**Cvičení: 12.12. od 8.00**, A7 (2.17)
- pláště, psací a kreslící potřeby

**Test: 19.12. od 9.00**, A2 (2.11) - psací potřeby (odpovědi A,B,C,D)

**Zkouška**/prezentace:

**19.12. po testu**, A2 (2.11) – max 6 studentů

Další 2 termíny v lednu … A2 (2.11) – po 6-ti studentech

Kvasinky … oblast vaší DP (ne samotná DP)
- úvod do problematiky
- výsledky z článku (ne starší než 5 let)
- závěry, reference

přednáška 15 + 5 minut

# Osnova (poslední) přednášky

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

# Základní prvky kvasinkového genomu

## *Saccharomyces cerevisiae* vs *S.pombe*

- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosomů (diploidní 2n, pivní kvasinky jsou polyploidní) vs 13Mbp/3 chromosomy

- délka nejdelšího chromosomu XII se u různých *S.c.* - dle počtu (až 200) kopii 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 chromosmy jsou více kondensované

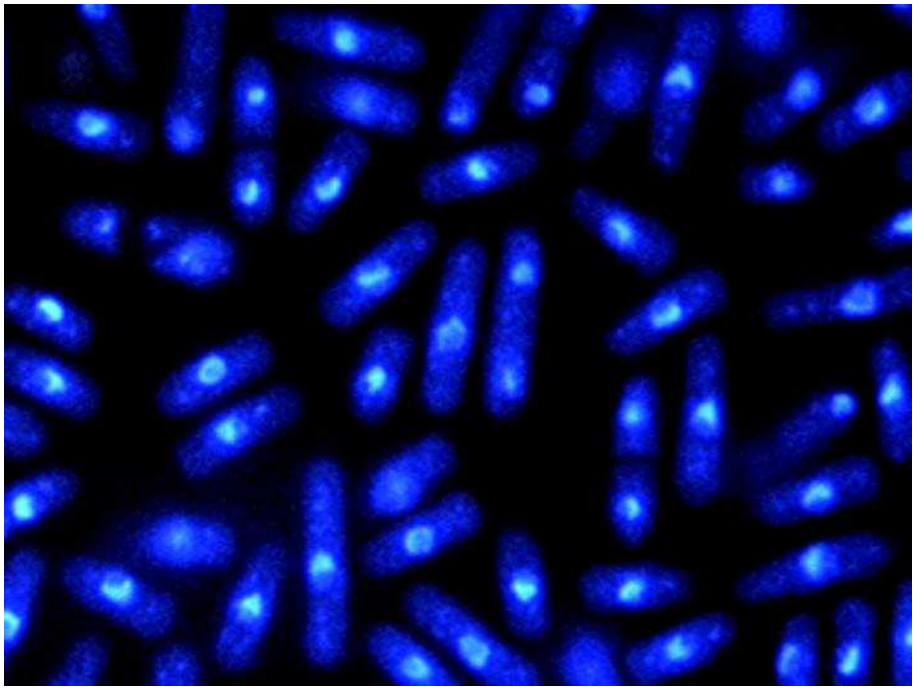
# Pozorování DNA/chromosomů u kvasinek

- Chromosomy jsou u kvasinek malé a těžko pozorovatelné v mikroskopu – barvení DNA na fixovaných preparátech pomocí DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol)
- Použití fůzních 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

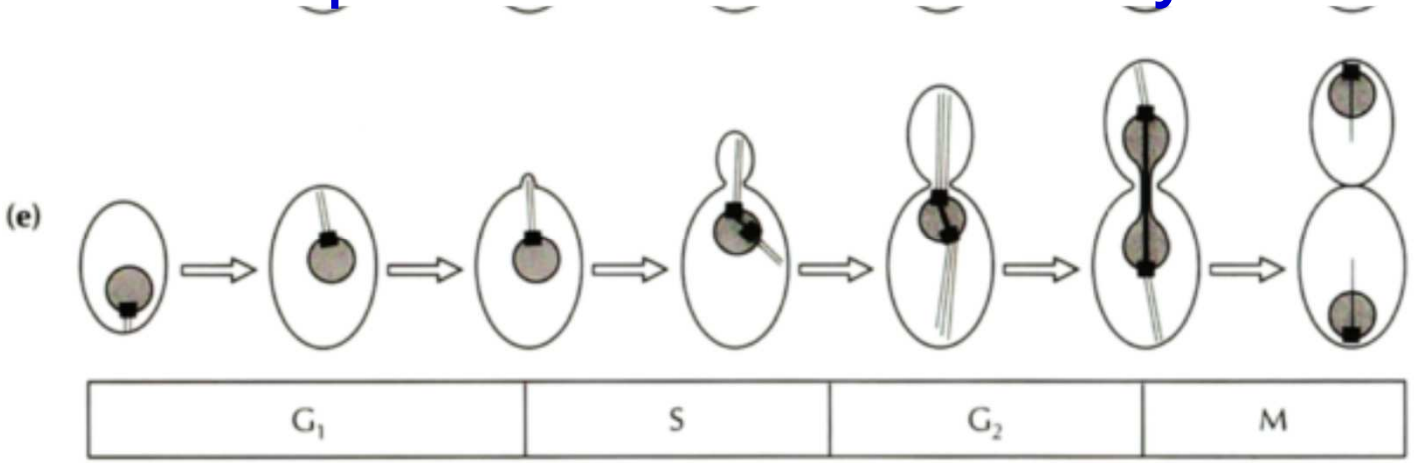
*Saccharomyces cerevisiae*

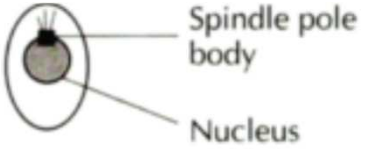
*Schizosaccharomyces pombe* →

Pozadí = mtDNA



# DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*

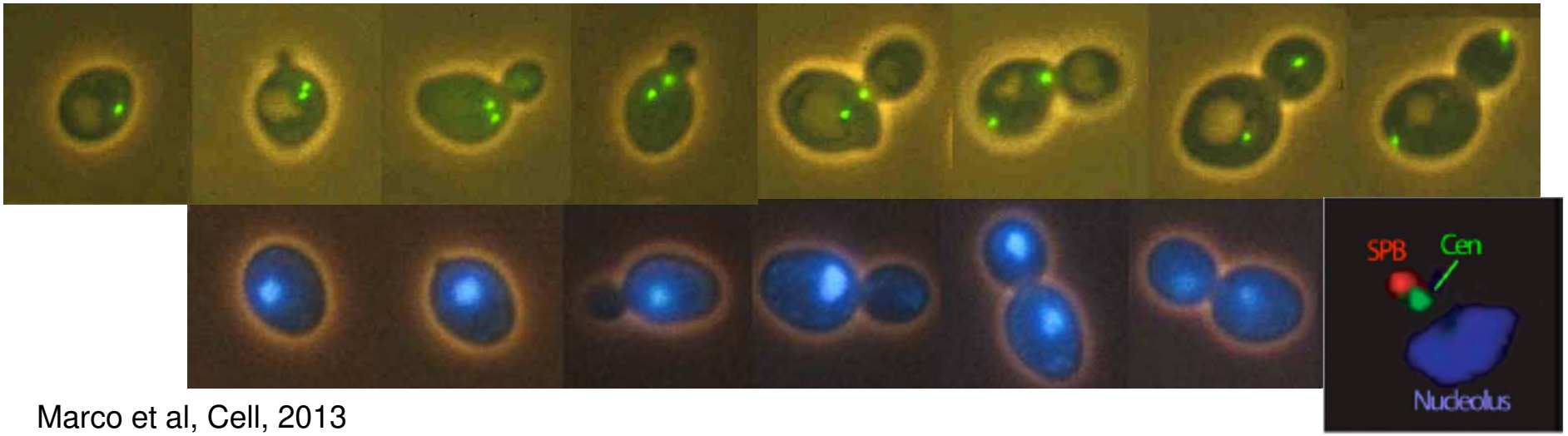



MT-cytoplasmatické -jaderné

- 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

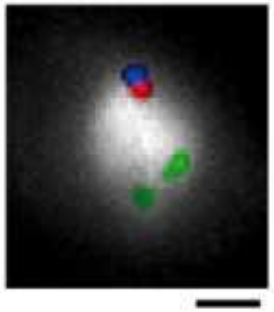
SPB-GFP barvení




Marco et al, Cell, 2013

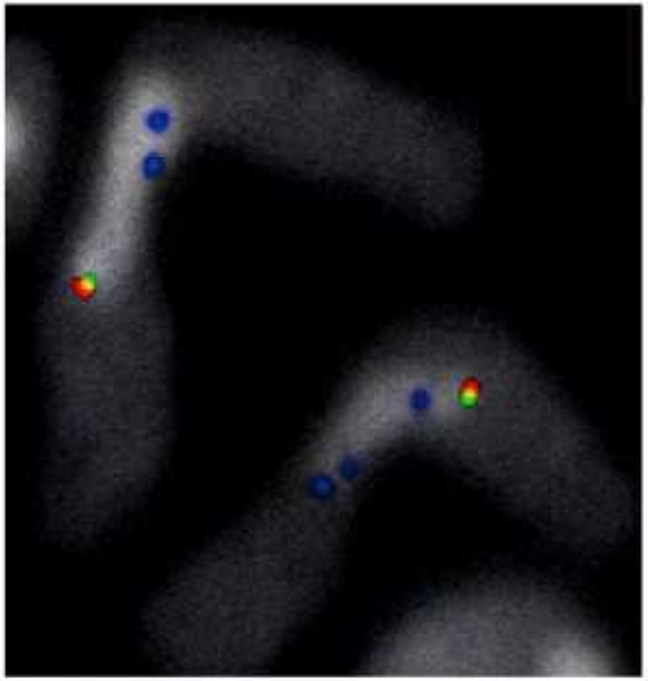
# Organizace chromosomů

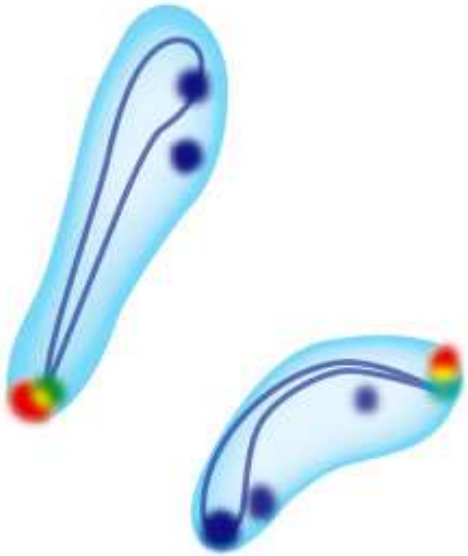
Mitotic interphase



FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

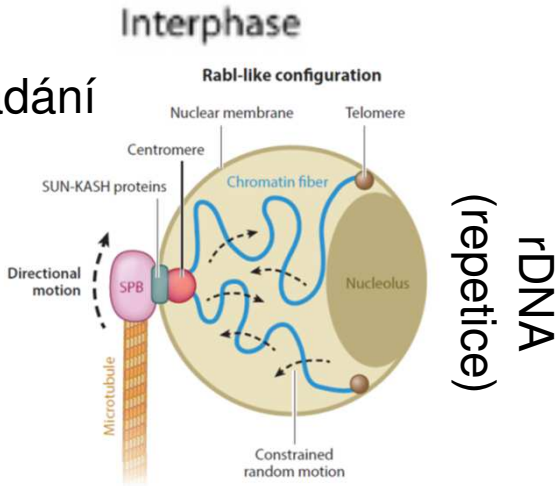
Meiotic prophase





SPB

RABL uspořádání



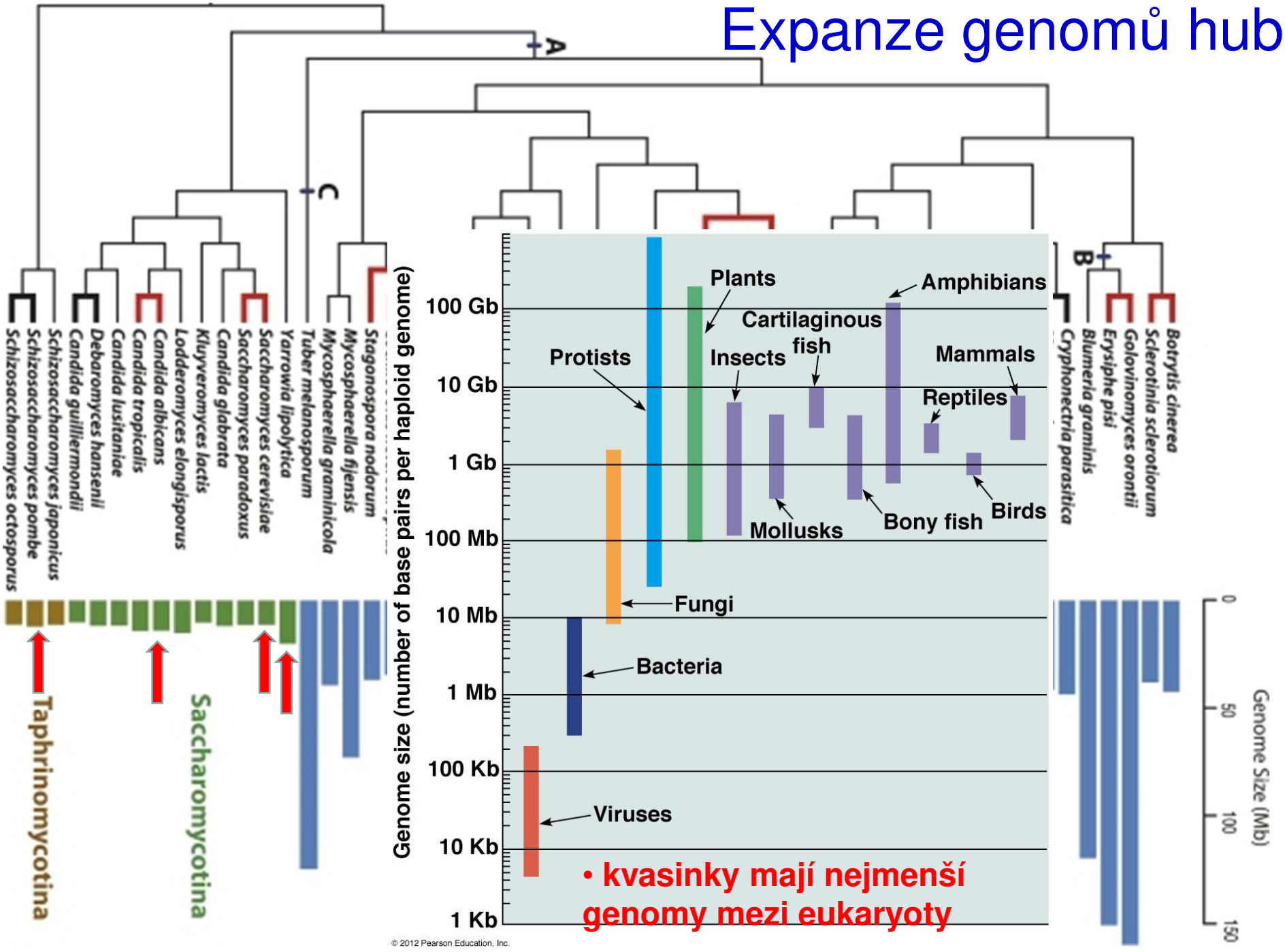

rDNA (repetice)

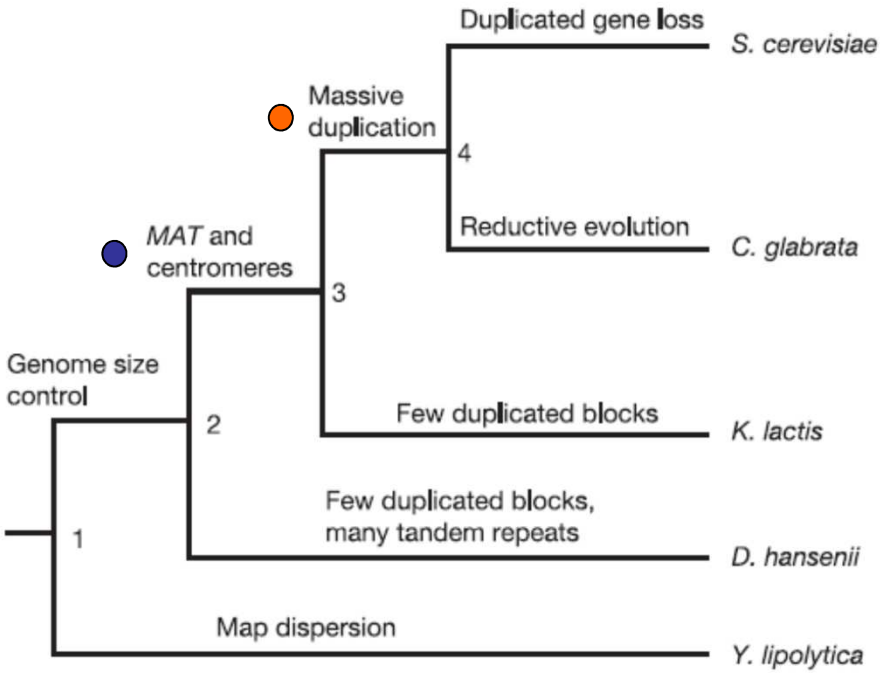
v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

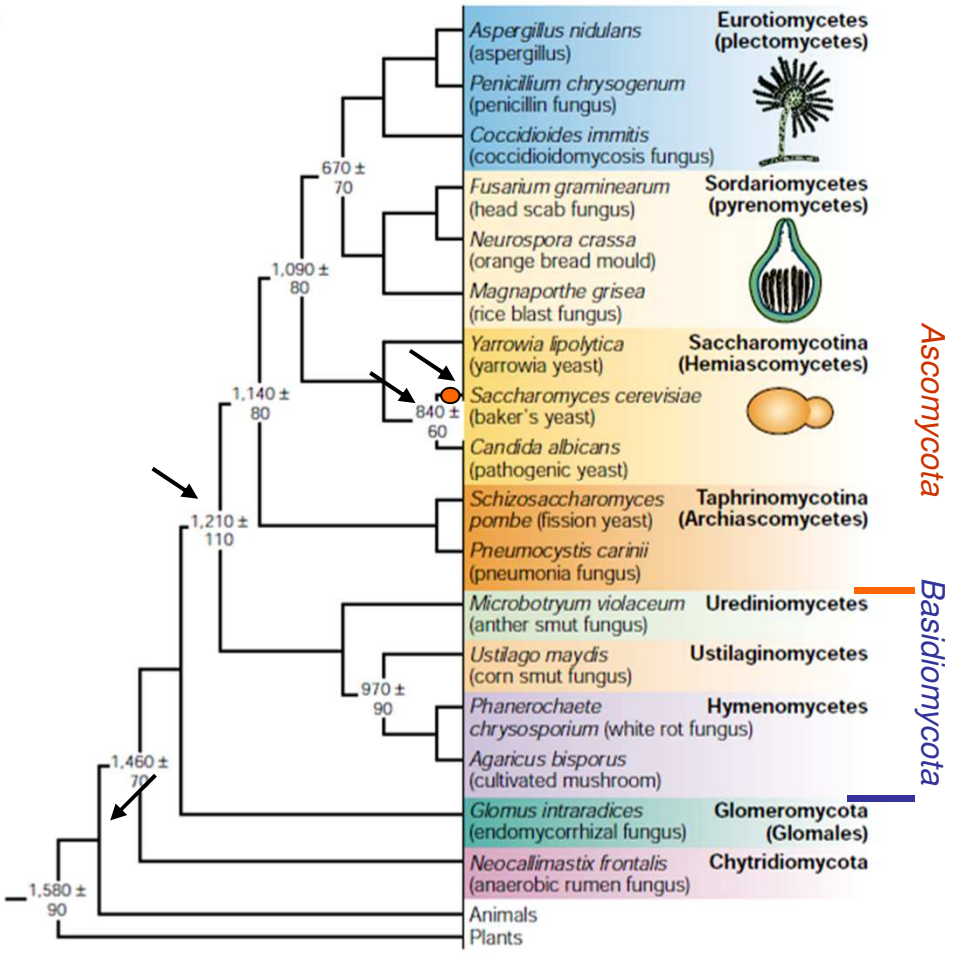
v meiotickém jádře jsou telomery blíž SPB

