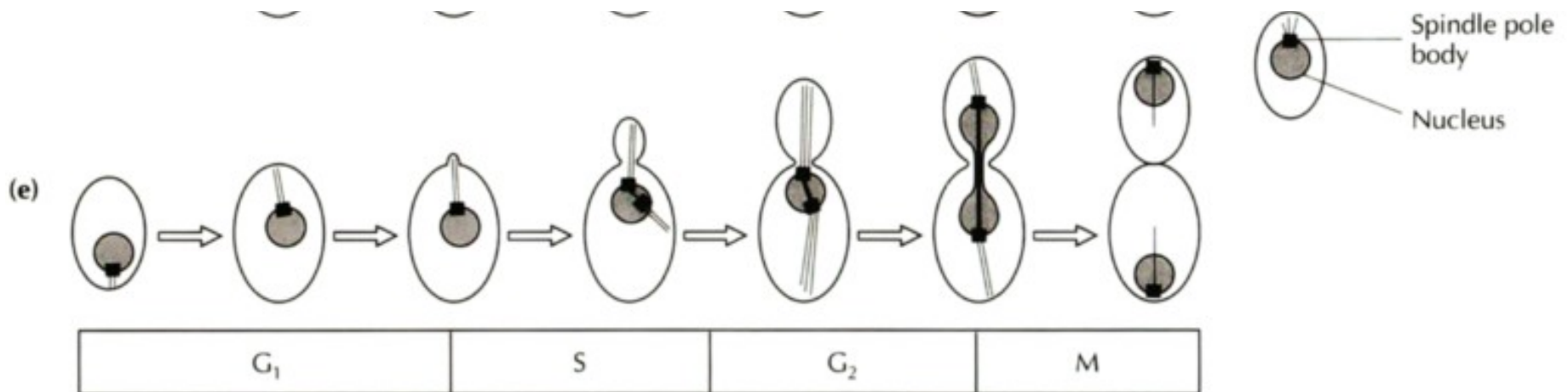


Základní prvky kvasinkového genomu

Saccharomyces cerevisiae

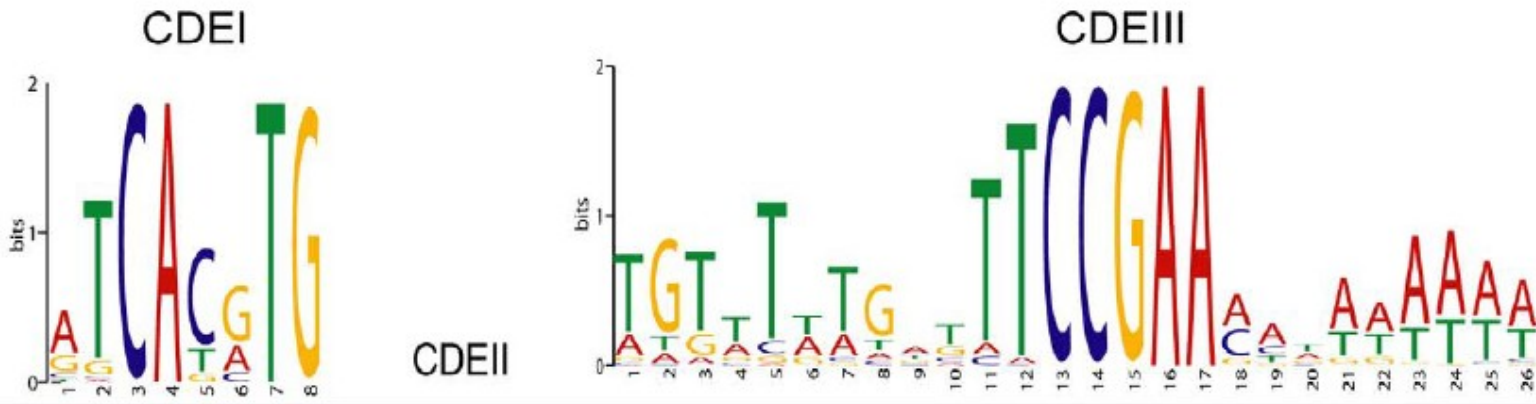
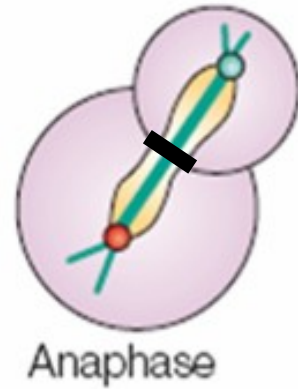
- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosomů (chrI=0.22 – chrXII=1.6Mbp)
- délka chromosomu XII se u různých *S.c.* liší dle počtu (až 200) kopií rDNA v repetici (9kbp), 262 tRNA, 40 snRNA,
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Geny (cca 6500) reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- Redundantní (2000 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



Centromera *S. cerevisiae*

(c)

