

**Cvičení: 9.12.** (COVID?, prof. Svoboda?)

**Zkoušky?: 16.12 od 9.00 (test)?** Další termín?

**Zkouška/prezentace:**

**Kvasinky** ... může být oblast vaší DP (ne samotná DP)

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

přednáška 10 + 5 minut diskuse

# Osnova (poslední) přednášky

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

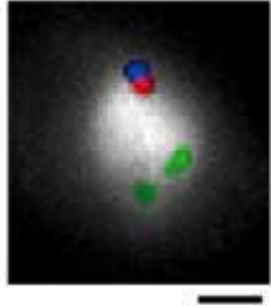
# Základní prvky kvasinkového genomu

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

- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosomů (diploidní 2n, 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 kondenzované

# Organizace chromosomů

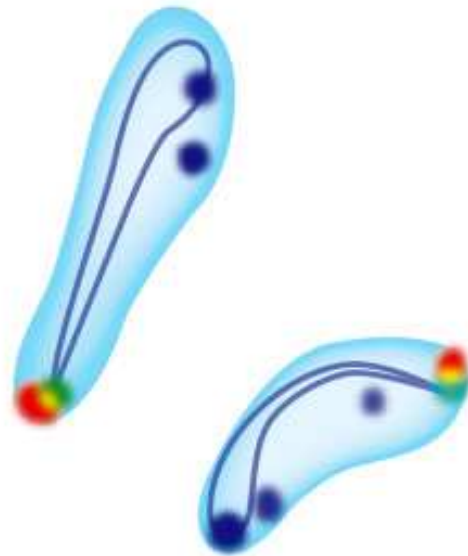
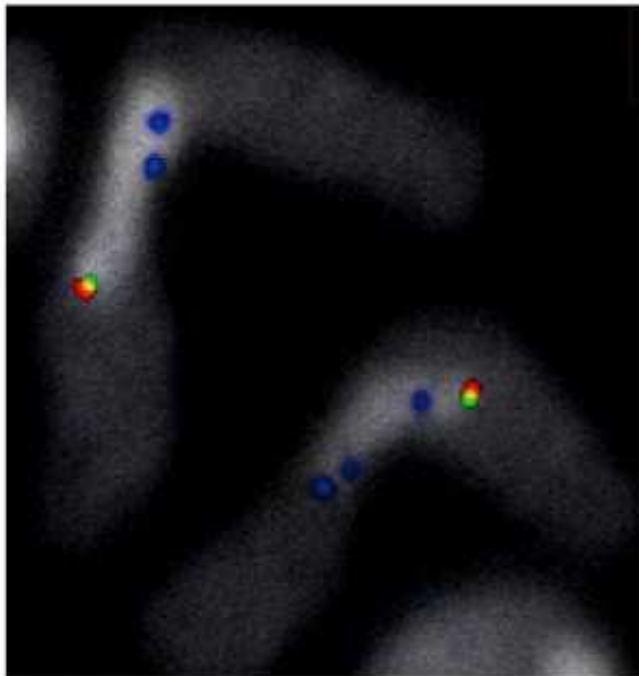
Mitotic interphase



- centromere
- telomere
- SPB

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

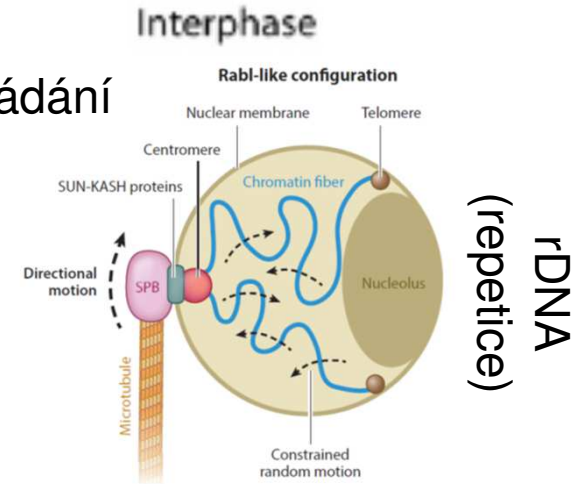
Meiotic prophase



SPB



RABL uspořádání

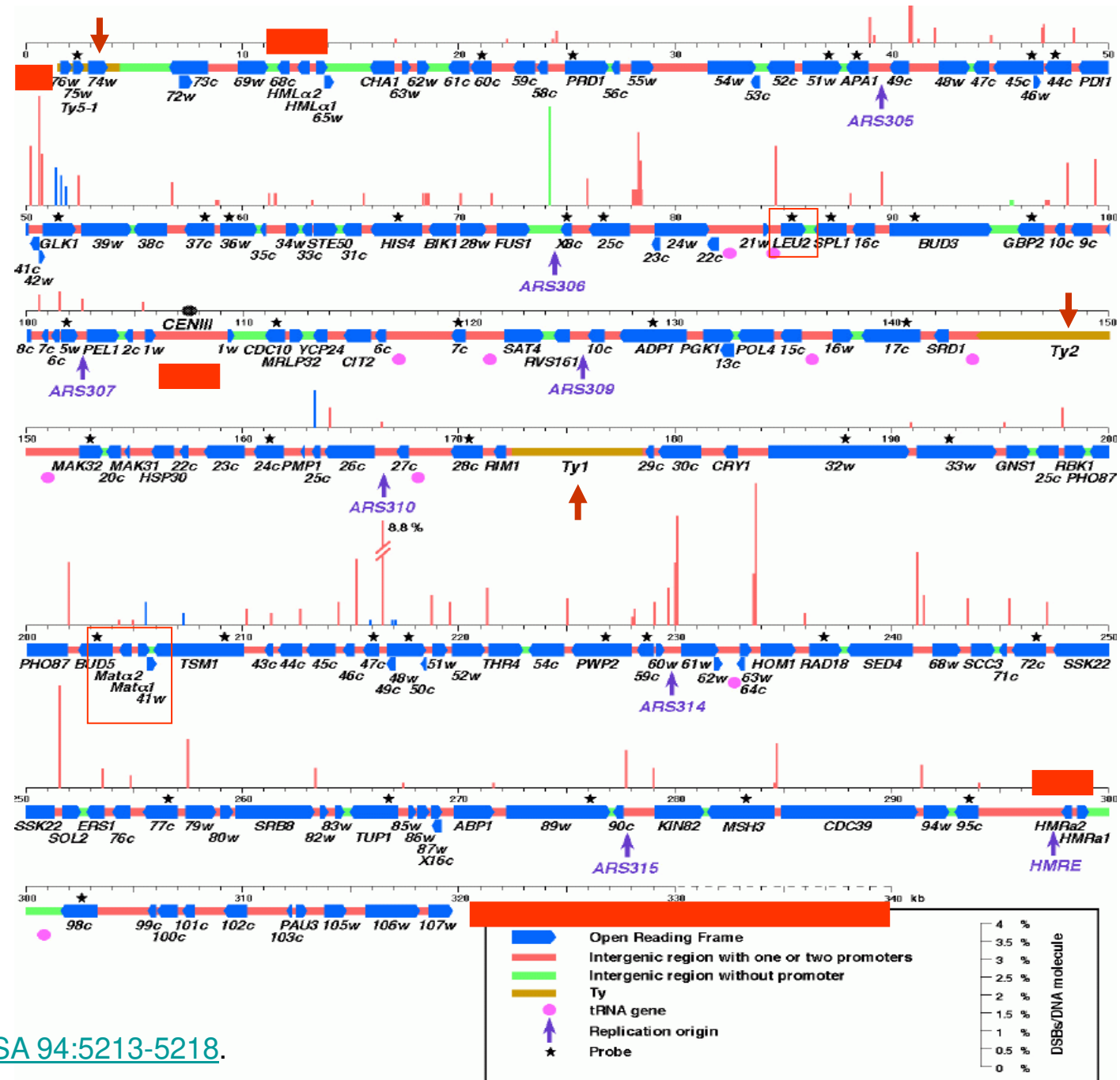


v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

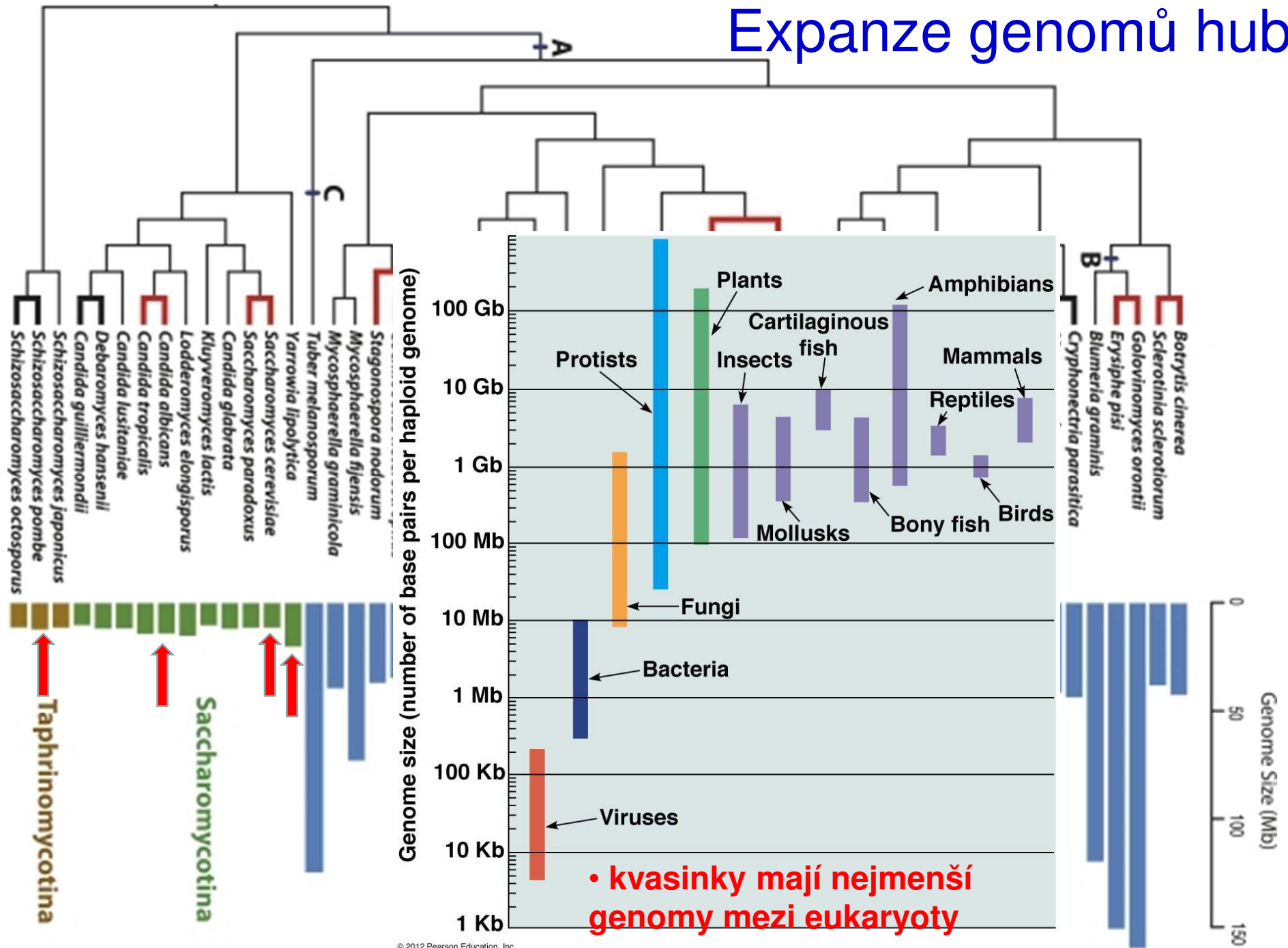
v meiotickém jádře jsou telomery blíž SPB

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

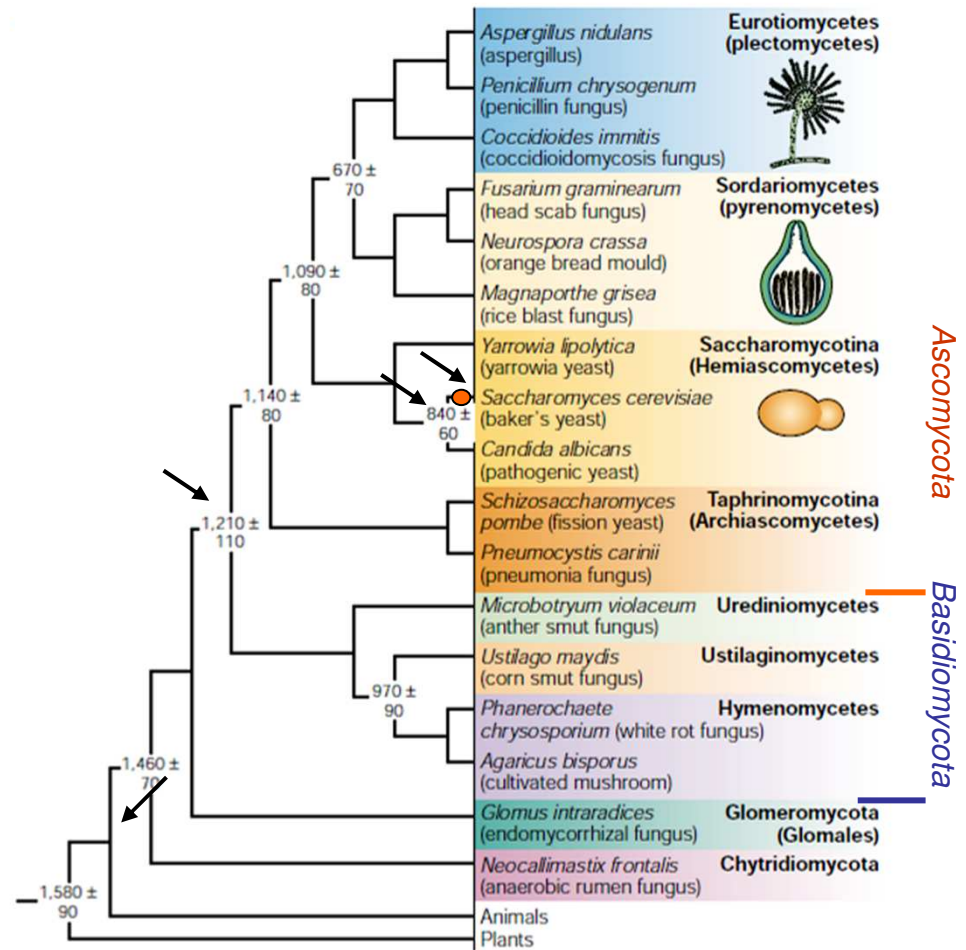
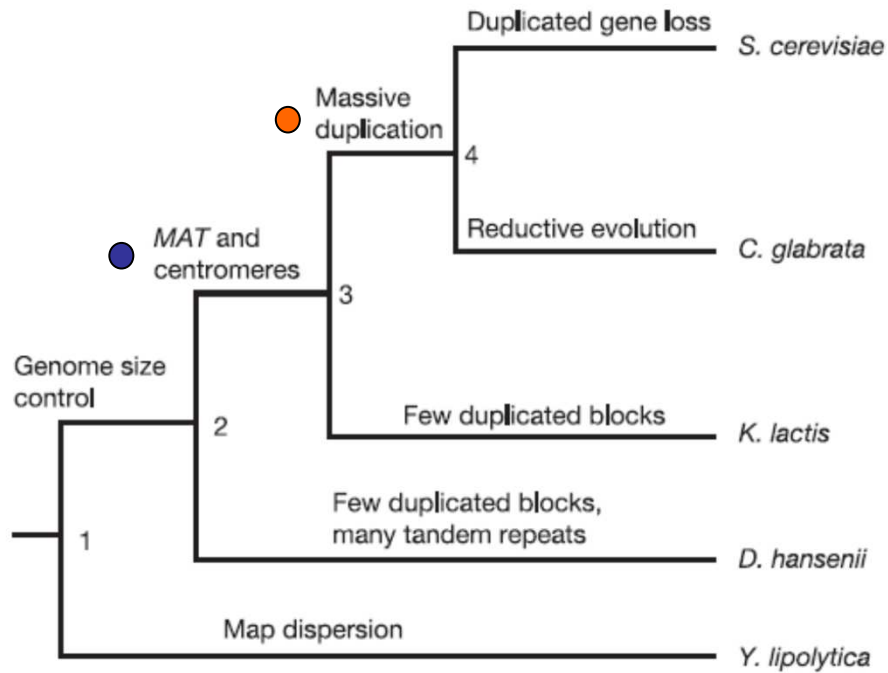
**Heterochromatin:**  
 centromera  
 telomery  
 HMR a HML  
 (MAT je aktivní  
 určuje haplotyp)



# Expanze genomů hub



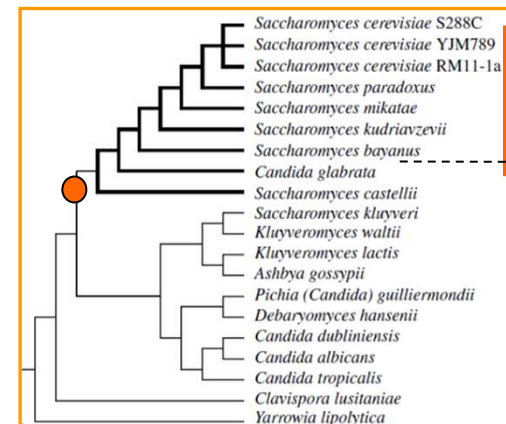




# Evolve kvasinek

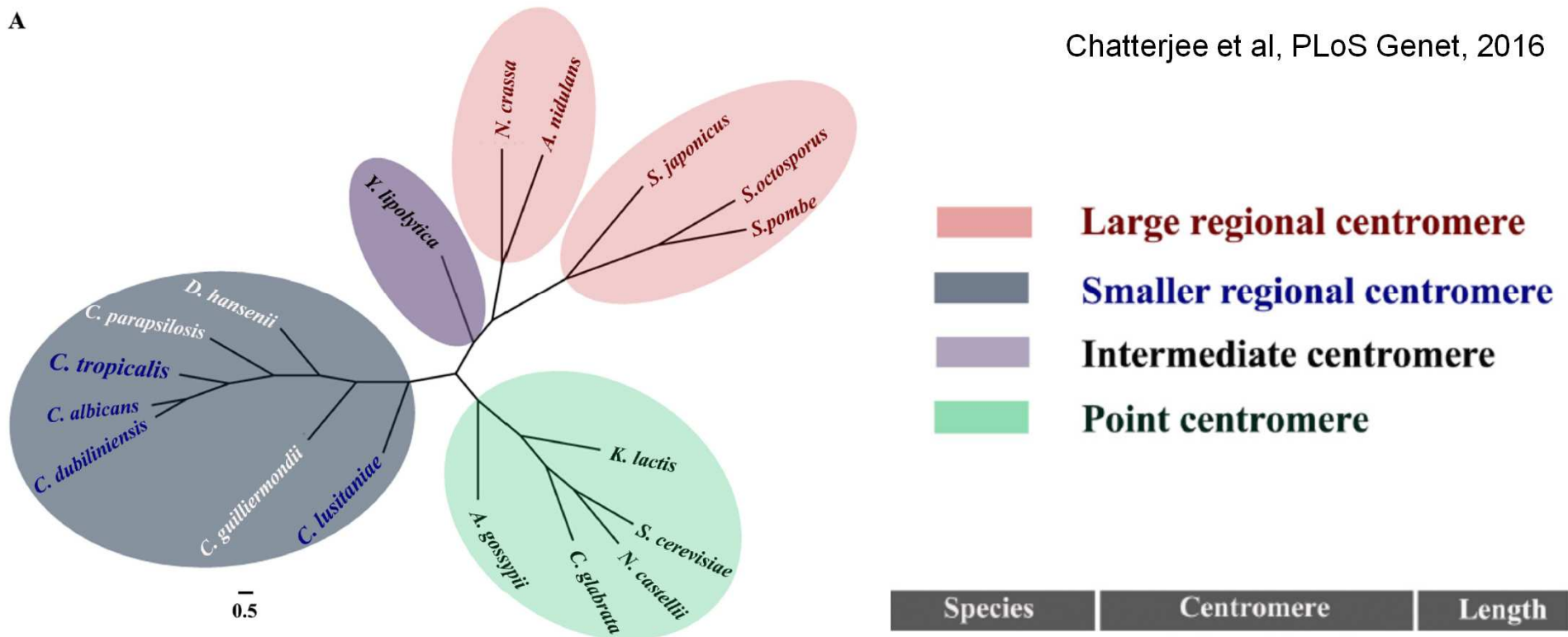
- 1500 Mya: Metazoa - Fungi
- 1200 Mya: Ascomycota – Basidiomycota.
- 1000 Mya: *S. cerevisiae* – *Schizosacch. pombe*
- 840 Mya: *S. cerevisiae* – *C. albicans*
- 170 Mya: (*Pichia*, *Candida*) – *Kluyveromyces aj.*
- 150 Mya: WGD

