

# Epigenetika 14

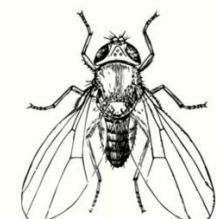
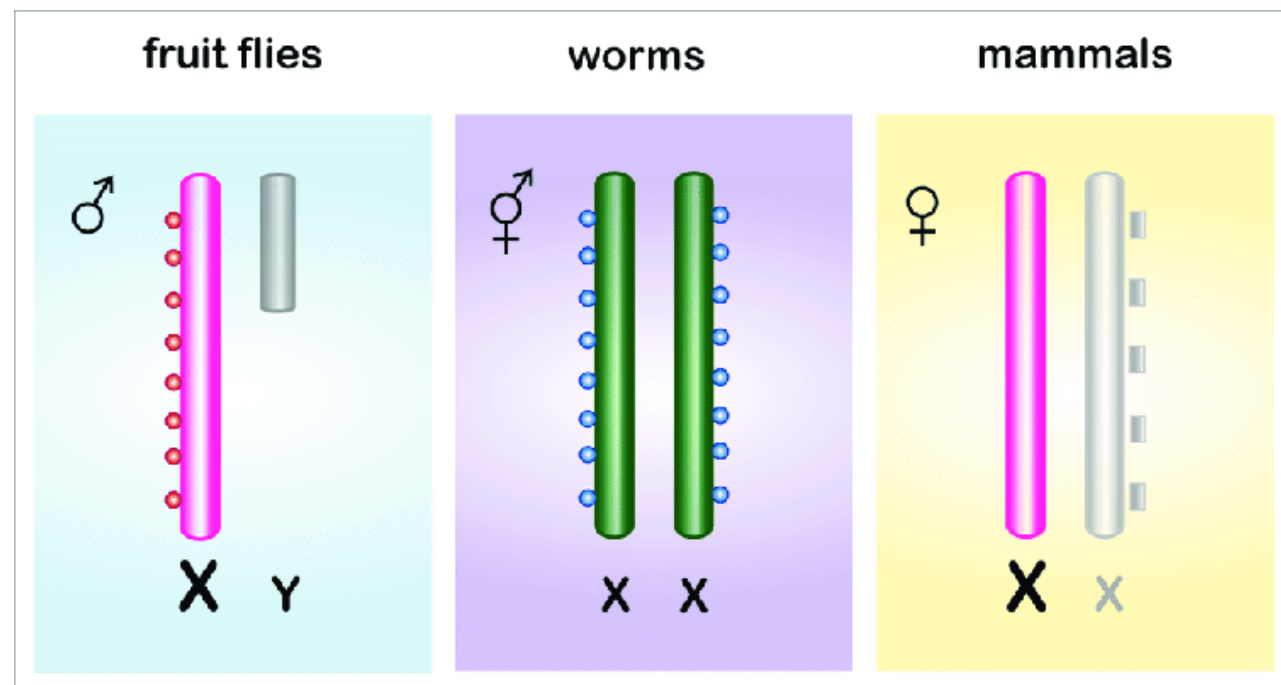
Mechanismus dávkové kompenzace

Epigenetika a onemocnění

Metody

# Dávková kompenzace

- Proces, kterým organismy vyrovnávají genovou expresi mezi jedinci různého pohlaví
- Hlavní modely
  - **octomilka** – 2x vyšší exprese X chromozomu u samčího pohlaví (důsledek Y degenerace)
  - **háďátko** – snížení exprese obou X chromozomů u hermaphroditů (vyrovnání XO)
  - **savci** – X inaktivace jednoho X chromozomu u samičího pohlaví (důsledek Y degenerace)=Barrovo tělísko



DROSOPHILA MELANOGASTER



# Historie - objev dávkové kompenzace

- 1949 – Barr a Bertram identifikovali strukturu blízko jaderné laminy v jádře, která nebyla přítomna v samčím jádře („sex chromatin“)
- 1959 – Ohno popsal Barrovo tělíčko jako kondenzovaný X chromozom
- 1961 – „Lyon hypothesis=law“
  - X inaktivace v samičím jádře jako nástroj dávkové kompenzace
  - Náhodný výběr X-chromozomu
    - Různé počty X chromozomů
      - XX,44 – diploid, normální karyotyp, 1 X
      - XY, 44 – diploid, normální karyotyp, 0 X
      - XXX, 44 – X trisomie, abnormální vývoj, 2 X
      - XXY, 44 – Klinefelterův syndrom, abnormální vývoj, 1 X
      - XXXX, 88 – tetraploid, abnormální vývoj, 2 X

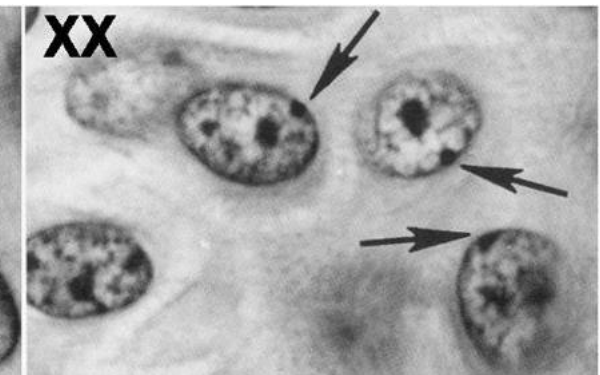
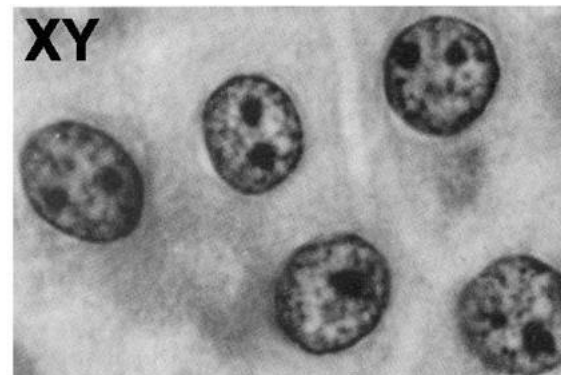
M. Barr a E. G. Bertram



S. Ohno

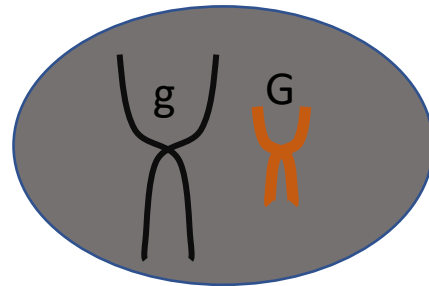
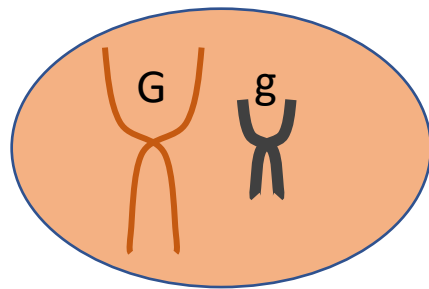


M. F. Lyon



# Fenotypový projev dávkové kompenzace

- U koček gen *ginger* (G) odpovědný za oranžové zbarvení (phaeomelanin), recesivní alela (g), nulová (b) – „*black color*“ (eumelanin) – **X vázaný gen**
- Kocouři = oranžové zbarvení nebo hnědo-černé (pruhované velmi vzácné, časo XXY), kočky = pruhování



F F M M M



Neplést – gen pro rzzavé vlasy (MCR1) je na chromozomu 16!

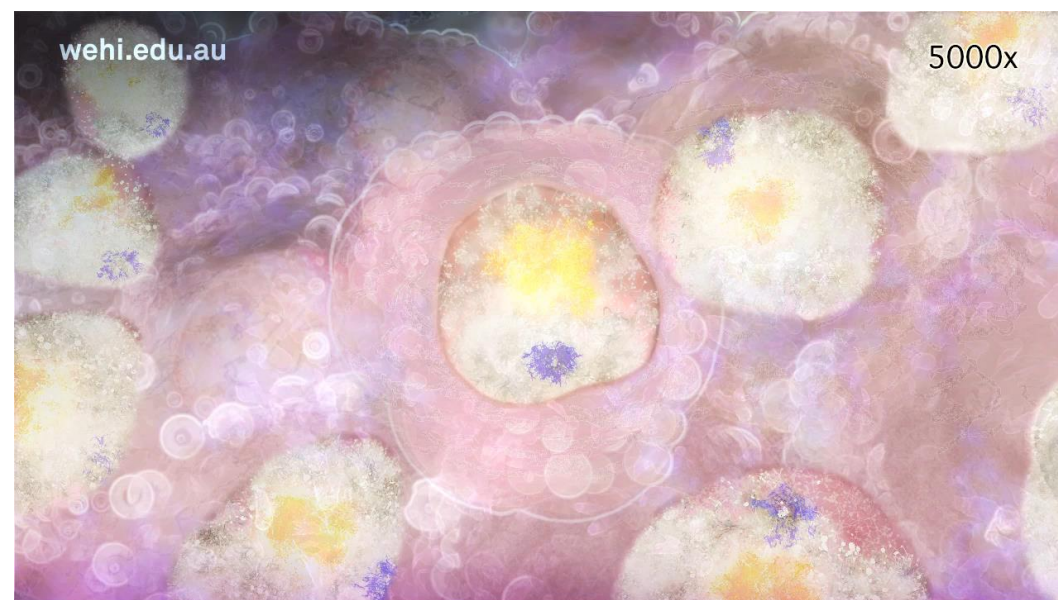
# Dvě formy X inaktivace u savců

- **Náhodná**

- Během gastrulace (epiblast)
- Inaktivace maternálního nebo paternálního chromozomu, dědičná do dceřiných buněk
  - Důvod pruhovaného zbarvení u koček

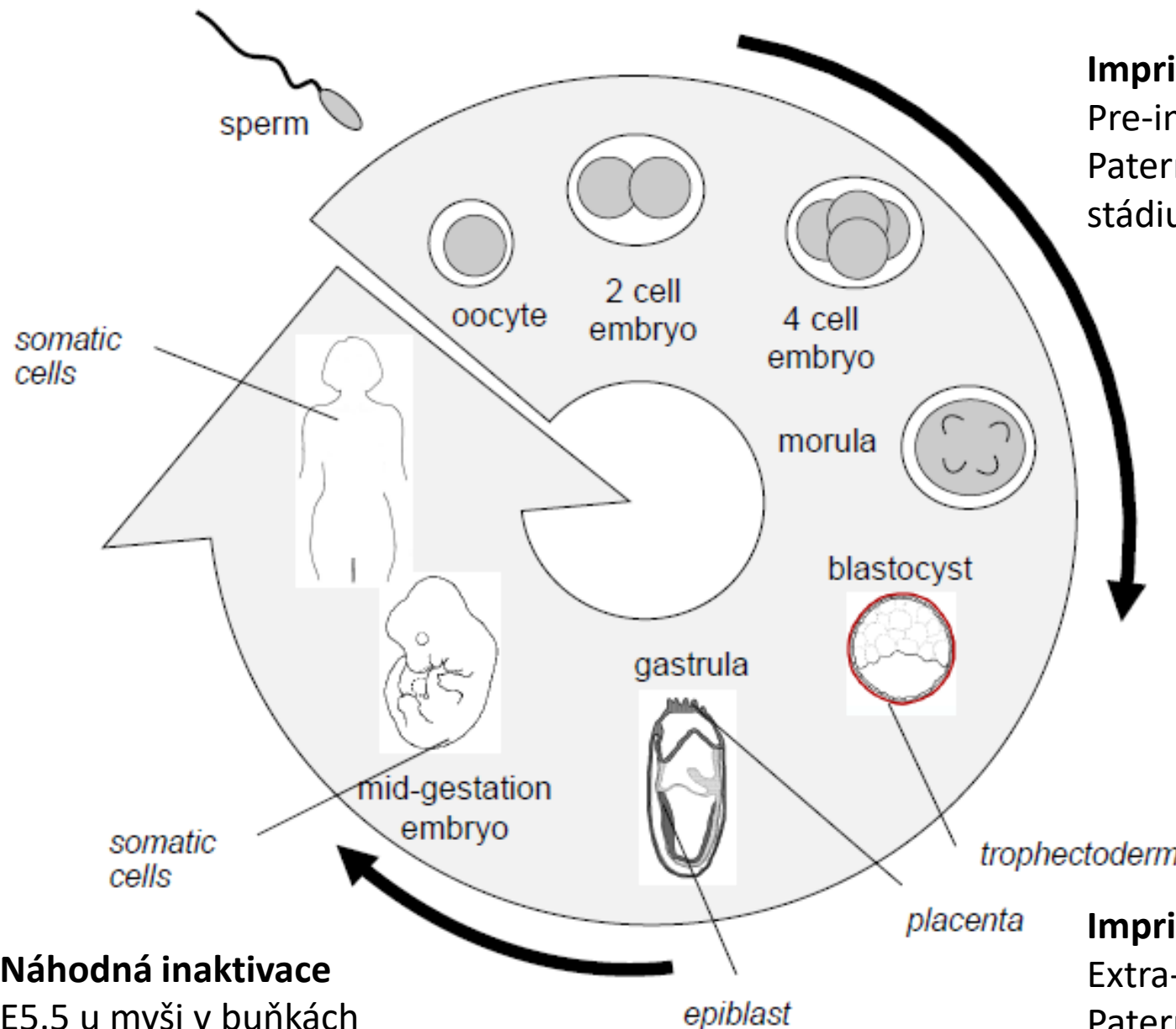
- **Imprintovaná X inaktivace**

- Paternální X chromozom
- Pre-implantační perioda embrya a extra-embryonální tkáň
- U vačnatců, zřejmě vývojově původnější/primitivnější mechanismus



