

Test: 15.12., C02-2.11 - psací potřeby (A,B,C,D)

Zkouška/prezentace:

15.12., C02-2.11 – max 6 studentů

Další termín v lednu pro 7 (+ 2 na Erasmu)

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

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

přednáška 15 + 5 minut

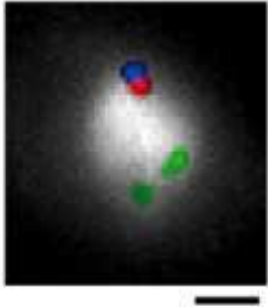
Cvičení: 8. 12. 8.00, B07-2.17 - pláště, psací a kreslicí potřeby

Osnova (poslední) přednášky

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

Organizace chromosomů

Mitotic interphase



RABL uspořádání

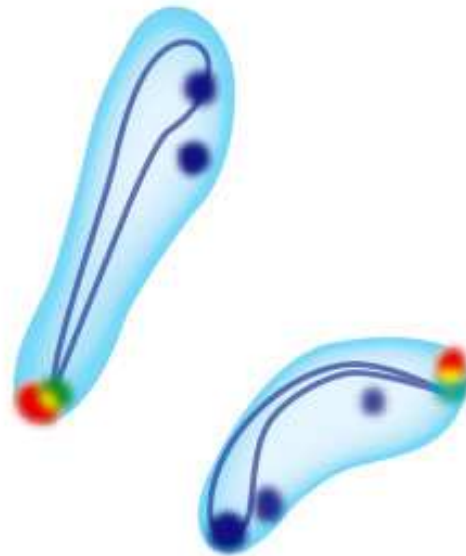
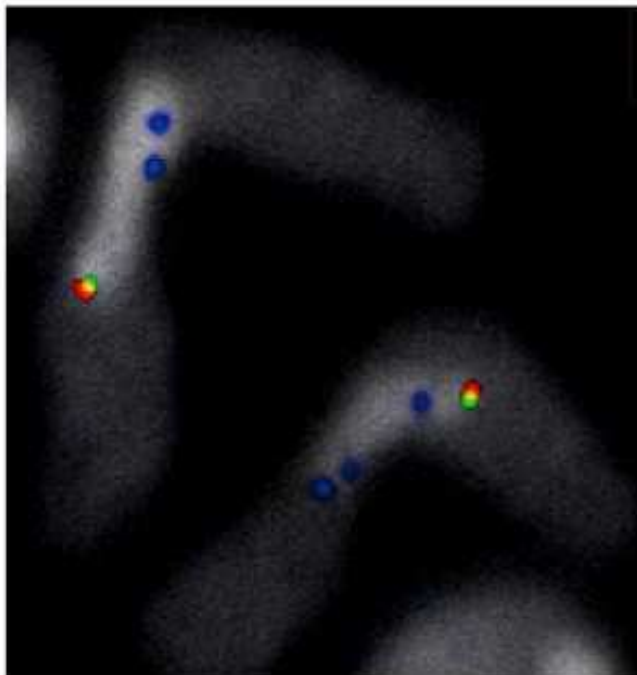
- centromere
- telomere
- SPB

SPB

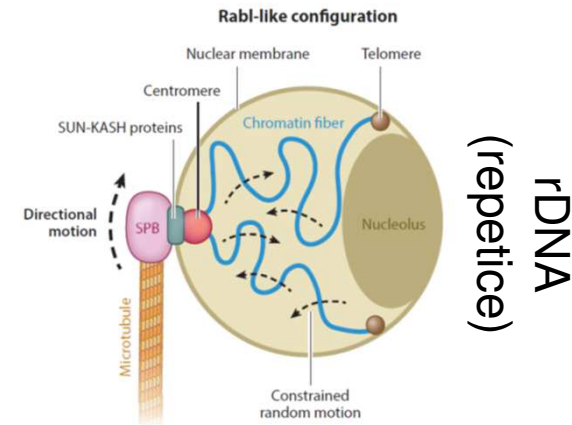


FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

Meiotic prophase



Interphase



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

v meiotickém jádře jsou telomery blíž SPB

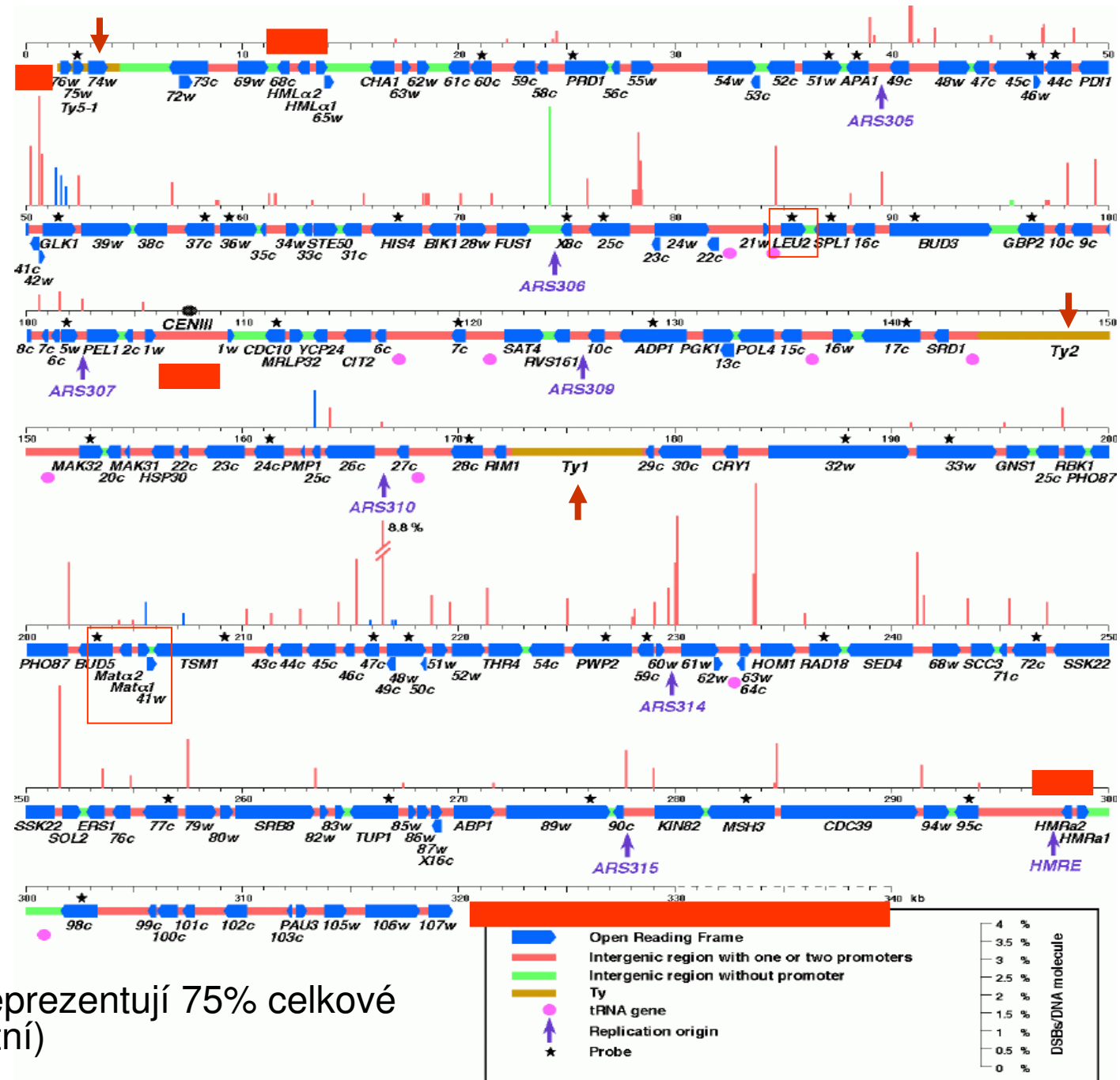
Základní prvky kvasinkového genomu

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 kopií rDNA v repetici (až 200), 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

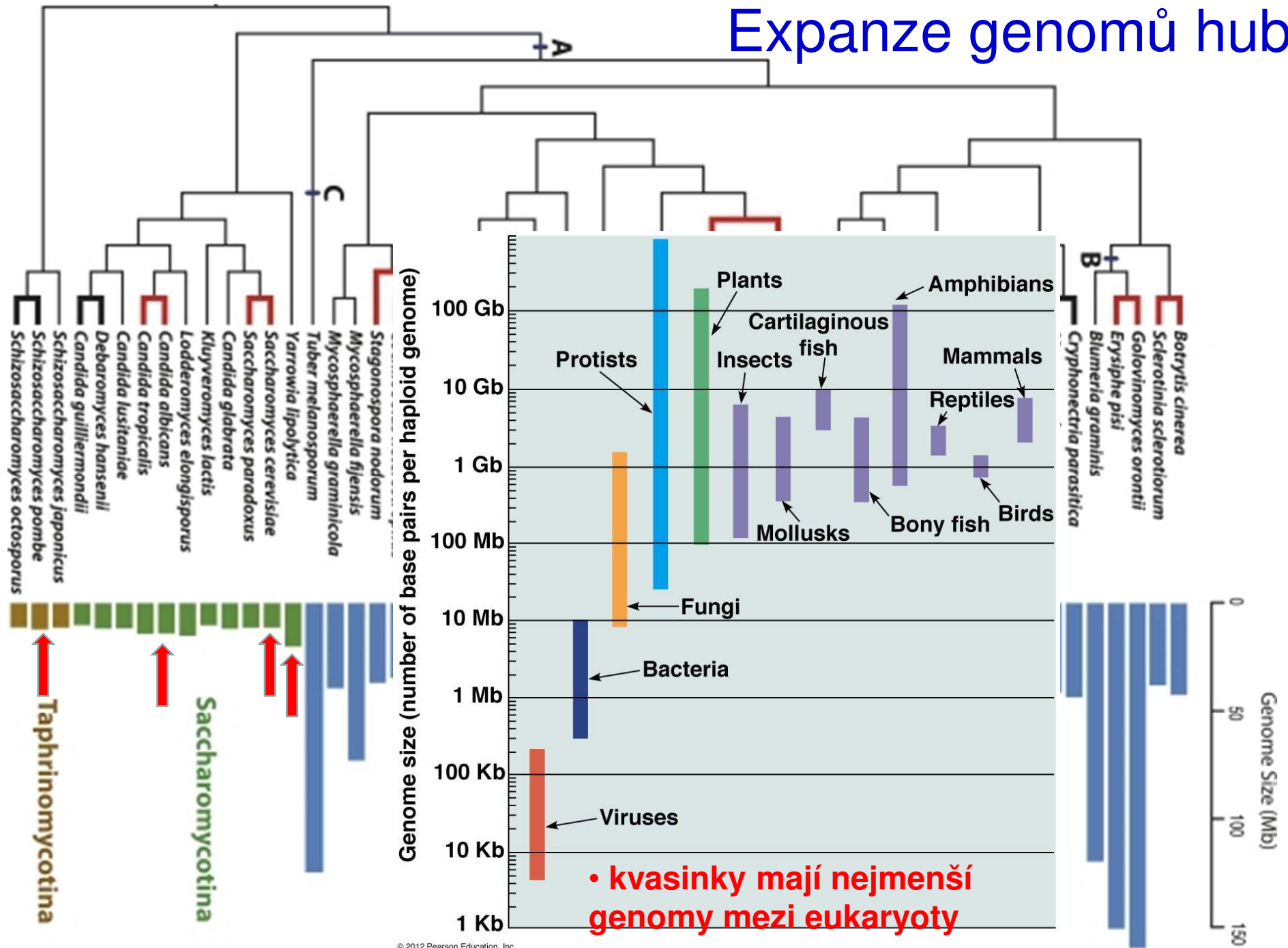
Chromosom III
 CEN=centromera
 ARS=autosomal
 replicating sequence
 TEL=telomery
 tRNA
 Ty transposony
 MAT a HML/HMR lokusy

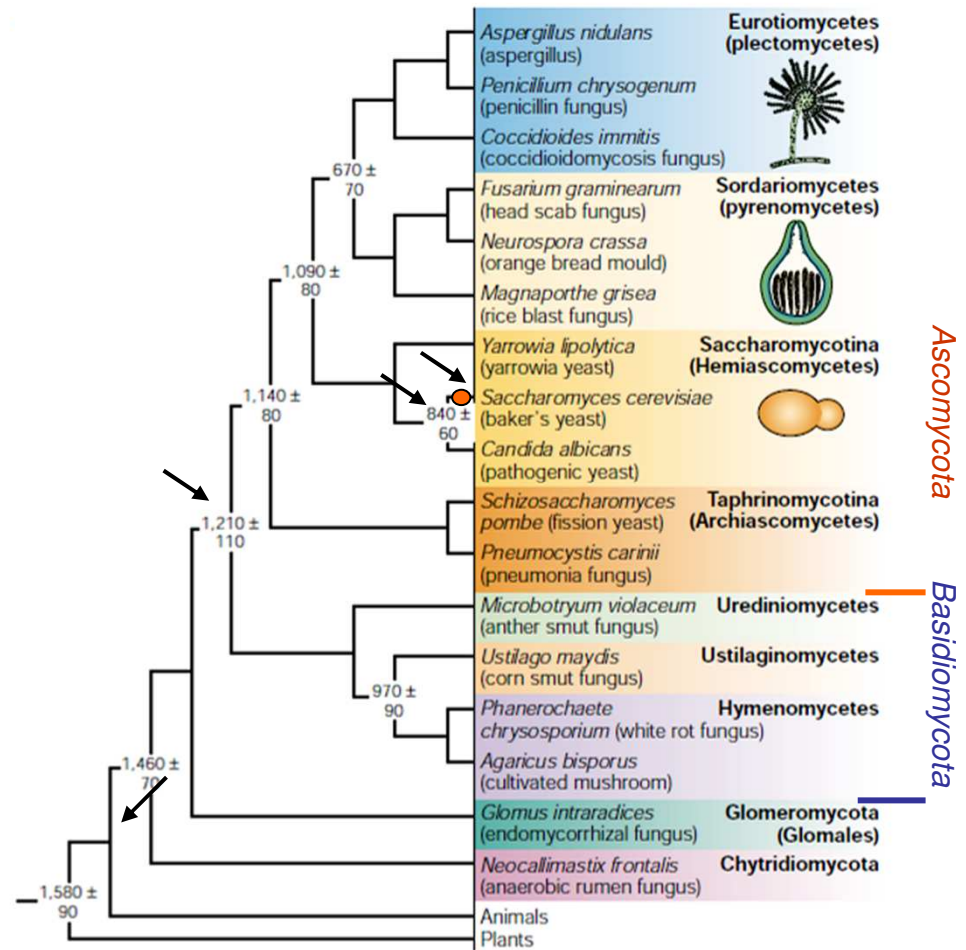
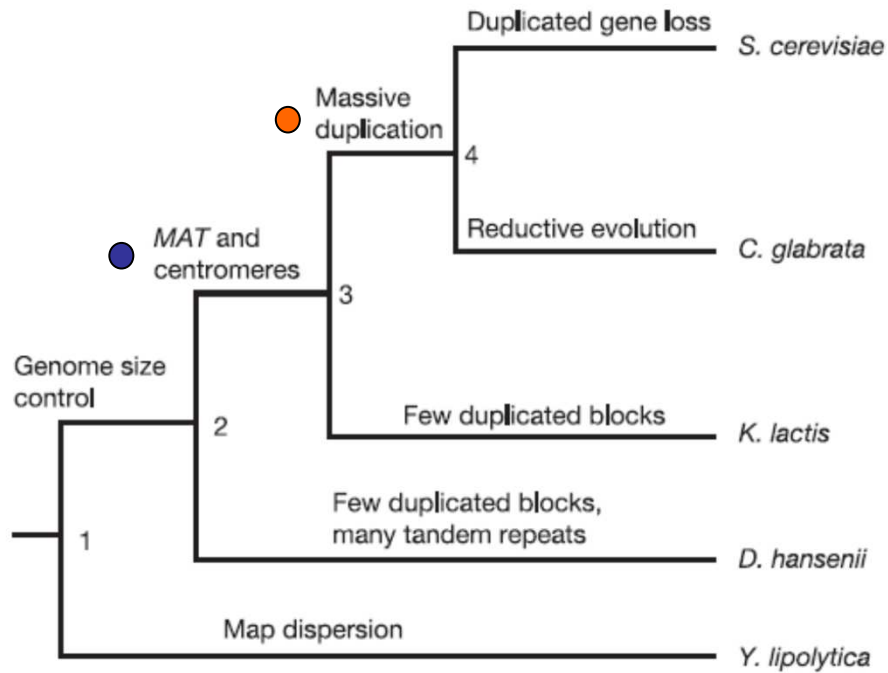
Heterochromatin:
 centromera
 telomery
 HMR a HML
 (MAT je aktivní
 určuje haplotyp)



-geny (cca 6500) reprezentují 75% celkové
 sekvenční (kompaktní)

Expanze genomů hub

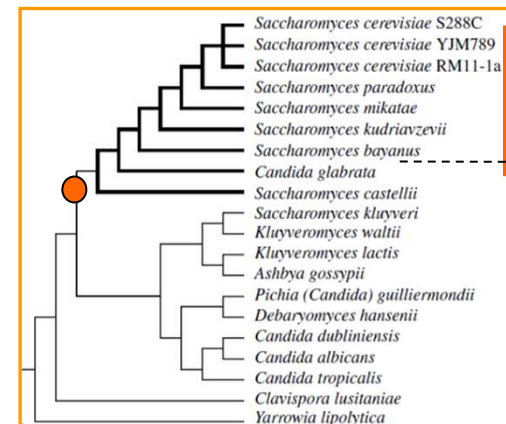




Evolve kvasinek

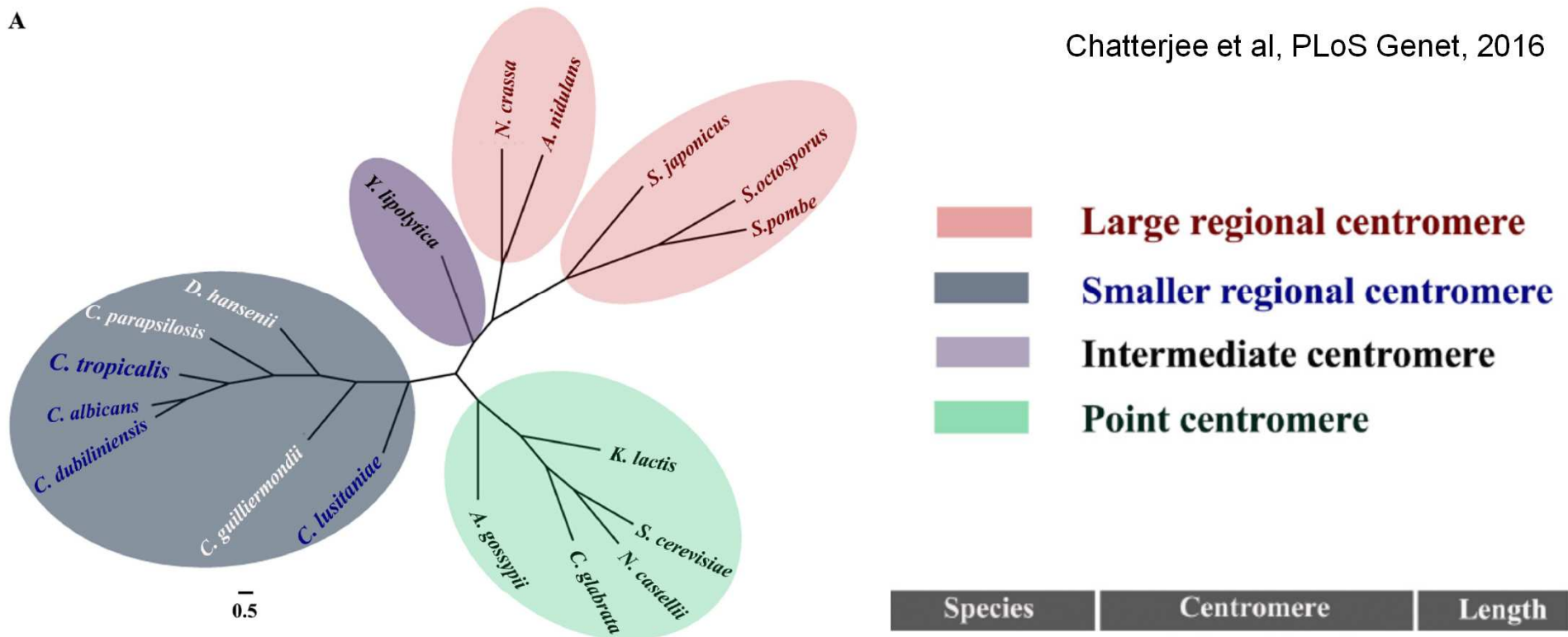
- 1500 Mya: Metazoa - Fungi
- 1200 Mya: Ascomycota – Basidiomycota.
- 1000 Mya: *S. cerevisiae* – *Schizosacch. pombe*
- 840 Mya: *S. cerevisiae* – *C. albicans*
- 170 Mya: (*Pichia*, *Candida*) – *Kluyveromyces aj.*
- 150 Mya: WGD

