

## Souhrn předchozí přednášky

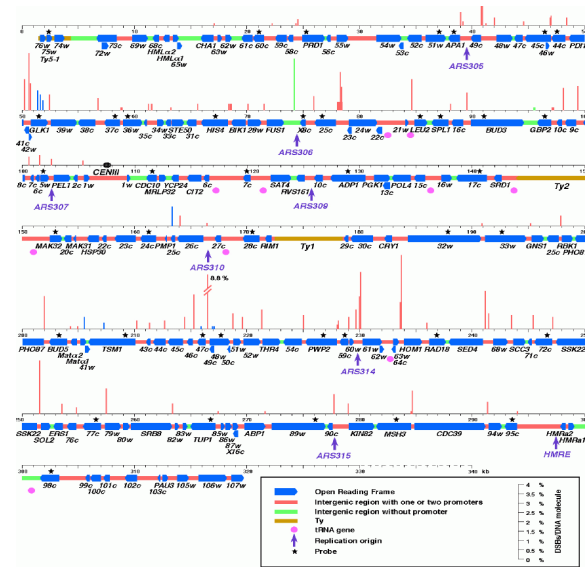
- Regulace transkripce
  - Gal4 transkripční faktor
    - transkripční hybridní systémy
  - alternativní kvasinkové systémy
    - hybridní – G-proteiny
    - komplementační – DHFR, ubikvitin

# Osnova (poslední) přednášky

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

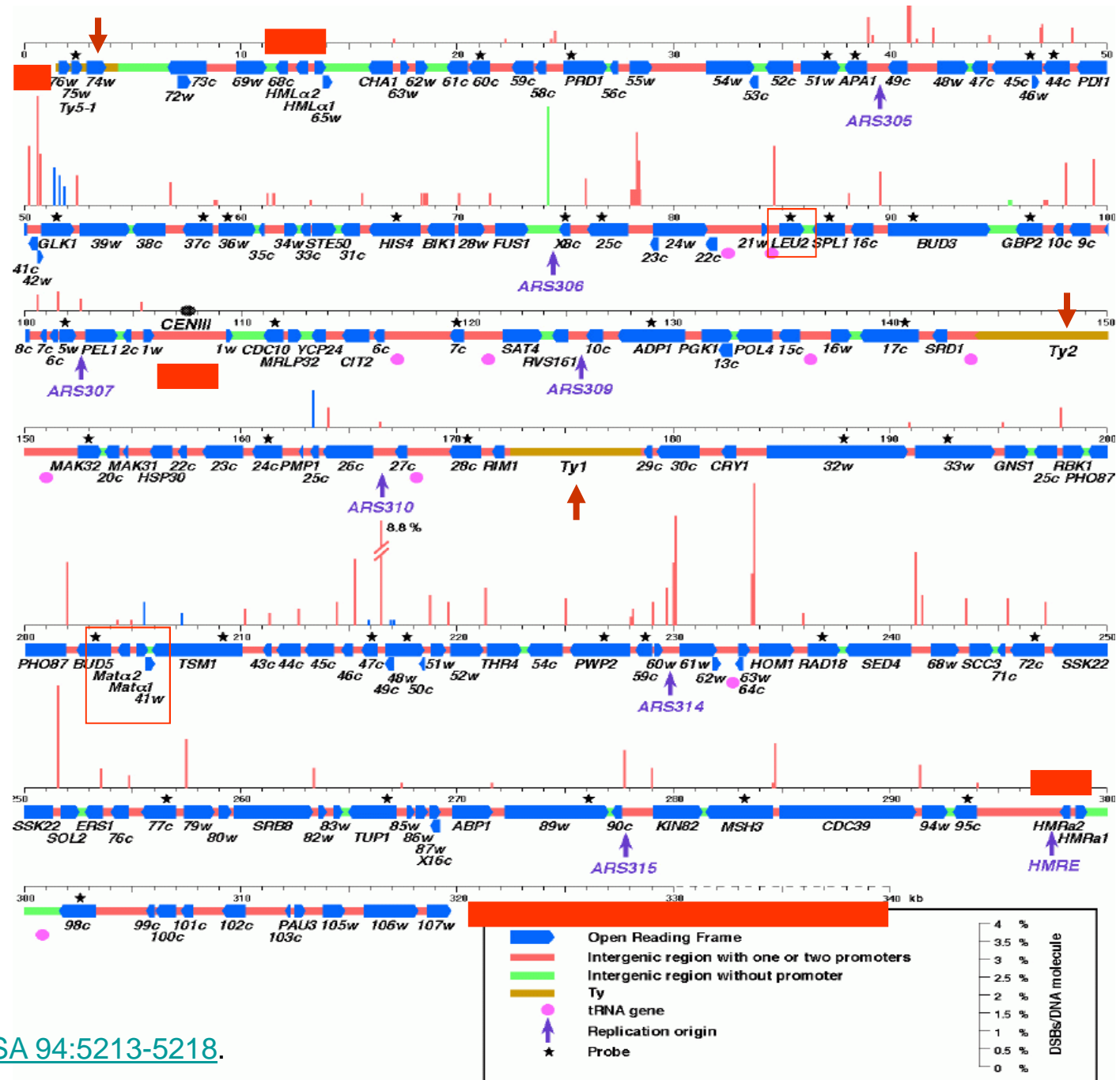
# Základní prvky kvasinkového genomu *Saccharomyces cerevisiae* (vs *S.p.*)

- haploidní genom - 12Mbp, 16 chromosomů (chrI=0.22 – chrXII=1.6Mbp)
- délka chromosomu XII se u různých *S.c.* liší dle počtu (až 200) kopii rDNA v repetici, 262 tRNA (pro 64 kodonů), 40 snRNA,
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Geny (cca 6500) reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- Redundantní (2000 genů duplikováno) – cca30% genomu vzniklo duplikacemi
- <5% genů (280) obsahuje introny (0.5% genomu),
- 3% Ty1-5 transposony (46% u člověka)
- Kondenzovaný/tichý heterochromatin: centromery, telomery a HMR/HML



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

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



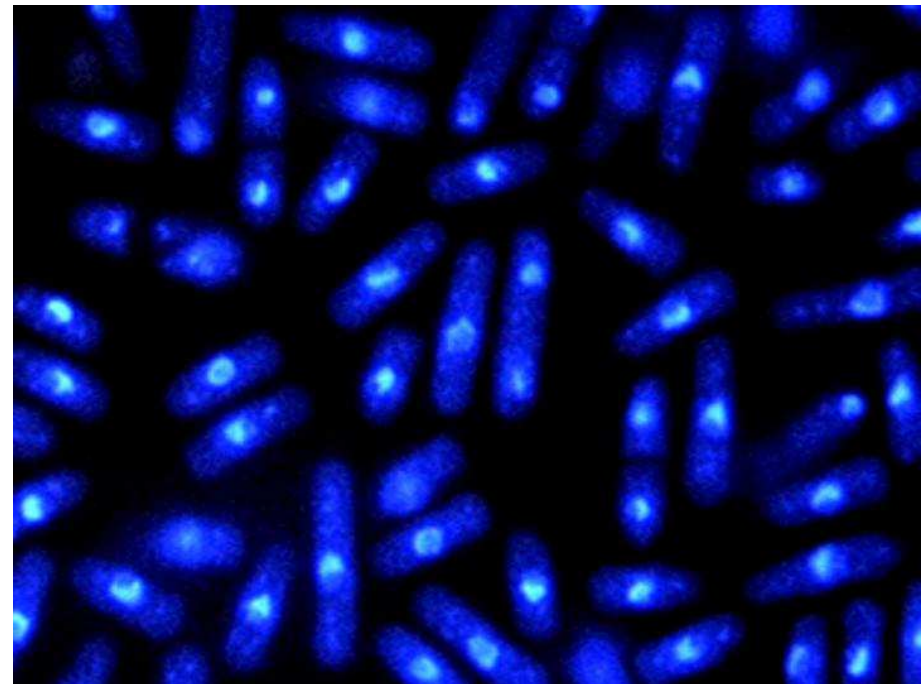
# Pozorování DNA/chromosomů u kvasinek

- 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 – chromatin conformation capture

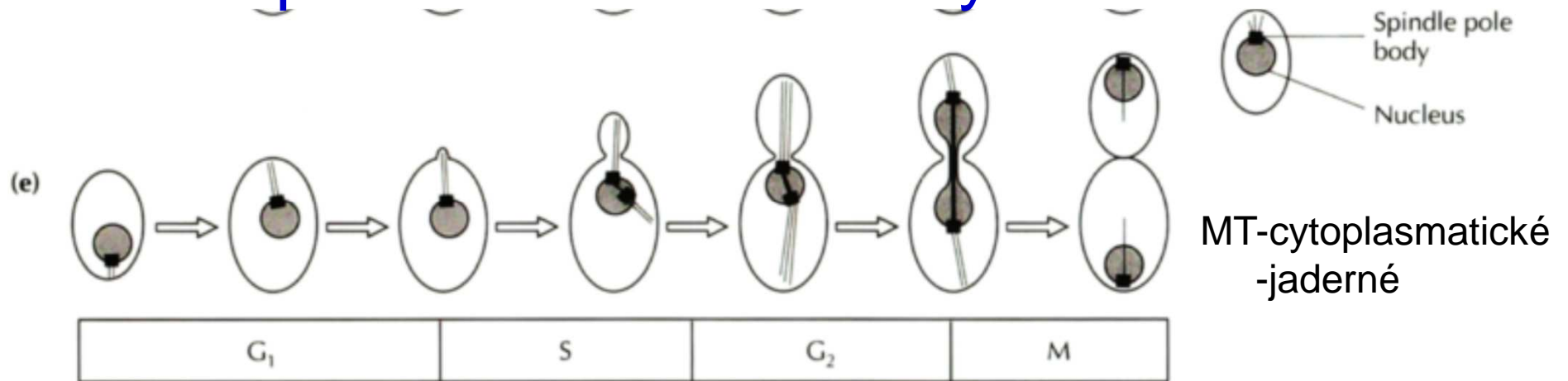


↑  
*Saccharomyces cerevisiae*  
→  
*Schizosaccharomyces pombe*

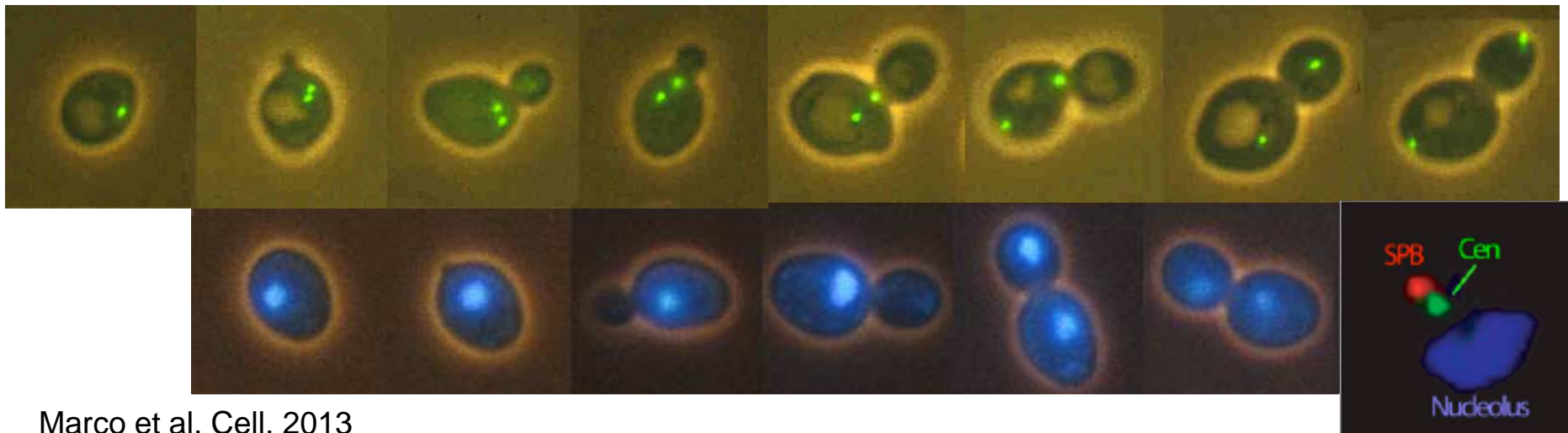
Pozadí = mtDNA



# DNA v průběhu buněčného cyklu *S.cerevisiae*

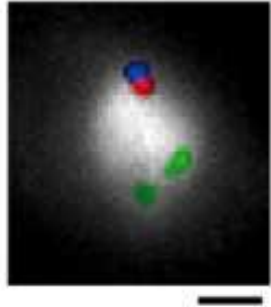


- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze tj. replikace
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G<sub>2</sub> fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (u kvasinek se jaderná membrána nerozpadá)
- na začátku anafáze dochází k oddělení sesterských chromatid a jejich segregaci  
SPB-GFP barvení



# Orientace chromosomů

Mitotic interphase

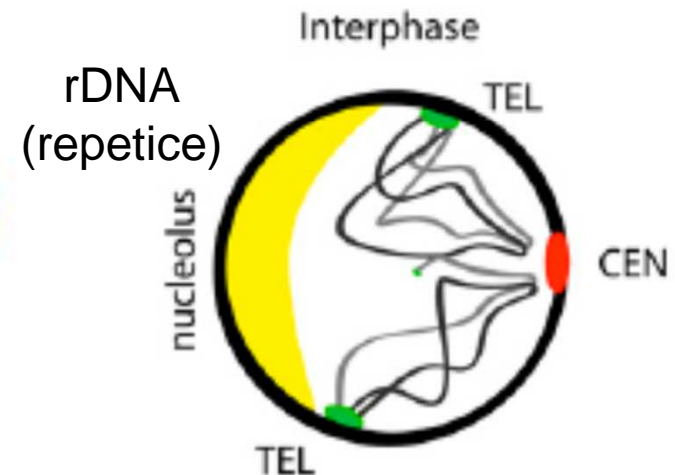
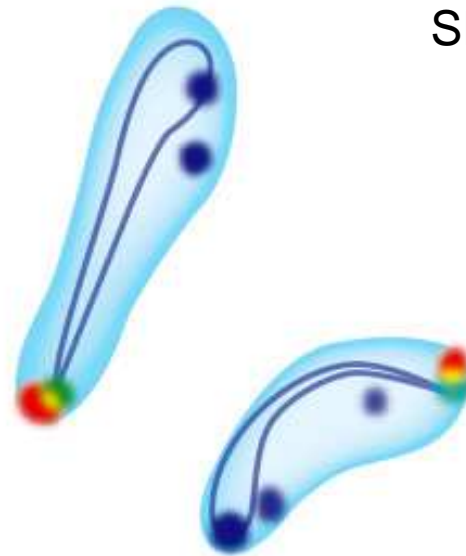
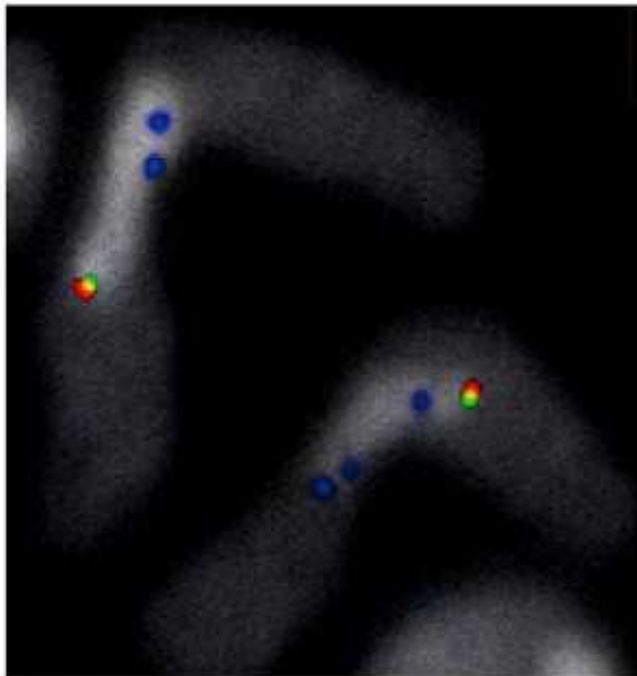


