

Regulace exprese lidského genomu

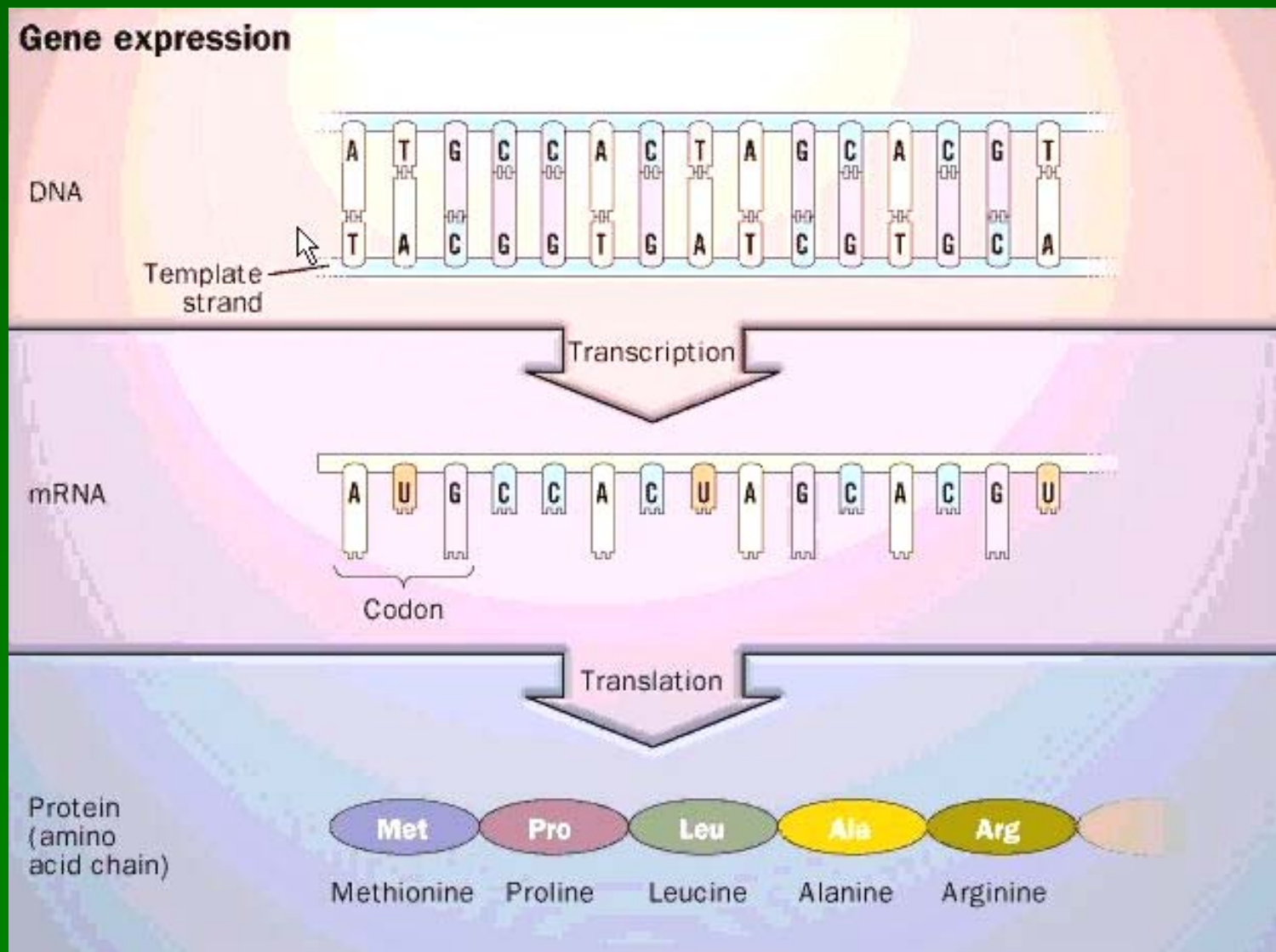
Úvod (tok genetické informace, skladba lidského genomu, velikost - porovnání s jinými organismy, úrovně regulace)

Porovnání regulace transkripce u pro- a eukaryot

Regulace transkripce na úrovni genetického kódu

Regulace na úrovni chromatinu a jádra

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

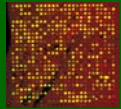
24 různých molekul, 22 autosomů, 2 pohlavní chr., velikost 50-250 Mb, 35 000 genů

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

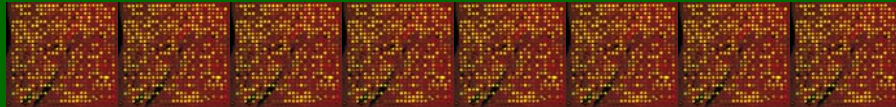
10% tvoří repetice (např. Alu sekvence)

10% tvoří transpozony

Počty genů u různých organismů

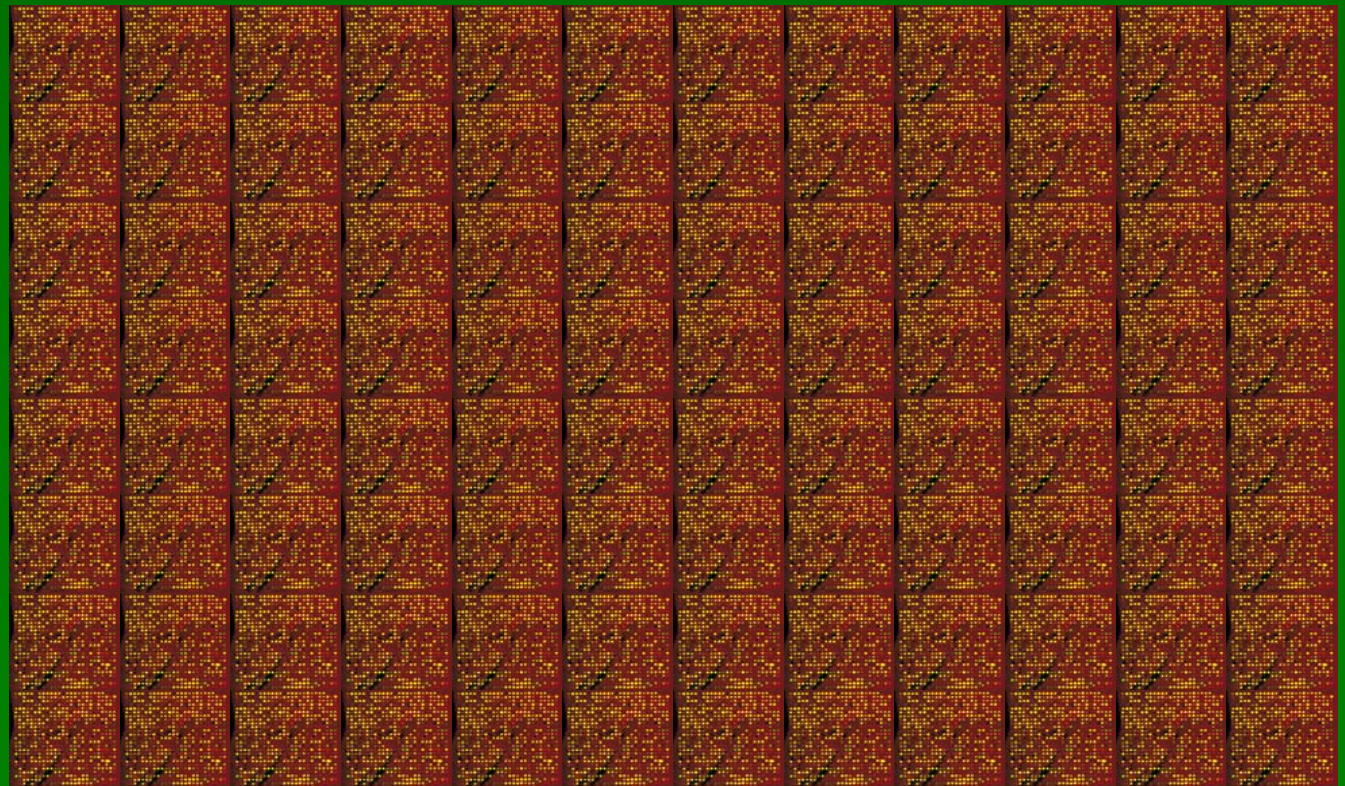


Mycoplasma (600)



