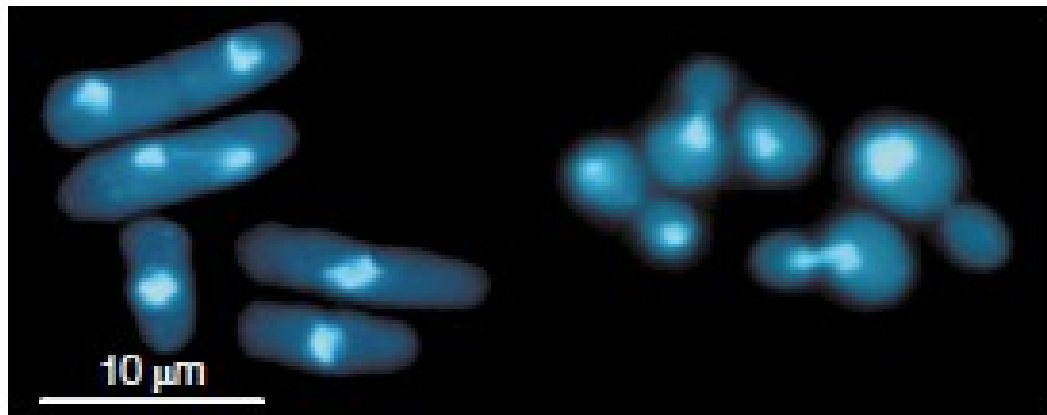


# Souhrn 4. přednášky

- Genetické metody
  - Plasmidy (kvasinkové elementy)
  - Integrace (plasmidy, PCR, kazety)
  - Teplotně-sensitivní mutanty (esenciálních genů)
  - Tetrádová analýza
  - Syntetická letalita, epistase, suprese

**sec**  
mutanty



Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy, proteinové komplexy, evoluce biologických systémů ... připravovány nové kmeny pro biotechnologie ... řešeny otázky týkající se zdraví člověka

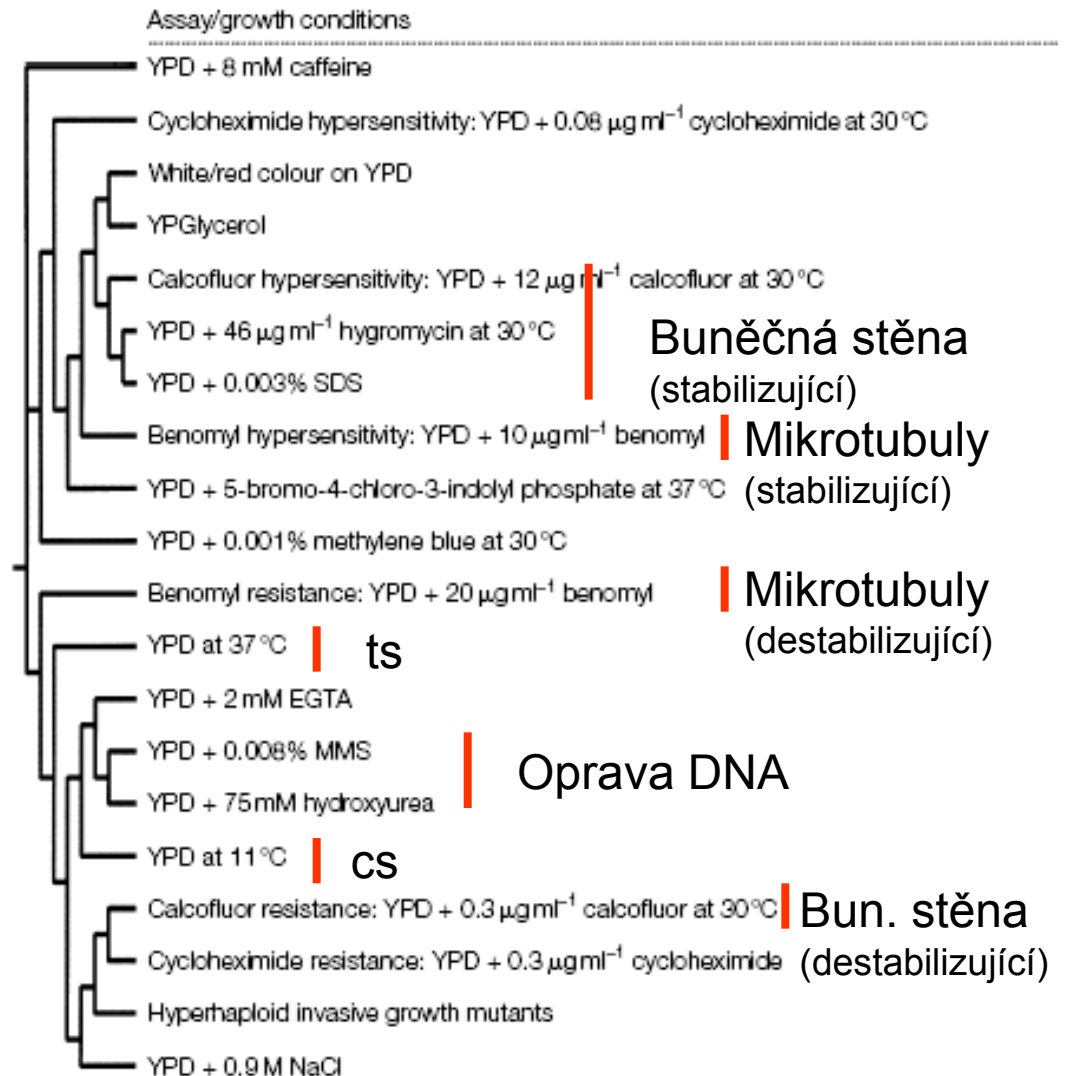
# Osnova 5. přednášky

- 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)

- mutace přímo v 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)

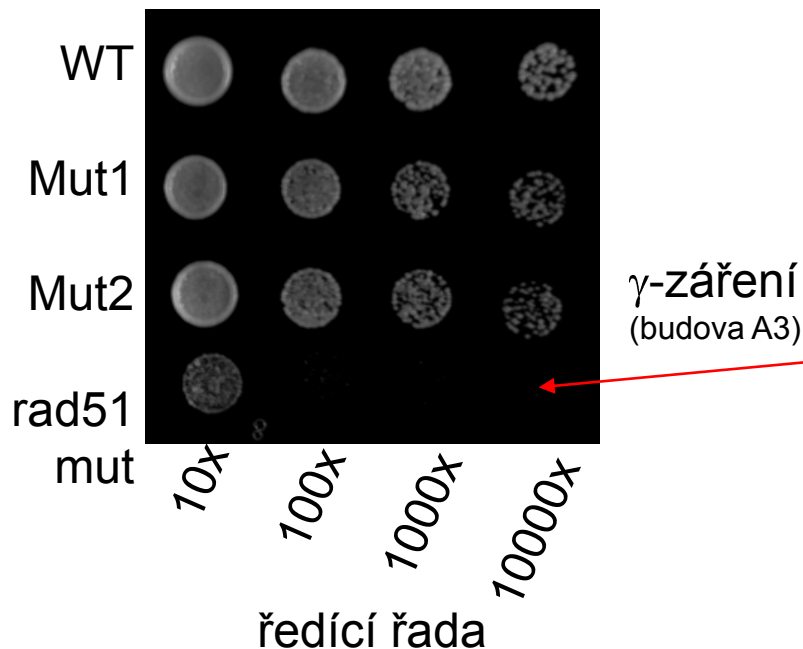


EuroFan projekt

- 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***, *mutanty*)
- ... buněčného cyklu (***CDC*** ...)

**sec**

,mutanty



$\gamma$ -záření  
(budova A3)



# 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>

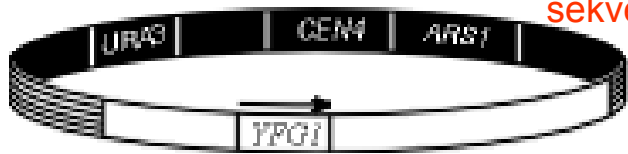


dnes - NGS

Kontrola závislosti na plasmidu na FOA plotnách

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

PCR genom sekvenace

*MATa yfg1* X

- MATa YFG*<sup>+</sup>
- MATa yfg1*
- MATa yfg2*
- MATa yfg3*
- etc.

