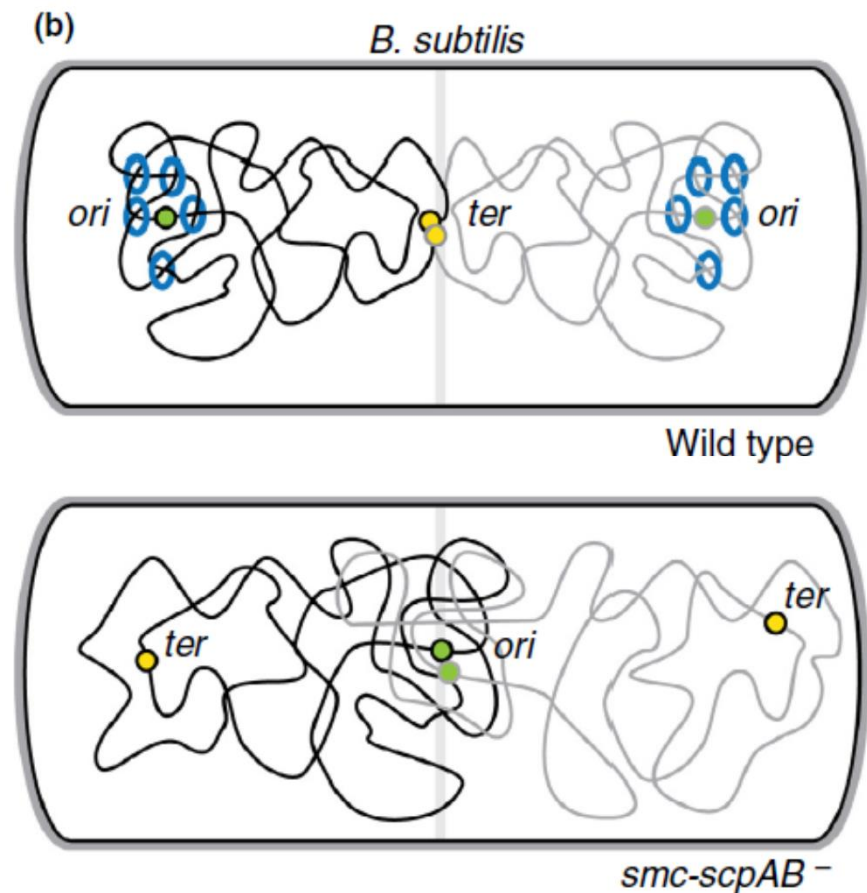
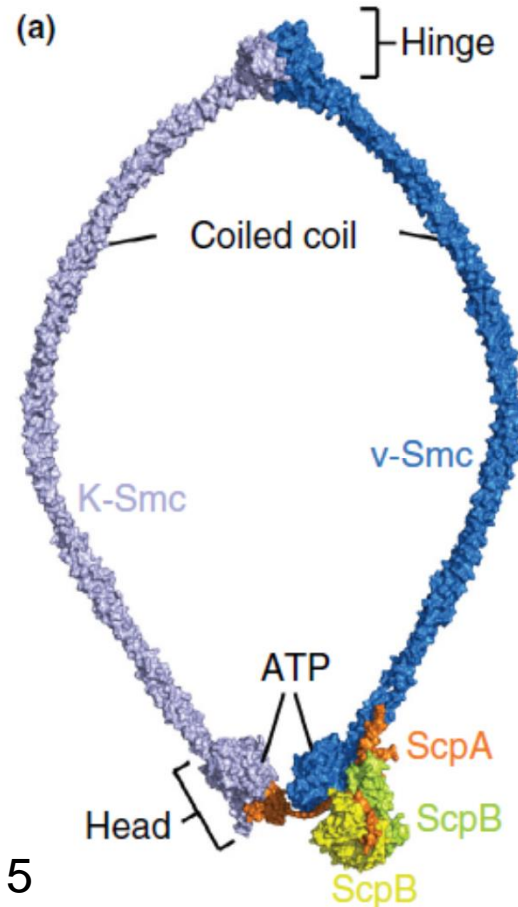


SMC condensin: How to organize bacterial chromosomes for segregation?+

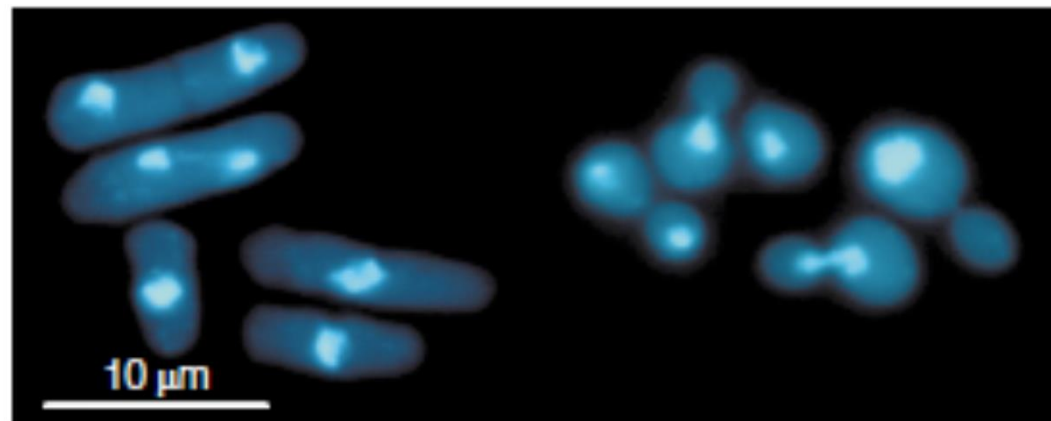
Stephan Gruber (Max Planck, Germany)
10.11. od 16.00 (A29, 252)



Souhrn 4. přednášky

Genetické metody

- . Plasmidy (kvasinkové elementy)
- . Integrace (plasmidy, PCR, kazety)
- . Teplotn -sensitivní mutanty (esenciálních gen)
- . Tetrádová analýza
- . Syntetická letalita, epistase, suprese



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

Osnova 5. přednášky

“ Genetické metody

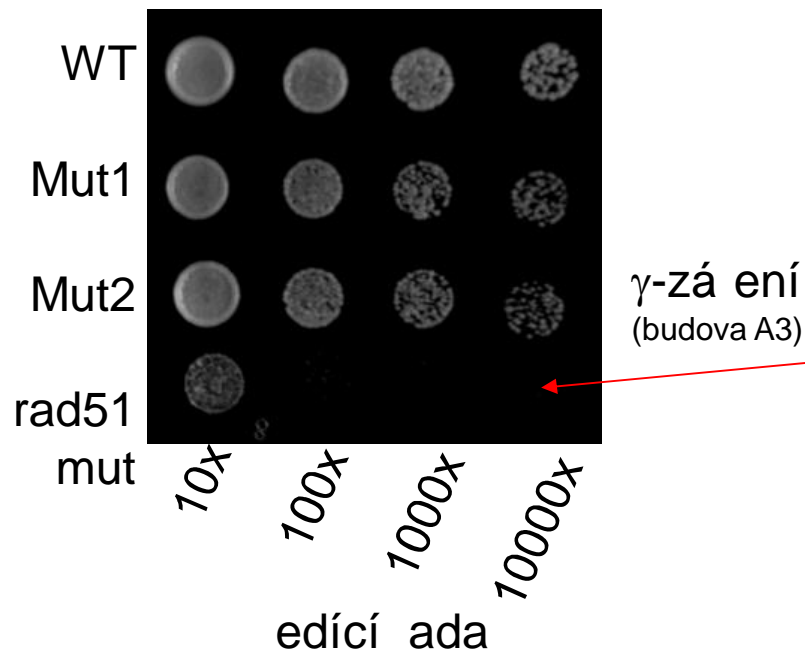
- . mutagenéze/screening
- . komplementace
- . identifikace

“ Buněčný cyklus

- . Průběh a regulace BC
- . Synchronizace buněk
- . mechanismy regulace párování
- . Homothalické kmeny

- “ Studium metabolických drah (*URA, GAL* ÷)
- “ ÷ flokulace, aglutinace (*FLO, AGA* ÷)
- “ ÷ **sekrece**, endocytózy, morfogeneze (*SEC, END* ÷ *ORB*)
- “ ÷ mechanismu párování (*STE* ÷)
- “ ÷ vlivu záření na buňky ÷ *rad* mutanty (nap. *RAD21*, *RAD50*, ***RAD51***)
- “ ÷ buněčného cyklu (***CDC*** ÷)

sec
mutanty



- “ 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*** ÷)

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

Izolace mutant

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

dnes - NGS

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



Detection of *Yfg*⁻ *ura*, *ade*, *rad* *õ*



Yfg⁻

Po et mutací

Complementation

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

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

PCR genom sekvenace

K íování . ovění - jedna mutace, meioticky defekt - rozdělení do komplementárních skupin (allelická kompl

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATa YFG*⁺



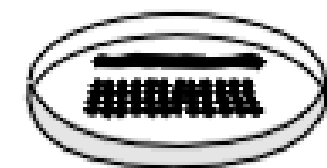
Isolate a diploid strain and Sporulate



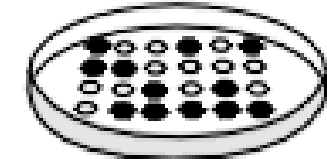
Digest ascus walls



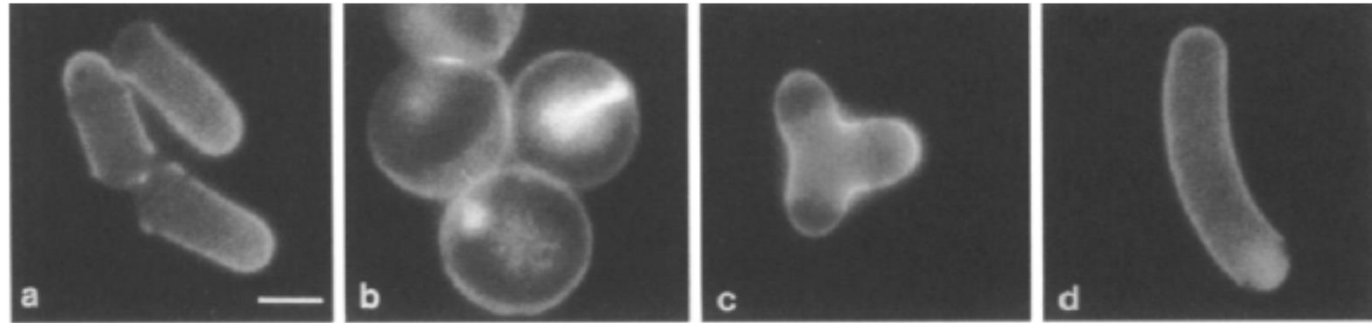
Dissect 4 spores of each tetrad



Score for *Yfg*⁺ and *Yfg*⁻



- mutagenese *S. pombe* . hledání ts mutant (55 000 kolonii) s defektní morfologií .
 nazli 64 kmen (3 druhy defektu: 51 kulatých=*orb*, 8 tip elongation aberrant=*tea*, 5
 banana=*ban*)



- z 51 *orb* mutant k í0ených s WT segregovalo 43 v pom ru 2:2 tj. jeden gen (8
 sterilních), linkage analysis%mezi mutantami ukázala 12 *orb* gen (skupin . *Tab.1*)
 ... aktinový cytoskelet (polarizovaný r stu)