Dujon et al., Nature, 2004



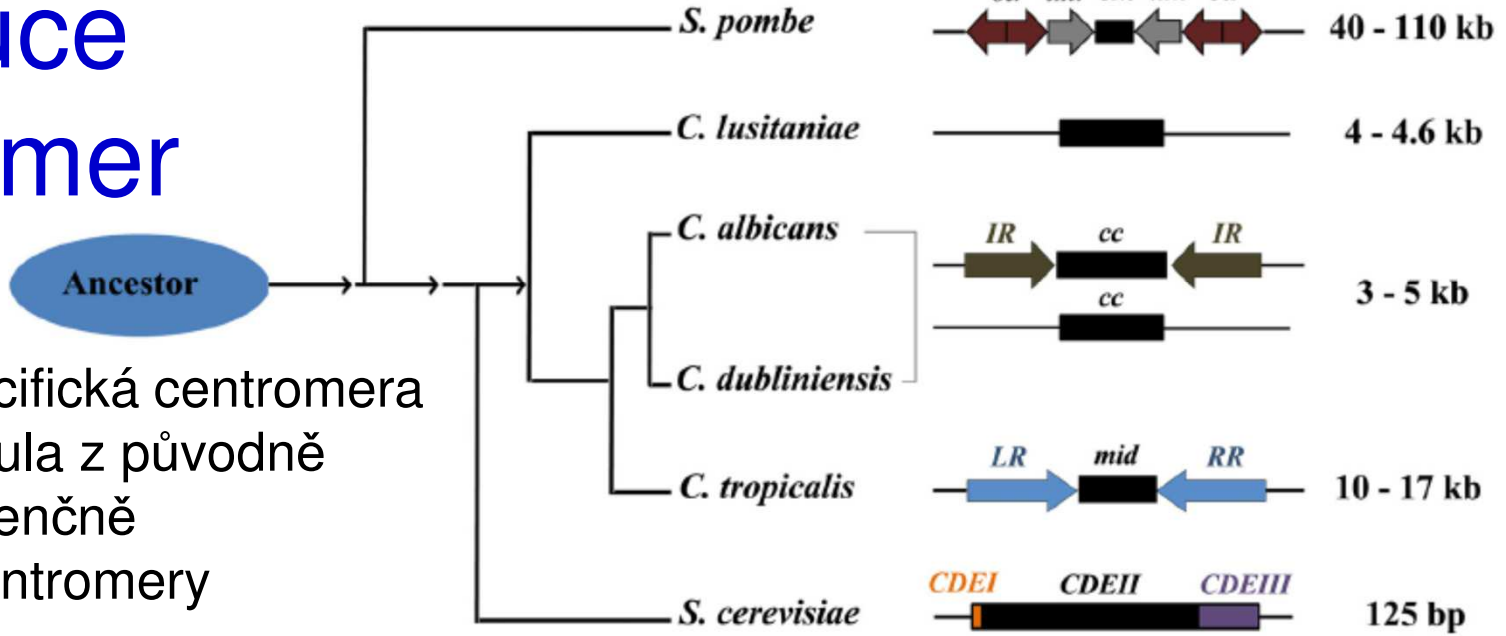
A

Chatterjee et al, PLoS Genet, 2016



Evolve centromer

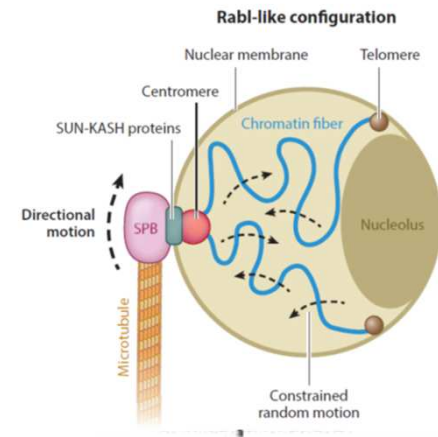
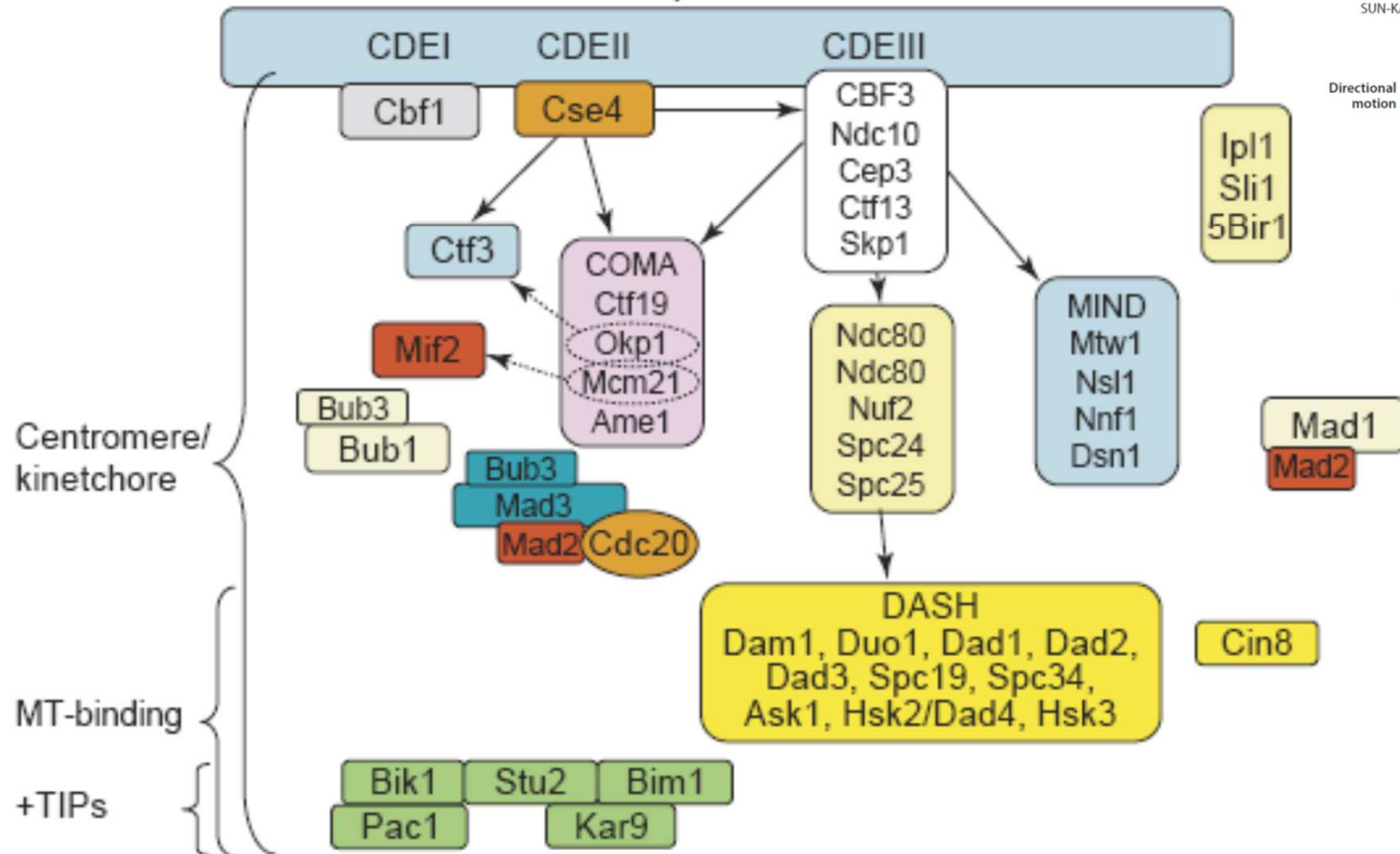
sekvenčně specifická centromera se patrně vyvinula z původně repetitivní/sekvenčně nespecifické centromery



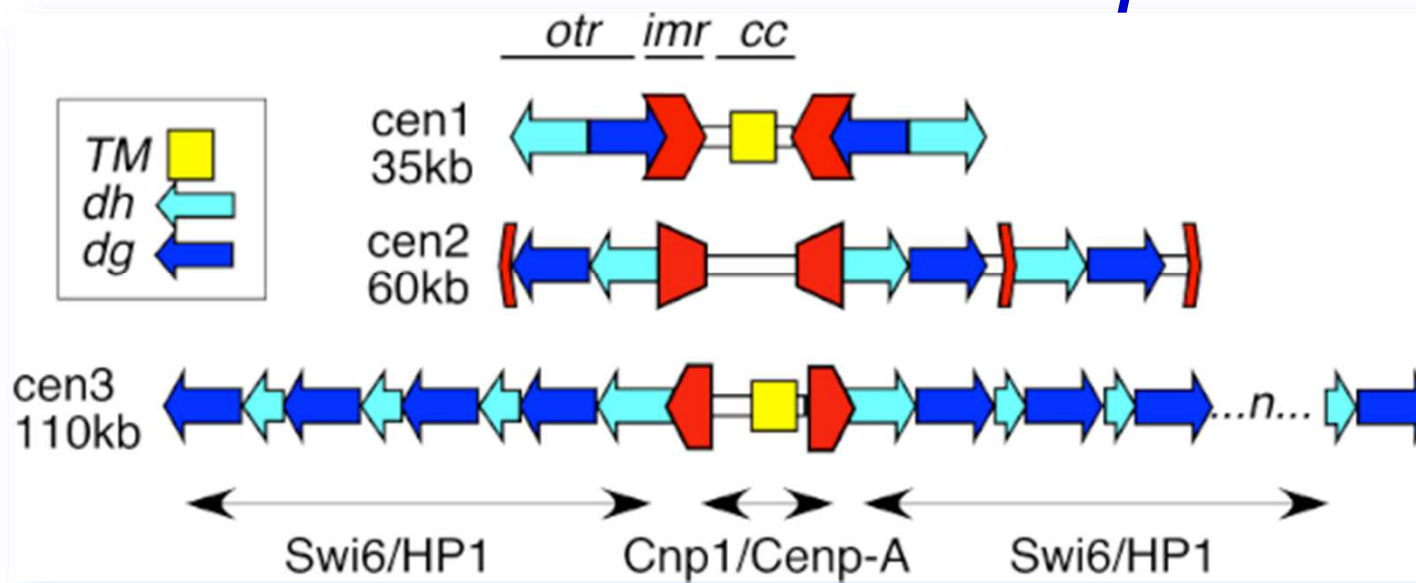
Centromera *S. cerevisiae*

(c)

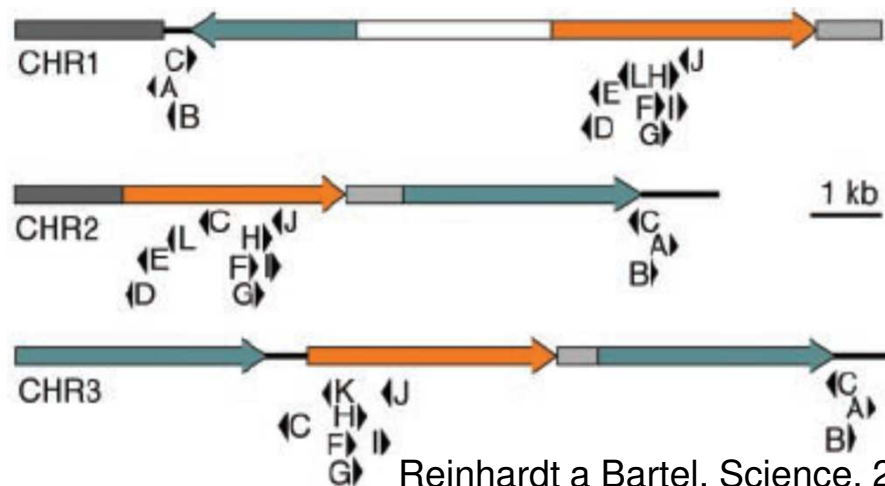
Budding yeast centromere/kinetochore
125-bp CEN DNA



Centromera *S. pombe*



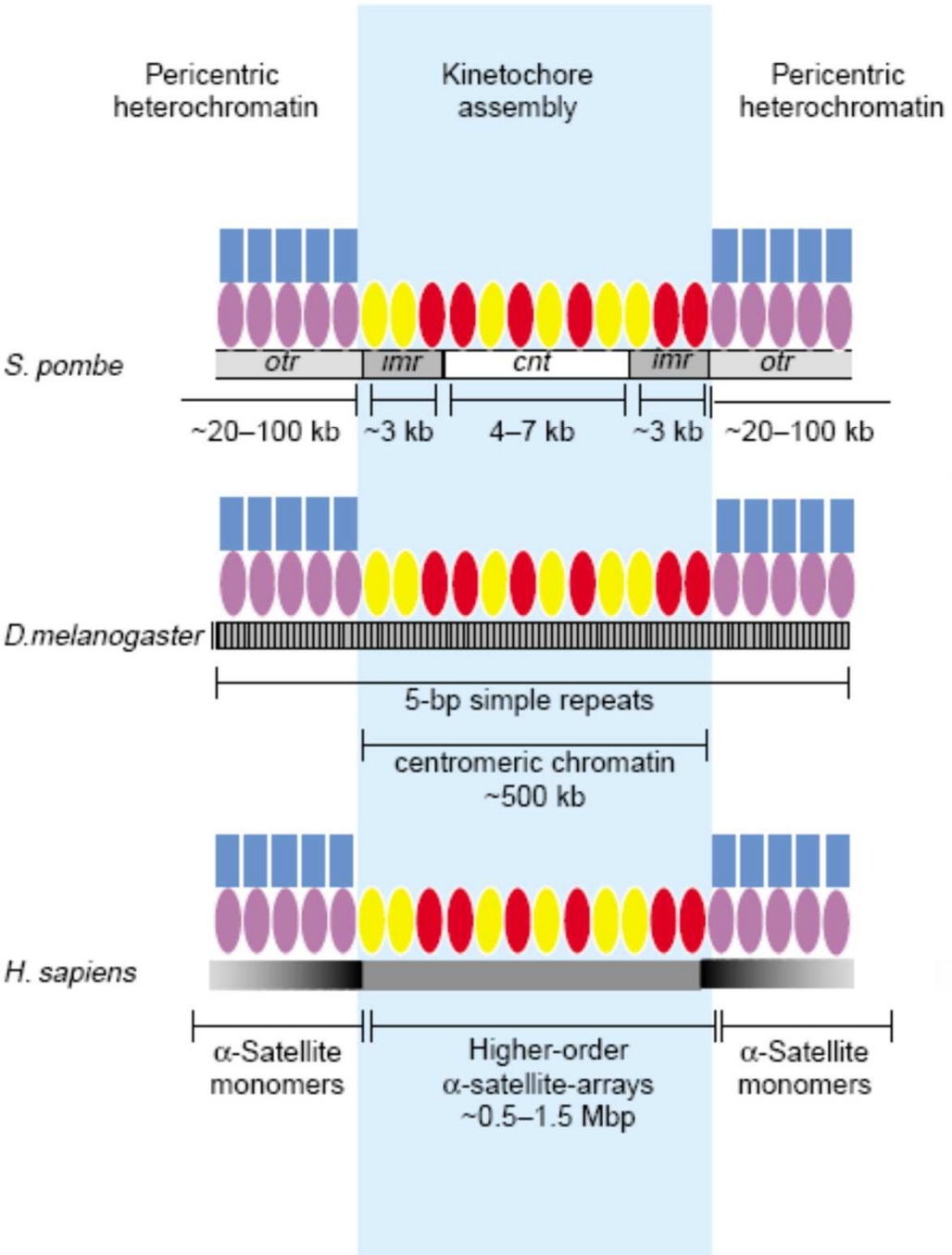
- pouze 3 chromozomy (13 Mbp = 3.5, 4.6, 5.7)
 - velké repetitivní centromery (40-150kb) a 1kb počátky replikace
 - centromery jsou definovány strukturou chromatinu
- siRNA**



- 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

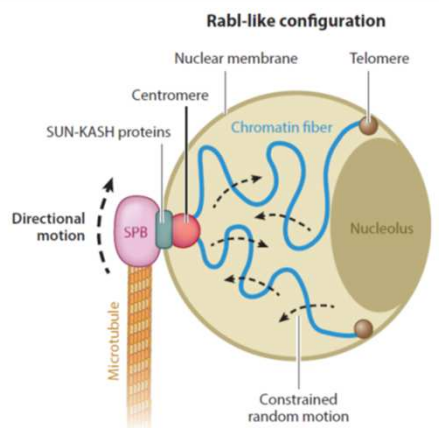
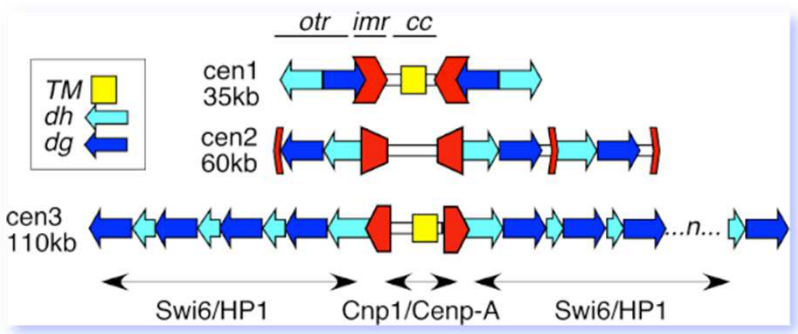
Reinhardt a Bartel, Science, 2002, <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main7.html>

