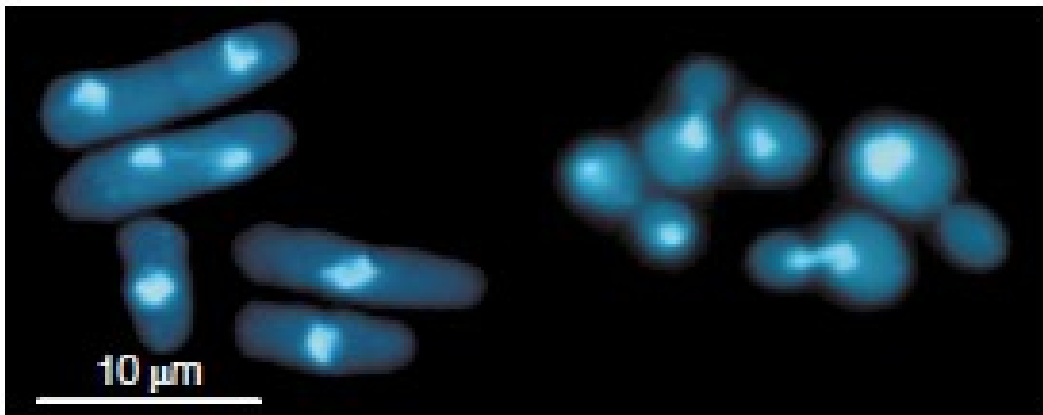


# Souhrn 4. přednášky

- Analytické/diagnostické metody
- Genetické metody
  - Plasmidy
  - Integrace

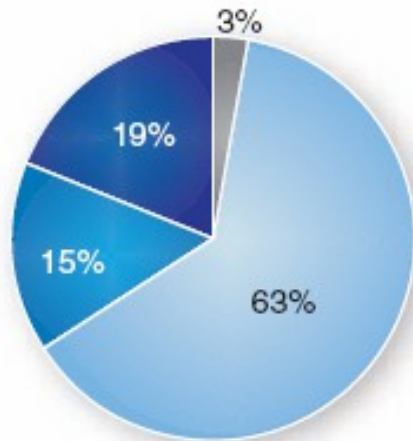
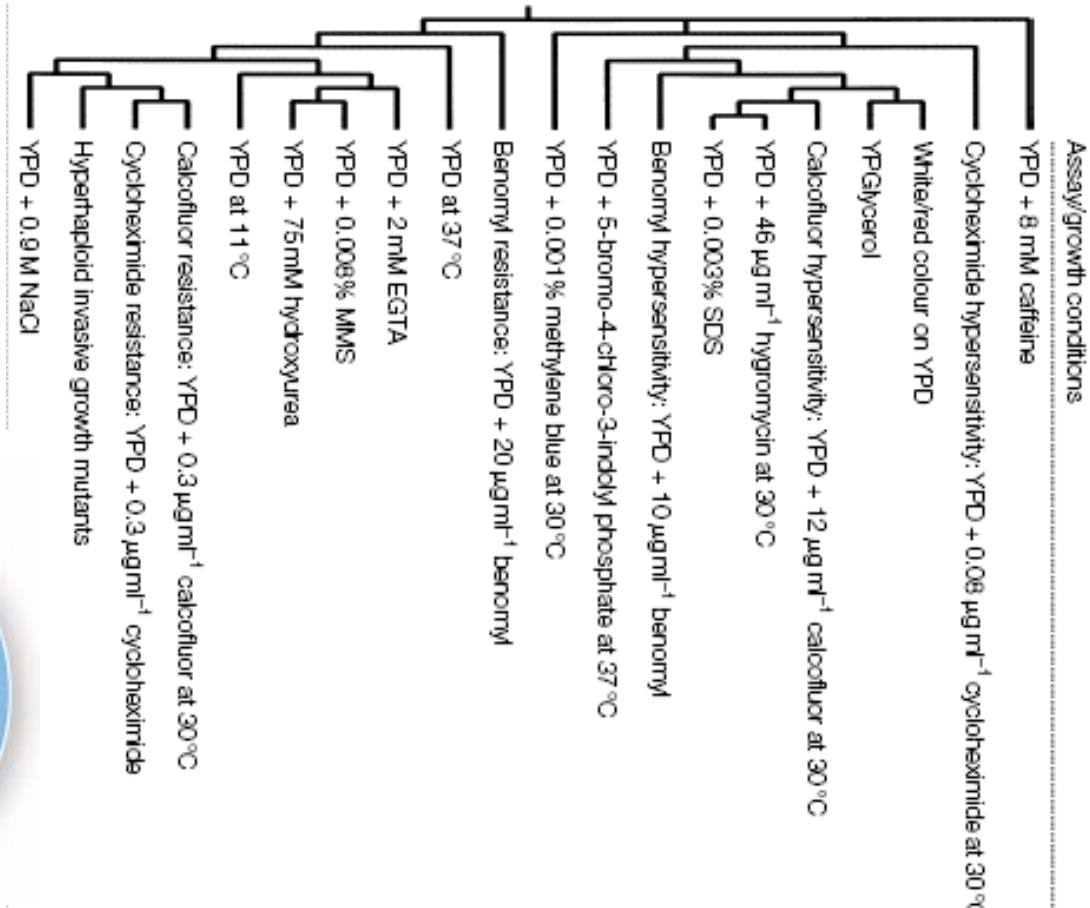
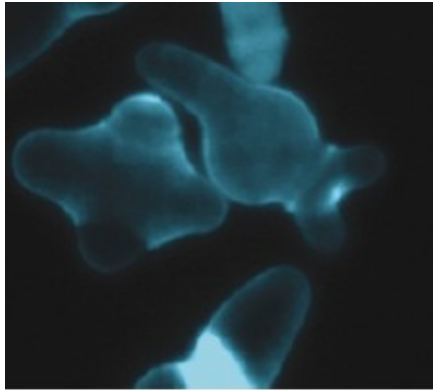


# Osnova 5. přednášky

- Genetické metody
  - mutageneze/“screen“
  - komplementace
  - identifikace
- Buněčný cyklus
  - Průběh a regulace BC
  - Synchronizace buněk
  - mechanismy regulace párování
  - Homothalické kmeny

# Mutace genu

- Studium funkce genu – fenotyp (1. delece, 2. mutace)
- **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)
- **esenciální gen** => buňky potřebují gen např. na plasmidu (*plasmid shuffling*)



Lethality (Giaever et al, 2002)

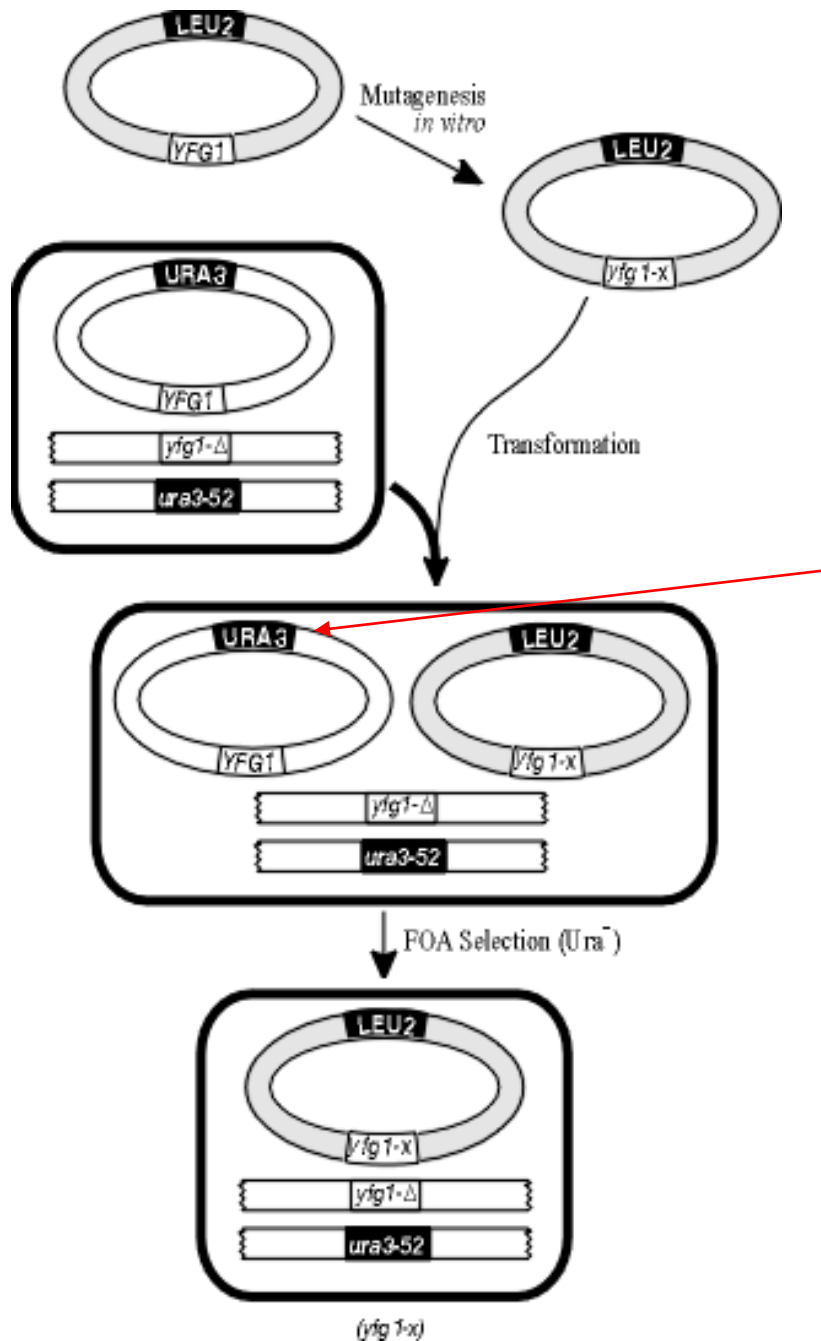
Growth defect in rich medium (Deutschbauer et al., 2005)

Growth defect in this study

No phenotype in this study

# Plasmid shuffling

Pokud je *YFG1* esenciální musí být v deleční mutantě přítomna extra divoká kopie genu např. na plasmidu