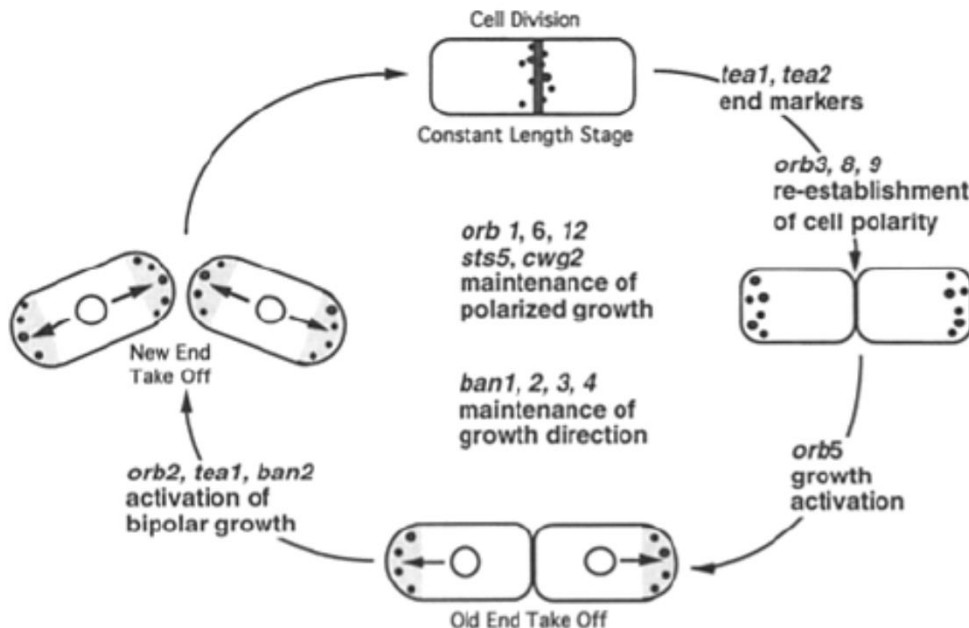


Table I. *orb* Genes

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> ^h	<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> ^h	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1</i> ⁺ , <i>pyp1</i> ⁺ , <i>ras1</i> ⁺

Nobelova cena za výzkum buněného cyklu v roce 2001

Leland Hartwell začal studovat buněný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*. Podarilo se mu izolovat kvasinky, které mají mutovaný gen kontrolující buněný cyklus (BC). V následujících letech identifikoval podobným způsobem více než 100 genů kontrolujících buněný 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.

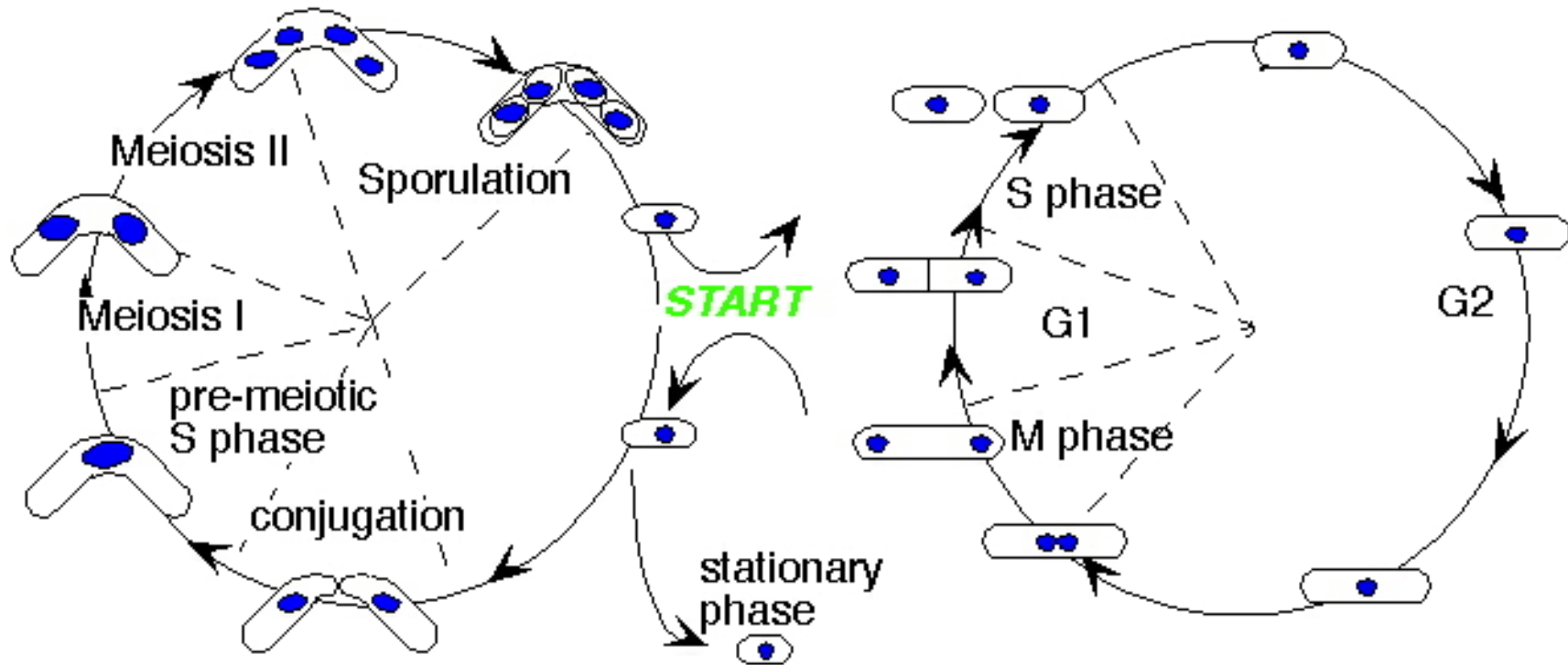
Paul Nurse studoval buněný cyklus na *S. pombe*. V 70. letech objevil gen *cdc2*, který je zodpovědný za regulaci v určité fázi BC. V roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



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

Buněný 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)