Tadei a Gasser, Genetics, 2012

# Expanze genomů hub

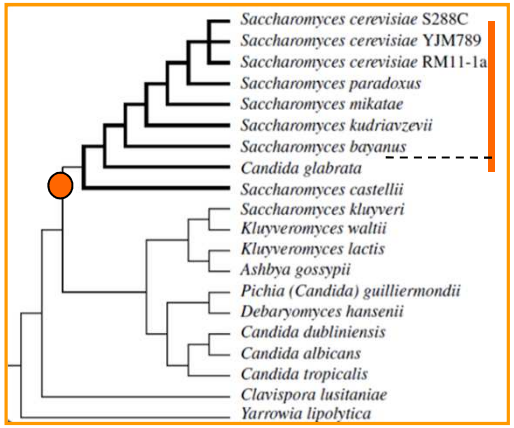




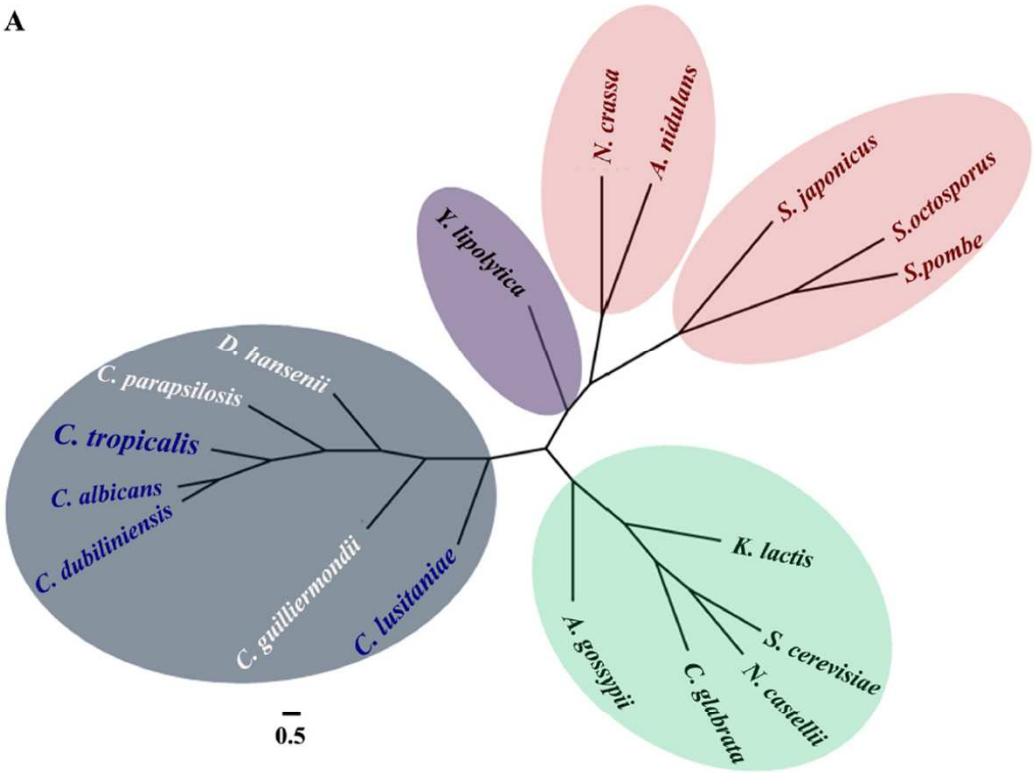

# Evoluce kvasinek

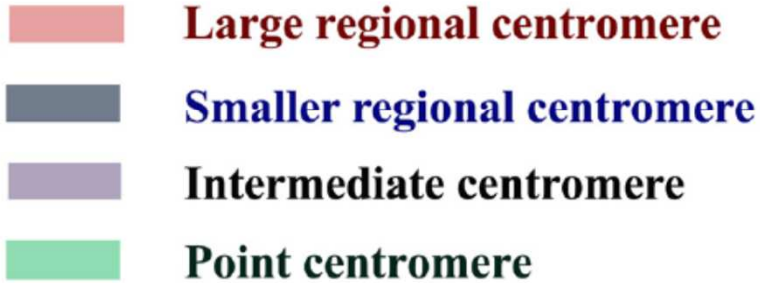
- 1500 Mya: *Metazoa - Fungi*
- 1200 Mya: *Ascomycota – Basidiomycota*.
- 1000 Mya: *S. cerevisiae – Schizosacch. pombe*
- 840 Mya: *S. cerevisiae – C. albicans*
- 170 Mya: *(Pichia, Candida) – Kluyveromyces a*j.
- 150 Mya: WGD



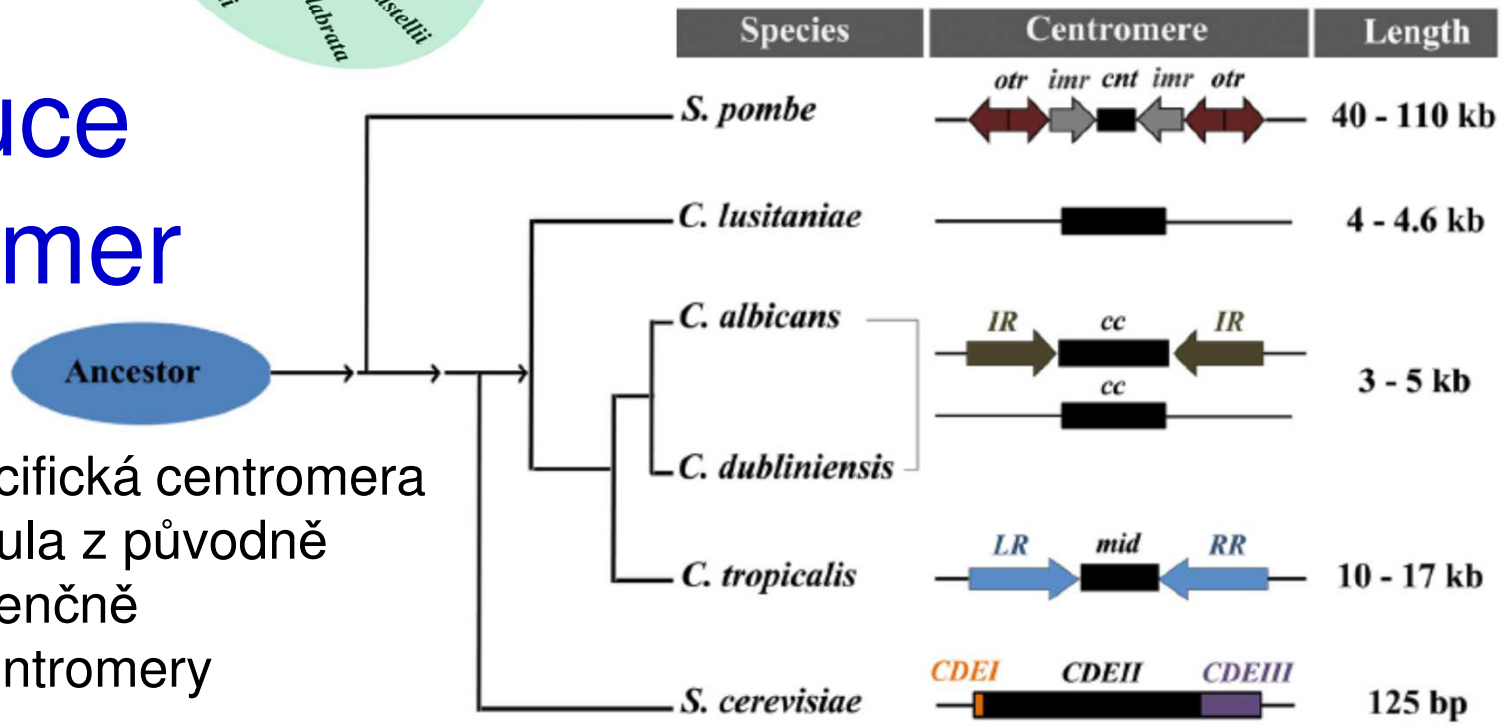

Dujon et al., Nature, 2004

Chatterjee et al, PLoS Genet, 2016



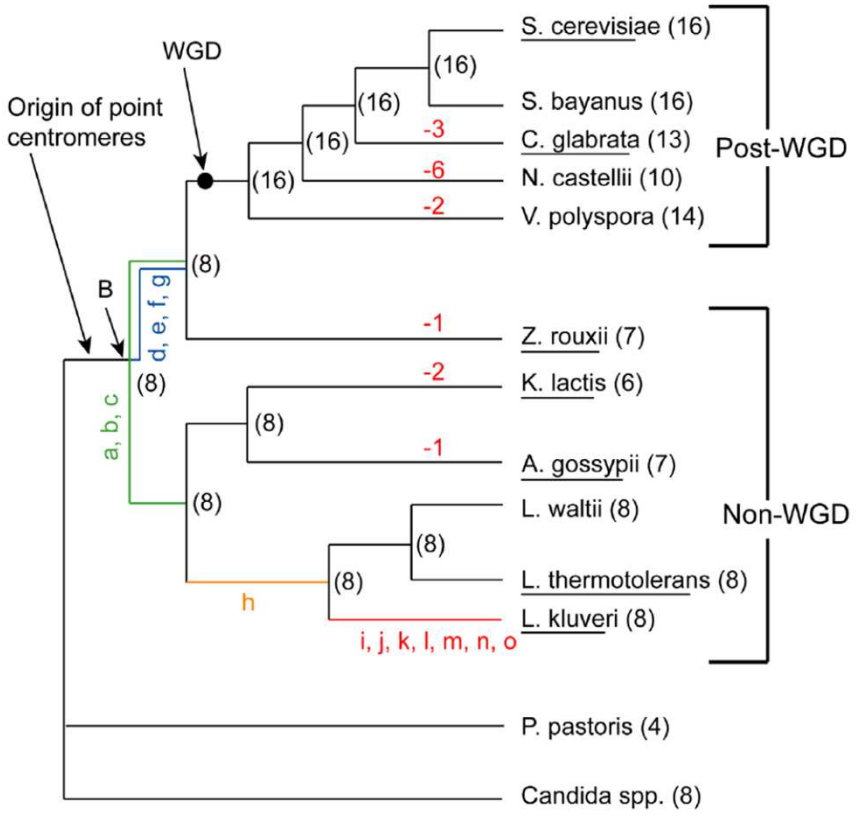

# Evoluce centromer



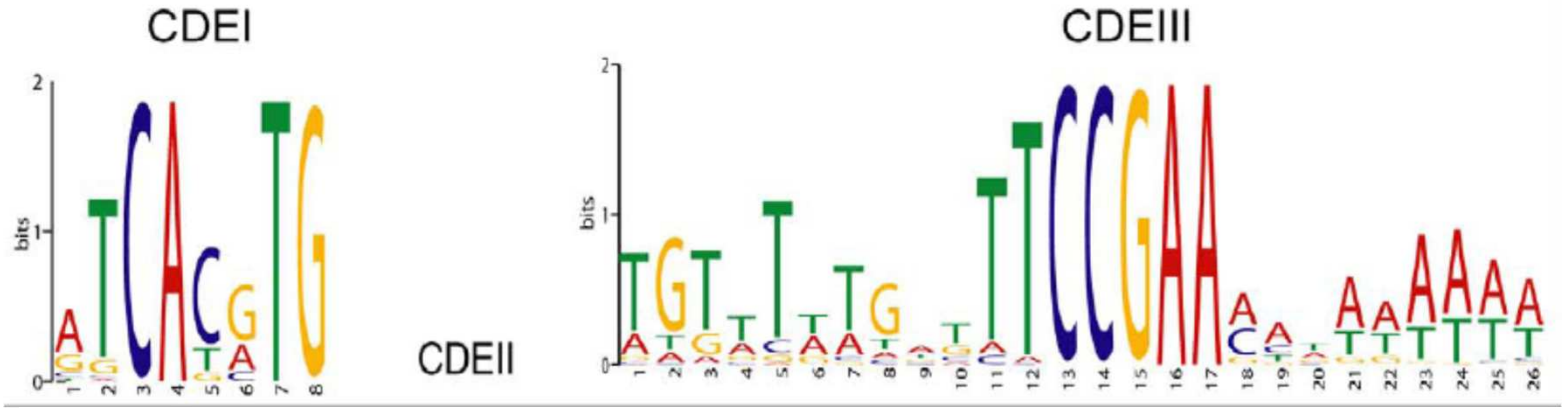

sekvenčně specifická centromera se patrně vyvinula z původně repetitivní/sekvenčně nespecifické centromery

