

Cvičení: 14. a 18.12., A7 (2.17) - plázeň, psací a kreslicí potřeby

Souhrn předchozích přednázek

- “ Regulace transkripce
 - . Gal4 transkripční faktor
 - “ transkripční hybridní systémy
 - . alternativní kvasinkové systémy
 - “ hybridní . G-proteiny
 - “ komplementační . DHFR, ubikvitin

Osnova (poslední) přednášky

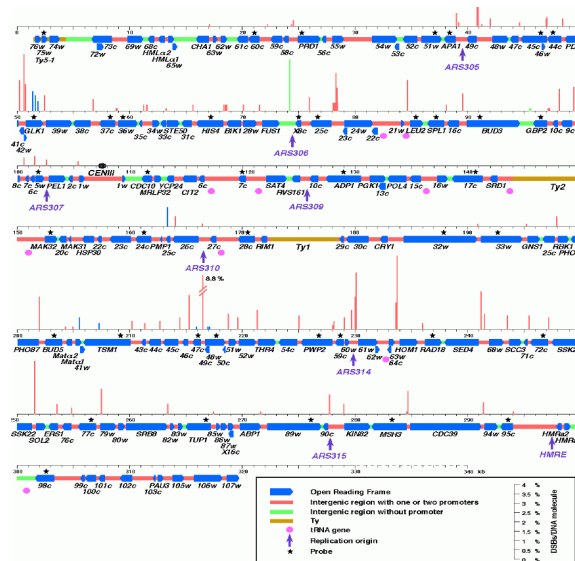
“ Chromatin

- . Charakteristika kvasinkového genomu
- . Chromosomy
 - “ chromatinové domény
 - “ SMC komplexy
- . Evoluce (duplikace genomu θ)
- . DNA-opravné mechanismy
 - “ NHEJ
 - “ Homologní rekombinace
- . SMC komplexy a struktura chromatinu

“ Závěry

Základní prvky kvasinkového genomu *Saccharomyces cerevisiae* (vs *S.p.*)

- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosom (chrI=0.22 . chrXII=1.6Mbp)
- délka chromosomu XII se u různých *S.c.* liší dle počtu (až 200) kopií rDNA v repetici, 262 tRNA (pro 64 kodon), 40 snRNA,
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Geny (cca 6500) reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- Redundantní (2000 gen duplikováno) . cca30% genomu vzniklo duplikacemi
- <5% gen (280) obsahuje introny (0.5% genomu),
- 3% Ty1-5 transposony (46% u lovka)
- 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

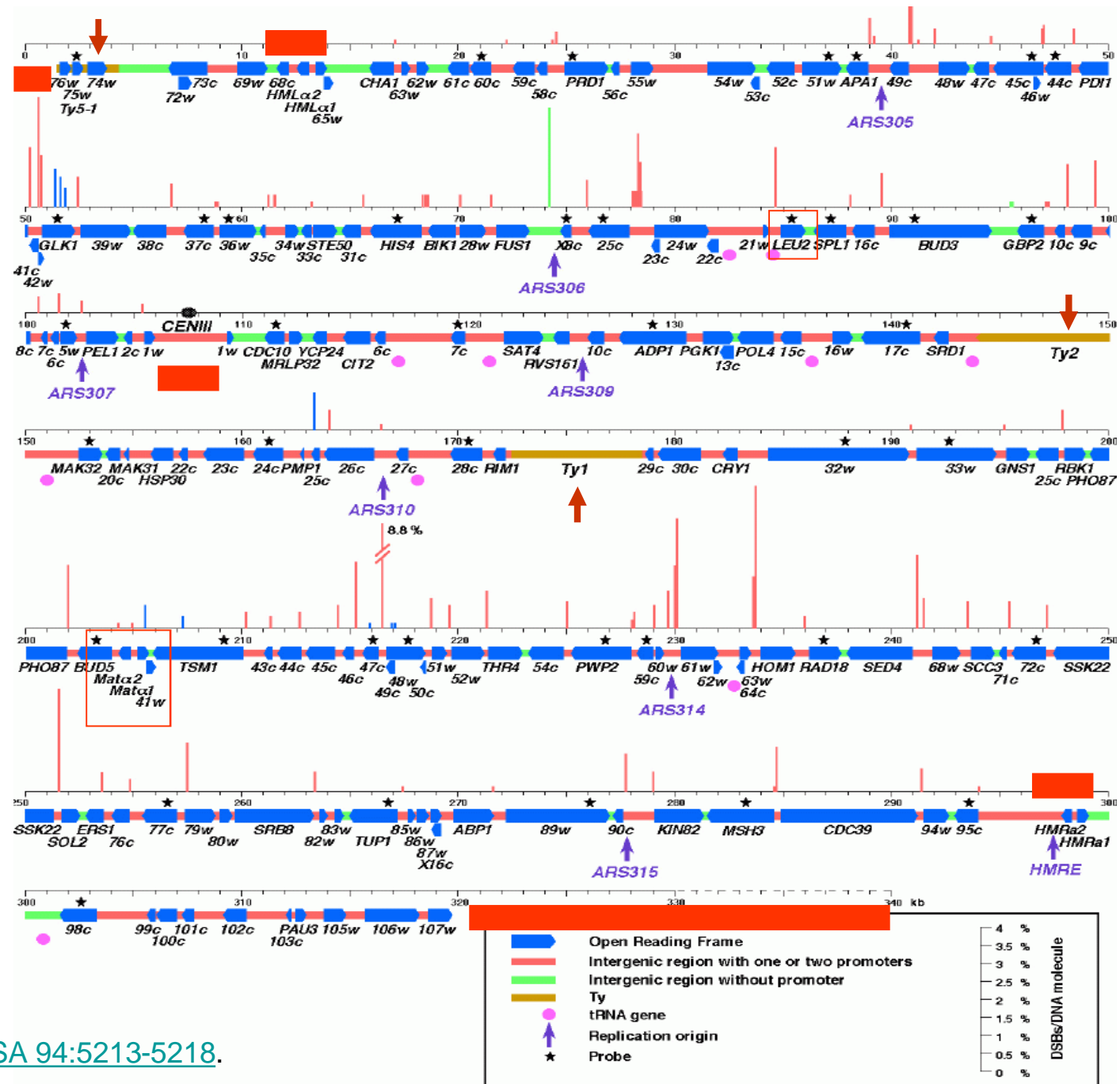
Heterochromatin:

centromera

telomery

HMR a HML

(MAT je aktivní
 ur uje haplotyp)



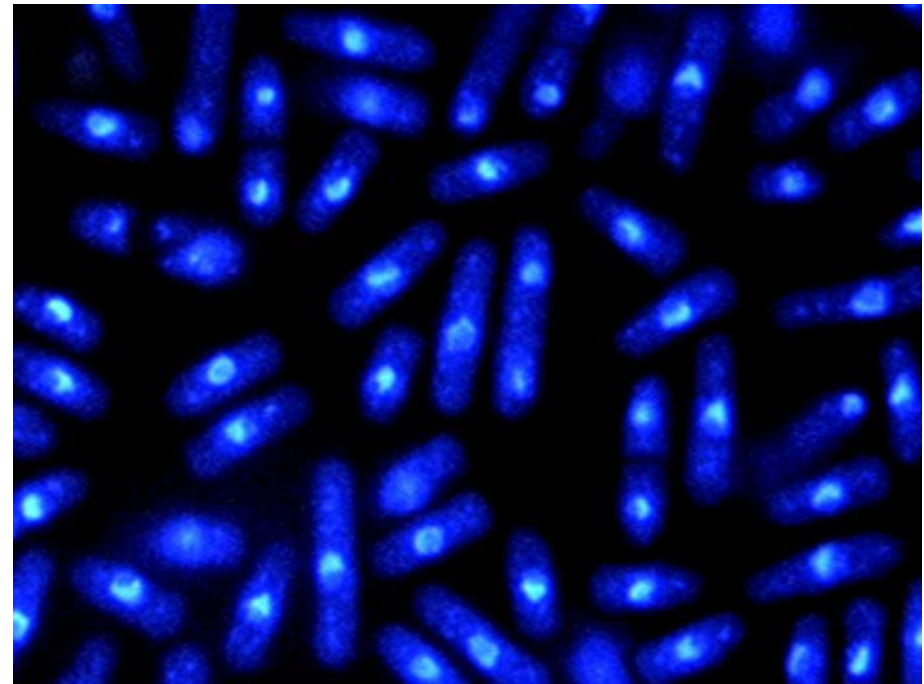
Pozorování DNA/chromosom u kvasinek

- “ Chromosomy jsou u kvasinek malé a těžko pozorovatelné v mikroskopu .
barvení DNA na fixovaných preparátech pomocí DAPI (4 ,6-diamidino-2-phenylindole)
- “ Použití fluorescenčních proteinů -GFP (green fluorescence protein) pro studium dynamiky chromatinu (H2A-GFP, 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 sChIP on CHIP%
- “ 3C . chromatin conformation capture

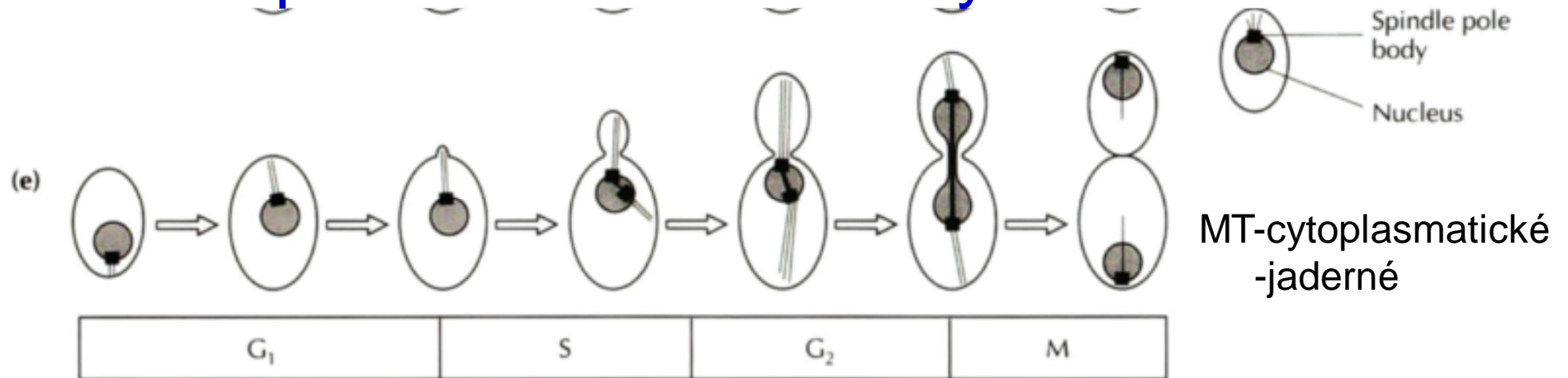


↑
Saccharomyces cerevisiae
→
Schizosaccharomyces pombe

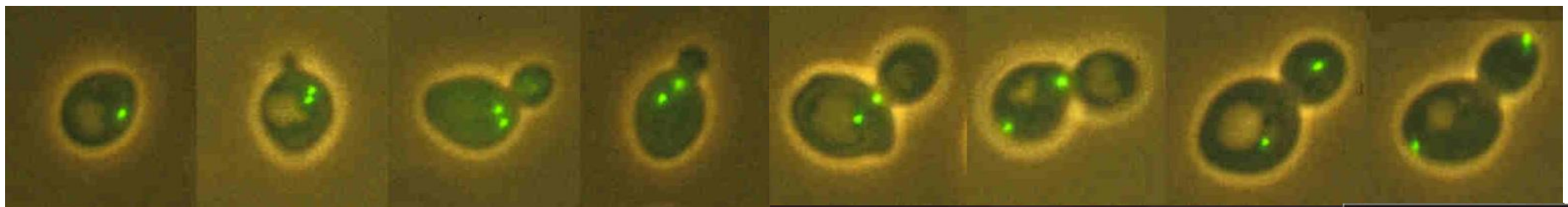
Pozadí = mtDNA



DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*

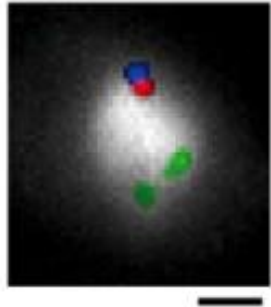


- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB . začátek S fáze tj. replikace
- rozchod jaderných plak na opačné póly . pokračování z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje . začátek M fáze (u kvasinek se jaderná membrána nerozpadá)
- **na začátku anafáze dochází k oddělení sesterských chromatid a jejich segregaci**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



Orientace chromosom

Mitotic interphase

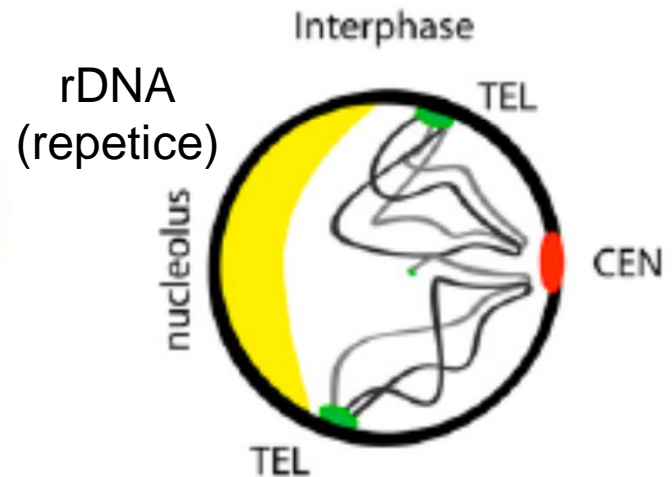
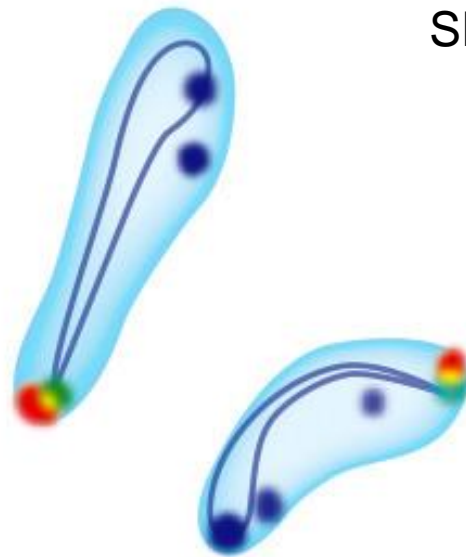
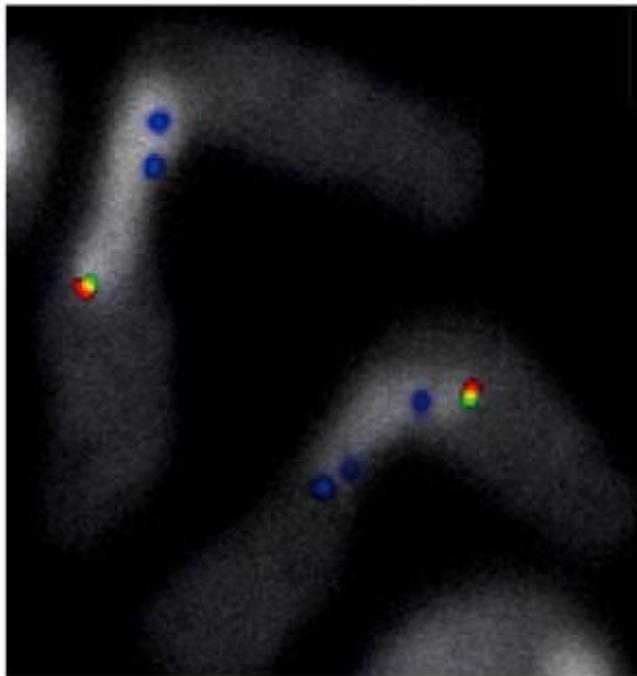


- centromere
- telomere
- SPB

v mitotickém jád e jsou centromery orientovány (p ichyceny) k SPB (spindle pole body)
v meiotickém jád e jsou telomery blí0 SPB

