

# Molekulární biologie

## 6. Regulace genové exprese

### Osnova

Řízení exprese bakteriálního genomu

Řízení exprese eukaryotického genomu

#### **Hlavní zdroje:**

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4*

*Masarykova Universita Brno*

*ISBN 80-902562*

*B. Staveley, Principles of Cell Biology*

*Memorial University of Newfoundland*

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms*

*University of Illinois, Chicago*

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

# **Řízení exprese bakteriálního genomu**

# Část první: Řízení exprese bakteriálního genomu

- u bakterií nejčastěji regulace na úrovni **transkripce**
  - NE všechny promotory jsou si rovny - některé mají slabší afinitu k RNA-polymeráze než jiné
  - proto potřebují pomoc regulátorů (pozitivní nebo negativní)
  - vypínání a zapínání transkripce v reakci na okolní podmínky
  - nikdy není potřeba vyrábět všechny proteiny najednou
- buňky nikdy neplýtvají zbytečně energií**

## Regulátory:

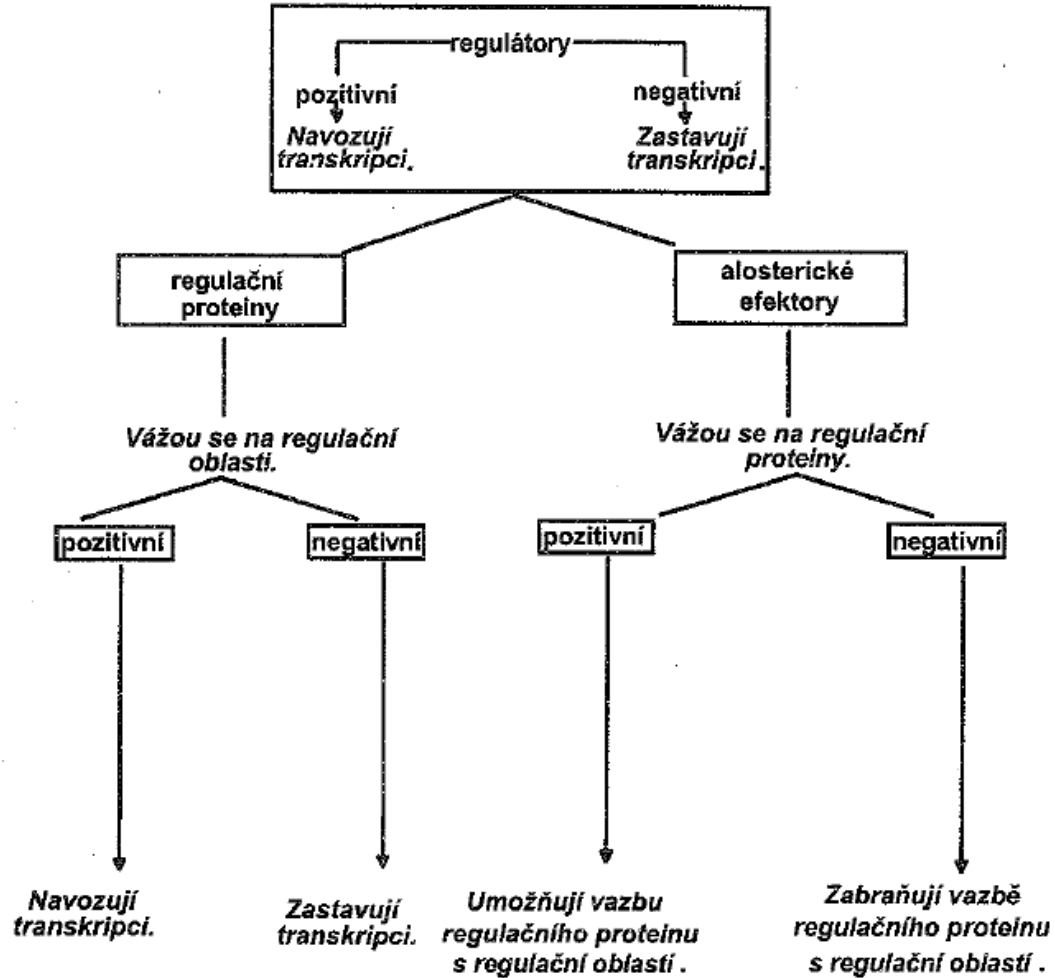
### 1. Regulační protein

- vážou se na regulační oblast DNA (promotor/operátor)
- 2 vazebná místa
  - a) pro rozlišení DNA promotoru/operátoru regulovaného genu
  - b) pro příslušnou signální molekulu
- po vazbě signální molekuly mění konformaci a tím afinitu k promotoru

### 2. Signální molekula (alosterický efektor)

- většinou malá a neschopná se přímo vázat na regulační oblast DNA (promotor/operátor)
- často **substrát (např. laktóza)** nebo **produkt (např. aminokyselina)** příslušného enzymu
- daný enzym se buď **zapne ( $\beta$ -galaktozidáza)** nebo **vypne (AA-syntetáza)**
- vazba na regulační protein (zprostředkovatel)

# Signální molekula (alosterický efektor) a Regulační protein



*Systém regulace genů je zkoumán od roku 1961,  
kdy **Jacques Monod** objevil lac operon (Nobelova cena 1968)*



[www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)

## **Indukce syntézy proteinů**

### **$\beta$ -galaktozidáza (u *E. coli*)**

- jeden z enzymů pro štěpení laktozy u *E. coli* (spolu s permeazou a transacetylázou)
- v prostředí kde je jediný zdroj uhlíku glukóza se enzym netvoří
- po přenosu do prostředí s jediným zdrojem uhlíku laktózou začnou syntetizovat  $\beta$ -galaktozidázu za 1min
- **Koreprese:** glukóza aktivně potlačuje syntézu  $\beta$ -galaktozidázy
  - samotná přítomnost laktozy nestačí, aby se začal tvořit enzym
  - tzn. za přítomnosti glukózy i laktozy zůstává laktoza nedotčena

## **Represe syntézy proteinů**

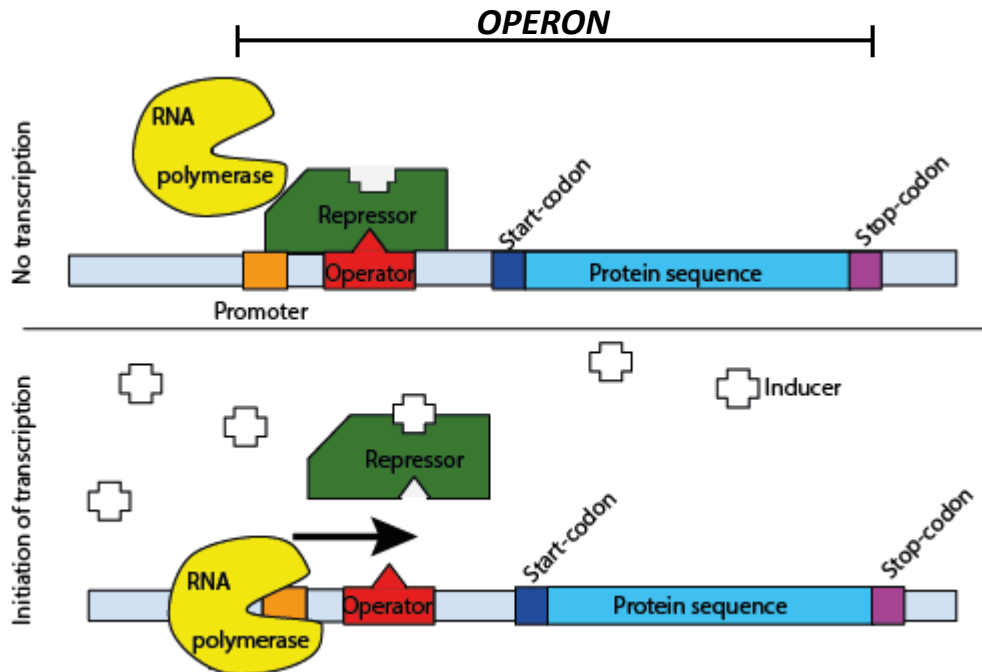
- syntéza enzymu potlačena metabolitem dané biochemické dráhy
- syntéza se zastavuje pokud se v buňce nahromadí metabolit do kritického množství (např. aminokyseliny)
- při poklesu pod kritickou mez se obnovuje

## Regulace operonu

- Operon - transkripční jednotka, která obsahuje regulační místa "Promotor" a "Operátor" před strukturálními geny
- Operátor - úsek na operonu, kam se váže **represor** → zastavení transkripce
- Slabé nekovalentní vazby

### Represor (negativní regulační protein)

- Fyzicky brání RNA-polymeráze ve vazbě nebo pohybu na DNA
- Na represor se váže signální molekula
  - a) induktor - zabraňuje vazbě na operátor - probíhá transkripce
  - b) korepresor (není nezbytný) - podporuje vazbu na operátor - neprobíhá transkripce



# Laktóзовý operon *E. coli* (*lac* operon)

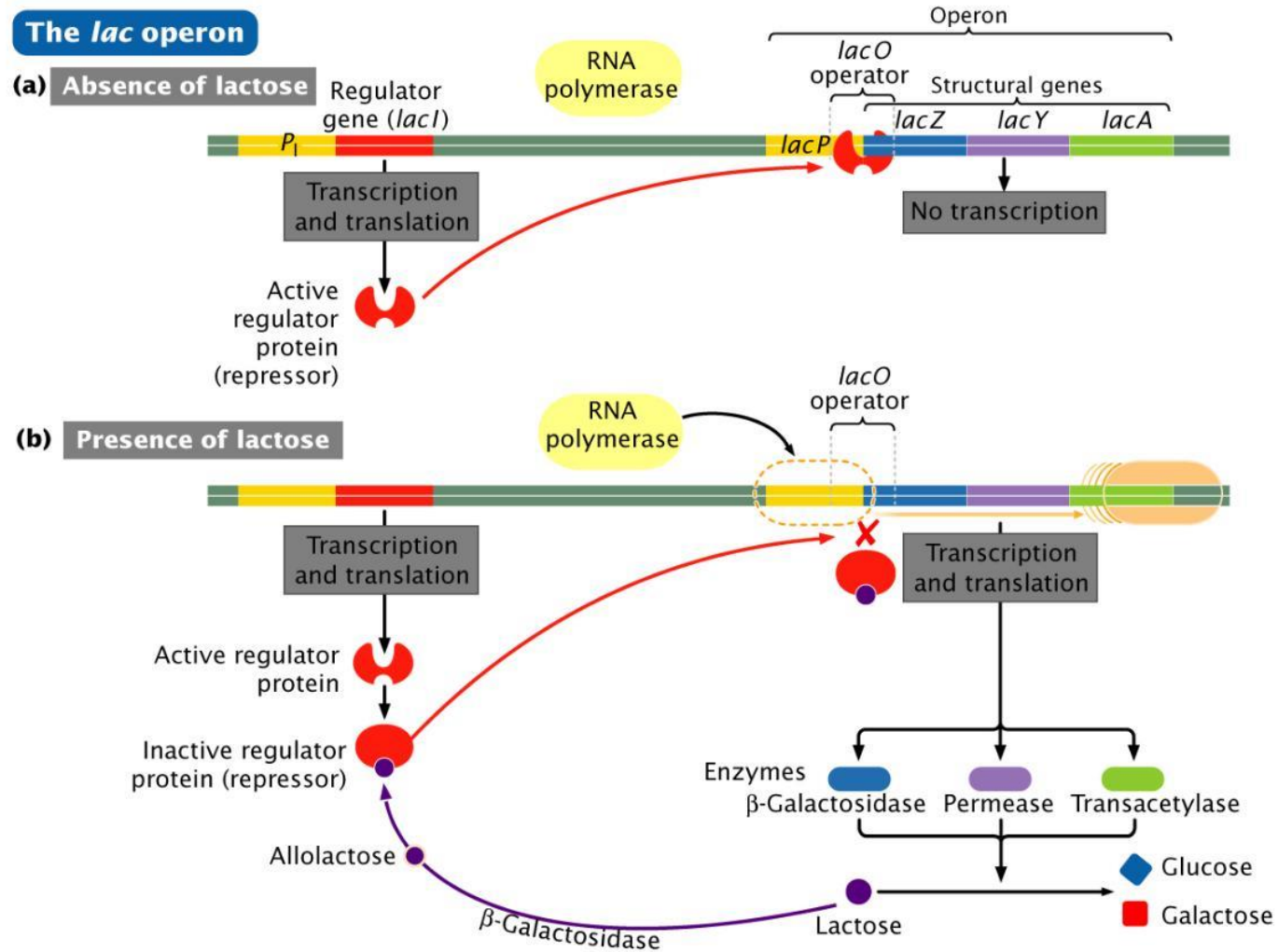
**lacI** - gen pro regulační protein (nachází se před strukturálními geny pro enzymy štěpící laktozu)

**lacZ** - gen pro β-galaktosidázu

**lacY** - gen pro Permeázu

**lacA** - gen pro Transacetylázu

*Geny pro funkčně blízké proteiny se nachází na DNA v rámci jedné transkripční jednotky (operonu)*

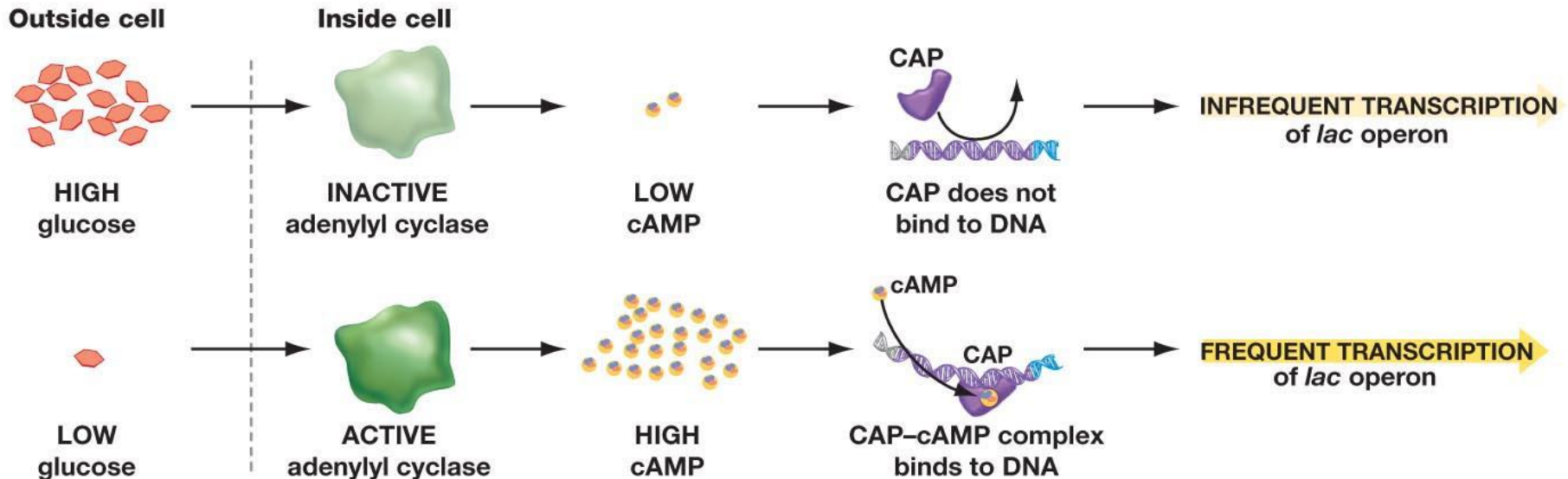


Fig\_16-08 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

## Laktózový operon *E. coli* (*lac operon*)

- glukóza je pro *E. coli* "sugar of choice" a dává jí přednost před laktozou
- samotná přítomnost laktozy nestačí, aby se začal tvořit enzym
- musí být zároveň nepřítomná glukóza
  
- RNA polymeráza má sama o sobě slabou afinitu k promotoru *lac operonu*
- potřebuje pomoc pozitivního regulačního proteinu - CAP (catabolite activator protein)
- CAP se váže na promotor *lac operonu* pouze po aktivaci pomocí cAMP (signální molekula/alosterický ef.)
- Glukóza ovšem inhibuje tvorbu cAMP inhibicí enzymu adenyl cyklázy

**(b) The amount of cAMP and the rate of transcription of the *lac operon* are inversely related to the concentration of glucose.**





