

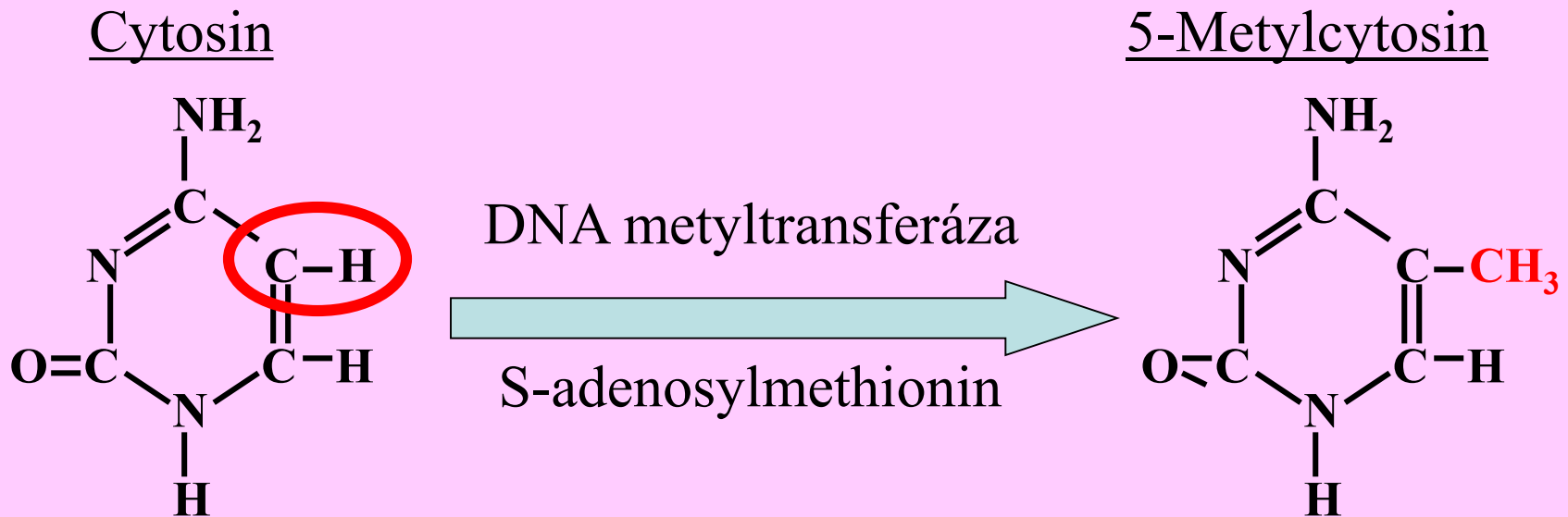
MECHANIZMY EPIGENETICKÝCH PROCESŮ

METYLACE DNA

Metylace DNA

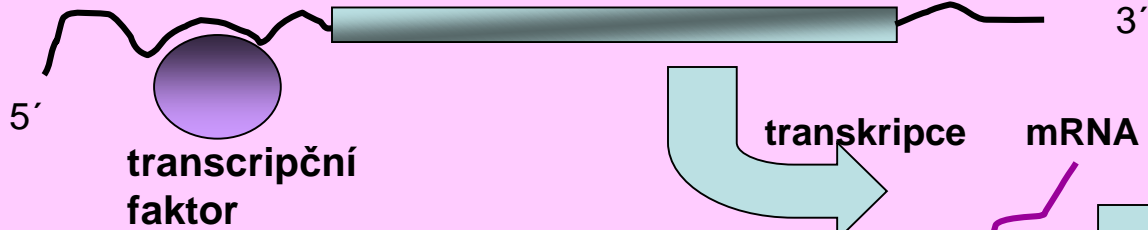
Adice metylové skupiny (CH₃) na 5. uhlík cytosinu

- Obvykle probíhá pouze na cytosinech 5' vůči guanosinu (CpG)

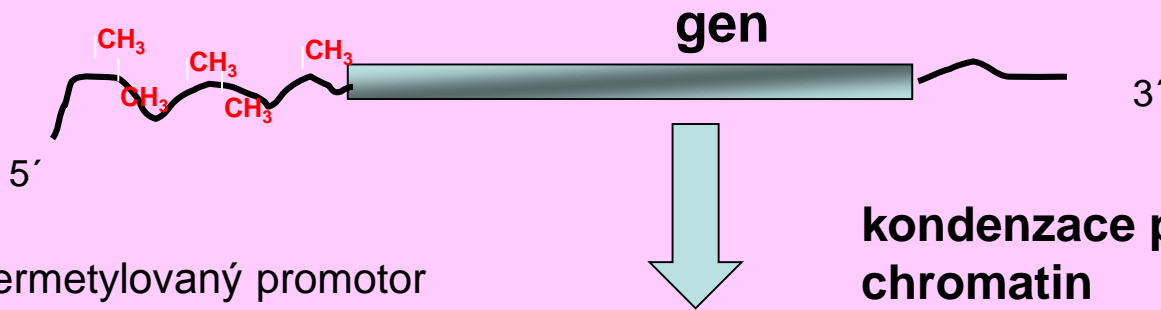


Epigenetické umlčování

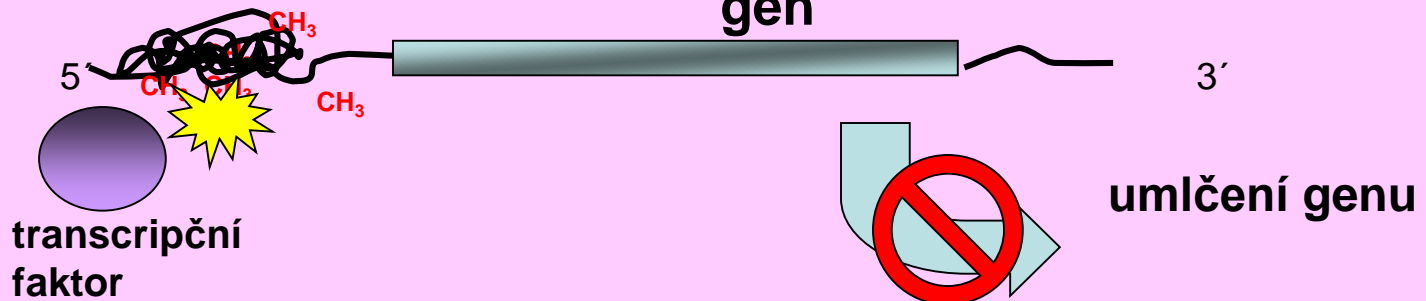
nemetylovaný promotor



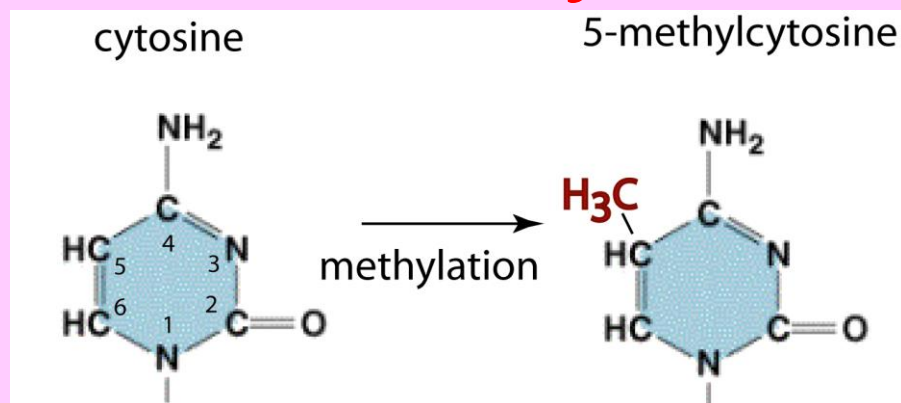
hypermetylovaný promotor



hypermetylovaný promotor (kondenzovaný)



DNA metylace



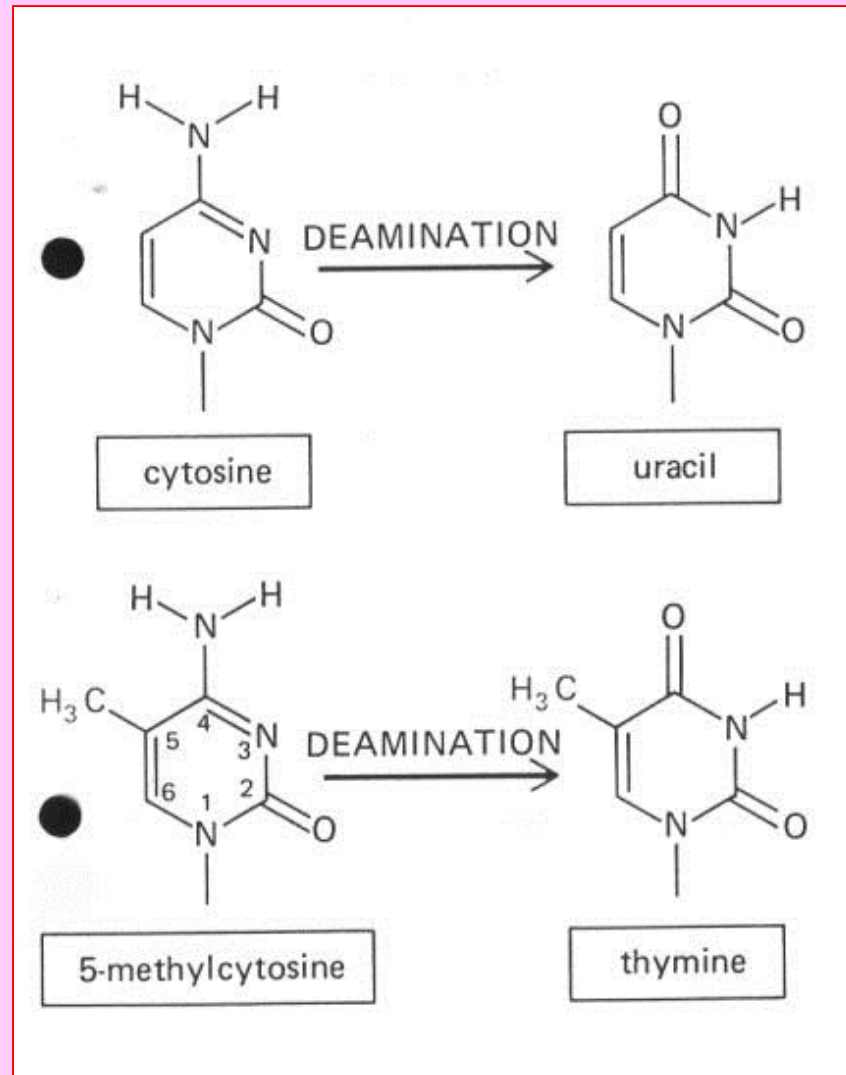
- DNA metylace se vyskytuje na 5-C v CpG dinukleotidech. 5mC obvykle tvoří <1% nukleotidů.
- Frekvence CpG je ~5x nižší než očekávaná, což je způsobeno zvýšenou mutací v CpG dinukleotidech.
 - Tranzice (C-T) se vyskytují 10-40x častěji než v jiných dinukleotidech.
- Až 50% bodových mutací v genu p53 v lidských nádorech se vyskytuje v CpG dinukleotidech.
 - CpG ostrovy nejsou v genomech distribuovány rovnoměrně.
 - CpG jsou obvykle metylovány v repeticích a 3' oblastech genů a nikoli v CpG ostrovech.
- V genomu savců je asi 35 tisíc CpG ostrovů, které bývají umístěny v promotorových oblastech housekeeping genů a tkáňově specifických genů.

