

Test: 4.1. 2018 od 9.00, A2 (2.11) - psací potřeby

Zkouška/prezentace:

4.1. 2018 od 9.00, A2 (2.11) po testu

Kvasinky ... oblast vaší DP (ne samotná DP)

- úvod do problematiky
- výsledky z článku (ne starší než 5 let)
- závěry, reference

přednáška 15 + 5 minut

Cvičení: 14. 12. v 8.00, A7 (2.17)

- pláště, psací a kreslicí potřeby

Souhrn předchozí přednášky

- Párování kvasinek
 - Mechanismy
 - Transkripční regulace
- Regulace transkripce GAL genů
 - Gal4 transkripční faktor
 - transkripční hybridní systémy
 - alternativní kvasinkové systémy
 - hybridní – G-proteiny

Osnova (poslední) přednášky

- Chromatin
 - Charakteristika kvasinkového genomu
 - Chromosomy
 - Evoluce (duplikace genomu ...)
 - DNA-opravné mechanismy
 - SMC komplexy a struktura chromatinu
- Závěry

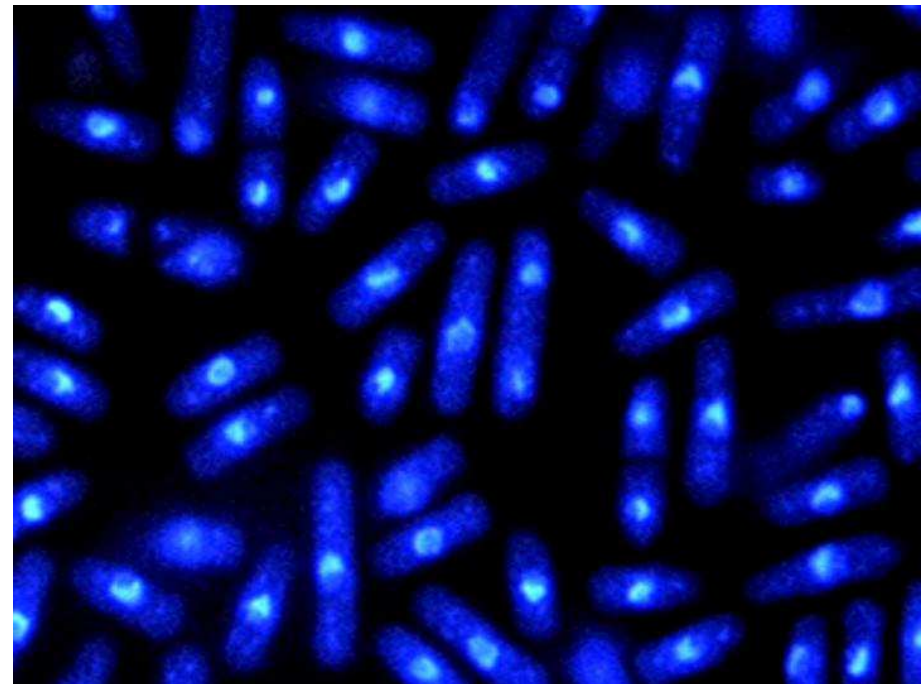
Pozorování DNA/chromosomů u kvasinek

- Chromosomy jsou u kvasinek malé a těžko pozorovatelné v mikroskopu – barvení DNA na fixovaných preparátech pomocí DAPI (4 ,6-diamidino-2-phenylindole)
- Použití fúzních 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 „ChIP on CHIP“
- 3C, 4C ... – chromatin conformation capture

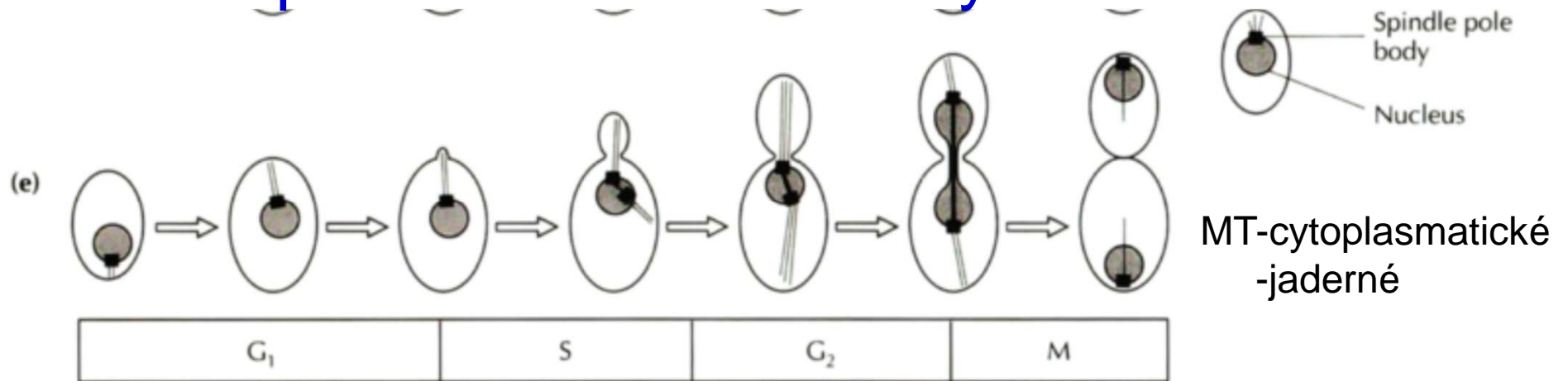


↑
Saccharomyces cerevisiae
→
Schizosaccharomyces pombe

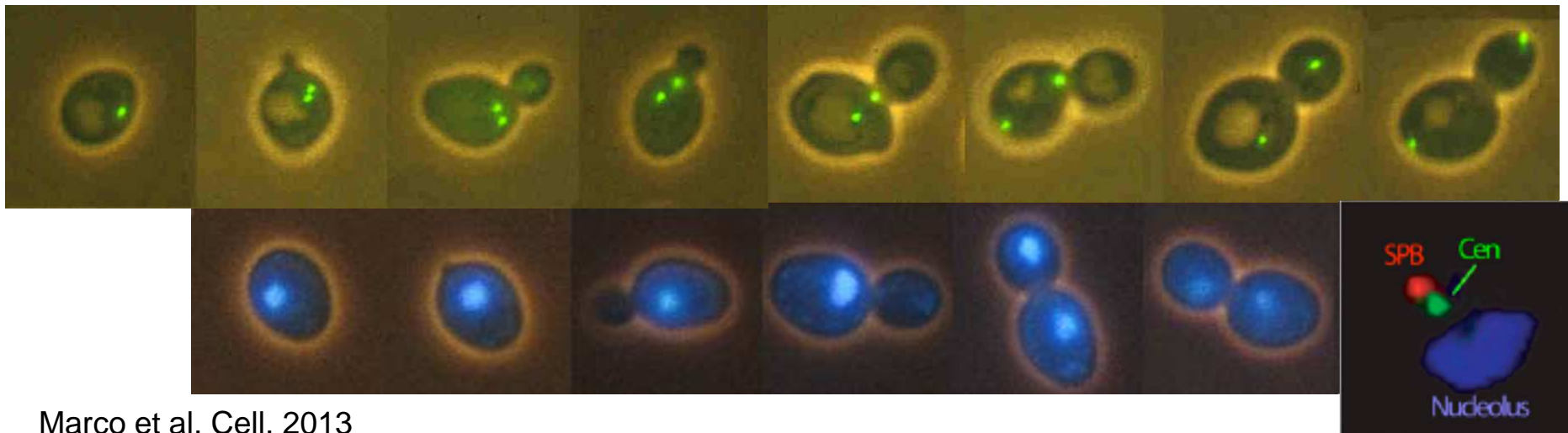
Pozadí = mtDNA



DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze tj. replikace
 - rozchod jaderných 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

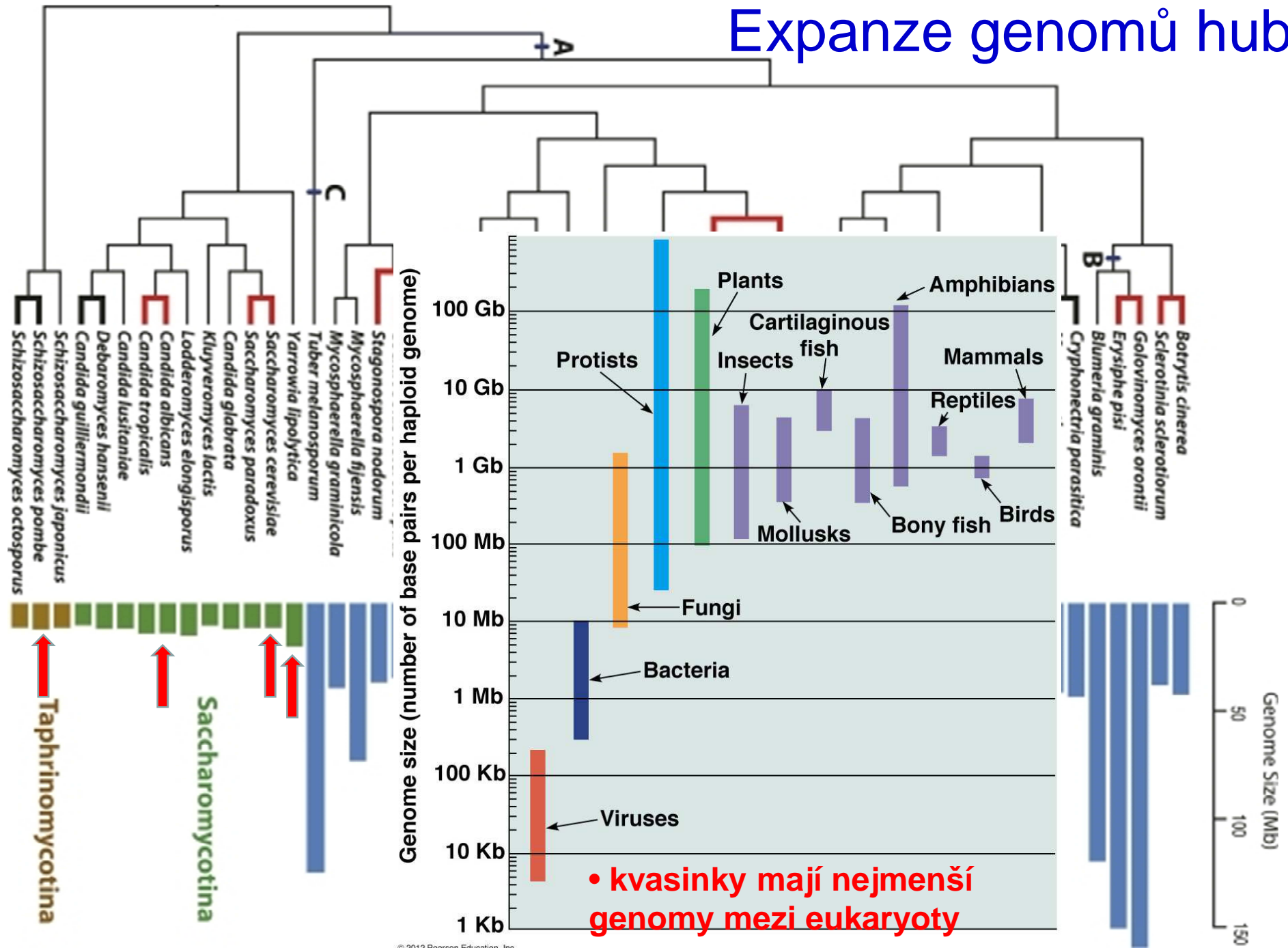


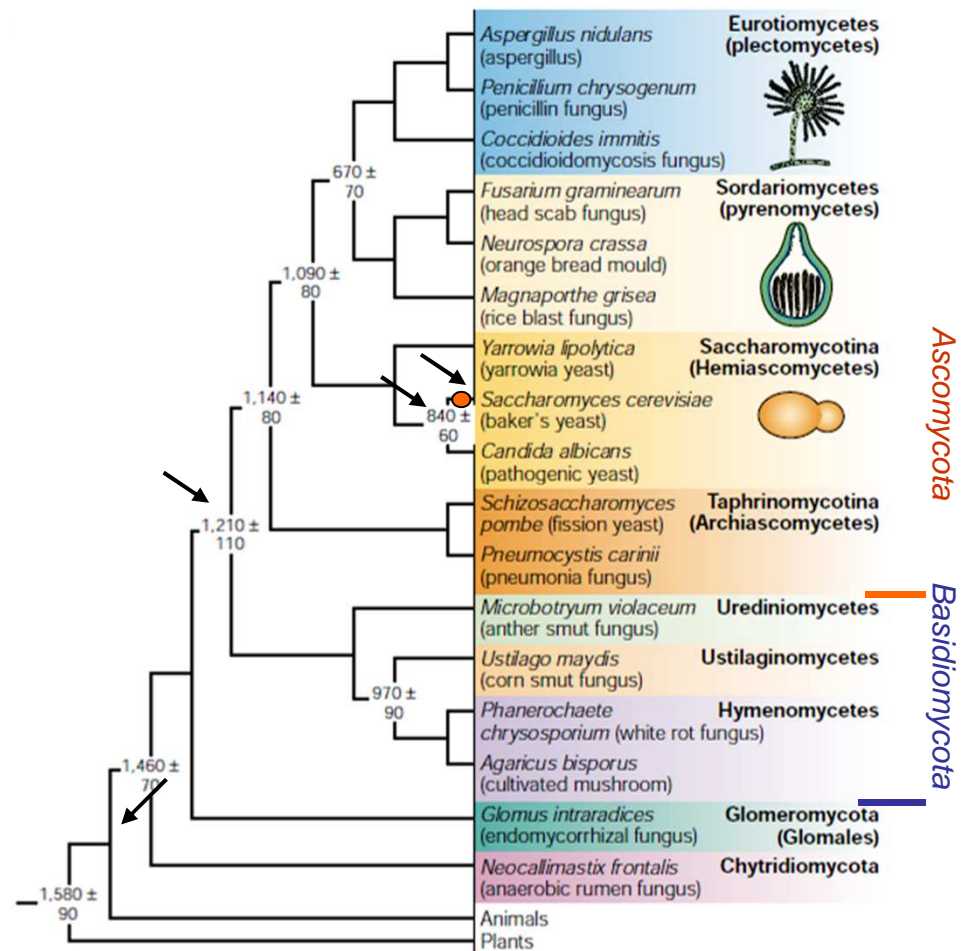
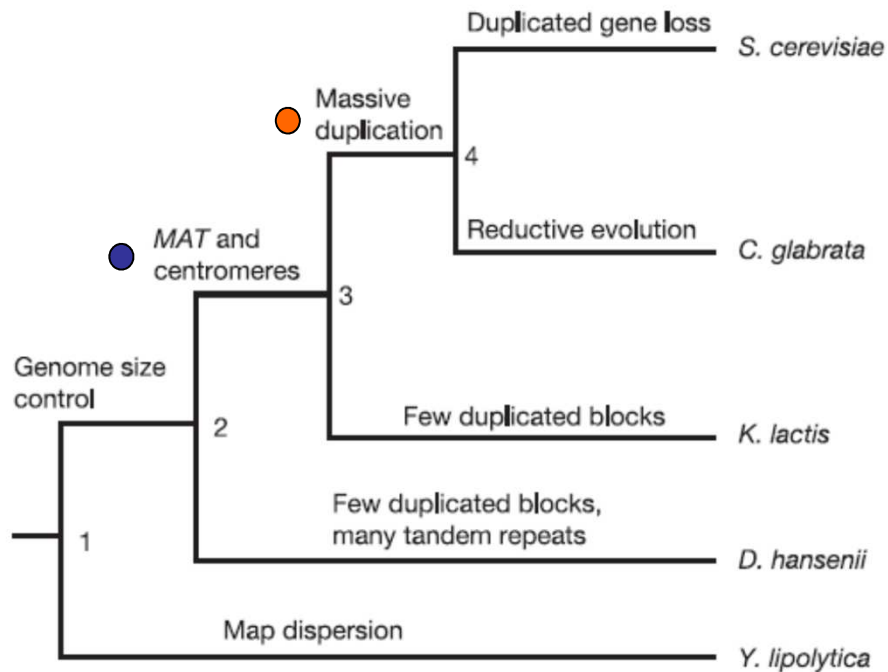
Základní prvky kvasinkového genomu

Saccharomyces cerevisiae vs *S.pombe*

- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosomů (diploidní 2n, pивní kvasinky jsou polyploidní) vs 13Mbp/3 chromosomy
- délka nejdelšího chromosomu XII se u různých *S.c.* - dle počtu (až 200) kopií rDNA v repetici, 262 tRNA (pro 64 kodonů)
- krátké centromery a ARS (100bp) vs repetitivní centromery
- geny (cca 6500) reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- redundantní (2000 genů duplikováno) – cca30% genomu vzniklo duplikacemi
- <5% genů (280) obsahuje introny (0.5% genomu) vs většina genů s introny (4500 genů)
- 3% Ty1-5 transposony (vs 46% u člověka)
- kondenzovaný heterochromatin: centromery, telomery a HMR/HML vs 3 chromosomy jsou více kondensované

Expanze genomů hub

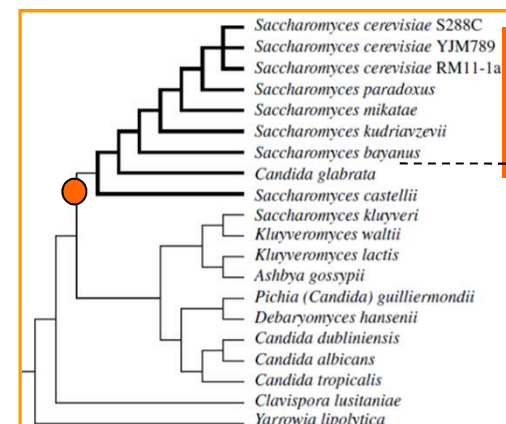




Evolve kvasinek

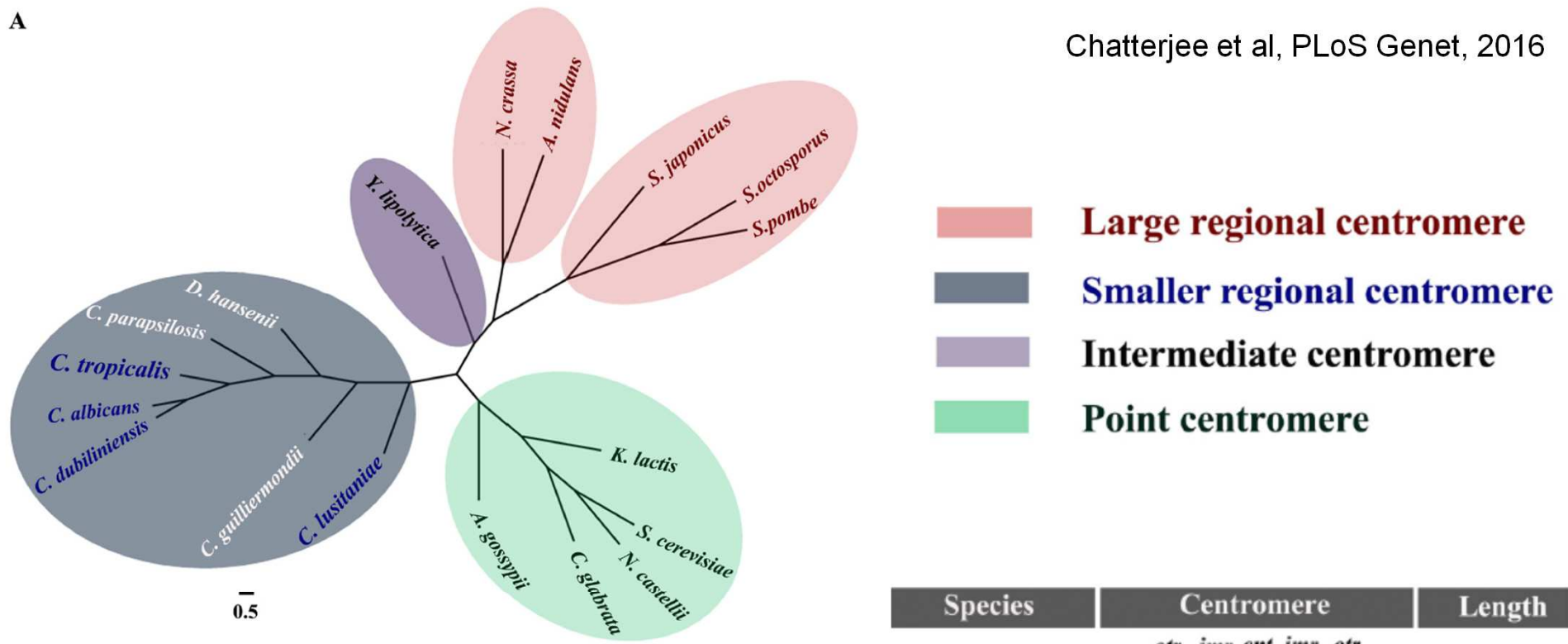
- 1500 Mya: Metazoa - Fungi
- 1200 Mya: Ascomycota – Basidiomycota.
- 1000 Mya: *S. cerevisiae* – *Schizosacch. pombe*
- 840 Mya: *S. cerevisiae* – *C. albicans*
- 170 Mya: (*Pichia*, *Candida*) – *Kluyveromyces aj.*
- 150 Mya: WGD