# Laktózový operon *E. coli* (*lac* operon)

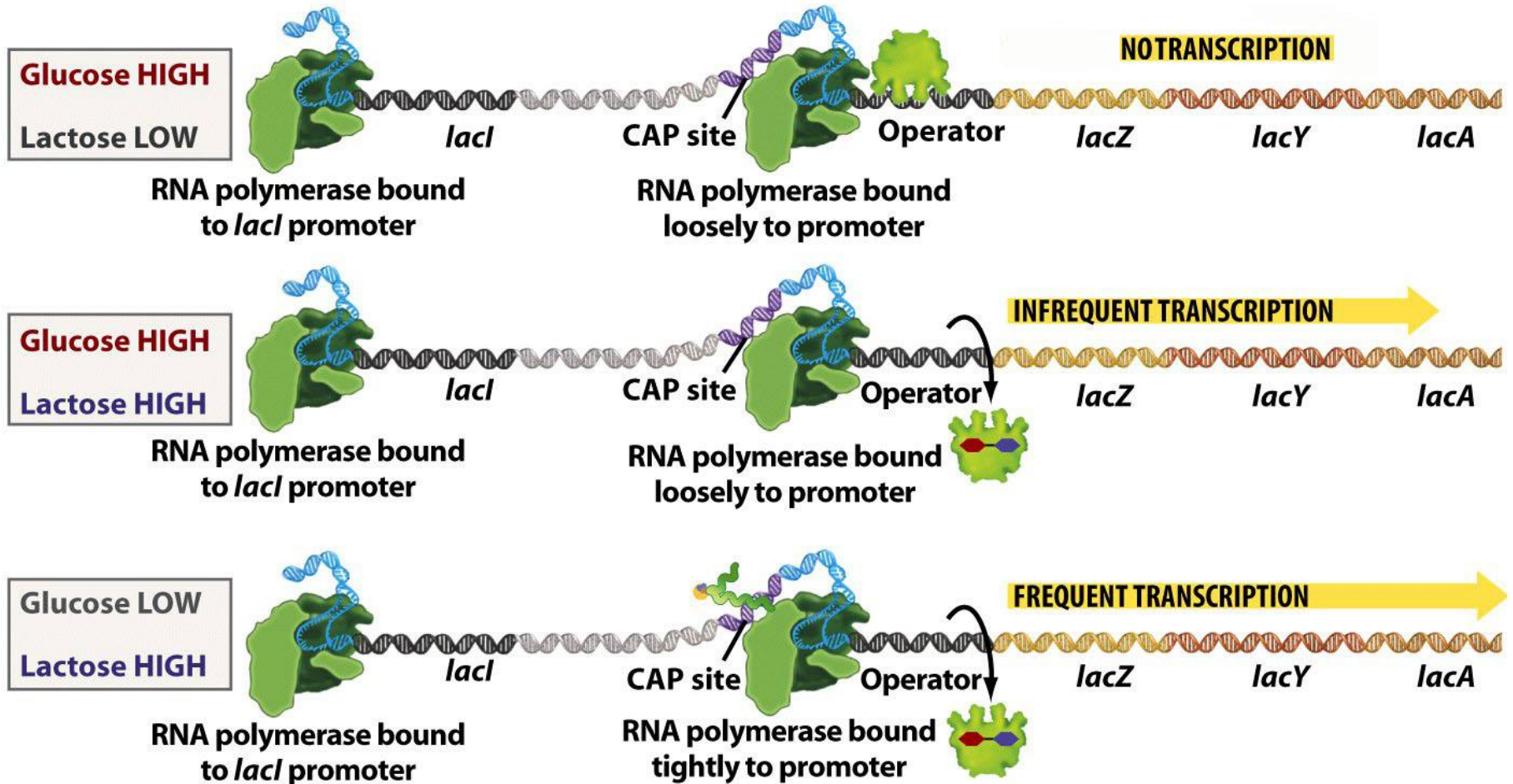
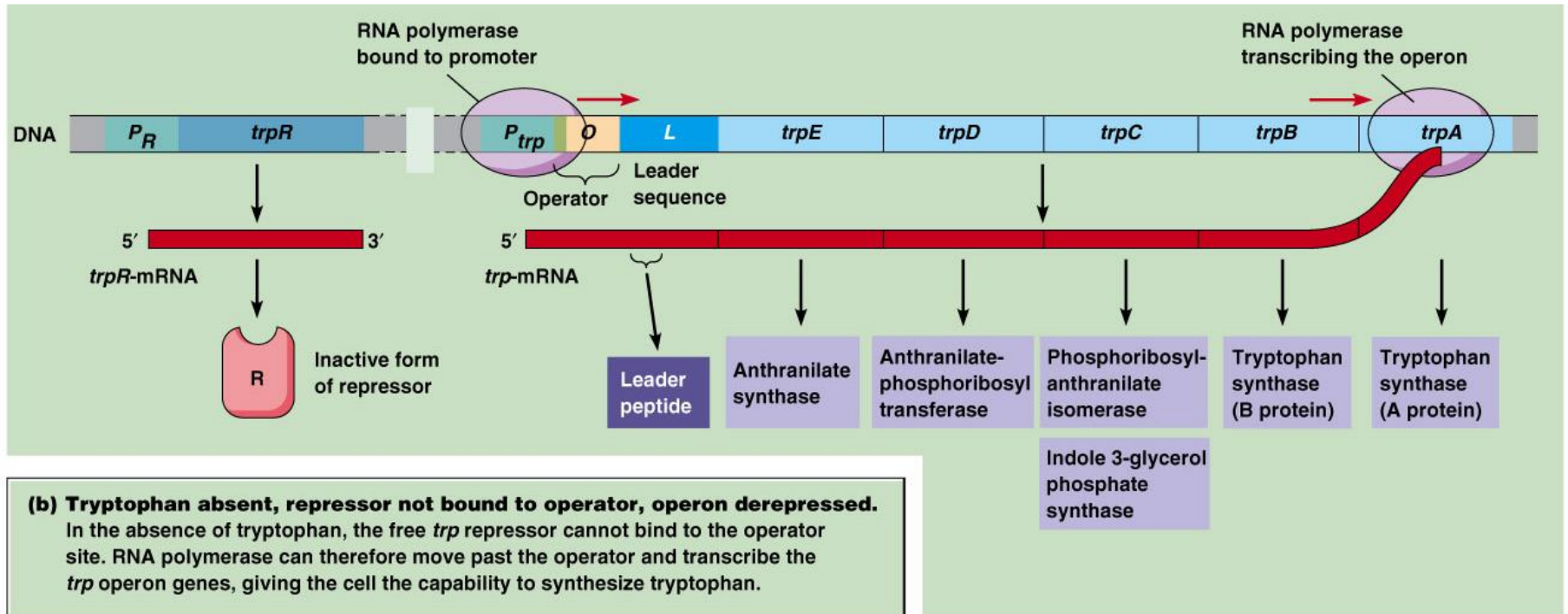


Figure 17-10 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

## Tryptofanový operon (trp operon)

- obsahuje 5 strukturních genů (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, and *trpA*), promotor ( $P_{trp}$ ), operator (O), a vedoucí sekvenci (L)
- Pokud Tryptofan chybí - represor (kodován *trpR*) je inaktivní - transkripce probíhá

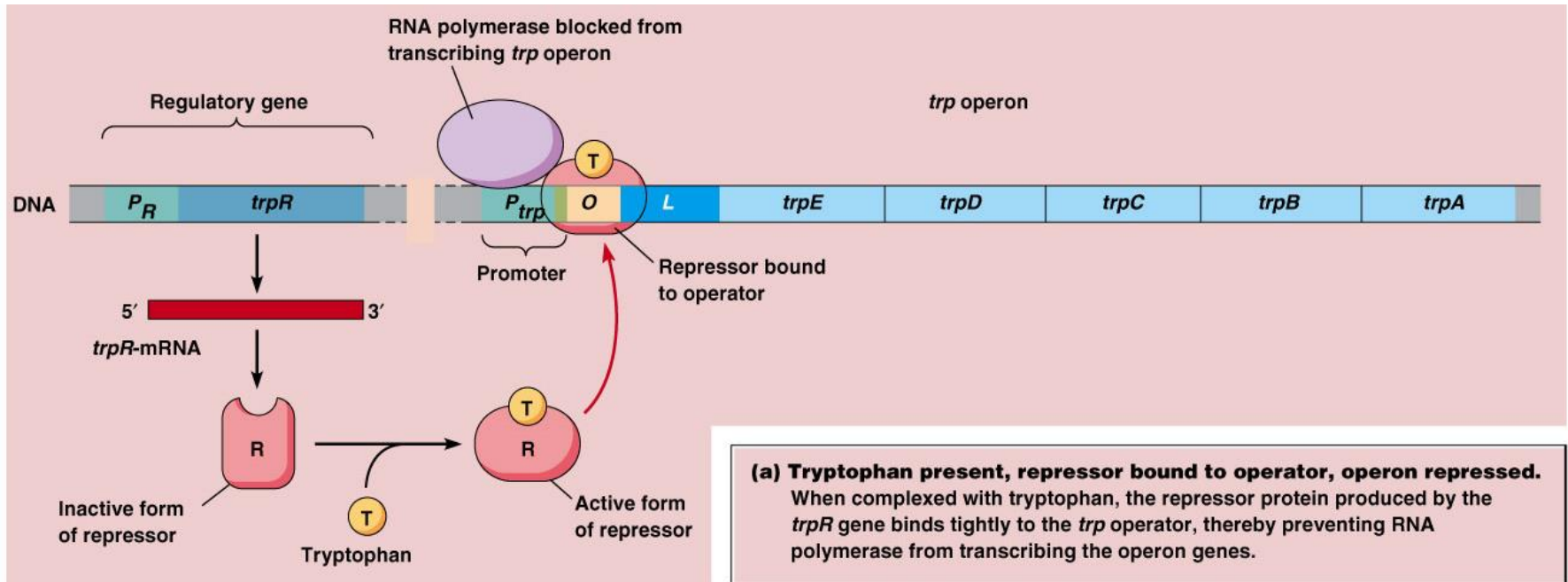


© 2012 Pearson Education, Inc.

**Vedoucí sekvence DNA** – úsek DNA v bakteriálních transkripčních jednotkách uložená mezi promotorem a prvním strukturním genem. Je v ní uložena Shine-Dalgarnova sekvence. Může obsahovat atenuátor.

## Tryptofanový operon (*trp* operon)

- Pokud je Tryptofan přítomen, váže se na represor a represor vazbou na DNA zastaví transkripci
- - Exprese genů kodujících enzymy biochemické dráhy pro syntézu Tryptofanu je navíc ještě řízena tzv. atenuací

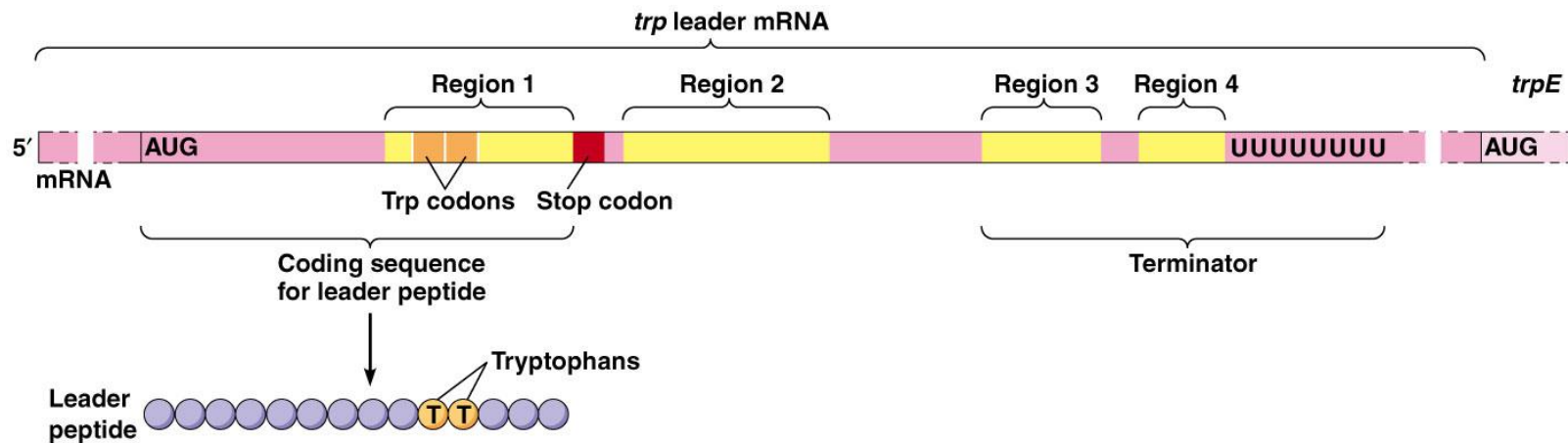


## Atenuace - riboswitch

- Atenuátor - oblast ve vedoucí sekvenci DNA (překládá se)
- Riboswitch - regulační úsek na mRNA (překládá se), který kontroluje produkci daného proteinu
- Pouze u prokaryot
- Spojení mezi transkripcí a translací u prokaryot umožňuje fungování kontrolního mechanismu atenuace
- Nascentní řetězec RNA je kousek dál simultánně překládán do proteinu
- Transkript *trp* operonu (mRNA) obsahuje 162 nukleotidů před prvním strukturálním genem *trpE*
- Tato vedoucí sekvence obsahuje "sensor" (neboli vedoucí peptid) o velikosti 14 AA

a) pokud je přítomen tryptofan - vytvoří se pouze vedoucí peptid

b) pokud není přítomen tryptofan - celý operon je přeložen a vytvoří se enzymy pro syntézu tryptofanu



© 2012 Pearson Education, Inc.

**Vedoucí sekvence DNA** – úsek DNA v bakteriálních transkripčních jednotkách uložený mezi promotorem a prvním strukturálním genem. Je v ní uložena Shine-Dalgarnova sekvence. Může obsahovat atenuátor.

## Mechanismus atenuace

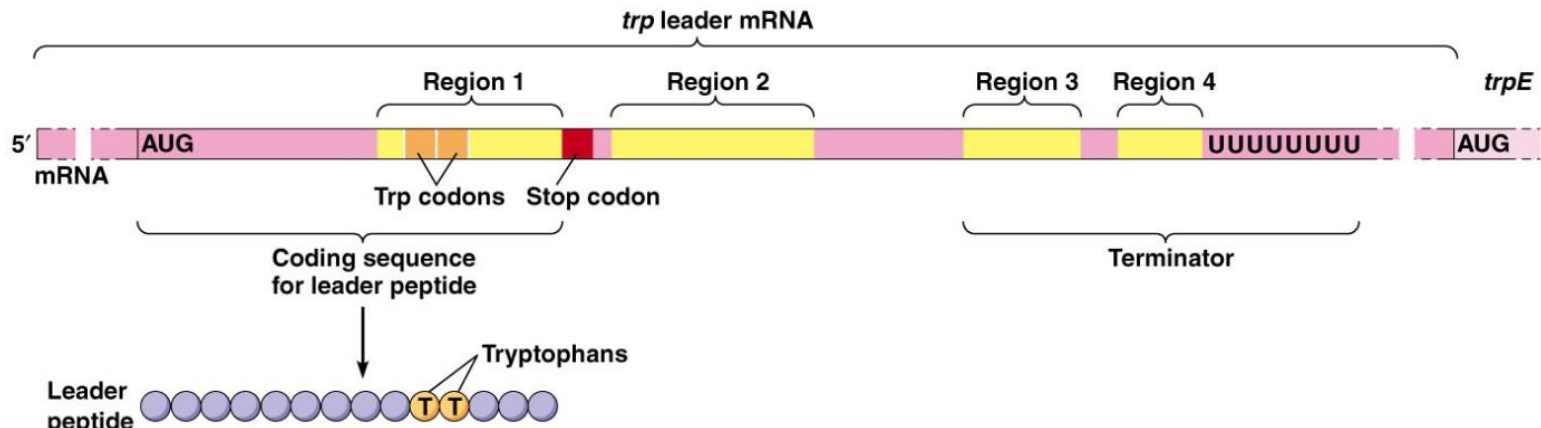
- vedoucí sekvence mRNA obsahuje 4 regiony, které jsou vzájemně kompatibilní a schopny tvořit vlásenky: 1+2, 2+3, 3+4
- regiony 3+4 jsou schopny tvořit terminační vlásenku - RNA-polymeráza se uvolňuje z DNA

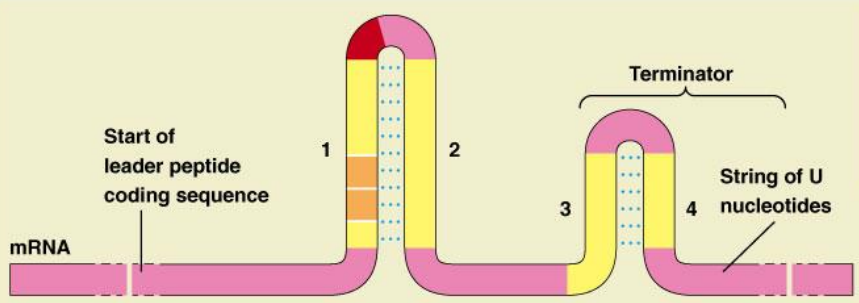
### 1. Nedostatek tryptofanu

- ribozom se zastaví na místě kodovaném pro tryptofan (region 1) čeká až přiletí tRNA
- ribozom fyzicky zablokuje region 1 a proto region 2 vytvoří vlásenku s regionem 3
- nevzniká tedy terminační vlásenka 3+4 → translace pokračuje a enzymy pro syntézu nedostatkového tryptofanu jsou vyrobeny

