

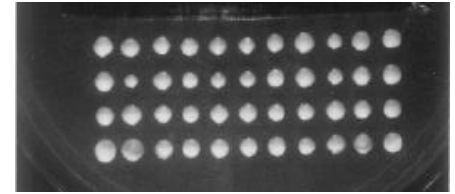
26.09.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Úvod – historie a význam
03.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
10.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
17.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika, morfologie a buněčný cyklus, párovací proces
24.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Mitochondrie, chromosomy
31.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
07.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
14.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
21.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
28.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Organizace a evoluce genomu kvasinek
05.12.2024?	9-12hod	C02-211	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky
12. a 13.12.2024?	8-12hod	B07-2.17	Paleček+Špirek	Cvičení k přednáškám

Genetické interakce

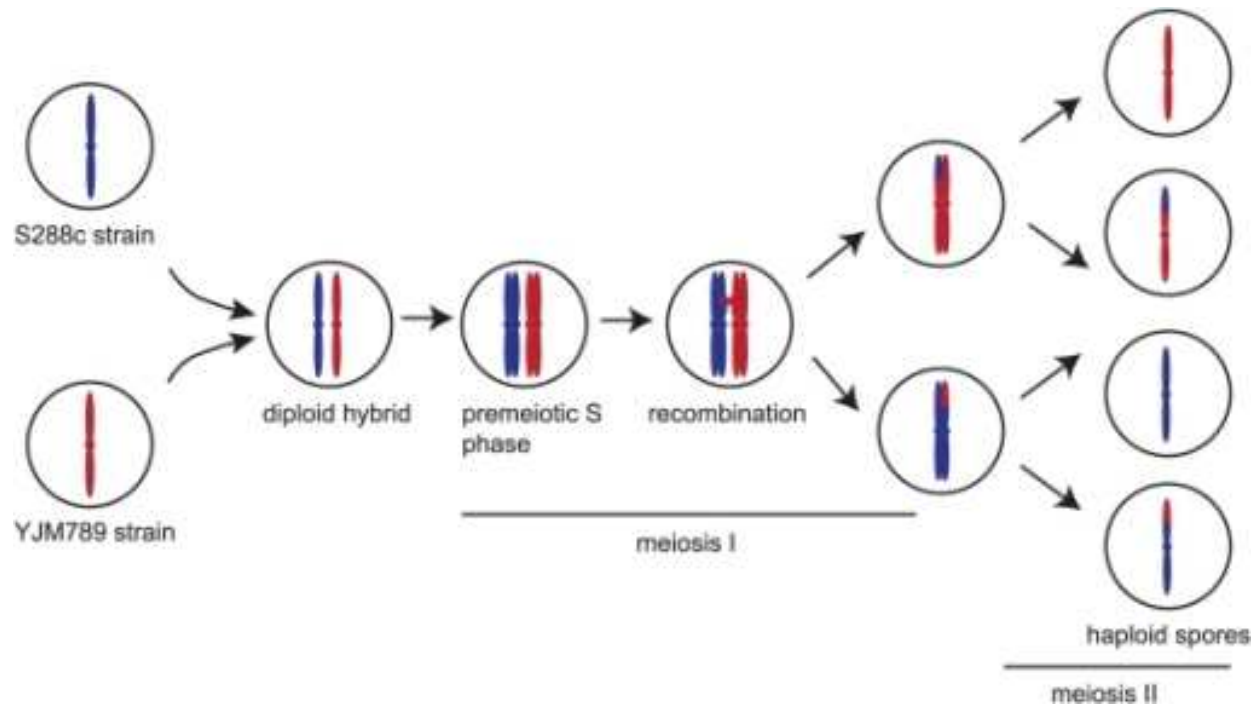
- studium funkce genu – fenotyp

- **esenciální gen** vs **ne-esenciální**

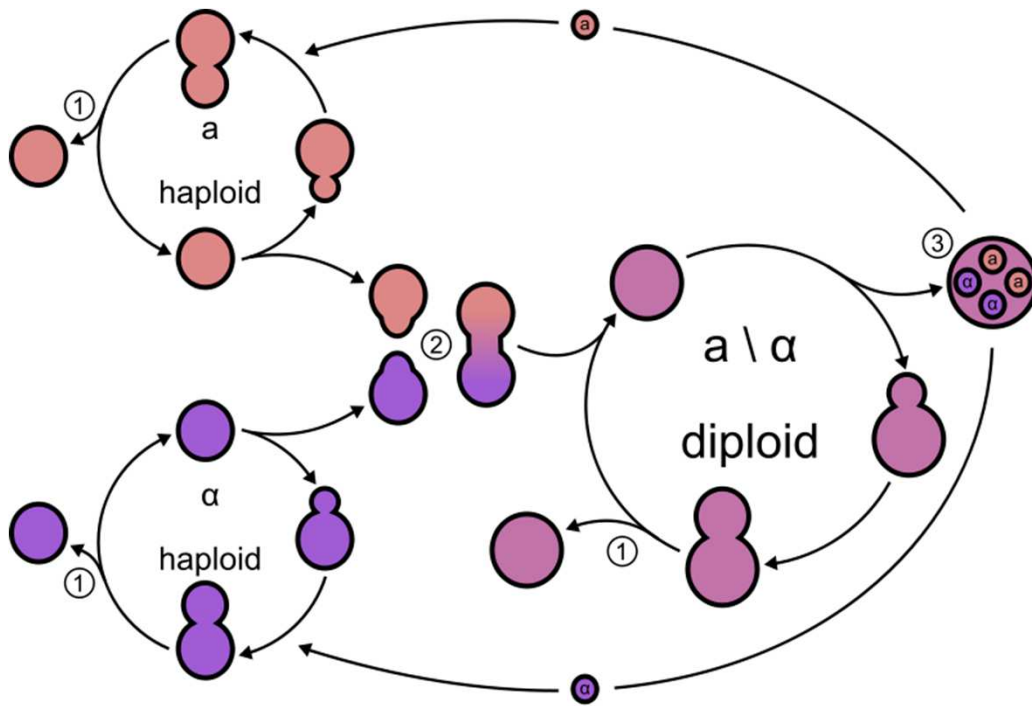
(mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“)



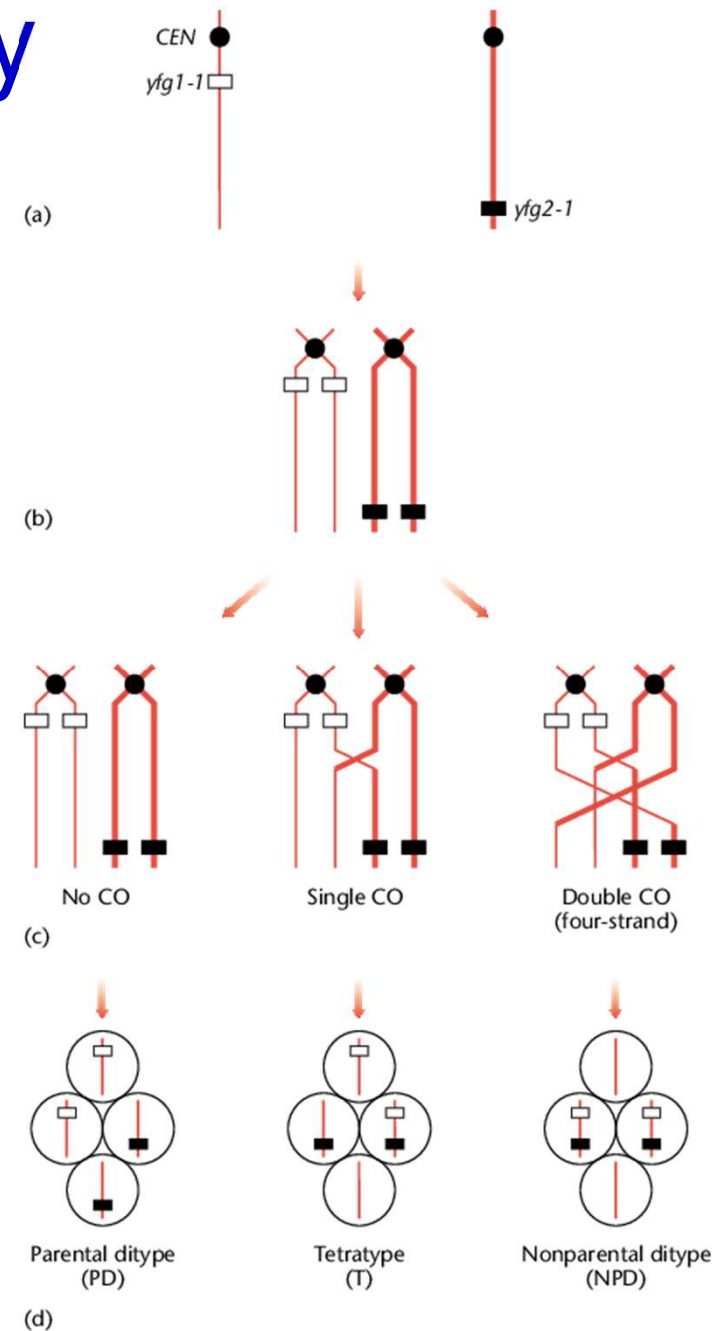
- dále je lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami a hledat jejich funkční vztahy (epistase x syntetická letalita x suprese)



Křížení - dvojité mutanty



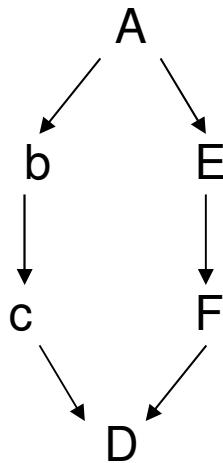
- lze připravit dvojitého mutantu křížením haploidních mutantů a poté sporulací diploida
- frekvence typů závisí na vzájemné pozici genů – různé chromosomy => nezávislá segregace vs stejný chromosom (Morganovy zákony – čím blíže, tím méně cross-over)



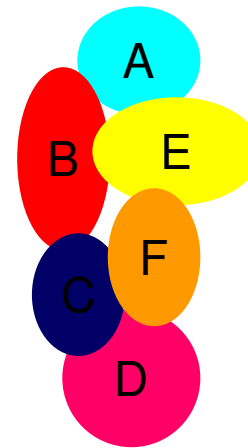
Dvojité mutanty – funkční příbuznost

haploid x haploid => **diploid** - stejný fenotyp - identický gen (nebo dominantní)
- 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

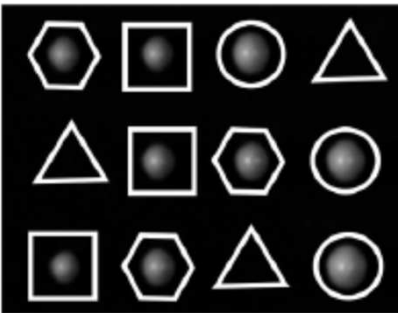
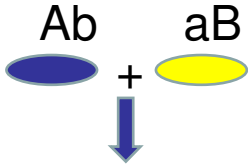


proteinový komplex

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

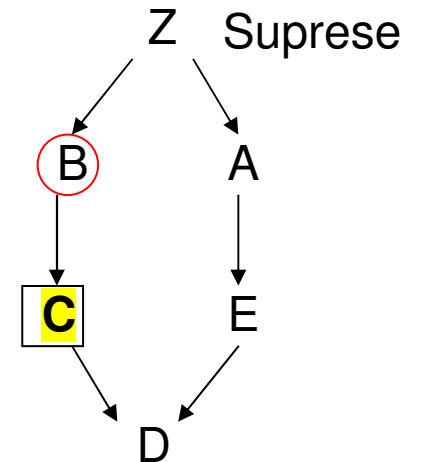
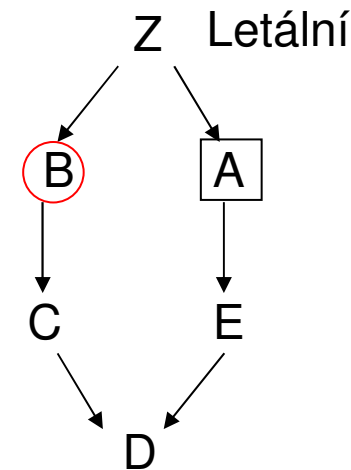
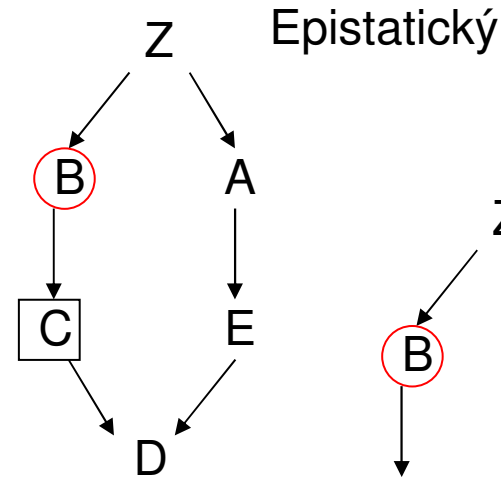
□ Ab