Dujon et al., Nature, 2004



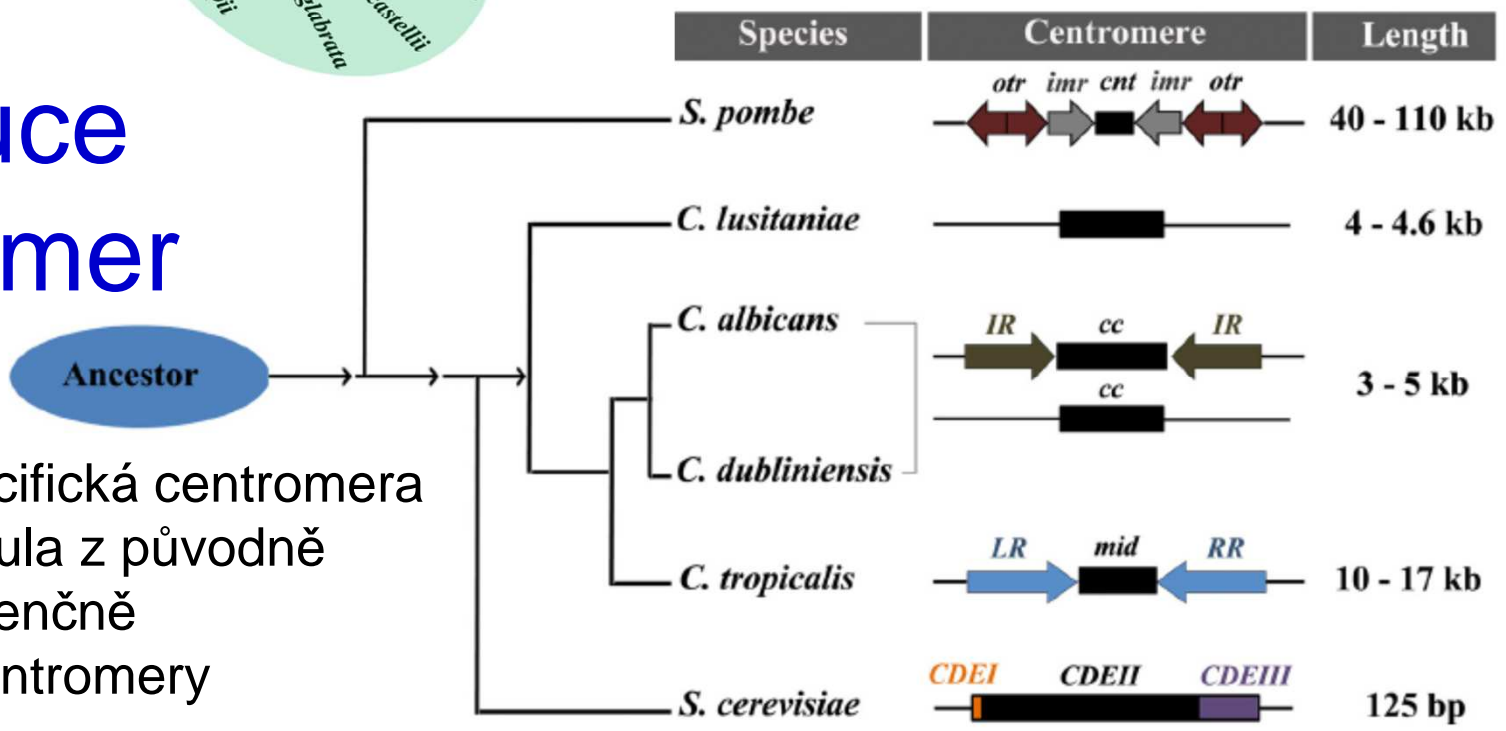
A

Chatterjee et al, PLoS Genet, 2016



Evolve centromer

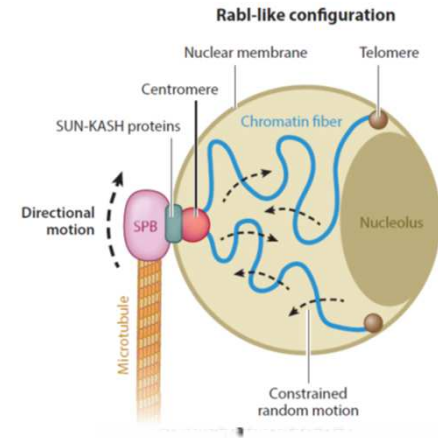
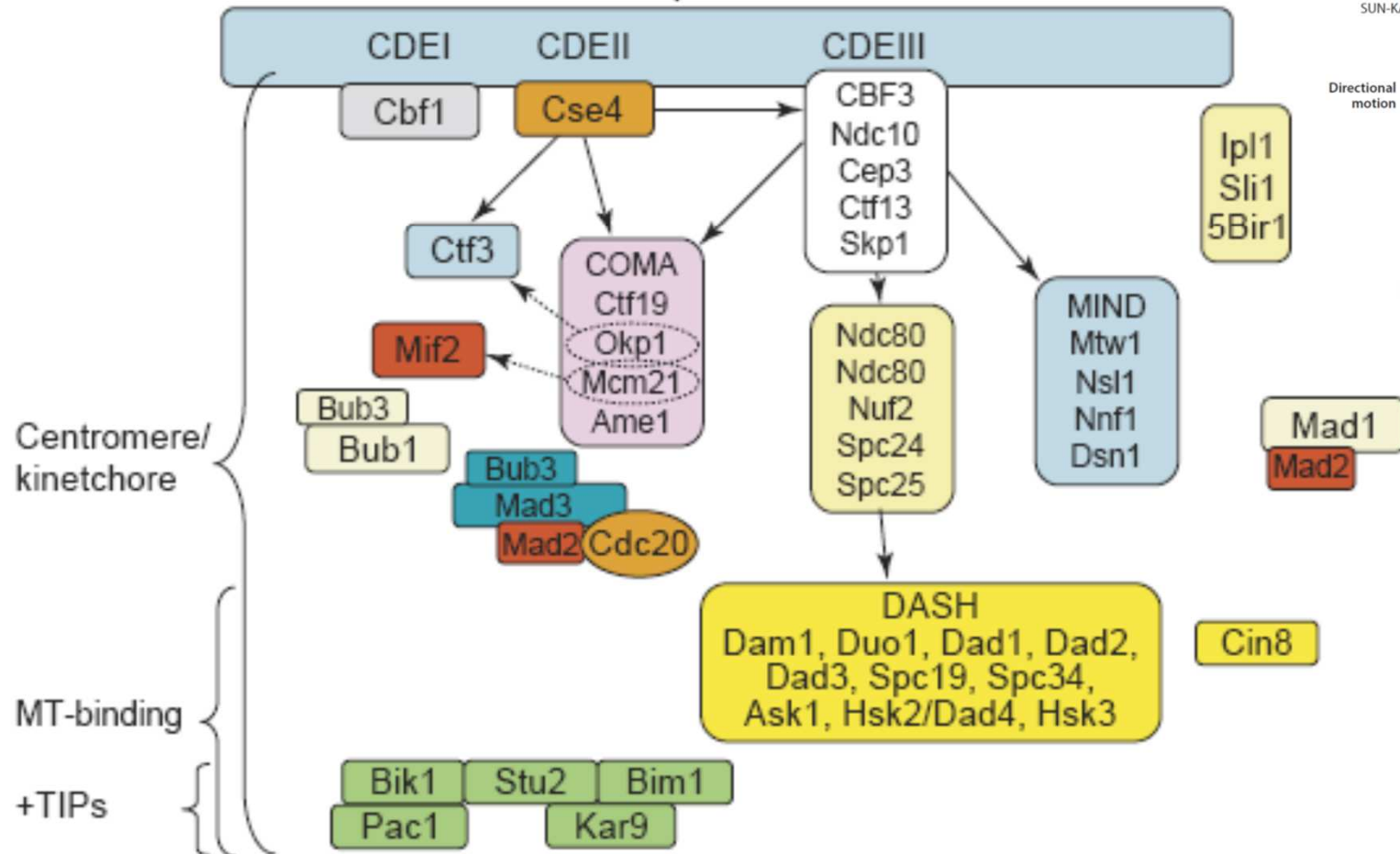
sekvenčně specifická centromera se patrně vyvinula z původně repetitivní/sekvenčně nespecifické centromery



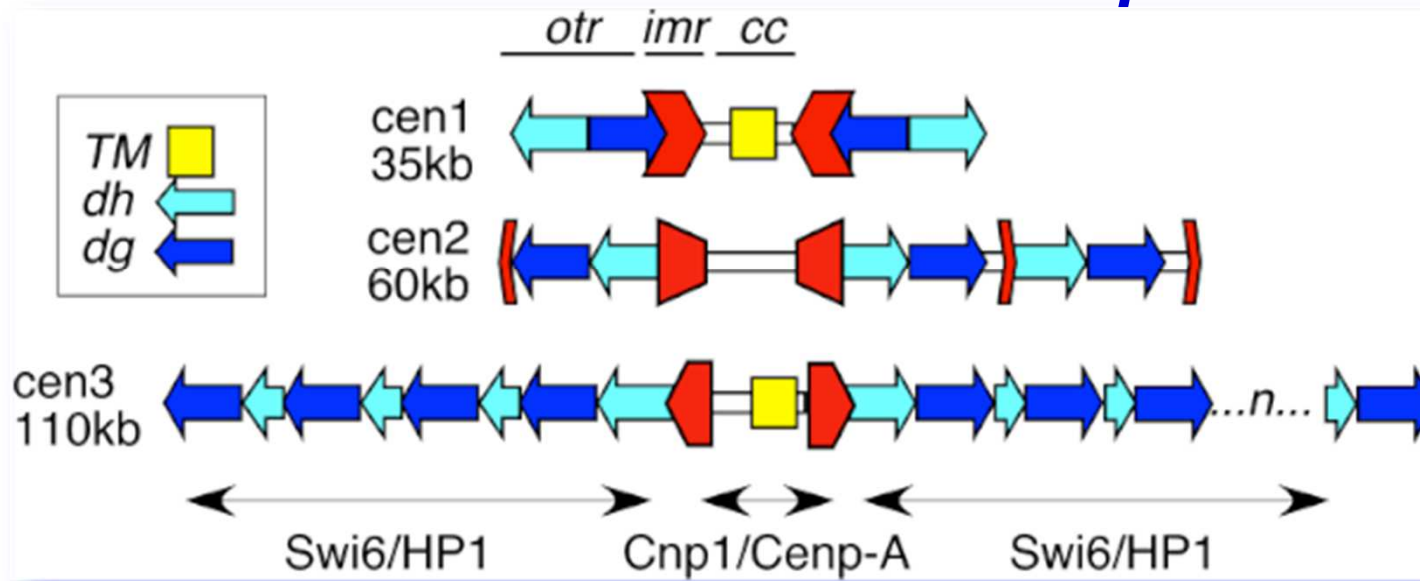
Centromera *S. cerevisiae*

(c)

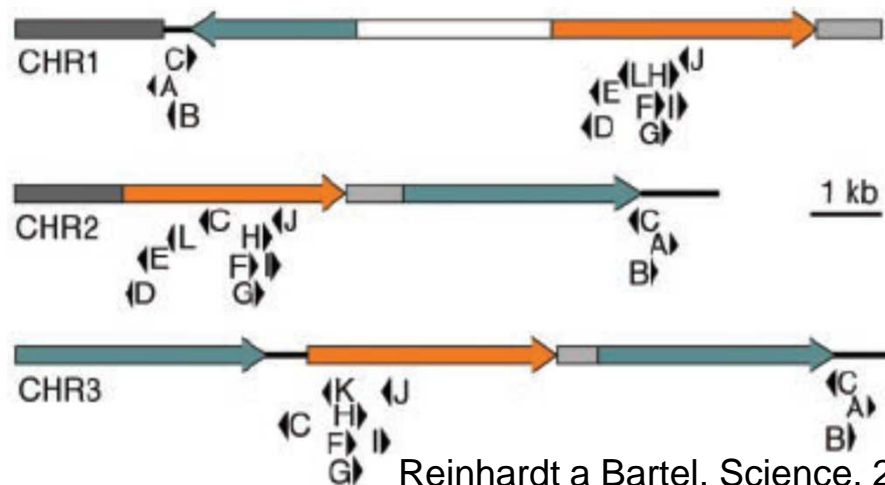
Budding yeast centromere/kinetochore
125-bp CEN DNA



Centromera *S. pombe*



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



A) GAGGCUUUCG GUUUAGUCGC
 B) AAUGC GGAGU AAGGCUAAUC 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) UAAACAACU GCAUAUCUG CCA

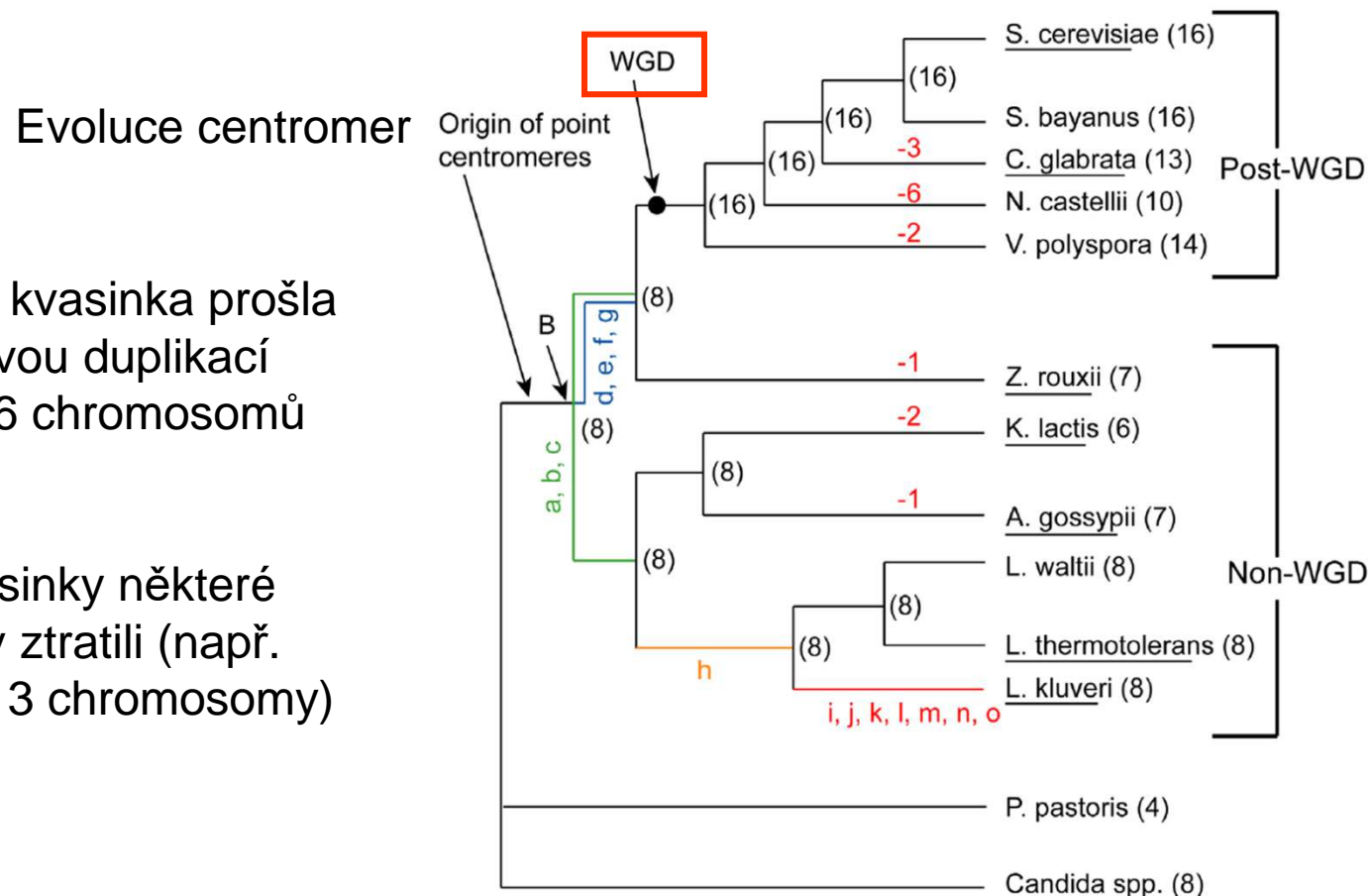
Reinhardt a Bartel, Science, 2002, <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main7.html>

Duplikace kvasinkového genomu

- srovnání kvasinkových genomů ukázalo na existenci „prakvasinky“ s 8-mi ancestrálními chromosomy (cca 4500 geny)
- nejbližše anc. genomu je *Lachancea kluveri* (8 chromosomů, nejméně = 15 přeskupení v genomu - viz a-o)

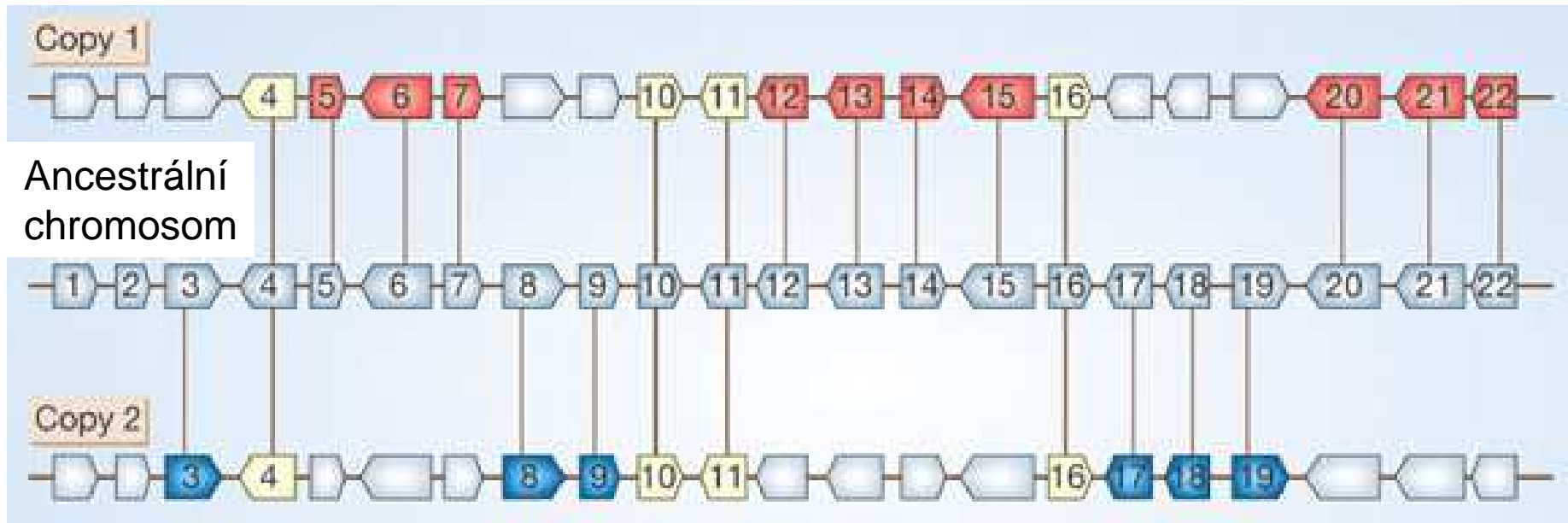
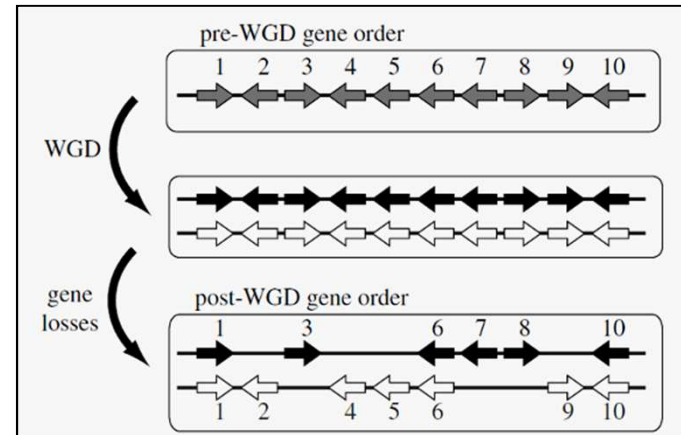
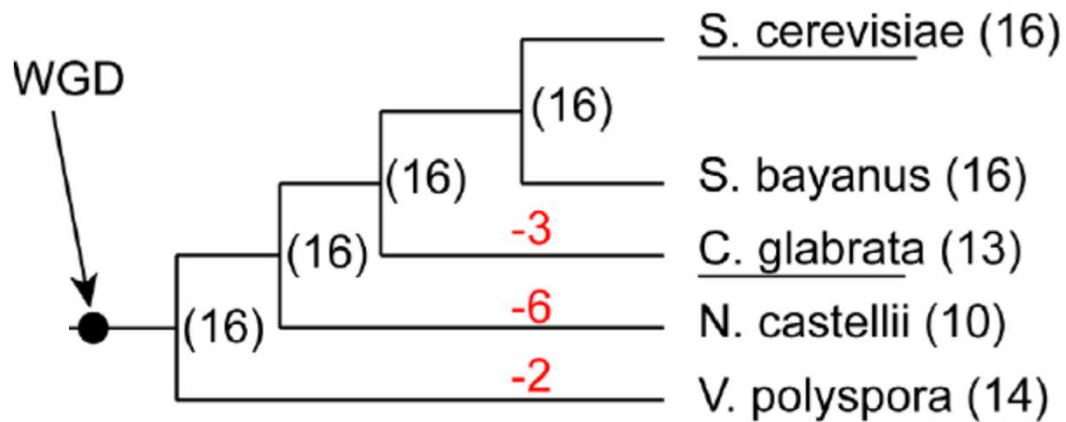
- ancestrální kvasinka prošla celogenomovou duplikací (WGD) 8->16 chromosomů

