Epigenetika 15

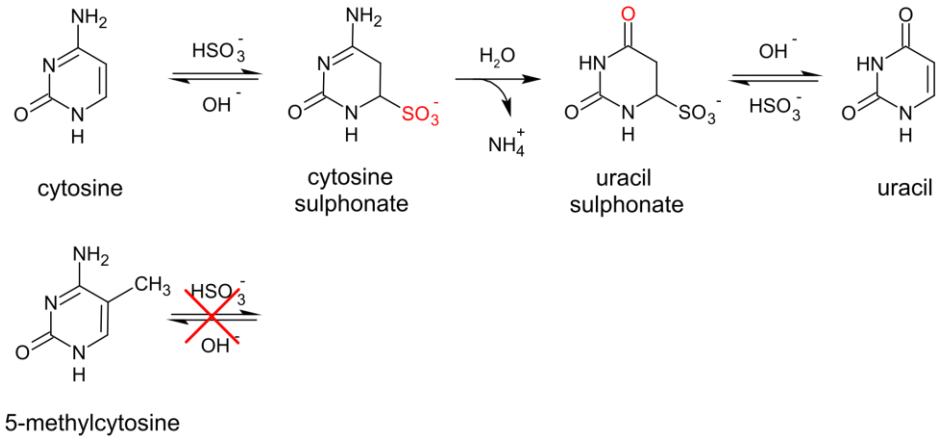
Metody

Obecné rozdělení

- **DNA methylační analýza**
  - Bisulfitové sekvenování, MSAP….
- DNA-protein interakce
  - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
  - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika

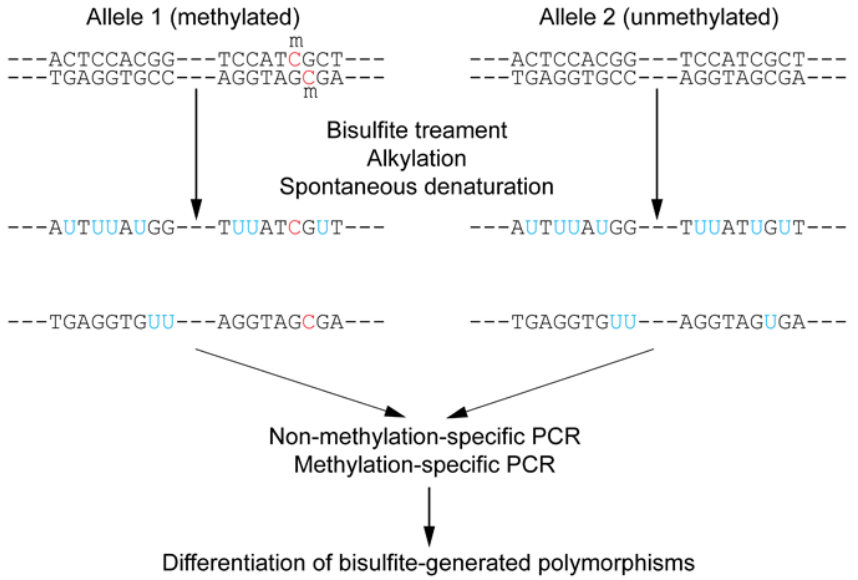
Bisulfitové sekvenování

- Působení hydrogensiřičitanu na cytosin=konverze na U (methylované C zůstávají stejné)

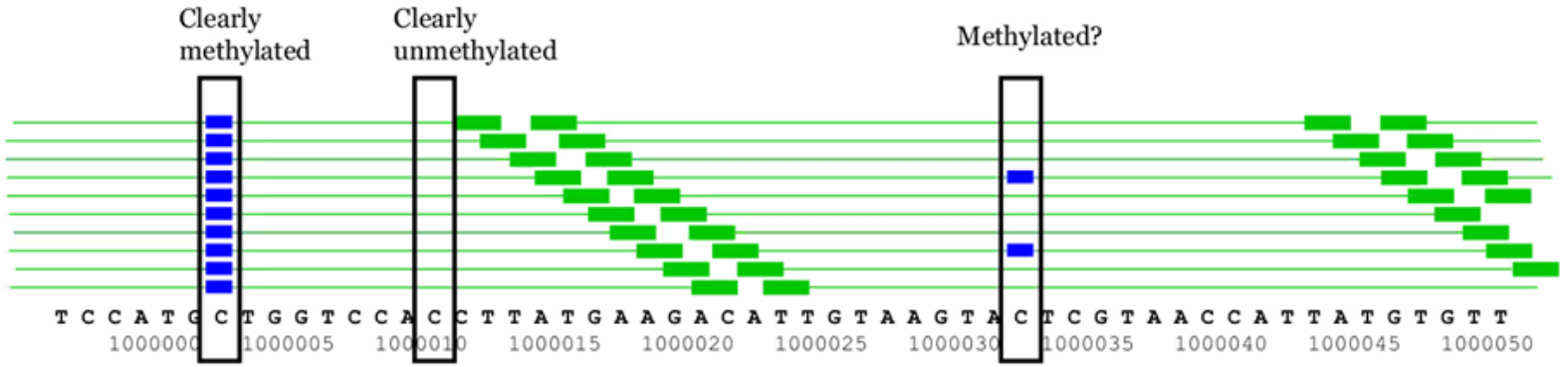


- Nutné porovnání proti referenční sekvenci, kterou analyzujeme

- Pro detekci ostatních modifikací (hmC, caC, fC) jsou nutné specifické reakce-konvenční bisulfitové sekvenování nerozlišuje mC a hmC a caC/fC od nemethylovaného C