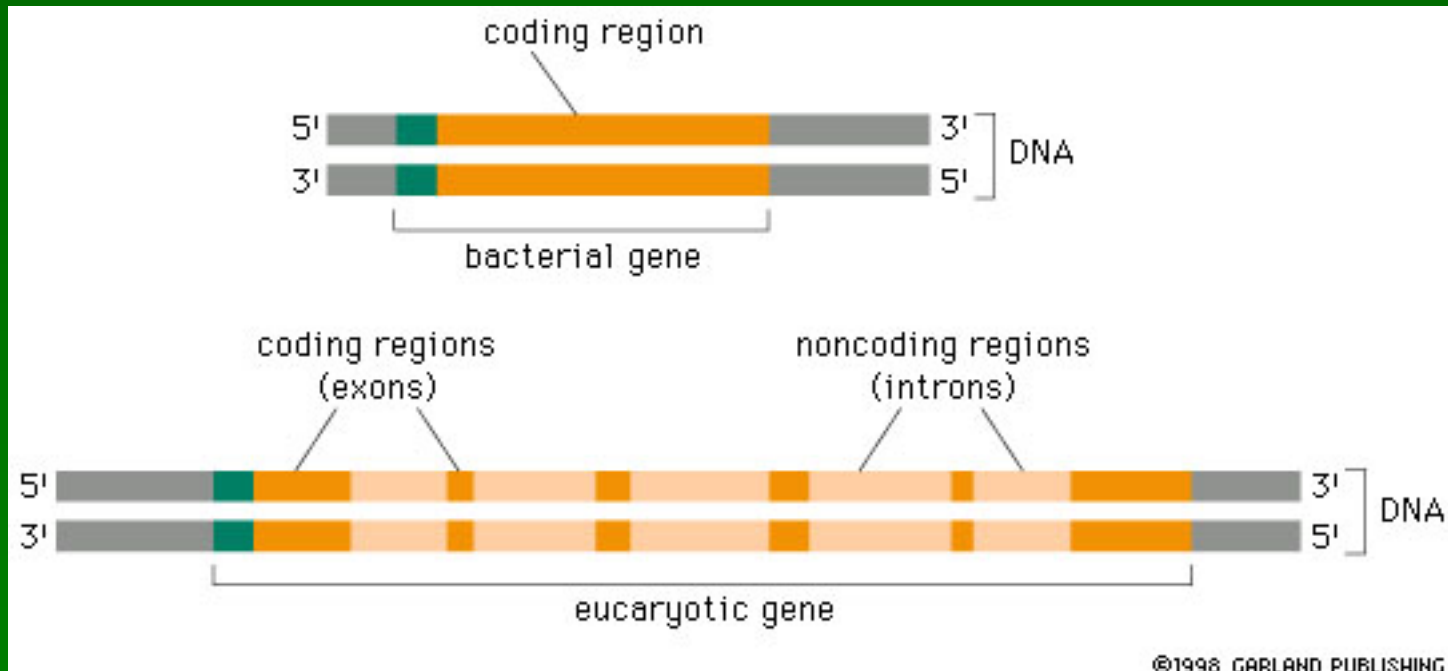
Escherichia coli (4000)

člověk
+ vyšší
organismy
(35 000)



Skladba genů u pro- a eukaryot

Genom eukaryot obsahuje mezi kodujícími sekvencemi řadu nekódujících oblastí - intronů



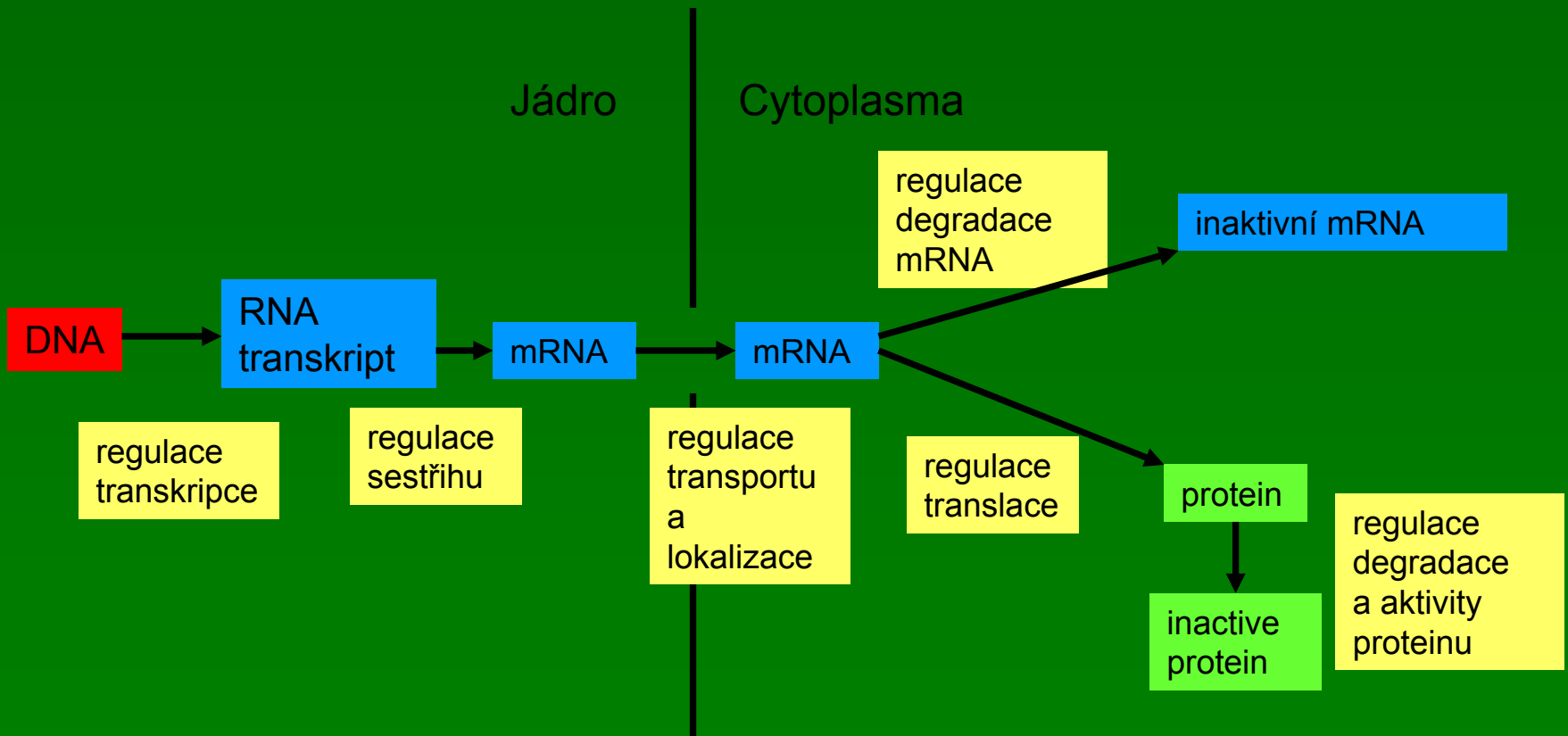
Geny : prům. velikost 10-15 kb ale variabilní od stovek bp- Mb (tRNA – Dys); exony činí od 100% až po 0.6% (Dys)

Introny jsou velmi variabilní: 0-118 na gen (u colagenu); délka 0.5 kb pro β -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



Epigenetická regulace exprese

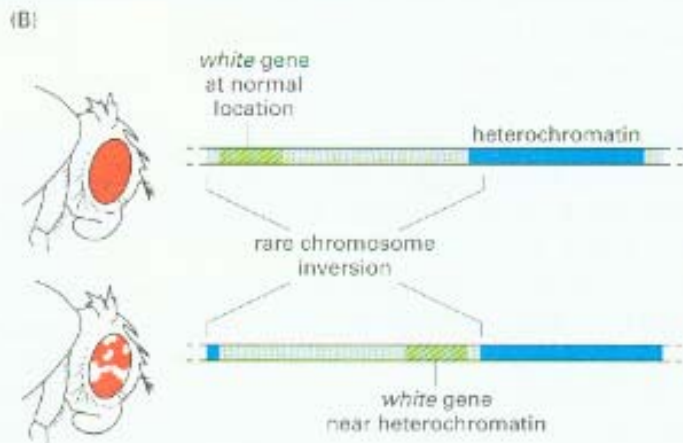
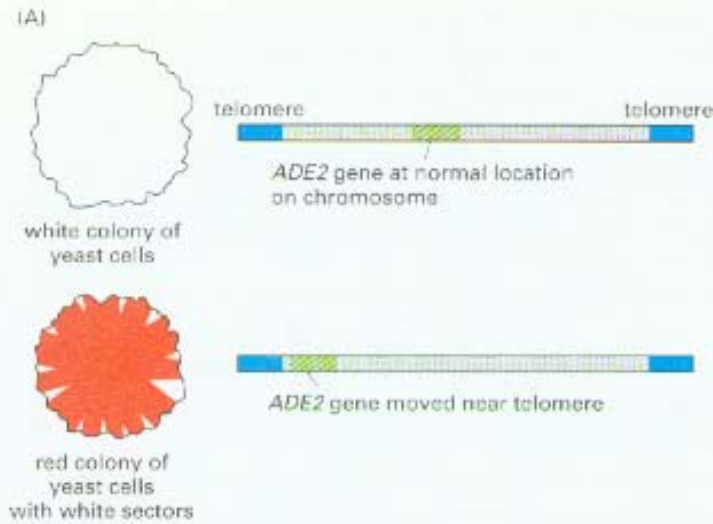
Epigenetika zahrnuje jevy související s dědičnou modifikací struktury a transkripce chromatinu jež navazuje zejména na:

- modifikace histonů
- metylaci DNA
- strukturu chromatinu a genomu

Patří zde PEV, umlčování genů heterochromatinem, LCR regulace, 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.

