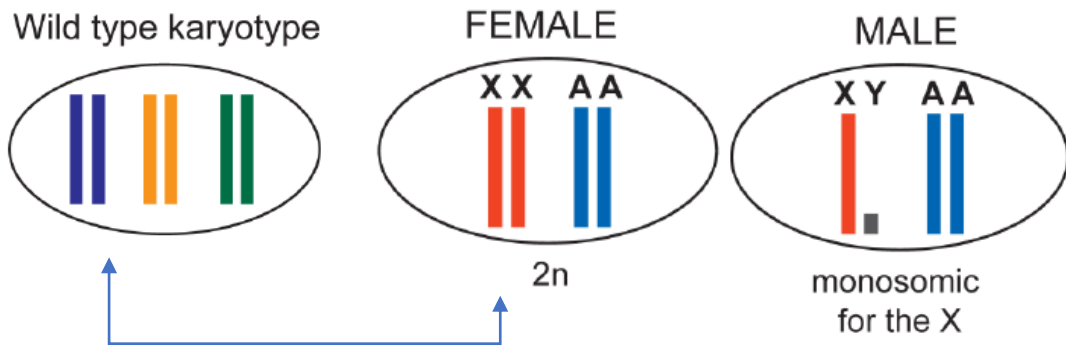
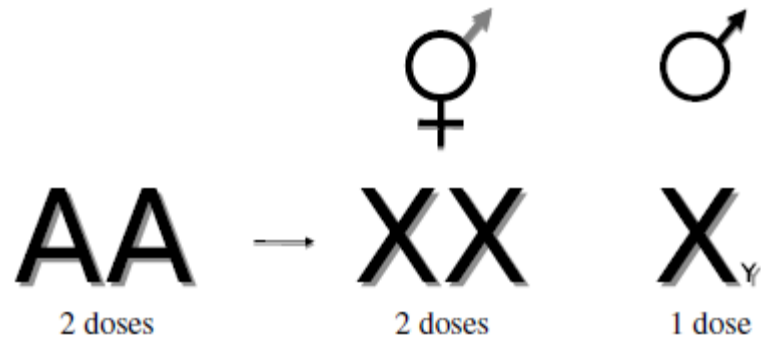


# Epigenetika 15

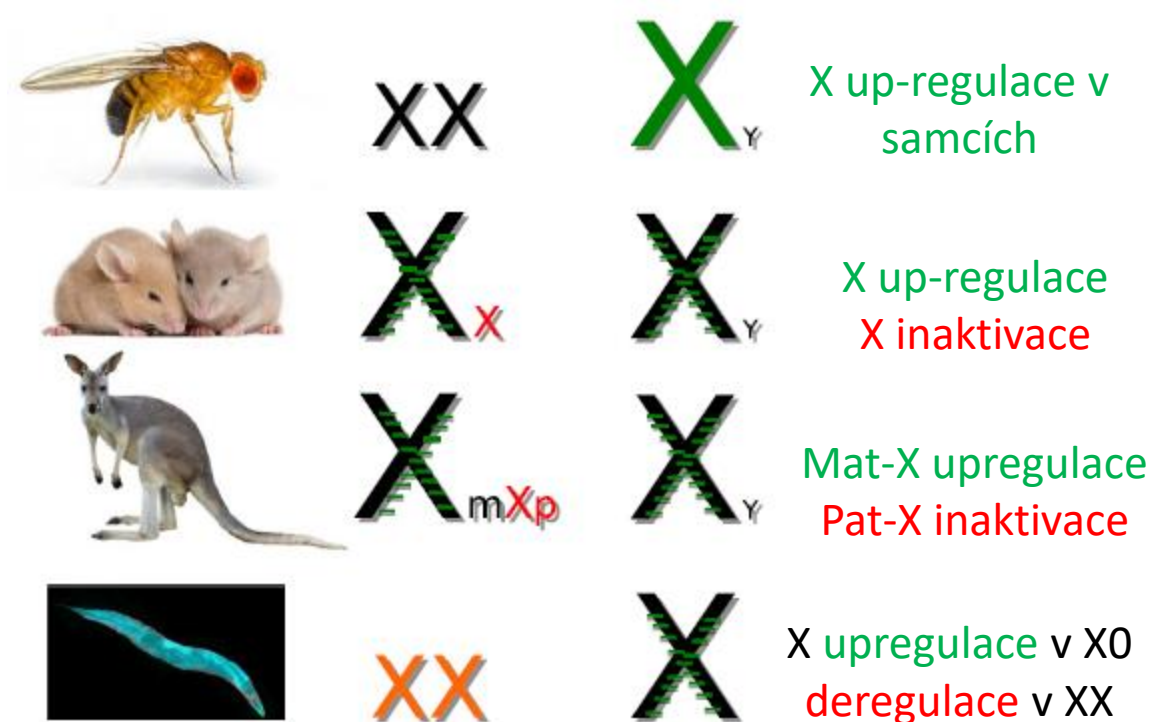
Mechanismus dávkové kompenzace a jeho evoluce

Vývojová genetika 2022

# Strategie vyrovnávající dávkově senzitivní expresi u rozdílných pohlaví



Evolve proto-pohlavních chromozomů, „X aneuploidie“ a X-vázaná nedostatečnost



Muyle *et al.* 2022

# 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 tělísko** 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

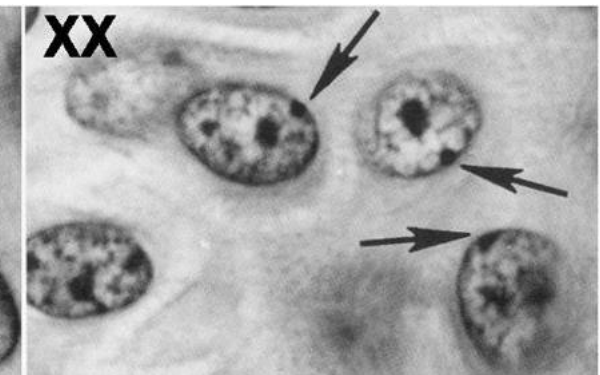
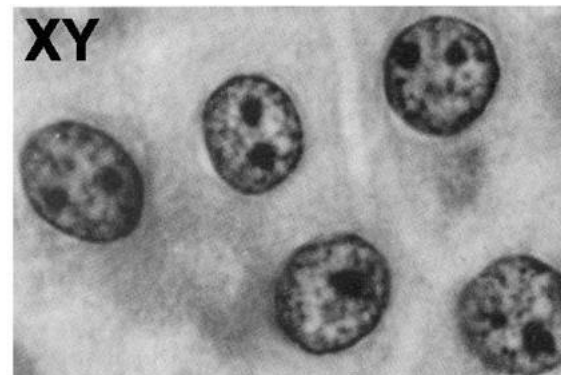
M. Barr a E. G. Bertram



S. Ohno

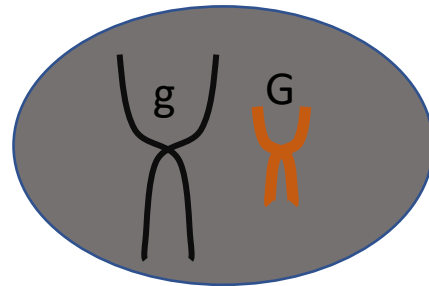
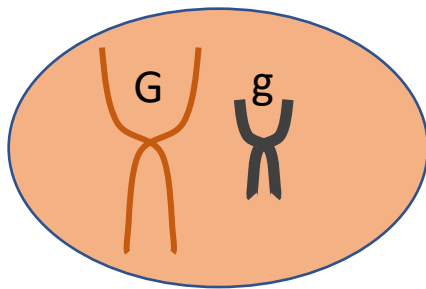