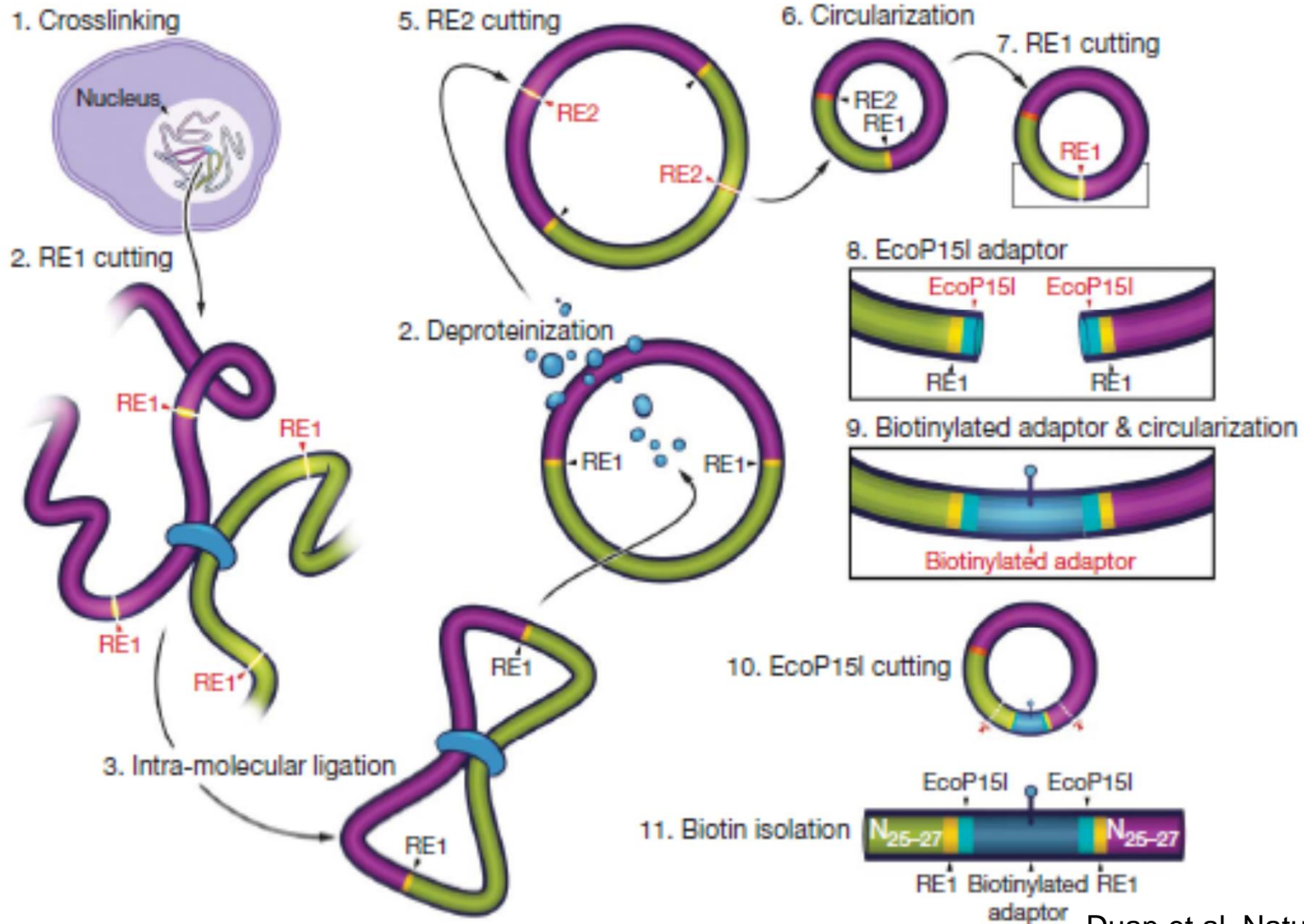
FISH . fluorecence *in situ* hybridization (1992)

Meiotic prophase

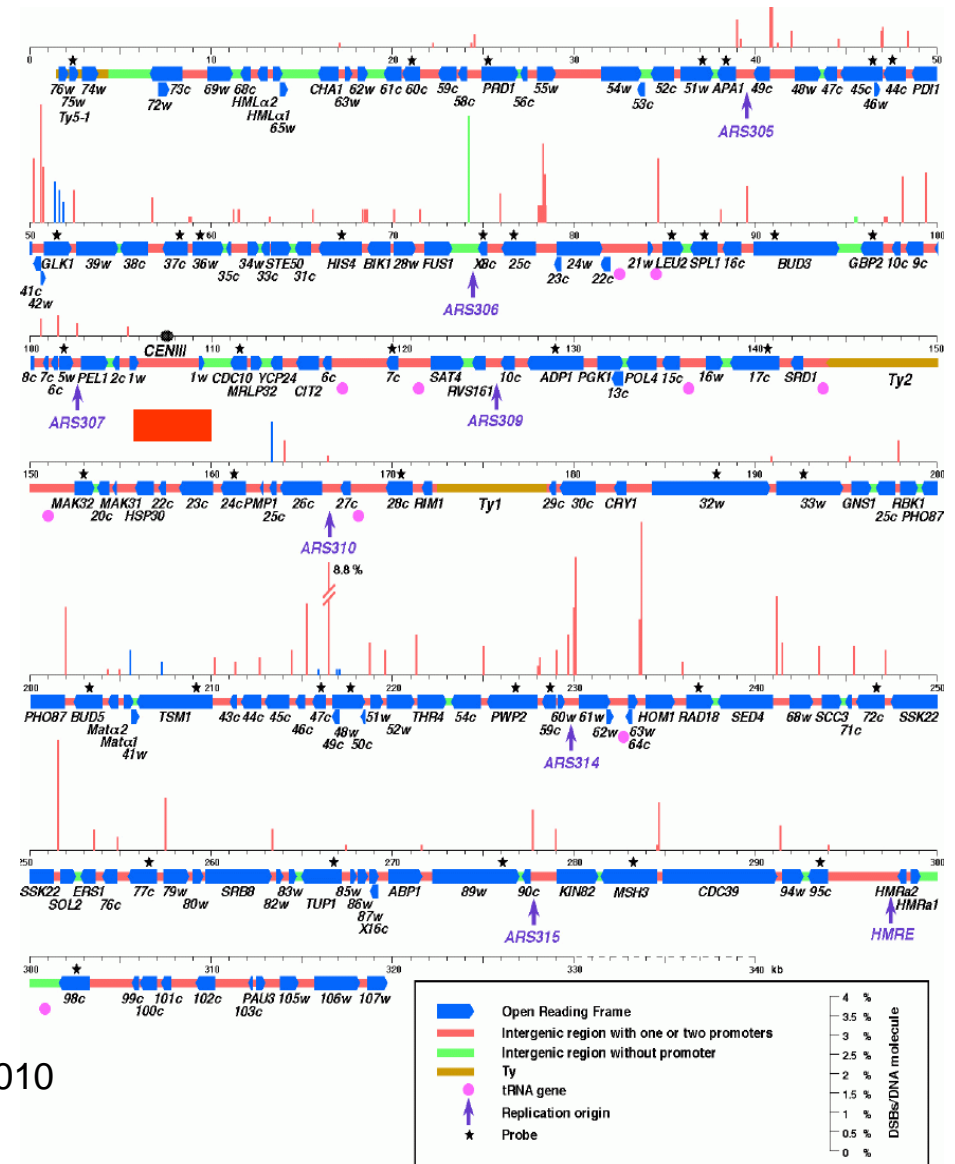
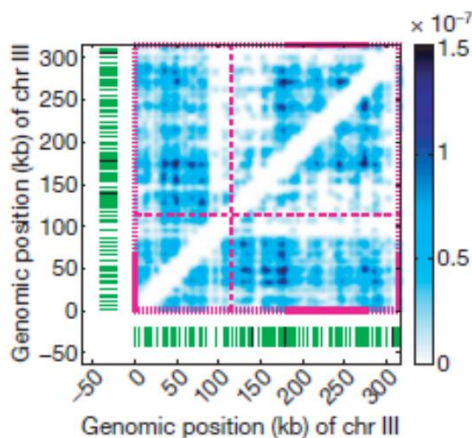
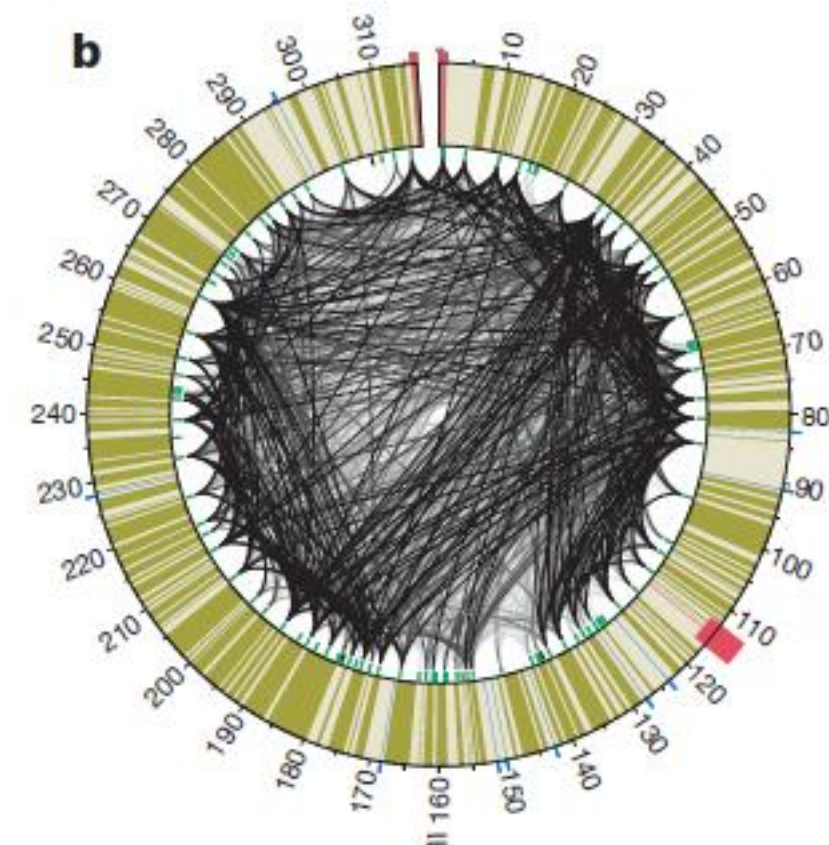


3D organize chromosom v S.c.

3C . chromosome conformation capture



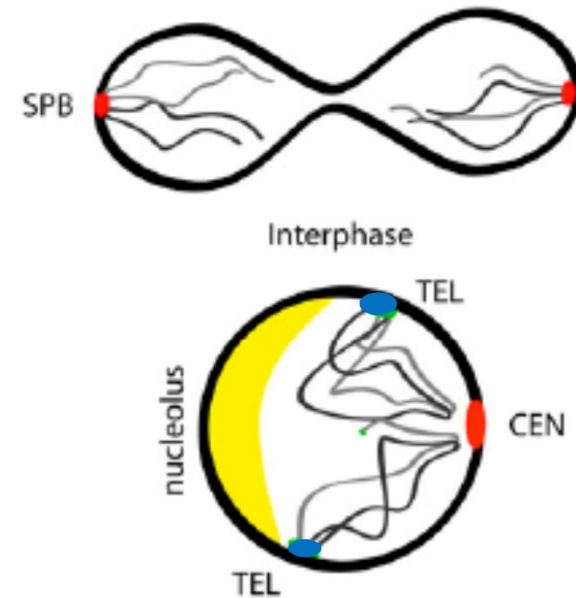
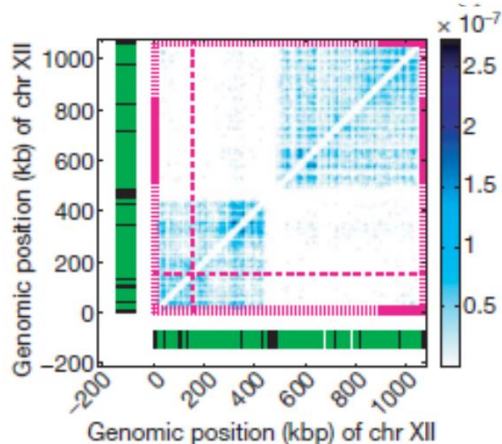
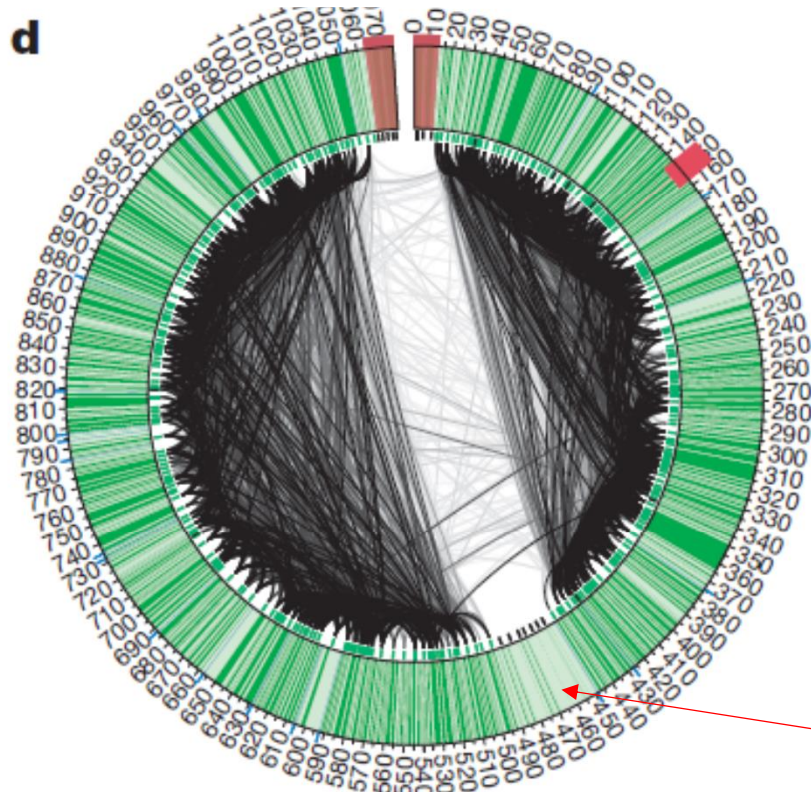
Chromosom III



Duan et al, Nature, 2010

Diagram ukazuje vícemén rovnom rnovou distribuci smy ek (prostorov sousedících úsek DNA) . napovídá o prostorovém uspo ádání chromosomu III

