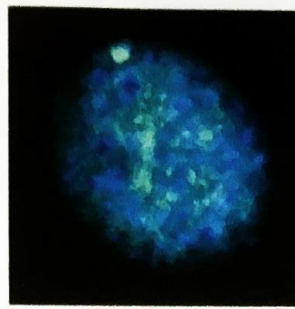
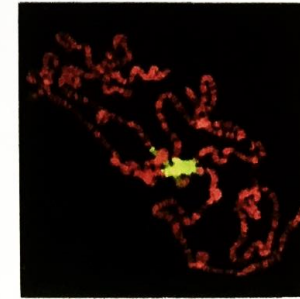




Twins



Barr body



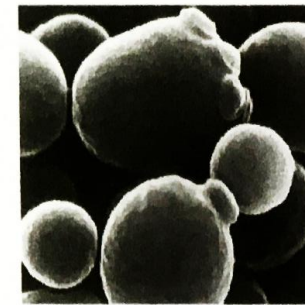
Polytene
chromosomes



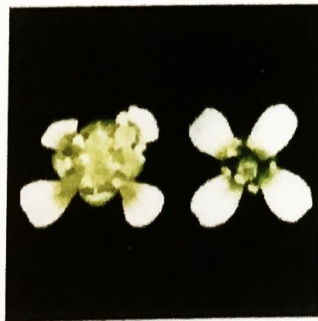
Cloned cat

Epigenetic biology

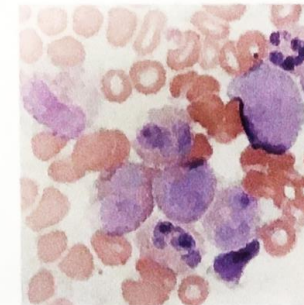
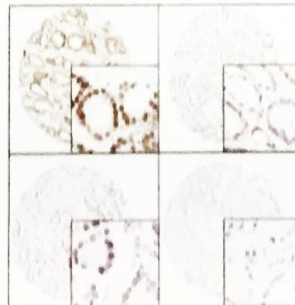
Vývojová genetika 2023



Yeast mating types



Mutant plant



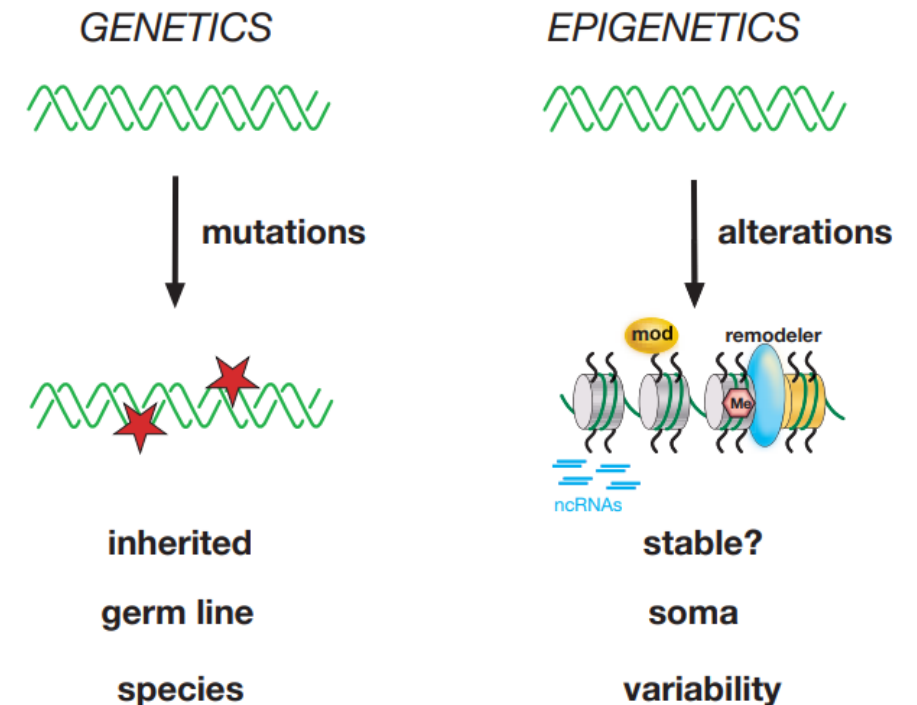
Blood smear

Epigenetika – definice

- Studium dědičných mitotických (a meiotických) změn v genové expresi, která se vyskytuje beze změny v primární struktuře DNA



- Ostatní definice nezahrnují nutně epigenetickou dědičnost mitotickým dělením



Epigenetika jako „vědecký jazyk“



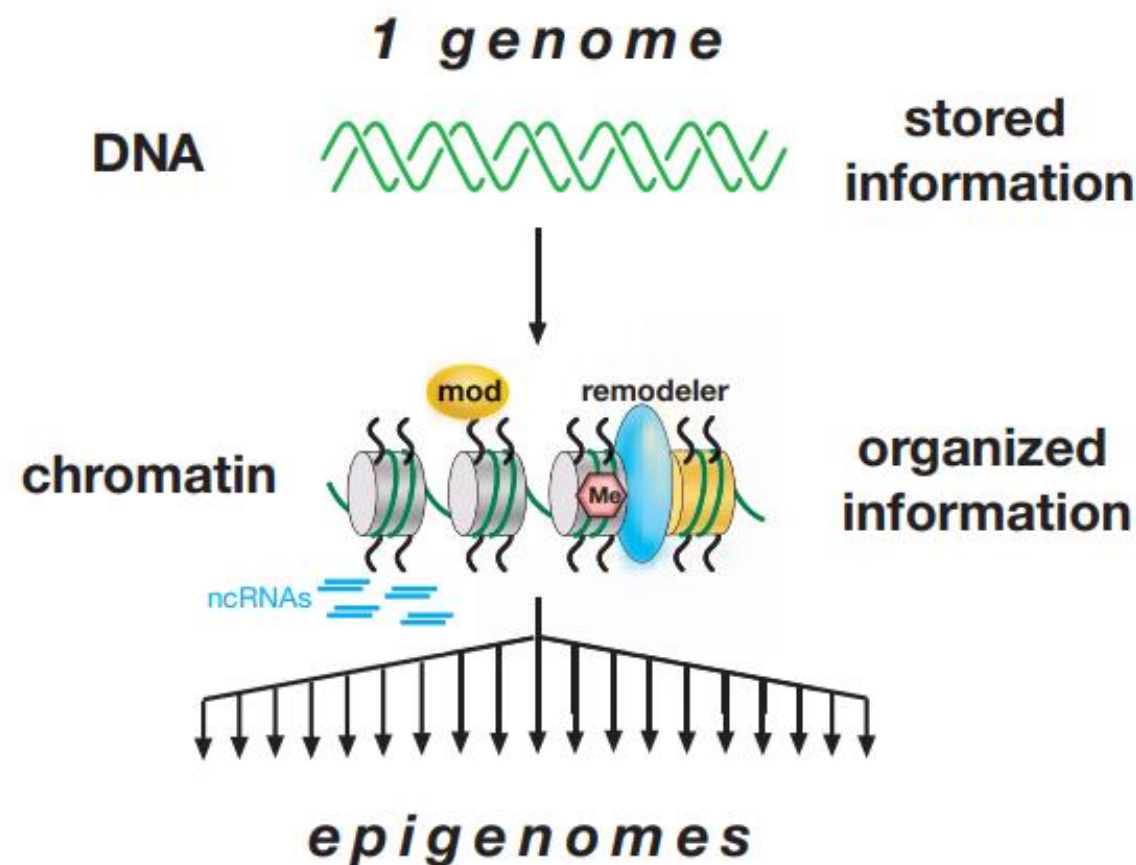
MIMINKO



- Termín epigenetika představuje vědní obor, studující změny v genové expresi a studující informaci nad DNA, která je nutná pro uskutečnění vývoje a bun. diferenciace

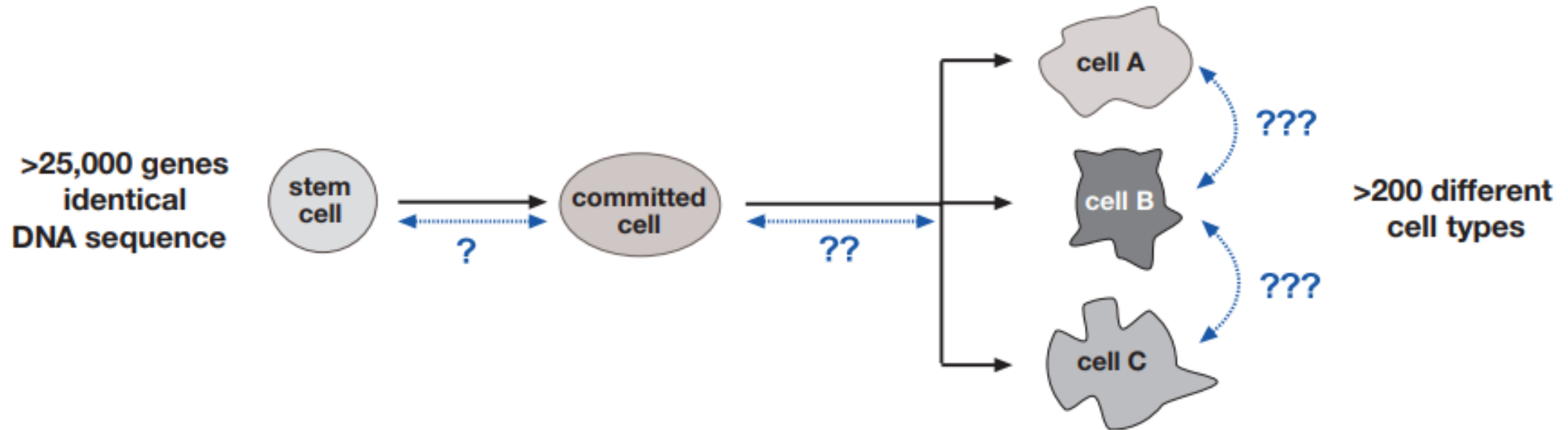
Každý buněčný typ je definován aktivitou specifické sady genů,
které jsou v čase a prostoru exprimovány

Definice základních pojmů



- **Genom** – veškerá genetická informace uložená v DNA (u některých virů v RNA) konkrétního jedince
- **Epigenom** – souhrn (záznam) chemických modifikací DNA a histonů, nebo dalších proteinů (**methylylace, acetylace, sumoylace...**), konkrétního organismu (modifikace jsou dědičné)
- **Epimutace** – změna v chemické struktuře DNA, která nezahrnuje změnu v primární struktuře (mC, caC, fC..)

Význam epigenetiky na buněčné úrovni I

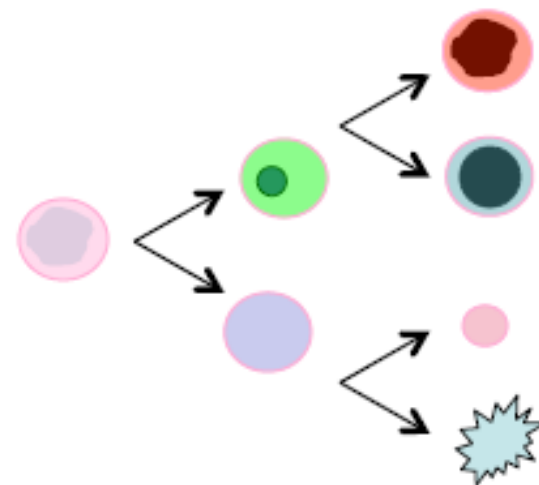
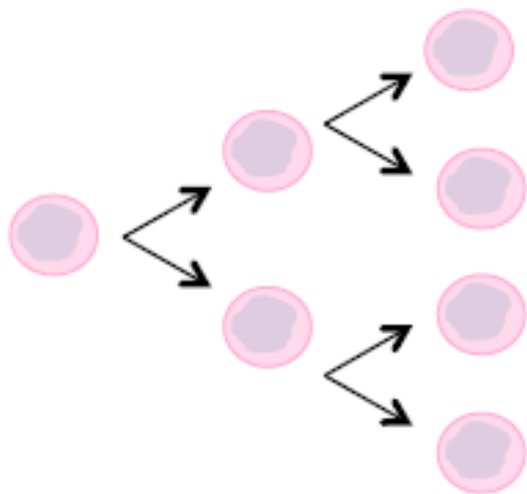


- „c-value paradox“ – velikost genomu se nezvyšuje s komplexitou a složitostí organismů
- Regulace genové exprese a její realizace je uskutečňována na několika úrovních, každá buňka dostává specifickou informaci z okolí a z předchozího buněčného dělení (**epigenetická dědičnost**)

Význam epigenetiky na buněčné úrovni II



Meruňka japonská

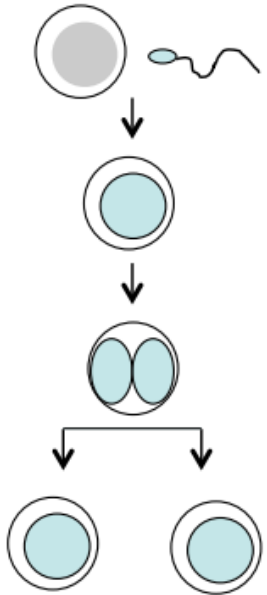


Taylor Muhl

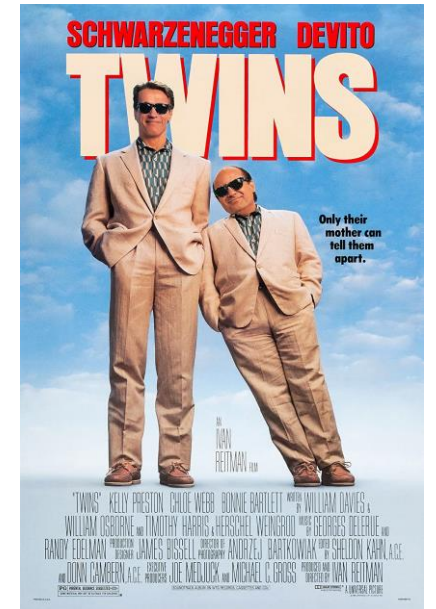
- Epigenetická dědičnost zajišťuje:
 - Expresi stejných genů v dceřiných buňkách
 - Tkáňovou homogenitu

- Absence epigenetické dědičnosti = tkáňová heterogenita (exprese různých genů, tkáňová chiméra-nezaměňovat s genetickou chimérou)

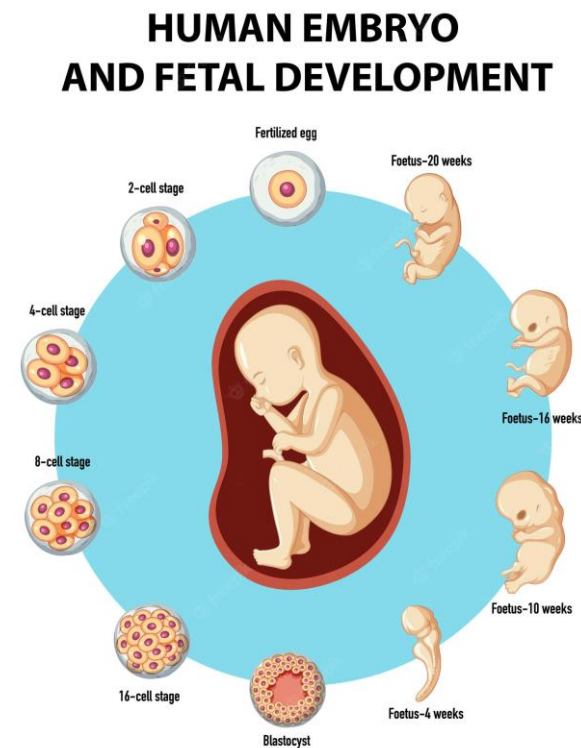
Rozdílnost jednobuněčných dvojčat – mechanismus?



- Jednobuněčná dvojčata vznikají během ranného 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



Epigenetika jako „vědecký jazyk“



GENOVÁ EXPRESE

DNA



RNA

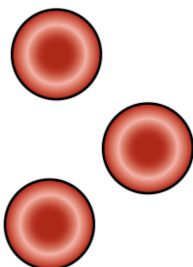


protein



NEURON

Hemoglobin -
Dopamin +
Myoglobin -



ČERVENÉ KRVINKY

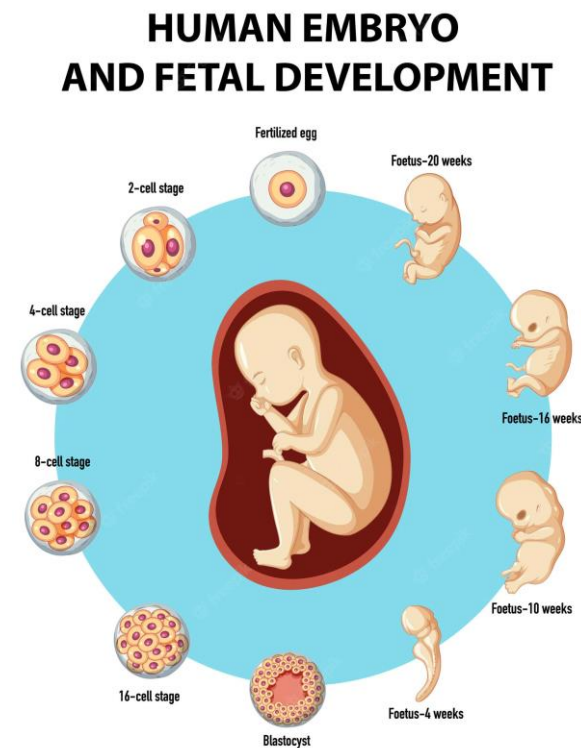
Hemoglobin +
Dopamin -
Myoglobin -



SVALOVÉ BUŇKY

Hemoglobin -
Dopamin -
Myoglobin +

Epigenetika jako „vědecký jazyk“



DNA



GENOVÁ EXPRESE

RNA



protein

- Aktivita specifických transkripčních faktorů
- Epigenetické modifikace na úrovni DNA a histonů

Čeština využívá 42 písmen (26 latinka), epigenetika v přeneseném slova smyslu funguje stejným principem jako znaménka a formátování textu.

Epigenetika jako „vědecký jazyk“ a znaménka v češtině?

Epigenetické modifikace mohou být považovány za znaménka nebo značky v genomu a jejich význam tohoto jazyka je vyvíjen pro všechny zacinající civedce

- Epigenetický kód slouží jako:
 - Formátování/styl textu (=aktivita nebo represe genu)
 - definuje mezery mezi slovy (=vyznačuje začátek nebo konec genu)
 - Definuje znaménka a tedy i význam slov (=jak a kdy mají být geny čteny)
 - Definuje kapitoly a odstavce (=struktura chromatinu a potažmo celého chromozomu)



NEURON

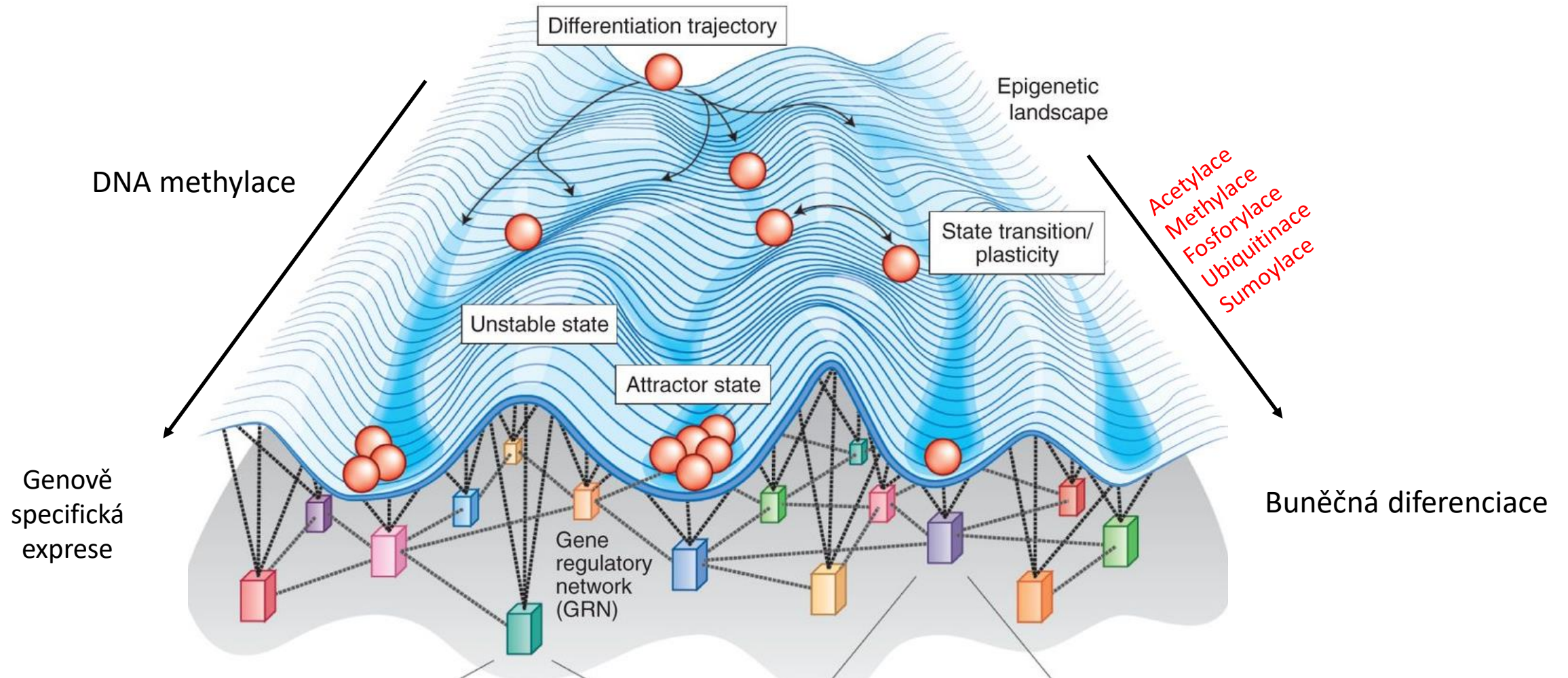
Hemoglobin = epigeneticky umlčen
Dopamin = epigeneticky aktivní
Myoglobin = epigeneticky umlčen



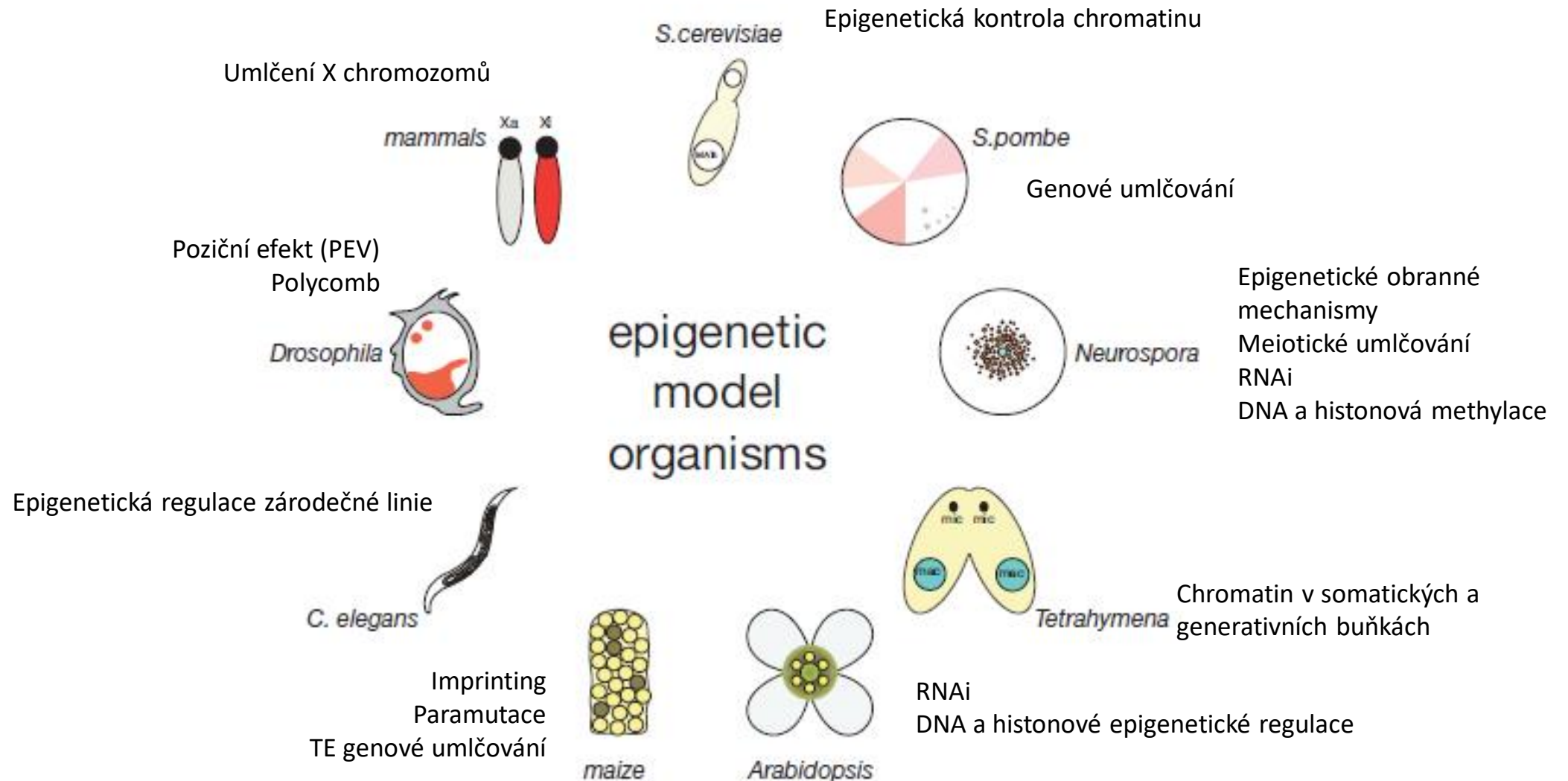
SVALOVÉ BUŇKY

Hemoglobin = epigeneticky umlčen
Dopamin = epigeneticky inaktivní
Myoglobin = epigeneticky aktivní

Epigenetická informace jako „epigenetický“ krajinný model



Modely ke studiu epigenetických jevů



EPIGENETICKÉ JEVY PŘEDSTAVUJÍ VÝJIMKY Z MENDELOVÝCH ZÁKONŮ



Gregor Mendel
(1822-1884)

- Samostatnost alel. Genotyp je soubor samostatných genů určujících znaky. Každý je znak je určen dvojicí samostatných alel.
- Segregace alel. Princip NEZÁVISLÉ SEGREGACE ALEL : dvojice samostatných alel se při meióze rozcházejí a každá gameta dostává jednu z obou alel
- Nezávislá kombinace alel. (s výjimkou alel ve vazbě)
- IDENTITA RECIPROKÝCH KŘÍŽENÍ. (při vzájemném křížení homozygotních rodičů (P) vzniká první filiální generace (F1) potomků, kteří jsou genotypově i fenotypově jednotní.
- Zákon o štěpení v potomstvu hybridů.

