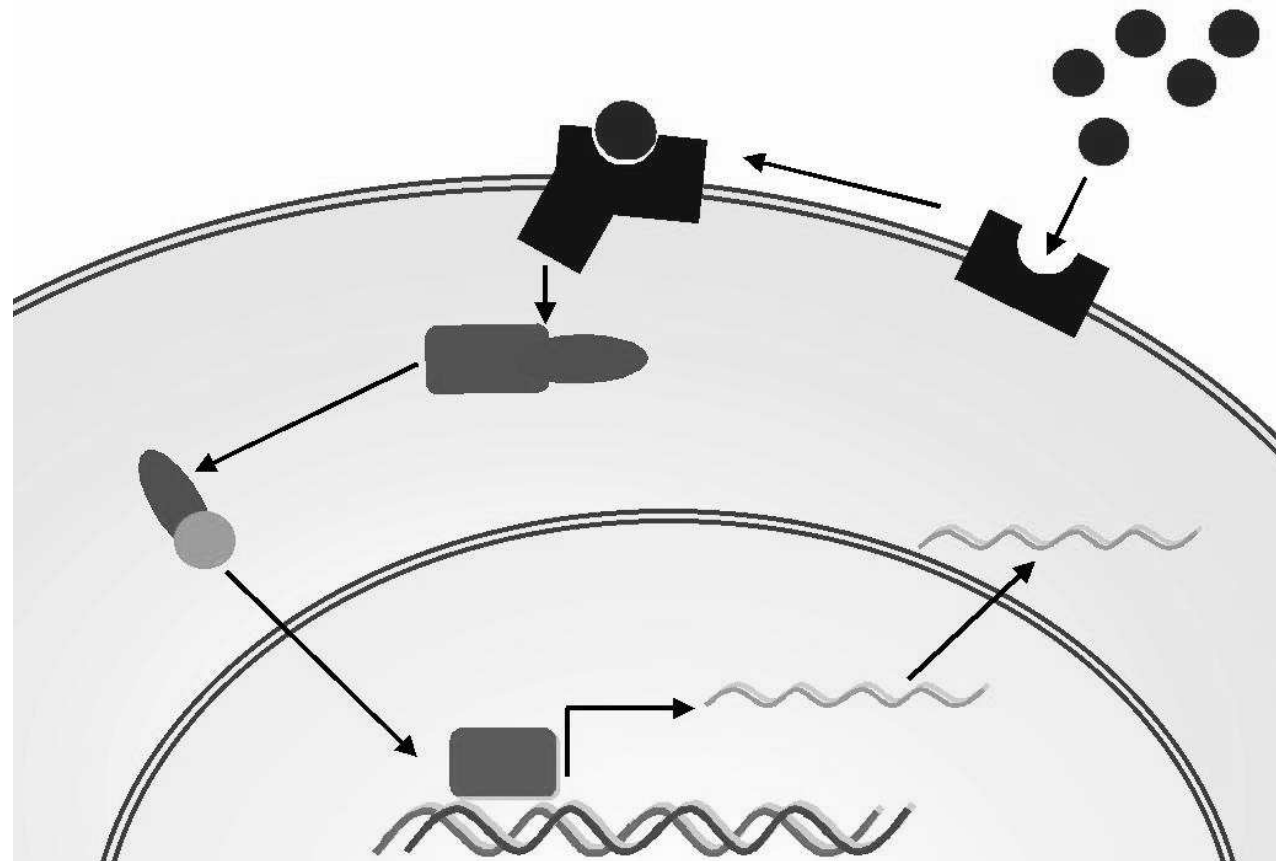


**Remodelace
chromatinu**

Struktura signální dráhy: klasifikace protoonkogenů



- **Růstové faktory**
- **Receptory růstových faktorů a Ras-proteiny**
- **Cytoplazmatické přenašeče**
- **Transkripční faktory**

**Remodelace
chromatinu**

DNA je uspořádána do chromatinu

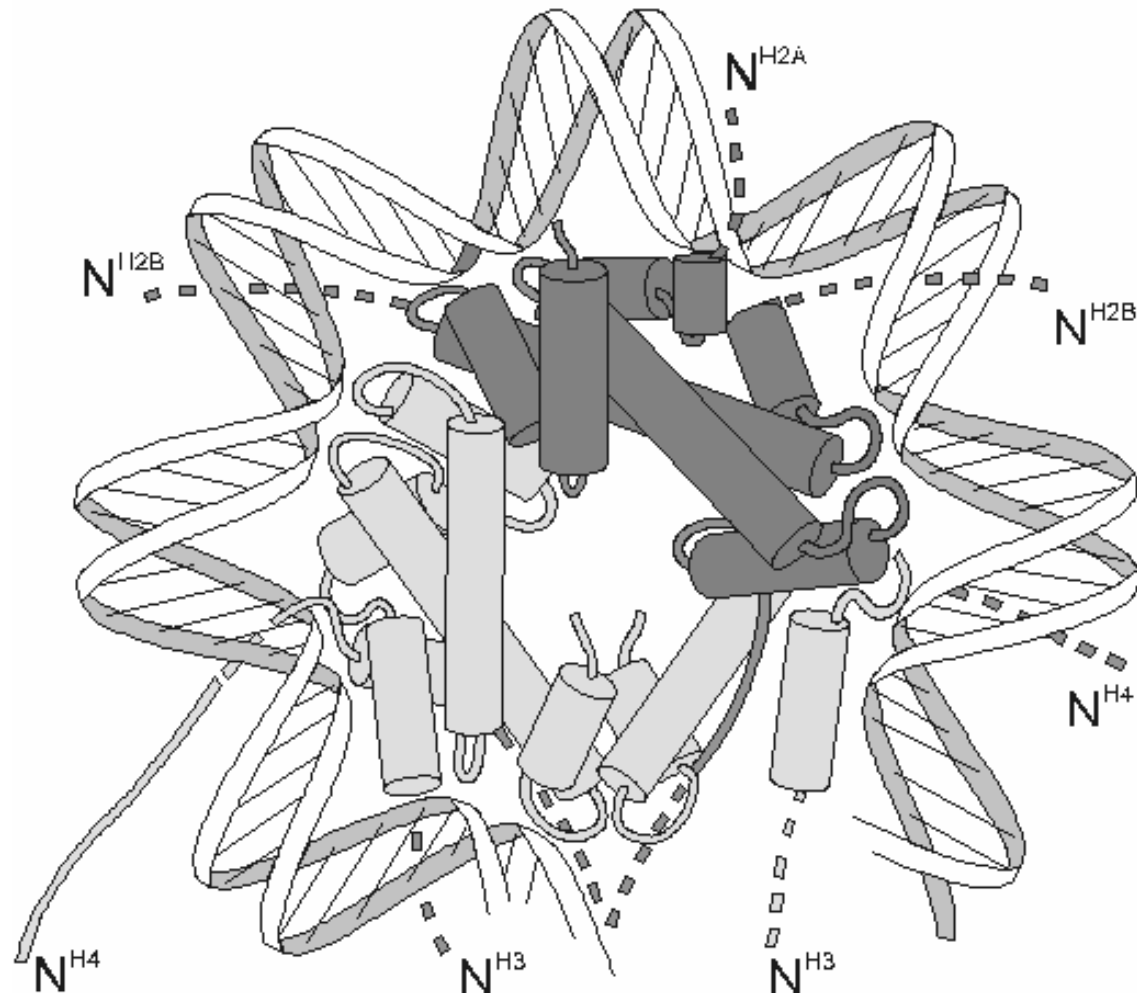
1. Ochrana DNA

2. Snížená dostupnost pro DNA vazebné proteiny:

- transkripce
 - replikace
 - opravy DNA
 - rekombinace
- Chromatin má velmi **stabilní a odolnou** strukturu.
 - Chromatin musí být **reverzibilně flexibilní**.
 - Základními jednotkami jsou **nukleosomy**.

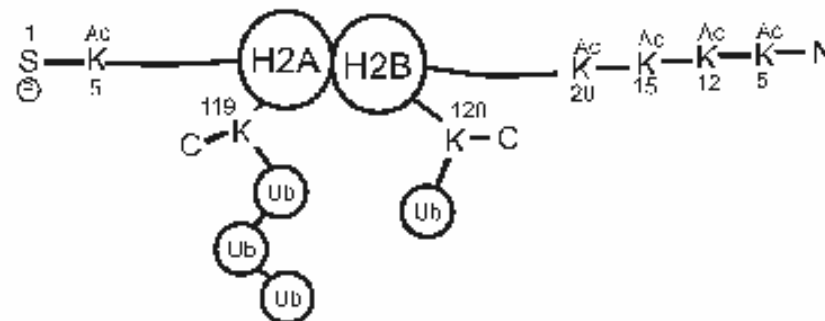
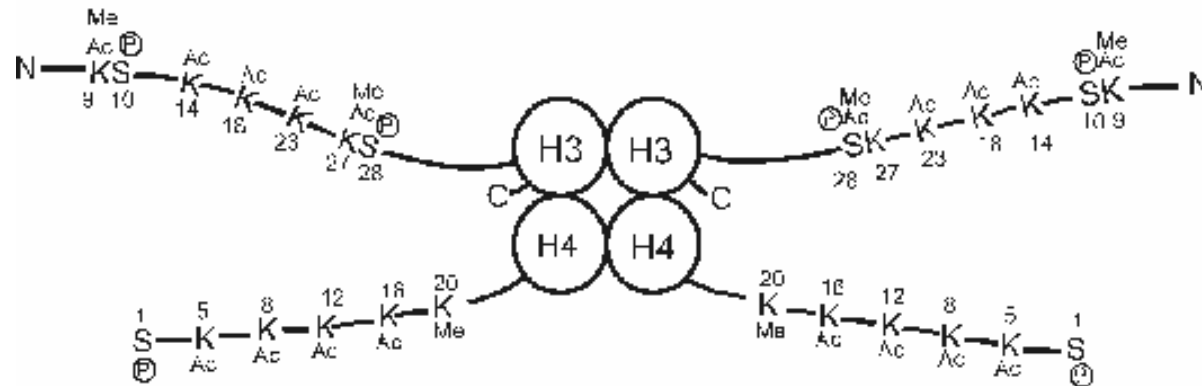
Struktura nukleosomu

- DNA: 146 pb
- oktamer histonů:
tetramer (H3/H4)₂ a
dva dimery H2A/H2B
- úseky DNA mezi
nukleosomy (**linker
DNA**) různě dlouhé,
interagují s histonem
H1 a podílejí se na
vytváření vyšších
struktur chromatinu



Uspořádání histonů v nukleosomu

- C-koncové části histonů tvoří jádro nukleosomu.
- N-části vybíhají do stran, tvoří tzv. N-tails a jsou volněji přístupné různým modifikacím.