M. F. Lyon



# 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, často XXY), kočky = pruhování



F F M M M



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

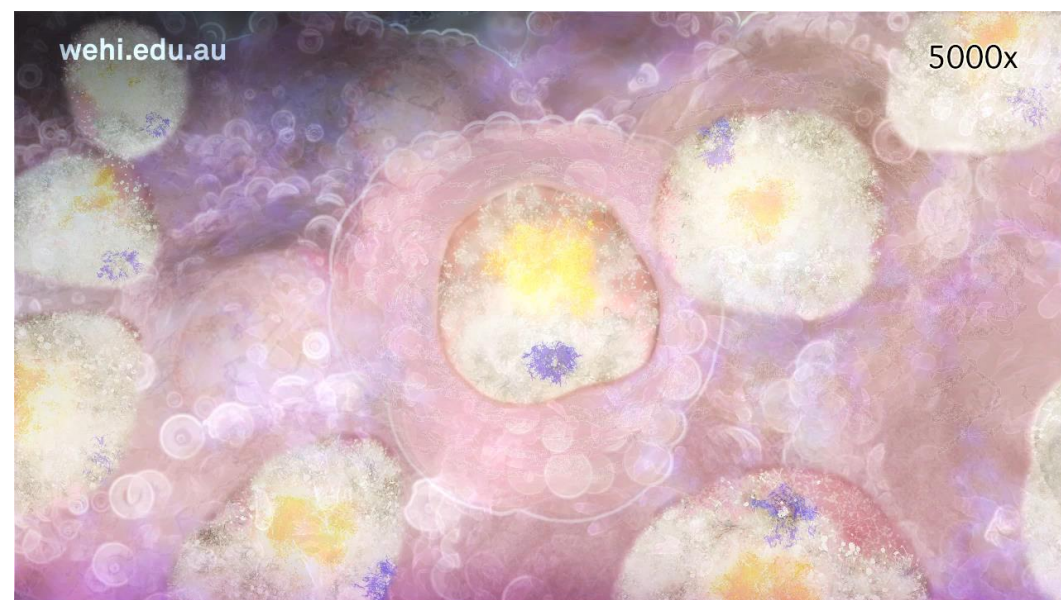
# Dvě formy X inaktivace u savců

- **Náhodná**

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

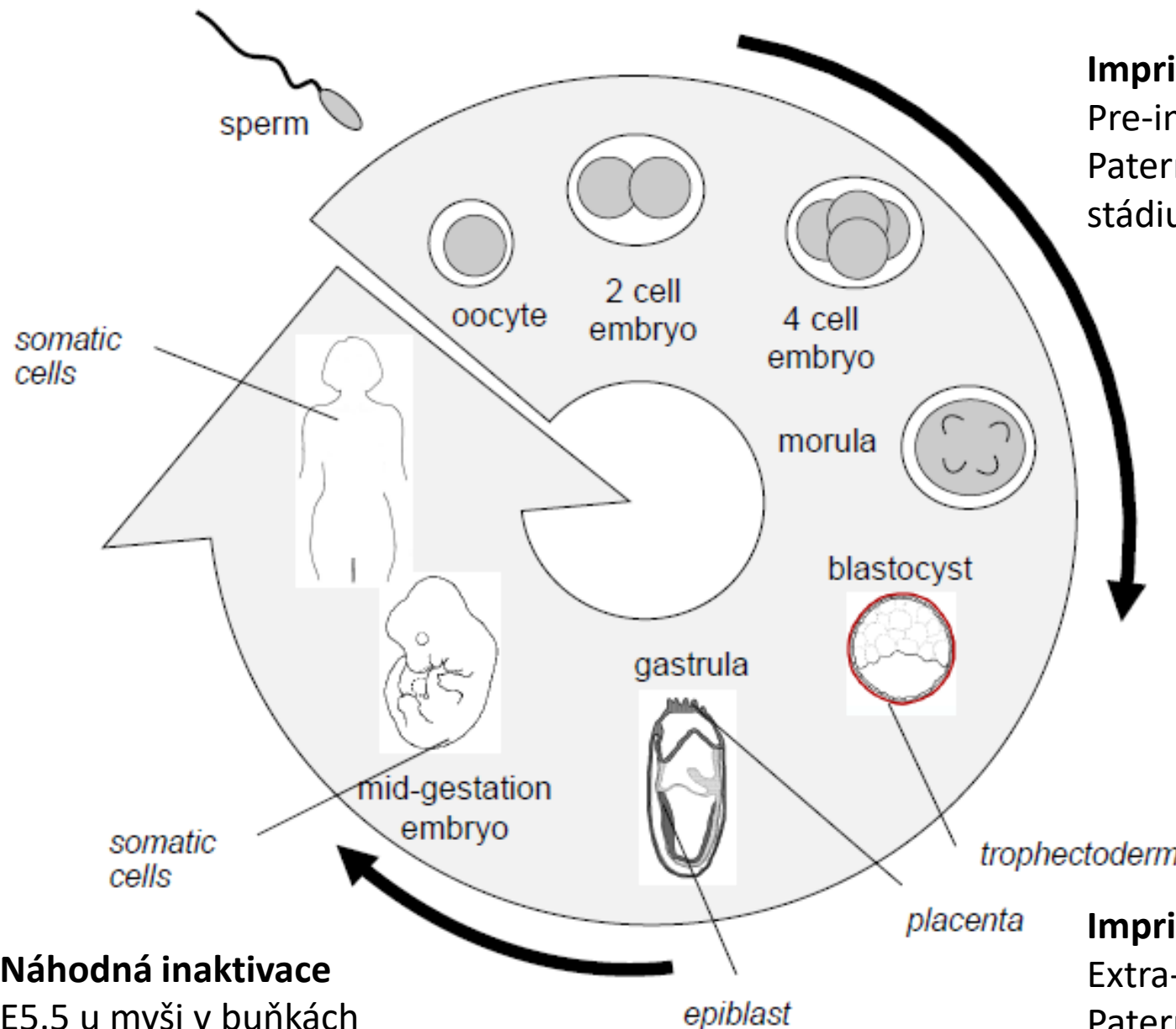
- **Imprintovaná X inaktivace**

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



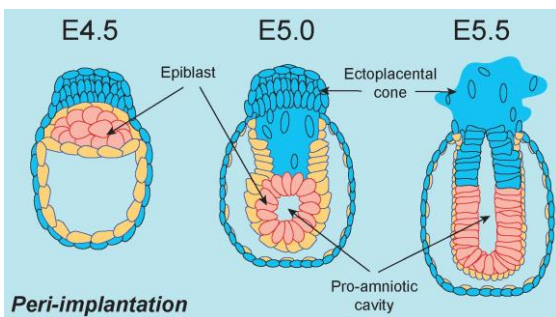


**Náhodná inaktivace**  
 Udržovaná u  
 somatických buněk  
 během celého života



**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

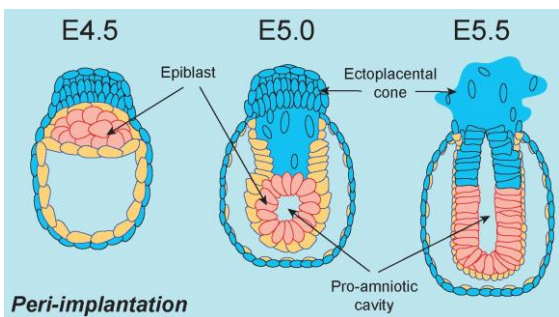
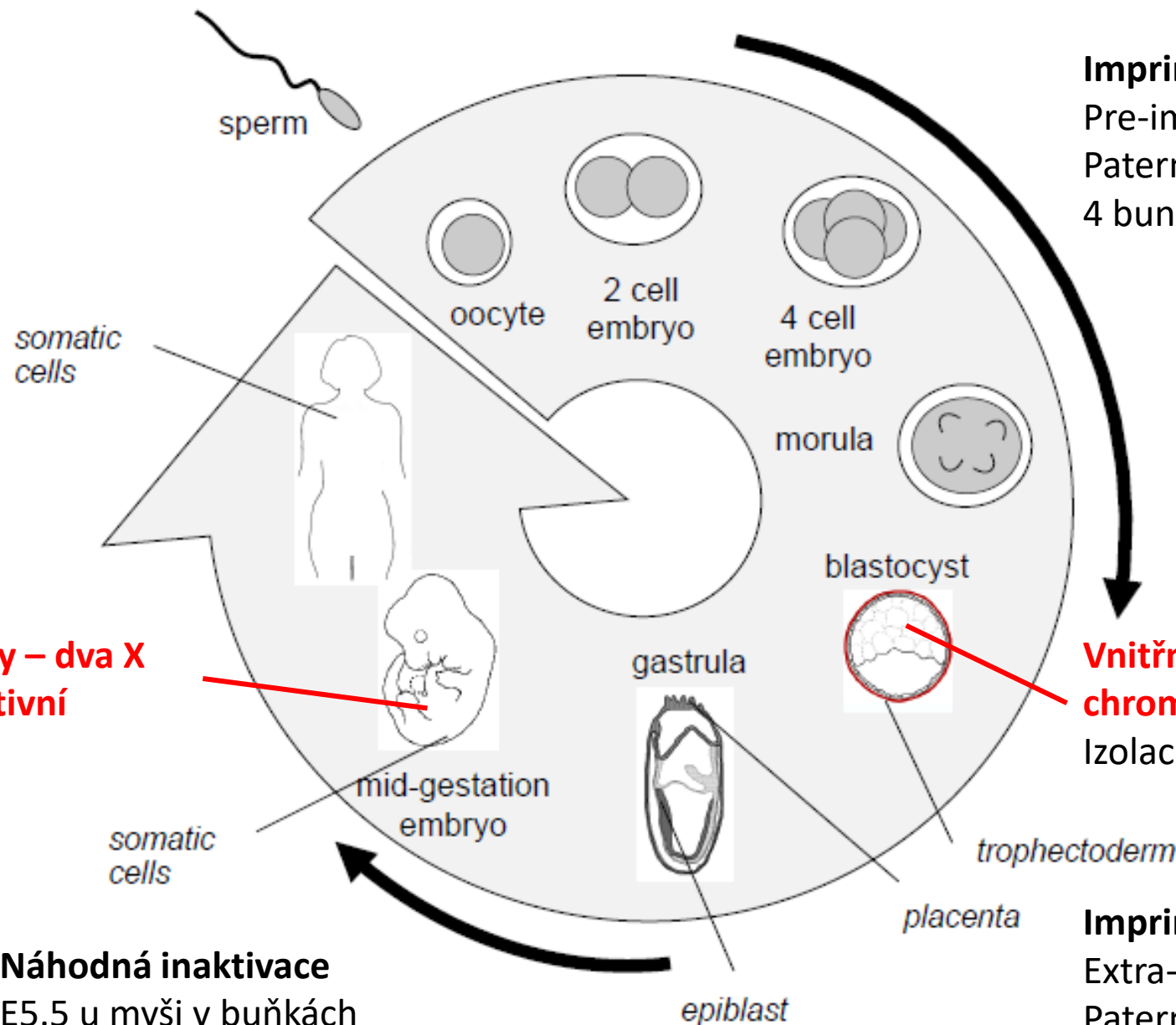
**Náhodná inaktivace**  
 Udržovaná u  
 somatických buněk  
 během celého života

**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

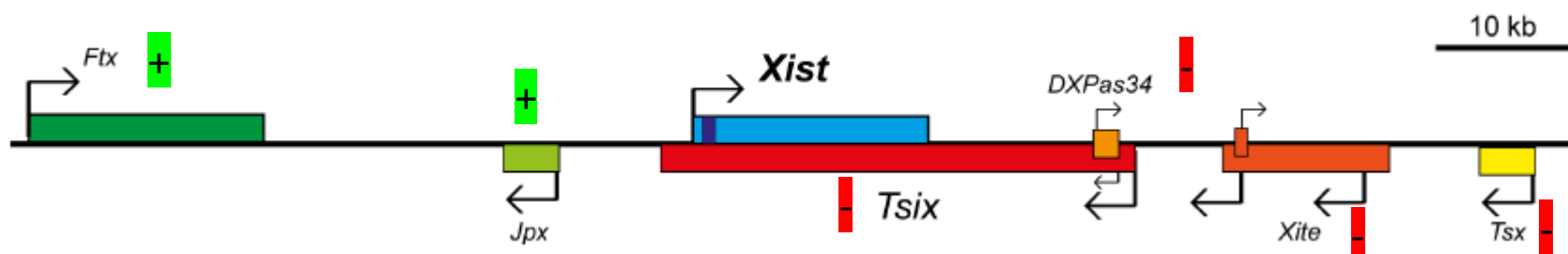
# Fáze X chromozom inaktivace u savců

- **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



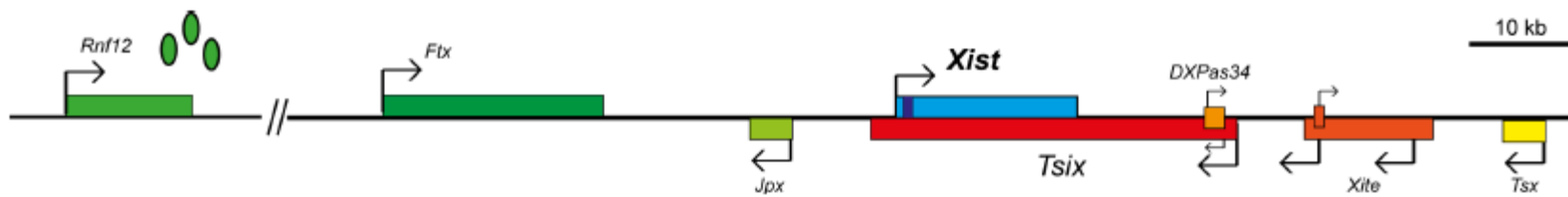
# Determinace počtu X chromozomů

- 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

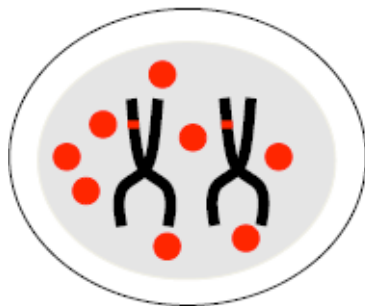
- Ne zcela popsáno, konsensus – **X-vázané faktory a autozomální faktory determinují počet (X:A)**
- Delece X-vázané oblasti (nekódující RNA) blízko *Xist* elementu vede k neúspěšné inaktivaci, autozomální faktory nejsou známy
- Gen *Rnf12* X-vázaný gen lokalizován před XIC
  - *Rnf12*/*Rlim* protein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



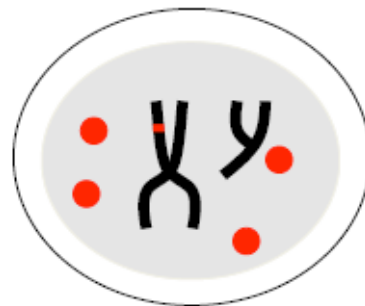
# Úloha Rnf12/Rlim a determinace počtu X chromozomů

