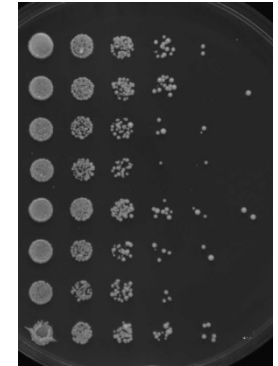


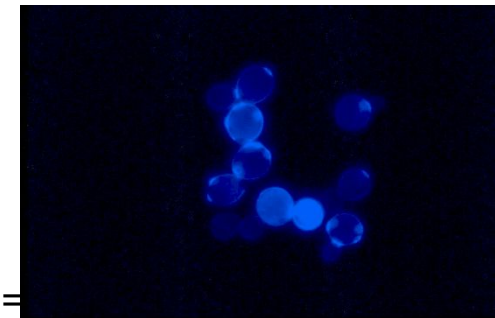
# Osnova 4. přednášky

- Genetické metody
  - Plasmidy
  - Integrace do genomu
  - Teplotně-sensitivní mutanty
  - Tetrádová analýza
  - Syntetická letalita, suprese
- Buněčný cyklus
  - průběh a regulace BC
  - synchronizace buněk
  - mechanismy regulace párování
  - homothalické kmeny

# Výhody kvasinkového modelu



- Rychle se množí 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, inzerční a mutantní kmeny**
- Vydrží v >15% glycerolu na -70°C „indefinitely“
- Techniky barvení (např. aktinový cytoskelet = phaloidin, 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)



Nevýhoda – malé buňky, malé orgány (např. nejsou vidět chromosomy – SMC)

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  
*leu2Δ* – delece  
*leu2-1* – mutace  
(identifikační číslo alely)  
*LEU2::HIS3* – inzerce  
*HIS3* genu v lokusu  
*LEU2*

Nomenklatura pro *S.p.*:  
SPAXXXX:  
SP=*S. pombe*  
A= 1. chromosom  
...

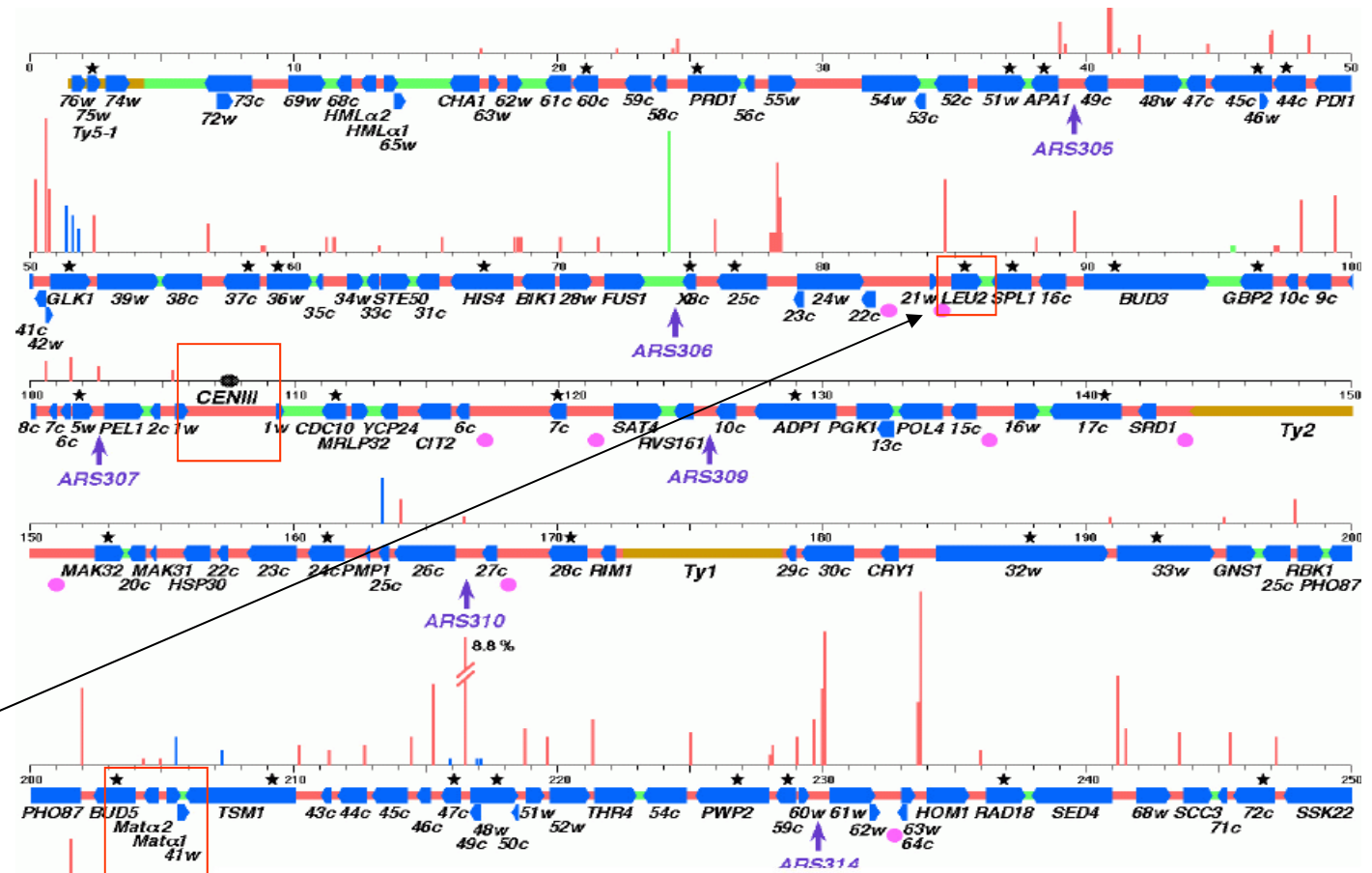


Table 1 | Nomenclature in the two yeast species

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Wild-type gene	<i>YFG1</i>	<i>yfg1<sup>+</sup></i>
Deletion (null) mutant	$\Delta yfg1$ <i>yfg1Δ</i>	$\Delta yfg1$ <i>yfg1Δ</i>
Recessive mutant	<i>yfg1-1</i>	<i>yfg1-1</i>
Dominant mutant	<i>YFG1-2</i>	<i>yfg1-2</i>
Protein	Yfg1 YFG1p	Yfg1 yfg1p

Yfg typically means 'your favourite gene'. The 'p' designation for proteins (for example, Yfg1p) is occasionally used. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

Forsburg: NRG, 2001  
Baudat a Nicolas, PNAS, 1997

# Laboratorní kvasinkové kmeny

**S. pombe – „501“**

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



IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

**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

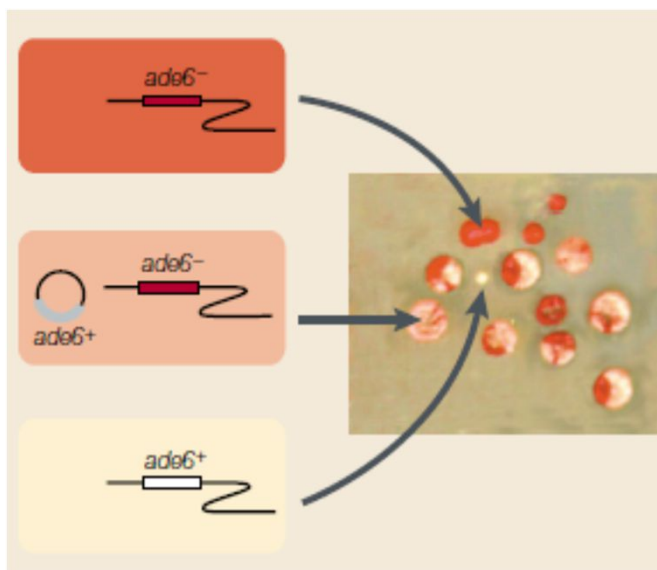
**Sources:** [Biosystems:YSC1058](#)

auxotrofie – využívána pro selekci

Dvojhybridní  
systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-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<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-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, cyh<sup>r</sup>2, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3 :: GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

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



### Genotype

*MAT $\alpha$* , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*,  
*gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*,  
*GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*,  
*URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

*MAT $\alpha$* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*,  
*leu2-3, 112*, *gal4 $\Delta$* , *met<sup>-</sup>*, *gal80 $\Delta$* ,  
*URA3 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

*MAT $\alpha$* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*,  
*trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh<sup>r2</sup>*,  
*LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*,  
*URA3 :: GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-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>
<b>Regulated promoter</b>	<i>GAL</i> (galactose regulated)	<i>nmt</i> (thiamine regulated)
<b>Plasmid replication origins</b>	<i>ARS1</i> or $2\mu$	<i>ars1</i>
<b>Auxotrophic markers</b>		
Uracil, orotidine 5'-phosphate decarboxylase Select against with 5-FOA	<i>URA3</i>	<i>ura4<sup>+</sup></i>
Leucine, $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase	<i>LEU2</i>	<i>leu1<sup>+</sup></i>
Adenine, phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase Accumulates red colour	<i>ADE2</i>	<i>ade6<sup>+</sup></i>

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

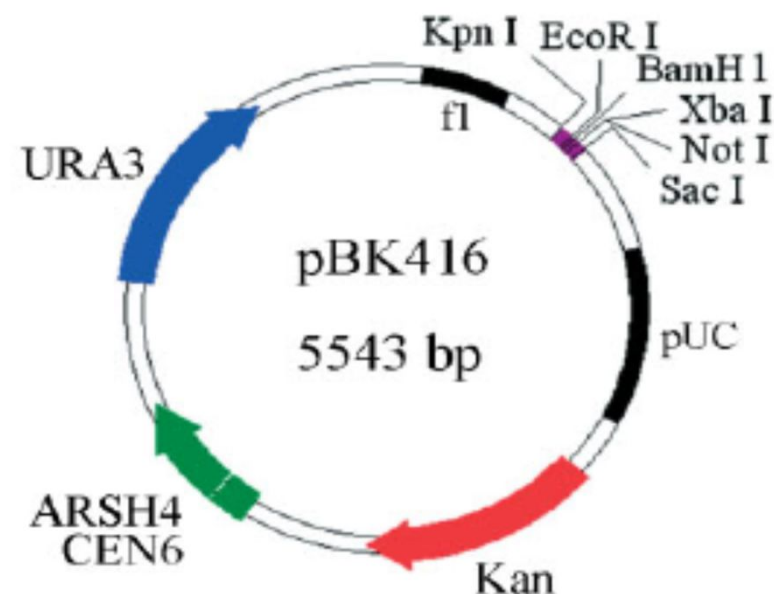
Forsburg: NRG, 2001

- **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 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 verticulus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*

# Shuttle vektory

- vychází z 2 $\mu$ m plasmidů nebo centromer (*S.c.*; 2 $\mu$ m přítomné také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilorum*)
- Kvasinková část – marker (URA3, NAT ...), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 $\mu$ m (~50 kopii 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 <sup>b</sup>
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) <sup>c</sup>	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) <sup>d</sup> +++ <sup>d</sup>
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>CUP1</i>	Indukovány mědí	
<i>MFA1</i>	MATa specifický (haploid specifický)	



**TABLE 2 | Metabolic engineering of yeast to improve the production of fatty acid-derived biofuels.**

Strategies	Target	Strain	Genetic manipulation	Titer/achievement	References
Improving precursor supplement	FFA (C16: 66.3%, C18: 21.1%)	BY4727	Overexpression of <i>TesA</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , and <i>FAS2</i>	0.4 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FFA (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>Mus musculus ACOT5</i>	0.493 g/L	Chen et al., 2014b
	FFA (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>Mus musculus ACL</i> . Deletion of <i>IDH1</i> and <i>IDH2</i>	0.13 g/L*	Tang et al., 2013
	FFA (C16, C18)	YPH499	Deletion of <i>FAA1</i> and <i>ADH1</i>	0.14 g/L	Li et al., 2014
	FFA (C16, C18)	CEN.PK2	Overexpression of the reversed $\beta$ -oxidation pathway and <i>SeAcsl641P</i> . Deletion of <i>ADH1</i> , <i>ADH4</i> , <i>GPD1</i> , and <i>GPD2</i>	0.011 g/L	Lian and Zhao, 2015
	TAL	BY4741	Overexpression of the <i>Gerbera hybrid</i> 2-pyrone synthase (2-PS)	2.2 g/L	Cardenas and Da Silva, 2014
	Fatty alcohol (C16: 91.1%; C18: 8.9%)	BY4742	Overexpression of mouse <i>FAR</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i>	0.086 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FAEE (C16, C18)	BY4742	Overexpression of <i>AbWS</i> , <i>ACC1</i> , <i>FAS1</i> , and <i>FAS2</i> . Deletion of <i>POX1</i>	0.005 g/L	Runguphan and Keasling, 2014
	FAEE (C16, C18)	BY4741	Overexpression of <i>WS2</i> . Deletion of <i>FAA2</i> , <i>ACB1</i> , <i>PXA2</i>	0.025 g/L	Thompson and Trinh, 2014
	FAEE (C16, C18)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> . Deletion of <i>ARE1</i> , <i>DGA1</i> , <i>ARE2</i> , <i>LRO1</i> , and <i>POX1</i>	0.017 g/L	Valle-Rodríguez et al., 2014
	FAEE (N/A)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> , <i>ADH2</i> , <i>ALD6</i> , and <i>SeAcsl641P</i>	0.002 g/L*	de Jong et al., 2014
	FAEE (C16, C18)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> , <i>ACB1</i> , and <i>GAPN</i>	0.048 g/L	Shi et al., 2014a
	FAEE (C16, C18)	CEN.PK113	Overexpression of <i>WS2</i> and phosphoketolase pathway	0.026 g/L*	de Jong et al., 2014
	FAEE (C4–C10)	CEN.PK113	Overexpression of the reversed $\beta$ -oxidation pathway and <i>EEB1</i> or <i>EHT1</i>	0.75 g/L	Lian and Zhao, 2015
	FAEE (Medium chain)	CEN.PK2	Overexpression of <i>AbWS</i> , <i>GUP1</i> , <i>GCY1</i> , and <i>DAK1</i> . Deletion of <i>FPS1</i> , and <i>GPD2</i>	0.52 g/L	Yu et al., 2012
	Alkane (Very long chain)	INVS <sub>c1</sub>	Overexpression of <i>SUR4<sup>F262A,K266L</sup></i> and <i>A. thaliana CER1</i> and <i>CER3</i>	Trace	Bernard et al., 2012

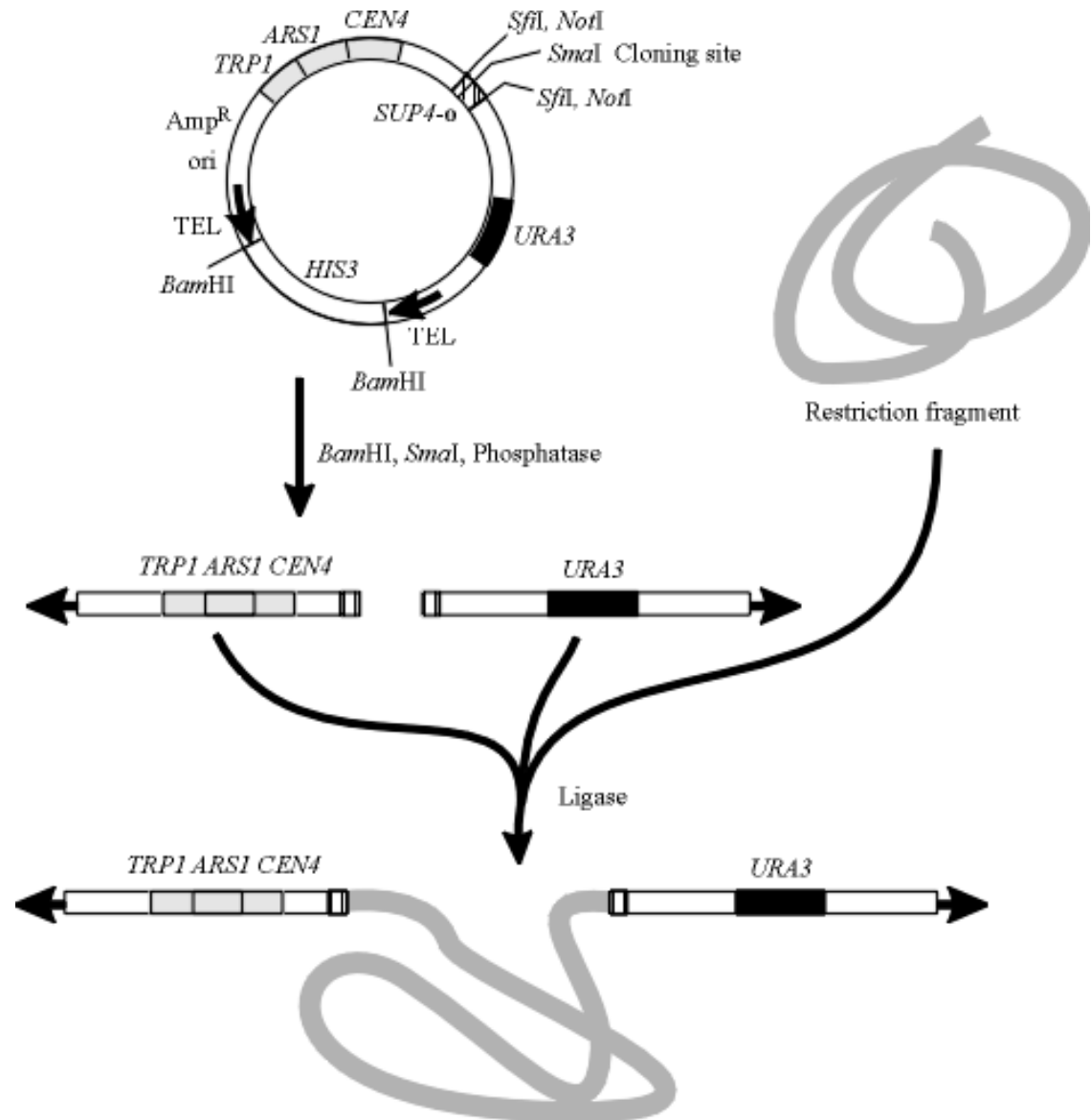
FFA- free fatty acids, FAEE - fatty acid ethyl esters

