

Souhrn předchozích přednášek

(relevantní pro tuto přednášku)

- Buněčný cyklus *S.c.* a *S.p.*
- Metodika analýzy kvasinek
- Genetické metody

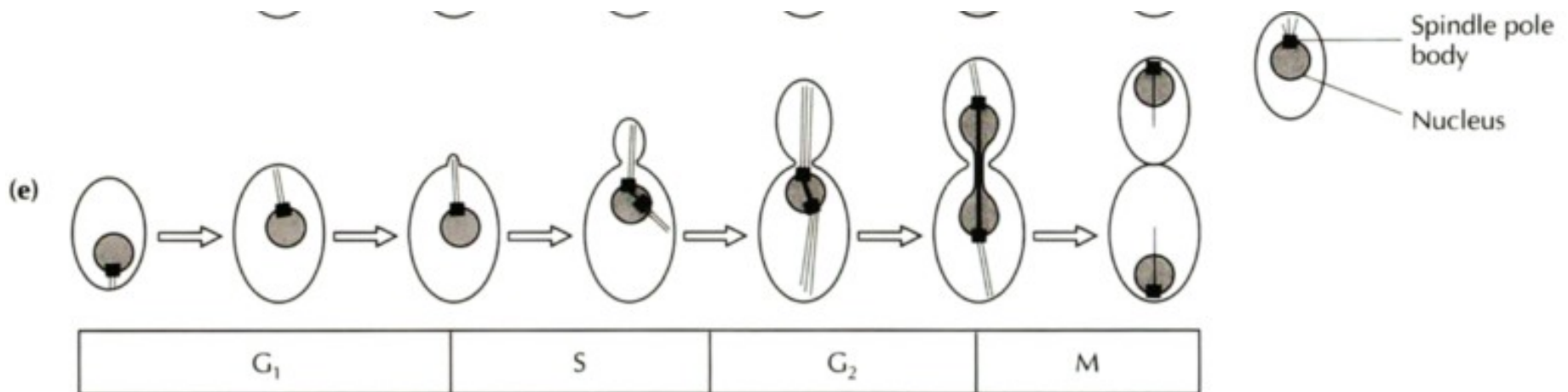
Osnova 7. přednášky

- Dynamika chromatinu
 - v buněčném cyklu
 - organizace: centromery, telomery
 - SMC komplexy
- Evoluce kvasinkového genomu

Základní prvky kvasinkového genomu

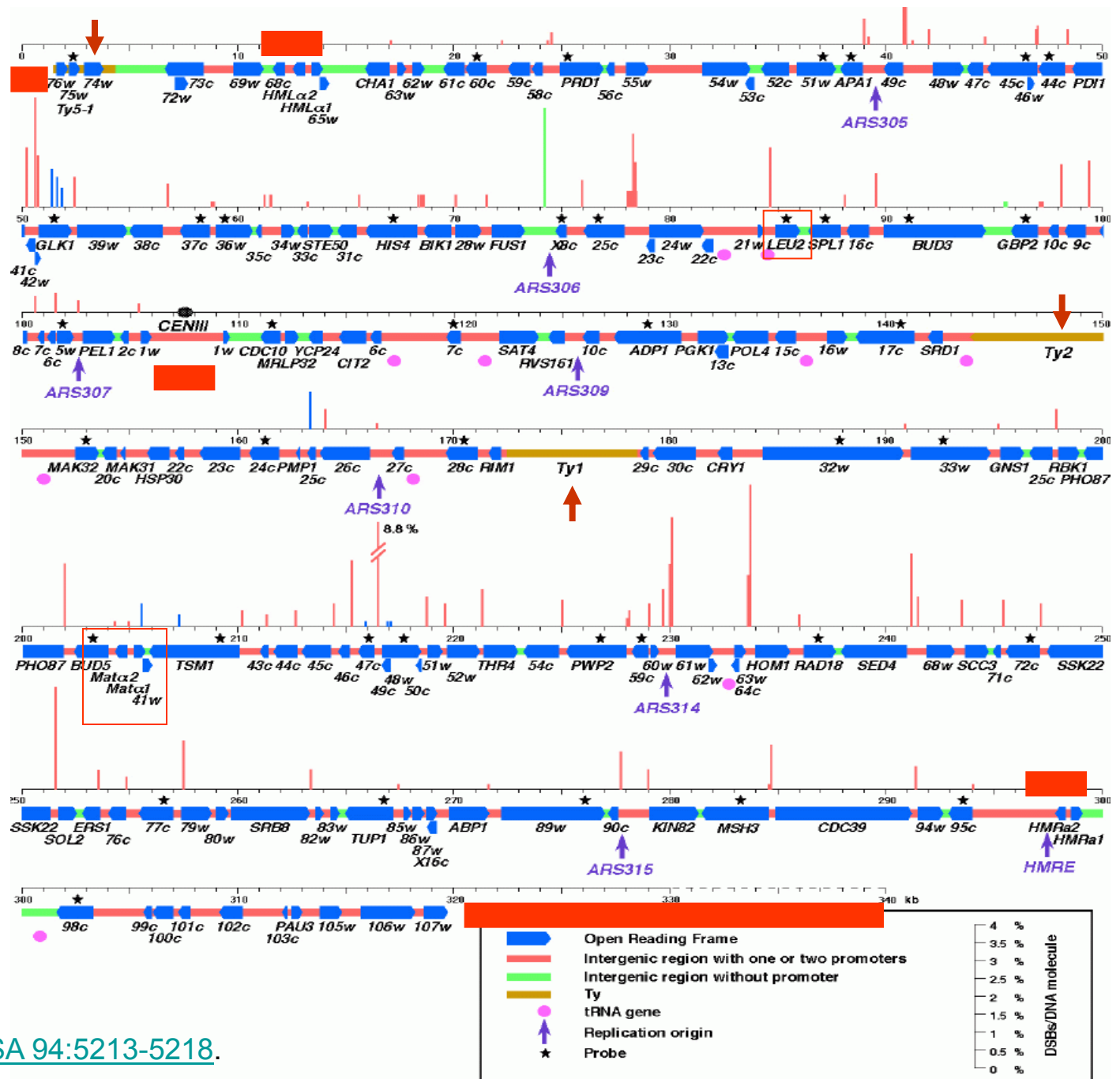
Saccharomyces cerevisiae (vs *S.p.*)

- 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



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

Heterochromatin:
 centromera
 telomery
 HMR a HML
 (MAT je aktivní
 určuje haplotyp)



Pozorování DNA/chromosomů u kvasinek

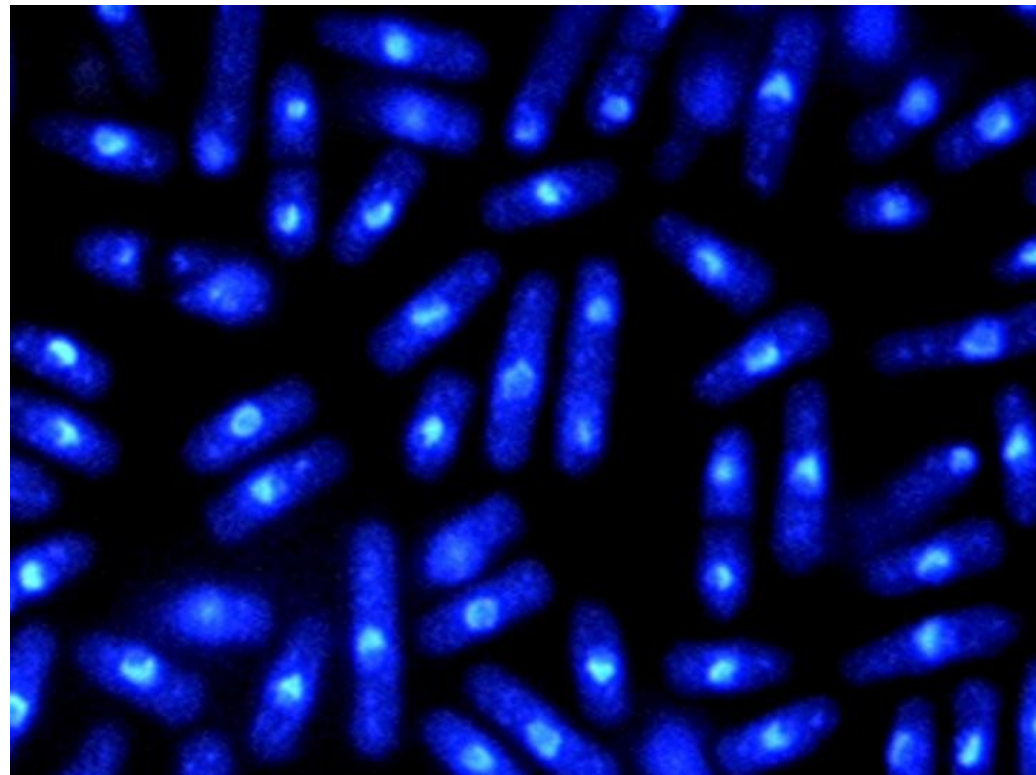
- Chromosomy jsou u kvasinek malé a těžko pozorovatelné – barvení DNA na fixovaných preparátech pomocí DAPI (4 ,6-diamidino-2-phenylindole)
- Použití fúzních proteinů-GFP (green fluorescence protein) pro studium dynamiky chromatinu (H2A, kinetochora-centromera)
- TetR-GFP represor se váže na TetO sekvence (operon) zaintegrované v přesně definovaném lokusu
- ChIP (chromatin immune precipitation) – specifické sekvence, ChIP-seq nebo „ChIP on CHIP“



