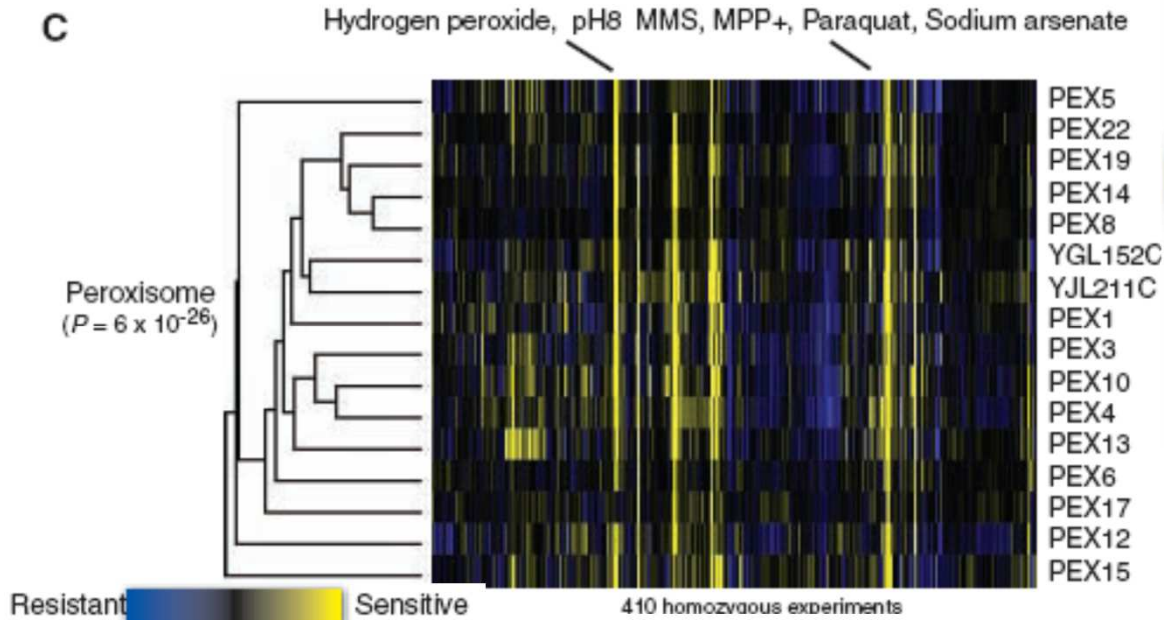


~ 6000 heterozygotních delečních kmenů  
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)  
 (neesenciální – pro růst za specifických podmínek nebo redundantní procesy)



- 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

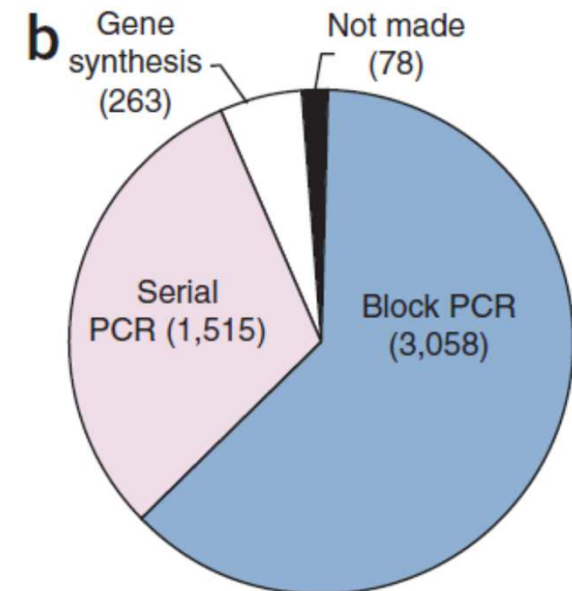
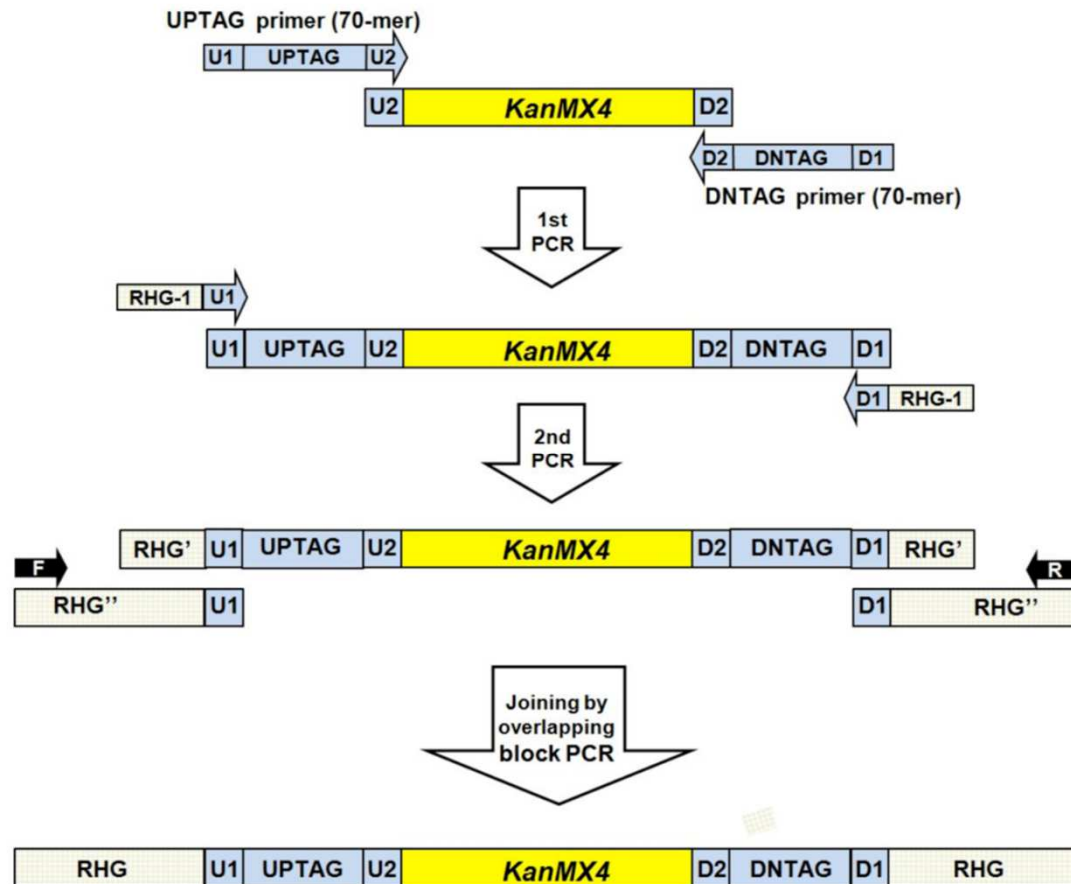


Geny/Proteiny peroxisomu

Hillenmeyer et al, Science, 2008

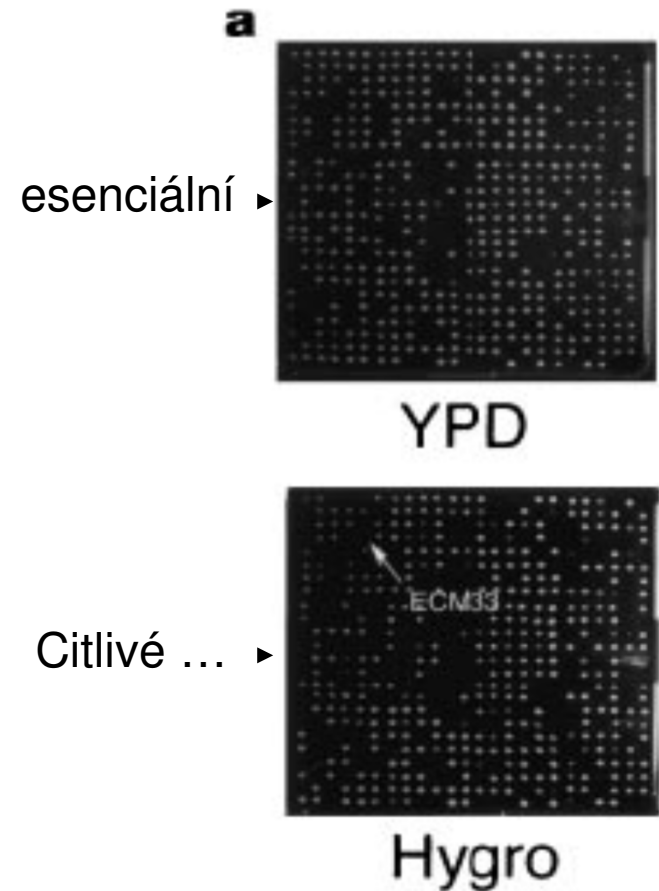
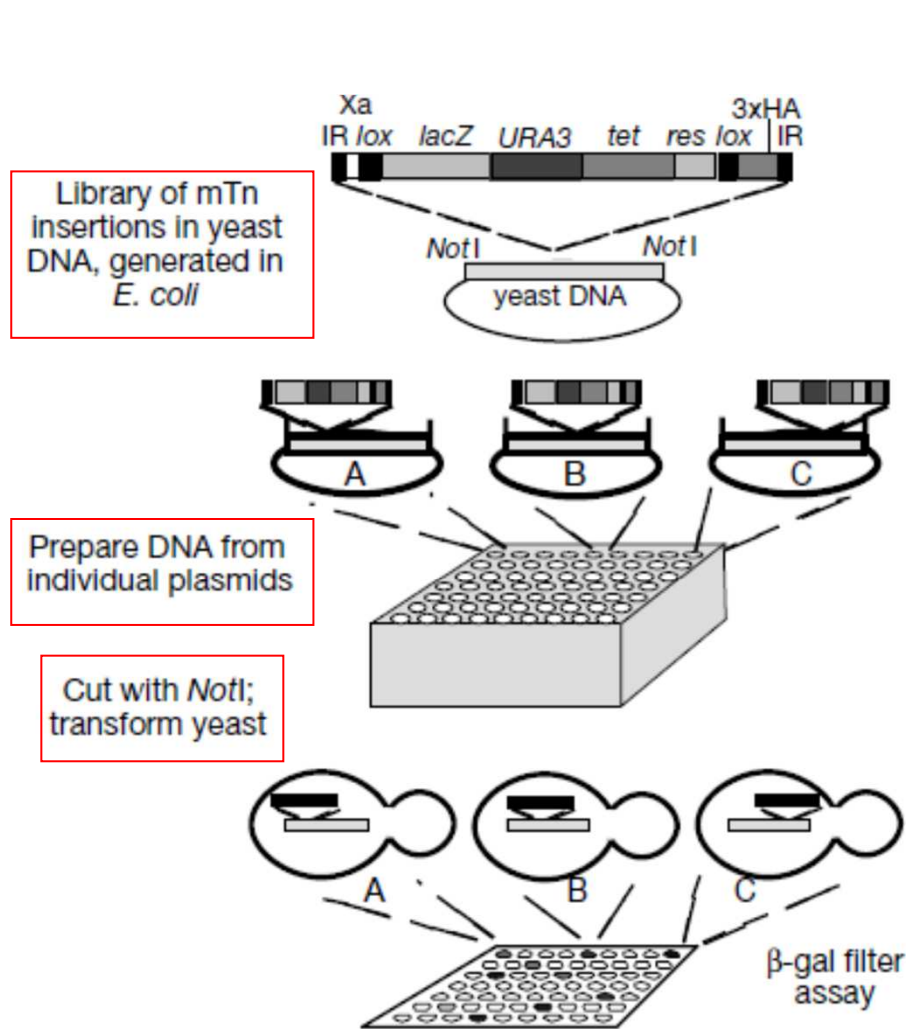
# Deleční knihovna – *S. pombe*