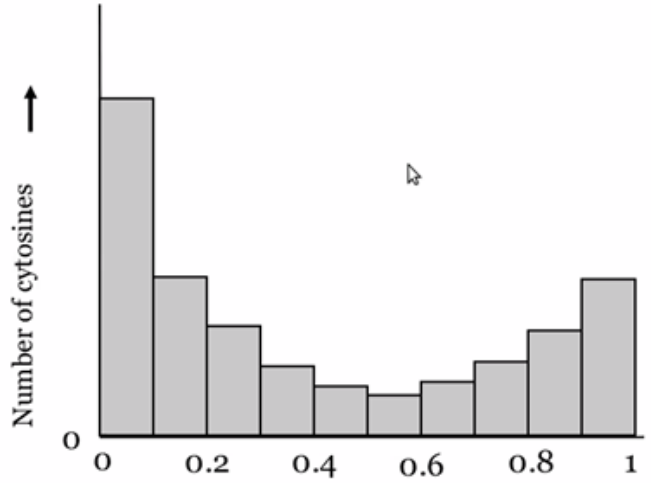


Výstup bisulfitového sekvenování

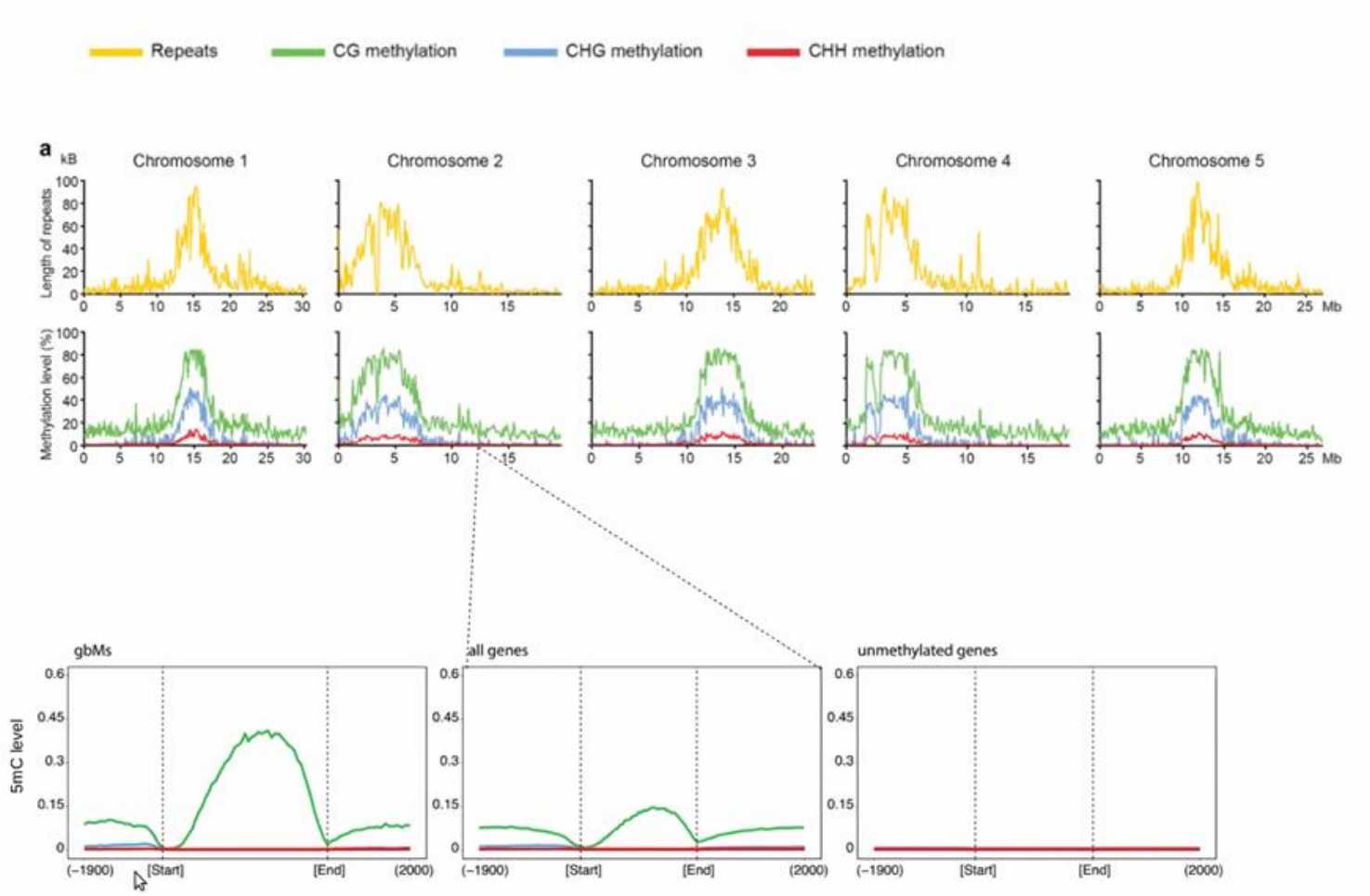


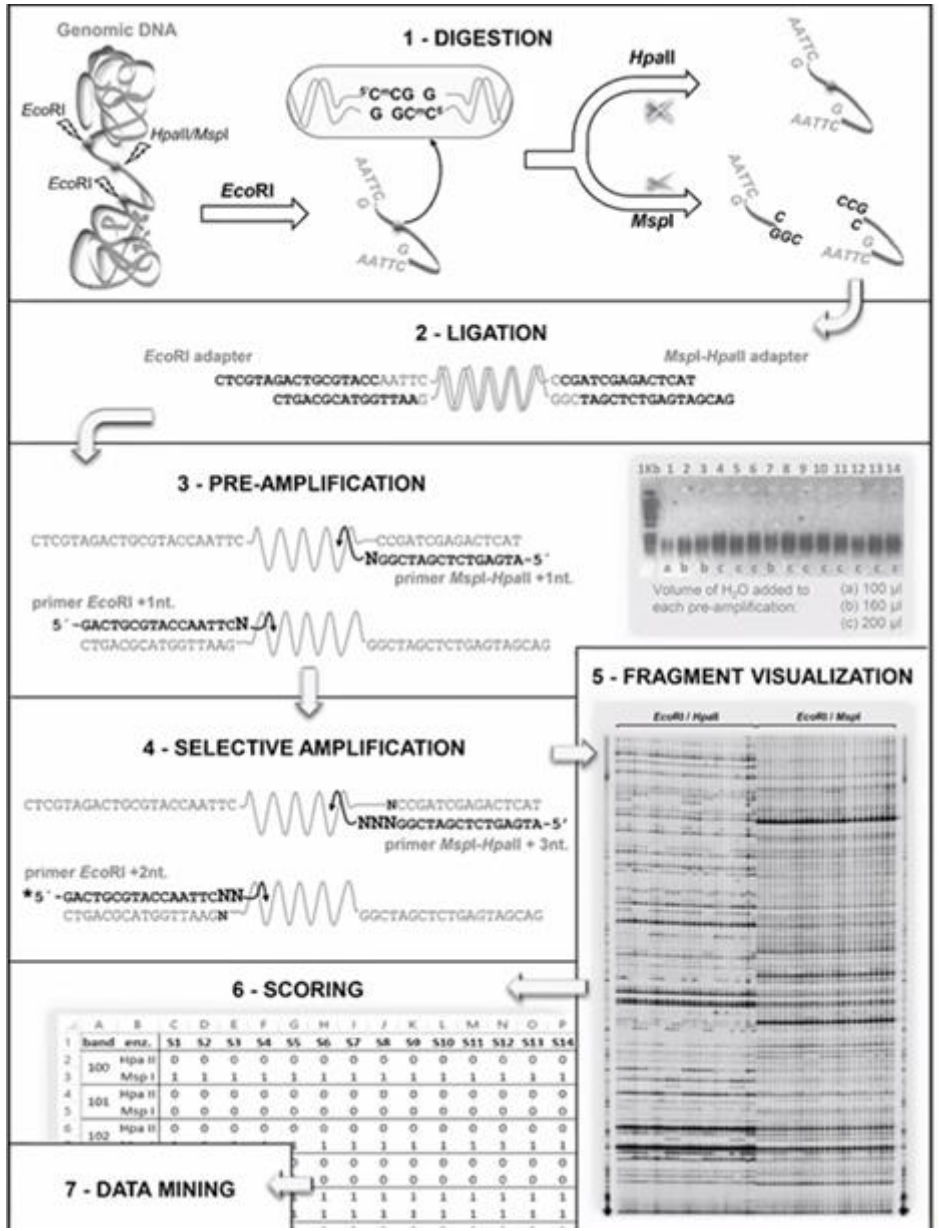
Methylation level of a cytosine =

$$\frac{\text{Number of reads methylated}}{\text{Total number of reads (coverage)}}$$



Vytváření methylomových map





MSAP

- **Pre-selektivní PCR amplifikace**
  - Ligace se specifickými primery
- **Selektivní PCR amplifikace**
  - Amplifikace specifických produktů
- **PCR produkt screening**
  - PAA nebo kapilárová elektroforéza
- **Výsledek**
  - Získání DNA methylace analyzovaných vzorků