Sheng, Front in Microb, 2015



# 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 nesestříhnutých genů (dlouhé regulační úseky)

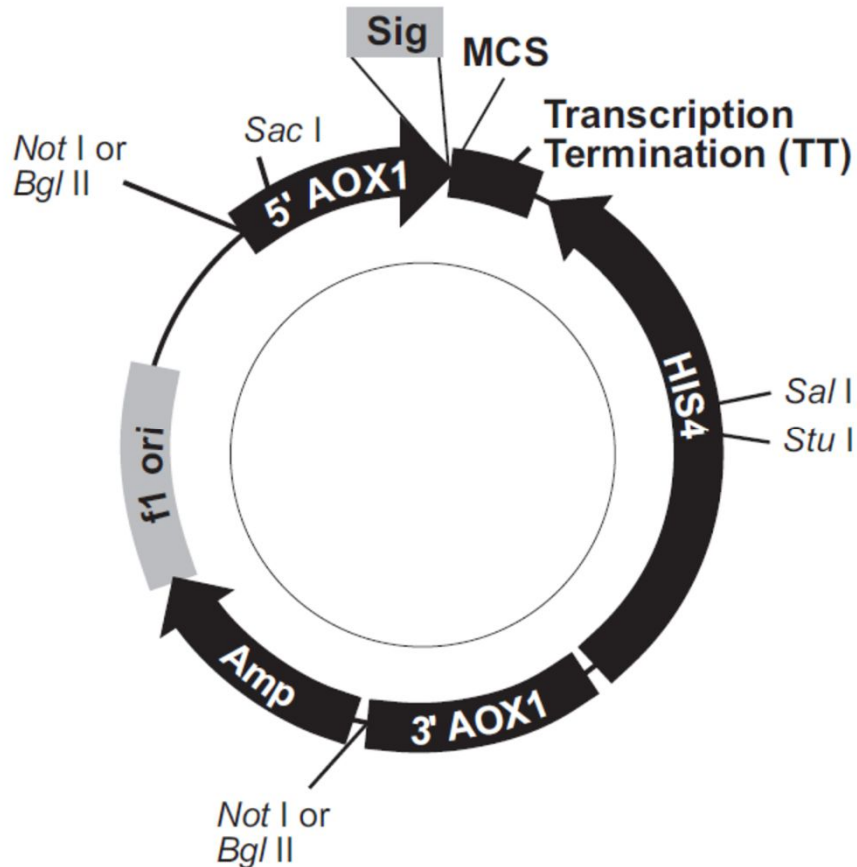


# Transformační protokol

- 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)
- Stočit a pelet rozsuspendovat v TE roztoku
- Rozetřít na selektivní plotnu

# Integrativní plasmidy

- nemají CEN ani 2 $\mu$ m části

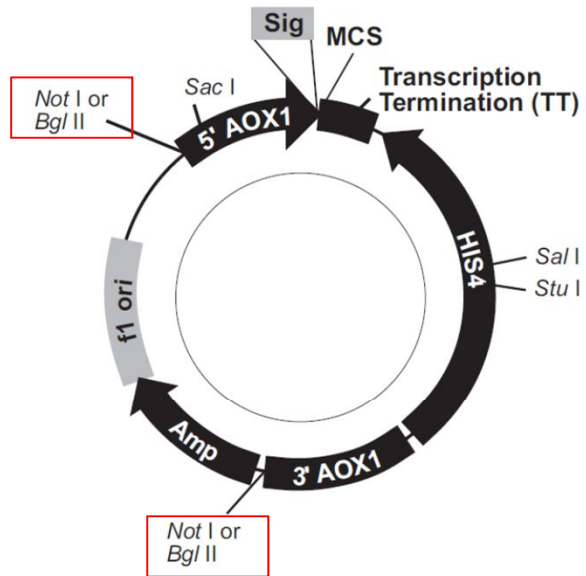


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4* )

- exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

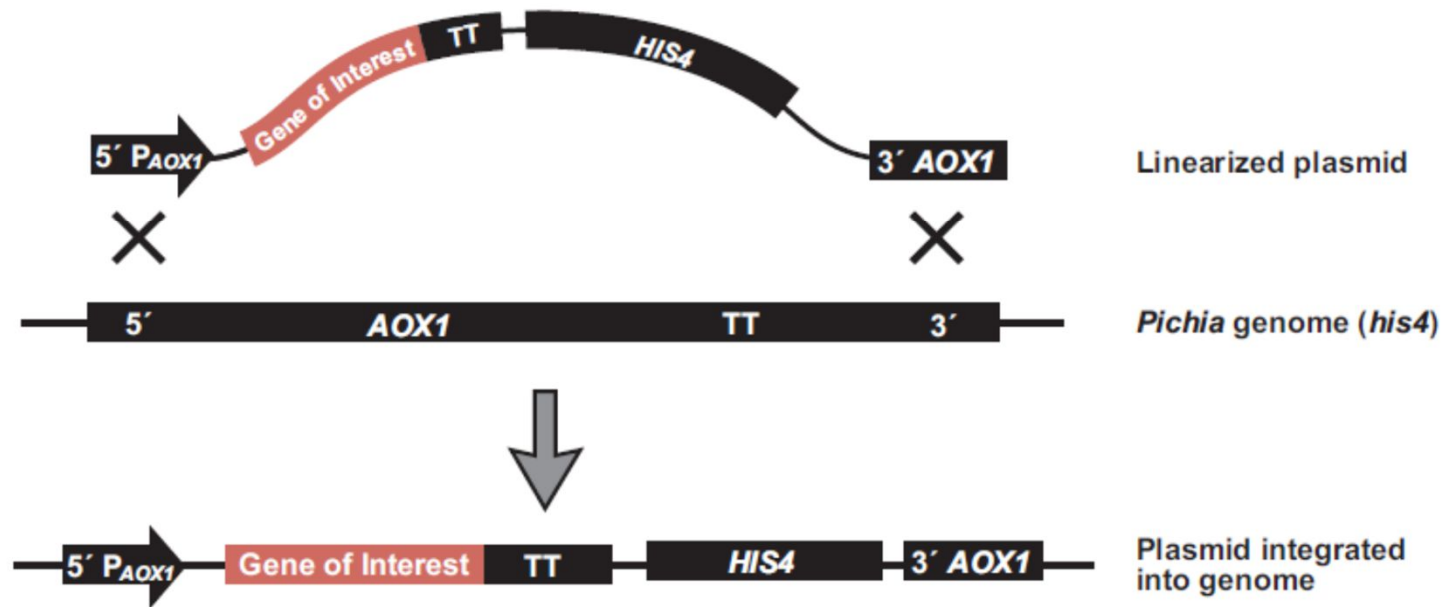
Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression in <i>Pichia</i></u> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal <u>protein secretion</u> signal	Targets desired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

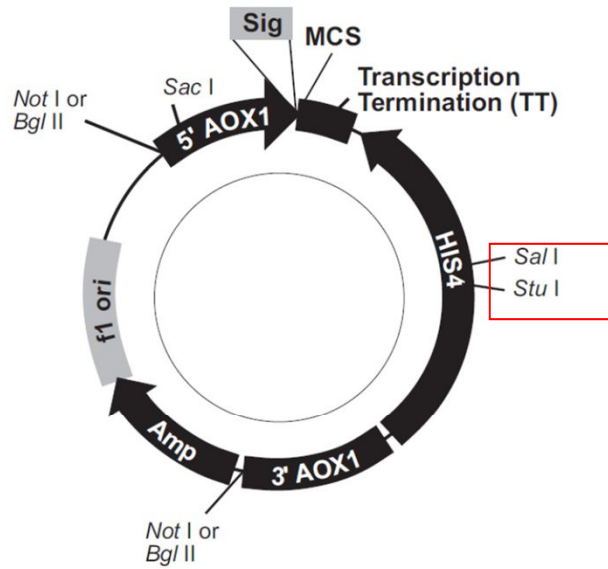


- integrativní plasmid pro *P. pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru
- integrace do AOX1 lokusu

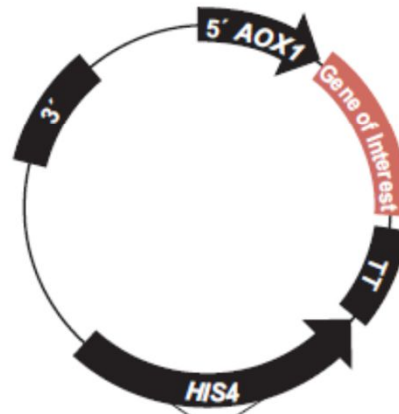
- **mechanismus homologní rekombinace**



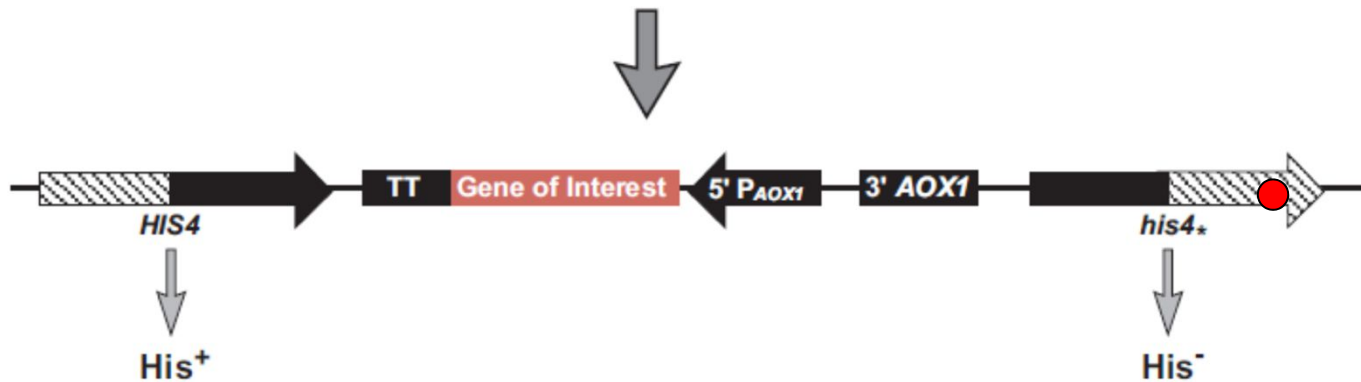
# Integrace II.



- integrace do *his4* lokusu



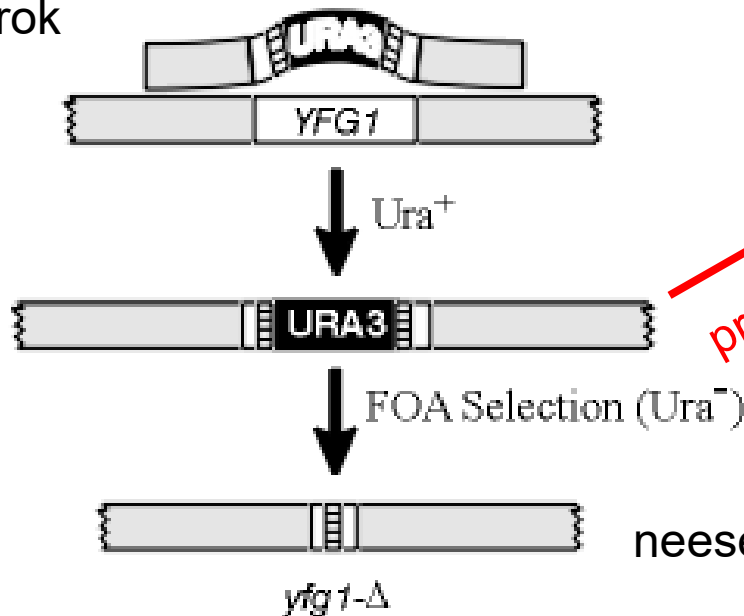
mechanismus  
homologní  
rekombinace



# Integrace: disrupce/delece genu

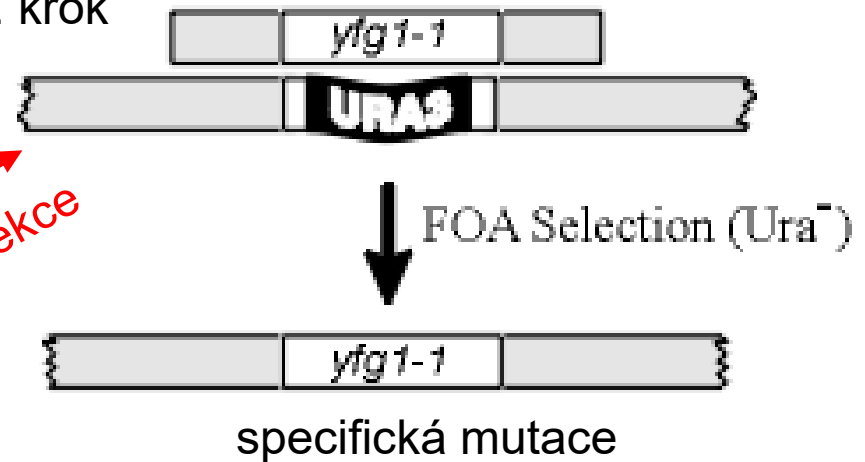
- studium funkce genu – fenotyp (delece/mutace)
  - **esenciální gen** => buňky potřebují gen např. na plasmidu (plasmid shuffling)
  - **životaschopné** – mutace lze přímo integrovat do genomu
- mutantní kmeny se testují na citlivost k různým „toxinům“ – dále lze křížit s funkčně podobnými geny-mutantami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

1. krok



2. krok

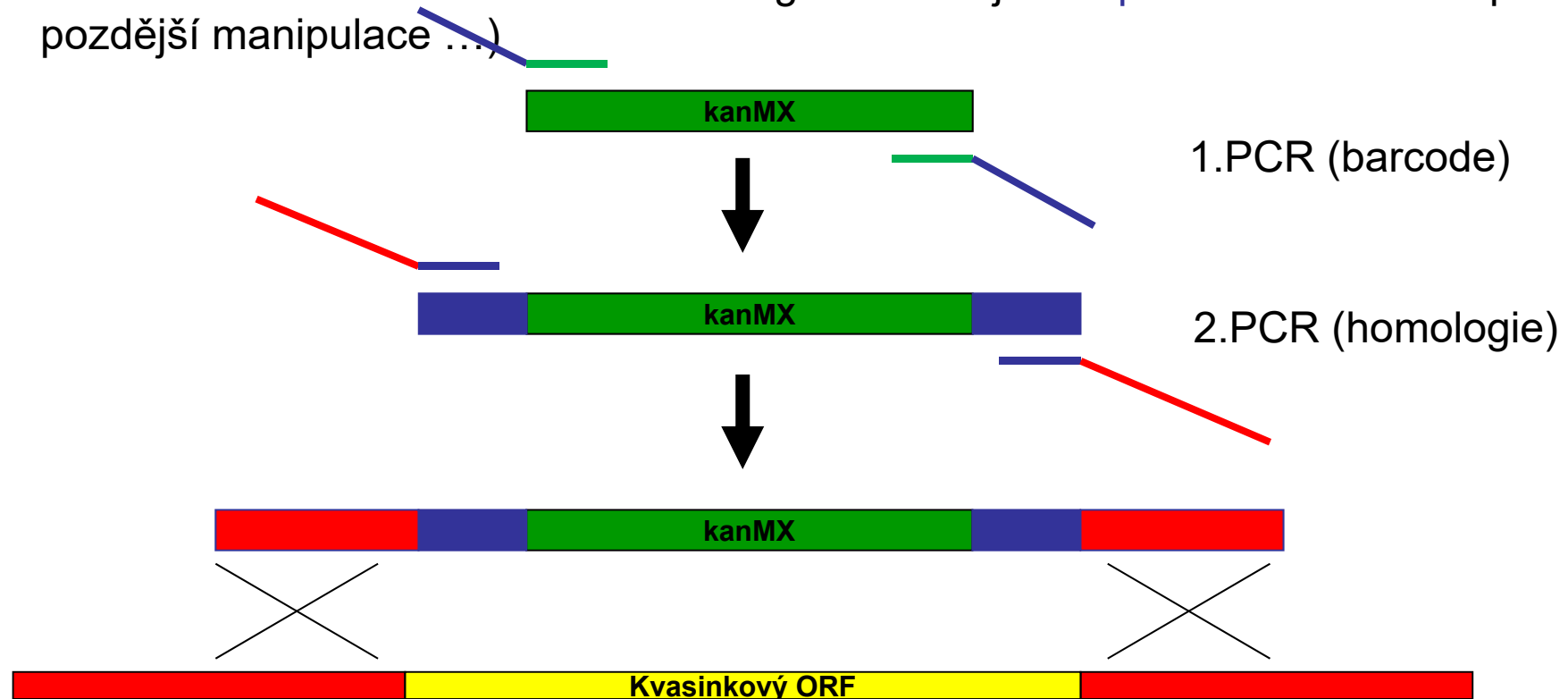
protiselekcce



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

# Delece genu - PCR

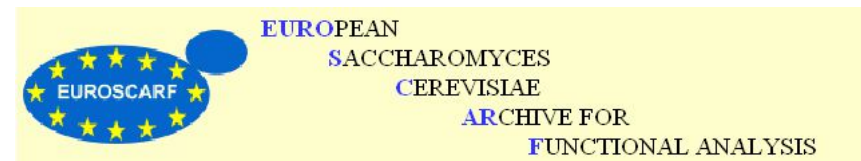
- pro rekombinaci stačí pouze **krátká homologie** (50-100nt pro S.c.)
- místo integrativních plasmidů = oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé postačí (při 2 krokové PCR se kromě dlouhé homologie vnesou ještě **specifické sekvence** pro pozdější manipulace ...)