EPIGENETICKÉ JEVY PŘEDSTAVUJÍ VÝJIMKY Z MENDELOVÝCH ZÁKONŮ



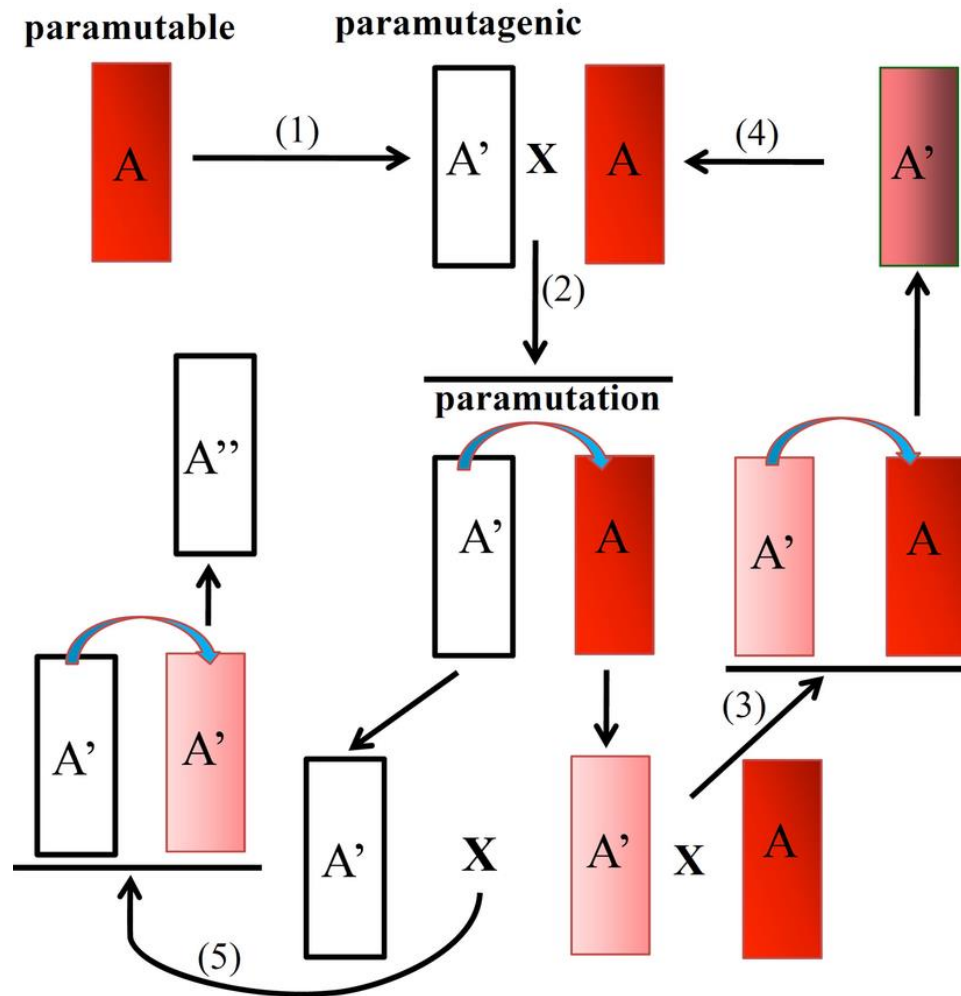
Gregor Mendel
(1822-1884)

Alely se mohou podrobovat vzájemným interakcím, které mají za následek dědičnou změnu jejich exprese : PARAMUTACE, TRANSVEKCE

Některé genomy, chromosomy či lokusy jsou v průběhu gametogeneze sex-specificky reverzibilně modifikovány, což vede k jejich umlčení ve filiální generaci : PARENTÁLNÍ IMPRINTING

Paramutace a její funkce

Paramutabilní alela – alela, která je exprimována



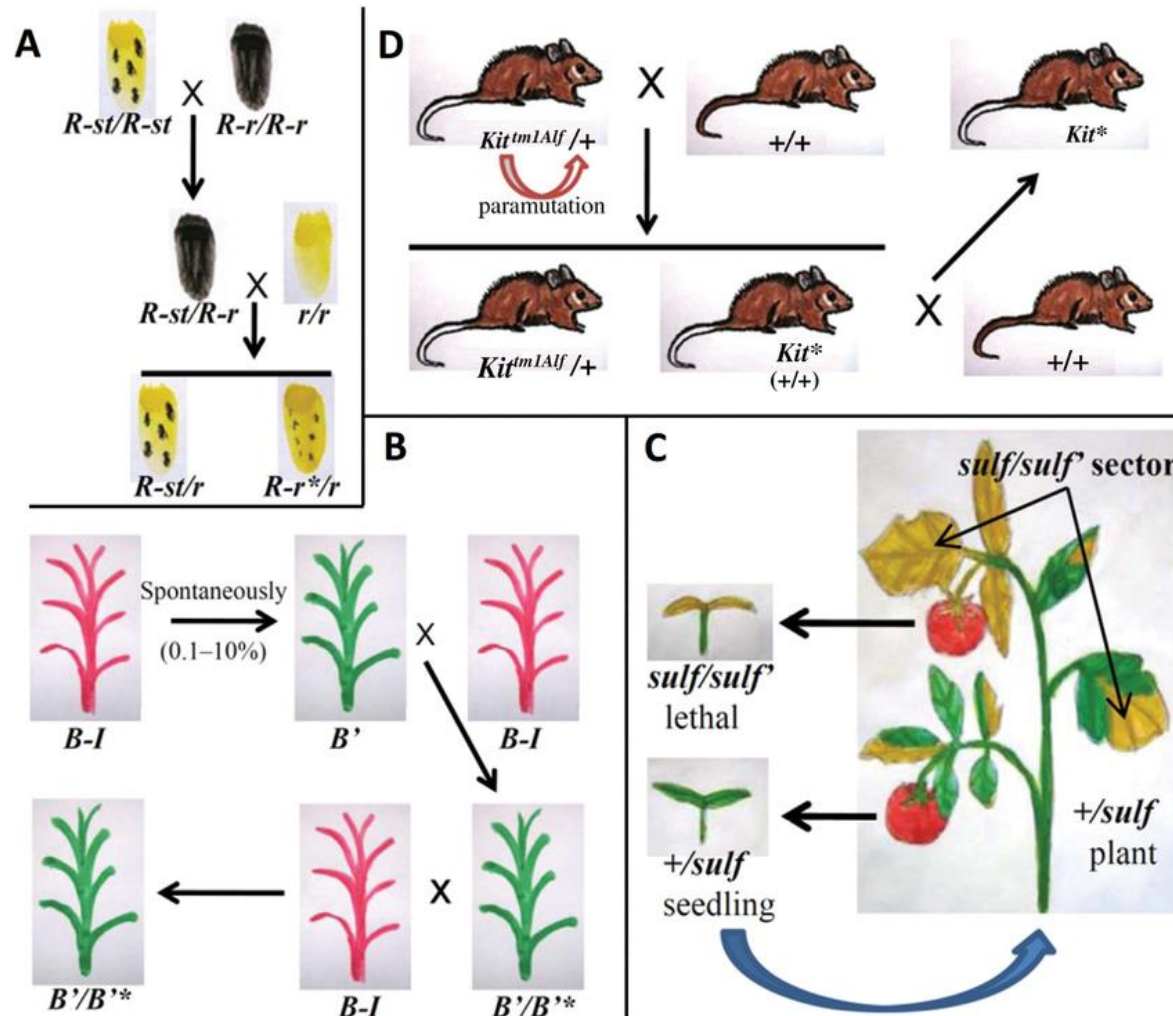
Paramutagenní alela – umlčená alela, která je schopna ovlivnit (umlčet) druhou alelu

Paramutace a její demonstrace u různých modelových organismů

Akumulace anthocyaninu v obilce kukuřice v případě r1 lokusu (paramutabilní R-r a paramutagenní R-st)

nebo

v případě celé rostliny lokusu b1 (paramutabilní B-I a paramutagenní B')



Kit lokus (tyrosine kináza receptor) – paramutabilní + a paramutagenní Kit^{tm1Alf}

Sulf lokus způsobující nedostatek chlorofylu (paramutabilní + a paramutagenní *sulf*)

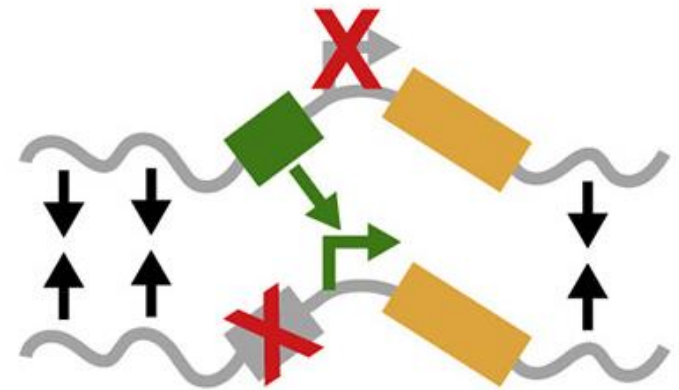
Transvekce – funkce a definice

- Edward Butts Lewis
 - získal Nobelovu cenu 1995 za práci na modelu *Drosophila* a objevení transvekce na *bithorax* komplexu



"Operationally, transvection is occurring if **the phenotype of a given genotype can be altered solely by disruption of somatic (or meiotic) pairing**. Such disruption can generally be accomplished by introduction of a heterozygous rearrangement that disrupts pairing in the relevant region but has no position effect of its own on the phenotype"

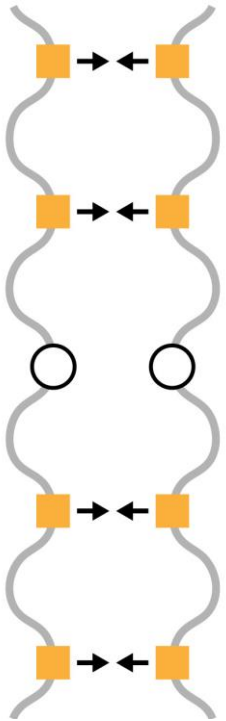
- Popsána u lidí, myší, rostlin, nematod, hmyzu a hub



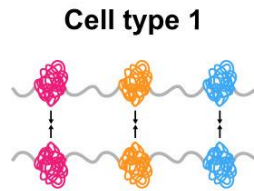
Viets et al. 2019

Transvekcce – molekulární mechanismus

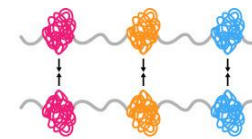
Step 1: Pairing
Physical proximity



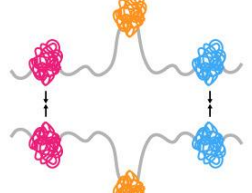
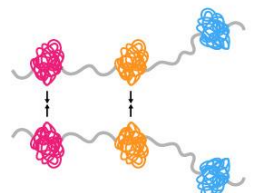
Constitutive pairing



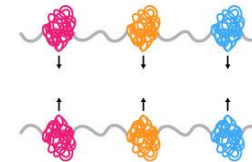
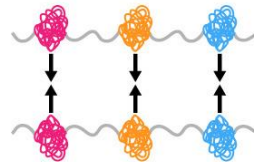
Cell type 2



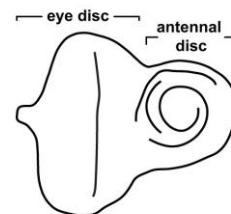
Cell-type-specific pairing



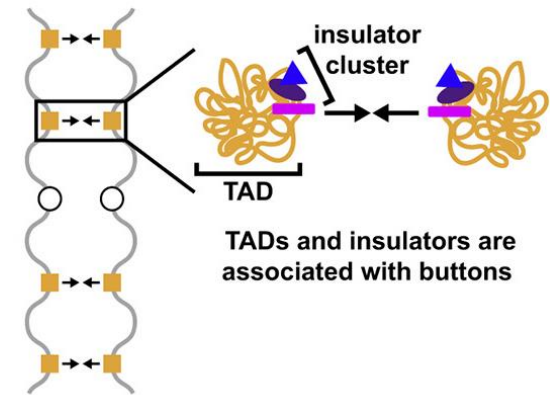
Strong vs. weak pairing cell types



Larva



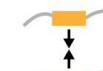
Button regions drive homologous chromosome pairing in *Drosophila*



Strong pairing cell type

Weak pairing cell type

Transgene:
1 button

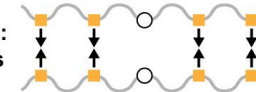


PAIRING

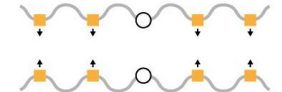


NO PAIRING

Chromosome:
Many buttons



PAIRING



PAIRING

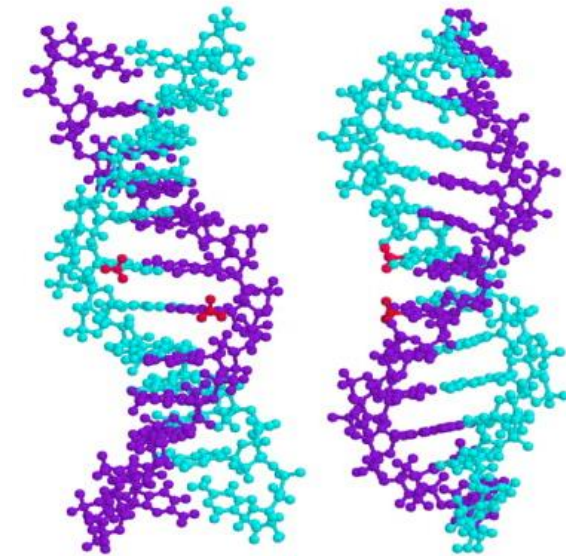
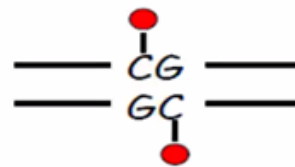
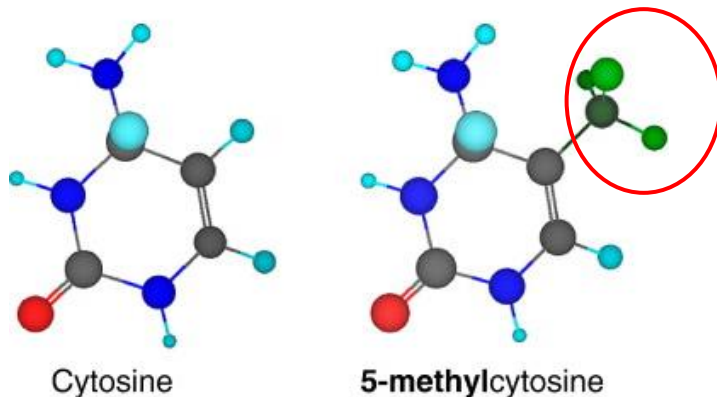
Regulace genové exprese epigenetickými mechanismy

- DNA methylace
- RNA interference
- Histonové modifikace

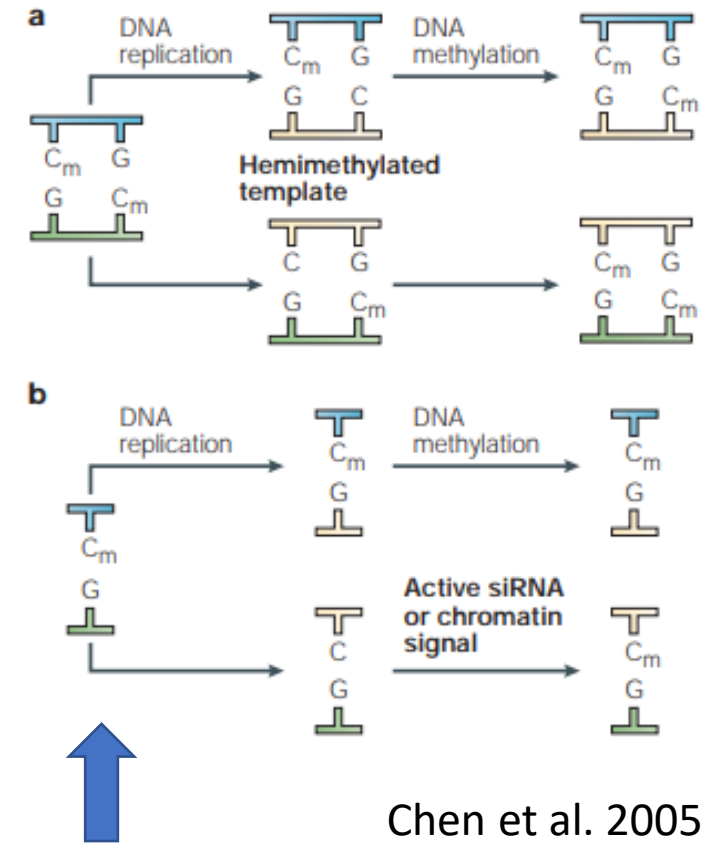
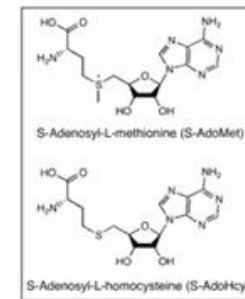
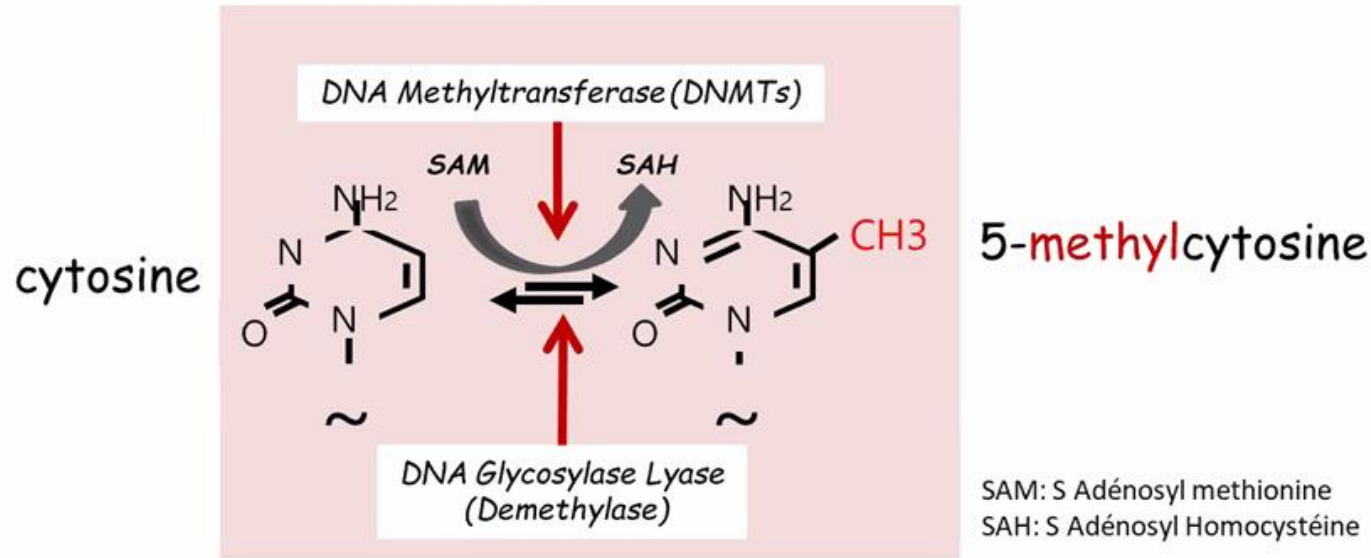