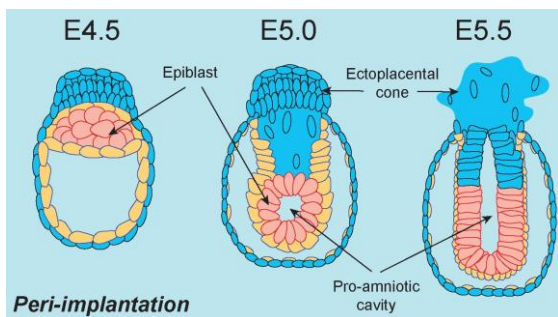


**Náhodná inaktivace**  
 Udržovaná u  
 somatických buněk  
 během celého života



**Imprintovaná X-inaktivace**  
 Pre-implantační doba  
 Paternální X chromozom,  
 stádium 2-4 buněk

**Imprintovaná X-inaktivace**  
 Extra-embryonální tkáň  
 Paternální X chromozom



**Náhodná inaktivace**  
 E5.5 u myši v buňkách  
 epiblastu

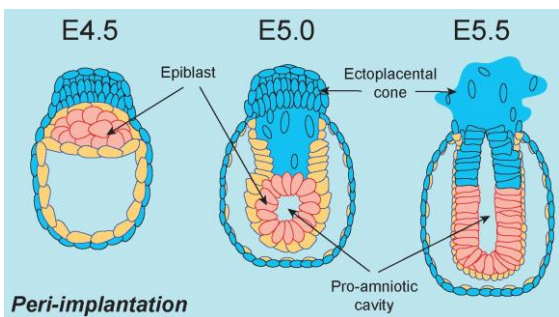
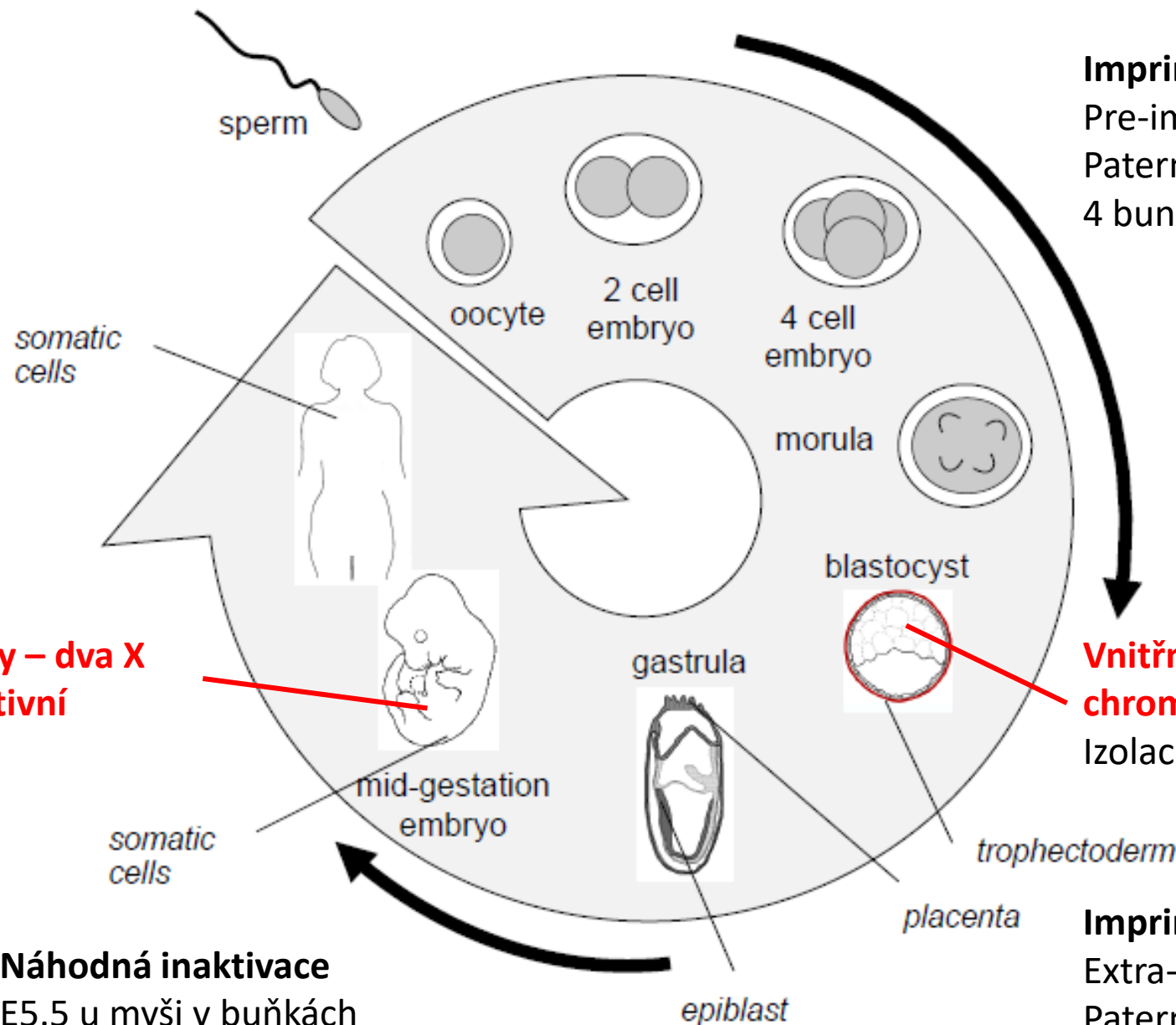
**Náhodná inaktivace**  
 Udržovaná u  
 somatických buněk  
 během celého života

**Zárodečné buňky – dva X  
 chromozomy aktivní**

**Imprintovaná X-inaktivace**  
 Pre-implantační doba  
 Paternální X chromozom, 2-  
 4 buněk

**Vnitřní buňky – dva X  
 chromozomy aktivní**  
 Izolace ES buněk

**Imprintovaná X-inaktivace**  
 Extra-embryonální tkáň  
 Paternální X chromozom



**Náhodná inaktivace**  
 E5.5 u myši v buňkách  
 epiblastu

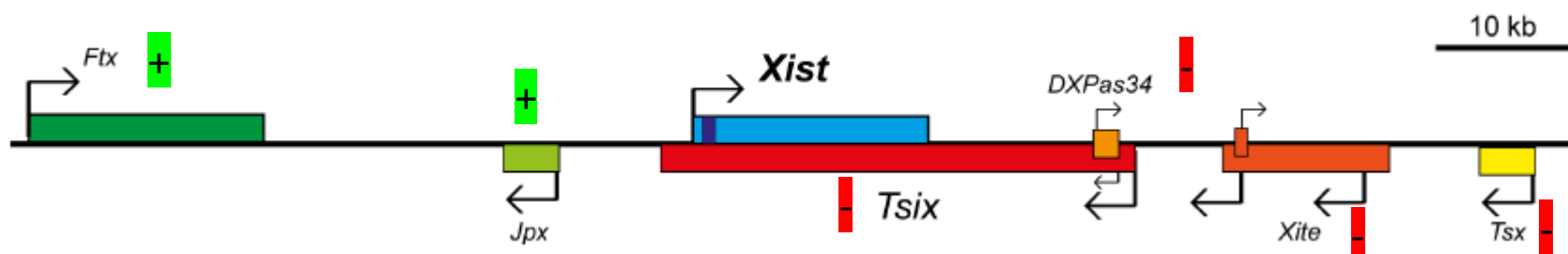
# Fáze X chromozom inaktivace u savců

- **Počítání**, založeno na mechanismu X:A dávky
- **Výběr**, který chromozom bude inaktivován
- **Iniciace**, inaktivace chromozomu, *Xist* exprese z X inaktivačního centra (XIC)
- **Šíření**, *in cis* podél inaktivovaného chromozomu
- **Kompletní umlčení**, stabilizace X inaktivace, *Xist* je umlčen
- **Udržení inaktivace**, během života a buněčného dělení, klonální populace buněk



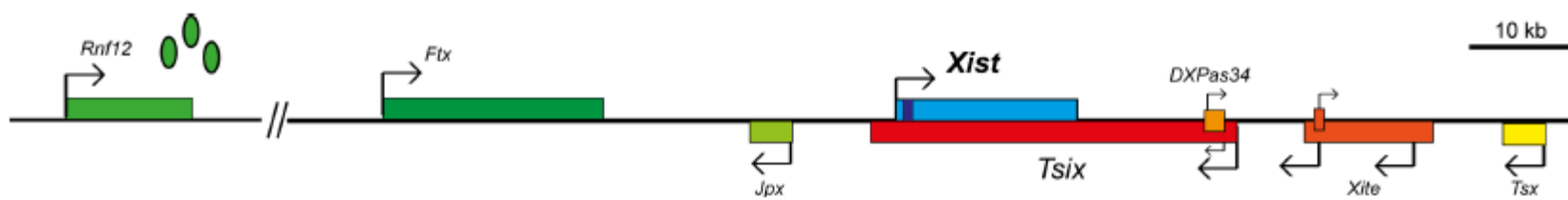
# Determinace počtu X chromozomů

- Úloha XIC kontrolní oblasti a Rnf12/Rlim proteinu
  - **XIC je nezbytná pro X inaktivaci**
  - Oblast zahrnující elementy regulující *Xist* RNA
    - *Xist* polyadenylovaná 17kb RNA, nemá proteinový produkt
    - Pouze z jednoho chromozomu (determinace Xp/m inaktivace, první známka procesu)
    - *Xist* RNA pokrývá celý chromozom
      - *Tsix*, *DXPas34*, *Xite* a *Tsx* přímo i nepřímo negativně reguluje *Xist* expresi
      - *Ftx* a *Jpx* pozitivně reguluje expresi



# Determinace počtu X chromozomů

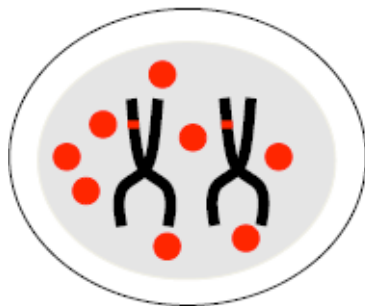
- Ne zcela popsáno, konsensus – X-vázané faktory a autozomální faktory determinují počet X:A
- Delece X-vázané oblasti (nekódující RNA) blízko *Xist* elementu vede k neúspěšné inaktivaci, autozomální faktory nejsou známy
- Gen *Rnf12* X-vázaný gen lokalizován před XIC
  - *Rnf12*/*Rlim* protein a jeho hladina jsou nutné pro pokračování inaktivace



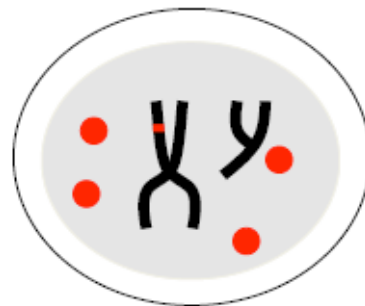
# Úloha Rnf12/Rlim a determinace počtu X chromozomů

- Počátek X inaktivace pro daný X chromozom se již nemění
- *Rnf12* aktivuje *Xist* expresi (?)
- X inaktivace snižuje hladinu Rnf12=druhý chromozom již nemůže být inaktivován
- Neznámý autozomální faktor nebo další faktory-Rnf12 musí být přímo zahrnuty v determinaci počtu, ale samotný Rnf12 zcela nevysvětluje celý jev