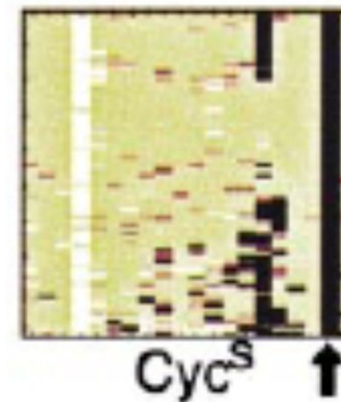
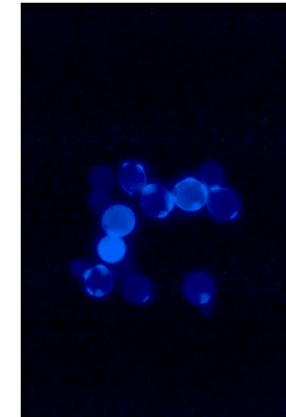
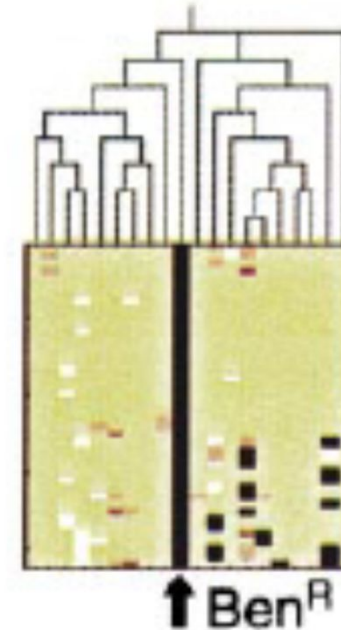
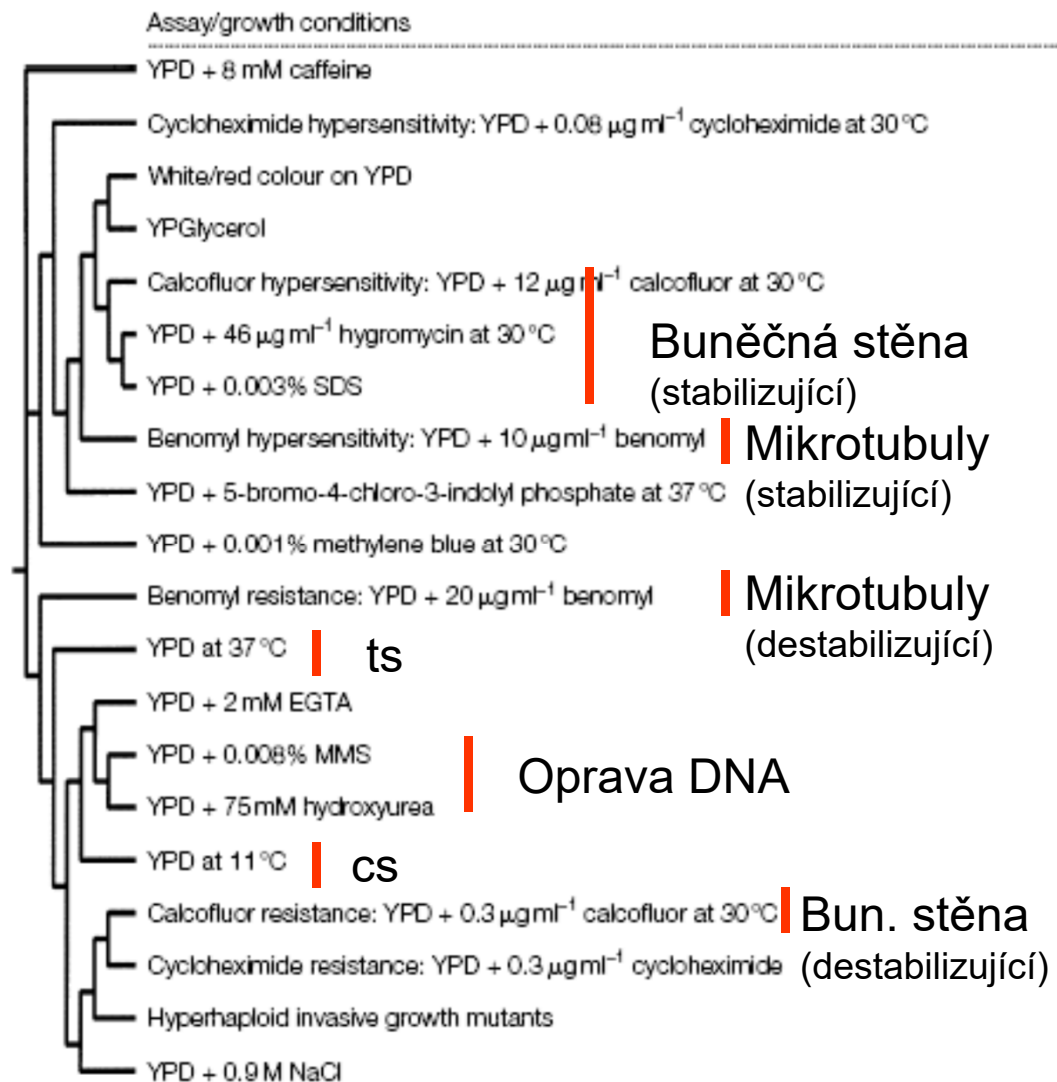
- systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- kmeny lze získat z archivu EUROSCARF

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

Giaever et al, Nature, 2002



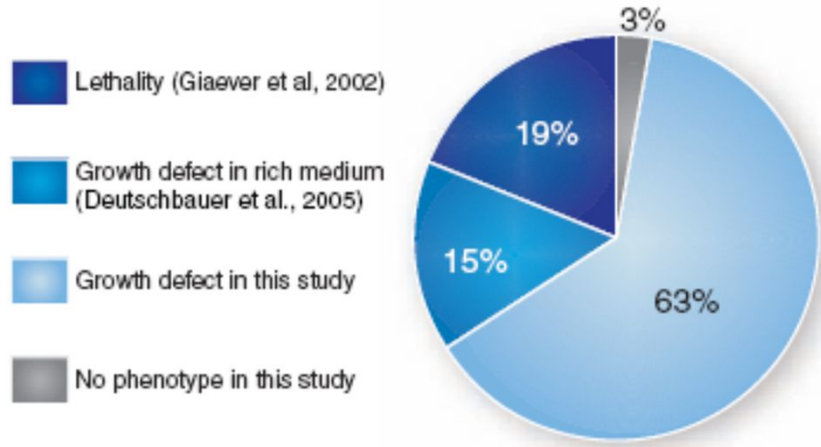
# EuroFan projekt - testy fenotypu



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

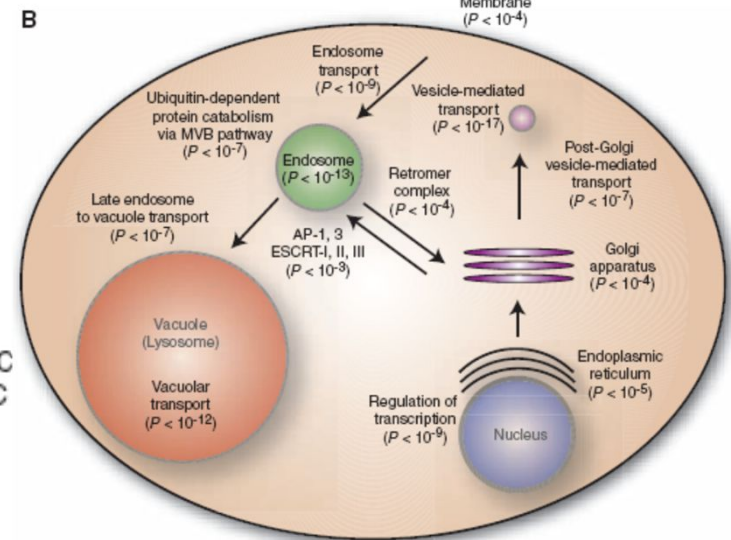
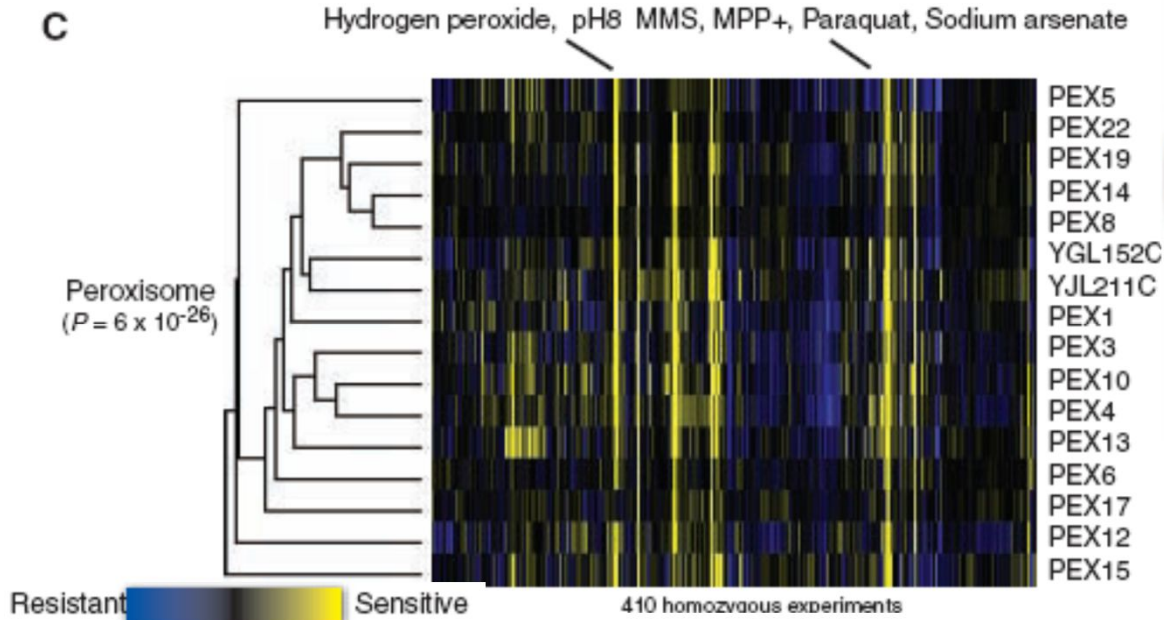


~ 6000 heterozygotních delečních kmenů  
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)  
 (neesenciální – růst za specifických podmínek nebo redundantní procesy)



- 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

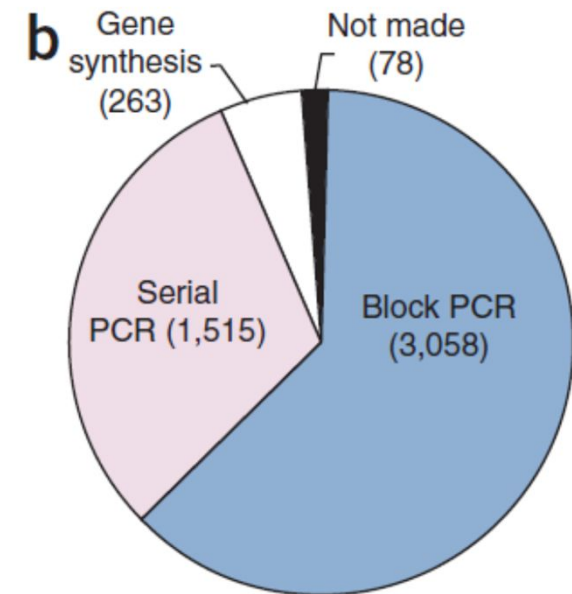
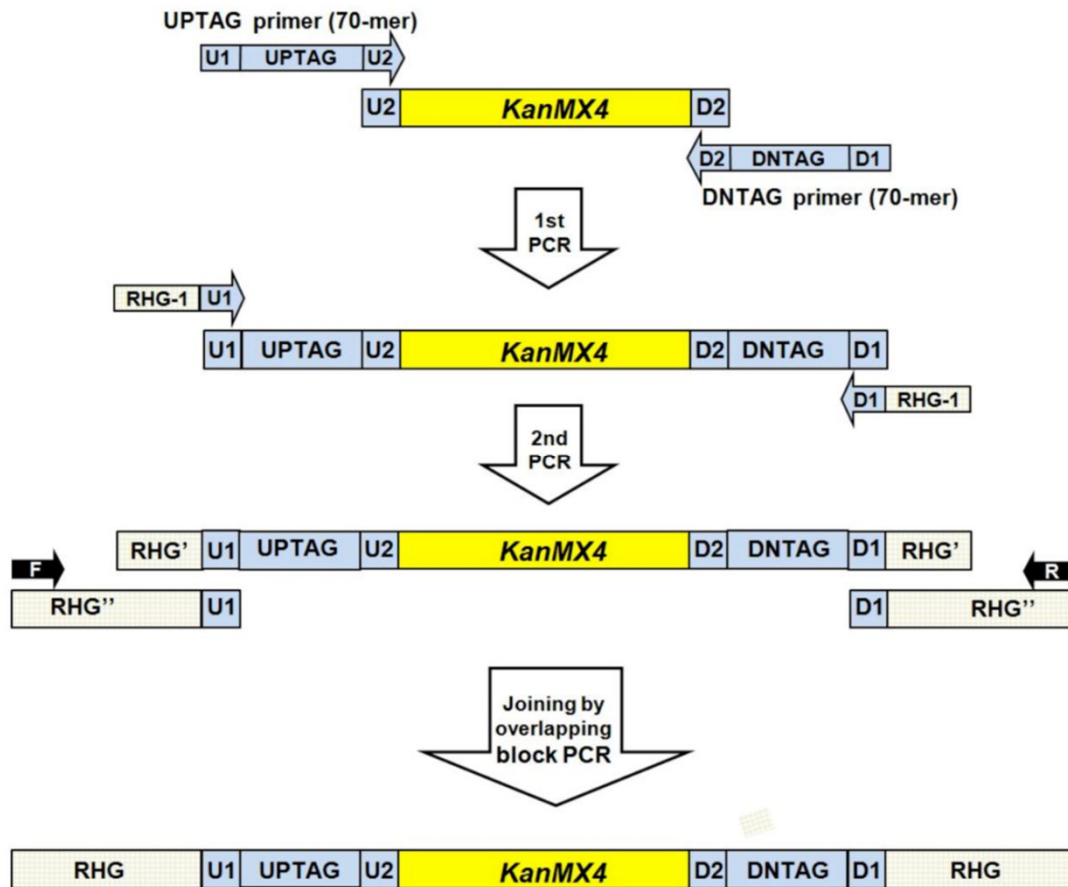


Geny/Proteiny peroxisomu

Hillenmeyer et al, Science, 2008

# Deleční knihovna – *S. pombe*

- *S. pombe* potřebuje delší homologii (serial PCR = 40-80bp; block PCR = 80-350bp)
- deleční knihovna od Bioneer (Korea, 25 000\$)

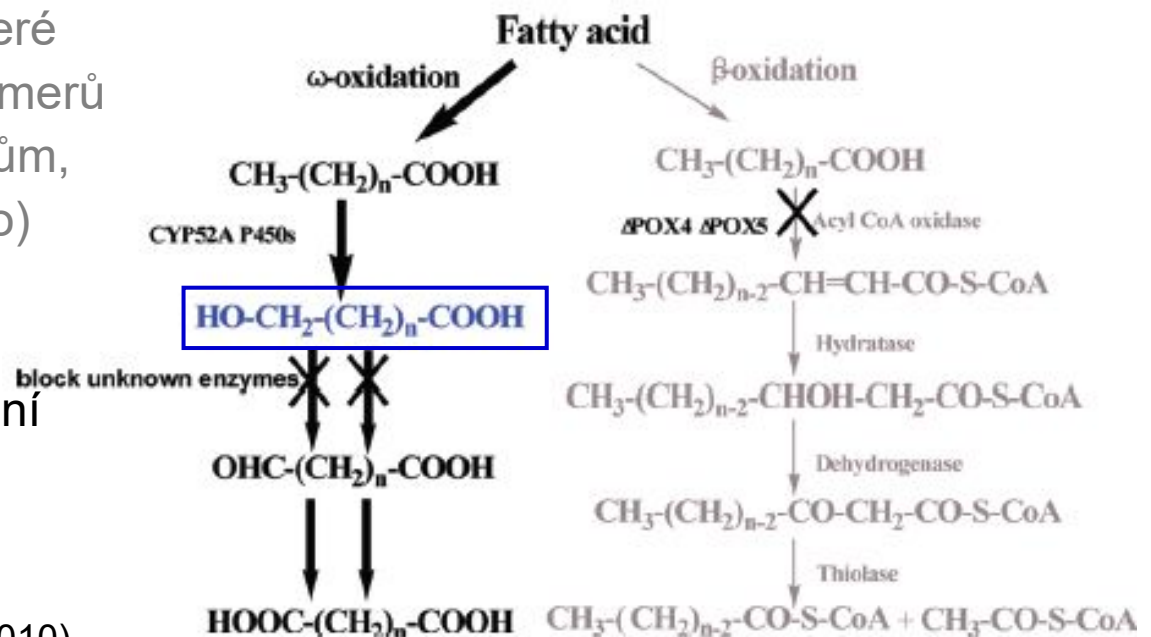


# Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen ( $\Delta$ POX4,  $\Delta$ POX5) není schopen  $\beta$ -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- pomocí flp rekombinasy odstranili geny oxidás (4 alkohol oxidásy) a dehydrogenás (6 alkohol dehydrogenás), aby eliminovali  $\omega$ -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat

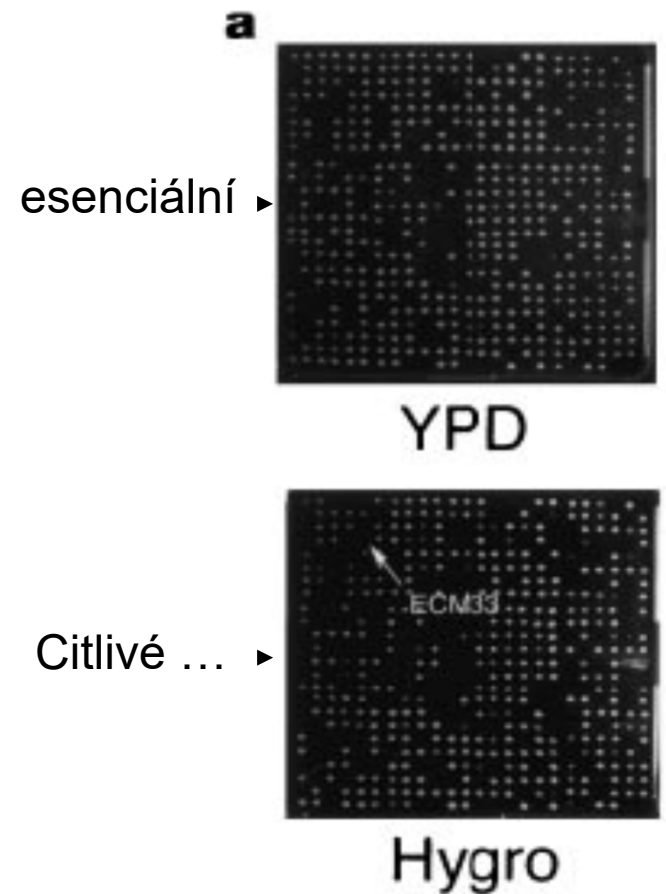
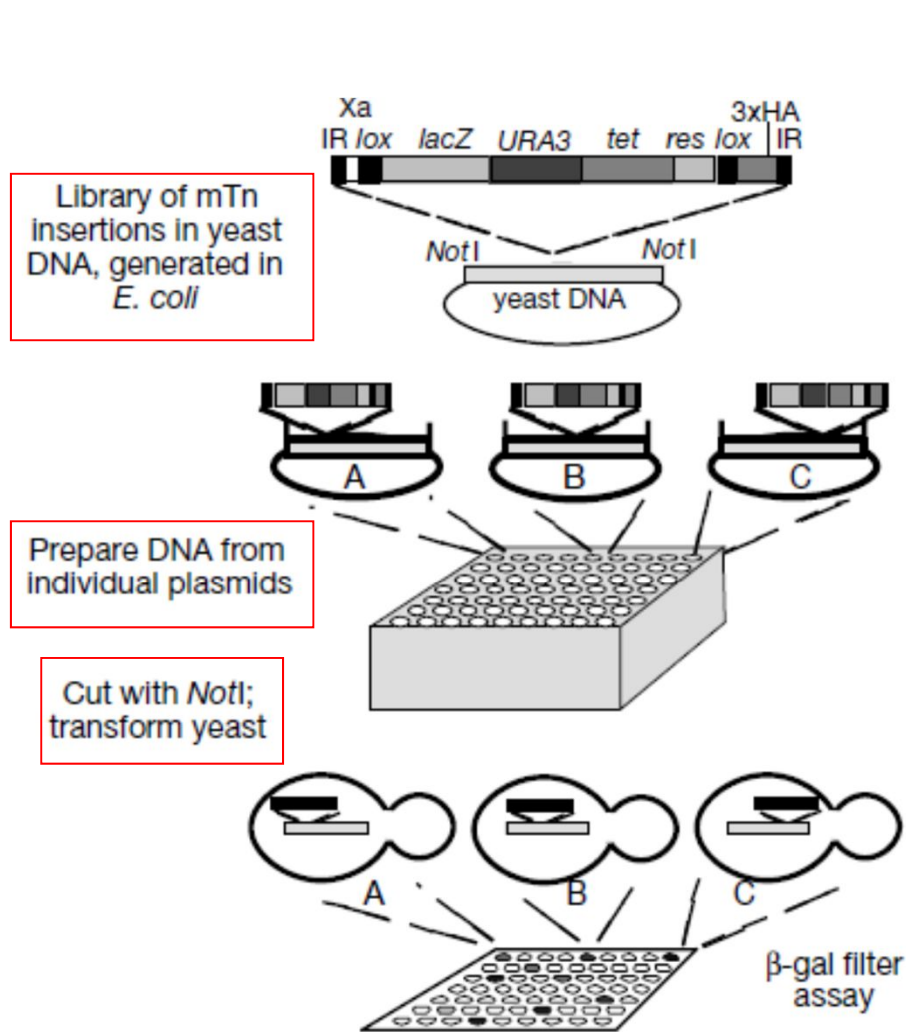
$\omega$ -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)