Methylace DNA

- 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

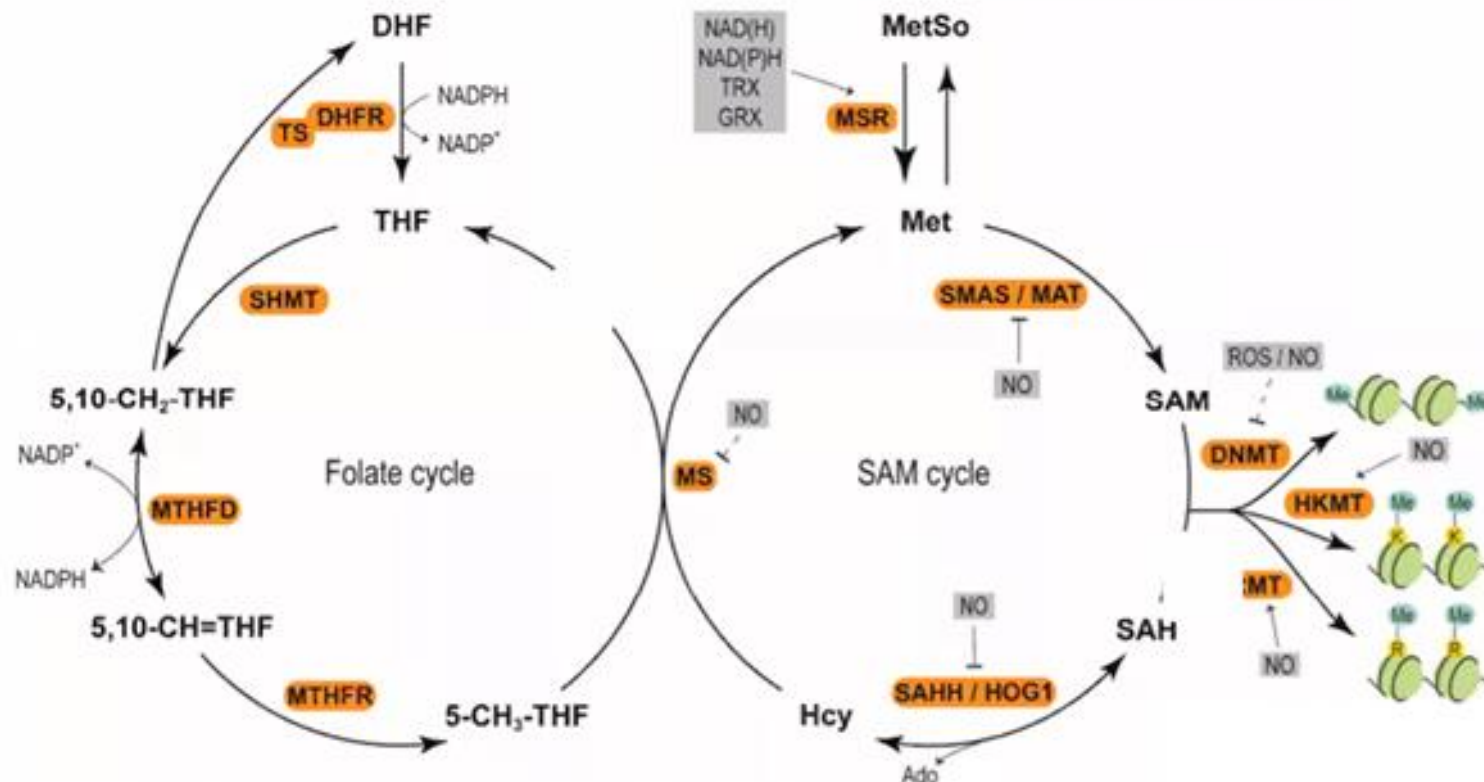


Mechanismus DNA methylace – de novo methylace a udržovací methylace



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

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

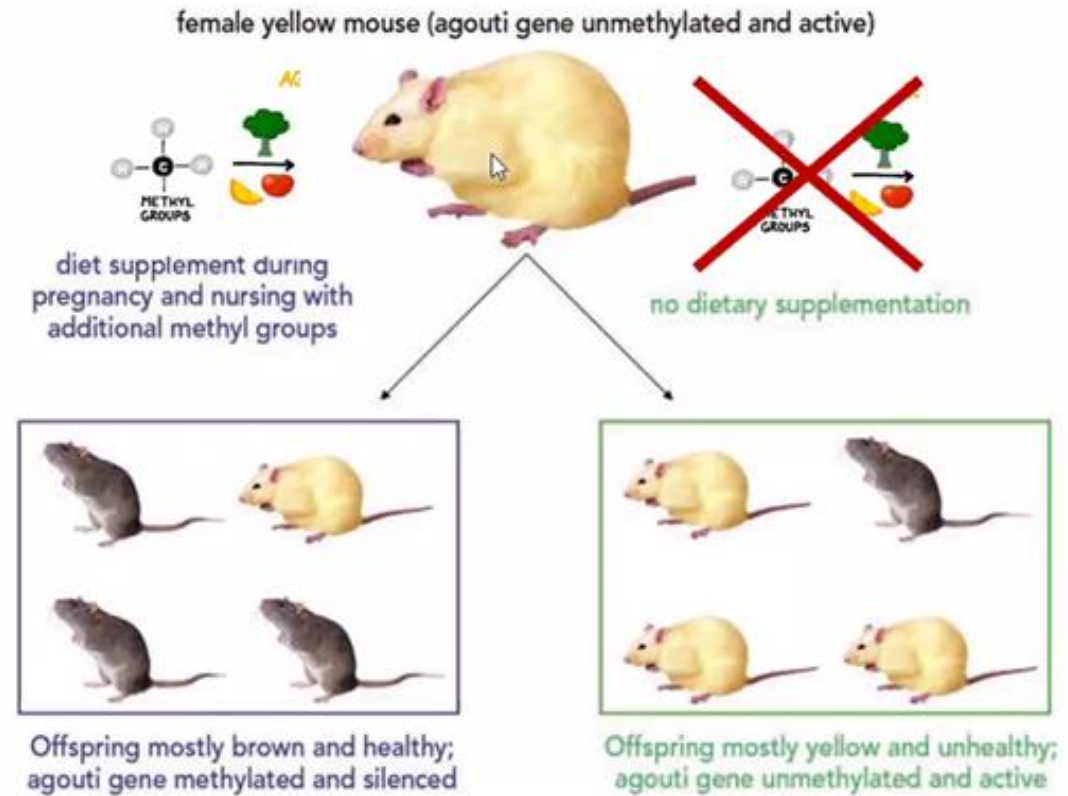
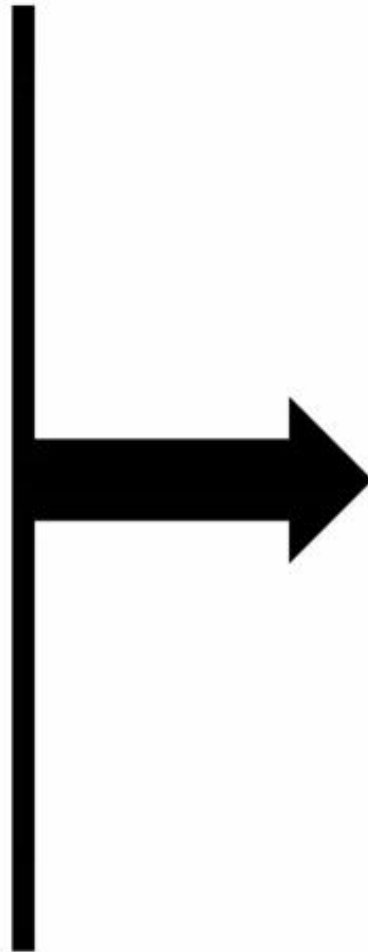
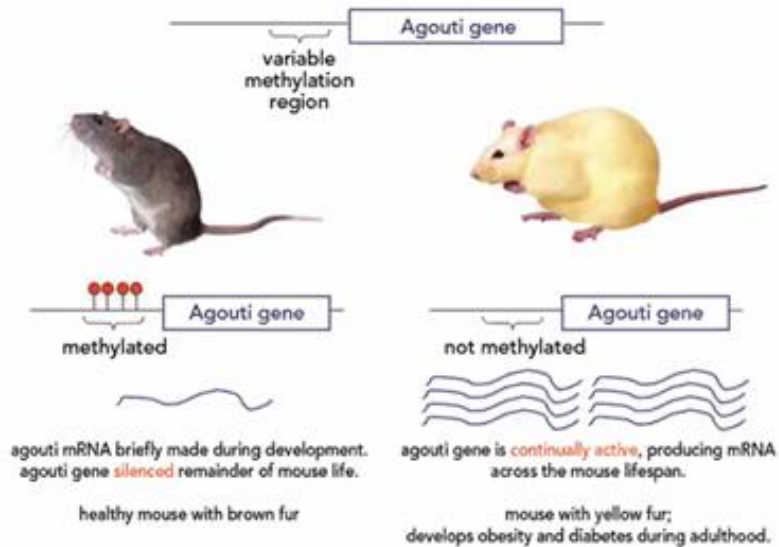
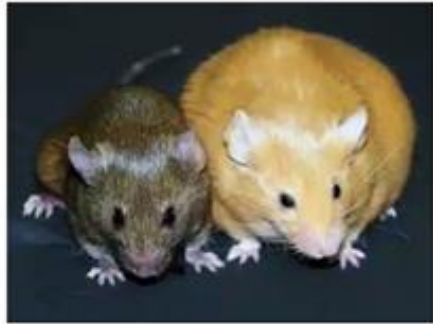


- SAM je prekurzor všech epigenetických modifikací vyžadující metylovou skupinu

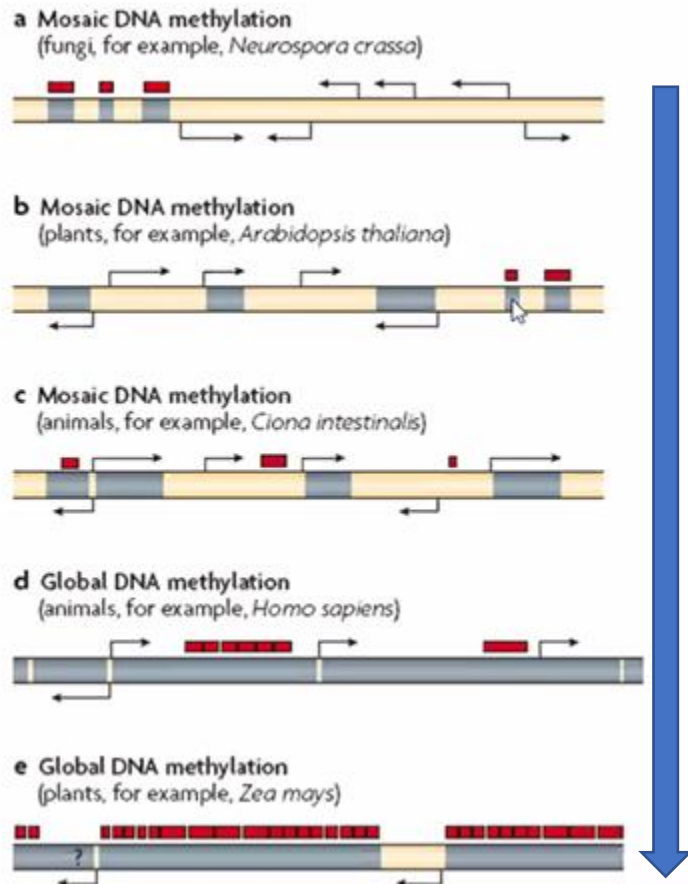
- DNA methylace
- Methylace lysinových residuí
- Methylace argininových residuí

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*

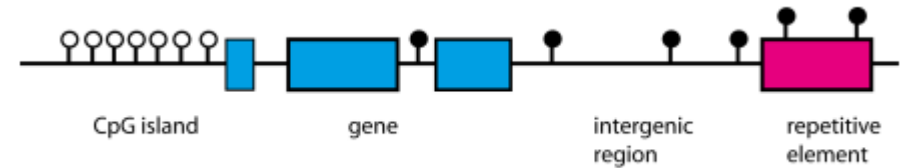


Rozdíly DNA methylace koreluje se strukturou genomů a jejich velikostí



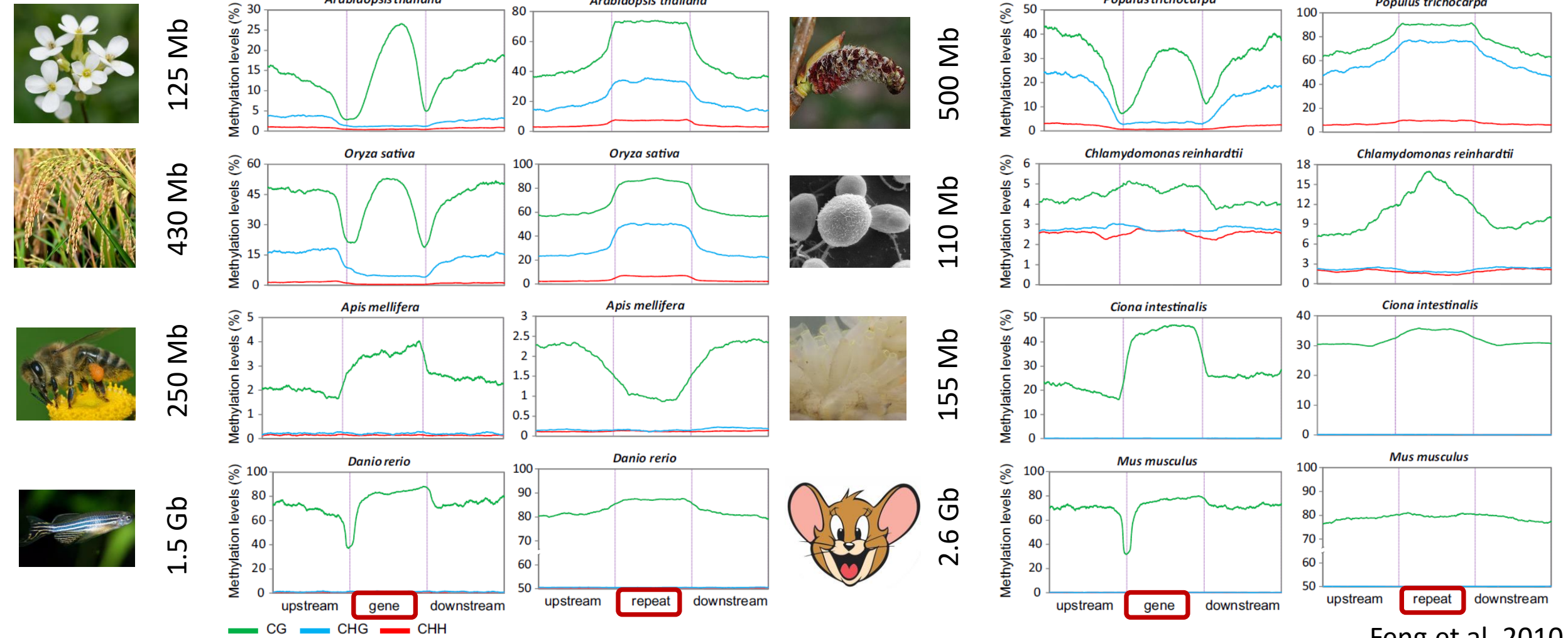
Množství repetit

Genomově
specifická
methylace
(např.
X inaktivace)



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

Rozdíly DNA methylace koreluje se strukturou genomů a jejich velikostí



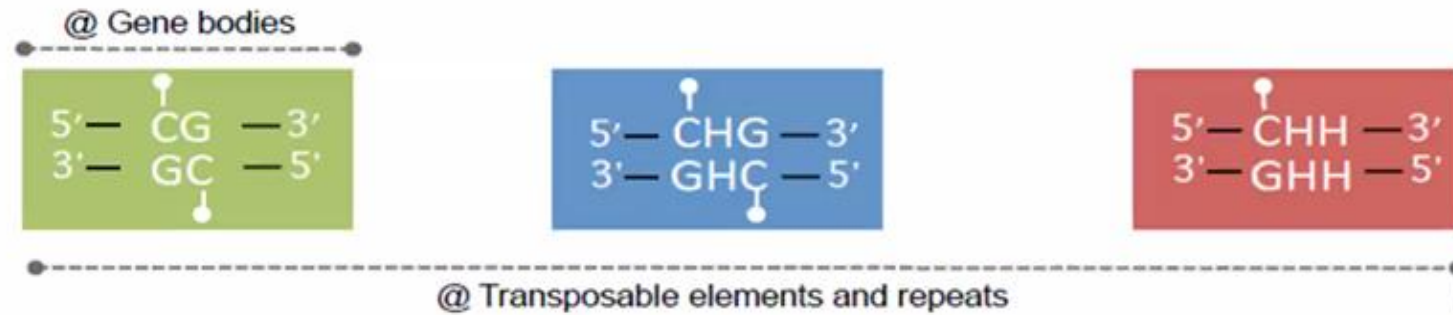
Rozdíly DNA methylace koreluje se strukturou genomů a jejich velikostí, **ale existují i druhově-specifické rozdíly!**

- Včela medonosná má 5 – 8% TEs v genomu, s relativně větším počtem LTR bez protein-kódujících sekvencí (přesto tyto LTR jsou stále zachovalé), podobně i *Chlamydomonas* obsahuje pouze 15 – 20% TEs v celém genomu
- Včela rovněž má i nižší procento genů s imunitní odpovědí, které jsou naopak kompenzovány velmi uspořádaným sociálním životem a hierarchií

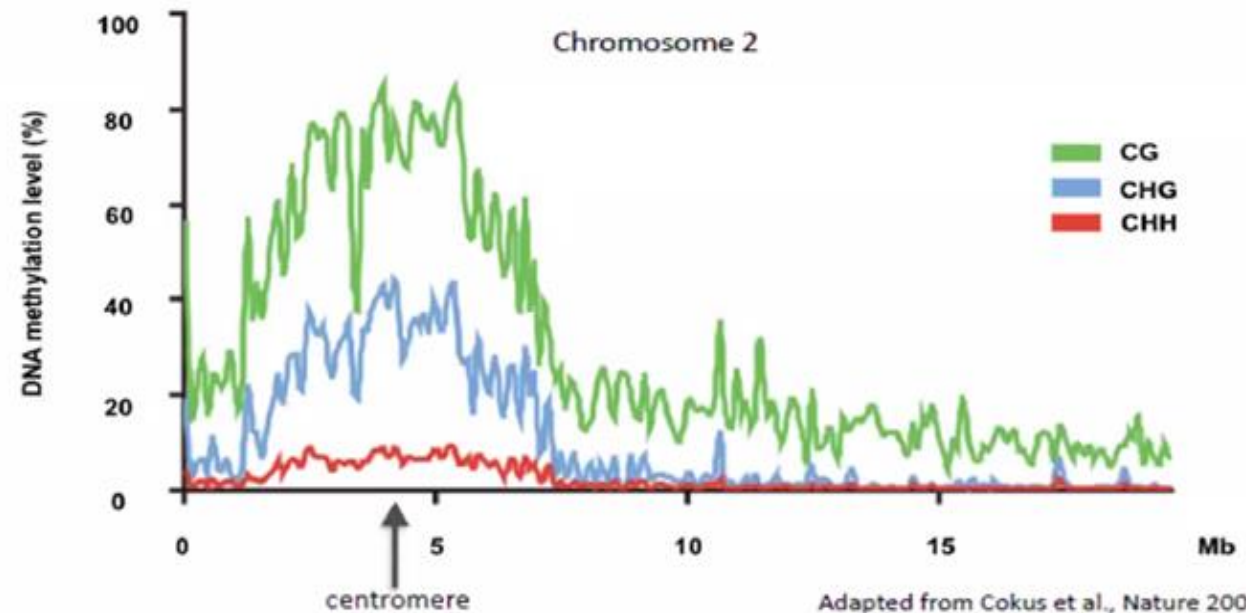
	CG	CHG	CHH
<i>Apis mellifera</i>	0.93%	0.26%	0.17%
<i>Ciona intestinalis</i>	31.1%	0.17%	0.12%
<i>Mus musculus</i>	74.2%	0.30%	0.29%
<i>Danio rerio</i>	80.3%	1.22%	0.91%
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.38%	2.59%	2.49%
<i>Oryza sativa</i>	59.4%	20.7%	2.18%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	22.3%	5.92%	1.51%
<i>Populus trichocarpa</i>	41.9%	20.9%	3.25%

DNA methylation se liší mezi geny a transpozony

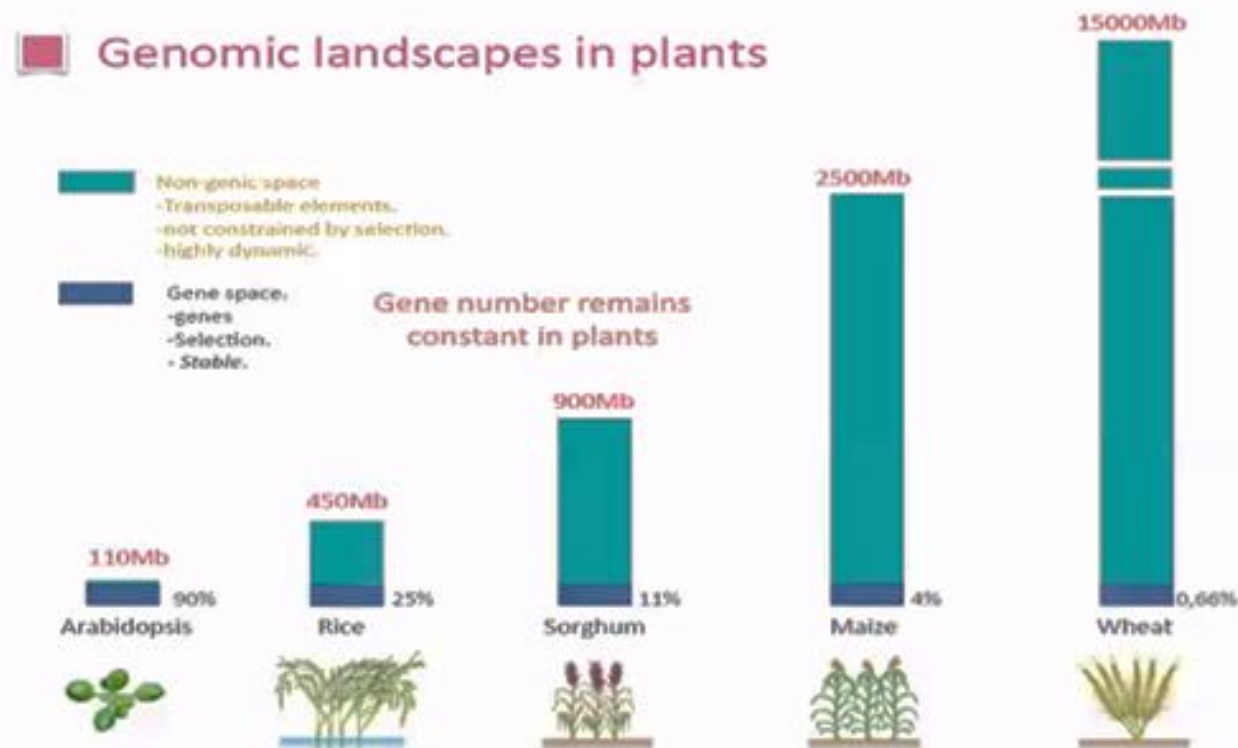
(H = T, A or C)



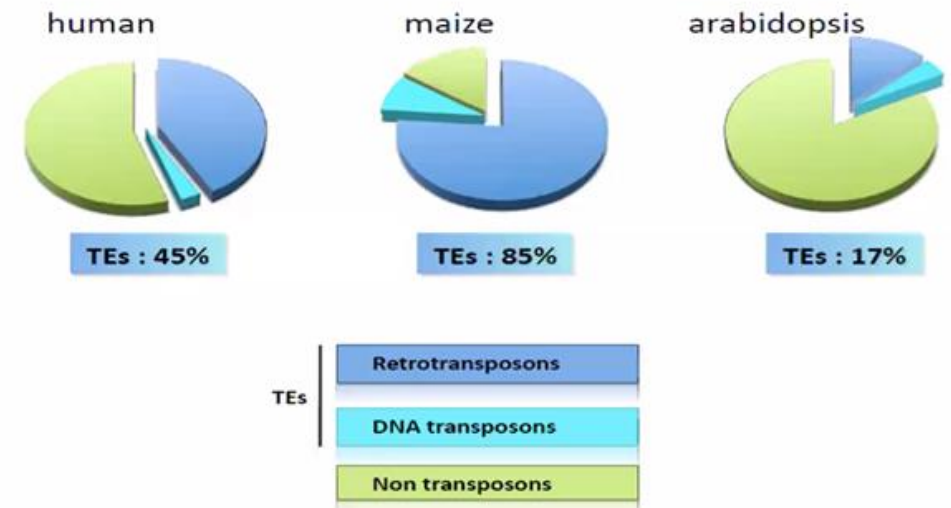
Arabidopsis leaves



Rozdíly DNA methylace koreluje se strukturou genomů a jejich velikostí, u rostlin však odpovídá i množství TEs