2 X aktivní

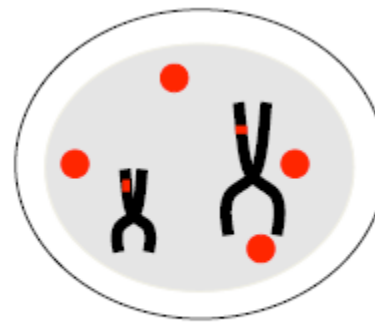


Female XX

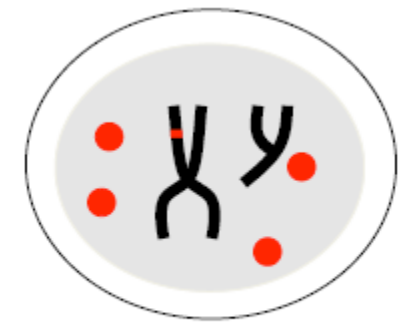


Male XY

1 X aktivní



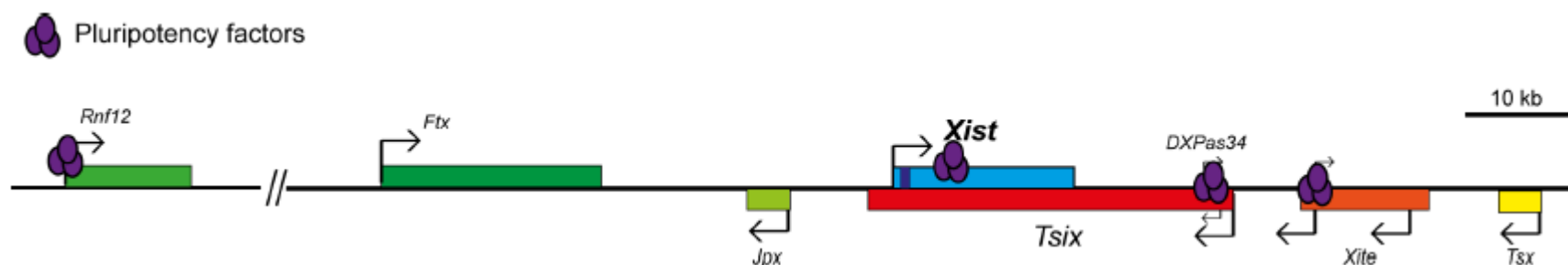
Female XX



Male XY

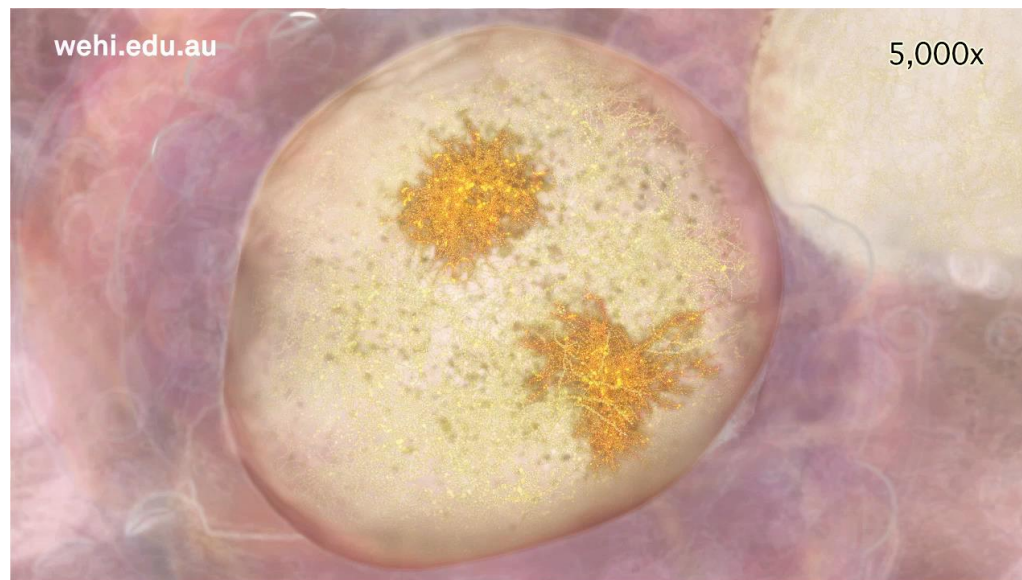
# Determinace počtu X chromozomů

- Rnf12 aktivuje expresi *Xist*
- Pluripotentní faktory – pluripotentní stav buňky (ES, PGC aj.)
  - Oct4, Sox2, Nanog...
    - Represe *Xist* (vazba do intronu)
    - Aktivace regulujících elementů (*Tsix*, vazba *DXPas34* a *Xite*)
    - Represe *Rnf12* (*Rnf12* aktivuje *Xist*)



# „X-chromosome kissing“ - výběr

- X chromozomy přicházejí do své blízkosti a párují se přes XIC a přiléhající oblasti, stabilizující expresi pouze z jednoho XIC
  - Výměna informace, které dávají volbu (vazebné faktory)
  - Kritické pro funkci – ektopické párování X:X vede k poruše exprese *Xist*
  - Výměna dalších zatím neznámých faktorů?



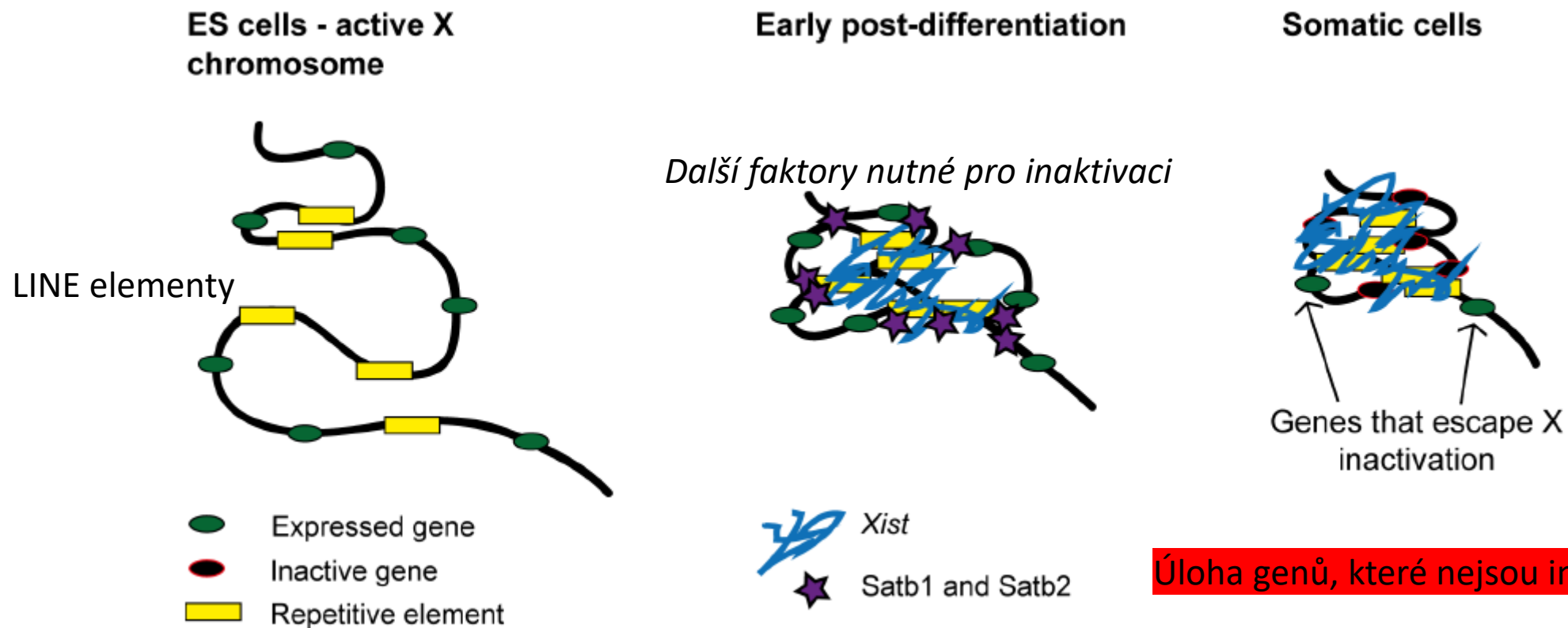




# Iniciace a šíření X-inaktivace

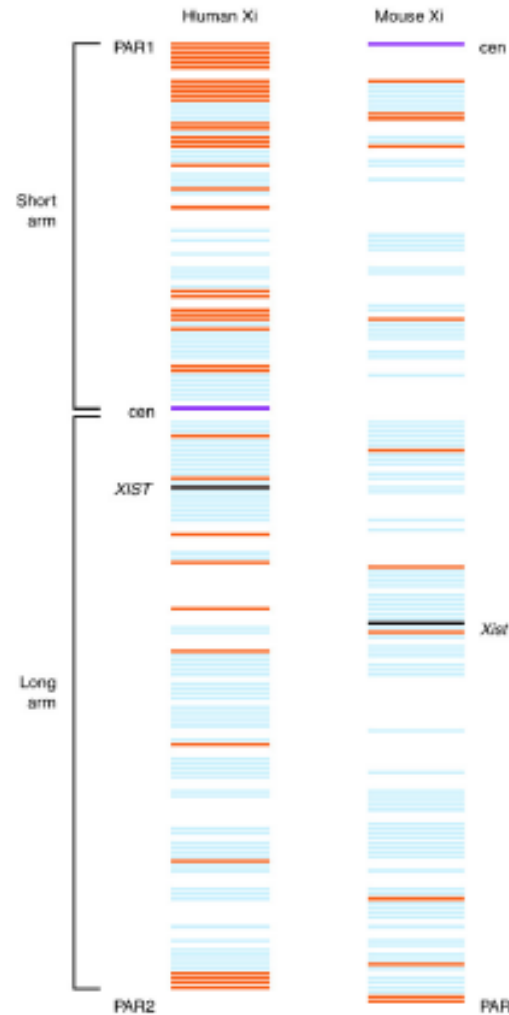
- Iniciace zahrnuje *Xist* expresi a pokrytí celého chromozomu touto RNA
- *Xist* exprese setrvává po celý život buňky
  - X inaktivace je závislá na *Xist* expresi a je reverzibilní, během buněčné determinace se stává neměnná (**epigenetický krajinný model**)
  - Pro úspěšné umlčení je *Xist* dostatečný pouze v několika buněčných typech (další faktory?)
- Šíření X inaktivace zahrnuje odstranění RNA PolII a umlčení repetitivních elementů
  - „sex body“ formace se objevuje před umlčením genů
  - Akumulace inaktivních epigenetických značek
    - Úloha LINE elementů v TADs (autozomy obohacené uměle o LINE-1 elementy jsou umlčeny)-similarita s *Xist* RNA

# Iniciace a šíření X-inaktivace



Úloha genů, které nejsou inaktivovány?

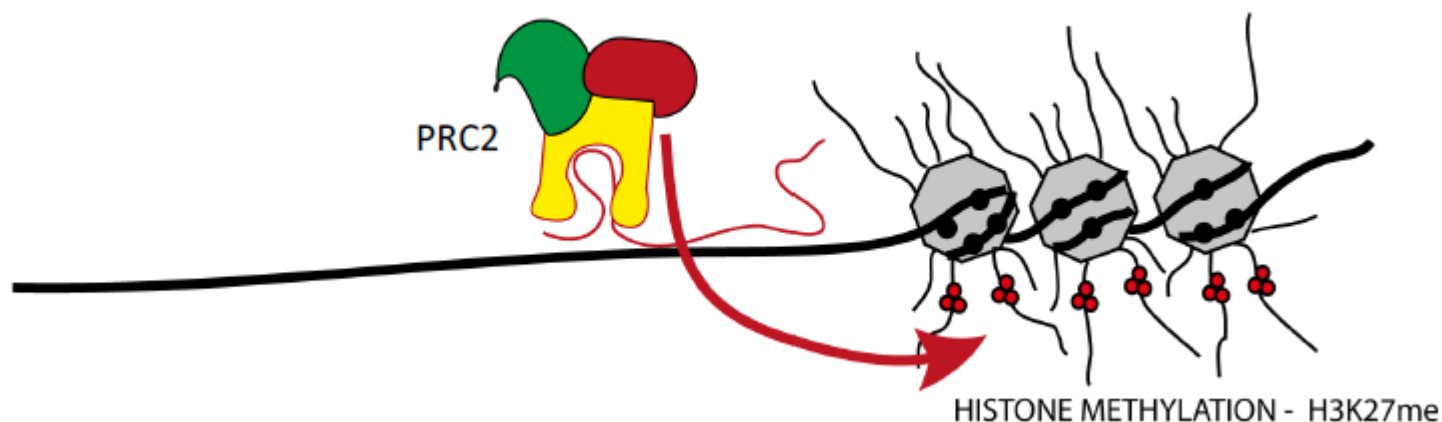
# Neúplná X-inaktivace



- Nejsou zahrnuty v „sex chromatin body“
- Geny PAR
- Non-PAR mají 2x vyšší expresi
- Poruchy regulace genů, které přiléhají k XIC, jsou zdrojem X-vázaných chorob
  - Rettův syndrom
    - Mutace nebo ztráta genu MeCP2 – mentální poruchy

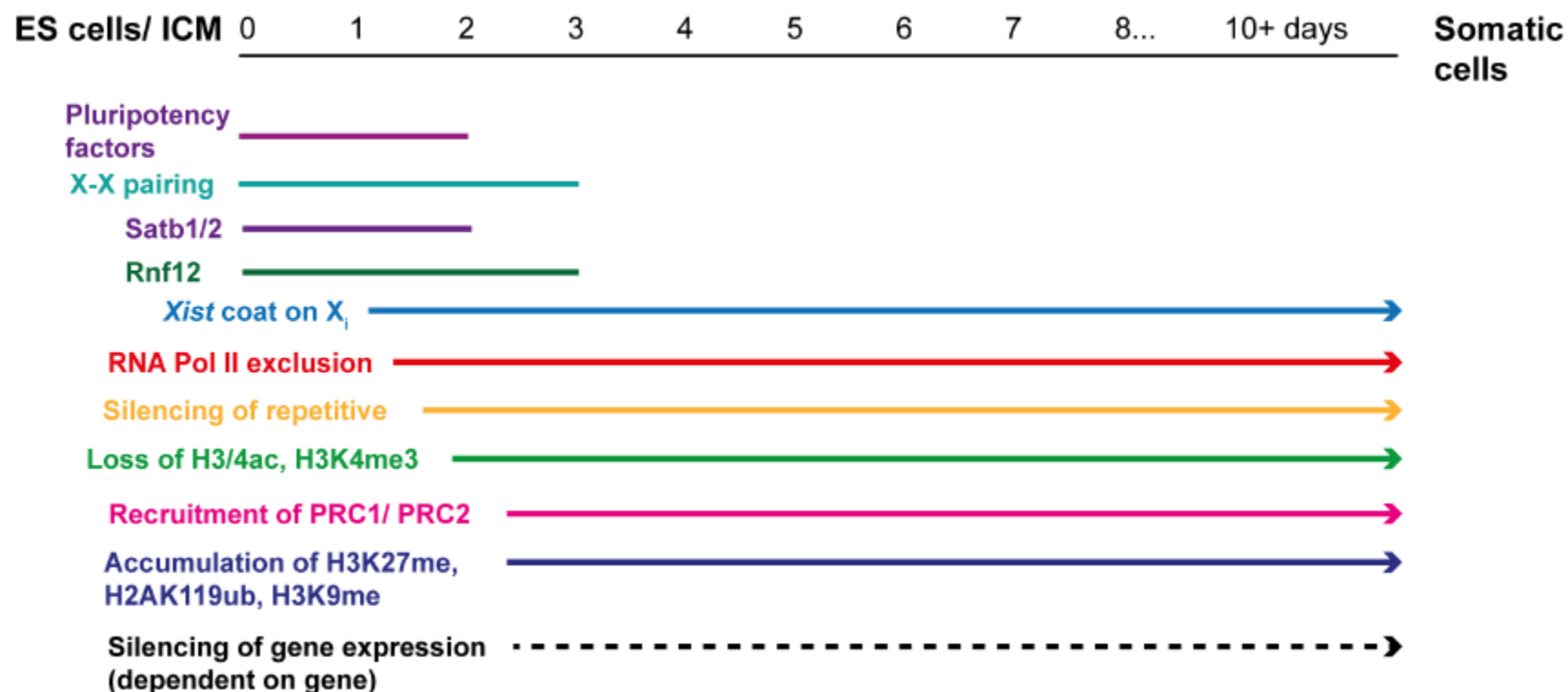
# Umlčení a udržení X-inaktivace

- Není zcela přesně determinováno (nejasné rozhraní)
- Založení trvale umlčeného chromatinu
  - Ztráta aktivních chromatinových modifikací (H3K4me, H4ac)
  - Akumulace represivních modifikací (H3K27me<sub>3</sub>, H3K9me<sub>2</sub>)
  - Vazba PRC2 (H3K27me) a PRC1 (H2AK119Ub)
    - Funkce RepA (Repeat A) jako vazebný faktor





