

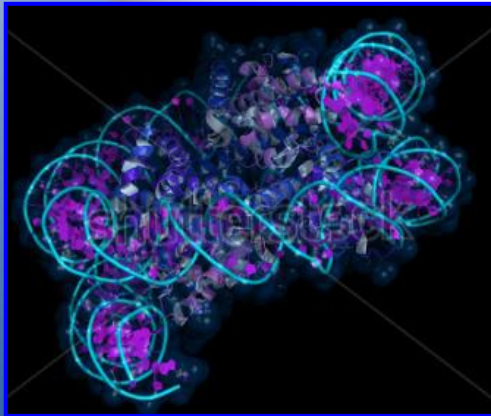
Remodelace chromatinu

Jana Šmardová

Jan Šmarda

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU



Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot

7. a 14.11.2019

Je možné zdědit strach či hřích?

Podtitul: Z nových biologických poznatků vyplývá, že máme svůj genetický osud pod kontrolou víc, než se dosud myslelo.

- rozluštění genetického kódu v polovině 20. století = převrat v biologii: zdálo se, že jsme objevili „boží jazyk“, základní úroveň, z níž bude možné definitivně vysvětlit vznik života a jeho evoluci...



Brian G. Dias Kerry J. Ressler

Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations

- dávali myším samcům čichat acetofenon a propanon (voní po třešních a mandlích) a přitom jim pouštěli elektrické šoky do tlapek
- po pár týdnech myšáci tuhli a nadskakovali strachy, kdykoliv vůni ucítili (= podmíněný reflex/Pavlov - slintající psi)





Brian G. Dias Kerry J. Ressler

- potomci: samotná vůně acetofenonu a propanonu v nich vyvolávala strach!
- spolehlivě bez vlastní zkušenosti!
- i při oplodnění ve zkumavce, tj. nulový kontakt myšat s otci
- zděděný strach si předávaly ještě tři další generace! teprve potom postupně vymizel



Je možné zdědit strach či hřích?

- můžeme zdědit i strachy a úzkosti našich rodičů a předat je dál svým vlastním dětem...
- za tímto typem dědičnosti stojí **epigenetické mechanismy**: konkrétně v tomto experimentu mikroRNA (gen *Olf151*, miR-34a, signální dráha Notch)
- DNA je sice hlavním paměťovým médiem dědičnosti, ovšem kdy a co se bude přehrávat a jakým způsobem, na tom se spolupodílíme
- na čtení genetického kódu je příhodnější nazírat jako na nesmírně bohatou síť různých promluv, diskusí a smlouvání; namísto vojenských povelů je to chat buněčného Facebooku

Epigenetika

- studuje potenciálně stabilní a potenciálně dědičné změny v genové expresi nebo změny v buněčném fenotypu, které se objevují beze změn na úrovni Watson-Crickova párování bází DNA
- ~ spojení mezi genotypem a fenotypem
- ačkoliv většina buněk organismu má stejný genotyp, výrazně se liší svým fenotypem: **buněčnou diferenciací** lze chápat jako epigenetický jev

Epigenetické mechanismy

- metylace DNA
- metylace RNA
- kovalentní modifikace histonů
- nastavení pozice nukleozomů: ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy
- varianty histonů
- nekódující RNA včetně miRNA
- jaderná lokalizace

Funkce remodelace chromatinu

- regulace genové exprese, diferenciace
- replikace DNA a sestavování nukleozomů
- kondenzace chromozomů během mitózy
- rozlišení heterochromatinu a euchromatinu
- opravy DNA
- inaktivace chromozomu X
- ... a další

Osnova přednášky

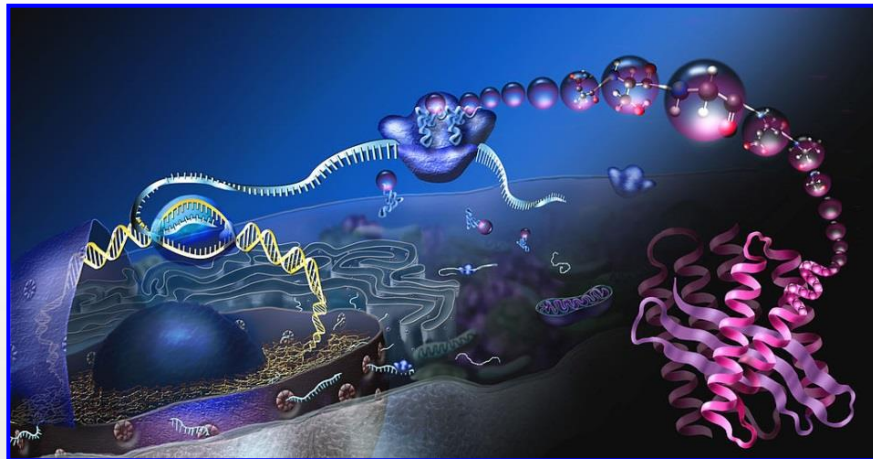
- struktura a funkce chromatinu
- metylace DNA
- kovalentní modifikace histonů
 - acetylace
 - fosforylace
 - metylace
 - ubikvitinace
- ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy
- histonové varianty (a nekódující RNA)
- součinnost jednotlivých typů přestavby chromatinu
 - inaktivace chromozomu X

Struktura a funkce chromatinu

Motto

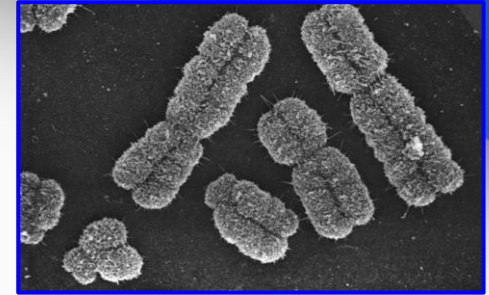
„... smyslem uspořádání do chromatinu není pouze **sbalit** 2 m DNA do 5 μ m jádra*, ale také vytvořit významnou platformu pro **regulaci genové exprese**...“

(Richly, Di Groce 2010)



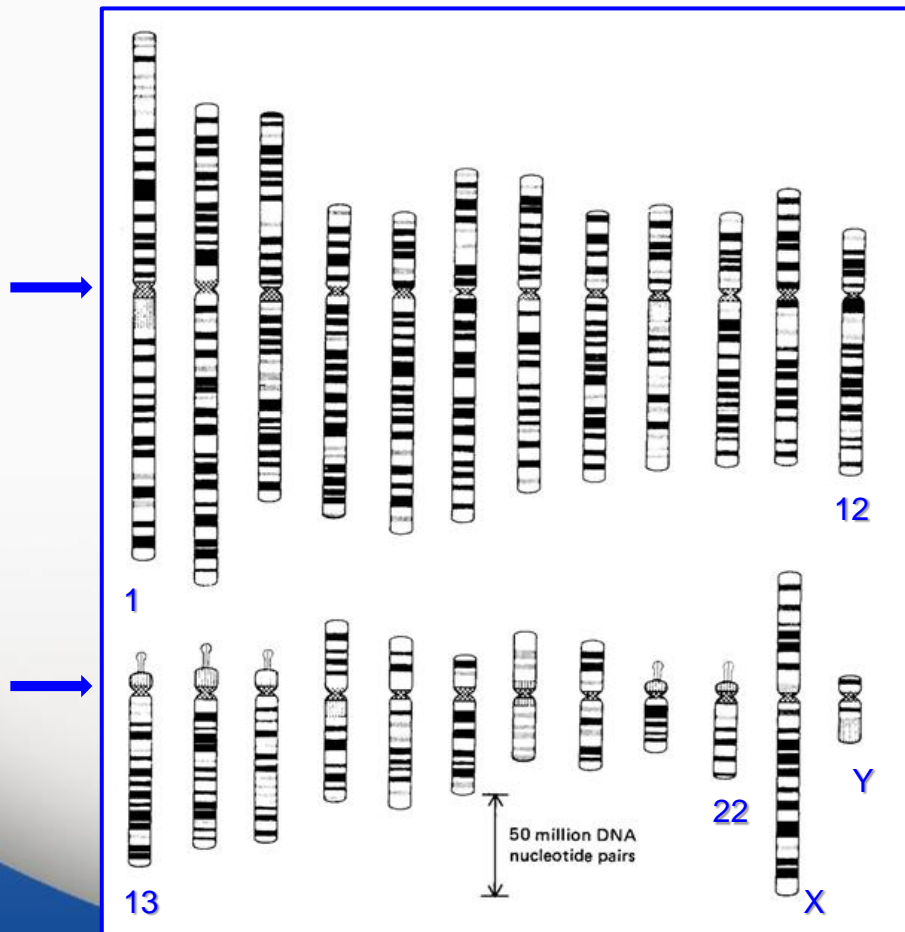
tenisový míček obsahující
20 km extrémně jemné nitě*

Struktura eukaryotických chromozomů



- **chromozom**: 1 dlouhá lineární molekula DNA a proteiny, které umožňují vytvoření kompaktní struktury
- **chromatin**: komplex DNA a proteinů: vedle proteinů pomáhajících sbalení, také proteiny zajišťující funkce spojené s DNA
- specializované sekvence na chromozomech: replikační počátky, centromery a na nich se tvořící komplexy kinetochory, telomery

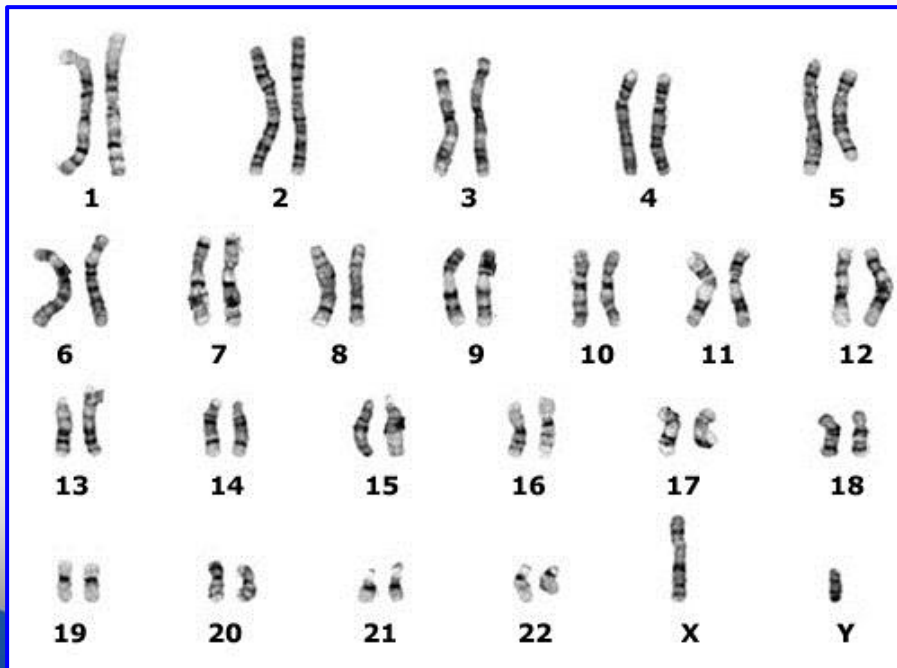
Karyotyp



- soubor všech chromozomů v buněčném jádře
- autozomy 1 až 22 seřazeny podle velikosti, pohlavní chromozomy X a Y
- šipky ukazují pozici centromery
- výčnělky na chromozomech 13, 14, 15, 21 a 22 obsahují geny pro rRNA
- barvení podle Giemsy, tmavě se barví oblasti s vysokým obsahem A-T