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



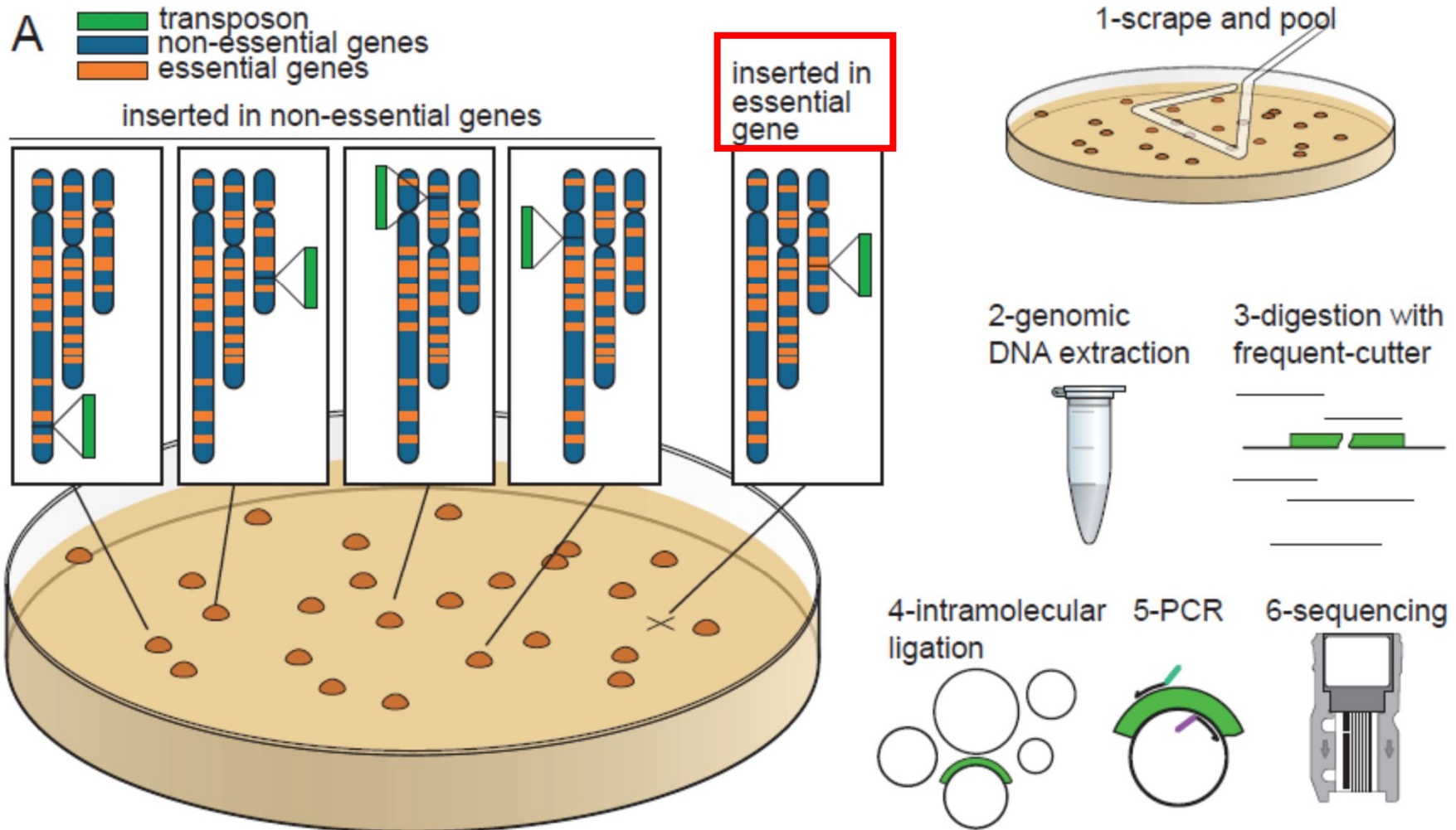
Lu et al., JACS (2010)

# Delece genu pomocí transposonů



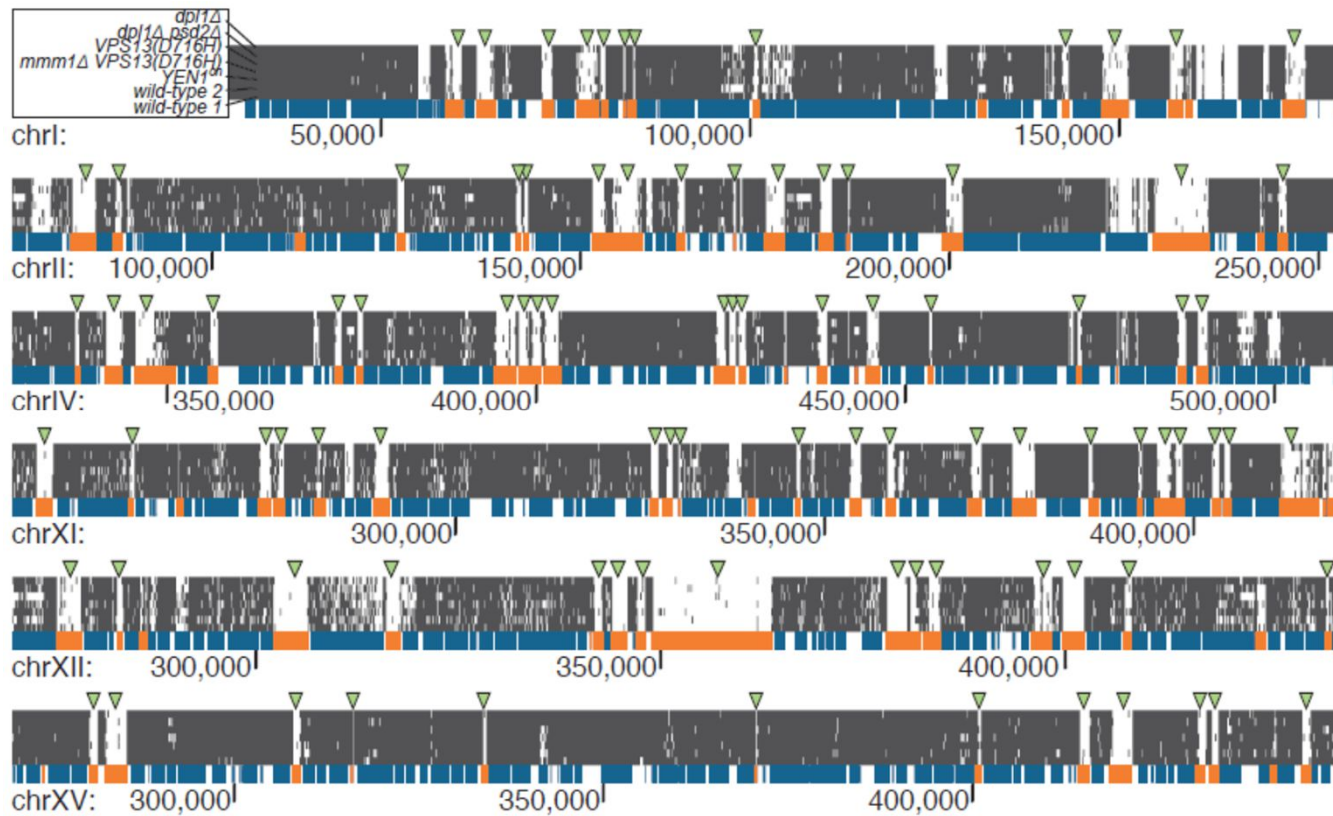
Defekt buněčné stěny

# Saturated Transposon Analysis in Yeast (SATAY)



Michel et al, eLife, 2017

- generováno 1,000,000 klonů – 300,000 inzercí (vysoké pokrytí na 6000 genů)
- cirkulární DNA použita pro NGS sekvenování (MiniDs transposon-specifické primery)
- inzerce každých 40bp (preferenčně v nucleosom-free oblastech)
- každý transposon sekvenován 20x ...



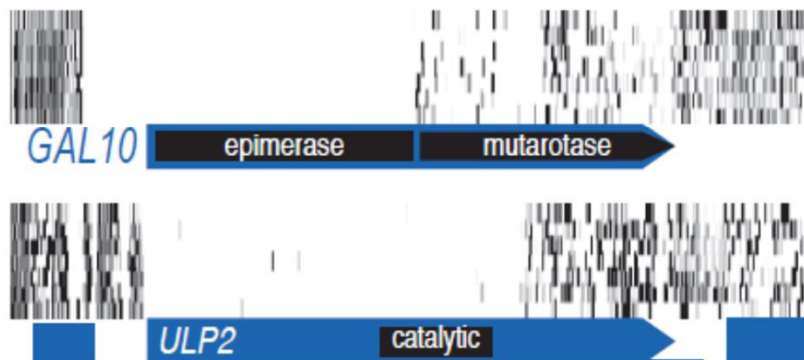
- inserce chyběly v **esenciálních genech** (zelené šipky)

- charakterizace GO, drug screening, syntetická letalita, ...

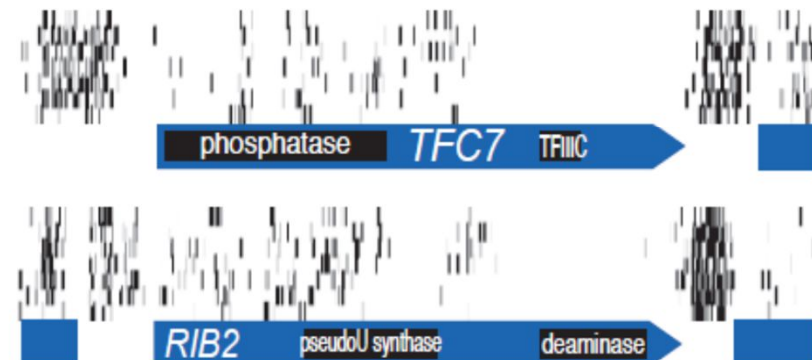
- rozlišení na úrovni domén (GAL10 – dvě domény z nichž esenciální je pouze první ...)

- C-koncové, ale i N-koncové delece

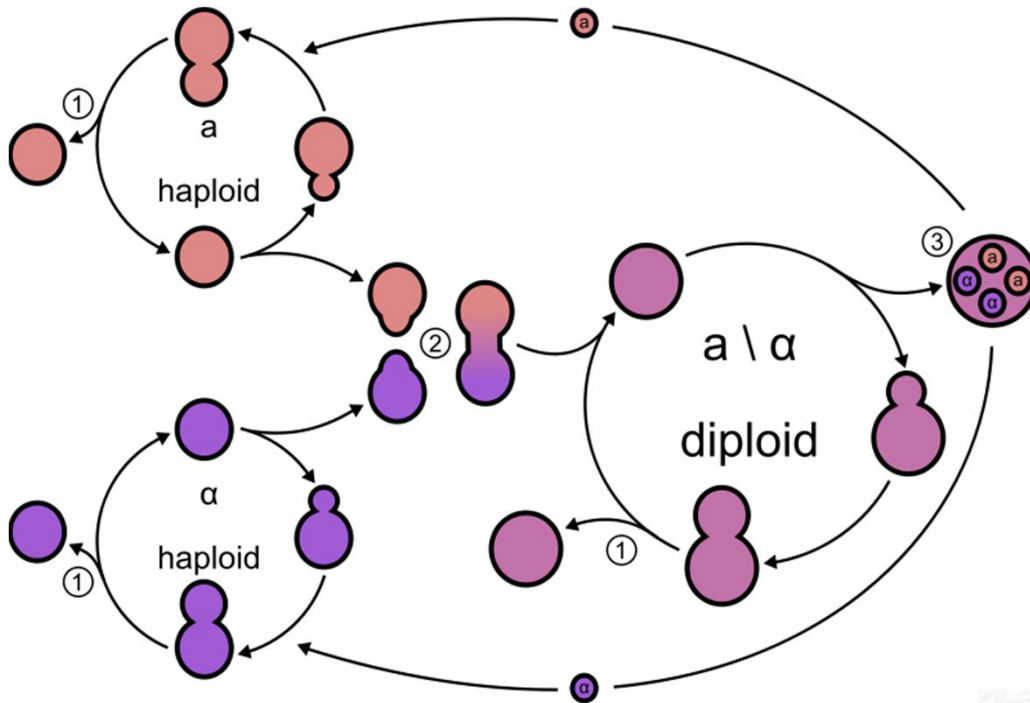
### A C-terminal truncations



### B N-terminal truncations



# 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 dvojitého 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)



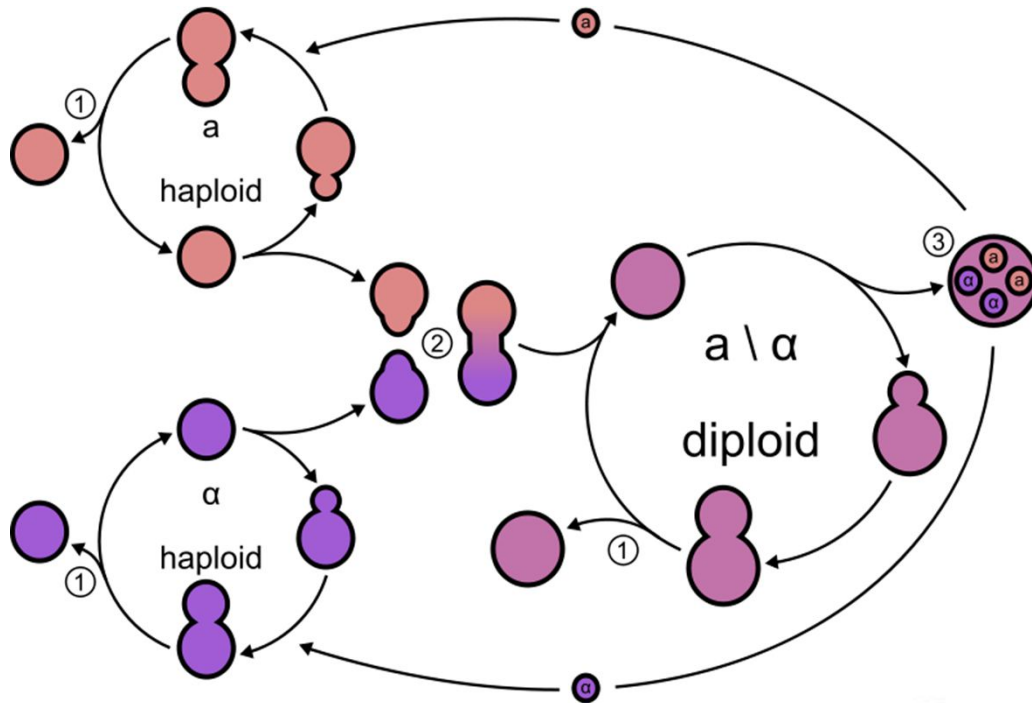
RHOMBOEDRICKÝ

S LINEÁRNÍM  
USPOŘÁDÁNÍM  
SPOR



- Více v dalších přednáškách

# Životní cyklus *S. cerevisiae*

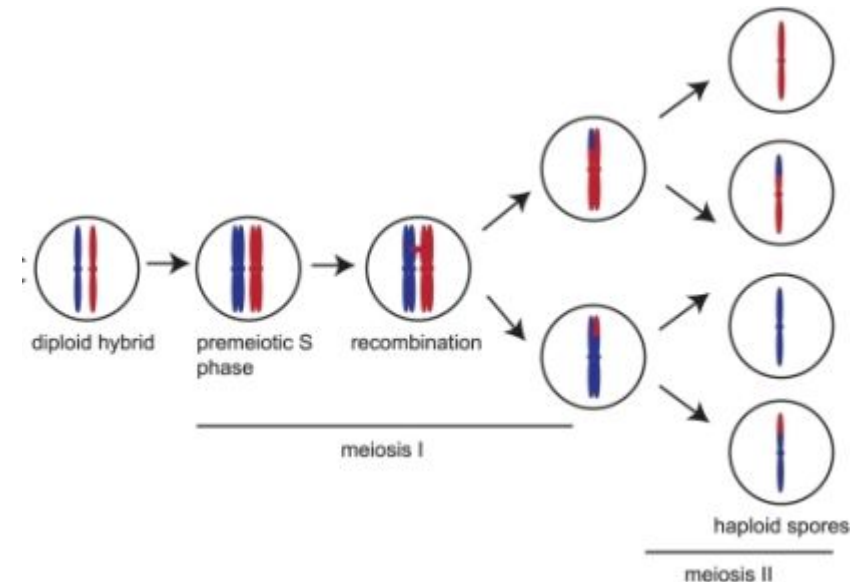


- Deleci či mutaci lze provést v haploidní či diploidní buňce

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

- lze připravit dvojitého mutantu křížením haploidních mutantů a poté sporulací diploida

- delece esenciálního genu lze provést pouze v diploidní buňce (haploidní nepřežije)
- po iniciaci sporulace dojde k meiotickému dělení ( $2n \rightarrow 4n \rightarrow 4 \times 1n$ ) a vzniknou 4 haploidní buňky (lze rozdělit mikromanipulátorem – tetrádová analýza)