Dujon et al., Nature, 2004



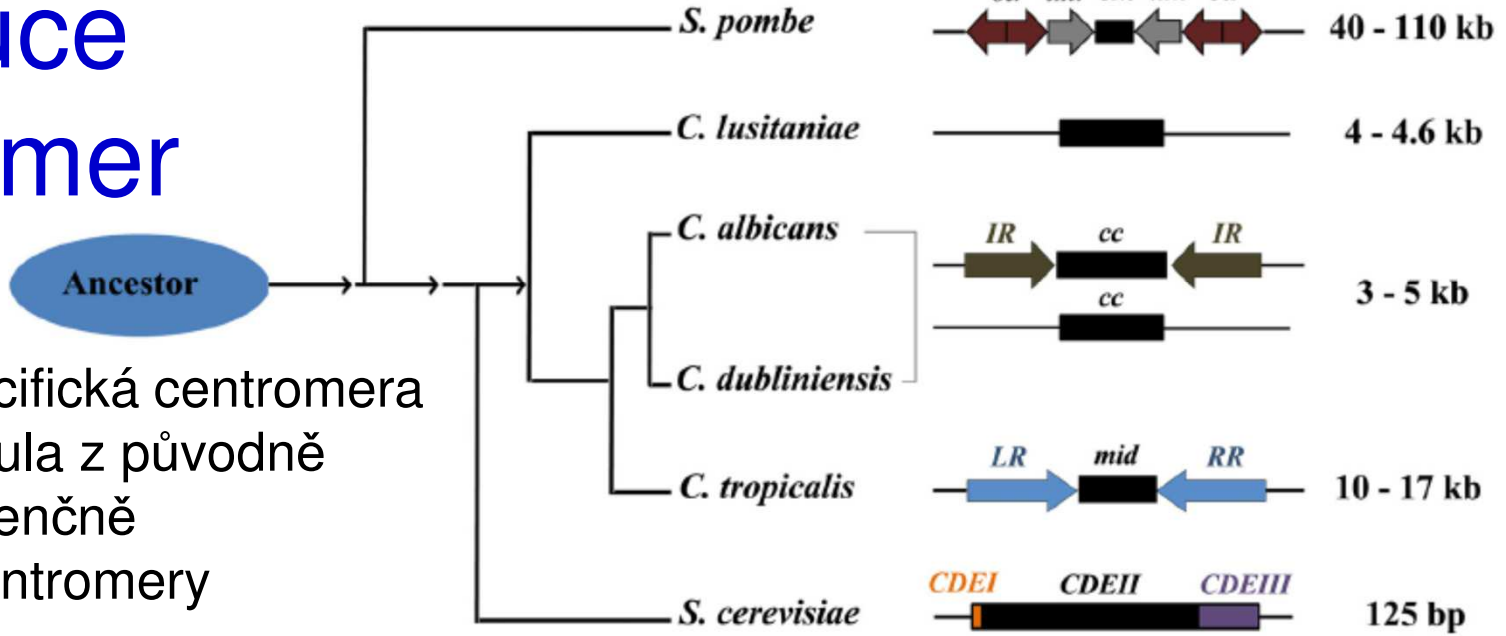
A

Chatterjee et al, PLoS Genet, 2016



# Evolve centromer

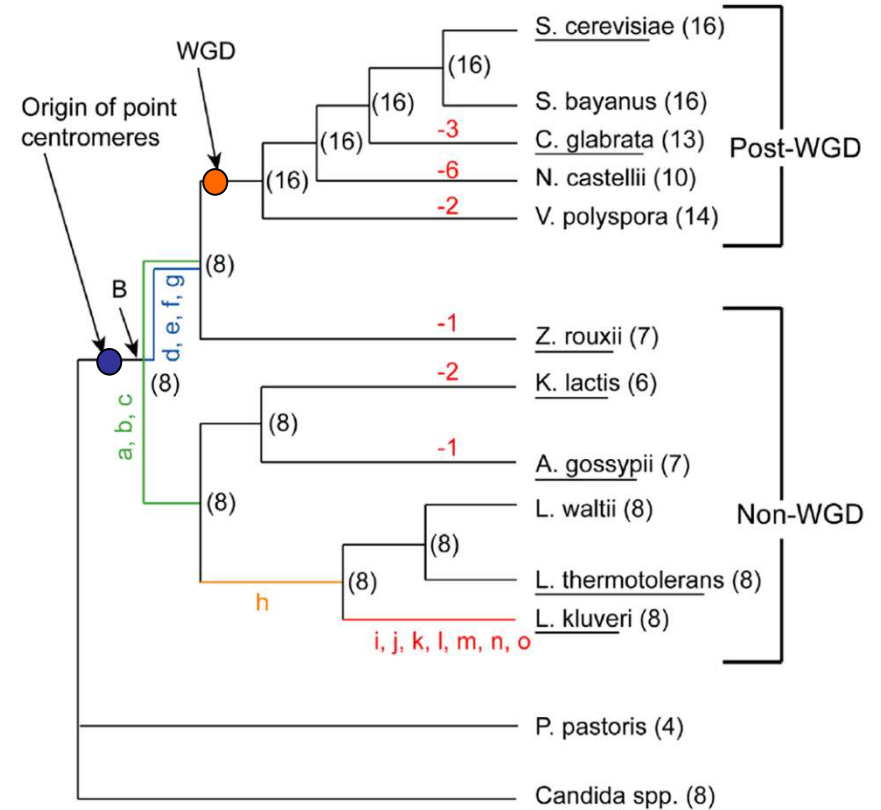
sekvenčně specifická centromera se patrně vyvinula z původně repetitivní/sekvenčně nespecifické centromery



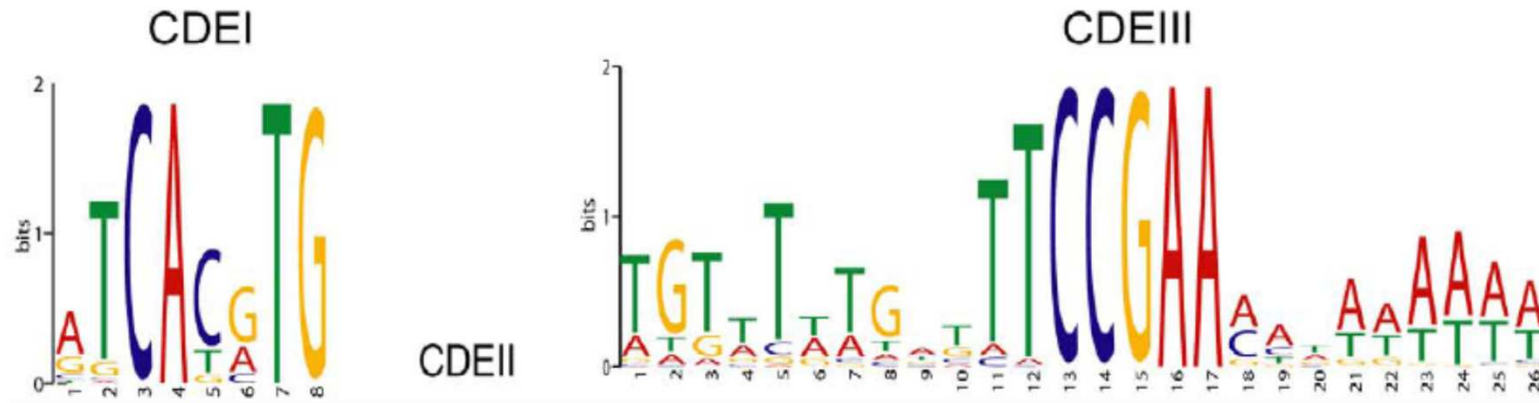


# Centromera *S. cerevisiae*

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



Konsensní sekvence *S.c.* centromer



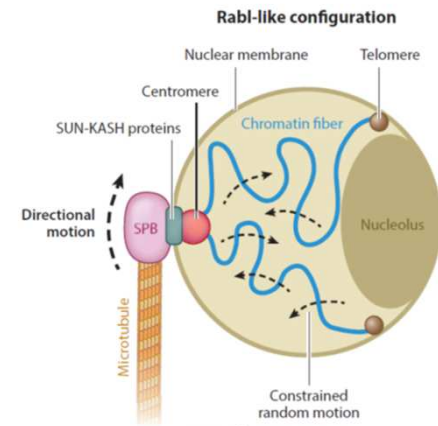
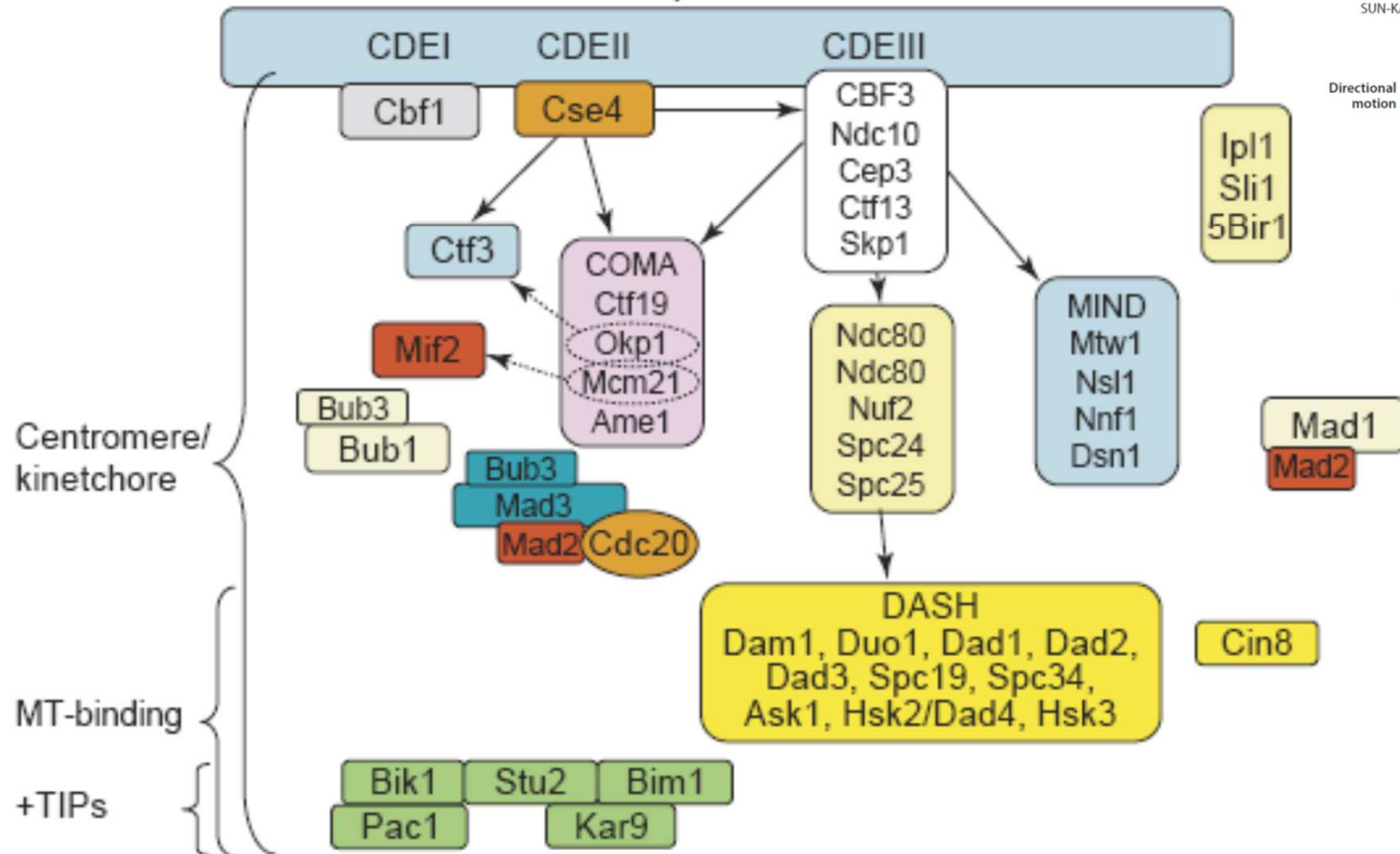
Chan et al., Trends in Cell Biol, 2005



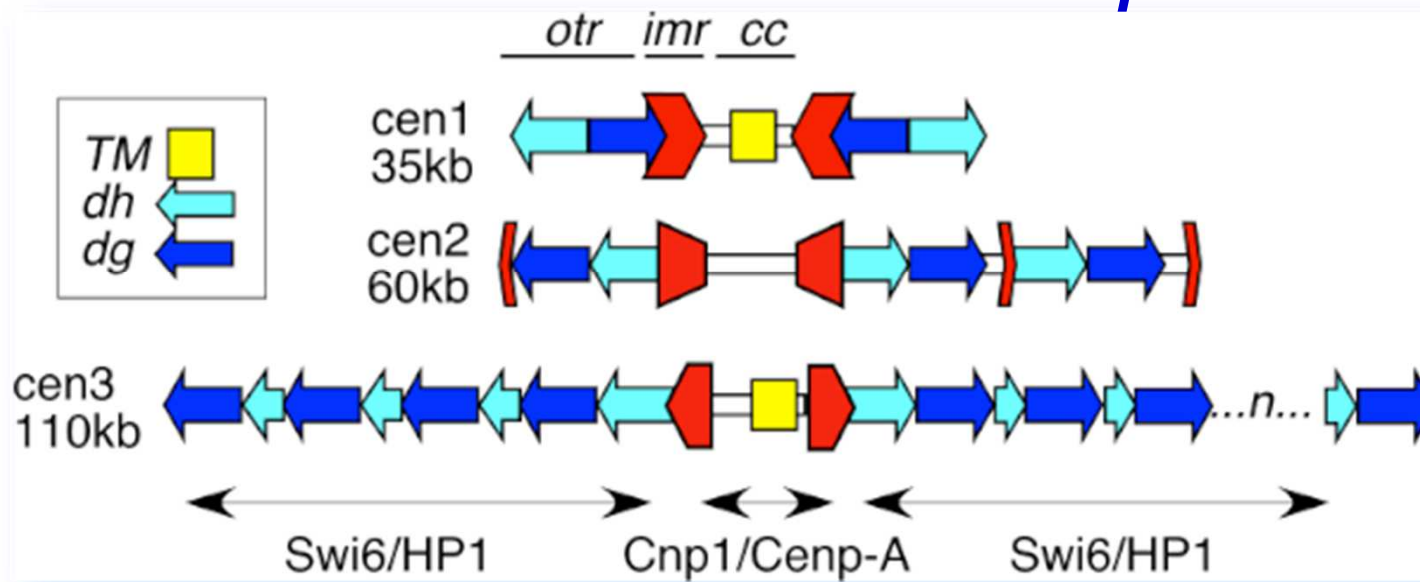
# Centromera *S. cerevisiae*

(c)

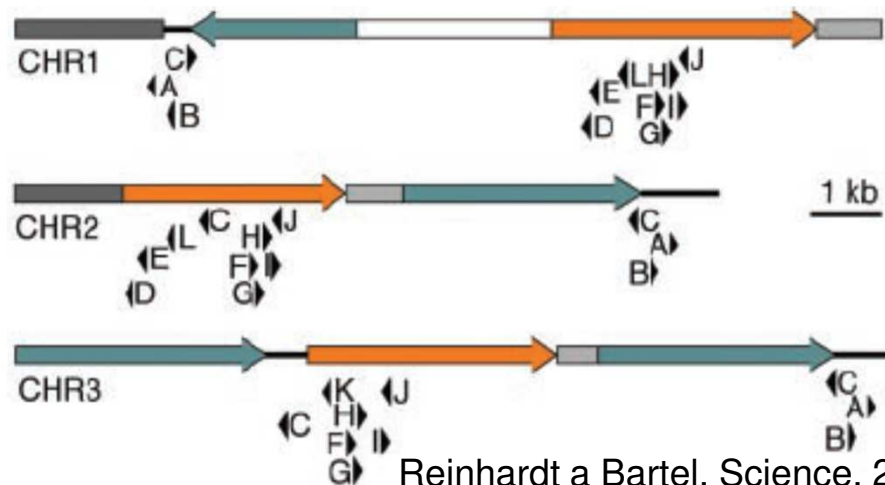
Budding yeast centromere/kinetochore  
125-bp CEN DNA



