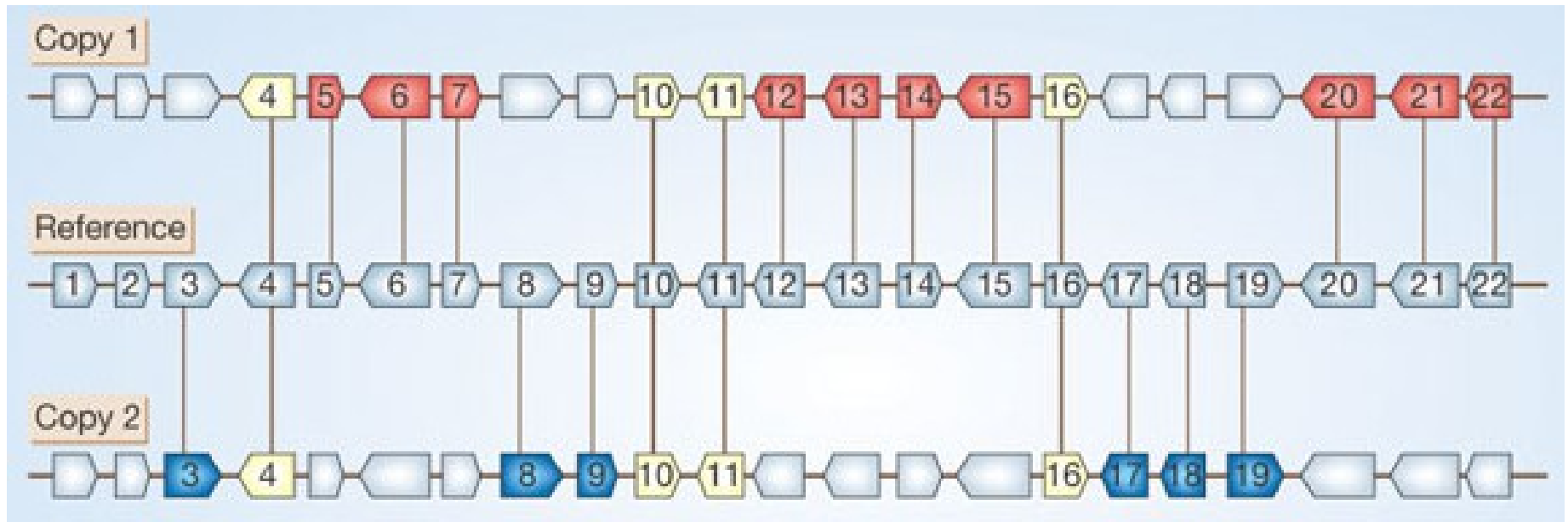


- Haploidní
- Diploidní
- Tetra- ... polyploidní (pivovarské kmeny)

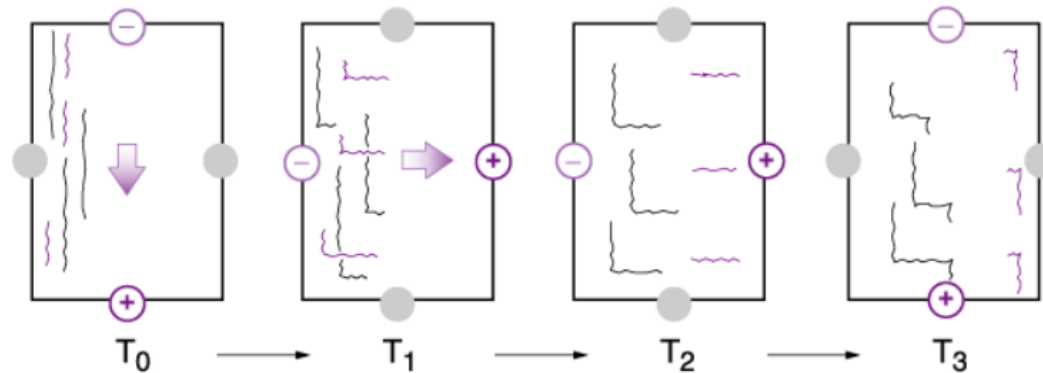
Základní prvky kvasinkového chromosomu *Saccharomyces cerevisiae*

- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosomů (chrI=0.22 – chrXII=1.6Mbp)
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- až 200 kopii rDNA v repetici (9kbp, chrXII), 262 tRNA, 40 snRNA,
- Geny (cca 6500) reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- Redundantní (2000 genů duplikováno) – cca30% genomu vzniklo duplikacemi
- <5% genů (220) obsahuje introny (0.5% genomu),
- 3% Ty1-5 transposony (46% u člověka)
- Kondenzovaný/tichý heterochromatin: centromery, telomery a HMR/HML

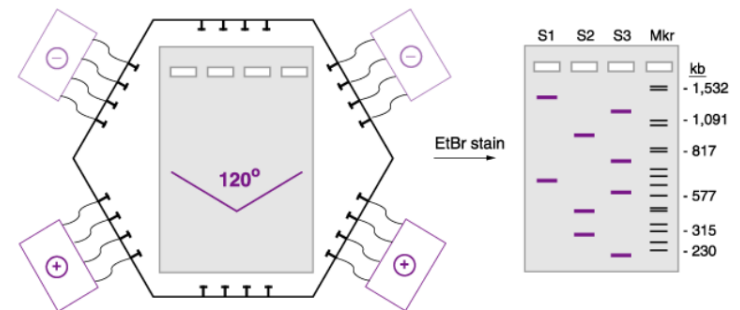


PFGE - princip

- PFGE gel obsahuje vzorky DNA uvnitř agarózových bločků (minimalizace náhodných zlomů velkých molekul DNA)
- DNA prochází agarózou v závislosti na vloženém napětí
- při změně směru elektrického pole však větším molekulám DNA trvá déle, než se přeorientují

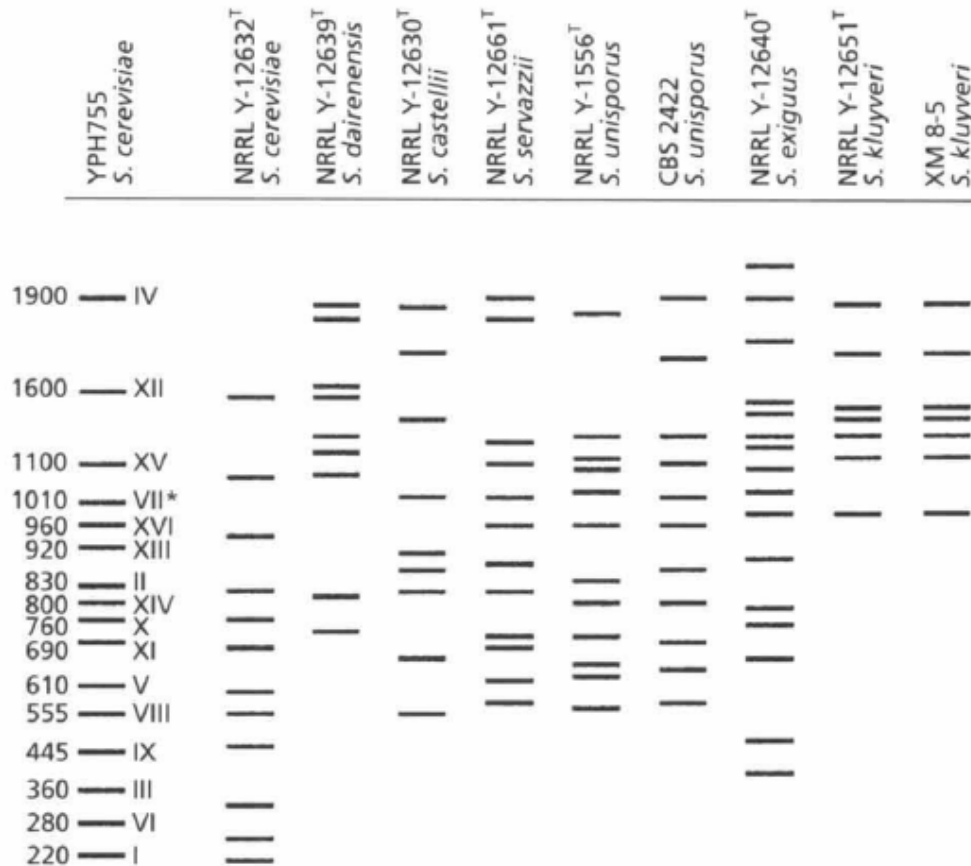


- contoured clamped homogeneous electric field (CHEF)
- hexagonální box – změna úhlu pole