⬡ aB

△ ab

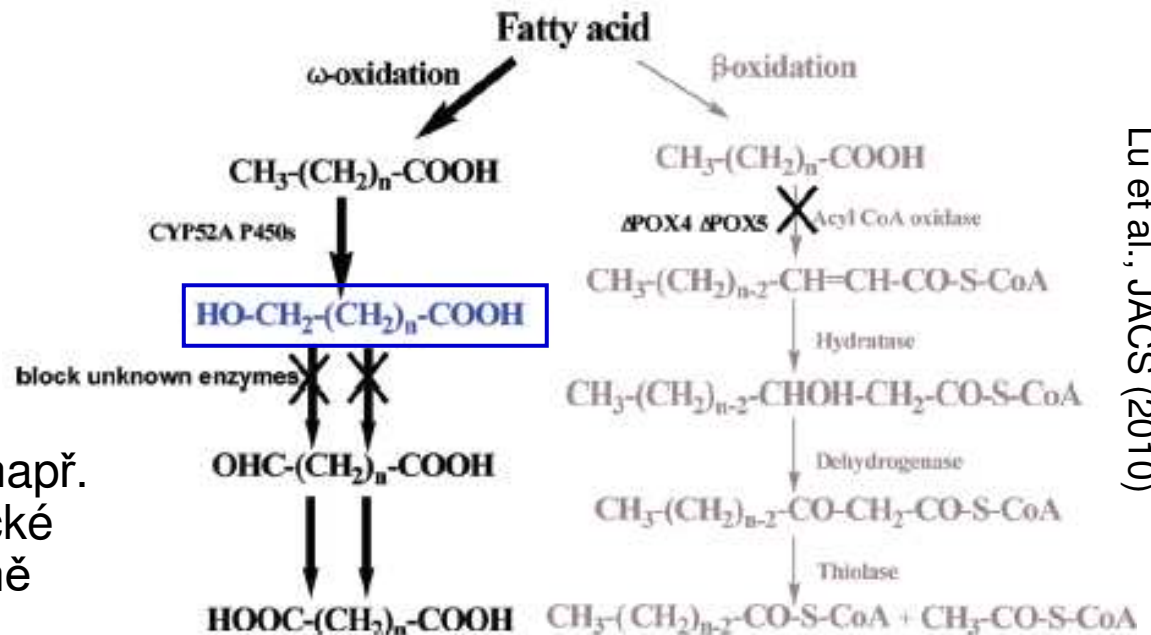
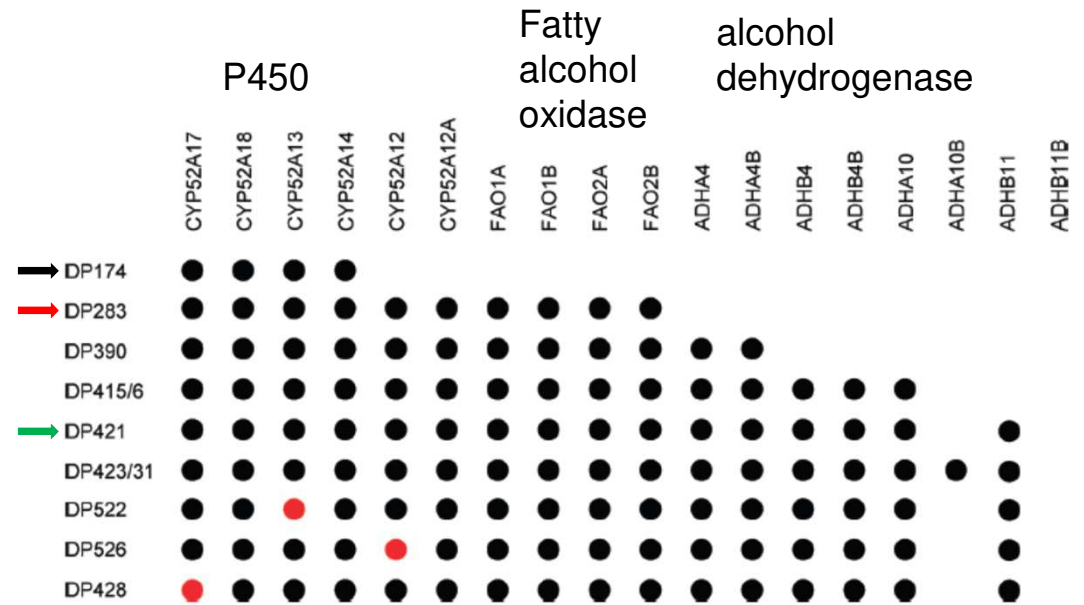
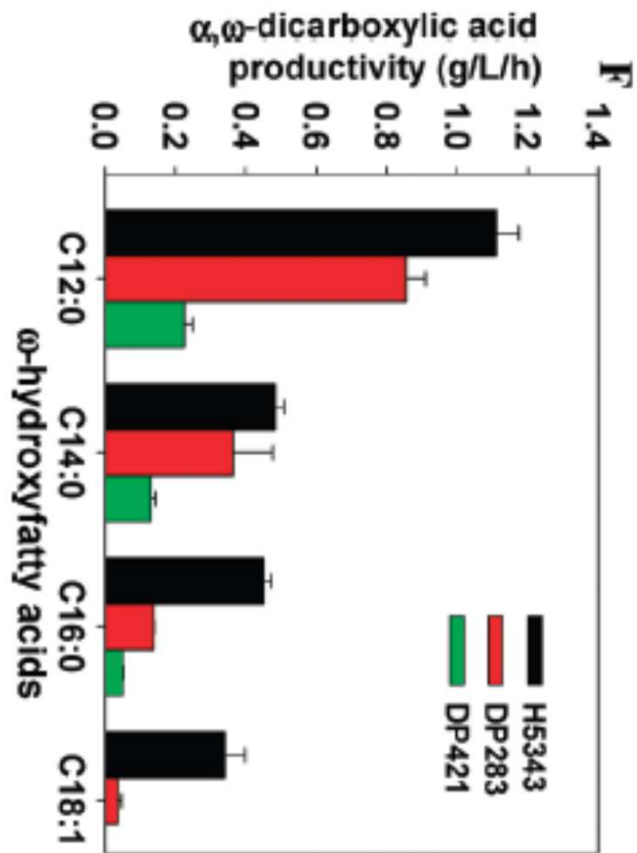
kombinace mutací ab je synteticky letální

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



Příklad signálních drah (suprese – aktivací)

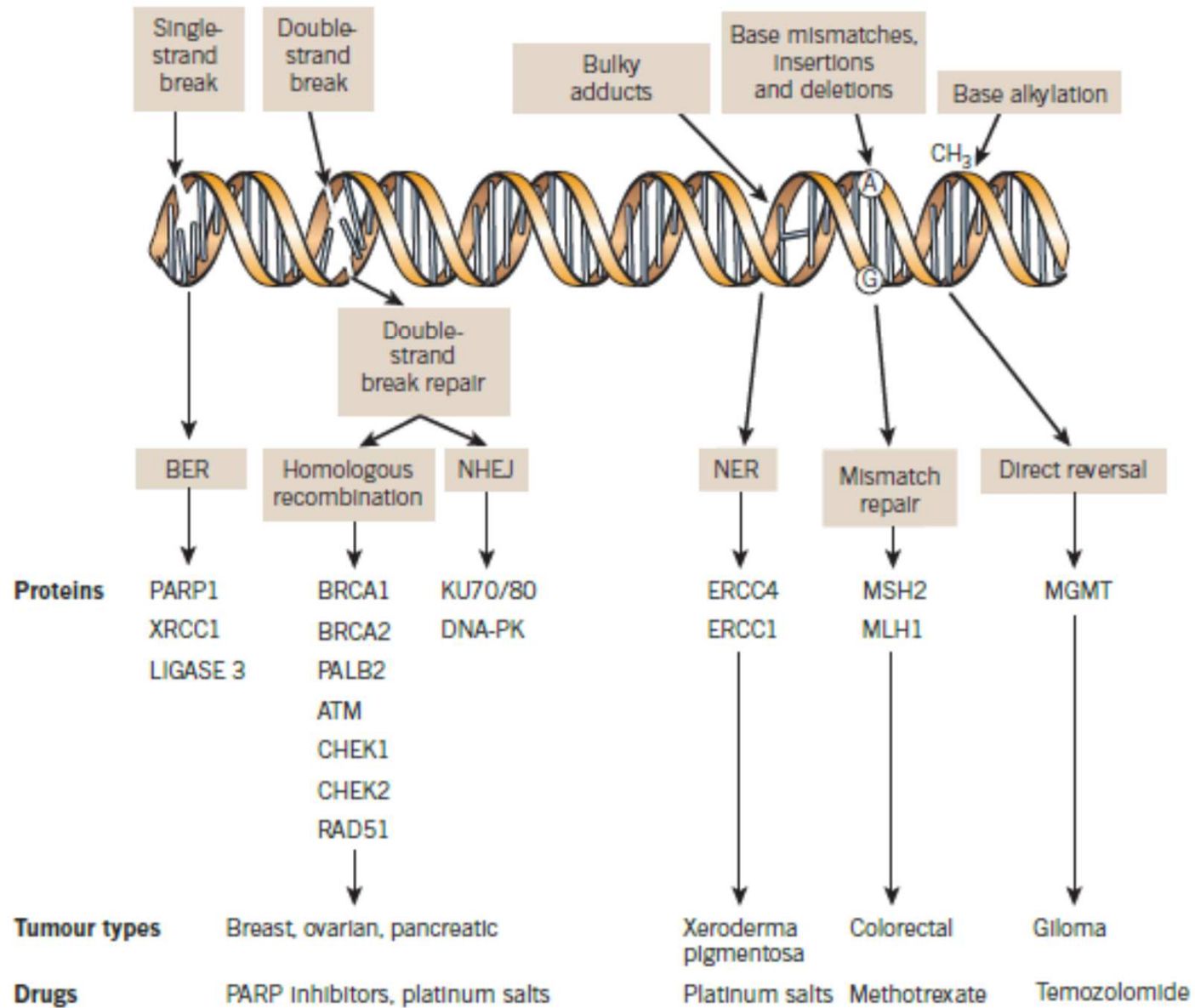
Hledání funkčně příbuzných genů



Lu et al., JACS (2010)

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

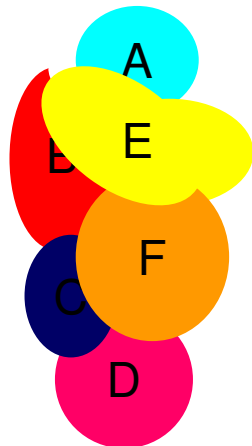
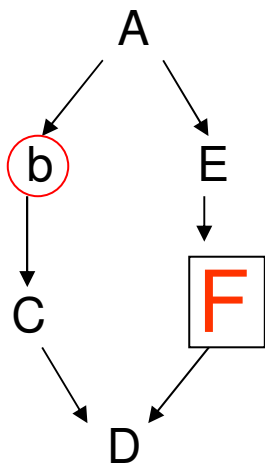
Syntetická letalita v léčbě rakoviny



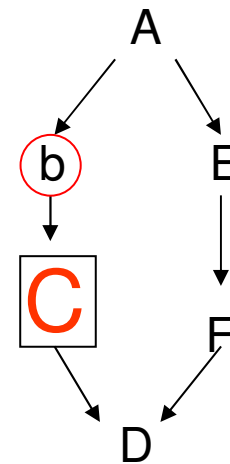
Supresory

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

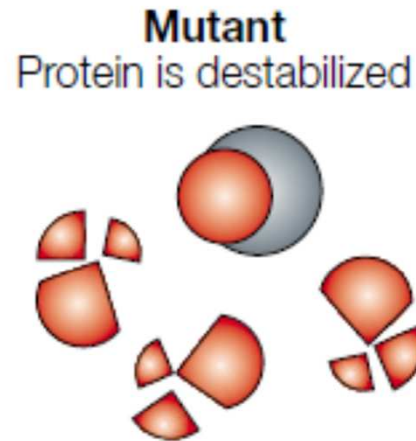
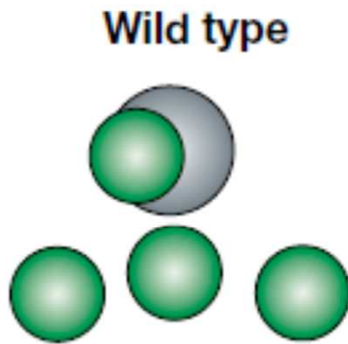


Proteinový komplex

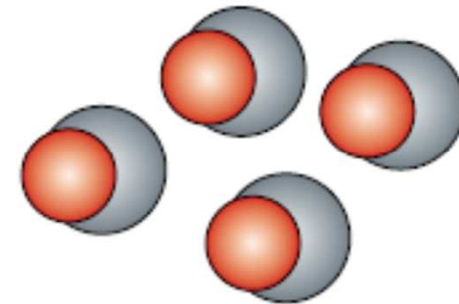


Supresory

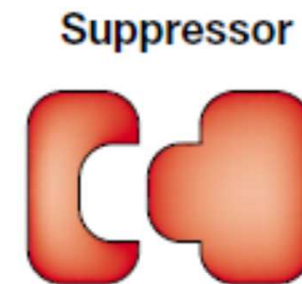
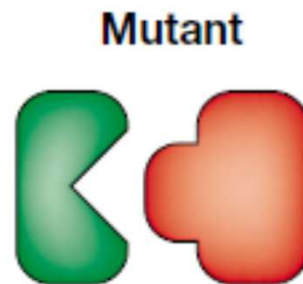
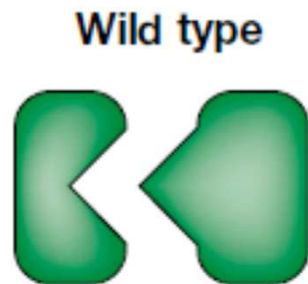
a Dosage suppressor: rescues in high copy



Suppressor
Increased dosage of wild-type
partner stabilizes protein

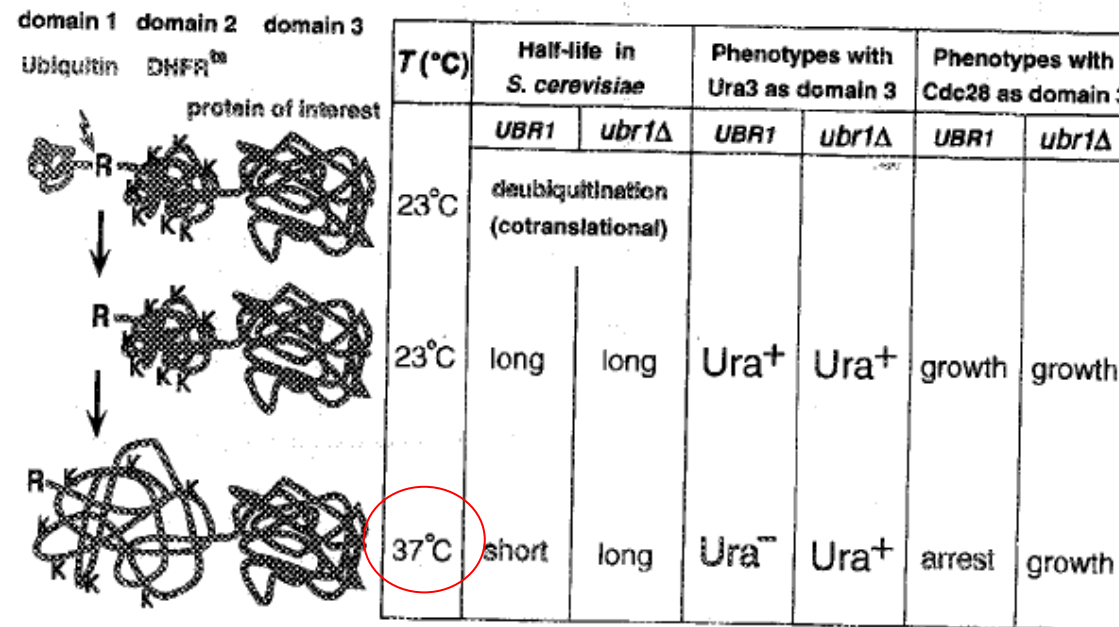


b Interaction suppressor: allele specific, gene specific



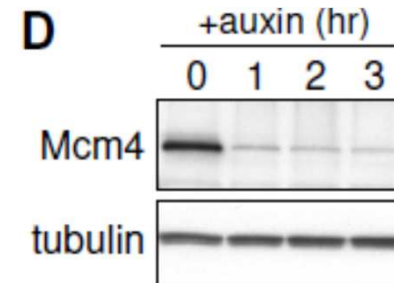
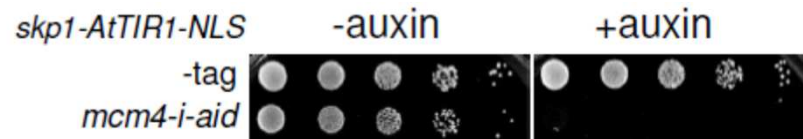
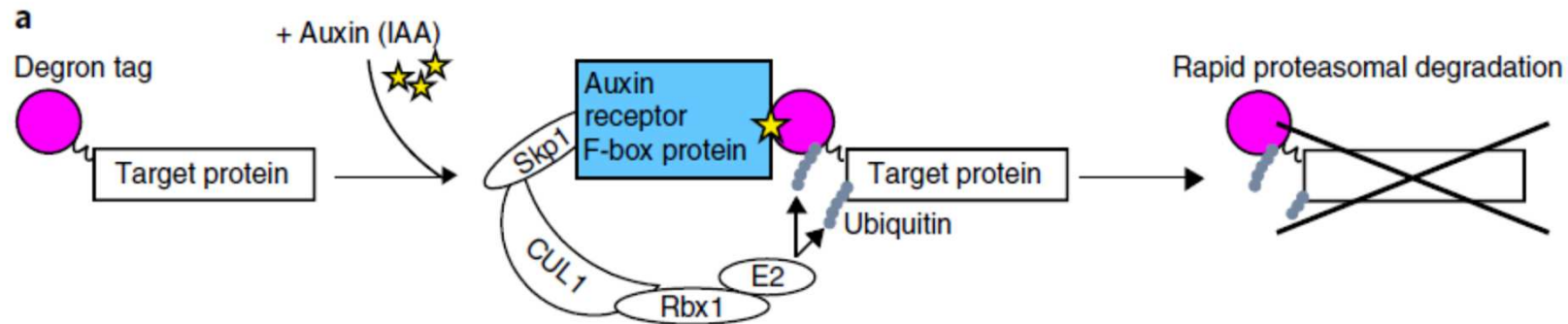
ts mutanty