# Centromera *S. pombe*



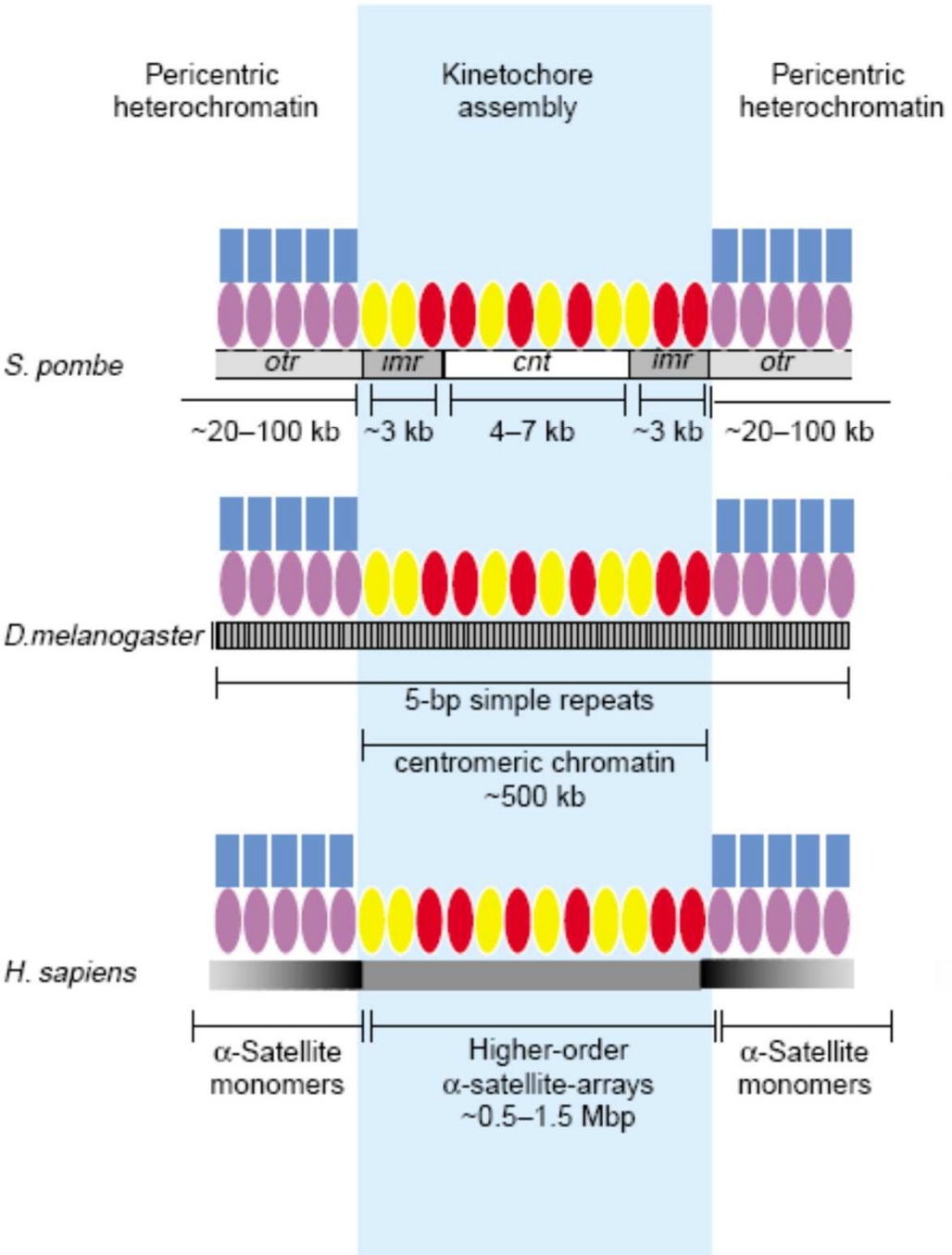
- pouze 3 chromozomy (13 Mbp = 3.5, 4.6, 5.7)
  - velké repetitivní centromery (40-150kb) a 1kb počátky replikace
  - centromery jsou definovány strukturou chromatinu
- siRNA**



- 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) UAAACAACU GCAUAUCUG CCA

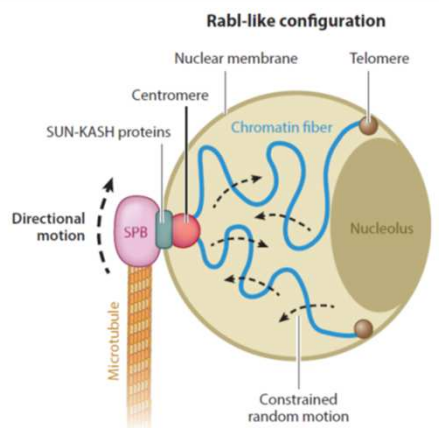
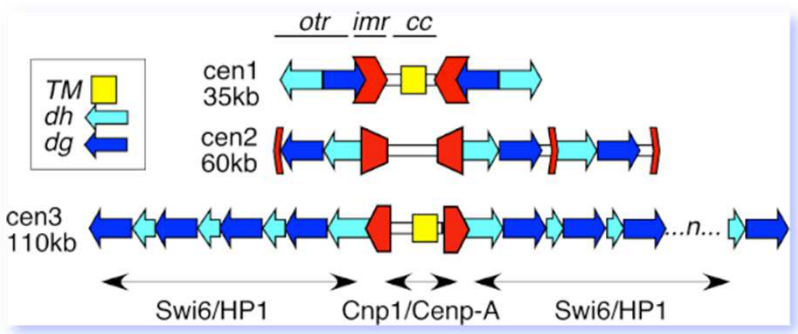
Reinhardt a Bartel, Science, 2002, <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main7.html>

# Eukaryotické centromery



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

Centromery jsou definovány více strukturou chromatinu než jejich sekvencí



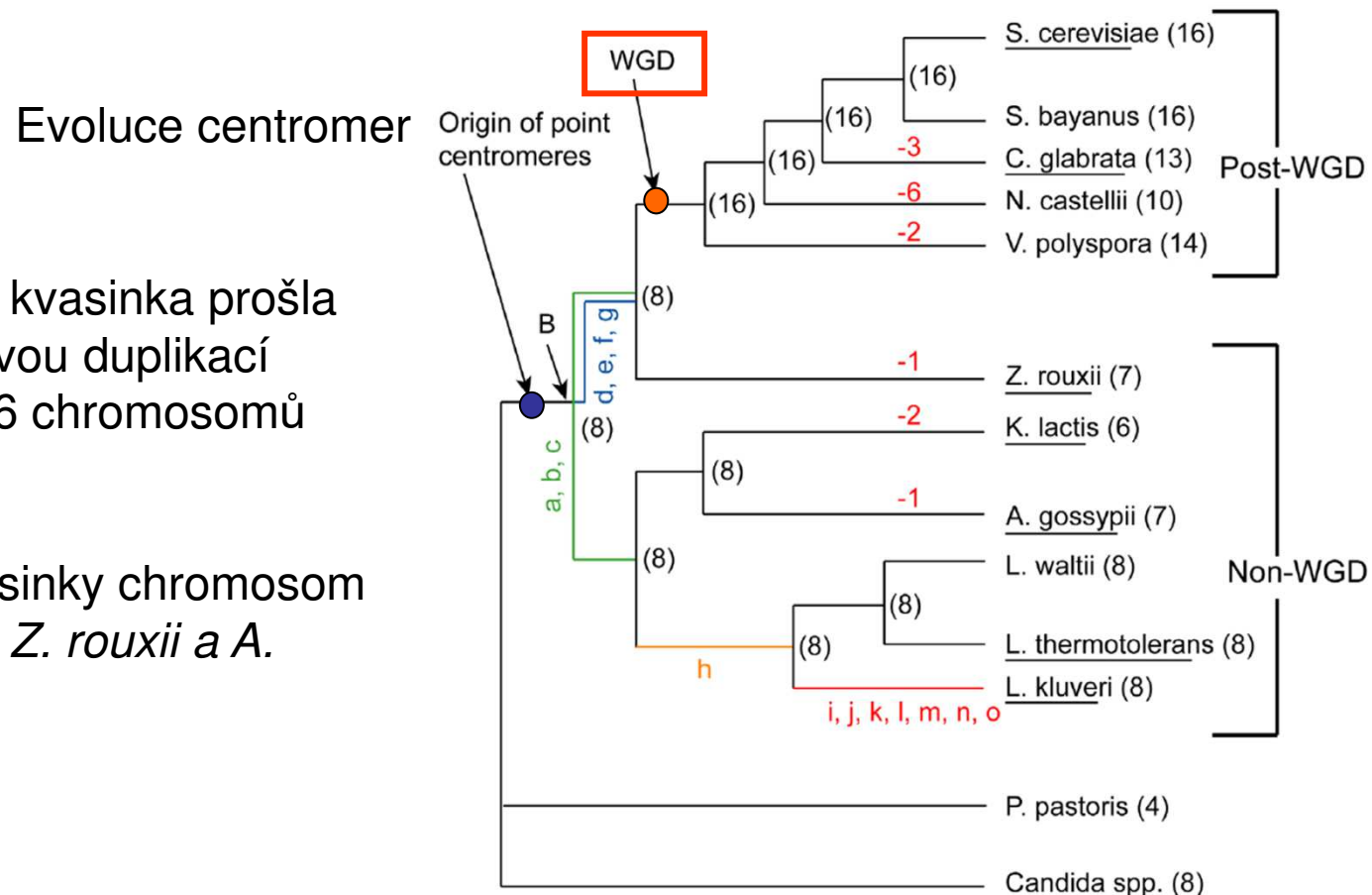
Carroll a Straight, Trends in Cell Biol, 2006

# Prakvasinka a duplikace genomu

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

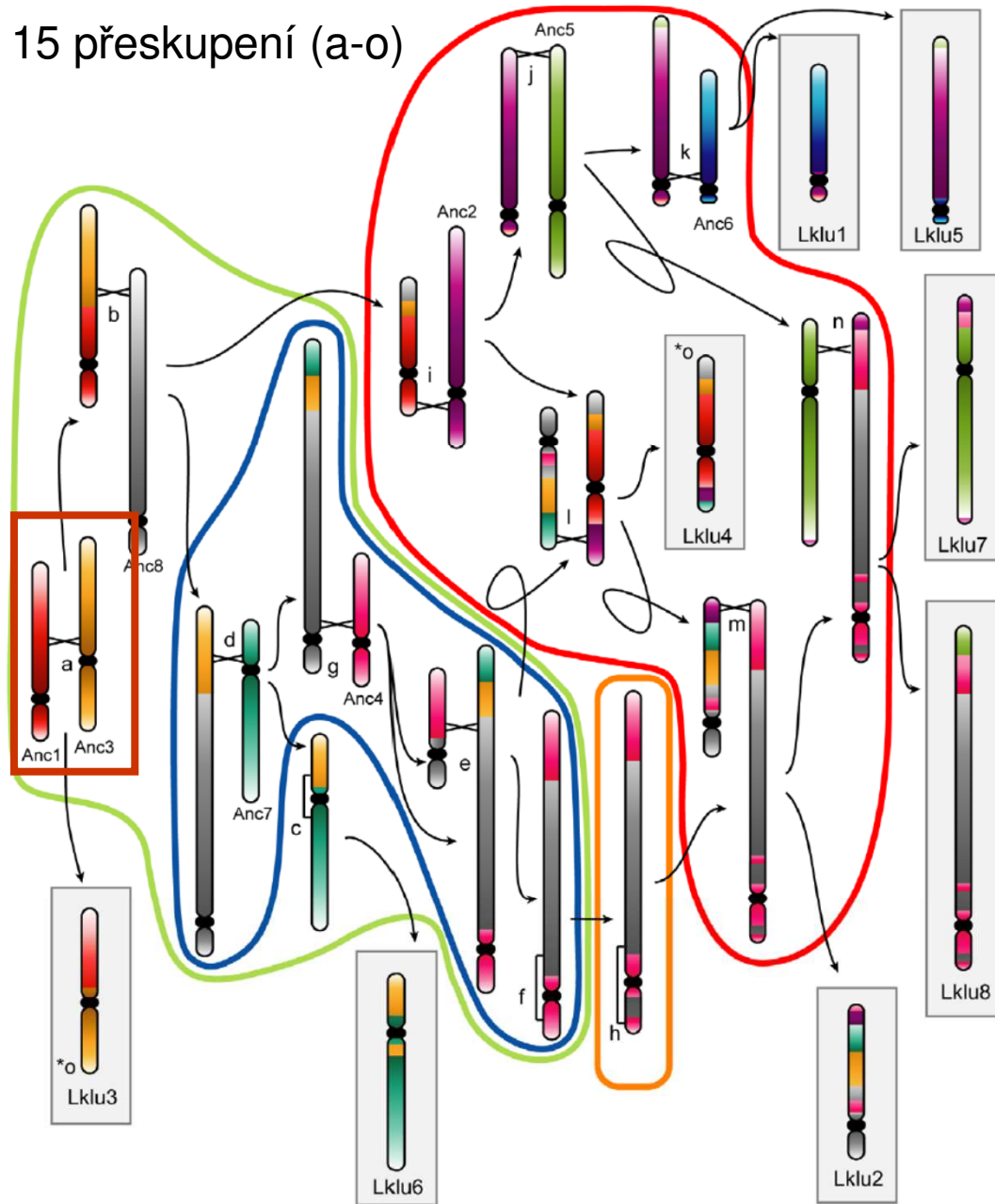
- ancestrální kvasinka prošla celogenomovou duplikací (WGD) 8->16 chromosomů

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

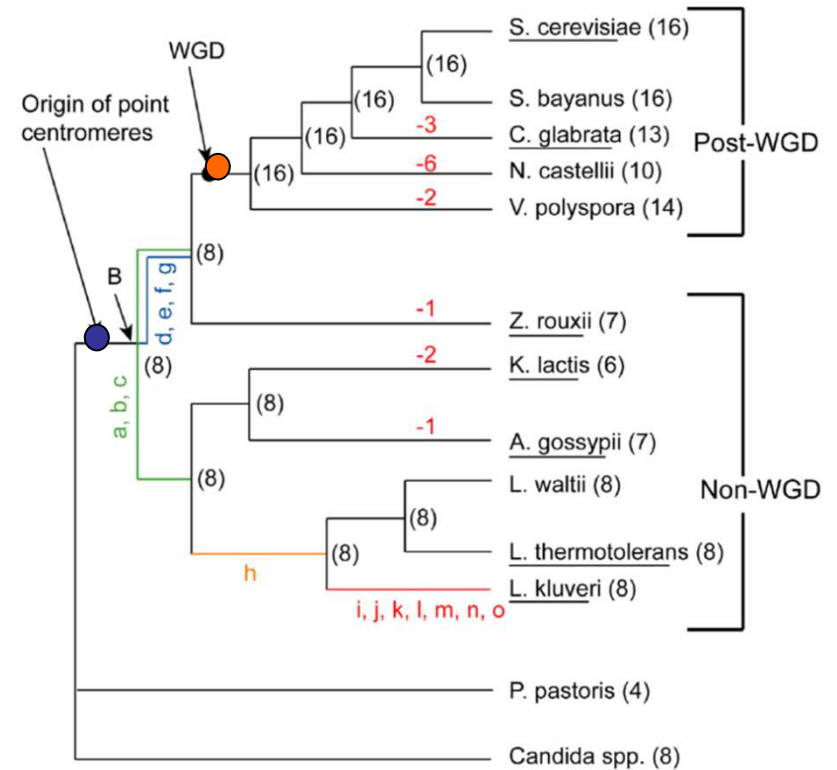




15 přeskupení (a-o)



# Přeskupování chrom. bloků u *L. kluyveri*

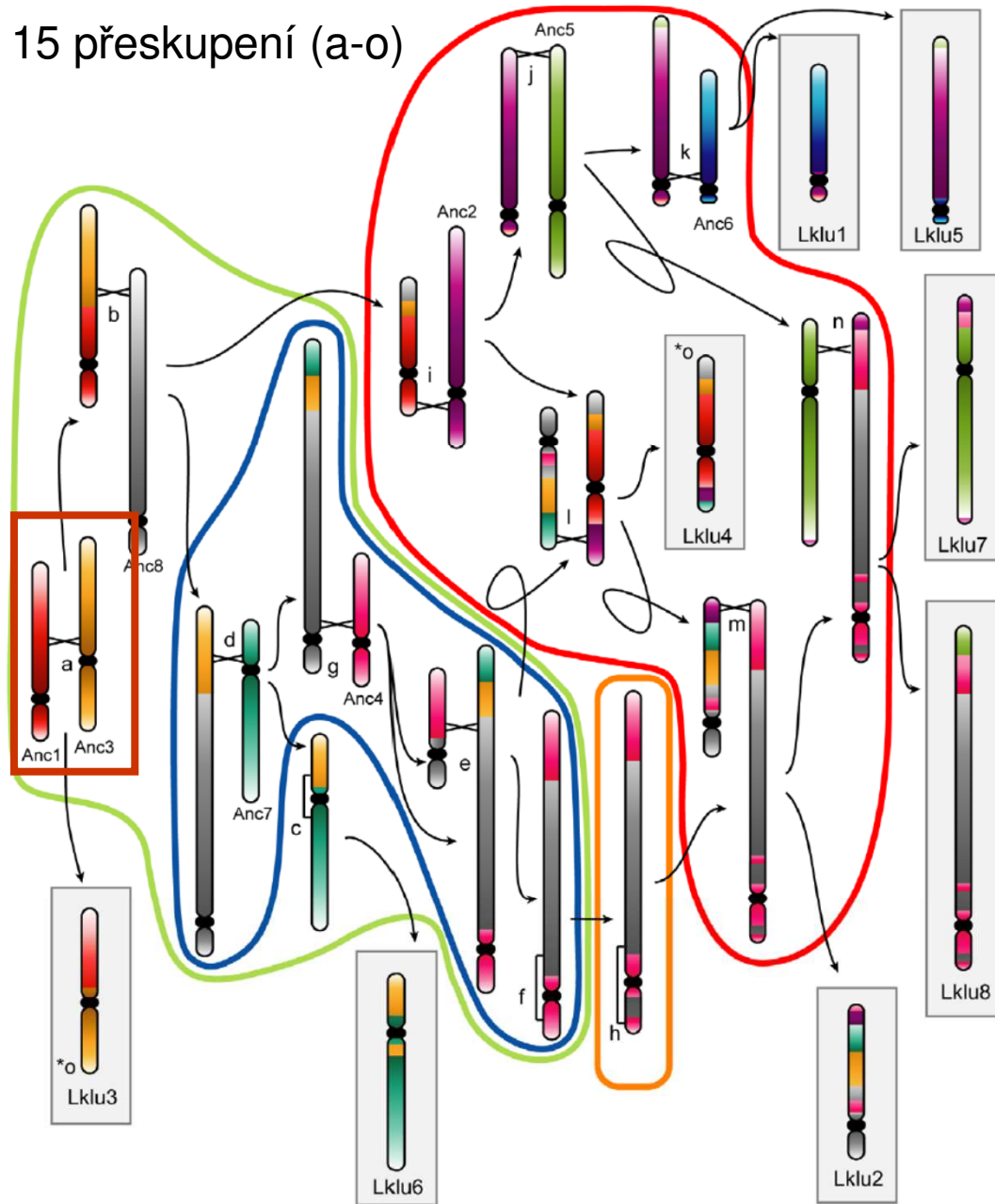


nejblíže anc. genomu je *Lachancea kluyveri*  
(8 chromosomů, nejméně = 15 přeskupení v genomu)

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011



15 přeskupení (a-o)