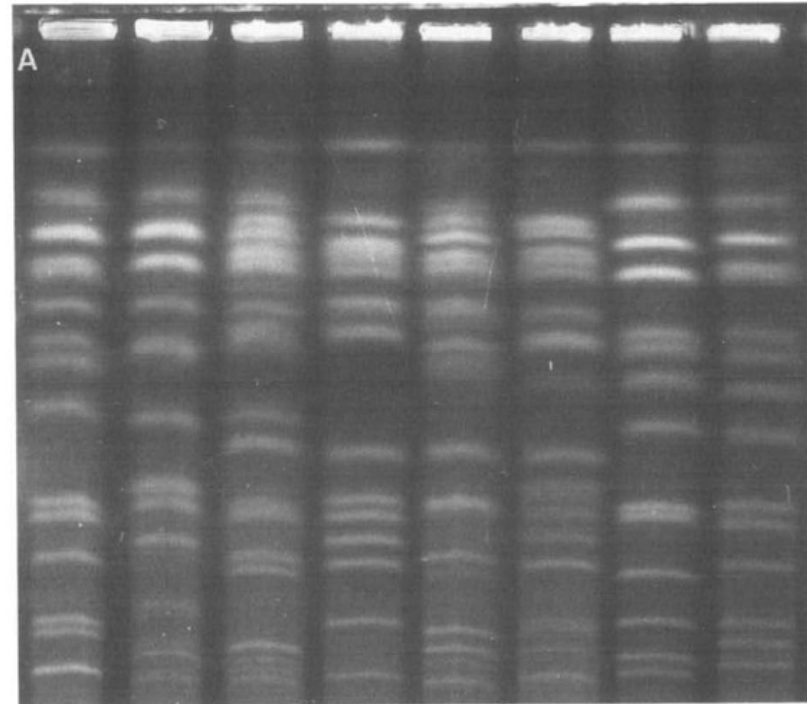


Electric field alternates 120° every 90 seconds for 18 to 24 hours at 14° C

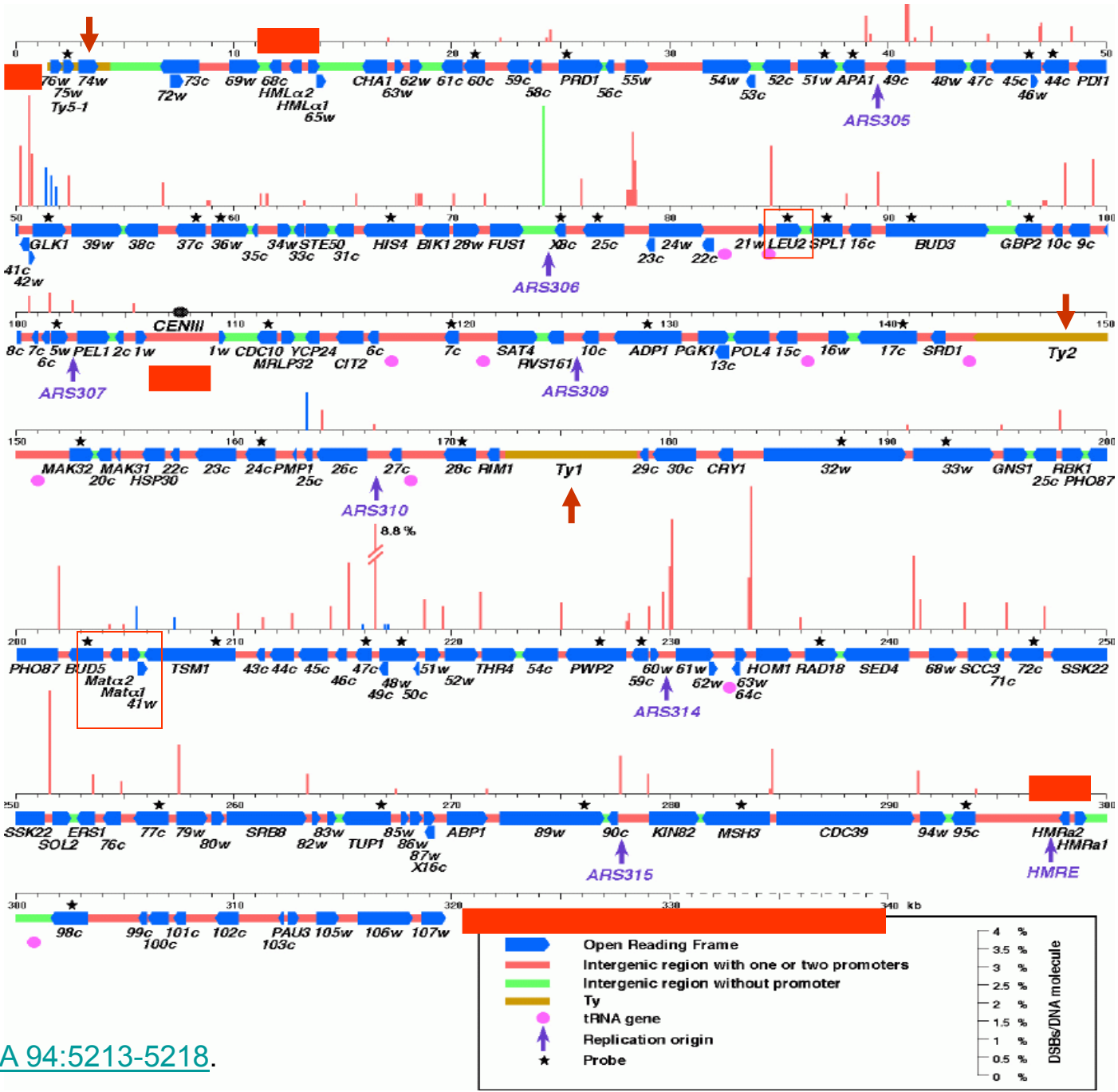
Karyotypizace



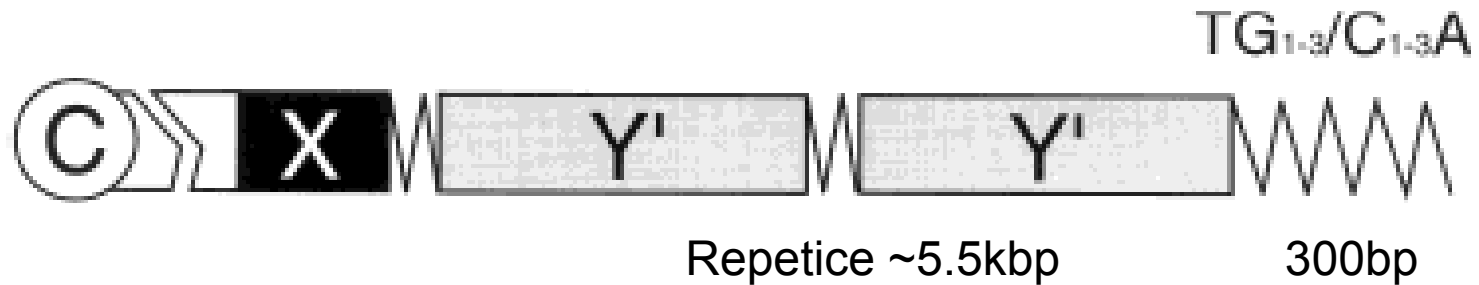
rozlišení druhů v rámci *Saccharomyces*



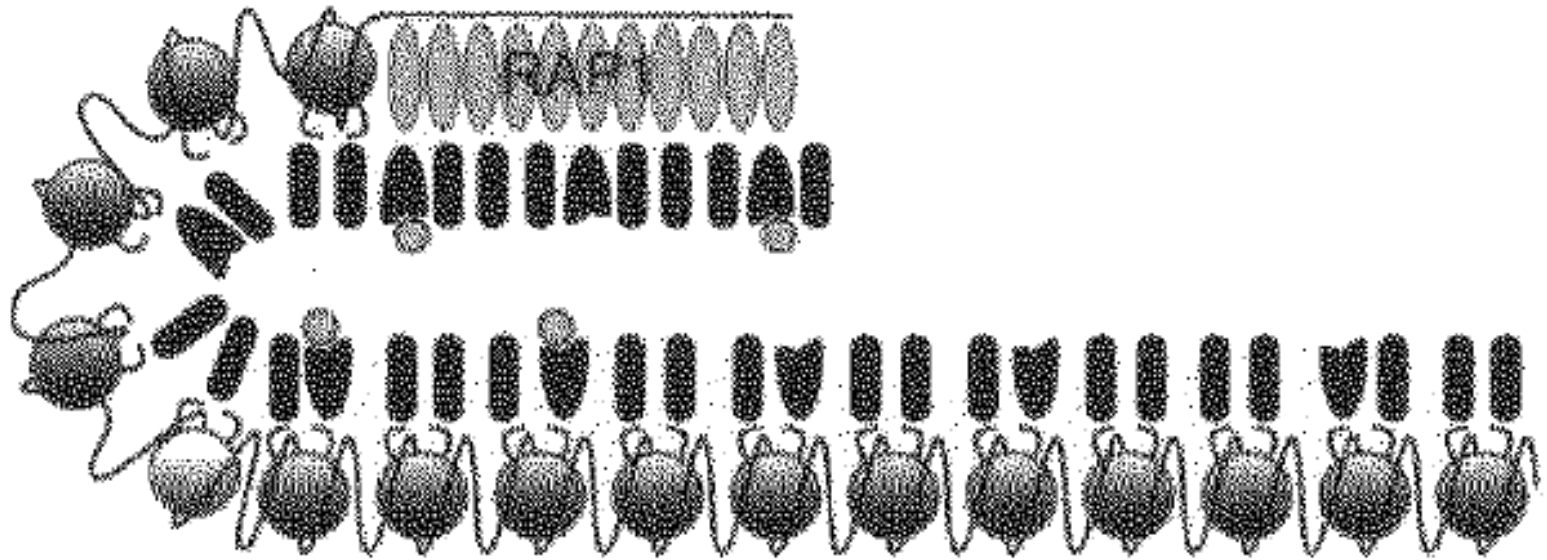
Chromosom III (nejmenší)
 CEN=centromera
 ARS=autosomal
 replicating sequence
 TEL=telomery
 tRNA
 Ty transposony
 MAT a HML/HMR lokusy



