

Генетика клеточного цикла

Электронно-лекционный курс
Глава 6



Методы обнаружения мутаций клеточного цикла у *Drosophila*

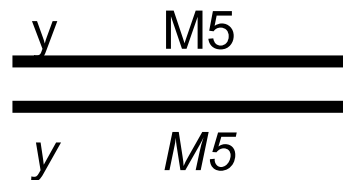
Мутации, связанные с воспроизводством клеток, чаще всего летальны.

Отбор стерильных особей и их исследование на дефекты мейоза

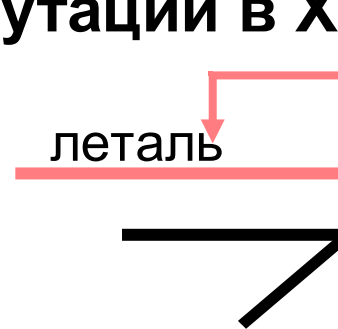
Поиск леталей и полулеталей

Методы селекции мутаций у Drosophila

Мёллер 5: летали и др. мутации в X-хромосоме



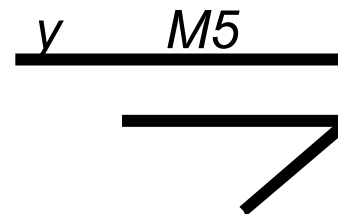
X



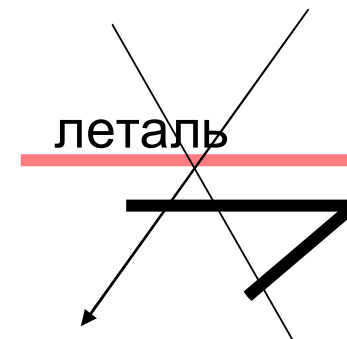
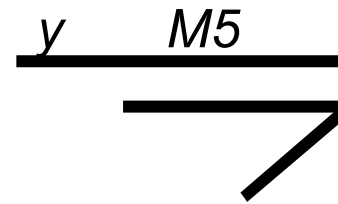
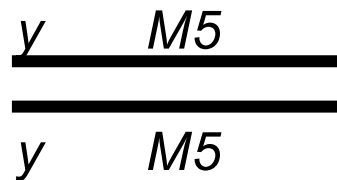
Мутации в гаметах



X

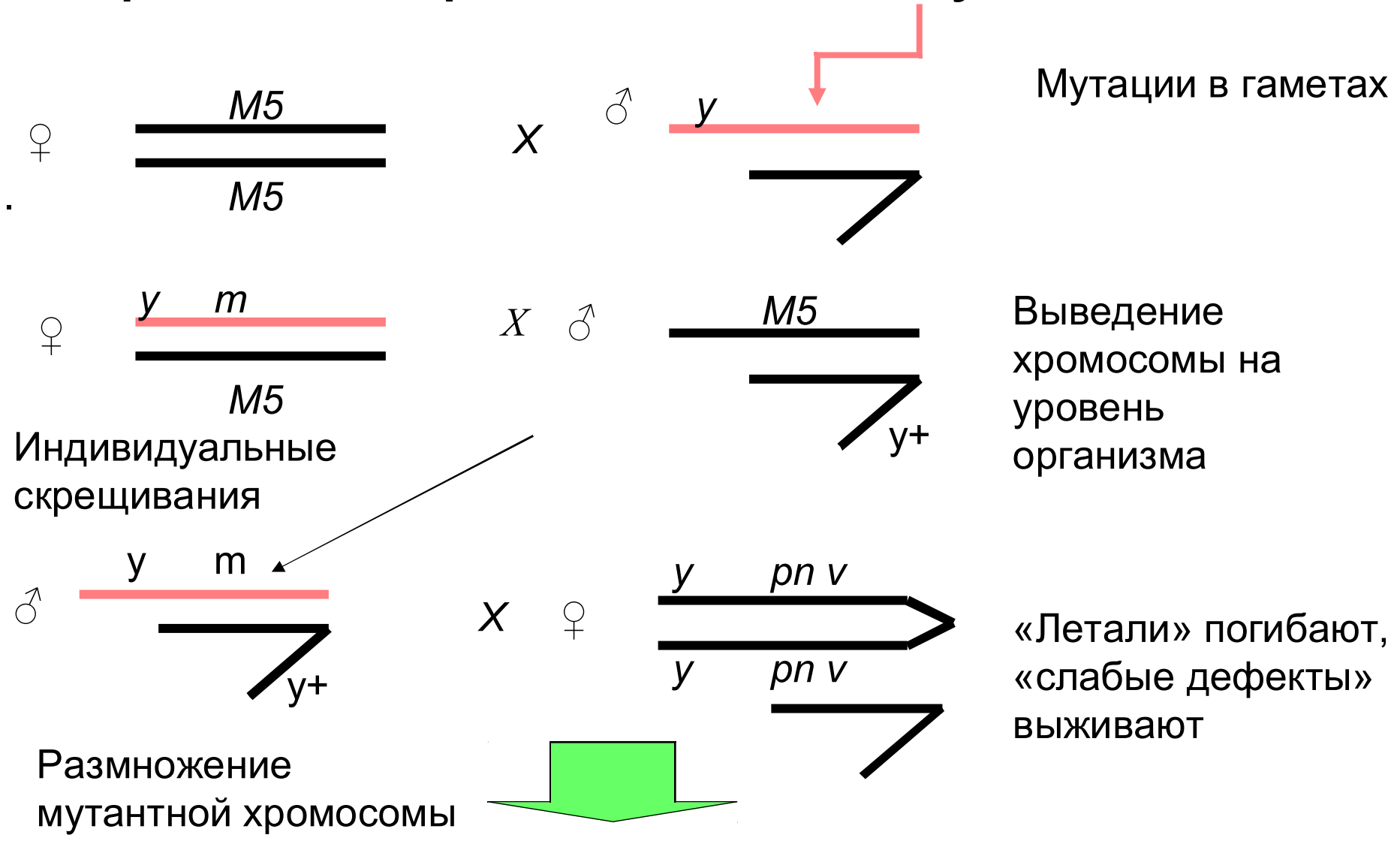


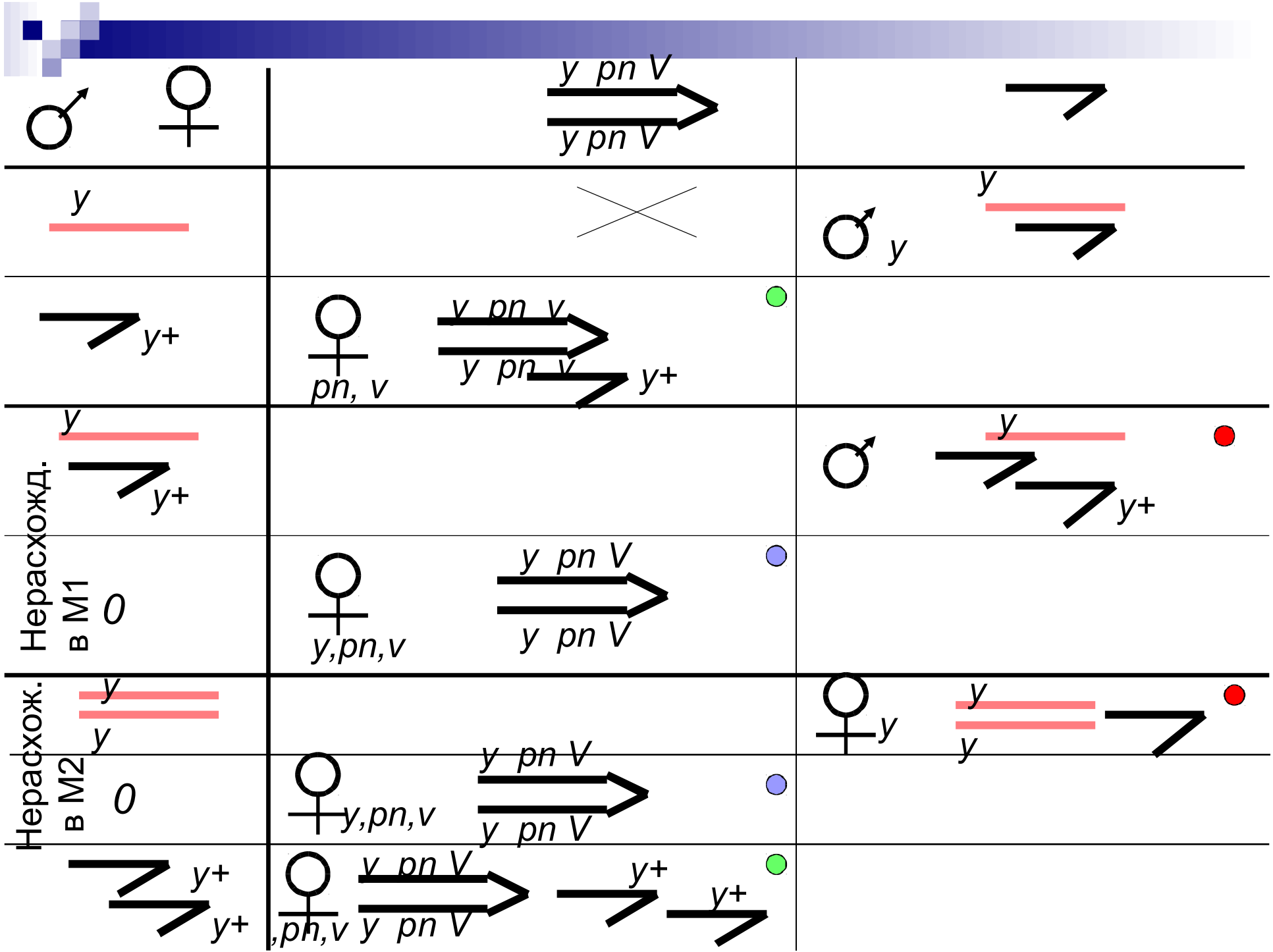
Выведение хромосомы на уровень организма