- **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**



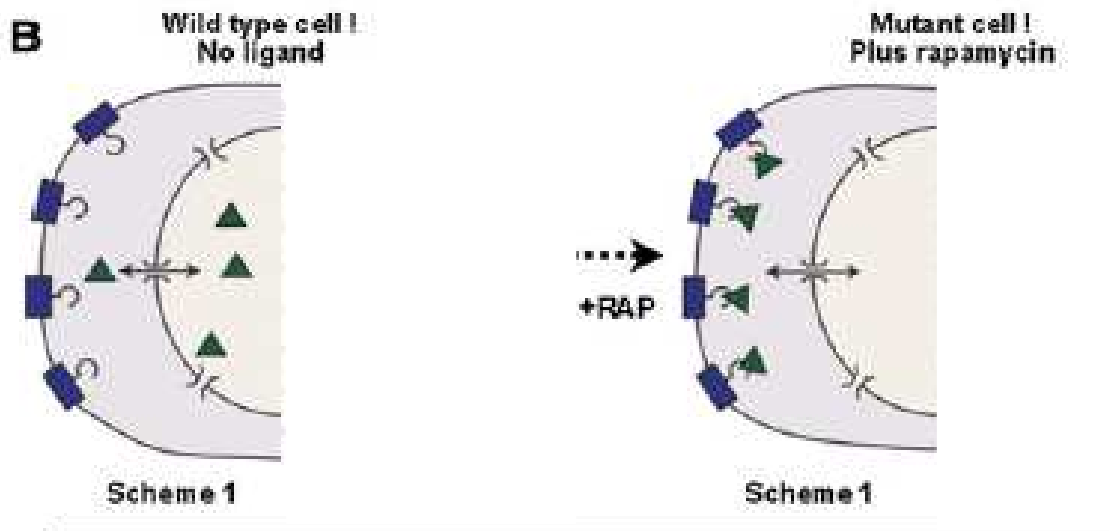
- ubikvitinace „označuje“ proteiny pro proteasom, kde je degradován – např. ts varianta DHFR je degradována (nestabilní protein – strukturní mutace)
- fúze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fúze s CDC28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

Rychlé vyřazení proteinu z funkce - degradace

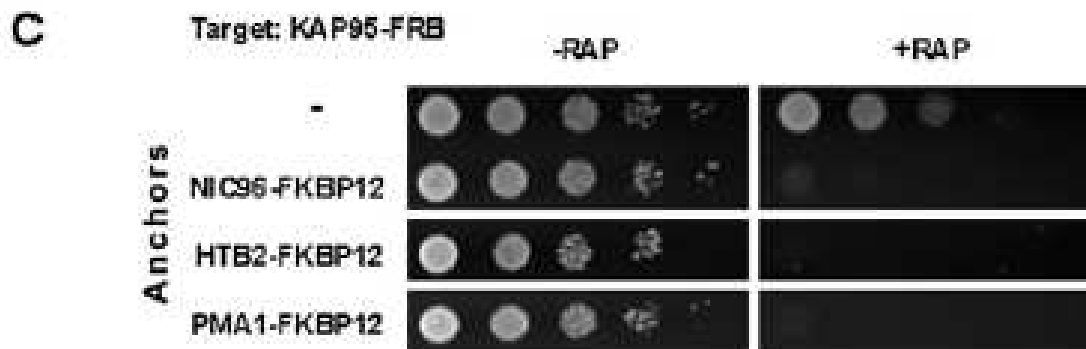


protein je cíleně degradován (vyřazen z funkce)
– odvozen z rostliné ubikvitin-ligázy indukované auxinem (využití i pro ostatní organismy)

Rychlé vyřazení proteinu z funkce - relokace



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.

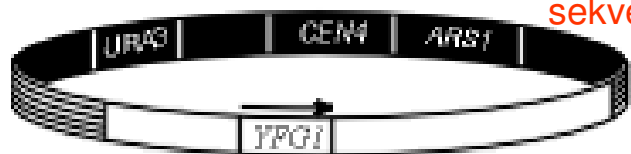
Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



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⁻

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

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

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATα YFG+*



Isolate a diploid strain and Sporulate



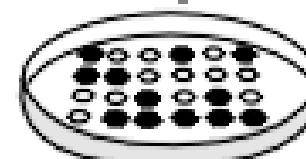
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad



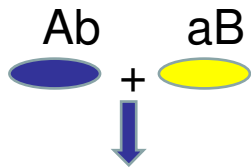
Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



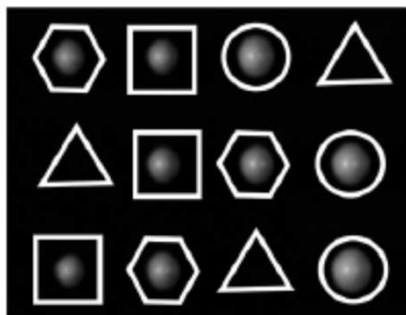
Počet mutací

- 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)

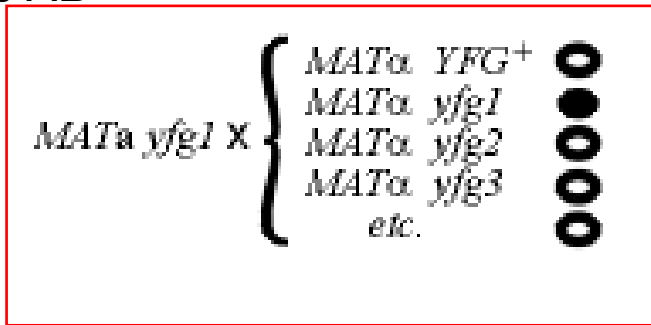


aB Ab AB ab

ab Ab aB AB kombinace těchto mutací je synteticky letální

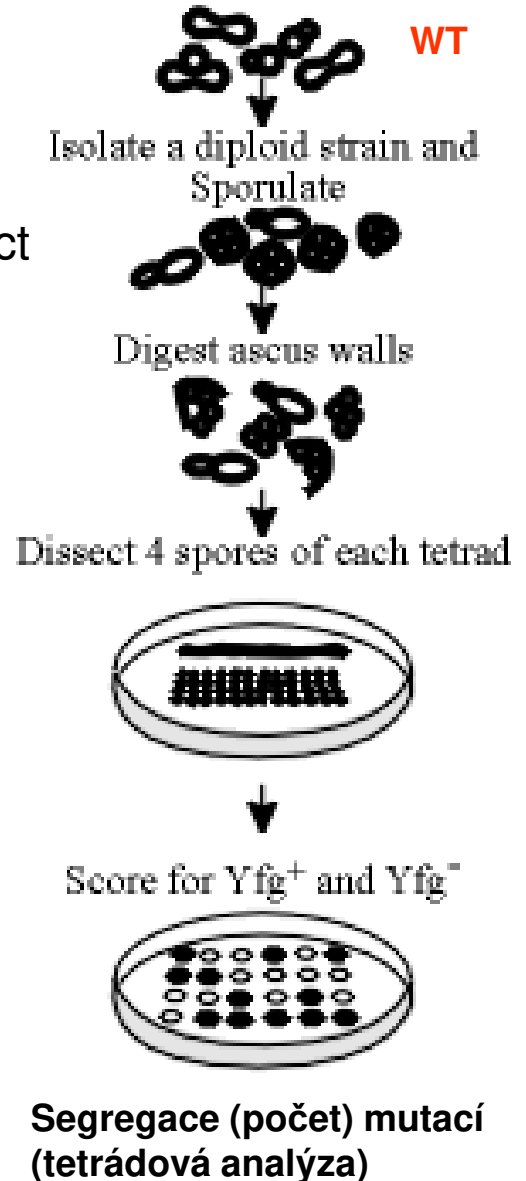
Ab aB ab AB

- AB
- Ab
- ⬡ aB
- △ ab

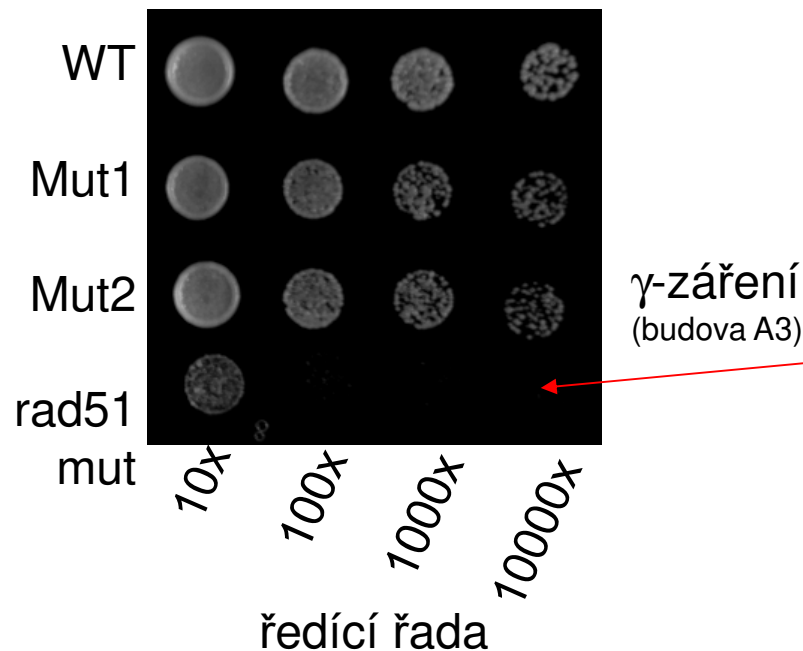


Komplementační skupiny (diploid)

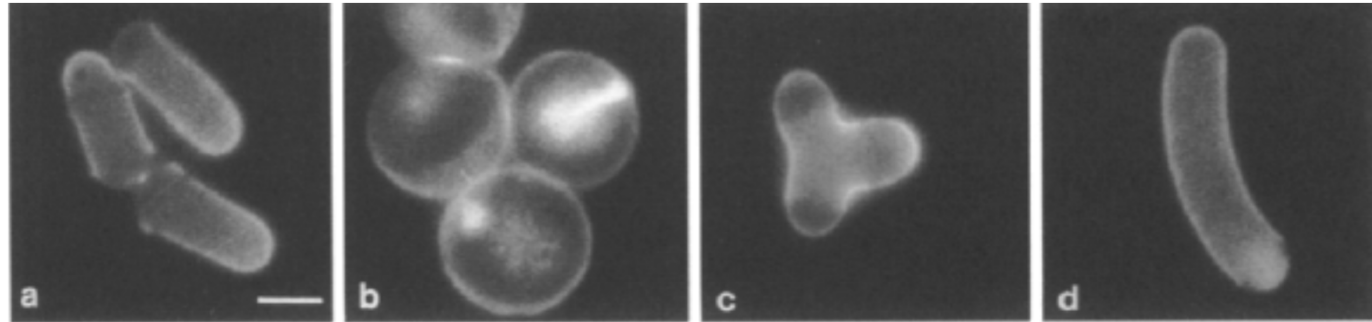
Meiotic Analysis
 Cross mutant to *MATa YFG+*



- 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*** = *cell-division-cycle*)



- 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)

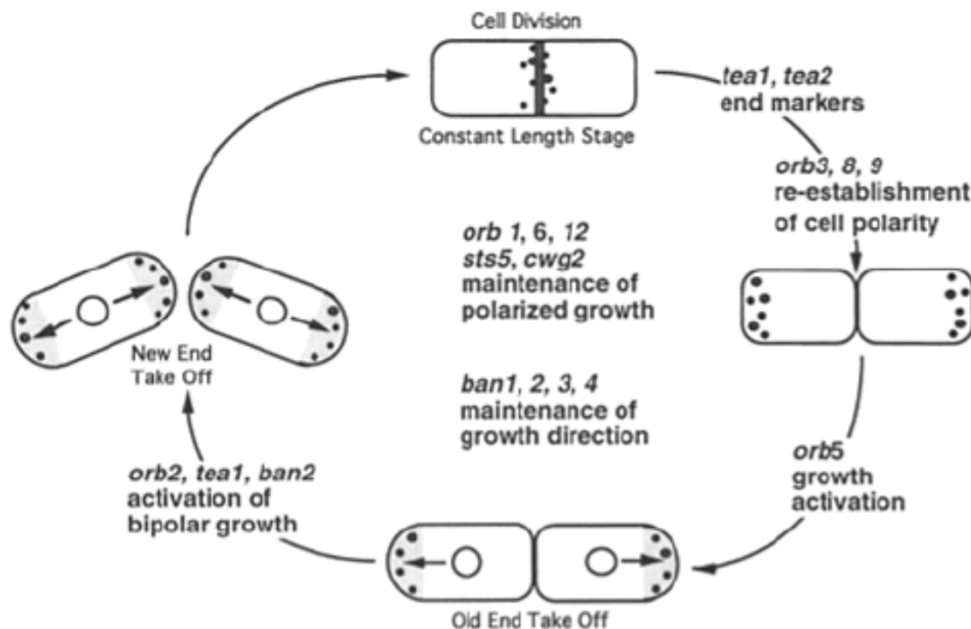


Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage*	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 [†])	<i>orb2, orb6</i>		
<i>orb2</i>	2 (4 [†])	<i>orb1, orb6</i>		
<i>orb3</i>	1 (1 [†])			
<i>orb4</i>	12 (1 [†])		<i>sts5</i> [§]	<i>pck1</i> ⁺ , <i>pyp1</i> ⁺
<i>orb5</i>	2 (2 [†])			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2</i> ^l	
<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> ^{ll}	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1</i> ⁺ , <i>pyp1</i> ⁺ , <i>ras1</i> ⁺

Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

Leland Hartwell začal studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*.
- izoloval mutantní kvasinky s mutovaným genem - >100 genů kontrolujících buněčný cyklus (např. *CDC28*) - také sledoval citlivost kvasinek na poškození DNA radiací - zjistil, že BC je při poškození DNA zastaven – aby získal čas na opravu DNA

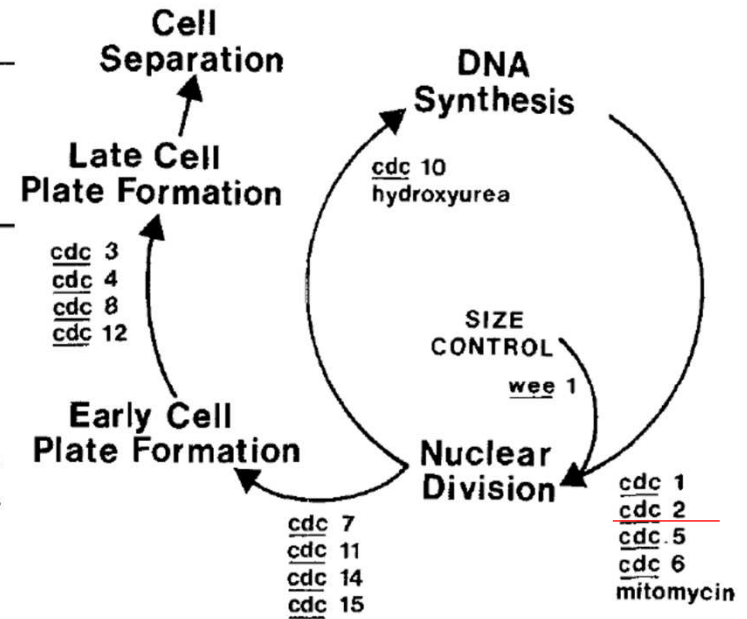
Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



Tim Hunt na začátku 80. let objevil první cyklin – cykliny jsou proteiny, které jsou syntetizovány a odbourávány (ubikvitinace) během určité části buněčného cyklu. Cykliny se váží na CDK a regulují jejich aktivitu.

Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

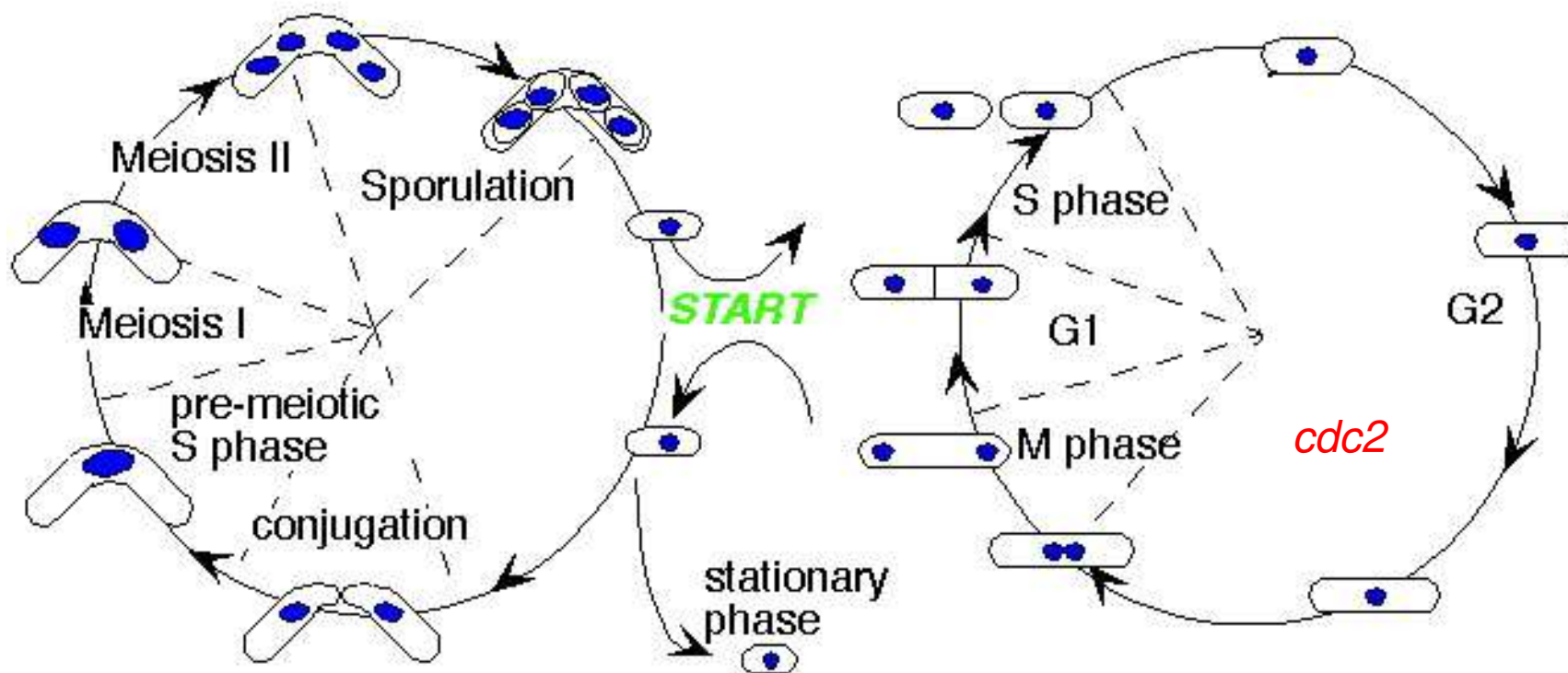
Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C ^a	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky ^b
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky ^b
„	121	0.38	32.1	„	
<i>cdc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

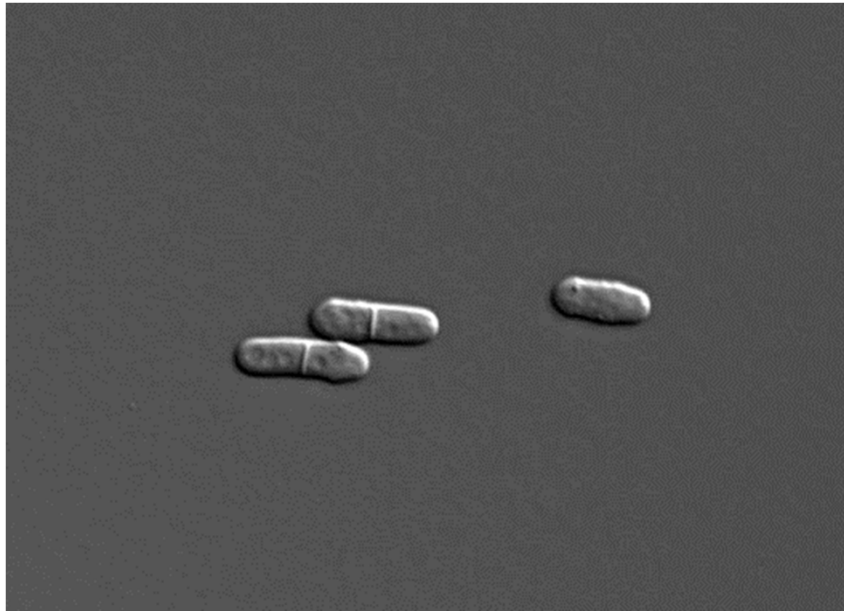


Meiotic cycle

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*

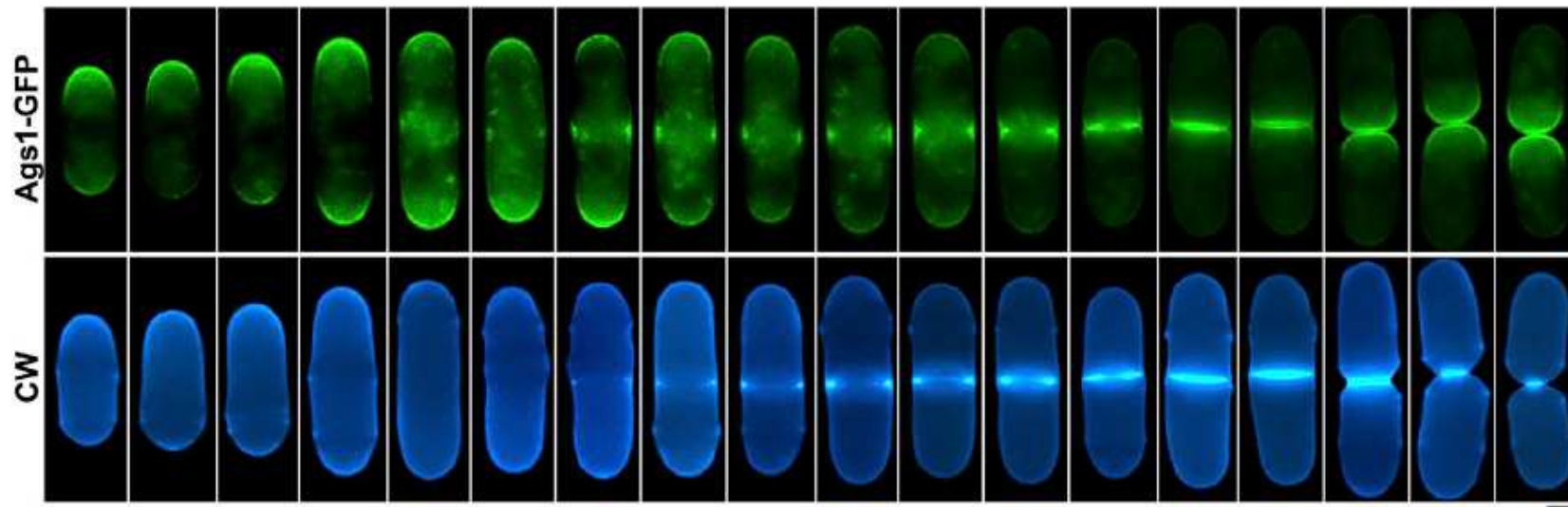
S. pombe



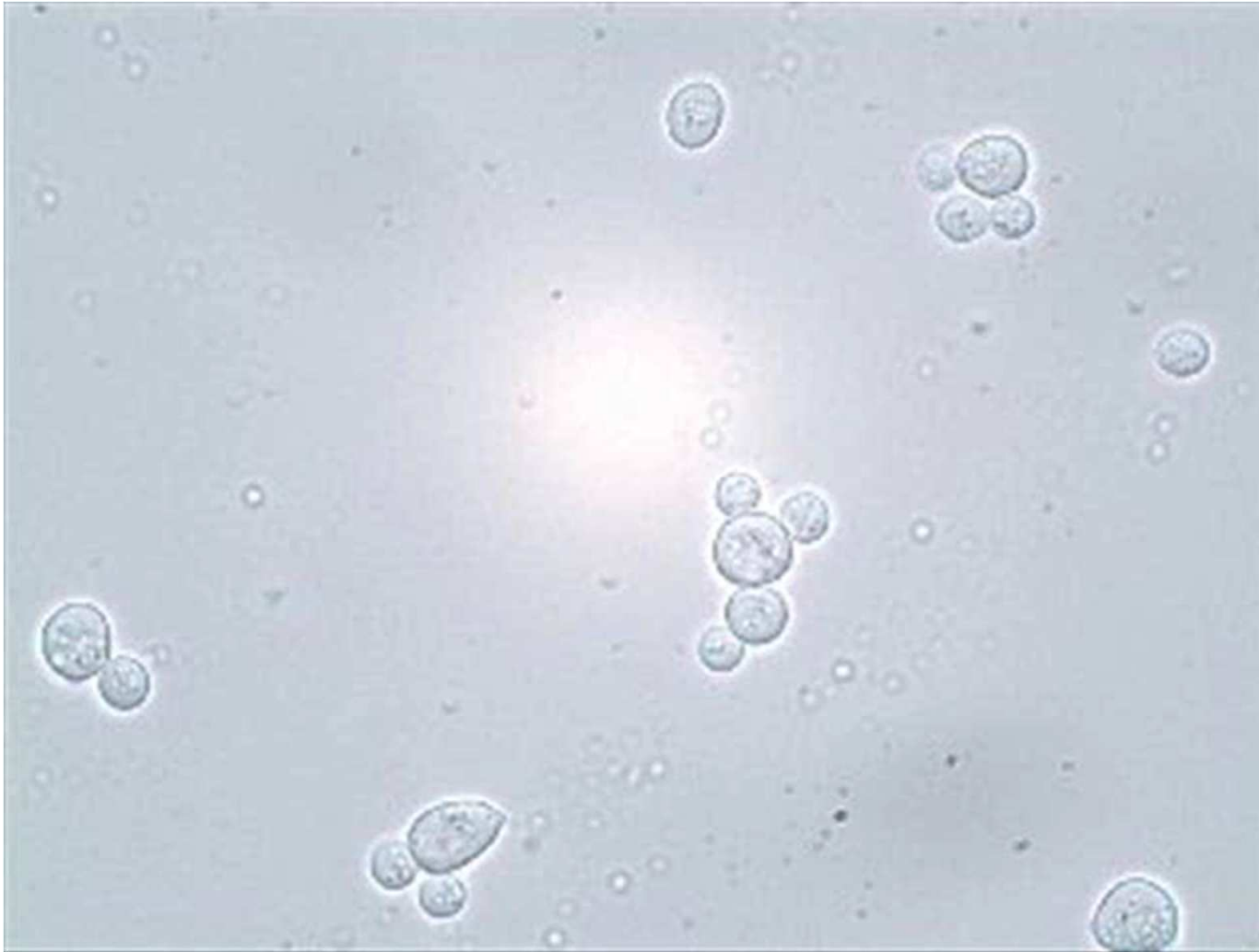
sekrece ... aktinový cytoskelet
jsou důležité pro procesy
polarizace ... v průběhu
buněčného cyklu ...
mating/fusion ...

- Více Dr. Špirek

Cortes et al, JCB, 2012

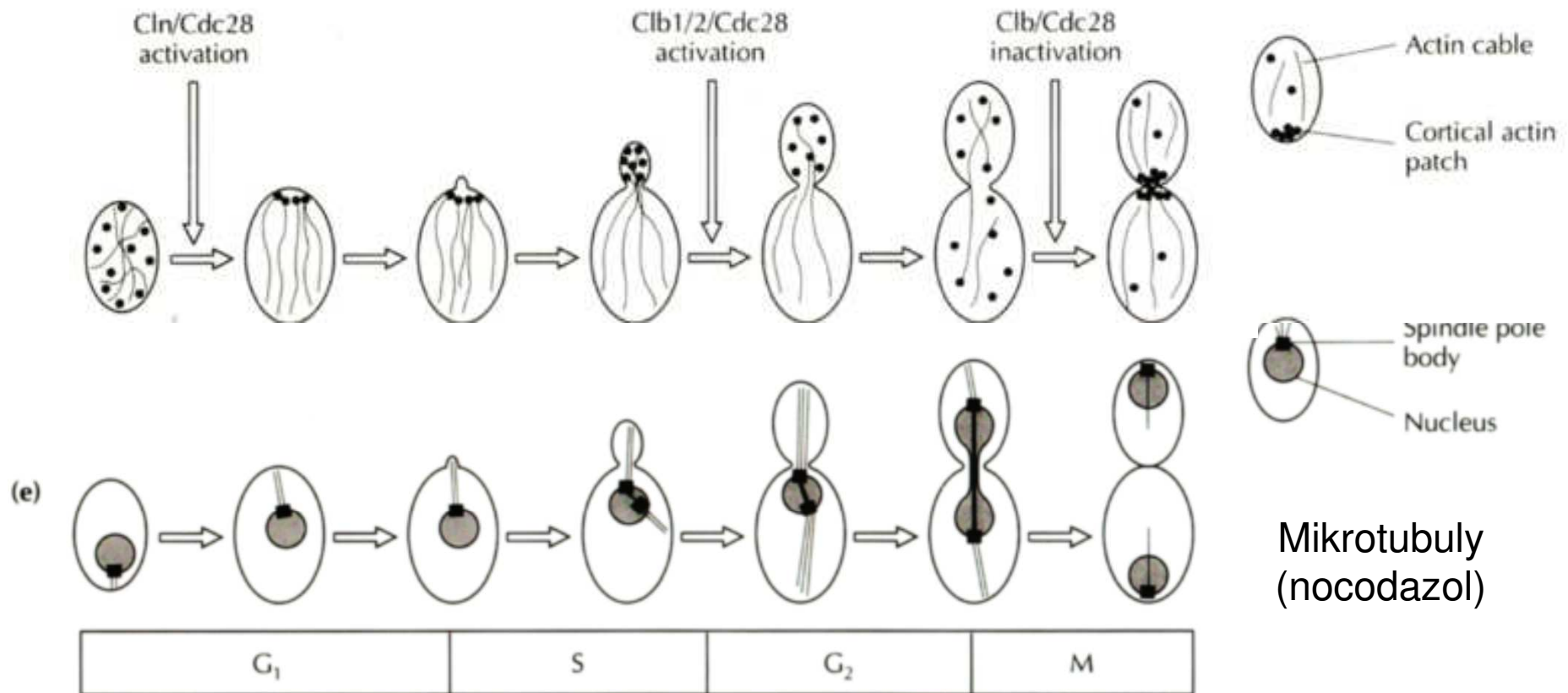


S. cerevisiae



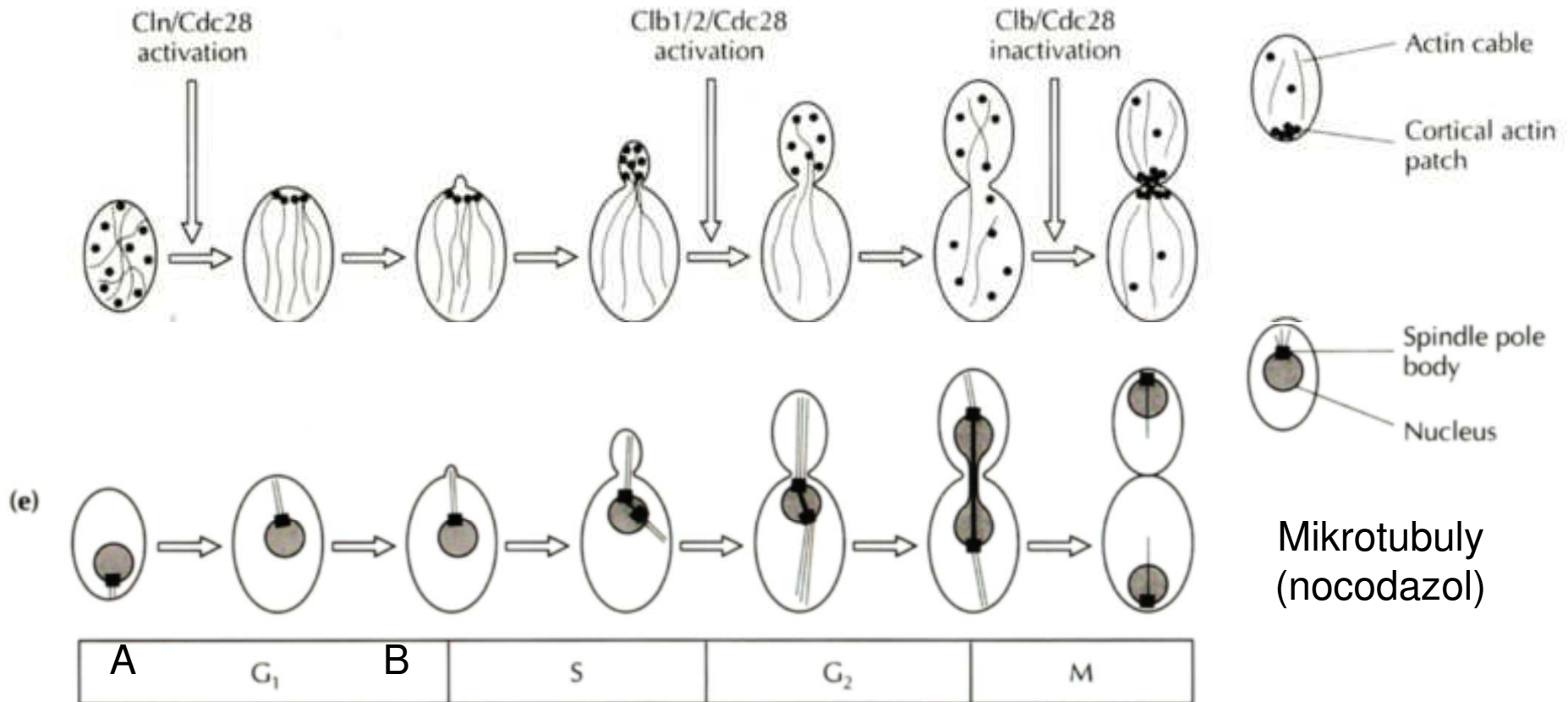
pučení ... párování (shmoo)

