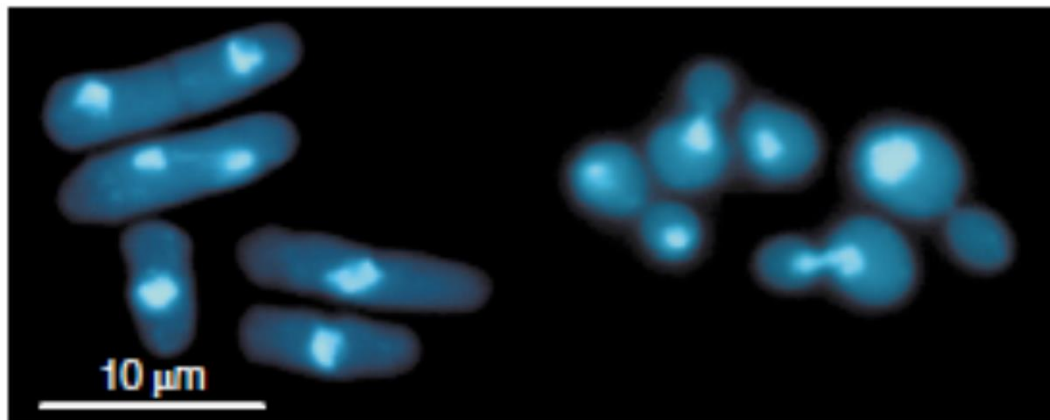
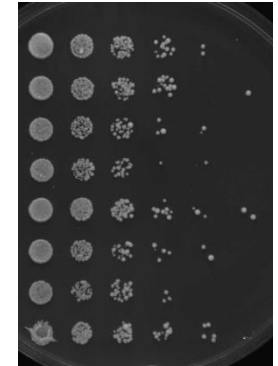


Osnova 4. p ednázky

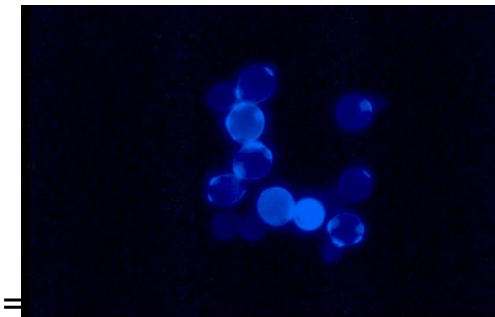
- “ Genetické metody
 - . Plasmidy
 - . Integrace
 - . Teplotn -sensitivní mutanty
 - . Tetrádová analýza
 - . Syntetická letalita, suprese



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 atd)
- “ **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 upravovat deleční a mutantní kmeny**
- “ Vydrží v >15% glycerolu na -70°C indefinitně
- “ 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 sekvencovaný genom (genomové aplikace)
- “ EuroFan projekt . delece všech S.c. genů (+GFP, +2-hybrid)
- “ Mikroipy - expresní profily za různých podmínek
- “ Účinnost dělení má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)



Laboratorní kvasinkové kmeny

S. pombe Ě 1501Í

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



IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

S. Cerevisiae Ě 15288CÍ Ě 1. osekvenovaný kmen

Genotype: *MAT 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](#)

W303Í . nej ast ji pou0Ívaný laboratorní kmen

Genotype: *MAT α /MAT 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.

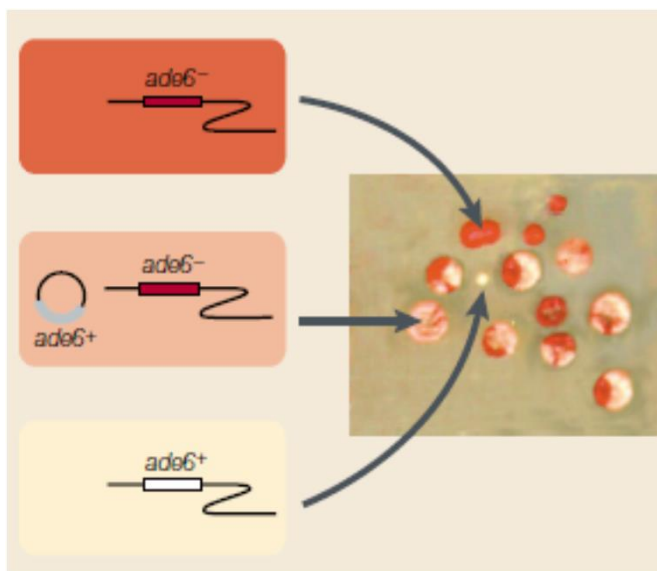
References: W303 constructed by Rodney Rothstein

Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní
systém:

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
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
ura3-52	no	-	Ty1 insertion	Rose and Winston 1984



Genotype

MAT α , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*,
gal4 Δ , *gal80 Δ* , *LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*,
GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*,
leu2-3, 112, *gal4 Δ* , *met⁻*, *gal80 Δ* ,
URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

MAT α , *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

References

James *et al.*, 1996;
A. Holtz, unpublished

Harper *et al.*, 1993

Feilotter *et al.*, 1994;
C. Giroux, pers. comm.

Selekce

Table 2 | **Corresponding tools in the two yeast species**

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Regulated promoter	<i>GAL</i> (galactose regulated)	<i>nmt</i> (thiamine regulated)
Plasmid replication origins	<i>ARS1</i> or 2μ	<i>ars1</i>
Auxotrophic markers		
Uracil, orotidine 5'-phosphate decarboxylase Select against with 5-FOA	<i>URA3</i>	<i>ura4⁺</i>
Leucine, β -isopropylmalate dehydrogenase	<i>LEU2</i>	<i>leu1⁺</i>
Adenine, phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase Accumulates red colour	<i>ADE2</i>	<i>ade6⁺</i>

2μ (2 micron), an endogenous plasmid DNA molecule found in some yeast cells, with a circumference of 2μ ; 5-FOA, 5'-fluoro-orotic acid. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

Forsburg: NRG, 2001

- **geneticin** (G418) . podobný kanamycinu (mistranslace)
- **nourseothricin** (NAT) . inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa . monoacetyluje NAT)
- **hygromycin B** . inhibuje translokaci v pr b hu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygrosopicus*), rezistence kódována *hph* genem z *Klebsiella pneumoniae*
- **phleomycin** . interkaluje se do DNA a zp sobuje DSB (zlomy, glycopeptid z *Streptomyces verticulus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*

Shuttle vektory

- “ vychází z 2 μ m plasmid nebo centromer (*S.c.*; 2 μ m plasmid také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilarum*)
- “ Kvasinková část . marker (URA3, NAT^r), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 μ m (~50 kopií na haploidní buňku) za účelem 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>	Indukovány m ⁺ dí	
<i>MFA1</i>	MATa specifický (haploid specifický)	

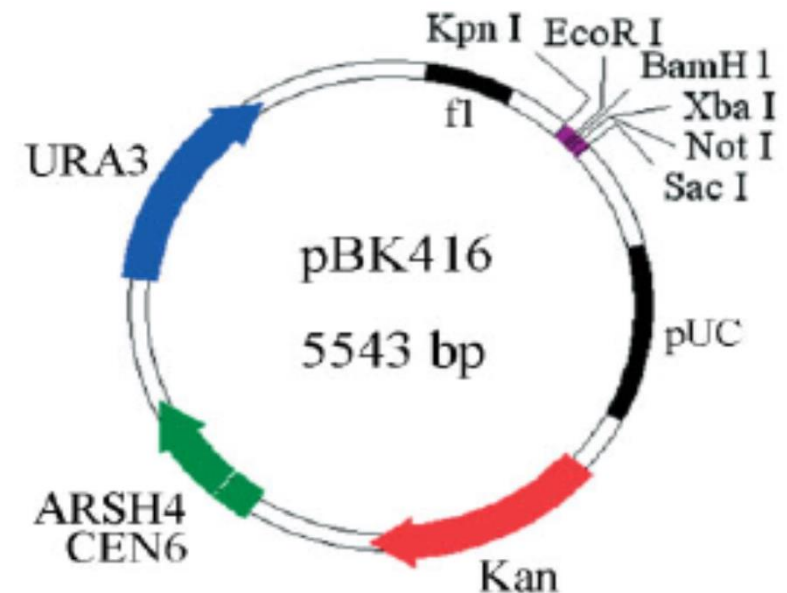


Table 1. Summary of pFA6 derivatives for genomic FLAG- and PK-tagging and gene deletion useful in *S. pombe*.

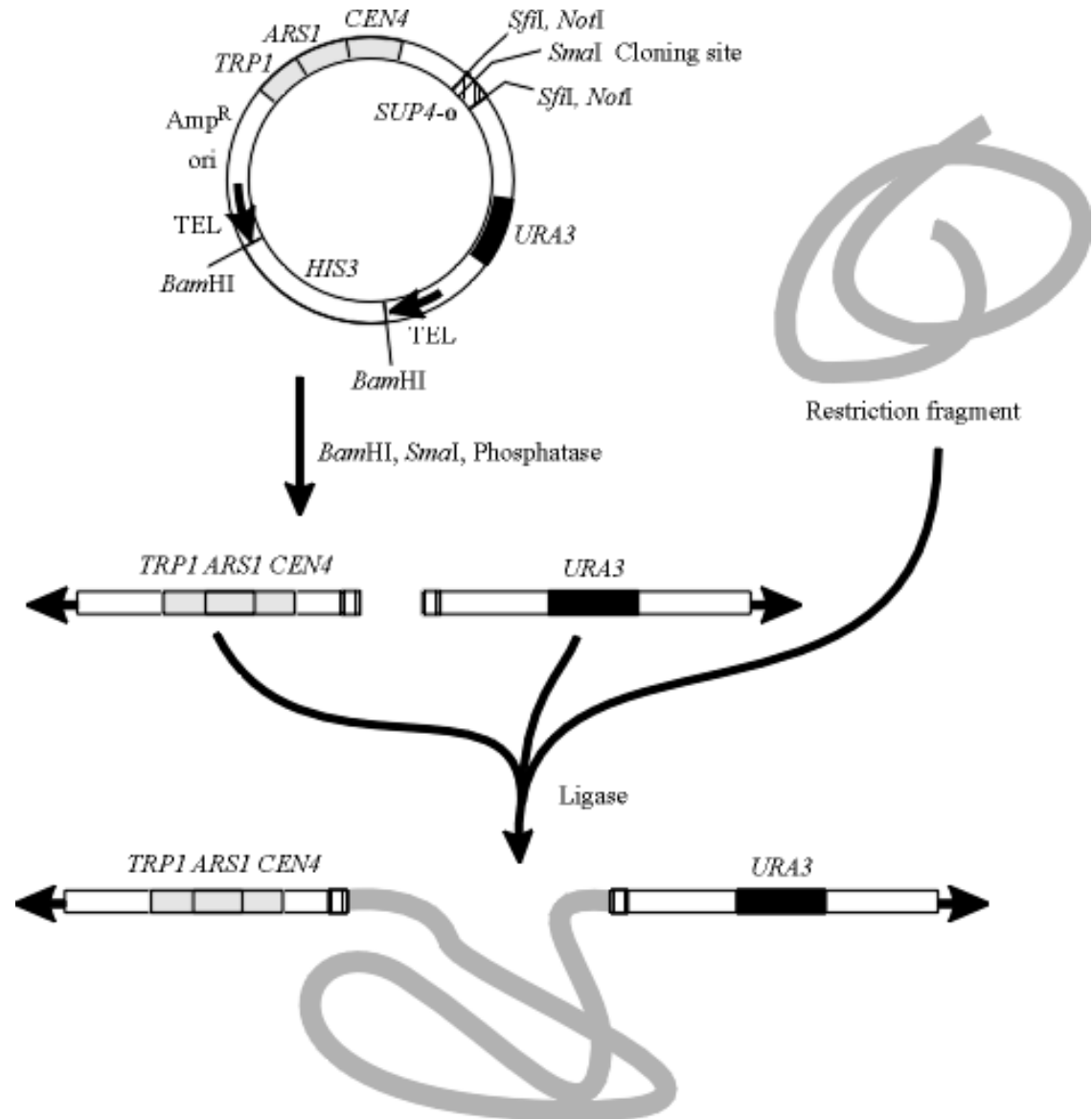
	Vector name	Comments	Markers	Sources
PK-tagging vectors	pFA6a-6xGLY-V5-(marker)	C-terminal G6-1PK(V5)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i>	(8) (8)
	pFA6a-12PK-(maker)	C-terminal 12PK(V5)-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>LEU2MX6</i> <i>ura4MX6</i>	This study This study This study This study This study
FLAG-tagging vectors	pFA6a-5FLAG-(maker)	C-terminal 5FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i>	(4) (4) (4) (4)
	pFA6a-6xGLY-FLAG-(maker)	C-terminal G6-FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i>	(8) (8)
	pFA6a-6xGLY-3FLAG-(maker)	C-terminal G6-3FLAG-tagging	<i>KanMX6</i> <i>hphMX4</i>	(8) (8)
	pFA6a-(marker)-Pnmt1-3FLAG*	N-terminal 3FLAG-tagging	<i>kanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i> <i>his3MX6</i>	(4) (4) (4) (4) (4)
	pFA6a-(marker)-Purg1-3FLAG**	N-terminal 3FLAG-tagging	<i>kanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i>	(4) (4) (4) (4)
	pFA6a-G9/G11-5FLAG-(maker)	C-terminal G9/G11-5FLAG-tagging	<i>kanMX6</i> <i>kanMX6</i>	This study
GFP-tagging vectors	pFA6a-GFP(S65T)-(maker)	C-terminal GFP(S65T)-tagging	<i>kanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i> <i>ura4MX6</i>	(2,15) (10) (10,16) This study This study
	pFA6a-(marker)-Pnmt1-GFP(S65T)*	N-terminal GFP(S65T)-tagging	<i>kanMX6</i> <i>natMX6</i>	(2) (16)
	pFA6a-mRFP-(maker)	C-terminal mRFP-tagging	<i>kanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>uraMX6</i>	(10) (10) (10) This study
Disruption plasmids	pFA6a-(maker)	For gene deletion	<i>kanMX6</i> <i>hphMX6</i> <i>natMX6</i> <i>bleMX6</i> <i>ura4MX6</i> <i>his3MX6</i> <i>LEU2MX6</i>	(2) (9,10) (9,10) (9,10) This study This study This study