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

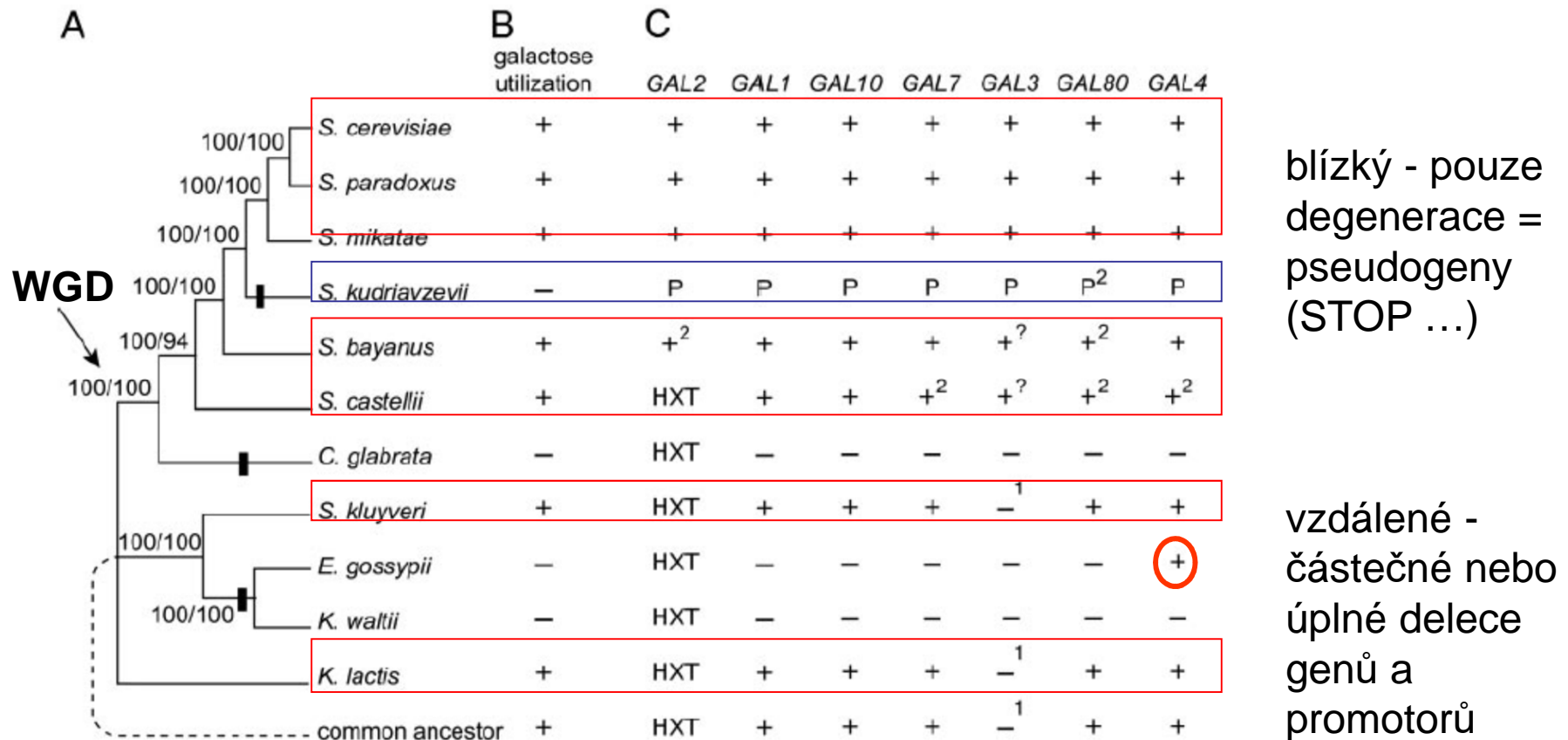


Celogenomová duplikace – *Saccharomycotina*

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 – 30% genomu u *S.c.* je pozůstatkem celogenomové duplikace (nikoli duplikace segmentů či genů)



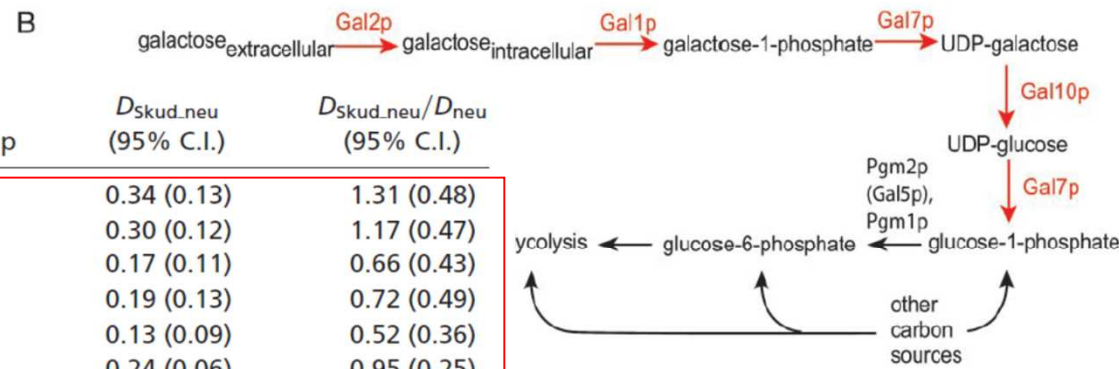
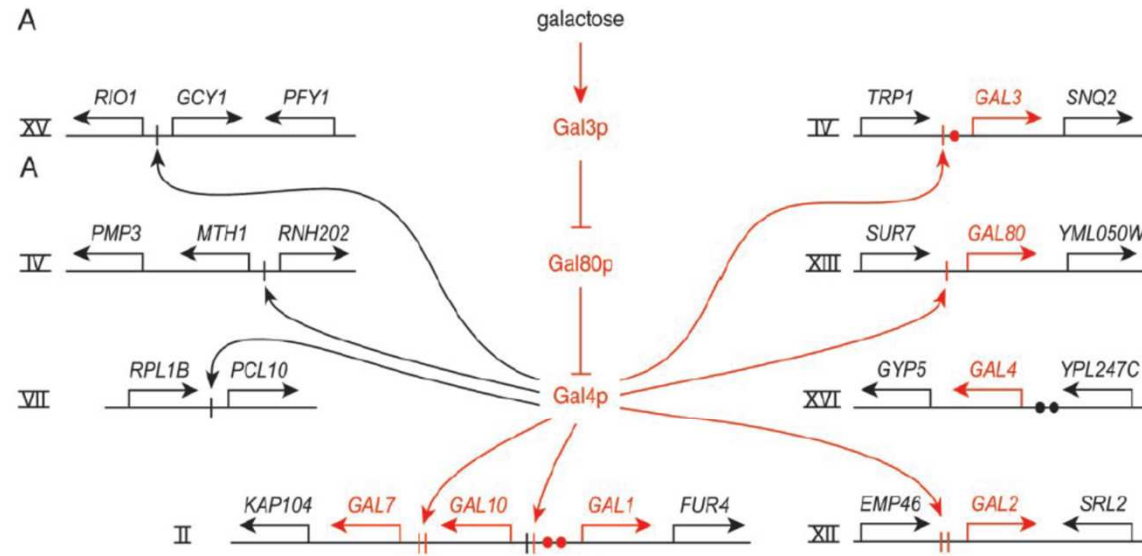
Evolve metabolismu galaktózy – ztráty genů



Hittinger et al., PNAS, 2004

- různé kvasinky využívají různé cukry (viz přednáška o určování kvasinek)
- *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. kluyveri*, a *K. lactis* využívají galaktosu – mají všechny GAL geny
- *S. kudriavzevii*, *C. glabrata*, *K. waltii*, a *E. gossypii* nemohou využívat galaktosu (vyřazení jednoho GAL genu znemožní kvasince metabolismus galaktosy – vede k degeneraci i ostatních GAL – GAL4 TF je „pleiotropní“/širší – více zachován)

Regulace metabolické dráhy galaktózy

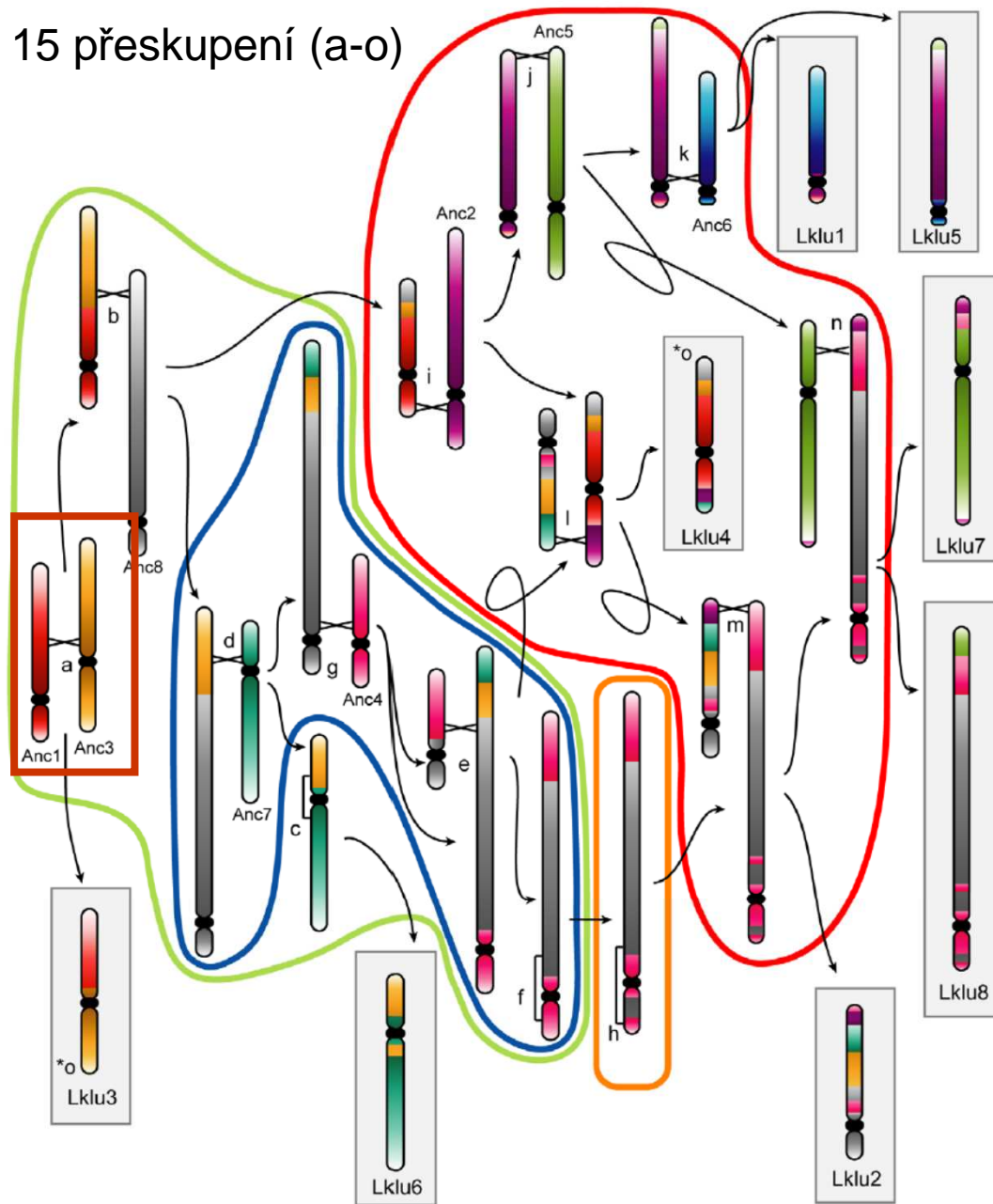


Gene	Length, bp	$D_{Skud.neu}$ (95% C.I.)	$D_{Skud.neu}/D_{neu}$ (95% C.I.)
GAL2	644	0.34 (0.13)	1.31 (0.48)
GAL1	728	0.30 (0.12)	1.17 (0.47)
GAL10	547	0.17 (0.11)	0.66 (0.43)
GAL7	390	0.19 (0.13)	0.72 (0.49)
GAL3	625	0.13 (0.09)	0.52 (0.36)
GAL80	1,088	0.24 (0.06)	0.95 (0.25)
GAL4	1,583	0.19 (0.07)	0.74 (0.26)
All GAL genes	5,605	0.21 (0.03)	0.82 (0.13)
GCY1	921	-0.07 (0.06)	-0.26 (0.25)
MTH1	1,287	-0.05 (0.05)	-0.21 (0.21)
PCL10	1,284	-0.05 (0.06)	-0.20 (0.23)
PGM2 (GAL5)	1,710	-0.04 (0.05)	-0.16 (0.20)
PGM1	1,699	-0.09 (0.05)	-0.35 (0.20)
MIG1	1,476	-0.09 (0.05)	-0.34 (0.19)

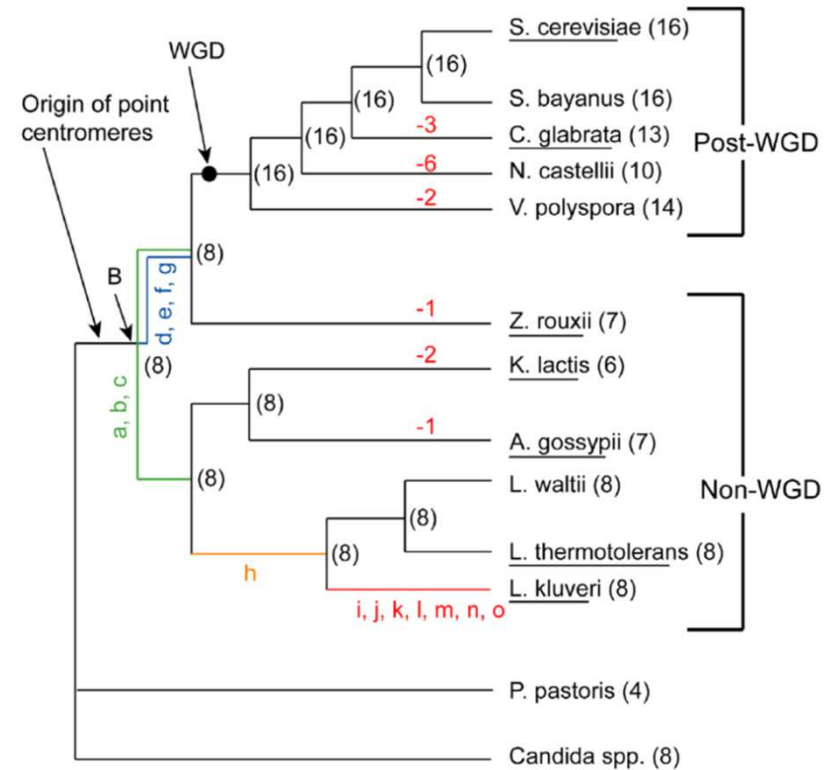
GAL4 gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* ...

