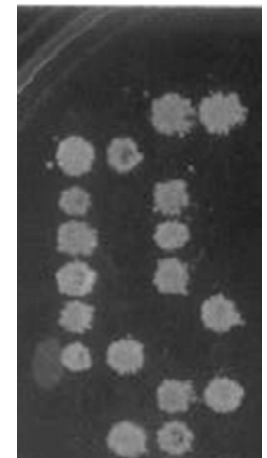
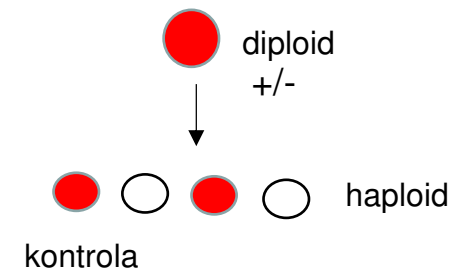


Osnova 5. přednášky

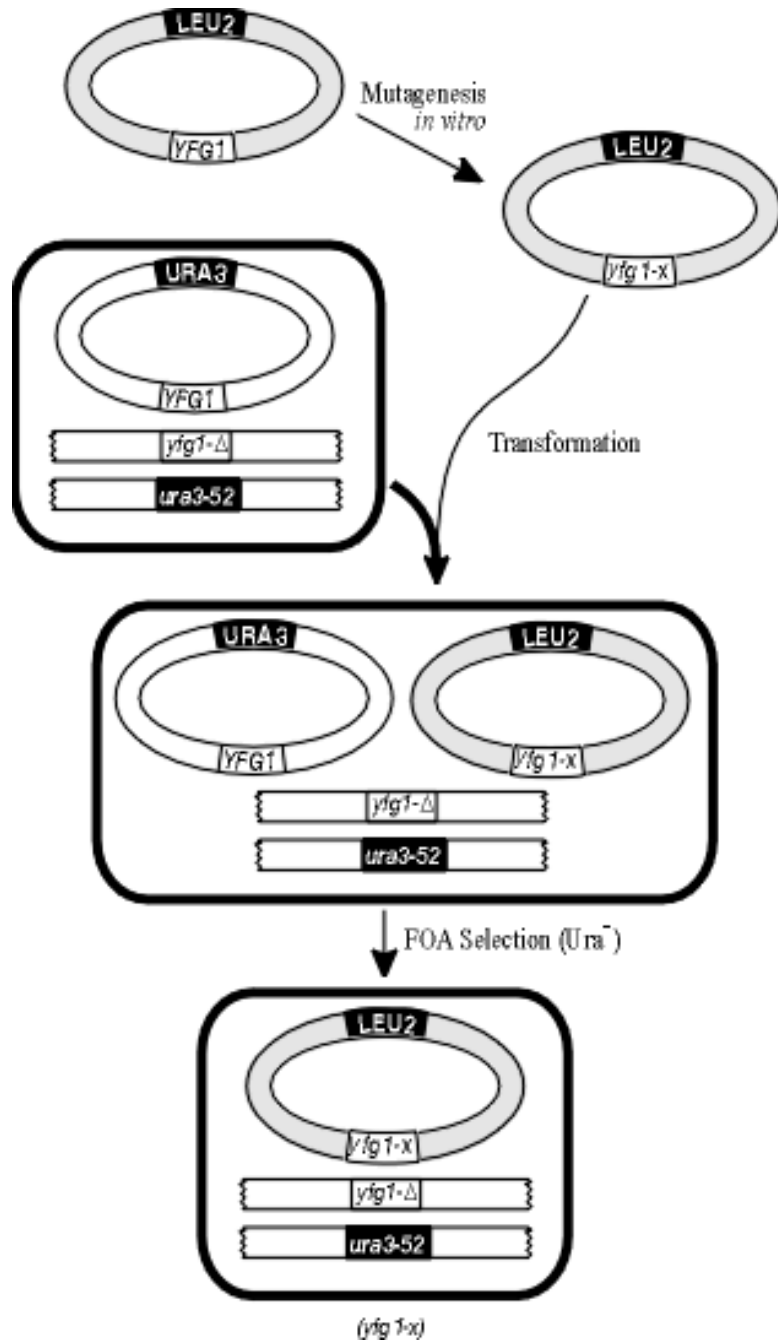
- Genetické metody
 - analýza esenciálních genů (ts mutanty)
 - mutageneze (“screen“)
 - genetické interakce
- Buněčný cyklus
 - průběh a regulace BC
 - synchronizace buněk
 - mechanismy regulace párování
 - homothalické kmeny

Esenciální geny

- **ne-esenciální gen** – lze přímo deletovat/odstranit v genomu haploidní buňky (předchozí přednáška)
- **esenciální gen**
 - **Tetrádová analýza** – ověření
 - **plasmid shuffling** - buňky potřebují funkční gen aspoň za určitých podmínek (kondicionální exprese)
 - **hypomorfní mutanty** - buňky potřebují aspoň „částečně“ funkční gen
 - **ts mutanty** - kondicionální mutanty



Plasmid shuffling



Pokud je *YFG1* **esenciální** musí být v deleční mutantě přítomna „divoká“ kopie genu např. na *URA3* plasmidu, který lze odstranit (pomocí FOA) – analýza terminálního fenotypu (např. buněčný cyklus)

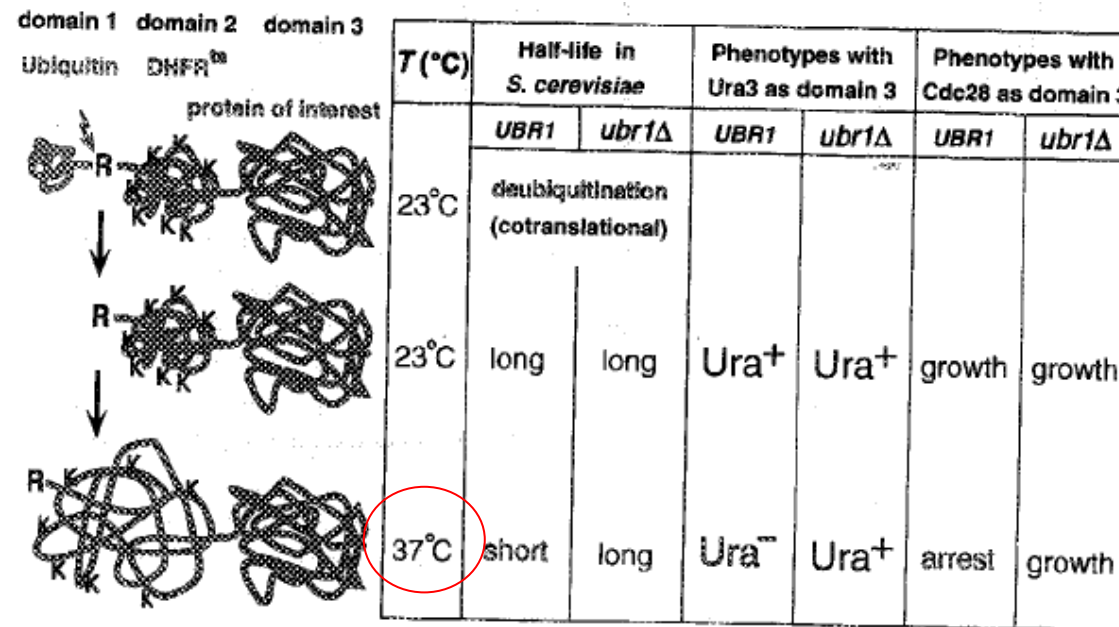
Na dalším plasmidu může být vnesena mutovaná verze *yfg1* – její efekt se projeví až po odstranění plasmidu s divokou kopií genu (pomocí FOA)

Lze připravit hypomorfní mutanty (včetně ts)

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

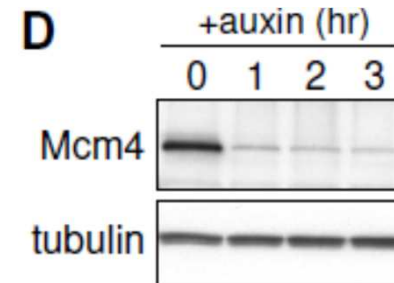
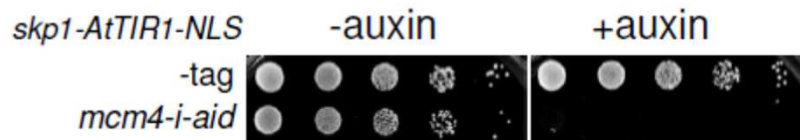
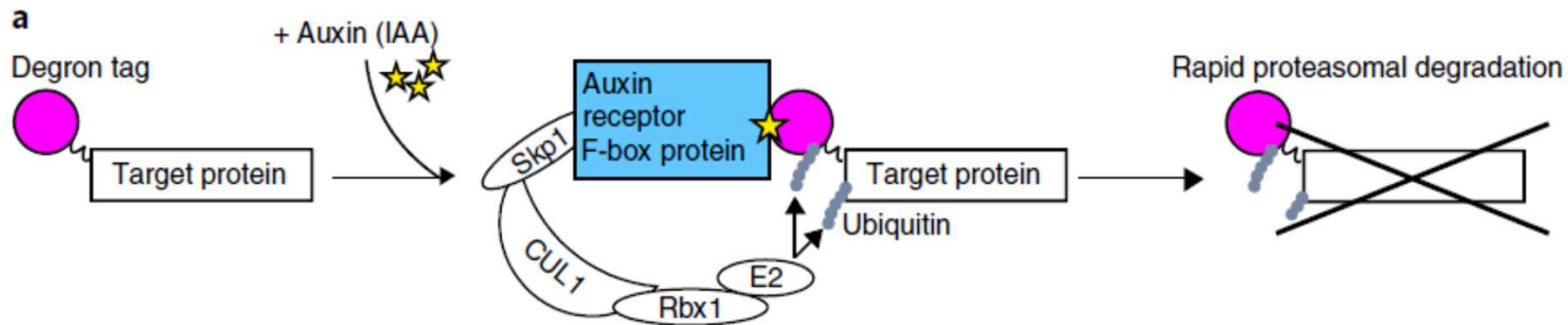
ts mutanty

- **ts mutanty** jsou výhodné pro studium funkce esenciálních genů – mutanty jsou funkční 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**



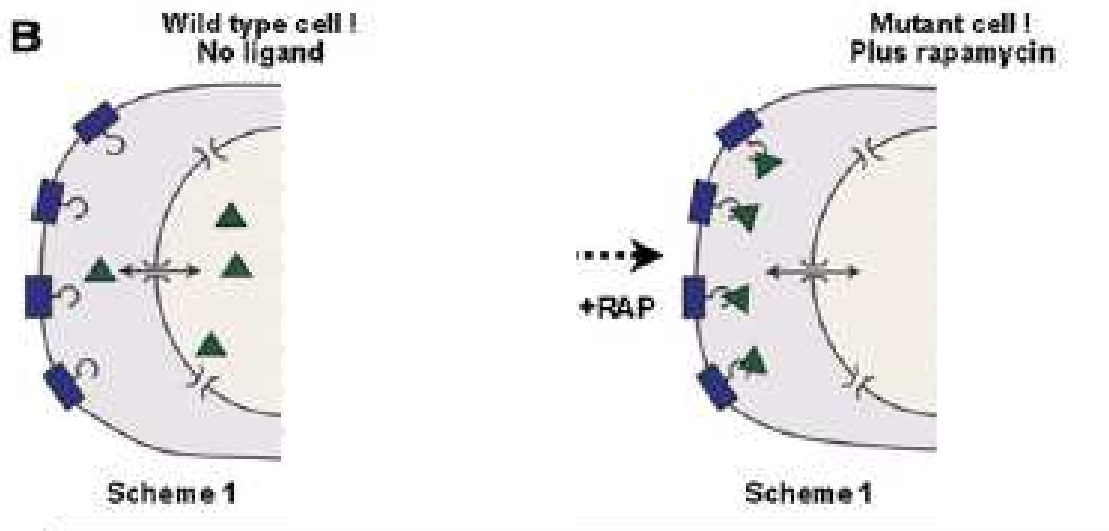
- ubikvitinace „označuje“ proteiny pro proteasom, kde je degradován – např. ts varianta DHFR je degradována (nestabilní protein – strukturní mutace)
- fúze DHFR (ts alely) s heterologním proteinem => celý protein je na 37°C degradován
- je možno využít pro přípravu ts mutantních kvasinek (fúze s CDC28 – kvasinky arestují v G1 fázi – sleduje se **terminální fenotyp**)

Rychlé vyřazení proteinu z funkce - degradace

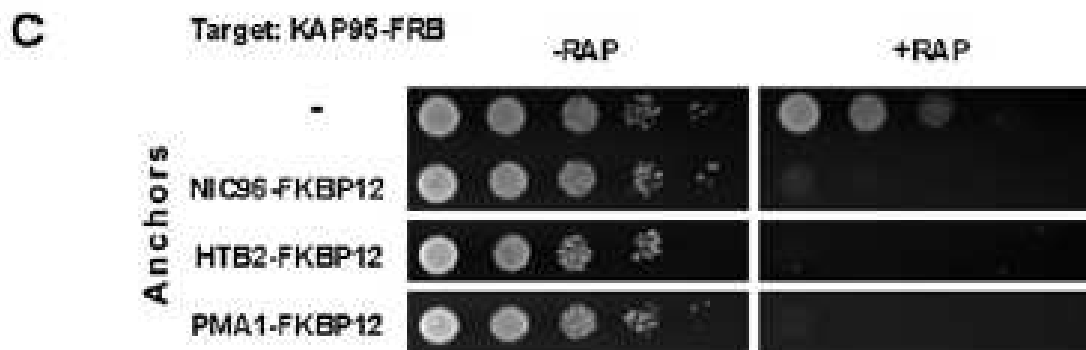


protein je cíleně degradován (vyřazen z funkce)
– odvozen z rostliné ubikvitin-ligázy indukované auxinem (využití i pro ostatní organismy)

Rychlé vyřazení proteinu z funkce - relokalizace



protein je cíleně relokizován tj. vyřazen z funkce (např. transkripční faktor je pomocí rapamycinového systému „vytažen“ z jádra – transkripce nebude spouštěna)



Izolace mutant

3.