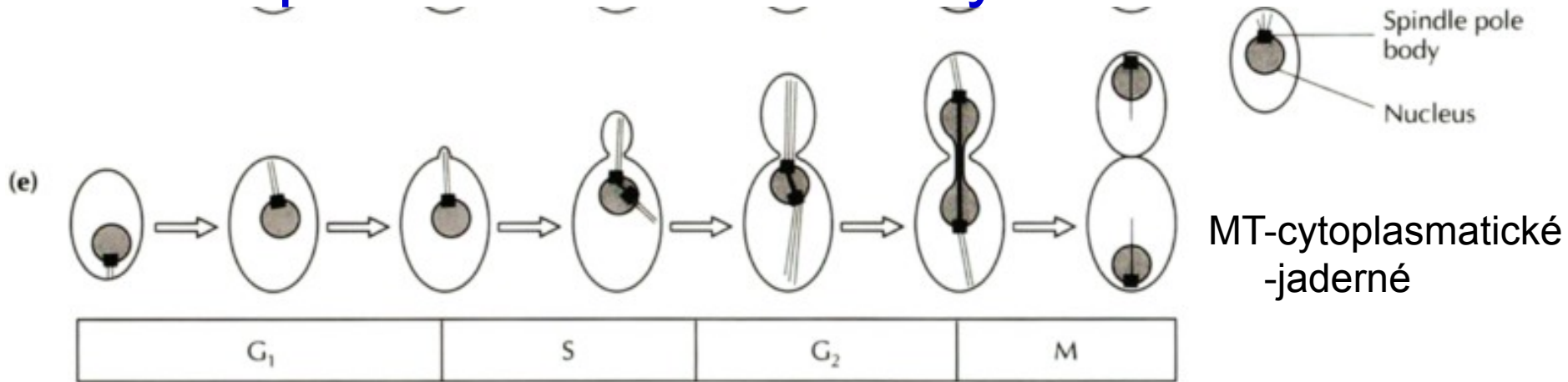
Saccharomyces cerevisiae

Schizosaccharomyces pombe →

Pozadí = mtDNA

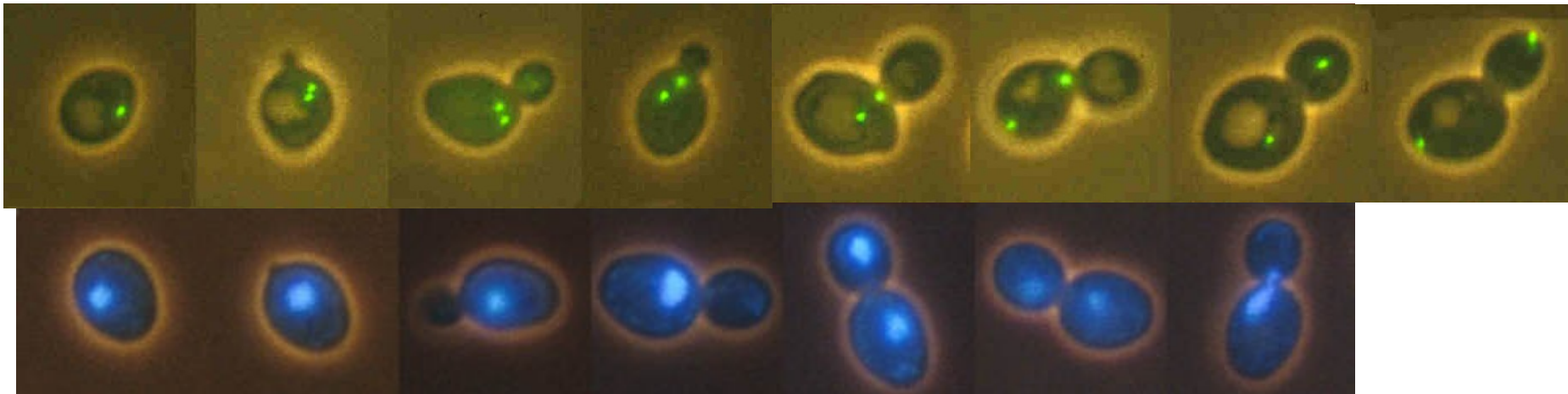


DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*



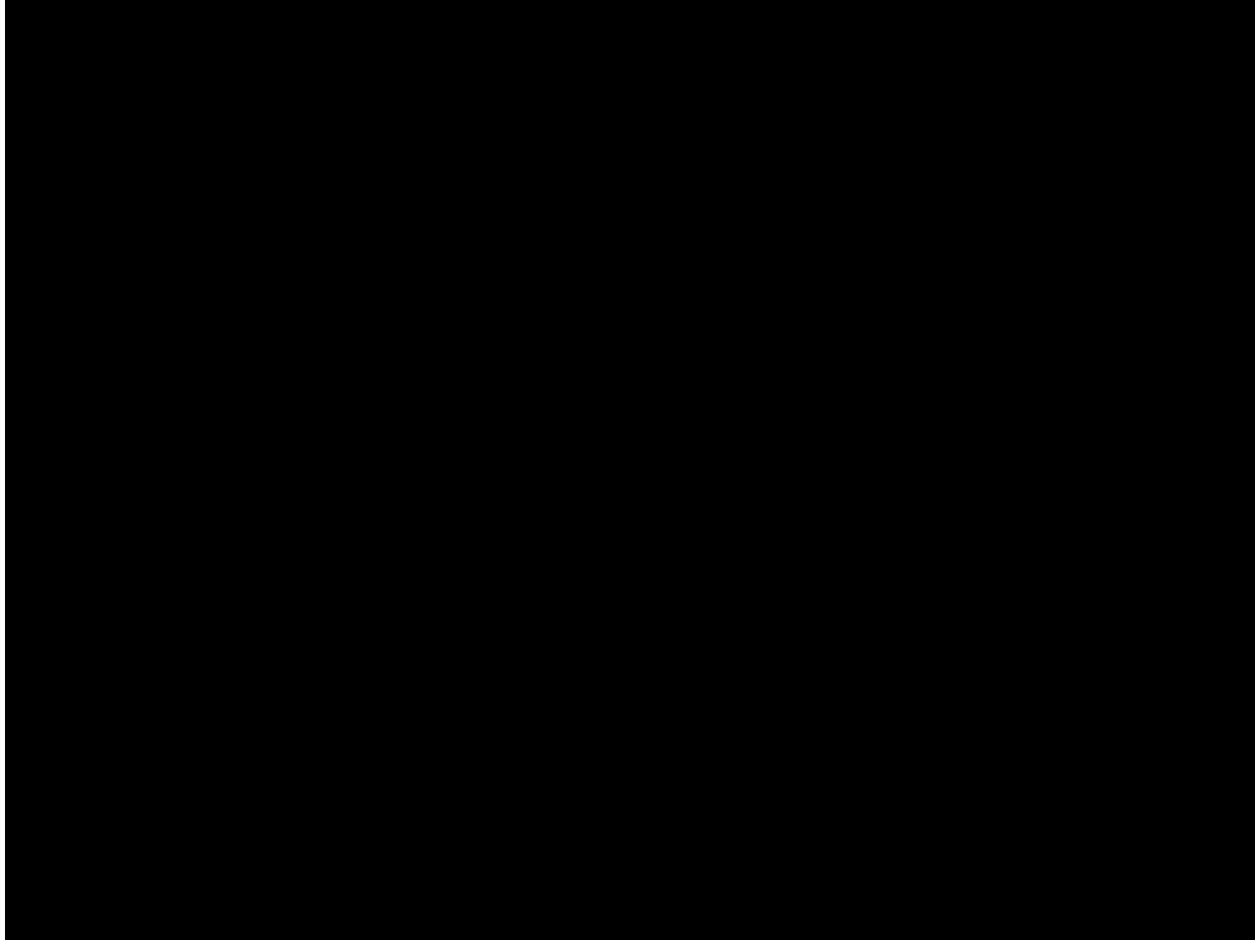
- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze tj. replikace
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (u kvasinek se jaderná membrána nerozpadá)
- **na začátku anafáze dochází k oddělení sesterských chromatid a jejich segregaci**

SPB-GFP barvení

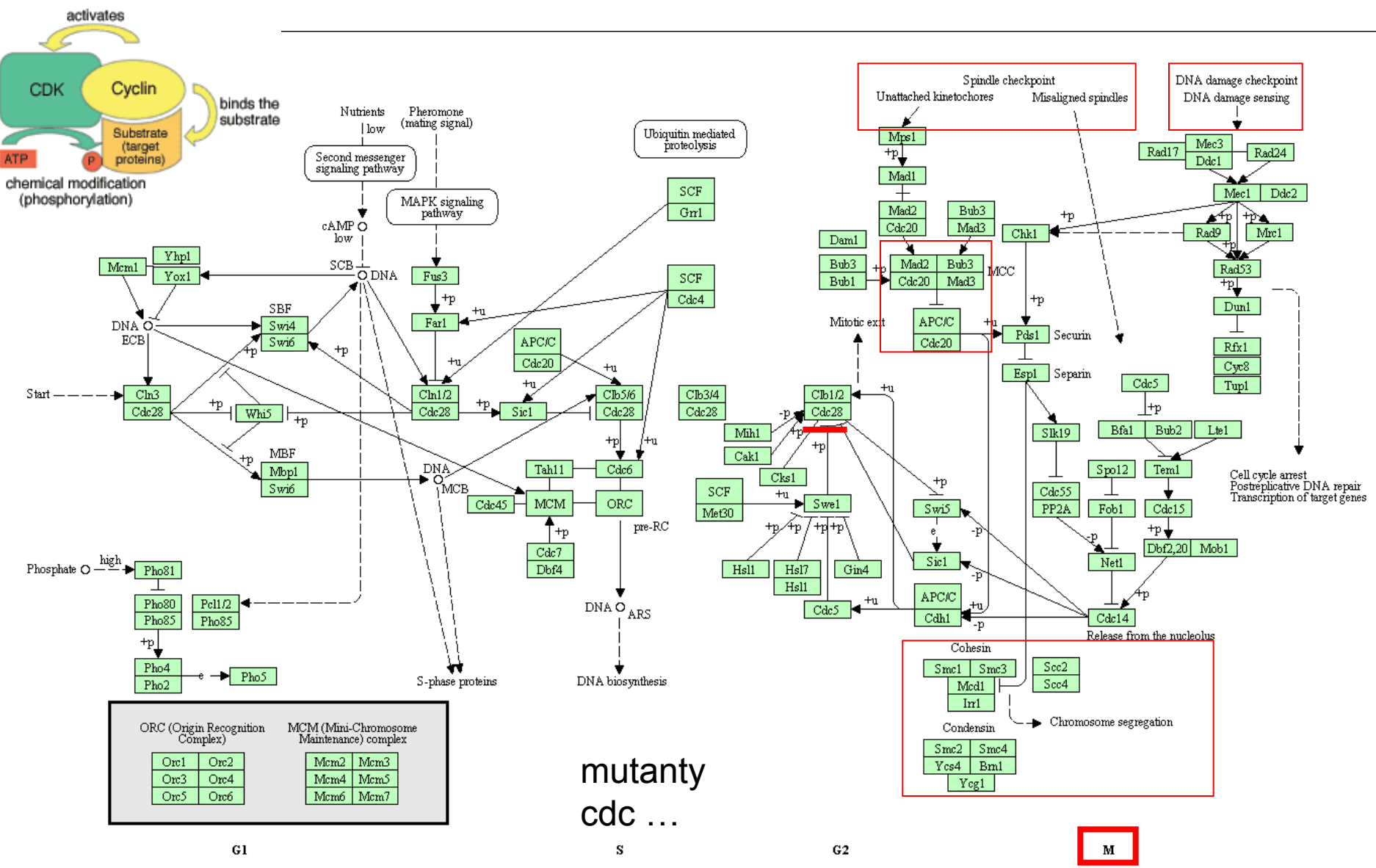


Separace a segregace chromosomů

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



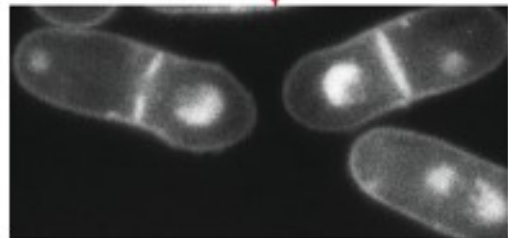
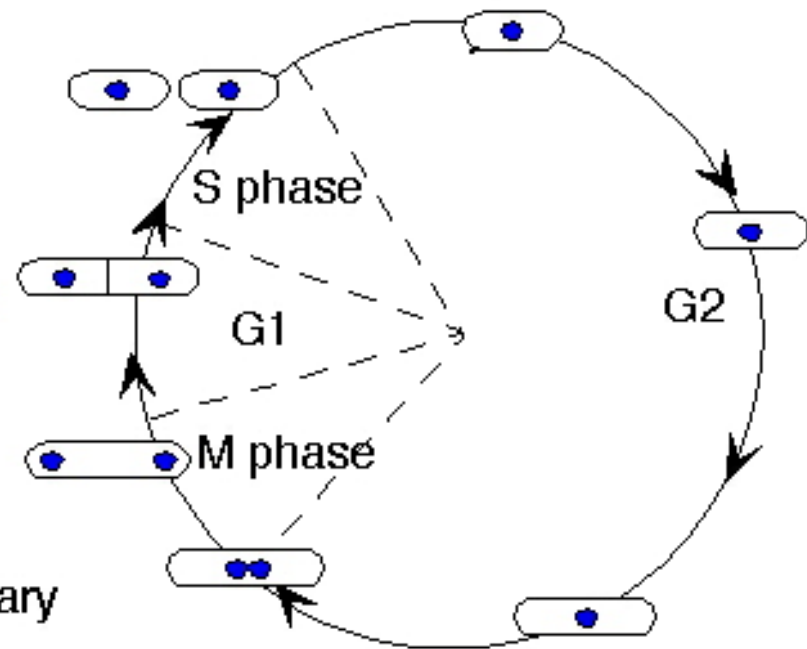
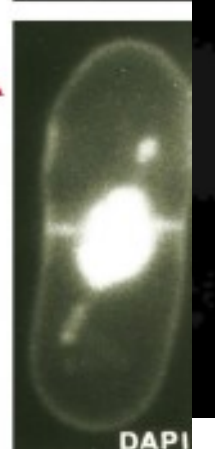
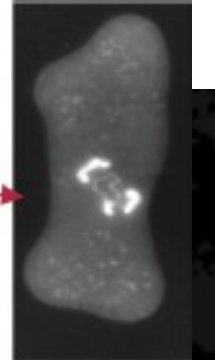
Kontrola buněčného cyklu (*S. cerevisiae*)