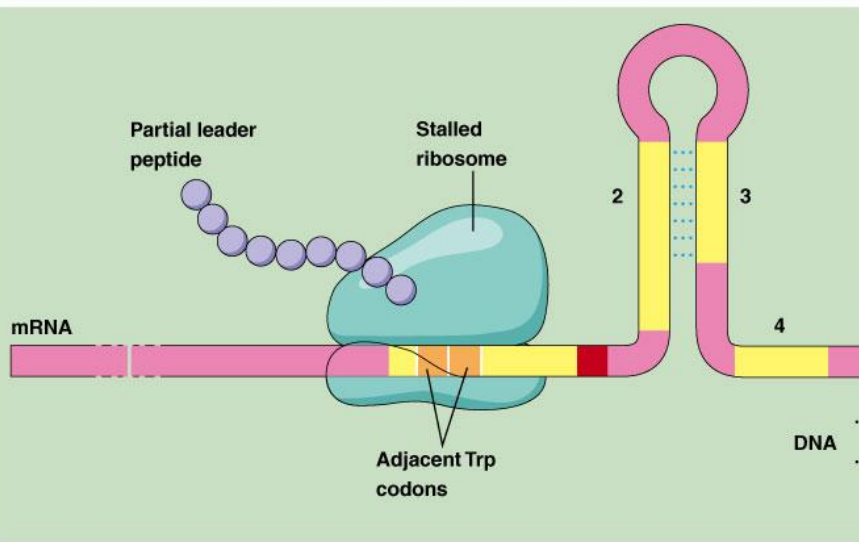
### 2. Dostatek tryptofanu

- ribozom se zastaví až ve stop kodonu - blokuje region 2
- vzniká terminační vlásenka 3+4 a RNA-polymeráza se uvolňuje
- výsledkem je pouze krátký vedoucí peptid (14 AA)



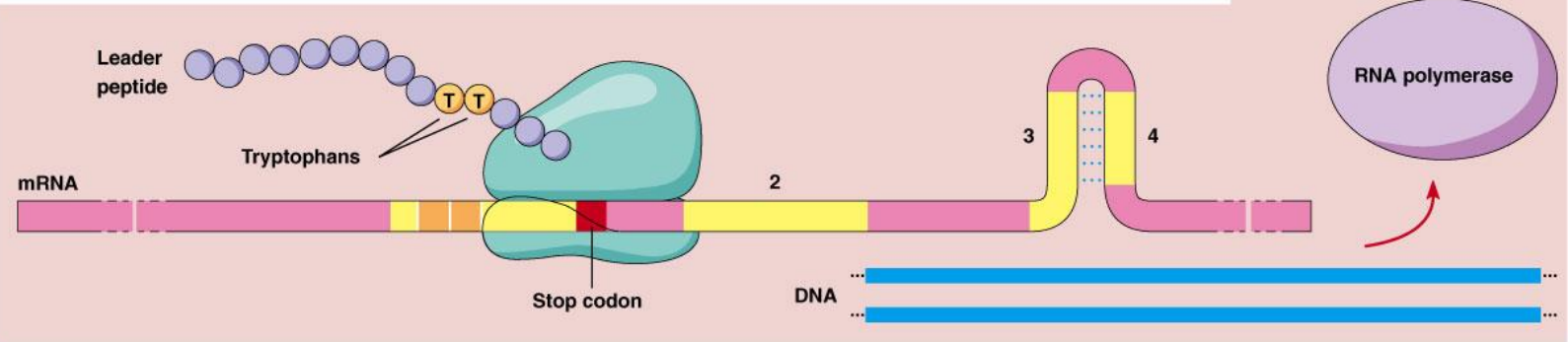


**(a) The most stable secondary structure for *trp* leader mRNA.** Attenuation depends on the ability of regions 1 and 2 and regions 3 and 4 of the *trp* leader sequence to base-pair, forming hairpin secondary structures. The 3–4 hairpin structure acts as a transcription termination signal.



**(b) When tryptophan is scarce the ribosome stalls, allowing a 2–3 “antiterminator” hairpin to form.** The ribosome stalls when it encounters the two tryptophan (Trp) codons due to a shortage of tryptophan-carrying tRNA molecules. The stalled ribosome blocks region 1, so a 1–2 hairpin cannot form. Instead an alternative 2–3 hairpin is created, which prevents formation of the 3–4 termination hairpin. Therefore RNA polymerase can move on to transcribe the entire operon.

**(c) When tryptophan is plentiful the ribosome continues, allowing the 3–4 transcription termination signal to form.** The moving ribosome completes translation of the leader peptide and pauses at the stop codon, blocking region 2. As a result, the 3–4 structure forms and terminates transcription near the end of the leader sequence.

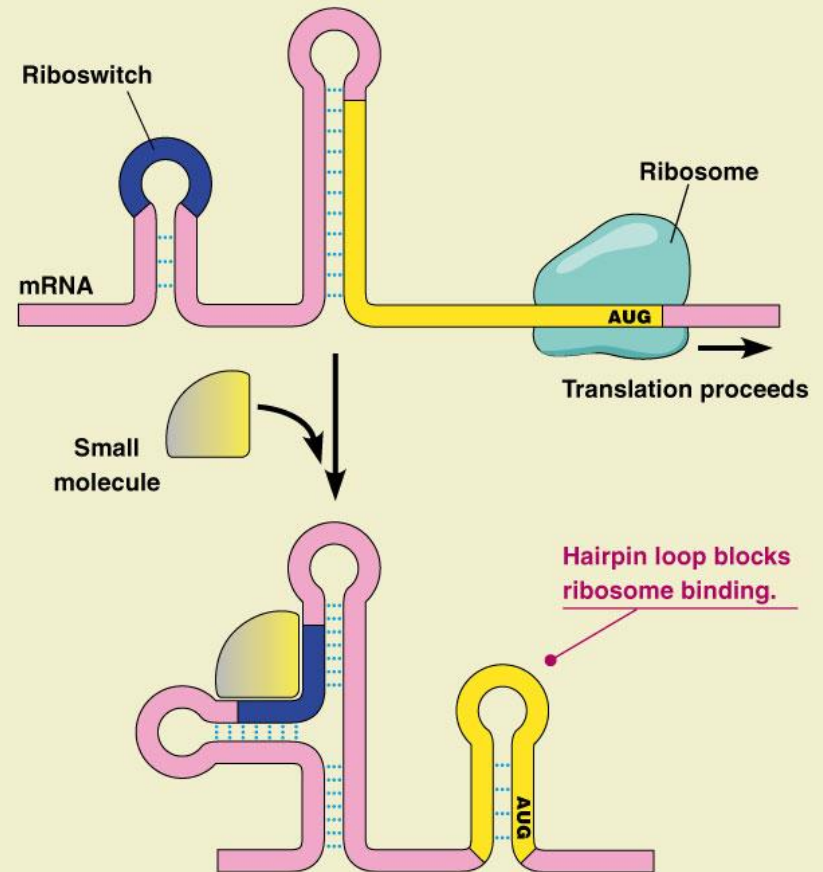
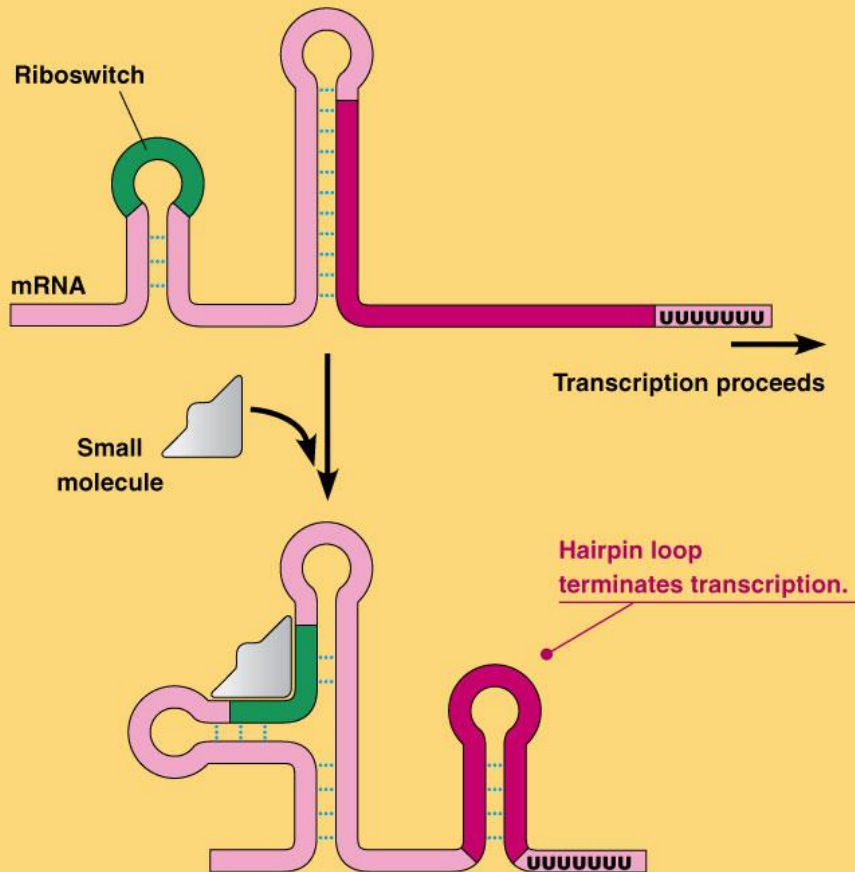


## Riboswitch - další příklady

- regulační úsek na mRNA, který kontroluje produkci daného proteinu (může vázat signální molekuly)

**(a) Transcription termination.** Binding of a small molecule to a riboswitch in the leader sequence of some mRNAs triggers the formation of a hairpin loop that terminates transcription. FMN binding to the leader sequence of the mRNA transcribed from the *rib* operon of *B. subtilis* works in this way.

**(b) Translation initiation.** In other mRNAs, a small molecule binding to a riboswitch triggers formation of a hairpin loop containing the site where ribosomes normally bind, thereby interfering with translation initiation. In *E. coli*, this type of control is used by FMN to inhibit translation of mRNAs coding for enzymes involved in FMN synthesis.



# Řízení exprese eukaryotického genomu



# Část druhá: Řízení exprese eukaryotického genomu

**Mnohem komplexnější než u prokaryot - příkladem je regulace exprese lidského genomu**

- Všechny buňky mají stejnou DNA (s výjimkou gamet)
- V běžné buňce musí být téměř všechny geny vypnuty
- Většinou má každý gen několik regulátorů
- Lidská buňka obsahuje kolem 21 000 genů (původní odhad 100 000)

	chromosomes --diploid	base pairs	genome size (#genes)
fruit fly	8	$1.65 \times 10^8$	13,600
Budding yeast	16	12,462,637	6,275
human	46	$3.3 \times 10^9$	~21,000
human mitochondria		16,569	13
rice	24	$4.66 \times 10^8$	46,022 -55,615
dog	78	$2.4 \times 10^9$	~25,000
mouse	40	$3.4 \times 10^9$	~23,000

[http://www.edinformatics.com/math\\_science/human\\_genome.htm](http://www.edinformatics.com/math_science/human_genome.htm)

# Část druhá: Řízení exprese eukaryotického genomu

## Exprese genů (tzn. "výroba proteinů")

### 1. Housekeeping geny

- exprimovány ve všech buňkách stále
- rutinní metabolické funkce (např. respirace)

### 2. Geny exprimované při diferenciaci buňky

- zapnutí určité signální dráhy nezbytné pro diferenciaci
- zapnutí pouze pro určitou dobu

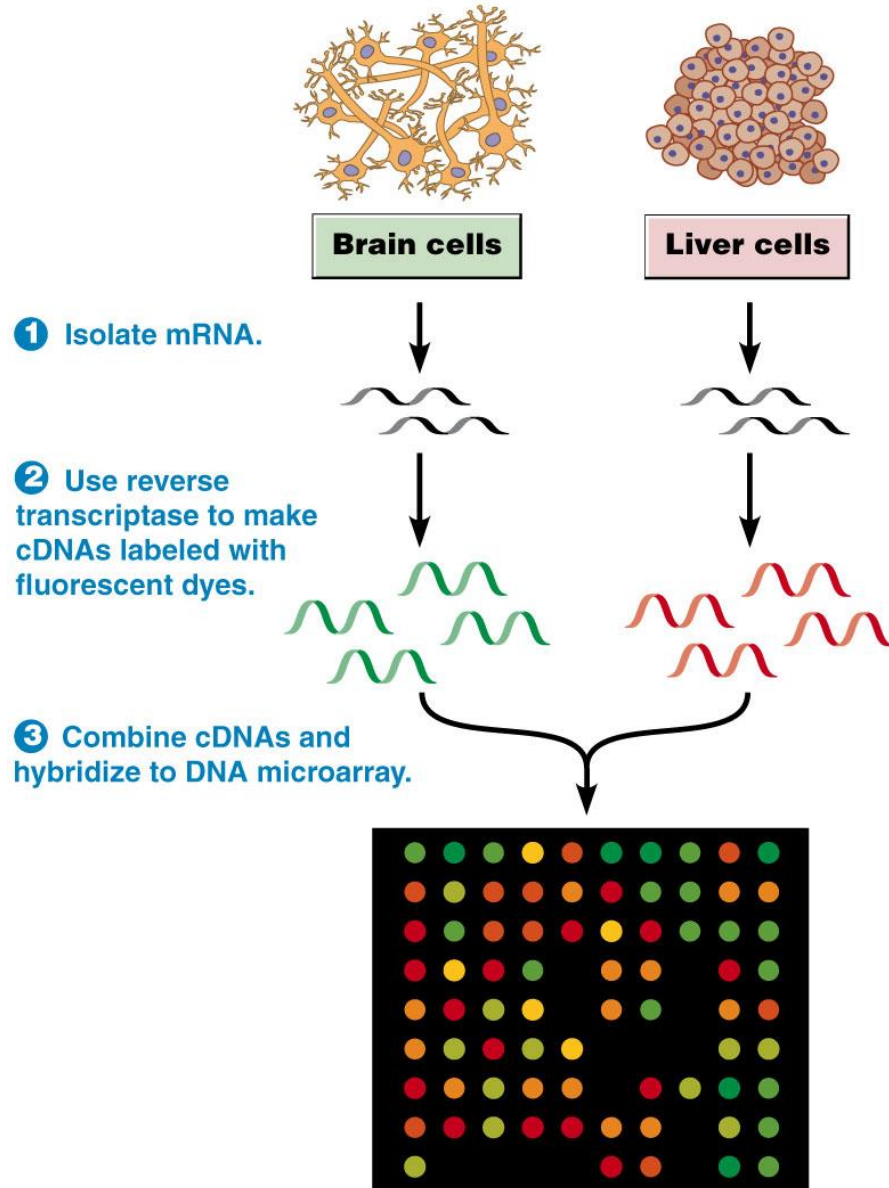
### 3. Geny nutné pro funkci specializované buňky

- stálá exprese pouze u určitého typu buněk
- např. syntéza protilátek v plazmatických buňkách (terminálně diferencovaný B-lymfocyt)

### 4. Geny zapnuté/vypnuté v reakci na okolní podmínky

- např. po signalizaci hormonem

# V rozdílných tkáních jsou transkribovány odlišné geny (vzniká jiná mRNA)



# Regulace genové exprese eukaryot

## 1. Chromatinová remodelace

- oblast chromozomu musí být otevřená aby měly enzymy a TF\* přístup ke genu
- epigenetické modifikace:
  - methylace DNA
  - methylace a acetylce histonů

## 2. Transkripční kontrola

- nejběžnější typ regulace
- vypínání/zapínání tvorby mRNA

## 3. Post-transkripční úpravy

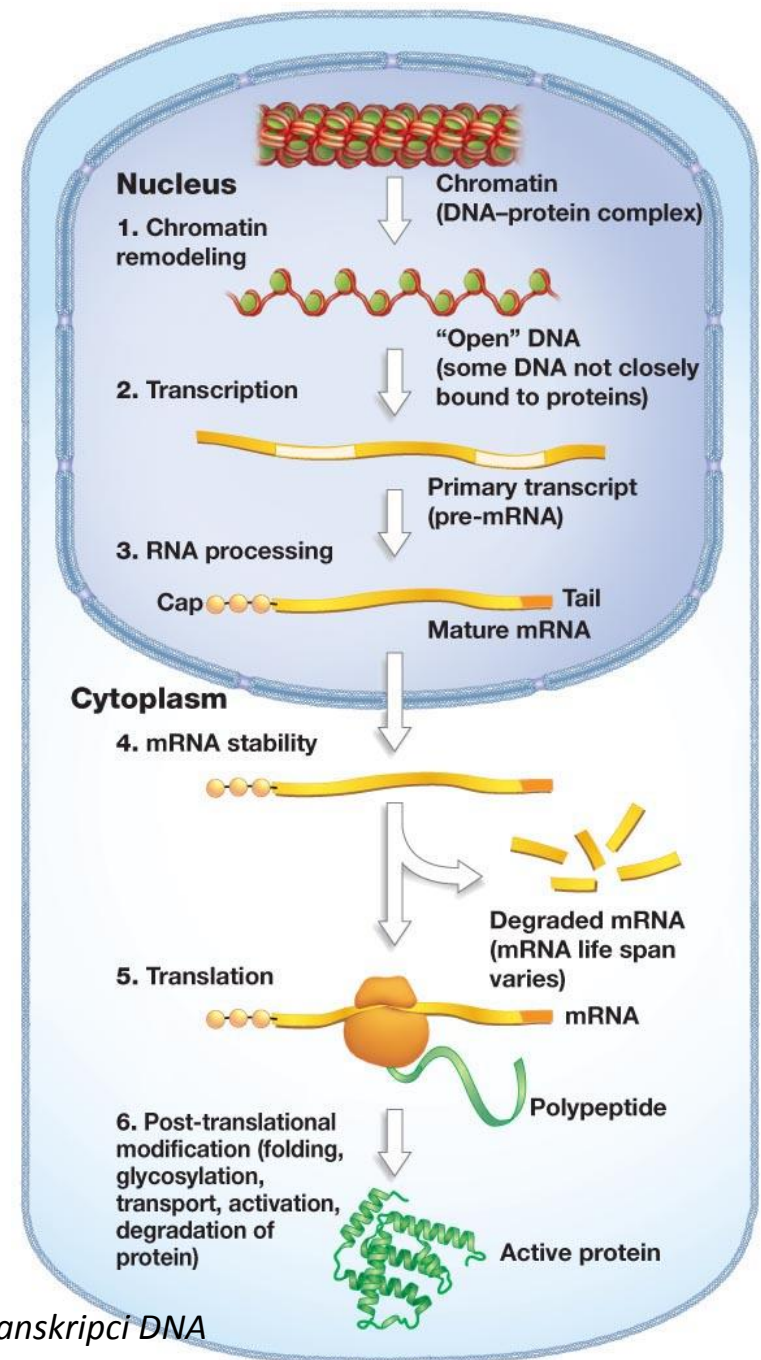
- zpracování pre-mRNA do mRNA
- RNA interference (RNAi)

