

# Regulace exprese lidského genomu

*Úvod (tok genetické informace, skladba lidského genomu, velikost - porovnání s jinými organismy, úrovně regulace)*

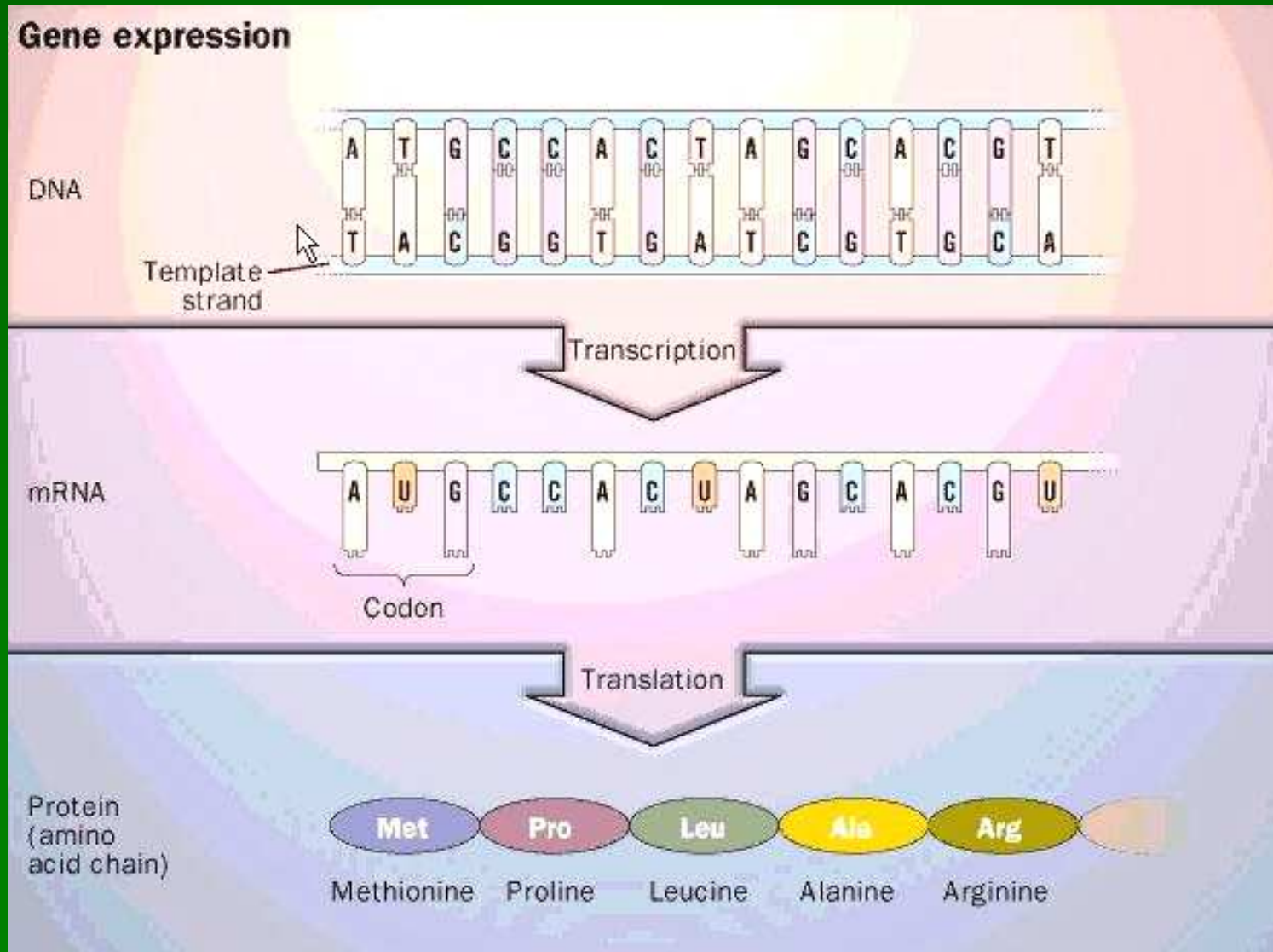
*Porovnání regulace transkripce u pro- a eukaryot*

*Regulace transkripce na úrovni genetického kódu*

*Regulace na úrovni chromatinu a jádra*

*Úroveň sestřihu, translace, degradace RNA a proteinu*

# Genetický kód a tok genetické informace



# Skladba lidského genomu

*Mitochondriální (MCH) genom (Anderson 1981) 14.5 kb, 0.5% celého genomu, dědí se výhradně od matky, při dělení buňky MCH DNA segreguje náhodně, 37 genů – syntéza na MCH ribosomech (vlastní rRNA a tRNA); MCH genom je kompaktní - kódující*

## *Jaderný genom*

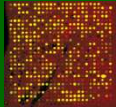
*24 různých molekul, 22 autosomů, 2 pohlavní chr., velikost 50-250 Mb, 25 000 genů*

*70% tvoří sekvence mající určitý vztah ke kódující DNA (včetně intronů a regulačních oblastí)*

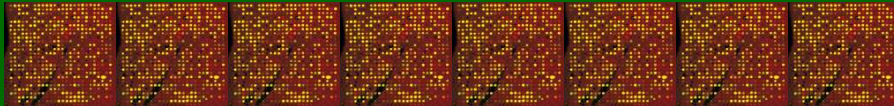
*10% tvoří repetice (např. Alu sekvence)*

*10% tvoří transpozony*

# Počty genů u různých organismů



*Mycoplasma* (600)

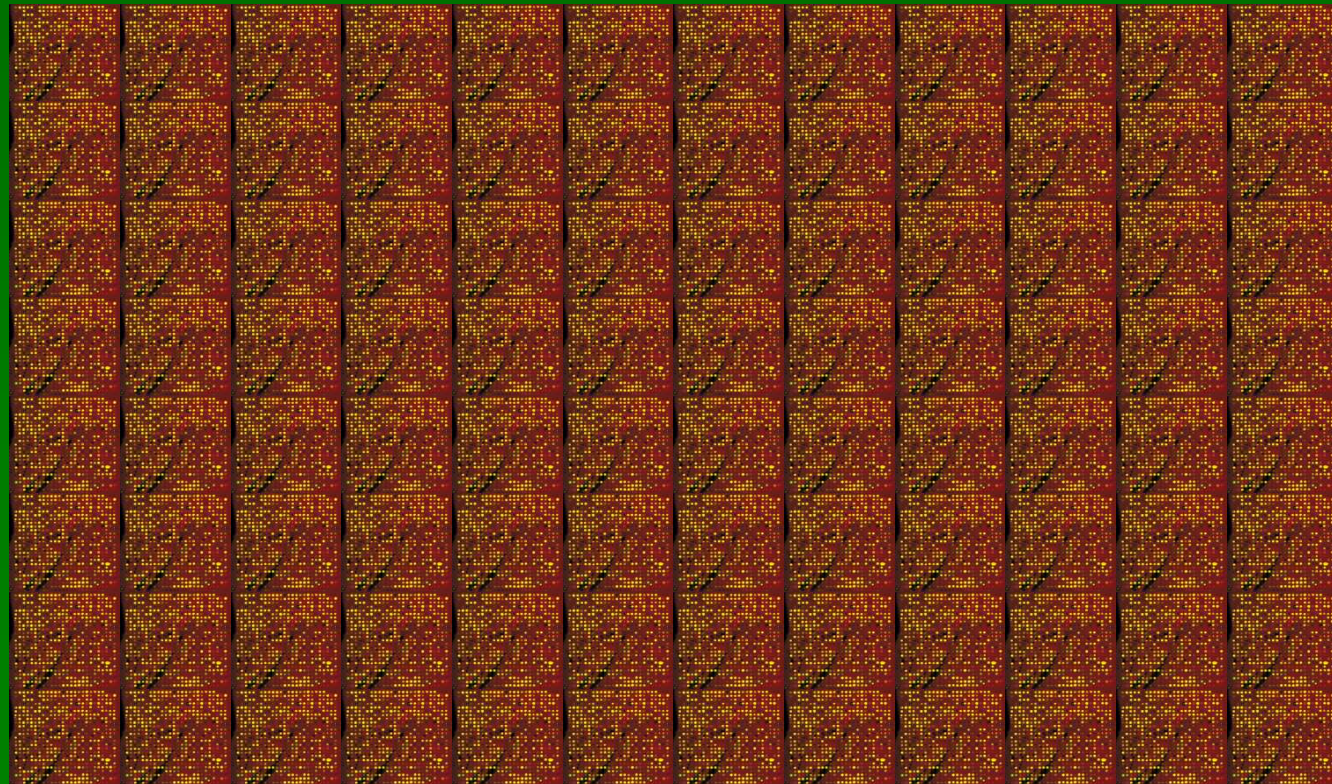


*Escherichia coli* (4000)

*člověk*

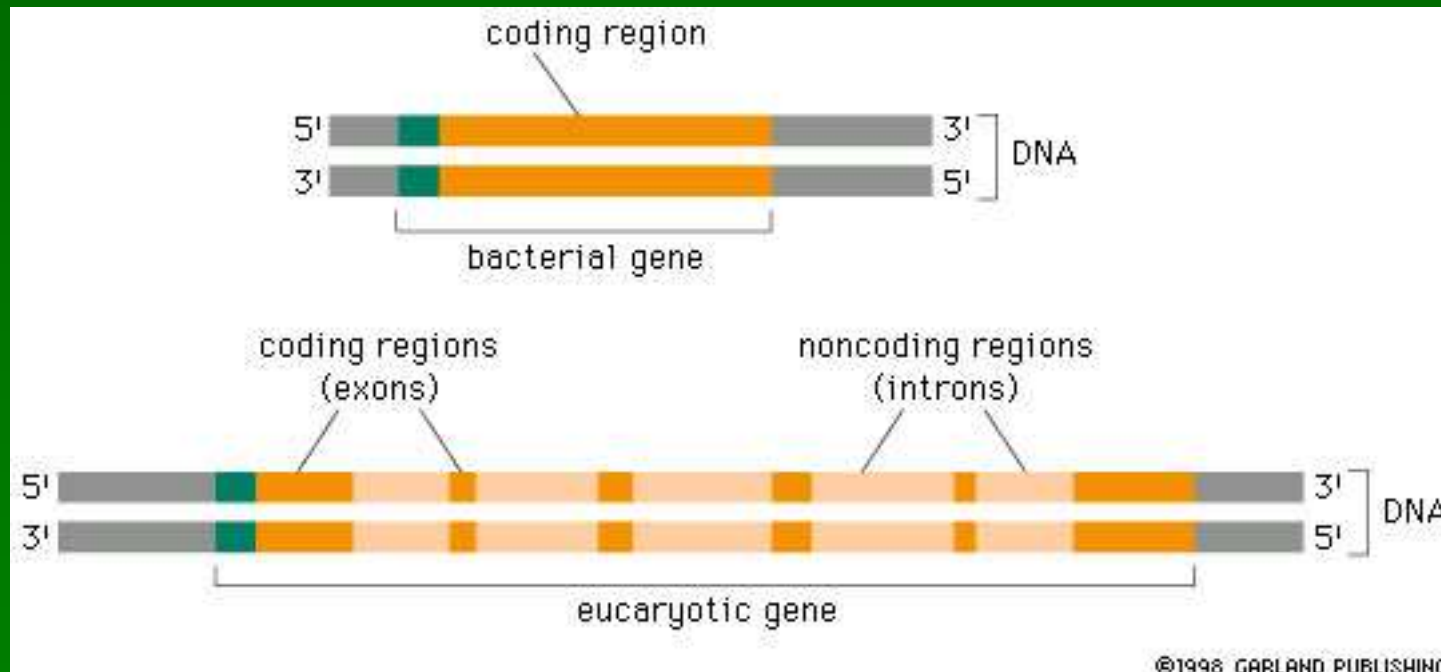
+ vyšší  
*organismy*

(25 000)



# Skladba genů u pro- a eukaryot

*Genom eukaryot obsahuje mezi kodujícími sekvencemi řadu nekódujících oblastí - intronů*