Arrest

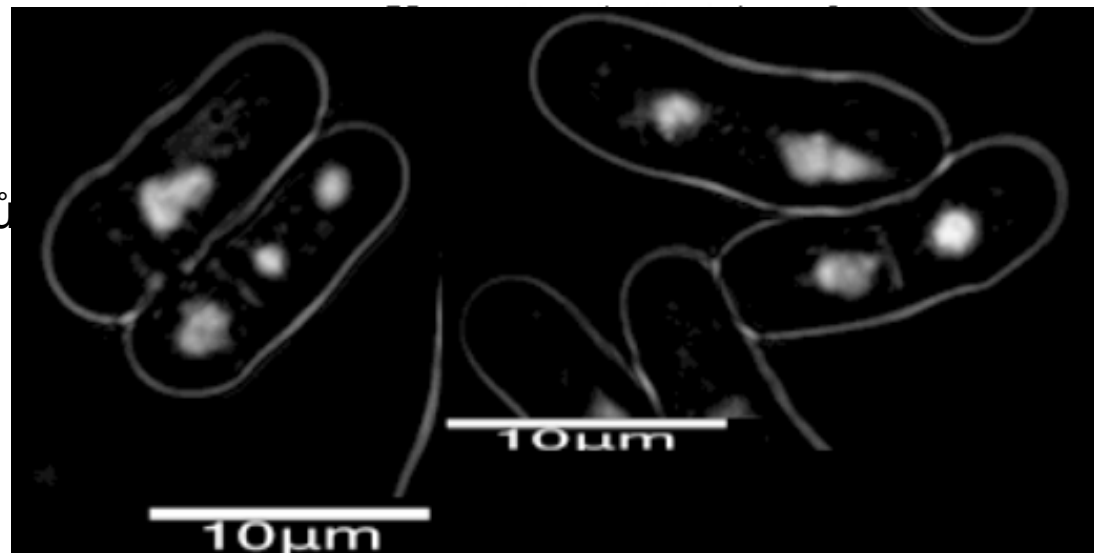
Cut phenotype

Unequal segregation



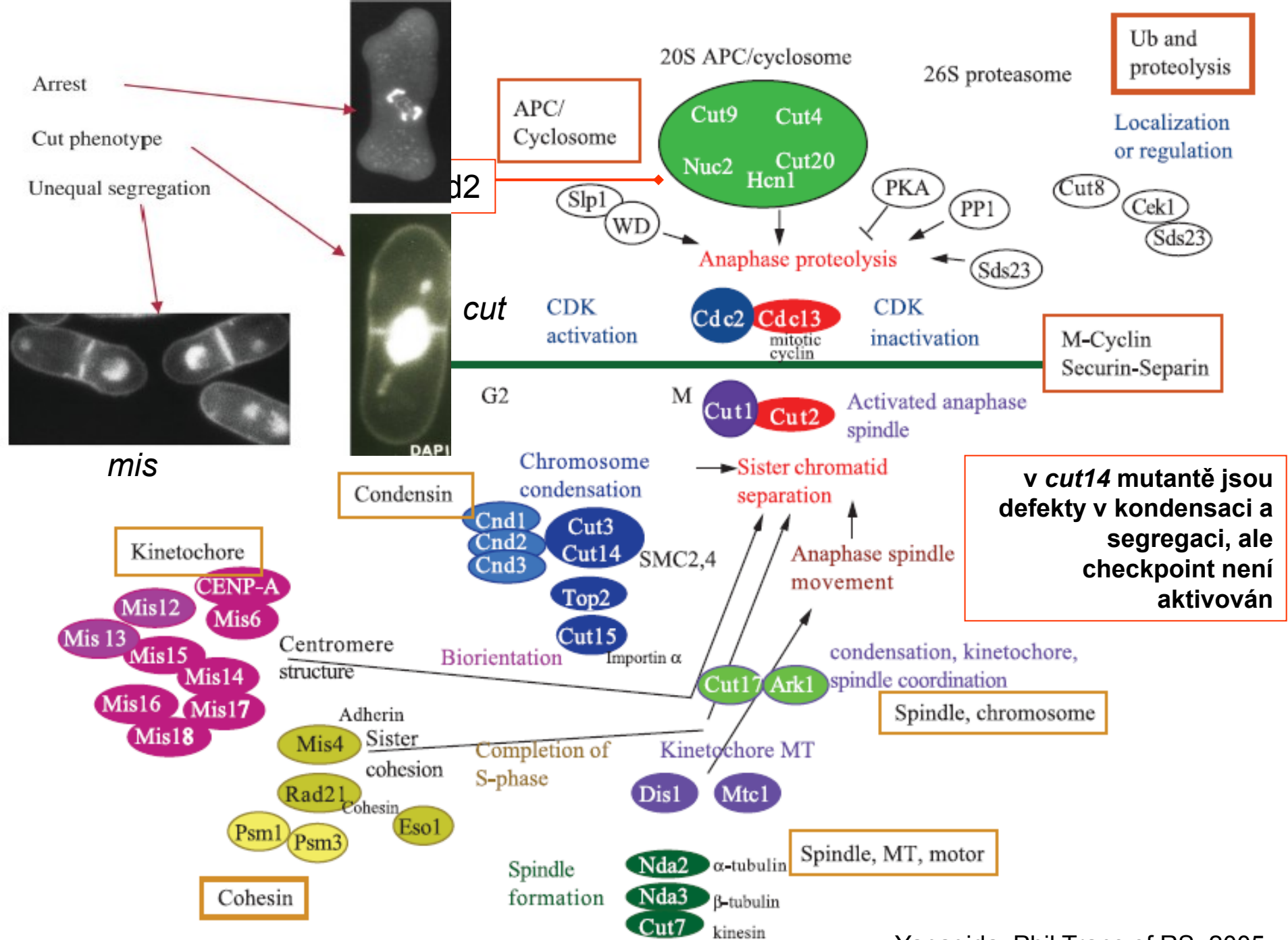
cut defekt:

- chyba v koordinaci mitózy (např. spindle attachment)
- chyba v segregaci chromosomů (např. kohesiny)

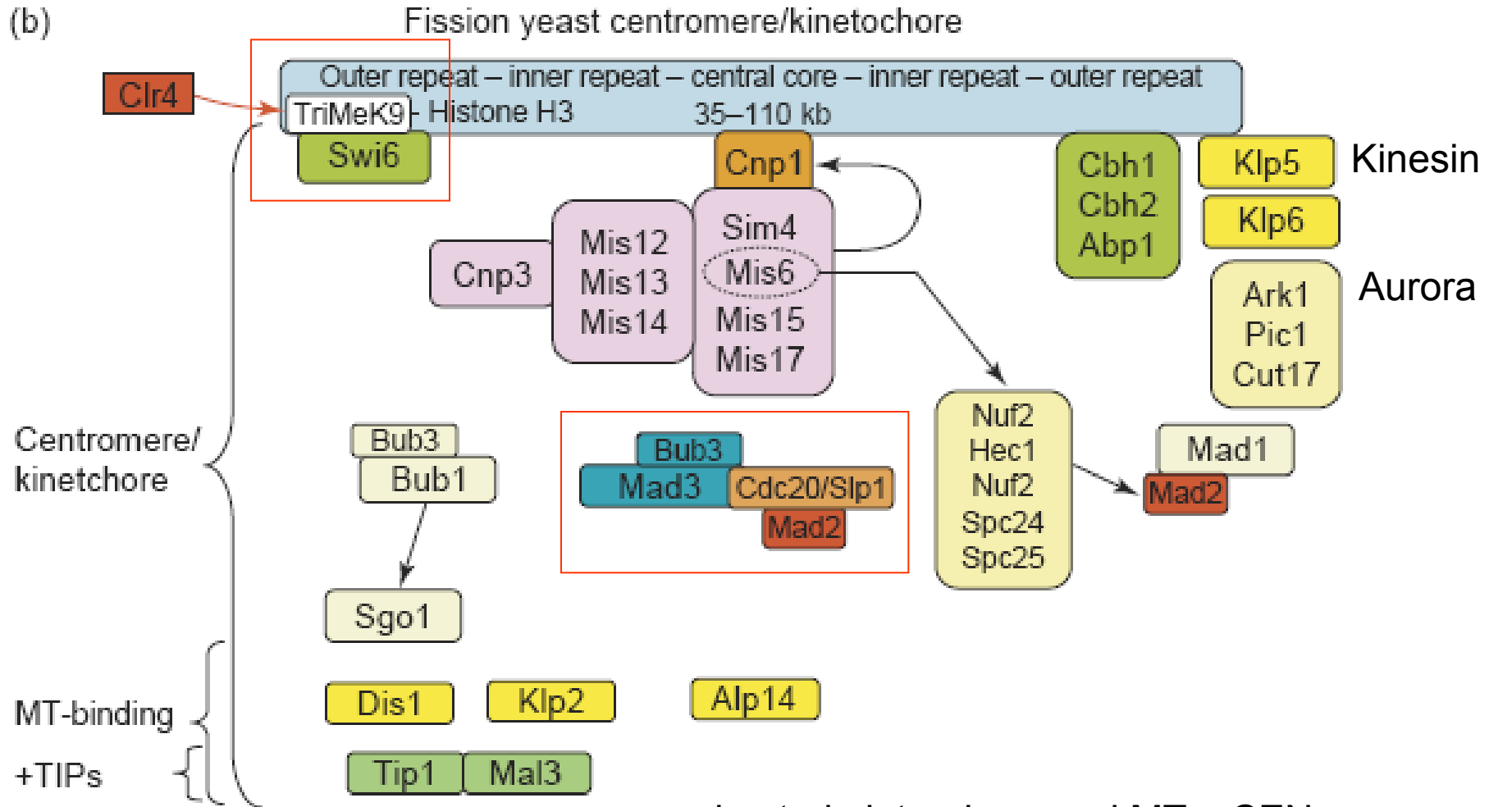


Yanagida, Phil Trans of RS, 2005
Nakazawa et al, JCS, 2011

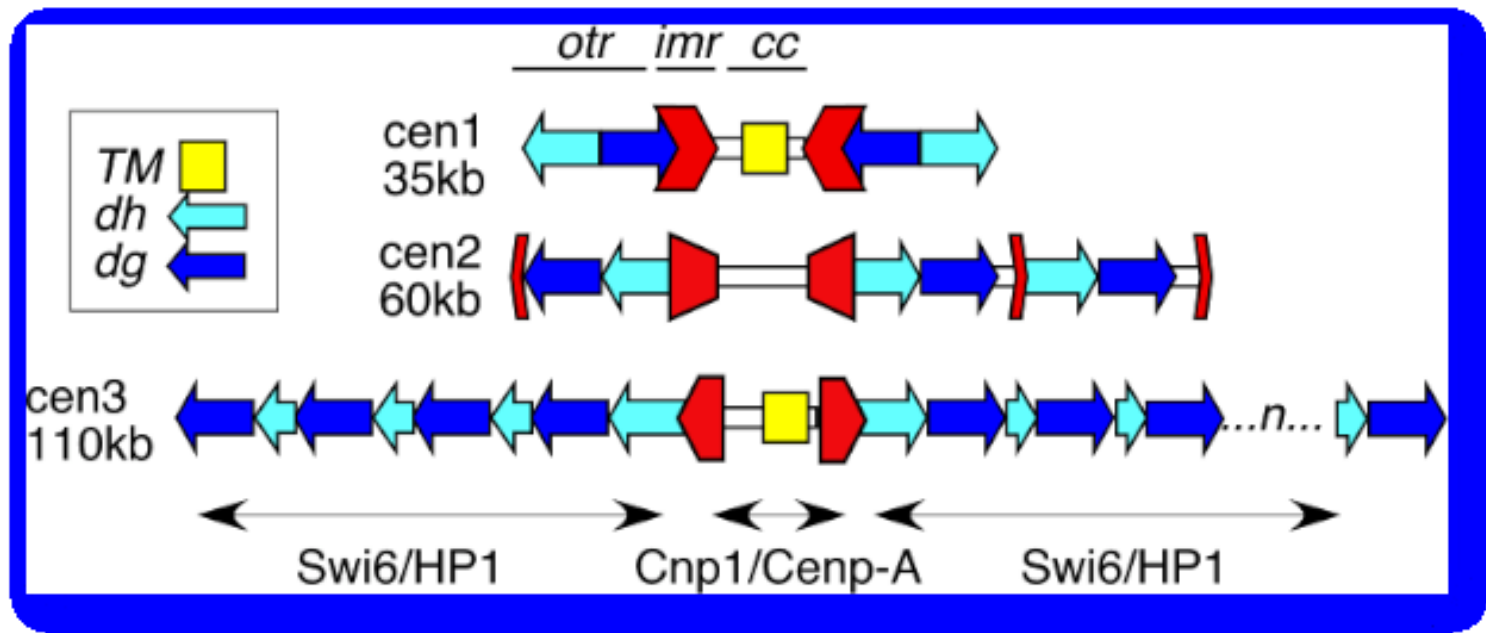
cut14-208 mutant (kondensin)



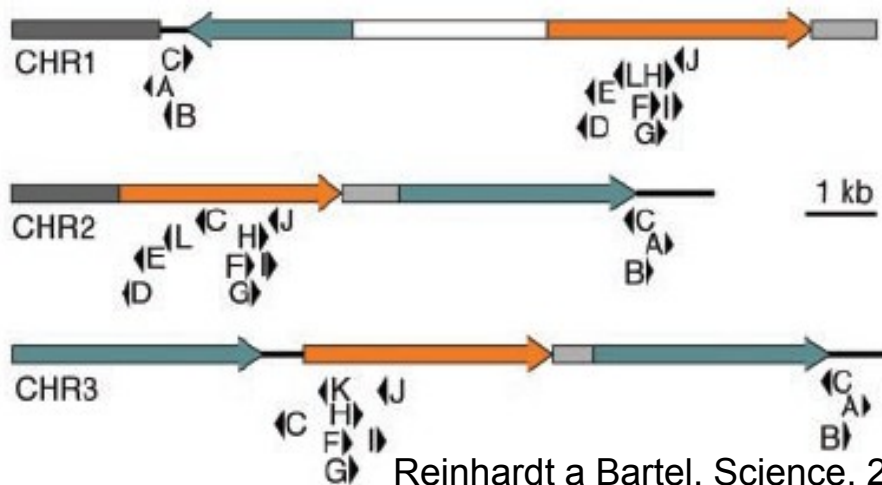
Centromera *S. pombe*



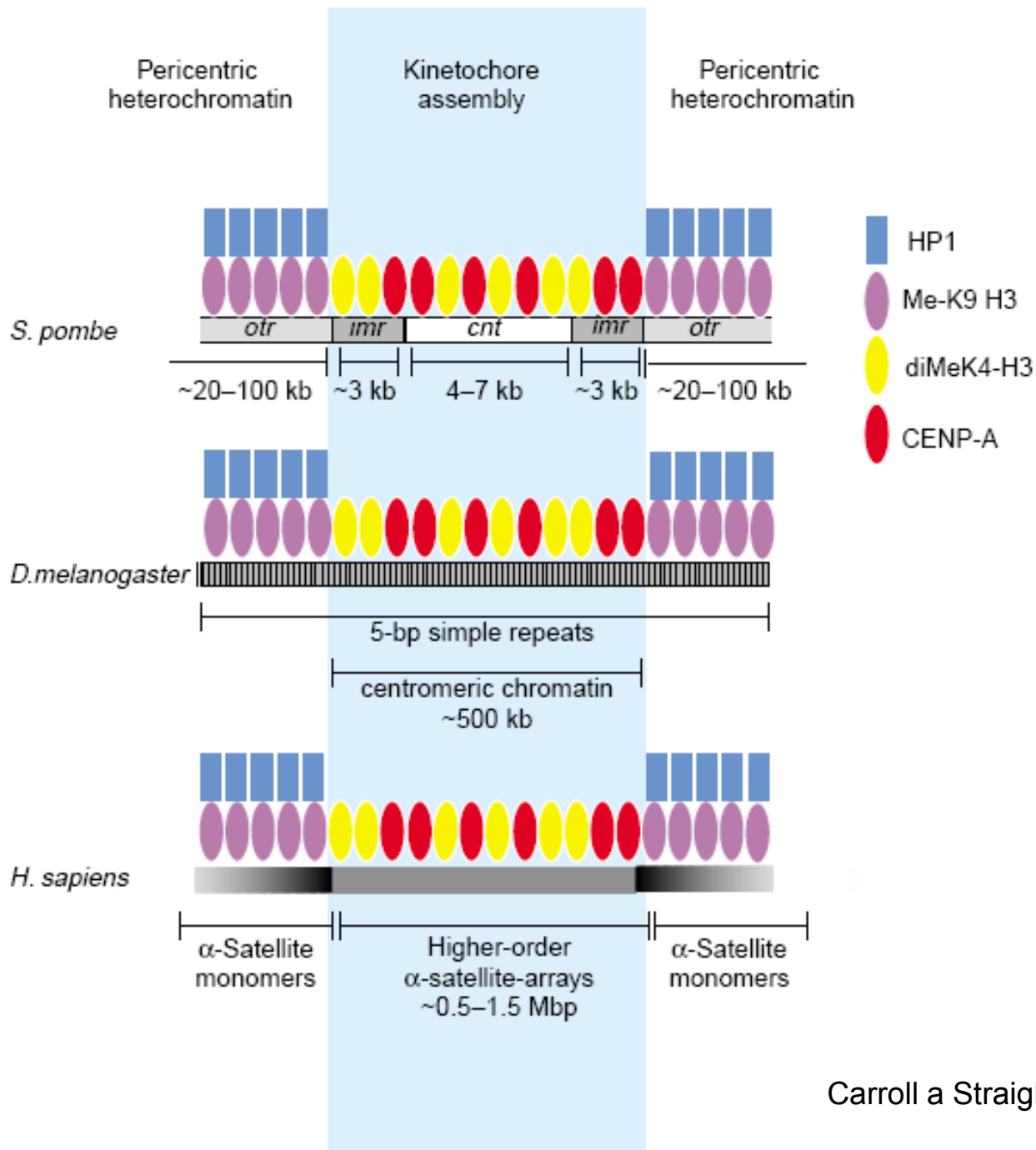
- kontrola interakce mezi MT a CEN
- kondenzované chromozomy
- geny pro heterochromatin (HP1, metylace ...)