Chromosom XII

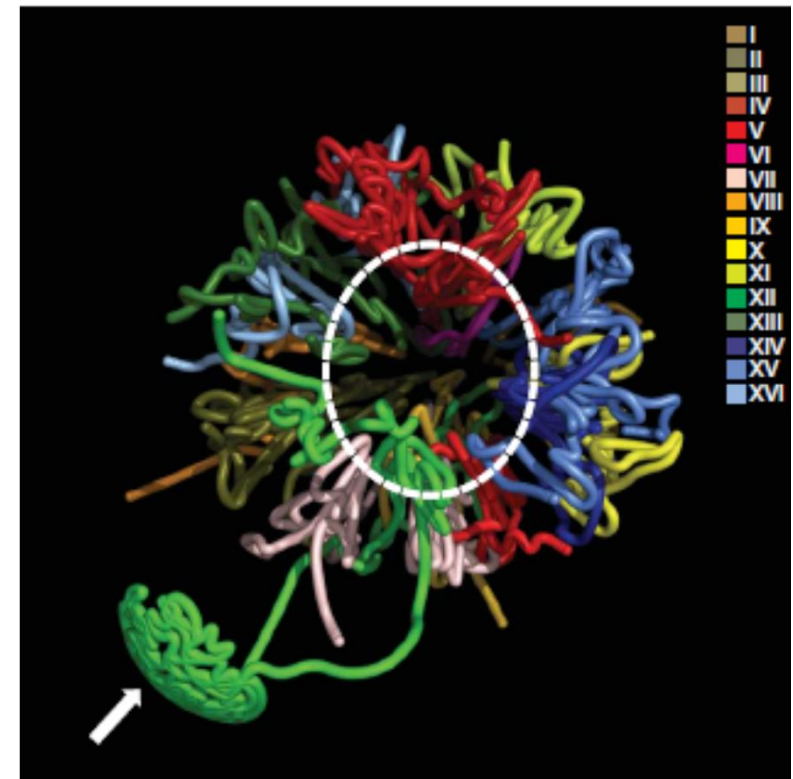
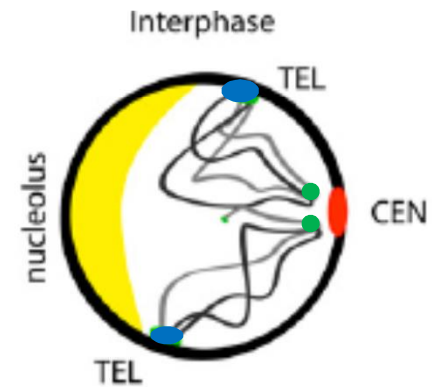
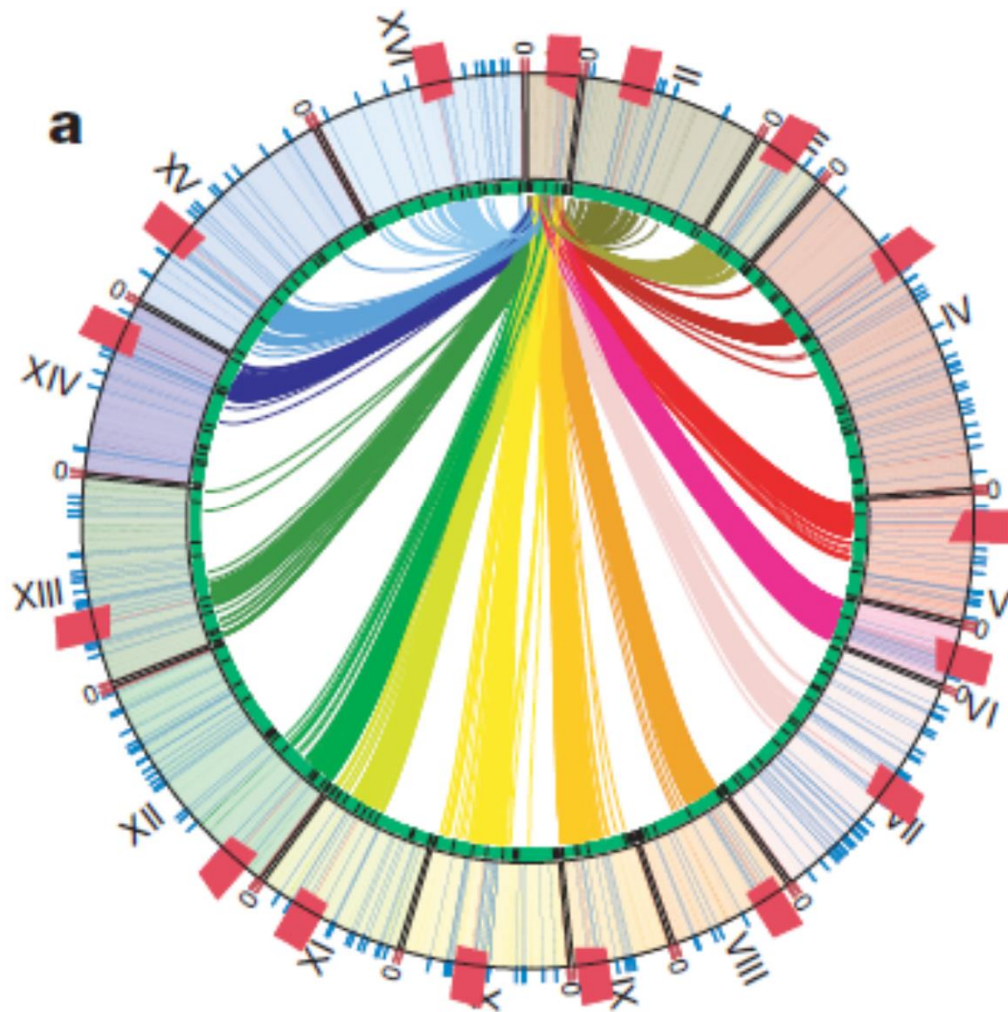


ibl, 1885

Chromosom XII obsahuje rDNA repetice, které jsou lokalizovány do jadérka . úsek nesousedí s žádnou z jaderných částí . je izolován (z bezpečnosti, aby nedocházelo k homologní rekombinaci mezi homologními repeticemi)

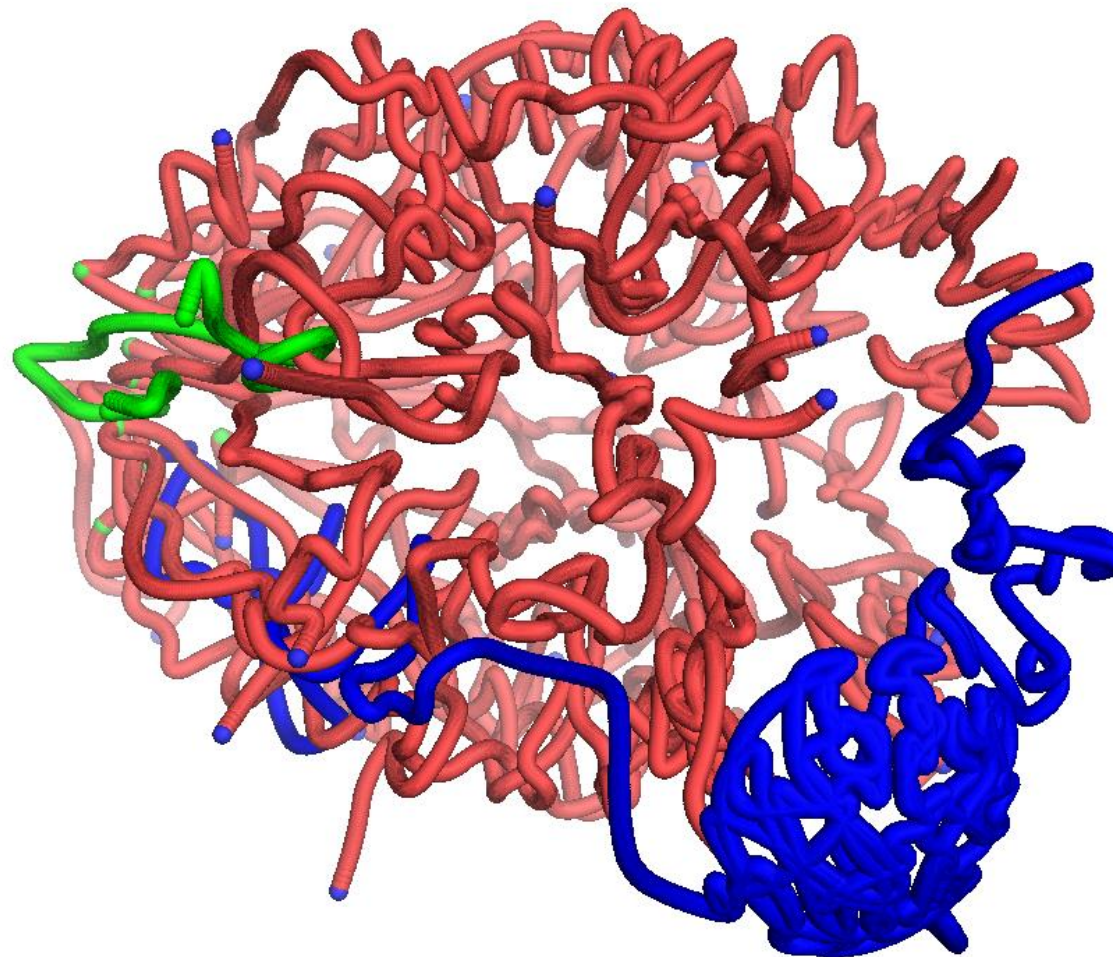
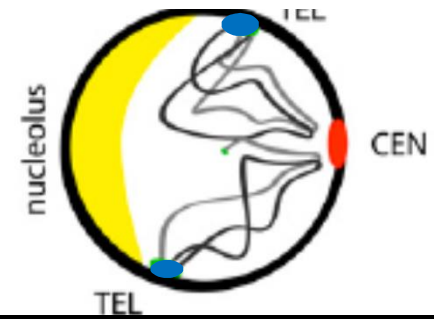
Duan a spol, Nature, 2010

Vzechny centromery jsou blízko sebe

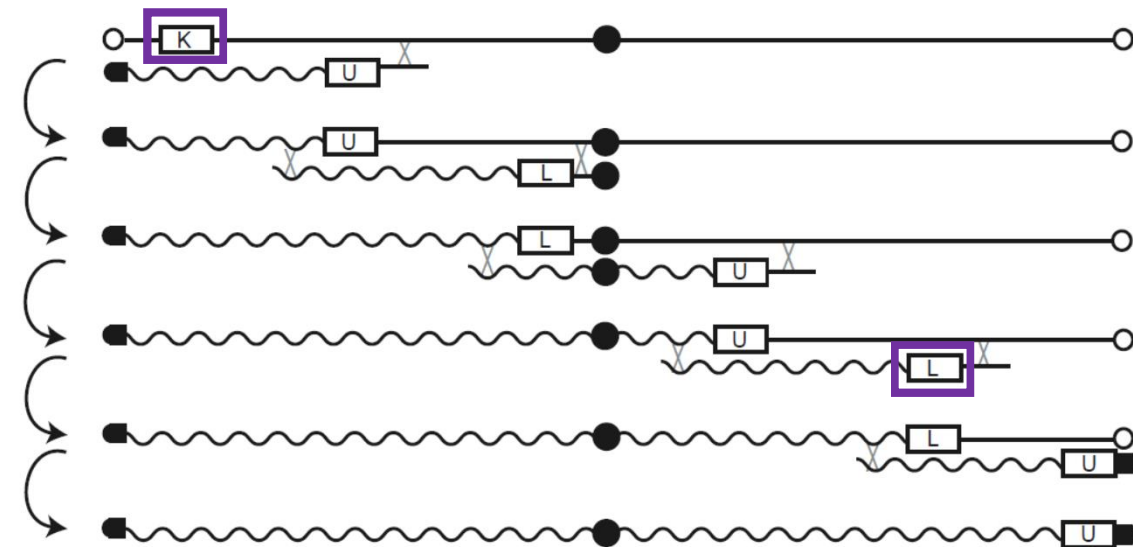


v mitotickém jádře jsou centromery orientovány
(přibližně) k SPB (spindle pole body)

3D rekonstrukce chromosom v kvasinkovém jádře

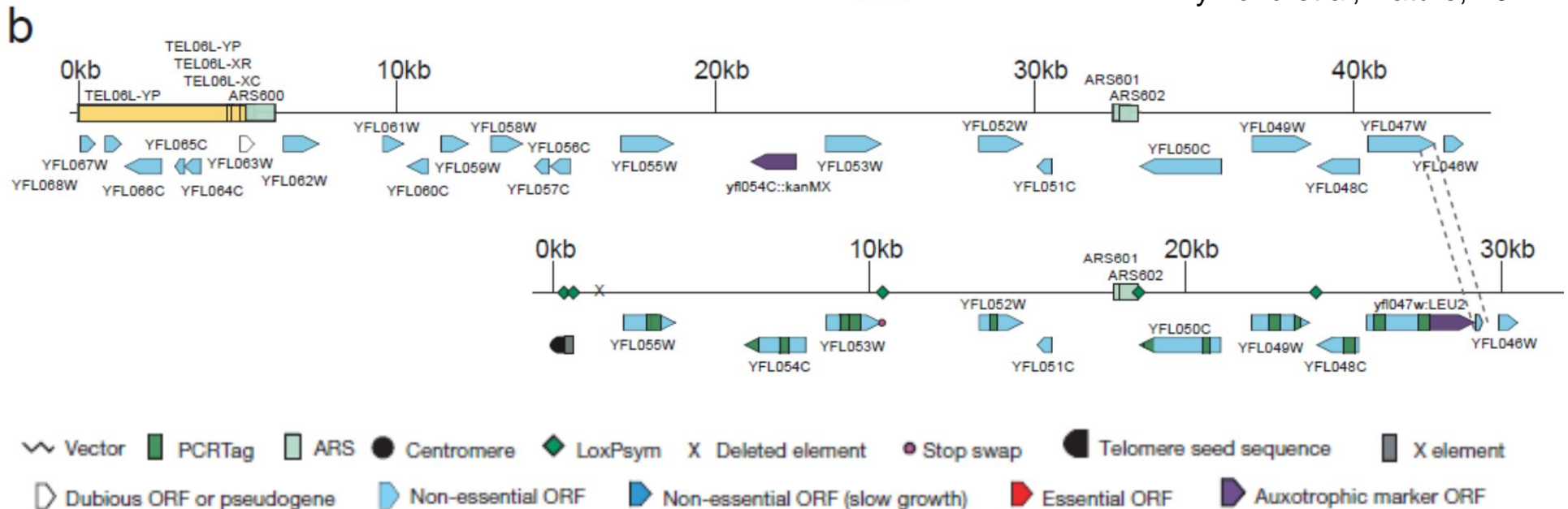


Syntetické raménko kvasinkového chromosomu



Syntetické raménko vytvářeno postupně (cca 10kbp fragmenty). Slouží jako selekční markery *URA3* vs *LEU2* pro selekci nových kmenů.

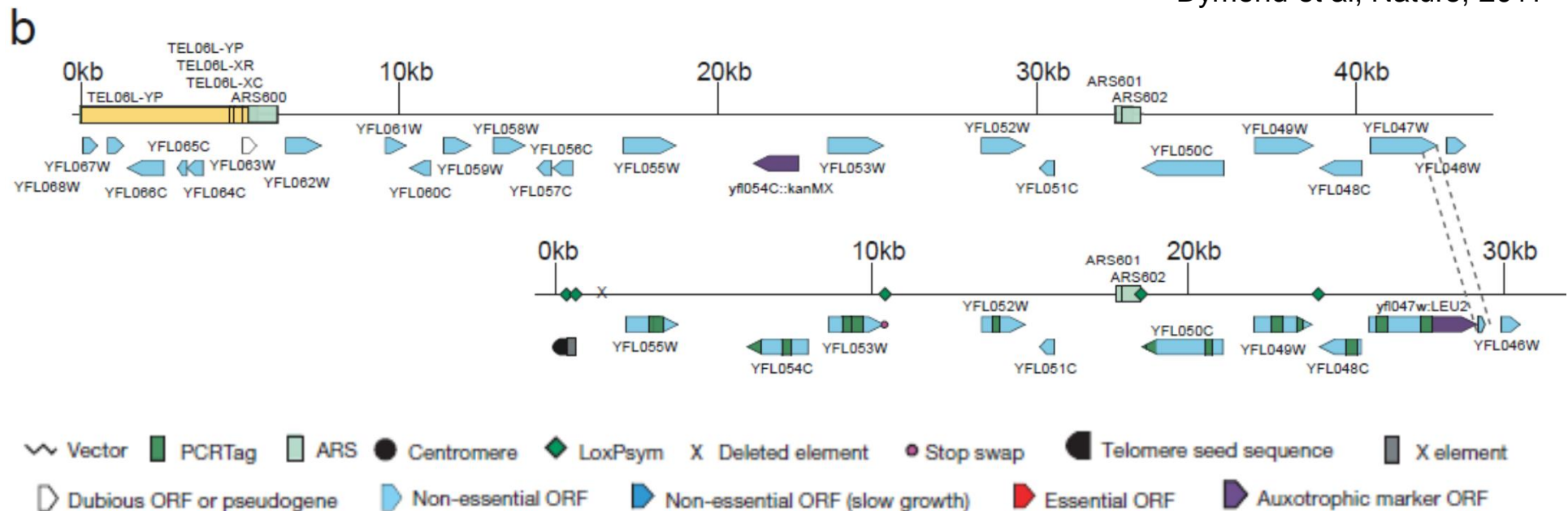
Dymond et al, Nature, 2011



Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- “ Zachováno po adí gen ō wt fenotyp (testovali UV, H₂O₂ ō)
- “ Odstran ny destabilizující repetitivní elementy (telomery, transposony)
- “ Redundantní tRNA (z 275 kopií na 42 kódujících . na extrachromosom)
- “ TAG na TAA stop kodony (TAG kodon uvoln n pro novou AMK)
- “ unikátní PCRtagy (odlizení syntetického a wt chromosomu)
- “ LoxPsym na vyzt pení non-essenciálních gen

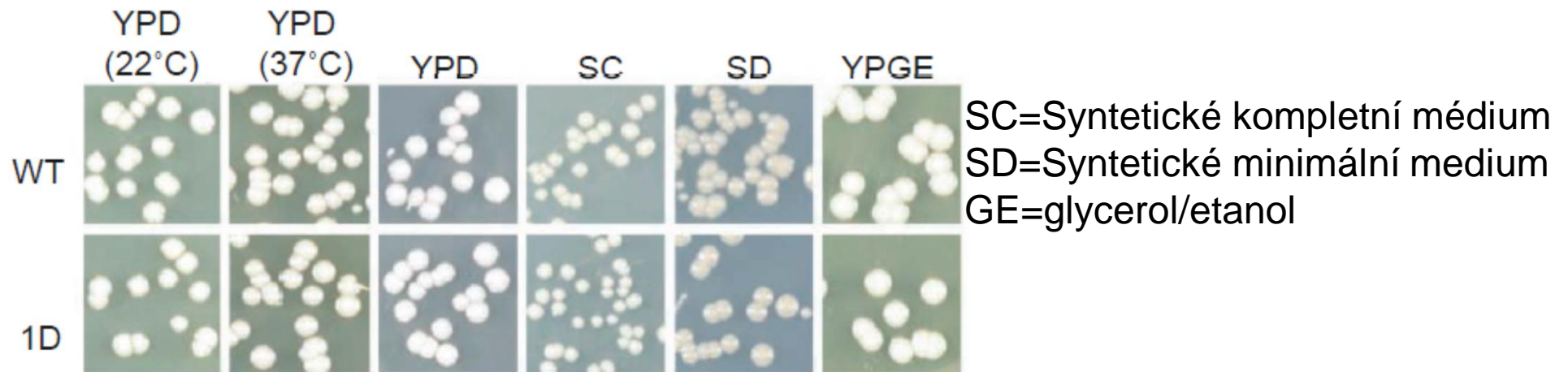
Dymond et al, Nature, 2011



Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- “ Zachováno po adí gen ϕ wt fenotyp (testovali UV, H_2O_2 ϕ)
- “ Odstraněny destabilizující repetitivní elementy (telomery, transposony)
- “ Redundantní tRNA (z 275 kopií na 42 kódujících . na extrachromosom)
- “ TAG na TAA stop kodony (TAG kodon uvolněn pro novou AMK)
- “ unikátní PCRtagy (odlizení syntetického a wt chromosomu)
- “ LoxPsym na vyztěpení non-essenciálních gen

