

Změna přednášejícího

22.9.201 1	10-11.30hod	Dr. Paleček	Úvod – historie, význam, charakteristika kvasinek (morfologie, kolonie, biofilm)
29.9.201 1	10-11.30hod	Dr. Paleček	Metody studia kvasinek, laboratorní kmeny, nomenklatura
6.10.201 1	10-11.30hod	Dr. Paleček	Genetika a molekulární biologie kvasinek
13.10.20 11	10-11.30hod	Dr. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces, HO endonukleasa, lokalizovaná exprese
20.10.20 11	10-11.30hod	Dr. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
27.10.20 11	10-11.30hod	Dr. Paleček	Organizace chromatinu a oprava DNA
3.11.201 1	10-11.30hod	prof. Svoboda	Sekreční dráhy a endocytóza
10.11.20 11	10-11.30hod	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
17.11.20 11	statní svatek		
24.11.20 11	8-12hod	prof. Svoboda+Dr.Paleček - Cvičení k přednášce	
1.12.201 1	8-12hod	prof. Svoboda+Dr.Paleček - Cvičení k přednášce	
8.12.201 1	A7/10- 11.30h od	Prof. Kopec ká	O podstatě buněčných stěn kvasinek
15.12.20 11	8-12hod	Dr. Paleček	Zkouška

Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

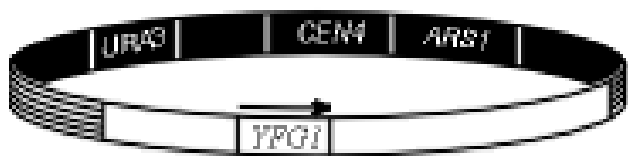
Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



Yfg⁺

Recover the YCp-*YFG1*⁺ plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (mutant+delece)

Mutant Isolation

Mutagenesis of a haploid *MAT α* strain



Detection of Yfg⁻



Yfg⁻

Complementation

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

MAT α yfg1 X $\left\{ \begin{array}{l} \textit{MAT}\alpha \textit{ YFG}^+ \\ \textit{MAT}\alpha \textit{ yfg1} \\ \textit{MAT}\alpha \textit{ yfg2} \\ \textit{MAT}\alpha \textit{ yfg3} \\ \textit{etc.} \end{array} \right.$



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

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MAT α YFG⁺*



Isolate a diploid strain and Sporulate



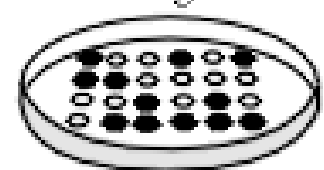
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

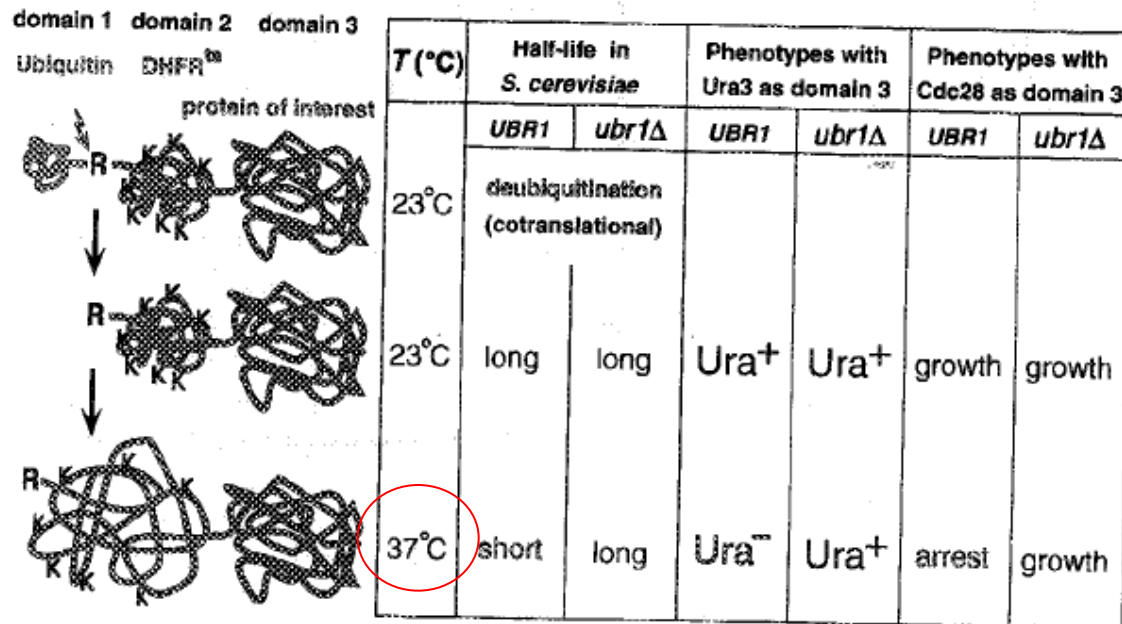


Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



ts mutanty

- ts mutanty jsou výhodné pro studium funkce genu – mutanty jsou normální na permissivní (25°C) teplotě, ale nemohou dokončit buněčný proces vyžadující aktivní protein (za zvýšené teploty - 37°C - neaktivní)
- ts mutanty = většinou nestabilní proteiny, které se při zvýšené teplotě denaturují/ztrácí aktivitu a jsou degradovány



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

Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

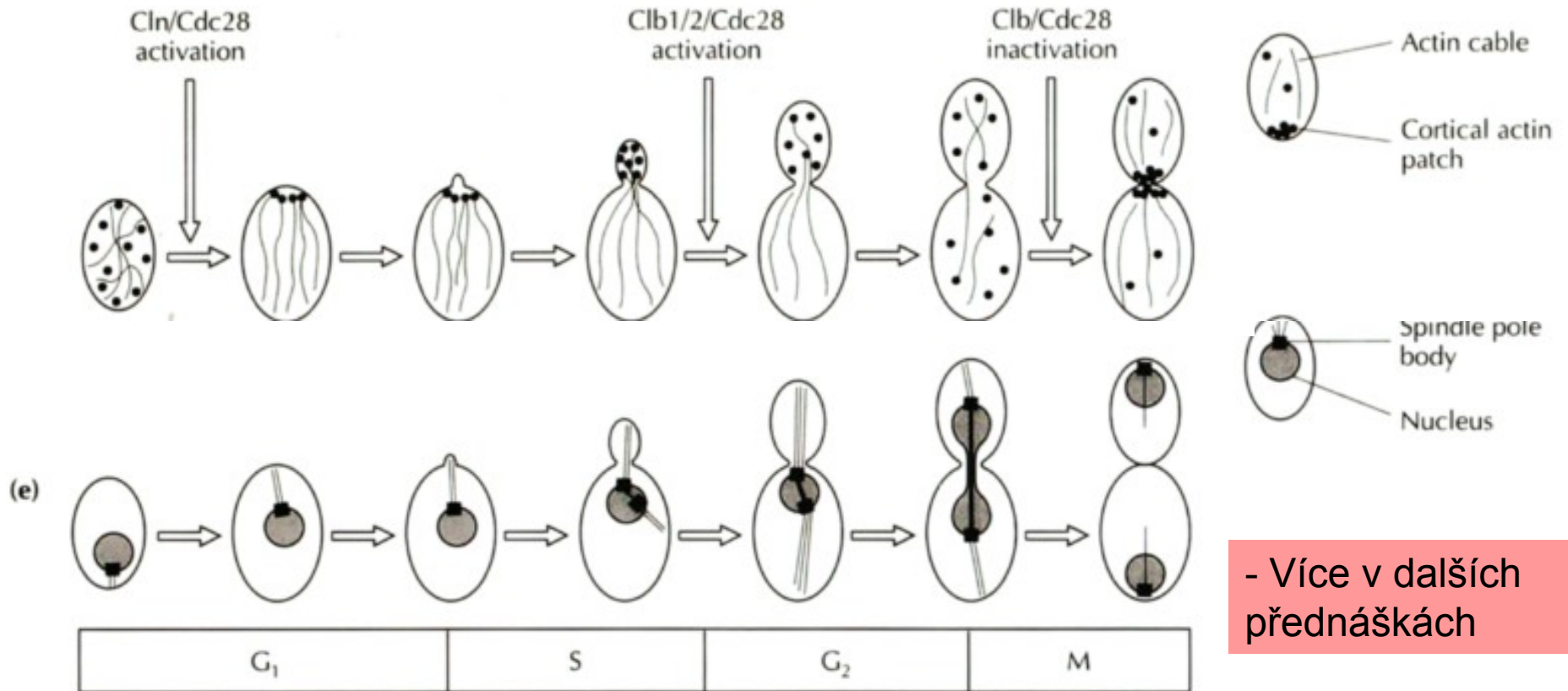
Leland Hartwell začala studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*. Podařilo se jí izolovat kvasinky, které měly mutovaný gen kontrolující buněčný cyklus. V následujících letech identifikovala podobným způsobem více než 100 genů kontrolujících buněčný cyklus (např. *CDC28*). Také sledovala citlivost kvasinek na poškození DNA radiací. Zjistila, 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*, který je 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 během určité části buněčného cyklu. Cykliny se váží na CDK a regulují jejich aktivitu.