Eukaryotické centromery



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

Centromery jsou definovány více strukturou chromatinu než jejich sekvencí



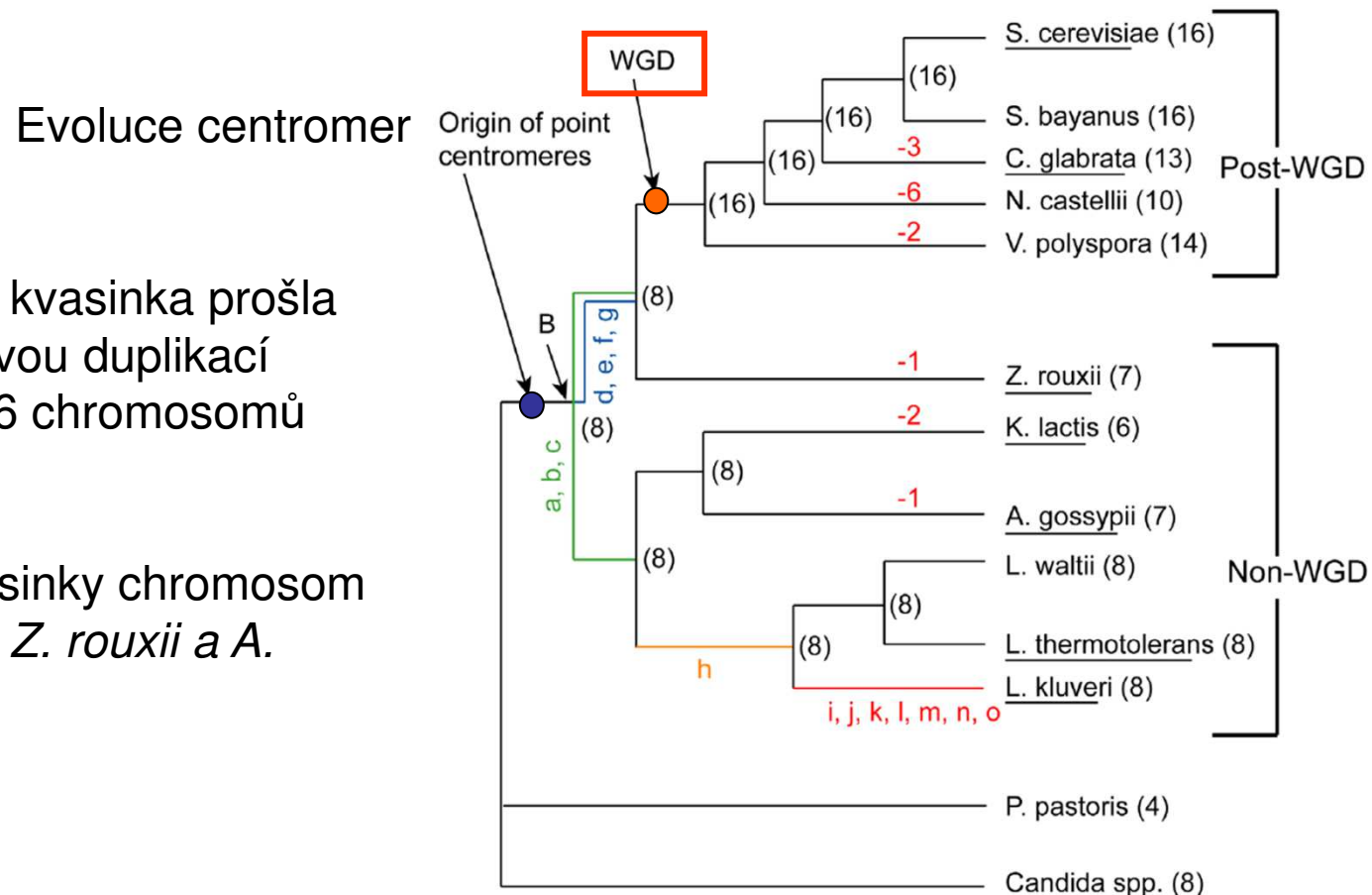
Carroll a Straight, Trends in Cell Biol, 2006

Prakvasinka a duplikace genomu

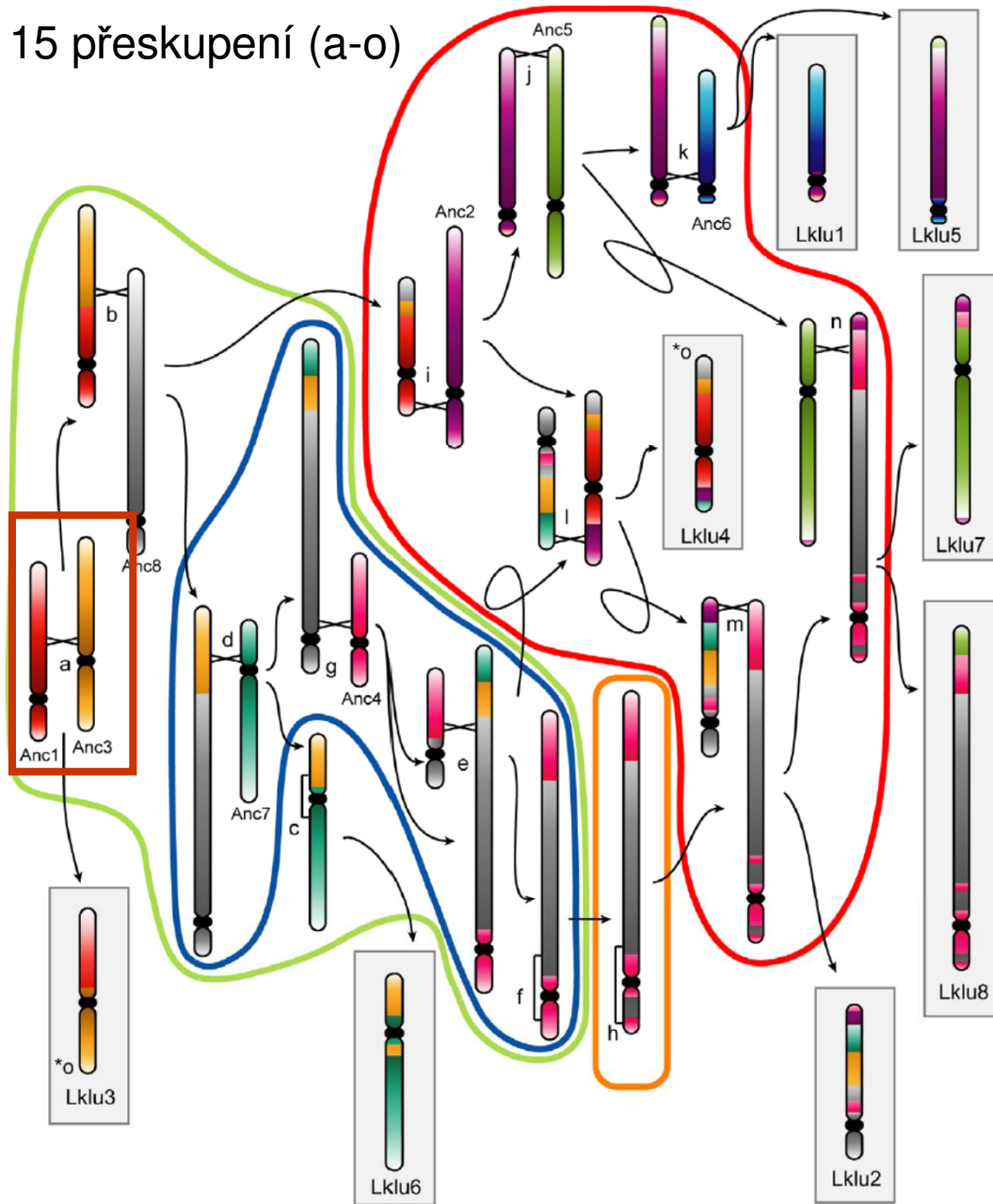
- srovnání kvasinkových genomů ukázalo na existenci „prakvasinky“ s 8-mi ancestrálními chromosomy (cca 4500 geny)
- nejbližší anc. genomu je *Lachancea kluyveri* (8 chromosomů, nejméně přeskupení v genomu = 15 - viz a-o)

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

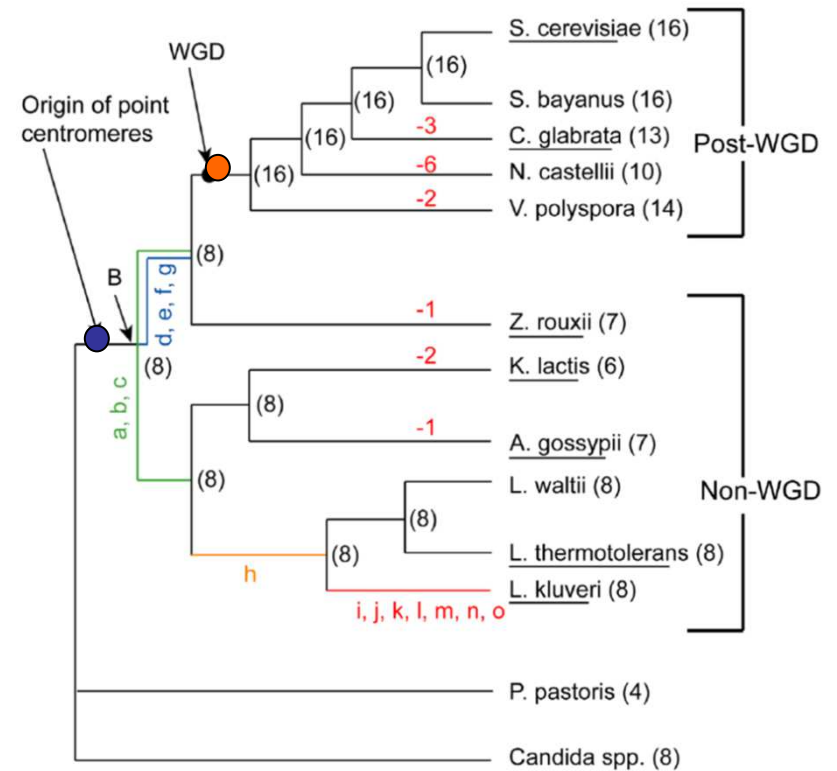
• některé kvasinky chromosom ztratili (např. *Z. rouxii* a *A. gossypii*)



15 přeskupení (a-o)



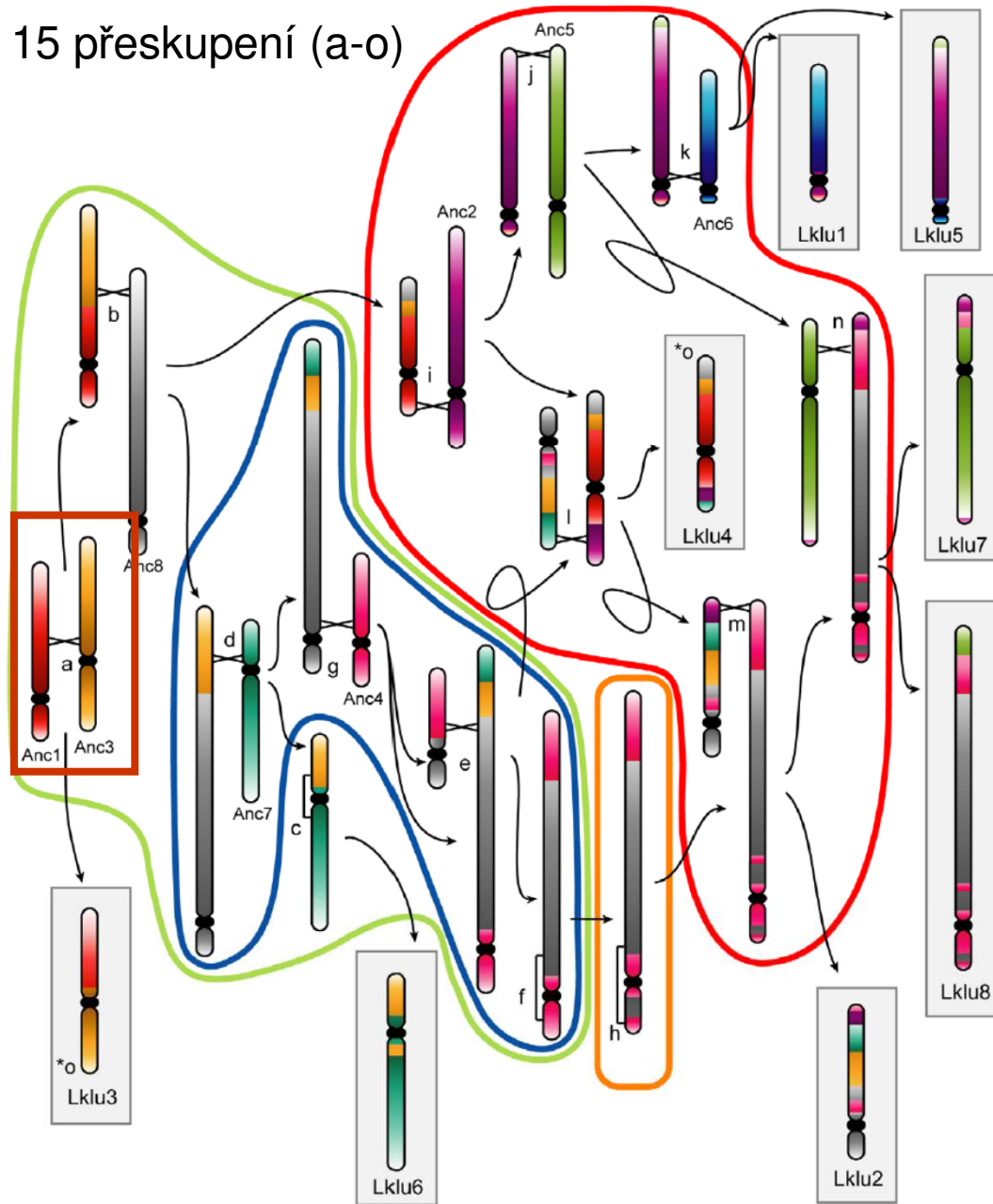
Přeskupování chrom. bloků u *L. kluyveri*



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

Gordon et al., PLoS Genetics, 2011

15 přeskupení (a-o)



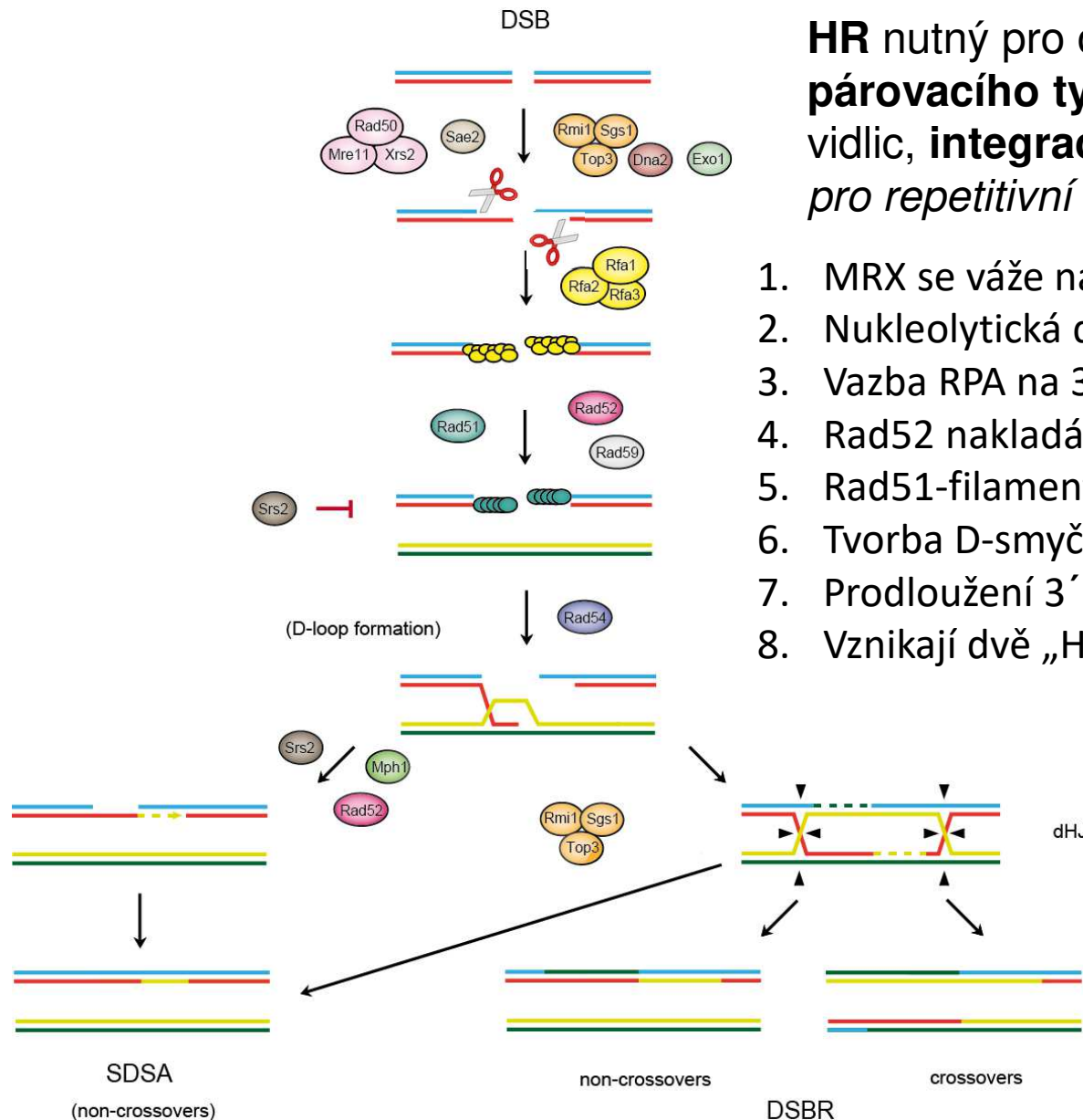
Přeskupování chrom. bloků u *L. kluyveri*

- 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



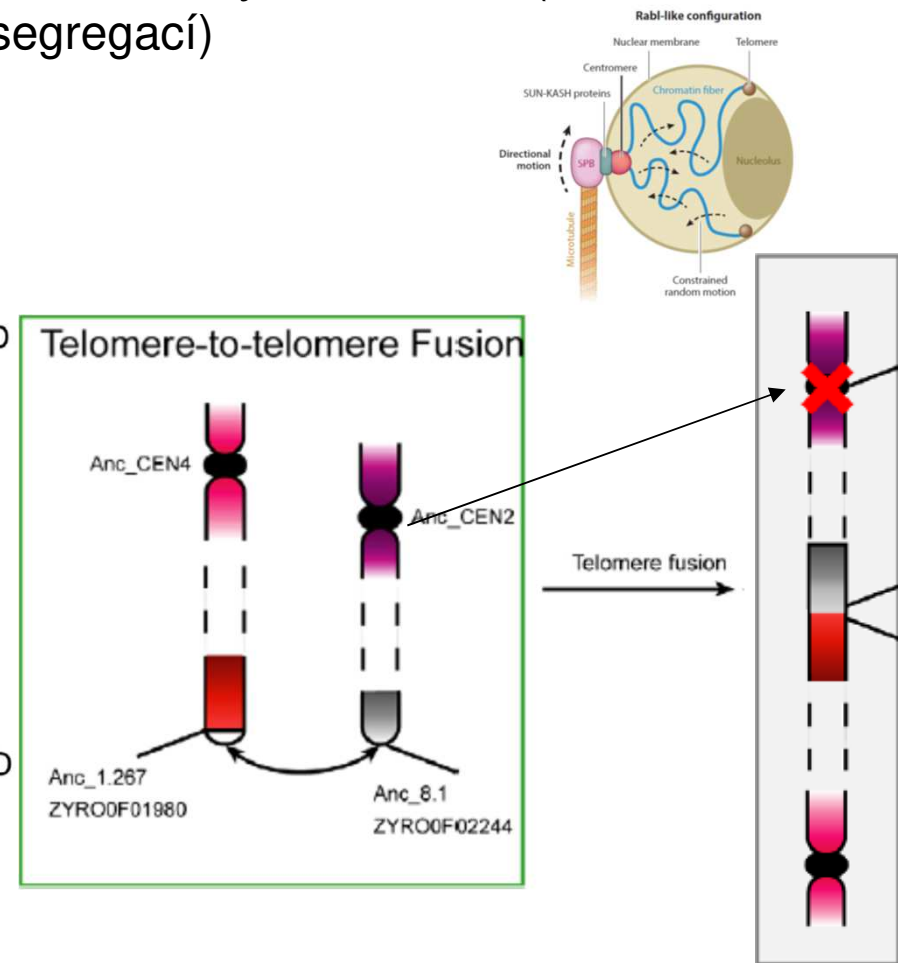
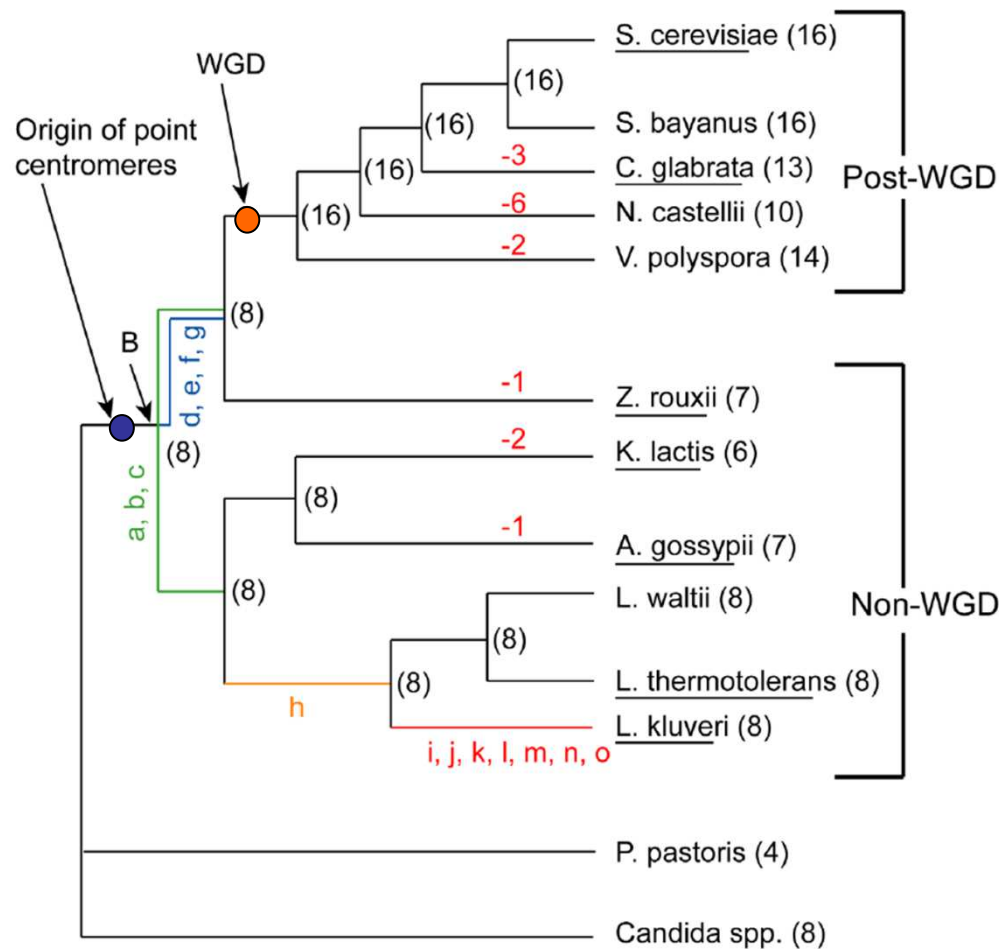
HR nutný pro opravu DSB, **přepínání párovacího typu**, meiosu, restart replikačních vidlic, **integraci DNA do genomu** - *nebezpečný pro repetitivní sekvence*