MSAP+NGS technologie

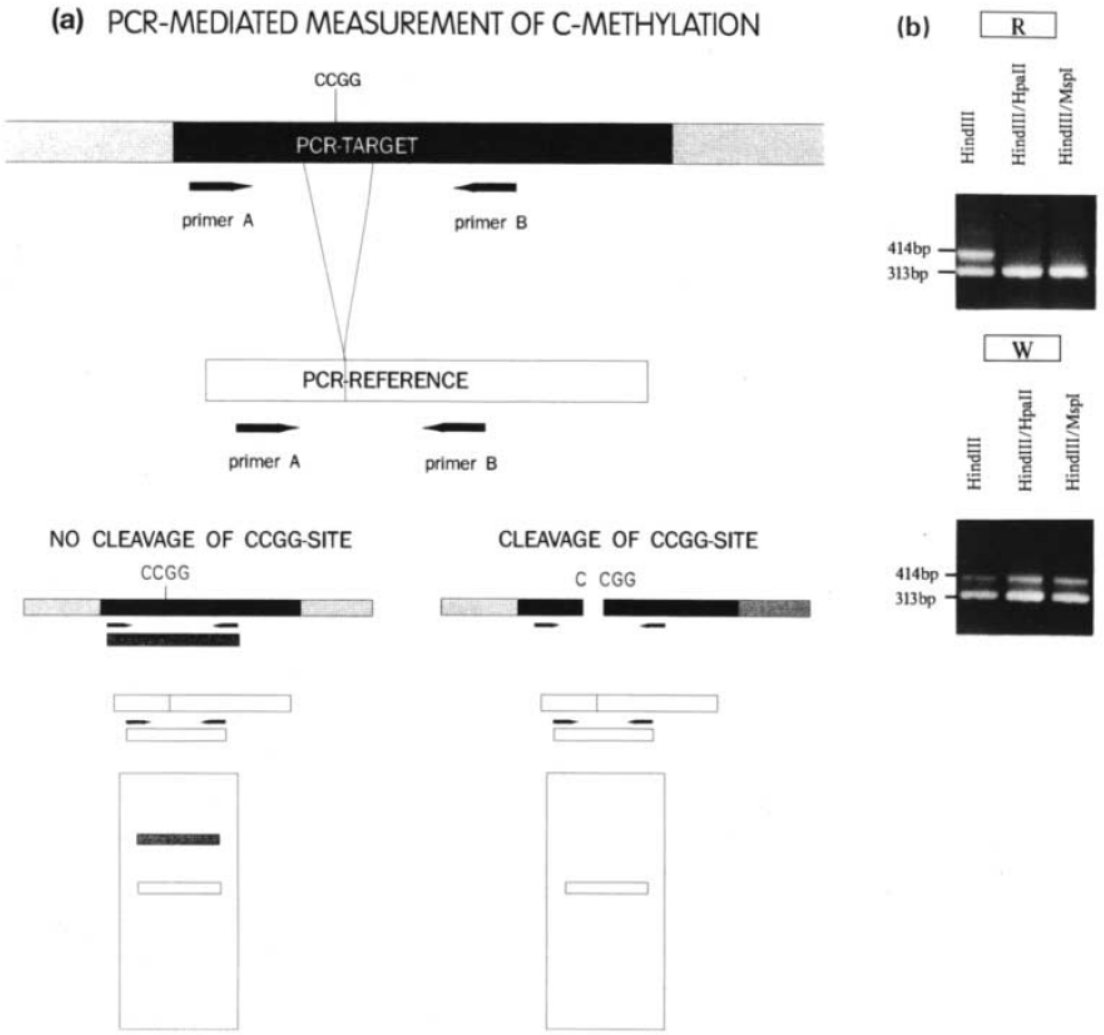
- **Identifikace regionů s odlišnou methylací (DMRs)**
- **Nutnost specifických softwarů**

- Po specifické PCR-preamplifikaci
  - Tvorba NGS knihovny
  - Sekvenování
  - Analýza produktů

TABLE A4-1 Isoschizomer Pairs That Differ in Their Sensitivity to Sequence-specific Methylation

	Isoschizomer Pairs[a]	
Methylated Sequence[b]	Cut by	Not Cut by
T^{m5}CCGGA	*Acc*III	*Bsp*MII
TC^{m5}CGGA	*Acc*III	*Bsp*MII
GGWC^{m5}C	*Afl*I	*Ava*II (*Eco*47I)
TCCGG^{m6}A	*Bsp*MII	*Acc*III
C^{m5}CWGG	*Bst*NI (*Mva*I)	*Eco*RII
GGTAC^{m5}C	*Kpn*I	*Asp*718I
C^{m5}CGG	*Msp*I	*Hpa*II (*Hap*II)
C^{m4}CGG	*Msp*I	*Hpa*II
G^{m6}ATC	*Sau*3AI (*Fnu*EI)	*Mbo*I (*Nde*II)
TCGCG^{m6}A	*Sbo*13I	*Nru*I
RG^{m6}ATCY	*Xho*II	*Mfl*I
CC^{m5}CGGG	*Xma*I (*Cfr*9I)	*Sma*I

Methyl-sensitivní PCR



Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
  - Bisulfitové sekvenování, MSAP….
- **DNA-protein interakce**
  - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
  - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika

Příprava vzorku

Pletivo/tkáň, buněčné útvary aj.

Fixace

PFAM, Glutaraldehyd, EtOH…

Permeabilizace membrány

Detergent

Blokace aj.