*Expressed under the control of the *nmt1* promoter; *P3nmt1* and its weaker derivatives *P41nmt1* and *P81nmt1* are available.

**Expressed under the control of the *urg1* promoter.

YAC (yeast artificial chromosome)

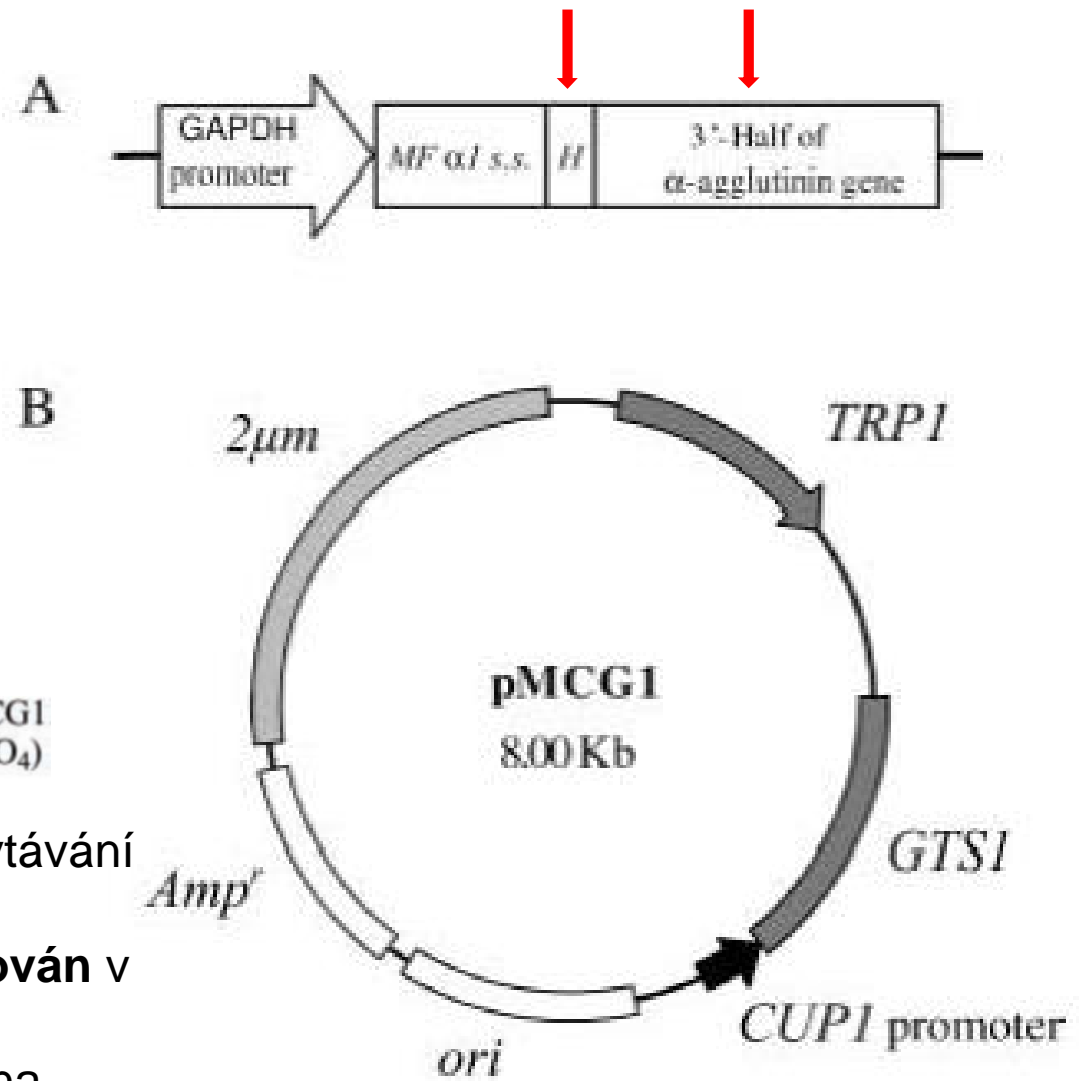
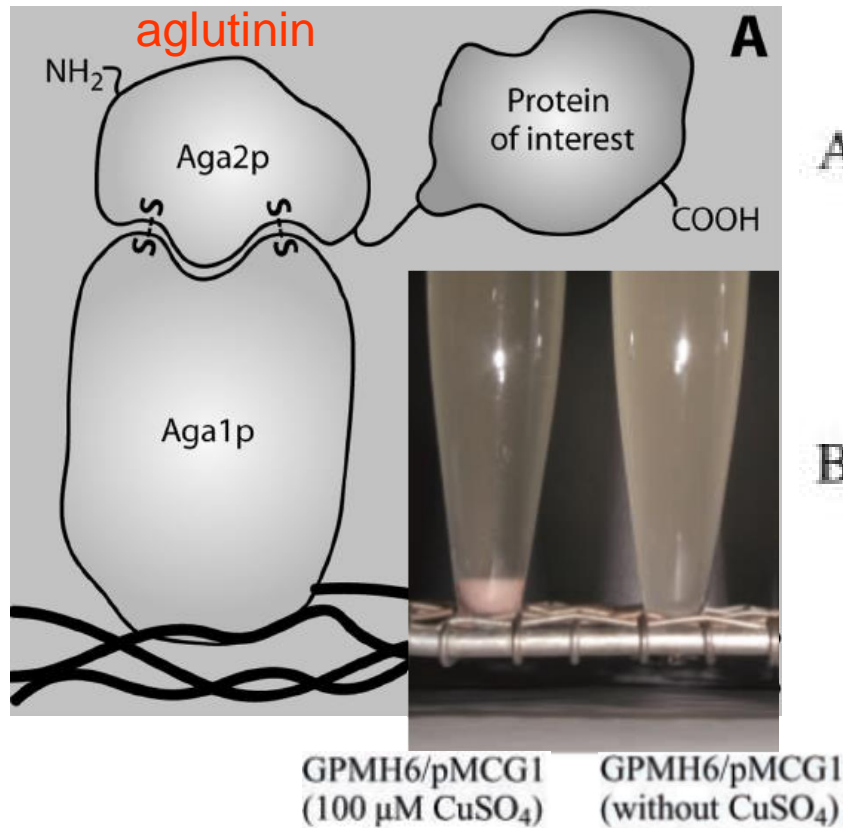
- “ Bakteriální část . Amp resistance, po útek replikace
- “ Kvasinková část . marker, CEN-ARS, TEL
- “ 50-500kbp insert např . lidská genová banka pro HuGO 80000 klon YAC (270kbp)
- “ Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- “ Výzkum savčích telomer a centromer
- “ Pomocí transfekce, lipofekce nebo elektroporace lze dostat YAC i do savčích buněk . náhodně se integrují do genomu - výzkum nesestihnutých genů (dlouhé regulační úseky)



Transformační protokol

- “ Exponenciální kultura
- “ Opláchnout vodou a TE/LiAc roztokem
- “ Rozsuspendovat v TE/LiAc roztoku a přidat DNA (plasmidová/cirkulární i lineární DNA)
- “ Přidat TE/LiAc/PEG4000 roztok
- “ 30 minut na 30°C a poté teplotní šok při 42°C (15min)
- “ Stolit a pelet rozsuspendovat v TE roztoku
- “ Rozetít na selektivní plotnu

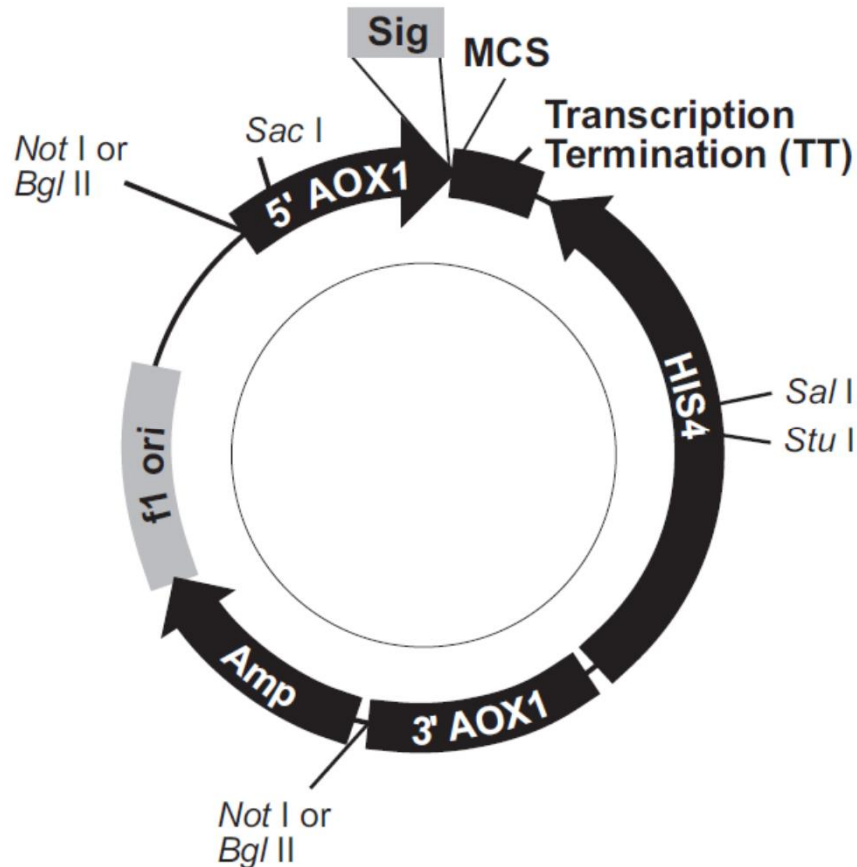
Yeast surface display



- využití i pro biotechnologie . vychytávání těžkých kov (dekontaminace)
- 6xHis-Aga2 (vychytání Cu) **integrován** v genomu
- CUP1-GTS1 (indukce aglutinace) na **plasmidu**