Hittinger et al., PNAS, 2004
Johnston, MMBR, 1987

15 přeskupení (a-o)



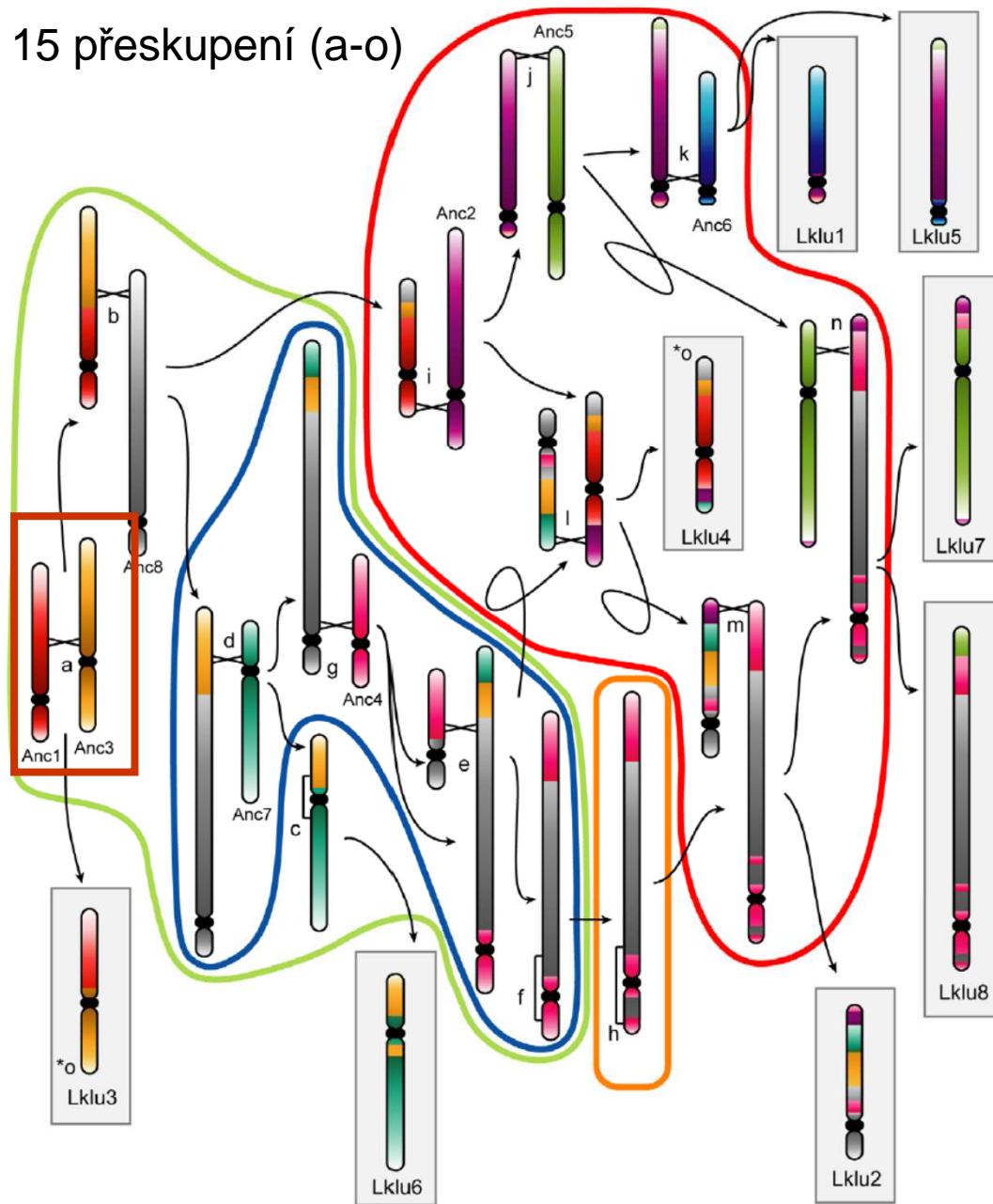
Přeskupování chrom. bloků u *L. kluyveri*



nejblíže anc. genomu je *Lachancea kluyveri*
(8 chromosomů, nejméně = 15 přeskupení v genomu)

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

15 přeskupení (a-o)



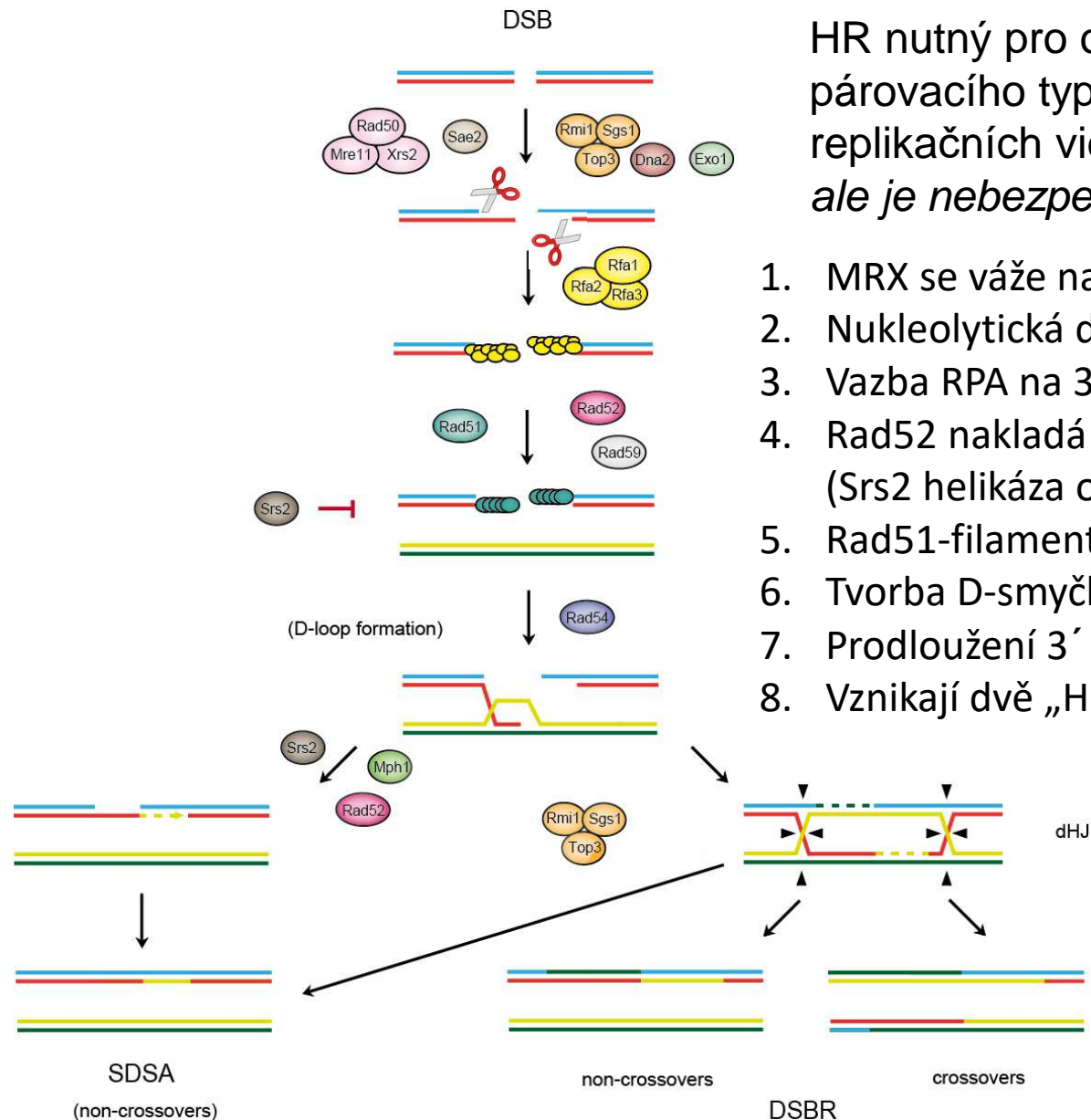
Přeskupování chrom. bloků u *L. kluyveri*

- přeskupení prostřednictvím rekombinace (mikrohomologií) po zlomení chromosomu (**DSB**)
- *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)

nejblíže anc. genomu je *Lachancea kluyveri*
(8 chromosomů, nejméně = 15 přeskupení v genomu)

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

Homologní rekombinace



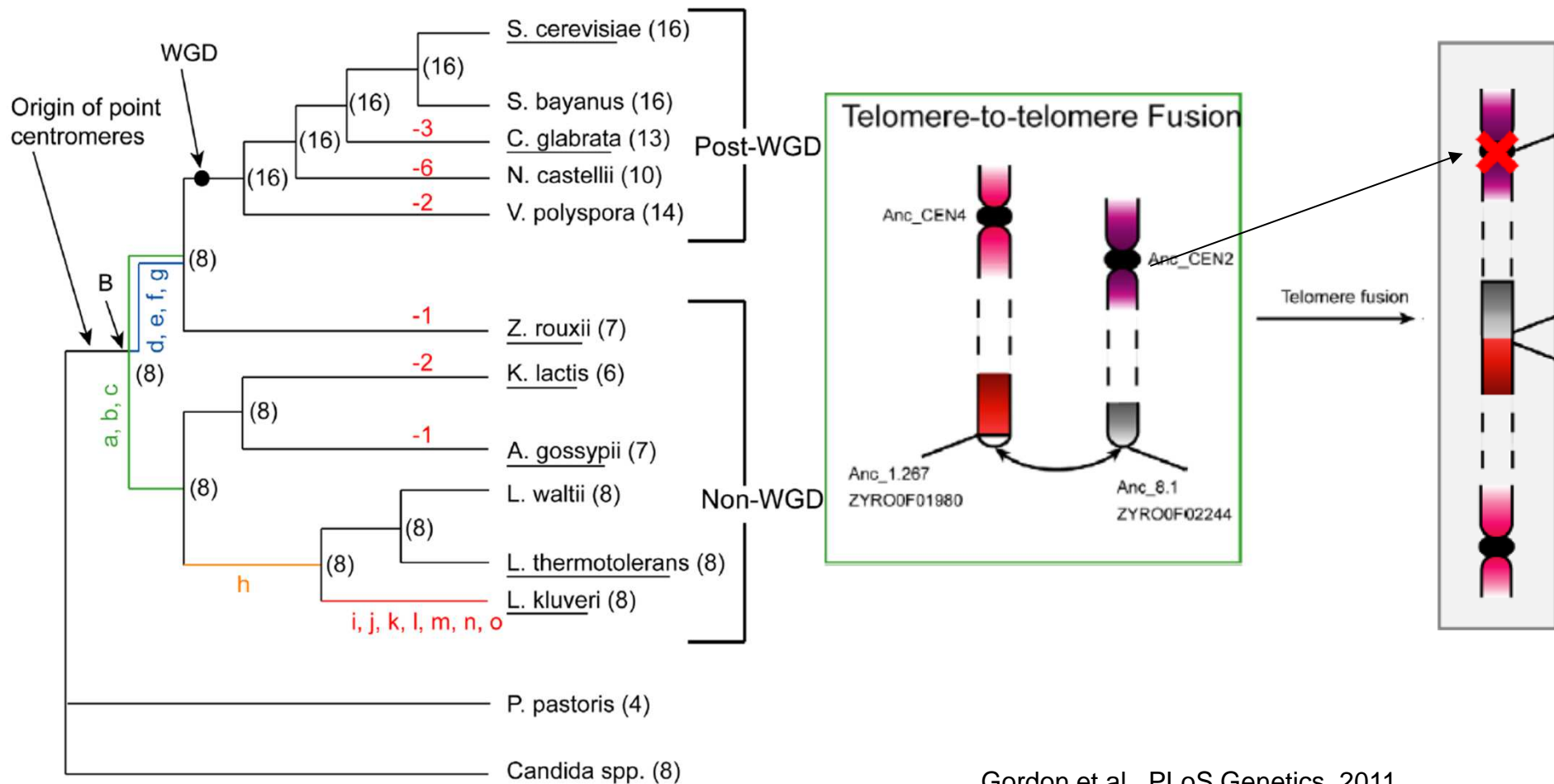
HR nutný pro opravu DSB, přepínání párovacího typu, restart zastavených replikačních vidliček, integraci DNA do genomu *ale je nebezpečný pro repetitivní sekvence*

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 helikáza 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).

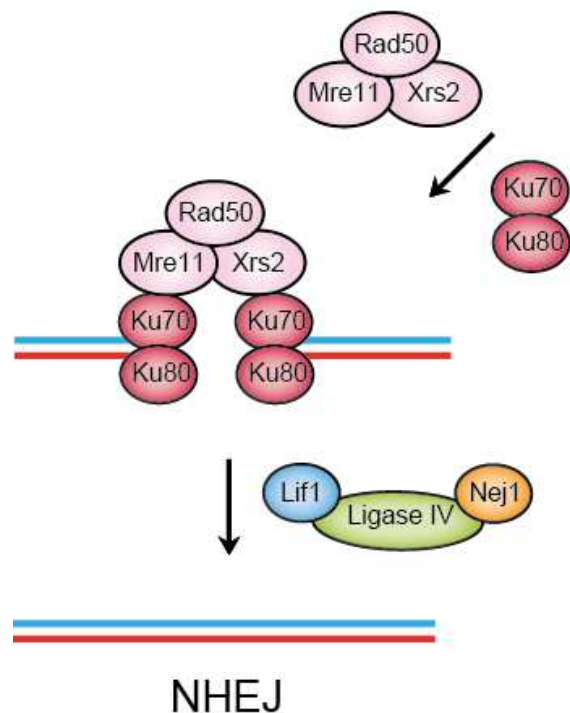
Redukce chromosomů telomera-telomera fúzí

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



Nehomologické spojování konců

Non-homologous end joining (NHEJ)

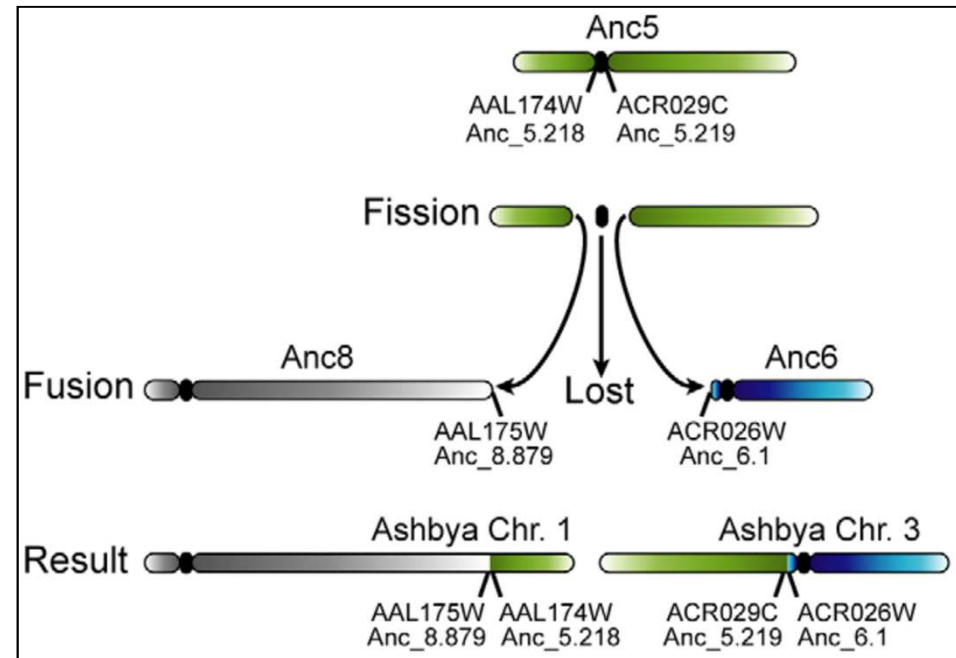
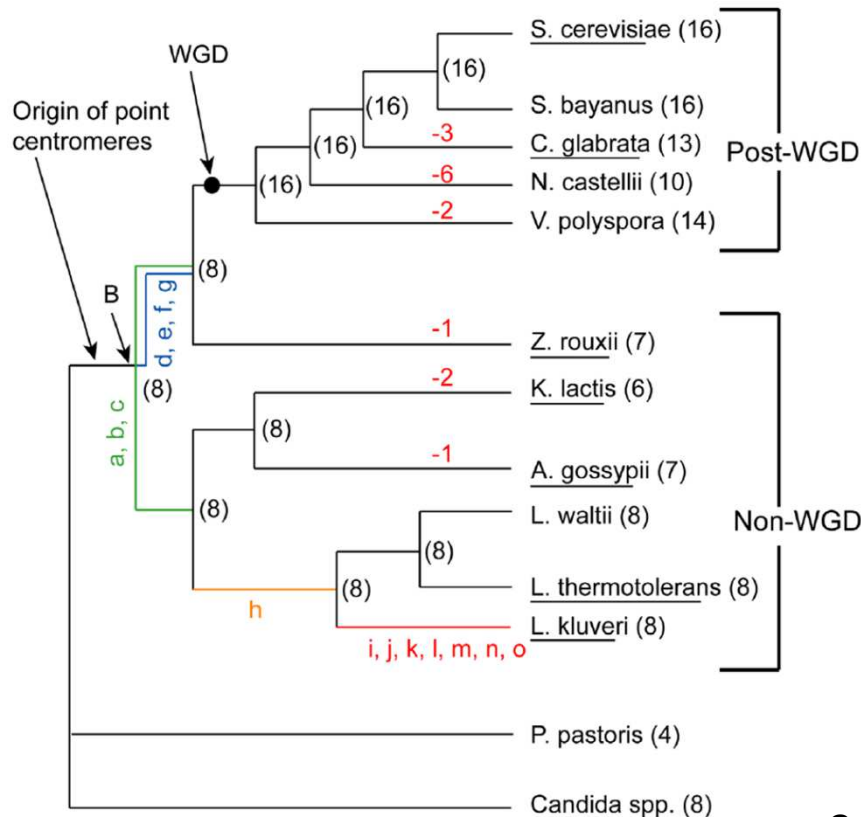


1. Vazba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) komplexu, Ku heterodimeru (Yku70-Yku80) na zlomené konce DNA
2. Vazba DNA ligázy IV (**Dnl4**) a jejích pomocných proteinů Lif1 a Nej1.
3. Hledání komplementarity mezi převisy dvou konců DNA.
4. Úprava konců - syntéza DNA (Pol4 DNA polymeráza)
5. Religace konců

při opravě nekompatibilních konců většinou dochází k delecím nebo inzercím – HR je lepší, ale je potřeba homologní sekvence – NHEJ v G1 zatímco HR v G2/M – dobře rostoucí kultura kvasinek má významnou frakci buněk v G2/M (proto je v kvasinkách možná integrace homologních sekvencí – genetika – použít exponenciální kultury pro transformace)

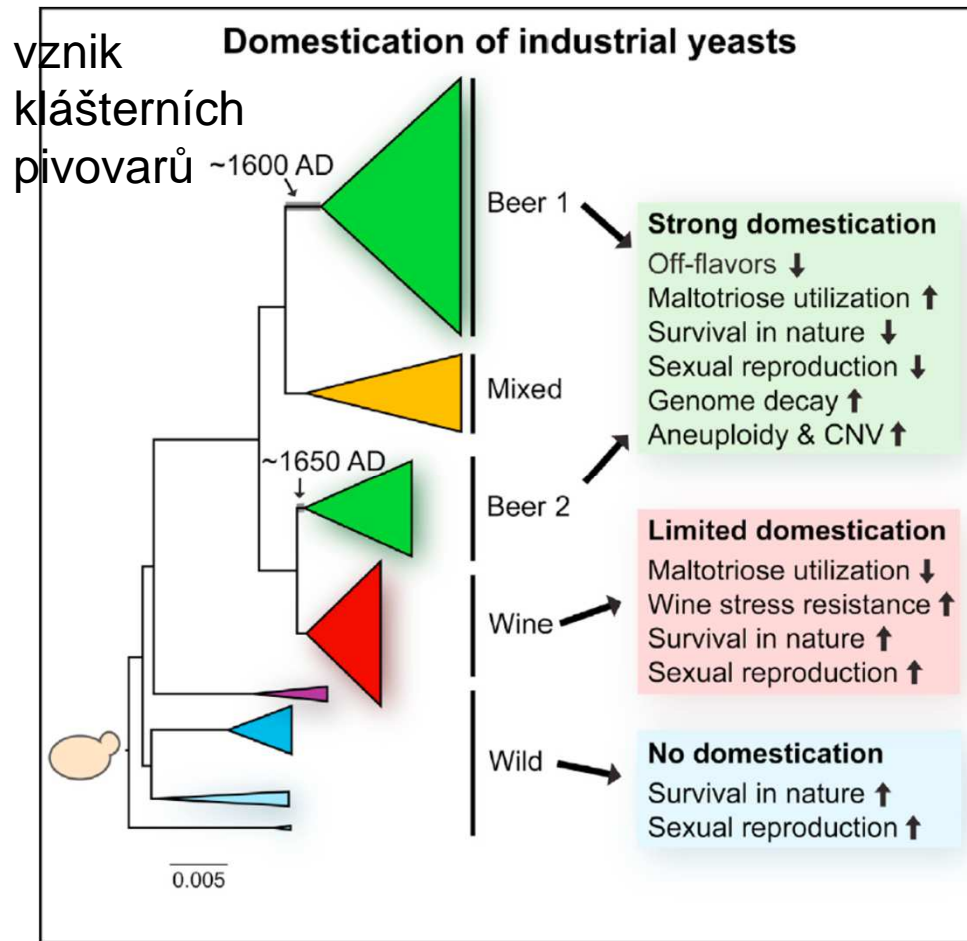
Redukce chromosomů telomera-telomera fúzemi

- rozlomení v centromeře a napojení vzniklých ramen na telomery jiných chromosomů (*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 chromosomů se geny z telomerových oblastí dostávají dovnitř chromozomu (změna míry exprese uvnitř chromozomu)



amplifikace genů

průmyslově-specifická selekce na toleranci ke stresu (vyšší obsah etanolu 7-15%), využití cukru, specifické aroma, nižší schopnost reprodukce