CpG dinukleotidy jsou
palindromatické

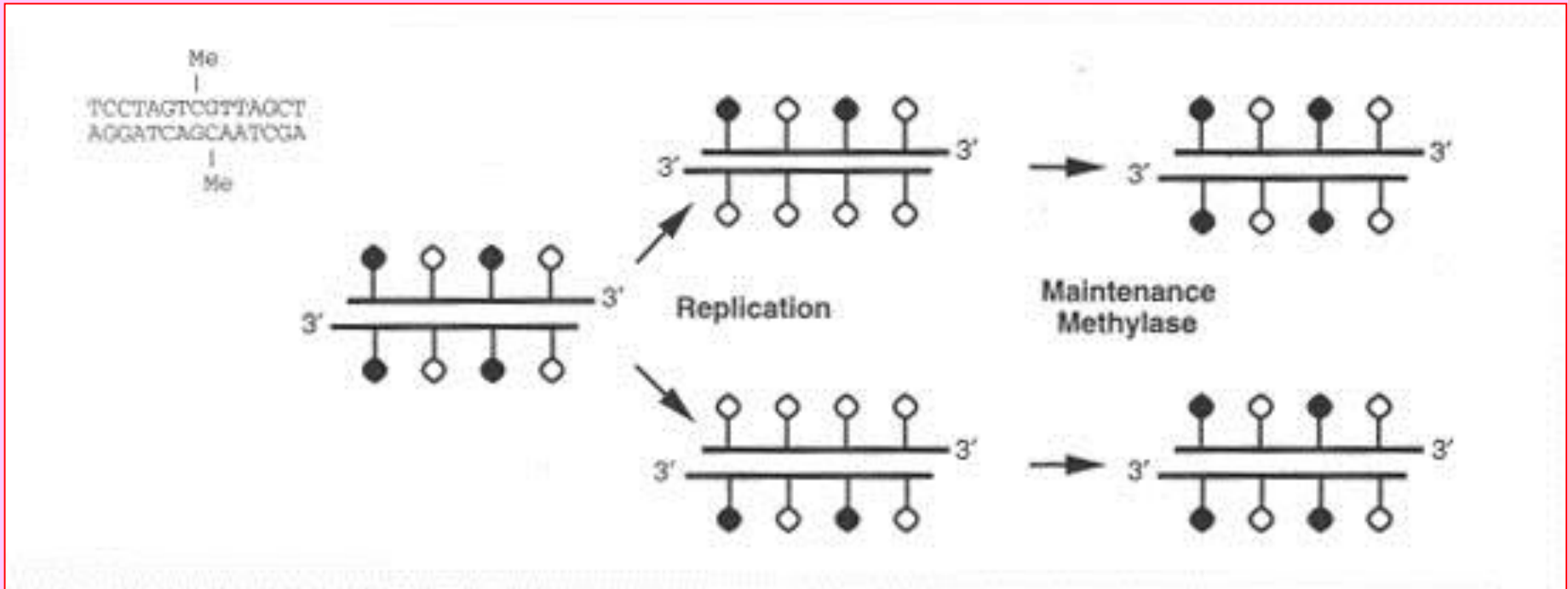
5' CpG 3'

3' GpC 5'

Mutace 5'-metylcytosinu nemohou být identifikovány a reparovány

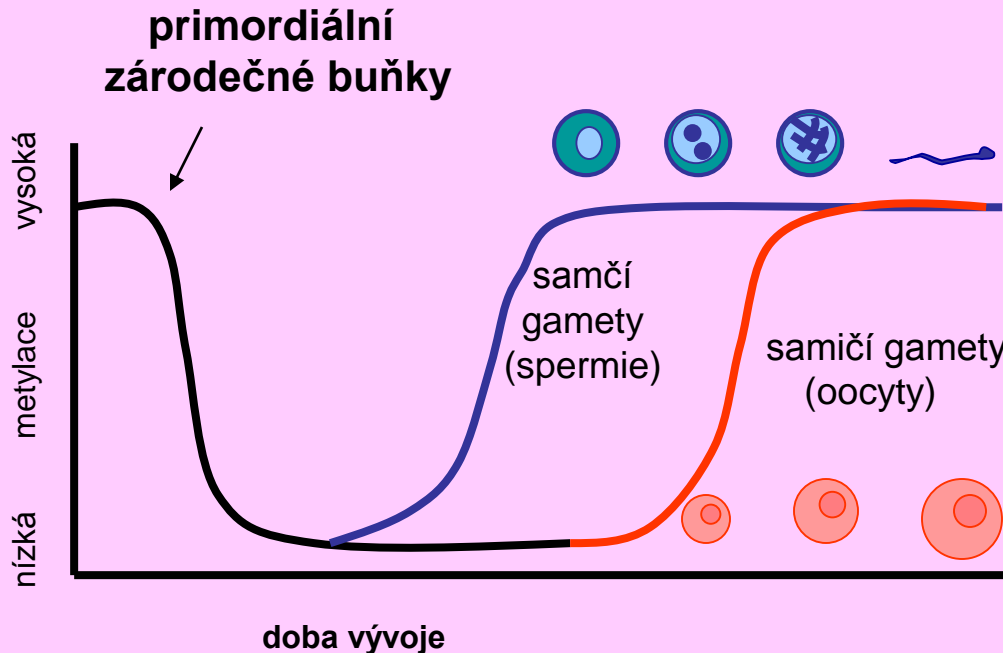


Udržovací metylace



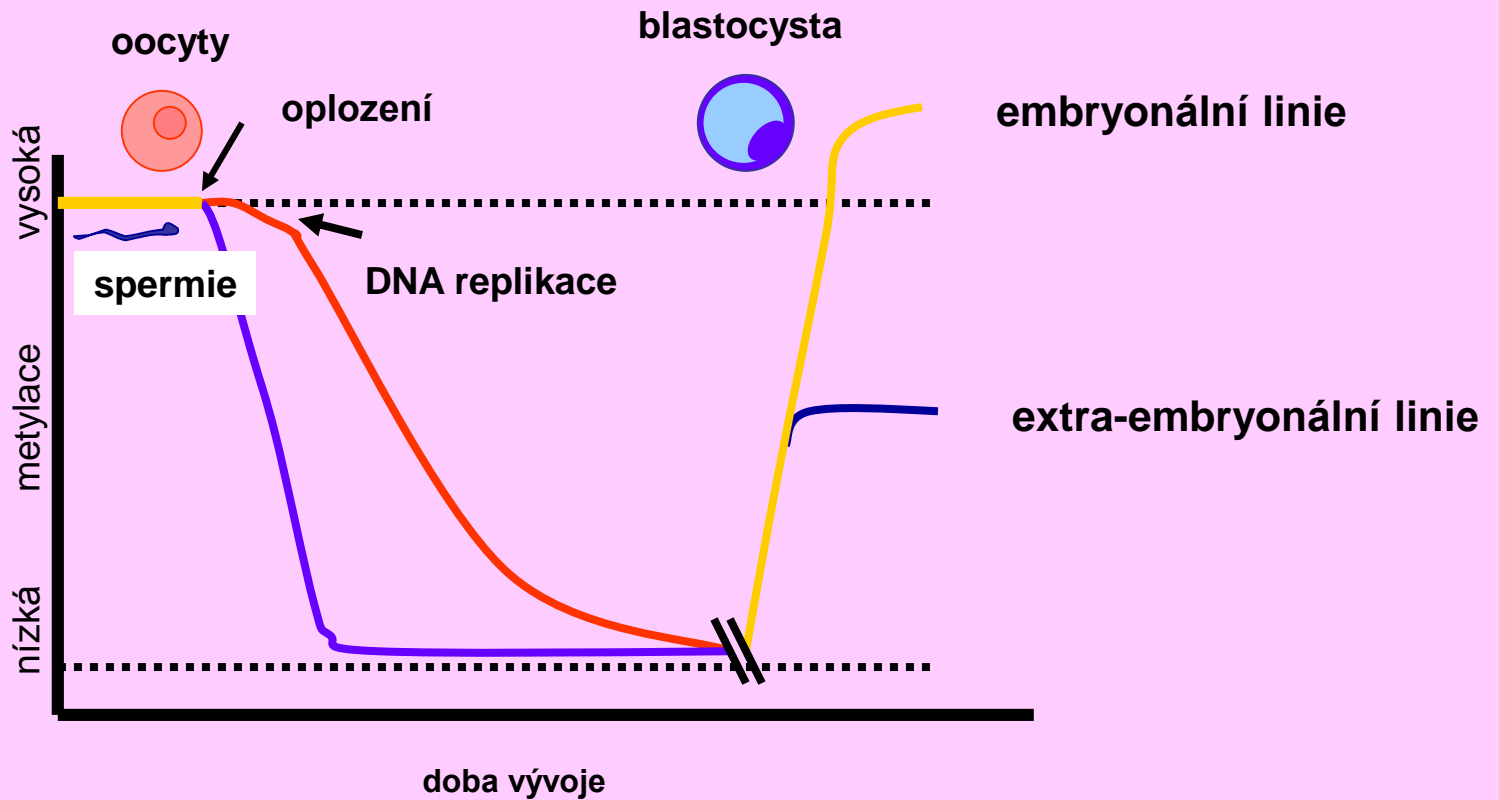
DNA metyltransferáza 1

Změny metylace DNA v průběhu vývoje buněk zárodečné dráhy



V průběhu ontogeneze dochází u savců k rozsáhlým změnám ve stupni metylace cytosinu. V primordiálních pohlavních buňkách dochází k výrazné demethylaci, ve vlastních gametách je metylace opět výrazná (včetně imprintů), v průběhu embryogeneze (*in utero*) zase vznikají nové metylační záznamy.