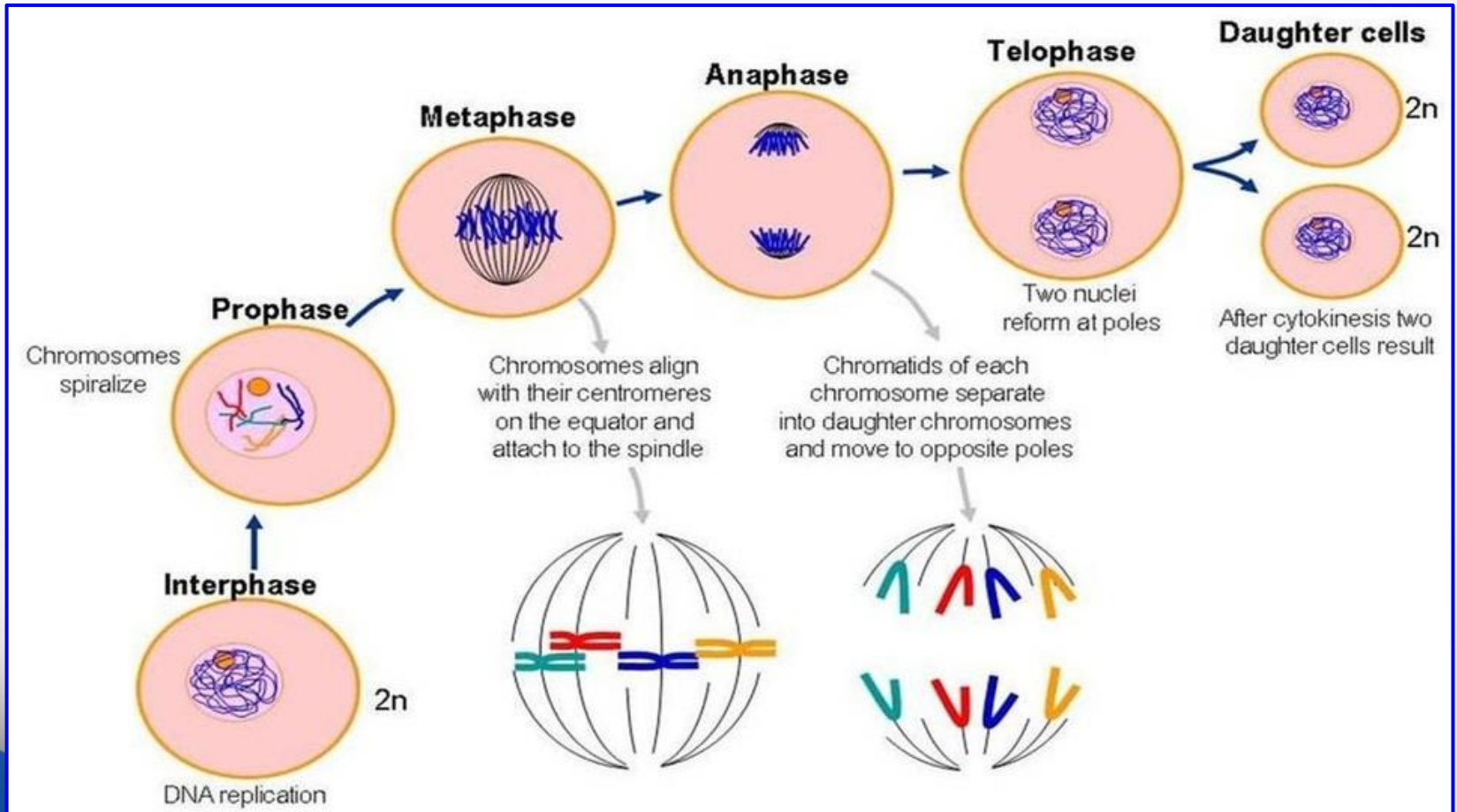
Pruhování lidských chromozomů

- nejčastěji rutinně užívaná metoda: **G pruhování**
 - trypsin (natráví chromozomové proteiny)
 - Giemsovo barvivo (směs barviv)



- tmavé pruhy bohaté na A-T, světlé na G-C
- specifické pro každý chromozomový pár
- lze rozpoznat strukturní a numerické abnormality (1 pruh obsahuje 50 i více genů)

Interfázni vs. kondenzované (mitotické) chromozomy



při mitóze je chromatin kondenzován 10 000x

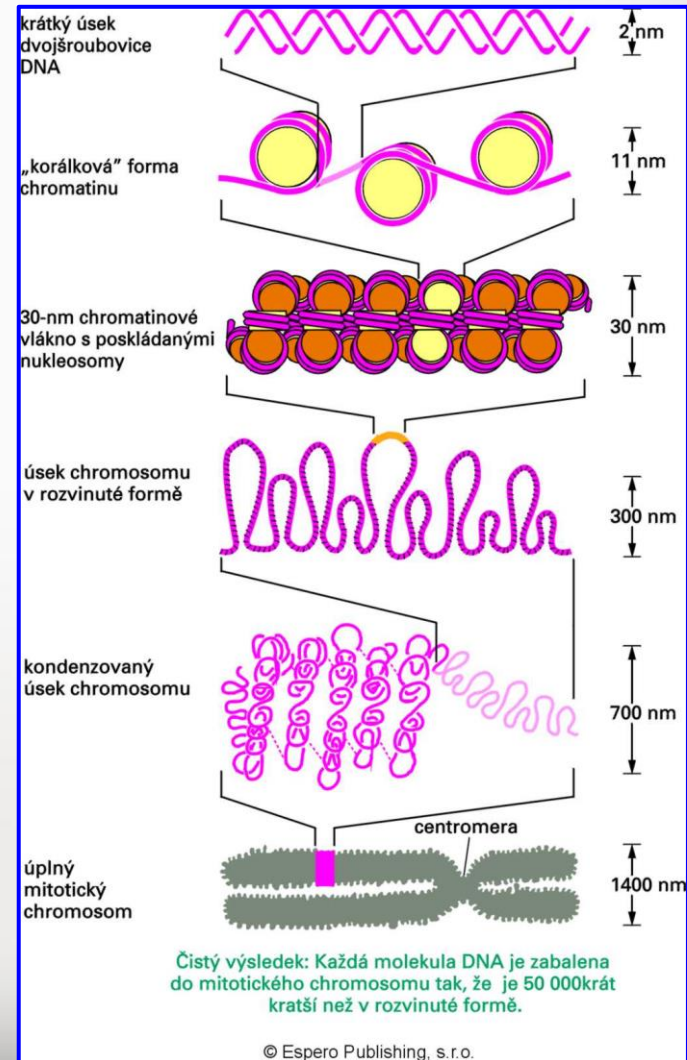
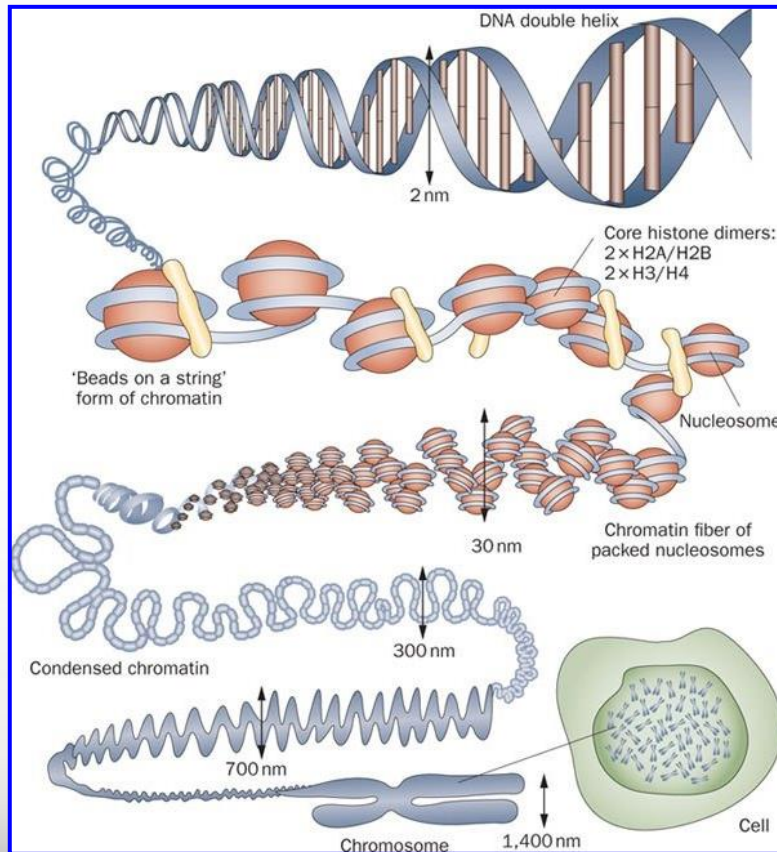
Uspořádání DNA do chromatinu

1. Ochrana (a kondenzace) 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**

Úrovně kondenzace chromatinu

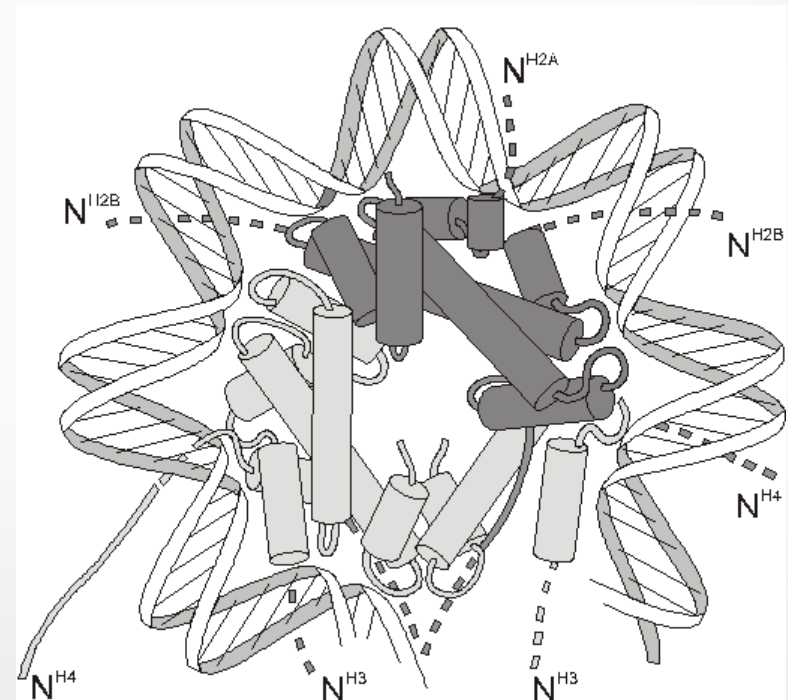
- základními jednotkami jsou **nukleozomy**, tvoří strukturu „**korálky na niti**“; **11 nm**
- nukleozomy těsně přiloženy k sobě, za účasti histonu H1 tvoří **30 nm vlákno**
- dále vznikají vysoce kondenzované struktury (**300 nm** a **700 nm**)
- **mitotické chromozomy** (**1400 nm**)

Úrovně kondenzace chromatinu

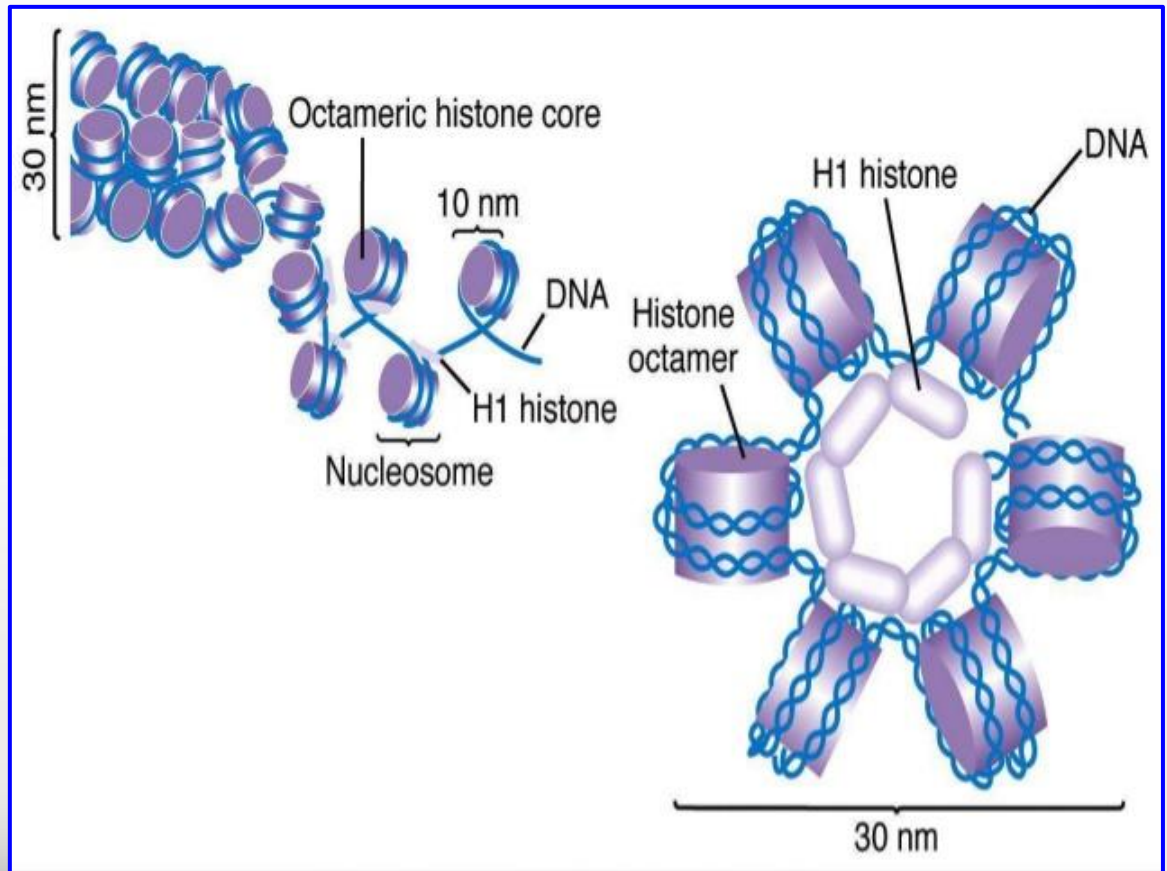
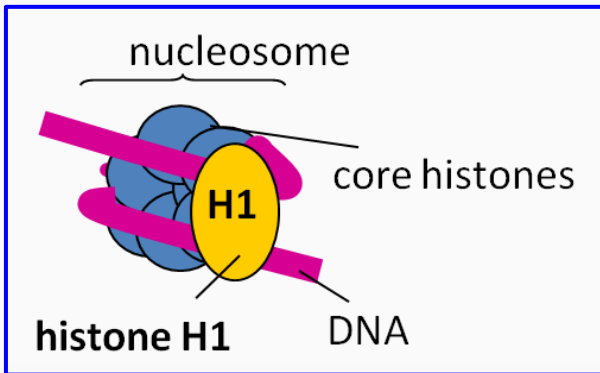