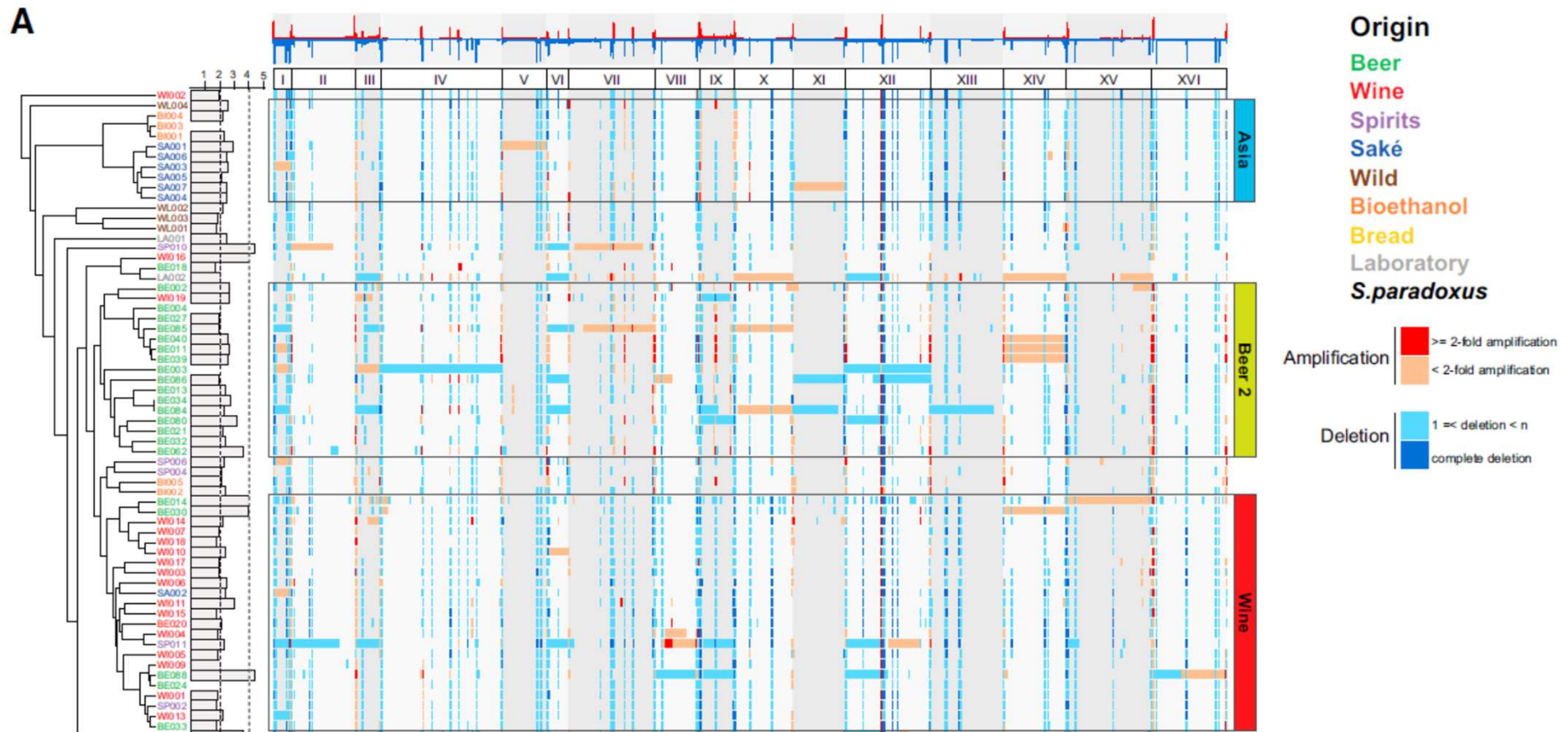
„technologie“ piva ~3000 BC

Gallone et al, Cell, 2016

„očkovaním“ předchozích pivních kultur do nových kvasných procesů (ztráta kontaktu s přírodním prostředím - ~75 000 generací) – např. ztráta schopnosti sporulovat (stále bohaté médium), rychlejší evoluce ... nebo naopak zvýšení resistance vůči sulfátům (přidávaným kvůli konzervaci)

mutace a duplikace v MAL genech – zlepšení schopnosti utilizace maltosy

- nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nepříjemné aroma piva) ...



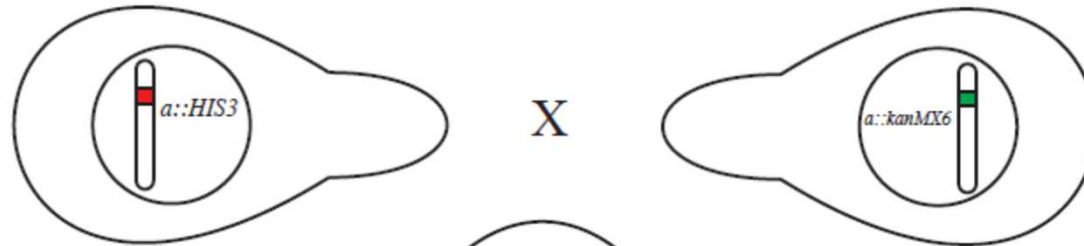
nejvíce amplifikací v MAL genech (IMA2, IMA3, MAL31, MAL33, MAL32) u pивních kvasinek (rostou na maltose), zatímco ve vinných kmenech došlo k mnoha delecím těchto genů (ve vinném moštu maltosa není) – obecně více delecí než amplifikací (v genomech analyzovaných kvasinek)

mnoho pивních kvasinek je polyploidních – stres ...

Aneuploidie

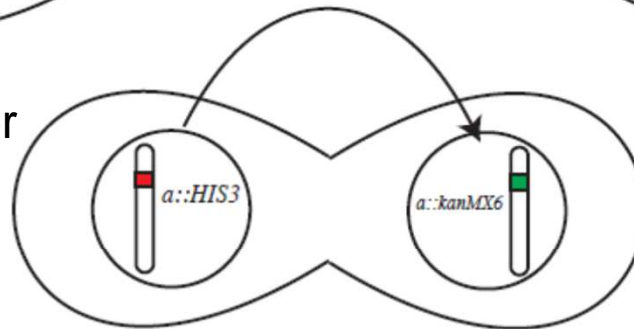
MAT α , kar1 Δ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3

MAT α , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100



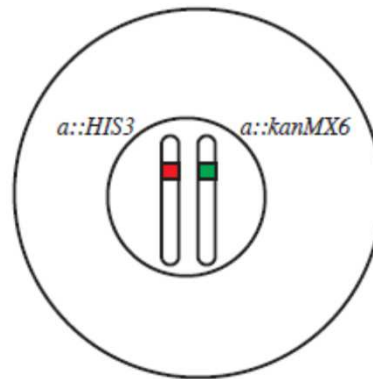
KAR1 gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

a::HIS3 + *a::kanMX6* =>
*a::*specifické promotory -
rezistence pouze v (a)
haploidních buňkách



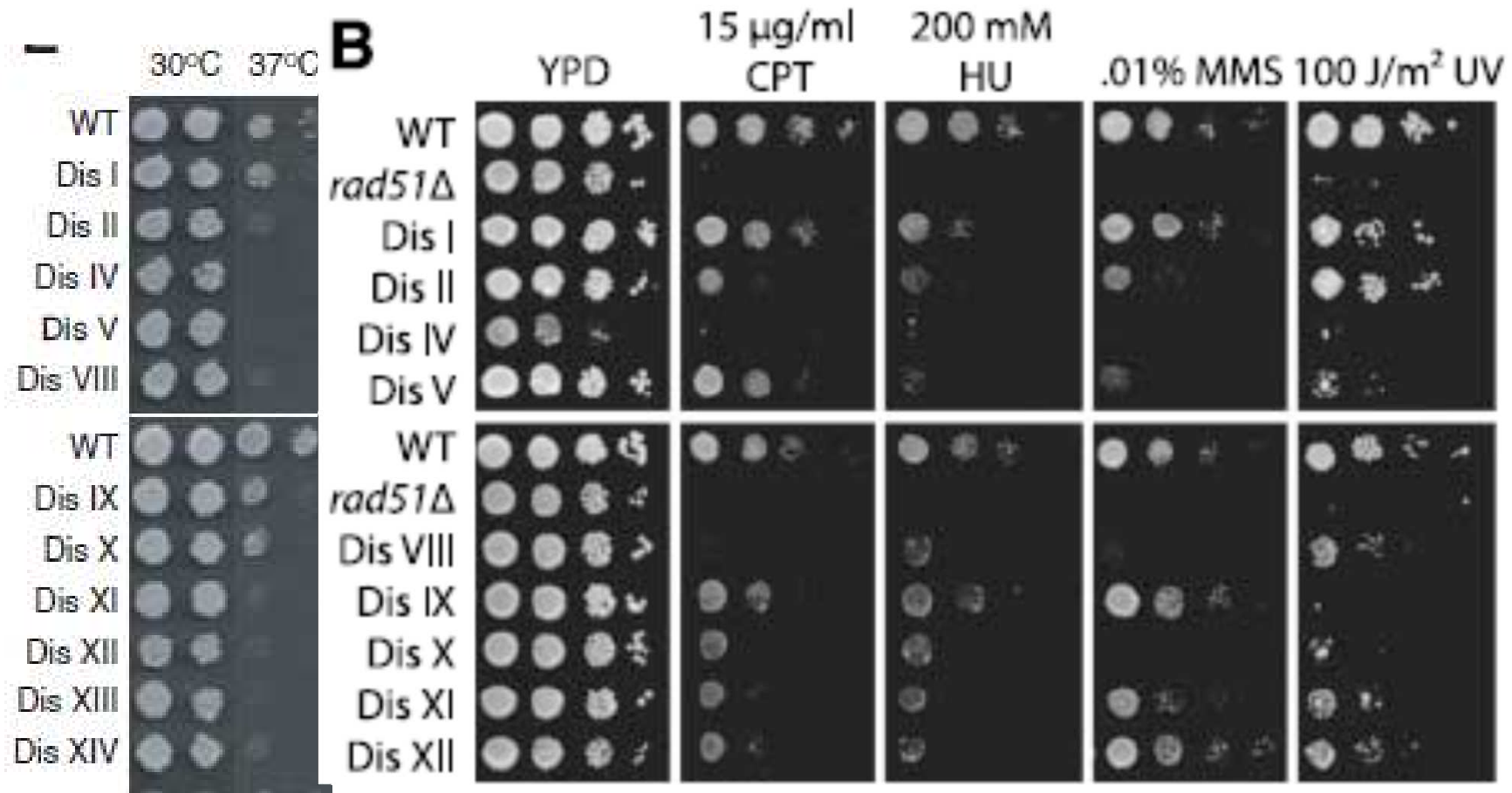
Select for: Can^R, -His and Kan^R

Studium vlivu aneuploidie na buňku (u člověka se podílí na kancerogenezi, aneuploidie v 90% lidských nádorů)

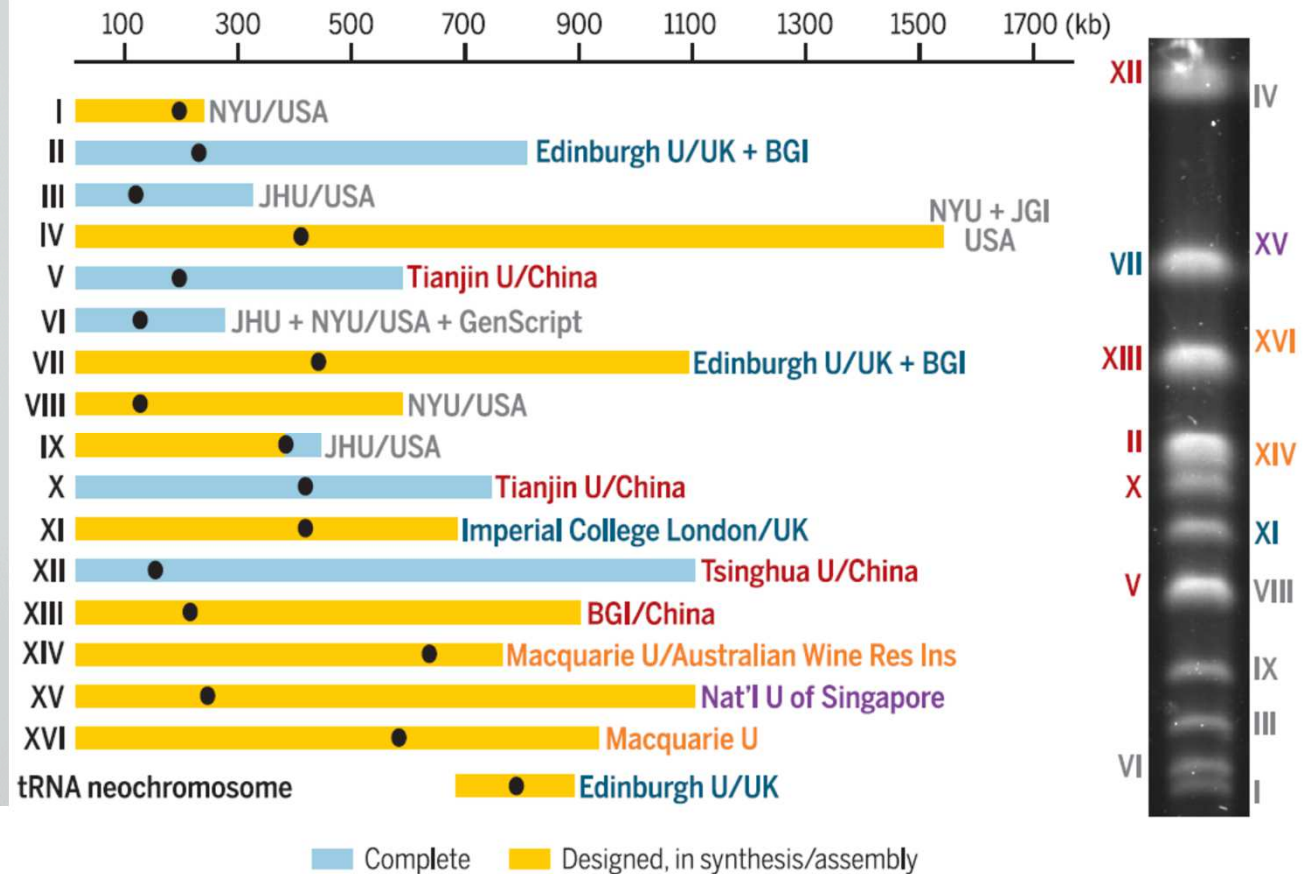


Aneuploidie způsobuje genomovou nestabilitu - rakovina

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

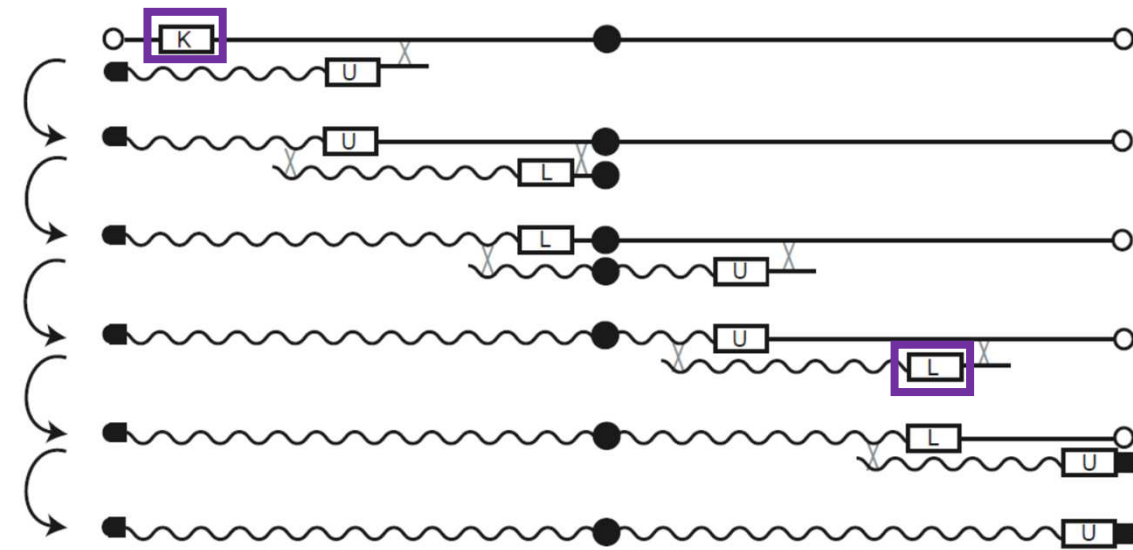


Torres et al, Science, 2007



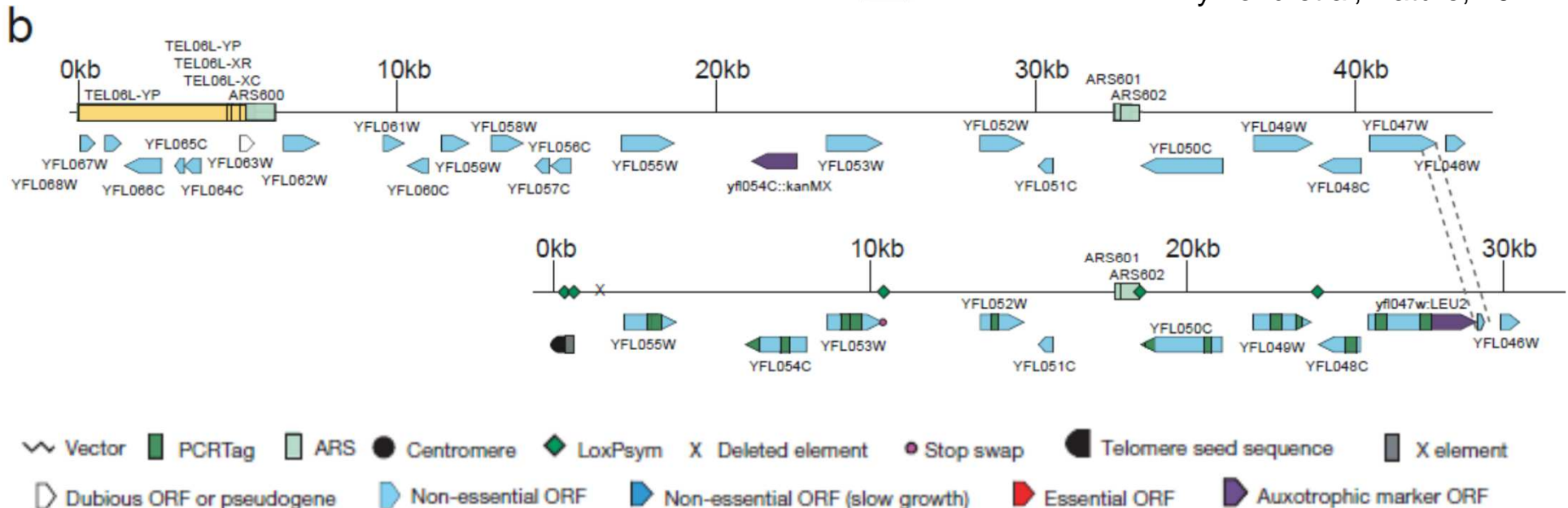
snaha vytvořit „syntetický“ eukaryontní organismus

Syntetické raménko kvasinkového chromosomu



Syntetické raménko vytvářeno postupně (cca 10kbp fragmenty) – střídavě *URA3* vs *LEU2* markery pro selekci nových kmenů

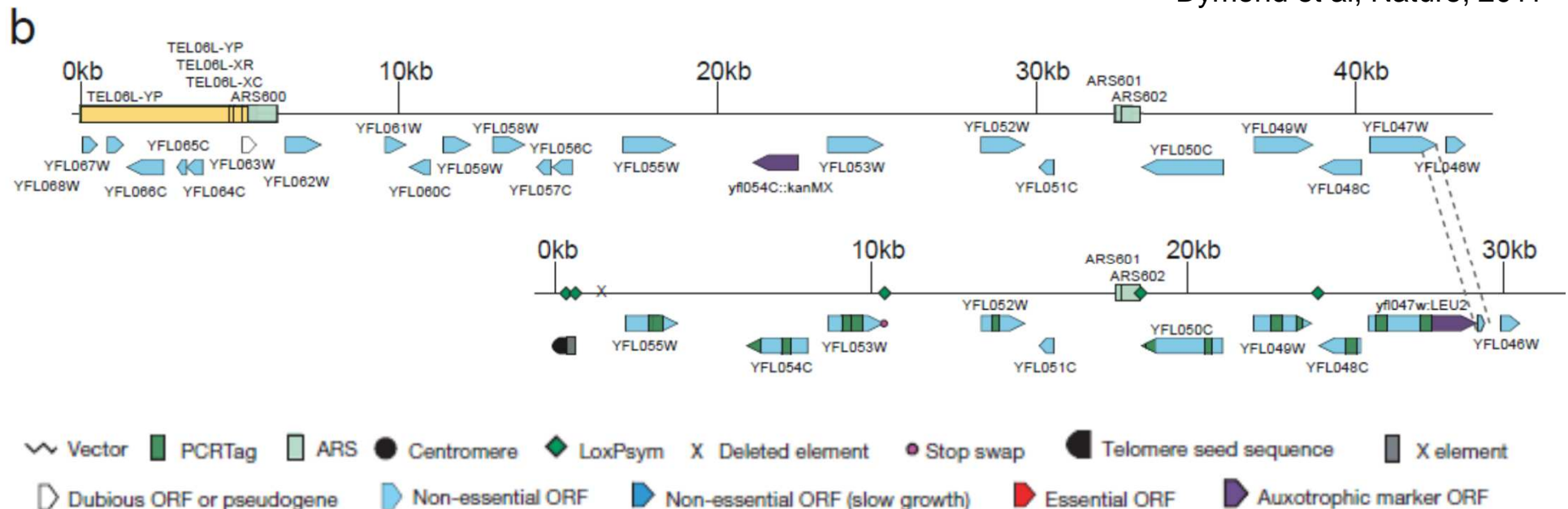
Dymond et al, Nature, 2011



Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů ... wt fenotyp (testovali UV, H₂O₂ ...)
- 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 (odlišení syntetického a wt chromosomu)
- LoxPsym na vyštěpení částí chromosomů