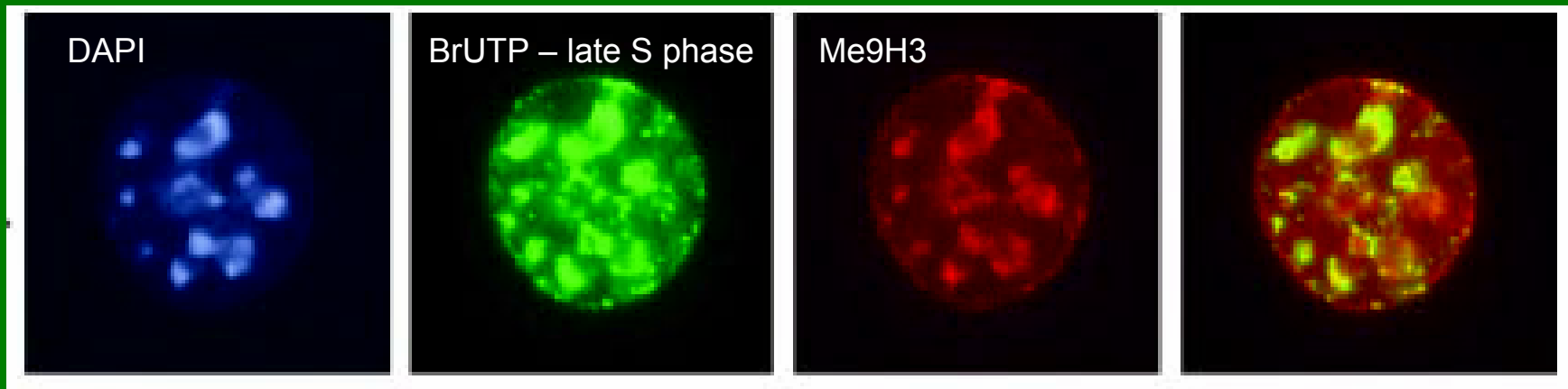
Jev bylo možno potlačit nebo naopak zesílit. Časem bylo nalezeno 50 genů modifikujících tento fenomén – Su(var) nebo E(var).

Nejlépe charakterizovaným modifikátorem je **HP1 protein**. HP1 obsahuje evolučně stálou chromo doménu, která se vyskytuje také u vývojového regulátoru **Polycom (PC)** proteinu.

Dalším je pak **SUV39H1**, který je příbuzný **trithorax (TRX)** proteinům a zajišťuje metylaci H3-K9.

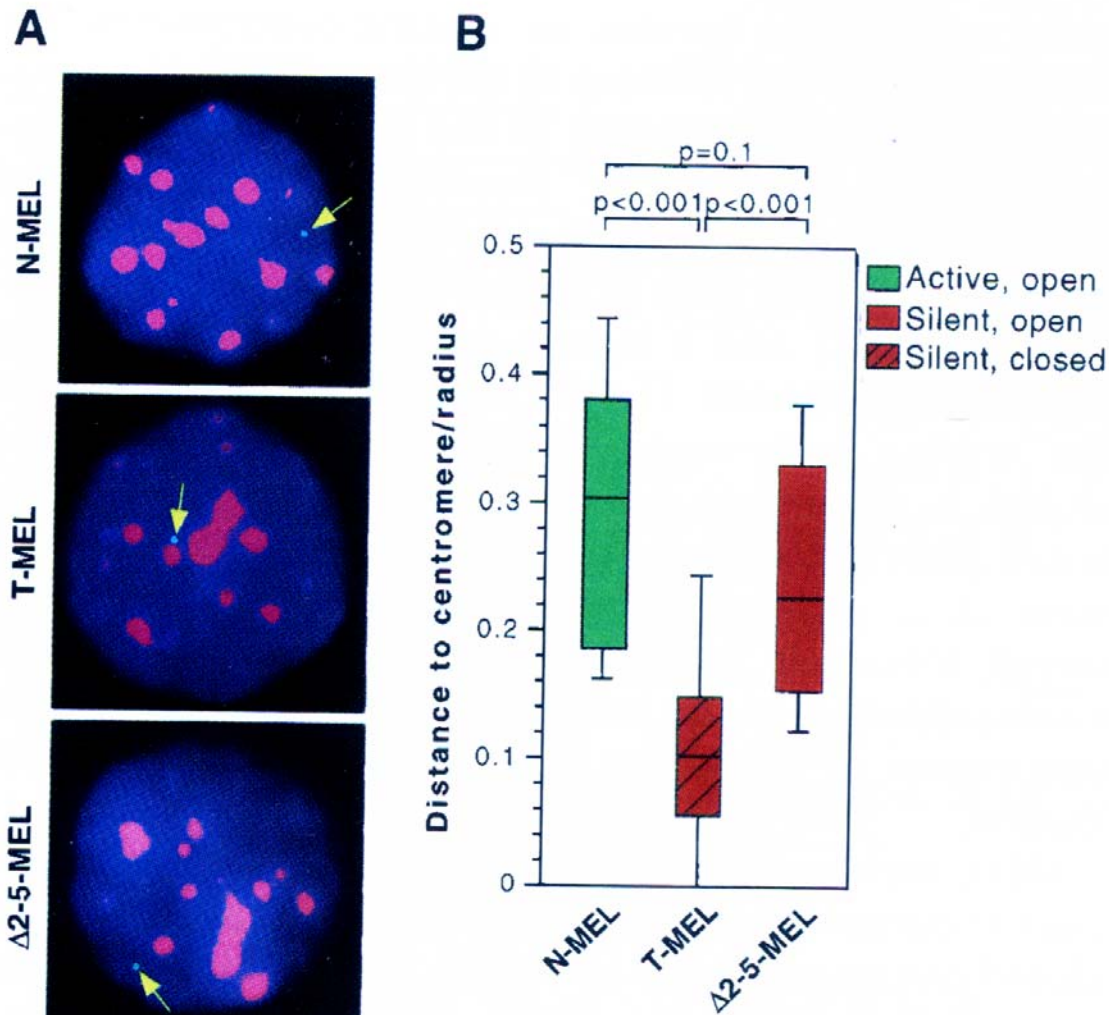
Úloha heterochromatinu při řízení exprese