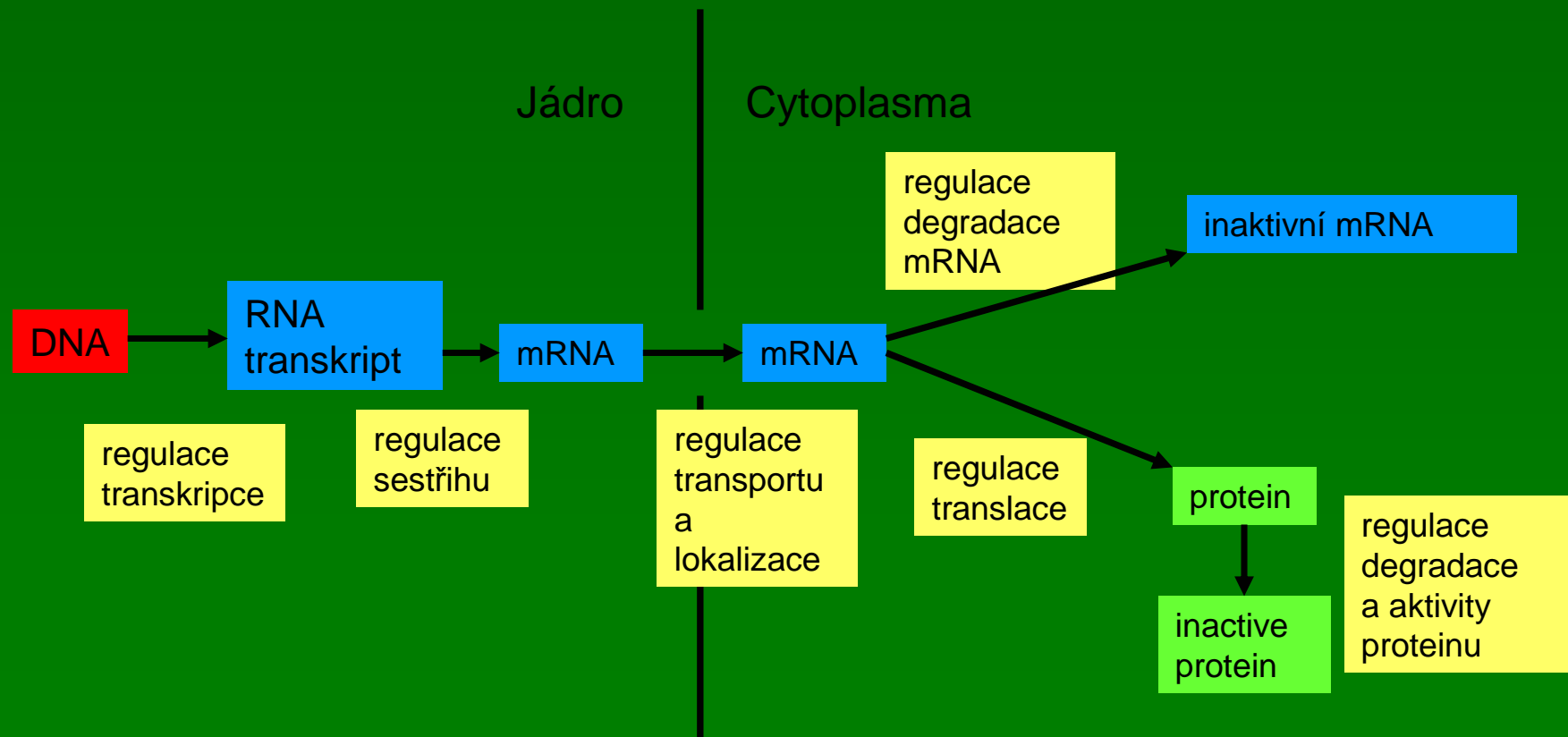
**Geny** : prům. velikost 10-15 kb ale variabilní od stovek bp- Mb (tRNA – Dys); exony činí od 100% až po 0.6% (Dys)

**Introny** jsou velmi variabilní: 0-118 na gen (u colagenu); délka 0.5 kb pro  $\beta$ -globin až po 30 kb pro dystrofin

# Rozdíly v regulaci u pro- a eukaryot

- Exprese u prokaryot je typicky regulována v rámci **operonu** – souboru kontrolních sekvencí v bezprostřední blízkosti protein-kódující sekvence
- **Eukaryotické geny** jsou rovněž **regulovány souborem kontrolních sekvencí**, které se nacházejí poblíž protein-kódující sekvence, ale operony zde neexistují.
- V eukaryotických buňkách je **jádro** – regulace je komplexnější (transkripce a translace jsou odděleny).
- **Introny** se u bakterií téměř nevyskytují a regulace sestřihem se uplatňuje pouze u eukaryot
- Existuje **krátkodobá a dlouhodobá regulace** transkripce.

# Možnosti regulace exprese u eukaryot



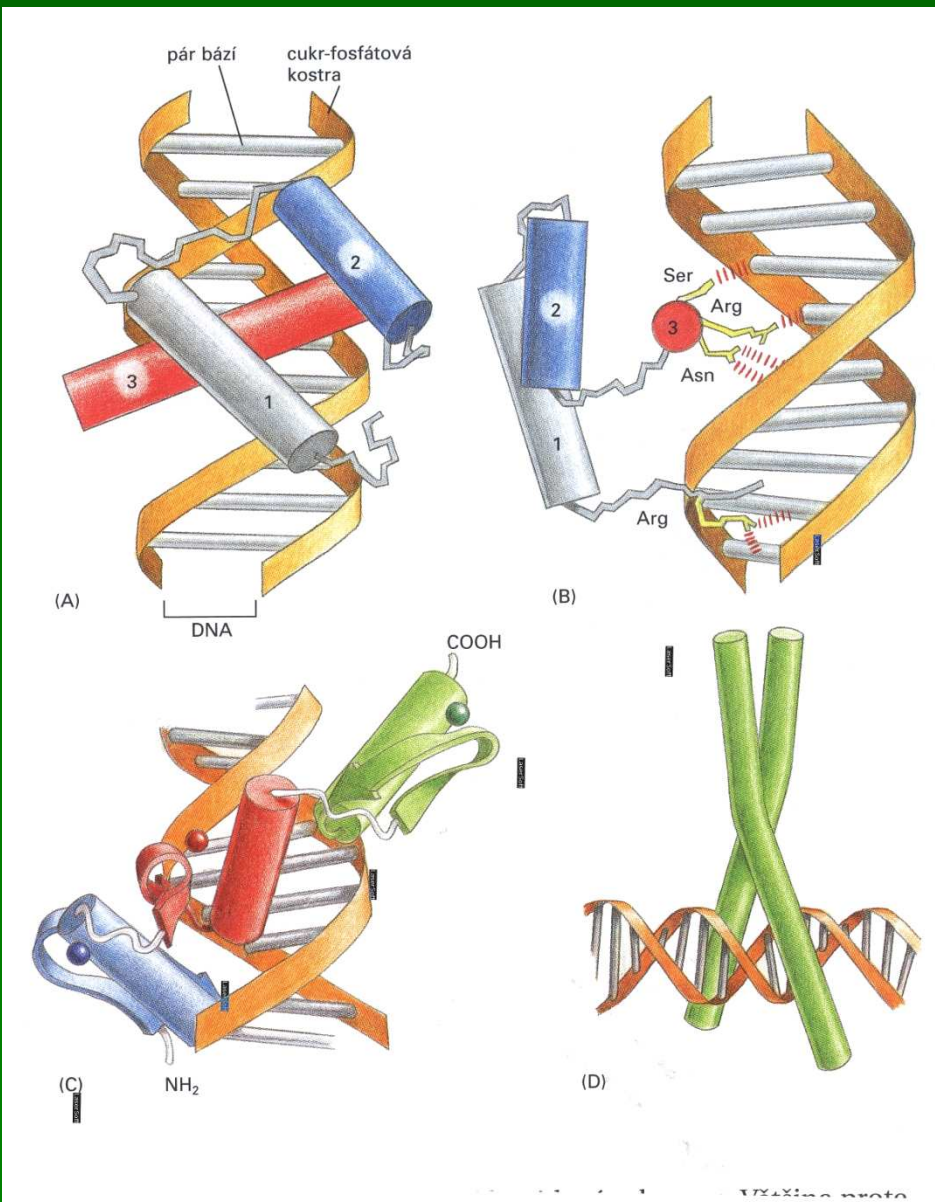
# Regulace transkripce u eukaryot

*Regulace krátkodobá* exprese se mění rychle jako reakce na potřeby buňky nebo na vnější faktory

*Regulace dlouhodobá* geny důležité z hlediska vývoje nebo diferenciac



# Základem regulace je vazba proteinů na DNA

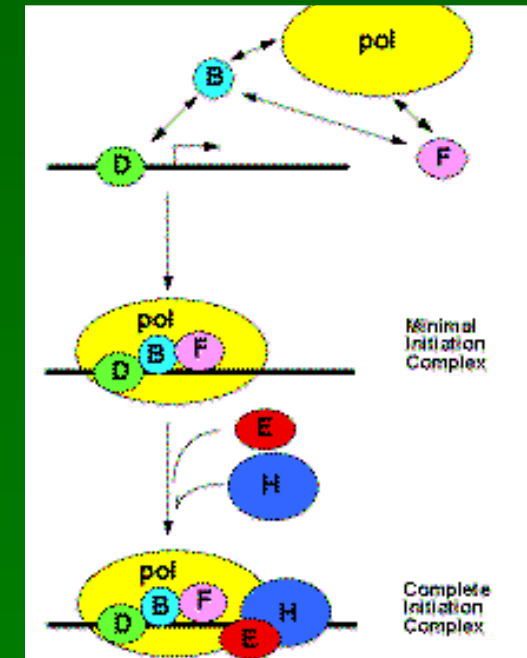
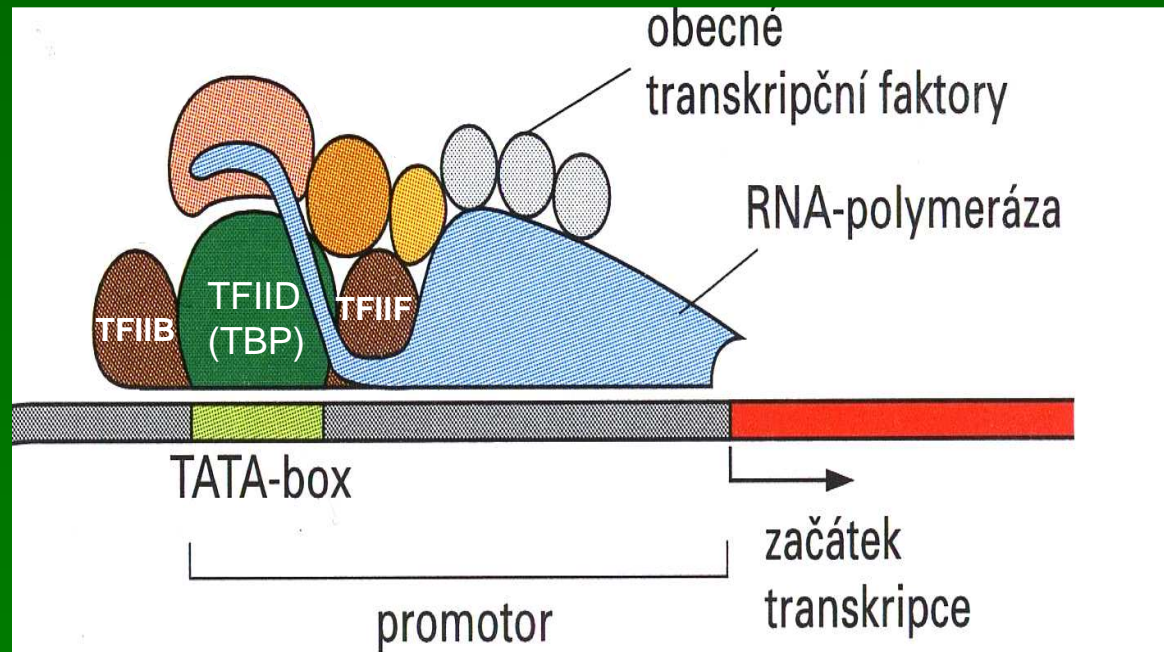


Vazba se uskutečňuje prostřednictvím interakce proteinu s DNA. Jsou známy různé strukturní motivy proteinů, které specificky vážou na DNA

- Homeodoména
- Motiv zinkového palce
- Leucinový zip

# Promotor a transkripční komplex

## Regulace na úrovni prvotního kódu DNA - promotoru

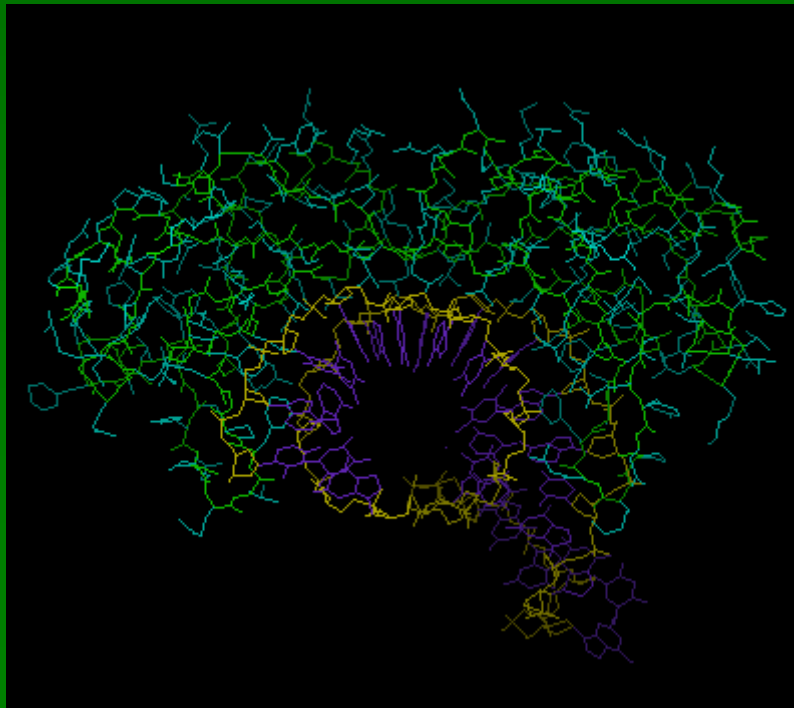


- **Promotor** se nachází **před** počátkem transkripce
- Některé promotory určují **kde** začne transkripce (např. TATA), jiné toto místo neurčují
- **Specifické TF** se vážou na specifické promotory
- Gen může mít **jeden nebo více** promotorů