Struktura nukleozomu

- DNA: **146 pb** (1 a $\frac{3}{4}$ otáčky superhelixu)
- **oktamer histonů**: tetramer (**H3/H4**)₂ a dva dimery **H2A/H2B**
- úseky DNA mezi nukleozomy (**linker DNA**) různě dlouhé (**15 až 55 pb**; v průměru asi **200 pb** na 1 nukleozom), interagují s histonem **H1** a podílejí se na vytváření vyšších struktur chromatinu (30 nm)
- **5-10 násobná kondenzace chromatinu**



Úloha histonu H1 při vytváření 30 nm vlákna



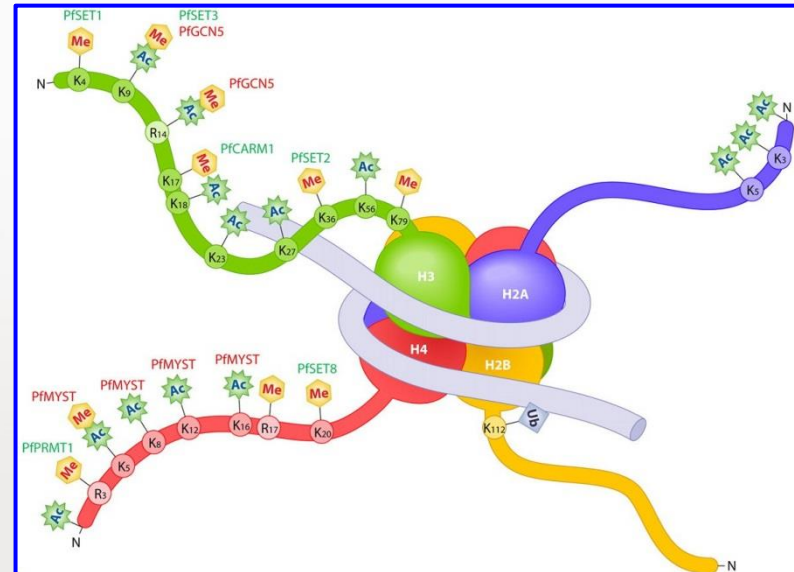
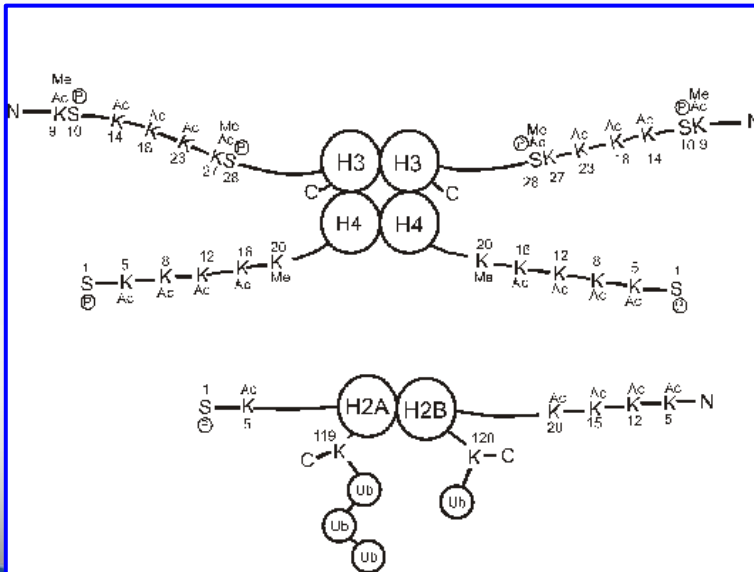
Histony

- malé proteiny s vysokým obsahem bazických aminokyselinových zbytků (lysin, arginin; 20-30%)
- pozitivní náboje umožňují pevné navázání histonů na negativně nabitou cukr-fosfátovou kostru DNA (bez ohledu na sekvenci nukleotidů)
- nejvíce konzervované proteiny mezi eukaryoty

histon	poměr Lys/Arg	počet AA	molekulová hmotnost
H1	20,0	215	21 000
H2A	1,2	129	14500
H2B	2,5	125	13 800
H3	0,72	135	15 300
H4	0,79	102	11 300

Uspořádání histonů v nukleozomu

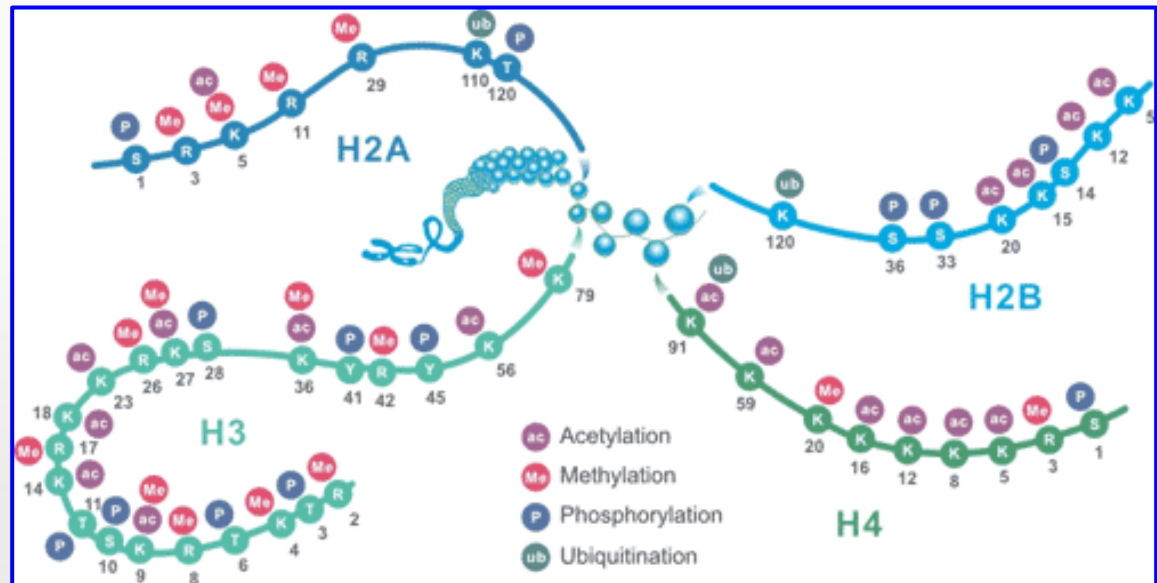
- C-koncové části histonů tvoří **jádro** nukleozomu
- N-části vybíhají do stran, tvoří tzv. **N-tails** a jsou volněji přístupné různým modifikacím



Kovalentní modifikace histonů

Kovalentní modifikace histonů

- acetylace
- metylace
- fosforylace
- ubikvitinace



Kovalentní modifikace histonů

- **dopad modifikace** záleží na **typu modifikace**, na **typu** a **pozici modifikovaného aminokyselinového zbytku**
 - **acetylace, ubikvitinace** zbytků **lysinu** (K)
 - **metylace** zbytků **lysinu** (K) a **argininu** (R)
 - **fosforylace** zbytků **serinu** (S) a **threoninu** (T)
 - **ubikvitinace** zbytků **lysinu** (K)
- téměř **dvacet** různých typů modifikací na více než **150** konzervovaných zbytcích AA na histonových proteinech

Kovalentní modifikace histonů

lysin (K) (acetylace, metylace, ubikvitinace)

- sumoylace (regulace transkripce, opravy DNA)
- ADP-ribosylace (regulace transkripce, opravy DNA, replikace)
- formylace (oxidativní stres, zánět)
- propionylace (regulace transkripce, karcinogeneze, metabolismus, diferenciacce)
- butyrylace (regulace transkripce, spermatogeneze, metabolismus, diferenciacce)
- malonylace (regulace genové exprese, metabolismus)
- krotonylace (regulace transkripce, spermatogeneze, stres, inaktivace X)
- sukcinylace (regulace transkripce, metabolismus, opravy DNA, onkogeneze)
- glutarylace (regulace genové exprese)

Kovalentní modifikace histonů

arginin (R) (metylace)

- citrulinace (regulace genové exprese, imunita, embryogeneze)

serin (S) (acetylace, fosforylace)

- glykosylace (regulace genové exprese, onkogeneze)

threonin (T) (acetylace, fosforylace)

- glykosylace (stabilita nukleozomu)

tyrosin (Y) (acetylace, fosforylace)

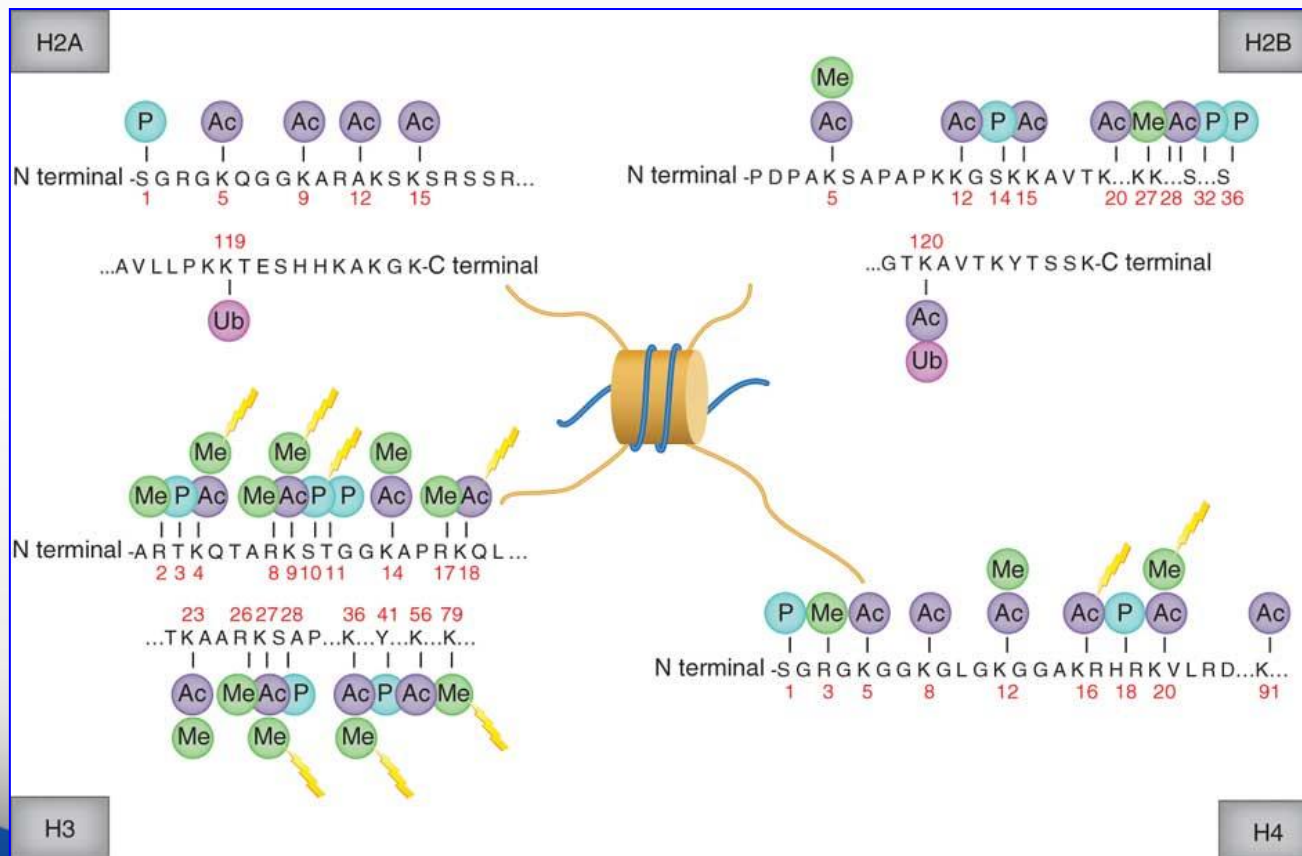
- glykosylace (regulace genové exprese, onkogeneze)

histidin (H) (fosforylace)