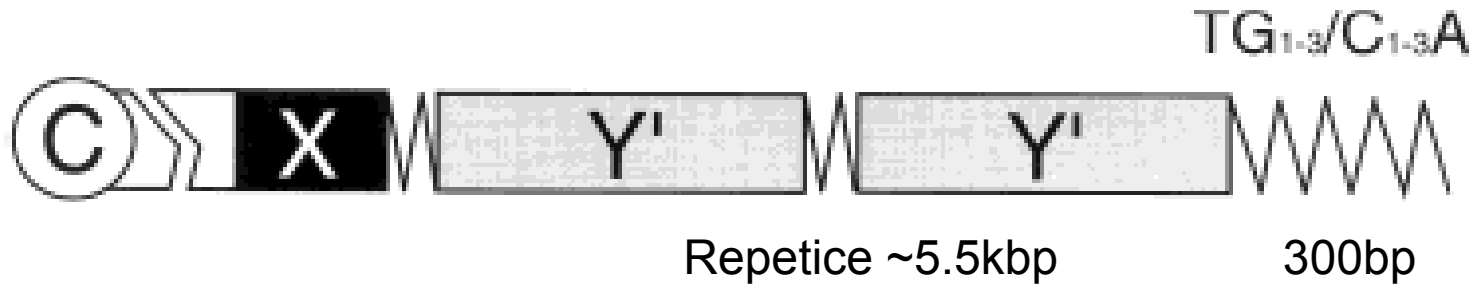
Struktura kvasinkových telomer



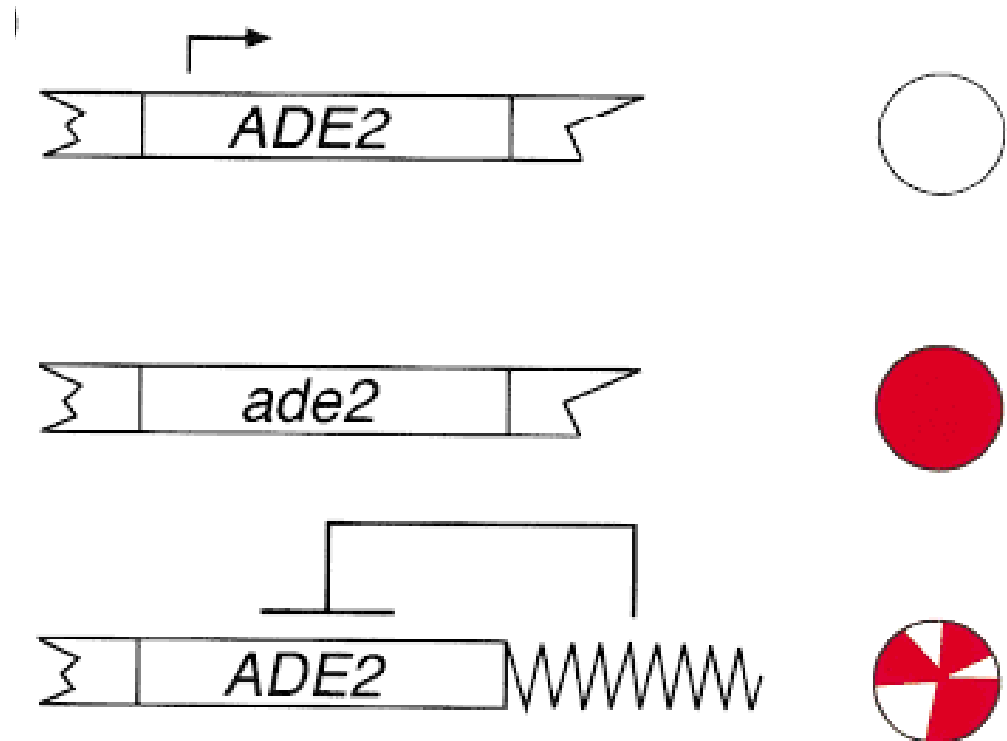
E. Blackburn, Nobelova cena, 2009



Struktura kvasinkových telomer



Telomery umlčují transkripci
 – ADE2 reporter je pod kontrolou telomer pouze občasně náhodně transkribován



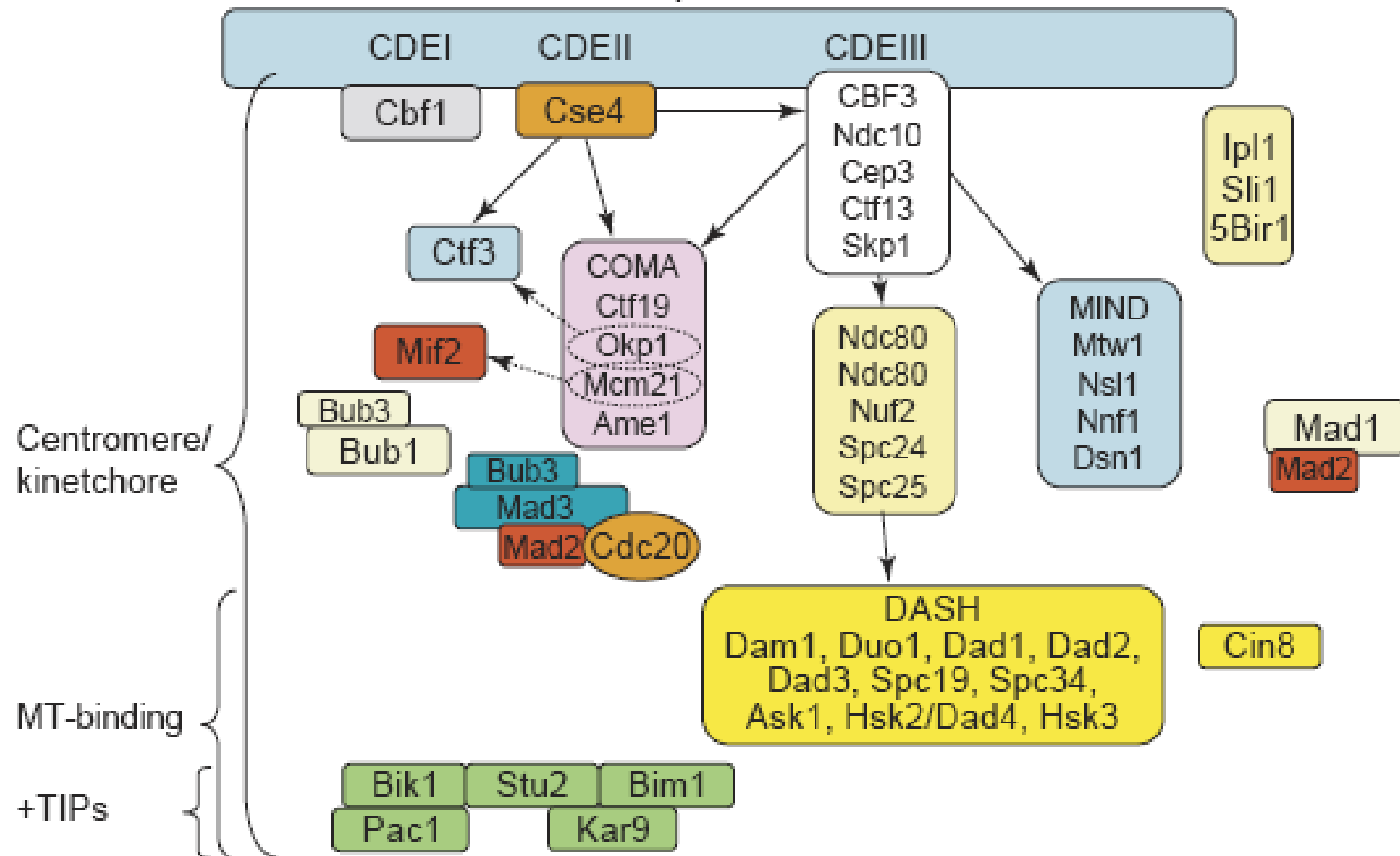
rDNA - repetice

- rDNA kóduje geny pro ribosomální RNA
- Je vysoce konzervativní
 - Identifikace a odlišování kvasinkových druhů
 - Sledování evolučních trajektorií
- Až 200 kopii v řadě za sebou
 - Problém s homologní rekombinací
 - Problém s replikací – ve stejném směru jako transkripce (probíhá v S-fázi – kolize)