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
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 (NHEJ) - současně ztratily centromeru (chromosom nemůže mít 2 centromery – problémy se segregací)

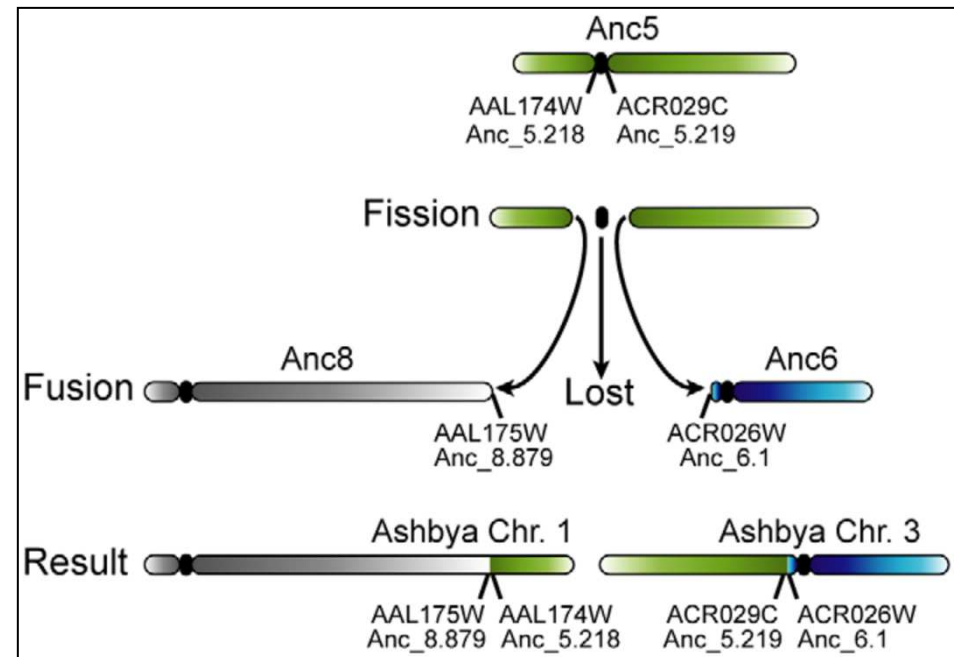
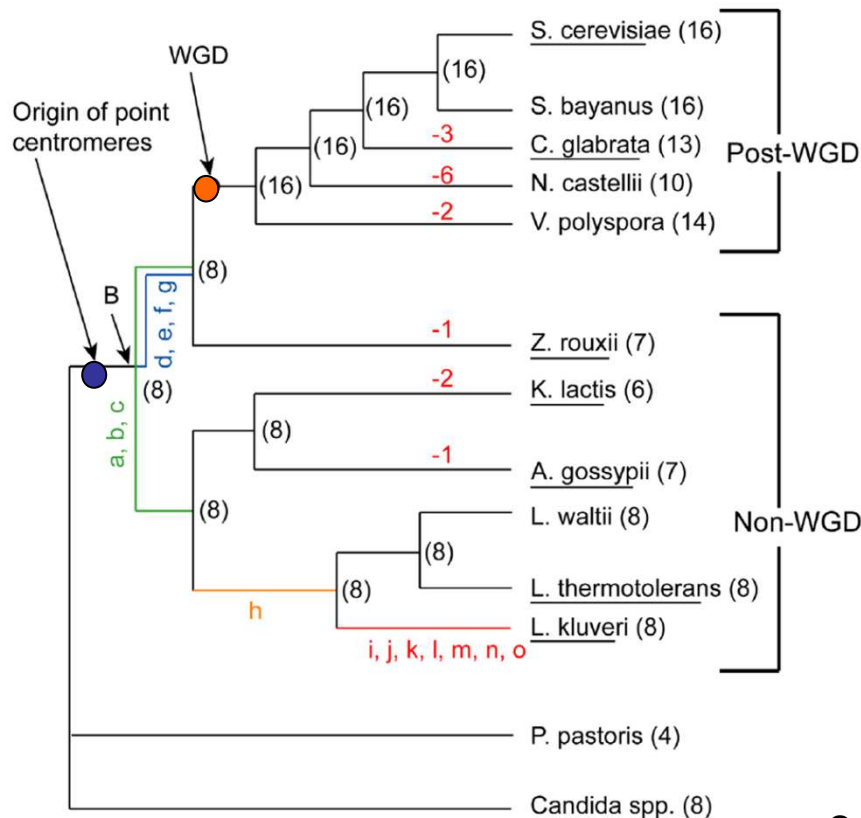


Redukce chromosomů fúzí

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

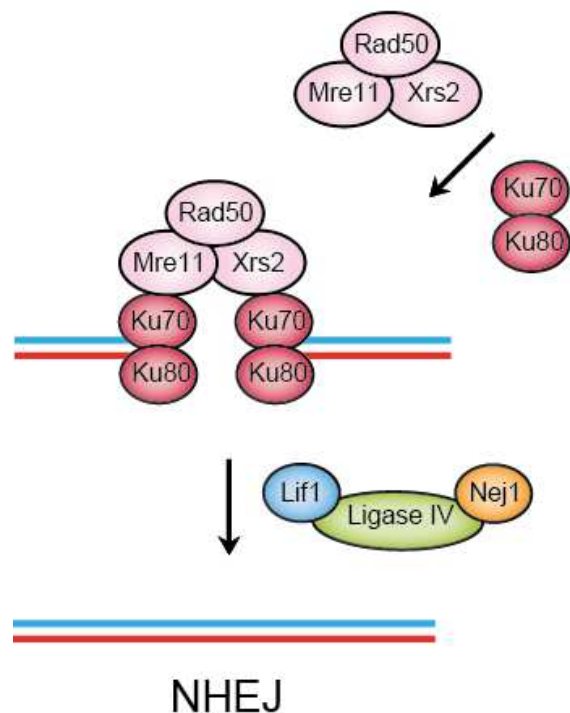
- geny v oblasti **telomer** (neesenciální, málo transkribovány, malý evoluční tlak) - mutují více než ostatní geny - telomery jako „kotlík“ evoluce („cooking pots of evolution“)

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



Nehomologické spojování konců

Non-homologous end joining (NHEJ)

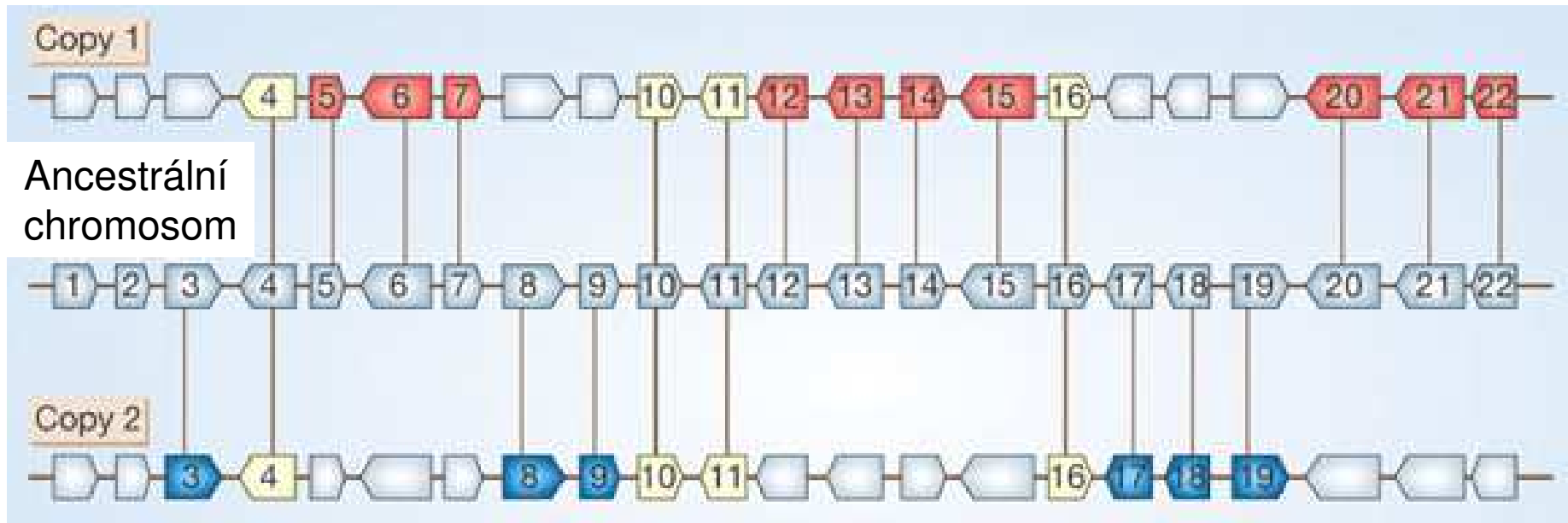
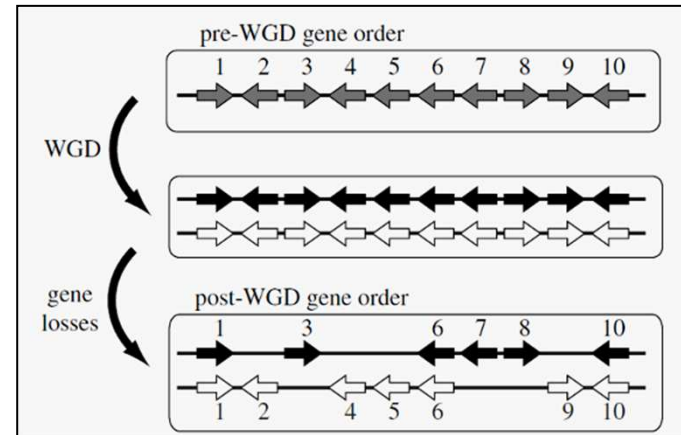
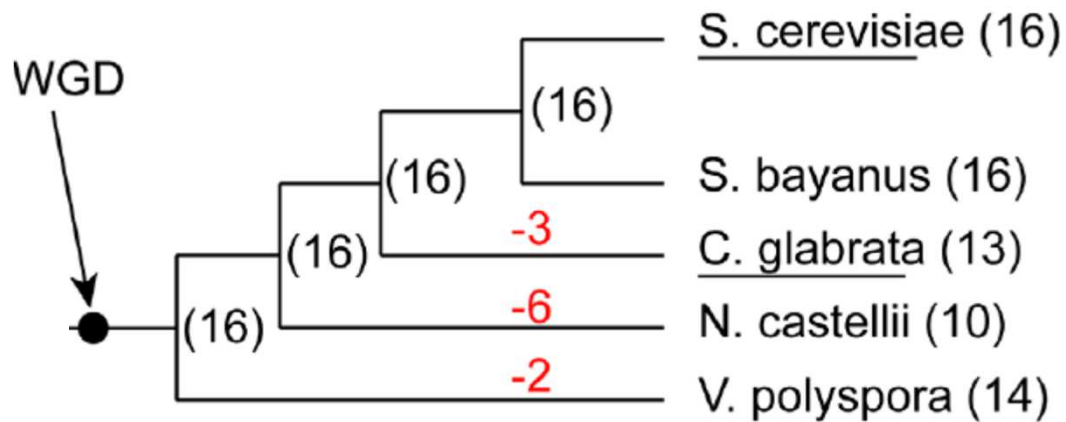


1. Vazba MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) komplexu, Ku heterodimeru (Yku70-Yku80) na zlomené konce DNA
2. Vazba DNA ligázy IV (**Dnl4**) a jejích pomocných proteinů Lif1 a Nej1.
3. Religace konců

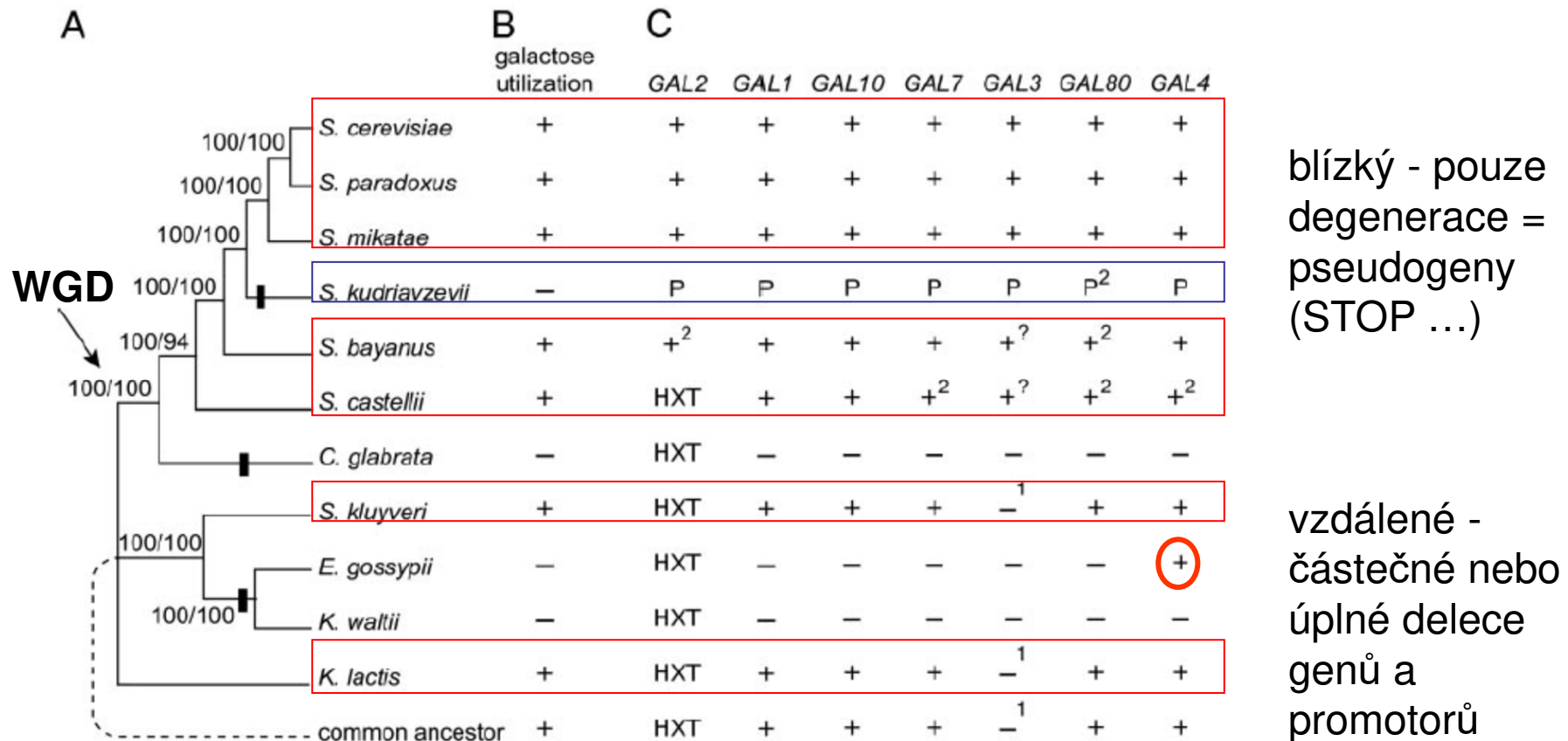
při opravě nekompatibilních konců většinou dochází k delecím nebo inzercím – HR je lepší, ale je potřeba homologní sekvence – NHEJ v G1 zatímco HR v G2/M – dobře rostoucí kultura kvasinek má významnou frakci buněk v G2/M (proto je v kvasinkách možná integrace homologních sekvencí – genetika – použít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