- centromere
- telomere
- SPB

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

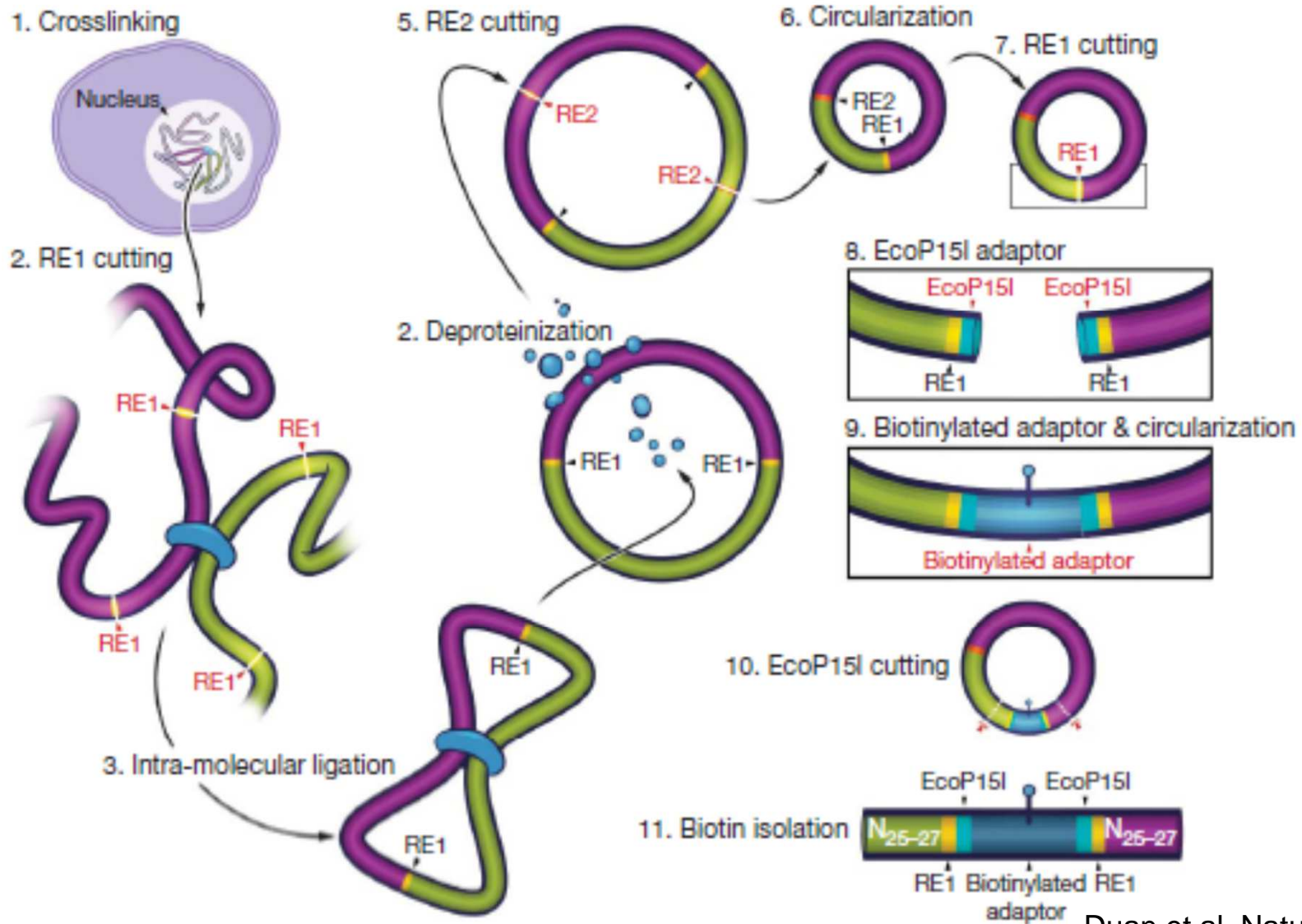
FISH – fluorescence *in situ* hybridization (1992)

Meiotic prophase



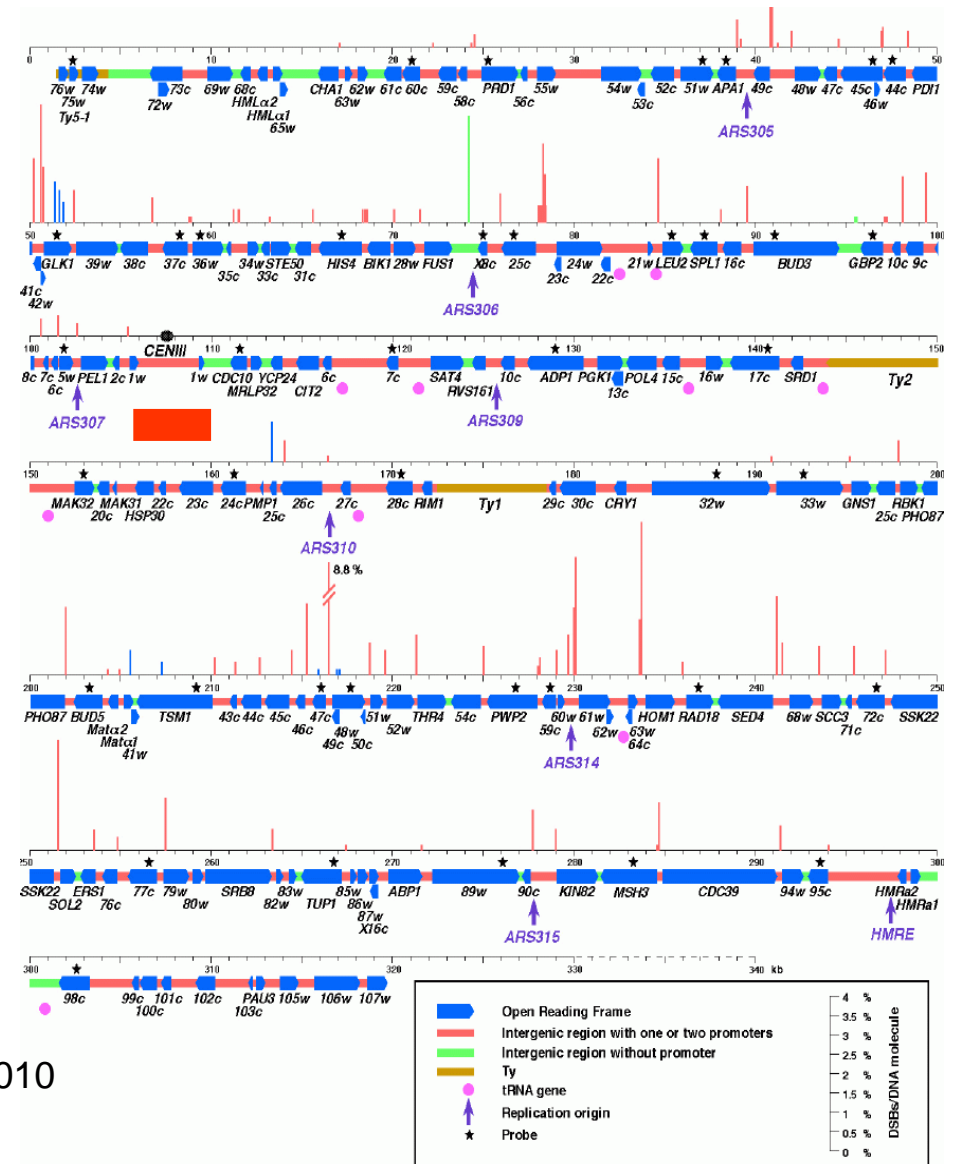
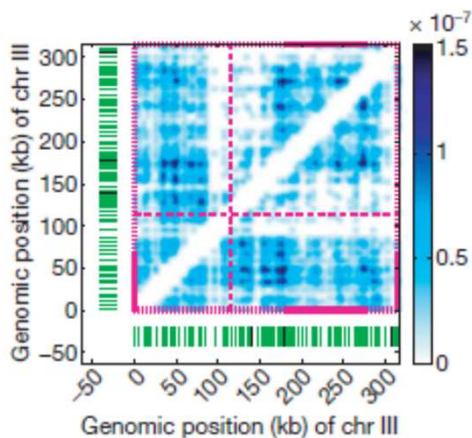
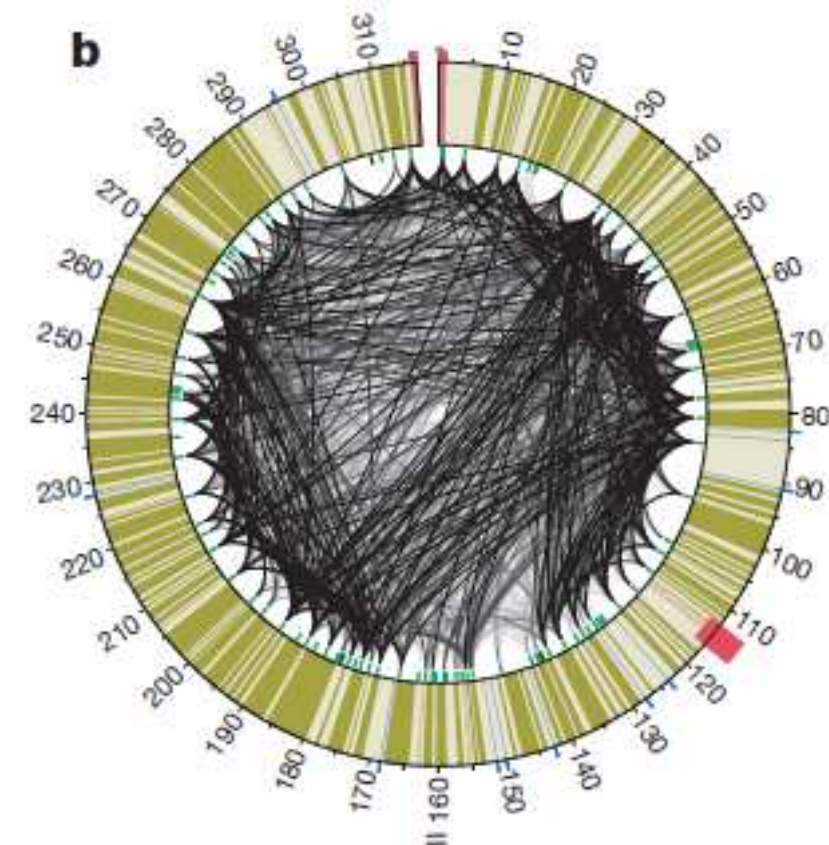
# 3D organizace chromosomů v *S.c.*

## 3C – chromosome conformation capture





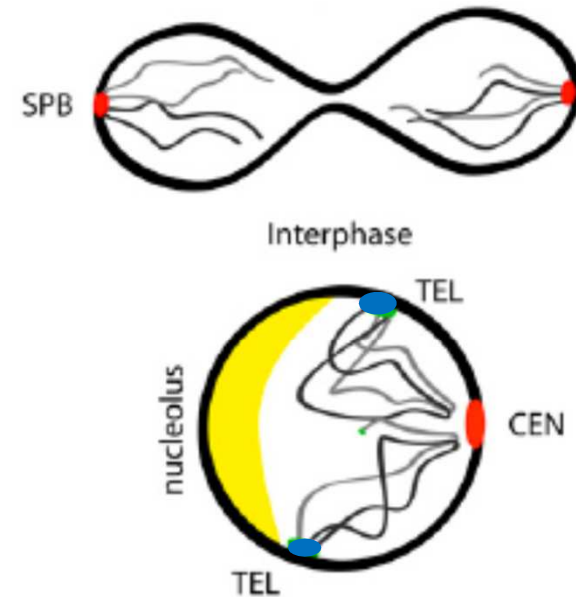
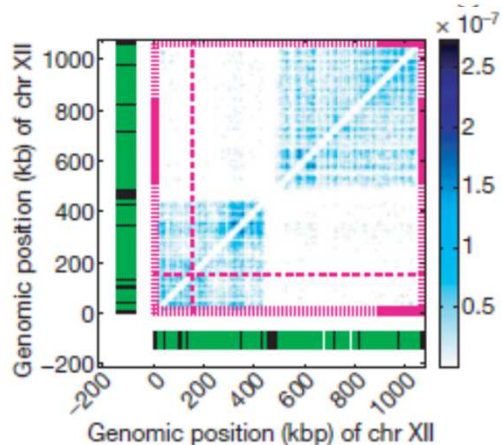
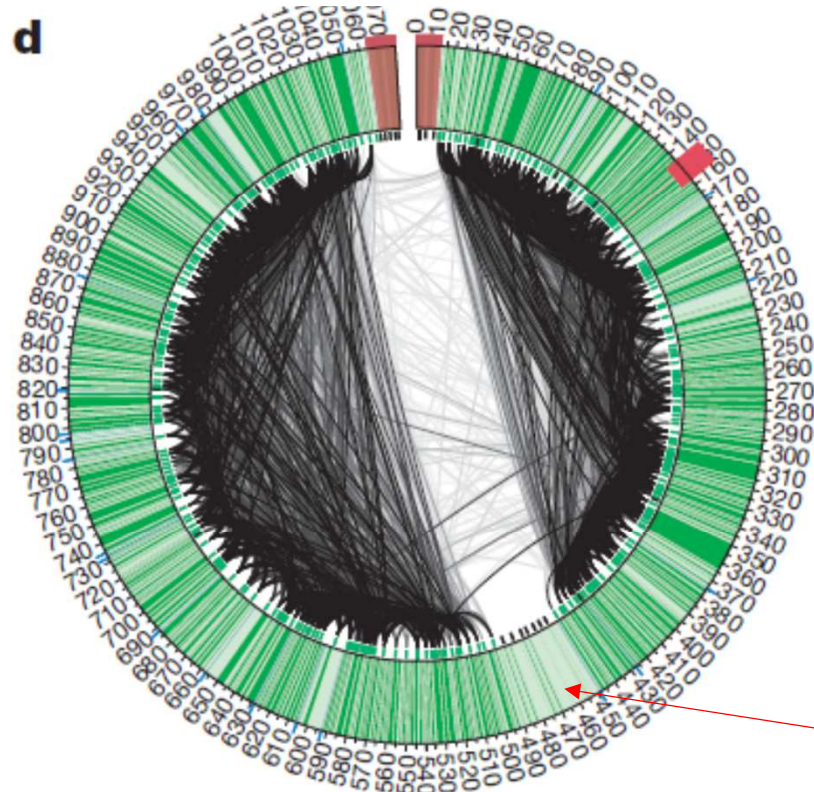
# Chromosom III