Integrativní plasmidy

- nemají CEN ani 2 μ m ásti

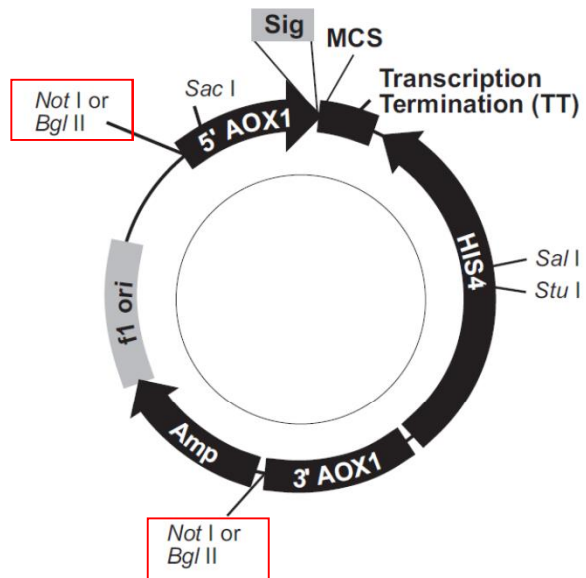


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)

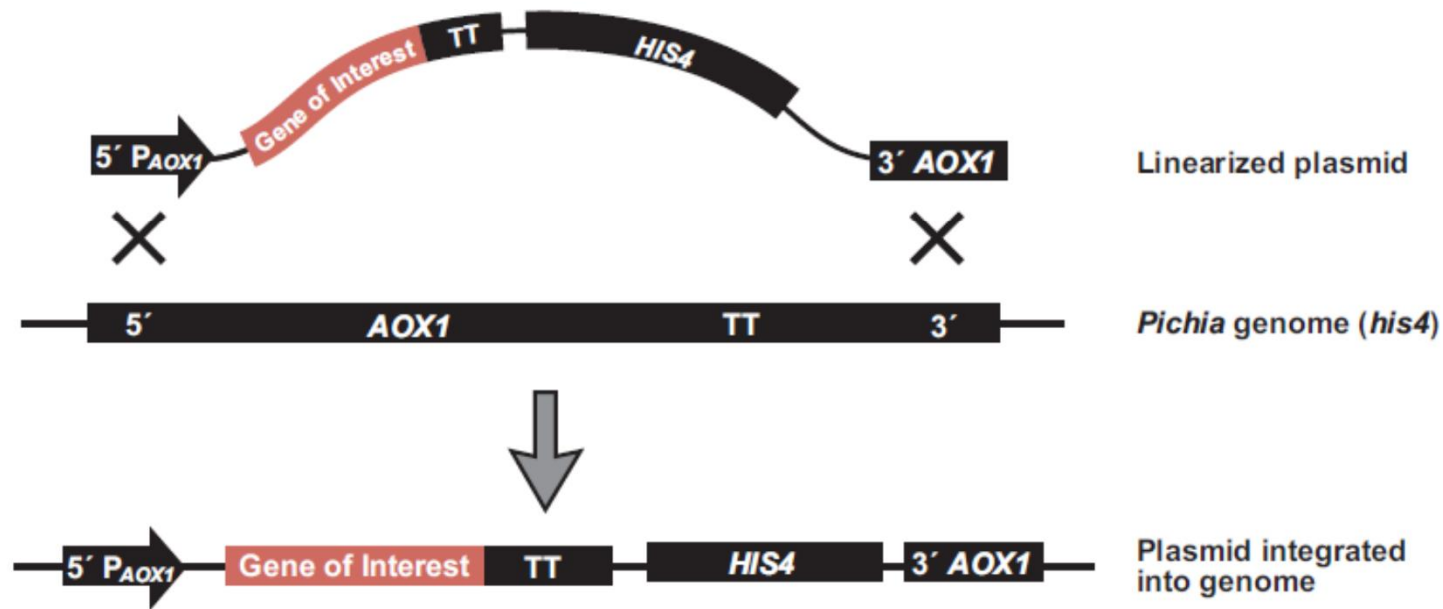
- exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression in <i>Pichia</i></u> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal <u>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 <u>integration into the <i>Pichia</i> genome</u>

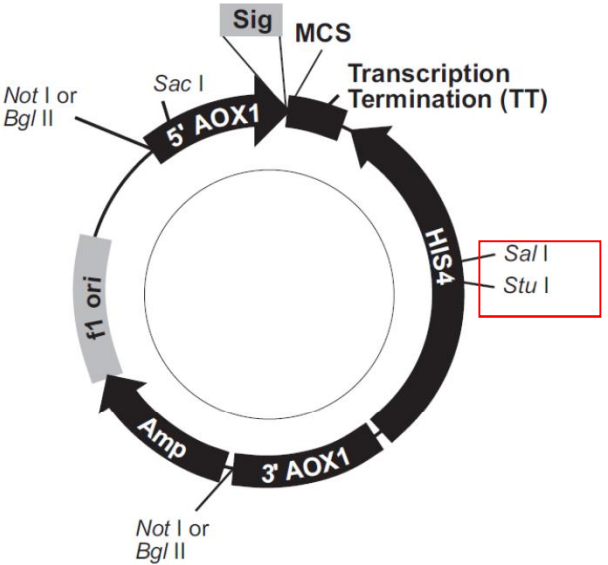
Integrace I.



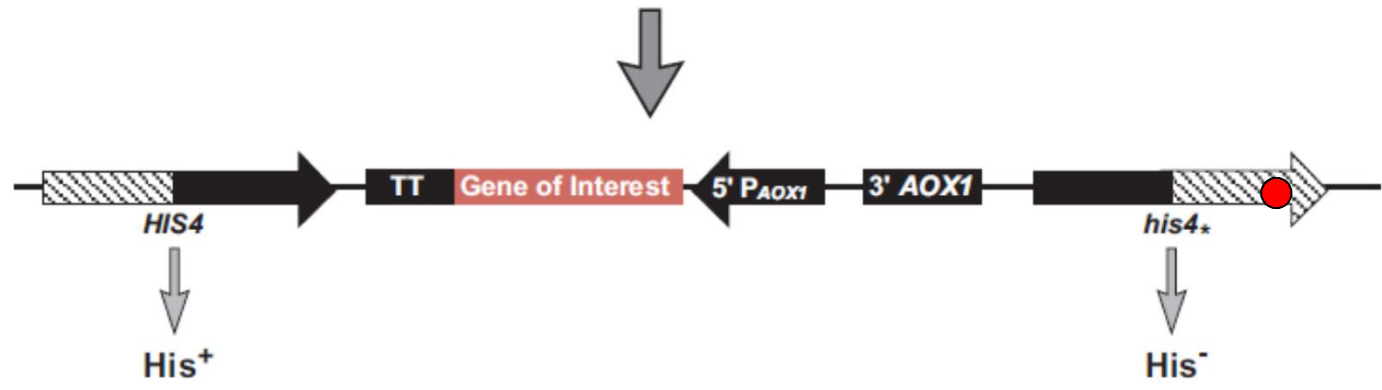
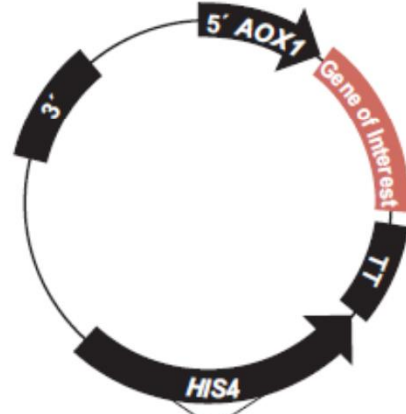
- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru
- integrace do AOX1 lokusu



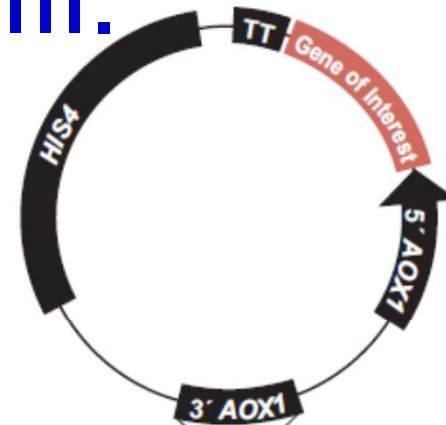
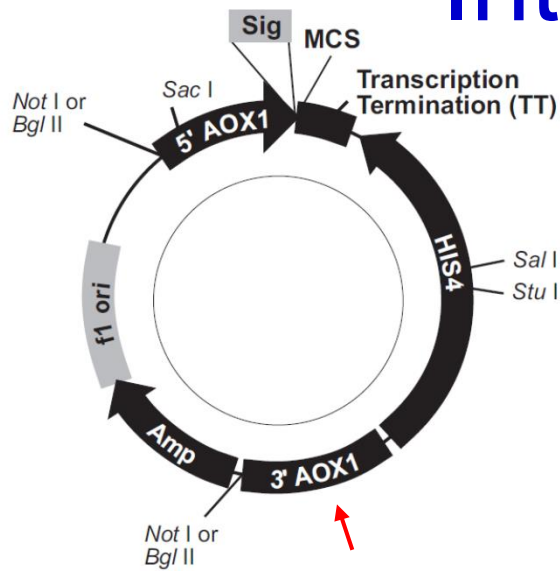
Integrace II.



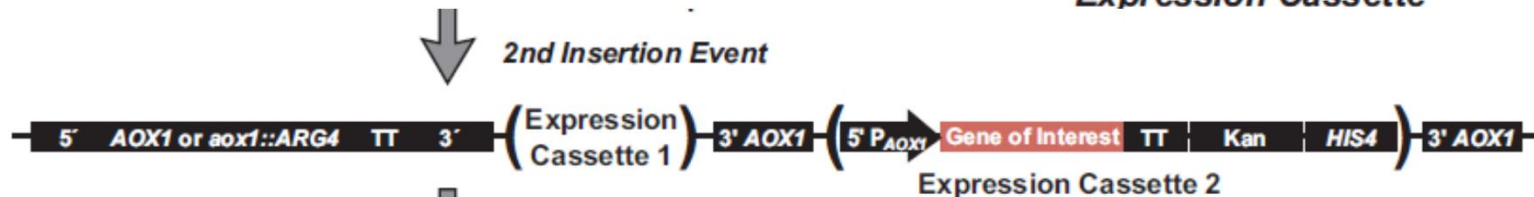
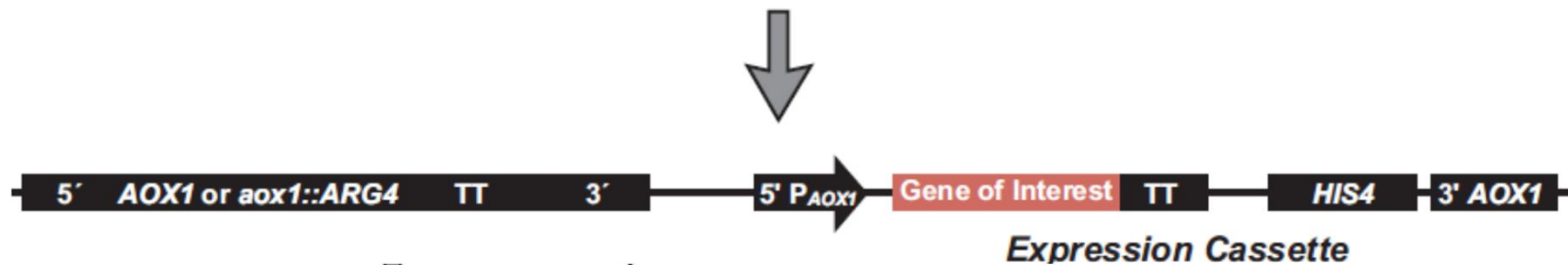
- integrace do *his4* lokusu



Integrace III.