BSA, případný enzymatický treatment

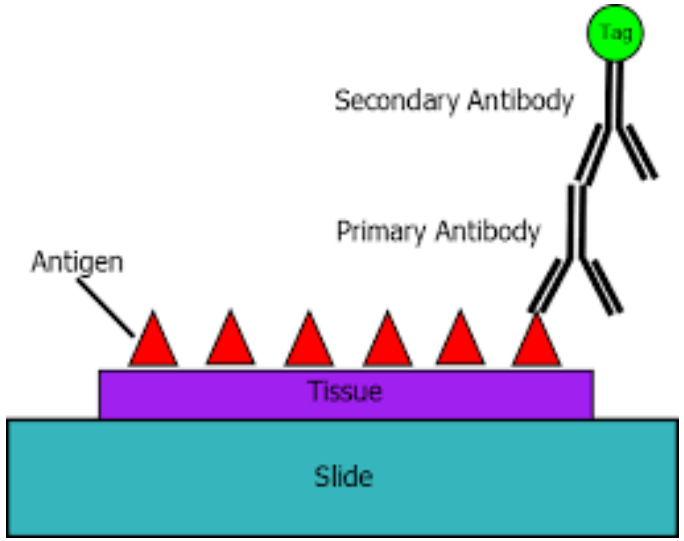
Inkubace protilátky

Monoklonální vs. polyklonální

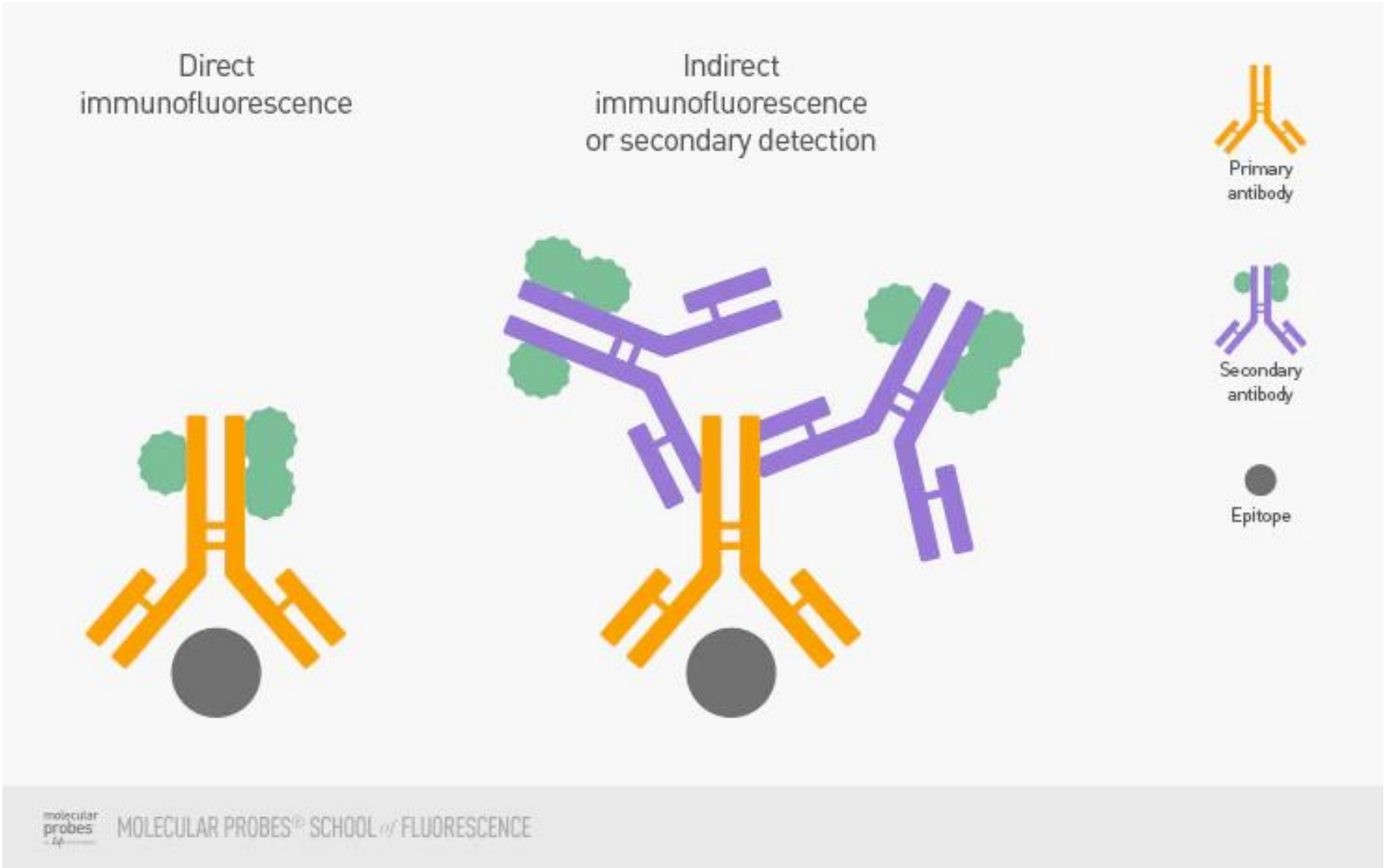
Vizualizace

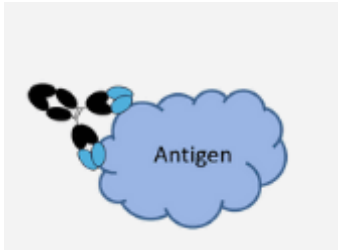
Mikroskopie

Princip imunolokalizace



Přímé a nepřímé barvení





Monoklonální protilátky

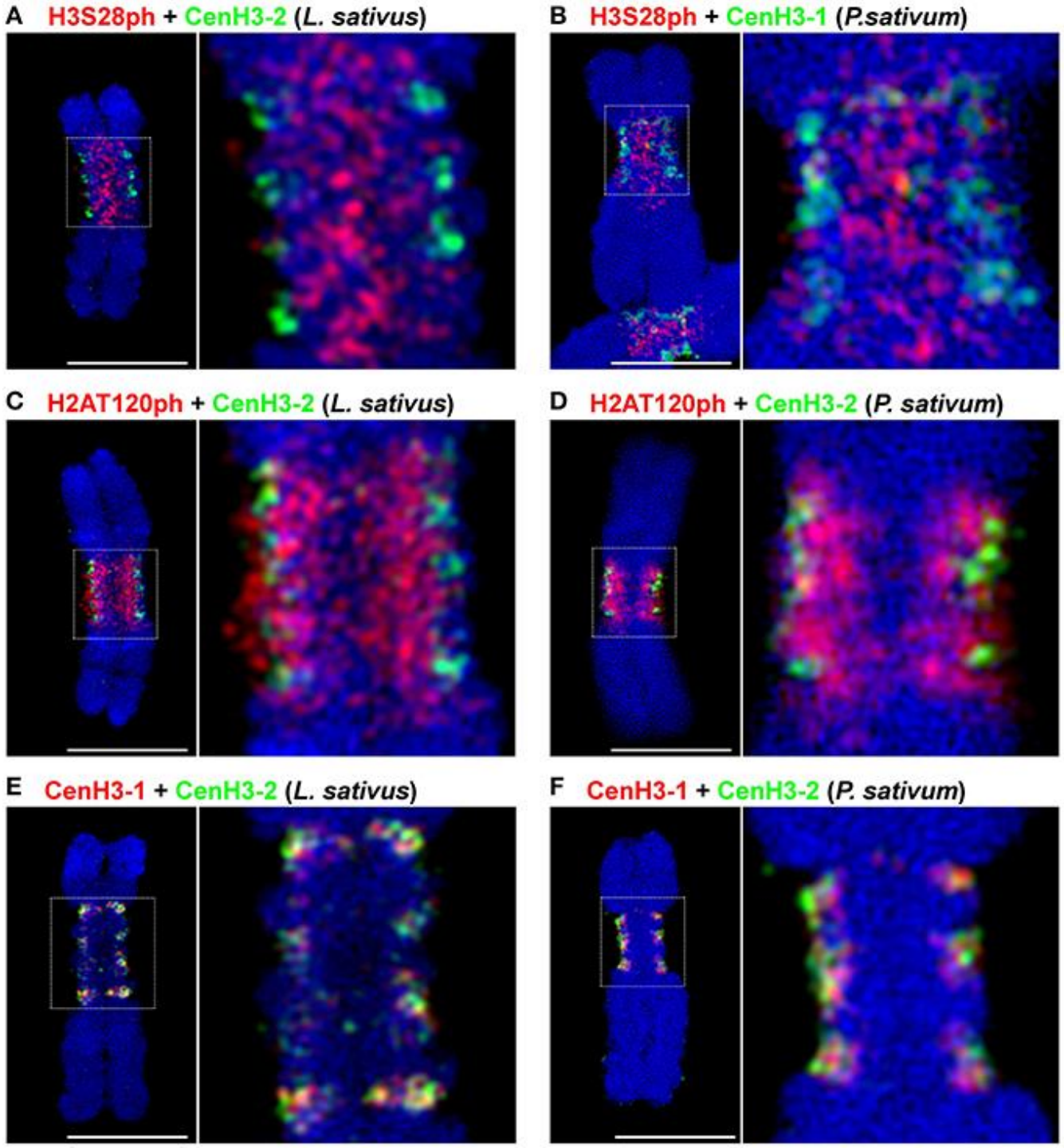
- Ve srovnání s pAbs draší
- Rozpoznají jeden epitop (váže se na specifické místo)
- Tvořeno jednou protilátkou

Polyklonální protilátky

- Levné pro produkci
- Mix různých protilátek
- Váží se na různé oblasti jedné molekuly
- Tolerantní na malé změny v epitopu cílené molekuly

Monoclonal Antibodies (mAbs)

Polyclonal Antibodies (pAbs)



Detail polycentromery u hrachu a výskyt histonových modifikací (H2AT120ph)/histonových variant (CENH3)