Mechanismy přestavby chromatinu

- ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy
- Kovalentní modifikace histonů:
 - acetylace
 - metylace
 - fosforylace
 - ubikvitinace

Kovalentní modifikace histonů

- Acetylace, metylace, ubikvitinace zbytků lysinu (K)
- Fosforylace zbytků serinu (S) a threoninu (T)
- Methylace zbytků argininu (R)

Acetylace histonů

- Acetylace zbytků lysinu: celkem 26 různých možností na 1 nukleosom.
- Rovnováha histon acetyl transferáz (HATs: **Gcn5, CBP/p300, PCAF, SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ, Tip60, TAF₂₅₀,...**) a histon deacetyláz (HDACs - **HDAC1 až 3** - homologní s **RPD3, HDAC4 až 8** - homologní s **HDA1**).
- Regulace: genové exprese
sestavování nukleosomů
rozlišení heterochromatinu a euchromatinu

Acetylace histonů: sestavování nukleosomů

- heterodimerizace H3/H4 → vznik tetrameru $(H3/H4)_2$ → vazba na DNA → heterodimerizace H2A/H2B → připojení k tetrameru $(H3/H4)_2$
1. Replikující se DNA : $(H3/H4)_2$ - **CAF1** („chromatin assembly factor 1“): interakce $(H3/H4)_2$ s CAF1 podmíněna acetylací histonu H4 na lys 5, 8 nebo 12 (ne 16!) nebo jejich kombinací
 2. Vytvoření komplexu H2A/H2B - **NAP1** („nucleosome assembly protein 1“)
- cytoplasmatické HATs (typu B) **Hat1**, **Hat2** - acetylují (lys 5, 12) volný H4 neuspořádaný do nukleosomů

Acetylace histonů: rozlišení heterochromatinu a euchromatinu

→ Heterochromatin acetylován výlučně na lys 12 H4
→ vazba komplexů **RAP1** („repressor/activator protein 1“) a **SIR** („silencing information regulator 2, 3, 4“) (RAP1 se váže na telomerickou DNA)

? sestavování nukleosomů: acetylace H4 lys 5 a 12

heterochromatin: acetylace lys 12 ?

1. Pouze acetylace lys 12 H4 a znemožněna další acetylace heterochromatinu
2. Acetylace lys 5 i 12 a duplikace heterochromatinu spojena s deacetylací lys 5 (pravděpodobně za účasti **HP1** („heterochromatin protein 1“), **CAF1** a příslušné HDAC

Acetylace histonů: regulace transkripce

- **Acetylace** histonů je spojena se vznikem tzv. otevřené struktury chromatinu a s **aktivací** transkripce.
- **Deacetylce** histonů spojena s uzavíráním struktury chromatinu a s **represí** transkripce.
- HATs a HDACs jsou přiváděny k cílovým sekvencím prostřednictvím sekvencně specifických transkripčních faktorů („wandering“ X „targeted“).
- Acetylace histonů brání uspořádání chromatinu do vyšších struktur; udržuje přepisovanou DNA rozvolněnou.

Histon acetyl transferázy

Gcn5 (γ) - H3 lys 14, H4 lys 8 a 16

- součástí multiproteinových komplexů SAGA a Ada - potencují aktivitu, ovlivňují specifitu, součástí SAGA některé TAFs (TFIID \Leftrightarrow SAGA?)

CBP/p300 - koaktivátory: CREB, E1A, jaderné receptory, c-Myb/v-Myb, c-Fos, c-Jun/v-Jun, Stat-1, Stat-2, GATA-1, p53, NF-kB,.. - integrátory

PCAF - „p300/CBP associated factor“, homologní s Gcn5, je součástí multiproteinového komplexu

SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ, Tip60, TAF₂₅₀

Acetylace nehistonových proteinů

- Proteiny často acetylovány na N-konci \Rightarrow N-acetyl transferázy (NATs), faktor acetyl transferázy (FATs)
- některé HATs acetylují i nehistonové proteiny - např. CBP/p300: p53, E2F1, GATA-1, TFIIIF, Myb,...

HMG - váží se na nukleosomy a stabilizují jejich strukturu

- CBP (nikoli PCAF) acetyluje HMG-1
- PCAF acetyluje HMG-17 na lys 2 \rightarrow oslabení vazby HMG-17 na nukleosom: vazba HMG-17 na nukleosom snižuje schopnost PCAF acetylovat H3
- p300 acetyluje HMG-14 a HMG-17 \rightarrow modifikace jejich interakce s jádrem nukleosomu

Histon deacetylázy

- **HDAC 1, 2 a 3** - homologní s y RPD3 (poprvé popsán vztah deacetylace histonů = represe transkripce)
- **HDAC 4, 5, 6, 7 a 8** - homologní s y HDA1
- HDACs obvykle tvoří multiproteinové komplexy: **Sin3**, **Mi-2/NuRD** (má deacetylační a také ATP-dependentní remodelační aktivitu).

Sin3: obvykle 8 proteinů, Sin 3 tvoří lešení pro sestavení celého komplexu (RbAp46/48 - váže histony,...)

Mad/Max, jaderné receptory, Ski,... - často interakce prostřednictvím korepresorů (N-CoR, SMRT,...), jen vzácně přímá vazba na sekvenčně specifické TF

Histon deacetylázy

Mi-2/NuRD - neobsahuje protein Sin3, obsahuje proteiny $Mi-2\beta$ a MTA-2

$Mi-2\beta$ má ATP-dependentní chromatin remodelující aktivitu

Sin3 - spíše genově specifická represe

Mi-2/NuRD - represe rozsáhlejších oblastí (vývojově specifická represe)

- některé HDACs interagují přímo s TF: Rb, YY1

Metylace DNA a deacetylace histonů

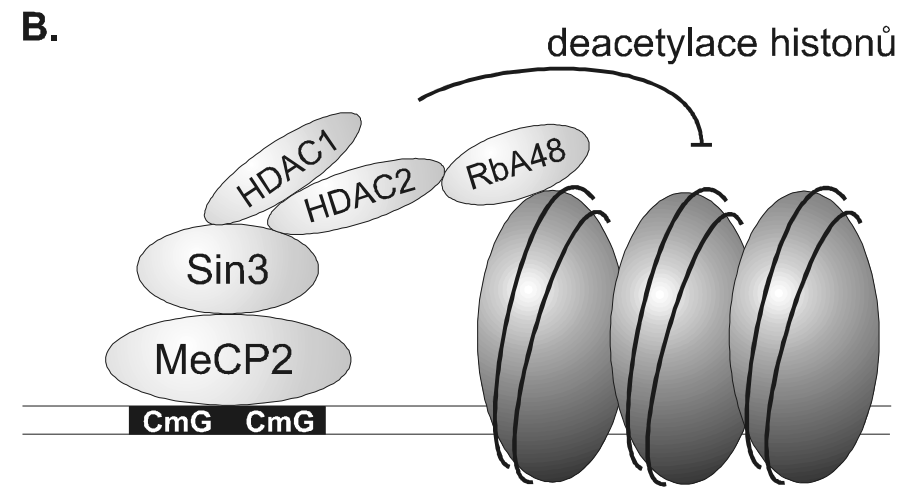
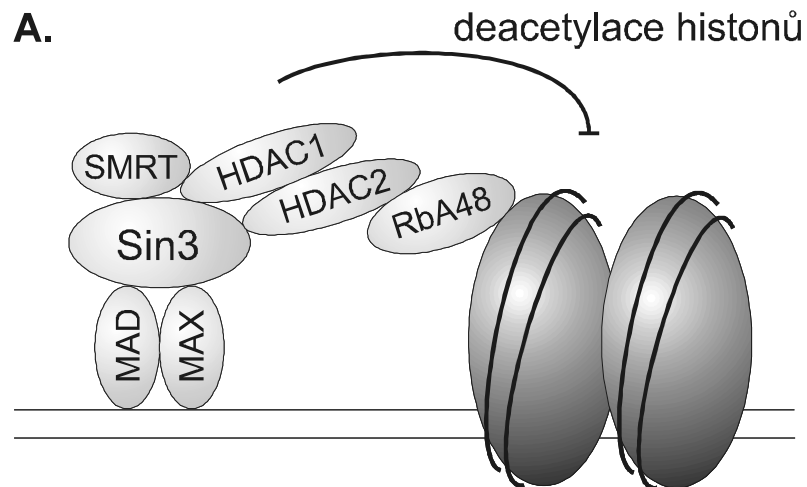
- **5-metylcytosin** („pátá baze“) - může být enzymaticky tvořen a udržován na dinukleotidu **CpG**.
- **CpG ostrůvky** („CpG islands“) - jsou oblasti v genomu s vysokým obsahem těchto sekvencí.
- CpG metylace DNA souvisí s **represí** transkripce - s udržováním stabilnějšího stavu chromatinu.

Metýlované oblasti DNA jsou rozpoznávány proteinem **MeCP2** (jeho doménou **MBD** - „methyl-DNA binding domain“) a dále specificky interagují (doménou **TRD** - „transcriptional repressor domain“) s korepresorem **Sin3**, který přivádí k metýlovaným oblastem **HDACs**.

HDACs a represe transkripce

A. přechodná represe

B. stabilní represe



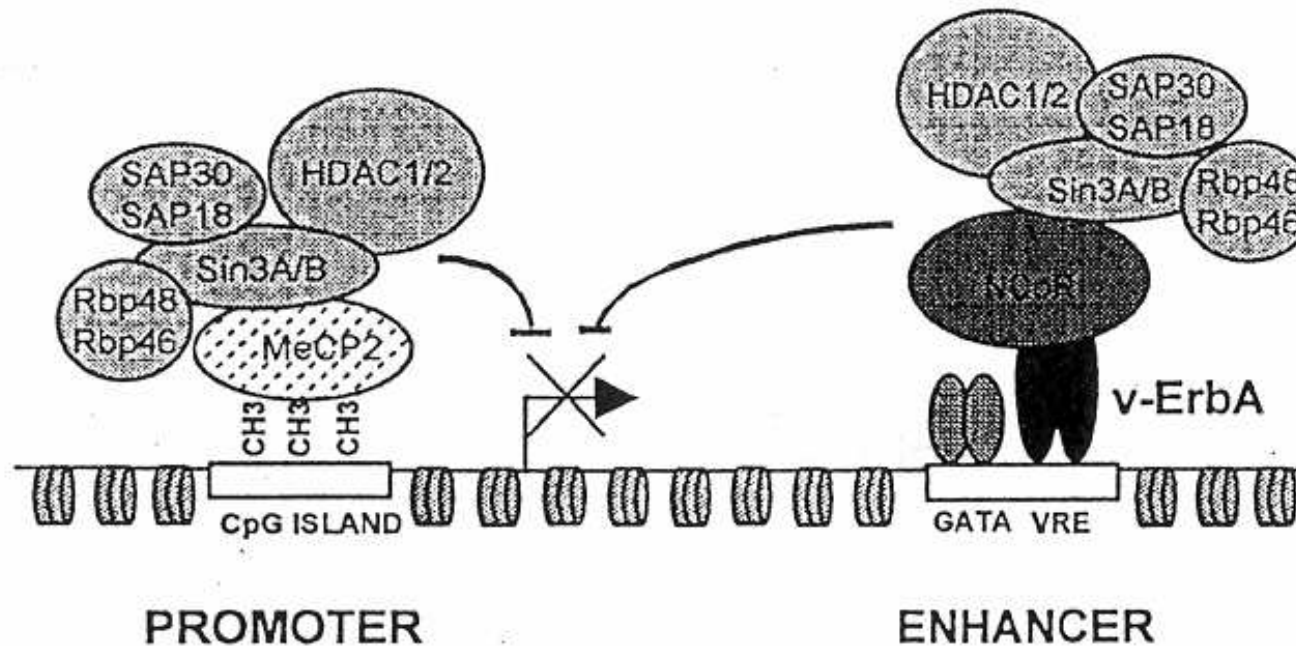
Kooperace represivních komplexů- struktura represosomu

Model represe genu karbonické anhydrasy II - CAII
- podle Rietvelda et al. 2001)

- Transkripce genu CAII je regulována z promotoru a zesilovače.
- Navrženy tři modely této regulace.
 - a) vazba dvou podobných korepresorových komplexů
 - b) vazba dvou odlišných korepresorových komplexů
 - c) tvorba vyšší struktury - represosomu