- integrace do AOX1 lokusu



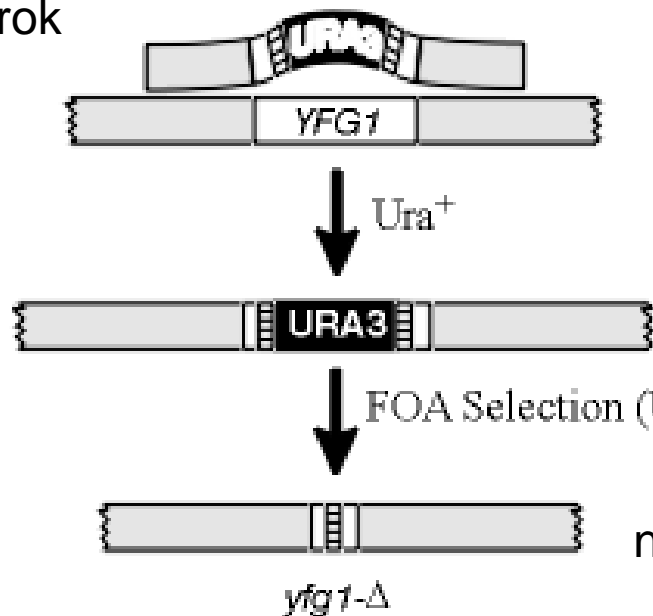
3rd Insertion Event, etc.

u *Pichia pastoris* dochází u 1-10% transformant k vícenásobné integraci . vyzzí exprese Pomocí jiného markeru lze integrovat další kazetu

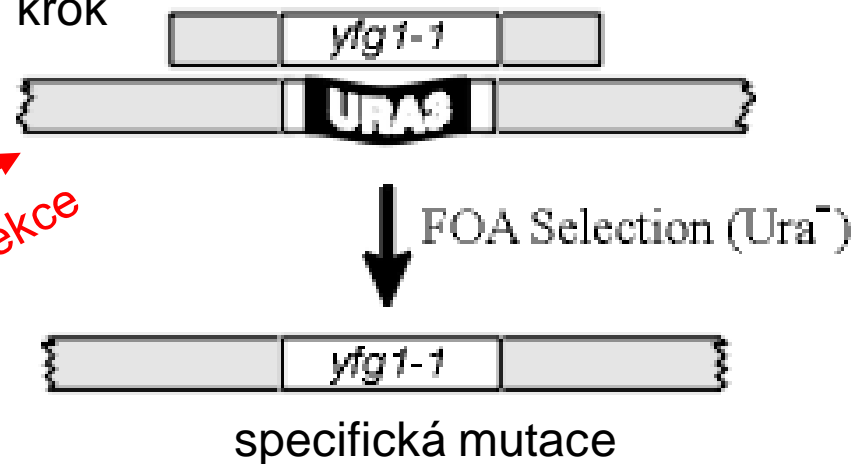
Disrupce/delece genu

- Studium funkce genu . fenotyp (1. delece, 2. mutace)
 - nezbytný/esenciální gen => bu ky pot ebují gen nap . na plasmidu (plasmid shuffling)
 - Oivotaschopné . mutace lze p ímo integrovat do genomu
 - mutantní kmeny se testují na citlivost k r zným šoxin m%o dále je lze k íoit s funk n podobnými geny-mutantami a hledat jejich funk ní vztahy (synthetic lethal x epistatic x suprese)

1. krok



2. krok

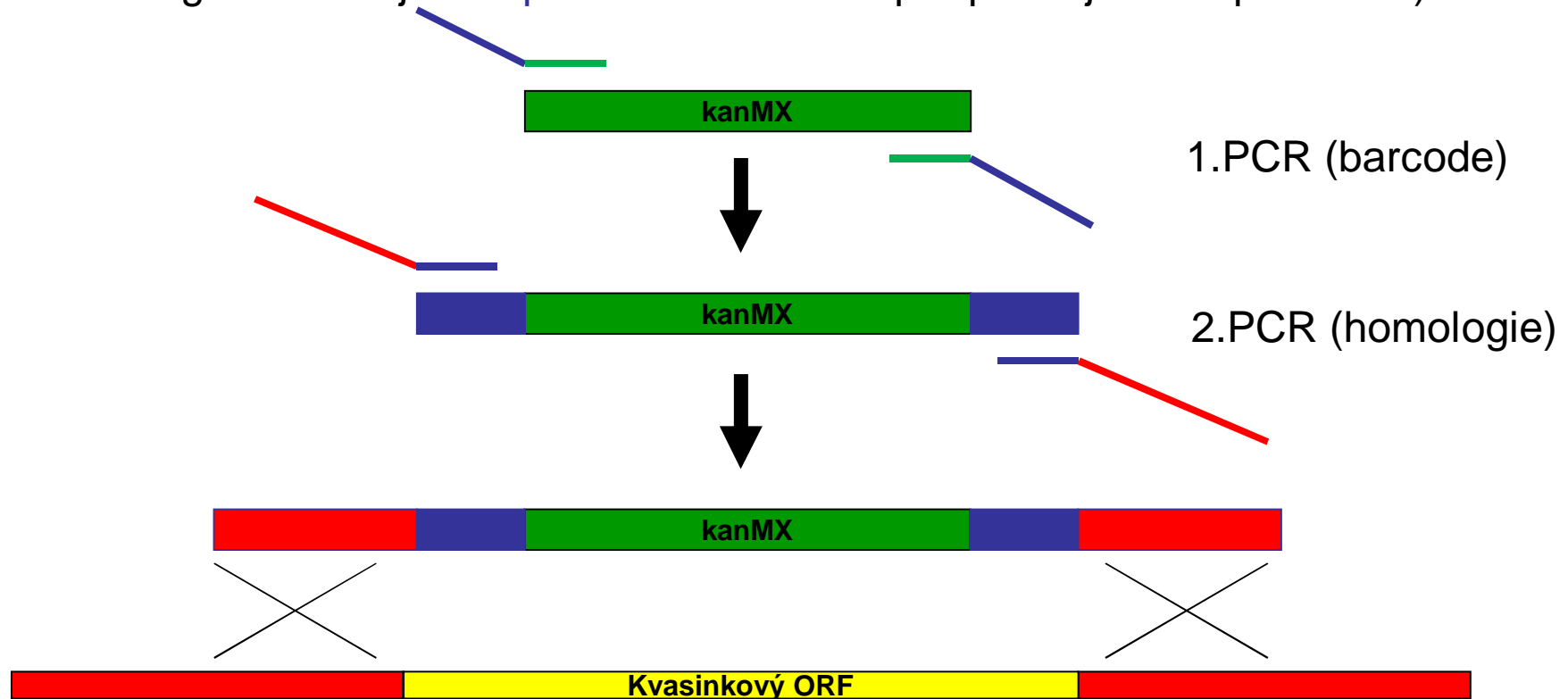


protiselekcce

- “ Využití inhibitoru FOA pro sodlé ení%URA3 markeru (FOA je p em ována Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil => **URA3+** bu ky nerostou, zatímco **ura3-** bu ky jsou rezistentní)
- “ Bu ky se stávají **ura-**, takže **URA3** marker lze využít n kolikrát

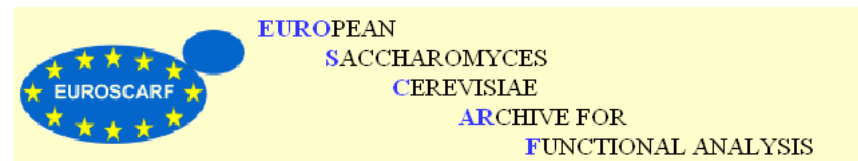
Delece genu - PCR

- “ pro rekombinaci sta í pouze **krátká homologie** (50-100nt pro S.c.)
- “ oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé posta í (p í 2 krokové PCR se krom dlouhé homologie vnesou jez **specifické sekvence** pro pozd jzí manipulace ò)



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

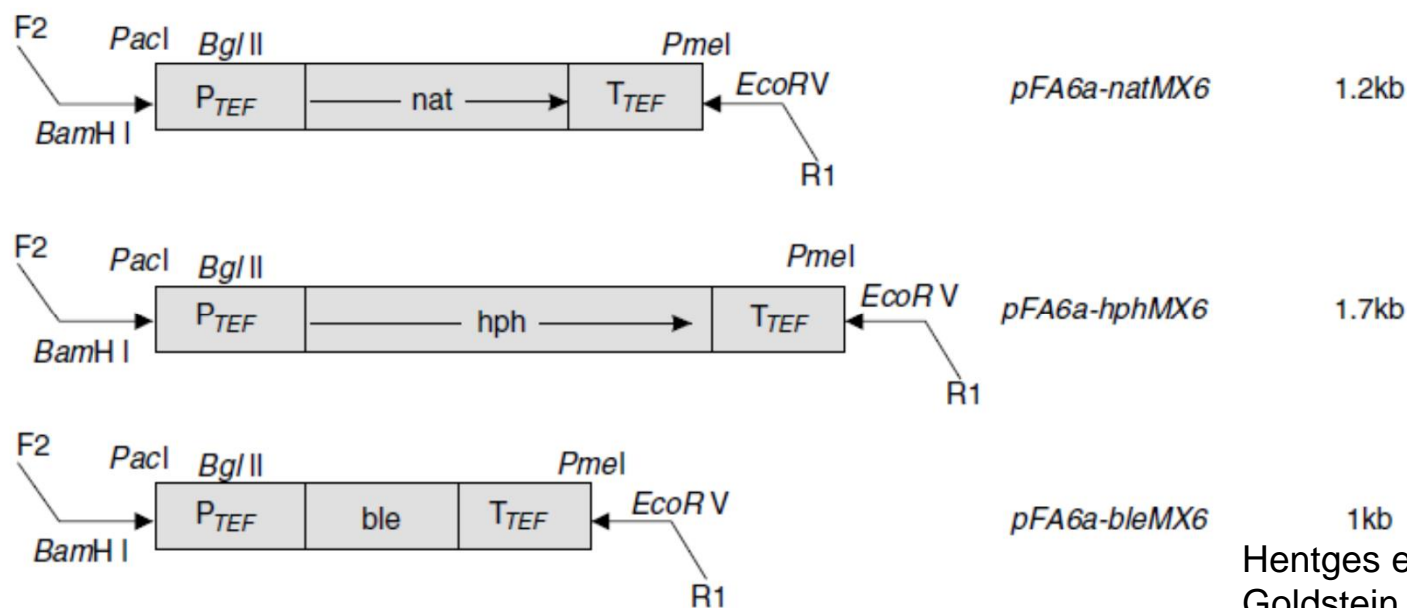
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>



MX6 kazety

- nourseothricin (NAT) . inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa . monoacetyluje NAT)
- hygromycin B . inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygroscopicus*), rezistence kódována *hph* genem z *Klebsiella pneumoniae*
- phleomycin . interkaluje se do DNA a způsobuje DSB (zlomy, glycopeptid z *Streptomyces verticillus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*)

Společná struktura kazety . možnost záměny kazet (pro genetické studie . klonování)