# Centromera *S. cerevisiae*

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

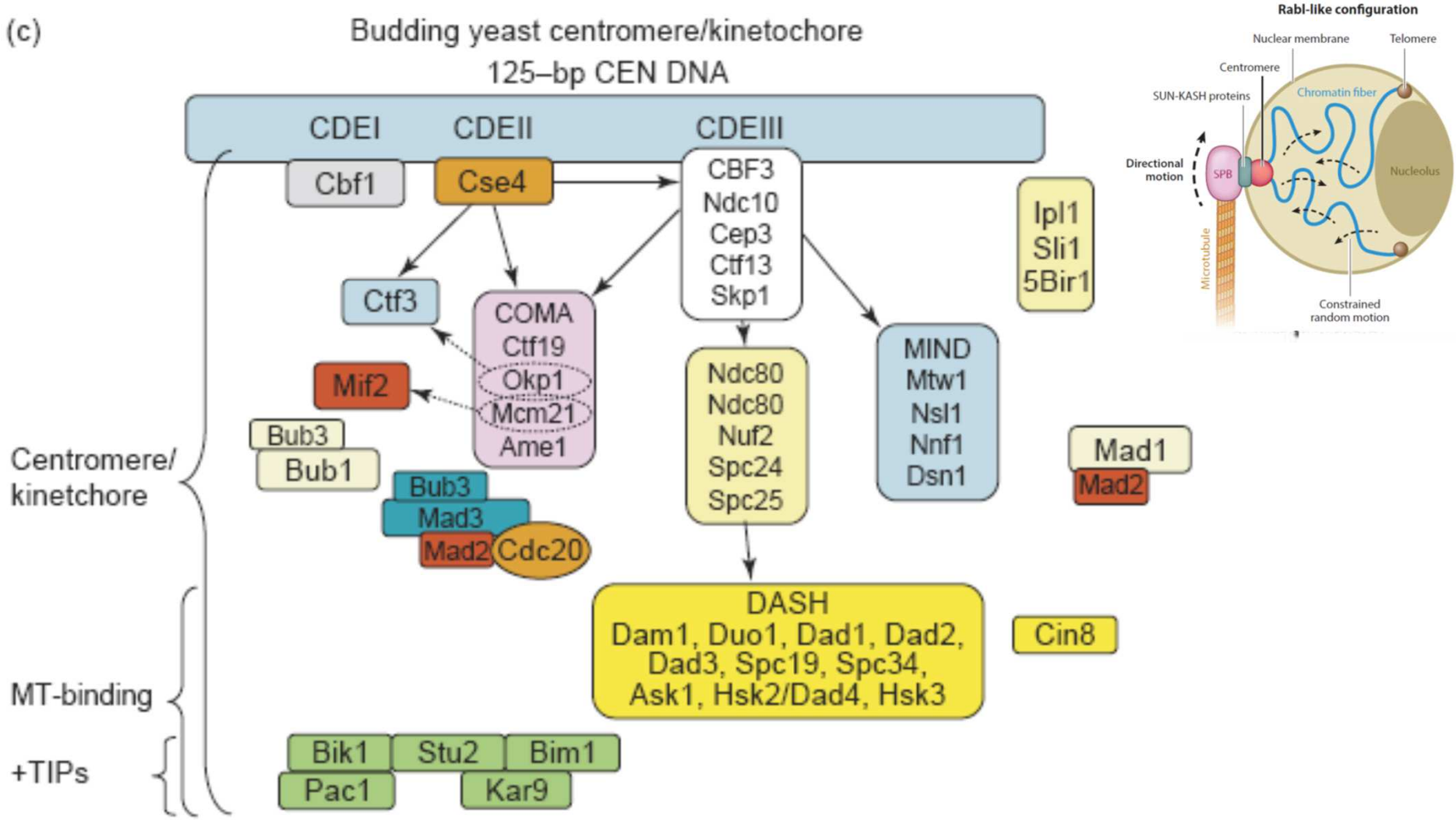



Konsensní sekvence *S.c.* centromer



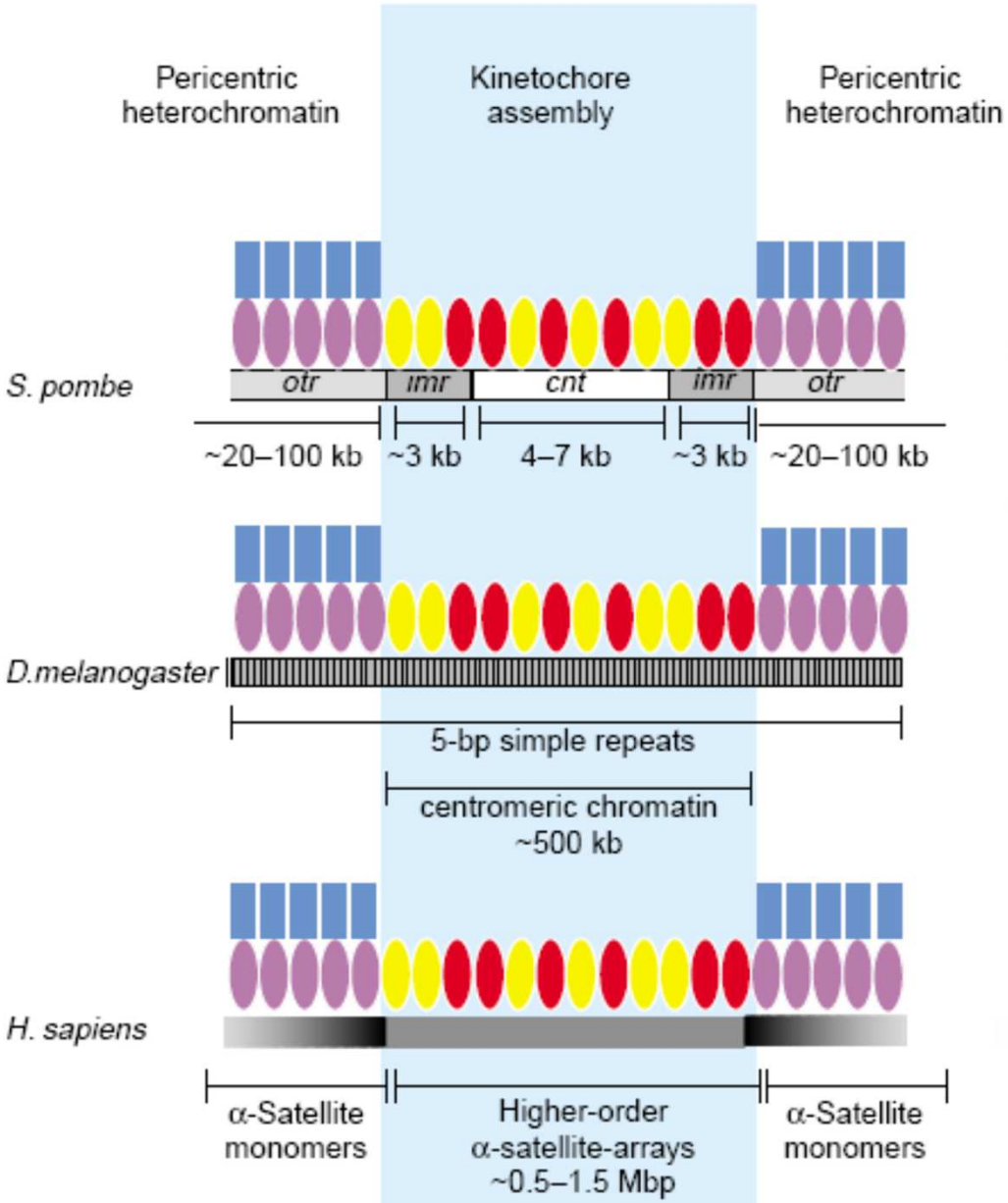

Chan et al., Trends in Cell Biol, 2005

# Centromera *S. cerevisiae*



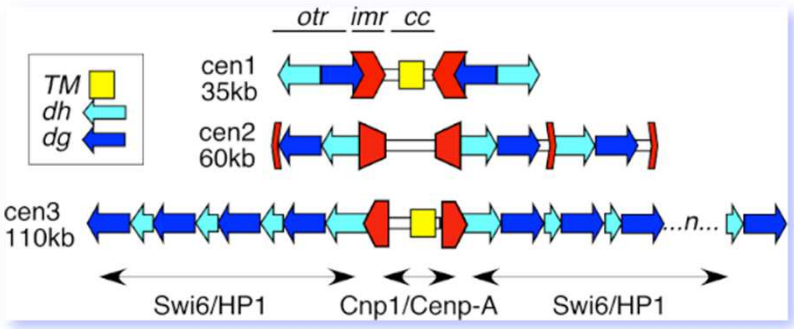

Chan et al., Trends in Cell Biol, 2005

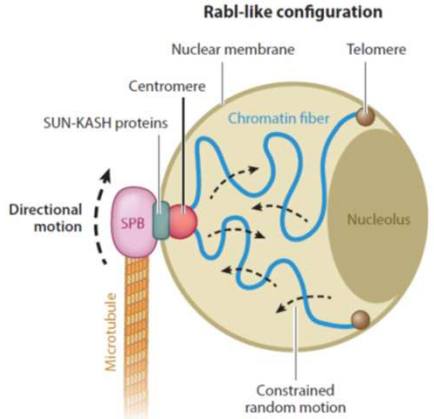
# Eukaryotické centromery




Carroll a Straight, Trends in Cell Biol, 2006

Centromery jsou definovány více strukturou chromatinu než jejich sekvencí

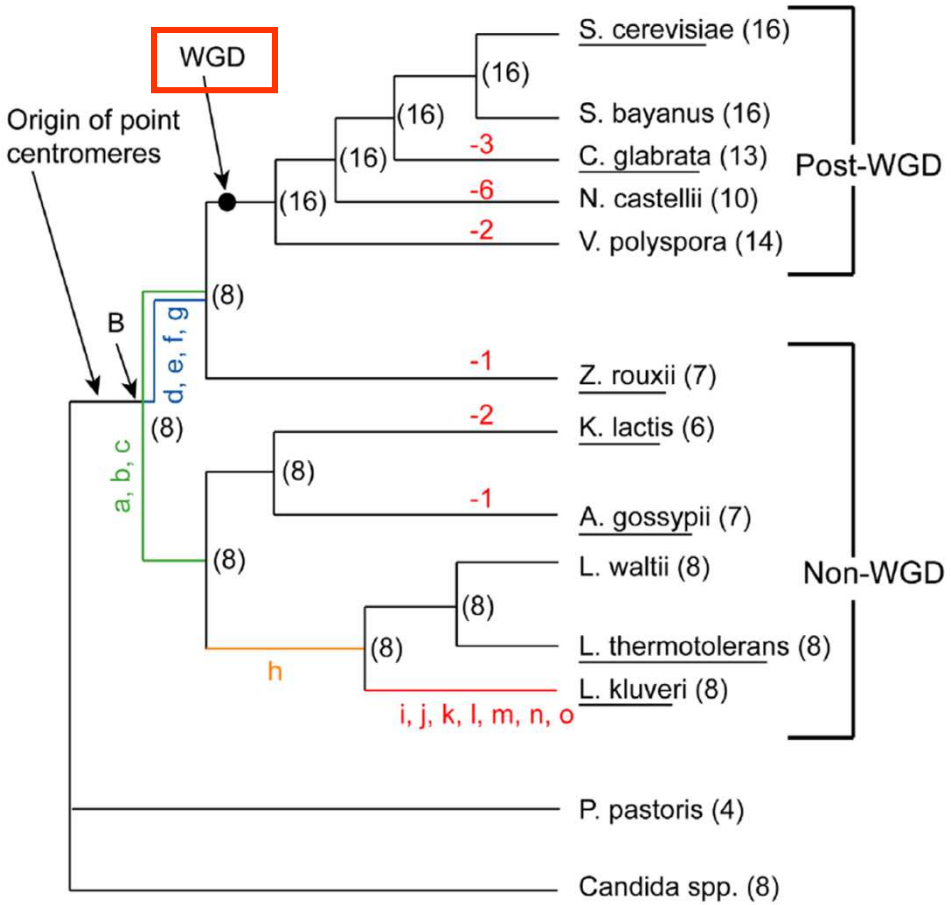


# Prakvasinka a duplikace genomu

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

Evoluce centromer



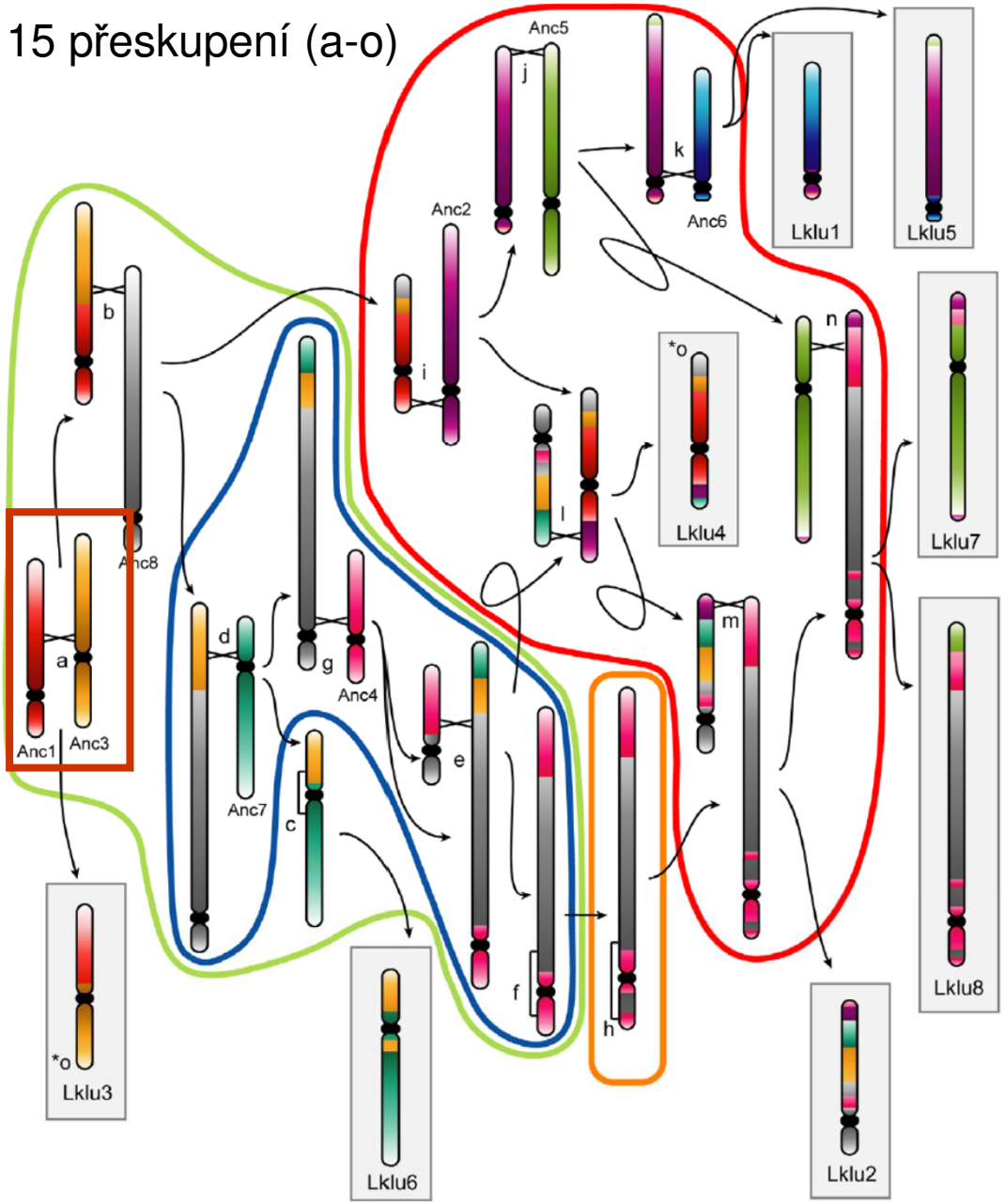

• ancestrální kvasinka prošla celogenomovou duplikací (WGD) 8->16 chromosomů

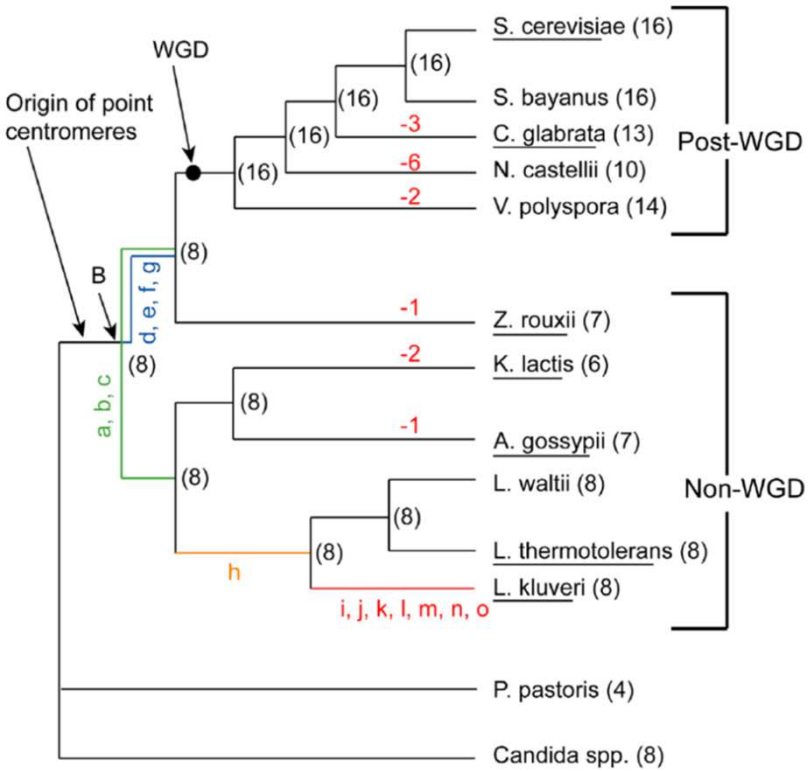
•některé kvasinky chromosom ztratili (např. *Z. rouxii a A. gossypii*)

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

15 přeskupení (a-o)

# Přeskupování chrom. bloků u *L.kluveri*

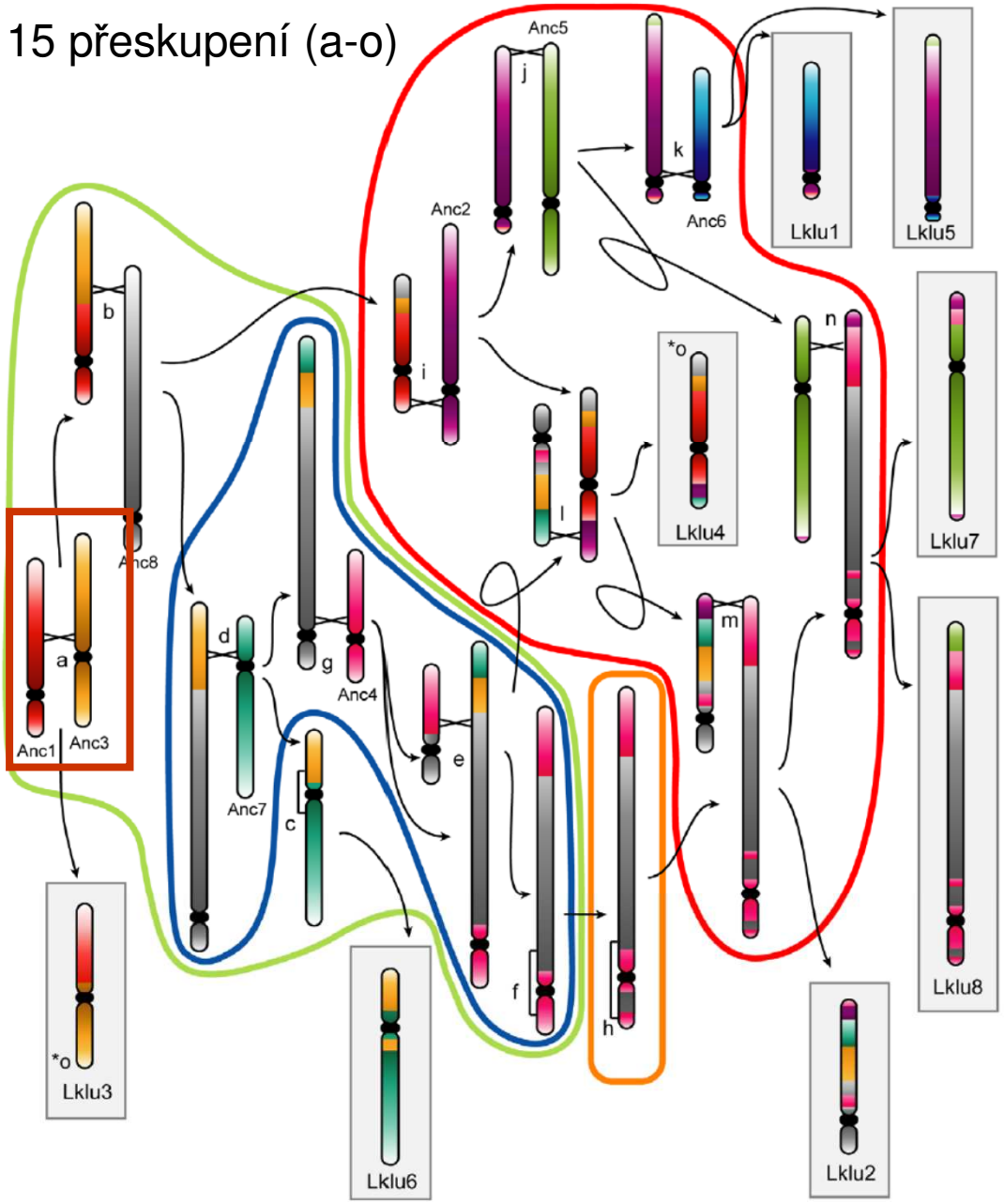



nejblíže anc. genomu je *Lachancea kluveri*
(8 chromosomů, nejméně = 15 přeskupení v genomu

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

15 přeskupení (a-o)




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

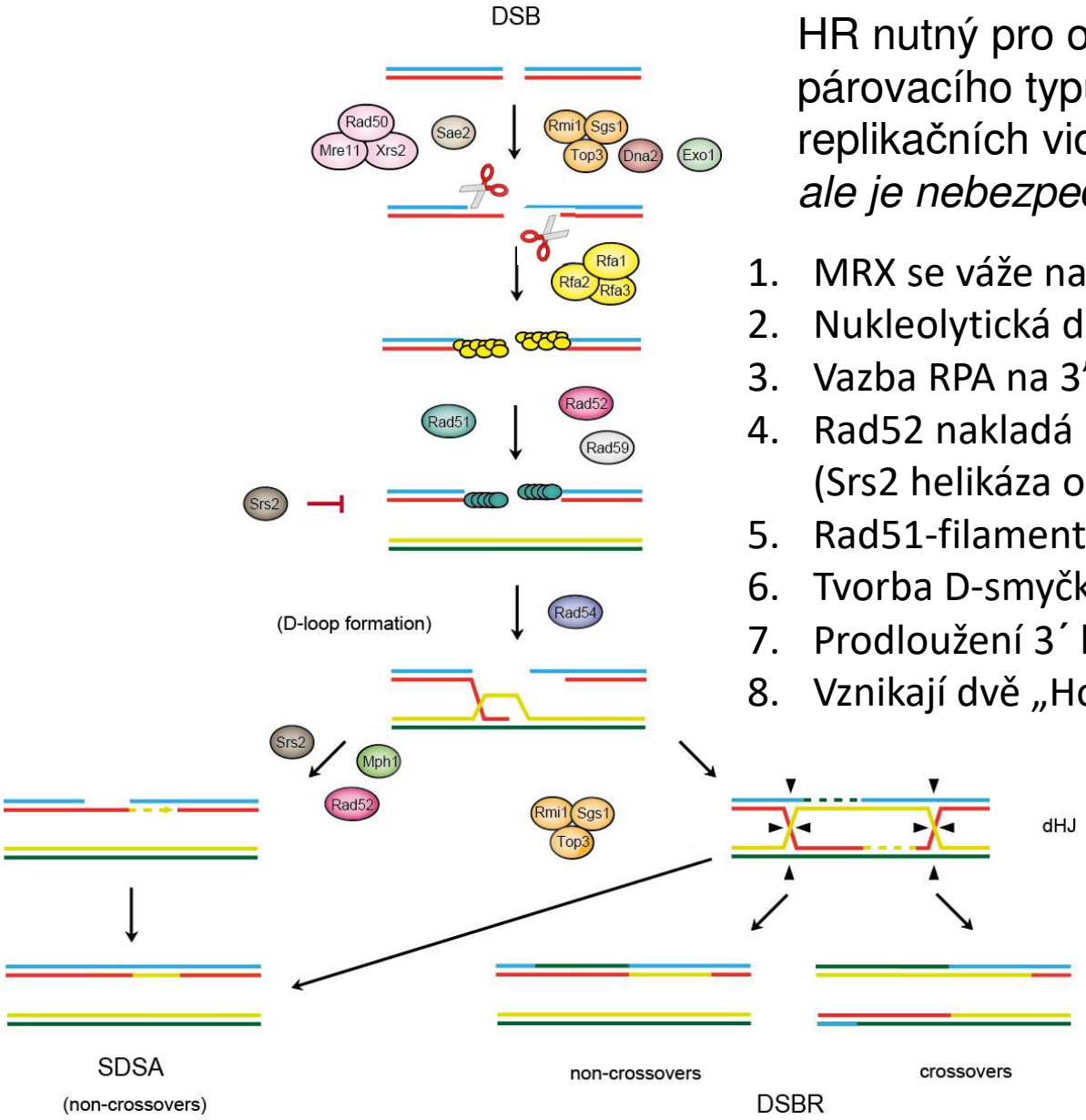
# Přeskupování chrom. bloků u *L.kluveri*