- glykosylace (regulace genové exprese)

Kovalentní modifikace histonů

acetylace – metylace – fosforylace - ubikvitinace



Acetylace histonů

- zbytky lysinu: celkem **26** různých možností na 1 nukleozom
- histon acetyl transferázy (HATs): **Gcn5, CBP/p300, PCAF, SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ, Tip60, TAF₂₅₀,...**
- histon deacetylázy (HDACs): **HDAC1, 2, 3...**

Acetylace histonů: sestavování nukleozomů

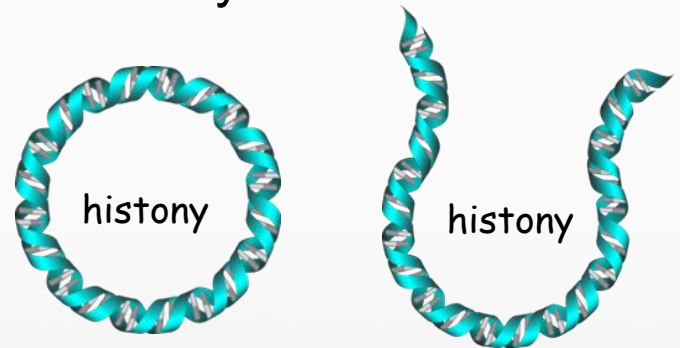
- heterodimerizace H3/H4 → vznik tetrameru $(H3/H4)_2$ → vazba na DNA → heterodimerizace H2A/H2B → připojení k tetrameru $(H3/H4)_2$
1. replikující se DNA : $(H3/H4)_2$ - **CAF1** („*chromatin assembly factor 1*“): interakce $(H3/H4)_2$ s CAF1 podmíněna **acetylací** histonu **H4** na **K5**, **K8** nebo **K12** (ne K16) nebo jejich kombinací
 2. vytvoření komplexu H2A/H2B - **NAP1** („*nucleosome assembly protein 1*“)
- **cytoplazmatická HAT1** - acetyluje (**K5**, **K12**) volný H4 neuspořádaný do nukleozomů (a méně efektivně také K5 H2A)

Acetylace histonů: rozlišení heterochromatinu a euchromatinu

- heterochromatin acetylován výlučně na **K12 H4** → vazba komplexů **RAP1** („*repressor/activator protein 1*“) a **SIR** („*silencing information regulator 2, 3, 4*“) (RAP1 se váže na telomerickou DNA)
- ? sestavování nukleozomů: acetylace H4 K5 a K12
heterochromatin: acetylace K12 ?
1. pouze acetylace K12 H4 a znemožněna další acetylace heterochromatinu
 2. acetylace K5 i K12 a duplikace heterochromatinu spojena s deacetylací K5 (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 sekvenčně specifických transkripčních faktorů
- obvykle fungují jako součást multiproteinových komplexů

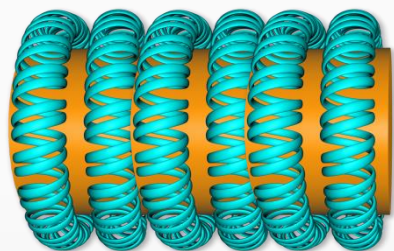
Acetylace histonů: regulace transkripce



acetylace působením HATs umožňuje transkripci a genovou expresi

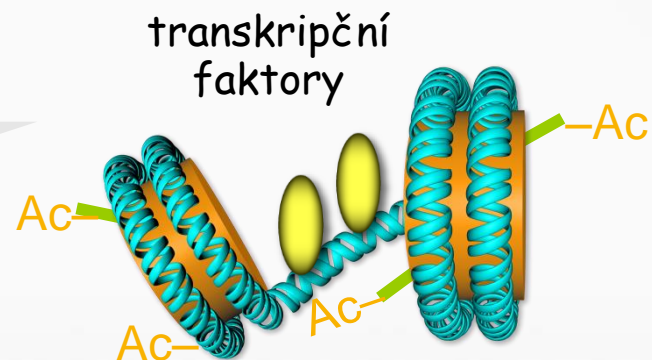


ACETYLACE HISTONŮ



deacetylované histony

*uzavřený chromatin
transkripční faktory se
nemohou dostat k DNA*



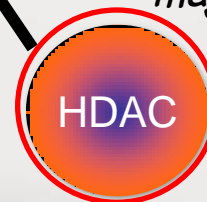
acetylované histony

*otevřený chromatin
transkripční faktory
mají přístup k DNA*



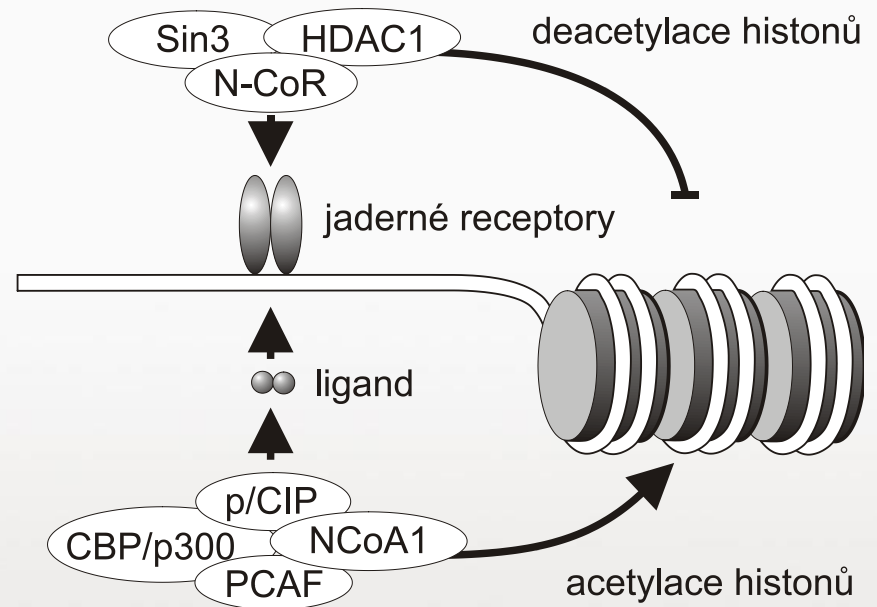
DEACETYLACE HISTONŮ

deacetylace působením HDACs reprimuje transkripci a genovou expresi

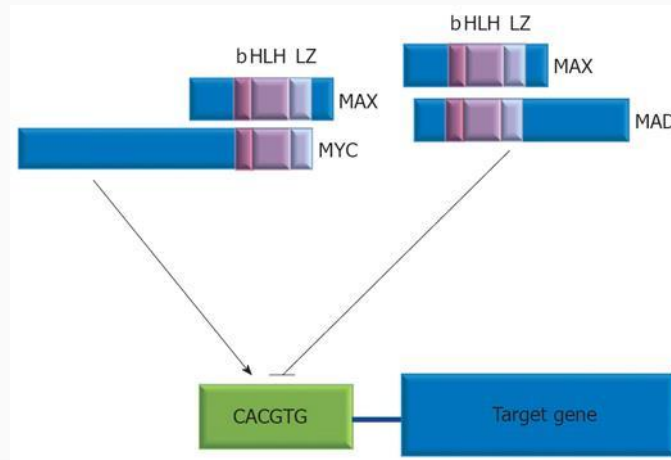


Acetylace histonů a regulace transkripce: jaderné receptory

- **acetylace** histonů je spojena se vznikem tzv. otevřené struktury chromatinu a s **aktivací** transkripce
- **deacetylce** histonů spojena s uzavíráním struktury chromatinu a **represí** transkripce
- HATs a HDACs jsou přiváděny k cílovým sekvencím prostřednictvím sekvencně specifických transkripčních faktorů
- jsou součástí multiproteinových komplexů

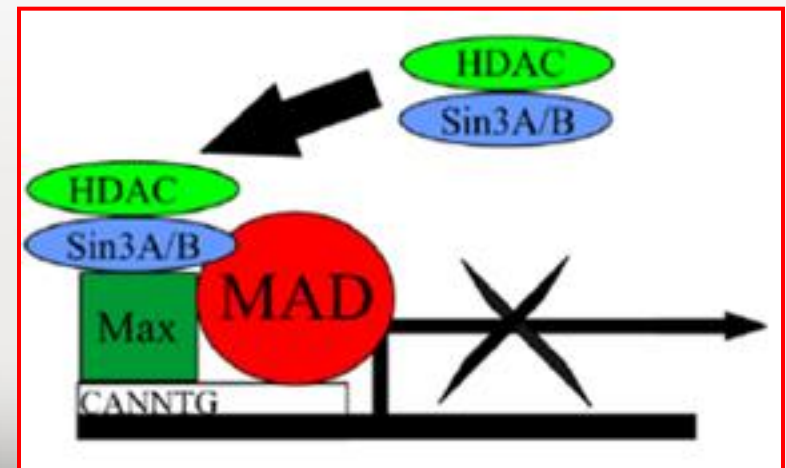
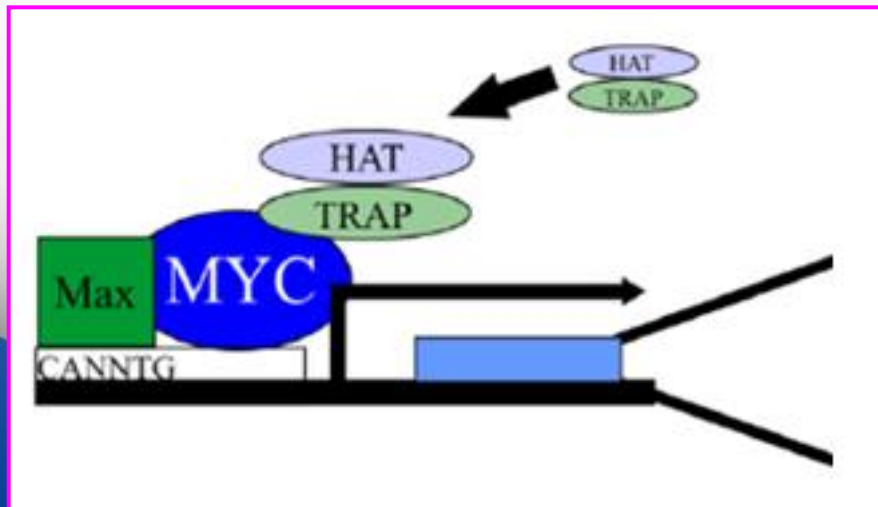