- 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 buněk

T-MEL – exprese umlčená
gen je blízko heterochromatinu

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

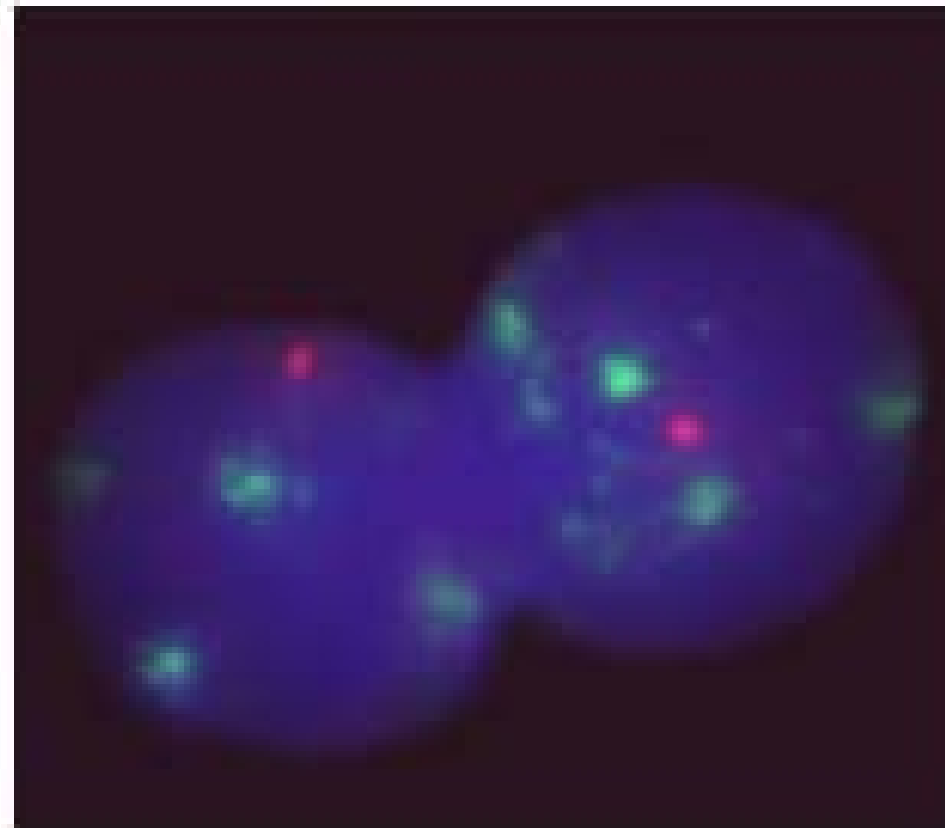
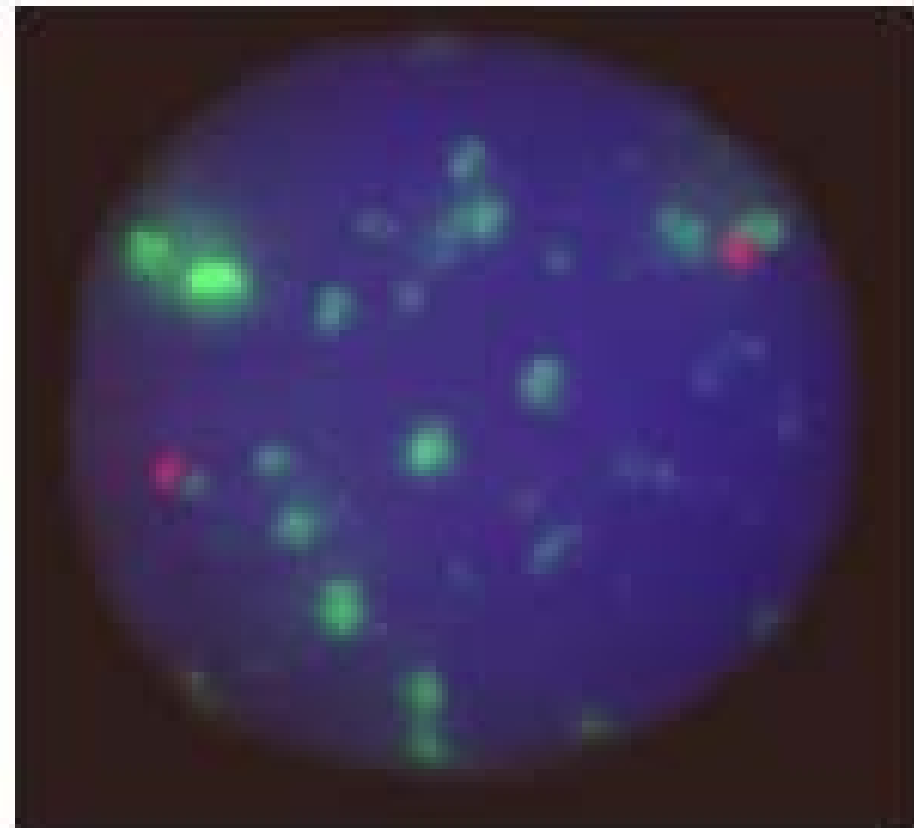
N-MEL – struktura je otevřená, gen je aktivní

Úloha heterochromatinu při řízení exprese

Vzdálenost Rb genů k chromocentrum (Bártová et al., 2000)