• 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 fůze chromosomů i přeskupovaní => omezené přeskupování)

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*

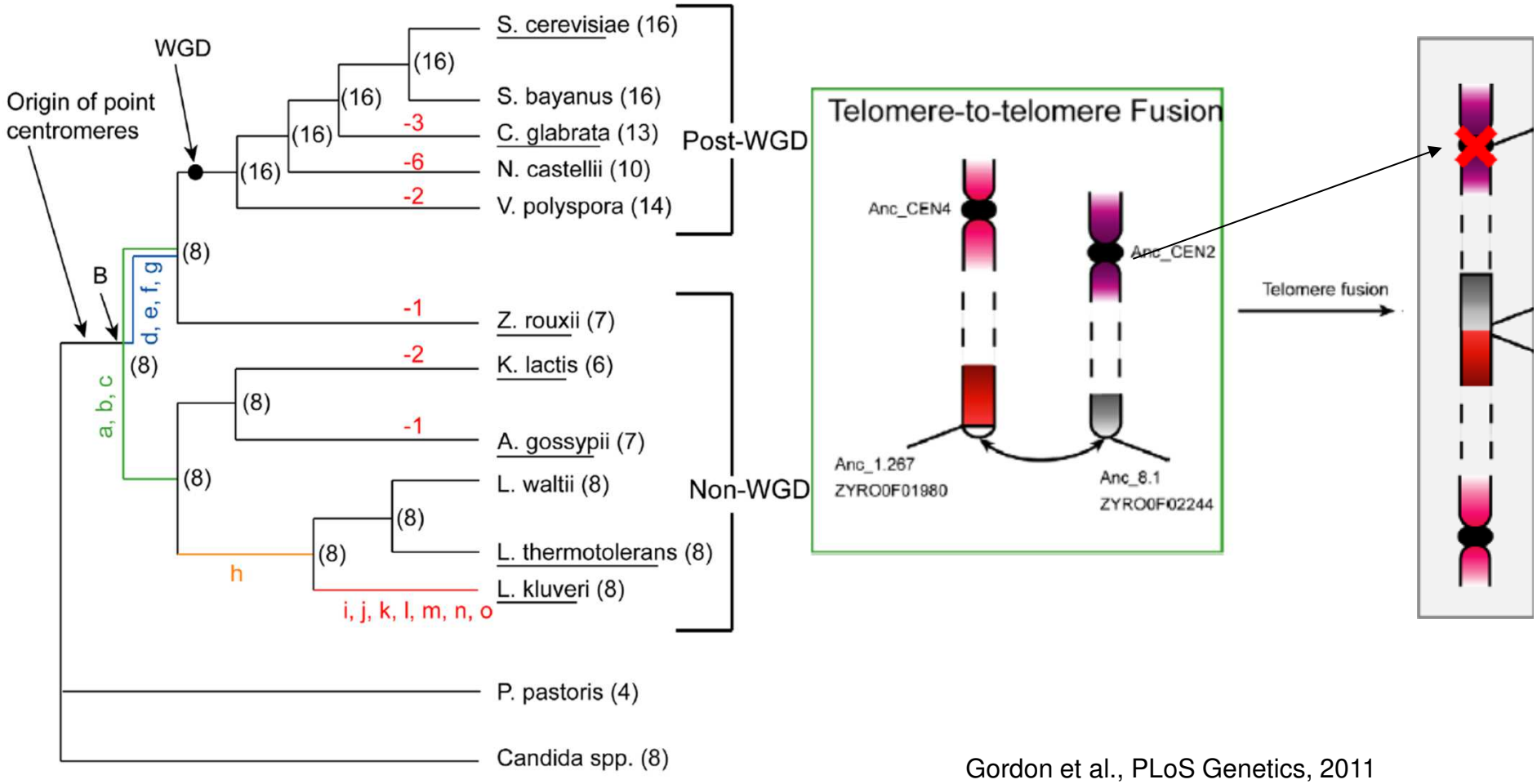
1. MRX se váže na zlomené konce DNA.
2. Nukleolytická degradace 5’ řetězců
3. Vazba RPA na 3’ jednovláknové konce
4. Rad52 nakládá Rad51 rekombinázu na ssDNA (Srs2 helikáza odstraňuje Rad51).
5. Rad51-filament hledá homologní DNA (Rad54).
6. Tvorba D-smyčky
7. Prodloužení 3´ konce filamentu (DNA polymeráza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

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

Upravené z Altmannová *et al.*, *Biomolecules,* 2012

# Redukce chromosomů telomera-telomera fúzemi

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

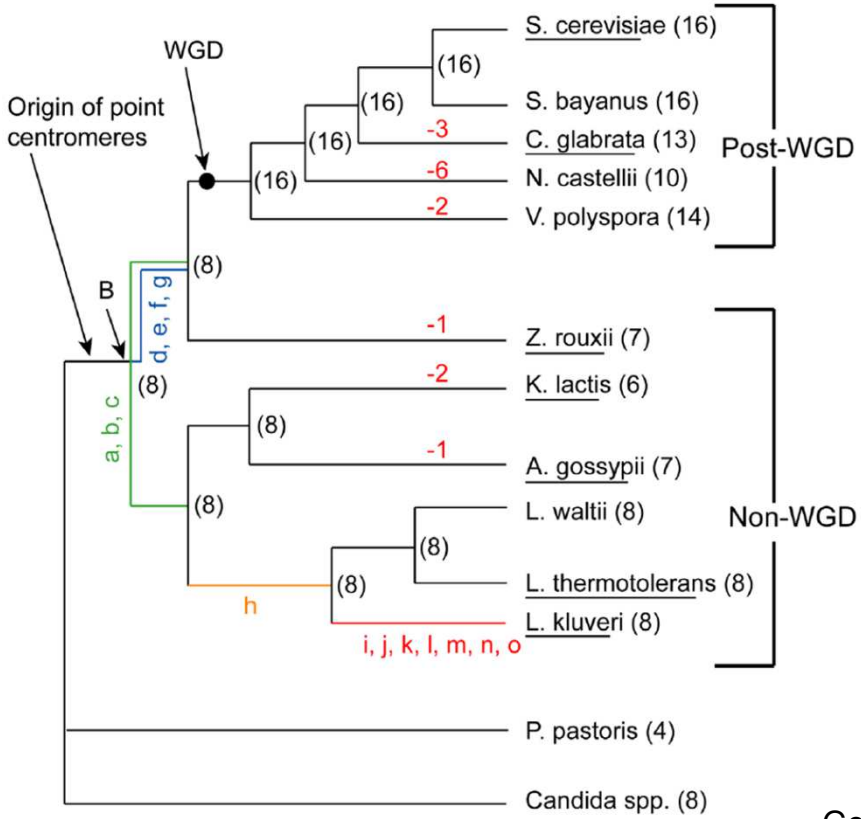


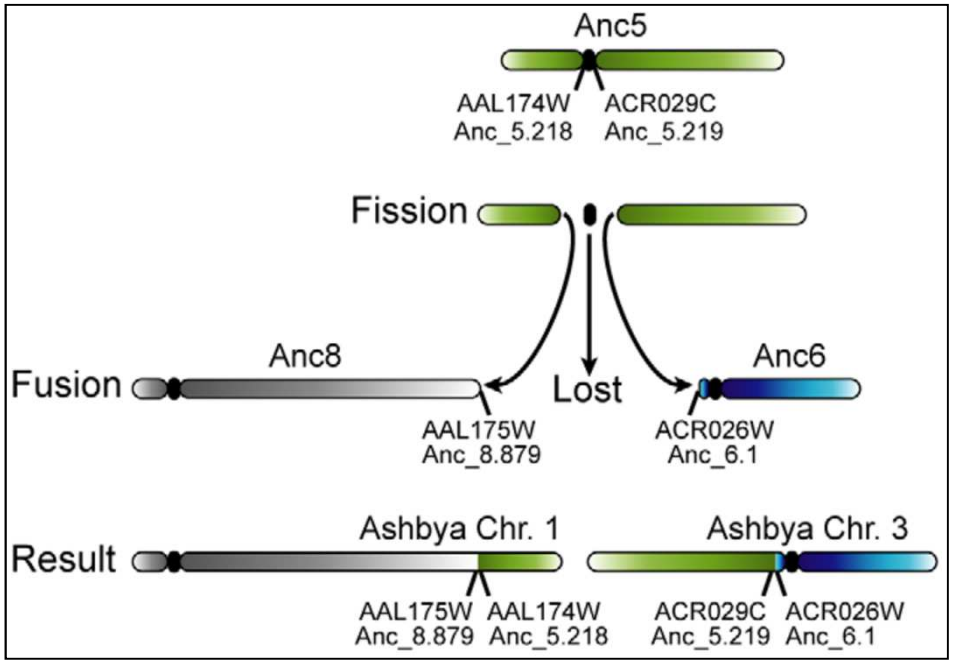

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

# Redukce chromosomů fúzemi

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

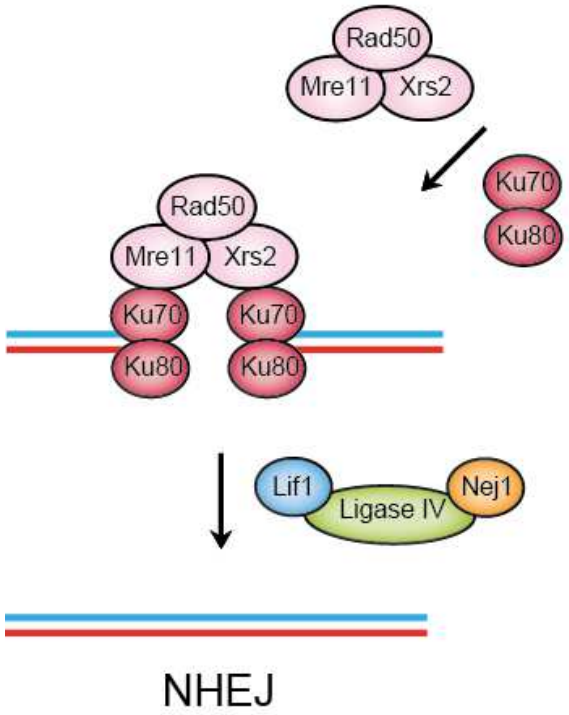



Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

# Nehomologické spojování konců

Non-homologous end joining (NHEJ)



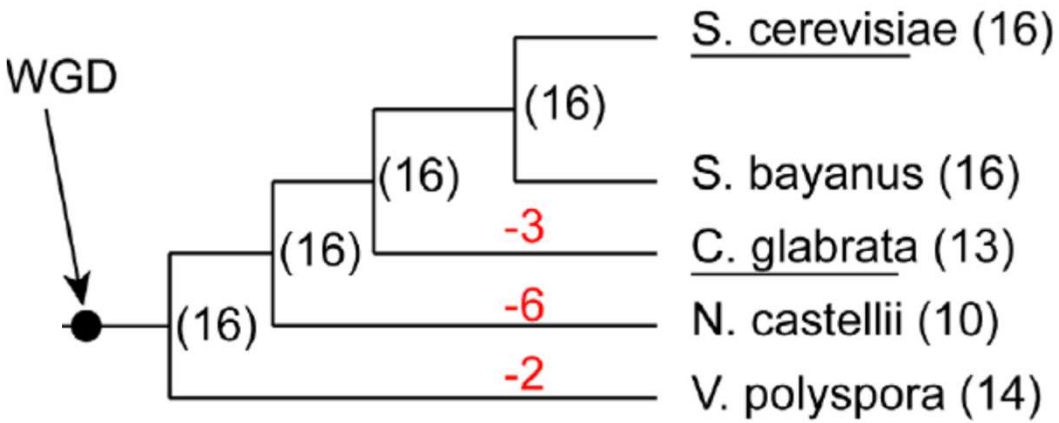

1. Vazba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) komplexu, Ku heterodimeru (Yku70-Yku80) na zlomené konce DNA
2. Vazba DNA ligázy IV (**Dnl4**) a jejích pomocných proteinů Lif1 a Nej1.
3. Hledání komplementarity mezi převisy dvou konců DNA.
4. Úprava konců - syntéza DNA (Pol4 DNA polymeráza)
5. Religace konců

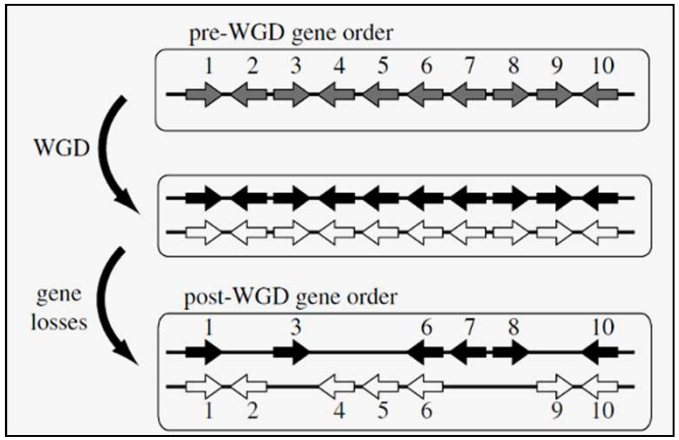
při opravě nekompatibilních konců většinou dochází k delecím nebo inzercím – HR je lepší, ale je potřeba homologní sekvence – NHEJ v G1 zatímco HR v G2/M – dobře rostoucí kultura kvasinek má významnou frakci buněk v G2/M (proto je v kvasinkách možná integrace homologních sekvencí – genetika – použít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

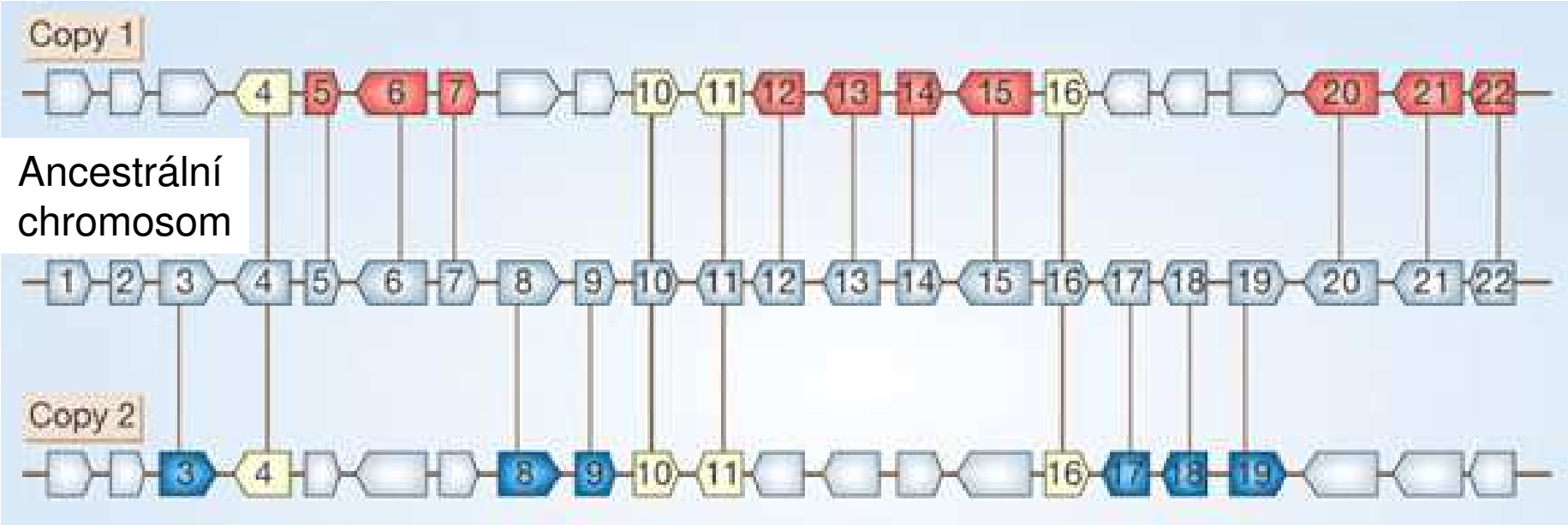
Upravené z Altmannová *et al*., *Biomolecules,* 2012

# Celogenomová duplikace – *Saccharomycotina*

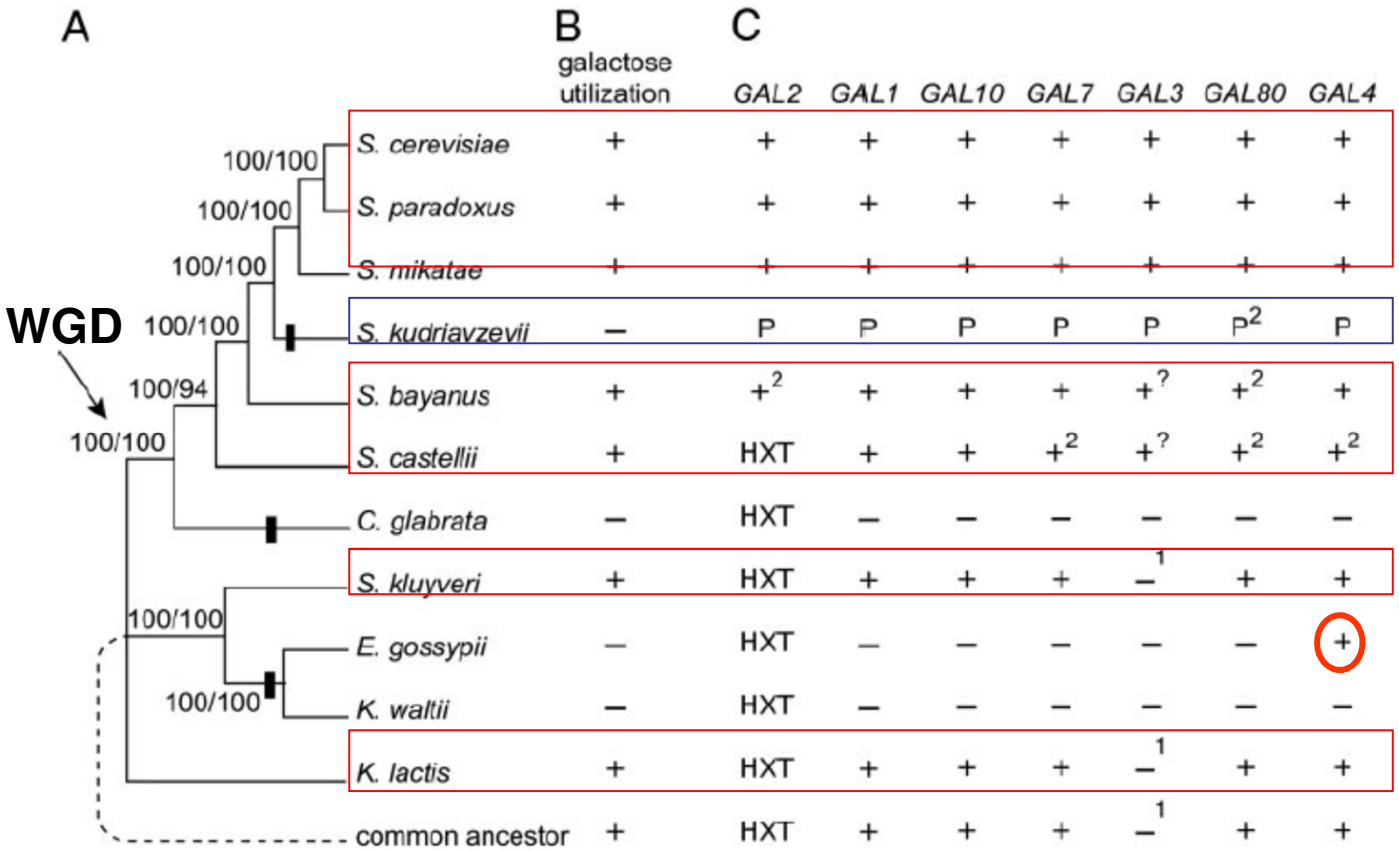
cca 30% genomu *S.c.* vzniklo duplikacemi => cca 2000 genů duplikováno nebo došlo k celogenomové duplikací (WGD) => a poté došlo k přeskupování a redukci segmentů – 30% genomu u *S.c.* je pozůstatkem celogenomové duplikace (nikoli duplikace segmentů či genů)