Cloning the Wild-type Gene by Complementation

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

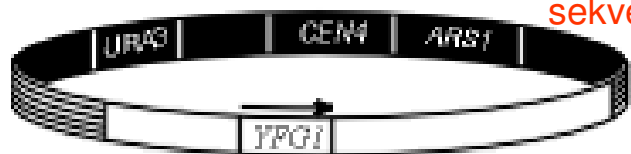
Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



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

nyní NGS

PCR genom sekvenace

Mutagenesis of a haploid *MATa* strain



1. Detection of Yfg⁻ *ura, ts, rad ...*



Yfg⁻

2. Complementation

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

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

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

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MATα YFG+*



Isolate a diploid strain and Sporulate



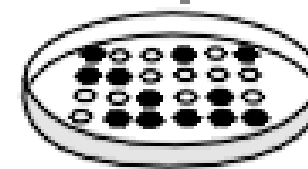
Digest ascus walls



Dissect 4 spores of each tetrad



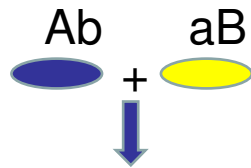
Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



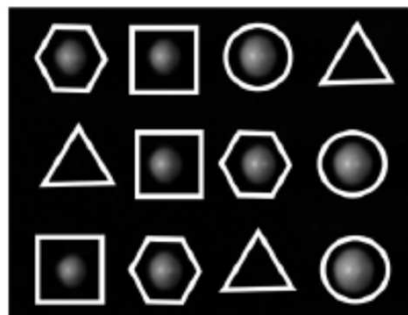
Počet mutací

- jedna mutace (segregace fenotypu)
- rozdělení do komplementačních skupin
- genetické vztahy mezi mutantami

stejný fenotyp – epistatický (funkčně příbuzné geny)
 aditivní až letální fenotyp - paralelní dráha, redundance
 suprese fenotypu - mutace může napravit původní defect



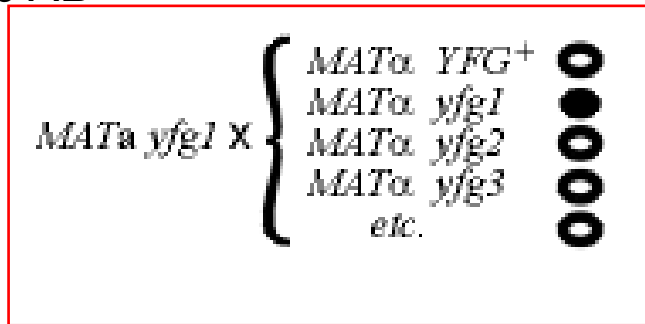
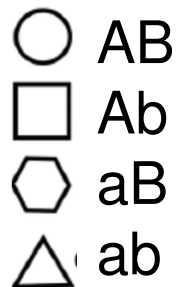
Genetické interakce (genetické vztahy)
(terádová analýza)



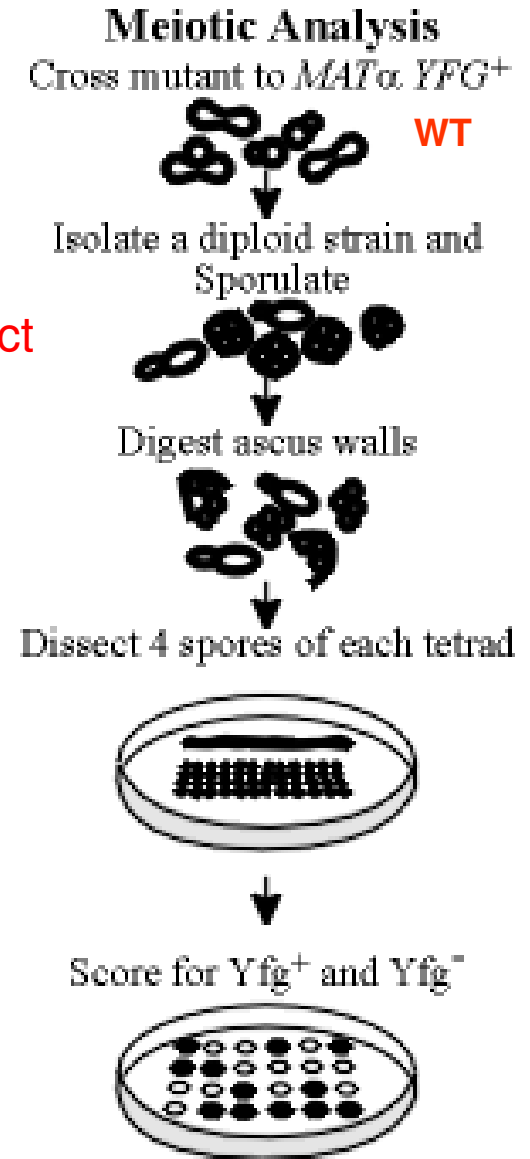
aB Ab AB ab

ab Ab aB AB kombinace těchto mutací je synteticky letální

Ab aB ab AB

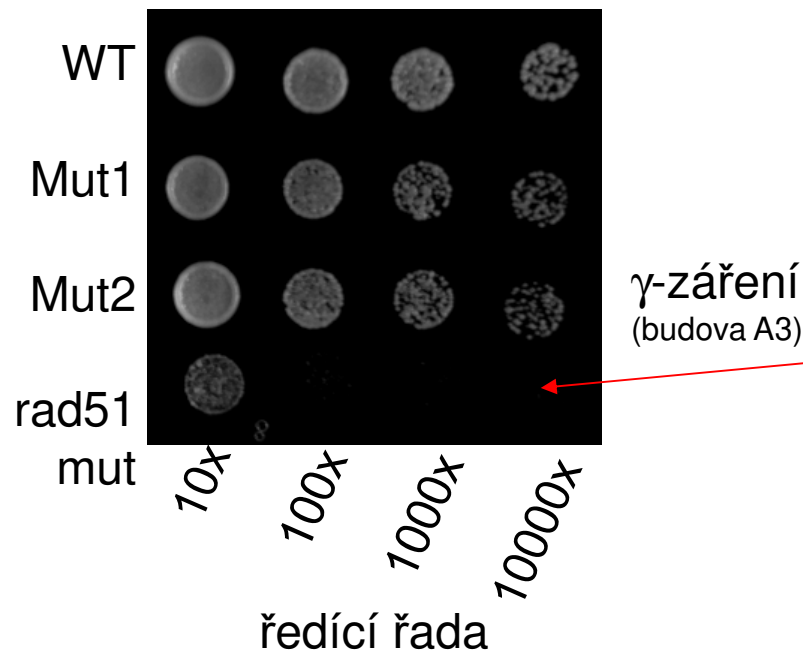


Komplementační skupiny (diploid)



Segregace (počet) mutací (tetradová analýza)

- 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 ...***)



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

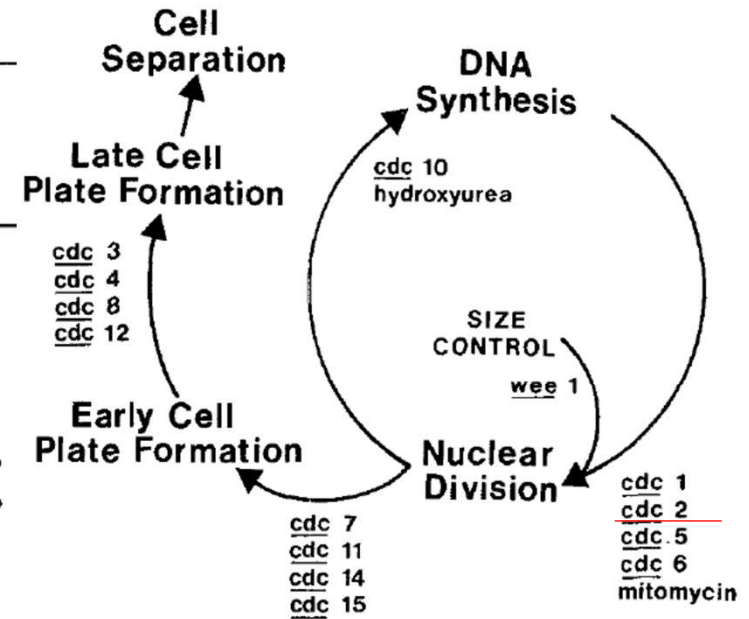
Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe* - v 70. letech objevil gen *Cdc2* (homolog *CDC28*) - zodpovědný za regulaci většiny fází BC - v roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).



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

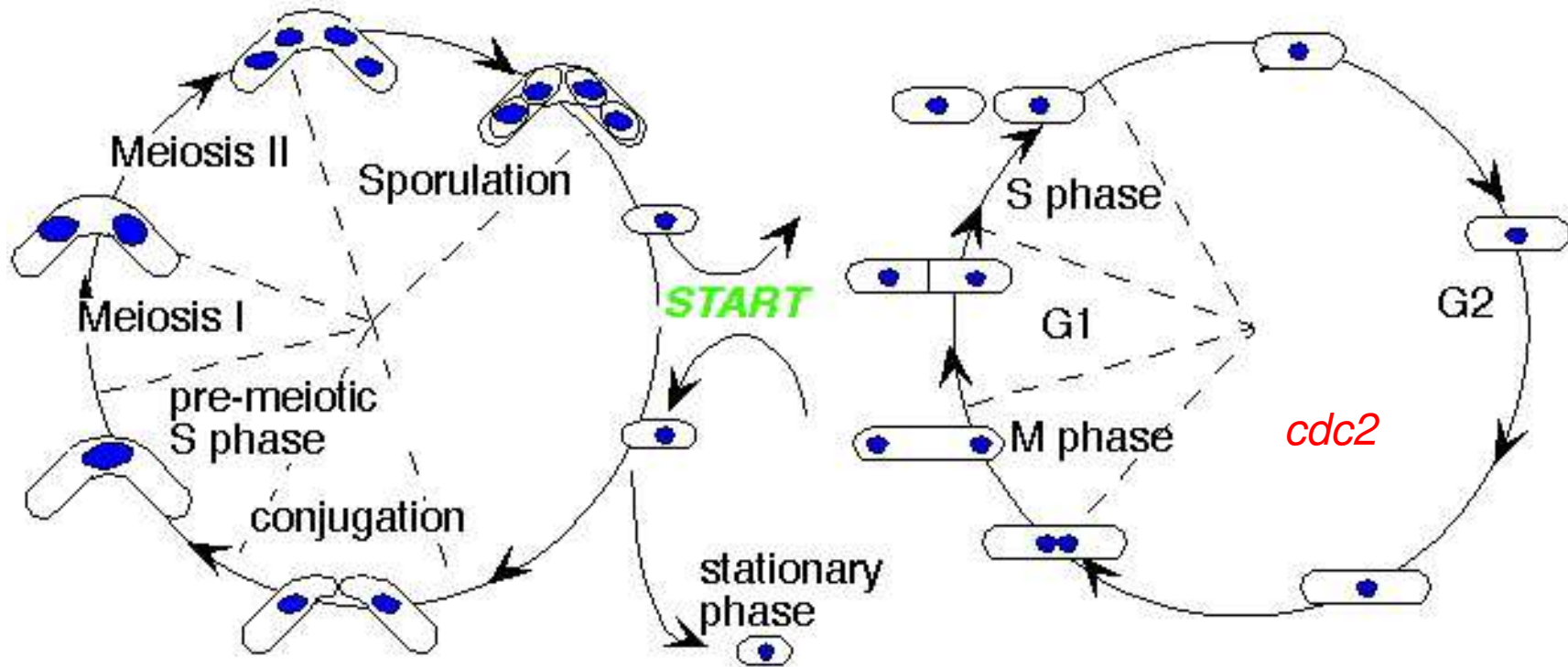
Gene	Allele	Transition point	fgDNA/nucleus after 5 h at 35° C ^a	Defect	Notes
<i>cdc 1</i>	7	0.69	32.6	Nuclear division	
„	18	0.74	30.1	„	
<u><i>cdc 2</i></u>	33	0,78	30.2	„	
„	56	0.69	–	„	
„	130	0.74	–	„	
<i>cdc 5</i>	120	0.79	31.1	„	leaky ^b
<i>cdc 6</i>	23	0.44	–	„	leaky ^b
„	121	0.38	32.1	„	
<i>cdc 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 ...

