

Génétique approfondie

- Enseignantes

- Anne Plessis

anne.plessis@ijm.fr

- Isabelle Bécam

isabellebecam@ijm.fr

Les documents présentés dans ce cours sont issus soit de travaux d'enseignement ou de recherche, soit de travaux présentés sur le web. Ils sont l'usage exclusif des étudiants. Leur utilisation ne doit donner lieu à aucune exploitation commerciale.

Introduction

Génétique

Génétique

- Règles gouvernant la ségrégation du matériel génétique
- Décryptage de la fonction des genes et de leurs produits (proteines, ARNs)
- Comprendre comment le role des interactions inter- et intra-moléculaires dans la fonction des protéines et les ARNs
- Elucidation de l'organisation/structure de processus biologiques

Génétique

« Forward »
génétique

The diagram illustrates the relationship between forward and reverse genetics. At the top, the word 'Génétique' is written in red. Below it, a dark red arrow points from left to right, labeled '« Forward » génétique'. This arrow connects a grey box on the left labeled 'Fonction' to a grey box on the right labeled 'Gènes'. Below the 'Forward' arrow, a green arrow points from right to left, labeled 'Génétique reverse', indicating the opposite direction of research.

Fonction

Gènes

Génétique
reverse

Génétique

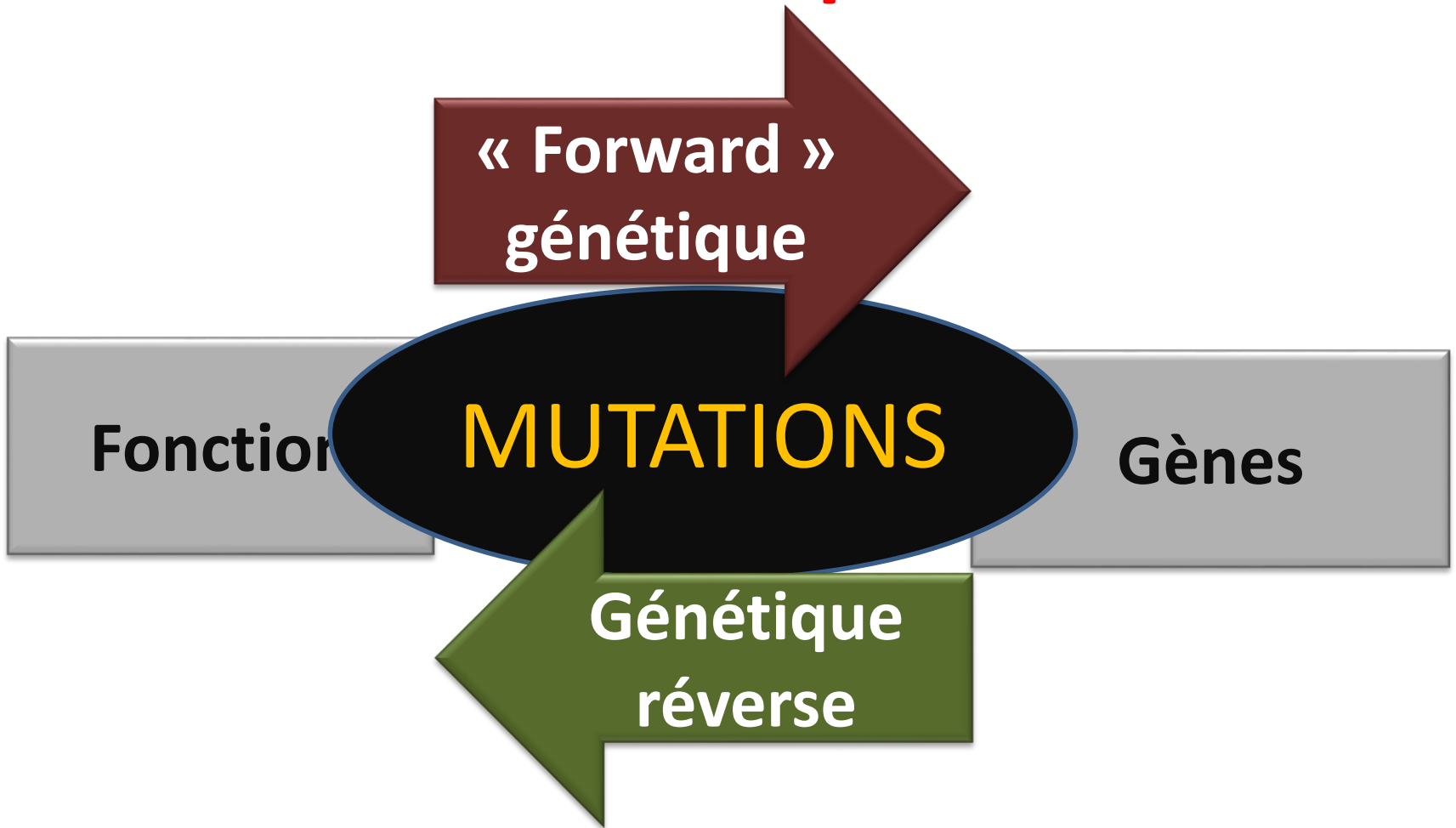
« Forward »
génétique

Fonction

MUTATIONS

Gènes

Génétique
réverse



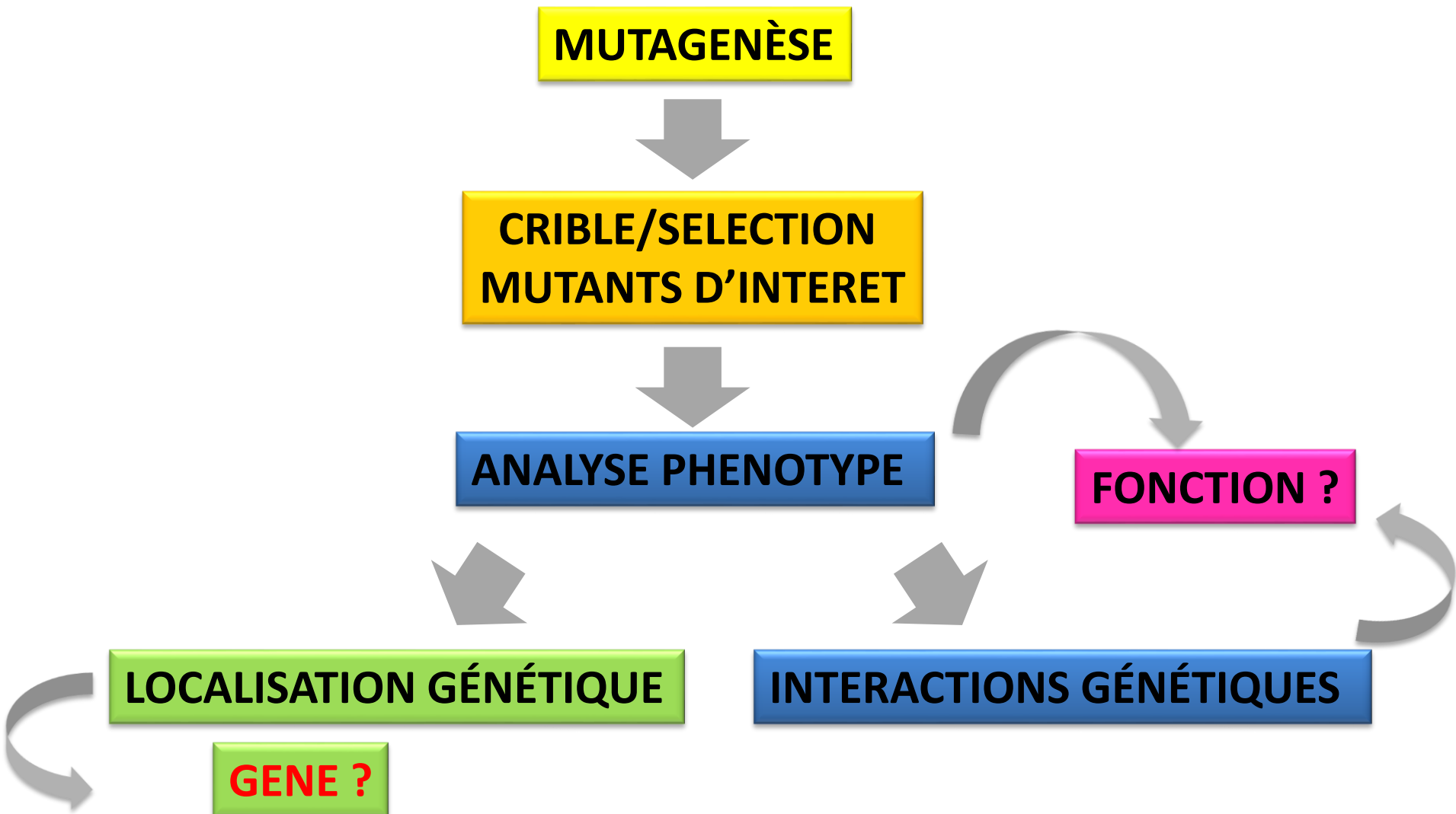
Génétique « Forward »

MUTAGENÈSE

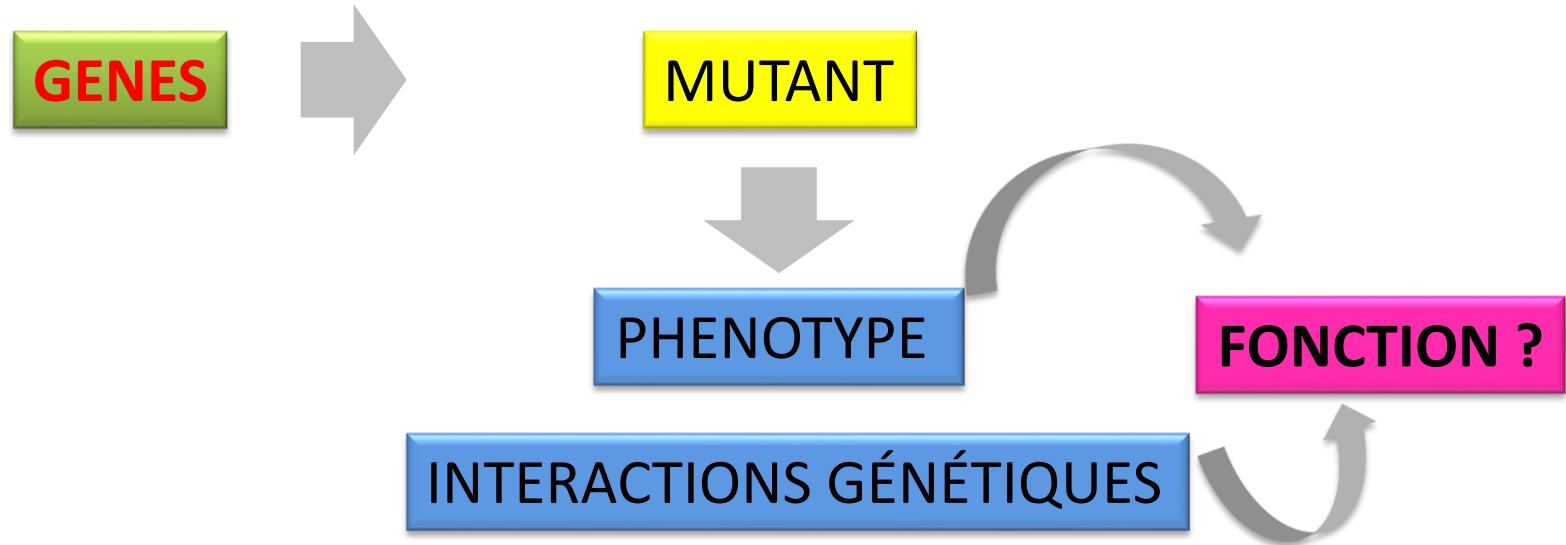


**CRIBLE/SELECTION
MUTANTS D'INTERET**

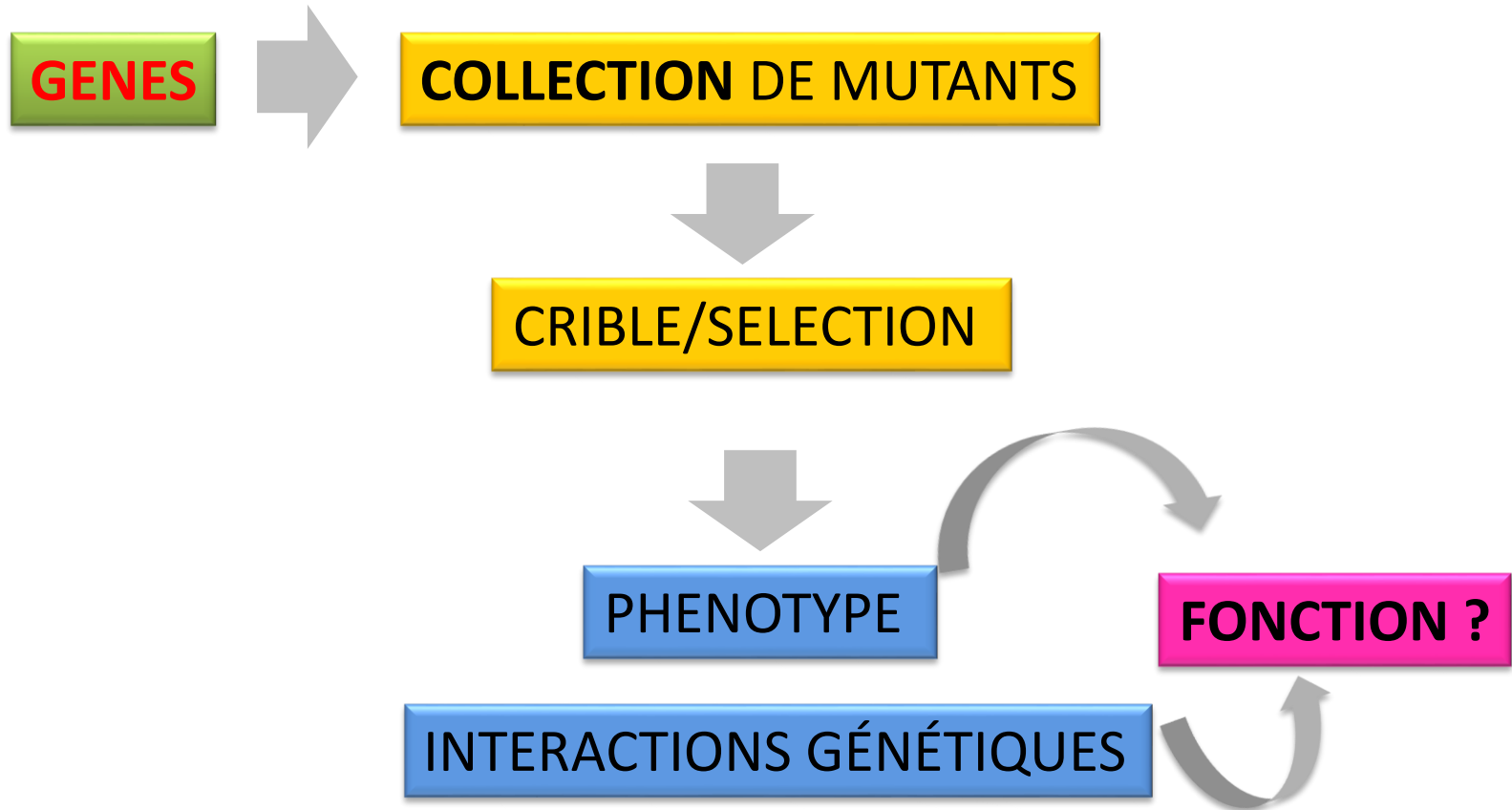
Génétique « Forward »



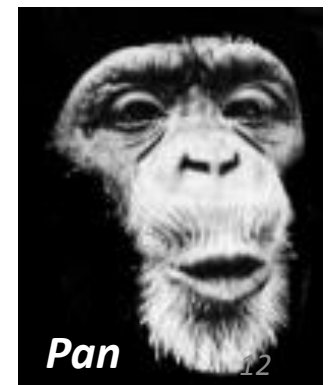
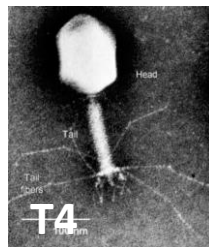
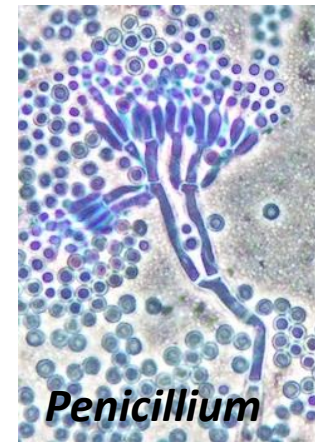
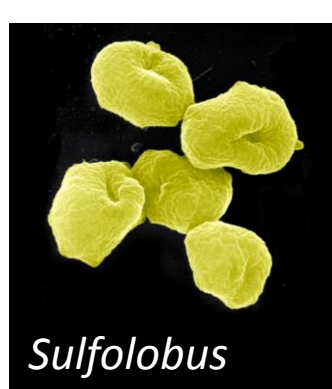
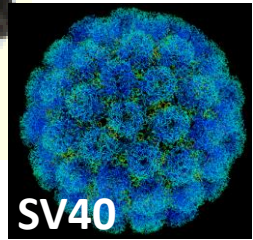
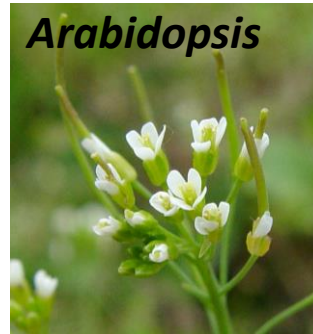
Approche “génétique réserve”



Approche “génétique reserve” post-génomique



Les organismes modèles



PLAN

- I - Etude d'un exemple: dissection génétique du régulon galactose chez la levure
- II- Mutagenèse et cribles
- III- Du mutant au gène et *vice versa*
- IV- Les collections de mutants et leur crible

I- Dissection génétique du régulon galactose chez la levure

A. Rappels

1. Le modèle levure
2. L'opéron lactose chez *E. coli*

B. Dissection génétique du « système GAL 4 » chez la levure

1. Présentation du modèle levure



Unnumbered figure pg 390a
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Saccharomyces cerevisiae

- Eucaryote
- Ascomycète
- Cycle haplodiplobiontique

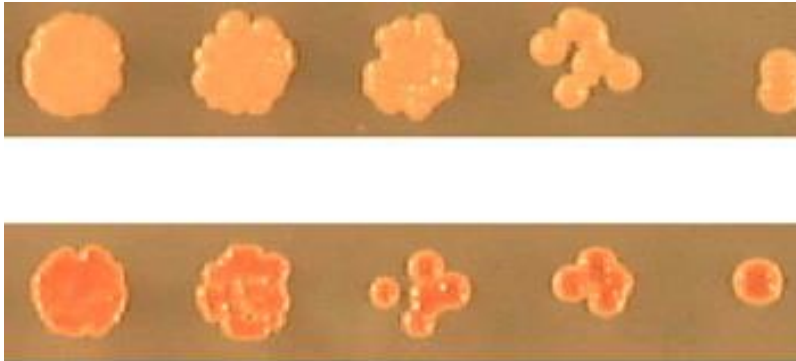
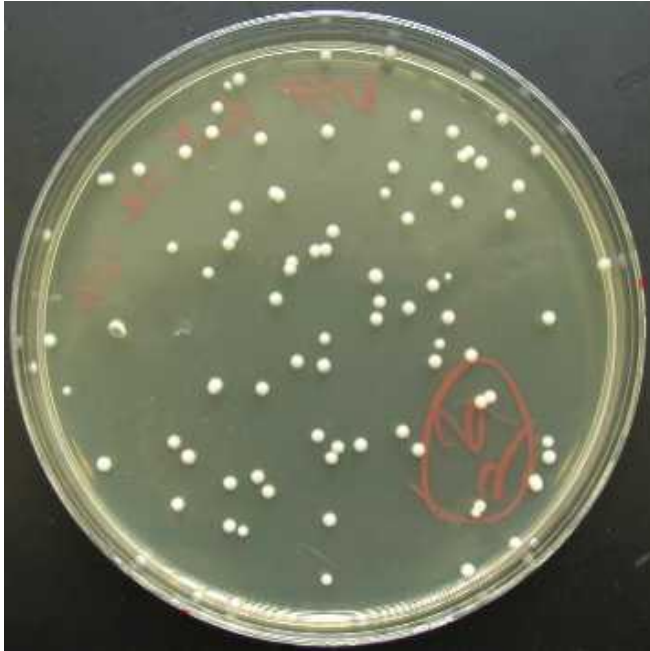


Unnumbered figure pg 390a
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

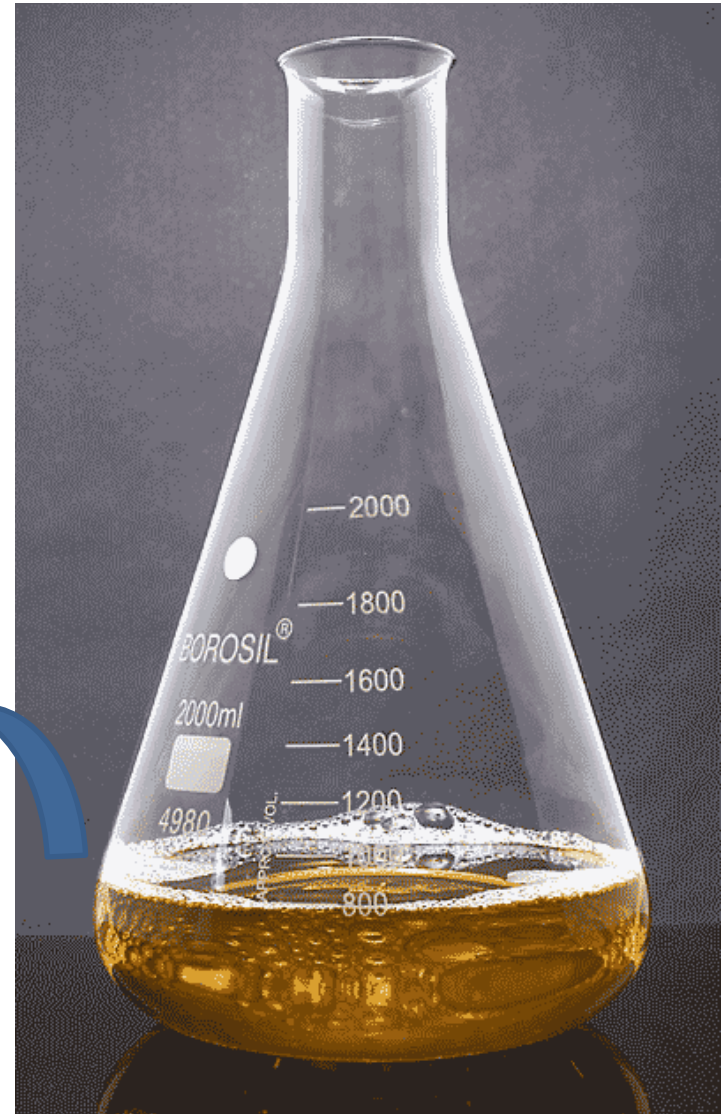
Présentation du modèle levure

- Facilité de manipulation
- Temps de division rapide
- Génétique: cribles pour mutations récessives et dominantes, test de complémentation, analyse asques
- 1^{er} eucaryote séquencé (1996)

Conditions culture



colonies en 48hr



Temps doublement: 1 à 2hr

Milieux de culture

- **Milieux riches** YEP, YEPD

Milieux de culture

- **Milieux riches** YEP, YEPD
- **Milieux synthétiques complets SC**
 - > avec ou sans différents acides aminés, ura, ade
 - > sélection marqueurs, diploïdes, transformants etc...
-

Milieux de culture

- **Milieux riches** YEP, YEPD
- **Milieux synthétiques complets** SC
 - > avec ou sans différents acides aminés, ura, ade
 - > sélection marqueurs, diploïdes, transformants etc...
- **Milieux minimum**

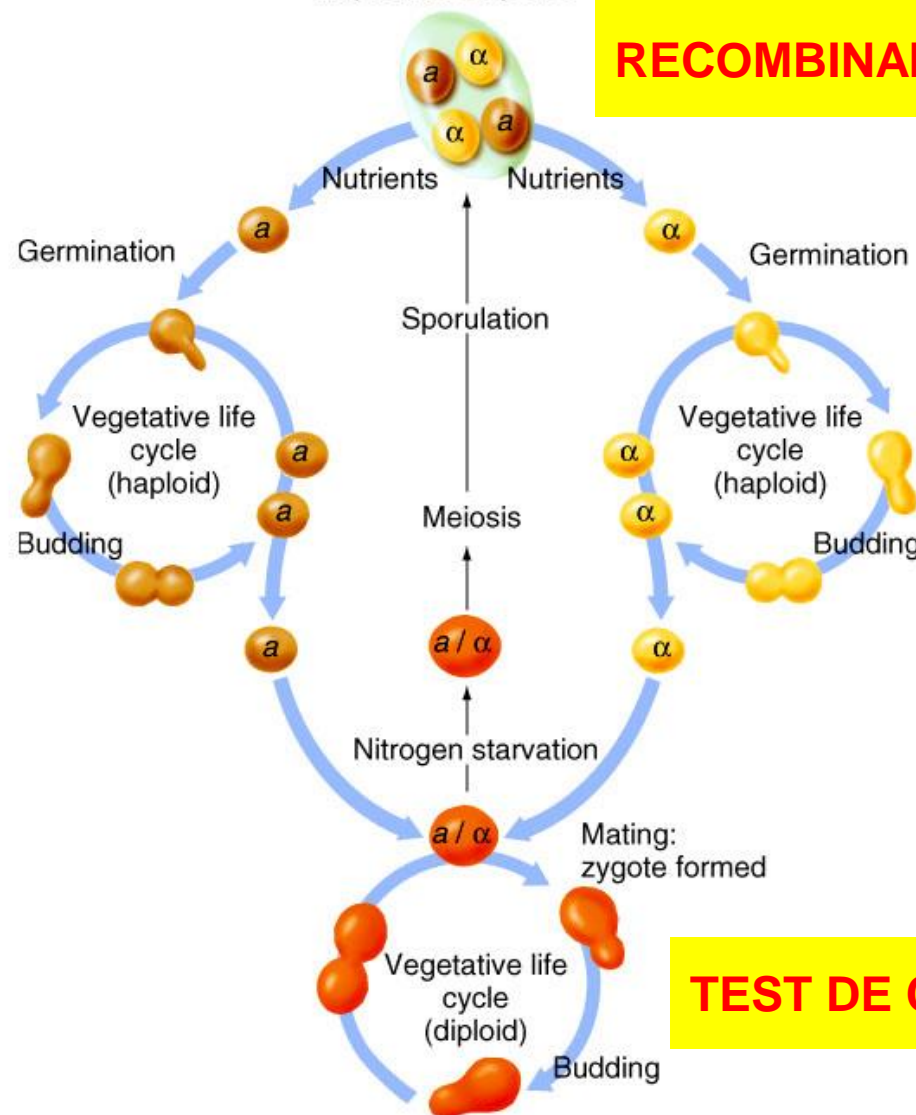
On y rajoute juste ce qui est nécessaire pour que ça pousse (ou pas si tests)

