

Souhrn 3. přednášky

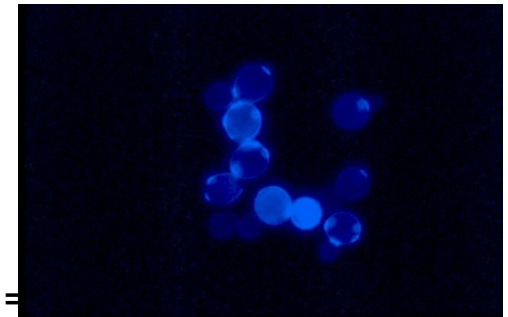
- Diagnostické metody
- Analytické metody
- Kvasinkové modelové organismy

Osnova 4. přednášky

- Genetické metody
 - Plasmidy
 - Integrace
 - Tetrádová analýza
 - Syntetická letalita, suprese

Výhody kvasinkového modelu

- Rychle se množící EUKARYOTNÍ mikroorganismy (90 min/dělení, 25-30°C)
- Vytváří kolonie na plotnách - mikrobiologické metody (otiskování ploten, kapkový 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“
- Techniky barvení (např. aktinový cytoskelet = phalloidin, buněčná stěna = + GFP *in vivo*)
- Techniky synchronizace buněk
- 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)
- Mikročipy - expresní profily za různých podmínek
- Řada životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)



Laboratorní kvasinkové kmeny

S. pombe – „501“

Genotype: *h- ura4-Δ18 leu1-32 ade6-704*

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

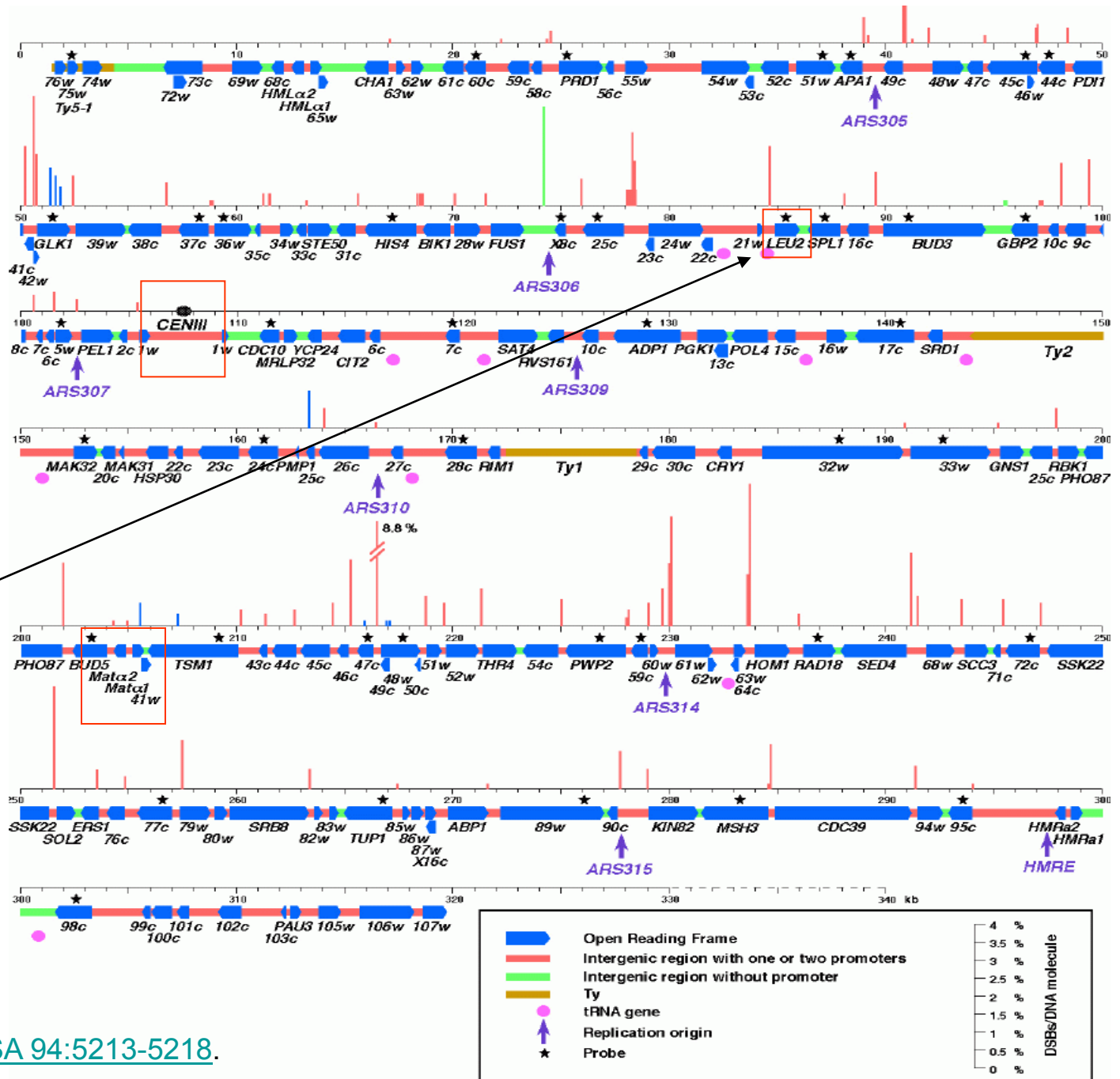
Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní s	Strain	Genotype	References
	AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
	Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
	CG-1945	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh2, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

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
leu2-Δ1 – delece
leu2-1 – mutance
(identifikační číslo alely)
LEU2::HIS3 – inzerce
HIS3 genu v lokusu
LEU2



Laboratorní kvasinkové kmeny

S. pombe – „501“

Genotype: *h- ura4-Δ18 leu1-32 ade6-704*

S. Cerevisiae – „S288C“ – 1. osekvenovaný kmen

Genotype: *MAT α 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: *MAT α /MAT α 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](#)

Dvojhybridní s	Strain	Genotype	References
	AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
	Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
	CG-1945	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

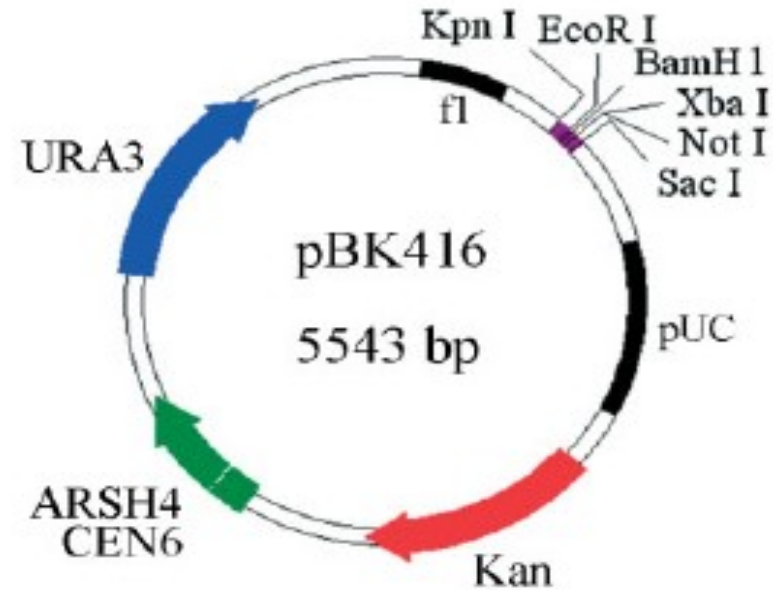
Allele	Reverts?	Notes	Molecular description ^a	Reference
<u>ade2-101</u>	yes	ochre mutation, red colonies	G to T transversion at nucleotide 190, changing amino acid 64 from a Glu to a STOP	<u>Gai and Voytas, 2005</u>
<u>his3-200</u>	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during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

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met-</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
CG-1945	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>cyhr2</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

