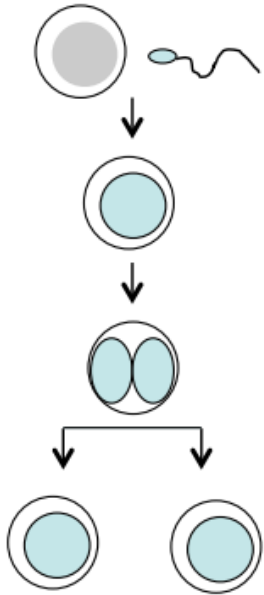


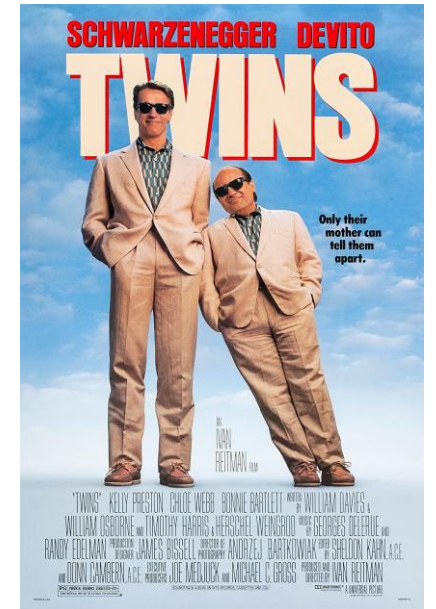
Mechanismy regulace genové exprese na epigenetické úrovni

Vývojová genetika 2021

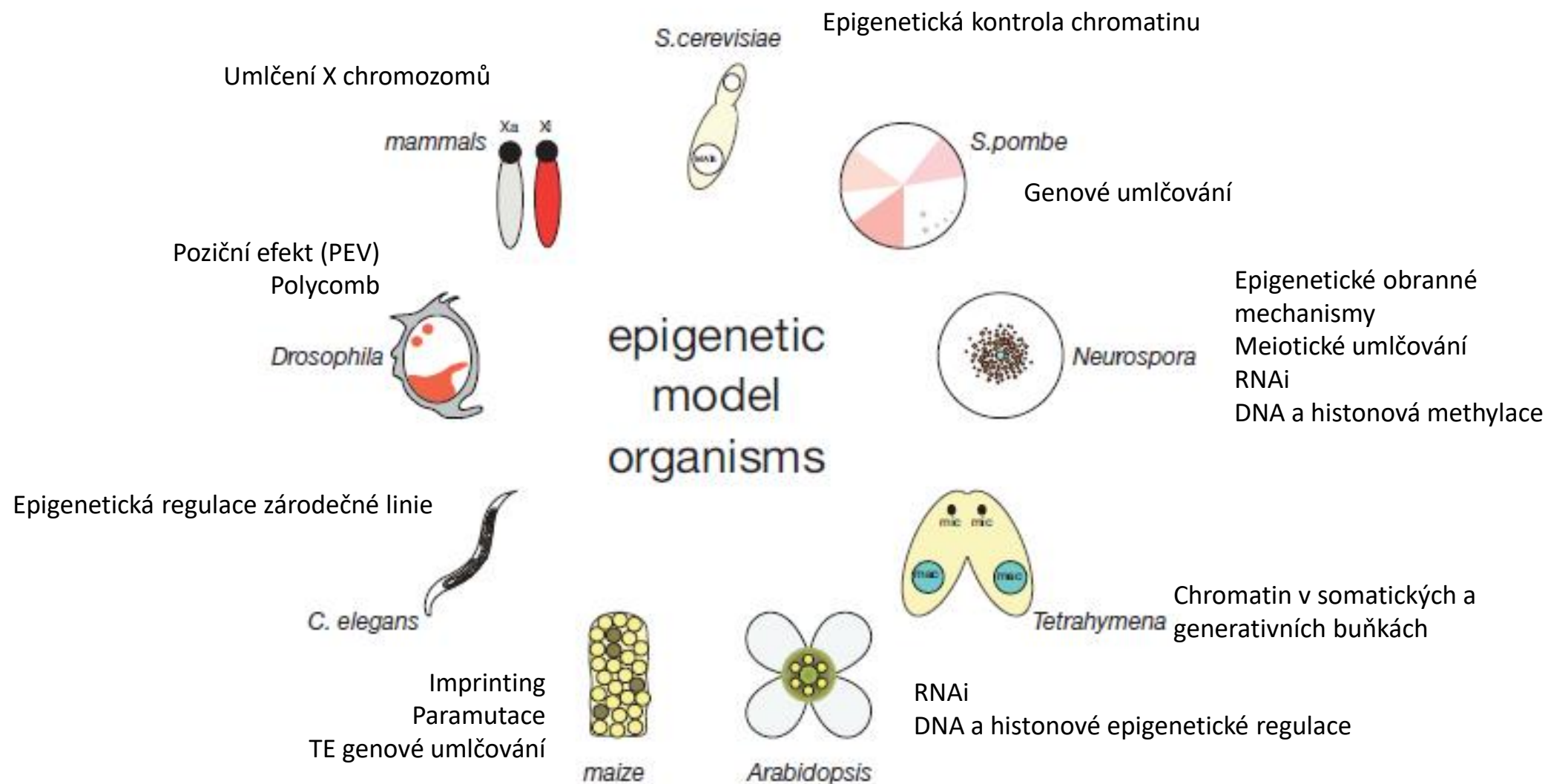
Rozdílnost jednobuněčných dvojčat – mechanismus?



- Jednobuněčná dvojčata vznikají během raného vývoje embrya (jeho rozdělením), jsou tvořeny tedy stejným genetickým materiálem (spermie i vajíčko)
- Často rozdíly ve vzhledu a vlastnostech (např. 30% výšky)
 - Jak? Genotyp x Fenotyp?
 - Proč? Prostředí?
- **Conrad Waddington**, 1942 – epigenetika (asimilace, krajinný model), vznik fenotypu(ů) na základě jednoho genotypu
- **Robin Holliday**, 1990 – časová a prostorová kontrola genové aktivity během vývoje komplexního organismu



Modely ke studiu epigenetických jevů

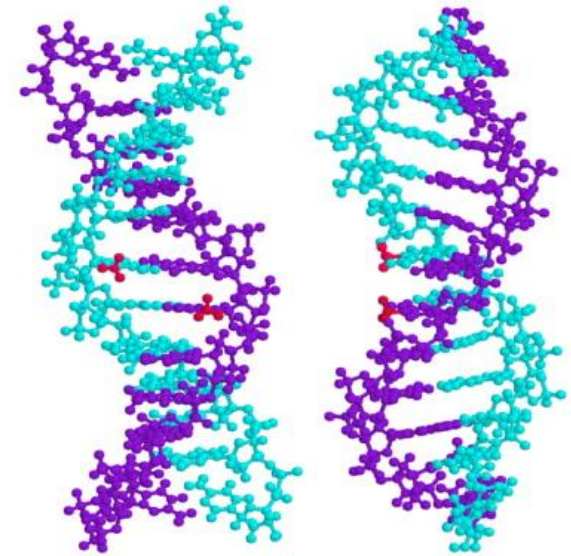
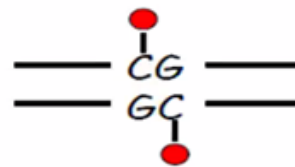
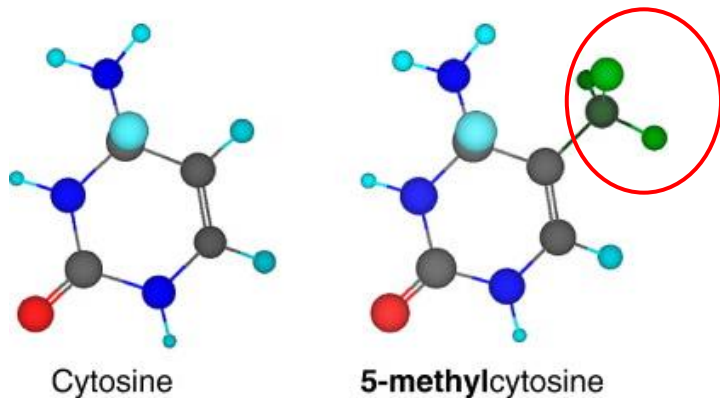


Mechanismy

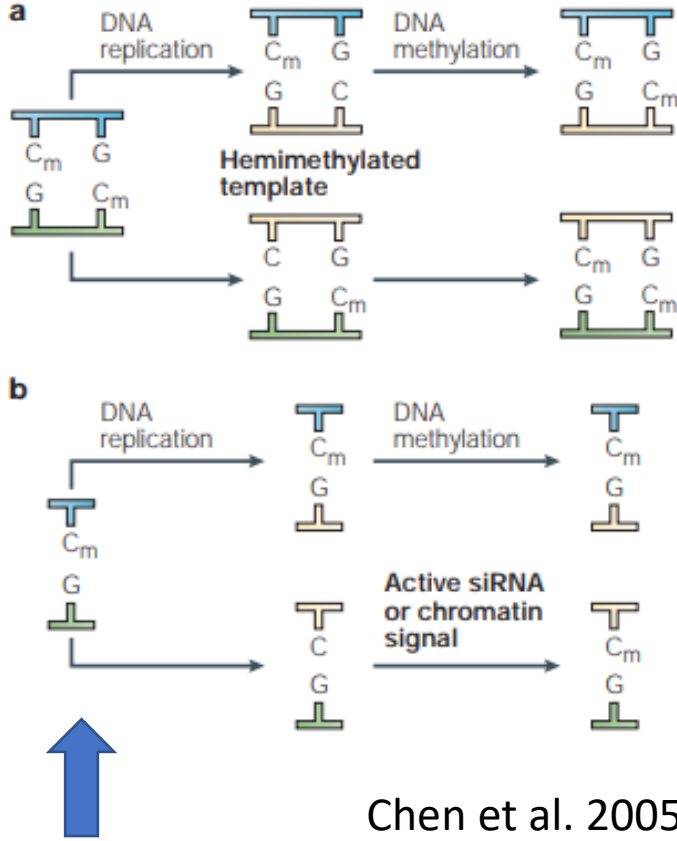
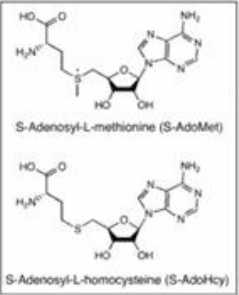
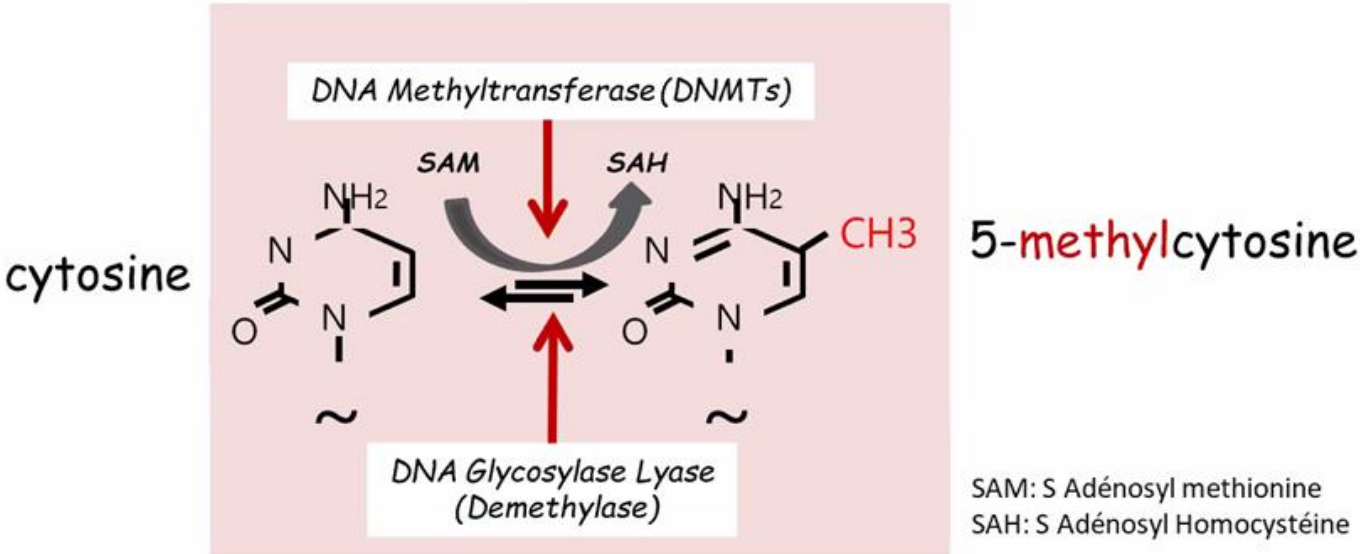
- DNA methylace
- RNA interference
- Histonové modifikace

Methylace DNA

- CH₃ skupiny jsou umístěny na velké jamce dsDNA
- Proteiny jako transkripční faktory, které se mohou vázat na DNA mají často kontakt právě ve velké jamce DNA

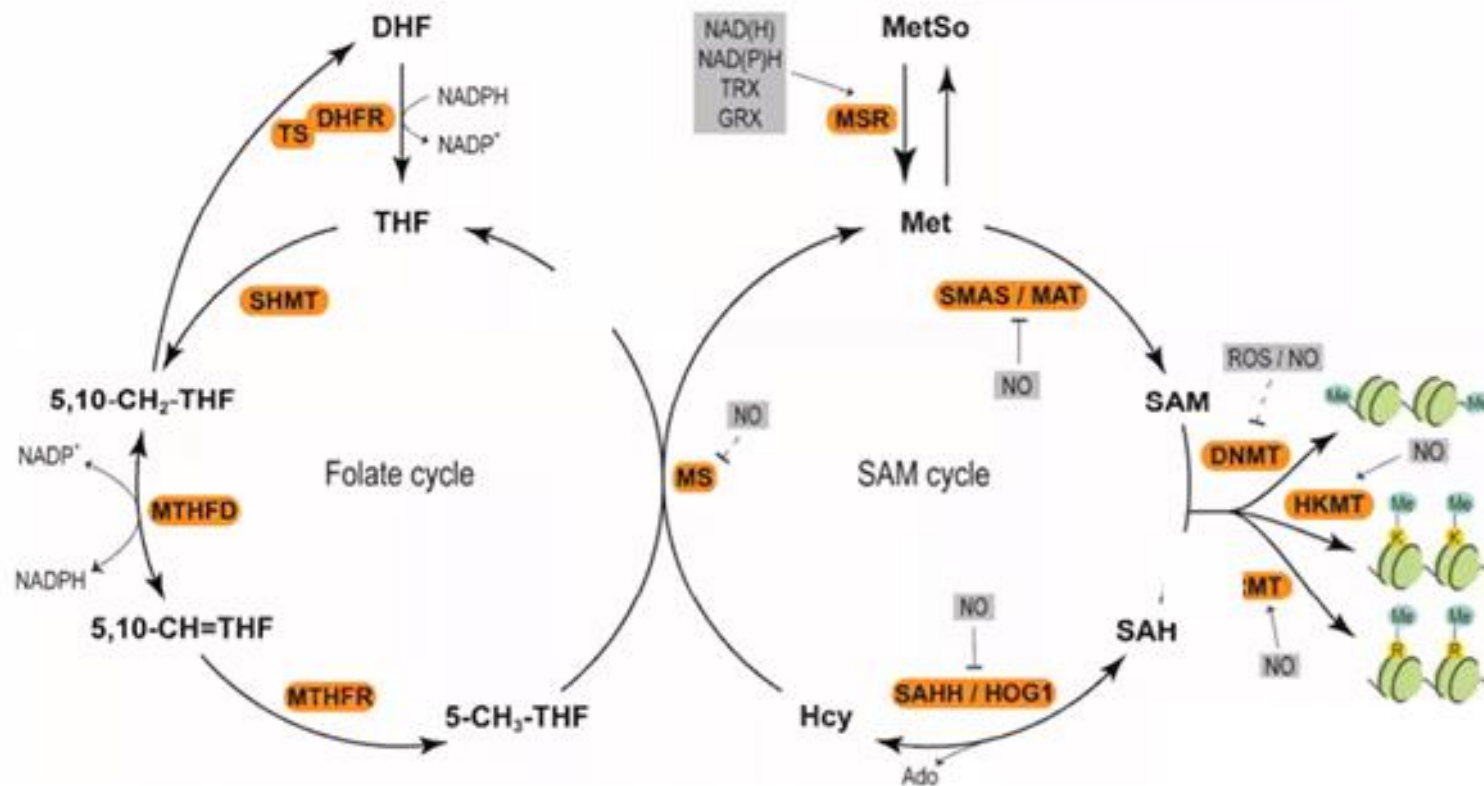


Mechanismus DNA methylace



De novo methylace, u živočichů *DNMT3a*
Udržovací methylace, *DNMT1*

Přímý vztah mezi metabolismem a DNA methylací (metabolom x epigenom)