Budding yeast centromere/kinetochore
125-bp CEN DNA

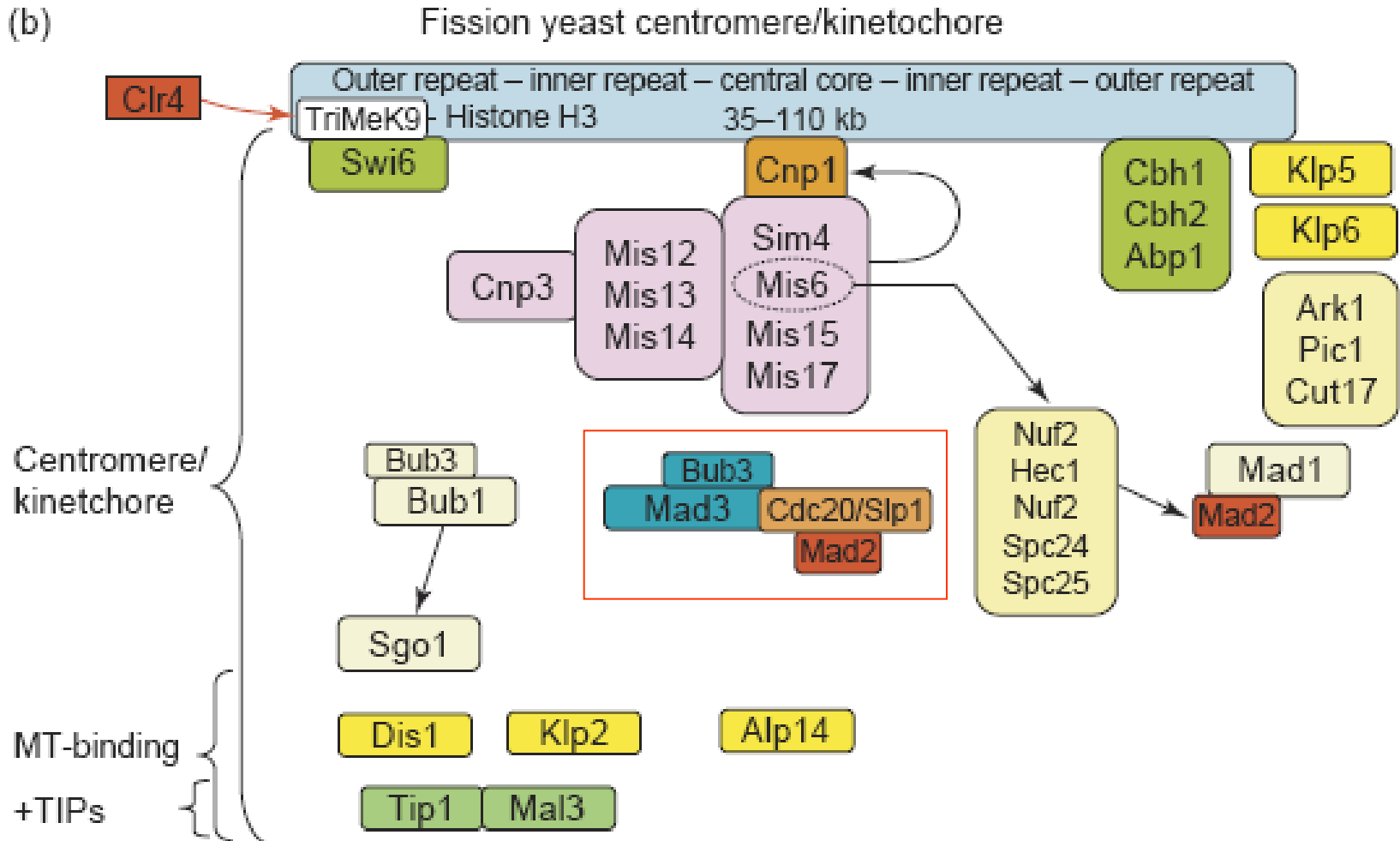


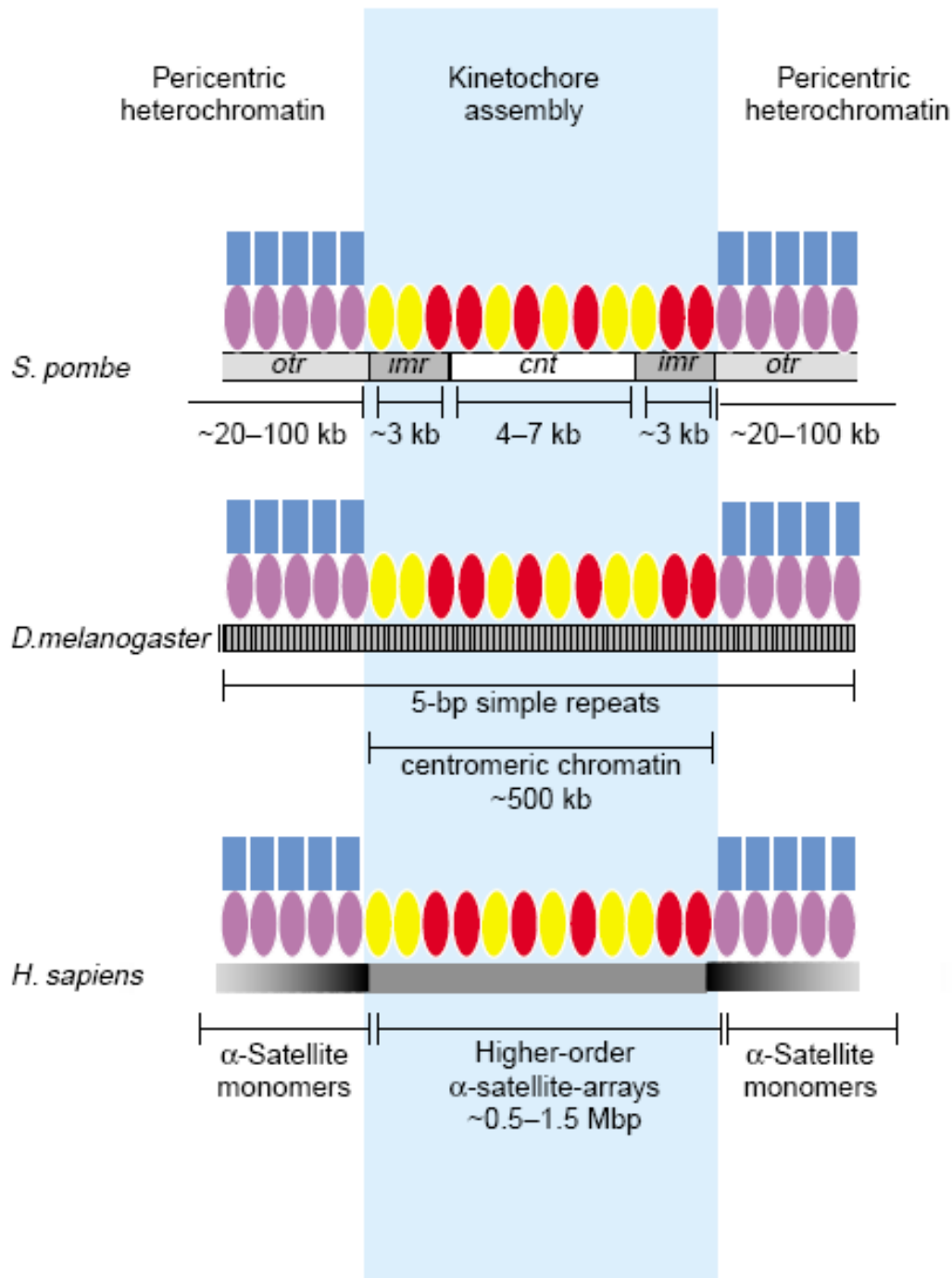
Konsensní skevence kvasinek

- Sekvenčně specifická centromera se patrně vyvinula z původně repetitivní/sekvenčně nespecifické

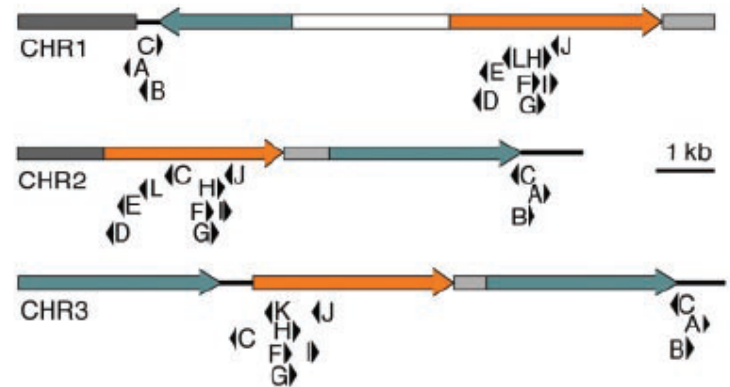
Centromera *S. pombe*

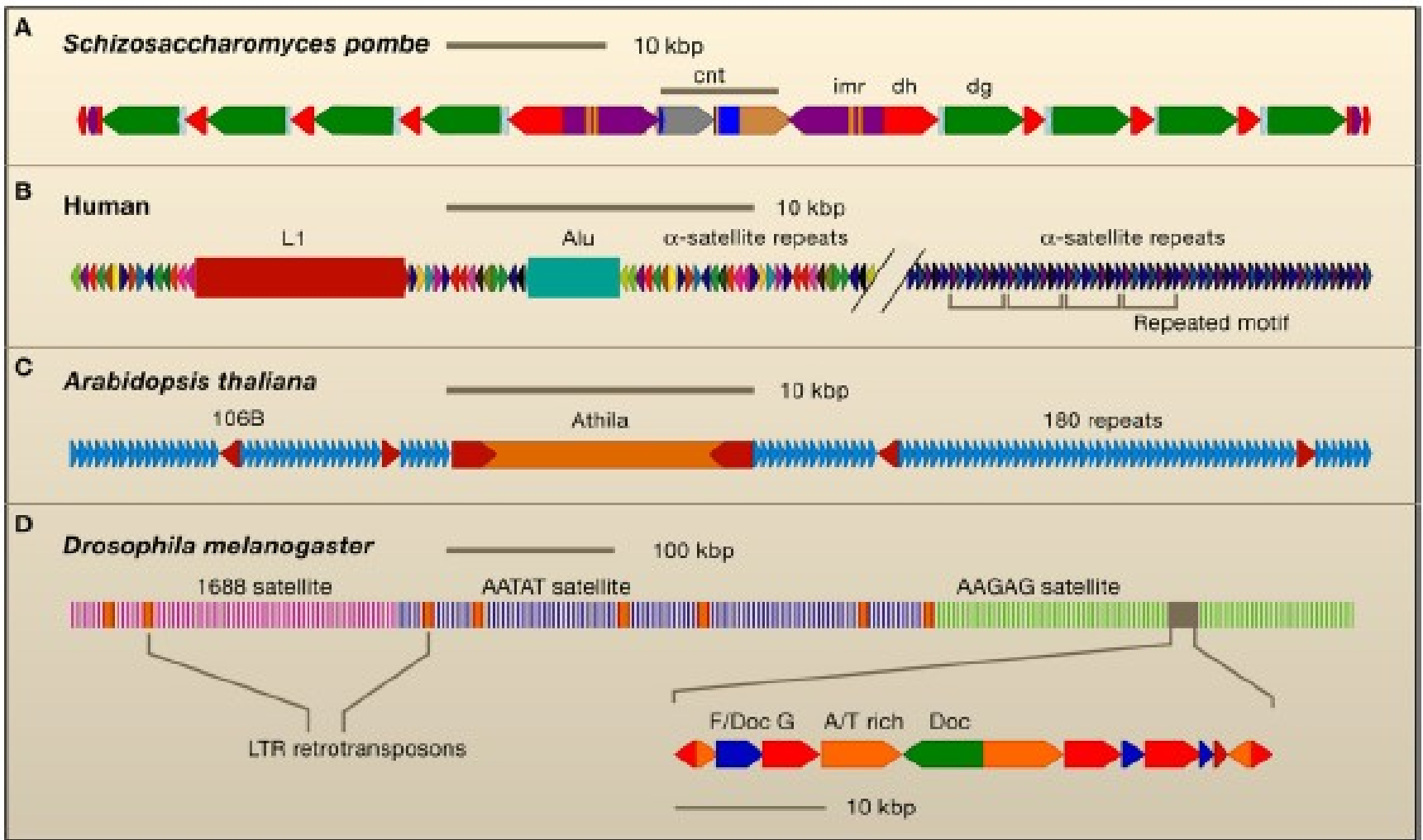
- Pouze 3 chromozomy (13 Mbp = 3.5, 4.6, 5.7)
- kondenzované chromozomy - geny pro heterochromatin
- velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace





siRNA silencing





Pozorování DNA/chromosomů u kvasinek

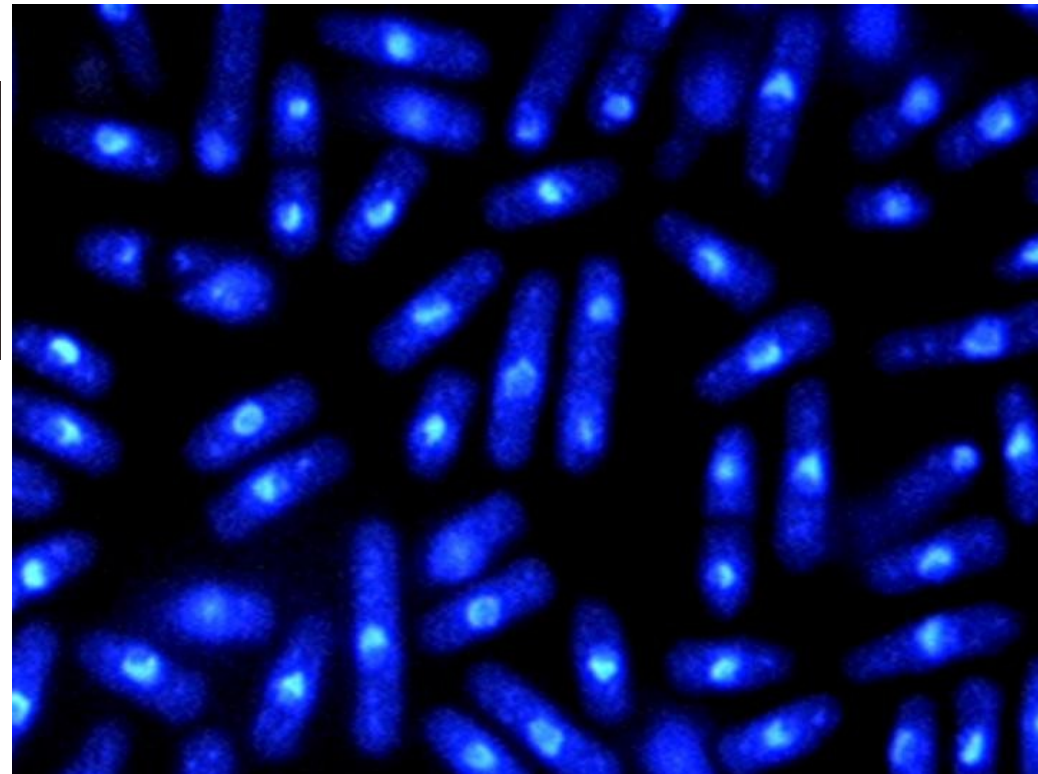
- Chromosomy jsou u kvasinek malé a těžko pozorovatelné – barvení DNA na fixovaných preparátech pomocí DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)
- Použití centromerických proteinů-GFP (green fluorescence protein) pro studium dynamiky chromatinu
- TetR-GFP represor se váže na TetO sekvence (operon) zaintegrované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