Buněčný cyklus *S. cerevisiae*

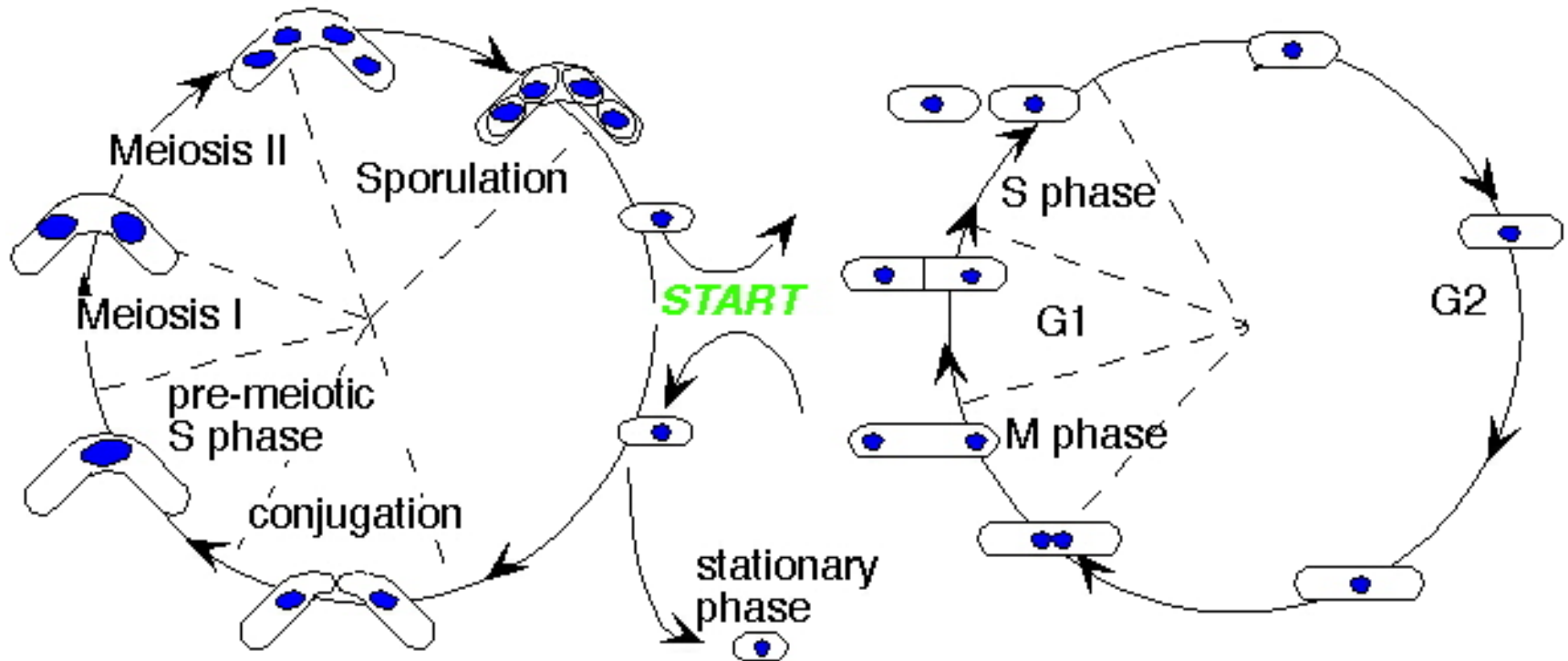


- Více v dalších přednáškách

- 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)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G₁
- Oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G₁ fáze

Buněčný cyklus *S. pombe*

S. pombe má rovnocenné dělení - vznikají buňky stejné velikosti – hned vstupují do S fáze (jsou dostatečně velké) – pro vstup do mitózy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)