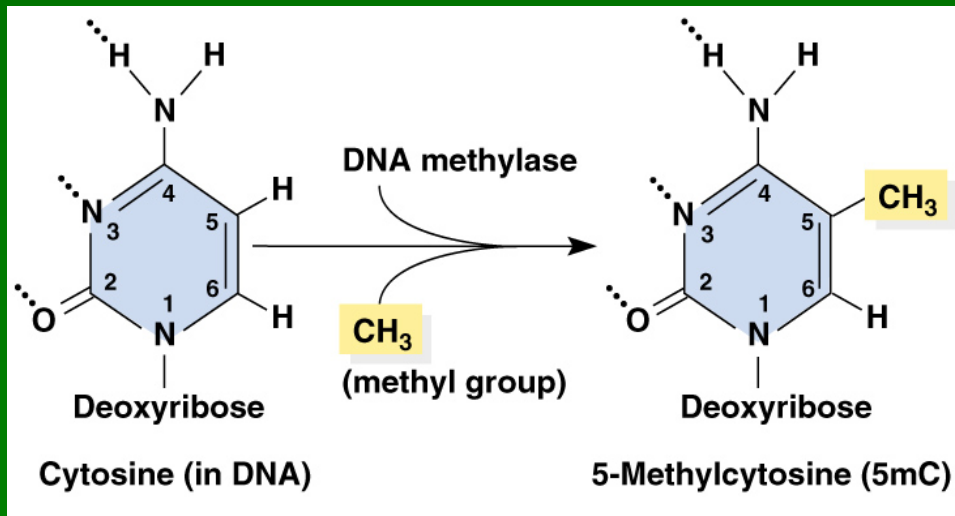
Buňky HL-60

Granulocyty



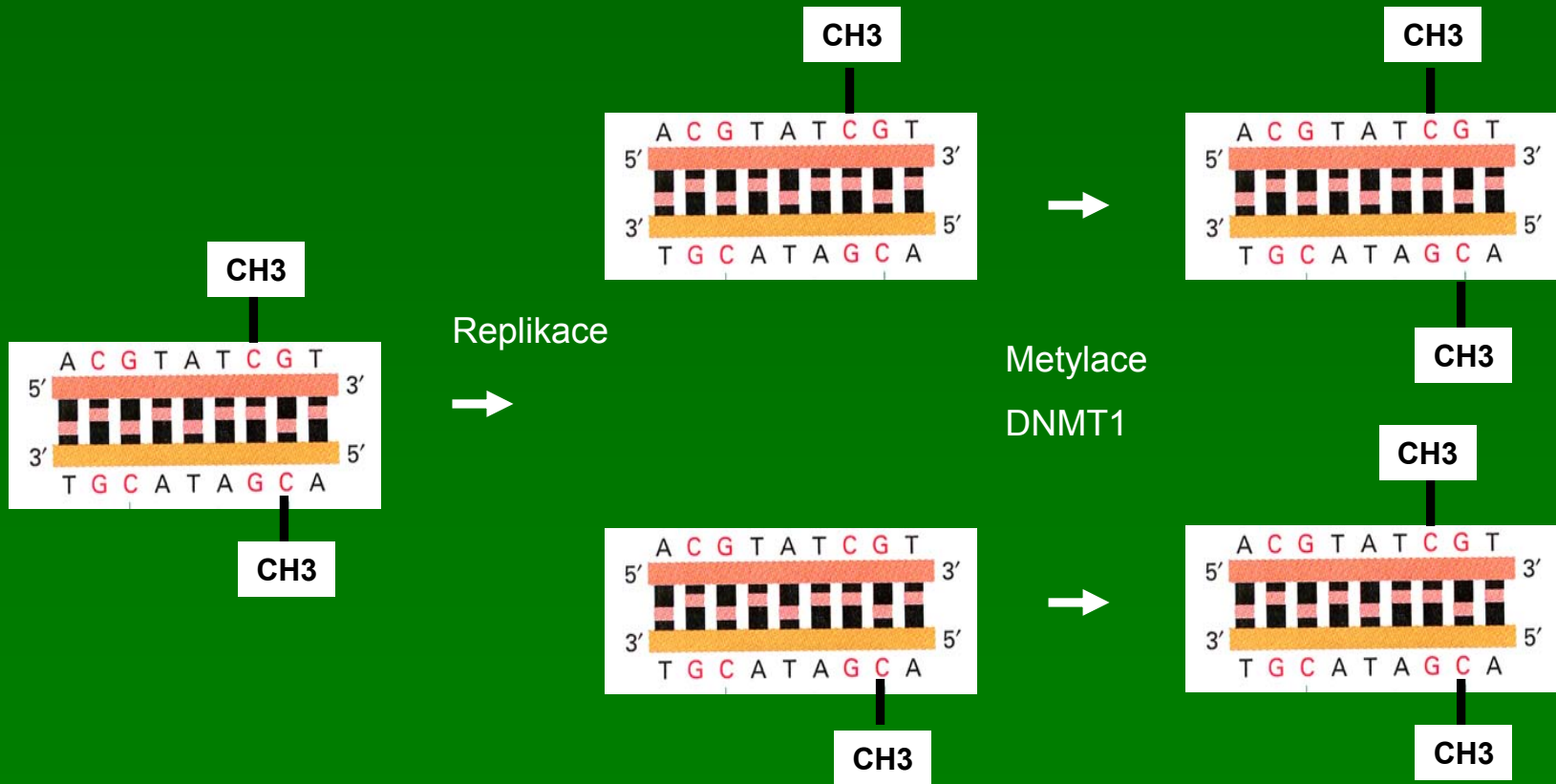
Metylace DNA

- 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“



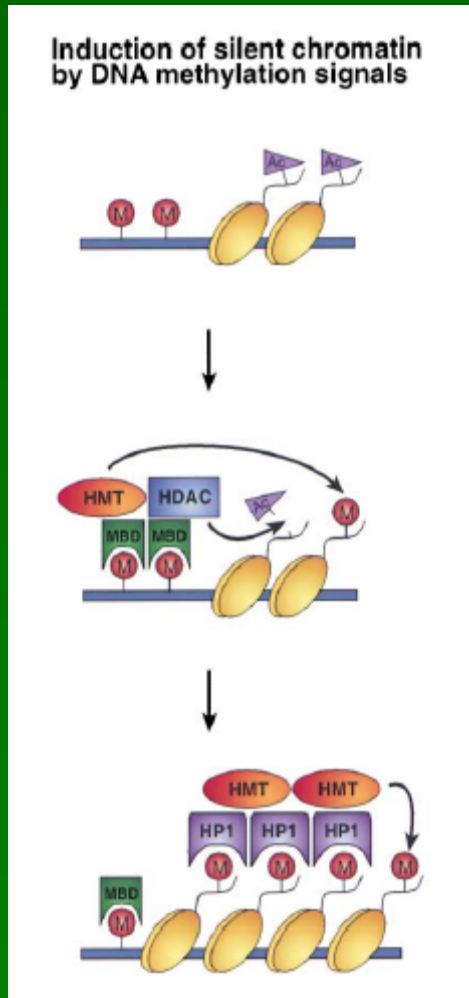
Metylace DNA je důležitá

- 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

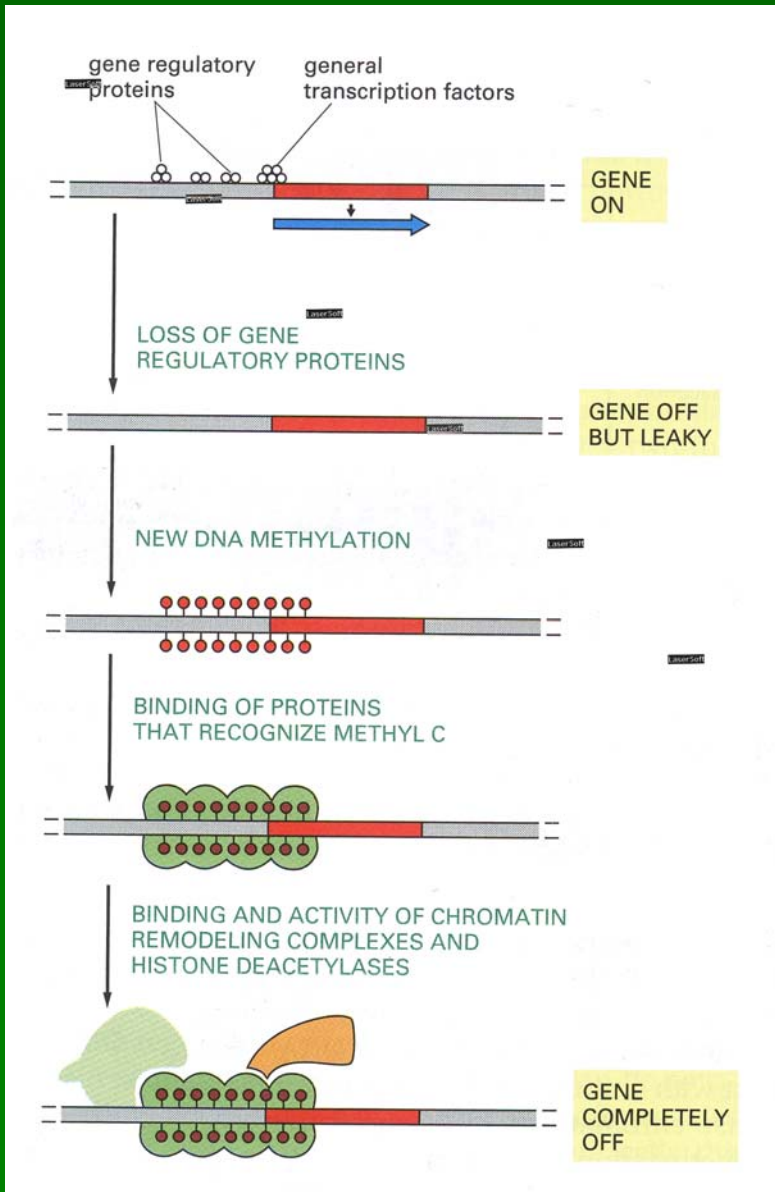
- **Transkripčně aktivní geny** obsahují podstatně menší hladinu metylované DNA ve srovnání s inaktivními geny,
- **Inaktivní chromatin je obvykle metylován** (např. inaktivní X-chromosom nebo inaktivované supresorové geny u nádorů)
- **Chromatin** v místě metylace DNA je **kondenzovanější** a brání 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

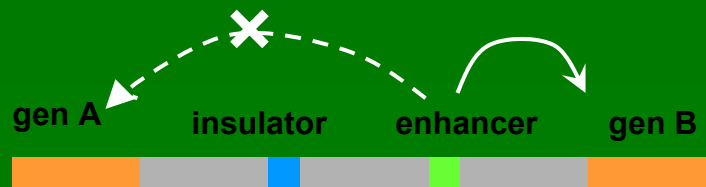
Insulator – hraniční element

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) blokuje funkci enhancerů (pokud se nacházejí mezi enhancerem a cílovým genem)



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

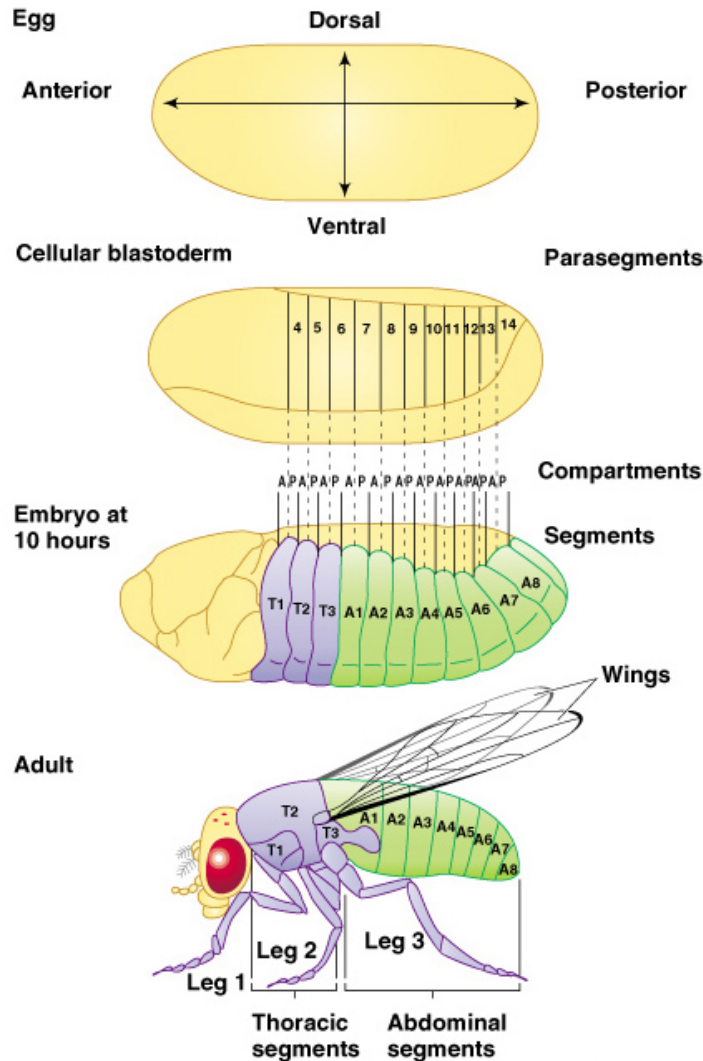
Ontogeneze je kontrolována důmyslnou **kaskádou genů**, jež zahrnují transkripční faktory nejprve rozdělující embryo do větších domén a následně do jemnějších podjednotek. **Identita jednotlivých částí těla je dána určitým TF.**