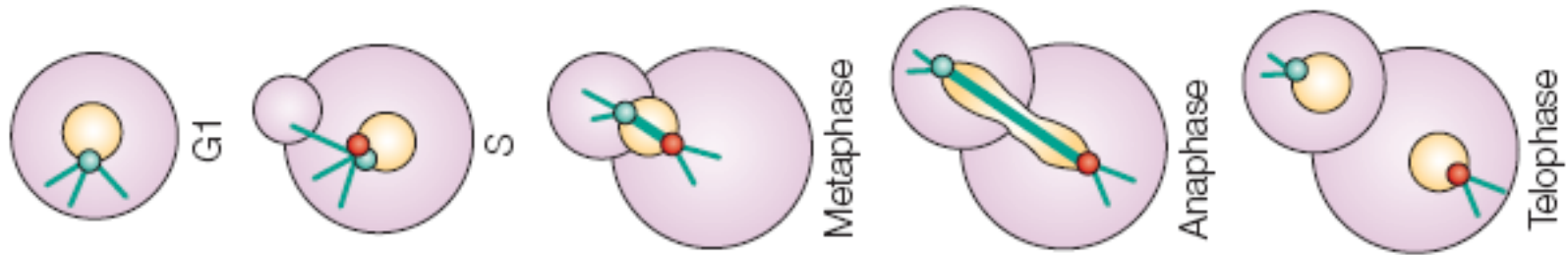
Saccharomyces cerevisiae

Schizosaccharomyces pombe →

Pozadí = mtDNA

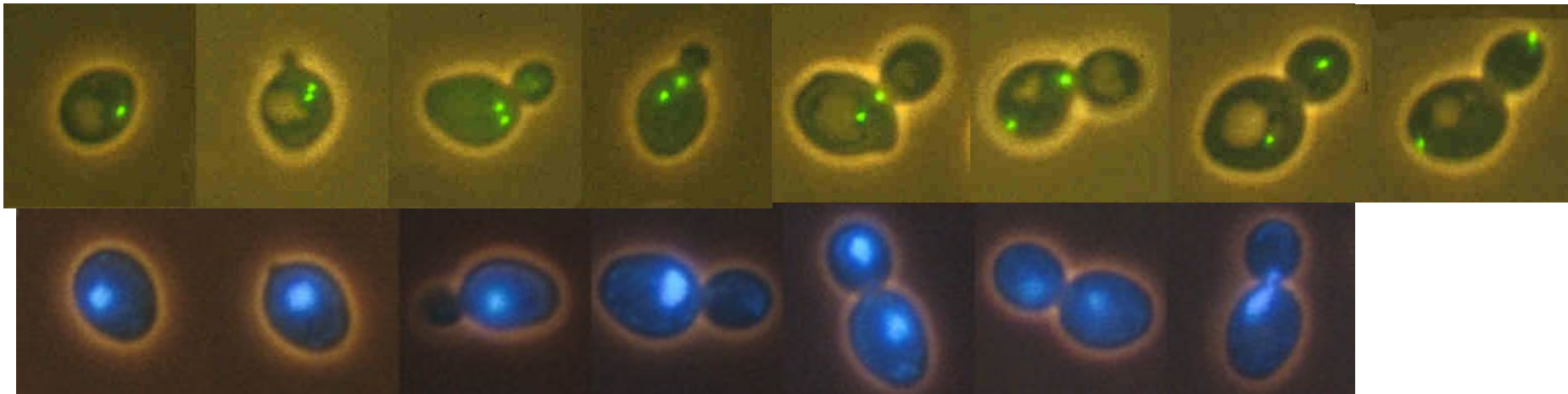


DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*



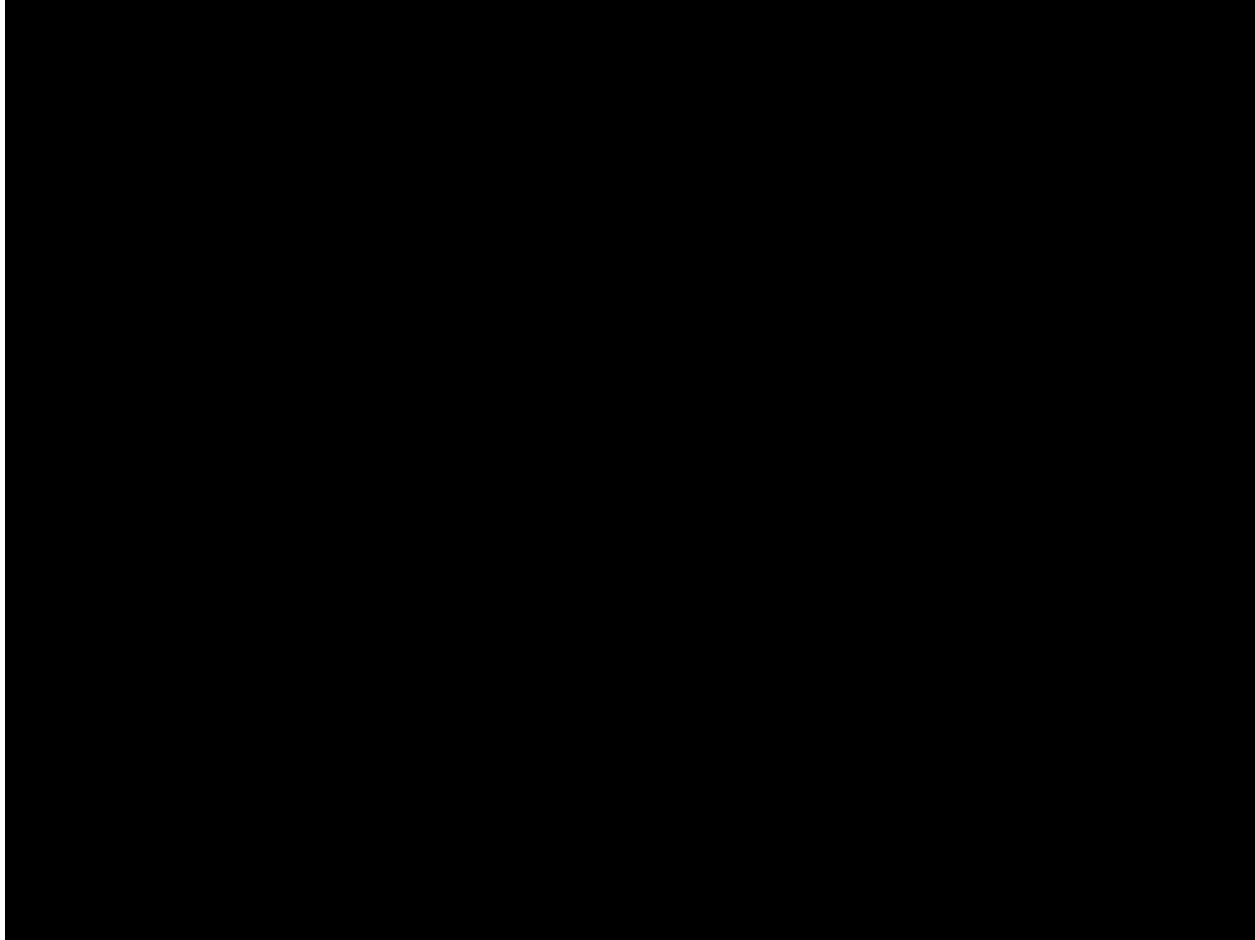
- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze tj. replikace
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G2 fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (u kvasinek se jaderná membrána nerozpadá)
- **na začátku anafáze dochází k oddělení sesterských chromatid a jejich segregaci**

SPB-GFP barvení



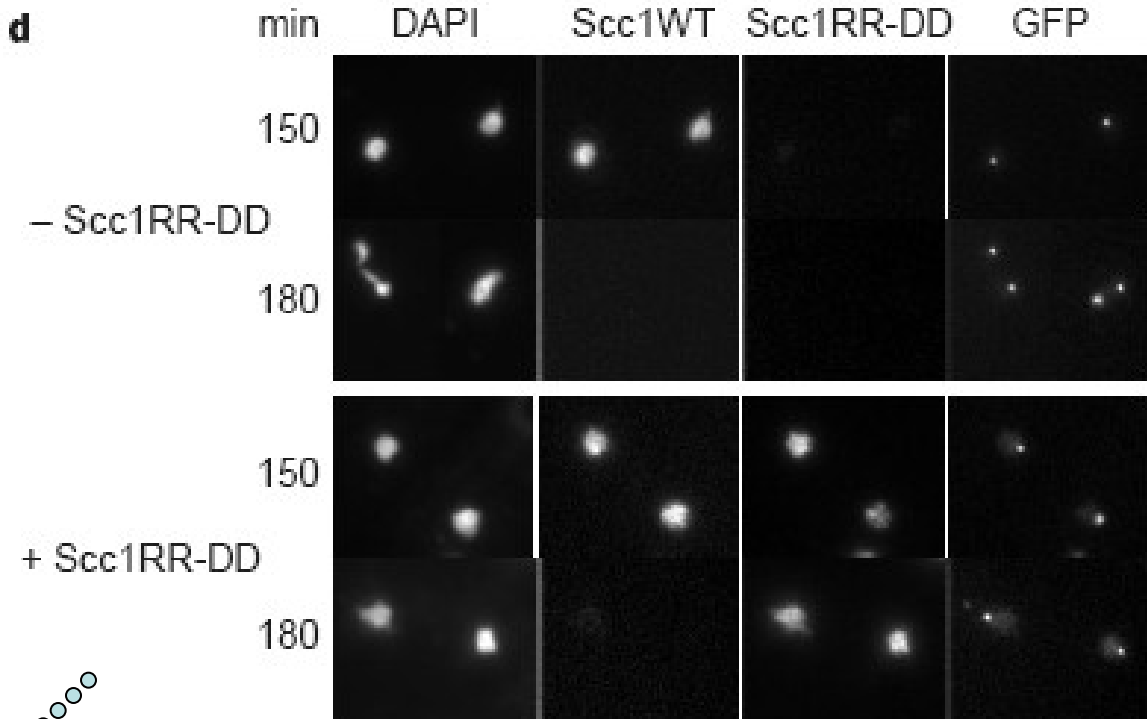
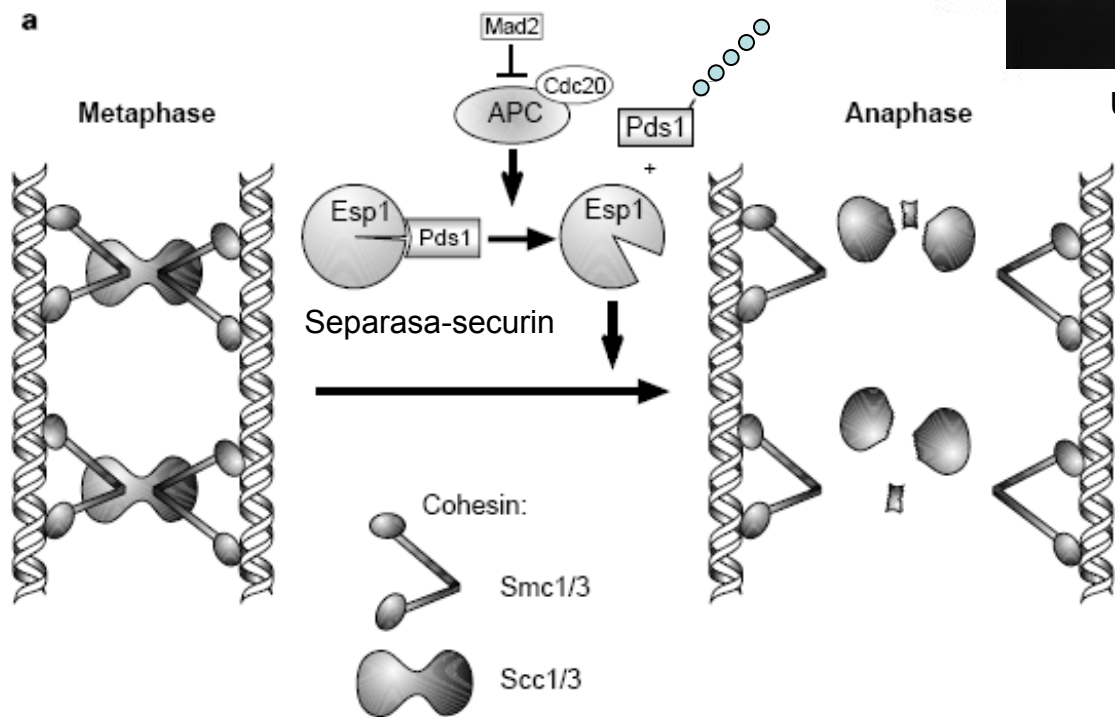
Separace a segregace chromosomů