- pouze 3 chromozomy (13 Mbp = 3.5, 4.6, 5.7)
- velké repetitivní centromery (40-150kb) a 1kb počátky replikace



- A) GAGGCUUUCG GUUUAGUCGC
 B) AAUGC GGAGU AAGGC UAAUC ACGGUA
 C) UCUAGCUUCG CCAUCAUAA GUA
 D) UGGAUUAAGG AGAAGCGGUA
 E) ACAAGUGAUA AGAGUAGGUG U
 F) UGCGCAACUC CUGCUUAUCG UC
 G) UACAAGAUAU AGCGCCACAC U
 H) UGAGCAUAUC CUAAUGACAG UA
 I) UGCCUAUUUA UACAUUUC C
 J) UCUACCUCAG CAGUCCUUGG GAAA
 K) UGUGUCCAUA UCCAUGCUGU GUCCA
 L) UAAACAACUU GCAAUAUCUG CCA



Centromera *S. cerevisiae*

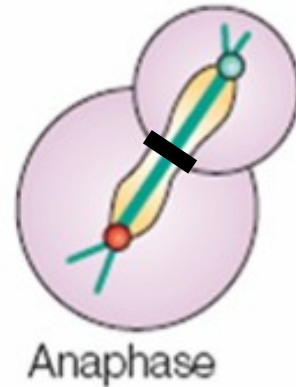
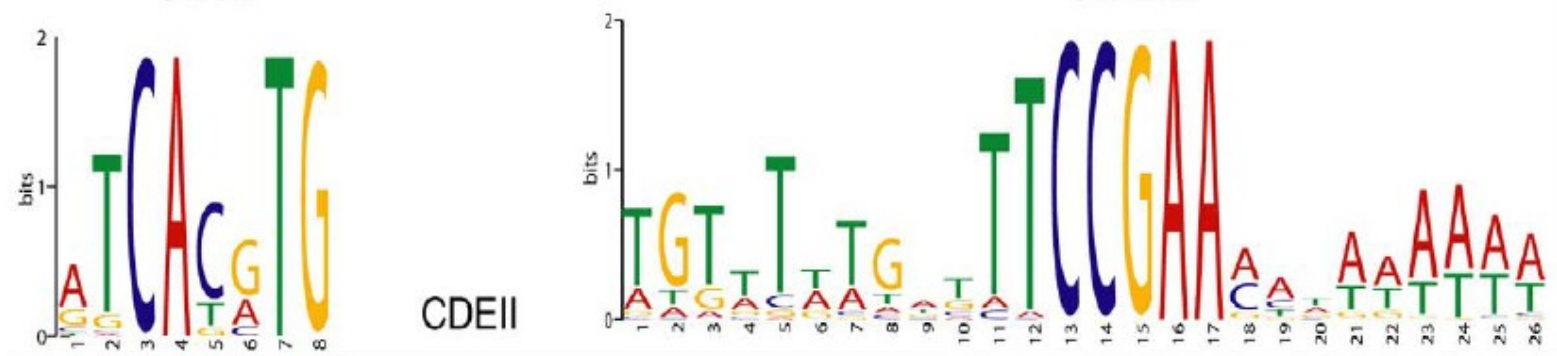
(c)

Budding yeast centromere/kinetochore
125-bp CEN DNA



CDEI

CDEIII

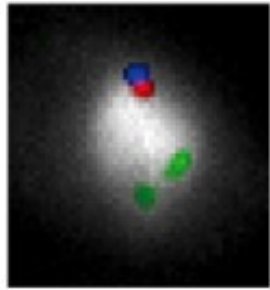


nek

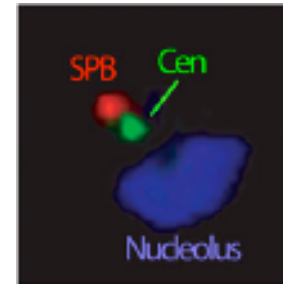
- Sekvenčně specifická centromera se patrně vyvinula z původně repetitivní/sekvenčně nespecifické

Orientace chromosomů v mitotickém jádře

A Mitotic interphase

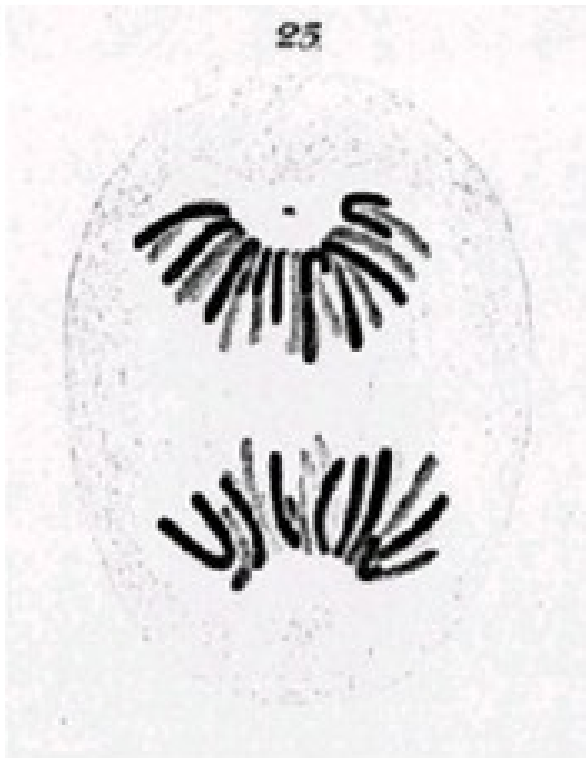


- centromere
- telomere
- SPB

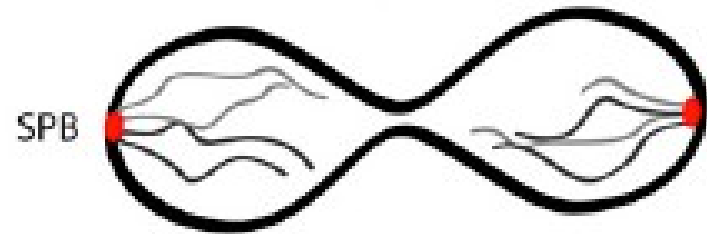


FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

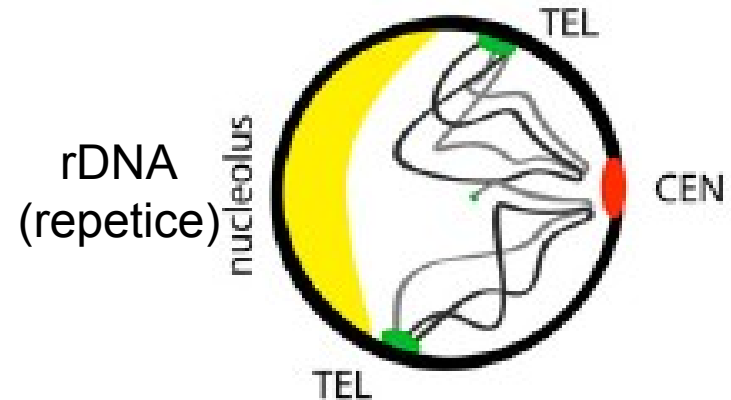
B



Rabl, 1885

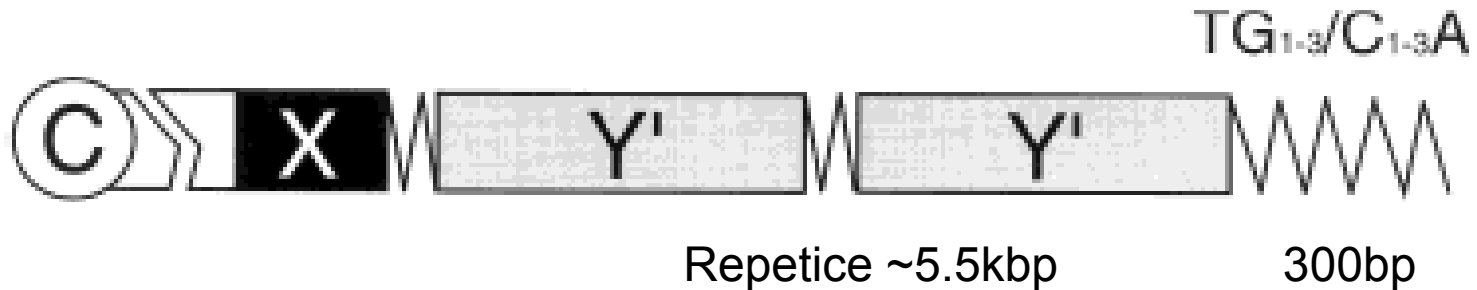


Interphase



Tadei a Gasser, Genetics, 2012

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

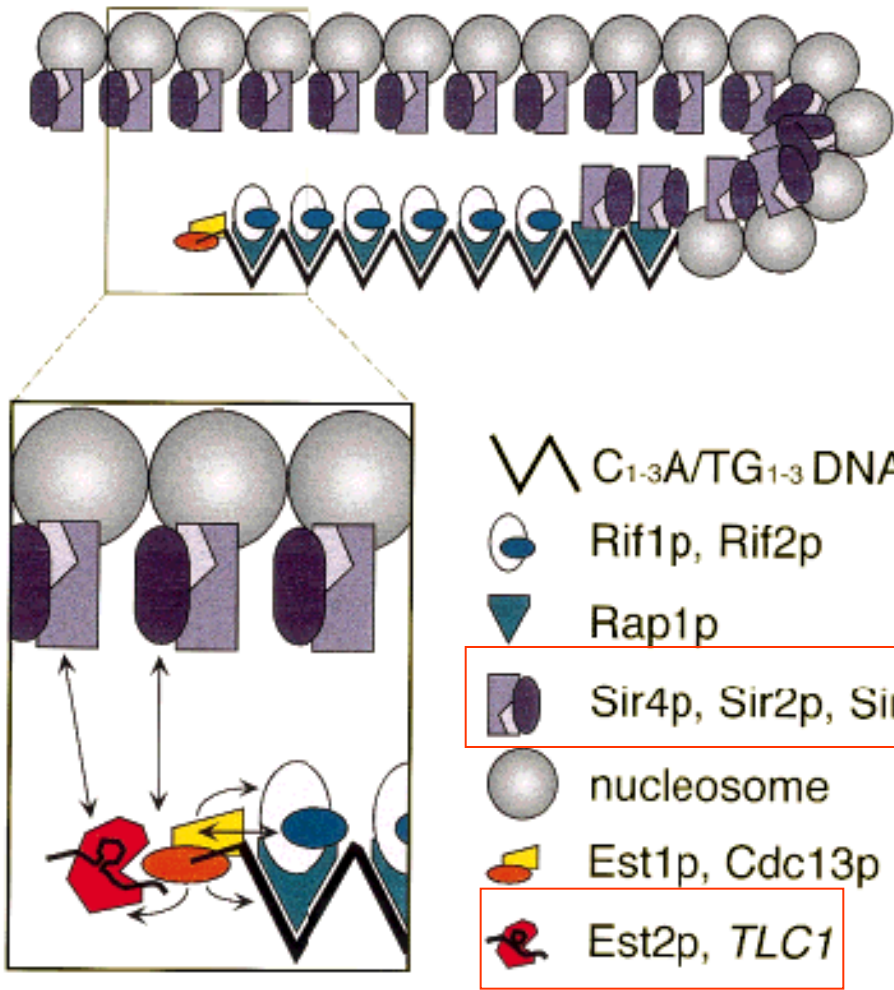
C. guilliermondii

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



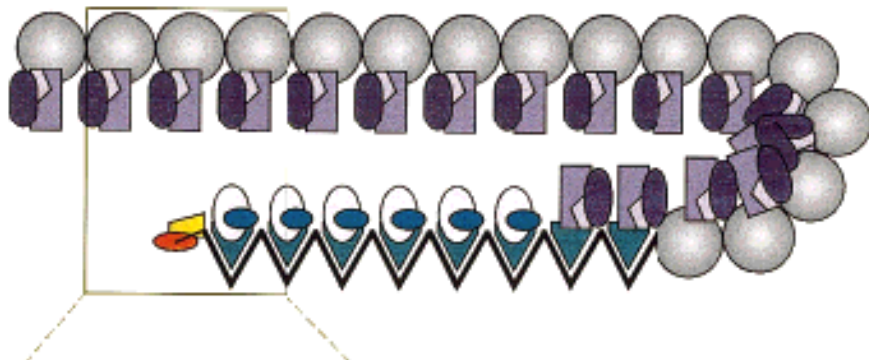
- musí být prodlužovány (telomerásou), jinak by se zkracovaly po každé replikaci