Duan et al, Nature, 2010

Diagram ukazuje víceméně rovnoměrnou distribuci smyček (prostorově sousedících úseků DNA) – napovídá o prostorovém uspořádání chromosomu III

# Chromosom XII

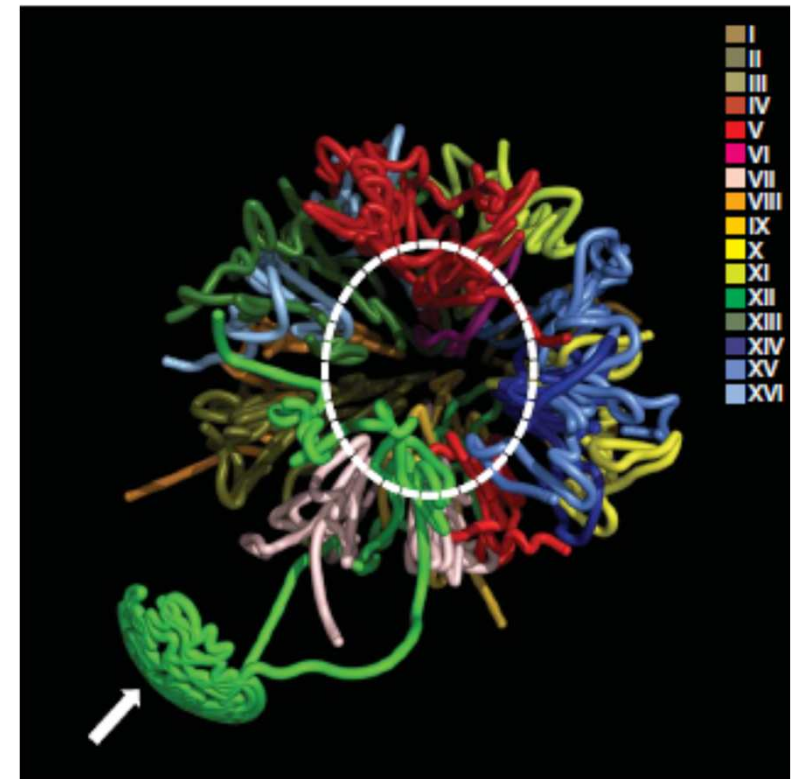
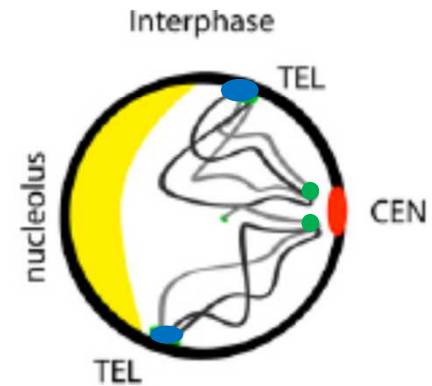
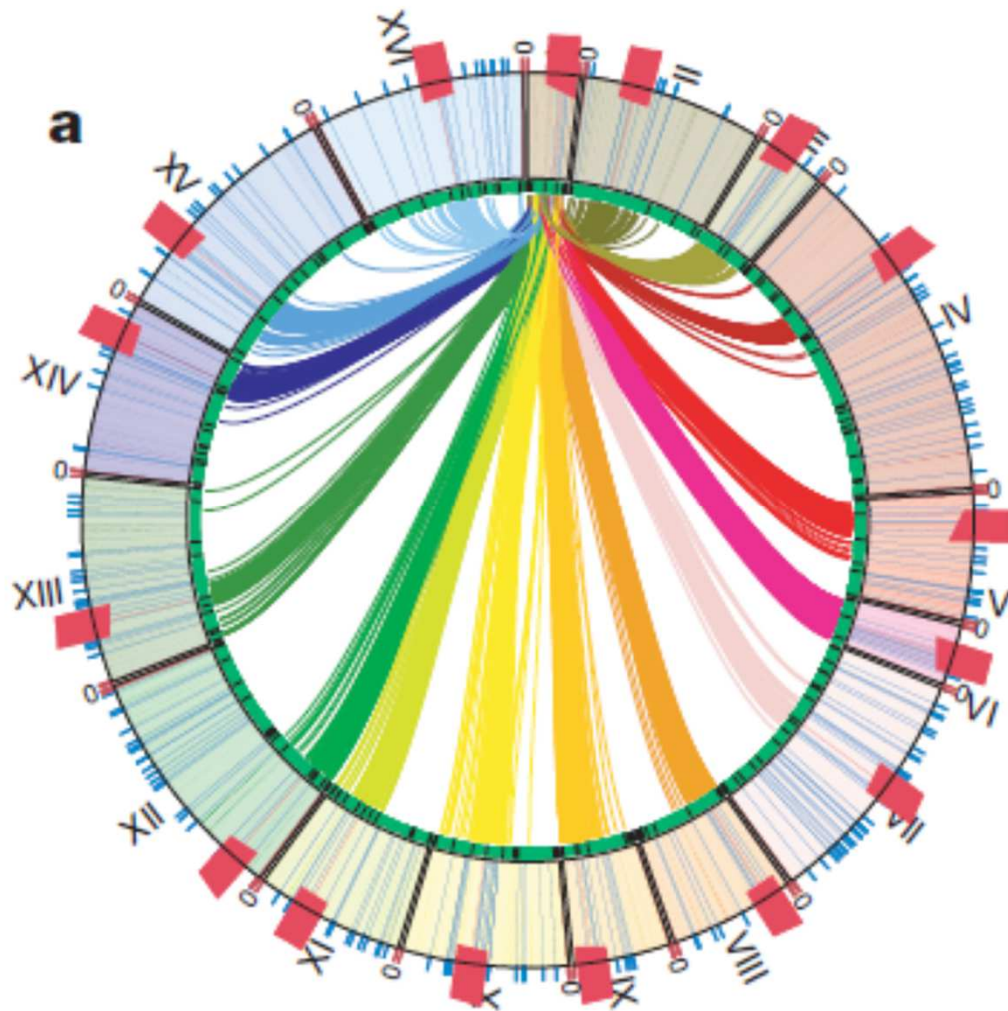


ibl, 1885

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

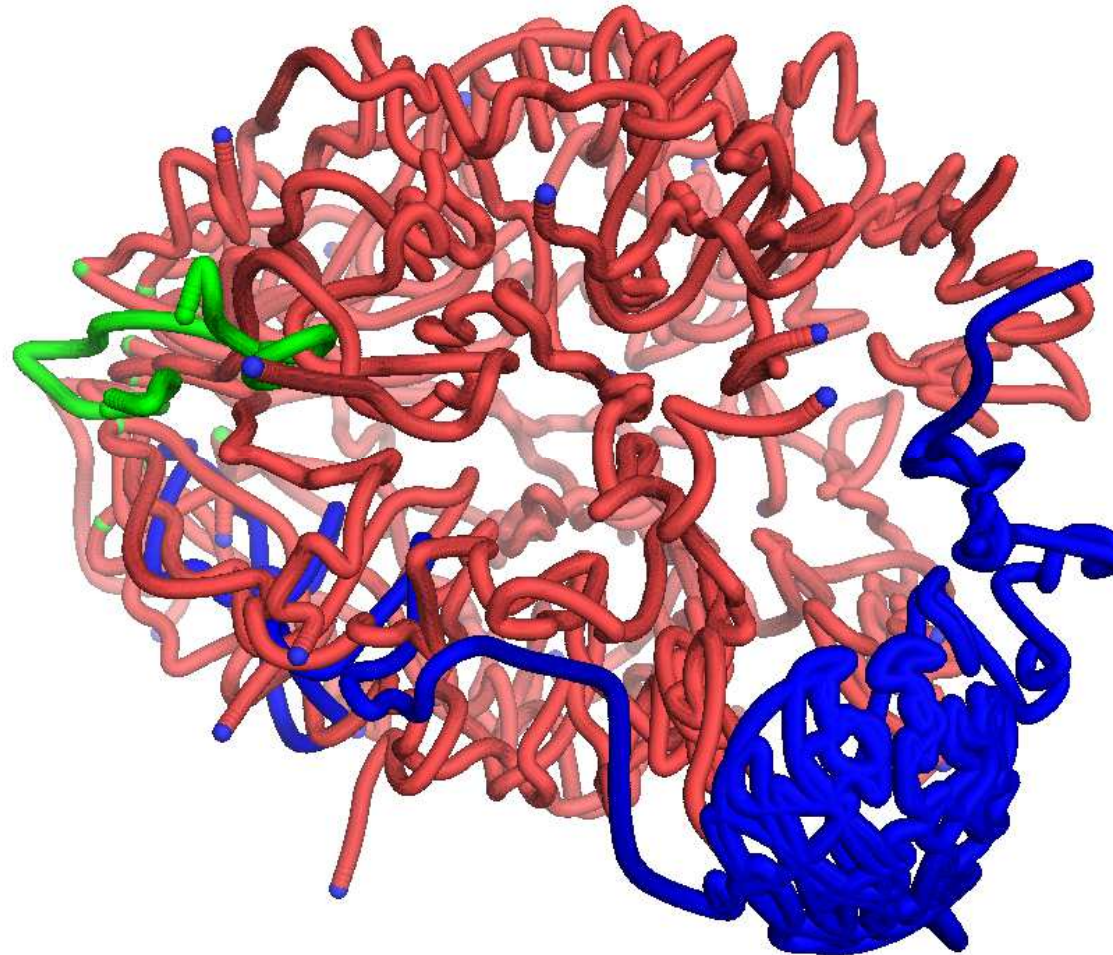
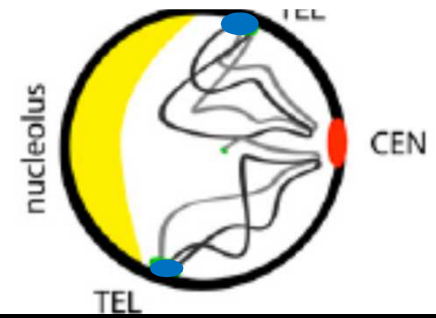
Duan a spol, Nature, 2010

# Všechny centromery jsou blízko sebe

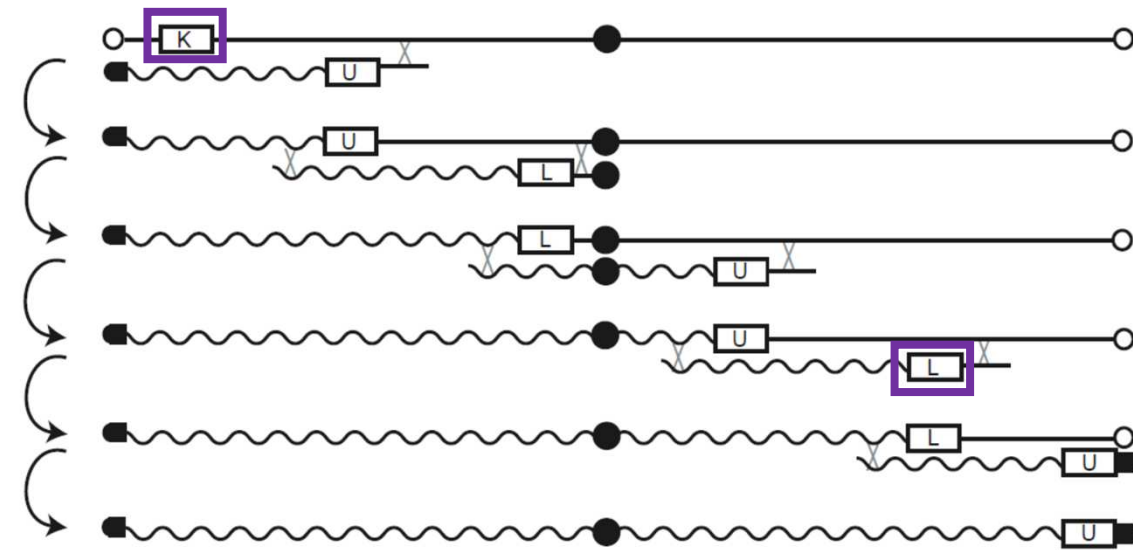


v mitotickém jádře jsou centromery orientovány (přichyceny) k SPB (spindle pole body)