- 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

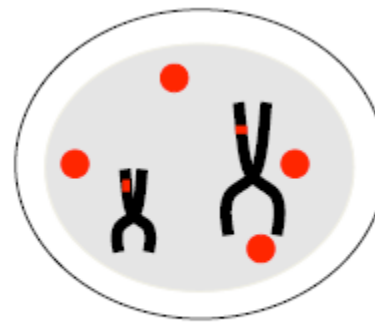


Female XX

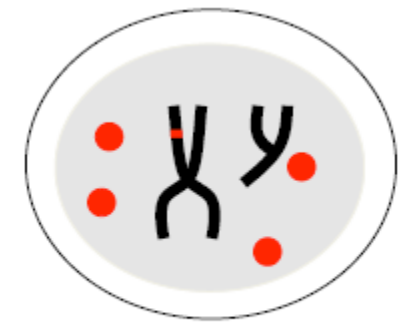


Male XY

1 X aktivní



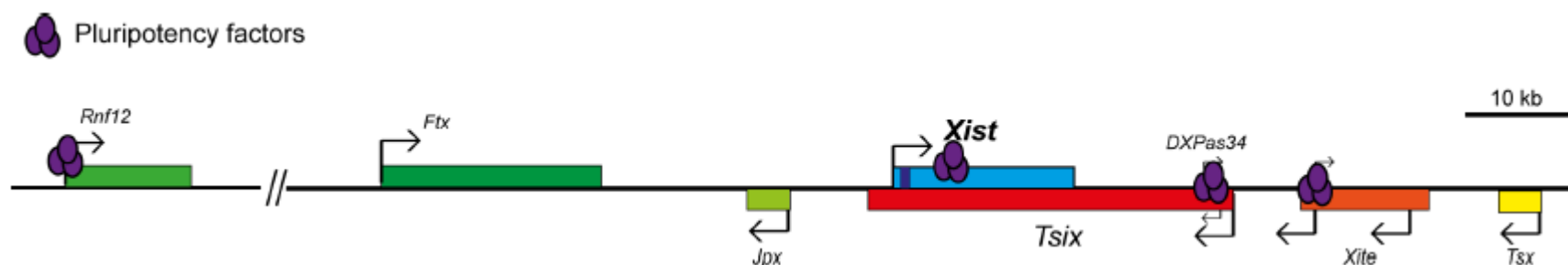
Female XX



Male XY

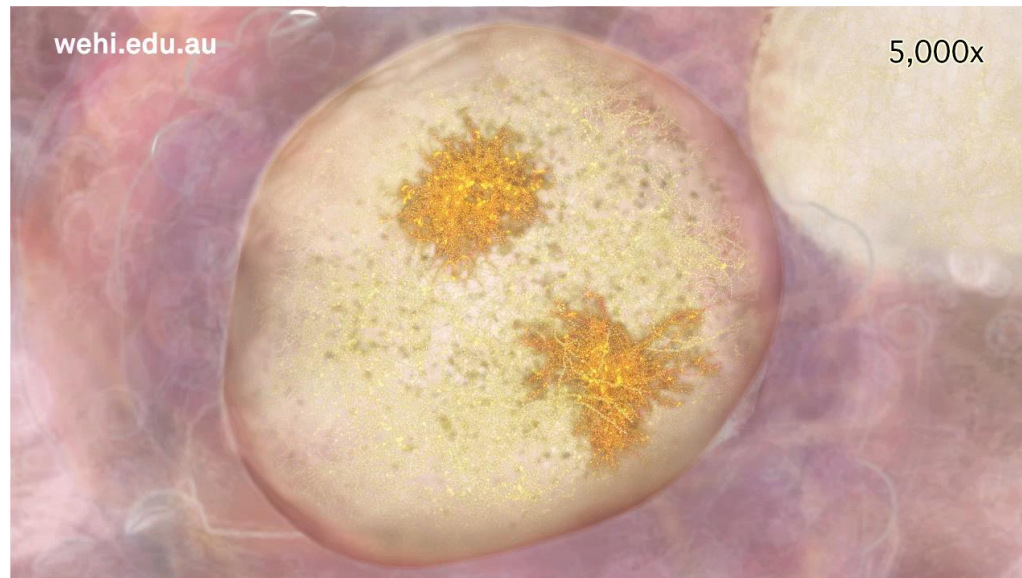
# Determinace počtu X chromozomů

- 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?



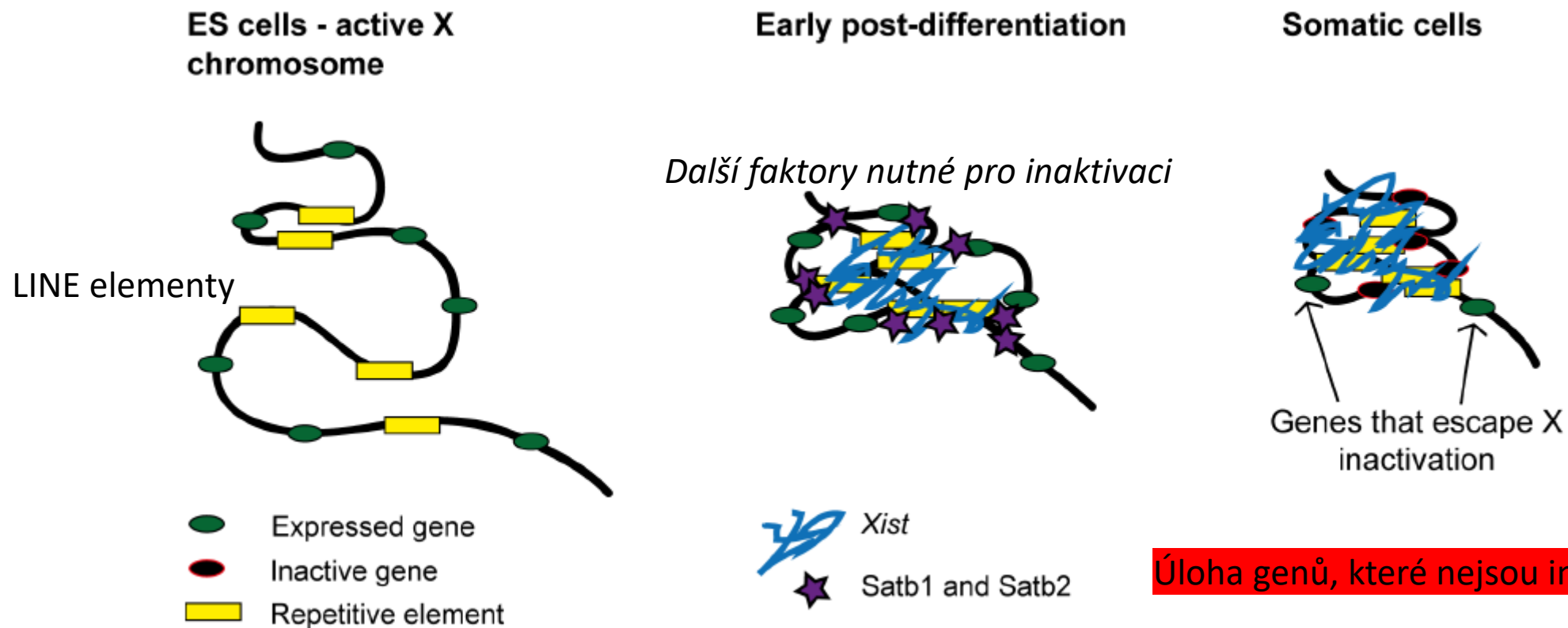




# Iniciace a šíření X-inaktivace

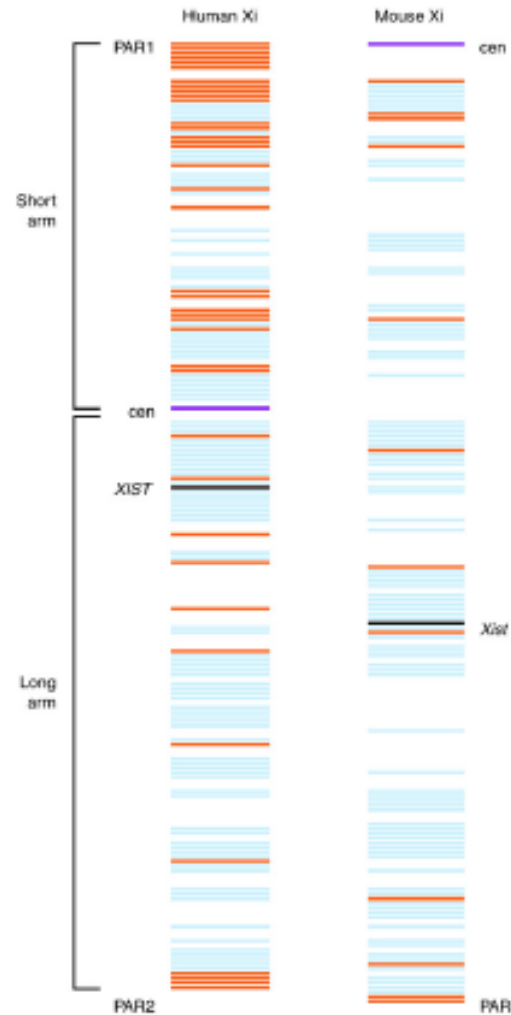
- Iniciace zahrnuje *Xist* expresi a pokrytí celého chromozomu touto RNA
- *Xist* exprese setrvává po celý život buňky
  - X inaktivace je závislá na *Xist* expresi a je reverzibilní, během buněčné determinace se stává neměnná (**epigenetický krajinný model**)
  - Pro úspěšné umlčení je *Xist* dostatečný pouze v několika buněčných typech (další faktory?)
- Šíření X inaktivace zahrnuje odstranění RNA PolII a umlčení repetitivních sekvencí
  - „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?