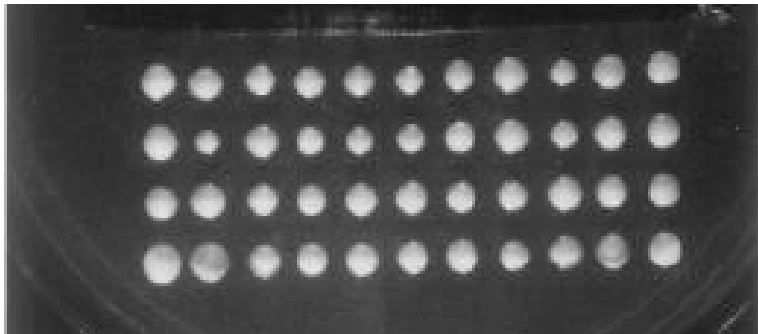




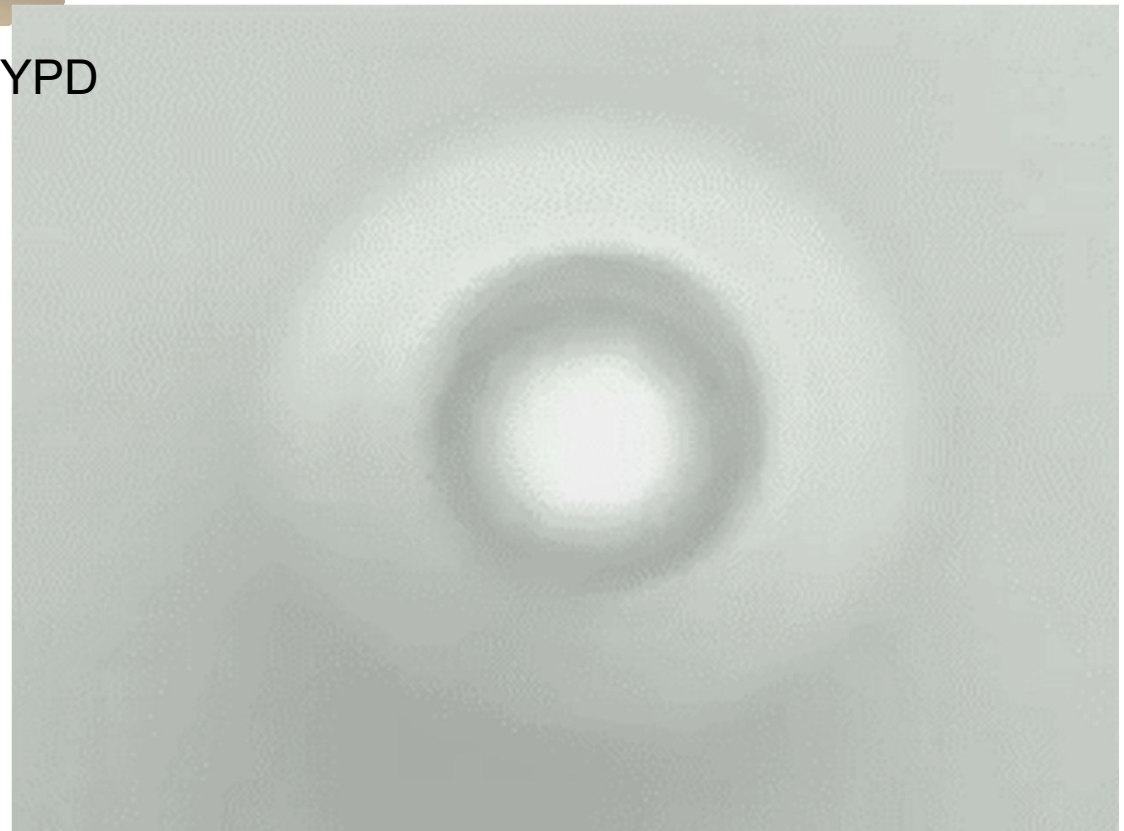
# Tetrádová analýza

(*S. pombe*)

spory přeneseny tenkou jehlou a  
rozmístěny v pravidelných  
odstupech

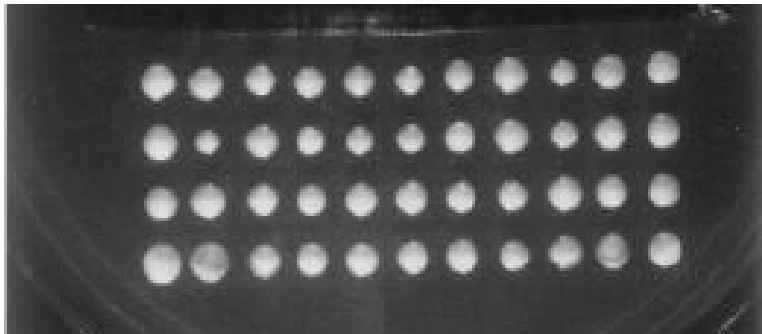


YPD

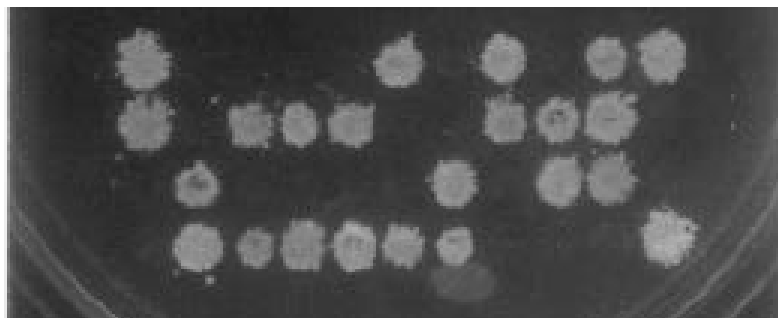


# Tetrádová analýza

2 spory/kolonie normální  
+  
2 spory/kolonie mutantní



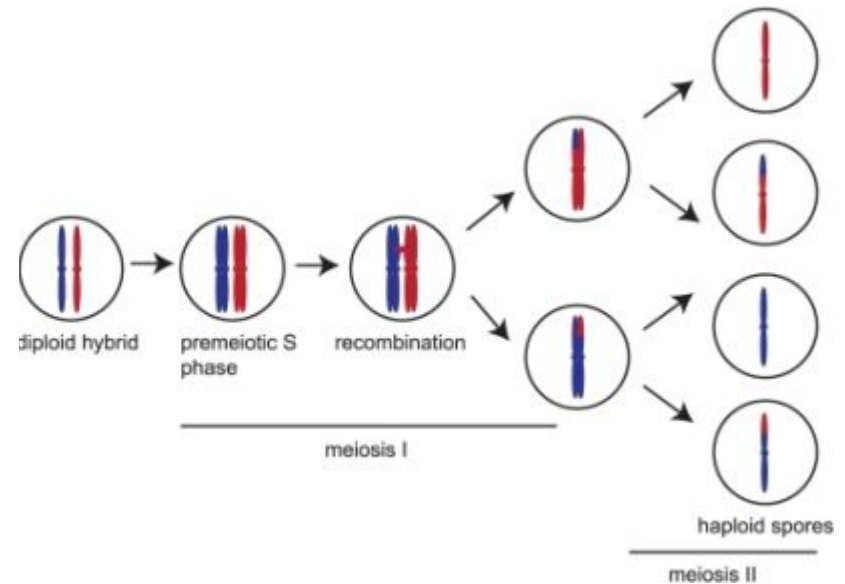
YPD



neesenciální gen

Selektivní médium (SD-ura ... testy)

AAaa  
AaAa  
AaAa  
...

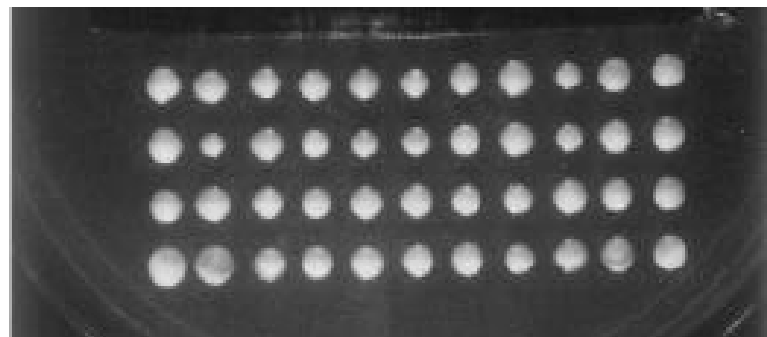




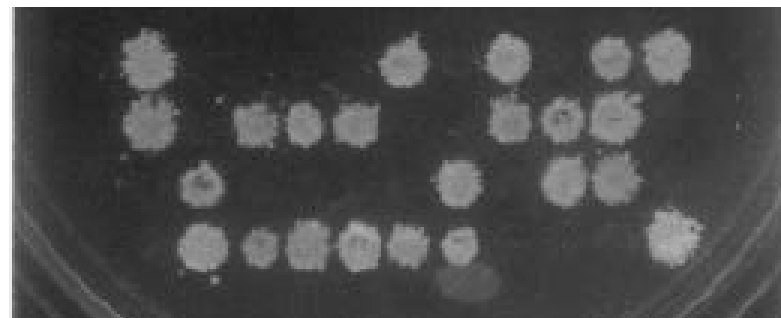
# Tetrádová analýza

2 spory/kolonie normální  
+

2 spory/kolonie mutantní  
Mendlovy zákony

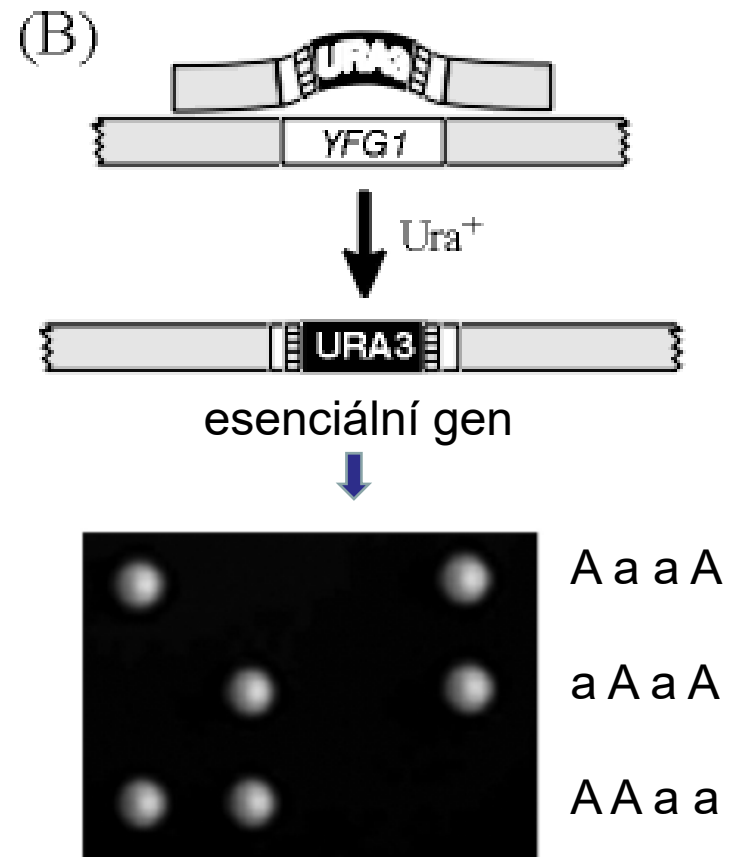


YPD

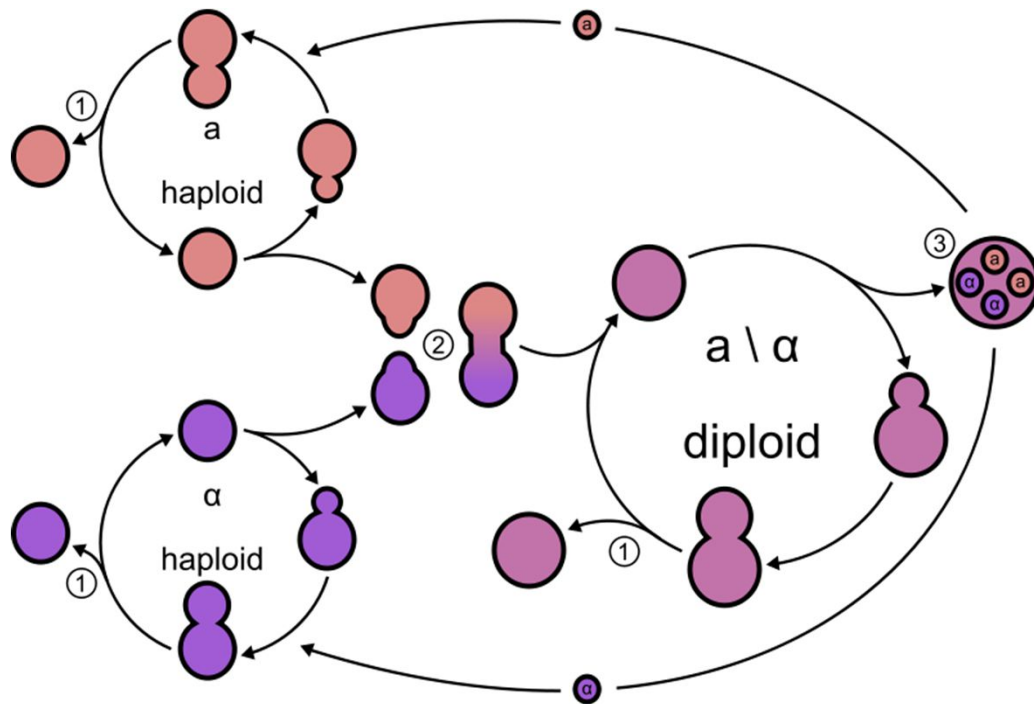


neesenciální gen

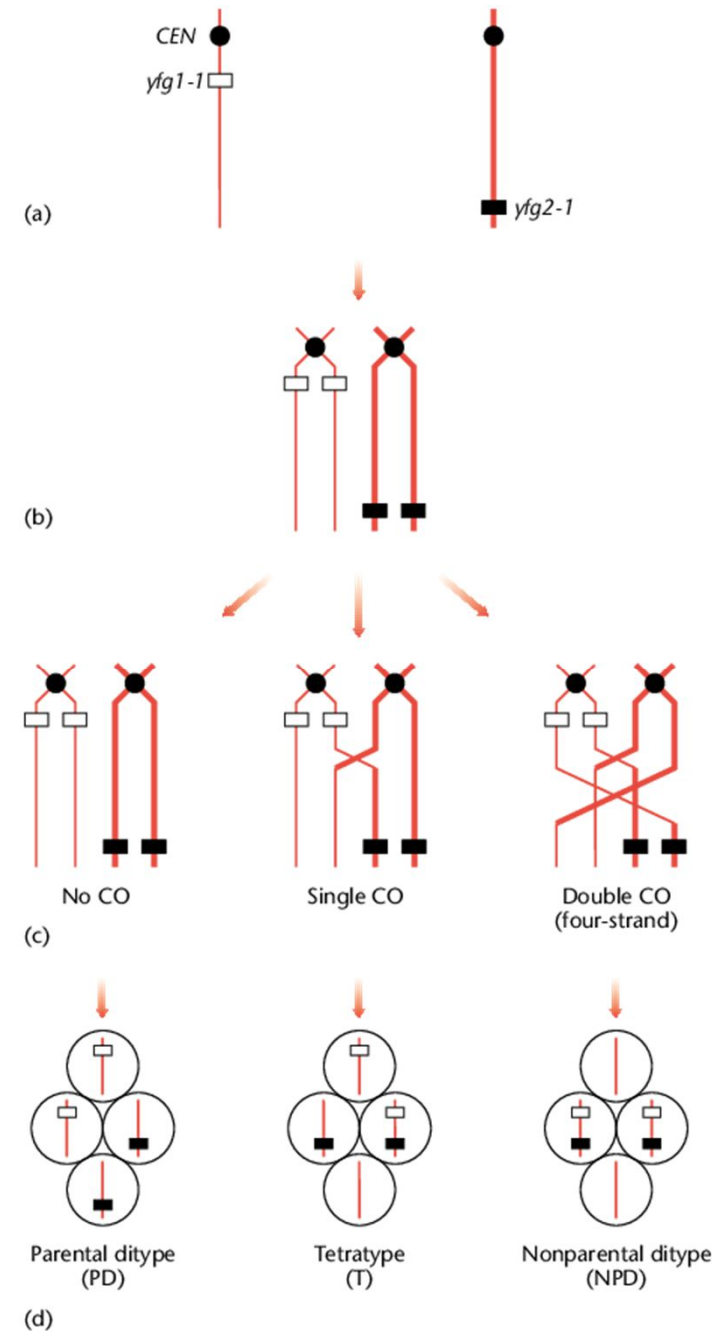
Selektivní médium (SD-ura ... testy)



# Životní cyklus *S. cerevisiae*

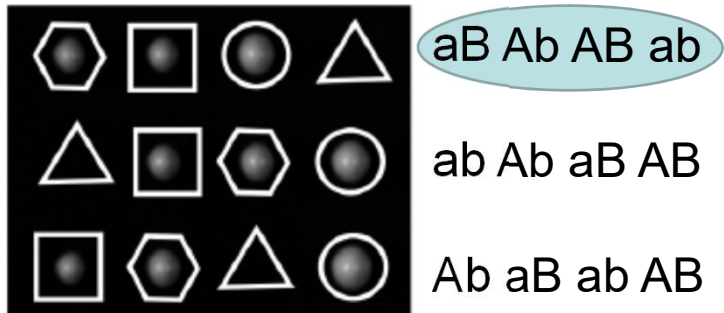


- lze připravit dvojitého mutanta křížením haploidních mutant a poté sporulací diploida
- frekvence typů závisí na vzájemné pozici genů – různé chromosomy => nezávislá segregace, stejný chromosom (Morganovy zákony – čím blíže, tím méně cross-over)



# Tetrádová analýza – dvojité mutanty

Analýza genetických interakcí  
(funkčních vztahů)



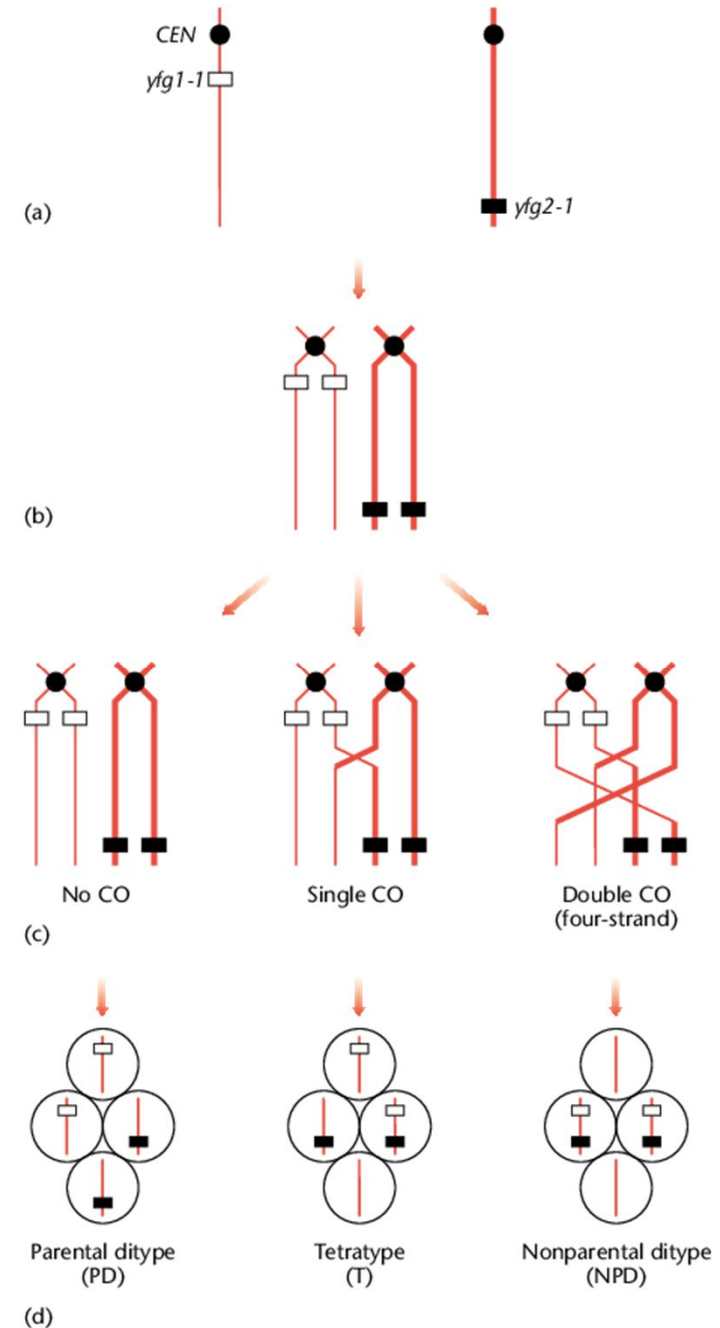
○ AB

□ Ab

⬡ aB

△ ab

kombinace těchto mutací je  
synteticky letální



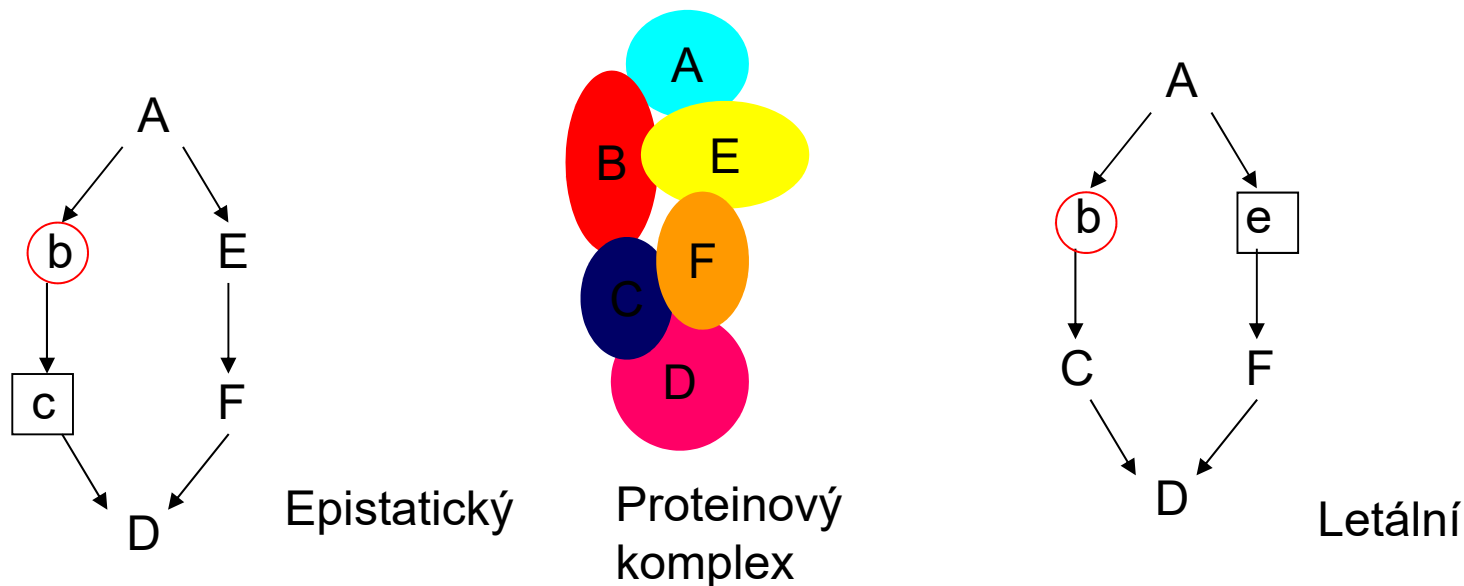
# Dvojité mutanty – funkční příbuznost

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

- bez fenotypu – díky wt alele (různé geny)

sporulace => haploid – stejný fenotyp – **epistatický** (funkčně příbuzné geny)