## 4. Kontrola translace

- regulace iniciace translace

## 5. Posttranslační procesy\*\*

- modifikace proteinu do formy aktivního proteinu

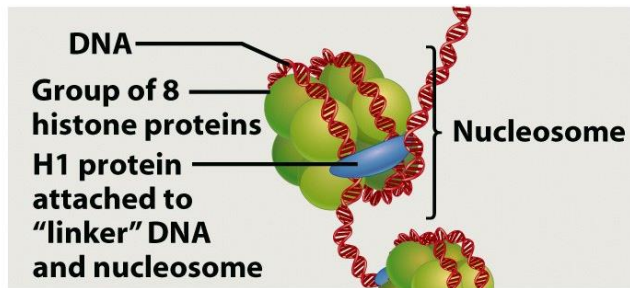


\* TF (Transkripční faktor): protein schopný spouštět či jinak regulovat transkripci DNA

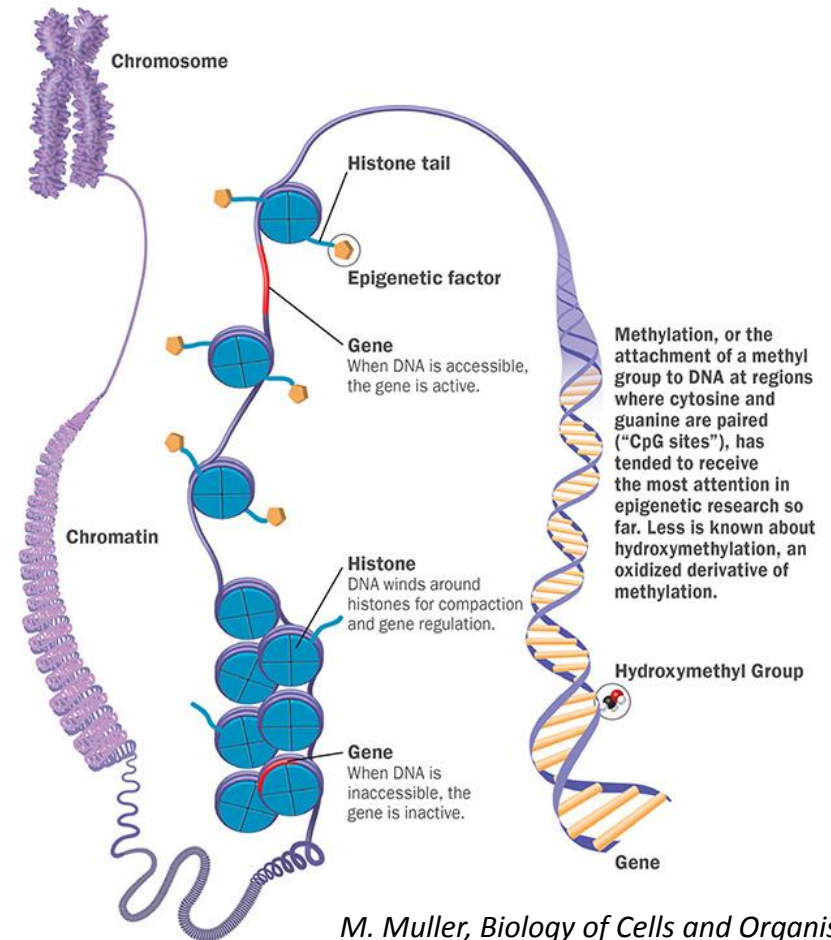
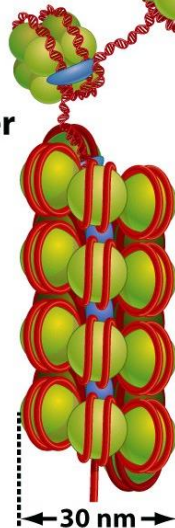
\*\* Někdy bývá rozlišována kotranslace a posttranslace

## Chromatinová remodelace

- oblast chromozomu musí být otevřená (dekondenzovaná) aby měly enzymy a TF přístup ke genu
- chromozom je tvořen komplexem histonových proteinů a DNA, nazývaným **CHROMATIN**
- transkripce může proběhnout, pouze pokud se "zabalený" **heterochromatin** dekondenzuje do "rozbaleného" **euchromatinu**
- Chromatinové remodelace patří mezi nejtypičtější **epigenetické modifikace**



(c) 30-Nanometer fiber



M. Muller, *Biology of Cells and Organisms*  
University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

## Chromatinová remodelace

- **Chromatin-remodeling complexes** - skupina proteinů, které mění strukturu chromatinu

- **KONDENZACI** a **DEKONDENZACI** chromatinu zajišťují enzymy:

### 1. Histon acetyl transferázy (HAT)

- rozbalují (dekondenzují) chromatin do euchromatinu

### 2. Histon deacetylázy (HDAC)

- zabalují (kondenzují chromatin) do heterochromatinu

### 3. Dnmt (DNA methyltransferázy)

- Methylace DNA (Cytosinu)  
- Zabalují chromatin

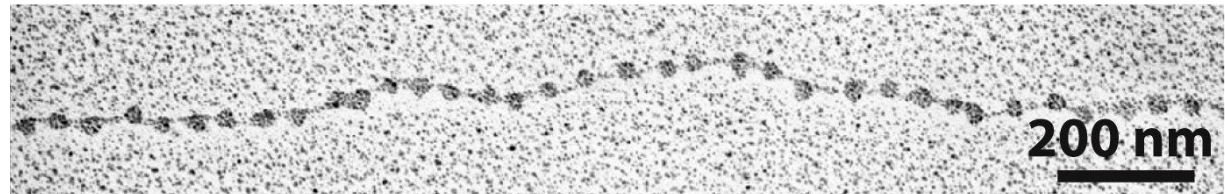
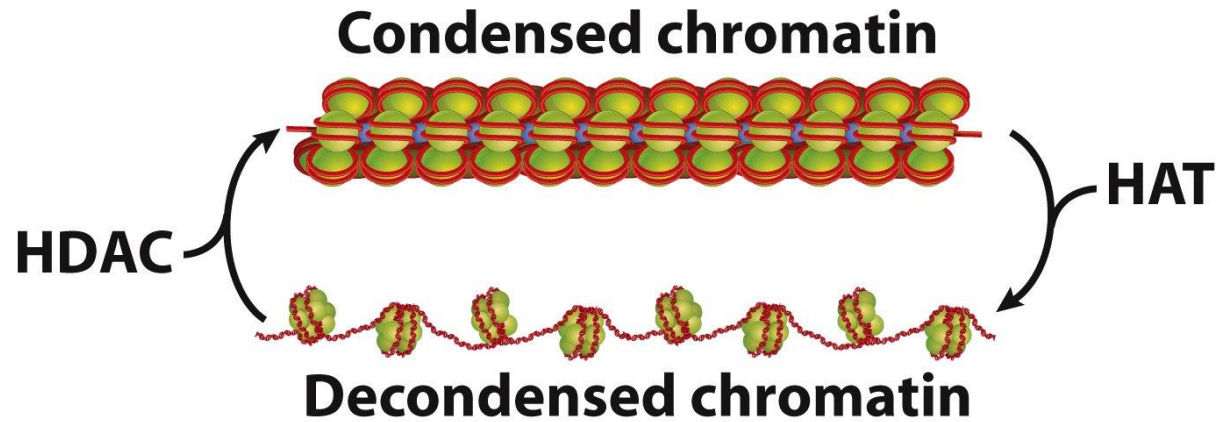
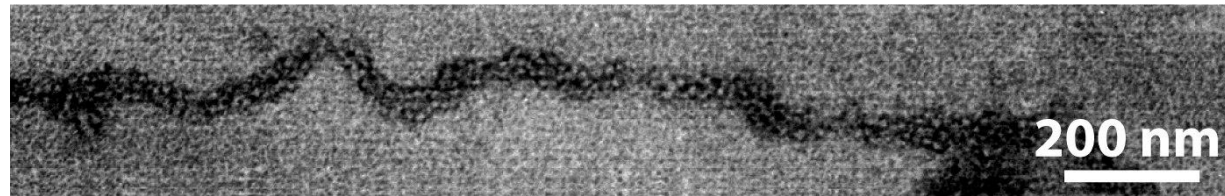


Figure 18-4 Biological Science, 2/e

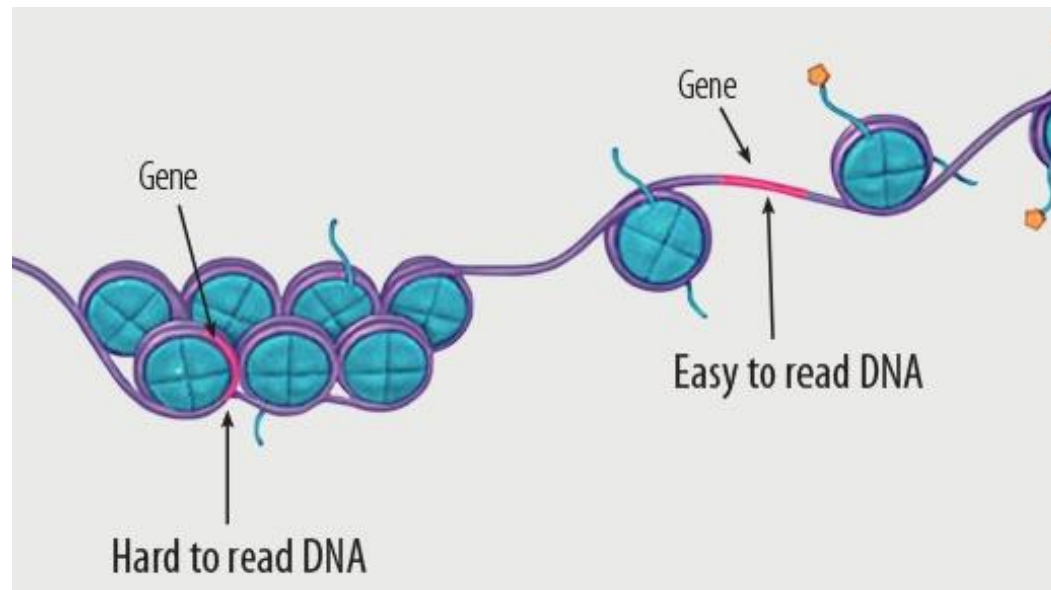
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

## Chromatinová remodelace - EPIGENETIKA

*"Studuje změny v genové expresi (buněčného fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA, ale mohou být dědičné"*

DNA sekvence (A, C, T, G) je jako manuál a epigenetické modifikace jako zvýrazňovače, které podtrhují různými barvami různě důležité části v jednotlivých buňkách

Na rozdíl od DNA sekvence se epigenetické značky mění během vývoje a v reakci na vnější okolnosti a mohou se též dědit



# Chromatinová remodelace - EPIGENETIKA

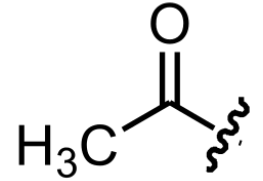
- hlavně kovalentní modifikace a) DNA a b) histonů
- tyto bývají synonymem pro "epigenetiku"
- mezi epigenetické regulátory řadíme též RNA interference (RNAi; regulační RNA)

## a) modifikace DNA

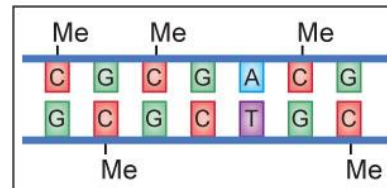
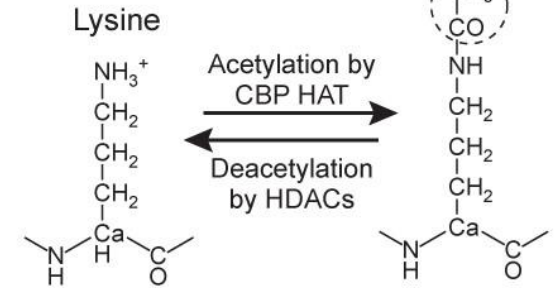
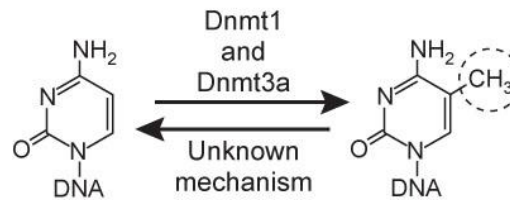
- methylace cytosinu
  - inhibuje transkripci
  - umlčení exprese
- Dnmt (DNA methyltransferáza)
- v CpG ostrůvcích\*\*

## b) modifikace histonových proteinů

- hlavně acetylace lysinu
  - aktivuje transkripci
- HAT a HDAC



Acetylated lysine



\*Dawson and Kouzarides, Cell 2012

\*\*CpG ostrůvky: nukleotidy C a G vedle sebe na stejné DNA řetězci (cytosin - fosfát - guanin)



# Histonový kód

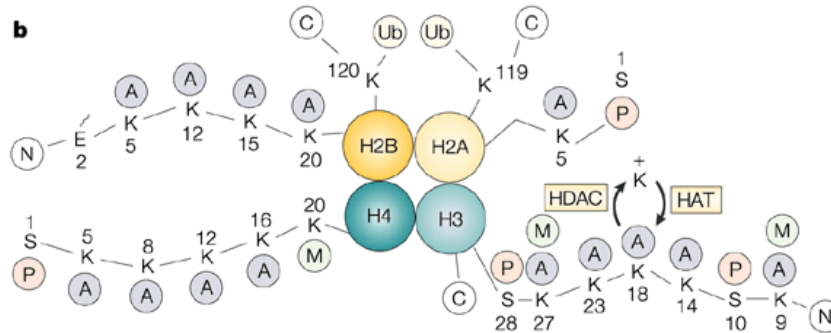
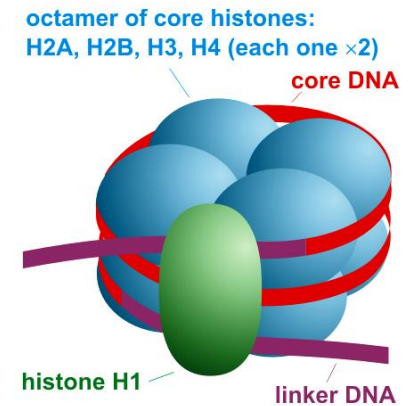
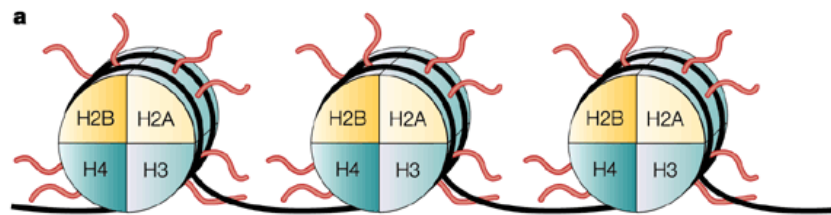
Hypotéza, že informace kódovaná v DNA je částečně řízena chemickými modifikacemi histonů

- spolu s DNA methylací tvoří *epigenetický kód*

- zatímco DNA kód mají všechny somatické buňky stejný, histonový a epigenetický kód je specifický pro každou buňku či tkáň

- modifikovány bývají N-konce, které vyčnívají z nukleozomu

- nejčastěji bývá modifikován lysin (K)