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



- individuální vědecké studie ...

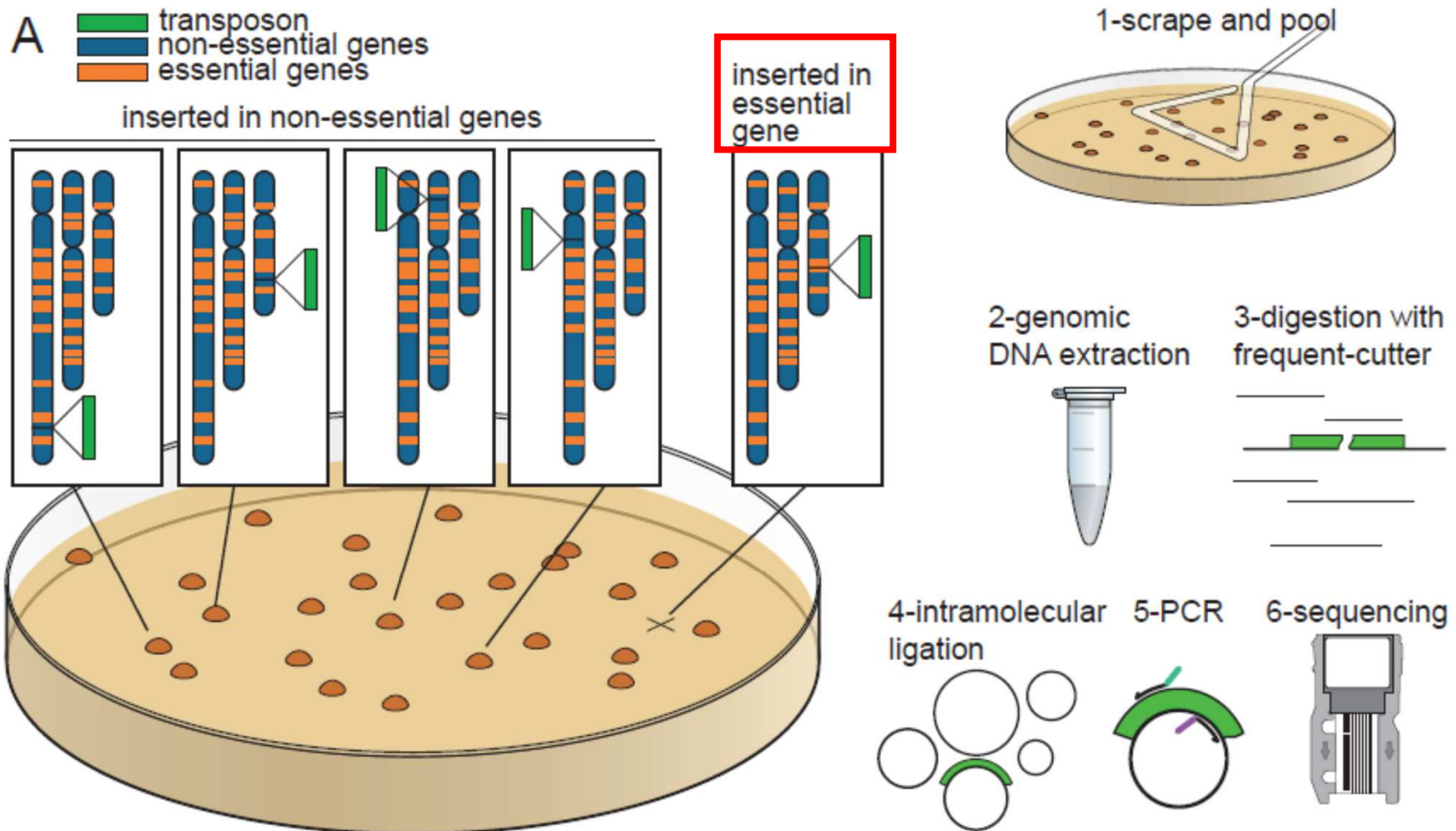
# Delece genu pomocí transposonů



Defekt buněčné stěny

- knihovna konstruktů s náhodnými integracemi

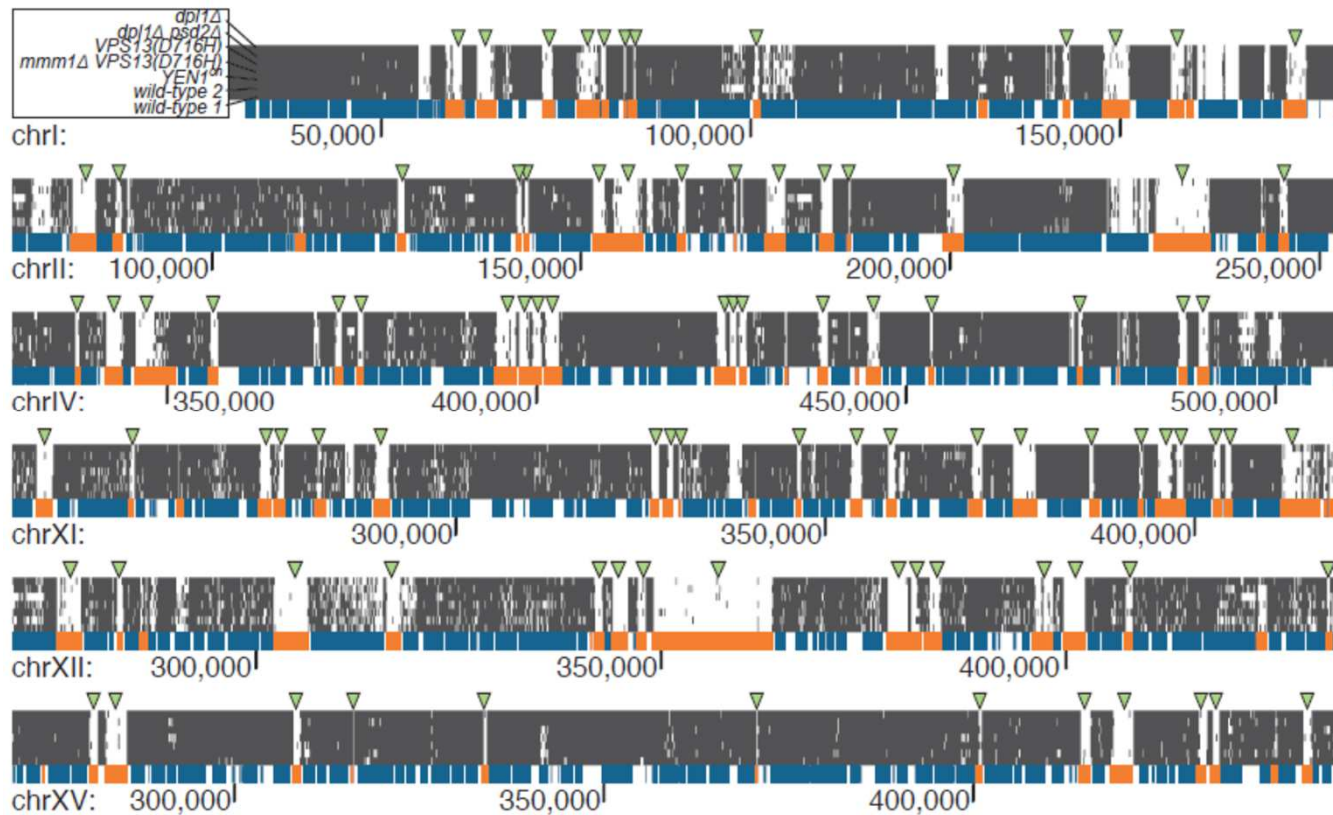
# Saturated Transposon Analysis in Yeast (SATAY)



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 ...