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

- struktura telomer a subtelomer umlčuje transkripci (silencing)

- *S. pombe* vs *S. cerevisiae*
(heterochormatin se Swi6 vs Sir proteiny)

Represe u kvasinkových telomer



- struktura telomery a subtelomery umlčuje transkripci (silencing)

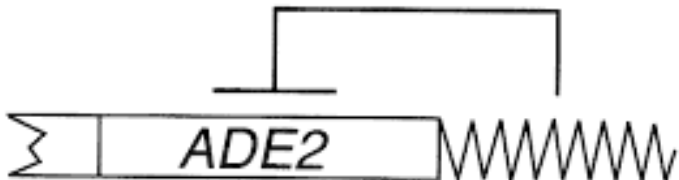
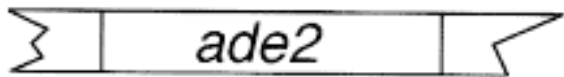
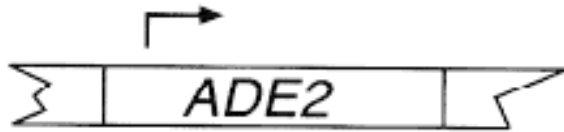
- např. HML a HMR lokusy jsou umlčené (pouze MAT lokus určuje párovací typ)

- ADE2 reporter je pod kontrolou telomer pouze občasně náhodně transkribován

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

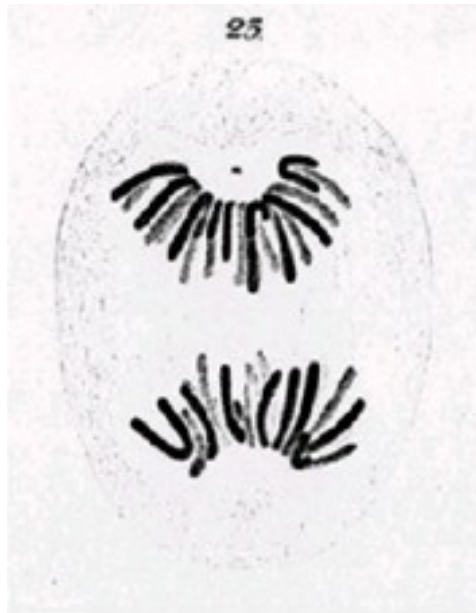


a)

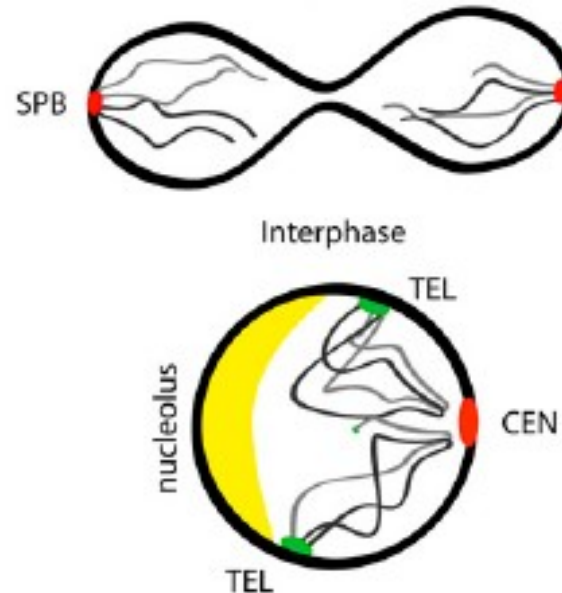


rDNA - repetice

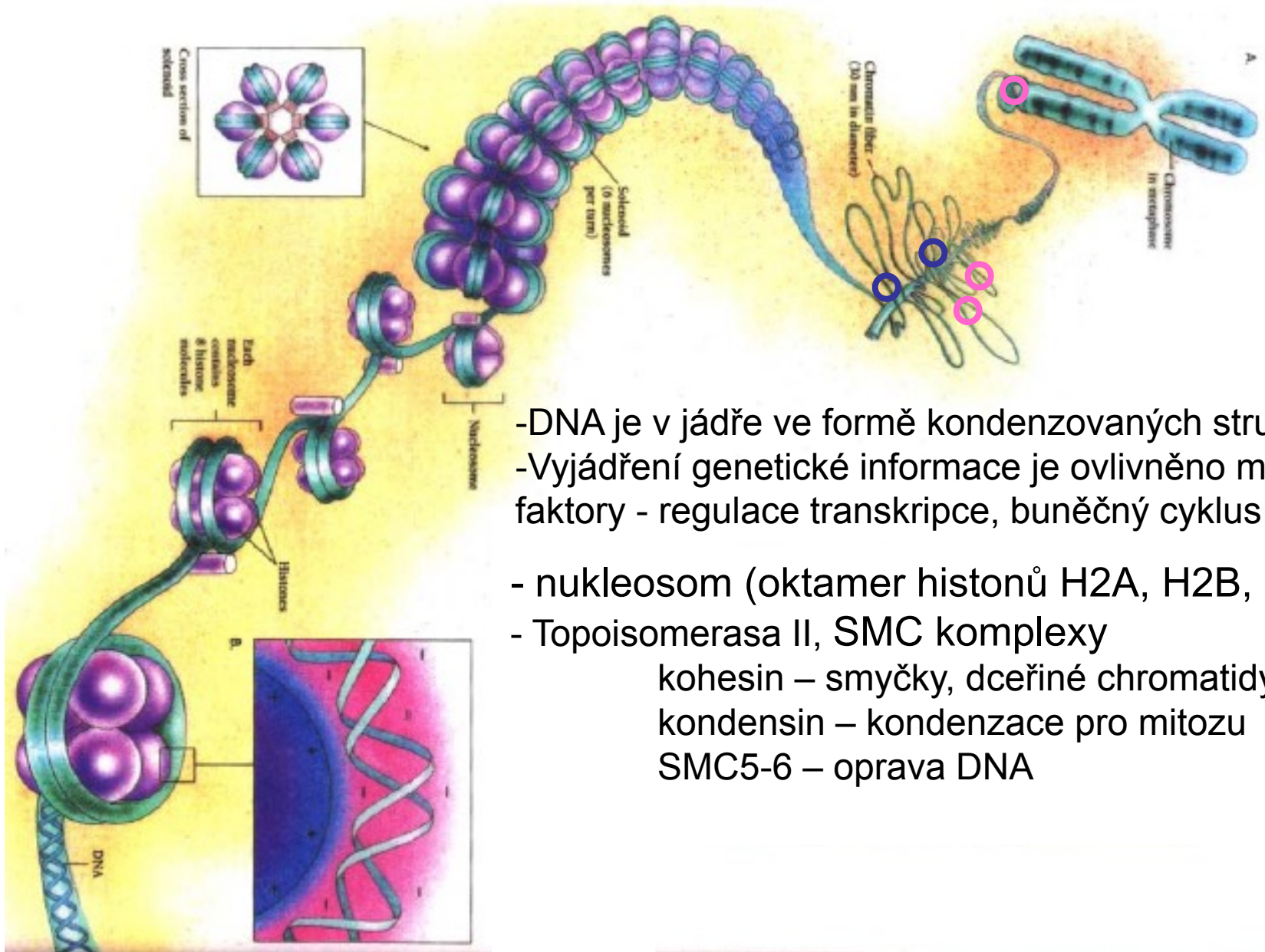
- rDNA kóduje geny pro ribosomální RNA (chromosom XII)
- Je vysoce konzervativní
 - Identifikace a odlišování kvasinkových druhů
 - Sledování evolučních trajektorií
- Až 200 kopií v řadě za sebou
 - Problém s homologní rekombinací
 - Problém s replikací – ve stejném směru jako transkripce (probíhá v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



Rabl, 1885



Komplexy chromatinu

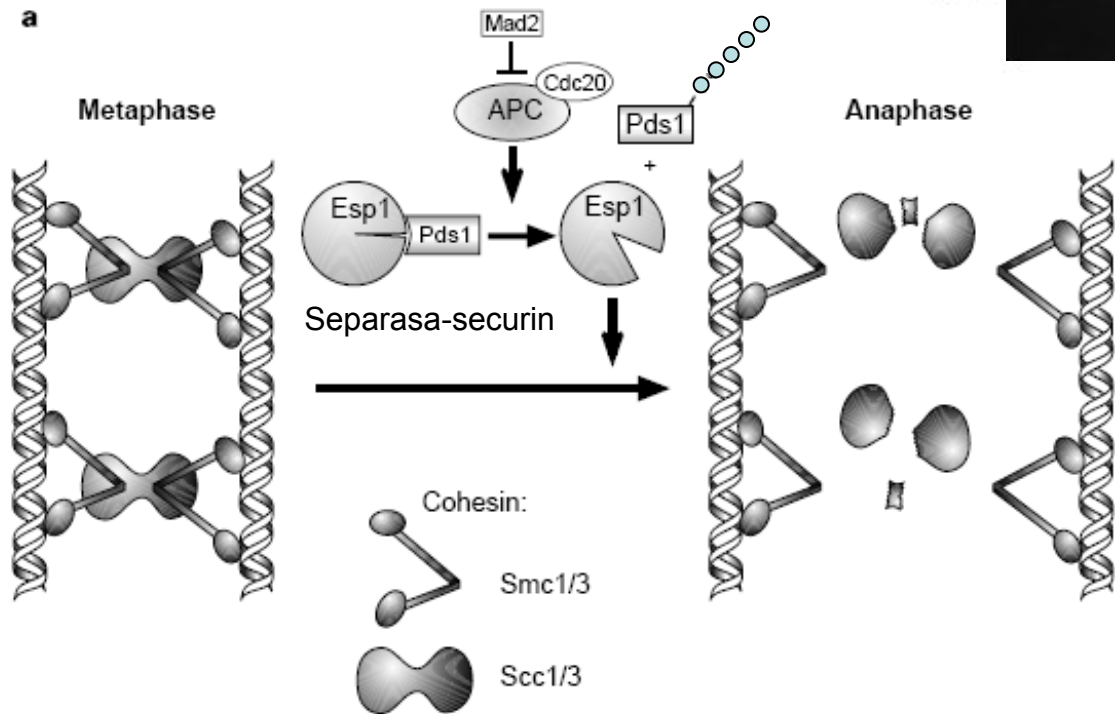


-DNA je v jádře ve formě kondenzovaných struktur
-Vyjádření genetické informace je ovlivněno mnoha faktory - regulace transkripce, buněčný cyklus ...

- nukleosom (oktamer histonů H2A, H2B, H3, H4)
- Topoisomerasa II, SMC komplexy
 - kohesin – smyčky, dceřiné chromatidy
 - kondensin – kondenzace pro mitozu
 - SMC5-6 – oprava DNA

Model separace chromosomů (*S. cerevisiae*)

APC=anaphase promoting



d

Uhlmann et al., Nature, 1999

min

DAPI

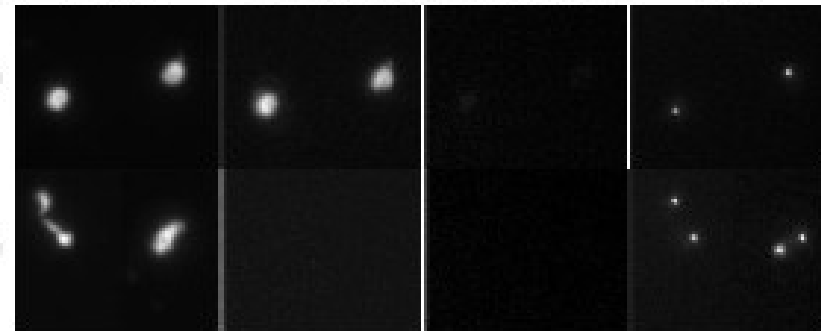
Sccl1WT

Sccl1RR-DD

GFP

- Sccl1RR-DD

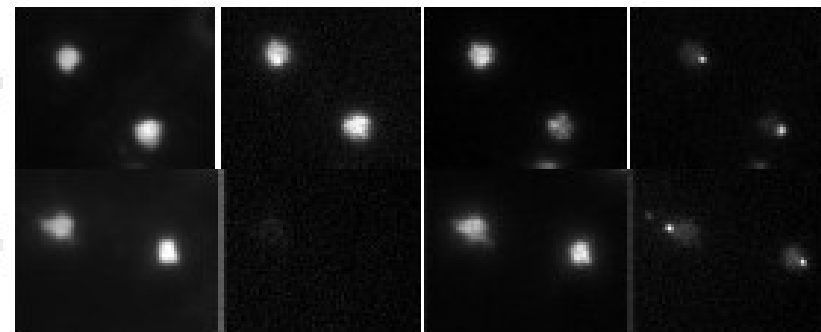
180



+ Sccl1RR-DD

150

180



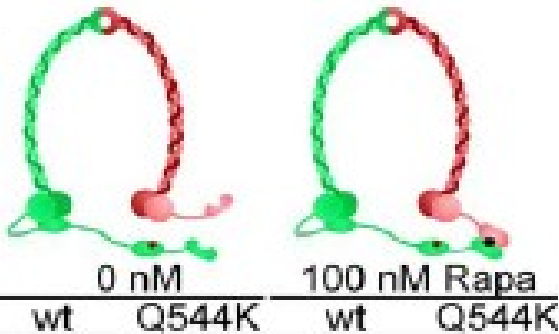
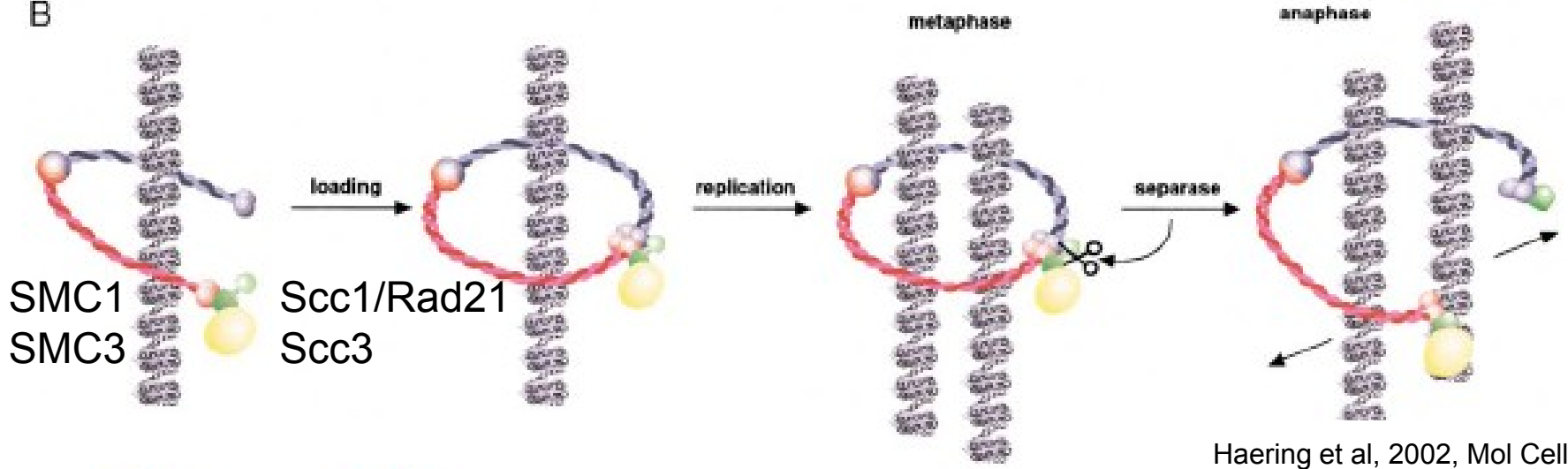
**malé chromosomy –
TetO na různá místa -
TetR-GFP (segregace)**