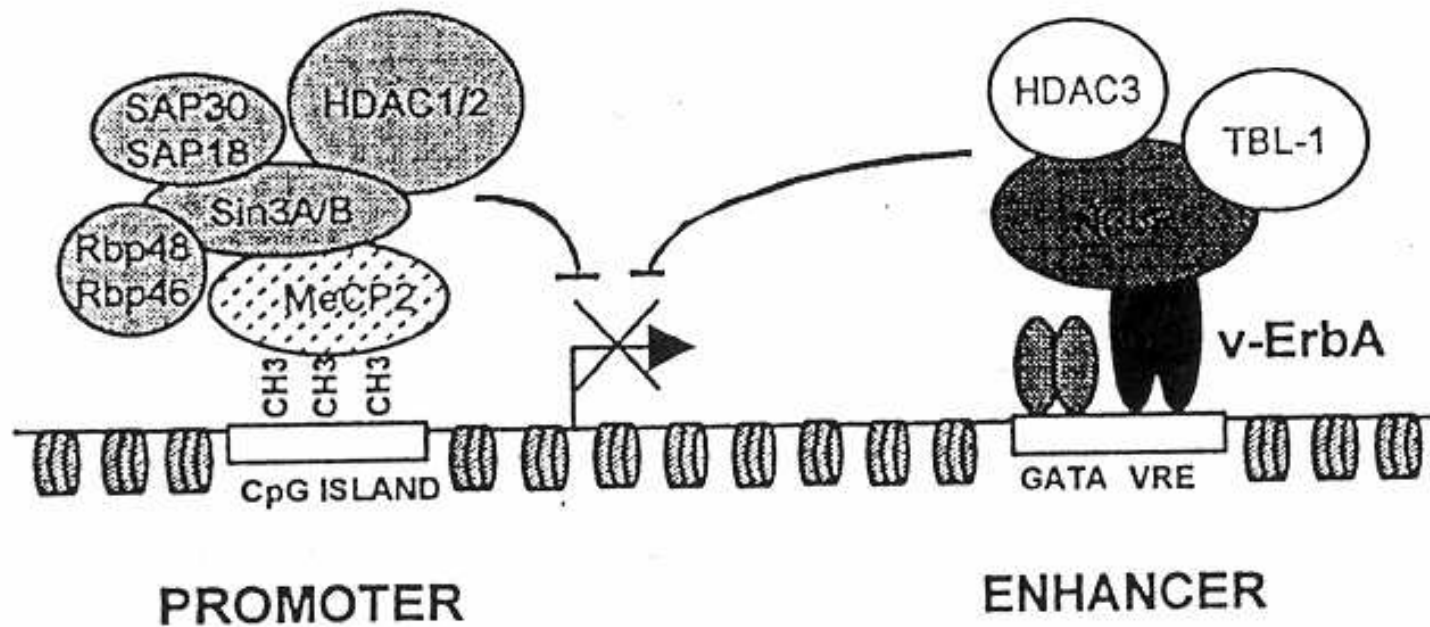
a) vazba dvou podobných korepresorových komplexů:
komplexu MeCP2/Sin3/HDAC na metylované CpG
oblasti promotoru a komplexu v-
ErbA/NCoR/Sin3/HDAC na zeslabovač („silencer“)

a)



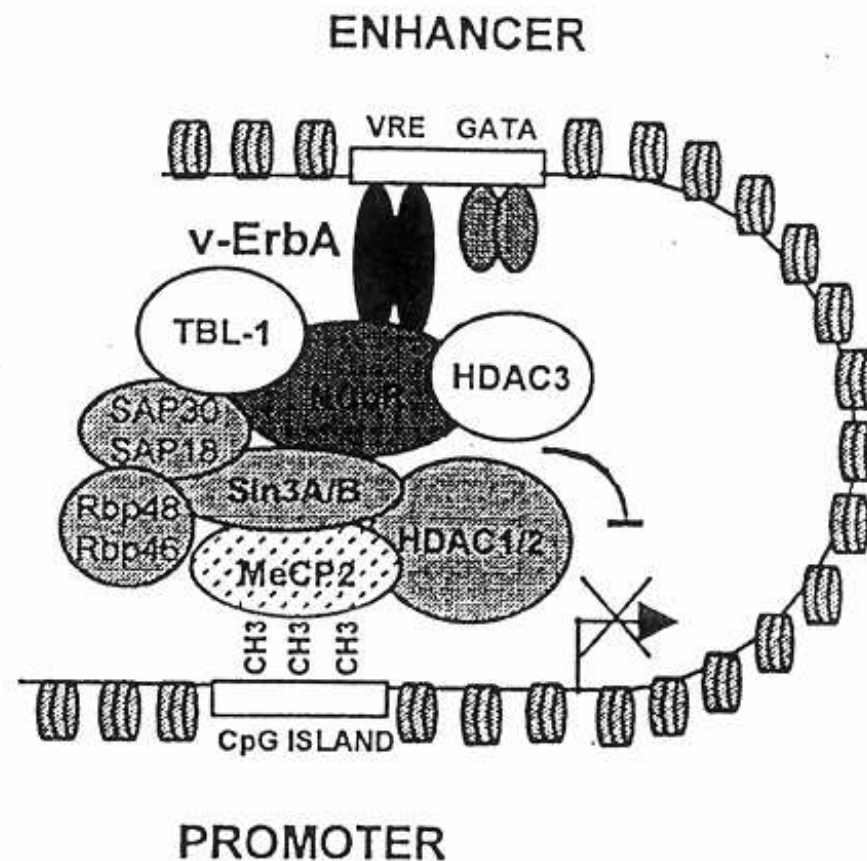
b) vazba dvou odlišných korepresorových komplexů:
MeCP2/Sin3/HDAC a komplexu v-
ErbA/NCoR/HDAC3/ TBL-1

b)



c) tvorba vyšší struktury - represosomu: fyzickou interakcí mezi podjednotkami korepresorových komplexů navázaných na metylované oblasti promotoru a na zeslabovač

c)



Fosforylace histonů

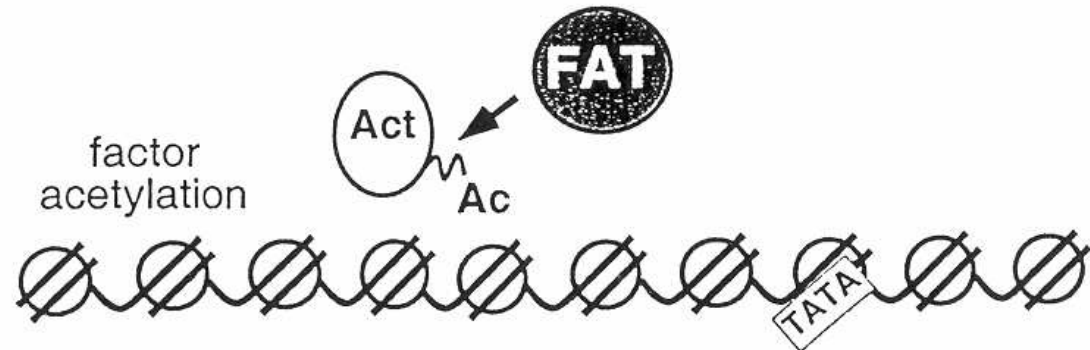
- Fosforylovány mohou být serinové zbytky.
- Mitogenní signály spouštějí kaskádu MAP kináz:
Rsk-2 fosforyluje H3 na **serinu 10** - tato fosforylace „otevívá“ strukturu chromatinu a umožňuje aktivaci (transkripci) genů spojených s buněčným dělením.
Podle typu stimulace další histon kináza - **MSK1**.
- Fosforylace histonů je funkčně provázaná s acetylací: některé HATs jsou aktivnější na fosforylovaném H3 než na nefosforylovaném.

Model kooperace acetylace a fosforylace histonů

(Berger 2001)

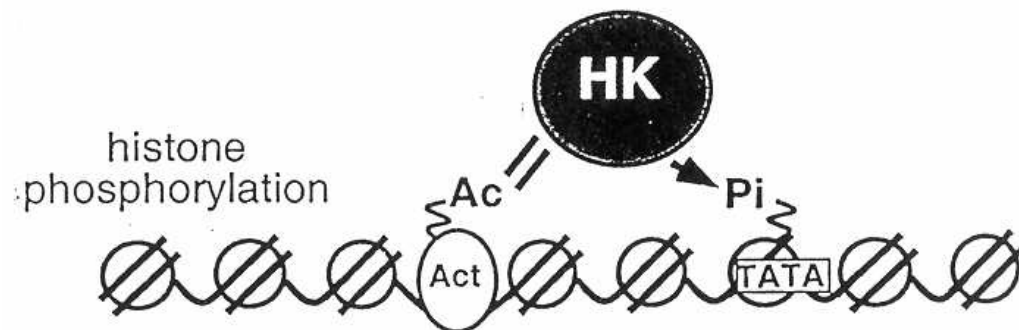
A. Acetylace transkripčního aktivátoru.

FAT („factor acetyltransferase“) acetyluje transkripční aktivátor, tím je posílena jeho schopnost vazby na DNA.



B. Fosforylace histonů.

Acetylovaný transkripční aktivátor interaguje s HK („histone kinase“) a histon je fosforylován



Model kooperace acetylace a fosforylace histonů

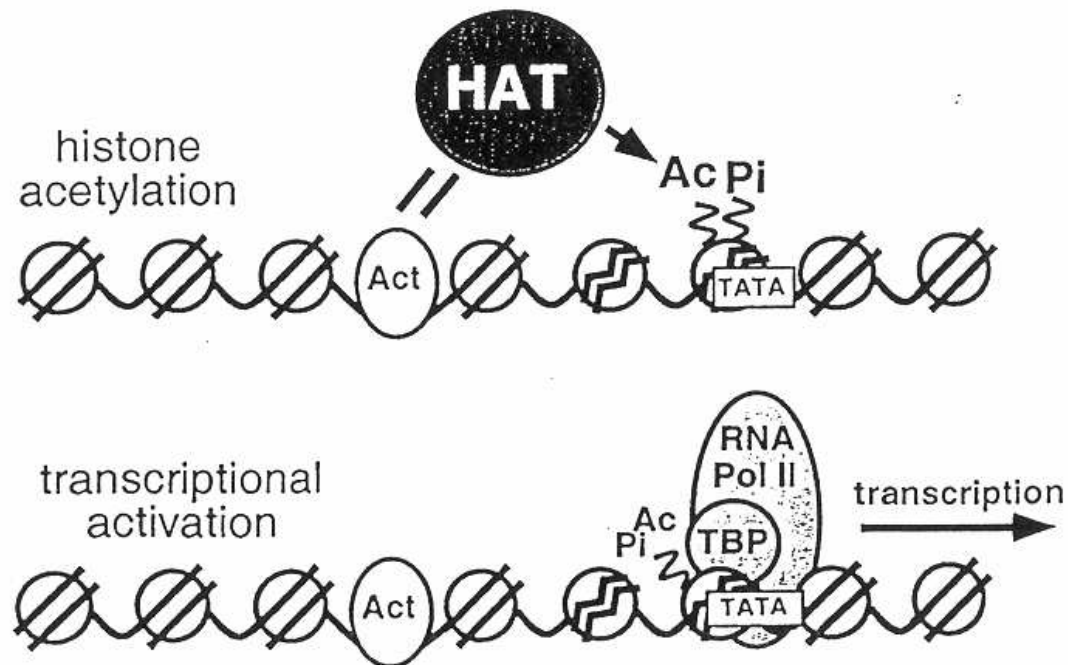
(Berger 2001)

C. Acetylace histonů.

Acetylovaný transkripční aktivátor interaguje za účasti fosforylovaného histonu s HAT.

D. Aktivace transkripce.

Dvojitá modifikace histonů (fosforylace a acetylace) v promotorové oblasti umožňuje interakci s bazálním transkripčním aparátem a aktivaci transkripce



Fosforylace histonů

- Fosforylace H3 na **serinech 10 a 28** spojena s kondenzací chromozomů během mitózy.
- Tato fosforylace nemá lokální omezení.
- Nesouvisí s aktivitou RSK-2.