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



Detection of Yfg<sup>-</sup>  
*sec, cdc, rad ...*



Yfg<sup>-</sup>

Počet mutací

## Complementation

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

## Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATα YFG*<sup>+</sup>



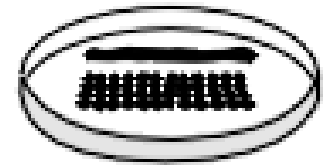
Isolate a diploid strain and Sporulate



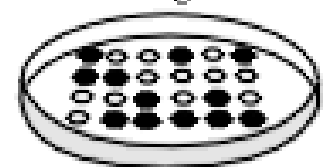
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

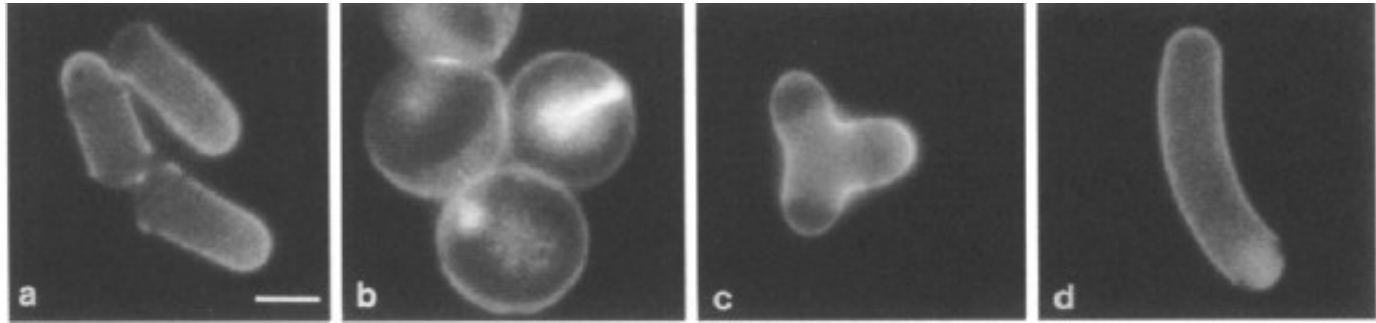


Score for Yfg<sup>+</sup> and Yfg<sup>-</sup>



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

- 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)

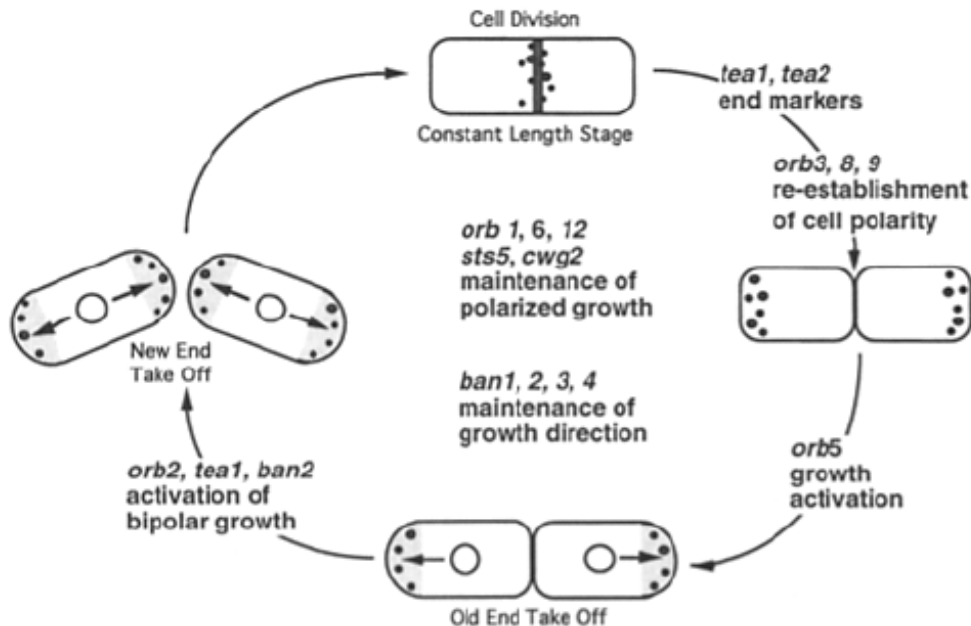


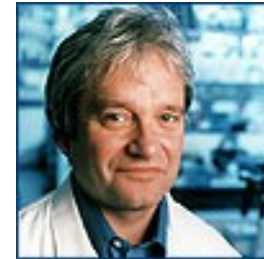
Table I. *orb* Genes

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<sup>+</sup>, pyp1<sup>+</sup></i>
<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<sup>+</sup>, pyp1<sup>+</sup>, ras1<sup>+</sup></i>

# Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

**Leland Hartwell** začal studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*. Podařilo se mu izolovat kvasinky, které měly mutovaný gen kontrolující buněčný cyklus (BC). V následujících letech identifikoval podobným způsobem více než 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

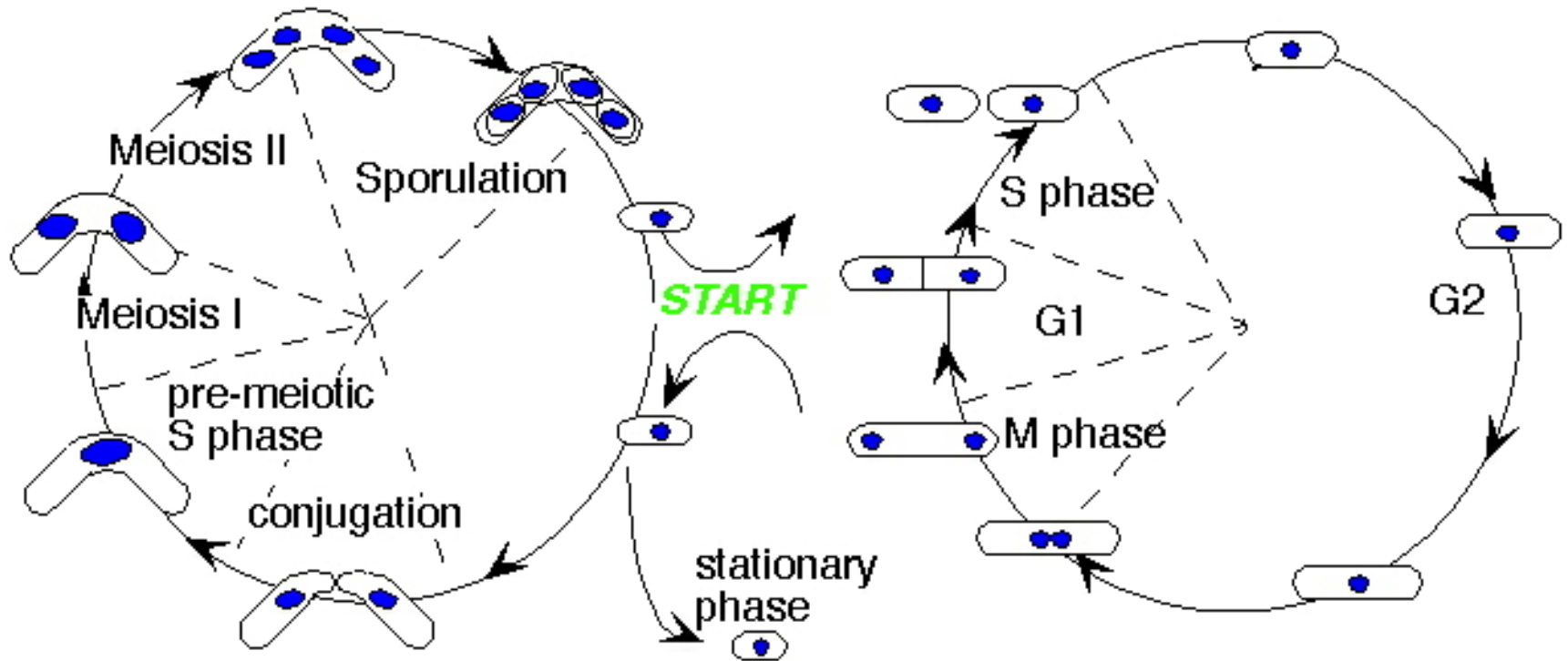
**Paul Nurse** studoval buněčný cyklus na *S. pombe*. V 70. letech objevil gen *cdc2*, který je zodpovědný za regulaci většiny fází BC. V roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



**Tim Hunt** na začátku 80. let objevil první cyklin – cykliny jsou proteiny, které jsou syntetizovány a odbourávány (ubikvitinace) 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)