**Použití TEV proteasy
kohesinový komplex
(SMC=structure
maintenance of
chromosome)**

SMC1, SMC3,
Sccl1 a Sccl3

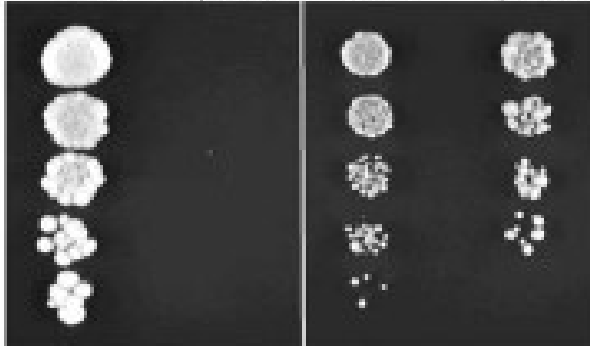
Kohesin „objímá” DNA

B

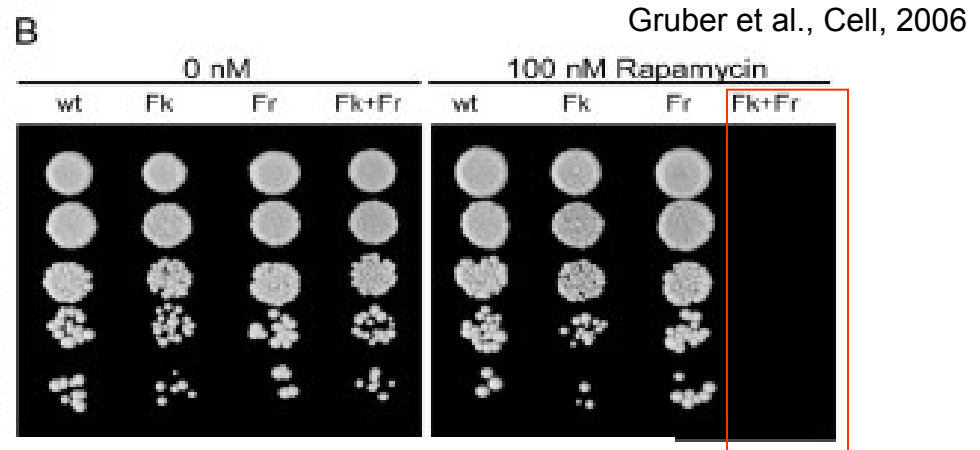
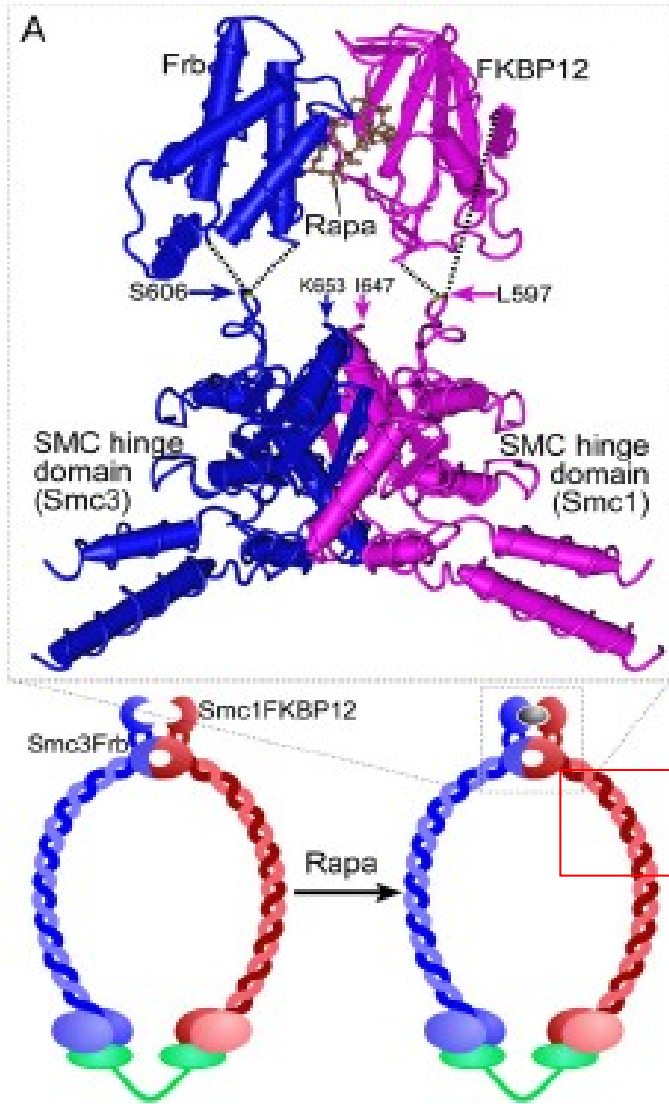


Použití fúzních proteinů při studiu kohese sesterských chromatid

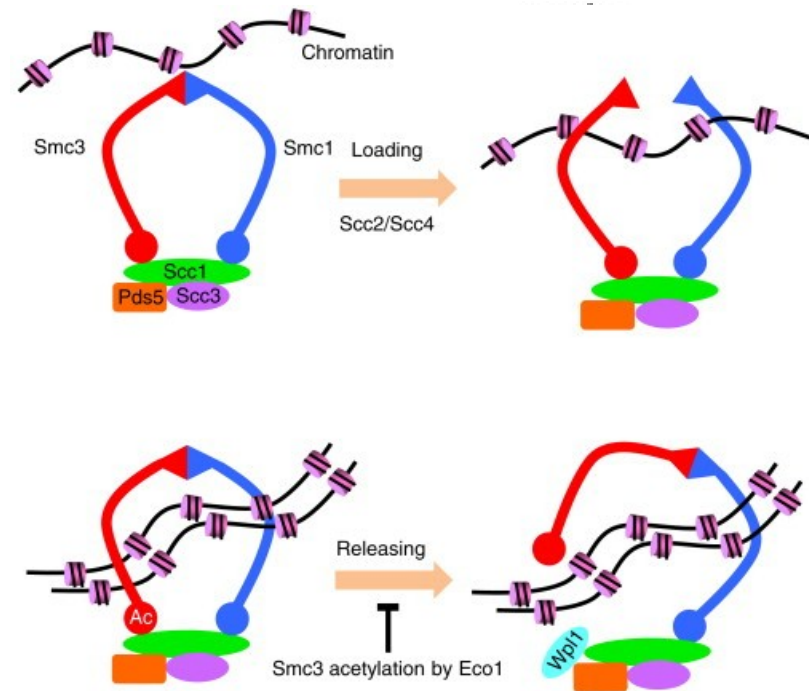
SMC3-Scc1-Frb + SMC1-FKBP12 (váží rapamycin)



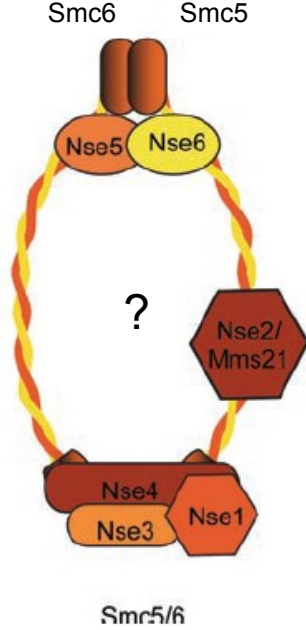
Vstup DNA přes opačný konec než uvolnění