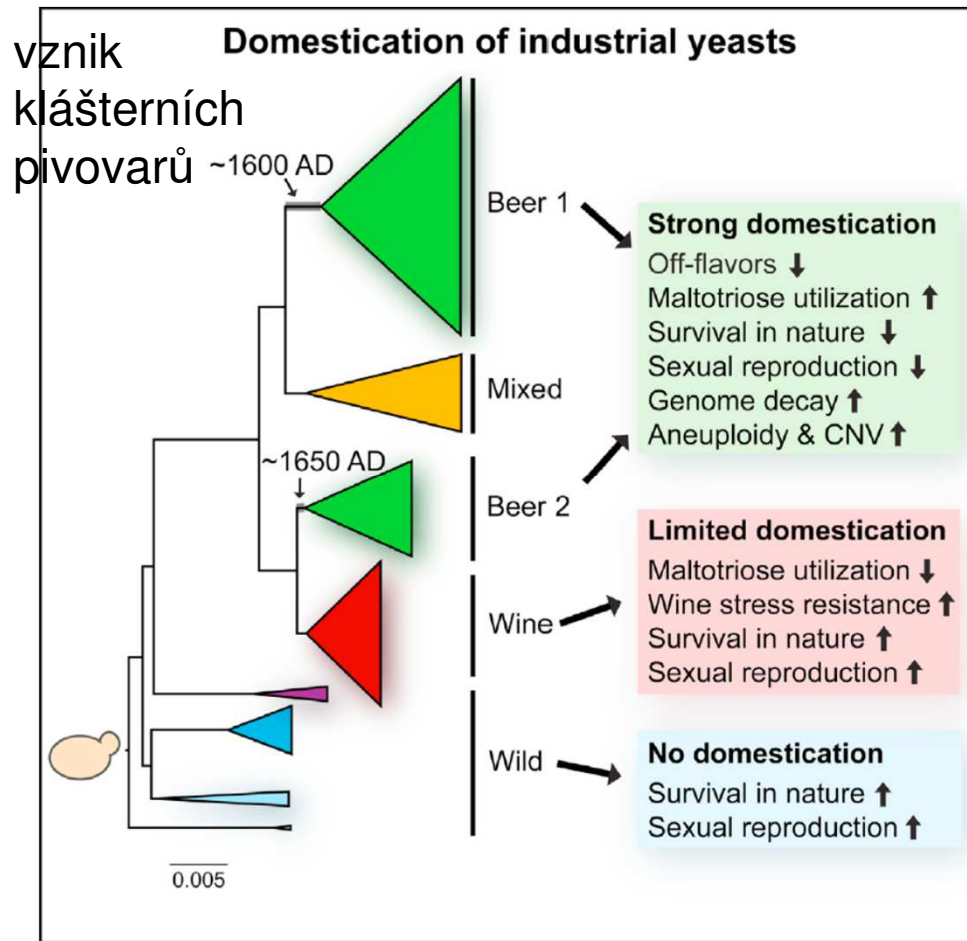


Hittinger et al., PNAS, 2004

- 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



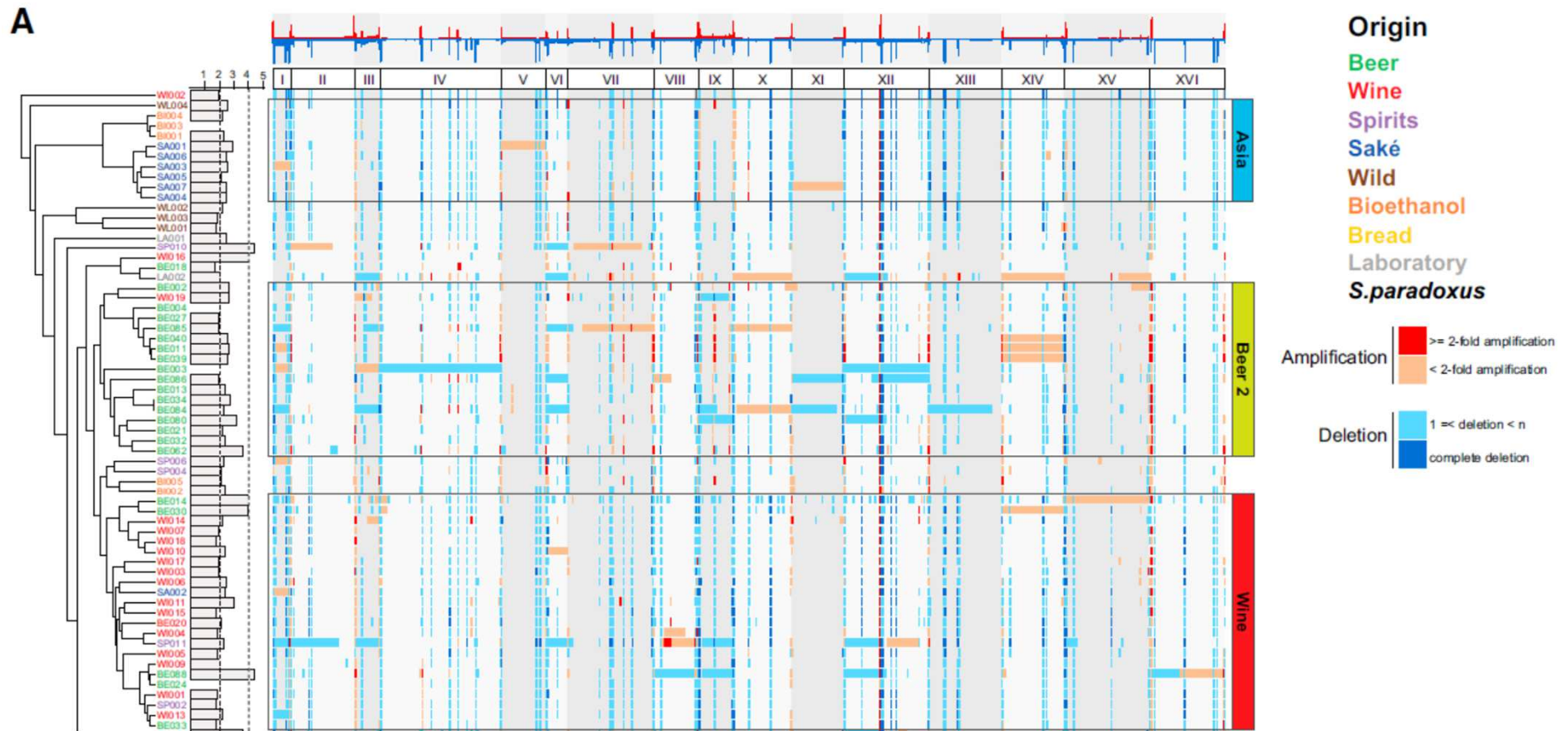
„technologie“ piva ~3000 BC

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

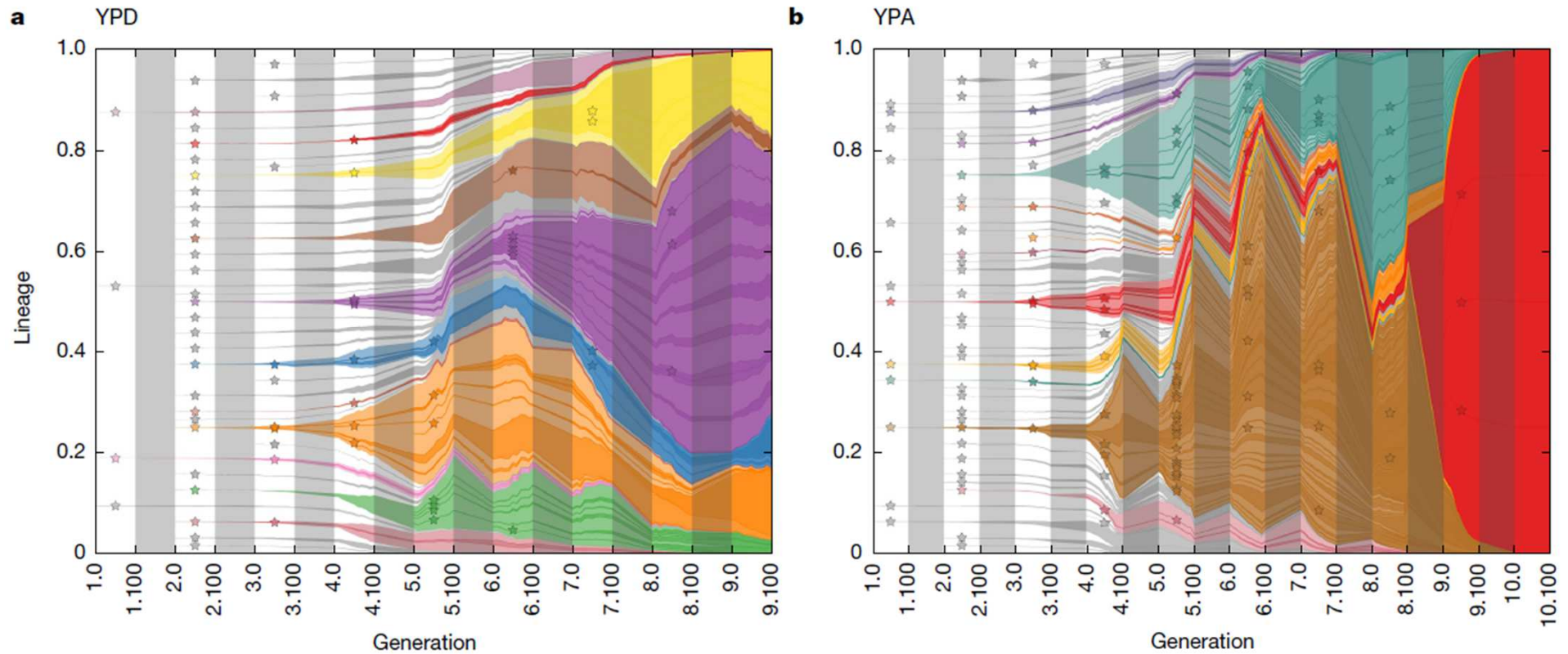
- nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nepříjemné aroma piva) ...



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 ...

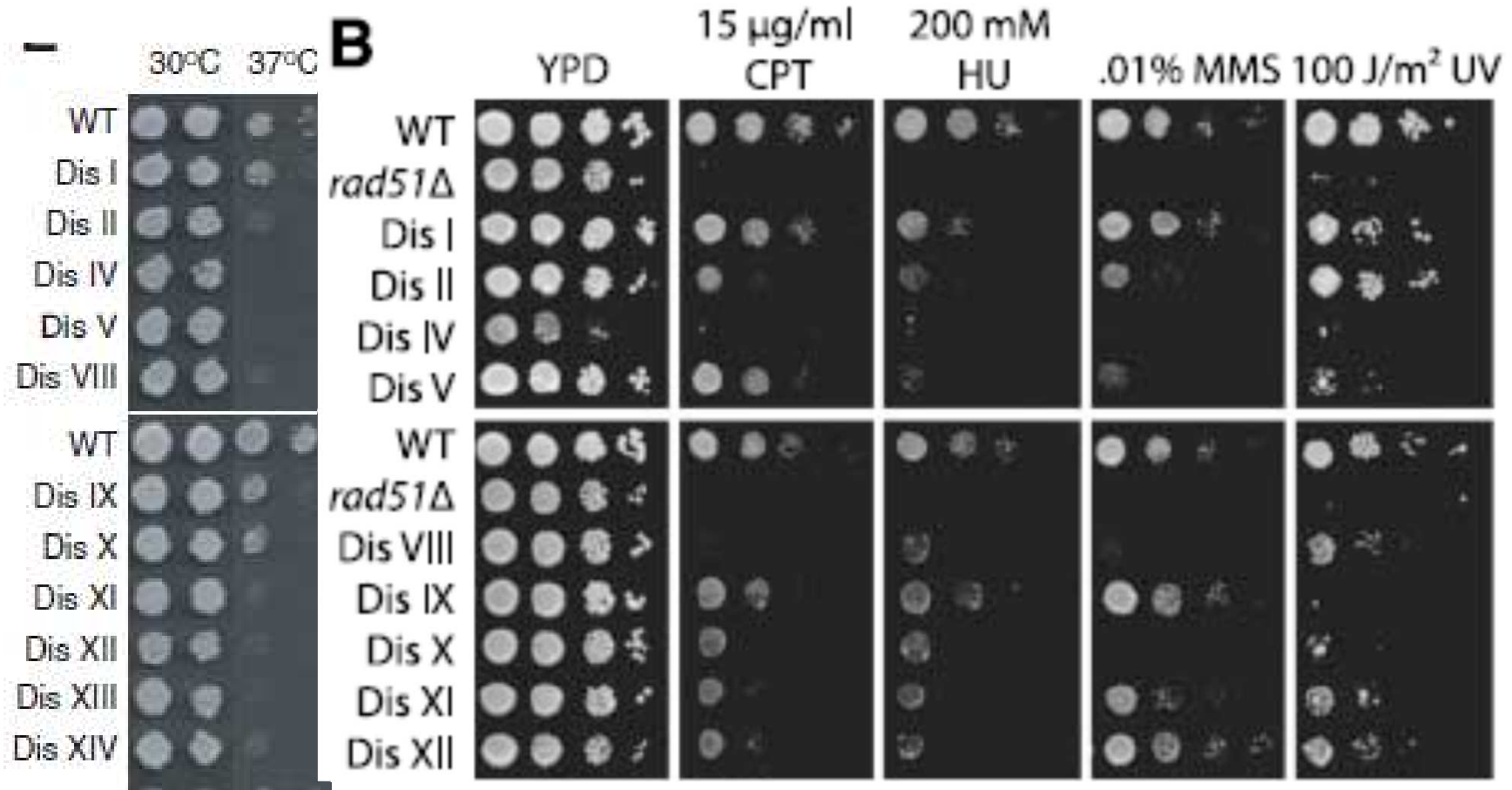
Evolve, adaptace a fitness

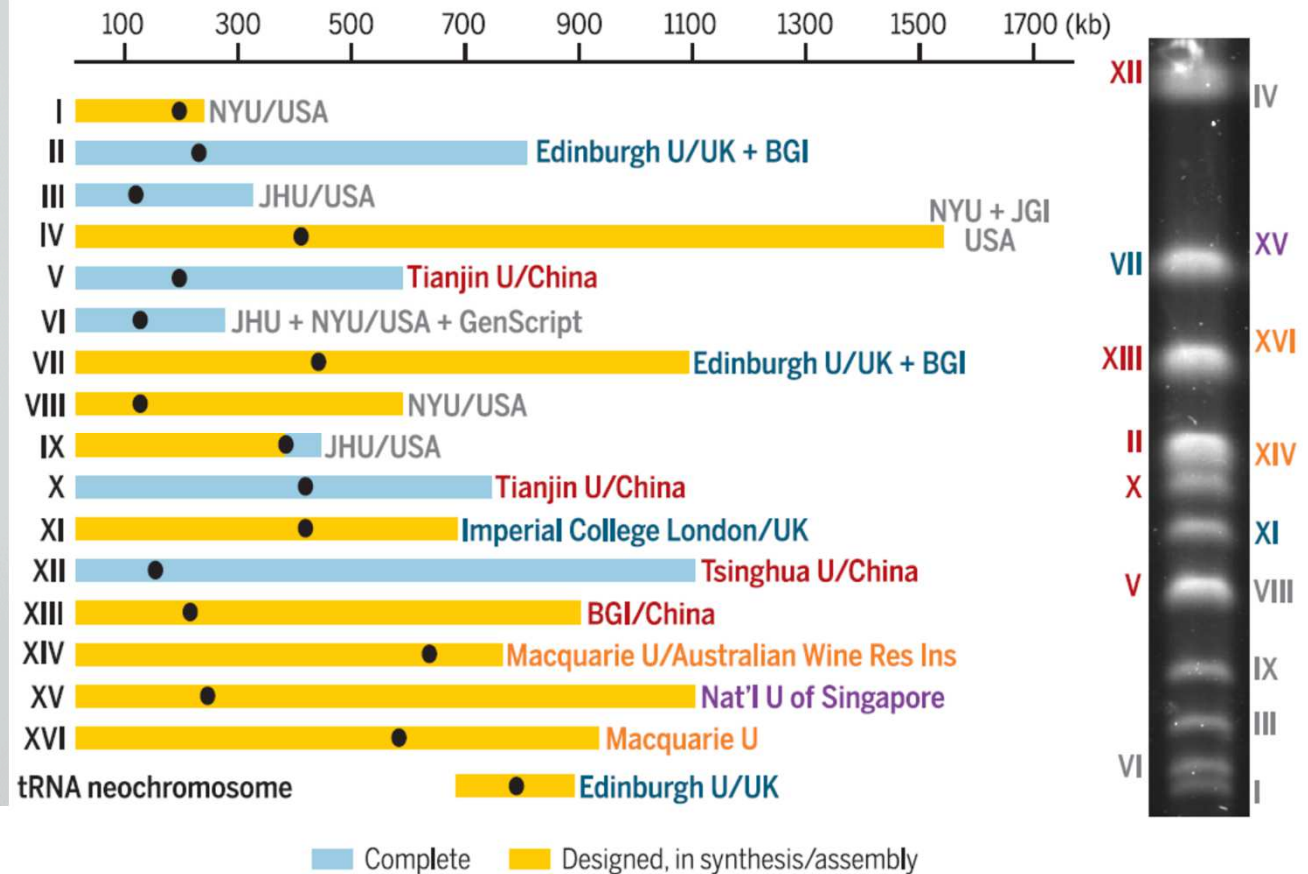


tlak prostředí snižuje variabilitu (bohaté YPD vs YPA s 0,3% kys. octovou) – klonální kompetice vytváří dynamický ‘rich-get-richer’ efekt - výhoda získaná na začátku evoluce „žene“ klonální expanzi – tato ale získává více nových mutací a může se stát časem méně „fit/výhodná“ - méně „fit“ linie mohou ale „přeskočit/leapfrog“ linie s vyšší „fitness“ (srovnej hnědou vs červenou linii)

Aneuploidie způsobuje genomovou nestabilitu - rakovina

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

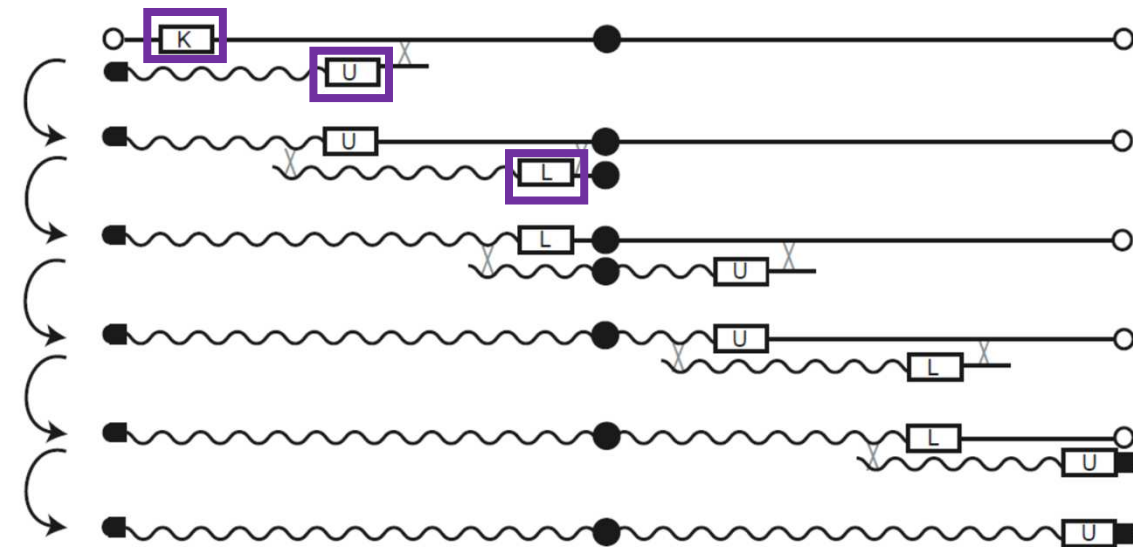




snaha vytvořit „syntetický“ eukaryontní organismus

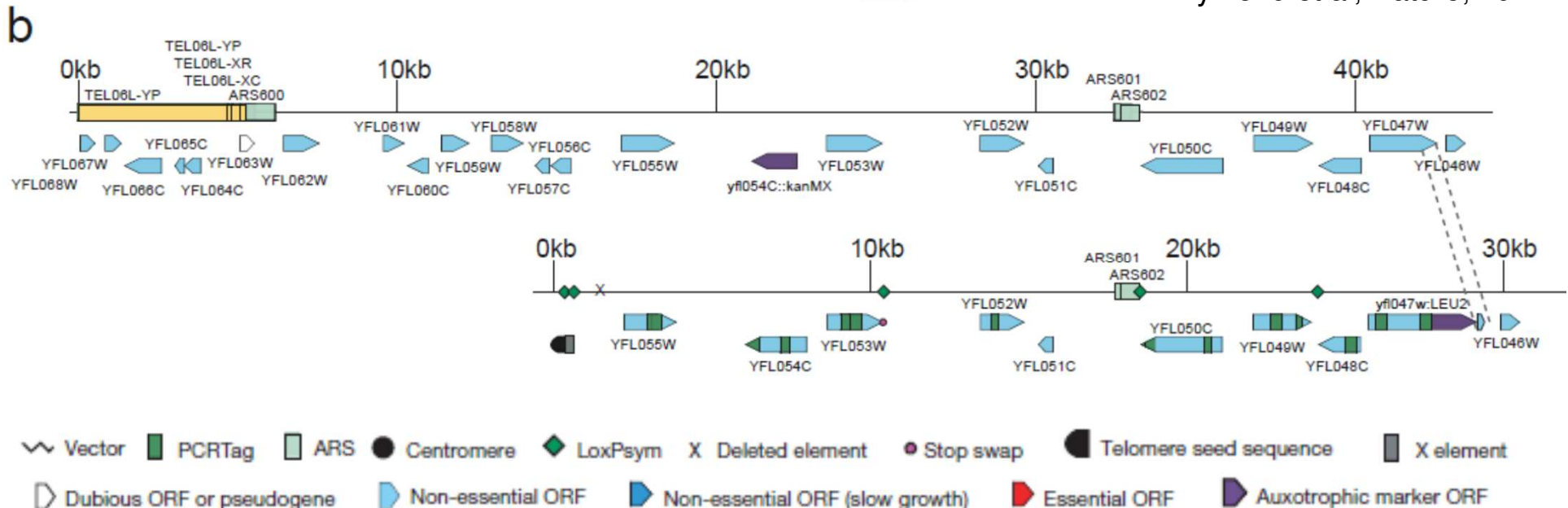
Konsorcium (jako EUROFUN ... projekty)