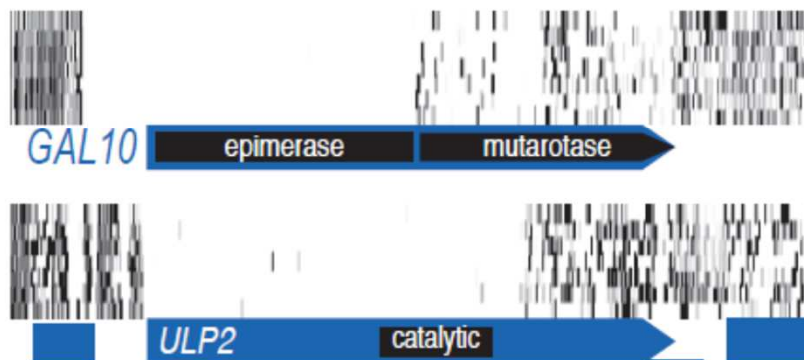
- inserce chyběly v **esenciálních genech** (zelené šipky)

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

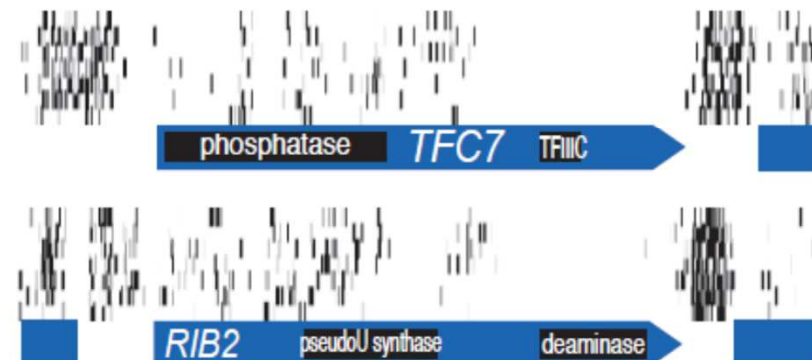
- rozlišení na úrovni domén (GAL10 – dvě domény z nichž esenciální je pouze první ...)

- C-koncové, ale i N-koncové delece

## A C-terminal truncations



## B N-terminal truncations

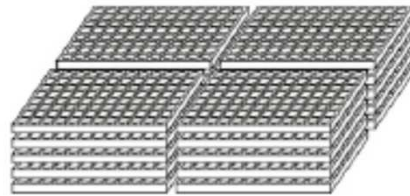




# 1 Cell growth & sample preparation



Prototrophic strains  
all gene deletions



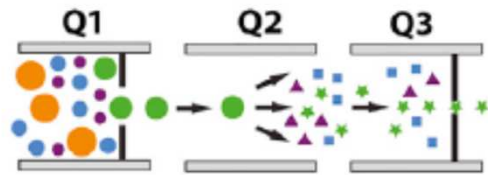
Exponential growth  
minimal media



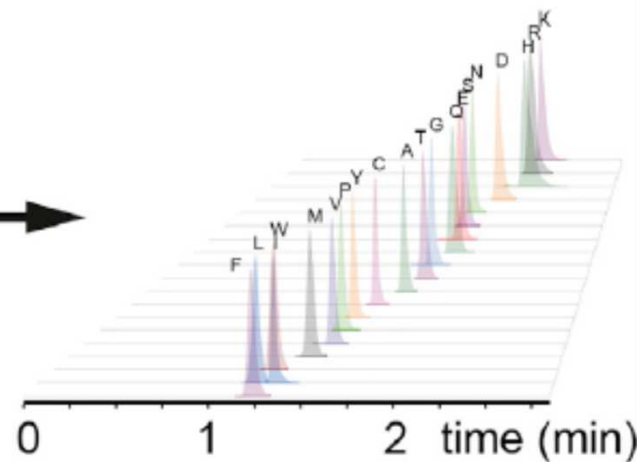
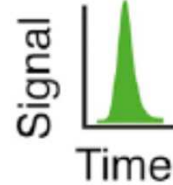
Metabolite  
extraction

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

# 2 Amino acid analysis

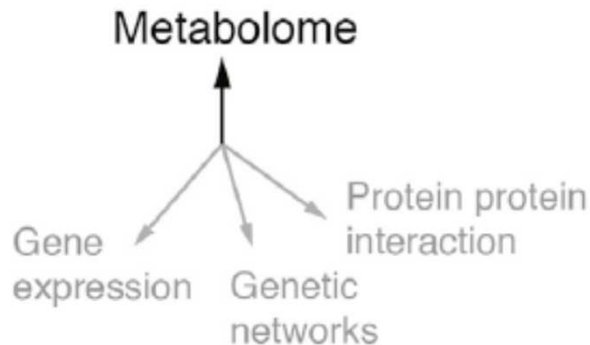


LC-Selective Reaction Monitoring

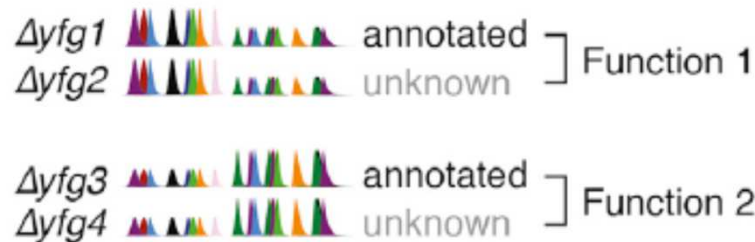


- analýza vztahu  
genom-metabolom

# 3 Function & physiology

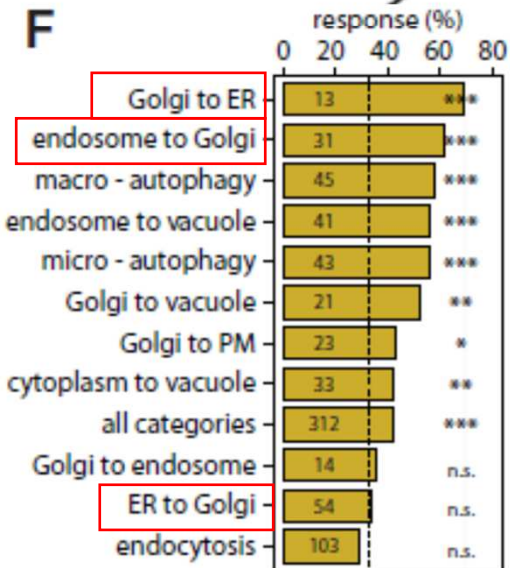
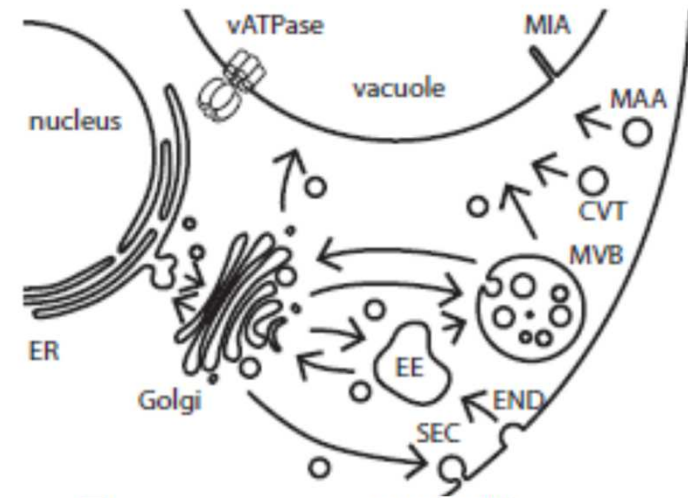
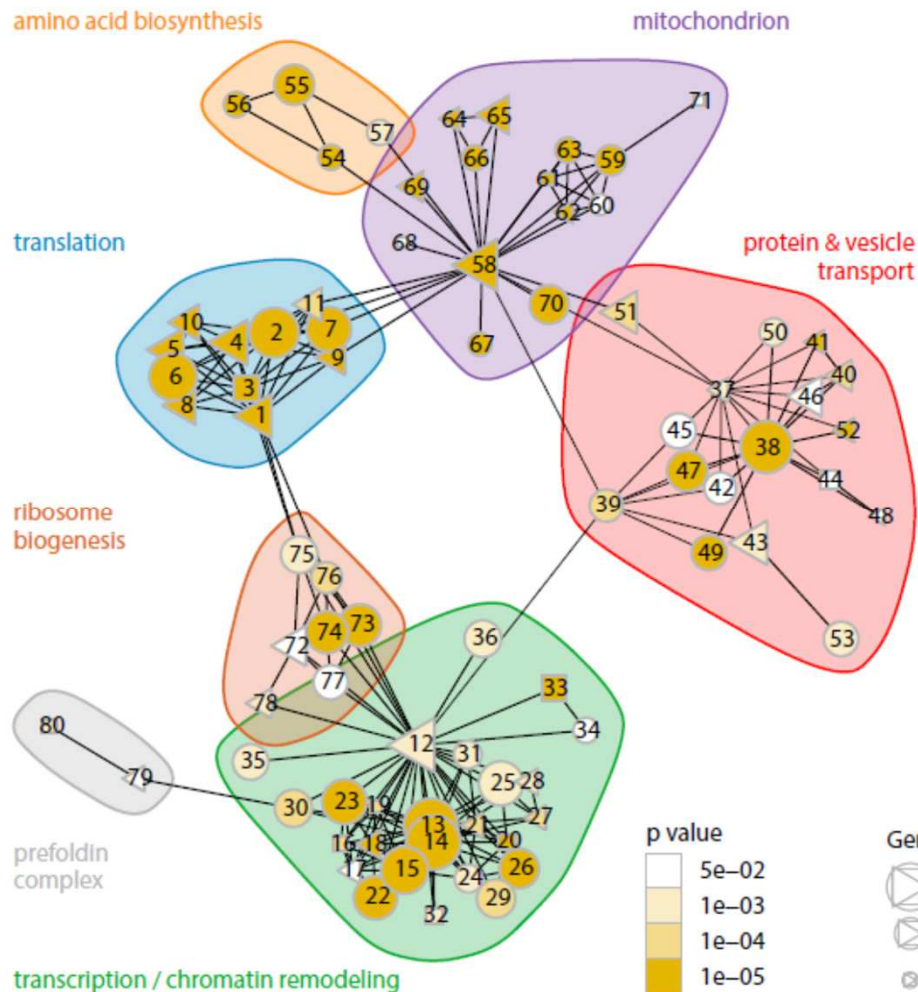