- Také H1 (není součástí nukleosomů) může být fosforylován v souvislosti s regulací transkripce (Tetrahymena)

Metylace histonů

- Metylovány mohou být lysiny H2B, H3 (lys 4, 9, 27, 36) H4 (lys 20) a argininy.
- Jaderné receptory aktivují transkripci za účasti koaktivátorů z rodiny proteinů p160: s nimi interaguje také metyltransferáza **CARM1** („coactivator-associated arginine methyltransferase 1“)/**PRMT4** - metyluje zbytky argininu na H3 a potencuje transaktivaci jadernými receptory.
- Příbuzný enzym **PRMT1** metyluje H4.
- Popsána synergie p300, **CARM1** a **PRMT1**.

Metylace nehistonových proteinů

- Příbuzné metyltransferázy **PRMT1, 2, 3, Carn1/PRMT4** a **PRMT5/JBP1** metylují také nehistonové proteiny.
- Methylace zbytků argininu pravděpodobně moduluje meziproteinové interakce. Uplatňují se v regulaci transkripce (methylace histonů), signalizaci, sortování proteinů.

Metylace nehistonových proteinů

Model regulace specificity CBP/p300 by CARM1

(Xu et al. 2001)

- CBP funguje jako integrátor signálních drah: není příliš specifický, funguje jako aktivátor mnoha různých TF. Je v buňce přítomen v nízké hladině a faktory o něj soutěží (⇒ „haploinsufficiency“).
- CARM1 interaguje s koaktivátory p160 a metyluje CBP/p300.
- Methylace CBP/p300 mění jeho specifitu: ztrácí afinitu k části TF (např. CREB, Myb), pro které funguje jako koaktivátor ⇒ zvyšuje se jeho afinita k ostatním TF (např. jaderným receptorům)

Regulace transkripce aktivované jadernými receptory komplexem obsahujícím CARM1 a CBP/p300:

1. Acetylace histonů
2. Methylace histonů
3. Methylace CBP/p300 a další potence acetylace histonů

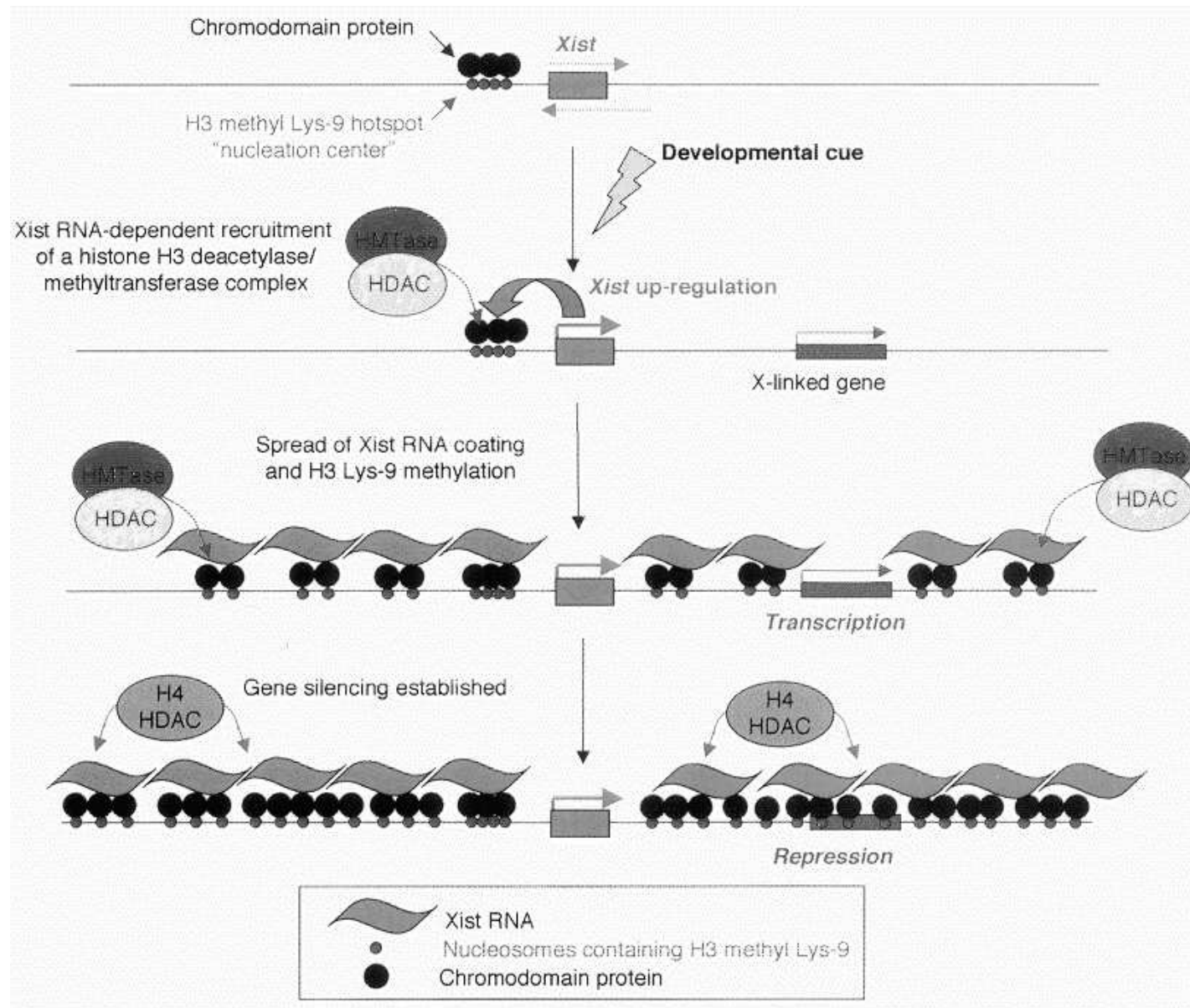
Metylace histonů

- **Suv39H1** metyluje lysin 9 histonu H3.
- Účastní se genově specifické represe: v komplexu s HDACs (např. Rb).
- Účastní se represe pericentrického heterochromatinu - za účasti proteinu **HP1** („heterochromatin-associated protein-1“).
Methylace lysinu 9 histonu H3 interferuje s fosforylací serinu 10: metylace lysinu 9 histonu H3 + hypoacetylace H4 = znak heterochromatinu.

Metylace histonů - inaktivace ch. X

- U **nediferencovaných** buněk je každý chromozom X aktivní:
Xist i antisense Tsix jsou slabě exprimovány
V upstream oblasti od genu *xist* je oblast s metylovaným lys 9 H3 s navázanými „chromodomain“ proteiny (např. HP1-like factor)
- Diferenciační signály → **diferenciace**, inaktivace chromozomu X:
 1. Upregulace *xist* a následný Xist RNA coating - netranslatovaná RNA genu *xist* pokryje povrch inaktivovaného chromozomu X - to je nejranější zachycená událost celého procesu.
 2. Methylace H3 lys 9 + hypoacetylace H3 lys 9 + hypomethylace H3 lys 4
 3. Methylace CpG islands; H4 hypoacetylace; macroH2A enrichment

Inaktivace chromozomu X



Ubikvitinace histonů

- Na C-konci histonů: lysin 119 histonu H2A a lysin 120 histonu H2B.
- Spojeno s transkripčně aktivním chromatinem - závislé na probíhající transkripci.
- Ubikvitinace H2B důležitá pro průchod buněčným cyklem.

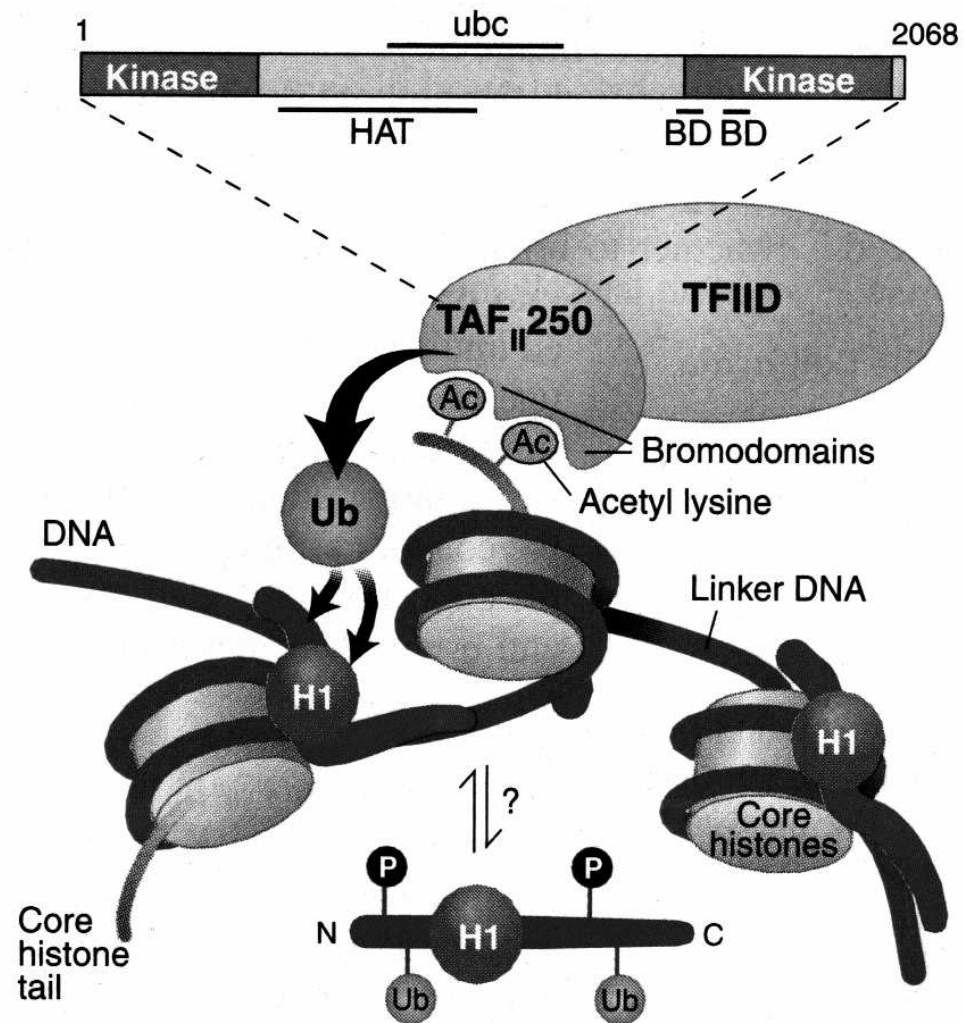
TAF₂₅₀ má 3 enzymatické aktivity:

- acetyltransferáza (→ histony)
- kináza (→ TF2A)
- ubikvitináza (→ H1)

Schopnost TAF₂₅₀ modifikovat histony

- Drosofilí TAF₂₅₀ obsahuje:
 - bromodoménu
 - protein kinázovou aktivitu (→ TF2A)
 - histon acetyl transferázovou aktivitu
 - ubikvitinační aktivitu
- Drosofilí TAF₂₅₀ se váže na acetylované N-tails histonů (svou bromodoménou), to umožňuje přinejmenším ubikvitinovat (fosforylovat?) H1 linker a udržovat tak transkripčně aktivní stav v dané oblasti.
Podíl na acetylaci, fosforylaci dalších histonů??