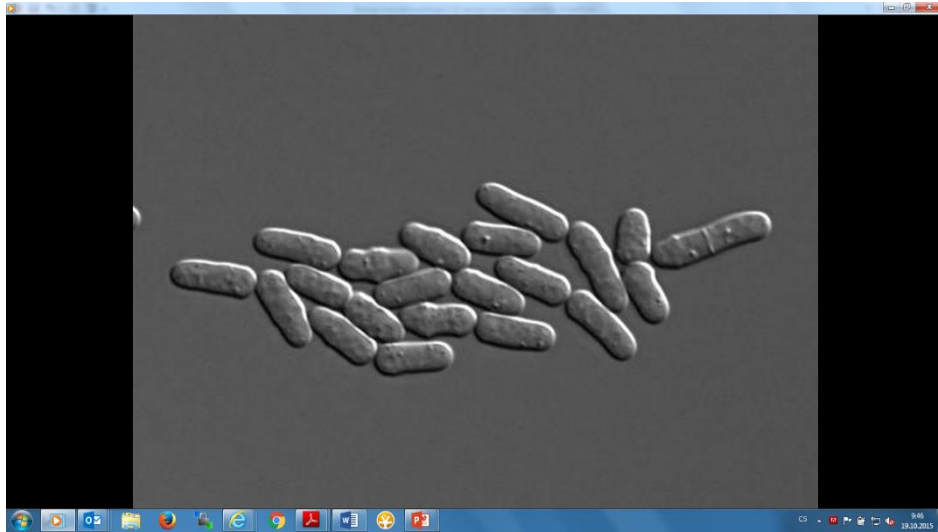


Meiotic cycle

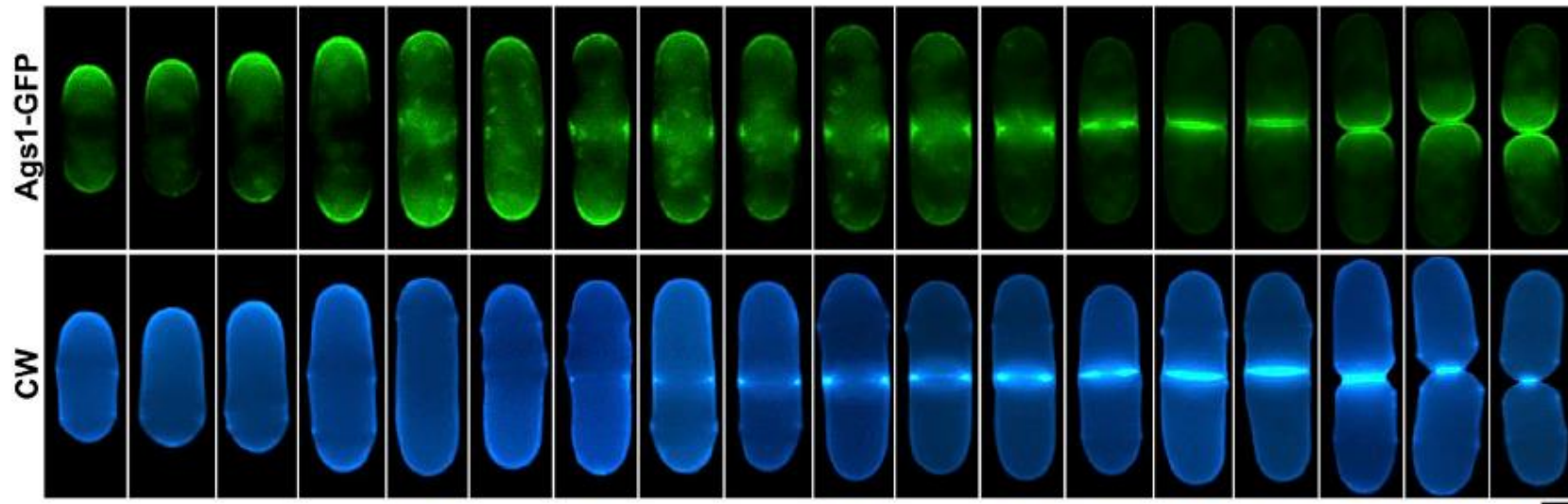
Vegetative (mitotic) cycle

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

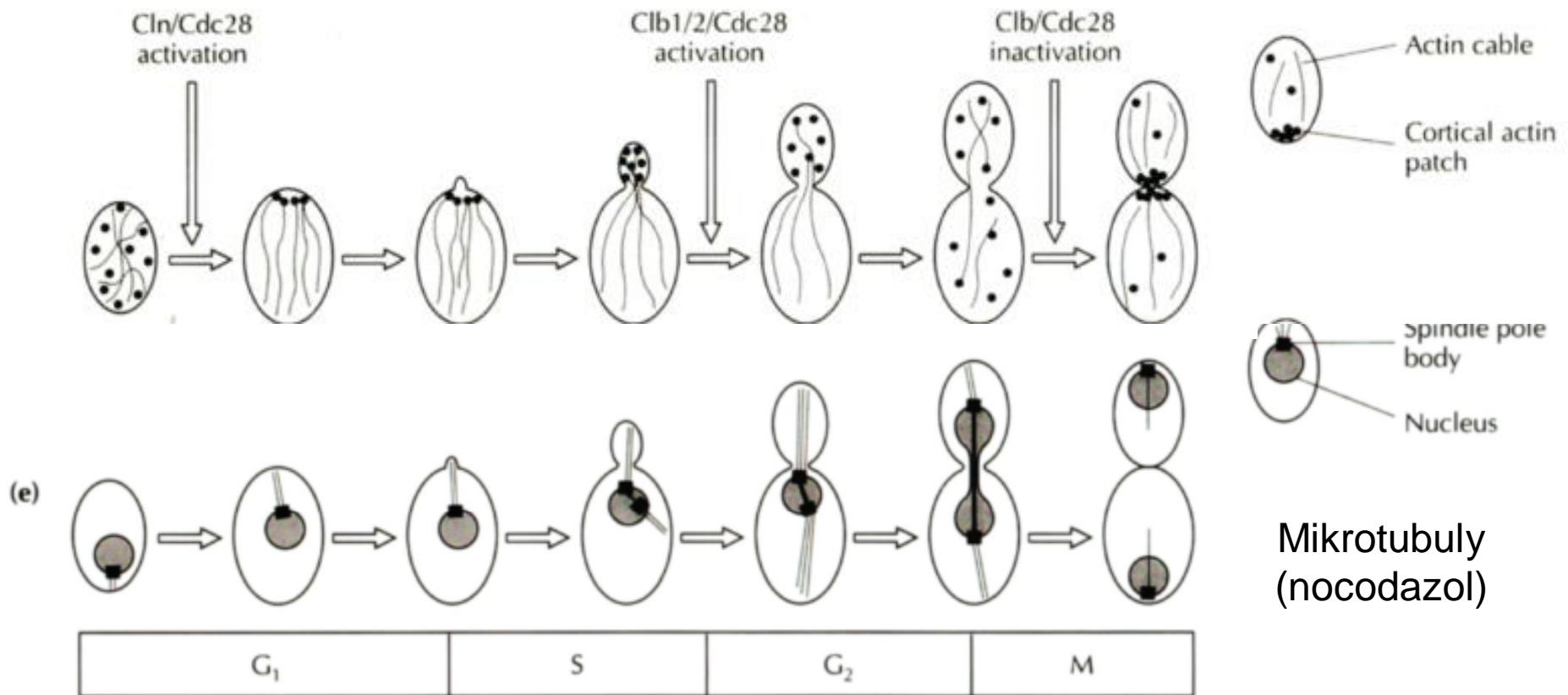
Hoffmann a spol, Genetics, 2015
<http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>



Cortes et al, JCB, 2012



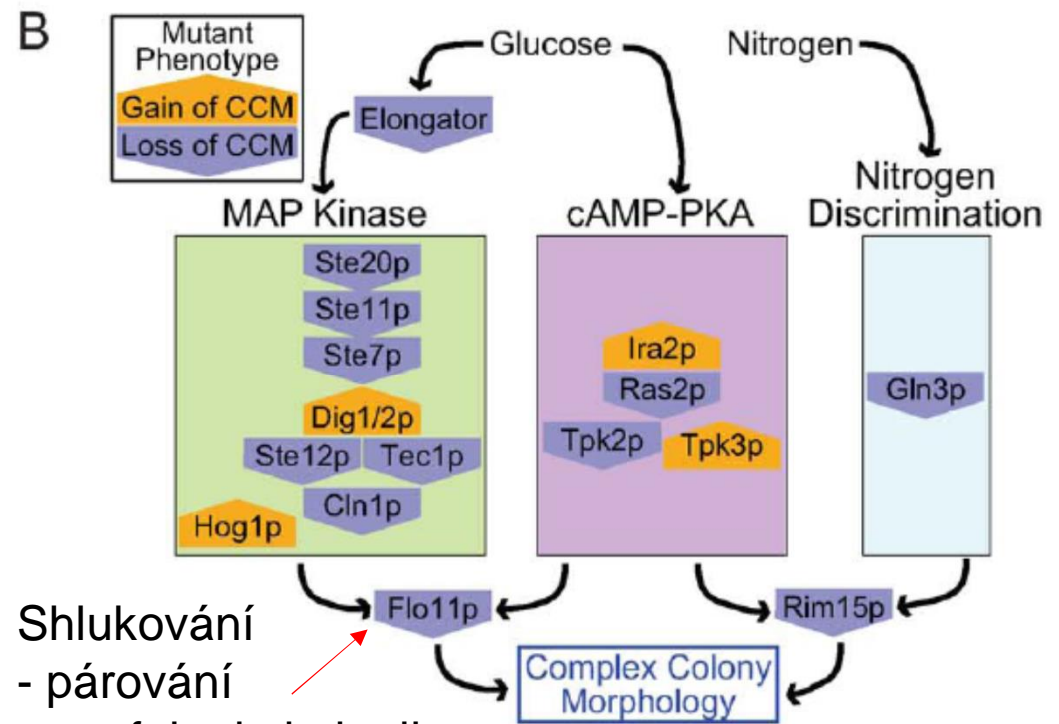
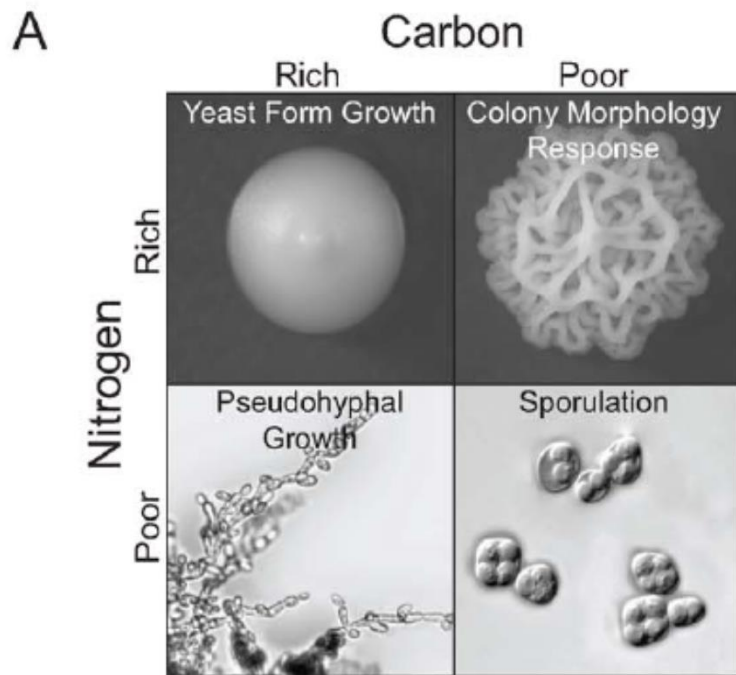
Buněný cyklus *S. cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB . za átek S fáze
- rozchod jaderných plak na opa né póly . p echod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje . za átek M fáze (mitózy) - mikrotubuly
- odd lení pupene . cytokineze . p echod z M do G₁
- Odd lená dce inná bu ka je menší než mate ská . nerovnocenné d lení. pro další d lení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G₁ fáze

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

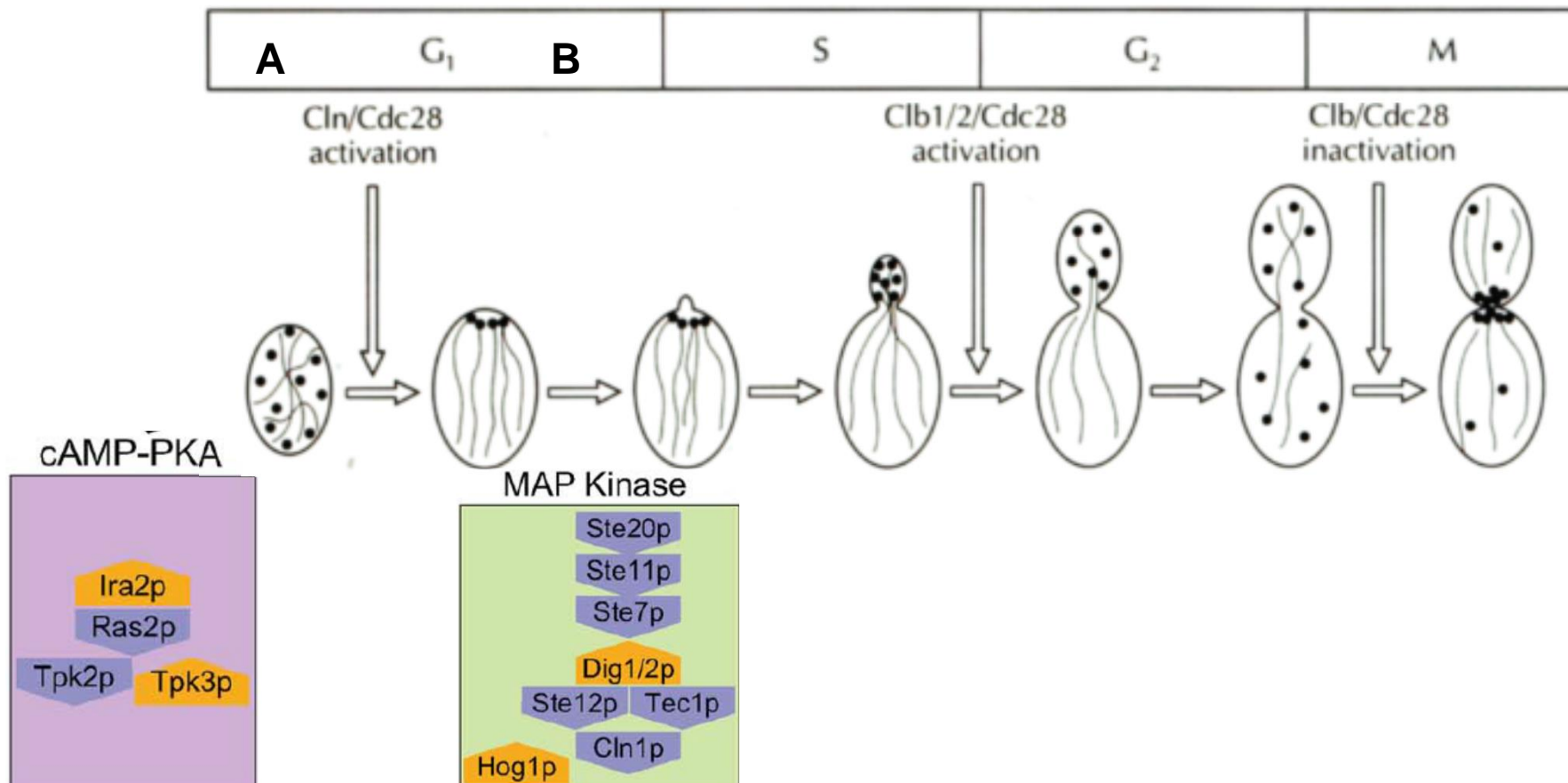
- pro další delení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
- při nedostatku živin aretuje v G1 nebo posléze přechází do stacionární fáze (vyčerpání živin)
- nedostatek dusíku vstává pseudohyfy
- při nedostatku N a C (diploidní buňky) zastavují v G1 a zahajují sporulaci
- haploidní buňky v přítomnosti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



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

Klí ovým mezníkem BC u *S. cerevisiae* je START, kdy se rozhoduje o p echodu z G1 do S fáze:

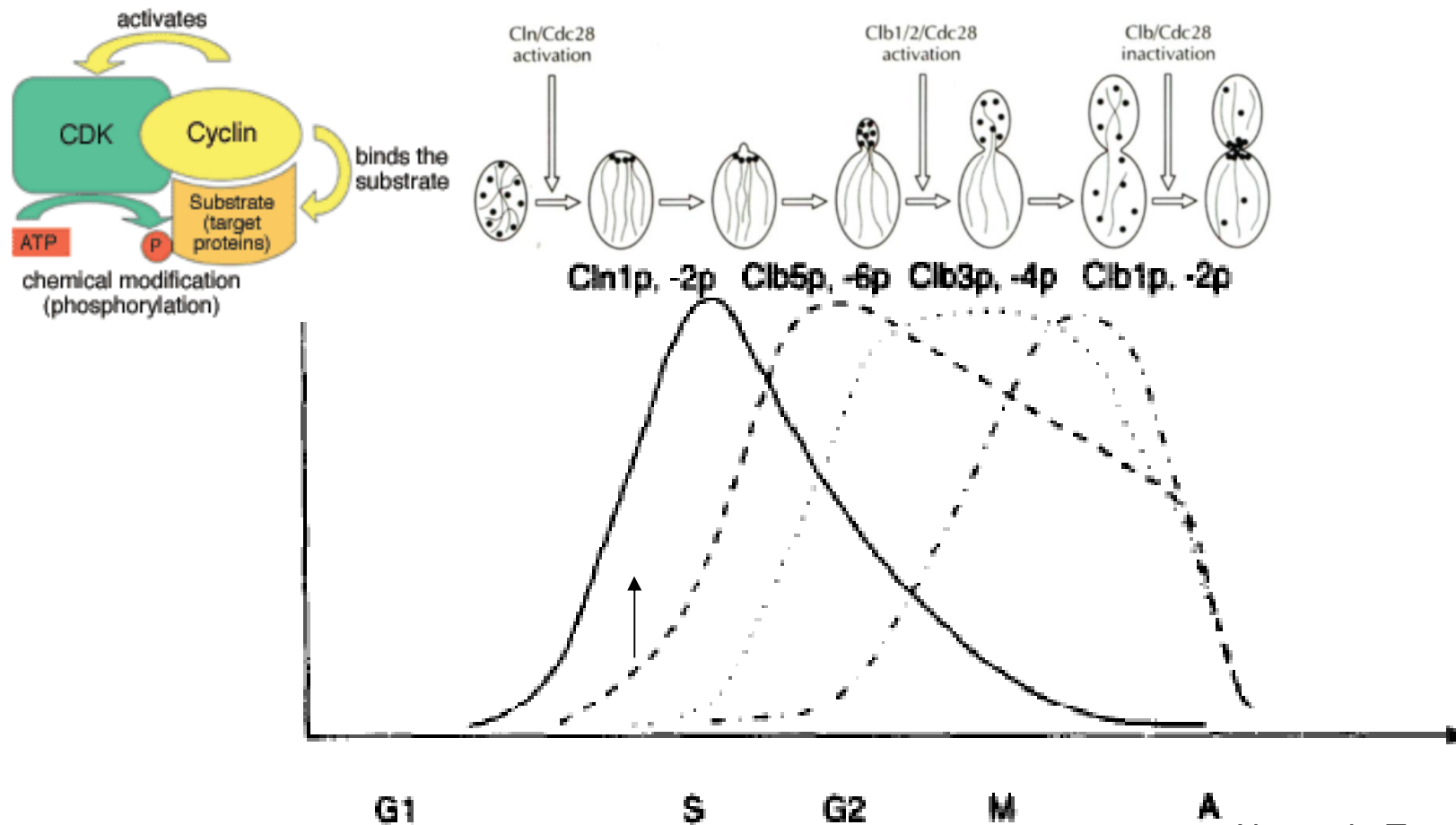
- STARTovní interval lze rozd ělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o p echodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - 0iviny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci i sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru, nem ůe být zvolena alternativa p echodu do stacionární fáze)
- pro úsek B (a další checkpoints) je klí ový *CDC28* (tj. CDK1) a p ísluzné cykliny



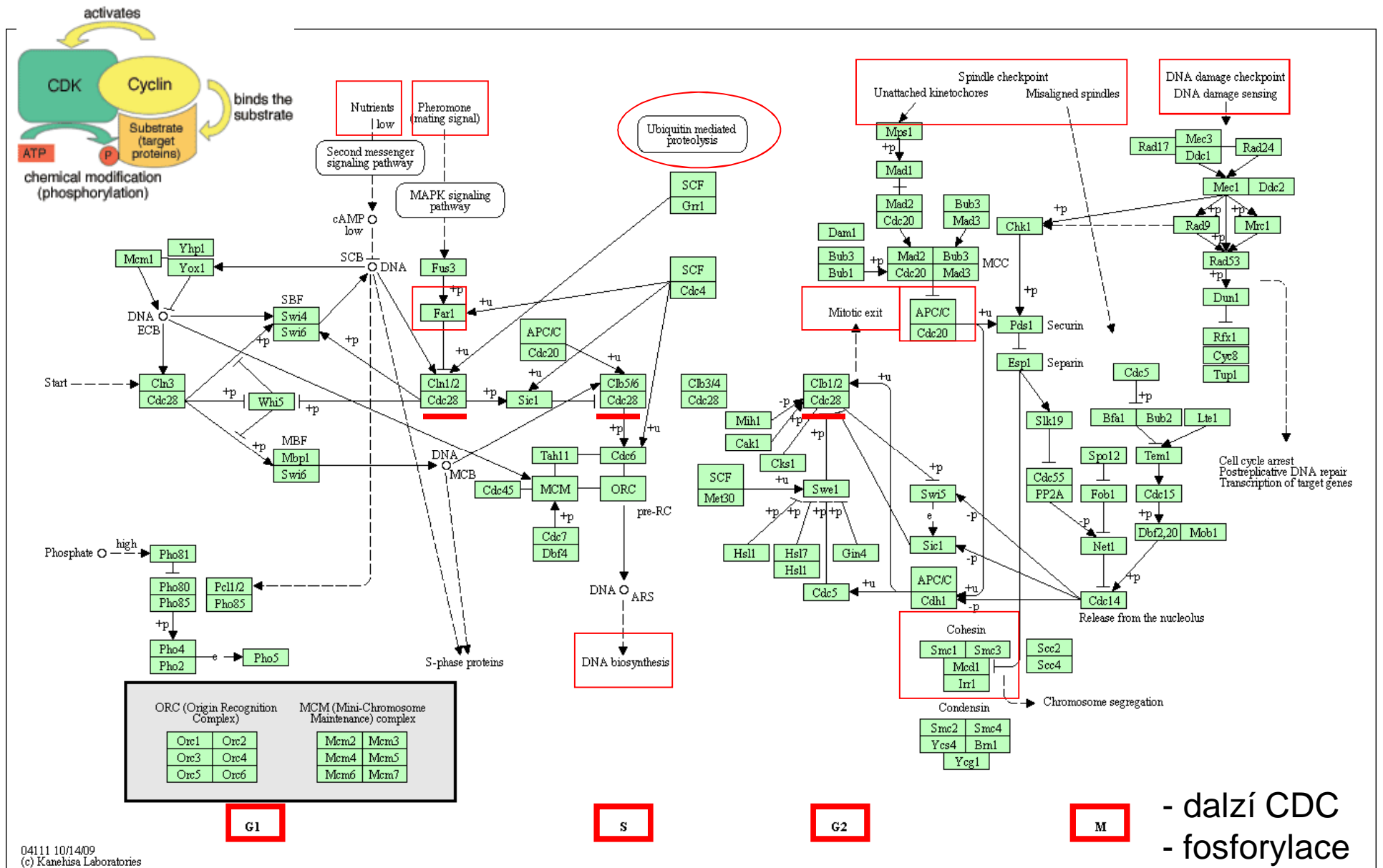
CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká aktivní komplex:

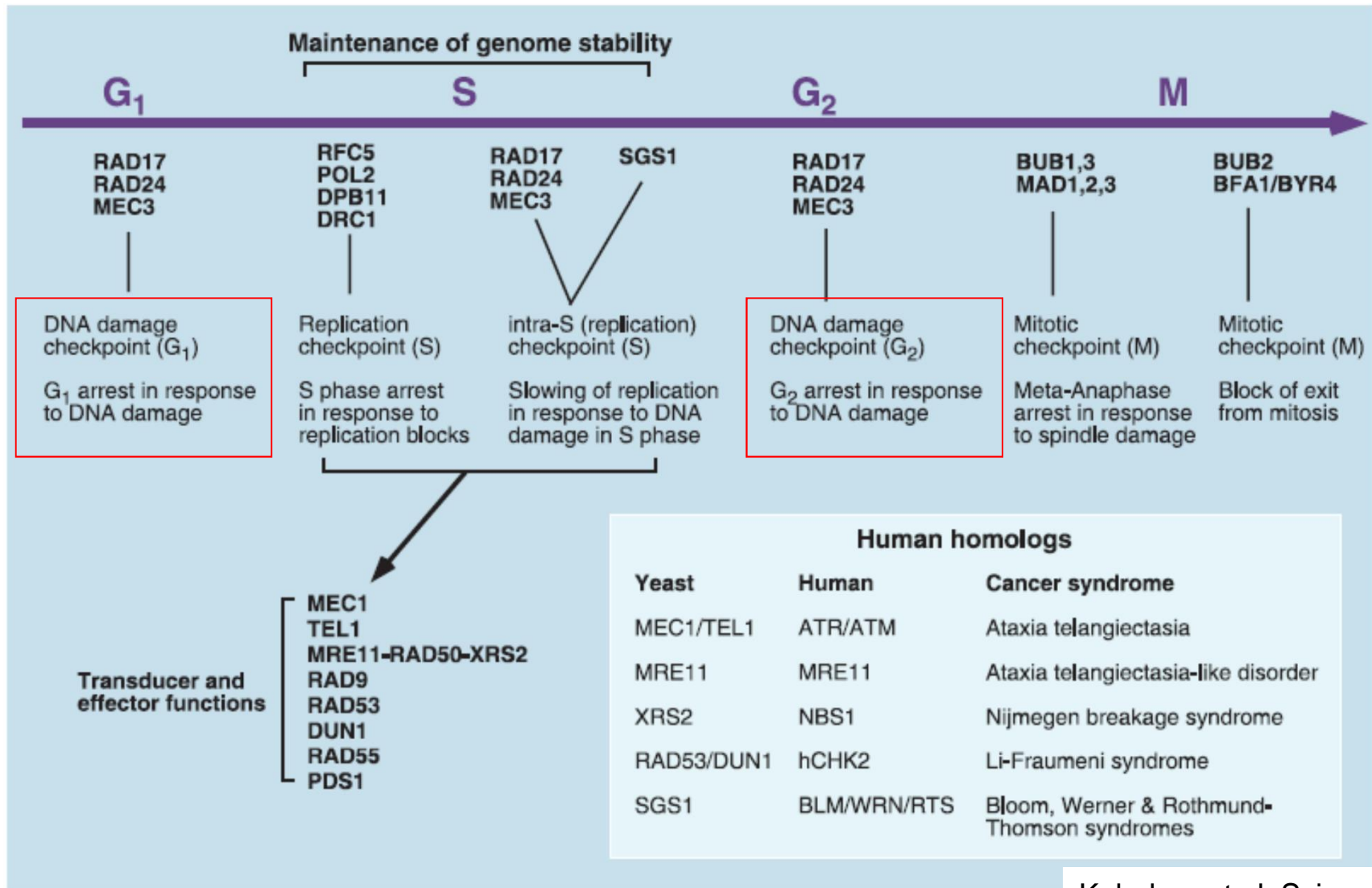
- v G1 fázi *Cln1p* a *Cln2p* (CLN3 mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *Clb5p* a *Clb6p* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se ú astní *Clb3p* a *Clb4p*
- mitózu ukon ují *Clb1p* a *Clb2p* a jejich degradace