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



Model separace chromosomů

APC=anaphase promoting complex



Uhlmann et al., Nature, 1999

TetR-GFP
TetO

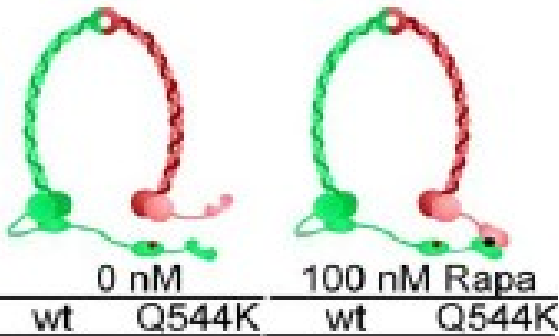
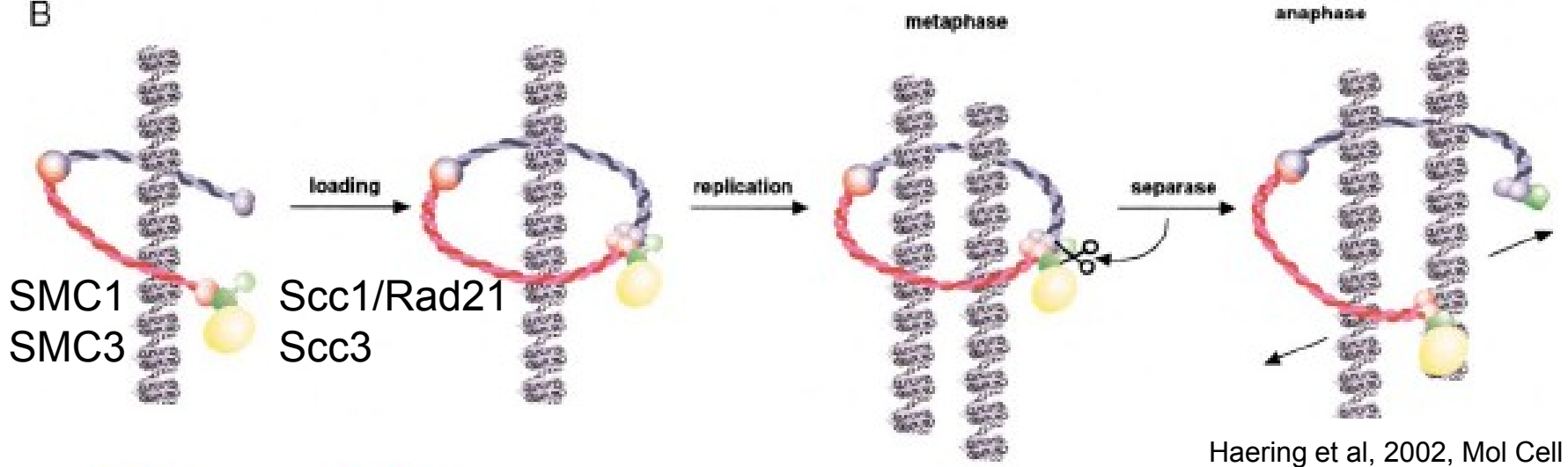
Použití TEV proteasy

kohesinový komplex
(SMC=structure maintenance of chromosome)

SMC1, SMC3,
Scs1 a Scs3

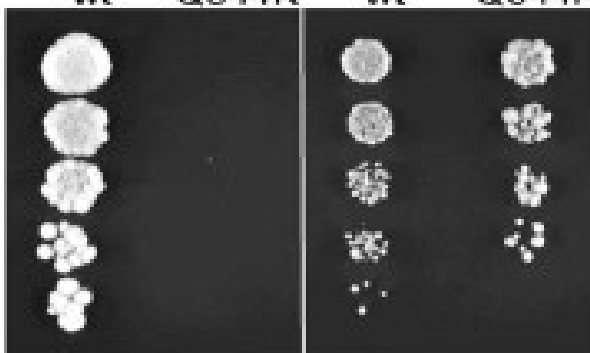
Kohesin „objímá” DNA

B

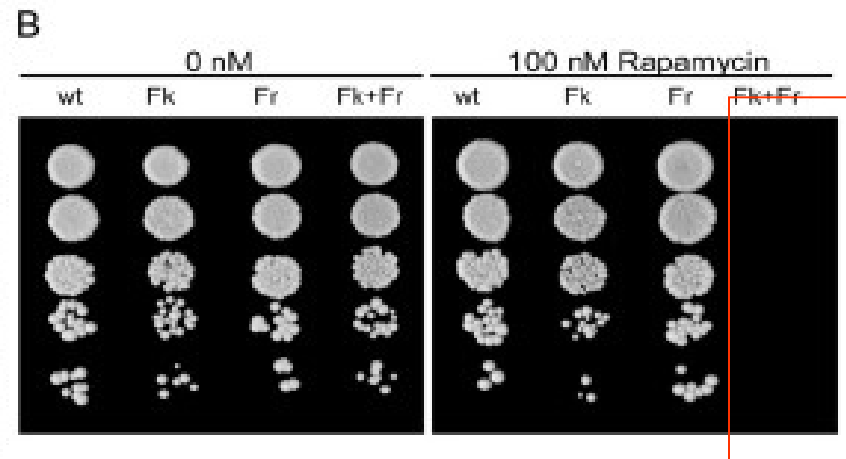
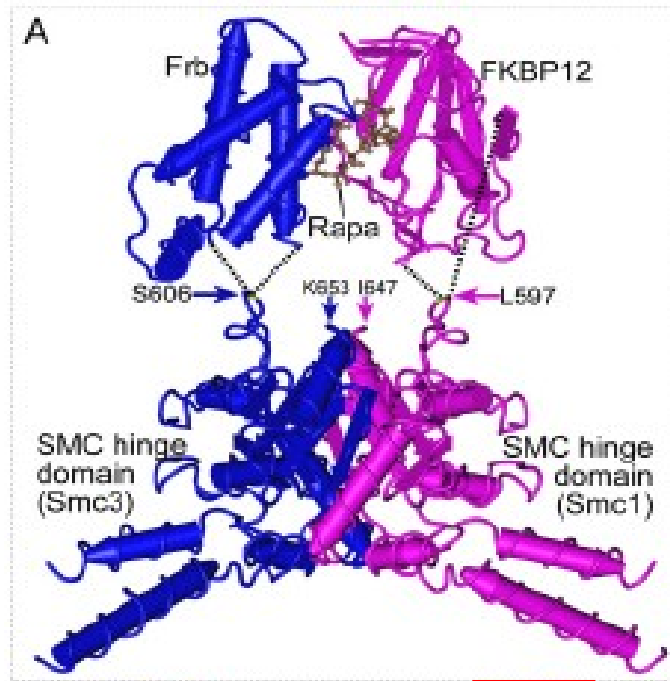


Použití fúzních proteinů při studiu kohese sesterských chromatid

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

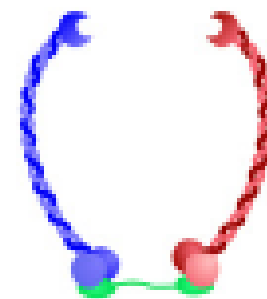
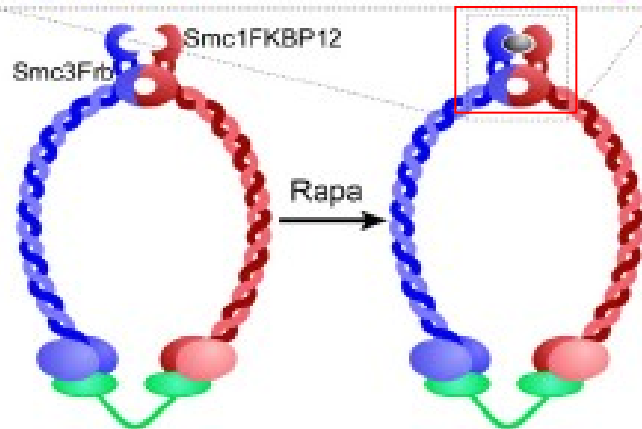