# 4 Gene functional annotation



Mulleder et al, Cell, 2016

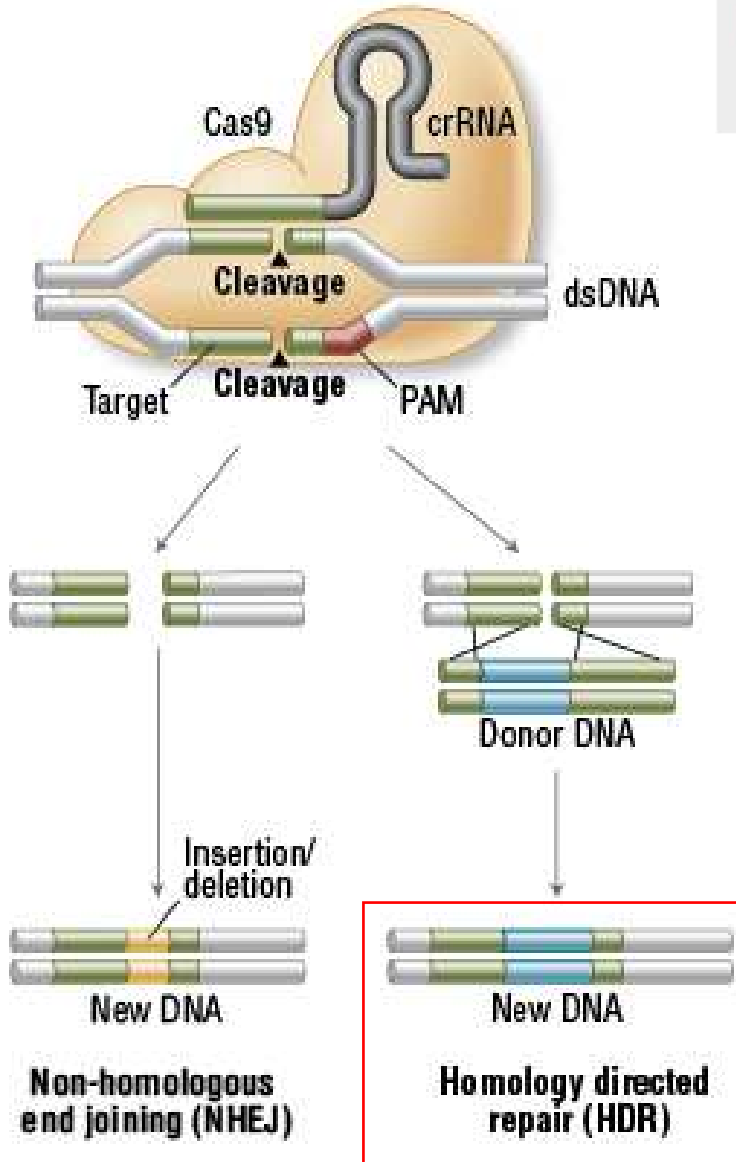
# vztah genom-metabolom



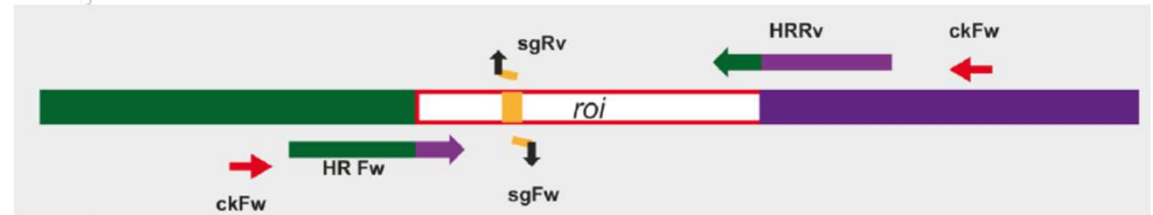
- transport proteinů a váčků (Golgi/ER ... degradace proteinů a recyklace AMK) má zřejmý vztah k hladině AMK – překvapivě velký vliv má struktura chromatinu

# Integrace: inzerce genu (CRISPR/Cas9)

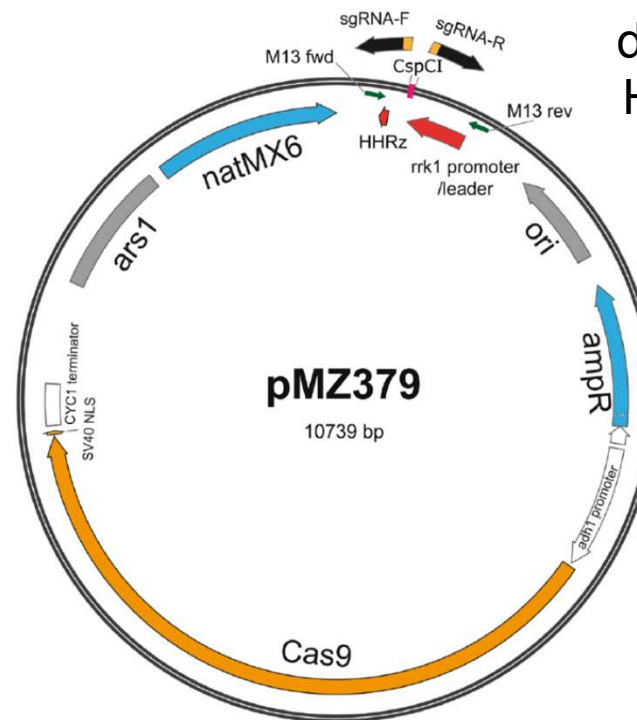
A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



Horwitz et al, Cell Syst, 2015



sgRNA kazeta definuje místo štěpení  
donorová DNA nese HR integrační insert

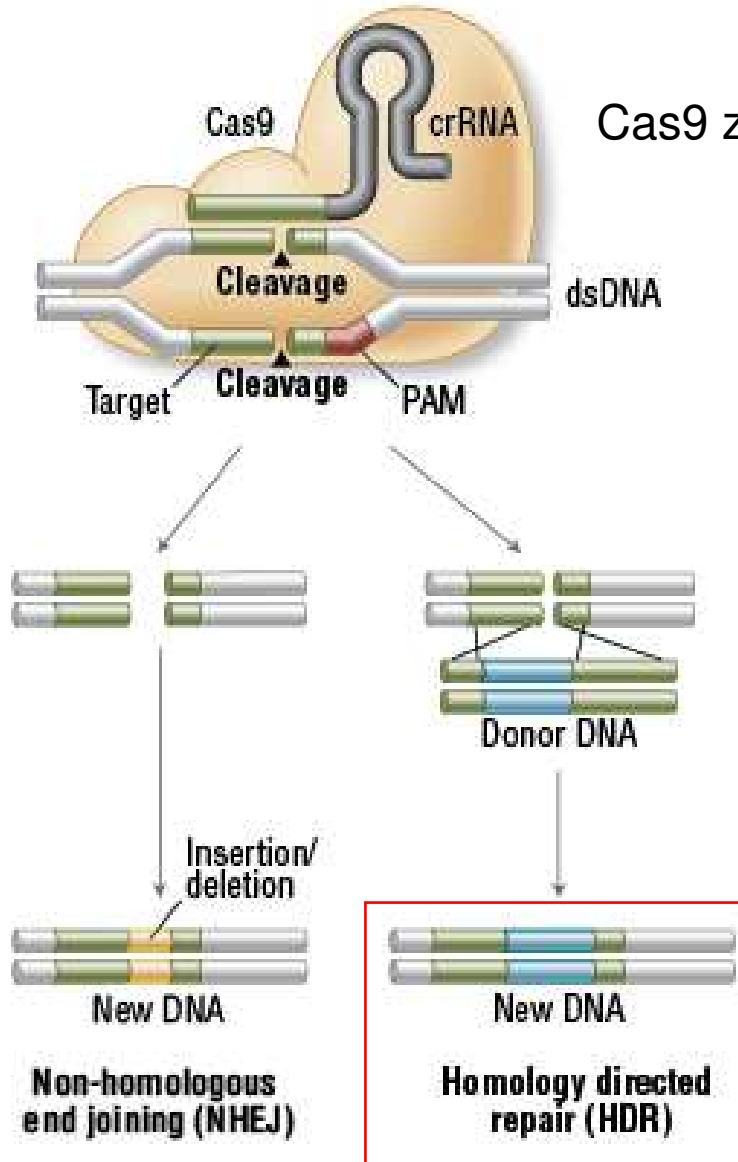


K integraci u kvasinek není nutný CRISPR  
- účinná homologní rekombinace  
- **CRISPR zvyšuje účinnost integrace a nezanechává „stopy“**

Torres-Garcia et al, WOR, 2020  
Rodríguez-Lopez et al, WOR, 2017

# Integrace: inzerce genu (CRISPR/Cas9)

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



Yeast expressing Cas9

Linear:

- guide RNA cassettes

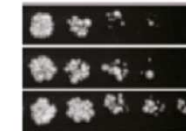
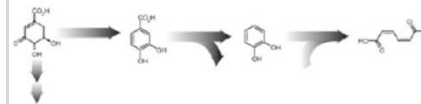
- donor DNA