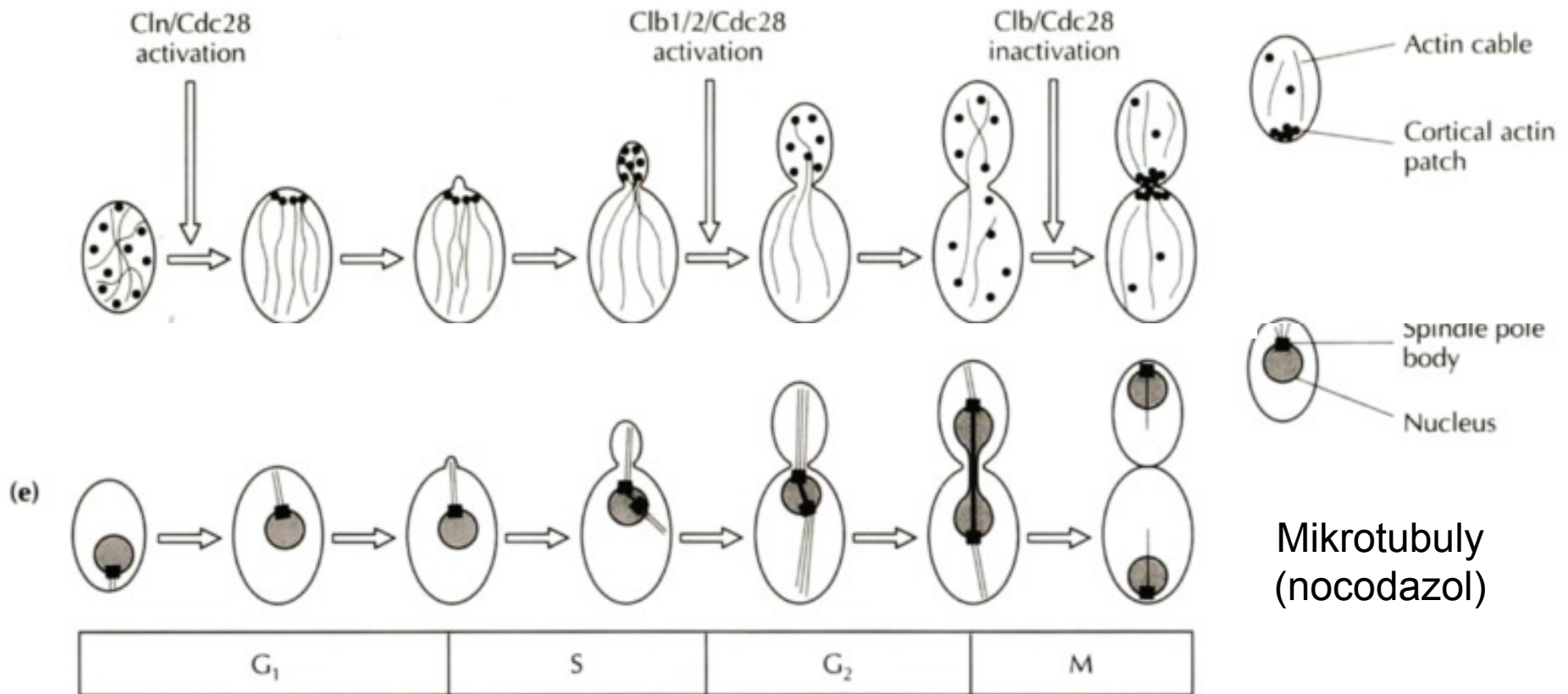
*Meiotic cycle*

*Vegetative (mitotic) cycle*

- nestálé diploidní buňky vstupují do meiosis hned po konjugaci (*ade6-M210xade6-M216*)
- pro konjugaci je kritická G1 fáze jako u *S. cerevisiae*



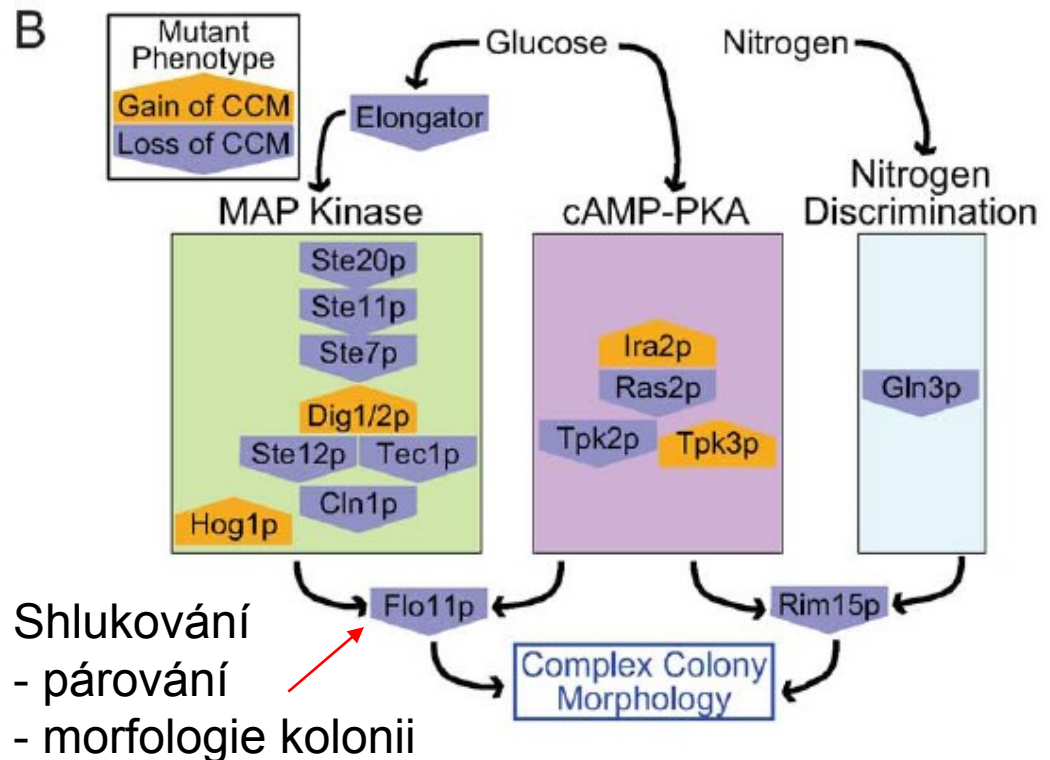
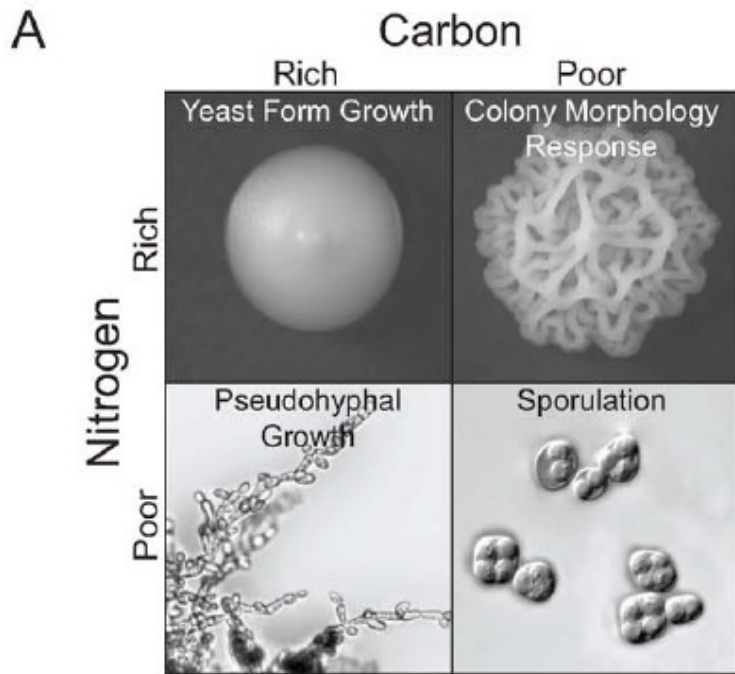
# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- 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) - mikrotubuly
- 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

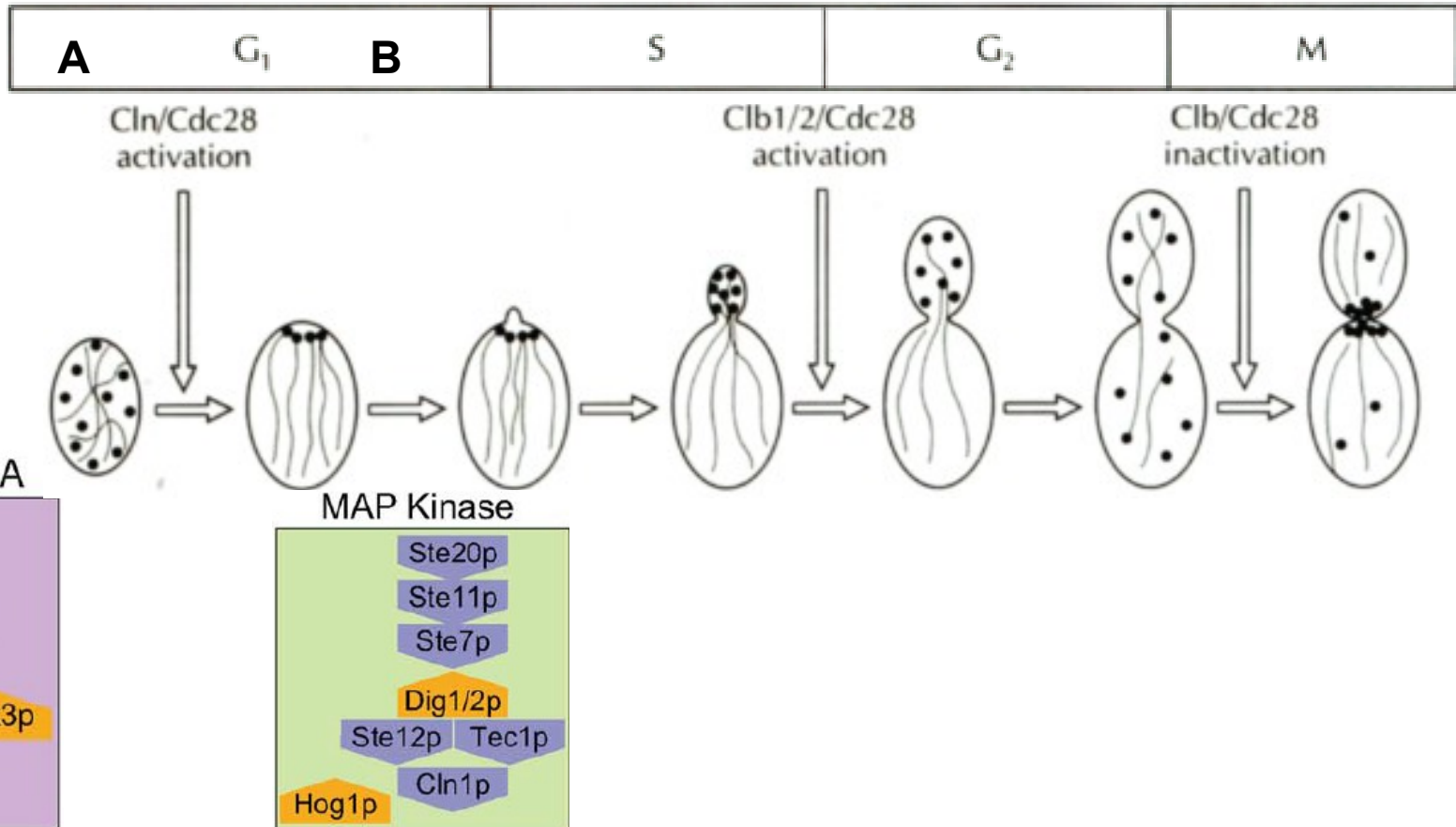
Klíčovým mezníkem BC u *S. cerevisiae* je START, kdy se rozhoduje o přechodu z G1 do S fáze:

- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
- 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 sporulaci
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují



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

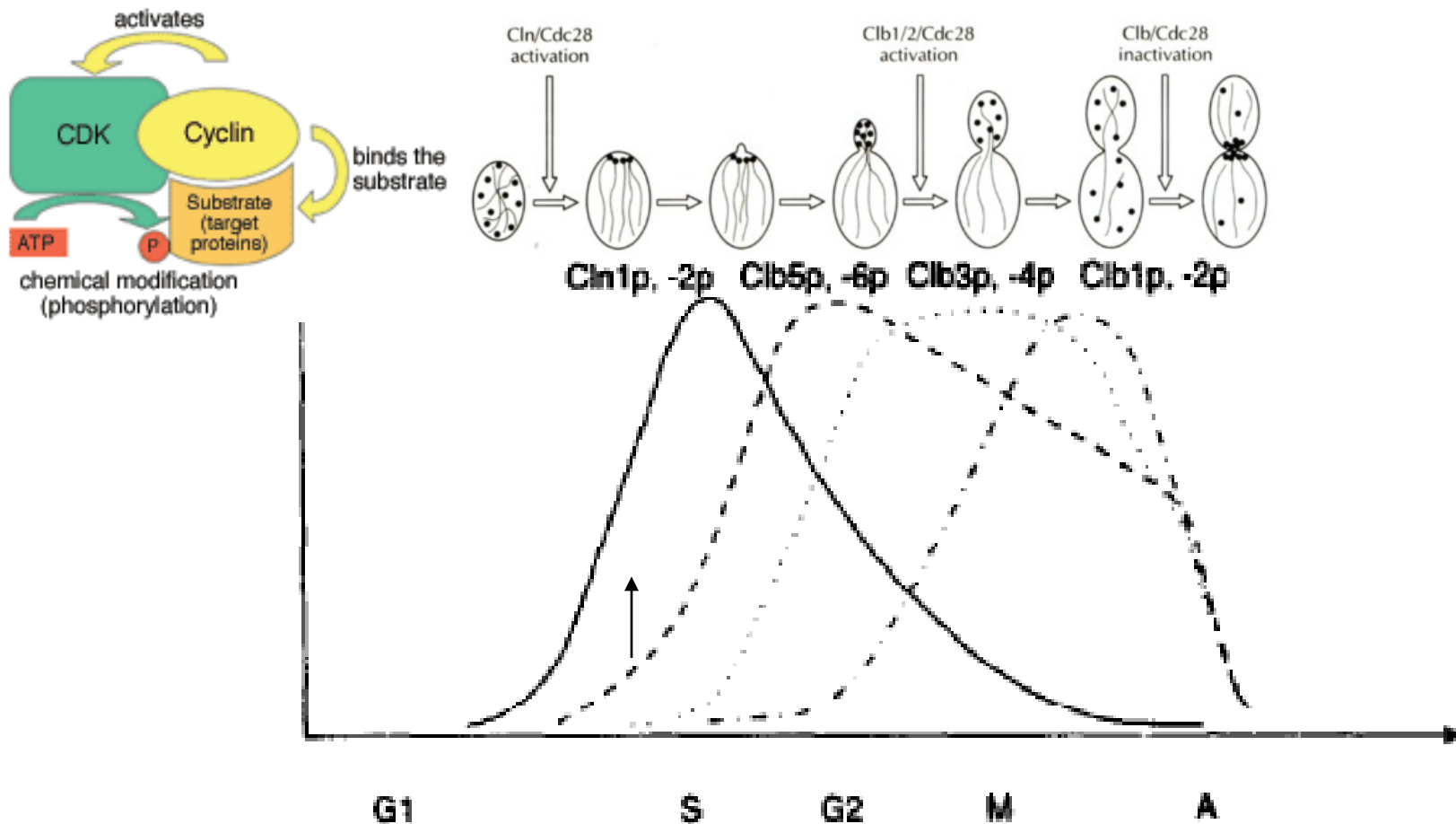
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



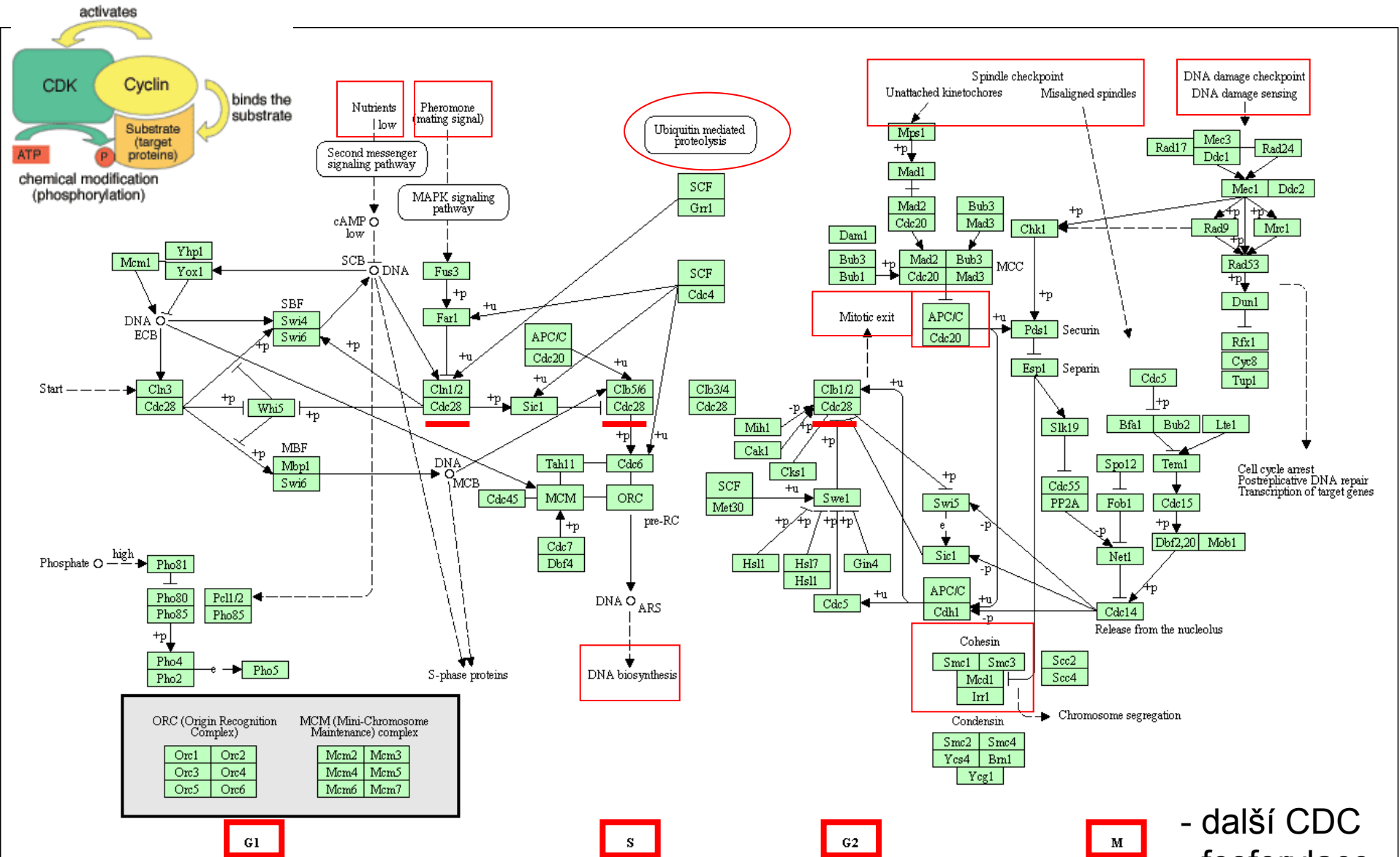
# CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká aktivní 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