# Shrnutí X-inaktivace a hlavních událostí

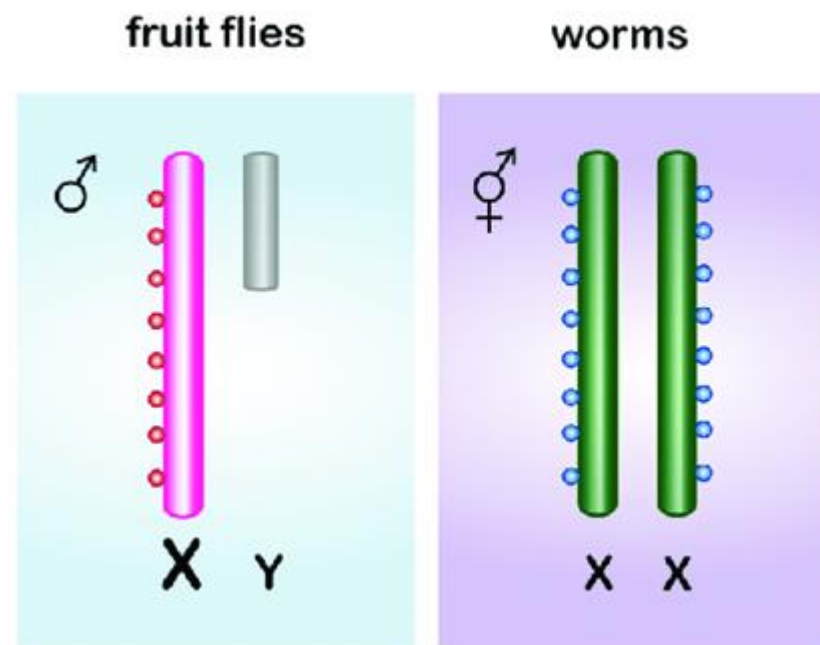


- Pro udržení nutná aktivita Dnmt1, vazba Smchd1 (SMC třída proteinů)

# Dávková kompenzace u drozofily a háďátka

## Up-regulace samčího X chromozomu

- Úloha nekódující RNA (roX1 a roX2)
- Zahrnuje histon acetyltransferázy, RNA/DNA helikázy
- Založení aktivní jaderné domény obohacené o transkripční jednotky



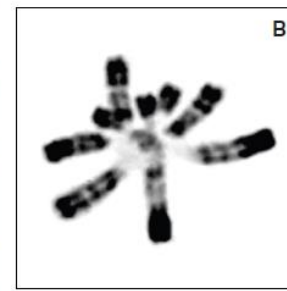
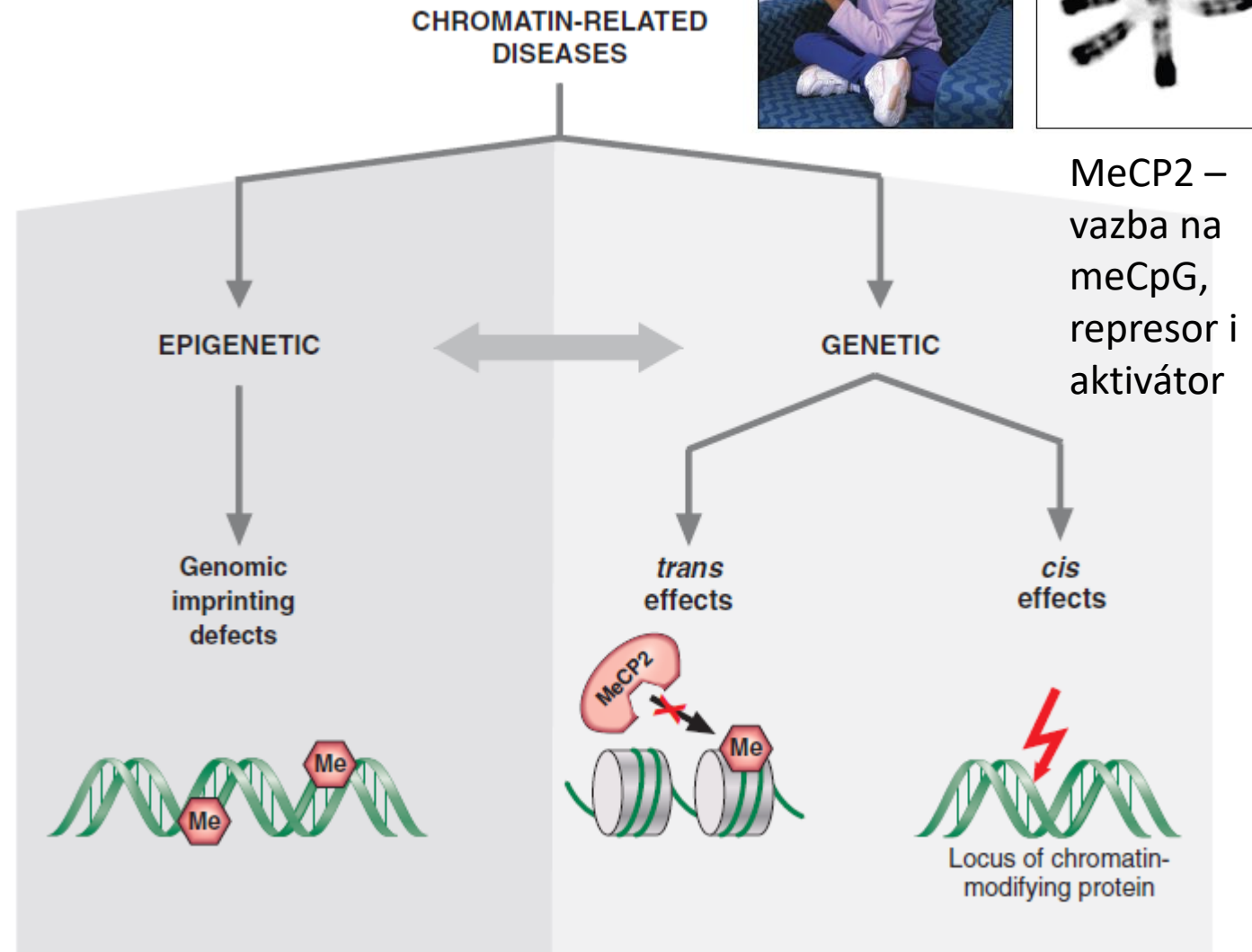
## De-regulace obou chromozomů

- Úloha SMC proteinů (kondenziny a kondenzin-like proteiny-**podobnost se Schmd1?**)
- Meiotické a proliferující buňky – regulace transkripce **chromatin remodelujícími proteiny MES** („maternal effect sterile“=PcG→H3K27me2, H3K27me3)
- **Epigenetické značky** (jiné pro jeden X chromozom u sameček v důsledku nepárování)-role?

# ÚLOHA EPIGENETIKY V LIDSKÝCH CHOROBÁCH

# Hlavní epigenetické mechanismy odpovědné za chromatin-asociované vývojové poruchy

- Narušení DNA methylace nebo chromatinu na imprintovaných lokusech
- Ztráta chromatin-regulujících faktorů vede ke změně struktury chromatinu a změně exprese
- Změna DNA a změna chromatinu jako zdroj variabilní exprese



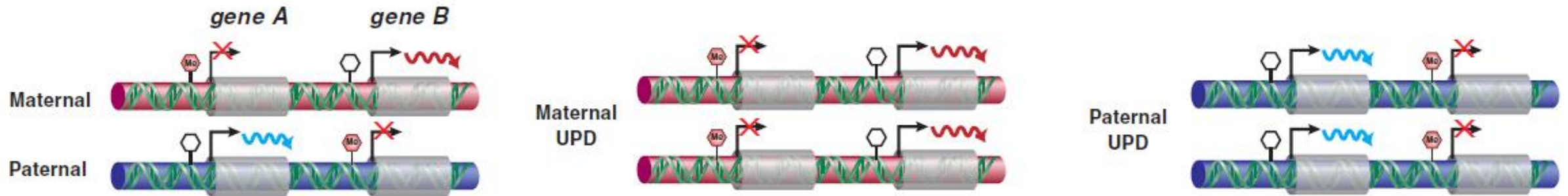
MeCP2 –  
vazba na  
meCpG,  
repressor i  
aktivátor

Monoalelická exprese

Změna DNA a/nebo  
chromatinu=změna exprese

# Opakování maternální/paternální (UDP) alelické disomie

- Bi-alelická exprese je důsledkem správného maternálního a paternálního imprintingu