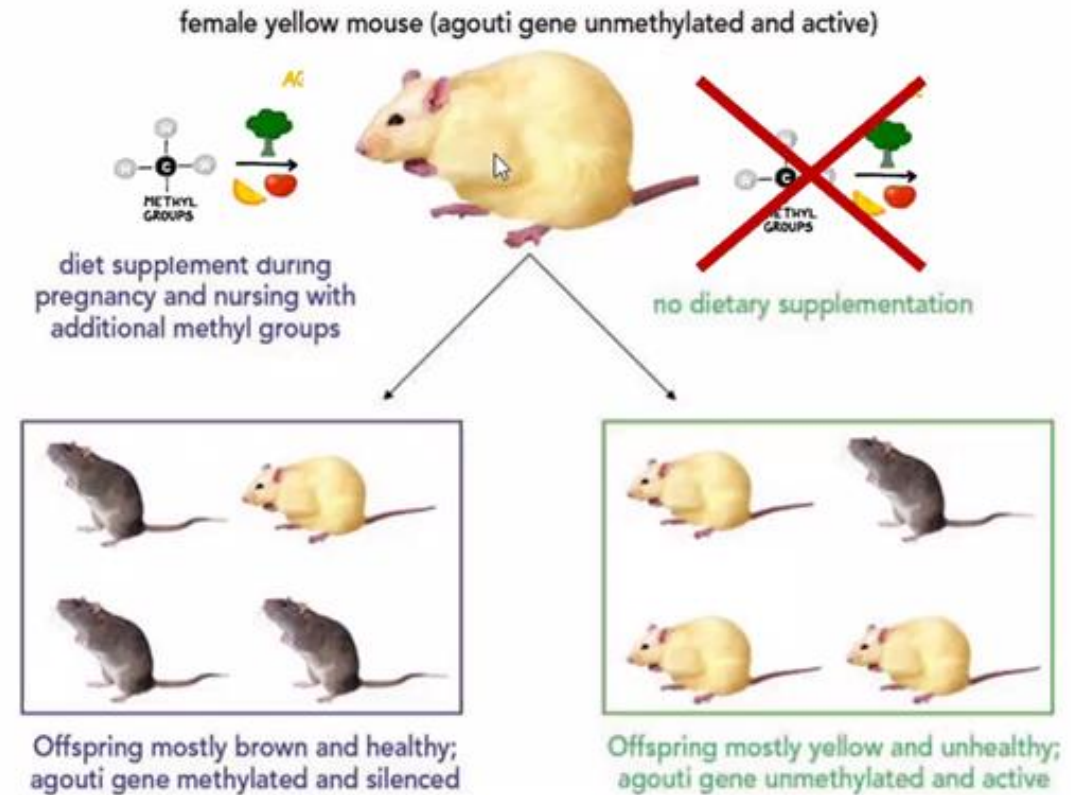
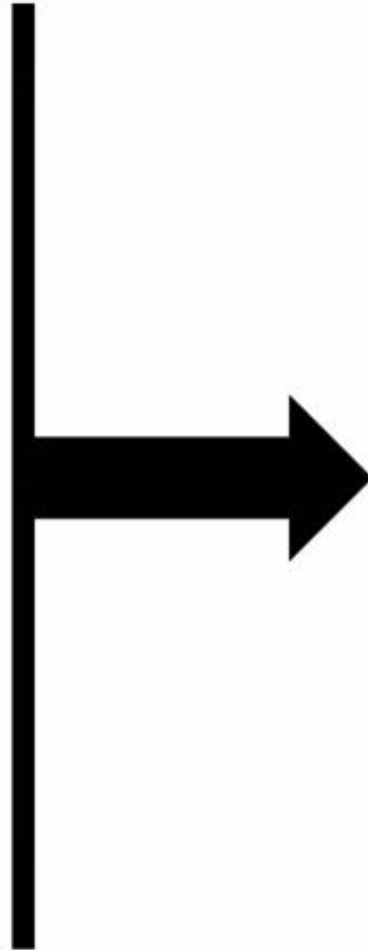
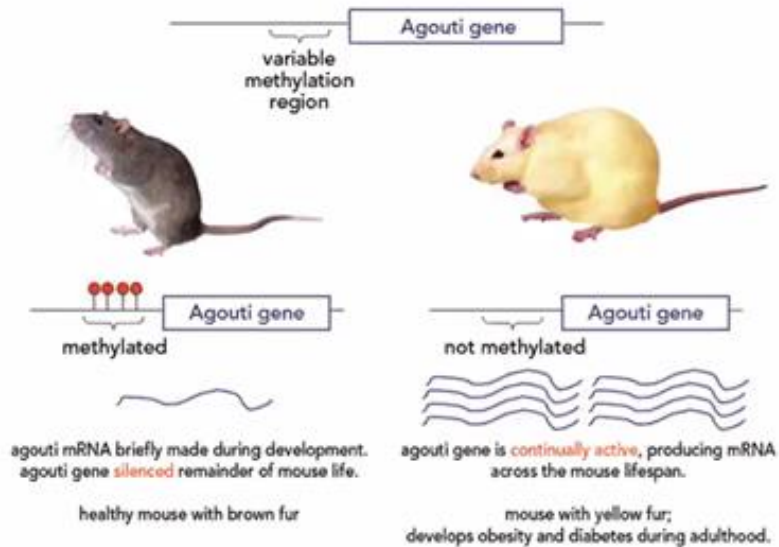
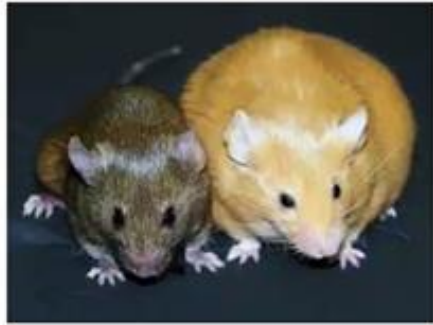


- SAM je prekurzor všech epigenetických modifikací vyžadující metylovou skupinu

- DNA methylace
- Methylace lysinových residuí
- Methylace argininových residuí

SAM cyklus – cyklus produkující, „konzumující“ a regenerující SAM molekuly
Folátový cyklus – produkce vitamínu B, regenerace DNA a genetického materiálu

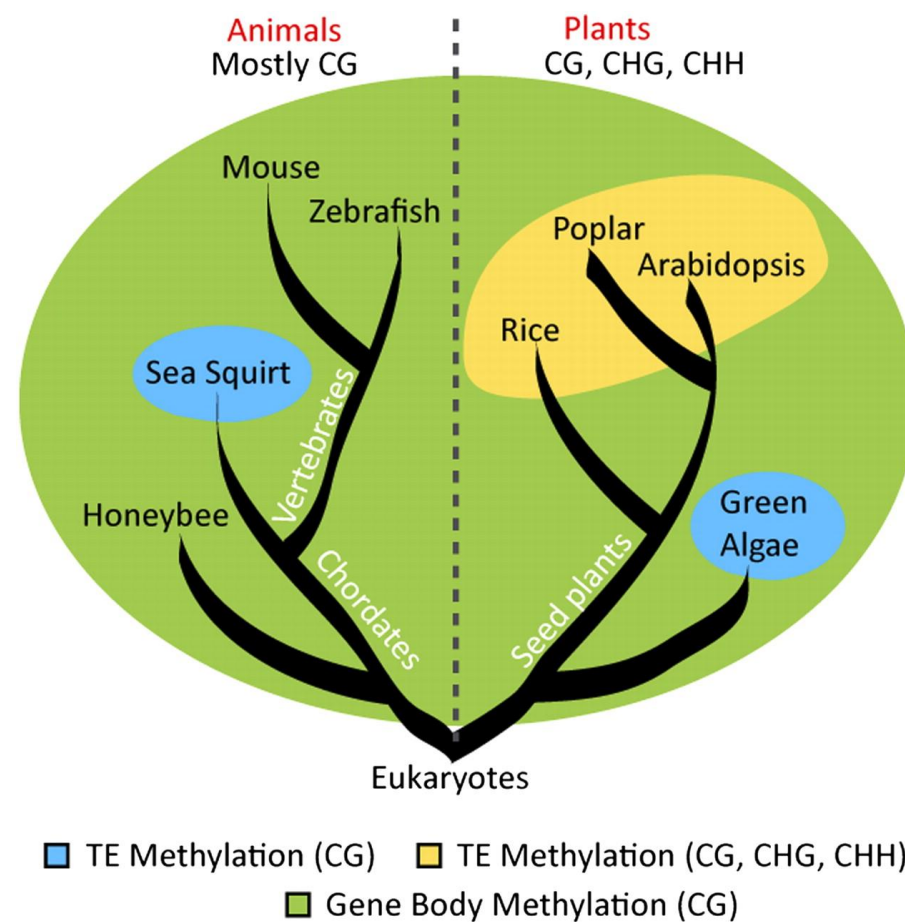
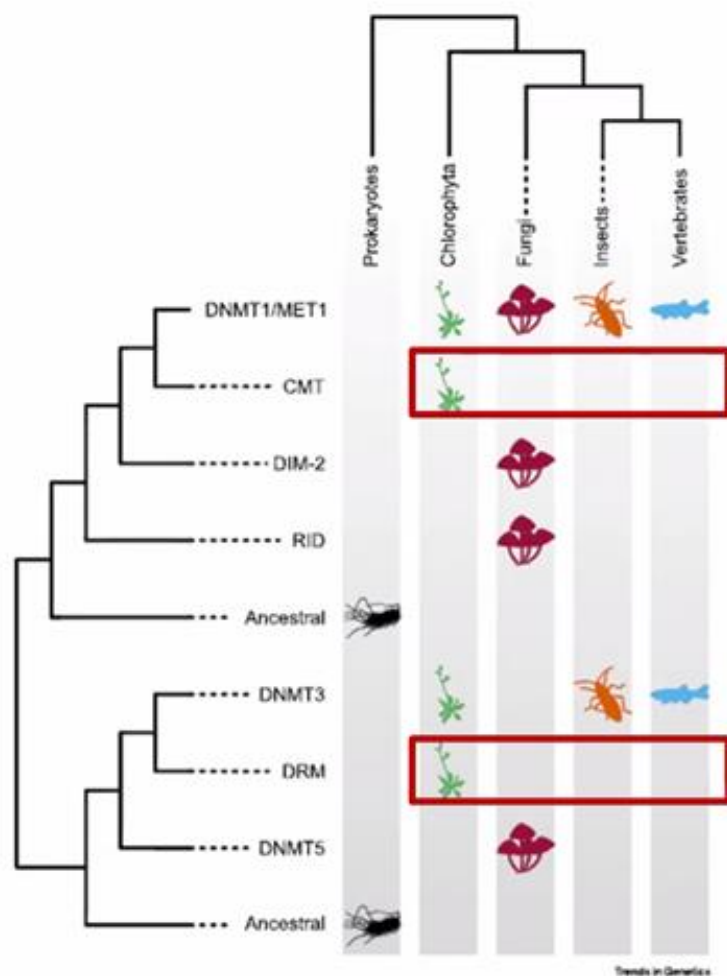
Důkaz vztahu mezi DNA methylací a metabolismem – *Agouti*



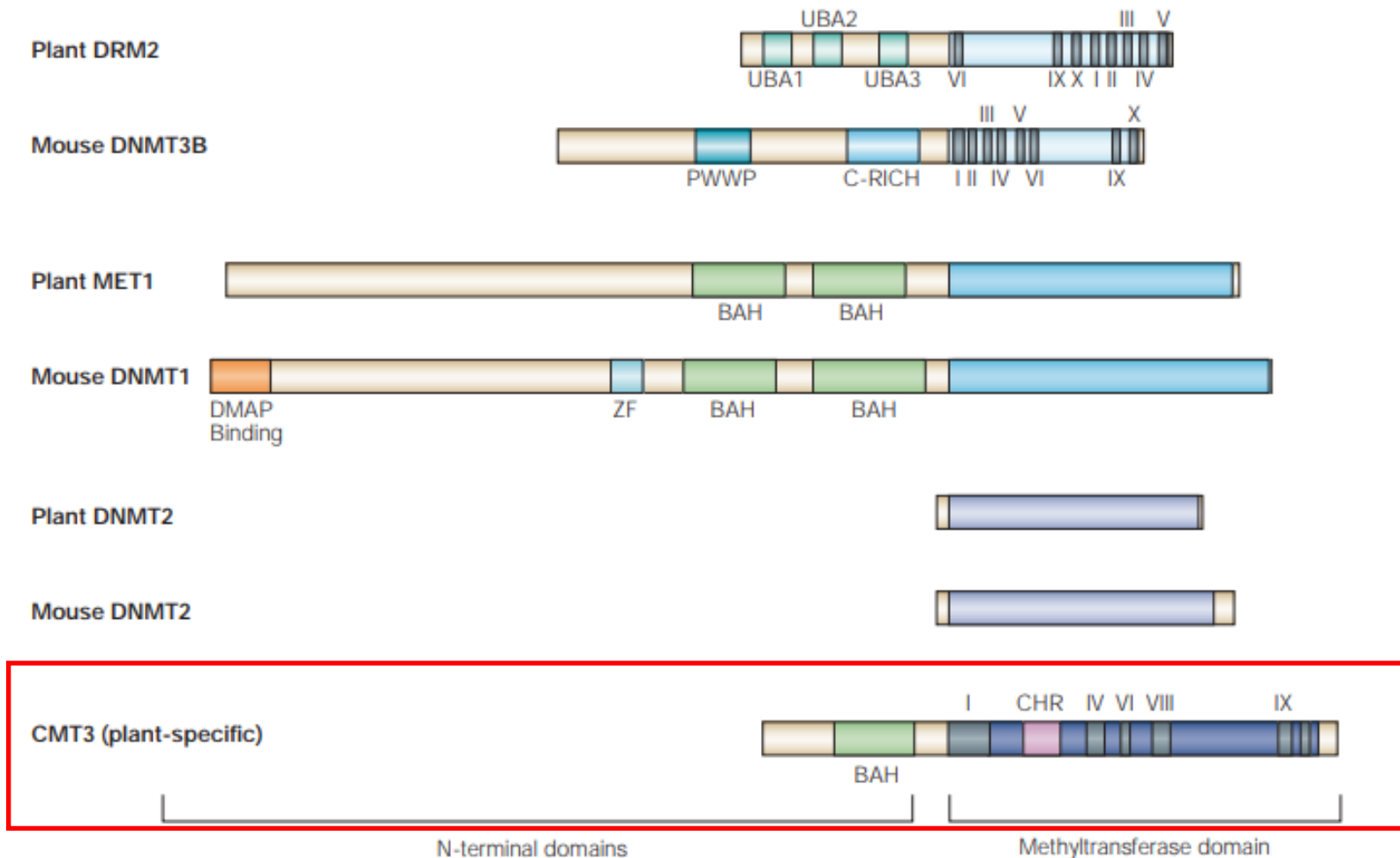
Methylace cytosinu se liší u různých eukaryotických genomů

		DNA methylation		
		Described		
Bacteria	<i>E. coli</i>	Yes	M-R systems	
			<i>De novo</i>	Maintenance
Fungi	<i>N. crassa</i>	Yes	Dim2	Dim2
	<i>S. pombe</i>	No	–	–
Protazoa	<i>T. brucei</i>	Yes	–	–
Animals	<i>C. elegance</i>	No	–	–
	<i>A. mellifera</i>	Yes	Dnmt3	Dnmt1.1 Uhrf1
Metazoa	<i>D. melanogaster</i>	No	–	–
	<i>M. musculus</i>	Yes	Dnmt3a Dnmt3b Dnmt3l	Dnmt1 Uhrf1
Plants	<i>A. thaliana</i>	Yes	Drm2	Met1 Vim1,2,3 Cmt3 Drm2