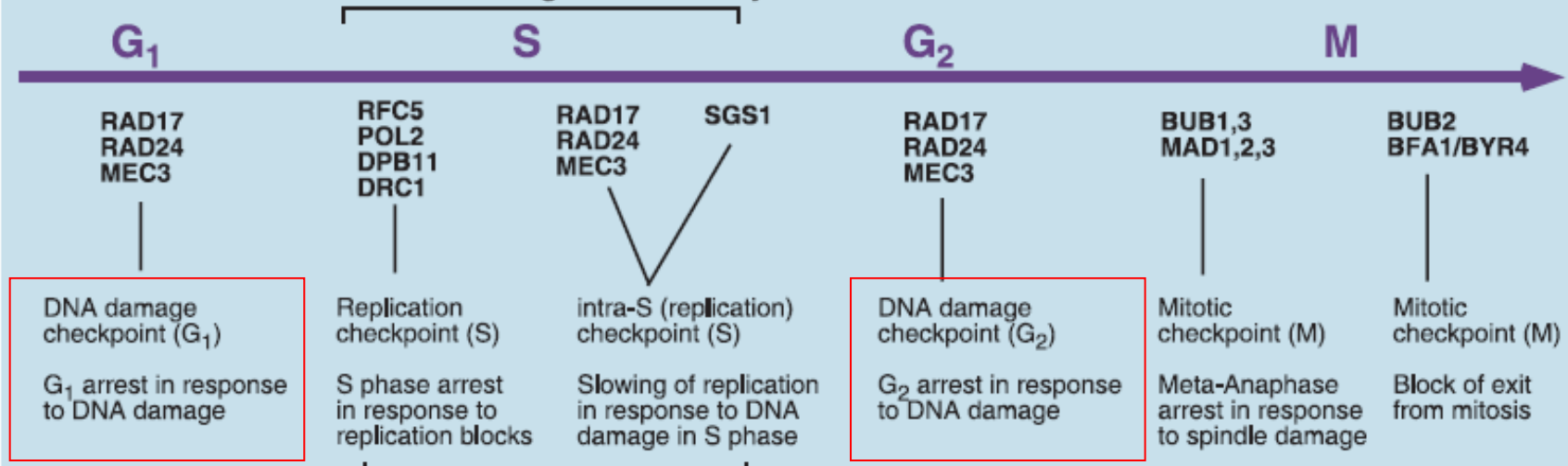


# Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



- další CDC  
- fosforylace  
- ubiquitylace

Maintenance of genome stability



DNA damage checkpoint (G<sub>1</sub>)  
G<sub>1</sub> arrest in response to DNA damage

DNA damage checkpoint (G<sub>2</sub>)  
G<sub>2</sub> arrest in response to DNA damage

Transducer and effector functions

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

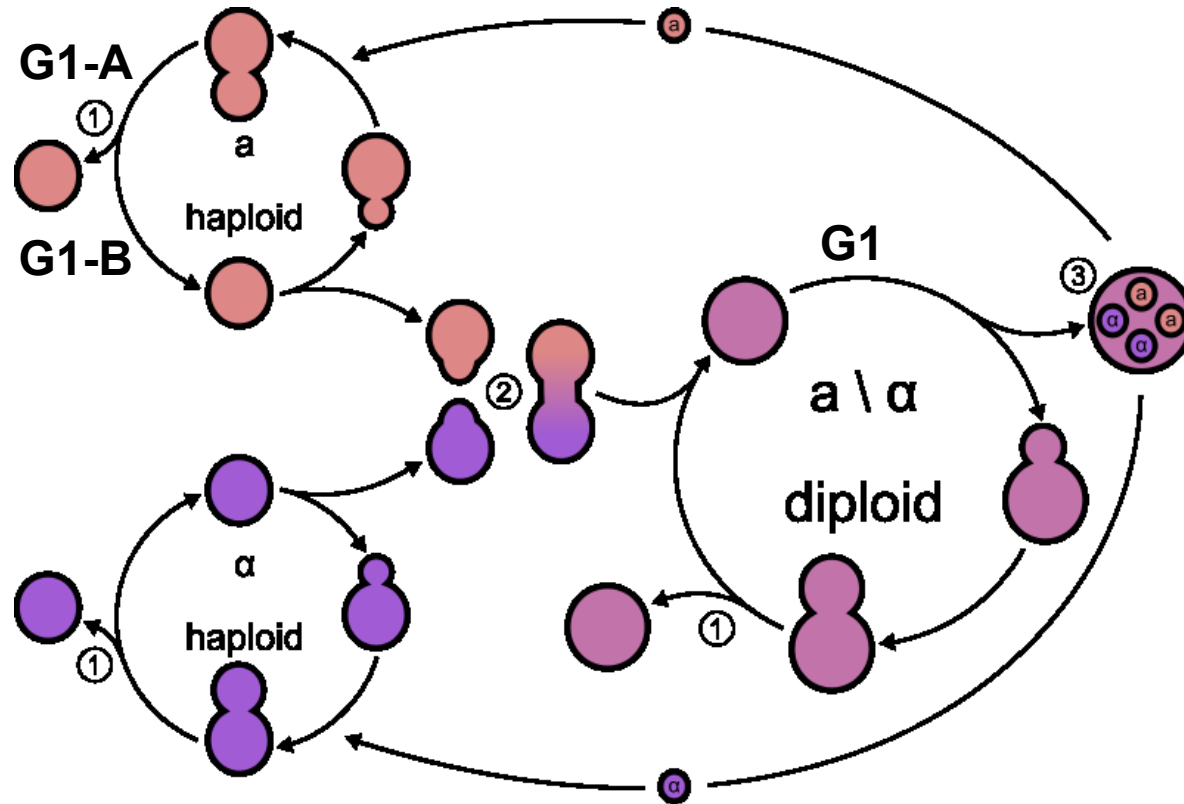
Human homologs		
Yeast	Human	Cancer syndrome
MEC1/TEL1	ATR/ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11	MRE11	Ataxia telangiectasia-like disorder
XRS2	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
RAD53/DUN1	hCHK2	Li-Fraumeni syndrome
SGS1	BLM/WRN/RTS	Bloom, Werner & Rothmund-Thomson syndromes

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)