Dymond et al, Nature, 2011

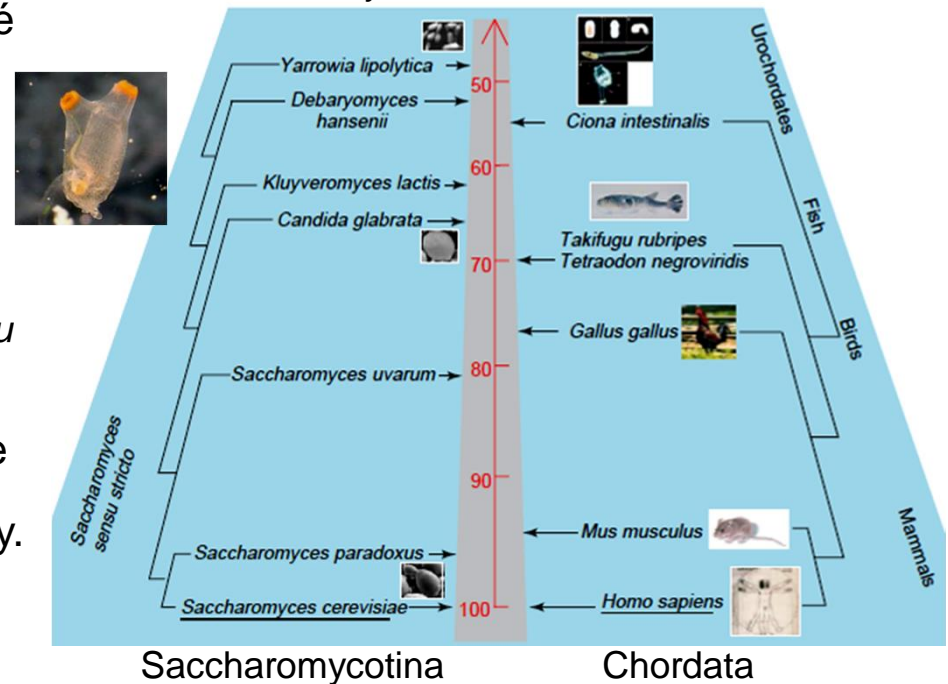


- “ Zachován fenotyp (teplotní citlivost, morfologie kolonií, růst na G/E ϕ)

Evoluce kvasinek

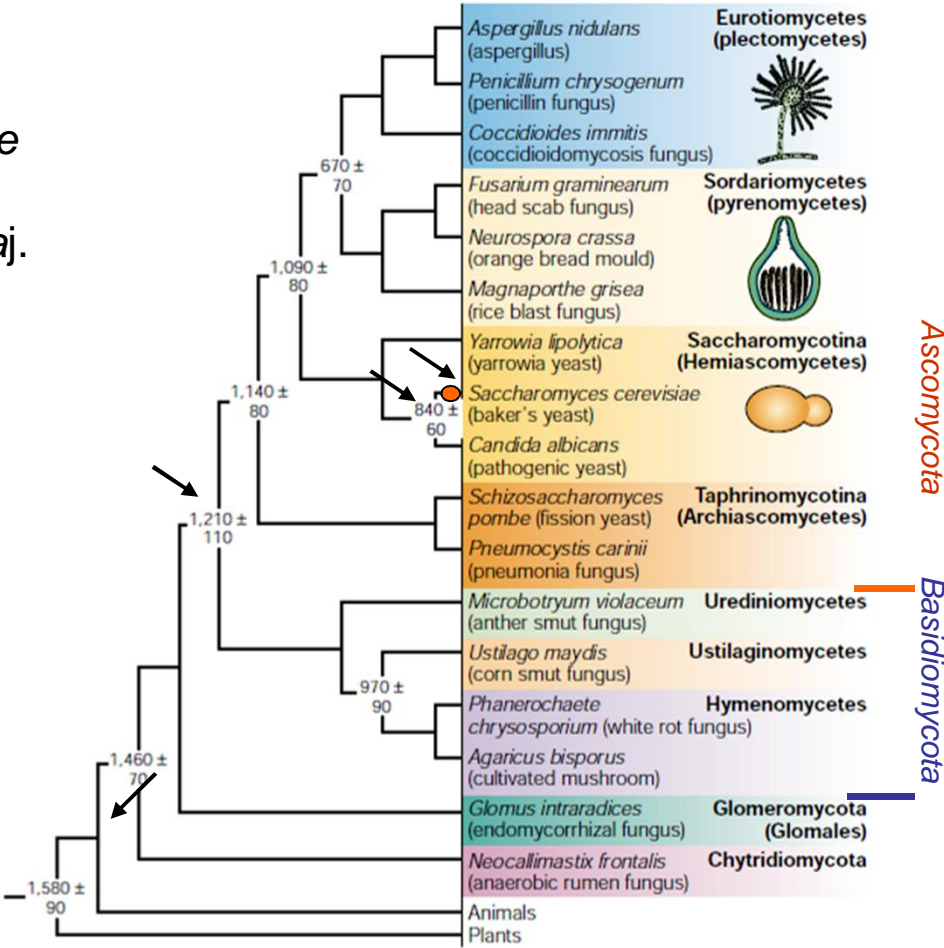
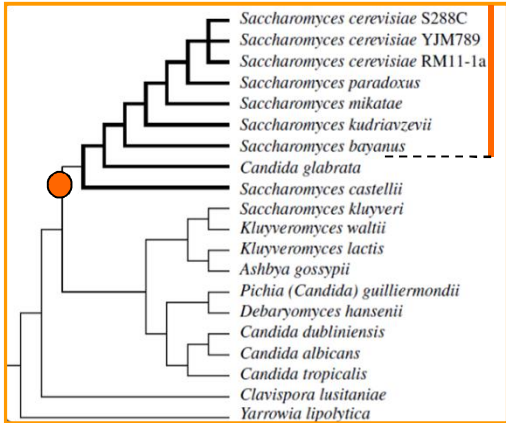
- “ p esto0e jsou si druhy morfologicky podobné a mají podobný životní styl
- “ % odliznost sekvence protein :
 - . *S. cerevisiae* a *C. glabrata* ~ lov k a ryba
 - . *S. cerevisiae* a *Y. lipolytica* ~ lov k a sumka
 - . mezi druhy *S. sensu stricto* ~ mezi ády savc
 - . Proteiny lov ka a hlodavc jsou si více podobné než proteiny druh ze skupiny *sensu stricto*, mezi nimi0 m 0ou vznikat životaschopné hybridy!
- “ Lze srovnat genomy l., krysy, myzi a ku ete a lze rekonstruovat zm ny, jimi0 genomy b hem evoluce od společného předka pozly.
- “ Genomy kvasinek ze vzdálen jzích v tví fylogenetického stromu takto srovnat nelze.
- “ Potvrzeno studiemi rDNA, nov ji srovnáním rozdíl sekvencí aminokyselin v ortologních proteinech.

Obr. 3. Srovnání průměrné % shody sekvence protein v taxonech Saccharomycotina a Chordata



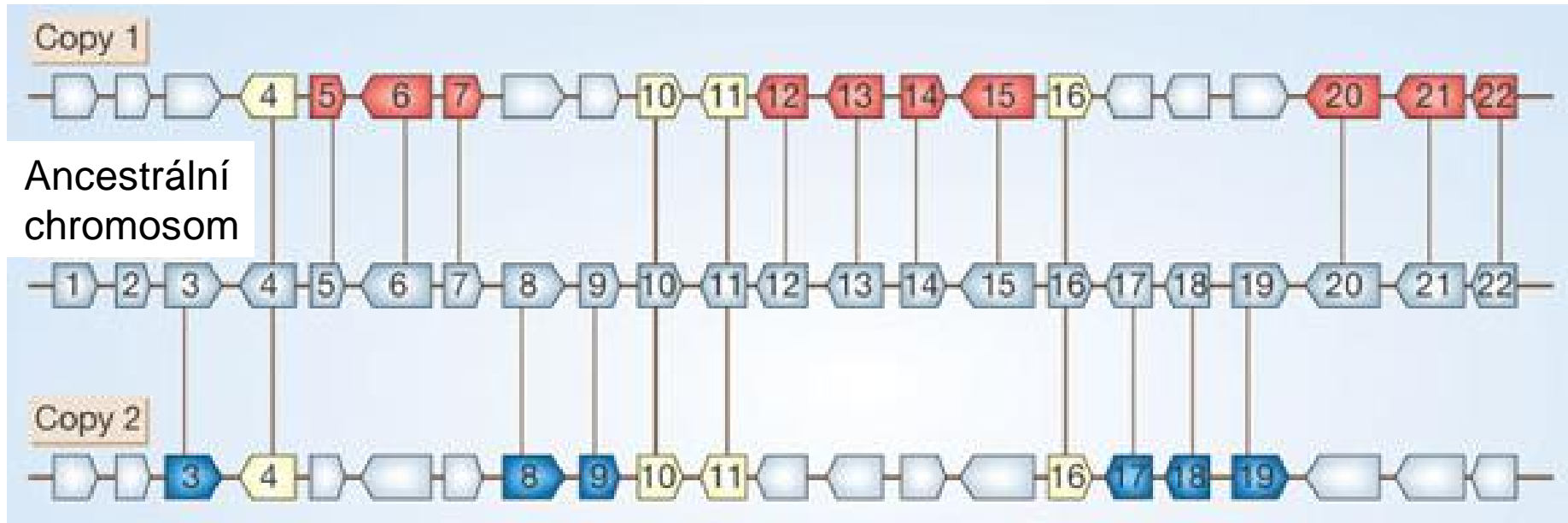
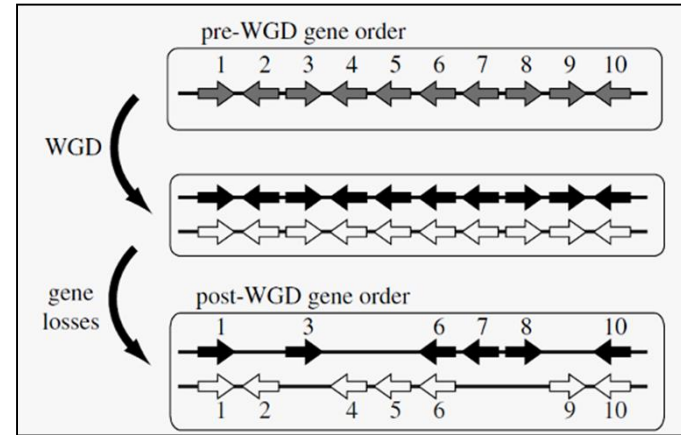
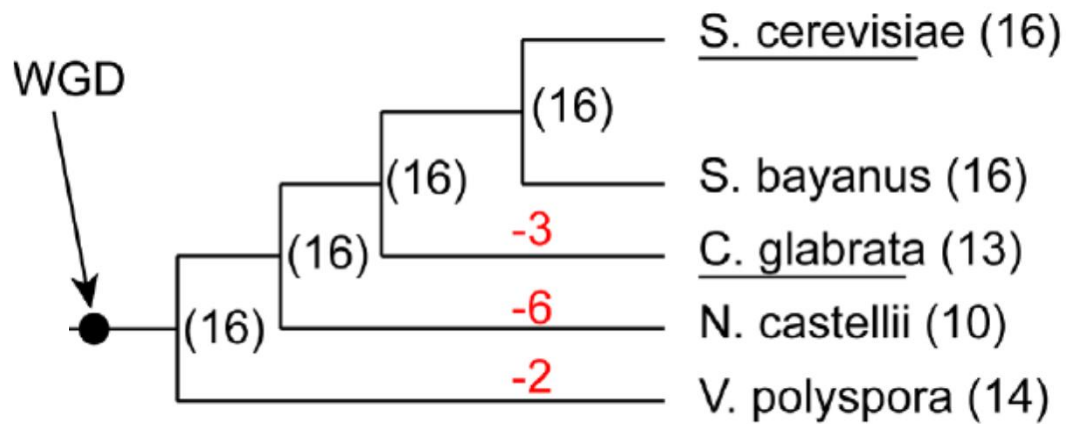
Evoluce kvasinek

- “ 1500 Mya: Metazoa - Fungi
- “ 1200 Mya: Ascomycota . Basidiomycota.
- “ 1000 Mya: *S. cerevisiae* . *Schizosacch. pombe*
- “ 840 Mya: *S. cerevisiae* . *C. albicans*
- “ 170 Mya: (*Pichia*, *Candida*) . *Kluyveromyces* aj.
- “ 150 Mya: WGD



Celogenomová duplikace . *Saccharomycotina*

cca 30% genomu *S.c.* vzniklo duplikacemi => cca 2000 gen duplikováno nebo došlo k celogenomové duplikaci (WGD) => a poté došlo k přeskupování a redukci segment (i chromosom). 30% genomu u *S.c.* je poz statkem celogenomové duplikace (nikoli duplikace segment i gen)