# Transkripční komplex

## *Regulace na úrovni prvotního kódu DNA*

*D – TFIID je multi-komponentní faktor, který rozpozná a váže se k promotoru DNA. Obsahuje TBP (TATA binding protein), který se váže k TATA sekvenci. Vazba TFIID k DNA je prvním krokem při iniciaci transkripce*

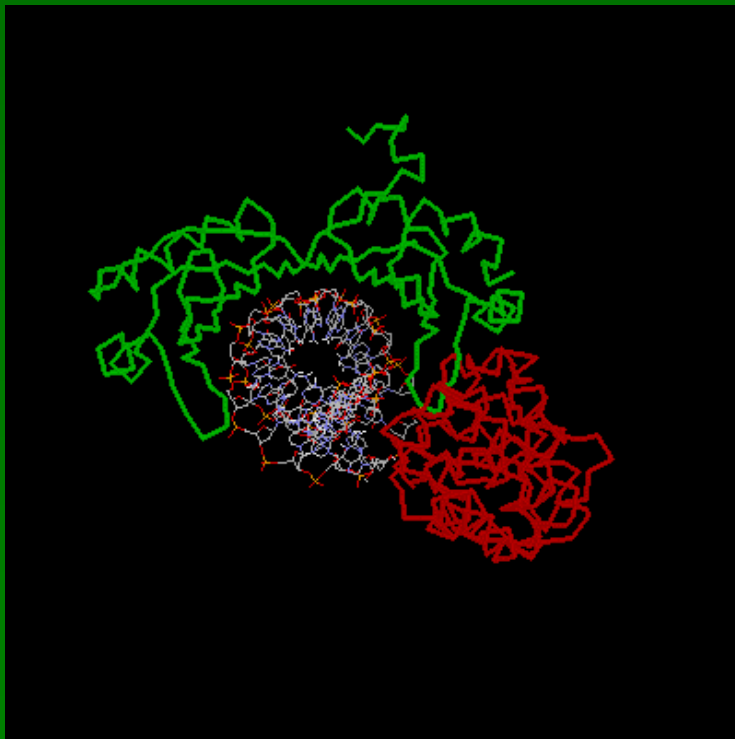


*TBP protein navázaný k DNA*

# Transkripční komplex

*Regulace na úrovni prvotního kódu DNA*

*B – TFIIIB – váže se k TBP a k RNA polymeráze II  
stabilizuje vazbu TBP k TATA elementu, nutný pro  
asociaci RNA polymerázy II k iniciačnímu komplexu*



*Struktura TFIIIB proteinu  
navázaného k TBP-TATA  
komplexu*

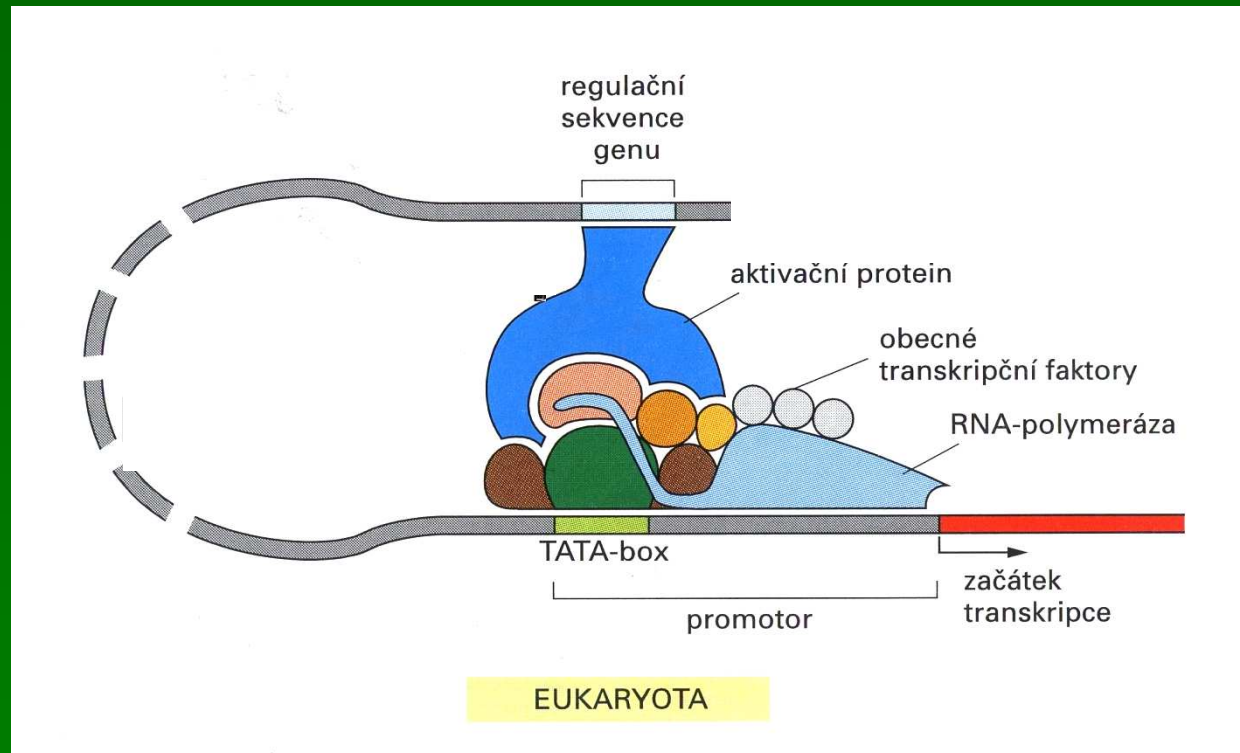
# Transkripční komplex

## *Regulace na úrovni prvotního kódu DNA*

*TFIIF má dvě podjednotky a váže se k RNA polymerase II – je potřebný pro stabilní vazbu polymerázy k promotorovému komplexu*

*TFIIH má 6 nebo více podjednotek, váže se k DNA prostřednictvím **TFIIE** a umožňuje polymeráze opustit promotor (přejít do elongačního režimu)*

# Enhancery a aktivátory transkripce



*Některé proteiny mohou mít dvě nebo více úrovní exprese, přičemž vyšší úroveň zajišťují aktivační proteiny, které mají dvě domény – vazebnou k DNA a aktivační. Vazebná sekvence se může nacházet daleko od regulovaného genu*

# Enhancery

*Enhancery jsou krátké sekvence regulující transkripci na větší vzdálenost*

- mohou se nacházet před i za místem transkripce*
- aktivační proteiny mají doménu pomocí níž se vážou specificky na enhancer a doménu aktivační*
- DNA může vytvářet smyčky, které umožní interakci aktivačního proteinu s transkripčním komplexem*
- interakce regulačních proteinů určuje zda bude transkripce aktivována (může být také utlumena)*

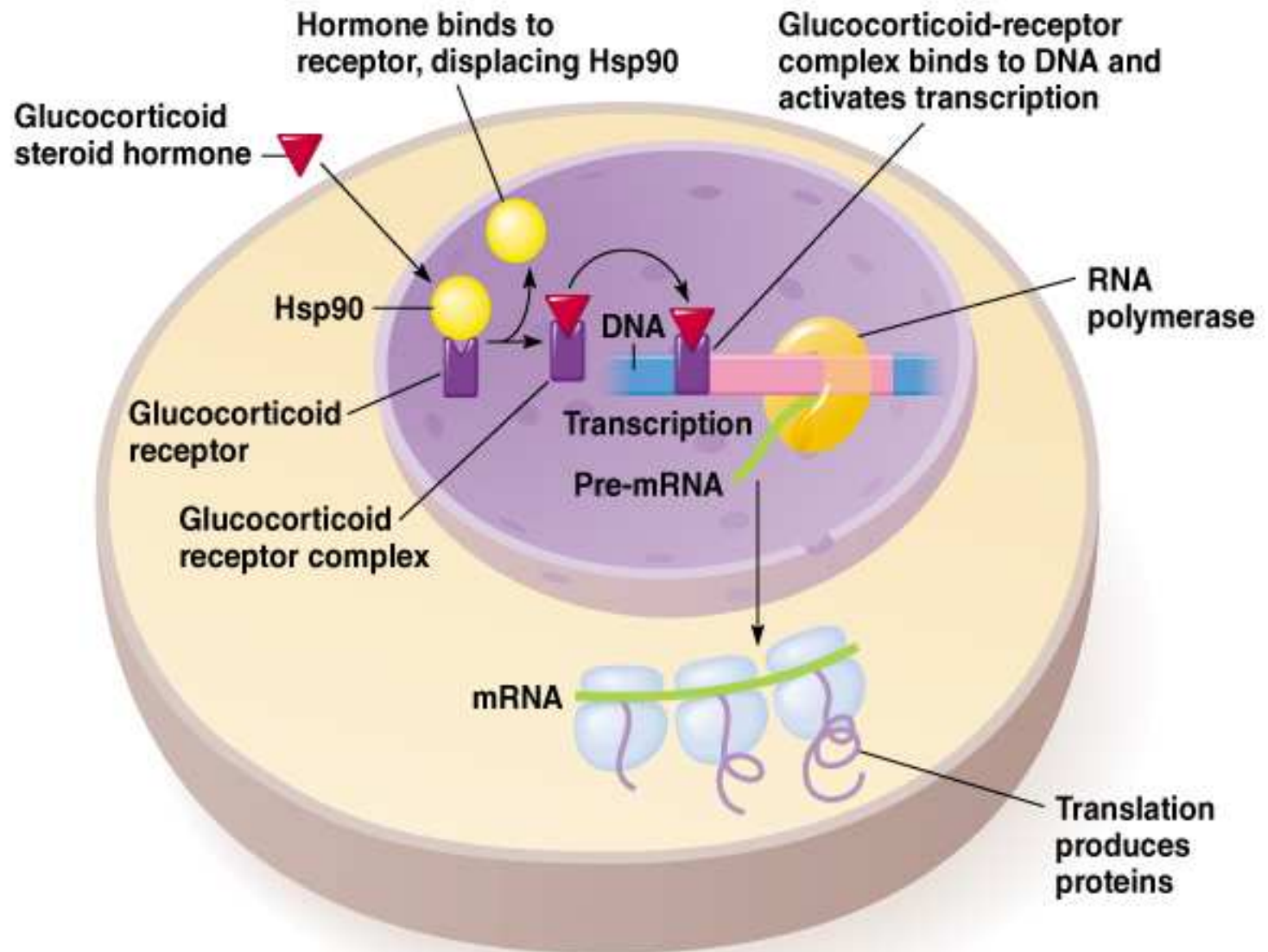
## Enhancers - příklad

*Příkladem jednoduché regulace u eukaryot je regulace steroidními hormony kdy jeden typ buněk organismu indukuje transkripci u jiných buněk*

- *geny regulované steroidními hormony mají enhancers HRE – hormone response elements*
- *HRE se nacházejí v mnoha kopiích*
- *při absenci hormonu je jaderný receptor vázán na chaperon*
- *přítomností hormonu se odstraní chaperon, změněný receptor se váže na enhancer*