# Evoluce metabolismu galaktózy – ztráty genů



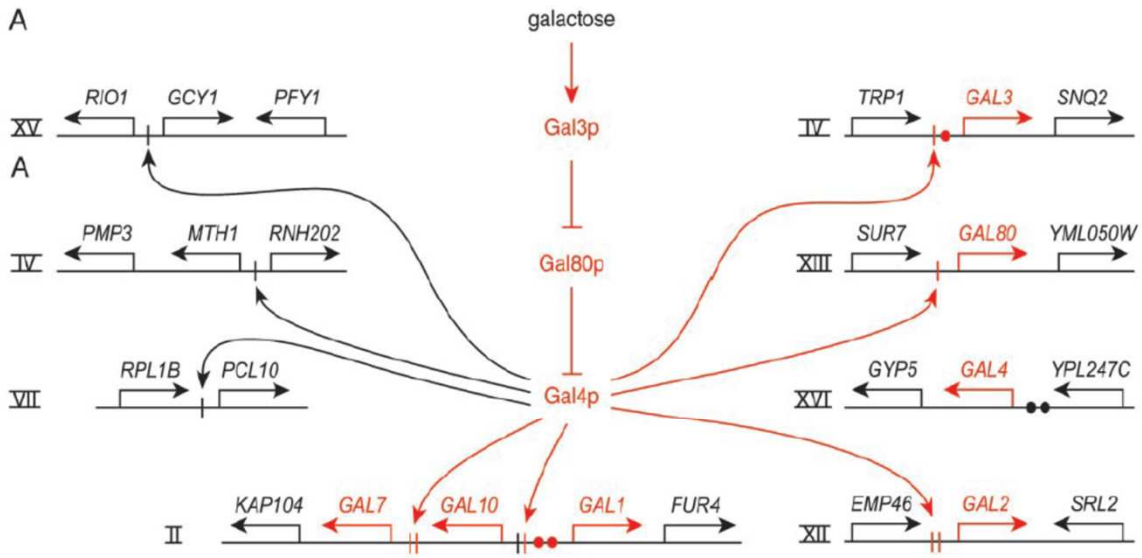

blízký - pouze degenerace = pseudogeny (STOP …)

vzdálené - částečné nebo úplné delece genů a promotorů

Hittinger et al., PNAS, 2004

- různé kvasinky využívají různe 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) |

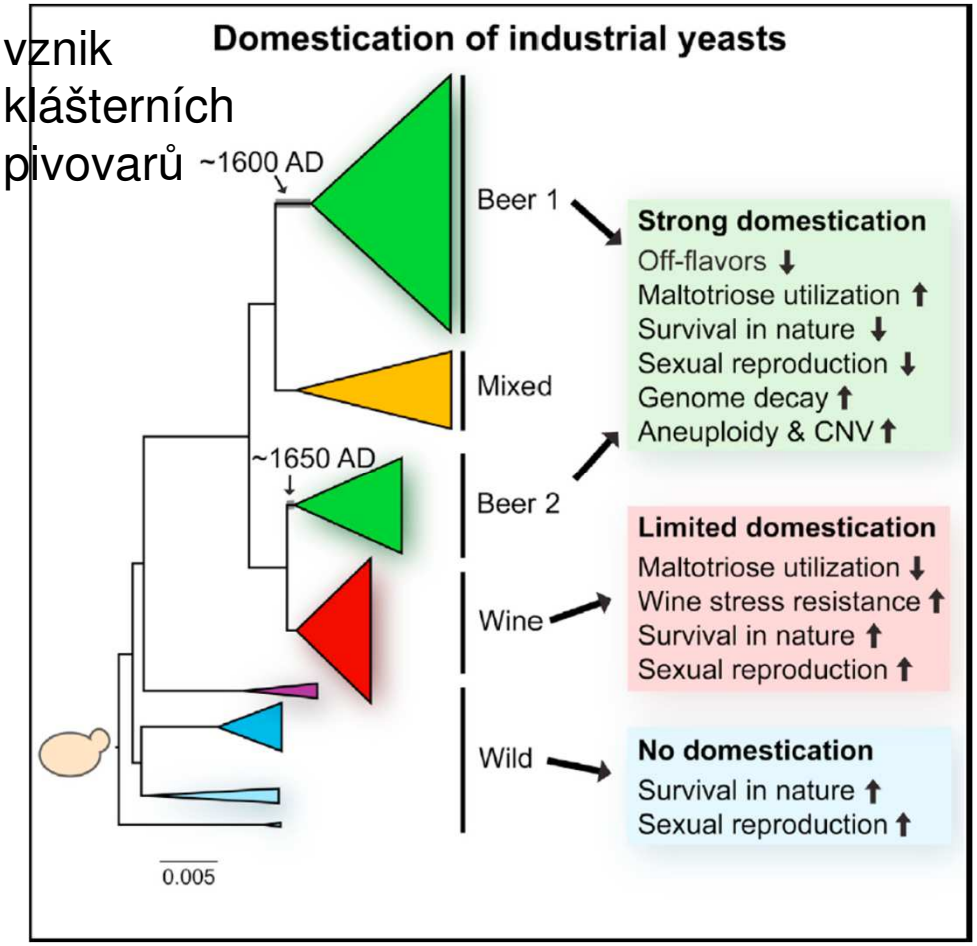
***GAL4*** gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS *GAL1, GAL7, GAL10 …*

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

# amplifikace genů

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

vznik klášterních pivovarů



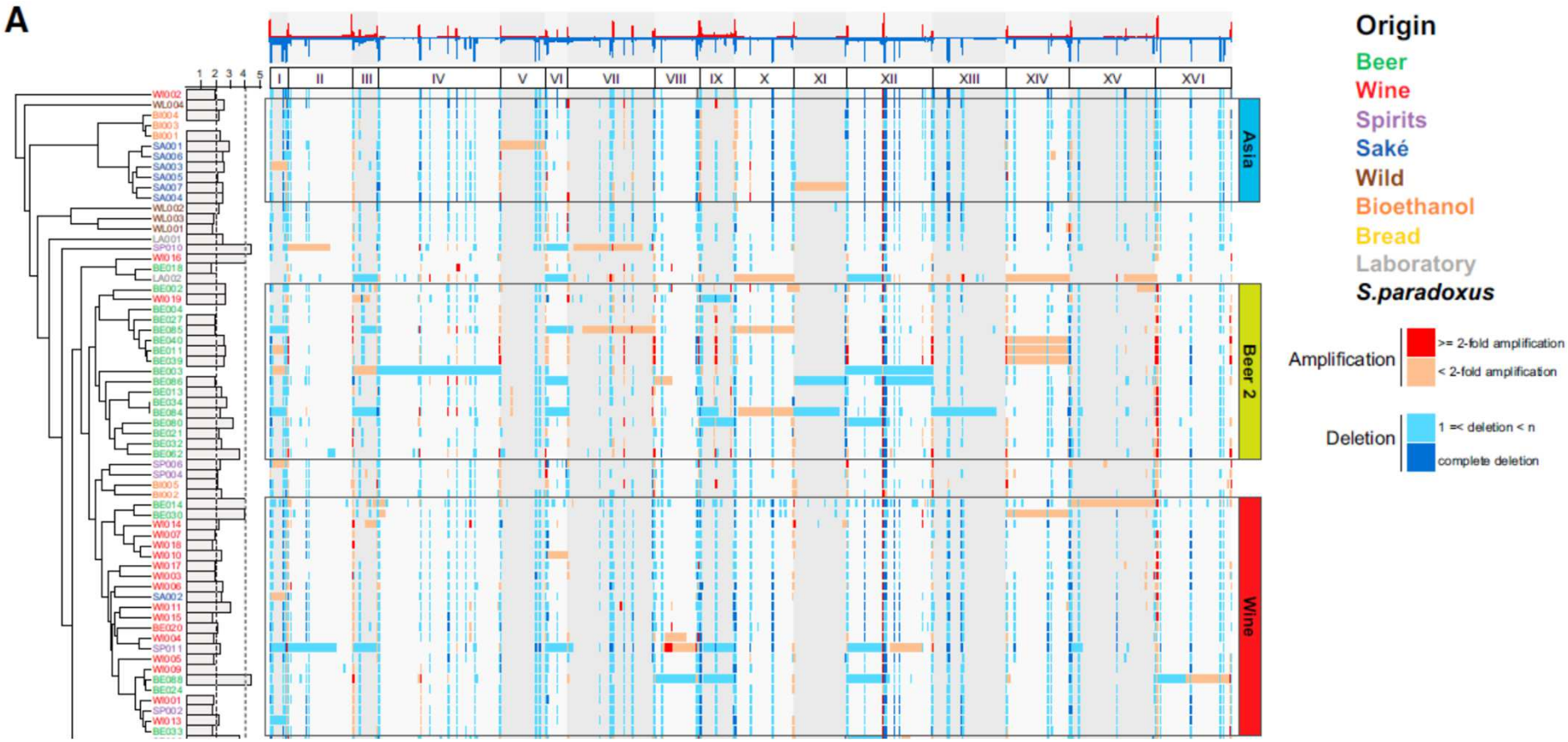

„technologie“ piva ~3000 BC

Gallone et al, Cell, 2016

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

mutace a duplikace v MAL genech – zlepšení schopnosti utilizace maltosy

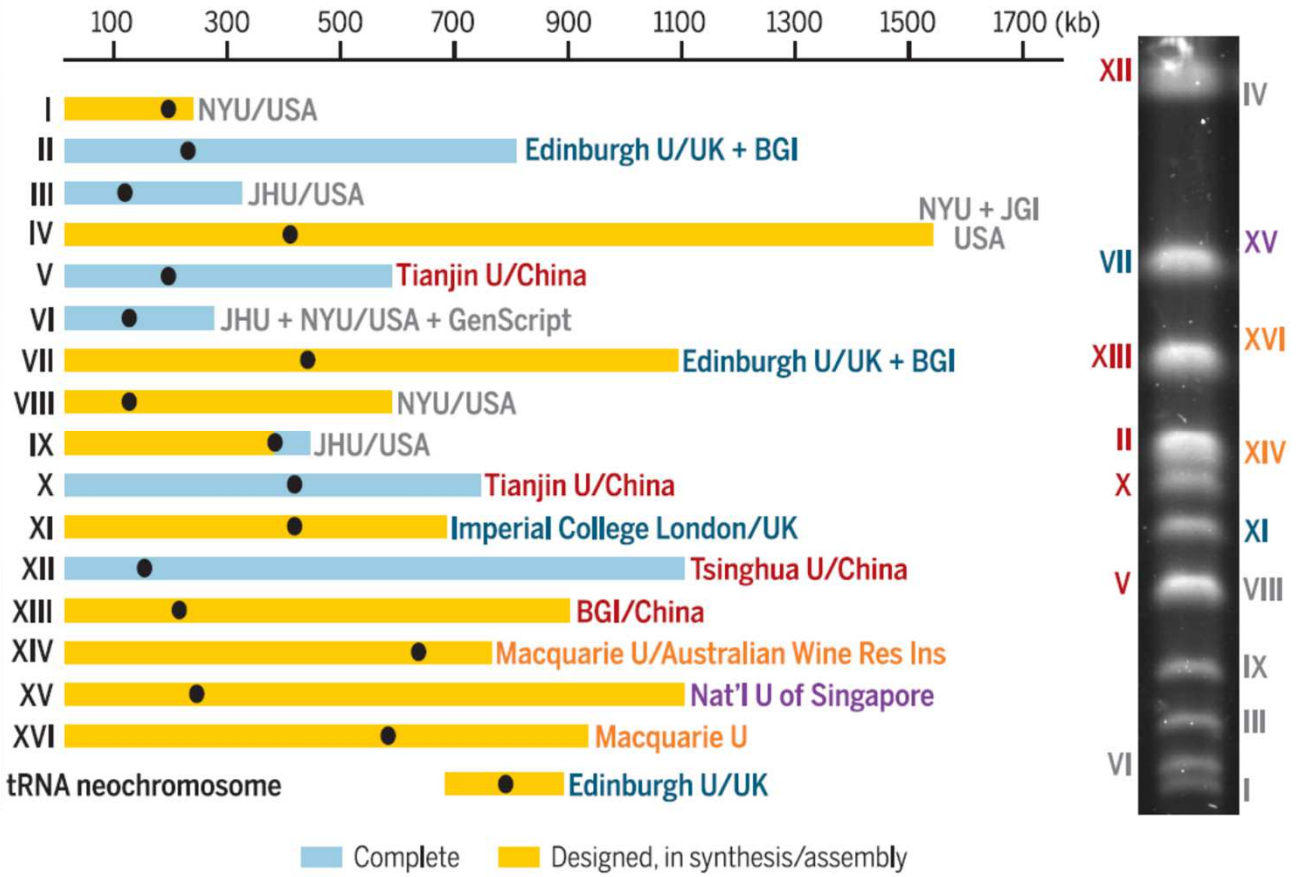
- nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nepříjemné aroma piva) …




nejvíce amplifikací v MAL genech (IMA2, IMA3, MAL31, MAL33, MAL32) u pivních 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 pivních kvasinek je polyploidních – stres …