Syntetické raménko kvasinkového chromosomu



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

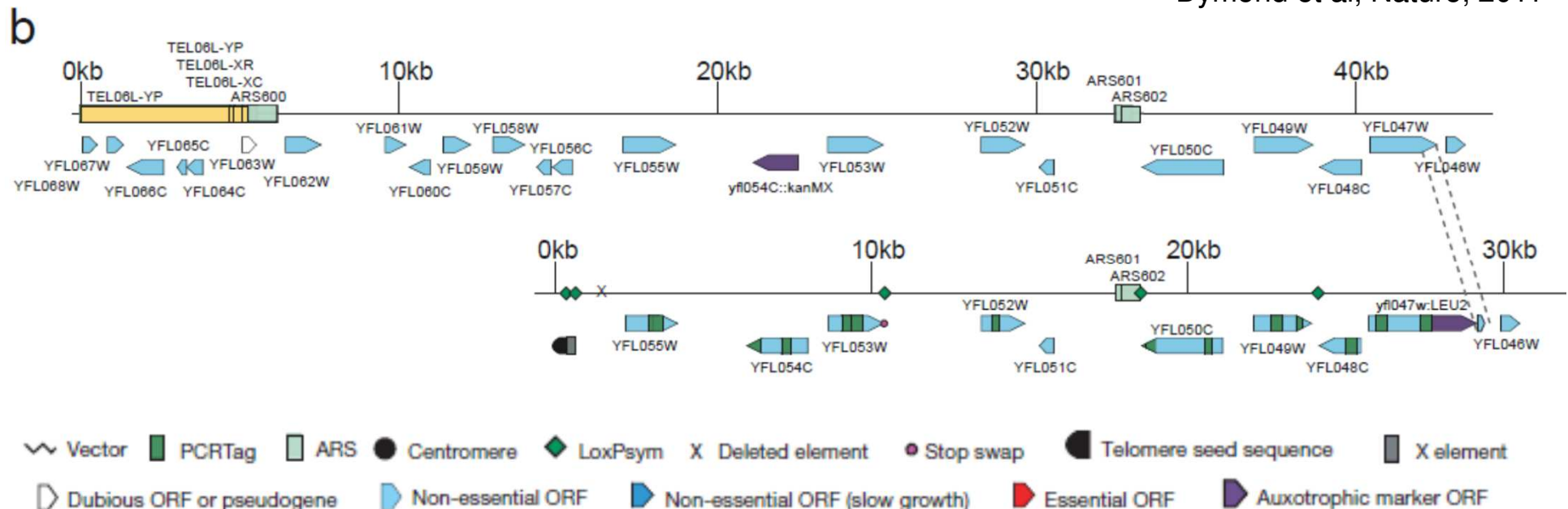
Dymond et al, Nature, 2011



Syntetické raménko kvasinkového chromosomu

- Zachováno pořadí genů ... wt fenotyp (testovali UV, 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-essenčních genů

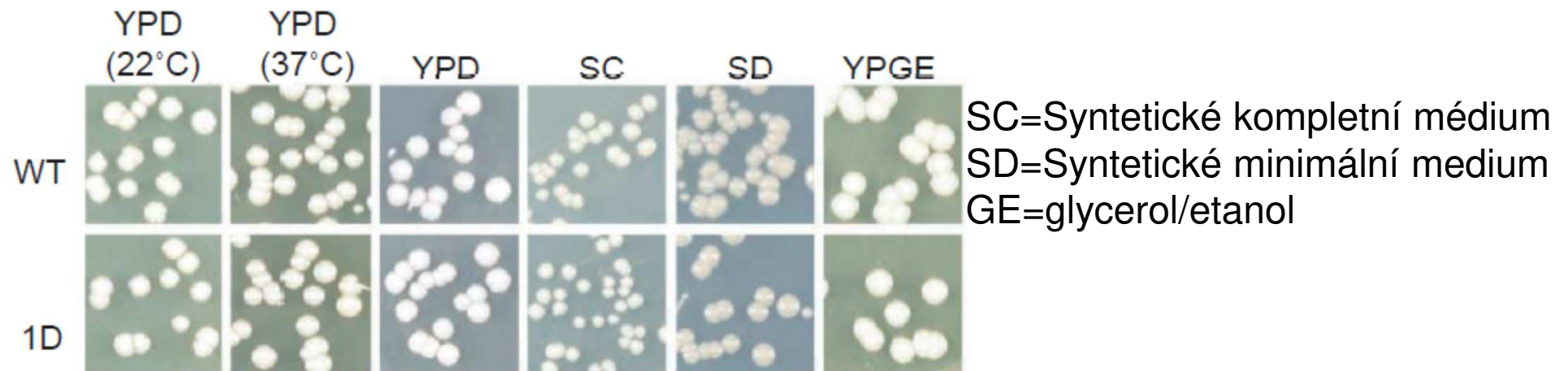
Dymond et al, Nature, 2011



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

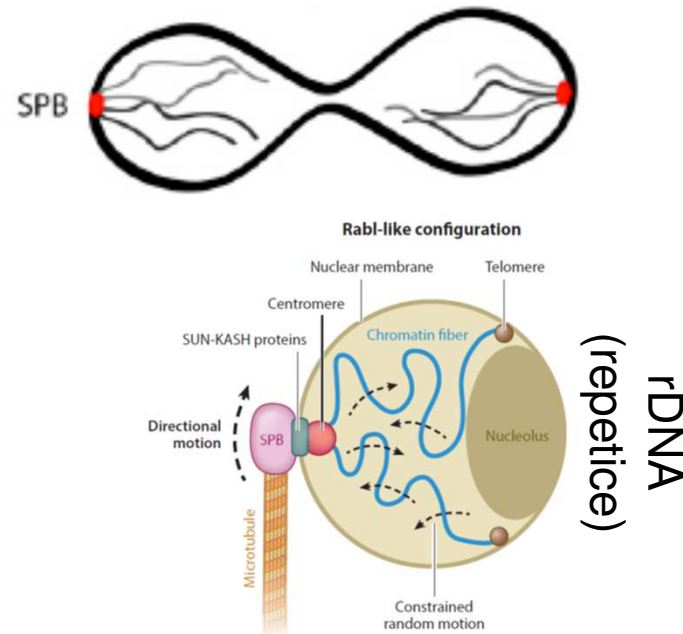
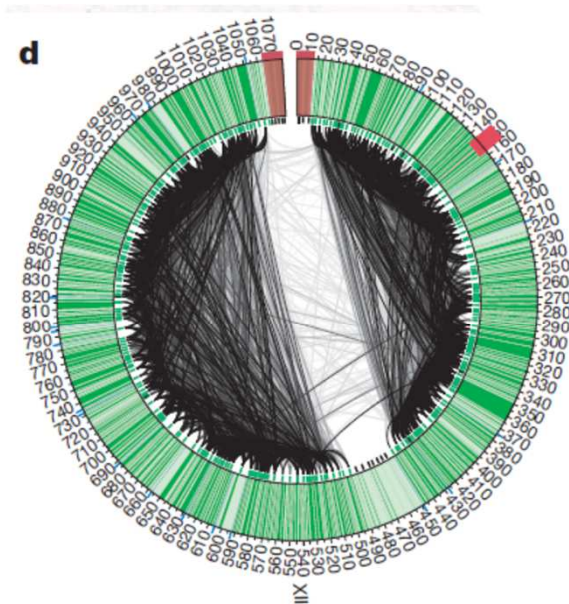
Dymond et al, Nature, 2011



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

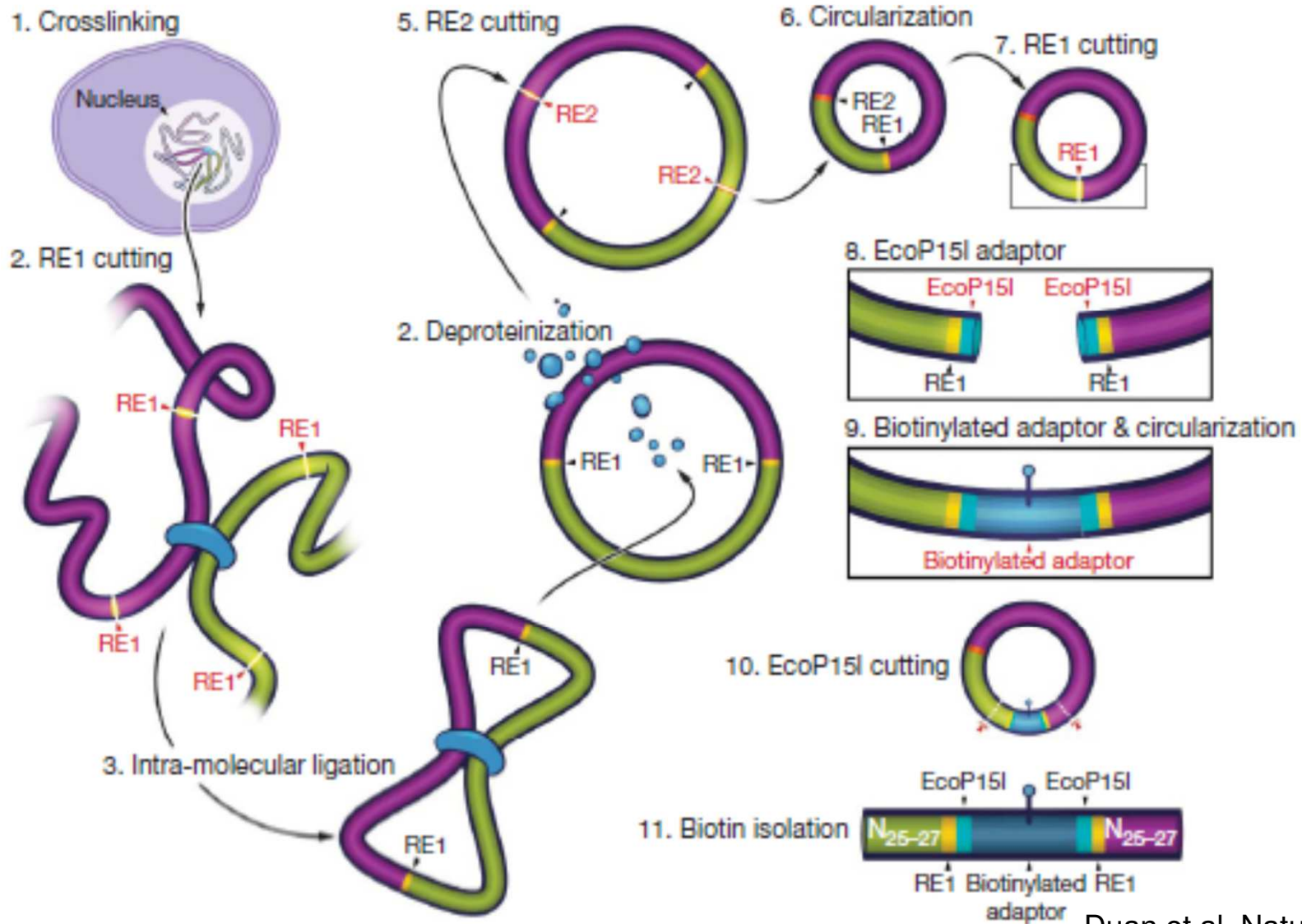
rDNA - repetice

- 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)

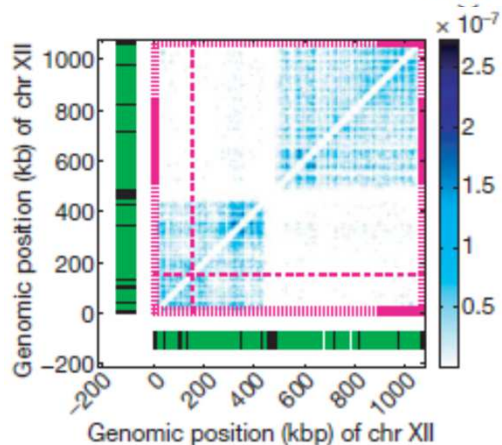
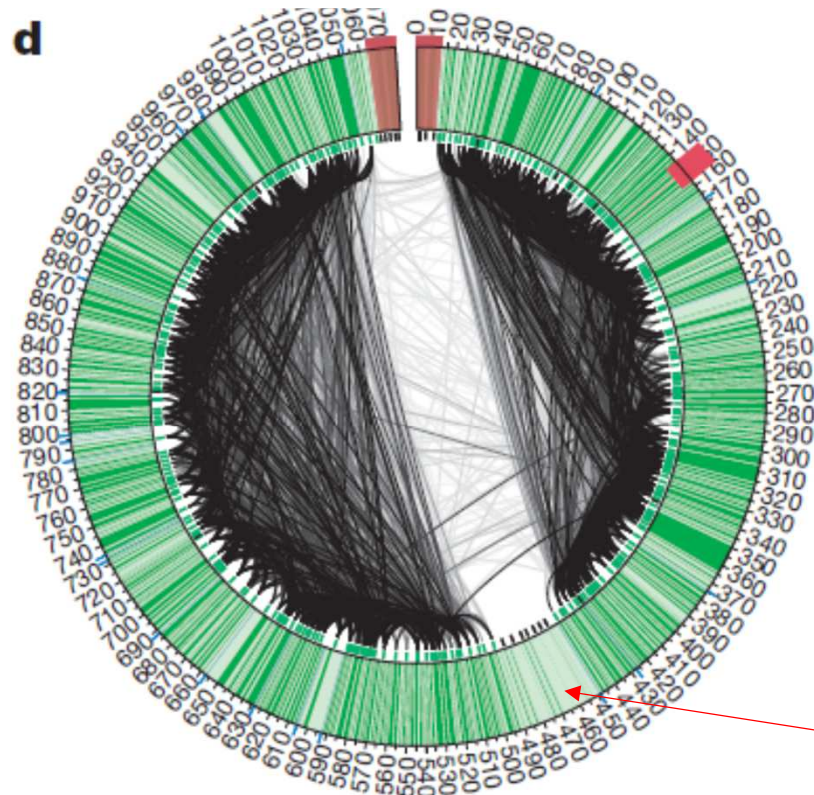


3D organizace chromosomů v *S.c.*

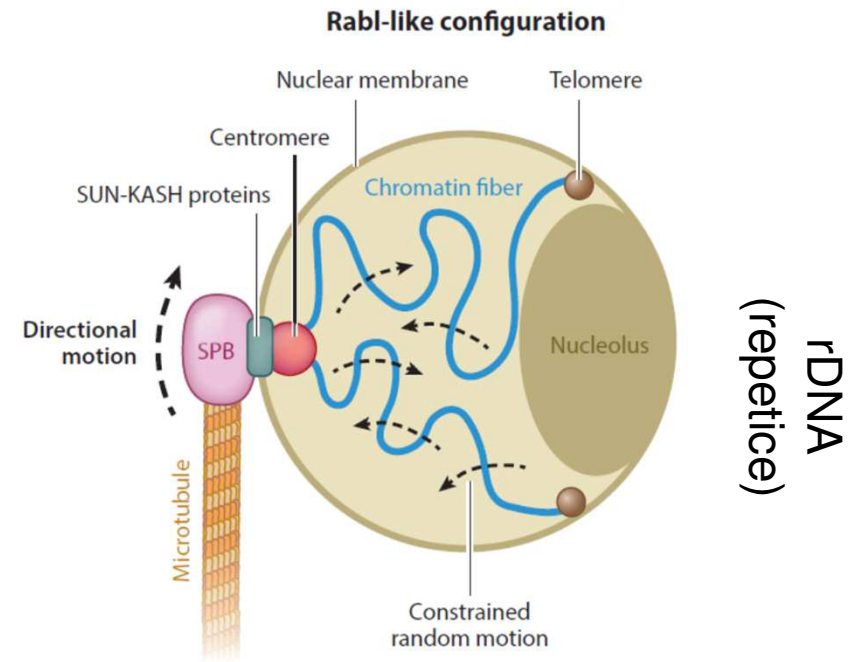
3C – chromosome conformation capture



Chromosom XII



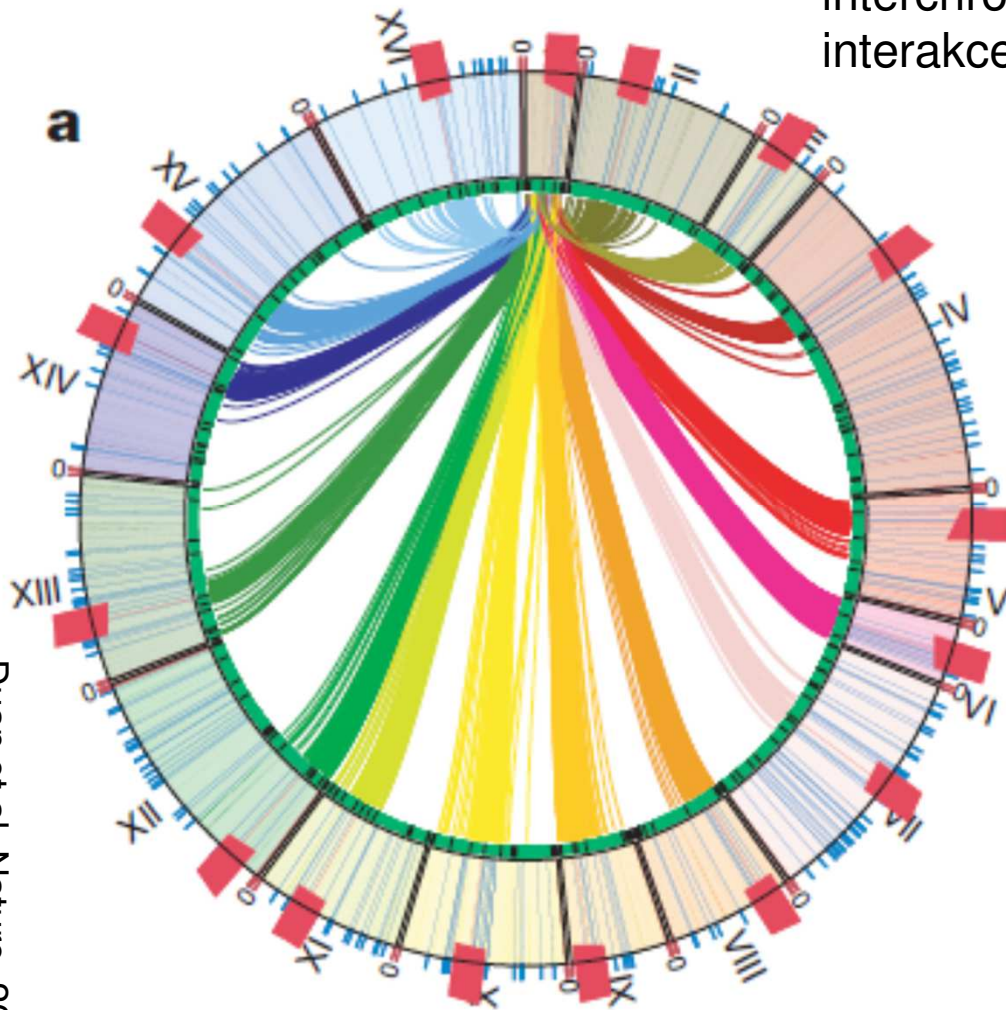
intrachromosomální interakce



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

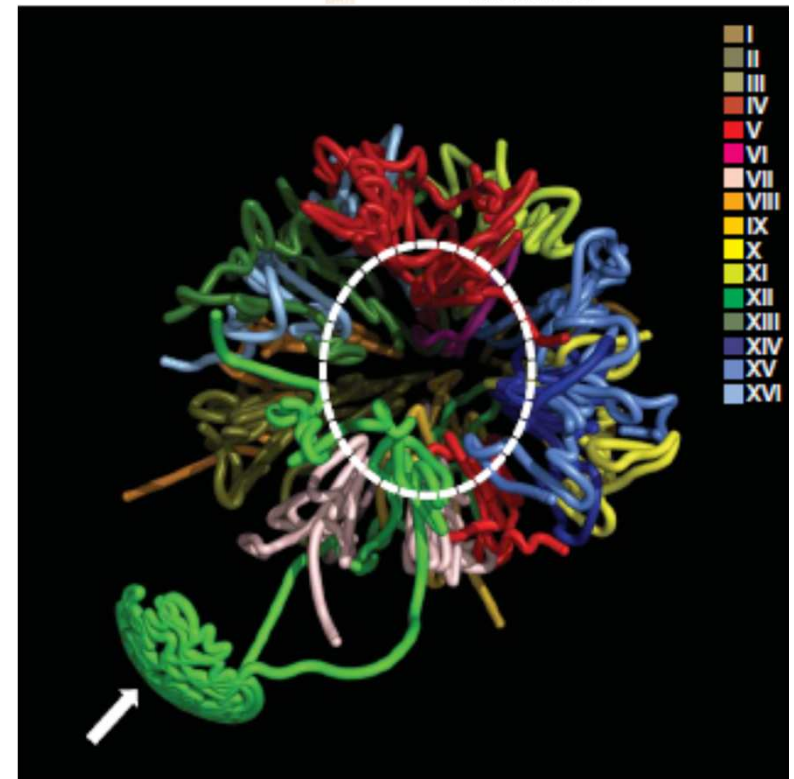
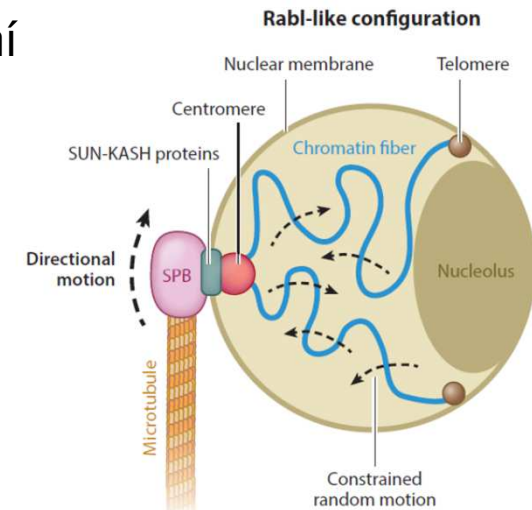
Všechny centromery jsou blízko sebe