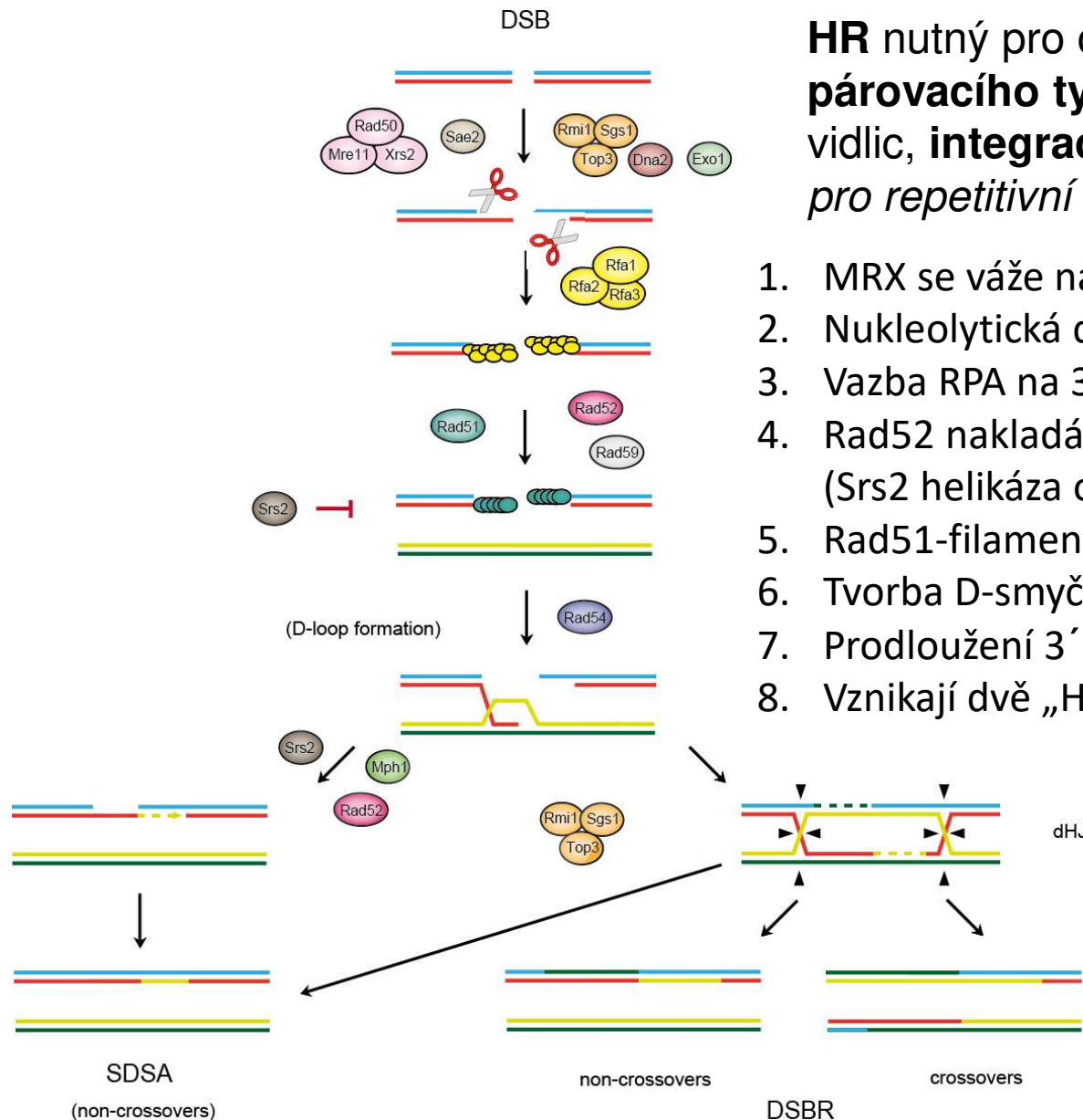
# Přeskupování chrom. bloků u *L. kluyveri*

- 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



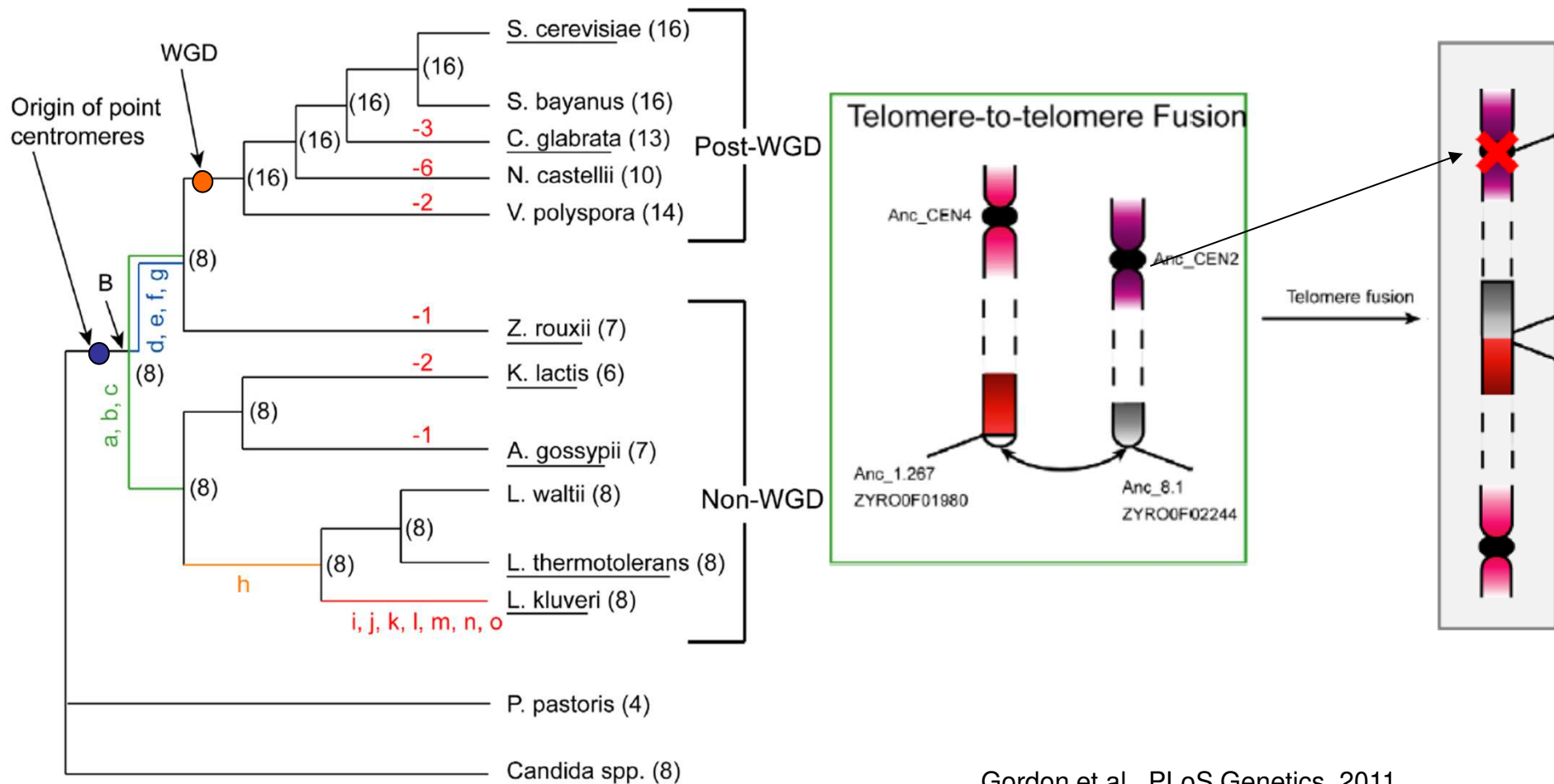
**HR** nutný pro opravu DSB, **přepínání párovacího typu**, meiosu, restart replikačních vidlic, **integraci DNA do genomu** - *nebezpečný pro repetitivní sekvence*

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 helicáza odstraňuje Rad51).
5. Rad51-filament hledá homologní DNA (Rad54).
6. Tvorba D-smyčky
7. Prodloužení 3' konce filamentu (DNA polymeráza  $\delta$ )
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 (NHEJ) - současně ztratily centromeru (chromosom nemůže mít 2 centromery – problémy se segregací)

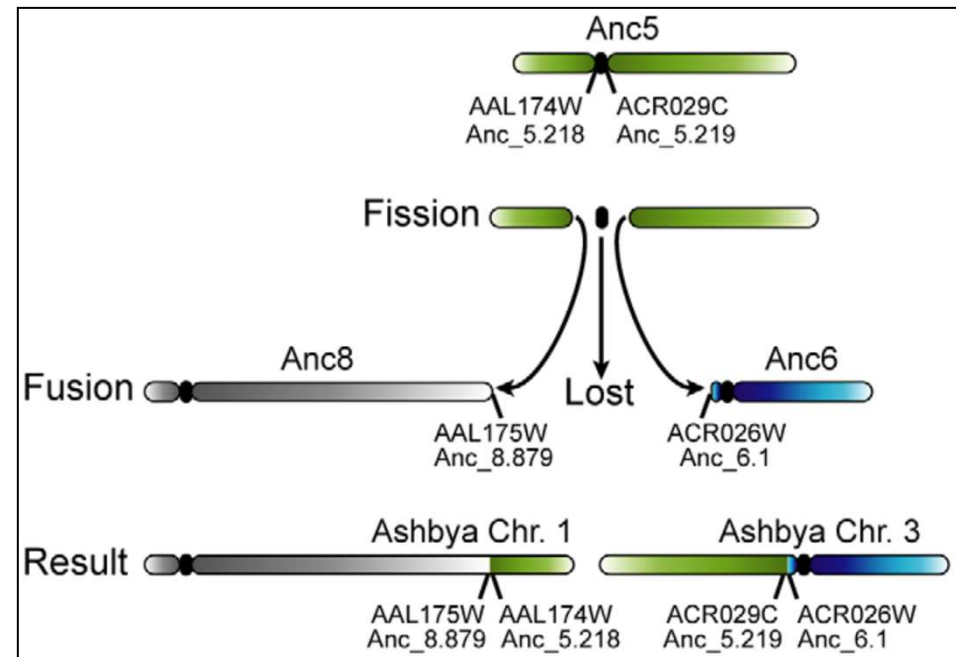
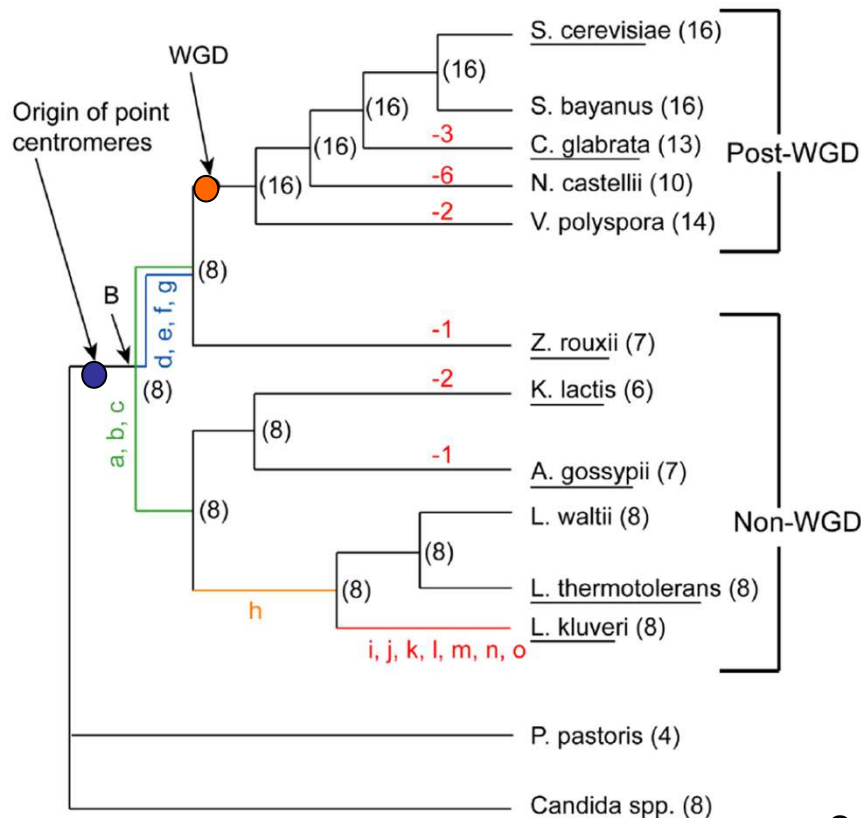


# Redukce chromosomů fúzí

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

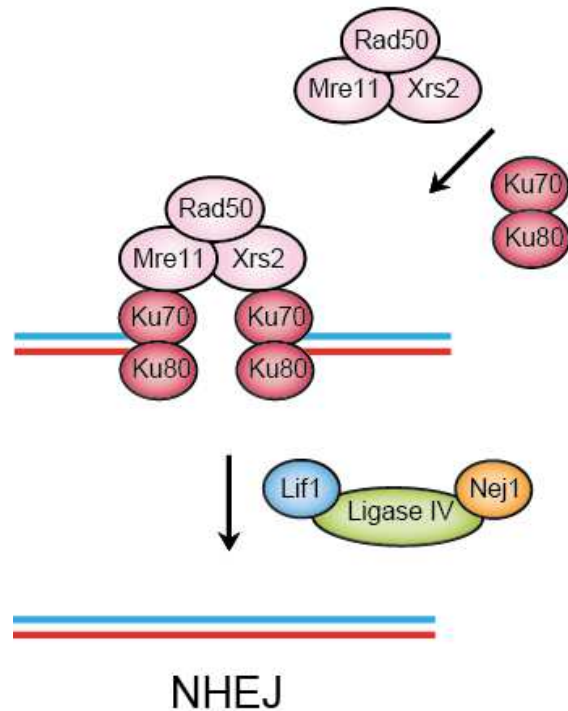
- geny v oblasti telomer (neesenciální, málo transkribovány, malý evoluční tlak - mutují více než ostatní geny - telomery jako „kotlík“ evoluce = „cooking pots of evolution“)

- při fúzi chromozomů se geny z telomerových oblastí dostávají dovnitř chromozomu (změna míry exprese uvnitř chromozomu)



# Nehomologické spojování konců

## Non-homologous end joining (NHEJ)

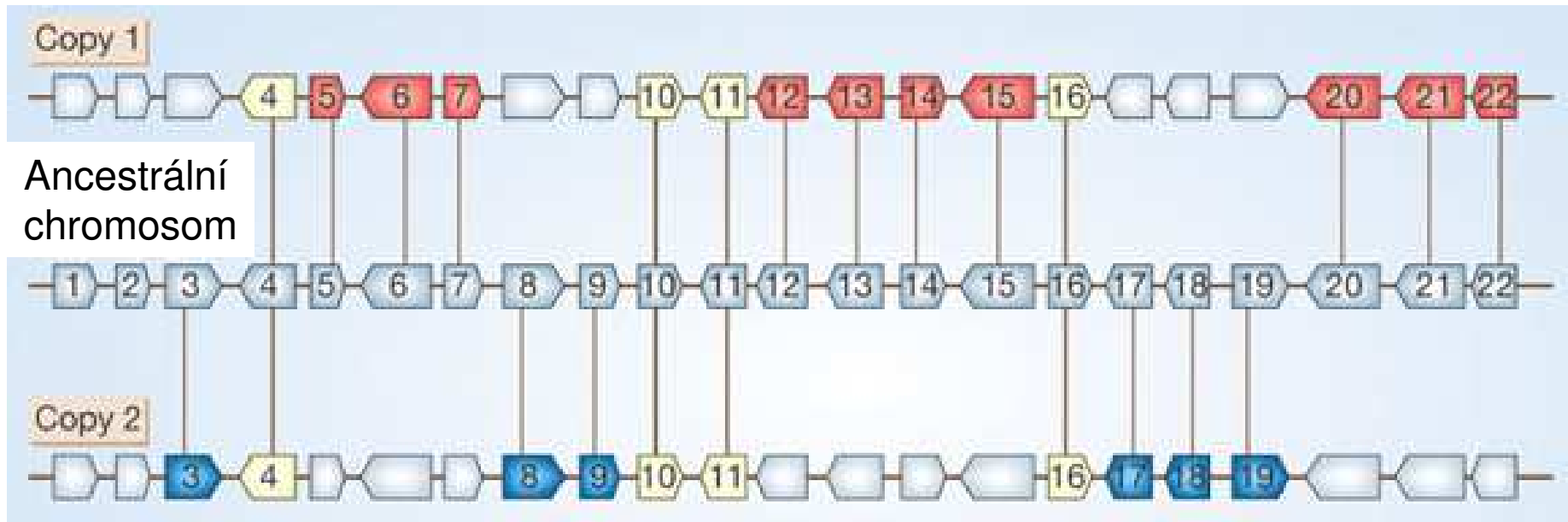
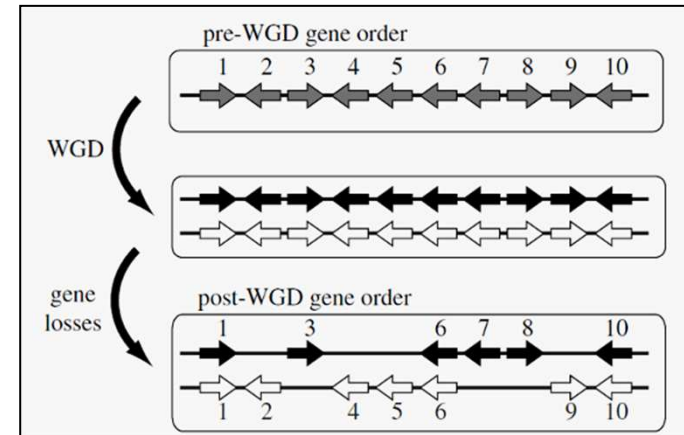
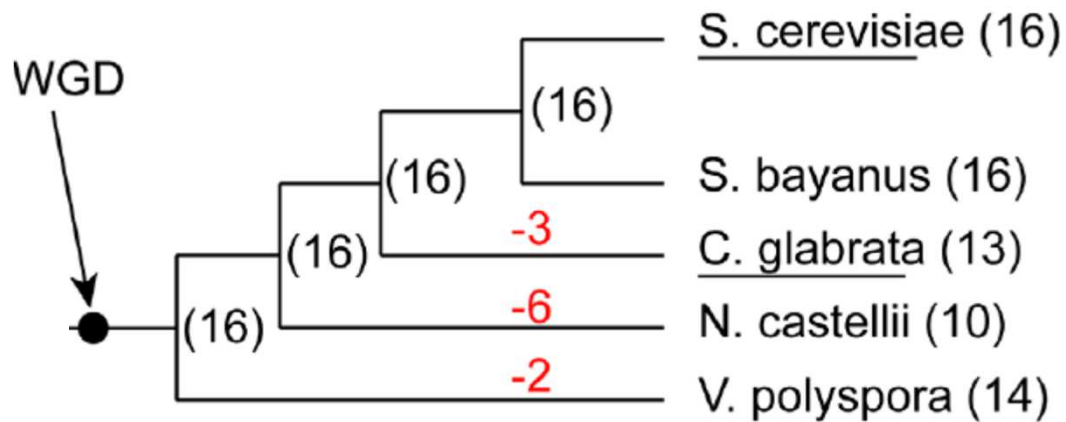