Cycle haplo-diplobiontique

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Ascus containing four
haploid ascospores

RECOMBINAISON



TEST DE COMPLEMENTATION

haploïdes
Mat a x Mat α



Zygote

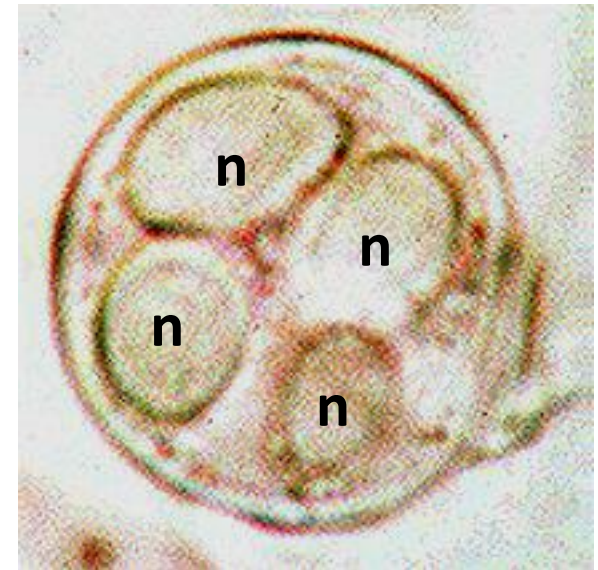
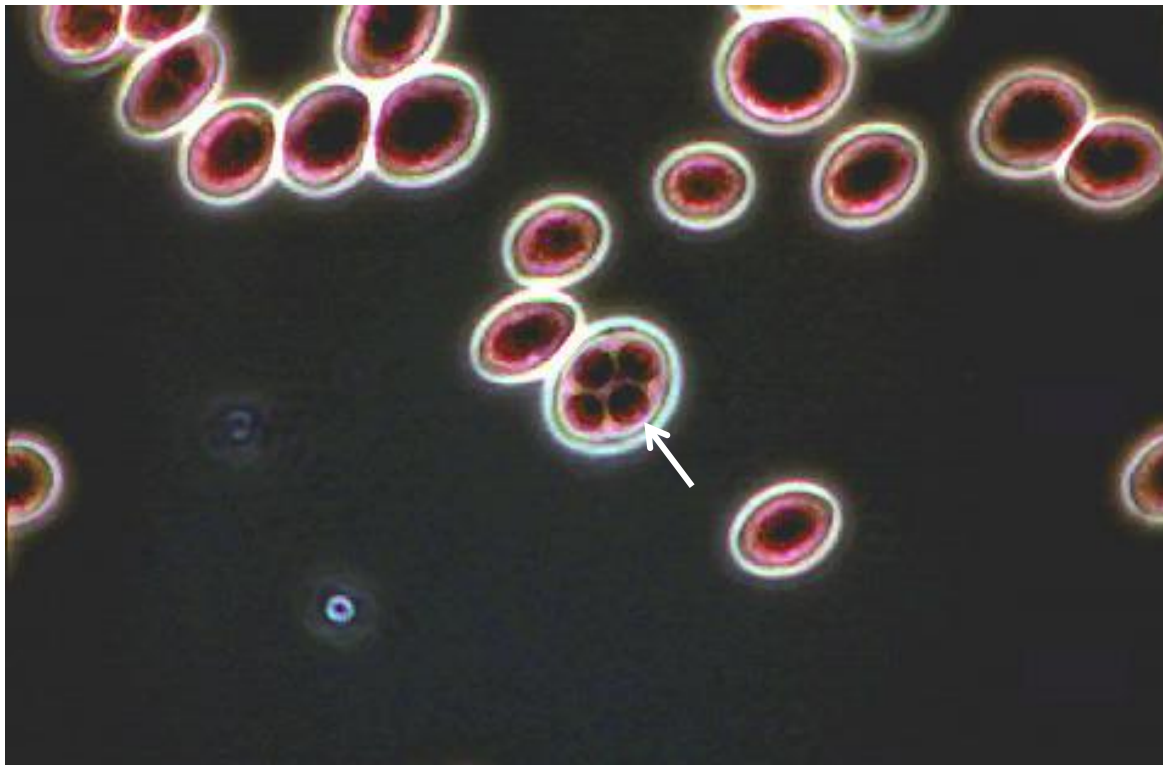


diploïdes

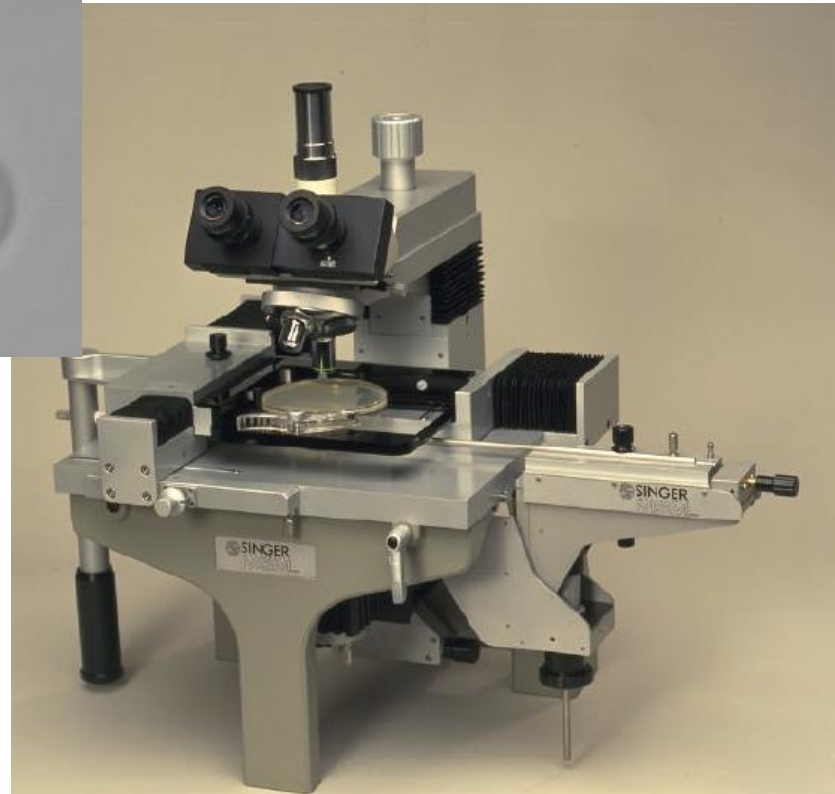
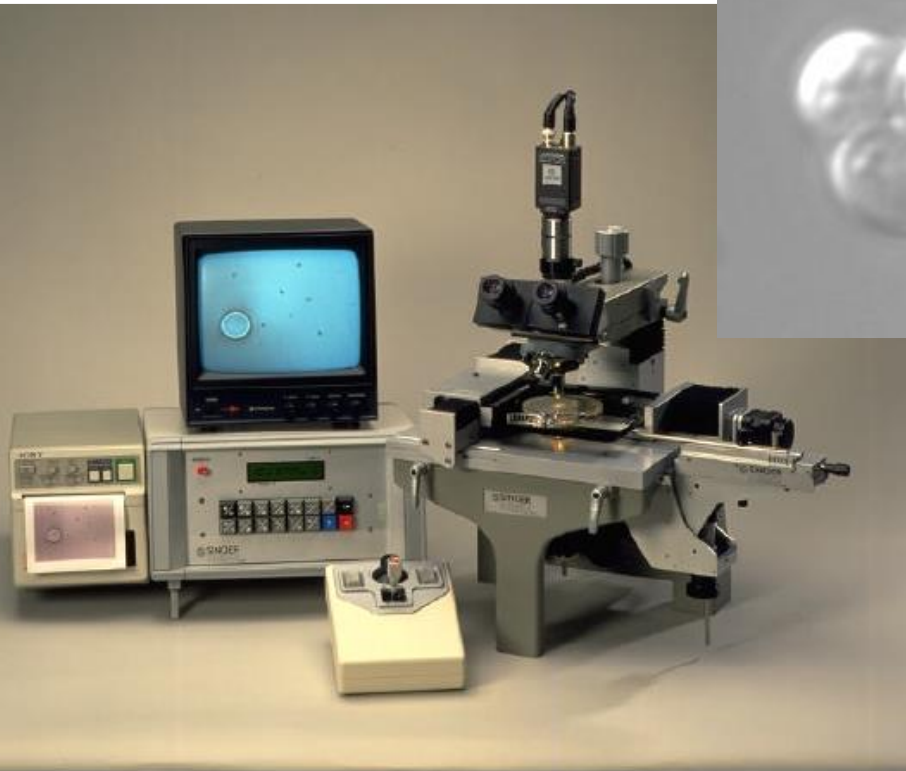
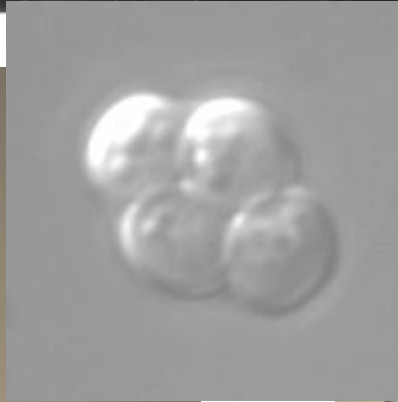
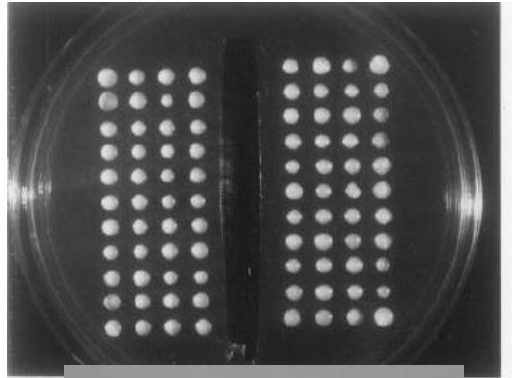
Carence
en nitrogen



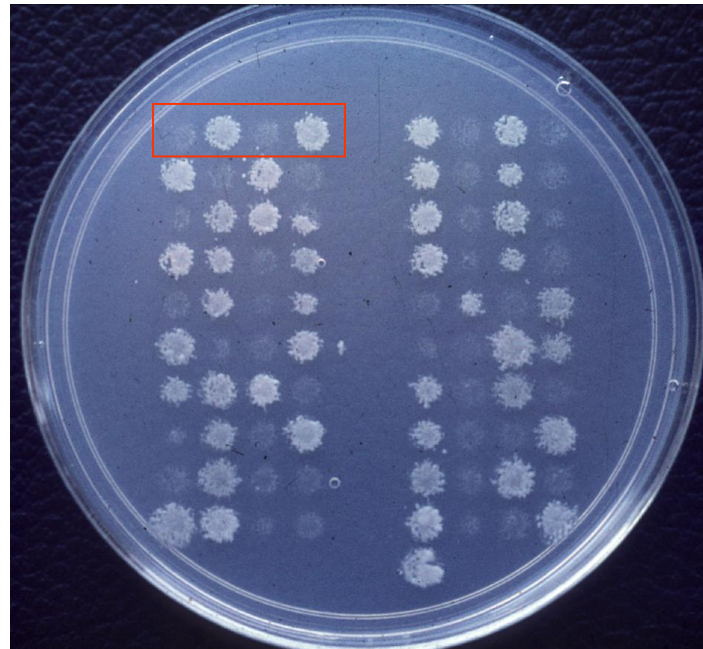
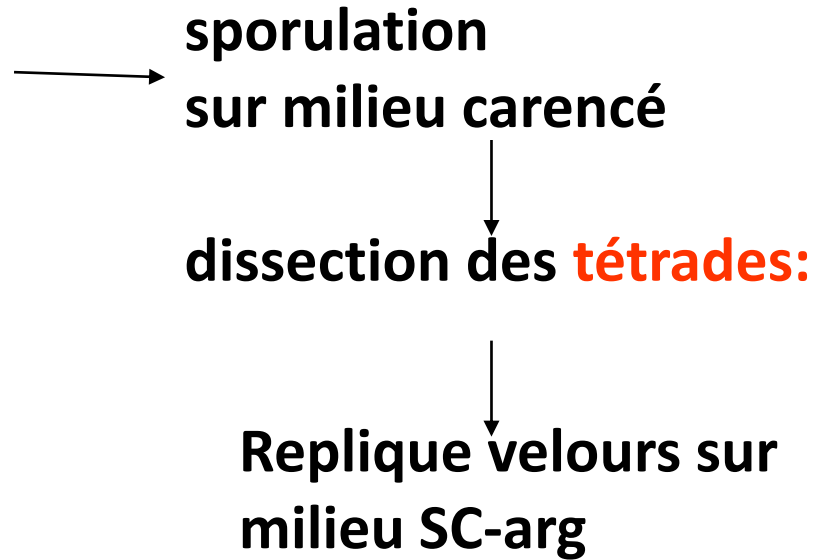
Asque avec tétrade
non orientée



Dissection des tétrades

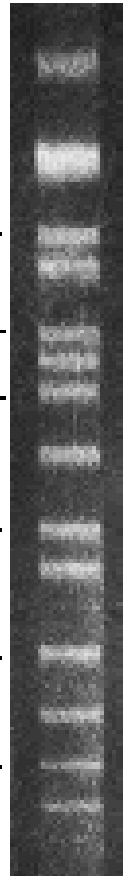


souche
arg4+/arg4-

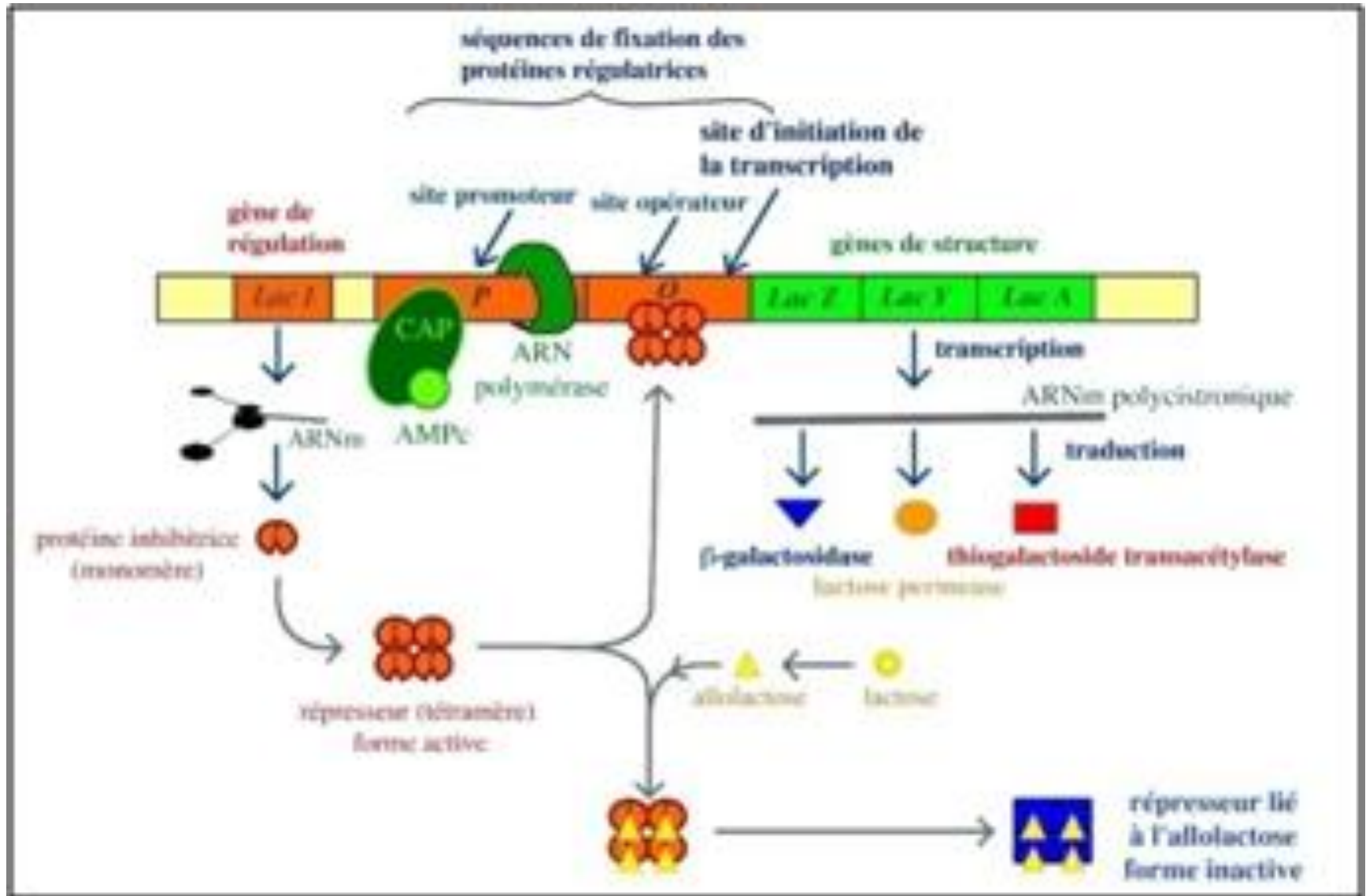


Génome

• Genome size	12.5 Mb + rDNA	1,900 + 1,640 —
• Single Copy DNA	12.0 Mb	1,120 + 1,100 —
• Genetic Map	> 4300 cM	945 — 915 — 815 — 785 — 745 — 680 —
• Chromosome number	16 (245-2190 kb)	610 — 555 —
• Organelle DNA	75 kb mitochondrial DNA	450 — 375 — 295 — 225 —
• Extrachromosomal elements	2 micron DNA double-stranded RNA	
• Nombre de genes (estimé)	6200	



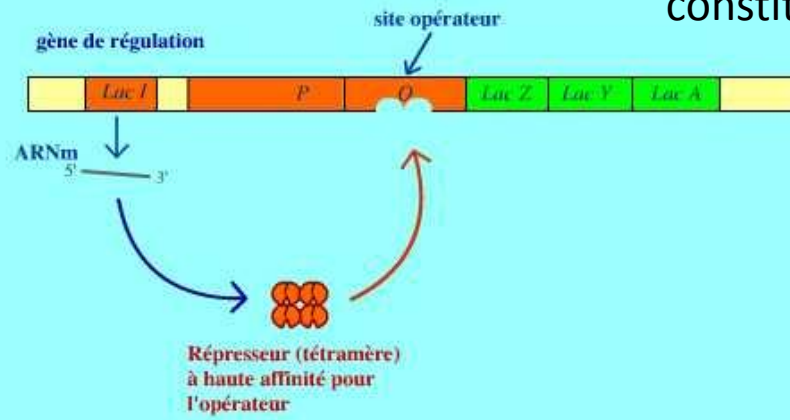
2. L'opéron lactose chez E. coli



Régulation de l'opéron lactose

Synthèse du
répresseur

constitutive

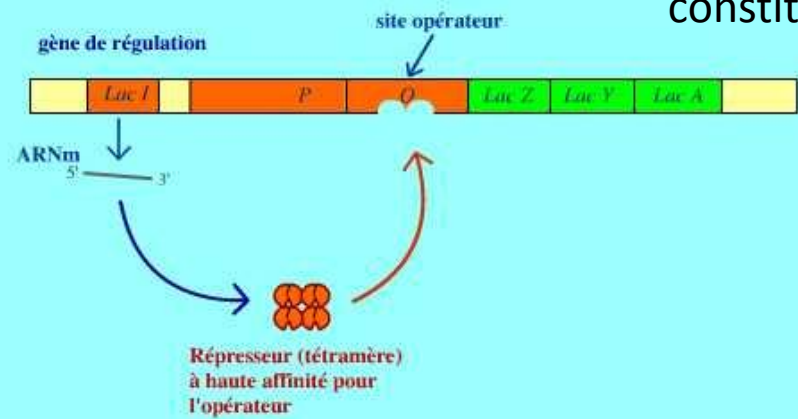


Carence glucose

Régulation de l'opéron lactose

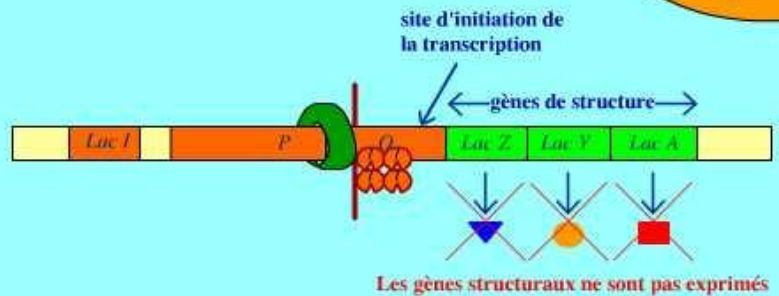
Synthèse du répresseur

constitutive



Régulation de l'opéron lactose

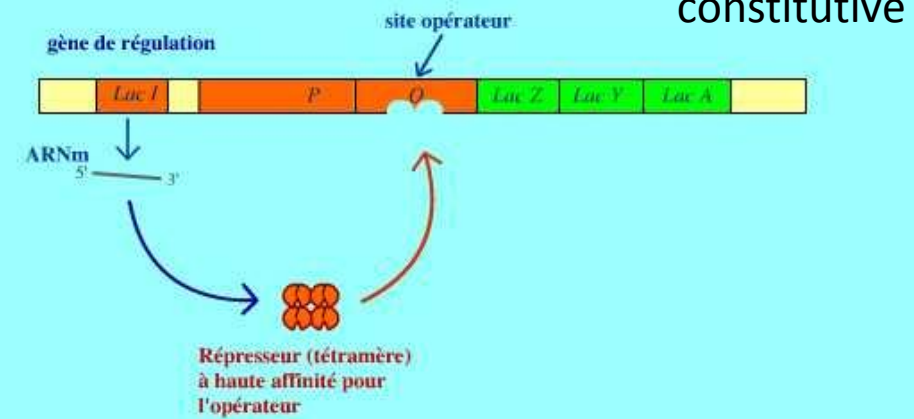
En absence de lactose



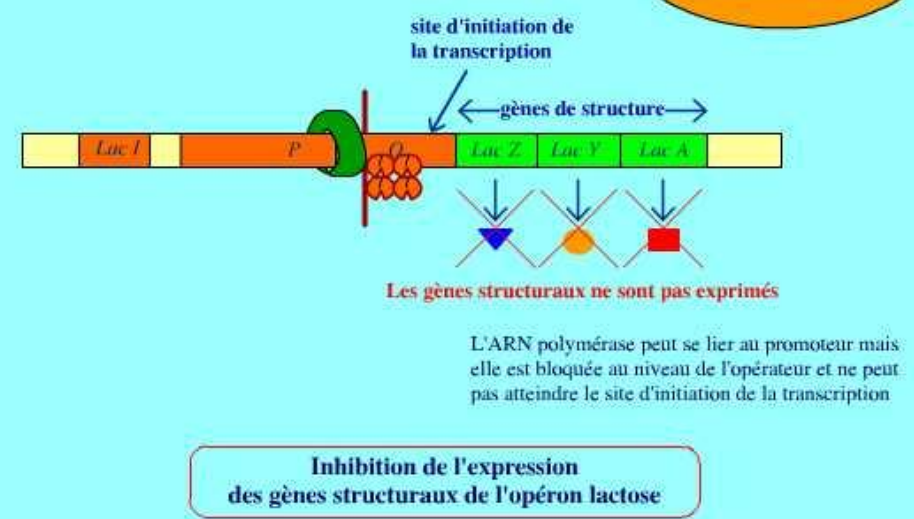
L'ARN polymérase peut se lier au promoteur mais elle est bloquée au niveau de l'opérateur et ne peut pas atteindre le site d'initiation de la transcription