interchromosomální interakce



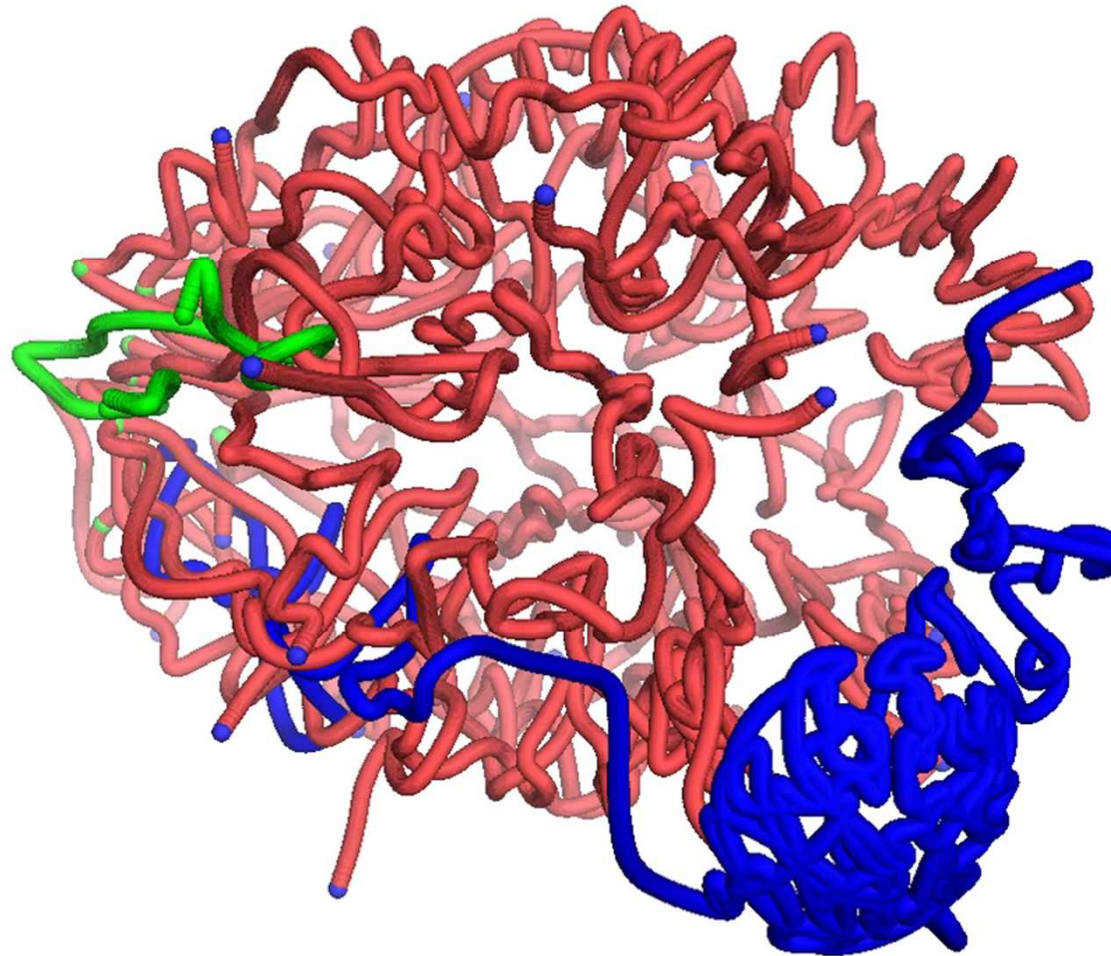
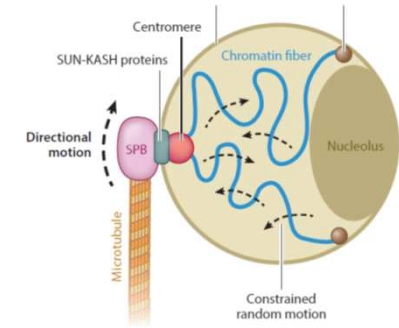
Duan et al, Nature, 2010

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

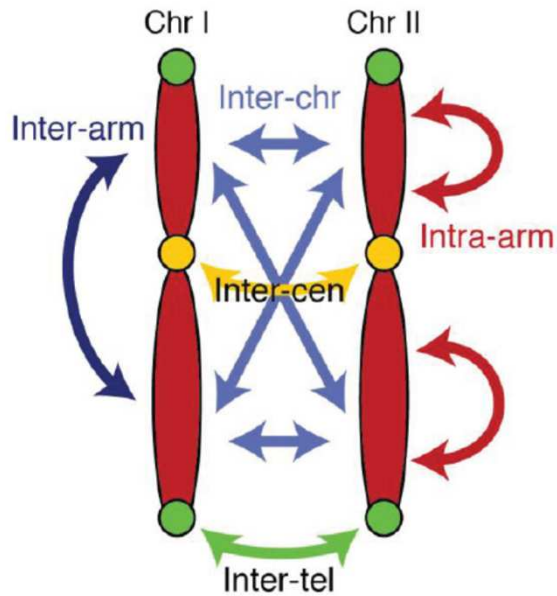


3D rekonstrukce chromosomů v kvasinkovém jádře

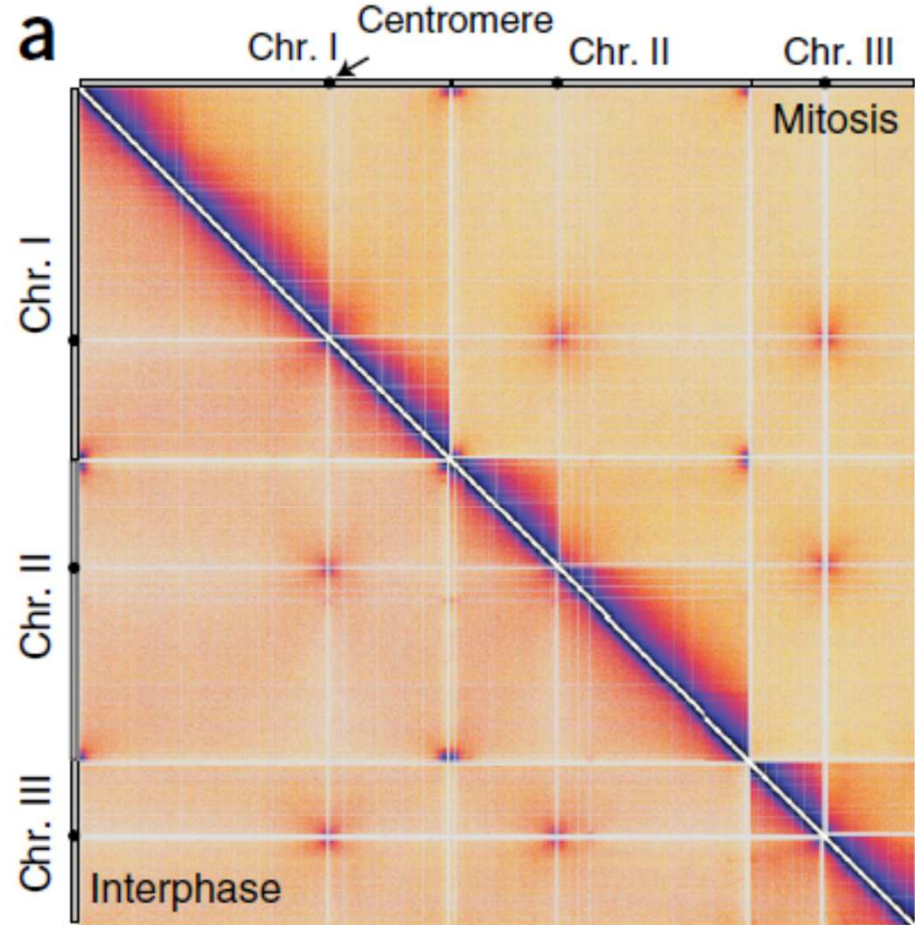
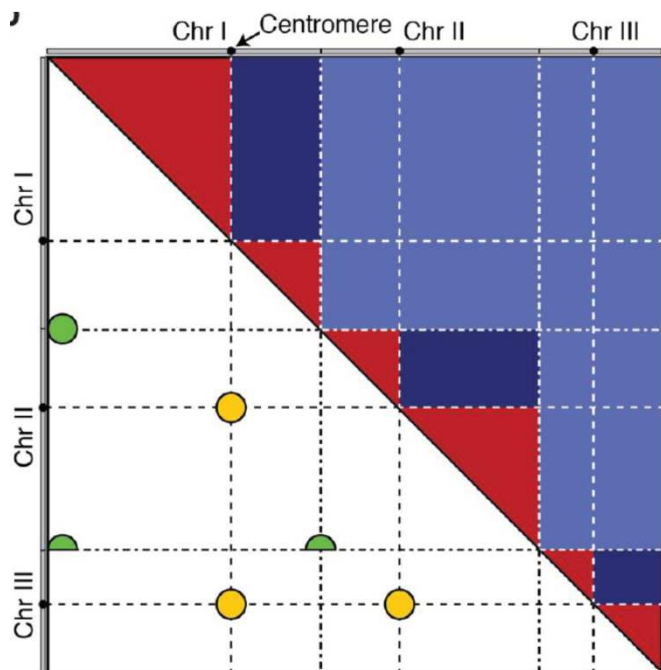
modrý chromXII – jadérko s rDNA izolované
zelený chromIII (MAT lokus)