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**

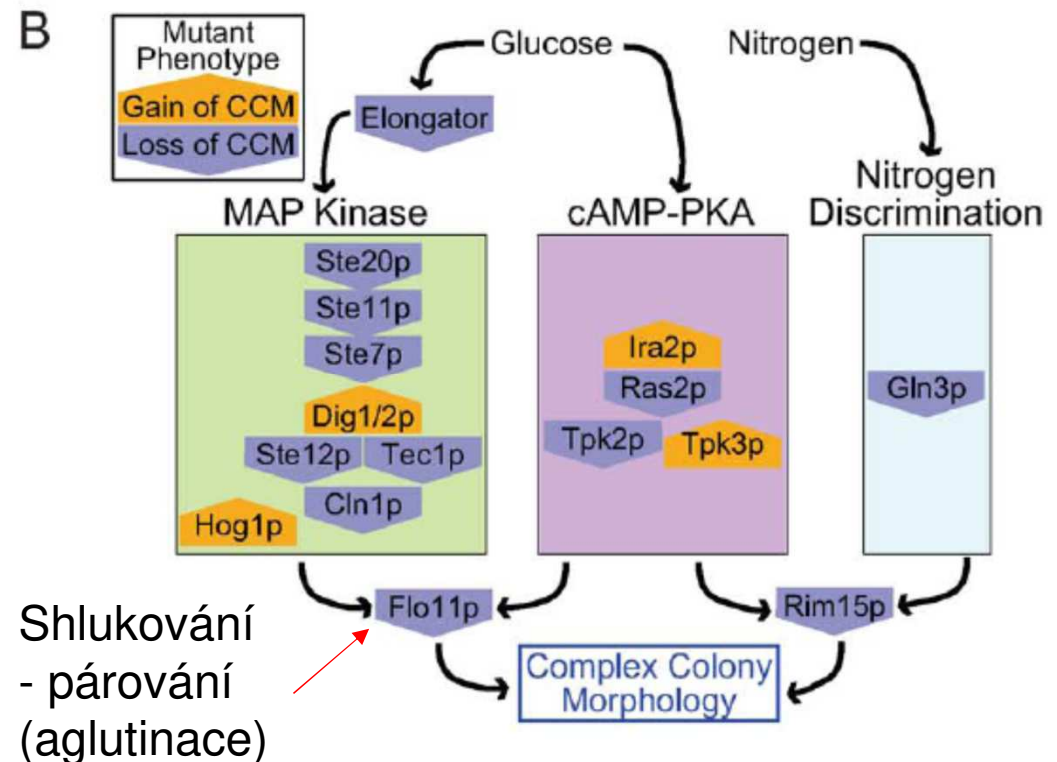
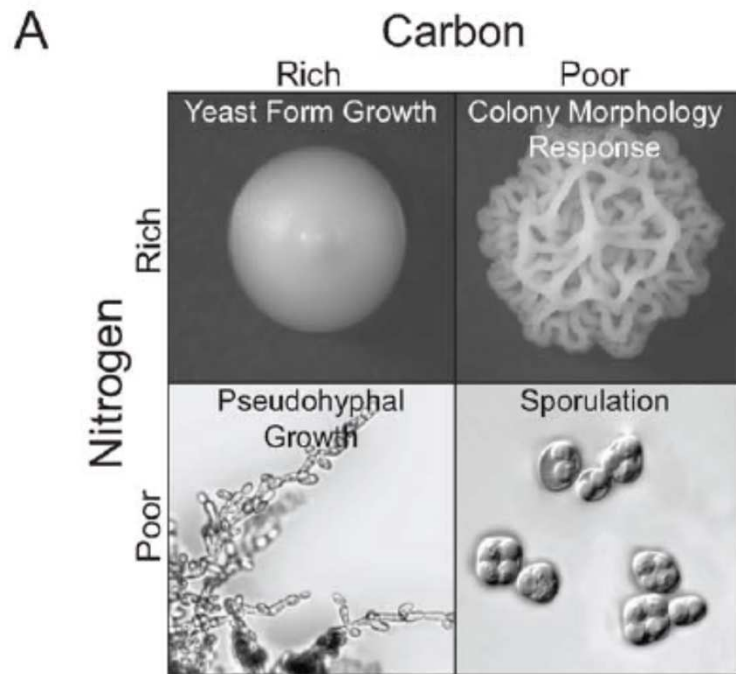
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

- 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:

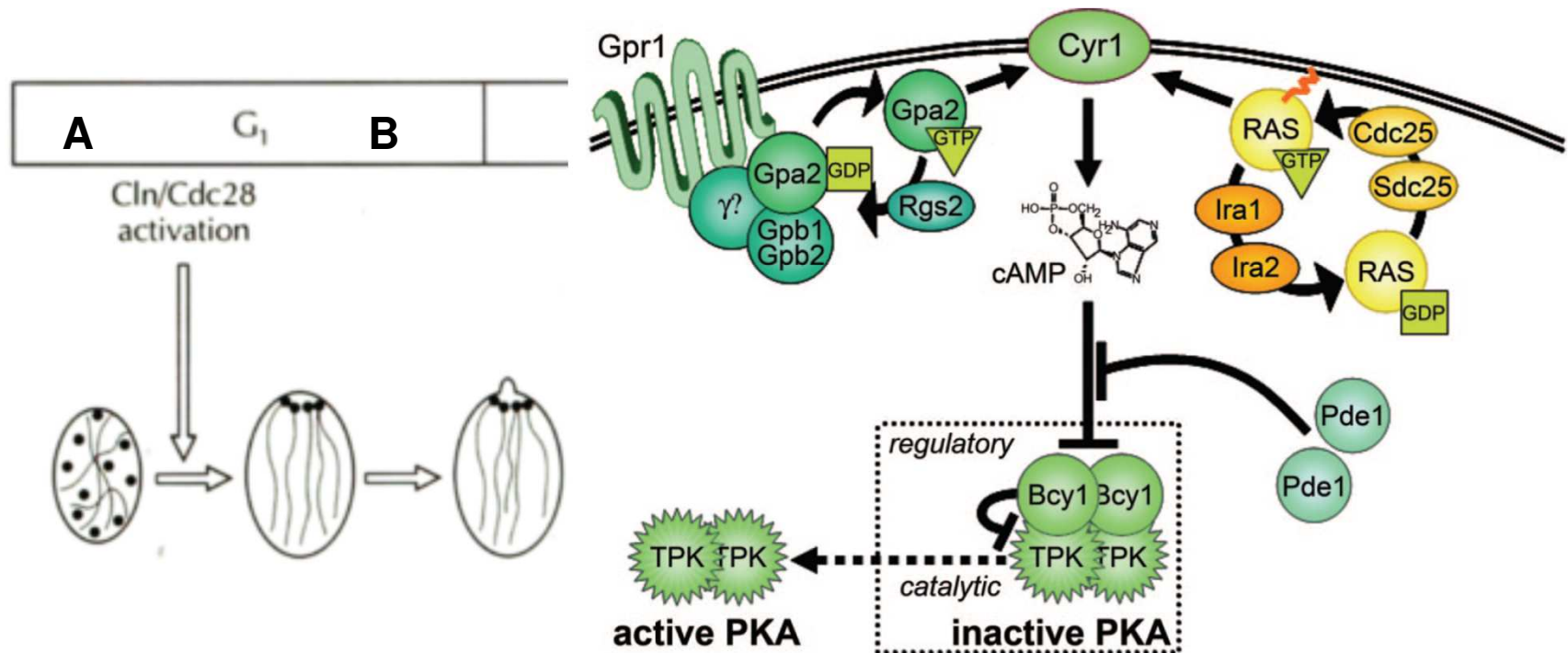
- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
- při nedostatku živin aretuje v G1 nebo posléze přechází do stacionární fáze (vyčerpání živin)
- nedostatek dusíku – růst pseudohyf
- při nedostatku N a C (diploidní buňky) zastavují v G1 a zahajují meiosis/sporulaci
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují



G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

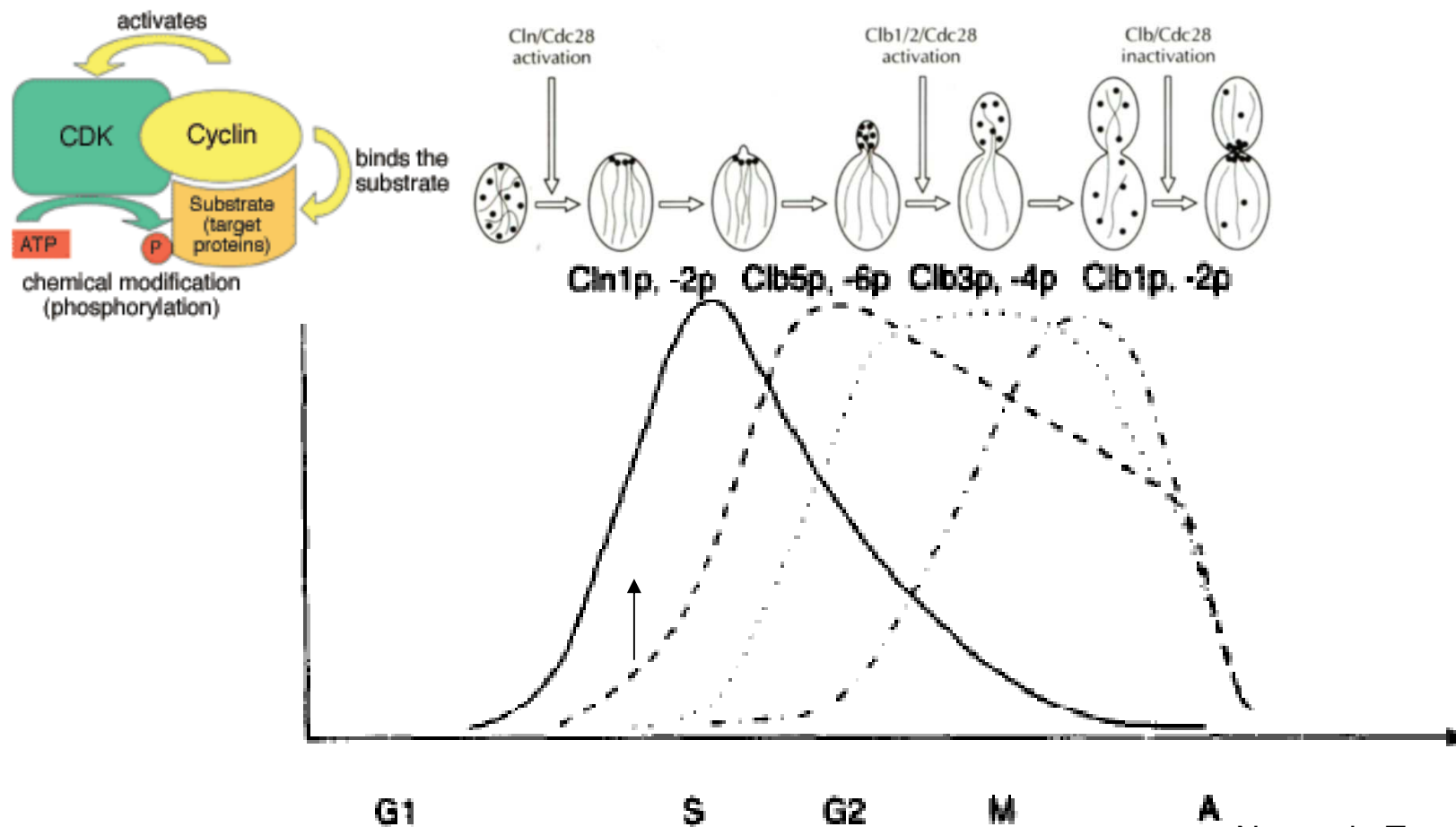
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



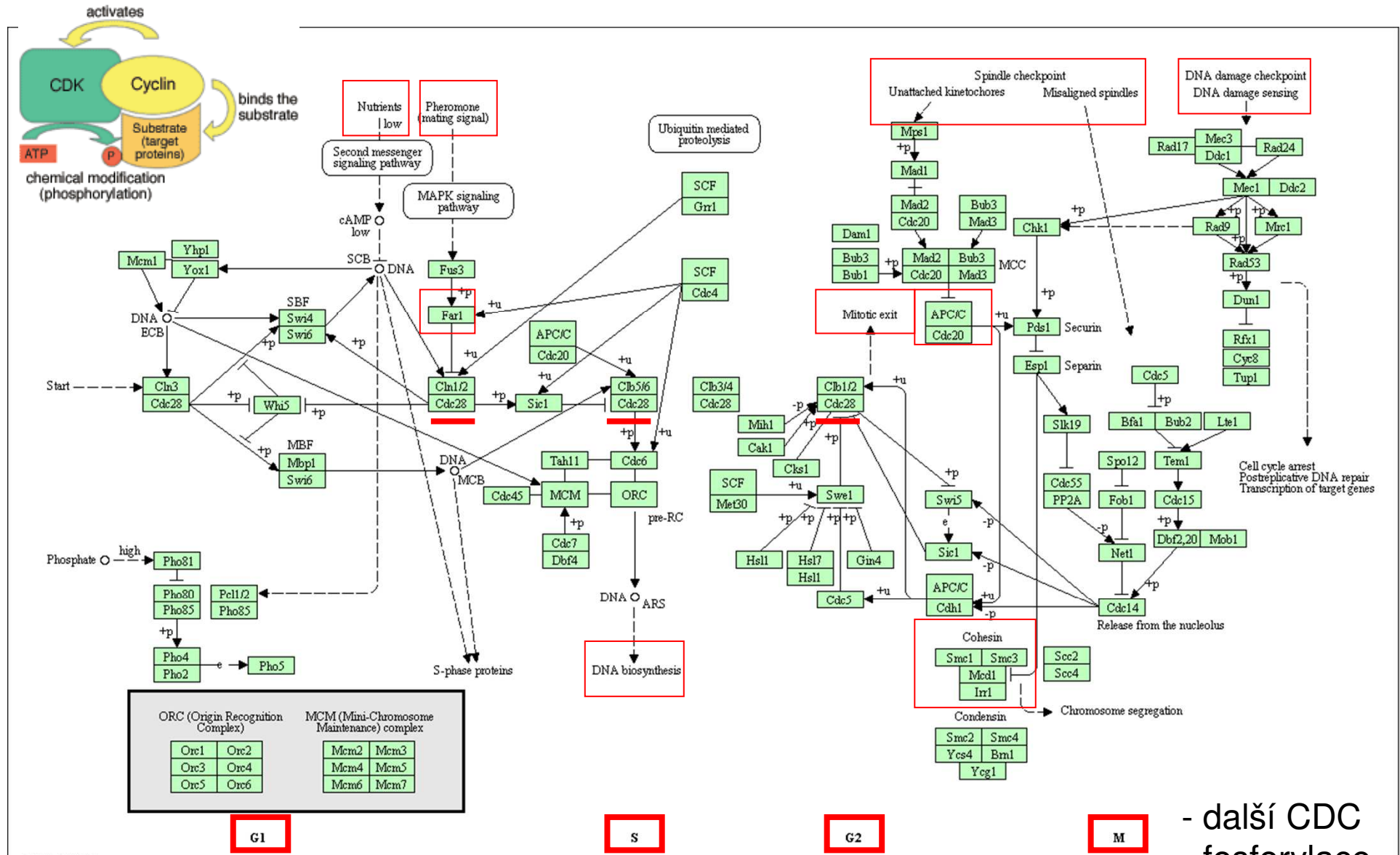
CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