Centromera *S. cerevisiae*

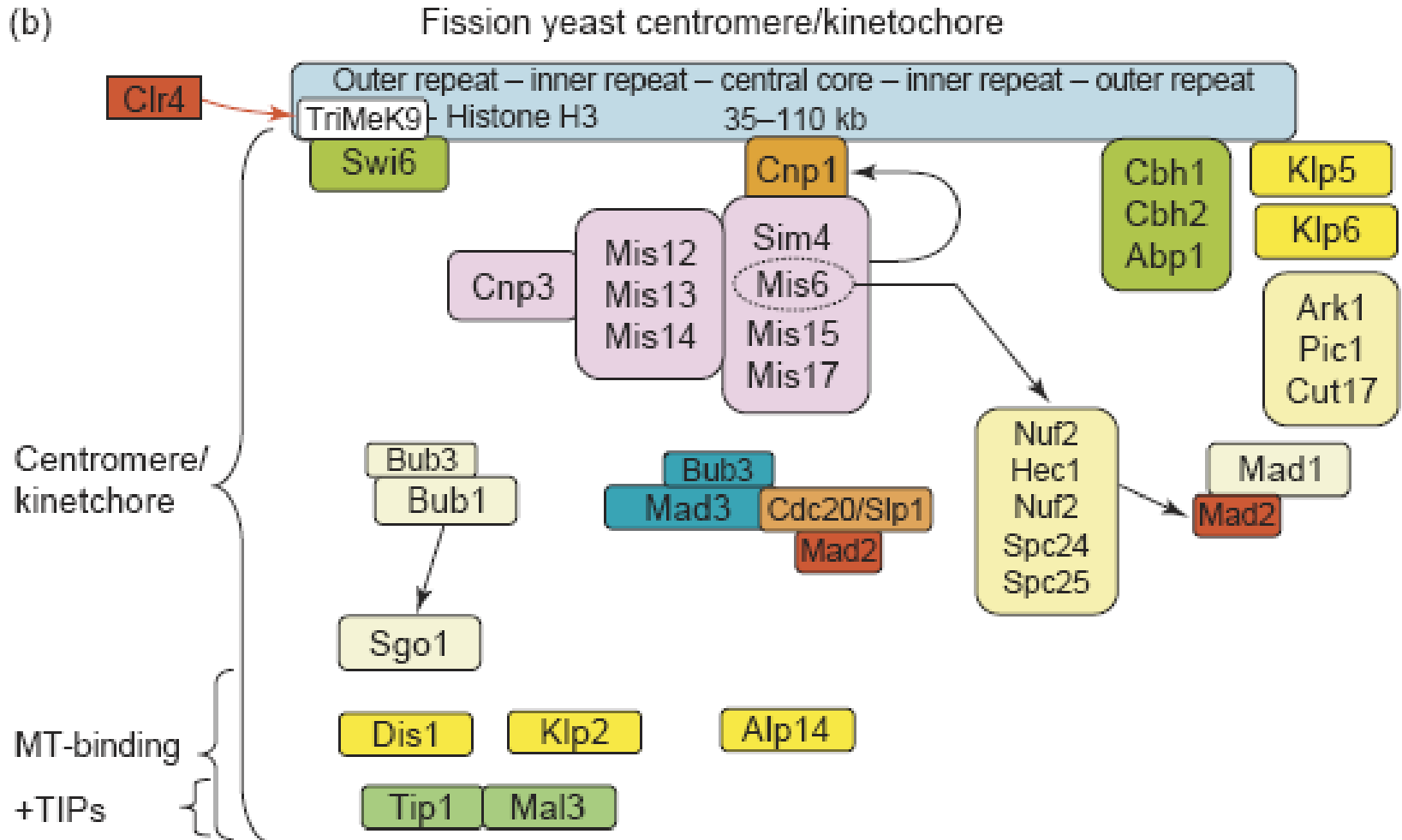
(c)

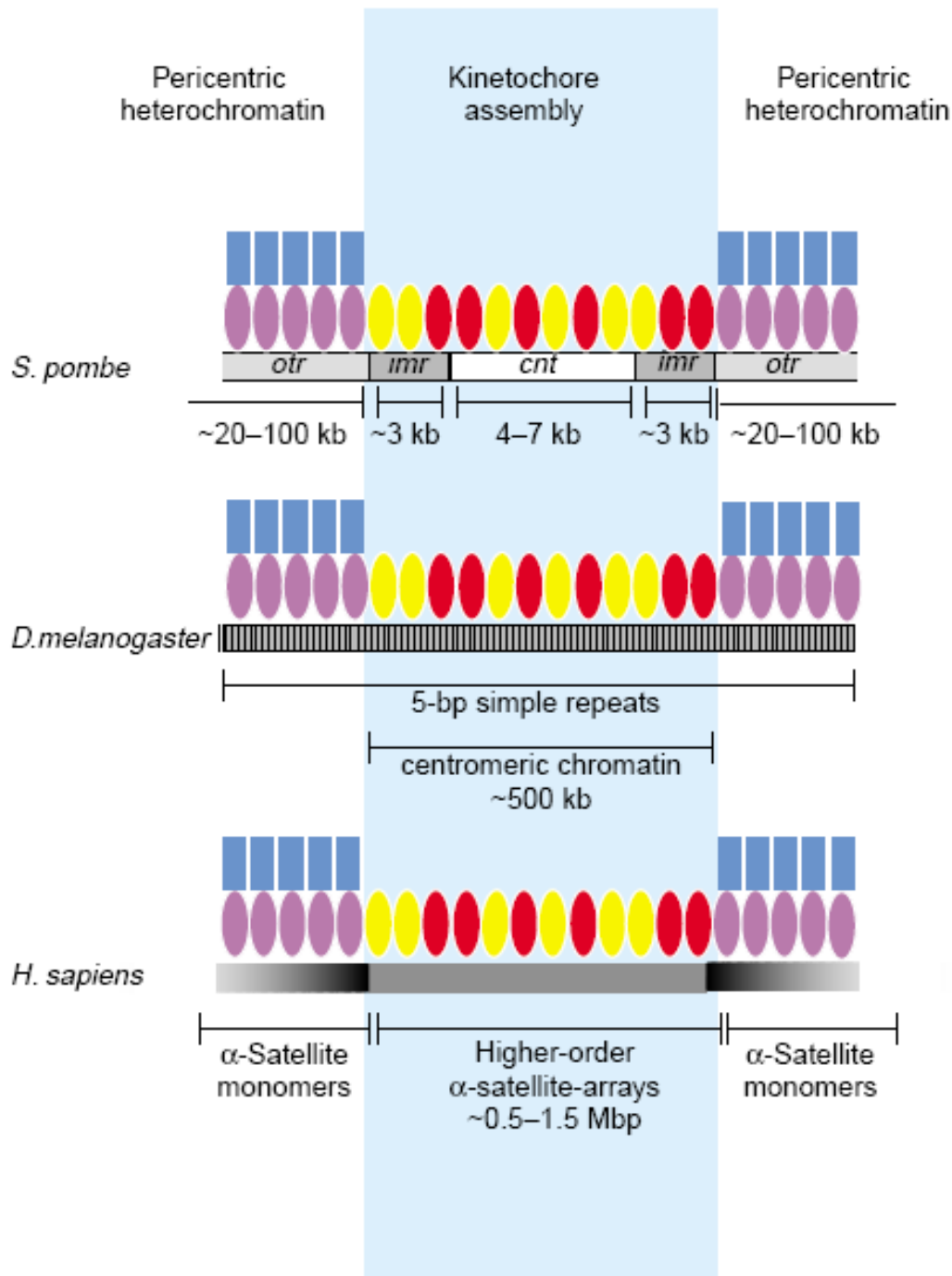
Budding yeast centromere/kinetochore
125-bp CEN DNA



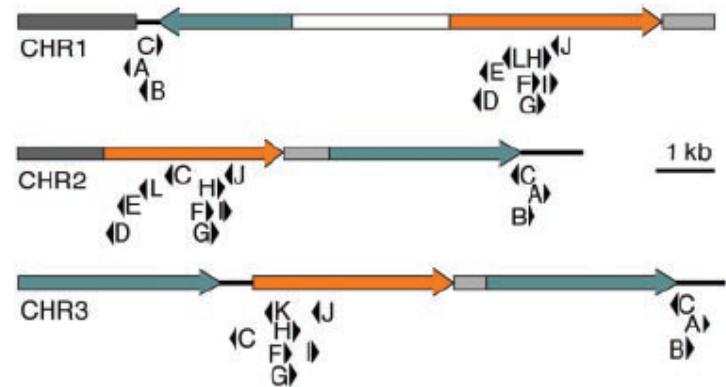
Centromera *S. pombe*

- Pouze 3 chromozomy (13 Mbp = 3.5, 4.6, 5.7)
- kondenzované chromozomy - geny pro heterochromatin (*S.c.* nemá)
- velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace





siRNA silencing



Pozorování DNA/chromosomů u kvasinek

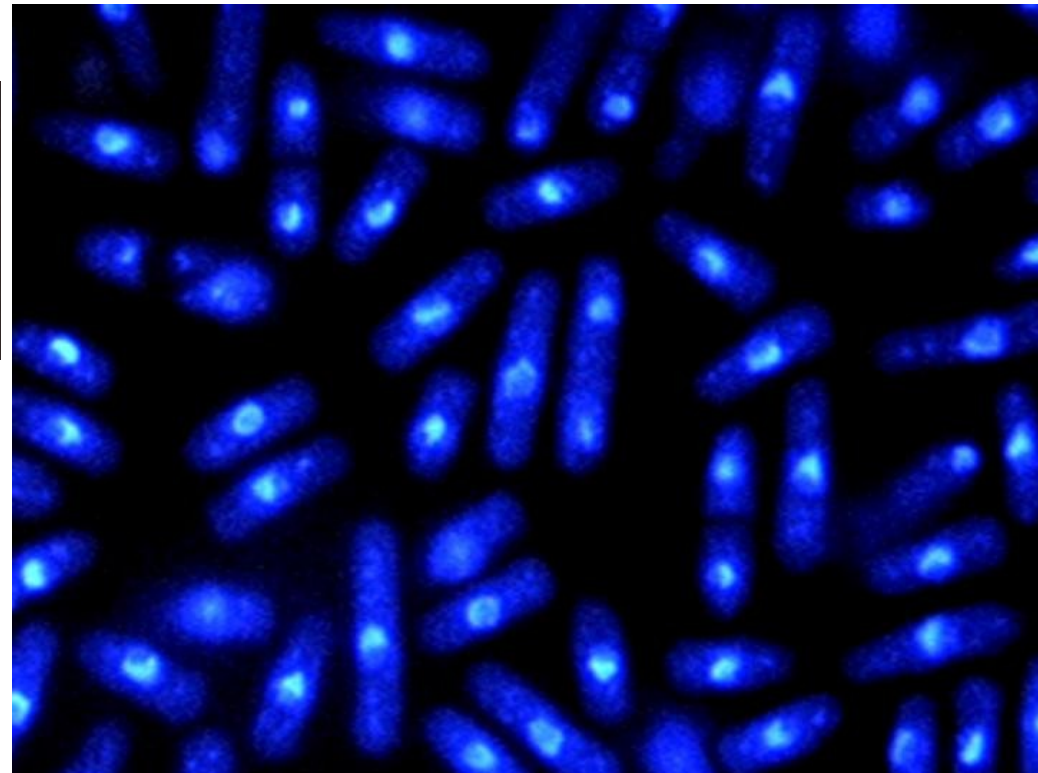
- Chromosomy jsou u kvasinek malé a těžko pozorovatelné – barvení DNA na fixovaných preparátech pomocí DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)
- Použití centromerických proteinů-GFP (green fluorescence protein) pro studium dynamiky chromatinu
- TetR-GFP represor se váže na TetO sekvence (operon) zaintegrované v přesně definovaném lokusu
- CHIP (chromatin immune precipitation) – specifické sekvence, CHIP-seq nebo „CHIP on CHIP“



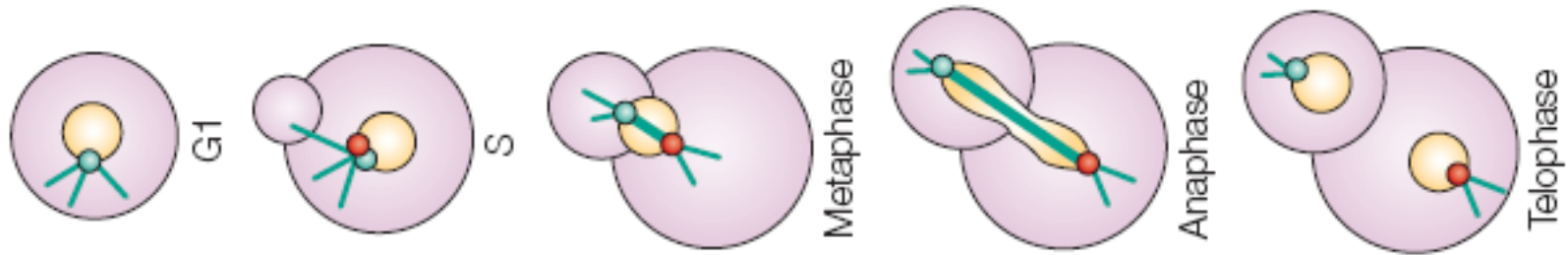
Saccharomyces cerevisiae

Schizosaccharomyces pombe →

Pozadí = mtDNA

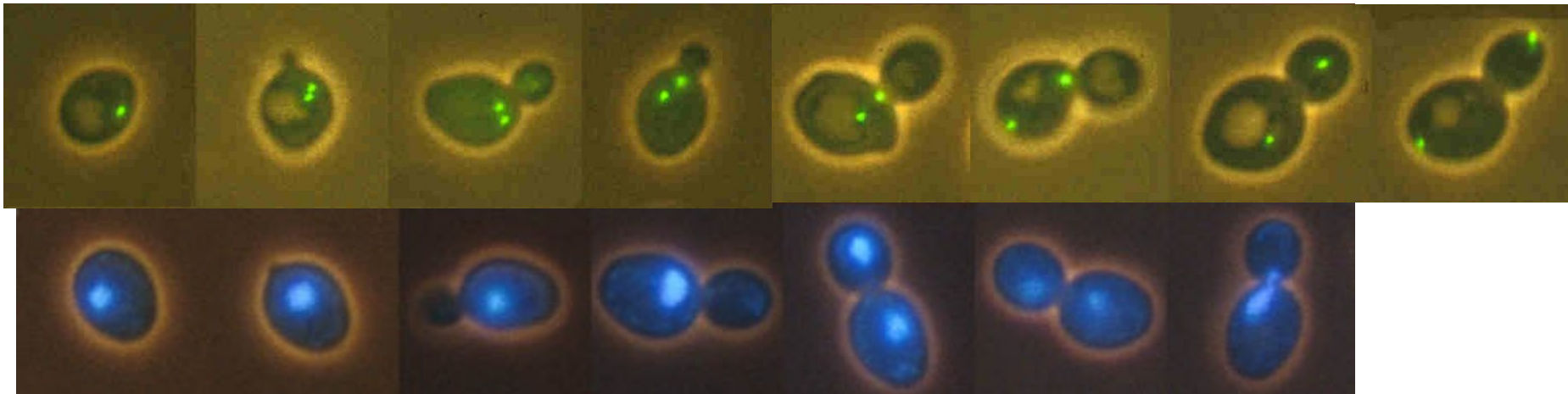


DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*



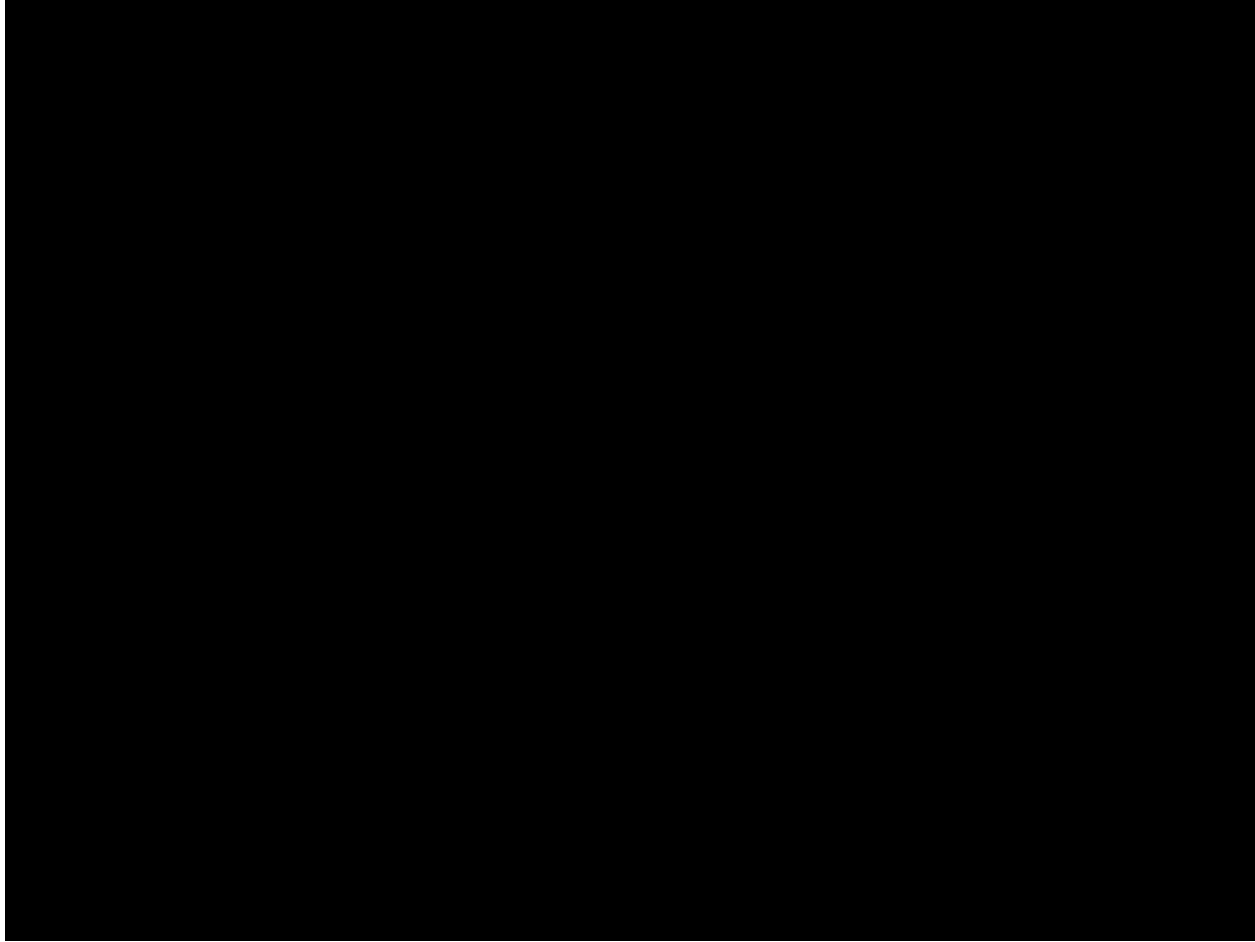
- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze tj. replikace
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G2 fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (u kvasinek se jaderná membrána nerozpadá)
- **na začátku anafáze dochází k oddělení sesterských chromatid a jejich segregaci**