Inhibition de l'expression des gènes structuraux de l'opéron lactose

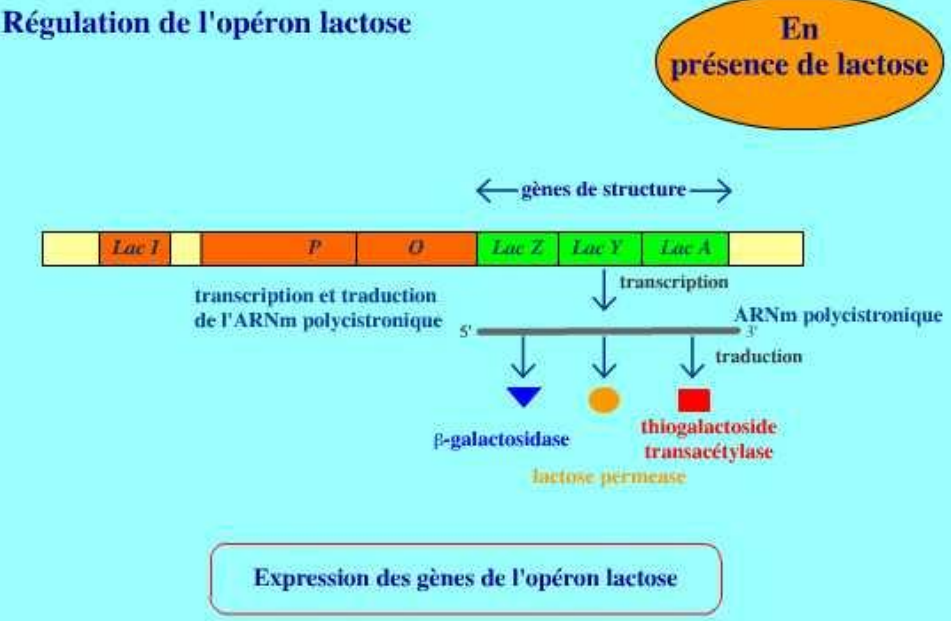
Régulation de l'opéron lactose



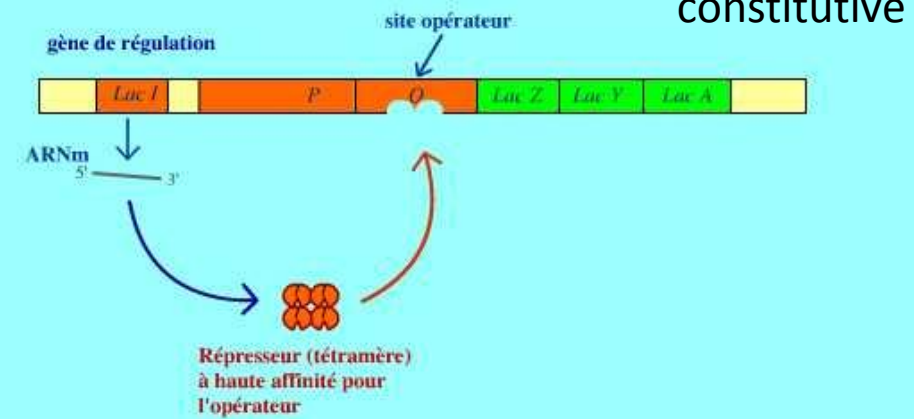
Régulation de l'opéron lactose



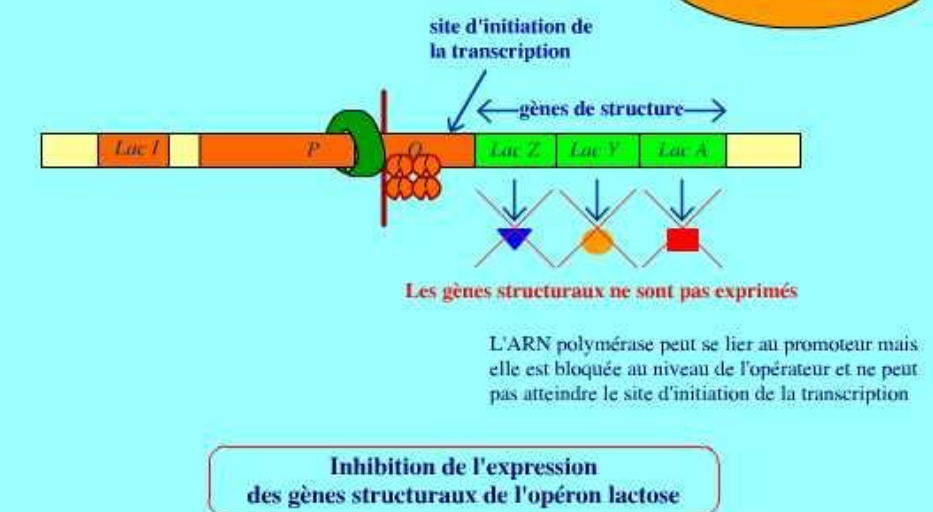
Régulation de l'opéron lactose



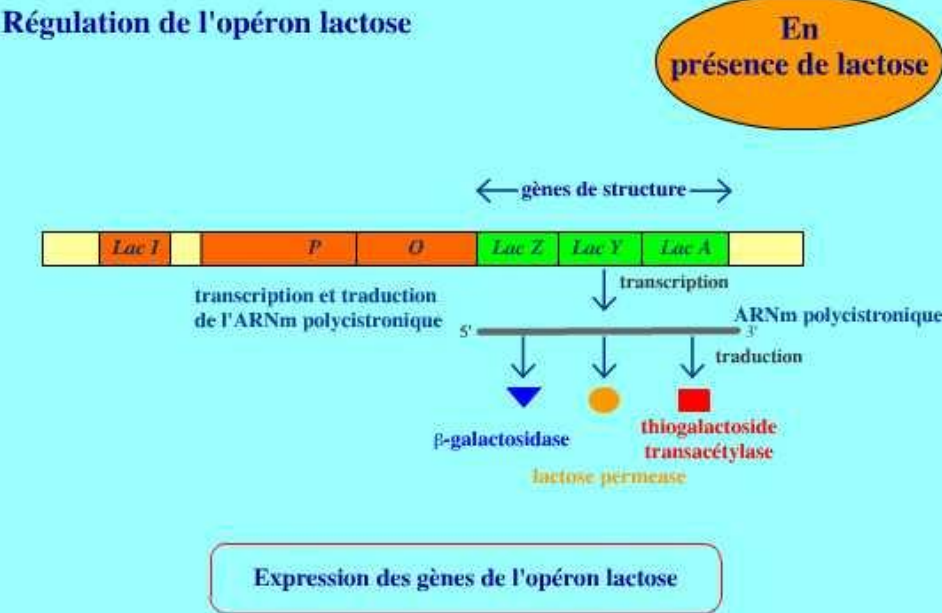
Régulation de l'opéron lactose



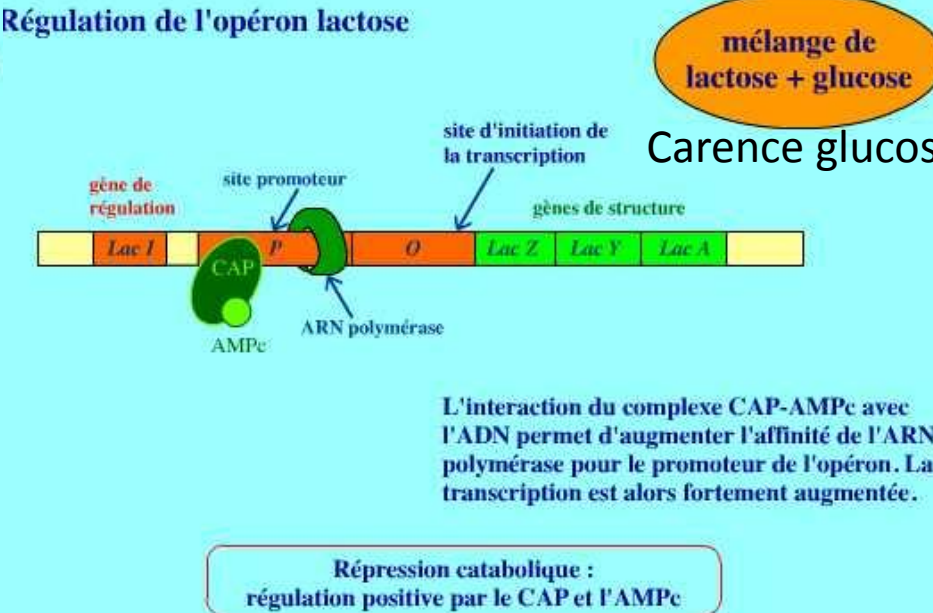
Régulation de l'opéron lactose



Régulation de l'opéron lactose



Régulation de l'opéron lactose



François Jacob:



“If it’s true for *E. coli*, it must be true for *E.lephant*.”



More from Dr. Jacob

“I have always been convinced that the same principles operating in bacteria are also operating in higher organisms with added complexity. **The question therefore is to understand what kind of complexity is involved and how it is generated.**”

B- Dissection génétique du régulon galactose chez la levure *S. cerevisiae*

Ot

Galactose

Out

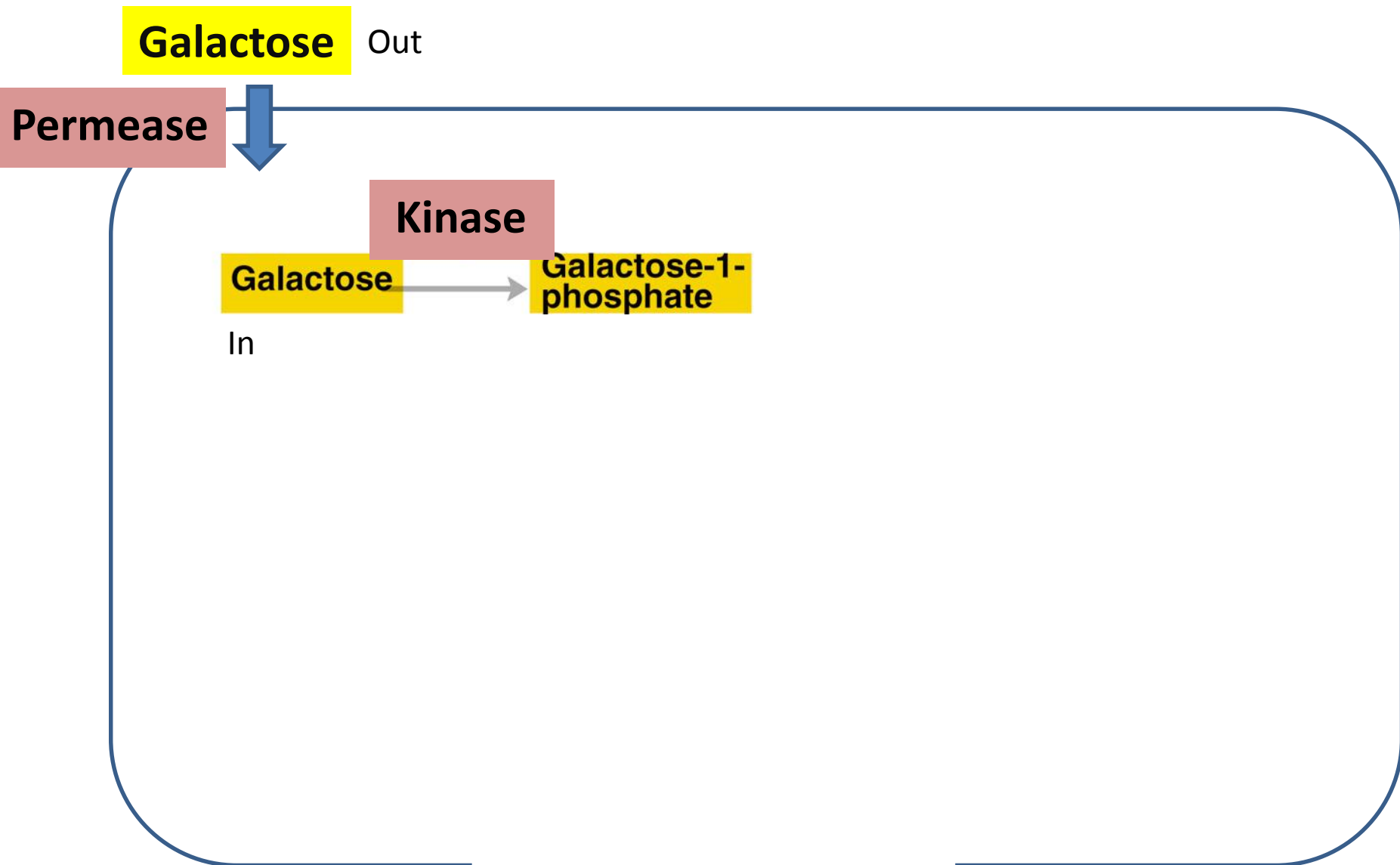
Permease

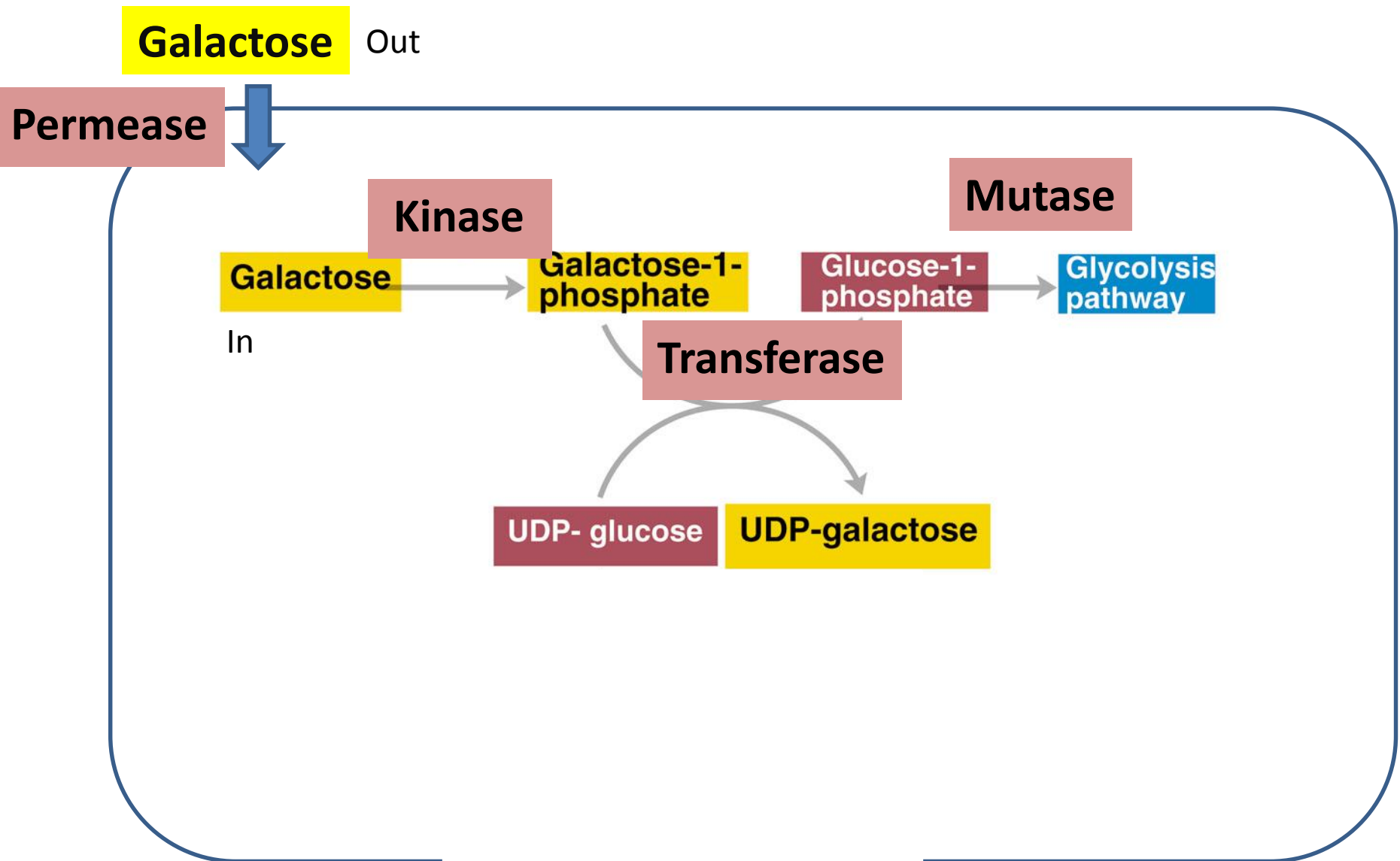


Galactose

In







In *Saccharomyces cerevisiae*

1. Enzymes for utilization of the sugar galactose are induced ~1000-fold by galactose.

In *Saccharomyces cerevisiae*

1. Enzymes for utilization of the sugar galactose are induced ~1000-fold by galactose.
2. These enzymes are also *severely* repressed by glucose in the medium.

In *Saccharomyces cerevisiae*

1. Enzymes for utilization of the sugar galactose are induced ~1000-fold by galactose.
2. These enzymes are also *severely* repressed by glucose in the medium.
3. Thus, for these genes to be induced fully, the medium must contain galactose and no glucose.

In *Saccharomyces cerevisiae*

1. Enzymes for utilization of the sugar galactose are induced ~1000-fold by galactose.
2. These enzymes are also *severely* repressed by glucose in the medium.
3. Thus, for these genes to be induced fully, the medium must contain galactose and no glucose.

Just like *E. coli*.

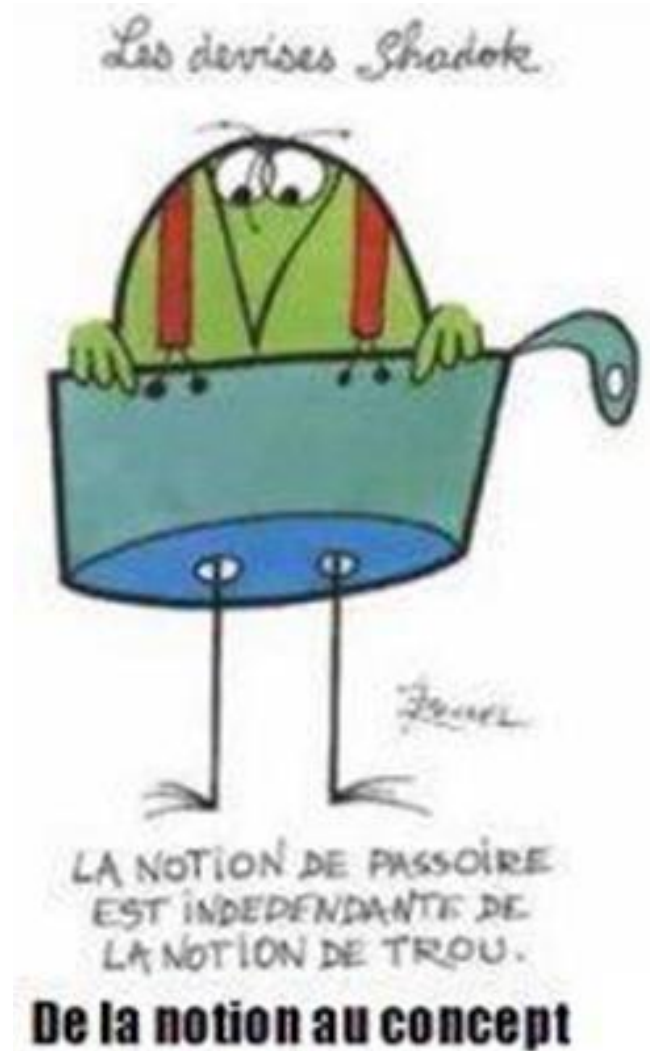
>> A major evolutionary conservation of cellular response to sugar in the medium

C- Dissection génétique du « système GAL 4 » chez la levure

1. Identification de mutants [gal-] à effet récessif
2. Identification de mutants [gal⁺ const] à effet récessif
3. Identification de mutants [gal⁺ const] à effet dominant
4. Identification de mutants [gal-] à effet dominant
5. Modèle(s)
6. Clonage de GAL4 et GAL80
7. L'activateur GAL4

1- Crible pour mutants [*gal*⁻].

Qu'auriez vous fait ?



U

V

Souche wt haploid [*gal*⁺ *inductible*].



U

V

Souche wt haploïd [*gal*⁺ *inductible*].



Croissance sur milieu avec glucose comme
source de C



Replique velours sur milieu avec galactose
comme source de C.



U

V

Souche wt haploïd [*gal*⁺ *inductible*].



Croissance sur milieu avec glucose comme source de C

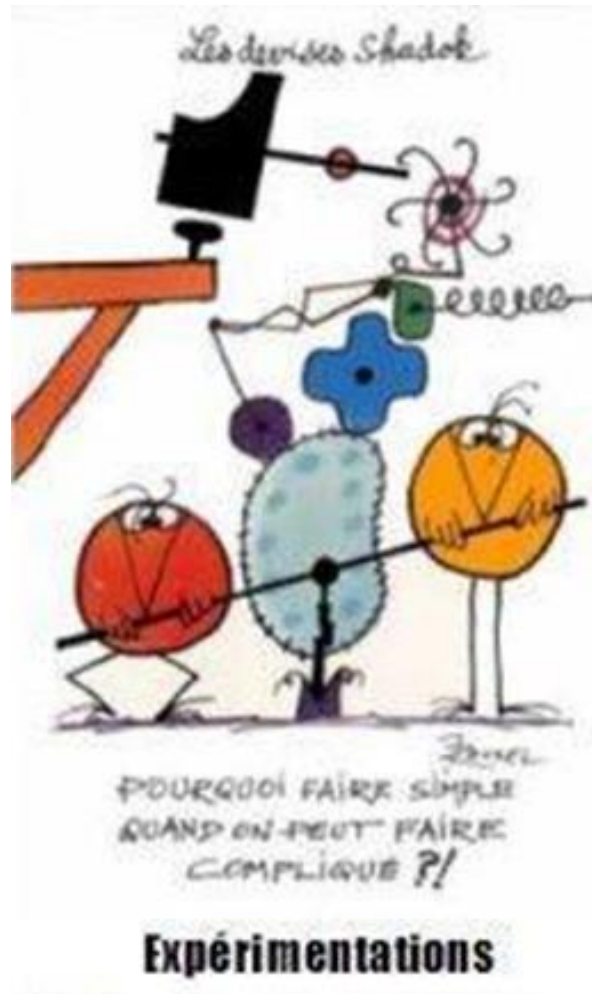


Replique velours sur milieu avec galactose comme source de C.



1:1000 sont [*gal*⁻]

Qu'auriez vous fait ensuite ?



Qu'auriez vous fait ?



Qu'auriez vous fait ?



Croisement avec wt

$2n$

Recess. /dom. Pr effet
allèle wt?

Qu'auriez vous fait ?

```
graph TD; A[Croisement avec wt] --> B[2n  
Recess. /dom. Pr effet  
allèle wt?]; B --> C[Sporulation];
```

Croisement avec wt

$2n$

Recess. /dom. Pr effet
allèle wt?

Sporulation

Qu'auriez vous fait ?



```
graph TD; A[Croisement avec wt] --> B[2n  
Recess. /dom. Pr effet  
allèle wt?]; B --> C[Sporulation]; C --> D[Nb site en jeu ?];
```

Croisement avec wt

$2n$

Recess. /dom. Pr effet
allèle wt?

Sporulation

Nb site en jeu ?

Qu'auriez vous fait ?

Croisement avec wt

Croisement avec mutant

$2n$

Recess. /dom. ?

Sporulation

Nb site en jeu ?

Qu'auriez vous fait ?

Croisement avec wt

$2n$

Recess. /dom. ?

Sporulation

Nb site en jeu ?

Croisement avec mutant

$2n$

Complémentation ?

Qu'auriez vous fait ?

Croisement avec wt



$2n$

Recess. /dom. ?

Sporulation



Nb site en jeu ?

Croisement avec mutant



$2n$

Complémentation ?

Sporulation



Qu'auriez vous fait ?

Croisement avec wt



$2n$

Recess. /dom. ?

Sporulation



Nb site en jeu ?

Croisement avec mutant



$2n$

Complémentation ?

Sporulation



Ségrégation des sites
mutés ?

Ce qu'ils en ont “sorti”:

7 groupes de complementation

- *GAL1* six mutants
- *GAL2* five mutants
- *GAL3* six mutants
- *GAL4* two mutants
- *GAL5* nine mutants
- *GAL7* four mutants
- *GAL10* one mutant

gal1, gal2, gal4, gal5, gal7, gal10 sont
toutes [gal⁻] mais

souche	Kinase K	Transfèrase T	Epimérase E	Mutase M
Gal+	+	+	+	+
gal1	-	+	+	+
gal4	-	-	-	+
gal5	+	+	+	-
gal7	+	-	+	+
gal10	+	+	-	+

Tous les allèle identifiés ont un effet récessif par rapport à l'effet des allèles sauvages respectifs.

gal1, gal2, gal4, gal5, gal7, gal10 sont
toutes [gal⁻] mais

souche	Kinase K	Transfèrase T	Epimérase E	Mutase M
Gal+	+	+	+	+
gal1	-	+	+	+
gal4	-	-	-	+
gal5	+	+	+	-
gal7	+	-	+	+
gal10	+	+	-	+

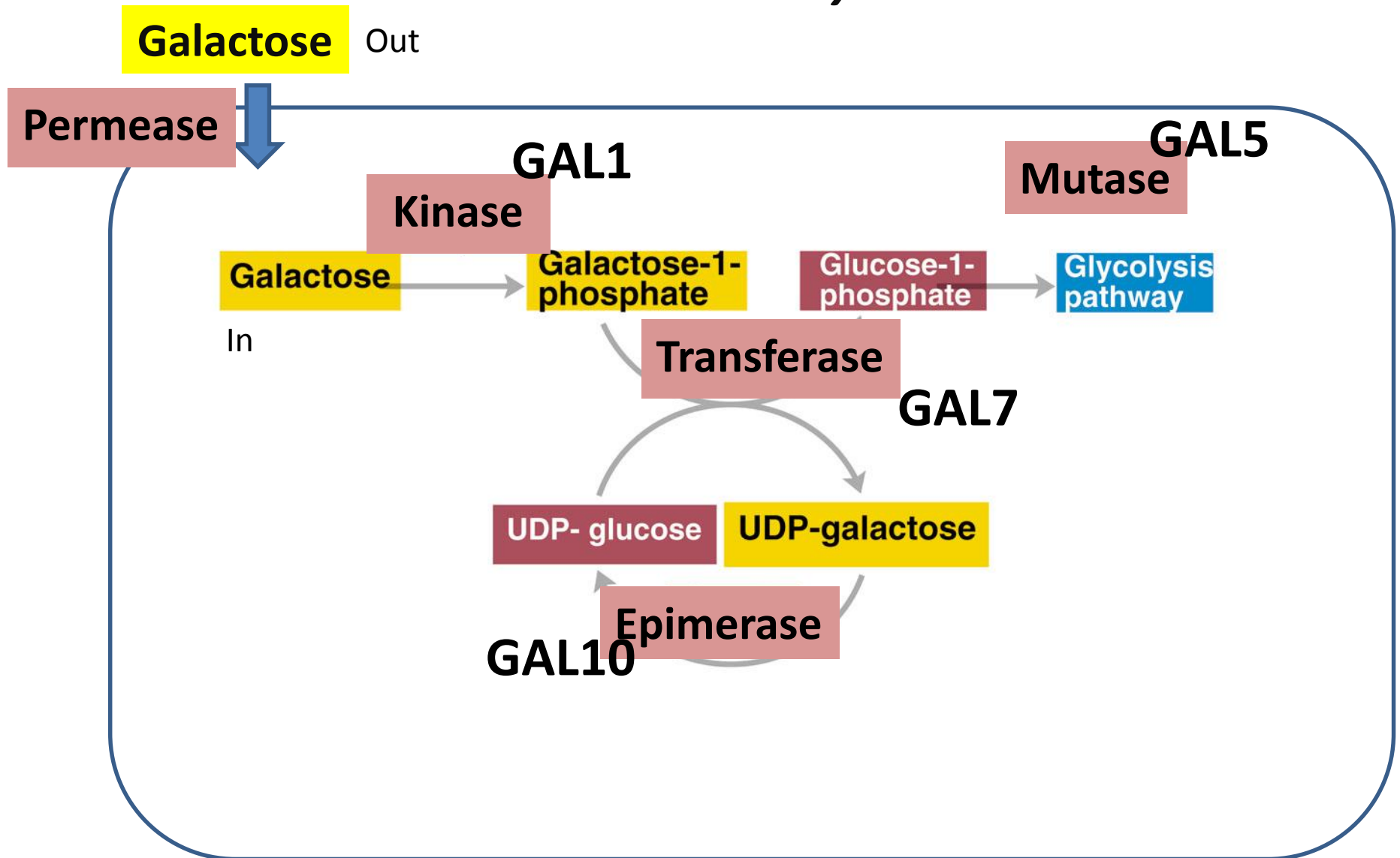
Tous les allèle identifiés ont un effet récessif par rapport à l'effet des allèles sauvages respectifs.

gal1, gal2, gal4, gal5, gal7, gal10 sont
toutes [gal⁻] mais

souche	Kinase K	Transfèrase T	Epimérase E	Mutase M
Gal+	+	+	+	+
gal1	-	+	+	+
gal4	-	-	-	+
gal5	+	+	+	-
gal7	+	-	+	+
gal10	+	+	-	+

Tous les allèle identifiés ont un effet récessif par rapport à l'effet des allèles sauvages respectifs.