1. Vazba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) komplexu, Ku heterodimeru (Yku70-Yku80) na zlomené konce DNA
2. Vazba DNA ligázy IV (**Dnl4**) a jejích pomocných proteinů Lif1 a Nej1.
3. Hledání komplementarity mezi převisy dvou konců DNA.
4. Úprava konců - syntéza DNA (Pol4 DNA polymeráza)
5. Religace konců

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)

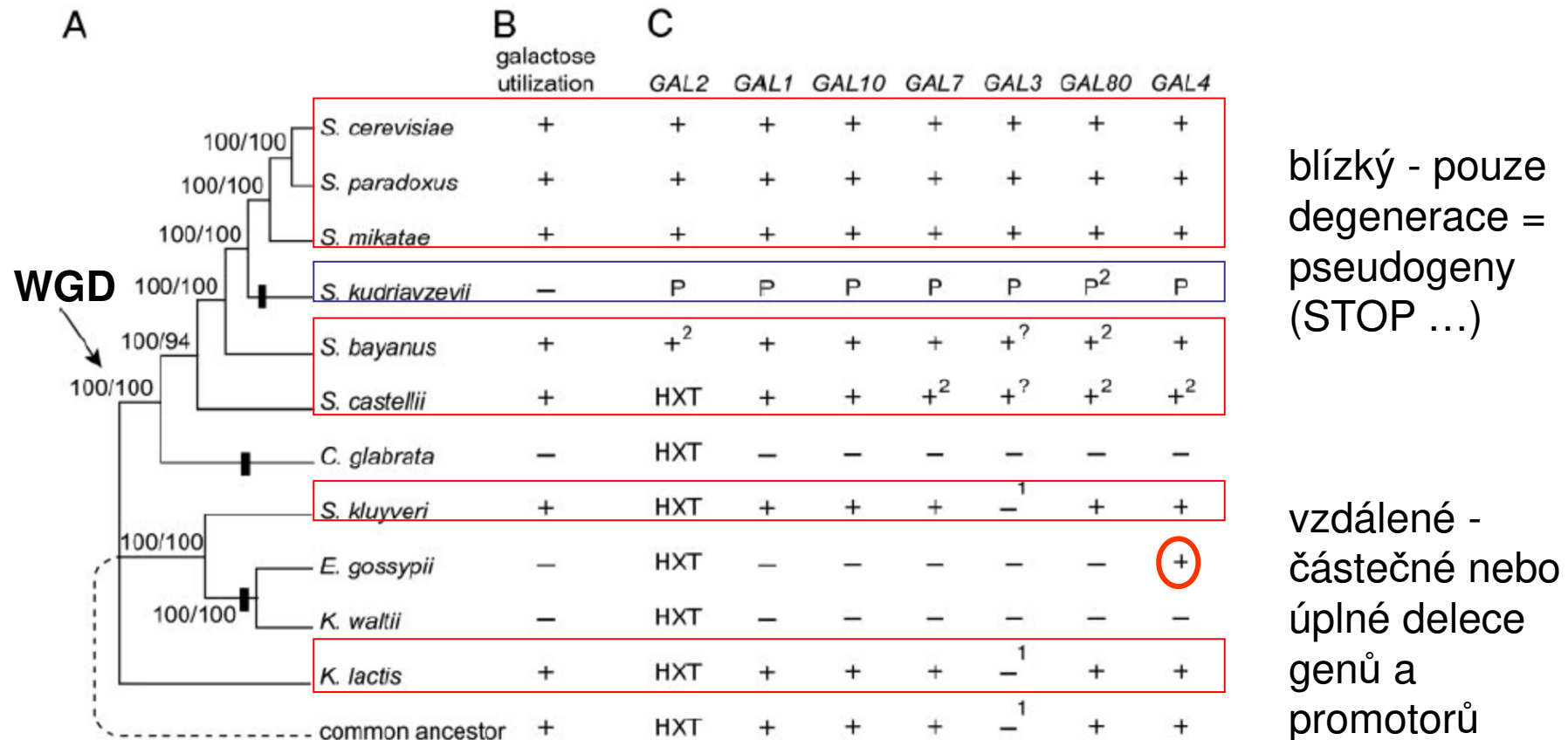
# Celogenomová duplikace – *Saccharomycotina*

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

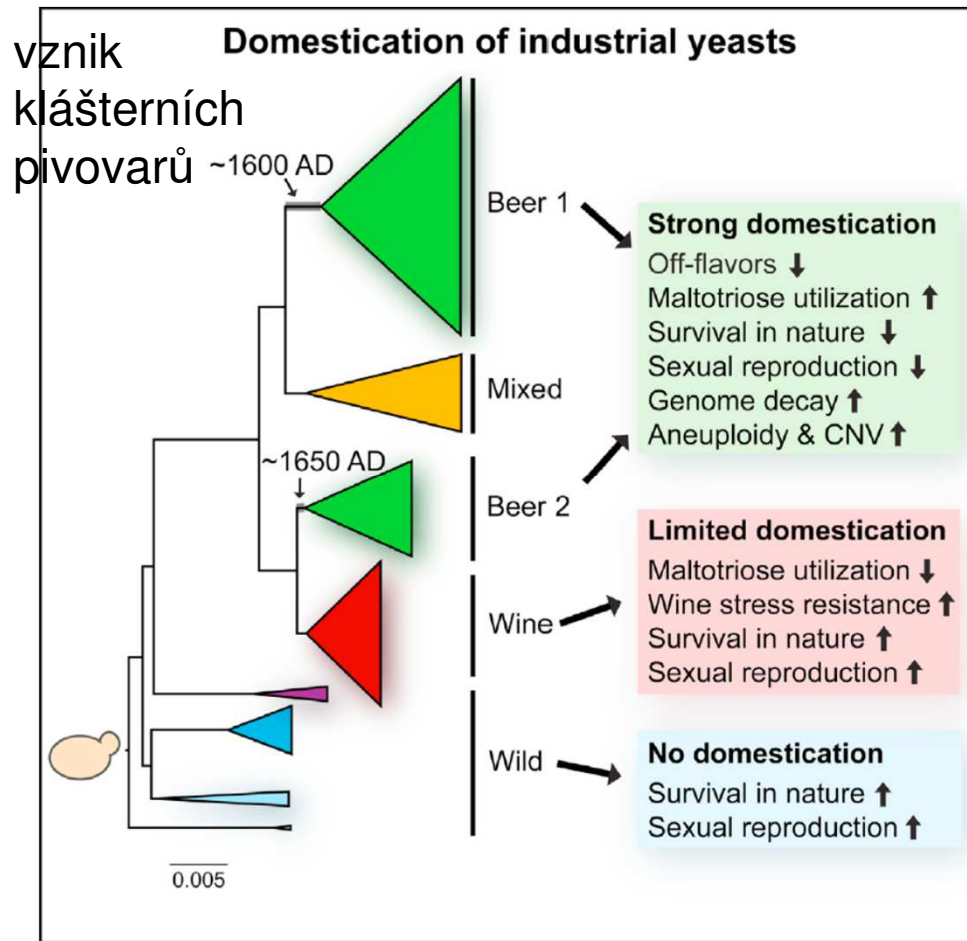


Hittinger et al., PNAS, 2004

- 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)

# amplifikace genů

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



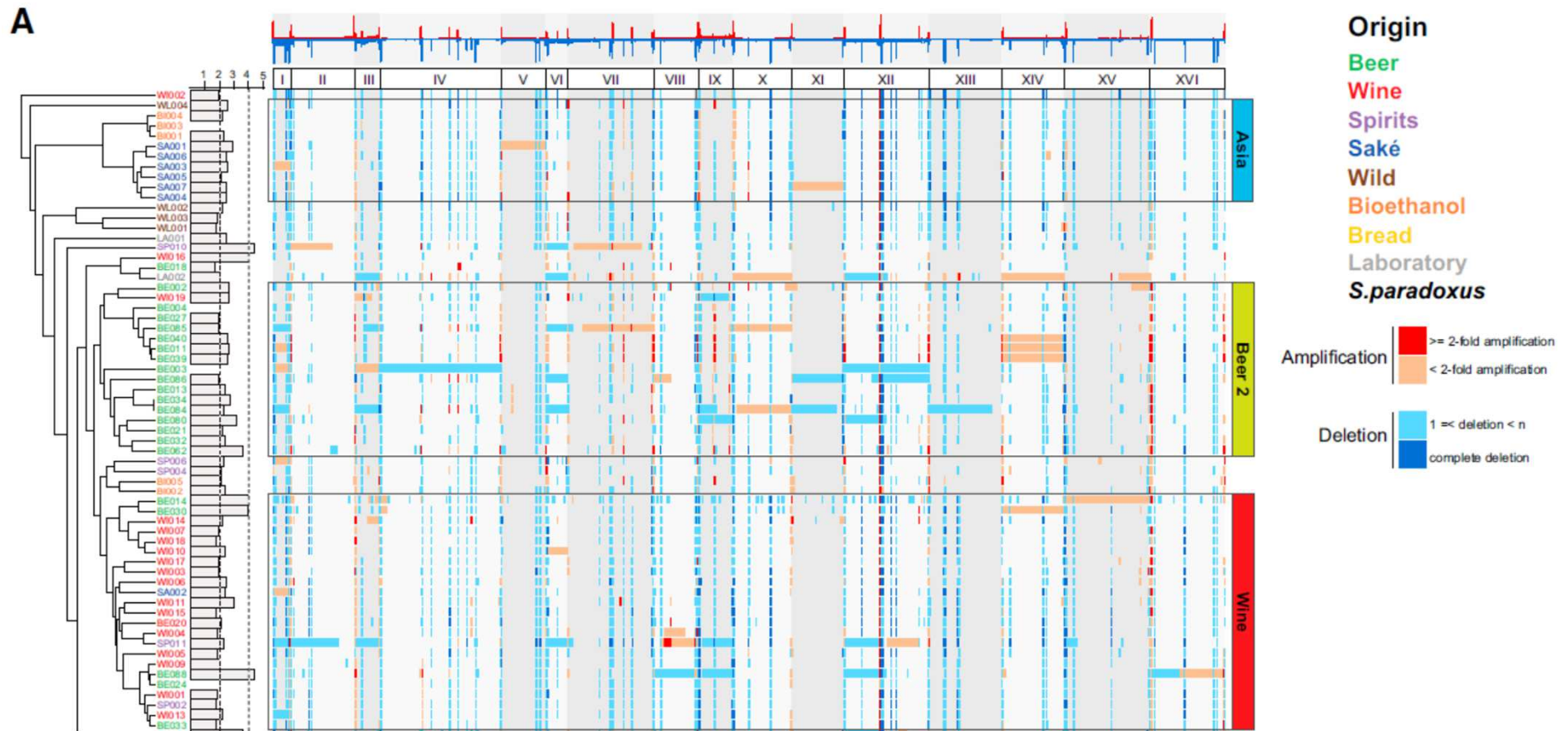
„technologie“ piva ~3000 BC

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) ...



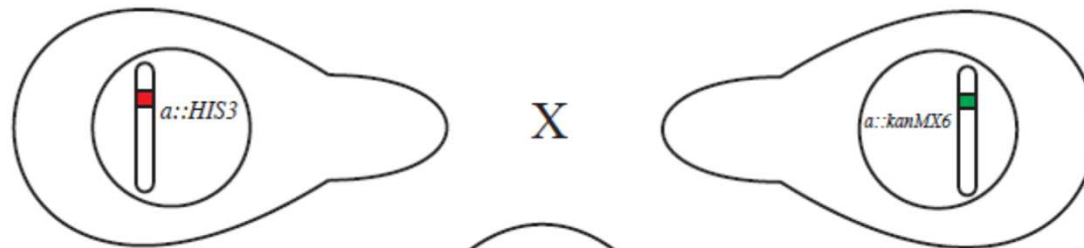
nejvíce amplifikací v MAL genech (IMA2, IMA3, MAL31, MAL33, MAL32) u pivních kvasinek (rostou na maltose), zatímco ve vinných kmenech došlo k mnoha delecím těchto genů (ve vinném moštu maltosa není) – obecně více delecí než amplifikací (v genomech analyzovaných kvasinek)

mnoho pivních kvasinek je polyploidních – stres ...

# Aneuploidie

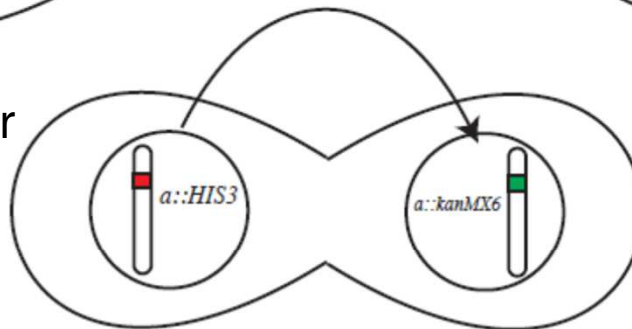
*MAT $\alpha$ , kar1 $\Delta$ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3*

*MATa, a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100*



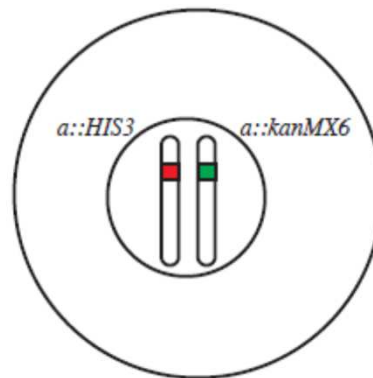
*KAR1* gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

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



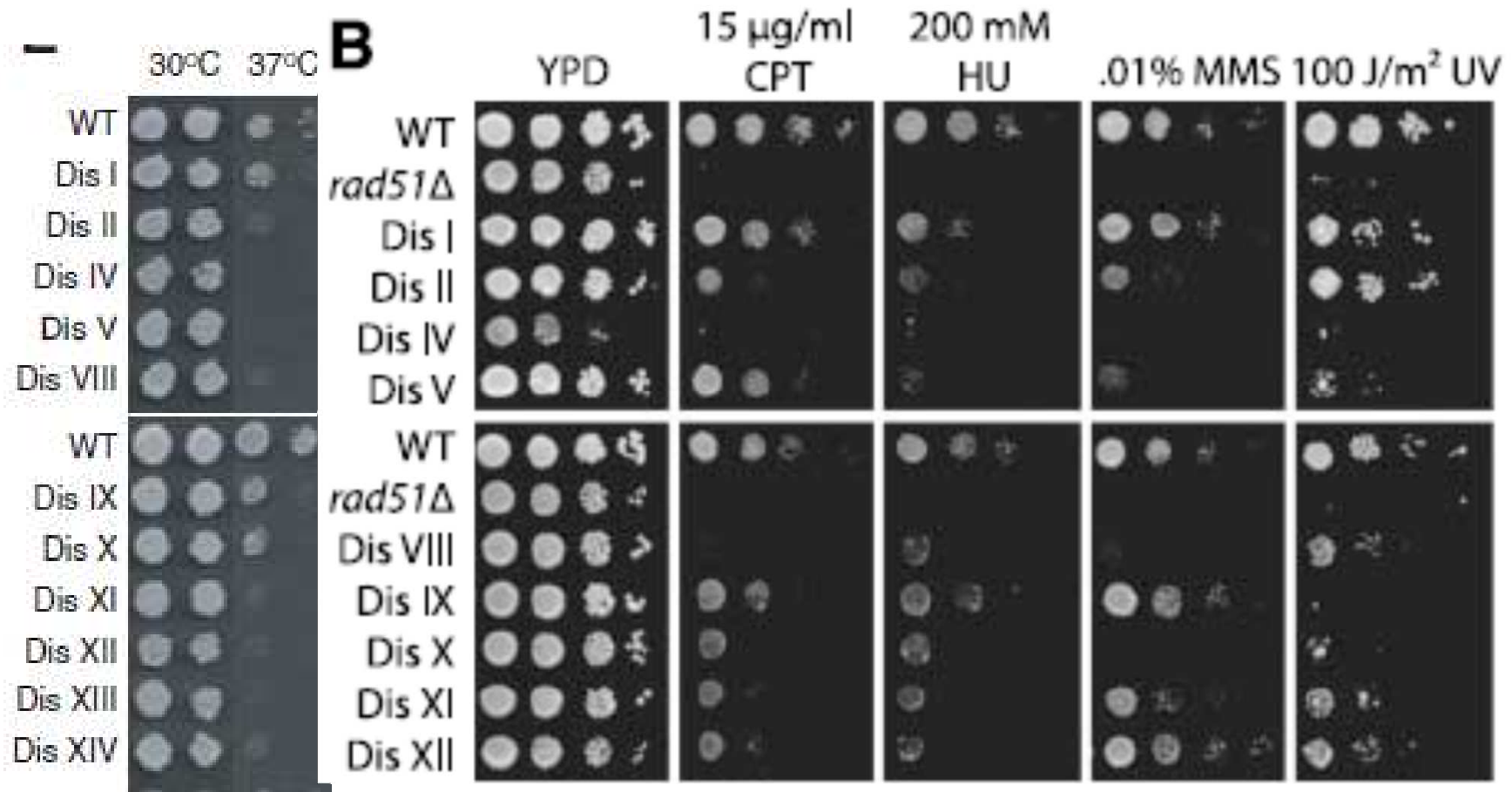
Select for: Can<sup>R</sup>, -His and Kan<sup>R</sup>