# Enhancery - příklad



# Epigenetická regulace exprese

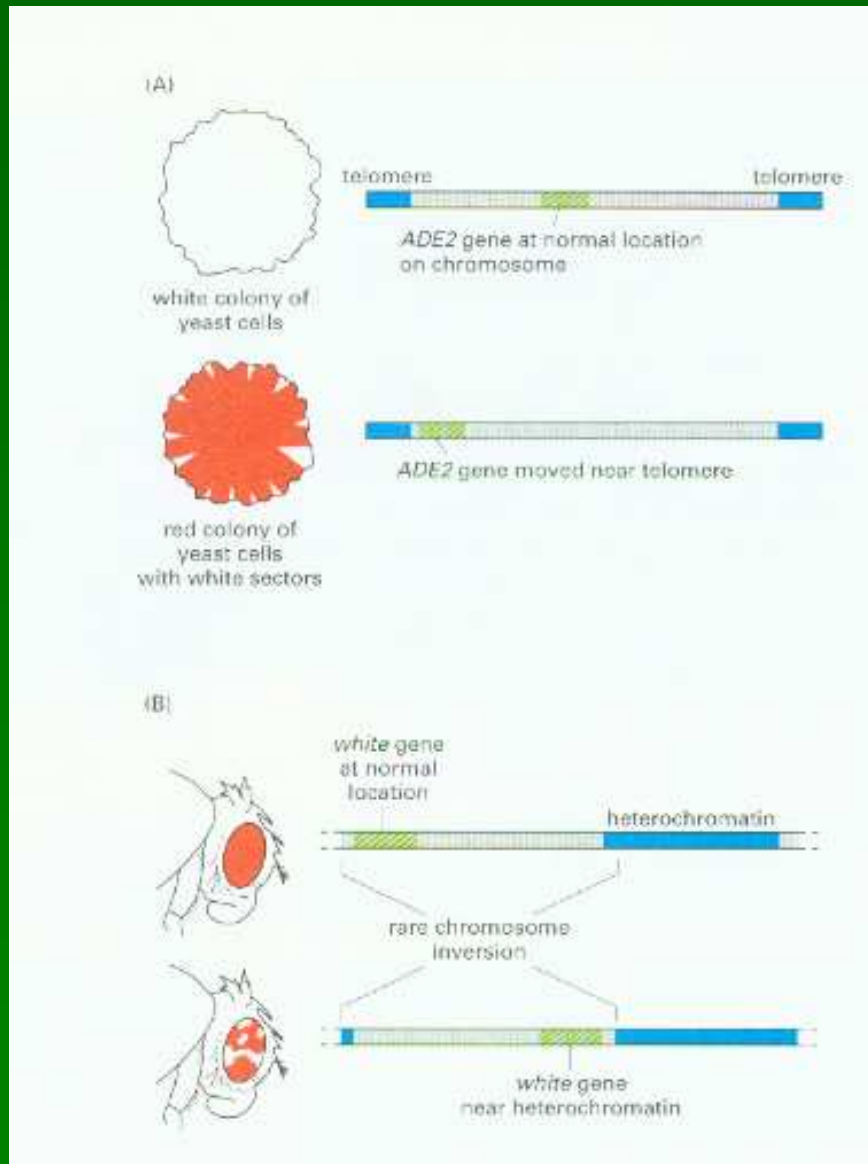
Epigenetika zahrnuje jevy související s dědičnou modifikací struktury a transkripce chromatinu jež navazuje zejména na:

- modifikace histonů
- metylaci DNA

**Patří** zde PEV, umlčování genů heterochromatinem, regulace vývoje a diferenciací Polycomb and trithorax proteiny, imprinting a další jevy.

**Nepatří** zde vliv vnějších faktorů na expresi buněk.

# „Position effect“ u kvasinek a Drosophily



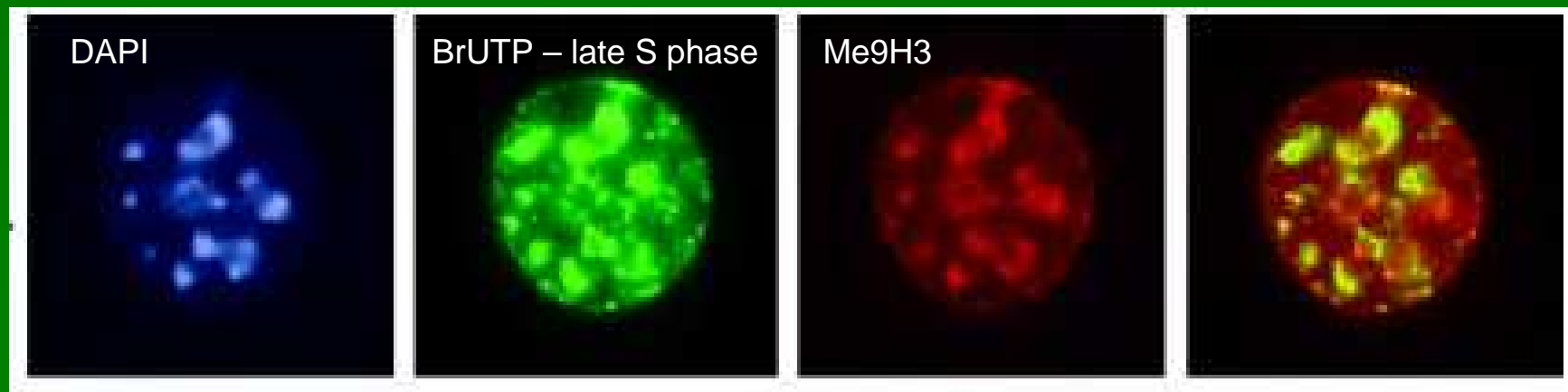
Po ozáření se u *Drosophily* objevila mutace při níž se červené facety očí změnily zčásti na bílé. Cytogenetická analýza ukázala, že došlo k inverzi chromosomu, kdy se gen označený jako „white“ přesunul do blízkosti heterochromatinu.

Jev bylo možno potlačit nebo naopak zesílit. Časem bylo nalezeno 50 genů modifikujících tento fenomén.

Nejlépe charakterizovaným modifikátorem je **HP1 protein**. HP1 obsahuje evolučně stálou chromo doménu, která se vyskytuje také u vývojového regulátoru **Polycomb (PC)** proteinu. Dalším je pak **SUV39H1**, který zajišťuje metylaci H3-K9. Opačný efekt mají tzv. **trithorax** proteiny.

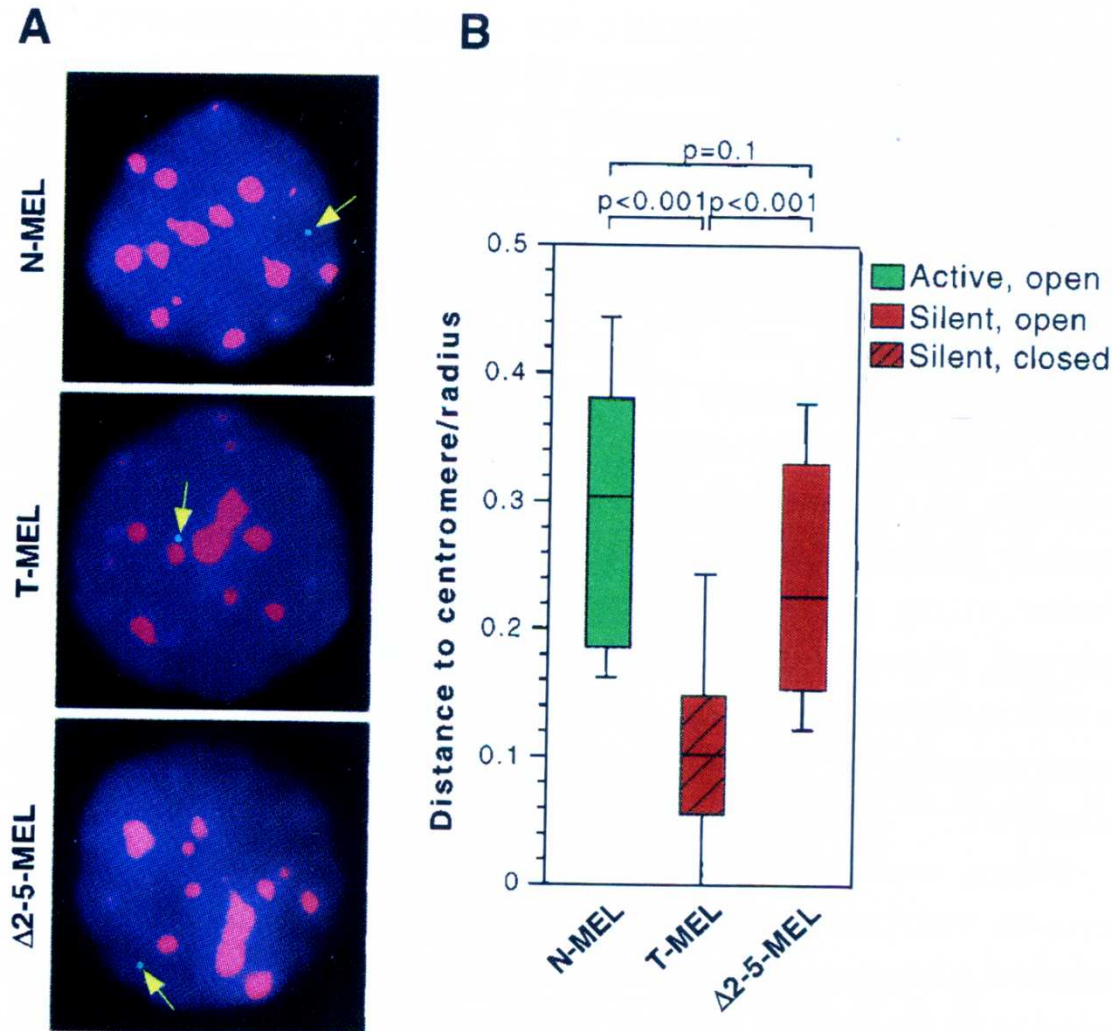
# Úloha heterochromatinu při řízení exprese

- Heterochromatin** - tmavě zbarvená část chromatinu,
- kondensovaná po dobu buněčného cyklu
  - nachází se hlavně v centromerických a telomerických oblastech
  - je genově chudý,
  - obsahuje repetitivní sekvence
  - nachází se většinou na okraji jádra
  - DNA v heterochromatinu je špatně přístupná pro transkripční faktory,
  - histony jsou málo acetylovány a hodně metylovány na H3-K9
  - obsahuje HP1 protein vázaný na metylovaný H3-K9



# Úloha heterochromatinu při řízení exprese

Dvoustupňová regulace exprese (Francastel et al., 1999)



Měřena vzdálenost genu od nejbližší oblasti heterochromatinu pro 3 typy buně

T-MEL – exprese umlčená gen je blízko heterochromatinu

Struktura se může otevřít - dole a k expresi ještě nemusí dojít

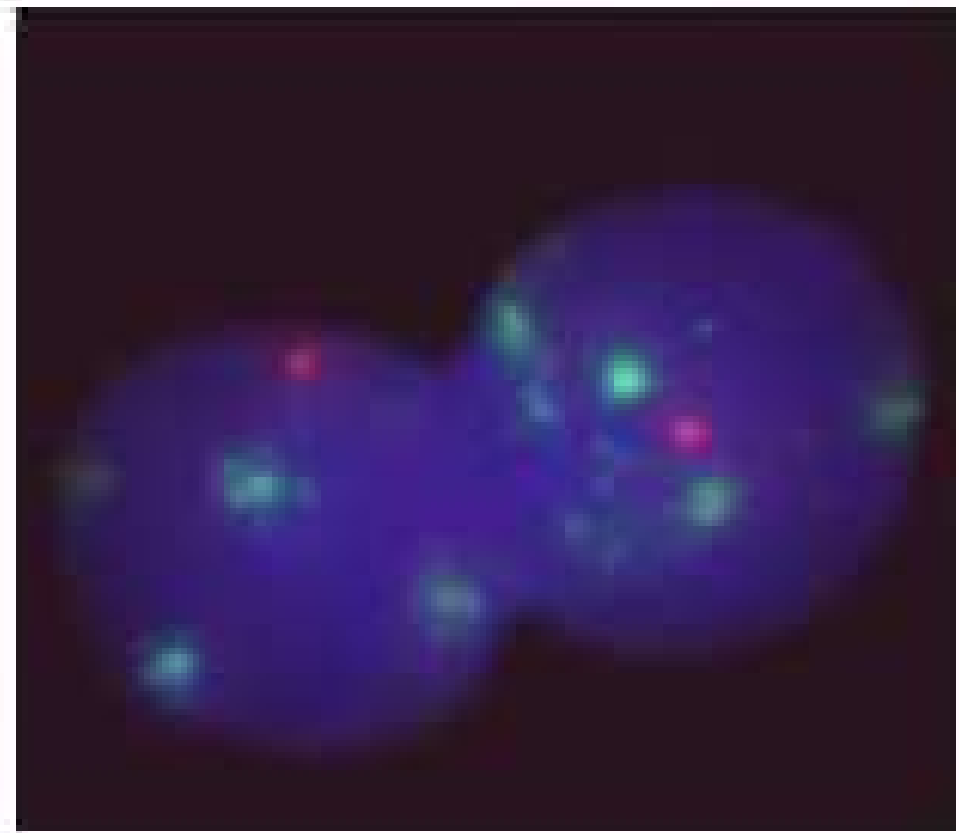
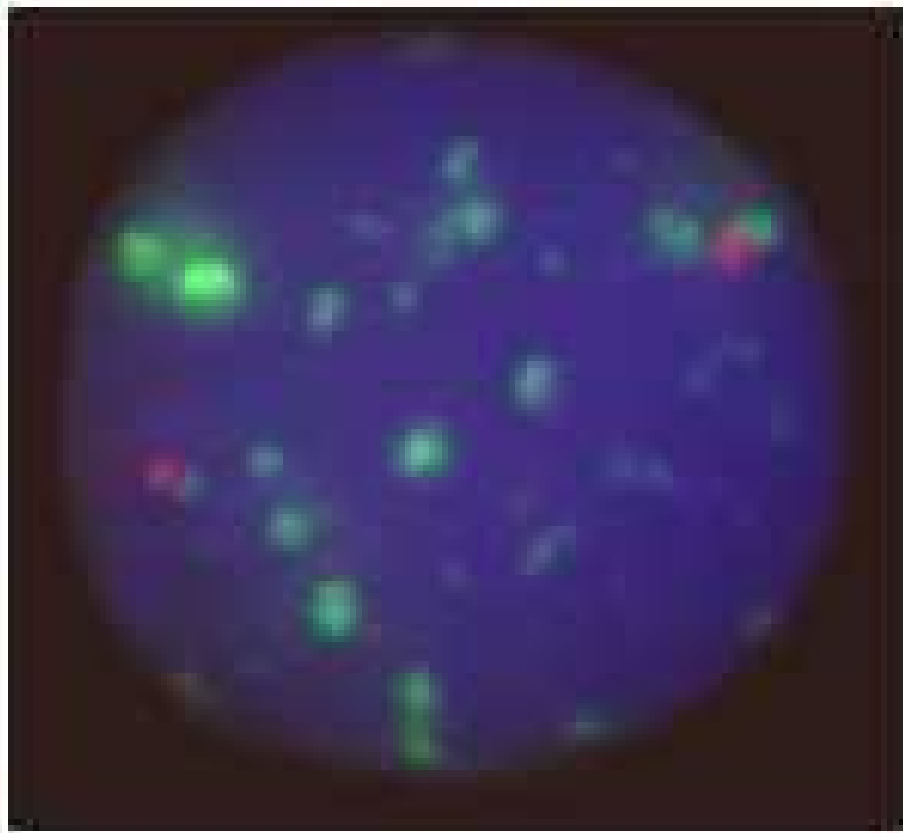
N-MEL – struktura je otevřená, gen je aktivní