# 3D rekonstrukce chromosomů v kvasinkovém jádře

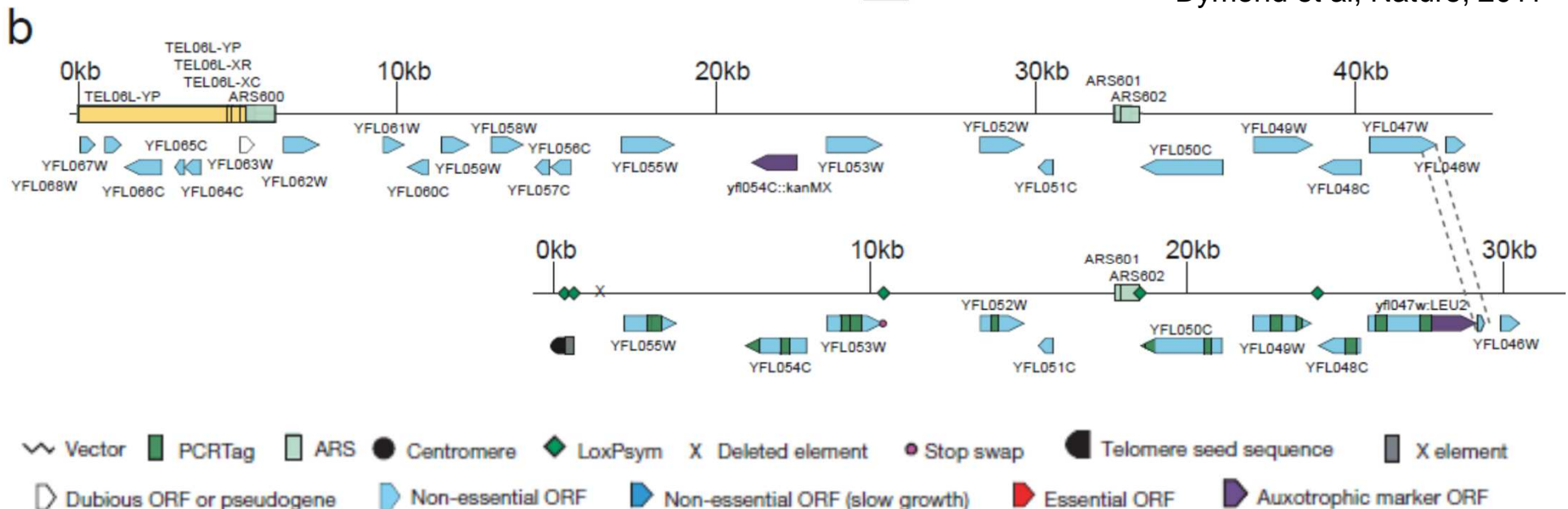


# Syntetické raménko kvasinkového chromosomu



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

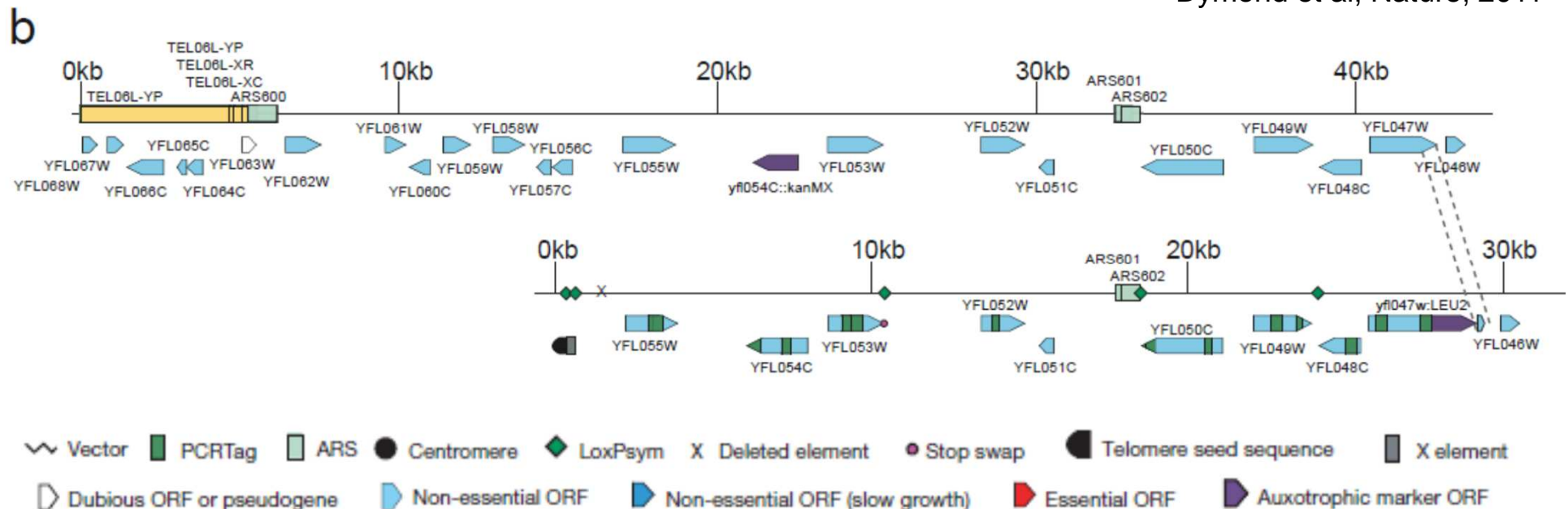
Dymond et al, Nature, 2011



# 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

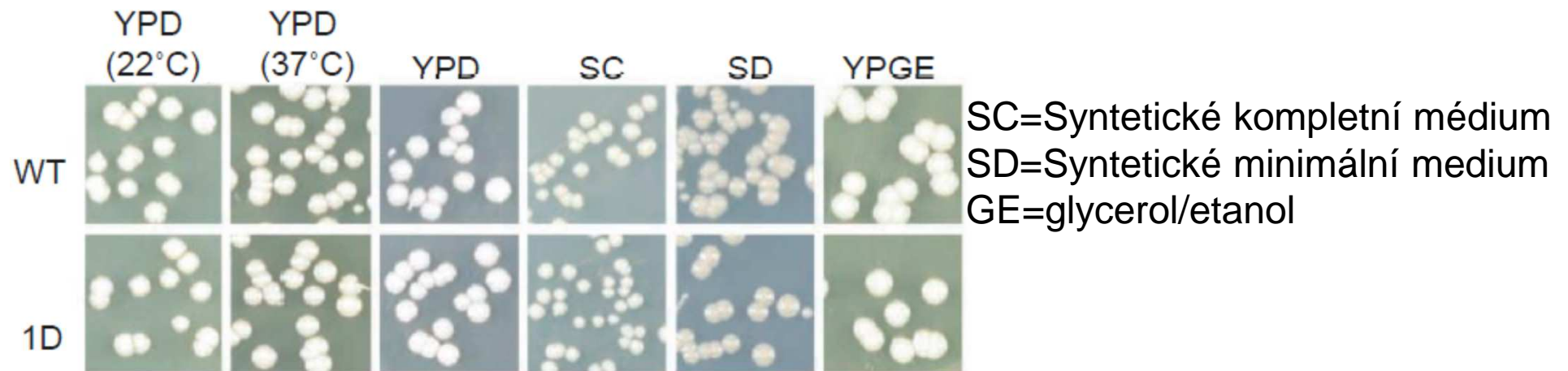
Dymond et al, Nature, 2011



# 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

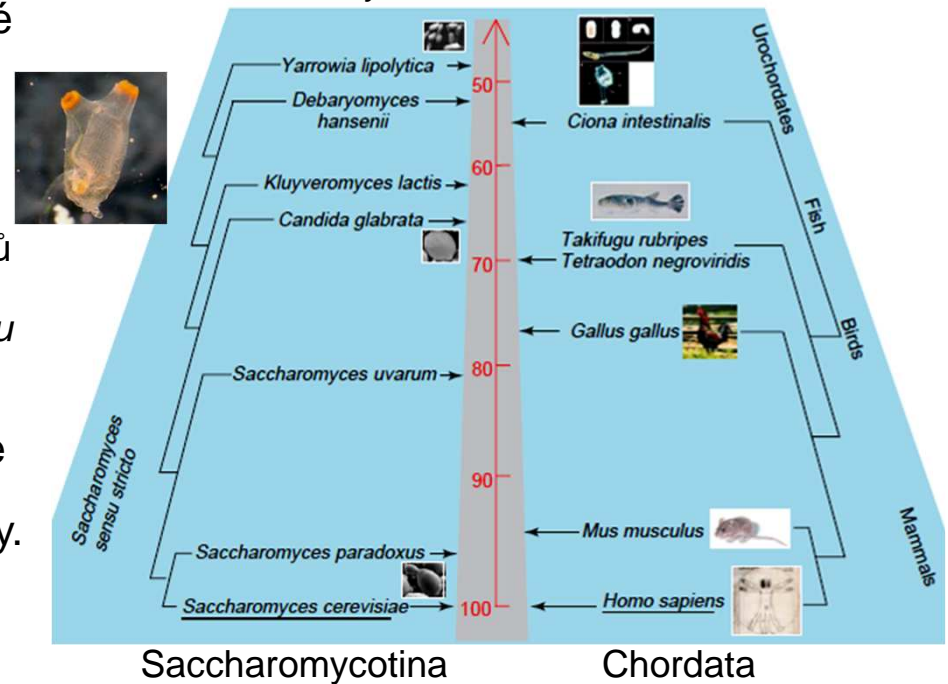


- Zachován fenotyp (teplotní citlivost, morfologie kolonií, růst na G/E ...)

# Evoluce kvasinek

- přestože jsou si druhy morfologicky podobné a mají podobný životní styl
- % odlišnost sekvence proteinů:
  - *S. cerevisiae* a *C. glabrata* ~ člověk a ryba
  - *S. cerevisiae* a *Y. lipolytica* ~ člověk a sumka
  - mezi druhy *S. sensu stricto* ~ mezi řády savců
  - Proteiny člověka a hlodavců jsou si více podobné než proteiny druhů ze skupiny *sensu stricto*, mezi nimiž můžou vznikat životaschopné hybridy!
- Lze srovnat genomy čl., krysy, myši a kuřete a lze rekonstruovat změny, jimiž genomy během evoluce od společného předka prošly.
- Genomy kvasinek ze vzdálenějších větví fylogenetického stromu takto srovnat nelze.
- Potvrzeno studiemi rDNA, nověji srovnáním rozdílů sekvencí aminokyselin v ortologních proteinech.

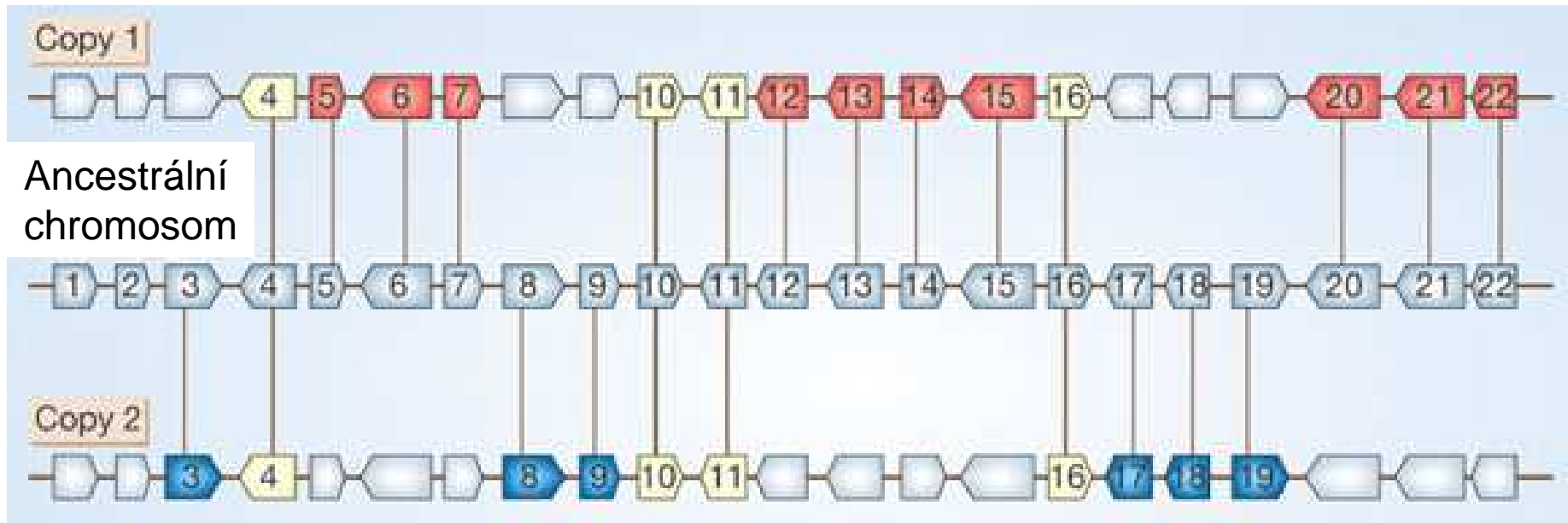
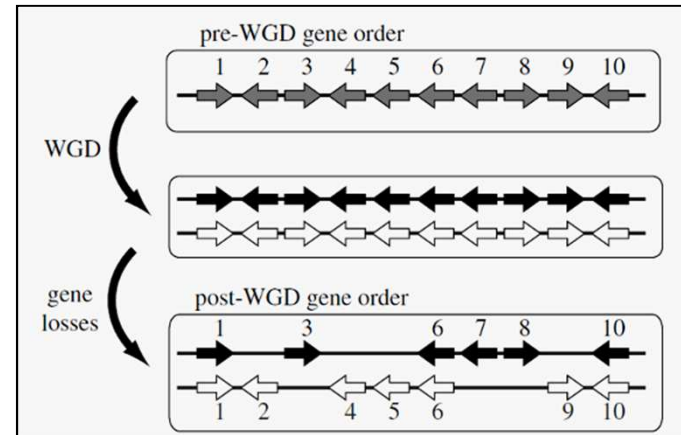
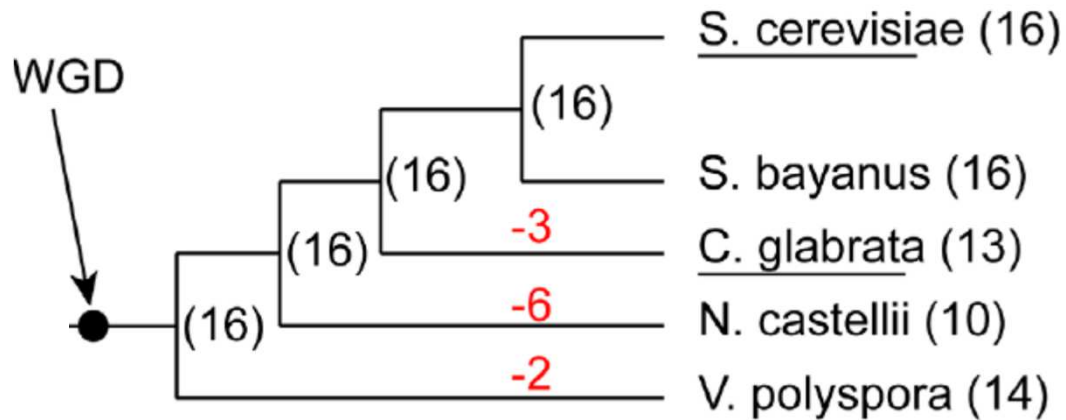
Obr. 3. Srovnání průměrné % shody sekvence proteinů v taxonech *Saccharomycotina* a *Chordata*