Acetylace histonů a regulace transkripce: onkoprotein Myc

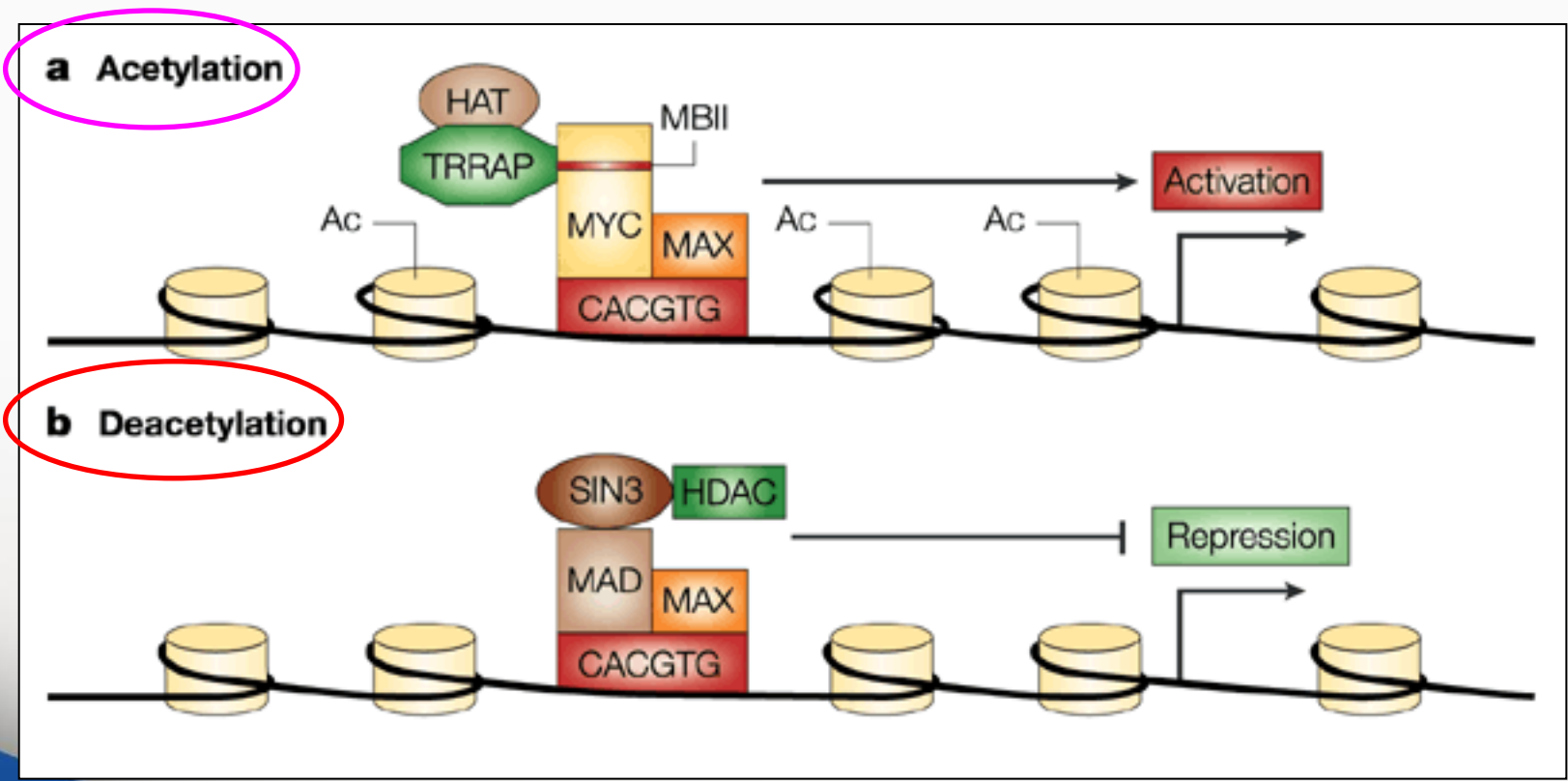


aktivace

represe



Acetylce histonů a regulace transkripce: onkoprotein Myc



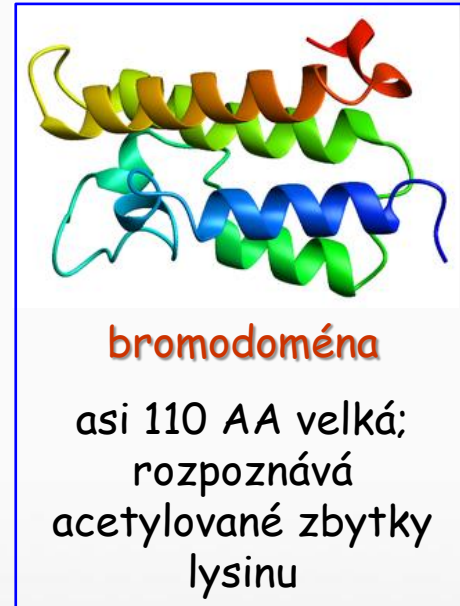
Histon acetyl transferázy

HAT typu A:

- lokalizovány v jádře
- podílejí se na regulaci genové exprese
- obsahují bromodoménu
- např. **Gcn5**, **p300/CBP**, **TAF_{II}250**,...

HAT typu B:

- lokalizovány v cytoplazmě
- acetylují nově syntetizované histony před tím než se stanou součástí nukleozomů
- neobsahují bromodoménu
- např. **HAT1**



Histon acetyl transferázy

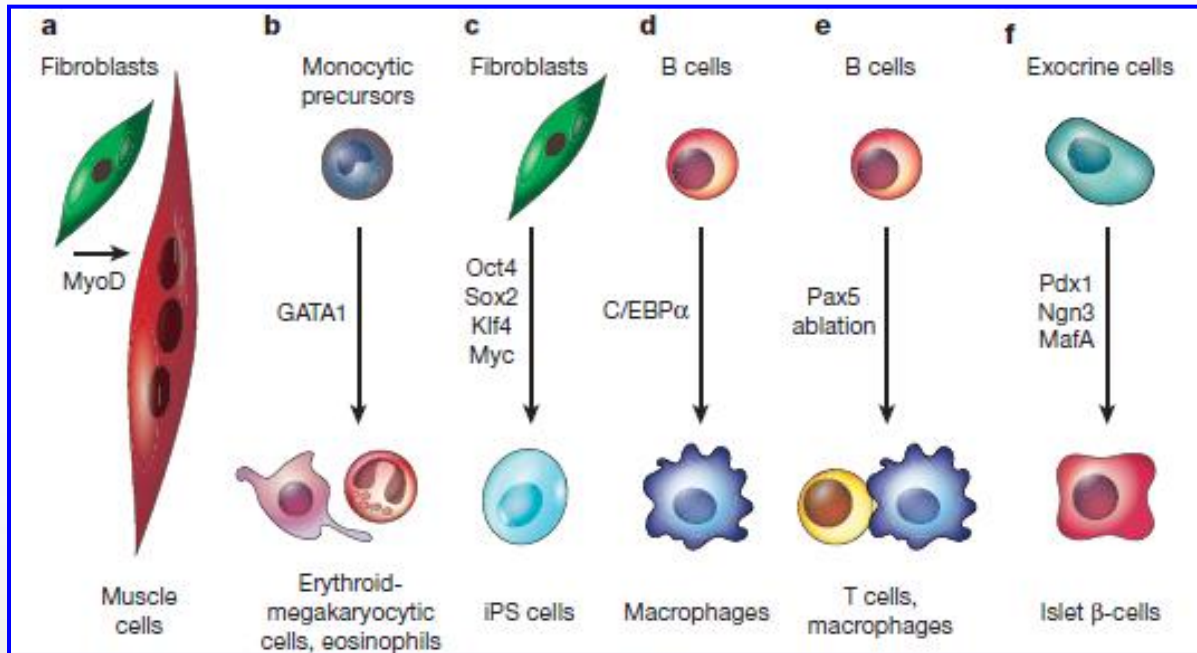
Gcn5 – histon acetyl transferáza kvasinek

CBP/p300 - koaktivátory: CREB (CBP – „CREB binding protein“), 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“

SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ, Tip60, TIF2, TAF₂₅₀ – např. regulátory jaderných receptorů

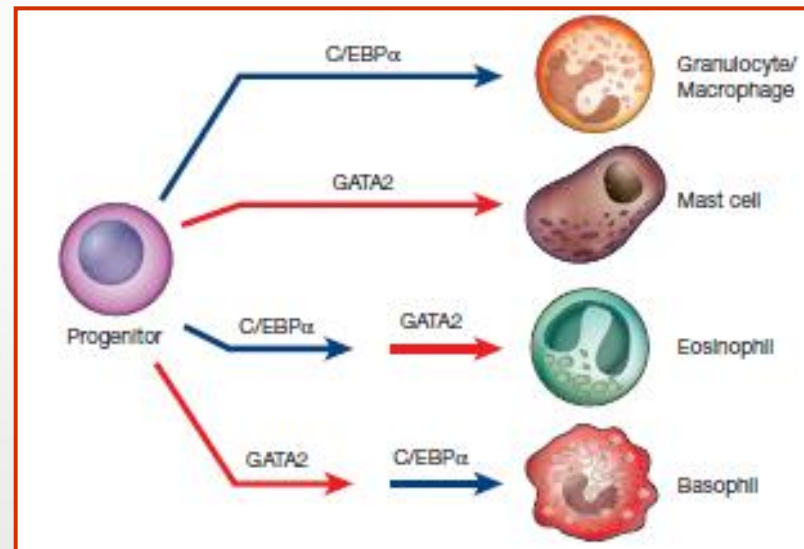
Histon acetyl transferázy jako integrátory



- zvýšená nebo snižená exprese některých **transkripčních faktorů** ovlivňuje vývoj – diferenciaci konkrétního buněčného typu

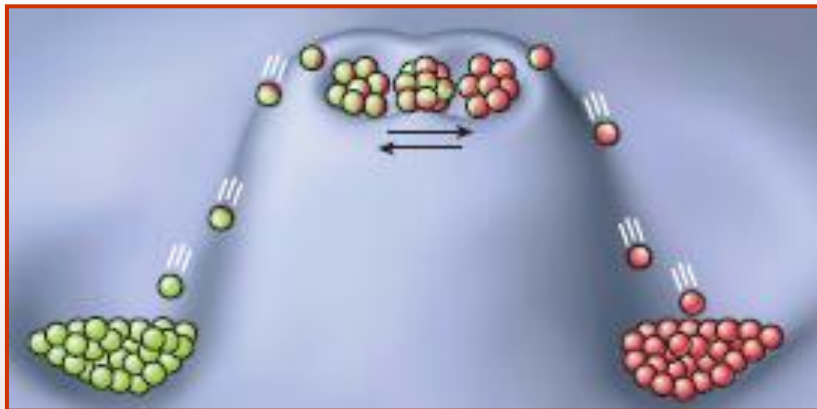
Histon acetyl transferázy jako integrátory

- úroveň a časování exprese **transkripčních faktorů** ovlivňuje osud buněk



Histon acetyl transferázy jako integrátory: paradigma **PU.1**:**GATA1**

- Progenitorové buňky fluktuují mezi dvěma stavy určenými poměrem aktivity transkripčního faktoru **PU.1** a **GATA1**. Po (indukovaném nebo spontánním rozhodnutí - „commitment“) diferencují buď v myeloidní nebo erytroidní buňky a převažuje v nich aktivita TF PU.1 nebo GATA1.

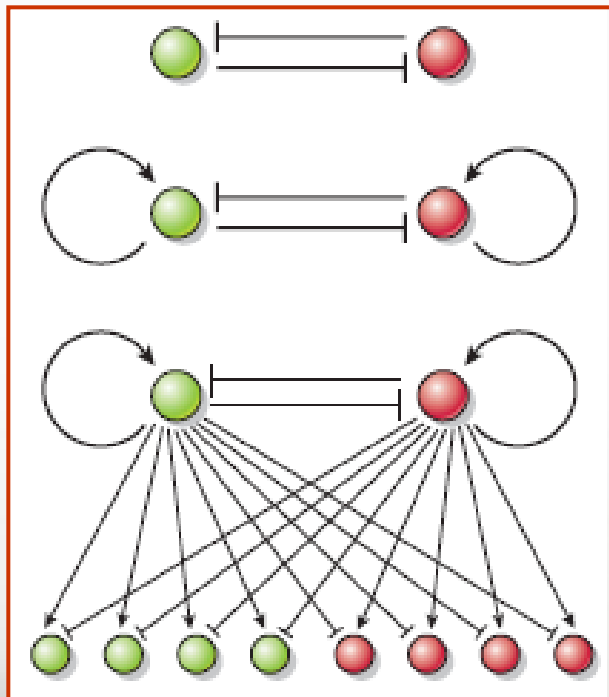


← **monocytické/erytroidní**
progenitory

myeloidní buňky (PU.1)

erytroidní buňky (GATA1)

Histon acetyl transferázy jako integrátory: paradigma **PU.1:GATA1**

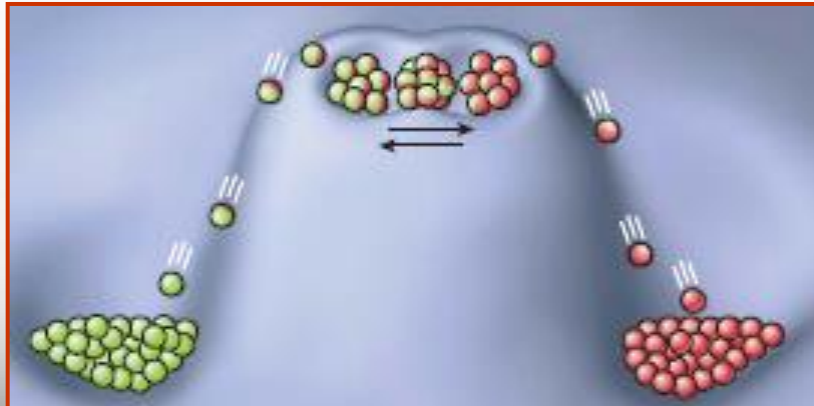
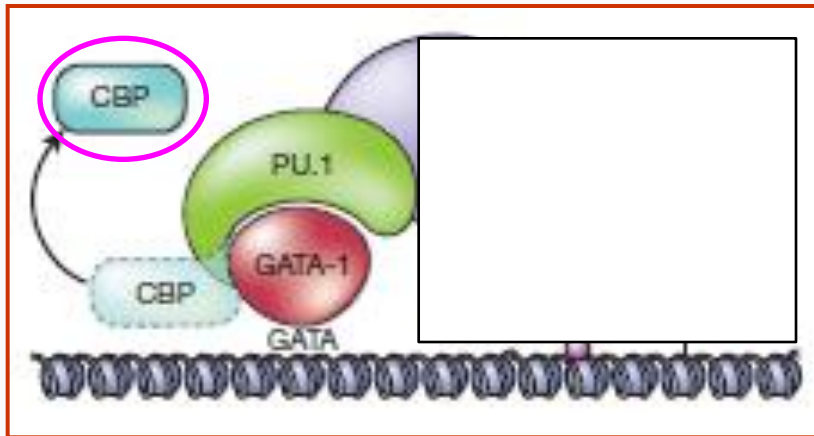