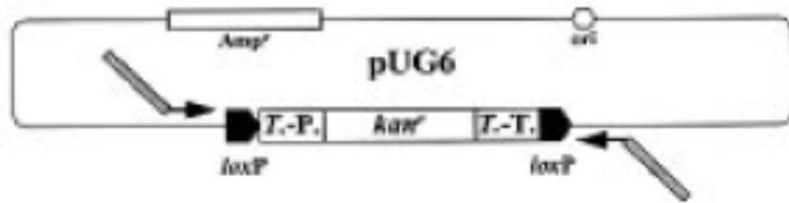


Hentges et al.: Yeast, 2005
Goldstein et al.: Yeast, 1999

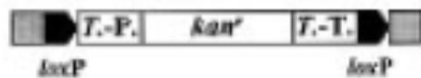
Cre rekombinasa

Watson et al, Gene, 2008

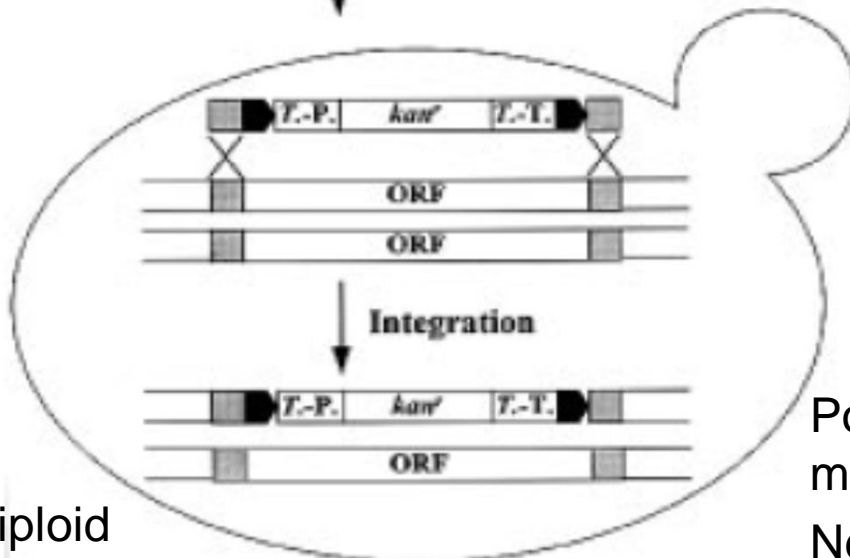
ESSENTIAL



PCR



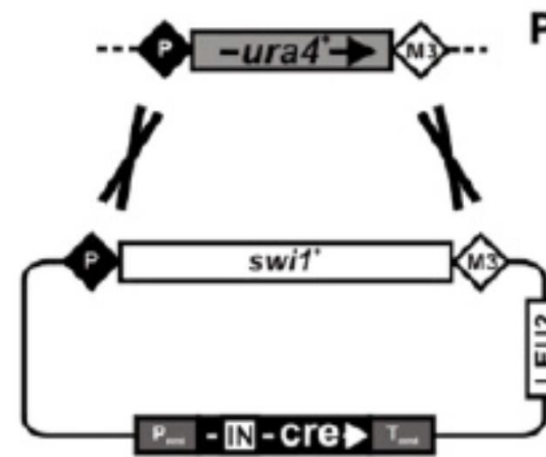
Transformation



diploid

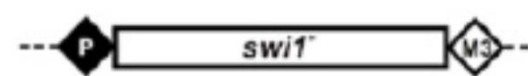
Guldener et al, NAR (1996)

NON-ESSENTIAL CPT^S



PCR product size
2.2 kb

+Cre



CPT^R
PCR product size
3.6 kb

Postup lze pou0ít n kolikrát se stále stejným markerem

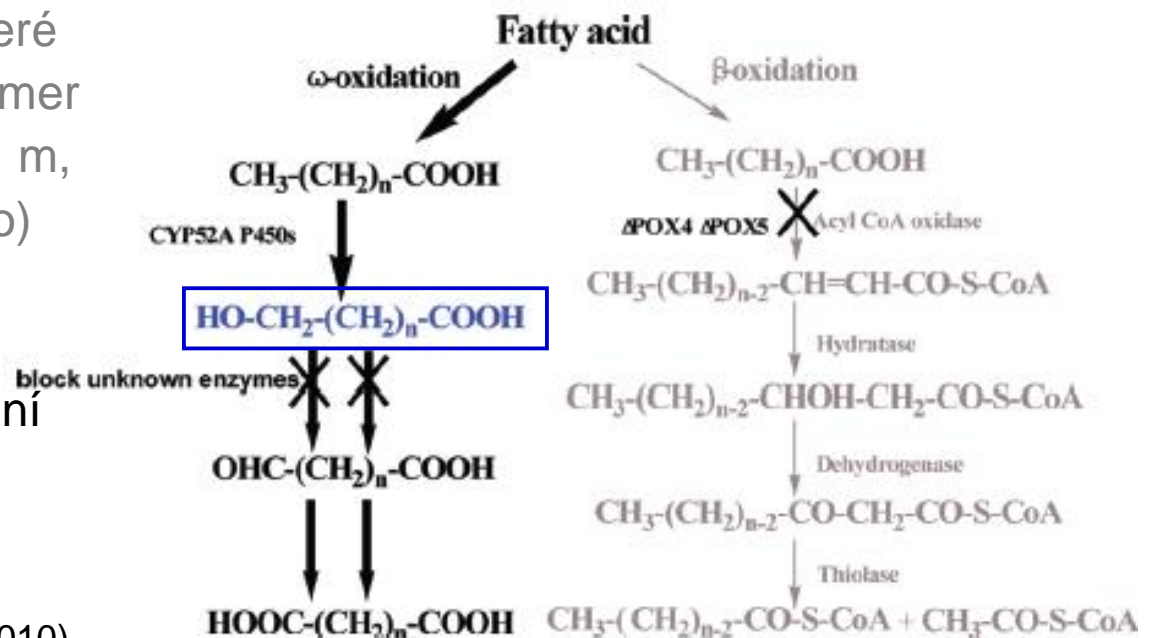
Nevýhoda pro genetické studie (marker nekosegreguje s mutací)

Příprava monomerů pro výrobu plastů využití *Candida tropicalis*

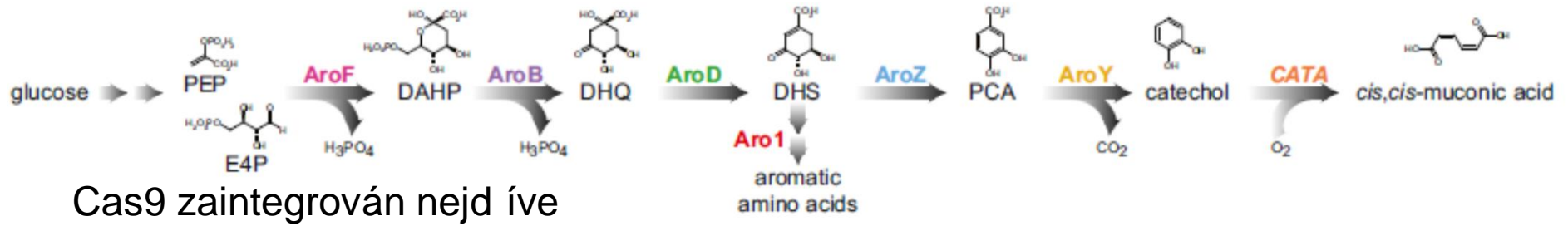
- “ *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- “ mutantní kmen (Δ POX4, Δ POX5) není schopen β -oxidace a přeměňuje je na oxidaci na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- “ pomocí flp rekombinasy odstranili geny oxidázy (4 alkohol oxidázy) a dehydrogenázy (6 alkohol dehydrogenázy), aby eliminovali ω -oxidaci
- “ nový kmen je schopen produkovat

ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenů, bio-odbouratelné na bio-palivo)

- “ další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů

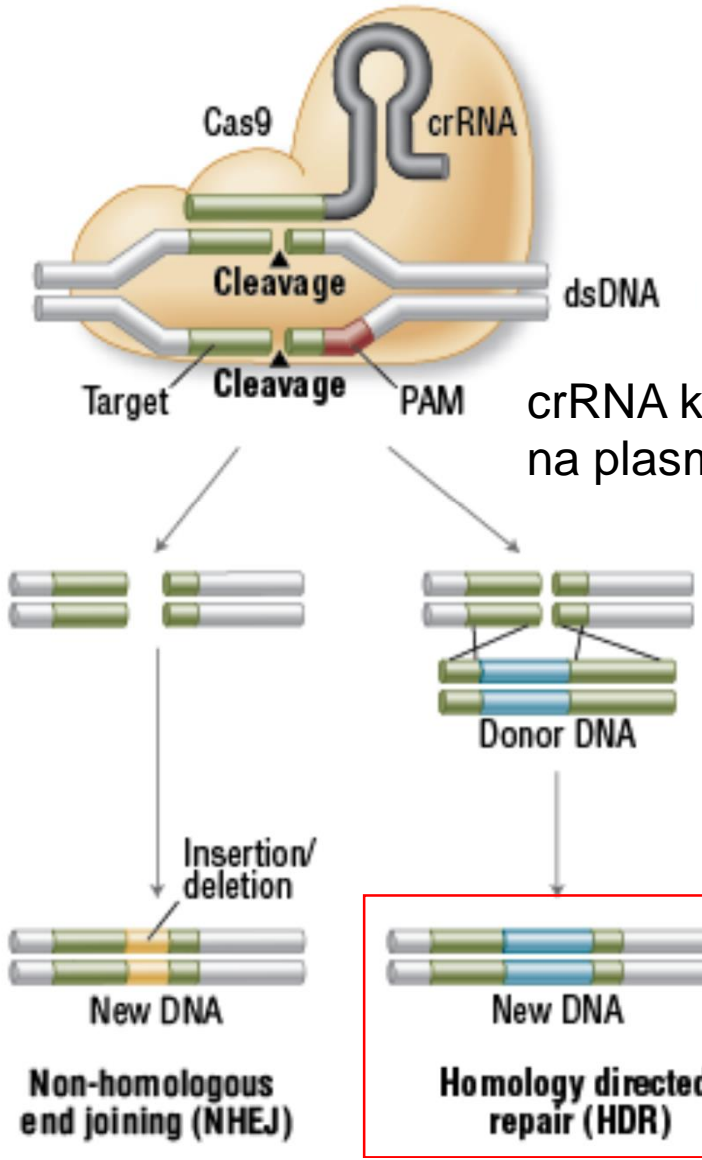


Lu et al., JACS (2010)

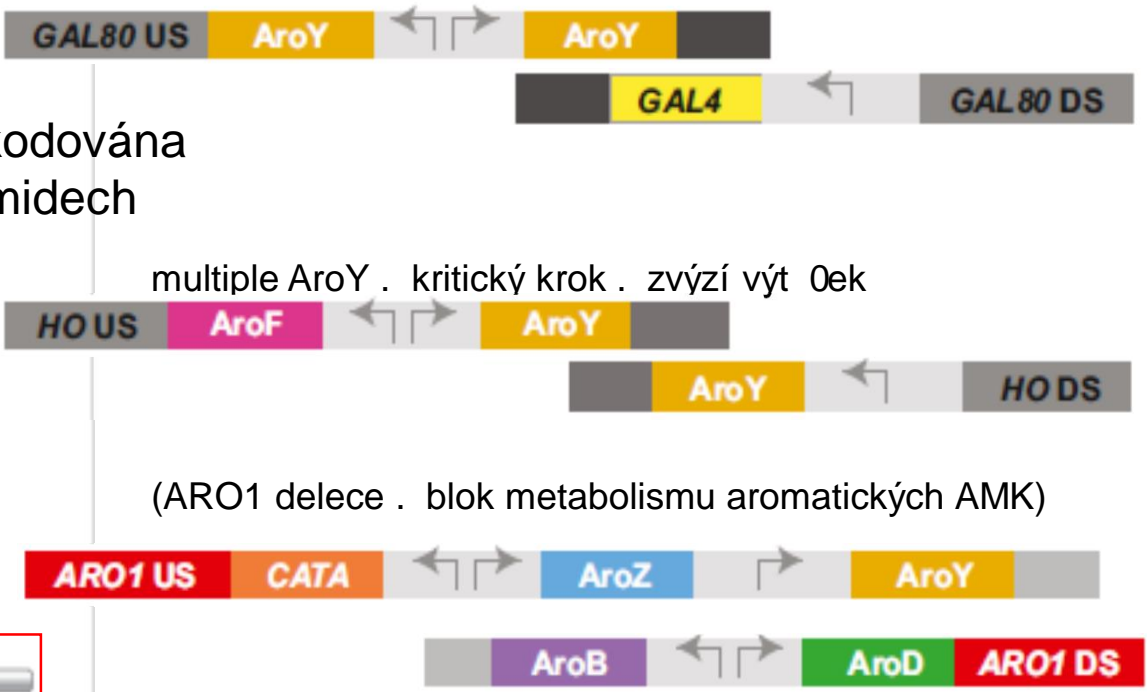


Cas9 zaintegrován nejdříve

CRISPR-Cas9 systém byl použit v *S. cerevisiae* ke vnesení nové metabolické dráhy v jednom integračním kroku do 3 lokusu (GAL80 delece . dereprese galaktosové dráhy)