Bun ný cyklus *S. cerevisiae* - detail



- dalzí CDC
- fosforylace
- ubiquitylace

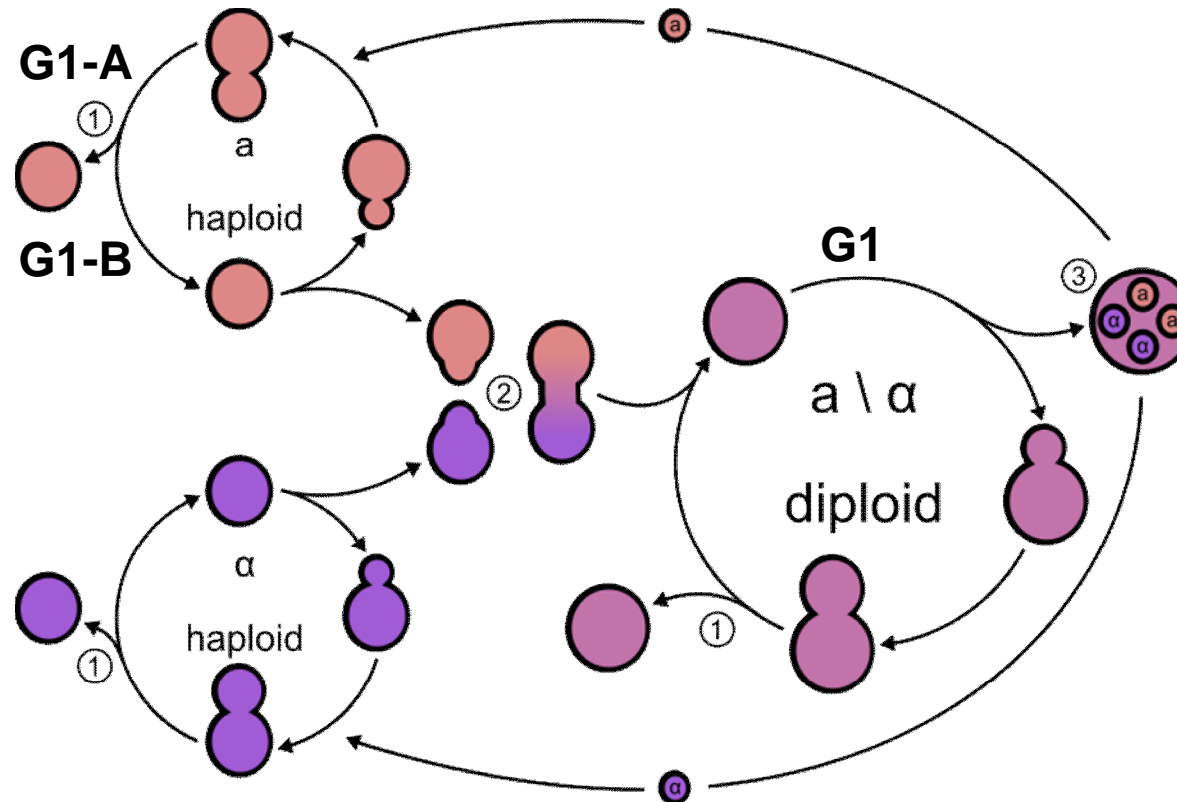


Kolodner et al, Science (2002)

Checkpoints slouží buďce ke kontrole úplnosti i správnosti průběhu určité části buněčného cyklu i procesu. například buďka nemůžeme 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 s nedostatečnou velikostí 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**

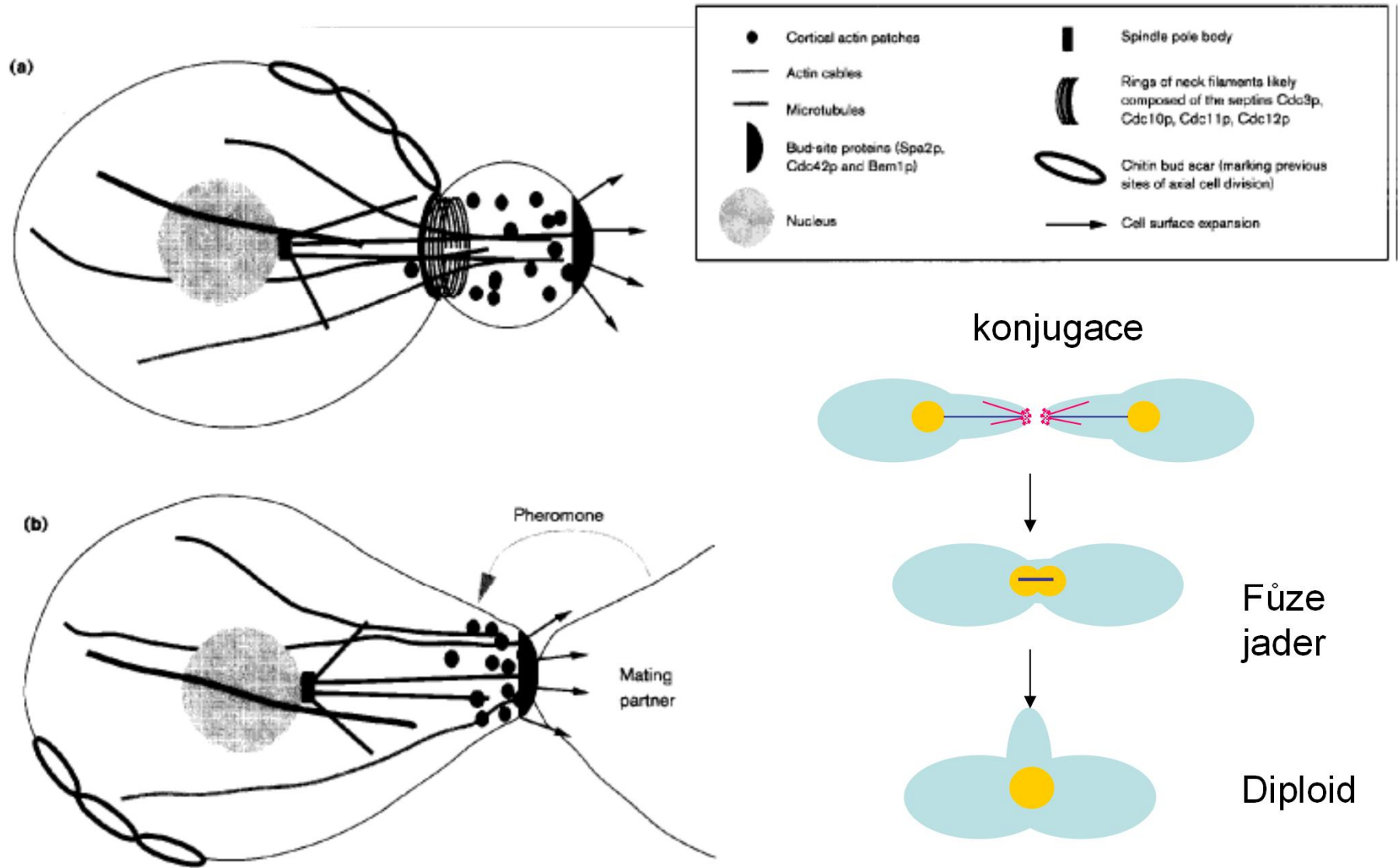
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci. **synchronizace v S fázi**