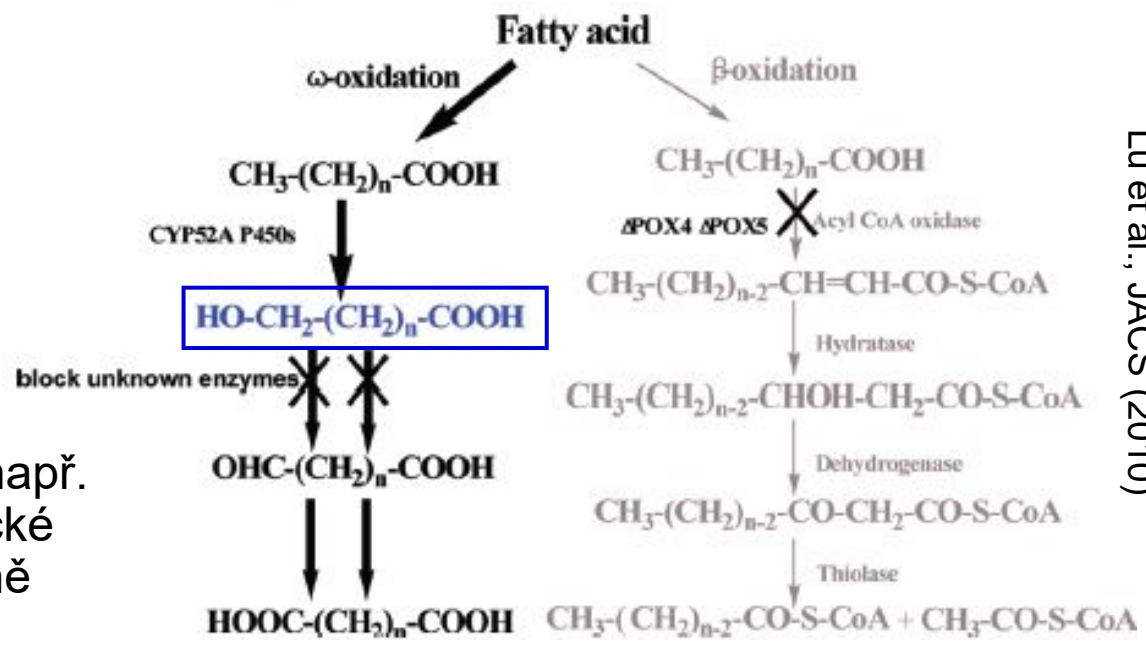
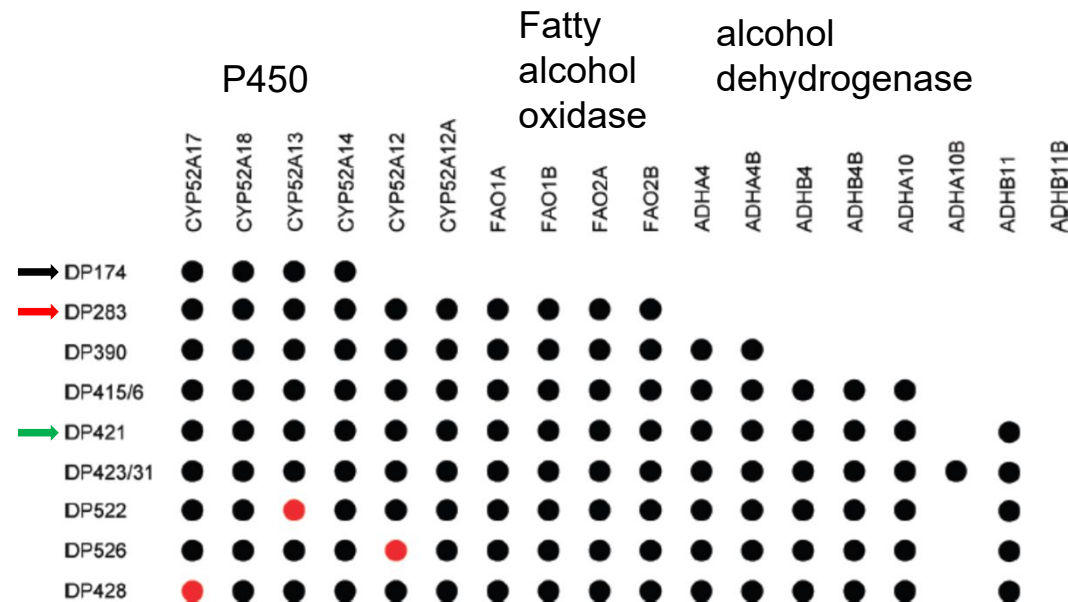
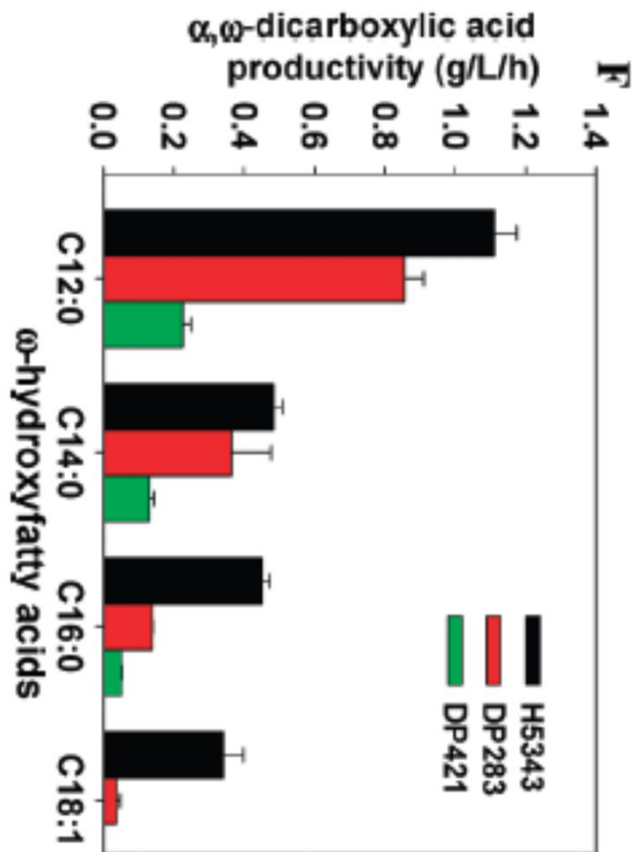
- **aditivní až letální** (paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu)



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

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

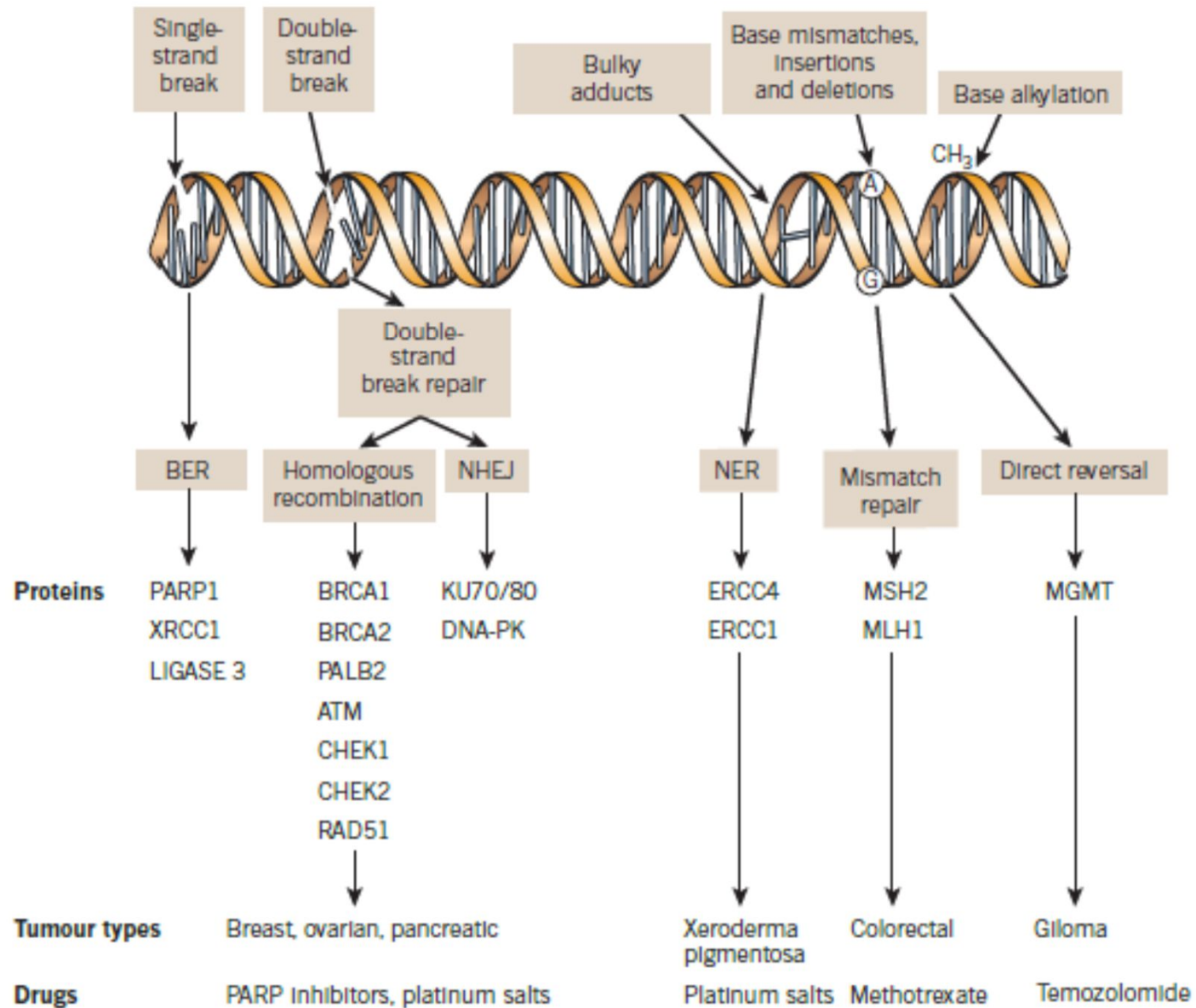
# Hledání funkčně příbuzných genů



Lu et al., JACS (2010)

- delece homologních enzymů (např. dehydrogenás) potlačí metabolické schopnosti buňky (DP421 = méně ω-hydroxymastné kyseliny)

# Syntetická letalita v léčbě rakoviny



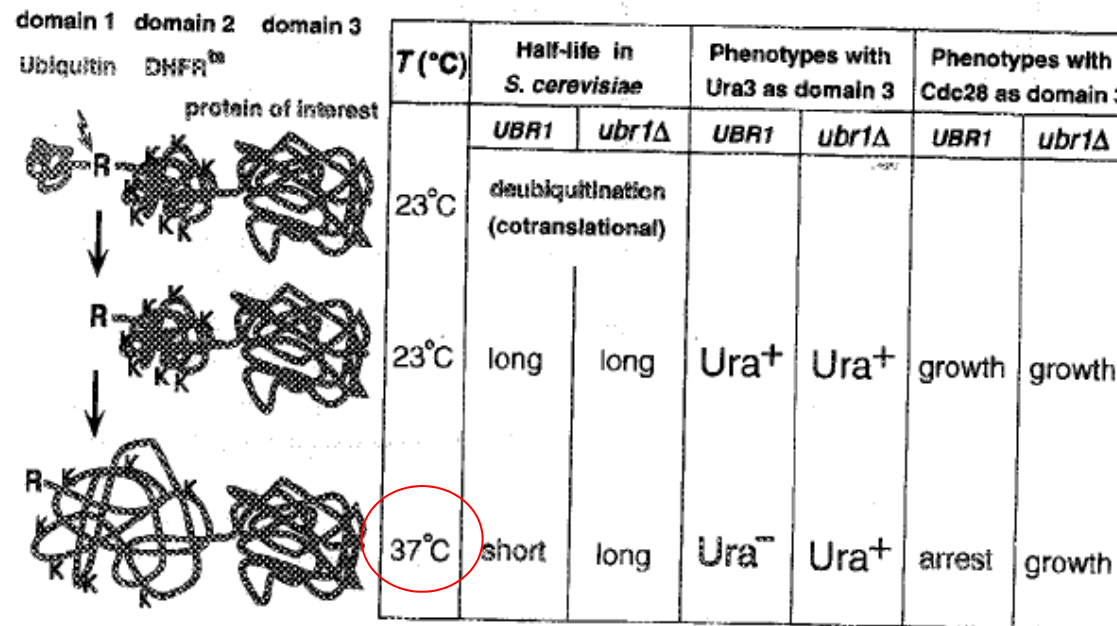


# Delece/mutace genu

- Studium funkce genu – delece nebo mutace genu
  - **esenciální gen** => buňky potřebují gen např. na plasmidu
    - **plasmid shuffling**
  - => buňky potřebují funkční gen aspoň za určitých podmínek (kondicionální exprese nebo kondicionální mutanty – **ts mutanty**)
  - => buňky potřebují aspoň „částečně“ funkční gen – **hypomorfní mutanty**
- **ne-esenciální gen** – lze přímo deletovat v genomu haploidní buňky
- deleční/mutantní kmeny se testují na životaschopnost ... za různých podmínek – dále je lze křížit s funkčně podobnými geny/mutantami a hledat jejich funkční vztahy (synthetic lethal x epistatic x suprese)

# Analýza esenciálních genů: 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 = 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 možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fůze s CDC28 – kvasinky arestují v G1 fázi – sleduje se **terminální fenotyp**)

# 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>



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

dnes - NGS

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



Detection of Yfg<sup>-</sup> *ura, ade, rad ...*



Yfg<sup>-</sup>

Počet mutací

## Complementation

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

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

Křížení – ověření - jedna mutace, meioticky defekt

- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl)

## Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATa YFG+*



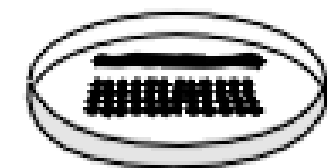
Isolate a diploid strain and Sporulate



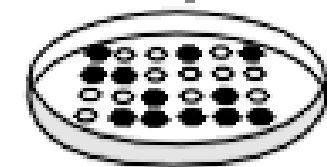
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad

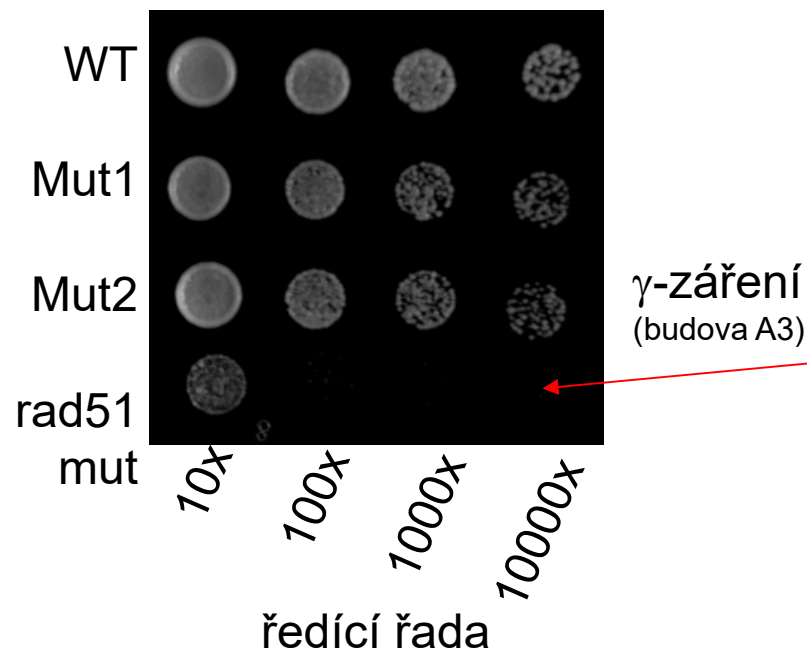


Score for Yfg<sup>+</sup> and Yfg<sup>-</sup>



- 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*** ...)