Nature Reviews | Cancer

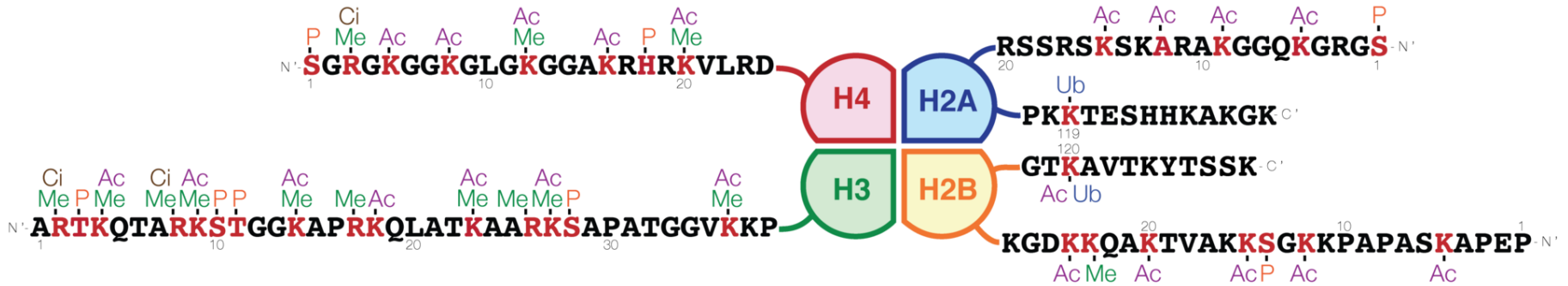
**Nukleozom:** skládá se z osmi histonových proteinů (2 od každého ze 4 druhů: H2A, H2B, H3 a H4) a z navinutého řetězce DNA dlouhého 147 nukleotidů

**Histony:** proteiny, okolo kterých je omotána DNA. 5 druhů (H1, H2A, H2B, H3 and H4)

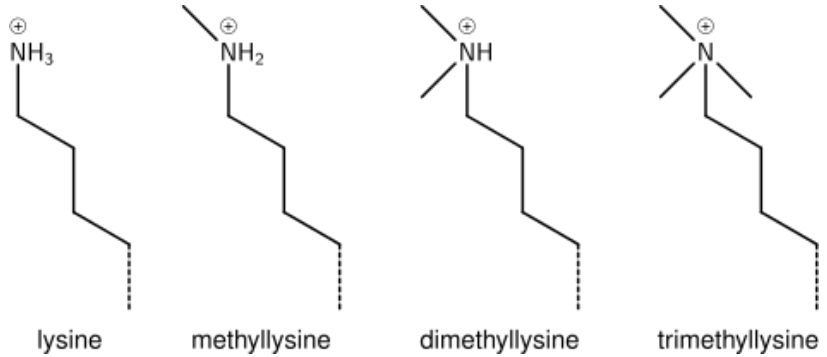
# Nomenklatura histonových modifikací

1. Jméno histonu (např. H3)
2. Jednopísmenná zkratka aminokyseliny (např. K pro lysin) a pozice AA v proteinu (počítáno od N'-konce)
3. Typ modifikace (Me: methyl, P: phosphate, Ac: acetyl, Ub: ubiquitin)
4. Počet modifikací (pouze methyl může mít více - až tři - kopie na AA zbytek)

Příklad: **H3K4me1** značí monomethylaci čtvrté AA od N'-konce (lysinu - K) na proteinu H3



Me Methylation      Ac Acetylation      Ci Citrullination  
 Ub Ubiquitination      P Phosphorylation



## Příklady známých histonových modifikací

Na rozdíl od methylace DNA neplatí, že methylace vždy znamená umlčení (represi) exprese genu

Type of modification	Histone						
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H4K20	H2BK5
mono-methylation	activation <sup>[6]</sup>	activation <sup>[7]</sup>		activation <sup>[7]</sup>	activation <sup>[7][8]</sup>	activation <sup>[7]</sup>	activation <sup>[7]</sup>
di-methylation	activation	repression <sup>[3]</sup>		repression <sup>[3]</sup>	activation <sup>[8]</sup>		
tri-methylation	activation <sup>[9]</sup>	repression <sup>[7]</sup>		repression <sup>[7]</sup>	activation, <sup>[8]</sup> repression <sup>[7]</sup>		repression <sup>[3]</sup>
acetylation		activation <sup>[9]</sup>	activation <sup>[9]</sup>				

[Video: Histonové modifikace](#)

### V kostce:

HDAC - Histon deacetylázy	potlačují expresi	HDAC1, HDAC2, HDAC2...
HAT - Histon acetyl transferázy	aktivují expresi	Gcn5, CBP/p300, PCAF, SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ...
Histon methyltransferázy	aktivují/potlačují exp.	Suv39H, CARM1, PRMT1...
DNMT - DNA methyltransferázy	potlačují expresi	DNMT1, DNMT3...

## EPIGENETIKA

*epigenetické změny mohou být ovlivněny okolními podmínkami (věkem, nemocí, výživou...)*

### **Vzrůstající epigenetické rozdíly v průběhu života u monozygotických dvojčat\***

- dvojčata jsou po narození epigeneticky identická, avšak po několika letech lze detekovat rozdíly v genomické distribuci 5-methylcytosinu DNA a acetylaci histonů
- rozdíly se zvětšují pokud mají dvojčata rozdílný životní styl nebo nežijí spolu\*

## EPIGENETIKA A VÝŽIVA

### **Epigenetické změny způsobené prenatálním vystavením hladomoru\*\***

- okolní podmínky mohou u lidí způsobit epigenetické změny které přetrvají po celý život
- testování DNA methylace u genu IGF2 mezi sourozenci stejného pohlaví
- lidé prenatálně vystavení hladu během hladomoru v Holandsku 1944-1945
- snížená methylace DNA v genu pro insulin-like growth factor II (IGF-2)
- zvýšená náchylnost k obezitě a srdečním onemocněním či schizofrenii

\* *Fraga et al., PNAS 2005*

\*\* *Heijmans et al., PNAS 2008*

# EPIGENETIKA A VÝŽIVA

## Rozdíl mezi včelí matkou a dělnicí

- shodný genom
- rozdíly v methylaci DNA u více než 550 genů



## Královská výživa

- "Royal jelly" je látka, produkovaná včelími dělnicemi pro výživu larev, určených za královny
- tyto larvy jsou geneticky identické s ostatními, vyrůstají v tzv. "Queen cup"
- tato dieta mj. utlumuje expresi DNA methyltransferase **Dnmt3**
- experimentální umlčení genu Dnmt3 pomocí RNA interference (RNAi) u larvy vedlo k vývoji v královnu u 72% larev\*



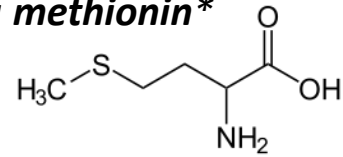
<http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/nutrition/>

\* Kucharski et al., Science 2008

# EPIGENETIKA A VÝŽIVA

## Výživa hraje velkou roli v methylačním statusu i u člověka

Zdrojem methyl-skupiny (-CH<sub>3</sub>) pro methylaci DNA u člověka je esenciální aminokyselina **methionin**\*



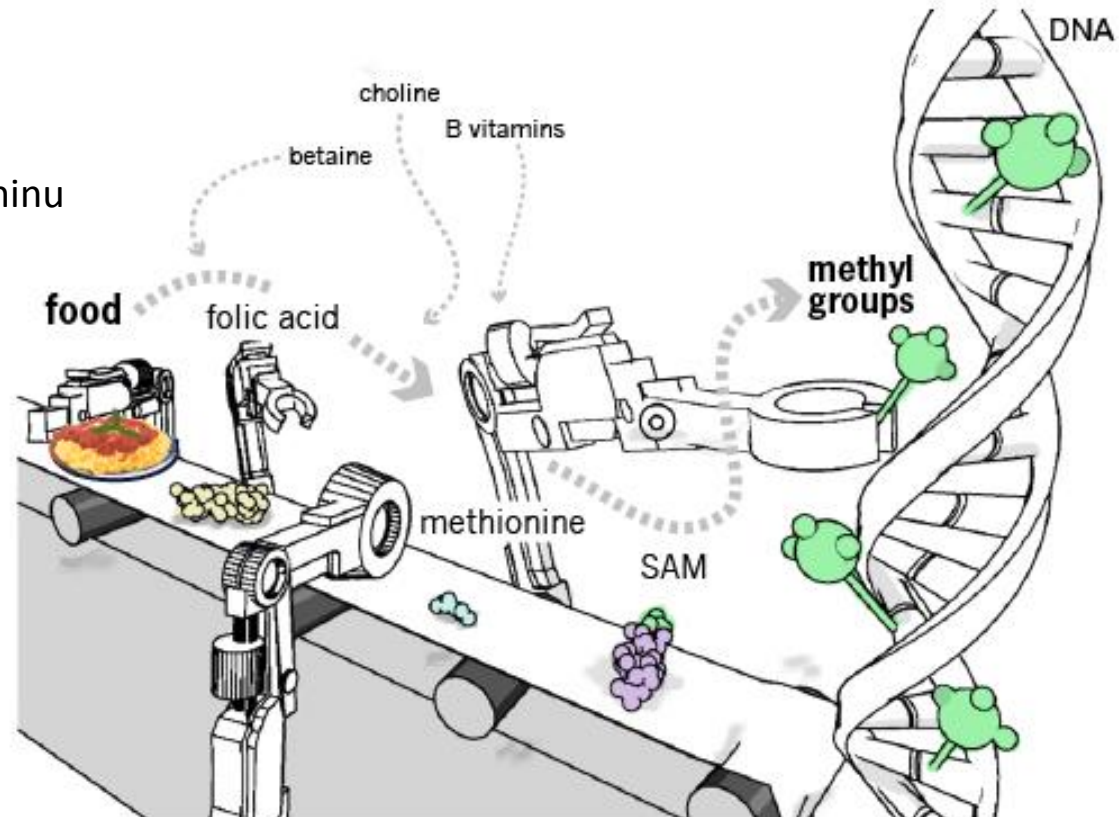
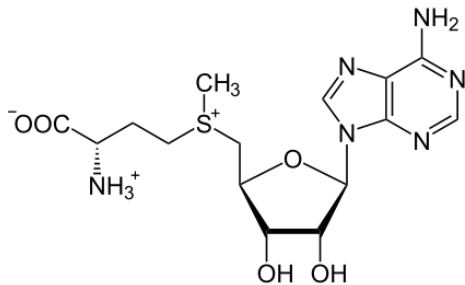
### B-komplex (soubor vitamínů B):

Působí jako koenzymy a donory -CH<sub>3</sub> v metabolismu methioninu

- Kyselina listová (folic acid; folate; Vitamín B9)
- Vitamíny B12 a B6
- Cholin (též označován jako B4)

### S-Adenosyl methionine (SAM)

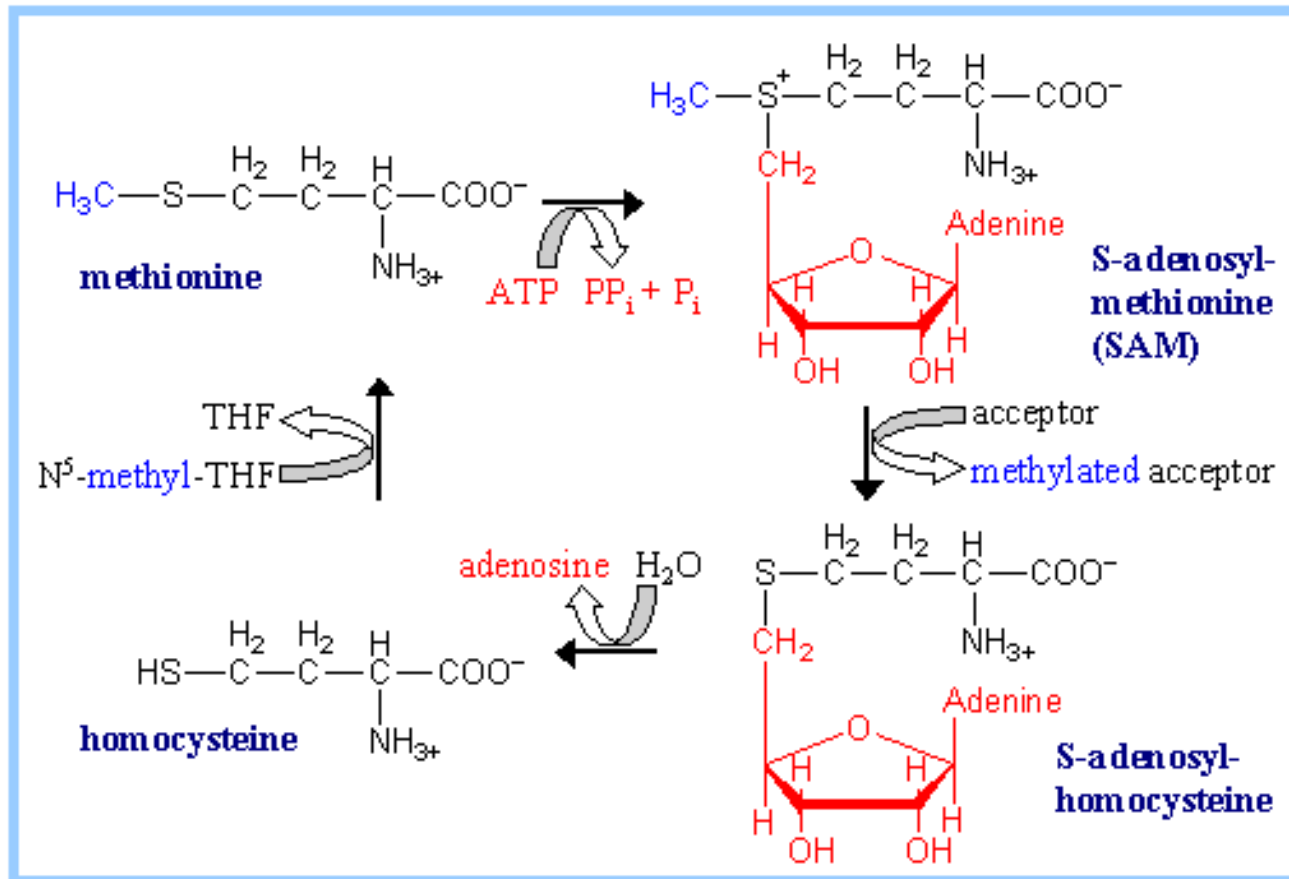
- meziprodukt při získávání -CH<sub>3</sub> z methioninu
- též výživový doplněk



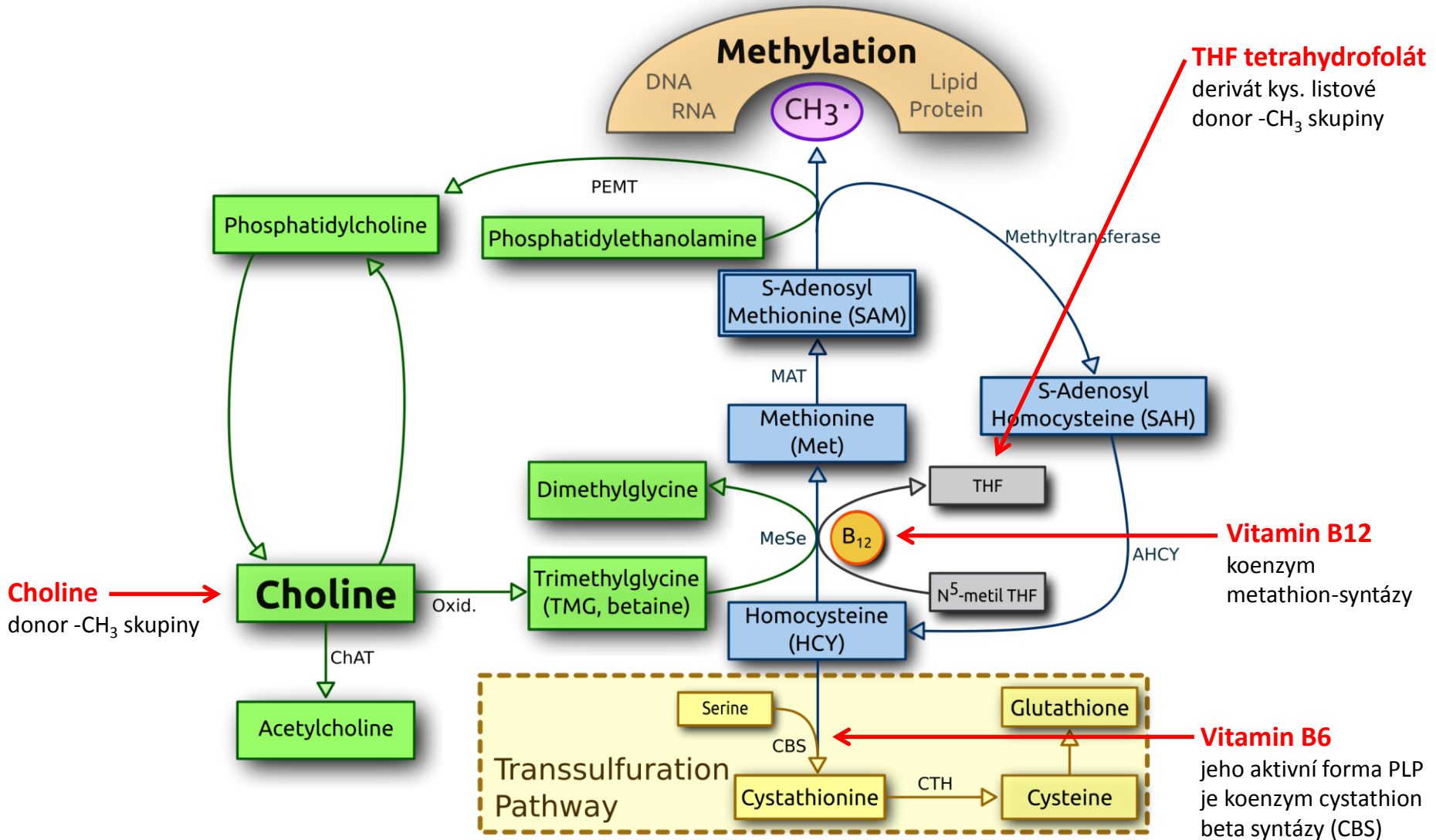
## EPIGENETIKA A VÝŽIVA - KDE SE BERE METHYL SKUPINA?