- nocodazol blokuje polymeraci tubulinu. zastaví mikrotubuly pro mitózu. **G2**

synchronizace

- ts mutanty různých *CDC* genů. různé fáze buněčného cyklu

Párování *S. cerevisiae*

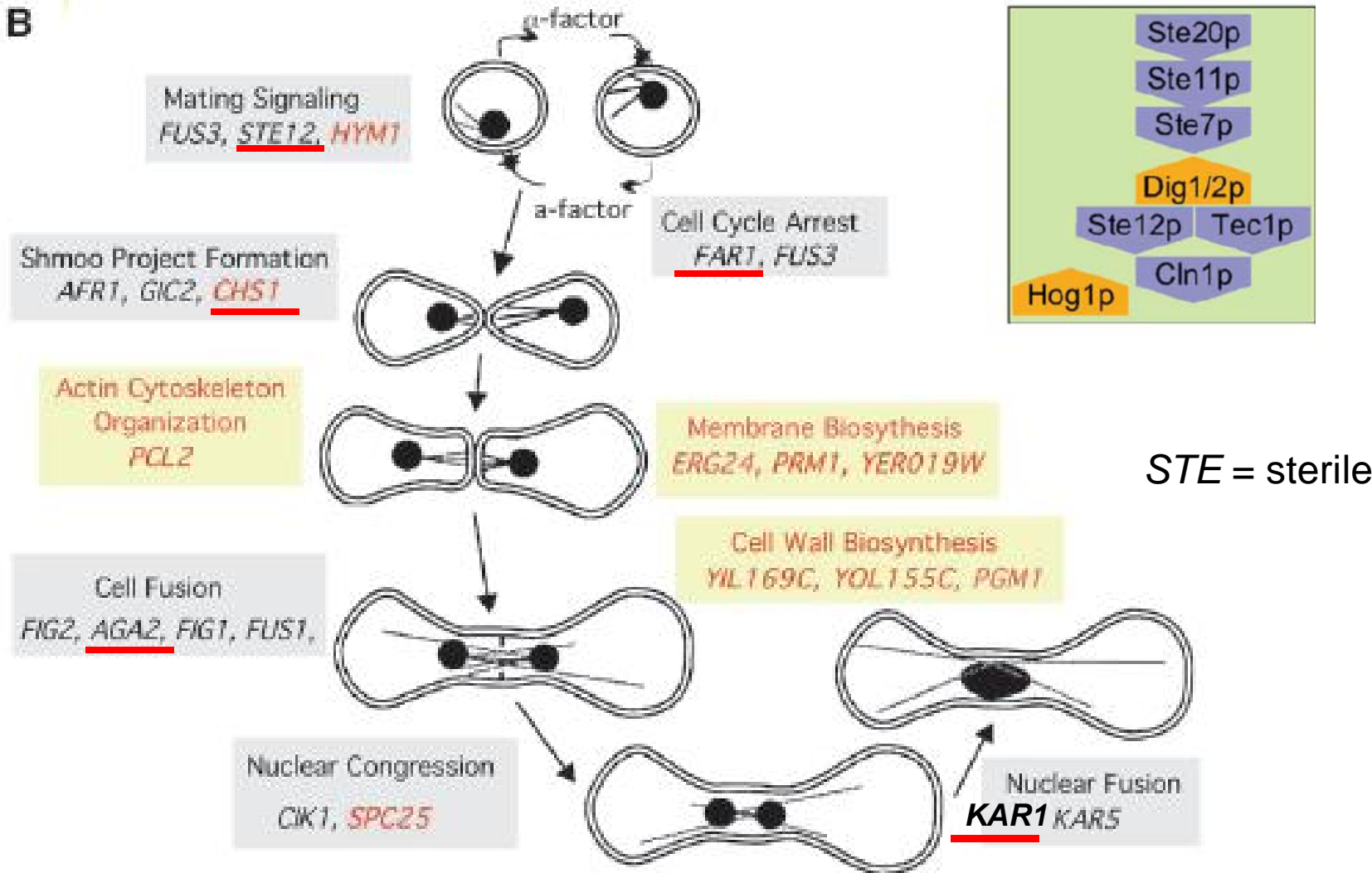


Chant, Curr Opin in Cell Biol, 1996

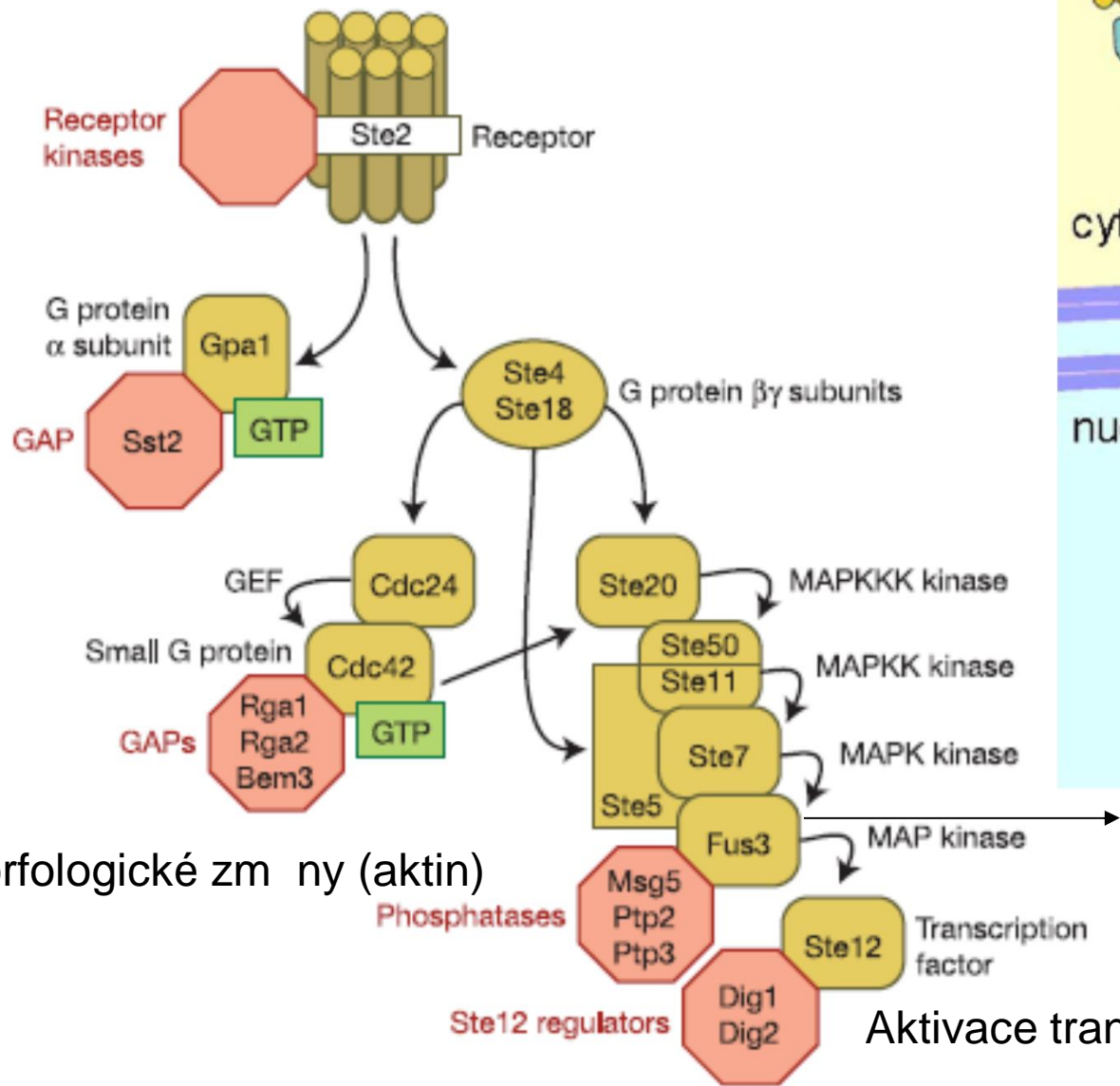
Vybudování bun né st ny p emos ující sshmoo%výb Oky

Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování/matingu

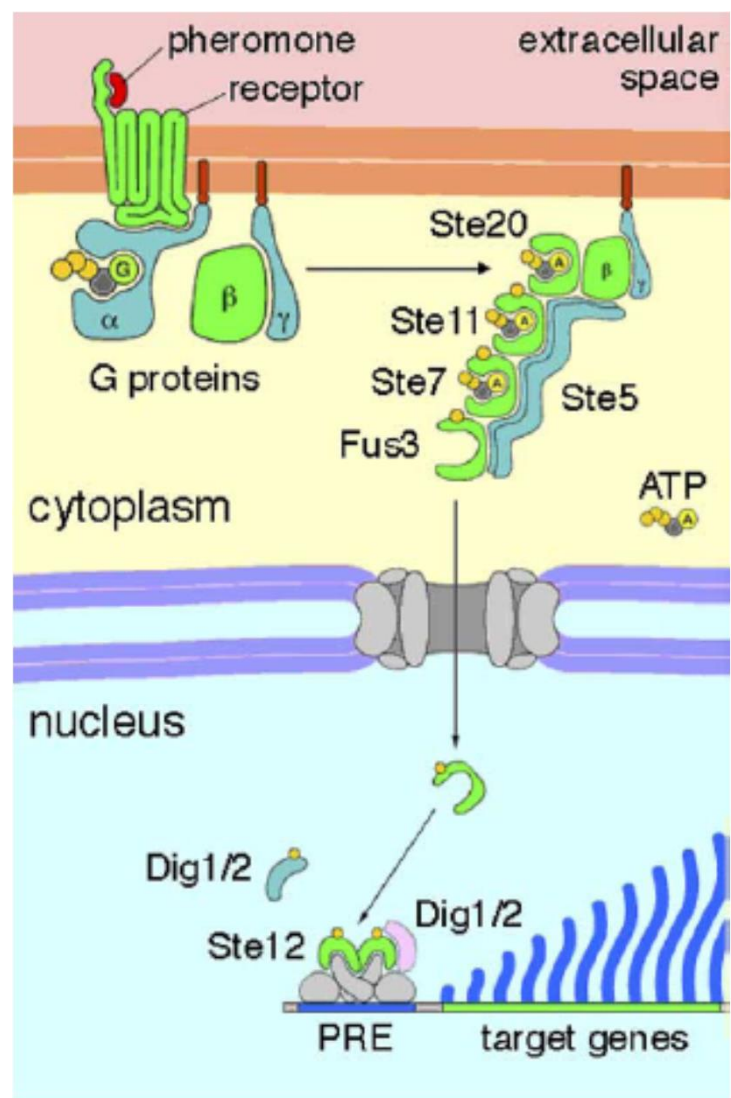
B



Signální dráha . α faktor



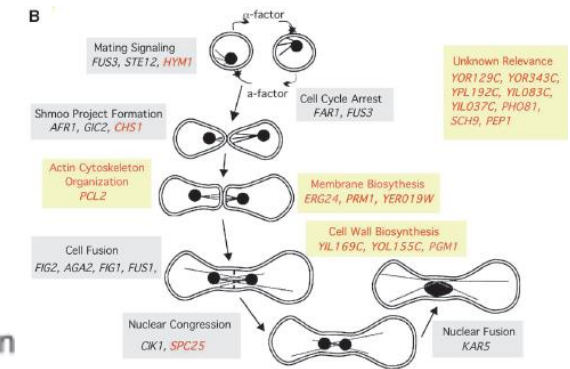
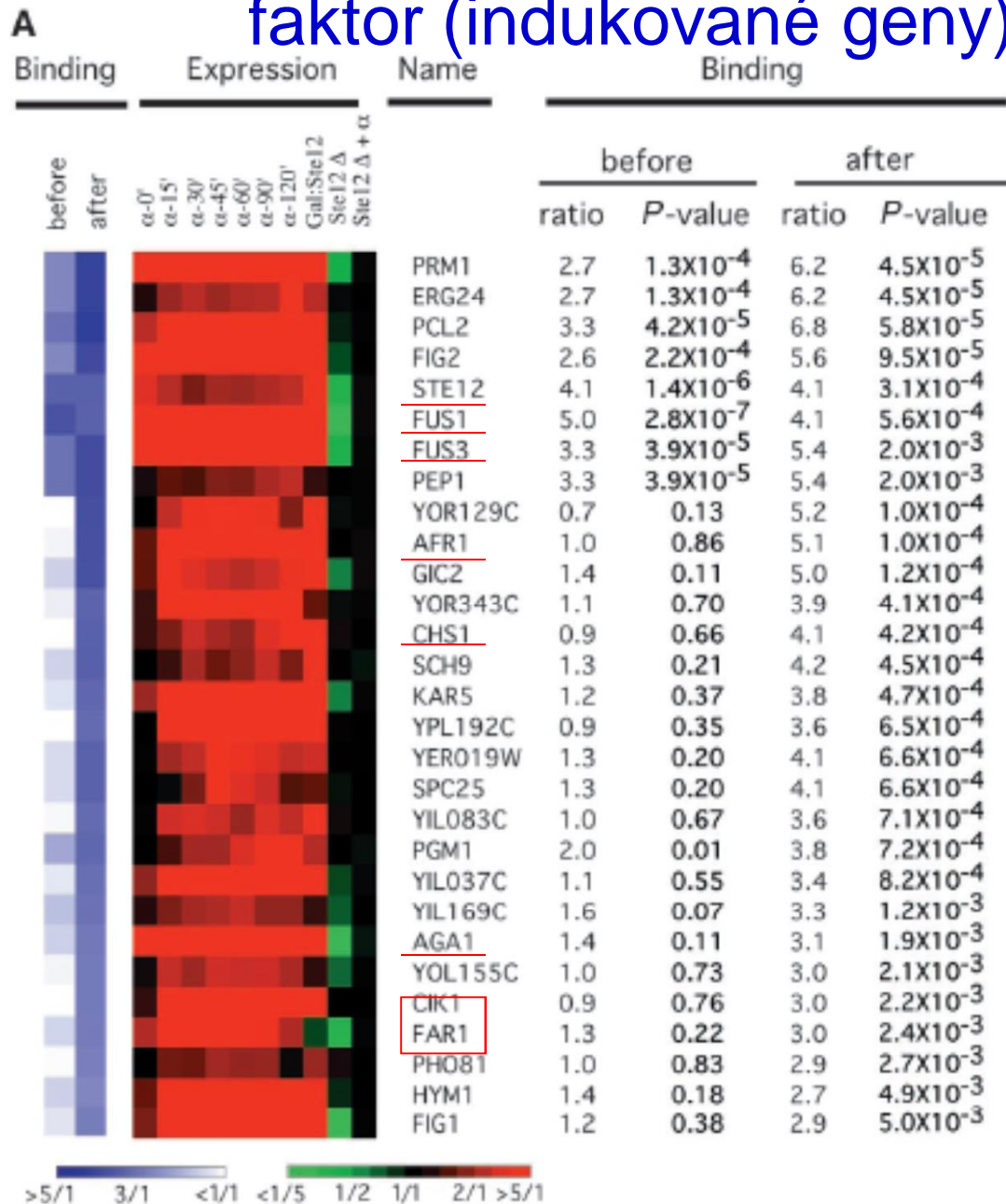
Morfologické změny (aktin)



Cdc28
Zastavení buněčného cyklu

Aktivace transkripce

ChIP on CHIP - Ste12p transkrip ní faktor (indukované geny)



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
 Protein of unknown function
 Phosphoglucosyltransferase
 Protein of unknown function
 Protein of unknown function
α-Agglutinin anchor subunit
 Similar to *S. cerevisiae* glucan 1,4- α -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 + α 1, α 2 - transkripční faktory, které ovlivní transkripci 3 skupin genů

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

α -spec.= *MFA α 1,2* (α -feromon), *STE3* (a-receptor), *STE13, KEX2* (proteazy)