Změny metylace DNA v průběhu vývoje savců



MODIFIKACE NUKLEOZOMÁLNÍCH HISTONŮ



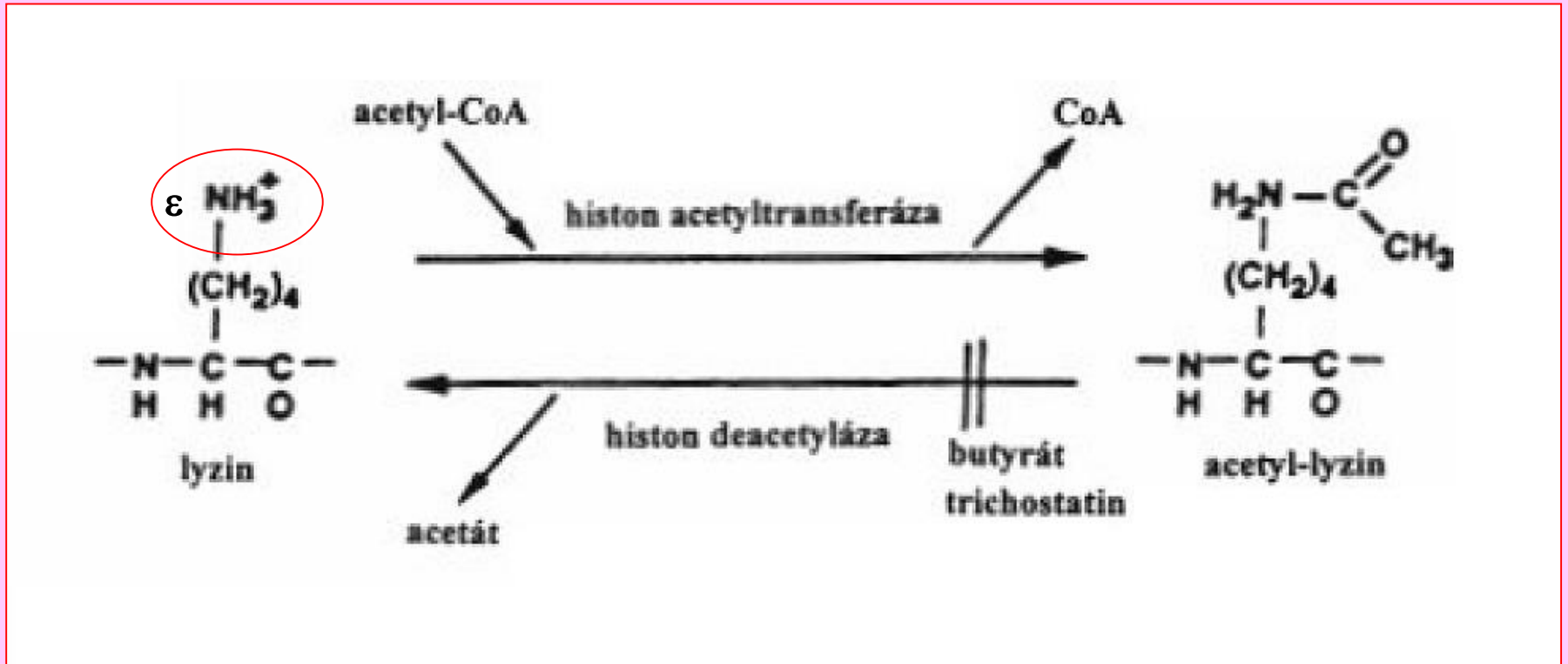
The amino-terminal tails of histones account for a quarter of the nucleosome mass. They host the vast majority of known covalent modification sites as illustrated. Modifications do also occur in the globular domain (*boxed*), some of which are indicated. In general, active marks include acetylation (*turquoise Ac flag*), arginine methylation (*yellow Me hexagon*), and some lysine methylation such as H3K4 and H3K36 (*green Me hexagon*). H3K79 in the globular domain has anti-silencing function. Repressive marks include H3K9; H3K27, and H4K20 (*red Me hexagon*), Green = active mark, red = repressive mark.

HISTONOVÉ KÓDOVÁNÍ

Nejčastěji modifikované aminokyseliny: R = arginin, K = lyzin, S = serin, ...

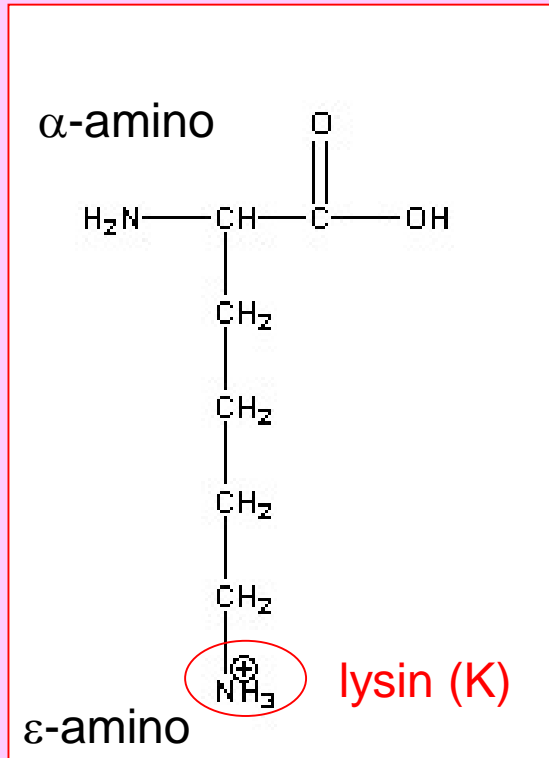
Cílem modifikací lyzinu je ϵ -aminoskupina

- vede to k neutralizaci jejího pozitivního náboje

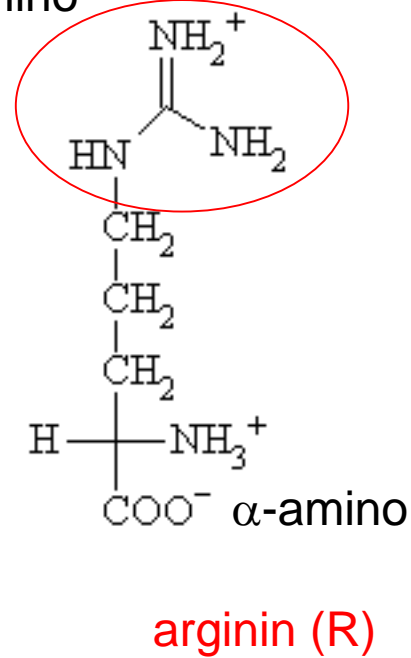


V jednom nukleozomu může být acetylováno až 26 lyzinových reziduí lokalizovaných v N-distálních ramenech histonového oktameru – H4 (4), H3 (4), H2A (1) a H2B (4).

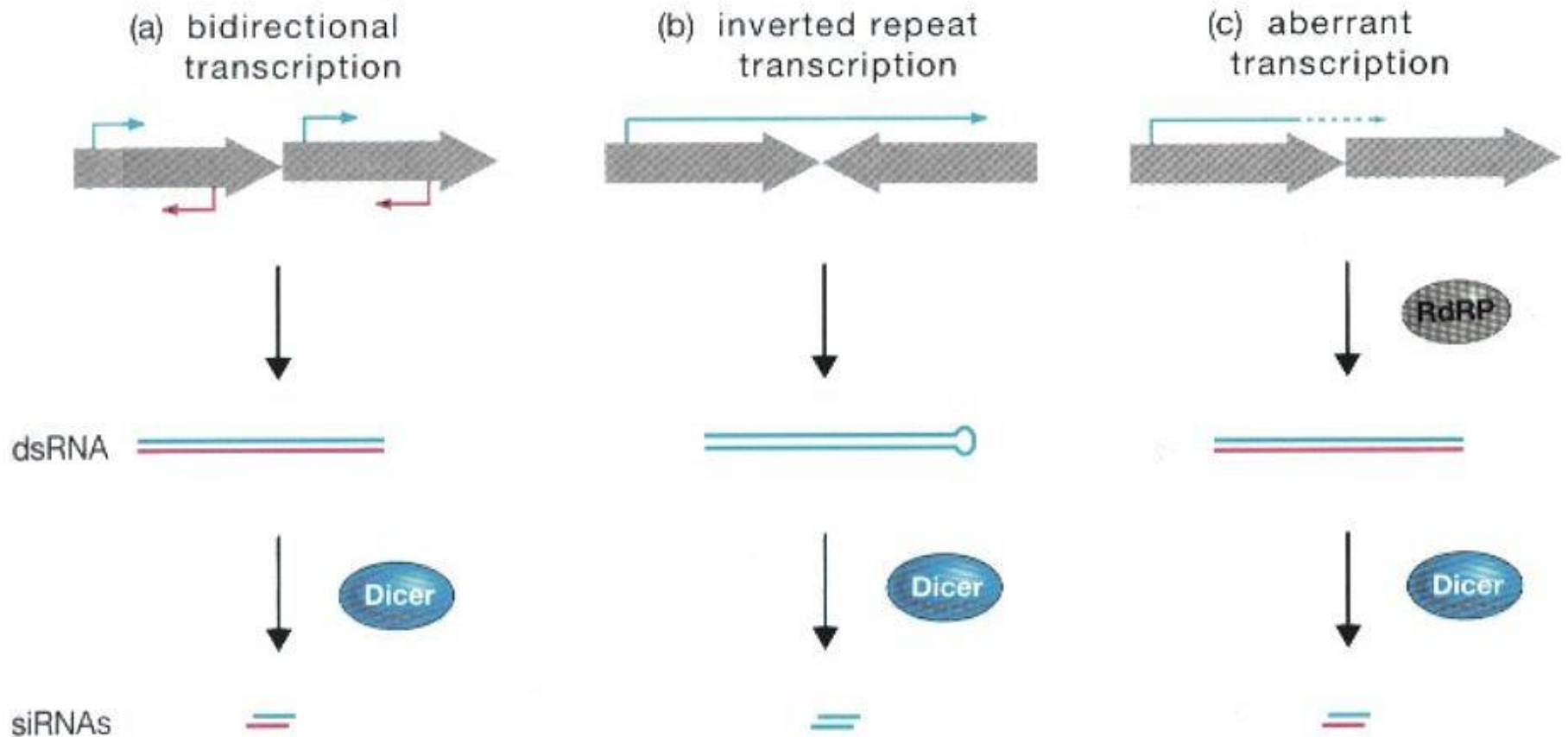
Nejčastejším cílem modifikací histonů jsou silně bázecké aminokyseliny lysin a arginin



δ -triamino



RNA INTERFERENCE A HETEROCHROMATIN

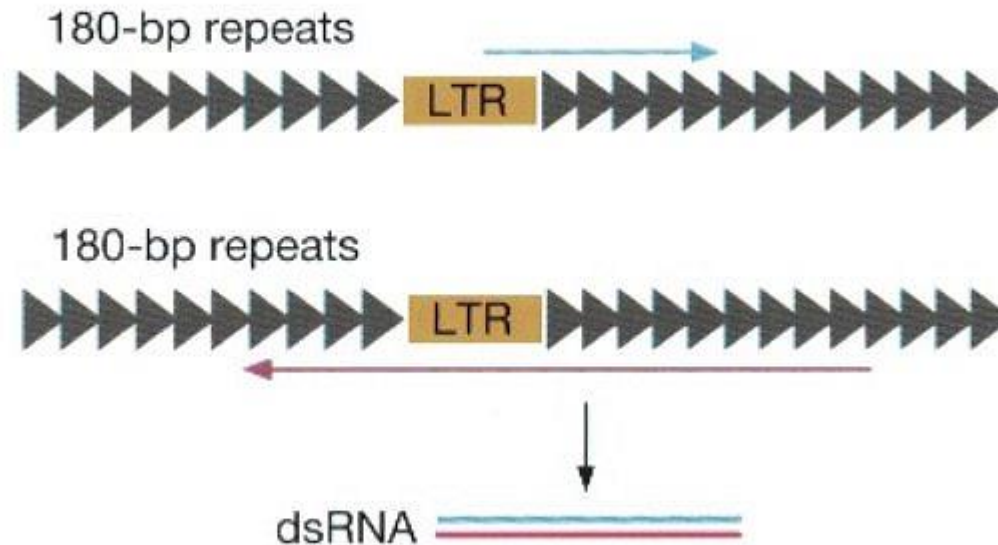


Zdroje dsRNA, které fungují jako substrát ke tvorbě siRNA (small interfering)

ribonukleázou Dicer a jsou spouštěči umlčování RNA:

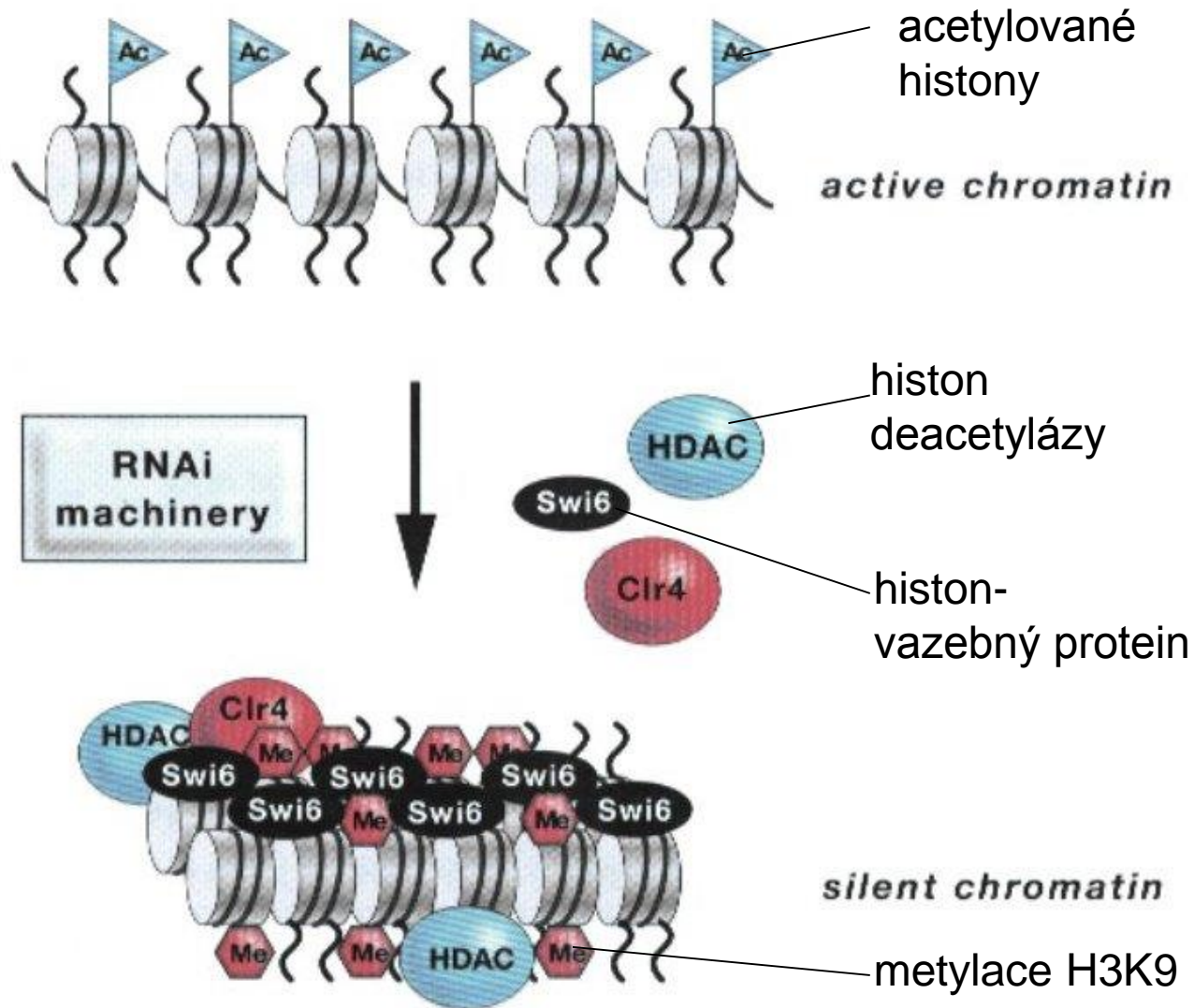
- (a) Obousměrná transkripce popsaná v centromerických repetičích *S. pombe*
- (b) Transkripce obrácených repetičí (rostliny, živočichové)
- (c) Transkripce aberantních RNA, bez sestřihu, s pomocí RNA dependentní RNA polymerázy (RdRP)

A.thaliana centromere

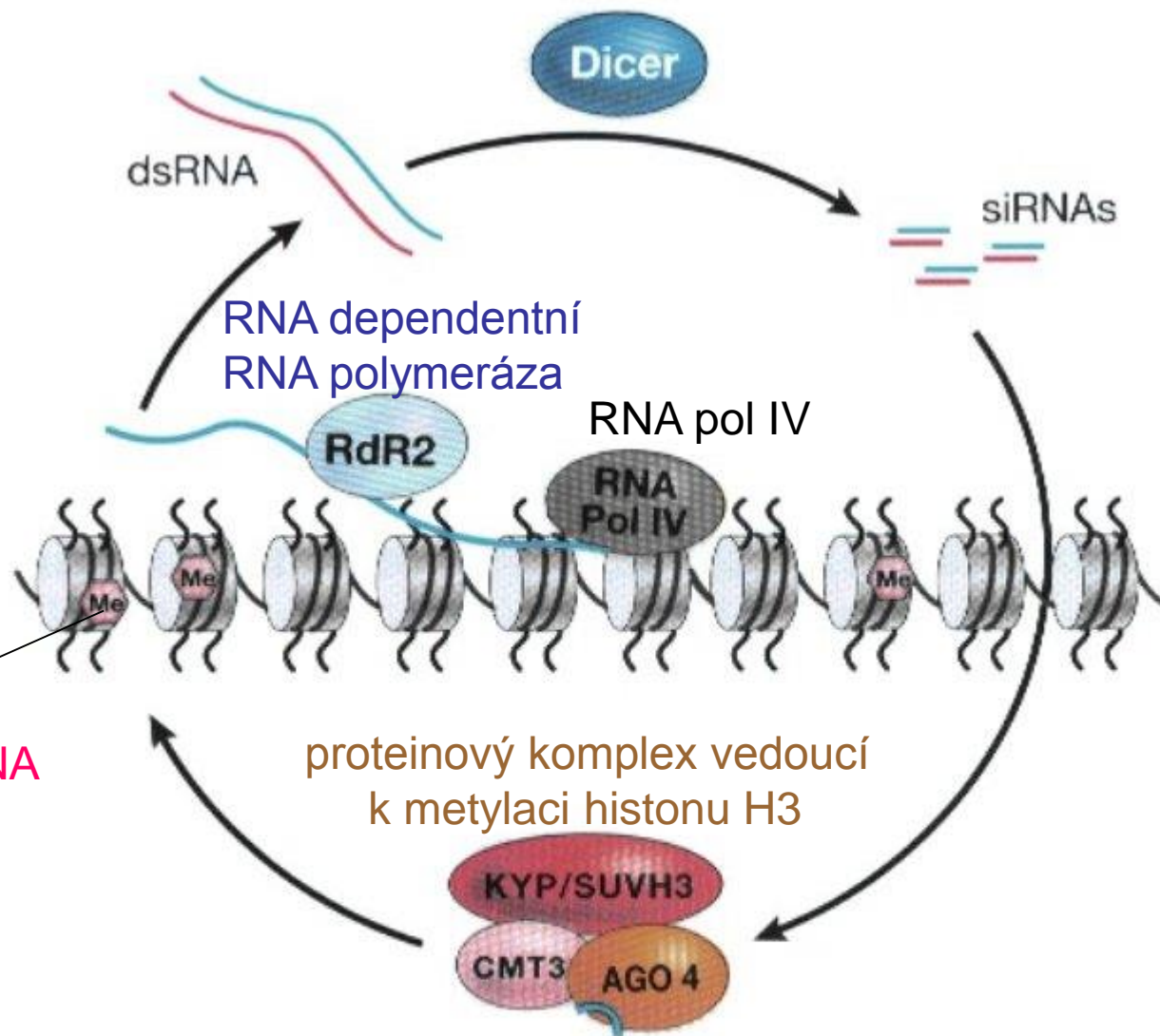


Organizace heterochromatinových oblastí chromozomů – centromera *Arabidopsis*

Centromery jsou složeny ze 180 pb repetič s vloženými retroelementy. Přímé transkripty jsou počaty z LTR (long terminal repeats) retroelementu, obrácené transkripty počínají přímo v repetičích.



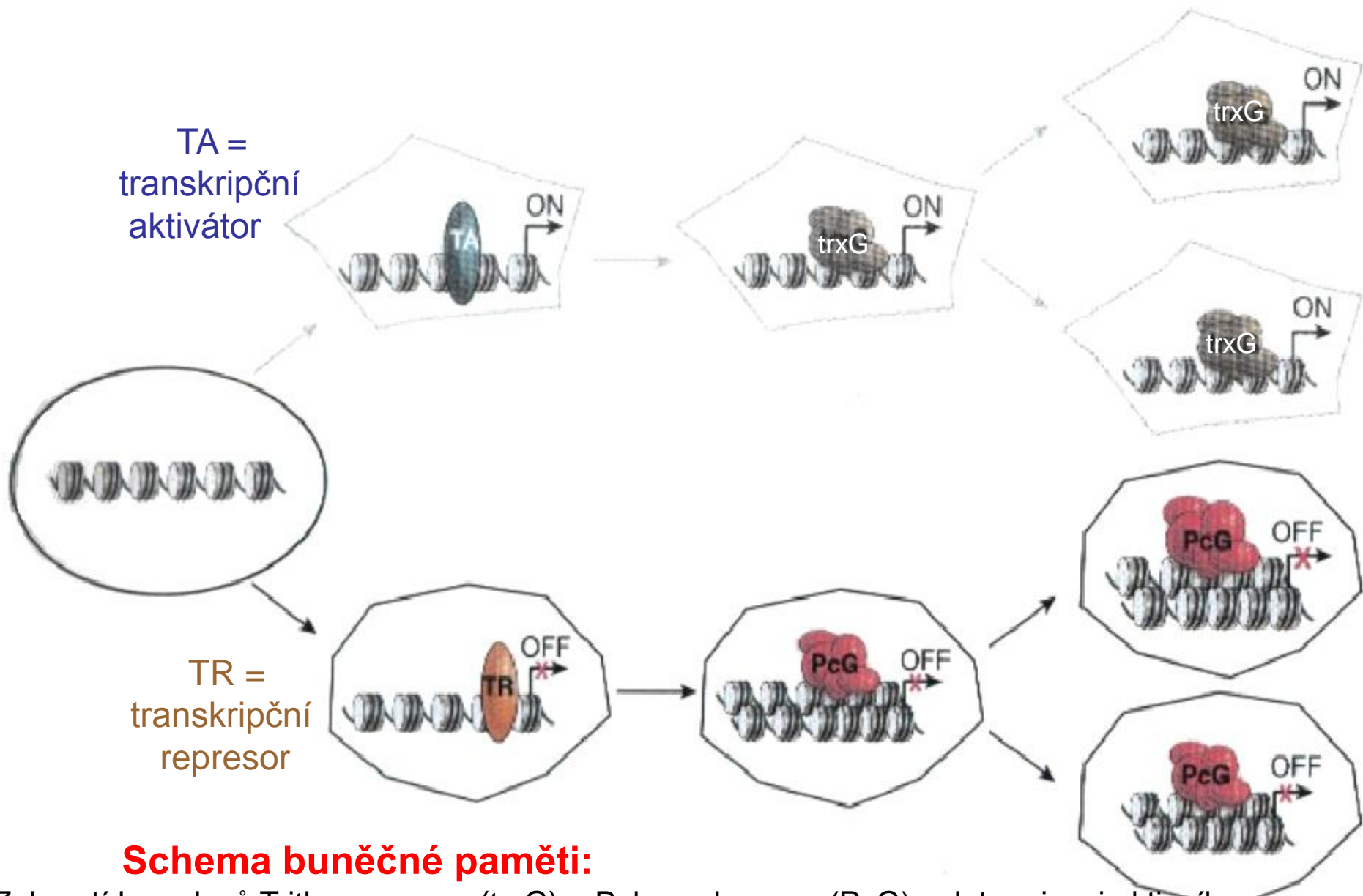
Uspořádání heterochromatinu zahrnuje koordinovaný účinek histon-modifikujících enzymů (HDAC, Clr4), histon-vazebných proteinů (Swi6) a je řízen RNAi mechanismem. Deacetylace je následována vazbou Clr4 a metylací H3K9, na ten se váže Swi6.



metylovaná DNA

Model úlohy RNA polymerázy IV v RNAi procesu a histon H3 metylaci:
 RNA pol IV transkribuje metylovanou DNA, RNA dependentní RNA polymeráza z ní dělá dsRNA, siRNA potom směřuje celý metyltransferázový komplex k chromozomu.