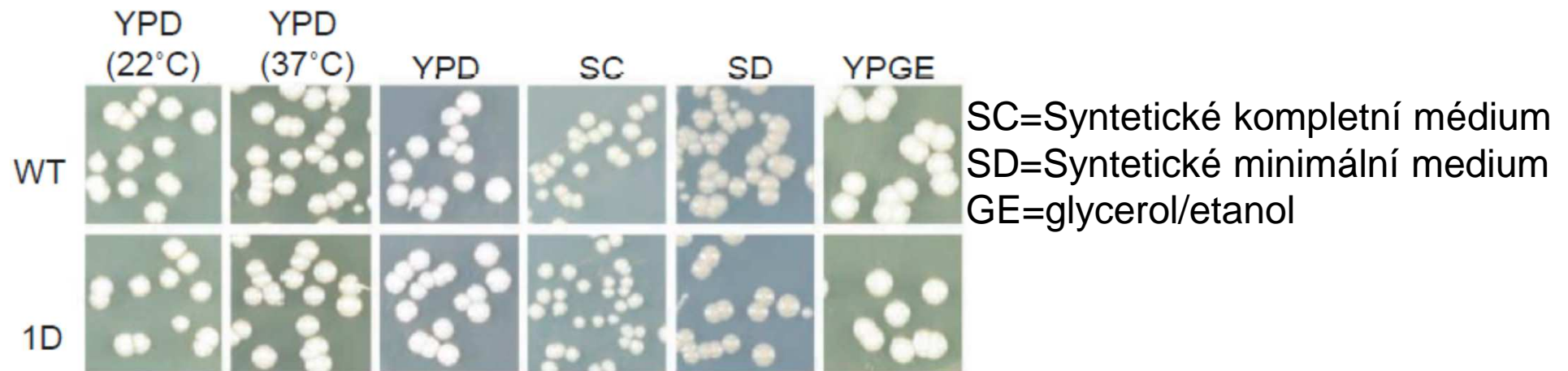
Dymond et al, Nature, 2011



Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů ... wt fenotyp (testovali UV, H₂O₂ ...)
- 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 (odlišení syntetického a wt chromosomu)
- LoxPsym na vyštěpení non-essenciálních genů

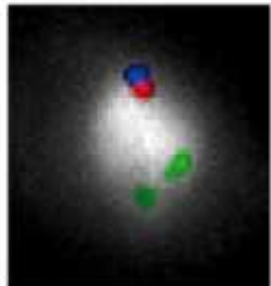
Dymond et al, Nature, 2011



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

Organizace chromosomů

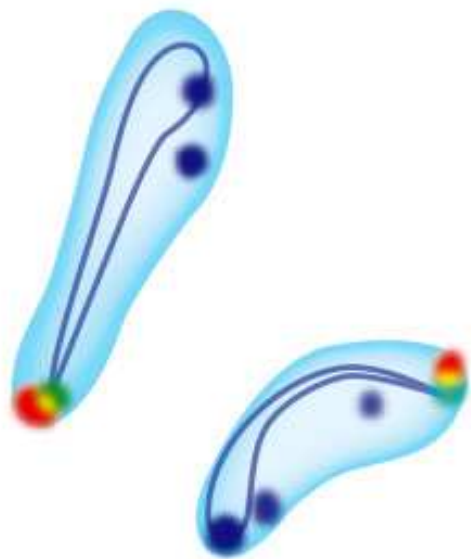
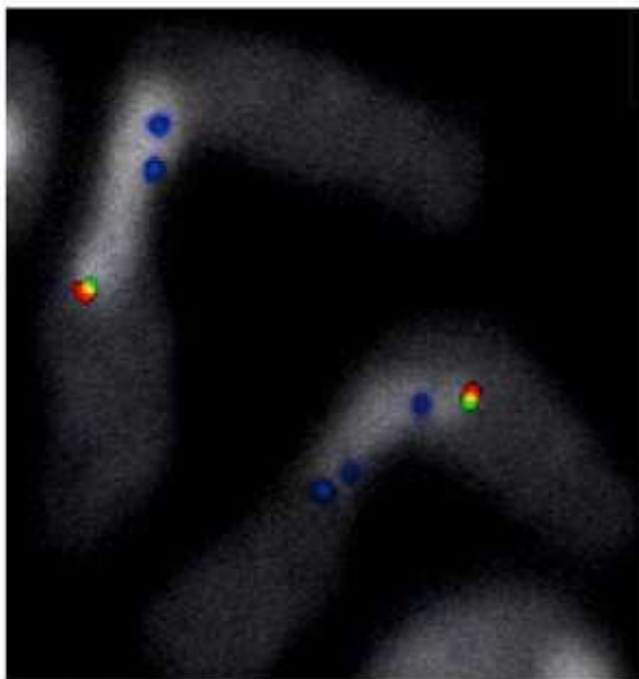
Mitotic interphase



- centromere
- telomere
- SPB

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

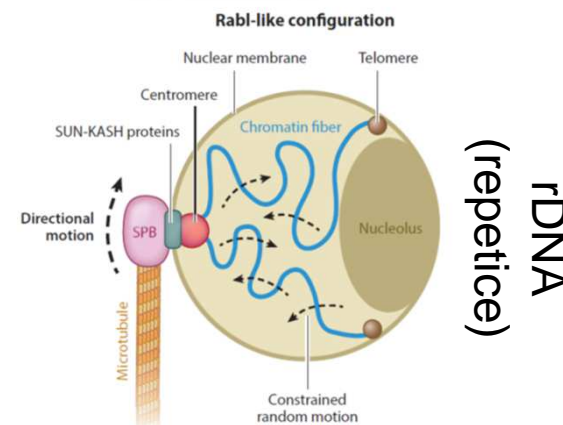
Meiotic prophase



SPB



Interphase

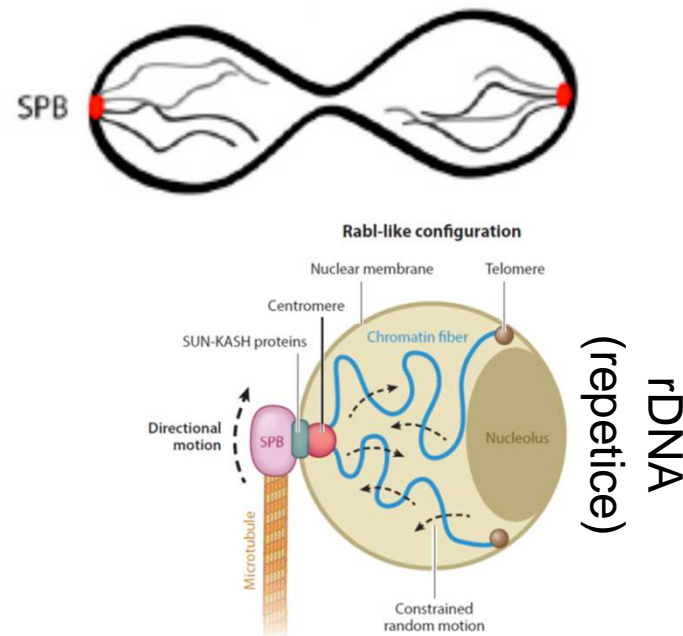
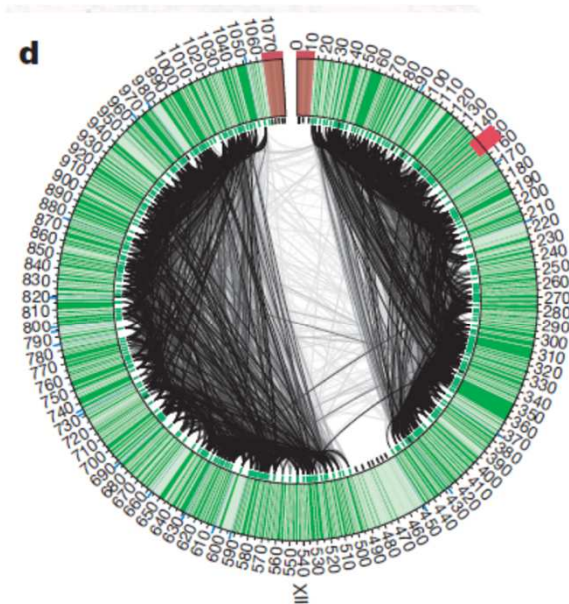


v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

v meiotickém jádře jsou telomery blíž SPB

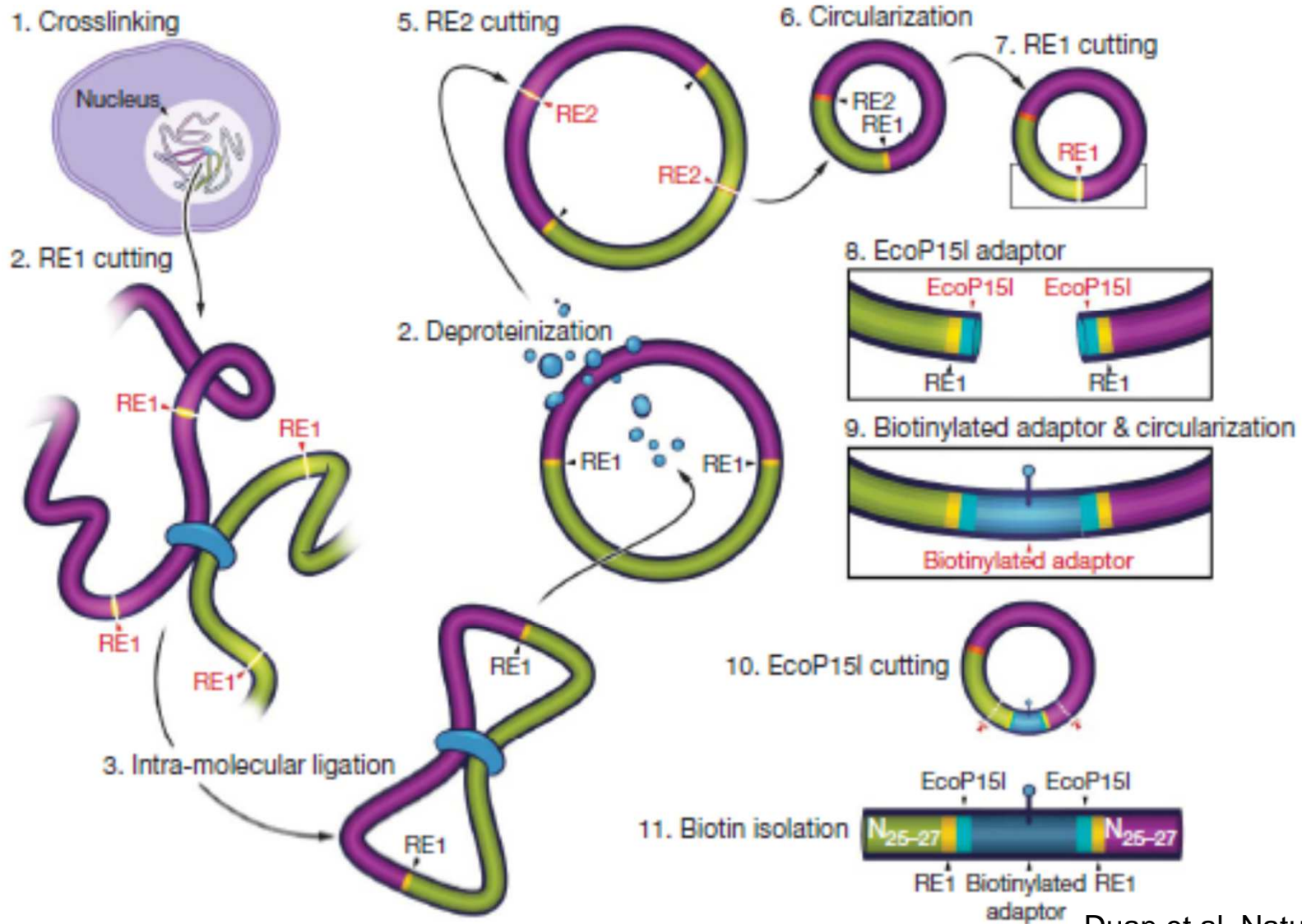
rDNA - repetice

- 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 (lokalizace do jadérka)
 - Problém s replikací – musí probíhat ve stejném směru jako transkripce (probíhá v S-fázi – kolize)

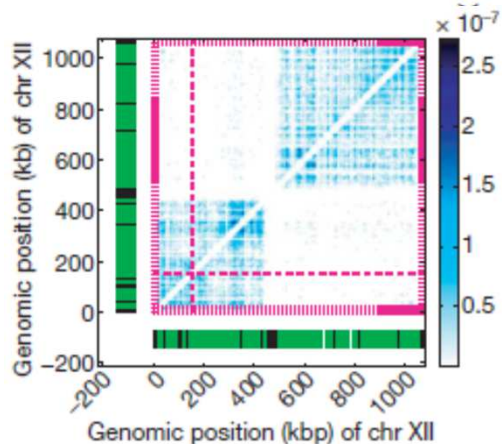
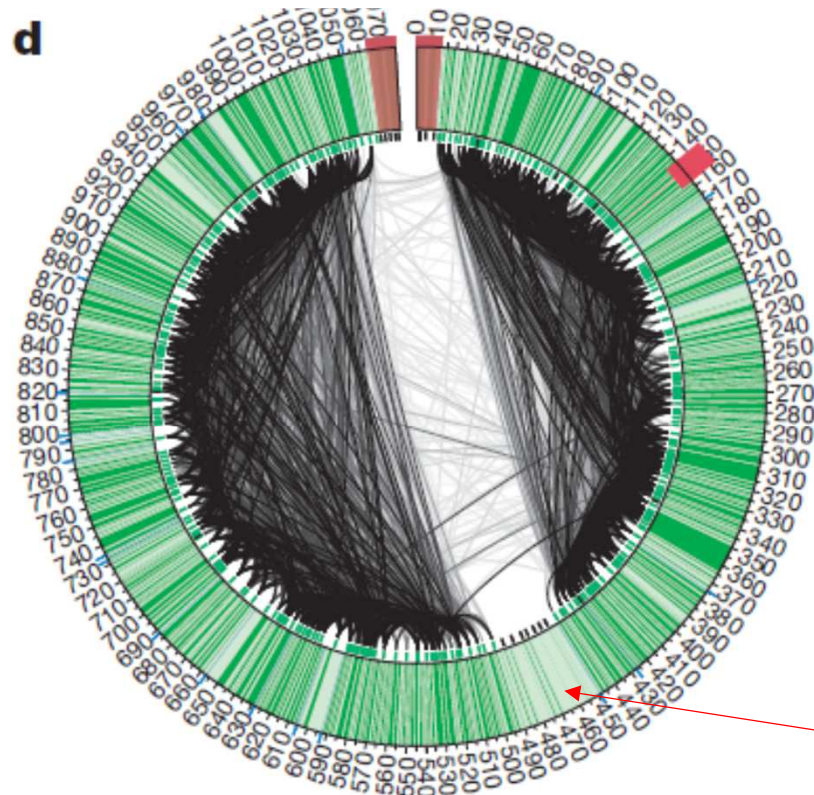


3D organizace chromosomů v *S.c.*

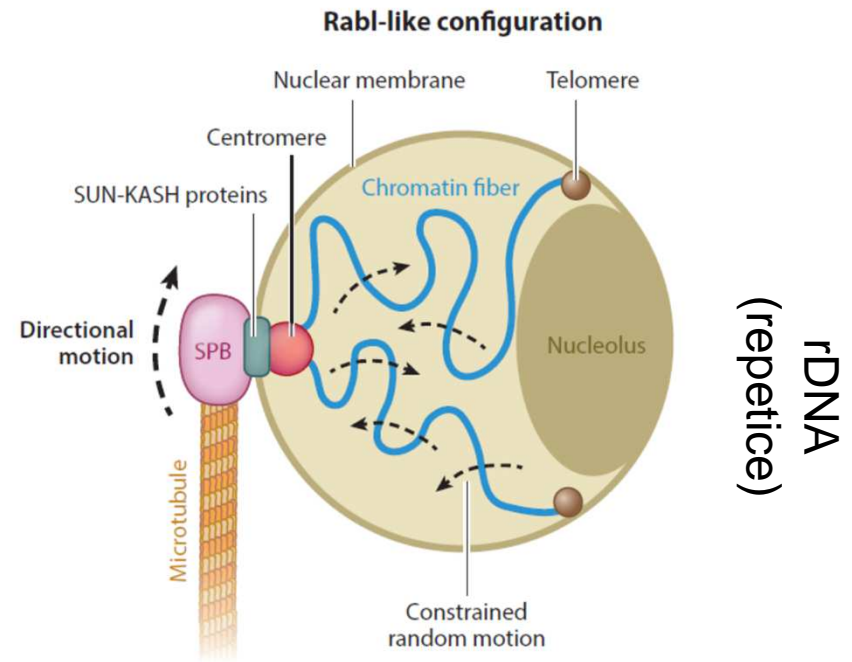
3C – chromosome conformation capture



Chromosom XII



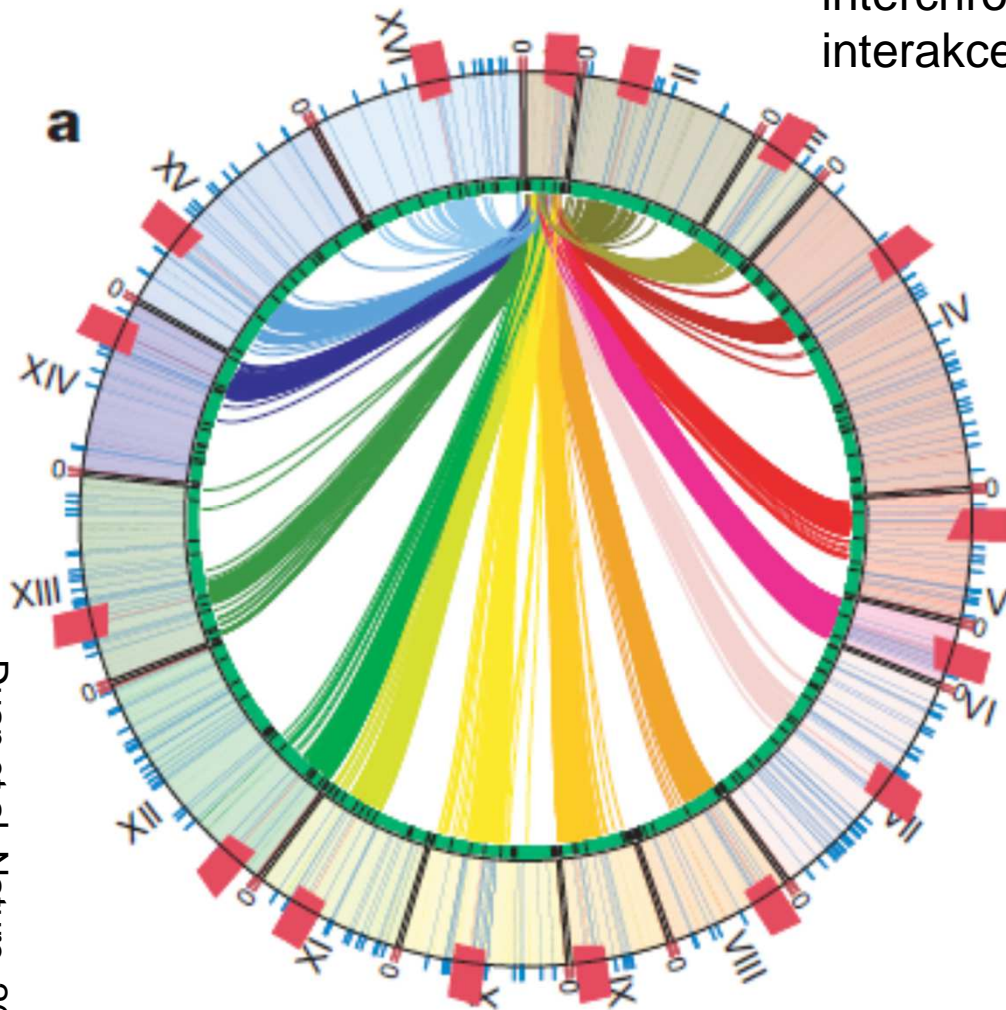
intrachromosomální interakce



Chromosom XII obsahuje rDNA repetice, které jsou lokalizovány do jadérka – úsek nesousedí s žádnou z „jaderných“ částí – je izolován (z „bezpečnostních“ důvodů ... syntéza ribozomů)