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

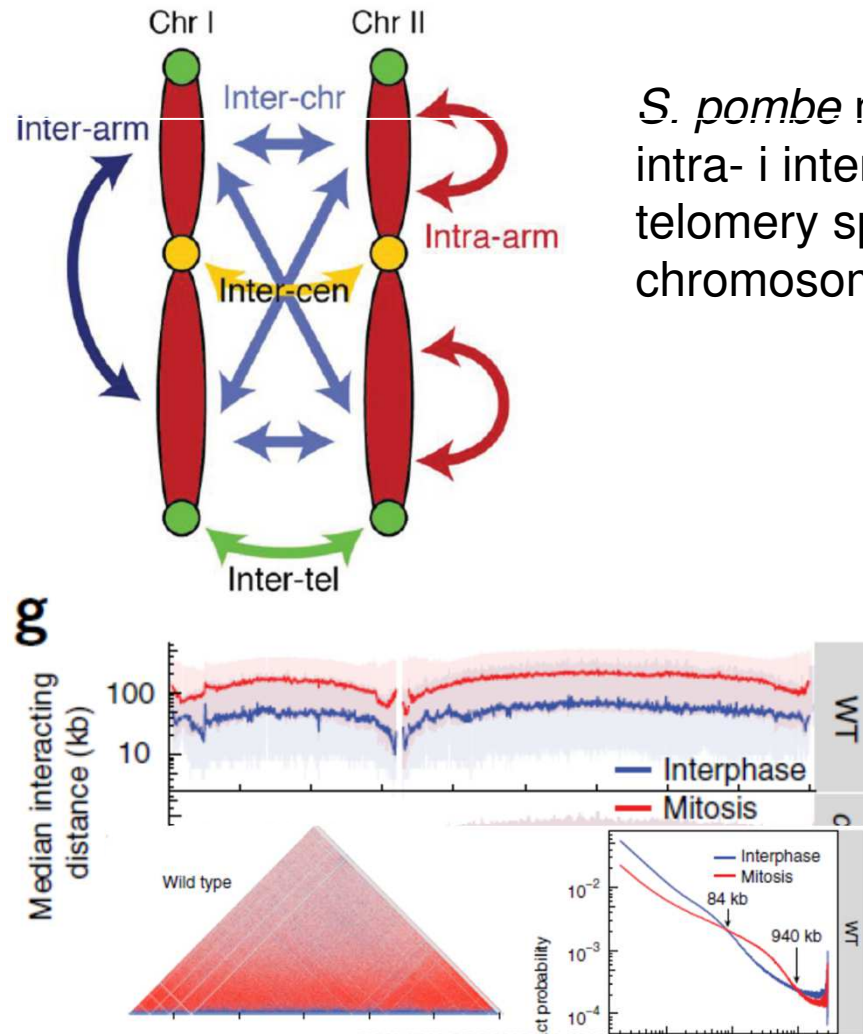
Contact probability
0.00005 |  | 0.005

Kondenzace chromosomů v mitóze

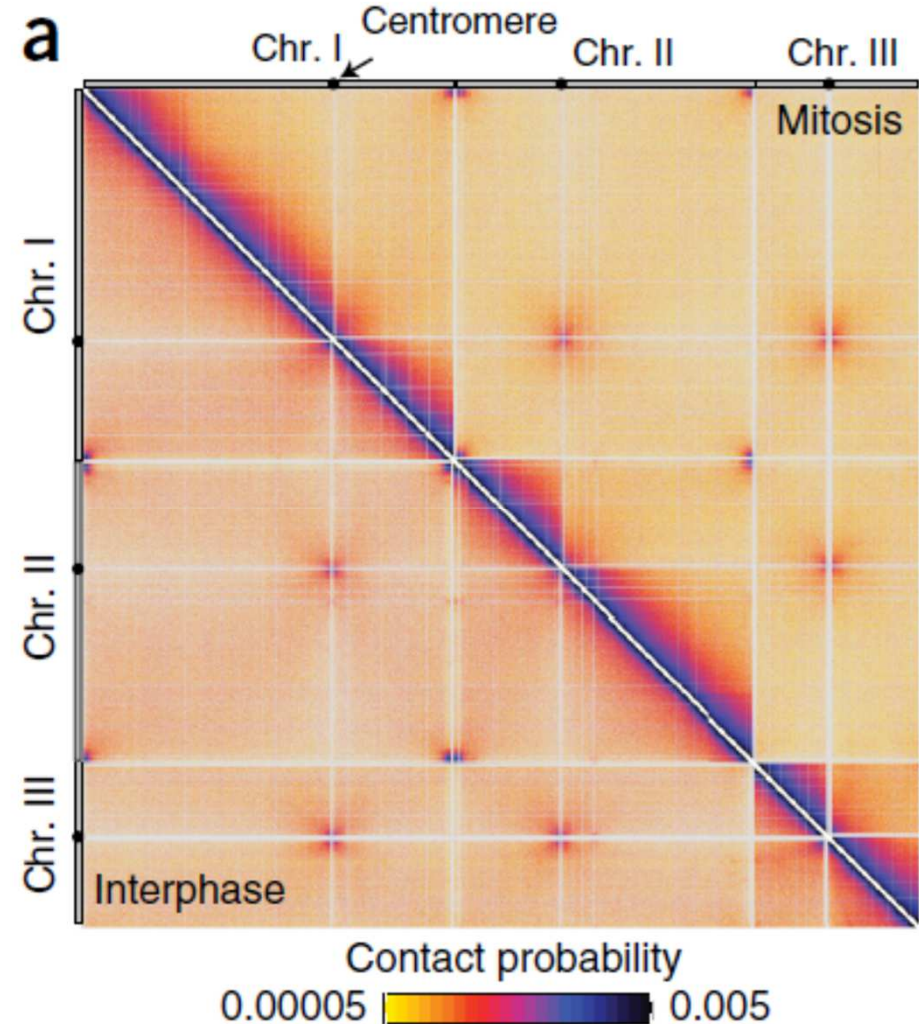
Kakui et al, Nat Genet, 2017

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

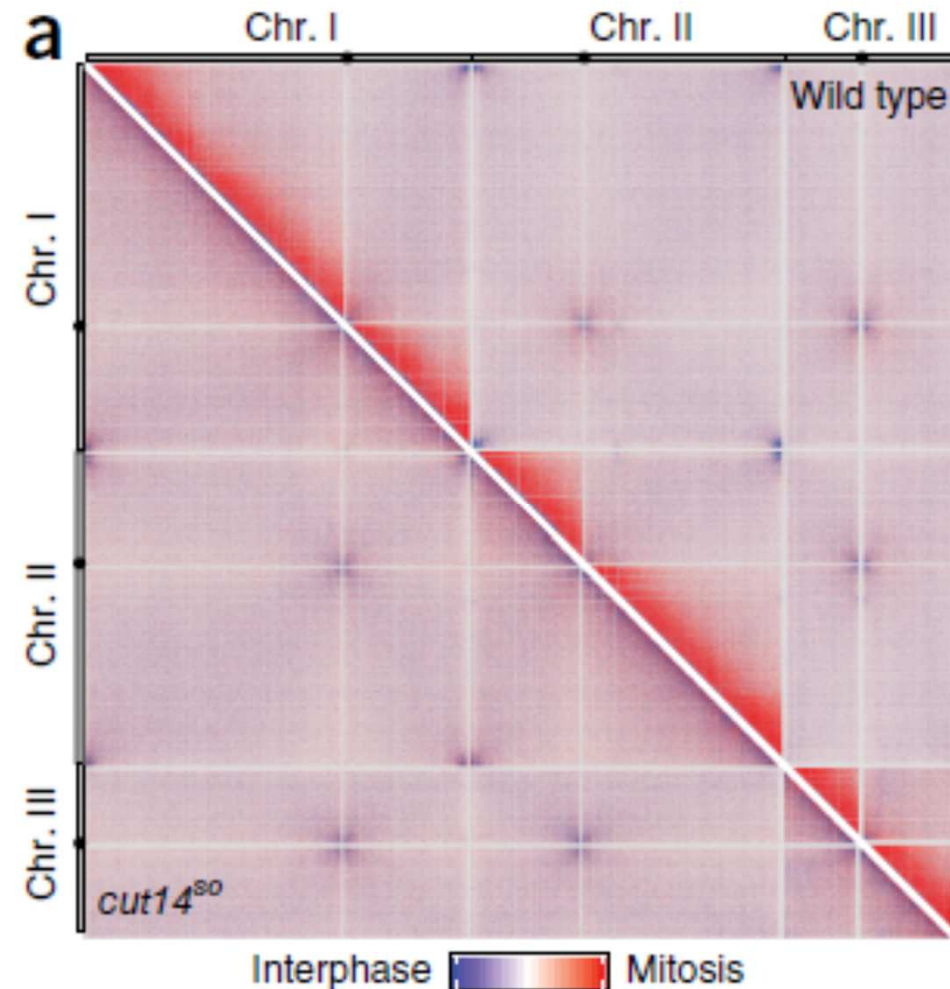
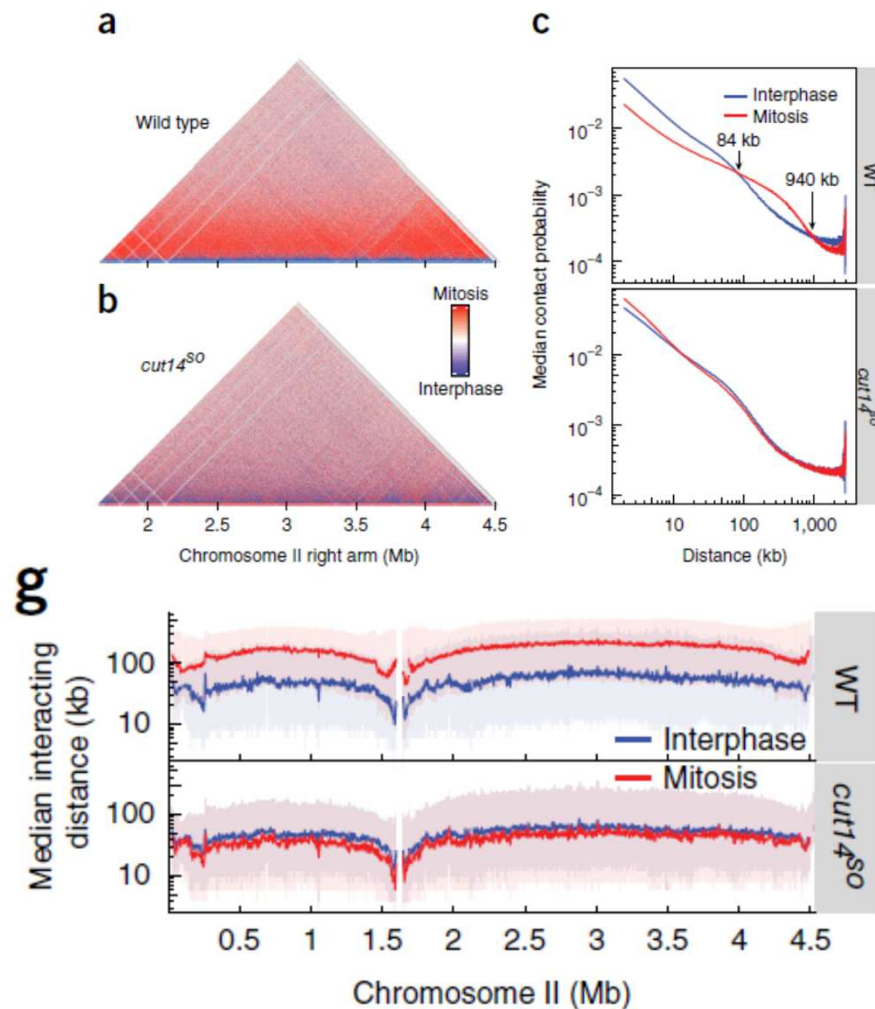


intrachromosomální interakce v mitóze jsou smyčky větší



Kondenzin kondenzuje chromosomy

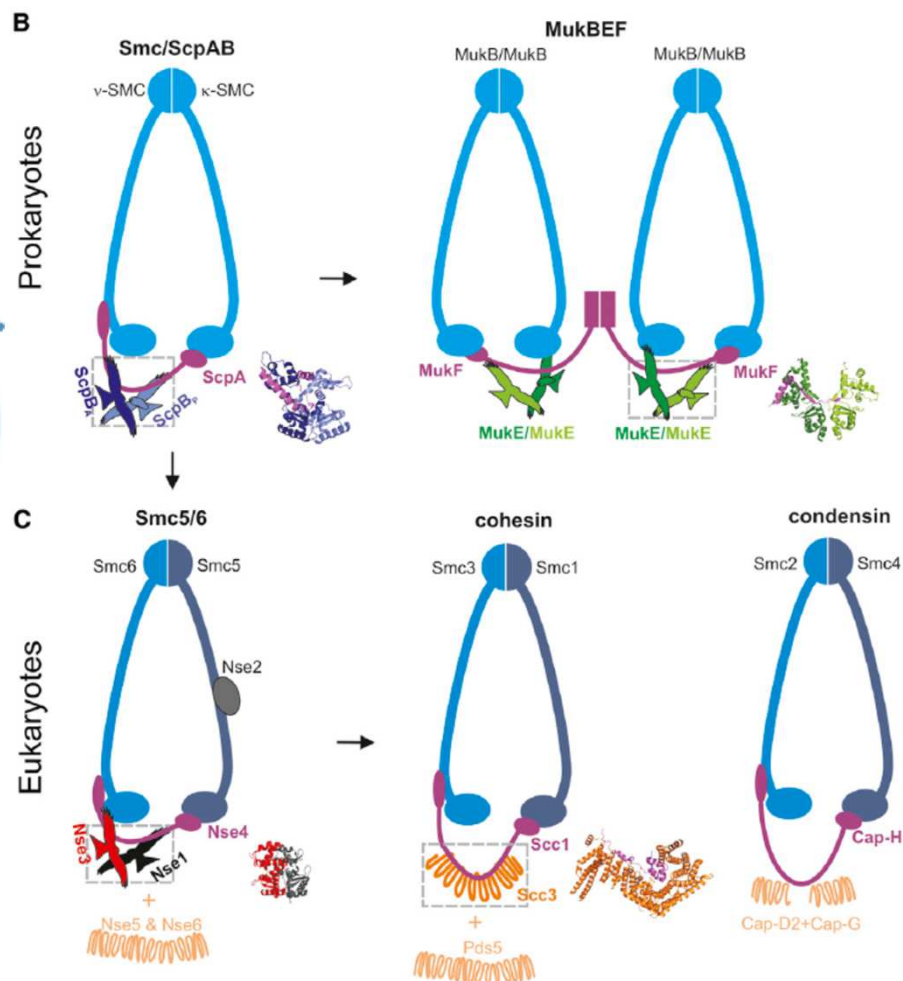
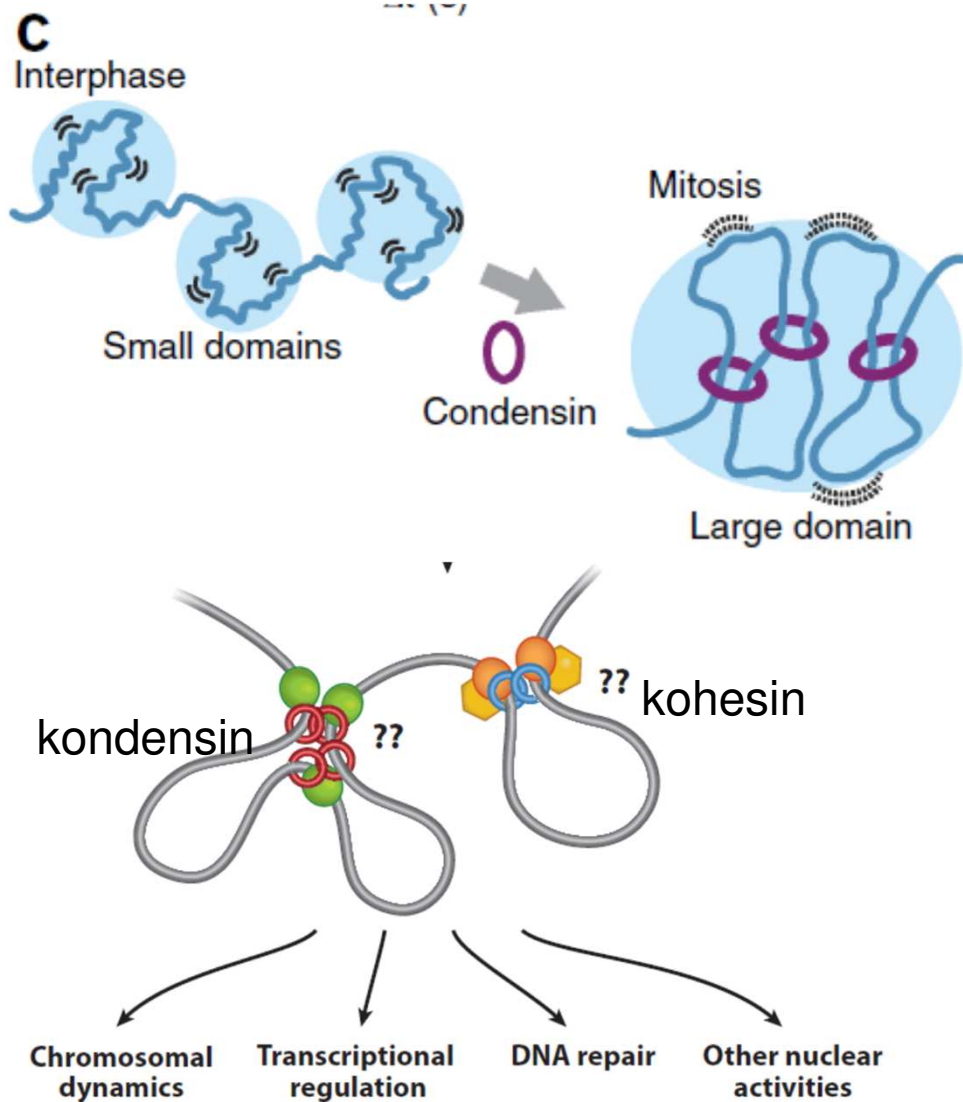
Kakui et al, Nat Genet, 2017
Tanizawa et al., NSMB, 2017



intrachromosomální interakce
větší mitotické smyčky jsou závislé na
kondensinu

SMC komplexy

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

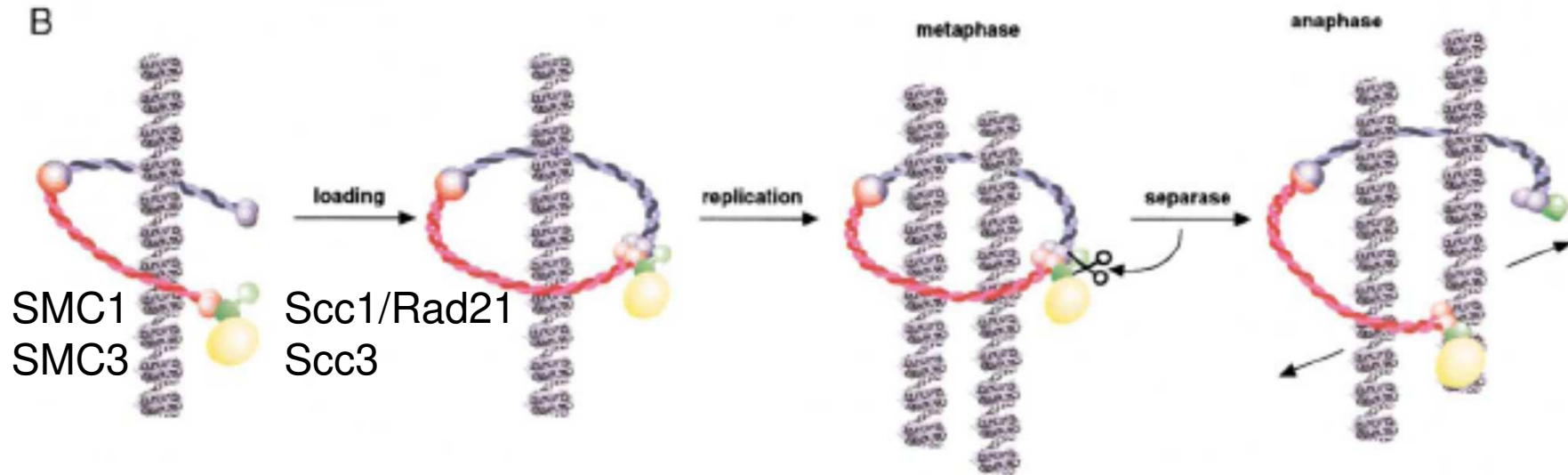


kvasinky mají pouze 1 kondensin (vyšší 2x)

Kakui et al, Nat Genet, 2017

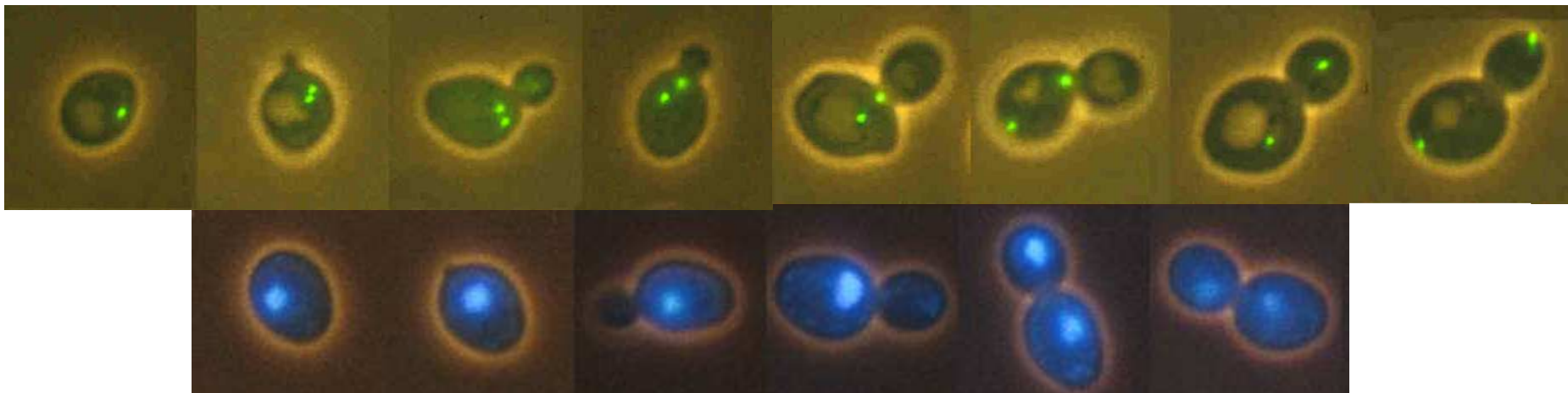
Palecek a Gruber, Structure, 2015

Kohesin drží sesterské chromatidy



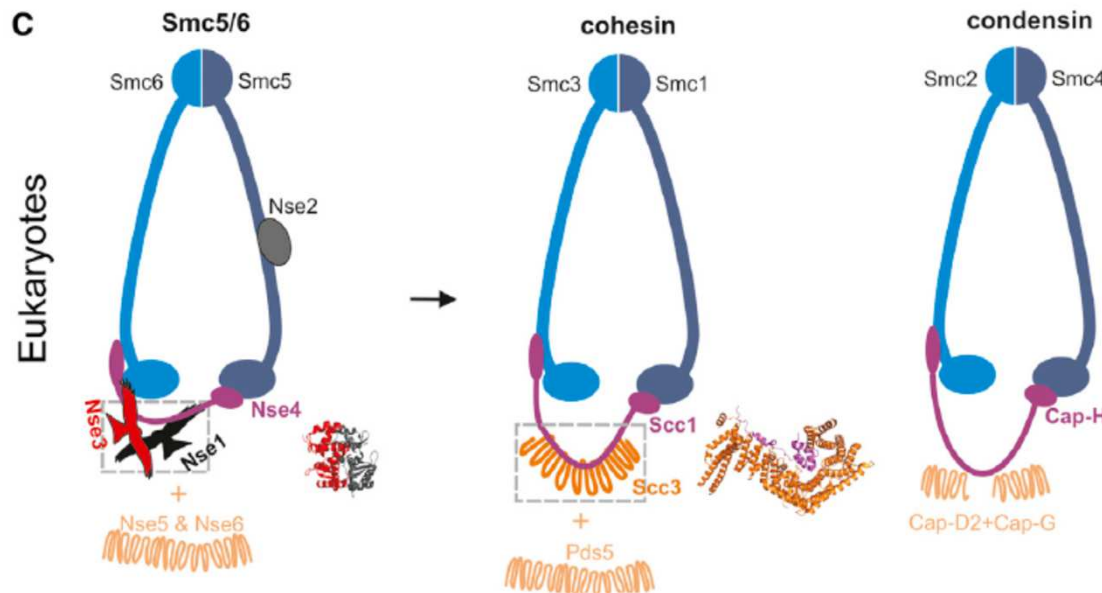
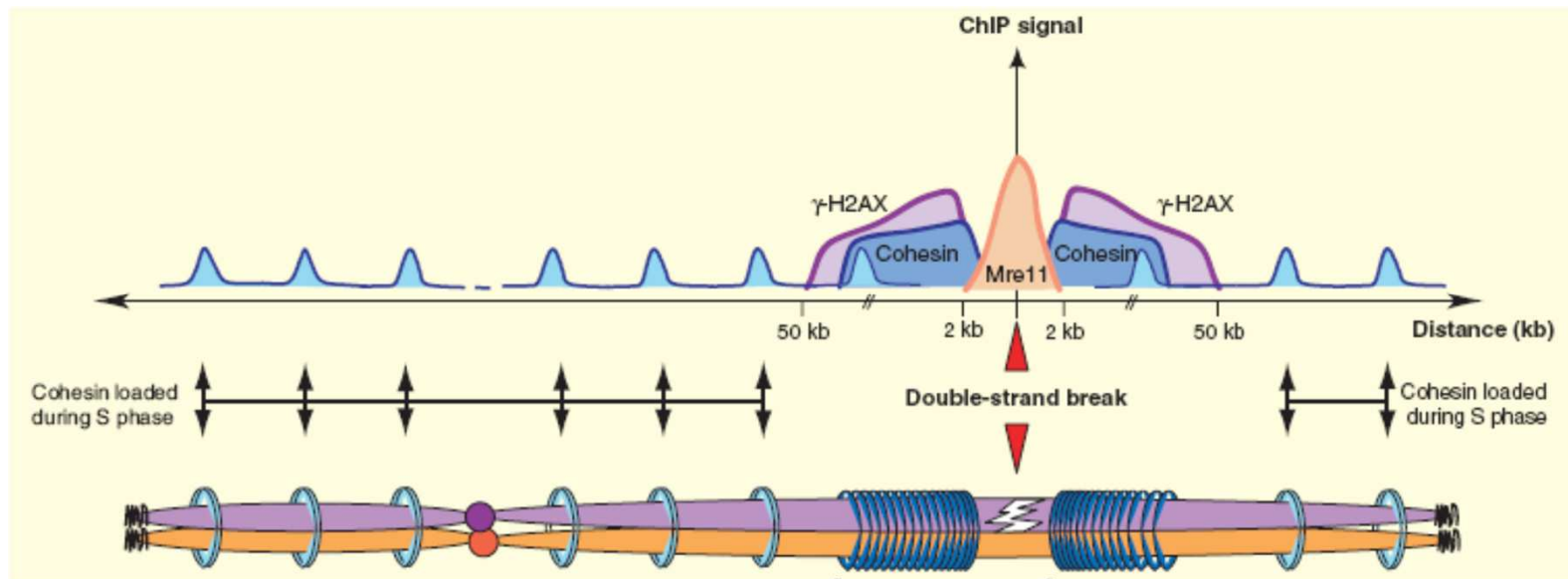
Haering et al, 2002, Mol Cell

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)

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 kvasinkových chromosomů