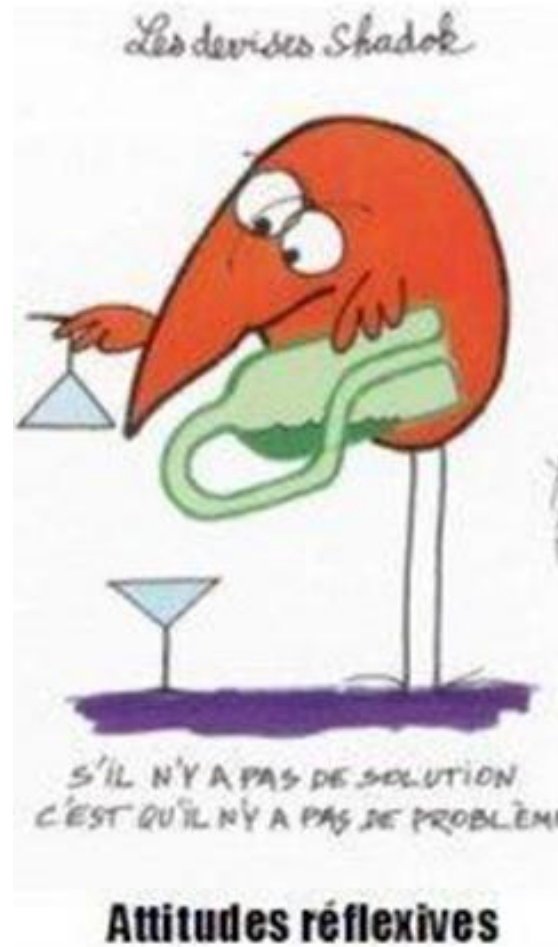
Utilisation du galactose chez *Saccharomyces*



gal1, gal2, gal4, gal5, gal7, gal10 sont
toutes [gal⁻] mais

souche	Kinase K	Transfèrase T	Epimérase E	Mutase M
Gal+	+	+	+	+
gal1	-	+	+	+
gal4	-	-	-	+
gal5	+	+	+	-
gal7	+	-	+	+
gal10	+	+	-	+

Hypothèse S pour le mutant gal4 ???



Analyse de liaison entre les mutations

**Analyse de tétrades issues de
diploïdes résultant des
croisements entre paires de
mutants**

DP, DNP (ou DR) et T

Rappels ?????

Linkage analysis

of tetrads

Gene pair	PD	NPD	T
<i>gal1/gal7</i>	313	0	0
<i>gal1/gal10</i>	59	0	0
<i>gal7/gal10</i>	72	0	0
<i>gal1/gal4</i>	21	23	56
<i>gal3/gal4</i>	20	13	48

Linkage analysis

of tetrads

Gene pair	PD	NPD	T
<i>gal1/gal7</i>	313	0	0
<i>gal1/gal10</i>	59	0	0
<i>gal7/gal10</i>	72	0	0
<i>gal1/gal4</i>	21	23	56
<i>gal3/gal4</i>	20	13	48

DONC.....

Linkage analysis

of tetrads

Gene pair	PD	NPD	T
<i>gal1/gal7</i>	313	0	0
<i>gal1/gal10</i>	59	0	0
<i>gal7/gal10</i>	72	0	0
<i>gal1/gal4</i>	21	23	56
<i>gal3/gal4</i>	20	13	48

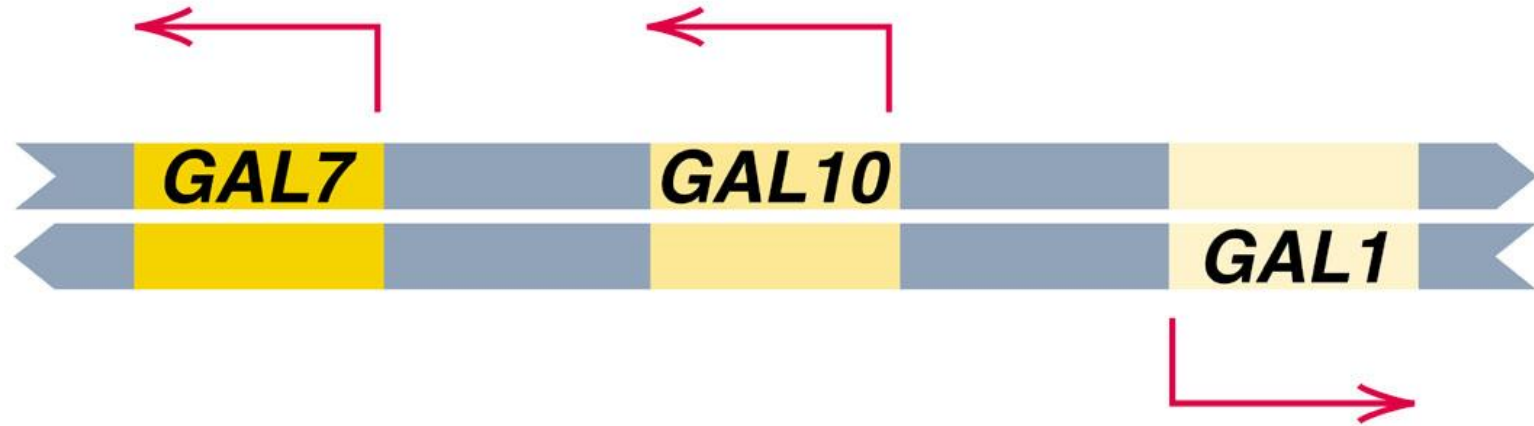
The following genes are very closely linked: *GAL1*, *GAL7*, and *GAL10*

The *GAL4* gene is not linked to those three

Comparaison avec l'operon lactose. chez *E.coli*

“The closely linked genes *GAL1*, *GAL7*, and *GAL10* [code for] the galactose pathway enzymes, galactokinase, transferase, and epimerase. The mutation *gal4* blocks the synthesis of these enzymes, but unlike the phenotypically similar mutation *O^o* in *E. coli* is complementable and is not linked to the genes whose expression it controls.”

Transcriptional orientation of 3 genes coding for enzymes important in galactose utilization in *Saccharomyces*



Mutant gal4

gal4 -> [gal⁻]

- ✓ Mutation à “effet récessif”
- ✓ Nécessaire pour l'expression de plusieurs genes codant des enzymes necessaires au metabolisme du galactose mais
- ✓ non liée génétiquement à ces gènes

Hypothèse ?

Mutant gal4

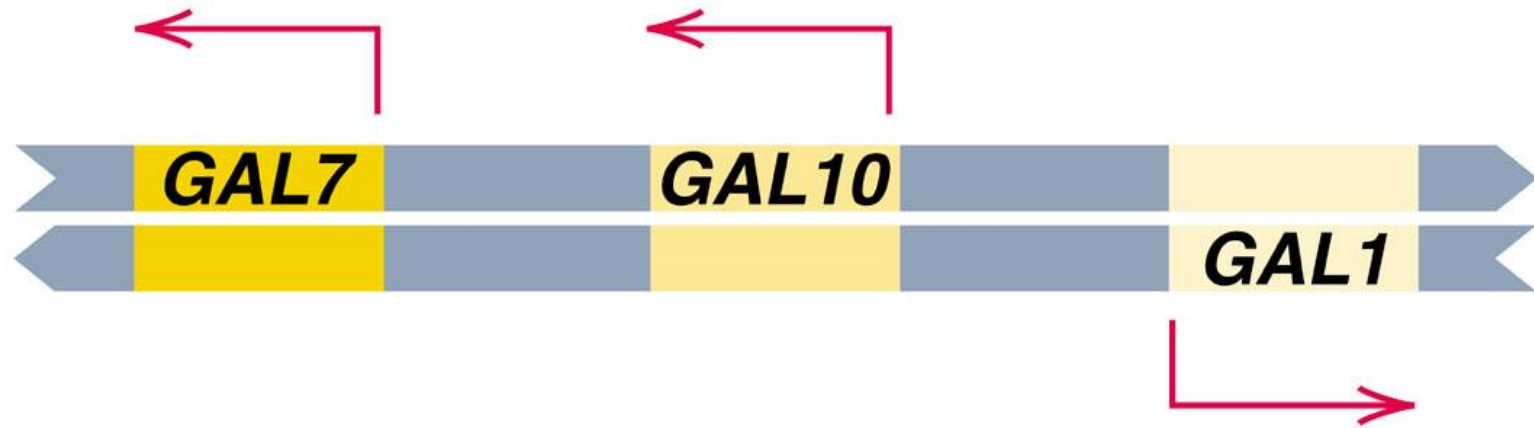
gal4 -> [gal⁻]

- ✓ Mutation à “effet récessif”
- ✓ Nécessaire pour l'expression de plusieurs genes codant des enzymes necessaires au metabolisme du galactose mais
- ✓ non liée génétiquement à ces gènes

Hypothèse ?

Perte de fonction dans gene activateur

Transcriptional orientation of 3 genes coding for enzymes important in galactose utilization in *Saccharomyces*



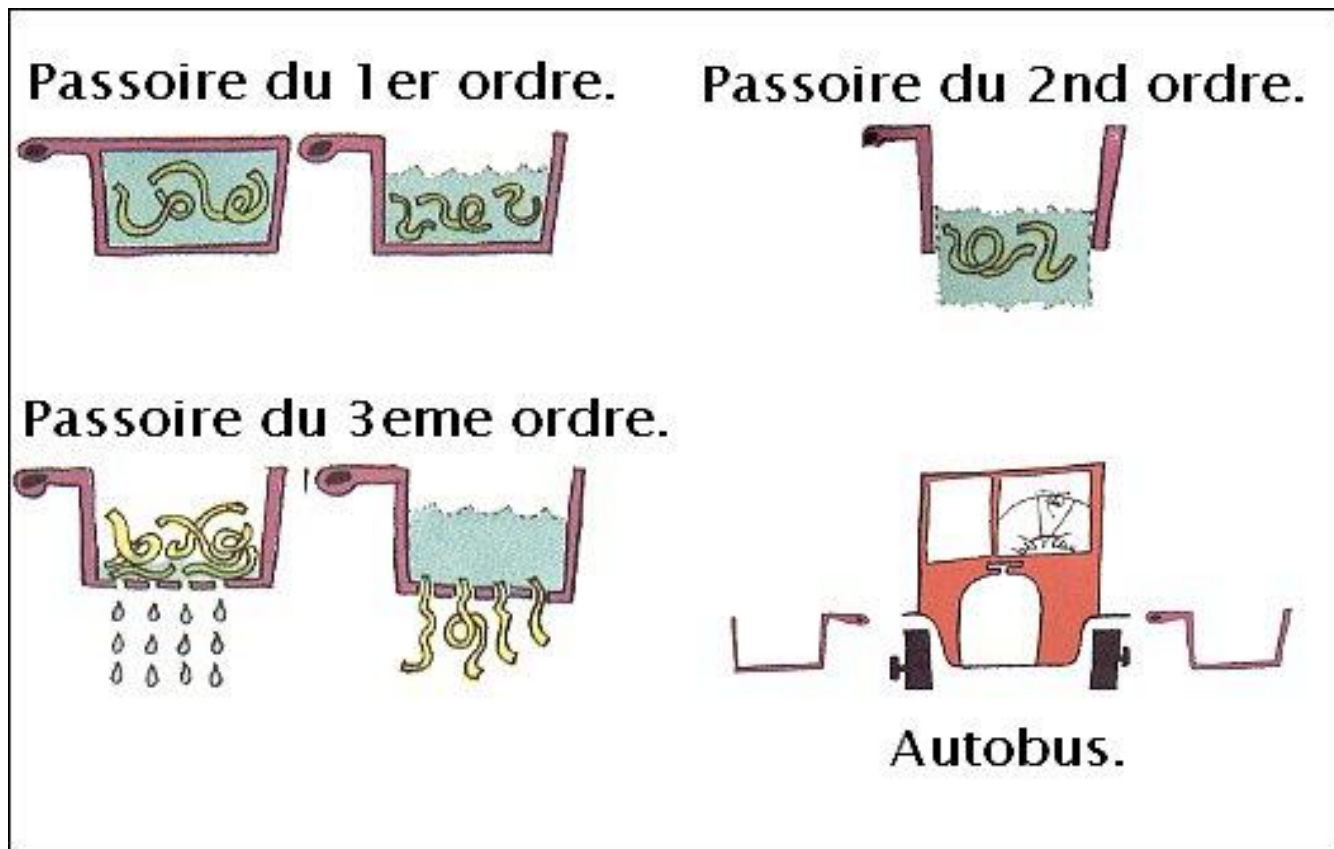
Hypothesis: Their synthesis is regulated by the transcription activator Gal4 protein.

D'autres expériences de Howard Douglas, 1963

But : identifier mutants qui produisent les
enzymes de métabolisme du galactose de
façon constitutive [$\text{gal}^{+\text{Con}}$]

2-Recherche mutant [gal^{+Con}]

Encore une histoire de Shadok et de cribles...



2-Recherche mutant [gal^{+Con}]

Au début était ...

Un mutant *gal3*⁻ : répond au galactose avec un délai et pousse mal sur galactose ,

phénotype [gal^{+ lent}]

Récessif, un seul site mute

Complémente autres mutants gal

Analyse du mutant R1

Souche	Activités enzymatiques K, E. T Après croissance sur		
	Lactate	Galactose	
wt		+	[gal ⁺ Ind]
gal3	-	+lent	[gal ⁺ lent]

Glycerol Lactate ou Glycerol Ethanol avec ou sans Galactose car répression par Glucose

Recherche mutant [gal^{+Con}]

mutant haploïde *gal3*⁻ : [gal^{+lent}]



Mutagenèse



Croissance sur **galactose** -> souches
“révertantes” qui poussent bien

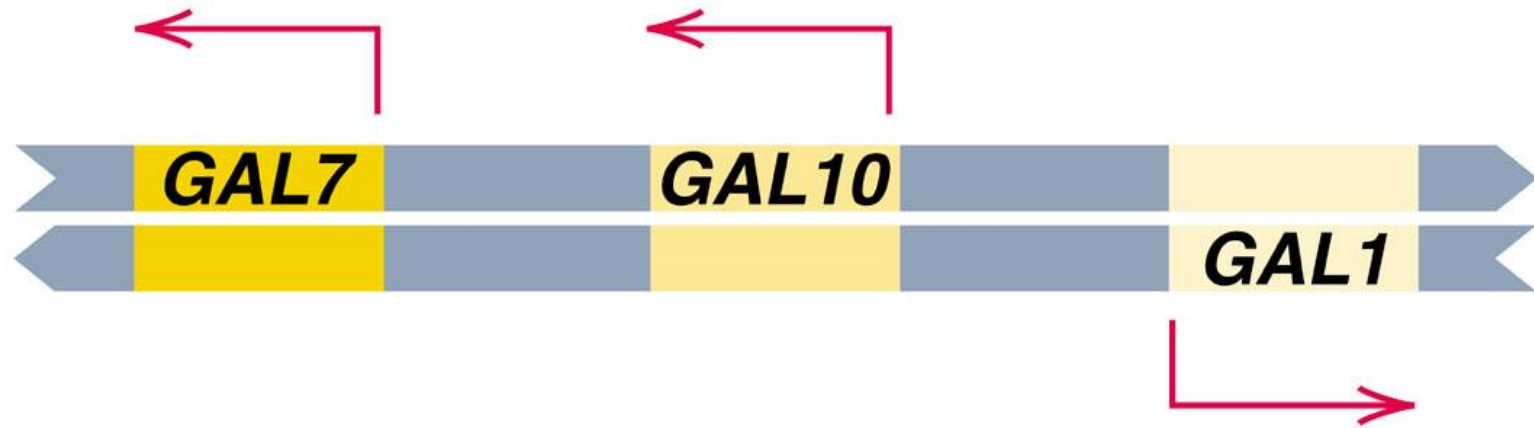
Qu'est ce qui a poussé ?

1. Attendu mais ... pas trouvé: revertants de la mutation *gal3*.

Qu'est ce qui a poussé ?

1. Attendu mais ... pas trouvé: reversion INTRAGENIQUE.
2. Souche appelée R1 qui produit les “enzymes GAL” de façon constitutive. [gal^{+const}]
-> Mutation appelée *i*-

Transcriptional orientation of 3 genes coding for enzymes important in galactose utilization in *Saccharomyces*



Hypothesis: Their synthesis is regulated by the transcription activator Gal4 protein.

Analyse du mutant R1

Souche	Activités enzymatiques K, E. T Après croissance sur		
	Lactate	Galactose	
wt	-	+	[gal ⁺ Ind]
gal3	-	+lent	[gal ⁺ lent]
R1	+	+	[gal ⁺ const]

Milieu Glycerol Lactate avec ou sans Galactose car cela évite la répression par le Glucose

Analyse du mutant R1

Souche	Activités enzymatiques K, E. T Après croissance sur milieu		
	Lactate	Galactose	
Wt	-	+	[gal ⁺ Ind]
gal3	-	+/-	[gal ⁺ lent]
R1	+	+	[gal ⁺ const]
Diploide R1xWT	-	+	[gal ⁺ Ind]

Analyse du mutant R1

Souche	Activités enzymatiques K, E. T Après croissance sur milieu		
	Lactate	Galactose	
Wt	-	+	[gal ⁺ Ind]
gal3	-	+/-	[gal ⁺ lent]
R1	+	+	[gal ⁺ const]
Diploide R1xWT	-	+	[gal ⁺ Ind]

gal3-/GAL3+, i-/ I+ /

Analyse du mutant R1

Souche	Activités enzymatiques K, E. T Après croissance sur milieu		
	Lactate	Galactose	
Wt	-	+	[gal ^{+Ind}]
gal3	-	+/-	[gal ^{+lent}]
R1	+	+	[gal ^{+const}]
Diploide R1xWT	-	+	[gal ^{+Ind}]

gal3-/GAL3+, i-/ I+ /

[gal^{+Ind}]->effet recessif de i- par rapport à I+

[gal^{+const}]

gal3⁻, i⁻ R1 x WT *GAL3⁺, I⁺*

[gal^{+Ind}]



gal3⁻/GAL3⁺, i⁻/I⁺

[gal^{+Ind}]

[gal⁺const]

gal3⁻, i⁻ R1 x WT *GAL3⁺, I⁺*

[gal⁺Ind]



gal3⁻/GAL3⁺, i⁻/I⁺



2 [gal⁺const]

2 [gal⁺Ind]

2 [gal⁺lent]

2 [gal⁺const]

1 [gal⁺lent]

2 [gal⁺const]

1 [gal⁺Ind]

[gal⁺const]

gal3⁻, i⁻ R1 x WT *GAL3⁺, I⁺*

[gal⁺Ind]



gal3⁻/GAL3⁺, i⁻/I⁺



2 [gal⁺const]

gal3⁻, i⁻

2 [gal⁺Ind]

GAL3⁺, I⁺

[gal⁺lent]

gal3⁻, I⁺

2 [gal⁺const]

GAL3⁺, i⁻

1 [gal⁺lent]

gal3⁻, I⁺

2 [gal⁺const]

gal3⁻, i⁻

GAL3⁺, i⁻

1 [gal⁺Ind]

GAL3⁺, I⁺

[gal⁺const]

gal3⁻, i⁻ R1 x WT *GAL3⁺, I⁺*

[gal⁺Ind]



gal3⁻/GAL3⁺, i⁻/I⁺



2 [gal⁺const]

gal3⁻, i⁻

2 [gal⁺Ind]

GAL3⁺, I⁺

2 DP

[gal⁺lent]

gal3⁻, I⁺

2 [gal⁺const]

GAL3⁺, i⁻

2 DR

1 [gal⁺lent]

gal3⁻, I⁺

2 [gal⁺const]

gal3⁻, i⁻

GAL3⁺, i⁻

1 [gal⁺Ind]

GAL3⁺, I⁺

8 T

[gal⁺const]

gal3⁻, i⁻ R1 x WT *GAL3⁺, I⁺*

[gal⁺Ind]



gal3⁻/GAL3⁺, i⁻/I⁺



2 [gal⁺const]

gal3⁻, i⁻

2 [gal⁺Ind]

GAL3⁺, I⁺

2 DP

=

[gal⁺lent]

gal3⁻, I⁺

2 [gal⁺const]

GAL3⁺, i⁻

2 DR

1 [gal⁺lent]

gal3⁻, I⁺

2 [gal⁺const]

gal3⁻, i⁻

GAL3⁺, i⁻

1 [gal⁺Ind]

GAL3⁺, I⁺

8 T

GAL3⁺, GAL4⁺, i⁻ x *GAL3⁺, gal4⁻, I⁺*



2n

[gal^{+Ind}]

GAL3⁺/ GAL3⁺, GAL4⁺/ gal4⁻, i⁻ / I⁺

Analyse des tétrades

- 2 $GAL4^+, i^-$

[gal⁺const]

- 2 $gal4^-, I^+$

[gal⁻]

- 2 $GAL4^+, I^+$

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-, i^-$

[gal⁻]

- $GAL4^+, i^-$

[gal⁺const]

- $GAL4^+, I^+$

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-, I^+$

[gal⁻]

- $gal4^-, i^-$

[gal⁻]

6

6

22

Analyse des tétrades

- 2 $GAL4^+, i^-$

[gal⁺const]

- 2 $gal4^-, I^+$

[gal⁻]

- 2 $GAL4^+, I^+$

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-, i^-$

[gal⁻]

- $GAL4^+, i^-$

[gal⁺const]

- $GAL4^+, I^+$

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-, I^+$

[gal⁻]

- $gal4^-, i^-$

[gal⁻]

Qu'en concluez et vous ? (au moins deux choses importantes)

6

6

22

Gal4-, i- ?

- 2 *GAL4*⁺, *i*⁻

[gal⁺const]

- 2 *gal4*⁻, *I*⁺

[gal⁻]

- 2 *GAL4*⁺, *I*⁺

[gal⁺Ind]

- 2 *gal4*⁻, *i*⁻

[gal⁻]

- *GAL4*⁺, *i*⁻

[gal⁺const]

- *GAL4*⁺, *I*⁺

[gal⁺Ind]

- 2 *gal4*⁻, *I*⁺

[gal⁻]

- *gal4*⁻, *i*⁻

[gal⁻]

6 DP

Indépendance
génétique

6 DR

22 T

Gal4-, i- ?

- 2 $GAL4^+$, i^-

[gal⁺const]

- 2 $gal4^-$, I^+

[gal⁻]

- 2 $GAL4^+$, I^+

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-$, i^-

[gal⁻]

Epistasie

- $GAL4^+$, i^-

[gal⁺const]

- $GAL4^+$, I^+

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-$, I^+

[gal⁻]

- $gal4^-$, i^-

[gal⁻]

6 DP

6 DR

22 T

Gal4-, i- ?

- 2 $GAL4^+$, i^-

[gal⁺const]

- 2 $gal4^-$, I^+

[gal⁻]

- 2 $GAL4^+$, I^+

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-$, i^-

[gal⁻]

Epistasie

- $GAL4^+$, i^-

[gal⁺const]

- $GAL4^+$, I^+

[gal⁺Ind]

- 2 $gal4^-$, I^+

[gal⁻]

- $gal4^-$, i^-

[gal⁻]

6 DP

Indépendance
génétique

6 DR

22 T

Conclusions

- Gal80- or i- = mutation
 - Effet récessif pr effet I⁺
 - Activatrice

Perte de fonction d'un répresseur/inhibiteur

Conclusions

- gal80 or i = mutation
 - Effet récessif pr effet I⁺
 - Activatrice
- gal4^{LOF} is epistatic on gal80^{LOF}
??

Perte de fonction d'un répresseur/inhibiteur

I⁺ gene is called *GAL80* and act as a repressor of *GAL4*

- gal80 or i = mutation
 - Effet récessif pr effet I⁺
 - Activatrice
- gal4^{LOF} is epistatic on gal80^{LOF}

Perte de fonction d'un répresseur/inhibiteur

GAL80 –I GAL4 -> GAL1, 10, 7

OU

I⁺ gene is called *GAL80* and act as a repressor of *GAL4*

- *gal80* or *i* = mutation
 - Effet récessif pr effet *I*⁺
 - Activatrice
- *gal4*^{LOF} is epistatic on *gal80*^{LOF}

Perte de fonction d'un répresseur/inhibiteur

GAL80 –| *GAL4* → *GAL1*, 10, 7

OU

GAL80 –| *GAL1*, 10, 7 <- *GAL4*

Conclusion

“The inducibility in gene in yeast fits the description proposed by Monod and Jacob for regulator genes. ... By analogy with the lactose system in *E. coli*, the galactose-inducible state in yeast corresponds to the production of a repressor, due to *I+*, while the constitutive state, due to *i-*, represents a failure to repression.”

Conclusion (suite)

“*GAL4* apparently produces a cytoplasmic product required for the expression of *GAL1*, *GAL7*, and *GAL10*.

The role of the repressor GAL80 might be to prevent the **synthesis** or the **activity** of this product.”

3- Recherche mutant [gal^{+Con}] « dominant »
et on recommence ...
mais avec une grosse différence...