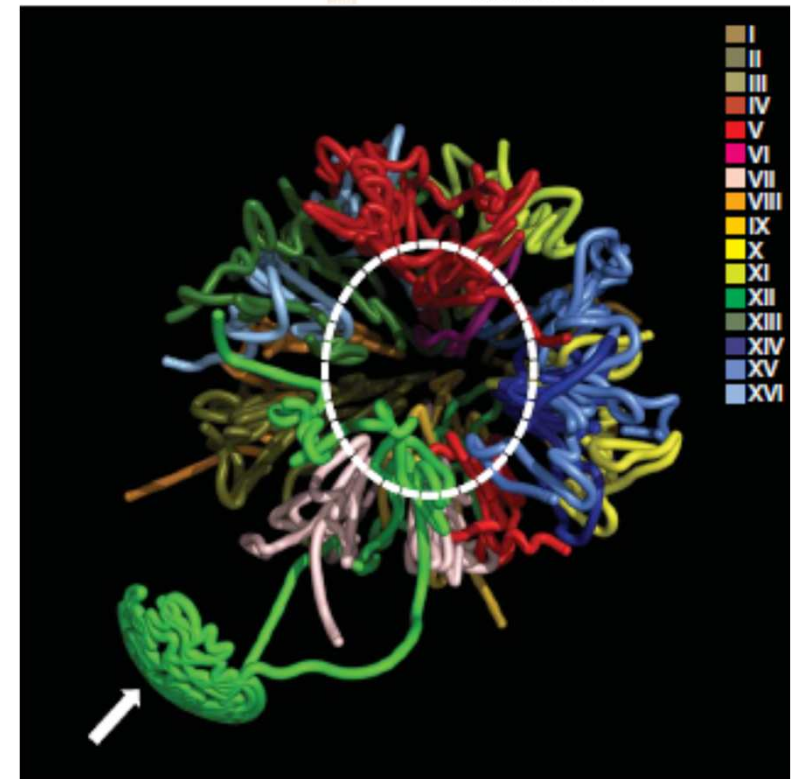
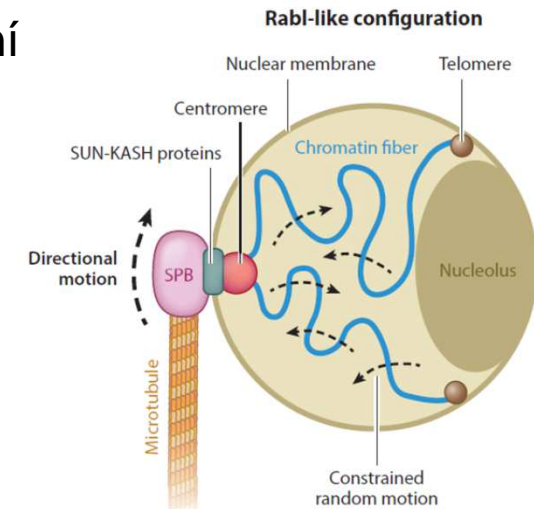
Všechny centromery jsou blízko sebe

interchromosomální interakce

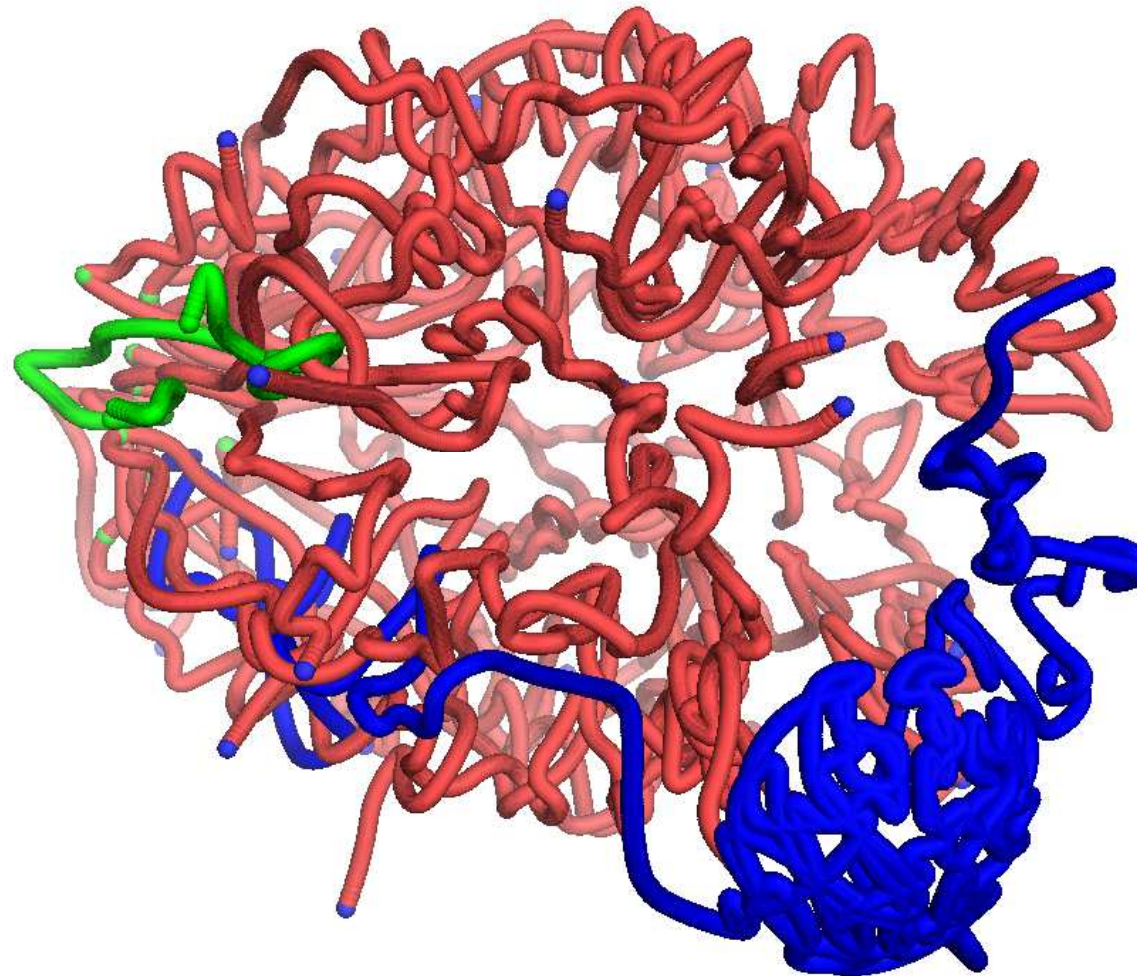
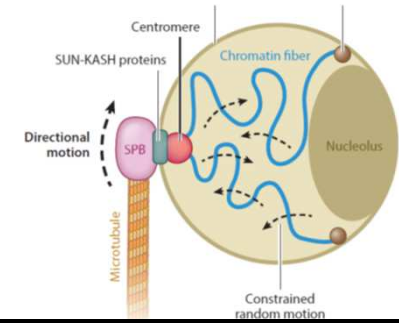


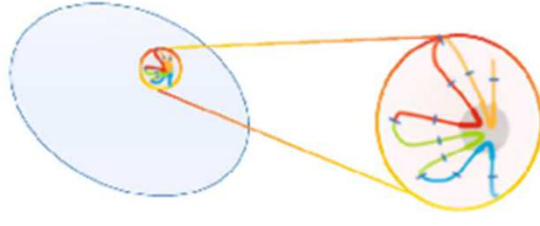
Duan et al, Nature, 2010

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



3D rekonstrukce chromosomů v kvasinkovém jádře





Chromatin network
(Crosslinking)



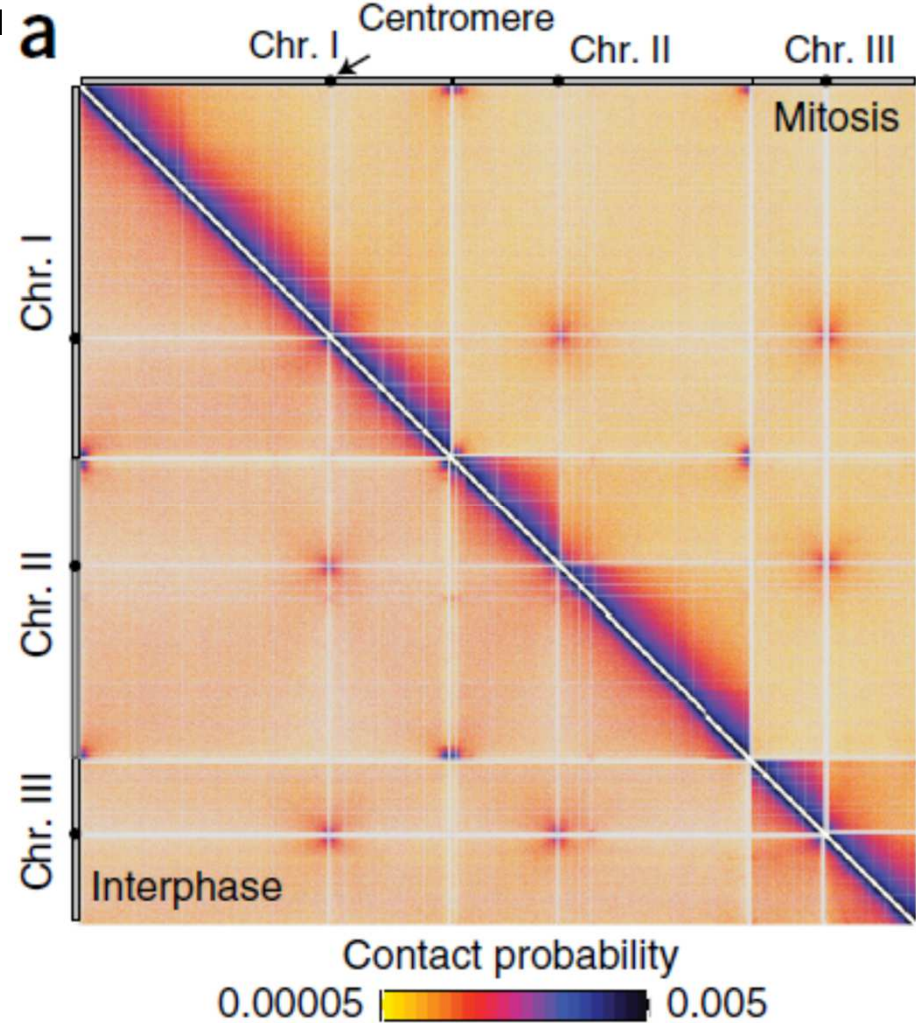
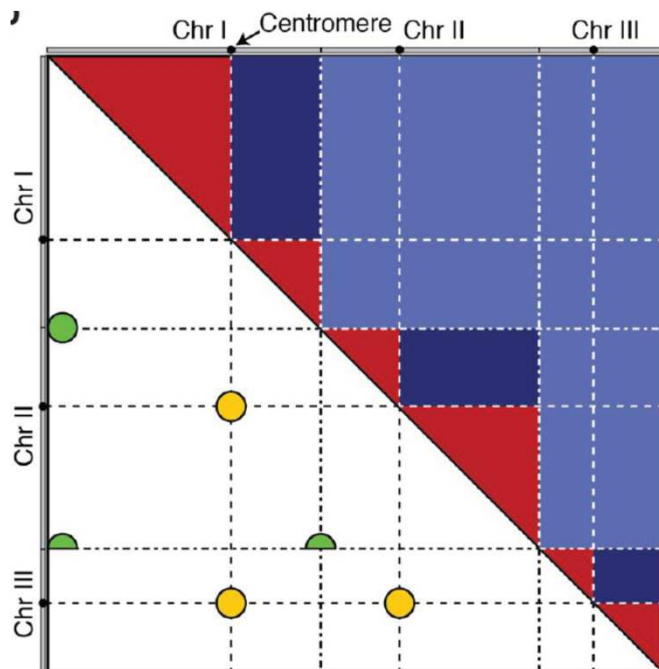
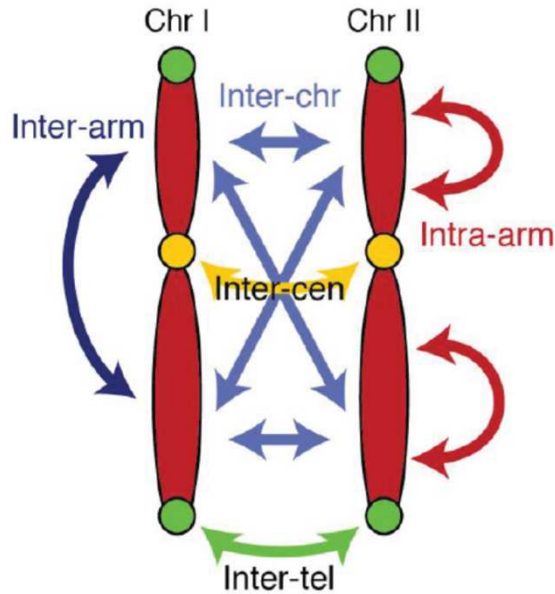
Restriction enzyme
(RE) digestion

<p>3C</p> <p>Intramolecular DNA ligation</p>	<p>Reverse crosslink</p>	<p>PCR amplification</p>	
<p>4C</p> <p>Intramolecular DNA ligation</p>	<p>Reverse crosslink and second RE digestion</p>	<p>Circulation and inverse PCR</p>	<p>Microarray</p>
<p>5C</p> <p>Intramolecular DNA ligation</p>	<p>Reverse crosslink</p>	<p>Oligo annealing and ligation</p>	<p>PCR amplification and deep sequencing or microarray</p>
<p>Hi-C</p> <p>Biotin fill in and intramolecular DNA ligation</p>	<p>Reverse crosslink</p>	<p>Terminal biotin removal, sonication and size selection</p>	<p>Pull down biotin, adapter ligation and deep sequencing</p>
<p>3D-DSL</p> <p>Intramolecular DNA ligation</p>	<p>Reverse crosslink and DNA biotinylation</p>	<p>DSL: oligo annealing and ligation</p>	<p>Purify ligated primers, PCR amplification and deep sequencing</p>

Kondenzace chromosomů v mitóze

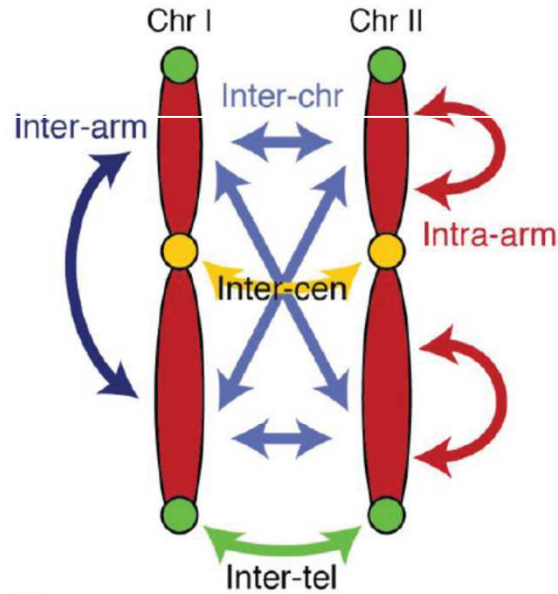
Kakui et al, Nat Genet, 2017

S. pombe má 3 chromosomy – diagram zachycuje intra- i interchromosomální interakce – centromery i telomery spolu ... srovnání interfázních a mitotických chromosomů

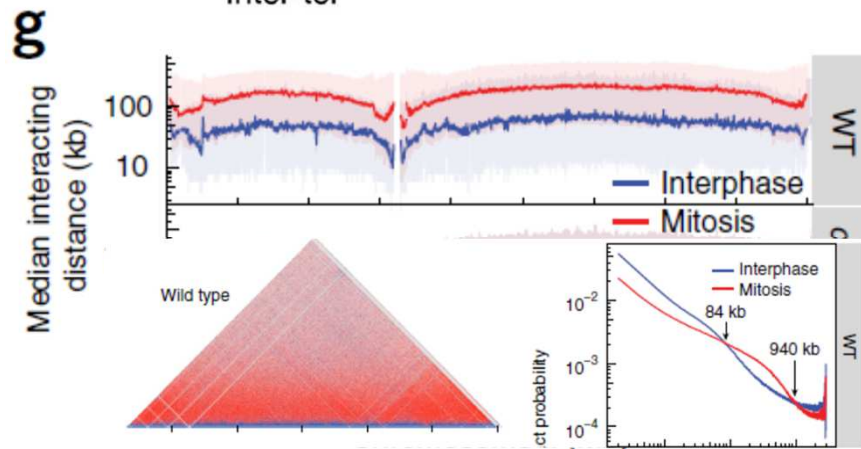


Kondenzace chromosomů v mitóze

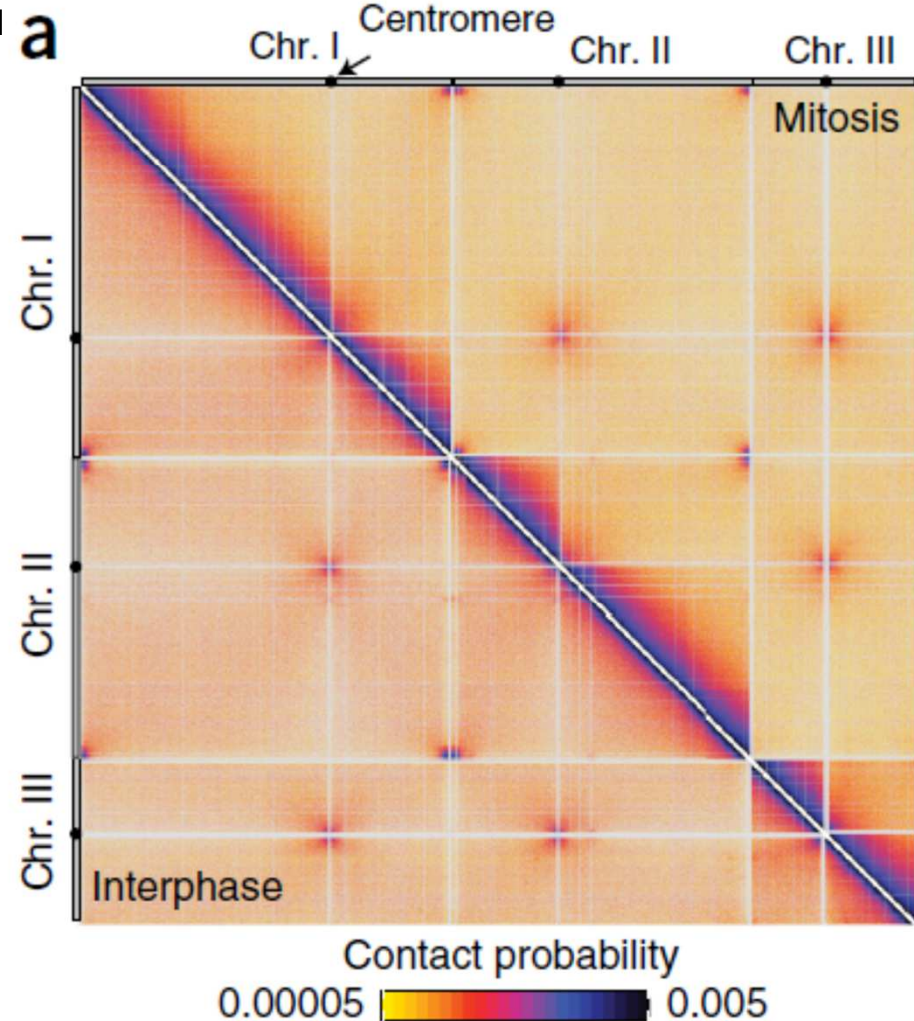
Kakui et al, Nat Genet, 2017



S. pombe má 3 chromosomy – diagram zachycuje intra- i interchromosomální interakce – centromery i telomery spolu ... srovnání interfázních a mitotických chromosomů