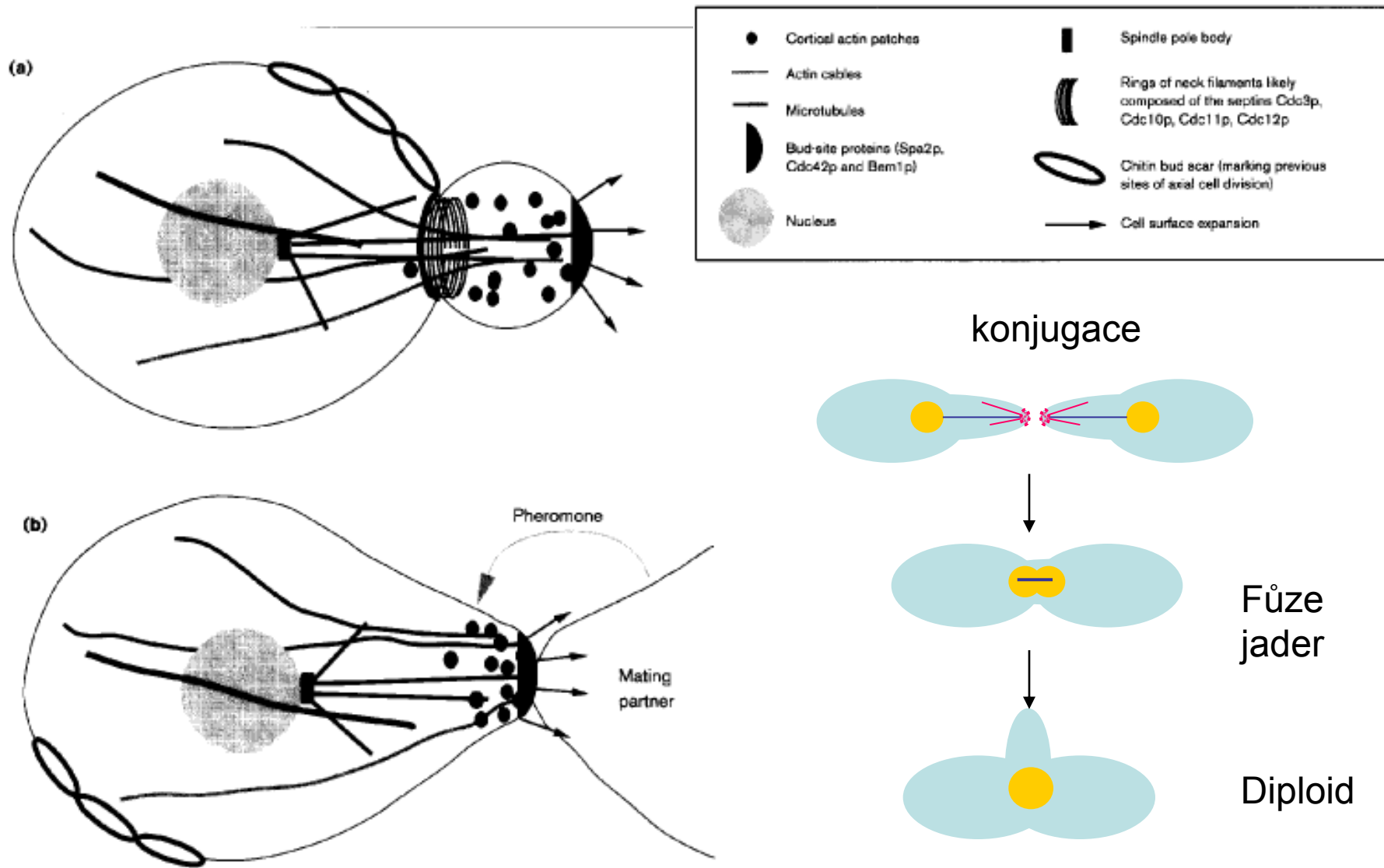
- Více v dalších přednáškách

# 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 (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

# Párování *S. cerevisiae*

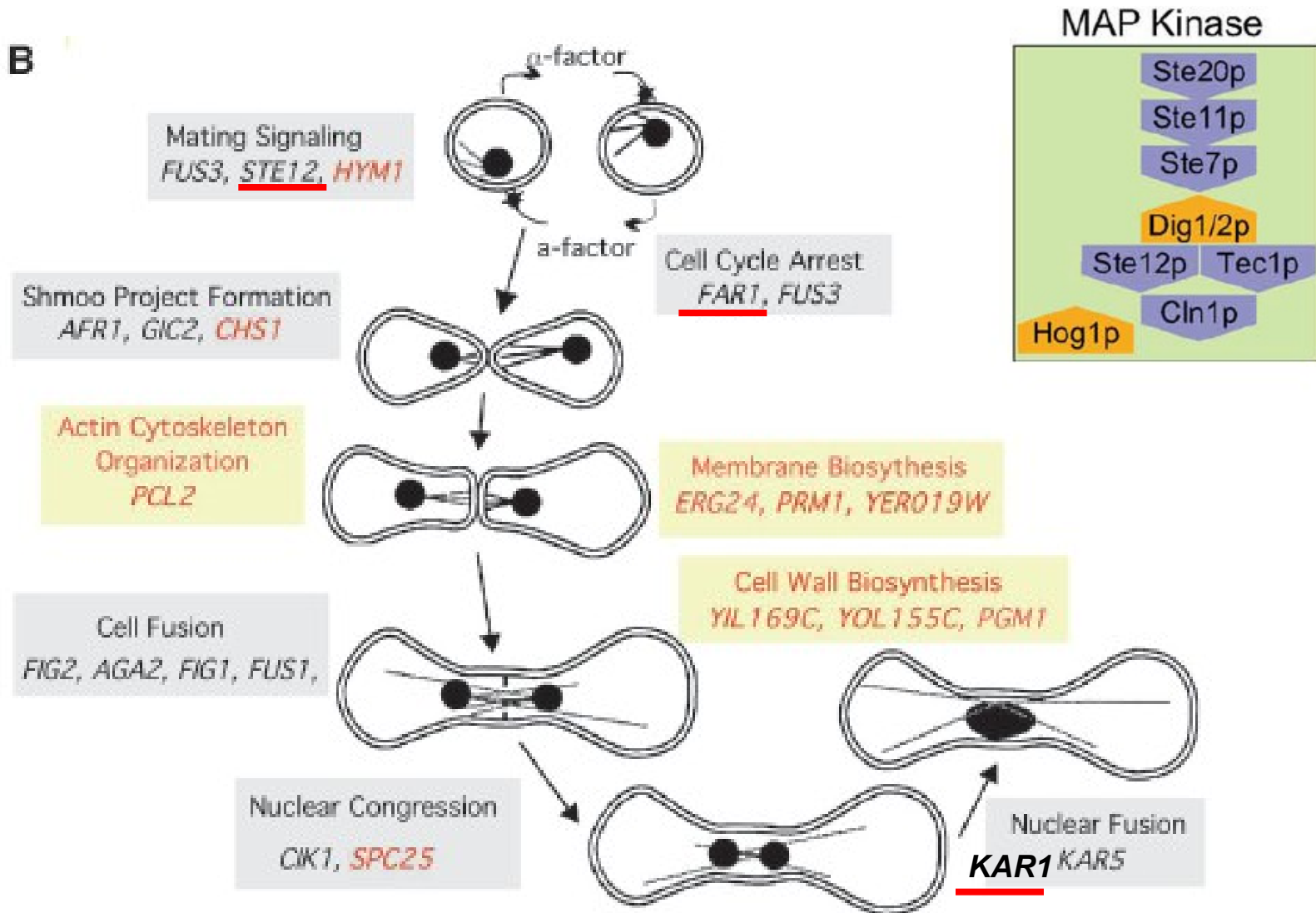


Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

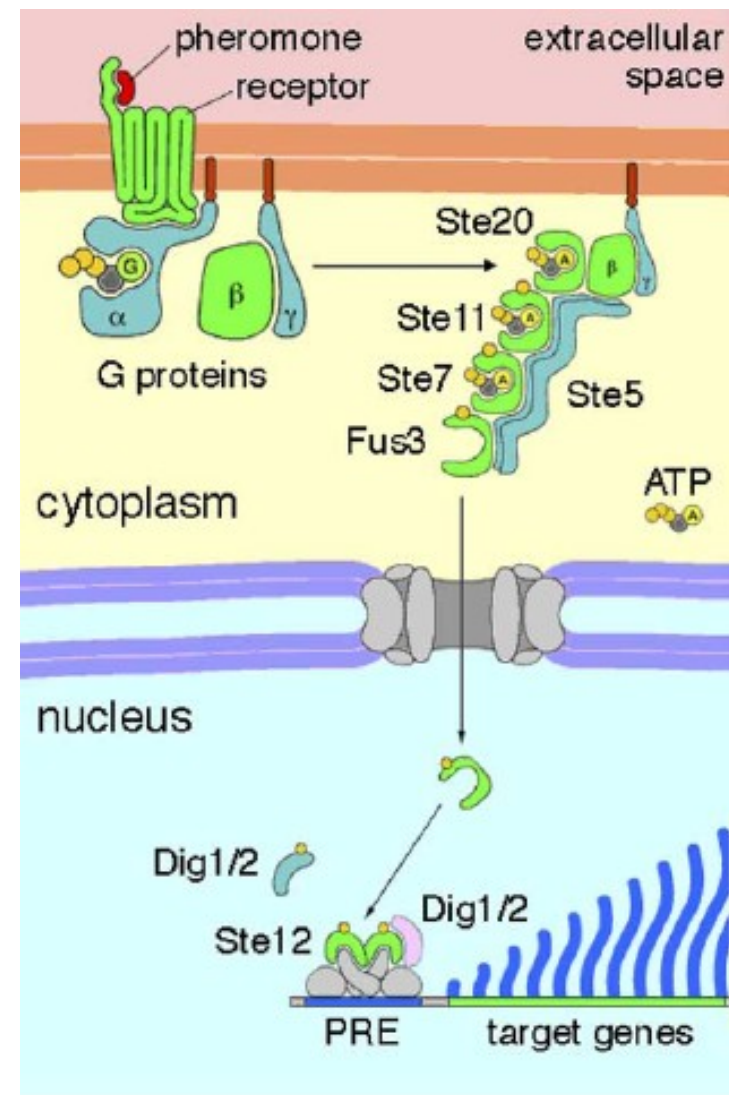
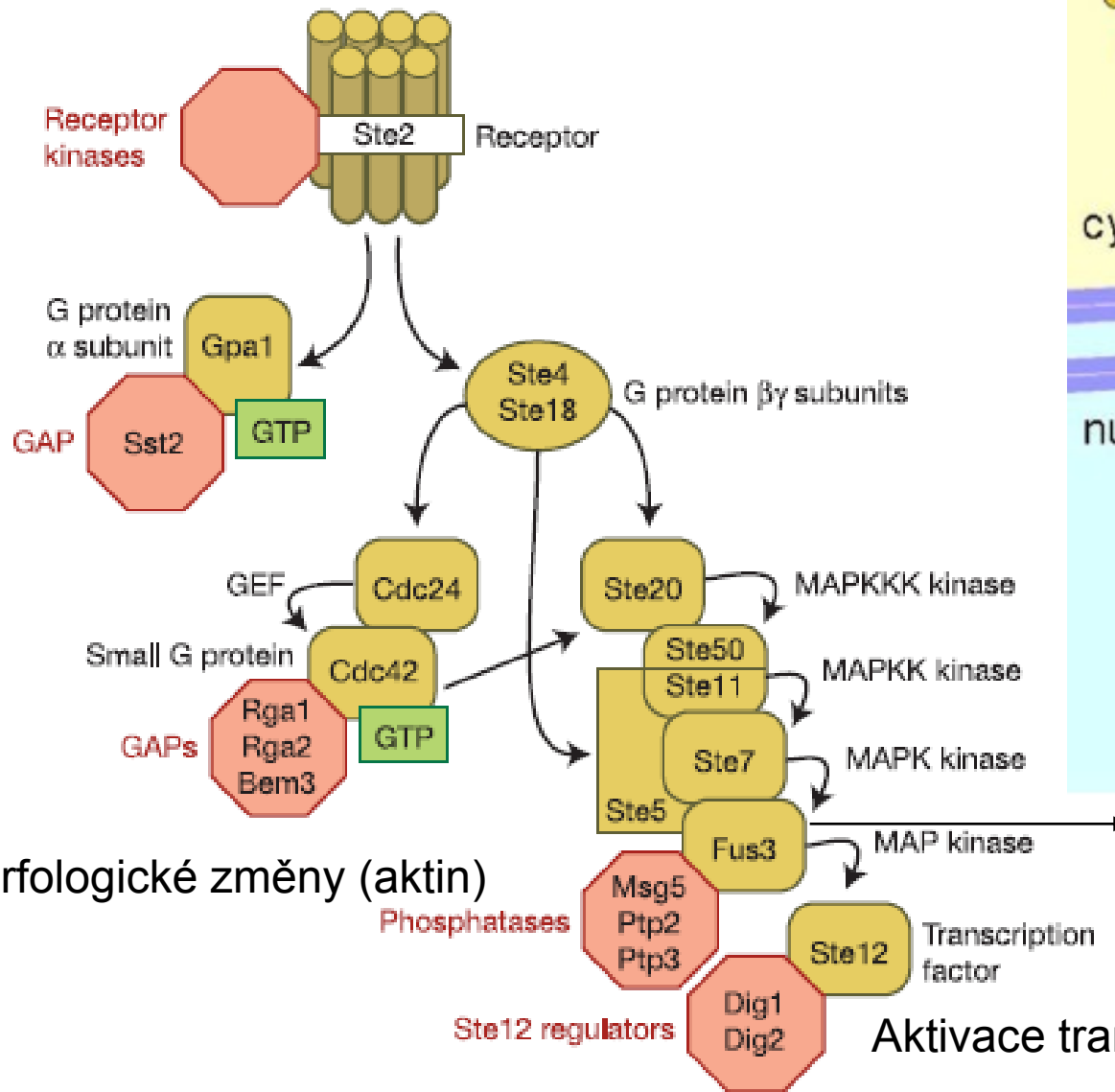
Vybudování buněčné stěny přemostující „shmoo“ výběžky



# Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu



# Signální dráha – $\alpha$ faktor



# ChIP on CHIP - Ste12p transkripční faktor (indukované geny)

**A**

Binding		Expression		Name	Binding			
before	after				before		after	
		$\alpha$ -0'	$\alpha$ -15'	$\alpha$ -30'	$\alpha$ -45'	$\alpha$ -60'	$\alpha$ -90'	$\alpha$ -120'
				Gal::Ste12				
				Ste12 $\Delta$				
				Ste12 $\Delta$ + $\alpha$				

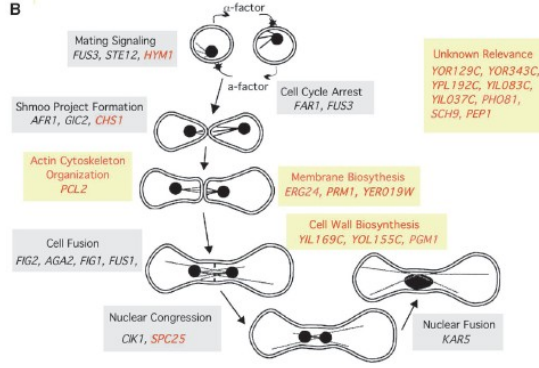
  

Name	ratio	<i>P</i> -value	ratio	<i>P</i> -value
PRM1	2.7	$1.3 \times 10^{-4}$	6.2	$4.5 \times 10^{-5}$
ERG24	2.7	$1.3 \times 10^{-4}$	6.2	$4.5 \times 10^{-5}$
PCL2	3.3	$4.2 \times 10^{-5}$	6.8	$5.8 \times 10^{-5}$
FIG2	2.6	$2.2 \times 10^{-4}$	5.6	$9.5 \times 10^{-5}$
STE12	4.1	$1.4 \times 10^{-6}$	4.1	$3.1 \times 10^{-4}$
FUS1	5.0	$2.8 \times 10^{-7}$	4.1	$5.6 \times 10^{-4}$
FUS3	3.3	$3.9 \times 10^{-5}$	5.4	$2.0 \times 10^{-3}$
PEP1	3.3	$3.9 \times 10^{-5}$	5.4	$2.0 \times 10^{-3}$
YOR129C	0.7	0.13	5.2	$1.0 \times 10^{-4}$
AFR1	1.0	0.86	5.1	$1.0 \times 10^{-4}$
GIC2	1.4	0.11	5.0	$1.2 \times 10^{-4}$
YOR343C	1.1	0.70	3.9	$4.1 \times 10^{-4}$
CHS1	0.9	0.66	4.1	$4.2 \times 10^{-4}$
SCH9	1.3	0.21	4.2	$4.5 \times 10^{-4}$
KAR5	1.2	0.37	3.8	$4.7 \times 10^{-4}$
YPL192C	0.9	0.35	3.6	$6.5 \times 10^{-4}$
YER019W	1.3	0.20	4.1	$6.6 \times 10^{-4}$
SPC25	1.3	0.20	4.1	$6.6 \times 10^{-4}$
YIL083C	1.0	0.67	3.6	$7.1 \times 10^{-4}$
PGM1	2.0	0.01	3.8	$7.2 \times 10^{-4}$
YIL037C	1.1	0.55	3.4	$8.2 \times 10^{-4}$
YIL169C	1.6	0.07	3.3	$1.2 \times 10^{-3}$
AGA1	1.4	0.11	3.1	$1.9 \times 10^{-3}$
YOL155C	1.0	0.73	3.0	$2.1 \times 10^{-3}$
CIK1	0.9	0.76	3.0	$2.2 \times 10^{-3}$
FAR1	1.3	0.22	3.0	$2.4 \times 10^{-3}$
PHO81	1.0	0.83	2.9	$2.7 \times 10^{-3}$
HYM1	1.4	0.18	2.7	$4.9 \times 10^{-3}$
FIG1	1.2	0.38	2.9	$5.0 \times 10^{-3}$

>5/1    3/1    <1/1    <1/5    1/2    1/1    2/1    >5/1

**B**



Unknown Relevance  
YOR129C, YOR343C,  
YPL192C, YIL083C,  
YIL037C, PHO81,  
SCH9, PEP1

Description

- Pheromone-regulated membrane protein
- C-14 sterol reductase (adjacent to *PRM1*)
- Cyclin partly in association with Pho85p
- Protein involved in mating induction
- Transcription factor required for mating
- Protein required for cell fusion during mating
- MAPK mediating mating pheromone signaling
- Receptor for vacuolar sorting (adjacent to *FUS3*)
- Protein of unknown function
- Protein involved in morphogenesis of the mating projection
- Putative effector of Cdc42p, important for bud emergence
- Protein of unknown function
- Chitin synthase I, functions during cell separation
- Serine/threonine protein kinase that is activated by cAMP
- Membrane protein required for homotypic nuclear fusion
- Protein of unknown function
- Moderately similar to mammalian neutral sphingomyelinases
- Protein of the spindle pole body
- Protein of unknown function
- Phosphoglucomutase
- Protein of unknown function
- Protein of unknown function
- a-Agglutinin anchor subunit
- Similar to *S. cerevisiae* glucan 1,4- $\alpha$ -glucosidase
- involved in spindle formation and karyogamy
- Involved in cell cycle arrest for mating
- CDK inhibitor for Pho80p-Pho85p complex
- Protein with similarity to *Aspergillus nidulans* hymA
- Protein required for efficient mating