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)

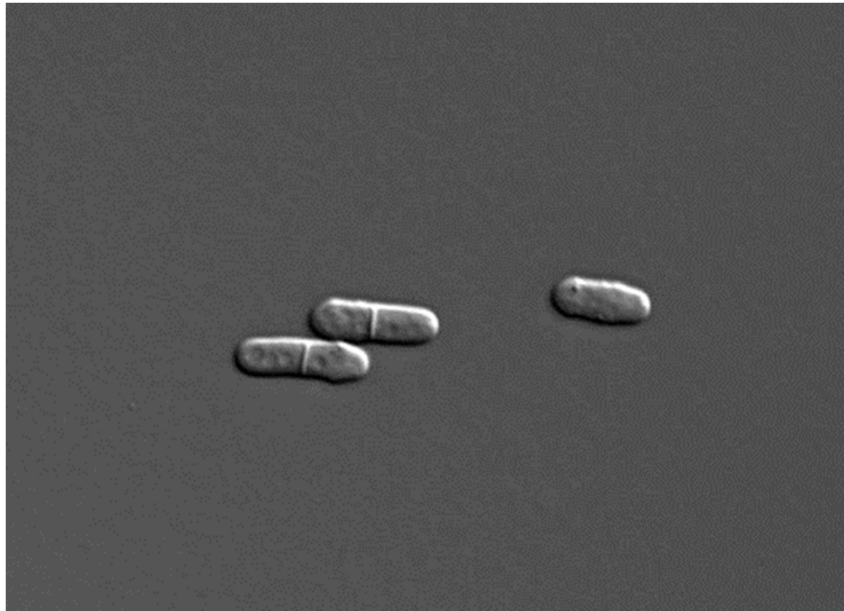


Meiotic cycle

Vegetative (mitotic) cycle

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

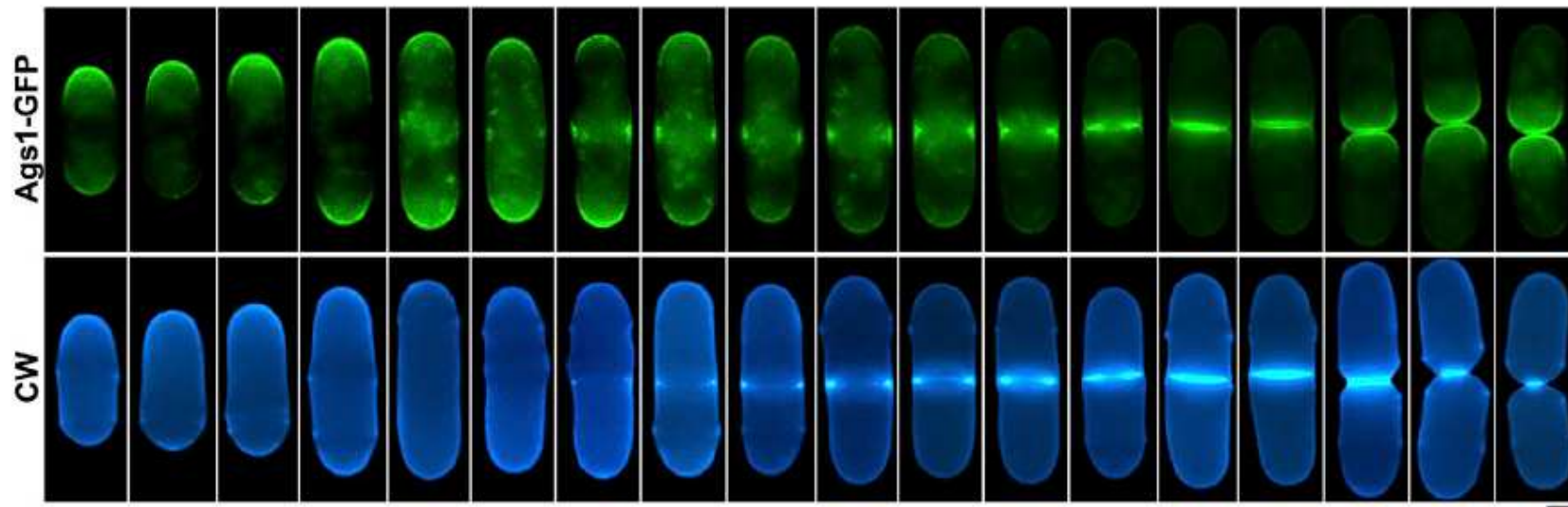
S. pombe



sekrece ... aktinový cytoskelet
jsou důležité pro procesy
polarizace ... v průběhu
buněčného cyklu ...
mating/fusion ...

- Více Dr. Špirek

Cortes et al, JCB, 2012

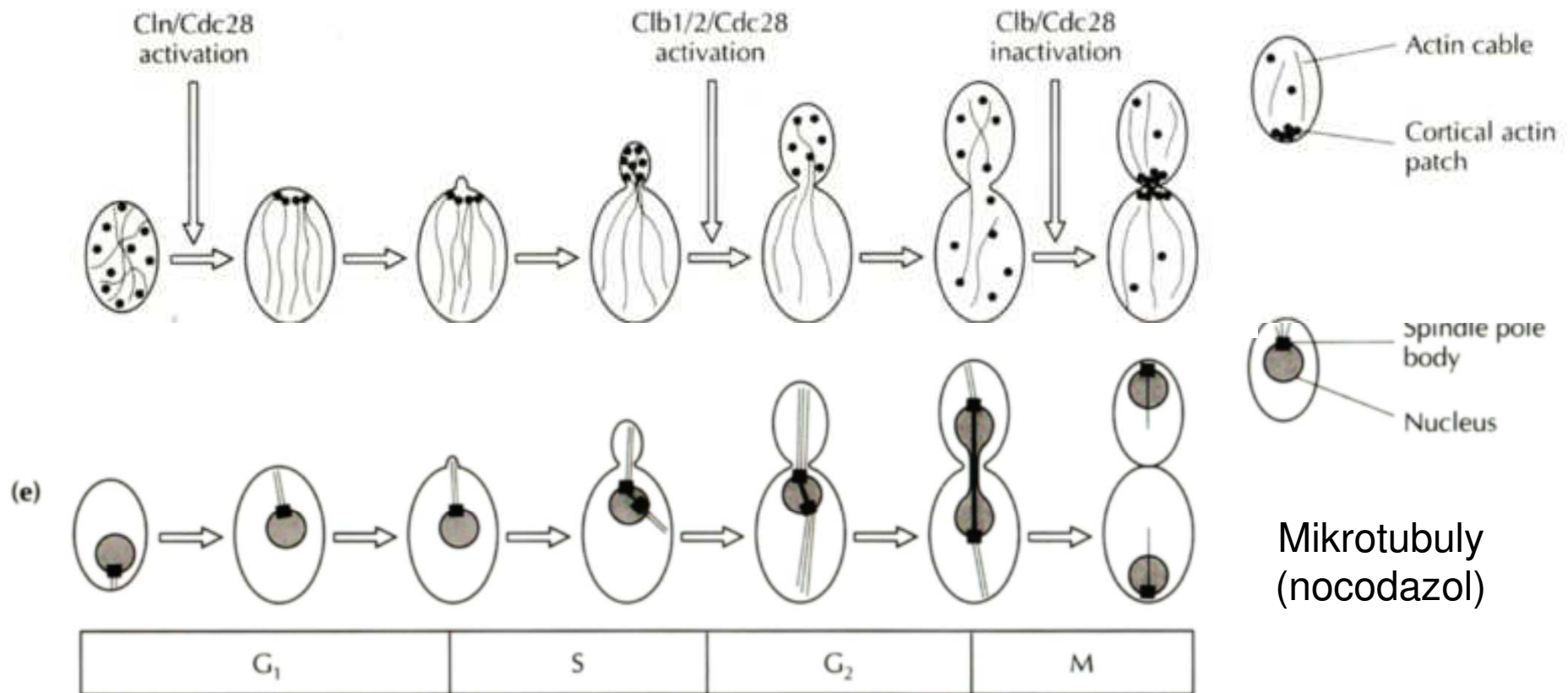


S. cerevisiae



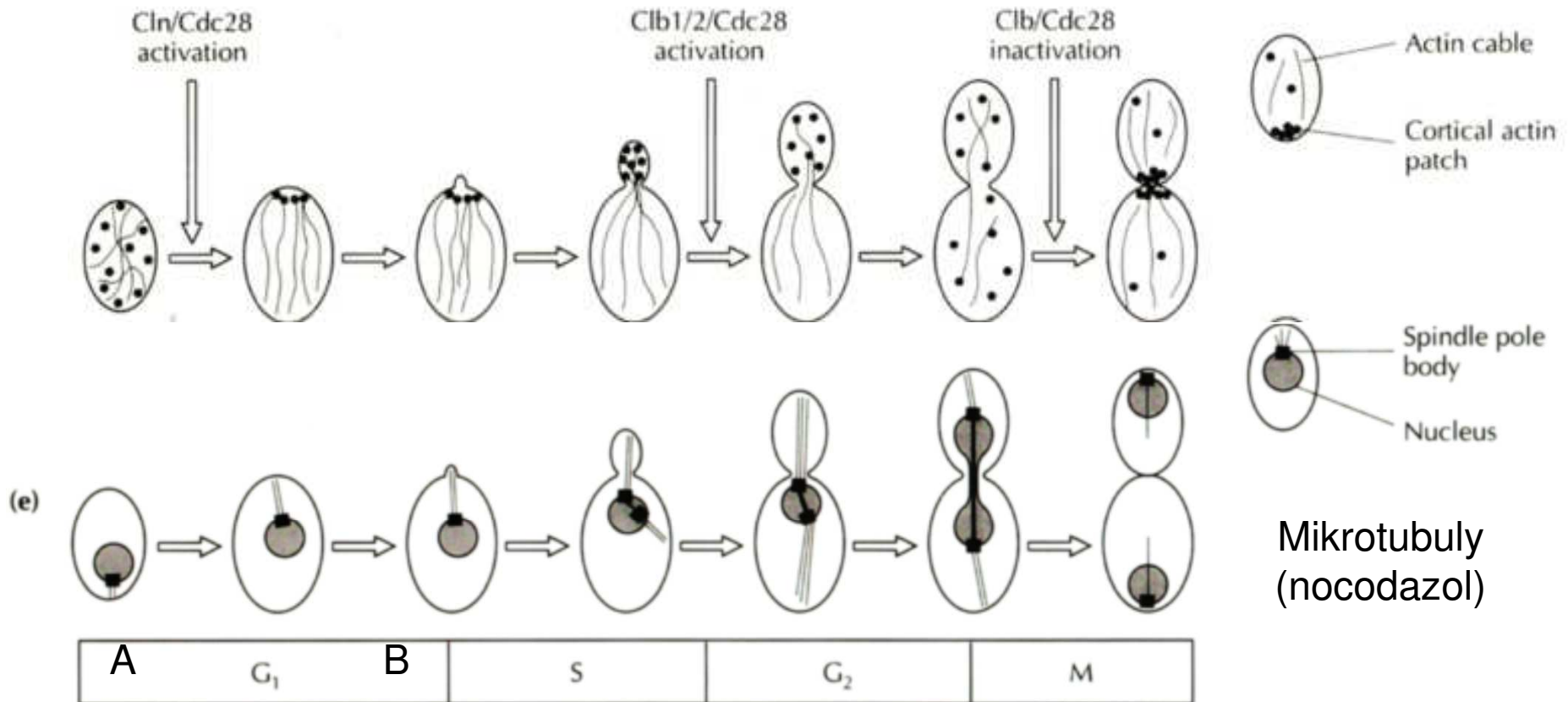
pučení ... párování (shmoo)

Buněčný cyklus *S. cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy) - mikrotubuly
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G₁
- oddělená dceřiná buňka je menší než mateřská – **nerovnocenné dělení**– pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G₁ fáze

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**

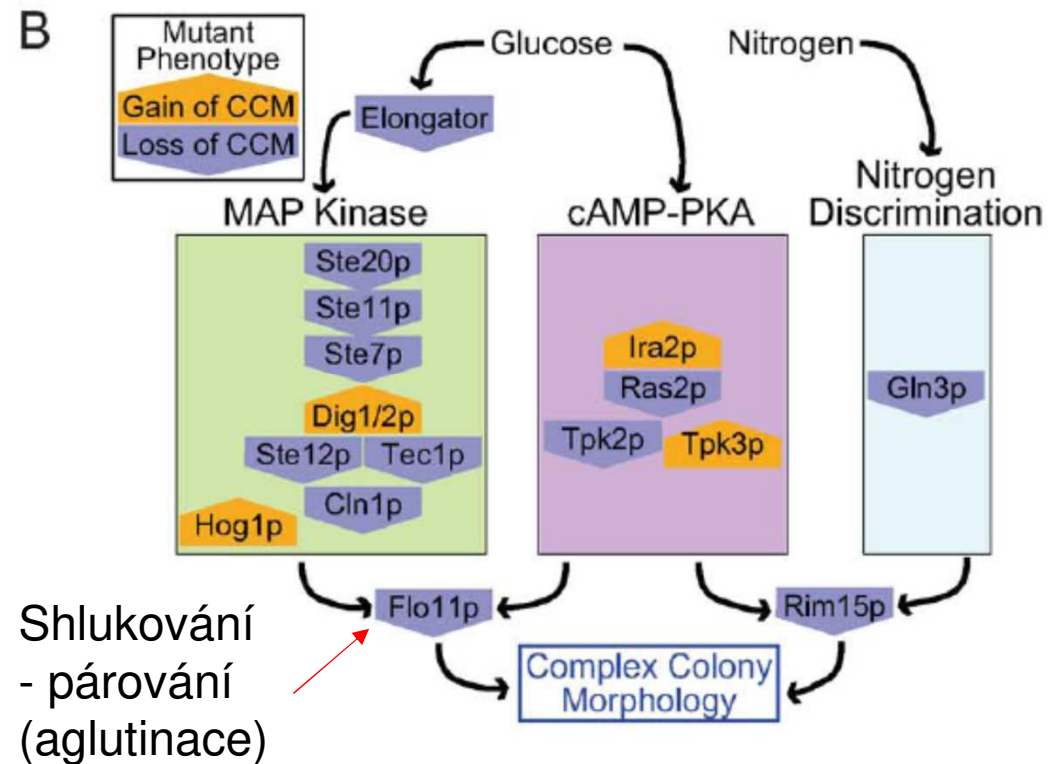
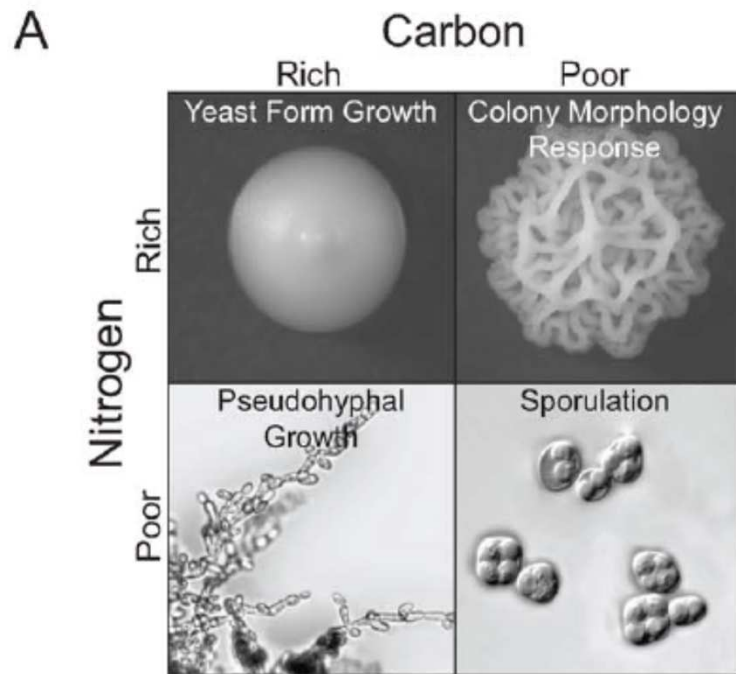
- HU inhibuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci – **synchronizace v S fázi**