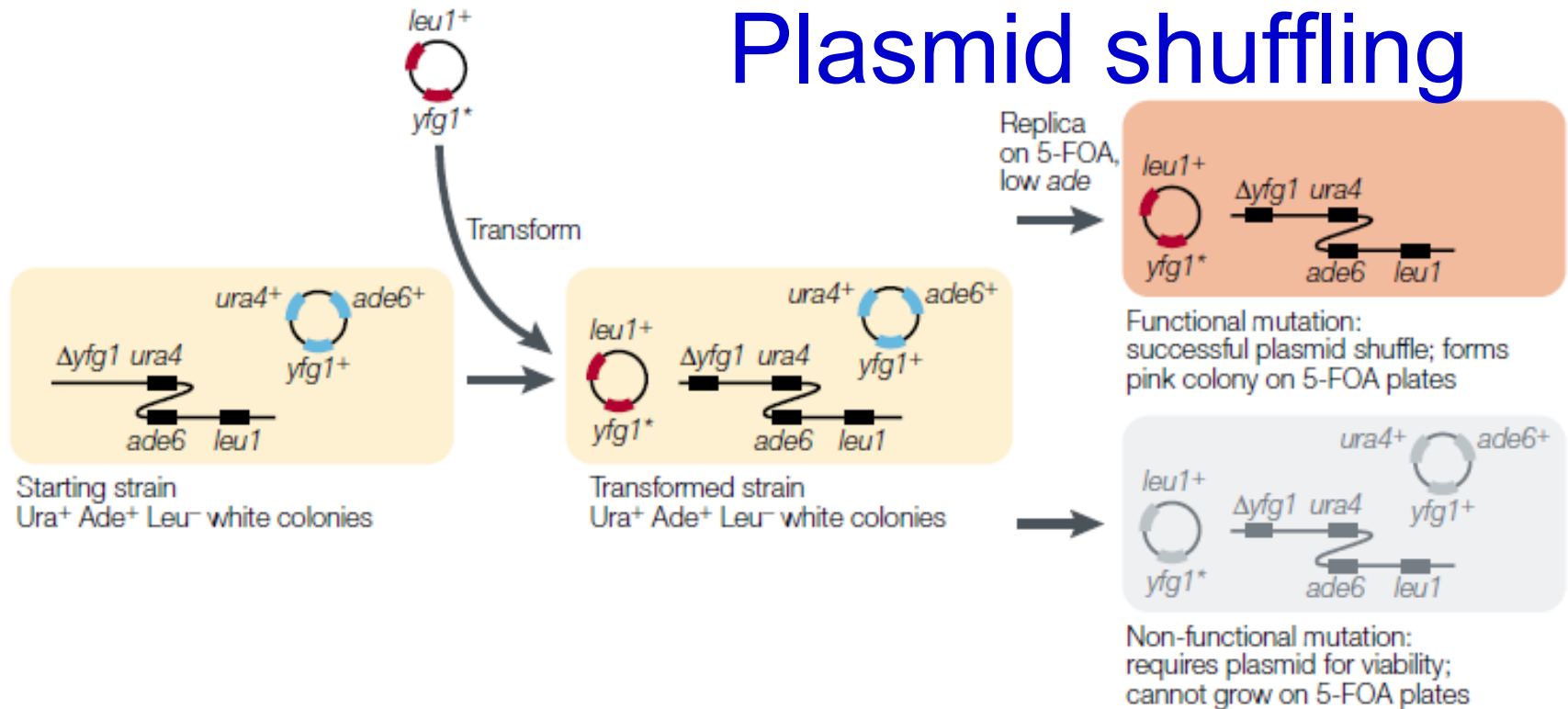


Na dalším plasmidu může být vnesena mutovaná verze *yfg1* – její efekt se projeví až po odstranění plasmidu s divokou kopií genu (pomocí FOA - přeměňována Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil => *URA3*+ buňky nerostou, zatímco *ura3*- buňky jsou resistantní)

Podobně lze použít *ade2*, *ade3* (S.c.) nebo *ade6* (S.p.) systémy s *YFG1* wt genem na plasmidu - s *ADE3* (kolonie jsou červené díky *ade2* mutaci) – po ztrátě plasmidu jsou sektory kolonii bílé (bez Ade3p enzymu je metabolická dráha blokována dříve než vzniká červený metabolit)

Tetrádová analýzy (potvrzení letálního fenotypu)

# Plasmid shuffling



Podobně lze použít *ade2*, *ade3* (S.c.) nebo *ade6* (S.p.) systémy s *YFG1* wt genem na plasmidu - s *ADE3* (kolonie jsou červené díky *ade2* mutaci) – po ztrátě plasmidu jsou sektory kolonii bílé (bez Ade3p enzymu je metabolická dráha blokována dříve než vzniká červený metabolit)

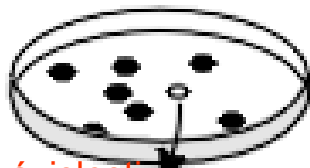
Tetrádová analýzy (potvrzení letálního fenotypu)

# Izolace mutant

## Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

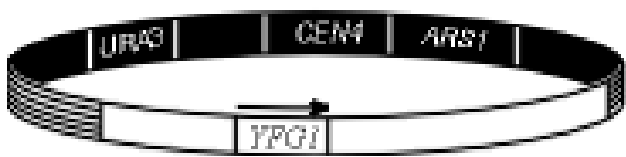
Isolate *Ura<sup>+</sup>* transformants and score for *Yfg<sup>+</sup>*



*Yfg<sup>+</sup>*

Recover the YCp-*YFGI<sup>+</sup>* plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (mutant+delece) X supresor na plasmidu

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



Detection of *Yfg<sup>-</sup>*



*Yfg<sup>-</sup>*

## Complementation

Cross the *Yfg<sup>-</sup> MATa* mutant to *MATα* tester strains. Isolate diploid strains. Score for *Yfg<sup>+</sup>* and *Yfg<sup>-</sup>*

*MATa yfg1* X

- MATα YFG<sup>+</sup>*
- 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<sup>+</sup>*



Isolate a diploid strain and Sporulate



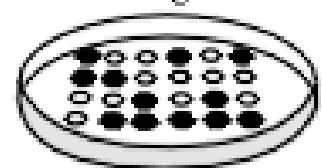
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

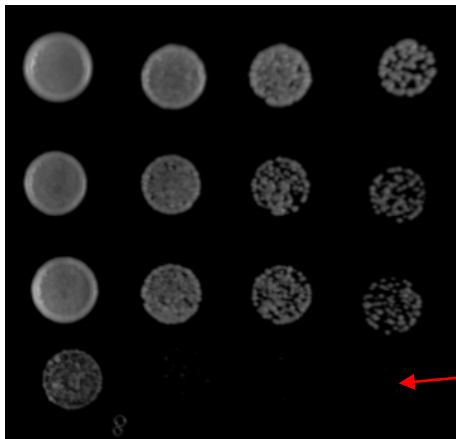


Score for *Yfg<sup>+</sup>* and *Yfg<sup>-</sup>*



Počet mutací

- 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 ...*)



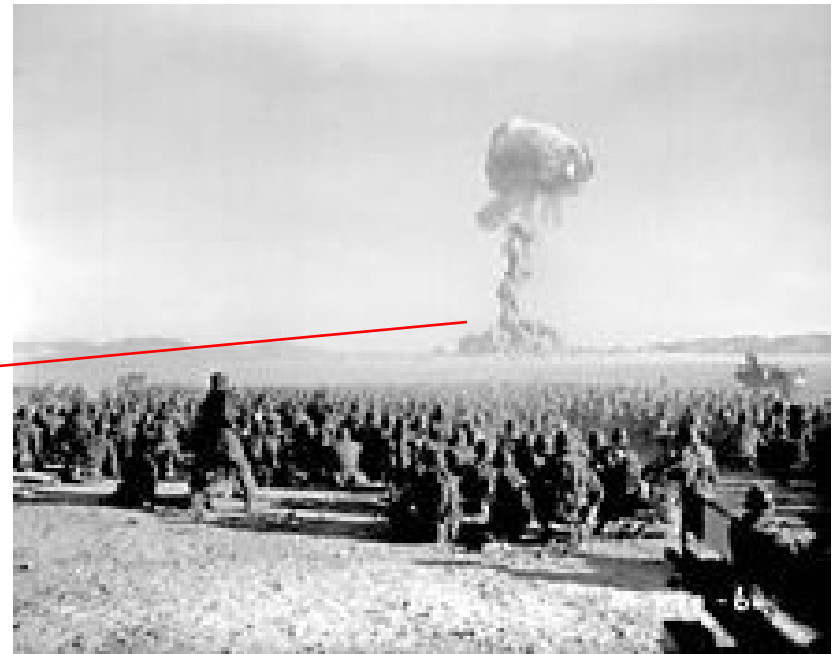
ředící řada

10x

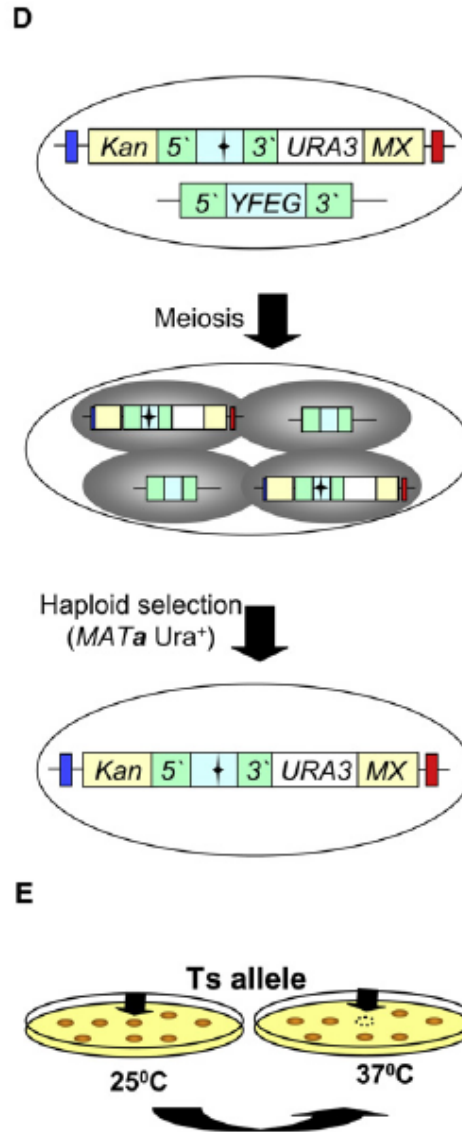
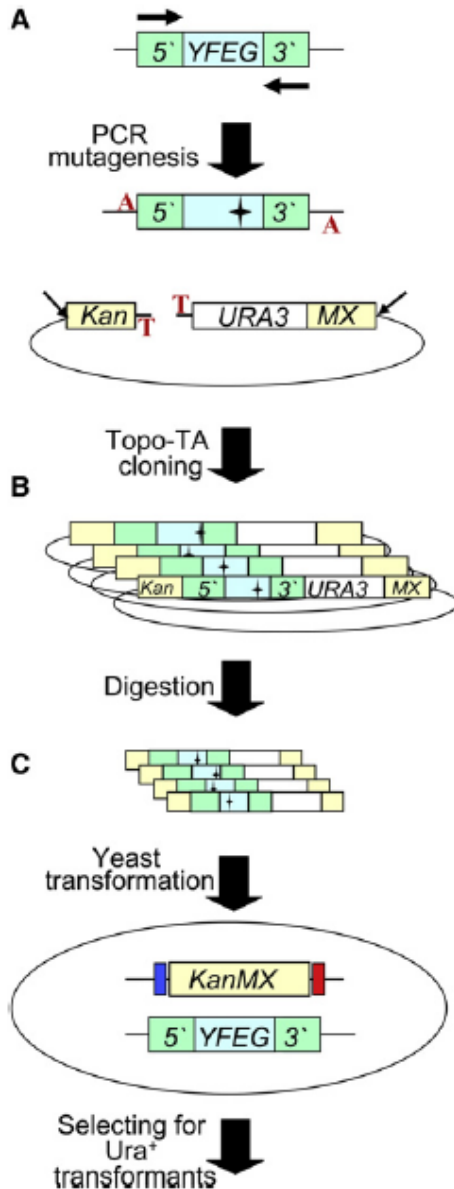
100x

1000x

10000x



specifické „barcodes“ pro každý gen



# ts mutanty

ts mutanty jsou výhodné pro studium funkce (esenciálního) genu – mutanty jsou normální na permissivní teplotě (25°C), ale za restriktivní teploty (37°C) nemohou dokončit buněčný proces vyžadující aktivní protein