Методы селекции мутаций у *Drosophila*

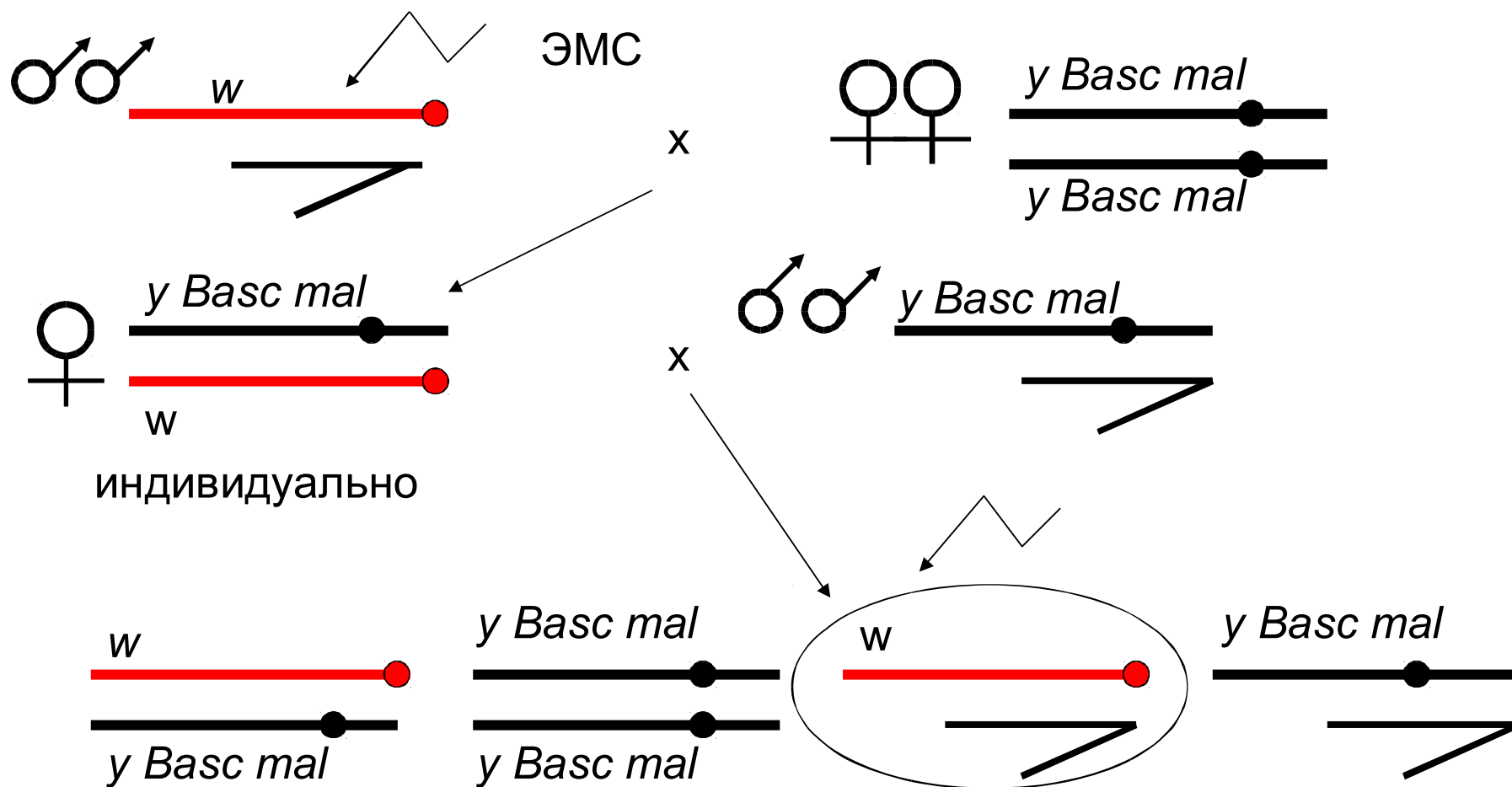
Нерасходения хромосом в мейозе- мутации *mei*





Поиск мутагенчувствительных мутаций. Мутации, нарушающие репарацию-*mis*

Мутации, в гомозиготе вызывающие гибель личинок на среде с мутагеном (этилметансульфонат), не вызывают гибели без мутагена



Метод поздних леталей.

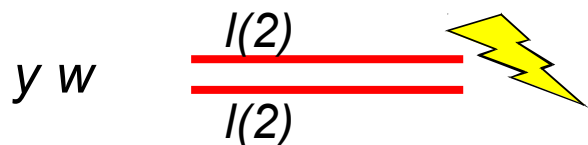
Нашли мутагенчувствительную леталь, гибнущую в 3-м личиночном возрасте (возникают множественные разрывы хромосом)

Линия, позволяющая получать гомозиготы по поздним леталям
 Инсерция P-элемента, содержащего ген u^+ , в балансер CyO (2-я хромосома):

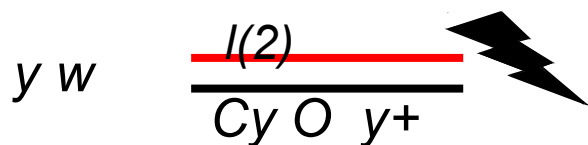
$u\ w; I(2) / P\{u^+\} CyO$

u^+ у личинок серые щетинки и черные челюсти,

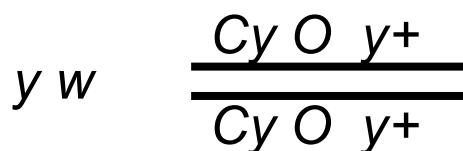
u - у личинок коричневые щетинки и желтые челюсти



Личинки живут, нет имаго –
 поздняя леталь



Жизнеспособные личинки и мухи



Ранняя леталь

Поиск мутаций по взаимодействию с определенными генами – синтетическая леталь

3-я хромосома маркирована генами клеточного деления:

gnu, polo, mgr, asp, stg

Хромосома,
обработанная мутагеном

Тест на
летальность

Обнаружены :

- аллели всех мутаций,
- новые мутации, проявляющие летальное взаимодействие с этими генами

gnu- Giant nuclei

asp- abnormal spindle

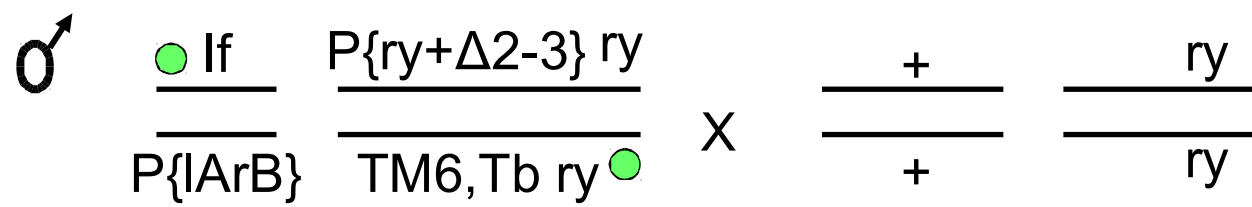
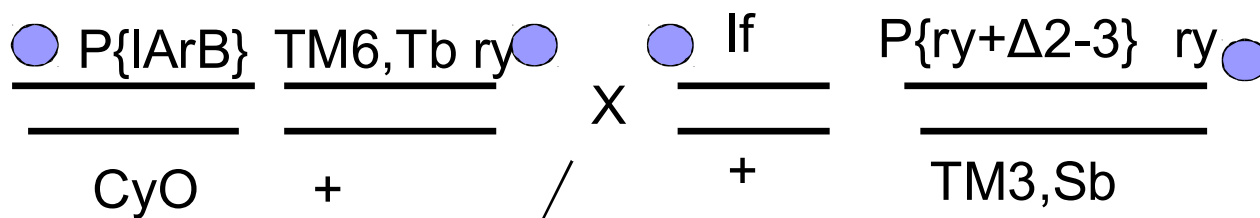
mgr- merry go round

stg- string- протеинфосфатаза,
гомолог *cdc25* *S.pombe*

polo- серин-треонин-
протеинкиназа, Полус веретена.
Монополярное веретено

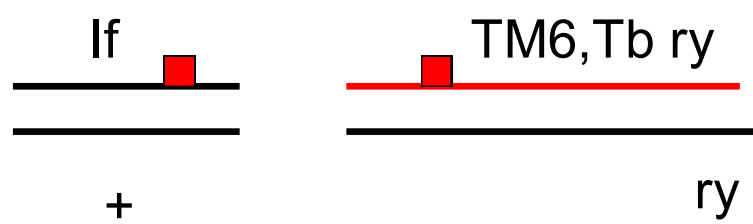
Получение мутаций инсерцией Р-элемента Ловушка энхансеров P{IArB}