Zoghbi et al. 2016

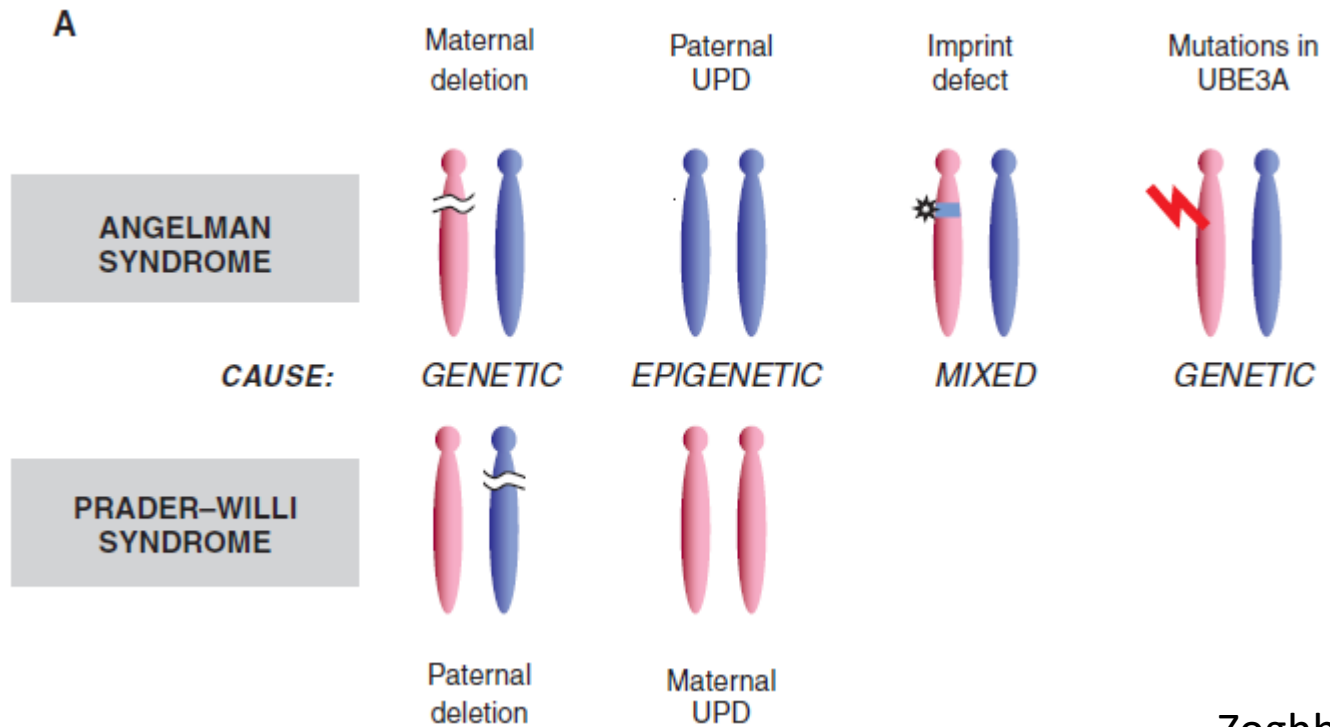
Každá alela je exprimována pouze jednou

2x vyšší exprese pouze jedné alely



# Prader-Willi a Angelman syndrom

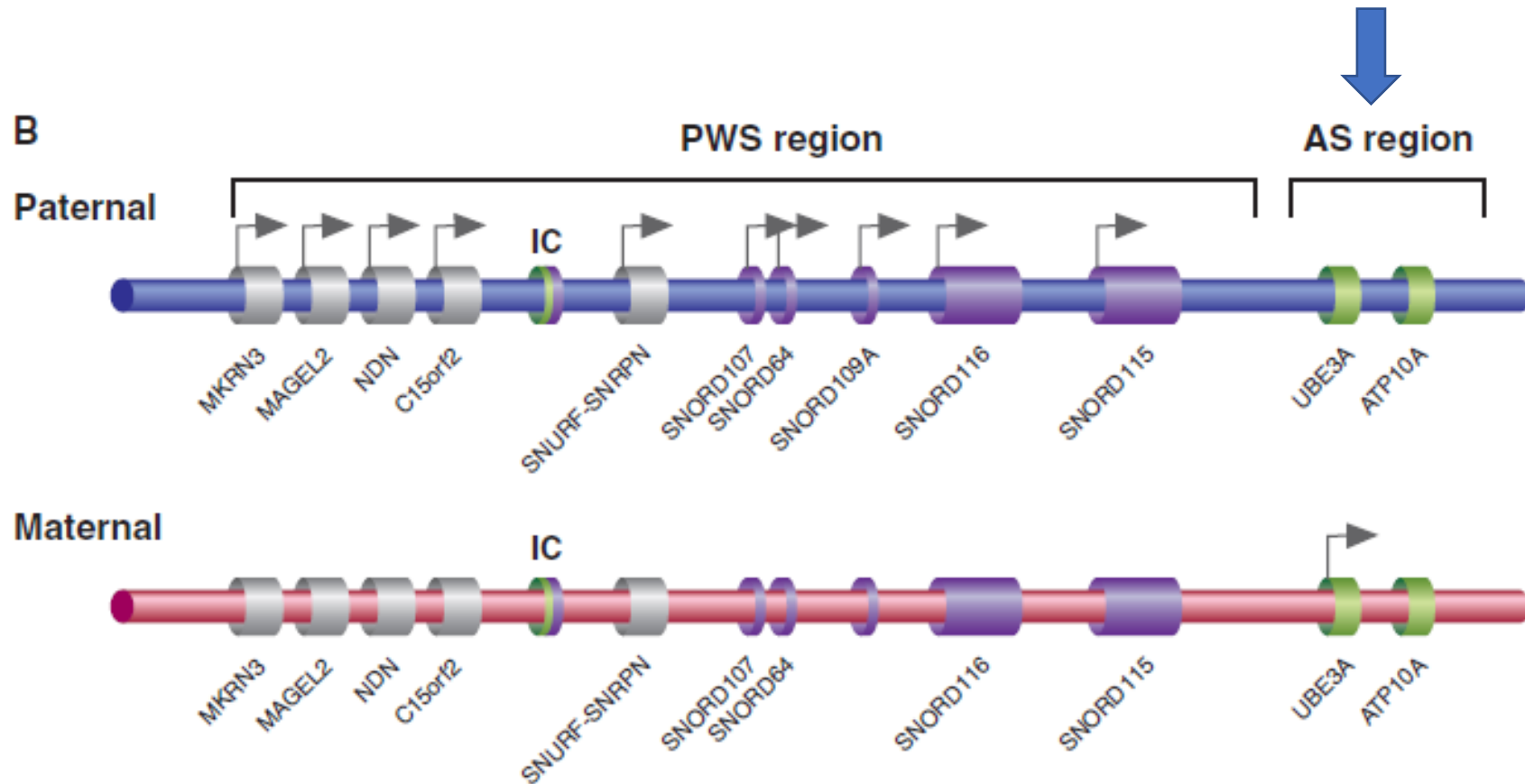
- Oba syndromy mohou být způsobeny delecí části lokusu, změnou chromatinu nebo kombinací genetiky a epigenetiky



# Prader-Willi a Angelman syndrom

Monoalelická maternální exprese

Monoalelická paternální exprese

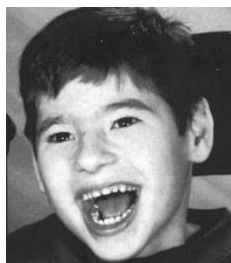


Zoghbi et al. 2016

# Přehled chorob související s imprintingem

**Table 1.** Selected disorders of genomic imprinting

Disorder	Type of mutation (% frequency where known)	Genomic region (cluster name)	Gene(s) involved
Prader–Willi syndrome	Deletion (70%) Maternal UPD (25%) Imprint defect (2%–5%)	15q11–q13 (Pws cluster)	snoRNAs and other (?)
Angelman syndrome	Deletion (70%) Paternal UPD (2%–5%) Epimutation (2%–5%) Point mutation Duplication <sup>a</sup>	15q11–q13 (Pws cluster)	<i>UBE3A</i>
Beckwith–Wiedemann syndrome	Epimutation Loss of maternal ICR2/ <i>Kcnq1</i> methylation Gain of H19 methylation (5%) Paternal UPD for <i>Igf2</i> cluster 11p15.5 duplication including <i>Igf2</i> Translocation at <i>KCNQ1</i> maternal Point mutation ( <i>CDKN1C</i> )	11p15.5 ( <i>Kcnq1</i> and <i>Igf2</i> cluster)	<i>IGF2</i> , <i>CDKN1C</i>
Silver–Russell syndrome	UPD, maternal (10%) Duplication Translocation, inversion Epimutation, loss of paternal ICR1 methylation (40%)	7p11.2 ( <i>Grb10</i> cluster)	Several candidates in the region
Pseudohypoparathyroidism	Point mutation Imprint defect UPD, paternal	11p15.5 ( <i>Kcnq1</i> cluster) 20q13.2 ( <i>Gnas</i> cluster)	Biallelic expression of H19 and decrease of IGF2 <i>GNAS1</i>



# Přehled chorob související se změnou chromatinu *in trans*

**Table 2.** Selected genetic disorders affecting chromatin structure in *trans*

Disorder	Gene	Comments
Coffin–Siris syndrome, intellectual disability	<i>ARID1A</i>	Component of the BRG1-associated factor complex
$\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome	<i>ARID1B</i>	Component of SWI/SNF complexes
CHARGE	<i>ATRX</i>	Helicase, SNF2-like family
Autism spectrum disorders	<i>CHD7</i>	Transcriptional regulator
Rubinstein–Taybi syndrome	<i>CHD8/Duplin</i>	
Neuropathy, hereditary sensory, type IE	<i>CREBBP</i>	Histone acetyltransferase
Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 1 (ICF1)	<i>EP300</i>	Histone acetyltransferase
Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 2 (ICF2) and intellectual disability	<i>DNMT1</i>	Maintenance DNA methyltransferase
Intellectual disability, seizures, dysmorphism; Kleefstra syndrome	<i>DNMT3B</i>	DNA methyltransferase 3B
Intellectual disability, seizures, syndromic, Claes–Jensen type	<i>ZBTB24</i>	DNA methylation
Kabuki 1 syndrome	<i>EHMT1/</i> <i>KMT1D</i>	Histone methyltransferase
Kabuki 2 syndrome	<i>KDM5C/</i> <i>JARID1C</i>	Histone H3 K4me 3 and K4Me2 demethylase
Rett syndrome	<i>MLL2</i>	Histone lysine methyltransferase
Sotos syndrome; acromegaly, intellectual disability	<i>KDM6A</i>	Histone H3 K27 demethylase
Recurrent biparental hydatidiform mole	<i>MECP2</i>	Transcriptional modulator
Intellectual disability, cleft lip/palate Siderius syndrome	<i>NSD1/</i> <i>KMT3B</i>	Nuclear receptor-binding Su-var; transcriptional coregulator
Skeletal malformations, intellectual disability, hearing deficits, Coffin–Lowry syndrome	<i>NLRP7</i> <i>KHDC3L/</i> <i>C6orf221</i>	
Intellectual disability, seizures, short stature, sparse hair, Nicolaidis–Baraitser syndrome	<i>PHF8</i>	Histone H4K20me1 demethylase
Immune defects, nephritis, skeletal abnormalities, Schimke immuno-osseous dysplasia	<i>RPS6KA3/RSK2</i>	EGF-stimulated phosphorylation of H3
	<i>SMARCA2</i>	Chromatin regulator
	<i>SMARCAL1</i>	SNF2-like family, DNA-dependent ATPase activity

SWI/SNF, switch/sucrose nonfermentable; KMT, lysine methyltransferase; *CREBBP*, CREB-binding protein gene; *MLL2*, mixed leukemia lineage 2.

# Přehled chorob související se změnou chromatinu *in cis*

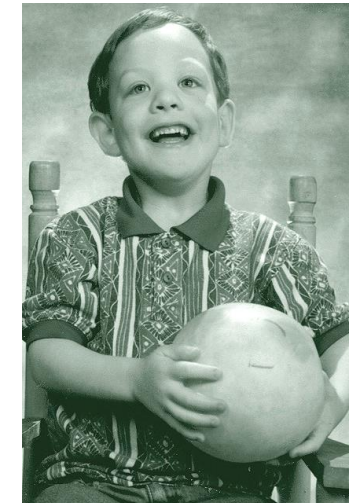
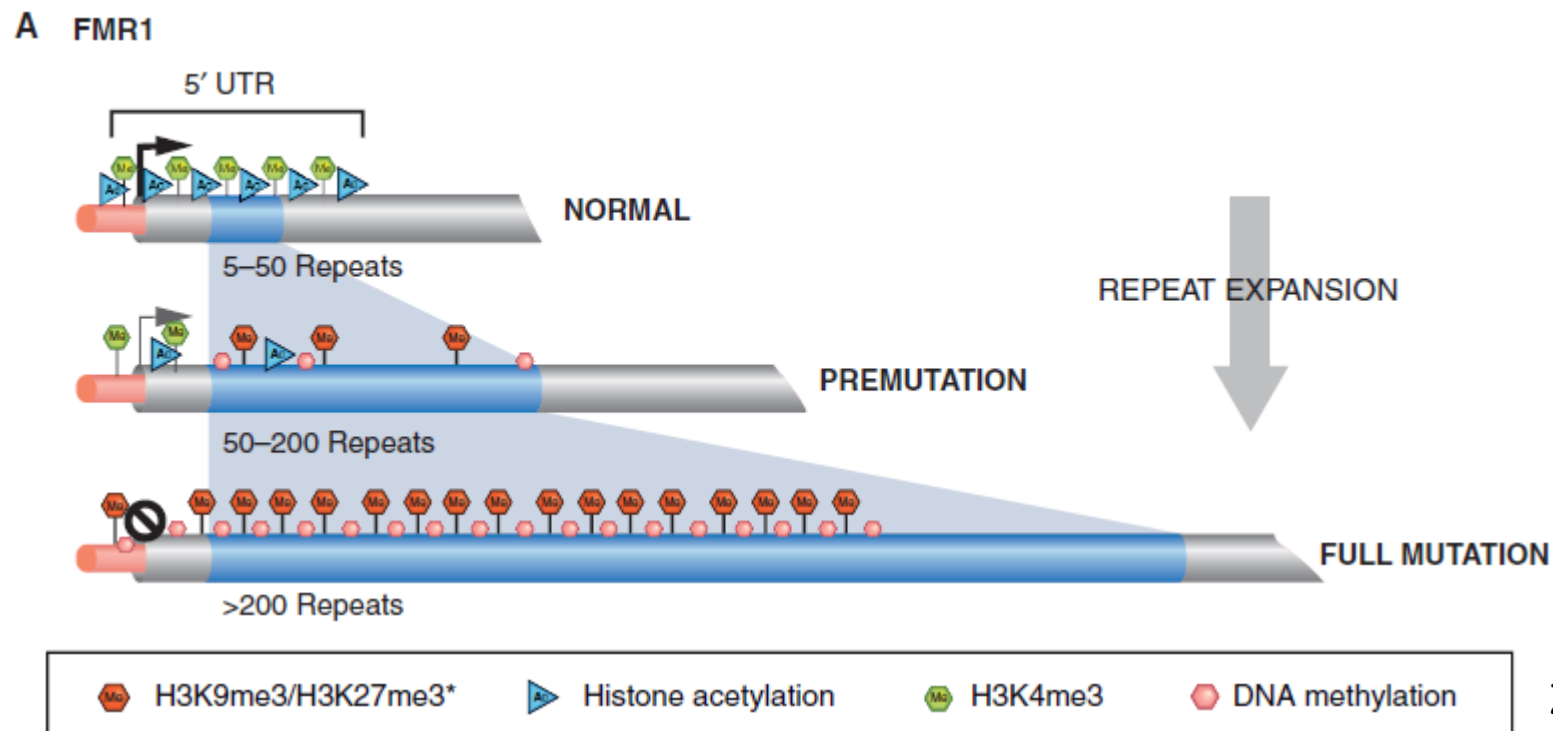
**Table 3.** Selected genetic disorders affecting chromatin structure *in cis*

Disorder	Gene	Comments
$\gamma\delta\beta$ - and $\delta\beta$ -thalassemia	Deletion of LCR causes decreased globin expression	
Fragile-X syndrome	Expansion of CCG repeat leads to abnormal methylation and silencing of <i>FMR1</i>	Premutation alleles (60–200) cause a neurodegenerative disorder
FSH dystrophy	Contraction of D4ZA repeats causes less repressive chromatin	
Multiple cancers	Germline epimutation of <i>MLH1</i>	

FSH, facioscapulohumeral.