„**cross-antagonismus**“

dvou transkripčních faktorů: dva regulátory

- negativně ovlivňují jeden druhého a zároveň
- pozitivně ovlivňují sebe sama

Histon acetyl transferázy jako integrátory: paradigma **PU.1:GATA1**



myeloidní
buňky (PU.1)

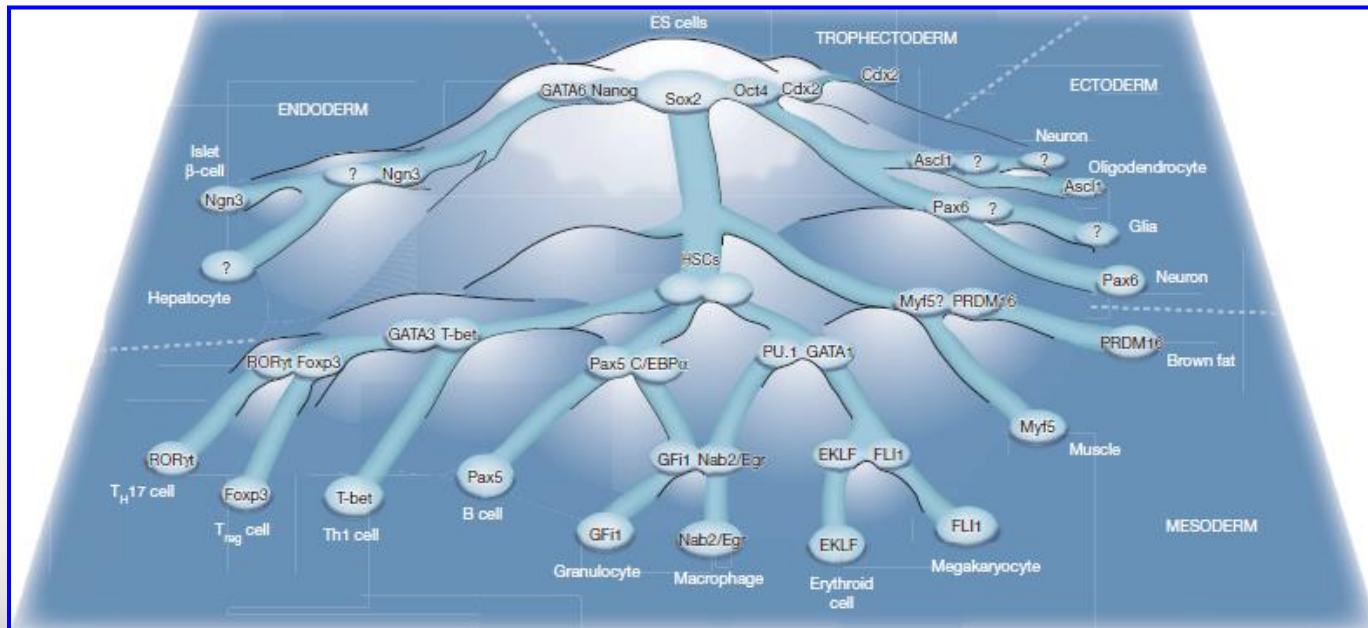
erythroidní
buňky (GATA1)

Jaký **mechanismus** je podstatou cross-antagonismu PU.1 a GATA1?

K aktivaci svých cílových genů v erythroidních buňkách potřebuje GATA1 protein **CBP**. Vysoká hladina PU.1 ale odebírá CBP z vazby na GATA1...

Cross-antagonismus transkripčních faktorů v kaskádovitě krajině stabilních a nestabilních buněčných stavů

vrcholky, svahy – nestabilní, přechodné, progenitorové buněčné typy



údolí – stabilně diferencované buněčné typy

Histon acetyl transferázy

Gcn5 – histon acetyl transferáza kvasinek

CBP/p300 - koaktivátory: CREB (CBP – „CREB binding protein“), 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“

SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ, Tip60, TIF2, TAF₂₅₀ – např. regulátory jaderných receptorů

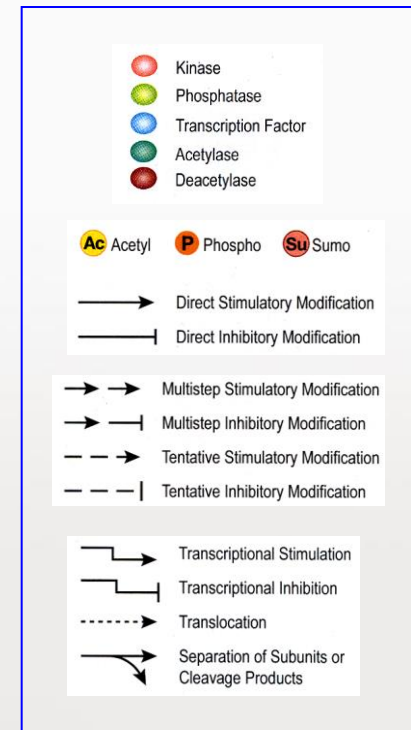
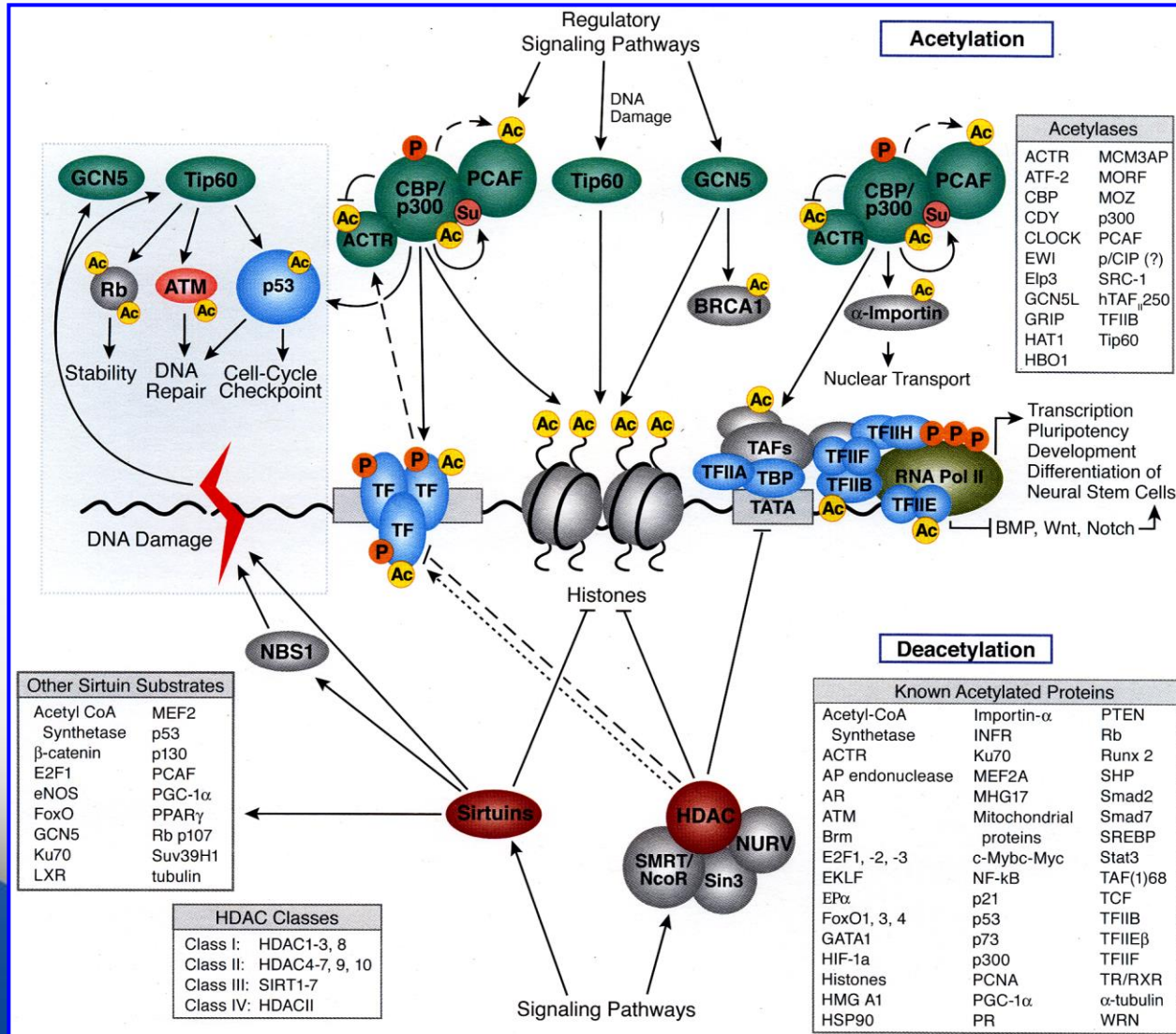
Acetylace nehistonových proteinů

- některé **HATs** acetylují i nehistonové proteiny - např. **CBP/p300**: p53, E2F1, GATA-1, TFIIF, Myb,...

HMG – *high mobility group proteins* - váží se na nukleozomy a stabilizují jejich strukturu, účastní se transkripce, replikace, rekombinace, oprav DNA,...

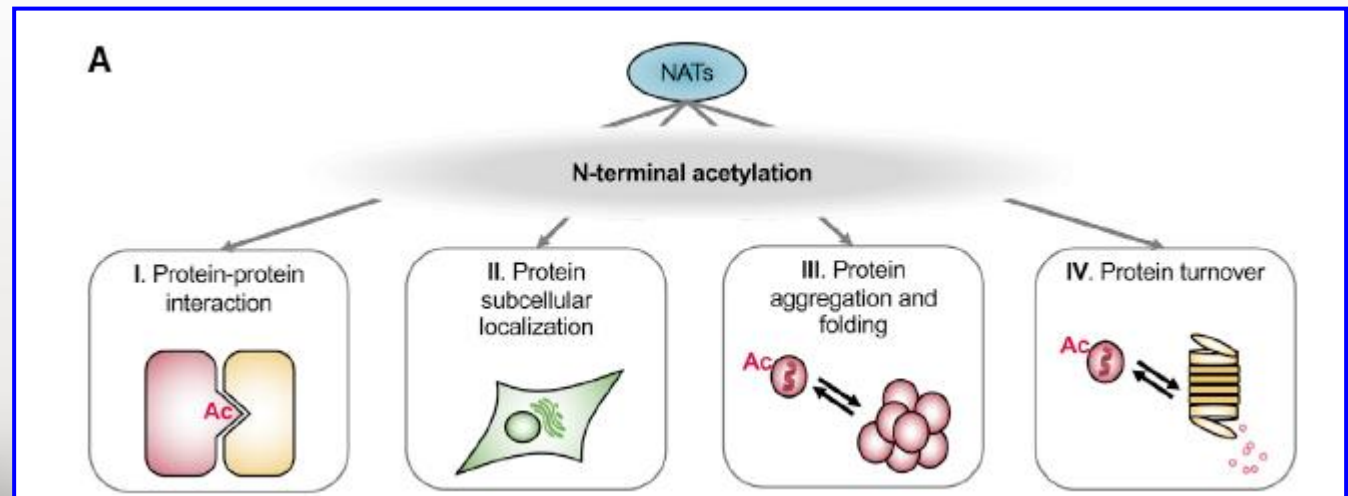
- **CBP** acetyluje **HMG-1**
- **PCAF** acetyluje **HMG-17** na **K2** → oslabení vazby HMG-17 na nukleozom: vazba HMG-17 na nukleozom snižuje schopnost PCAF acetylovat H3
- **p300** acetyluje **HMG-14** a **HMG-17** → modifikace jejich interakce s jádrem nukleozomu