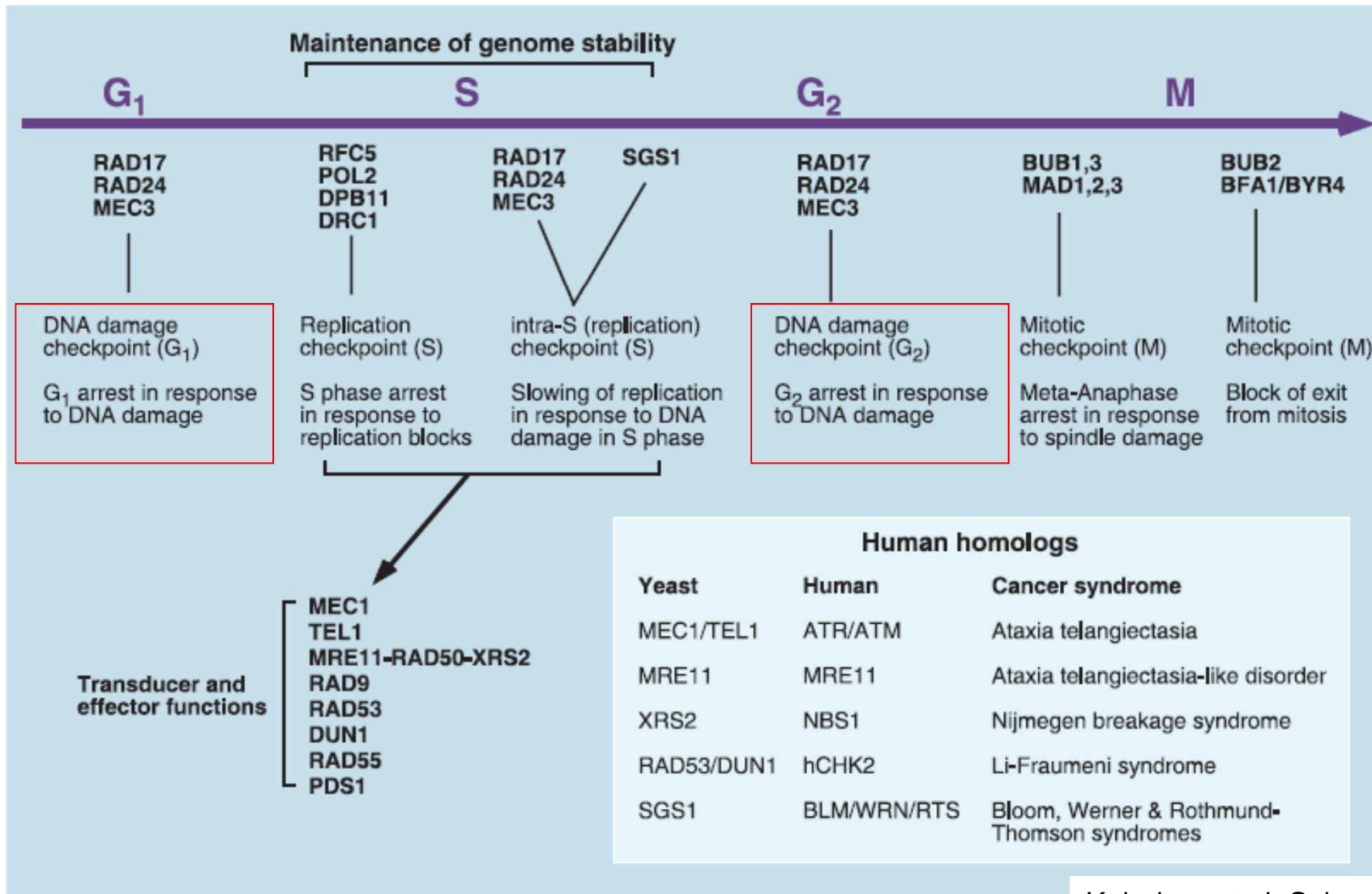
Interakcí fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká **aktivní kinasový komplex**:

- 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

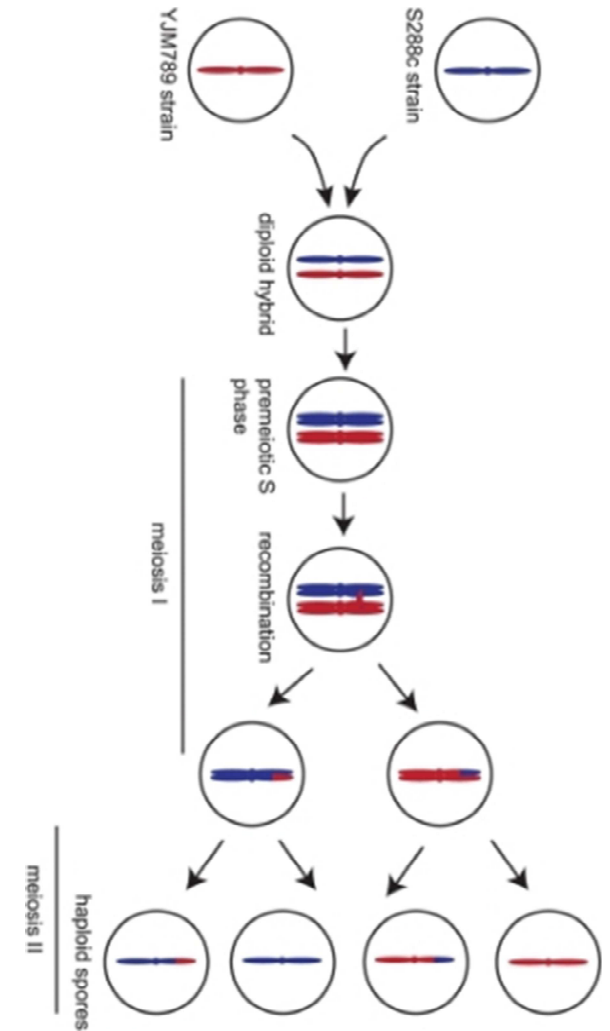
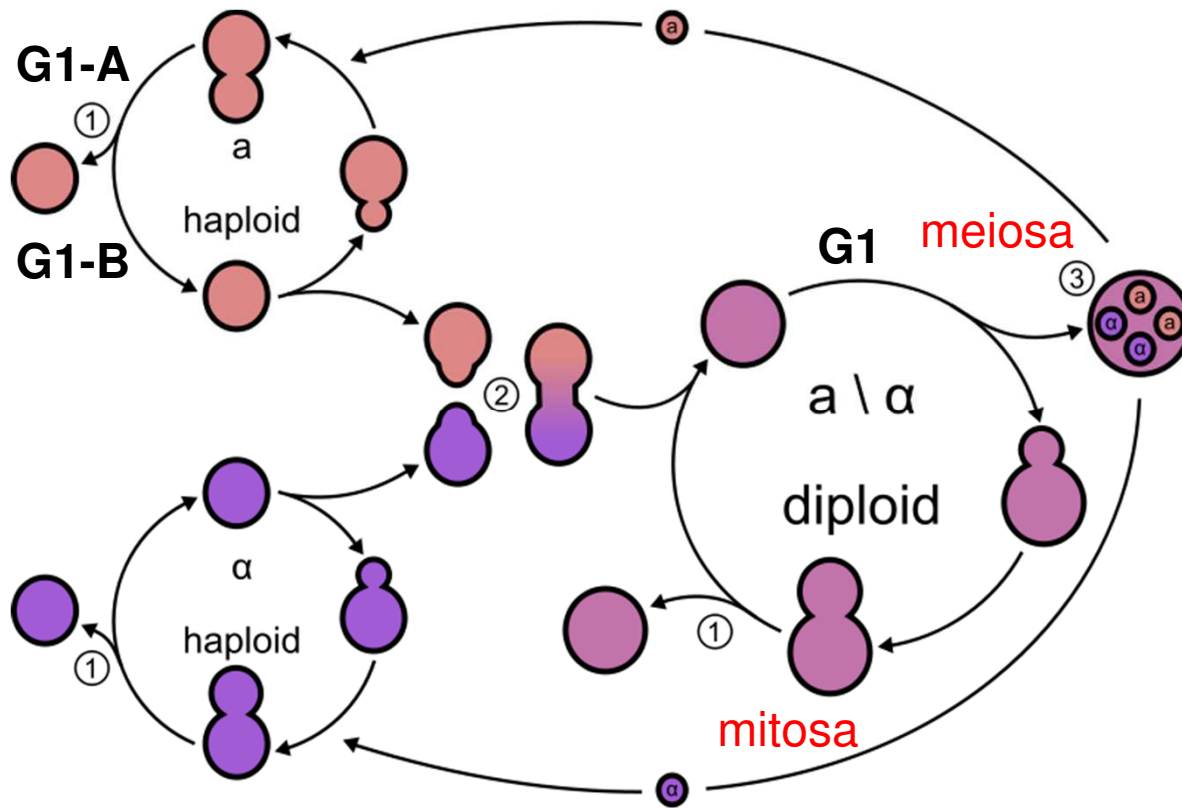




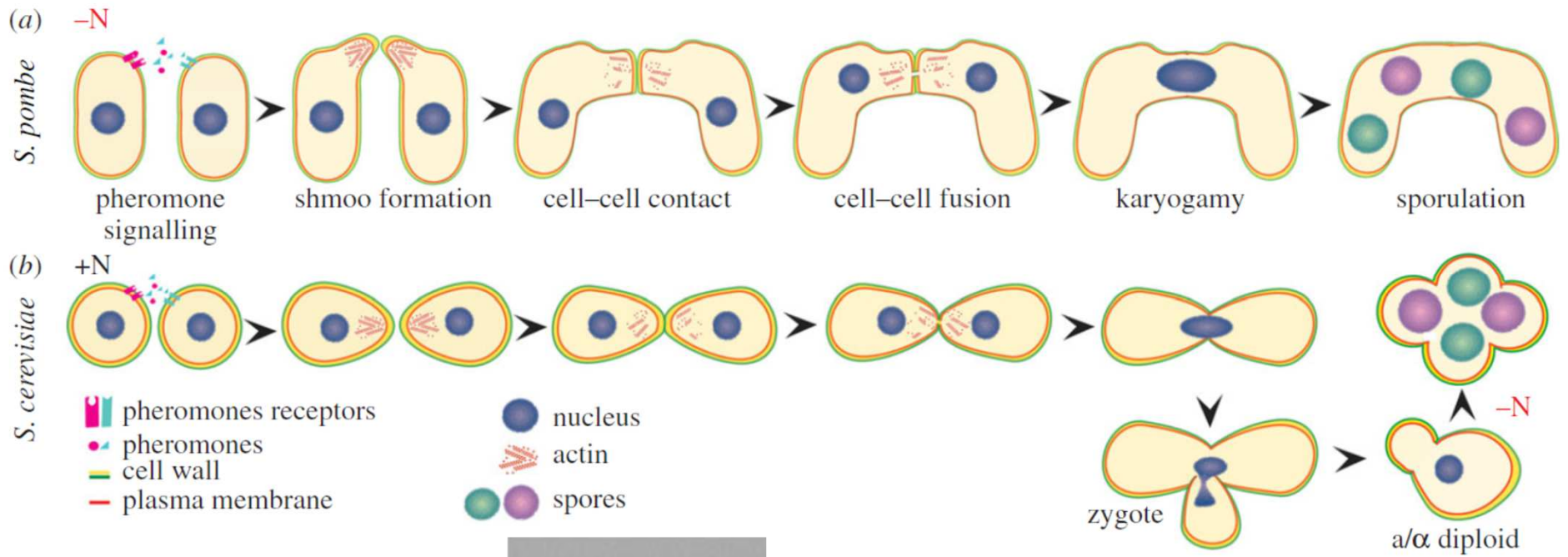
Kolodner et al, Science (2002)

Fig. 1. Summary of *S. cerevisiae* DNA damage, replication, and mitotic checkpoints. The 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)

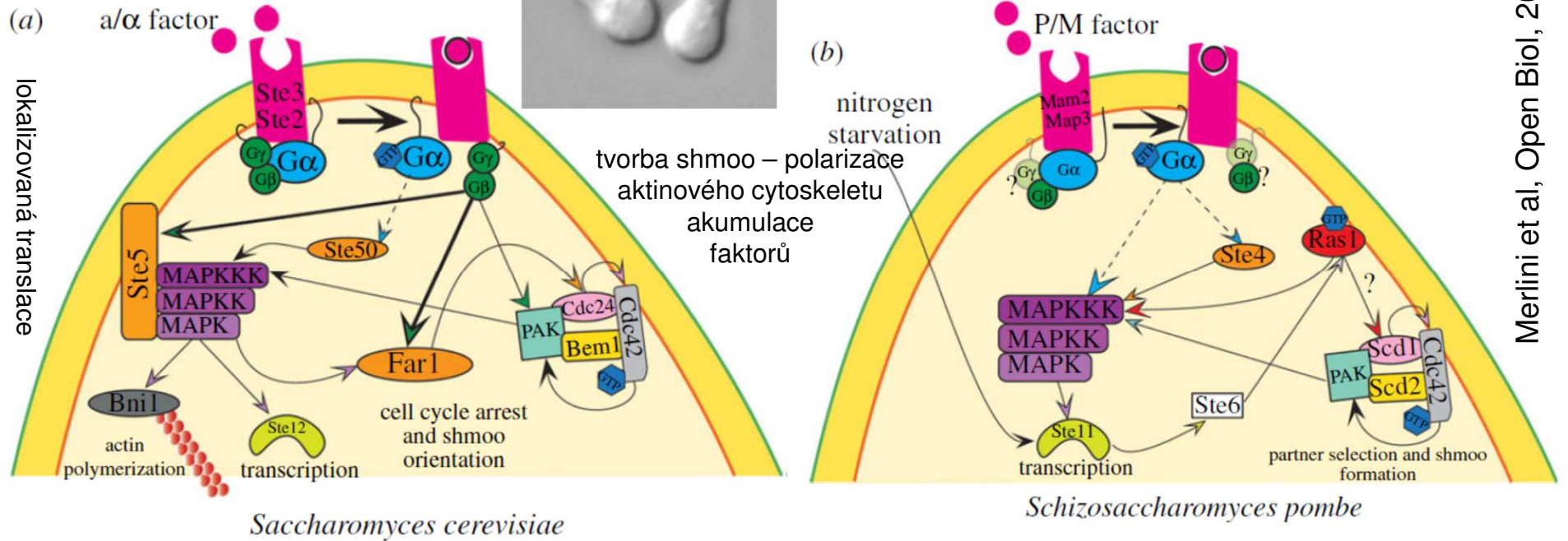
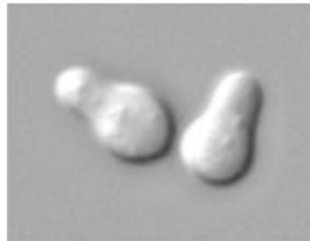
Párování/mating kvasinkových buněk