Evoluce DNA methyltransferáz u rostlin

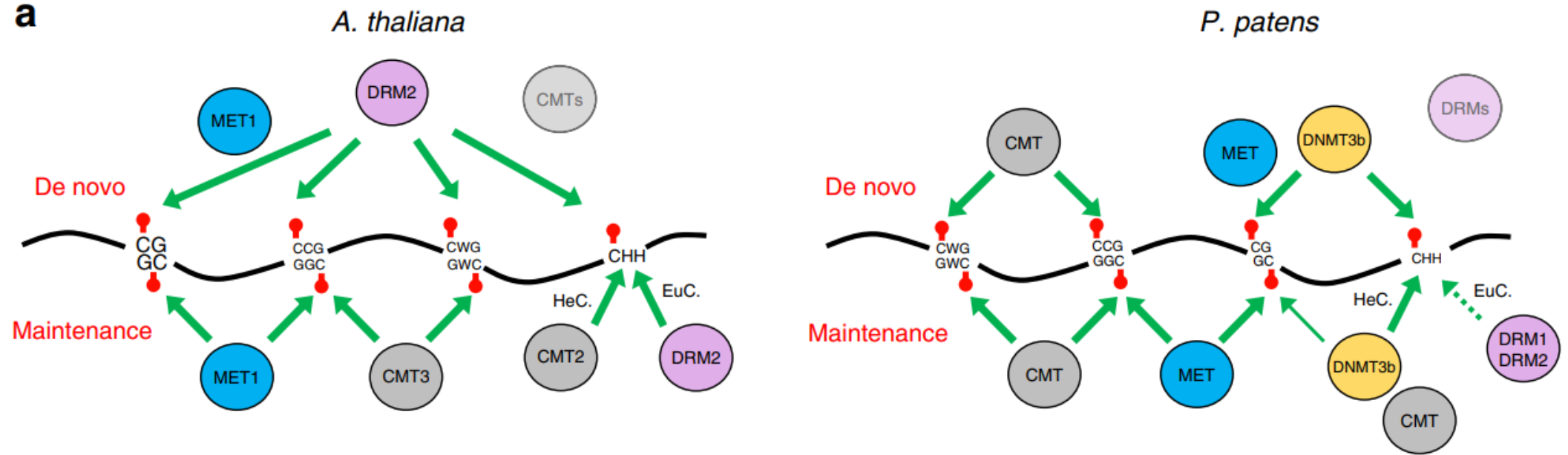
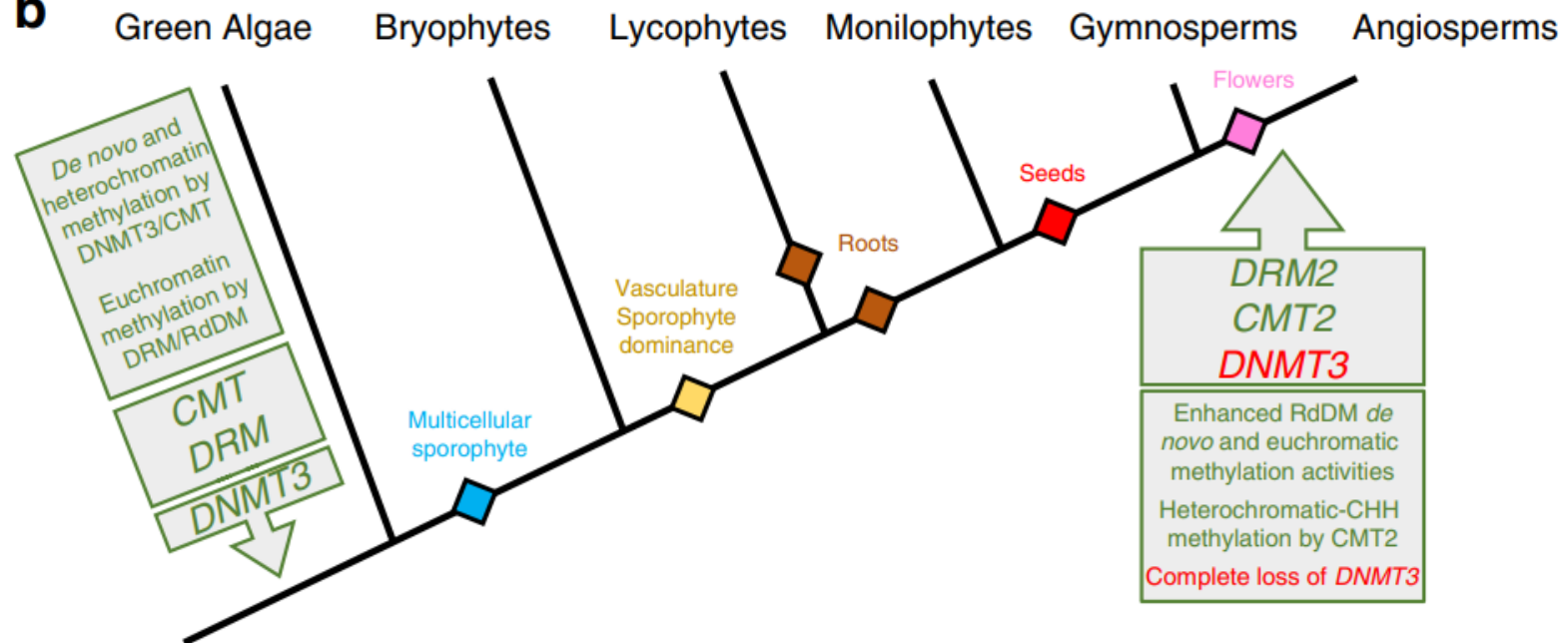


Specifita DNA methyltransferáz u rostlin

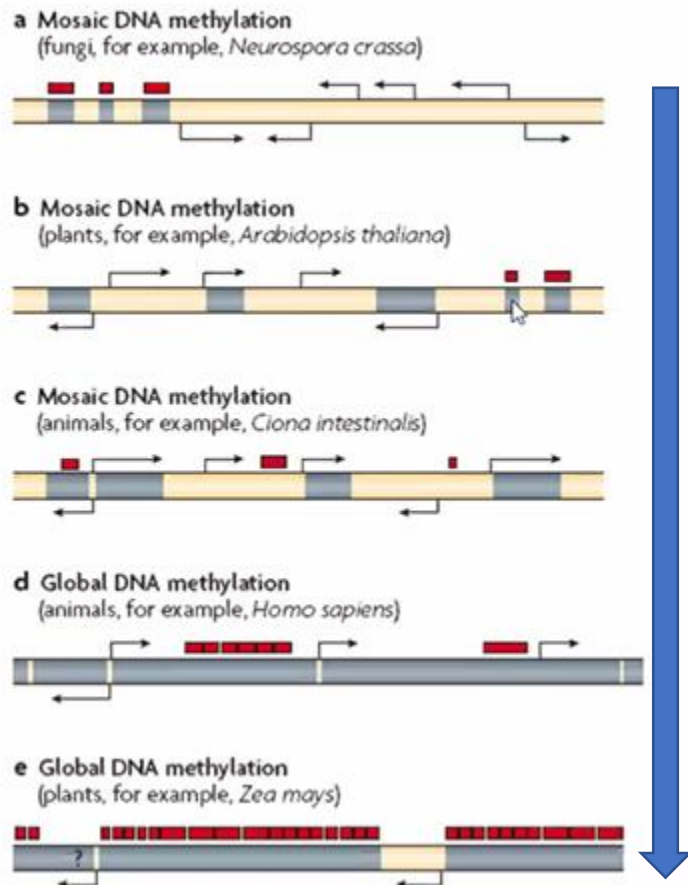


- DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) - CHH
- METHYLTRANSFERASE 1 (MET) – CG
- **CHROMOMETHYLASE (CMT) – CG**
- DNA methyl transferase (DNMT) – CG(?)

=Specifická pouze pro rostliny

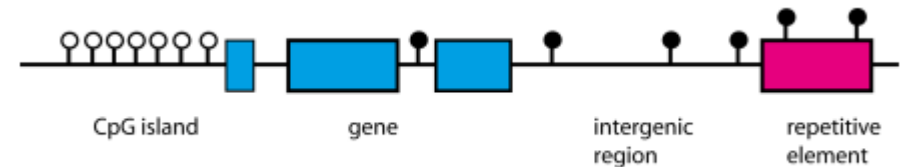
a**b**

Rozdíly DNA methylace koreluje se strukturou genomů a jejich velikostí



Množství repetit

Genomově
specifická
methylace
(např. X
inaktivace)

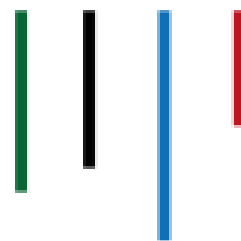


- CpG ostrůvky – většinou nemethylovány (u rostlin v malé míře)
- Mezigenové oblasti – většinou methylovány
- Repetitivní oblasti – většinou methylovány

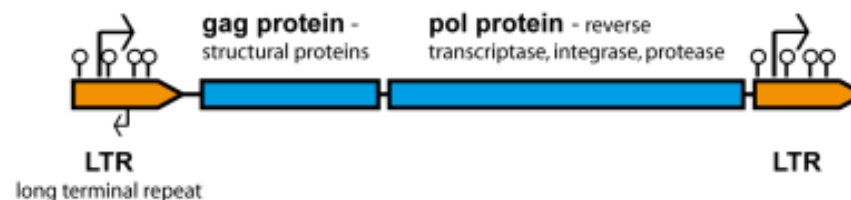
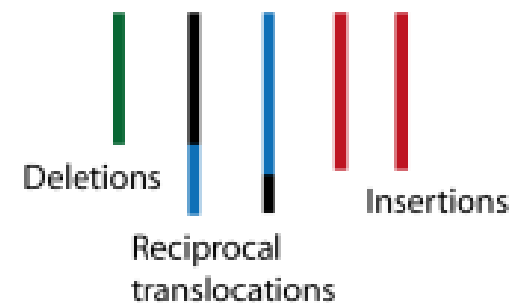
Udržení genomové integrity

- Dnmt1 linie vykazují vysokou genomovou instabilitu
- Umlčení nejenom repetitivních elementů, ale i kryptických promotorů a alternativních míst sestřihu
- **Mutace v místě repetic (meC = T) jako prevence transpozice**
- **Umlčení repetic a jejich transkripční interference**
- **Potlačení ilegitimní rekombinace**

normal karyotype

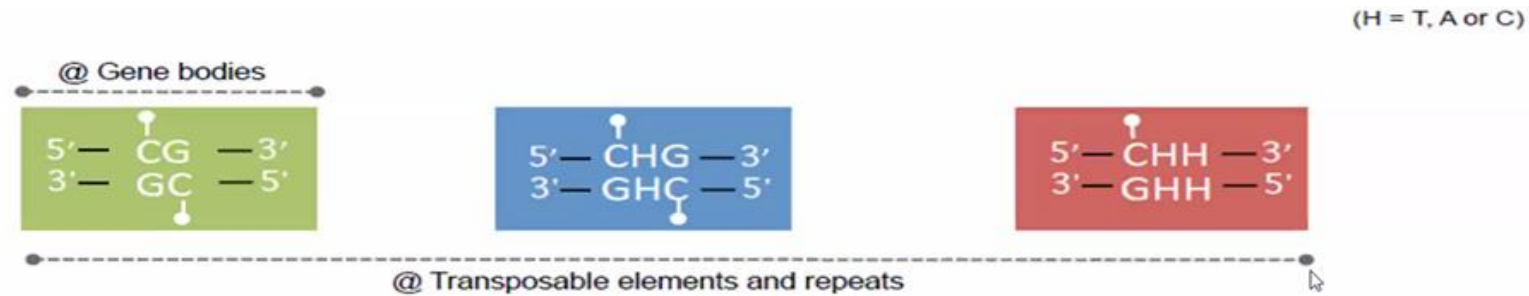


abnormal karyotype due to genomic instability

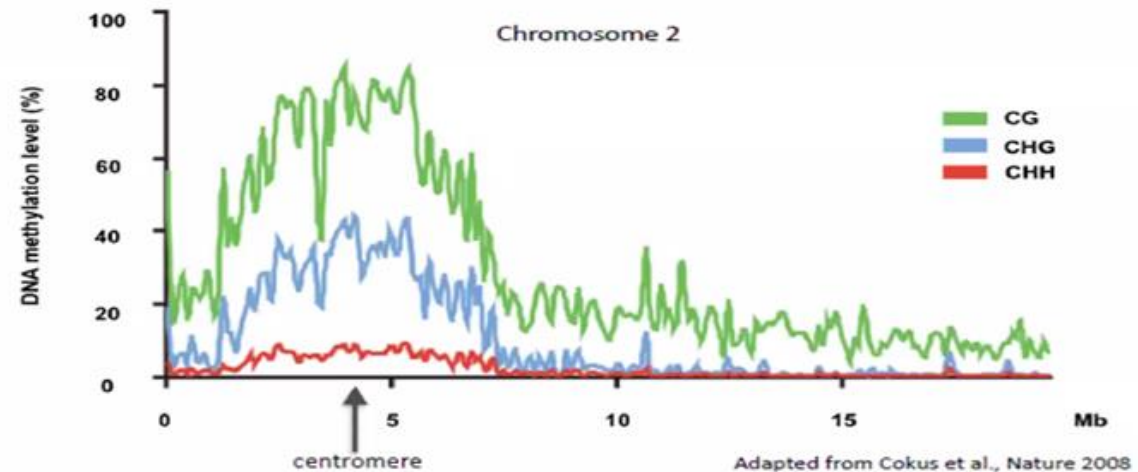
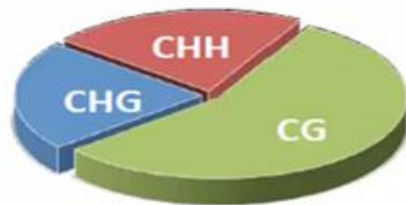


„Genome defense model“ – DNA methylace je mutagenní, proto musí mít pozitivní vliv na stabilitu (prof. Timothy Bestro)

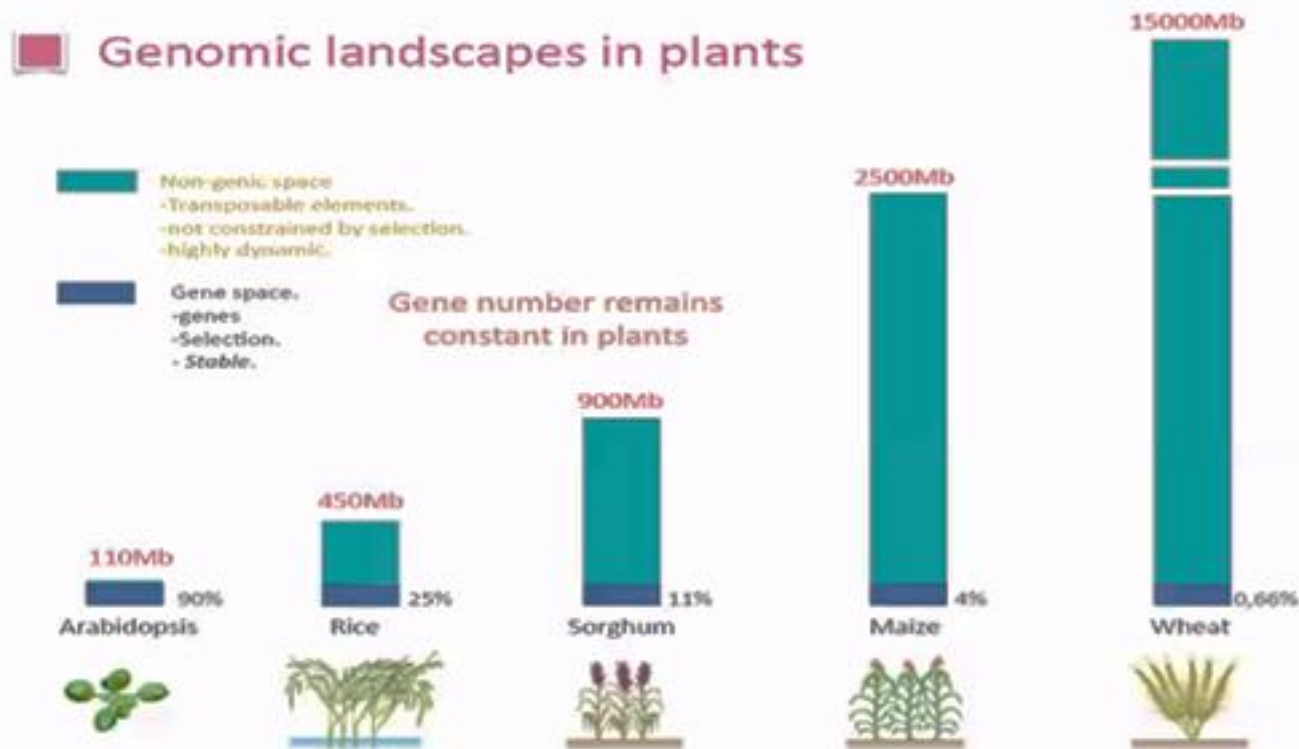
DNA methylation se liší mezi geny a transpozony