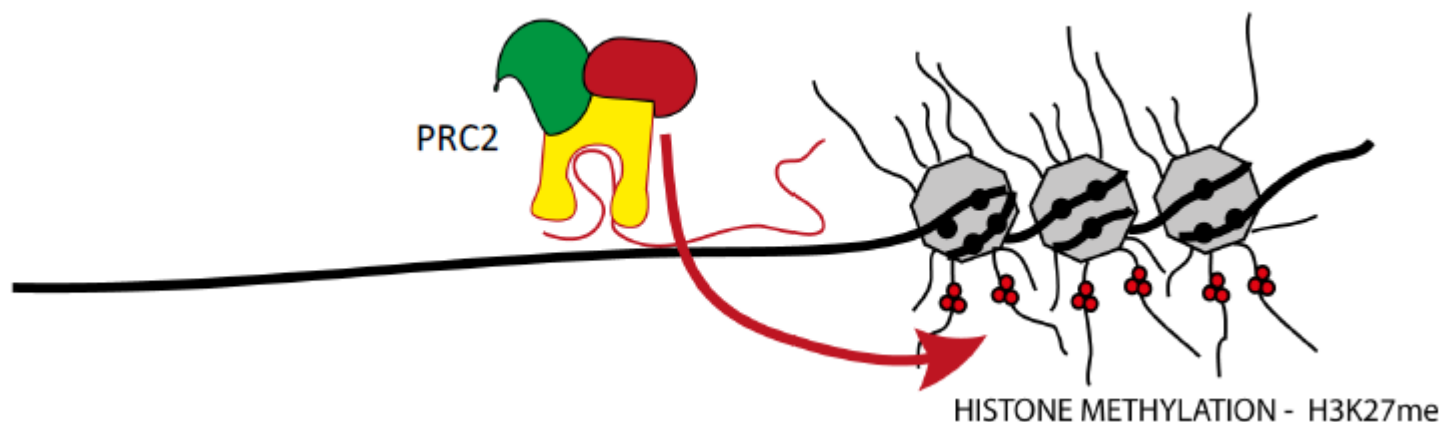
# Neúplná X-inaktivace



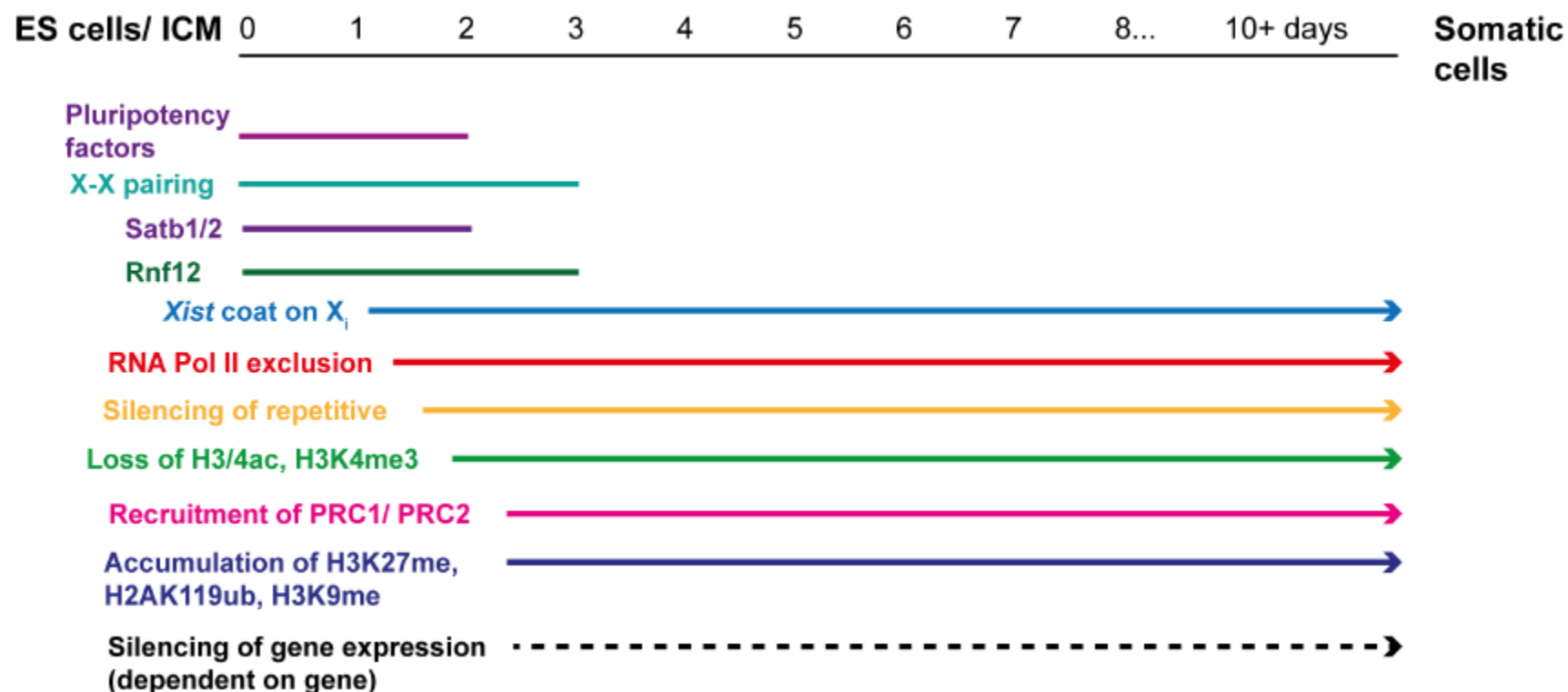
- Nejsou zahrnuty v „sex chromatin body“
- Geny PAR
- Non-PAR mají 2x vyšší expresi
- Poruchy regulace genů, které přiléhají k XIC, jsou zdrojem X-vázaných chorob
  - Rettův syndrom
    - Mutace nebo ztráta genu MeCP2 – mentální poruchy

# Umlčení a udržení X-inaktivace

- Není zcela přesně determinováno (nejasné rozhraní)
- Založení trvale umlčeného chromatinu
  - Ztráta aktivních chromatinových modifikací (H3K4me, H4ac)
  - Akumulace represivních modifikací (H3K27me3, H3K9me2)
  - Vazba PRC2 (H3K27me3) a PRC1 (H2AK119Ub)
    - Funkce RepA (Repeat A) jako vazebný faktor



# Shrnutí X-inaktivace a hlavních událostí

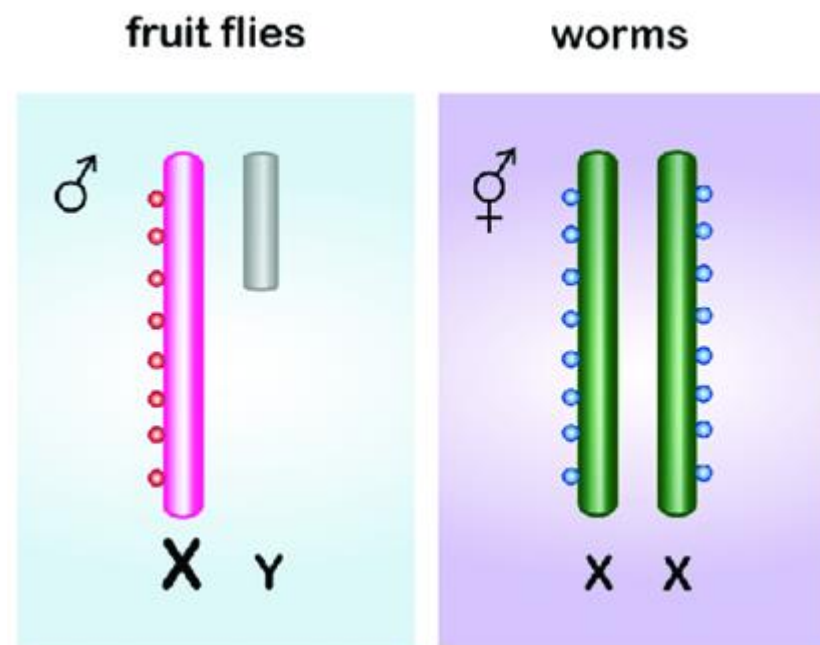


- Pro udržení nutná aktivita Dnmt1, vazba Smchd1 (SMC třída proteinů)

# 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



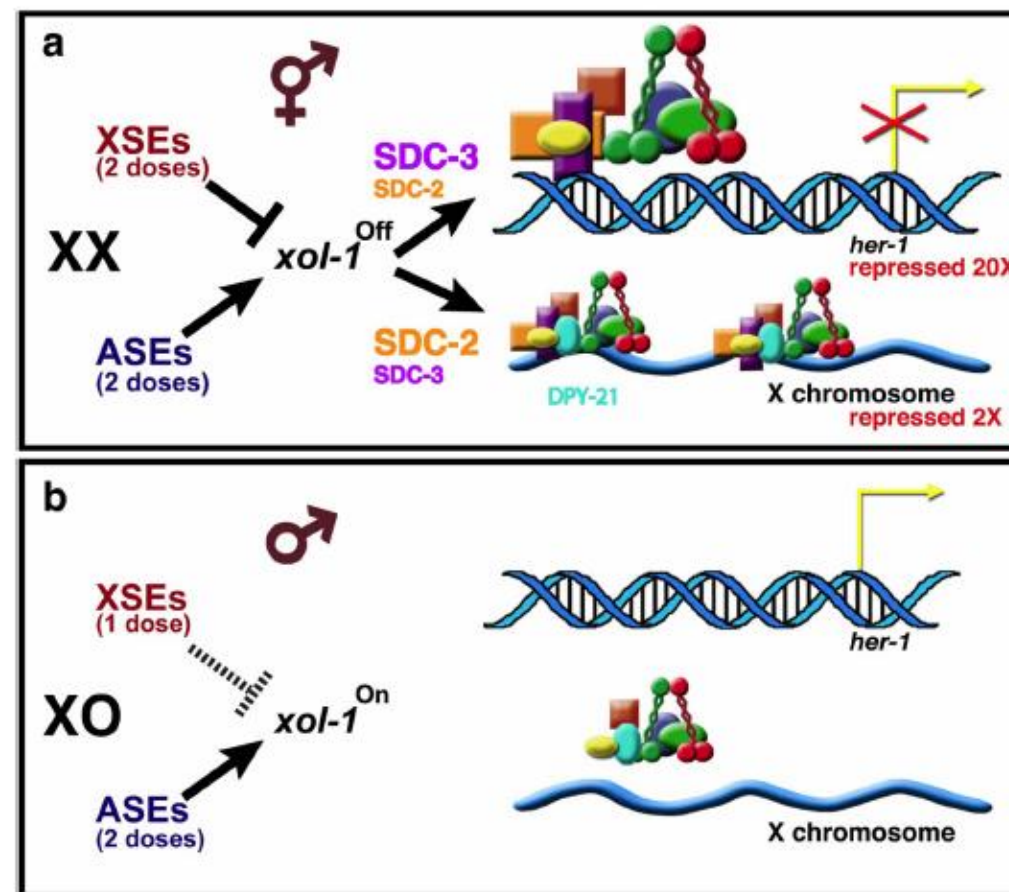
## De-regulace obou chromozomů

- 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?



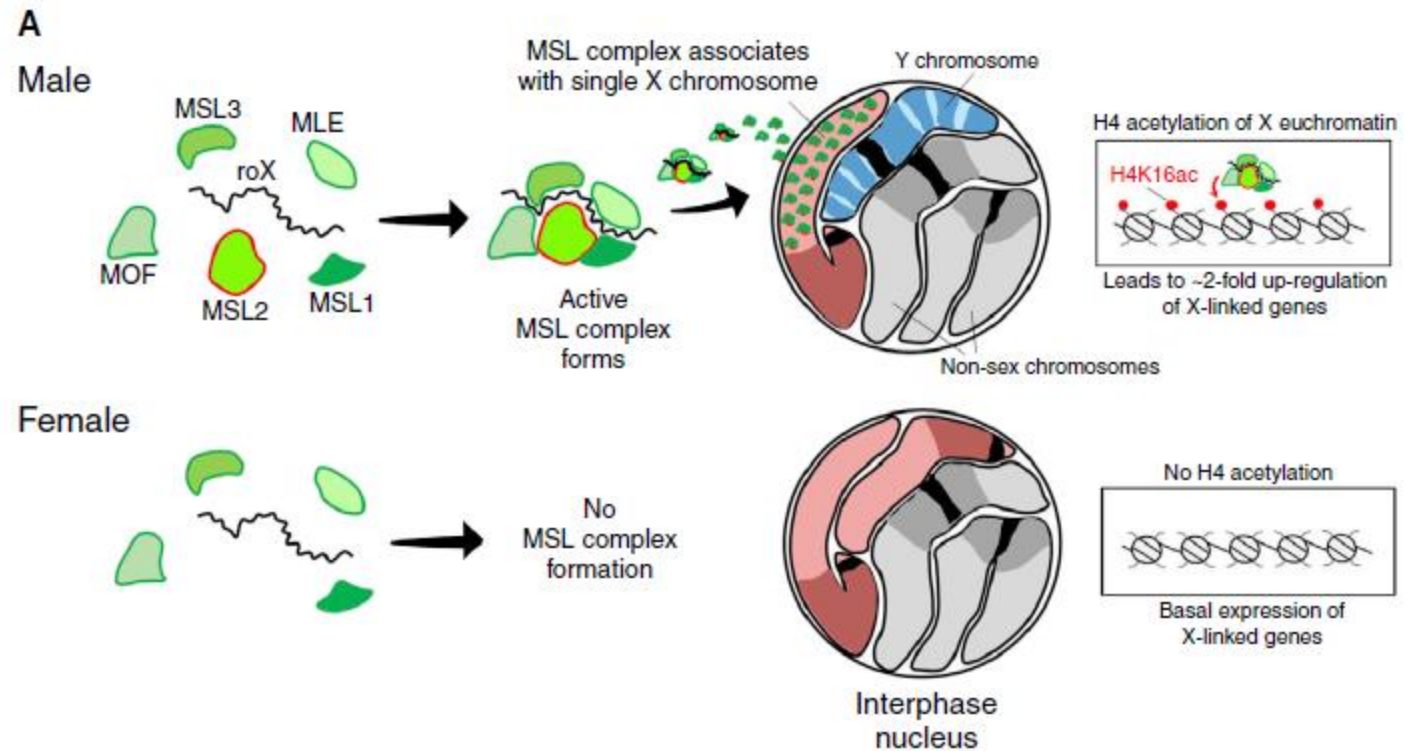
# Funkce dávkové kompenzace v *C. elegans*

- Xol-1 je master gen, který kontroluje pohl. determinaci i DC
  - V hermaphroditech (XX), 2x vyšší dávka XSE reprimuje xol-1 aktivaci (srkze ASEs)
- Represe xol-1 umožňuje expresi/aktivitu XX-specifického proteinu SDC-2, který stabilizuje SDC-3, snižující expresi obou X chromozomů o ½ (lokus her-1 a 20x)
  - DPY-30 je podjednotka SMC proteinu, který interaguje s COMPASS komplexem (methylace histonů, „writer“)
- V XO samcích, XSEs-dávka jednoho chromozomu není dostatečná pro vazbu a překonání ASEs, nedochází k umlčení X-chromozomu a her-1 lokusu