PAMĚŤOVÉ PROTEINY: POLYCOMB



Schema buněčné paměti:

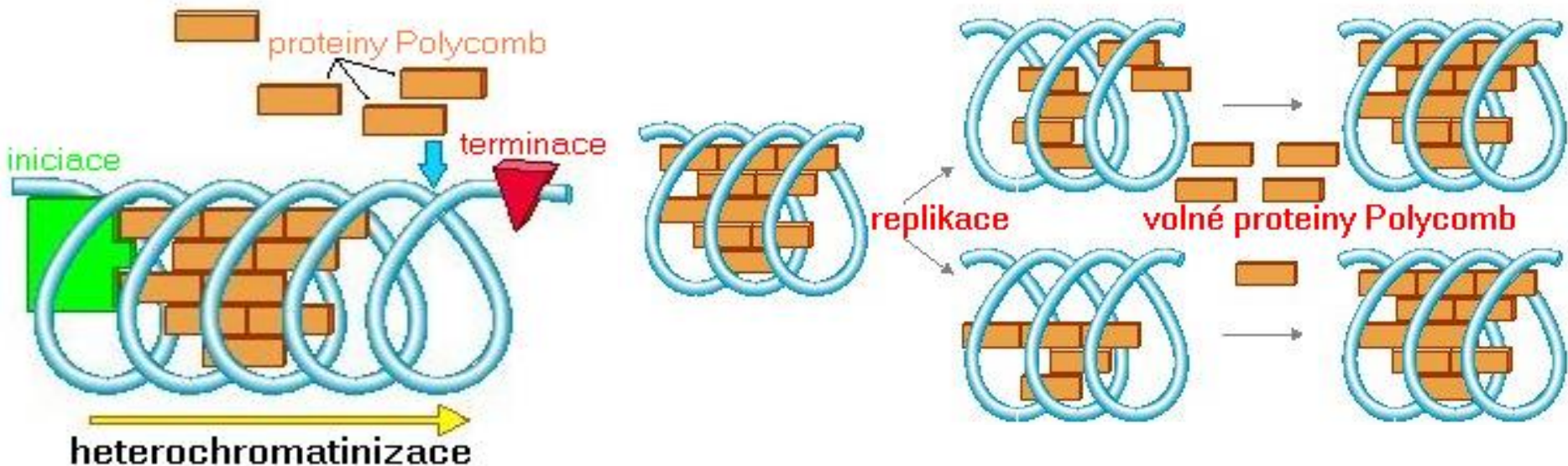
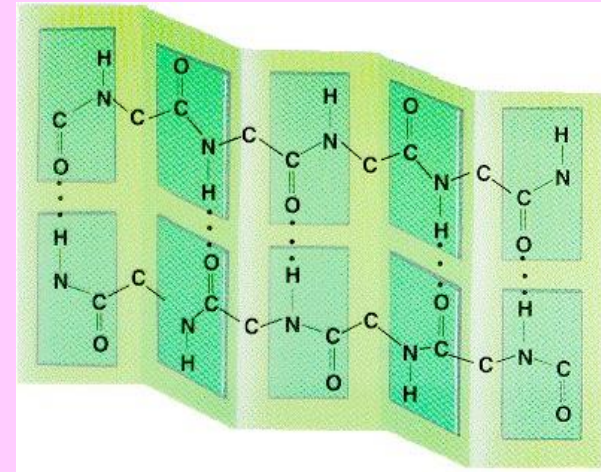
Zahrnutí komplexů Trithorax group (trxG) a Polycomb group (PcG) v determinaci aktivního a reprimovaného stavu genové exprese (a tím i buněčné diferenciaci) po mnoho buněčných dělení.

Proteiny epigenetické buněčné paměti

[Cellular Memory Proteins]

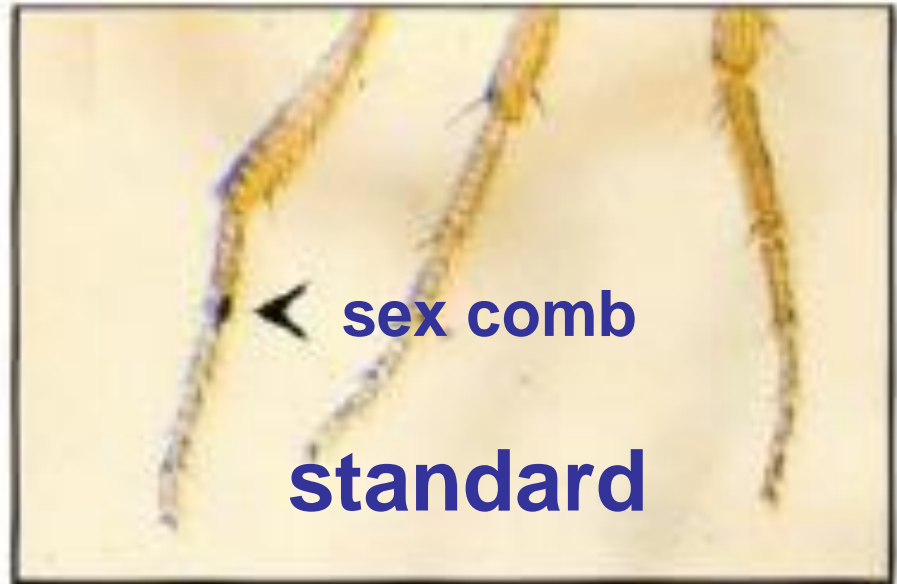
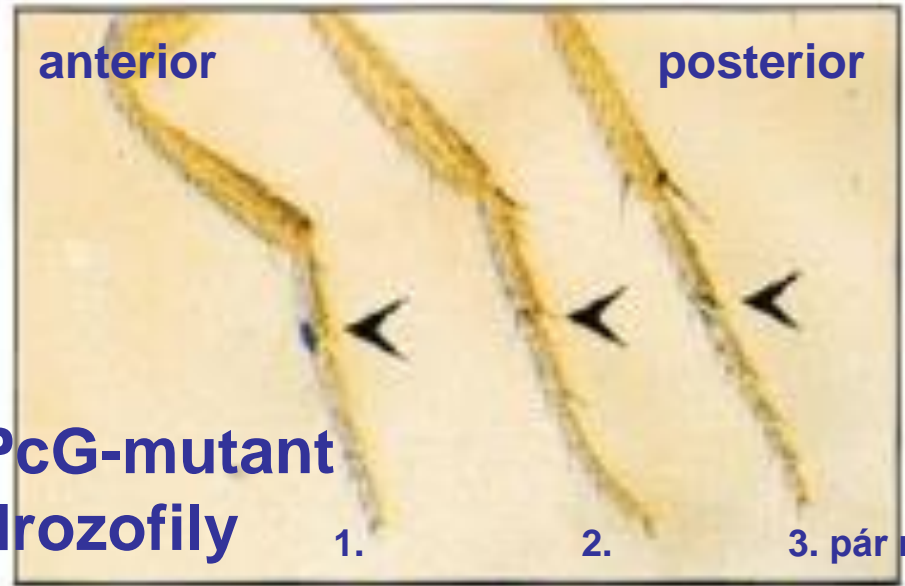
POLYCOMB a TRITHORAX

– skupiny klíčových regulátorů
vývoje, sktruktury a exprese
homeotických genů, vazba na DNA –
Polycomb Response Elements



Polycomb group

repressory homeotických genů, mutace způsobují „více anteriorní či posteriorní“ fenotyp



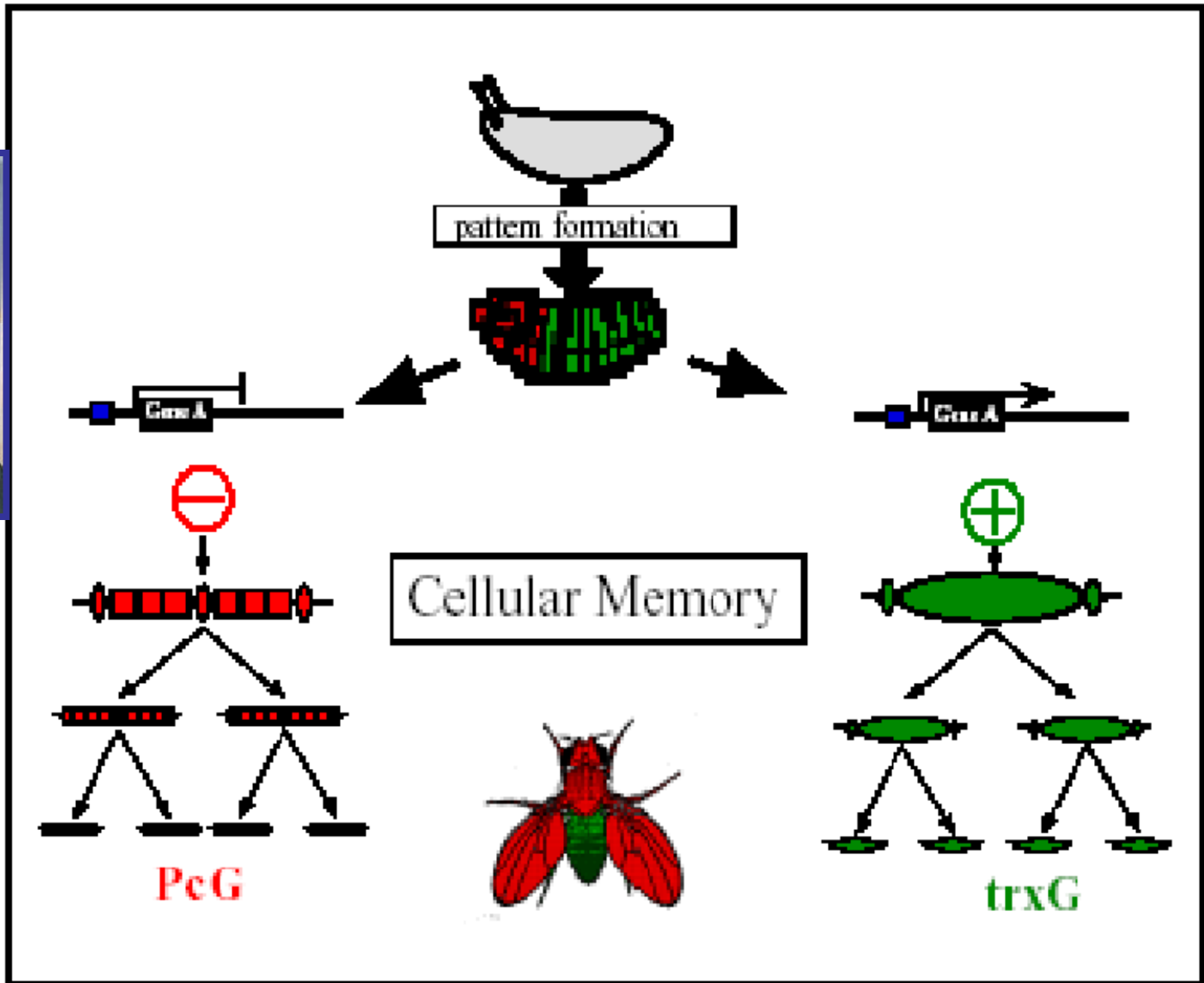


Imunolokalizace paměťových proteinů Polycomb na polytenních chromozomech ze slinných žláz drozofily



Renato
Paro

(Heidelberg)



teorie chromatinové paměti ... Remembering silence ...