### Získání methyl-skupiny z aminokyseliny methioninu

- probíhá ve všech buňkách těla, zejména v játrech
- příjemci methyl-skupiny jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy...
- methionin zbavený  $-CH_3$  se v těle recykluje přes homocystein přidáním  $-CH_3$  za účasti tetrahydrofolátu (THF), B12 a cholinu (a jeho metabolitu betainu)



# EPIGENETIKA A VÝŽIVA - KDE SE BERE METHYL SKUPINA?





# EPIGENETIKA A VÝŽIVA

<b>Nutrient</b>	<b>Food Origin</b>	<b>Epigenetic Role</b>
<b>Methionine</b>	Sesame seeds, brazil nuts, fish, peppers, spinach	SAM synthesis
<b>Folic Acid</b>	Leafy vegetables, sunflower seeds, baker's yeast, liver	Methionine synthesis
<b>Vitamin B12</b>	Meat, liver, shellfish, milk	Methionine synthesis
<b>Vitamin B6</b>	Meats, whole grain products, vegetables, nuts	Methionine synthesis
<b>SAM-e (SAM)</b>	Popular dietary supplement pill; unstable in food	Enzymes transfer methyl groups from SAM directly to the DNA
<b>Choline</b>	Egg yolks, liver, soy, cooked beef, chicken, veal and turkey	Methyl donor to SAM
<b>Betaine</b>	Wheat, spinach, shellfish, and sugar beets	Break down the toxic byproducts of SAM synthesis

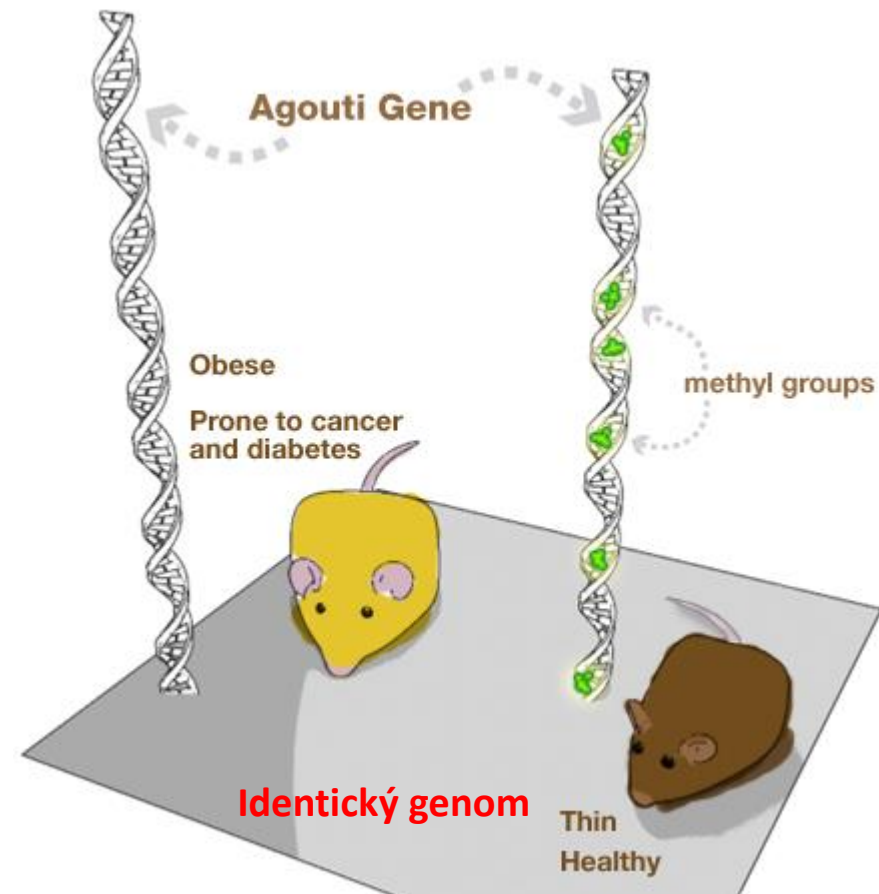
## EPIGENETIKA A VÝŽIVA

*Výživa bohatá na zdroj methylové skupiny (cholin a folát) ovlivňuje methylaci DNA hlavně v prenatálním vývoji*

- některé regiony genomu pak zůstávají odmethylovány (zapnuty) po celý život
- methyl-deficientní dieta v dospělosti vede také ke snížení methylace DNA, ale je reverzibilní

### Gen *Agouti*

- vyskytuje se u všech savců
- normálně je u myši **zamethylován**:
  - hnědá srst, normální váha
- pokud je u myši **odmethylován**:
  - žlutá srst, obézní
  - sklony k diabetu a rakovině
- při krmení žluté myši v březosti stravou bohatou na zdroj methyl-skupin se narodili hnědí potomci, zdraví po celý život (žluté matce už tato dieta nepomohla)



# EPIGENETIKA A VÝŽIVA

## Bisphenol A (BPA)

- sloučenina k výrobě plastů (plastové láhve, plechovky)
- snižuje metylaci DNA (prokázáno na *Agouti* genu u myší\*)
  - BPA podávané matkám, potomstvo bylo žluté a obézní
  - pokud však zároveň s BPA krmili methyl-rich dietou - potomstvo hnědé a neobézní

These Two Mice are Genetically Identical and the Same Age



While pregnant, both of their mothers were fed Bisphenol A (BPA) but **DIFFERENT DIETS**:

The mother of this mouse received a **normal mouse diet**

The mother of this mouse received a diet **supplemented** with choline, folic acid, betaine and vitamin B12

# EPIGENETIKA

## Genomický imprinting (vtiskování)

- exprese alely závisí na pohlaví rodiče, od něhož byla zděděna
- např. pro určitý gen je exprimována pouze otcovská alela (nemythylovány u spermií)
- mateřská alela v oocytech je methylována
- děj musí být reverzibilní, aby při tvorbě spermií byly obě alely nemythylovány
  
- morfologická, anatomická i etologická odlišnost samice muly a samice mezka
- identický genom

### Mula

kříženec samce osla se  
samici koně

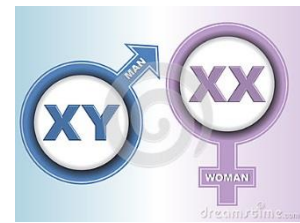


### Mezek

kříženec samice osla se  
samcem koně

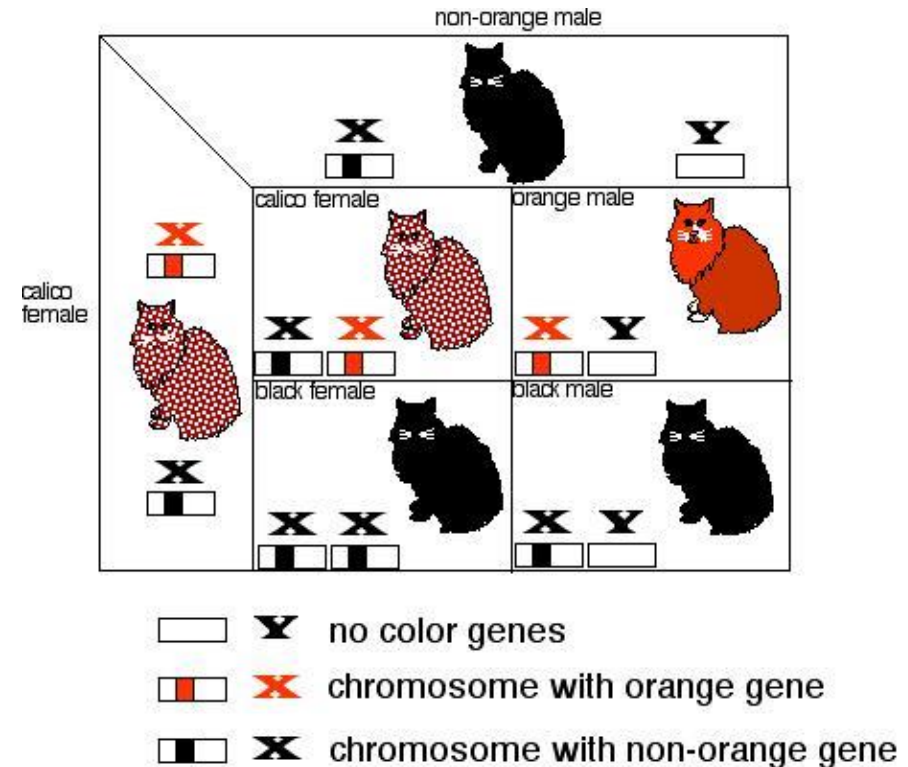
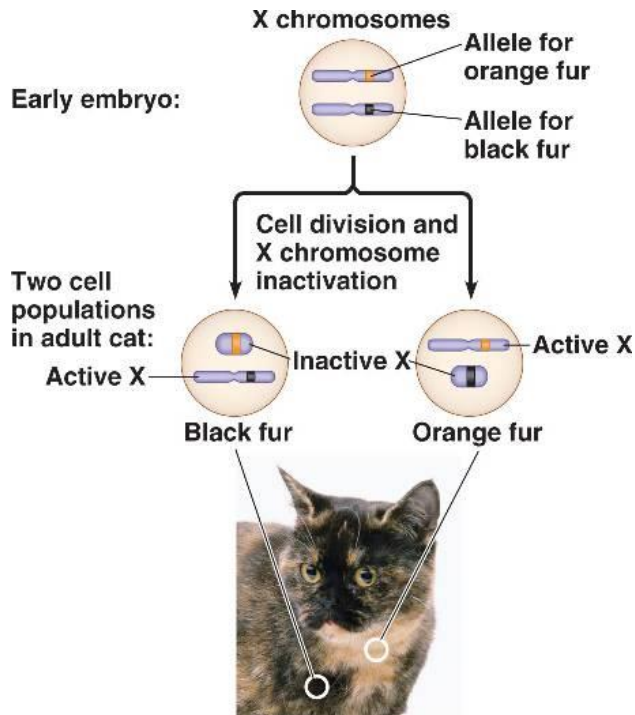


# EPIGENETIKA - X-inactivation



Proces, při kterém je inaktivována jedna z kopií X-chromozomu u samic savců

- k umlčení transkripce dochází zabalením do **heterochromatinu**, nepřístupného transkripci
  - důvod: zabránit aby samice měly dvojnásobnou expresi genů na X-chromosomu než samci
  - u placentálních savců (člověk) je volba X-chromosomu pro inaktivaci náhodná (ve fázi raného embrya)
  - vačnatci mají vždy umlčen otcovský X-chromozom
- Vizuální manifestace inaktivovaného X-chromozomu: na X-chromozomu se nachází gen pro zbarvení srsti kočky (strakaté jsou vždy samice a říká se jim "calico")



## EPIGENETIKA - X-inactivation

- jedná se o epigenetickou změnu, která vede ke změně fenotypu\*
- X-inaktivace je reverzibilní u zárodečných buněk
- Ženy často přenašečky chorob vázaných na X-chromozom (u heterozygotek je ten nemocný X-chromozom inaktivován), ale ve vajíčku se reaktivuje
- Muž má X vždy aktivní (zdravý nebo nemocný)

\* neplést s mosaicismem (mozaika), kdy existují dvě a více populací s rozdílným genotypem uvnitř jedince

## EPIGENETIKA - X-inactivation

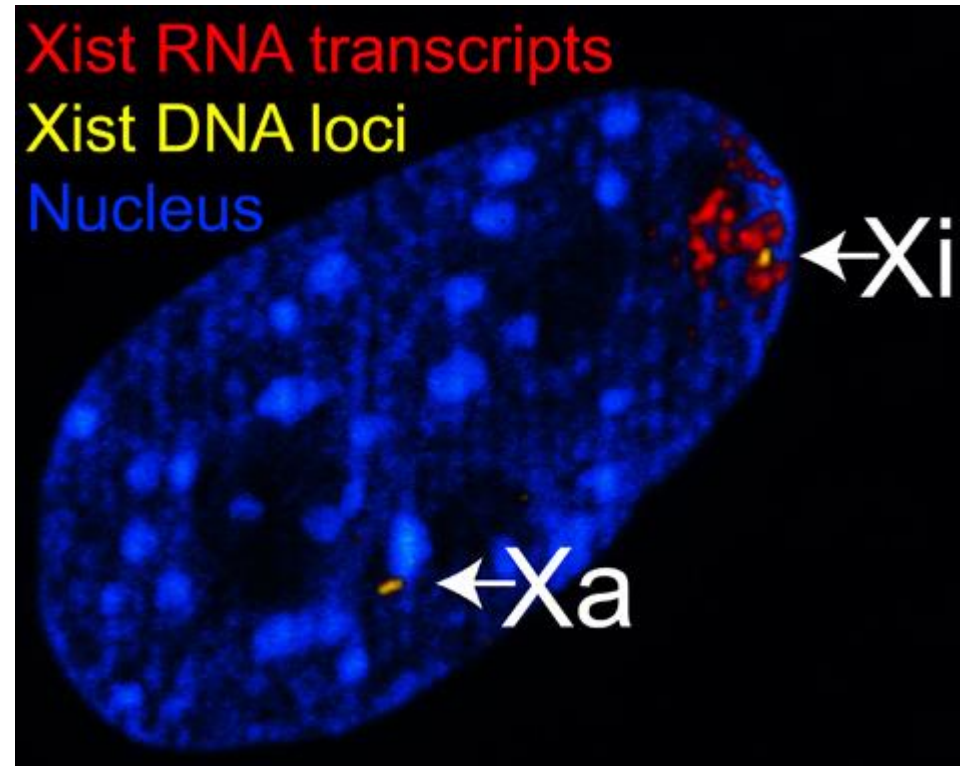
- každá ženská somatická buňka obsahuje aktivní (Xa) a inaktivní (Xi) chromozom
- Xi neexprimuje většinu genů - silencing je způsoben sbalením DNA do heterochromatinu

### **Xist** (*X-inactivation specific transcript*)

- hlavní gen zodpovědný za inaktivaci X-chromozomu je exprimován Xi chromozomem
- přepisuje se do nekódující RNA

### **Xi má na rozdíl od Xa:**

- vyšší hladiny methylace DNA
- nízké hladiny histonové acetylace
- nízkou 4-methylaci lyzinu na histonu H3 (H3K4)



# EPIGENETIKA A RAKOVINA

## Methylace DNA

- U nádorových buněk je pozorována **celková hypomethylace genomu**
- avšak 5-10% normálně nemetylovaných CpG ostrůvků **na promotorech** je v **rakovinných buňkách abnormálně methylováno**
- **hypermethylace na promotorech** ovlivňuje jak expresi proteinů tak nekodující regulační RNA
- důležité je prostorové rozložení DNA methylací:
  - methylace DNA na promotoru inhibuje transkripci
  - methylace DNA uvnitř genů transkripci tolik nevadí

## Modifikace histonů

- Aktivační a represivní modifikace se mohou vyskytovat na stejném histonu - BIVALENTNÍ DOMÉNY
- HISTONE CROSSTALK: kombinace aktivačních a represivních modifikací vede k různé míře aktivace nebo inhibice exprese



# EPIGENETIKA A RAKOVINA

## Léčba cílená na epigenetiku

Roku 1983 byly poprvé popsány změny v methylaci DNA, související s **rakovinou tlustého střeva\***

- pozorovány specifické vzorce v methylaci určitých genů
- srovnání s nezasazenou okolní tkání
- u 4 z 5 pacientů byla pozorována hypomethylace v rakovinných buňkách
- progresivní hypomethylace u metastazujících pacientů

- DNA hypo- a hypermethylace a změny v acetylaci histonů byly pozorovány u **rakoviny prostaty\*\***

- Ovlivnění velkého množství genů

Epigenetická regulace hraje důležitou roli i v dalších typech rakoviny: děložního čípku, leukemie...