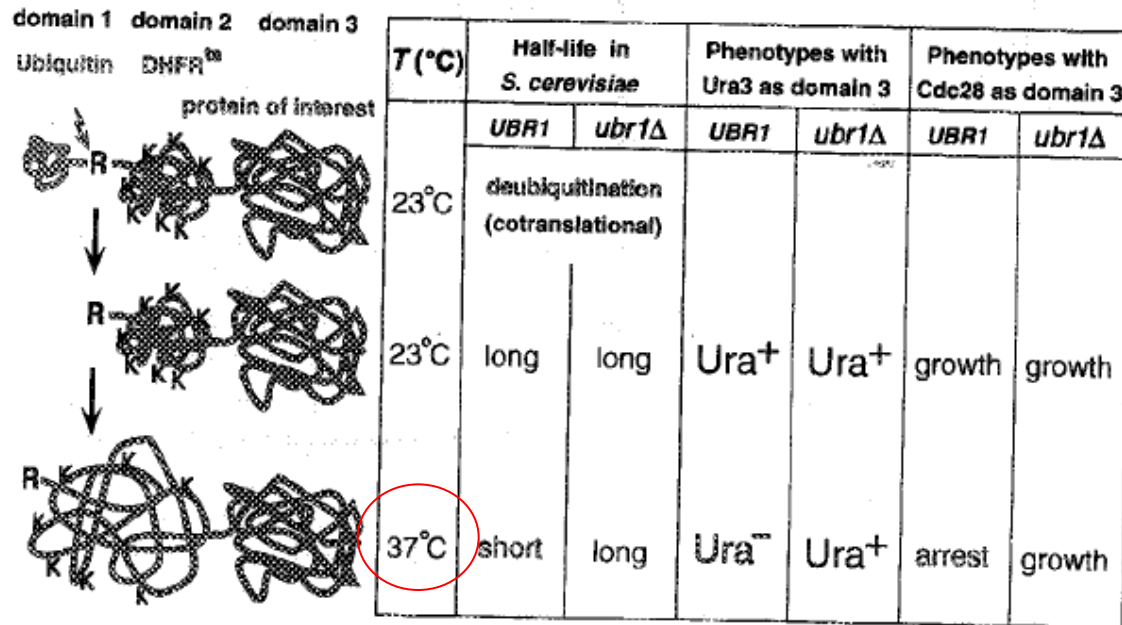
Diploidní heterozygotní kmeny z EuroFan projektu

Ben-Aroya et al, Mol Cell, 2008

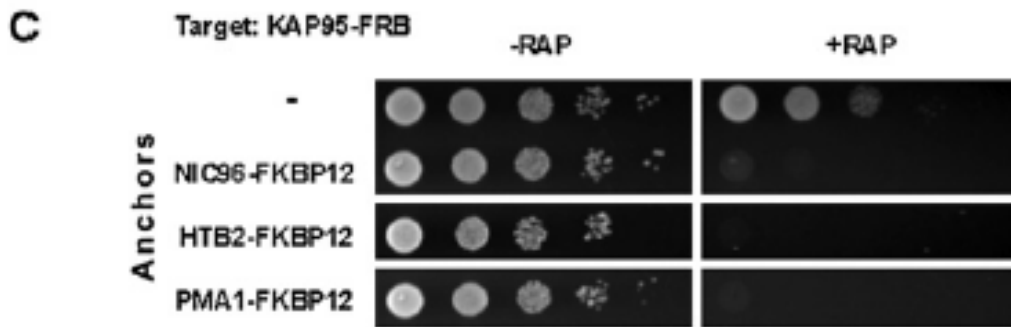
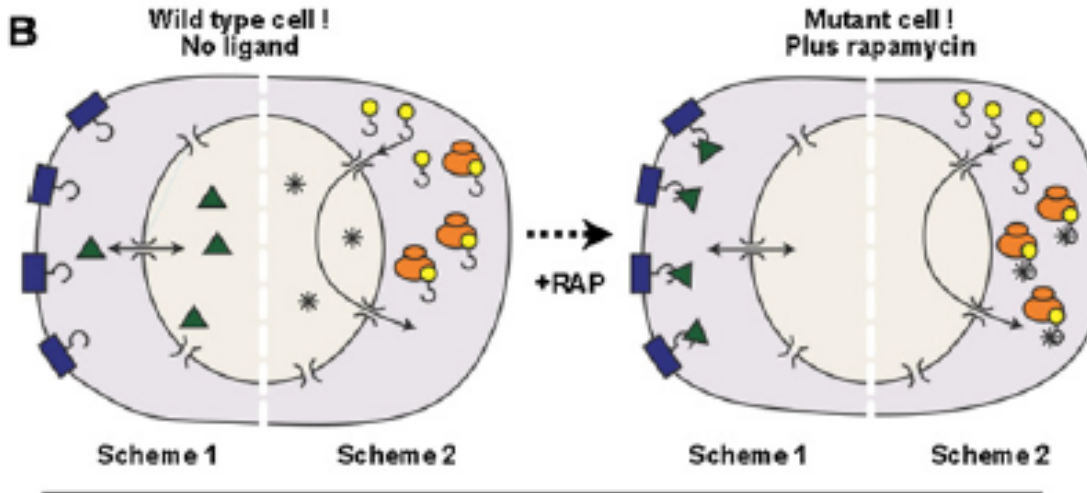


# ts mutanty

ts mutanty = většinou nestabilní proteiny, které se při zvýšené teplotě denaturují/ztrácí aktivitu a jsou degradovány



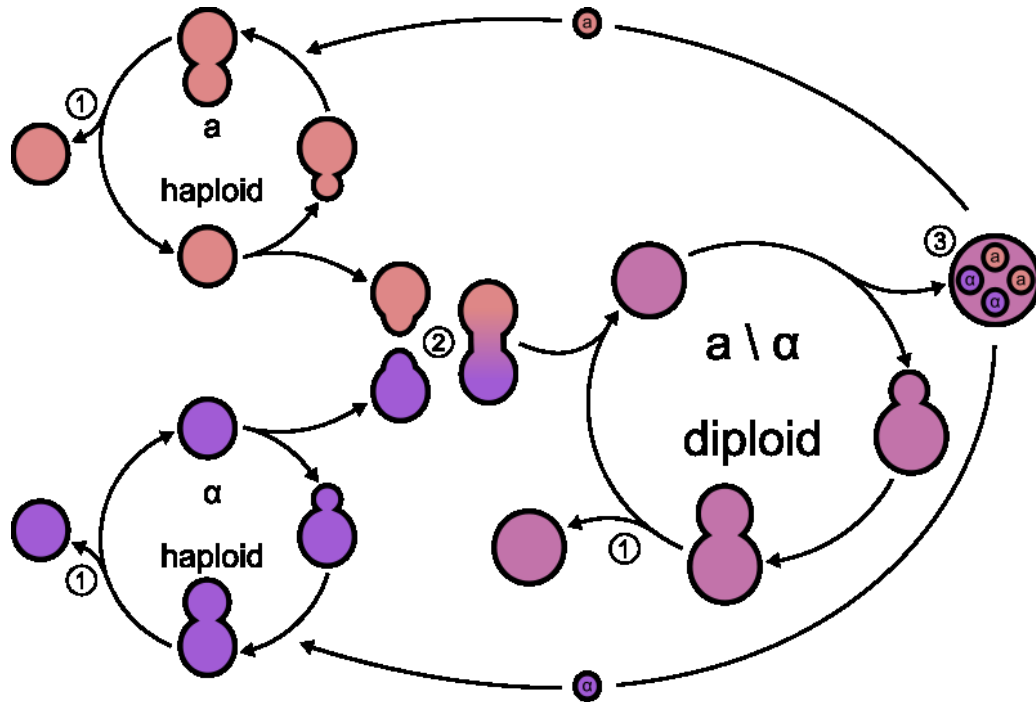
- ubiquitinace „označuje“ proteiny pro proteasom (degradaci)
- ts alela DHFR je degradována (nestabilní protein – strukturní mutace)
- fůze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možné využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fůze s CDC28 – kvasinky arestují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



- ke studiu terminálního fenotypu je třeba rychlé deaktivace proteinu (plasmid shuffling nebo vypínání promotoru je pomalé) – kromě toho mutant byla vyvinuta nová technologie na odstranění proteinu ze správného místa (např. z jádra do cytoplasmy) má stejný efekt jako jeho deaktivace (není použitelné pro všechny proteiny)

- kotva (PMA1 na membráně nebo ribosomální HTB2 rychle přechází do cytoplasmy a tvoří ribosomy) po přidání rapamycinu „odtáhne“ cílový protein

# 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)

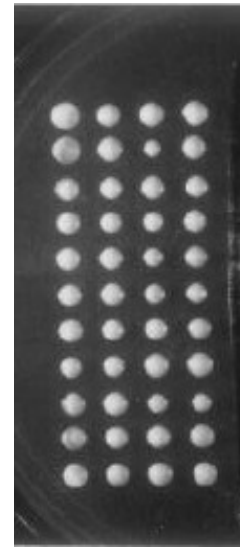
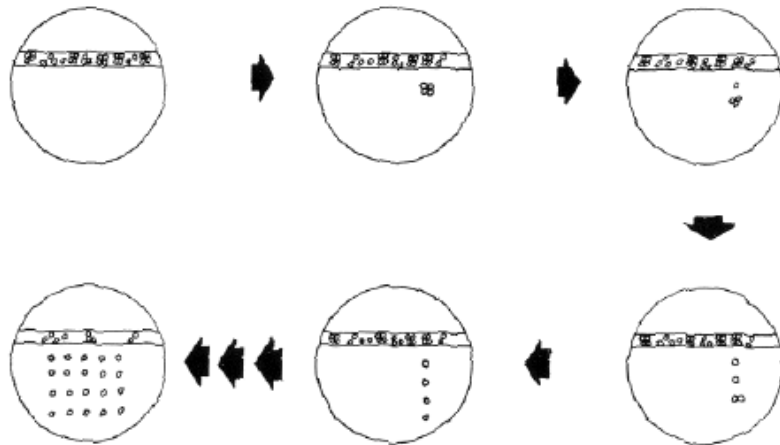
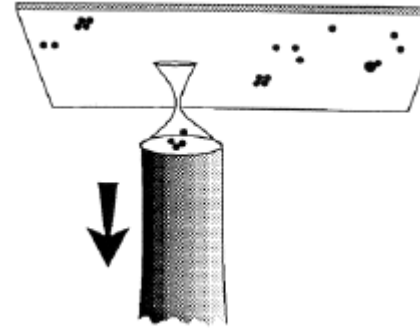


RHOMBOEDRICKÝ

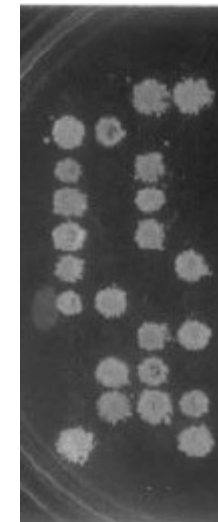
S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR



# Tetrádová analýza



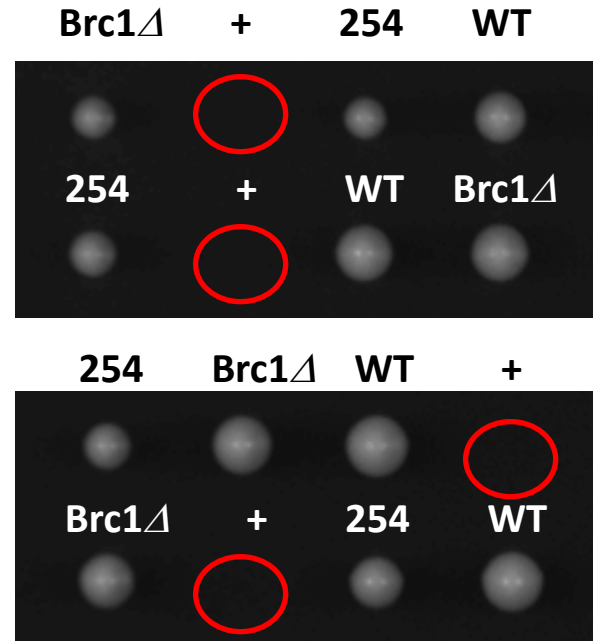
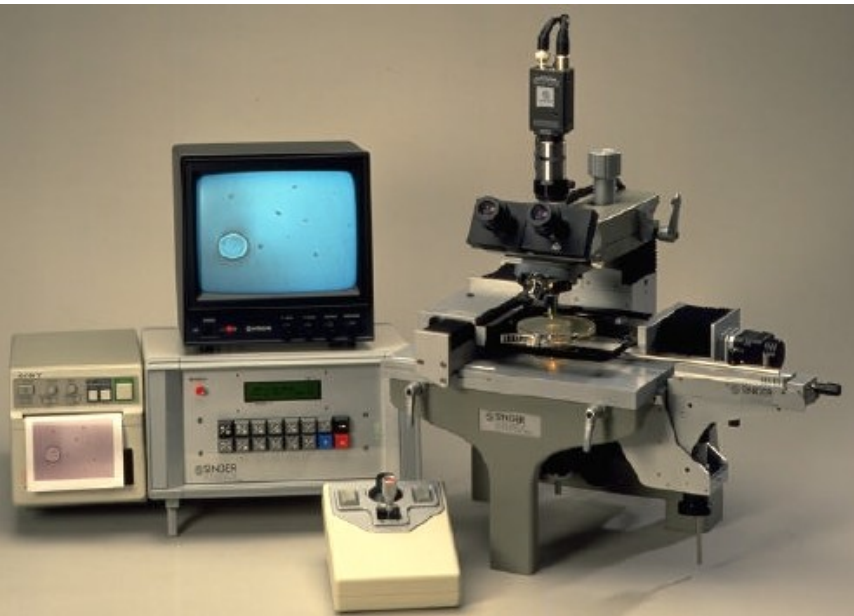
YPD