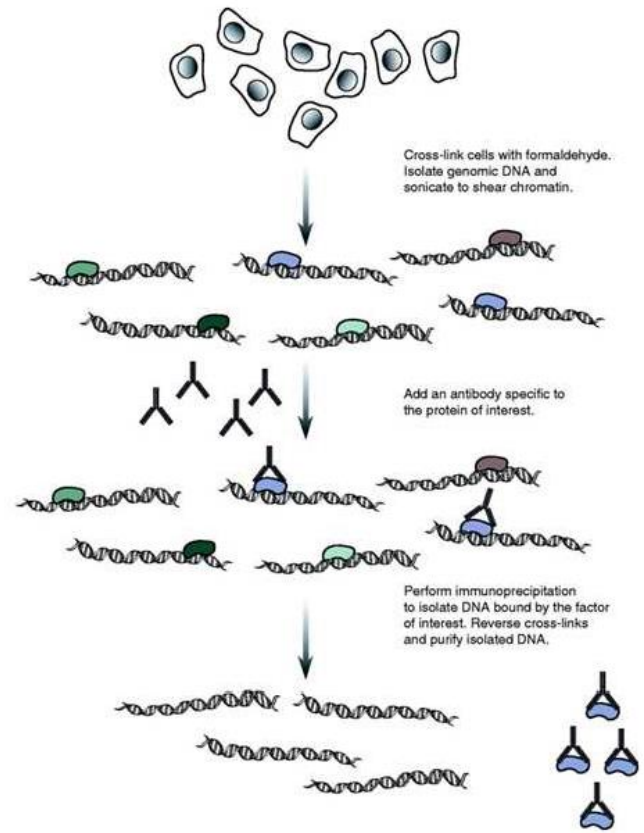
Neumann *et al. 2016*

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

- Izolace částí genomu podle toho s jakými proteiny interagují (např. promotory, modifikované histony)

Postup:

1) Cross-linking – vytvoření kovalentní vazby proteinu s DNA (UV, formaldehyd, u histonů netřeba)
2) Fragmentace DNA (sonikace, enzymaticky)
3) Inkubace s protilátkou k proteinu, který mě zajímá
4) Izolace proteinu s navázanou DNA
5) (Uvolnění kovalentní vazby), přečištění DNA



Co dál?
microarray (ChIP on chip), ChiP-seq, …

Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
  - Bisulfitové sekvenování, MSAP….
- DNA-protein interakce
  - Imunolokalizace, Chip-seq
- **Chromatinová analýza**
  - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika

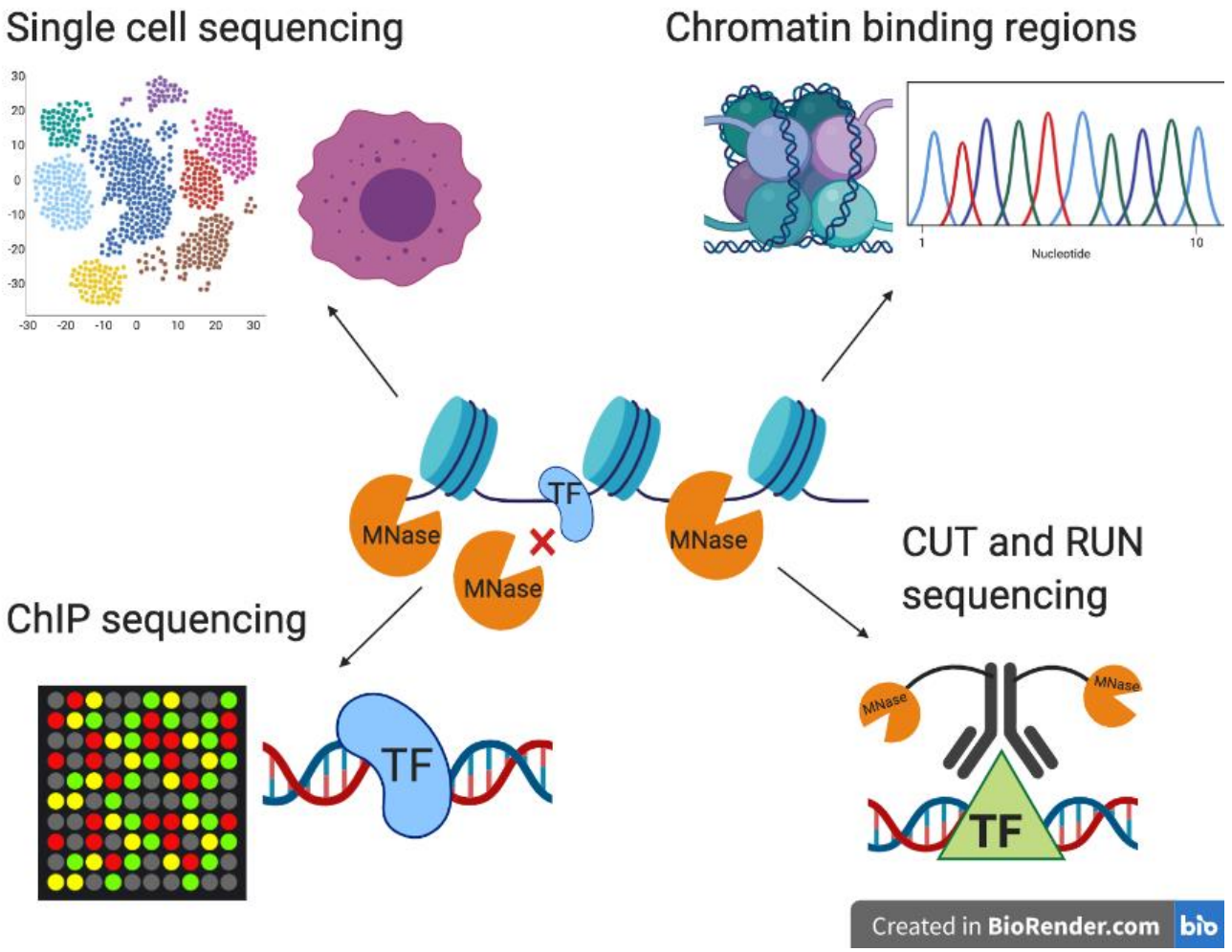
ATAC-seq („assay for transposase-accessible chromatin“

- Nukleozomové mapování
- Vazba transkripčních faktorů
- Detekce faktorů související s nemocemi
- Komparativní epigenomika
- Regulace buněčné specifikace

Illumina official website

gDNA je exponována vysoce aktivní transposáze → fragmentace DNA v otevřených oblastech → tagování se sekvenčními primery

MNase-seq („micrococcal nuclease digestion“)