# Úloha heterochromatinu při řízení exprese

Vzdálenost Rb genů k chromocentřům (Bártová et al)

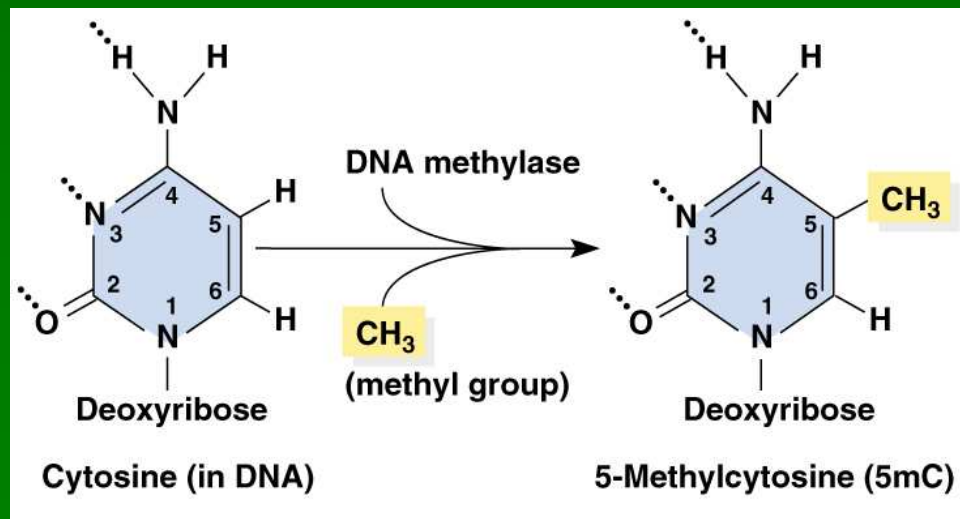
Buňky HL-60

Granulocyty



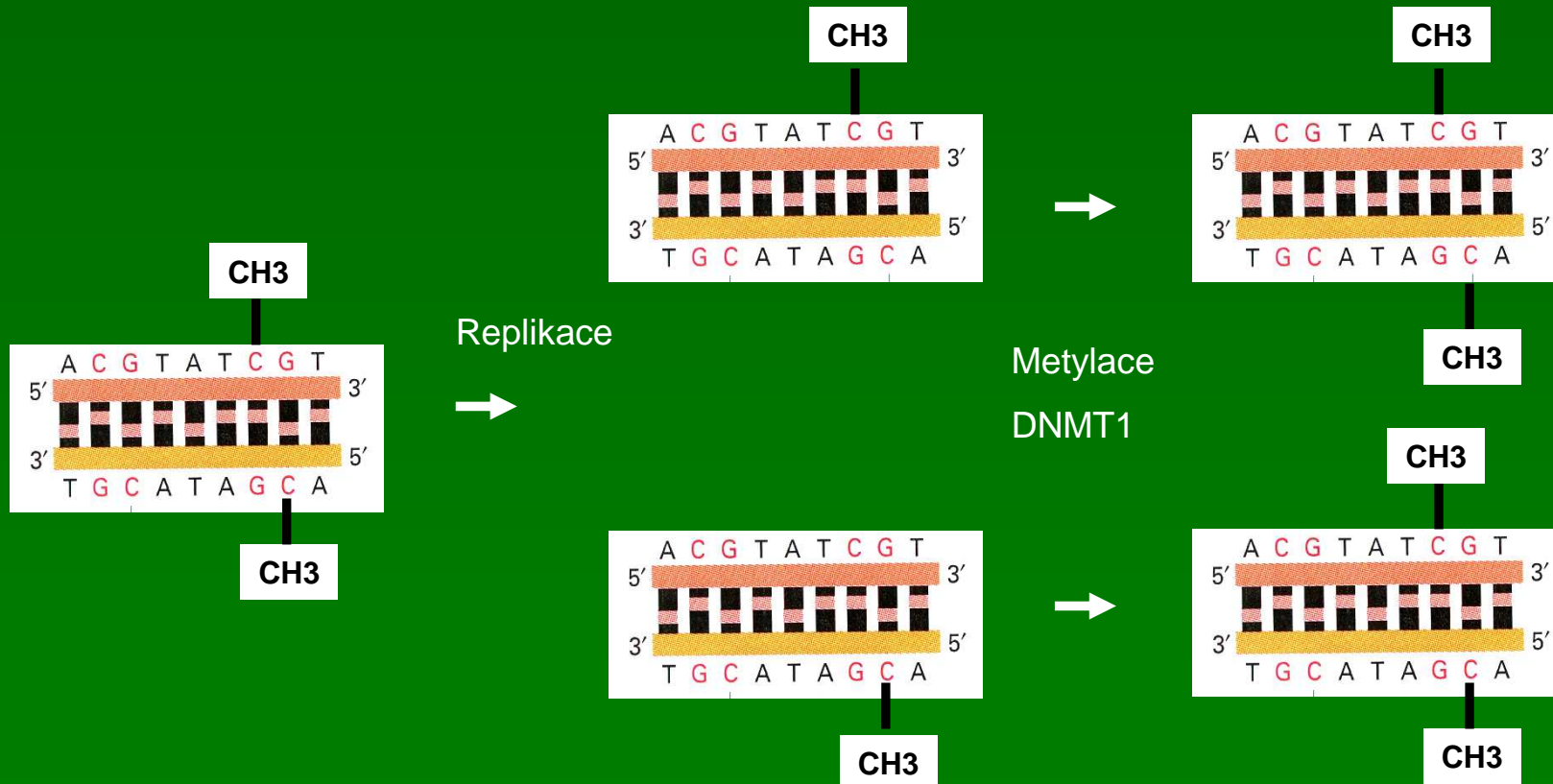
# Metylace DNA

- Existují enzymy metylující **de novo** (DNMT3a a DNMT3b)
- Existují enzymy, které **metylují druhý řetězec** DNA podle prvního („maintenance methylaes“) – ty jsou odpovědné za **dědičnost metylace**
- Existuje **demetyláza**, která odstraní metylaci z DNA.
- Metylace DNA nastává nejčastěji v **symetrických CG sekvencích** (CpG islands), které se nacházejí u poloviny lidských genů



transfer metylové skupiny  
S-adenosylmethioninu na 5-tou pozici  
cytosinu

# Zachování metylace při replikaci „udržovací metylázou“





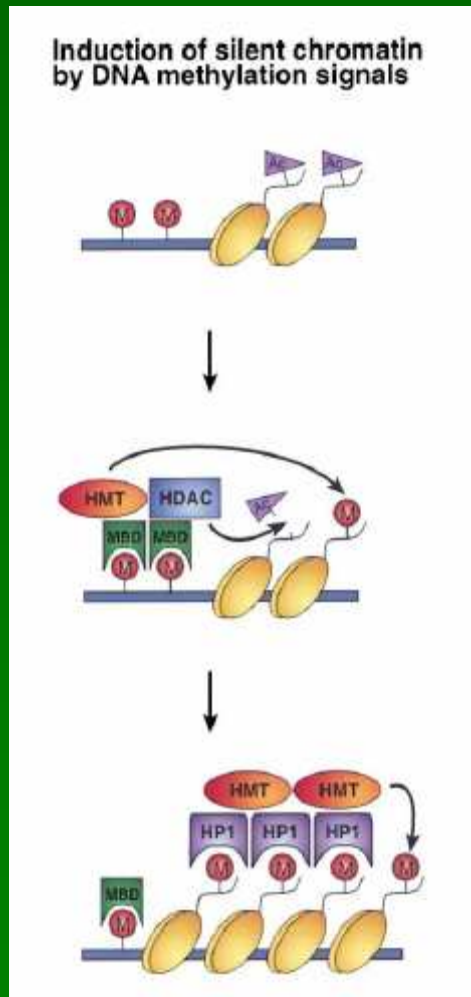
## Metylace DNA je důležitá

- Methylace DNA se nachází hojně u **zhoubných nádorů** (jak u onkogenů tak i u tumor supresorových genů)
- Poškození metyláz (mutací) vede k **těžkým onemocněním** (bez methyltransferáz se embryo nevyvine)

# Úloha metylace při řízení transkripce

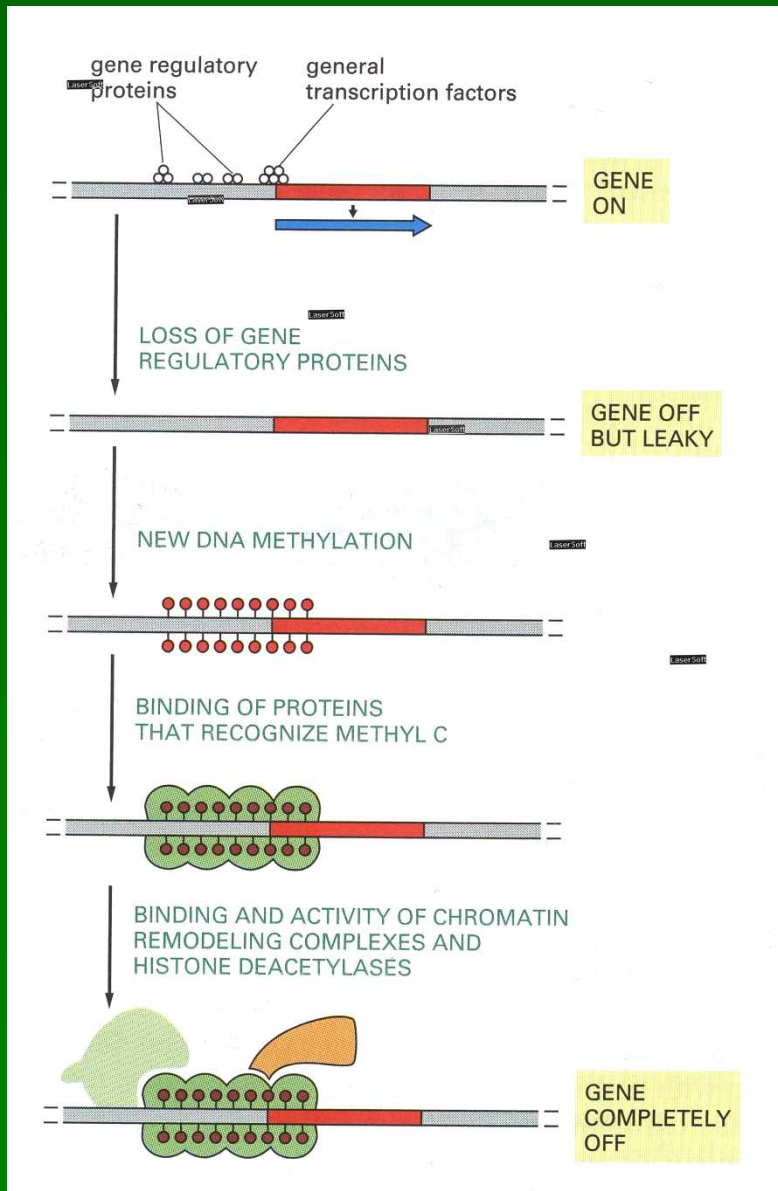
- **Transkripčně aktivní geny** obsahují podstatně menší hladinu metylované DNA ve srovnání s inaktivními geny,
- **Inaktivní chromatin je obvykle metylován** (např. inaktivní X-chromosom nebo inaktivované supresorové geny u nádorů)
- **Chromatin** v místě metylace DNA je **kondenzovanější** a brání přístupu TF
- Promotory, které nemají CpG ostrůvky, mohou být citlivé na metylaci jednotlivých cytosinů – **TF mohou být metylačně závislé** (např. AP-2), existují však proteiny, které se vážou pouze na metylovanou DNA

## Mechanismus jak metylace DNA vede ke kondensovanému chromatinu



DNA metylace usnadňuje vazbu HDAC komplexů (přes MBP – methyl binding proteins) a histon metylázy (HMT). Tyto enzymy odstraní Ac skupinu a přidají M skupinu na H3-K9, která je rozpoznána HP1 proteinem. Tento stav je dále šířen vazbou histon metyltransferázy na HP1.