- 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



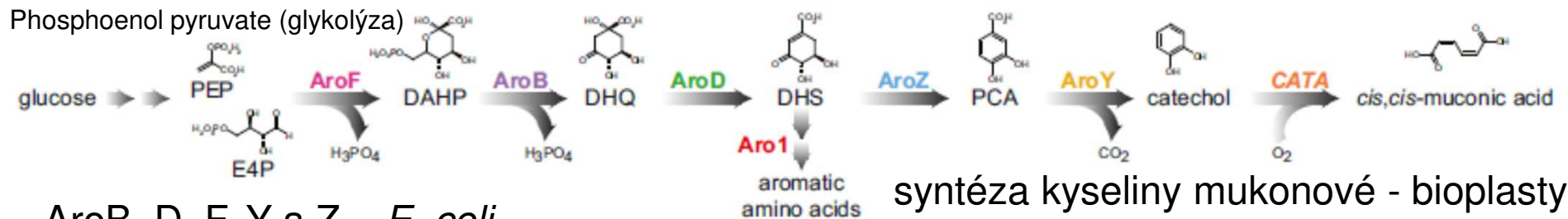
lokusy: GAL80, HO, ARO1



AroY v pěti kopiích – zvýšilo výtěžek



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



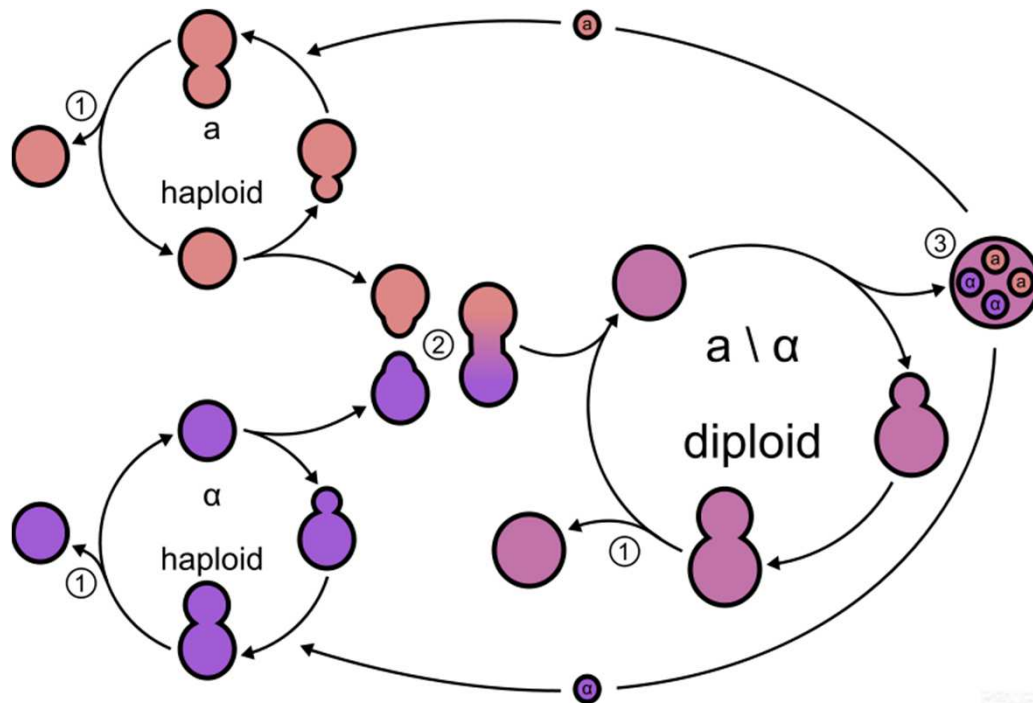
AroB, D, F, Y a Z = *E. coli*  
CATA = *C. albicans*

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

- 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)



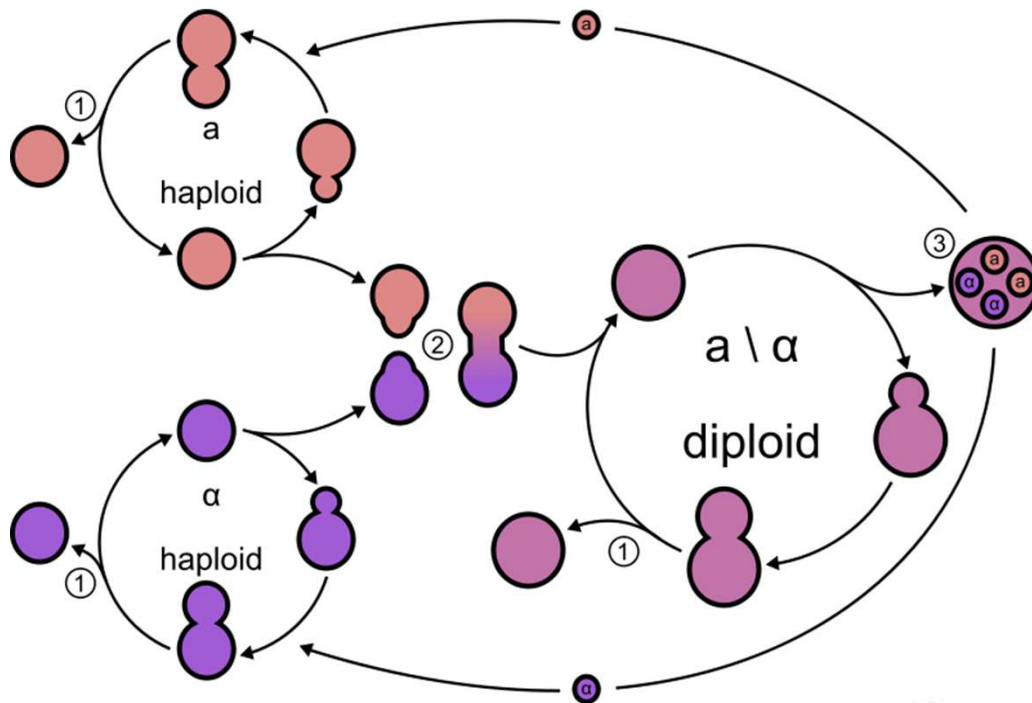
RHOMBOEDRICKÝ

S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR





# Životní cyklus *S. cerevisiae*

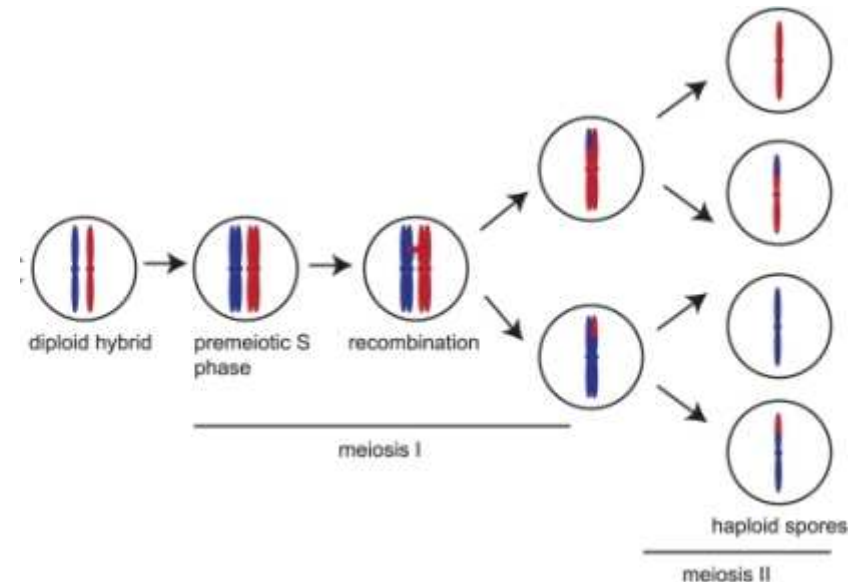


- Deleci či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

- 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

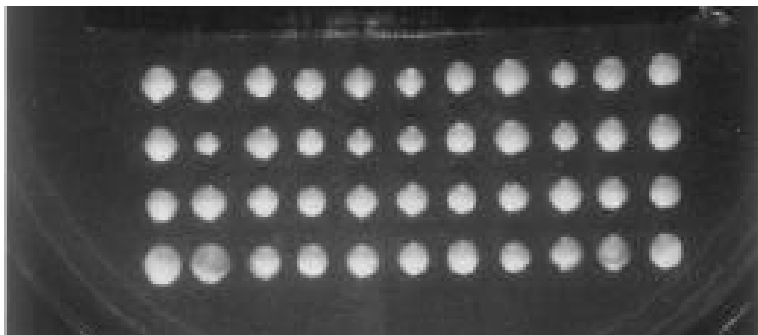
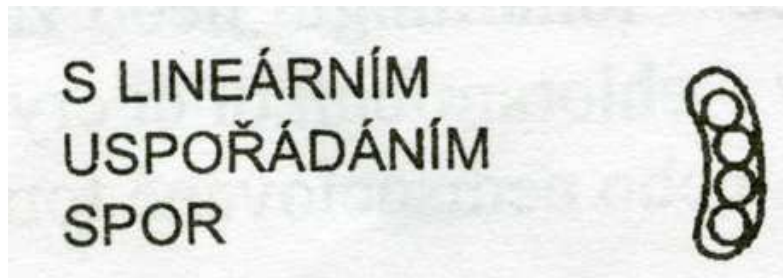
- delece esenciálního genu lze provést pouze v diploidní buňce (haploidní nepřežije)  
 - po iniciaci sporulace dojde k meiotickému dělení ( $2n \rightarrow 4n \rightarrow 4 \times 1n$ ) a vzniknou 4 haploidní buňky (lze rozdělit mikromanipulátorem – tetrádová analýza)



# Tetrádová analýza

(*S. pombe*)