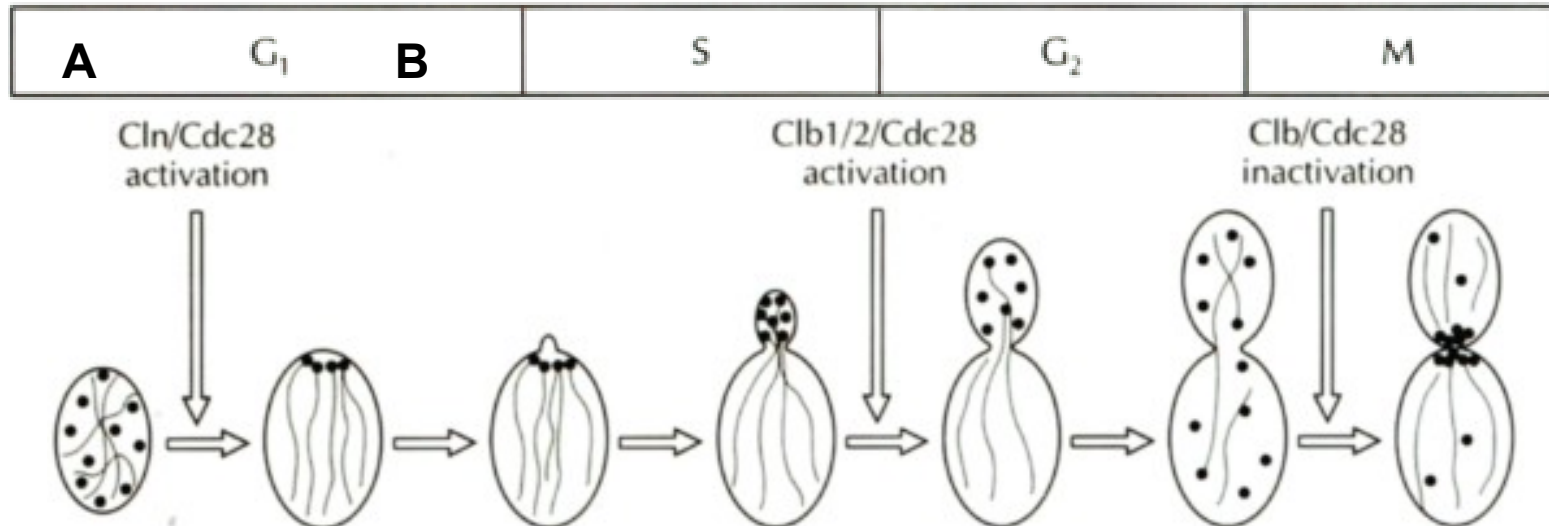
Meiotic cycle

Vegetative (mitotic) cycle

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

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

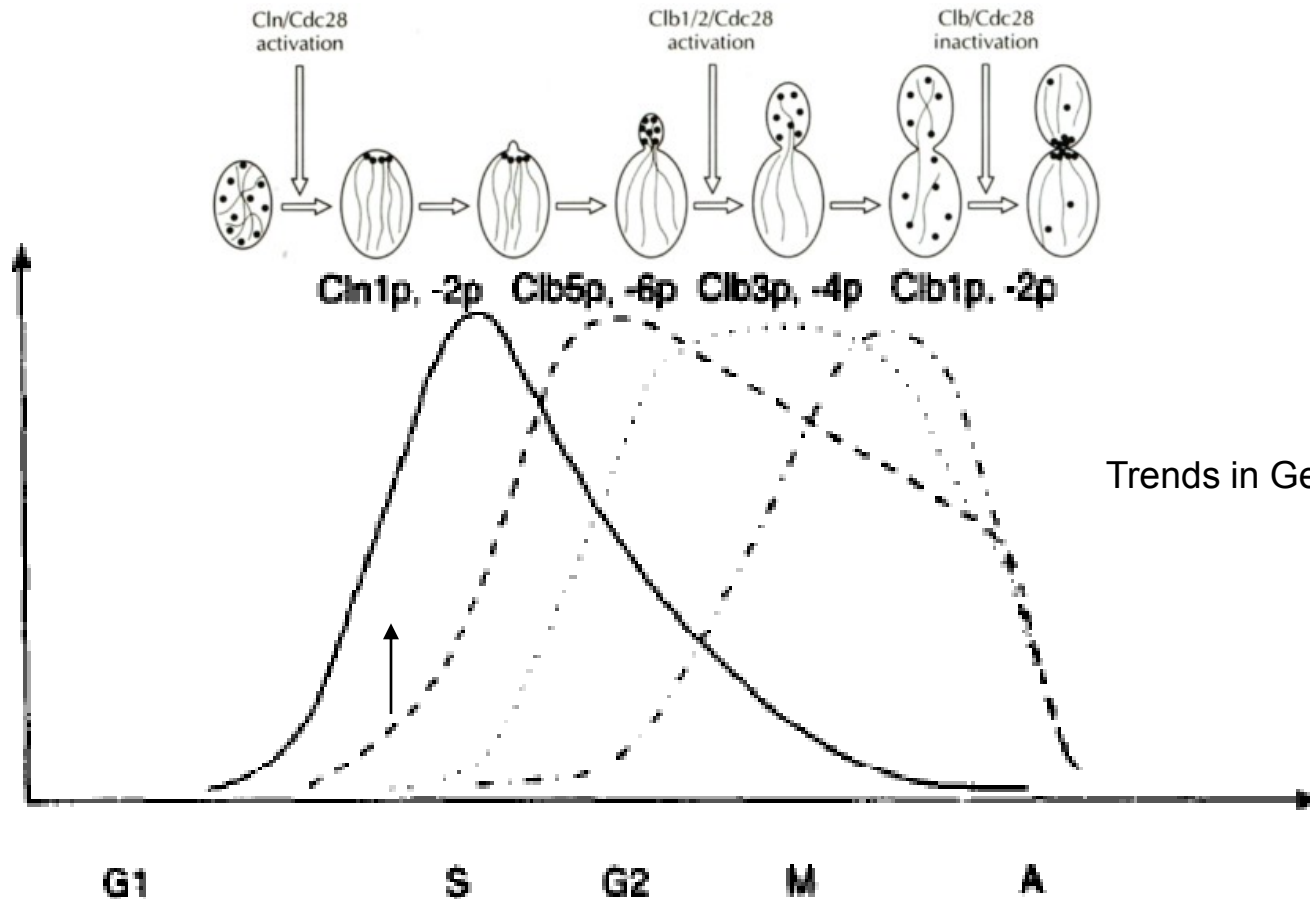
- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
 - haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
 - diploidní buňky (při nedostatku N a C) zastavují v G1 a zahajují sporulaci
 - při vyčerpání živin z média přechází z G1 do stacionární fáze
 - nedostatek dusíku – růst pseudohyf
-
- 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 B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru, nemůže být zvolena alternativa přechodu do stacionární fáze)
 - v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy)
 - pro úsek B (a další „checkpoints“) je klíčový *CDC28* (tj. CDK1) a příslušné cykliny



CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

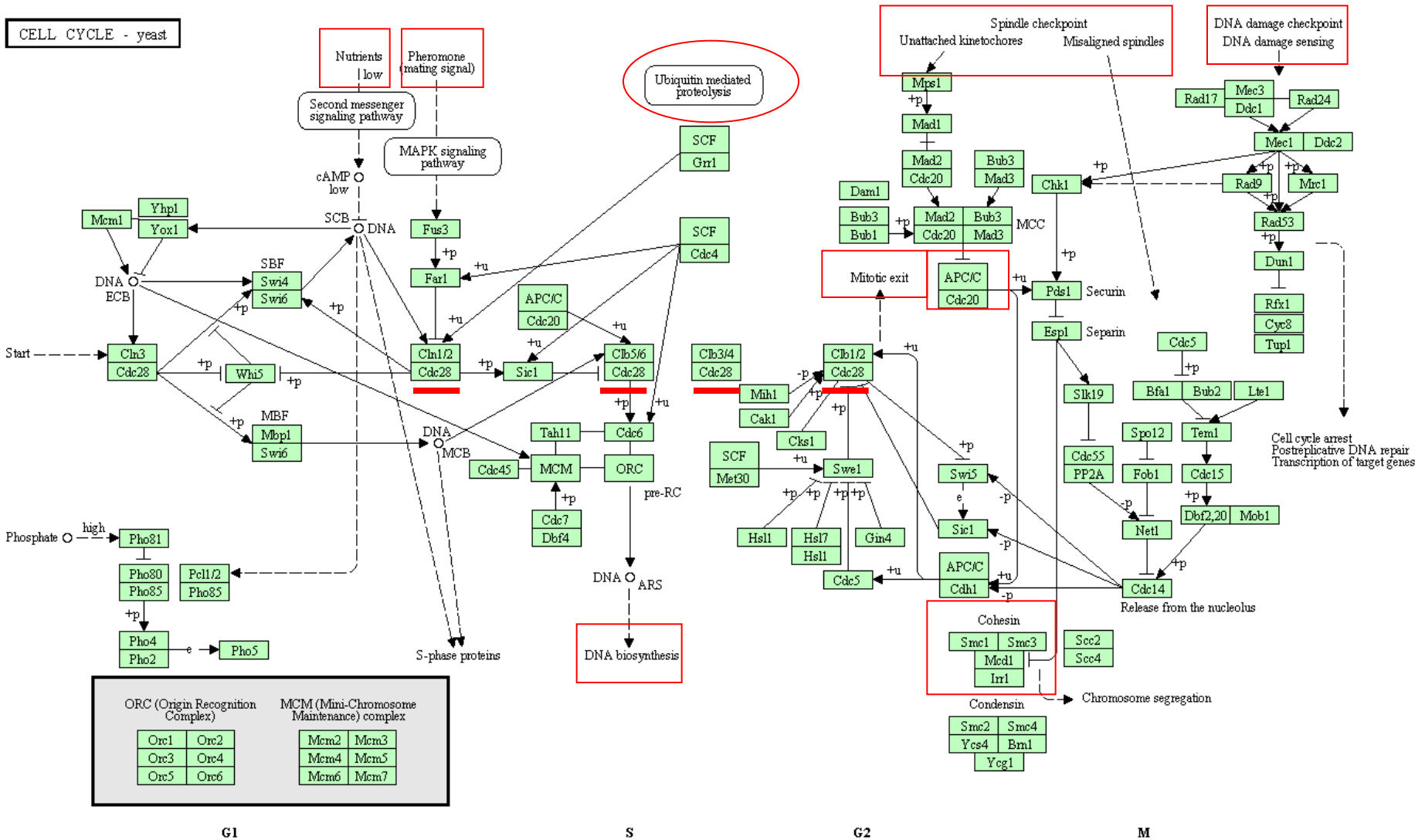
Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem (defosforylace) vzniká aktivní komplex:

- v G1 fázi *CLN1* a *CLN2* (*CLN3* mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *CLB5* a *CLB6* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se účastní *CLB3* a *CLB4*
- mitózu ukončují *CLB1* a *CLB2*



Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail

CELL CYCLE - yeast



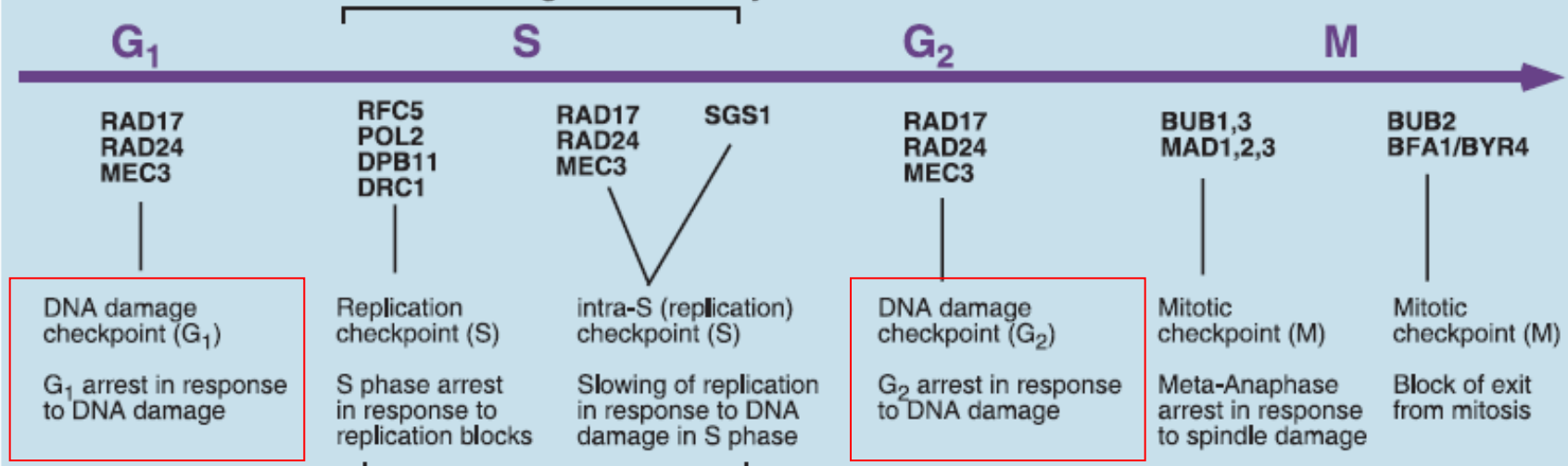
G1

S

G2

M

Maintenance of genome stability



DNA damage checkpoint (G₁)
G₁ arrest in response to DNA damage

DNA damage checkpoint (G₂)
G₂ arrest in response to DNA damage

Transducer and effector functions

- MEC1
- TEL1
- MRE11-RAD50-XRS2
- RAD9
- RAD53
- DUN1
- RAD55
- PDS1

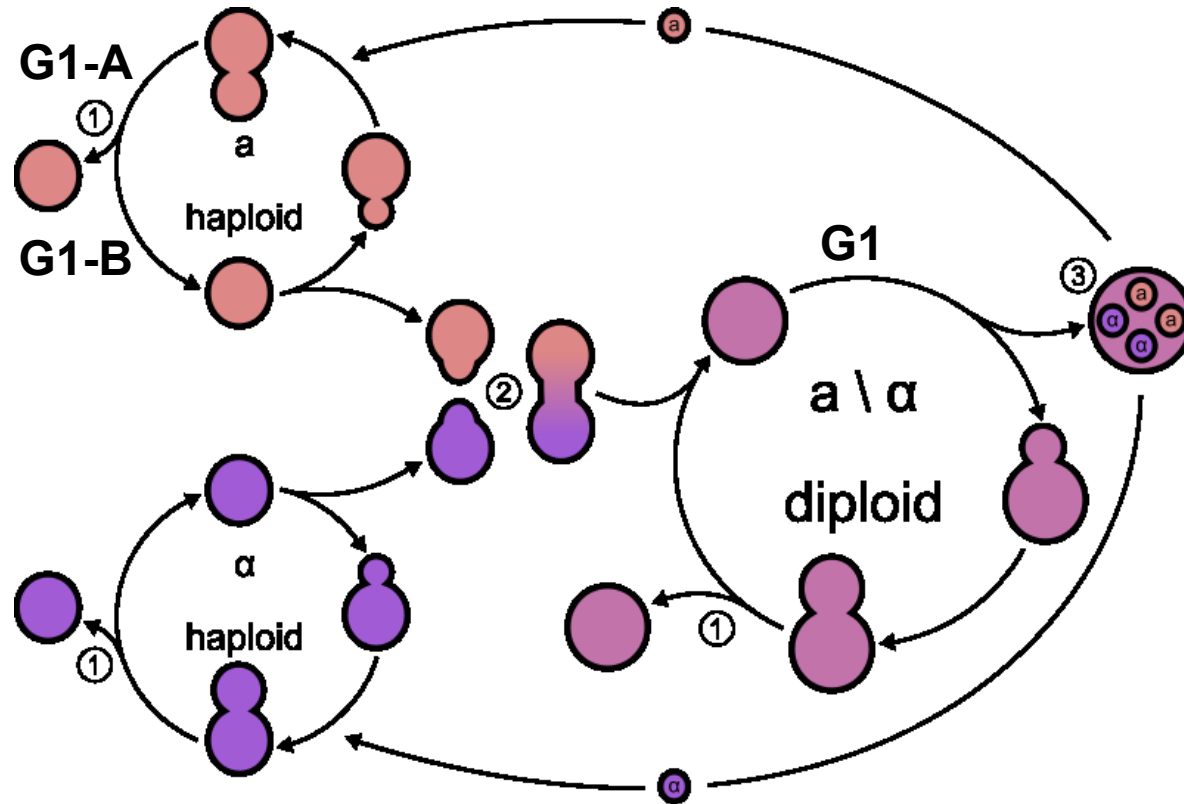
Human homologs		
Yeast	Human	Cancer syndrome
MEC1/TEL1	ATR/ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11	MRE11	Ataxia telangiectasia-like disorder
XRS2	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
RAD53/DUN1	hCHK2	Li-Fraumeni syndrome
SGS1	BLM/WRN/RTS	Bloom, Werner & Rothmund-Thomson syndromes

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)