Shuttle vektory

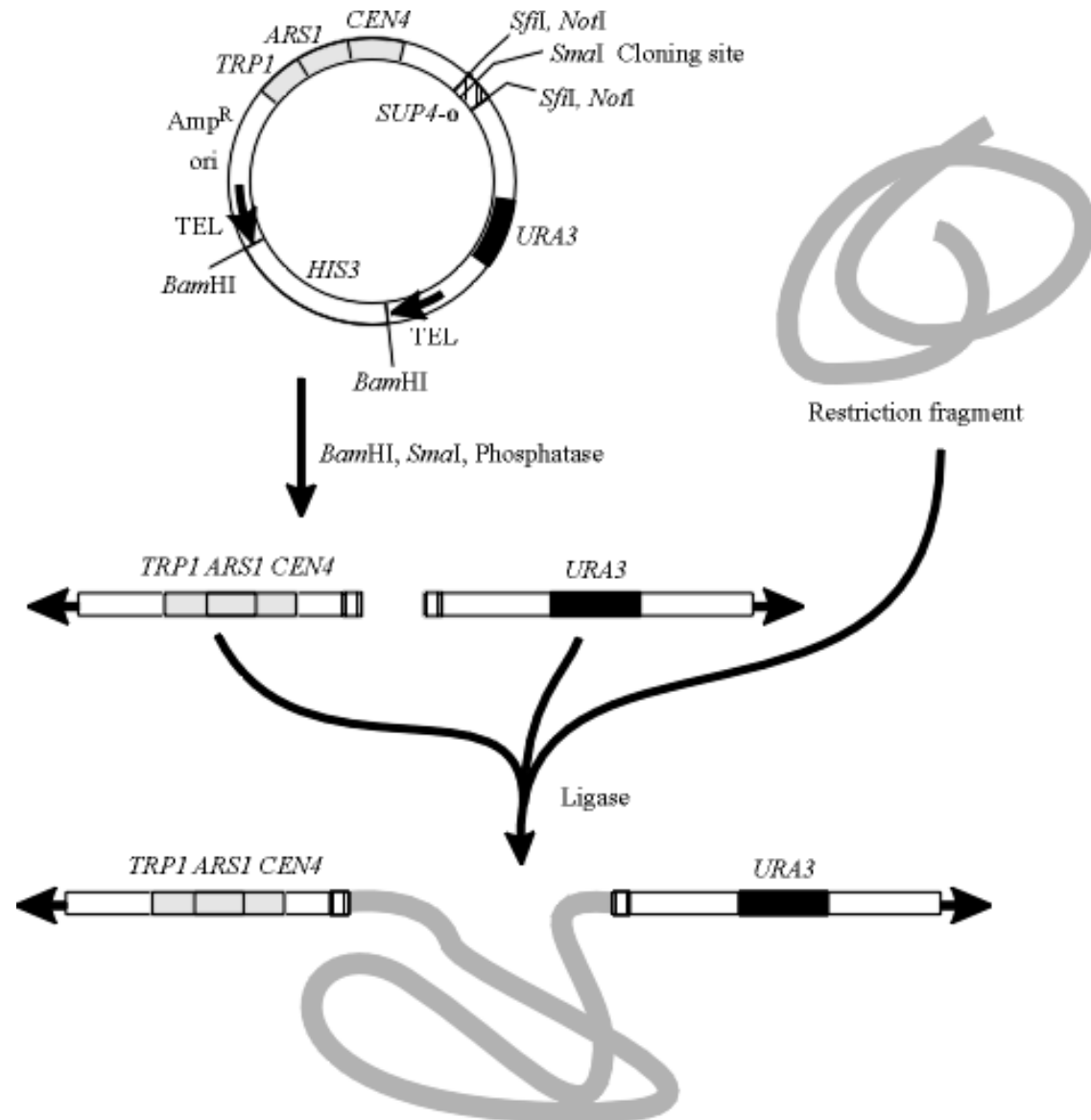
- vychází z 2 μ m plasmidů nebo centromer (*S.c.*; 2 μ m přítomné také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilorum*)
- Kvasinková část – marker (URA3 ... kanMX), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 μ m (60 kopií na haploidní buňku) začátek replikace
- Bakteriální část – Kan resistance, replikace
- Promotor, tag, MCS
 - Kondicionální mutanty (fenotyp-funkce)
 - Nadprodukce (suprese mutací nebo toxicita)

Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not detectable)
<i>ADH1</i> (700 bp)	Constitutive/high	+++
<i>GAL1</i> (full-length)	Repressed by glucose; induced (high-level) by galactose	(not detectable) ^d +++ ^d
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>CUP1</i>	Indukovaný mědí	
<i>MFA1</i>	MATa specifický (haploid specifický)	

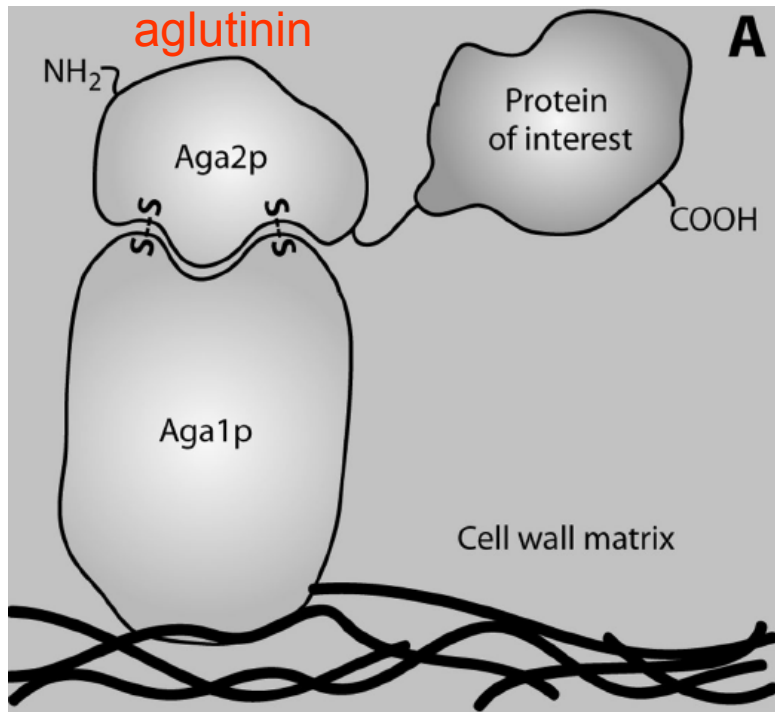
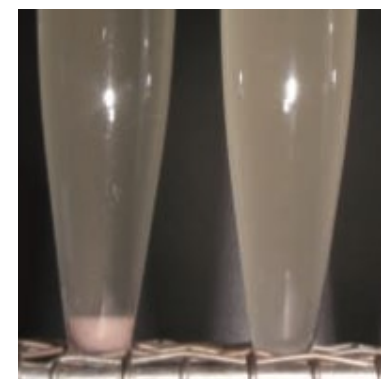


YAC (yeast artificial chromosome)

- Bakteriální část – Amp resistance, počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, 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 nesestřihnutých genů (dlouhé regulační úseky)

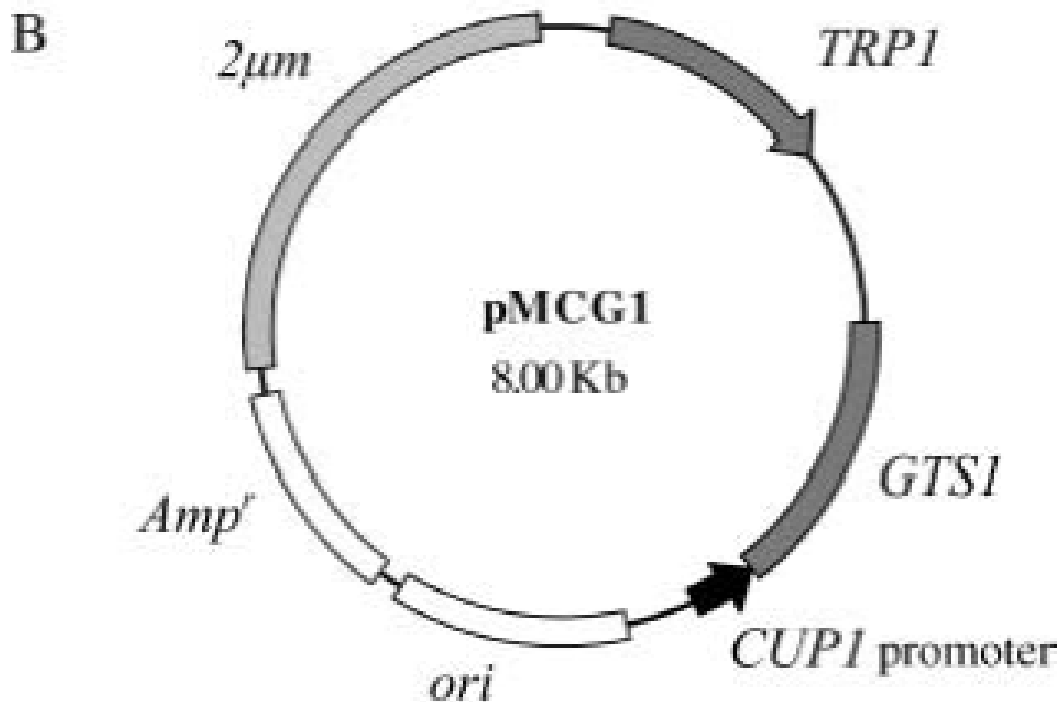
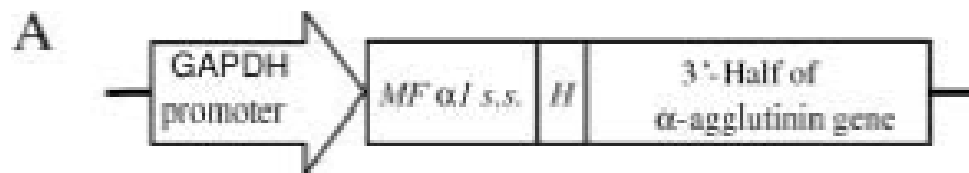