spory přeneseny tenkou jehlou a  
rozmístěny v pravidelných  
odstupech

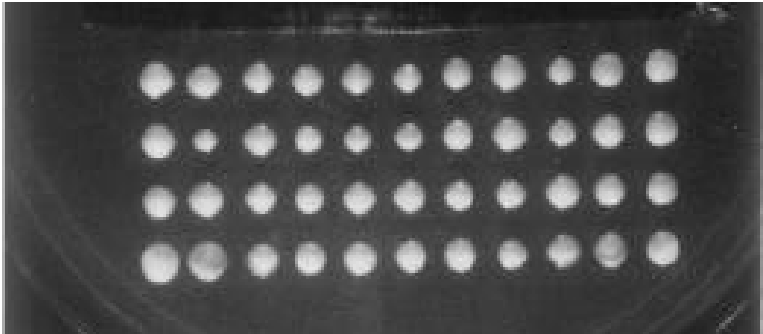


YPD

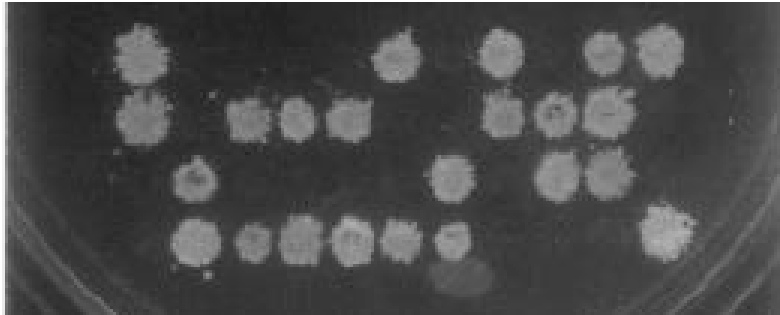


# Tetrádová analýza

2 spory/kolonie normální  
 +  
 2 spory/kolonie mutantní

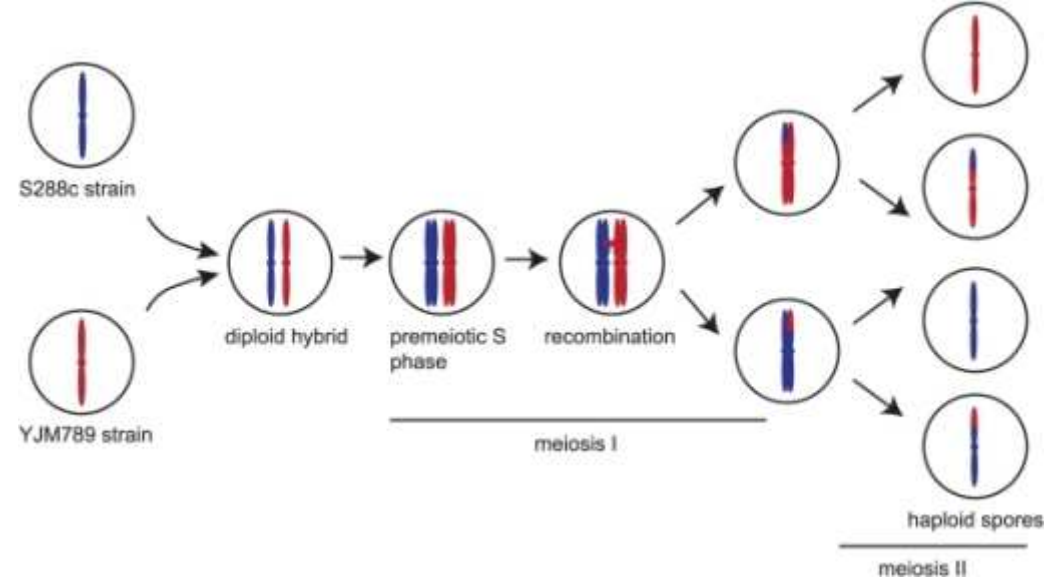


YPD



Selektivní médium (SD-ura ... testy)

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



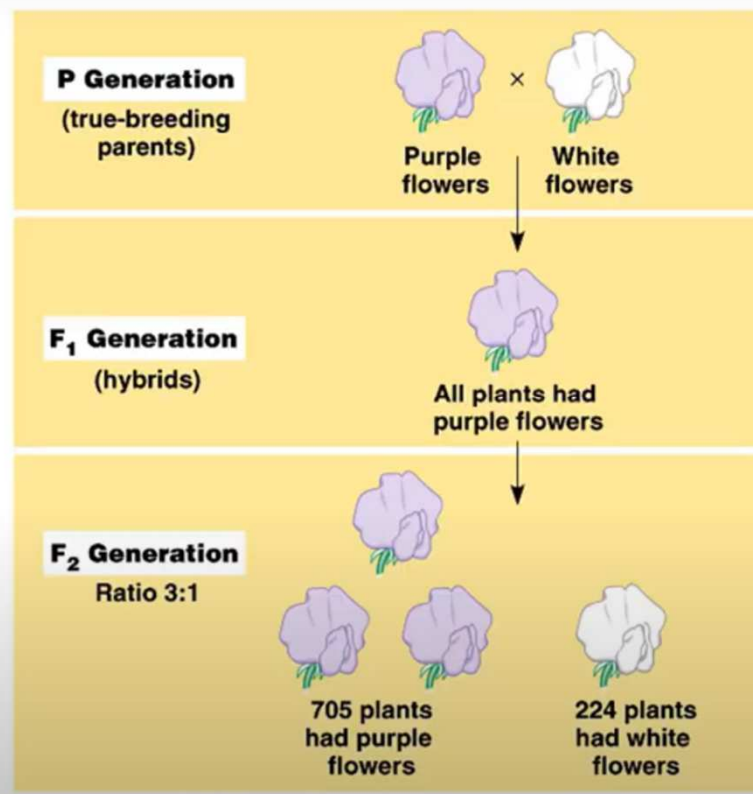
# Mendelův základní pokus

s hrachem (diploidní)

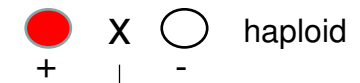
P generace =  
parentální, rodičovská

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

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

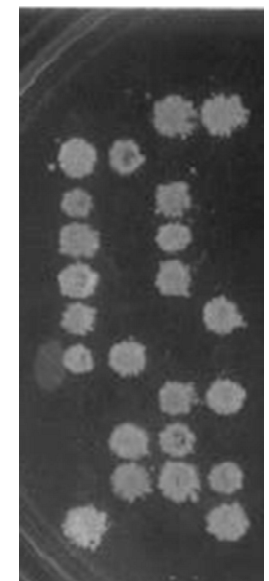
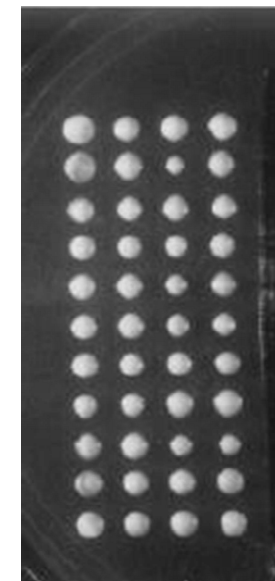


s kvasinkami (haploidní)



kontrola

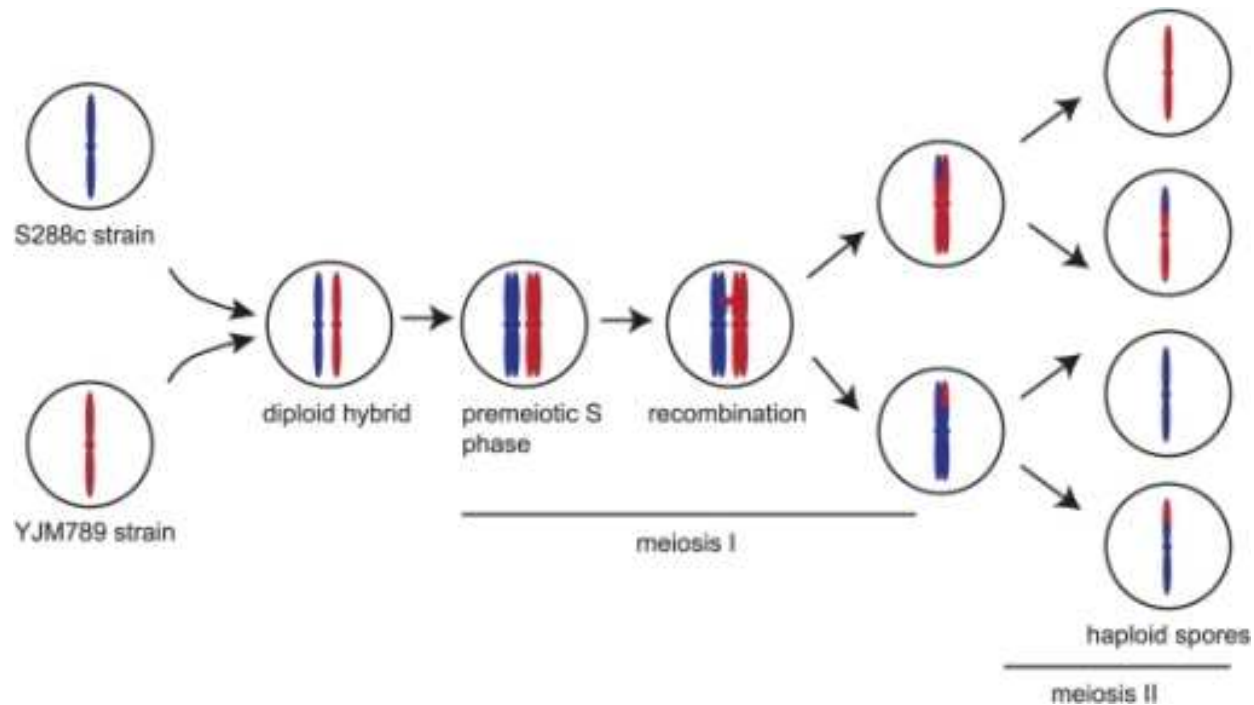
bez uracilu



s ade2 by byly červené

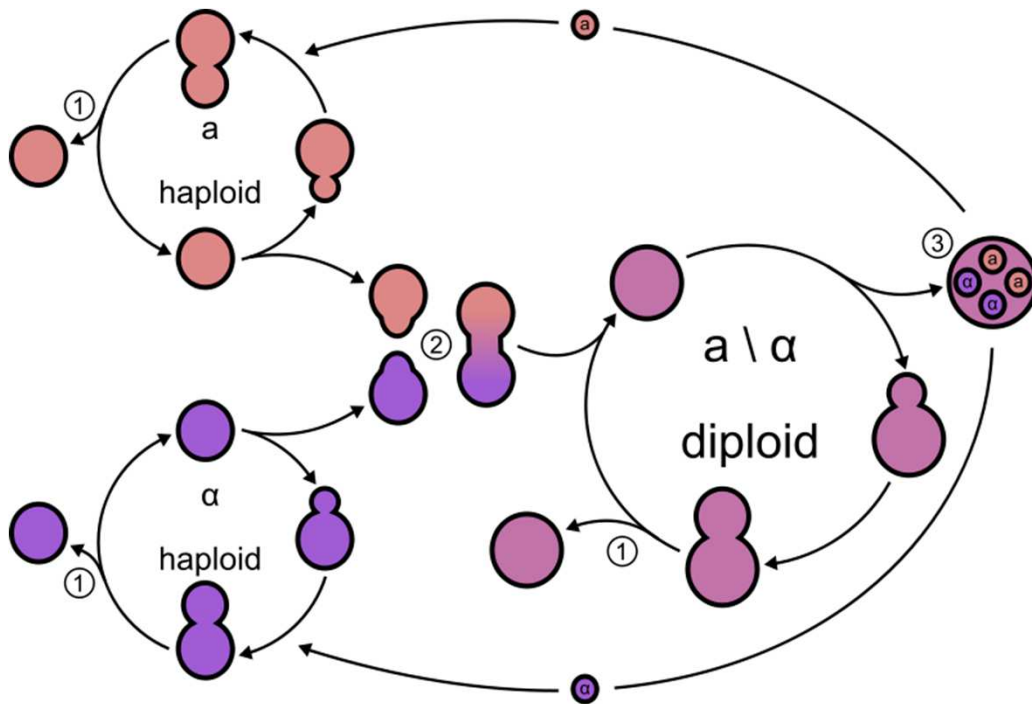
# Genetické interakce

- studium funkce genu – fenotyp
  - **esenciální gen** vs **ne-esenciální**  
(mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“)
- dále je lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami a hledat jejich funkční vztahy (epistase x syntetická letalita x suprese)