Gallone et al, Cell, 2016

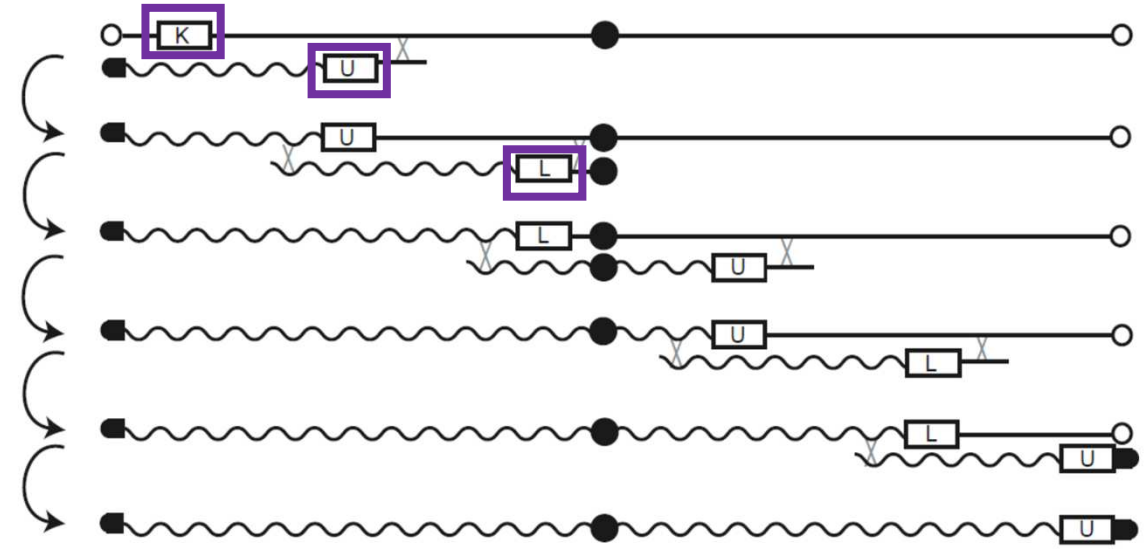



snaha vytvořit „syntetický“ eukaryontní organismus

*Konsorcium (jako EUROFUN … projekty)*

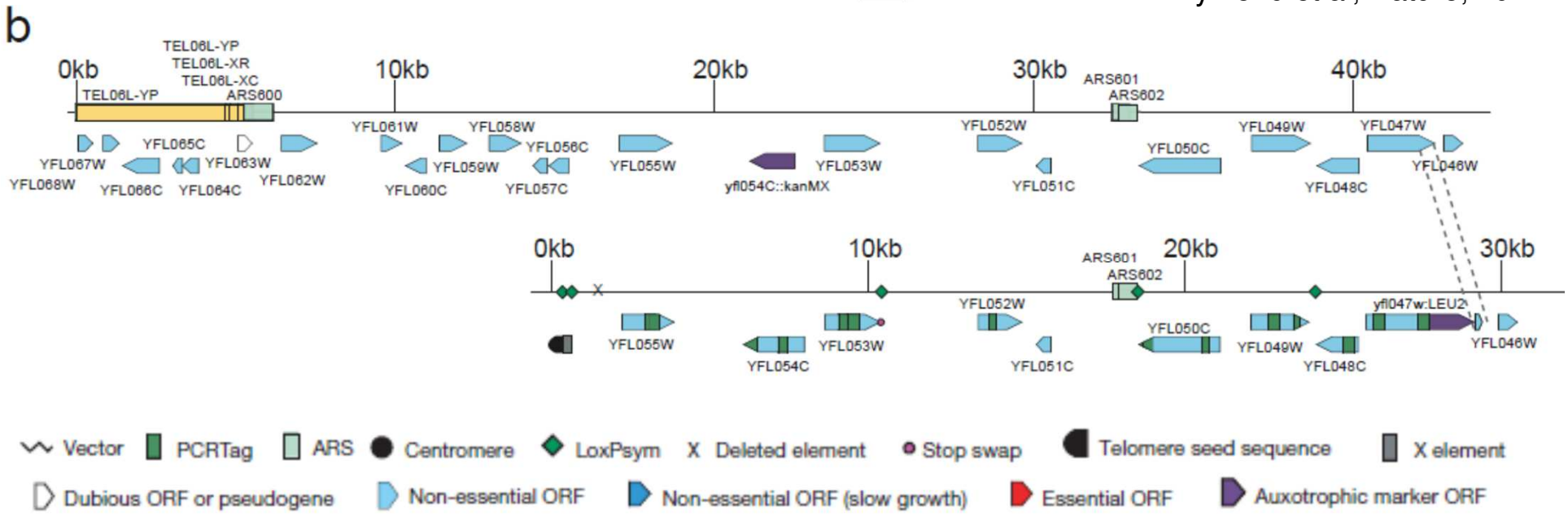
Richardson et al, Science, 2017

# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu




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

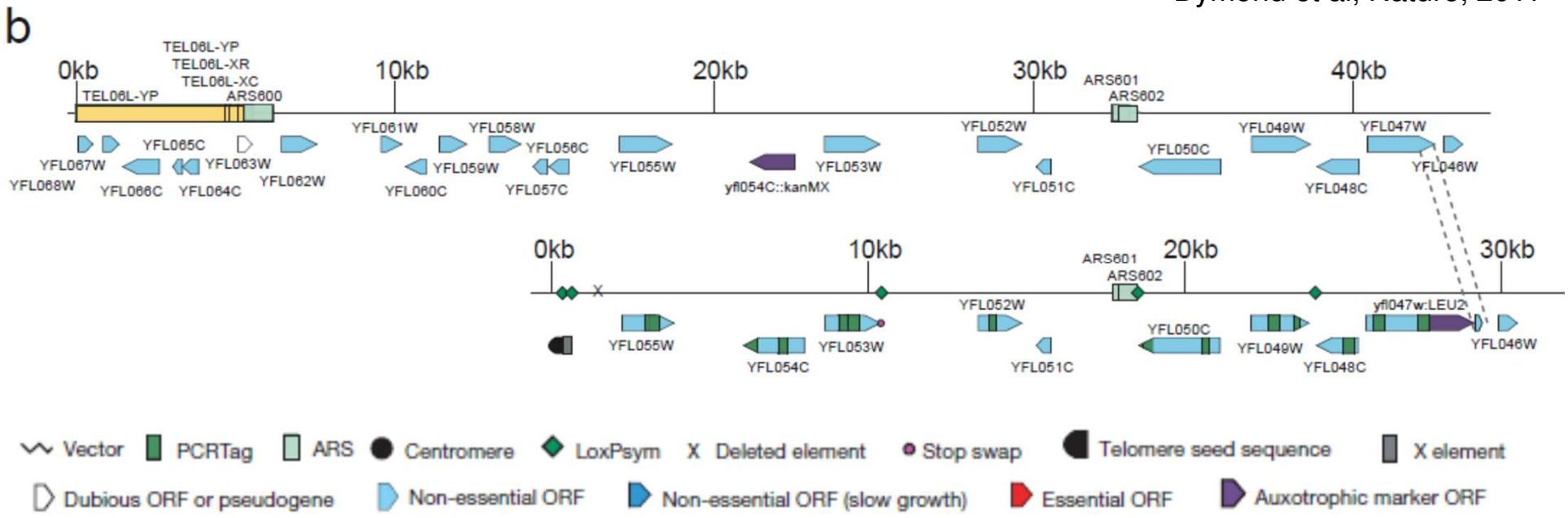
Dymond et al, Nature, 2011



# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů … wt fenotyp (testovali UV, $H_2O_2$ …)
- Odstraněny destabilizující repetitivní elementy (telomery, transposony)
- Redundantní tRNA (z 275 kopii 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

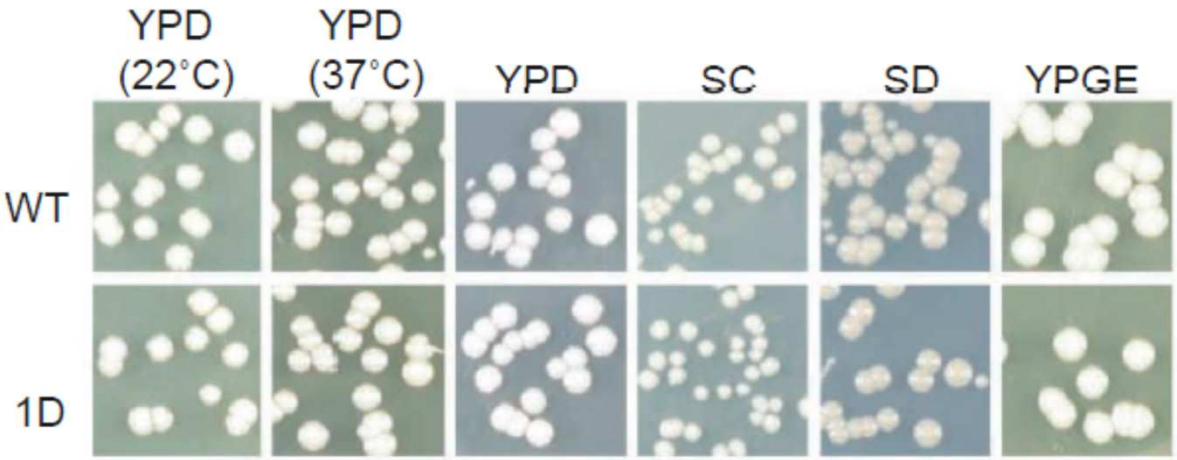
Dymond et al, Nature, 2011



# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů … wt fenotyp (testovali UV, $H_2O_2$ …)
- Odstraněny destabilizující repetitivní elementy (telomery, transposony)
- Redundantní tRNA (z 275 kopii 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

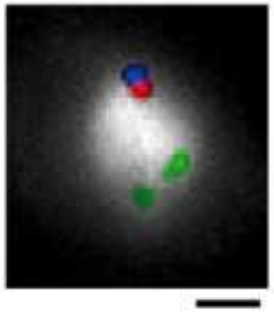



SC=Syntetické kompletní médium
SD=Syntetické minimální medium
GE=glycerol/etanol

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

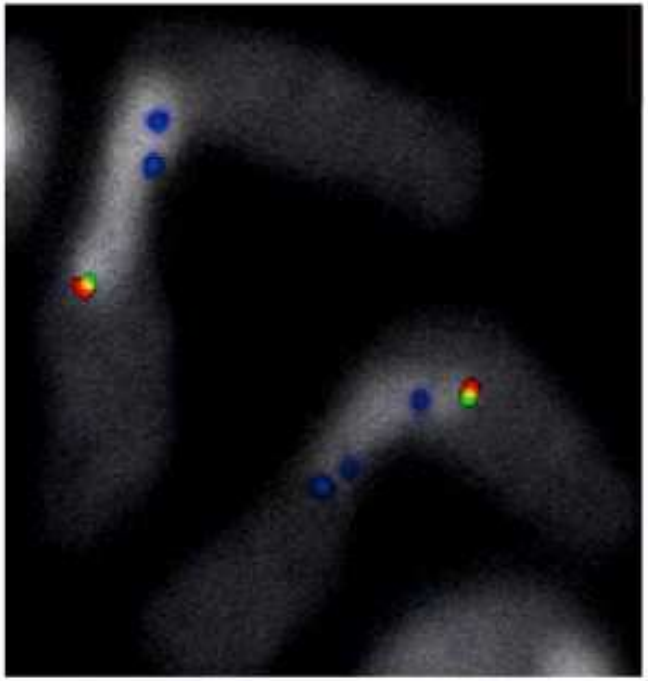
# Organizace chromosomů

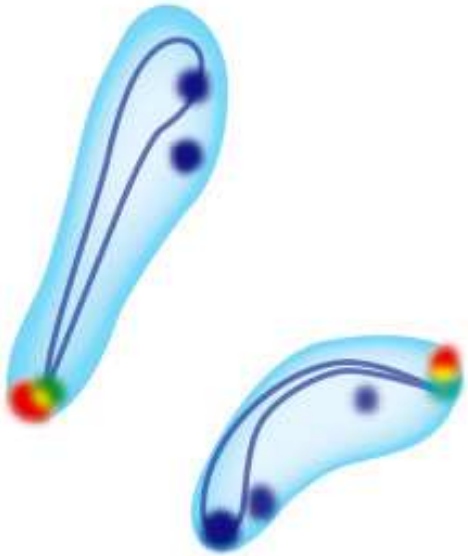
Mitotic interphase



FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

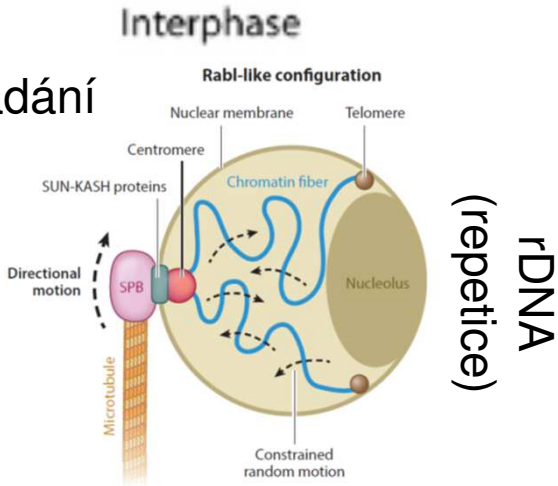
Meiotic prophase





SPB

RABL uspořádání




rDNA (repetice)

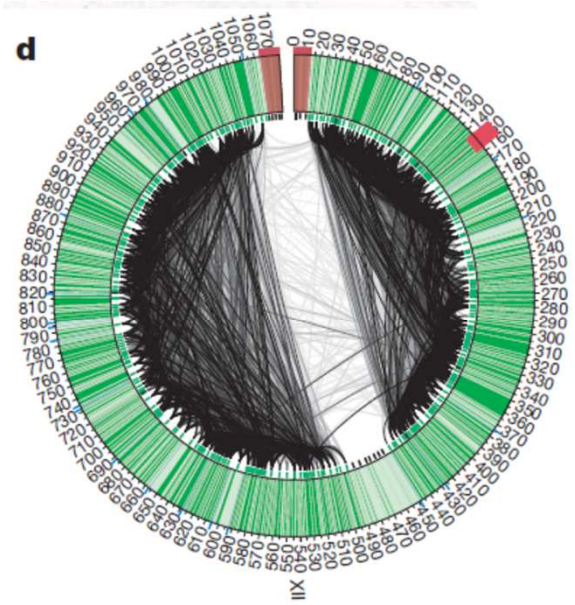
v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

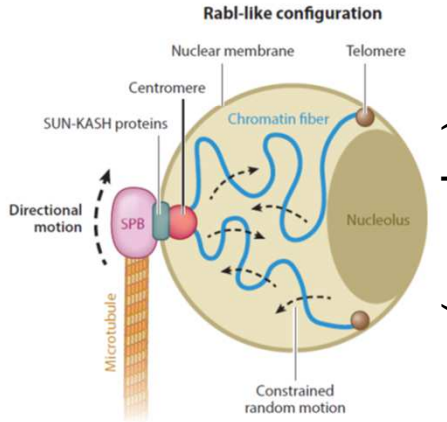
v meiotickém jádře jsou telomery blíž SPB

Tadei a Gasser, Genetics, 2012

# rDNA - repetice

- rDNA kóduje geny pro ribosomální RNA (chromosom XII)
- Je vysoce konzervativní
    - Identifikace a odlišování kvasinkových druhů
    - Sledování evolučních trajektorii
- Až 200 kopii 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)

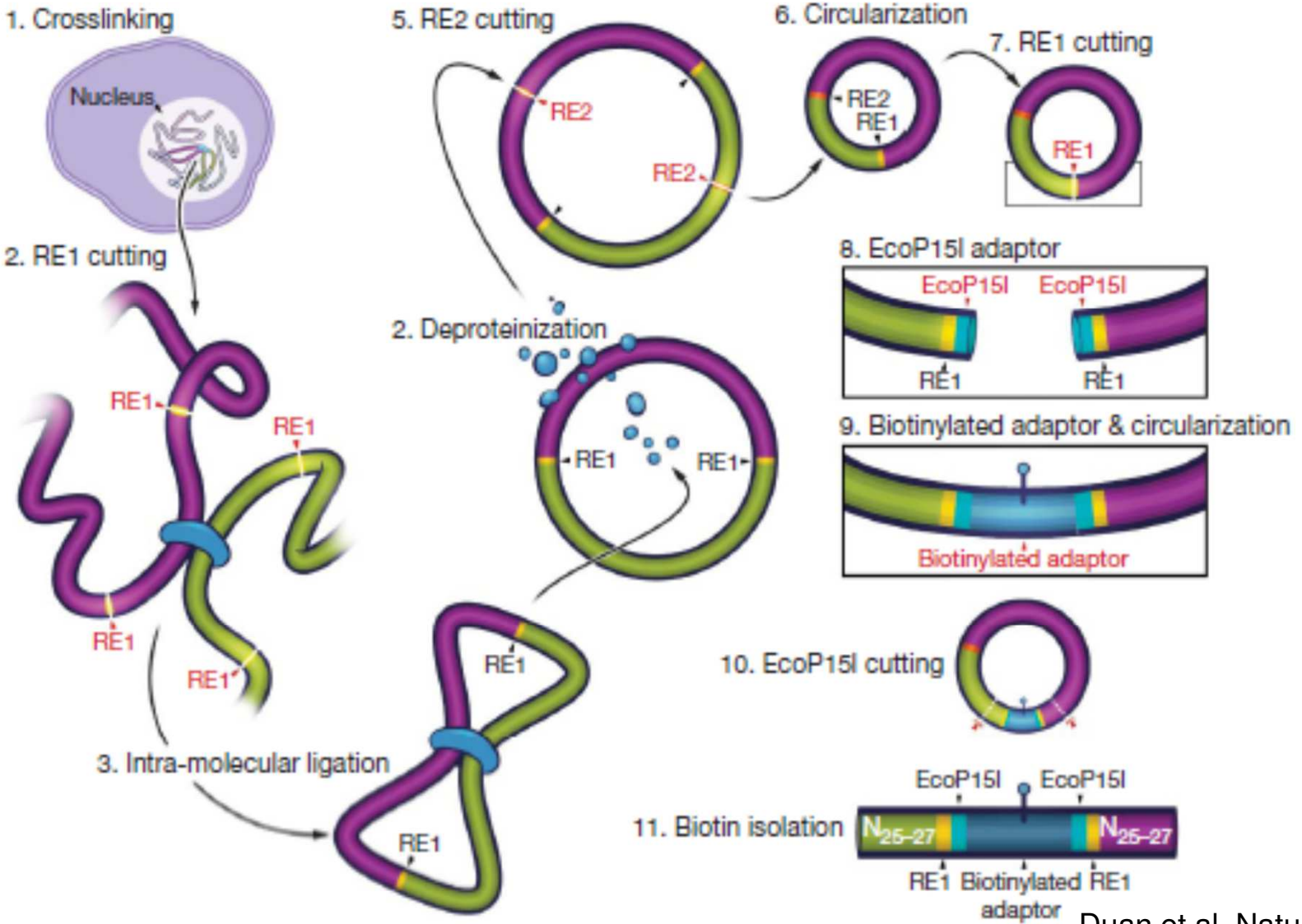





rDNA (repetice)