\* *Feinberg and Vogelstein, Nature 1983*

\*\* *Li et al., J Natl Cancer Inst 2005*

# EPIGENETIKA A RAKOVINA

- Léčiva se zaměřují na reverzi epigenetických změn vedoucích ke vzniku rakoviny
- Nespecifické a s vedlejšími účinky
- Musí být cílená na daný typ rakoviny (např. nefunkční tumorsupresor, nebo hyperaktivní onkogen)

## 1. Inhibitory DNA methyltransferáz (Dnmt)

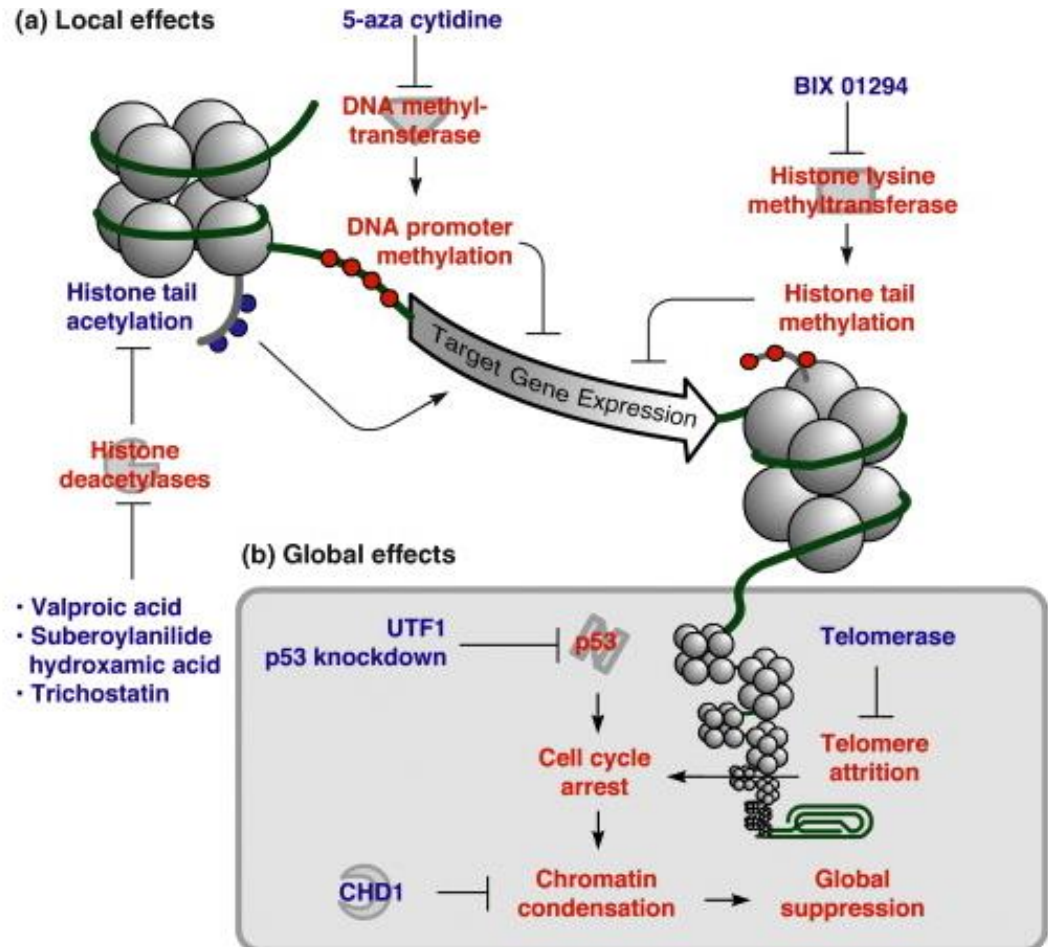
- hypometylační efekt
- **nastartování** transkripce tumorsupresorů
- azacitidine, decitabine

## 2. Inhibitory histon acetyltransferáz (HAT)

- **inhibice** transkripce onkogenů
- vorinostat, romidepsin

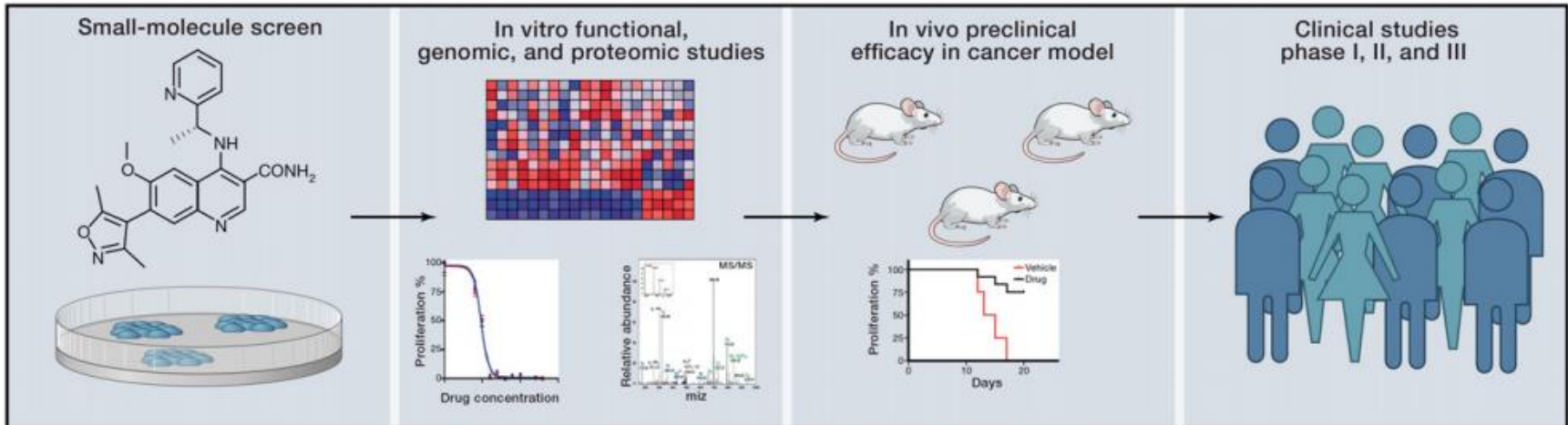
## 3. Inhibitory histon deacetyláz (HDAC)

- kyselina valproová, trichostatin
- **podpora** exprese genů spojených s apoptozou - zpomalení progresu rakoviny
- též indukce diferenciaci u nezralých buněk (např. při leukemiích)

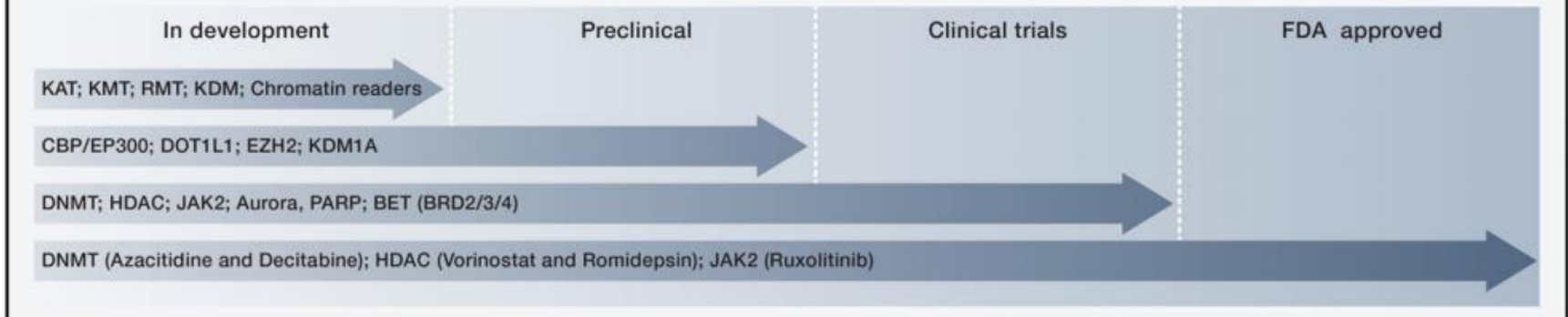


# Vývoj léčiv pro epigenetickou terapii

1. Kandidátní malé molekuly jsou nejprve testovány na rakovinných buňkách *in vitro* (inhibice proliferace, indukce apoptozy, cell-cycle arrest)
2. Zjištění potenciálních signálních drah, které jsou zodpovědné za daný pozorovaný efekt (např. expresní microarrays)
3. Účinné látky jsou testovány na zvířecích modelech s rakovinou (zjištění *in vivo* terapeutického účinku - survival, a dále toxicitu, vedlejší účinky a farmakokinetické vlastnosti dané látky)
4. Kandidátní molekuly jsou do klinických studií



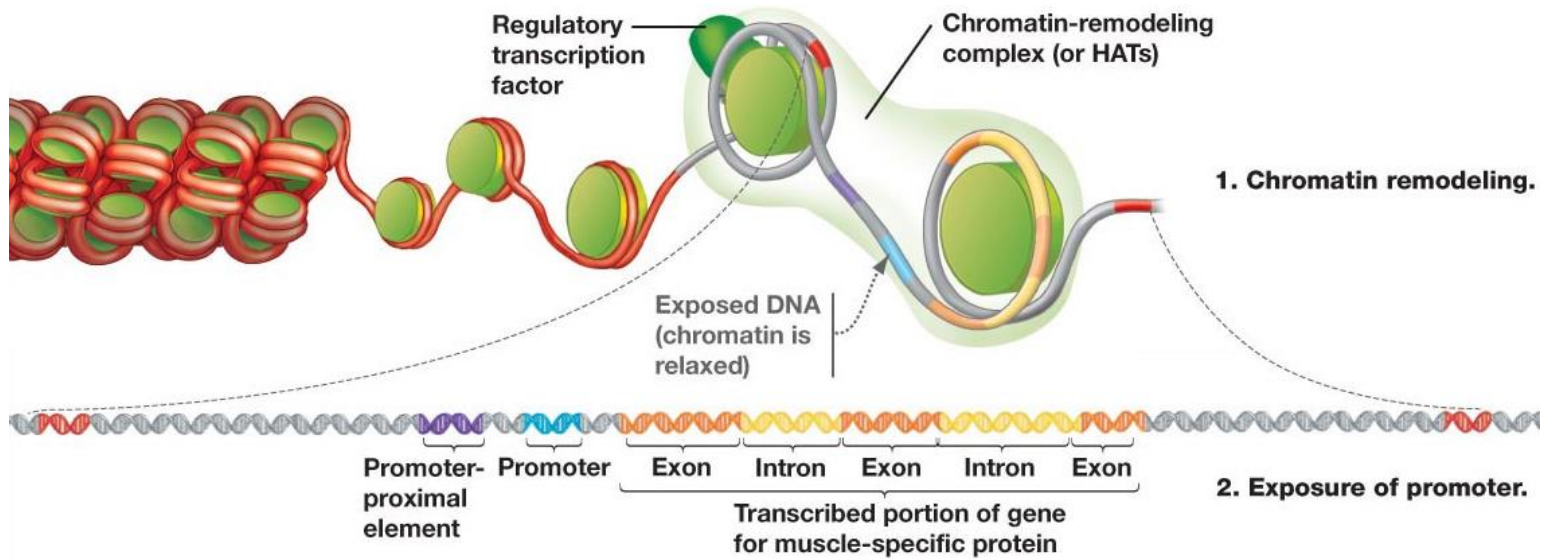
## Current States of Epigenetic Targets for Inhibitors



# Transkripční kontrola

*podobně jako u prokaryot se RNA-polymeráza (větš. II) váže na oblast promotoru*

## 1. remodelace chromatinu odhalí promotor



## Transkripční kontrola

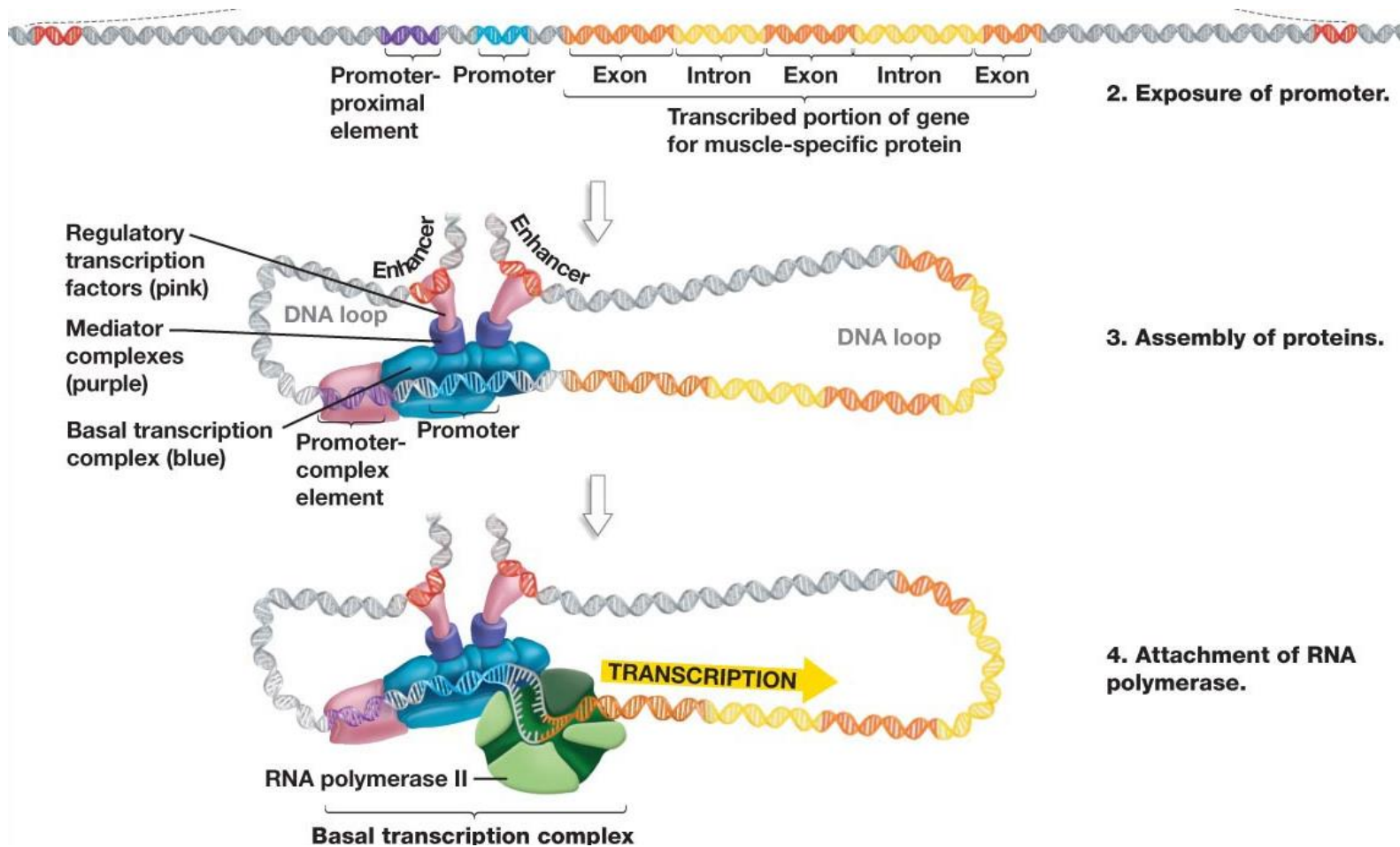
*podobně jako u prokaryot se RNA-polymeráza (větš. II) váže na oblast promotoru*

2. bazální TFs (modrá) se váží na promotor

3. regulační TFs (růžová) se vážou na enhancery (červená oblast), silencery nebo na promotor-proximální elementy (fialová oblast). DNA může tvořit vlásenku.

4. bazální a regulační TFs dohromady tvoří **INICIAČNÍ KOMPLEX**

5. RNA-polymeráza II se váže na promotor a je aktivována - **BAZÁLNÍ TRANSKRIPČNÍ KOMPLEX**



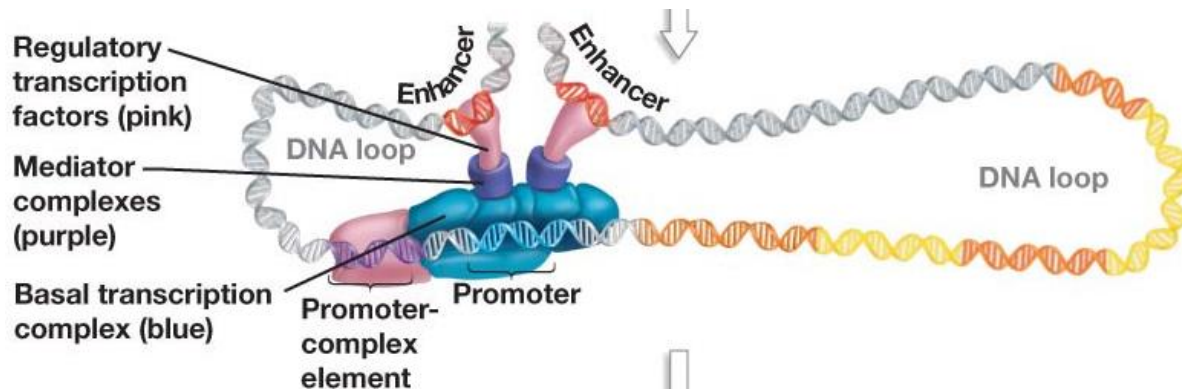
# Transkripční Faktory

## 1. Bazální a obecné transkripční Faktory (TFs)

- ve všech eukaryotických buňkách
- nezbytné pro transkripci, ale neposkytují žádnou regulaci
- Bazální: TFIIA, TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF
- Obecné: Oct1, CT1, SPF
- nejdůležitější je TFIID a jeho podjednotka TBP (TATA binding protein)
- interagují s promotorem
- TFIID je první protein, který se váže na DNA při zahájení transkripce (tvorbě iniciačního komplexu)

## 2. Regulační Transkripční Faktory (TFs)

- též zvané aktivátory iniciace transkripce
- jsou **hlavními regulačními mechanismy genové exprese u eukaryot**
- proteiny jež se vážou na
  - a) enhancery (zesilovače transkripce)
  - b) silencers
  - c) promoter-proximální elementy
- jsou specifické pro určité geny (nebo rodiny genů)



# Funkční klasifikace transkripčních faktorů

## 1. Konstitutivně aktivní

- Přítomné stále ve všech buňkách
- Bazální a obecné TFII A-H, Sp1, NF1...