P{ry+Δ2-3} – Р-элемент, кодирует транспозазу



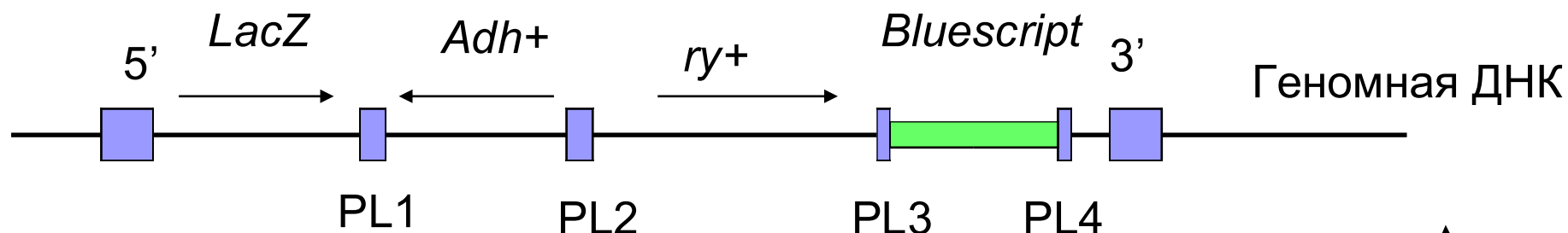
Jump start

If, Tb, ry⁺



инсерция

Ловушка энхансеров P{IArB}



LacZ – β -галактозидаза *E.coli*,

Adh+ – алкогольдегидрогеназа дрозофилы –
возможность поиска делеций селекцией на
потерю активности в присутствии pentylne 3-ol,

ry+ - ксантиндегидрогеназа дрозофилы,

Bluescript- плаزمида, несет ген устойчивости к
ампицилину,

PL 1-4 - полилинкеры

Разрезание
эндонуклеазами,
«спасение»
плазмиды,
получение
фрагмента генома

Омельянчук, 2007,
слайды к курсу «Генетика», НГУ

Инсерция Р-элемента в геном дрозophilы.

Детекция экспрессии репортерного гена

Имагинальные диски окрашены на β -галактозидазу

Ножные диски

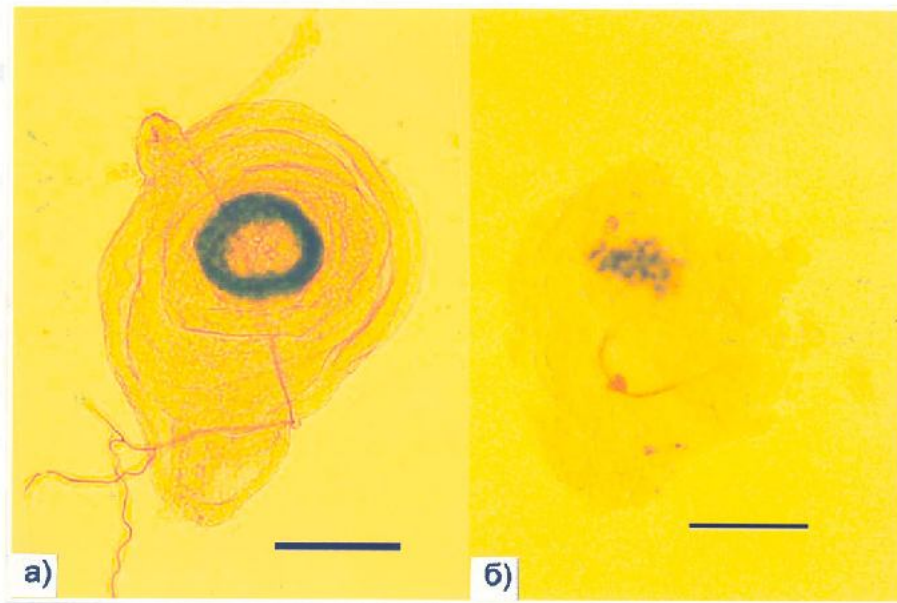


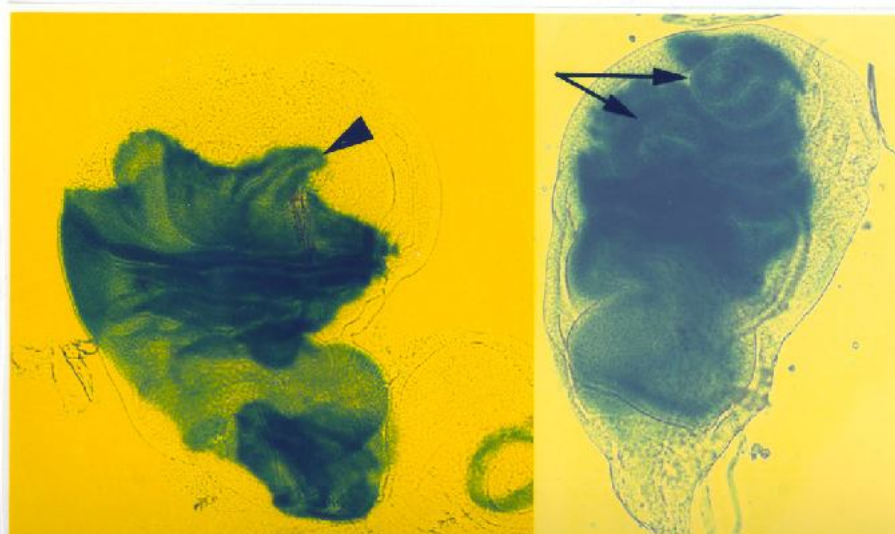
Рис 11. Экспрессия *ap* в ножных имагинальных.

а) – контрольные личинки $ft^d ap^{rk568} / CyO y^+$;

б) $l(2)gl^{DV275} ap^{rk568} / l(2)gl^{DV275}$.

Окраска на репортерную β -галактозидазу (синий). Масштаб – 100 мкм.

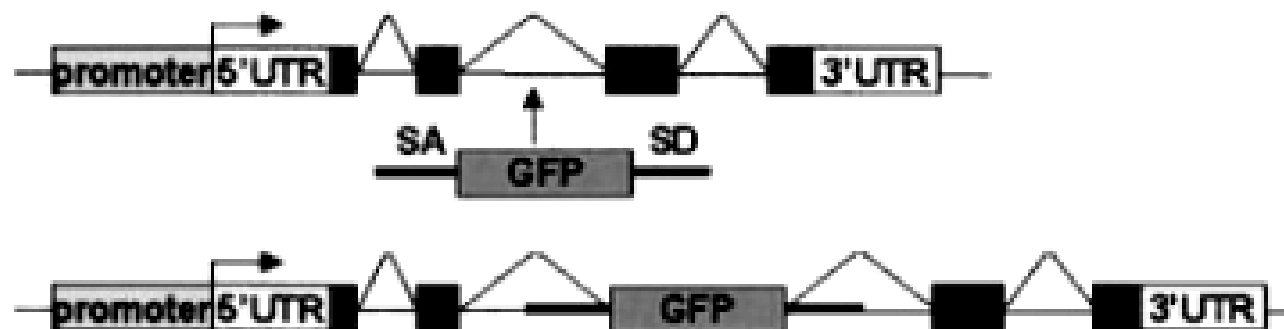
Крыловые диски



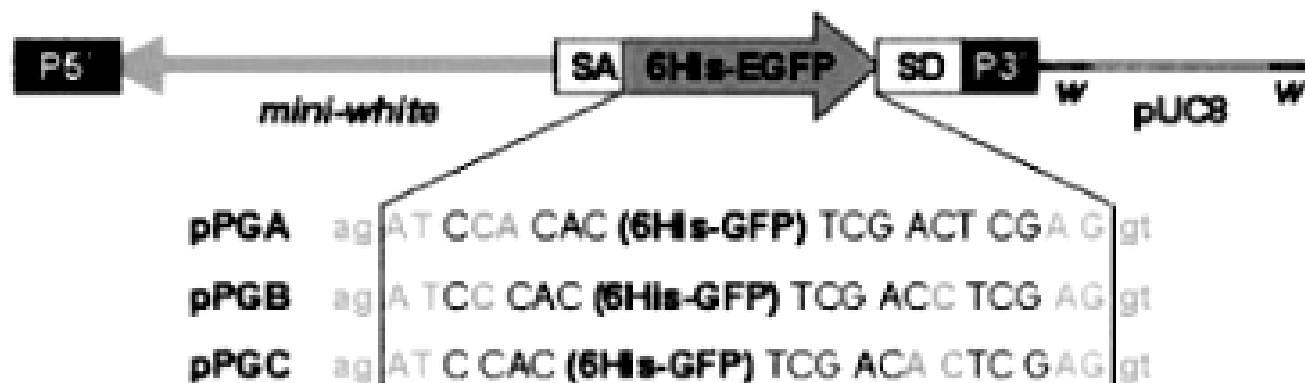
Метод GFP- белковой ловушки:

а — принцип искусственного экзона; б — PTT (protein trap transposone): три варианта конструкции со сдвигом рамки считывания, SA, SD — акцепторный и донорный сайты сплайсинга

а

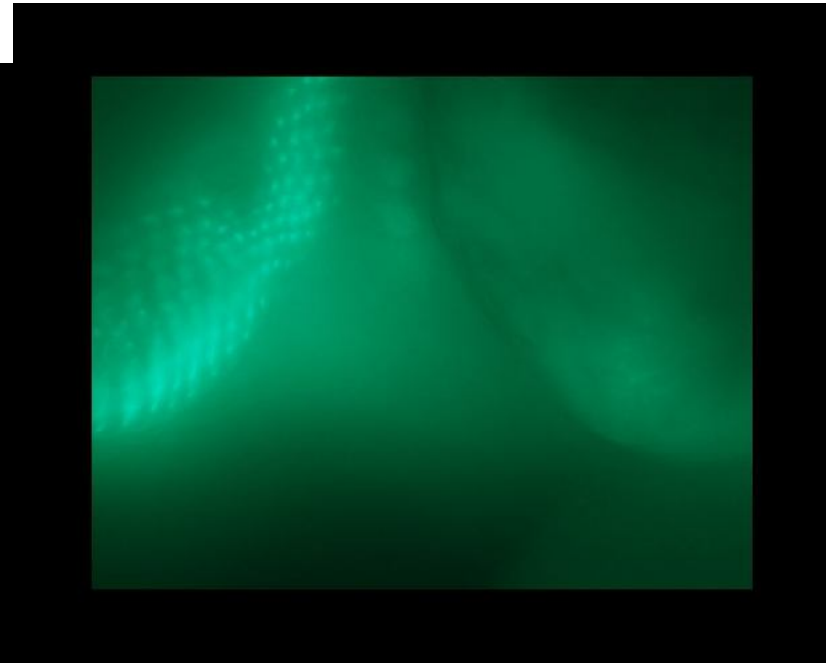
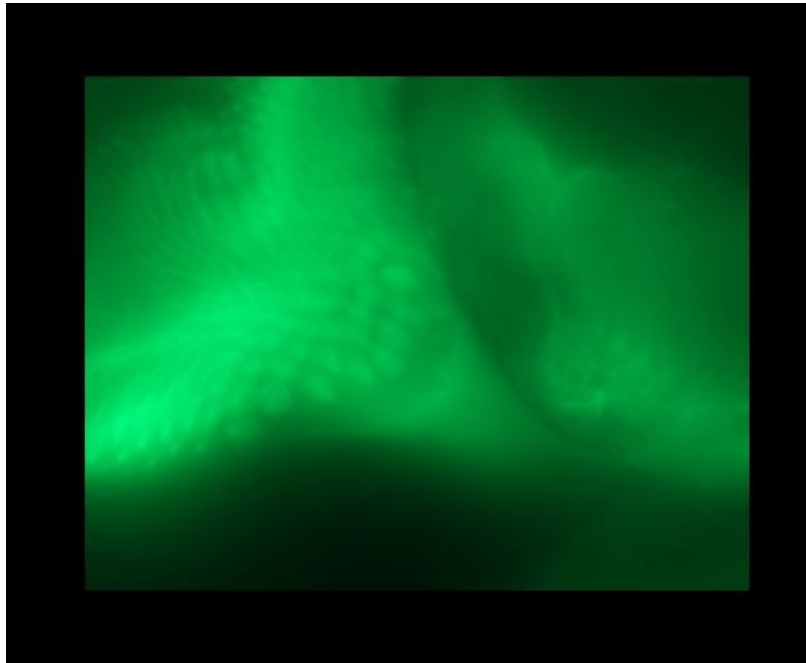


б



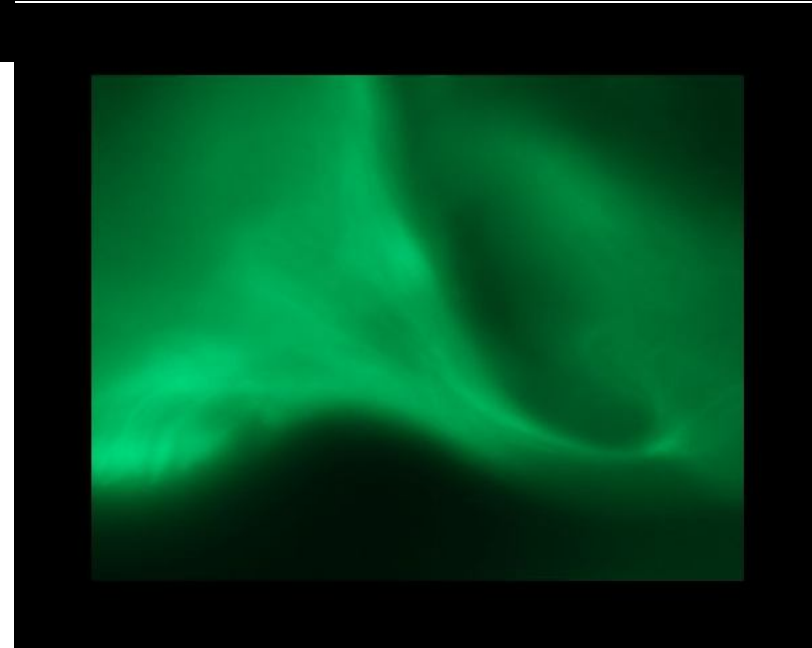
flybase

GFP- белковая ловушка



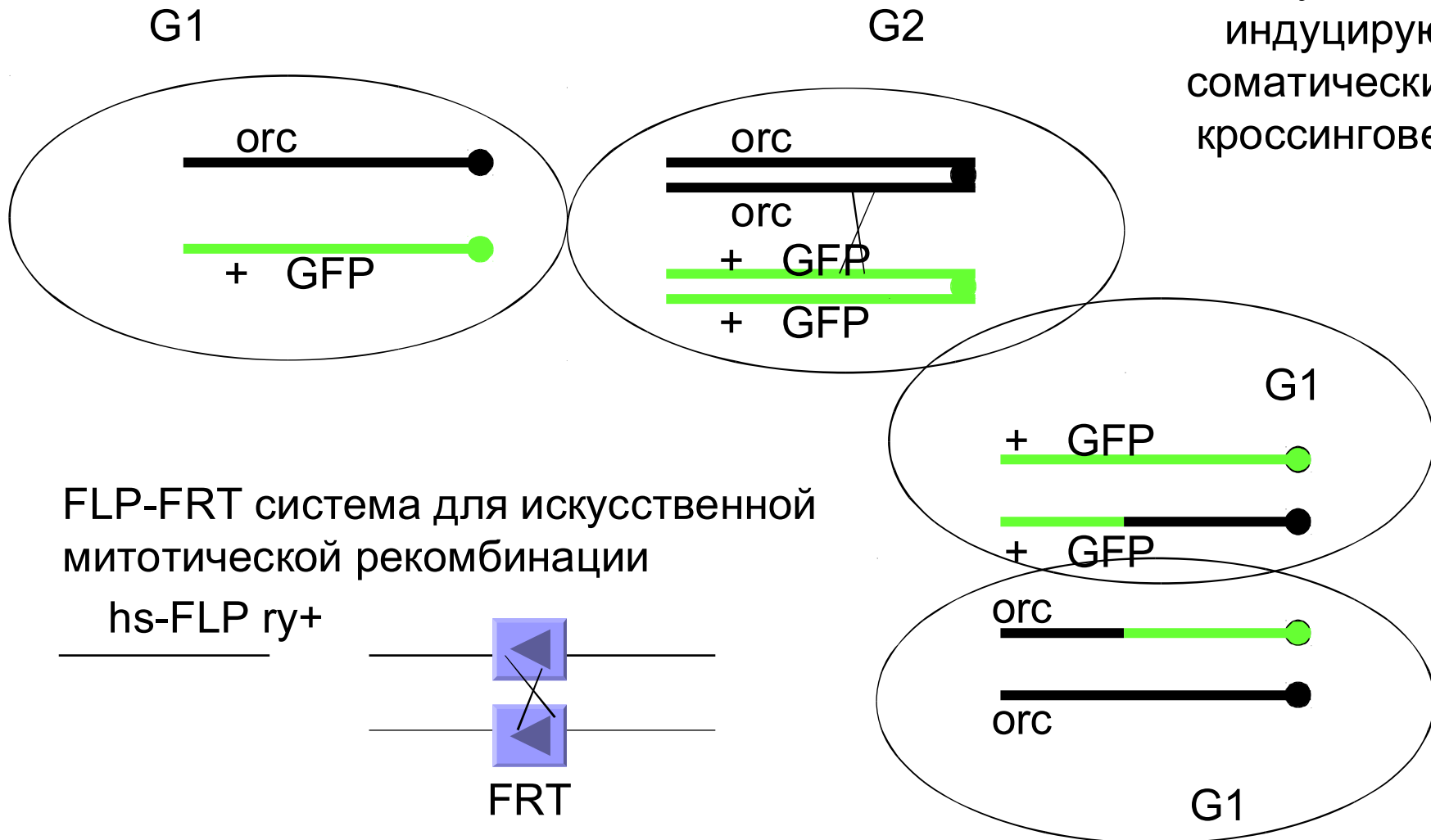
*Белок, связанный с тубулином,
маркирован GFP-доменом.*