Yeast surface display



- His-His-His-His-His-His
(chelatuje Ni, Cu, Co kovy)

pRS406-Ura3 plasmid



- hybrid Aga2 (aglutininy nebo Flo1... proteinem

- exprese eukaryotních proteinů v kvac mechanismy ... posttranslační modifi

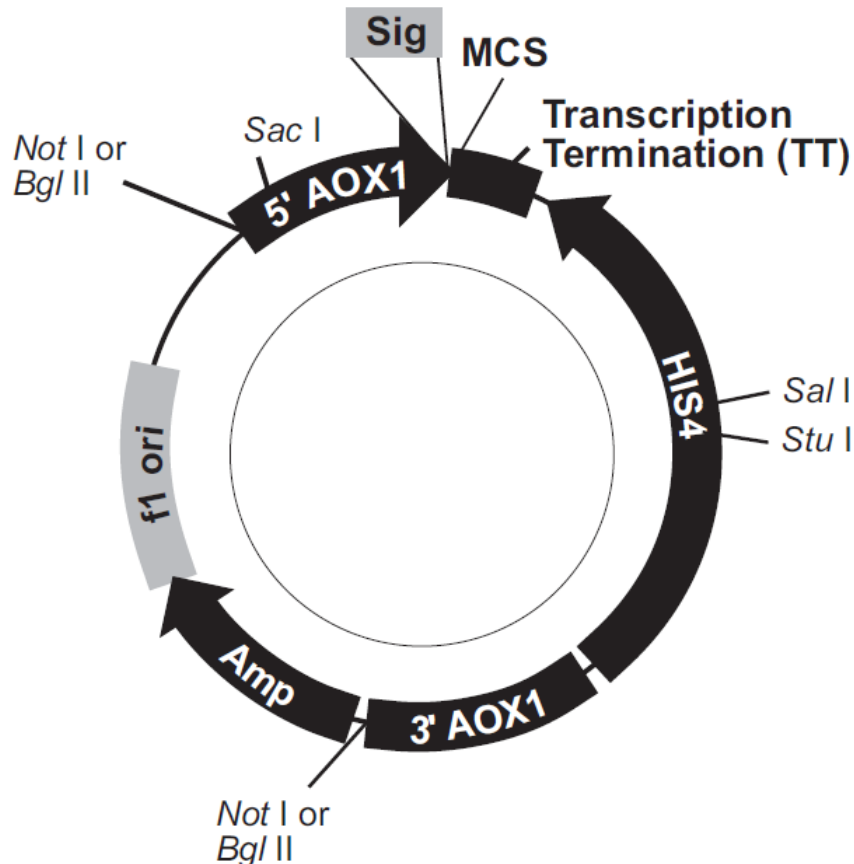
lidských cDNA (i protilátek z pacientů - využití i pro biotechnologie – vychyt (dekontaminace)

Kuroda et al, Ap

Pepper et al, CCHTS (2008)

Integrativní plasmidy

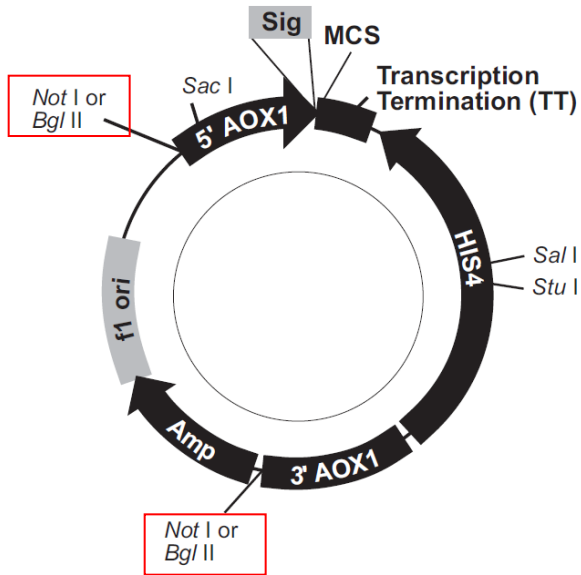
- nemají CEN ani 2 μ m části



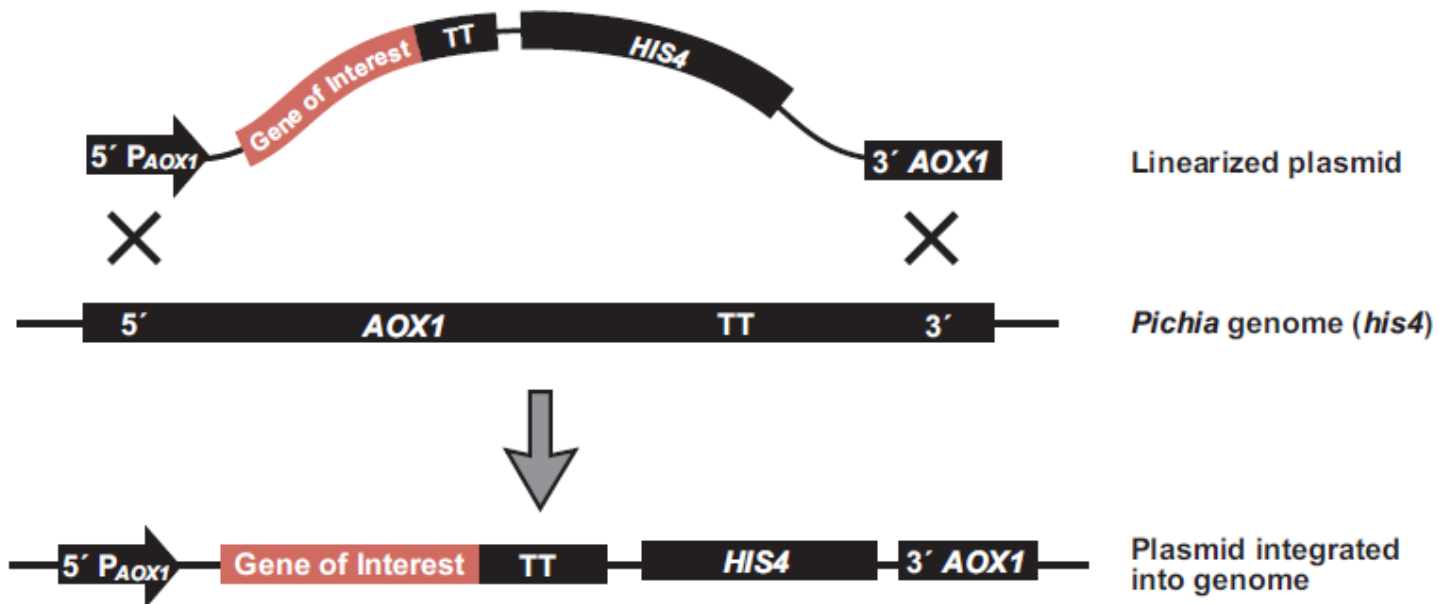
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
 - exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression</u> in <i>Pichia</i> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an <u>N-terminal 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</u> and polyadenylation signal from AOX1 gene (~260 bp)	Permits efficient <u>transcription termination and polyadenylation</u> of the mRNA
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</u> gene <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 integration into the <i>Pichia</i> genome

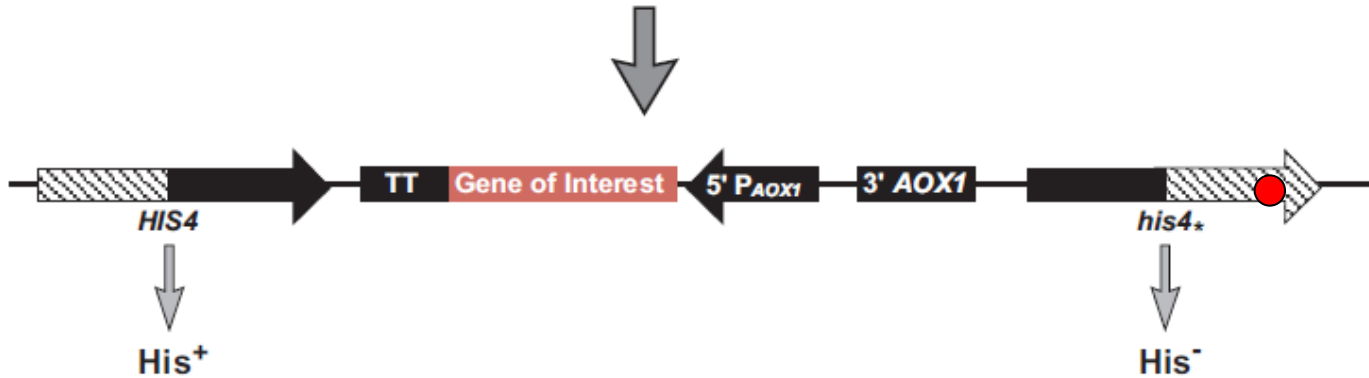
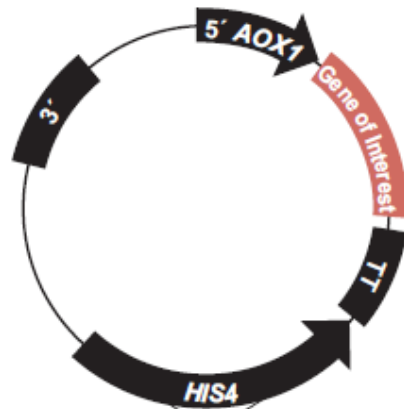
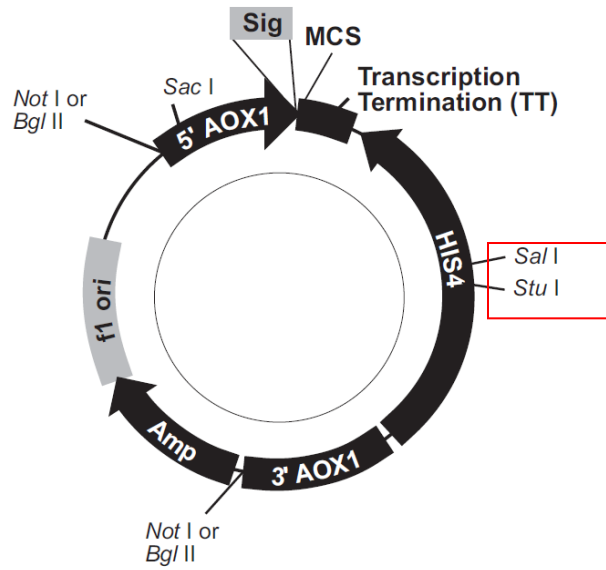
Integrace I.