# Celogenomová duplikace – *Saccharomycotina*

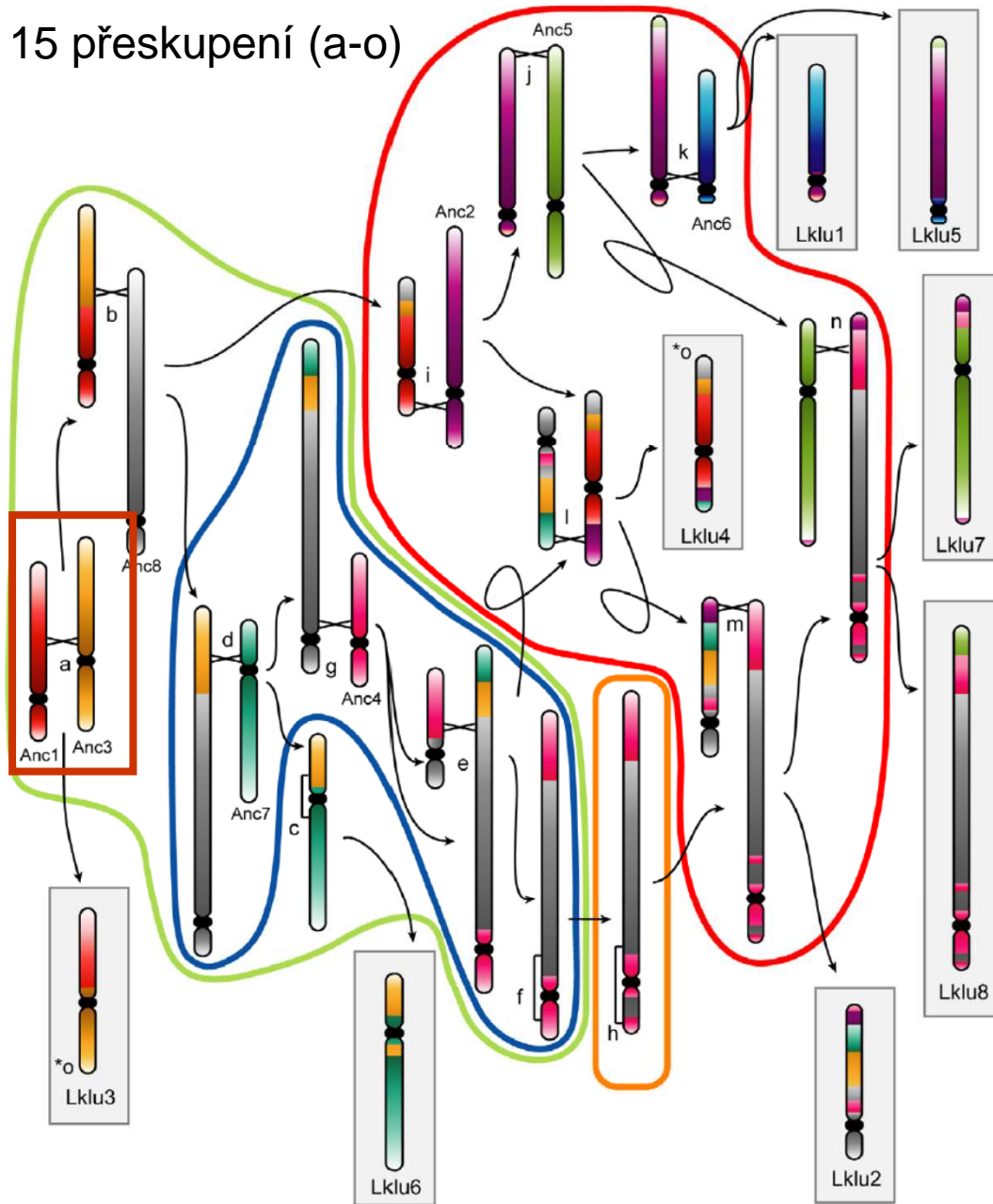
cca 30% genomu *S.c.* vzniklo duplikacemi => cca 2000 genů duplikováno nebo došlo k celogenomové duplikaci (WGD) => a poté došlo k přeskupování a redukci segmentů (i chromosomů) – 30% genomu u *S.c.* je pozůstatkem celogenomové duplikace (nikoli duplikace segmentů či genů)







15 přeskupení (a-o)



# Přeskupování chrom. bloků u *L. kluveri*

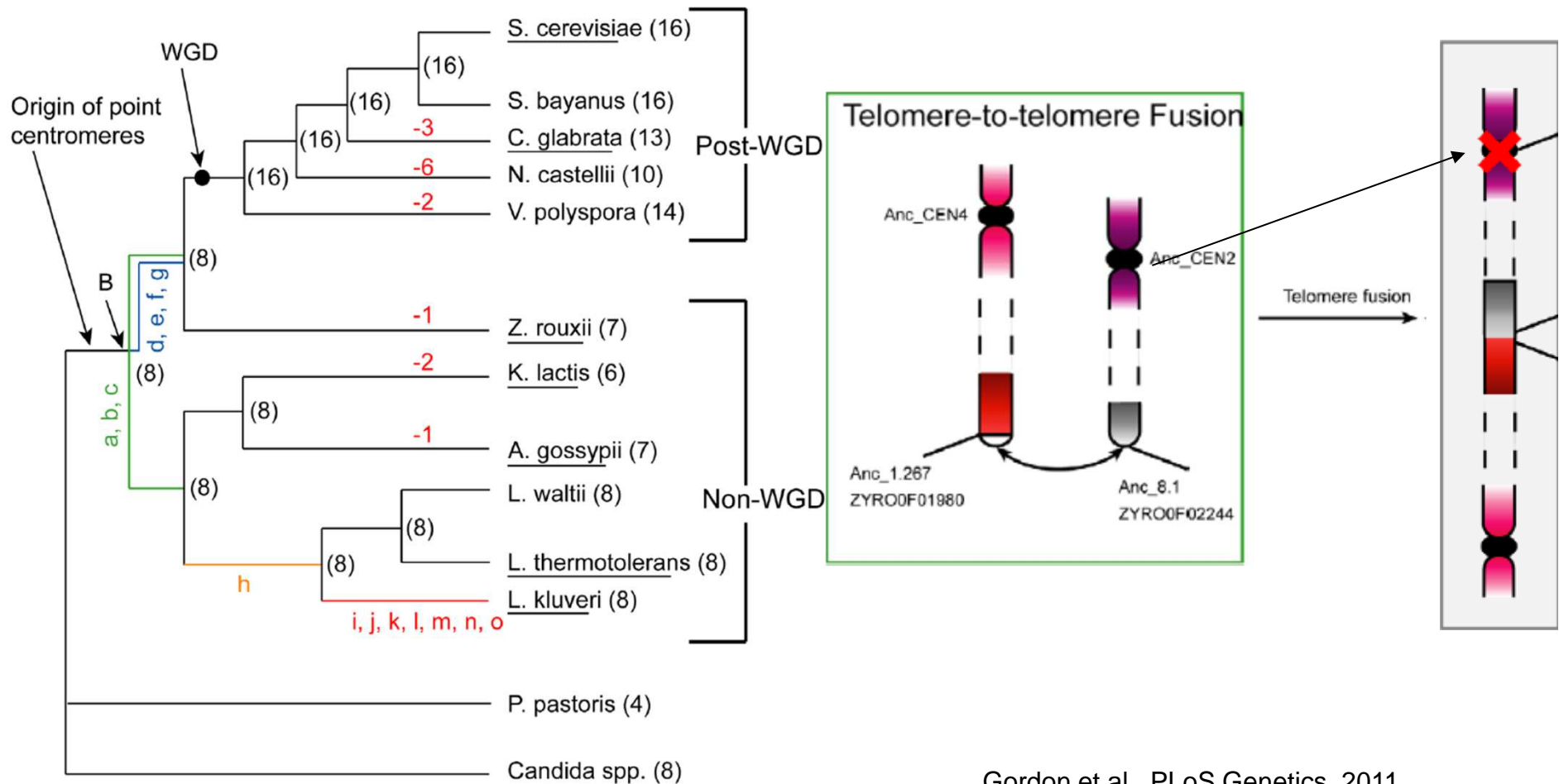
- přeskupení prostřednictvím rekombinace (mikrohomologií)

- *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)

**Figure 2. Cartoon showing the rearrangements indicated by lowercase letters in Figure 1.** Monocolored chromosomes belong to the WGD Ancestor. Chromosomes in gray boxes are extant *L. kluveri* chromosomes. Events encircled by a color correspond to events on branches of the same color in Figure 1. Black crossed lines between chromosomes represent points of interchromosomal translocations, and square brackets along chromosomes (events c, f and h) represent inversions. Arrows point to the products resulting from each rearrangement. The rearrangement for event: o (marked with two asterisks) is not shown as it involves a reciprocal translocation located one gene from the edge of the Ancestral inference, which essentially swaps the telomeres of Anc3 and Anc8 at the ends of Lklu3 and Lklu4.

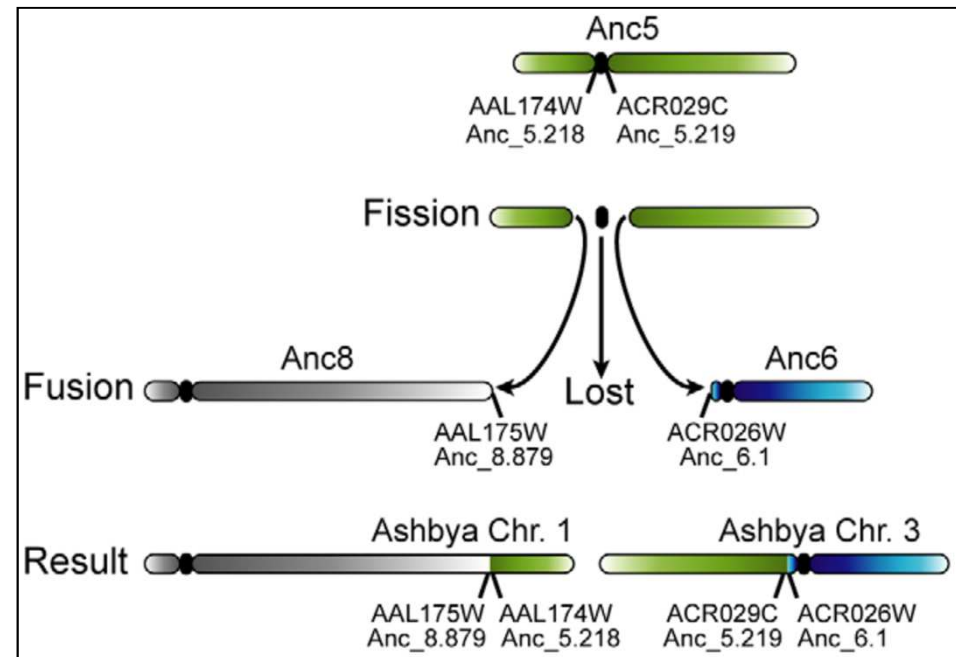
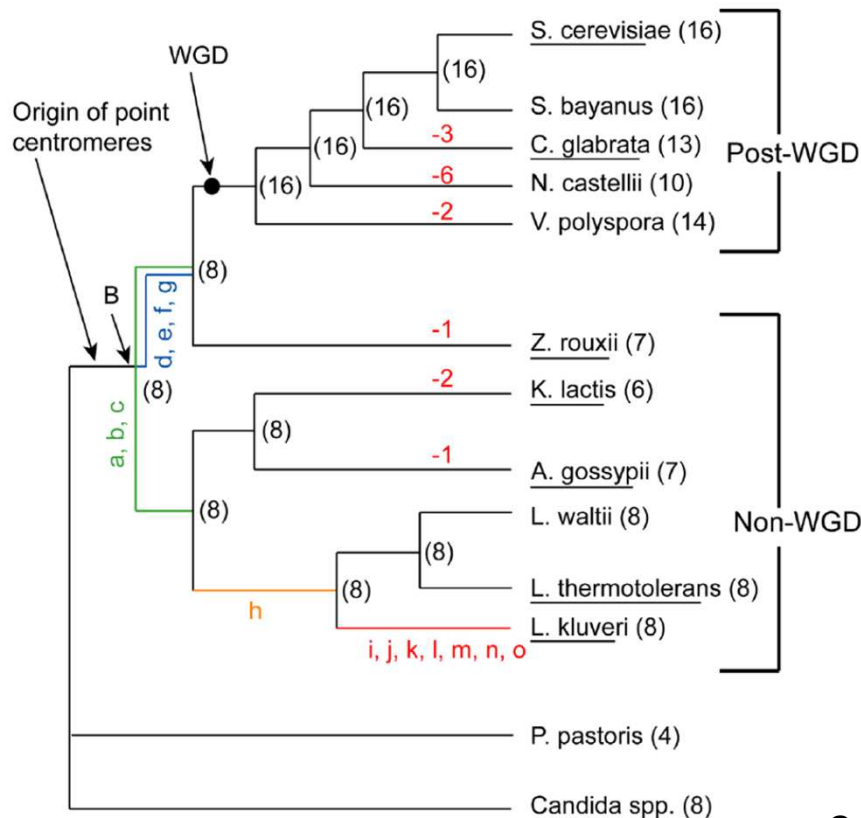
# Redukce chromosomů telomera-telomera fúzí

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

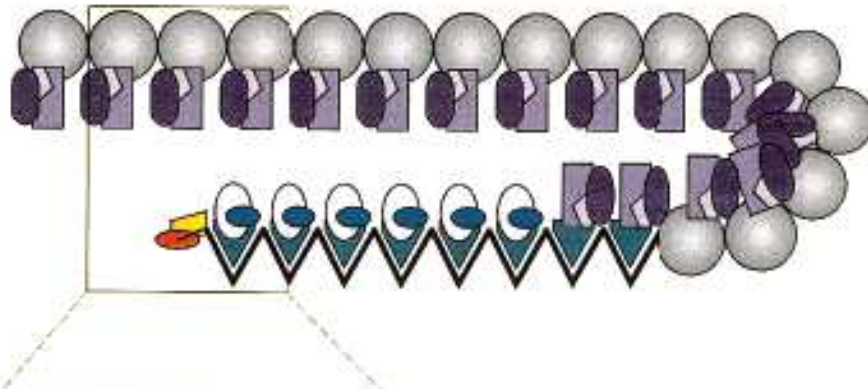


# Redukce chromosomů telomera-telomera fúzí

- 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)



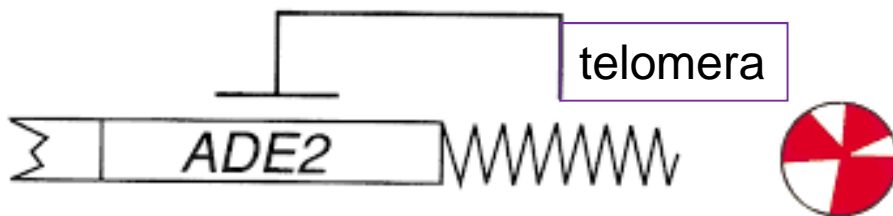
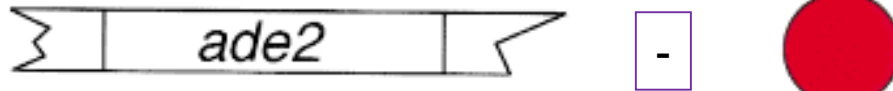
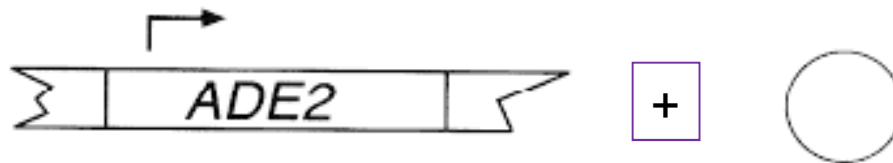
# Represe u kvasinkových telomer



## Heterochromatin:

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

a)