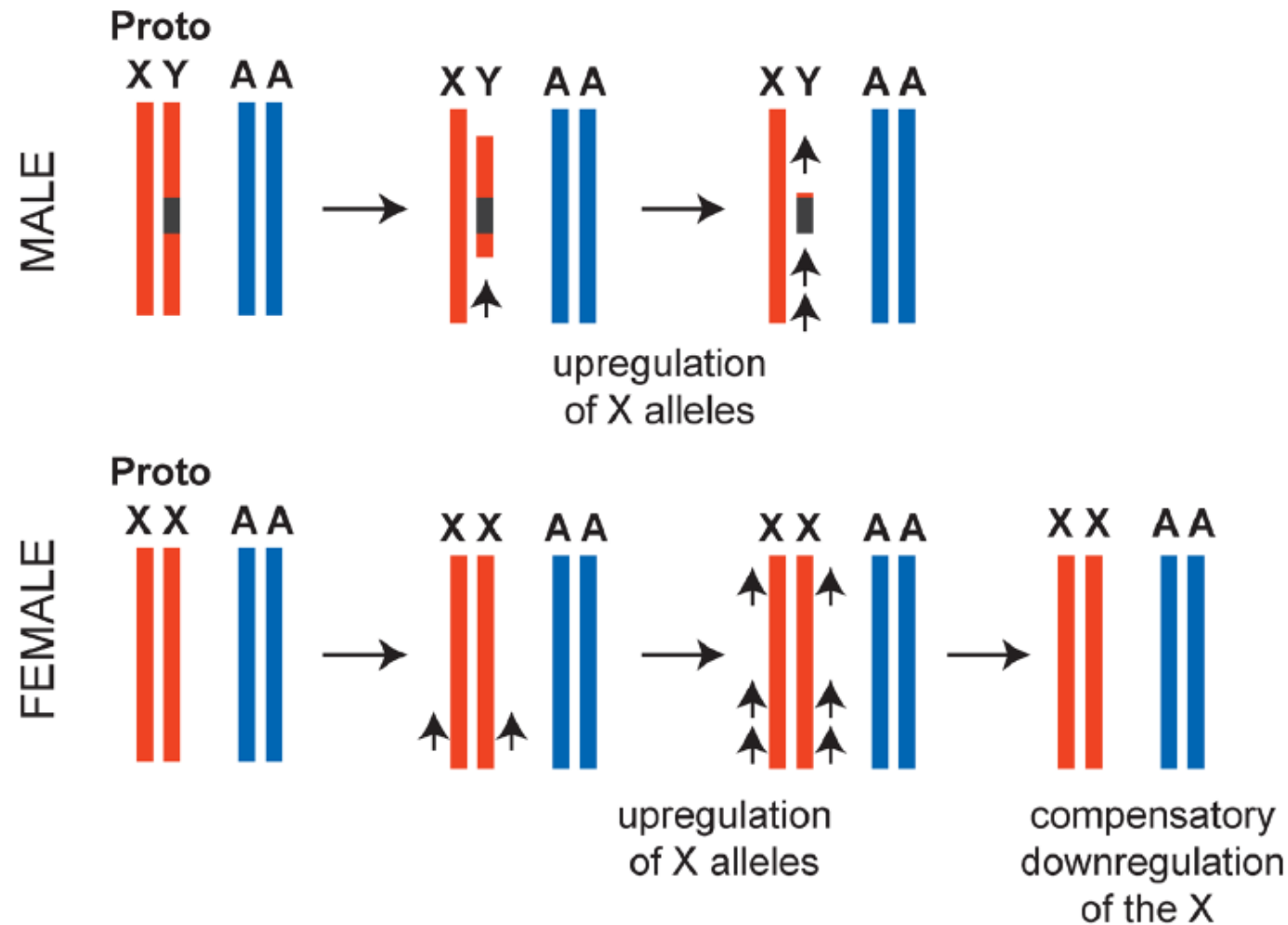


# Dávková kompenzace u *Drosophila melanogaster*

- Samčí MSL komplex se tvoří během ranné embryogeneze a je asociován přímo s X-vázanými geny
- U samic nedochází k expresi MSL2, proto se netvoří MSL komplex, nedochází 2x vyšší expresi X chromozomu



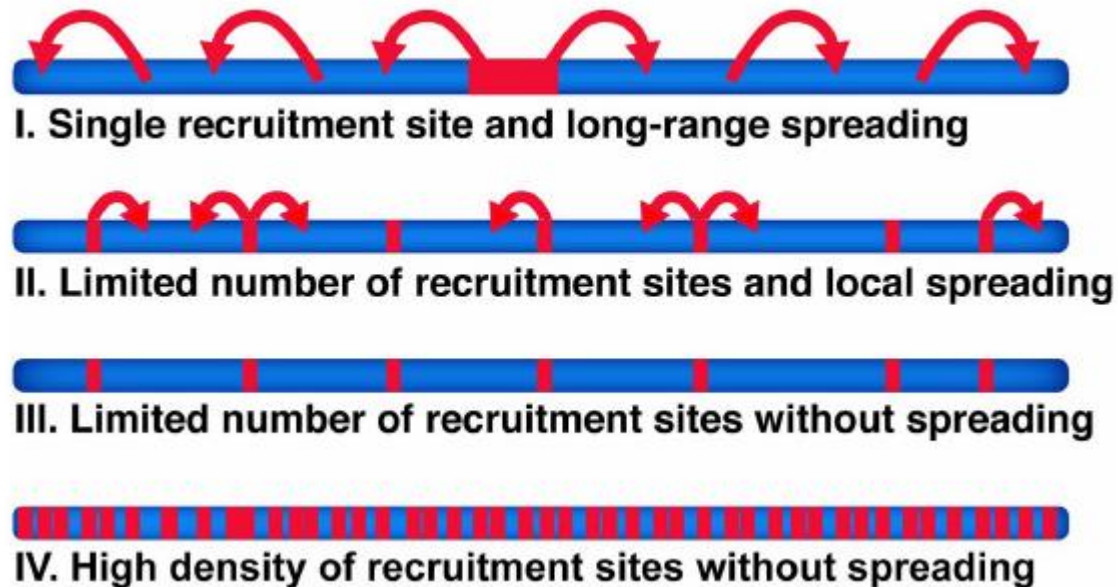
# Cesta vedoucí k překonání X-vázané „haploinsuficience“ a DC mechanismu



- X up-regulace je typický příklad jak se buněčný mechanismus vyrovnává s nerovnou dávkou genové exprese mezi pohlavími (u savců)- “Ohno’s hypothesis”=kvůli Y degeneraci, X alely mohou být potencionálně haploinsuficientní

- K překonání této genové dávky a její nerovnosti, organismy mají různé typy, z nichž evolučně jednodušší se jeví X chromozom up-regulace nejdříve v obou pohlavích, posléze de-regulace nebo inaktivace v homogametickém pohlaví

# Evoluce šíření X-chromozom DC vazebných míst

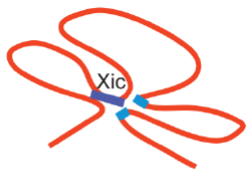
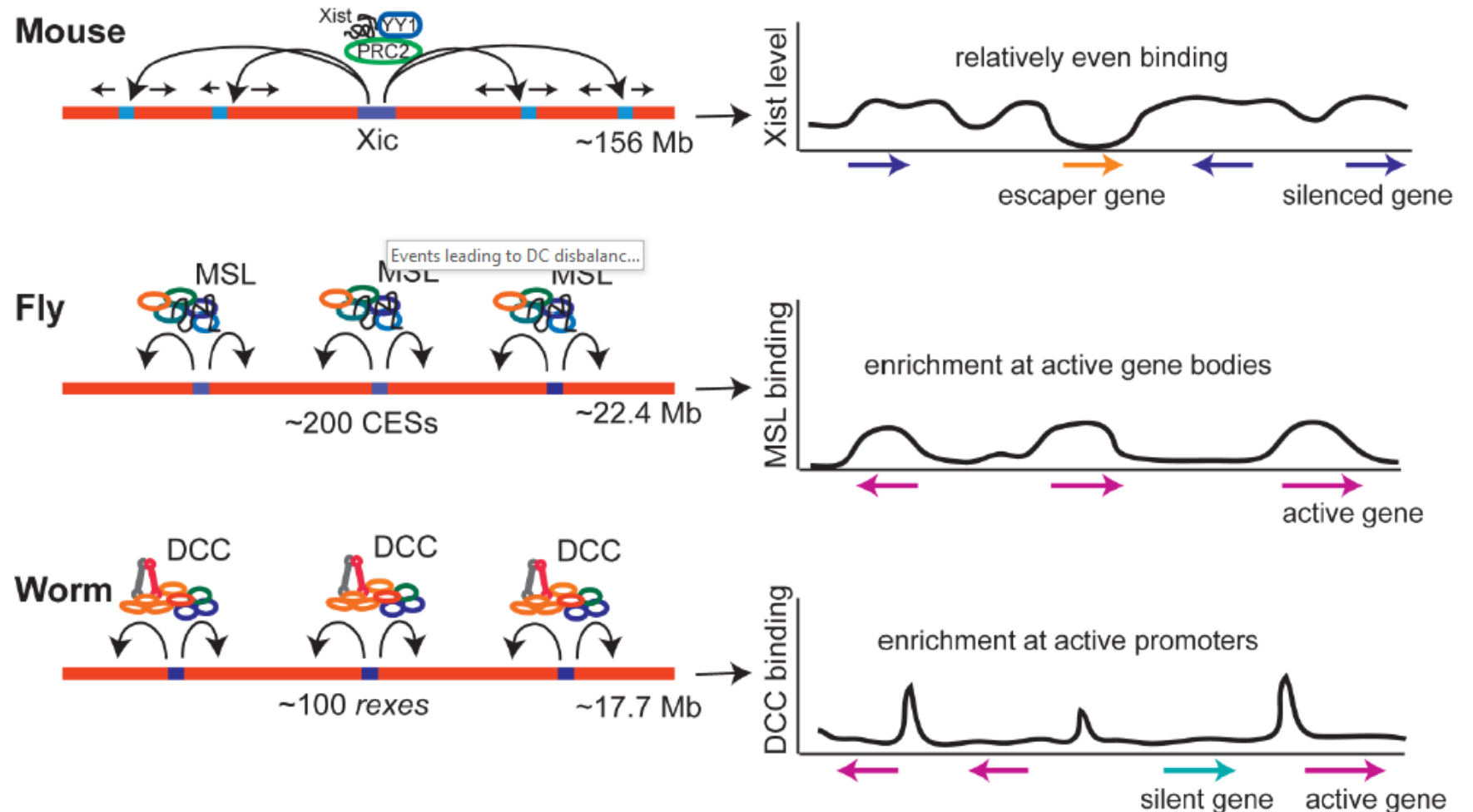


- Z hlediska evoluce DC vazebných elementů byly předpovězeny 4 různé varianty
  - *Cis-acting* elementy na dlouhé vzdálenosti
  - Několik *cis-acting* elementů a šíření umlčování lokálně
  - Několik *cis-acting* elementů bez šíření inaktivace
  - Mnohočetné šíření inaktivace *in-cis* na krátké vzdálenosti

Meyer et al. 2005

# Podobnost specifikace DCC vazby a šíření mezi modelovými organismy

- Podobně jako TFs, DCC s váže do oblastí s nízkou nukleozomální hustotou (MSL se váže na více otevřená místa chromatinu, označená H3K36me3)
- Není známo, jak přesně je DCC lokalizován na X chromozom, možná role několika faktorů
  - Histonová varianta (H2A.Z)
  - Pol II – „pushing“
  - Chromozomální interakce
  - sRNA(?)