crRNA kodována na plasmidech

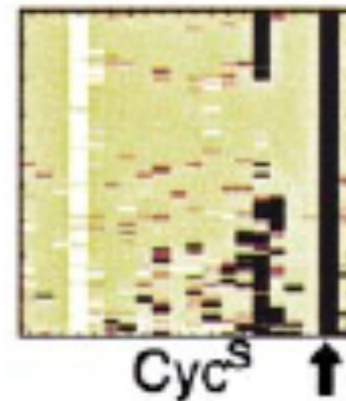
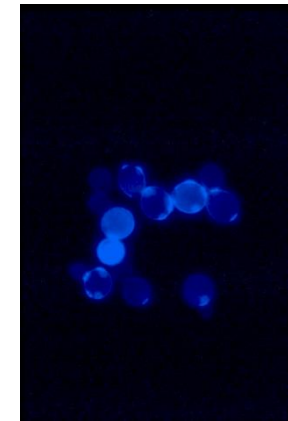
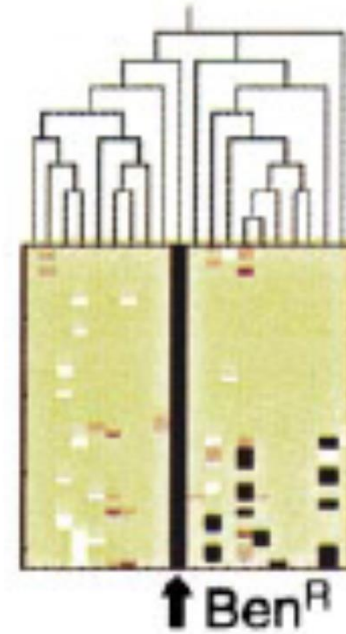
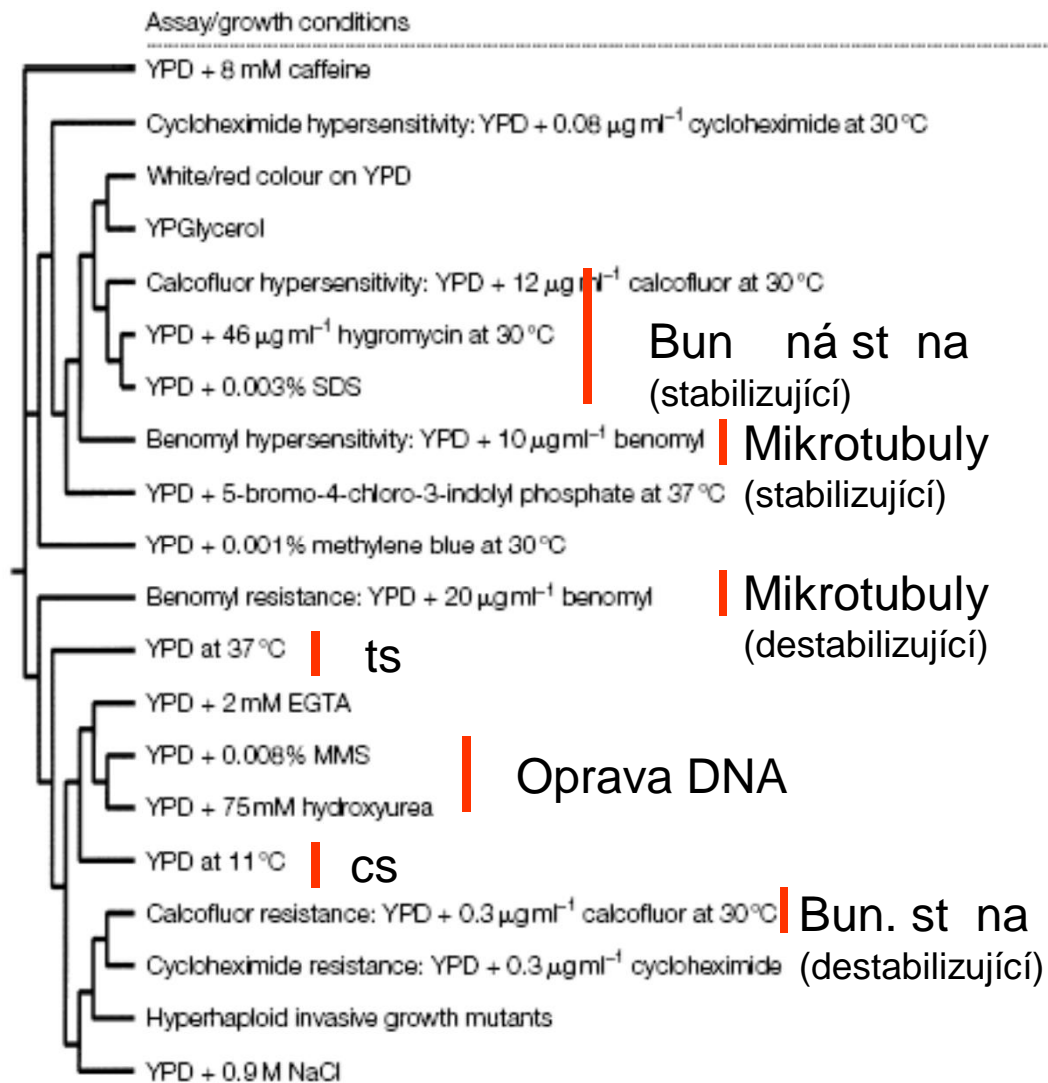


multiple AroY . kritický krok . zvýší výtěk

(ARO1 delece . blok metabolismu aromatických AMK)

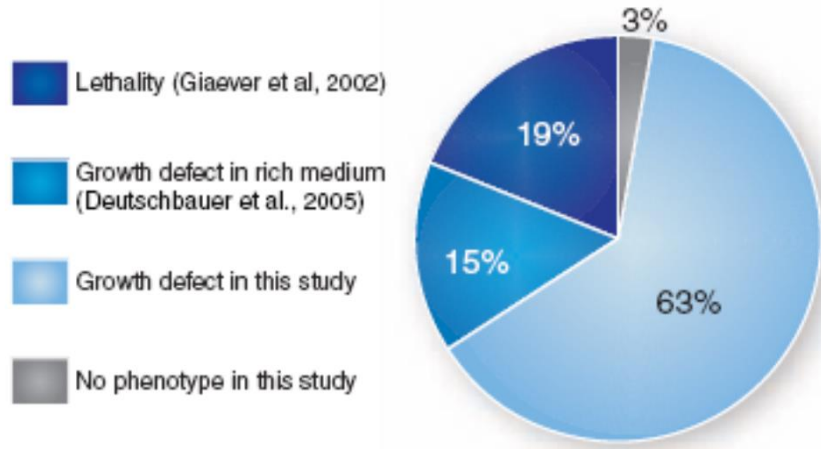
účinnost všech 6 integrací najednou pouze 5%
Dosaeno syntézy kyseliny mukonové - plasty

EuroFan projekt - testy fenotypu



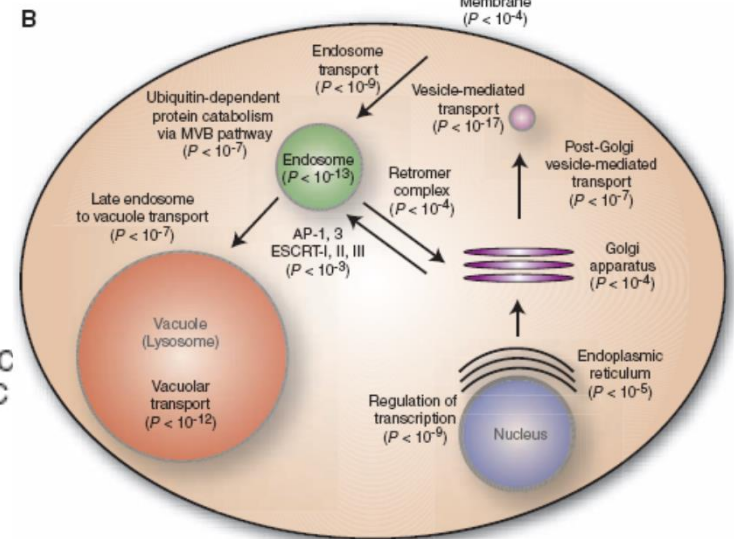
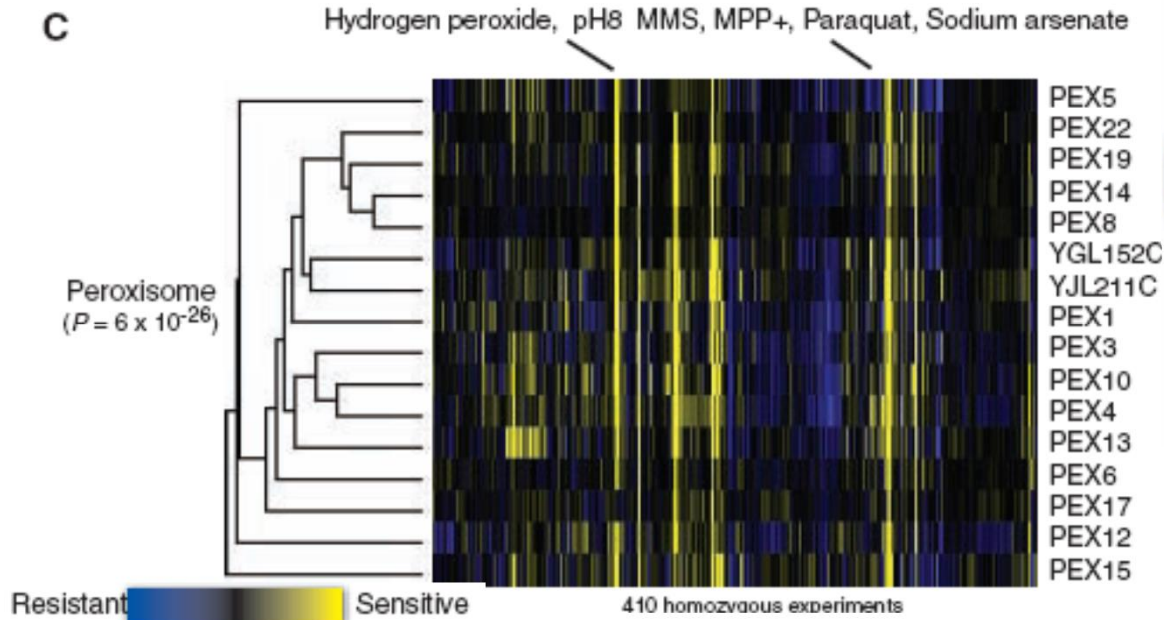
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů anotace v databázích (genová ontologie)