SPB-GFP barvení



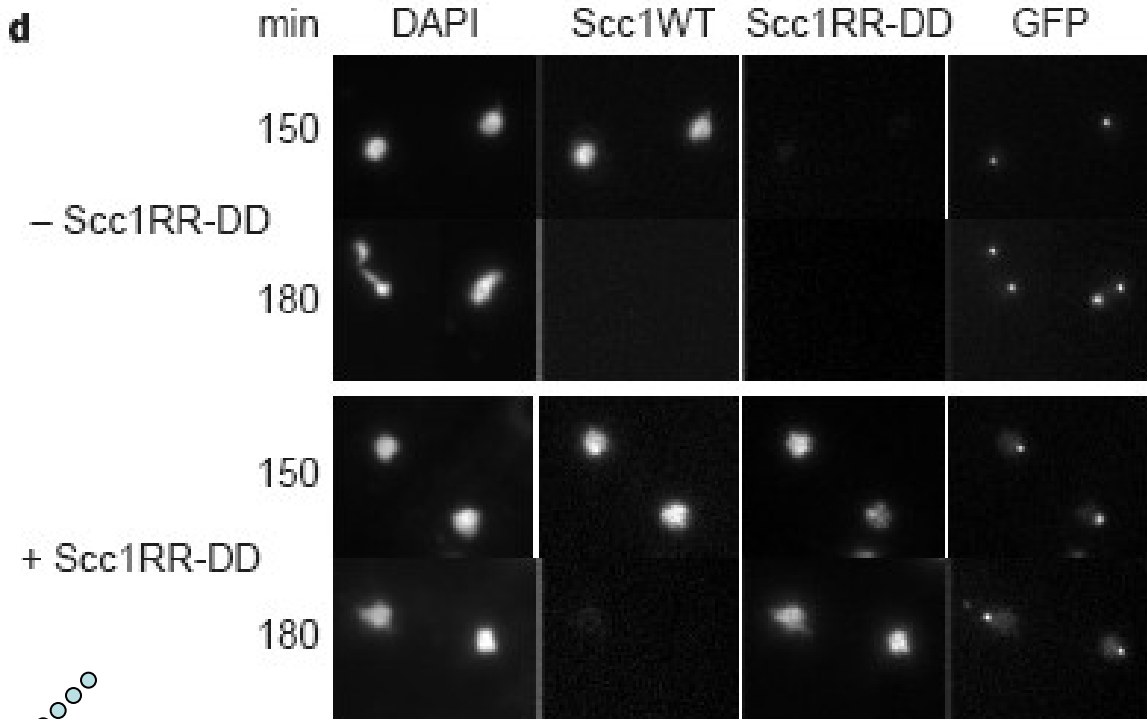
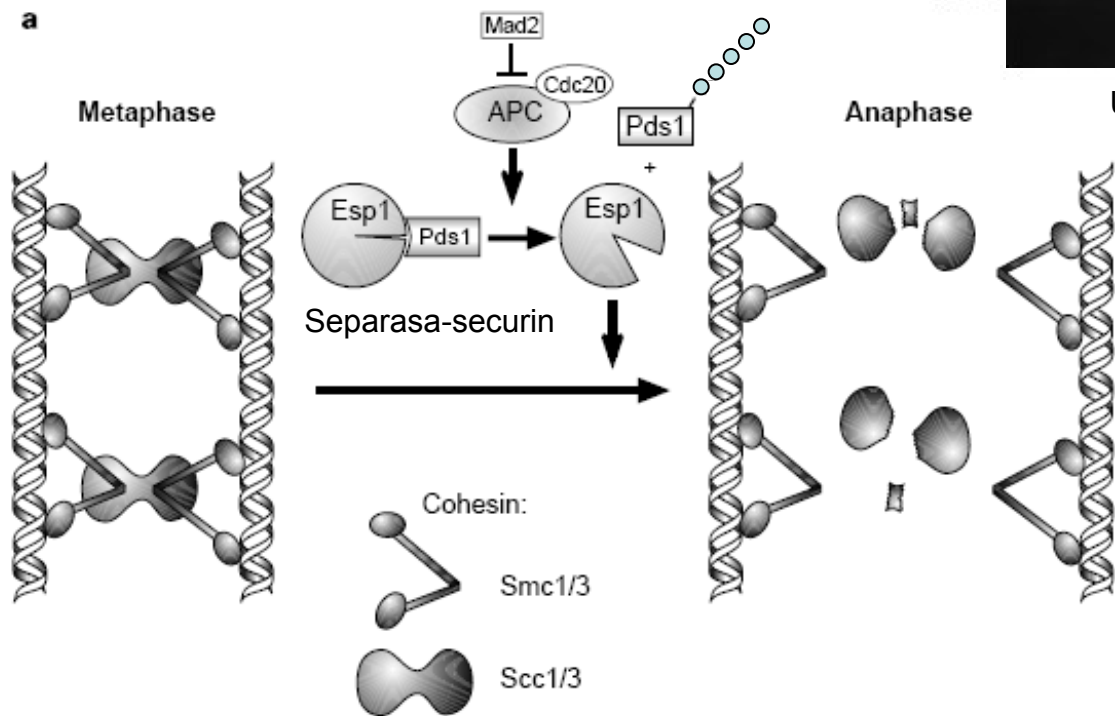
Separace a segregace chromosomů

(centromera-kinetochora=Ndc80-GFP + SPB=Cdc11-CFP)



Model separace chromosomů

APC=anaphase promoting complex



Uhlmann et al., Nature, 1999

TetR-GFP
TetO

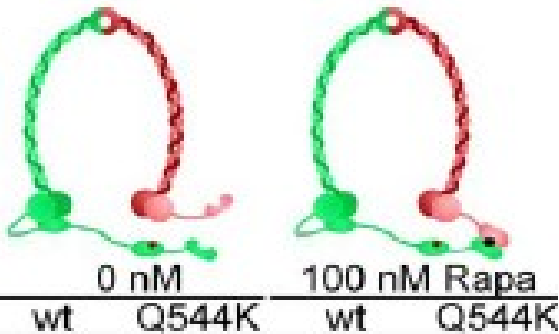
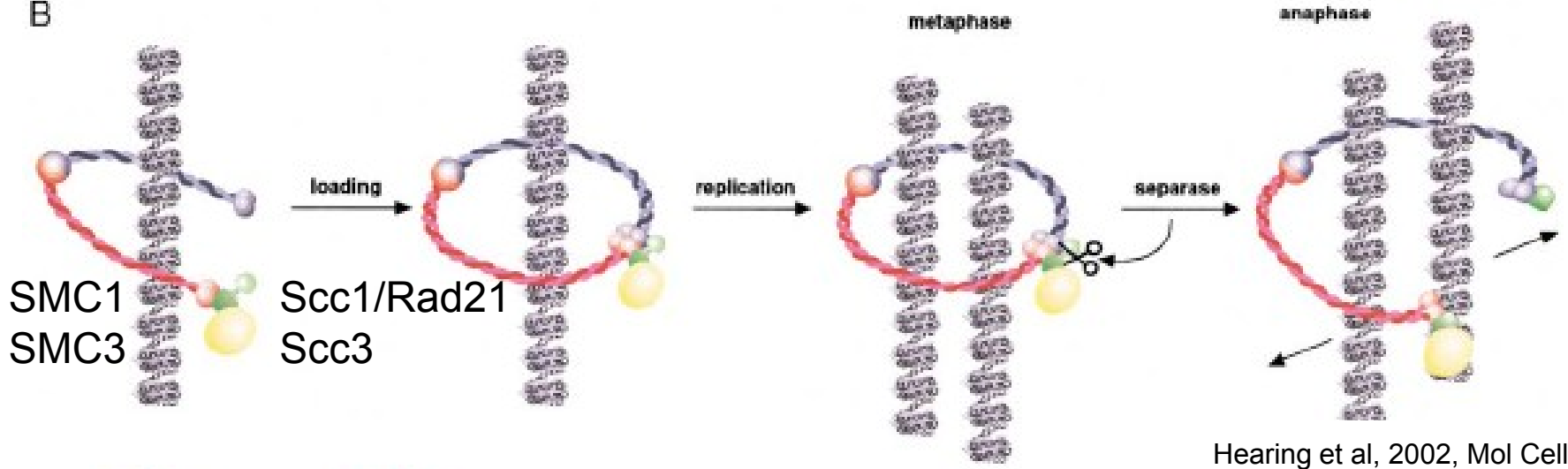
Použití TEV proteasy

Cohesin komplex
(SMC=structure
maintenance of
chromosome)