Three dimensional interactions may aide Xist spreading



# Similarita DC a kondenzin komplexu, jeho funkce v *C. elegans*

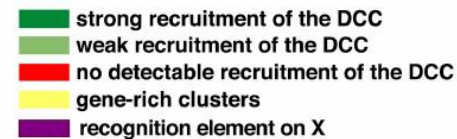
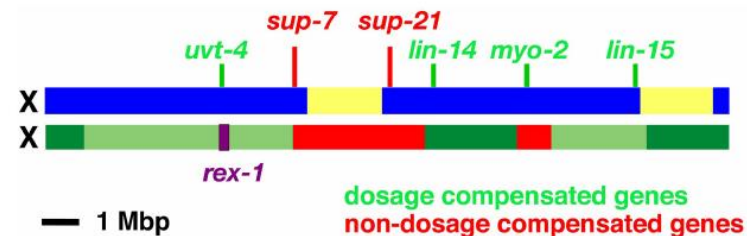
- DC-kondenzin geny v *C. elegans* mají podobnost s geny kódující 13S kondenzin komplex, který je esenciální pro rozlišení a organizaci mitotických a meiotických chromozomů u člověka, kvasinky a dalších druhů = využití existujícího mechanismu
- DC komplex v *Caenorhabditis* se vyvinul ještě s dalšími podjednotkami, které určují jeho specifitu (SDC-2, SDC-3, DPY-30)



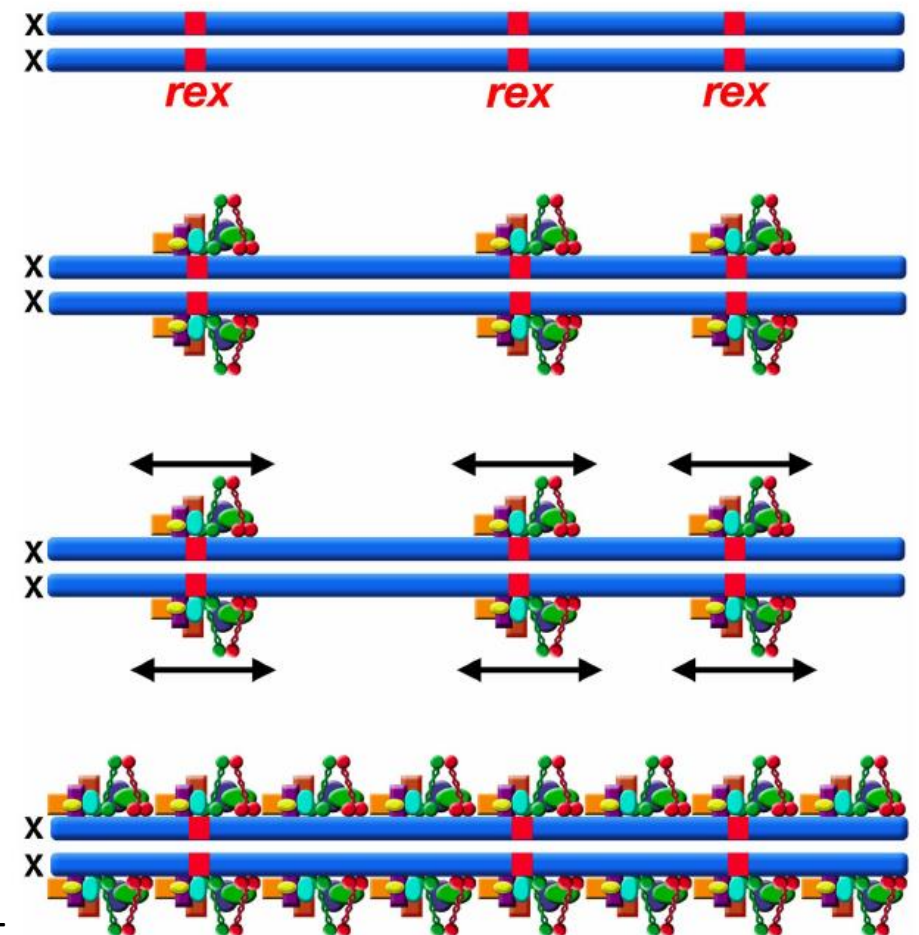


# *C. elegans* X-chromozom vazebná místa a X-chromozom inaktivace

- X chromozom obsahuje několik XRE (X rozpoznávajících elementů)
- XRE se liší od ostatních míst v genomu změnou v bp, tak aby DCC specificky rozpoznal pouze X chromozom
- DCC po vazbě na XRE se šíří *in cis* na další místa X chromozomu

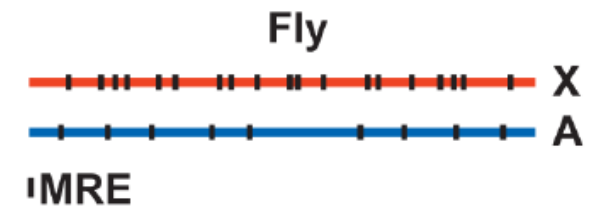
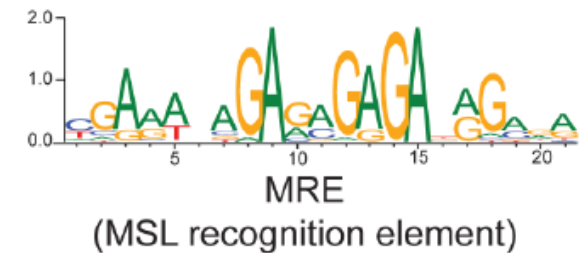
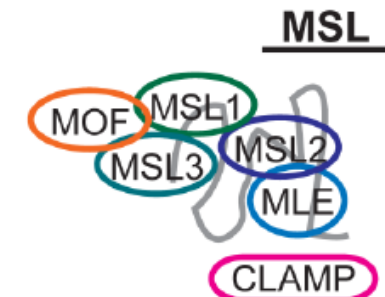
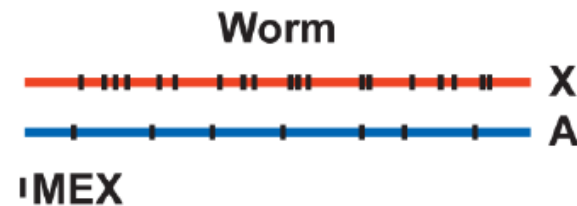
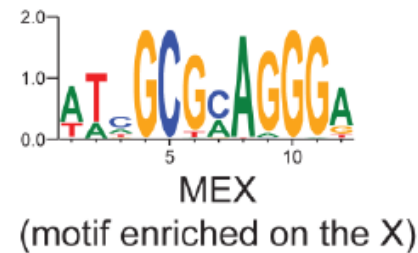
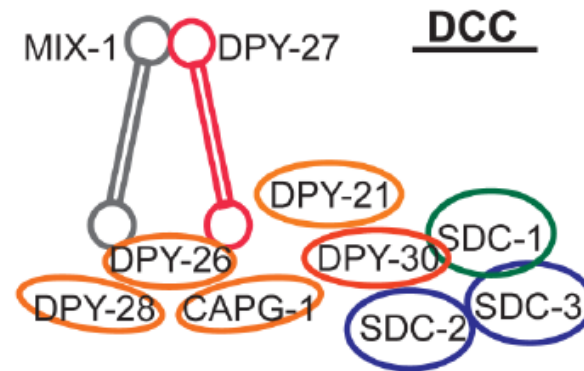


Meyer *et al.* 2005

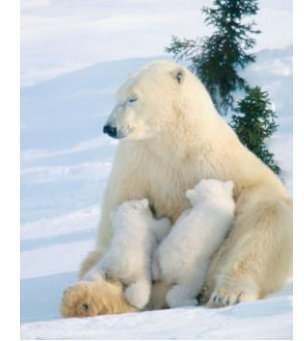
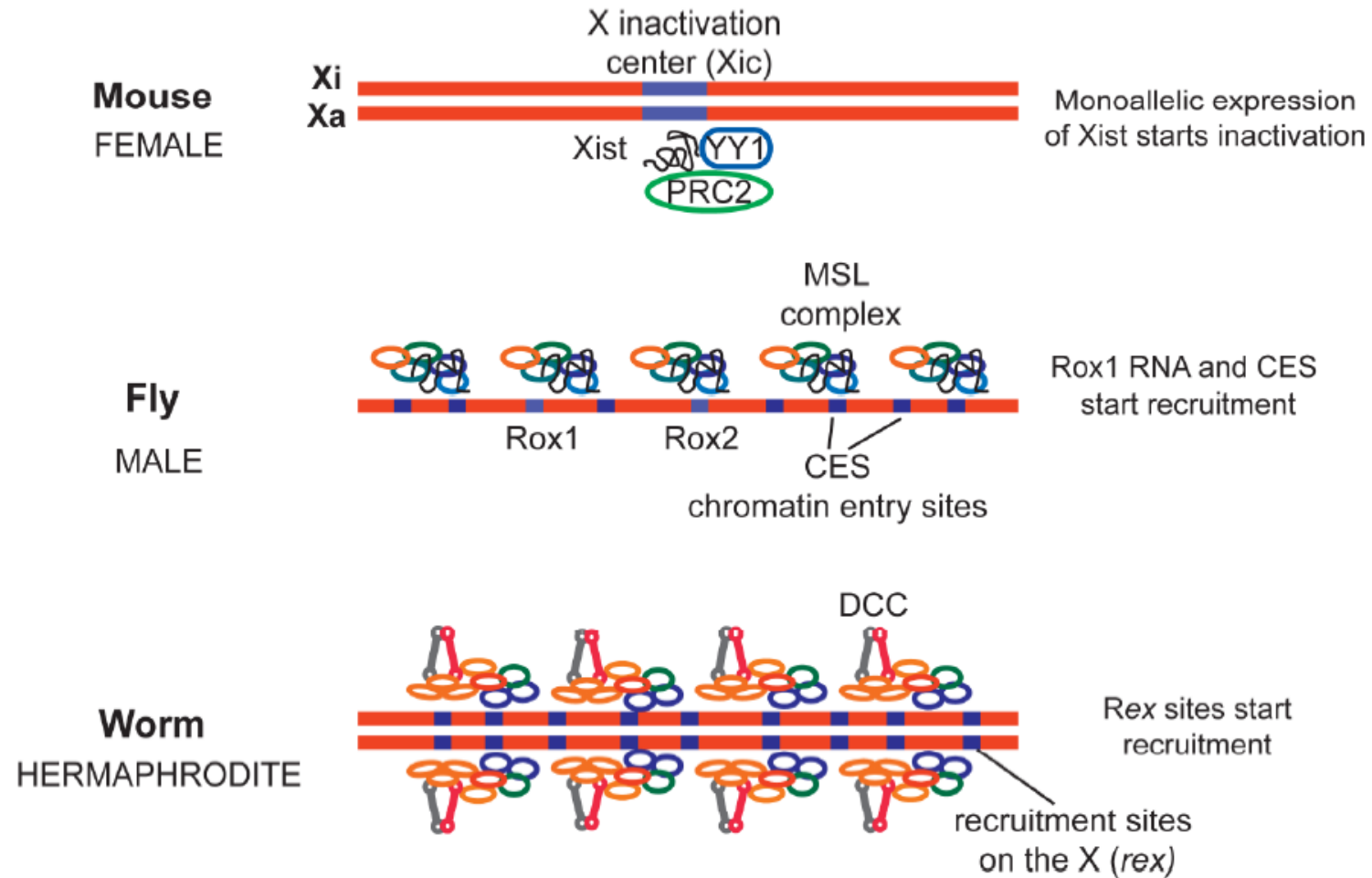