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



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

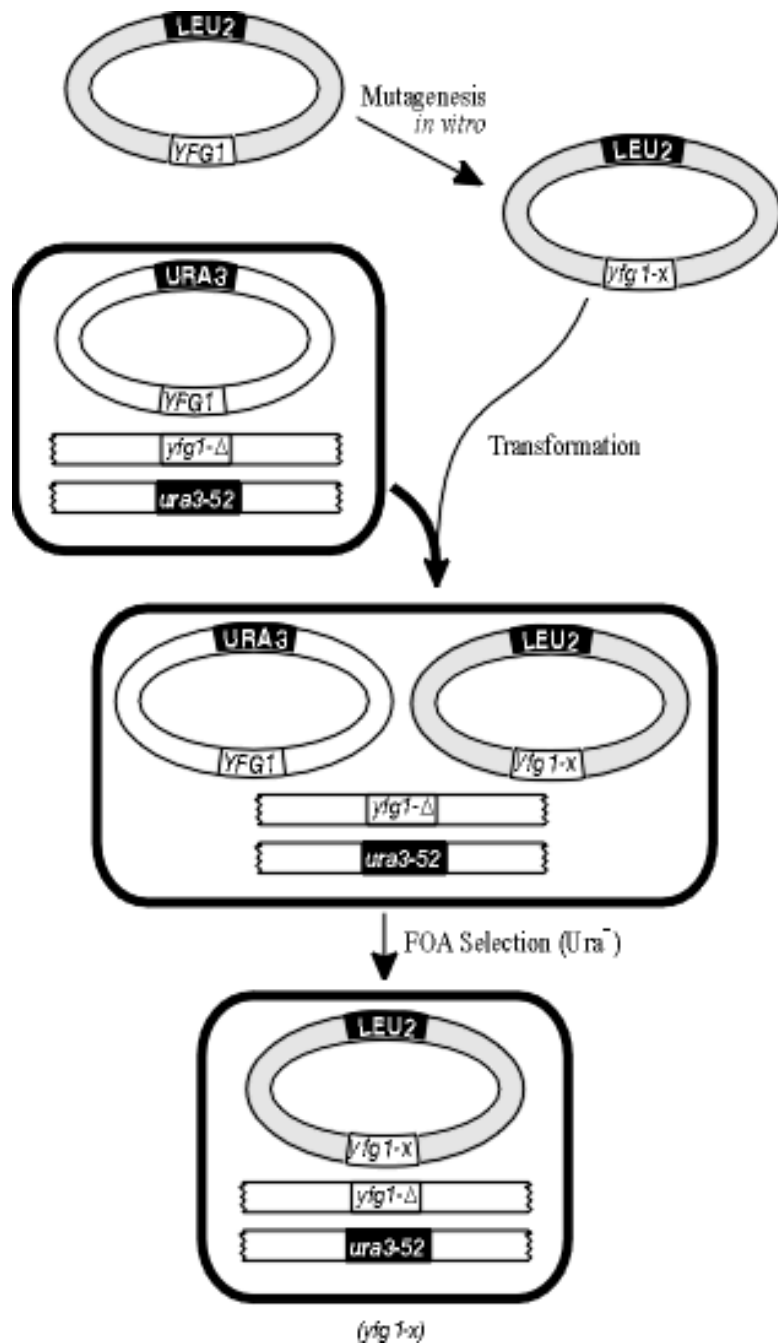
- Podobné profily svádí o funkční podobnosti



Geny/Proteiny peroxisomu

Science 320 (2008), p.362

Plasmid shuffling



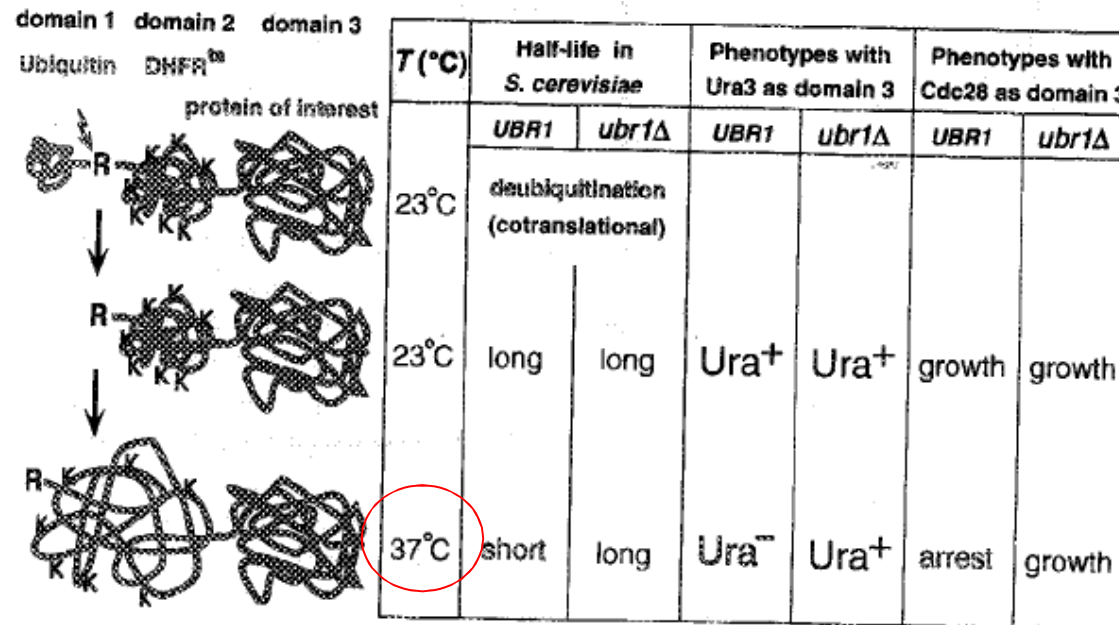
Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v dele ní mutant p ítomna extra divoká kopie genu nap . na plasmidu

Na dalším plasmidu m ůže být vnesena mutovaná verze *yfg1* . její efekt se projeví a0 po odstran ění plasmidu s divokou kopií genu (pomocí FOA)

Podobn ě lze pouít *ade2*, *ade3* systém s *YFG1* wt genem na plasmidu s *ADE3* (kolonie jsou ěrvené díky *ade2* mutaci) . po ztrát ě plasmidu jsou sektory kolonii bílé (bez Ade3p enzymu je metabolická dráha blokována d íve ne0 vzniká ěrvený metabolit)

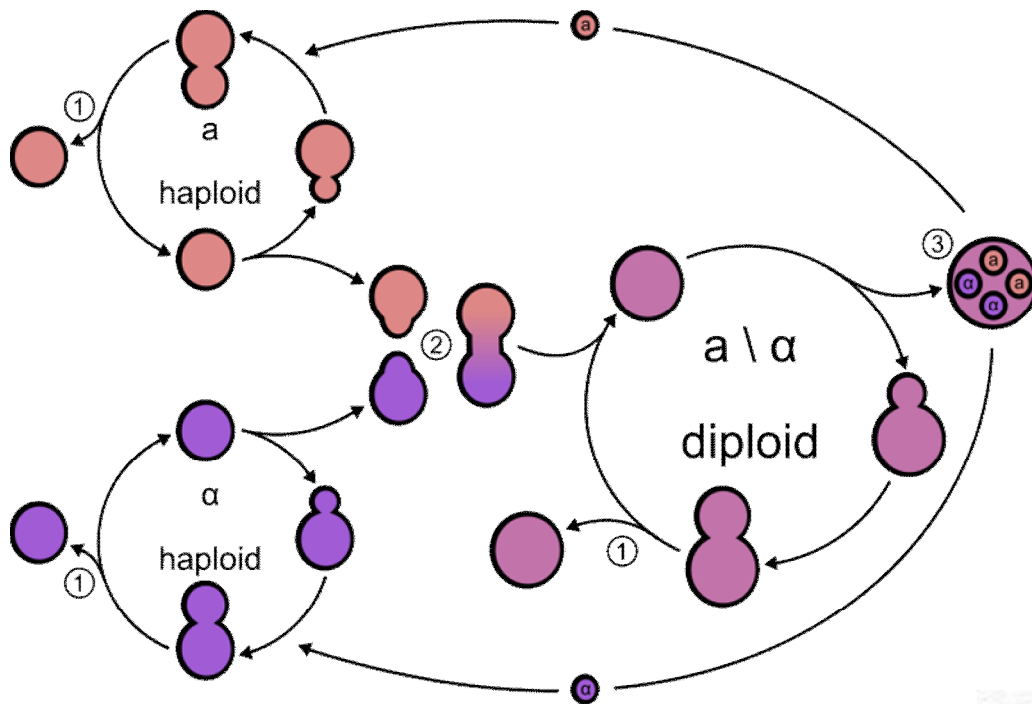
ts mutanty

- ts mutanty jsou výhodné pro studium funkce esenciálních genů. mutanty jsou normální na permissivní (25°C) teplotě, ale nemohou dokončit buněčný proces vyžadující aktivní protein za restriktivní teploty (37°C)
- ts mutanty = v tuzinou 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)
- f ze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (f ze s CDC28 . kvasinky arestují v G1 fázi)

Životní cyklus *S. cerevisiae*

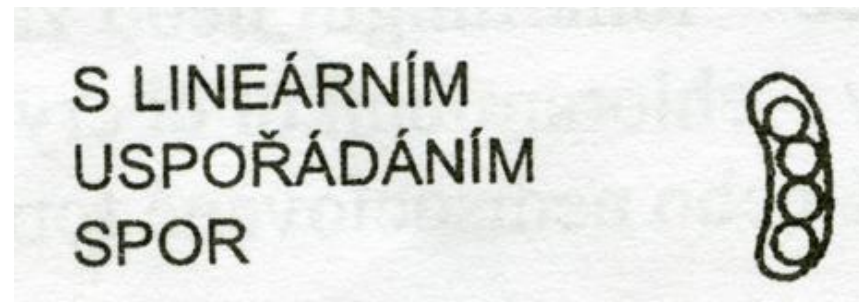
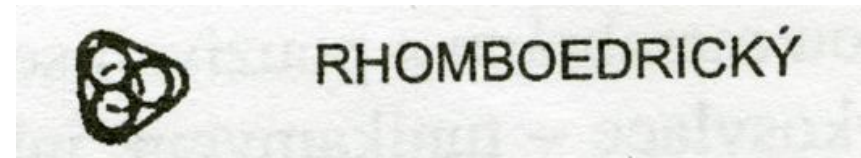


- Deleci i mutaci lze provést v haploidní i diploidní buňce

- v haploidní buňce hrozí suprese defektu proto je lépe používat diploidní buňky (druhá kopie zůstává nezměněná)

- lze přivést dvojitého mutantu k životu 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)

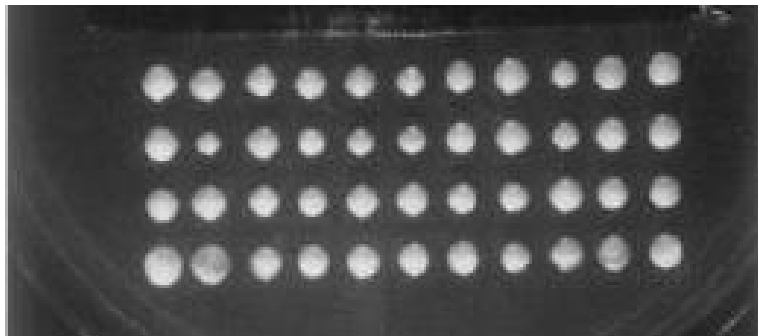
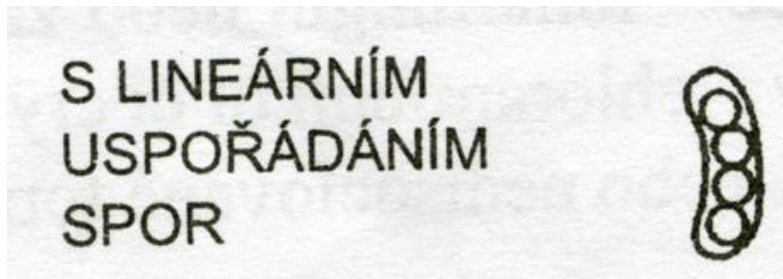