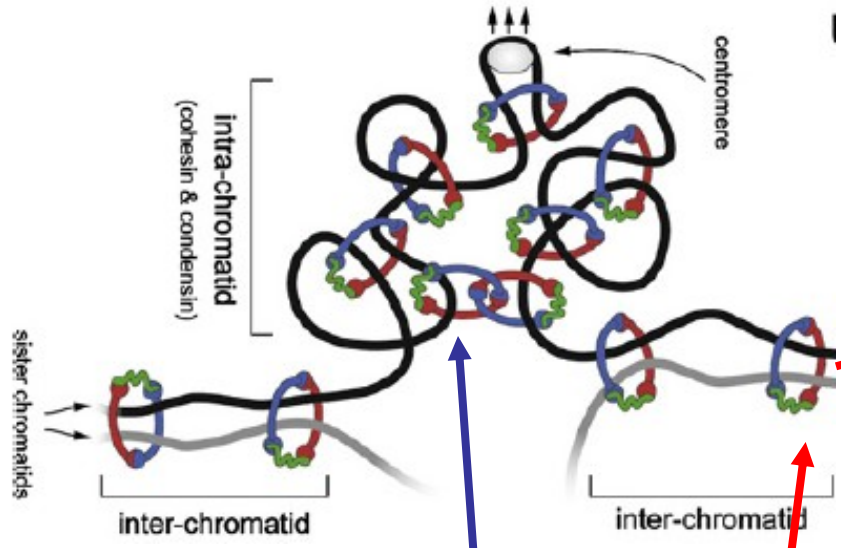
Uzamčení je pro buňku letální



Prokaryota

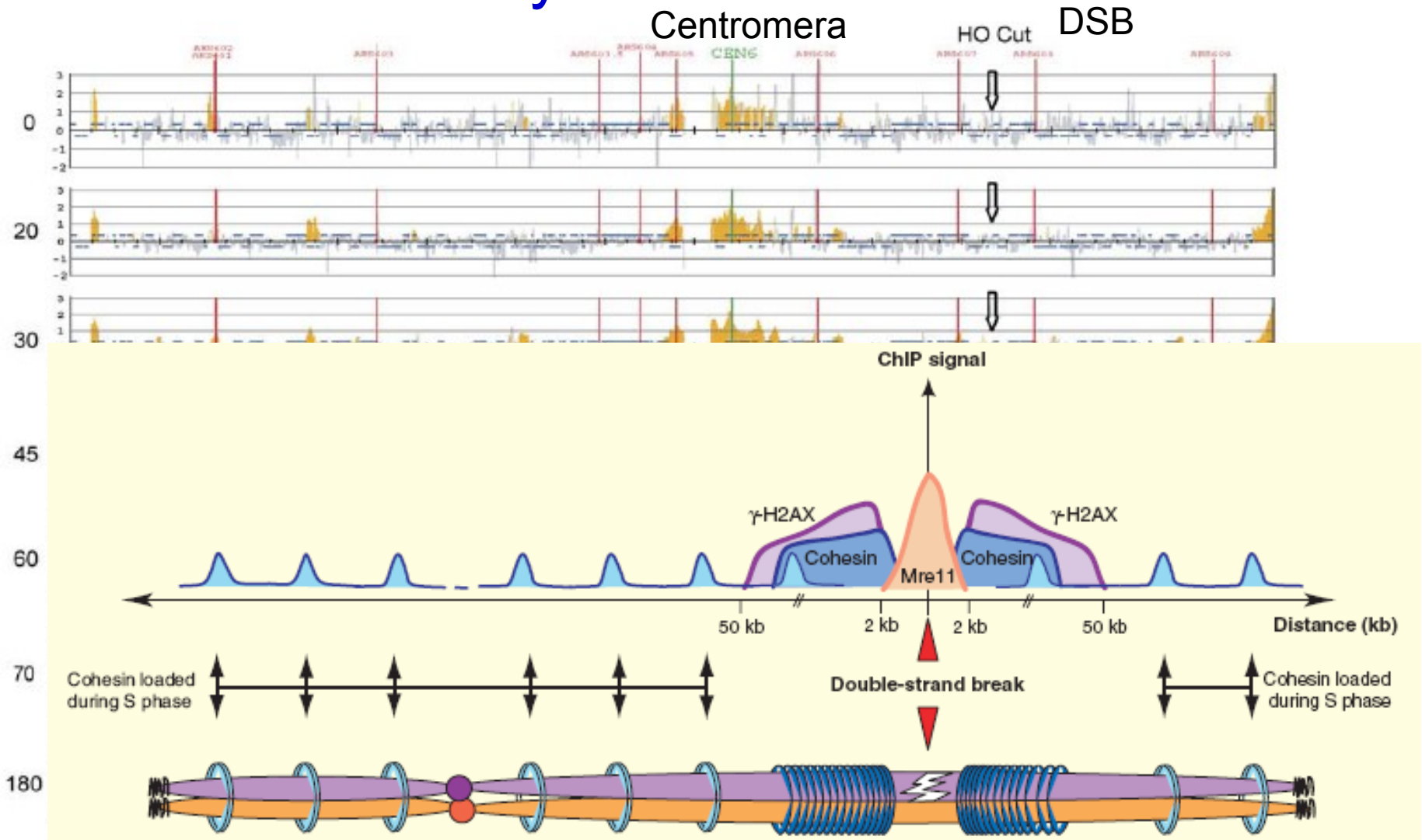


Eukaryota

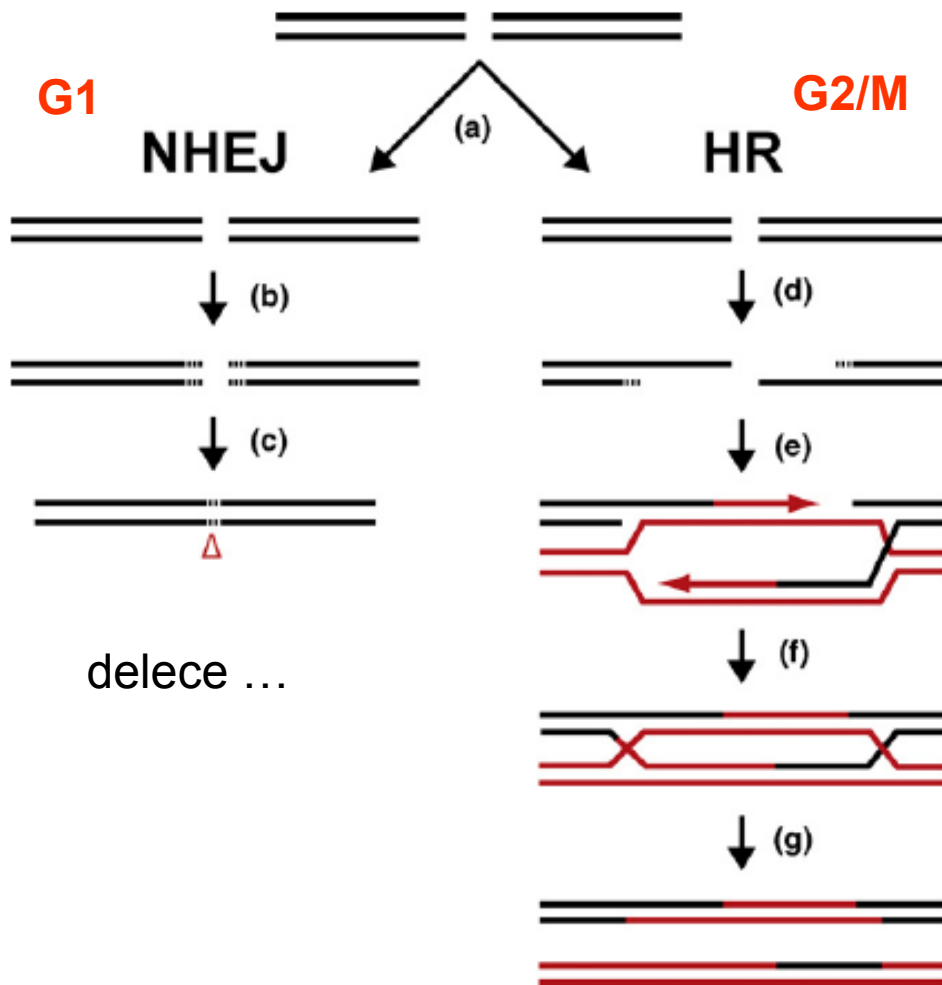


SMC komplexy utváří vyšší strukturu chromatinu

SMC komplexy napomáhají při opravě dvouřetězcových zlomů v G2/M fázi



Oprava DSB (dvouřetězcové zlomy)

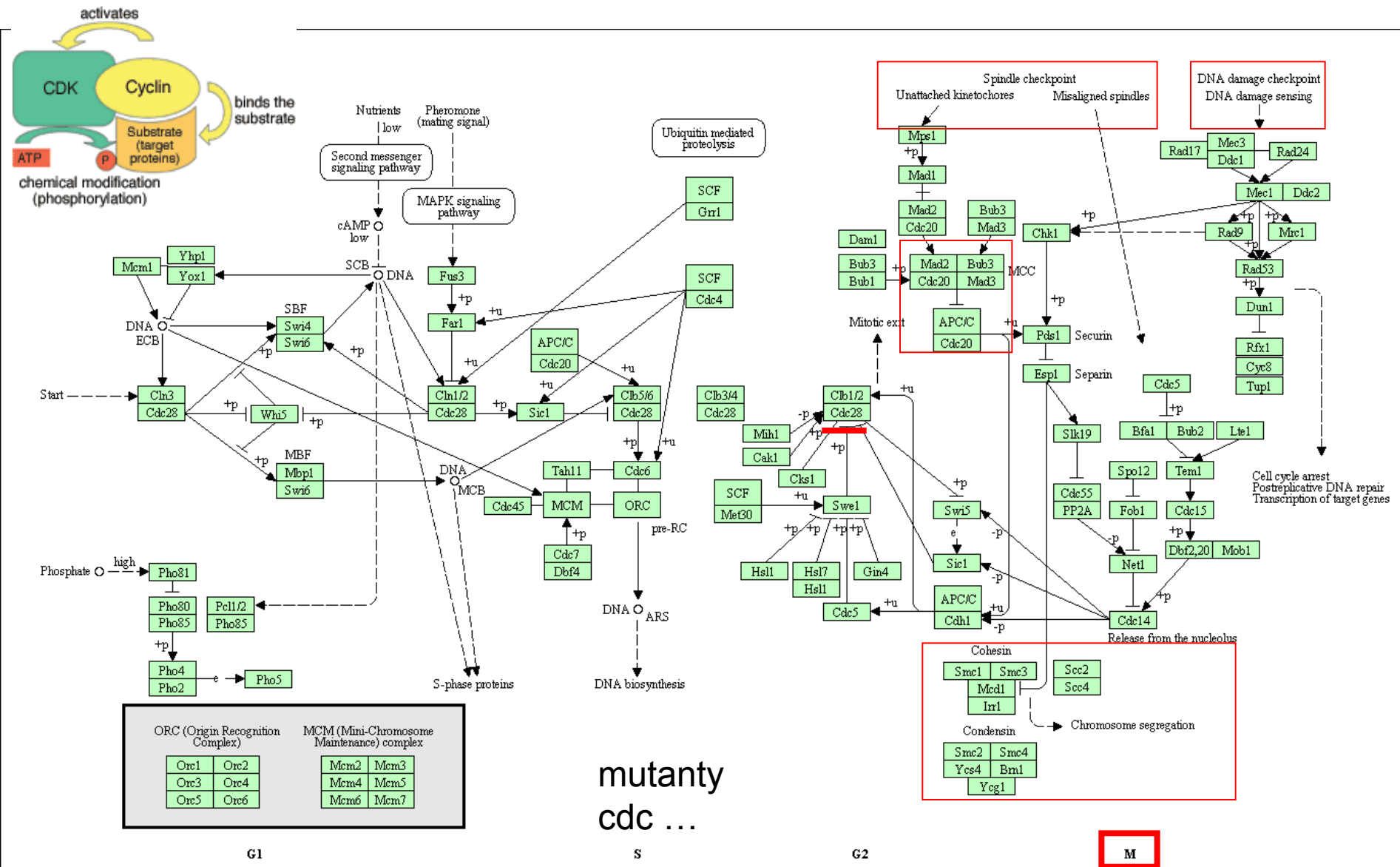


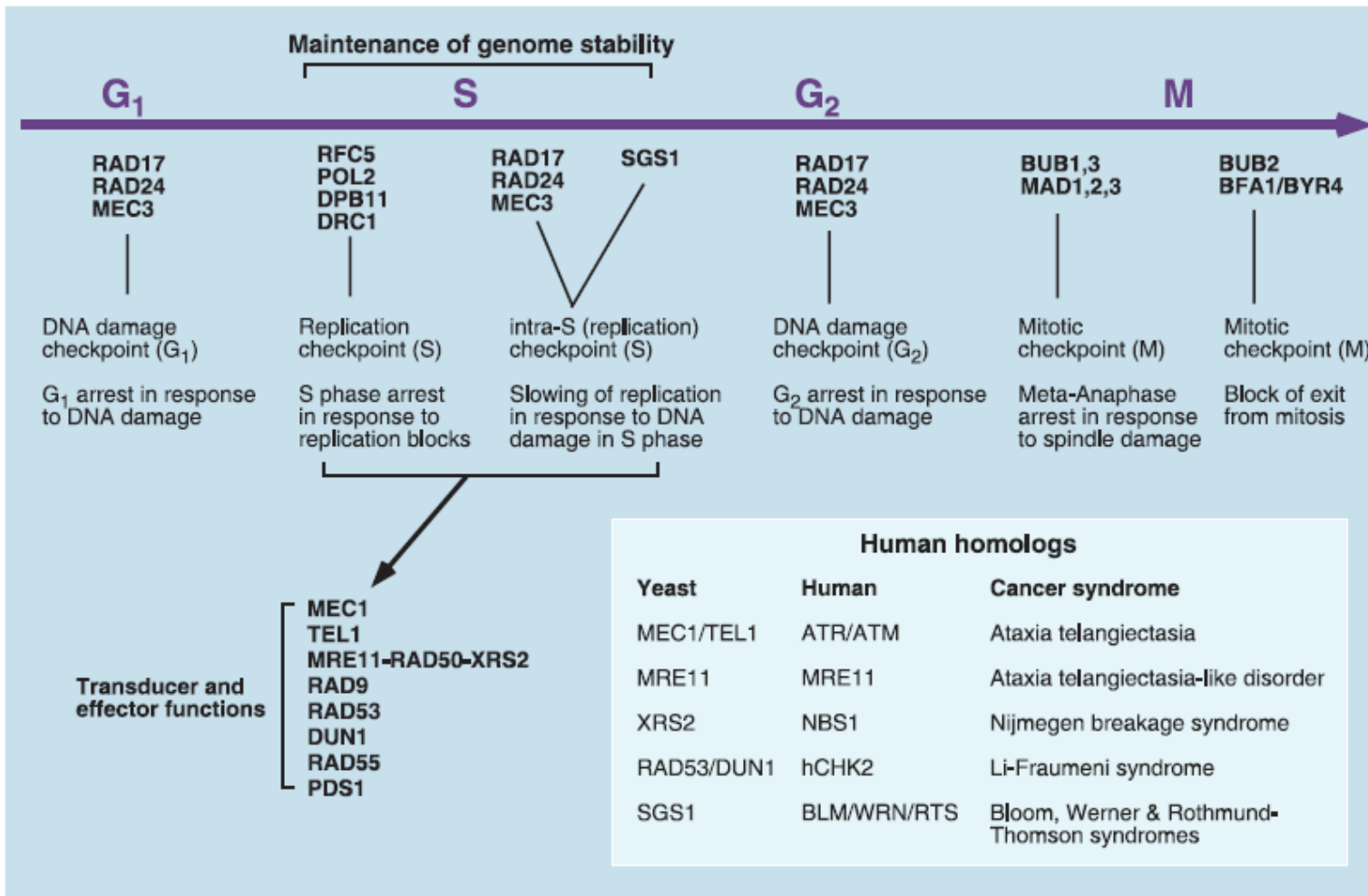
Každý DSB je nebezpečný pro buňku.

Základní mechanismy opravy DSB, společné pro *S. c.* a *S. p.* (evolučně vzdálené), lze nalézt i ... u člověka

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

Kontrola buněčného cyklu (*S. cerevisiae*)