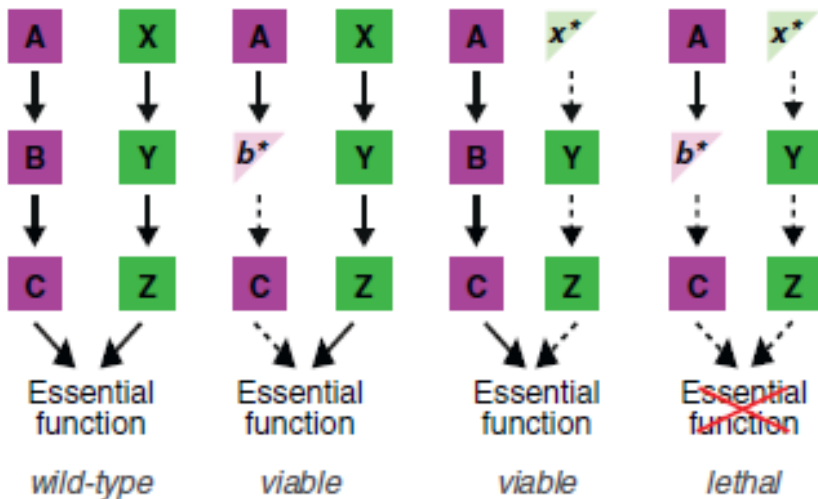
Selektivní médium  
(SD-ura ... testy)  
Segregace 2:2

AAaa  
aaAA  
aAaA  
.  
.  
.

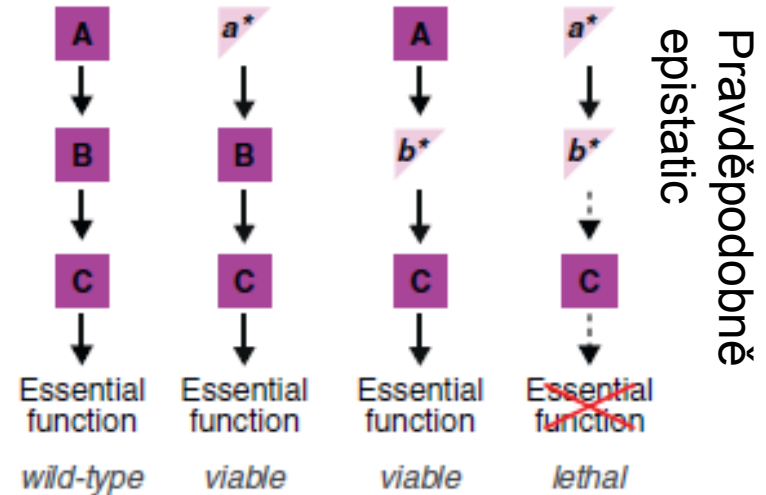
# Tetrádová analýza – syntetická letalita



(a) Between Pathway Genetic Interactions (non-essential pathways)



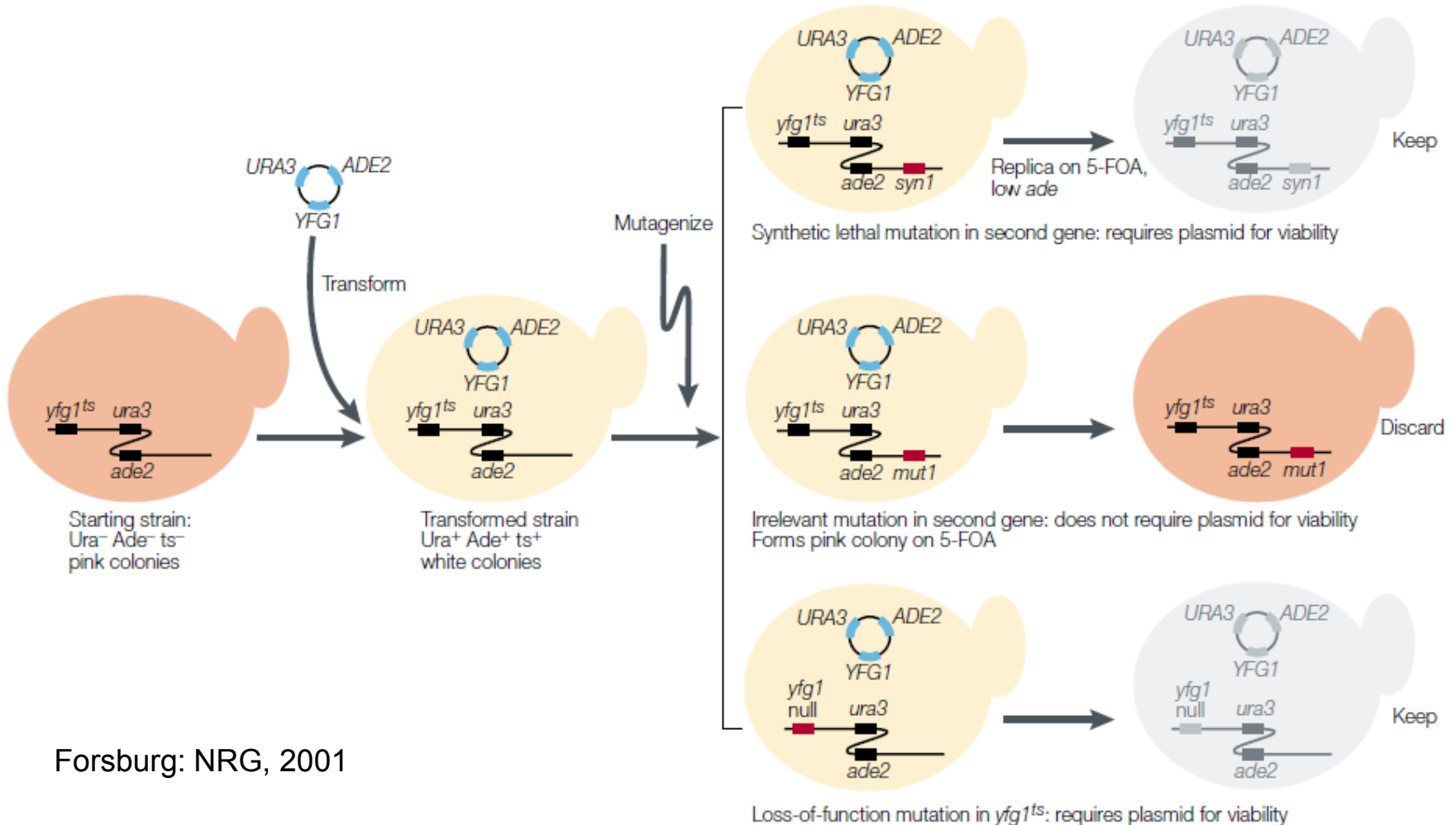
(c) Within Pathway Genetic Interactions (essential pathway)



Costanzo et al, 2010, CO in BT

# Syntetická letalita-screen

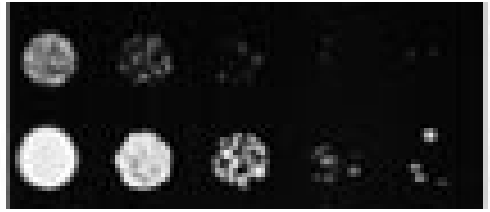
- křížení s knihovnou mutant (delečních) nebo další mutageneze mutanty



Forsburg: NRG, 2001

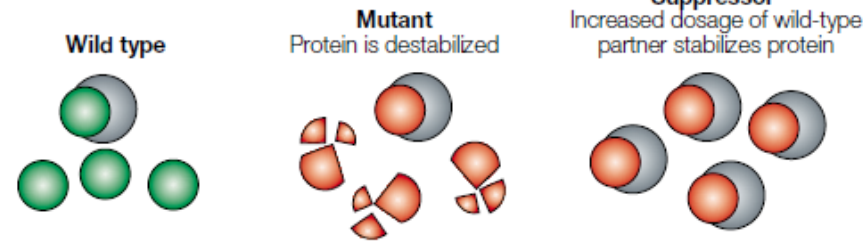
# Suprese

pRusA

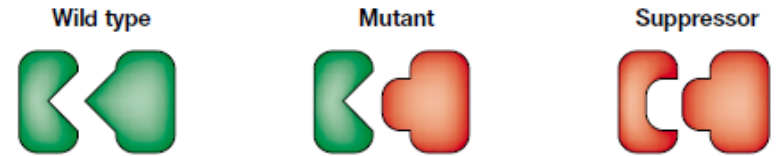


- mutace téhož genu „napraví“ původní mutaci
- mutace sousedního (protein) zesílí oslabenou interakci
- nadprodukce proteinu z paralelní dráhy
- nadprodukce proteinu z téže dráhy

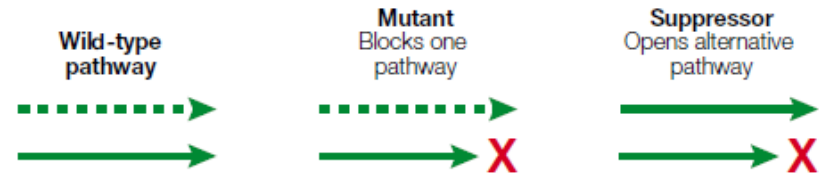
a Dosage suppressor: rescues in high copy



b Interaction suppressor: allele specific, gene specific



c Bypass suppressor: pathway specific, rescues null allele



Forsburg: NRG, 2001

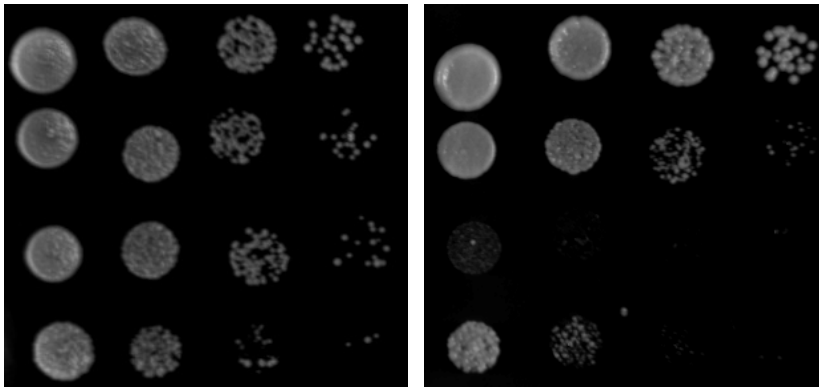
vyřazení dráhy může pomoci pokud chyba (downstream) v této dráze je příčinou problémů