3- Recherche mutant [gal^{+Con}] « dominant »
et on recommence ...
mais avec une grosse différence...

diploide *gal3⁻/gal3⁻* [gal^{+lent}] [gal^{+lent}]

3- Recherche mutant $[gal^{+Con}]$ « dominant »
et on recommence ...
mais avec une grosse différence...

diploide $gal3^- / gal3^-$ $[gal^{+lent}]$

$[gal^{+lent}]$



Mutagenèse

3- Recherche mutant $[gal^{+Con}]$ « dominant » et on recommence ... mais avec une grosse différence...

diploide $gal3^- / gal3^-$ $[gal^{+lent}]$

$[gal^{+lent}]$



Mutagenèse



$[gal^{+const}]$

3- Recherche mutant $[gal^{+Con}]$ « dominant » et on recommence ... mais avec une grosse différence...

diploïde $gal3^- / gal3^-$ $[gal^{+lent}]$

$[gal^{+lent}]$



Mutagenèse



Croissance sur **galactose**

$[gal^{+const}]$

-> souche “révertante” qui poussent bien

Appelée R2d

R2d sporulation

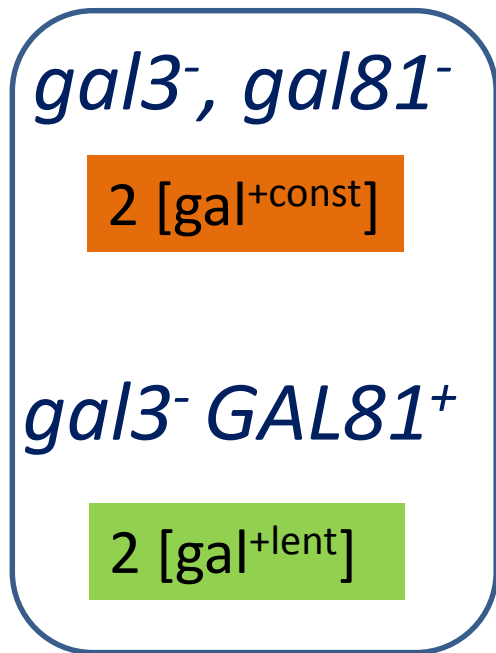
- Toutes les tétrades sont

2 [gal⁺const]

2 [gal⁺lent]

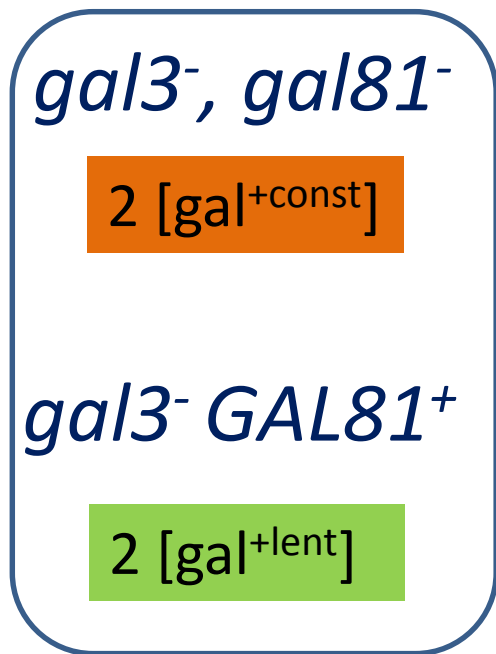
Qu'est ce que
cela veut dire
???

R2d: $gal3^- / gal3^-$, $GAL81^+ / gal81^-$



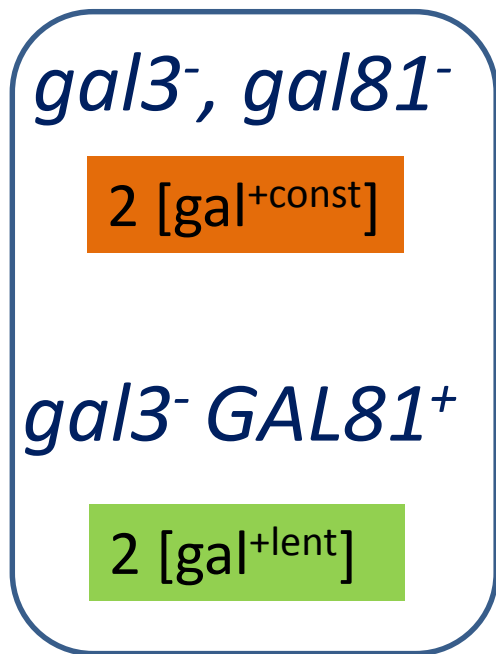
- Une seule mutation en jeu

R2d: $gal3^- / gal3^-$, $GAL81^+ / gal81^-$



- Une seule mutation en jeu
- R2d hétérozygote

R2d: $gal3^- / gal3^-$, $GAL81^+ / gal81^-$



- Une seule mutation en jeu
- R2d hétérozygote
- Effet dominant de la mutation $gal81$...

Analyse du mutant gal81

- *gal3⁻, gal81⁻ x wt: GAL3⁺, GAL81⁺*

2 [gal^{+lent}]

[gal^{+Ind}]



2n



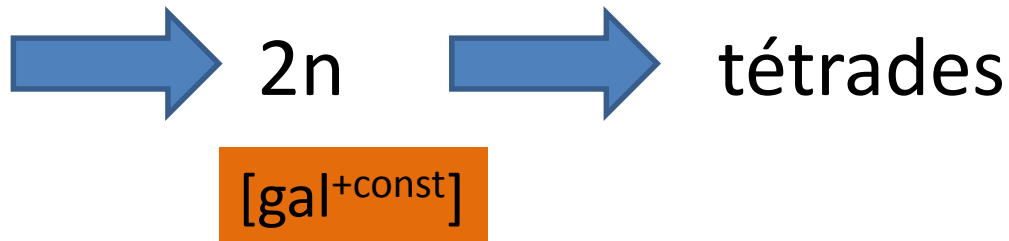
spores entre autres

[gal^{+const}]

GAL3⁺, gal81⁻

Analyse du mutant gal81

- $\overbrace{GAL4^+, gal81^-}^{[gal^{+const}]} \times \overbrace{gal4^-, GAL81^+}^{[gal^-]}$



$GAL4^+/gal4^-, gal81^-/GAL81^+$

• 2

[gal⁺const]

• 2

[gal⁻]

[gal⁺const]

[gal⁻]

[gal⁺Ind]

[gal⁻]

On obtient 2 types de tétrades

- 2 $GAL4^+$, $gal81^-$



[gal⁺const]

- 2 $gal4^-$, $GAL81^+$



[gal⁻]

82

- $GAL4^+$, $gal81^-$



[gal⁺const]

- $gal4^-$, $GAL81^+$



[gal⁻]

- $GAL4^+$, $GAL80^+$



[gal⁺Ind]

- $gal4^-$, $gal81^-$



[gal⁻]

1

- 2 $GAL4^+$, $gal81^-$



[gal⁺const]

- 2 $gal4^-$, $GAL81^+$



[gal⁻]

82

- $GAL4^+$, $gal81^-$

[gal⁺const]

- $gal4^-$, $GAL81^+$

[gal⁻]

- $GAL4^+$, $GAL80^+$

[gal⁺Ind]

- $gal4^-$, $gal81^-$



[gal⁻]

1

- 2 $GAL4^+$, $gal81^-$



[gal⁺const]

- 2 $gal4^-$, $GAL81^+$



[gal⁻]

- $GAL4^+$, $gal81^-$

[gal⁺const]

- $gal4^-$, $GAL81^+$

[gal⁻]

- $GAL4^+$, $GAL80^+$

[gal⁺Ind]

- $gal4^-$, $gal81^-$



Epistasie

[gal⁻]

82 DP



1 T

Liaison génétique

$$D = \frac{2}{4} \times 83 \times 100 = 0,6 \text{ CM}$$

gal81⁻ is

- a dominant mutation
- *very* tightly linked to the *GAL4* gene.

Hypothèse ?

gal81 is

- a dominant mutation
- *very* tightly linked to the *GAL4* gene.

Hypothèse ?

Gain de fonction d'un activateur qui pourrait être GAL4 ?

gal4⁻, gal81⁻ x *gal4⁺, GAL81⁺*  2n [gal⁺Ind]

$$gal4^{-}, gal81^{-} \times gal4^{+}, GAL81^{+} \longrightarrow 2n \quad [gal^{+Ind}]$$

$$\frac{gal4^{-}, gal81^{-}}{gal4^{+}, GAL81^{+}}$$

$$GAL4^{+}, gal81^{-} \times gal4^{-}, GAL81^{+} \longrightarrow 2n \quad [gal^{+const}]$$

$$\frac{GAL4^{+}, gal81^{-}}{gal4^{-}, GAL81^{+}}$$

Les devises Shadok



LA PLUS GRAVE MALADIE
DU CERVEAU C'EST DE
RÉFLÉCHIR.

Observation réfléchie

-> gal81⁻ = allèle gain de fonction de GAL4

1 [gal^{+Ind}]

gal4⁻ , *gal81⁻*

gal4⁺ , *GAL81⁺*

[gal^{+const}]

GAL4⁺ , *gal81⁻*

gal4⁻ , *GAL81⁺*

Bilan

1. Mutant récessif [gal⁻] : LOF activateur GAL4
2. Mutant dominant [gal^{Const}] GOF activateur GAL4
3. Mutant récessif [gal^{Const}] LOF répresseur/inhibiteur GAL80

In summary

L'activateur



Les cibles



L'inhibiteur



L'inducteur



In summary

L'activateur



- Mutation gal4
“effet récessif”
- Mutation gal4
“effet dominant”

-> [*gal*⁻]

-> [*gal*^{con}]

L'inhibiteur



Mutation gal80
“effet récessif”

-> [*gal*^{+const}]

**Qu'est ce que l'on pourrait
chercher d'autre et comment ?**

4- mutant dominant [gal⁻]

À partir d'un diploïde

Allèle gal80^s = “super-repressor” allelic form of *GAL80* does not respond to galactose.

Overexpression of Gal4p can overcome its effect! That is, *GAL4 GAL80^s* is uninducible, but *GAL4^{high copy} GAL80S* is inducible (voir plus loin).

5- Modèles

L'activateur



Les cibles



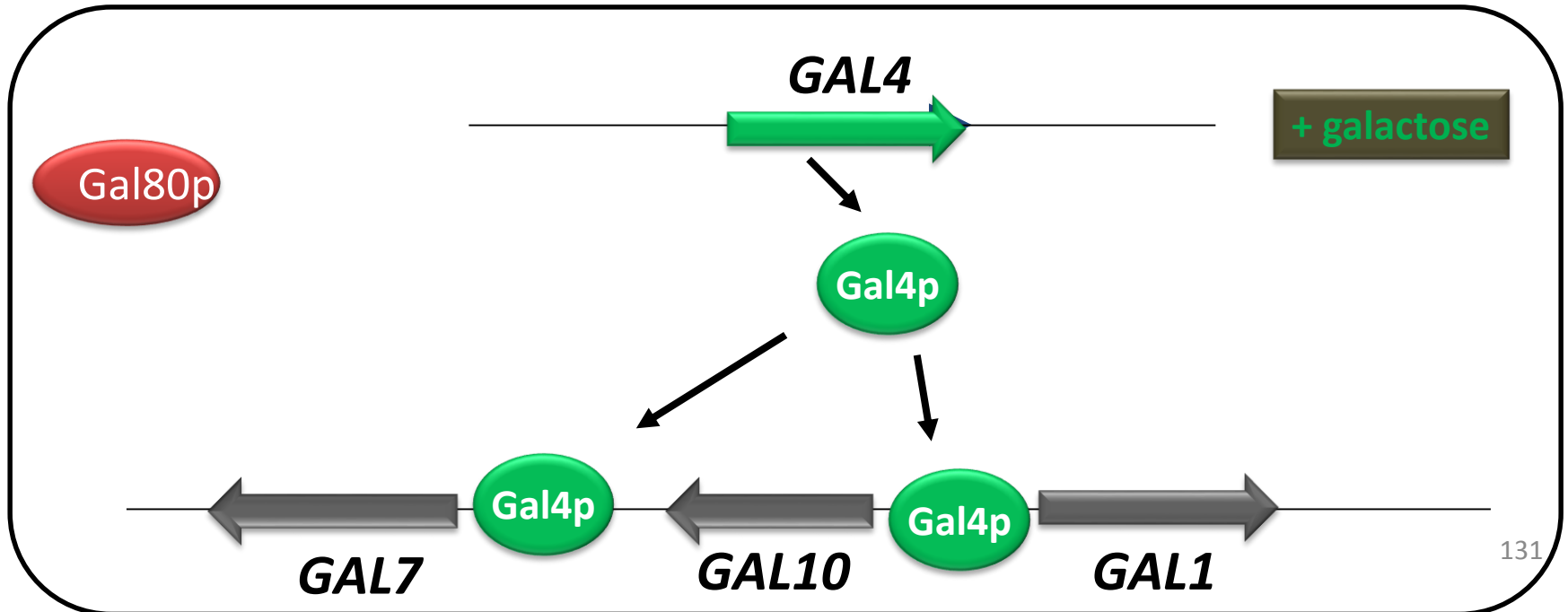
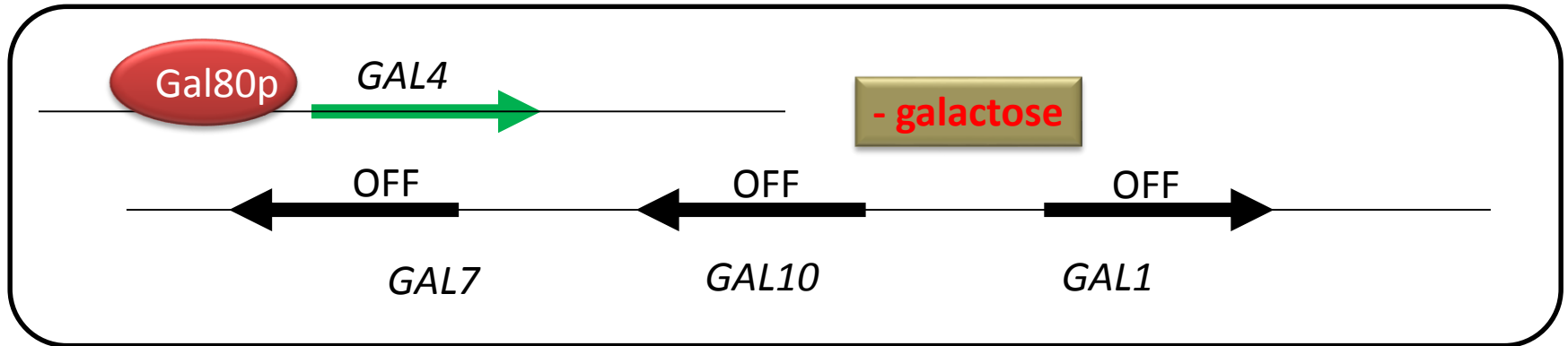
L'inhibiteur



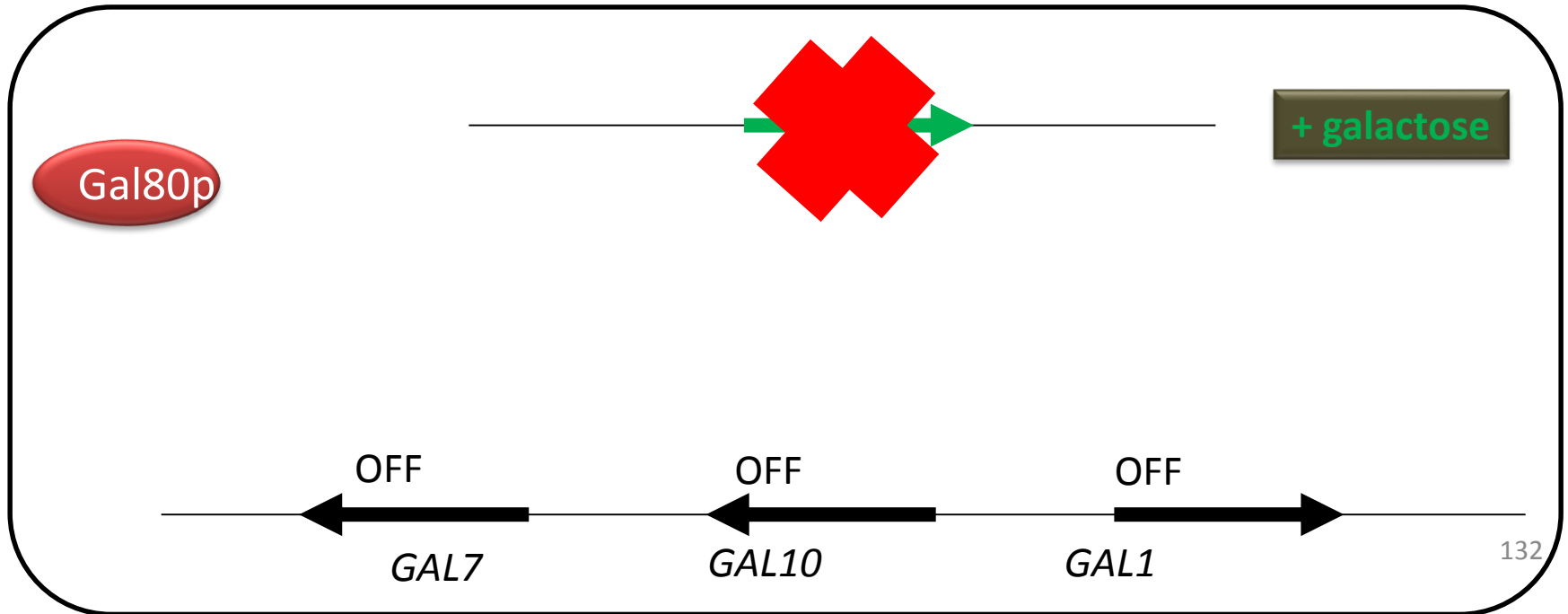
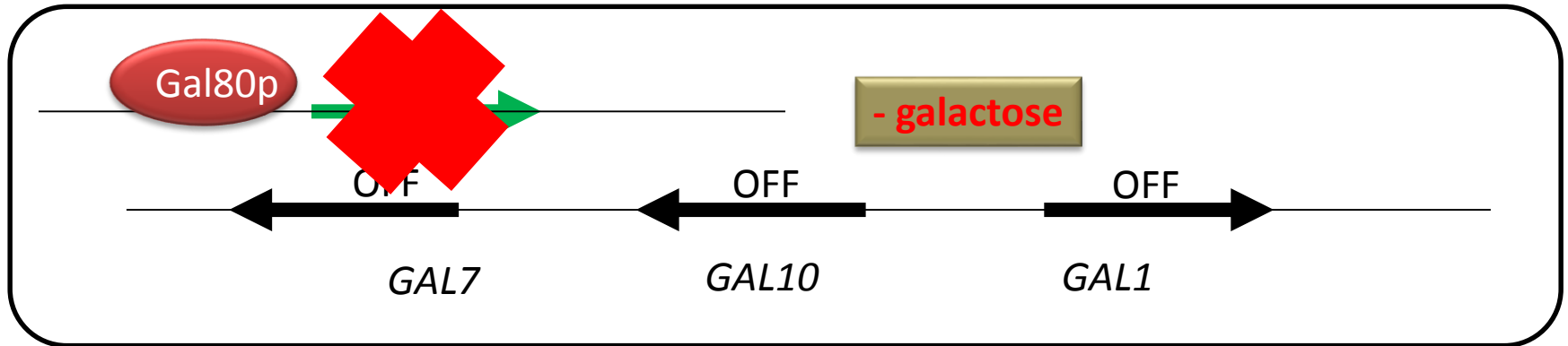
L'inducteur



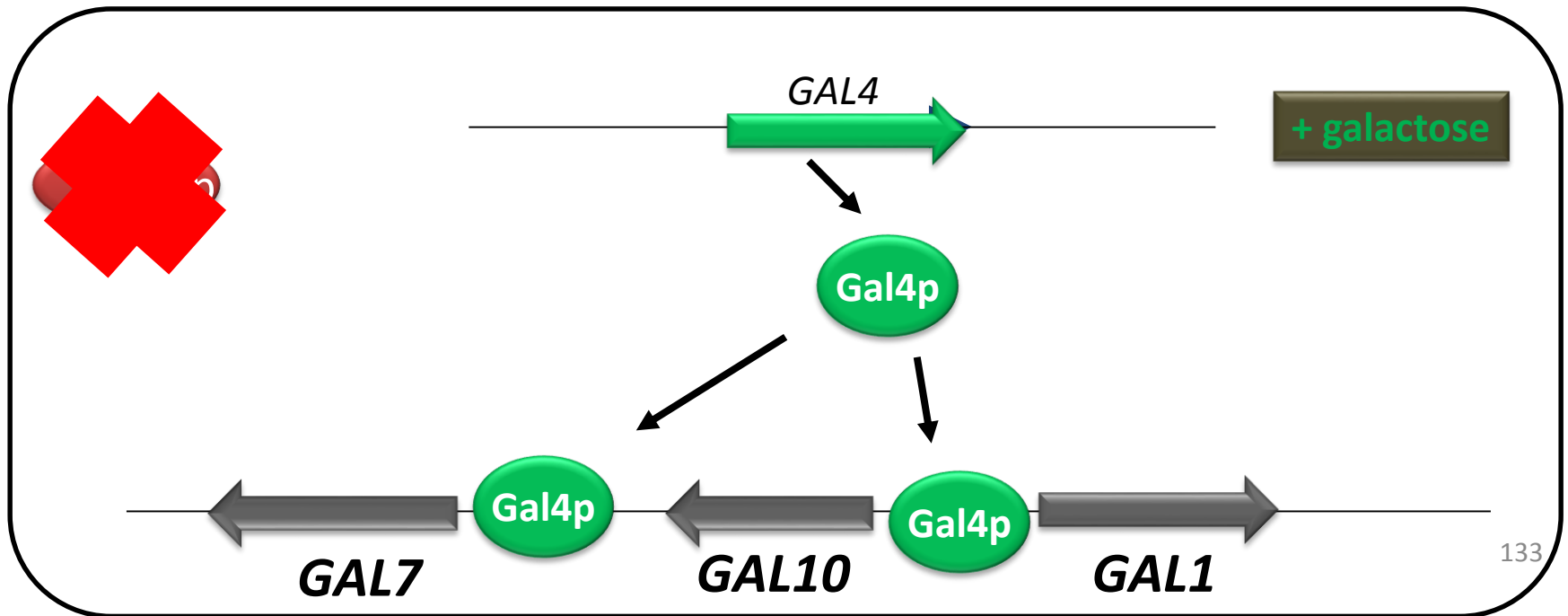
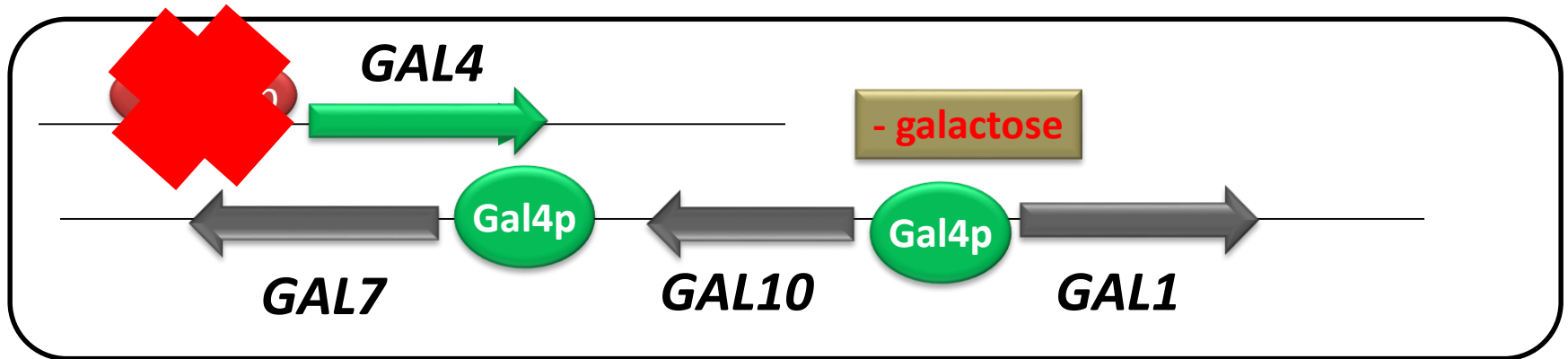
Un premier modèle



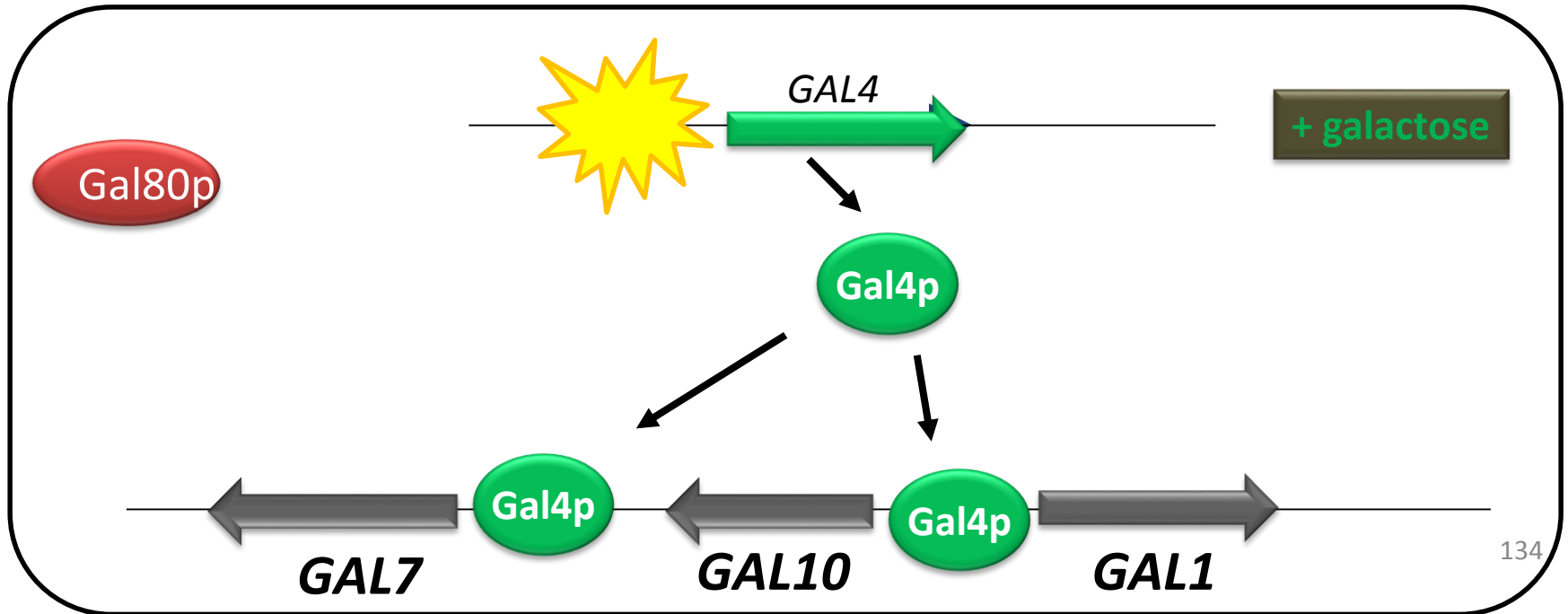
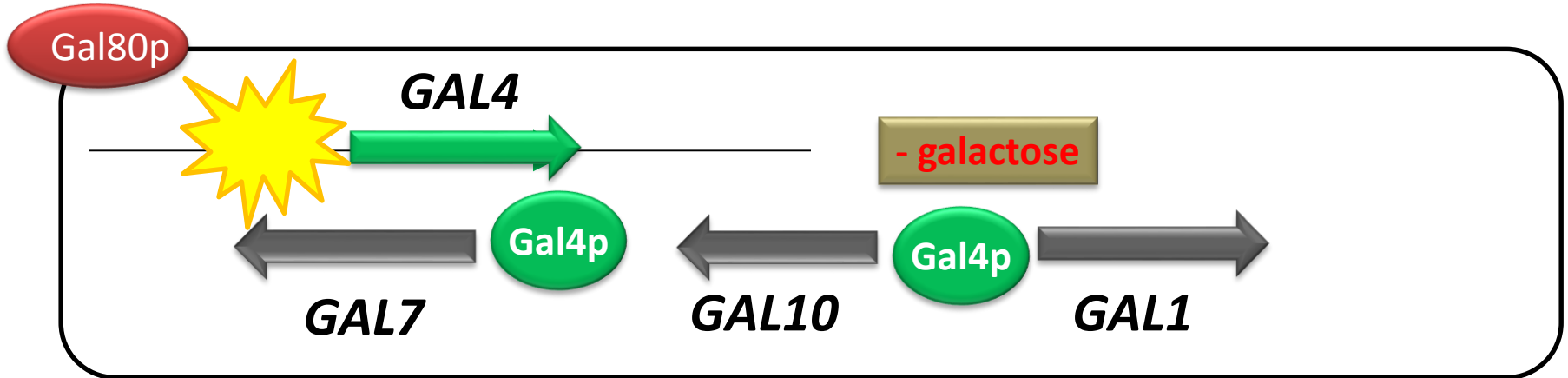
gal4 LOF