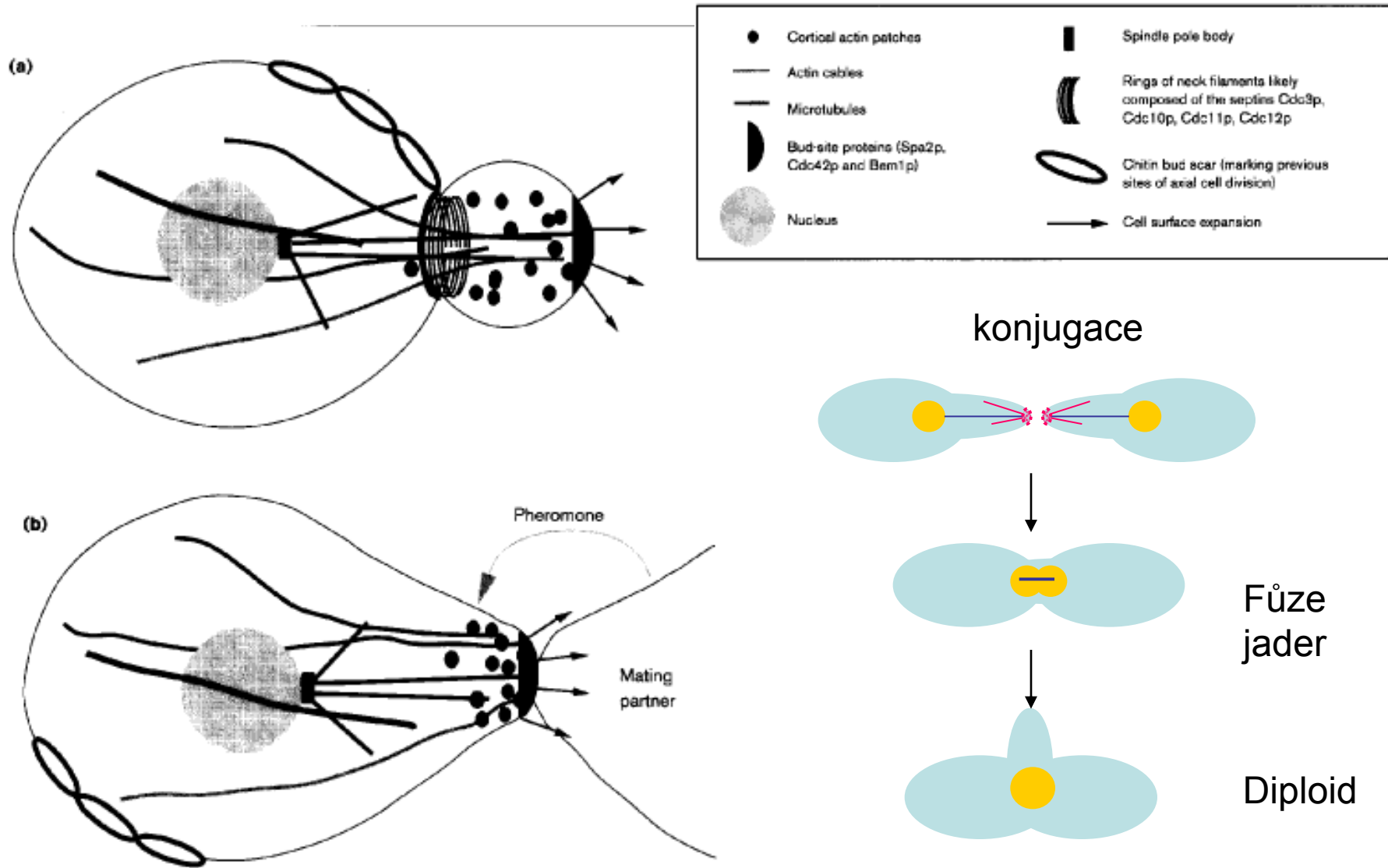
- Více v dalších přednáškách

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 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