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



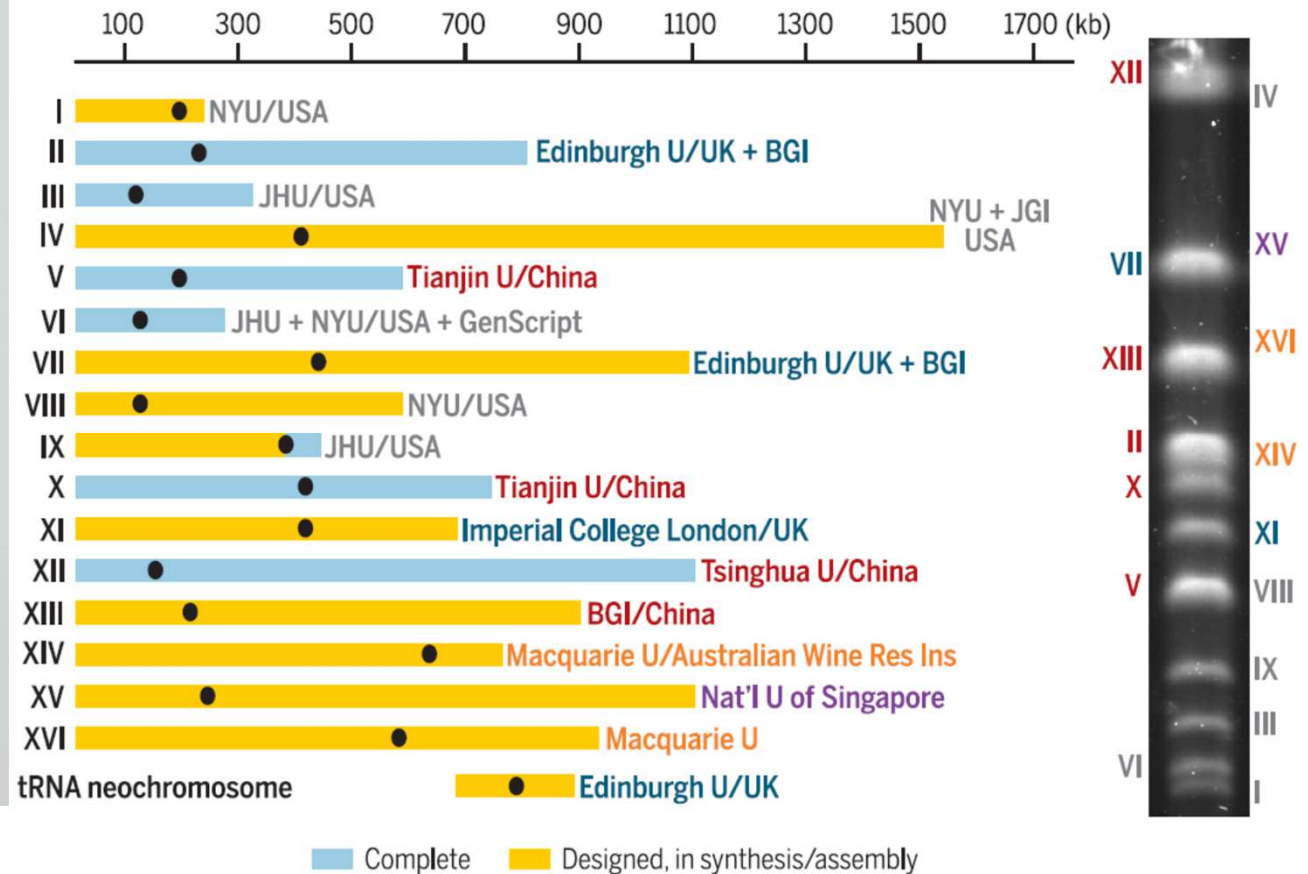
# Aneuploidie způsobuje genomovou nestabilitu - rakovina

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



Torres et al, Science, 2007



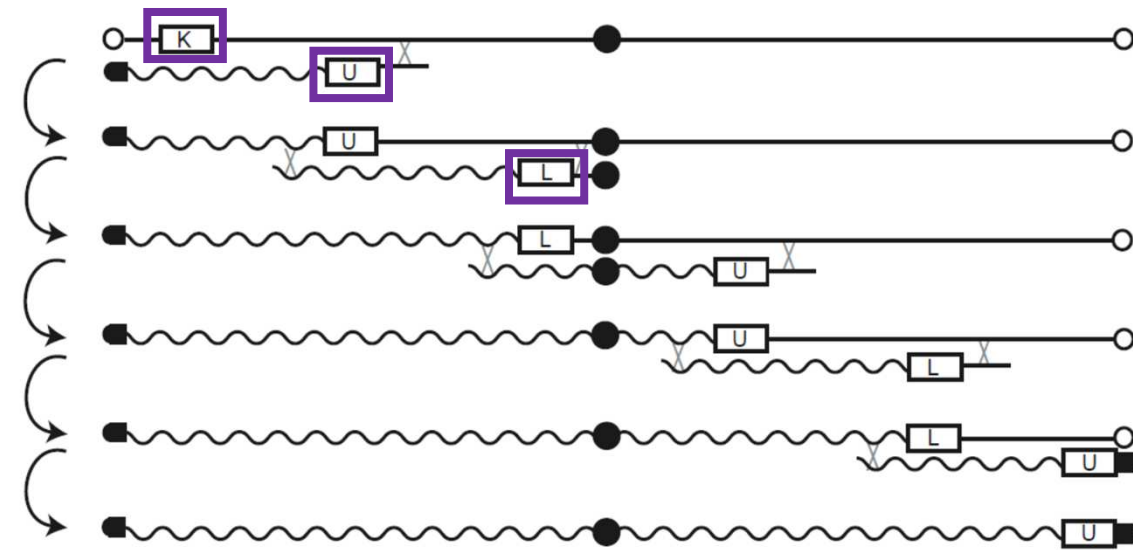


snaha vytvořit „syntetický“ eukaryontní organismus

*Konsorcium (jako EUROFUN ... projekty)*

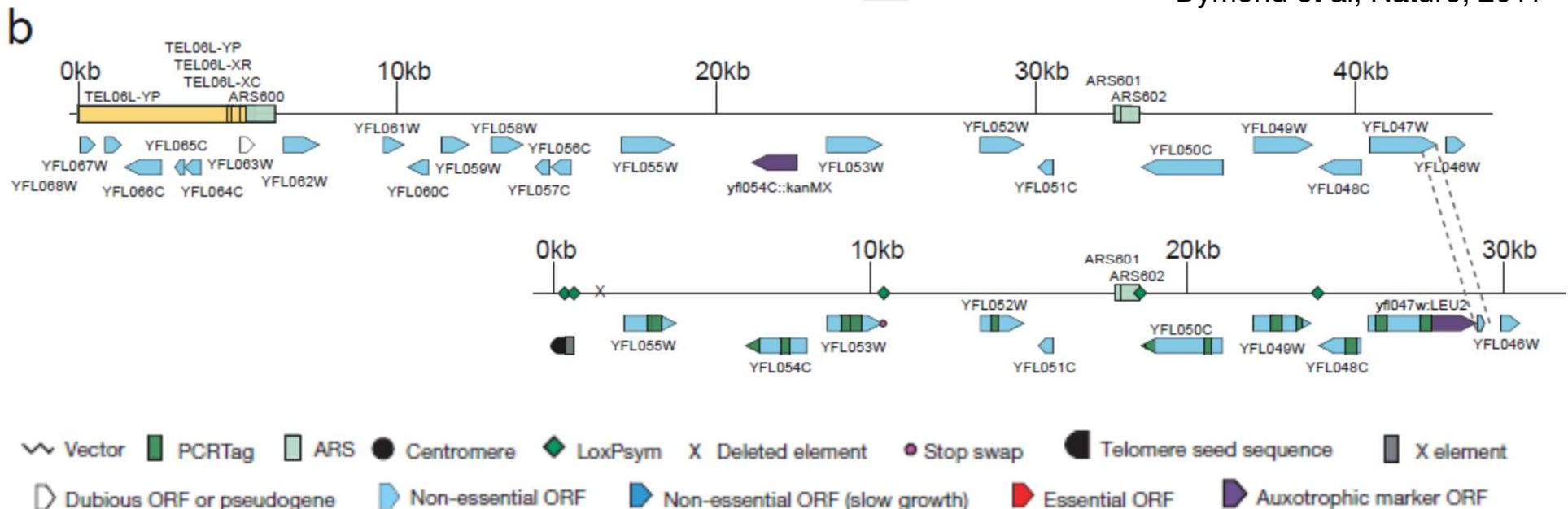


# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu



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

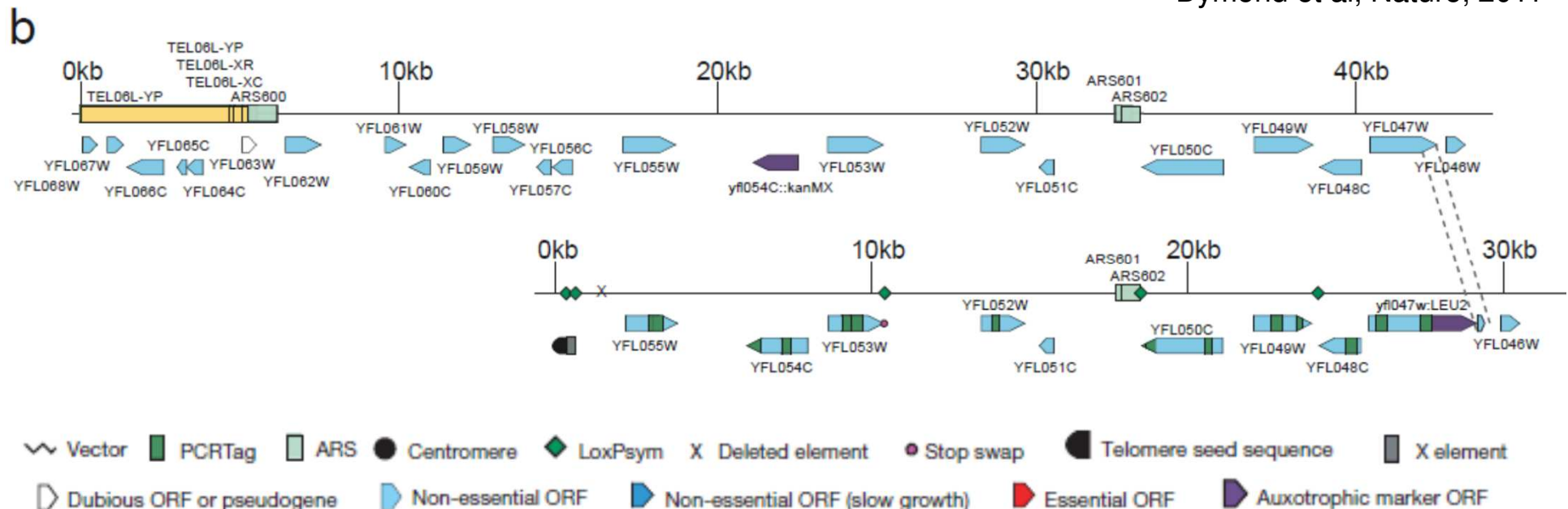
Dymond et al, Nature, 2011



# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů ... wt fenotyp (testovali UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ...)
- 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-essenčních genů

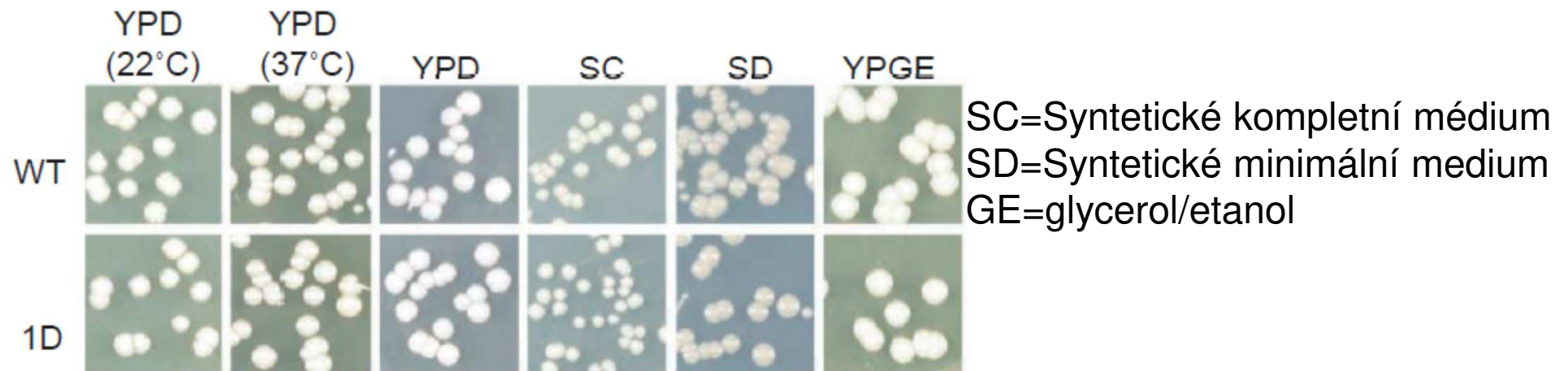
Dymond et al, Nature, 2011



# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů ... wt fenotyp (testovali UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ...)
- 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

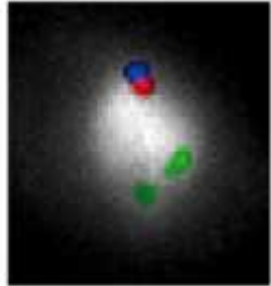
Dymond et al, Nature, 2011



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

# Organizace chromosomů

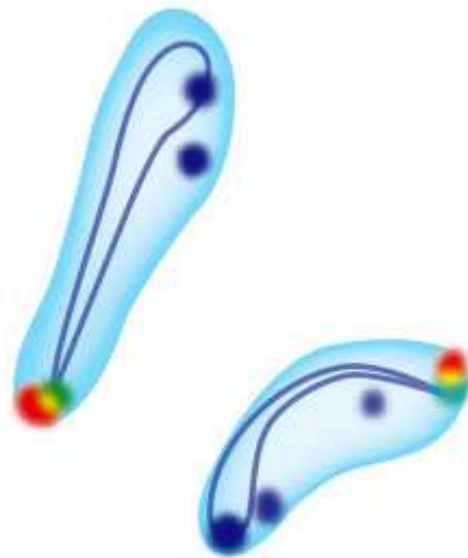
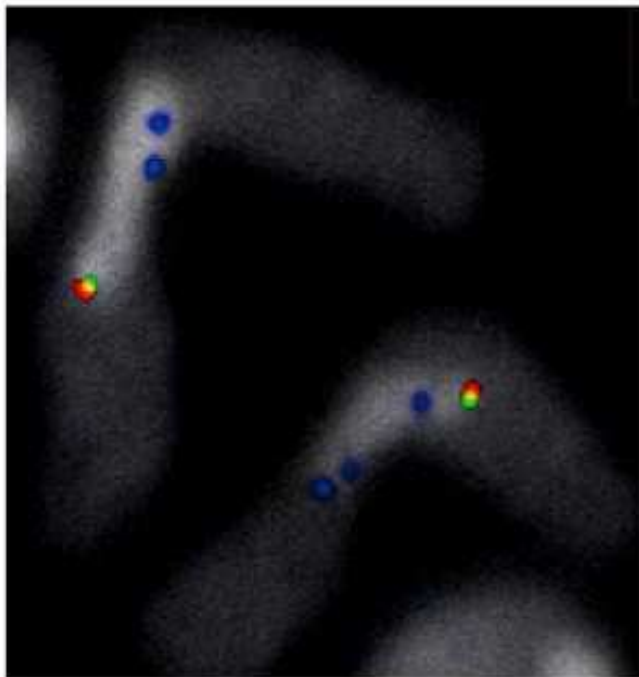
Mitotic interphase



- centromere
- telomere
- SPB

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

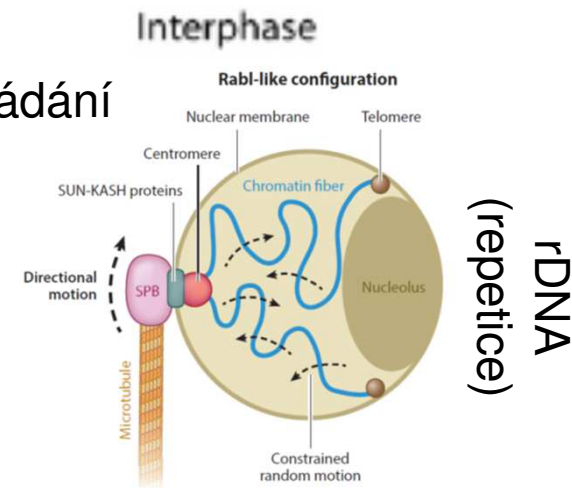
Meiotic prophase



SPB



RABL uspořádání

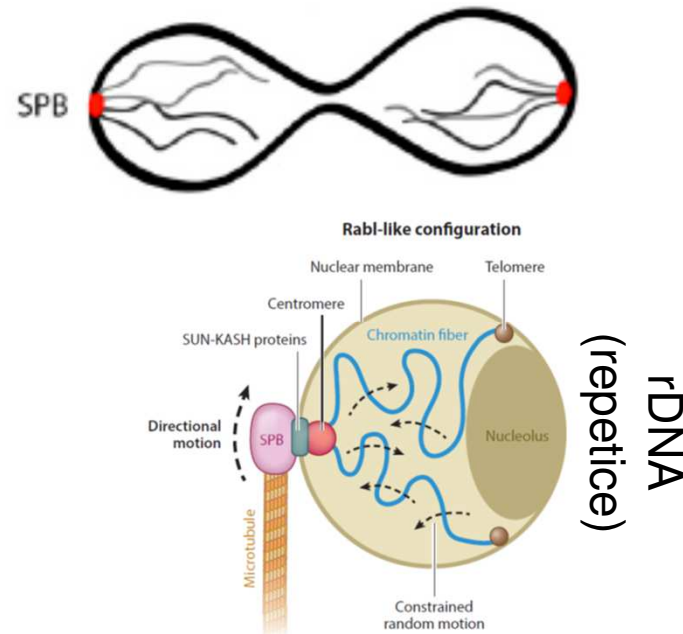
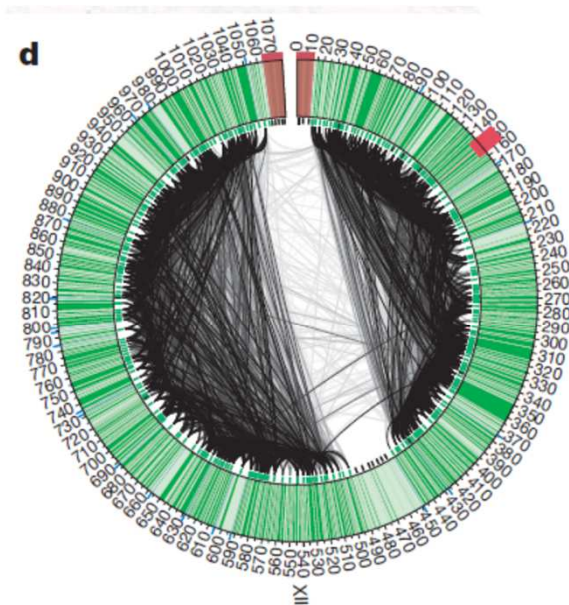