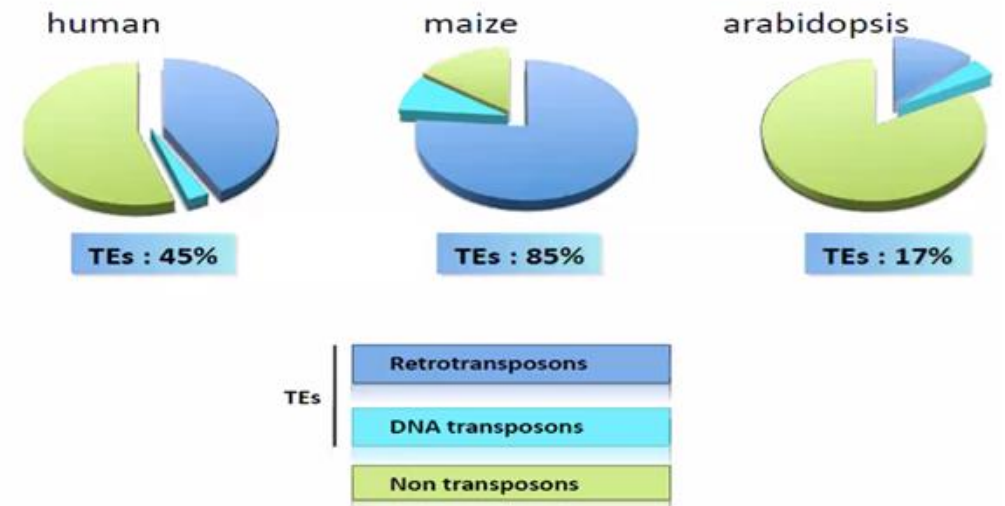
Arabidopsis leaves



Rozdíly DNA methylace koreluje se strukturou genomů a jejich velikostí



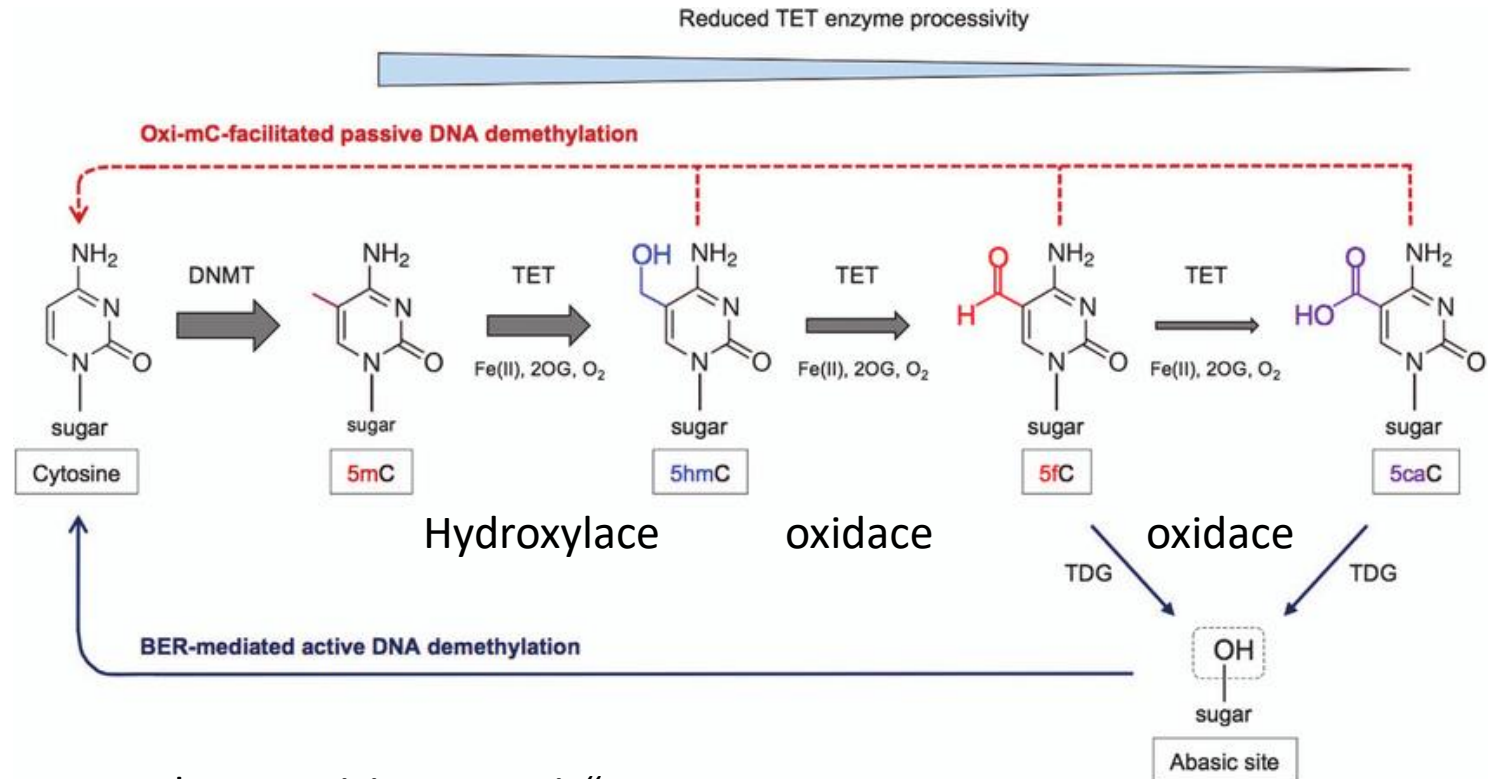
Umlčení repetitivní DNA = stabilita genomu a potlačení škodlivých inzercí



- S větší procentem repetitivní DNA roste úměrně množství inaktivního chromatinu (dříve fakultativní heterochromatin) a tím se mění i chromozomální distribuce epigenetických značek

DNA demethylace (TET – methylcytosin dioxygenáza)

- Pasivní DNA demethylace
 - Rozvolnění „hustoty“ methylace s každým buněčným dělením (nizká aktivita DNMT1)
- Aktivní DNA demethylace
 - -C-C vazba je velmi silná, odstranění přes intermediáty, používající různé systémy (TET enzymy – rodina 10 enzymů)
 - Především ve vyvíjejících se embryích a zárodečných buňkách, rakovinné buňky, mozkové buňky
 - 5hmC
 - 5fC (→BER)
 - 5caC (→BER)
- U rostlin MEDEA, ROS1 (TET orthology prozatím neposáány, **ALE! Modifikace se v genomu vyskytují-jiné enzymatické dráhy?**)

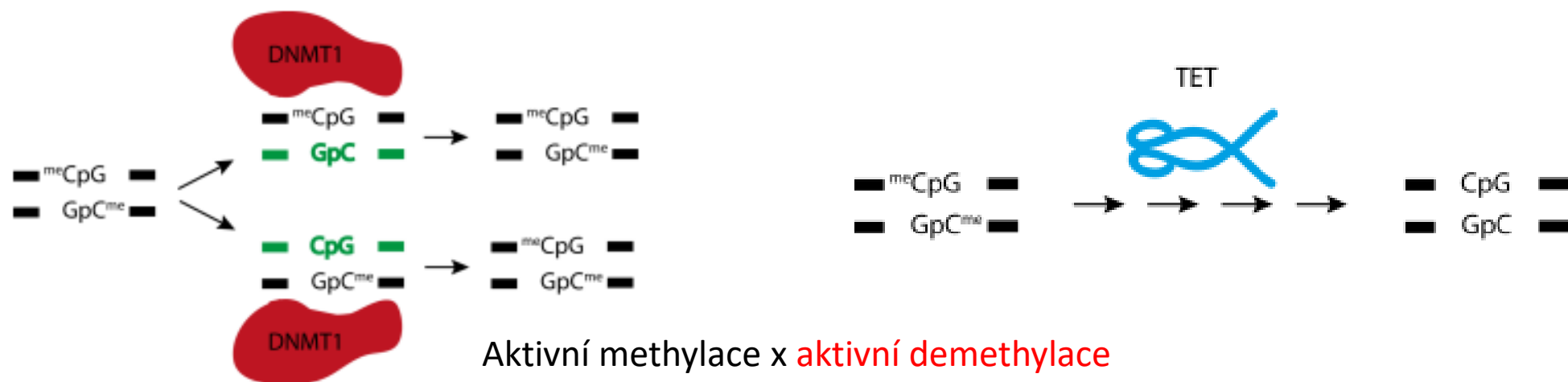


BER – „base excision repair“

TDG – „thymine DNA glycosylase“

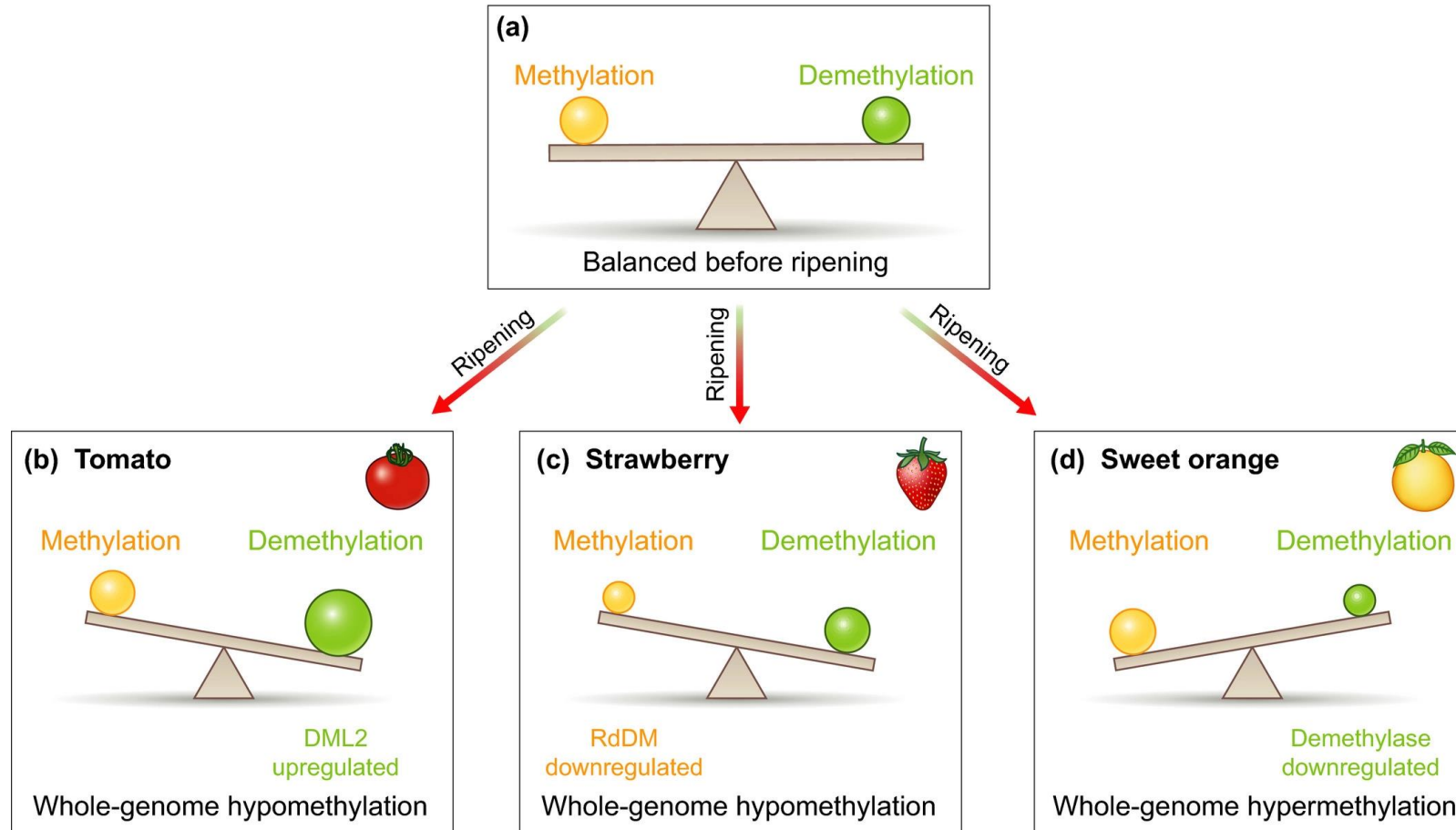
AID – „activation induced deaminase“ nebo APOBEC (5mC → T+thymine glycosylase MB4 → BER)

Proč je DNA methylace dědičná?



- DNA methylace je dědičná, protože DNMT1 rozpoznává hemi-methylovanou DNA na obou řetězcích
- TET enzymy jsou specificky demethylovány pouze během specifického období během vývoje

Úloha DNA methylace ve významných procesech a rozdílná úloha v podobných orgánech u rostlin



X inaktivace jako příklad mitotické dědičnosti DNA methylace

- X inaktivace je epigenetický mechanismus dávkové kompenzace u savců (samci a i samice mají stejnou dávku genové exprese X chromozomu)
- Během vývoje dochází k náhodné X inaktivaci v období gastrulace v embryu, tento jev je posléze předáván do dceřiných buněk



Female XX



Male XY



Mechanismy

- DNA methylace
- RNA interference
- Histonové modifikace

Výskyt a diverzita malých RNA

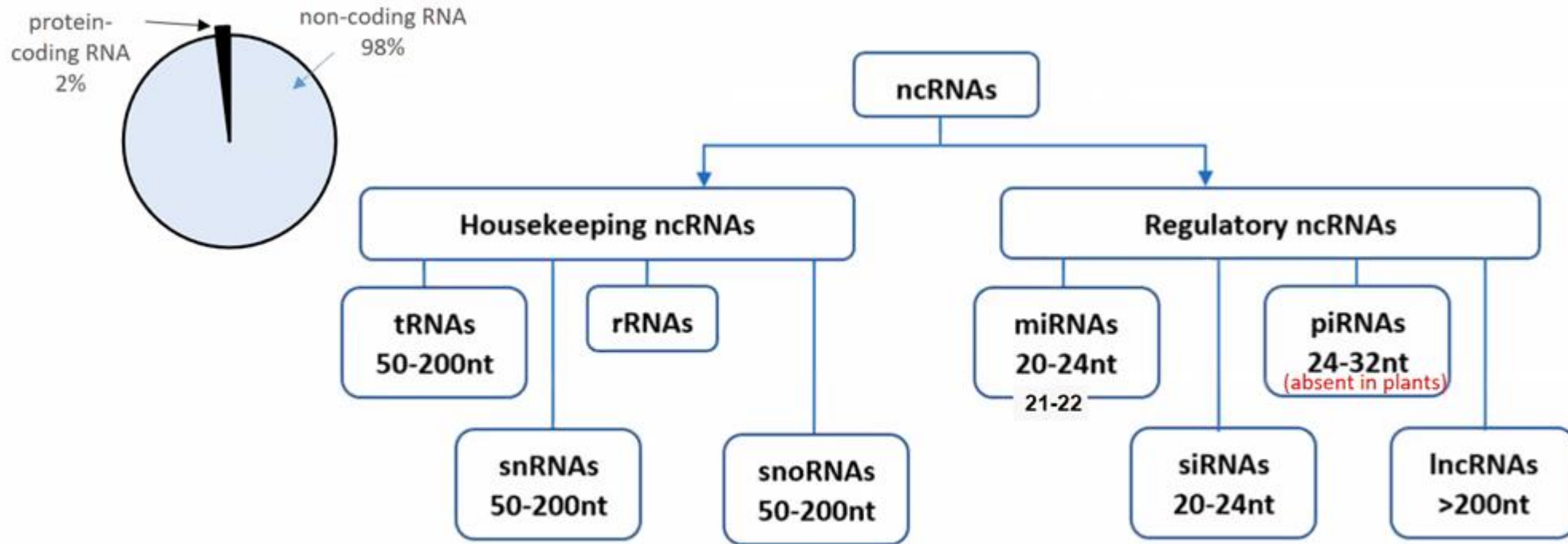
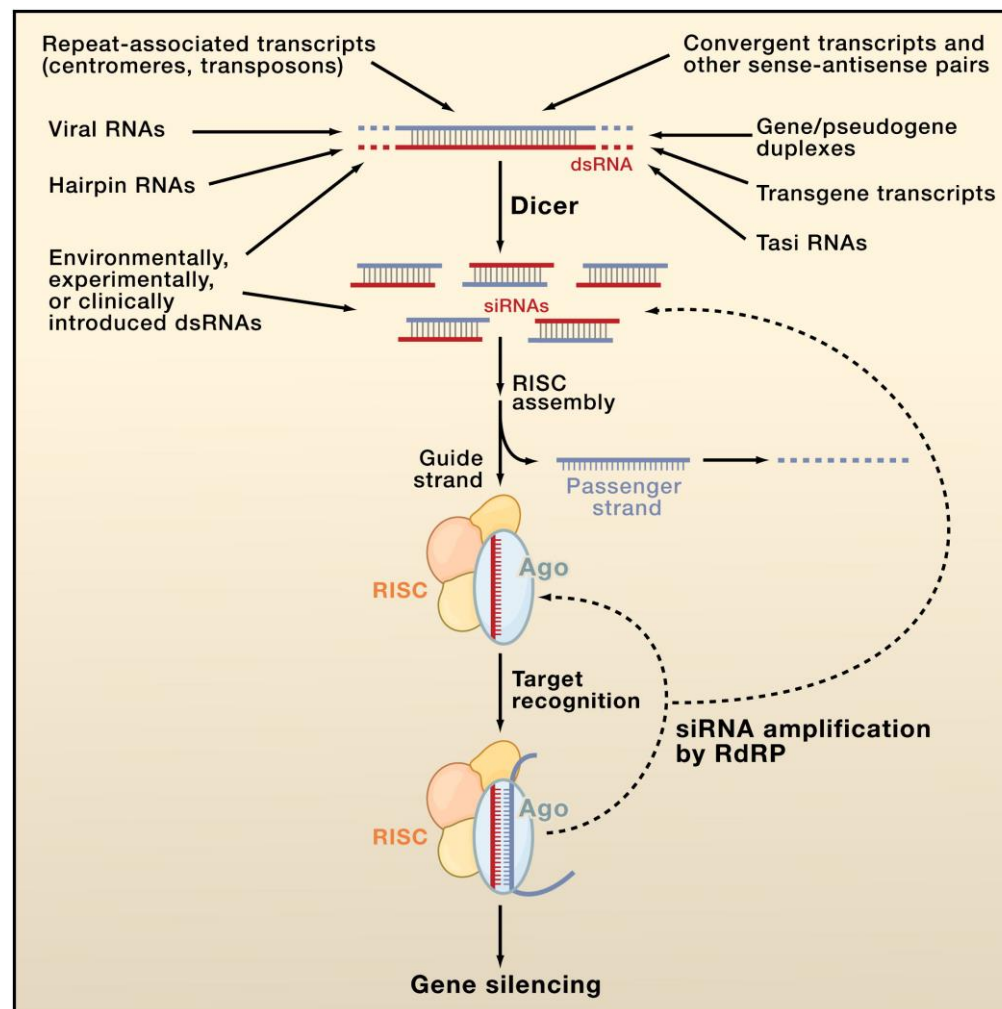


Figure 1. Classification of non-coding RNAs (ncRNAs). Housekeeping ncRNAs include; tRNAs-transfer RNAs, snRNAs-small nuclear RNAs, rRNAs-ribosomal RNAs, snoRNAs-small nucleolar RNAs. The regulatory ncRNAs consist of miRNAs-microRNAs, siRNAs-short interfering RNAs, piRNAs-piwi-interacting RNAs, and lncRNAs-long non-coding RNAs.