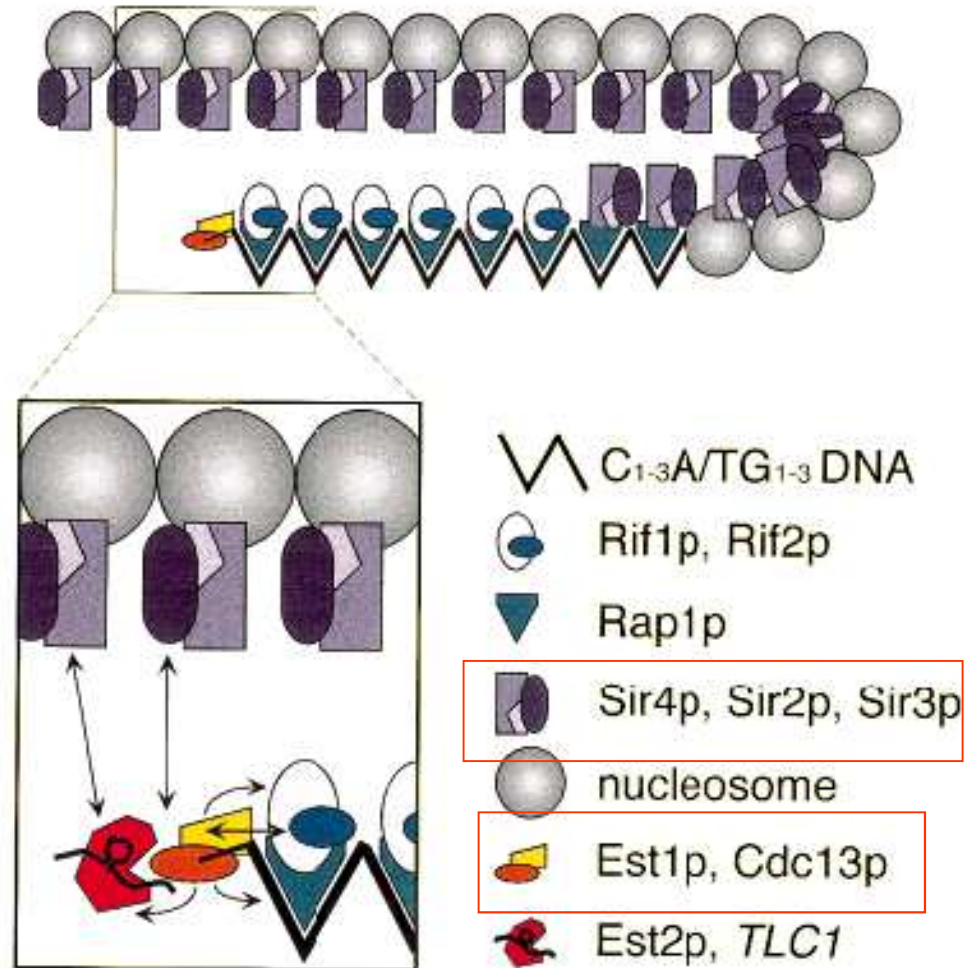


- struktura telomery a subtelomery umlčuje transkripci (silencing)

- ADE2 reporter je pod kontrolou telomer pouze občasně náhodně transkribován

- např. HML a HMR lokusy jsou umlčené (pouze MAT lokus určuje párovací typ)

# Represe u kvasinkových telomer



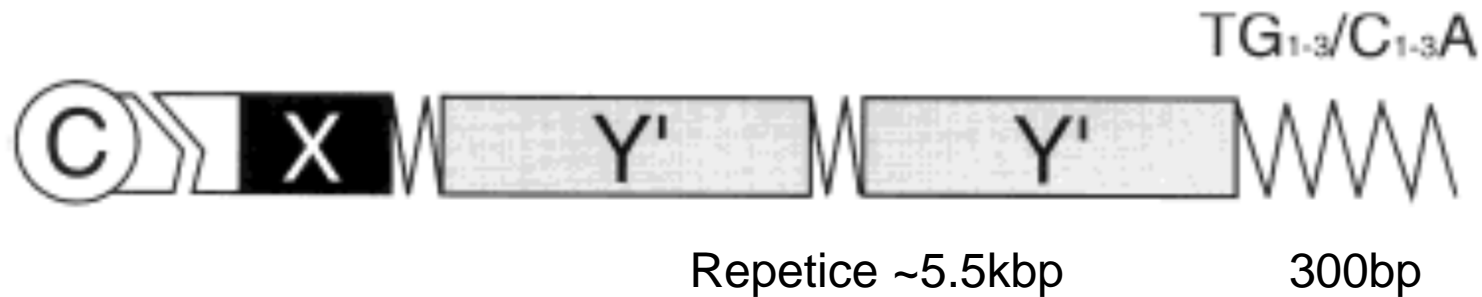
**Heterochromatin:** centromera  
telomery  
HMR a HML  
(MAT je aktivní  
určuje haplotyp)

Sir proteiny (deacetylasy atd. –  
umlčují/kondenzují chromatin)

Est1p ... telomerasa  
zodpovědná za  
replikaci/prodlužování telomer



# Struktura kvasinkových telomer



E. Blackburn, Nobelova cena, 2009

## Species

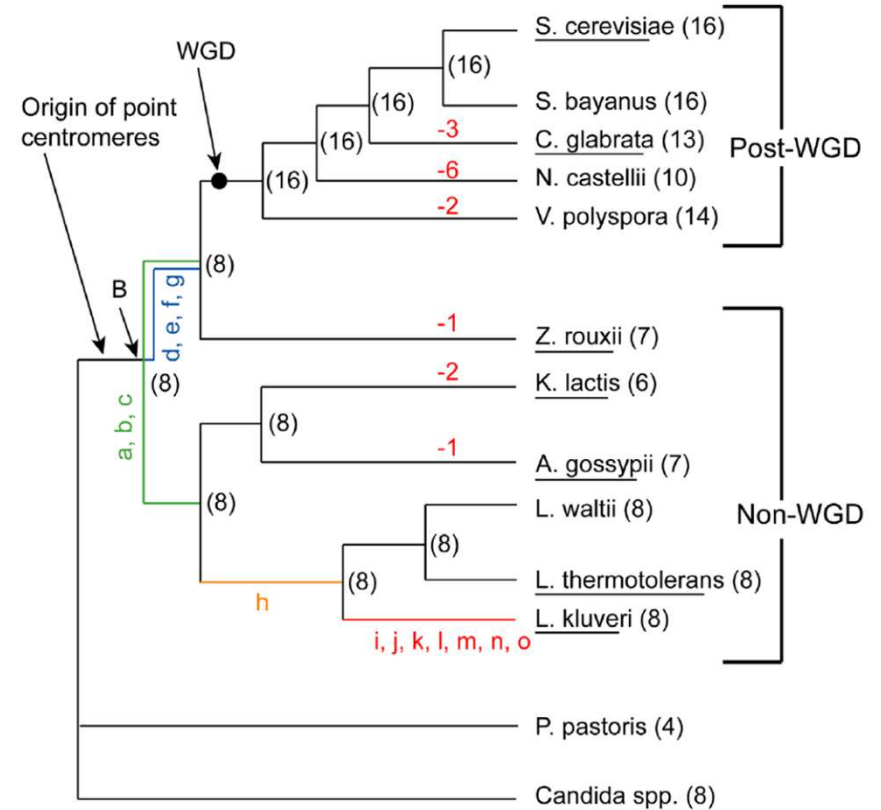
## RAP1 consensus

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

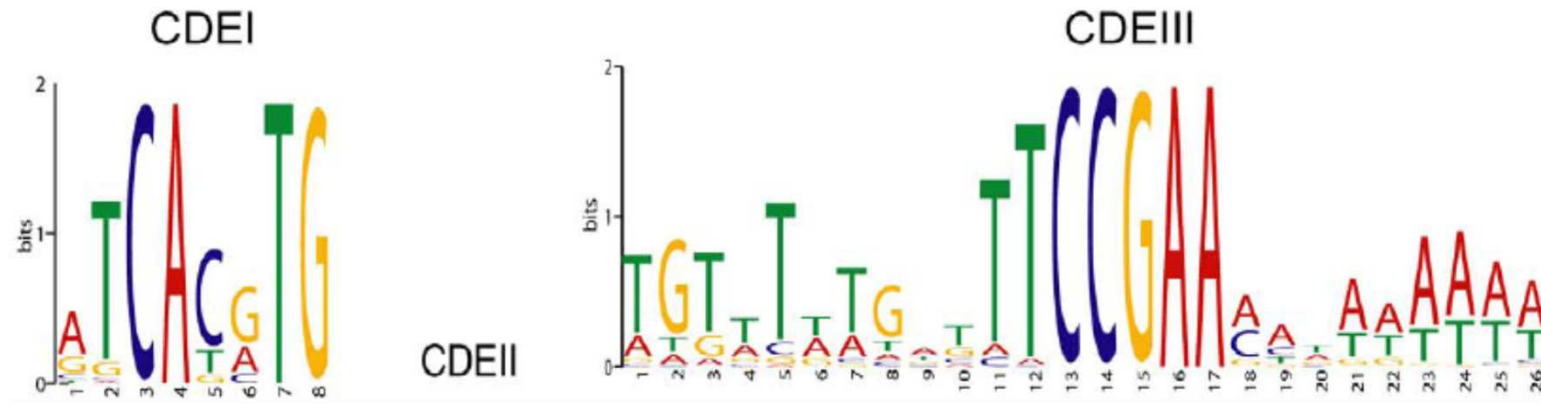
5' To end of telomere → 3'