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

gbM kontroverze a vliv na genovou expresi

Negative

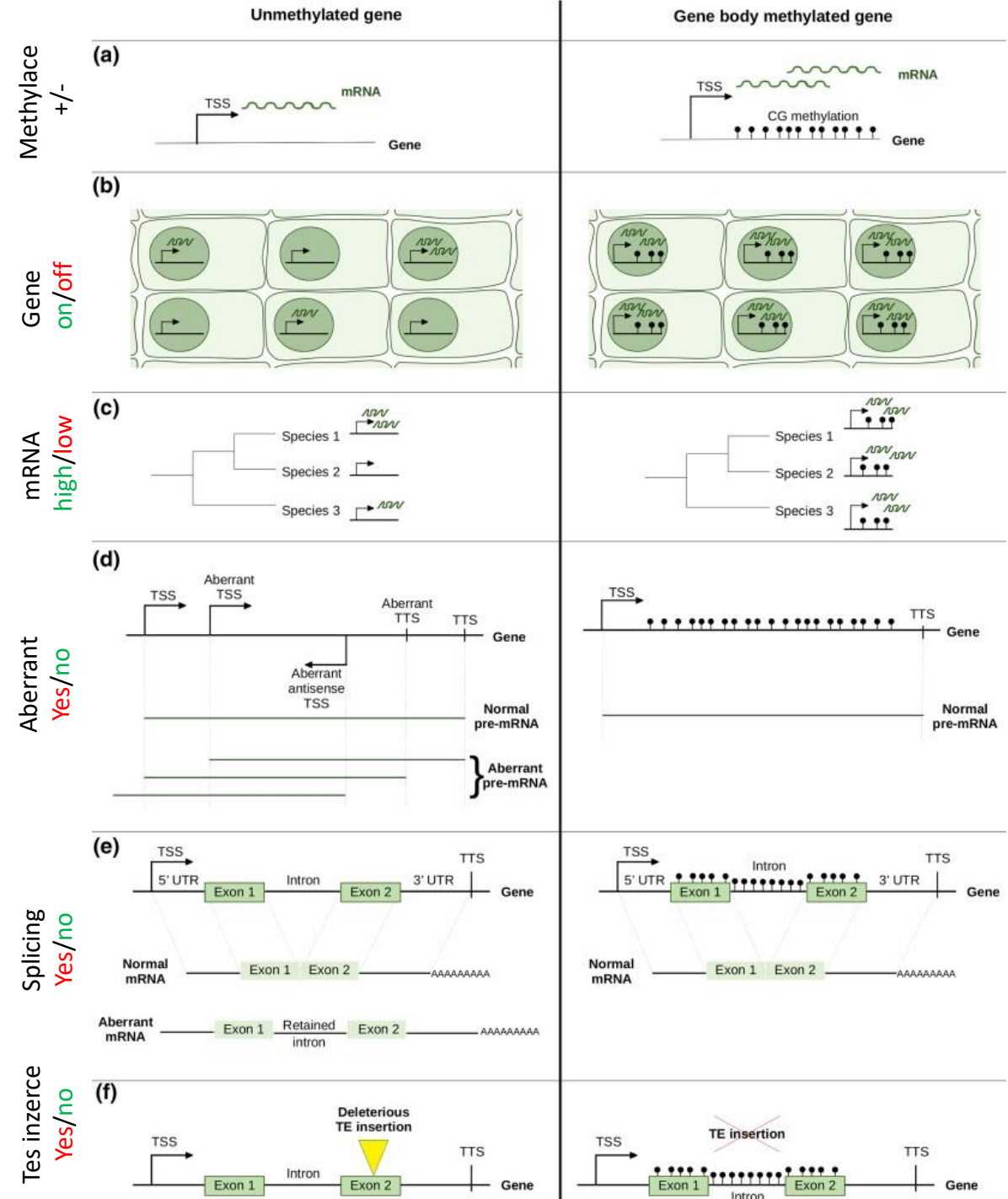


Positive

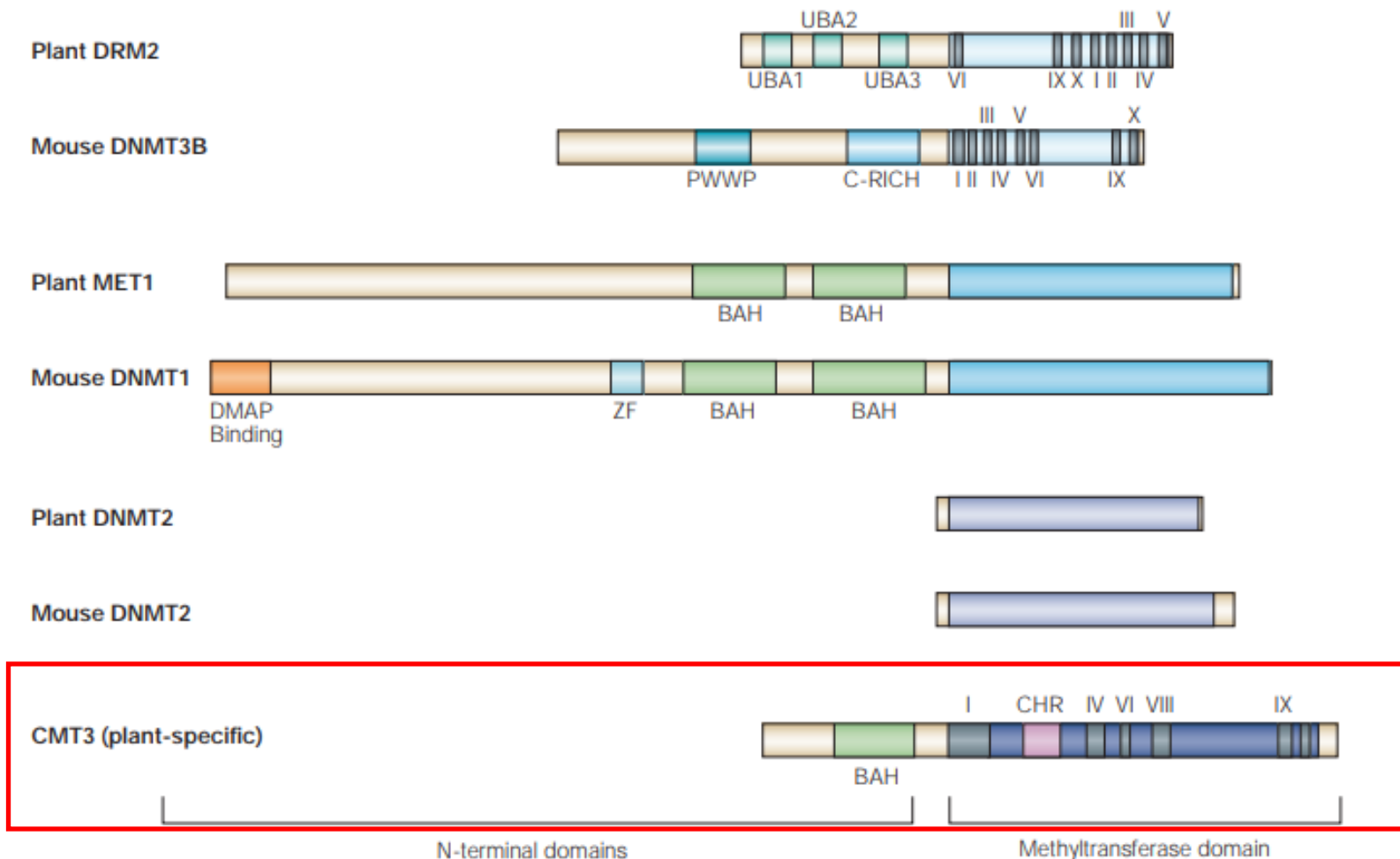
- gbM je hypotetický pozitivní regulátor genové exprese = pokud není metylace rozmístěna mezi promotory a cis-regulačními oblastmi

- Může regulovat pre-mRNA splicing
- Ovlivňuje pool aberantní mRNA
- Může chránit geny před TE inzercí

Muyle et al. 2022



Specifita DNA methyltransferáz – divergence rostlin a živočichů



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

=Specifická pouze pro rostliny

Methylace cytosinu se liší u eukaryotických genomů, odpovídá i zmiňované struktuře genomu

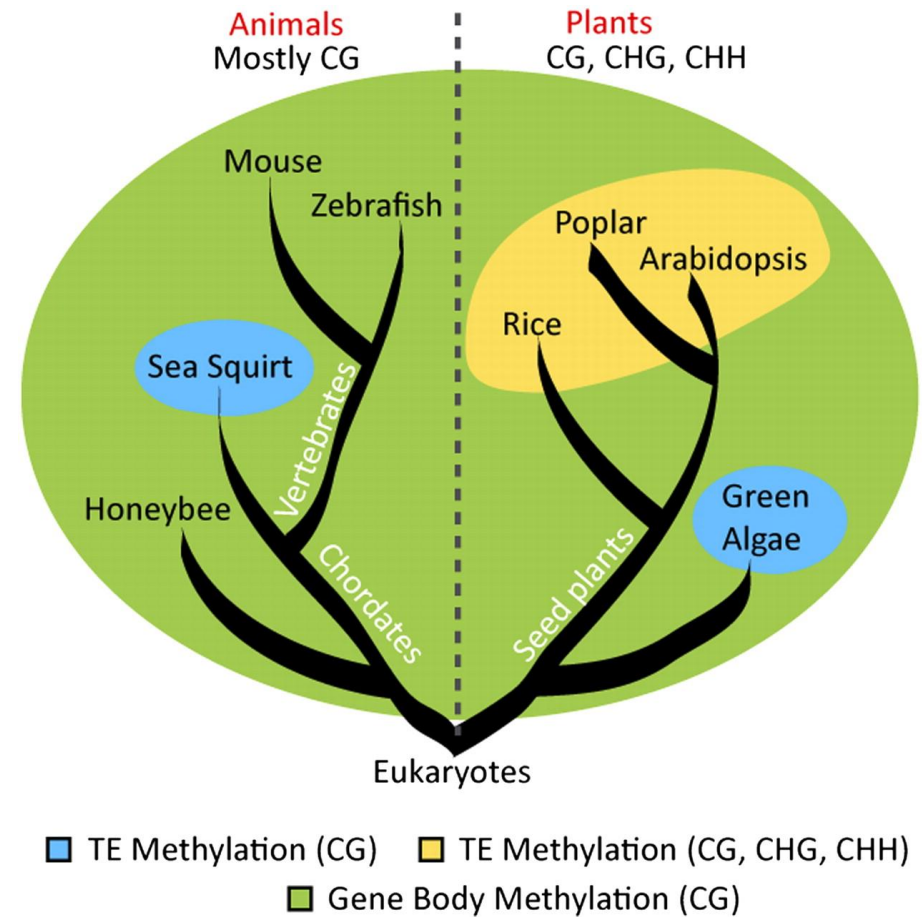
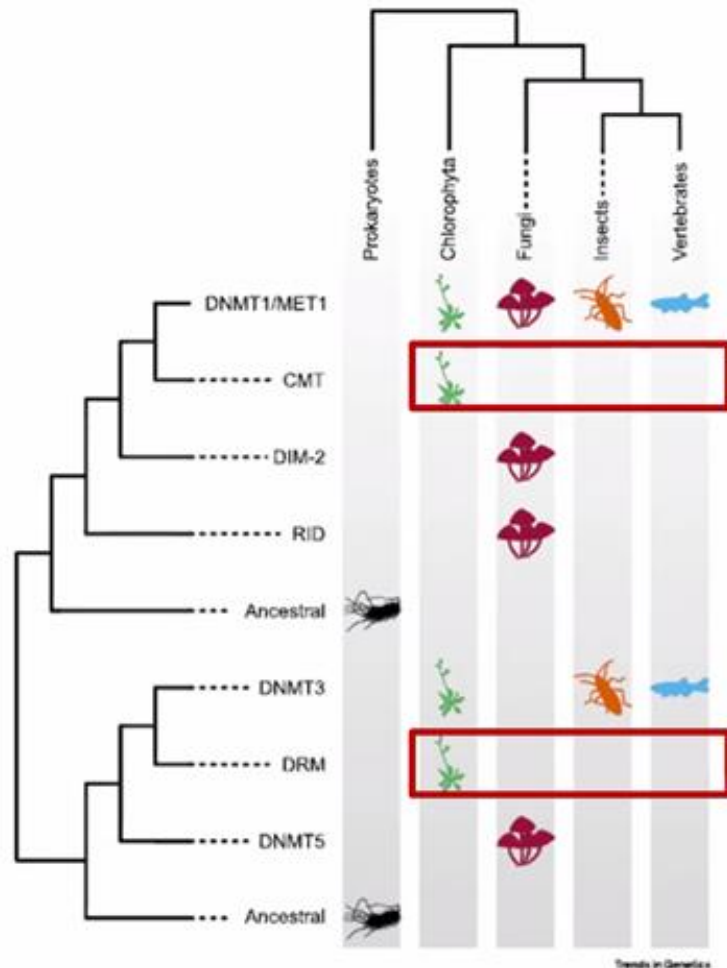
		DNA methylation		
		Described		
Bacteria	<i>E. coli</i>	Yes	M-R systems	
			<i>De novo</i>	Maintenance
Fungi	<i>N. crassa</i>	Yes	Dim2	Dim2
	<i>S. pombe</i>	No	–	–
Protazoa	<i>T. brucei</i>	Yes	–	–
Animals	Nematodes			
	<i>C. elegance</i>	No	–	–
	Insects			
	<i>A. mellifera</i>	Yes	Dnmt3	Dnmt1.1 Uhrf1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

→ Nedetekovatelná 5mC methylace, výskyt na cytosinu 38 tRNA-Asp a tRNA-Glu

→ Nedetekovatelná 5mC methylace, výskyt 6mA

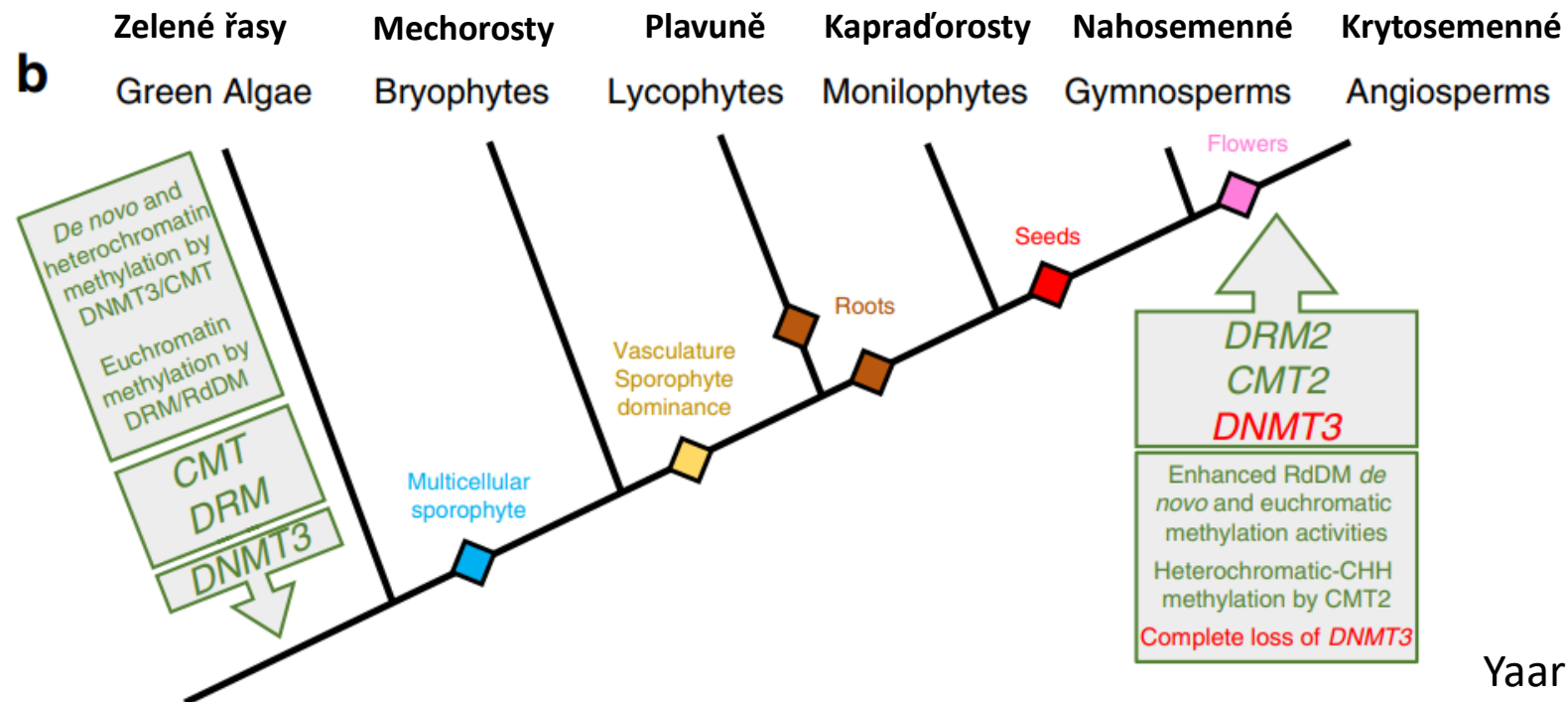
→ Ortholog TET enzymů, pouze malé procento genomu (0.01%)

Evolve DNA methyltransferáz u rostlin a živočichů

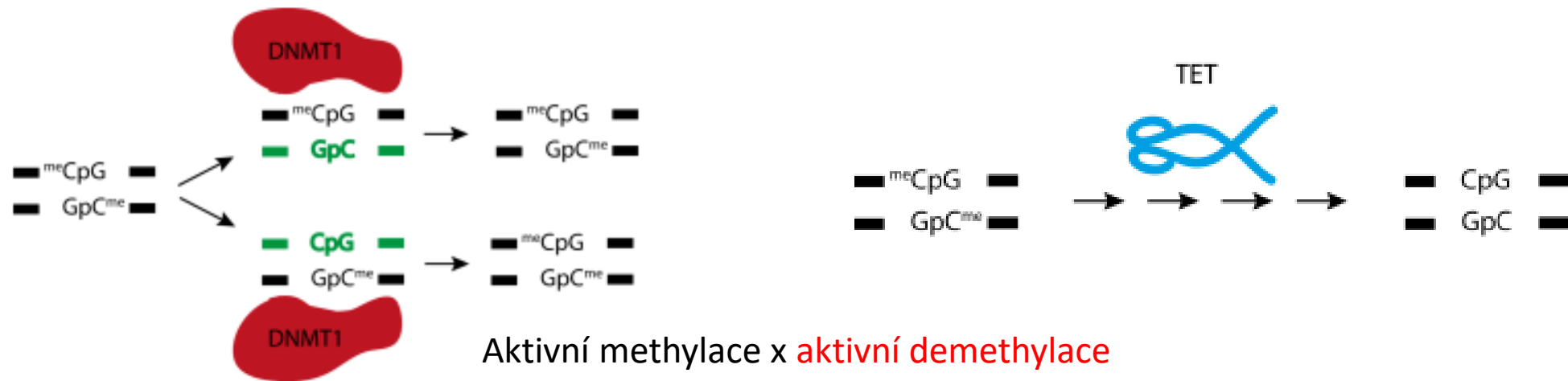


Evolve a divergence DNA methyláz u rostlin

- Komplexita 5mC regulace a exprese se liší mezi vyššími a nižšími rostlinami
- Ztráta DNMT3 a duplikace CMT a DRM genů pro CG metylaci až u vyšších rostlin



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

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

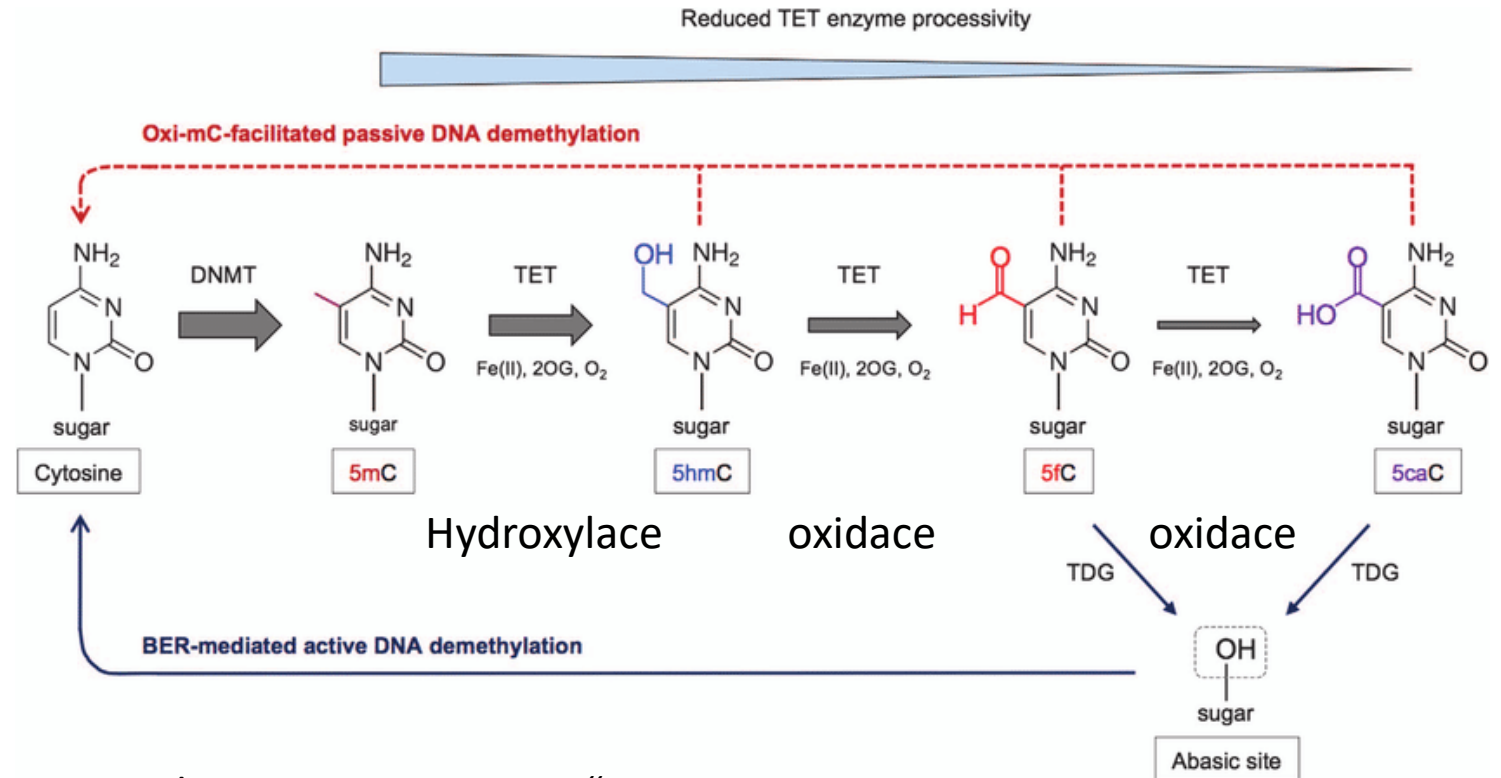


Male XY



DNA demethylace aktivní vs. pasivní cesta (TET – methylcytosin dioxygenáza)

- Pasivní DNA demethylace
 - Rozvolnění „hustoty“ methylace s každým buněčným dělením (nízká 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“

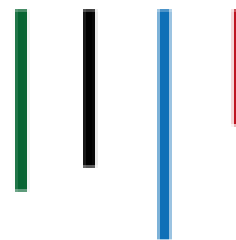
TDG – „thymine DNA glycosylase“

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

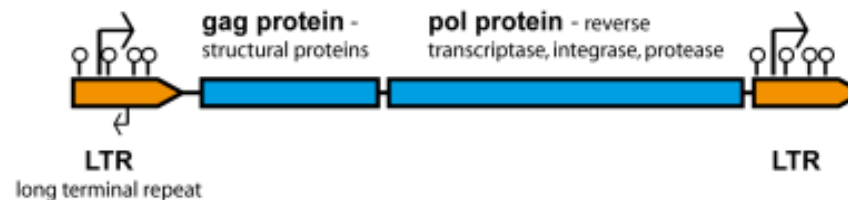
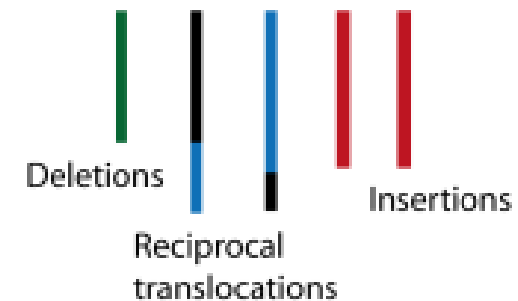
Udržení genomové integrity

- 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

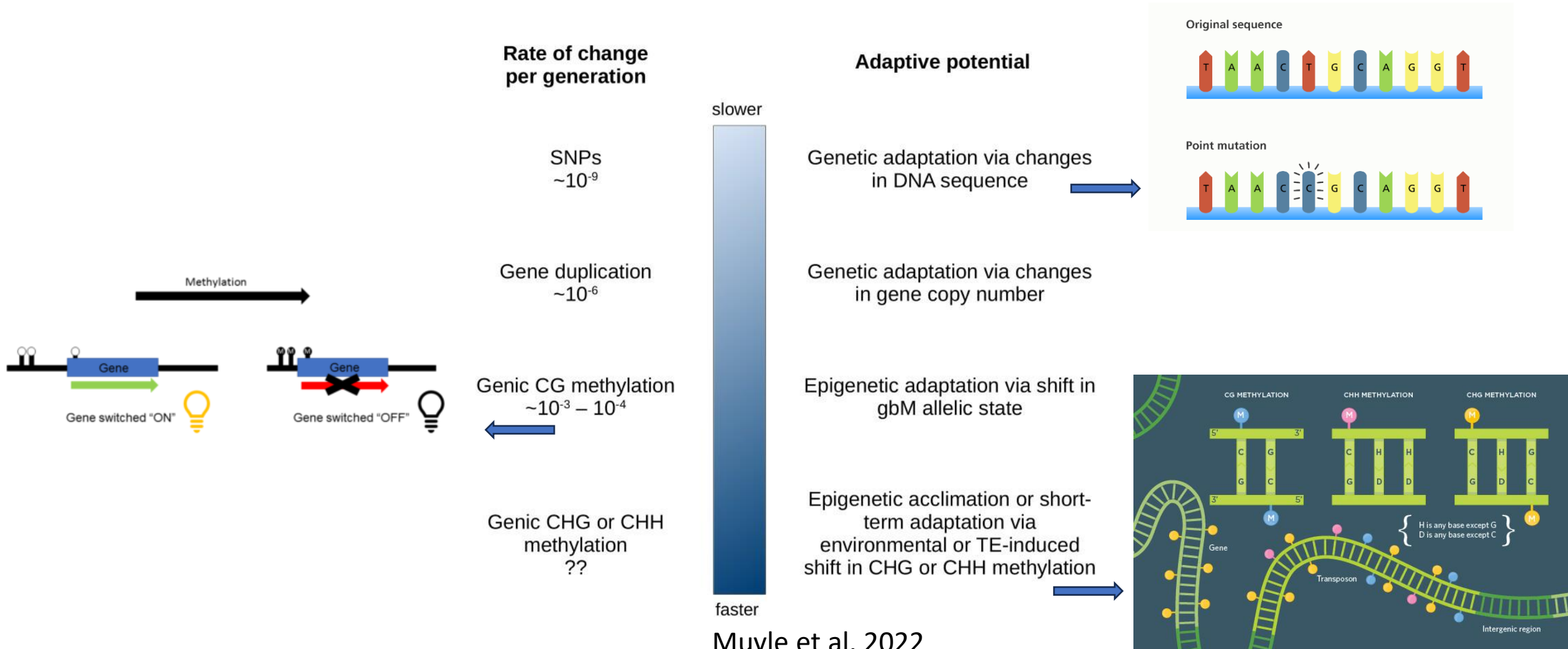


abnormal karyotype due to genomic instability

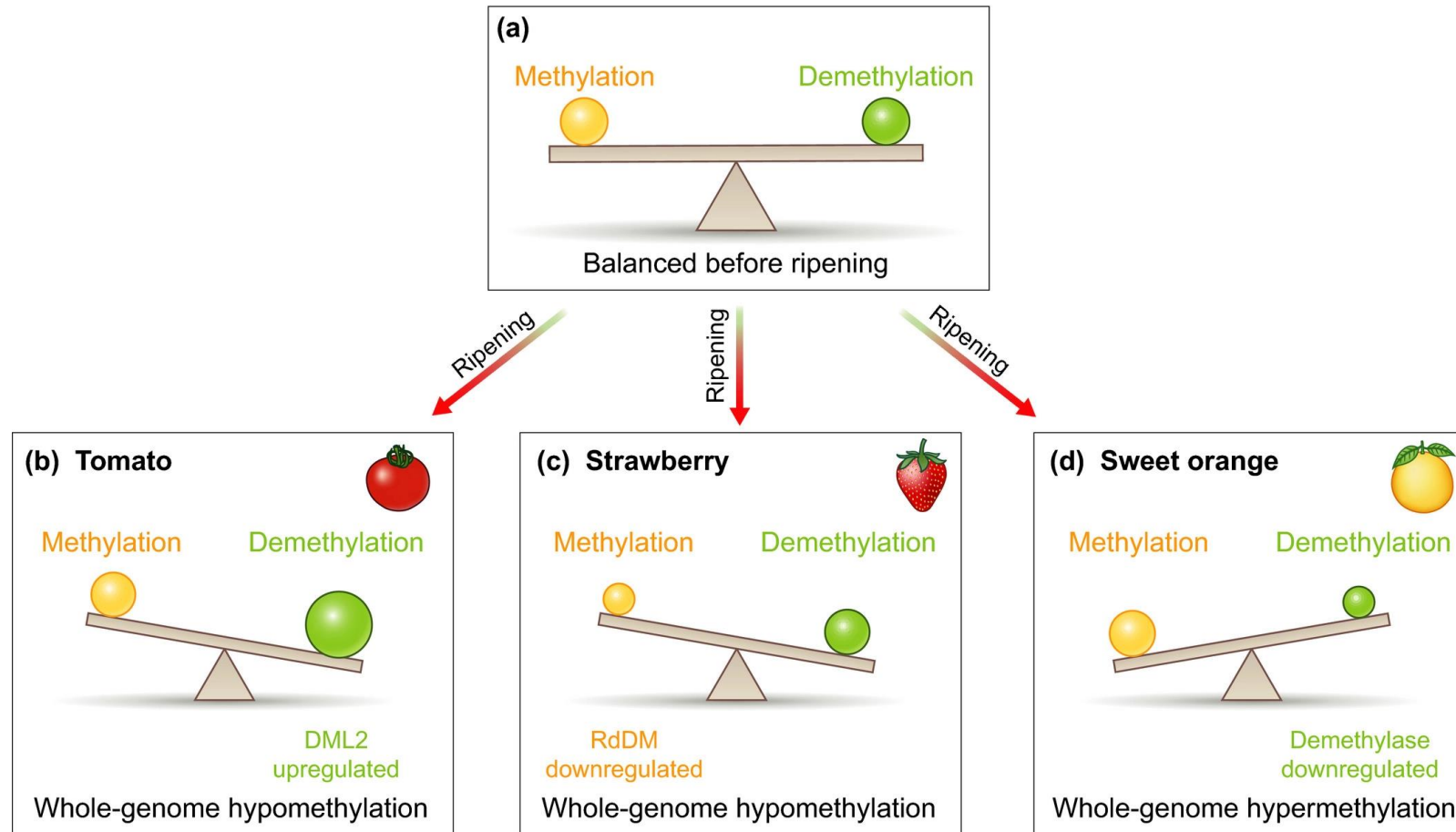


„Genome defence model“ – DNA methylace je mutagenní, proto musí mít pozitivní vliv na stabilitu (prof. Timothy Bestro)

gbM slouží jako evoluční klíčový element a má relativně silný adaptivní potenciál