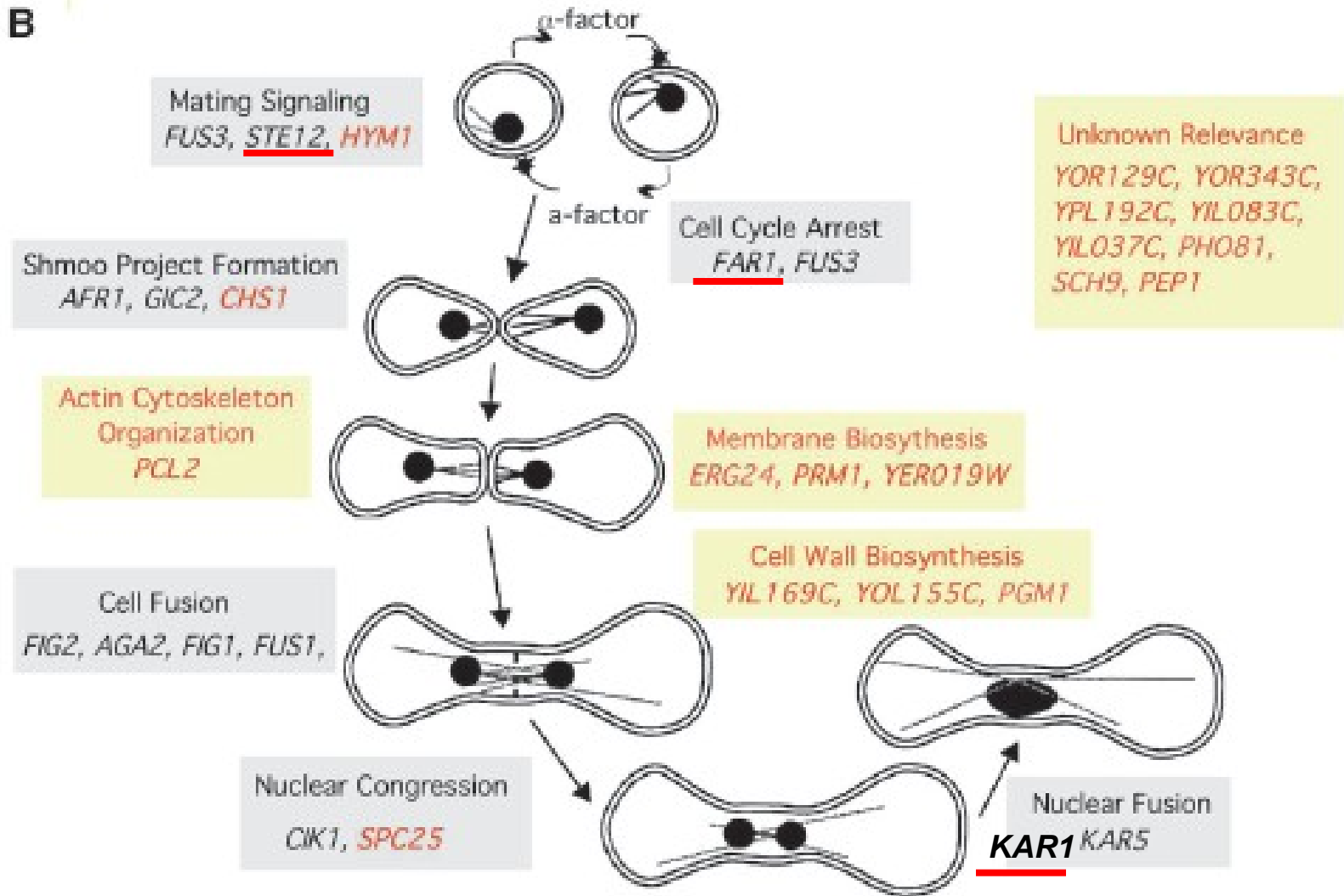
Párování *S. cerevisiae*



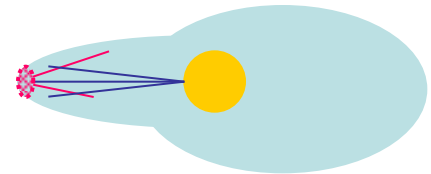
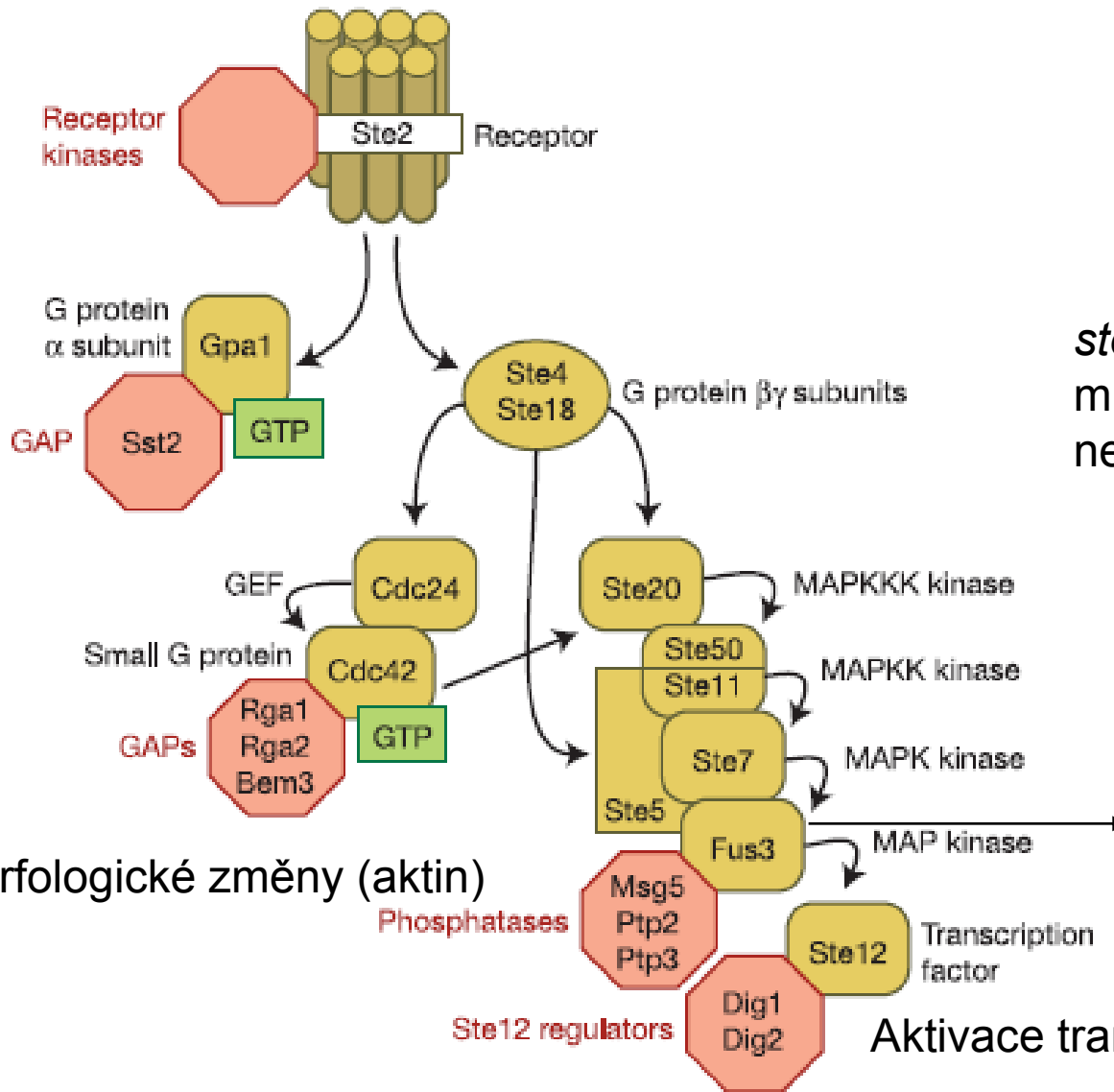
Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

Vybudování buněčné stěny přemostující „shmoo“ výběžky

Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu



Signální dráha – α faktor



ste mutanty (získané mutagenézí) – sterilní, neschopné párování

Zastavení buněčného cyklu



Morfologické změny (aktin)