# Podobnost a rozdíly DCC vazebných míst mezi *Drosophila* a *C. elegans*

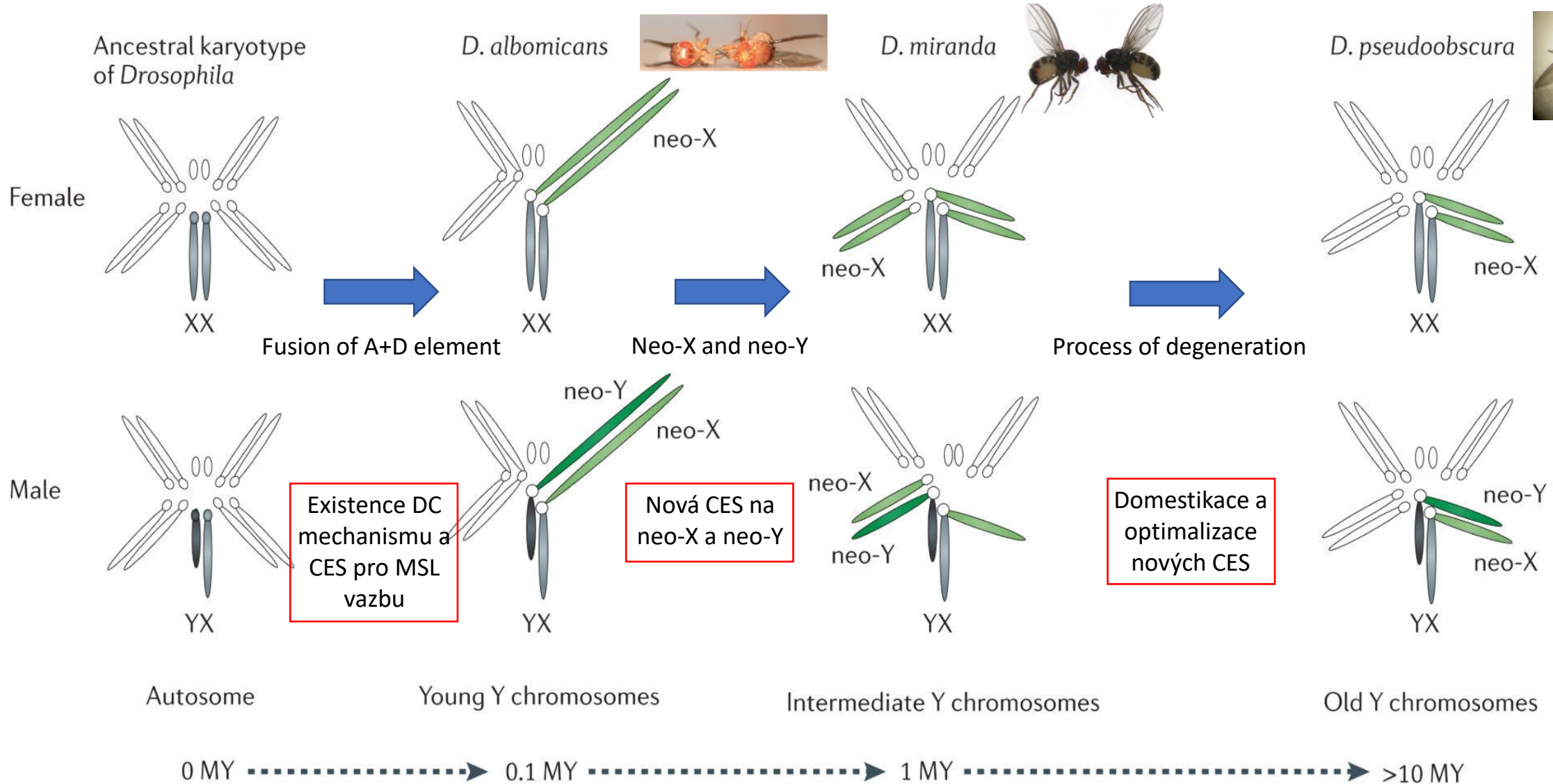
- MRE (21bp) a MEX (12bp) jsou obohaceny na X chromozomu, mají vyšší obsah GA a jsou esenciální pro vazbu DCC
- MRE a MEX se nacházejí v genomu, oproti autozomálním motivům došlo k sekvenční divergenci, mají 2-4x vyšší hustotu na X chromozomu
- DCC v *C. elegans* sdílí 4/5 podobnost s kondensinem I zatímco DCC v *Drosophila* zahrnuje několik podjednotek vázajících non-coding RNA roX



# Rozdíl šíření X chromozom inaktivace mezi modelovými druhy



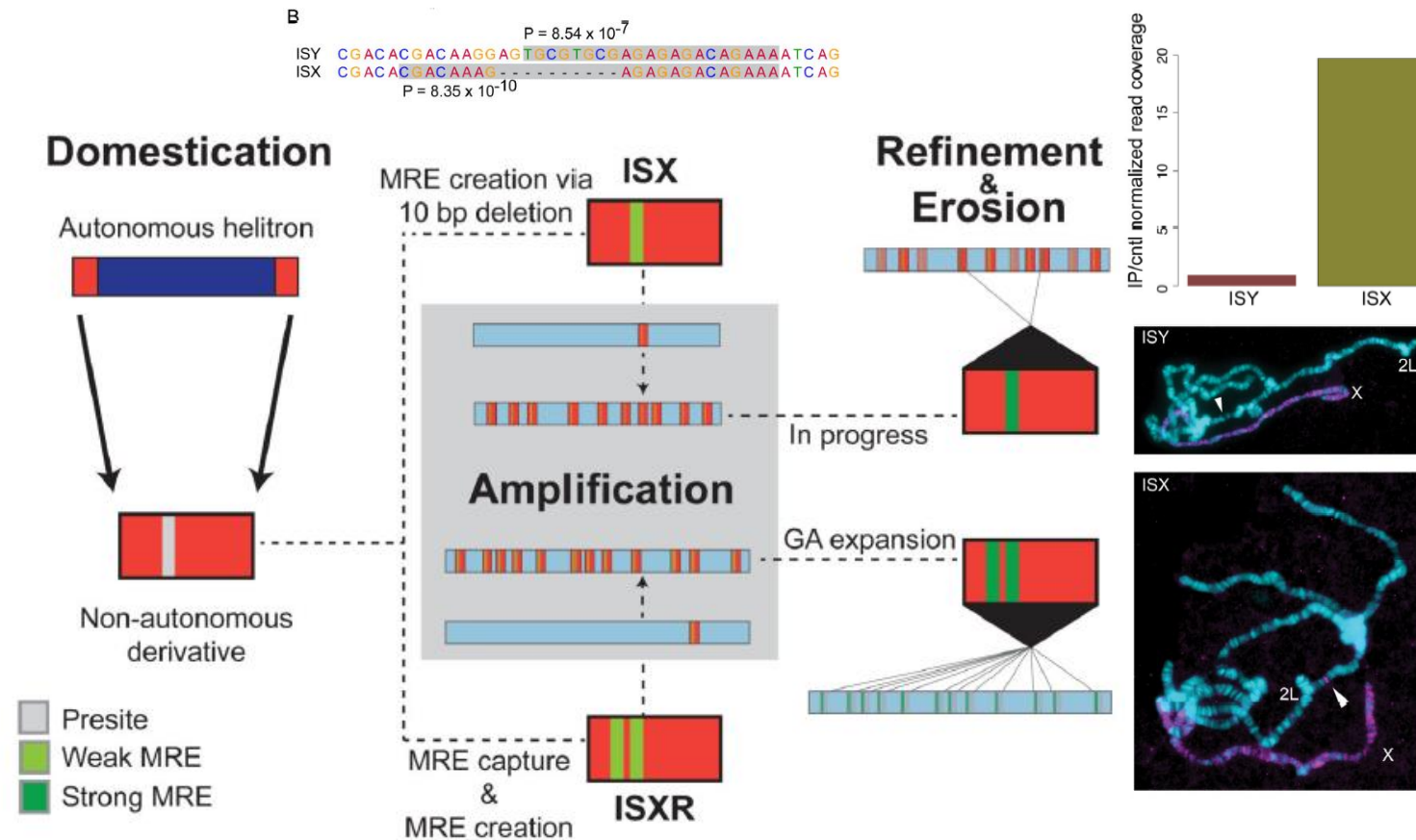
# Evolve XRE a jejich „optimalizace“ na mladých pohl. chromozomech





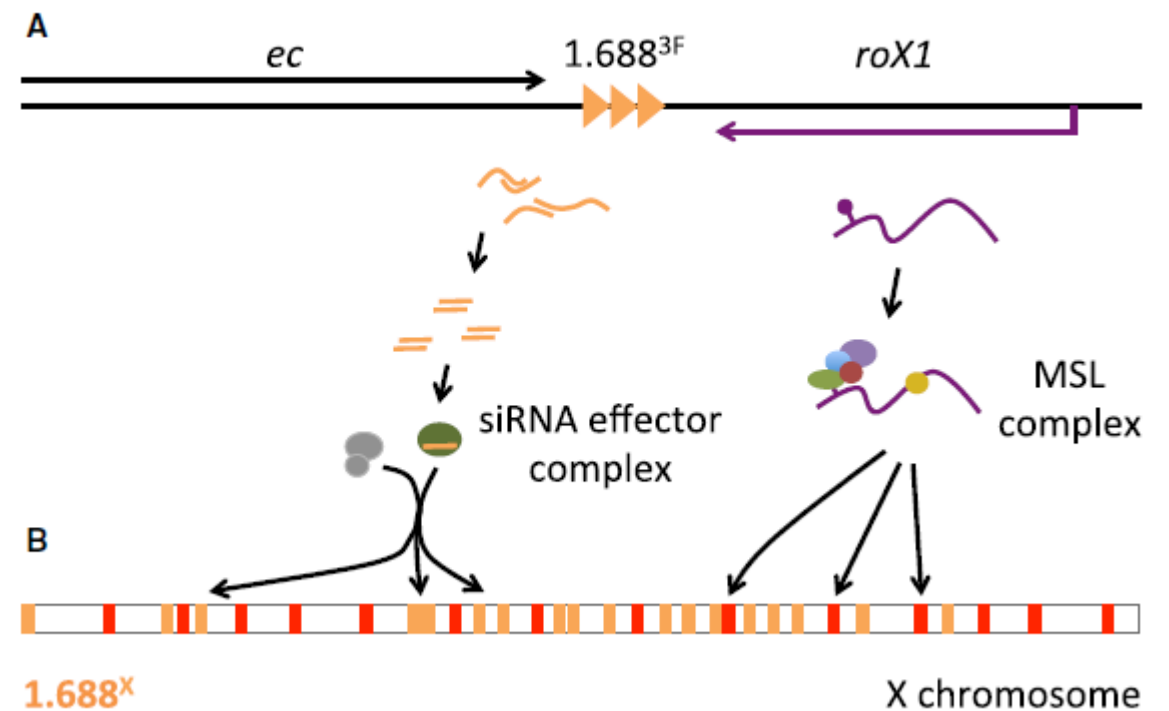
# Evoluce CES na X chromozomu – staré vs. mladé X a Y chromozomy

- I. domestikace a akvizice MRE sekvence jako CES pro MSL komplex
- II. Amplifikace domestikovaných TE (s pre-MRE) na X chromozomu
- III. Degenerace TE a ztráta signálu TE
- IV. Optimalizace pre-MRE na zralá MRE (plná vzaba MSL komplexu)