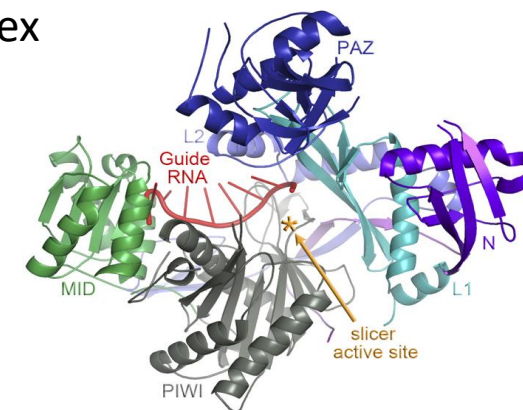
Klíčové momenty RNAi a genového umlčování

- Prekurzor - dsRNA
- Štěpení proteinovým komplexem DICER nebo DICER-like
- Sestavení RISC komplexu, vazba sRNA ARGONAUTE proteiny
- Vazba RISC na základě homologie
- Umlčení



RISC komplex

- PAZ
- PIWI
- AGO
- sRNA



Původ a rozdíl siRNA vs. miRNA

• siRNA

- Deriváty nezávislé na genomu (obsaženy vzácně)- mRNA, transponovatelné elementy, viry
- Vznik z dlouhých molekul RNA a jejich prodloužených sekund. RNA struktur
- Nespecifická produkce siRNA molekul (nespecifický prekurzor)
- Konzervativní oblasti poměrně vzácné, siRNA „auto-silencing“ efekt

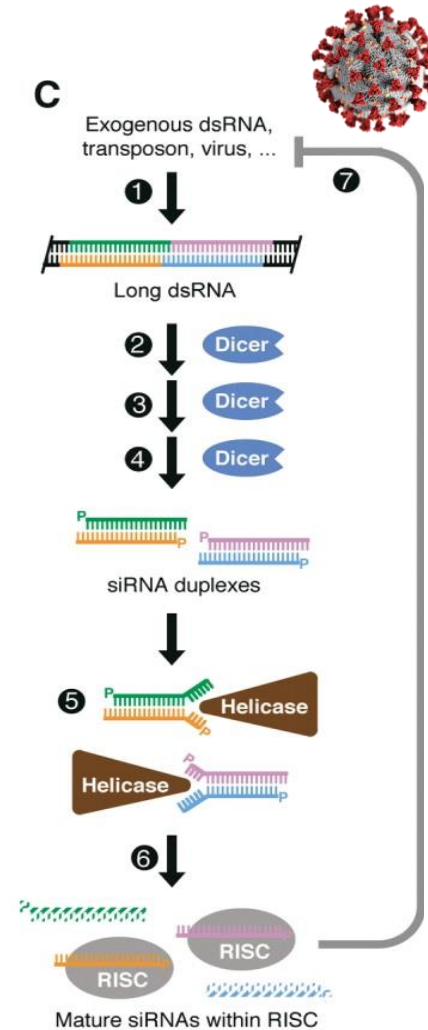
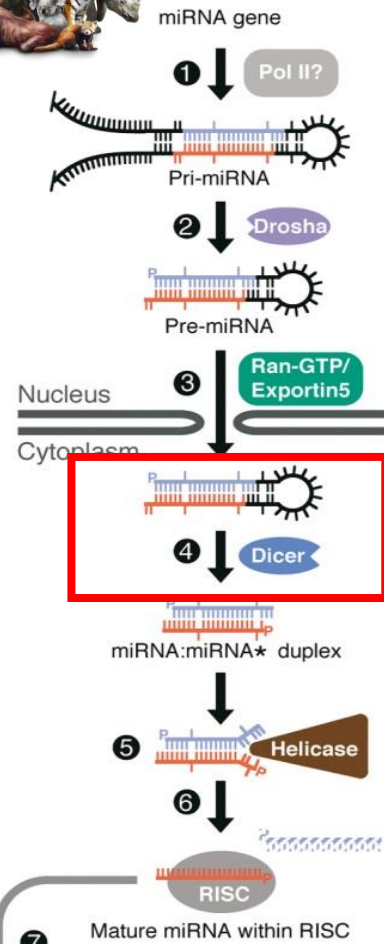
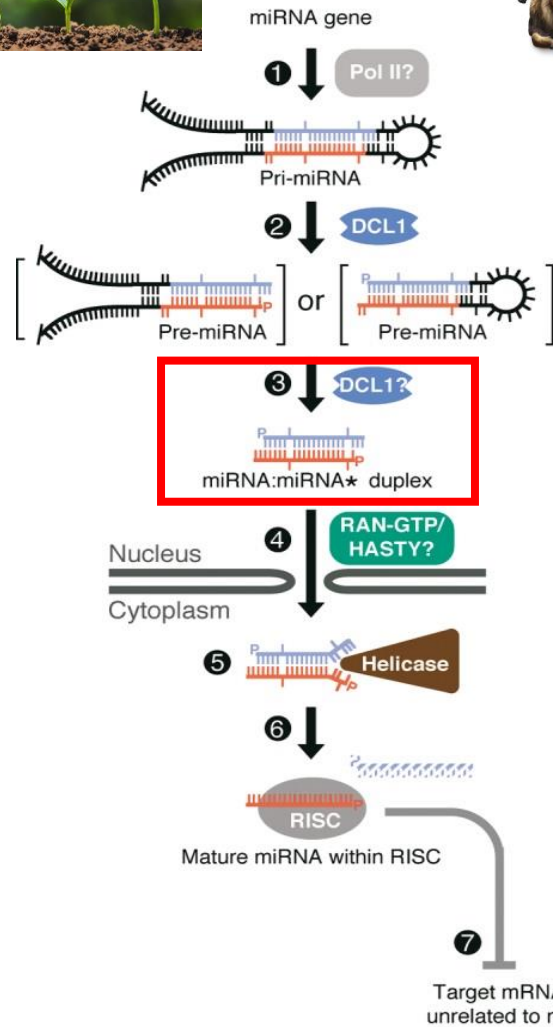
• miRNA

- Deriváty genomické RNA (obsaženy v genomu)
- Vznik z lokálních transkribovaných sekund. RNA struktur (vlásenka)
- Syntéza miRNA:miRNA duplexů
- Konzervativní genové oblasti příbuzných organismů
- miRNA „hetero-silencing“ efekt

Biogeneze miRNA

- Autonomní miRNA zahrnují ve svých produktech elementy potřebné pro regulaci a iniciaci transkripce
- Ostatní miRNA jsou závislé na svých pri-mRNA, u kterých probíhá „parazitický“ proces
- Syntézy nových krátkých úseků katalyzovány RNA polymerázou II a III
- Většina miRNA katalyzovaných pol RNA II a rovněž většina živočišných miRNA nemá typický signál pro polyadenylaci

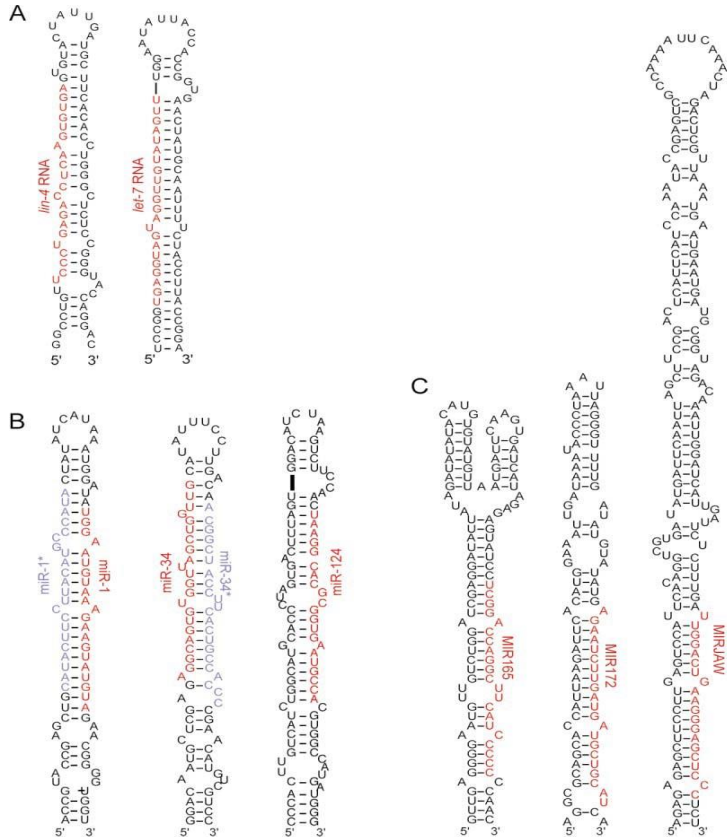
Základní rozdíl syntézy miRNA u rostlin a živočichů



Diverzita funkce sRNA

Živočichové

Rostliny



Bartel 2004

- Funkce v různých vývojových procesech, „micromanagement“ exprese

Table 2. MicroRNAs and Their Functions: Examples for which Strong Evidence for the Validity of the Regulatory Target Has Been Reported but the Phenotypic Consequences of Disrupted or Ectopic miRNA Regulation Are Not Yet Known

miRNA	Target Gene(s)	Biological Role of Target Gene(s)	Refs
Insects			
miR-7	<i>Dm HLHm3</i> basic HLH transcriptional repressor	Interprets Notch-mediated decisions in neuronal development	1,2
	<i>Dm hairy</i> basic HLH transcriptional repressor	Interprets Notch-mediated decisions in neuronal development	2
	<i>Dm m4</i> Brd family protein	Interprets Notch-mediated decisions in neuronal development	2
miR-14 family	<i>Dm grim</i> antagonist of caspase inhibitor	Promotes apoptosis	2
	<i>Dm reaper</i> antagonist of caspase inhibitor	Promotes apoptosis	2
	<i>Dm sickle</i> antagonist of caspase inhibitor	Promotes apoptosis	2
Mammals			
miR-1	<i>Hs</i> Brain-derived neurotrophic factor (<i>BDNF</i>)	Growth factor; neuronal development	3
	<i>Hs</i> Glucose-6-phosphate dehydrogenase (<i>G6PD</i>)	Oxidative stress resistance	3
miR-19a	<i>Hs</i> PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase (<i>PTEN</i>)	Tumor suppressor gene	3
miR-23a	<i>Hs</i> Stromal cell-derived factor 1 (<i>SDF-1</i>)	Growth & localization of hematopoietic progenitor cells	3
	<i>Hs</i> <i>BRN-3b</i> POU-domain transcription factor	Neuronal development	3
miR-26a	<i>Hs</i> <i>SMAD-1</i> transcriptional co-modulator	Regulates TGF-dependent gene expression	3
miR-34	<i>Hs</i> <i>Delta1</i> transmembrane protein	Activates Notch during cell-fate decisions	3
	<i>Hs</i> <i>Notch1</i> transmembrane receptor for Delta	Cell-fate decisions during development	3
miR-101	<i>Hs</i> <i>ENX-1</i> polycomb gene	Proliferation of hematopoietic cells and other gene regulation	3
	<i>Hs</i> <i>N-MYC</i> basic HLH transcription factor	Proto-oncogene; cell differentiation & proliferation	3
miR-130	<i>Hs</i> Macrophage colony stimulating factor-1 (<i>MCSF</i>)	Mononuclear phagocytic lineage regulation	3
Plants			
miR170/171	<i>At</i> <i>SCL6-III, -IV</i> & related transcription factors	Related to genes for root radial patterning	4-7
miR156/157	<i>At</i> <i>SPL2</i> & related transcription factors	Related to genes for floral meristem identity	6,8
miR160	<i>At</i> <i>ARF10, ARF17</i> & related transcription factors	Related to genes for auxin response & development	6,8
miR167	<i>At</i> <i>ARF8</i> & <i>ARF6</i> transcription factors	Related to genes for auxin response & development	6,8,9
miR164	<i>At</i> <i>CUC1, CUC2</i> & related transcription factors	Shoot apical meristem formation & organ separation	6,8
miR169	<i>At</i> <i>CBF-HAP2</i> DNA-binding proteins	unknown	6
miR162	<i>At</i> <i>DCL1</i> Dicer-like RNase III	miRNA biogenesis	10,11

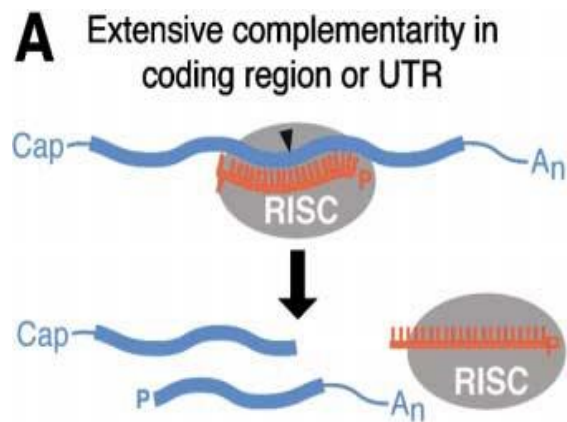
The metazoan regulatory targets listed were predicted computationally then supported experimentally. The plant regulatory targets listed were predicted computationally then supported with independent phylogenetic and/or experimental evidence. Species abbreviations: *Drosophila melanogaster*, *Dm*; human, *Hs*; *Arabidopsis thaliana*, *At*.

Specifikace exprese miRNA

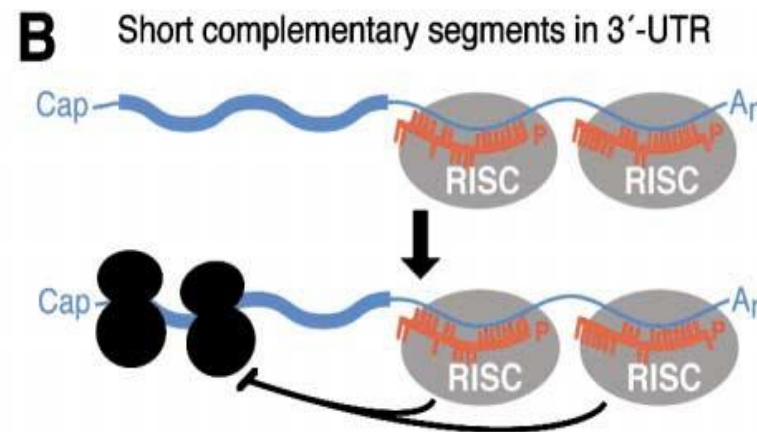
- Různé hladiny regulace genové exprese miRNA zajišťující dokonalý systém kontroly de-novo vzniklých transkripčních jednotek
- Zavislá na druhu buňky, momentální úlohy a vývojového stádia
- Počet jednotlivých miRNA v daném stavu buňky ovlivněn mírou exprese daného lokusu a tvorby pri-/pre-mRNA (50 000 molekul miR-2, miR-52 x 800 molekul miR-124)
- Vysoká x nízká úroveň exprese na počet buněk (vysoká exprese důsledkem specializace pouze několika málo buněk, nízká produkce na úrovni např. celého organismu)

Molekulární mechanismus funkce RISC - dvě cesty regulace genové exprese

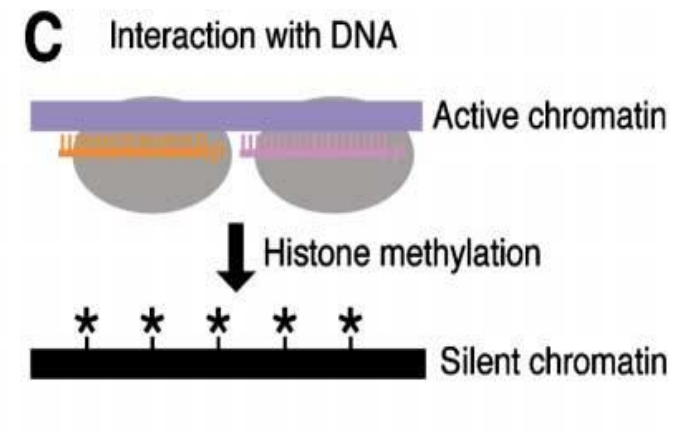
- Na úrovni mRNA – RISC komplex a štěpení RNA nebo regulace na úrovni translace (neúplná komplementarita)
- Na úrovni DNA – methylace DNA, inaktivace chromatinu



mRNA specifické štěpení



regulace na úrovni translace

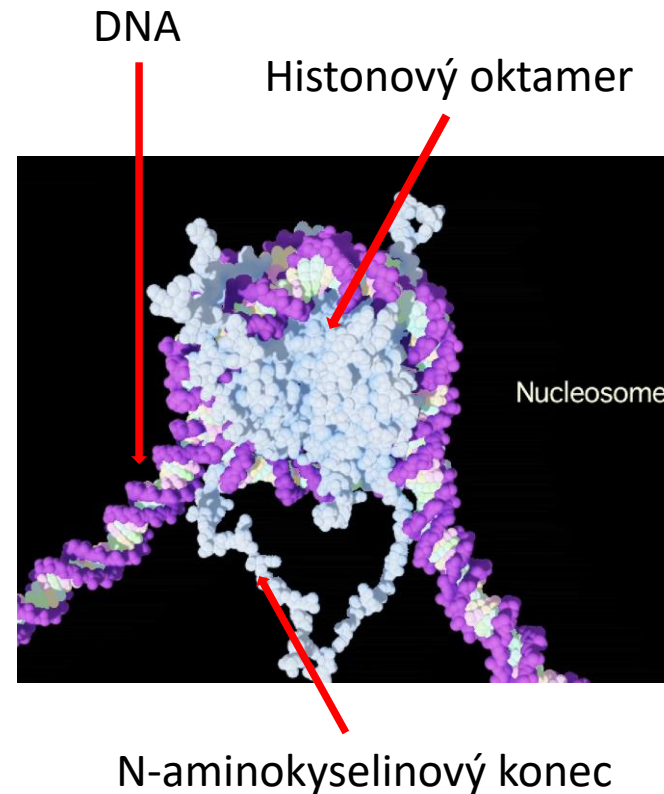
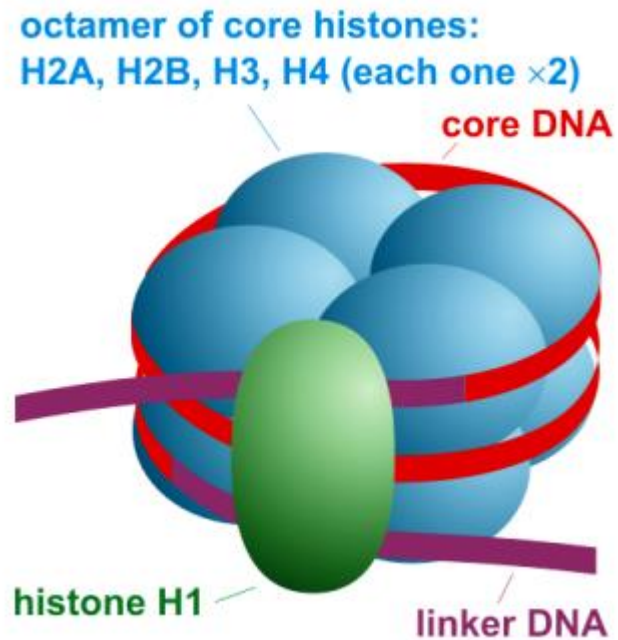


vazba na DNA (methylace)