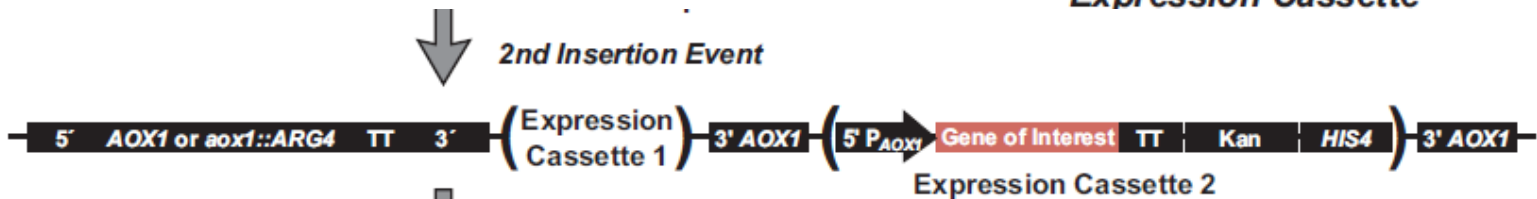
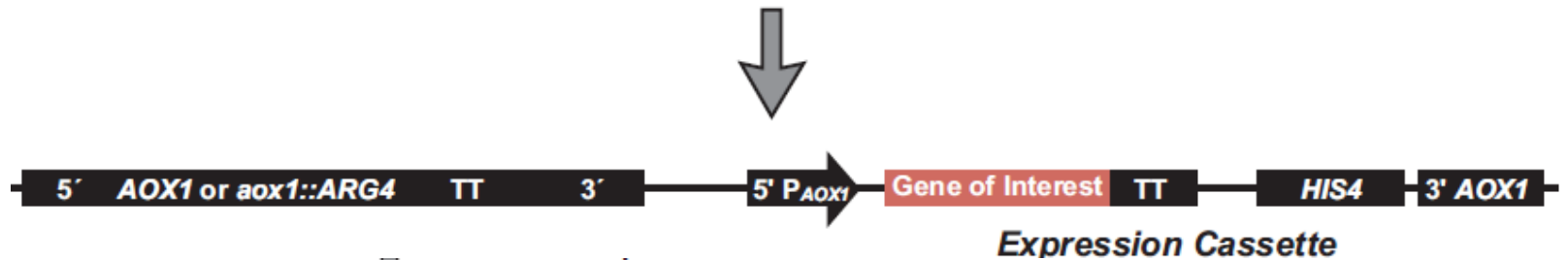
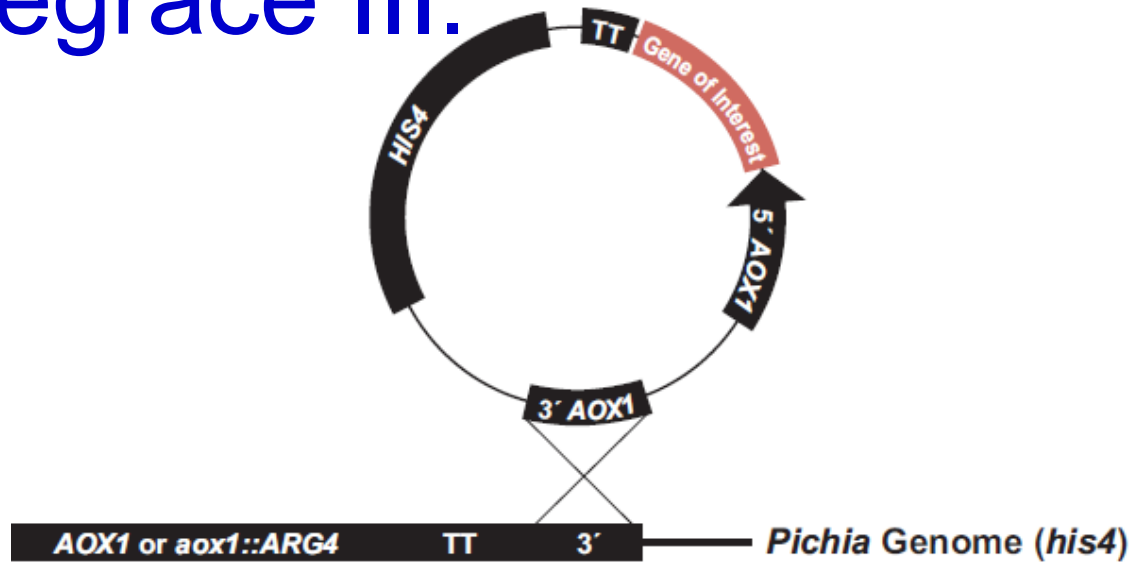
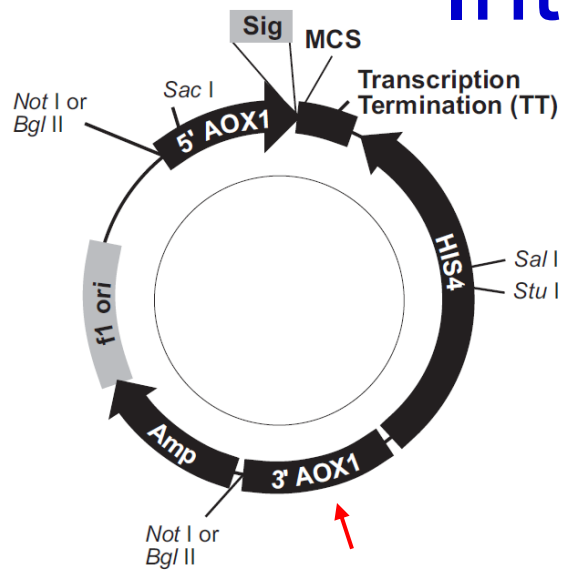
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru



Integrace II.



Integrace III.



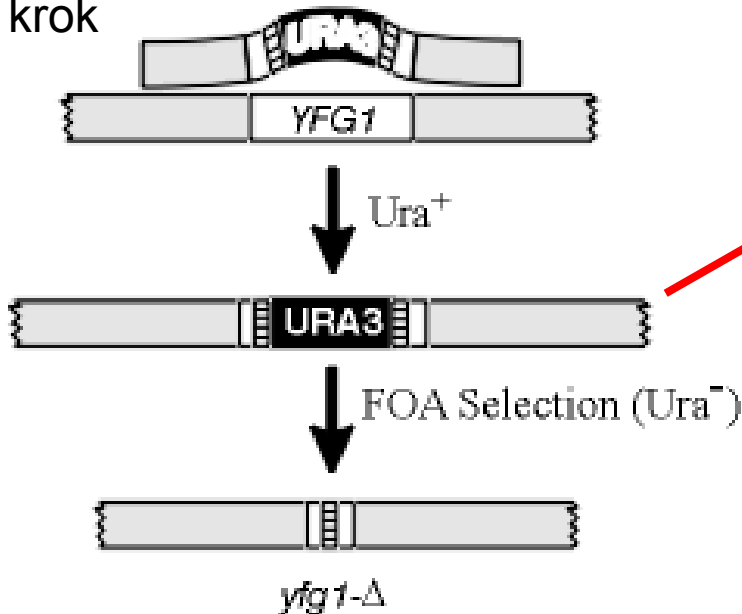
3rd Insertion Event, etc.

u *Pichia pastoris* dochází u 1-10% transformantů k vícenásobné integraci – vyšší exprese
Pomocí jiného markeru lze integrovat další kazetu

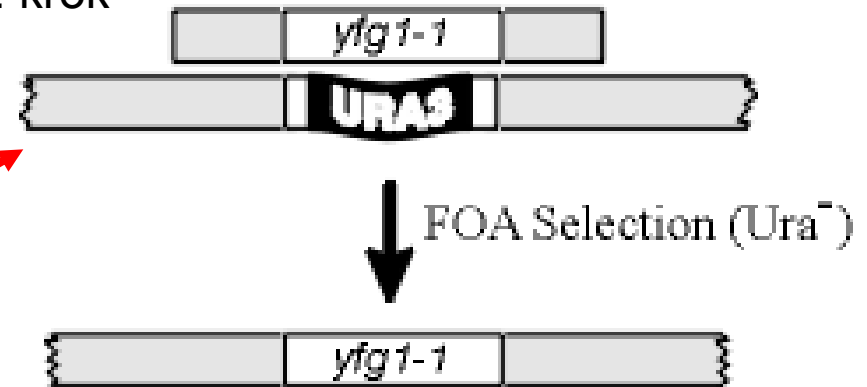
Disrupce/delece genu

- Studium funkce genu – fenotyp (1. delece, 2. mutace)
 - nezbytný/esenciální gen => buňky potřebují gen např. na plasmidu (plasmid shuffling)
 - životaschopné – mutace lze přímo integrovat do genomu
- mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“ – dále lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami a hledat jejich funkční vztahy (synthetic lethal x epistatic)