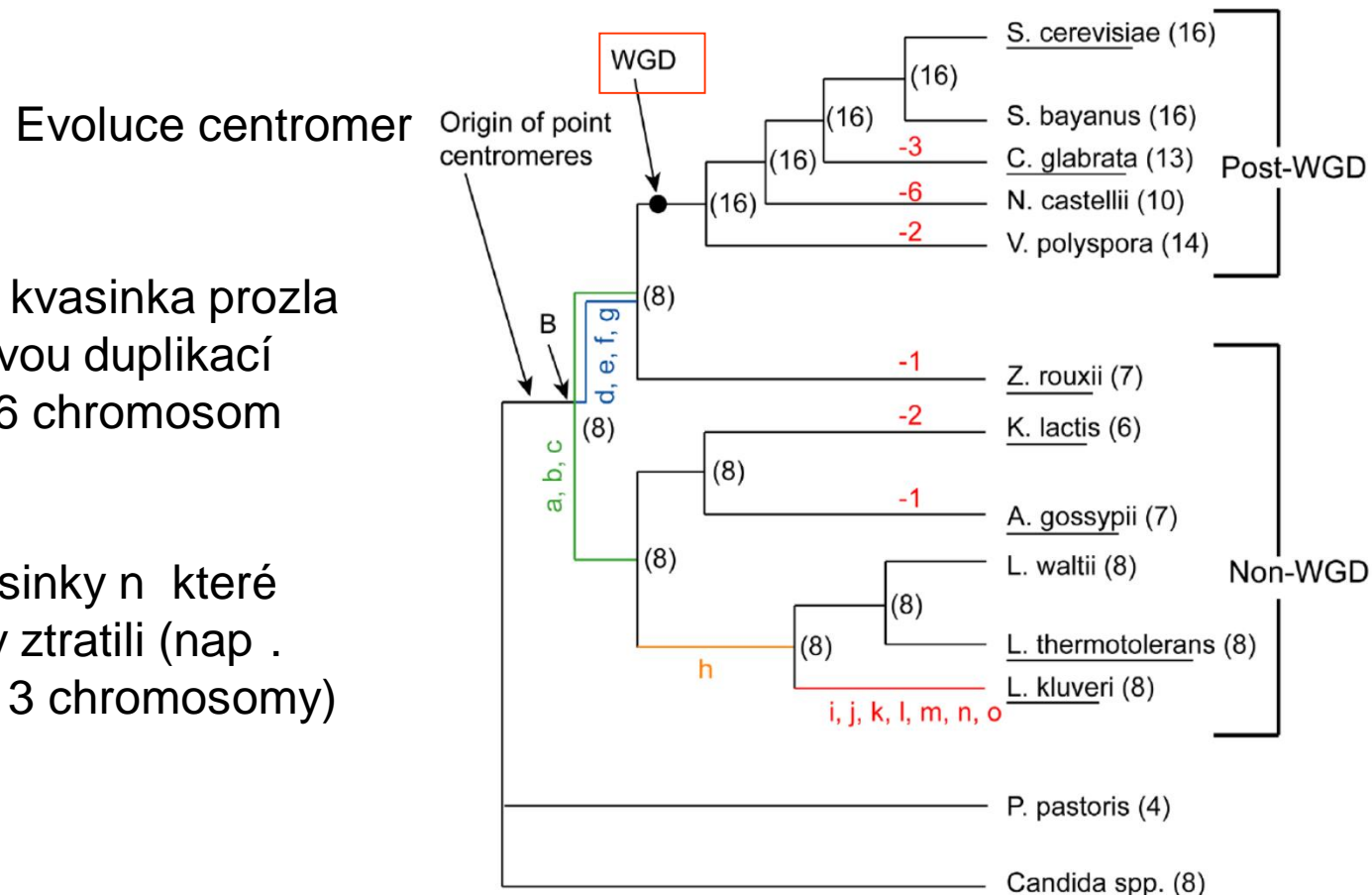


Evoluce kvasinkového genomu

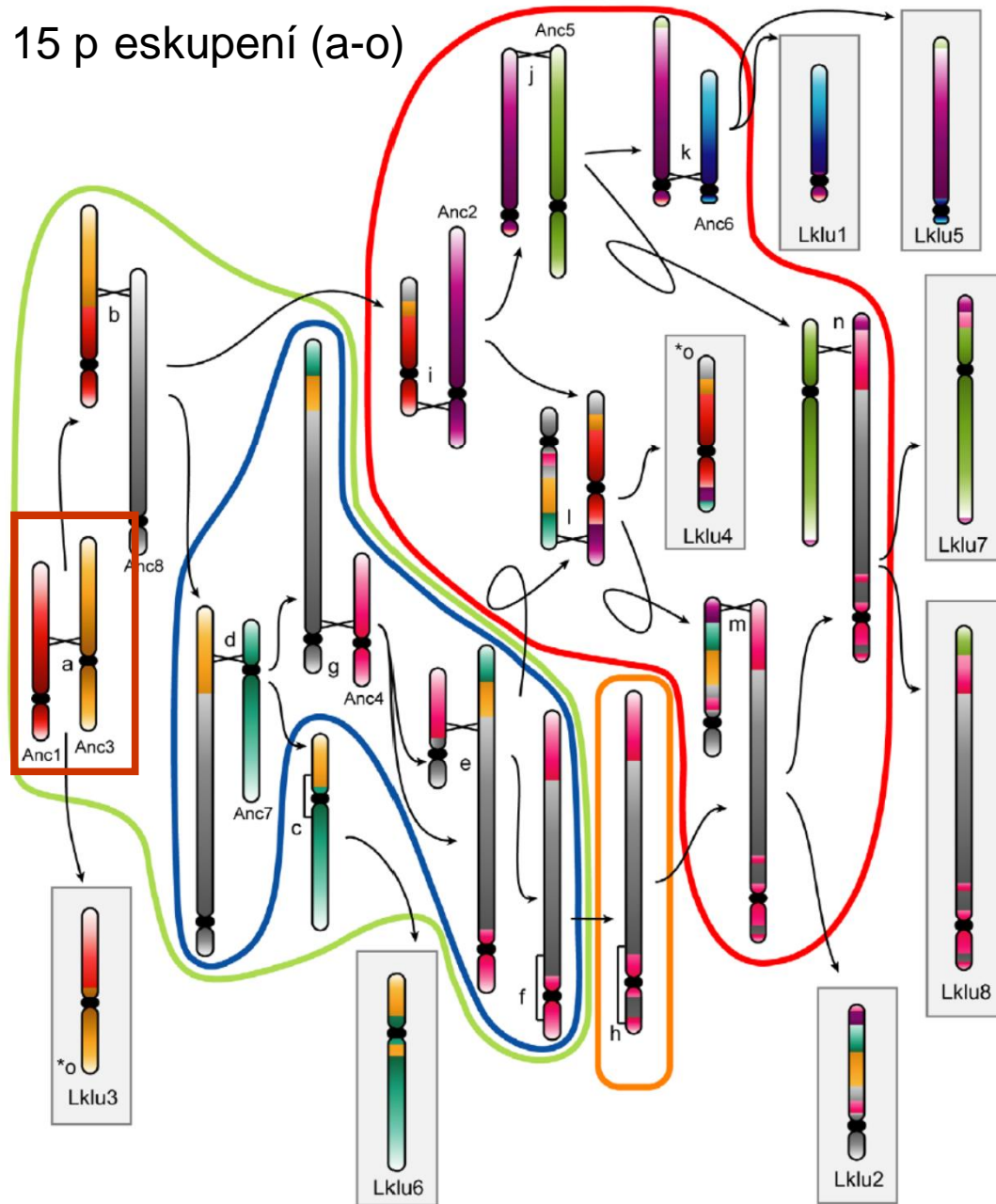
- “ srovnání kvasinkových genomů ukázalo na existenci praprkvasinky s 8-mi ancestrálními chromosomy (cca 4500 geny)
- “ nejbližší anc. genomu je *Lachancea kluyveri* (8 chromosomů, nejméně = 15 skupení v genomu - viz a-o)

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

“ některé kvasinky, které chromosomy ztratili (např. *C. glabrata* = 3 chromosomy)



15 p eskupení (a-o)



P eskupování chrom. blok u *L. kluyveri*

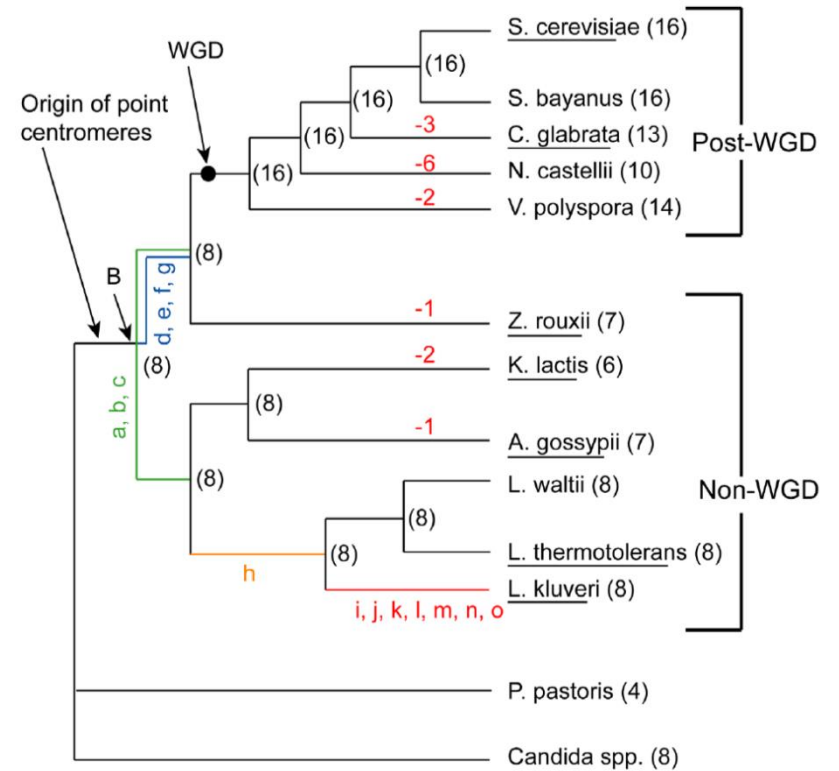
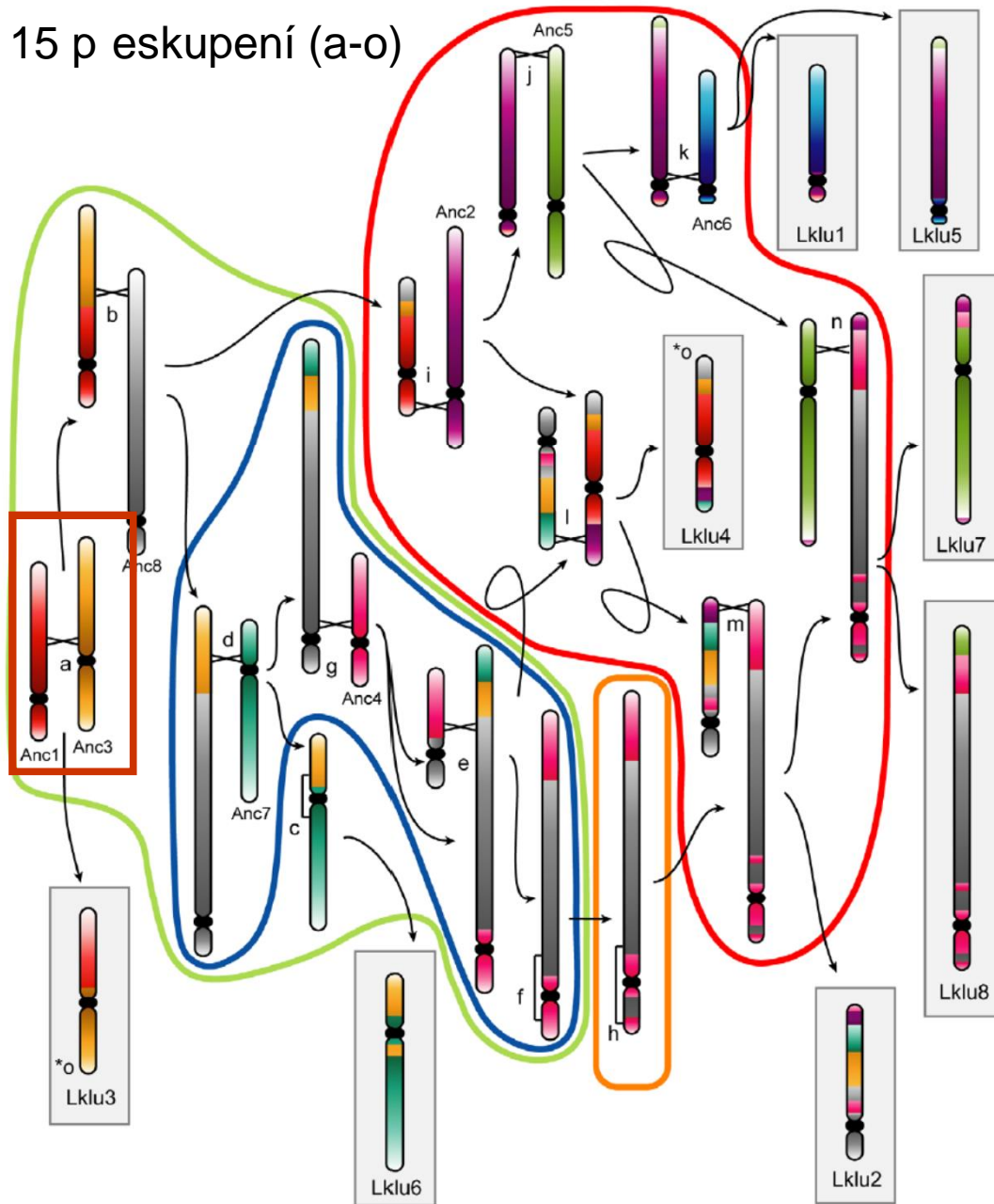


Figure 2. Cartoon showing the rearrangements indicated by lowercase letters in Figure 1. Monocolored chromosomes belong to the WGD Ancestor. Chromosomes in gray boxes are extant *L. kluyveri* chromosomes. Events encircled by a color correspond to events on branches of the same color in Figure 1. Black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

15 p eskupení (a-o)



P eskupování chrom. blok u *L. kluveri*

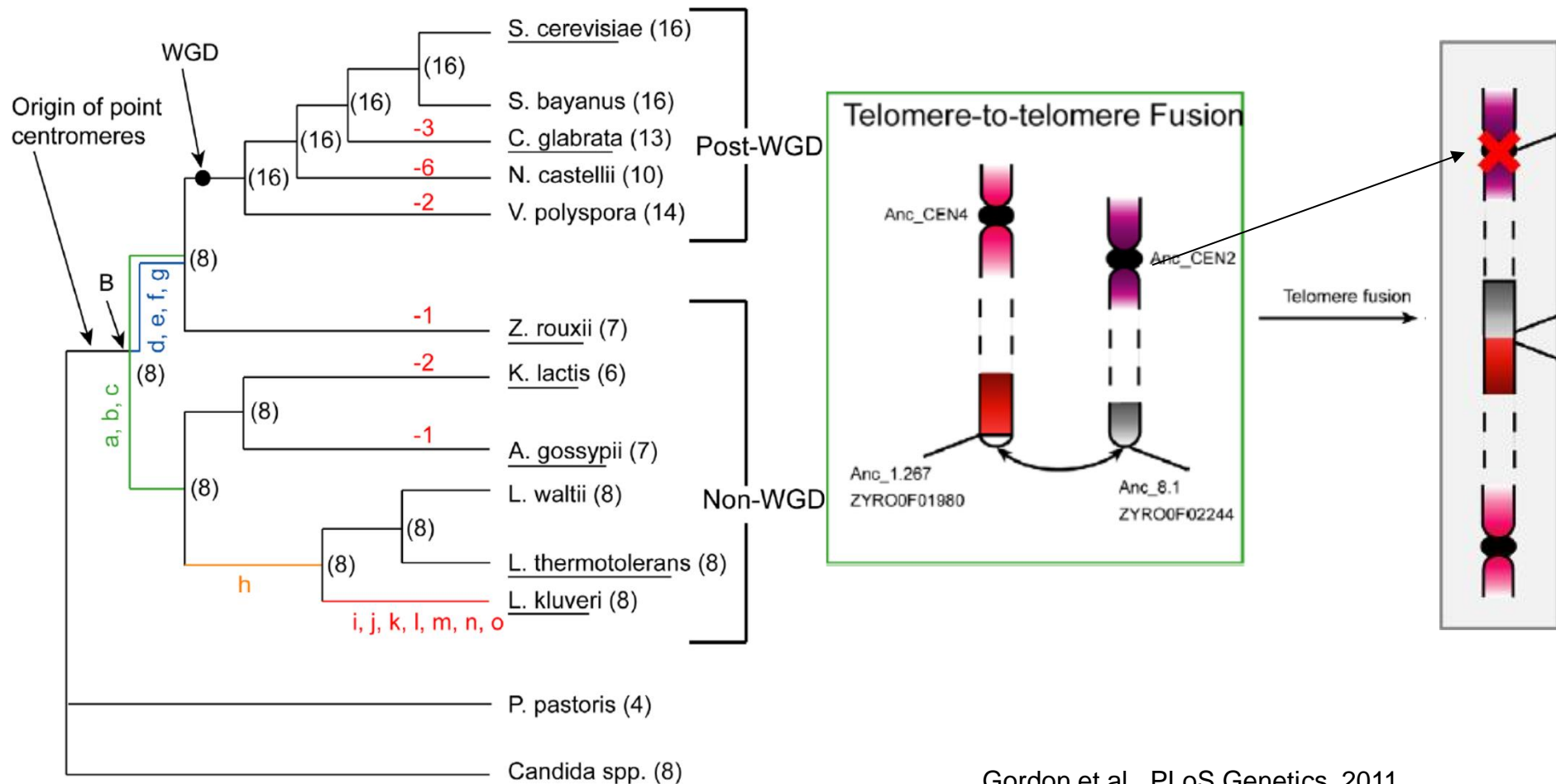
~ p eskupení prost ednictvím rekombinace (mikrohomologií)

~ *L.k.* neztratil chromosom -
 patr n zp sobeno absencí gen *DNL4, POL4, NEJ1*.
 d le0ité pro NHEJ mechanismus (oprava pozkozené DNA nap .
 dvou et zcových zlom , které jsou nutné pro f ze chromosom i p eskupování => omezené p eskupování)

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 chromosom telomera-telomera fúzemi

Zygosaccharomyces rouxii ztratila 1 chromosom díky telomera-telomera fúzi 2 ancestrálních chromosom - souasn ztratily centromeru (chromosom nemoe mít 2 centromery . problémy se segregací)