Mechanismy

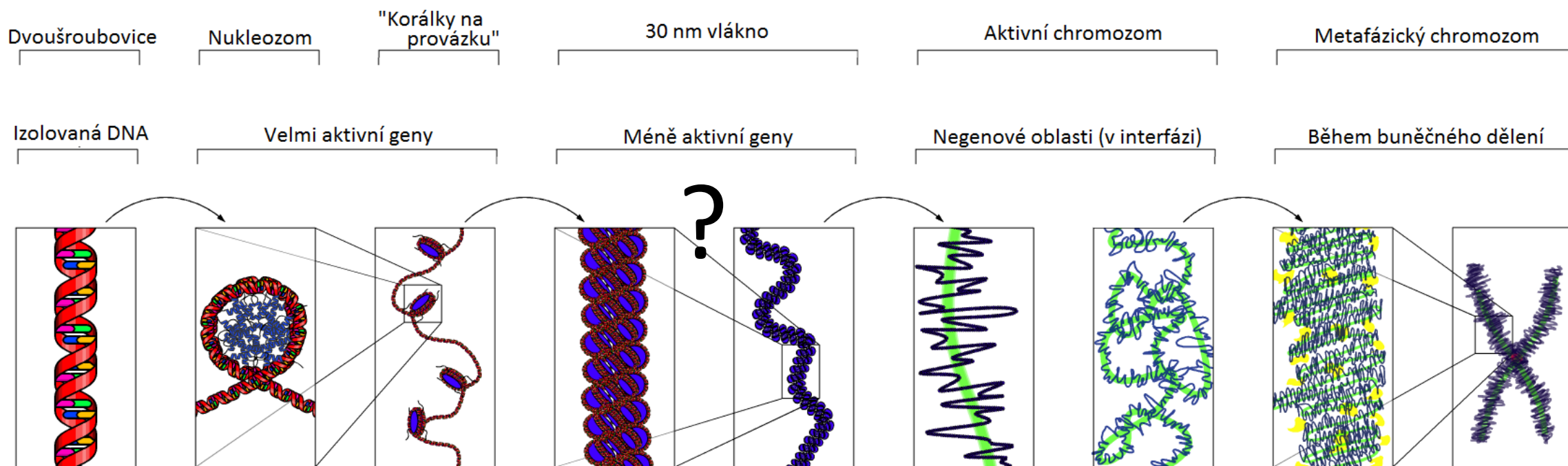
- DNA methylace
- RNA interference
- Histonové modifikace

Chromatin a DNA - struktura



- DNA+histony (H2A, H2B, H3, H4)= chromatin
- Chromatin umožňuje svinutí DNA do jádra
- Vyšší organizace chromatinu ovlivňuje regulaci genové exprese a přístupnost transkripčních nebo DNA reparačních proteinů

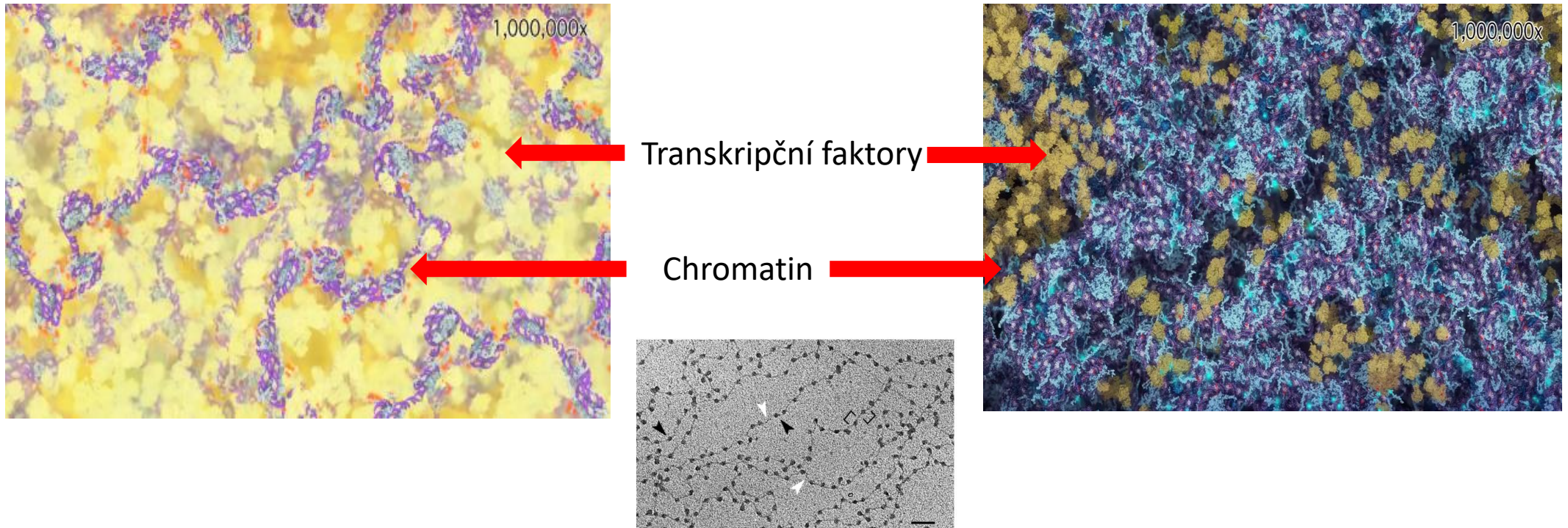
Vyšší organizace chromatinu



Vyšší organizace chromozomu záleží kromě dalších faktorů na kontaktech H1

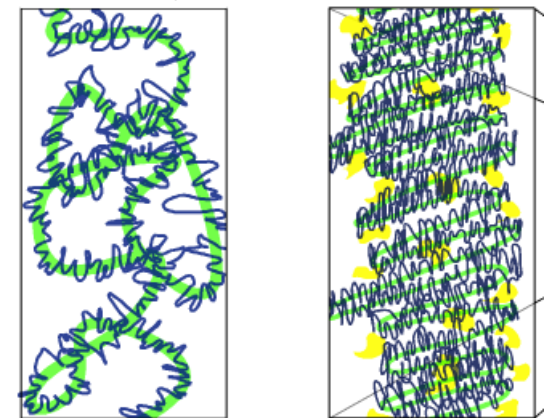
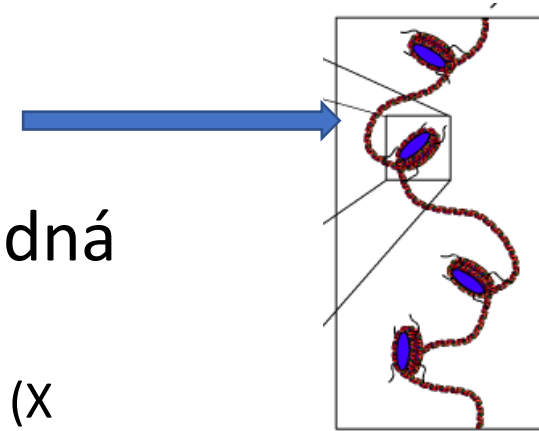
Struktura chromatinu ovlivňuje transkripci

- Více sbalený chromatin – DNA je méně přístupná transkripčním faktorům
- Volný chromatin – DNA je dostupná pro transkripční faktory = genová exprese



Heterochromatin vs. euchromatin

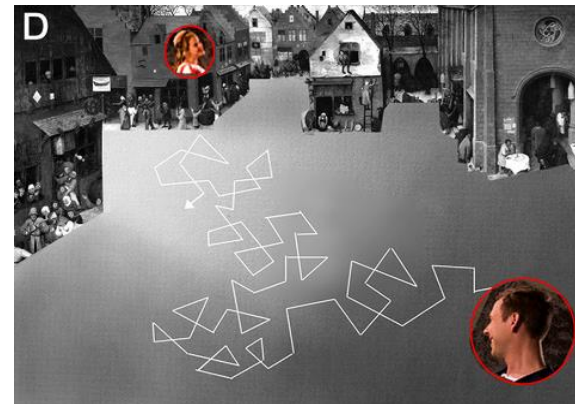
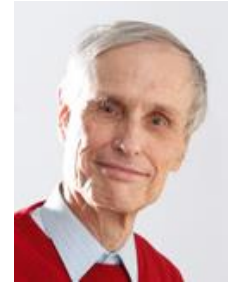
- Euchromatin – otevřený, méně kondenzovaný
- Heterochromatin – kondenzovaný, nízká nebo žádná genová exprese
 - Fakultativní – liší se na typu buňky nebo časové organizace (X inaktivace, specifické geny aj.)
 - Konstitutivní – kondenzovaný chromatin ve všech buňkách
 - Centromery, telomery, část Y chromozomu
- Genové umlčování, udržení integrity genomu (5mC, represivní histonové modifikace)
 - Centromery, telomery, část Y chromozomu



→Nedostatečná nomenklatura z hlediska epigenetiky a významu jednotlivých modifikací!

Synapse epigenetických modifikací a organizace chromatinu

- Thomas a Christoph Cremer – 2020 „ functional nuclear organization depends on still unexplored movements of genes and regulatory sequences between ANC and INC“

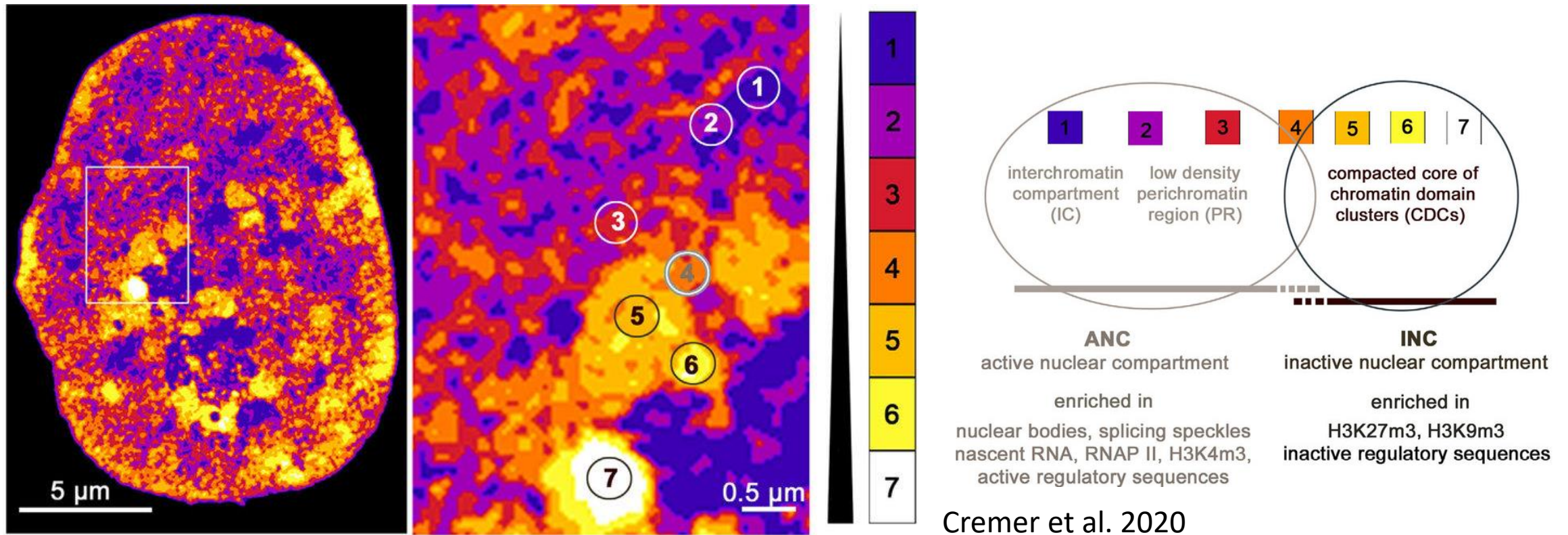


ANC – aktivní jaderné komponenty



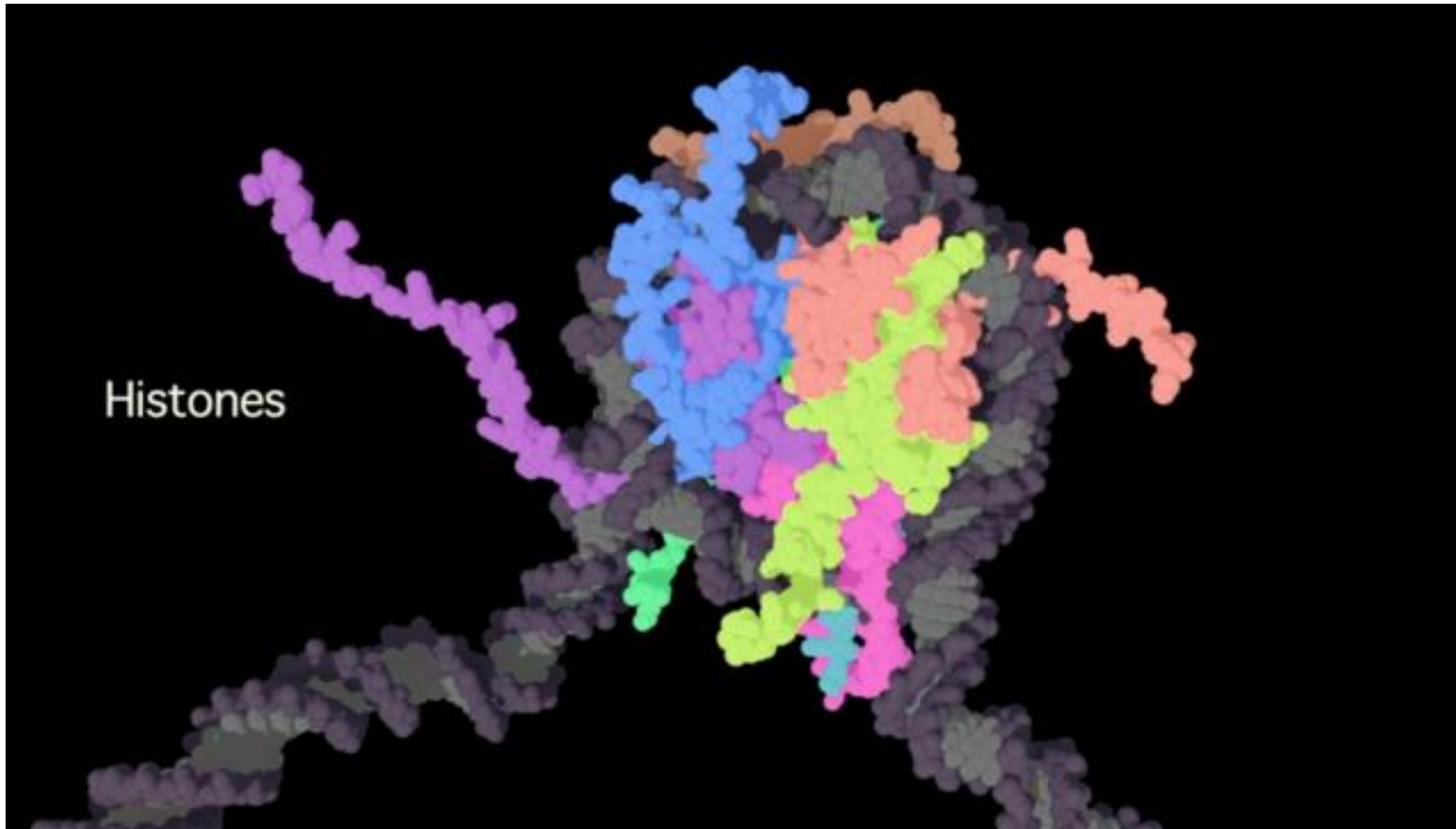
INC – inaktivní jaderné komponenty

Vztah mezi organizací chromatinu a epigenetickými modifikacemi



- 3D rekonstrukce DAPI barvených jader a intezita ve vztahu k aktivním a represivním modifikacím