wild-type

Rhp51 $\Delta$

R254E

double



# 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).

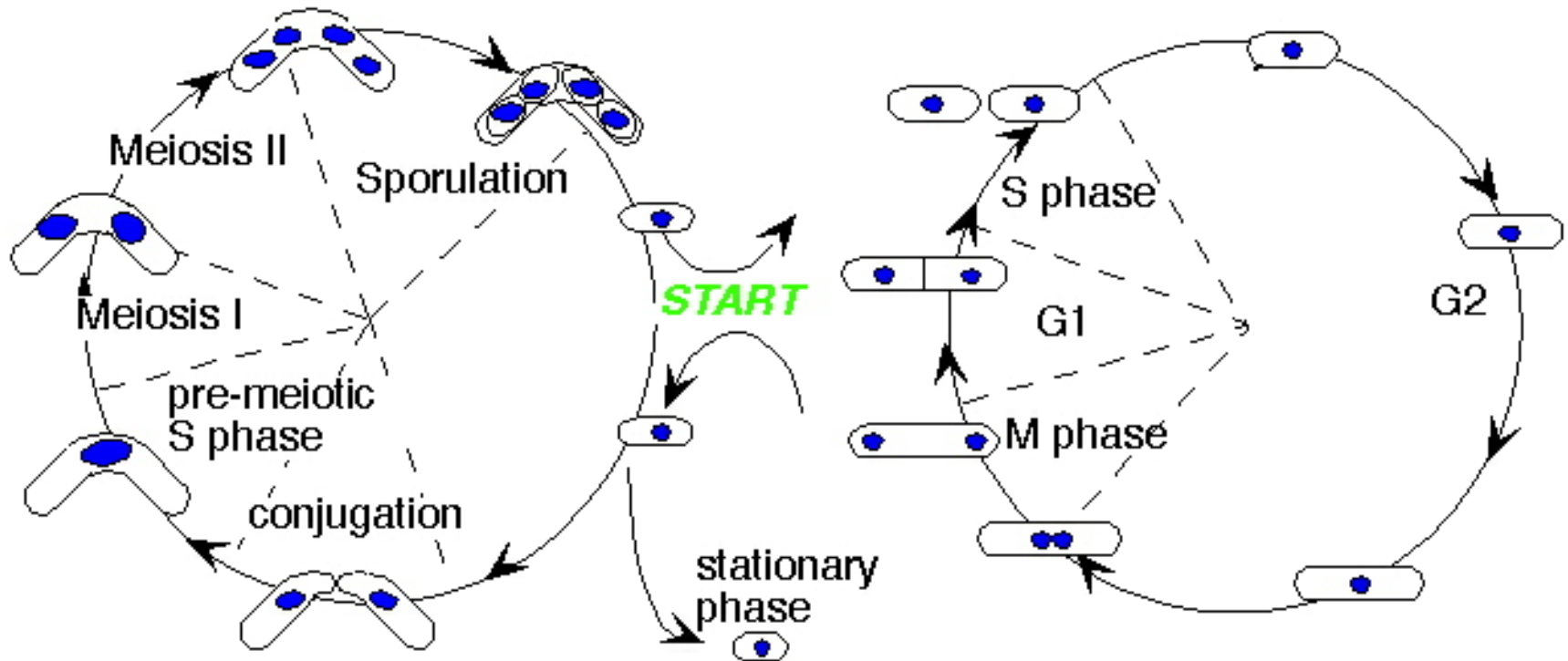


**Tim Hunt** na začátku 80. let objevil první cyklin – cykliny jsou proteiny, které jsou syntetizovány a odbourávány během určité části buněčného cyklu. Cykliny se váží na CDK a regulují jejich aktivitu.



# Buněčný cyklus *S. 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)

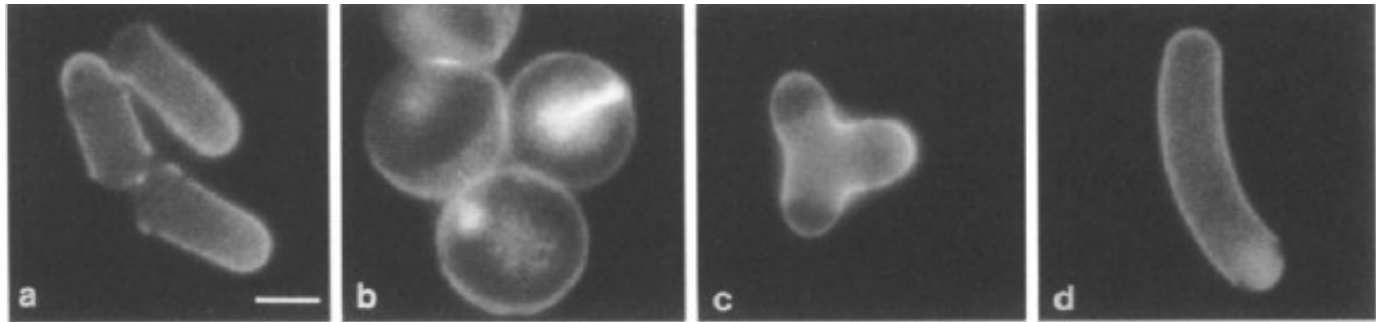


*Meiotic cycle*

*Vegetative (mitotic) cycle*

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

- 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 růstu)

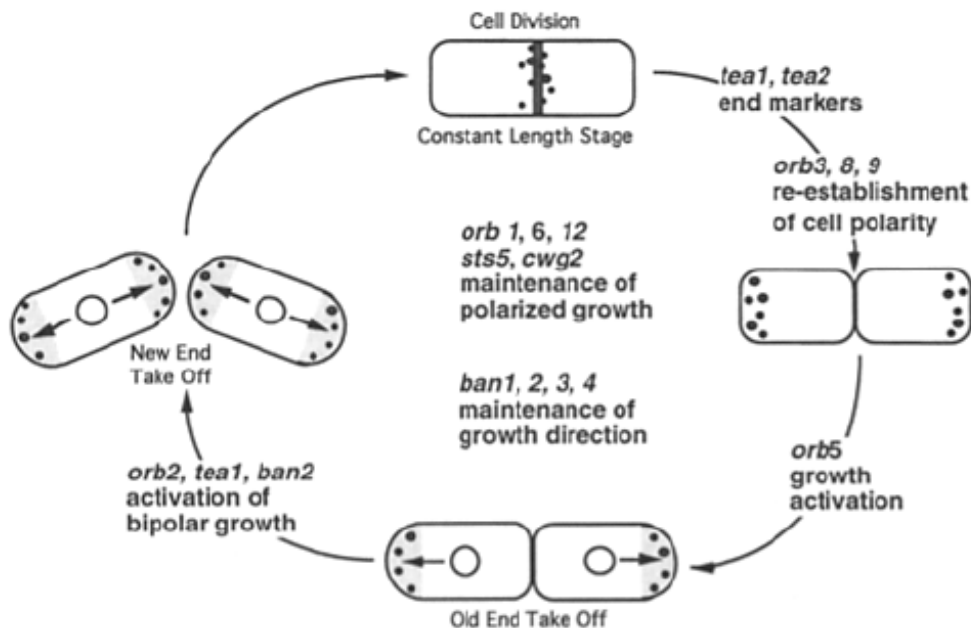
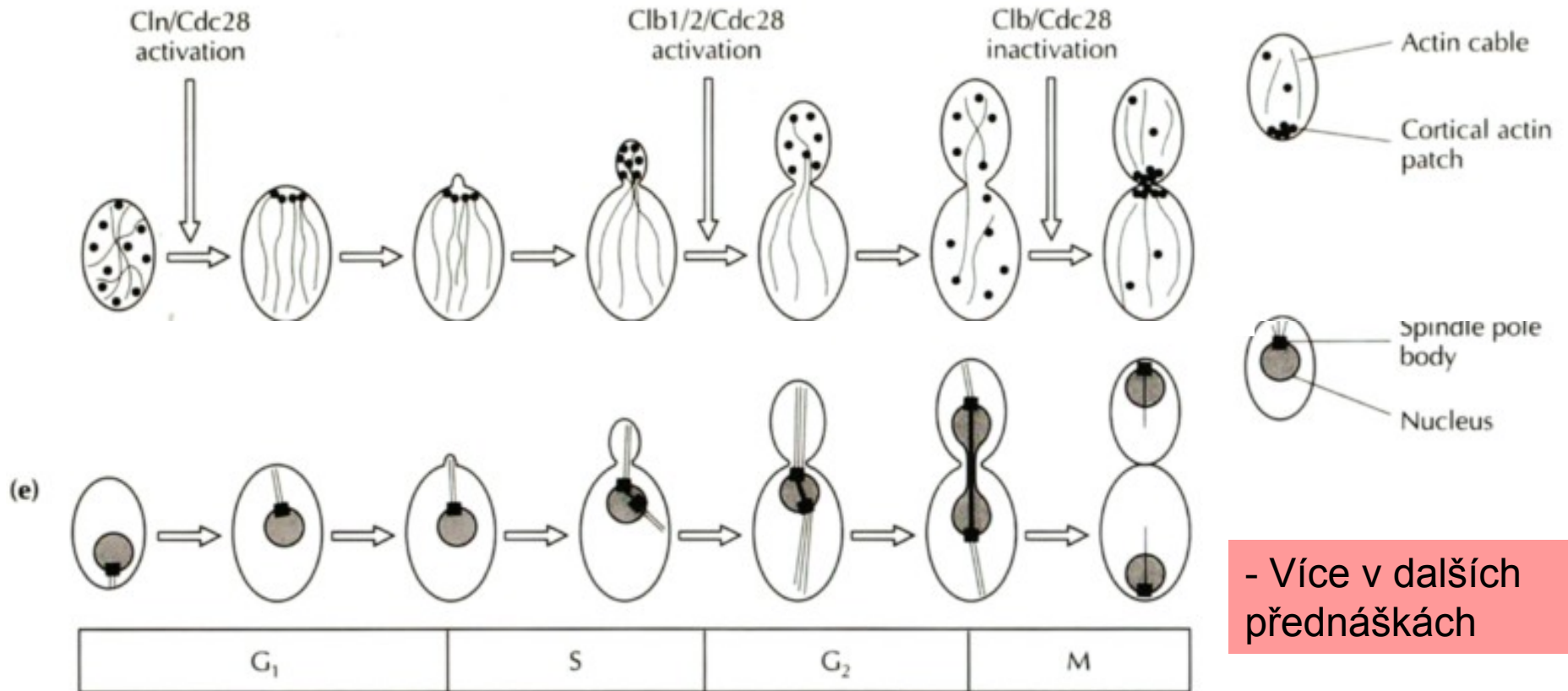