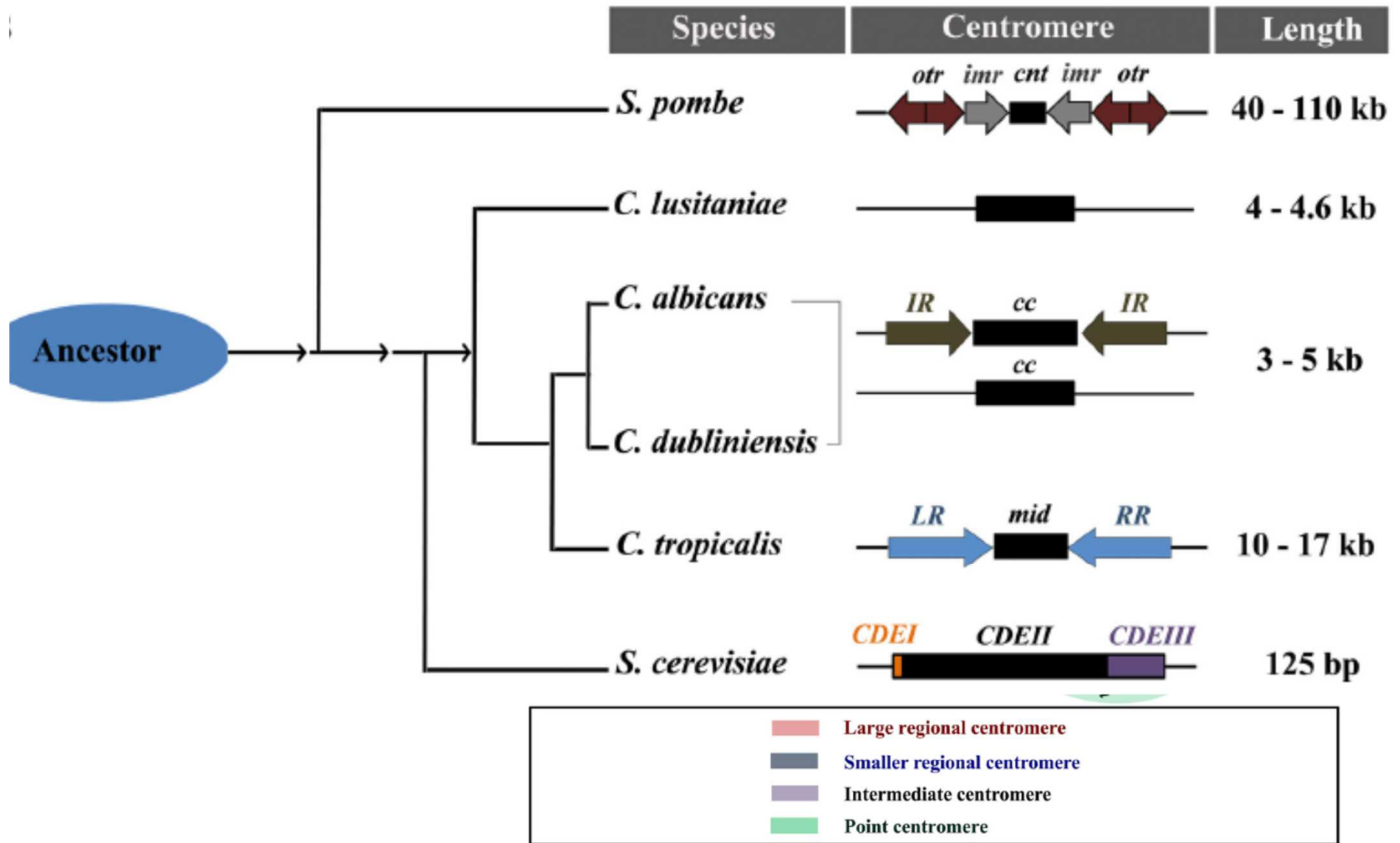
# Centromera *S. cerevisiae*

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



Konsensní sekvence *S.c.* centromer

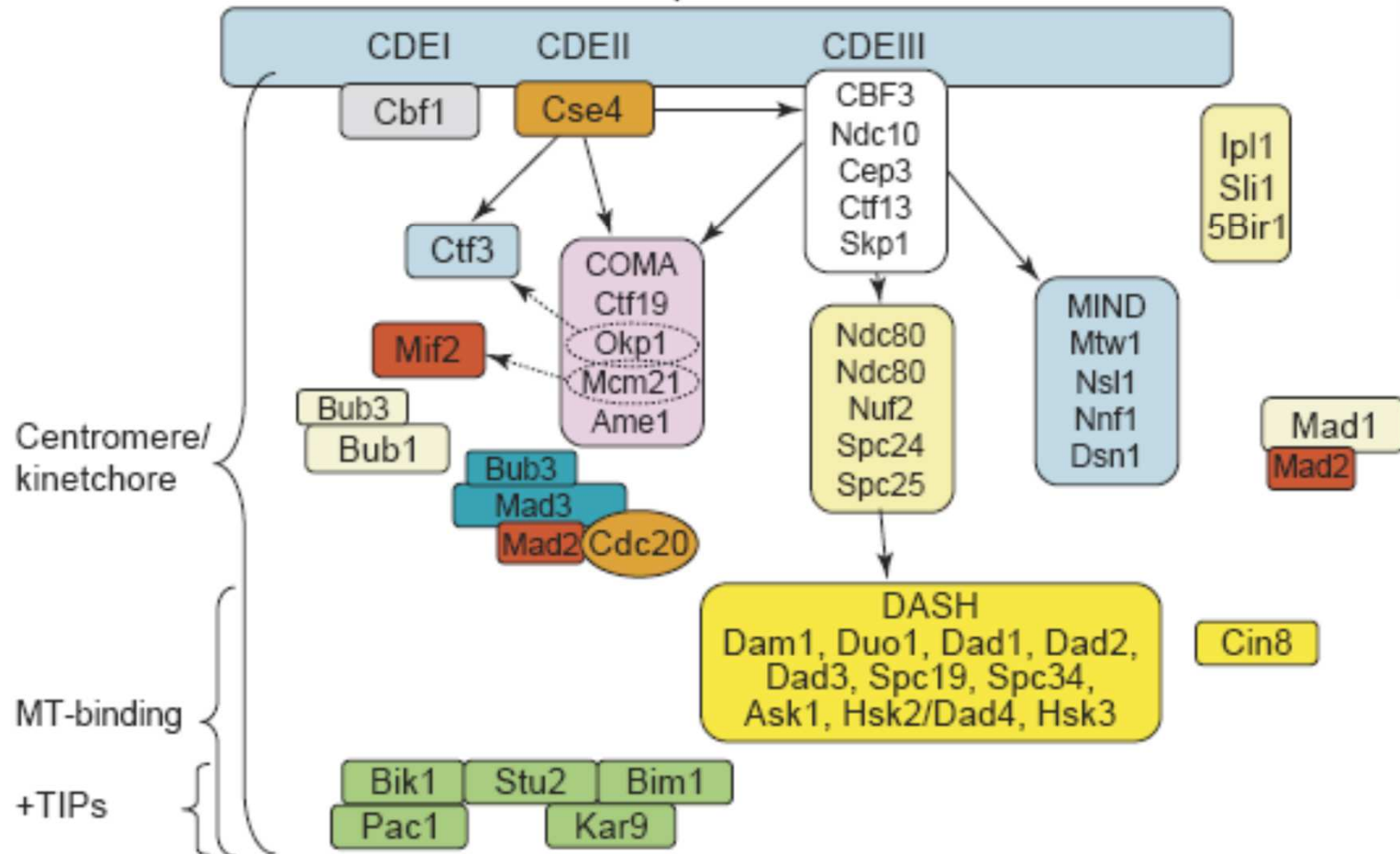




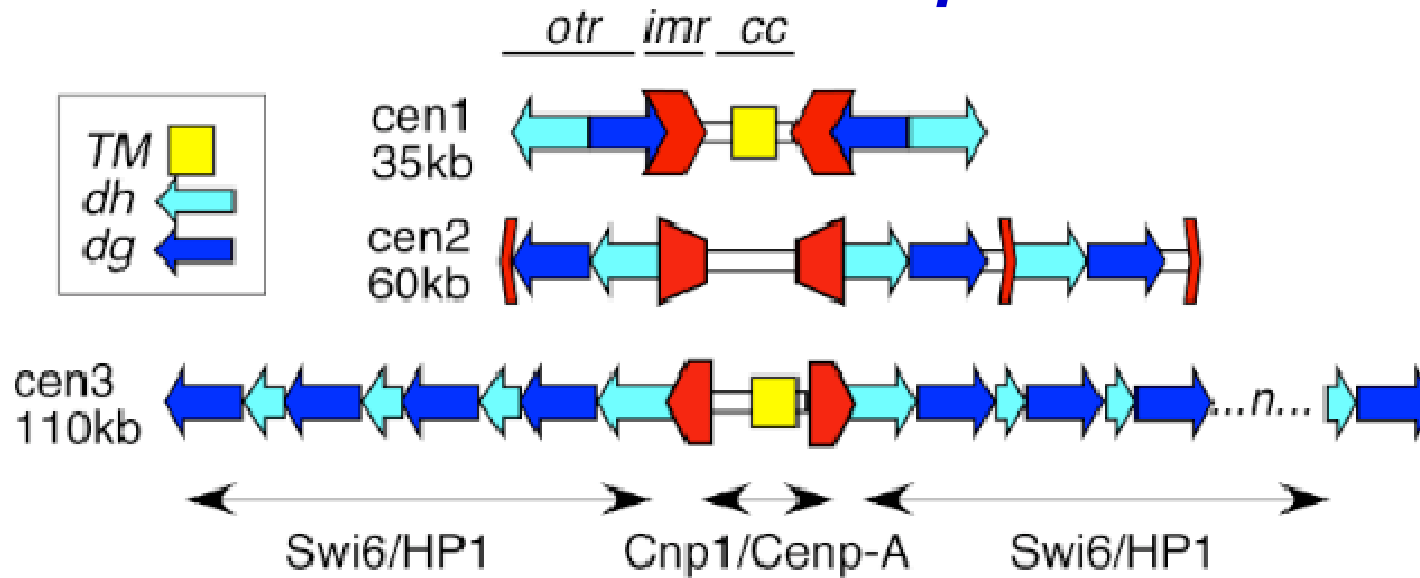
# Centromera *S. cerevisiae*

(c)

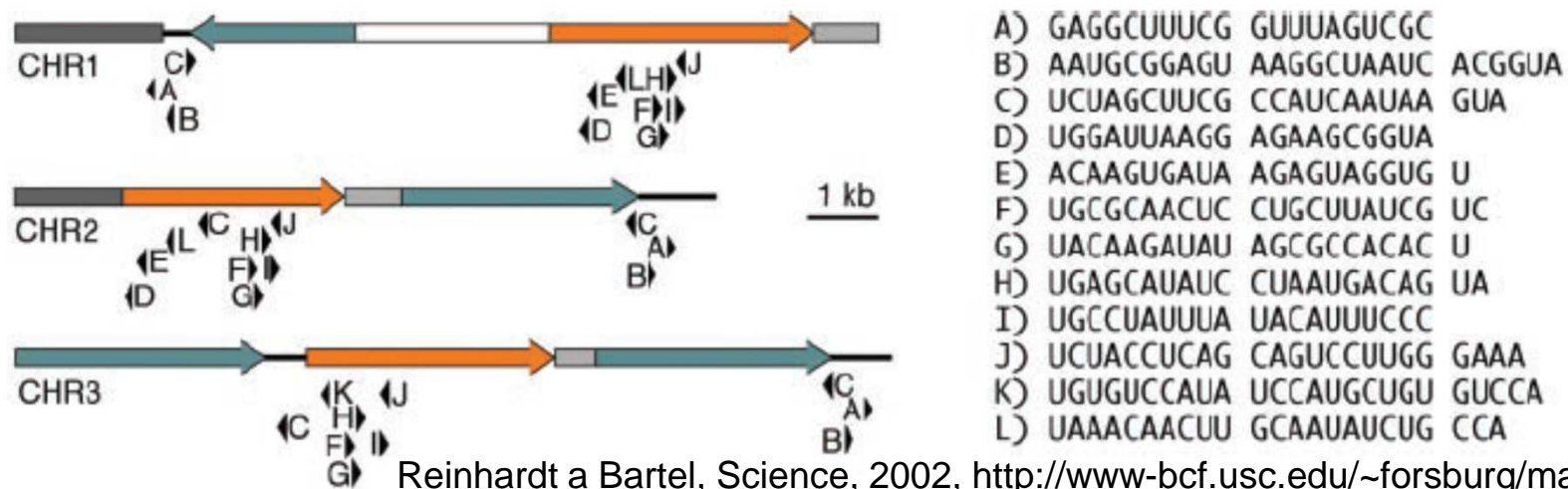
Budding yeast centromere/kinetochore  
125-bp CEN DNA



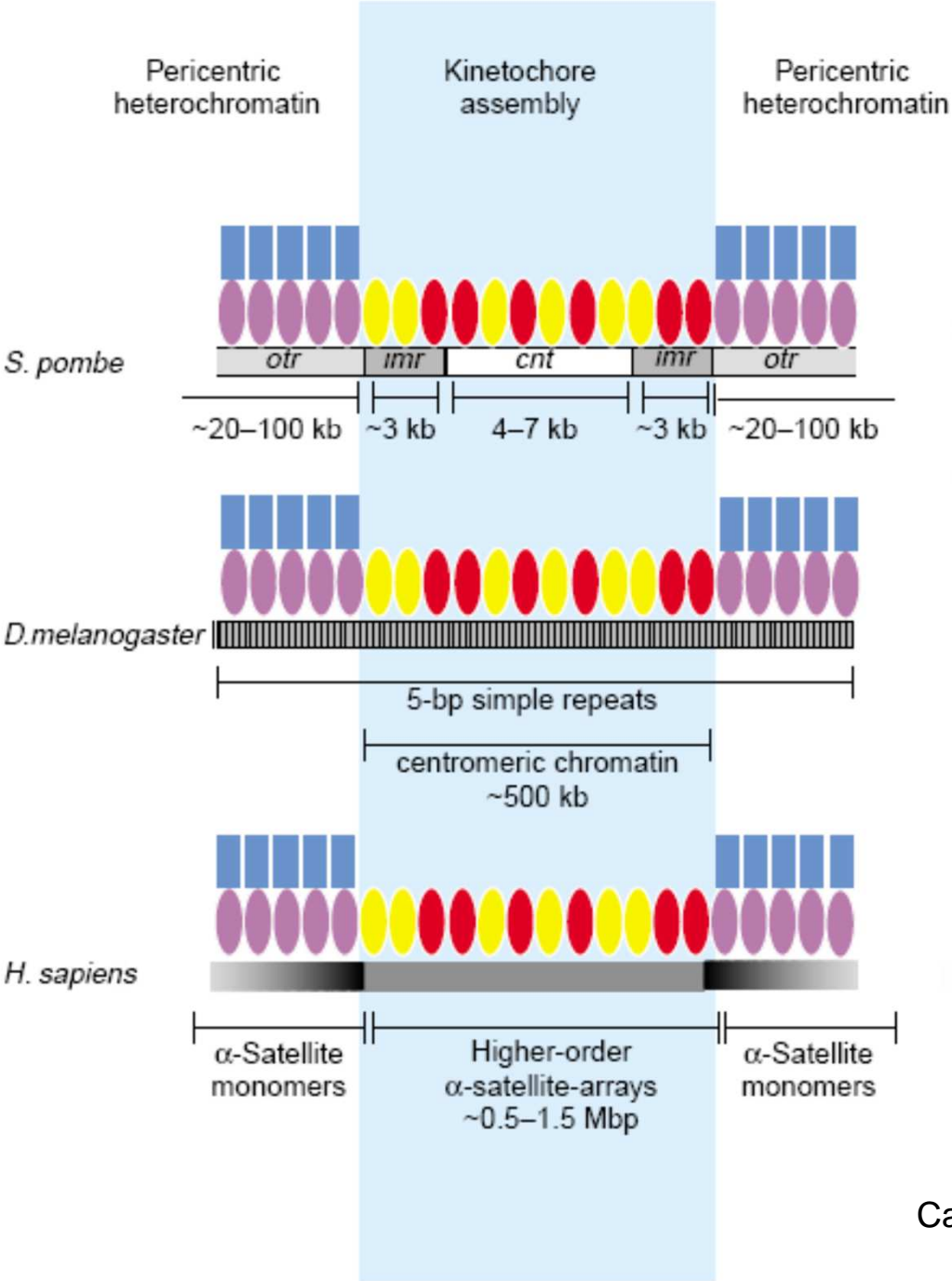
# Centromera *S. pombe*



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

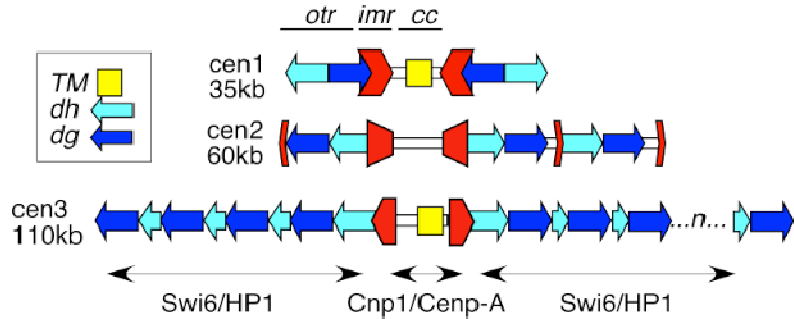


# Centromera *S. pombe*



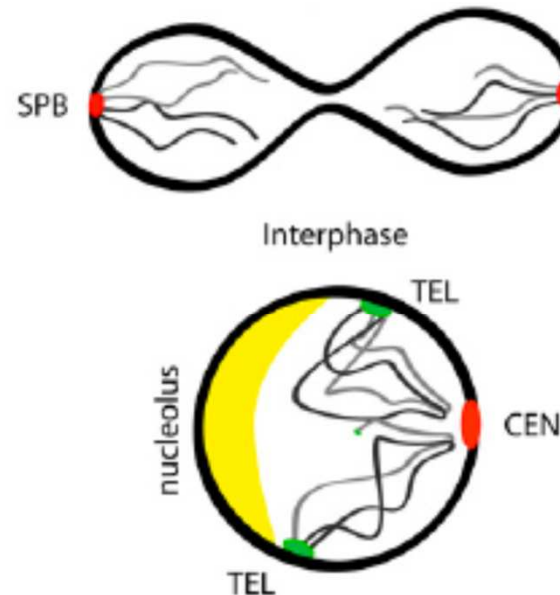
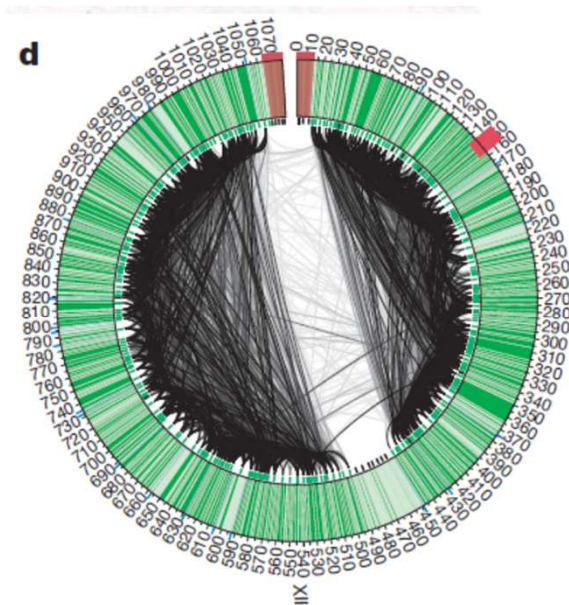
- HP1
- Me-K9 H3
- diMeK4-H3
- CENP-A