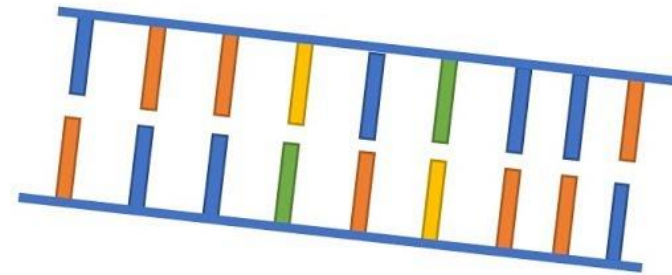
Úloha DNA methylace ve významných procesech a rozdílná úloha v podobných orgánech u rostlin



Regulace genové exprese epigenetickými mechanismy

- DNA methylace
- RNA interference
- Histonové modifikace

RNAi



Výskyt a diverzita malých RNA

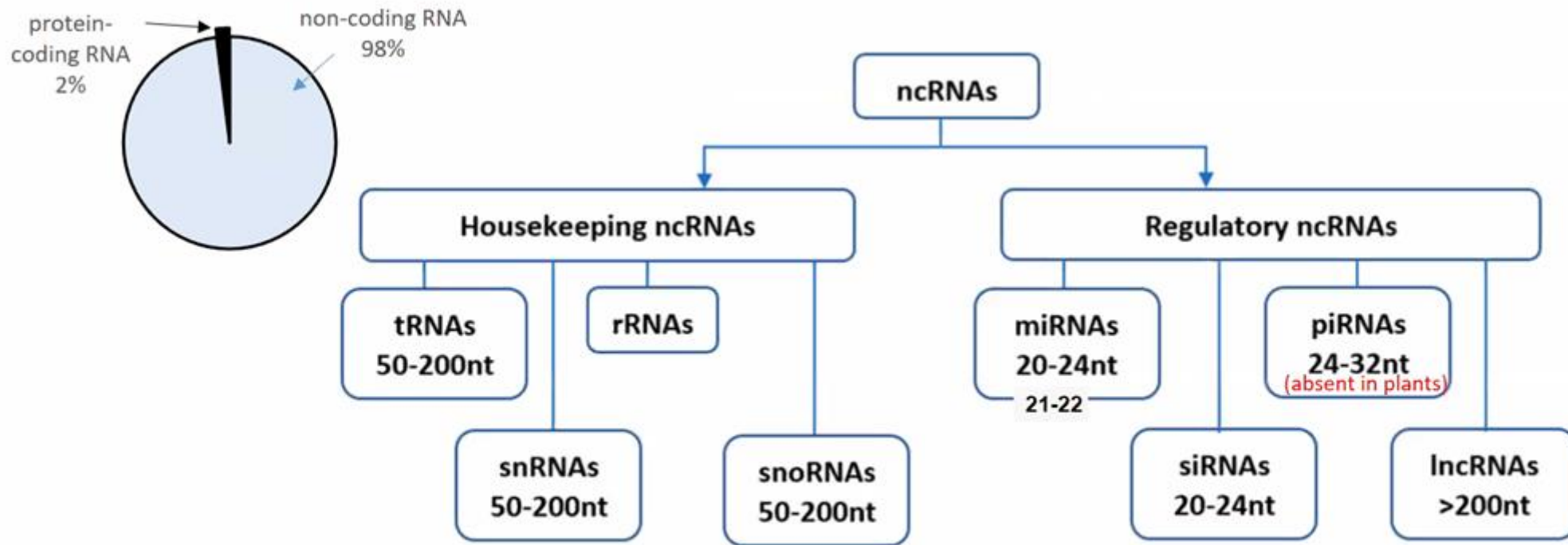
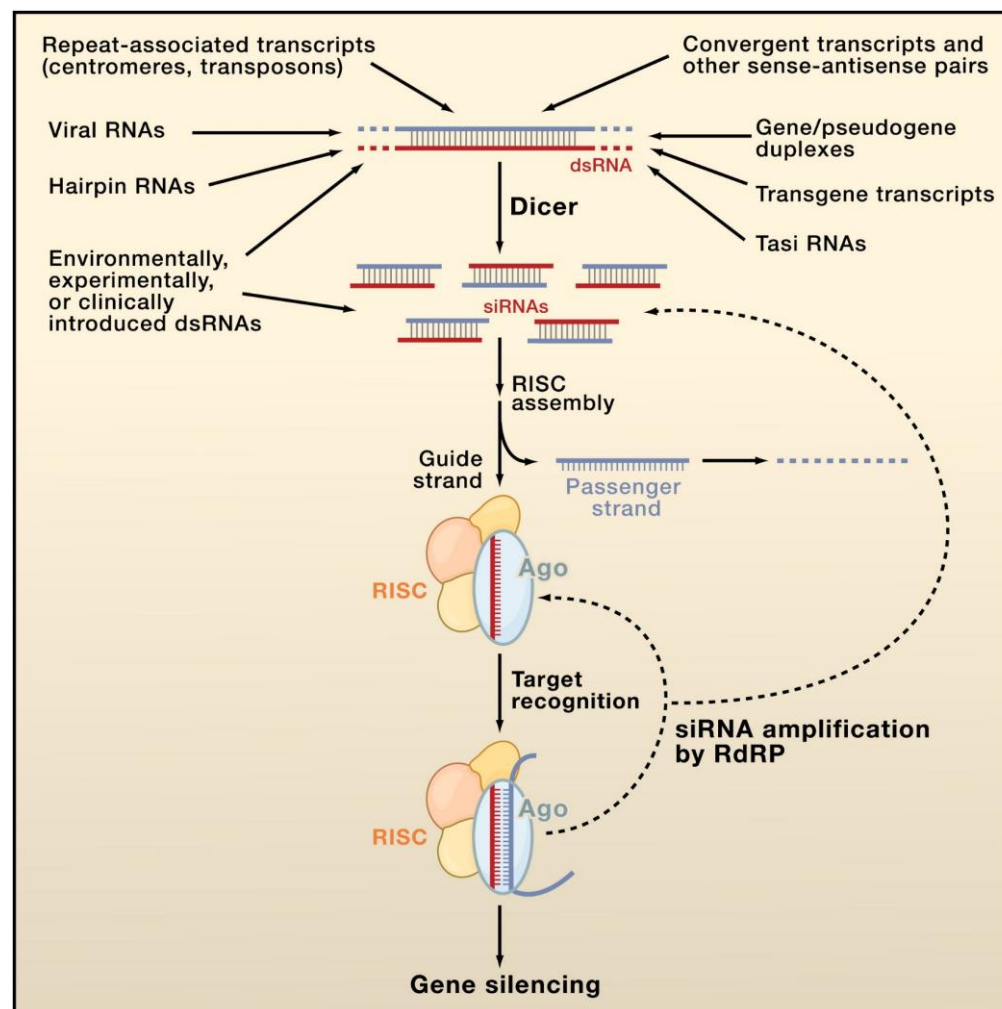


Figure 1. Classification of non-coding RNAs (ncRNAs). Housekeeping ncRNAs include; tRNAs-transfer RNAs, snRNAs-small nuclear RNAs, rRNAs-ribosomal RNAs, snoRNAs-small nucleolar RNAs. The regulatory ncRNAs consist of miRNAs-microRNAs, siRNAs-short interfering RNAs, piRNAs-piwi-interacting RNAs, and lncRNAs-long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

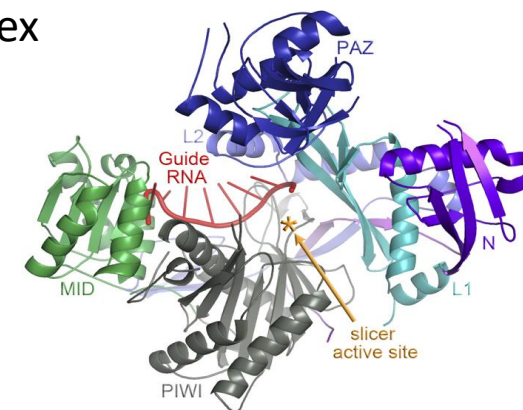
Klíčové momenty RNAi a genového umlčování

- 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
- Nеспецифická produkce siRNA molekul (nespecifický prekurzor)
- Konzervativní oblasti poměrně vzácné, siRNA „auto-silencing“ efekt

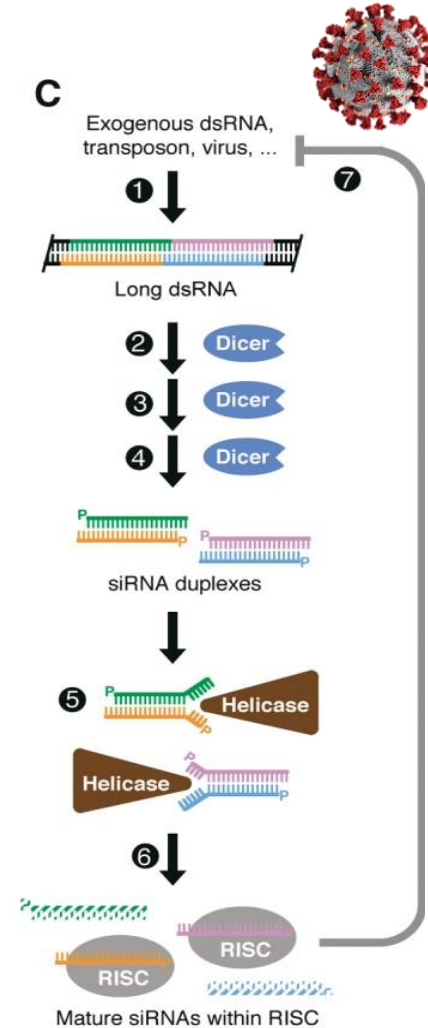
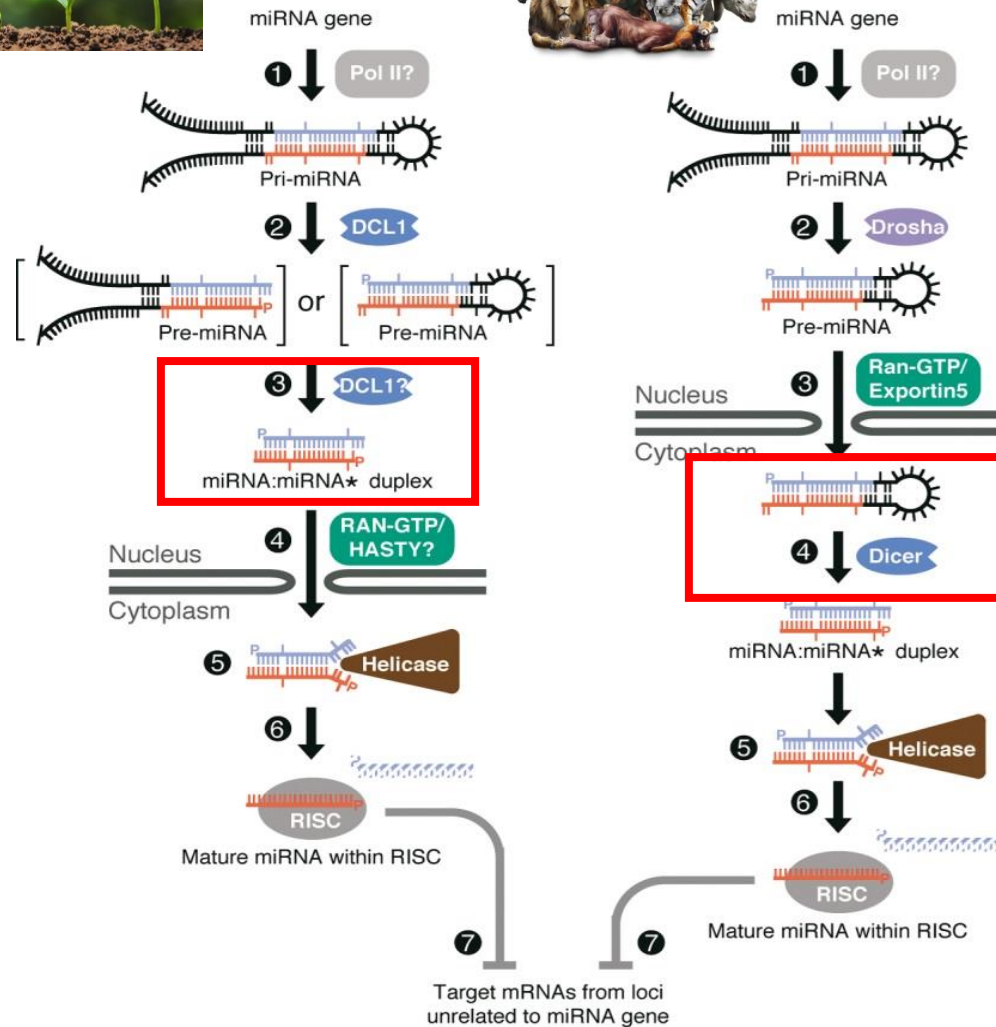
• miRNA

- 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

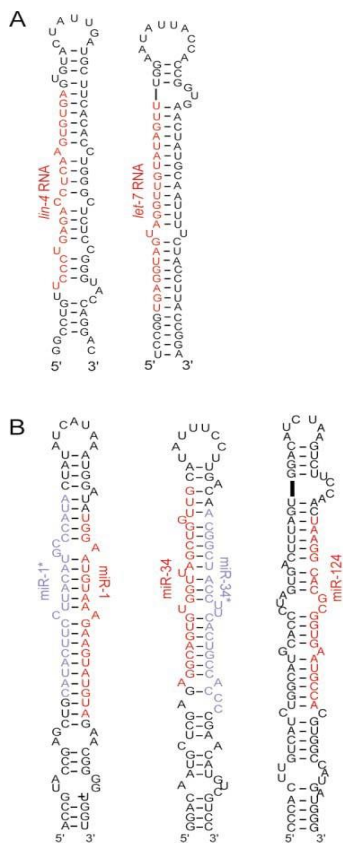
- Autonomní miRNA zahrnují ve svých produktech elementy potřebné pro regulaci a iniciaci transkripce
- Ostatní miRNA jsou závislé na svých pri-mRNA, u kterých probíhá „parazitický“ proces
- Syntézy nových krátkých úseků katalyzovány RNA polymerázou II a III
- Většina miRNA katalyzovaných pol RNA II a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

Základní rozdíl syntézy miRNA u rostlin a živočichů

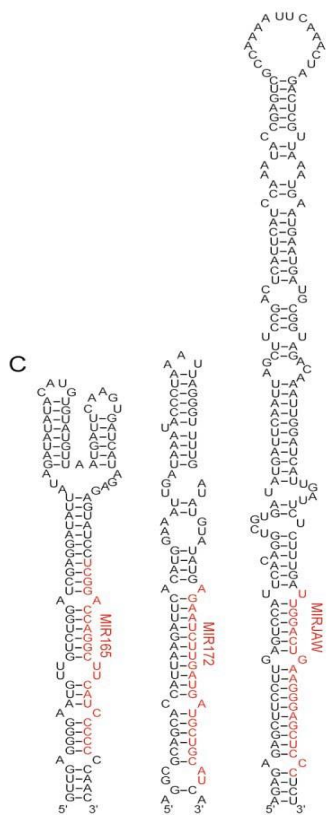


Diverzita funkce sRNA

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> Ptdlns(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

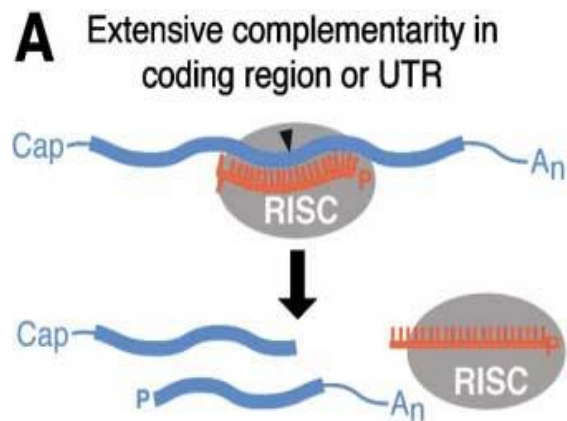
The metazoan regulatory targets listed were predicted computationally then supported experimentally. The plant regulatory targets listed were predicted computationally then supported with independent phylogenetic and/or experimental evidence. Species abbreviations: *Drosophila melanogaster*, *Dm*; human,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

Specifikace exprese miRNA

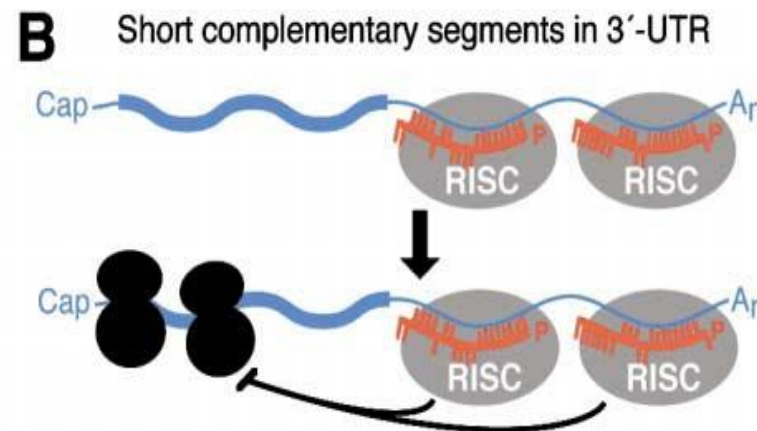
- Různé hladiny regulace genové exprese miRNA zajišťující dokonalý systém kontroly de-novo vzniklých transkripčních jednotek
- Zavislá na druhu buňky, momentální úlohy a vývojového stádia
- Počet jednotlivých miRNA v daném stavu buňky ovlivněn mírou exprese daného lokusu a tvorby pri-/pre-mRNA (50 000 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

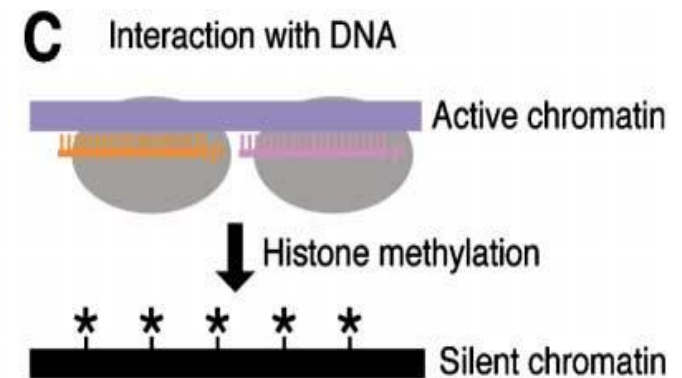
- Na úrovni mRNA – RISC komplex a štěpení RNA nebo regulace na úrovni translace (neúplná komplementarita)
- Na úrovni DNA – methylace DNA, inaktivace chromatinu



mRNA specifické štěpení



regulace na úrovni translace

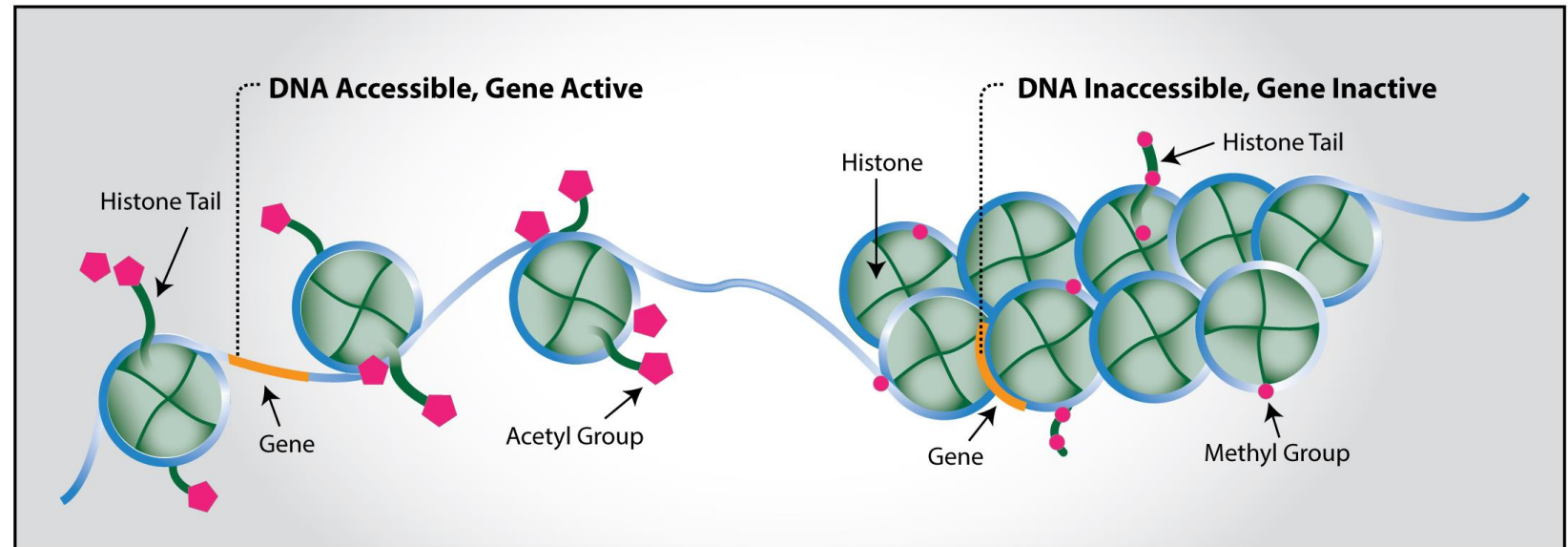


vazba na DNA (methylace)