Vstup DNA přes opačný konec než uvolnění



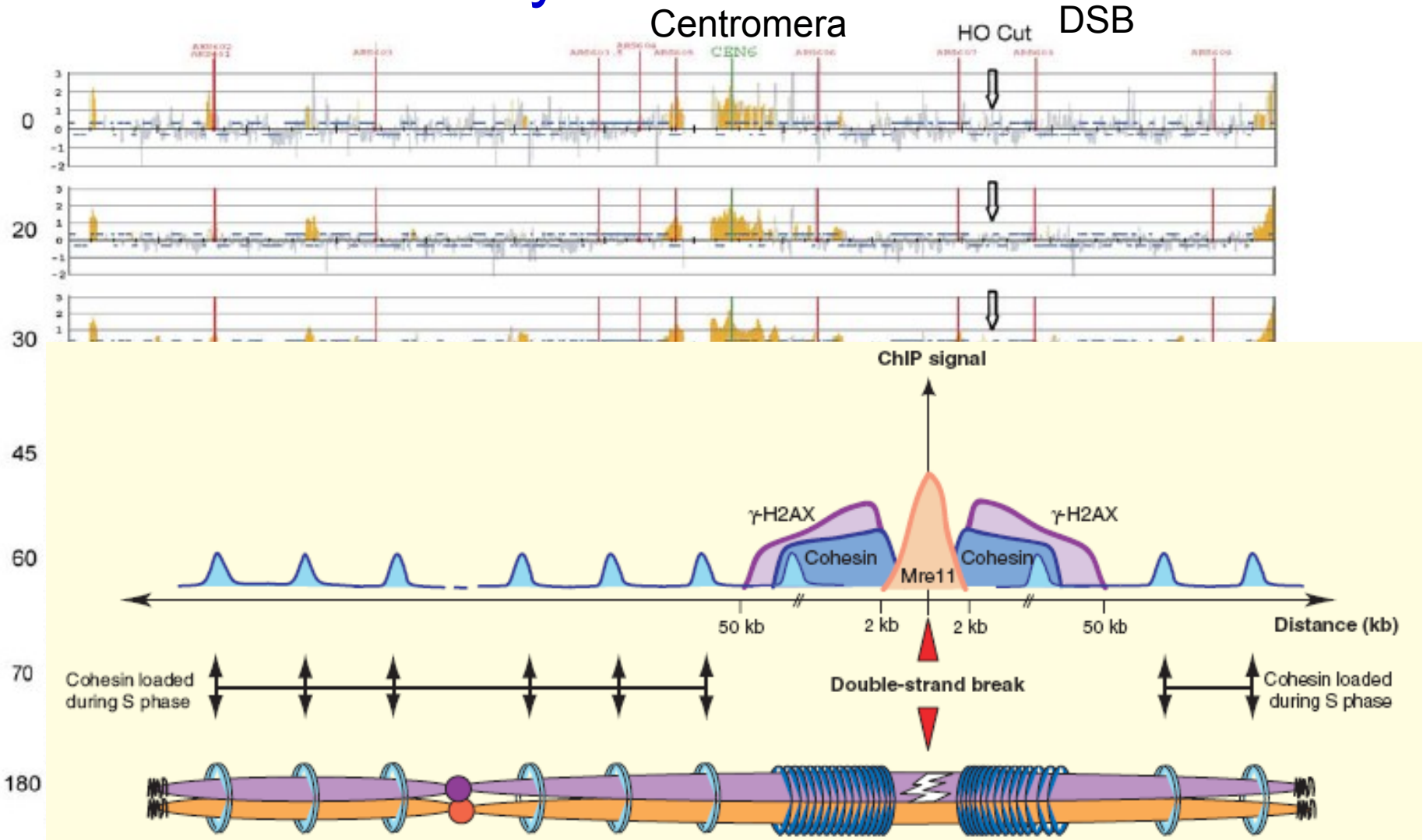
Gruber et al., Cell, 2006

Uzamčení je pro buňku letální



Clothes Peg Model

Kohesin napomáhá při opravě dvouřetězcových zlomů v G2/M fázi

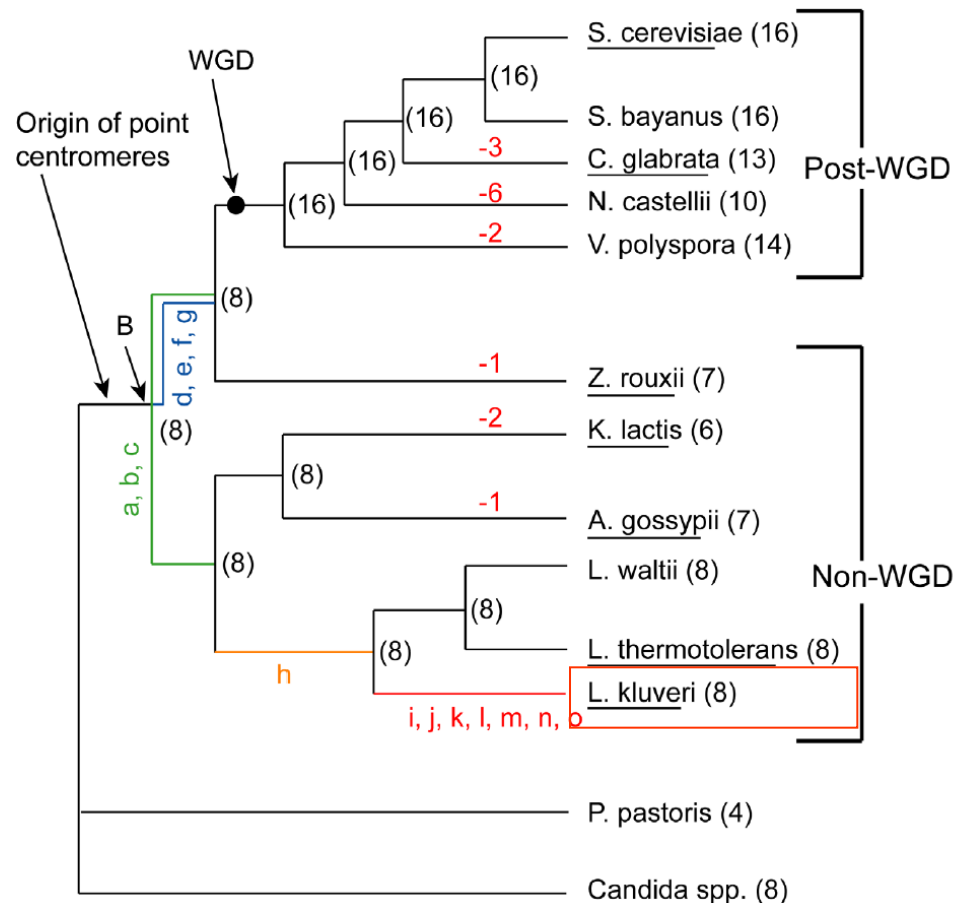


Evoluce kvasinkového genomu

- cca 30% genomu *S.c.* vzniklo duplikacemi – cca 2000 genů duplikováno
- srovnání kvasinkových genomů ukázalo na existenci „prakvasinky“ s 8-mi ancestrálními chromosomy (cca 4500 geny)
- nejbližší anc. genomu je *Lachancea kluyveri* (8 chromosomů, nejméně = 15 přeskupení v genomu)

- ancestrální kvasinka prošla celogenomovou duplikací (WGD) 8->16 chromosomů

- některé kvasinky některé chromosomy ztratili (např. *C.glabrata* = 3 chromosomy)



Přeskupování chrom. bloků u *L. kluveri*

- přeskupení prostřednictvím rekombinace (mikrohomologií)

- *L.k.* neztratil chromosom - patrně způsobeno absencí genů *DNL4*, *POL4*, *NEJ1* – důležité pro NHEJ mechanismus (oprava poškozené DNA např. dvouřetězcových zlomů, které jsou nutné pro fuze chromosomů i přeskupování => omezené přeskupování)