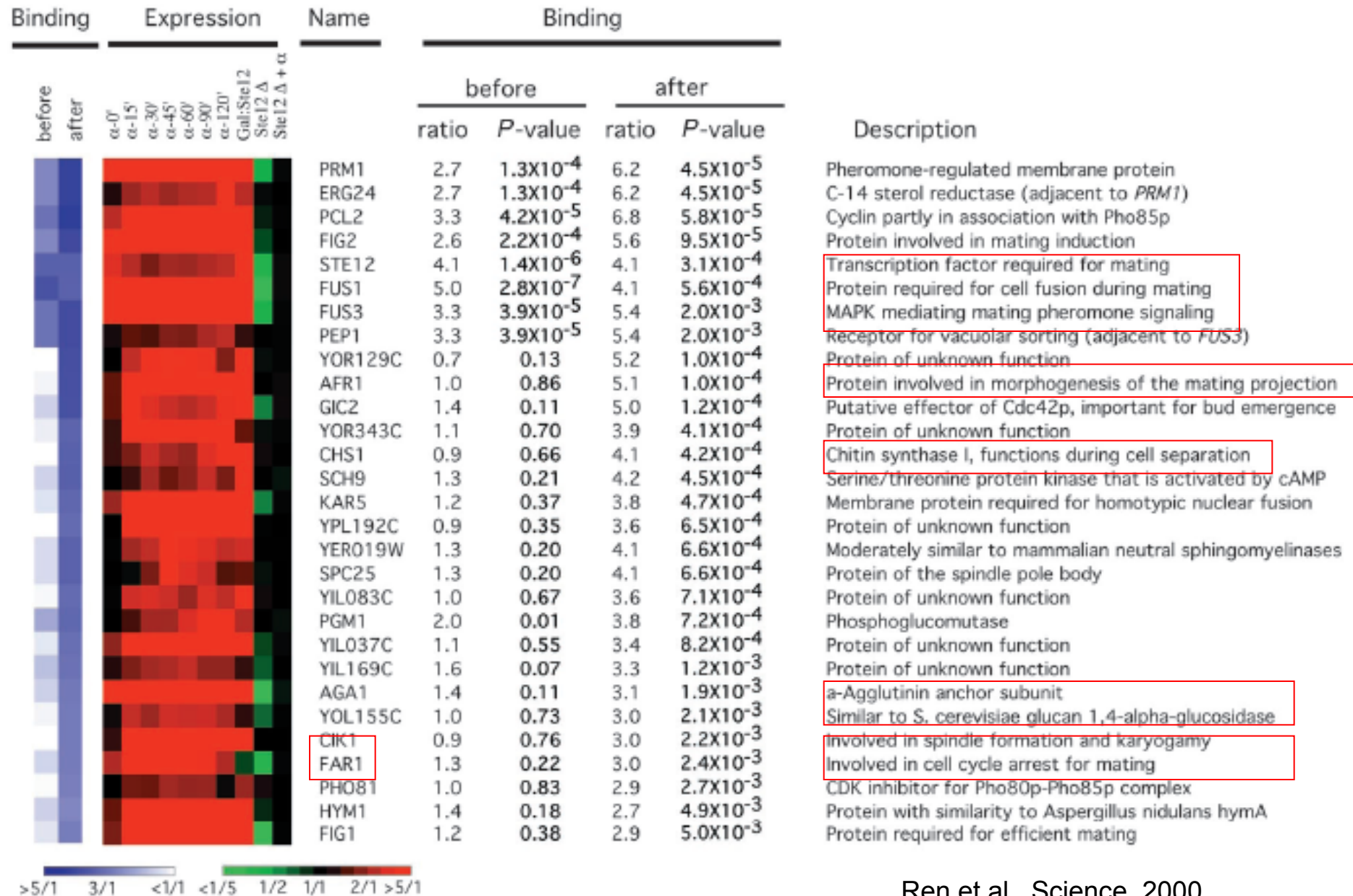
Phosphatases

Ste12 regulators

Aktivace transkripce

ChIP on CHIP se Ste12p transkripčním faktorem

A



Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

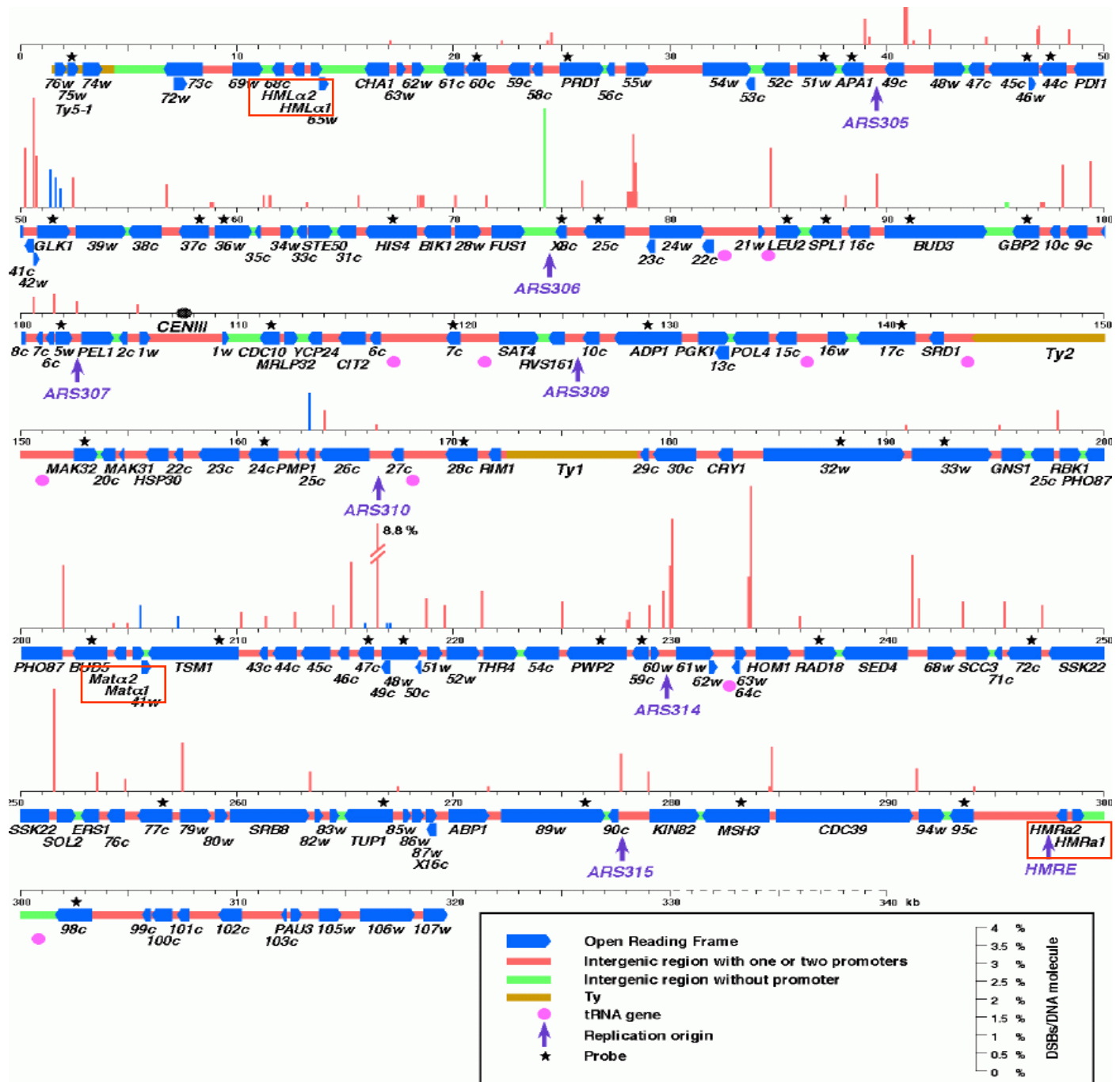
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

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



Regulace transkripce v haploidních buňkách

a1, a2 + α 1, α 2 kódují transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

a-spec.= *MFA*1,2 (a-feromon), *STE*2 (α -receptor), *STE*6, 14 (úprava a sekrece feromonu)

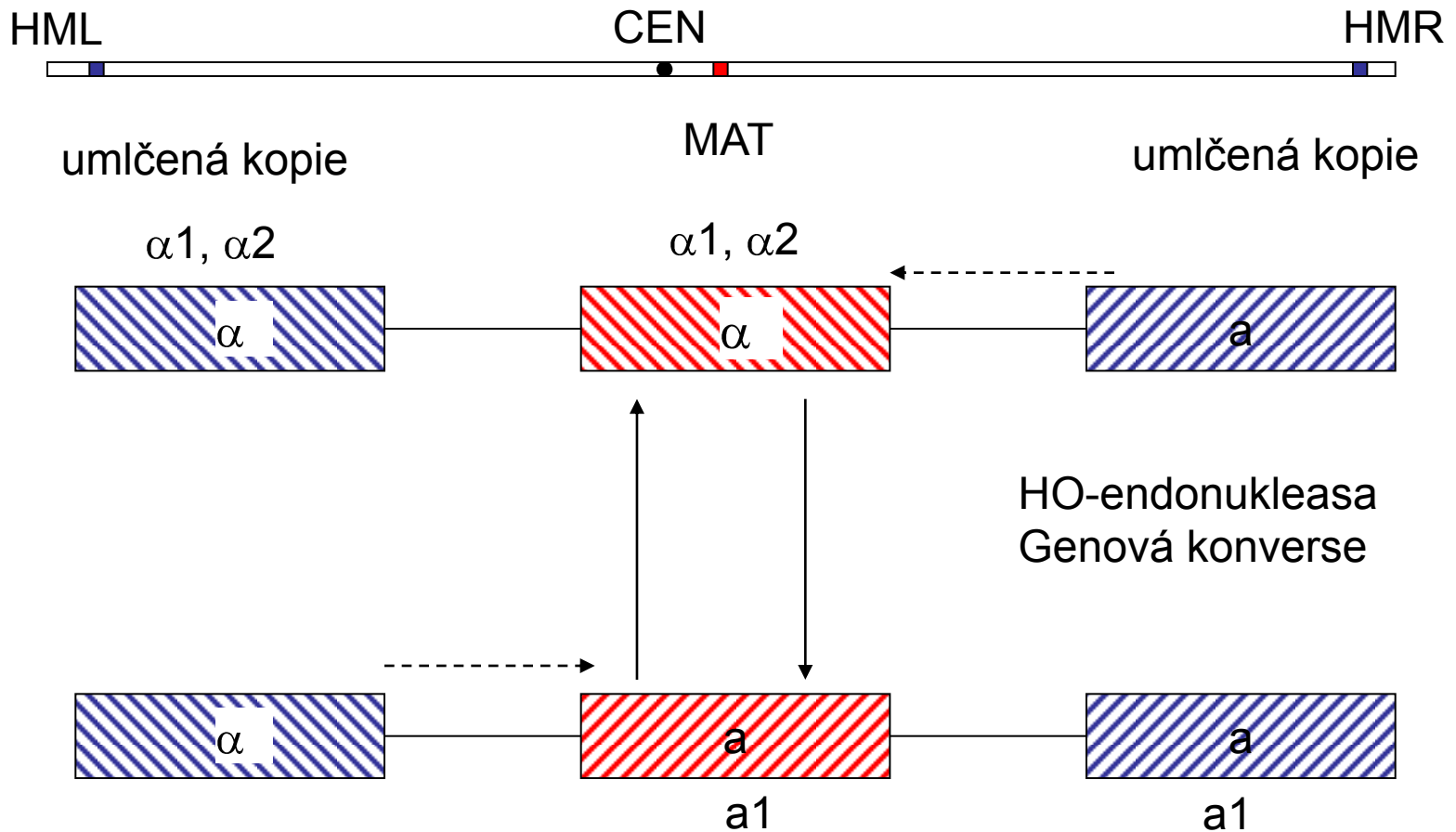
α -spec.= *MF* α 1,2 (α -feromon), *STE*3 (a-receptor), *STE*13, *KEX*2 (proteasy)

haploid spec.= *STE*4,18 (podjednotky G-proteinu), *RME*1 (inhibitor meiosis)

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	 aSG ON α SG OFF haploid SG ON
α 1, α 2	α haploid	 aSG OFF α SG ON haploid SG ON
α 1, α 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF α SG OFF haploid SG OFF