- nocodazol blokuje polymeraci tubulinu – schází mikrotubuly pro mitózu – **G₂ synchronizace**

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

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

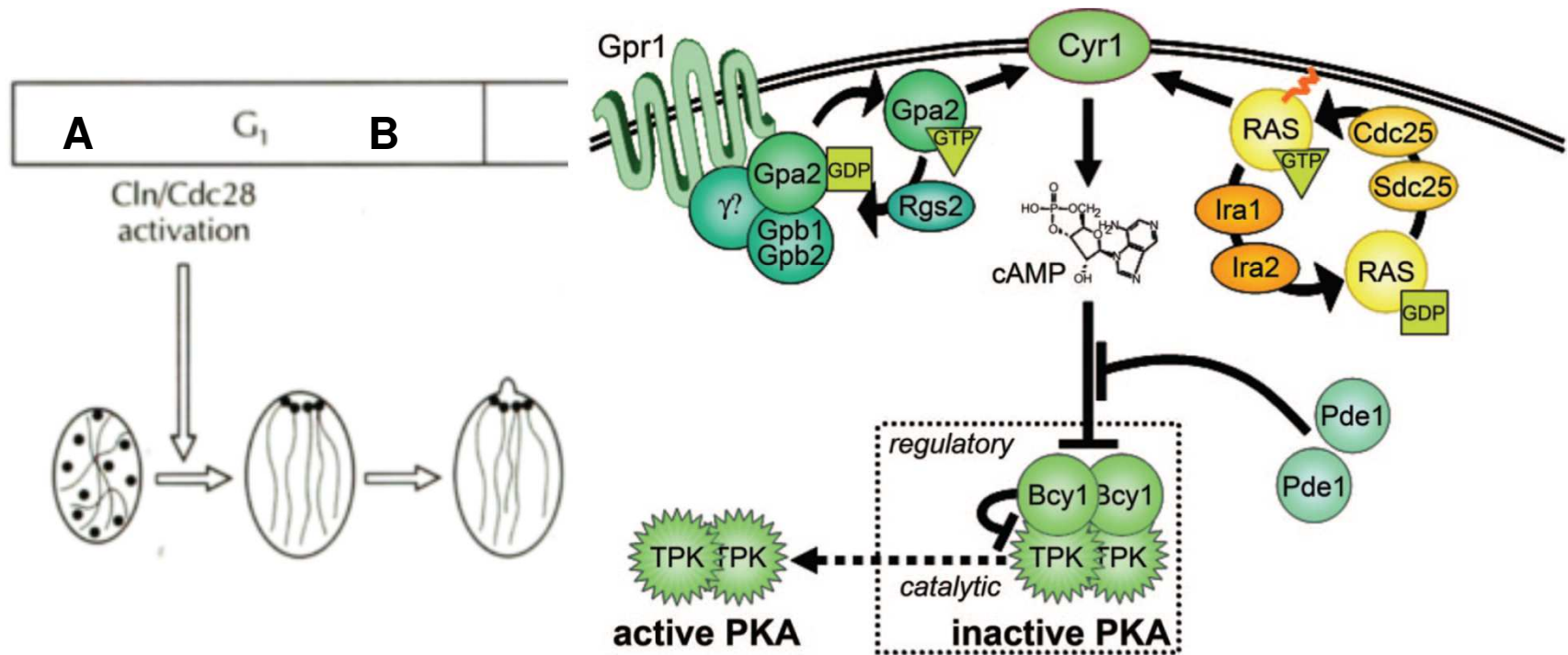
- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
- při nedostatku živin aretuje v G1 nebo posléze přechází do stacionární fáze (vyčerpání živin)
- nedostatek dusíku – růst pseudohyf
- při nedostatku N a C (diploidní buňky) zastavují v G1 a zahajují meiosis/sporulaci
- haploidní buňky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



G1 fáze - *S. cerevisiae*

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

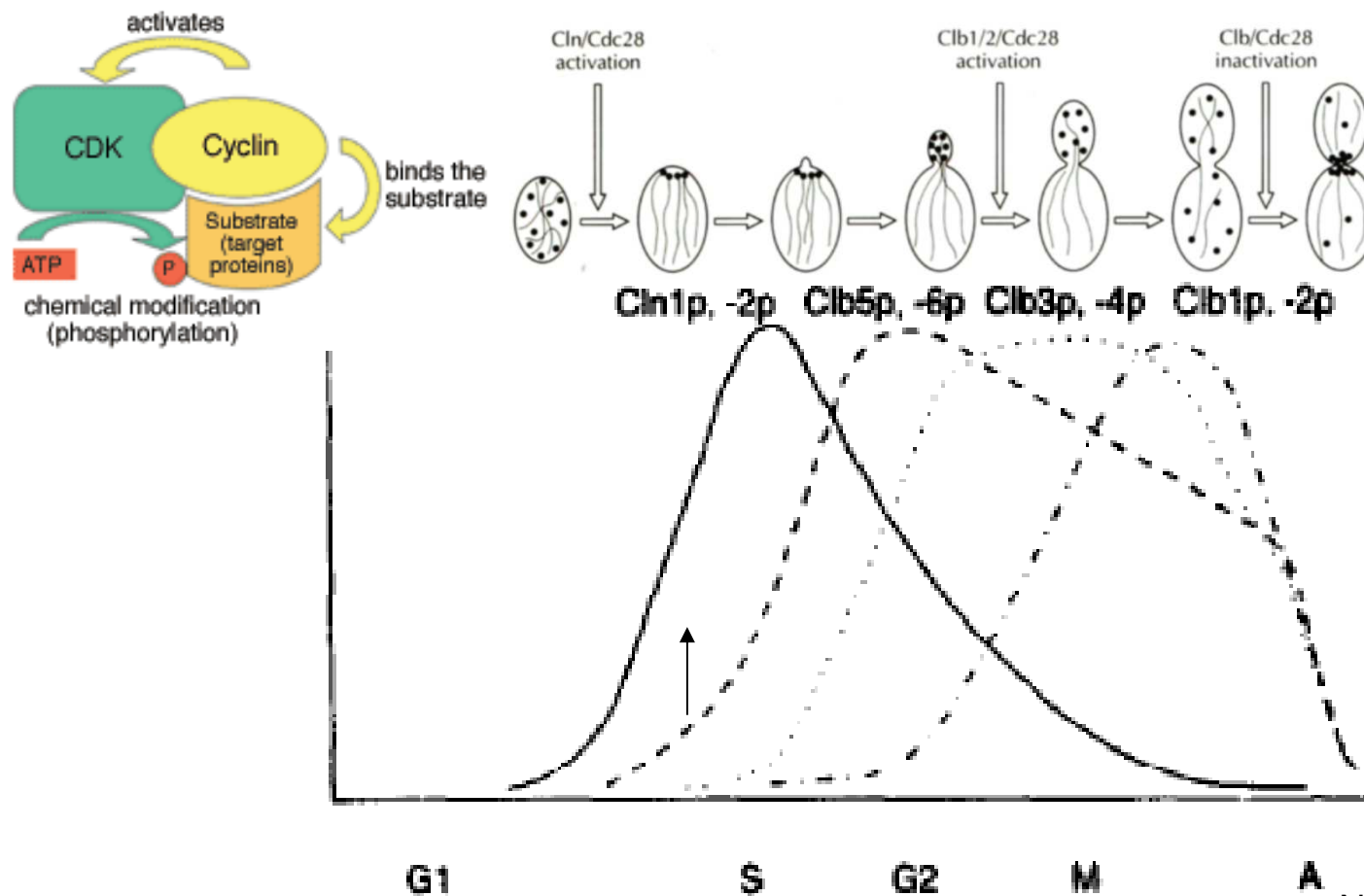
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
- v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy - živiny)
- v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (zastavení pomocí alfa-faktoru,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



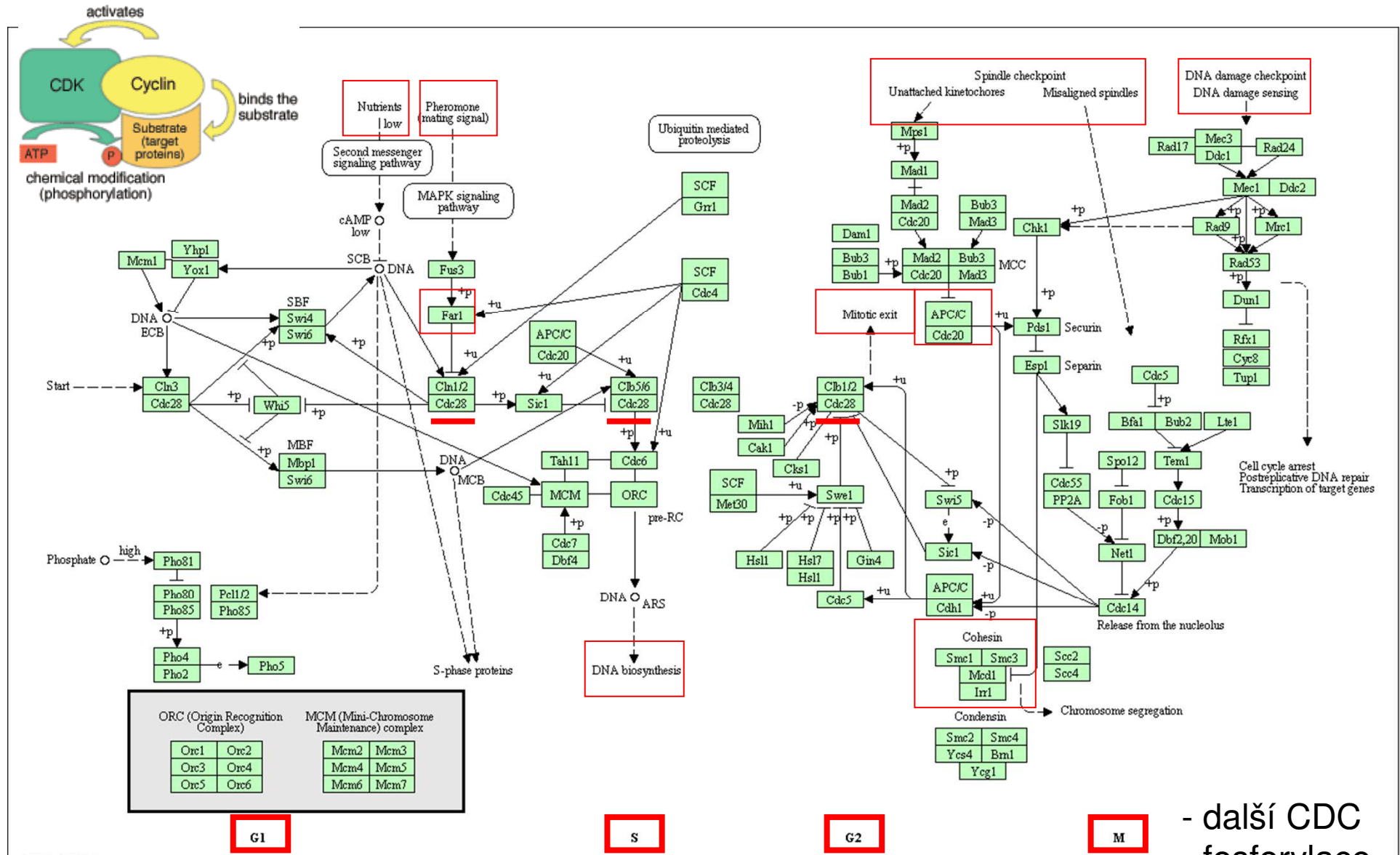
CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