1. krok

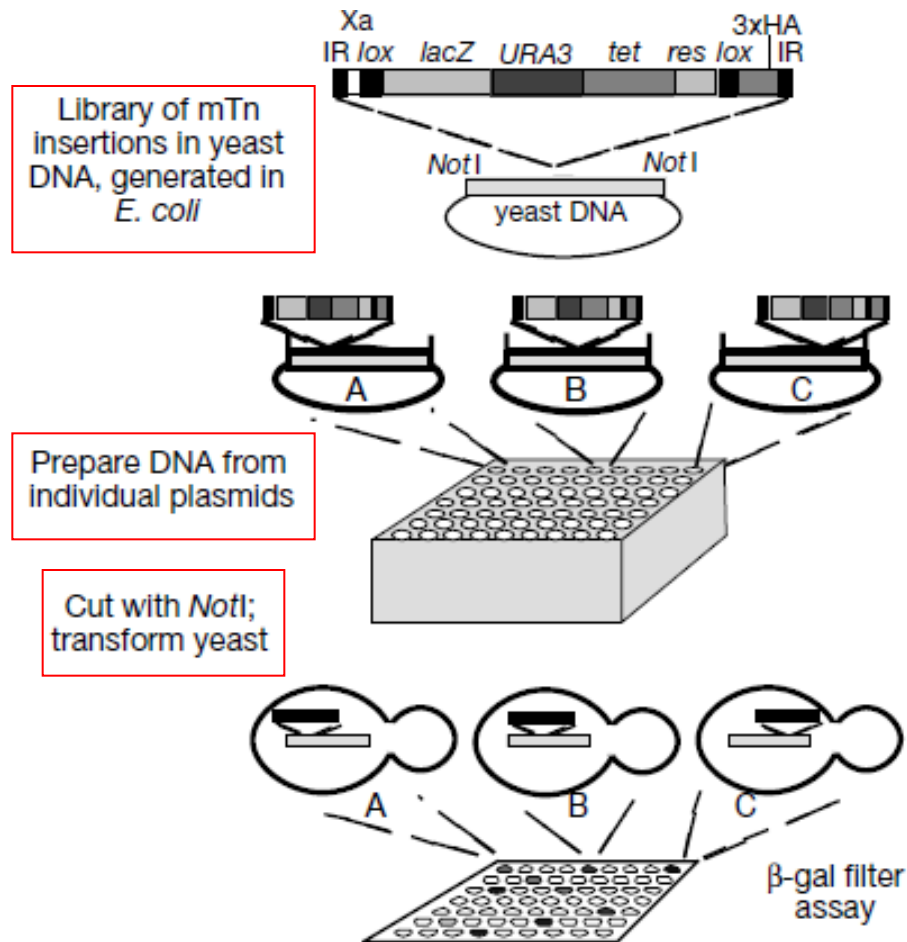


2. krok



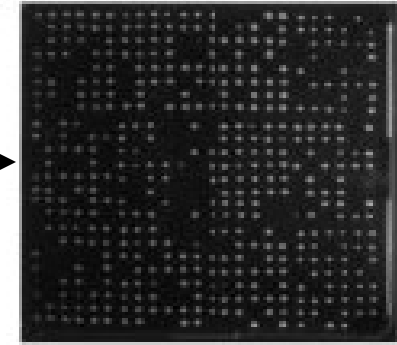
- Využití inhibitoru FOA pro „odlčení“ URA3 markeru (FOA je přeměňována Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil => URA3+ buňky nerostou, zatímco *ura3-* buňky jsou resistantní)
- Buňky se stávají *ura-*, takže URA3 marker lze využít několikrát

Delece genu pomocí transposonů



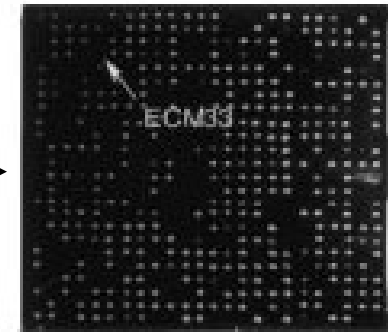
esenciální ▶

a



YPD

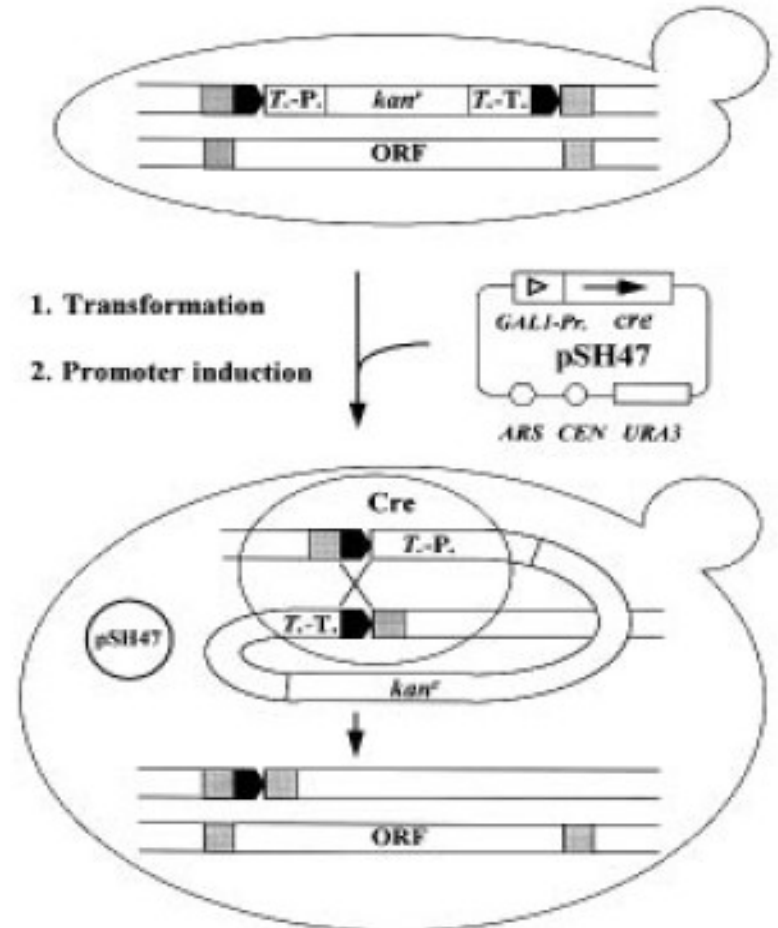
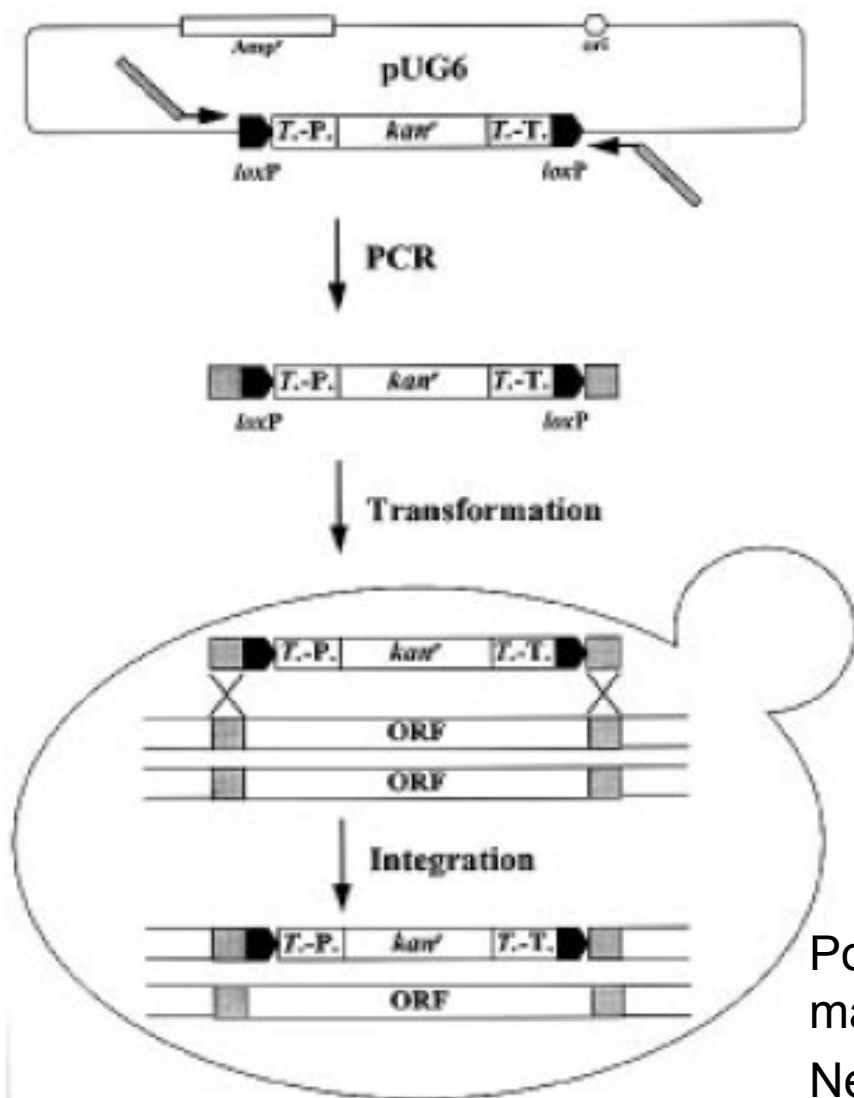
Citlivé ... ▶