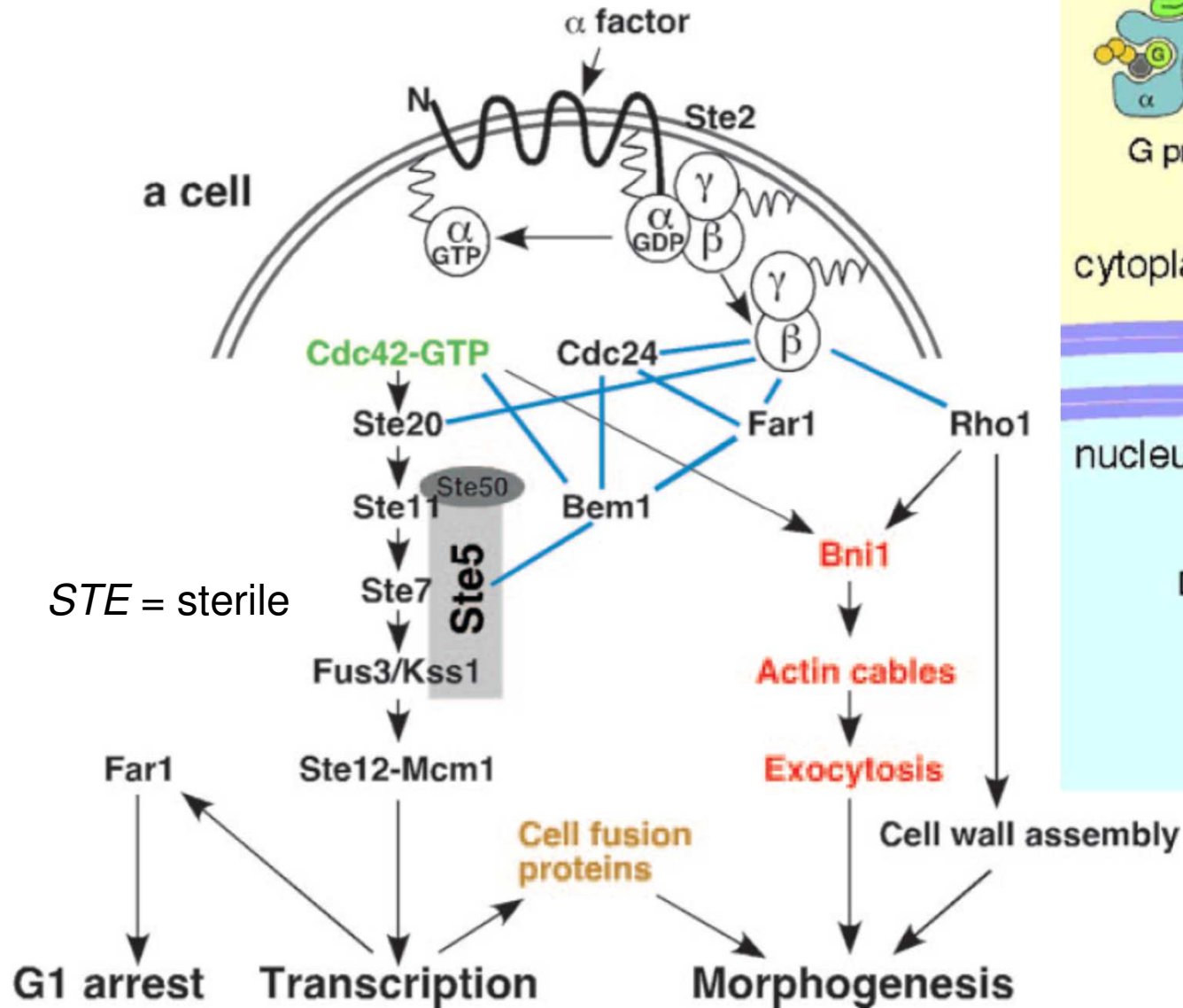
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují ... meiotické dělení
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii



STE = sterile

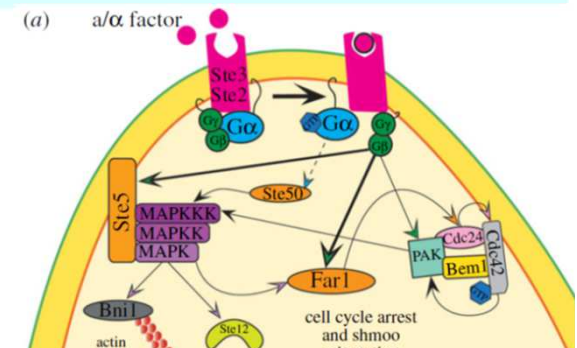
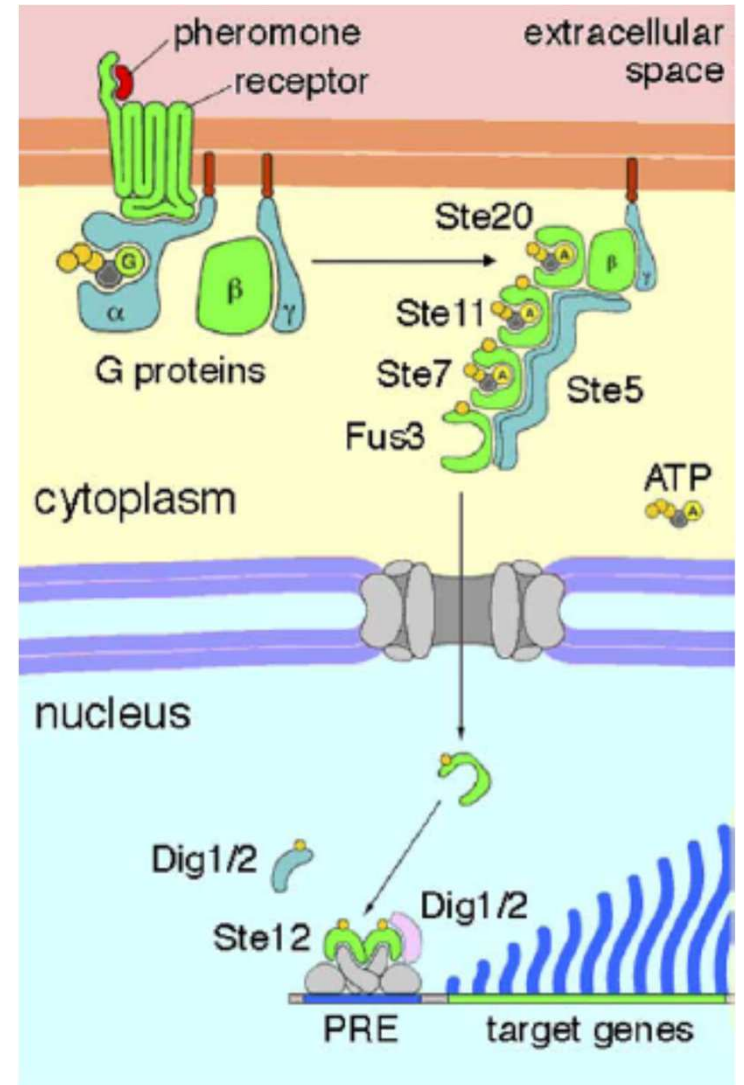


Signální dráha – α faktor



transkripce ... další přednáška

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



Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

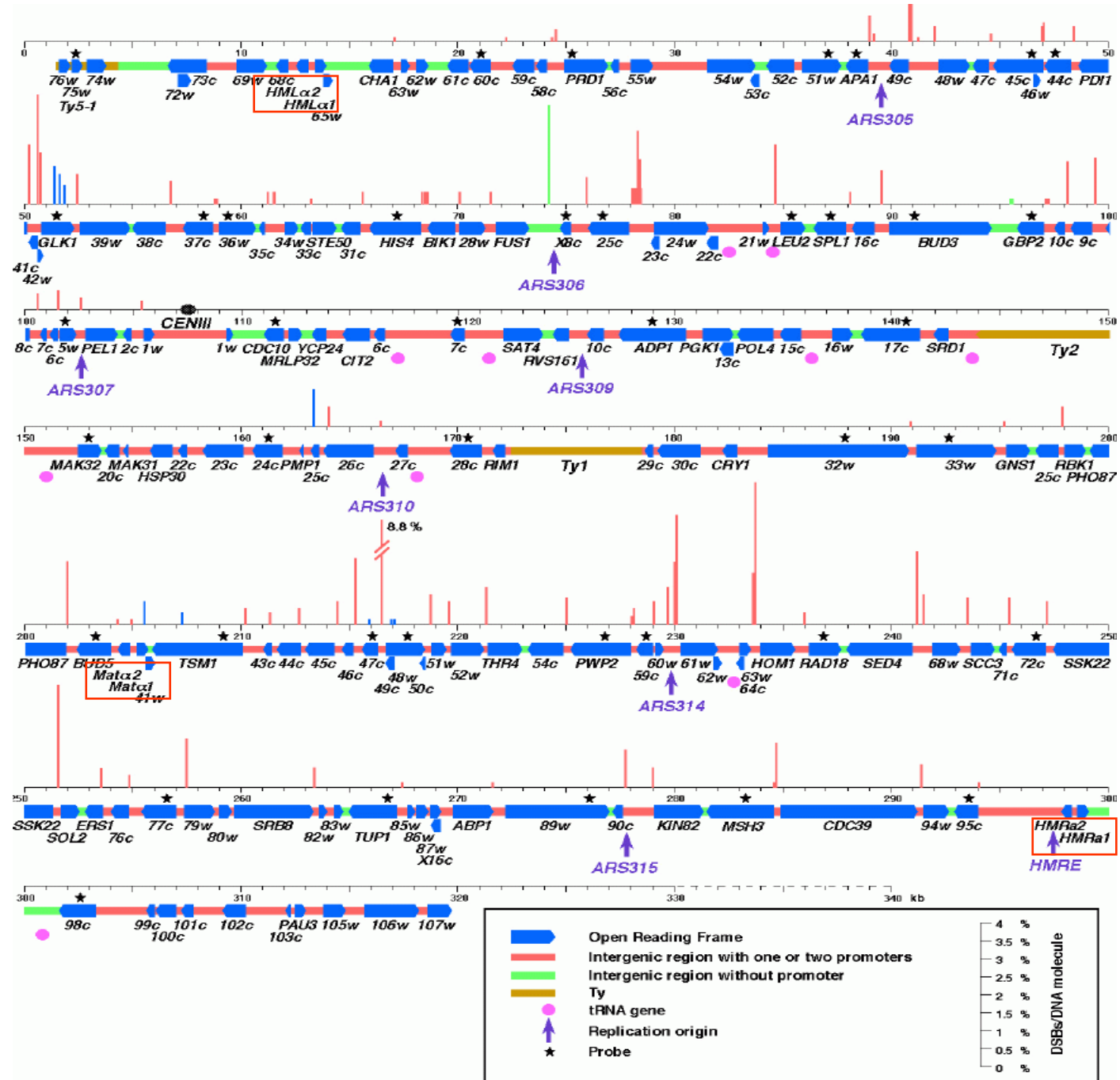
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

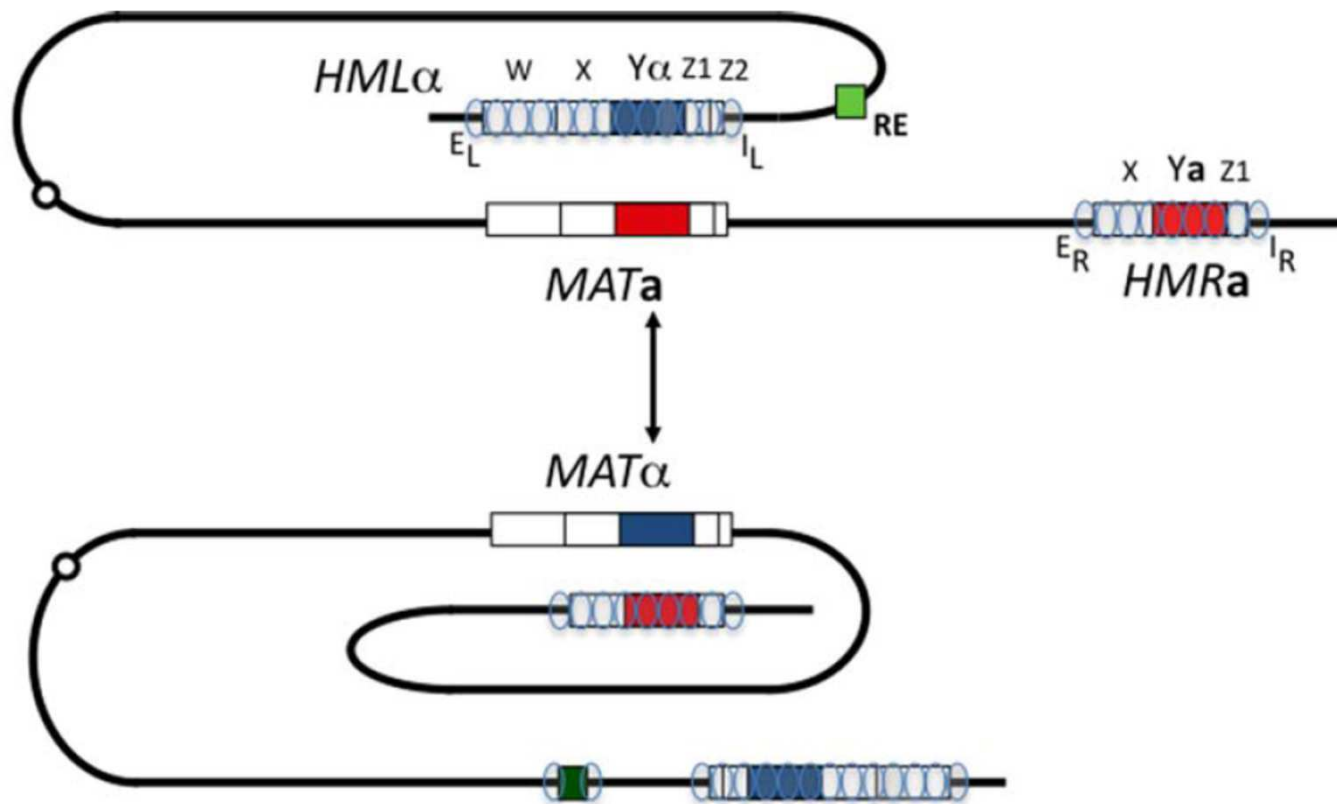
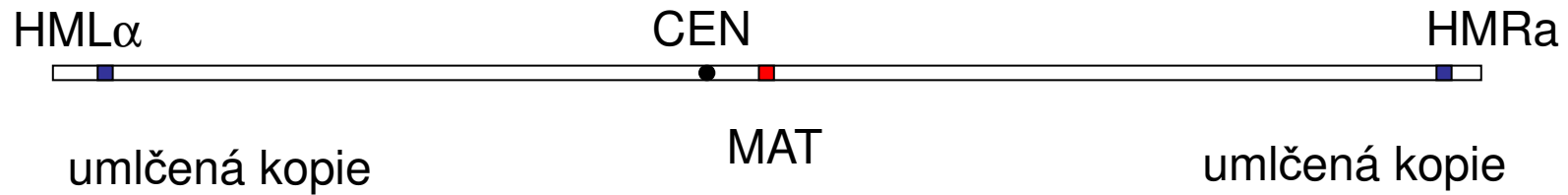
HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické – stabilní
Homothalické – přepínají párovací typ