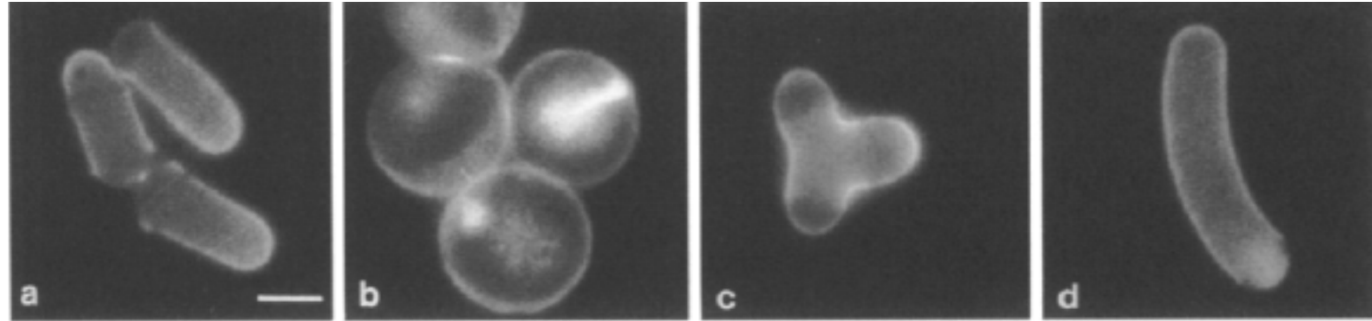
**sec**  
mutanty



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

- 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)

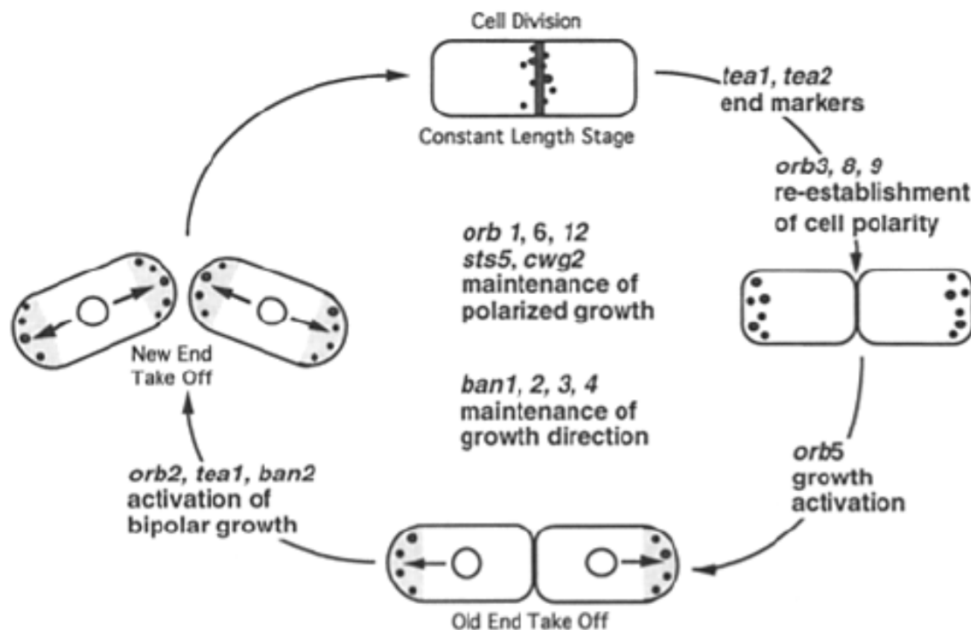


Table I. *orb* Genes

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

# Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

**Leland Hartwell** začal studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*.  
- izoloval mutantní kvasinky s mutovaným genem - >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

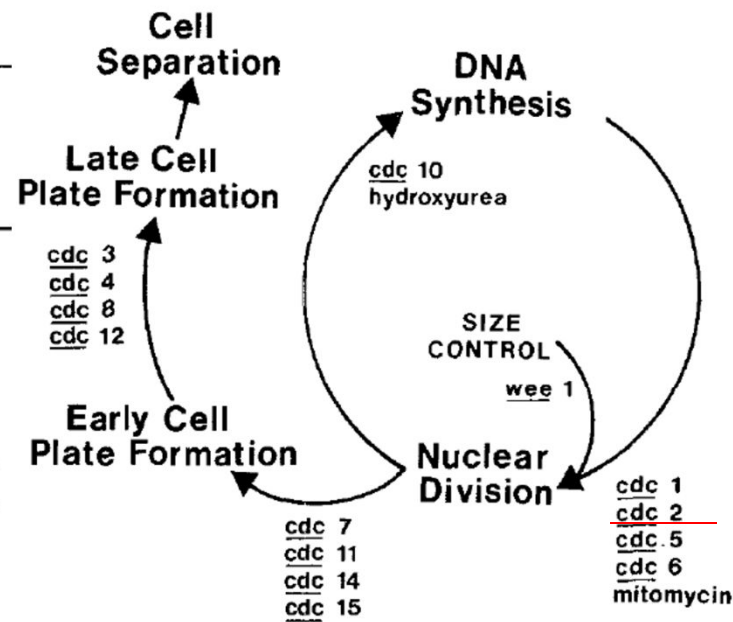
**Paul Nurse** studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



**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.

# Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C <sup>a</sup>	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky <sup>b</sup>
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky <sup>b</sup>
„	121	0.38	32.1	„	
<i>cdc 10</i>	129	–0.10	20.3	DNA Synthesis	
„	28	–0.10	–	„	
<i>cdc 13</i>	117	0.64	30.5	Nuclear division	Forms multiple cell plates
–	22	0.88	33.1	„	Sterile



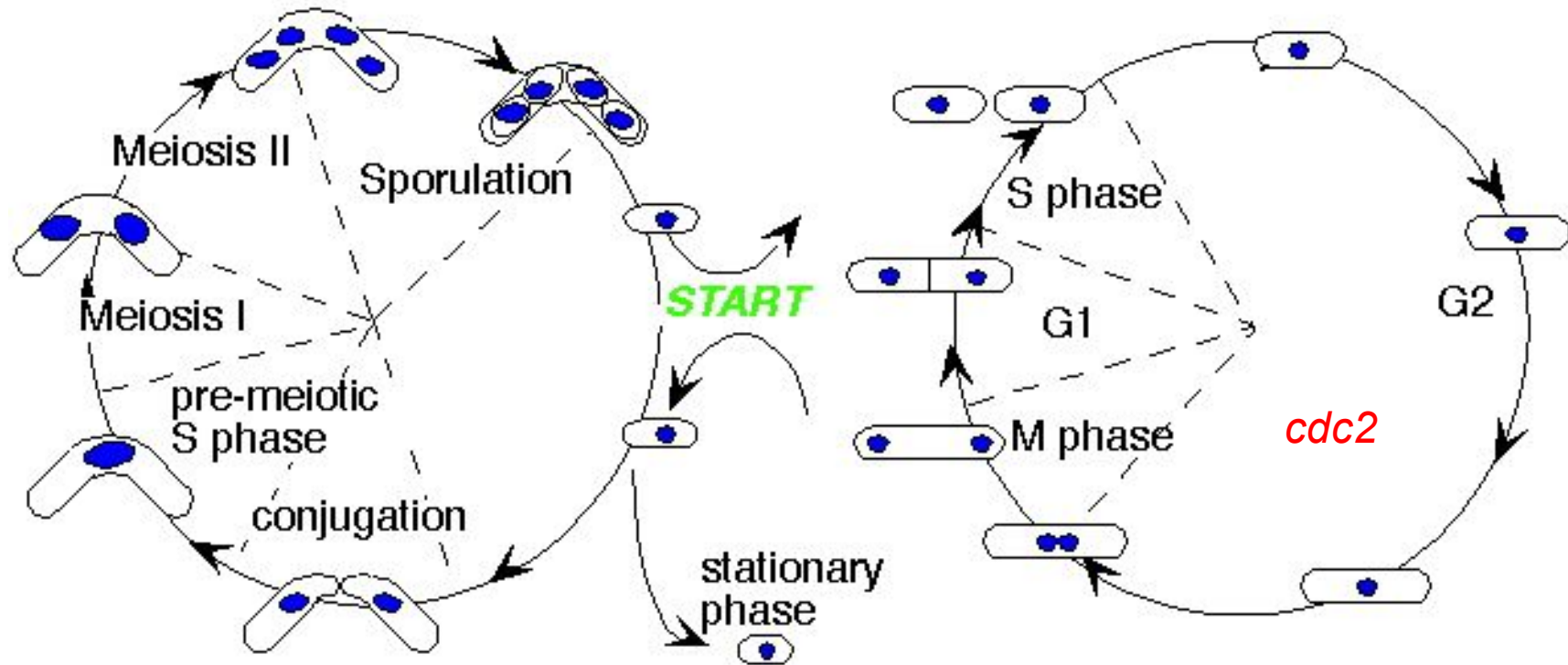
Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).

Nurse et al, MGG, 1976



# Buněčný cyklus *S. pombe*

*S. pombe* má **rovnocenné dělení** - vznikají buňky stejné velikosti – hned vstupují do S fáze (jsou dostatečně velké) – pro vstup do mitozy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)

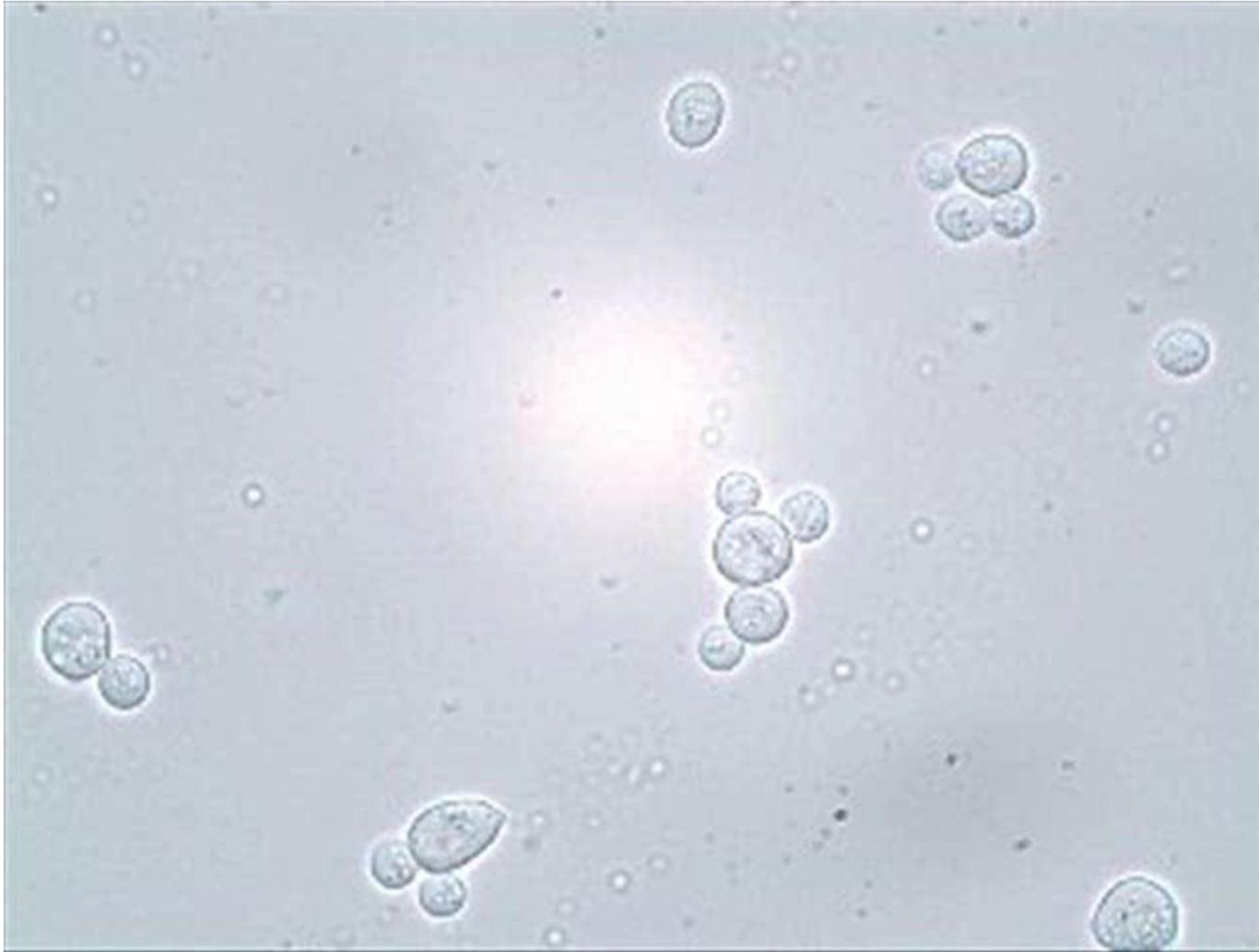


*Meiotic cycle*

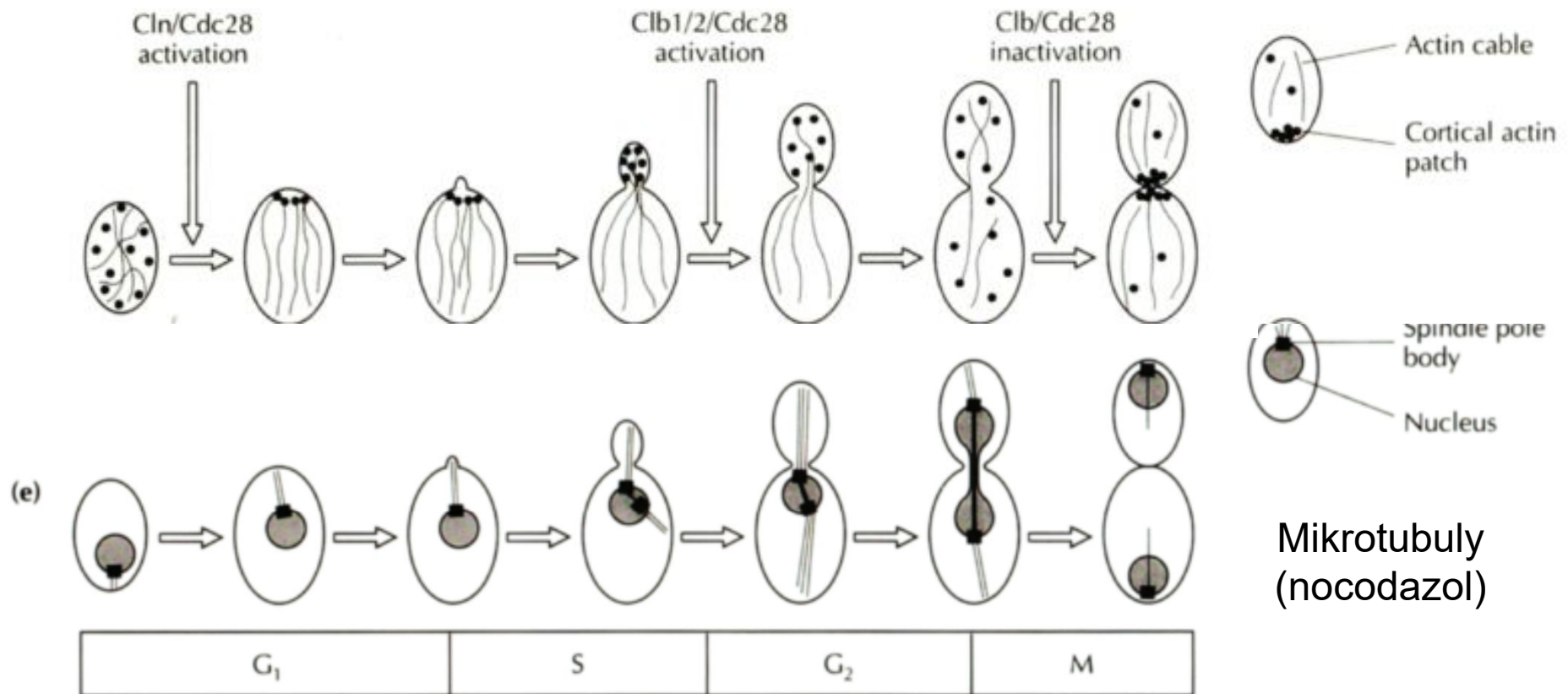
*Vegetative (mitotic) cycle*

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

# *S. cerevisiae*

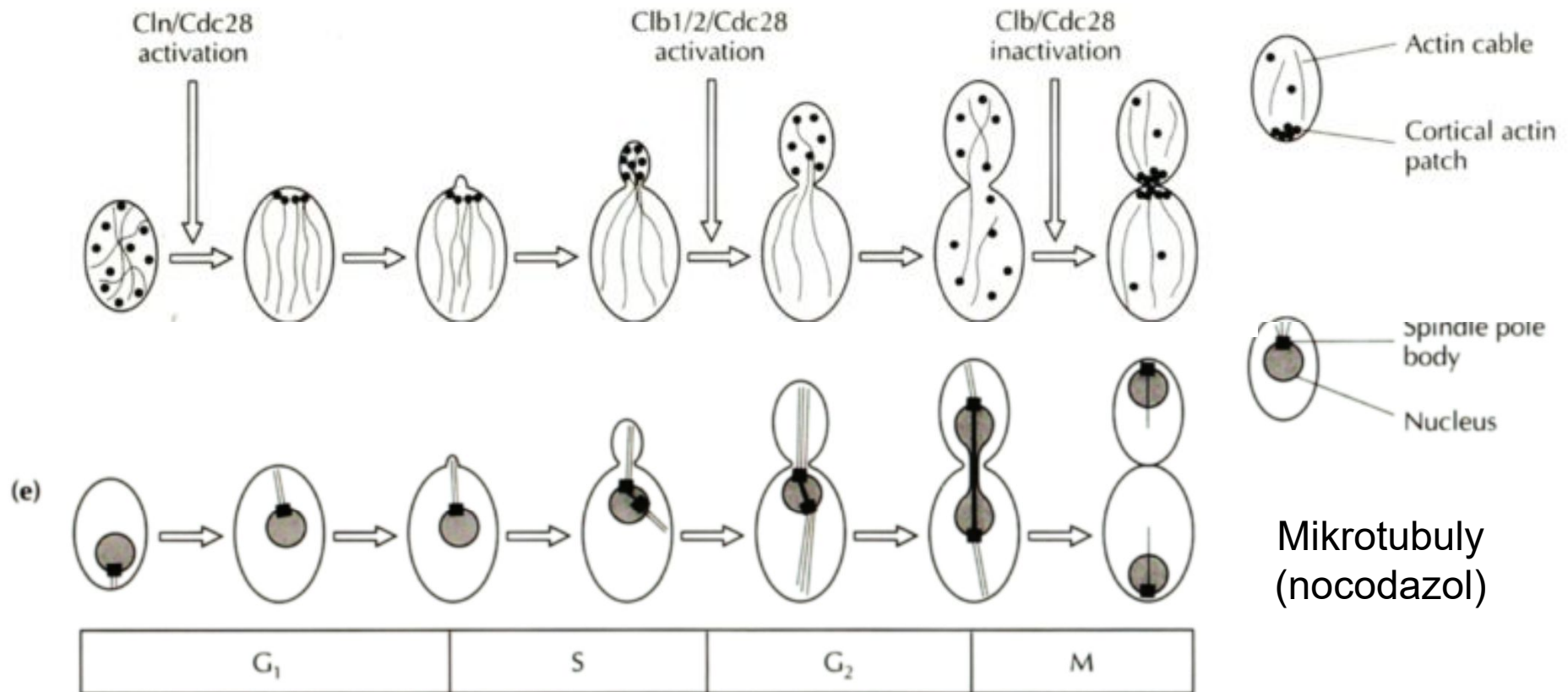


# Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- 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 dceřiná buňka je menší než mateřská – **nerovnocenné dělení** – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G<sub>1</sub> fáze

# Synchronizace *S. cerevisiae* buněk



- v úseku A jsou buňky „nedorostlé“ – elutriace (centrifugace dle velikosti buněk) – tzv. **G<sub>0</sub> synchronizace**