# Syndrom fragilního X (Martin-Bell syndrom)

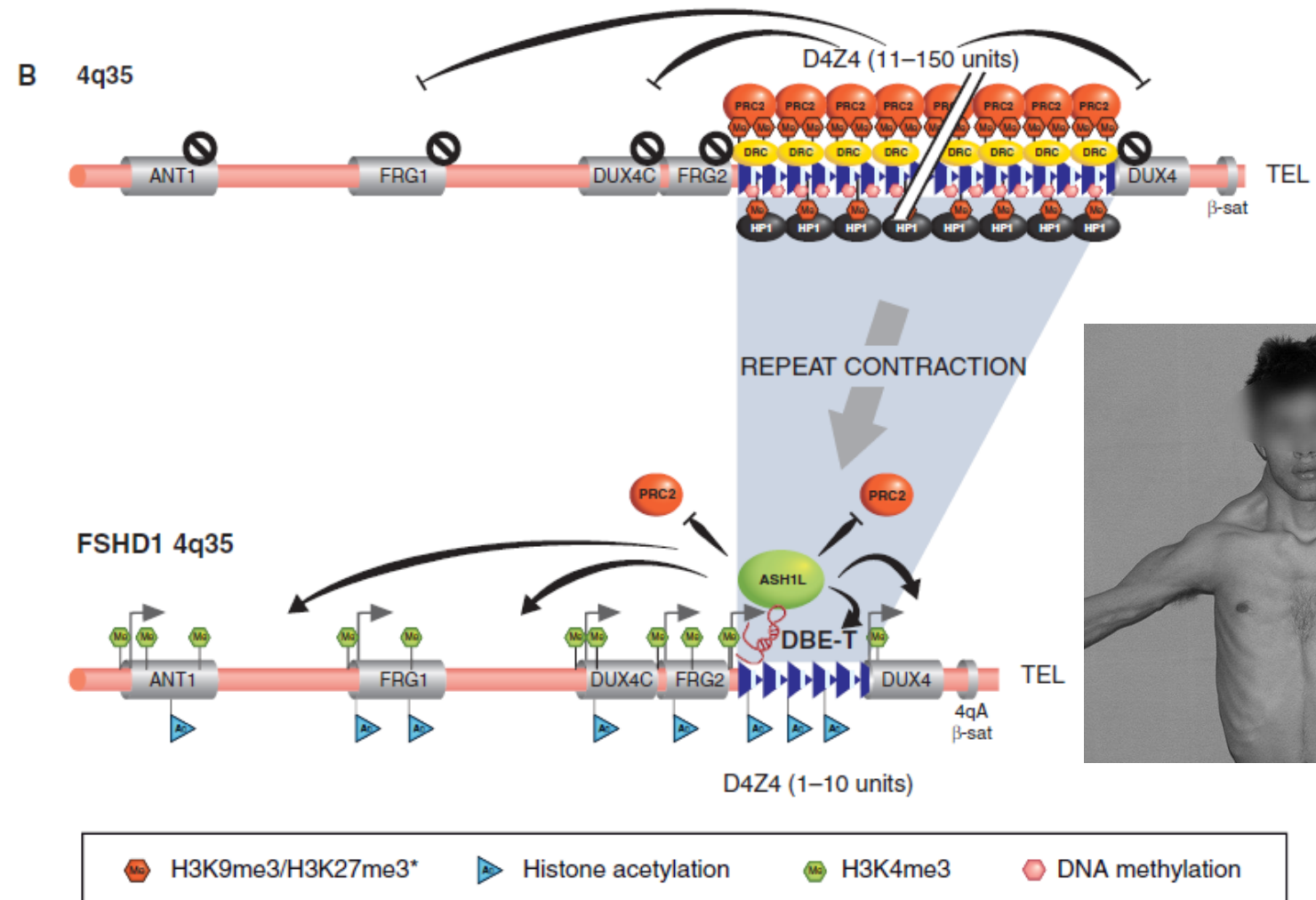
- normální X má 6-60 tripletů CGG v 5'UTR genu FMR1 (CGG)<sub>10</sub>AGG(CGG)<sub>9</sub>AGG(CGG)<sub>9</sub>
- muži-přenašeči nesou premutaci mezi 60 and 200 kopiemi
- M-B pacienti mají přes 200 kopií repetice C





# Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD)

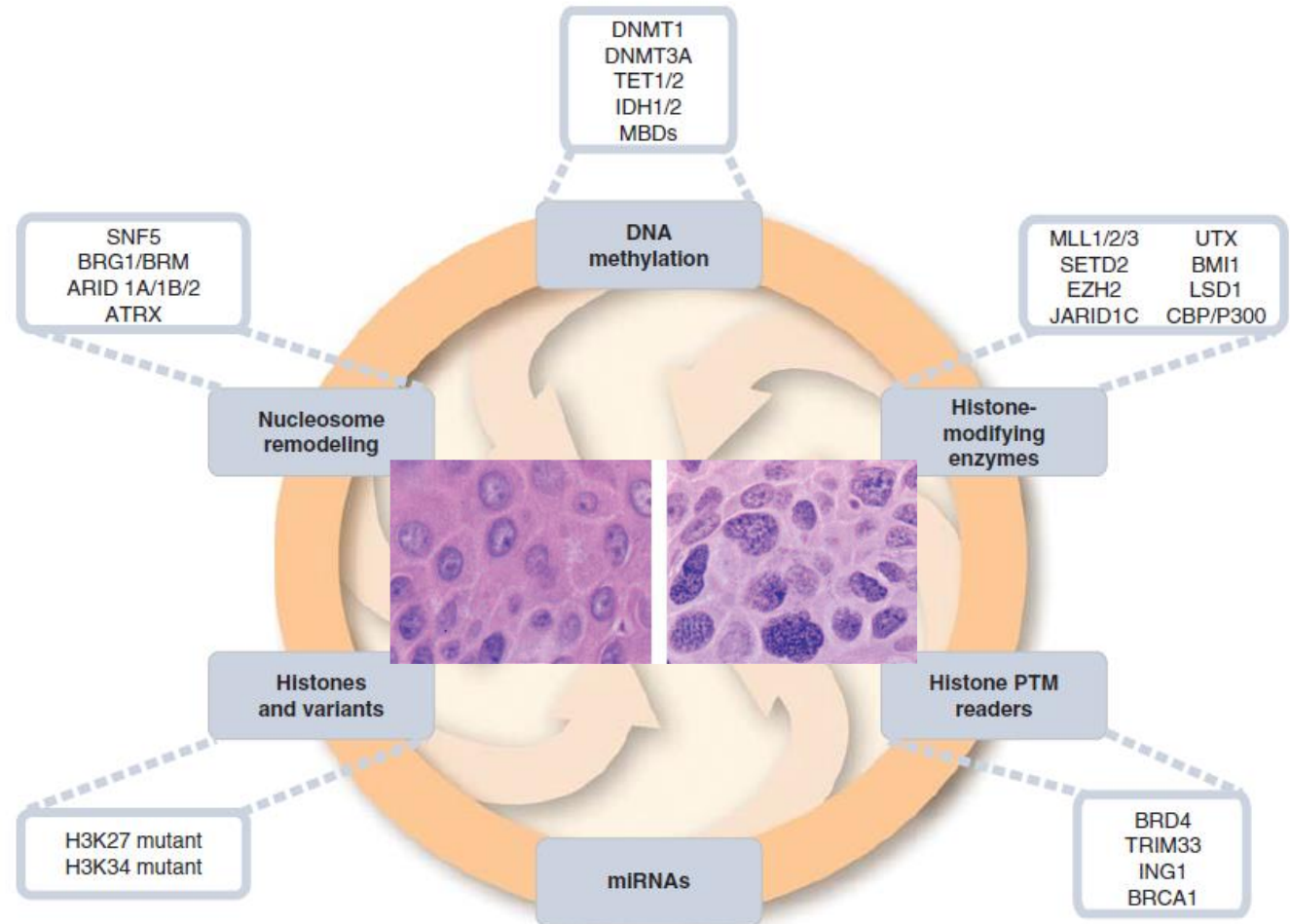
- Změna počtu repetit D4Z4 vede k zpřístupnění lokusu pro remodelující faktory, změnu na aktivní chromatin a expresi genů s myopathickým potenciálem





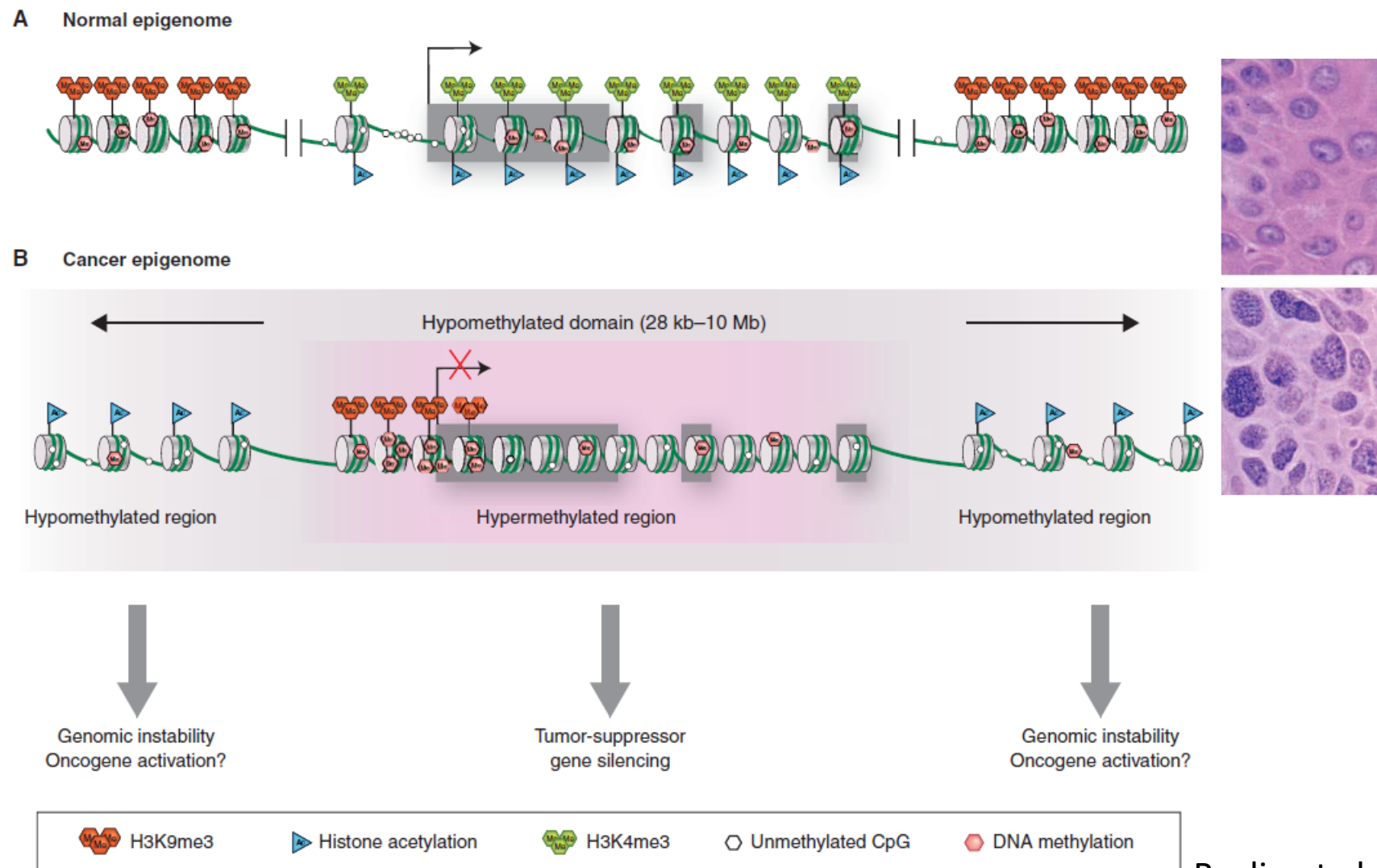
# Úloha epigenetické regulace v nádorovém bujení

- DNA methylace
- Histonové modifikace
  - „Writers“
  - „Readers“
  - Histonové varianty
- Histon-remodelující komplexy
- RNA-interference



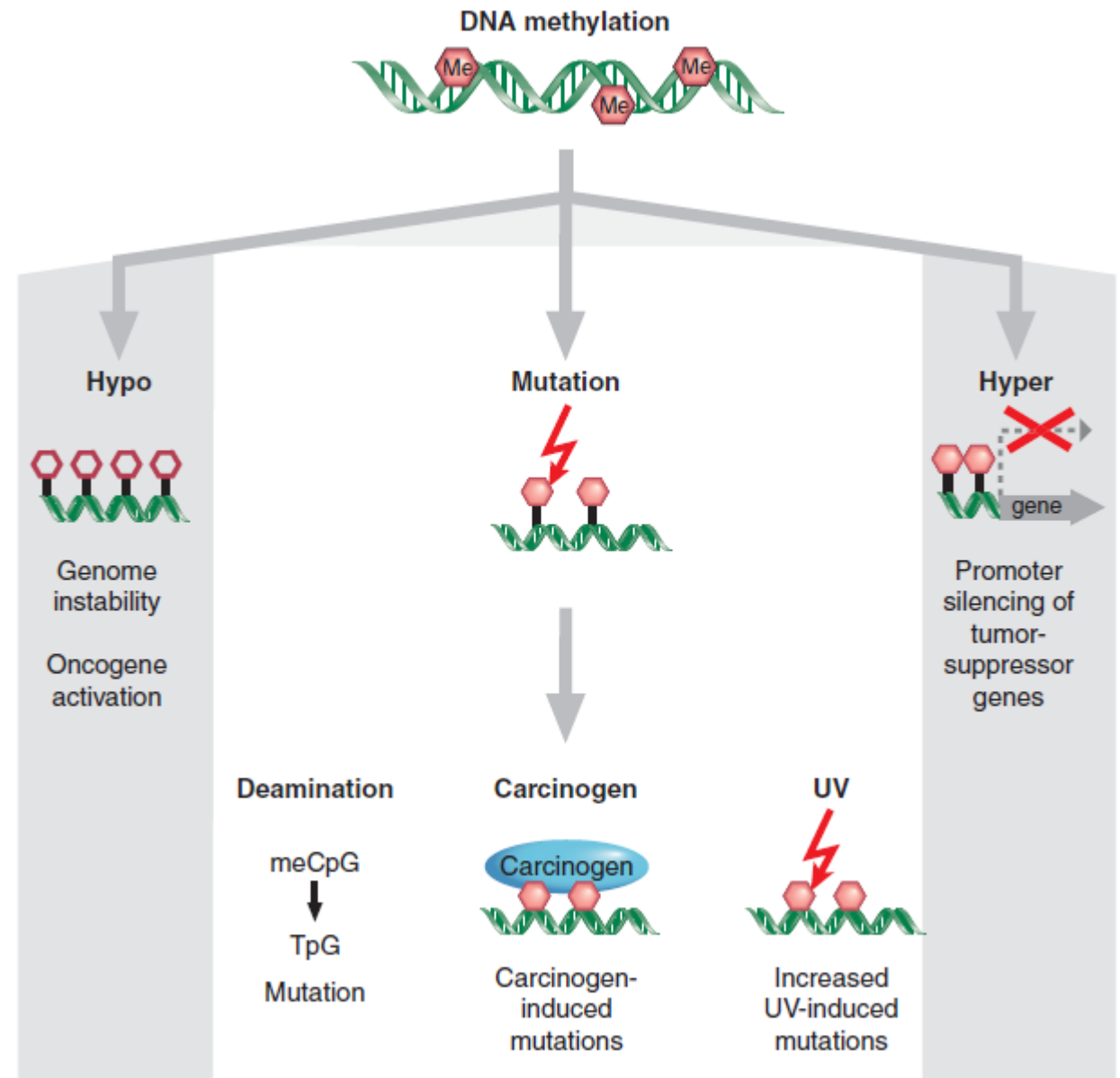
# Chromatinové změny při nádorovém bujení