# Umlčení exprese genu metylací de novo



Umlčení genu probíhá v následujících krocích:

1) Odstranění regulačních proteinů

2) Metylace DNA

3) Vazba metylačně závislých proteinů

4) Deacetylázy a histon-metylázy

5) HP1 se váže na met. H3-K9 a posílí kondenzaci chromatinu

# Insulator – hraniční element

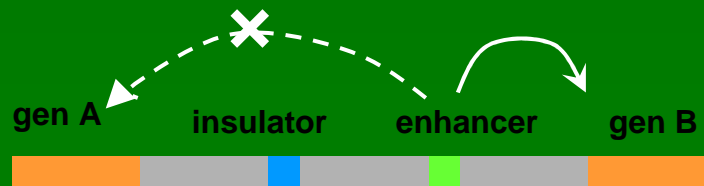
Vzhledem k působení aktivátorů na velkou vzdálenost, musí být jejich vliv oddělen (aby si nepřekážely). To zprostředkovávají insulatory – elementy jež vážou proteiny, které

- 1) chrání geny před šířením heterochromatinu (jejich přenos společně s genem do blízkosti heterochromatinu vyloučí PEV)
- 2) blokují funkci enhancerů (pokud se nacházejí mezi enhancerem a cílovým genem)

gen A      insulator      heterochromatin



gen A není ovlivněn blízkým heterochromatinem



gen A není ovlivněn enhancerem, zatímco gen B je

# Úloha Polycomb group proteinů (PcG) a trithorax group proteinů (trxG) při řízení vývoje

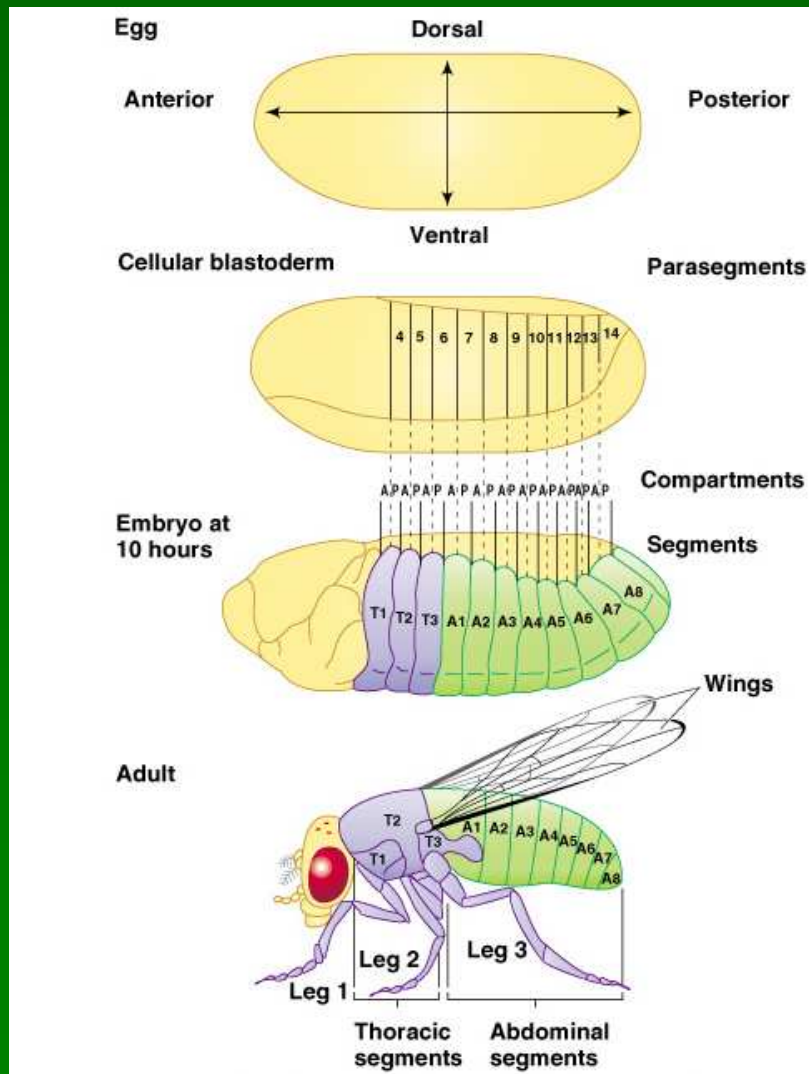
**Ontogeneze** je kontrolována důmyslnou **kaskádou genů**, jež zahrnují transkripční faktory nejprve rozdělující embryo do větších domén a následně do jemnějších podjednotek. **Identita jednotlivých částí těla je dána určitým TF.**

U *Drosophily* tyto TF tvoří tzv. **HOM-C komplex**, u obratlovců je to **Hox komplex**.

**Stabilní expresi** těchto TF zajišťují **PcG proteiny** (udržují geny v reprimovaném stavu) a **trxG proteiny** (udržují aktivní stav). Mechanismus, kterým se tak děje zahrnuje modulaci struktury chromatinu.

Existují významné paralely mezi regulací vývoje a umlčováním genů prostřednictvím modifikace chromatinu. Některé **PcG proteiny mají HDAC aktivitu** a naopak **trxG proteiny mají HAT aktivitu.**

# Úloha PcG a trxG proteinů při řízení vývoje

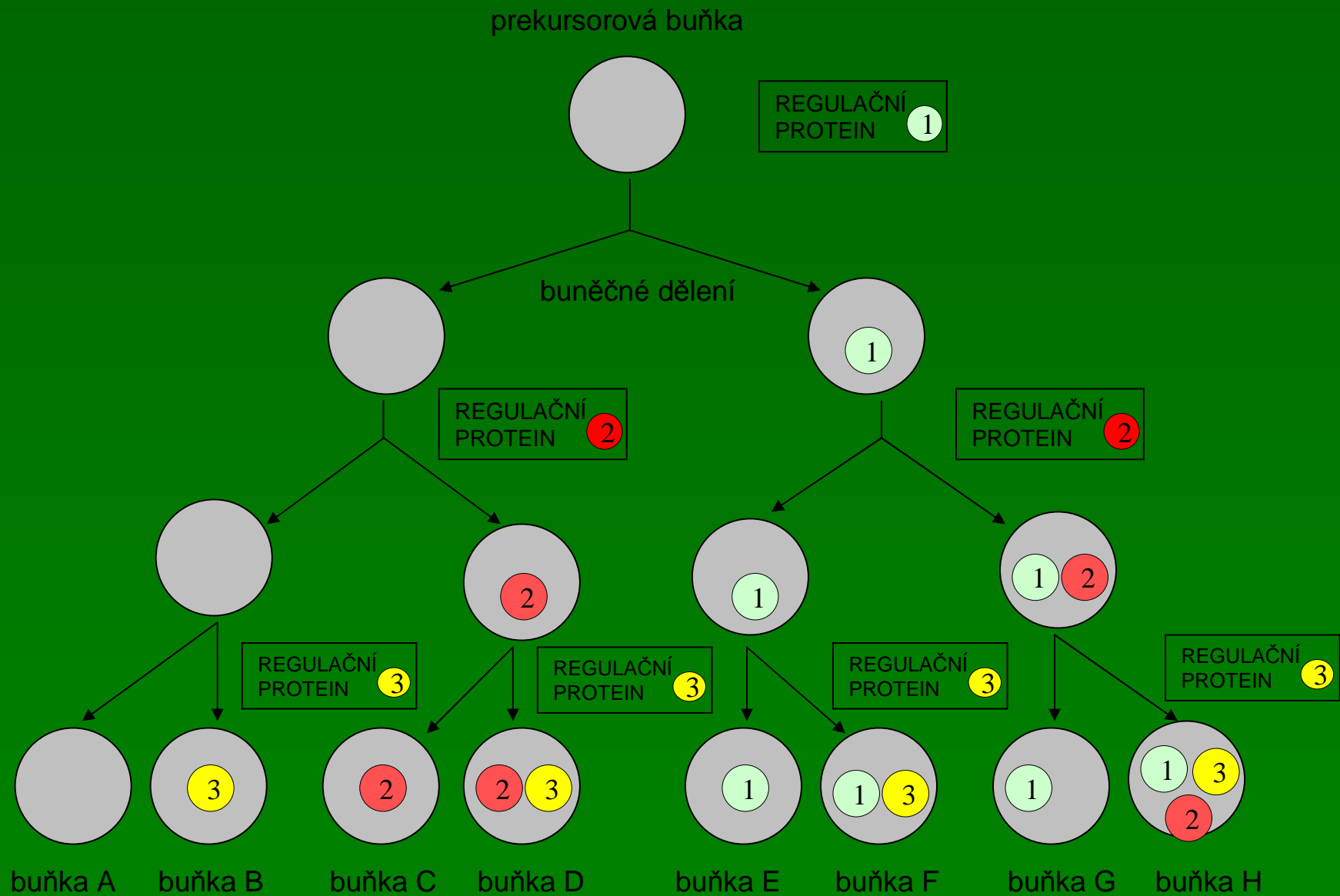


**Molekulární gradienty** v anterior-posteriorálním a dorso-ventrálním směru vedou k formování parasegmentů a poté segmentů u embrya i dospělého jedince

V každém segmentu je exprimován jiný řídicí protein

Segmentace u embrya a dospělého jedince

# Úloha PcG a trxG proteinů při řízení vývoje





# Regulace exprese lidského genomu

*Úvod (tok genetické informace, skladba lidského genomu, velikost - porovnání s jinými organismy, úrovně regulace)*

*Porovnání regulace transkripce u pro- a eukaryot*

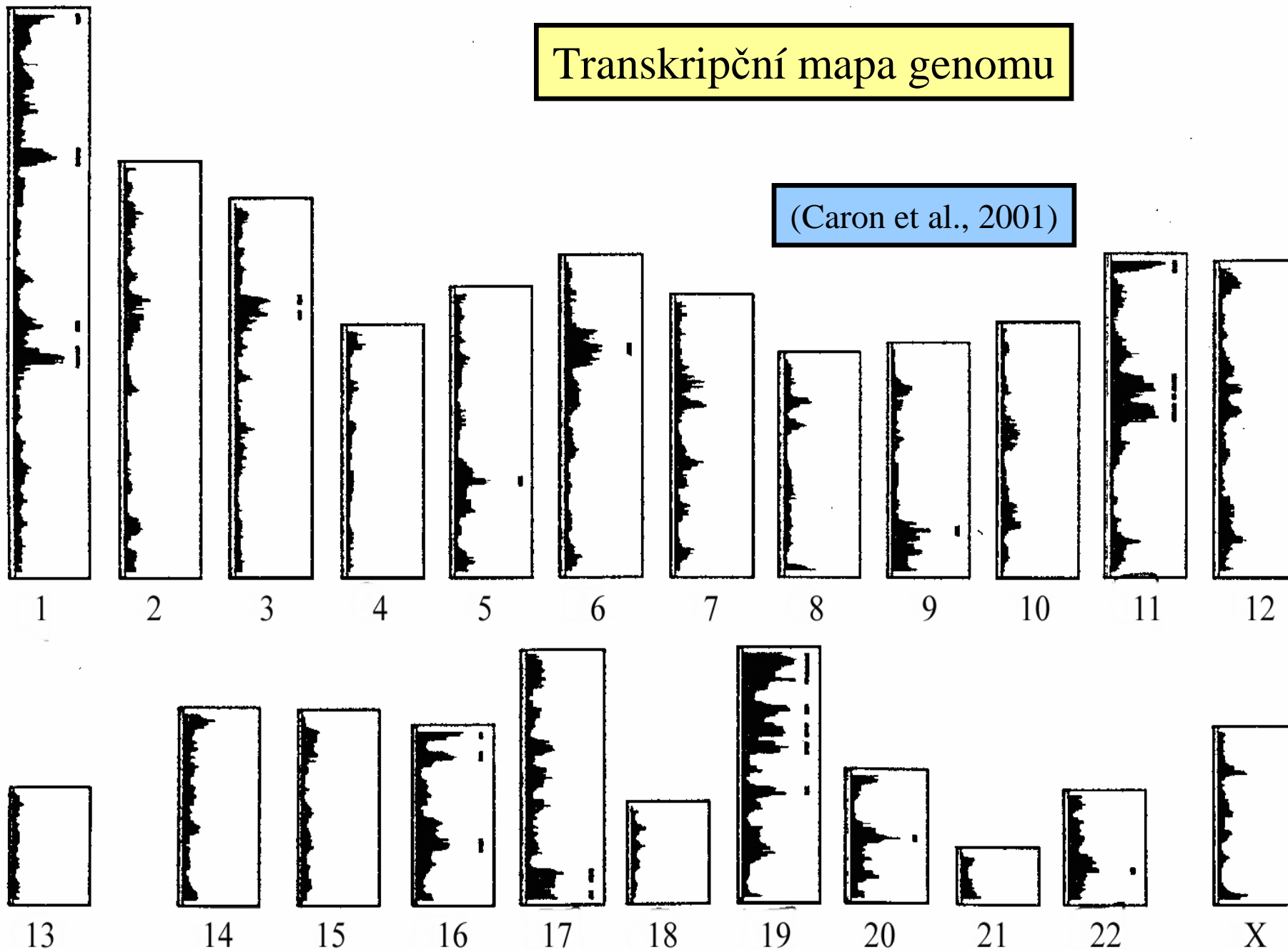
*Regulace transkripce na úrovni genetického kódu*