Regulace genové exprese epigenetickými mechanismy

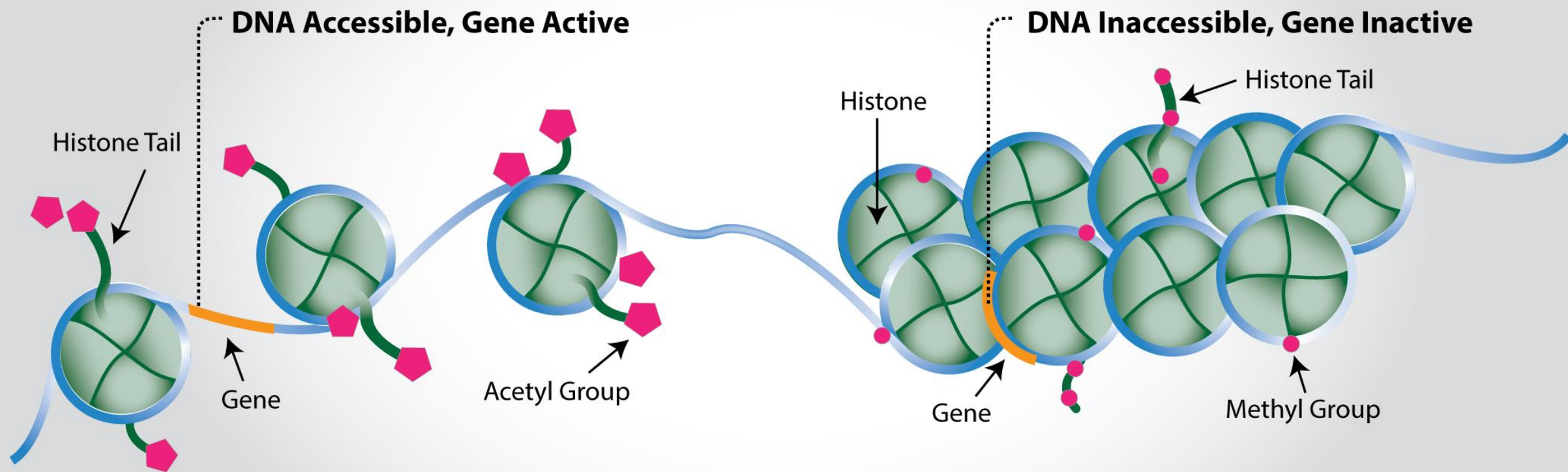
- DNA methylace

- RNA interference

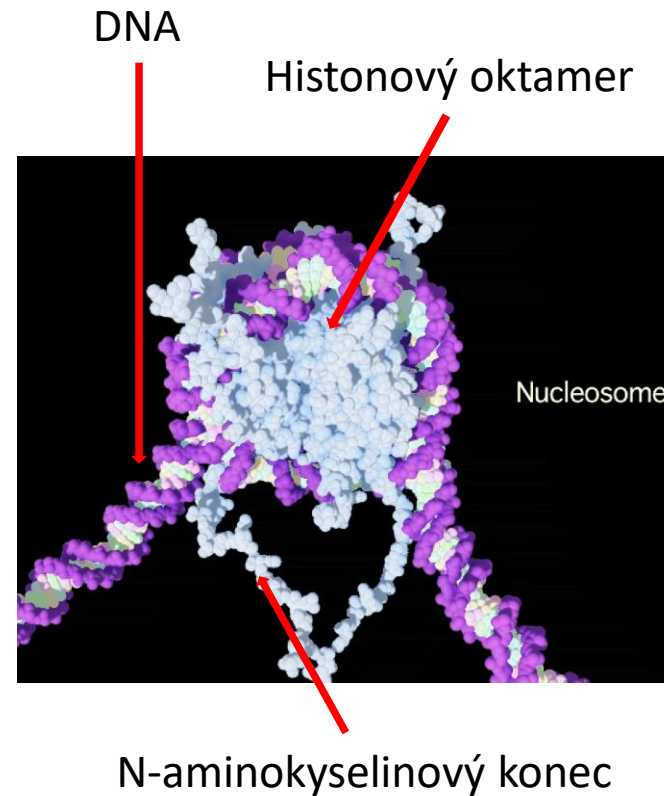
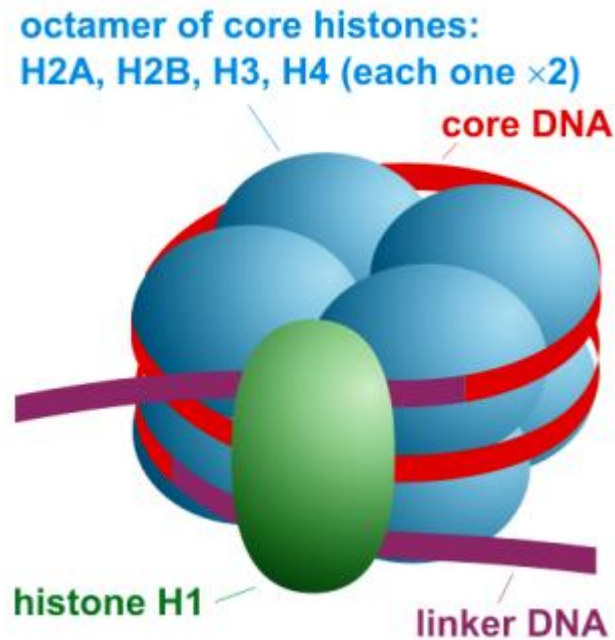


- Histonové modifikace

Histonové modifikace

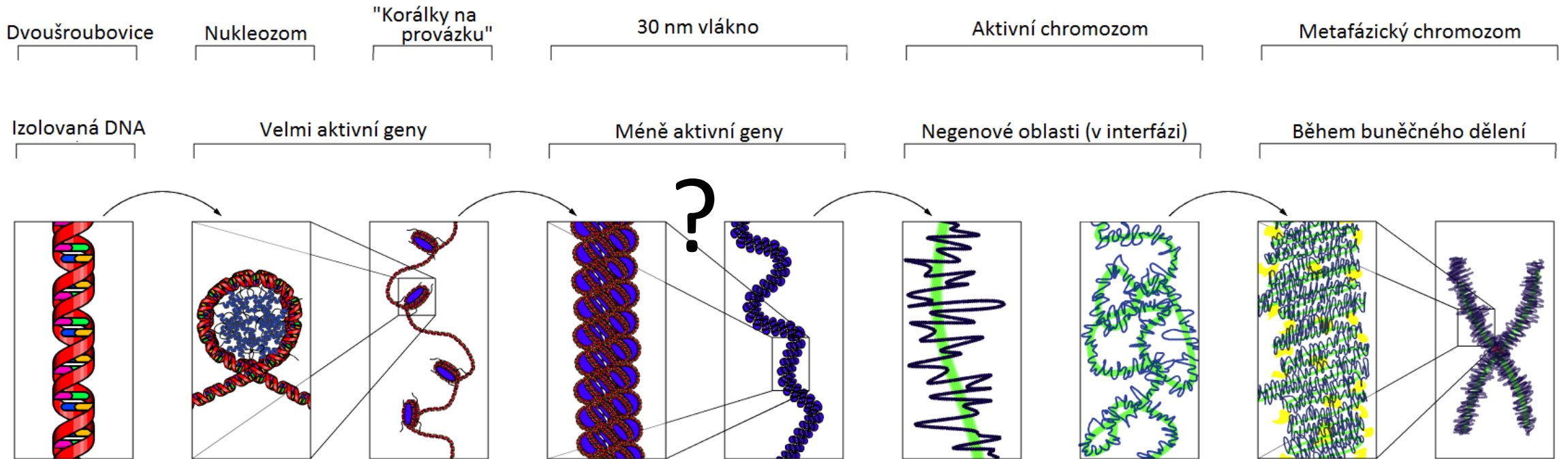


Chromatin a DNA - struktura



- 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

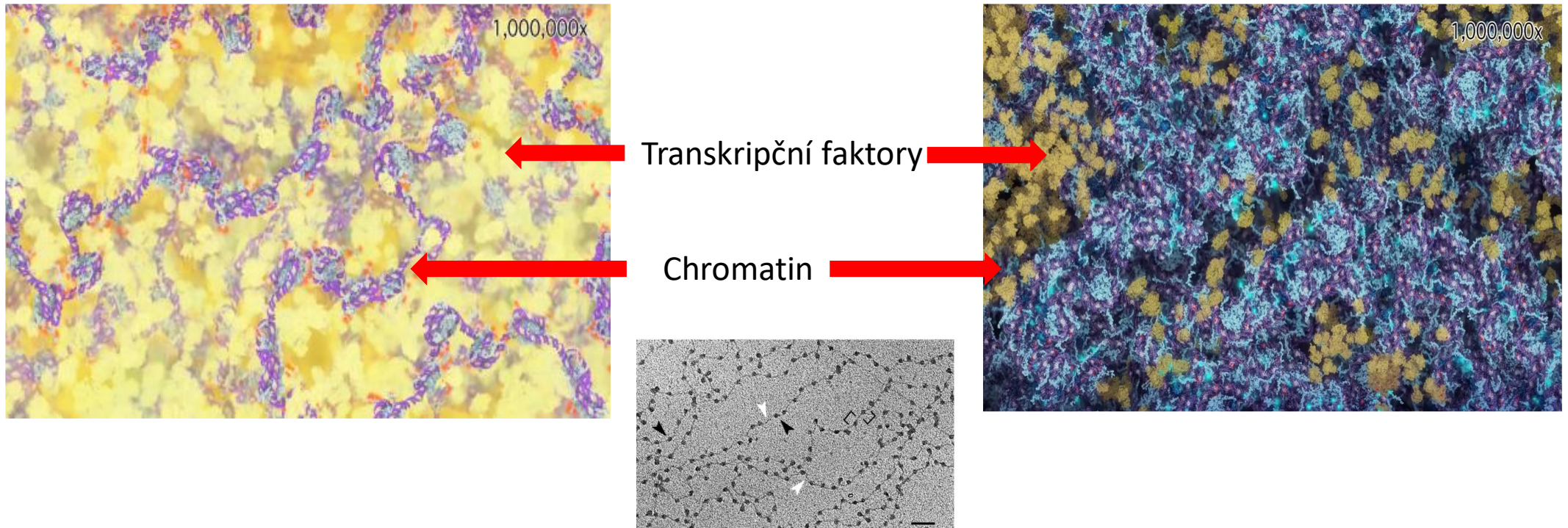
Vyšší organizace chromatinu



Vyšší organizace chromozomu záleží kromě dalších faktorů na kontaktech H1

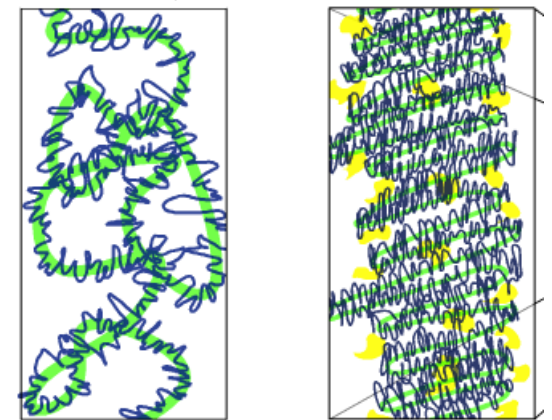
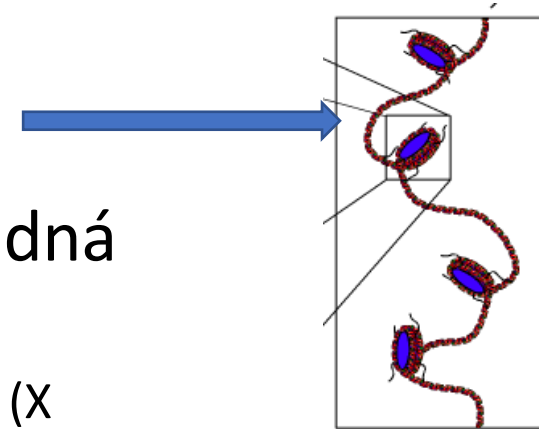
Struktura chromatinu ovlivňuje transkripci

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



Heterochromatin vs. euchromatin

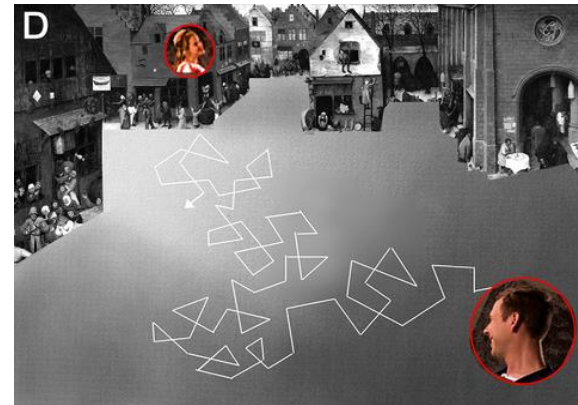
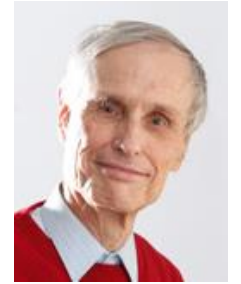
- Euchromatin – otevřený, méně kondenzovaný
- Heterochromatin – kondenzovaný, nízká nebo žádná genová exprese
 - Fakultativní – liší se na typu buňky nebo časové organizace (X inaktivace, specifické geny aj.)
 - Konstitutivní – kondenzovaný chromatin ve všech buňkách
 - Centromery, telomery, část Y chromozomu
- 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“

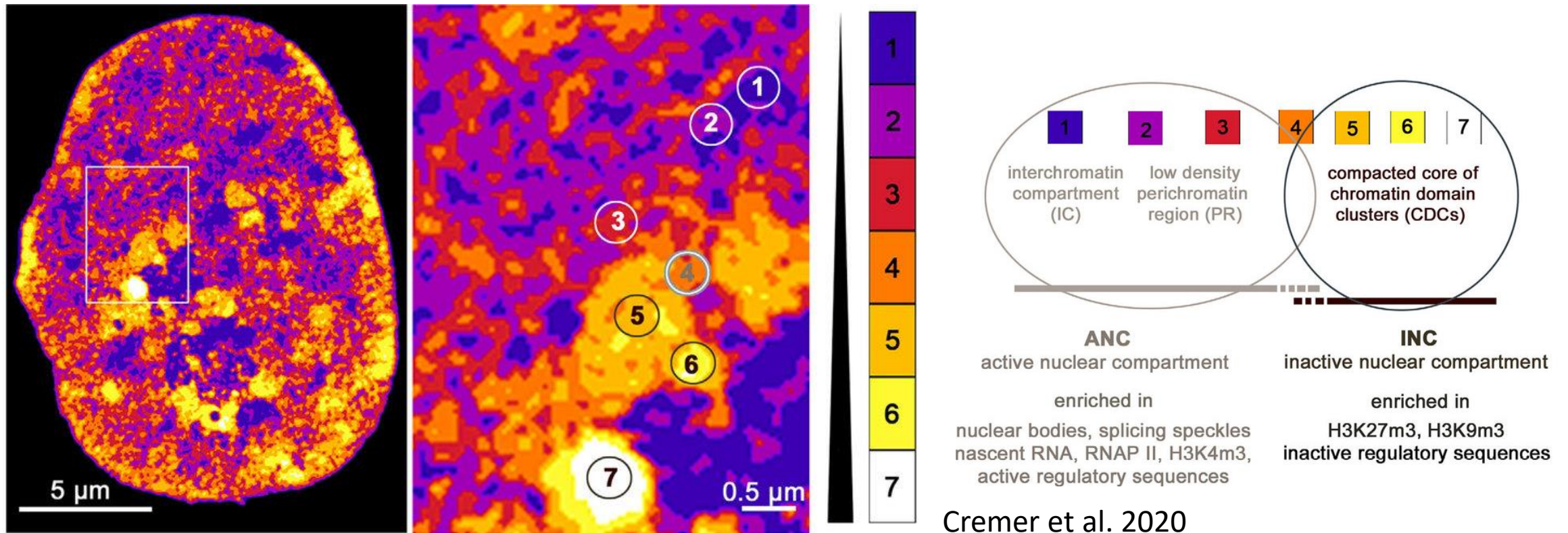


ANC – aktivní jaderné komponenty



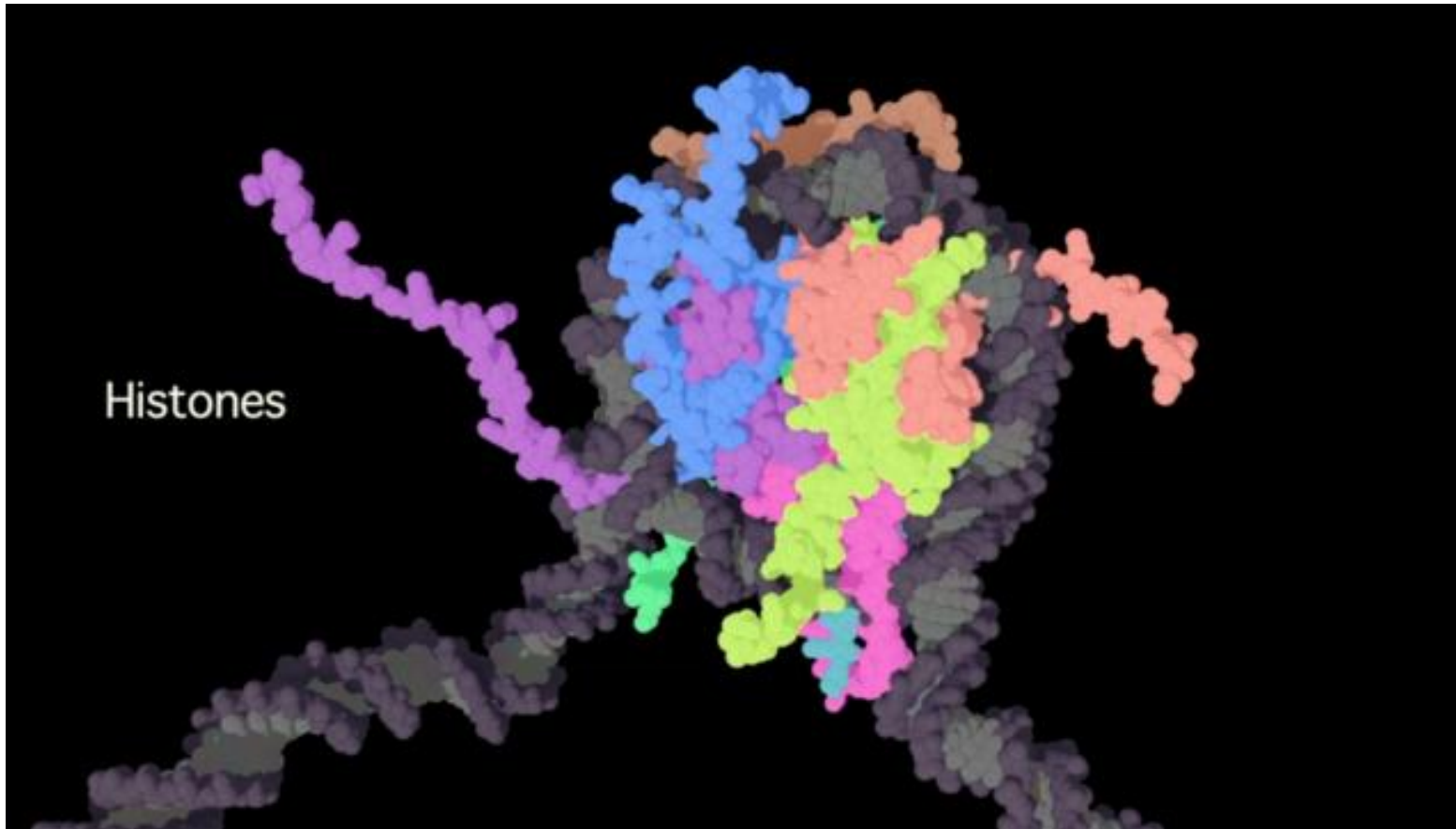
INC – inaktivní jaderné komponenty

Vztah mezi organizací chromatinu a epigenetickými modifikacemi



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

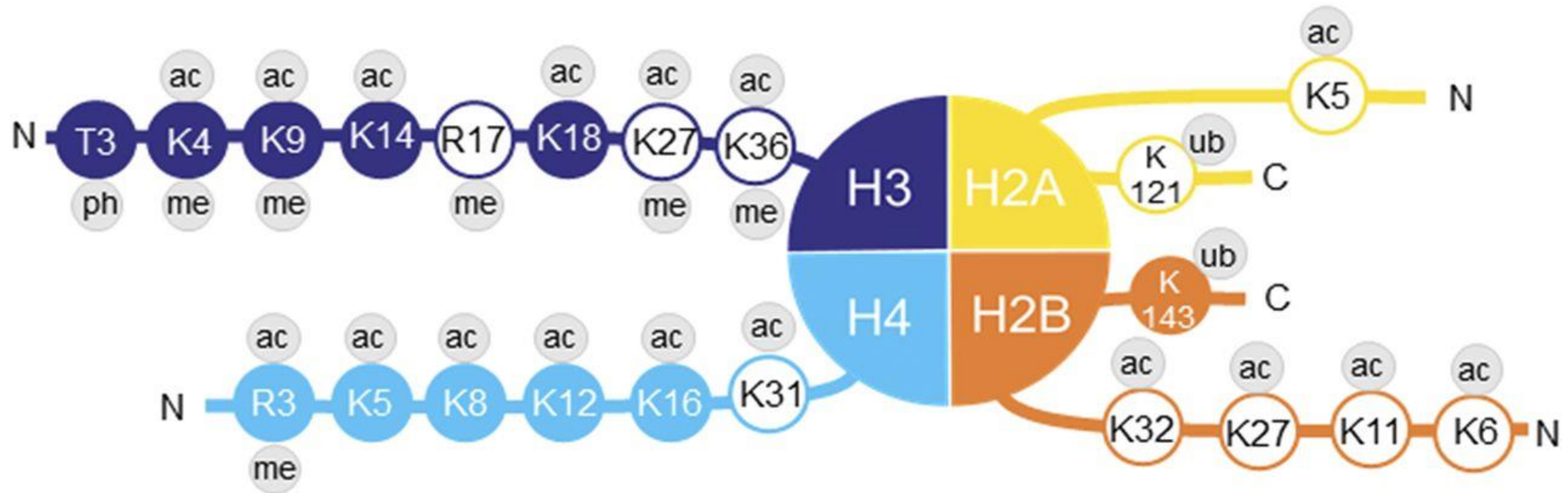
Úloha histonových modifikací



- Většina modifikací na N-terminálních koncích
- Více než 50 AA může být modifikováno, více než jedním typem modifikace (me1/me2/me3)
- Nejvíce prostudovány H3, H4, 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

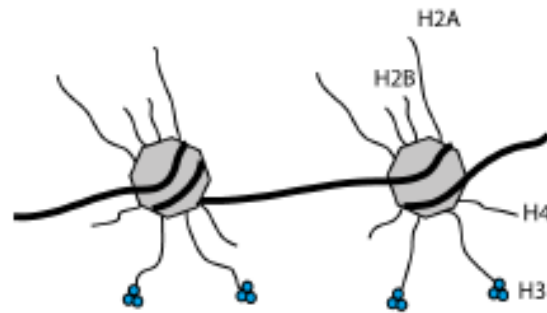
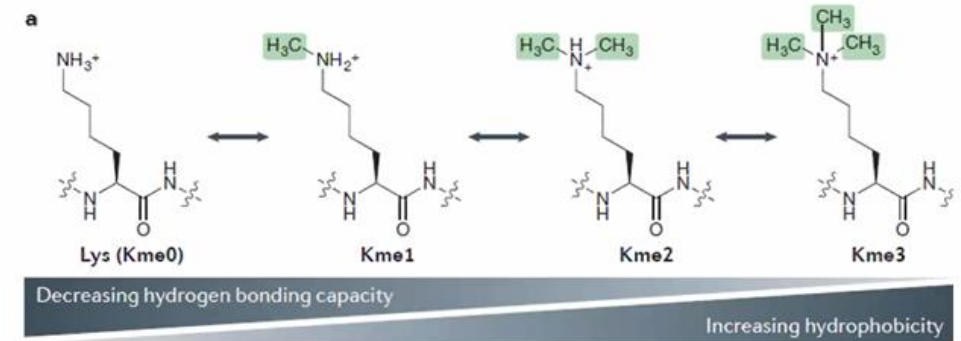
Repressive marks