- v úseku B se rozhoduje o konjugaci - za přítomnosti alfa-faktoru (krátký syntetický peptid) dochází k zastavení buněčného cyklu – **G<sub>1</sub> synchronizace**

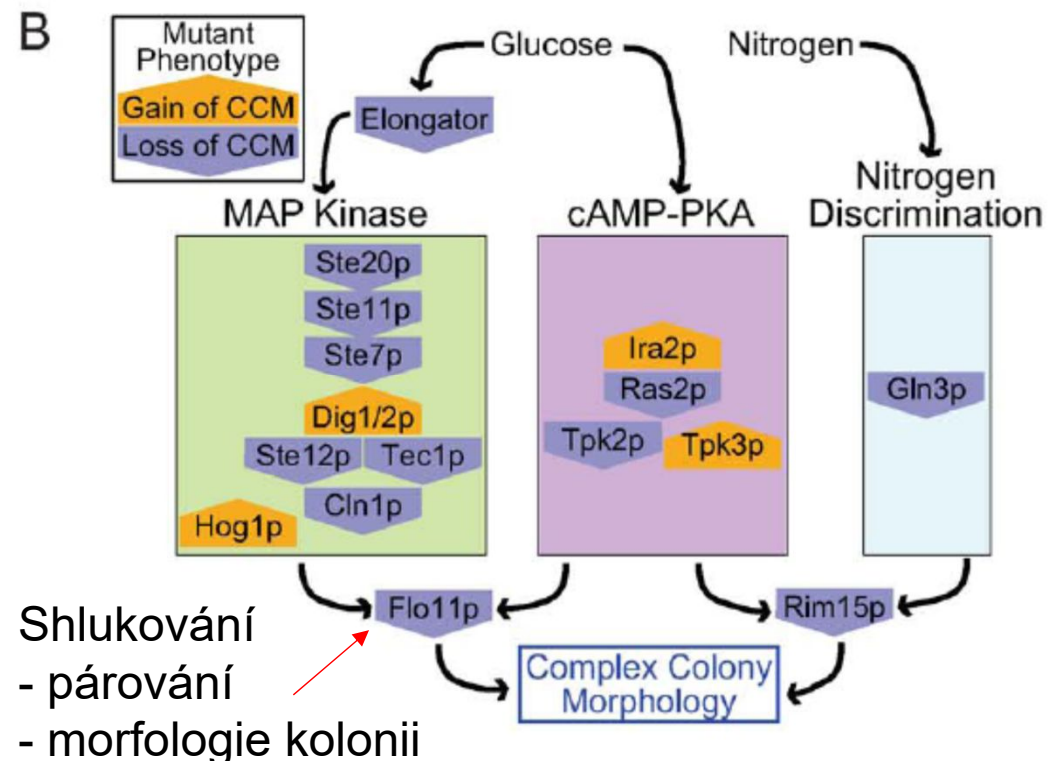
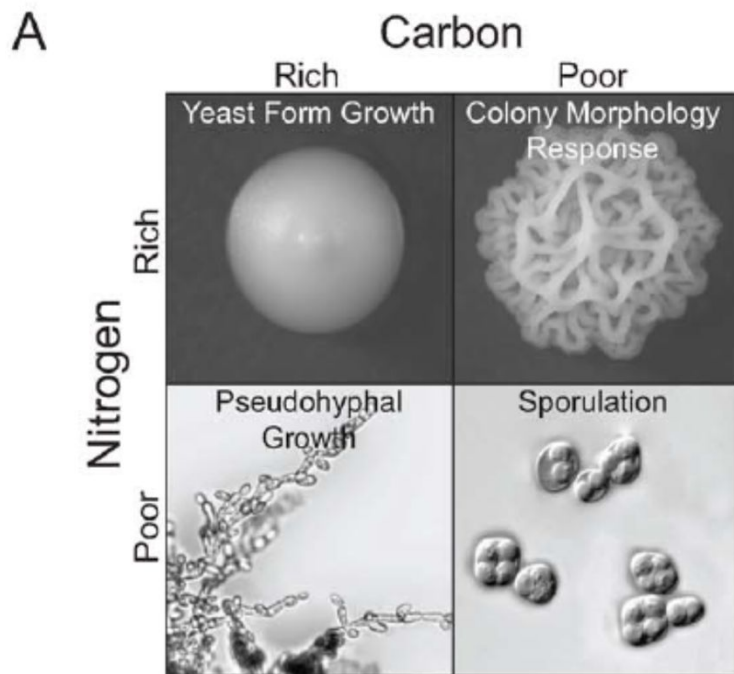
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

- nocodazol blokuje polymeraci tubulinu – schází mikrotubuly pro mitózu – **G<sub>2</sub> synchronizace**

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

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

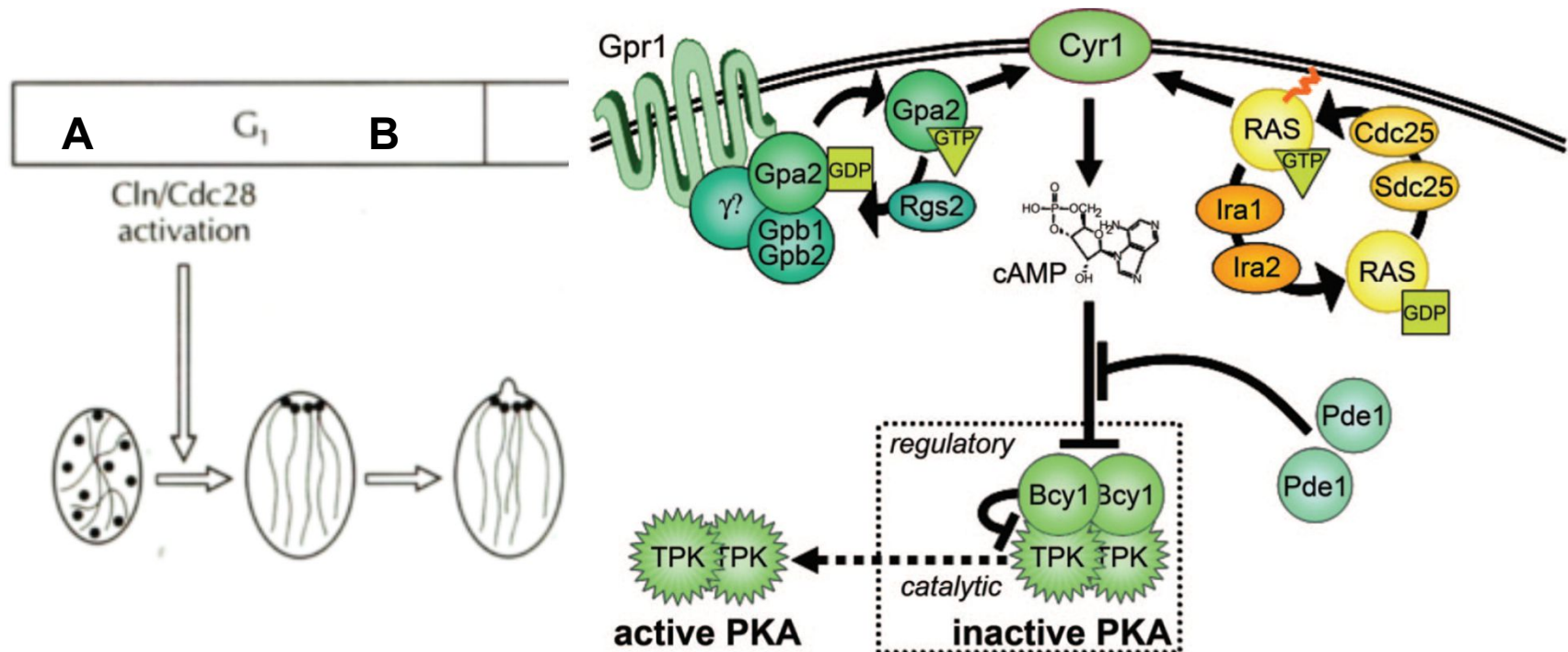


Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

# G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

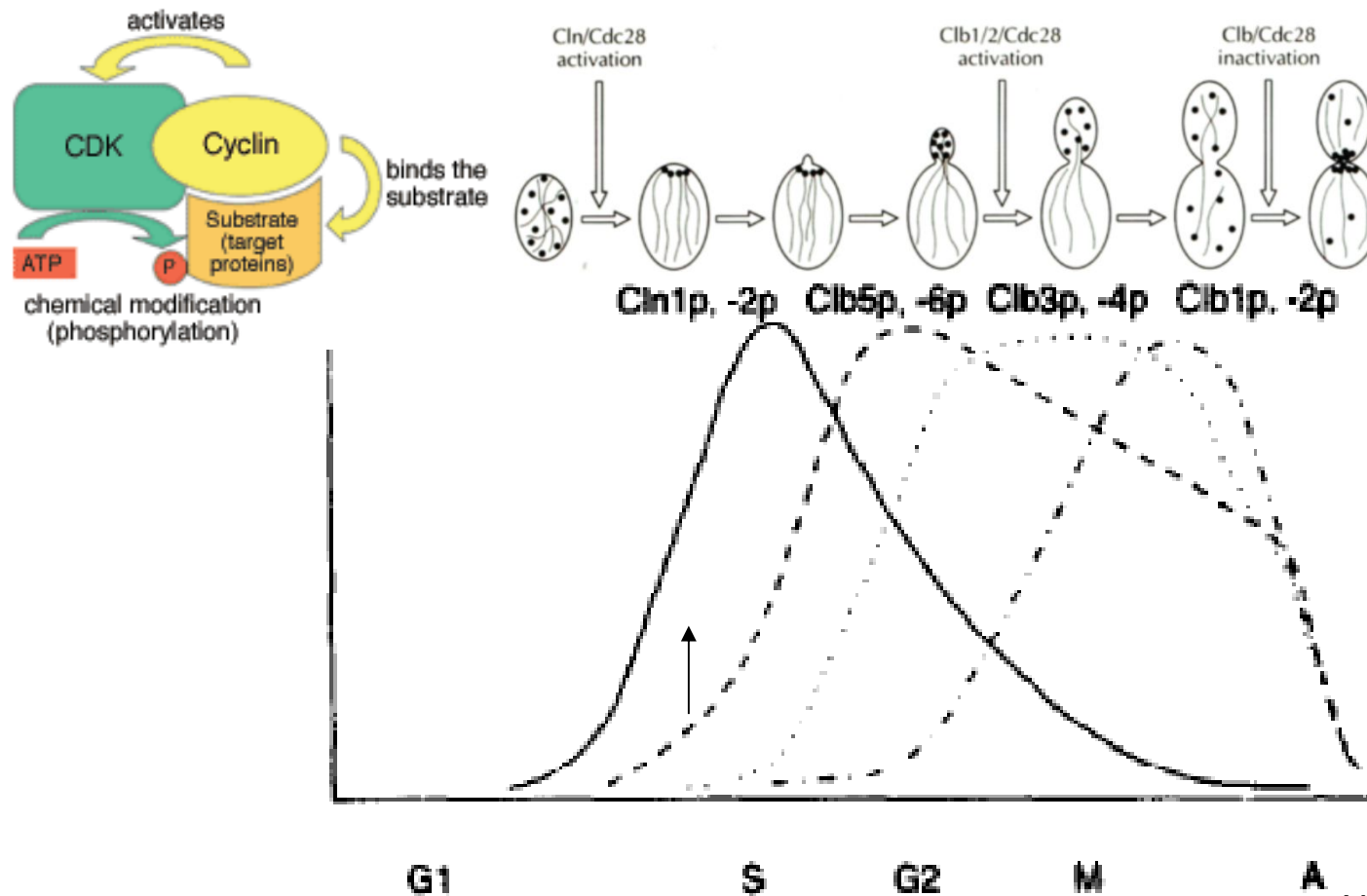
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



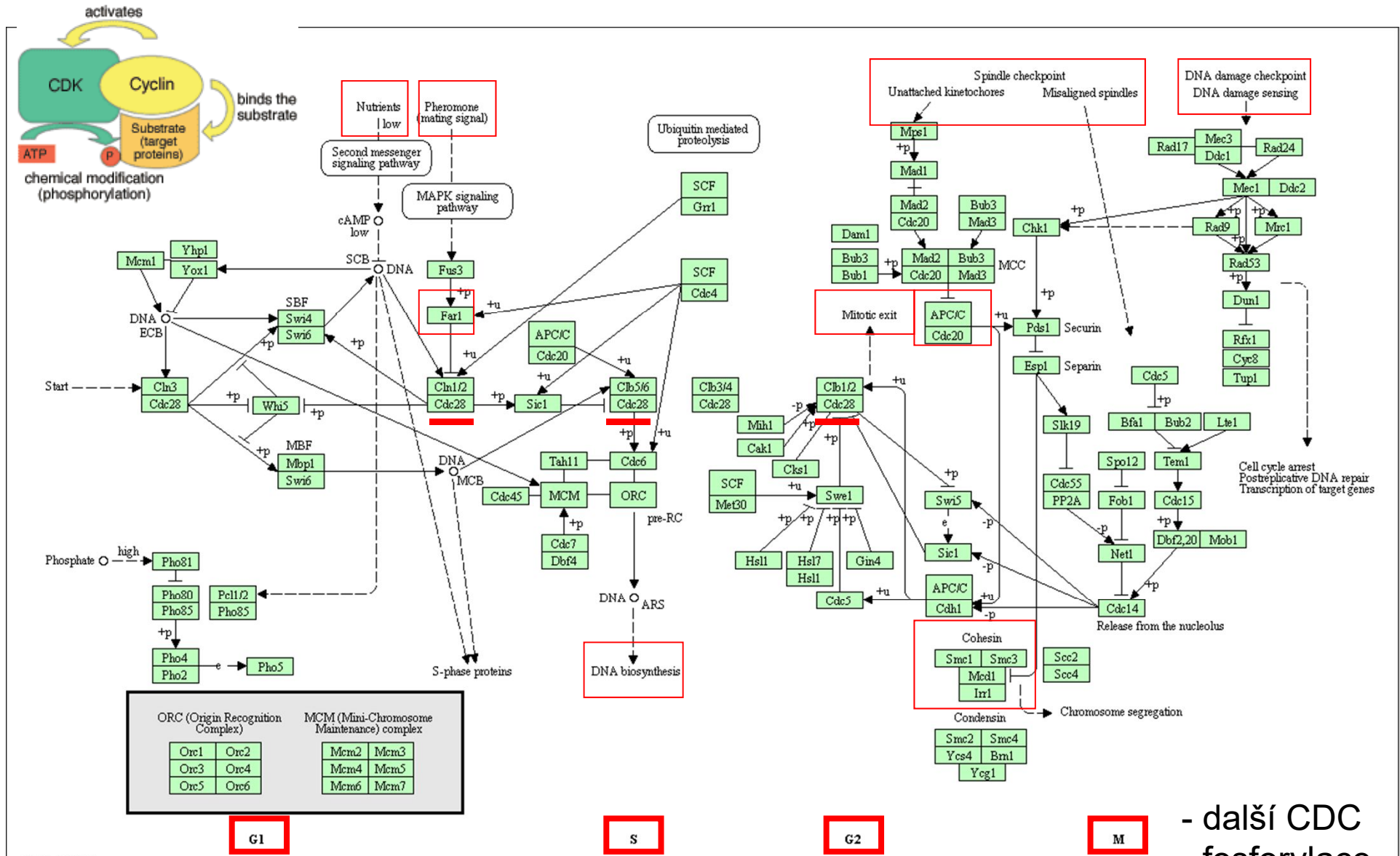
# CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakcí 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

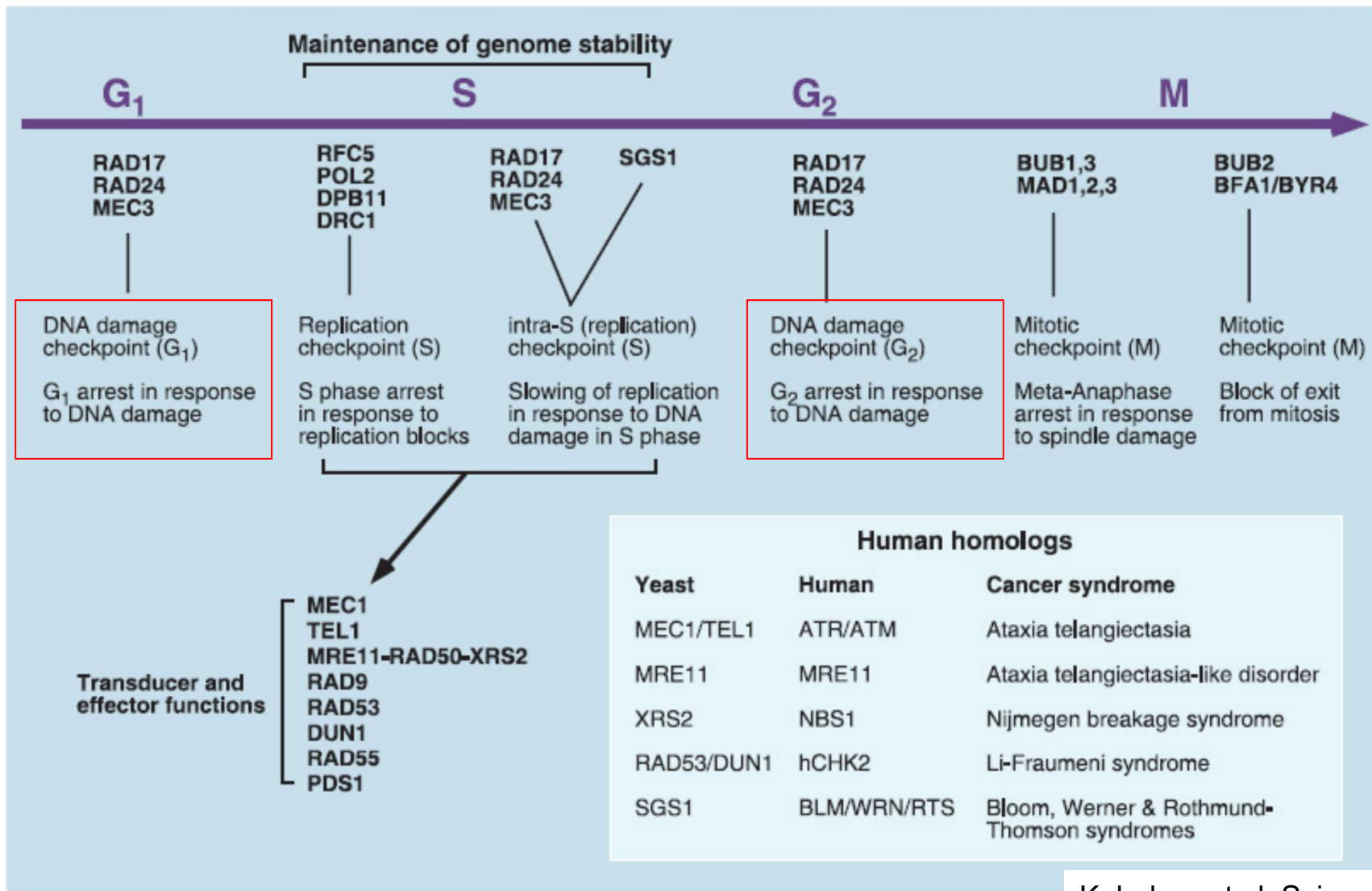


# Buněčný cyklus *S. cerevisiae* - detail



- další CDC  
- fosforylace  
- ubiquitylace





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