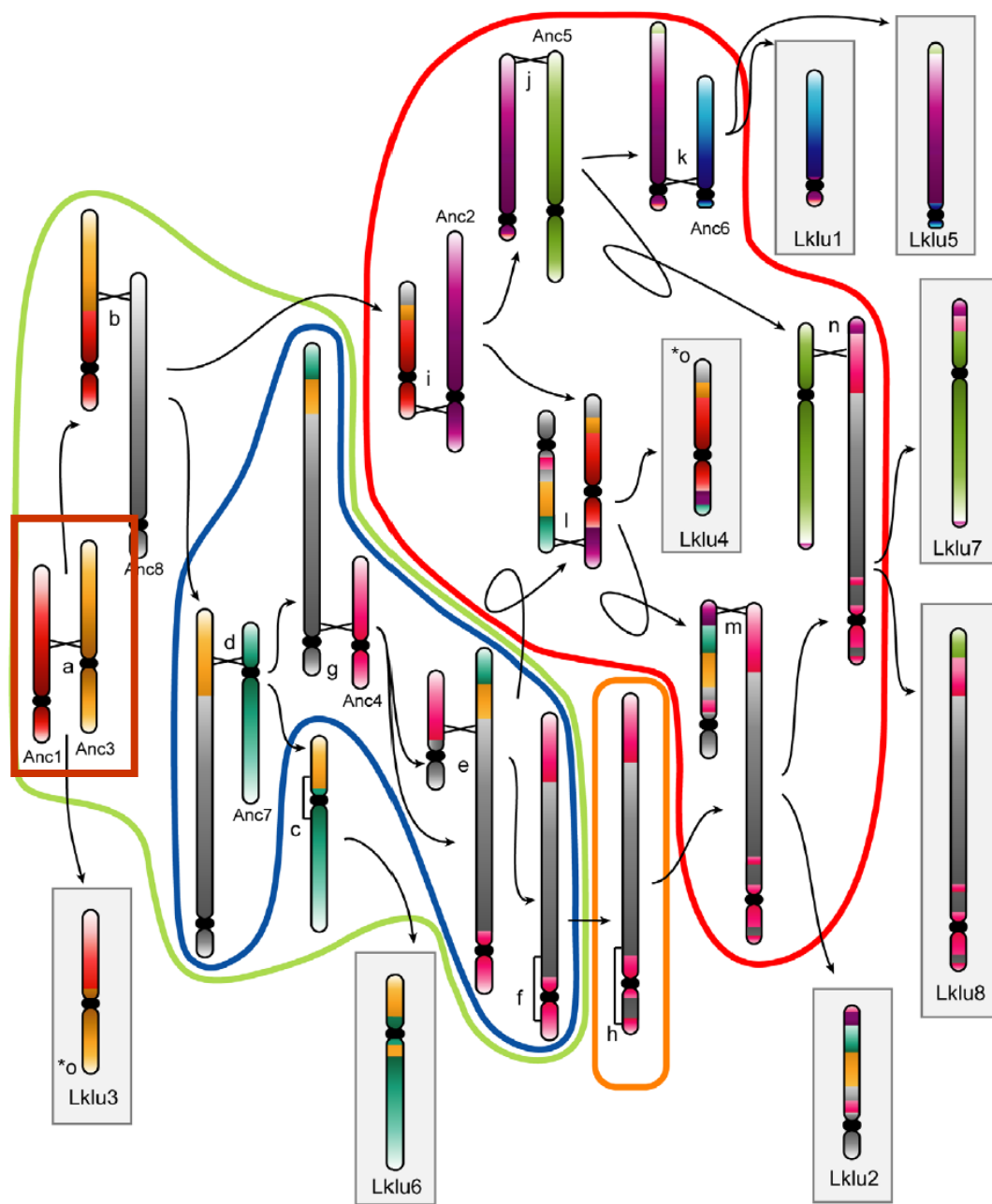
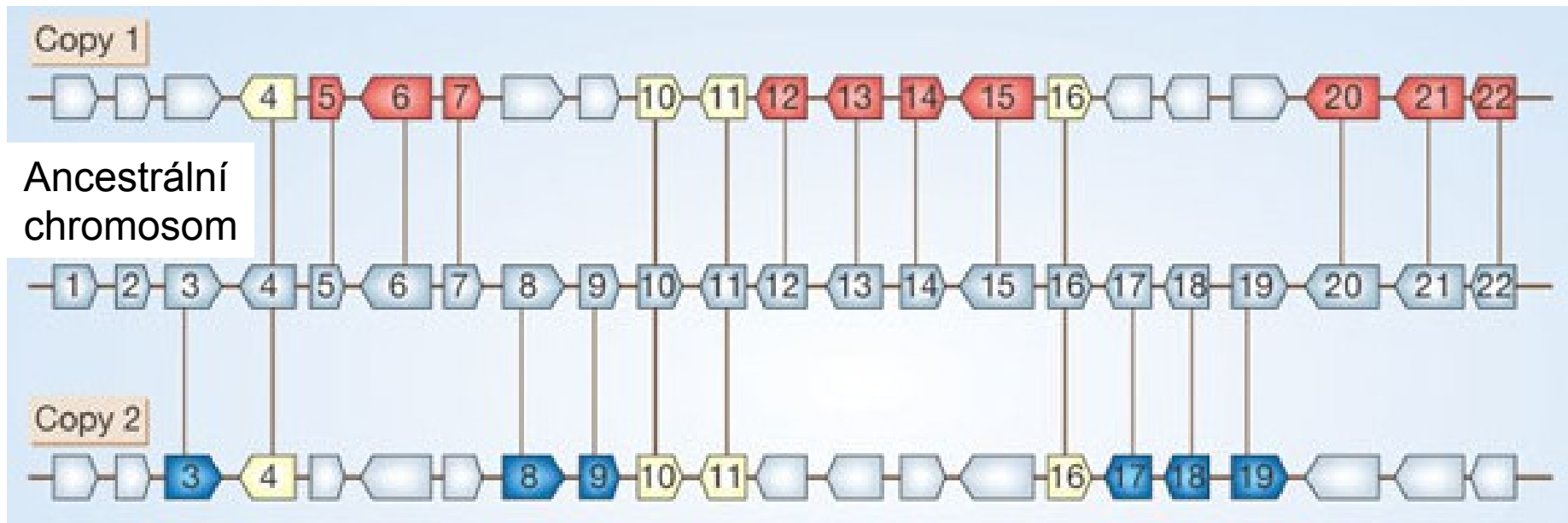
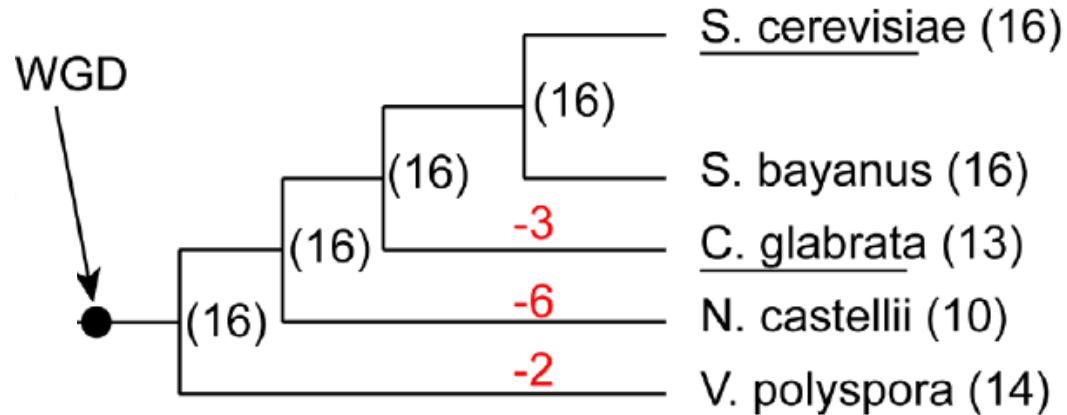


Figure 2. Cartoon showing the rearrangements indicated by lowercase letters in Figure 1. Monocolored chromosomes belong to the WGD Ancestor. Chromosomes in gray boxes are extant *L. kluveri* chromosomes. Events encircled by a color correspond to events on branches of the same color in Figure 1. Black crossed lines between chromosomes represent points of interchromosomal translocations, and square brackets along chromosomes (events c, f and h) represent inversions. Arrows point to the products resulting from each rearrangement. The rearrangement for event o (marked with two asterisks) is not shown as it involves a reciprocal translocation located one gene from the edge of the Ancestral inference, which essentially swaps the telomeres of Anc3 and Anc8 at the ends of Lklu3 and Lklu4.

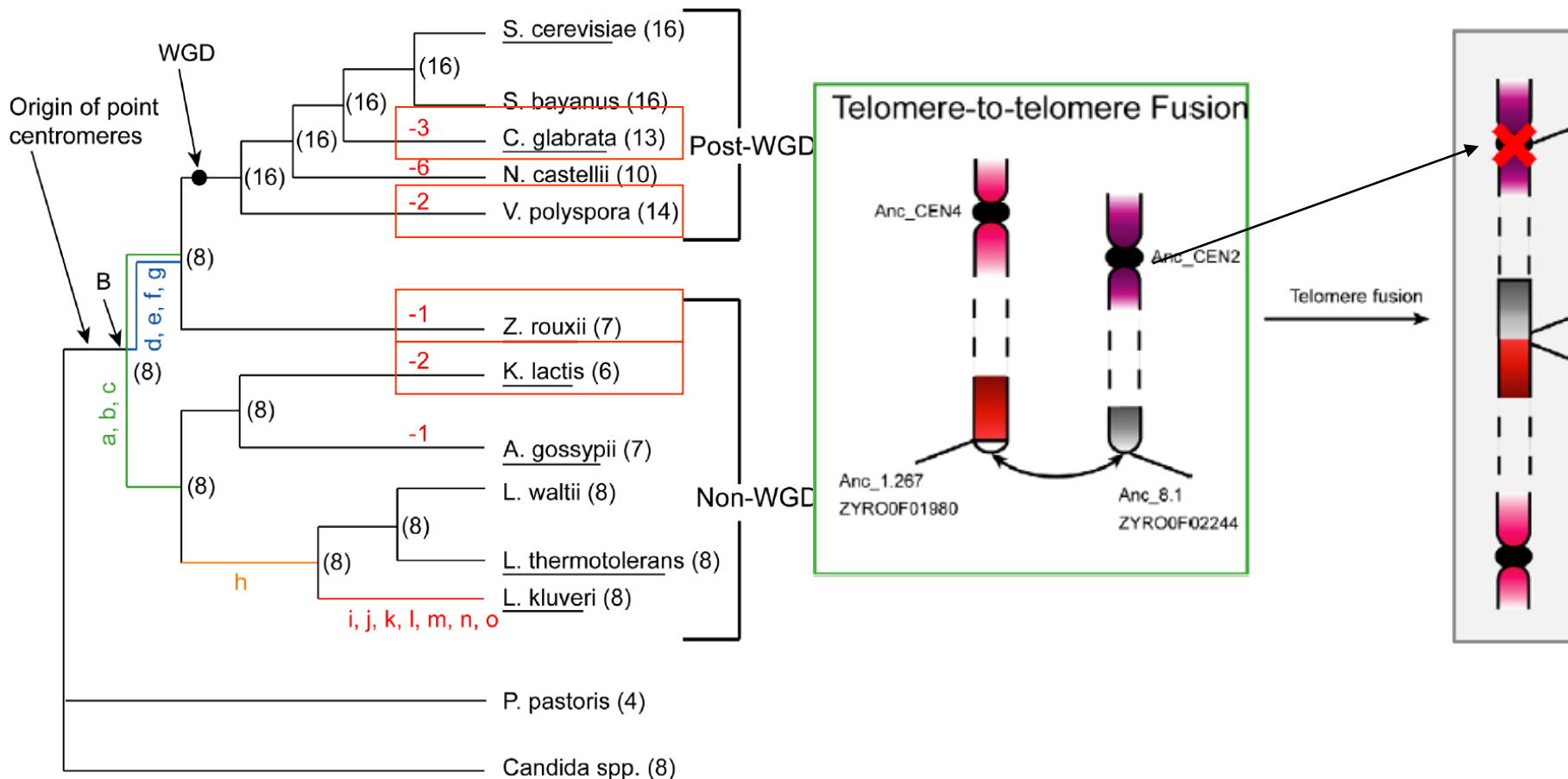
Celogenomová duplikace – *S.cerevisiae*

- ancestrální kvasinka prošla celogenomovou duplikací (WGD) 8->16 chromosomů
- poté došlo k přeskupování a redukci segmentů (i chromosomů) – 30% genomu u *S.c.* je pozůstatkem celogenomové duplikace (nikoli duplikace segmentů či genů)