Proteiny skupiny POLYCOMB

- jsou antagonisty (represory) homeotických genů s homeoboxem či MADS doménou
- specifikují místo účinku homeotických transkripčních faktorů



Justin Goodrich
(Edinburgh)

Arabidopsis CURLY LEAF versus AGAMOUS



listy
wild-typu

listy mutace *clf* :
ektopická
exprese květního
genu *AG*

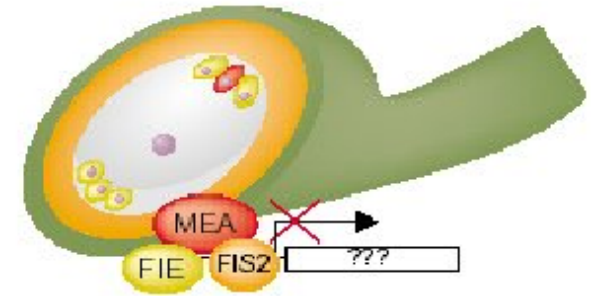
kvetení

vývoj gametofytu

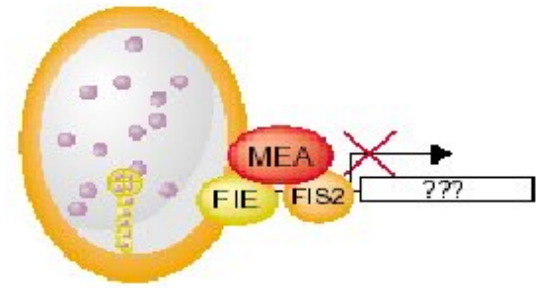
Úlohy komplexů POLYCOMB v životním cyklu rostlin

před oplozením

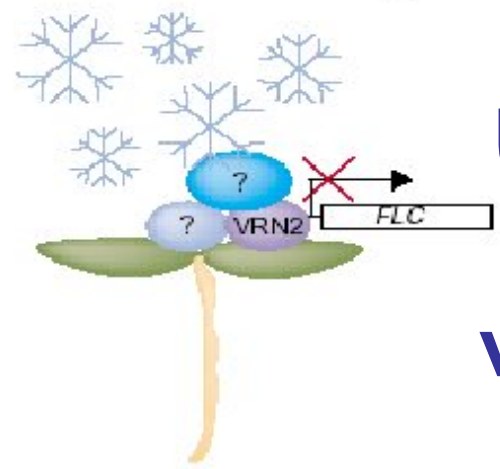
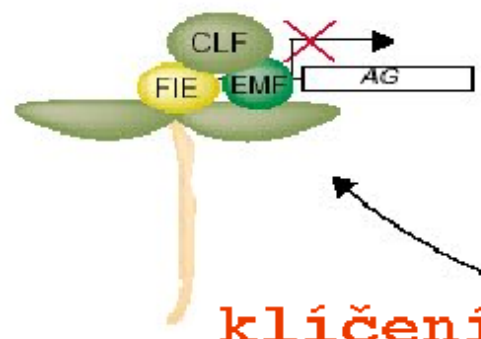
vernalizace



po oplození



klíčení



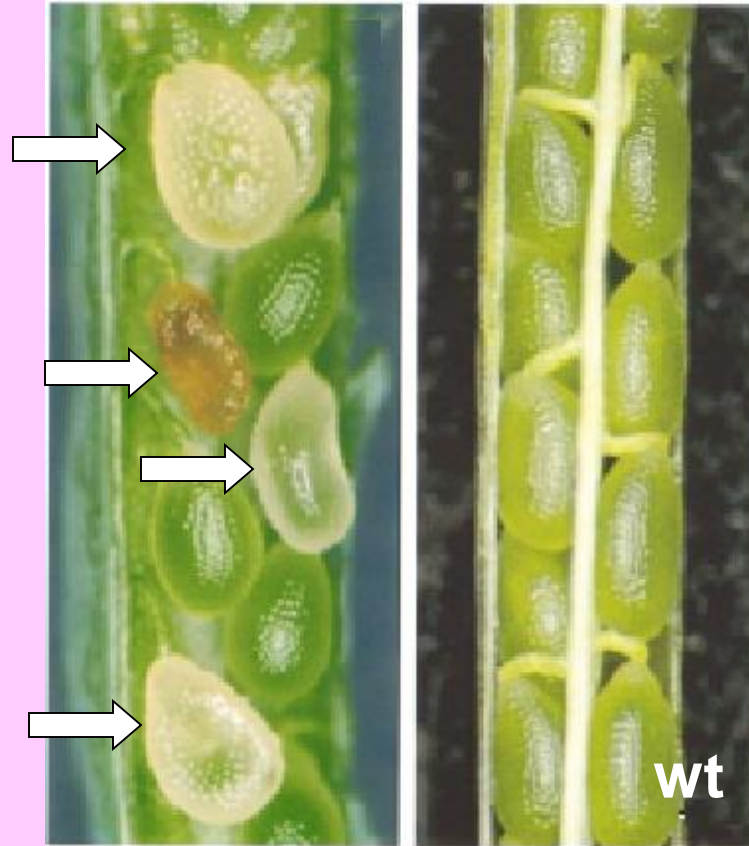
Parentální imprinting u rostlin : maternální efekt genu

MEDEA

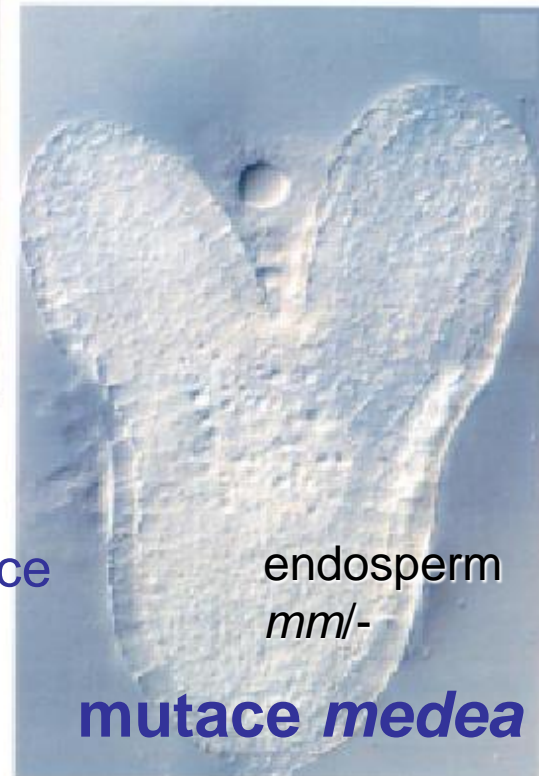
... příběh
Otesánka



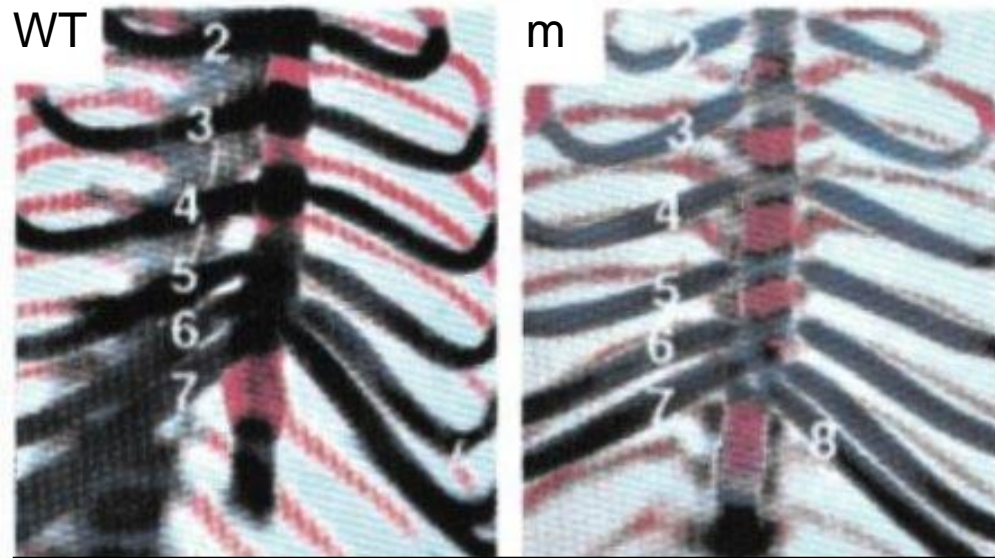
Ueli Grossniklaus
(Zurich 1998)



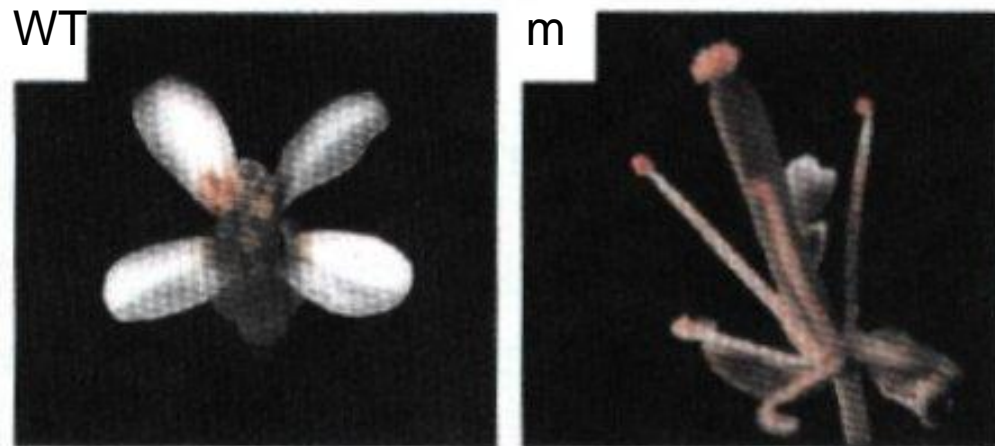
maternální wt-alela: kontrola
(redukce) embryonální proliferace



anteriorní transformace osmého
hrudního obratle v žebro
mutantu Ring1A^{-/-} u myši