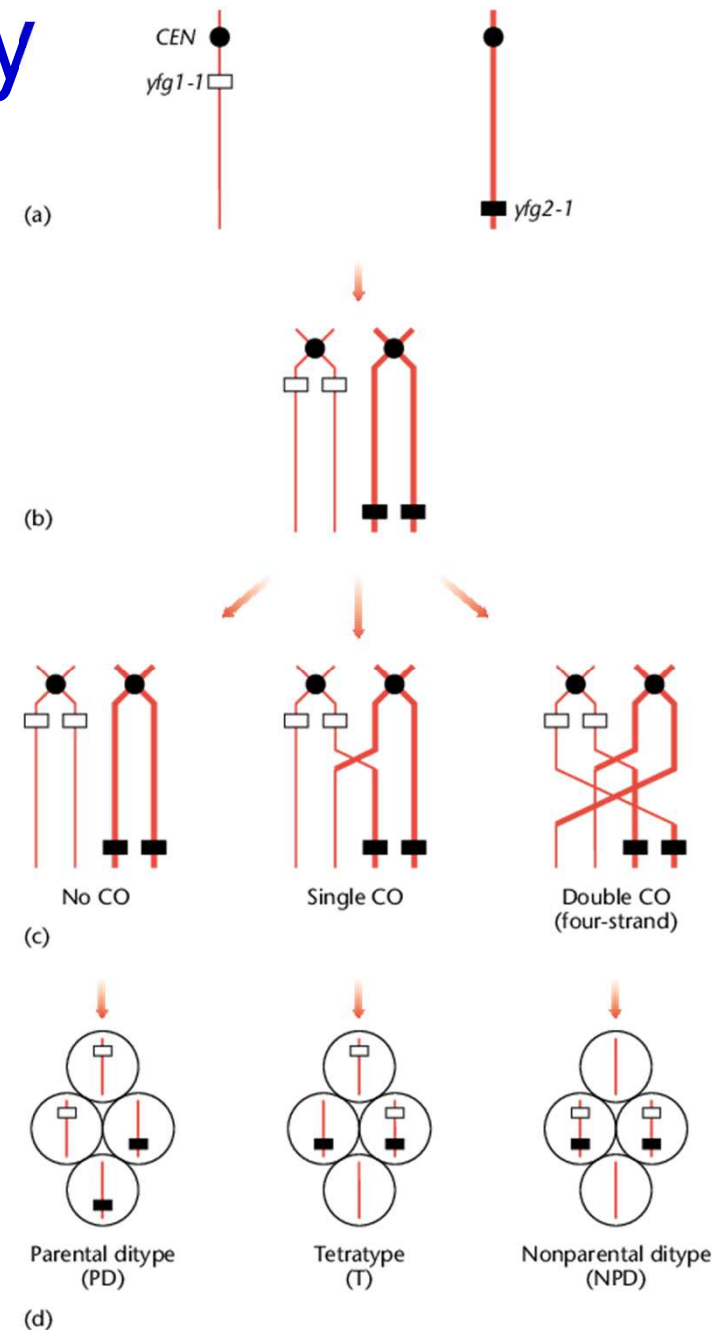




# Křížení - dvojité mutanty



- 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)



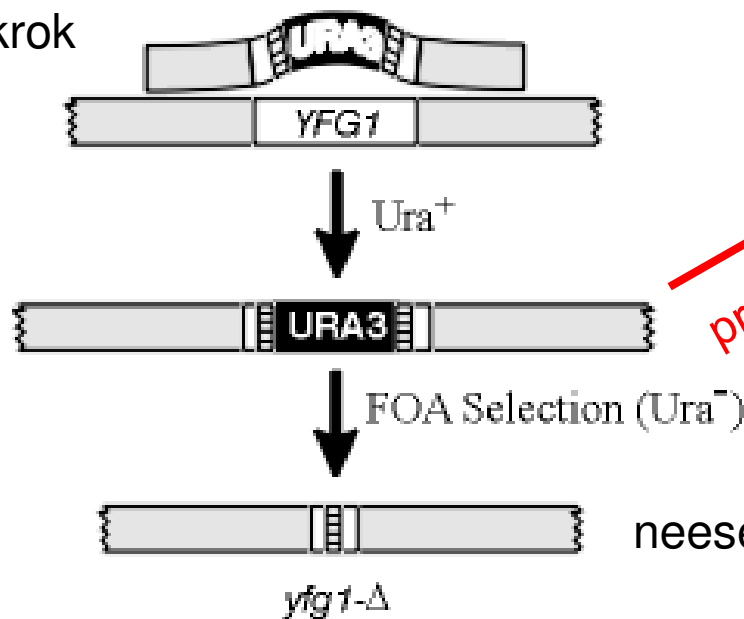
# Delece genu

- studium funkce genu – fenotyp

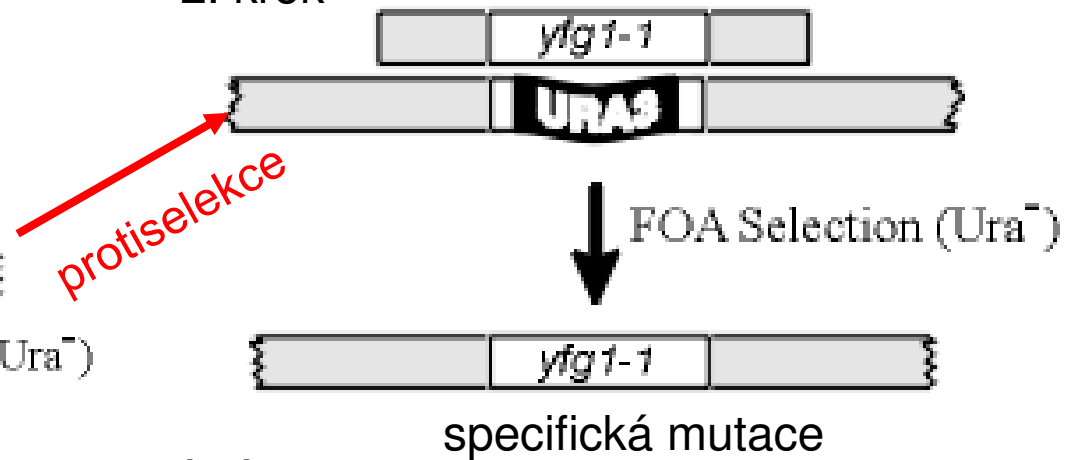
- **esenciální gen vs životaschopné** – mutace lze přímo integrovat do genomu

- mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“ – dále je lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami a hledat jejich funkční vztahy (synthetic lethal x epistatic x suprese)

1. krok



2. krok



- 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 využít několikrát

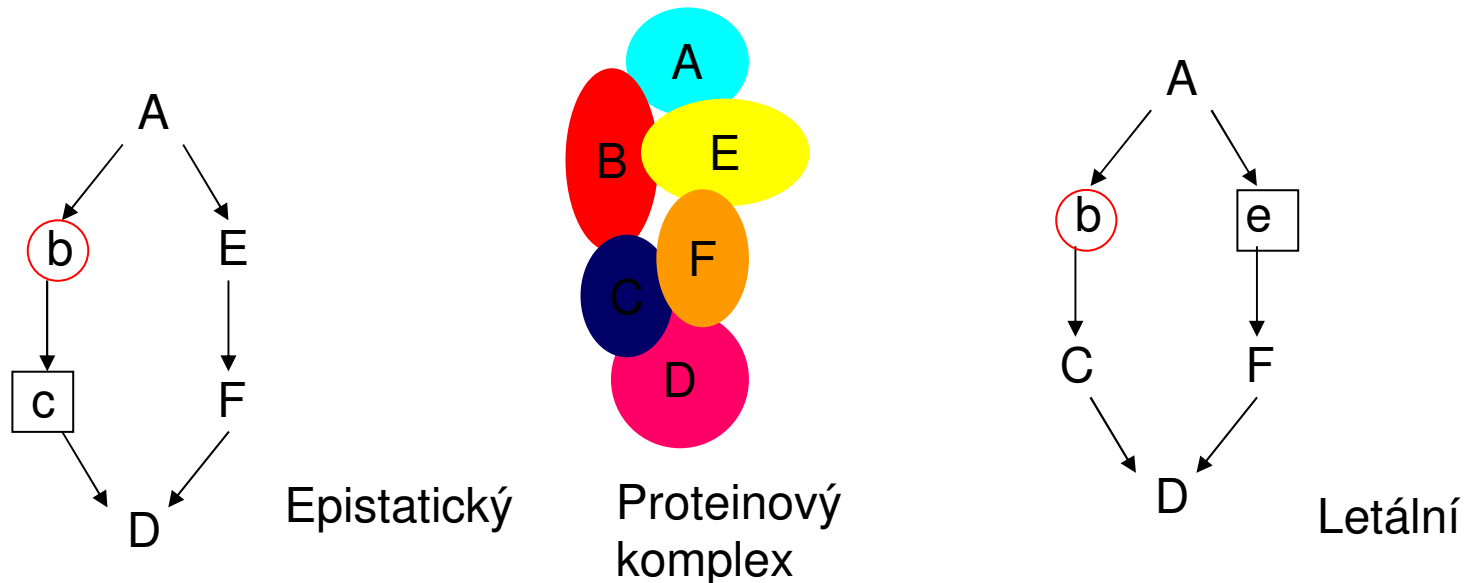
# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