Acetylase: histonů a nehistonových proteinů



Acetylace nehistonových proteinů

- proteiny často acetylovány na N-konci \Rightarrow **N-terminální acetyl transferázy (NATs)**; (faktor acetyl transferázy - **FATs**)
 - multifunkční proteiny
 - N-terminální acetylace patří k hlavním buněčným regulátorům
 - s ribozomy asociované ko-translační i post-translační modifikace



Histon deacetylázy

- „**klasické**“ HDACs; jejich funkci inhibuje TSA – trichostatin A
 - **třída I:** HDAC 1, 2, 3, 8
 - **třída II :** HDAC 4, 5, 6, 7, 9 a 10
 - **třída I:** příbuzné Sir2 kvasinek (*silent information regulator 2*)
- **sirtuiny = třída III:** – jejich funkci neovlivňuje TSA
 - **HDAC 1, 2, 8** – hlavně v jádře
 - **HDAC 3** – v jádře i cytoplasmě a také asociována s membránami
 - **HDAC 4, 5, 6, 7, 9 a 10** - mohou být opakovaně transportovány do jádra a z jádra na základě signalizace
 - **HDAC 6** – cytoplazmatická, asociována s mikrotubuly
- celkem **18** hHDACs



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** a následná snížená dávka genu, tzv. **haploinsuficience**
- gen je lokalizován na chromozomu 16 (16p13.3)



Metylase DNA

Metylace DNA a deacetylace histonů

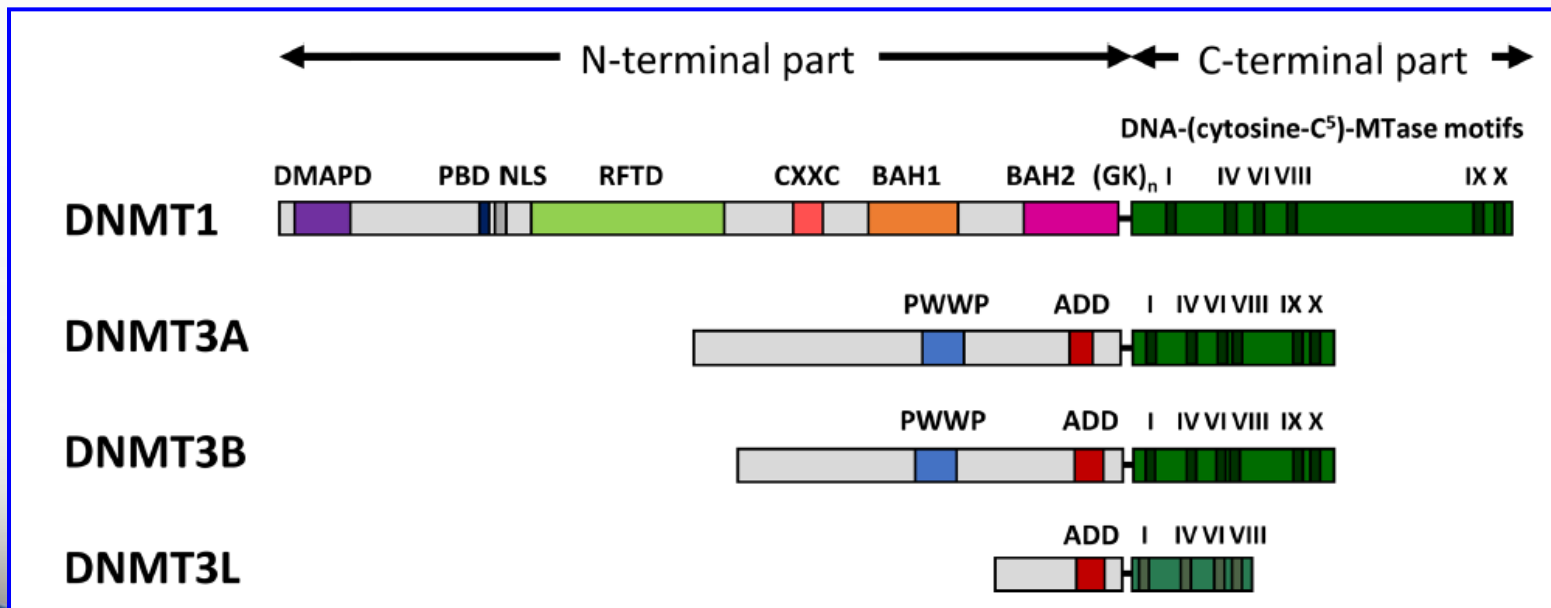
- **5-metylcytosin** („pátá báze“) - může být enzymaticky tvořen a udržován na dinukleotidu **CpG**
- (metylové zbytky objeveny také na dinukleotidech CpA*, CpC nebo CpT; v oocytech, embryonálních buňkách, neuronech)
- **CpG ostrůvky** („*CpG islands*“) - jsou oblasti v genomu s vysokým obsahem těchto sekvencí, často v promotorech, obvykle nemetylovány
- CpG metylace DNA spojena s **represí transkripce** (a obecně s „represí chromatinu“: represe rekombinace,...)

* Metylace 6mA v DNA

- **6mA** (N⁶-metyladenin) DNA je převládající modifikací u prokaryotických buněk
- tato modifikace zastoupena bohatě také v lidském genomu, především v kódujících oblastech, pravděpodobně souvislost s regulací (aktivací) transkripce
- za metylaci N⁶ adeninu v DNA odpovídá metyltransferáza **N6AMT1**, a demetyláza **ALKBH1**

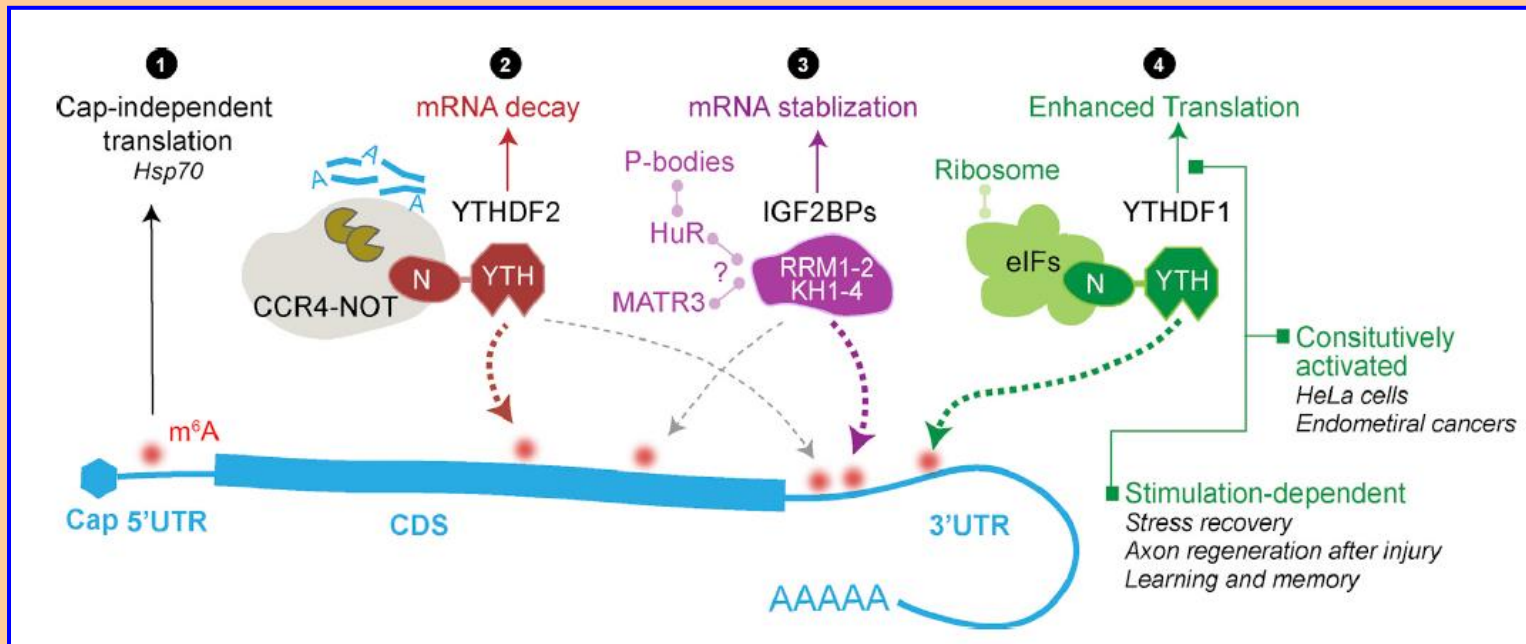
Rodina lidských DNMT

- DNMT1 – **udržovací** („maintenance“) – 10x vyšší afinita k semimetylované DNA, mnohem aktivnější než DNMT3a a 3b
- DNMT3a a DNMT3b – **de novo** – metylují nemetylovanou DNA
- DNMT2 – katalyzuje hlavně metylaci **tRNA***



* Metylace RNA

- **6mA** modifikace mRNA
- rychle se rozvíjející komplikovaná, heterogenní oblast biologie
- (modifikace/metylace i dalších typů RNA)



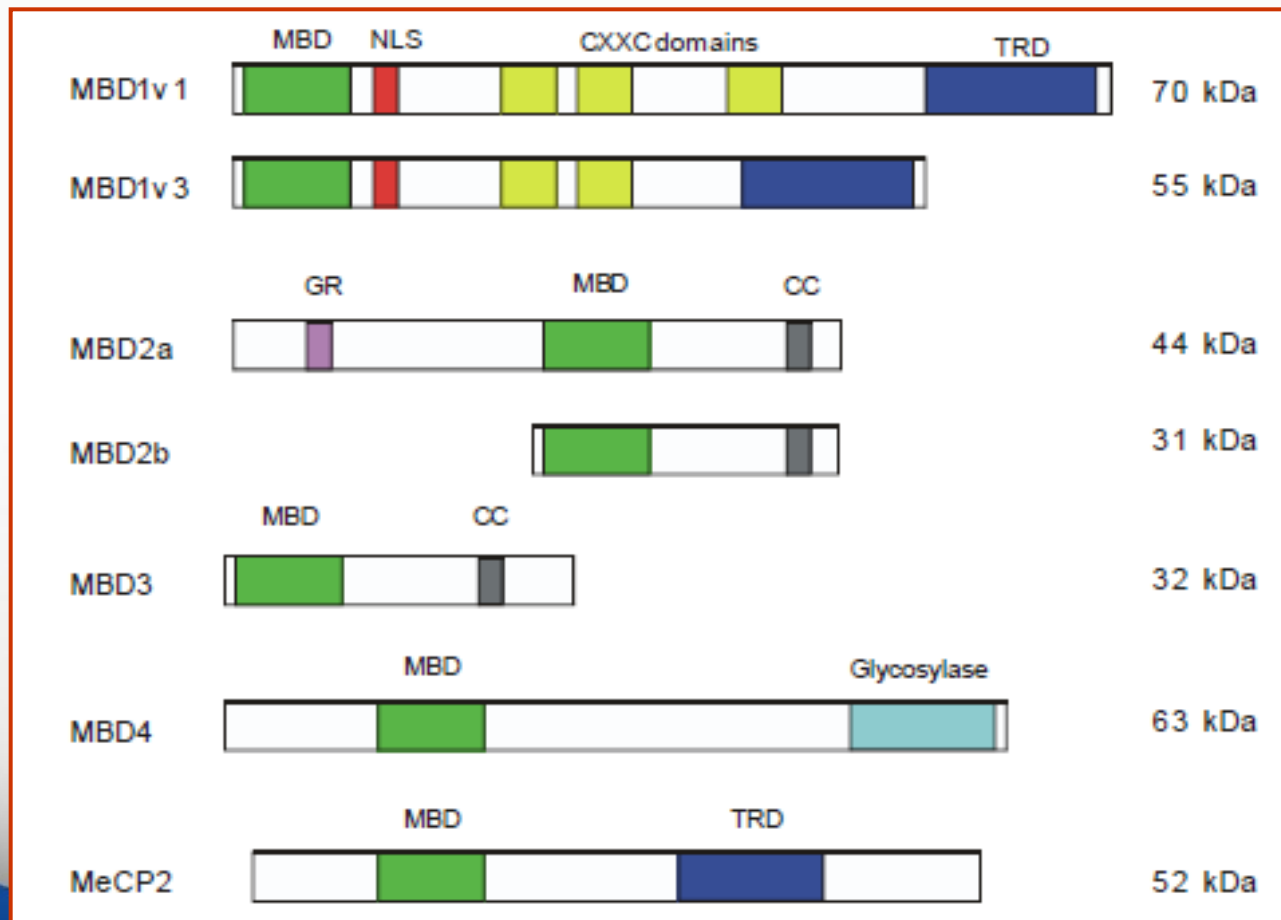
Shi H et al, *Mol Cell* 74 (18): 640-650, 2019

tRNA: Kaiser S et al, *RNA Biol* 14 (9): 1241-1251, 2017

Metylace DNA a deacetylace histonů

- Metylované 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 metylovaným oblastem **HDACs**.