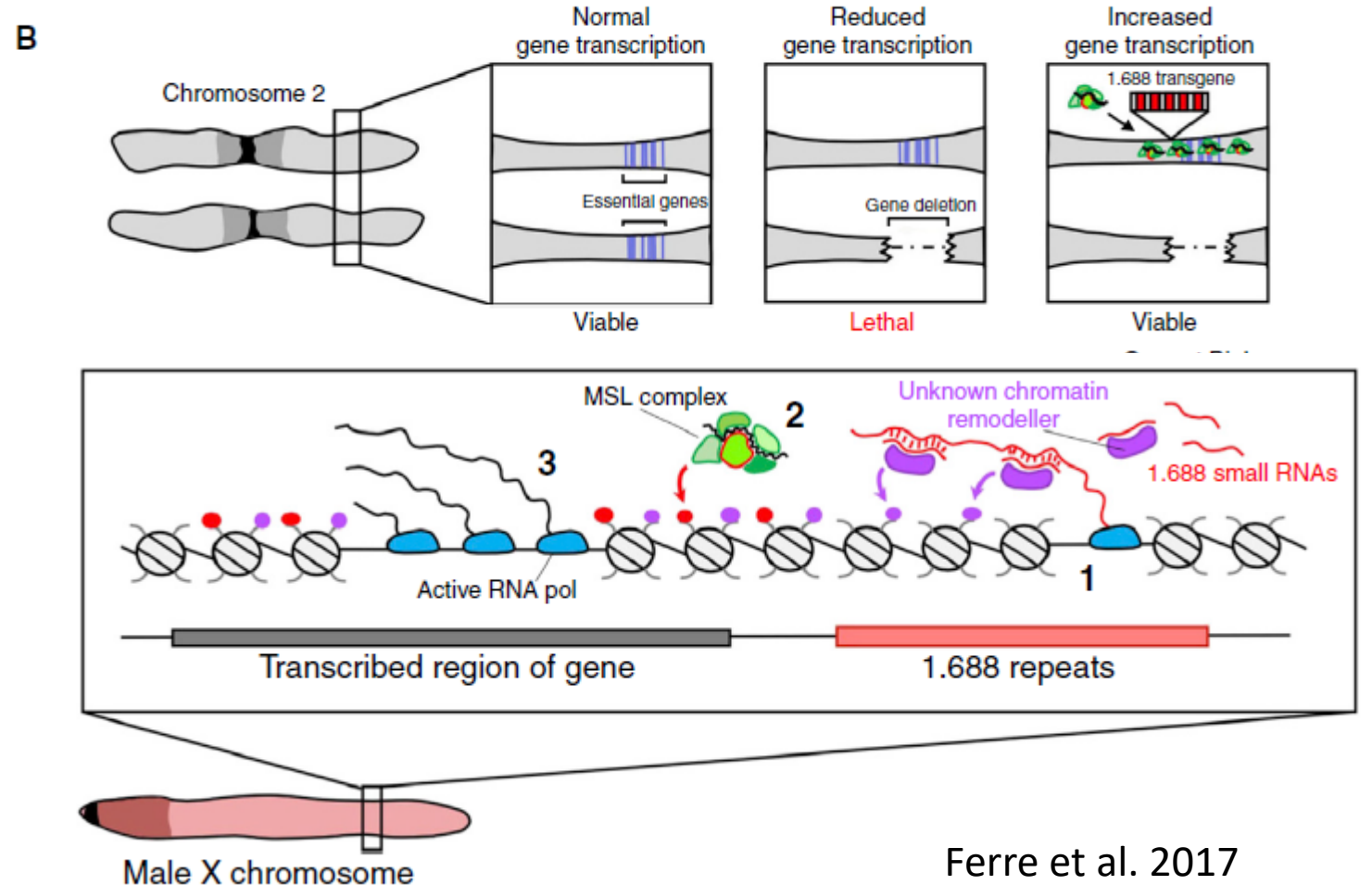
# Úloha sRNA interference ve specifikaci DCC na X chromozomu

- 1.688 satelit je 359bp dlouhá repetice, v malém množství na autozomech, unikátní na X chromozomu
- Slouží k produkci malých RNA během embryogeneze
- siRNA efektor ovlivňuje chromatinové remodelující komplexy na X chromozomu, jejichž funkce je zřejmě nezbytná pro vazbu MSL



# Funkce X chromozom-specifického satelitu u autozomálních genů u letálních mutací

- Inzerce 1.688 satelitu do genové oblasti na autozomu 2 umožňuje přežít jedincům s delecí homologního úseku (napodobení XY genové disbalance)
- siRNA tedy nepřímo umožňuje vazbu MSL komplexu pro acetylaci H4K16 a vyšší genovou expresi

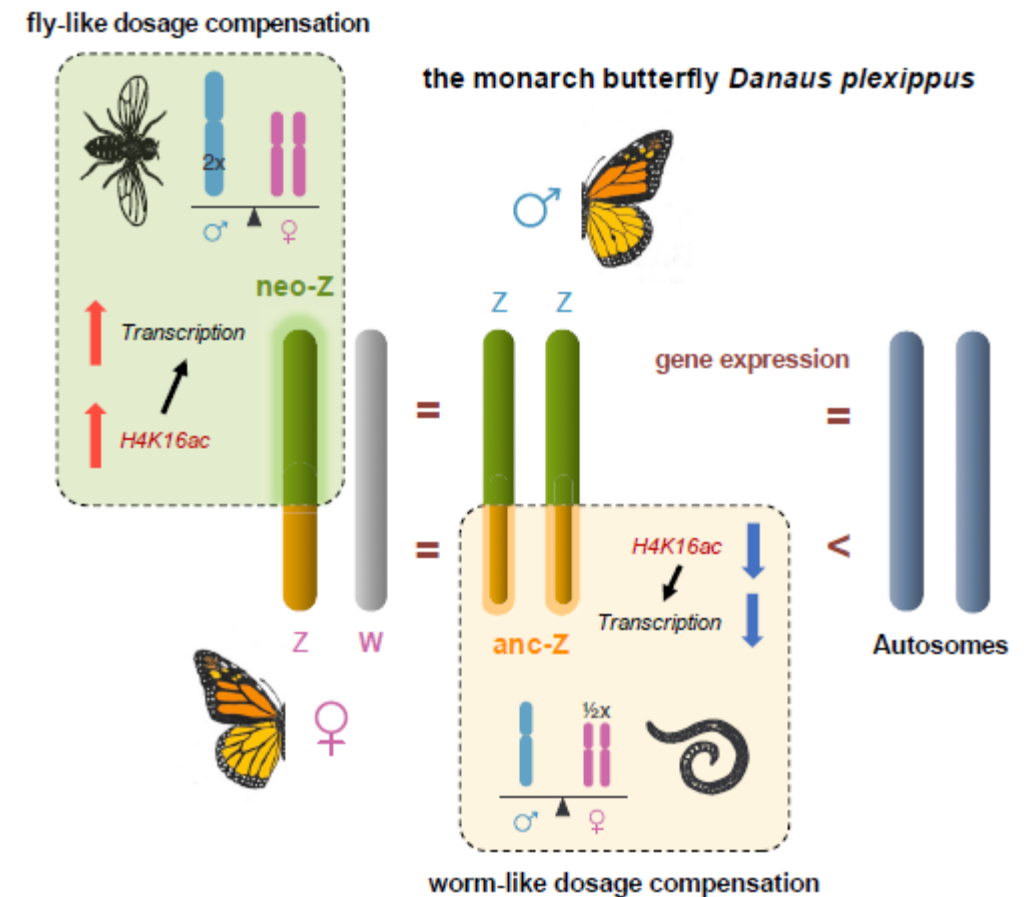


Ferre et al. 2017

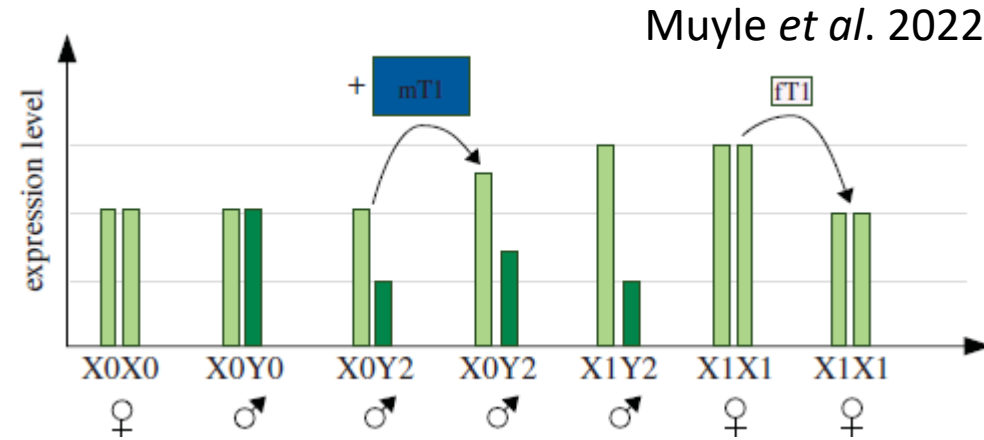
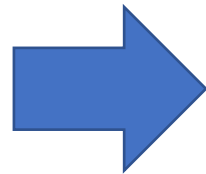
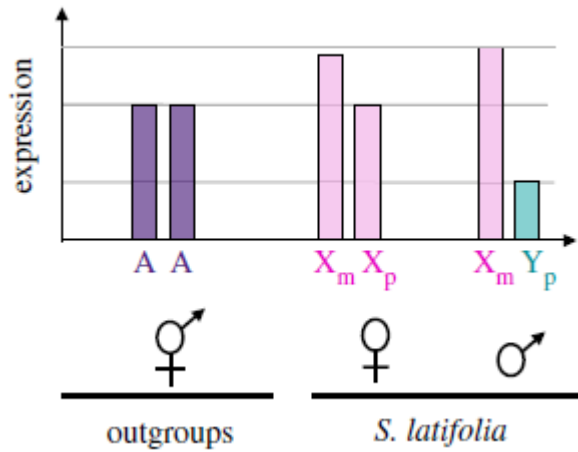


# Ko-existence DC mechanismů a jejich kombinační vlastnosti na chromatin – dichotomie DC mechanismu u monarchy stěhovavého

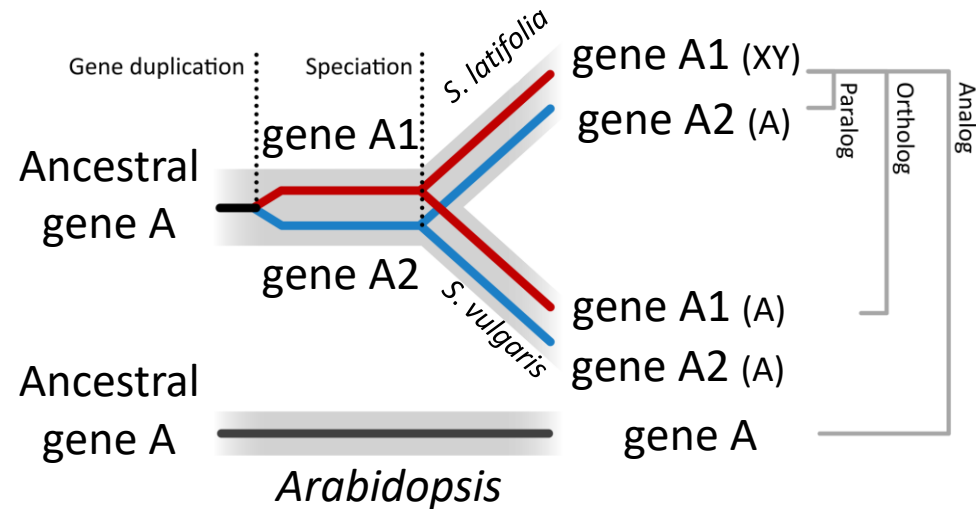
- Ancestrální část Z chromozomu má nižší expresi a nižší úroveň H4K16ac („*C. elegans* like DC“)
- Nové neo-Z oblasti jsou obohaceny H4K16ac („*Drosophila* like DC“)
- Mechanismus rozporující evoluční hypotézu – nové pohl. chromozomy získávají DC mechanismus ancestrálního typu



# Jak lze studovat evoluci DC mechanismus



V optimálních podmínkách se exprese X(Z) senzitivních alel zvyšuje s mírou úrovně Y(W) degenerace



- Pro studium DC a jeho skutečného efektu je nutné porovnat ancestrální stav exprese pohlavně-vázaných genů s jejich ortology (autozomální stav)

Děkuji za pozornost!