Přepínání párovacího typu

Chromosom III



HO endonukleasa rozeznává a štípe specifické sekvence

Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

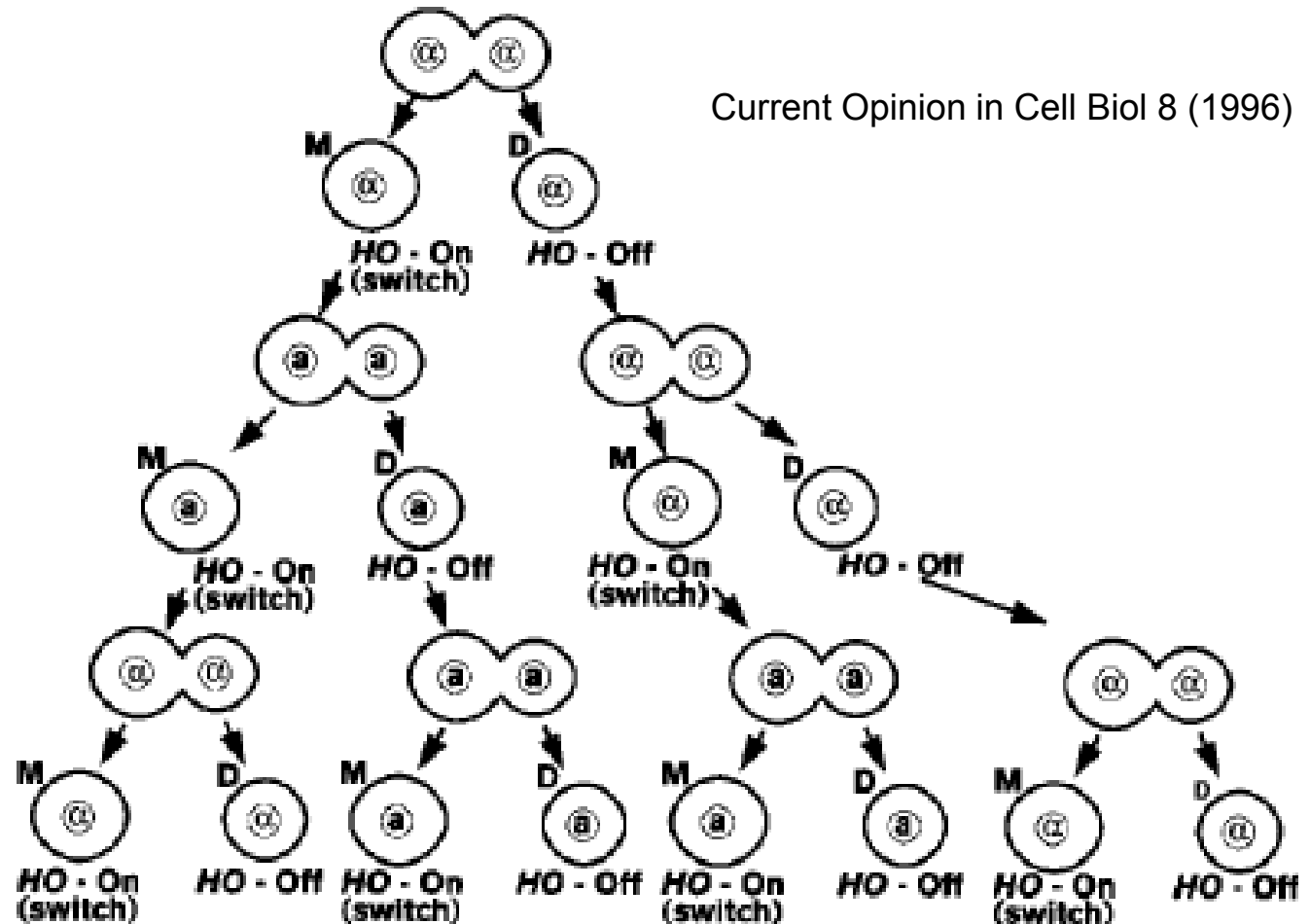
Přepínání párovacího typu

DNA z MAT lokusu je HO endonukleasou vystřižena a na její místo se překopíruje sekvence z kazety opačného páru

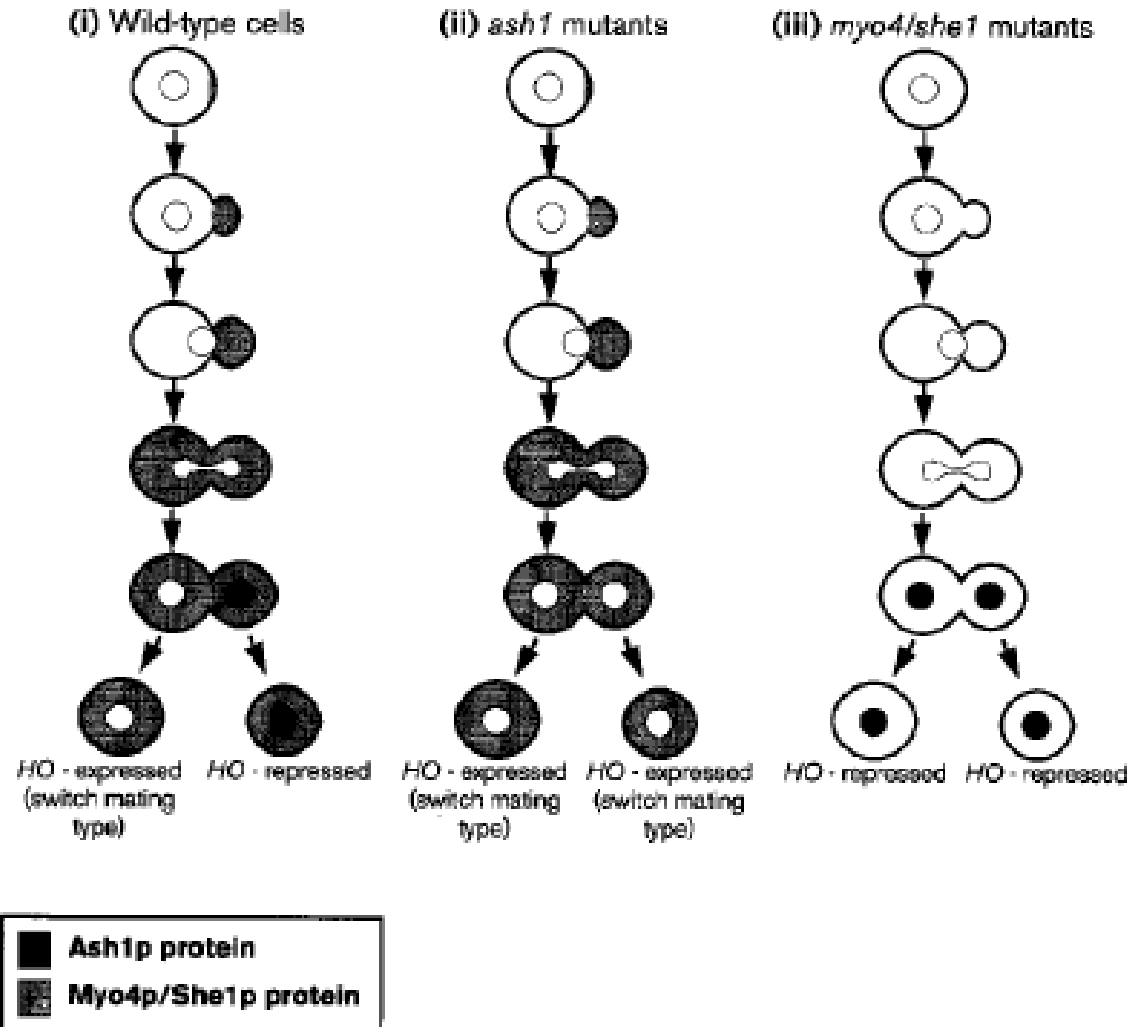
- HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Current Opinion in Cell Biol 8 (1996)

homothalické



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 ribozomech asociovaných s cytoskeletem

Příklady translace lokalizované mRNA