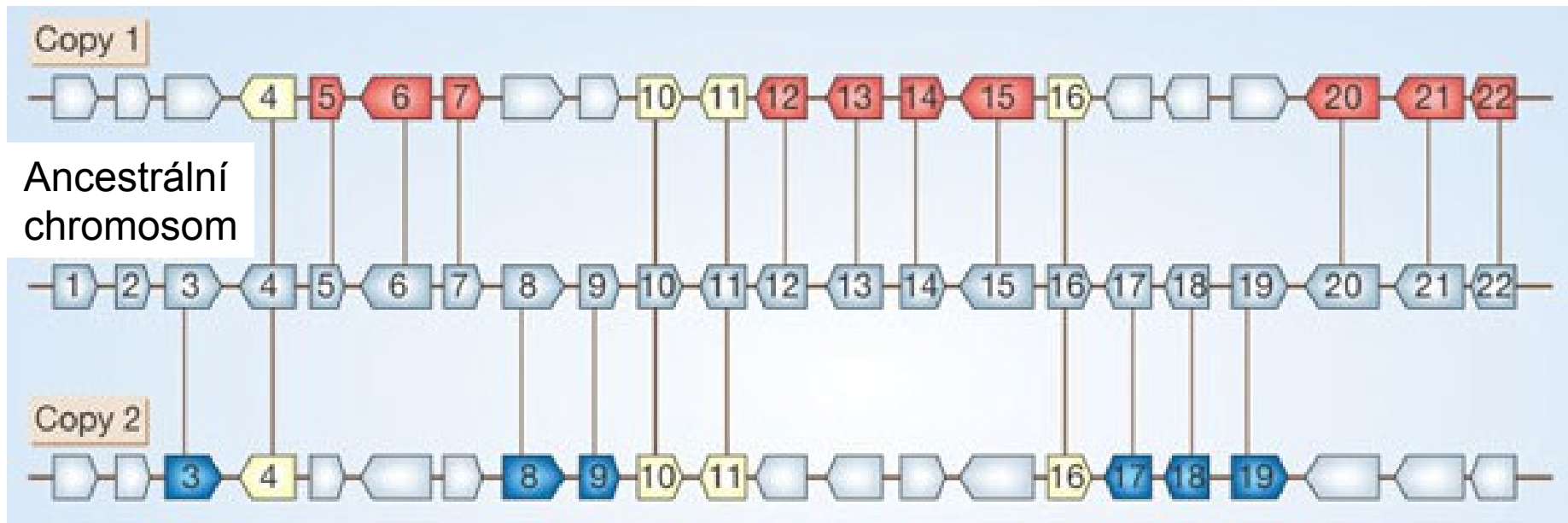
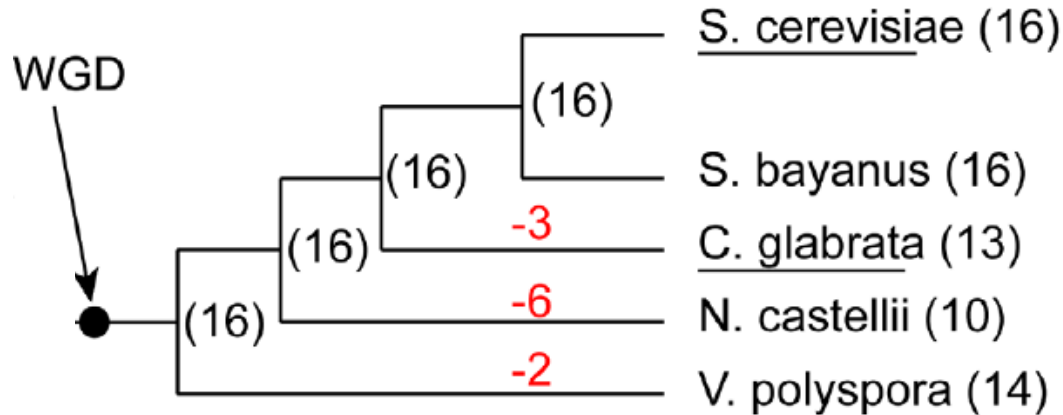


Základní mechanismy kontroly buněčného cyklu, segregace, opravy DSB jsou konzervované od kvasinek až po člověka ...

Problémy se segregací či opravou poškozené DNA mají konsekvence ... aneuploidie ... rakovinné bujení ... ale také důležitý faktor v evoluci ...

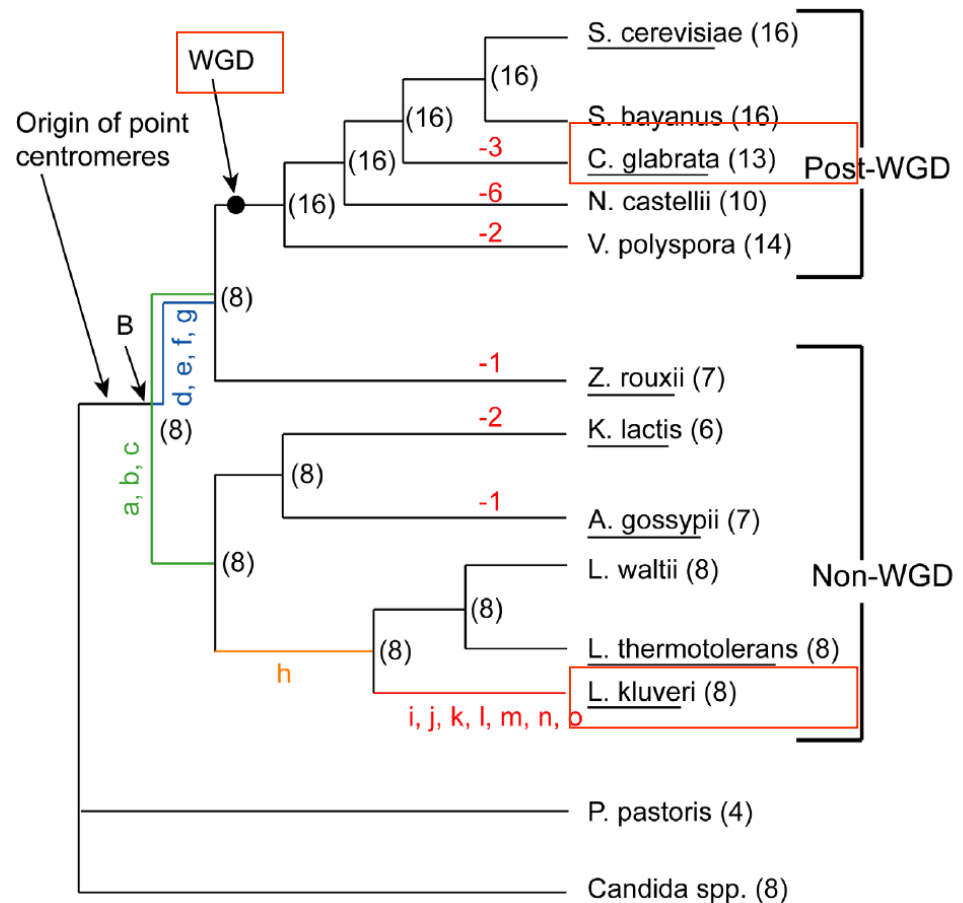
Celogenomová duplikace – *S.cerevisiae*

cca 30% genomu *S.c.* vzniklo duplikacemi => cca 2000 genů duplikováno nebo došlo k celogenomové duplikaci (WGD) => a poté došlo k přeskupování a redukci segmentů (i chromosomů) – 30% genomu u *S.c.* je pozůstatkem celogenomové duplikace (nikoli duplikace segmentů či genů)



Evoluce kvasinkového genomu

- srovnání kvasinkových genomů ukázalo na existenci „praskvasinky“ 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 fúze chromosomů i přeskupování => omezené přeskupování)

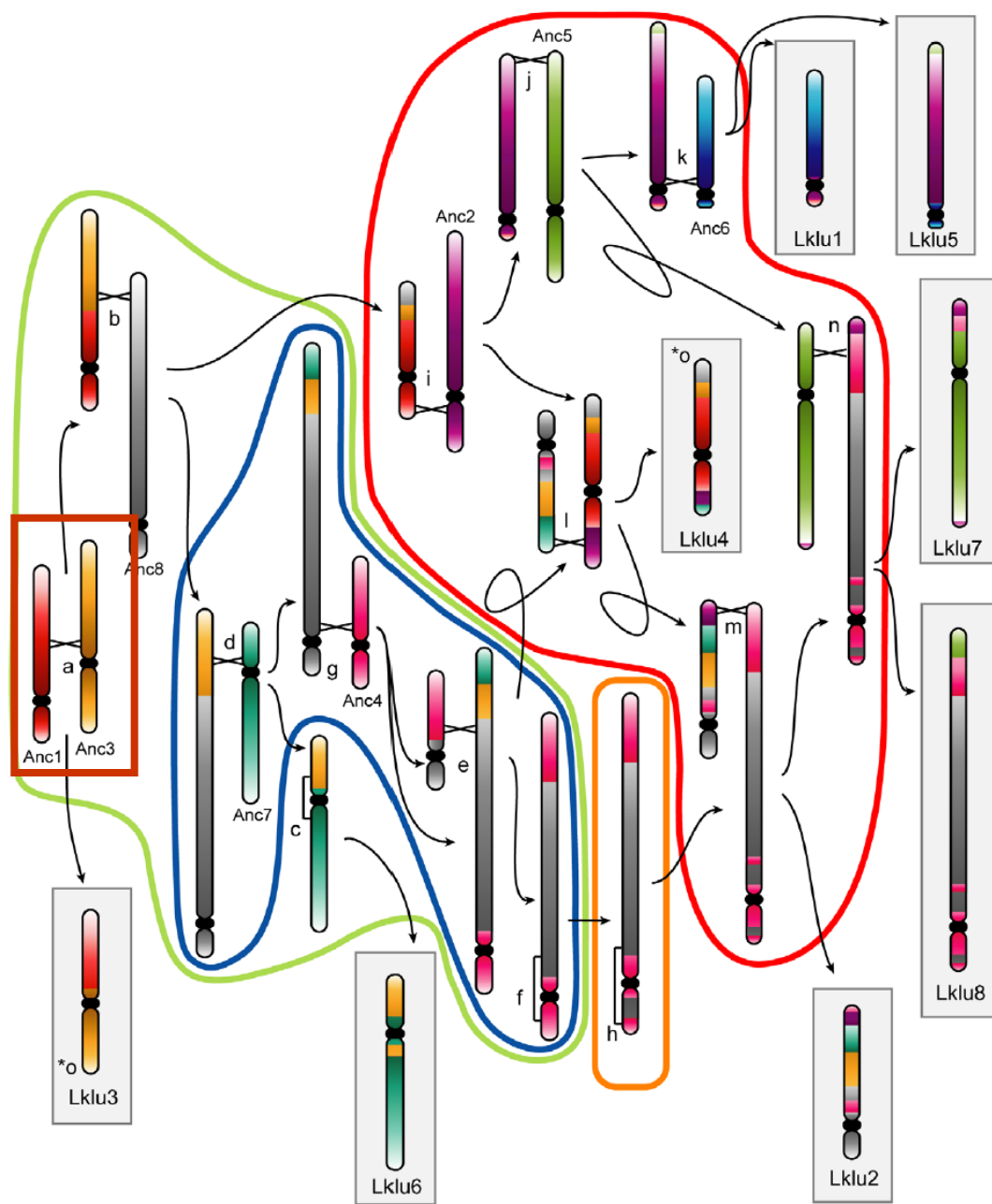
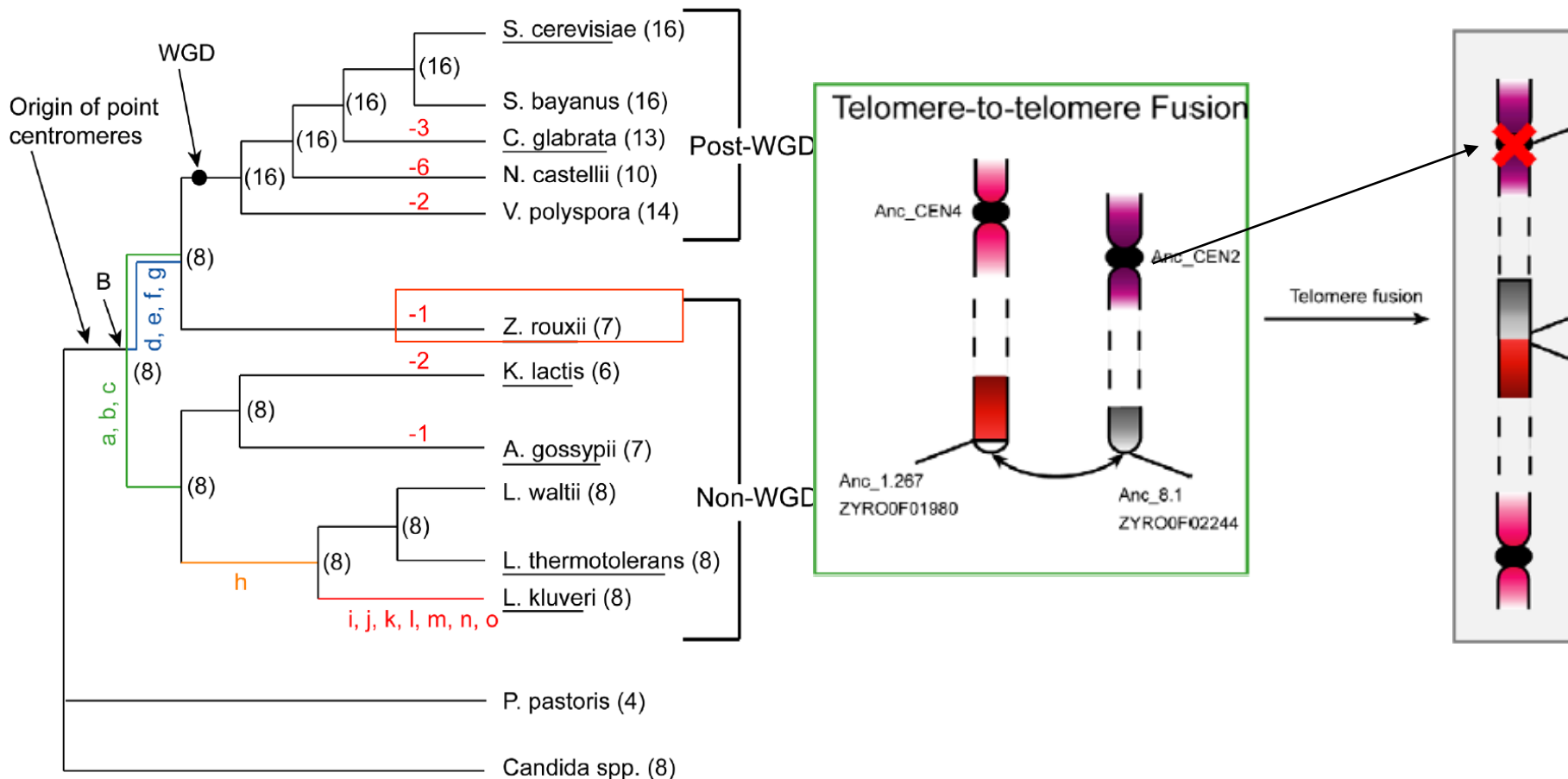


Figure 2. Cartoon showing the rearrangements indicated by lowercase letters in Figure 1. Monocolored chromosomes belong to the WGD Ancestor. Chromosomes in gray boxes are extant *L. kluveri* chromosomes. Events encircled by a color correspond to events on branches of the same color in Figure 1. Black 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.

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)



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