Centromery jsou definovány více strukturou chromatinu než jejich sekvencí

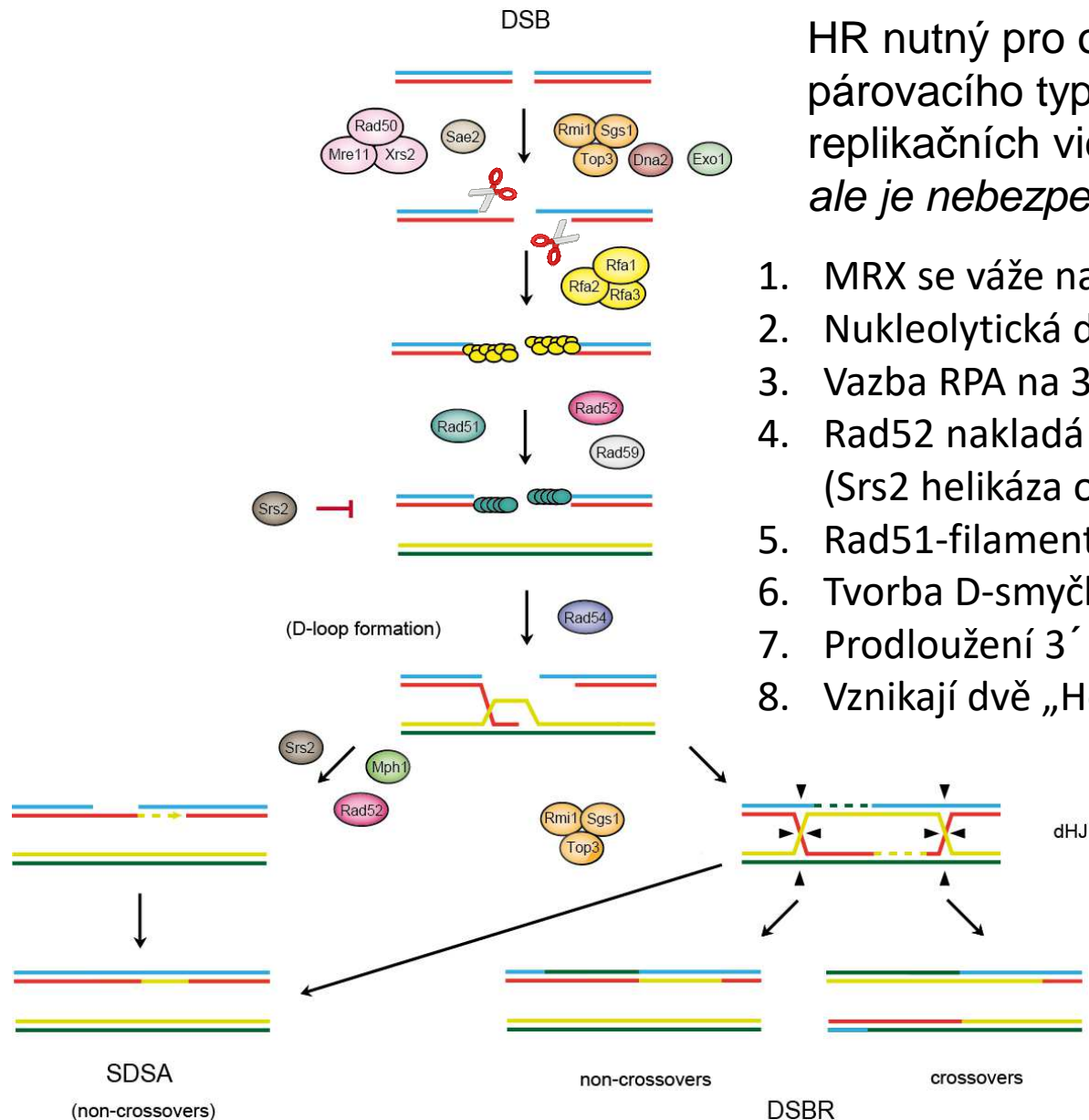


# rDNA - repetice

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



# Homologní rekombinace



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

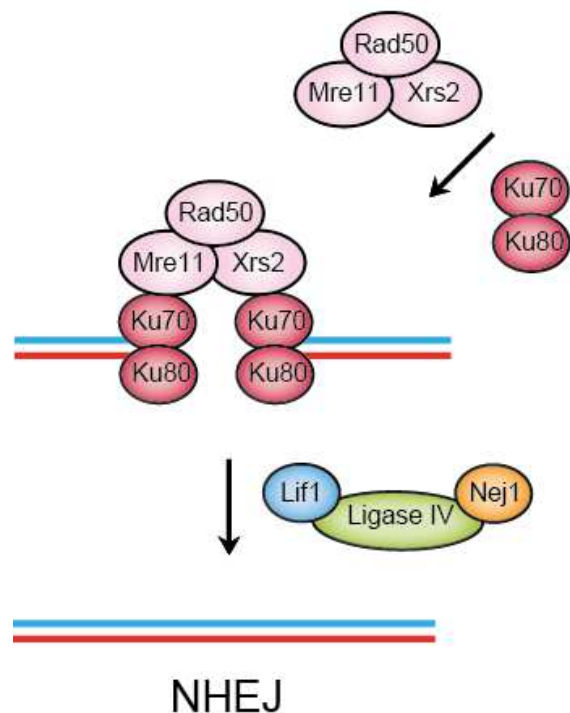
1. MRX se váže na zlomené konce DNA.
2. Nukleolytická degradace 5' řetězců
3. Vazba RPA na 3' jednovláknové konce
4. Rad52 nakládá Rad51 rekombinázu na ssDNA (Srs2 helicáza odstraňuje Rad51).
5. Rad51-filament hledá homologní DNA (Rad54).
6. Tvorba D-smyčky
7. Prodloužení 3' konce filamentu (DNA polymeráza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

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



# Nehomologické spojování konců

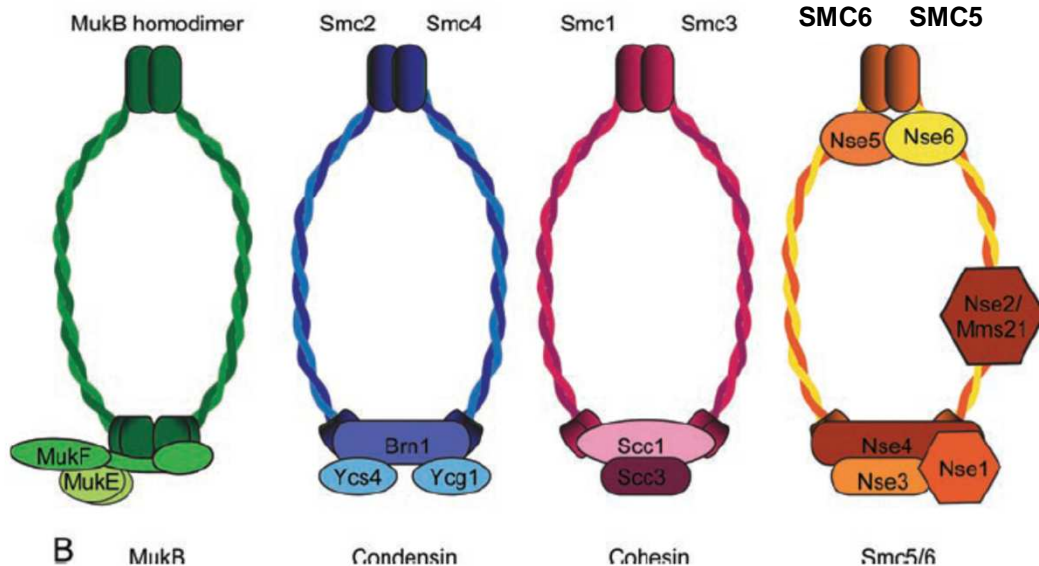
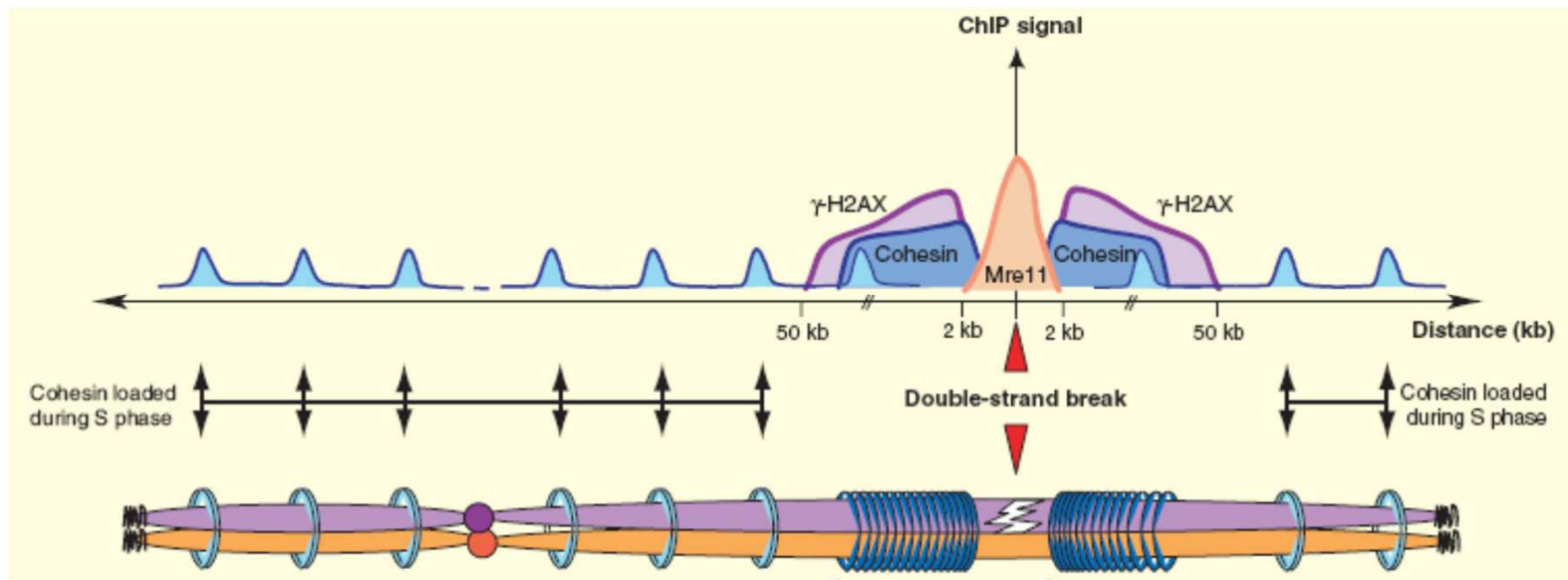
Non-homologous end joining (NHEJ)



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

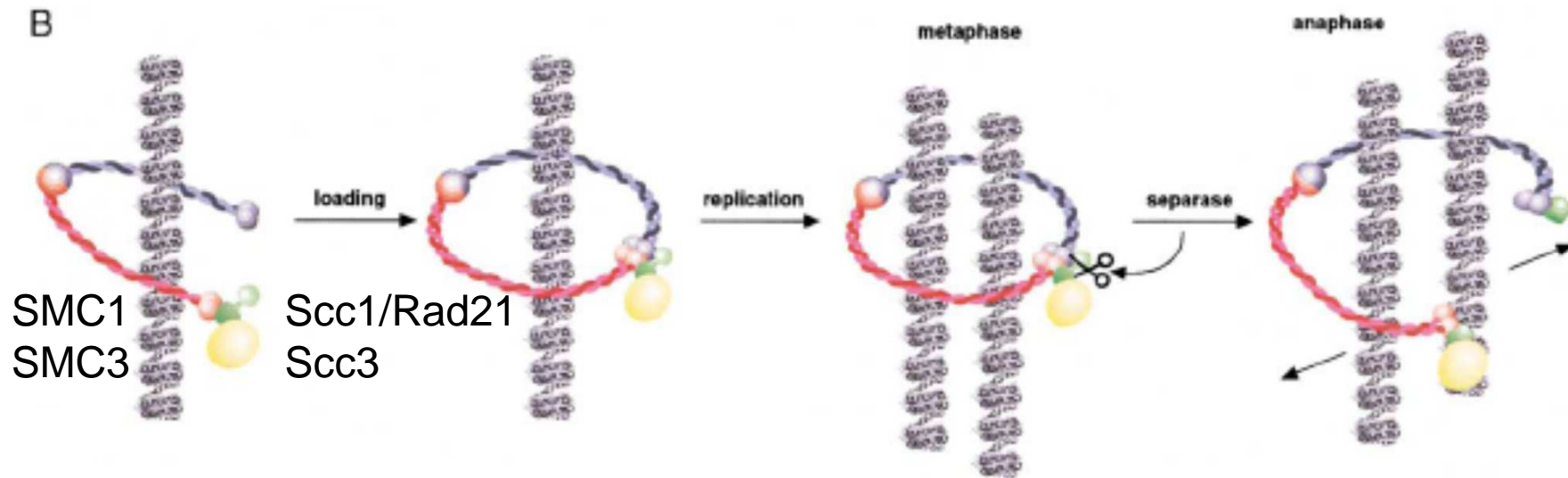
při opravě nekompatibilních konců většinou dochází k delecím nebo inzercím – HR je lepší, ale je potřeba homologní sekvence – NHEJ v G1 zatímco HR v G2/M – dobře rostoucí kultura kvasinek má významnou frakci buněk v G2/M (proto je v kvasinkách možná integrace homologních sekvencí – genetika – použít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

# SMC komplexy napomáhají při HR



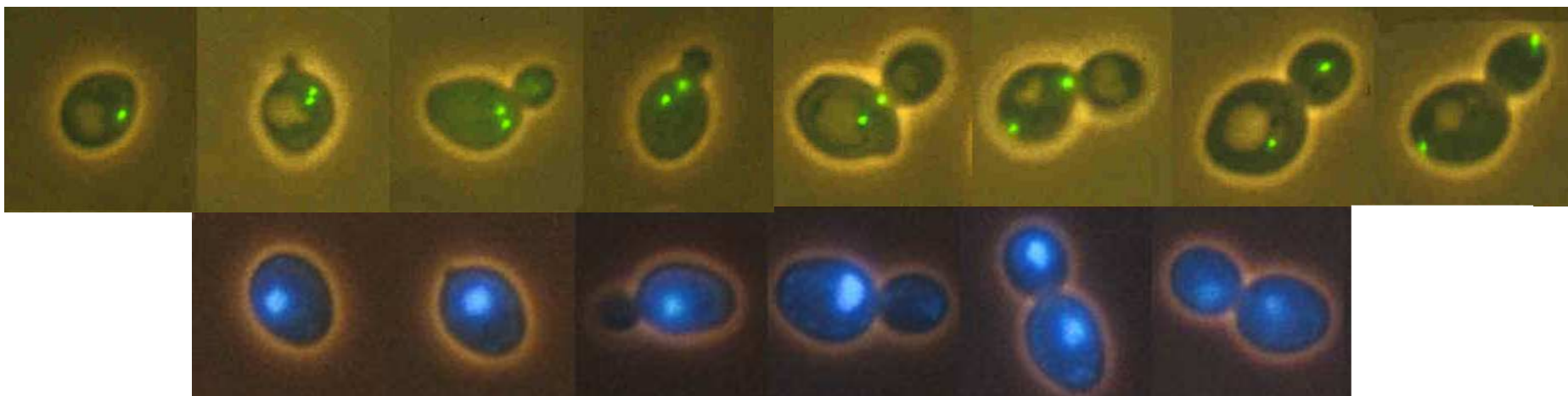
- kohesin přidržuje homologní chromosomy při sobě a napomáhá HR
- SMC5/6 reguluje restart zastavených replikačních vidliček (limituje HR v repetitivních sekvencích)

# Kohesin „objímá” DNA



Haering et al, 2002, Mol Cell

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



Marco et al, Cell, 2013

# Souhrn přednášky

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