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

Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

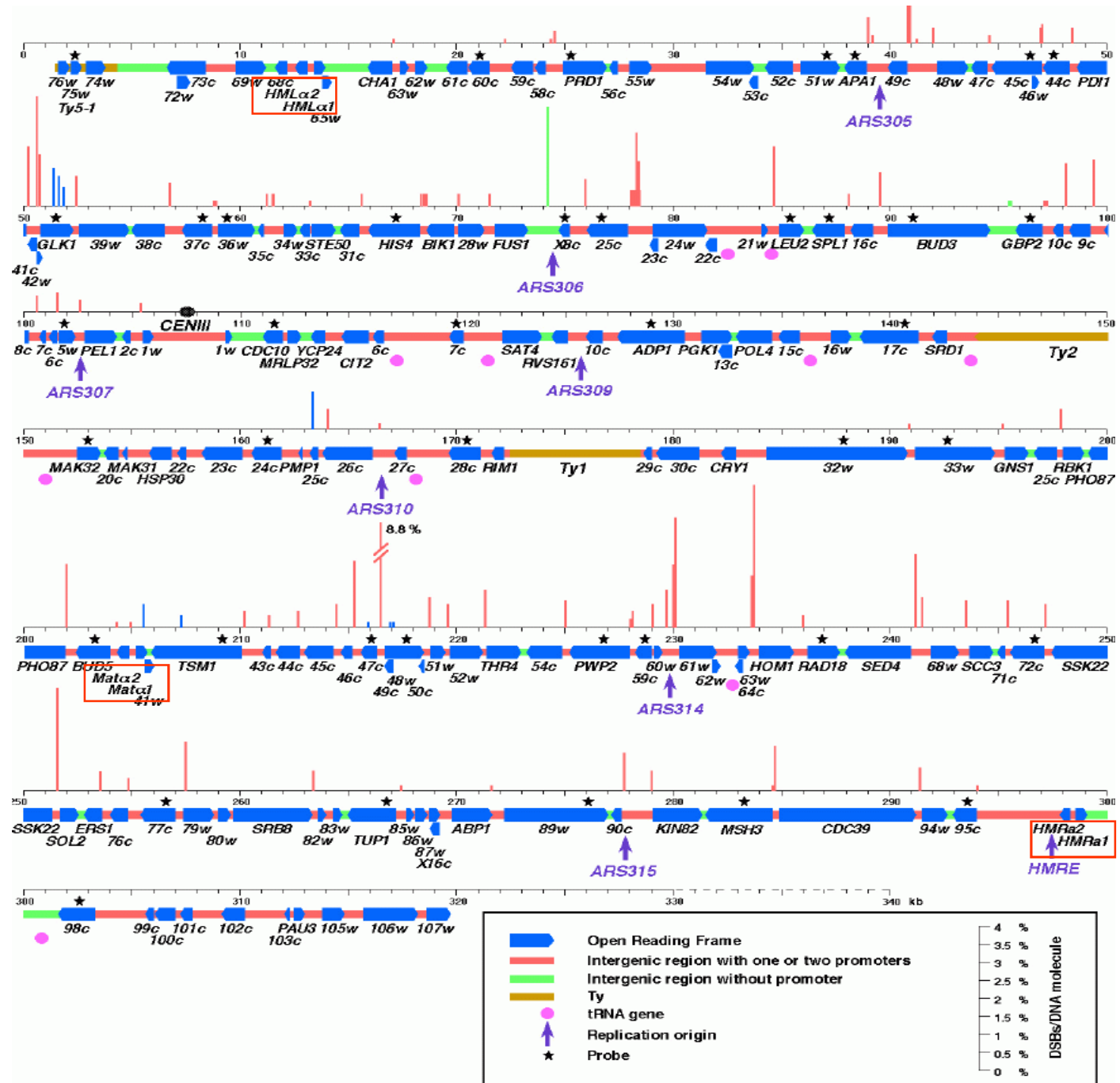
- MAT lokus
- MAT α (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

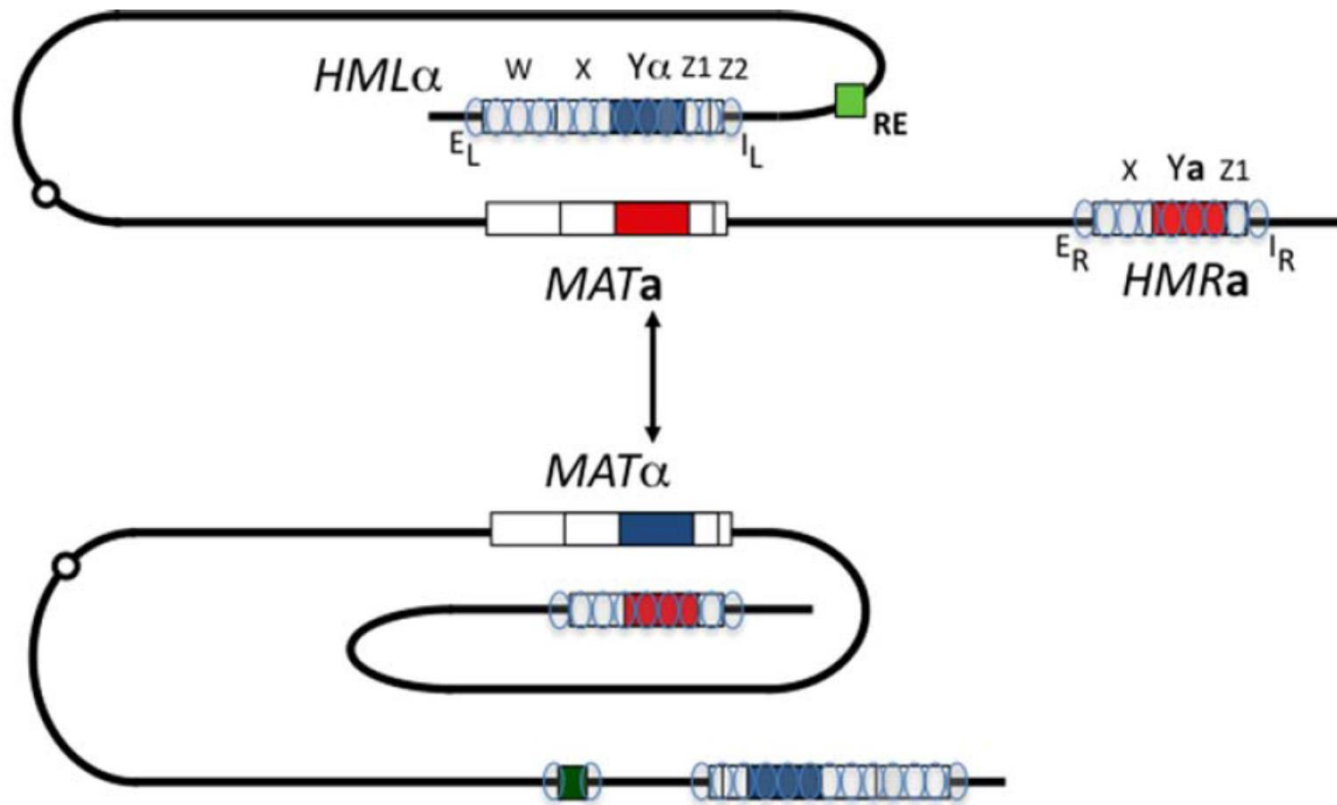
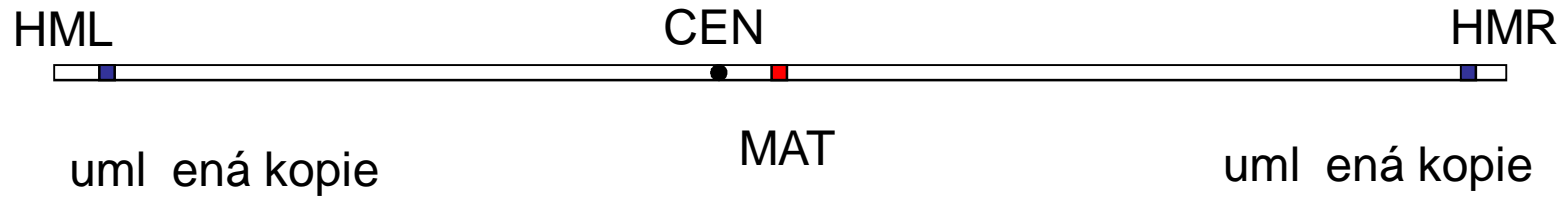
HO endonukleasa v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické . stabilní
Homothalické . p epínají párovací typ



P epínání párovacího typu

Chromosom III



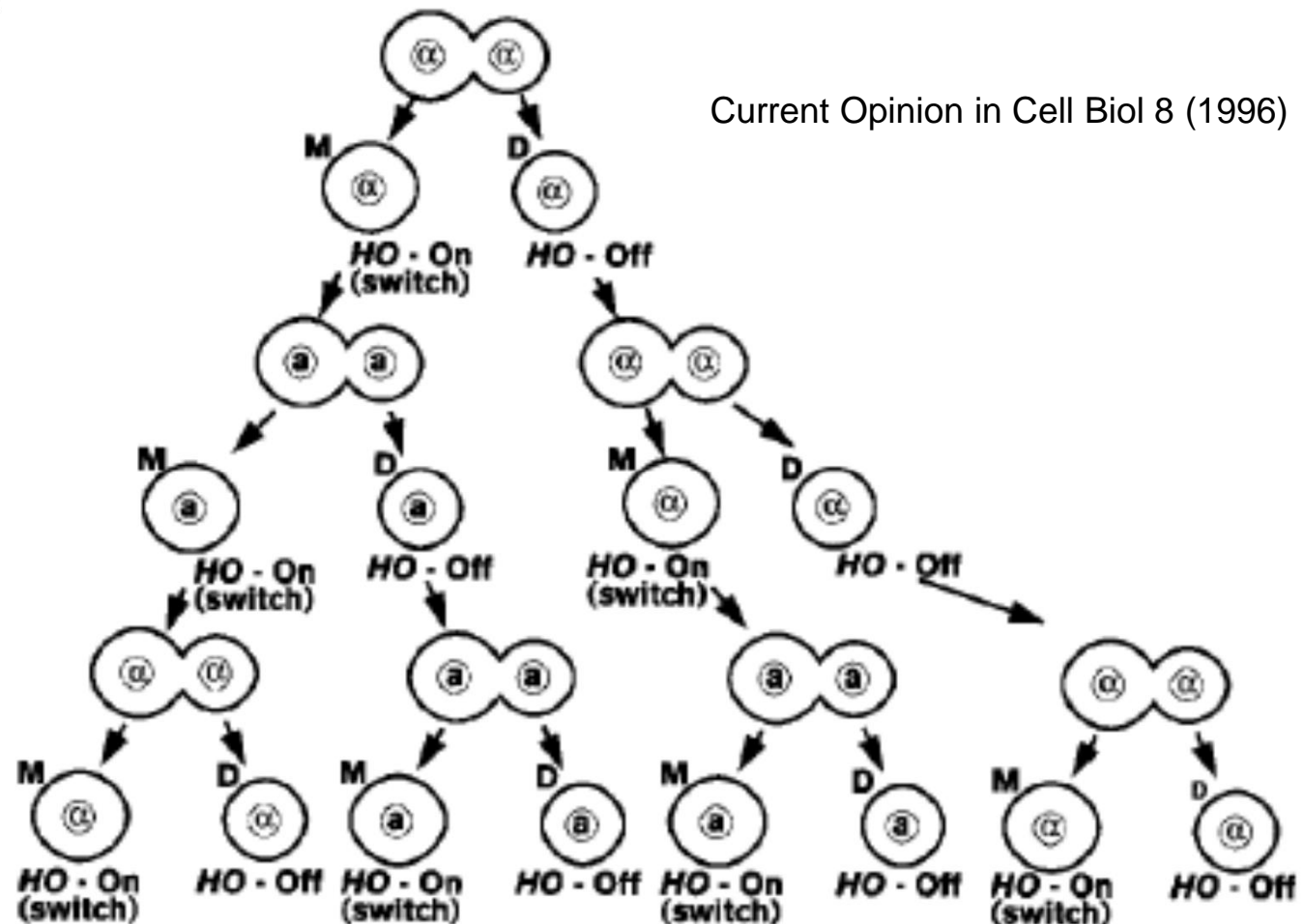
HO endonukleasa rozeznává a ztípe specifické sekvence
Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismu opravy poškozené DNA