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

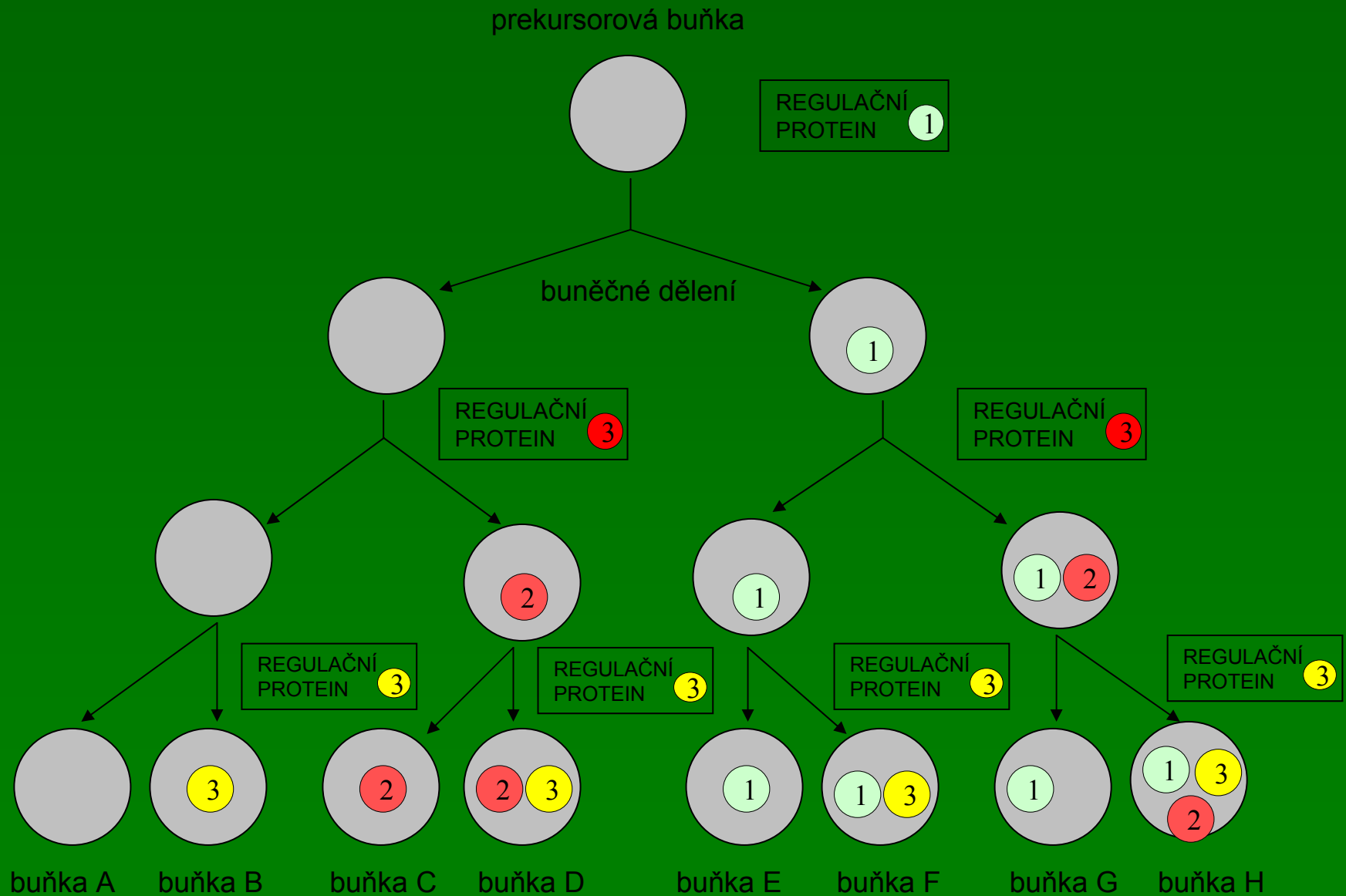


Molekulární gradienty v anterior-posteriorálním a dorso-ventrálním směru vedou k formování parasegmentů a poté segmentů u embrya i dospělého jedince

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

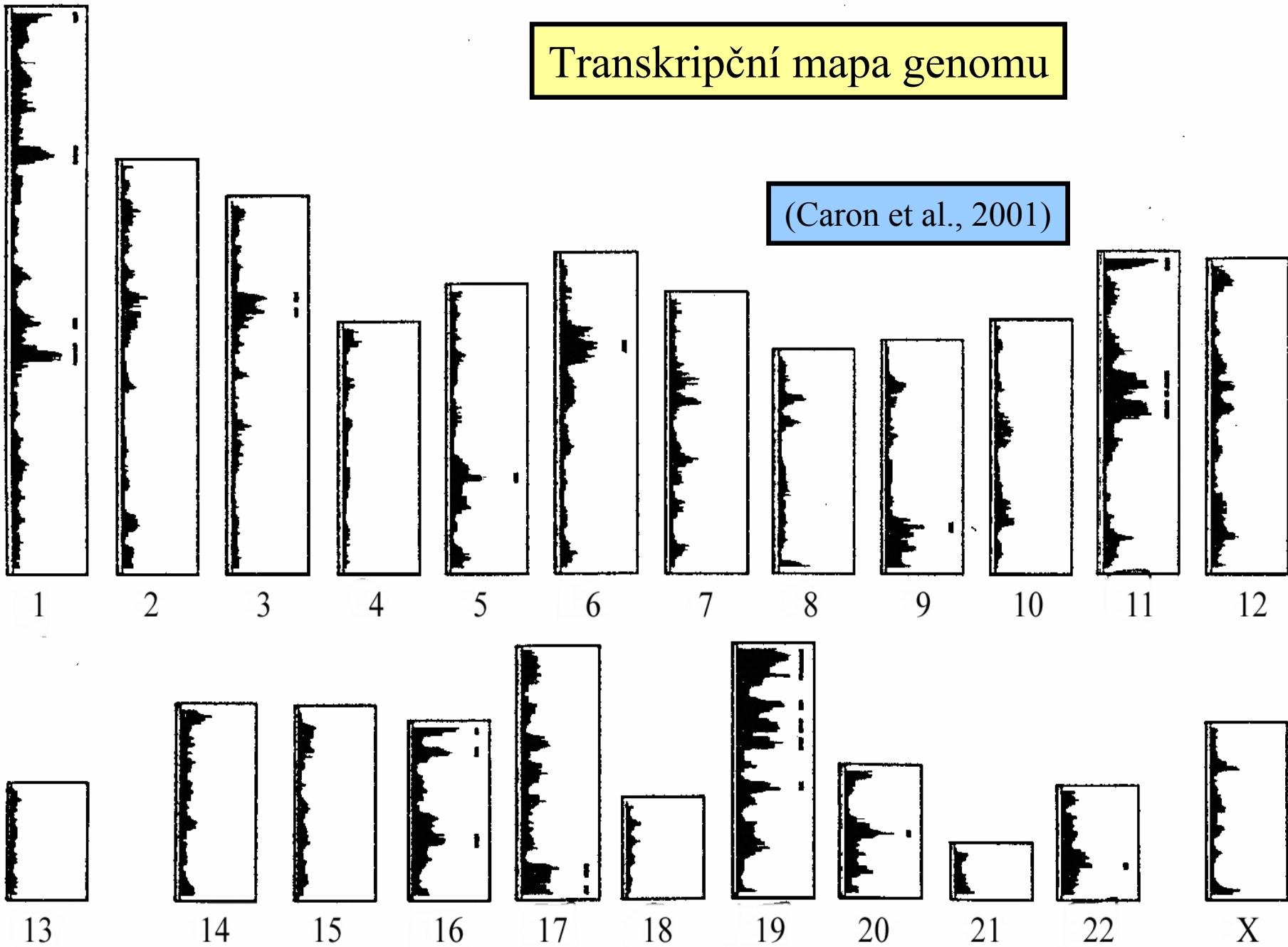
Regulace transkripce na úrovni genetického kódu