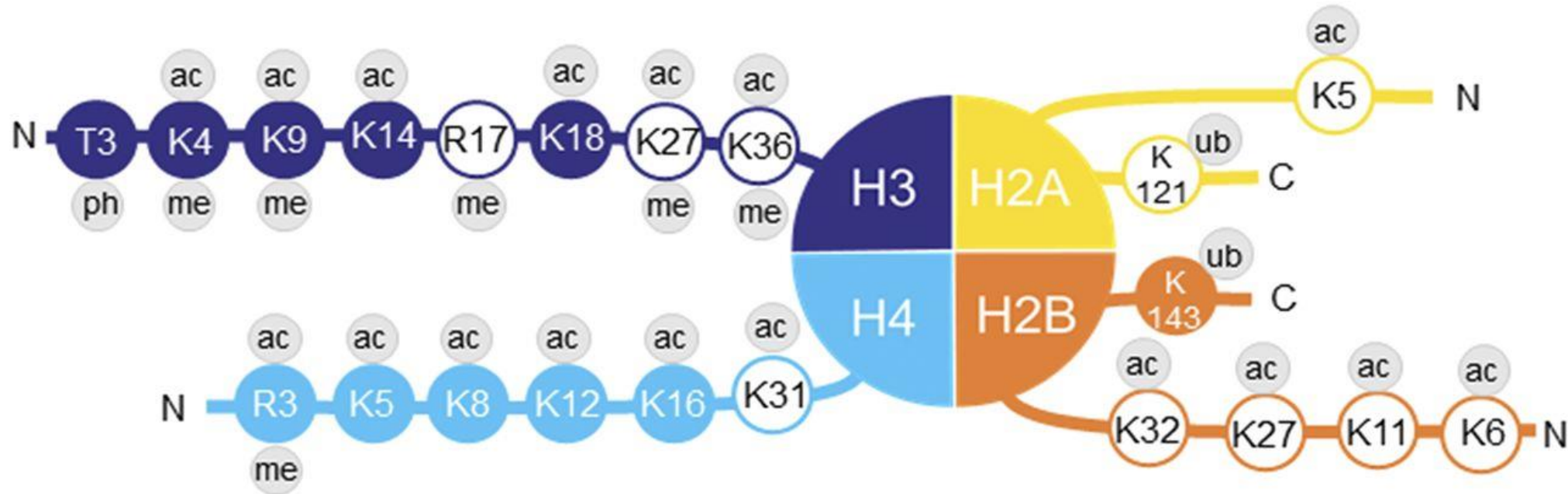
Úloha histonových modifikací



- Většina modifikací na N-terminálních koncích
- Více než 50 AA může být modifikováno, více než jedním typem modifikace (me1/me2/me3)
- Převážně H3, H4 (nejvíce prostudovány), méně H2A a H2B
- Kombinace umocněny **kombinatoriální komplexitou = histonový kód**

The Walter and Elizabeth Hall Institute of Medical Research

Histonové modifikace tvoří významnou část genové regulační dráhy



Active marks

Histone acetylations, H2Bub
H3K4me3, H3K36me2/3

Repressive marks

H3K9me2/3, H3K27me3, H3T3ph,
H2Aub, symmetric H4R3

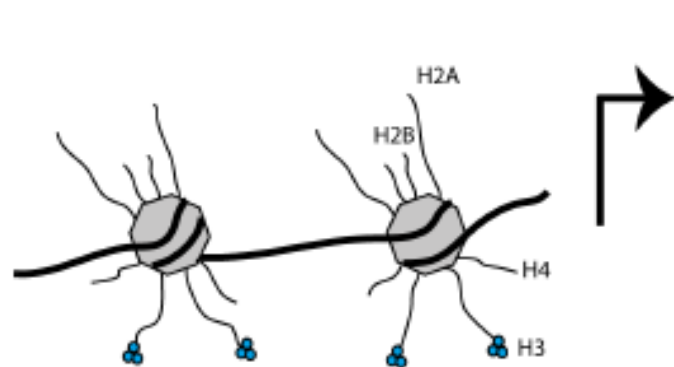
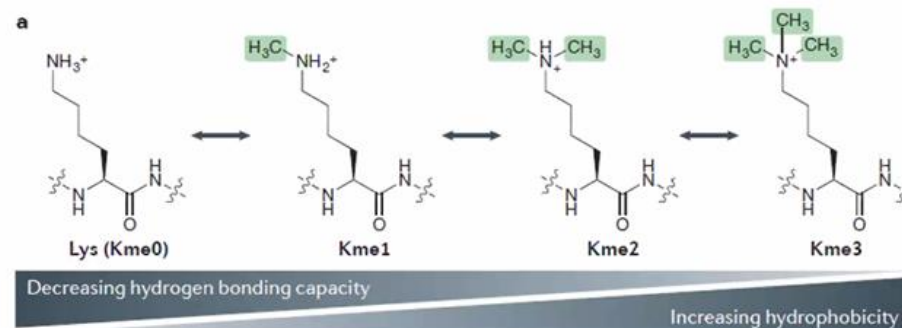


Druhově specifická funkce a distribuce a

Diverzita histonových modifikací a jejich funkce

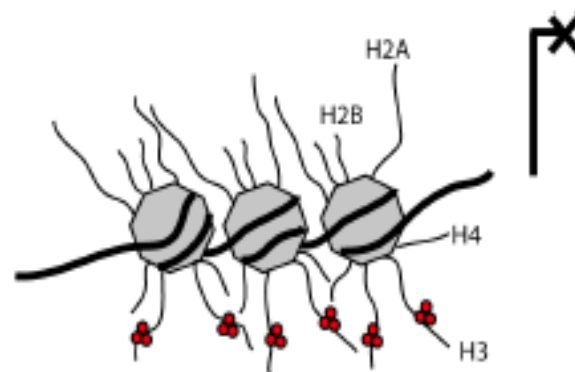
Histone modification	Which residues?	Functions
Methylation (me, mono, di or tri me)	Lysines (K) and Arginines (R)	Transcription, Repair (K)
Acetylation (ac)	K	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Ubiquitination (ub)	K	Transcription
Sumoylation (su)	K	Transcription
ADP-ribosylation	Glutamate (E)	Transcription
Phosphorylation (Ph)	Serine (S) and Threonine (T)	Transcription, Repair, Condensation
Citrullination (Cit)	R converts to Cit	Transcription

Histone (lysine) methylation



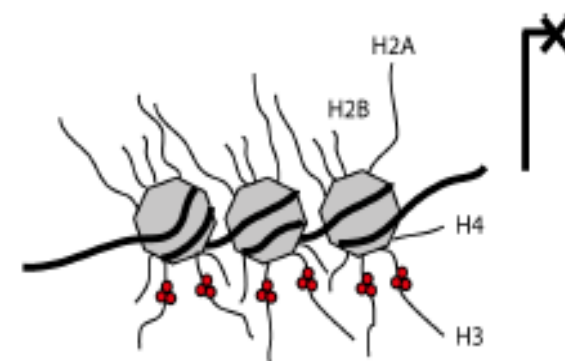
H3K4me

- aktivní modifikace
- Promotorová oblast a exony



H3K9me

- Inaktivující modifikace
- v genových oblastech nebo konstitutivní heterochromatin



H3K27me

- Inaktivující modifikace,
- V genových oblastech nebo konstitutivní heterochromatin
- H3K27me3 důležitá pro regulace vývojových genů u rostlin i živočichů

Methylace H3 závisí na velikosti genomu a druhové diverzitě

H3K4me

=všechny kombinace mají u rostlin i živočichů většinou aktivující charakter

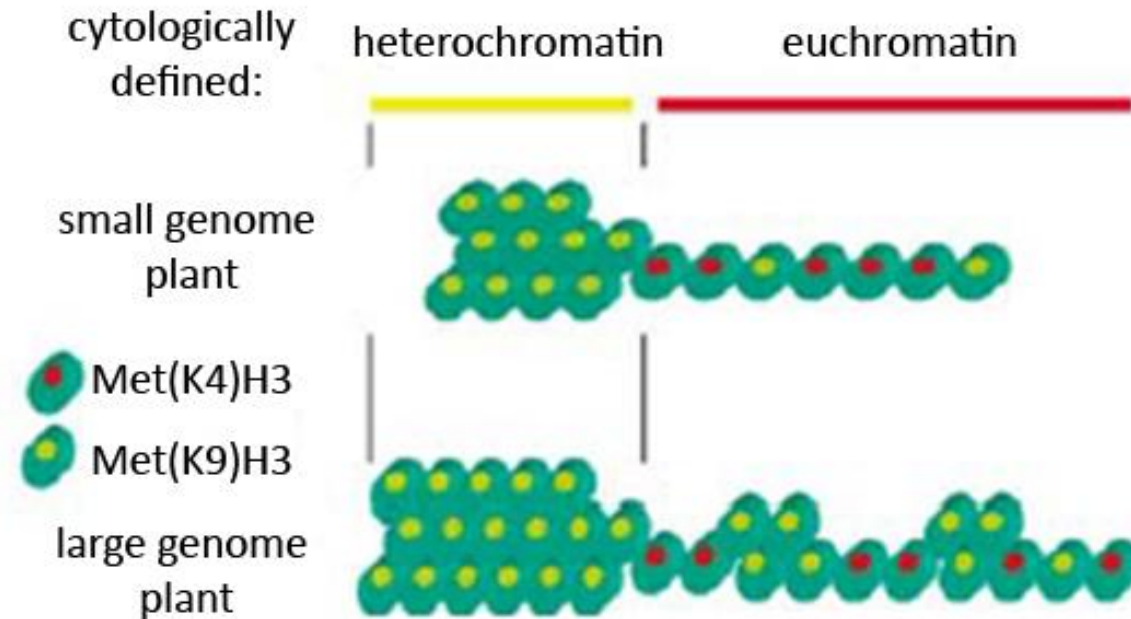
H3K9me1, H3K9me2,

H3K27me1

=značky inaktivního chromatinu

H3K27me2/me3

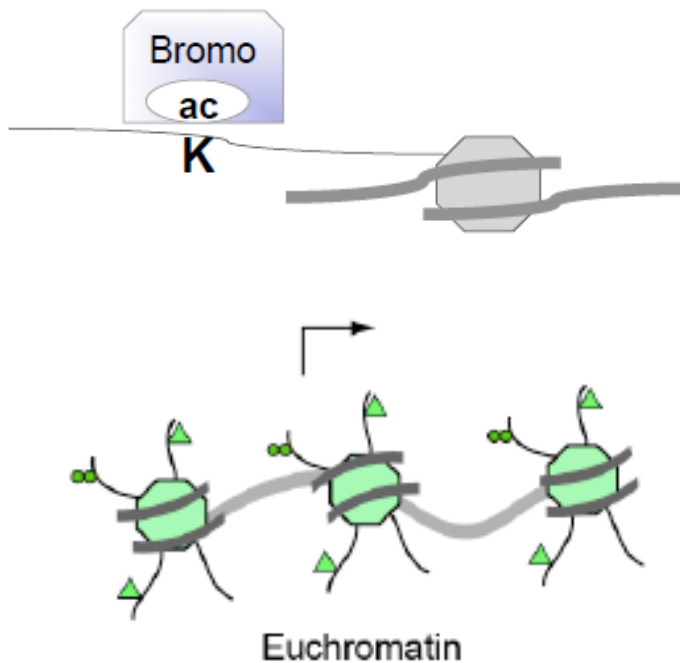
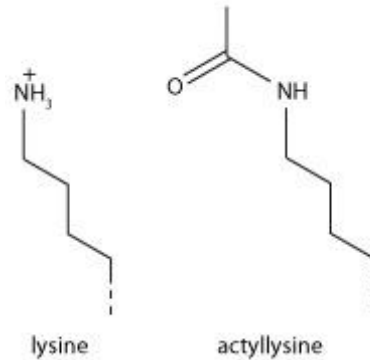
=druhově specifické, spíše inaktivující charakter



Houban *et. al.* 2003

•Velikost genomu >500 Mb vede ke změně distribuce aktivních a represivních modifikací!

Acetylace



- Koreluje spíše s genovou aktivitou (např. H3K9ac)

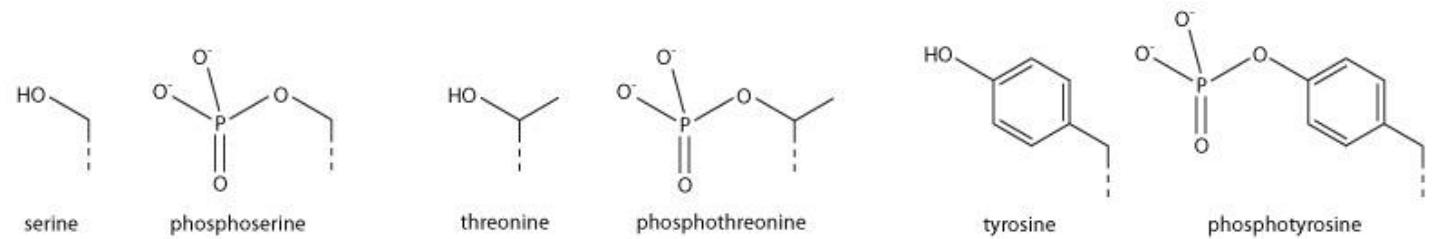
- Redukuje pozitivní náboj histonových aminokyselin = DNA je více dostupná pro další enzymy

- Spekulativní jako epigenetická modifikace, spíše chromatinová modifikace

- Některé ac-skupiny postrádají mitotickou dědičnost, závislé na např. na cirkadiánní rytmu

- Velice proměnlivé

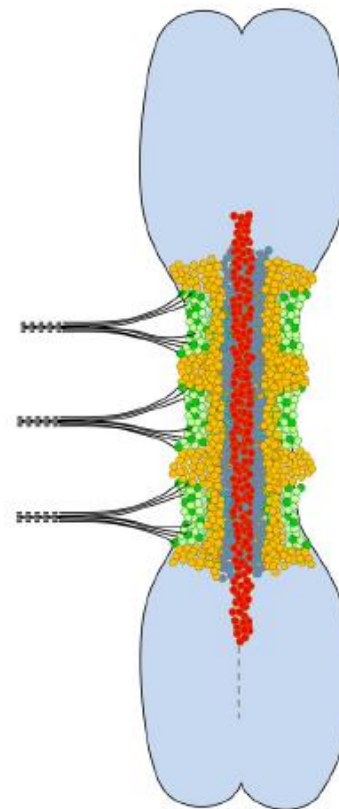
Fosforylace



- Nejvíce prostudovaná modifikace, z hlediska centromer

- V závislosti na umístění = rozličná funkce

- Závislá na buněčné cyklu, důležitá pro kondenzaci chromatinu



CenH3-1
CenH3-2
H3T3ph
H3S28ph
H2AT120ph
tubulin

H3S10ph(+H3S28ph)
V oblasti pericentromer
(opak u živočichů -
H3T3ph and H3T11ph)

H3At108(120)ph
Vnitřní část centromery

Neumann *et. al.* 2016

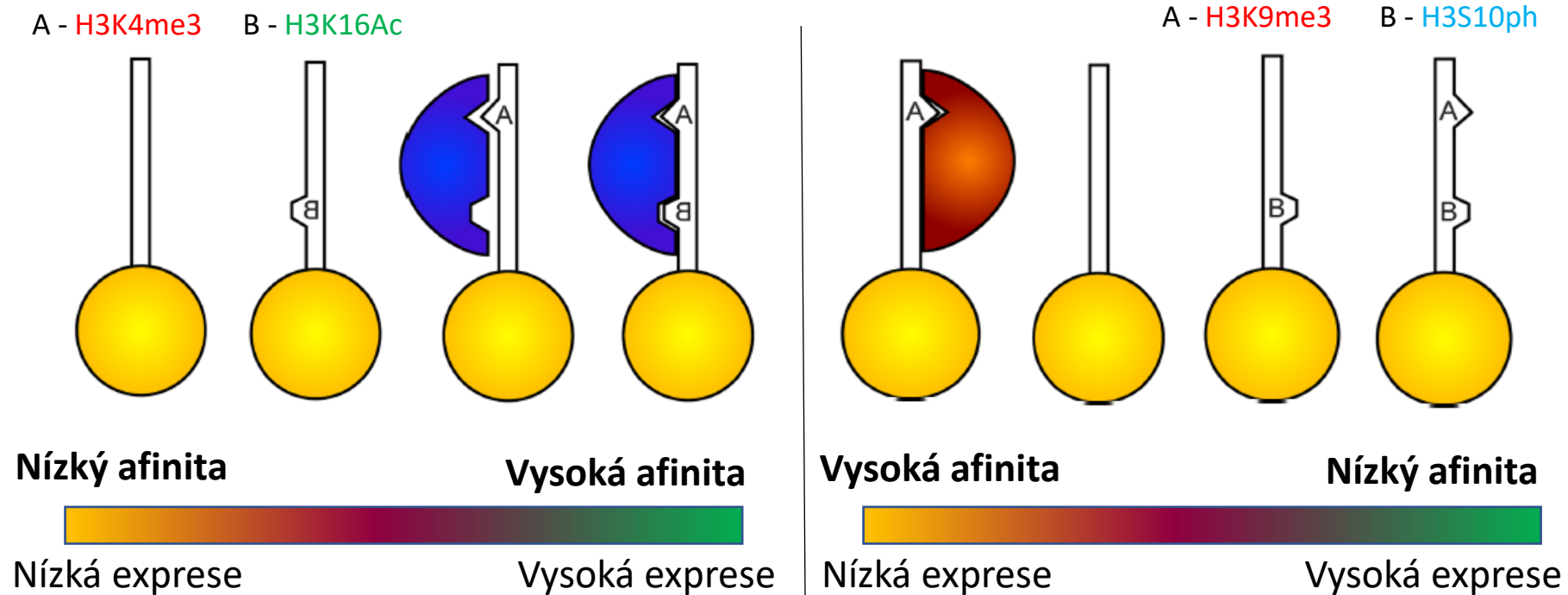
H3S10ph

H3T11ph



Fuchs *et. al.*
2012

Molekulární evidence kombinatoriální komplexity



BPTF
(„Nucleosome-remodeling factor subunit“)