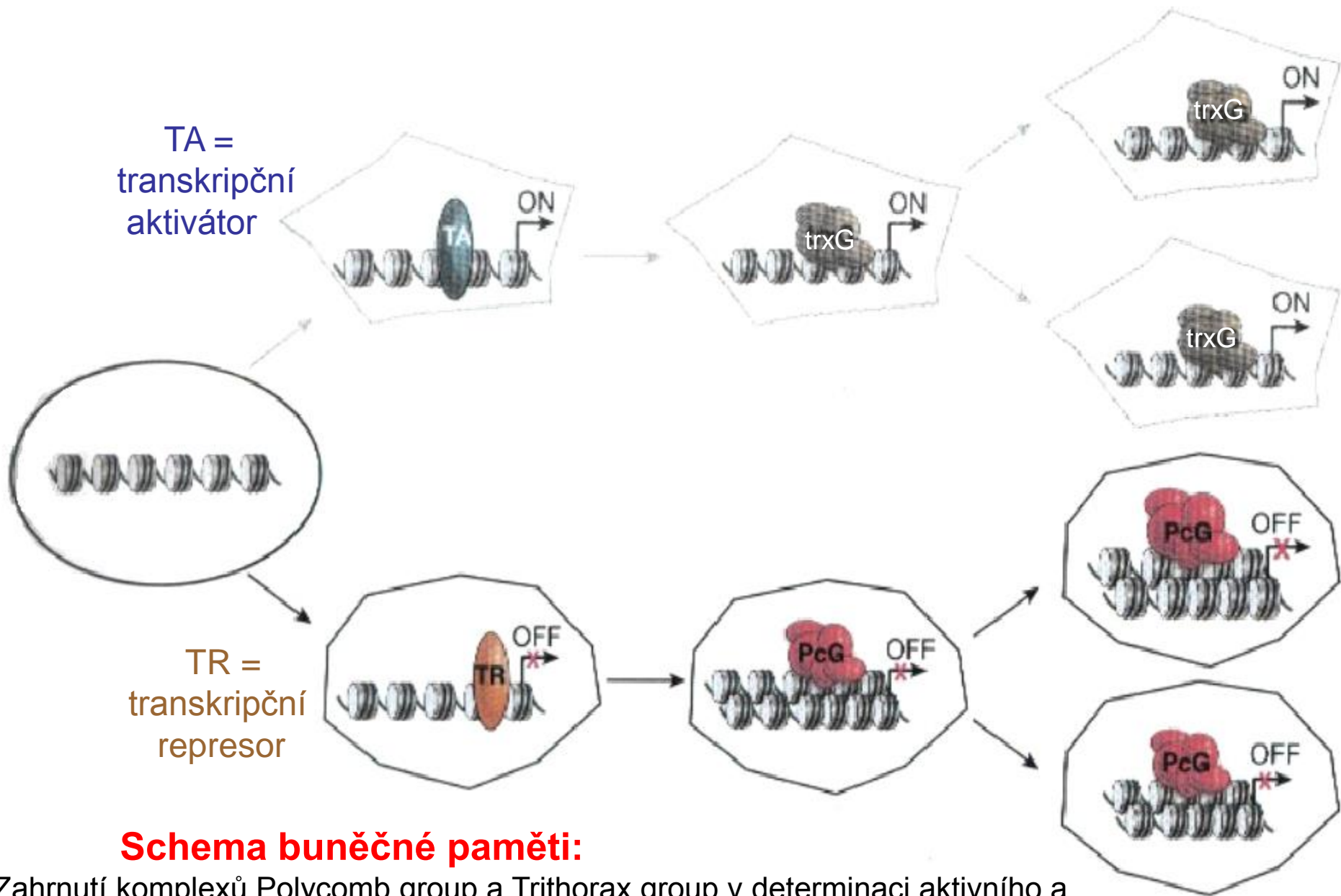
mutant *clf-2* u *Arabidopsis*
má absenci korunních plátků



Homeotické transformace v Polycomb mutantech

Polycomb proteiny jsou antagonisty homeoboxových genů (myš)
i MADS-boxových genů (*Arabidopsis*)

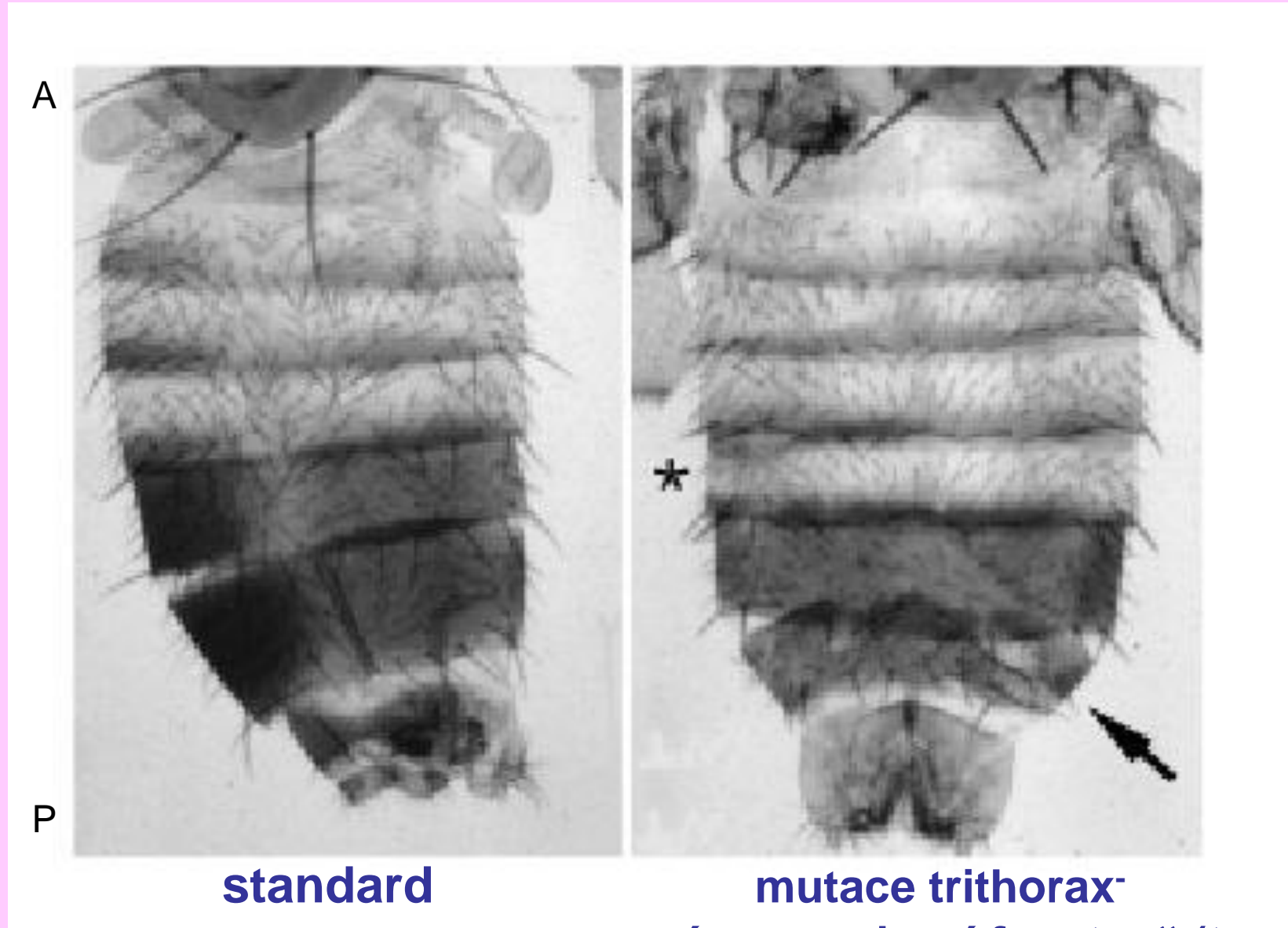
PAMĚŤOVÉ PROTEINY: TRITHORAX



Schema buněčné paměti:

Zahrnutí komplexů Polycomb group a Trithorax group v determinaci aktivního a reprimovaného stavu genové exprese (a tím i buněčné diferenciace) po mnoho buněčných dělení

Trithorax group – aktivátory homeotických genů

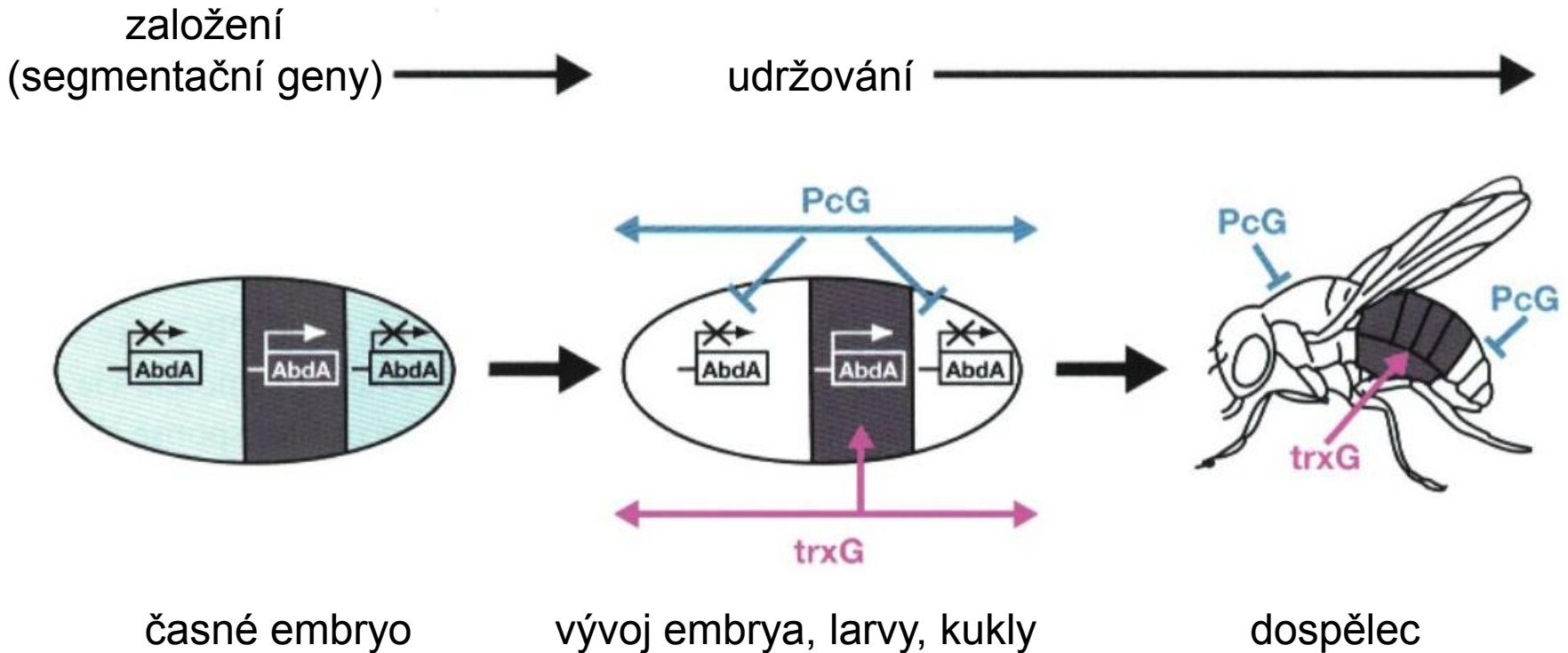


„více anteriorní fenotyp“ (trupu)

ATX-1, homolog genu *Trithorax* drosofily, aktivuje květní homeotické geny (typu MADS)



SET doména arabisčího genu *Trithorax* má metylázovou aktivitu k lysinu 4 histonu H3 → genová aktivace



Regulace transkripce homeoboxových genů

Hranice transkripce homeotického genu *AbdominalA* a ostatních *Hox* genů jsou založeny účinkem segmentačních genů (velkých mezer, párového pravidla a orientace článků), které rozdělí embryo na 14 identických článků. Stavby exprese a vypnutí *Hox* genů jsou udržovány *trxG* aktivátory a *PcG* represory.

HEAT-SHOCK PROTEINY

vývojová změna (kanalizace) !