*Regulace na úrovni chromatinu a jádra*

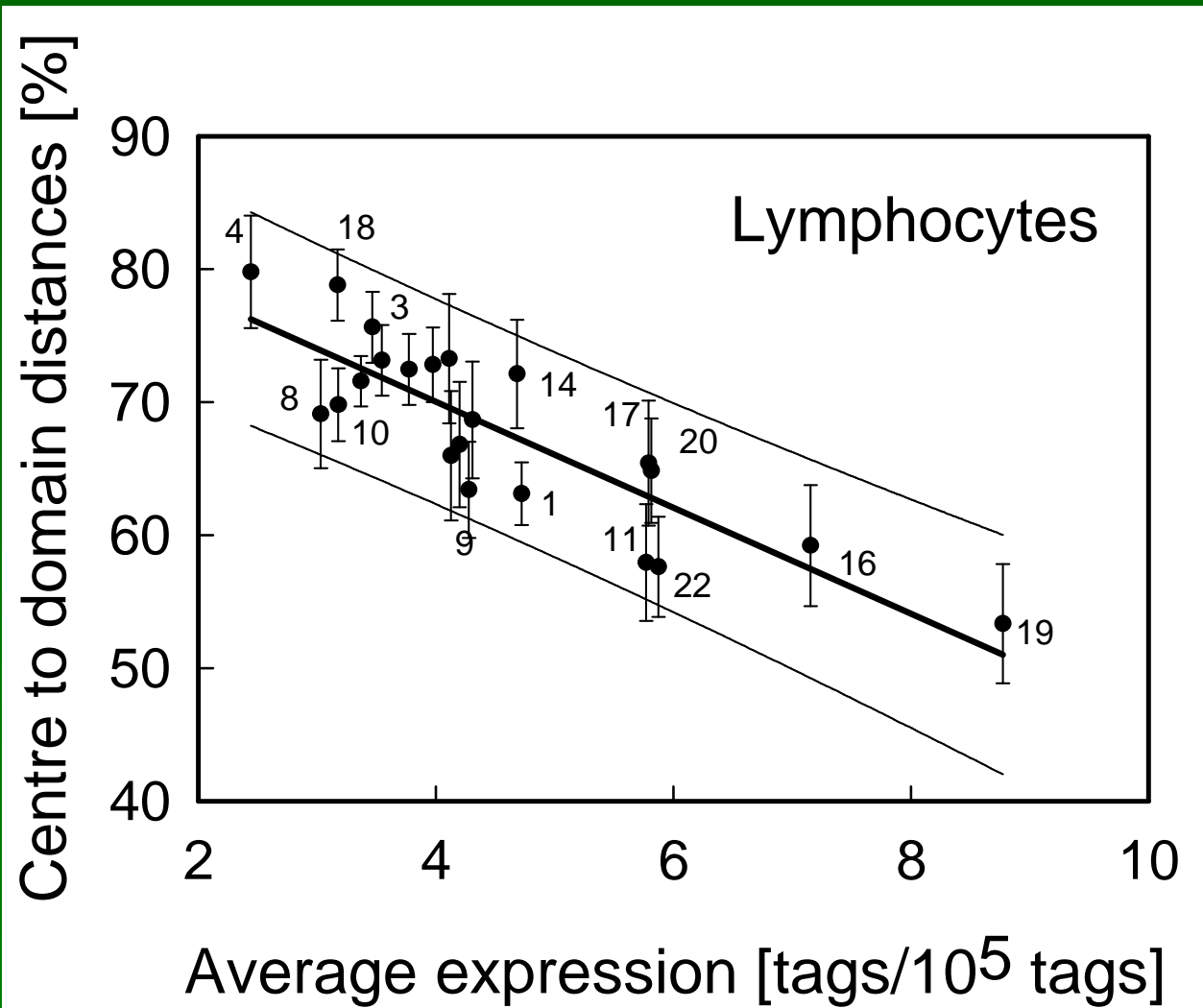
*Úroveň sestřihu, translace, degradace RNA a proteinu*

# Transkripční mapa genomu

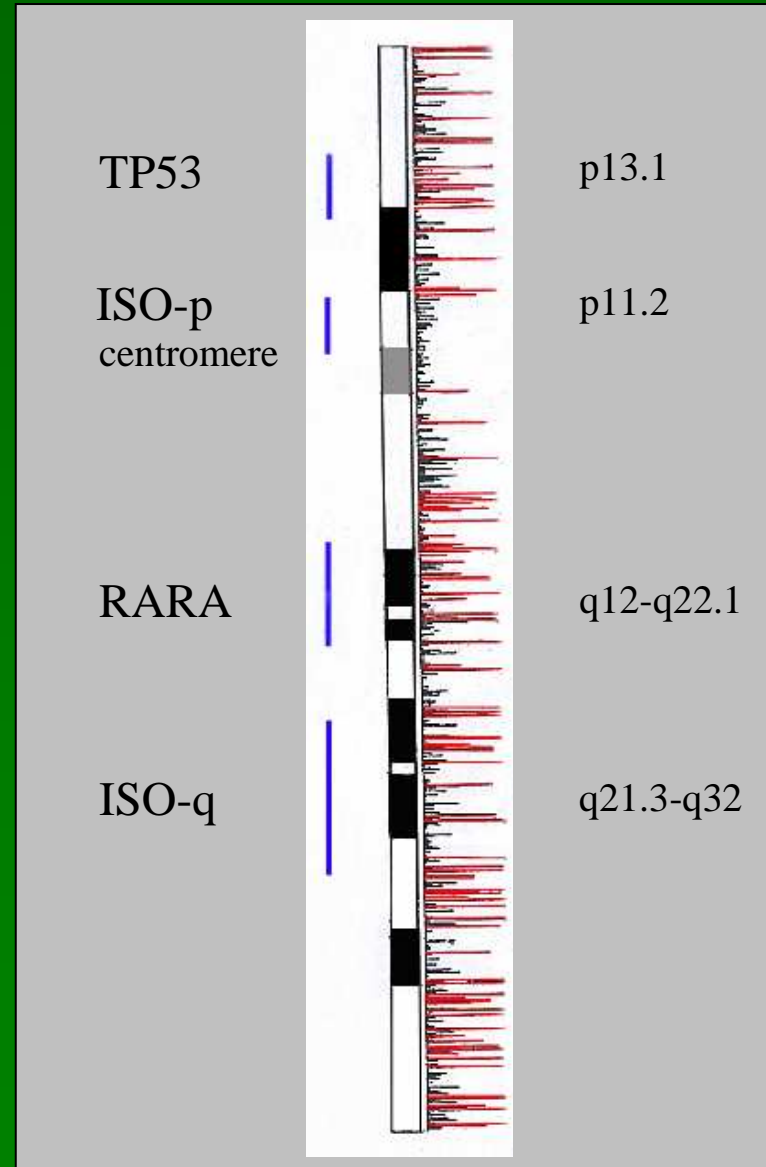
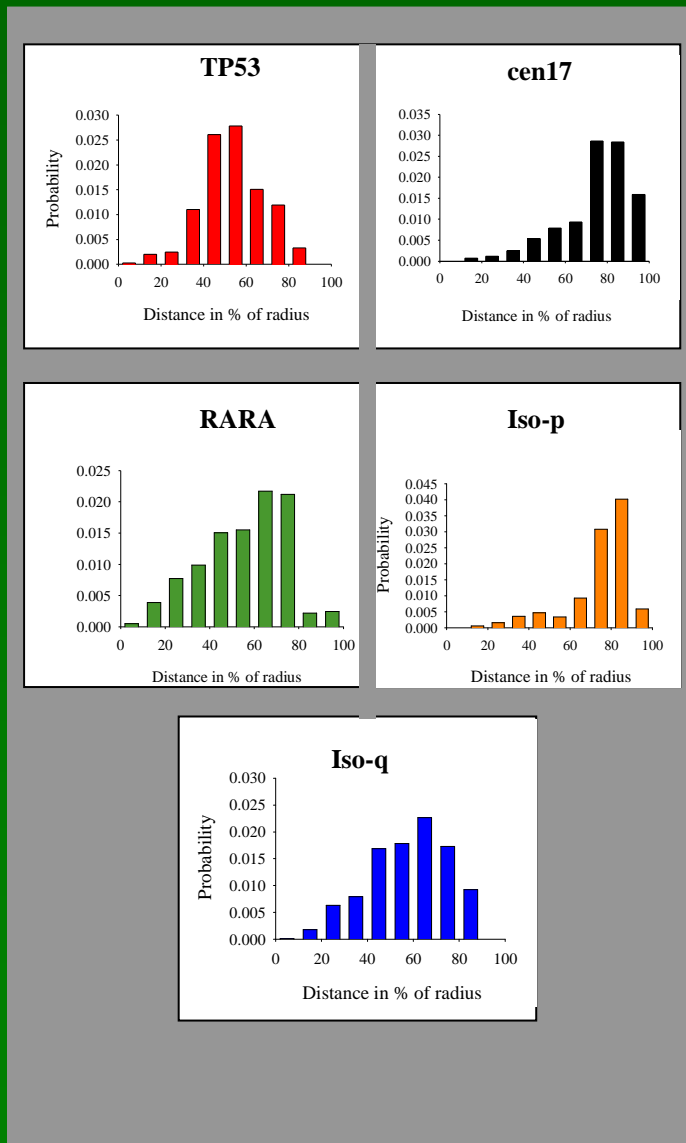
(Caron et al., 2001)



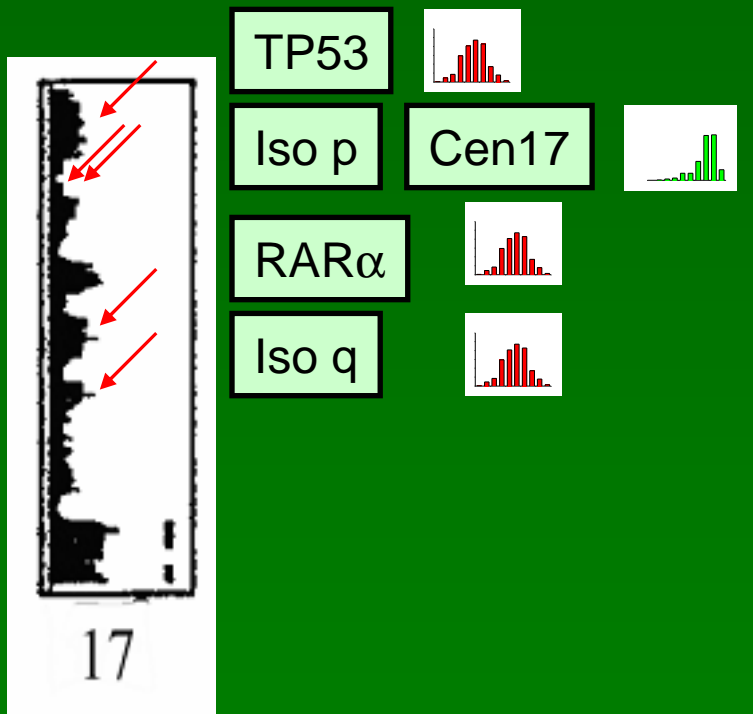
# Positions of all chromosomes in nuclei of different cell types