P epínání párovacího typu

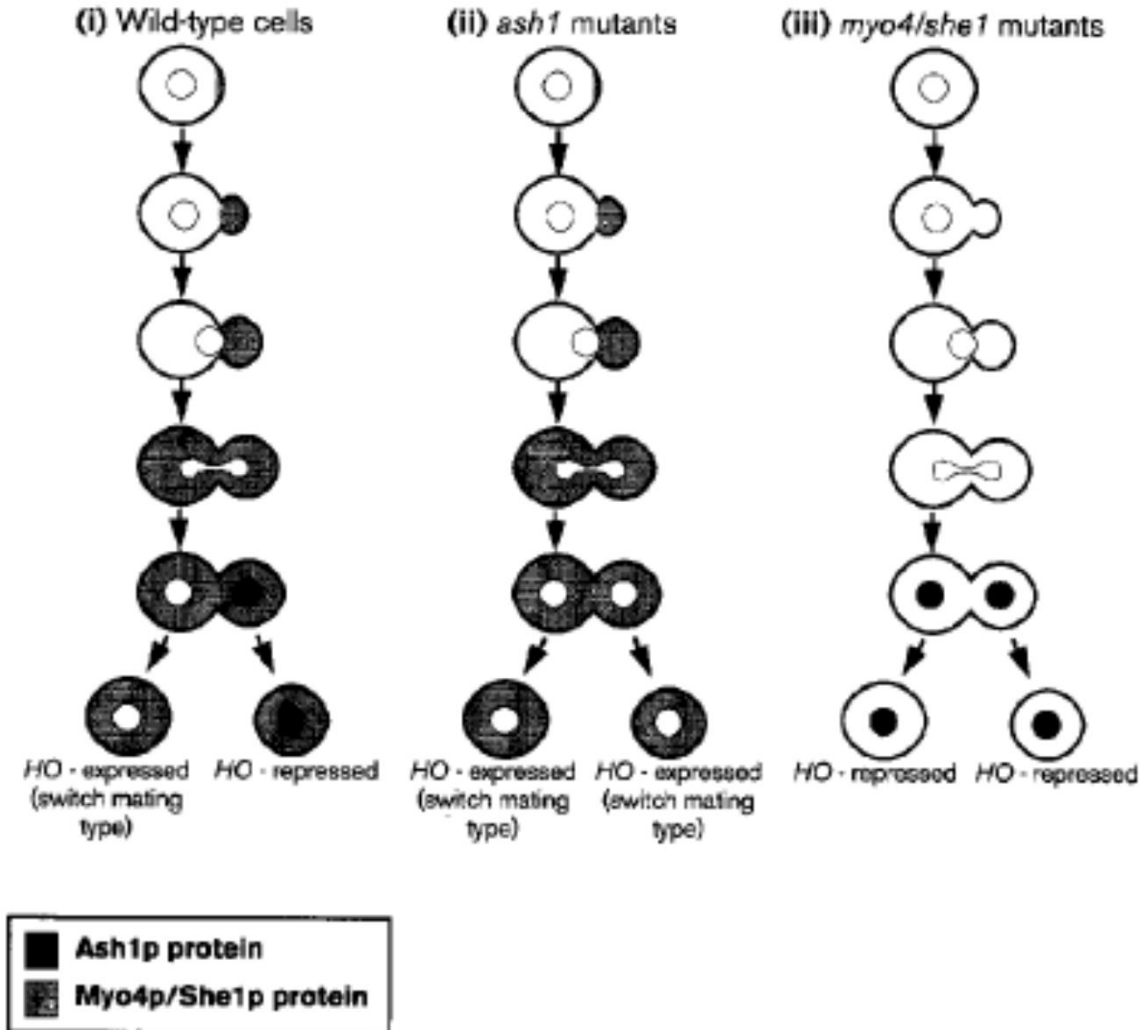
DNA z MAT lokusu je HO endonukleasou vystřihána a na její místo se přikopíruje sekvence z kazety opačného páru

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

homotalické



Asymetrická lokalizace Ash1p

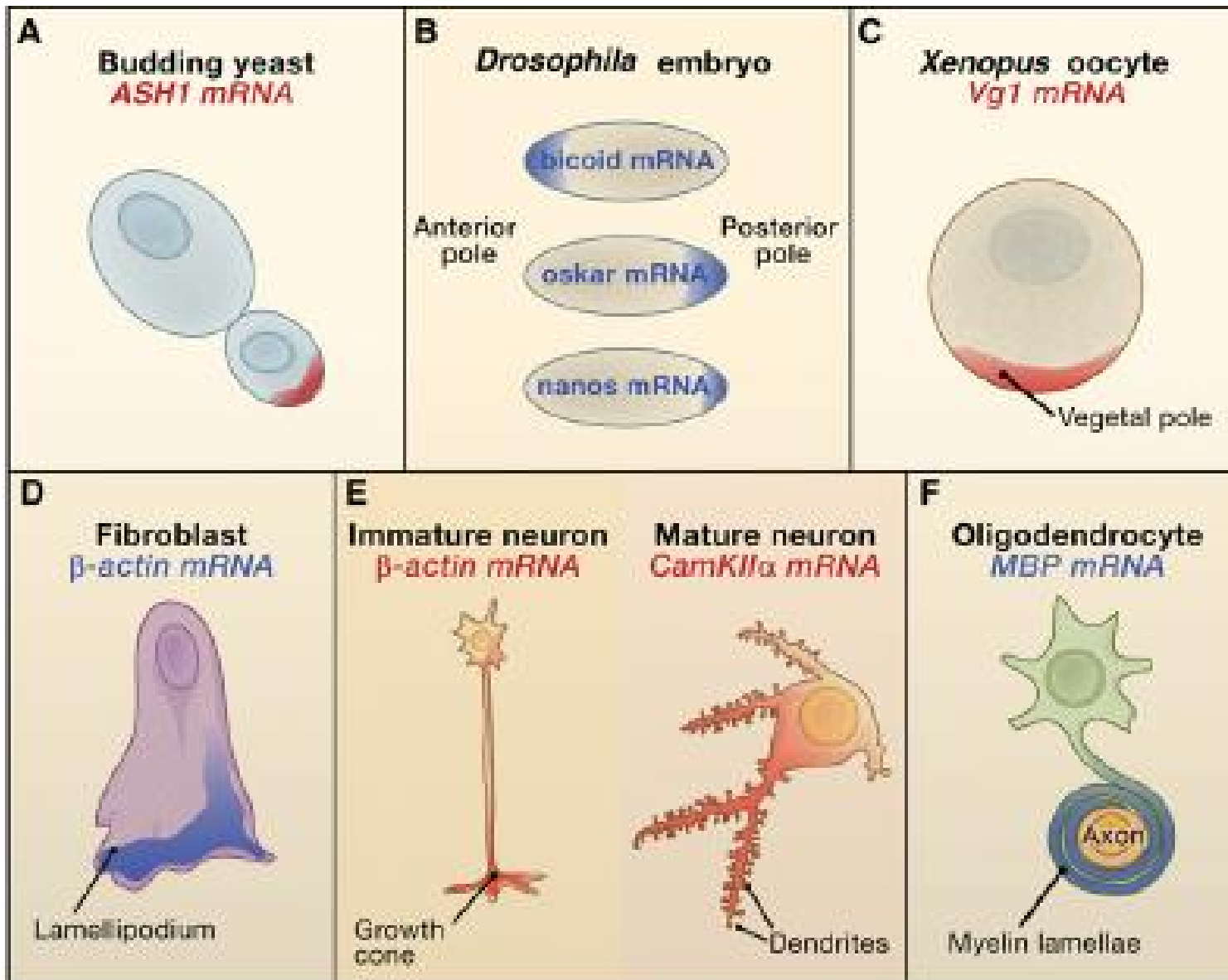


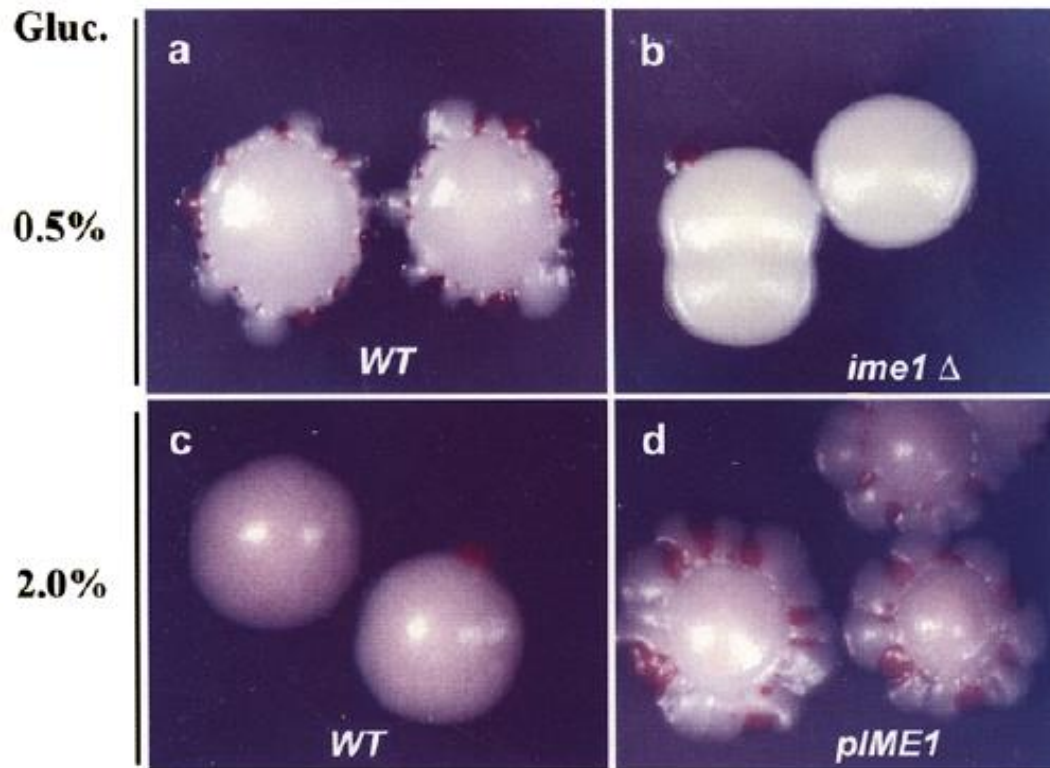
- Ash1p represor je asymetricky lokalizován do dce iné bu ky, kde blokuje transkripci HO-endonukleasy

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

- (translace RNA na specializovaných ribozomech asociovaných s cytoskeletem

Příklady translace lokalizované mRNA





- při vyerpání O₂ vna misce mohou (krajní) bučky začít meiotické dělení (diploidní *S. cerevisiae*)
 - meiosa je indukovaná *IME1* transkripčním faktorem (v *ime1Δ* se meiosa neindukuje vs. v *pIME1* overexprimovaných bučkách je indukována meiosa i bez vyerpání O₂ tj. 2% glukosa)

ade2 (červená barva) ukazuje haploidizaci heterozygotního diploida

zipky ukazují v ecká seřady mi sporami