SMC1, SMC3,
Sccl a Sccl3

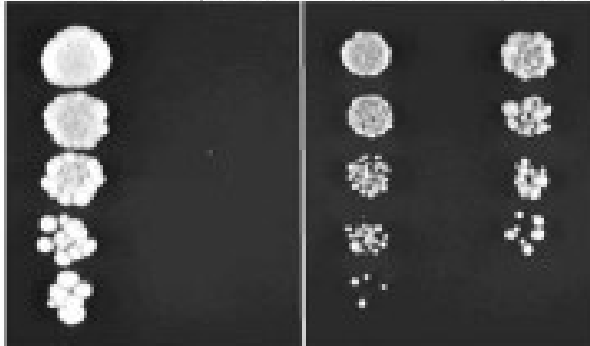
Kohesin „objímá” DNA

B

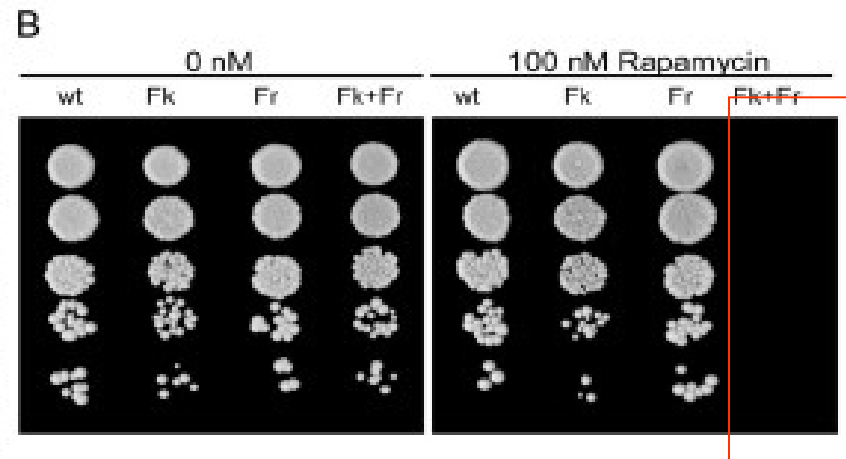
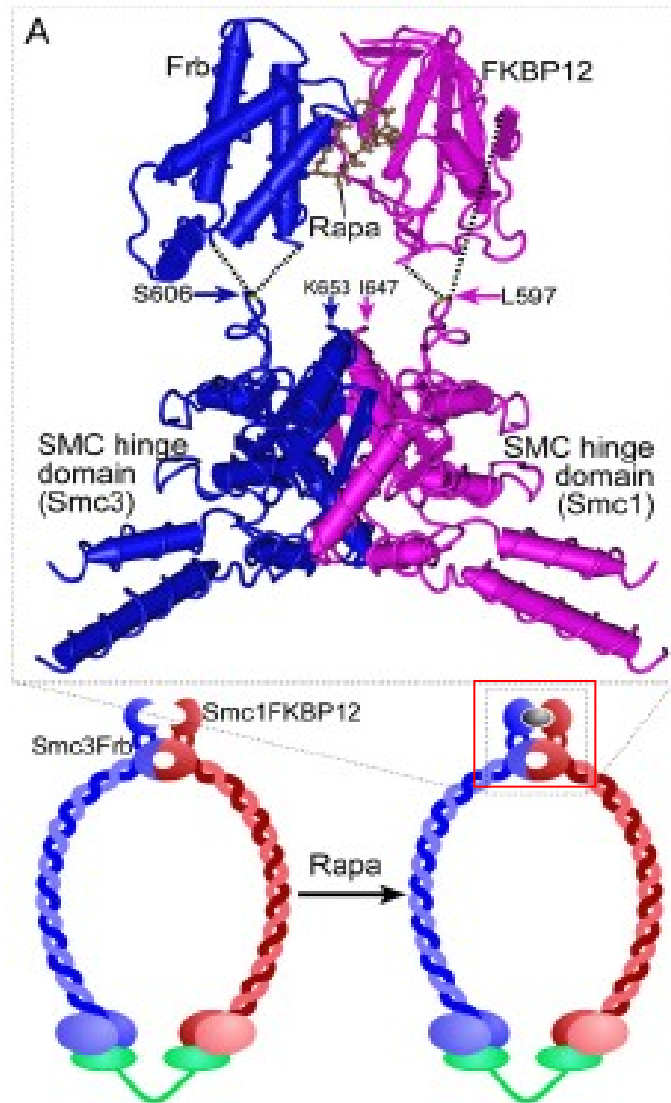


Použití fúzních proteinů při studiu kohese sesterských chromatid

SMC3-Scc1-Frb + SMC1-FKBP12 (váží rapamycin)