- Změna chromatinu zahrnuje hypomethylaci a hypermethylace specifických genů, vazba histone-modifikujících enzymů navozujících in/aktivovaný stav
- Změna chromatinu je vidět po barvení hematoxylinu-rakovinné buňky mají větší jádra a více granulovaná

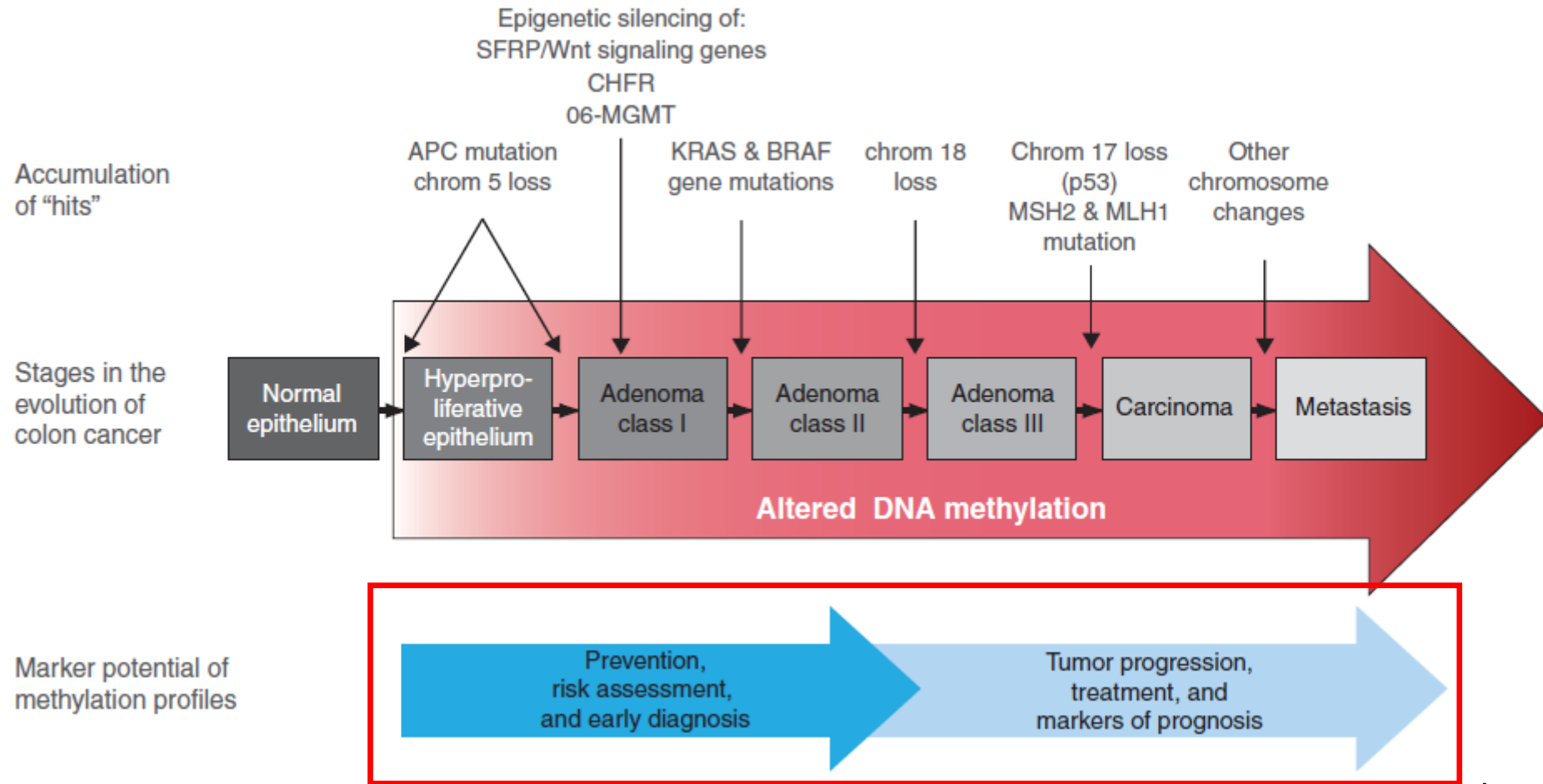


# Úloha DNA methylace v nádorovém bujení

- Hypomethylace onkogen-aktivujících genů
- Hypermethylace tumor-supresujících genů
- Mutageneze
  - C-T tranzice
  - Vyšší vazba meCpG pro karcinogeny
  - meCpG UV mutageneze

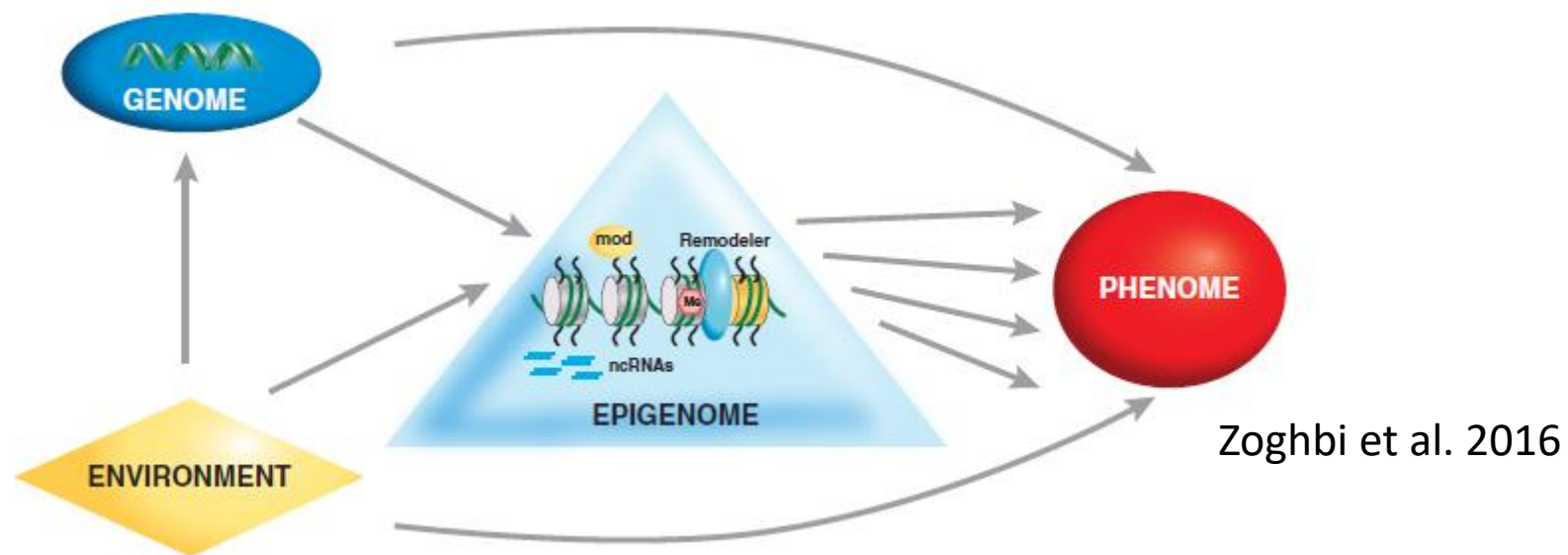


# Úloha DNA methylace v nádorovém bujení a progrese kolorektálního karcinomu

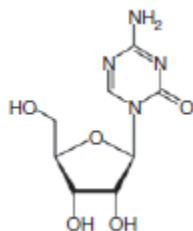


# Příklad povolených léčiv - chemoterapie

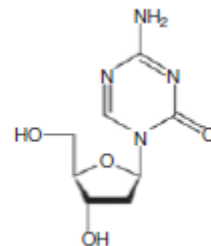
- Vliv chemoterapeutik na globální úrovni,
- Aktivně proliferující buňky akumulují více látek nebo lokálně dodávané



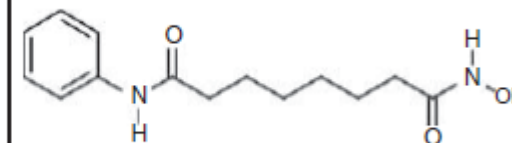
5-Azacytidine  
5-Aza-CR  
(Vidaza)



5-Aza-2'-  
deoxycytidine  
5-Aza-CdR  
Decitabine  
(Dacogen)



Suberoylanilide  
hydroxamic acid  
(SAHA)  
Vorinostat  
(Zolinza)

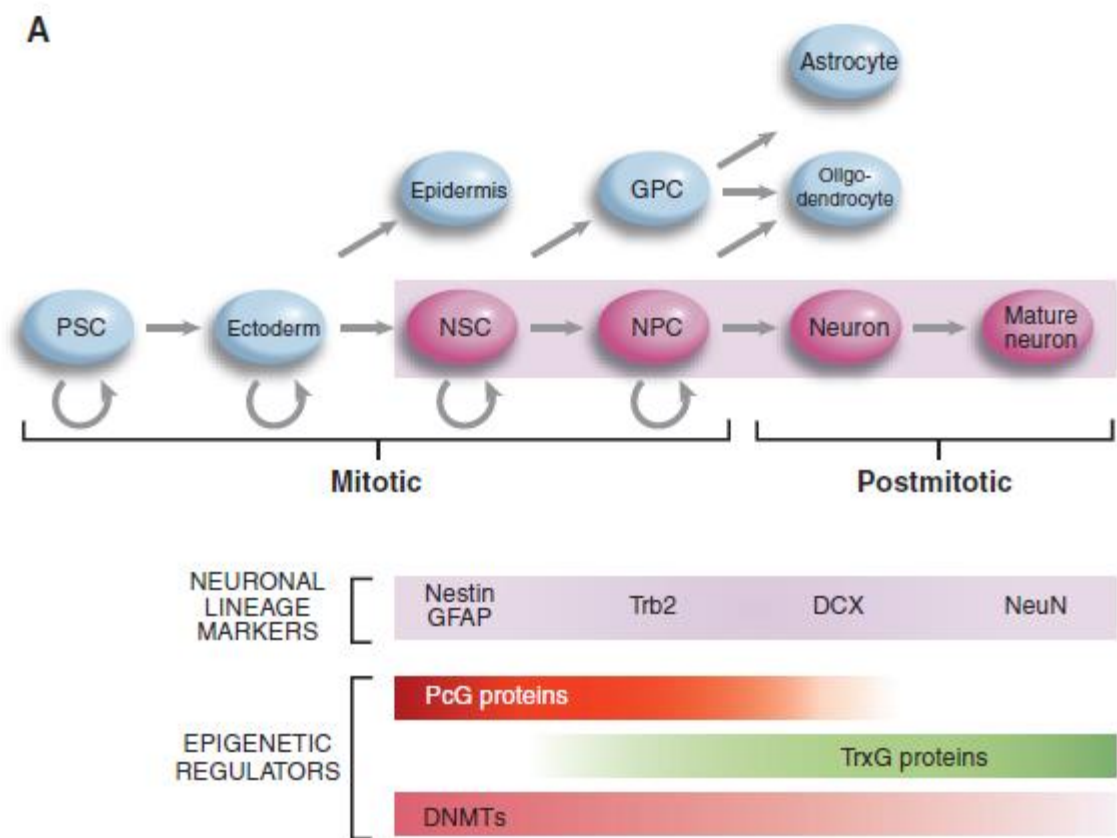


DNA methyltransfáza inhibice (vazba na DNA)