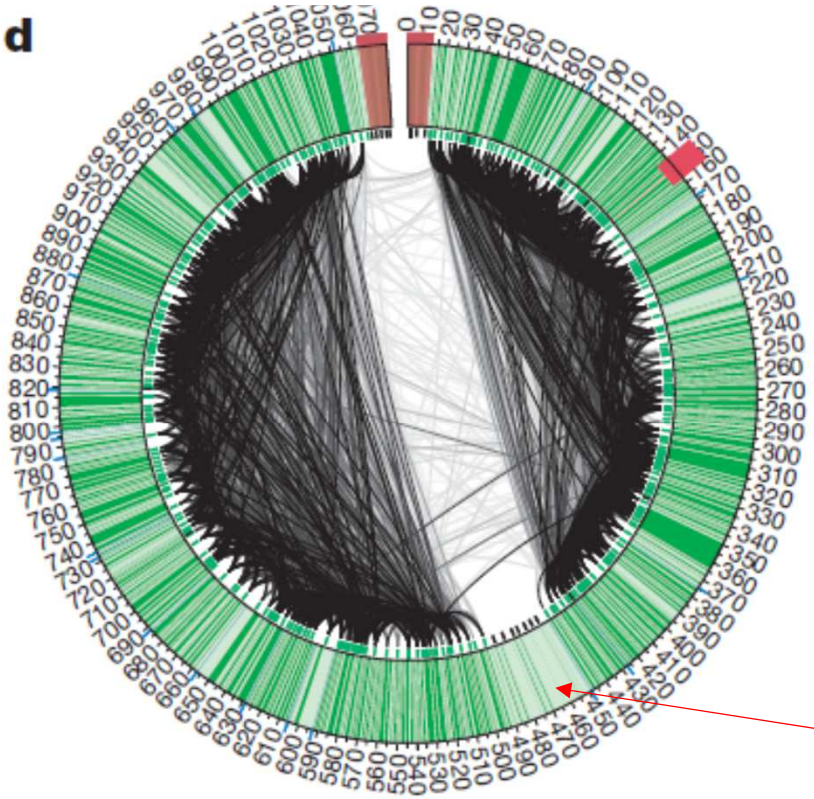
# 3D organizace chromosomů v *S.c.*

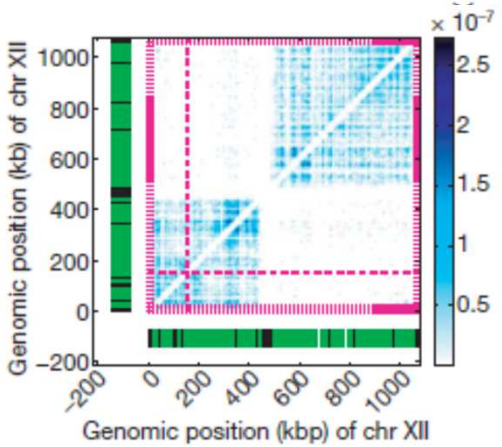
## 3C – chromosome conformation capture



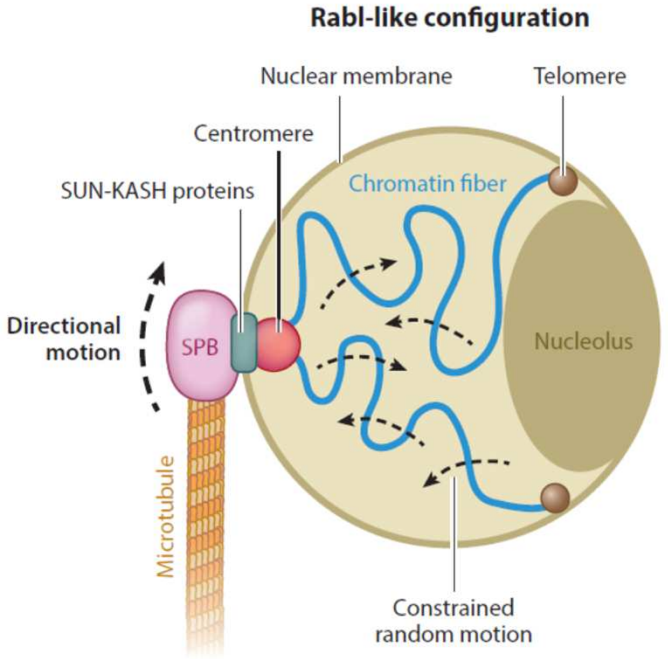

Duan et al, Nature, 2010

# Chromosom XII




intrachromosomální interakce



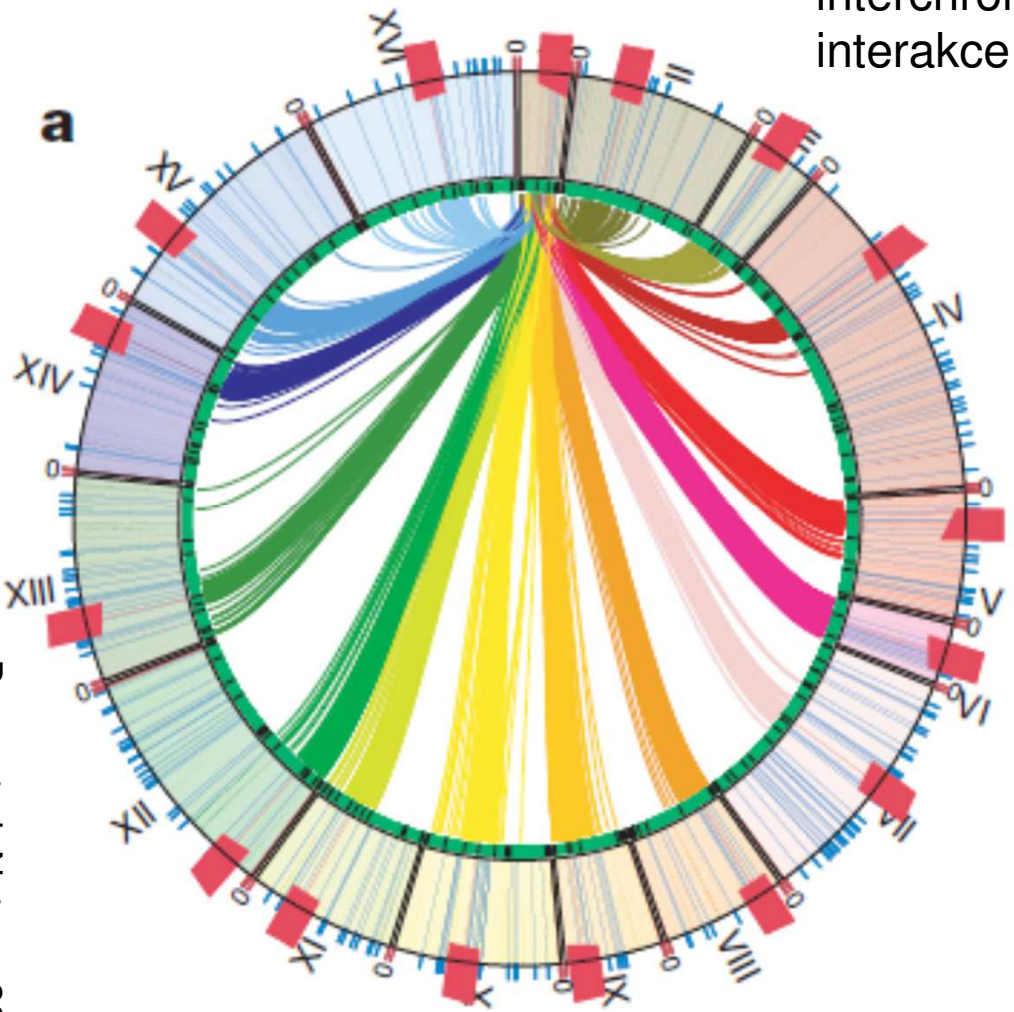

rDNA (repetice)

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

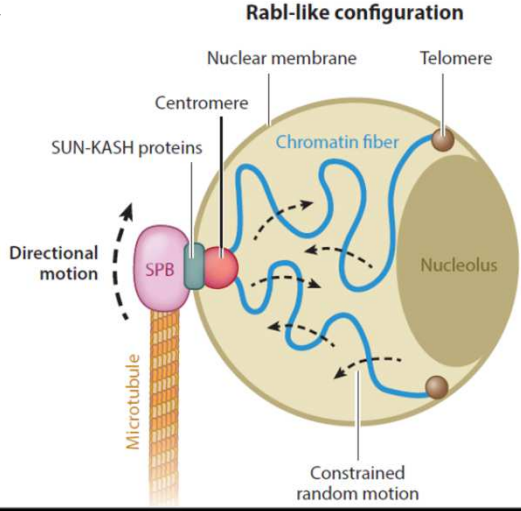
Duan et al, Nature, 2010

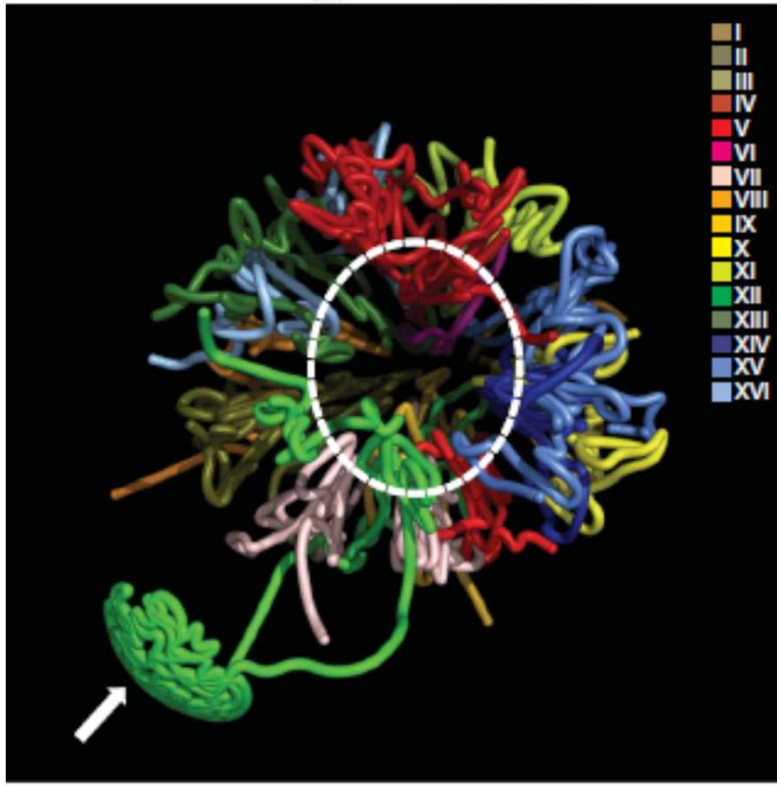
# Všechny centromery jsou blízko sebe

interchromosomální interakce




Duan et al, Nature, 2010

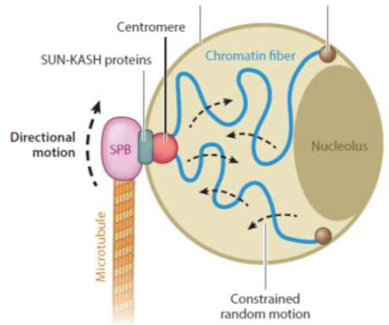


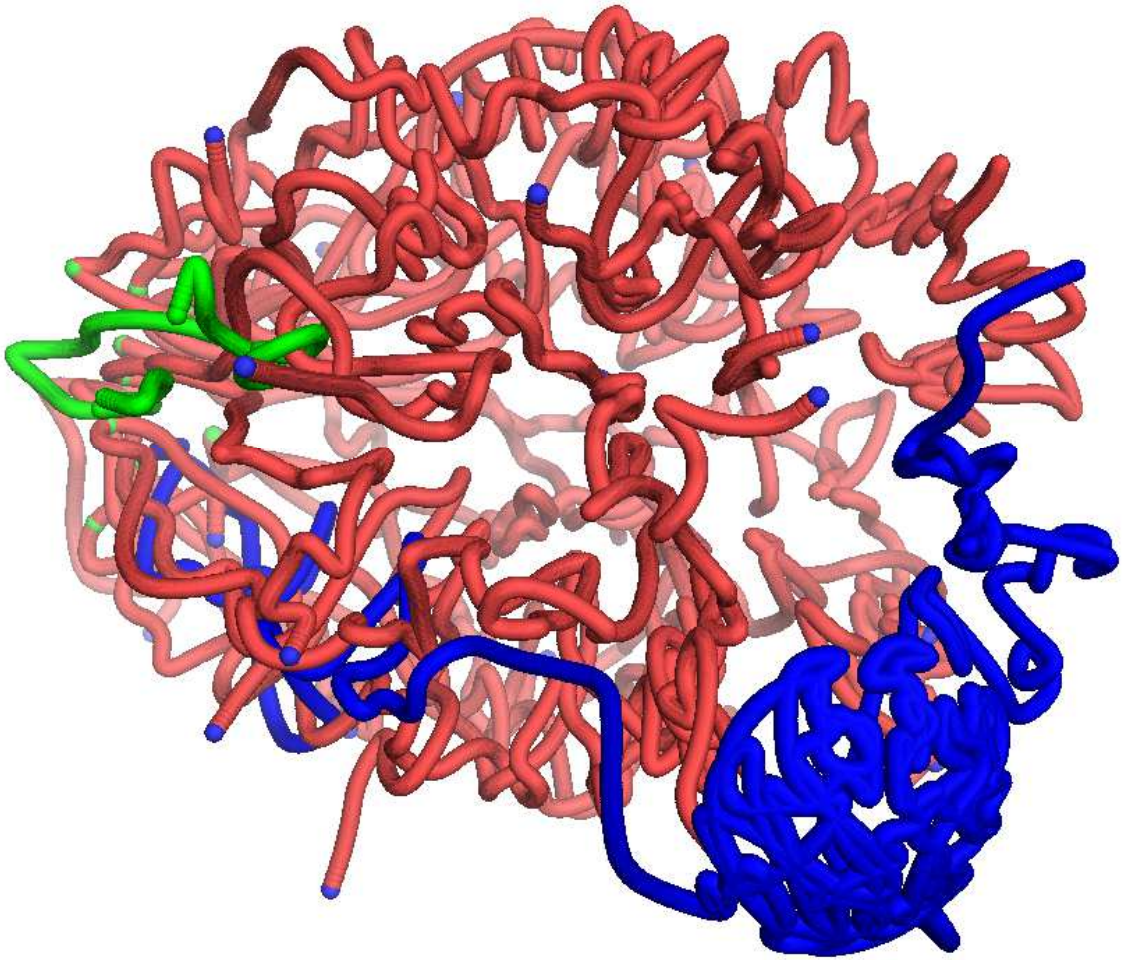




v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

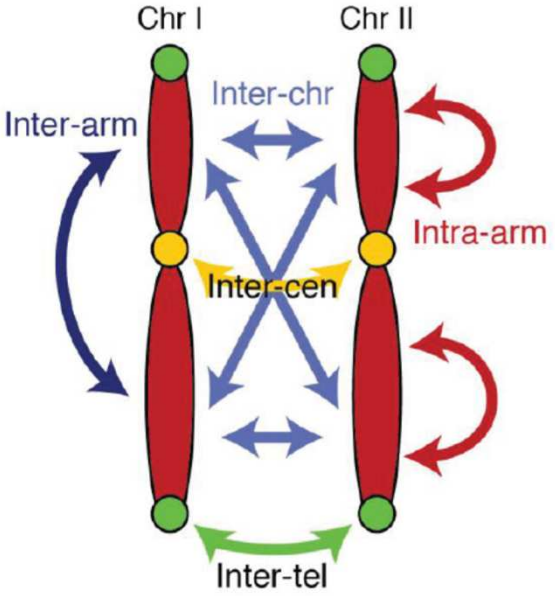
# 3D rekonstrukce chromosomů v kvasinkovém jádře

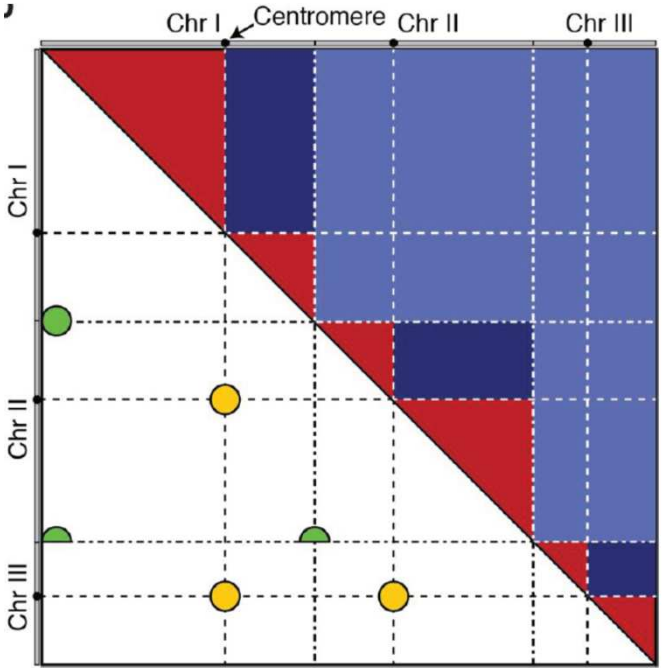
modrý chromXII – jadérko s rDNA izolované
zelený chromIII (MAT lokus)



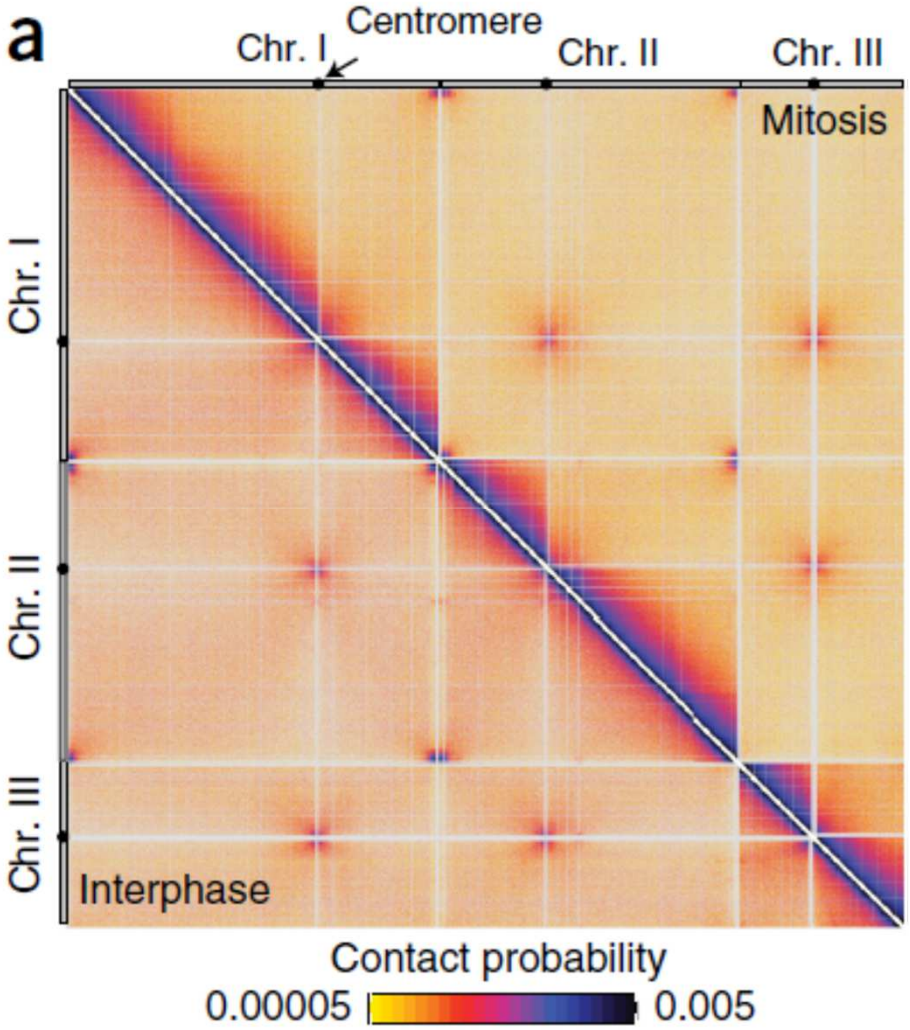
# Kondenzace chromosomů v mitóze




Kakui et al, Nat Genet, 2017

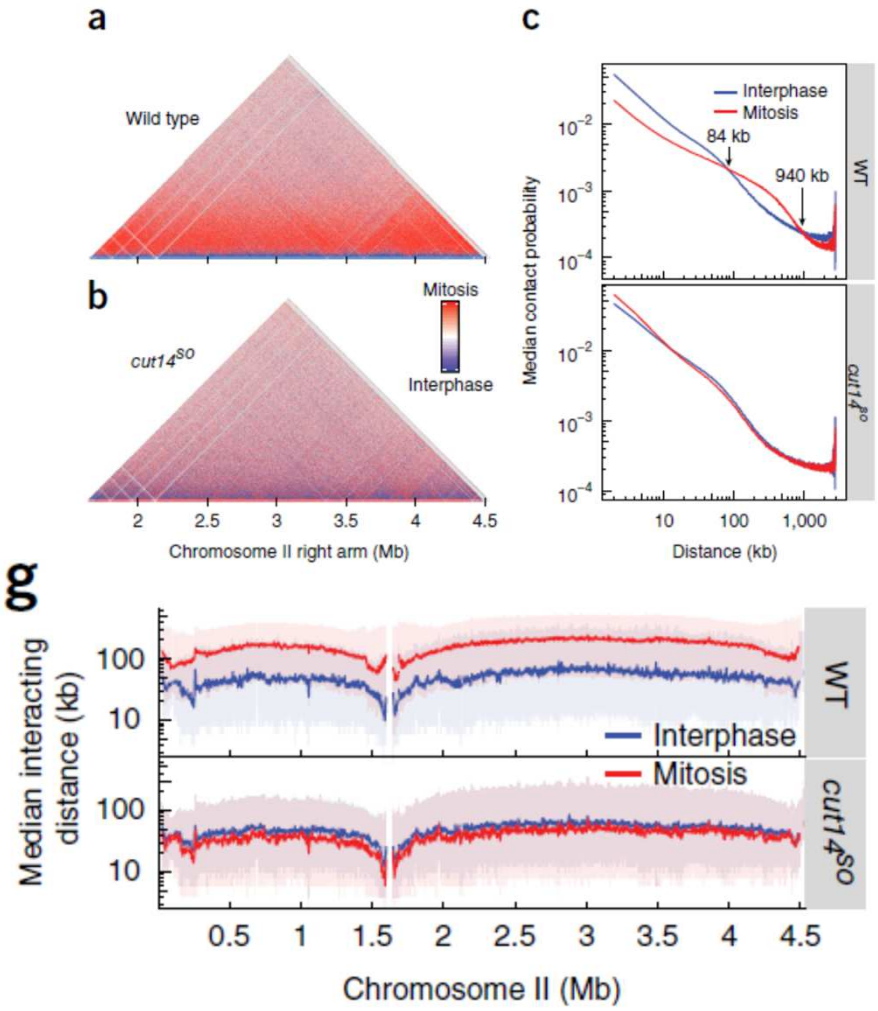
*S. pombe* má 3 chromosomy – diagram zachycuje intra- i interchromosomální interakce – centromery i telomery spolu … srovnání interfázních a mitotických chromosomů