Regulace na úrovni chromatinu a jádra

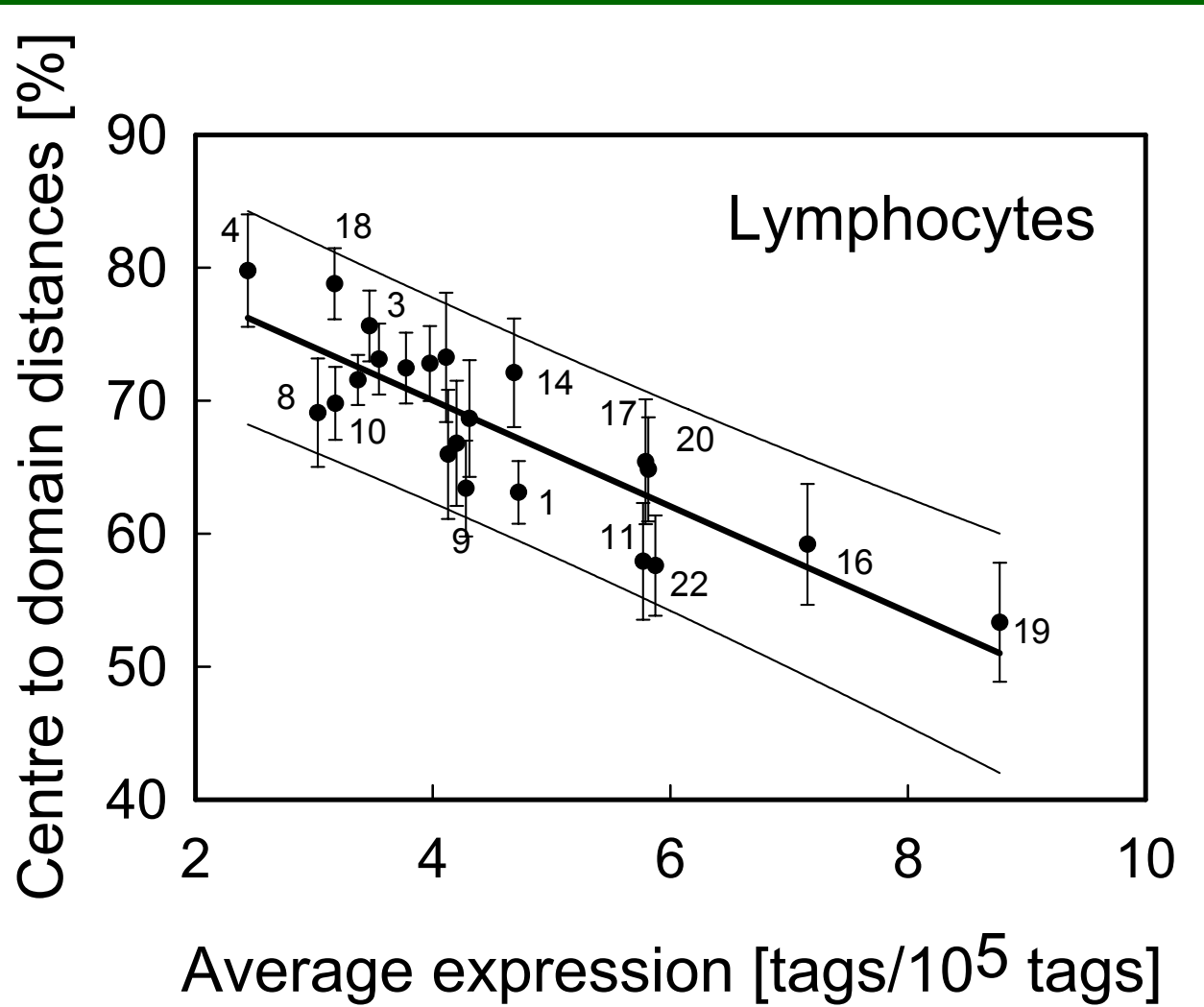
Úroveň sestřihu, translace, degradace RNA a proteinu

Transkripční mapa genomu

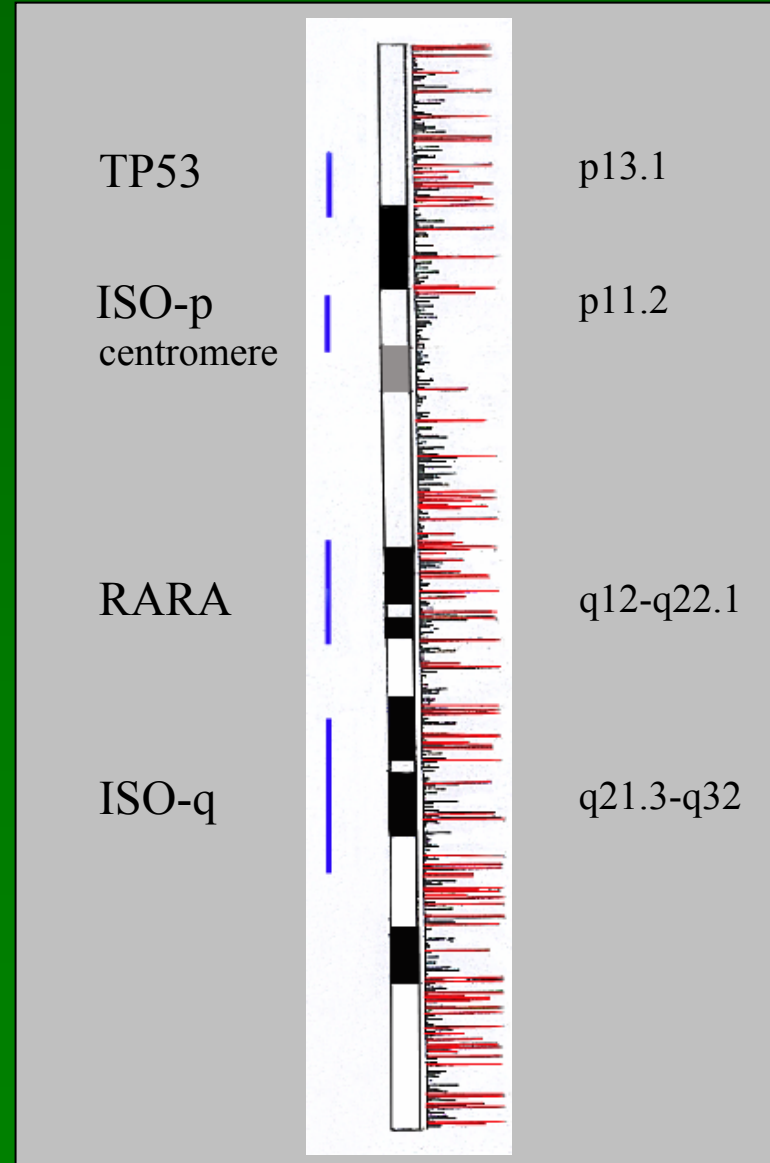
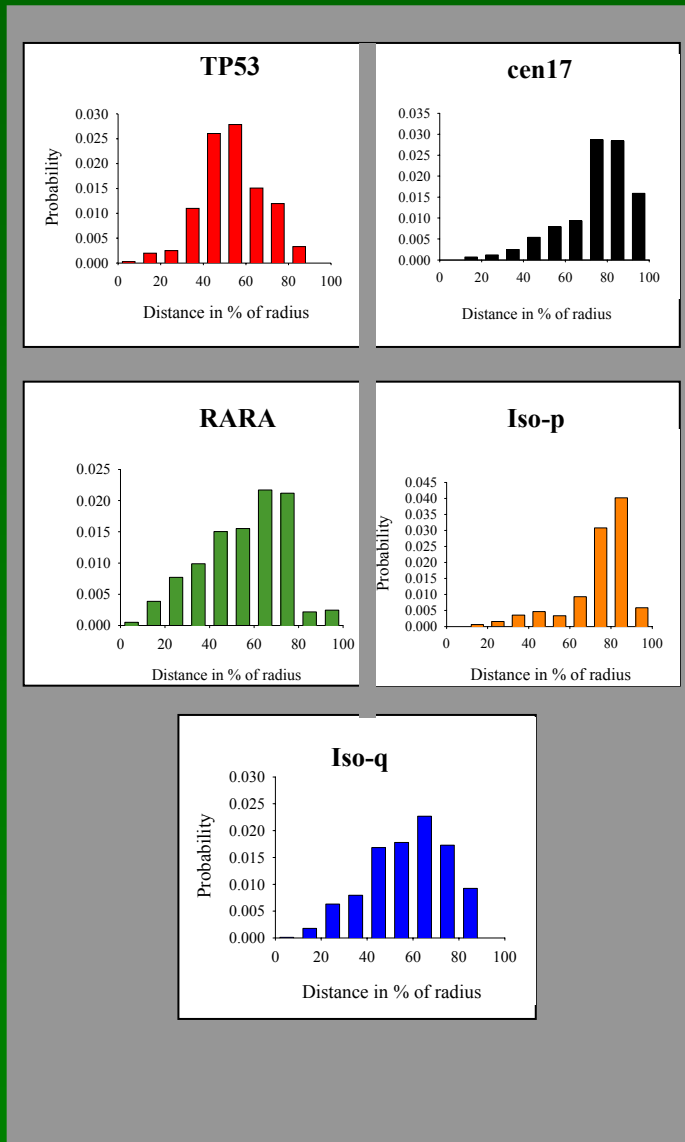
(Caron et al., 2001)