Table I. *orb* Genes

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

# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*

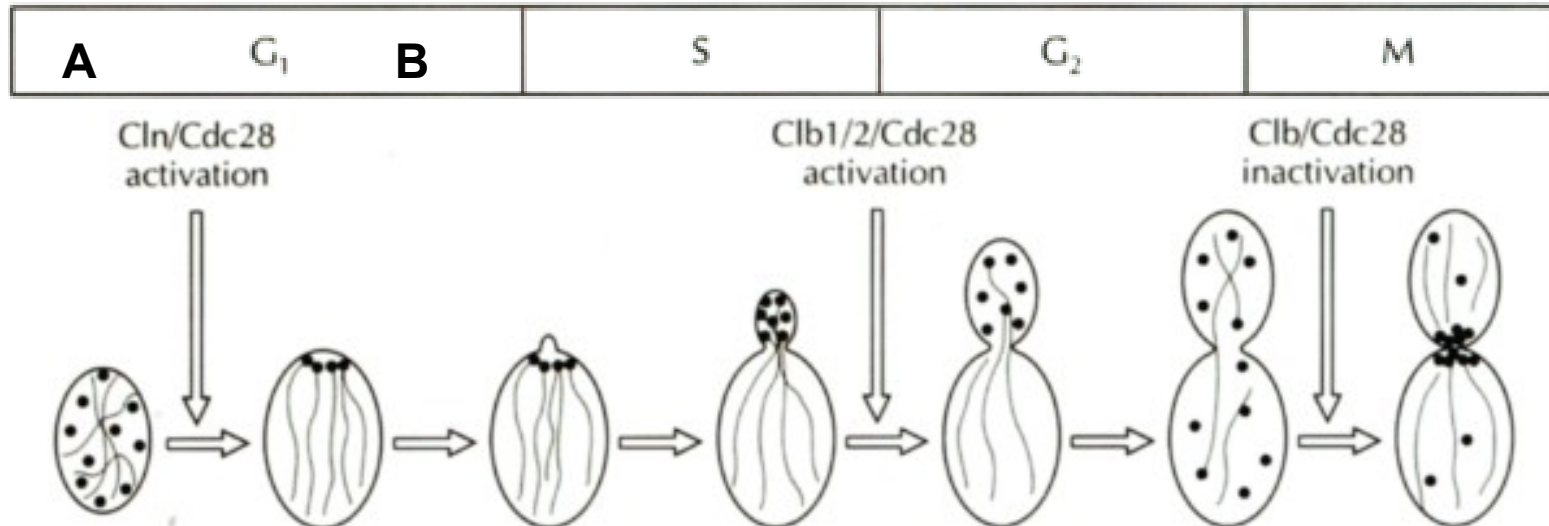


- Více v dalších přednáškách

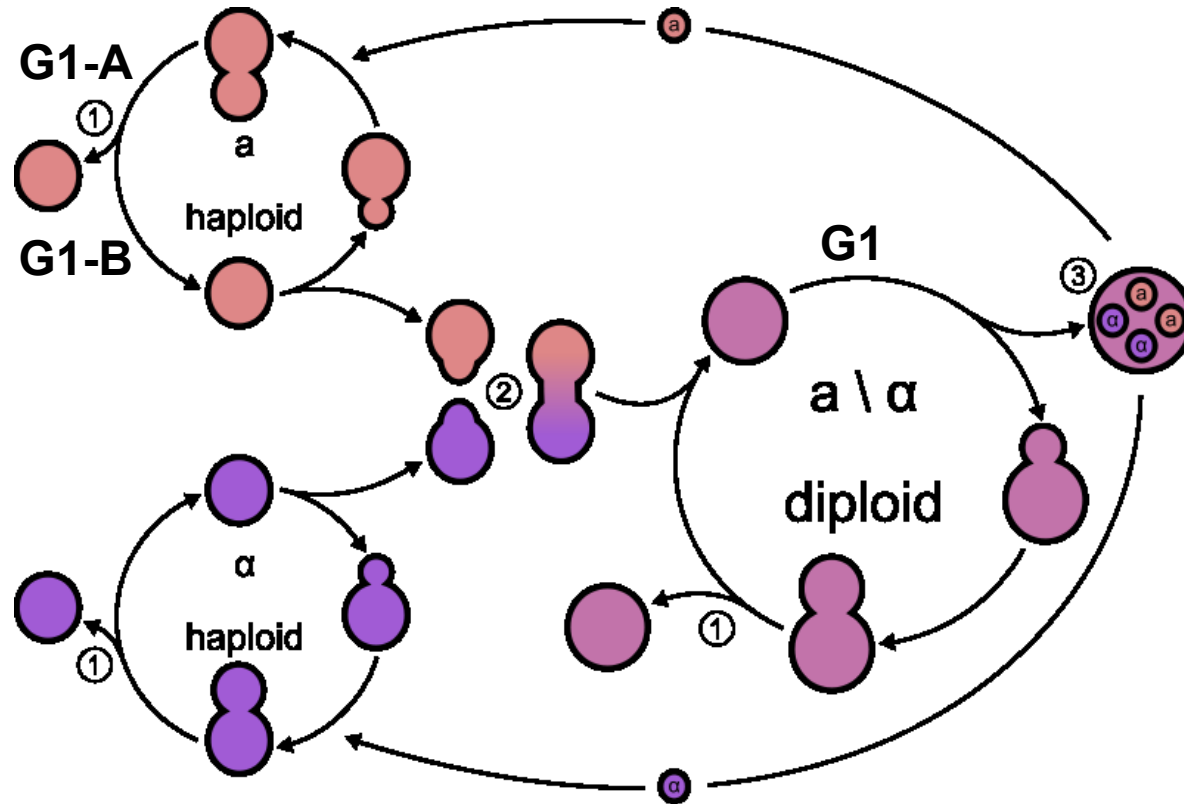
- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G<sub>2</sub> fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G<sub>1</sub>
- Oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G<sub>1</sub> fáze

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

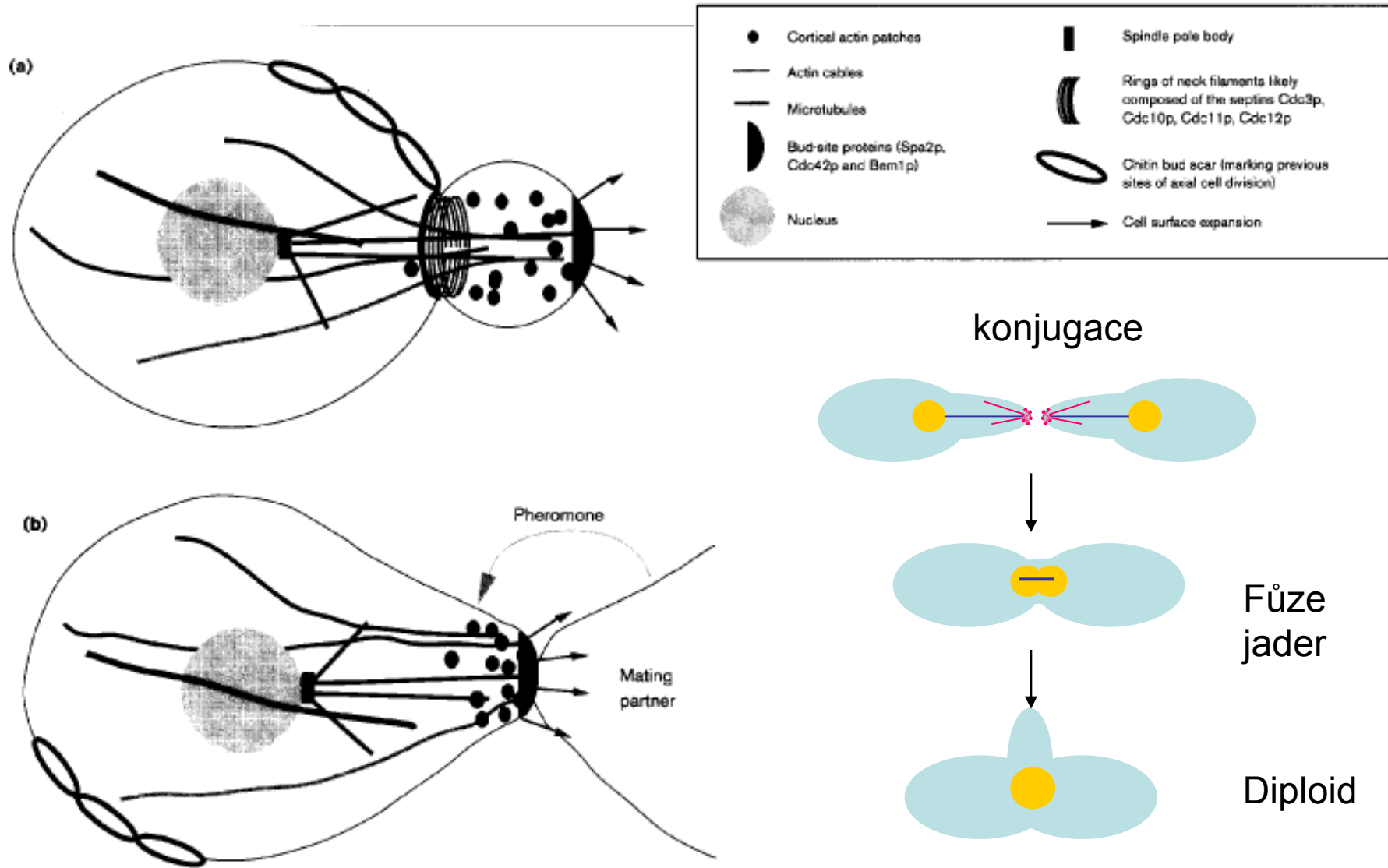


# Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



- 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

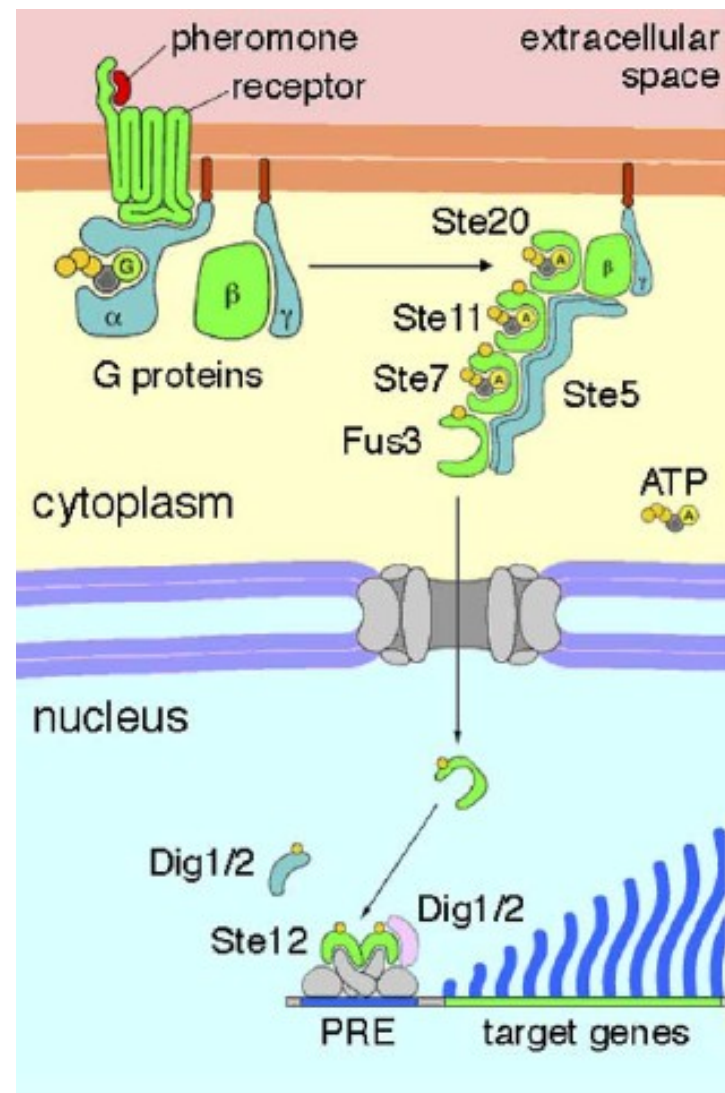
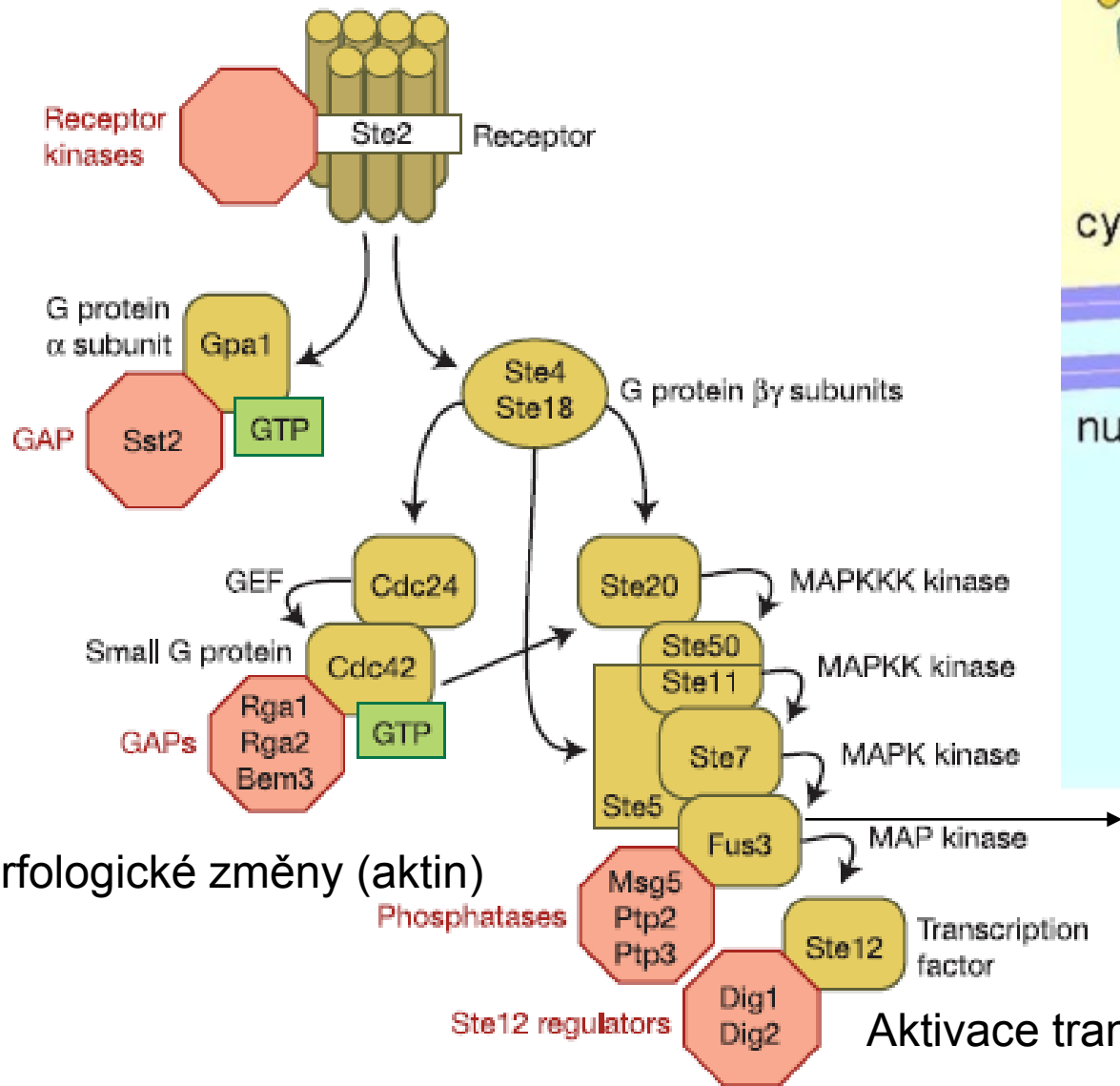
# Párování *S. cerevisiae*