v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

v meiotickém jádře jsou telomery blíž SPB

# rDNA - repetice

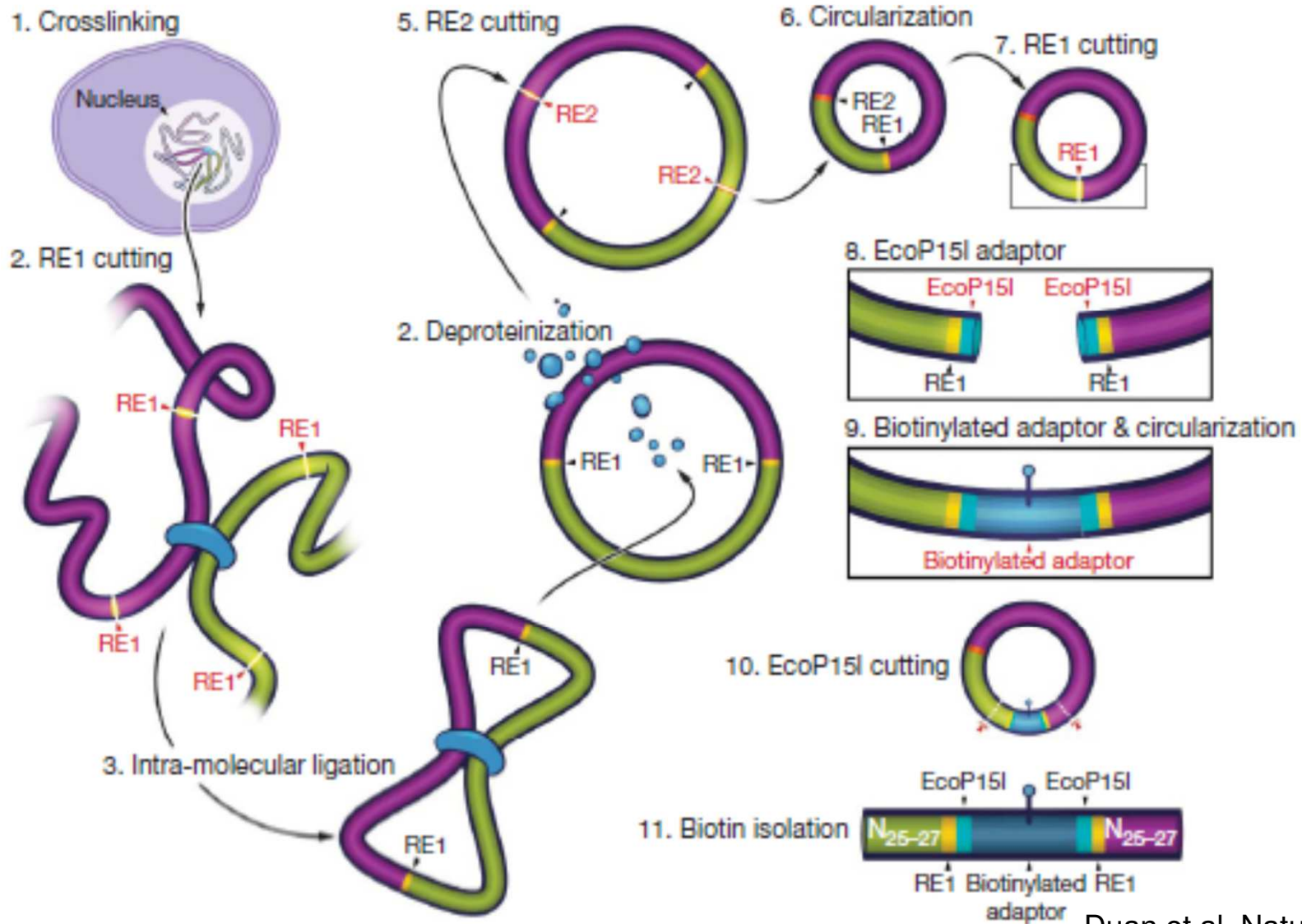
- rDNA kóduje geny pro ribosomální RNA (chromosom XII)
- Je vysoce konzervativní
  - Identifikace a odlišování kvasinkových druhů
  - Sledování evolučních trajektorií
- Až 200 kopií v řadě za sebou
  - Problém s homologní rekombinací (lokalizace do jadérka)
  - Problém s replikací – musí probíhat ve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



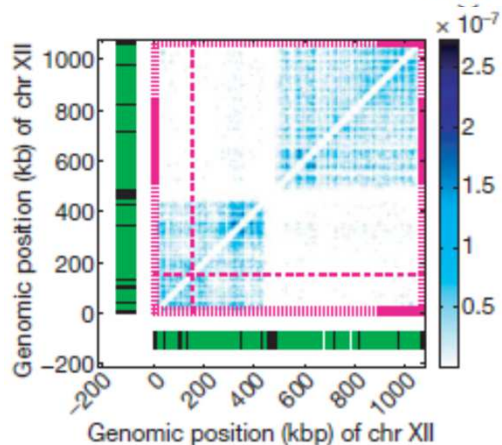
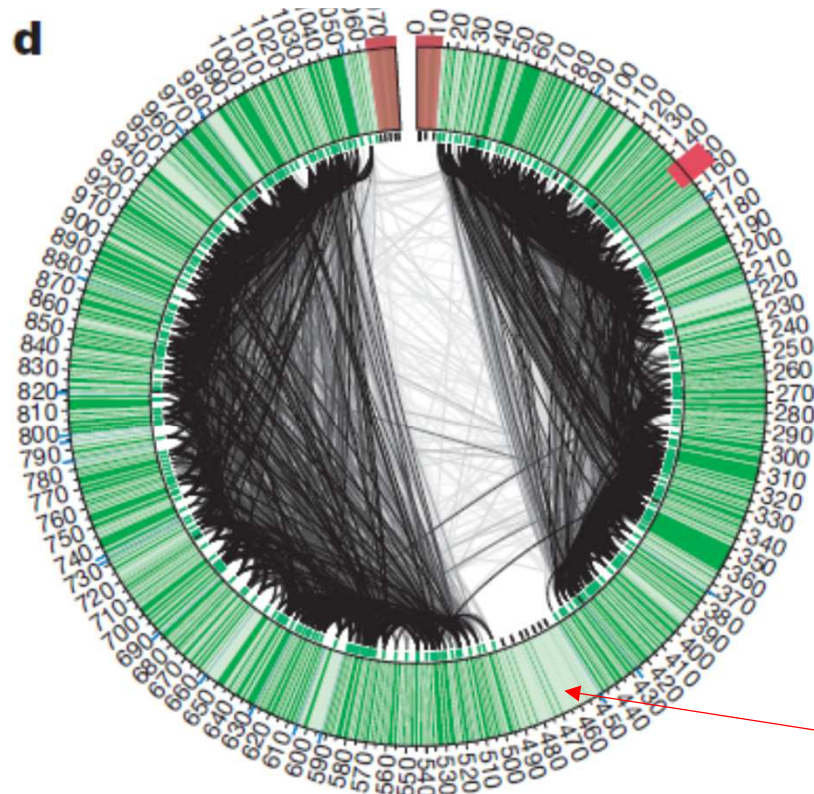


# 3D organizace chromosomů v *S.c.*

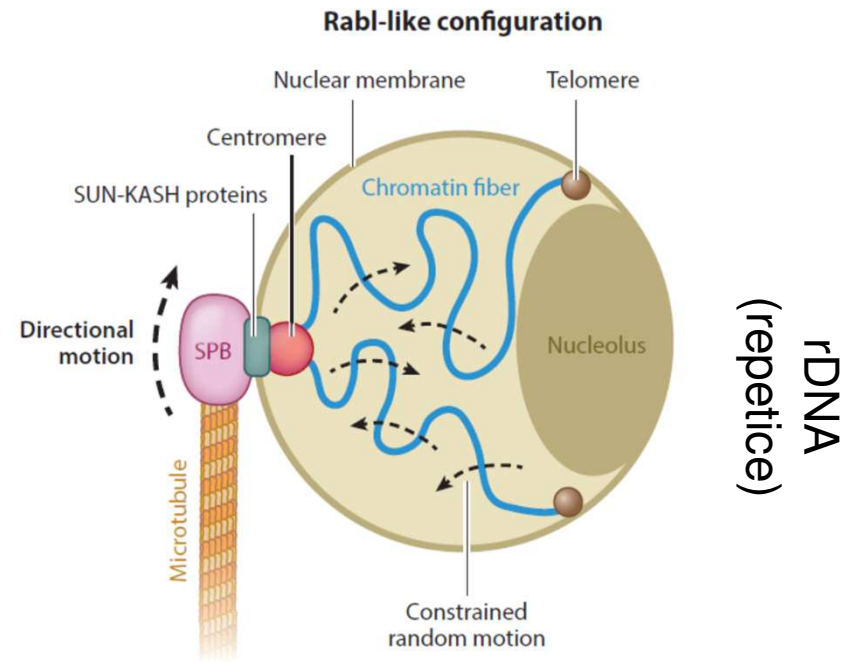
## 3C – chromosome conformation capture



# Chromosom XII



intrachromosomální interakce



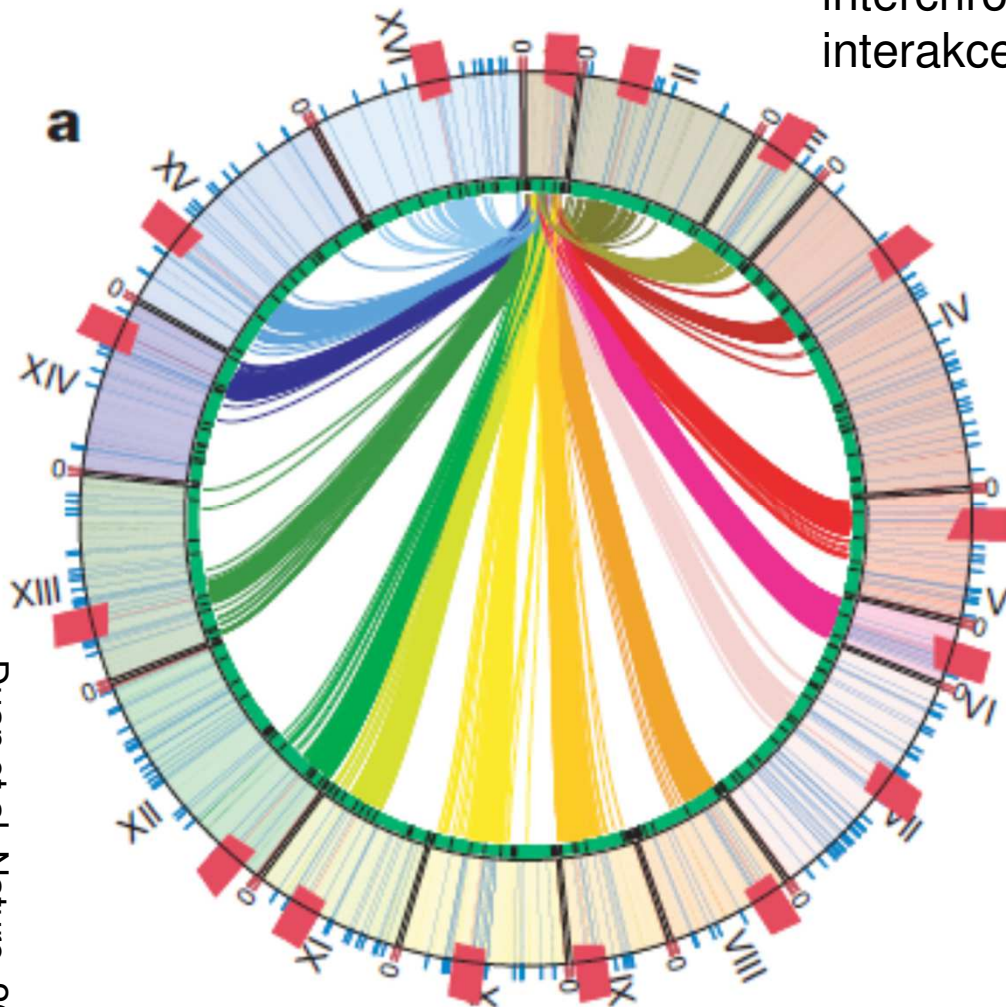
rDNA  
(repetice)

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



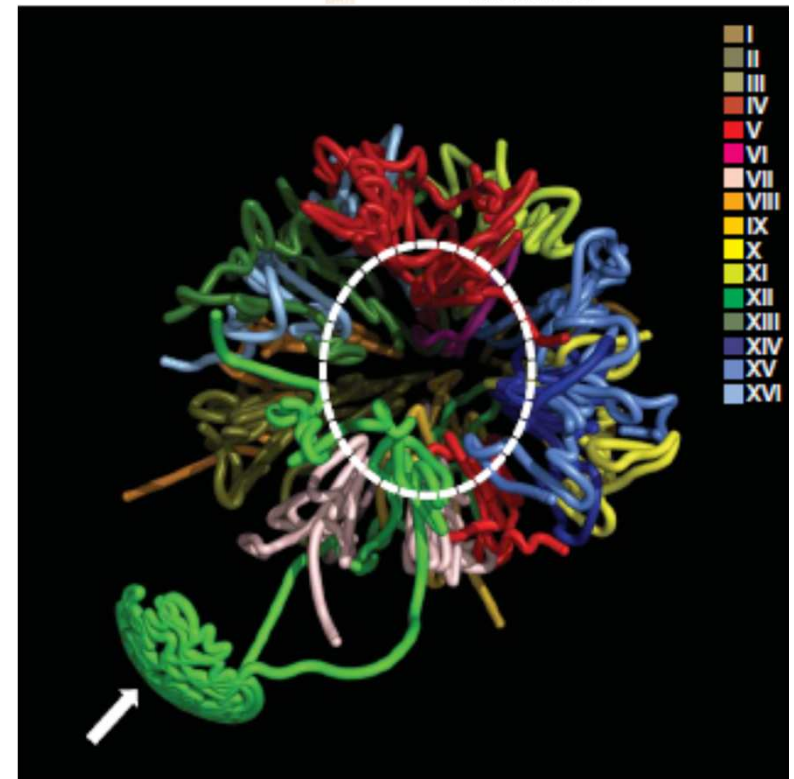
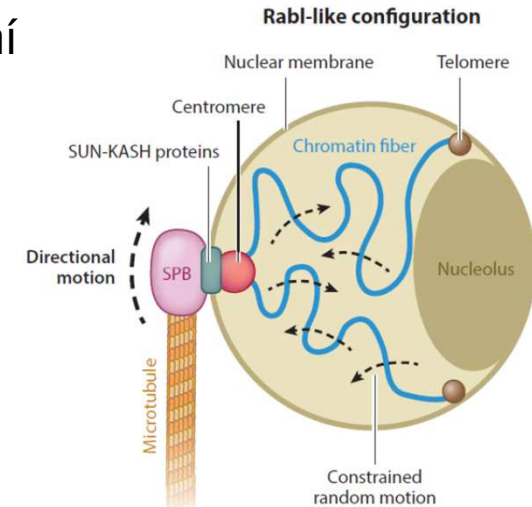
# Všechny centromery jsou blízko sebe

interchromosomální interakce



Duan et al, Nature, 2010

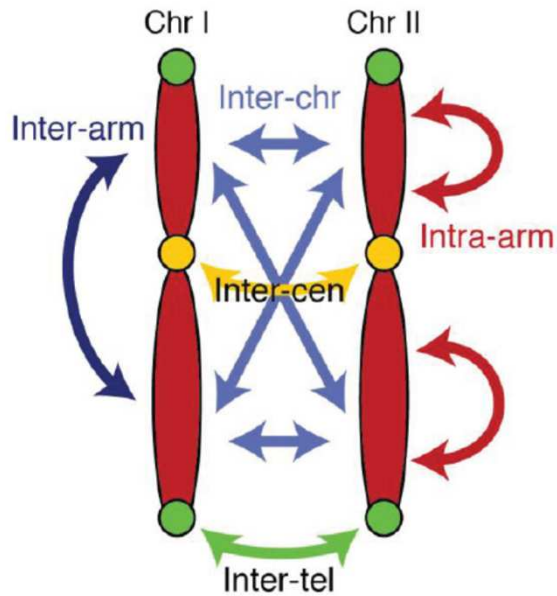
v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)



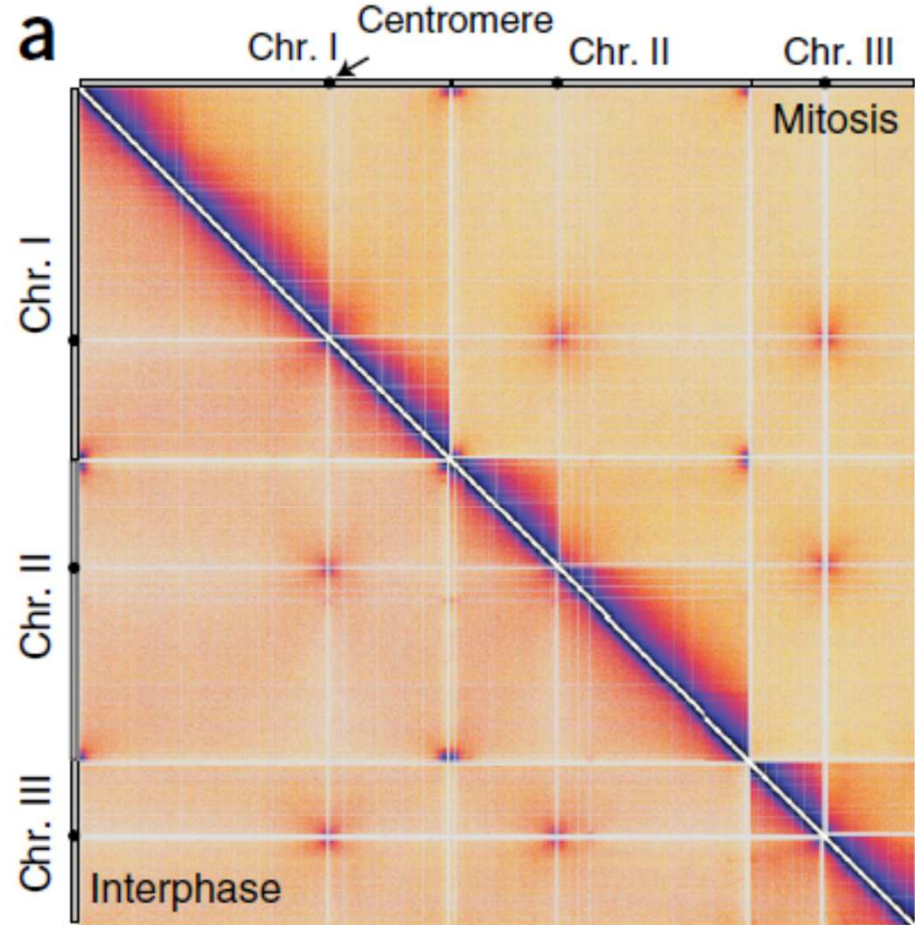
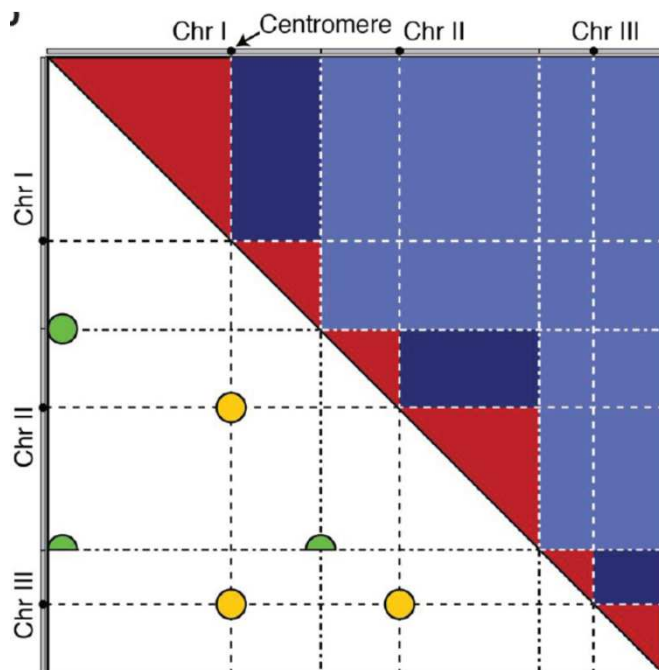