- Více v dalších přednáškách

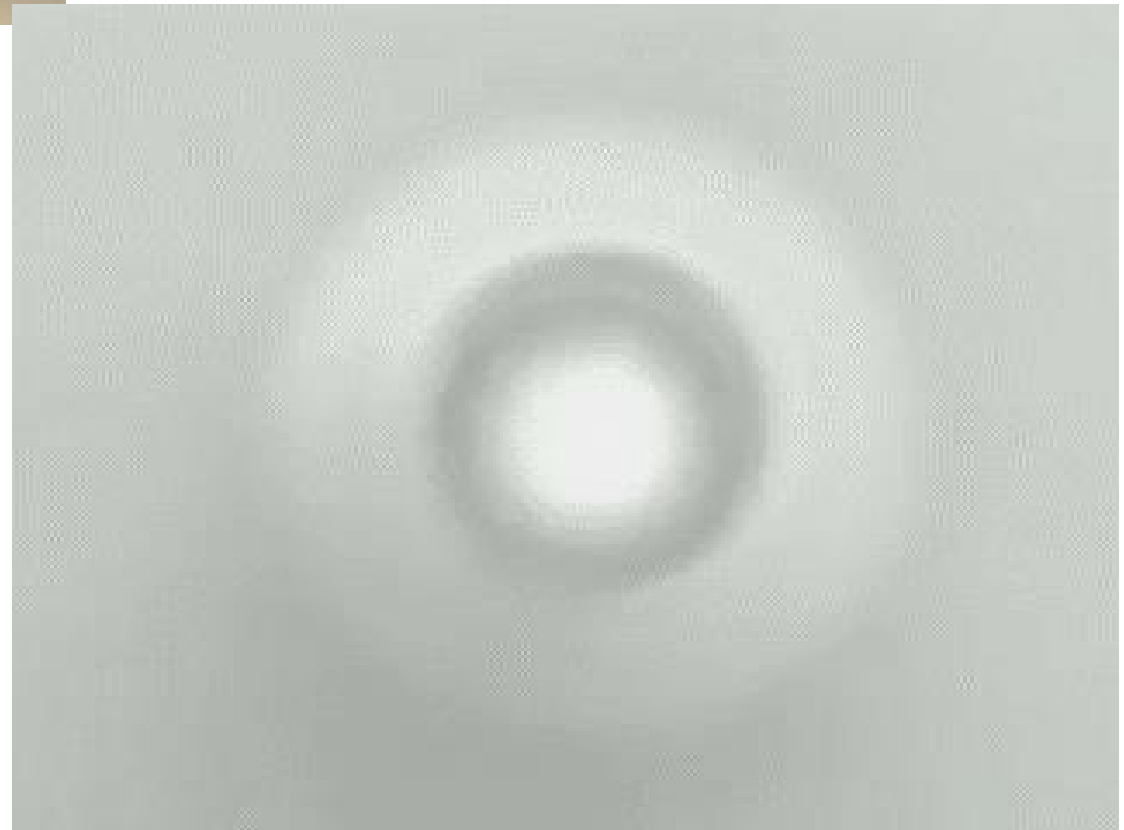
Tetrádová analýza

(*S. pombe*)

genetické vztahy
k í0ení dvou mutant



YPD



Tetrádová analýza

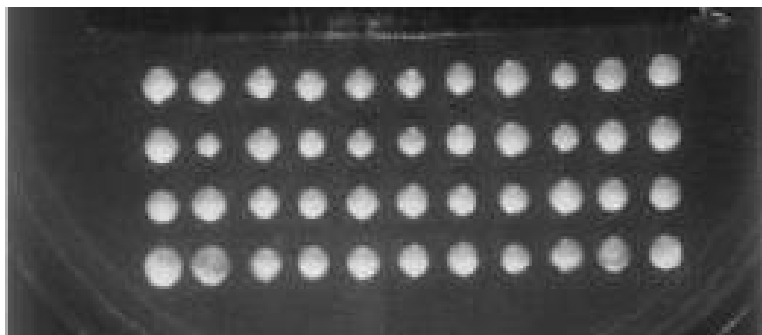
genetické vztahy
k í0ení dvou mutant



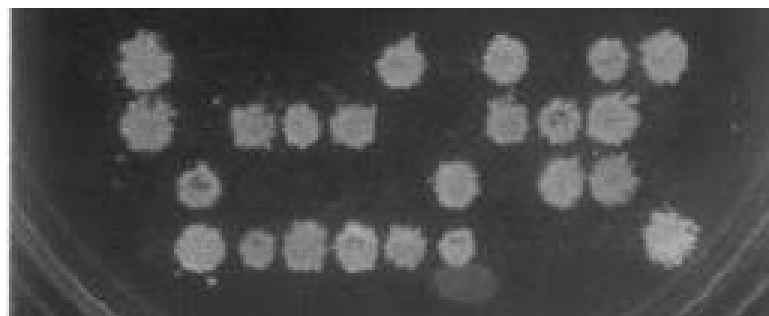
A A a a
A a A a
A a A a

Segregace 2:2
Mendlovy zákony ÷

. . .



YPD



Selektivní médium
(SD-ura ... testy)

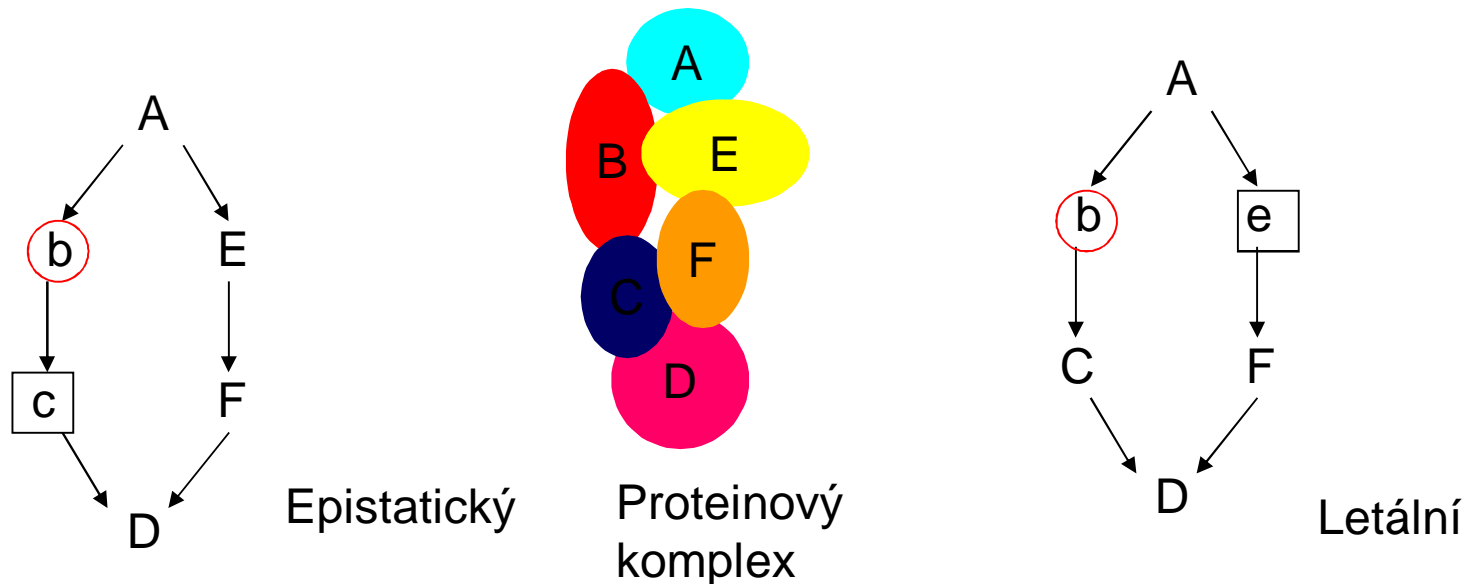
Dvojité mutanty . funk ní p íbuznost

haploid x haploid => diploid . stejný fenotyp - identický gen

- bez fenotypu . díky wt alele (r zné geny)

sporulace => haploid . stejný fenotyp . epistatický (funk n p íbuzné geny)

- aditivní a0 letální (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)



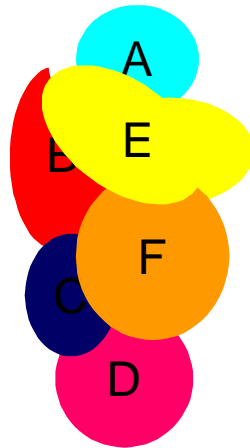
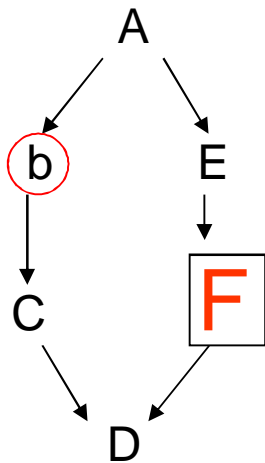
Mutagenese pomocí hydroxylaminu ò hledání (screening) letálního mutanta .
mutagenese kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA . viz
plasmid shuffling)

Pomocí těchto genetických metod byly analyzovány metabolické dráhy ò
proteinové komplexy ò

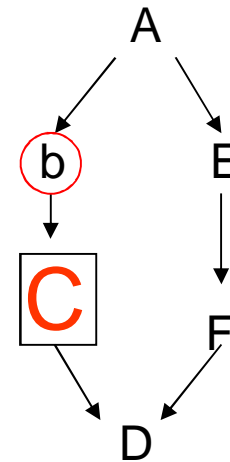
Supresory

Supresory potlačují p v odní fenotyp . mutace tého0 genu napraví%p v odní mutaci

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



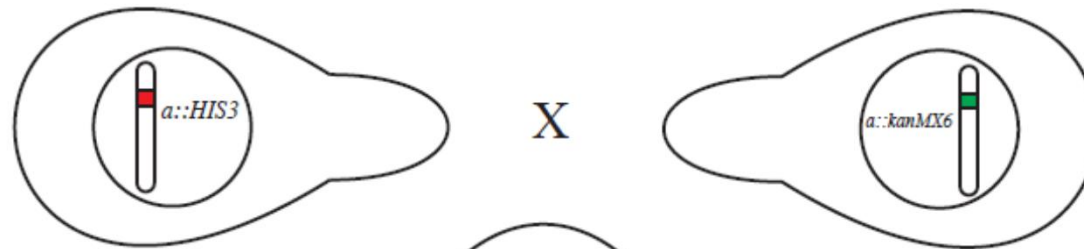
Proteinový komplex



Příprava aneuploidních buněk

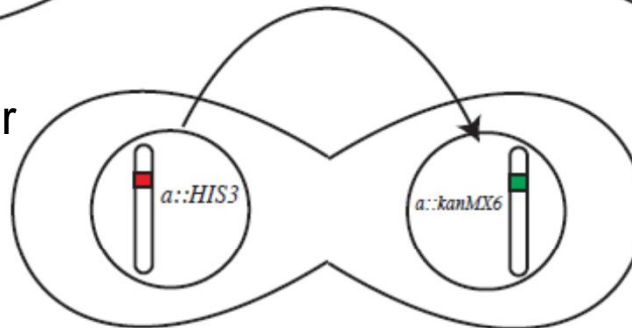
MAT α , kar1 Δ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3

MAT α , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100



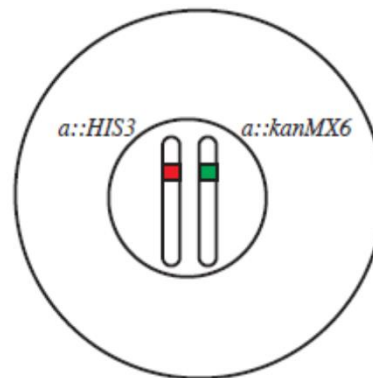
KAR1 gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

a::HIS3 + a::kanMX6 => *a::*specifické promotory - rezistence pouze v (*a*) haploidních buňkách



Select for: Can^R, -His and Kan^R

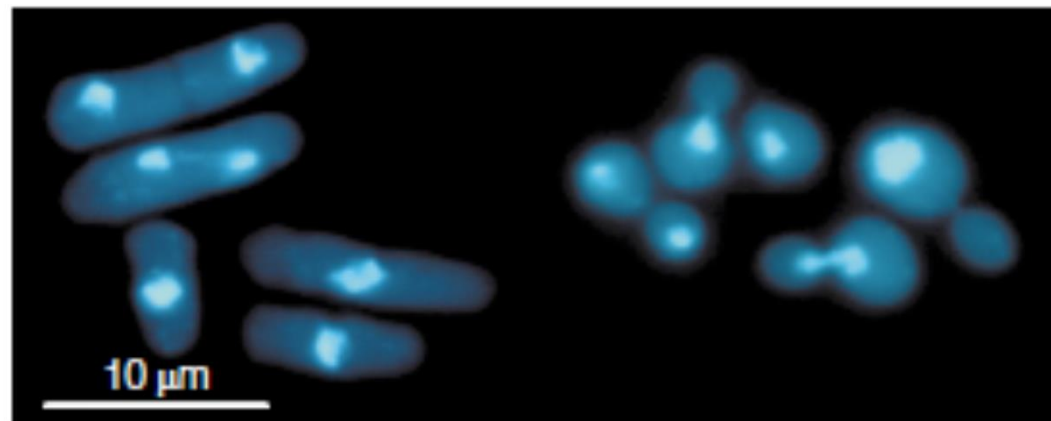
Studium vlivu aneuploidie na buňku (u člověka se podílí na kancerogenezi, aneuploidie v 90% lidských nádorů)



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.