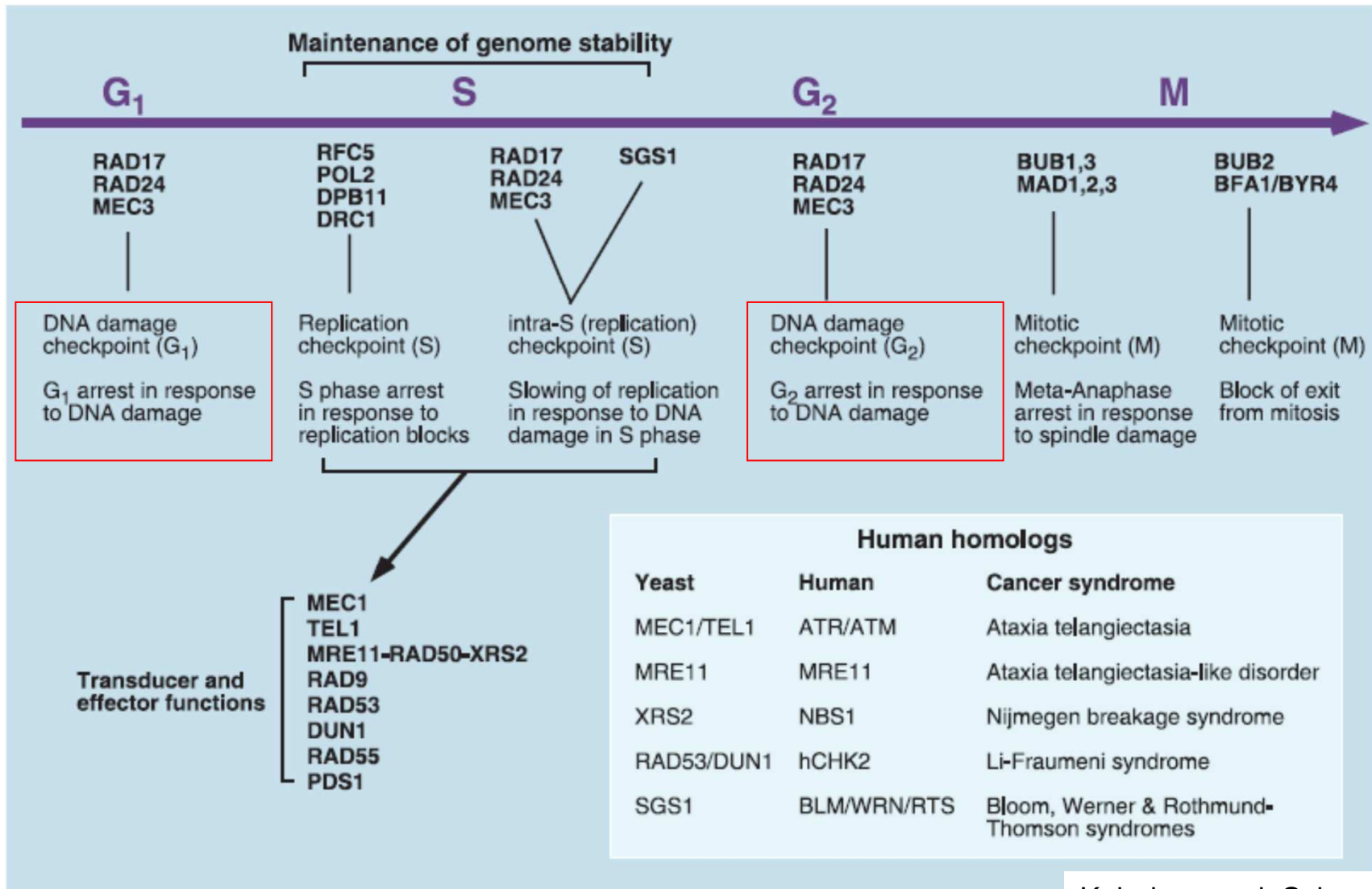
Interakcí fosforylované Cdc28p s cyklinem vzniká **aktivní kinásový komplex**:

- 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

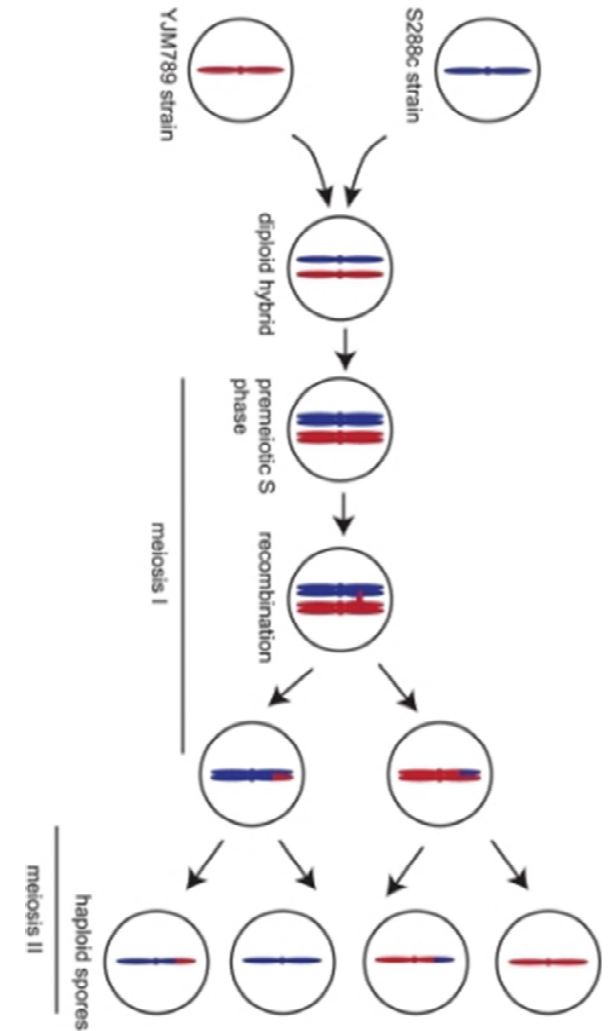
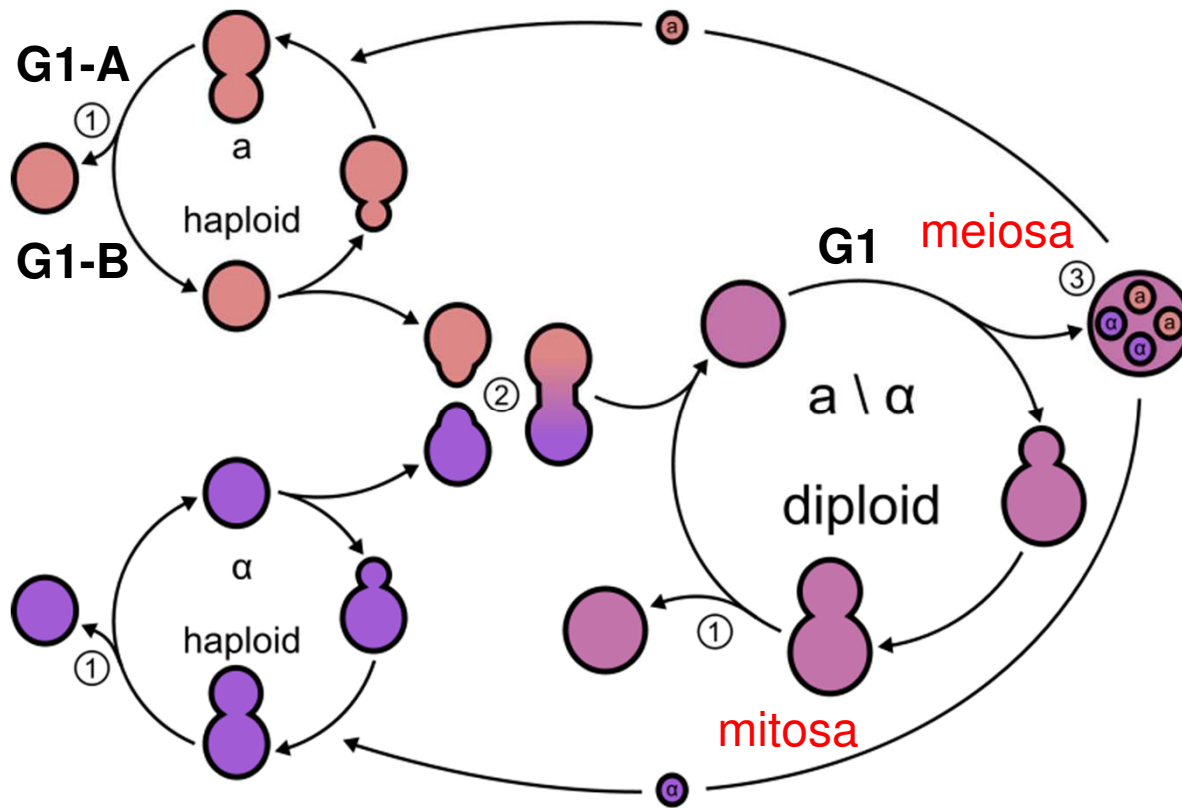




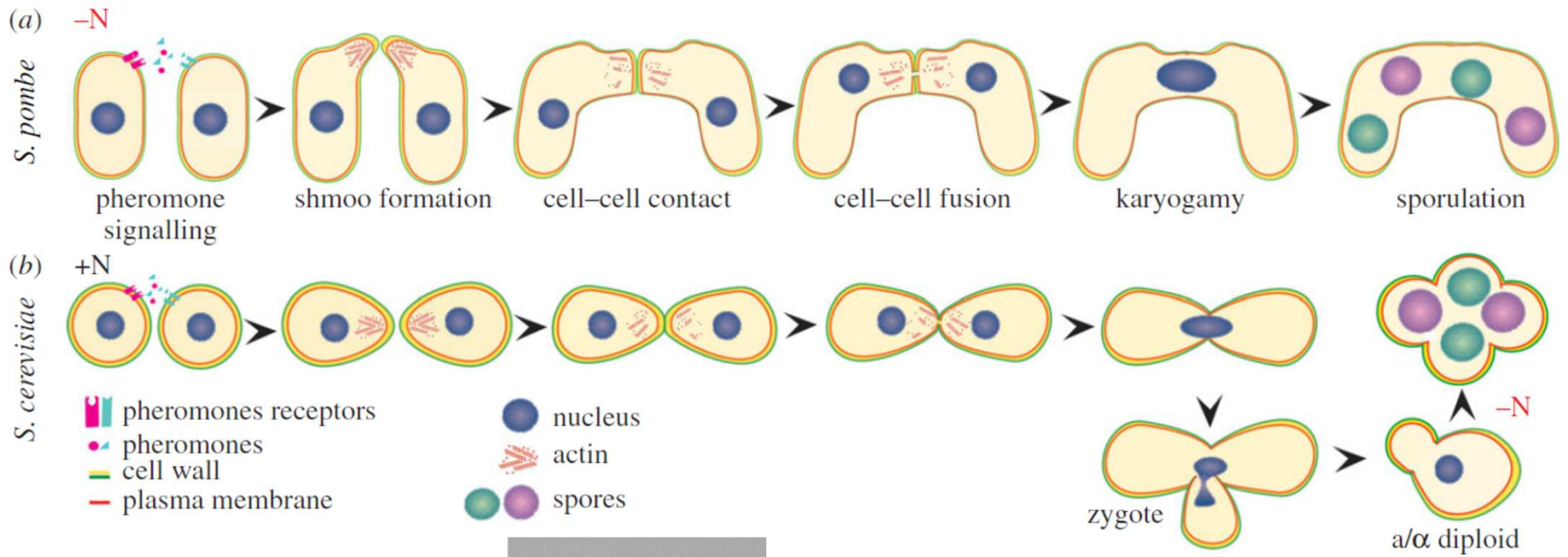
Kolodner et al, Science (2002)

Fig. 1. Summary of *S. cerevisiae* DNA damage, replication, and mitotic checkpoints. The 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)

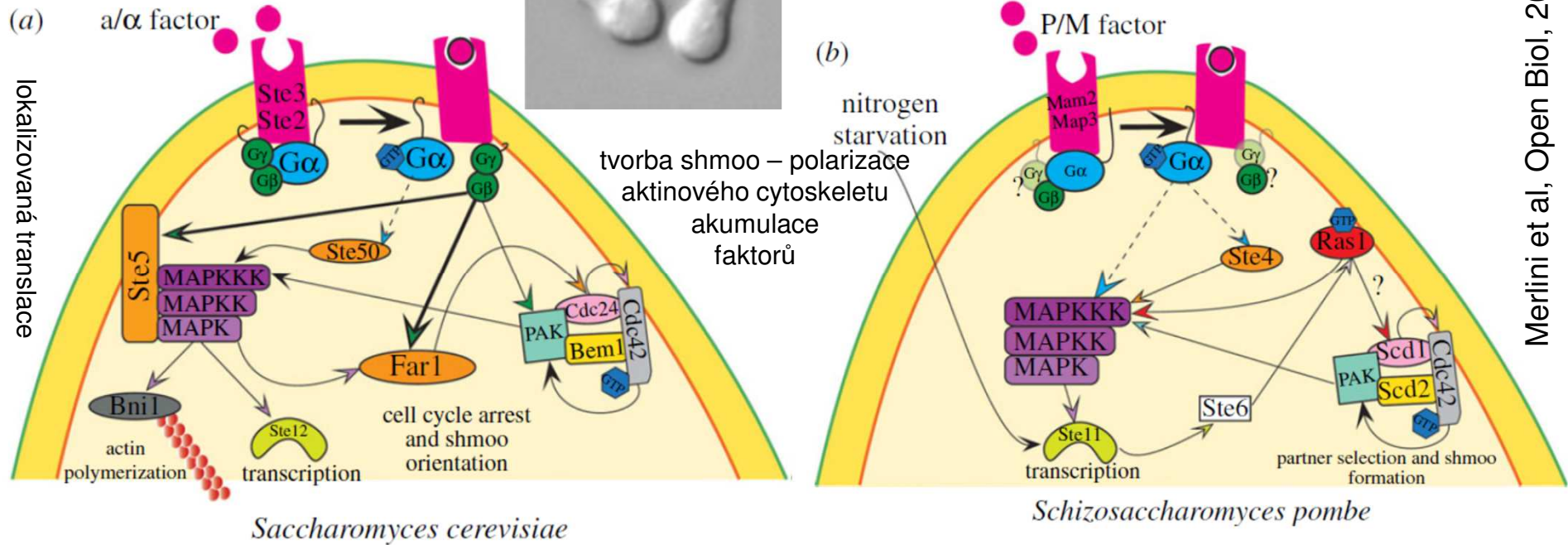
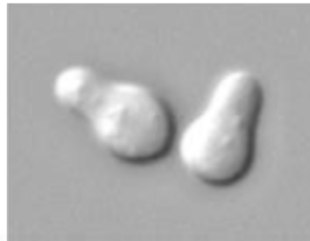
Párování/mating kvasinkových buněk