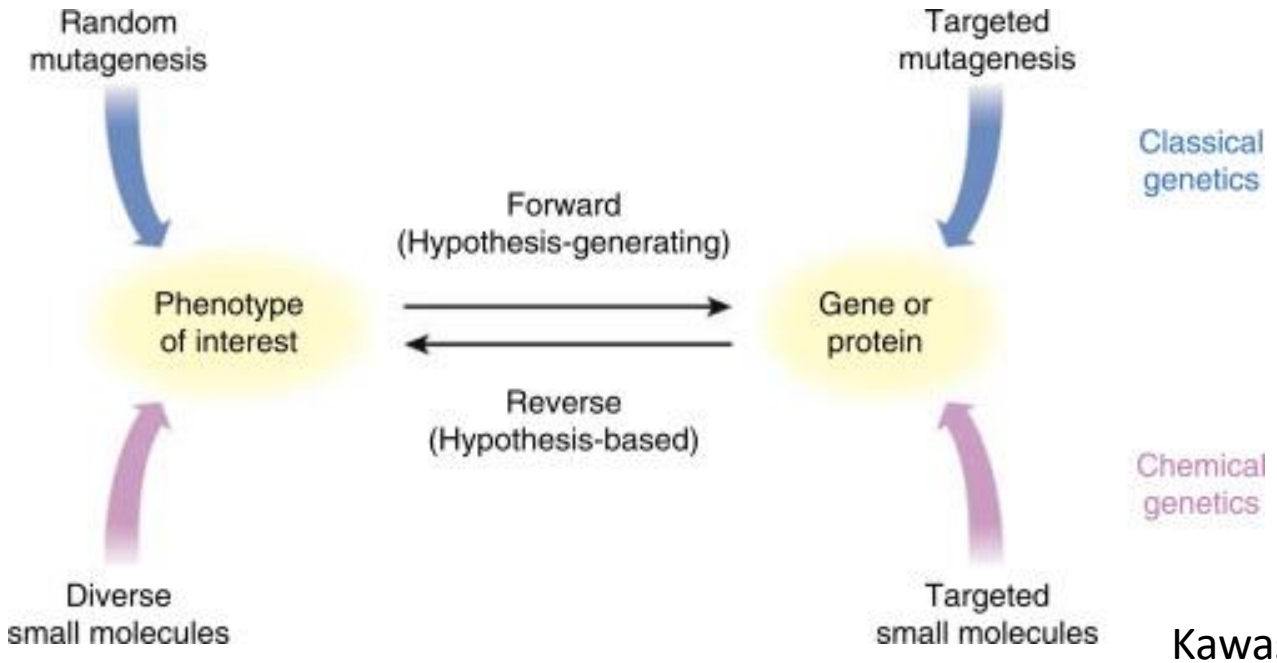
Wikipedia commons

Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
  - Bisulfitové sekvenování, MSAP….
- DNA-protein interakce
  - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
  - ATAC-seq, MNase-seq
- **Chemická genetika**

Chemická genetika

- Aplikace chemických látek pro studium fenotypu nebo genové regulační dráhy
- Chemická epigenetika neinterferuje s DNA (ne primárně)



Kawasumi 2007

Chemické látky ovlivňující DNA

Table 1. Major drugs used in plant DNA damage repair studies

Drugs	Mechanism of action	Induced damage	Key references
Replication blocking agents			
Hydroxyurea (HU)	RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE and CATALASE 2 inhibition	dNTP pool depletion	De Schutter et al., 2007; Cools et al., 2010; Spadafora et al., 2011
Aphidicolin	DNA POLYMERASE α inhibition	replication blocking	Cook et al., 2013
Inhibitor of DNA synthesis in organelles			
Novobiocin	inhibition of DNA GYRASE in organelles	replication blocking	Cappadocia et al., 2010
Alkylating agents			
1-Ethyl-1-nitrosourea	ethylation of bases (mostly T)	AT→TA transversions, AT→GC transitions	Gichner et al., 2003; Cooper et al., 2013
Ethyl methanesulfonate	ethylation of G→O^6-ethylG	GC→AT transitions	Kim et al., 2006; Abe et al., 2012; Nordstrom et al., 2013
Methyl methanesulfonate	methylation of N7- and O^6-dG, N3-dA and N4-dT	TA→GC transversions, AT→GC transitions	Bagherieh-Najjar et al., 2005; Mannuss et al., 2010
Mitomycin C	G-specific 5′-CpG-3′ double-alkylation	G-G or G-A interstrand crosslinks	Bleuyard et al., 2005; Mannuss et al., 2010; Da Ines et al., 2013
Cisplatin	1,2-intrastrand d(GpG) and d(ApG) adducts	G-G or G-A intrastrand crosslinks	Jamieson and Lippard, 1999; Mannuss et al., 2010
Radiomimetic drugs			
Bleomycin (bleocin)	metal-dependent free radical production	DSB, SSB at 5′-GC-3′ or 5′-GT-3′ sequences	Ma et al., 2009; Pecinka et al., 2009; Lang et al., 2012
Zeocin	most likely similar to bleomycin	DSB	Adachi et al., 2011

DSB = Double strand break; SSB = single strand break.

Liu 2014

Chemické látky ovlivňující chromatin a DNA methylaci

Table 2. Drugs for chromatin research

Inhibitors	DNA methylation	Histone H3 modifications[a]			Chromatin condensation	Transposon expression	Gene expression	Pol II activity	Key references
		K4me3	K9me2	K27me3					
Methyl-group biosynthesis inhibitors and methionine antagonists									
Sulfamethazine	↓	n.a.	↓	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Zhang et al., 2012
S-Dihydroxypropyladenine	↓	↑	↓	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Baubec et al., 2010
3-Deazaneplanocin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Foerster et al., 2011
L-Ethionine	↓	n.a.	n.a.	n.a.	↓	n.a.	n.a.	n.a.	Fajkus et al., 1992
DNA methylation inhibitors									
Zebularine	↓	↑	↓	n.a.	↓	↑	n.a.	n.a.	Baubec et al., 2009
5-Azacytidine	↓	n.a.	↓	n.a.	↓	↑	↑ 73; ↓ 52[b]	n.a.	Chang and Pikaard, 2005
Histone deacetylase inhibitors									
Trichostatin A and sodium butyrate	–	–	↓	n.a.	n.a.	–	↑ 2; ↓ 34[b]	n.a.	Chang and Pikaard, 2005; Baubec et al., 2010
Sirtinol (putative)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑ 138[c]	n.a.	Grozinger et al., 2001; Zhao et al., 2003
Inhibitors of RNA polymerase II									
α-Amanitin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↓	Haag et al., 2012
Actinomycin D	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↓	Narsai et al., 2007
Unknown mode of action									
Genistein	↓	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Arase et al., 2012

↑ = Increase; ↓ = decrease; – = no change; n.a. = not analyzed.
[a] At normally silenced loci.
[b] Out of 7,800 *Arabidopsis* genes analyzed [Chang and Pikaard, 2005].
[c] Out of 23,000 *Arabidopsis* genes analyzed, number of down-regulated genes not specified [Zhao et al., 2003].

Liu 2014

Děkuji za pozornost!