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



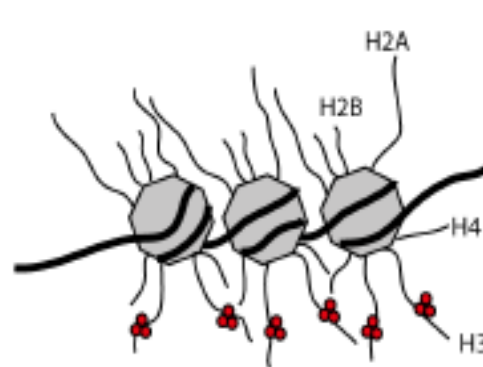
Druhově specifická funkce a distribuce

Histone (lysine) methylation



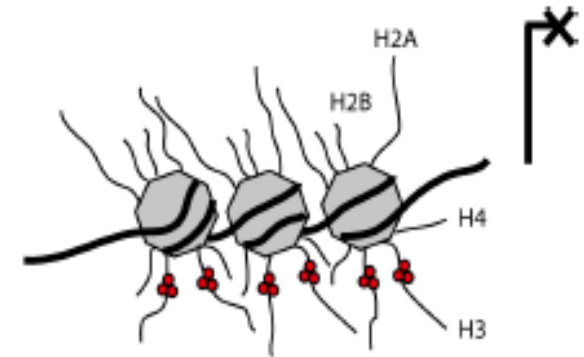
H3K4me

- 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

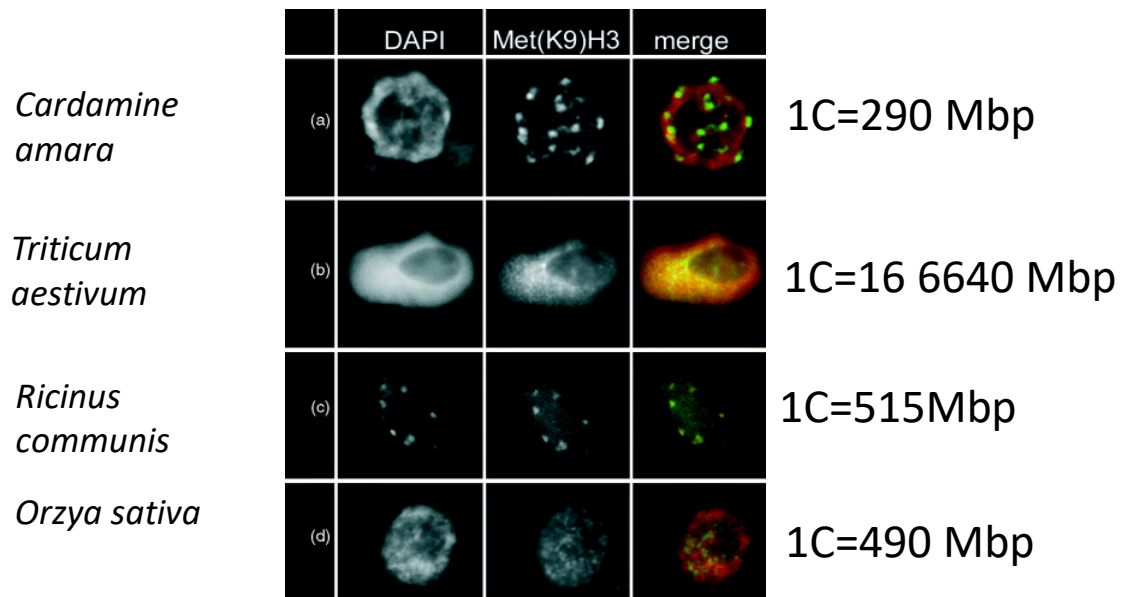
H3K9me1, H3K9me2,

H3K27me1

=značky inaktivního chromatinu


H3K27me2/me3


=druhově specifické, spíše inaktivující charakter



Houban *et. al.* 2003

Small genome plant

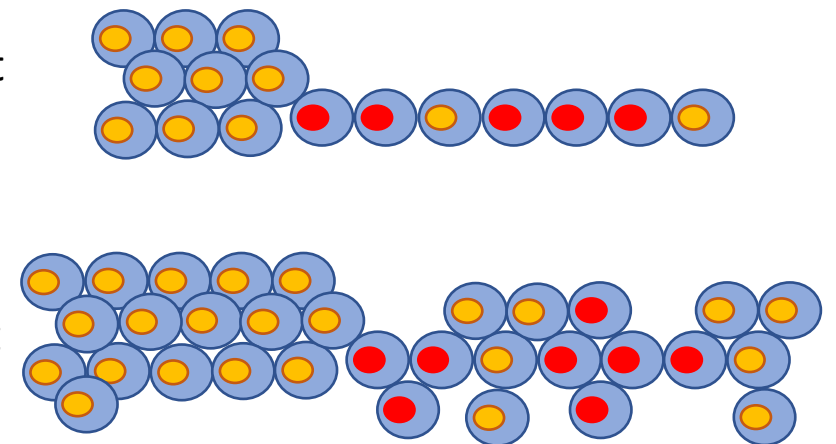
 H3K4me

 H3K9me

Large genome plant

heterochromatin

euchromatin



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

Acetylace lysinových reziduí

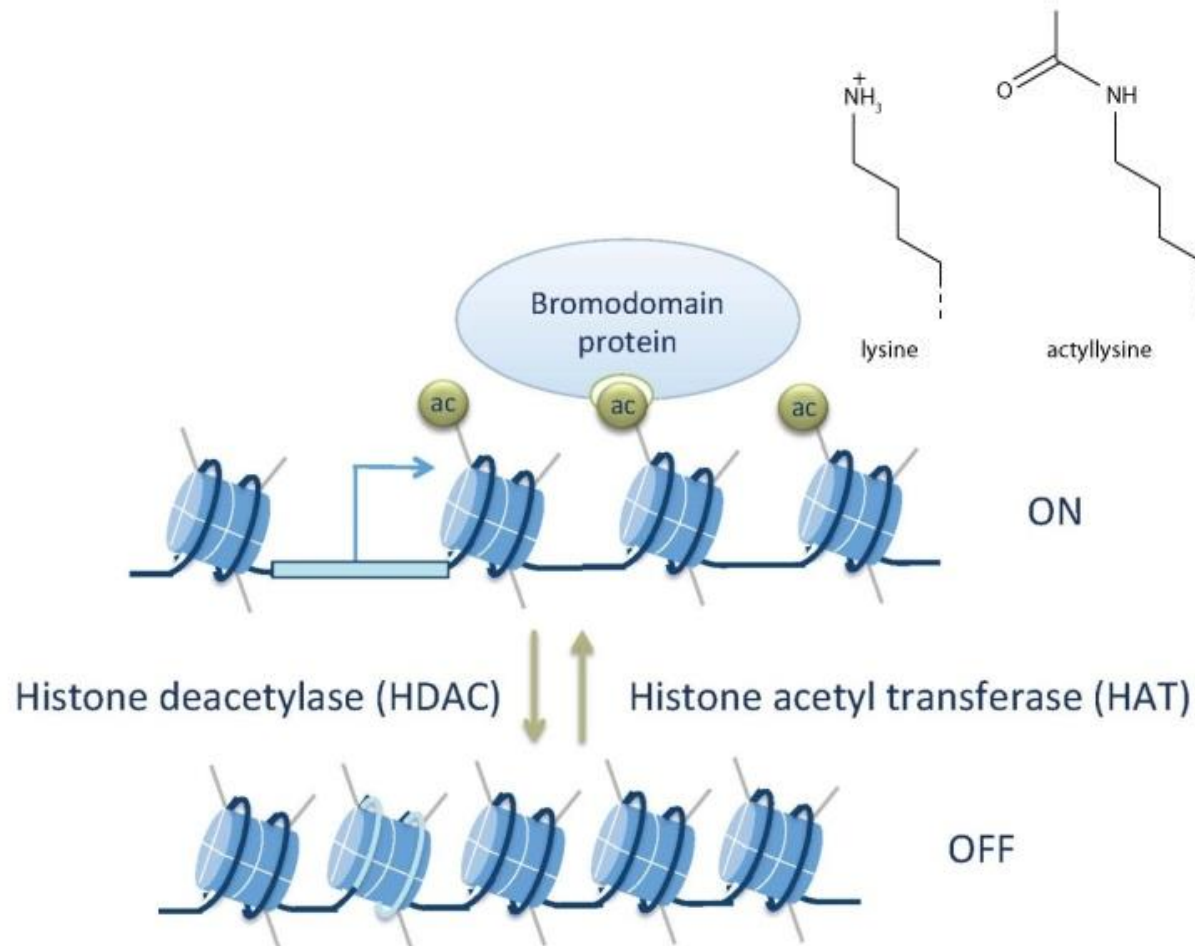
- Koreluje spíše s genovou aktivitou (např. H3K9ac)

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

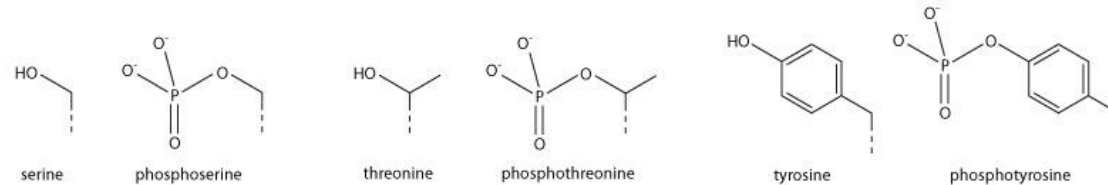
- **Spekulativní jako epigenetická modifikace, spíše chromatinová modifikace**

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

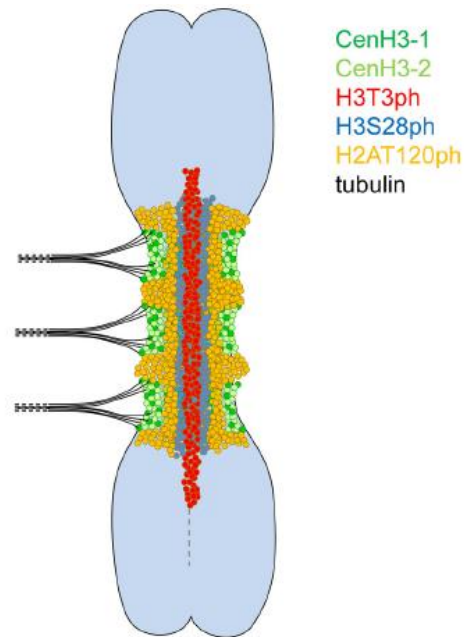
- **Velice proměnlivé**



Fosforylace serinu, threoninu a tyrosinu



- Nejvíce prostudovaná modifikace, z hlediska centromer
- V závislosti na umístění=rozličná funkce
- Závislá na buněčné cyklu, důležitá pro kondenzaci chromatinu



Neumann *et. al.* 2016

- **H3S10ph(+H3S28ph)**
- **V oblasti pericentromer** (opak u živočichů - H3T3ph and H3T11ph)
- **H3At108(120)ph**
- **Vnitřní část centromery**

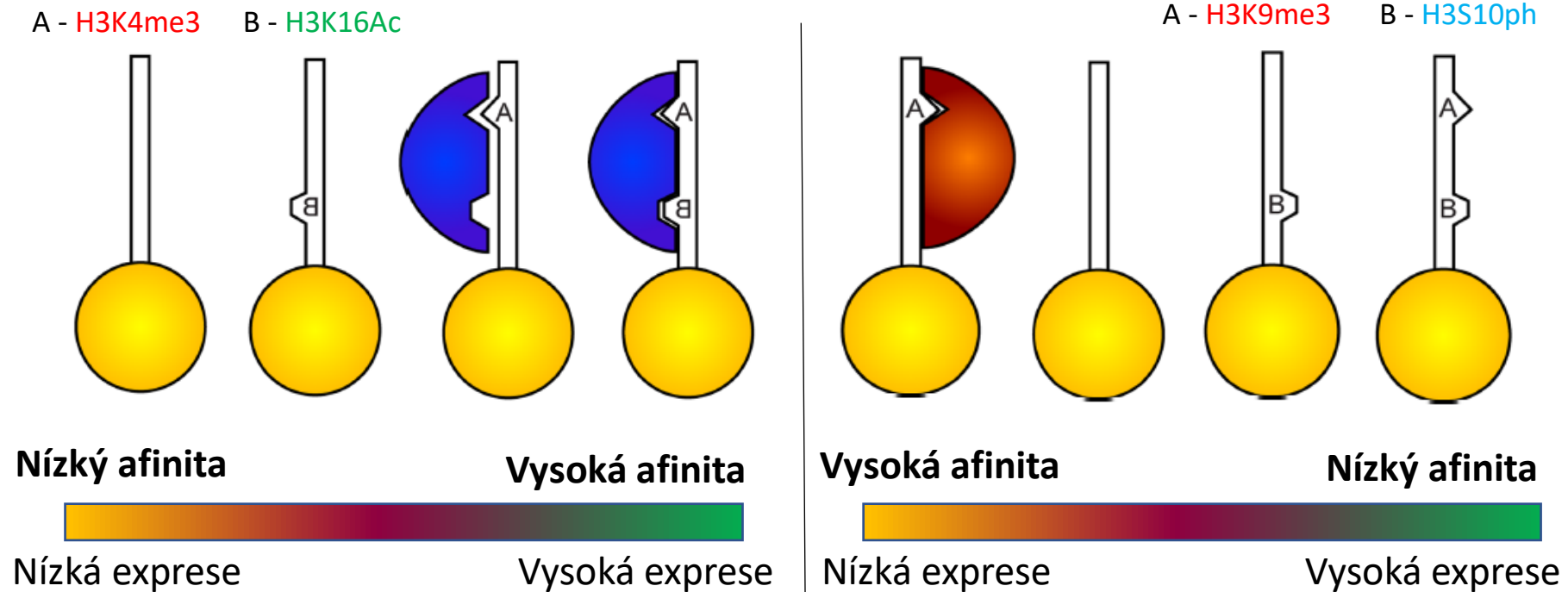


Fuchs *et. al.* 2012

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

Molekulární evidence kombinatoriální komplexity



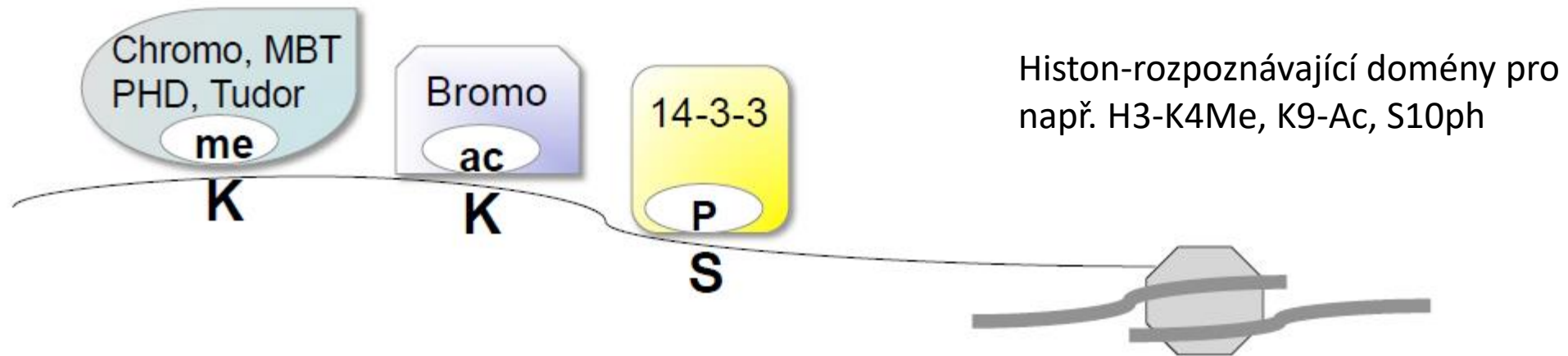
BPTF
(„Nucleosome-remodeling factor subunit“)

HP1
(heterochromatin protein, důležitý pro vazbu DNMT1)

Rando 2012

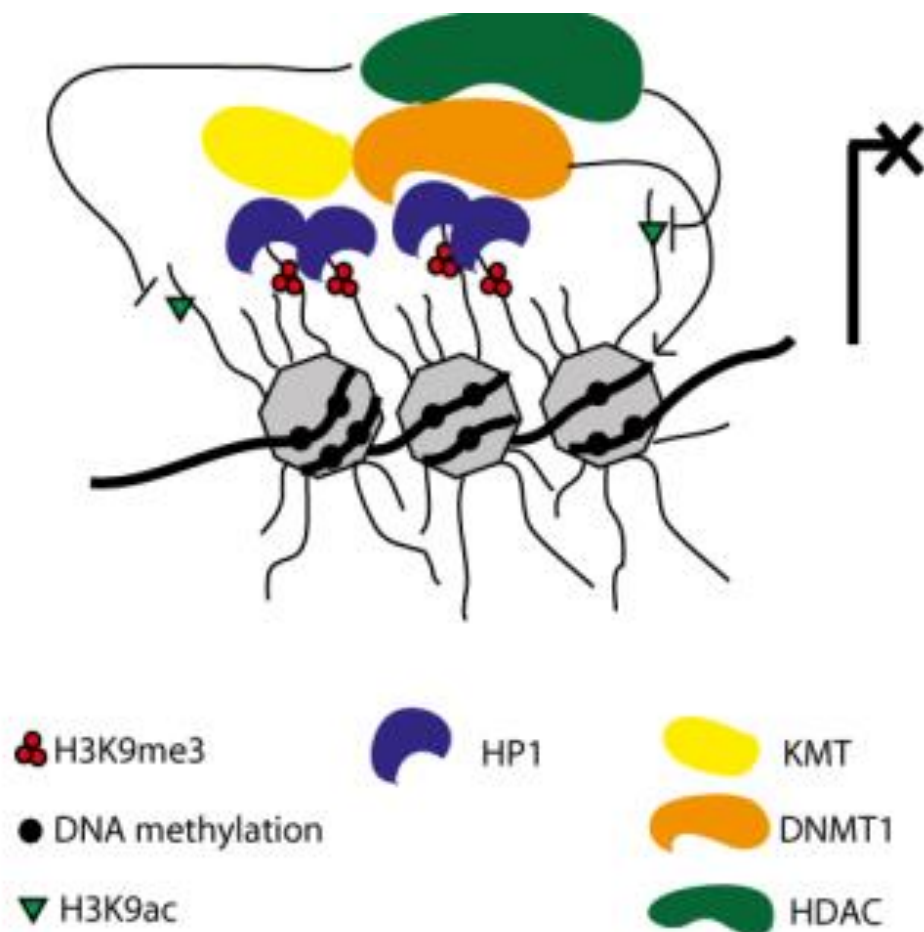
U Arabidopsis, CMT3 (CHH methylace) se preferenčně váže k dimeru H3K9me3H3K27m3.

Histon-rozpoznávající domény histon-methylace, -acetylace a -fosforylace



- Příklady proteinů obsahující chromodoménu
 - CHD1 – ATP-chromatinový remodeler
 - HP1 – protein typický pro inaktivní heterochromatin, vazba DNMT1
 - CBX2 – část PrC proteinu, ubiquitinace H2AK119

Neznámá hierarchie jednotlivých faktorů

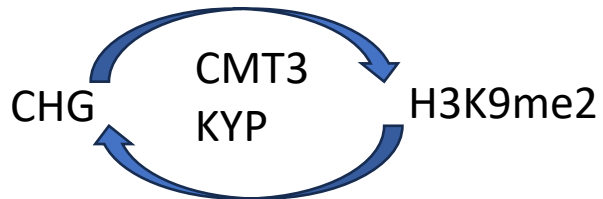


- HP1 vazba na H3K9me3
- HP1 vazba s DNMT
- HP1 vazba HMT a šíření H3K9me3
- DNMT může vázat HDAC

=není jasné, které elementy jsou na vyšší regulační úrovni

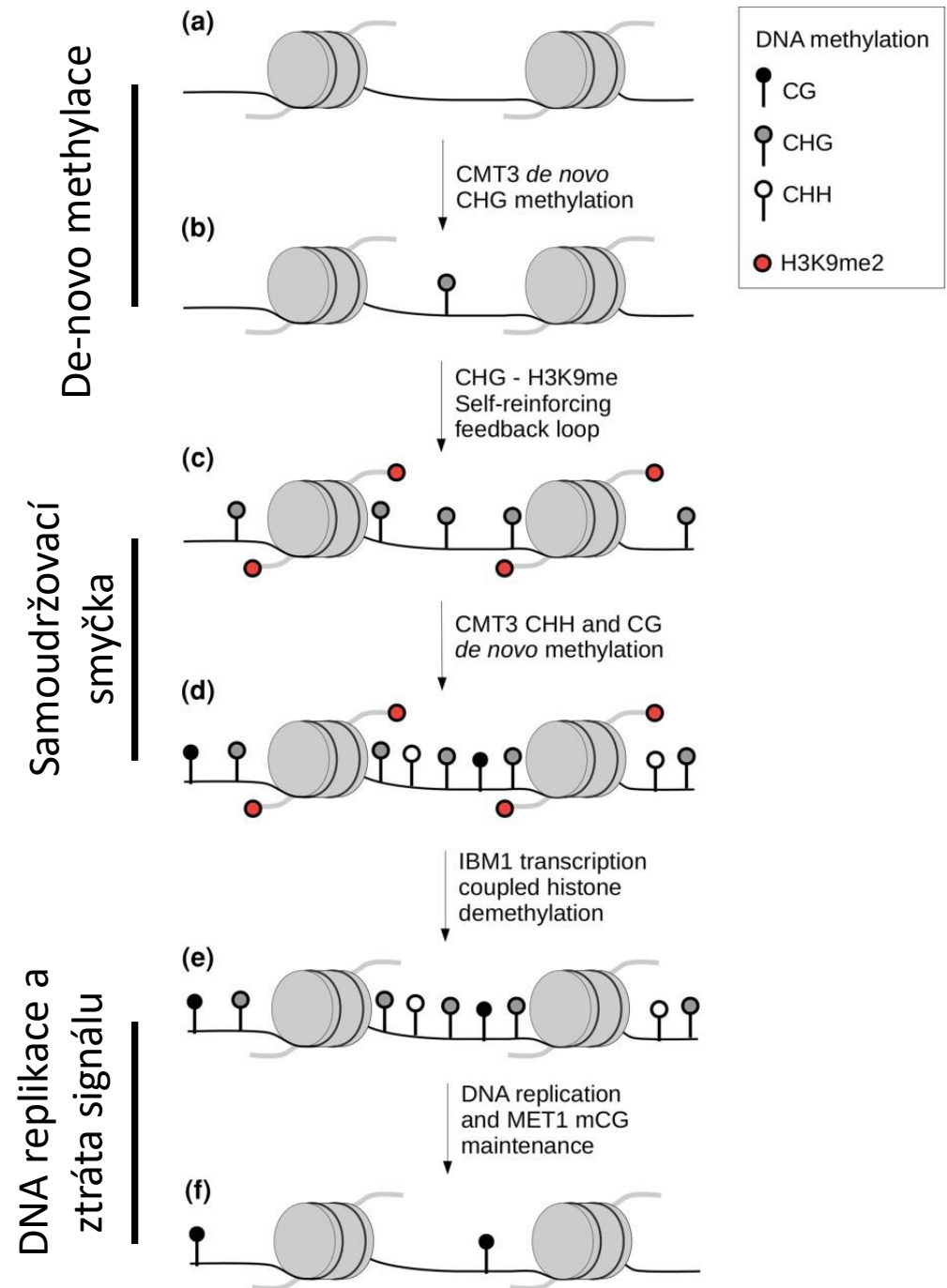
Udržení gbM probíhá skrz interakci mezi CMT3 methylázou a H3K9me2 modifikací

- CMT3 methyluje CHG místa v oblastech sousedících s inaktivním chromatinem – CHG methylace je signálem pro H3K9me2