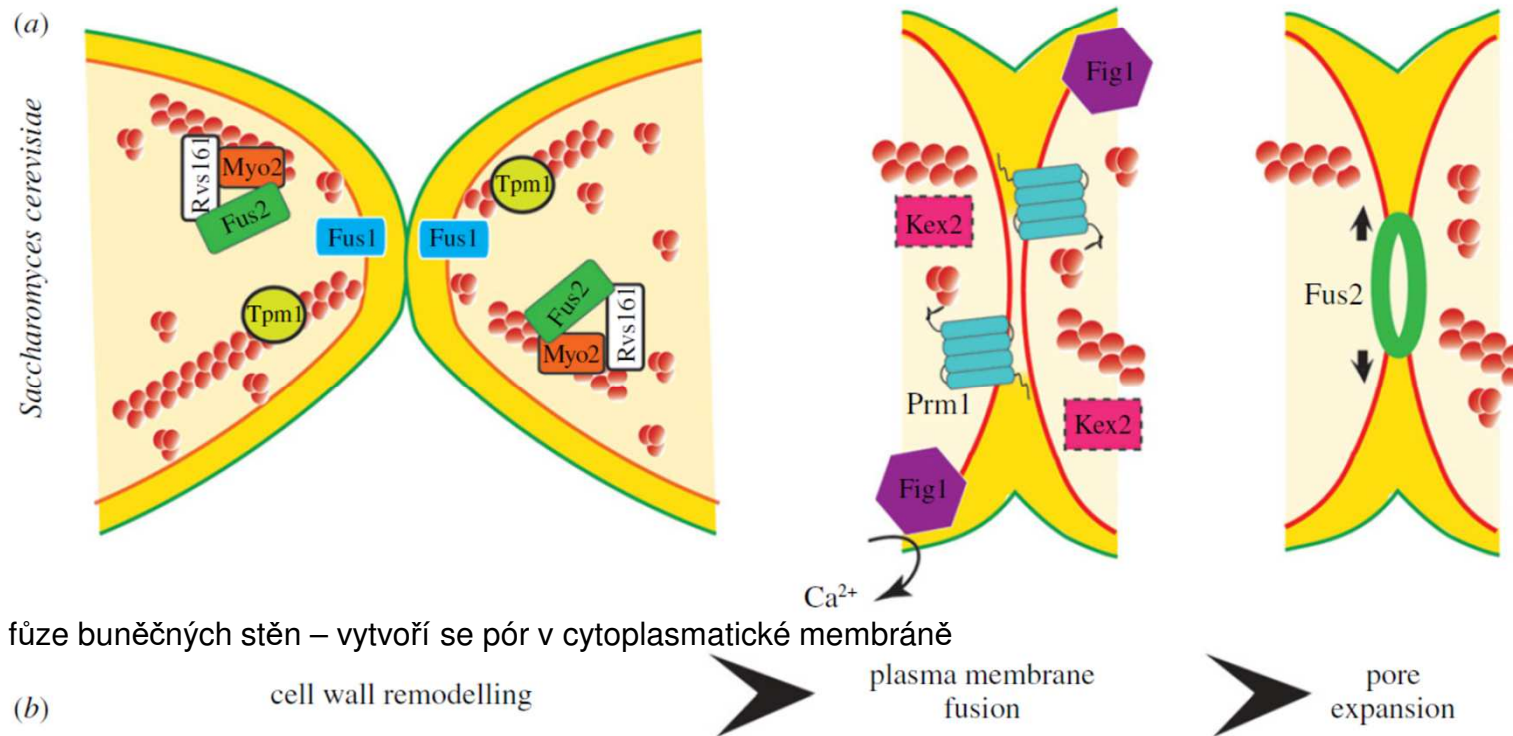
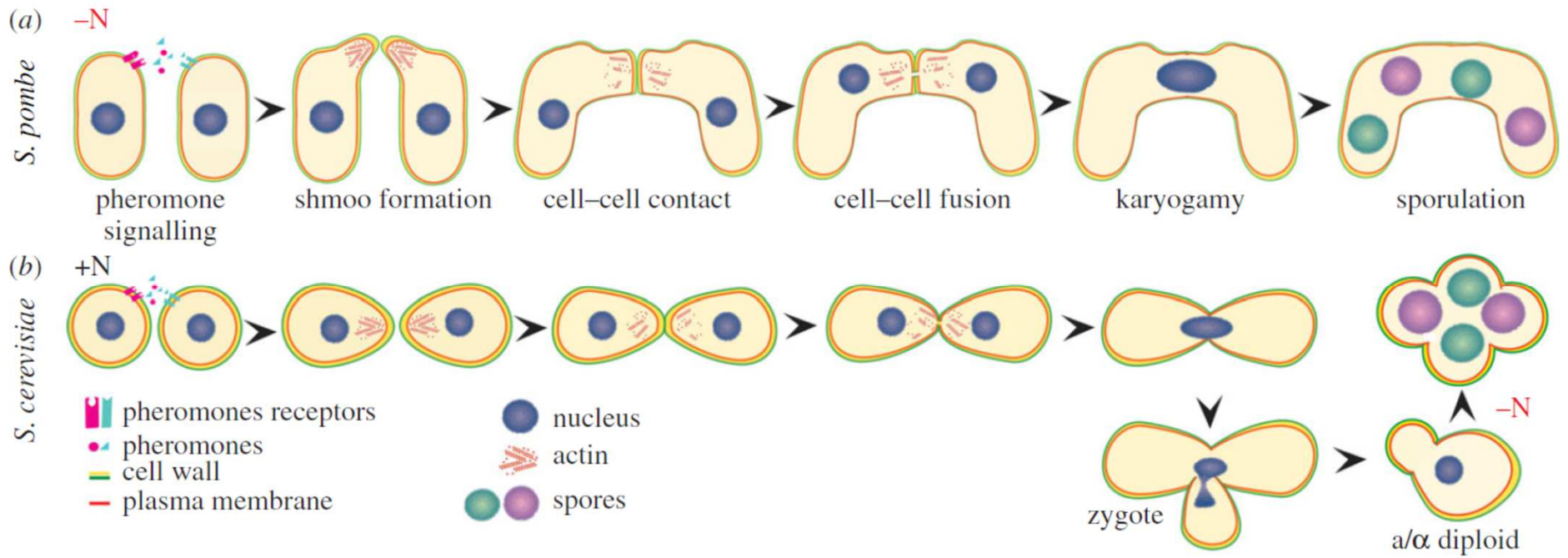


- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují ... meiotické dělení
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii



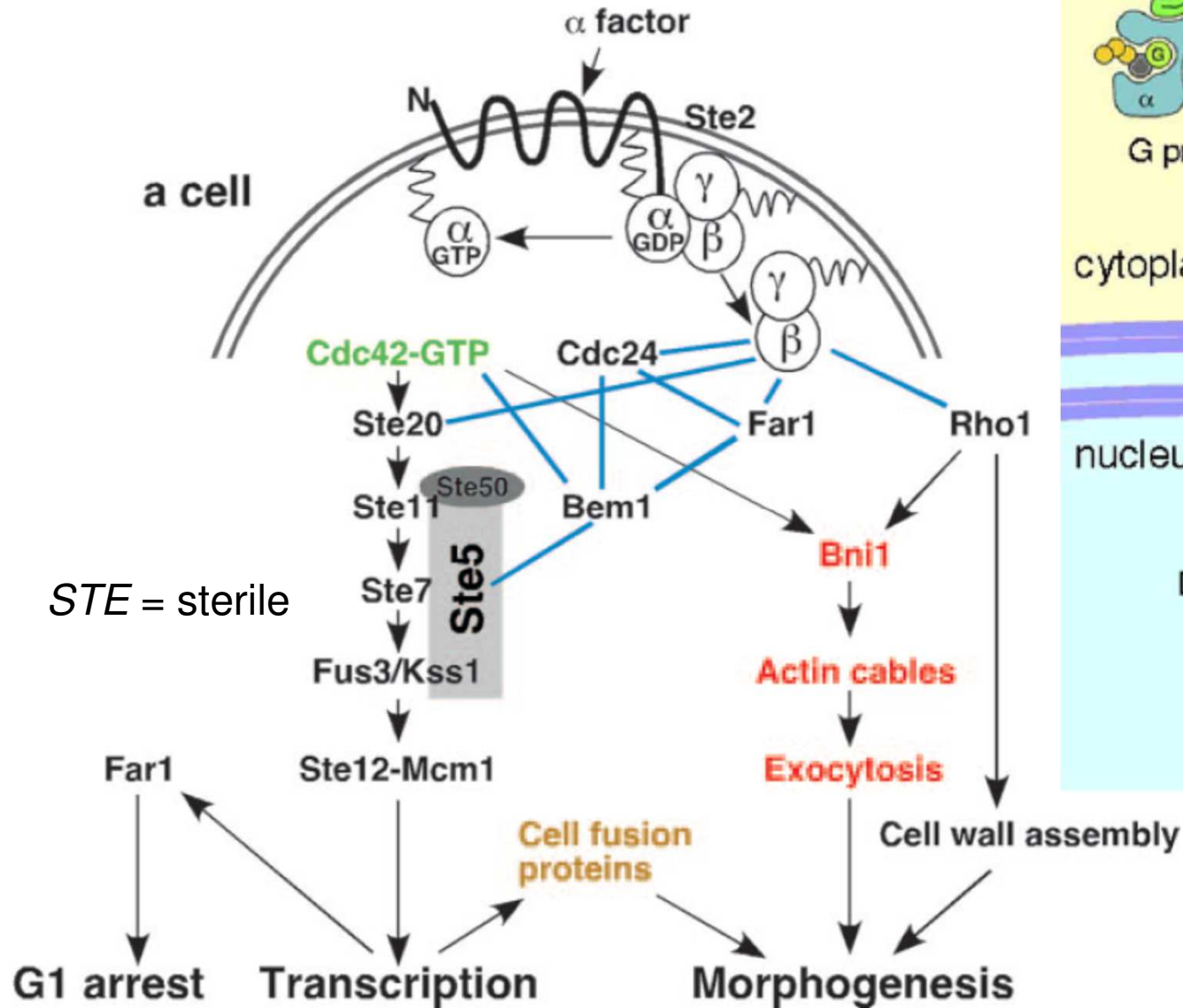
STE = sterile





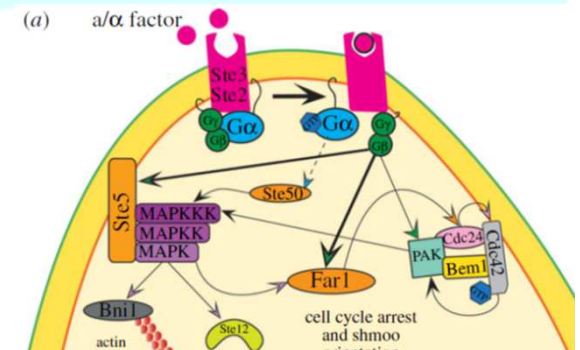
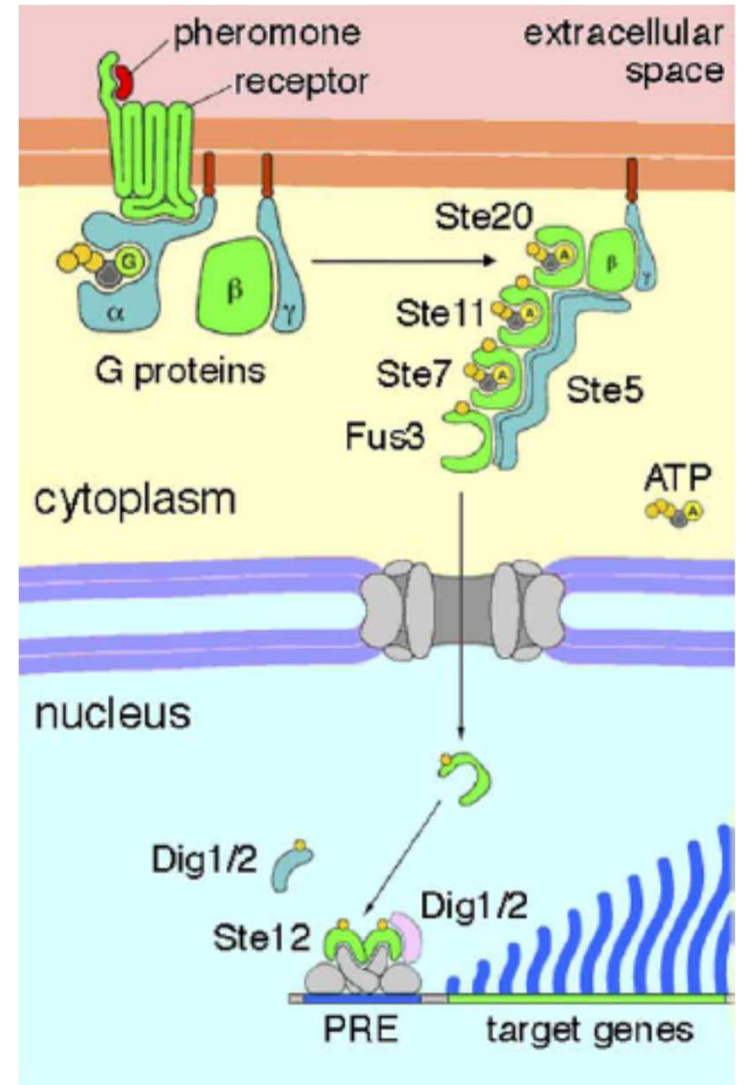
Merlini et al, Open Biol, 2013

Signální dráha – α faktor

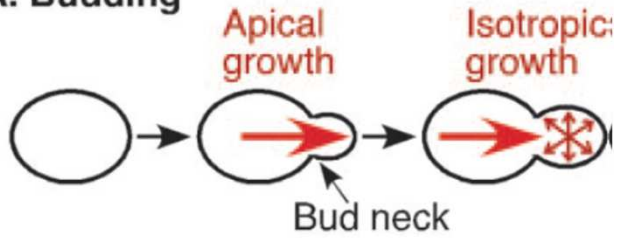


transkripce ... příště

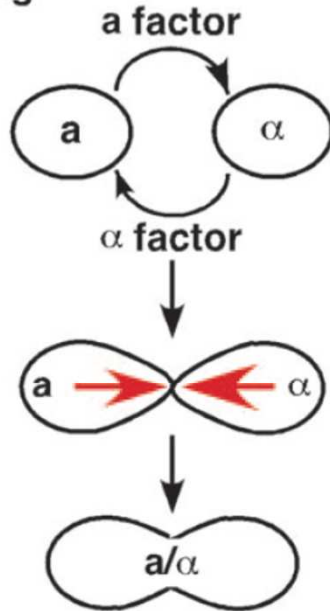
Park et al., MMBR, 2007
Wang et al., Nature, 2004