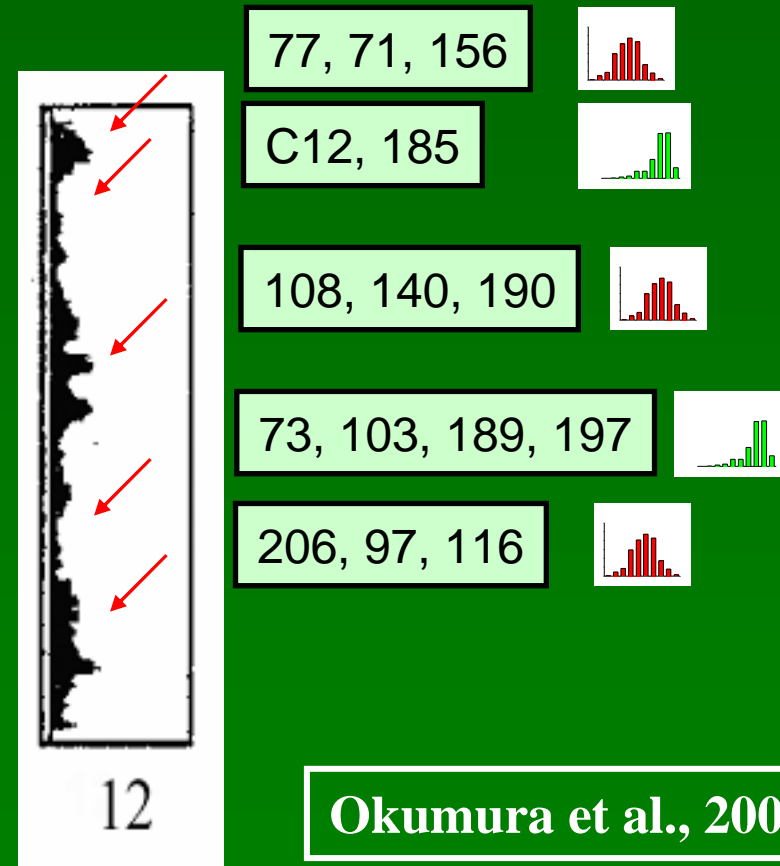
# Umístění genetických elementů HSA 17 vzhledem ke středu jádra a jejich umístění na transkripční mapě



# Umístění genetických elementů HSA 17 a HSA 12 na transkripčních mapách chromosomů

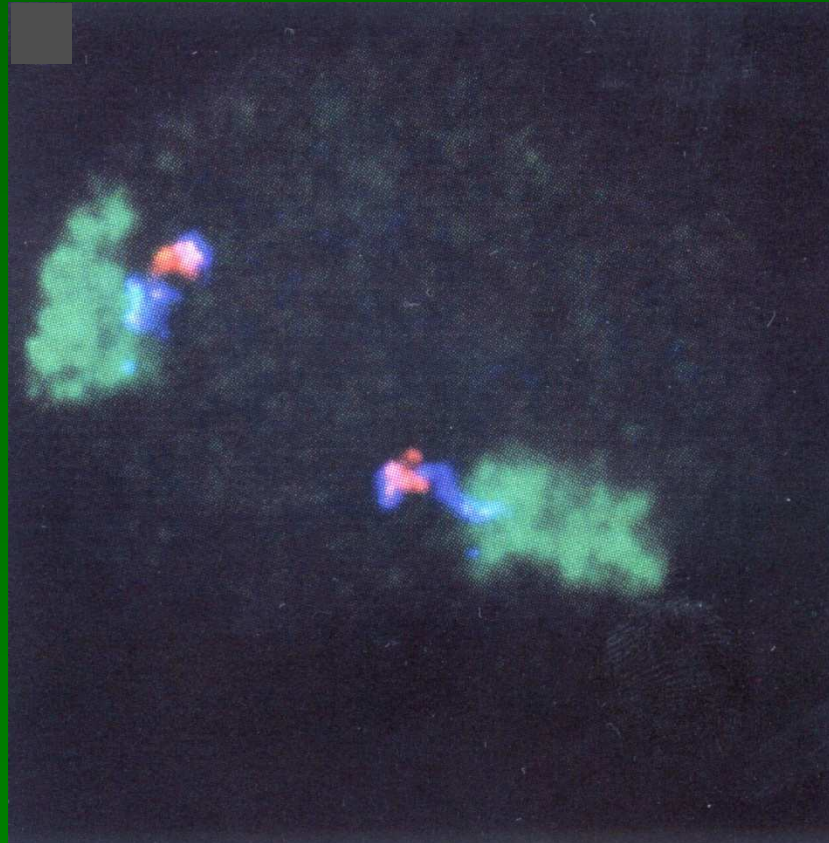


Lukášová et al., 2002



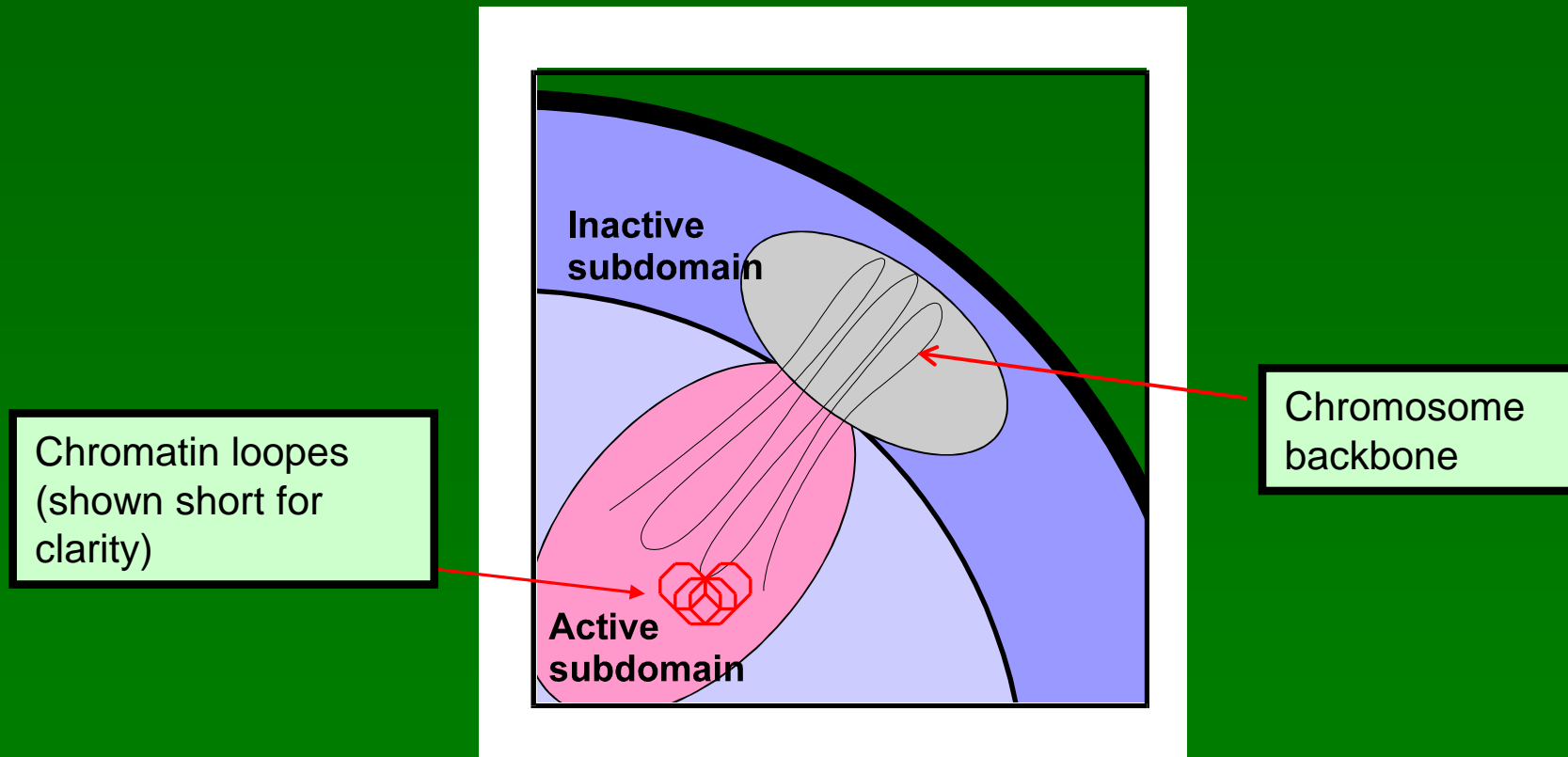
Okumura et al., 2000

## Vliv genové exprese na strukturu chromosomových teritorií



Volpi et al., JCS, 2000

# Schéma interfázního chromosomu



Chromatin loops  
(shown short for  
clarity)

Chromosome  
backbone

Chromosomy jsou polární s aktivní (dekondensovanou) doménou uvnitř a neaktivní (kondensovanou) doménou na okraji jádra. Toto uspořádání se v zásadě vytvoří v telofázi/G1 fázi a zůstává v průběhu cyklu neměnné. Tím se nastaví expresní profil buňky. Je dáno metylací DNA???

# Regulace exprese lidského genomu

*Úvod (tok genetické informace, skladba lidského genomu, velikost - porovnání s jinými organismy, úrovně regulace)*

*Porovnání regulace transkripce u pro- a eukaryot*

*Regulace transkripce na úrovni genetického kódu*

*Regulace na úrovni chromatinu a jádra*

*Úroveň sestřihu, translace, degradace RNA a proteinu*



# Regulace exprese na úrovni zpracování mRNA

Existuje několik regulačních mechanismů:

**Alternativní polyadenylace** – podle toho kde se přidá polyA konec (jeden gen může dát proteiny zcela odlišné funkce)

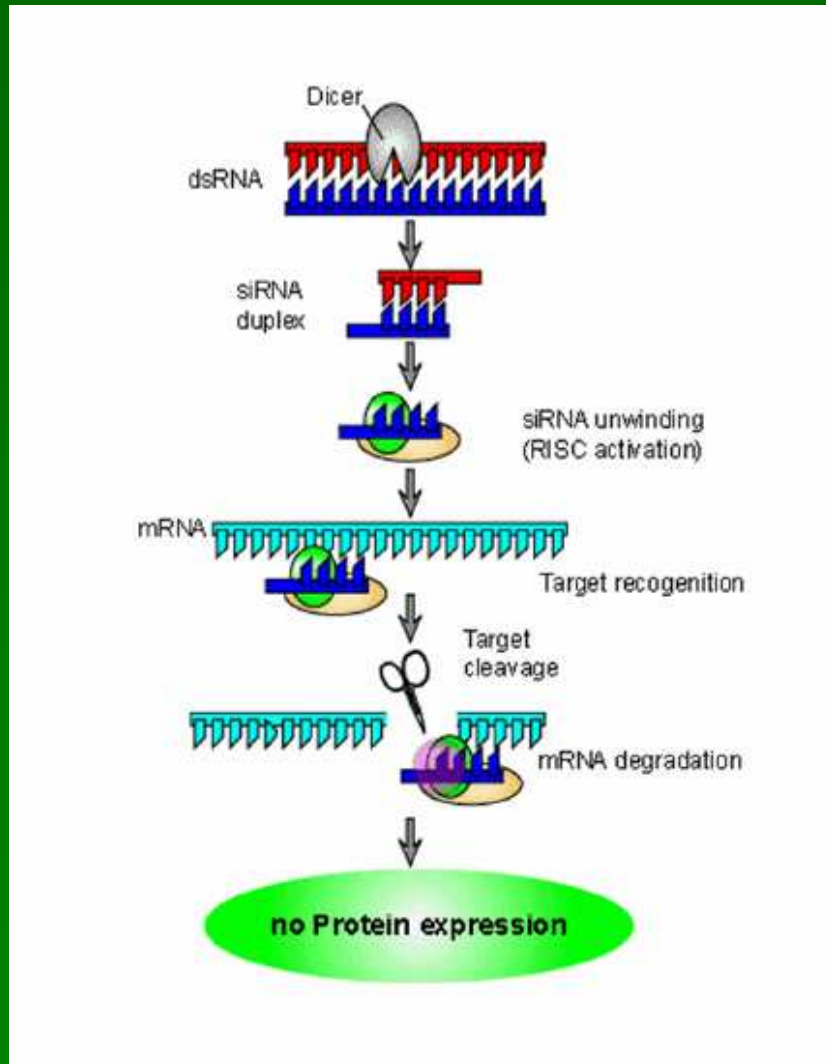
**Alternativní sestřih** – podle toho, který exon je začleněn do konečné mRNA

**Malé molekuly RNA (siRNA)** – 20-25 nukleotidů dlouhé dsRNA mohou potlačit expresi určitého genu (RNAi efekt), jiné mohou aktivovat expresi. Nobelova cena – Andrew Fire a Craig Mello v roce 2006 „RNA interference“

**MicroRNA (miRNA)** – kodovány genomem, regulují expresi 30% genů u člověka podobně jako siRNA (buď degradací mRNA nebo post-transkripčně. Exprese miRNA deregulována u nádorových onemocnění, snížená exprese miRNA vede k rychlejší onkogenezi u modelových organismů.

Tyto mechanismy mohou fungovat i současně

# Regulace exprese na úrovni zpracování mRNA



dsRNA lze do buňky dopravit pomocí plasmidu, který umožní její expresi.

dsRNA štěpí protein DICER, po navázání dalších proteinů se aktivuje

Komplex rozpoznává mRNA a degra-duje ji

Proběhlo již testování terapeutických možností u lidí.

Byly objeveny microRNA, které mají podobnou funkci, kodovány genomem