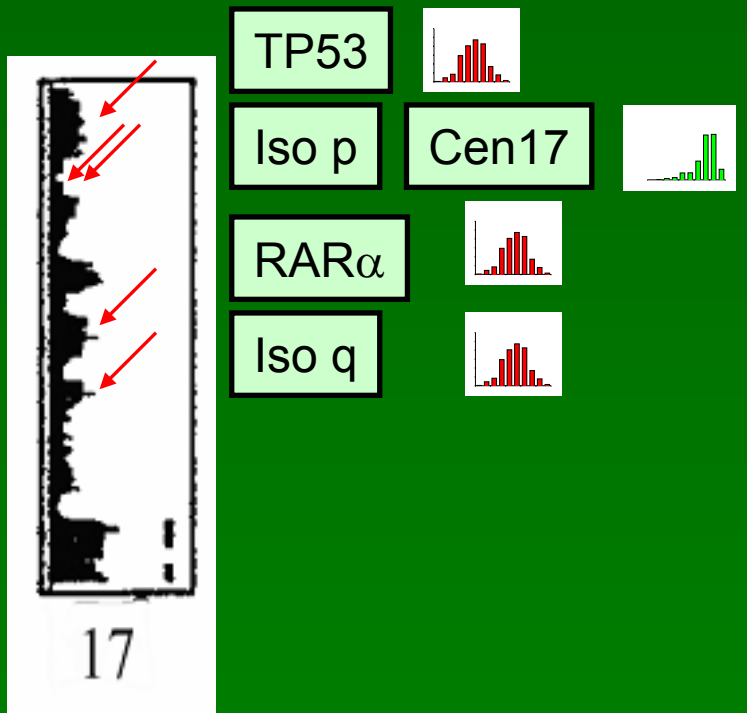
Positions of all chromosomes in nuclei of different cell types



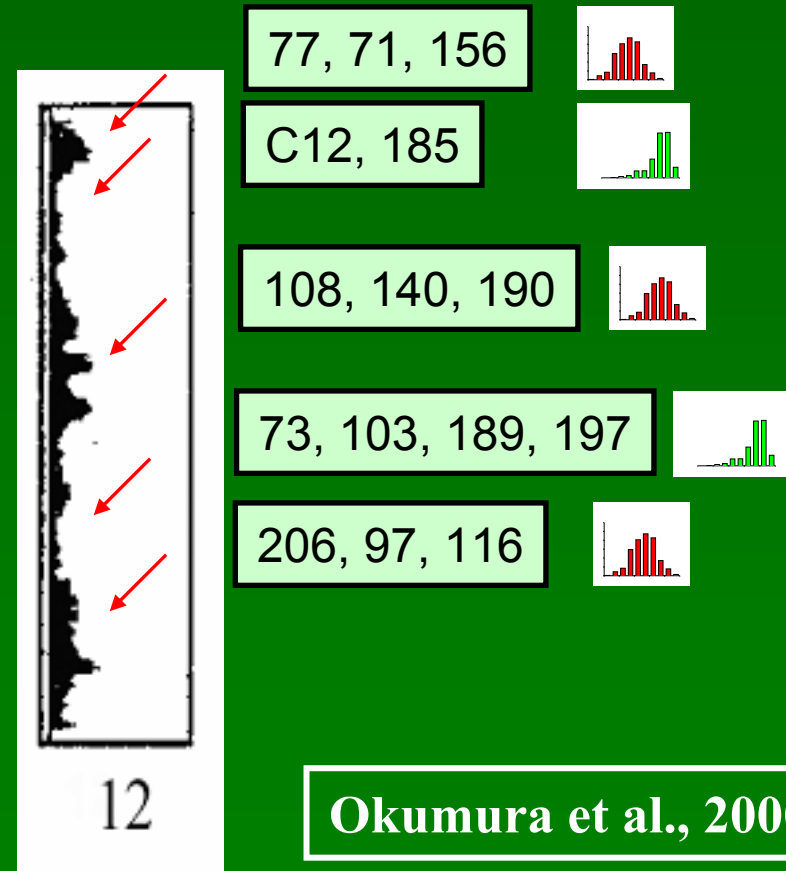
Umístění genetických elementů HSA 17 vzhledem ke středu jádra a jejich umístění na transkripční mapě



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

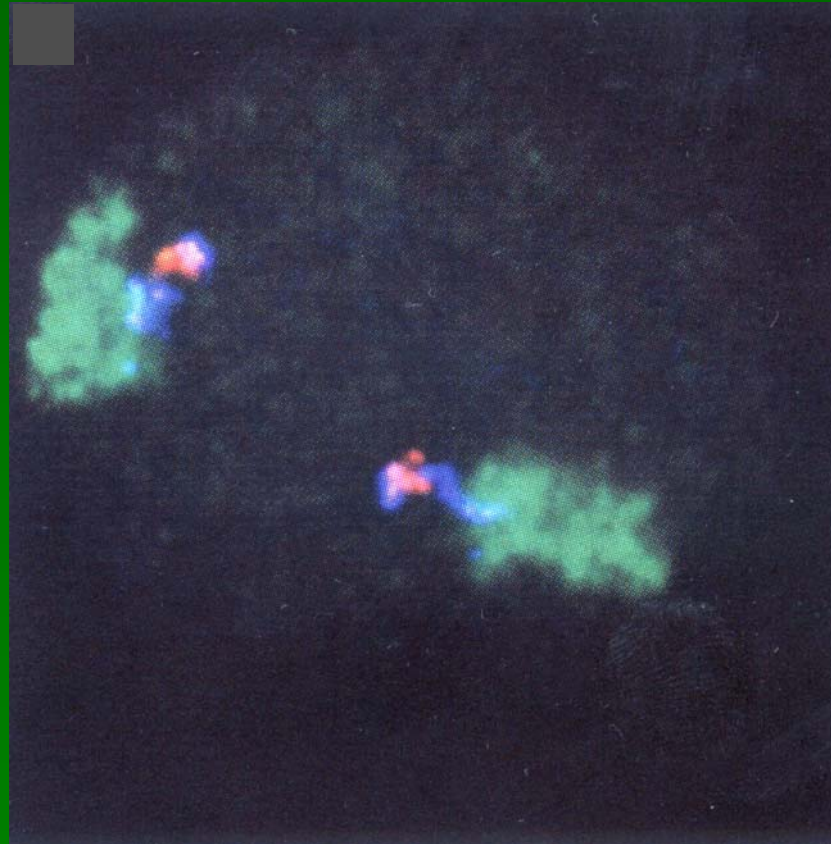


Lukášová et al., 2002



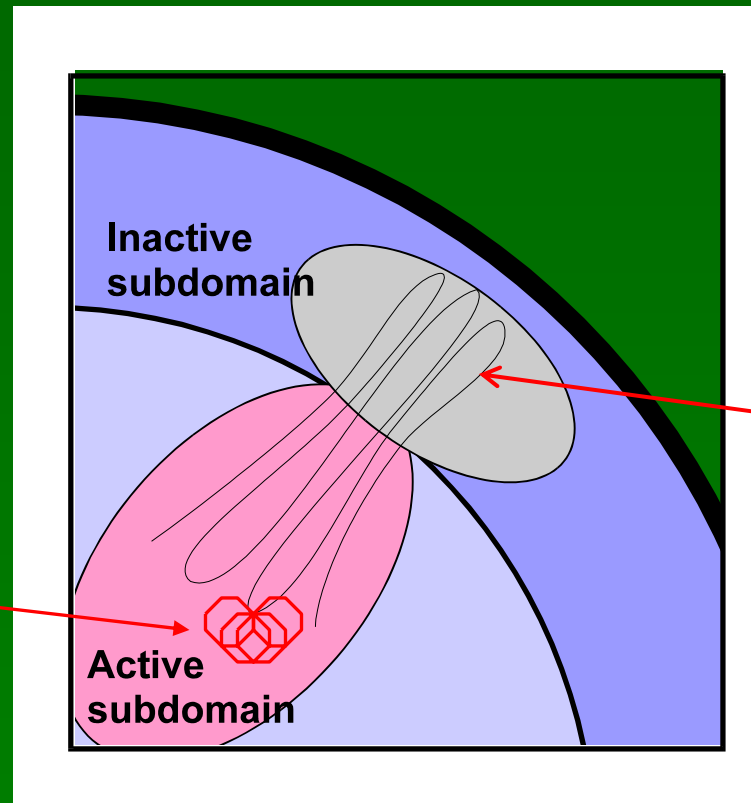
Okumura et al., 2000

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???