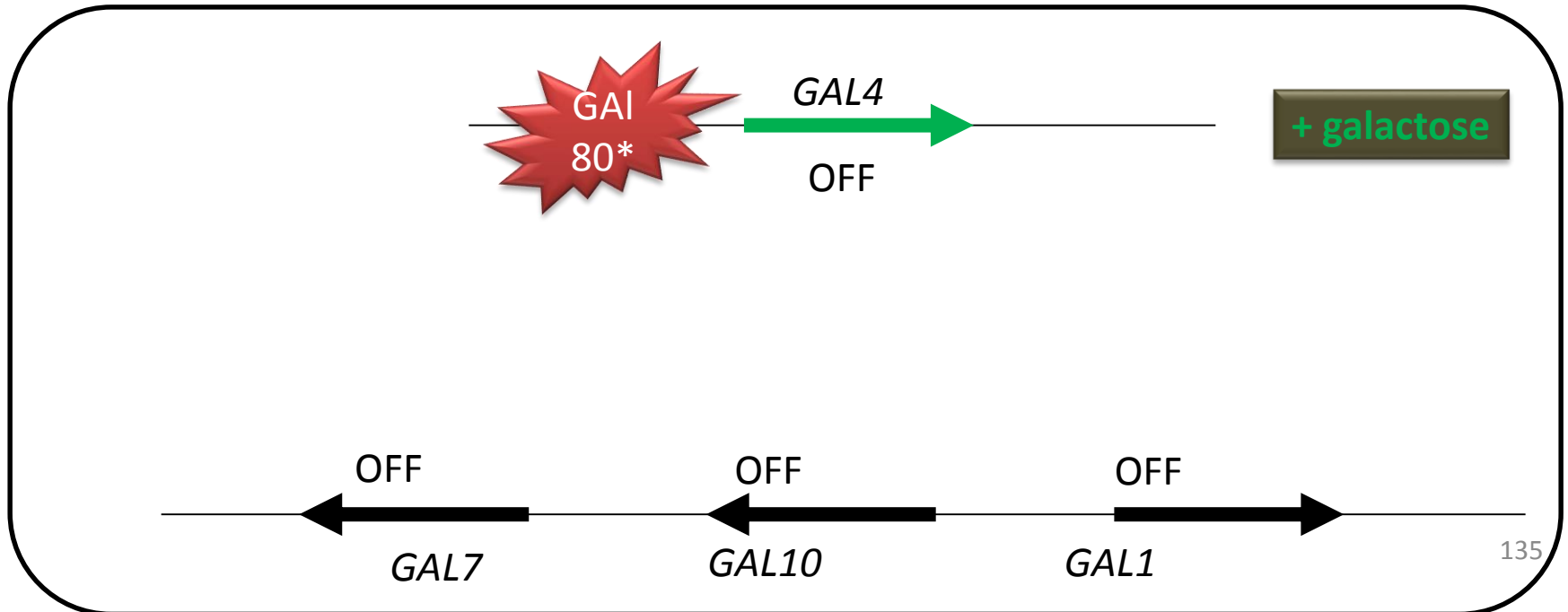
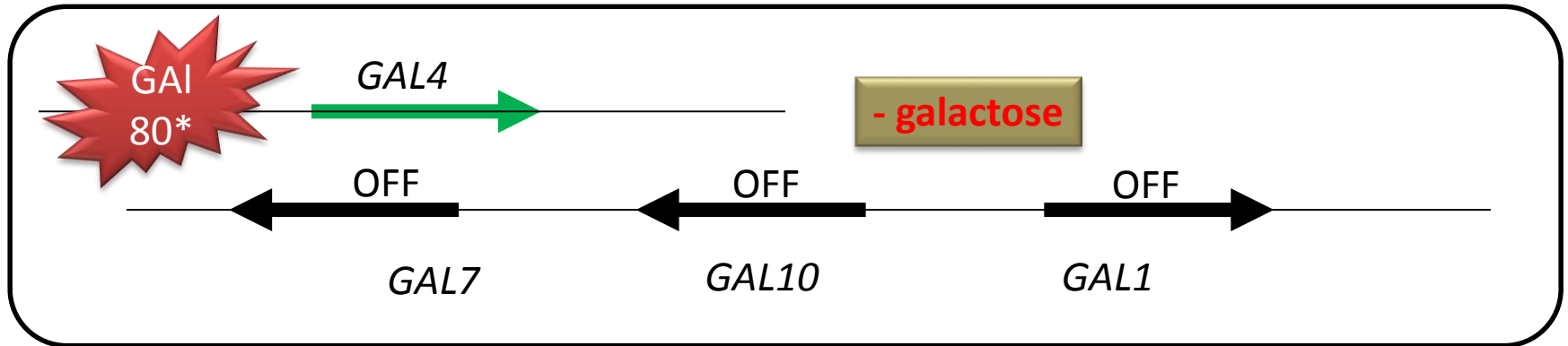
gal80 LOF



gal4 GOF



gal80 GOF



6- GAL4 et GAL80 cloning

Un petit détour méthodologique:

- La transgénèse chez la levure
 - répllicative
 - intégrative

La transgénèse répllicative

Les plasmides :

Navettes *E. coli* / levure

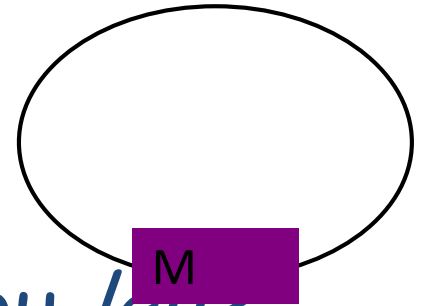
- Marqueurs
- Origine de réplication
- > stabilité et nombre de copies

Marqueurs

Auxotrophie

URA3, ADE2, TRP1 ou LEU2

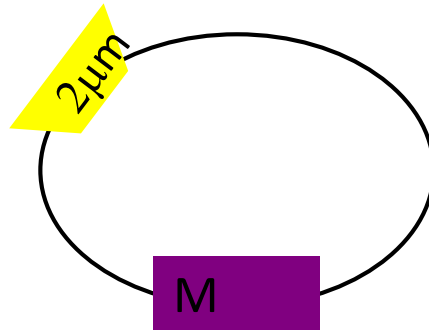
Souches *ura3-*, *ade1-*, *trp1-* ou *leu2-*



Résistance drogues

Plasmides réplicatifs “very high copy number”

- De type 2 micron
 - > ori du plasmide endogène 2micron



Copies **multiples** (très haut nombre >20),

Réplication autonome (épisode)

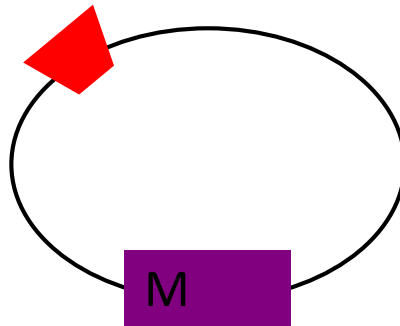
Si pas sélection:

Instabilité mitotique

Mauvaise transmission méiotique

Plasmides réplcatifs “high copy number”

- De type ARS
 - > ARS (Autonomous replication Sequence)



Copies **multiples**,

Réplication autonome (épisode)

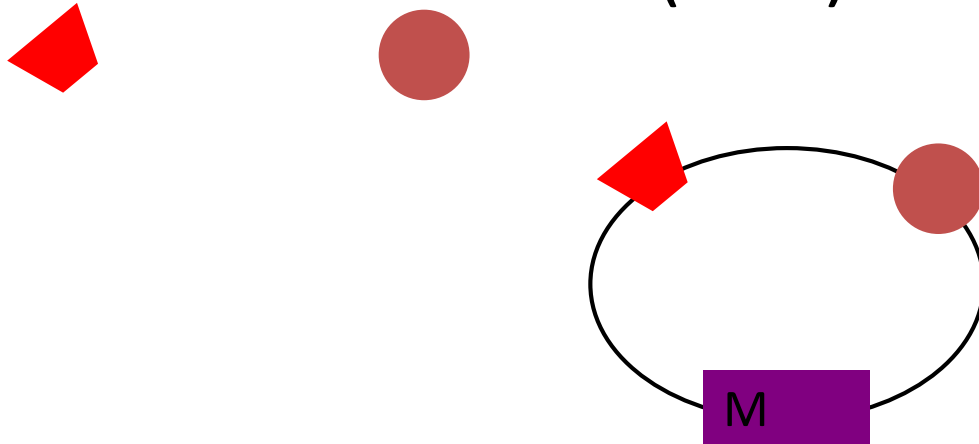
Si pas sélection:

70% **stabilité** mitotique

Mauvaise transmission méiotique (30% de 2+/2-)

Plasmides réplcatifs “low copy number”

- ARS + centromère (CEN)



Copies: environ 1

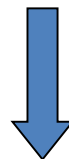
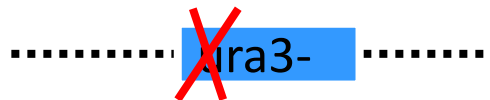
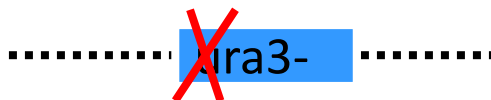
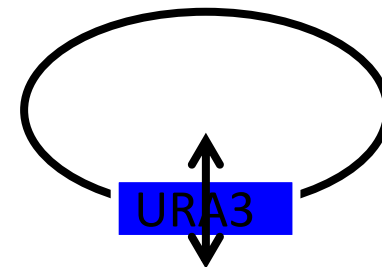
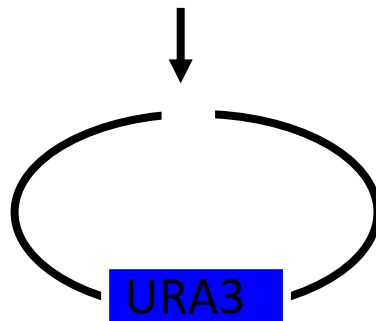
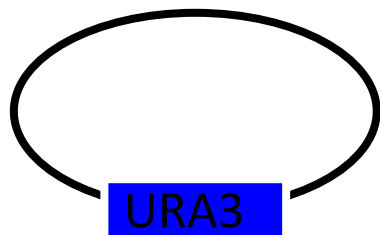
Réplication autonome (épisode)

Si pas sélection:

95 % **stabilité** mitotique

Transmission méiotique : 95 % 2+/2-

La transgénèse intégrative

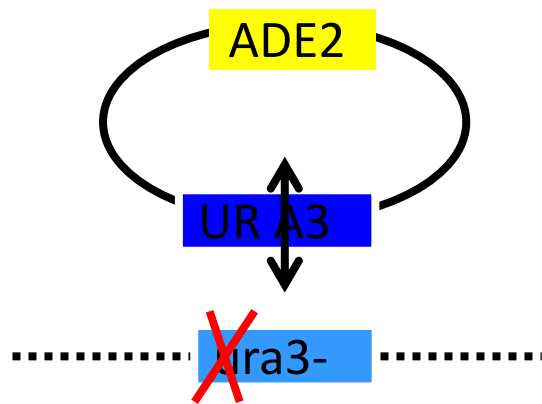


Transformants (ura+) ?

non

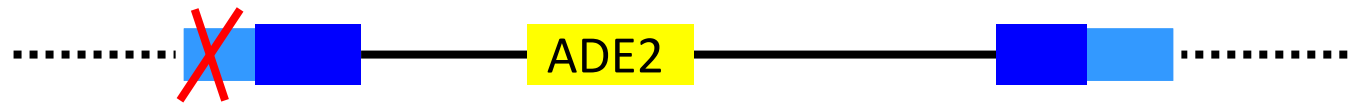
non

oui



Analyse des transformants (ura+)

(Ura+, Ade+)



Réparation DSB + intégration (crossing-over)

(Ura+, Ade-)

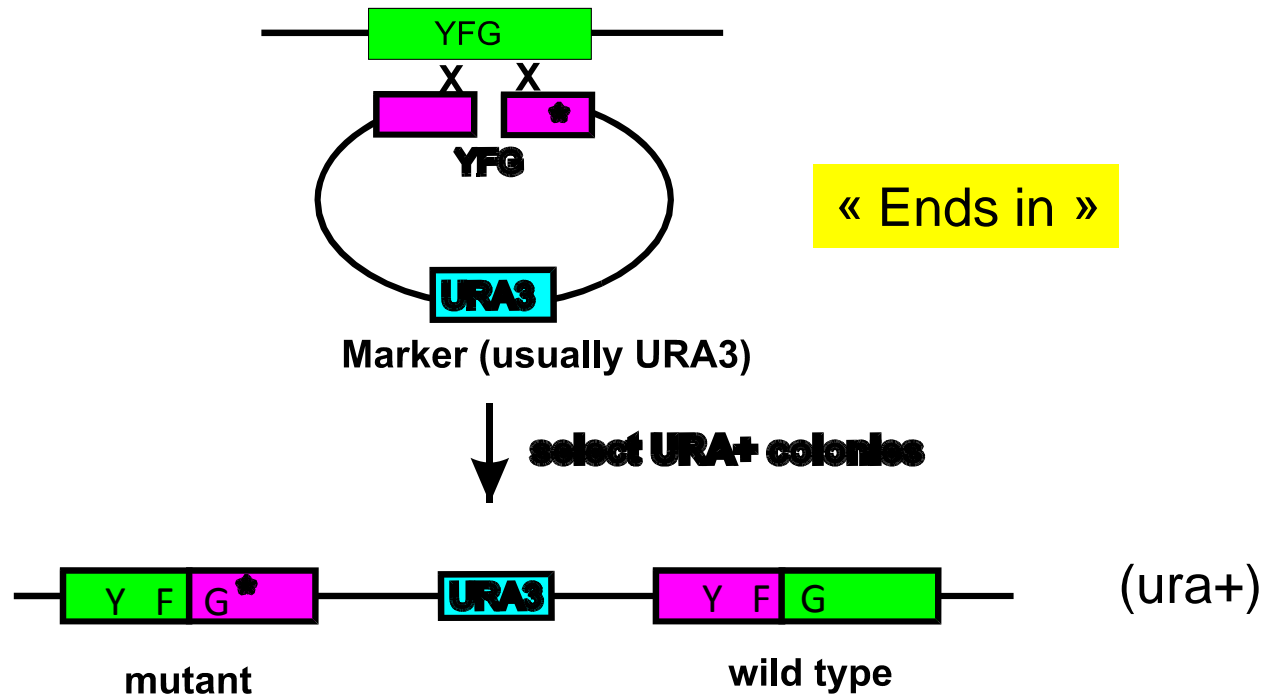


conversion génique

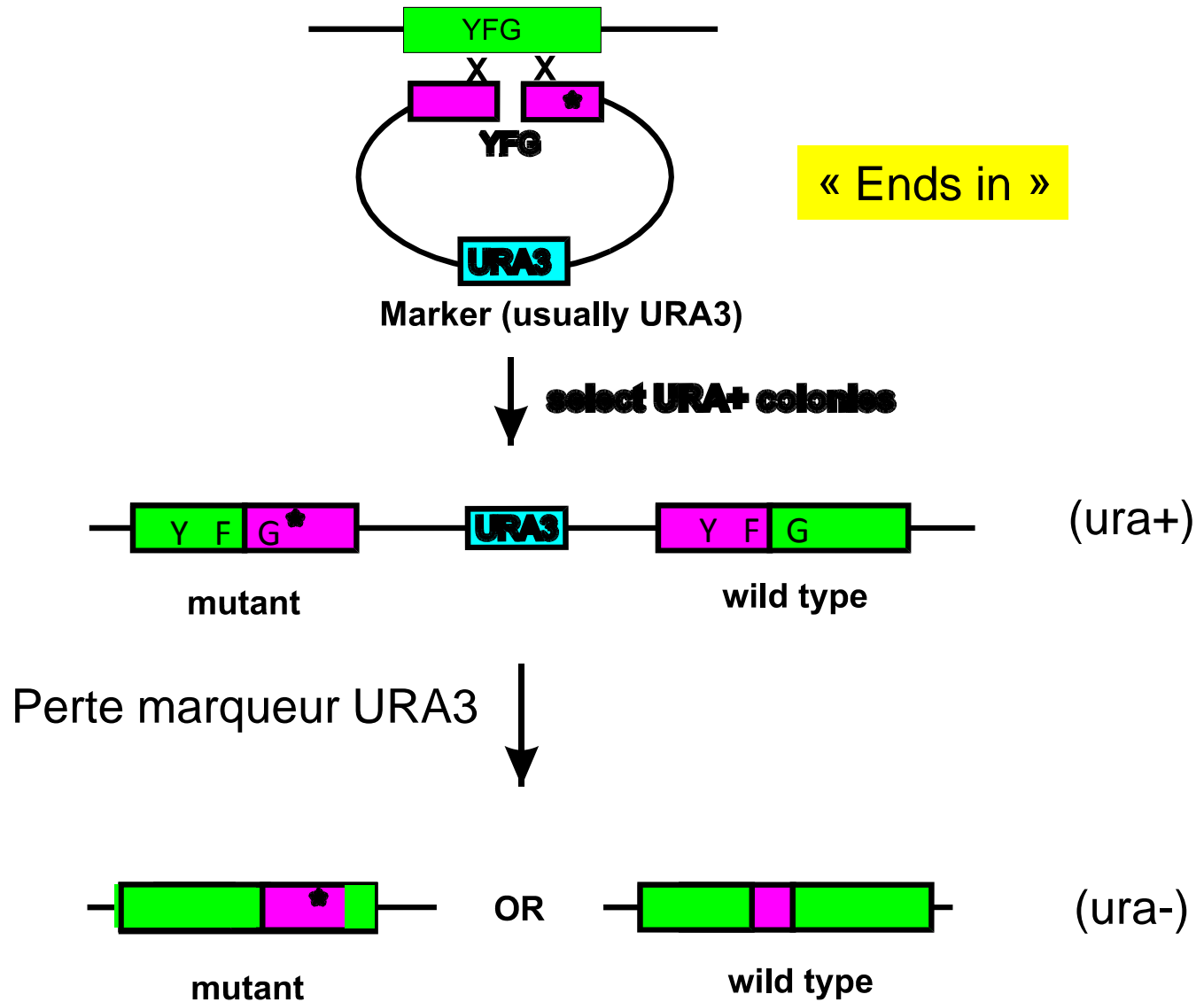
Applications : transgénèse par recombinaison

- Insertion
- Remplacement
- Clonage allèles (gap repair)

TWO-STEP GENE REPLACEMENT



TWO-STEP GENE REPLACEMENT



ONE STEP GENE REPLACEMENT

chromosomal copy

YFG

« Ends out »

X

X

URA3

cloned copy (introduced as linear DNA)

may contain YFG sequences with mutation,
a marker gene, or any sequence of interest



URA3

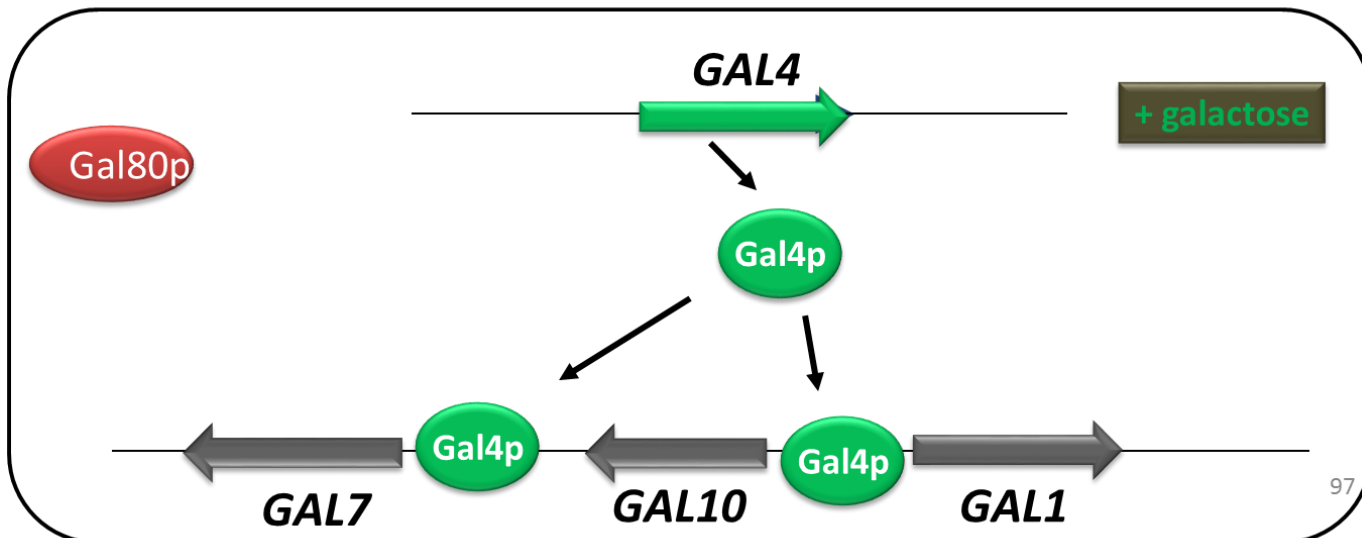
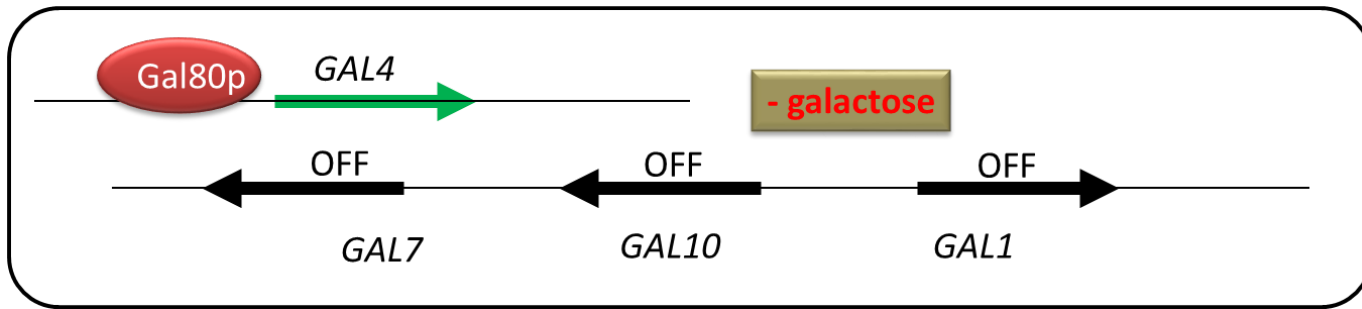
(ura+)

chromosomal integrant

(must have strategy to select or screen for integrants)

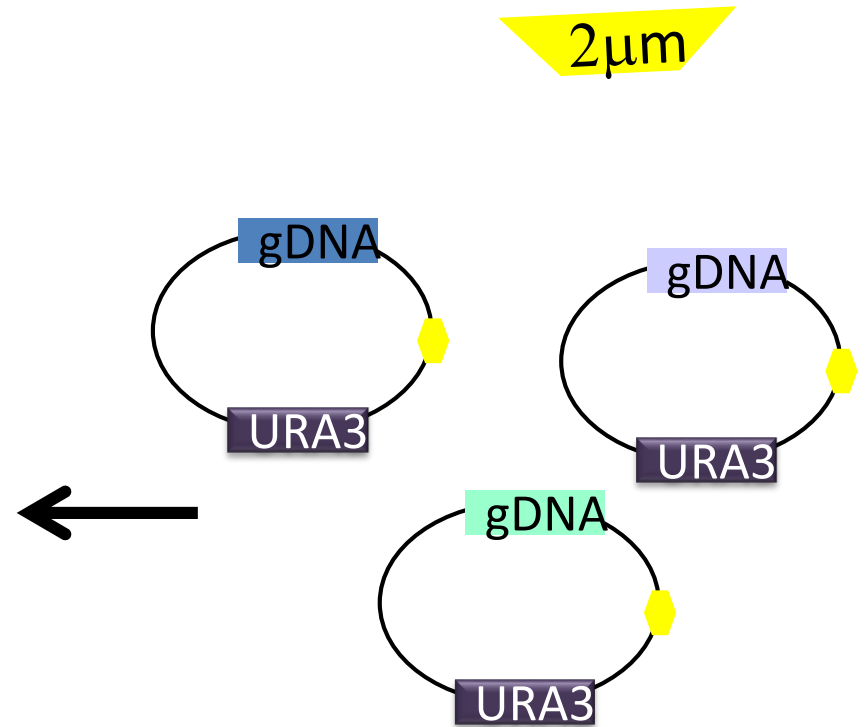
Back to our story

GAL4 et GAL80 cloning

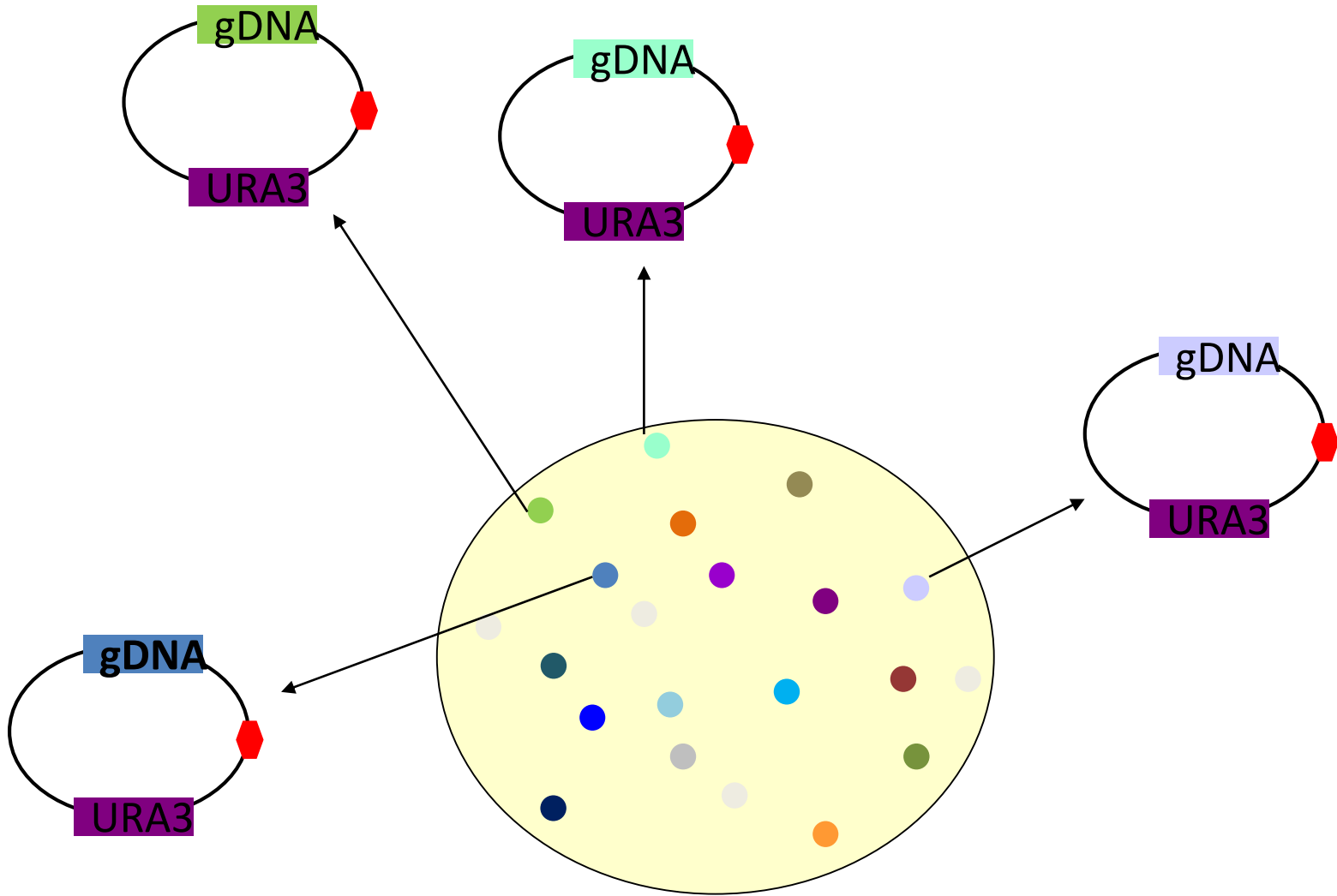


GAL 4 cloning

Souche gal4-, ura3- 52
[Ura-, Gal-]