*Глазоантеннальный имагинальный
диск *D. melanodaster*,
последовательные проекции*



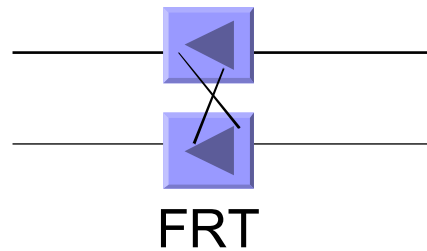
Явление соматического кроссинговера используют для тестирования мутаций

Облучением индуцируют соматический кроссинговер

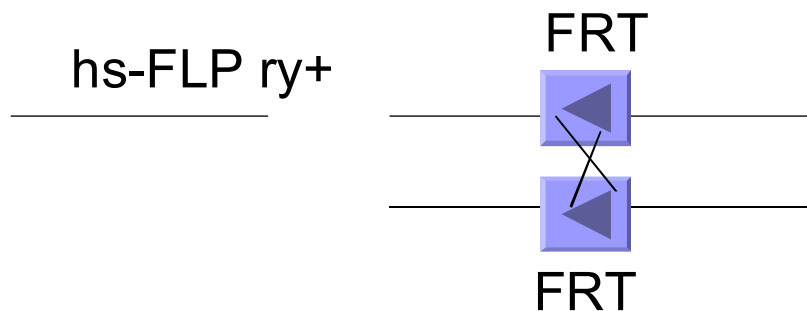


FLP-FRT система для искусственной митотической рекомбинации

hs-FLP ry+



FLP-FRT система для искусственной митотической рекомбинации

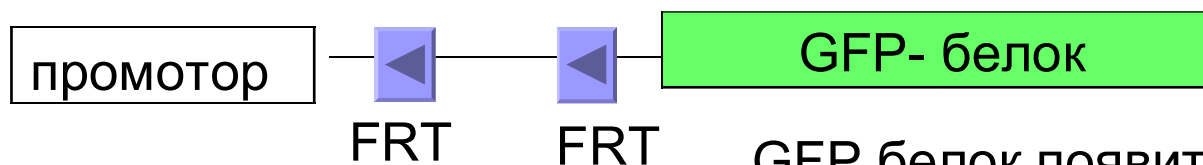


1. линии, содержащие FLP-рекомбиназу, работающую под промотором теплового шока
2. линии, содержащие встройки Р-элемента с геном *white+* и FRT-сайтами

При индукции FLP рекомбиназы происходит митотический обмен между двумя одинаково ориентированными FRT сайтами на стадии 4-х хроматид.

Вариант: $\frac{UAS-FLP}{+}$; $\frac{GAL4}{+}$; $\frac{FRT}{FRT}$ вводят мутацию

Применение системы для маркирования мозаичного клона в ткани:



GFP белок появится, если спейсер удален.

Orc1 необходим для амплификации

(A-F) Соматический клон *orc1*^{-/-} из 2-х фолликулярных клеток яичника (stage11) generated in WT (A-C) and *orc1*^{+/-} heterozygous (D-F) flies.

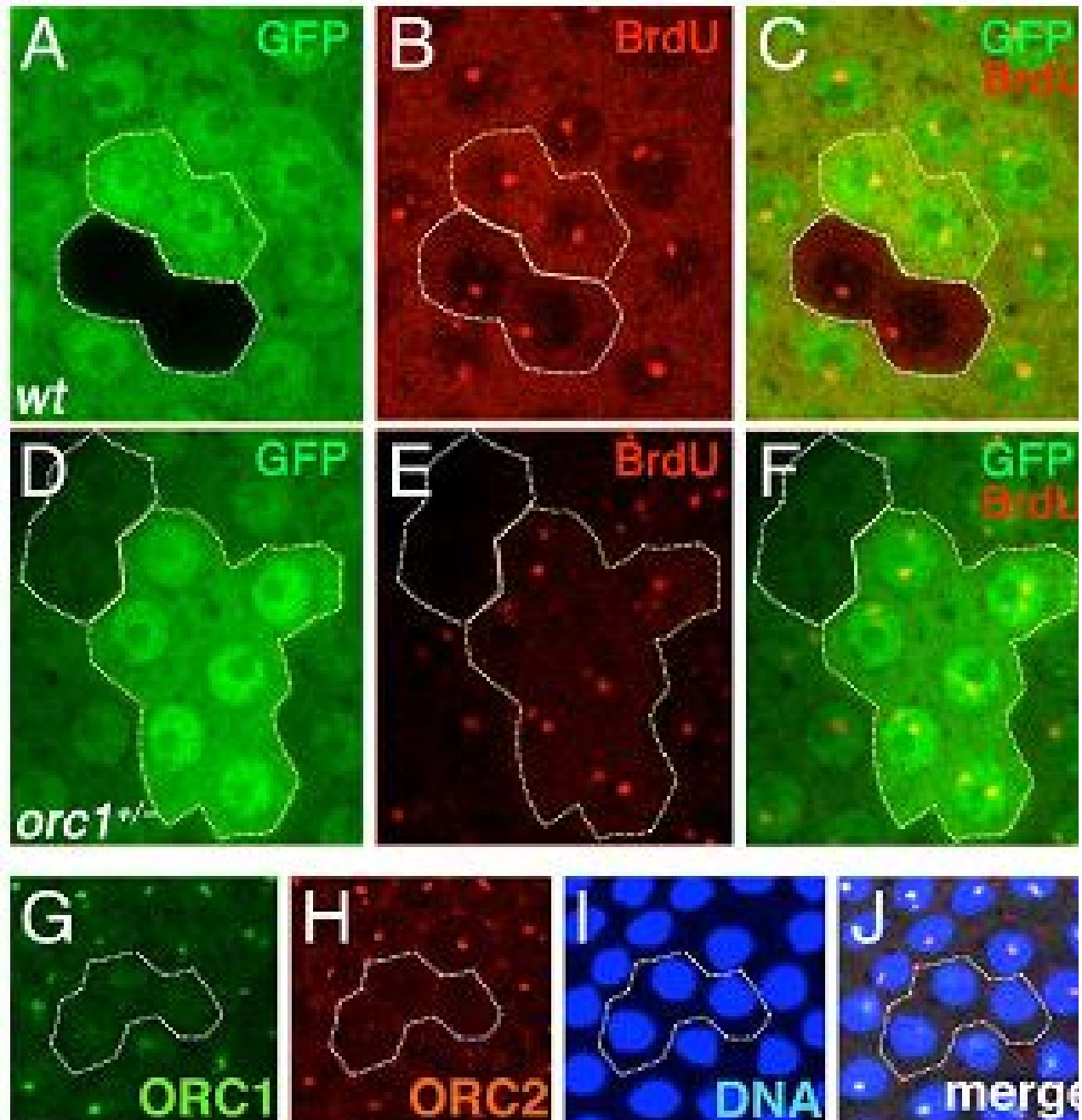
GFP (-/-) or GFP (+/+) clones are outlined.

DNA synthesis occurs only at the specific amplification loci at this stage of oogenesis.

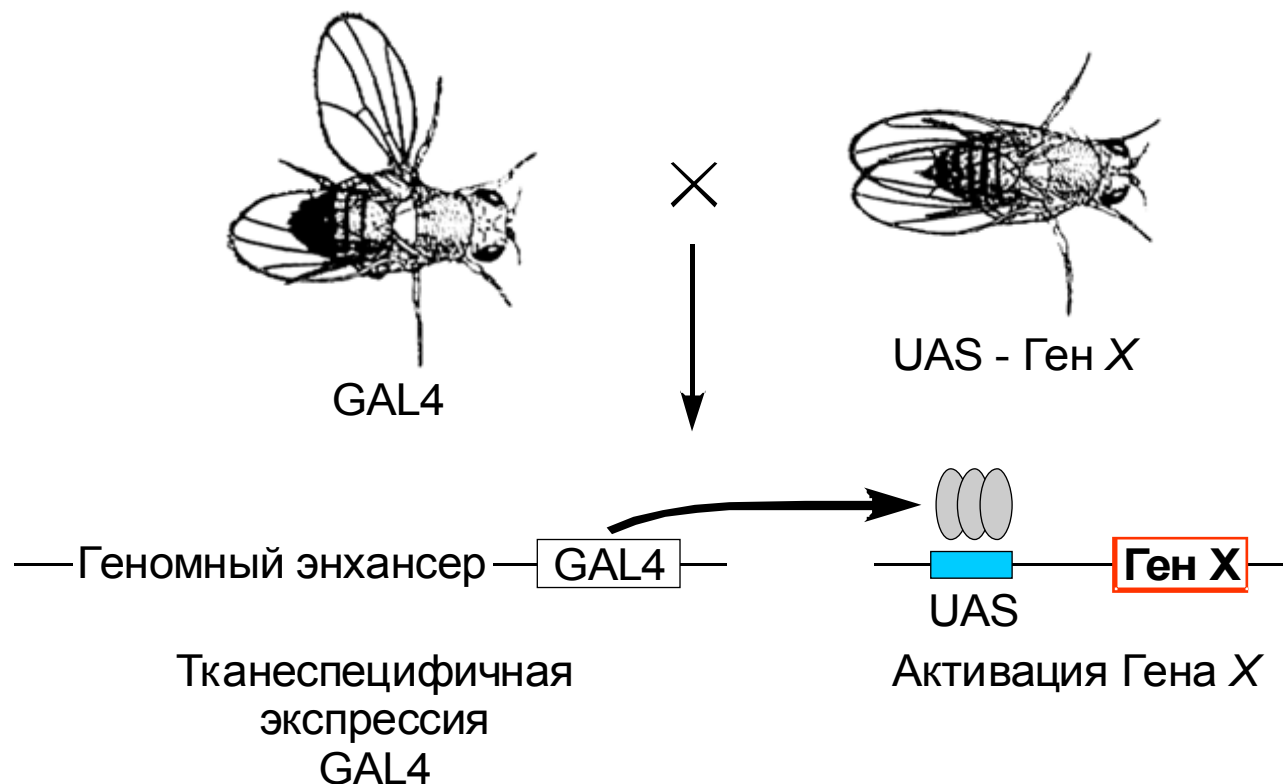
(G-J) Histochemical analyses of ORC1(G), ORC2(H), and DNA(I). A 3-cell/ somatic clone was generated in an *orc1*^{+/-} heterozygote. Note that