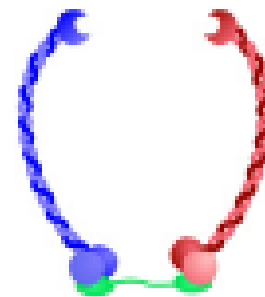


Vstup DNA přes opačný konec než uvolnění



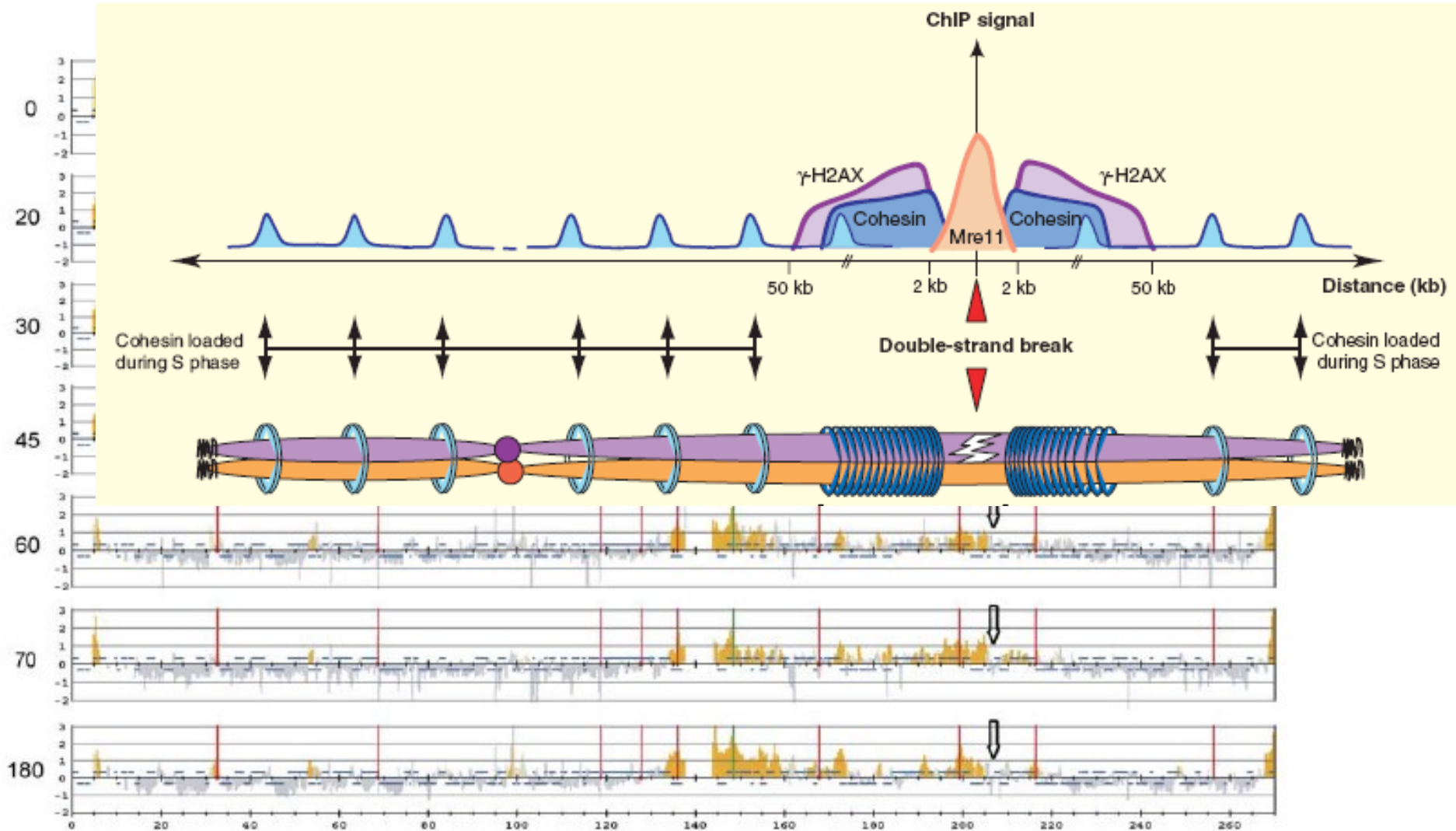
Gruber et al., Cell, 2006

Uzamčení je pro buňku letální



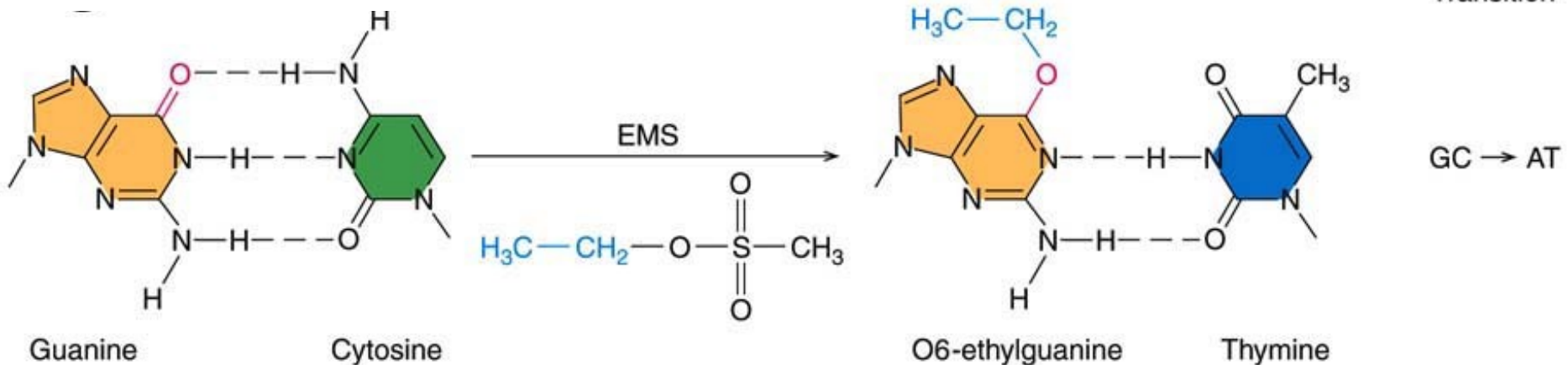
Clothes Peg Model

Kohesin napomáhá při opravě dvouřetězcových zlomů v G2/M fázi



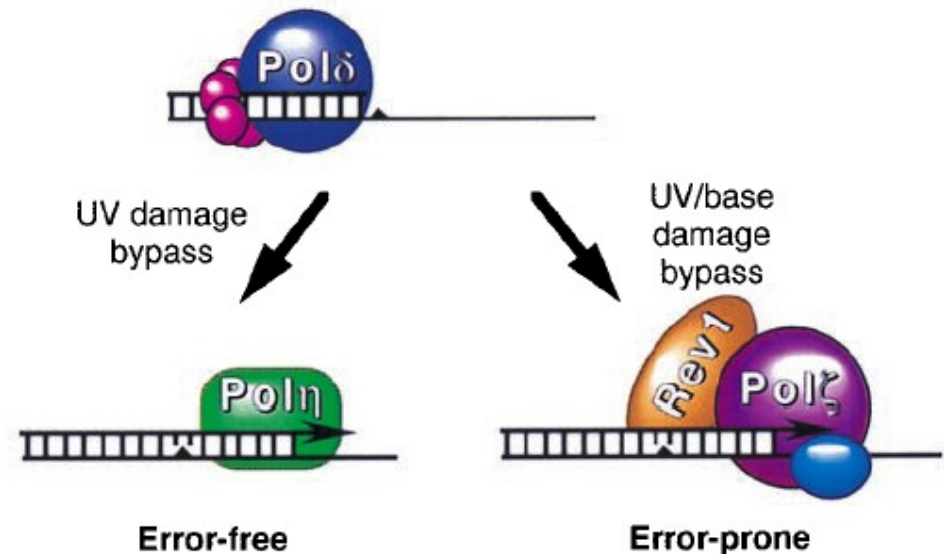
Poškození DNA

- Studium kvasinek po ozáření ... *rad* mutanty (např. *RAD21*, *RAD50*, *RAD51*)
 - Ionizující záření generuje především DSB (double-strand break)
 - UV záření modifikuje nukleotidy tzv. TT-dimery
- Chemická činidla/mutageny modifikují nukleotidy – mají za následek změnu genetické informace
 - MMS (methyl methan sulfonat) – (např. *MMS21*)
 - Alkylační činidla (např. EMS = ethyl methan sulfonat), ROS (reactive oxygen species)
- HU (hydroxy urea) blokuje replikaci – v mutantách dochází ke kolapsům replikační vidlice (např. *HUS1*) => DSB

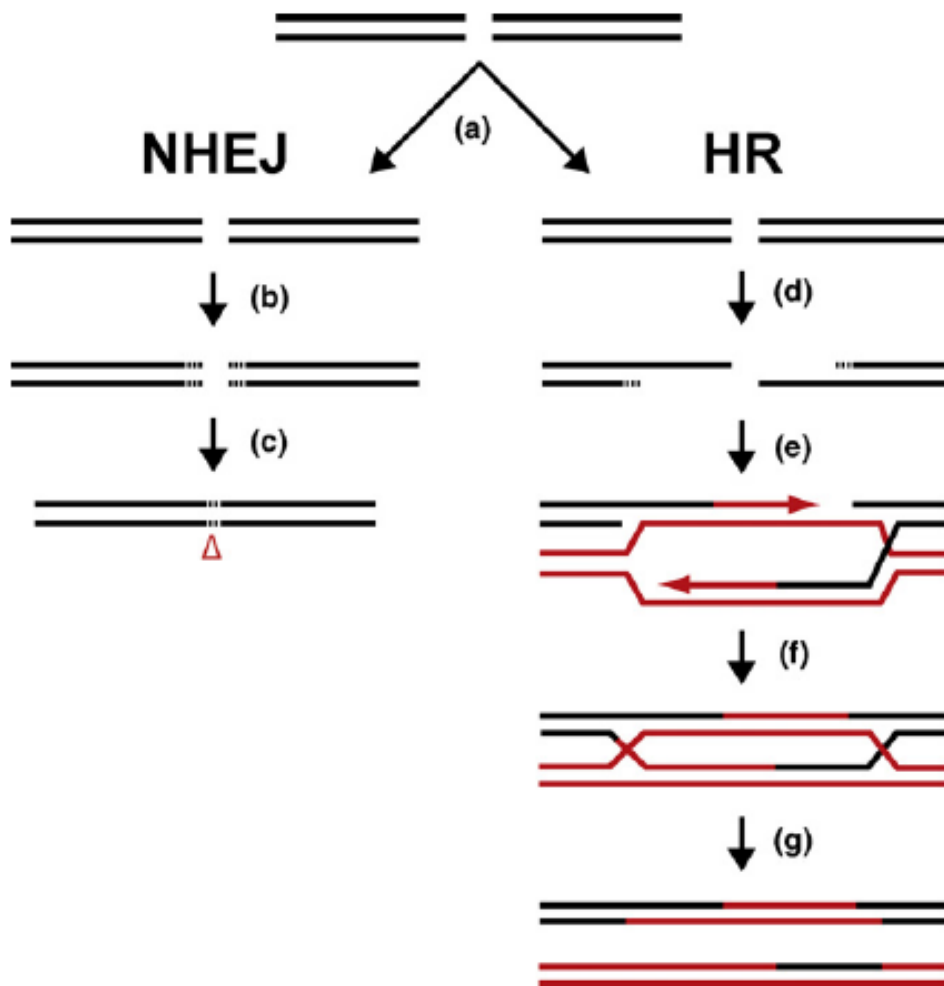


Opravné mechanismy

- Dvoj-řetězcové zlomy (DSB)
 - homologní rekombinace (HR) – v přítomnosti homologů (tj. sesterské chromatidy v G2 fázi)
 - nehomologní spojování konců (NHEJ) – v G1 fázi
- Jednořetězcové zlomy, modifikace nukleotidů
 - Přímé opravy (specifické enzymy)
 - Vystřihování poškozeného úseku (BER, NER – excision repair)
- Opravy chybného párování
 - MMR – mismatch repair (*MSH1-6, MLH1-3*)
 - Speciální polymerázy (TLS – translesion synthesis) *S. cerevisiae*



Oprava DSB



Functional class	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mammalian
DNA damage sensors	Mre11-Rad50-Xrs2 Rfa1-Rfa2-Rfa3	MRE11-RAD50-NBS1 RPA1-RPA2-RPA3
Checkpoint proteins	Rad24-RFC Ddc1-Mec3-Rad17 Mec1-Ddc2 Tel1 Dpb11	RAD17-RFC RAD9-HUS1-RAD1 ATR-ATRIP ATM TopBP1
Homologous recombination proteins	- Sem1 Rad52 Rad51, Rad55-Rad57 Rad54 Rad59 Rdh54 Sgs1	BRCA2-PALB2 DSS1 RAD52 RAD51, RAD51B, RAD51C RAD51D, XRCC2, XRCC3 RAD54 RAD52B RAD54B BLM, RTS, WRN
End-joining proteins	Yku70-Yku80 Dnl4-Lif1-Nej1 - Pso2	KU70-KU80 LIG4-XRCC4 DNA-PK _{cs} Artemis
Structural components	Smc5-Smc6 Smc1-Smc3 H2A	SMC5-SMC5 SMC1-SMC3 H2AX

Závěry

- Kvasinky jsou využívány v biotechnologiích (pivo...)
- V klinické praxi mohou být nebezpečné pro pacienty se sníženou imunitou ...
- Jako modelový organismus
 - studium buněčných procesů
 - Genetické, evoluční ... analýzy