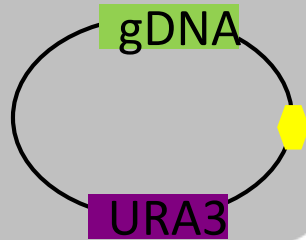
Banque d'ADN génomique
d'une souche de levure wt



Milieu complet glucose sans URA

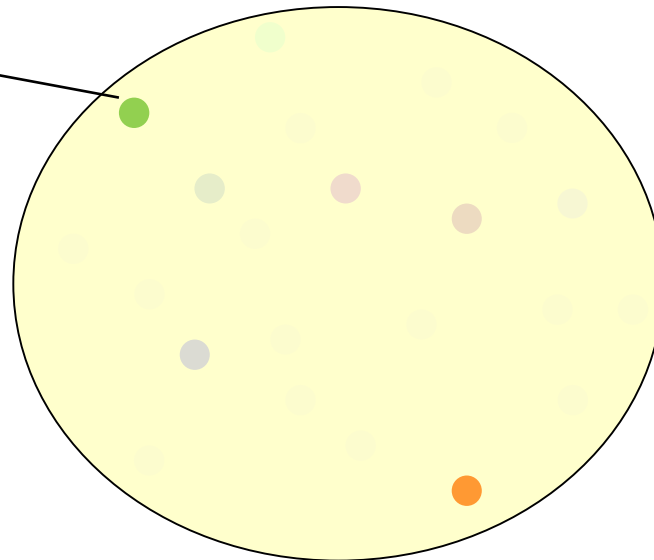
-> Sélection Clones [Ura⁺]

Souche gal4-, ura3- 52



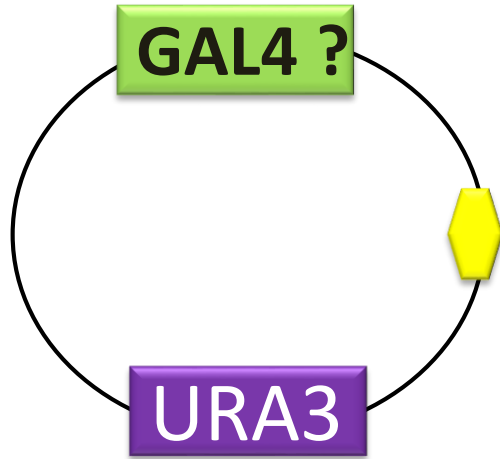
[Ura+, Gal+]

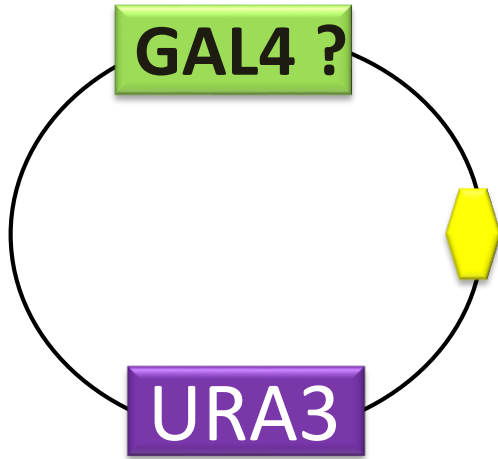
Réplique velours



Milieu complet galactose sans URA

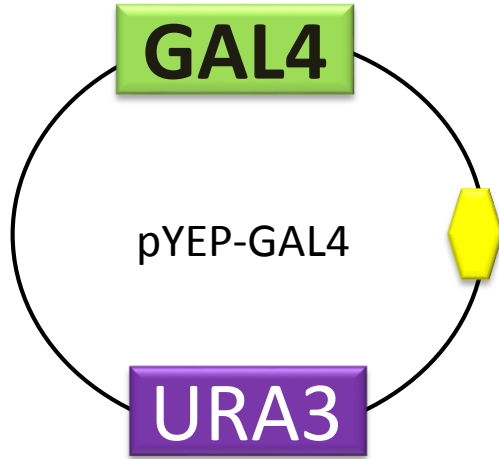
Sélection Clones [Ura+, Gal+]





Comment être sûr.e que l'on a cloné le bon gène ???

GAL4 overexpression

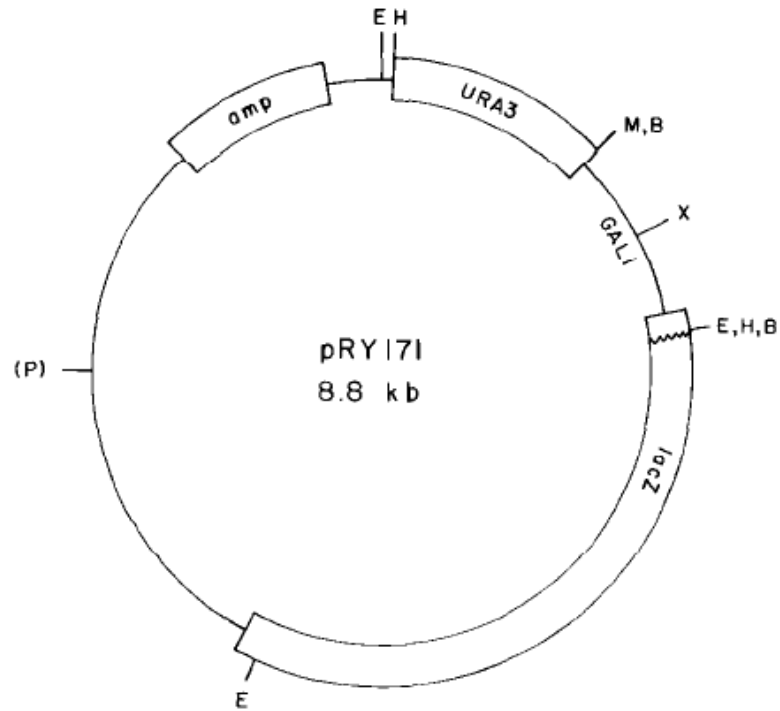


strain	no galactose	galactose
No plasmid	9	160
Empty pYEP	5	140
pYEP-GAL4	92	150
GAL7 activity		

GAL4 disruption

- Comment faire ?

GAL80 Cloning

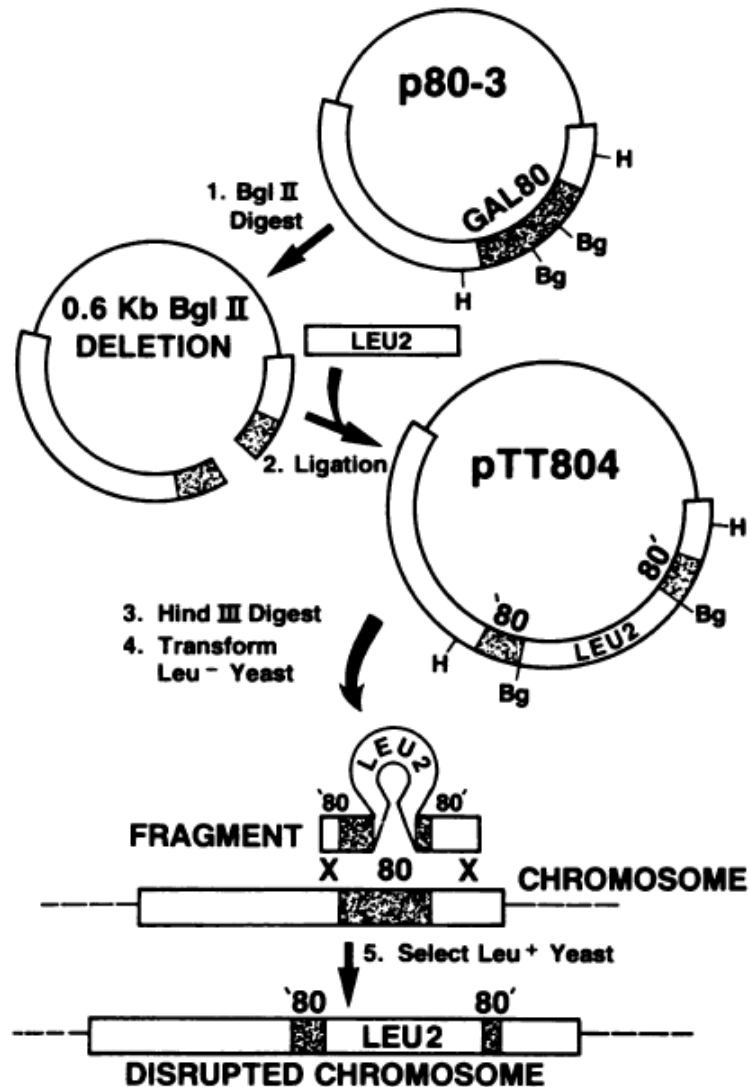


Intégration at GAL1 locus

β -Galactosidase activity of *GAL80* and *gal80* yeast strains transformed with pRY171 and grown in minimal selective media containing various carbon sources

Strain	Relevant genotype	Units β -galactosidase activity			
		Glucose	Glucose + Galactose	Galactose	Glycerol + Ethanol
DBY745	<i>GAL80</i>	0	10	1330	0
RY3-11C	<i>gal80</i>	19	41	2290	1510

GAL80 disruption



Genotype	Glycerol-lactate	
	Kinase	α -Galactosidase
Wild type	<0.3	1.5 (0.7–2.1)
<i>gal80-D</i>	290.8	231.8

Gal4p is synthesized at all times, irrespective of the presence of galactose *Yasuji Oshima*

Les protéines GAL4p and Gal80p interagissent physiquement *Zenke et al 1996*



The initial GAL4/GAL80 model was
wrong
(correct between 1966-1978)

A better model

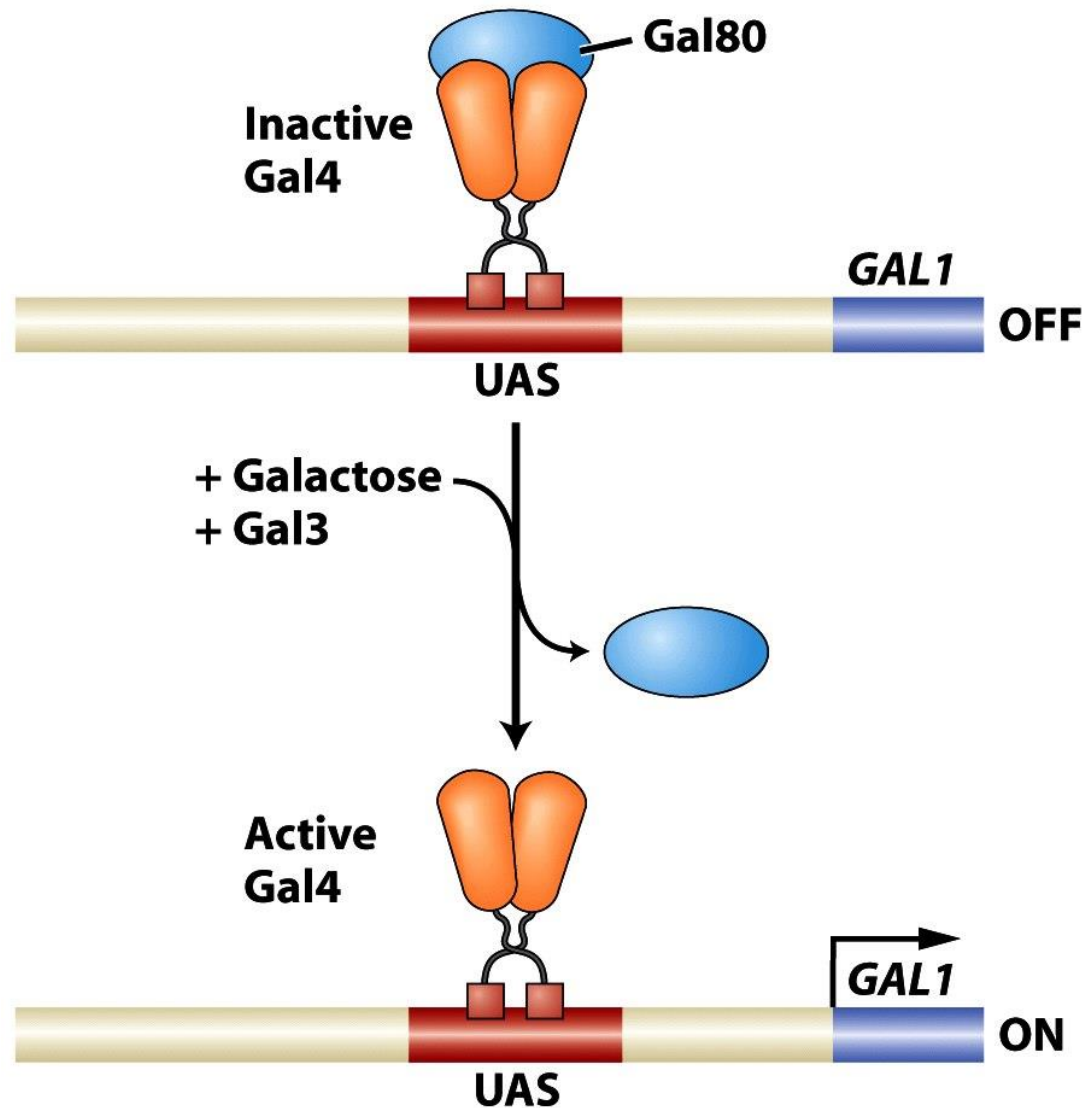
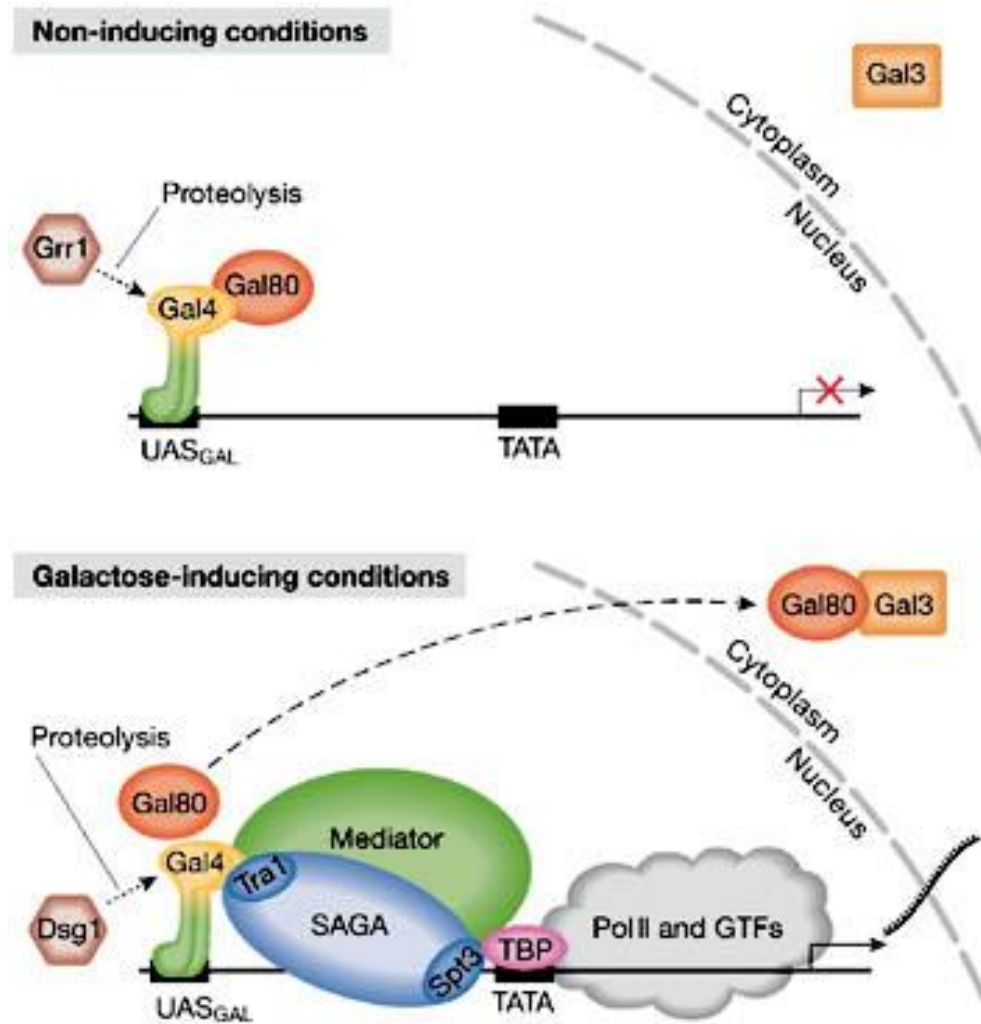


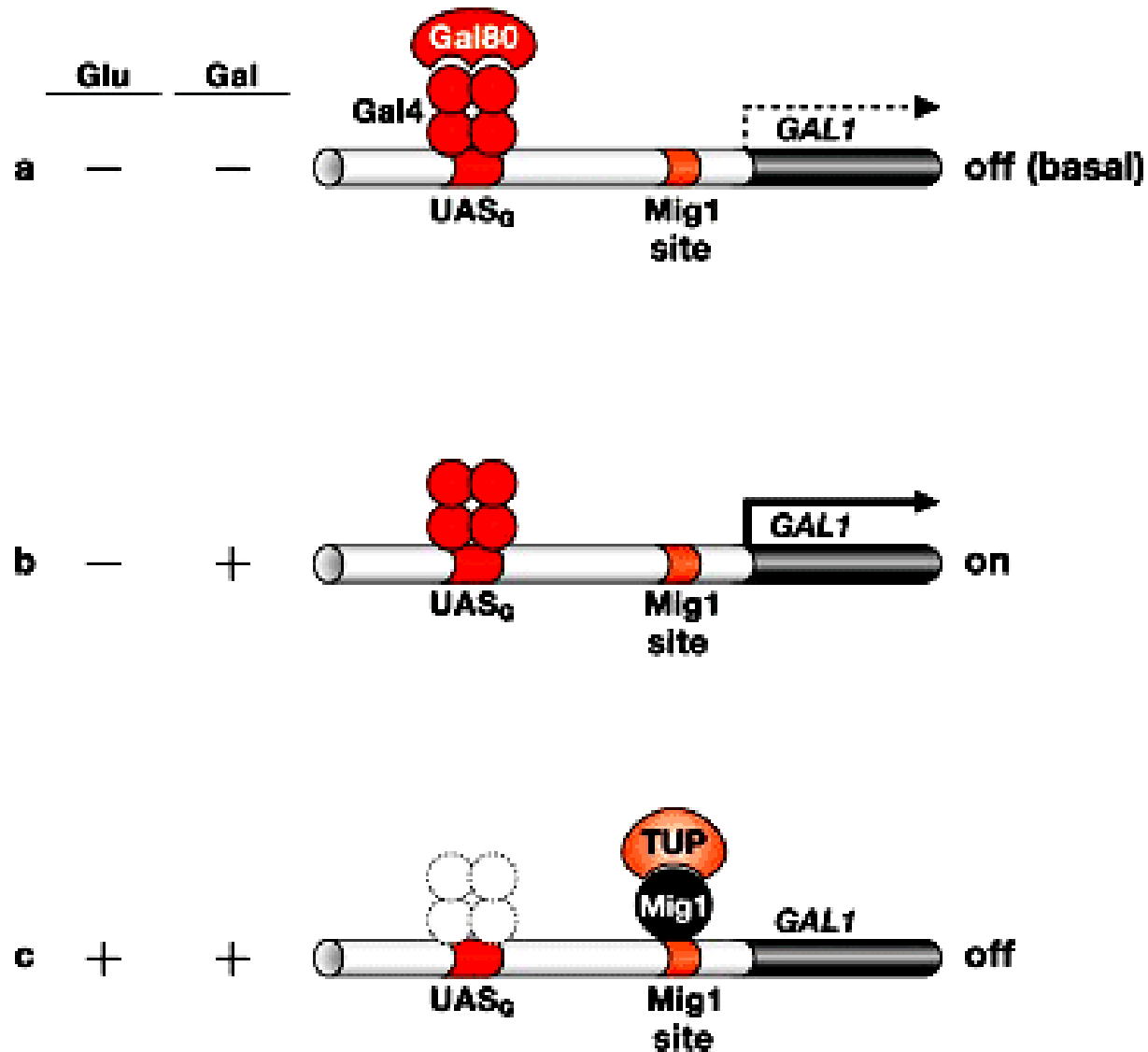
Figure 11-8
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Transcriptional activation by Gal4.



Traven A et al. EMBO Rep. 2006;7:496-499

Là où ça se complique encore ...