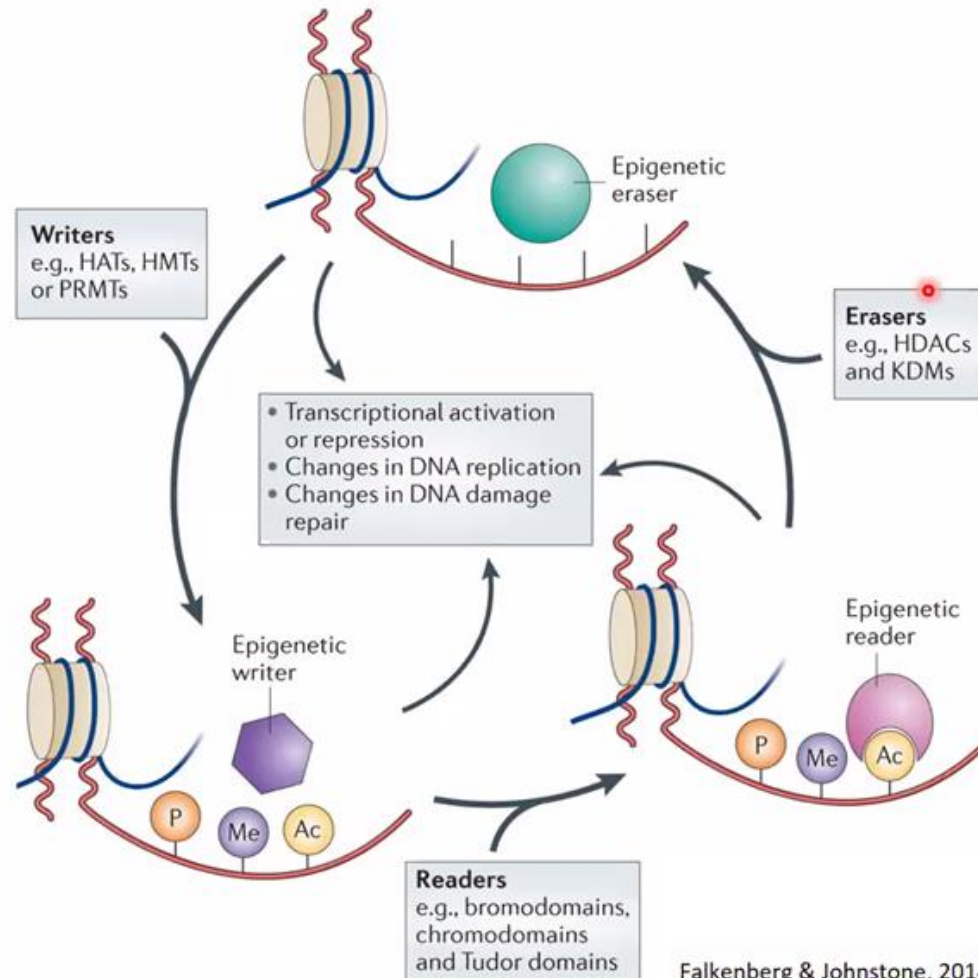
HP1
(heterochromatin protein, důležitý pro vazbu DNMT1)

Rando 2012

U Arabidopsis, CMT3 (CHH methylace) se preferenčně váže k dimeru H3K9me3H3K27m3.

„Writers, erasers and readers“

Acetyltransferázy
Methyltransferázy
Kinázy
Ubiquitinázy

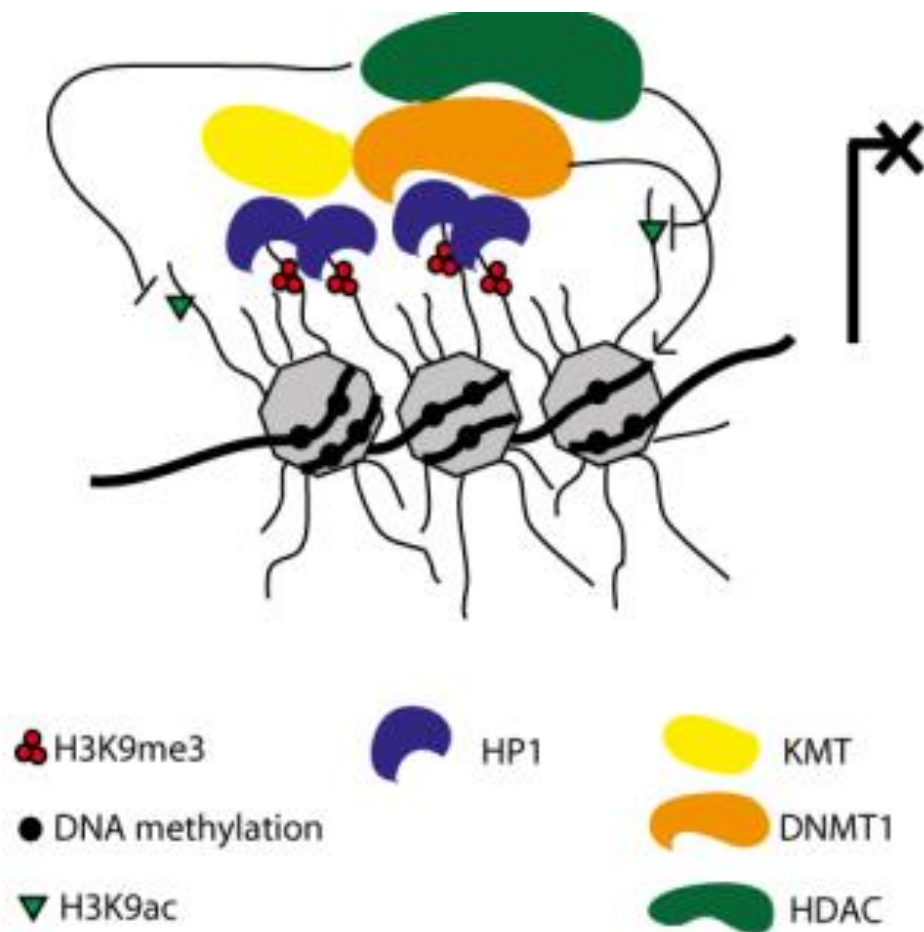


Deacetylázy
Demethylázy
Fosfatázy
Deubiquitinázy

→ Rozpoznání specifických histonových značek

→ Vazba dalších remodelujících proteinů a chromatin-modifikujících enzymů (změna funkce a architektury chromatinu-Swi, ISWI...)

Neznámá hierarchie jednotlivých faktorů

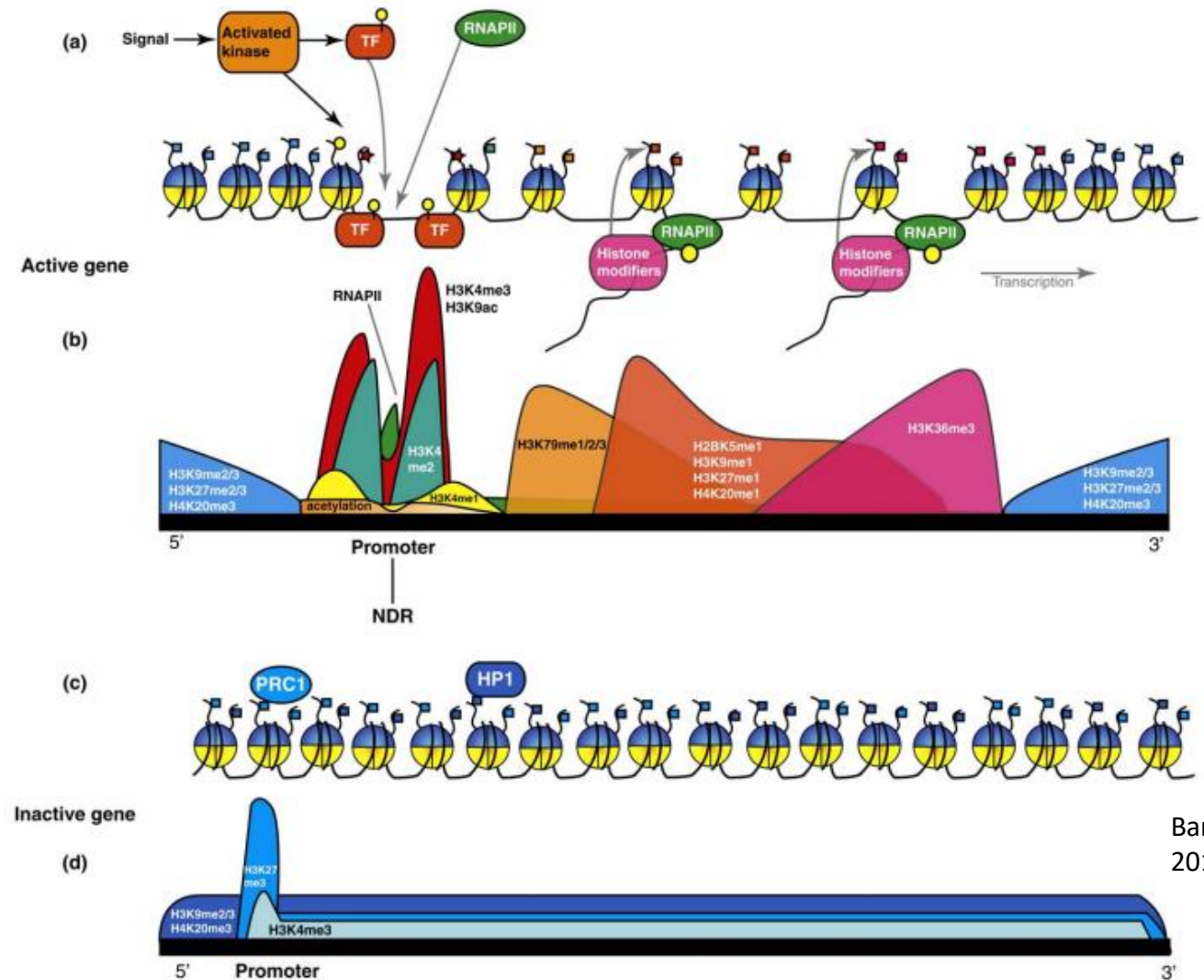


- HP1 vazba na H3K9me3
- HP1 vazba s DNMT
- HP1 vazba HMT a šíření H3K9me3
- DNMT může vázat HDAC

=není jasné, které elementy jsou na vyšší regulační úrovni

Distribuce histonových modifikací v genových oblastech

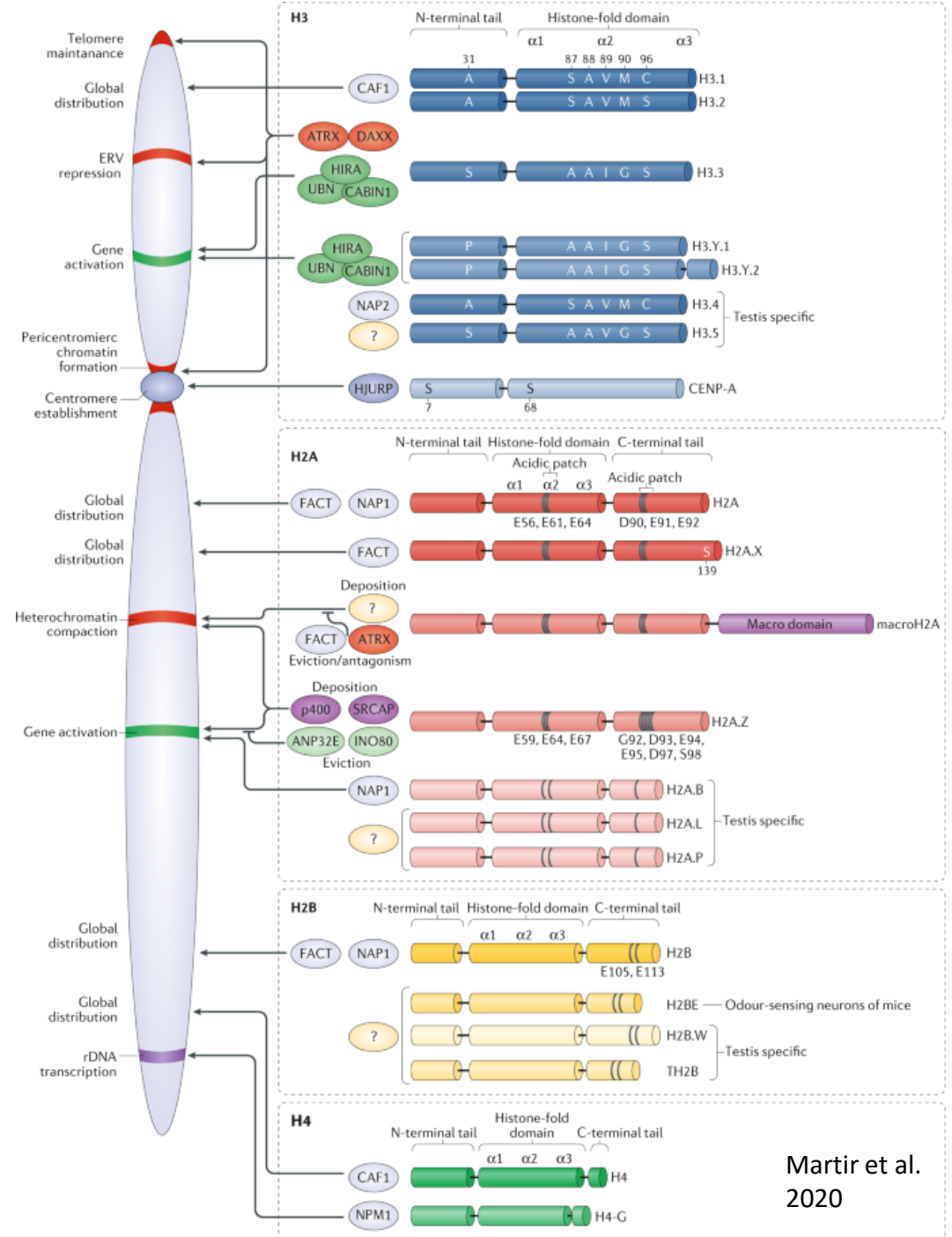
- H3K27me3 – modifikace typická pro genovou inaktivitu (vývojové geny)
- H3K4me2/me3 a H3K9ac – značky typické pro genovou expresi a aktivitu (promotor)
- H3K36me3 – značka typická pro genovou expresi (exony)



Bart et al.
2010

Diverzita histonových variant a změna struktury chromatinu

- Různé varianty H2A, H3, H4
- Každá varianta obsahuje specifické AA, měnící jejich funkci
 - Zvýšená stabilita
 - Výskyt AA, které mohou být modifikovány
 - Úloha v reparačních mechanismech, funkce centromer



Vybrané specifické varianty a jejich funkce

Histone	Variant			Functional association
	Mammals	Yeast	<i>Drosophila</i>	
H3	H3.1	–	–	S-phase subtypes
	H3.2	–	–	S-phase subtypes
	H3.3	H3.3	H3.3	Transcriptionally active regions
	Cenp-A	Cse4	Cid	Centromeric nucleosomes
H2A	H2A.Z	Htz1	H2Av ^a	Different functions in various organisms: maintenance of pericentric and telomeric heterochromatin, transcriptional activation and viability
	H2A.X	H2A	H2Av ^a	Sex body in mammals, site of DNA double stranded breaks; condensation and silencing of male sex chromosome
	MacroH2A	–	–	Inactivation of X-chromosome, interferes with both transcription factor binding and SWI/SNF remodelling
	H2A.Bbd	–	–	Close spacing of nucleosomes

^a*Drosophila melanogaster* has a single H2A variant, H2Av, in addition to the major H2A. H2Av is not only a member of H2A.Z family, it also contains an SQ motif similar to mammalian H2A.X. It is phosphorylated at Ser137 and hence it is a functional homologue of H2A.X.

Děkuji za pozornost!