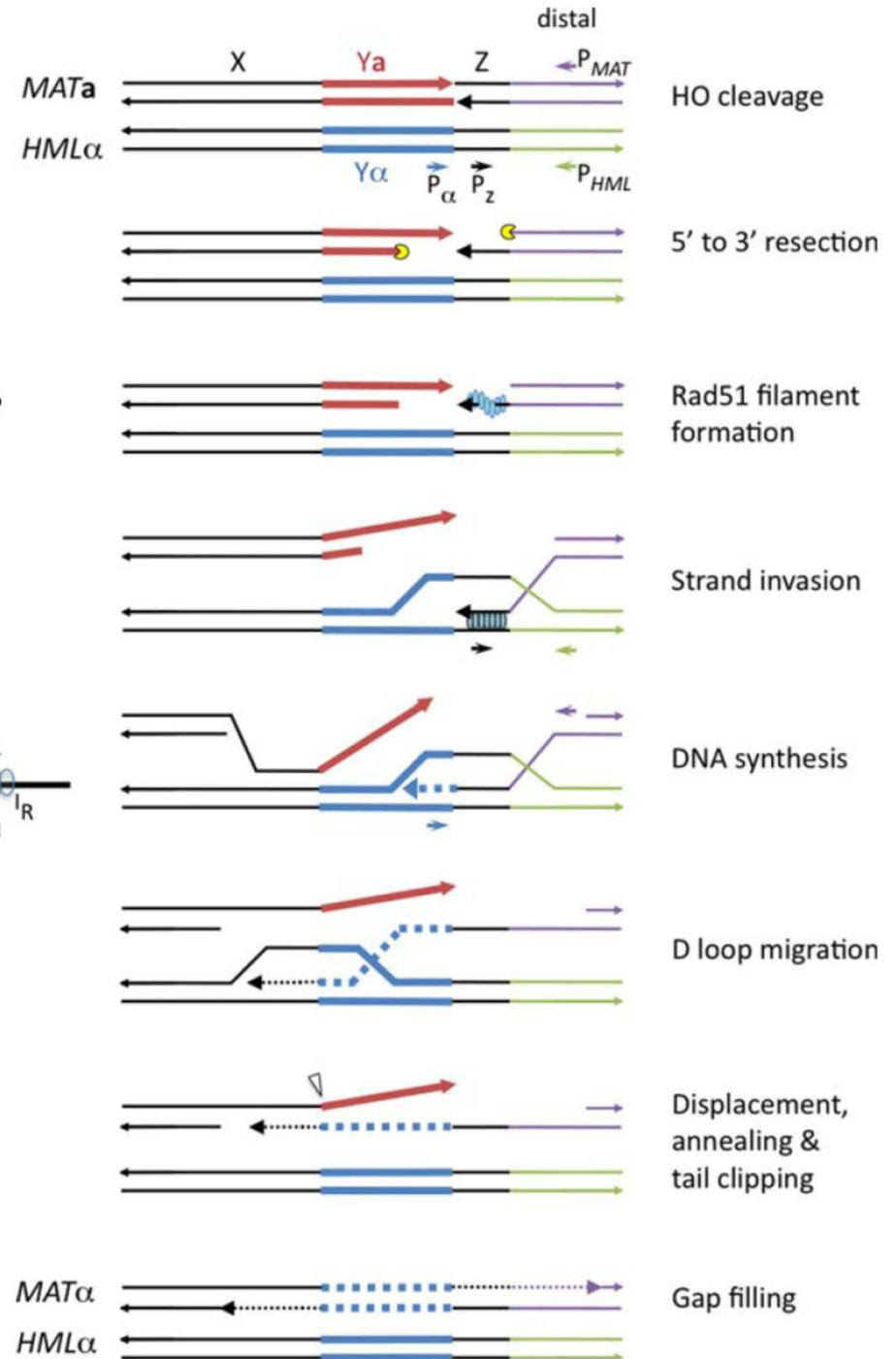
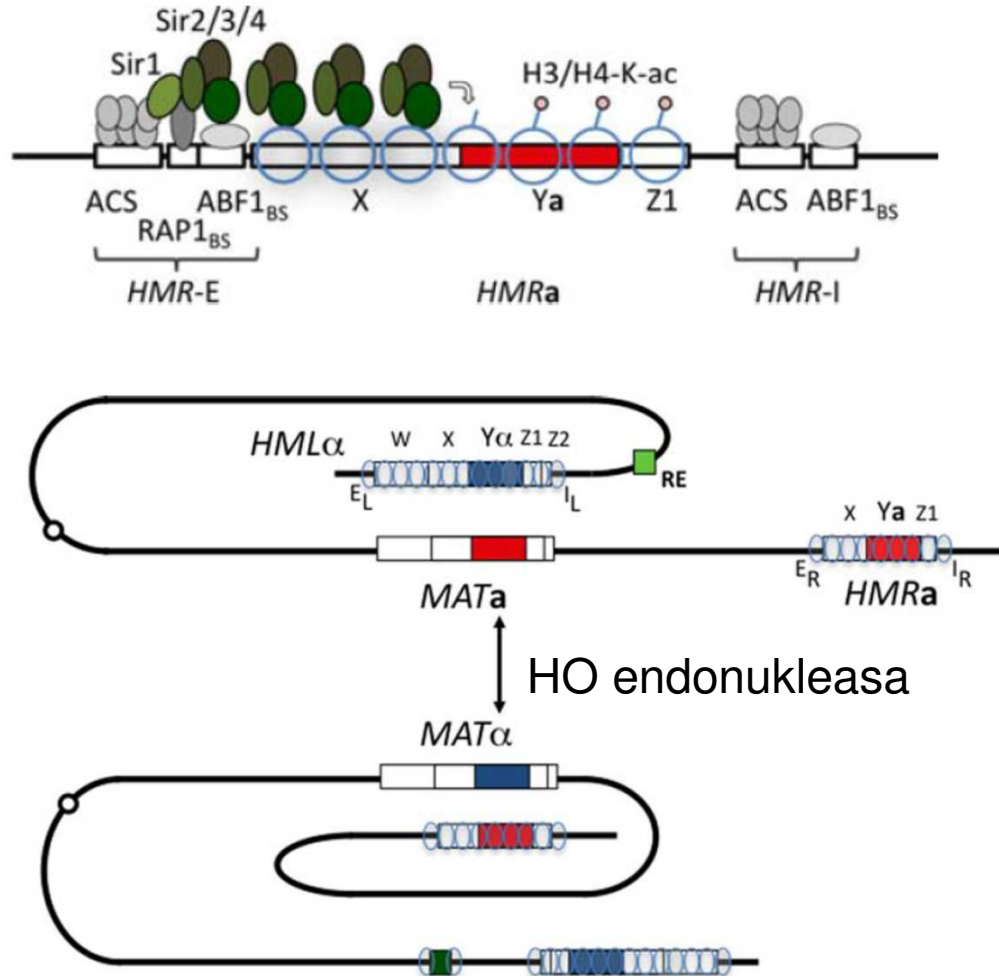
Přepínání párovacího typu

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

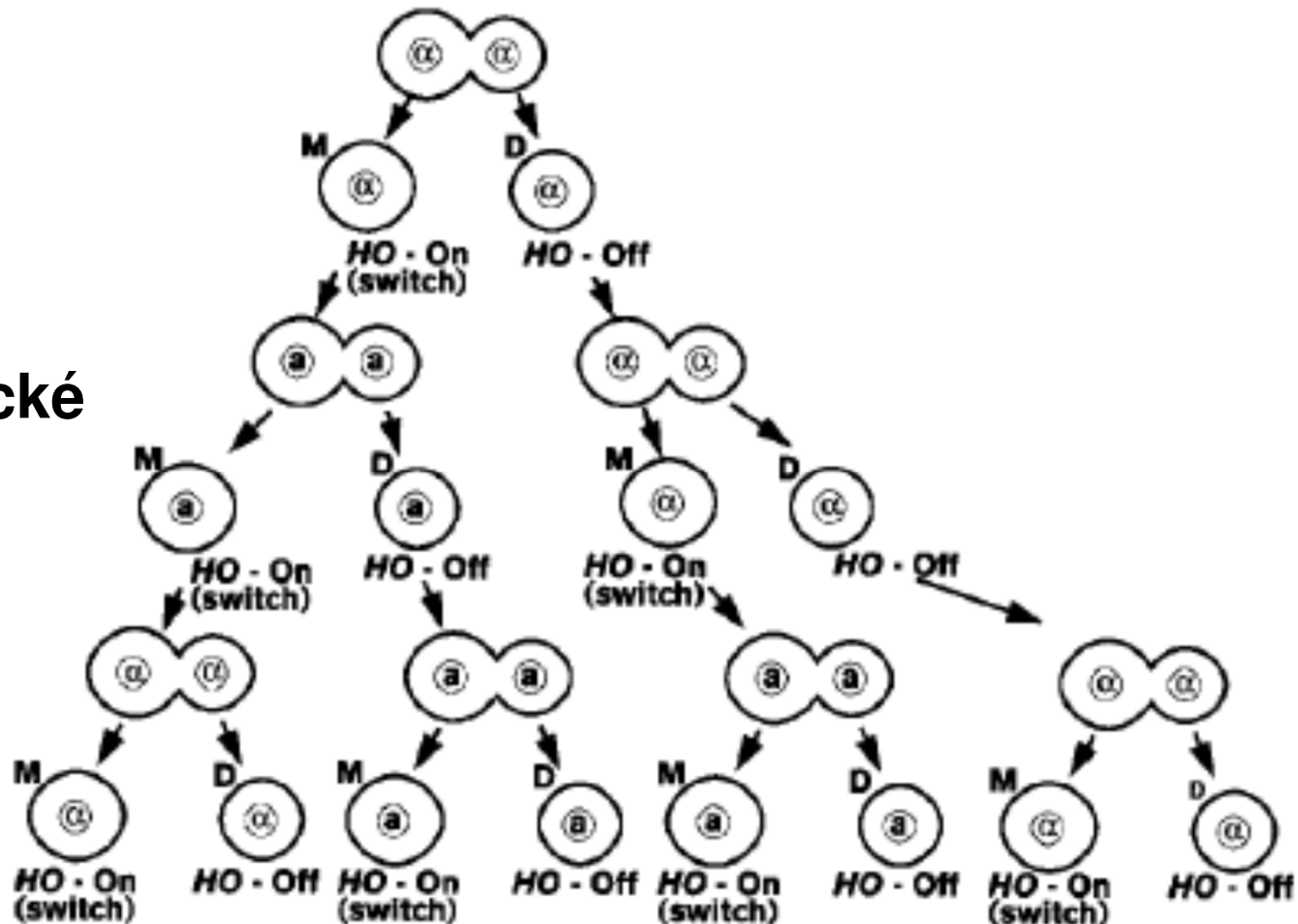


Přepínání párovacího typu

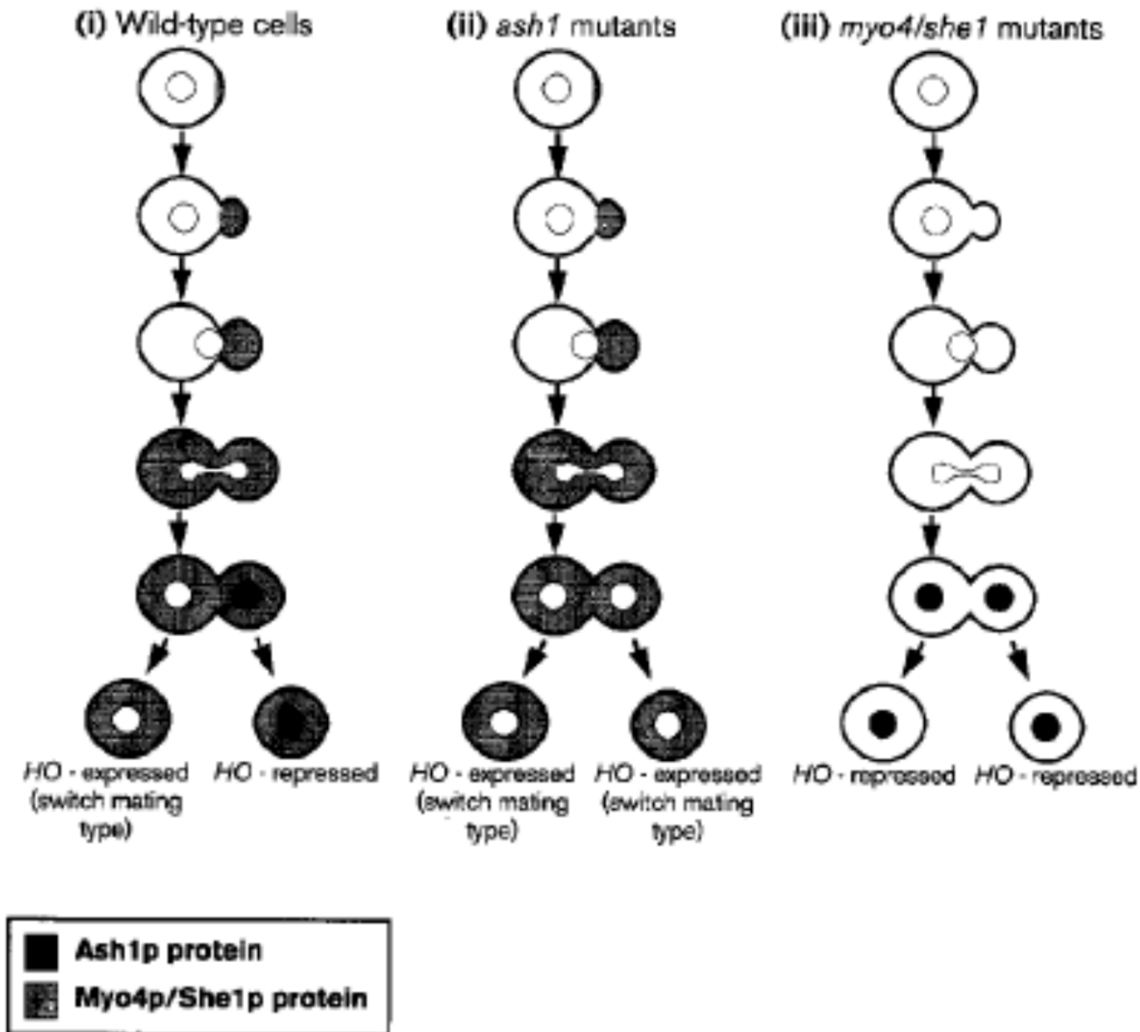
Homotalické - HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Heterotalické – nemají funkční HO endonukleasu

homotalické



Asymetrická lokalizace Ash1p



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

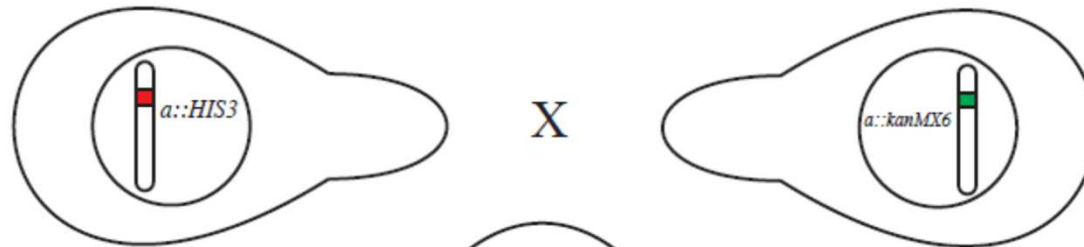
- Není do ní sekretován, ale dochází k expresi (translaci) asymetricky lokalizované mRNA

- translace RNA na specializovaných ribosomech asociovaných s cytoskeletem

Příprava aneuploidních buněk

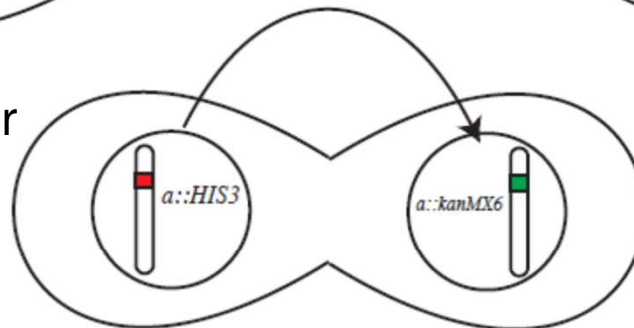
MAT α , kar1 Δ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3

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



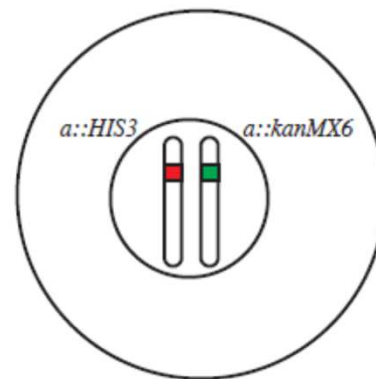
KAR1 gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

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



Select for: Can^R,-His and Kan^R

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?