Hygro

Defekt buněčné stěny

Cre rekombinasa

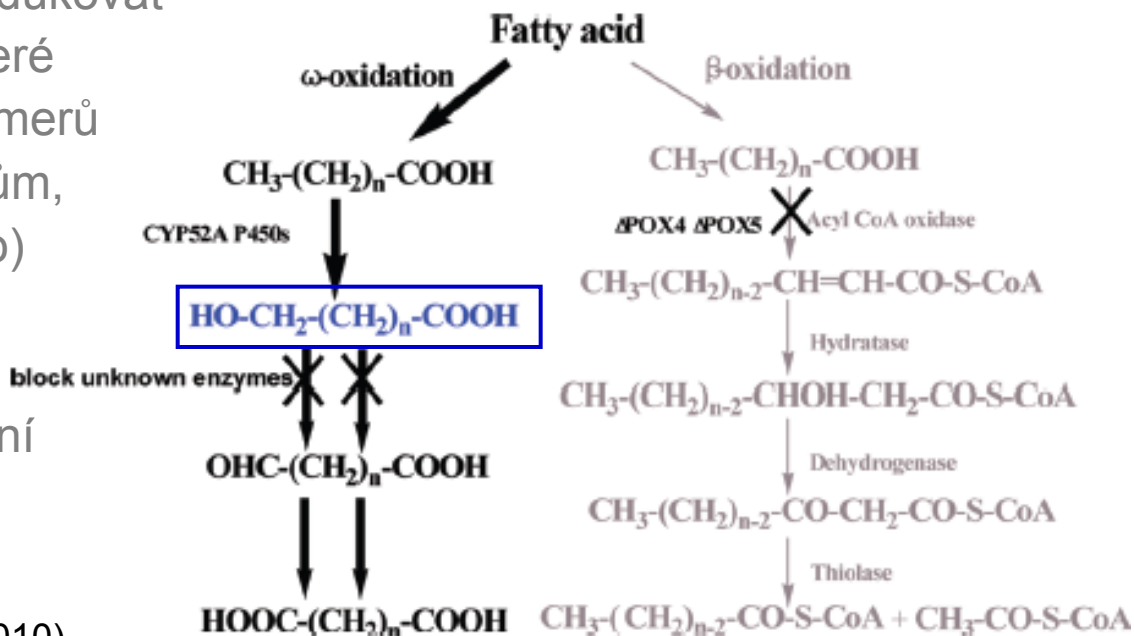


Postup lze použít několikrát se stále stejným markerem

Nevýhoda pro genetické studie (nekosegreguje s mutací)

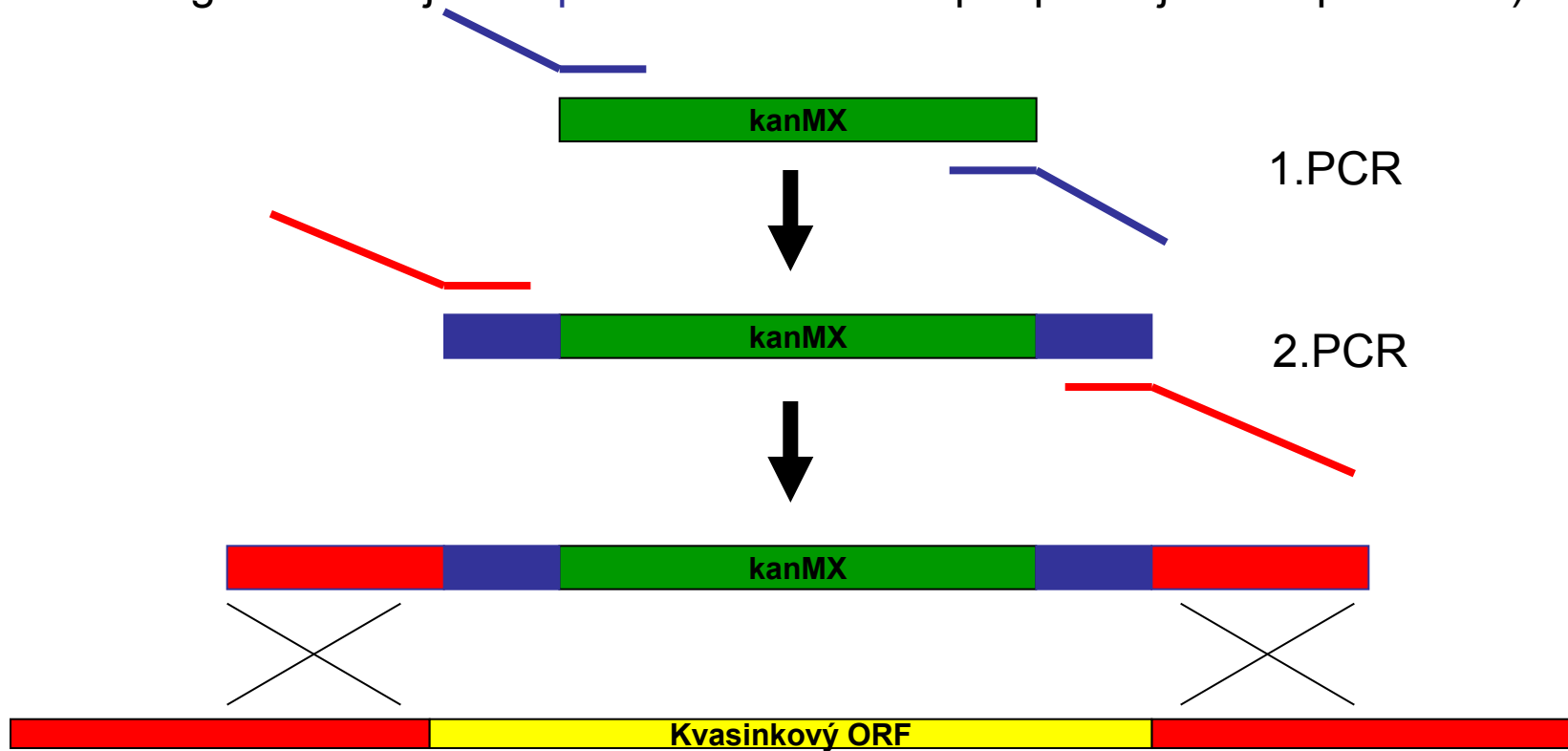
Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (Δ POX4, Δ POX5) není schopen β -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- další mutagenezí (pomocí flp rekombinasy – viz genetika) odstranili geny dalších oxidás (4 alkohol oxidázy) a dehydrogenás (6 alkohol dehydrogenás) aby eliminovali ω -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)
- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...