Schopnost TAF₂₅₀ modifikovat histony



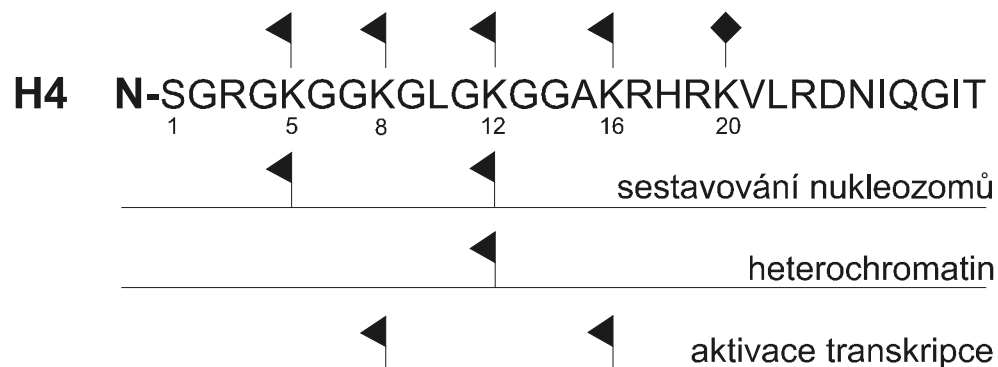
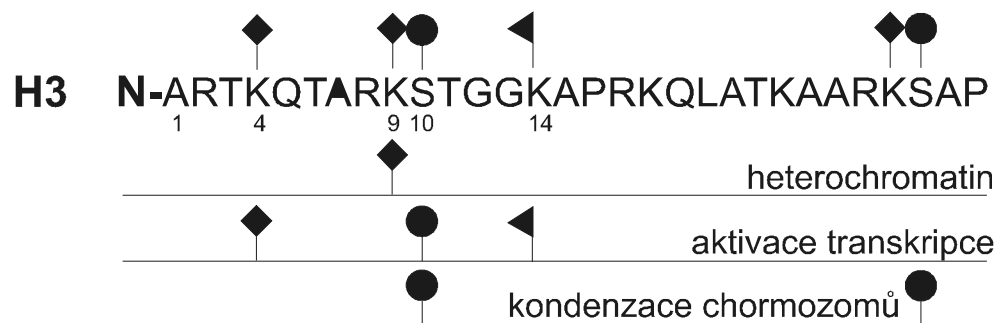
Mechanismus účinku kovalentních modifikací histonů

1. Modifikace = redukce pozitivního náboje histonů
→ oslabení interakcí mezi histony a DNA
2. Modifikace → inhibice kondenzace chromatinu vyššího stupně
- ? Fosforylace histonů spojena s kondenzací chromozomů, ale také s aktivací transkripce; metylace může být aktivující i reprimující
- ? specifita modifikací
3. Hypotéza histonového kódu

Hypotéza „histonového kódu“

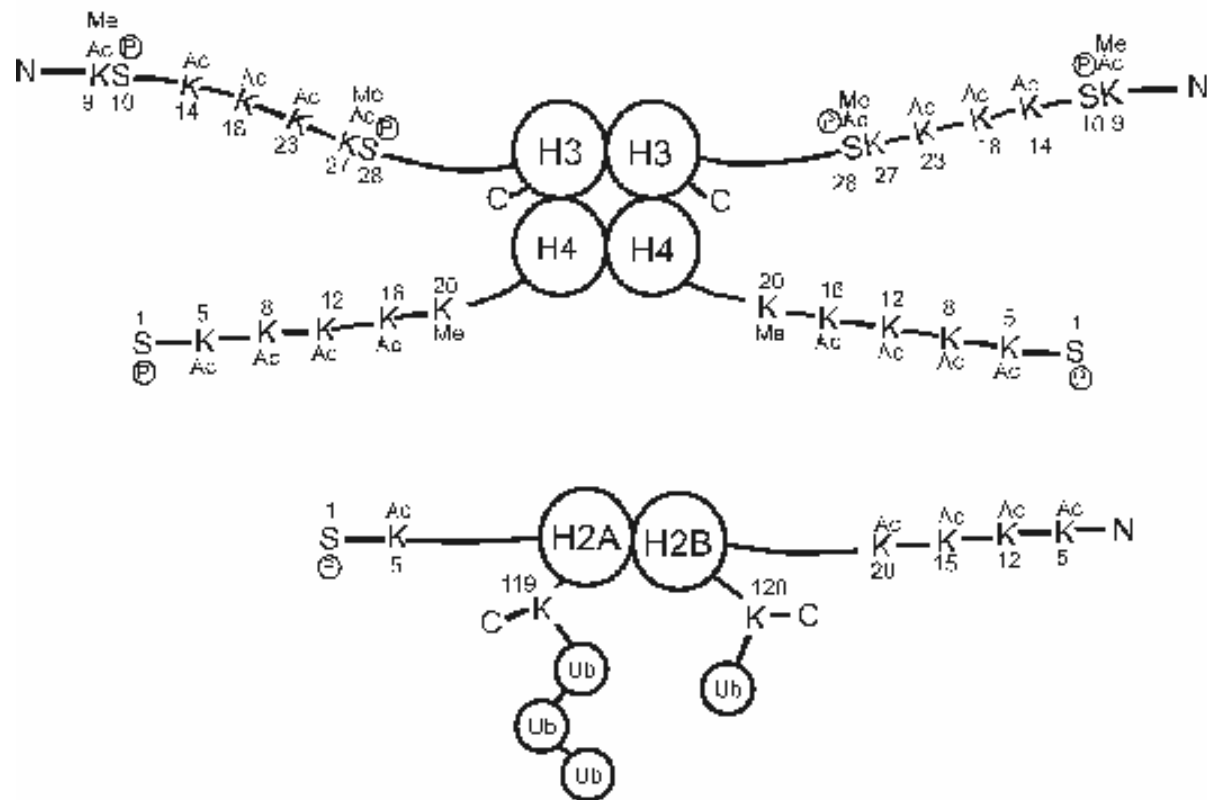
- Konkrétní kovalentní modifikace nebo jejich kombinace (jejich konfigurace) představují **specifické značky pro specifické proteinové komplexy s odlišnými funkcemi.**

Hypotéza „histonového kódu“



◀ acetylace ◆ metylace ● fosforylace

Hypotéza „histonového kódu“



„Formátování genetického textu“

- Psaný text „formátujeme“. Např. podtrháváme, píšeme proloženě, tlustě a podobně - tím upřesňujeme smysl, posunujeme význam...
- Modifikace histonů funguje jako formátování při čtení/využívání genetické informace.

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

- Multiproteinové komplexy, které mění konformaci histonů a DNA / pozici nukleosomů, využívají k tomu energii z hydrolýzy ATP.
- Substrátem není mononukleosom, spíše řetězec nukleosomů.
- **SWI/SNF, RSC, NURF, CHRAC, ACF, FACT.**
- Klasifikace podle ATPázové podjednotky:
 - SWI2/SNF2
 - ISWI
 - Mi-2 (+ deacetylázová podjednotka)

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

- Aktivita ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů je obecně nutná všude tam, kde se proměňuje uspořádání nukleosomů, pro udržování chromatinové plasticity.
- Zda participuje na aktivaci nebo represi, záleží více na rovnováze ostatních ko-aktivujících nebo ko-reprimujících aktivit.

⇒ Jejich součinnost nutná pro aktivátory i represory.

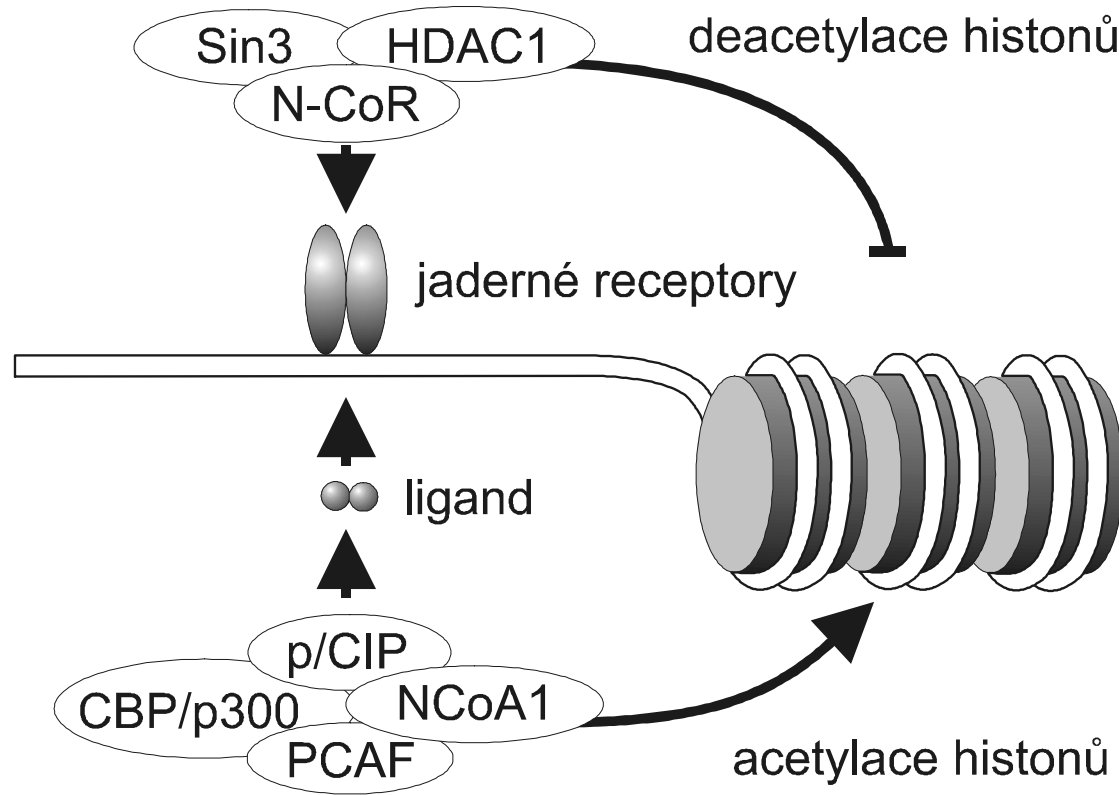
Součinnost jednotlivých typů přestavby chromatinu

- komplexy Mi-2
- sestavování nukleosomů: acetylace H4 (lys 5 a 12), účast remodelujících komplexů
- rozlišení heterochromatinu a euchromatinu, inaktivace chromozomu X
- zvláště komplexní je regulace genové exprese

Jaderné receptory

- příklad: **RAR/RXR**
- Bez ligandu: aktivní represe za účasti korepresorů **N-CoR** („nuclear receptor co-repressor“) nebo **SMRT** („silencing mediator of retinoid and thyroid receptors“), které interagují s proteinem **Sin3** a tedy s **HDAC1**.
- S ligandem: konformační změna **RAR/RXR** → disociace komplexu **N-CoR/Sin3/HDAC1** a vytvoření aktivujícího komplexu - jeho součástí je **p300/CBP**, **PCAF**, koaktivátory z rodiny **p160** (např. **p/CIP** - „p300/CBP cointegrator-associated protein“, **NCoA-1** - „nuclear coactivator-1“, **SRC-1**, **NCoA-2 = TIF-2**).

Jaderné receptory



Jaderné receptory

- **CARM1** („coactivator-associated arginine methyltransferase 1“) - interaguje s C-koncem koaktivátorů p160 a metyluje H3 - potencuje aktivaci
- RNA koaktivátor **SRA** („steroid receptor coactivator“) - funguje jako RNA transkript a je součástí komplexu SRC-1 (popsáno pro steroidní hormony)
- možná součinnost glukokortokoidního receptoru, RAR, estrogenového receptoru s remodelujícími komplexy **SWI2/SNF**
- aktivující komplex (asi 15 proteinů) **DRIP/TRAP**, jehož spojení s receptory (thyroidní, vit D) závislé na ligandu

Nádorový supresor Rb

- Součástí komplexu Rb-E2F je **HDAC1**.
- Alespoň jeden z faktorů E2F (E2F1) je pozitivně regulován přímou acetylací histon acetyl transferázami **CBP/p300** a **PCAF**. **HDAC1** deacetyluje a tím reprimuje E2F1.
- Součástí represivního komplexu Rb-E2F/HDAC1 je **hSWI/SNF***: fosforylace Rb vede k uvolnění HDAC1, v další fázi se uvolňuje také hSWI/SNF.
- * Rb není schopen suprimovat růst v nepřítomnosti BRG1 (součást SWI/SNF), což naznačuje, že **BRG1** samotný může být nádorovým supresorem. Inaktivující mutace BRG1 byly skutečně detekovány v některých nádorových buněčných liniích, ve kterých byl zároveň prokázán funkční („wild-type“) Rb.