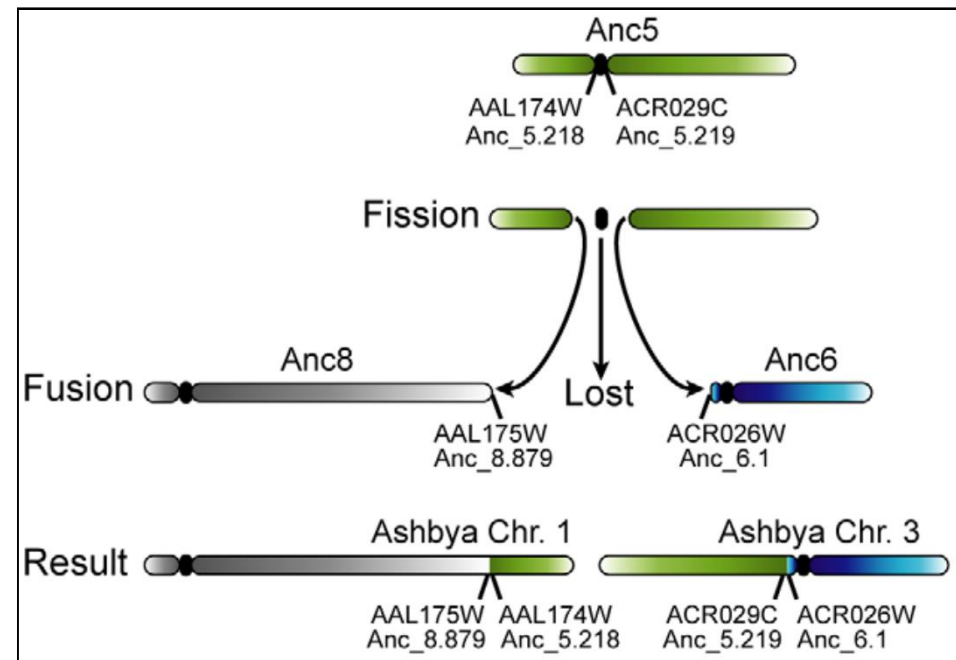
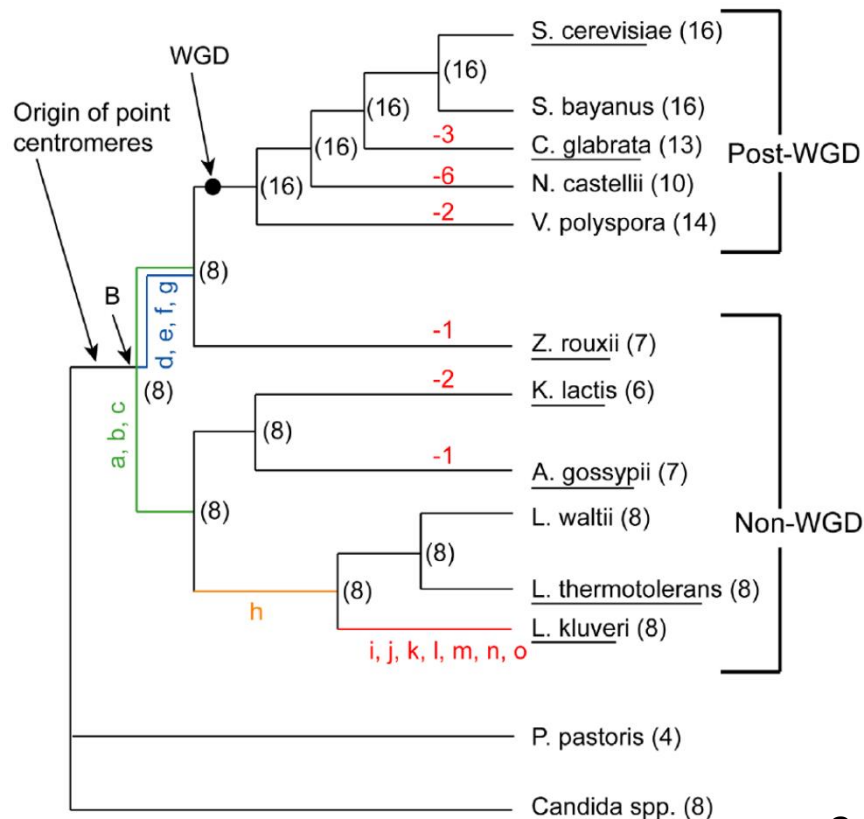


Redukce chromosom telomera-telomera fúzemi

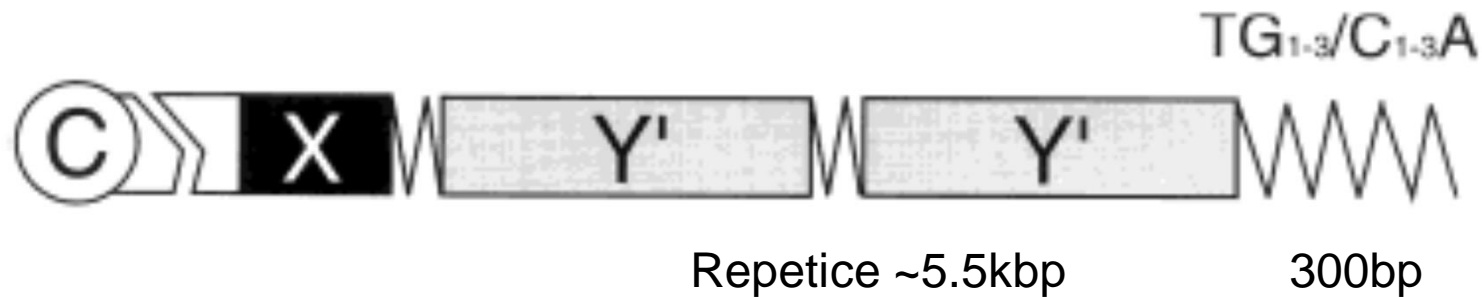
- rozlomení v centromere a napojení vzniklých ramen na telomery jiných chromosom (*A. gossypii*)

- geny v oblasti telomer (neesenciální, málo transkribovány, malý evoluční tlak - mutují více než ostatní geny - telomery jako kotlík%evoluce = cooking pots of evolution)

- při fúzi chromosom se geny z telomerových oblastí dostávají dovnitř chromosomu (změna na míry exprese uvnitř chromosomu)



Struktura kvasinkových telomer



E. Blackburn, Nobelova cena, 2009

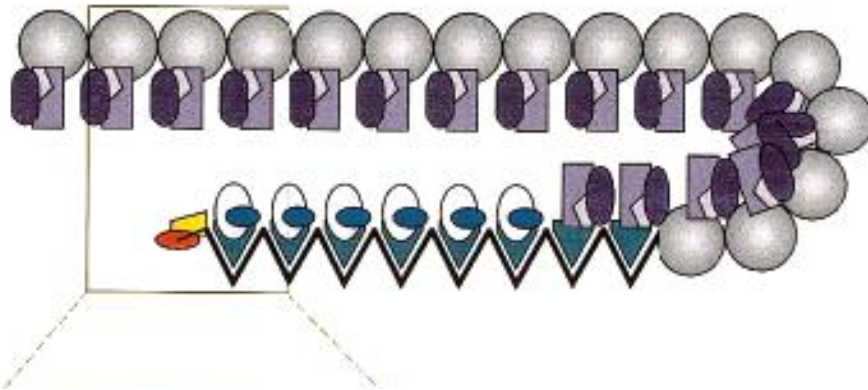
Species

RAP1 consensus

Species	RAP1 consensus	No. of repeats
	<u>t/a R R T G Y a Y R G R t</u>	
<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i>	T G G T G T G T G G G T G	1
<i>S. castellii</i> , <i>S. dairensis</i>	T C T G G G T G T C T G G G T G	2
<i>C. glabrata</i>	C T G T G G G G T C T G G G T G	1
<i>S. kluyveri</i>	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
<i>C. albicans</i>	T C T A A C T T C T T G G T G T A C G G A T G	1
<i>C. tropicalis</i>	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
<i>C. maltosa</i>	C A G A C T C G C T T G G T G T A C G G A T G	1
<i>C. pseudotropicalis</i>	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
<i>K. lactis</i>	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
<i>C. guilliermondii</i>	T A C T G G T G T A C T G G T G	2

5' To end of telomere → 3'

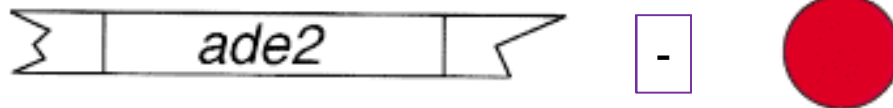
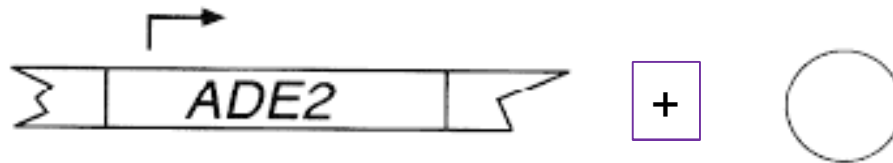
Represe u kvasinkových telomer



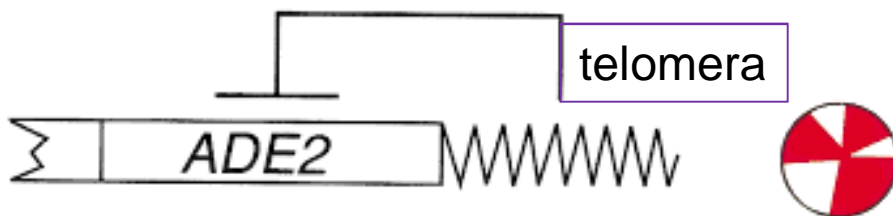
Heterochromatin:

centromera
telomery
HMR a HML
(MAT je aktivní
ur uje haplotyp

a)



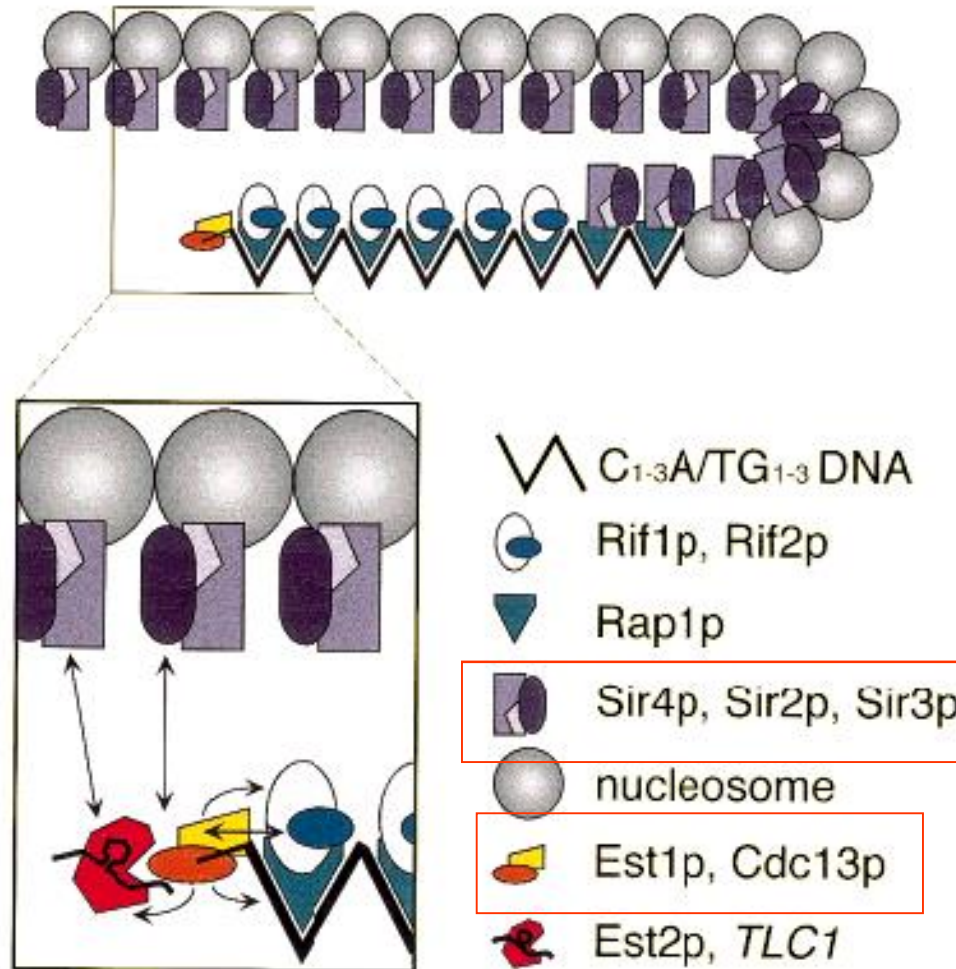
- struktura telomery a subtelomery uml uje transkripci (silencing)



- ADE2 reporter je pod kontrolou telomer pouze ob asn náhodn transkribován

- nap . HML a HMR lokusy jsou uml ené (pouze MAT lokus ur uje párovací typ)

Represe u kvasinkových telomer



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

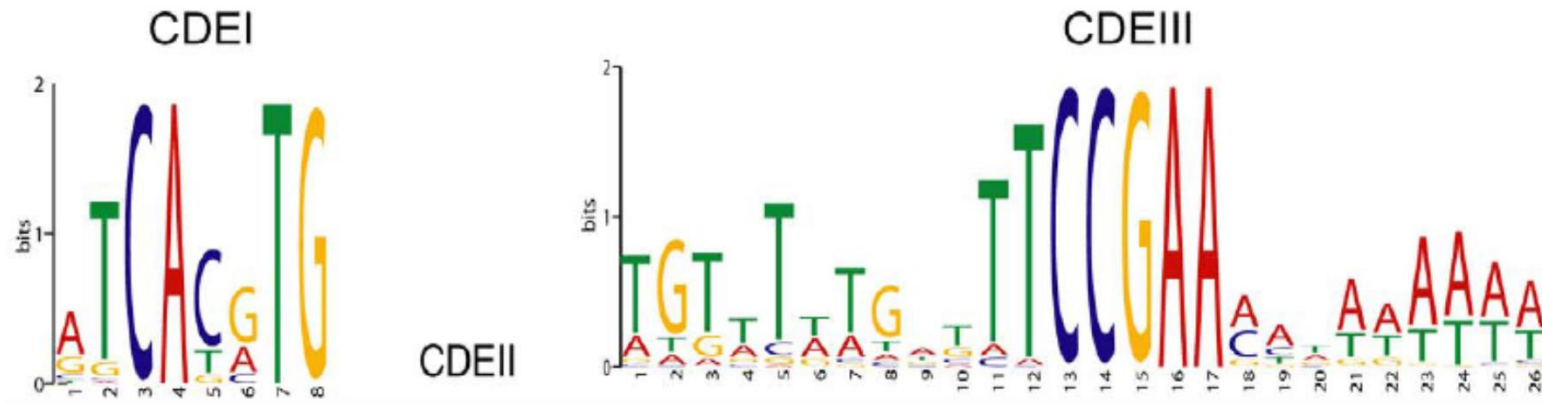
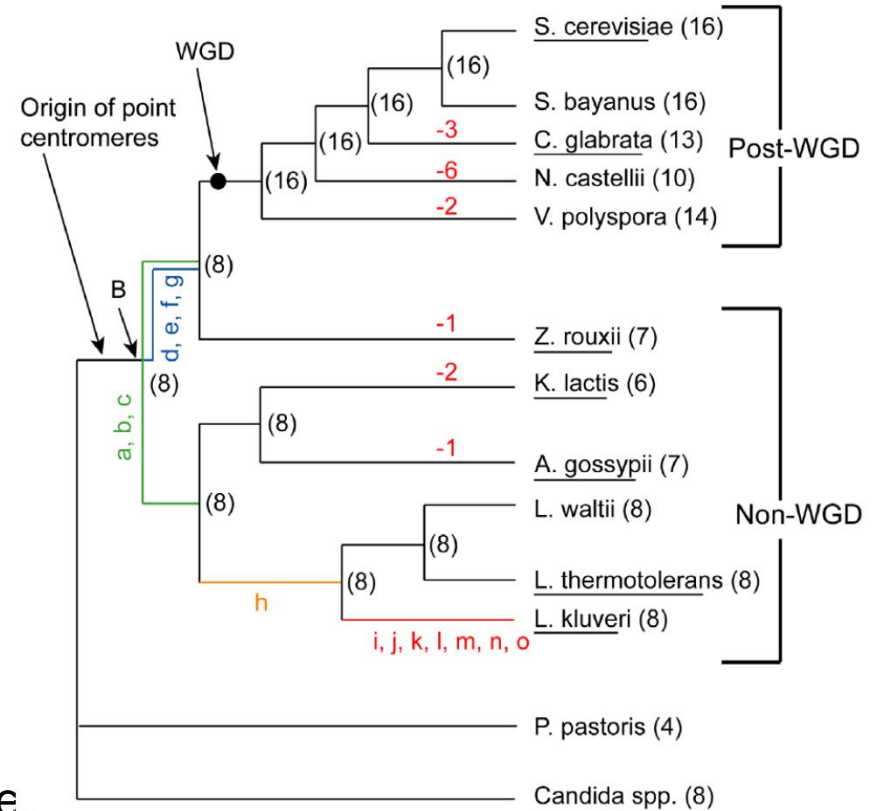
Sir proteiny (deacetylasy atd. .
uml ují/kondenzují chromatin)