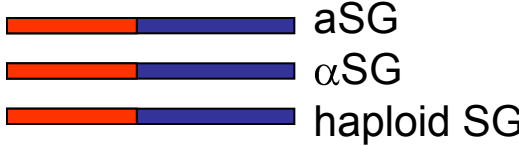
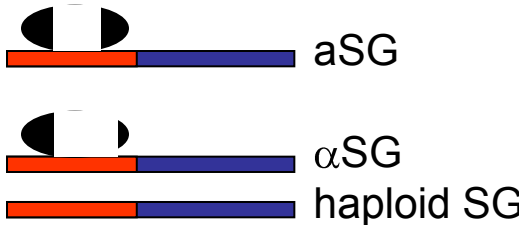
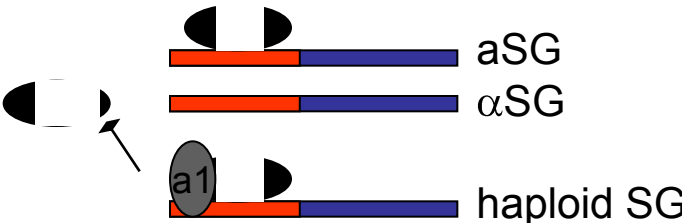
# Regulace transkripce v haploidních buňkách (konstitutivní)

a1, a2 +  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 - transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

a-spec.= *MFA1,2* (a-feromon), *STE2* ( $\alpha$ -receptor), *STE6*, 14 (úprava a sekrece feromonu)

$\alpha$ -spec.= *MF $\alpha$ 1,2* ( $\alpha$ -feromon), *STE3* (a-receptor), *STE13*, *KEX2* (proteasy)

haploid spec.= *STE4,18* (podjednotky G-proteinu), *RME1* (inhibitor meiosis)

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

# Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

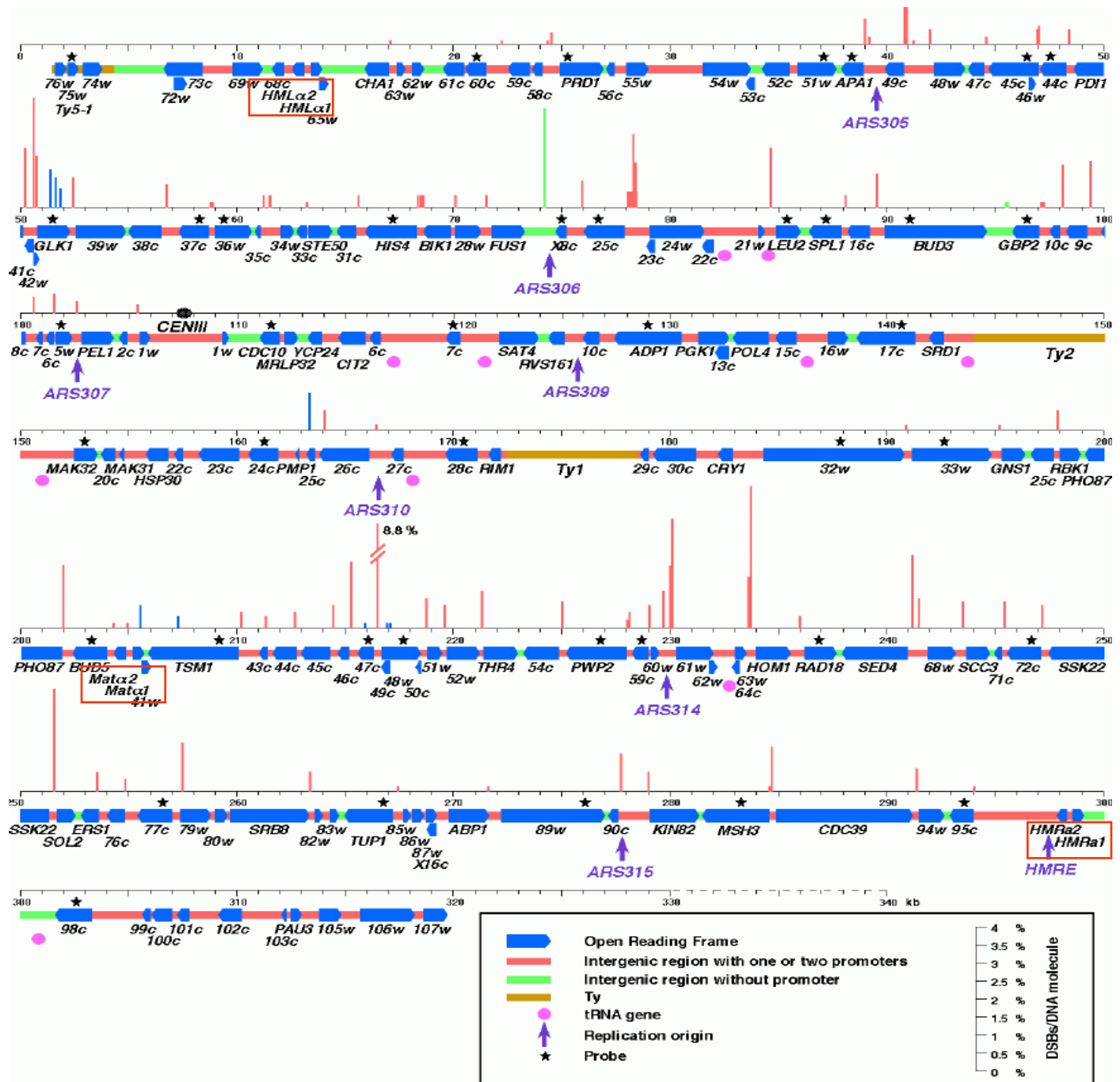
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT  $\alpha$  (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

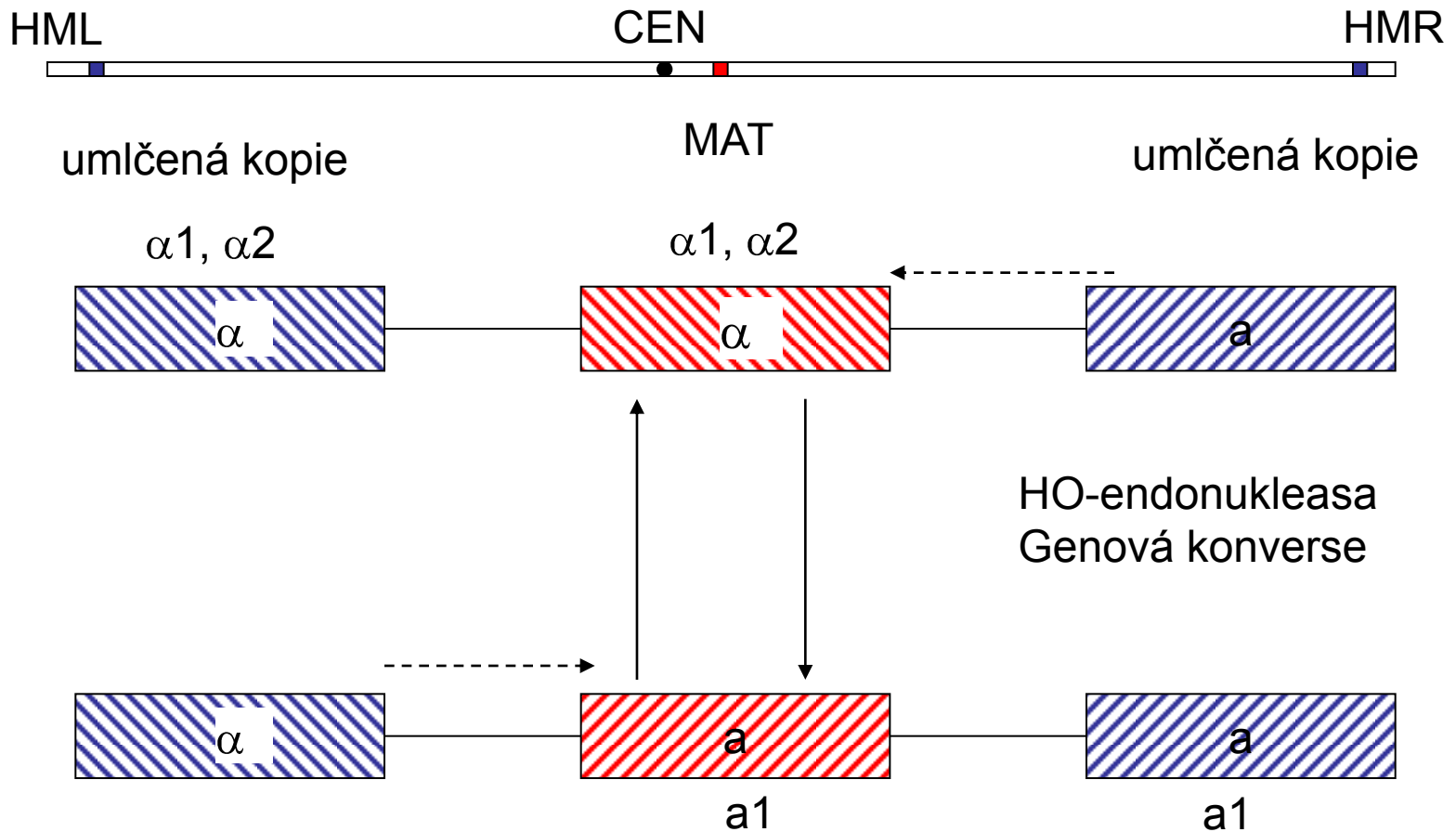
HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

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