ORC2 also fails to localize to the amplification loci in *orc1*^{-/-} cells.

S.Y.Park & M.Asano,^{cells.}
2008



Gal4-UAS система – это ловушка энхансеров, разбитая на две части.



Достоинства этой системы: можно подставлять разные драйверы под один и тот же UAS-трансген и экспрессировать его в разных тканях, введение промежуточного GAL4 позволяет амплифицировать (усилить) сигнал.

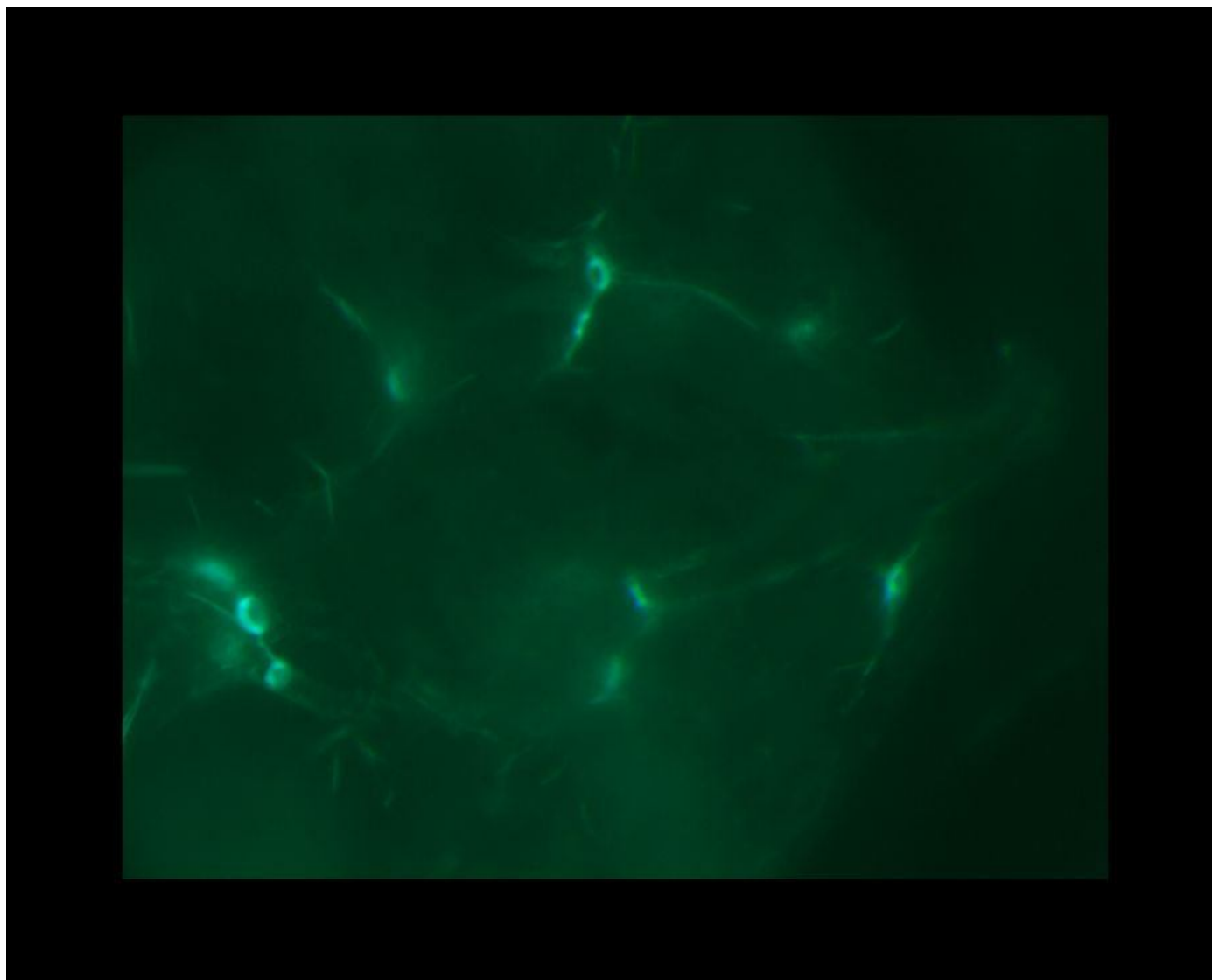
Омельянчук, 2007,
слайды к курсу «Генетика», НГУ

Gal4-UAS система

Направленная экспрессии GFP-актина у дрозофилы.

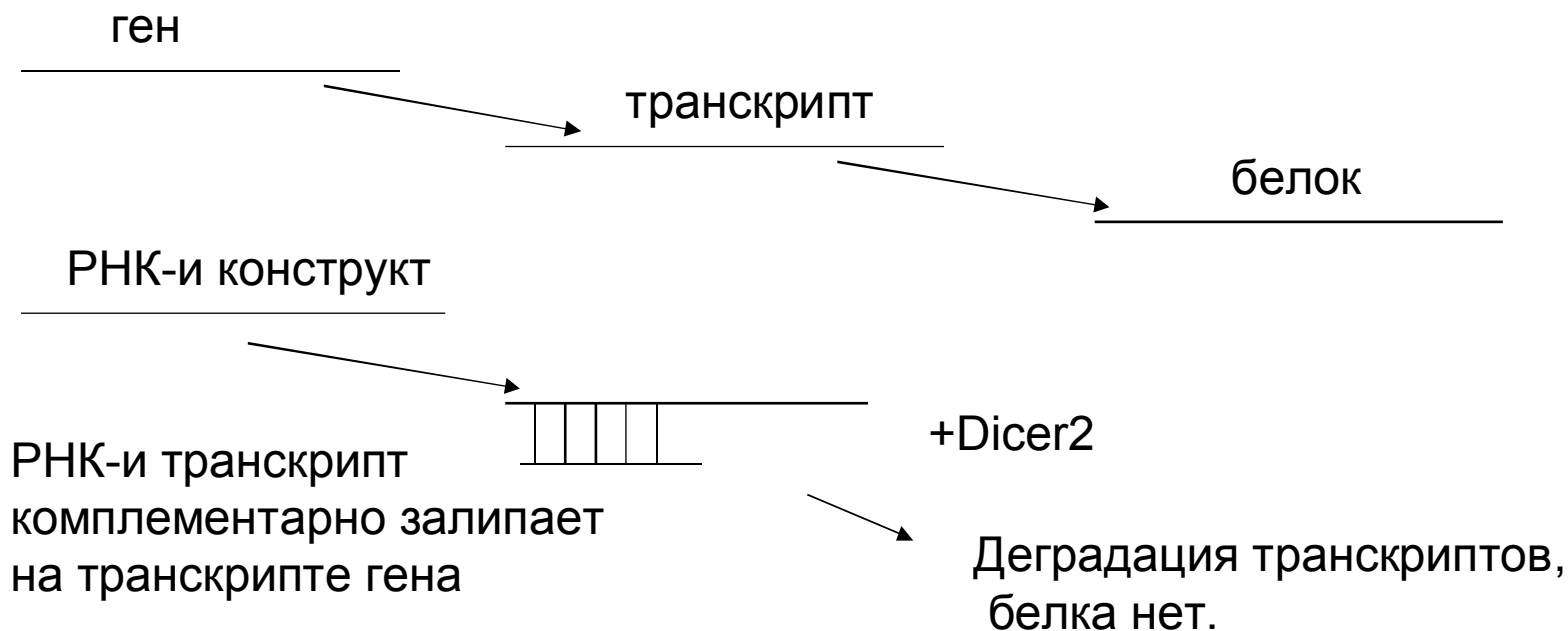
CoG-GAL4 - экспрессия GAL4 в оогенезе, *UAS GFP-актин*