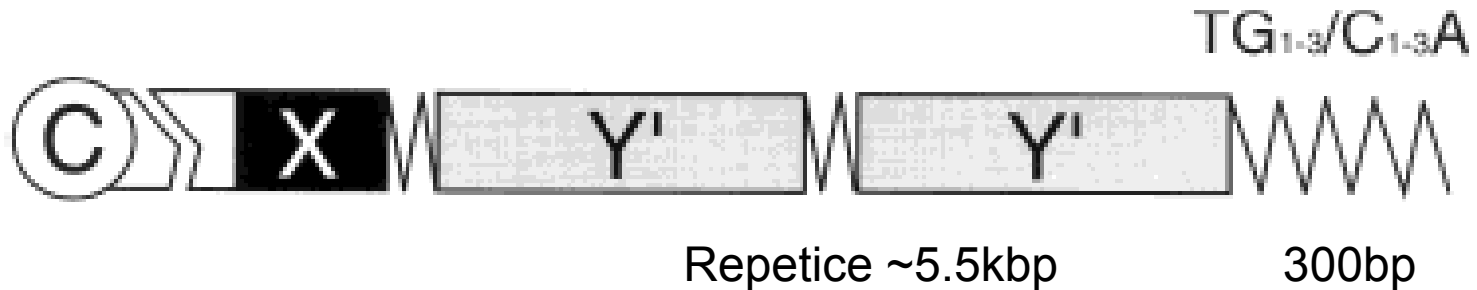


Redukce chromosomů telomera-telomera fúzí

- např. *Zygosaccharomyces rouxii* ztratila 1 chromosom díky telomera-telomera fúzi 2 ancestrálních chromosomů - současně ztratily centromeru (chromosom nemůže mít 2 centromery – problémy se segregací)



Struktura kvasinkových telomer



E. Blackburn, Nobelova cena, 2009

Species

RAP1 consensus

t/a R R T G Y a Y R G R t

No. of repeats

S. cerevisiae, *S. exiguus*

T G G T G T G T G G G T G

1

S. castellii, *S. dairensis*

T C T G G G T G T C T G G G T G

2

C. glabrata

C T G T G G G G T C T G G G T G

1

S. kluyveri

G A C A T G C G T A C T G T G A G G T C T G G G T G

1

C. albicans

T C T A A C T T C T T G G T G T A C G G A T G

1

C. tropicalis

T C A C G A T C A T T G G T G T A a/c G G A T G

1

C. maltosa

C A G A C T C G C T T G G T G T A C G G A T G

1

C. pseudotropicalis

T G A T T A G T T A T G T G G T G T A C G G A T T

1

K. lactis

T G A T T A G G T A T G T G G T G T A C G G A T T

1

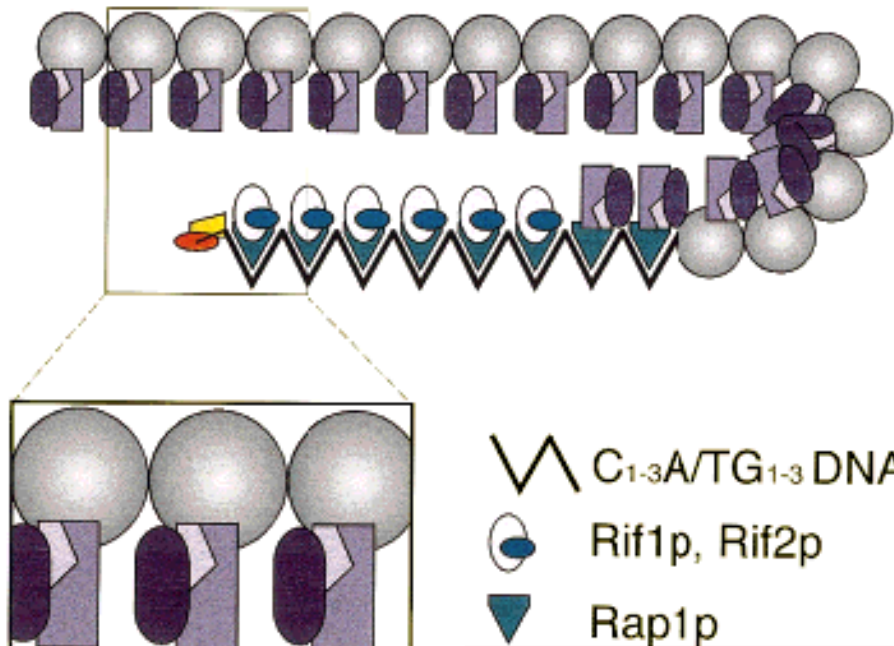
C. guilliermondii




T A C T G G T G T A C T G G T G

2

5' To end of telomere → 3'

Ochrana kvasinkových telomer



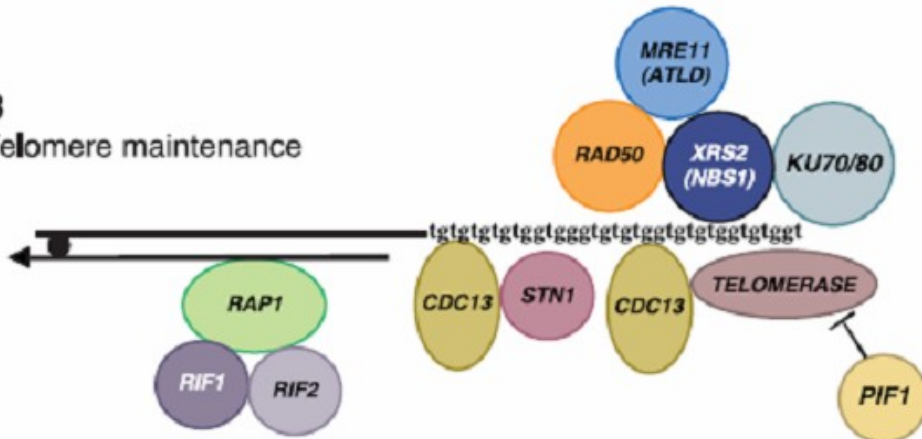
 C₁₋₃A/TG₁₋₃ DNA
 Rif1p, Rif2p
 Rap1p

- musí být prodlužovány (telomerásou), jinak by se zkracovaly po každé replikaci

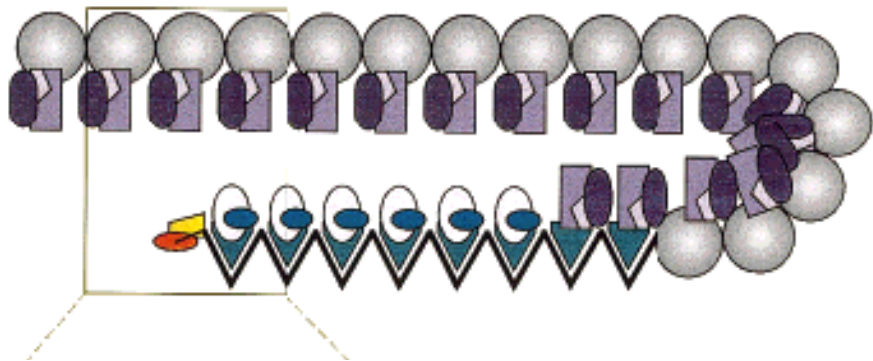
- musí být chráněny, jinak by byly považovány za konec zlomené DNA („opraveny“ např. fúze chromosomů)

- struktura telomer a subtelomer umlčuje transkripci (silencing)

B Telomere maintenance



Represe u kvasinkových telomer



- struktura telomery a subtelomery umlčuje transkripci (silencing)

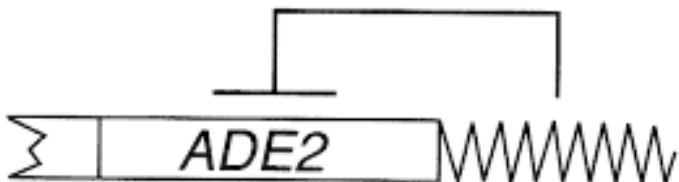
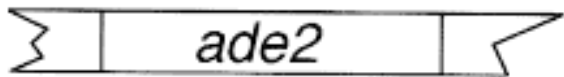
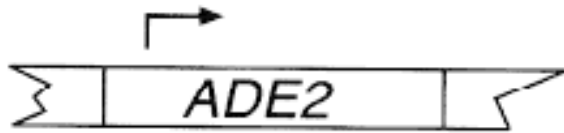
-např. HML a HMR lokusy jsou umlčené (pouze MAT lokus určuje párovací typ)

- ADE2 reporter je pod kontrolou telomer pouze občasně náhodně transkribován

- v průběhu evoluce některé geny mění lokalizaci a jsou jinak regulovány



a)



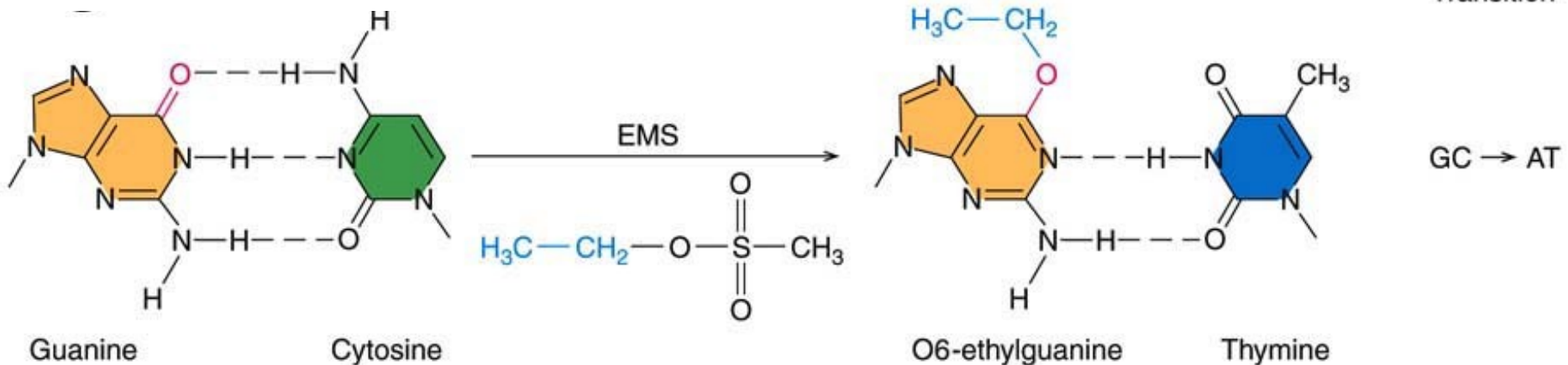
Aneuploidie způsobuje genomovou nestabilitu - rakovina

- aneuploidie ve >90% rakovinných buněk
- je genomová nestabilita důsledkem aneuploidie nebo je aneuploidie důsledkem genomové nestability?