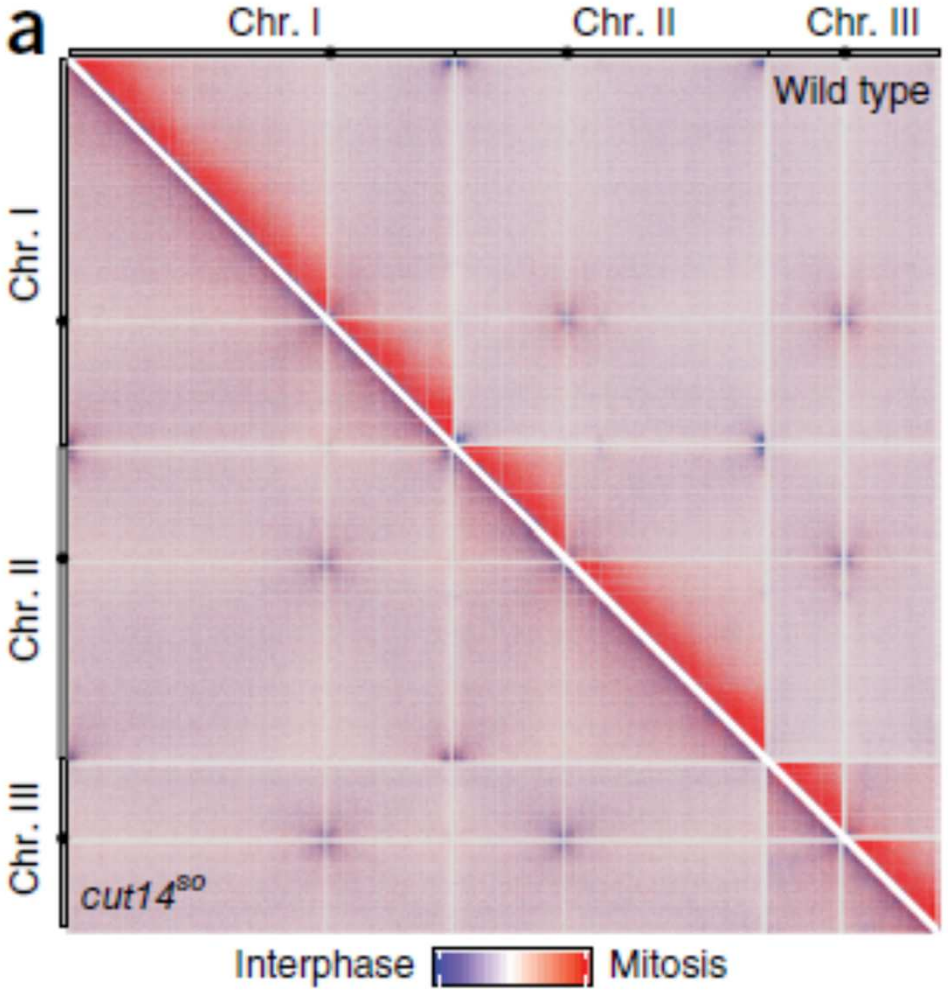


# Kondenzin kondenzuje chromosomy

Kakui et al, Nat Genet, 2017

Tanizawa et al., NSMB, 2017

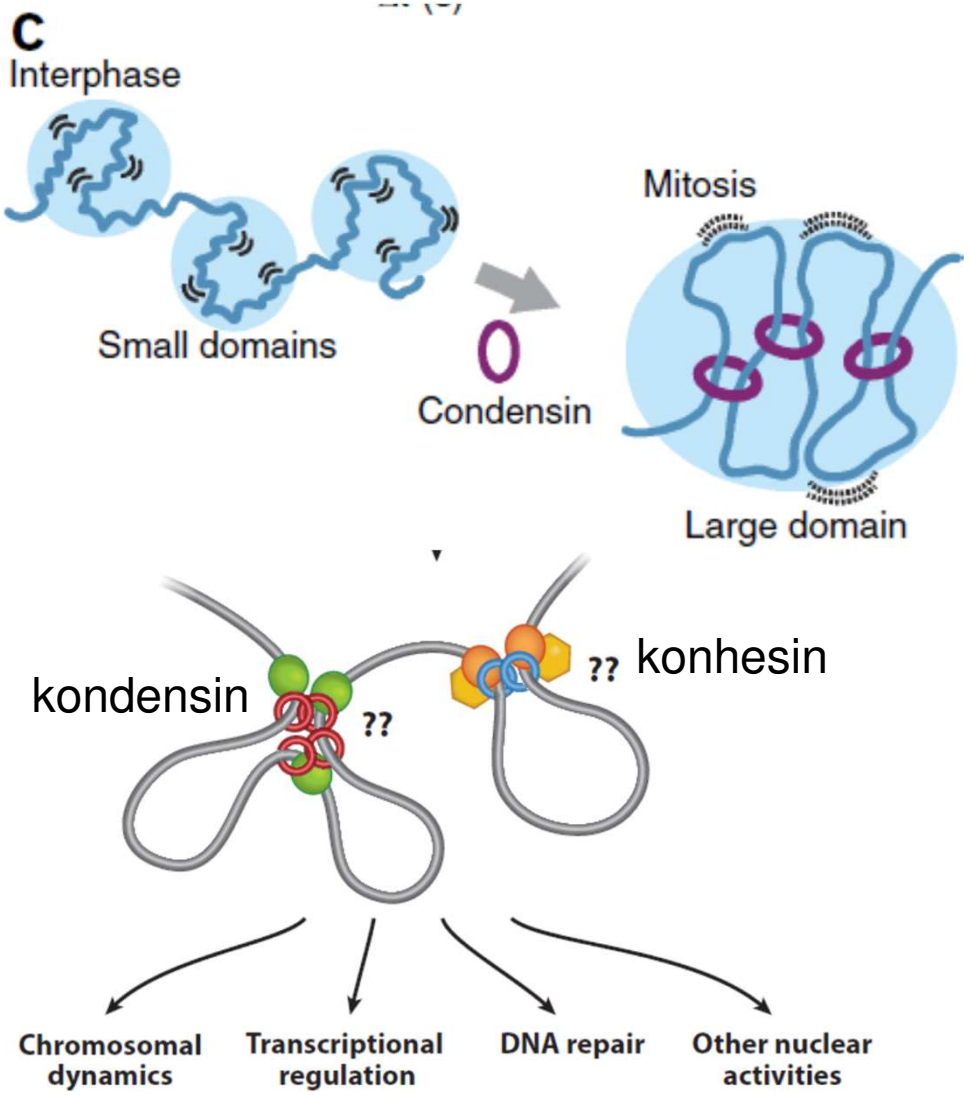


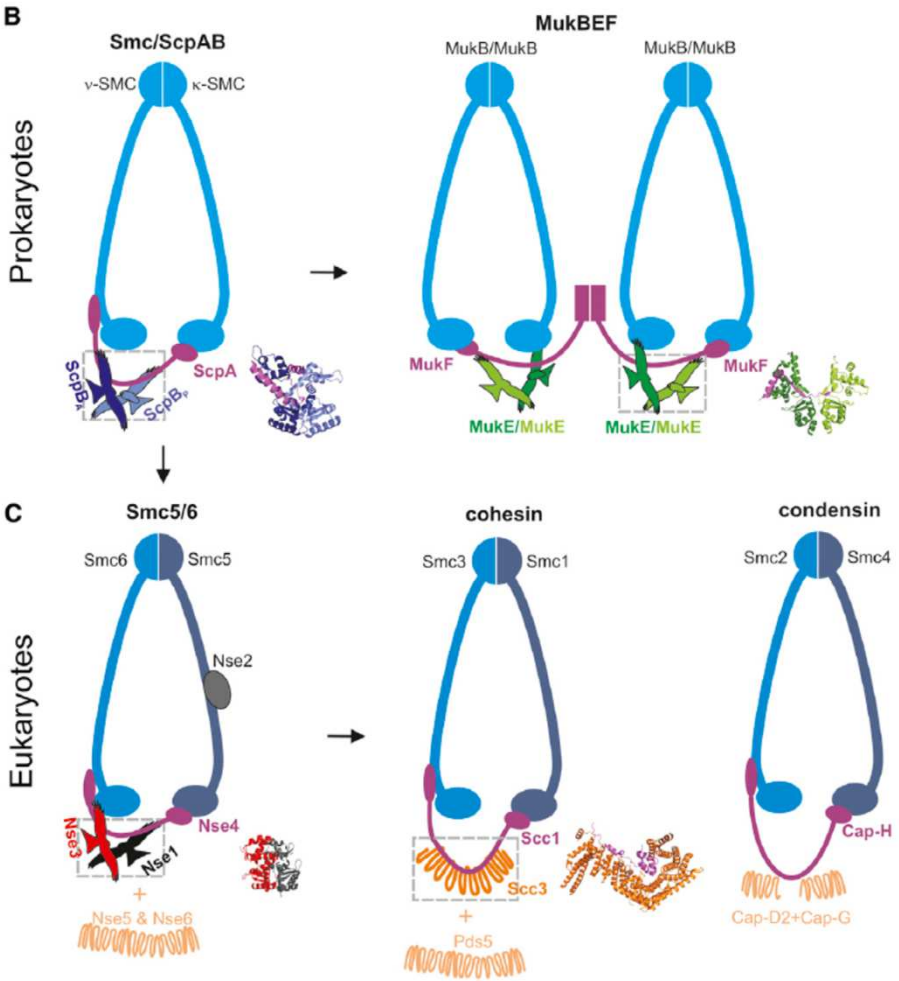




intrachromosomální interakce
větší mitotické smyčky jsou závislé na kondensinu

# Kondenzin – SMC komplexy

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

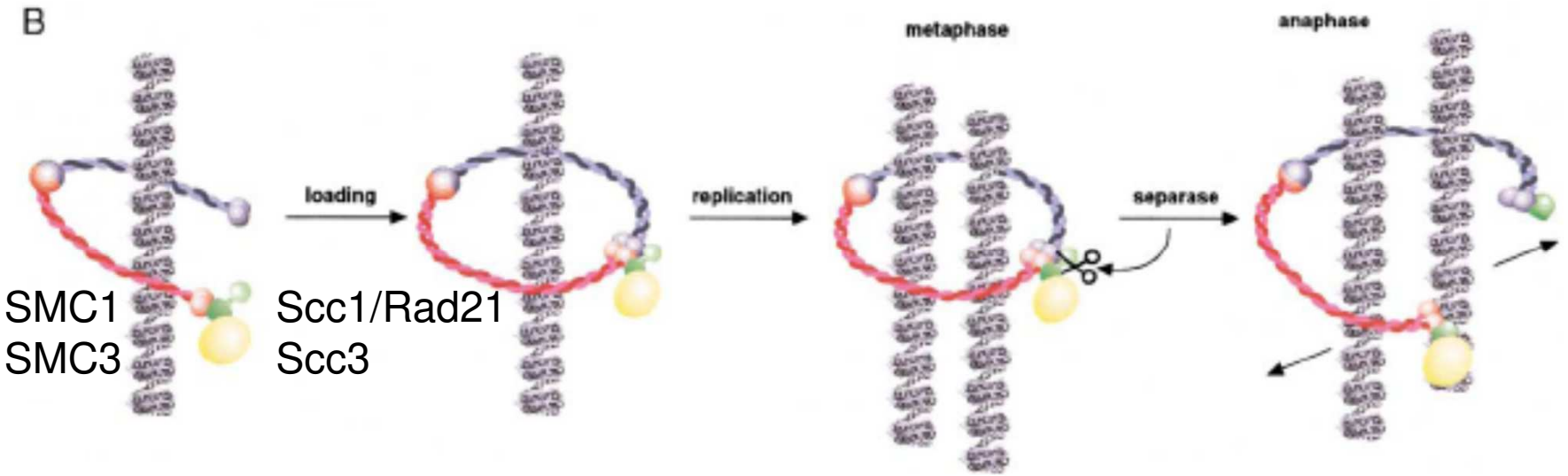



Kakui et al, Nat Genet, 2017

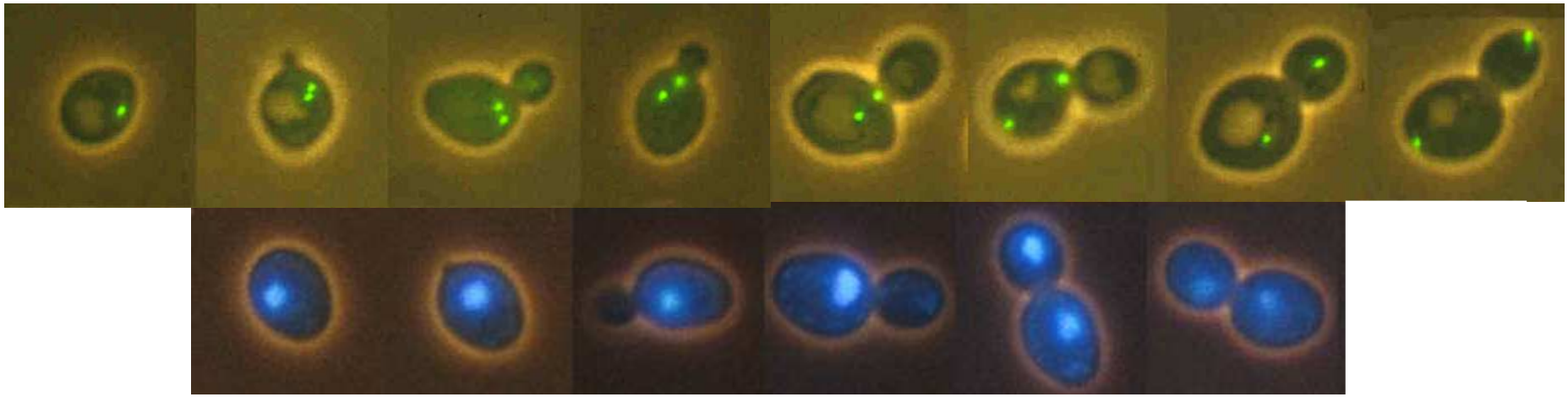
Palecek a Gruber, Structure, 2015

# Kohesin drží sesterské chromatidy



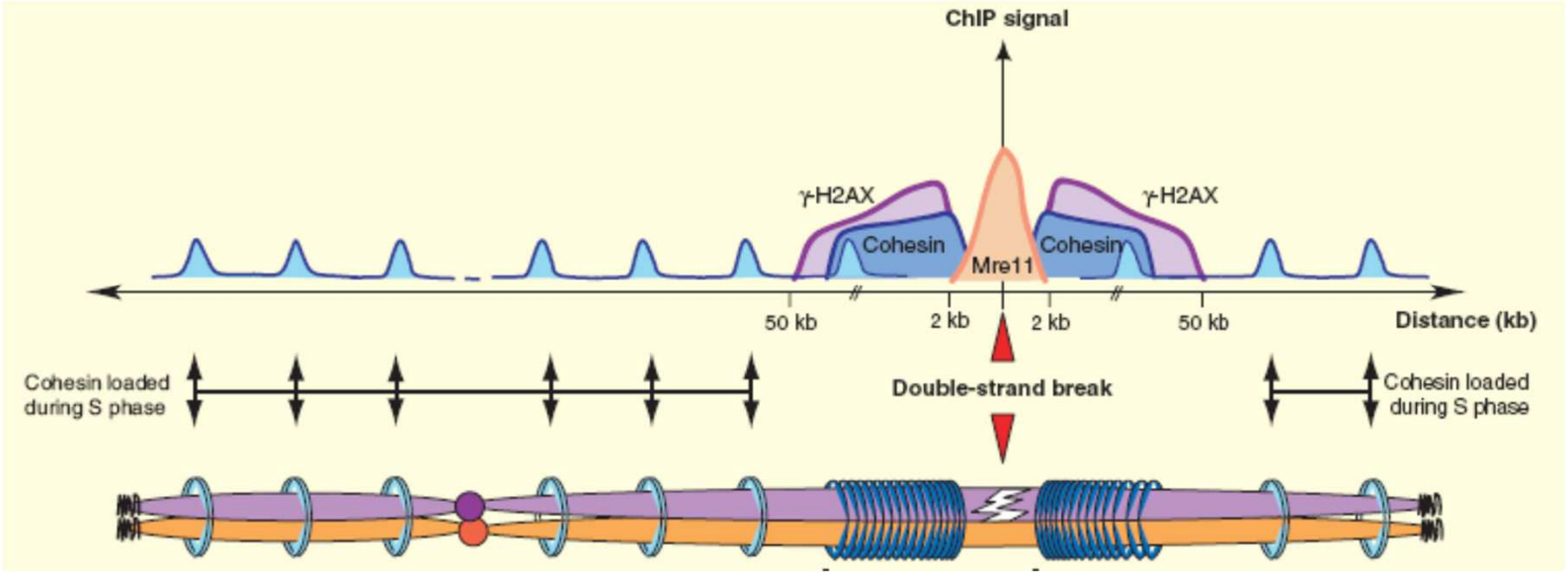

Haering et al, 2002, Mol Cell

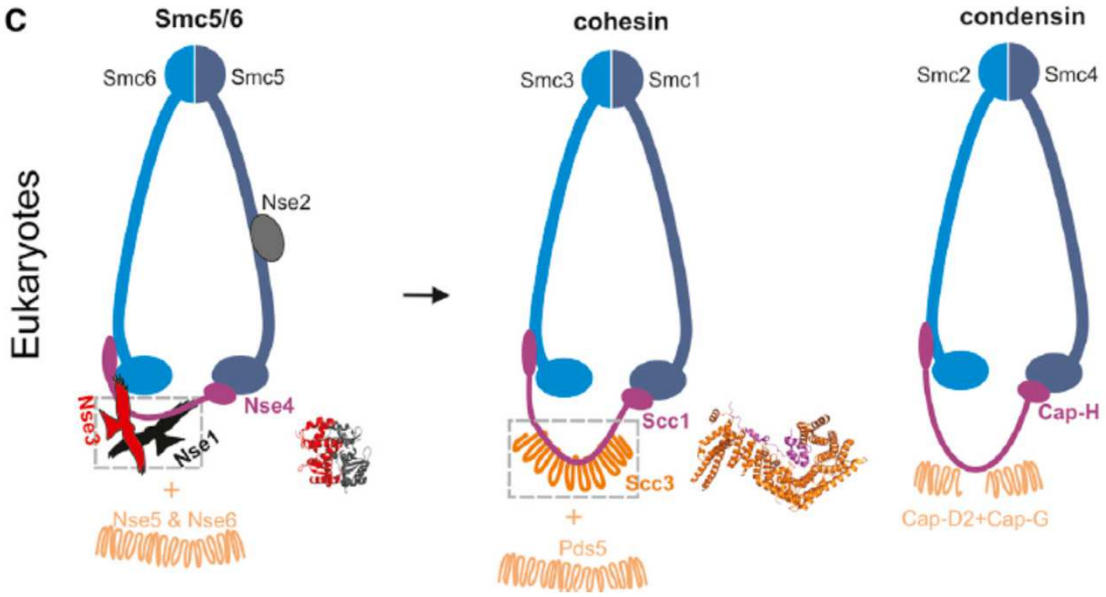
Kohesin je klíčový pro průběh mitosy – otevření kruhu v anafázi umožňuje segregaci



Marco et al, Cell, 2013

# SMC komplexy napomáhají při HR




- kohesin přidržuje homologní chromosomy při sobě a napomáhá HR
- SMC5/6 reguluje restart zastavených replikačních vidliček (limituje HR v repetitivních sekvencích)

Palecek a Gruber, Structure, 2015