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

- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

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

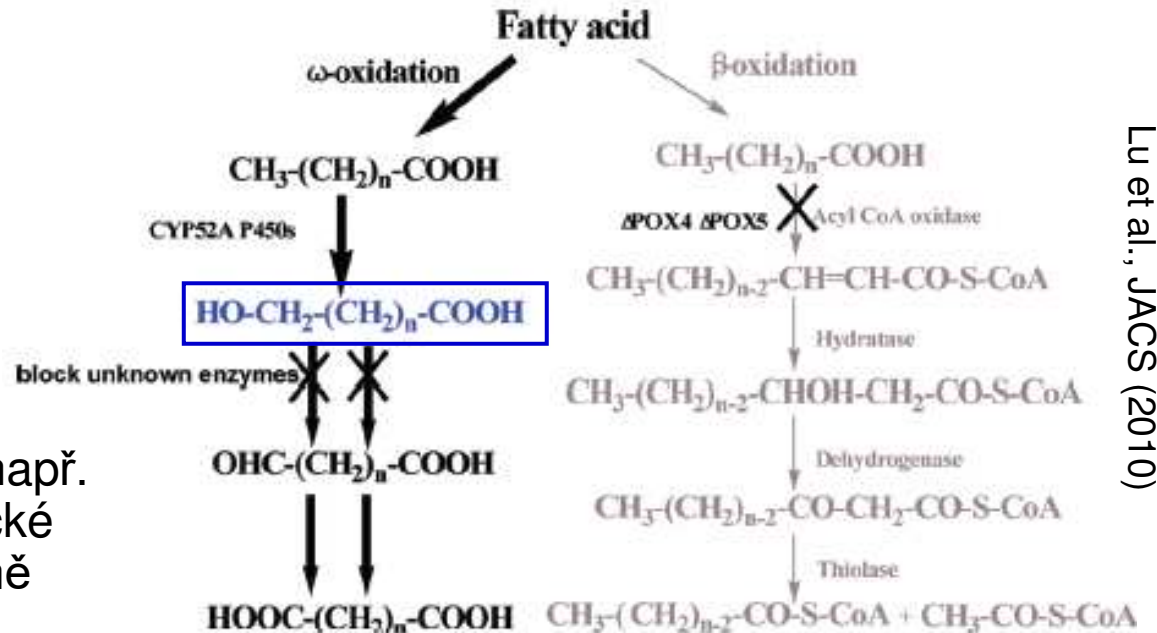
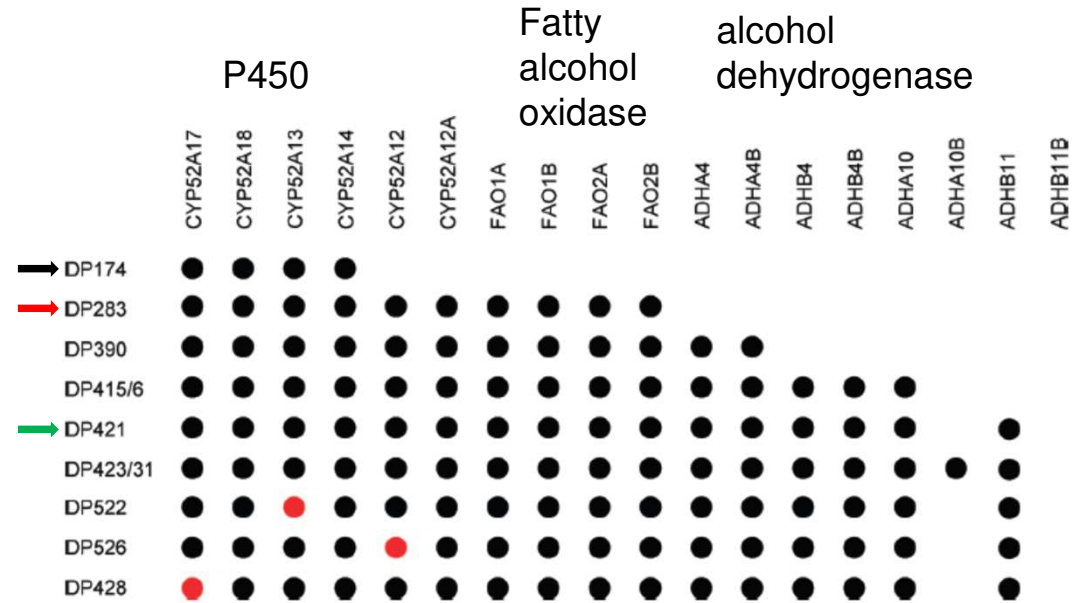
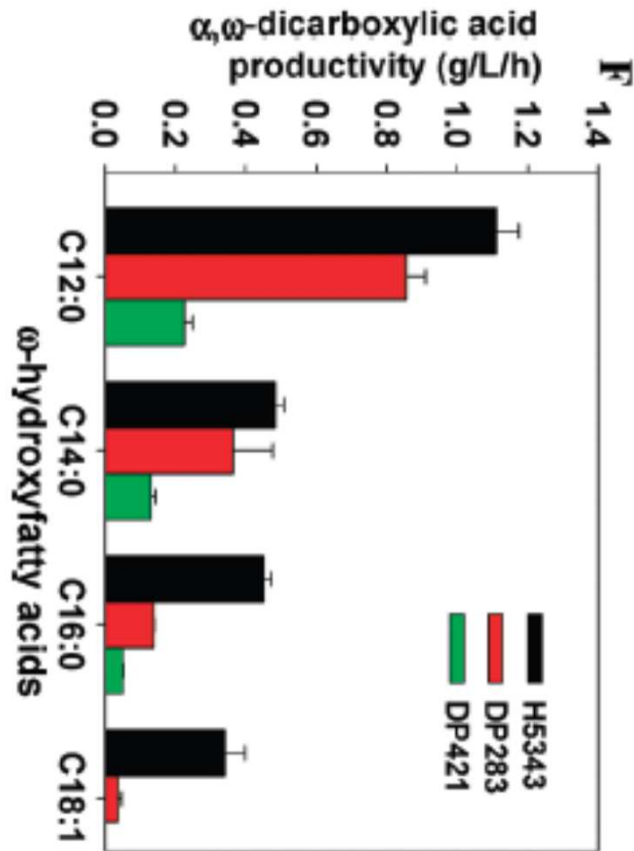
- **aditivní až letální** (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)



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 ...

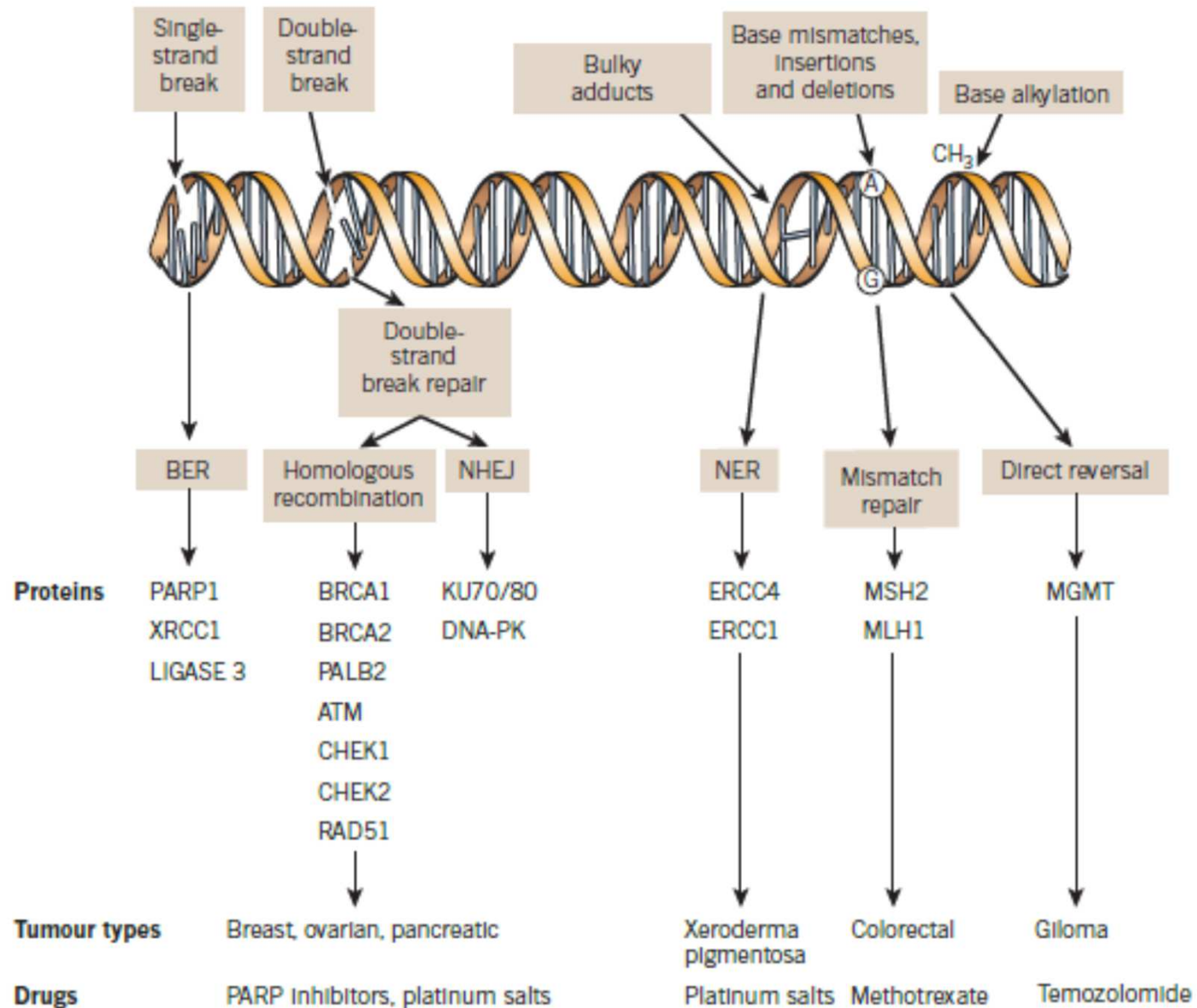
# Hledání funkčně příbuzných genů



Lu et al., JACS (2010)

- delece homologních enzymů (např. dehydrogenás) potlačí metabolické schopnosti buňky (DP421 = méně ω-hydroxymastné kyseliny)

# Syntetická letalita v léčbě rakoviny





# Supresory

Supresory potlačují původní fenotyp – mutace téhož genu „napraví“ původní mutaci (nebo nedojde k produkci toxického produktu)

- mutace sousedního proteinu zesílí oslabenou interakci
- nadprodukce proteinu z paralelní dráhy
- nadprodukce proteinu z téže dráhy