***Выявляется
актин в
оогенезе
дрозофилы.
Видны
кольцевые
каналы между
ооцитом и
трофоцитами,
пучки актина***



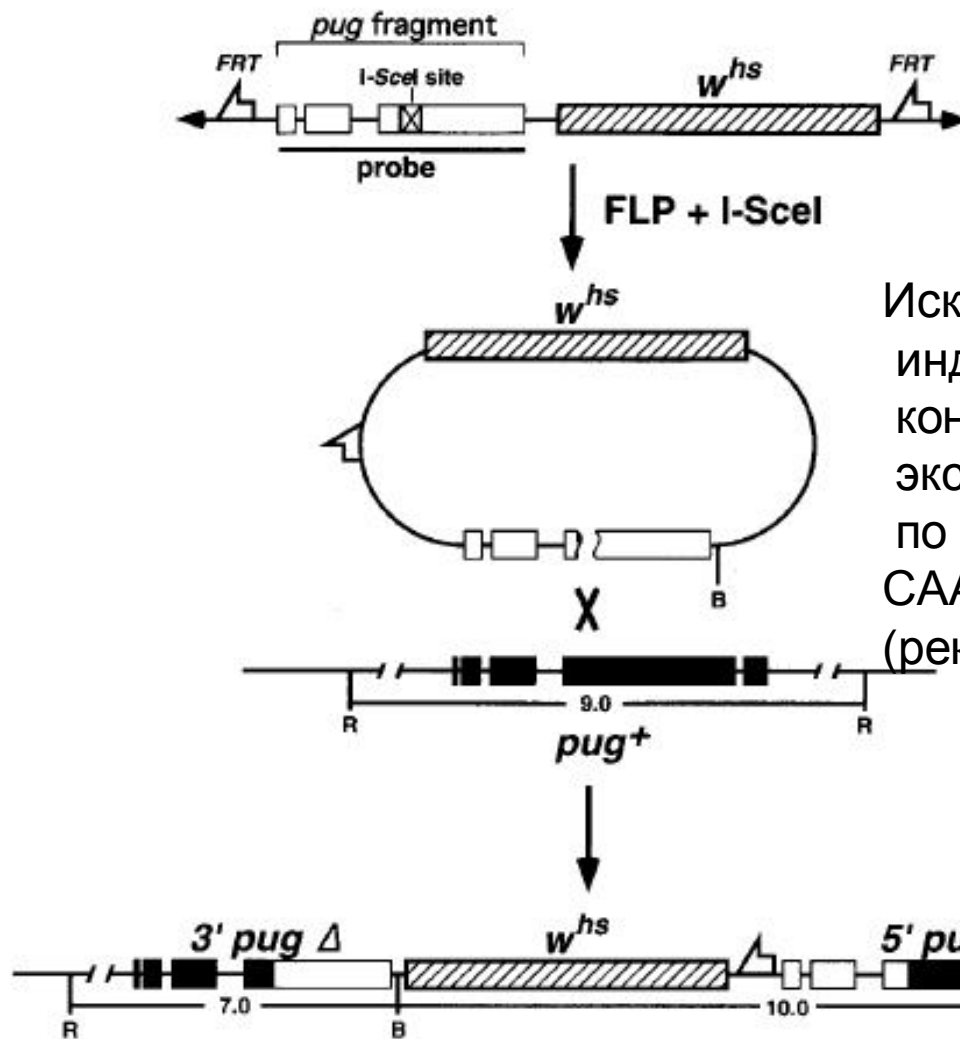
Сайленсинг генов с помощью РНК интерференции

У животных имеется защита от РНК-содержащих вирусов. При попадании двуцепочечной РНК в клетку она фрагментируется на на 20-25 п.н. участки под действием РНКзы Dicer2. Это явление используется для индукции сайленсинга генов.



Омельянчук, 2007,
слайды к курсу «Генетика», НГУ

Направленный мутагенез



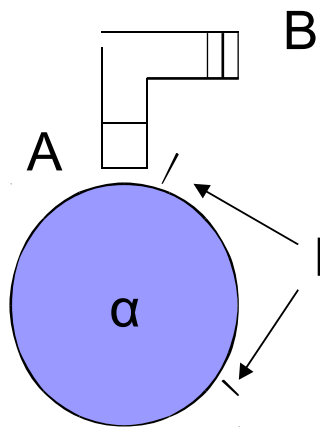
Под действием FLP-рекомбиназы конструкция выщепляется из хромосомы.

Искусственная homing нуклеаза индуцируется с помощью *hs-I-SceI* конструкта и расщепляет экстрахромосомную ДНК по сайту I-SceI:
 CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG
 (рекомбиногенный разрыв).

Это приводит к рекомбинации пробного гена (белые прямоугольники) и гомологичной геномной мишени (черные прямоугольники).

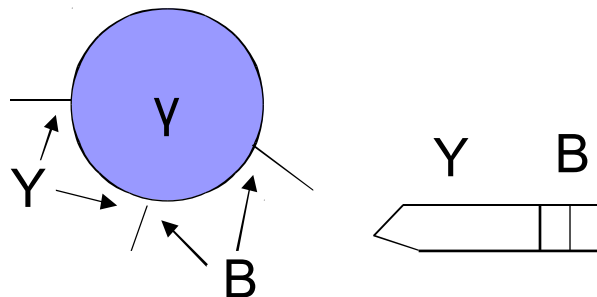
Омельянчук, 2007, Встройки находят по маркеру *w⁺*
 слайды к курсу «Генетика», НГУ

Ловушка белок-белковых взаимодействий – дрожжевая дигибридная система.

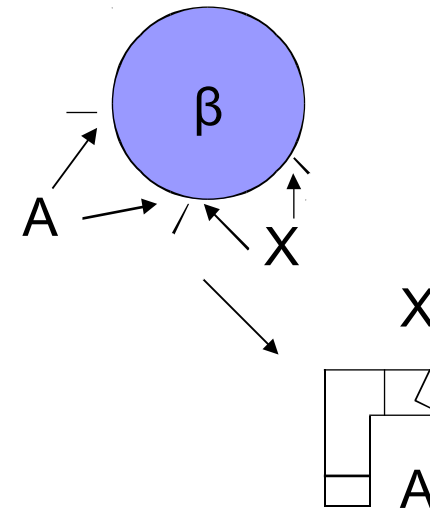


Транскрипционный фактор с сайтами A и B в плазмиде α
Ген репортер

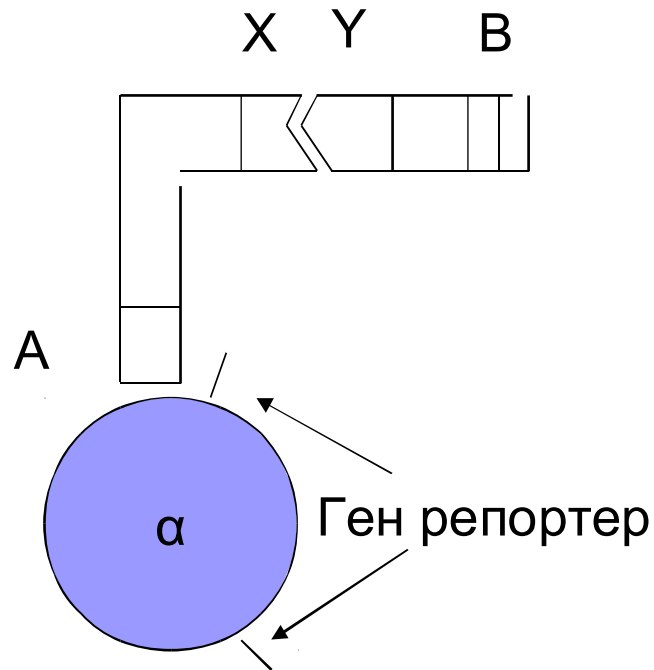
Приготовим «библиотеку» всех белков Y, пришитых к сайту B в плазмиде γ



Приготовим плазмиду, содержащую изучаемый белок X, сшитый с фрагментом, содержащим сайт A.



Клетки дрожжей трансформируют такими концентрациями плазмидных ДНК, чтобы в клетку попала только одна копия плазмиды γ .