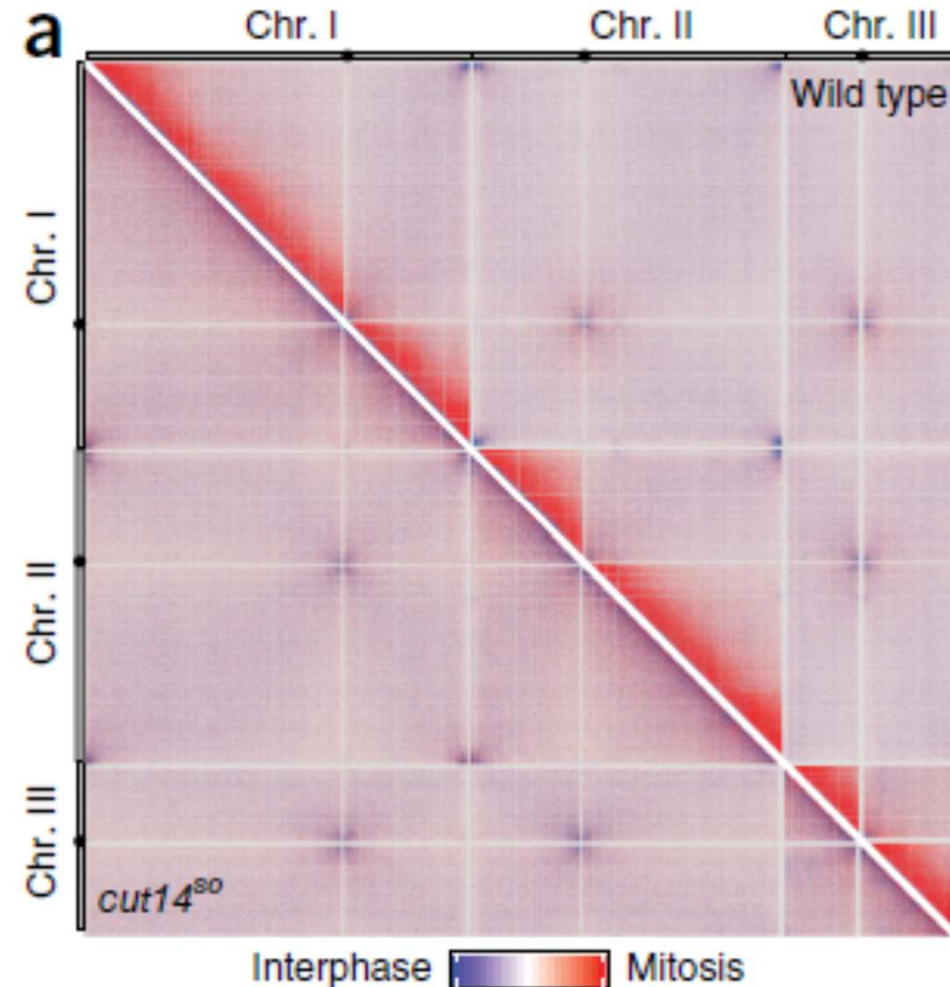
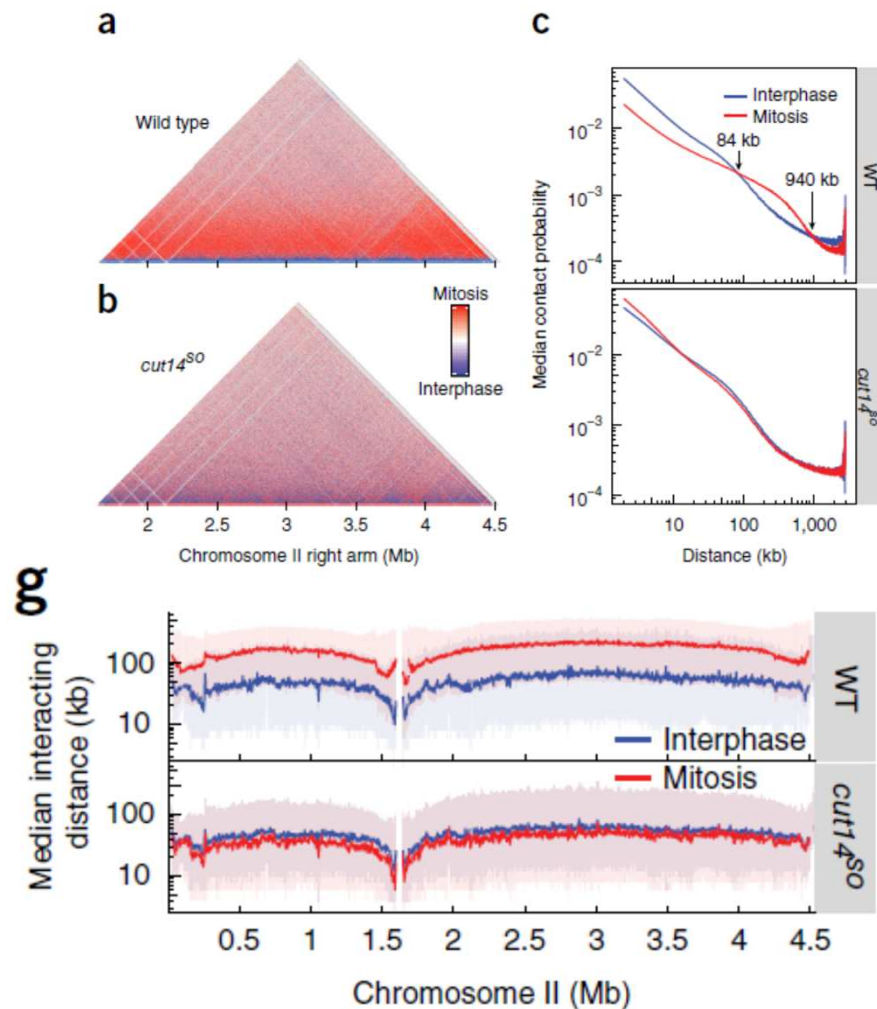


intrachromosomální interakce v mitóze jsou smyčky větší



Kondenzin kondenzuje chromosomy

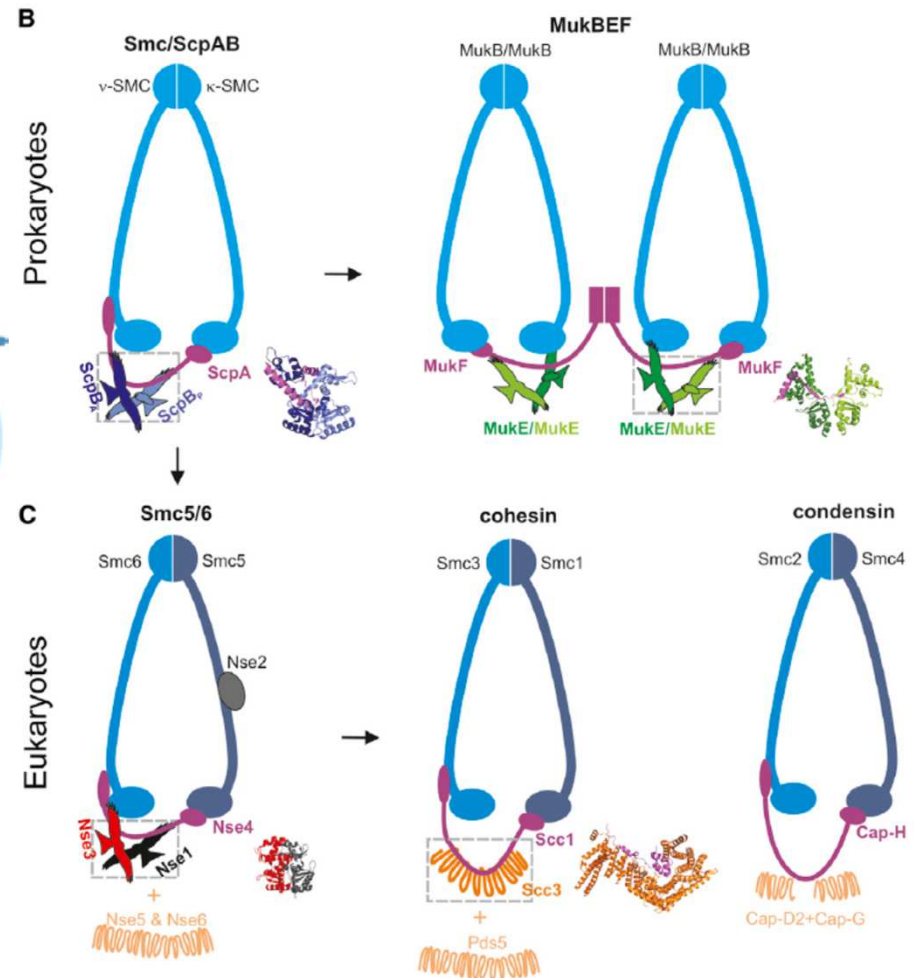
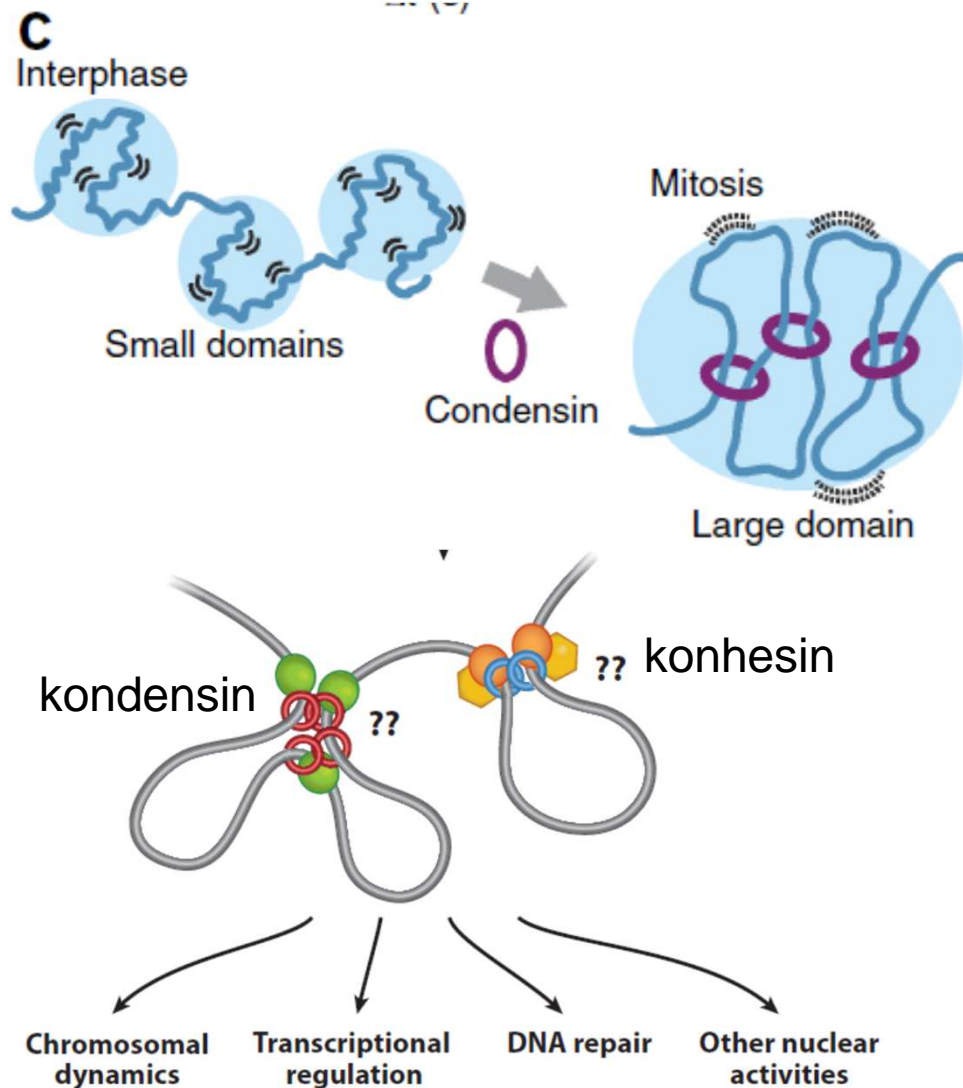
Kakui et al, Nat Genet, 2017



intrachromosomální interakce
větší mitotické smyčky jsou závislé na kondensinu

Kondenzin – SMC komplexy

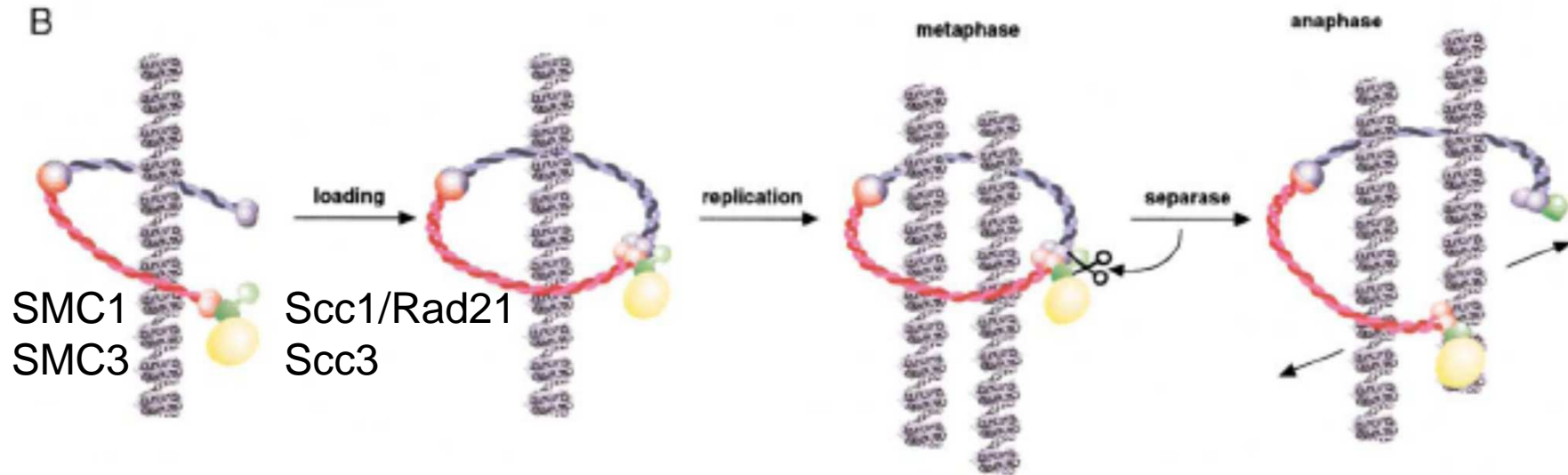
SMC (Structure Maintenance of Chromosom) komplexy jsou konzervované od bakterií až po eukaryota



Kakui et al, Nat Genet, 2017

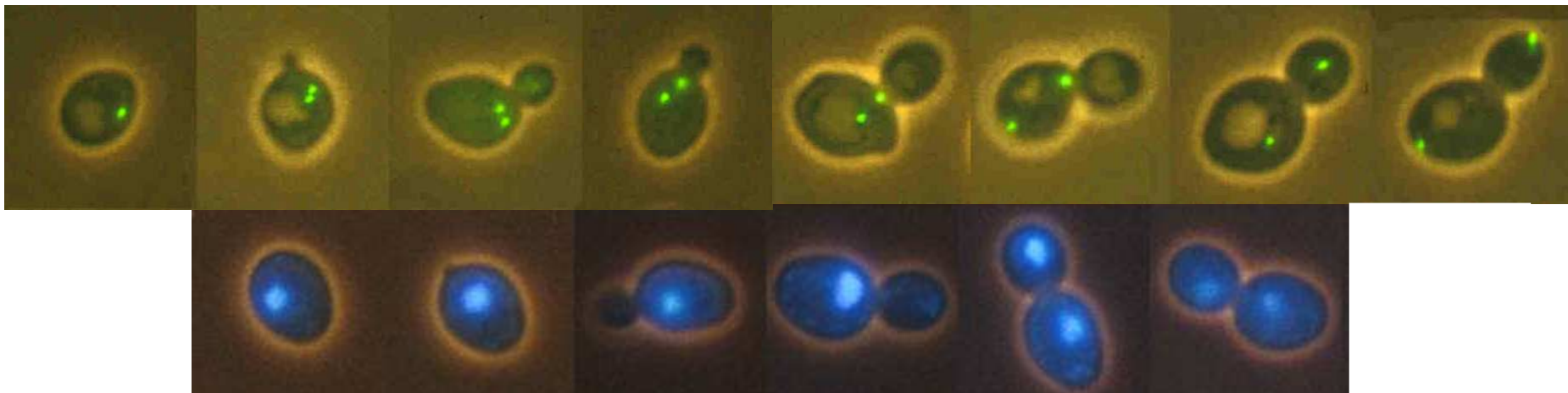
Palecek a Gruber, Structure, 2015

Kohesin drží sesterské chromatidy



Haering et al, 2002, Mol Cell

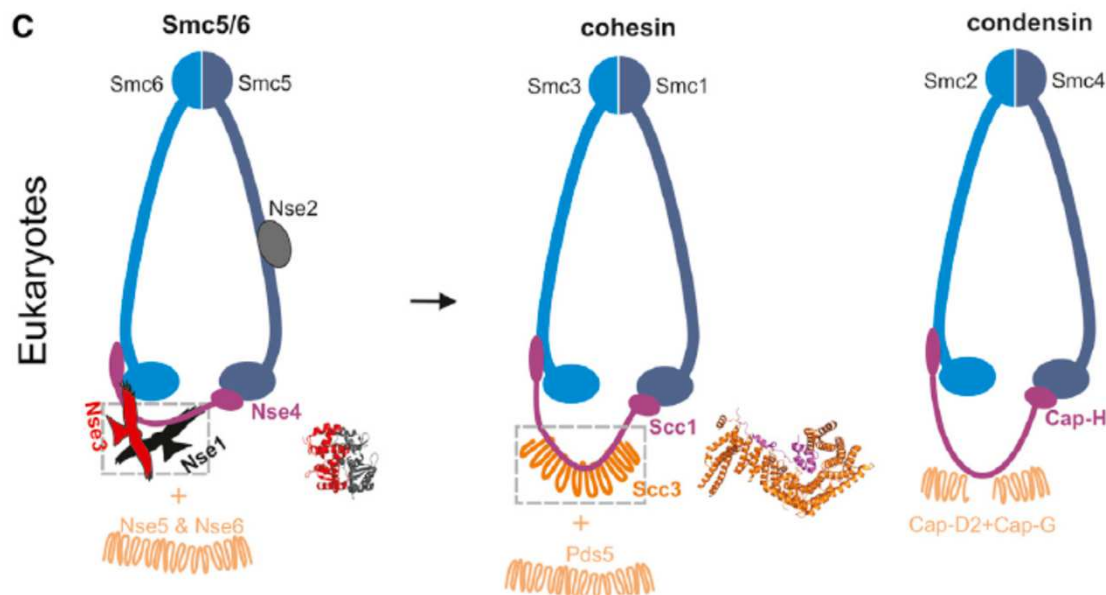
Kohesin je klíčový pro průběh mitosy – otevření kruhu v anafázi umožňuje segregaci



Marco et al, Cell, 2013

SMC5/6 komplex – PhD studium

- základní výzkum – architektura a funkce SMC5/6 komplexu
- biochemické, proteomické, genetické, molekulárně biologické přístupy
- *S. pombe* modelový organismus (i lidské proteiny a tkáňové kultury)
- <http://www.ncbr.muni.cz/SPEC/>
- jpalecek@sci.muni.cz



Jaká je funkce SMC5/6?

Co dělají jednotlivé podjednotky a jak se chová celý komplex (objímá DNA ...)?

Souhrn přednášky

- Chromatin
 - Charakteristika kvasinkového genomu
 - Chromosomy
 - Evoluce (duplikace genomu ...)
 - DNA-opravné mechanismy
 - SMC komplexy a struktura chromatinu
- Závěry