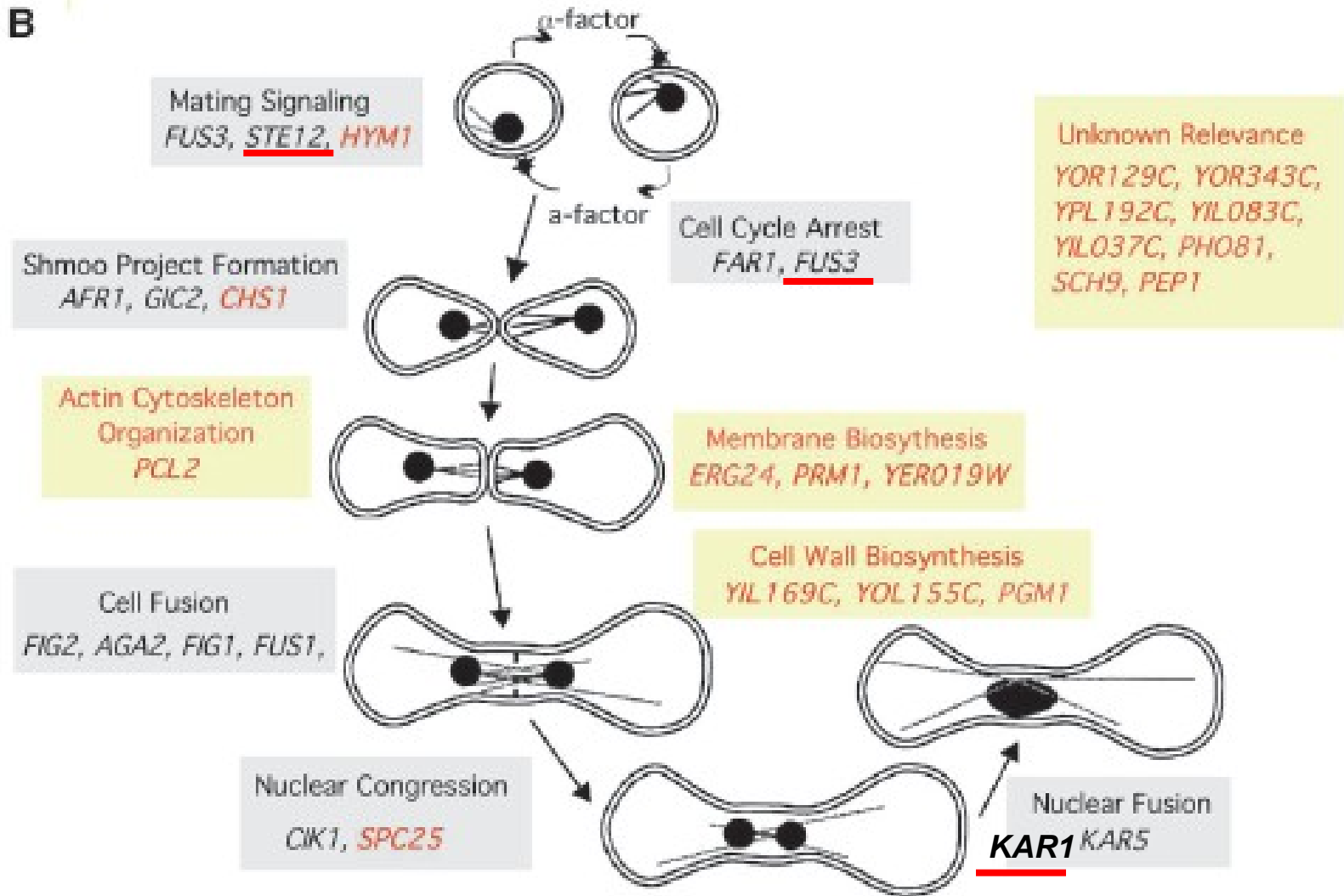
Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

Vybudování buněčné stěny přemostující „shmoo“ výběžky

# Signální dráha – $\alpha$ faktor



# Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu





# Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

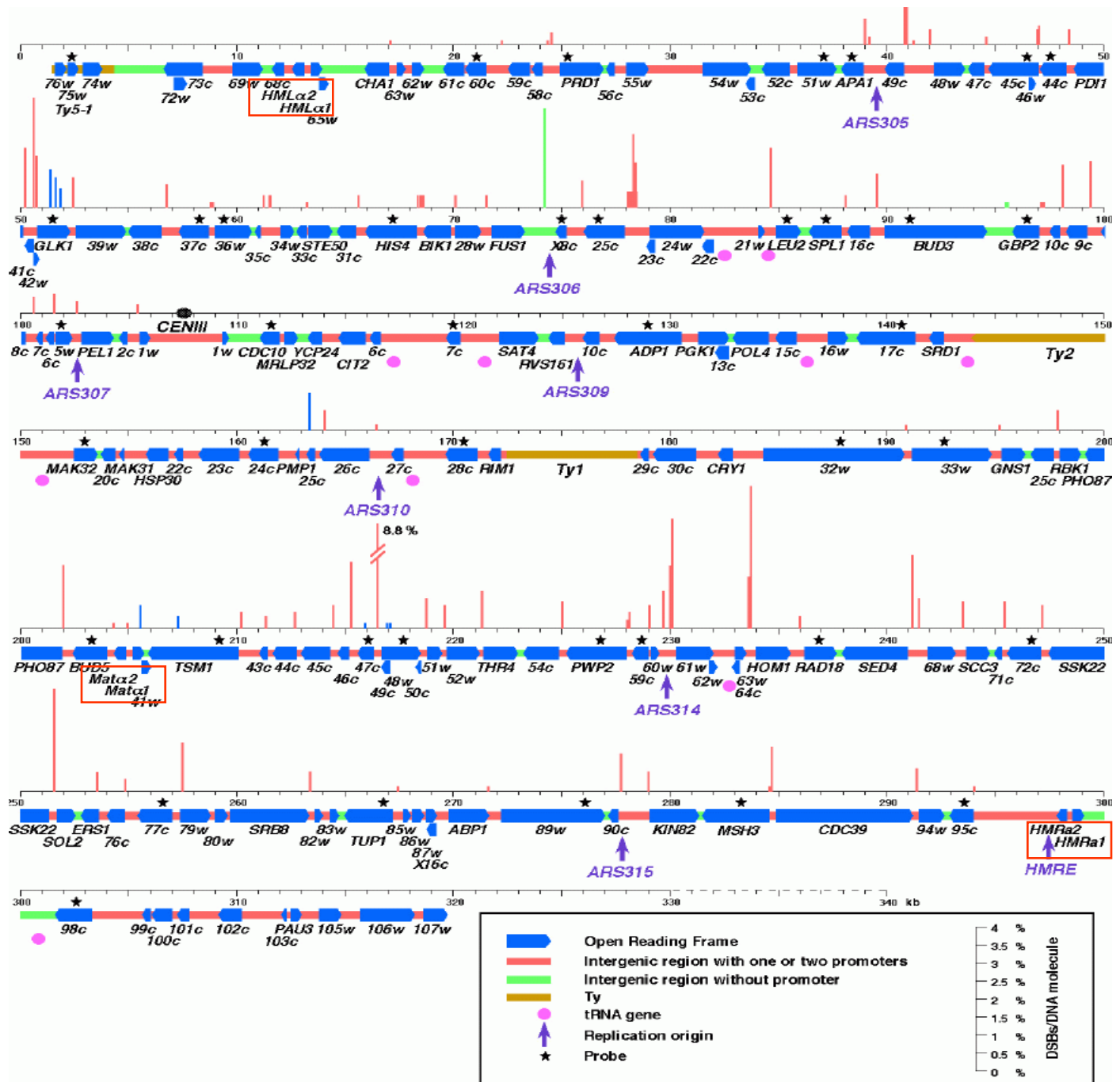
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT  $\alpha$  (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