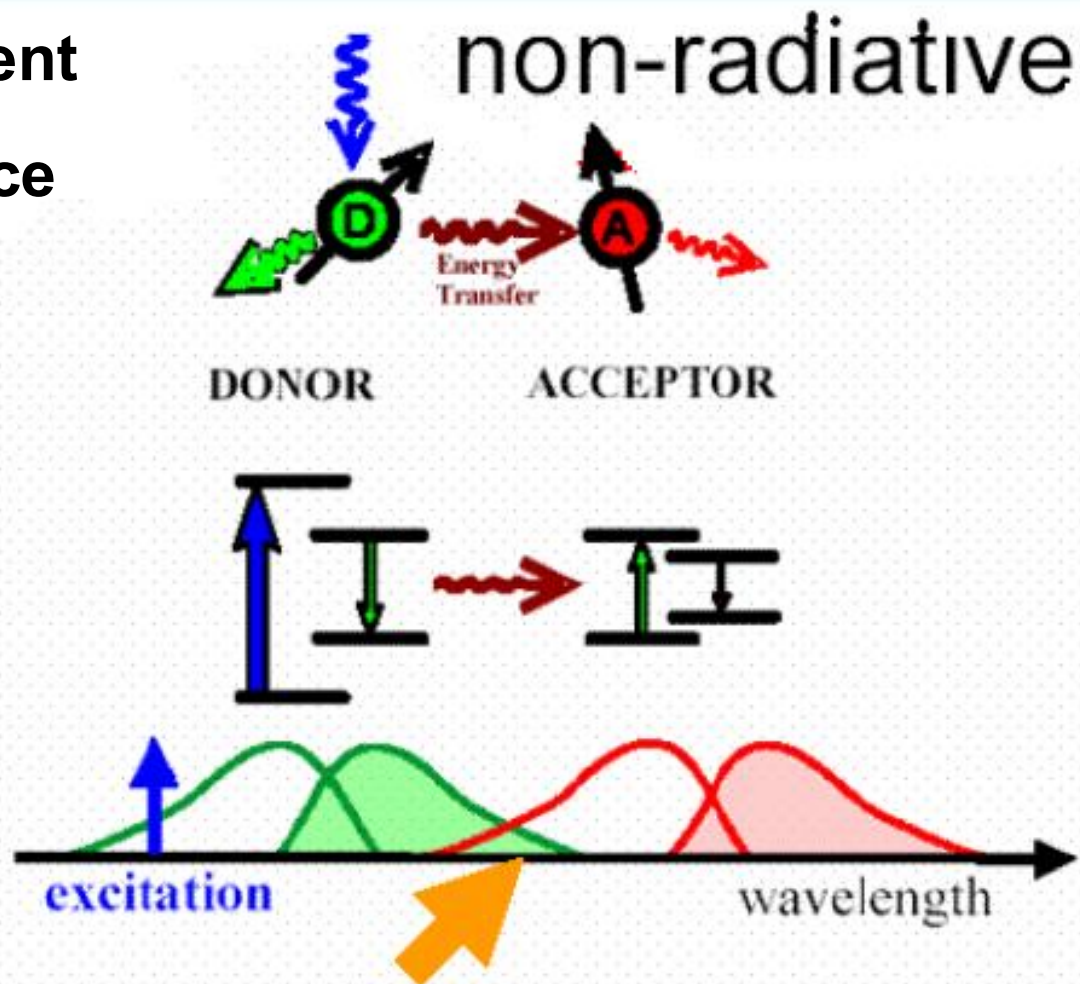


Если белок Y из библиотеки физически взаимодействует с изучаемым белком X, соберется транскрипционный фактор, который начнет транскрипцию гена-репортера.

Это позволит увидеть клетки, в которых имеются белки, взаимодействующие с X.

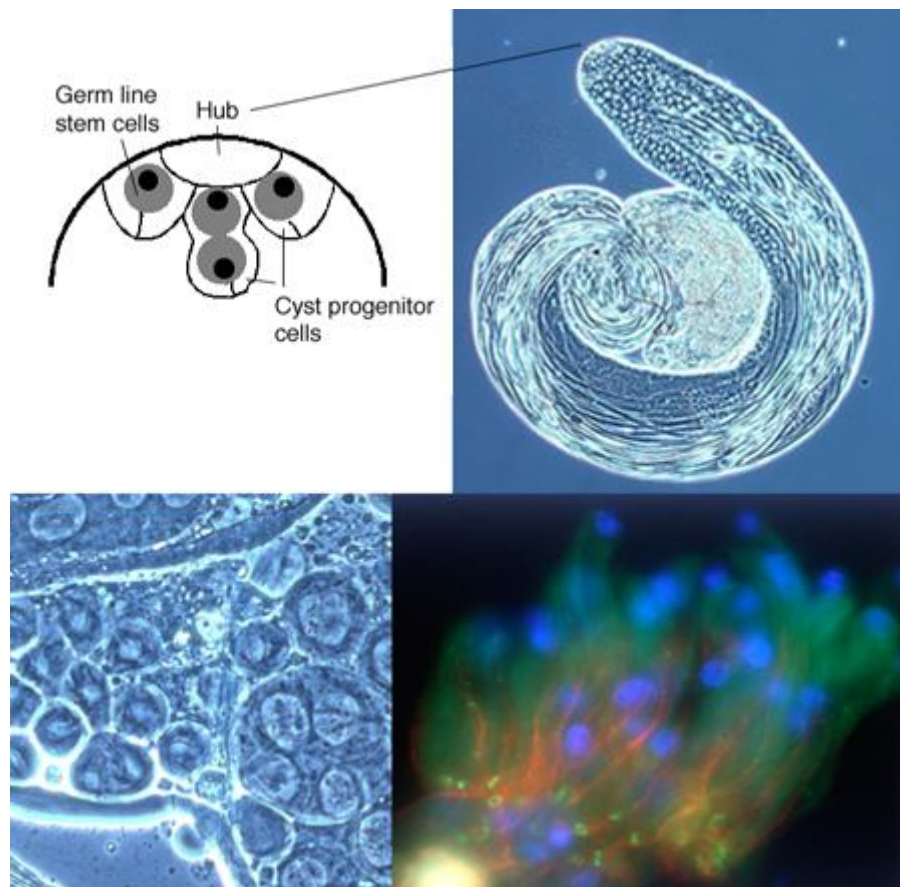
Исследование взаимодействия белков с помощью FRET

Fluorescent
Resonance
Energy
Transfer

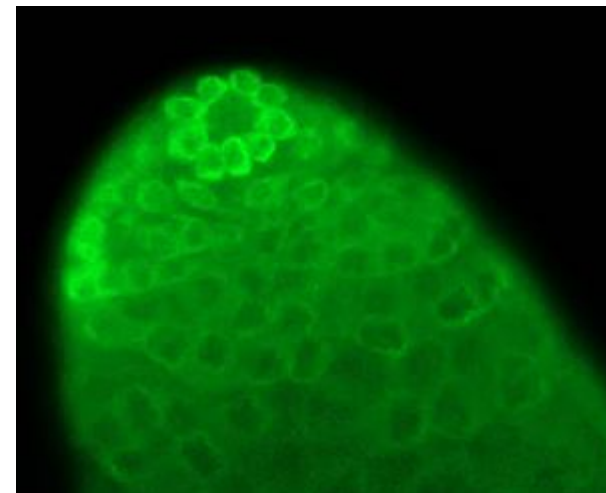


FRET requires overlap of the emission band of the donor and the absorption band of the acceptor

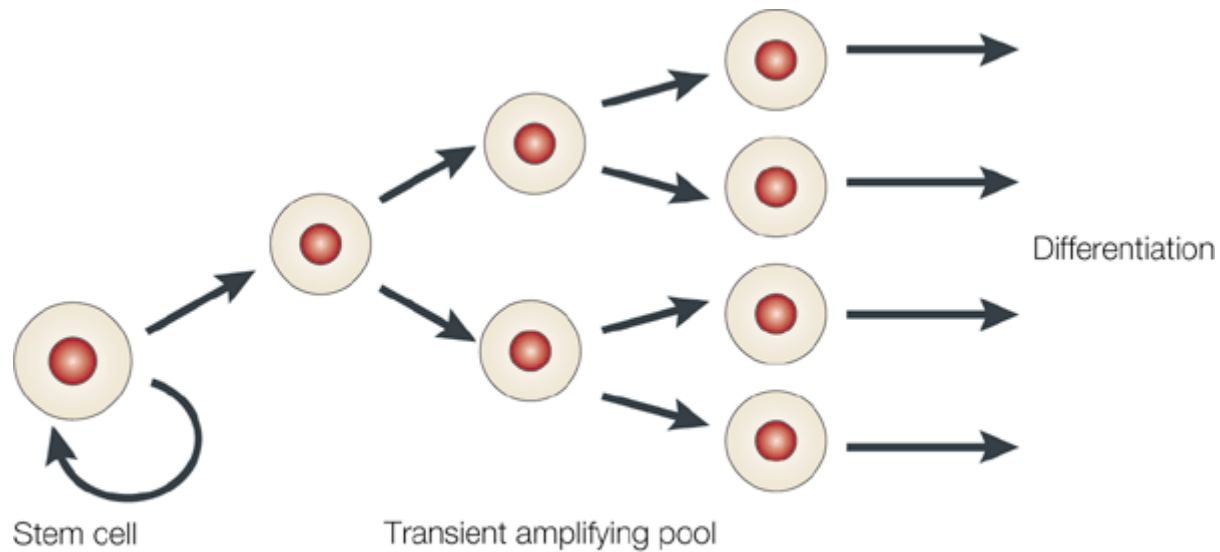
Стволовые клетки семенника



Розетка стволовых клеток,
выявленная с помощью
антител к vasa



Деление стволовой клетки зародышевой линии асимметрично



Наследование центросом в делениях стволовой клетки семенника дрозофилы

From **The Cell Cycle: Principles of Control**
2007-2008 Online Update by David O Morgan