Delece genu - PCR

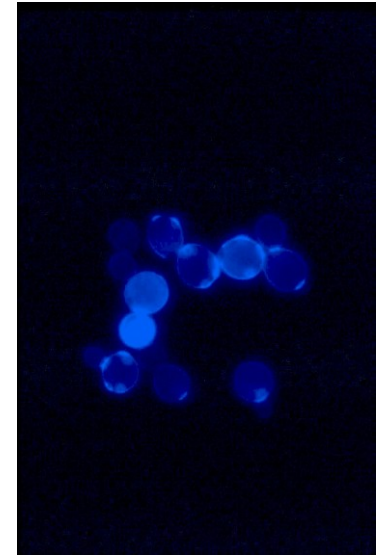
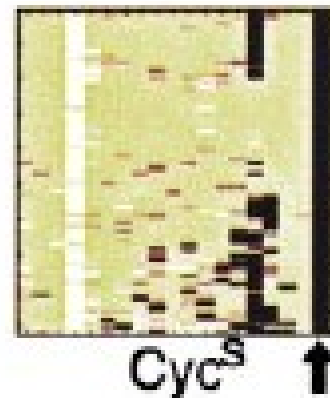
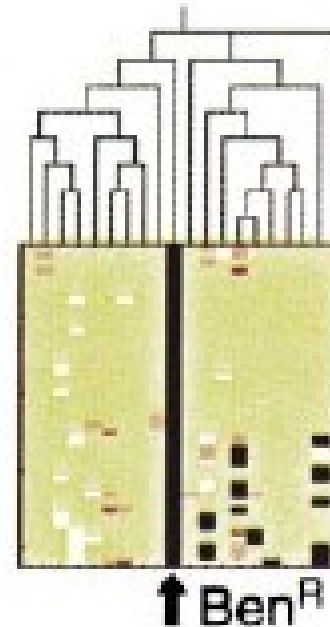
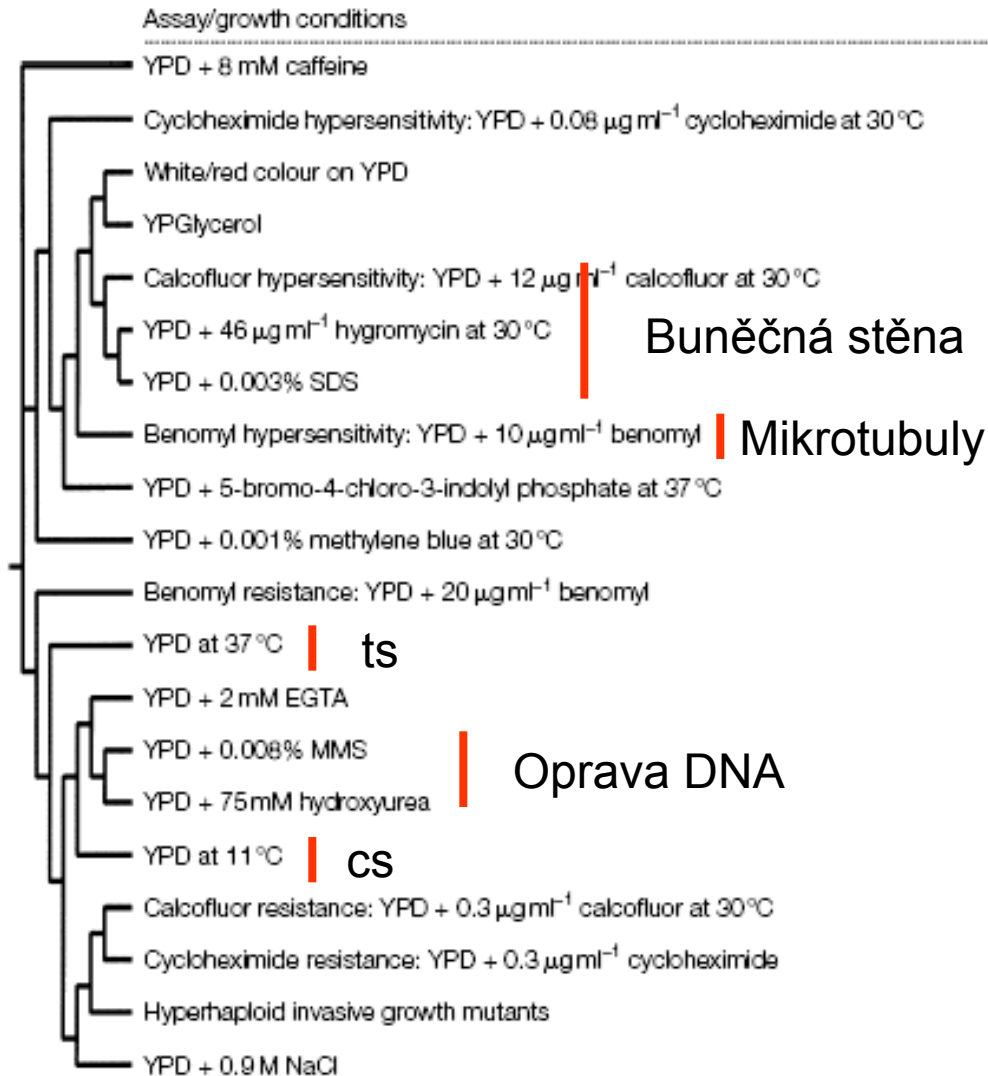
- pro rekombinaci stačí pouze **krátká homologie** (50nt)
- oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé postačí (při 2 krokové PCR se kromě dlouhé homologie vnesou ještě **specifické sekvence** pro pozdější manipulace ...)



- systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- kmeny lze získat z archivu EUROSCARF

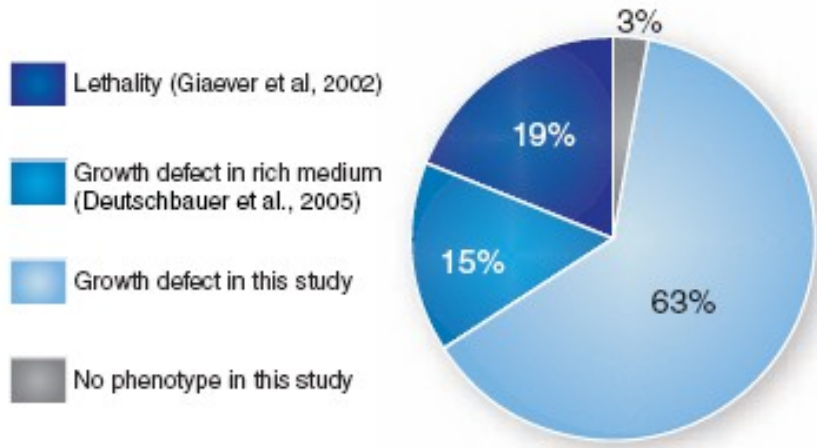
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>

Testy fenotypu-funkce



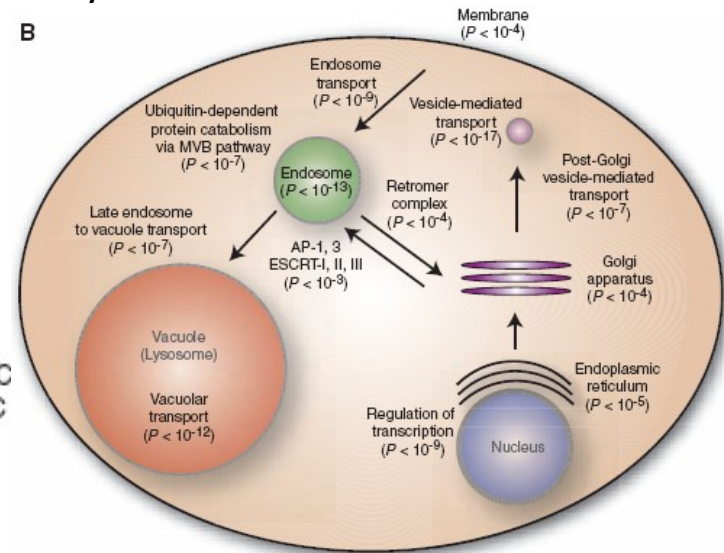
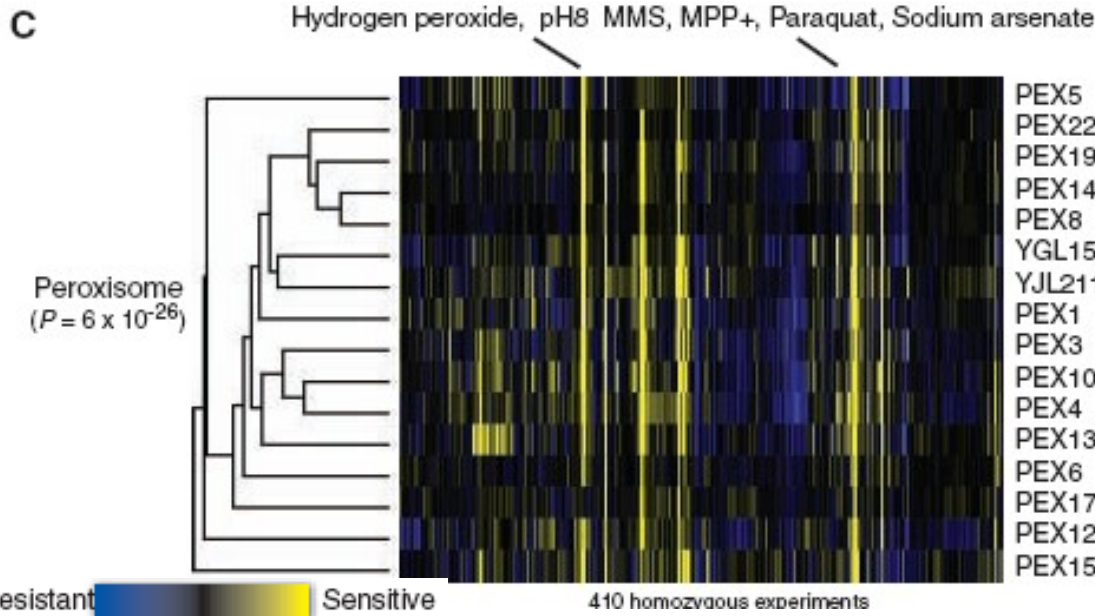
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů – anotace v databázích

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



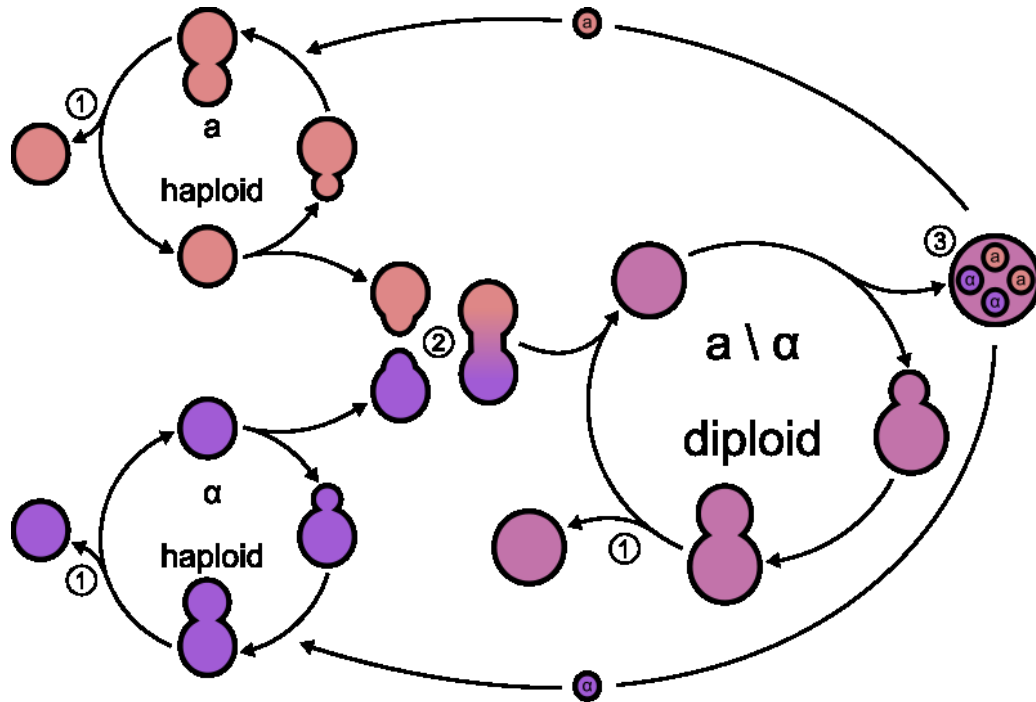
- Testováno ~400 malých molekul a stresových podmínek (-aa ...)
- Celkem provedeno ~ 6milionů testů
- multidrug resistance (MDR) pokud byl gen potřebný pro resistenci vůči >20% z testovaných látek

- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti



Science 320 (2008), p.362

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 dvojitýho 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)



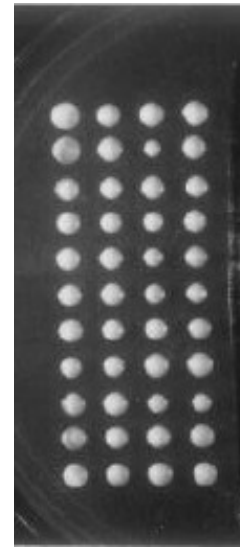
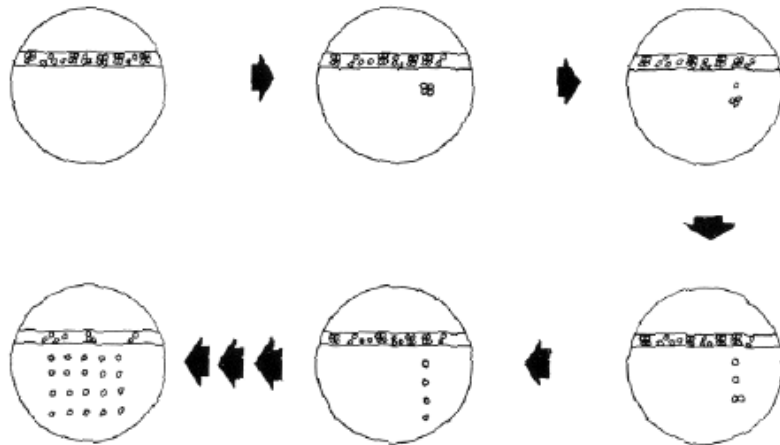
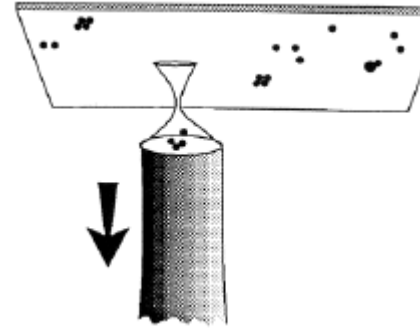
RHOMBOEDRICKÝ

S LINEÁRNÍM
USPOŘÁDÁNÍM
SPOR

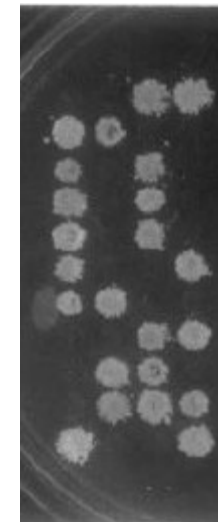


Více o BC a párování příště

Tetrádová analýza



YPD



Selektivní médium
(SD-ura ... testy)
Segregace 2:2

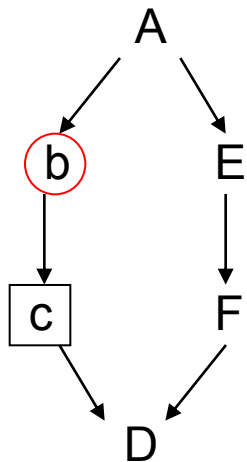
AAaa
aaAA
aAaA
.
.
.

Dvojité mutanty – funkční příbuznost

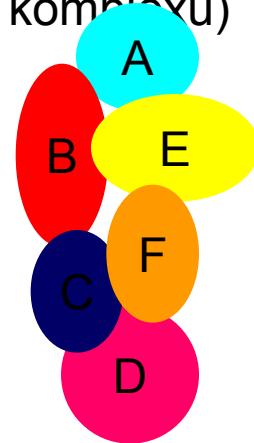
Mutagenese pomocí hydroxylaminu ...

haploid x haploid => diploid – stejný fenotyp - identický gen
- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

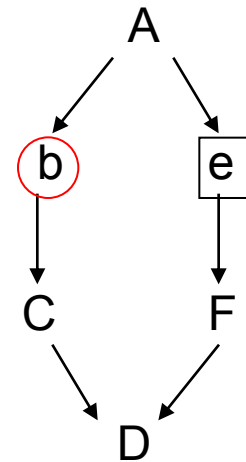
sporulace => haploid – stejný fenotyp – epistatický (funkčně příbuzné geny)
- aditivní až letální (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)



Epistatický



Proteinový
komplex



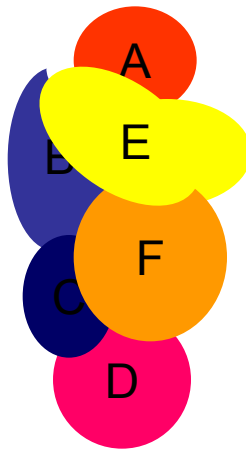
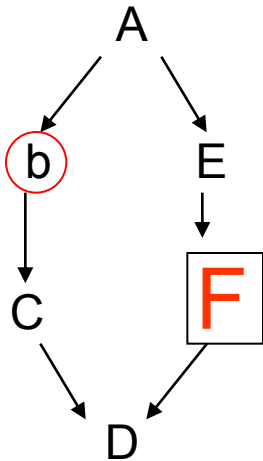
Letální

Hledání (screening) letálního mutanta – mutagenese kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA)

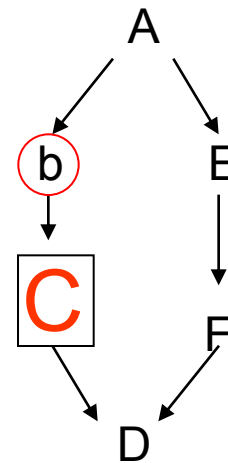
Supresory

Supresory potlačují původní fenotyp – mutace téhož genu „napraví“ původní mutaci

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

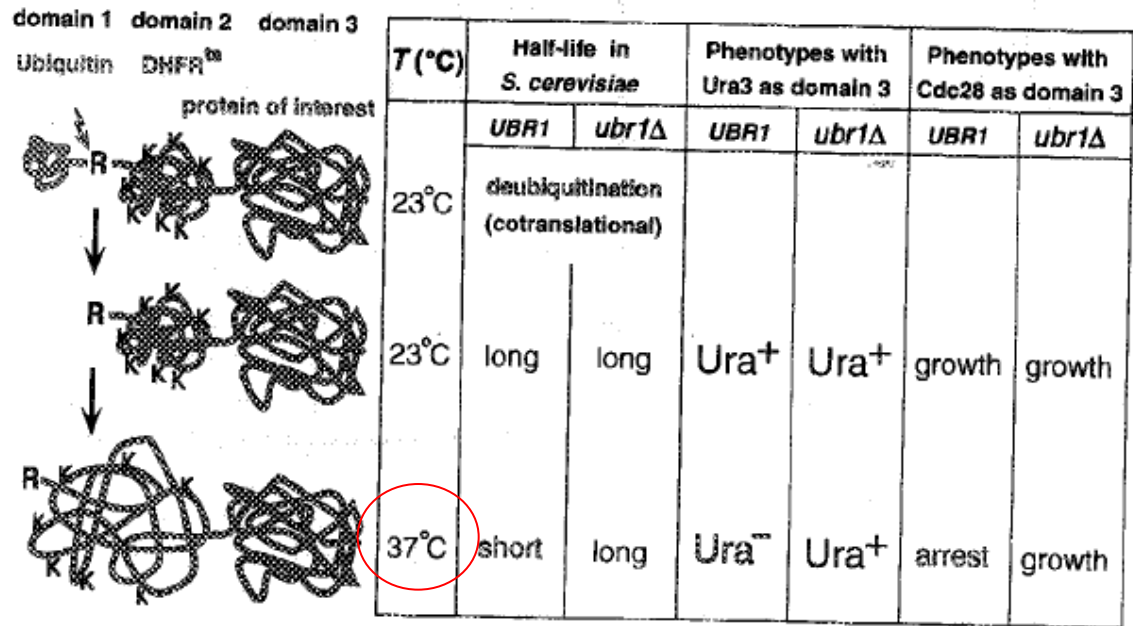


Proteinový komplex



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 restriktivní teploty (37°C)
- 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)