Est1p ò telomerasa
zodpov dná za
replikaci/prodlu0ování telomer

Centromera *S. cerevisiae*

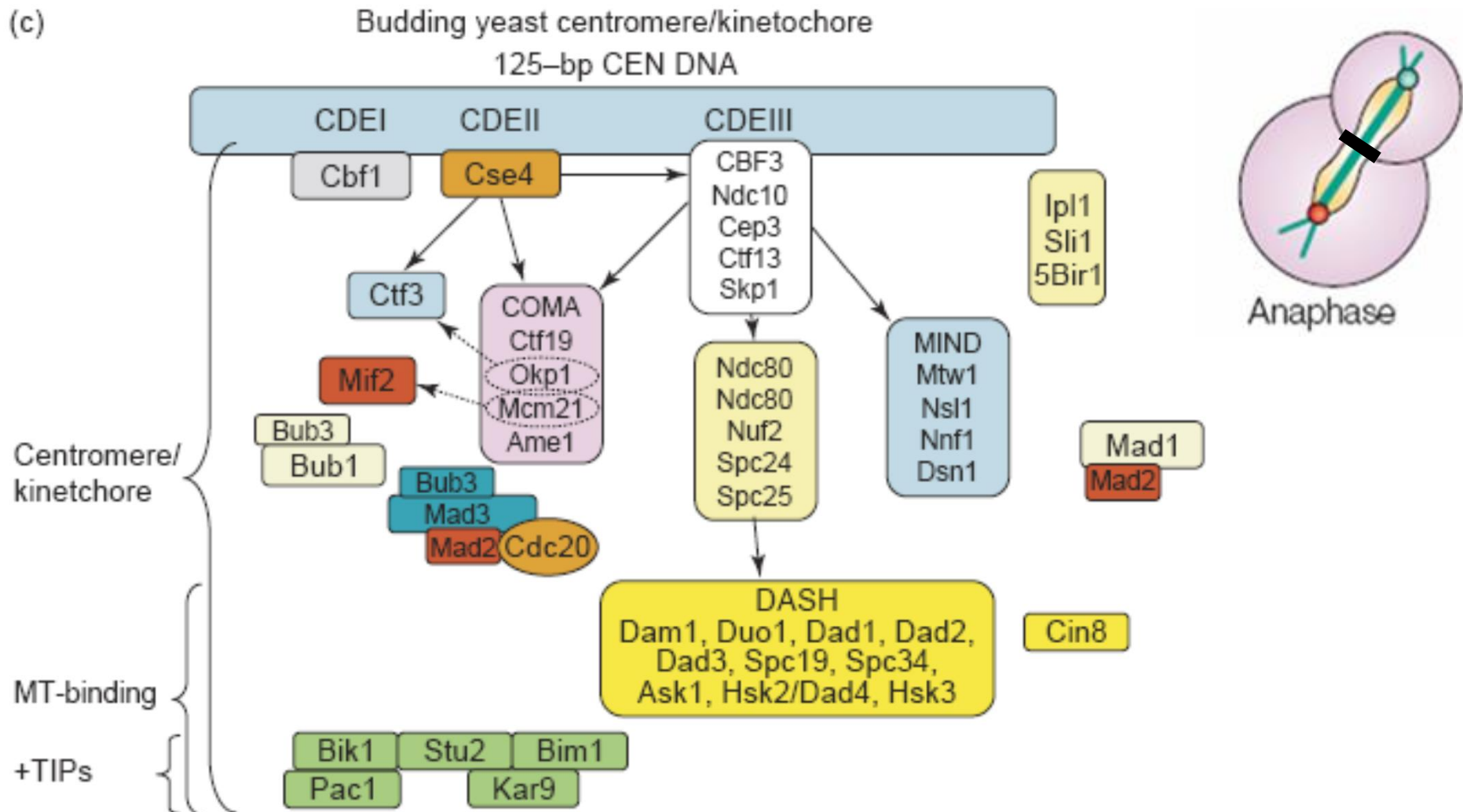
- Sekven n specifická centromera se patr n vyvinula z p vodn repetitivní/sekven n nespecifické centromery

Konsensní sekvence *S.c.* centrome.

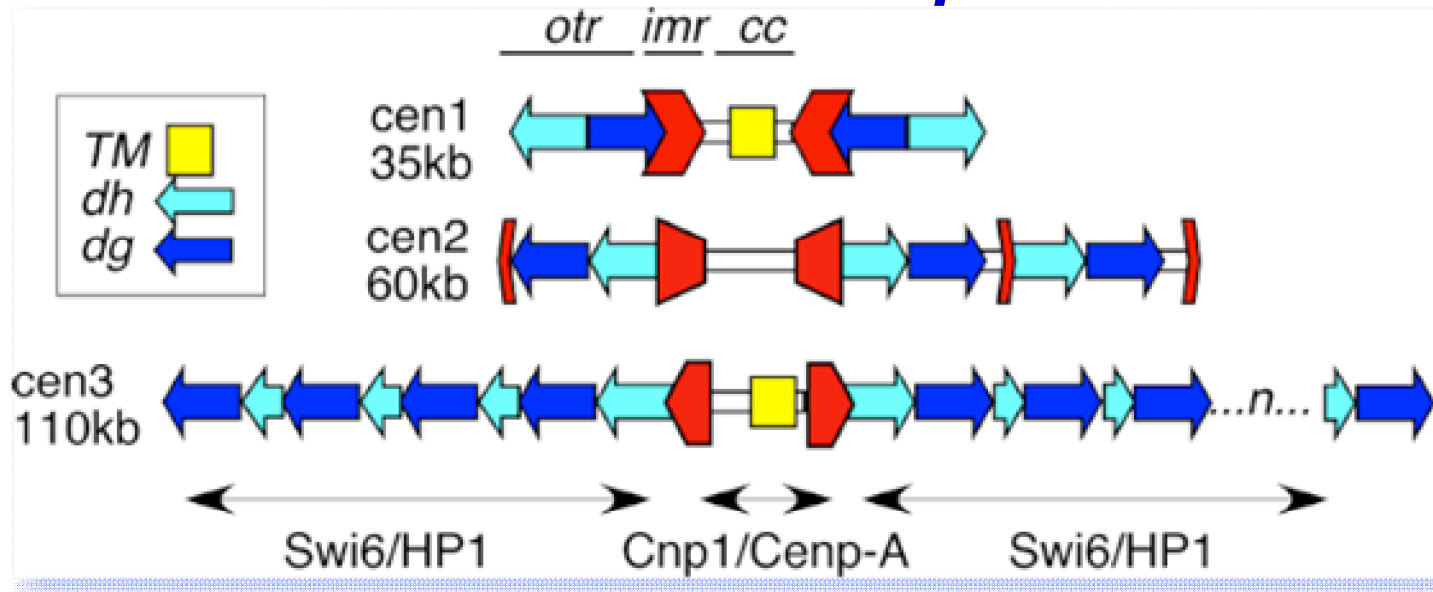


Centromera *S. cerevisiae*

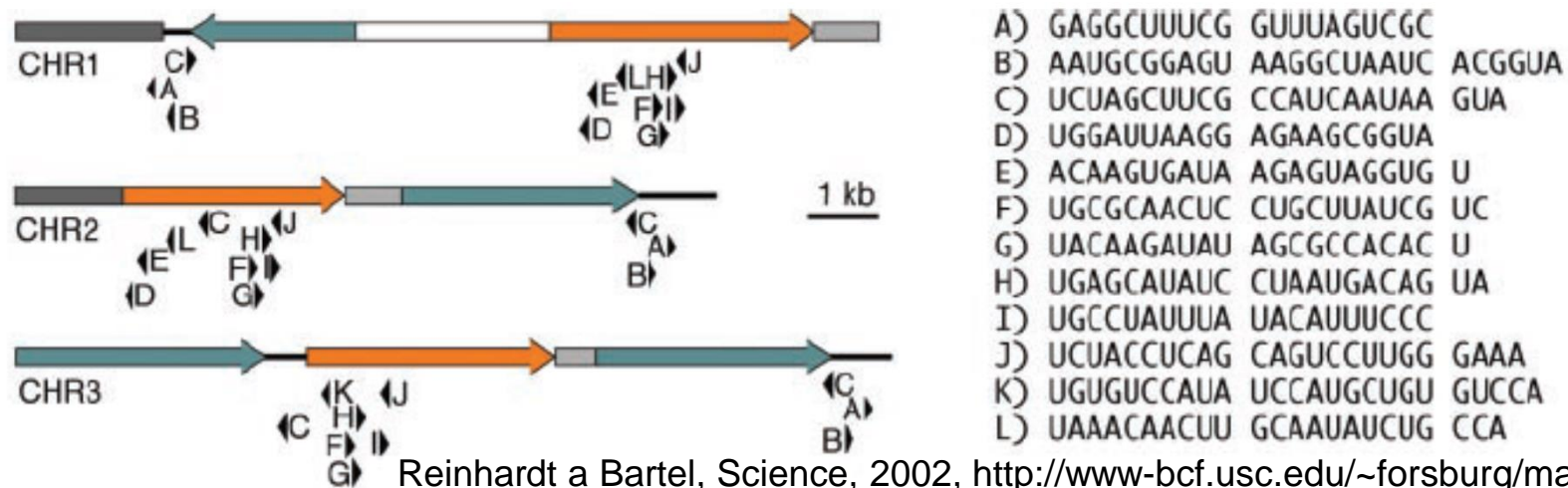
(c)



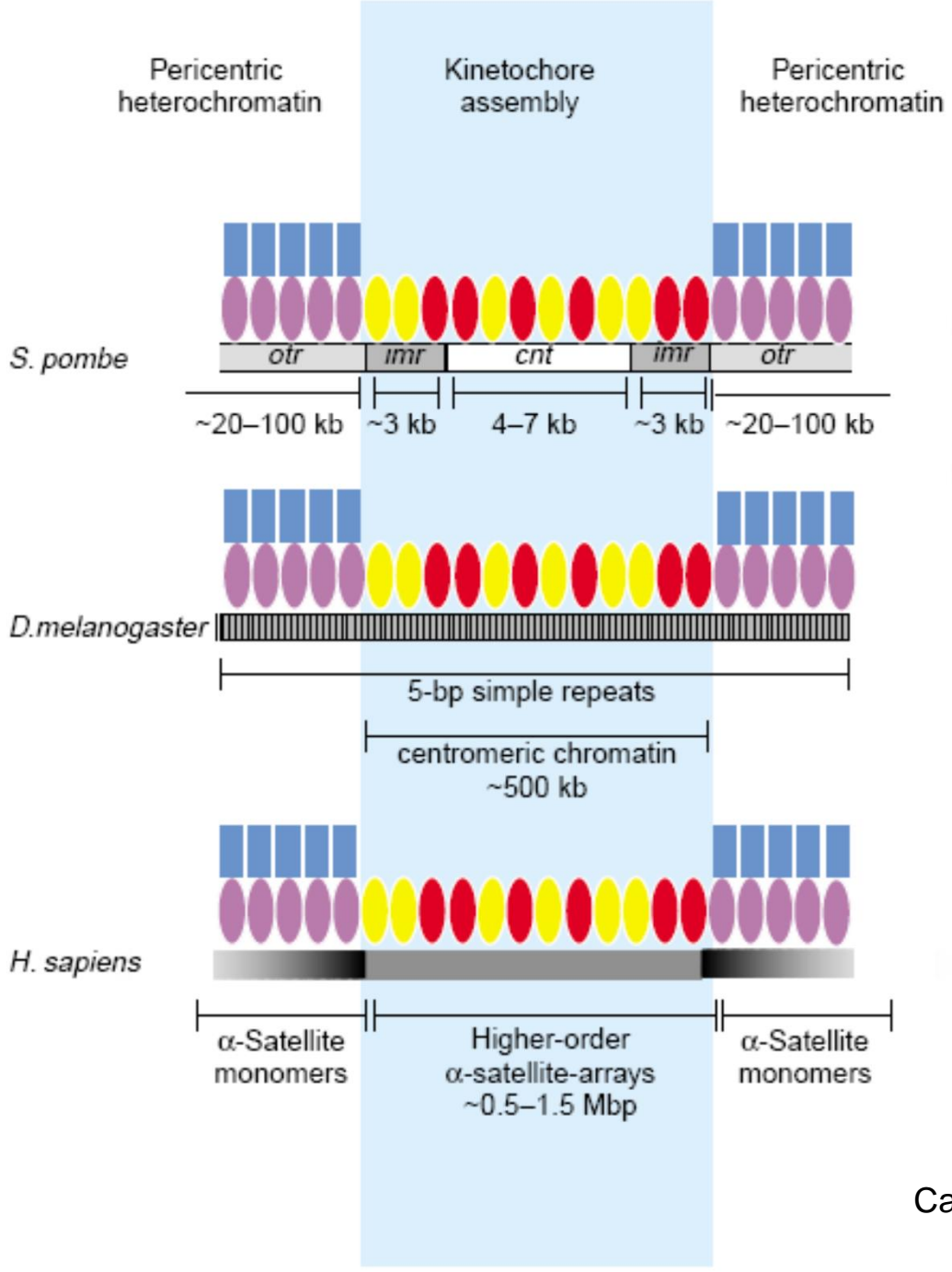
Centromera *S. pombe*



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

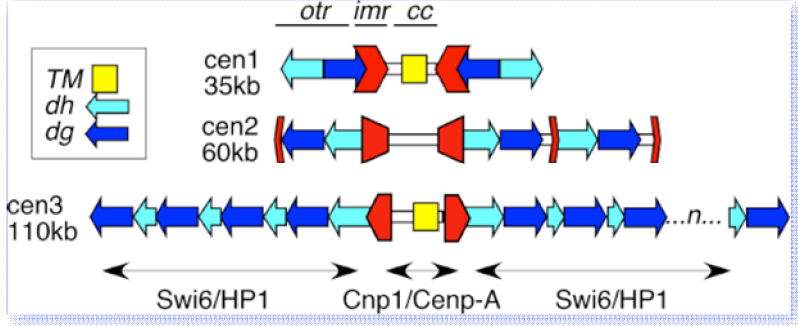


Centromera *S. pombe*



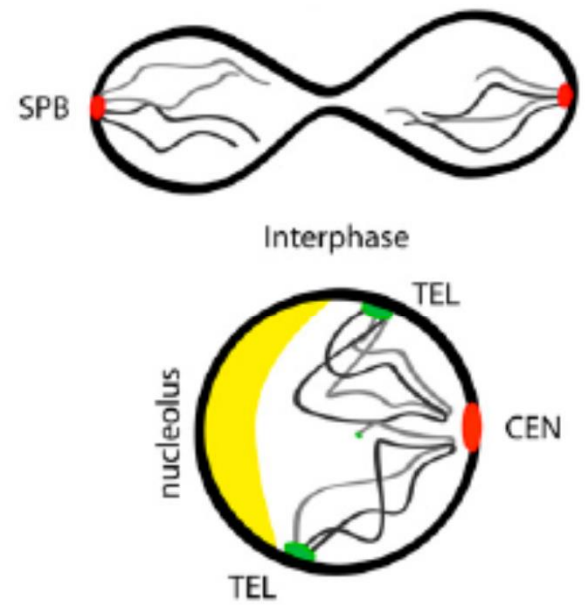
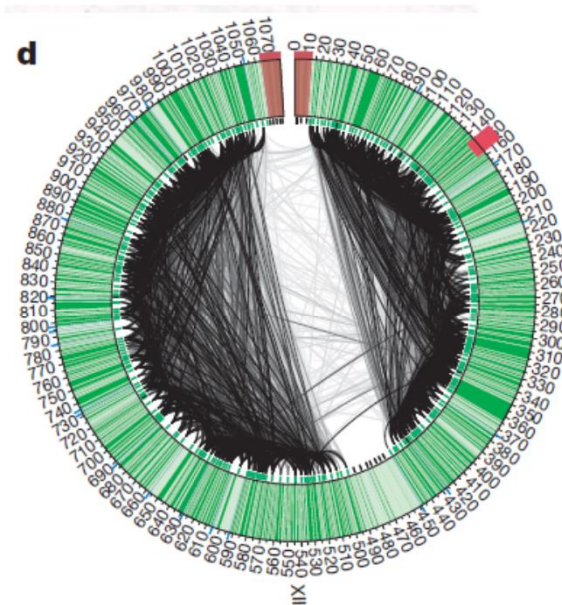
- HP1
- Me-K9 H3
- diMeK4-H3
- CENP-A