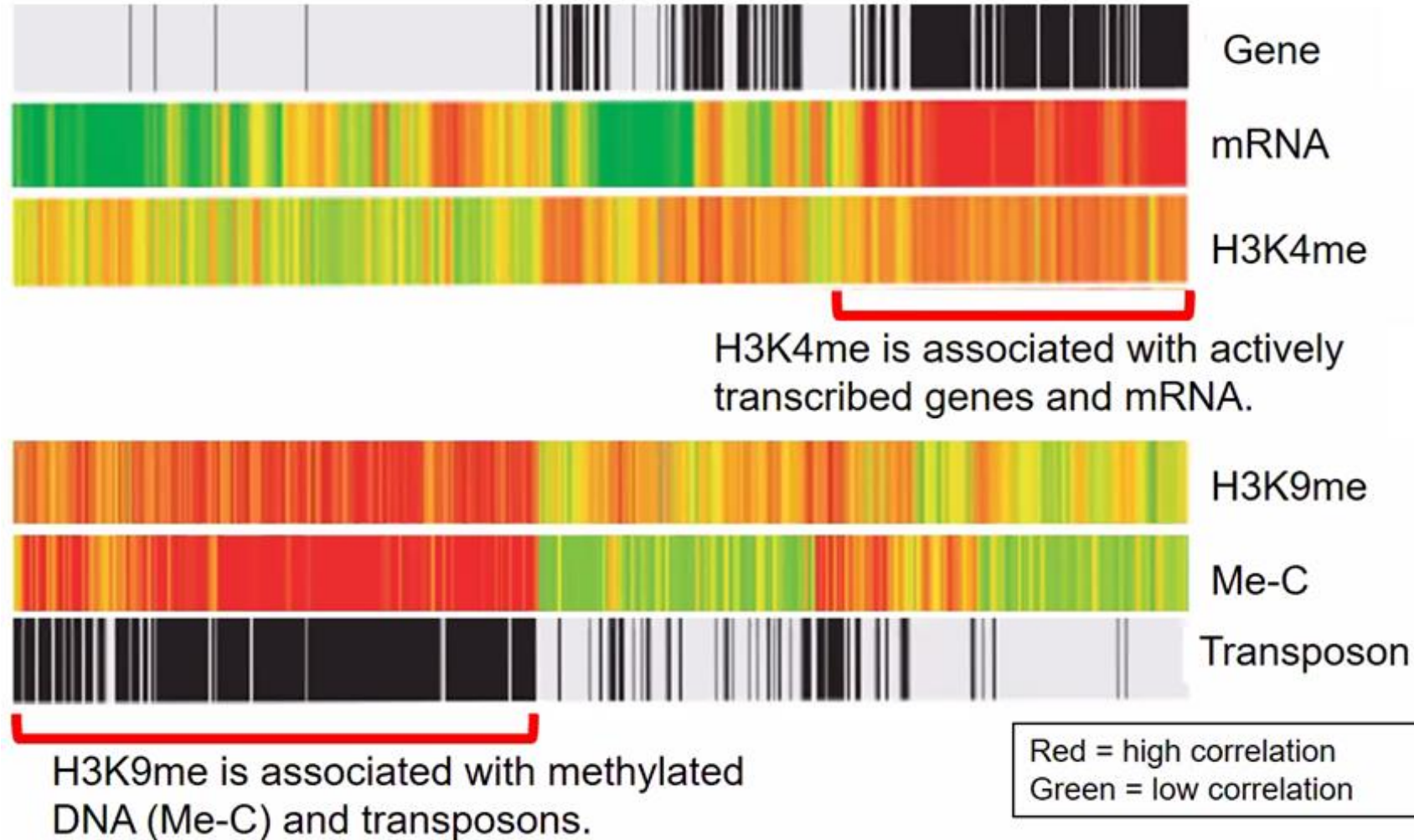


- DNA replikace vede ke snížení CHG/CHH methylace, CGm jsou udržovány MET1

Muyle et al. 2022

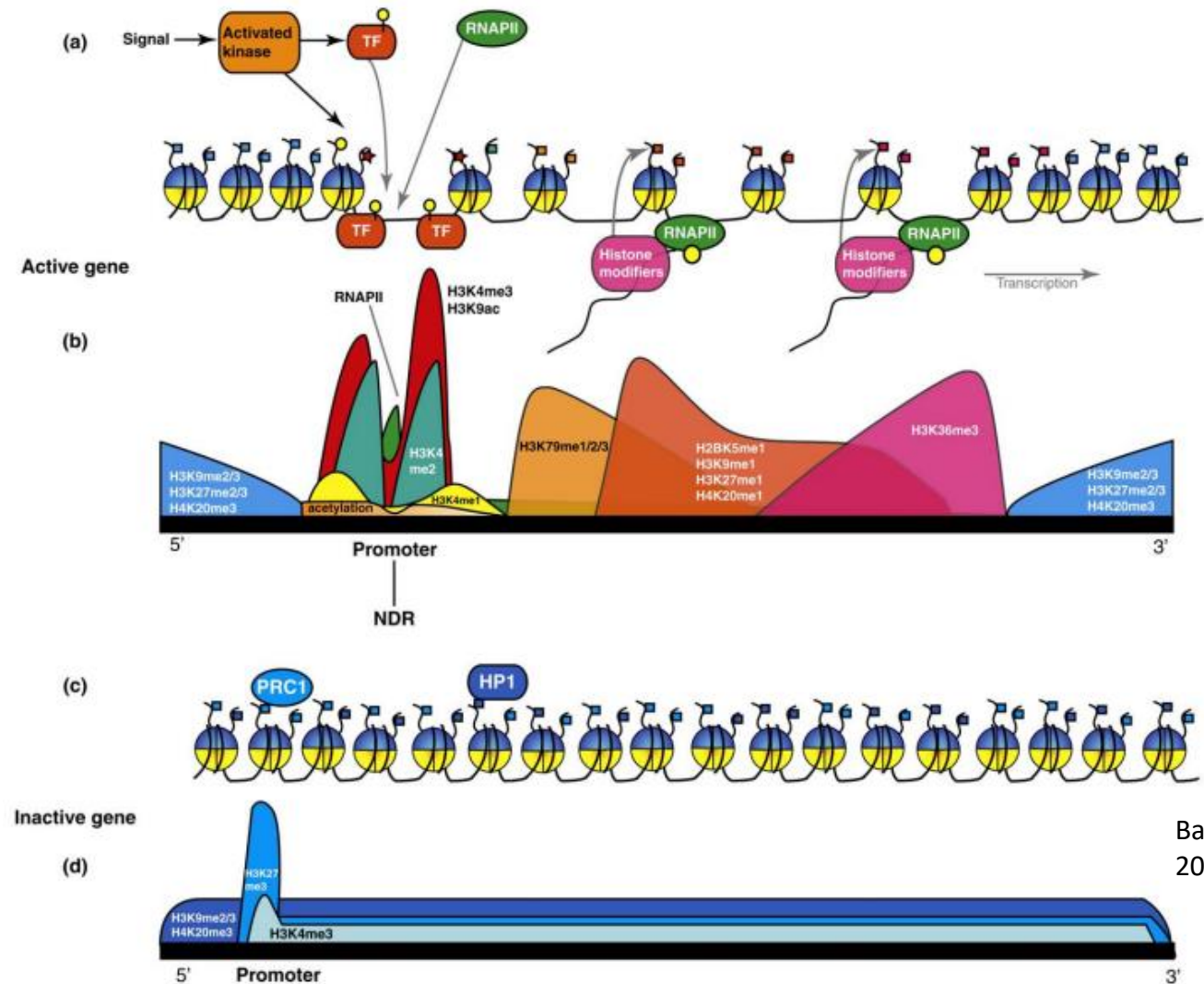


Histonové modifikace jsou odlišně distribuovány mezi geny a TEs



Distribuce histonových modifikací v genových oblastech

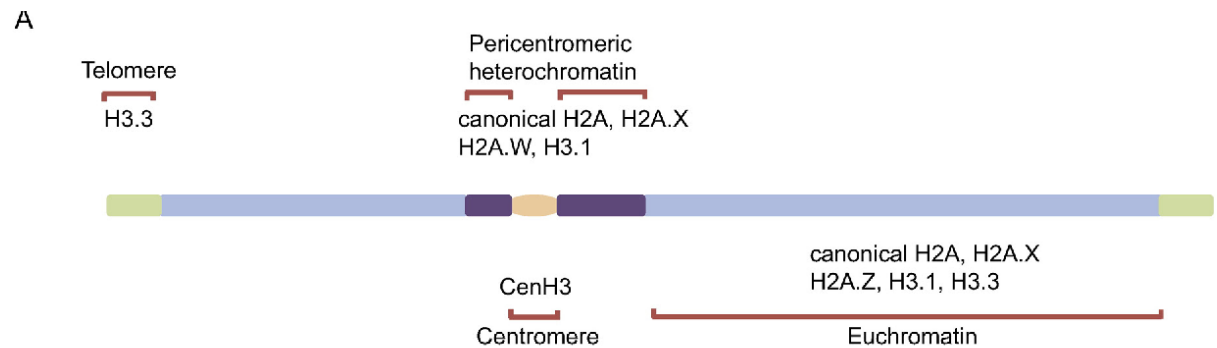
- H3K27me3 – modifikace typická pro genovou inaktivitu (vývojově důležité geny)
- H3K4me2/me3 a H3K9ac – značky typické pro genovou expresi a aktivitu (promotor)
- H3K36me3 – značka typická pro genovou expresi (exony)



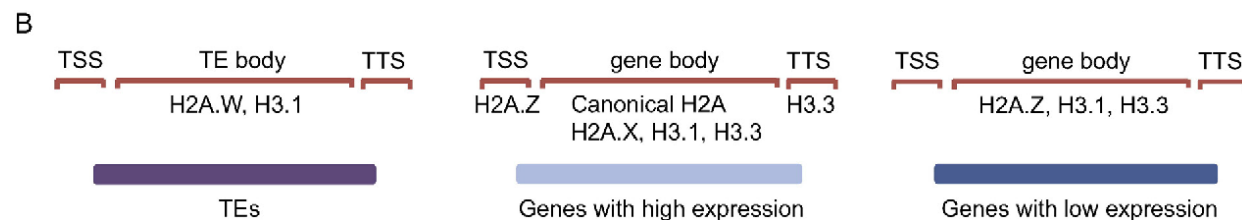
Bart et al.
2010

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 aj.



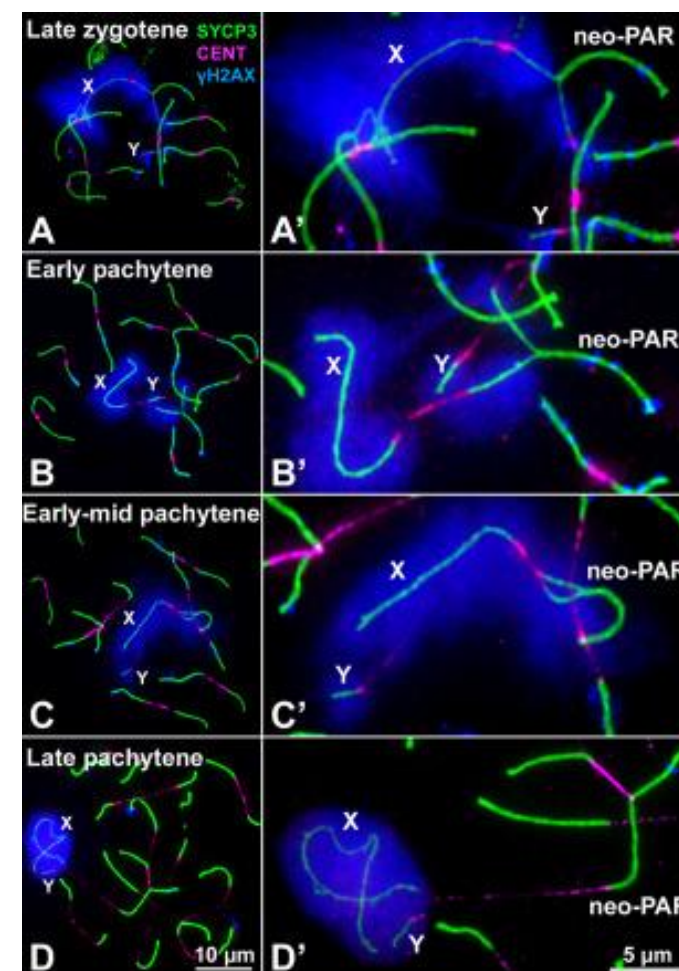
➔ Euchromatin vs. Heterochromatin vs. centromere



➔ Rozdíl genů a repetit

Histonové varianty jsou životně nezbytné

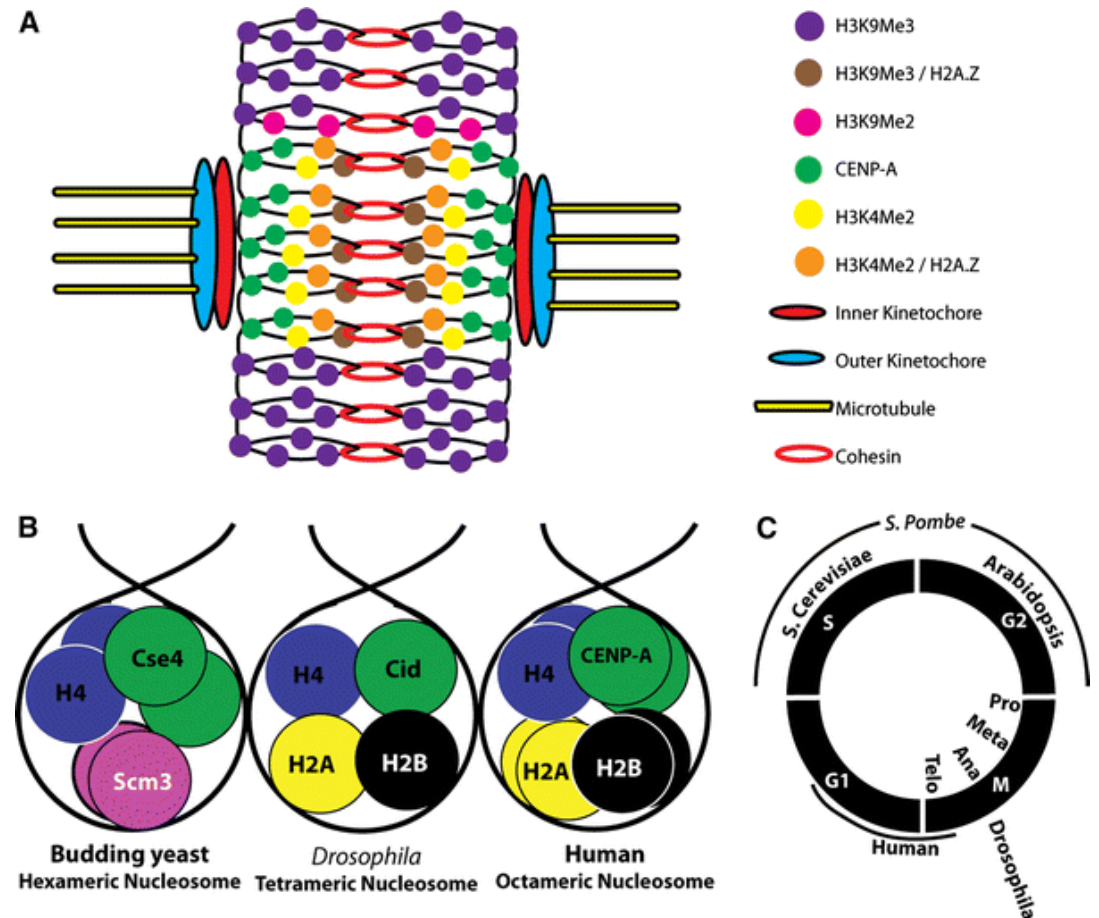
- Buněčná regulace cyklu (DNA reparacem formace „sex body“ a MSCI)
- Regulace genové exprese (ANC vs INC)
- Chromatinové skládání a členění (X chromozom inaktivace)
- Buněčná dědičnost (pluripotence a dozrávání buněčných linií)
- Úloha v lidských chorobách a imunitě
- Úloha při stárnutí



Identita centromery je definována cent-specificickým histonem

- Pro většinu eukaryotických genomů je centromera definována chromatinovými a epigenetickými značkami
 - Aktivita centromery definována zejména H3-specificickou variantou (CENH3, Cse4, CENP-A)
- Historicky definována jako konstitutivní heterochromatin, dnes zejména aktivní a represivní modifikace s jasnou hierarchií

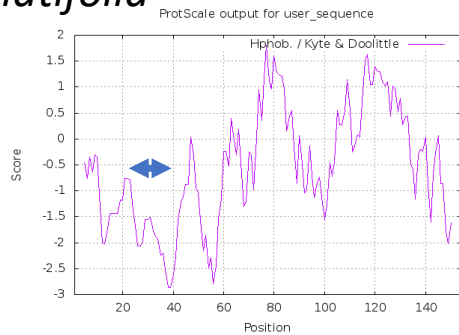
=centromerické satelity částečně nutné pro vazbu histonové varianty, druhově specifická DNA sekvence (speciace?)



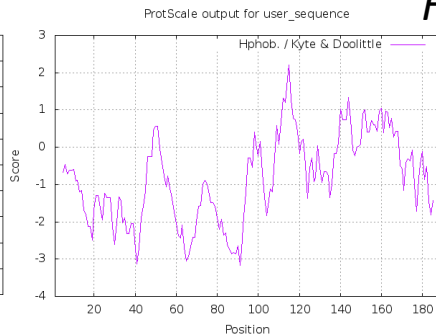
Specifita centromerické histonové varianty spočívá v divergenci N-terminální domény

- Největší variability centromerického histonu v AA N-terminálním konci

S. latifolia

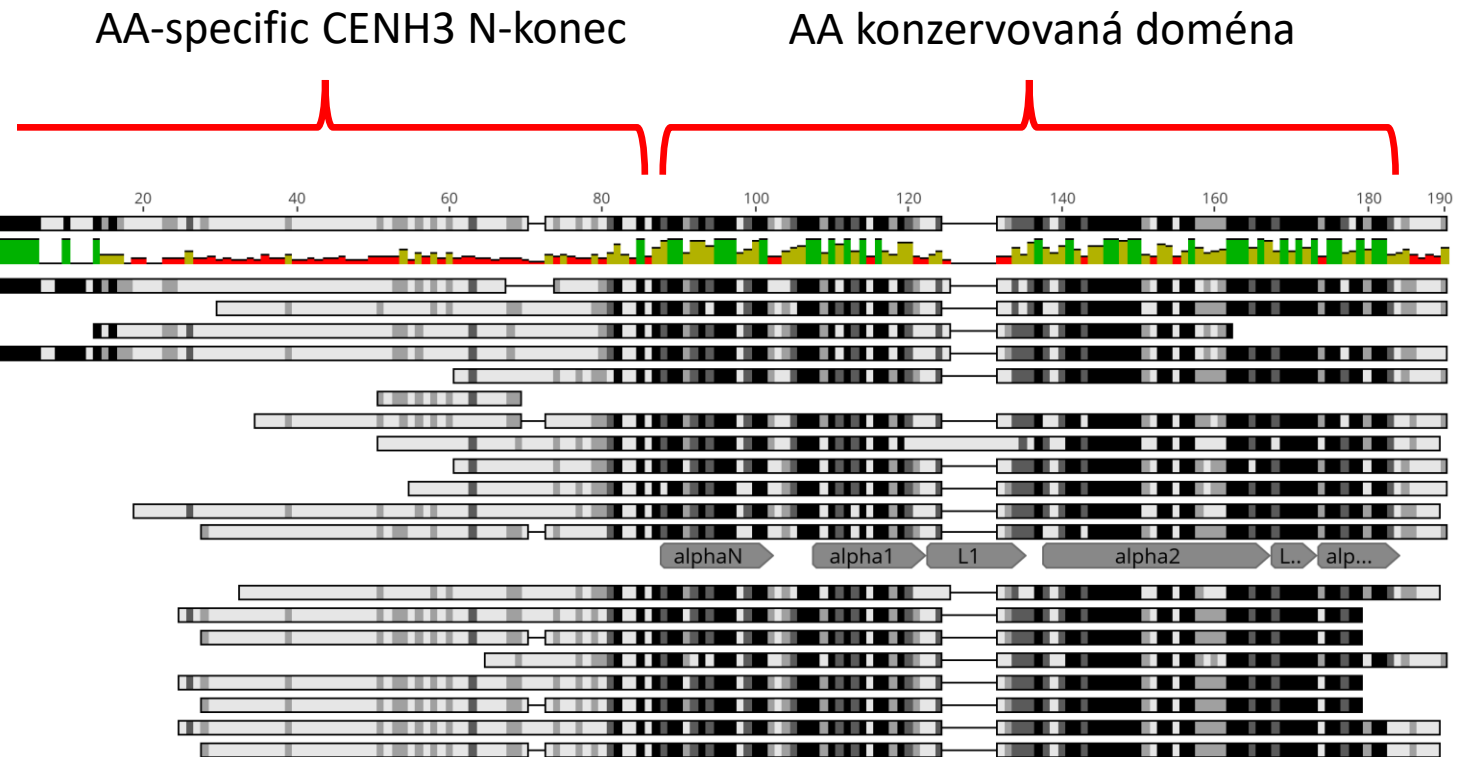


H. lupulus



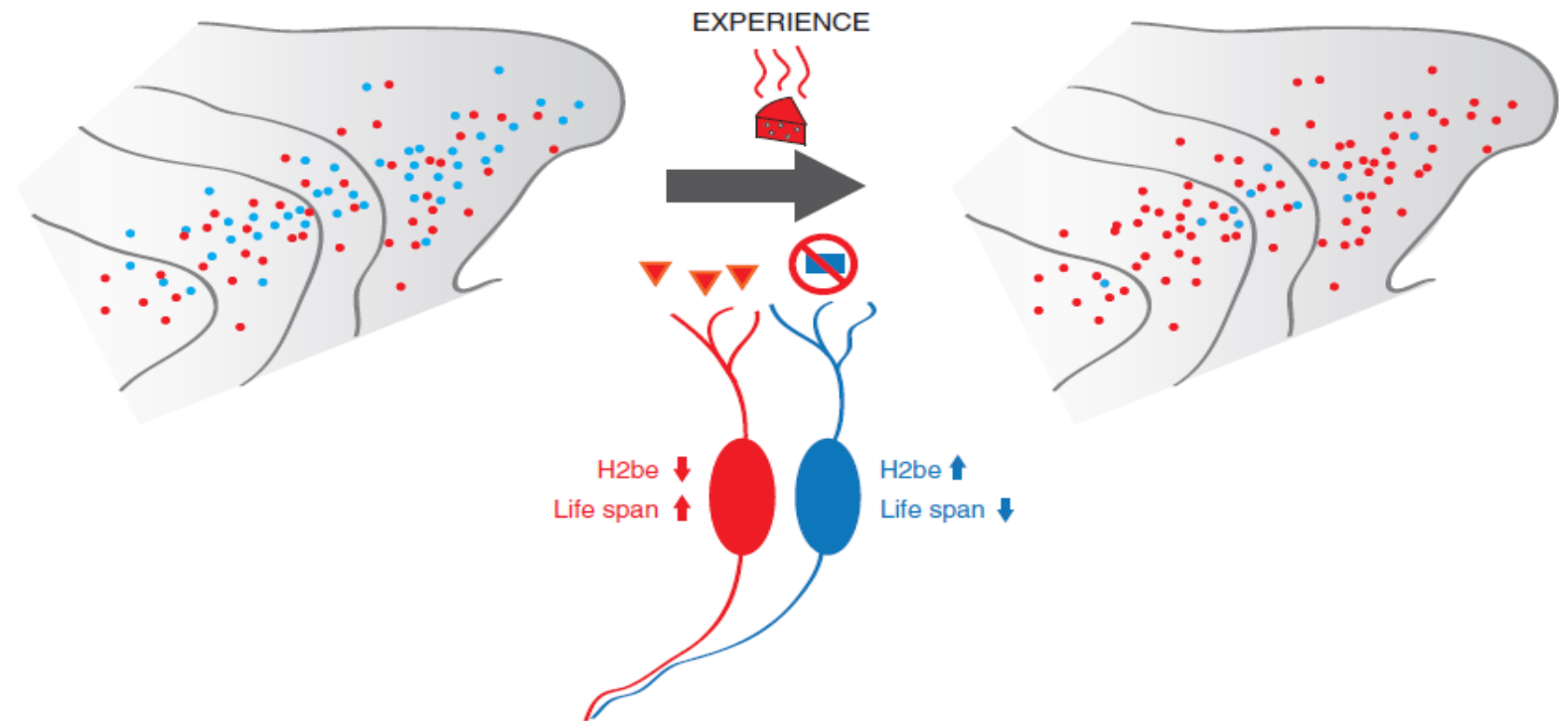
Consensus
Identity

1. A thaliana sp|Q8RVQ9|HTR12_ARATH
2. Beta vulgaris subsp. vulgaris tr|A0A0J8BDX6|A0A0J8BDX6_BETVU
3. Brassica napus tr|E2IPK9|E2IPK9_BRANA
4. Brassica oleracea tr|D1MH57|D1MH57_BRAOL
5. Cicer arietinum tr|X5GE29|X5GE29_CICAR
6. Clipboard Contents
7. Daucus carota tr|A0A068CMC2|A0A068CMC2_DAUCA
8. Hordeum vulgare subsp. vulgare tr|G1APU3|G1APU3_HORVW
9. Lathyrus sativus tr|A0A0D3QLT7|A0A0D3QLT7_LATSA
10. Melilotus albus tr|A0A0D3QLV6|A0A0D3QLV6_MELAB
11. Oryza sativa subsp. japonica tr|Q6T367|Q6T367_ORYSJ
12. S latifolia FMHP01017919 - ORF 1 (frame 1) translation
13. Secale cereale tr|A0A2I6RN92|A0A2I6RN92_SECCE
14. V u subsp. sesquipedalis LC490907-1|BBM60645.1|148|Vigna
15. V u subsp. sesquipedalis LC490908-1|BBM60646.1|143|Vigna
16. Vicia peregrina tr|A0A0E3KS29|A0A0E3KS29_9FABA
17. Vigna u subsp. unguiculata LC490905-1|BBM60643.1|148|Vigna
18. Vigna u subsp. unguiculata LC490906-1|BBM60644.1|143|Vigna
19. Vigna unguiculata LC490903-1|BBM60641.1|158|Vigna
20. Vigna unguiculata LC490904-1|BBM60642.1|153|Vigna



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**



Děkuji za pozornost!