Inhibice HDAT

# Epigenetika a neurogeneze

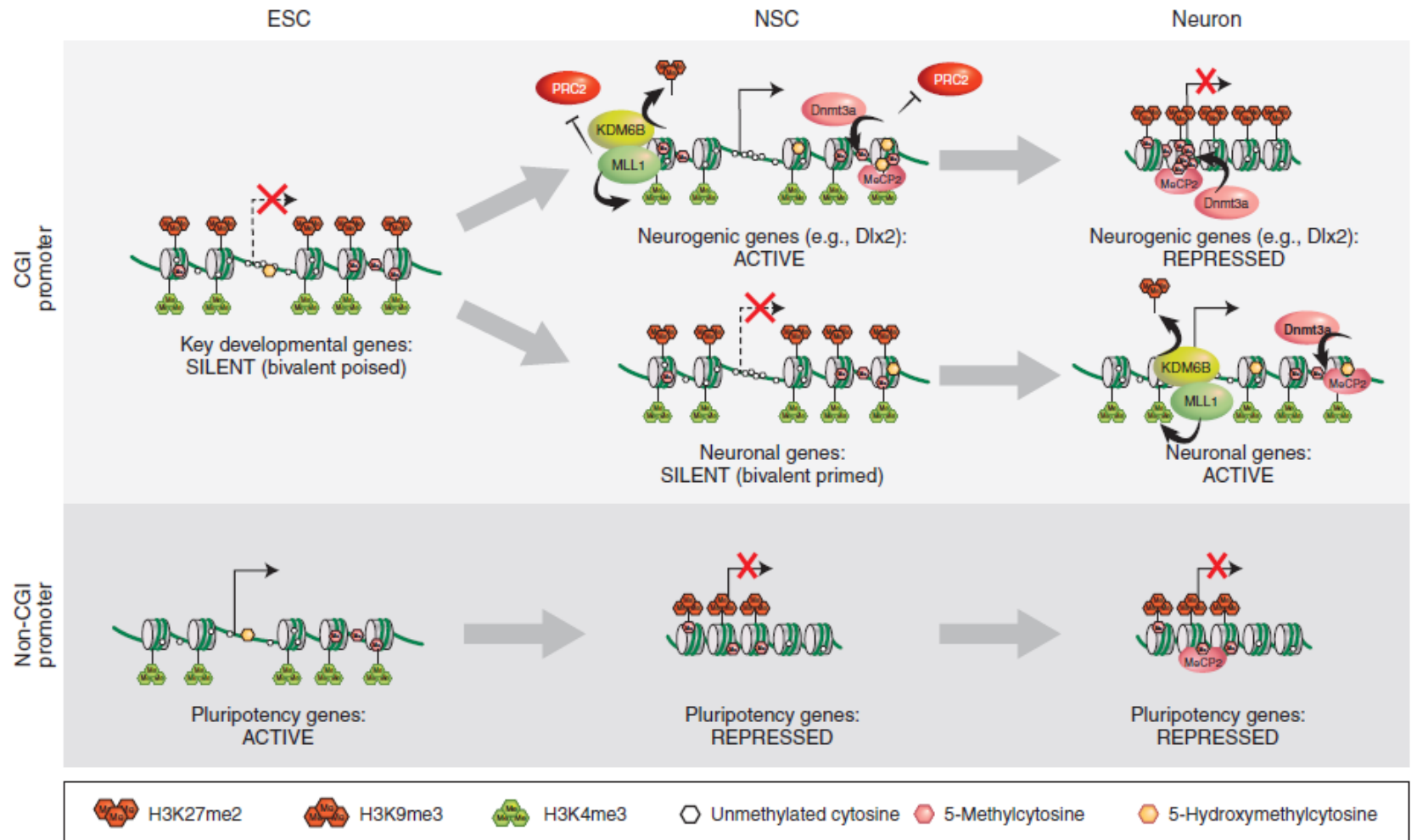
- Determinující faktory jsou regulovány mozaikou epigenetických modifikací
  - Methylace genu před promotorem (Dlx2) chrání gen před PcG umlčováním,
  - Úloha TrxG přes bivalentní metylaci H3K4me3K27me3, odstranění H3K27me3 aktivuje genovou oblast





# Epigenetika a neurogeneze

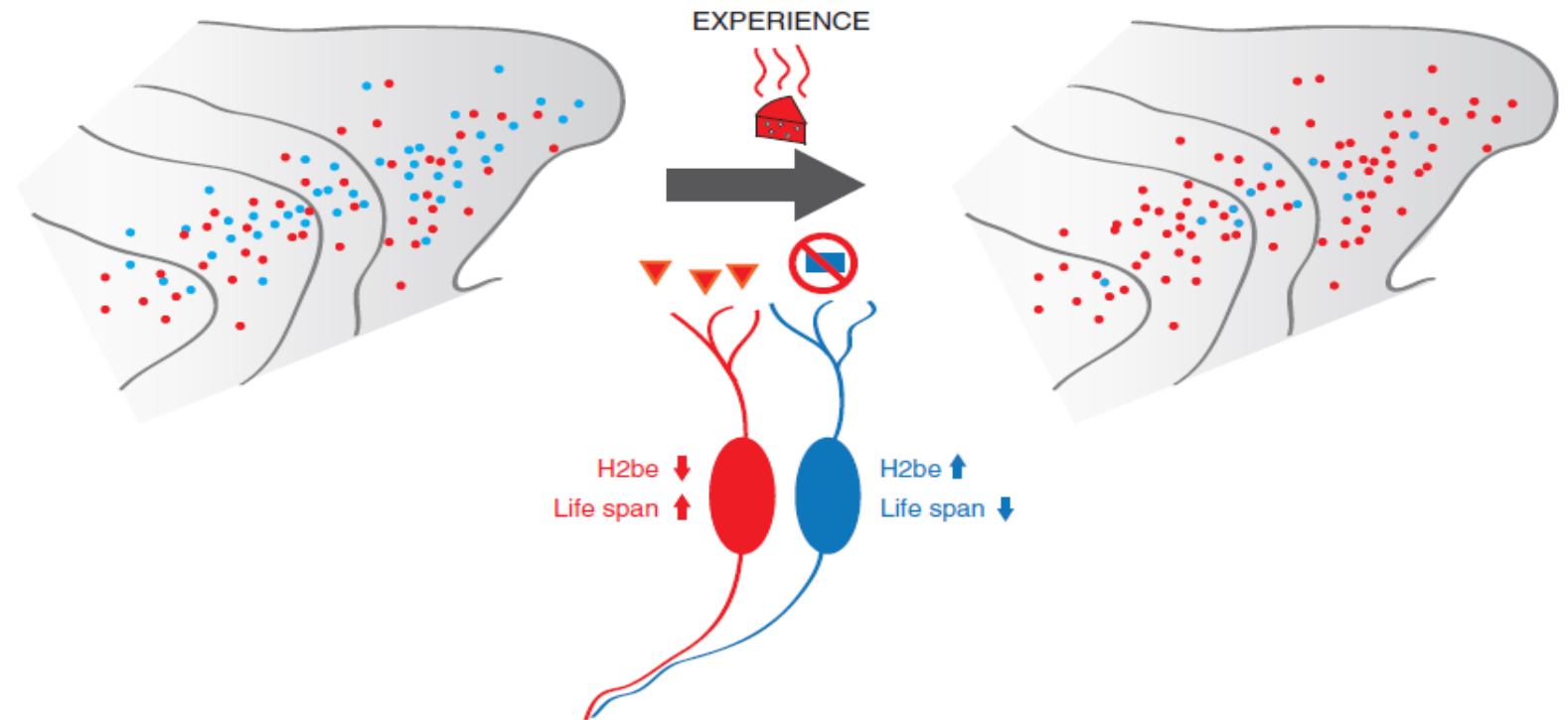
- **meCpG se vyskytují na „house-keeping“ genech v neurogeních buňkách**, během ranného vývoje jsou umlčeny H3K4me3K27me3
- **Neurogení geny umlčeny během determinace přes inaktivující modifikace (H3K9me)**
- **Neuronální geny uvolněny v pozdním vývoji nebo finální determinaci** (geny nutné pro finální funkci-odstranění H3K27me3 x H3K4me3 zůstává a aktivuje)
- ESC nemají meCpG v promotorech, aktivní faktory během ranného vývoje, umlčeny během determinace



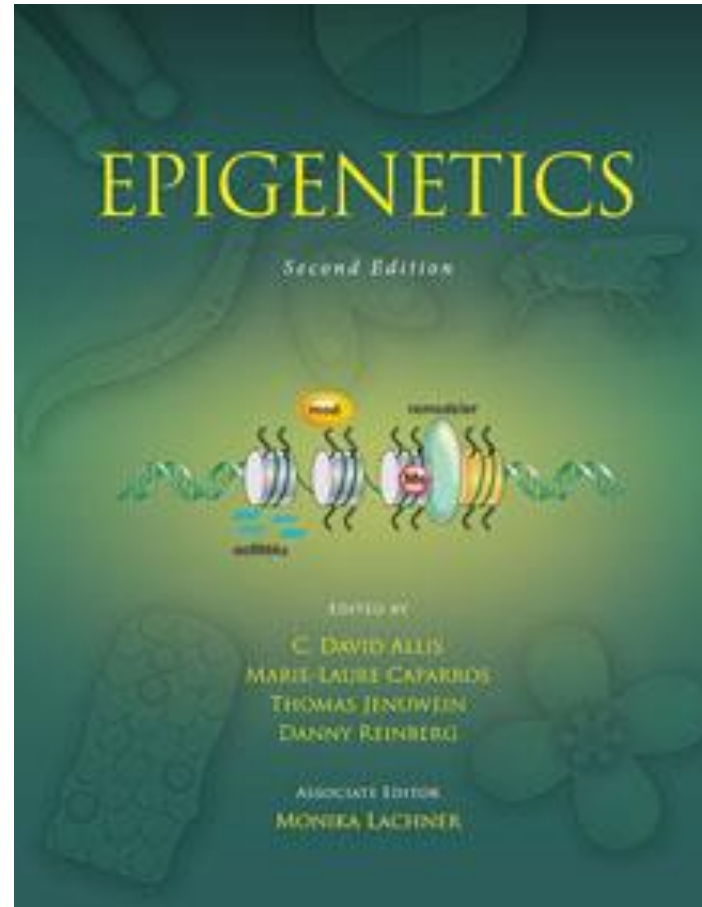
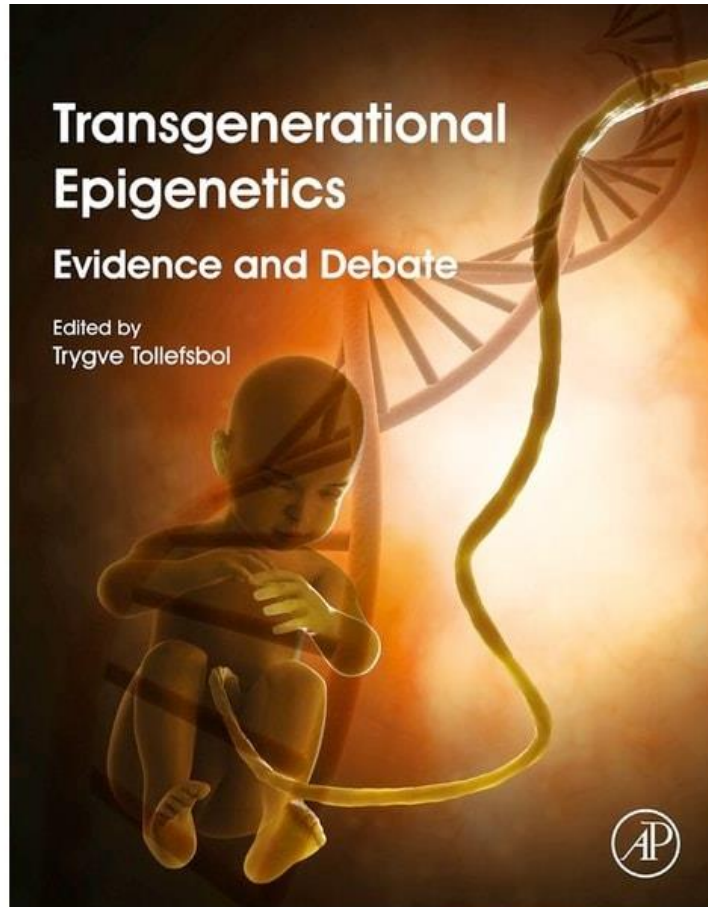


# Úloha histonové varianty H2be při dozrání feromon-detekujících chemoreceptorů

- Olfaktorické neurony jsou smyslové buňky v nose vnímající pachy a čich (v membráně neuronů jsou čichové receptory citlivé na pachy)-umístěné v olfaktorickém epitelu v čichové sliznici
- **H2be se liší 5 AA od H2b (není methylován/acetylován na K5)**
- Aktivace neuronů vede ke snížení exprese H2be a prodlužuje životnost (aktivované buňky mají nízkou hladinu exprese této histonové varianty)
- **H2be mimo jiné aktivuje apoptózu a tedy determinuje životnost neuronů**



# Doporučená literatura/online kurzy



100% Free

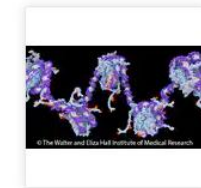
## Start Learning with Free Courses

Free online courses from the world's top universities and companies.

**coursera**

Explore ▾

epigenetics



### Epigenetic Control of Gene Expression

The University of Melbourne

Course

★★★★★ 4.8 (732) | 41k students

Mixed



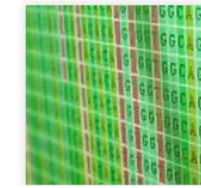
### Cancer Biology

Johns Hopkins University

Specialization

★★★★★ 4.8 (7 724) | 200k students

Beginner



### Plant Bioinformatic Methods

University of Toronto

Specialization

★★★★★ 4.7 (1 764) | 100k students

Beginner

Děkuji za pozornost!