Wild-type	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disome I	-	+	ND	+	-	+	-	+	-	-
Disome II	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Disome IV	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	+
Disome V	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Disome VIII	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Disome IX	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Disome X	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Disome XI	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Disome XII	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Disome XIII	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Disome XIV	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Disome XV	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Disome XVI	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-

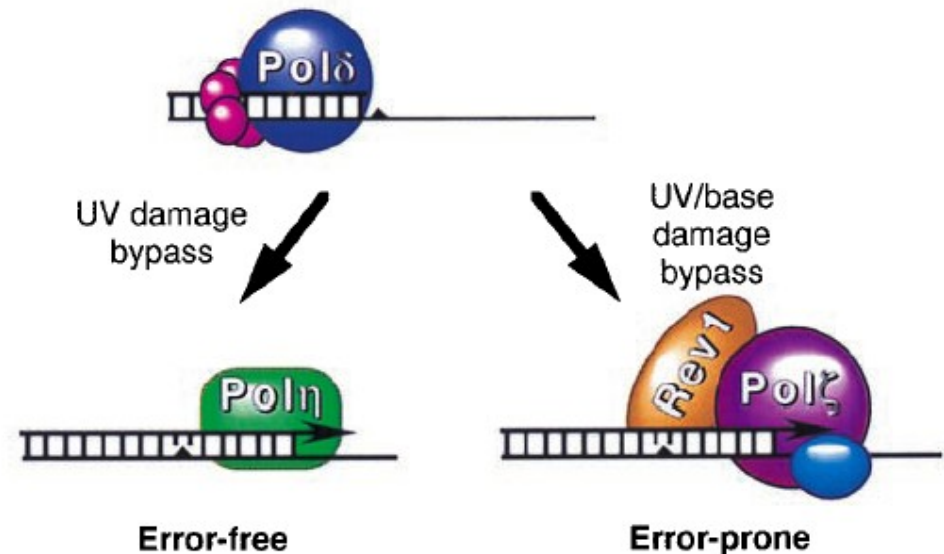
Poškození DNA

- 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, *S.pombe*)
 - nehomologní spojování konců (NHEJ) – v G1 fázi (*S.cerevisiae*)
- 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 – v průběhu replikace)



Oprava DSB

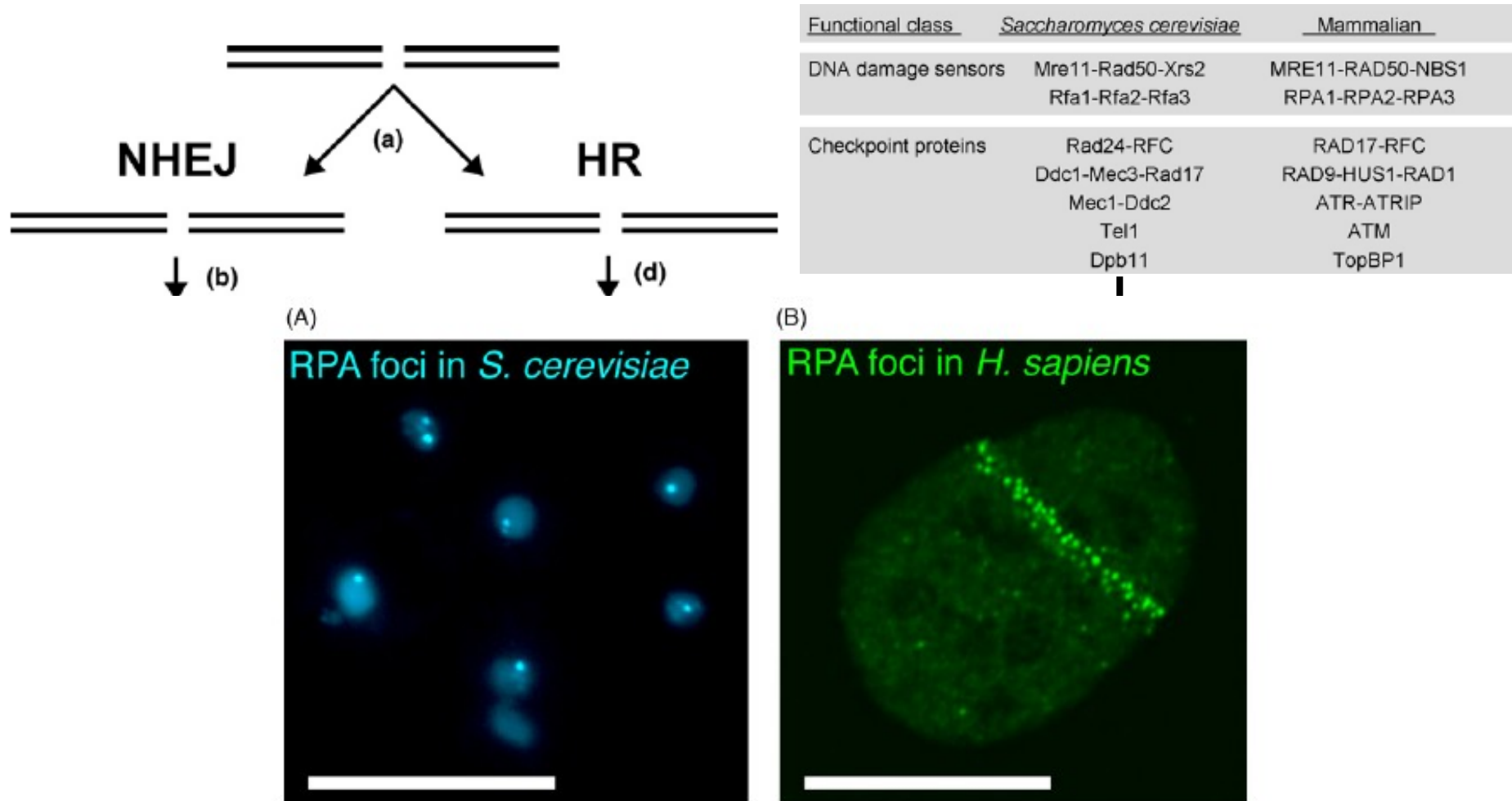
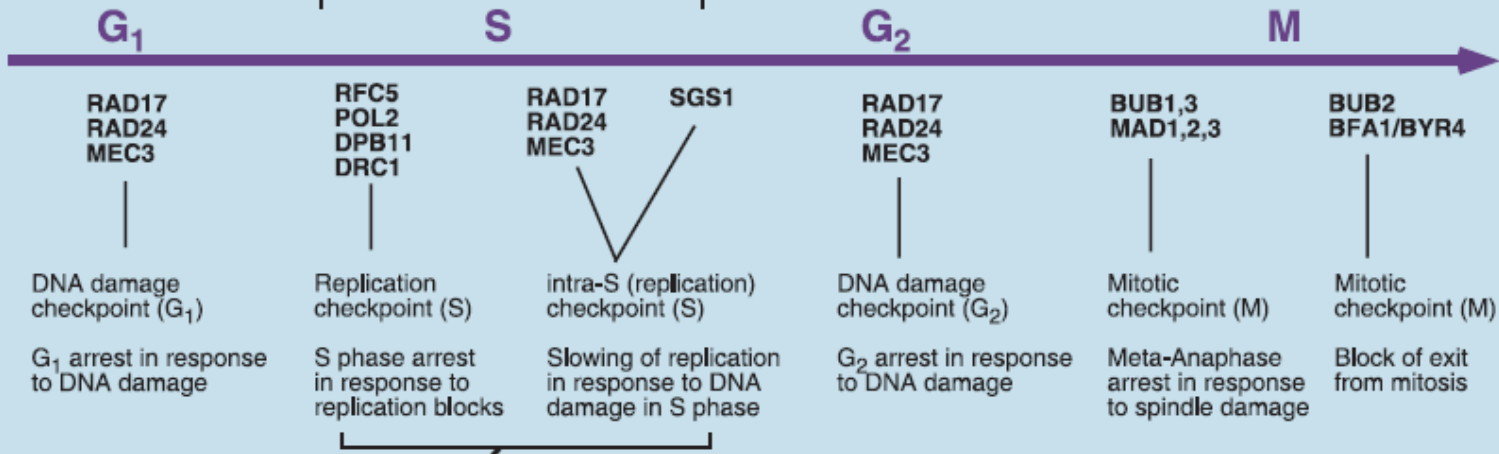


Fig. 1. DNA damage-induced RPA foci. (A) Rfa1 foci in *S. cerevisiae*. A yeast strain expressing Rfa1-CFP was treated with 200 µg/ml zeocin for 1 h to induced DSBs. Six yeast nuclei are shown. (B) RPA foci in human cells. U2OS cells were sensitized with BrdU and laser micro-irradiated at 337 nm to generate a track of DSBs. Immunostaining with target specific antibodies against RPA. One nucleus is shown. Reproduced from [2] with permission from Journal of Cell Biology. Scale bars, 10 µm.

Maintenance of genome stability



Human homologs

Yeast	Human	Cancer syndrome
MEC1/TEL1	ATR/ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11	MRE11	Ataxia telangiectasia-like disorder
XRS2	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
RAD53/DUN1	hCHK2	Li-Fraumeni syndrome
SGS1	BLM/WRN/RTS	Bloom, Werner & Rothmund-Thomson syndromes

Transducer and effector functions

- MEC1
- TEL1
- MRE11-RAD50-XRS2
- RAD9
- RAD53
- DUN1
- RAD55
- PDS1

Fig. 1. Summary of *S. cerevisiae* DNA damage, replication, and mitotic checkpoints. The different stages of the cell cycle are indicated above the horizontal line. Below the line are listed a subset of the proteins that function in the indicated checkpoint branches. These proteins are thought to detect the "damage" that triggers each checkpoint. The primary effect of activating each checkpoint is shown below the proteins. Listed below the three checkpoint branches that function in S-phase are many of the known proteins that function in the downstream signal transduction cascade or are targeted by this cascade. The box at the right lists human homologs of yeast checkpoint genes that are mutated in human cancer susceptibility syndromes.

rDNA - repetice

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