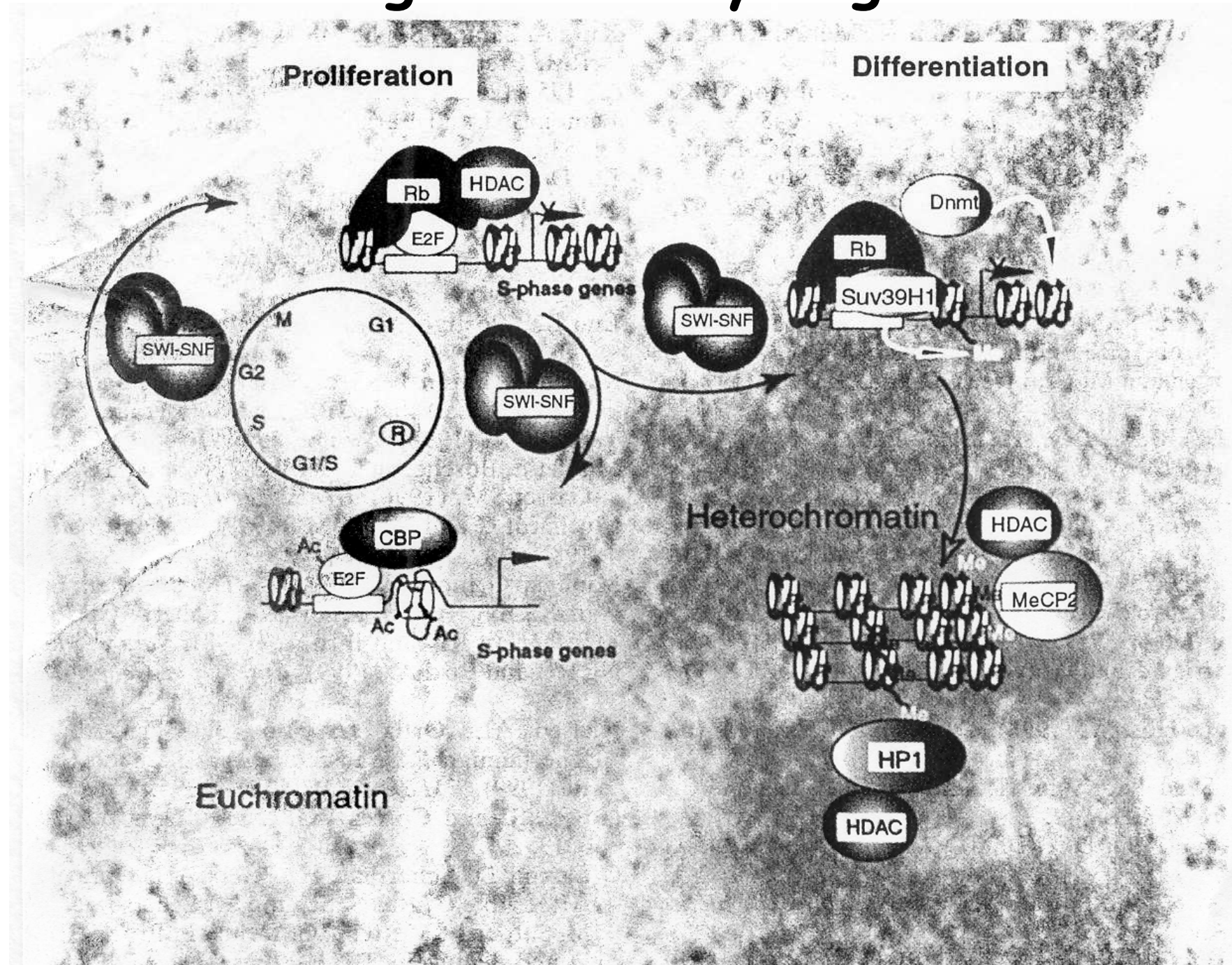
Nádorový supresor Rb

- Rb funguje v součinnosti s histon H3 metyltransferázou (pravděpodobně **Suv39H1**).
- Rb funguje v součinnosti s DNA metyltransferázou **DNMT1** - geny Rb inaktivovány hypermetylací CpG v promotorové oblasti.

⇒ Model regulace cílových genů E2F:

- **proliferující buňky:** regulace cyklickými interakcemi s HATs a HDACs, ale zůstávají součástí euchromatinu
- **diferencující buňky:** cílové geny E2F metylovány jak na histonu H3 tak na úrovni DNA - „přemístění“ genů do heterochromatinu

Model regulace cílových genů E2F



Nádorový supresor p53

- **CBP**, **p300** jsou koaktivátory p53.
- Jako odpověď na stres může být p53 **acetylován p300/CBP, PCAF**.
Acetylovaný protein p53 může být deacetylován **HDAC1, 2 a 3** - tím aktivita snížena.
- Funkčně nezbytnou součástí komplexu **MDM2-p53** je **p300**.
- Koordinace mezi p53 a **NF-κB** (navozuje rezistenci k apoptóze) zajišťují **p300 a CBP**: p53 a NF-κB o ně soutěží.
- Koordinace mezi p53 a **E2F** (nutné pro přechod z G1 do S fáze) zajištěna **p300**.

Nádorové supresory BRCA1 a BRCA2

BRCA1

- **Exprese** BRCA1 může být u některých sporadických nádorů reprimována **aberrantní metylací promotoru** - a související deacetylací histonů.
- **Aktivita** BRCA1 modulována interakcí s **CBP** a **p300** a chromatin remodelujícím komplexem **SWI/SNF**.

BRCA2

- **á** histon acetyltransferázovou aktivitu.
- Interaguje s **PCAF**.

Přestavba chromatinu a vývojová onemocnění

Rubinstein-Taybiho syndrom

- Vrozené vývojové onemocnění spojené s mentální a růstovou retardací, typickými obličejovými malformacemi, širokými palci u nohou a rukou.
- Příčinou je zárodečná mutace jedné alely genu pro histon acetyl transferázu **CBP** (chromozom 16 p13.3) a následná snížená dávka genu („haploinsufficiency“).
- Onemocnění spojeno se **zvýšeným rizikem vzniku nádorů** (především nádory nervové soustavy a hlavy - ne leukémií).
- Gen je lokalizován na chromozomu 16 (p13.3).

Přestavba chromatinu a vývojová onemocnění

Coffinův-Lowriho syndrom

- Vrozené vývojové onemocnění spojené s těžkými psychomotorickými poruchami, obličejovými a progresivními skeletálními deformacemi.
- Příčinou je zárodečná mutace genu pro **Rsk-2** (protein fosforyluje mj. H3 jako odpověď na některé mitogenní signály).
- Gen je lokalizován na chromozomu X (p22.2).

Přestavba chromatinu a vývojová onemocnění

Rettův syndrom

- Progresivní neurodegenerativní onemocnění, které je jednou z nejčastějších příčin mentální retardace žen: pacientky se vyvíjejí normálně až asi do 6. až 18. měsíce života; následuje zástava psychického vývoje, postupná ztráta řeči a dalších mentálních schopností, rozvoj autistických projevů.
- Příčinou onemocnění je mutace v genu pro protein **MeCP2**, který rozpoznává metylované CpG sekvence.
- Gen je lokalizován na chromozomu X (q28).

Přestavba chromatinu a vývojová onemocnění

Williamsův syndrom

- Vzácné vrozené onemocnění charakterizované typickými obličejovými malformacemi, mentální retardací, sníženými rozpoznávacími a jazykovými schopnostmi.
- Onemocnění je spojováno s delecemi na chromozomu 7 v oblasti q11.23: v této oblasti se nachází několik genů, mezi nimi také **WCRF180** a **WBSCR9** - proteiny kódované těmito geny obsahují struktury typické pro proteiny, které jsou součástí ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů.

Struktura chromatinu a stárnutí??

- Stárnutí - souvislost se ztrátou chromatin silencing
- Stárnutí - nádory??

Epigenetické faktory a nádory

Chromatin a solidní nádory

- Gen **hSNF5/INI1** kóduje jednu podjednotku ATP-dependentního chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF. Mutace tohoto genu spojovány s velmi agresivními maligními rhabdoidními nádory u dětí, nádory, které se tvoří v ledvinách, v mozku a měkkých tkáních.
- **BRG1** je součástí ATP-dependentního chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF, který funguje mimo jiné v součinnosti s Rb. Bez funkčního BRG1 není Rb schopen suprimovat růst. Inaktivující mutace BRG1 byly detekovány v některých nádorových buněčných liniích, které měly zároveň funkční Rb.

Rubinstein-Taybiho syndrom

- Onemocnění spojeno se **zvýšeným rizikem vzniku nádorů** (především nádory nervové soustavy a hlavy - ne leukémií).
- Gen CBP se nachází ve dvou translokacích spojených s vývojem leukémií: **t(8;16) → MOZ/CBP** a **t(11;16) → MLL/CBP**.

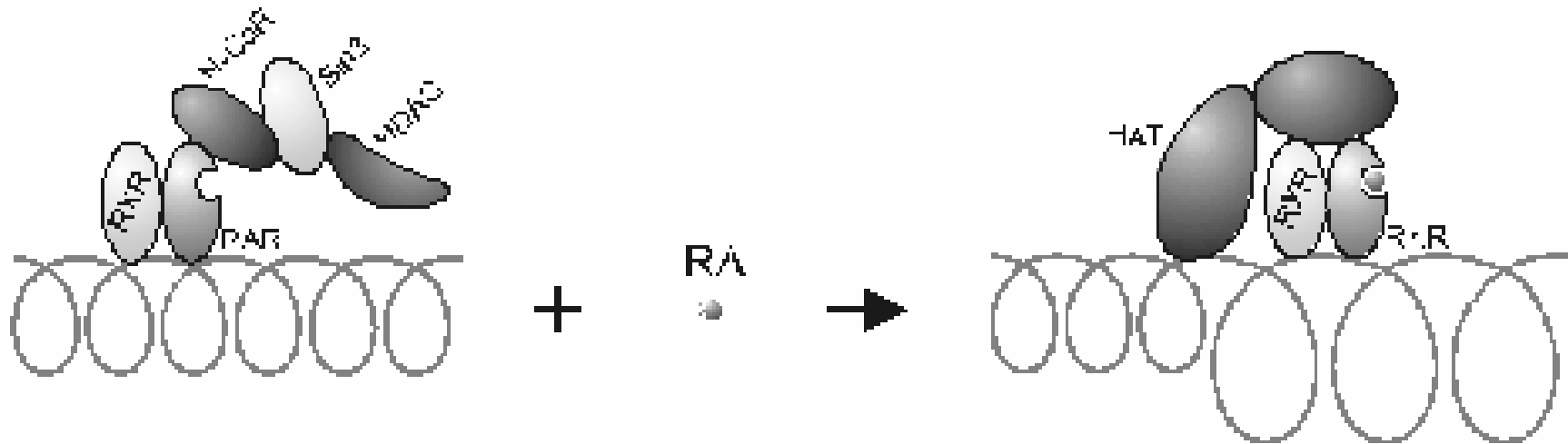
Chromatin a leukémie

- Diferenciace pluripotentní hematopoietické buňky regulována koordinovanou expresí celých skupin genů.
- Klíčovou roli hrají sekvenčně specifické TF.
- Pro úspěšný průběh jsou nezbytné faktory remodelující chromatin: celá řada z nich může být během leukemogeneze poškozená.