Exposing cryptic genetic variation

Normal level of Hsp90

Lowered level of Hsp90

Normal level of Hsp90 restored

(a)



Wild-type *Drosophila*



Deformed
fore-leg



Deformed
eye



Deformed
wing

(b)



Wild-type *Drosophila*



Deformed
fore-leg

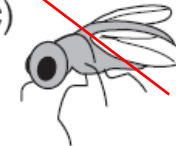


Deformed
eye



Deformed
wing

(c)



Deformed fore-leg



Wild-type *Drosophila*



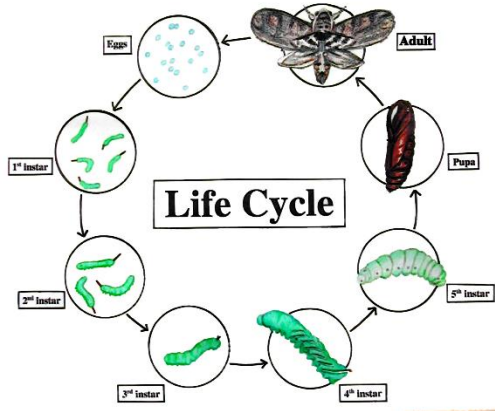
Deformed
eye



Deformed
wing

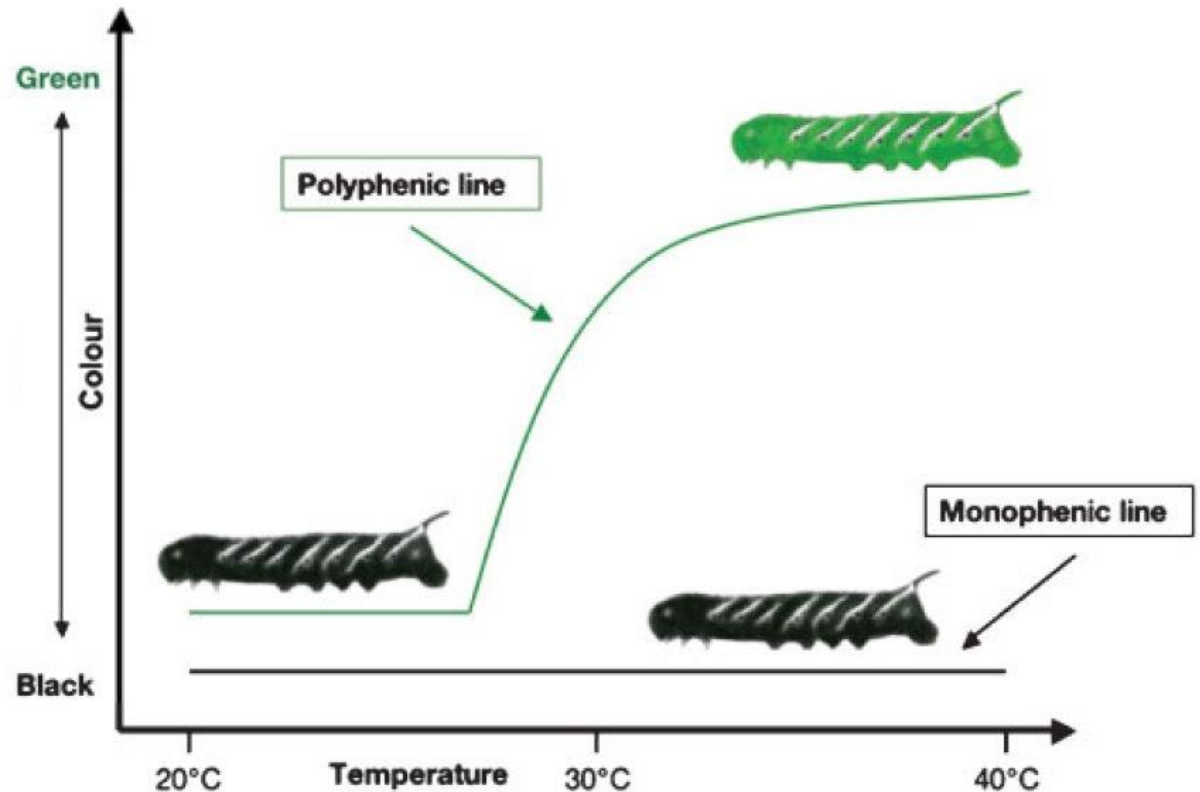
(a) When heat-shock protein Hsp90 is expressed at the normal level, wild-type *Drosophila* with a normal phenotype develop (indicated by only the wild-type fly being in the white area). Numerous cryptic variations are suppressed by the buffering action of Hsp90 (grey area). (b) When the level of Hsp90 is reduced by gene targeting, or by drug treatment, or by heat treatment, cryptic variations are no longer suppressed, and mutant flies develop (white area). These mutants can be subject to selection. (c) After several generations of selection (in this case, for flies with deformed legs), mutant flies develop even when Hsp90 is restored to its normal level (white area). Many cryptic variations are again suppressed. Development has been shifted into a new pathway, that is, a change of canalization, in Waddington's terminology.

**Tobacco
Hornworm**
(*Manduca sexta*)



POLYFENISMUS : genotyp je realizován v různých fenotypech dle podmínek prostředí

- skrytá genetická variabilita se projeví až po teplotním šoku a pomáhá adaptaci housenky *Manduca sexta*



Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation

Christine Queitsch*, Todd A. Sangster† & Susan Lindquist*‡

* Department of Molecular Genetics and Cell Biology, and † Committee on Genetics, Howard Hughes Medical Institute, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637, USA

Heat-shock protein 90 (Hsp90) chaperones the maturation of many regulatory proteins and, in the fruitfly *Drosophila melanogaster*, buffers genetic variation in morphogenetic pathways. Levels and patterns of genetic variation differ greatly between obligatorily outbreeding species such as fruitflies and self-fertilizing species such as the plant *Arabidopsis thaliana*. Also, plant development is more plastic, being coupled to environmental cues. Here we report that, in *Arabidopsis* accessions and recombinant inbred lines, reducing Hsp90 function produces an array of morphological phenotypes, which are dependent on underlying genetic variation. The strength and breadth of Hsp90's effects on the buffering and release of genetic variation suggests it may have an impact on evolutionary processes. We also show that Hsp90 influences morphogenetic responses to environmental cues and buffers normal development from destabilizing effects of stochastic processes. Manipulating Hsp90's buffering capacity offers a tool for harnessing cryptic genetic variation and for elucidating the interplay between genotypes, environments and stochastic events in the determination of phenotype.

Hsp90 as a capacitor for morphological evolution



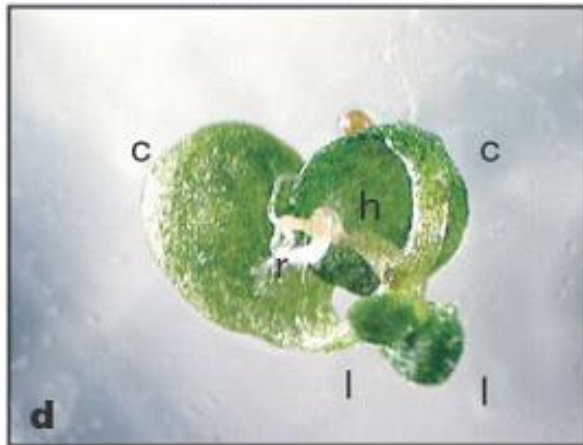
Suzanne L. Rutherford*† & Susan Lindquist*

*Howard Hughes Medical Institute, University of Chicago, 5841 South Maryland Avenue MC1028, Chicago, Illinois 60637, USA

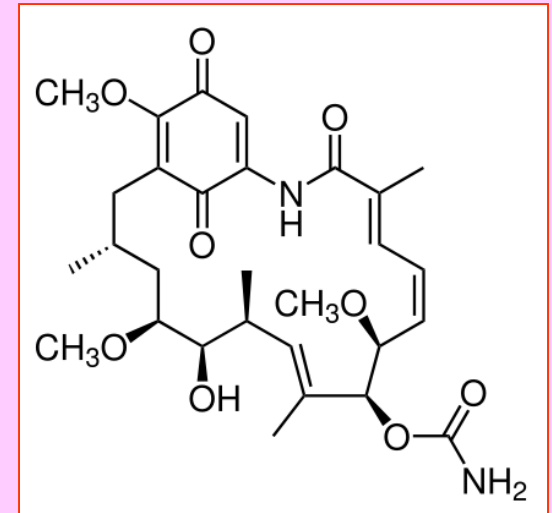
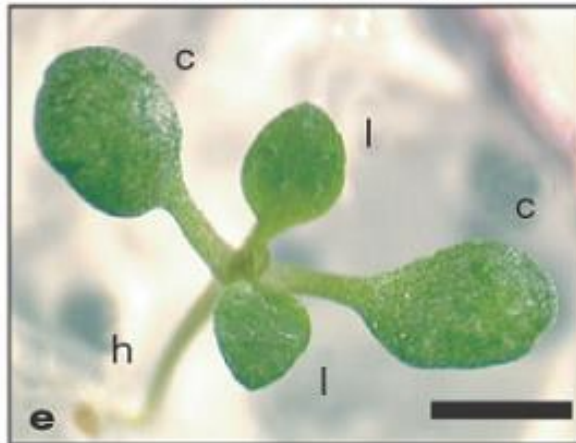
The heat-shock protein Hsp90 supports diverse but specific signal transducers and lies at the interface of several developmental pathways. We report here that when *Drosophila* Hsp90 is mutant or pharmacologically impaired, phenotypic variation affecting nearly any adult structure is produced, with specific variants depending on the genetic

Různorodé abnormální fenotypy způsobené kultivací na geldanamycinu

Ler plant on GDA

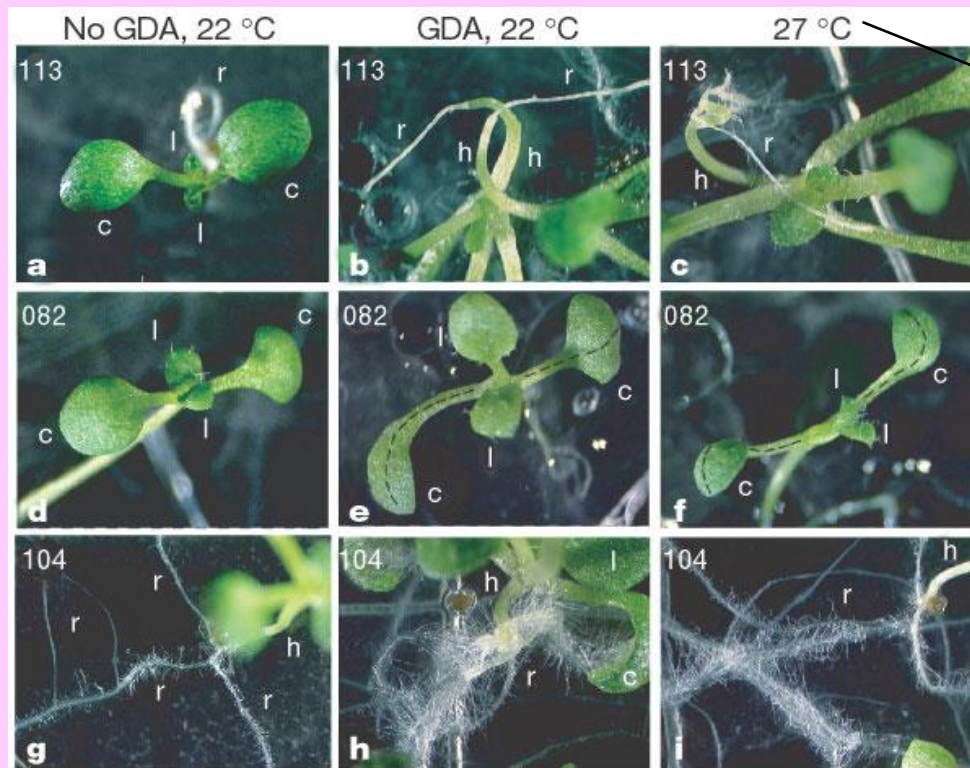


Ler plant no GDA



Queitsch *et al* (2002) *Nature* 417:618

Fenotypová variabilita specifická pro rekombinantní inbrední linie



- extrémní kroucení hypokotylu, kořeny rostou do vzduchu
- zkroucené rozety, vertikálně orientované listové čepele
- akumulace fialového pigmentu
- četné kořenné vlásky
- zkroucené hypokotylu, rozety na ploše média
- malformované pravé listy



Vývojové abnormality drosofily způsobené deficiencí Hsp90

Reparační úlohy *Heat Shock* proteinů