## 2. Regulační

**a) Vývojové (buněčně specifické)** – exprese přísně kontrolována, ale jakmile dojde k aktivaci, nepotřebují další aktivaci – GATA, HNF, PIT-1, MyoD, Myf5, Hox, Winged Helix

**b) signal-dependentní** – vyžadují externí signalizaci pro aktivaci

1 extracelulárním ligandem (endokrinní nebo parakrinní) – vazba na DNA v jádře

2 intracelulárním ligandem (autokrinní) – např. p53 – vazba na DNA v jádře

3 závislé na membránovém receptoru – nutná signalizační kaskáda vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru (fosforylace)

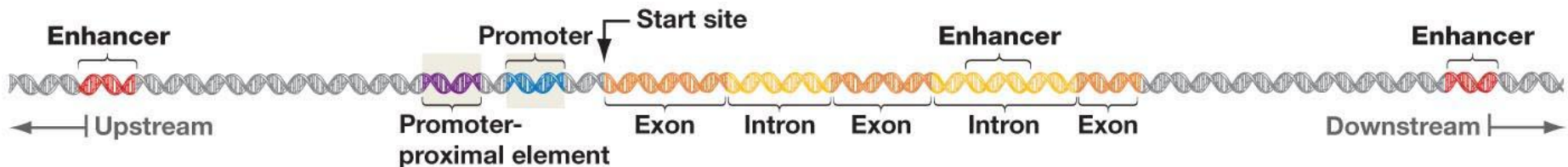
## Kontrolní elementy

### Promoter-proximální elementy

- vždy umístěny v blízkosti promotou
- na rozdíl od promotoru unikátní pro každý gen
- tyto oblasti na DNA umožňují vazbu specifických regulačních TFs
- díky PPE je eukaryotická buňka schopná rozlišovat mezi jednotlivými geny a regulovat expresi

### Enhancery a silencery

- zvyšují nebo snižují míru transkripce
- také genově specifické
- mohou sousedit s promotorem nebo se nacházet uvnitř transkripční jednotky
- často bývají umístěny daleko od promotoru (10-100 bazí), pak se tvoří DNA vlásenka
  - po směru transkripce (downstream)
  - proti směru transkripce (upstream)
- nefungují pokud se vzdálí miliony bazí od promotoru či na jiný chromozom





## Transkripční kontrola

Zapínání a vypínání určitých genů v určitých buňkách pravděpodobně regulováno unikátními kombinacemi:

1. vazebných míst na DNA (promotor, promoter-proximální elementy, silencers a enhancers)  
a
2. transkripčních faktorů

## Analogie s bankovní schránkou

- můj klíč - specifický pro určitou schránku, ale sám o sobě ji neotevře - **REGULAČNÍ FAKTOR**
- klíč bankéře - stejný pro všechny schránky, ale sám o sobě větš. nefunkční - **BAZÁLNÍ FAKTOR**

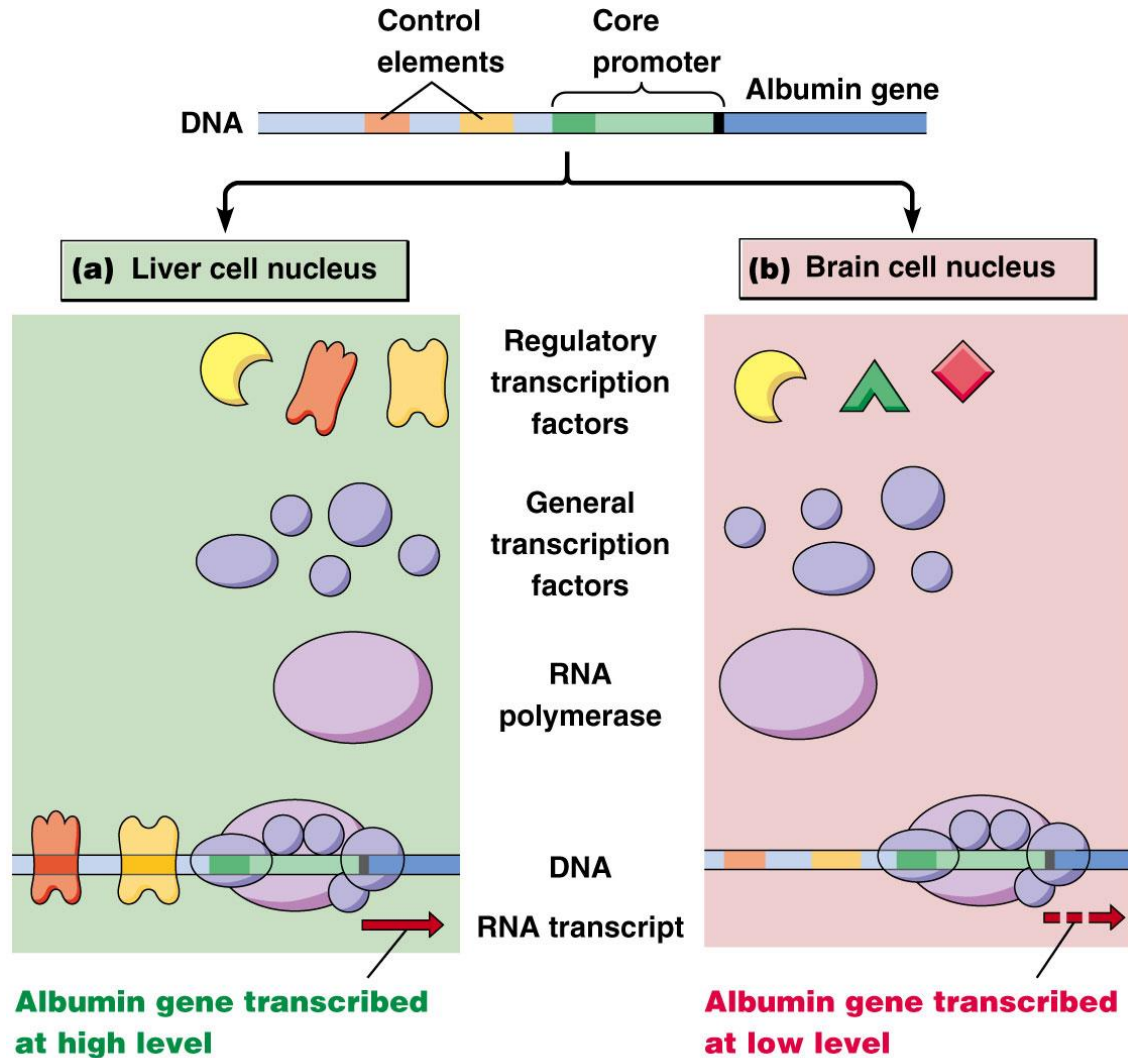


## Transkripce genu pro albumin\*

Všechny buňky obsahují RNA-polymerázu a **bazální (obecné) TFs**

Jaterní buňky obsahují **regulační TFs** rozpoznávající všechny kontrolní elementy pro albuminový gen (enhancery/silencery/promotor-proximální elementy)

Regulační TFs mozkových buněk nerozpoznávají všechny kontrolní elementy albuminového genu



© 2012 Pearson Education, Inc.

\* Albumin: protein krevní plazmy, tvoří 60 % všech plazmatických bílkovin. Důležitý při transportu látek krví (mastné kyseliny, minerály, léky). Syntetizován v játrech.

Extracelulární signál (hormon) spouští expresi genů specifických pro svalovou buňku

## EXTRACELLULAR SIGNALS TRIGGER CELL-SPECIFIC GENE EXPRESSION.

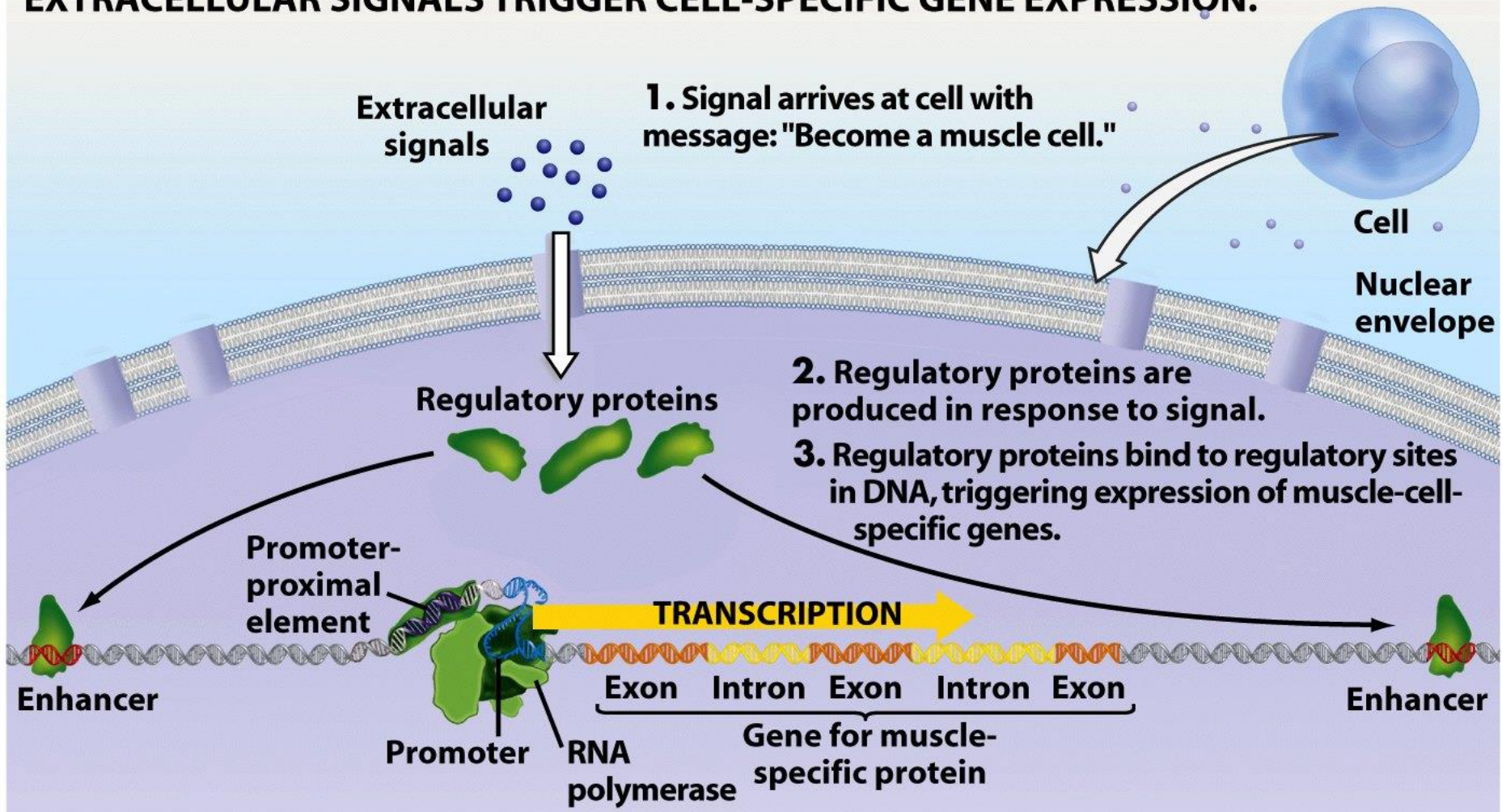


Figure 18-9 Biological Science, 2/e

# Jak se proteiny vážou k DNA?

- nejčastěji vazba  $\alpha$ -helixu s větším žlábkem DNA
- nekovalentní vazby: vodíkové můstky a iontové vazby

## Motivy vazby:

### a) Helix-turn-helix

- 2  $\alpha$ -helixy spojené krátkou otáčkou

### b) Zinkové prsty

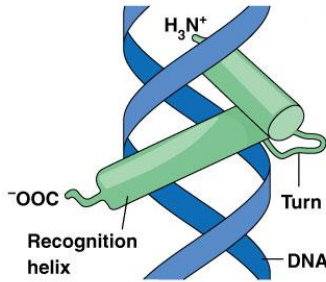
- 1  $\alpha$ -helix a 2 antiparalelní  $\beta$ -listy, vše spojené atomem zinku
- více jednotek (zinkových prstů)

### c) Leucinový zip

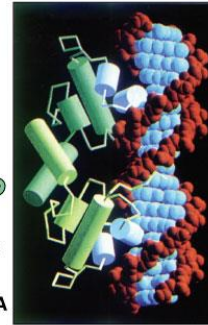
- 2  $\alpha$ -helixy se okolo sebe ovinují díky pravidelně uspořádaným leucinům

### d) Helix-loop-helix

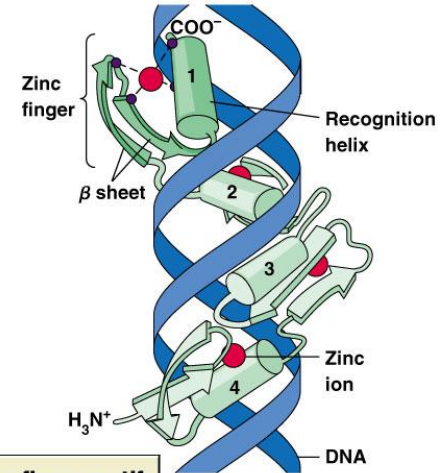
- kratší a delší  $\alpha$ -helix v dimeru



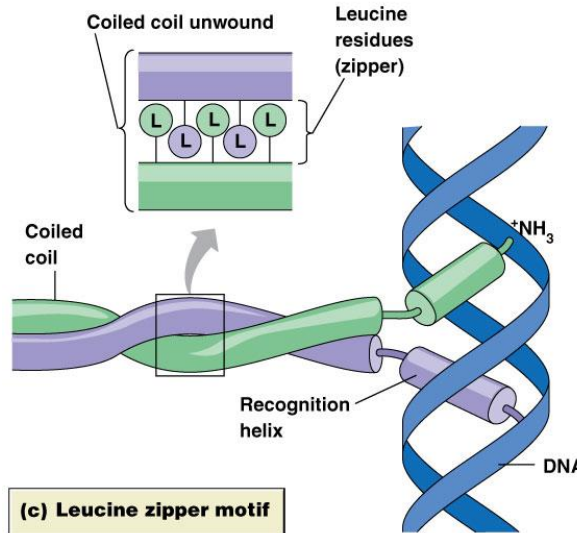
(a) Helix-turn-helix motif



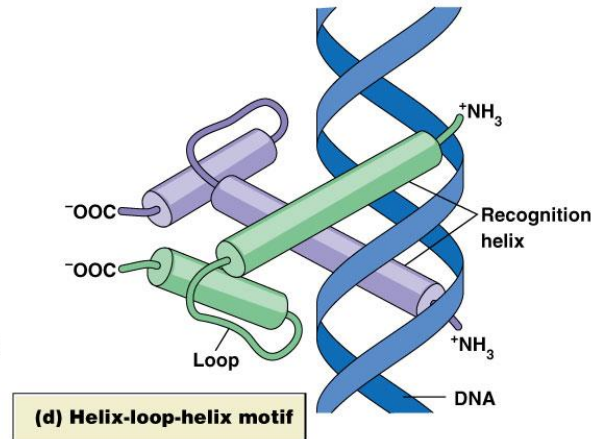
Phage  $\lambda$  repressor bound to DNA



(b) Zinc finger motif



(c) Leucine zipper motif



(d) Helix-loop-helix motif

SUMMARY TABLE 18.1 **Regulating Gene Expression in Bacteria and Eukaryotes**

Level of Regulation	Bacteria	Eukaryotes
<b>Chromatin remodeling</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited packaging of DNA</li> <li>• Remodeling not a major issue in regulating gene expression.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extensive packaging of DNA</li> <li>• Chromatin must be opened for transcription to begin.</li> </ul>
<b>Transcription</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to the promoter</li> <li>• Sigma interacts with promoter.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to and far from promoter</li> <li>• Large basal transcription complex interacts with promoter.</li> <li>• Mediator complex required.</li> </ul>
<b>RNA processing</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• None documented</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extensive processing: alternative splicing of introns addition of 5' cap and 3' tail</li> </ul>
<b>mRNA stability</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Some RNA interference documented</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• For many genes, RNA interference limits life span or translation rate.</li> </ul>
<b>Translation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulatory proteins bind to mRNAs and/or ribosome and affect translation rate.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulatory proteins bind to mRNAs and/or ribosome and affect translation rate.</li> </ul>
<b>Post-translational modification</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Folding by chaperone proteins</li> <li>• Chemical modification (e.g., phosphorylation) may change activity.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Folding by chaperone proteins</li> <li>• Chemical modification (glycosylation, phosphorylation)</li> <li>• Ubiquitination targets proteins for destruction by proteasome.</li> </ul>