Akutní promyelocytární leukémie - APL

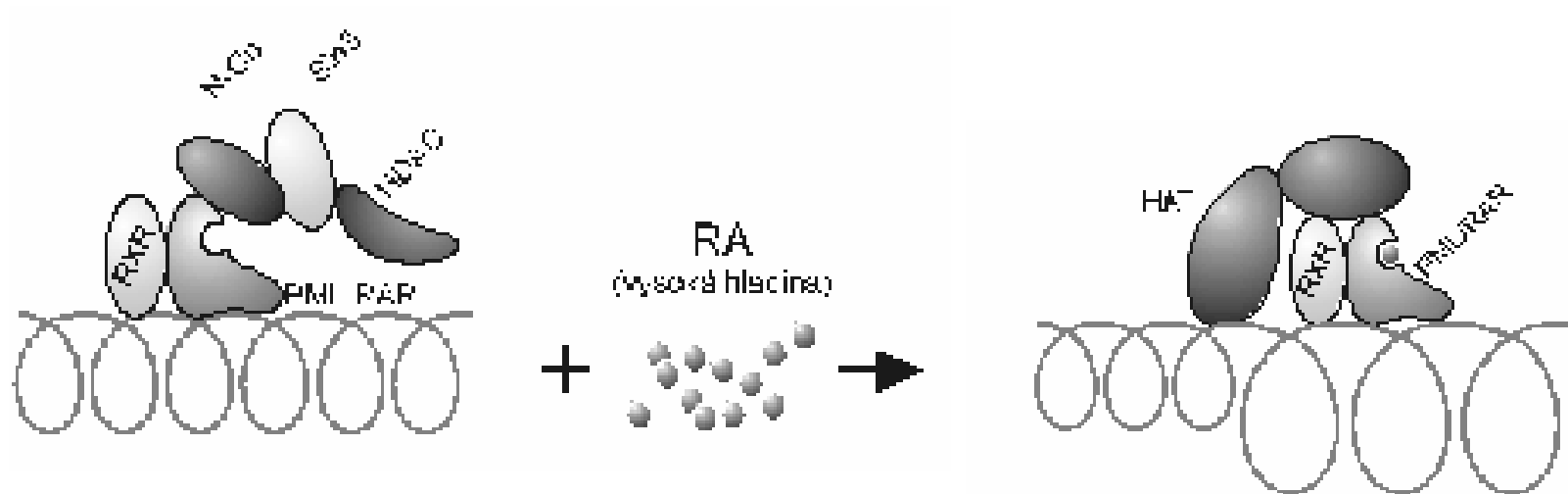
- Jediný typ leukémie, který odpovídá na diferenciační terapii, a to ATRA.
- Všichni pacienti s APL mají translokaci v genu $RAR\alpha$:
 - t(15;17) \Rightarrow PML-RAR
 - t(11;17) \Rightarrow PLZF-RAR
 - t(5;17) \Rightarrow NPM-RAR
 - t(11;17) \Rightarrow NuMA-RAR
- Všechny chiméry mají zachovanou tu část molekuly $RAR\alpha$, která zajišťuje vazbu na DNA, vazbu ligandu, korepresoru, koaktivátoru \Leftrightarrow **vazba na chiméru ji neaktivuje!!**

APL



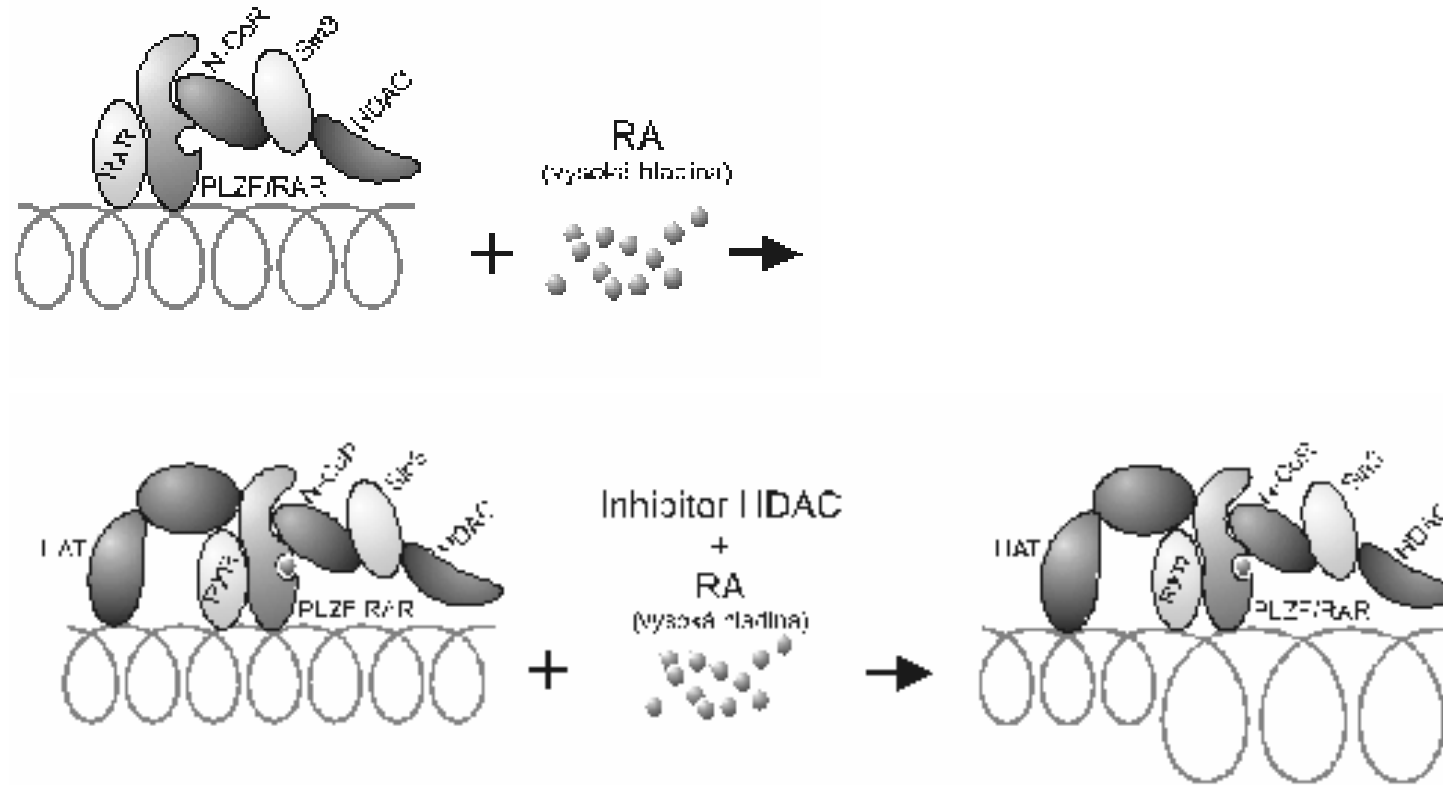
Represivní komplex heterodimeru RXR/RAR α
aktivovaný nízkými dávkami RA.

APL



Represivní komplex RXR/PML-RAR α aktivovaný farmakologickými dávkami RA.

APL

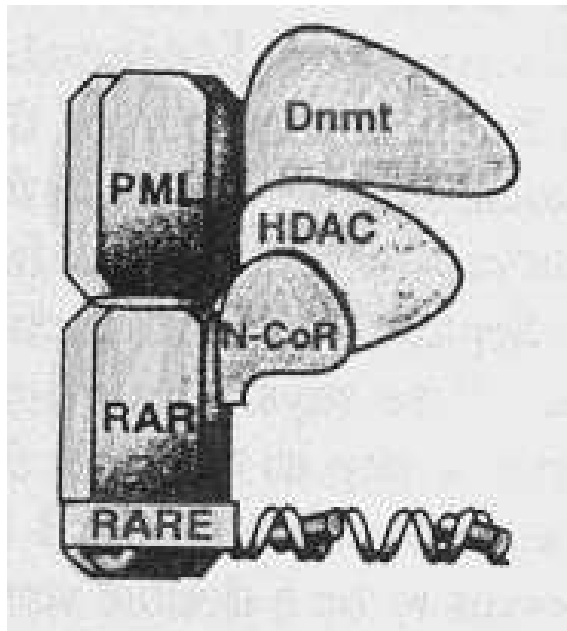


Represivní komplex heterodimeru RXR/PLZF-RAR α nelze aktivovat ani farmakologickými dávkami RA; lze jej aktivovat kombinací vysoké hladiny RA a inhibitorů histon deacetyláz.

APL: „gene lock-up“

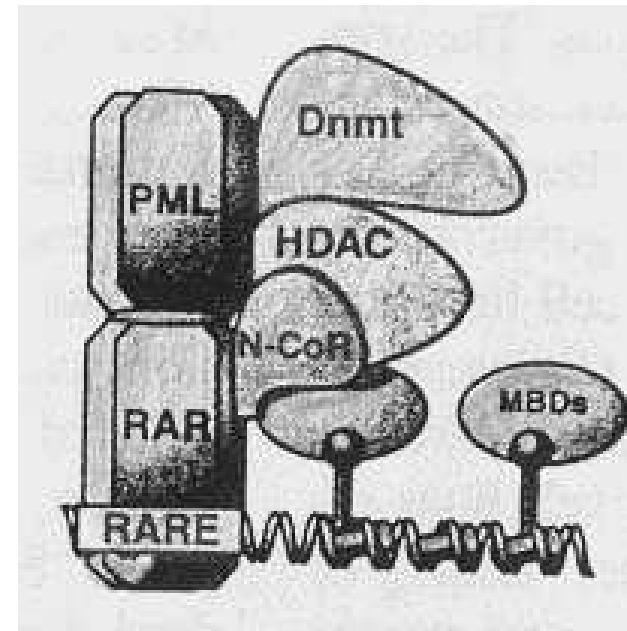
(Di Croce et al. 2002)

časná přechodná represe



hypoacetylovaný
chromatin

pozdní stabilní represe



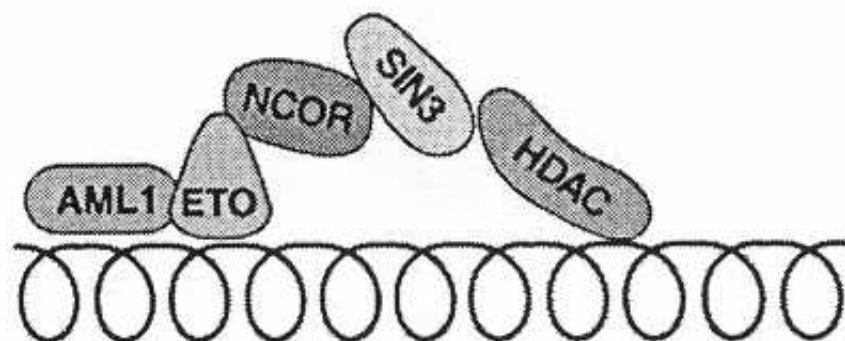
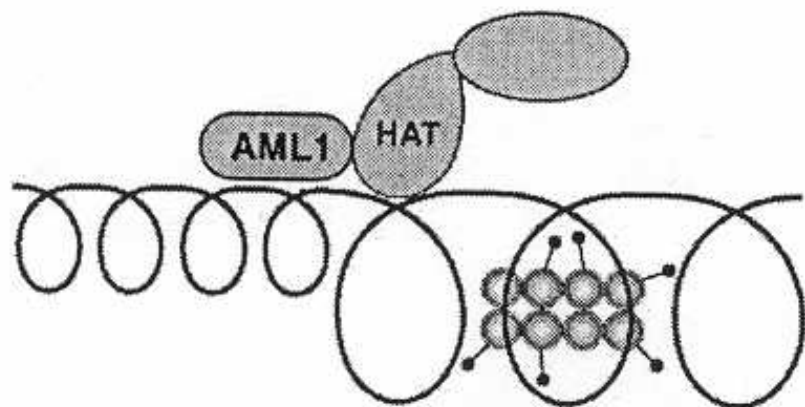
hypoacetylovaný a
hypermetylovaný
chromatin

AML-ETO

- Následek translokace t(8;21), vyskytuje se u 10 % pacientů s AML.
- AML1 je sekvenčně specifický TF nutný pro myeloidní zrání; interaguje s koaktivátorovým komplexem p300/PCAF.
- ETO reprimuje transkripci interakcí s komplexem N-CoR-Sin3-HDAC1.