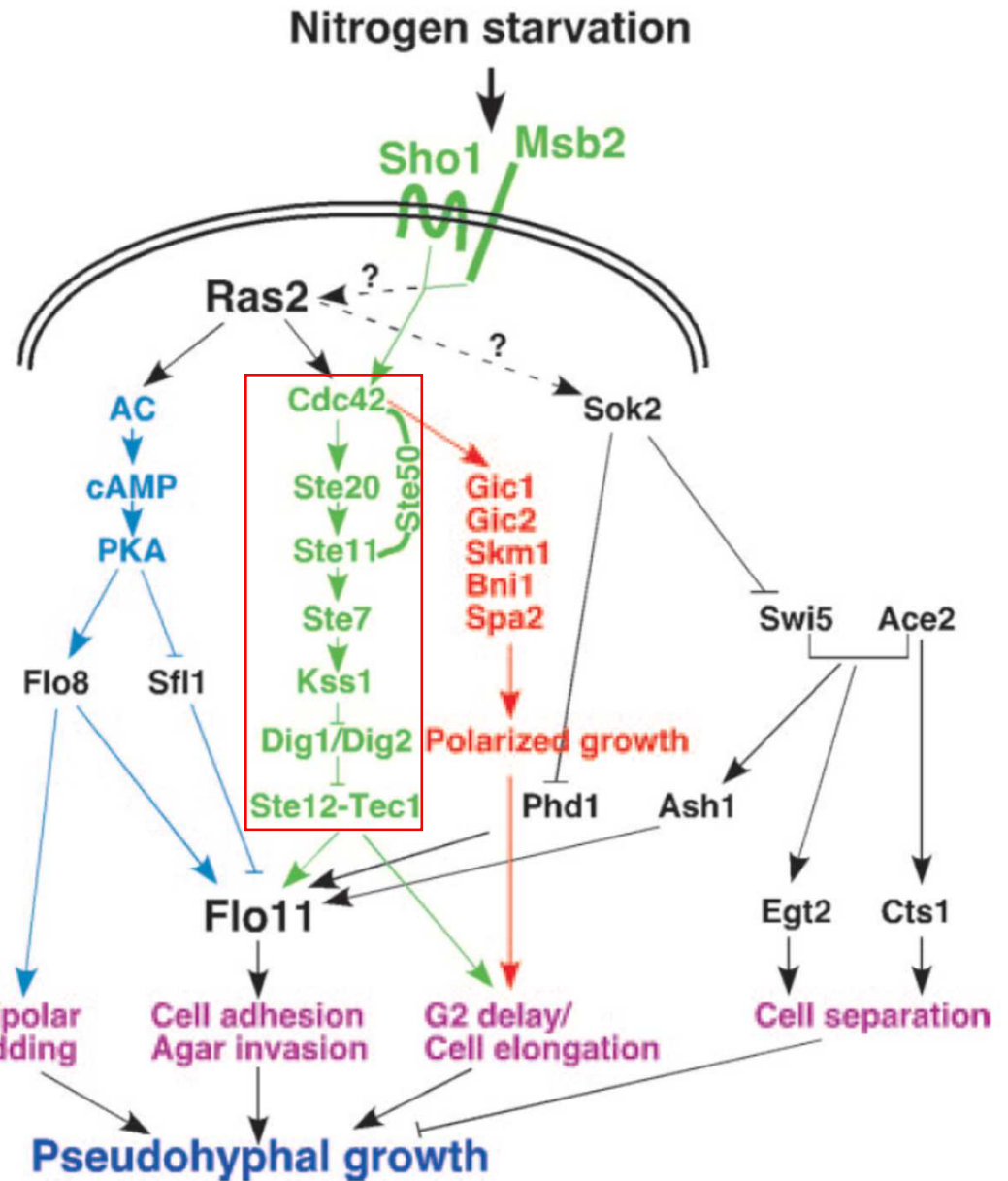
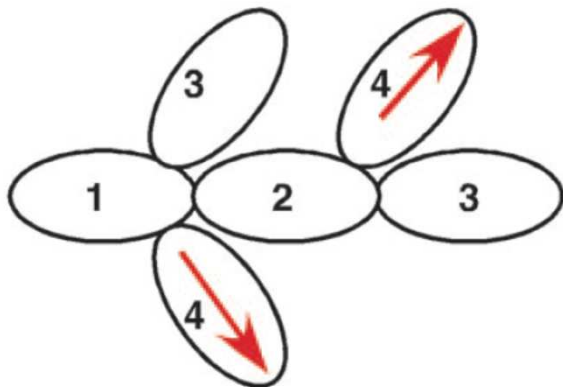
A. Budding



B. Mating



C. Filamentous growth



buňka využívá podobné „dráhy/nástroje“
pro jiné programy (vláknitý růst)

Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

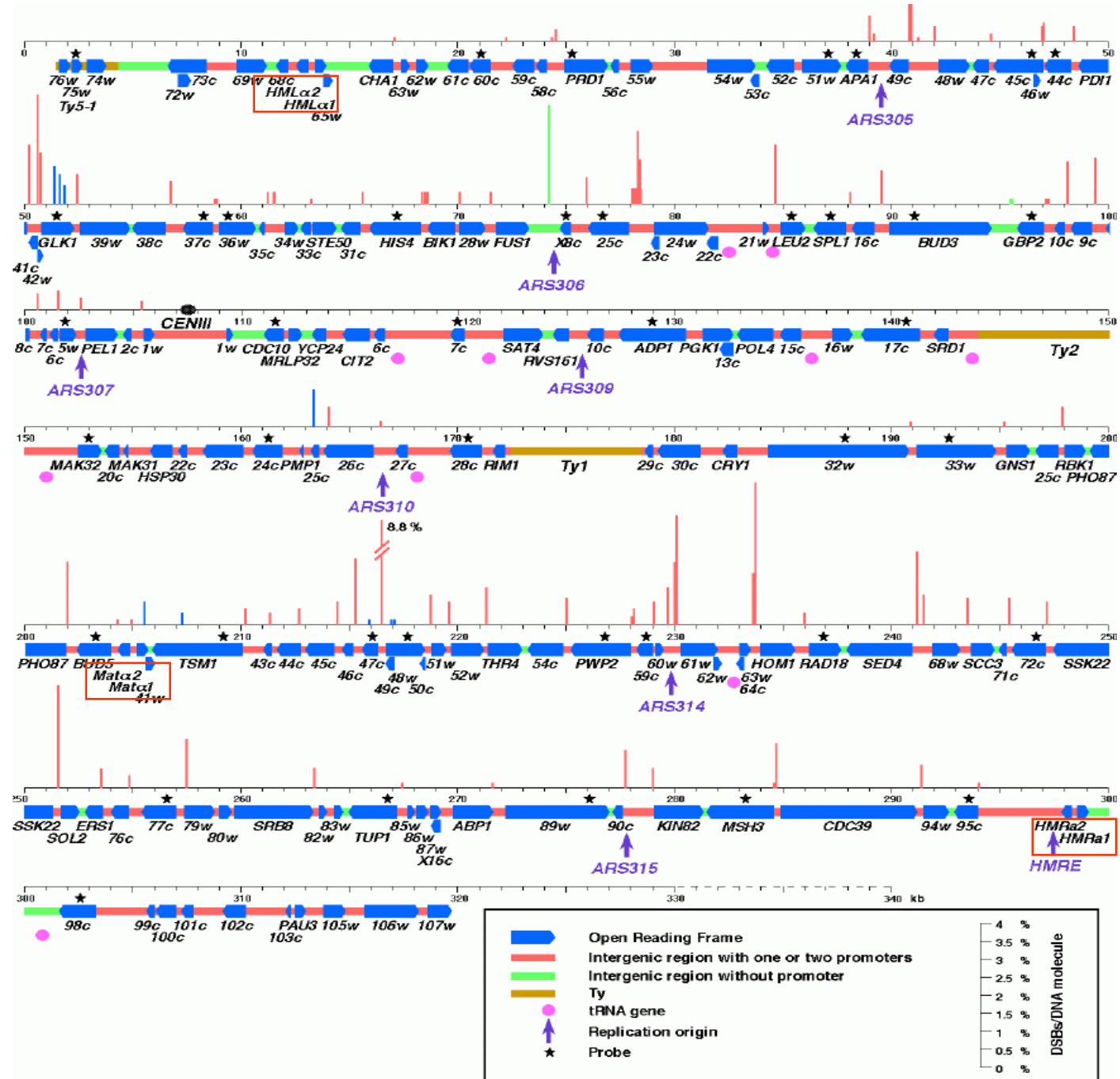
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

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

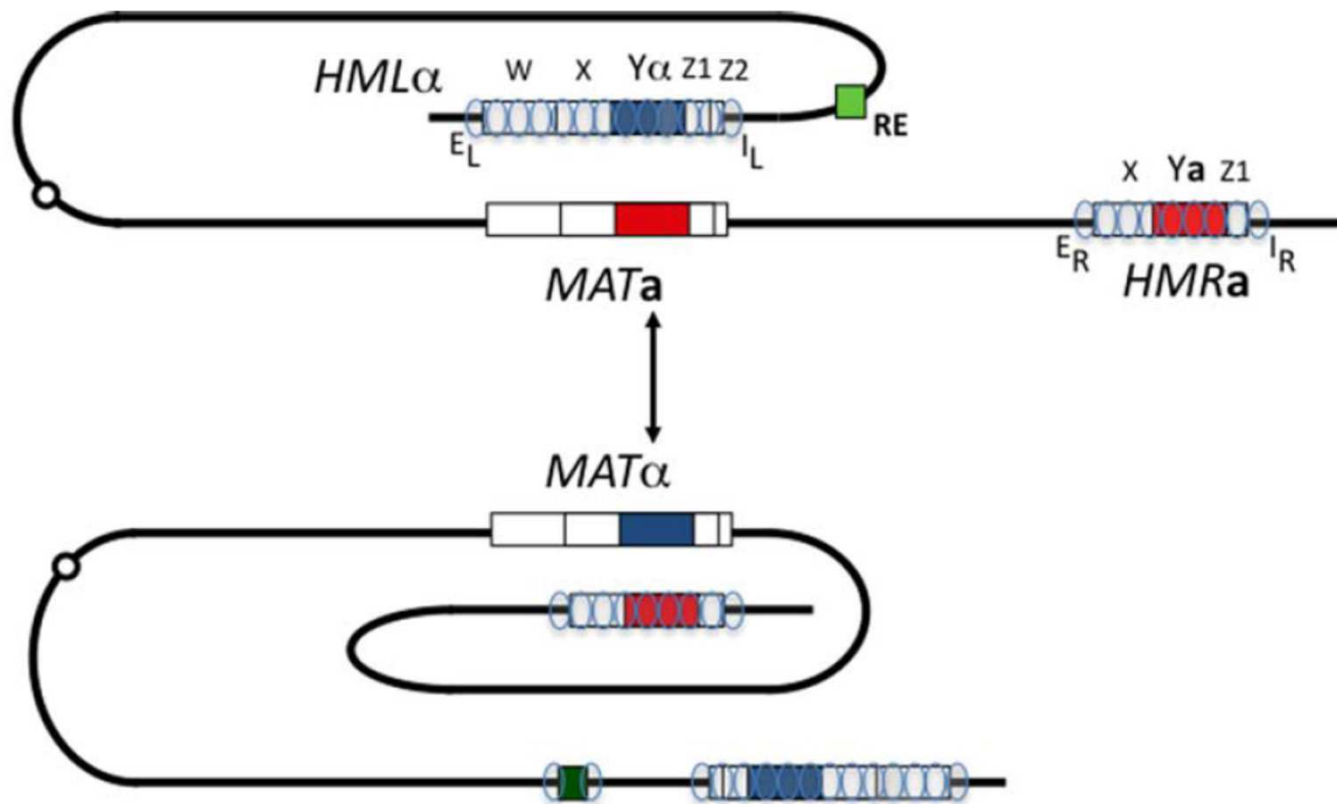
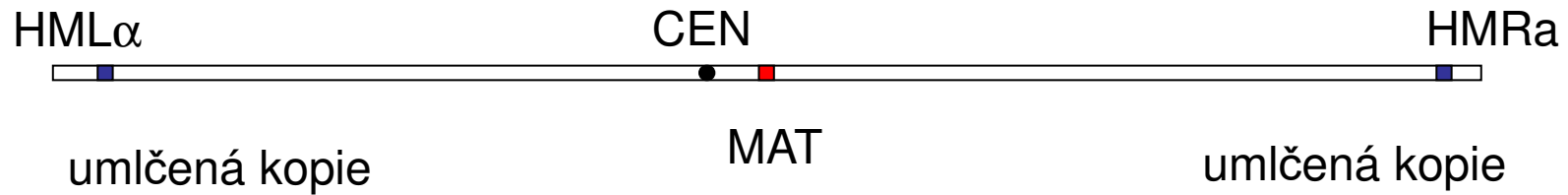
HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