# Kondenzace chromosomů v mitóze



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



Kakui et al, Nat Genet, 2017

Contact probability  
0.00005 | | 0.005

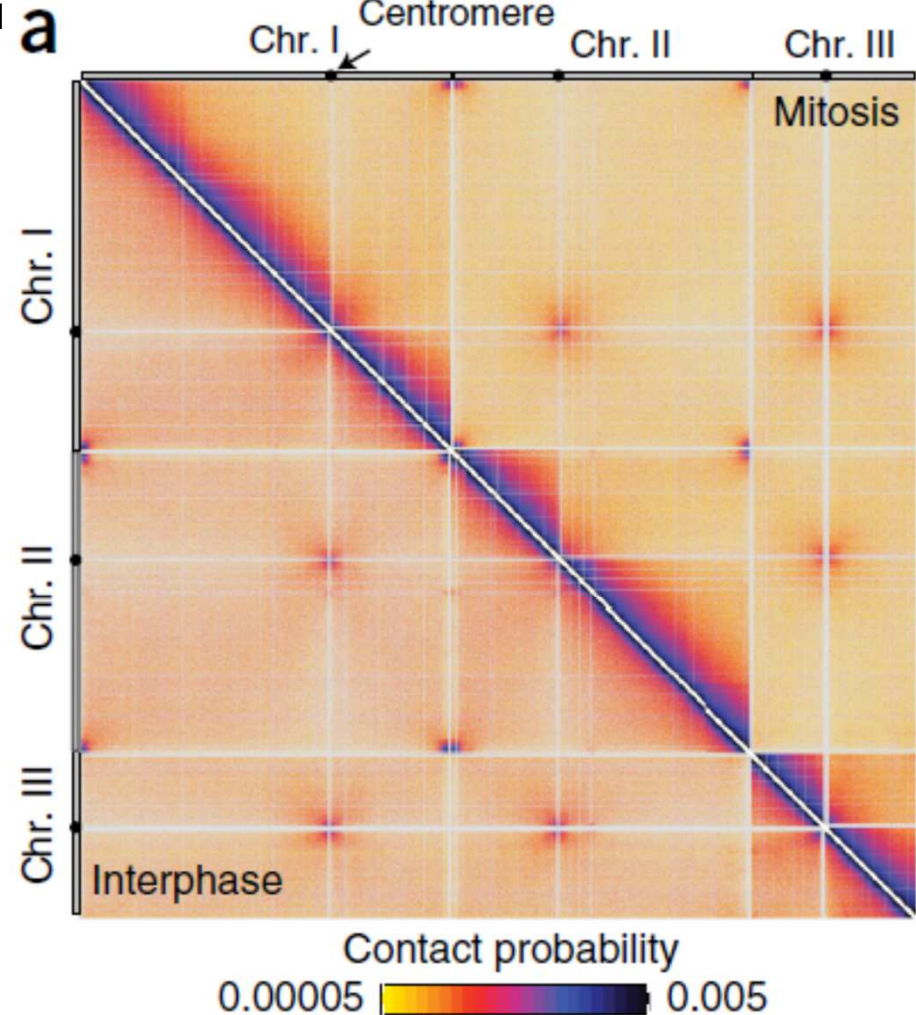
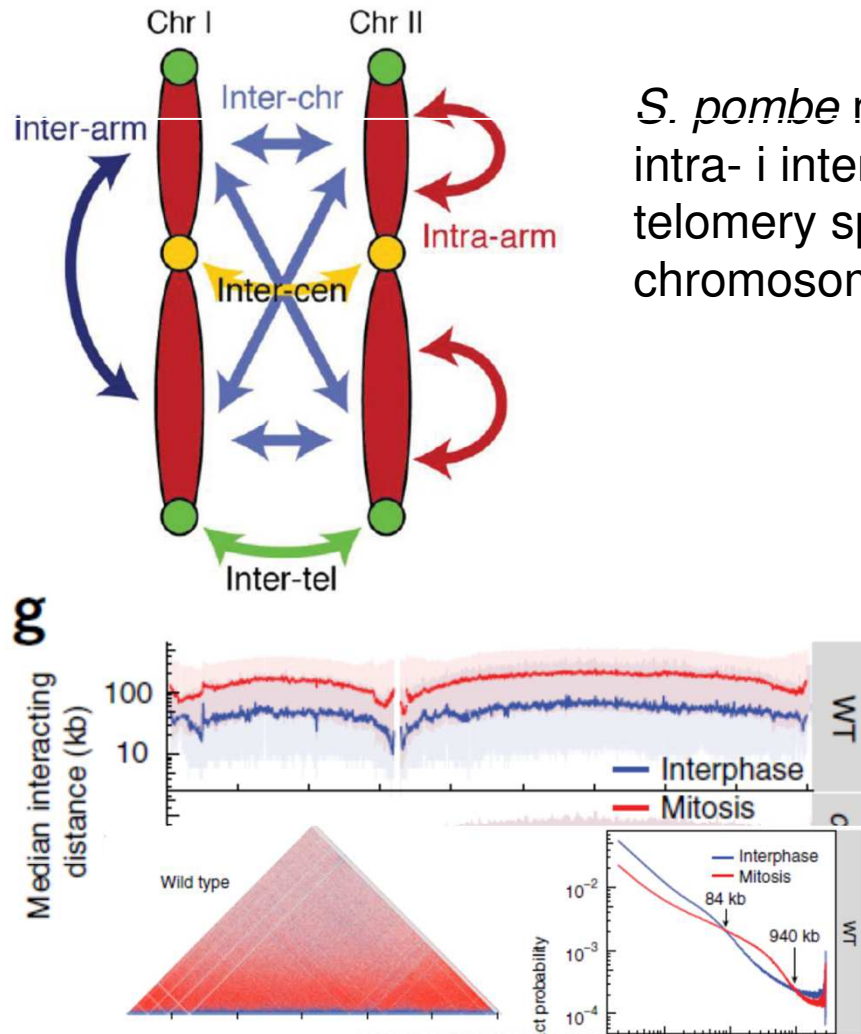


# Kondenzace chromosomů v mitóze

Kakui et al, Nat Genet, 2017

Tanizawa et al., NSMB, 2017

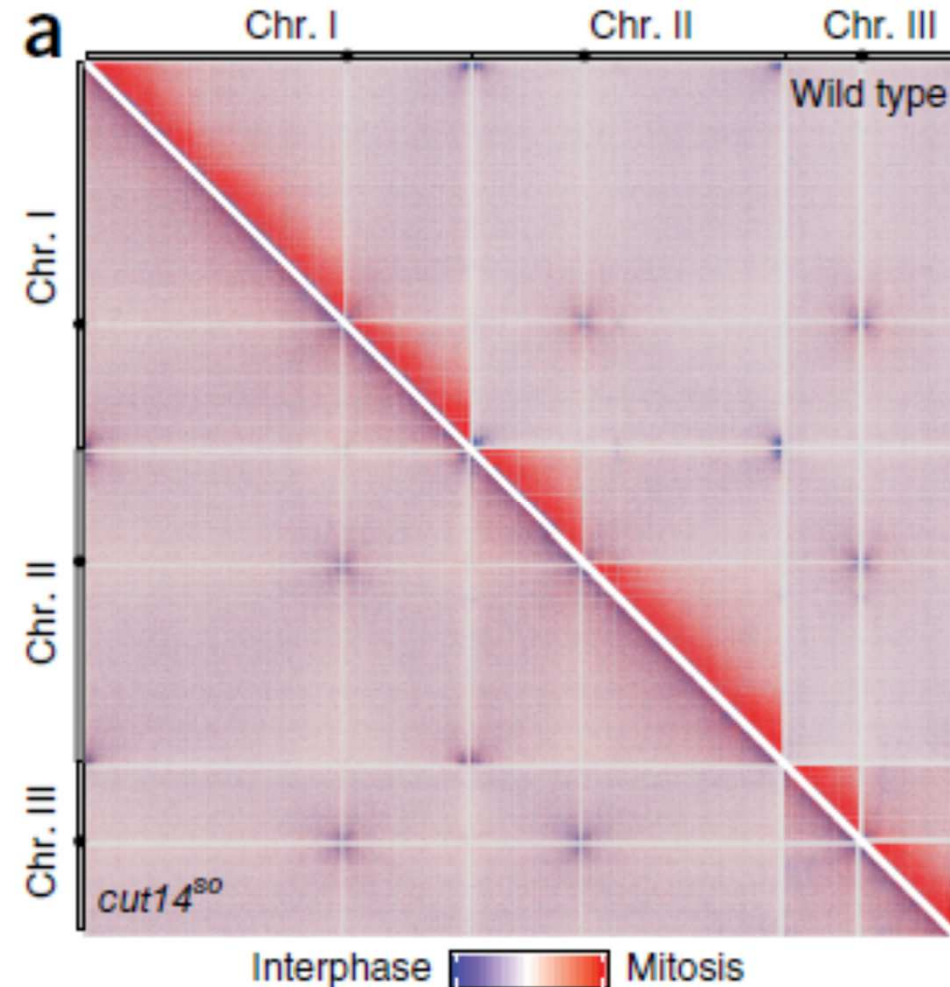
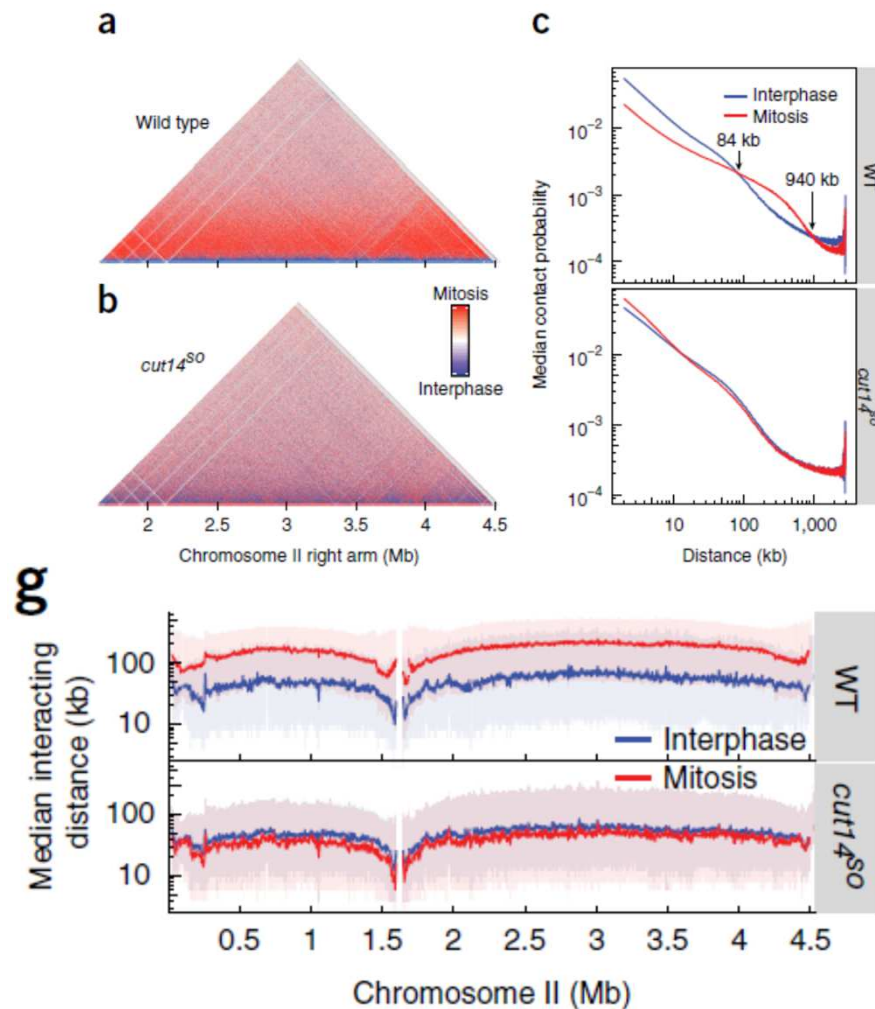
*S. pombe* má 3 chromosomy – diagram zachycuje intra- i interchromosomální interakce – centromery i telomery spolu ... srovnání interfázních a mitotických chromosomů



intrachromosomální interakce v mitóze jsou smyčky větší

# Kondenzin kondenzuje chromosomy

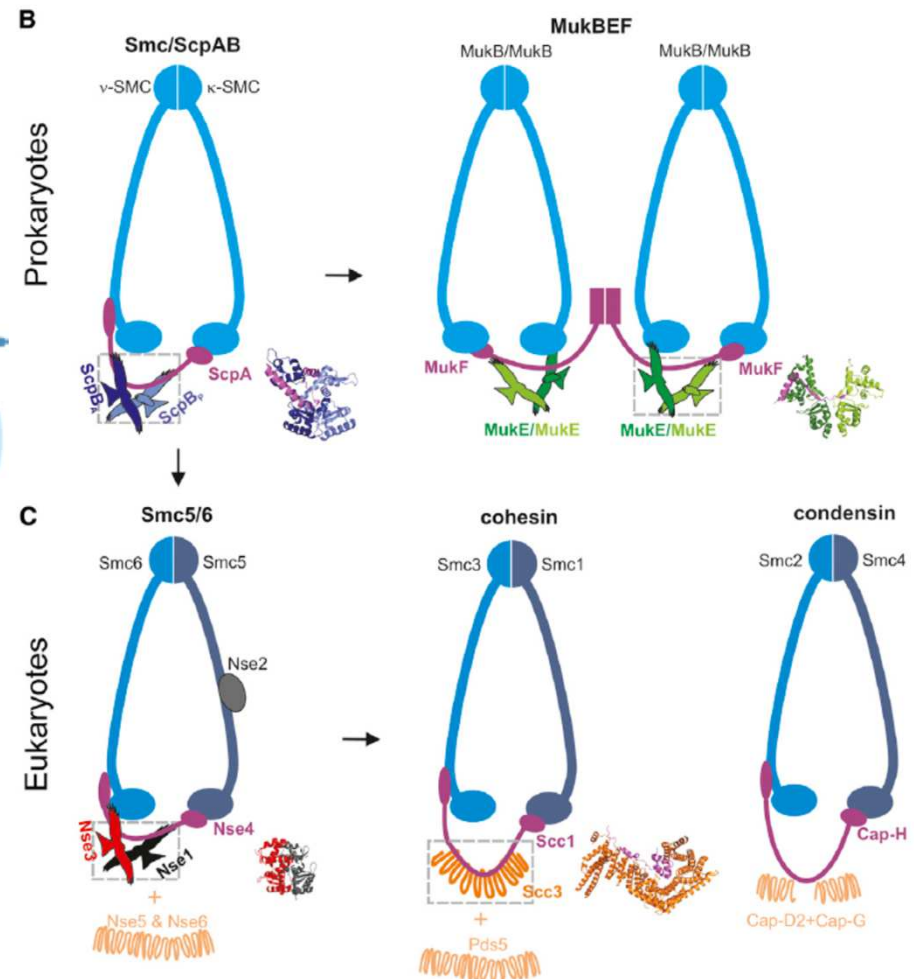
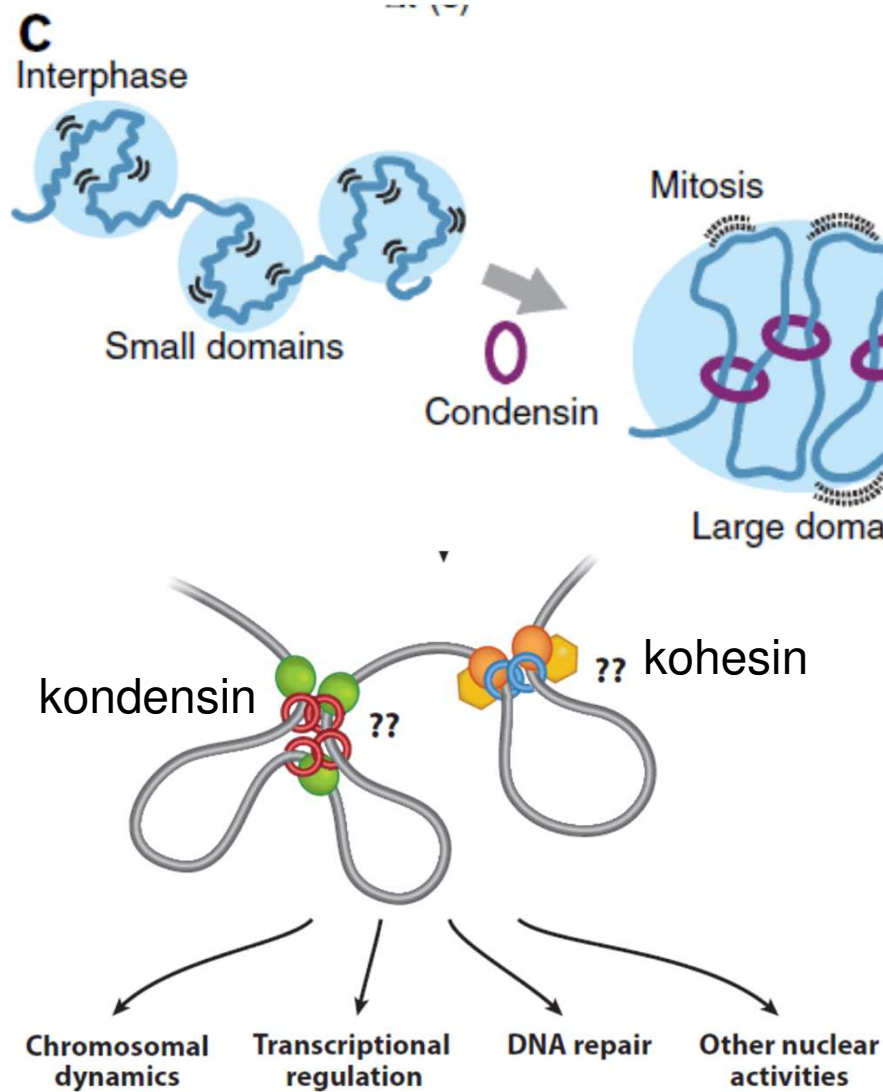
Kakui et al, Nat Genet, 2017  
Tanizawa et al., NSMB, 2017



intrachromosomální interakce  
větší mitotické smyčky jsou závislé na  
kondensinu

# 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