Centromery jsou definovány více strukturou chromatinu než jejich sekvencí

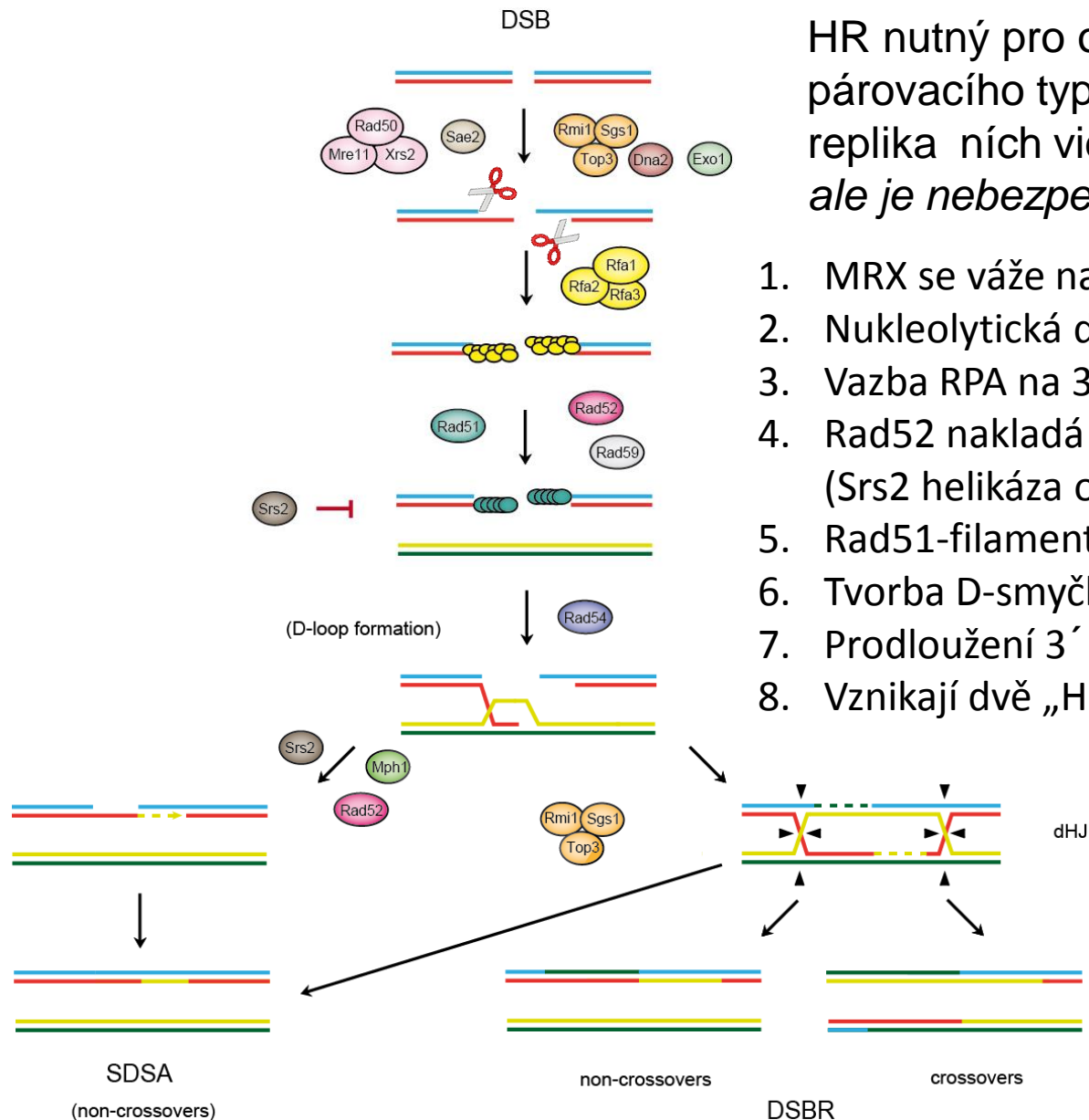


rDNA - repetice

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



Homologní rekombinace



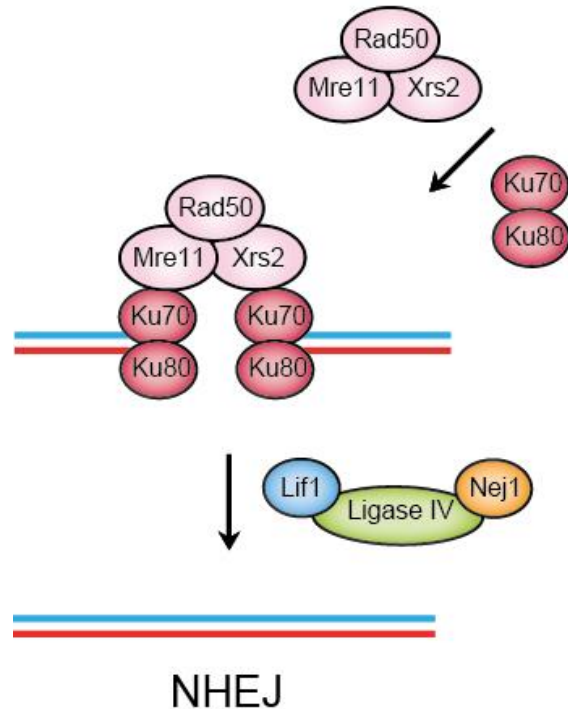
HR nutný pro opravu DSB, p epínání párovacího typu, restart zastavených replika ních vidli ek, integraci DNA do genomu *ale je nebezpe ný pro repetitivní sekvence*

1. MRX se váže na zlomené konce DNA.
2. Nukleolytická degradace 5' řetězců
3. Vazba RPA na 3' jednovláknové konce
4. Rad52 nakládá Rad51 rekombinázu na ssDNA (Srs2 helicáza odstraňuje Rad51).
5. Rad51-filament hledá homologní DNA (Rad54).
6. Tvorba D-smyčky
7. Prodloužení 3' konce filamentu (DNA polymeráza δ)
8. Vznikají dvě „Holiday junctions“

rozrušený Sgs1-Top3-Rmi nebo rozštěpený endonukleázami (Mus81-Mms4, Slx1-Slx4, Rad1-Rad10, Yen1).

Nehomologické spojování konc

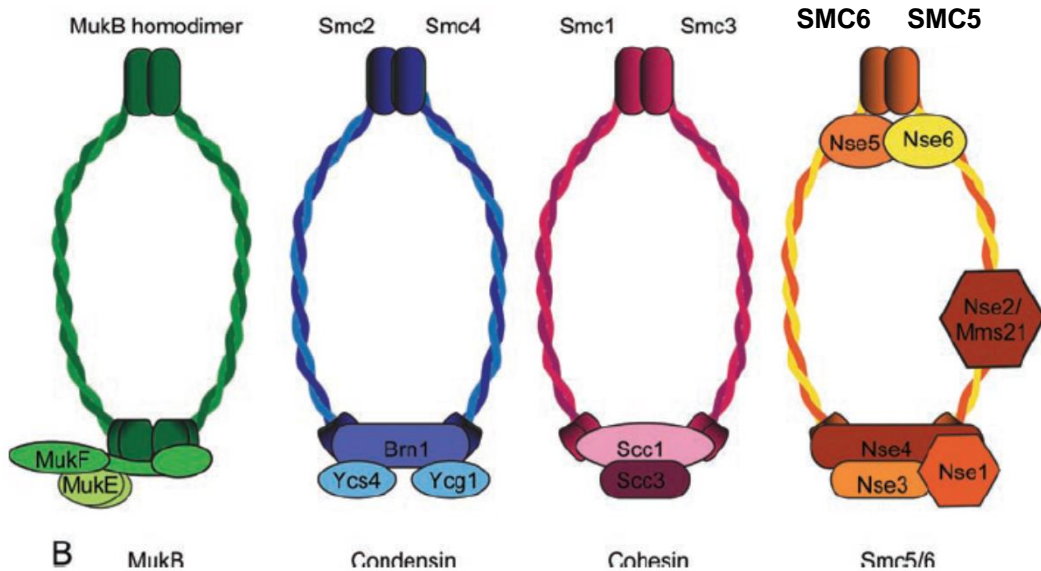
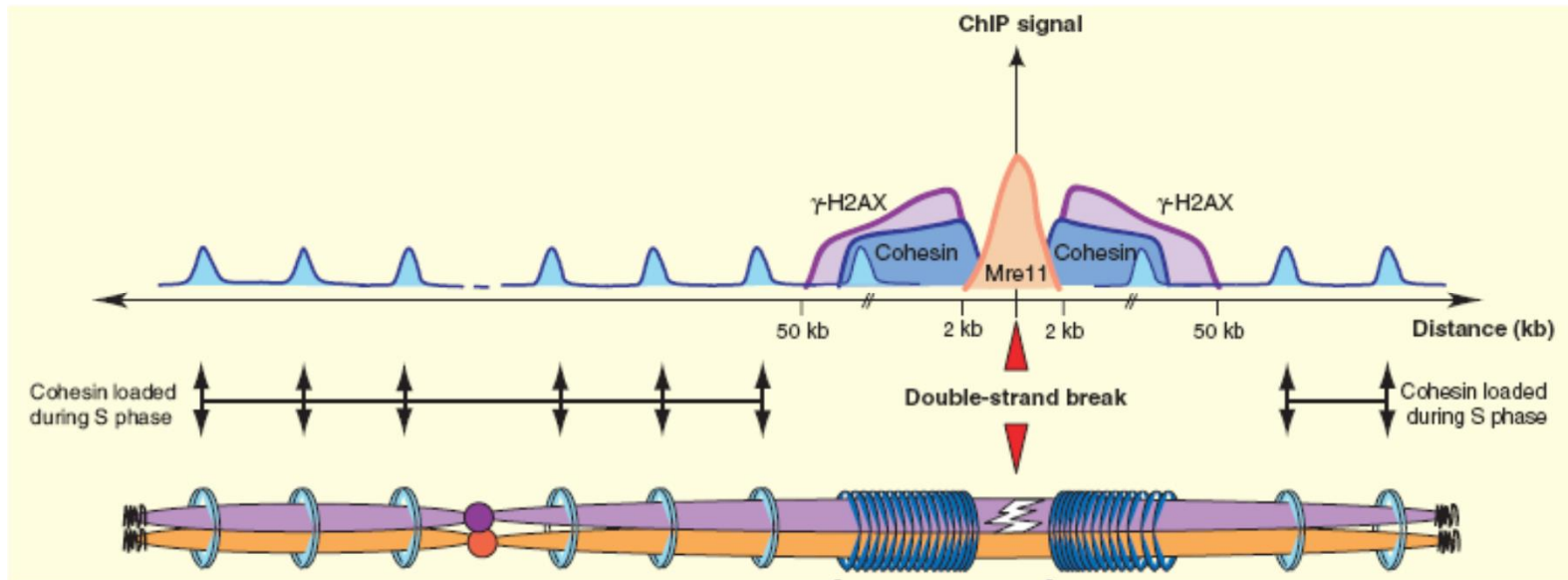
Non-homologous end joining (NHEJ)



1. Vazba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) komplexu, Ku heterodimeru (Yku70-Yku80) na zlomené konce DNA
2. Vazba DNA ligázy IV (Dnl4) a jejích pomocných protein Lif1 a Nej1.
3. Hledání komplementarity mezi p evisy dvou konc DNA.
4. Úprava konc - syntéza DNA (Pol4 DNA polymeráza)
5. Religace konc

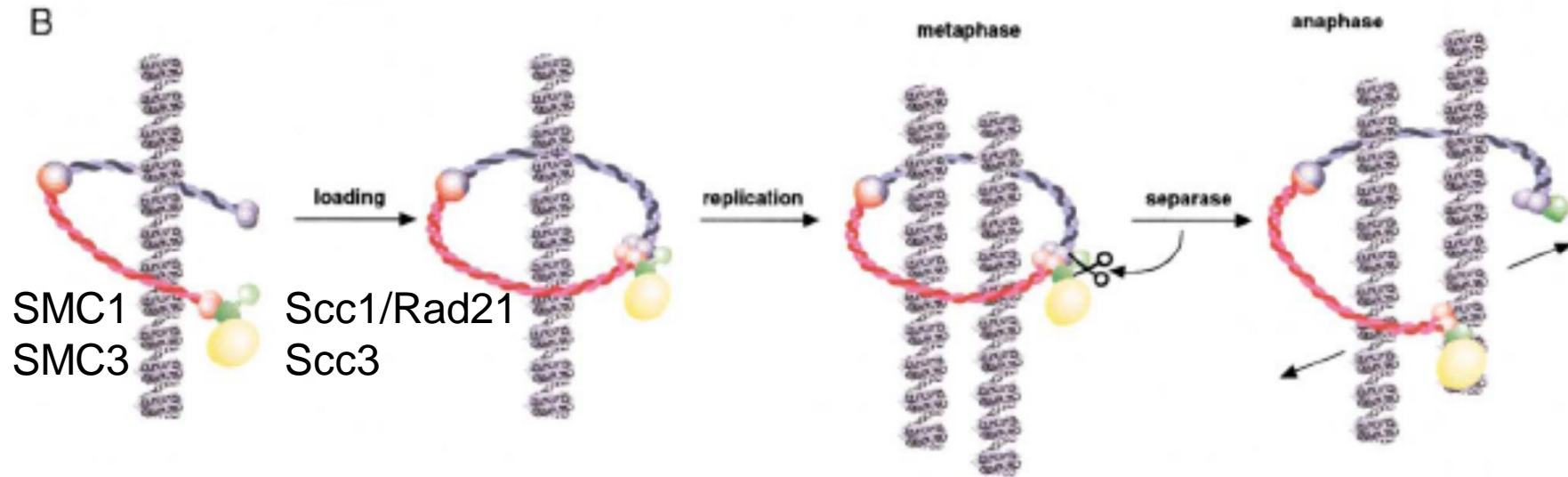
p i oprav nekompatibilních konc v tzinou dochází k delecím nebo inzercím . HR je lepší, ale je pot eba homologní sekvence . NHEJ v G1 zatímco HR v G2/M . dob e rostoucí kultura kvasinek má významnou frakci bun k v G2/M (proto je v kvasinkách mo0ná integrace homologních sekvencí . genetika . pou0ít exponenciální kultury pro transformace)

SMC komplexy napomáhají p i HR



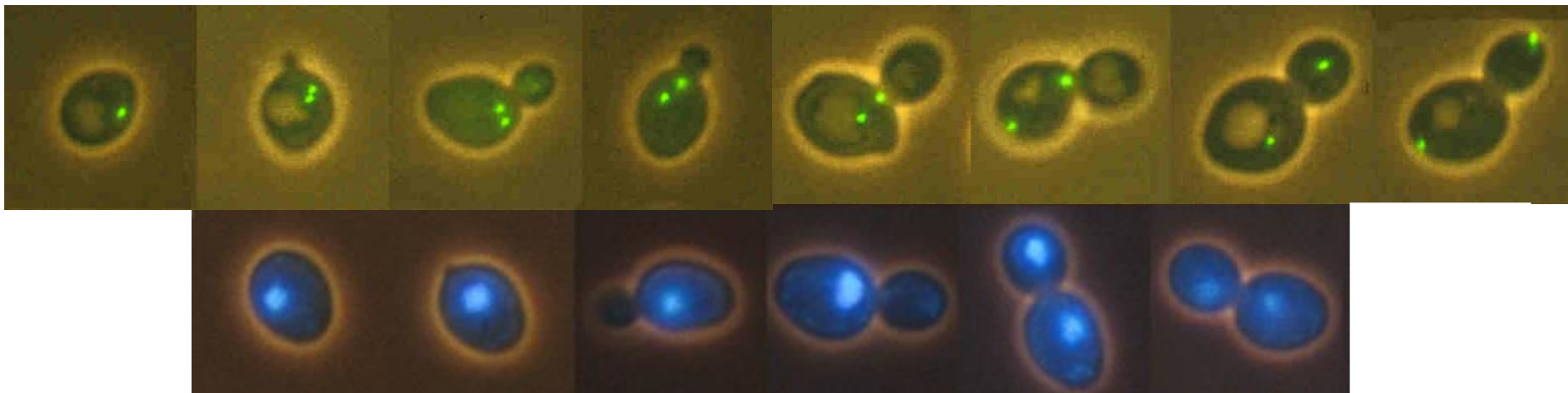
- kohesin p idr0uje homologní chromosomy p i sob a napomáhá HR
- SMC5/6 reguluje restart zastavených replika ních vidli ek (limituje HR v repetitivních sekvencích)

Kohesin sbjímá+DNA



Haering et al, 2002, Mol Cell

Kohesin je klí ový pro pr b h mitosy . otev ení kruhu v anafázi umo0 uje segregaci



Marco et al, Cell, 2013

Souhrn přednášky

“ Chromatin

- . Charakteristika kvasinkového genomu
- . Chromosomy
 - “ chromatinové domény
 - “ SMC komplexy
- . Evoluce (duplikace genomu θ)
- . DNA-opravné mechanismy
 - “ NHEJ
 - “ Homologní rekombinace
- . SMC komplexy a struktura chromatinu

“ Záv řy

Přehled - závěry

Úvod . historie, význam

Základní charakteristiky kvasinek

Kvasinky a biotechnologie

Diagnostické a molekulárně biologické metody

Genetika kvasinkových organismů

Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,

Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza

Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty

Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy

Organizace kvasinkového chromatinu