Heterothalické – stabilní
Homothalické – přepínají párovací typ



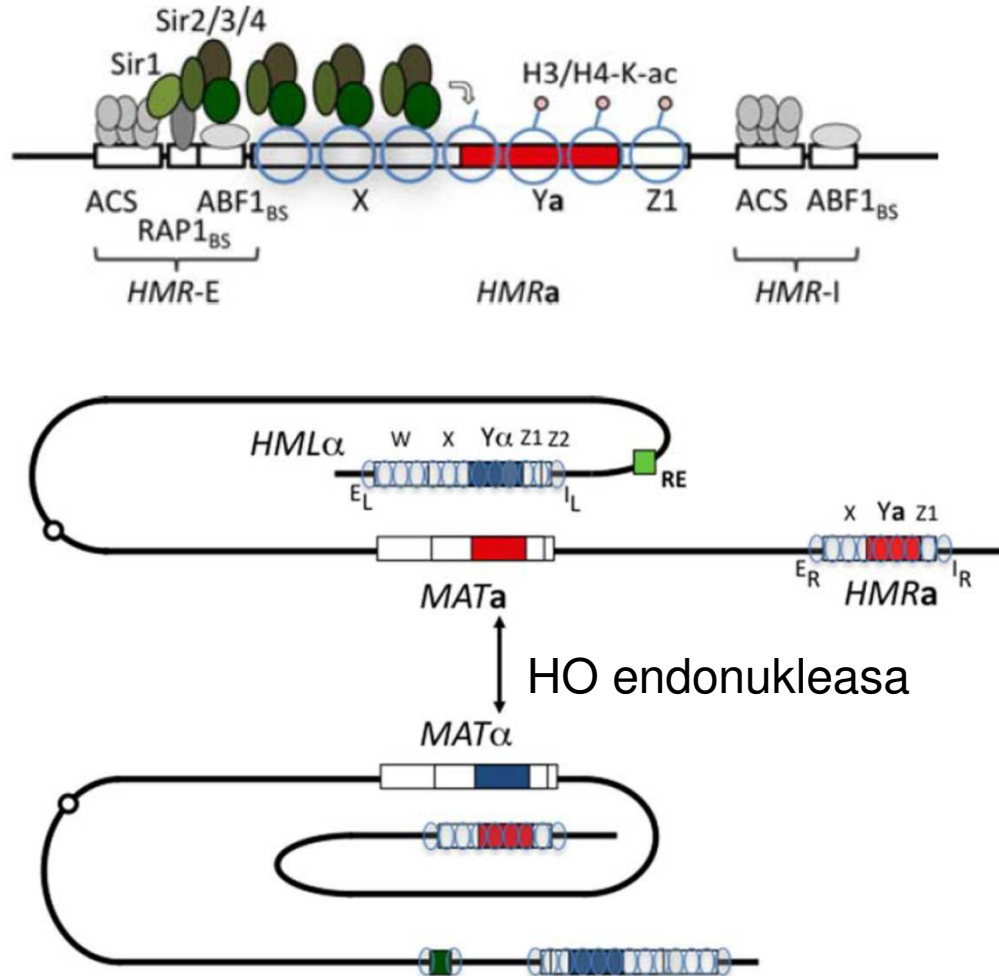
Přepínání párovacího typu

Chromosom III

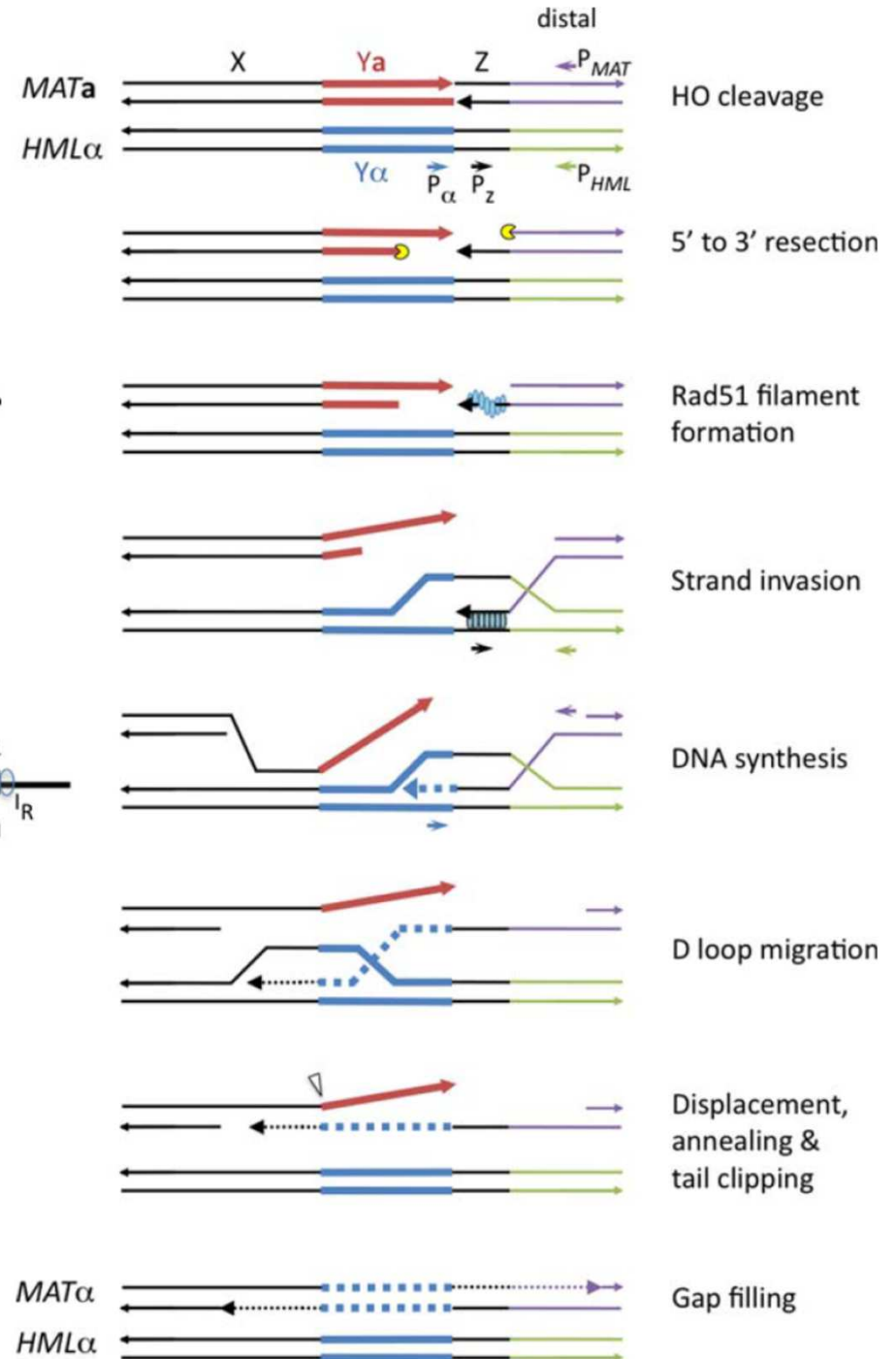


HO endonukleasa štěpí specifické sekvence v MAT lokusu - homologní rekombinace - záměna kopií
Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

Přepínání párovacího typu



Lee a Haber, Microbiol Spect, 2015

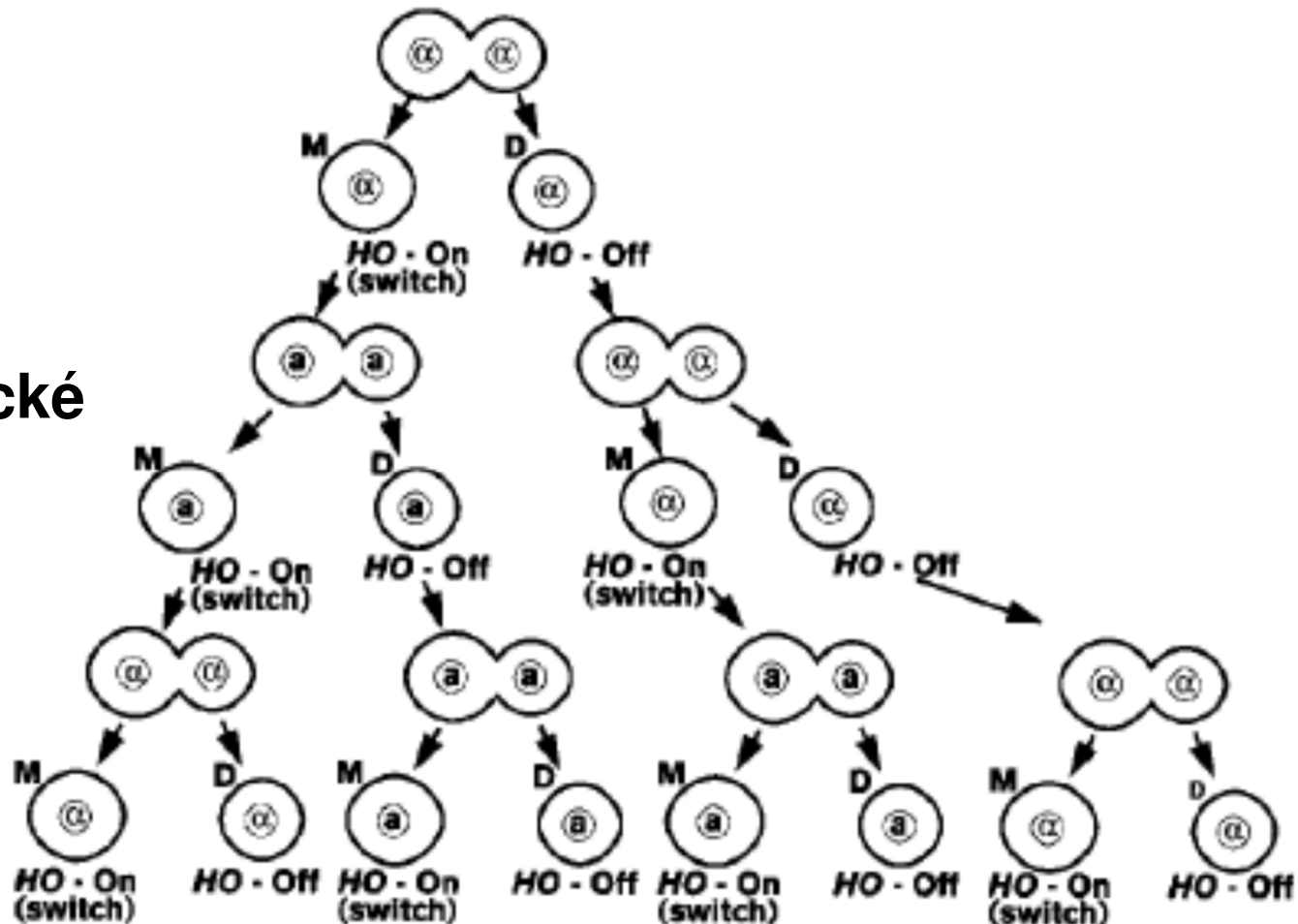


Přepínání párovacího typu

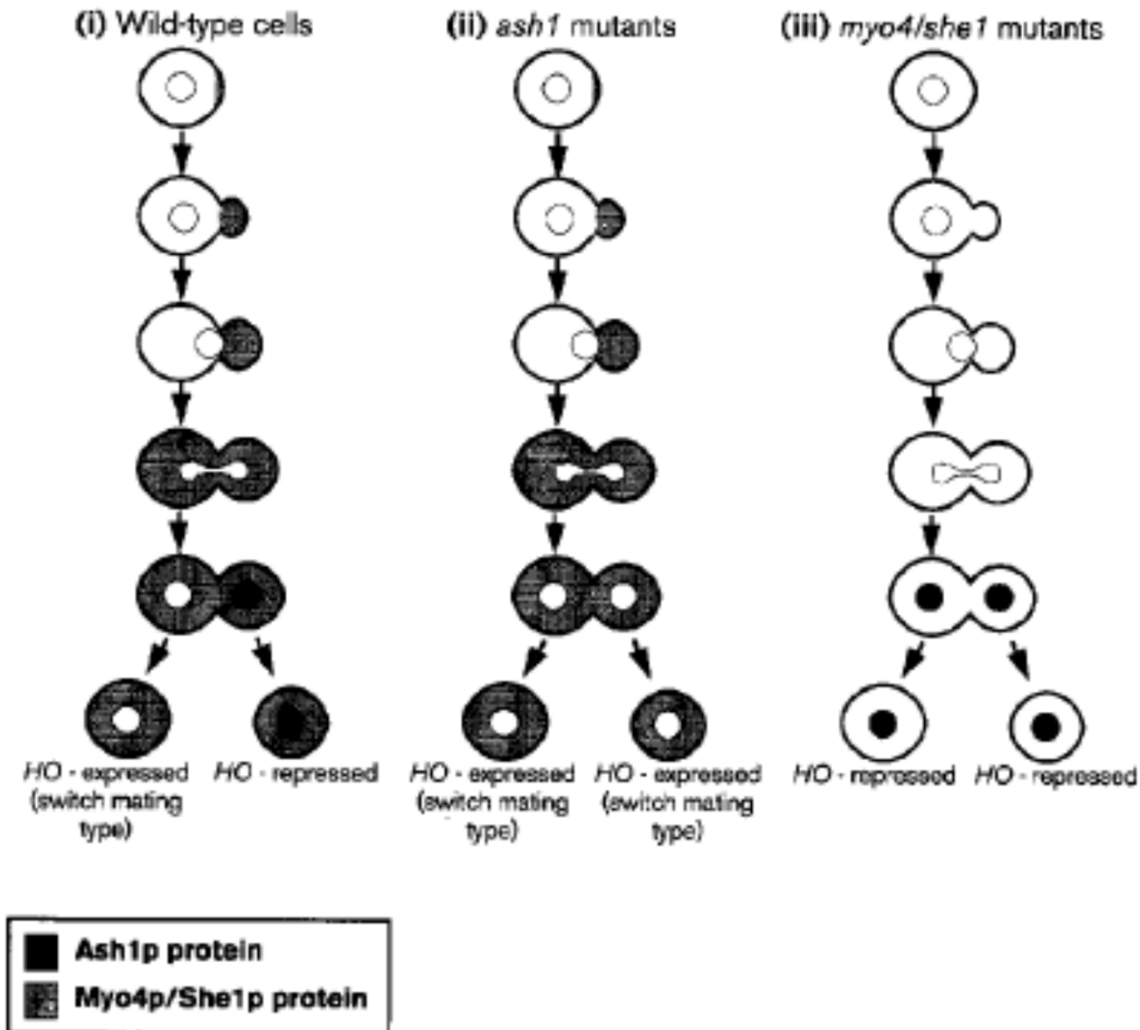
Homotalické - HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Heterotalické – nemají funkční HO endonukleasu

homotalické



Asymetrická lokalizace Ash1p



- Ash1p represor je asymetricky lokalizován do dceřiné buňky, 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