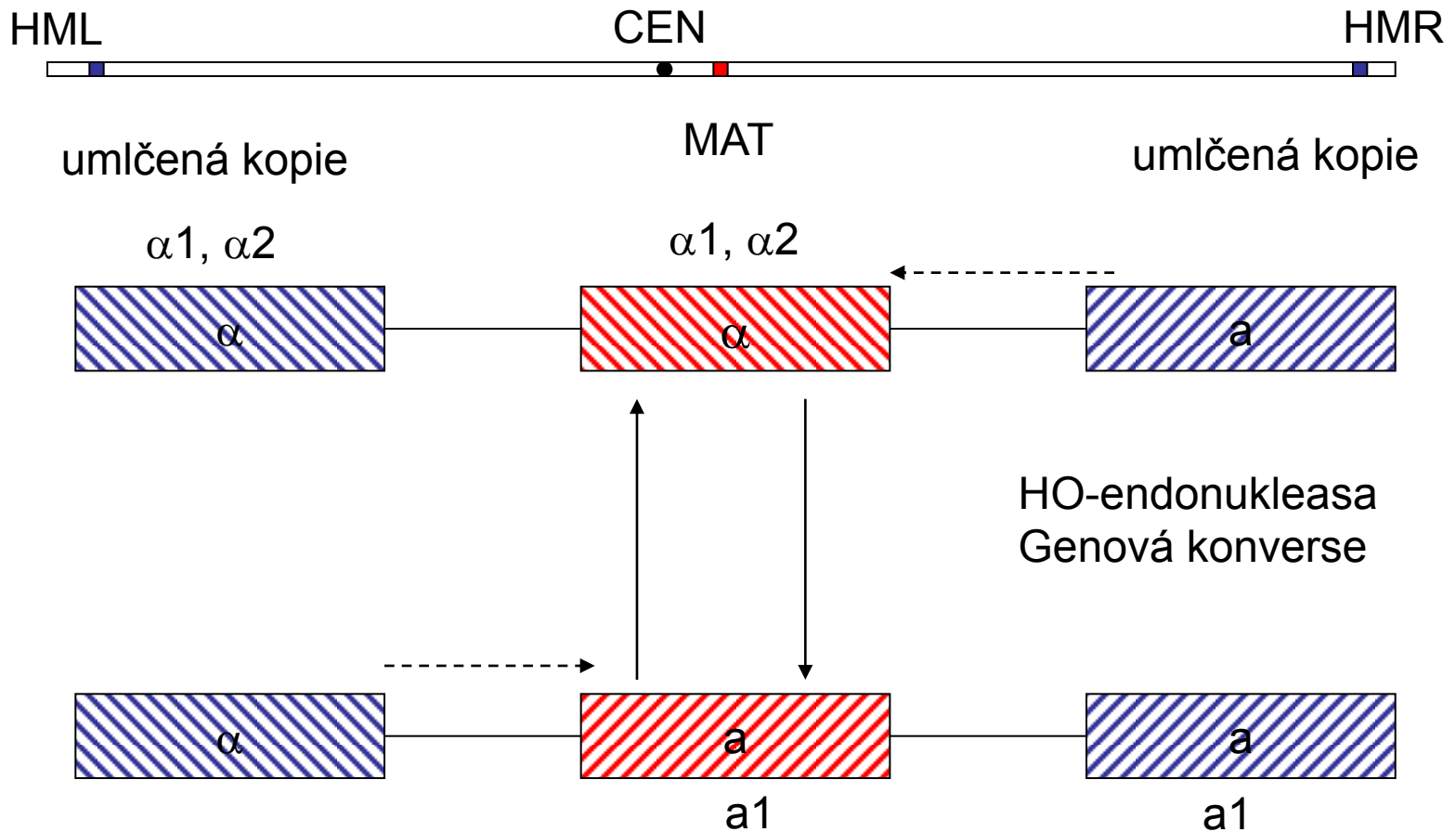
HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické – stabilní  
Homothalické – přepínají párovací typ



# Přepínání párovacího typu

Chromosom III



HO endonukleasa rozeznává a štípe specifické sekvence

Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

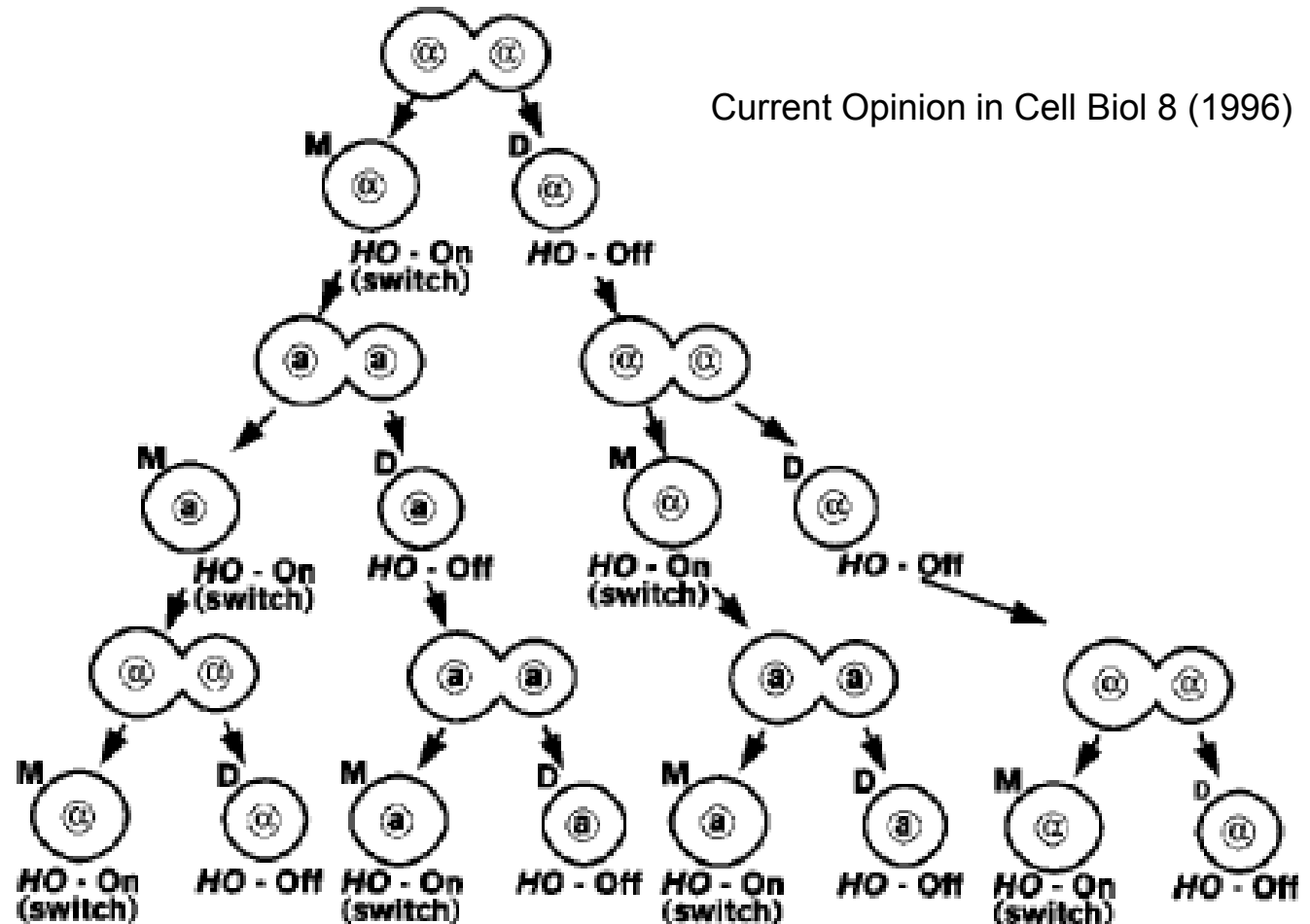
# Přepínání párovacího typu

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 uchováá původní typ)

Current Opinion in Cell Biol 8 (1996)

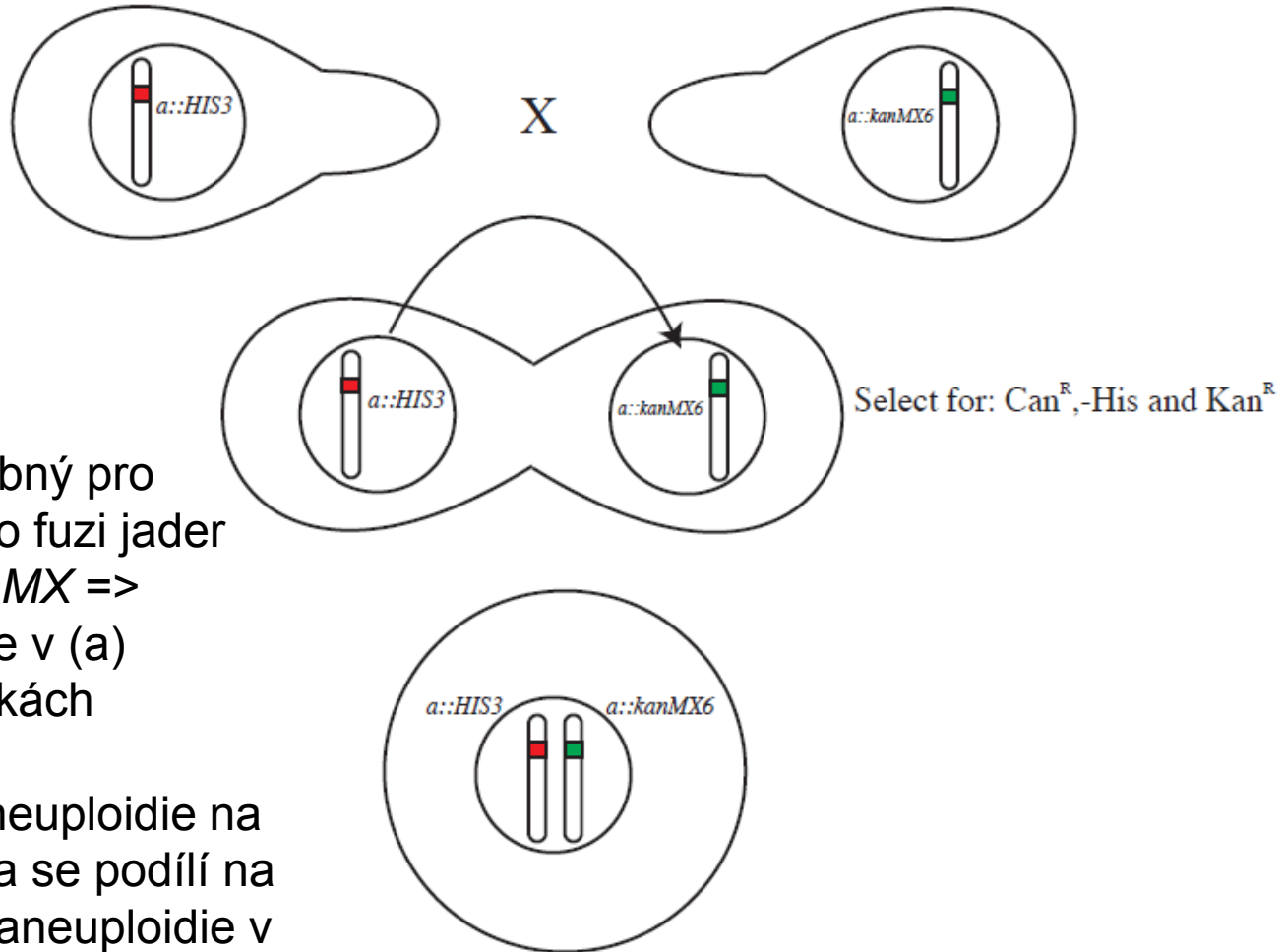
homothalické



# Příprava aneuploidních buněk

*MAT $\alpha$ , kar1 $\Delta$ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3*

*MAT $\alpha$ , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100*



*KAR1* gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader  
*a::HIS3* + *a::kanMX* => rezistence pouze v (a) haploidních buňkách

Studium vlivu aneuploidie na buňku (u člověka se podílí na kancerogenezi, aneuploidie v 90% lidských nádorů)

# Rozvrh přednášek

19.9.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
26.9.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
3.10.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Mgr. J. Kopecka	Kvasinky a biotechnologie
10.10.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Genetické a molekulárně biologické metody
17.10.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
24.10.2013	10-11.50hod	A7-2.14	prof. M. Kopecká	O podstatě buněčných stěn kvasinek
31.10.2013	11-12hod	A2-2.11	Dr. Převorovský	Od transkripčních faktorů ke zkráceným chromozomům
7.11.2013	10-11.50hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Sekreční dráhy a endocytóza, protoplasty kvasinek jako modelový objekt
14.11.2013	10-11.50hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
21.11.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
28.11.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesár	Využití kvasinek pro studium procesů opravy DNA
5.12.2013	8-12hod	A7-2.14	prof. Svoboda+Doc.Paleček	Cvičení k přednášce
12.12.2013	10-11.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Organizace chromatinu ???
19.12.2013	9-11hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Zkouška