⇒ AML/ETO se váže na cílové sekvence AML1, ale místo aktivujícího komplexu váže komplex represivní.

AML-ETO

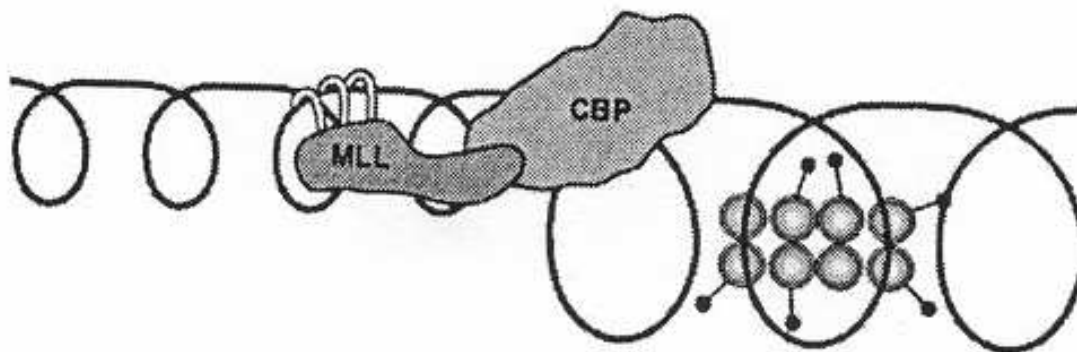
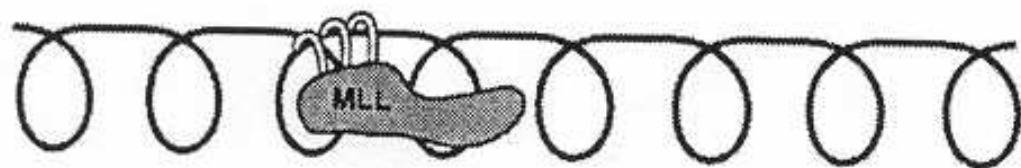


AML/ETO se váže na cílové sekvence AML1, ale místo aktivujícího komplexu váže komplex represivní.

MLL-CBP (p300, MOZ, TIF2)

- MLL může být postižen mnoha různými translokacemi - tvoří reciproké translokace až se 40 partnerskými geny (mezi nimi CBP a p300).
- MLL reguluje expresi genů HOX (homeobox geny), mimo jiné v součinnosti s ATP-dependentními chromatin remodelujícími komplexy.
- Translokace vedou ke vzniku chimér, které ztratily schopnost správné součinnosti s faktory, které mění strukturu chromatinu \Rightarrow deregulace genové exprese během krvetvorby \Rightarrow maligní transformace.

MLL-CBP



Chiméra nemá schopnost správné součinnosti s faktory, které mění strukturu chromatinu \Rightarrow deregulace genové exprese během krvinek tvorby.

Inhibitory histon deacetyláz - HDACIs - potenciální nádorová („chromatinová“) terapie?

TSA - trichostatin A

SPB - sodium phenylbutyrát

SAHA - suberanilohydroxamic acid

depsipeptidy

a další - trapoxin, oxamflatin,...

Inhibitory histon deacetyláz

- Účinek HDACIs je obecný, tj. globálně inhibují represivní aktivitu TF, které využívají jako korepresory HDACs k remodelaci chromatinu ⇒ jejich biologický efekt bude tkáňově specifický.
- × HDACIs inhibují růst, indukují apoptózu a diferenciaci u různých nádorových linií bez souvislosti s histologickým typem!!??
 - Zřetelný a výrazný protinádorový efekt a zároveň nepatrná toxicita u netransformovaných buněk (v koncentracích, které vedou k akumulaci acetylovaných histonů).
- × Obecně ale neplatí, že podávání HDACI zvrátí maligní fenotyp!!

Inhibitory histon deacetyláz

- U některých leukémií a solidních nádorů fungují v kombinaci s diferenciacními činidly:
 - **SAHA** je účinný při supresi růstu buněk nádoru prostaty (*in vitro* i *in vivo*)
 - kombinace **HDACIs** a **ATRA** při terapii APL
 - **SAHA** v kombinaci s **ATRA** účinný při supresi růstu neuroblastových buněk
 - **HDACIs** zcitlivují AML blasty s translokací AML1-ETO k účinku **ATRA**

Inhibitory histon deacetyláz

? prevence ?

- Nízké dávky SAHA v dietě snižovaly incidenci a velikost nádorů u krys, u kterých byla indukována tvorba nádorů mléčné žlázy N-metyl-nitroso-ureou.
- Vysoký obsah vlákniny v potravě představuje snížené riziko vývoje kolorektálního karcinomu ⇔ při trávení vlákniny střevní mikroflorou vzniká ve vysokých koncentracích sodium butyrát.

Inhibitory histon deacetyláz

- Počet genů ovlivněných těmito inhibitory je konečný a některé z „up-regulovaných“ genů kódují růstové (nádorové) supresory.
- Pokud je inhibice transkripce zprostředkovaná HDACs spojena s metylací DNA, pak samotné použití HDACIs nefunguje, ale může být úspěšné v kombinaci s 5-aza-2'-deoxycytidinem (inhibitor DNA metyltransferáz).

Metylace DNA a nádory

- Původní funkcí metylace DNA byla ochrana genomu: metylace měla zabránit šíření parazitických elementů (transpozonů); tento obranný systém se začal až později využívat i jako metoda regulace genové exprese.
- Distribuce („pattern“) metylace genomu se ustavuje během embryogeneze.
- Metylovány především parazitické (např. LTR) a repetitivní sekvence, konstitutivní heterochromatin v pericentrických oblastech některých chromozomů.

Metylace DNA a nádory

Distribuce metylace je v genomu nádorových buněk často pozměněna:

- rozsáhlé hypometylované oblasti
- hypermetylace ve specifických oblastech

Hypometylace DNA u nádorů

- Metylace transkripčně inaktivuje, zabraňuje transpozicím a homologní rekombinaci, a tak přispívá genomové stabilitě.
- V nádorových buňkách dochází k rozsáhlým **demetylacím repetitivních sekvencí** a stupeň hypometylace koreluje s progresí onemocnění.
- Hypometylace repetitivních sekvencí může být **časnou událostí** kancerogeneze a může predisponovat buňku k přestavbám genomu mechanismem rekombinace.

Hypermethylace DNA u nádorů

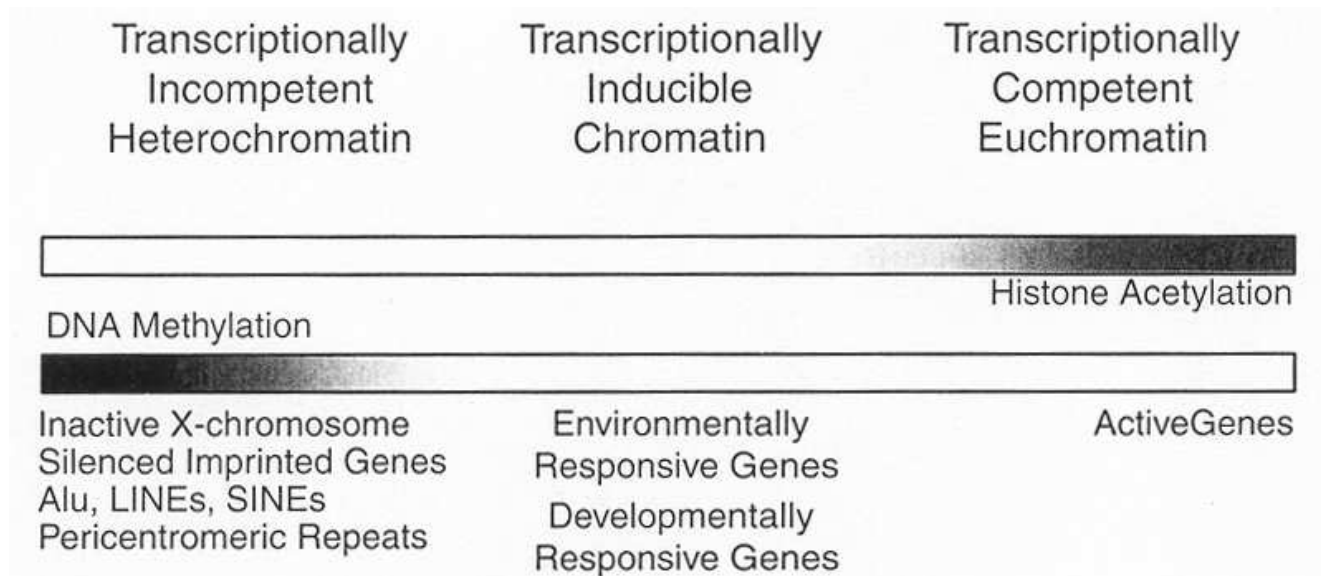
- CpG ostrůvky jsou obvykle v promotorových oblastech na 5' -konci genů.
- Odhaduje se, že v lidském genomu je asi 45.000 CpG oblastí.
- Methylace CpG oblastí je v normálních buňkách poměrně vzácná, hraje roli při inaktivaci chromozomu X a při imprintingu - vtiskování (vývojově specifická inaktivace genů), vzrůstá s věkem a ve tkáňových kulturách.
- V nádorových buňkách hypermethylace v promotorech genů pro nádorové supresory, genů účastnících se mezibuněčných adhezí, oprav DNA, ..

Geny inaktivované během kancerogeneze metylací DNA

- Geny účastnící se regulace buněčného cyklu:
Rb, p16^{INK4A}, p15, p14^{ARF}, p73
- Geny účastnící se oprav DNA:
MLH1, O⁶MGMT, GST π , BRCA1
- Inhibice apoptózy:
DAP-kináza, prokaspáza-8, TMS1
- Invaze nádorů a angiogeneze:
E-cadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP3, thrombospondin 1
- Členy signálních drah:
ER, RAR β , Androgen receptor, Endothelin B receptor, RASSF1A

Hypermethylace DNA u nádorů

- Na rozdíl od genetických změn, které se dějí po skocích, epigenetické změny mohou být postupné: DNA metylace a acetylace histonů fungují jako tzv. „transkripční reostat“



Hypermethylace DNA u nádorů

- Na rozdíl od mutací, hypermethylace promotorů je potenciálně reverzibilní: taková epigenetická plasticita může odrážet dynamiku některých procesů během kancerogeneze, např. během tvorby metastáz:
- Např. ztráta **E-cadherinu** se uplatňuje v počáteční fázi tvorby metastáz při uvolňování buněk z primárního nádoru X schopnost invadujících buněk tvořit metastatická ohniska může být podmíněna re-expresí E-cadherinu.
- Mutace E-cadherinu, které zcela vyřazují funkci tohoto proteinu, jsou vzácné, s výjimkou pacientů s familiálním nádorem žaludku s vrozenou mutací E-cadherinu a pacientů s poměrně vzácným lobulárním karcinomem prsu; tyto nádory jsou silně invazivní, ale výsledné metastázy se tvoří spíše podél bazálních membrán, neprorůstají do orgánů.

KONEC