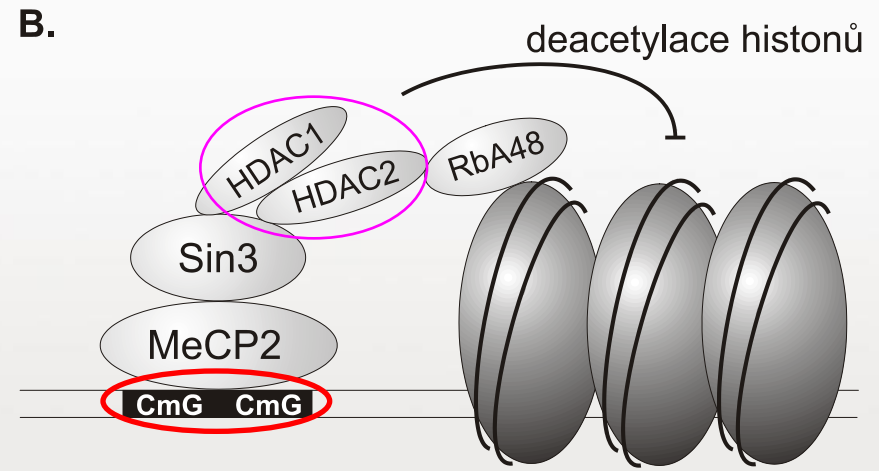
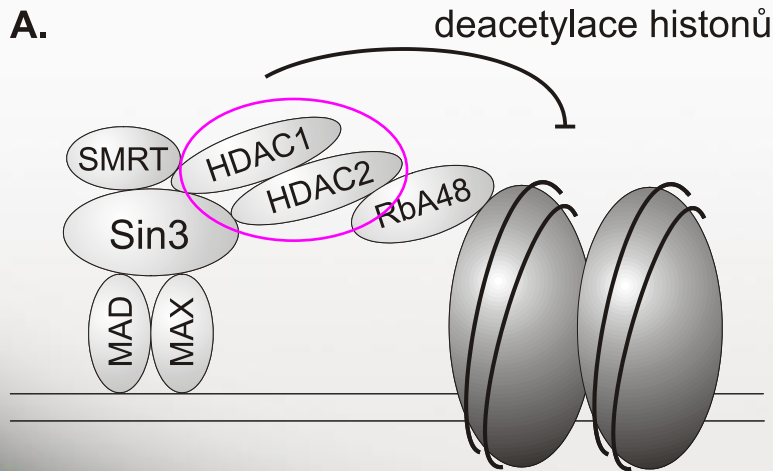
Rodina lidských proteinů vázajících metyl-CpG



HDACs a represe transkripce

A. přechodná represe

B. stabilní represe



Model regulace cílových genů E2F

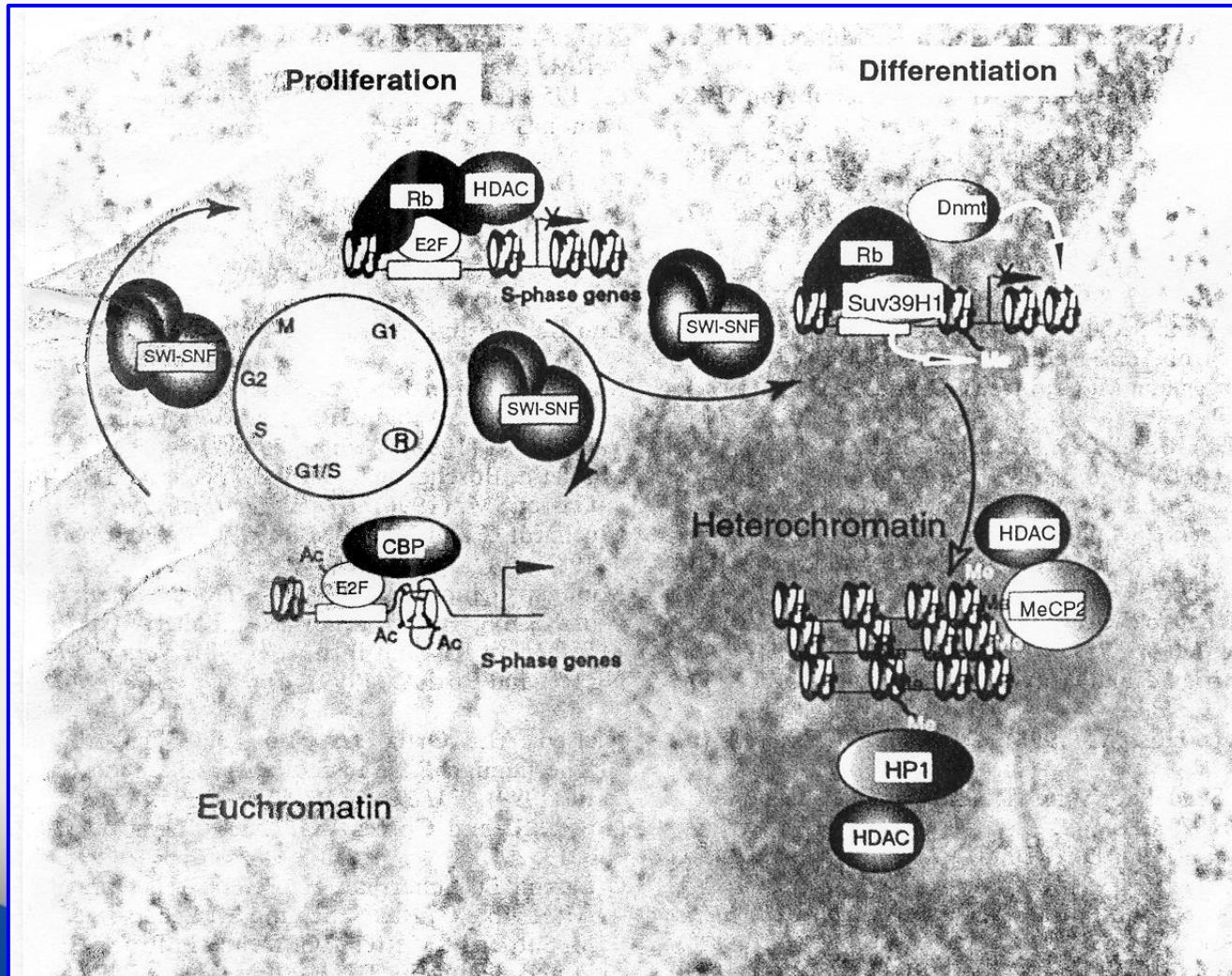
➤ proliferující buňky:

- cílové geny E2F jsou součástí euchromatinu
- jsou regulovány cyklickými interakcemi s HATs a HDACs

➤ diferencované buňky:

- DNA cílových genů E2F je metylována
- je součástí heterochromatinu

Model regulace cílových genů E2F



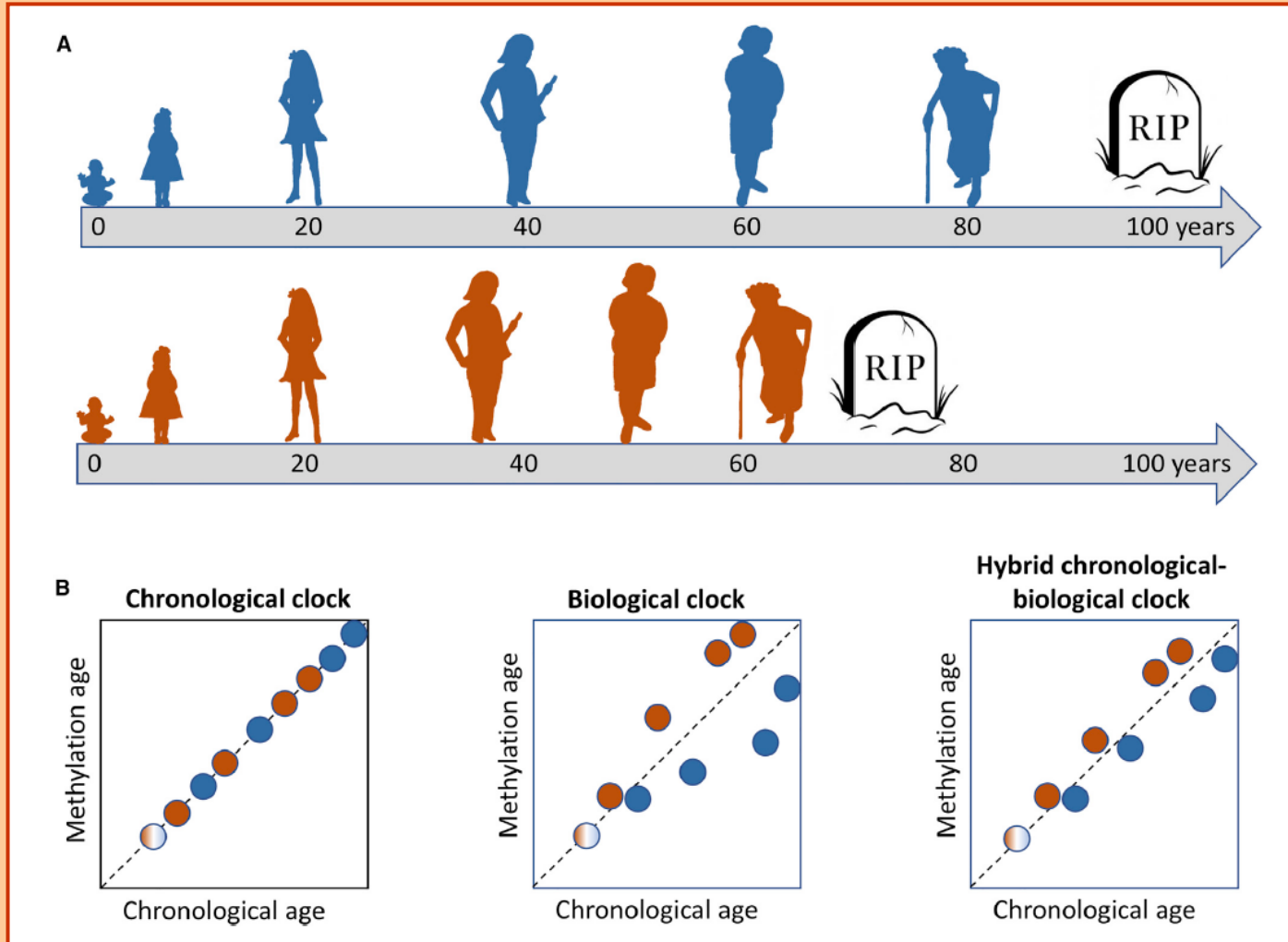


Rettův syndrom

- progresivní neurodegenerativní onemocnění, jedna 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 (Xq28)



Metylace DNA a stárnutí



Field AE et al. DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences. *Mol Cell* 71: 882-895, **2018**

Metylace DNA a stárnutí

Figure 3: Chronological versus Biological Age and Their Assessment by Methylation Clocks

(A) Two people, blue and red, born at the same time, will always share the same chronological age (gray arrow timeline measured in years). However, because of genetic, epigenetic, and environmental factors and lifestyle choices, they may progress through the functional decline that characterizes biological aging at different rates. Shown here, red ages biologically more quickly than blue, likely associated with earlier onset of lethal disease. As illustrated, in early life, red and blue are assumed to have the same biological age.

(B) By definition, a perfect chronological clock (left), whether based on DNA methylation or any other molecular parameter, measures time elapsed since birth. Therefore, it cannot distinguish between individuals that biologically age fast (red) or slow (blue). In contrast, a biological clock (center) can distinguish between unhealthy (red) versus healthy (blue) aging but is a less accurate chronological clock. A hybrid clock (right) tracks closely with chronological age, but deviation from the position of the 45° perfect chronological clock is a reflection of biological age. However, the hybrid clock is likely less accurate predictor of age and disease than *bona fide* biological clock. The human clocks calibrated against chronological age are likely hybrid clocks.

The colors of the filled circles indicate the donor, red or blue, from (A).

Kovalentní modifikace histonů - pokračování 14.11.2019