7- The GAL4 activator

Transcriptional activator proteins bind to UAS elements in yeast

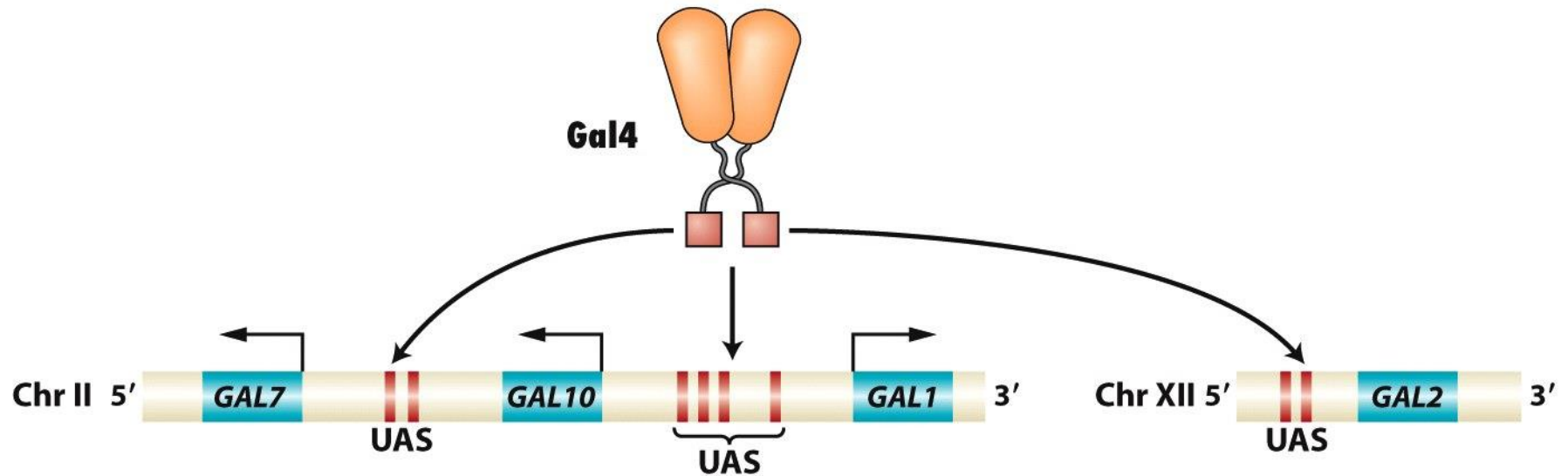


Figure 11-6
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

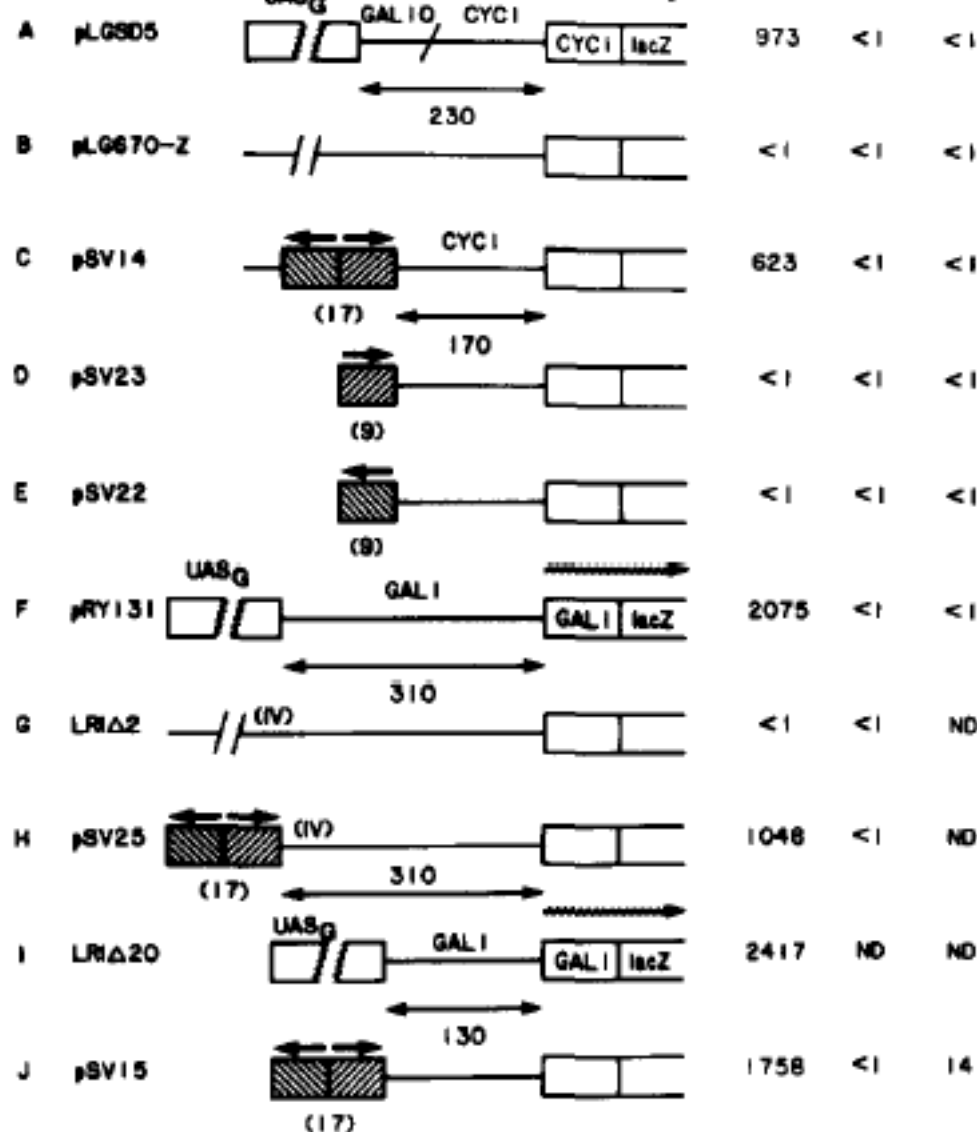


Figure 8. UAS_G Activity of a Synthetic, Putative GAL4 Protein Recognition Sequence

The 17 bp synthetic *GAL4* recognition sequence shown in Figure 7 was installed in various positions upstream of fusions of *E. coli lacZ* to the yeast *CYC1* (C) or *GAL1* (H, J) genes. For comparison, other constructions contained no UAS (B, G), a complete UAS_G (A, F and I), or just

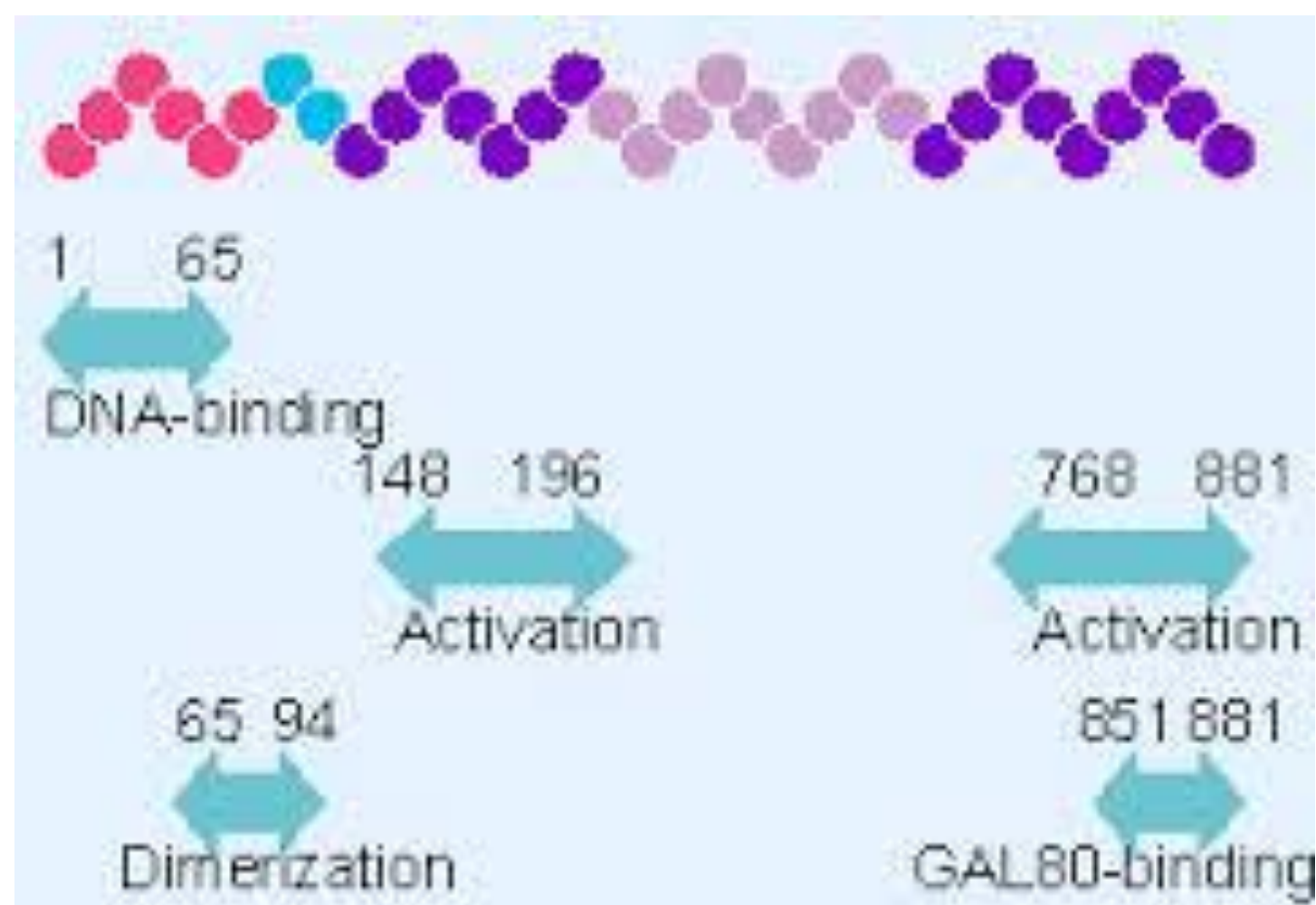


Figure 9. Sequence of UAS_G

The sequence of UAS_G is shown from position 361 to position 486. The four proposed GAL4 protein recognition sequences are indicated by brackets. The arrows emphasize the approximate dyad symmetry of each recognition sequence, and GAL4-dependent protections (●) and elements (λ) of DMS reactivity are noted. Sequences 2 and 3 correlate with GAL4 interaction sites 1 and 2 proposed by West et al., 1984.

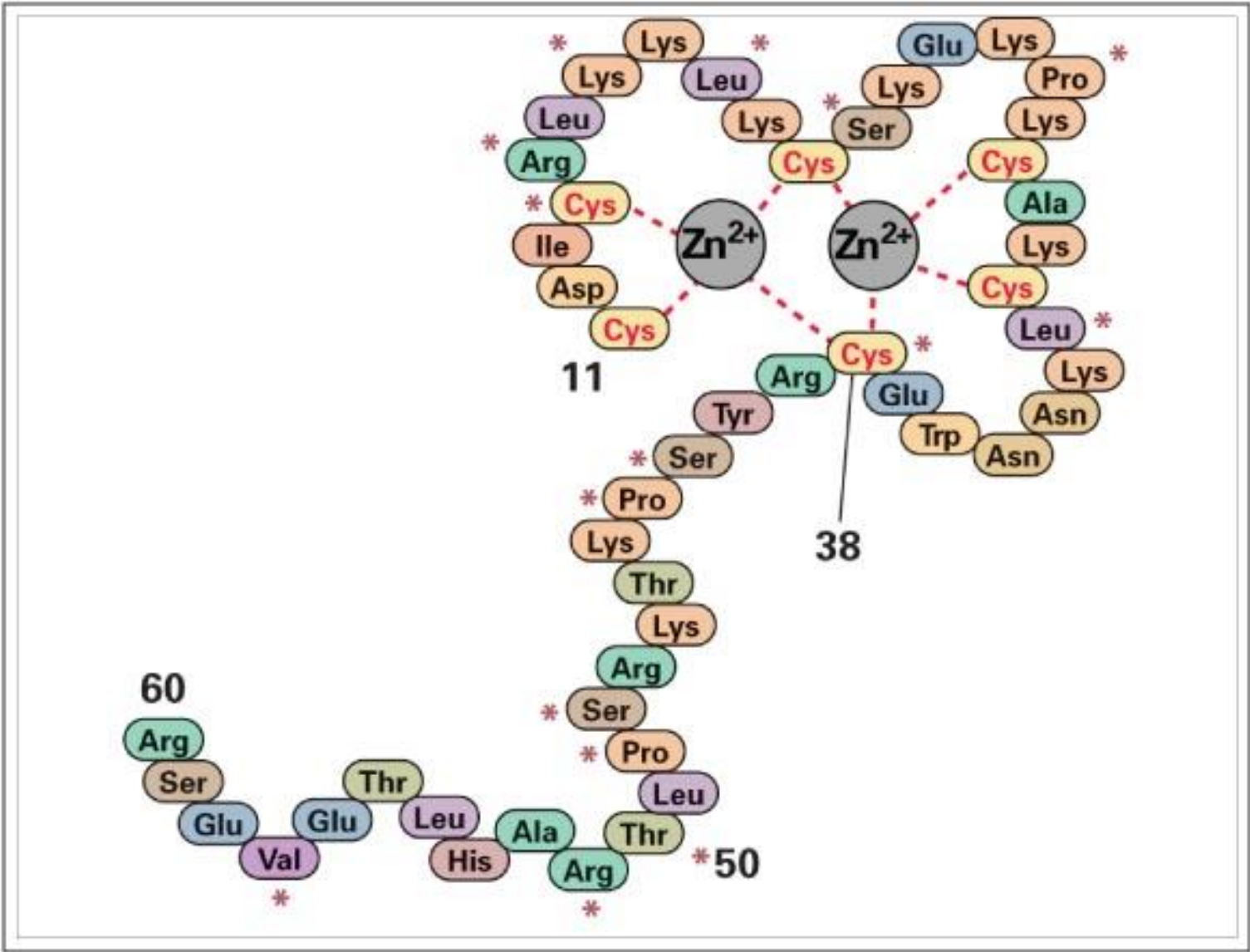
GAL 4 Binding Sites

GAL 1, 10	I	C [•] G GATTAG A [•] AGCCG [•] CCG GCCTAATCTTCGGCGGC	(11/17)
	II	C [•] G GGTGAC A [•] AGCCCTCCG GCCCACTGTTCGGGAGGC	(14/17)
	III	A [•] G GAAGACTCTCCTCCG TCCTTCTGAGAGGAGGC	(14/17)
	IV	C [•] G C [•] GCCGCACTGCTCCG GCGCGGCGTGACGAGGC	(11/17)
GAL 7		CGGACAAC [•] TGTTGACCG GCCTGTTGACAAC [•] TGGC	(14/17)
Consensus		C [•] G G A ^G G A C (A) (T) C A G ^G A G G C 9 10 9 6 7 5 7 6 10	
Synthetic		CGGAAGACTCTCCTCCG GCCTTCTGAGAGGAGGC	(15/17)



DNA-binding domain of the GAL4 transcriptional activator protein in yeast

Figure 11.22



Transcriptional activator proteins are modular

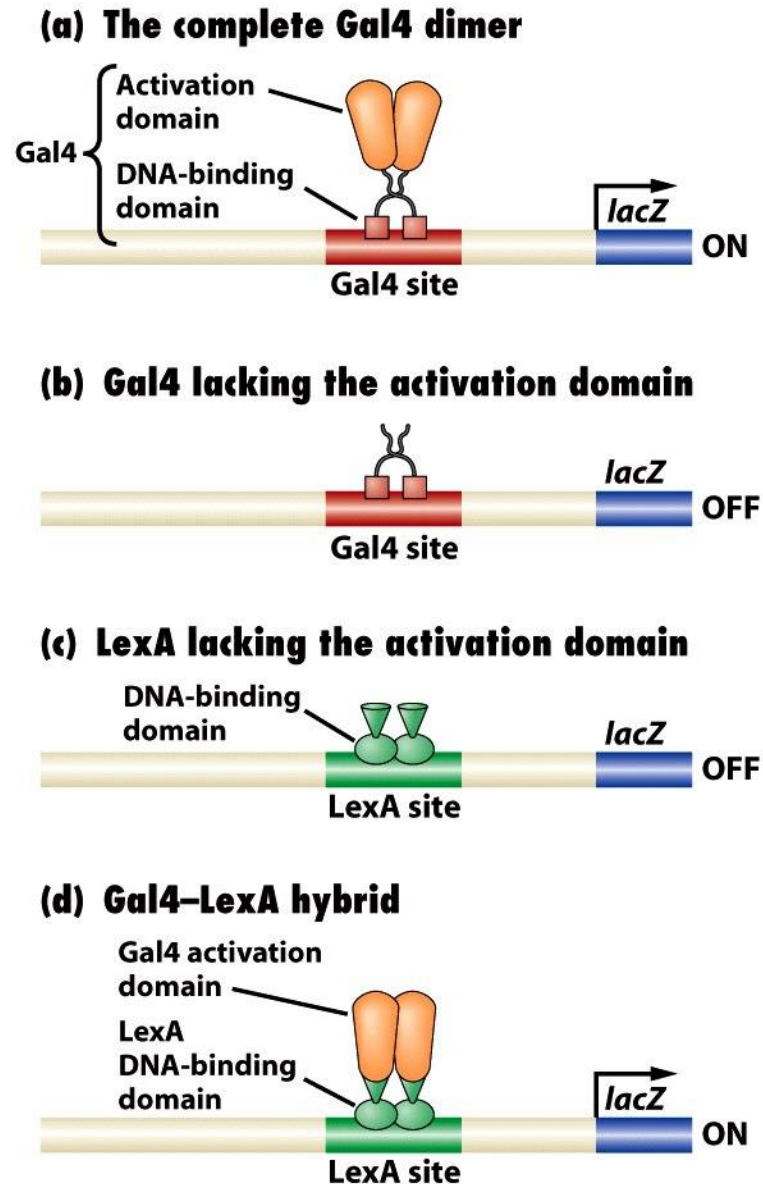


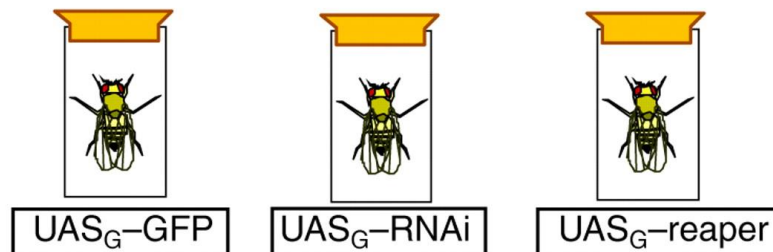
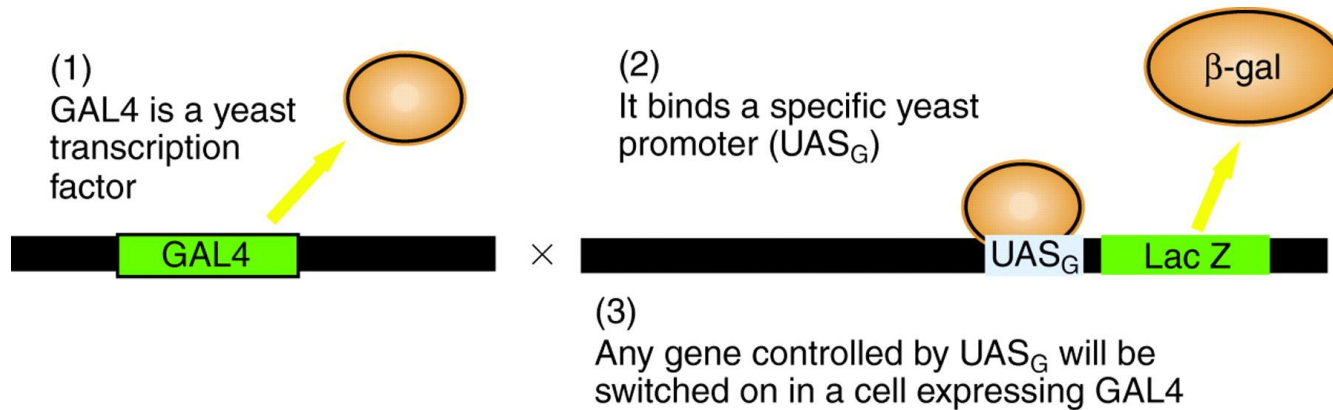
Figure 11-7
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

PUBMED « GAL4 »

-> 4322 !!!!!!!!!!!

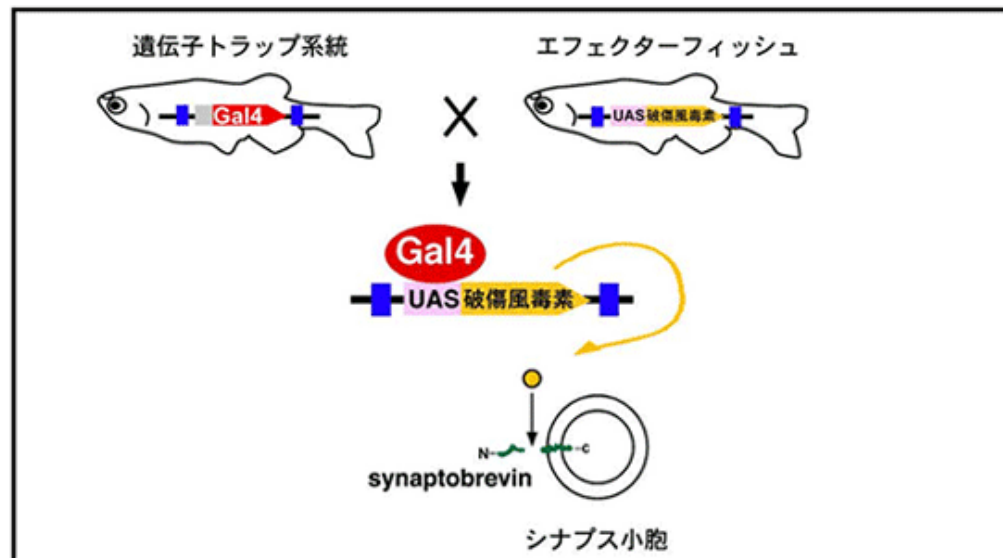
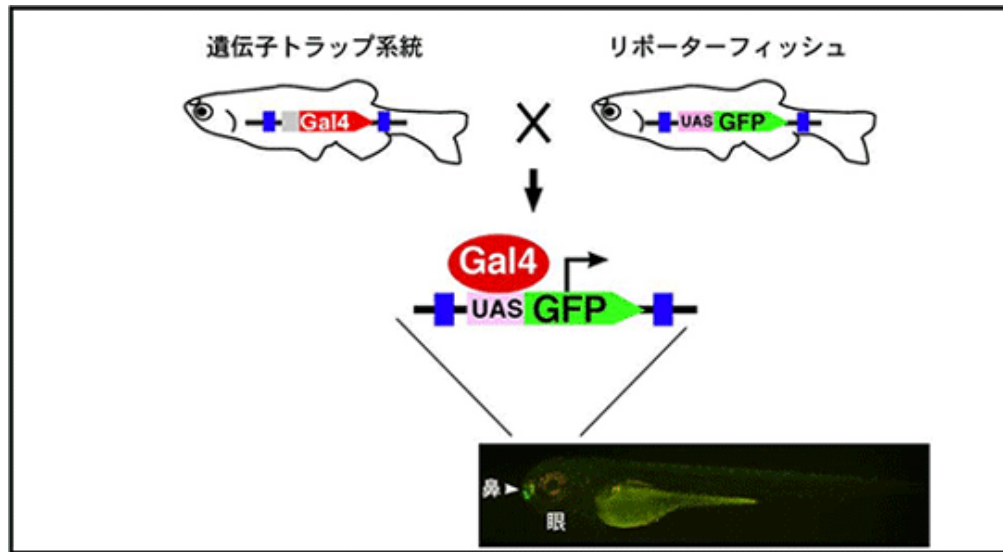
Why ??

Pour contrôler l'expression de gènes

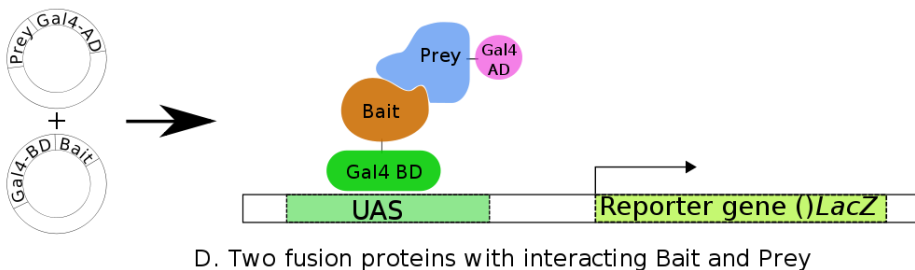
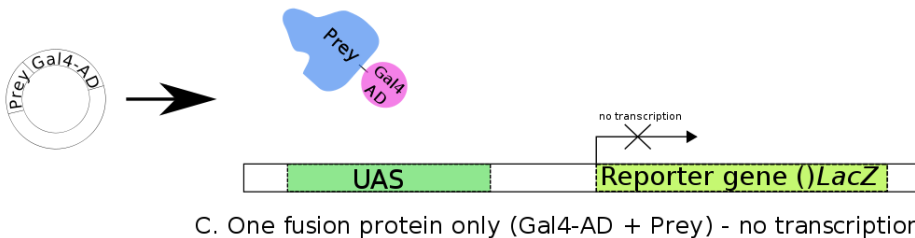
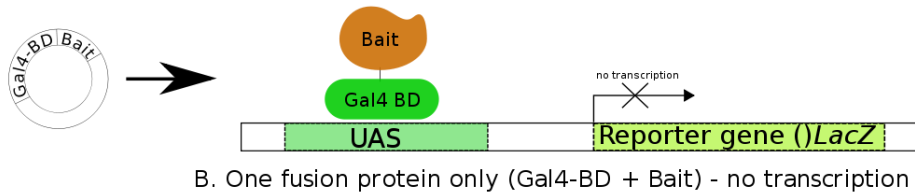
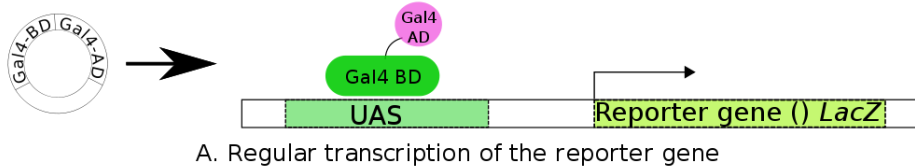


(4) Crossing a GAL4 line with flies containing the appropriate UAS_G construct, any gene can be expressed cell-specifically

Pour contrôler l'expression de gènes

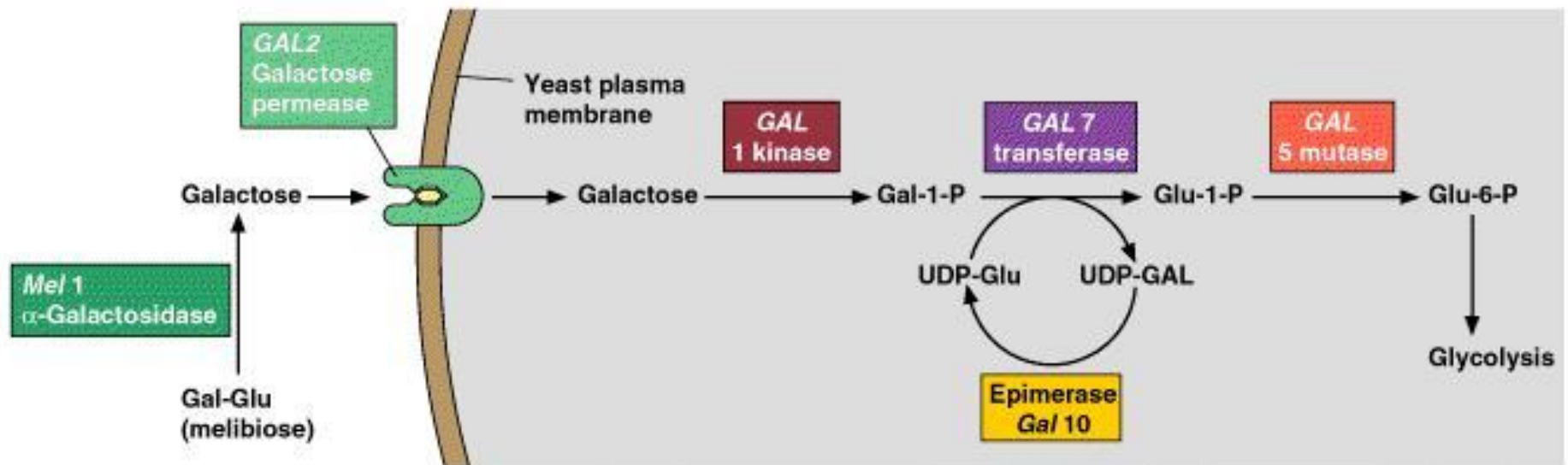


Pour détecter des interactions protéiques

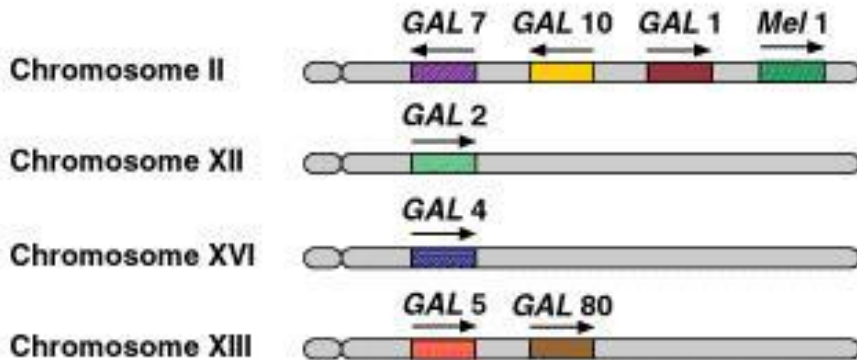


Le système
double-hybride

Function of the yeast GAL genes



Chromosomal location of GAL genes in yeast



GAL3, GAL4, and GAL80 are regulatory genes.