

Epigenetická paměť

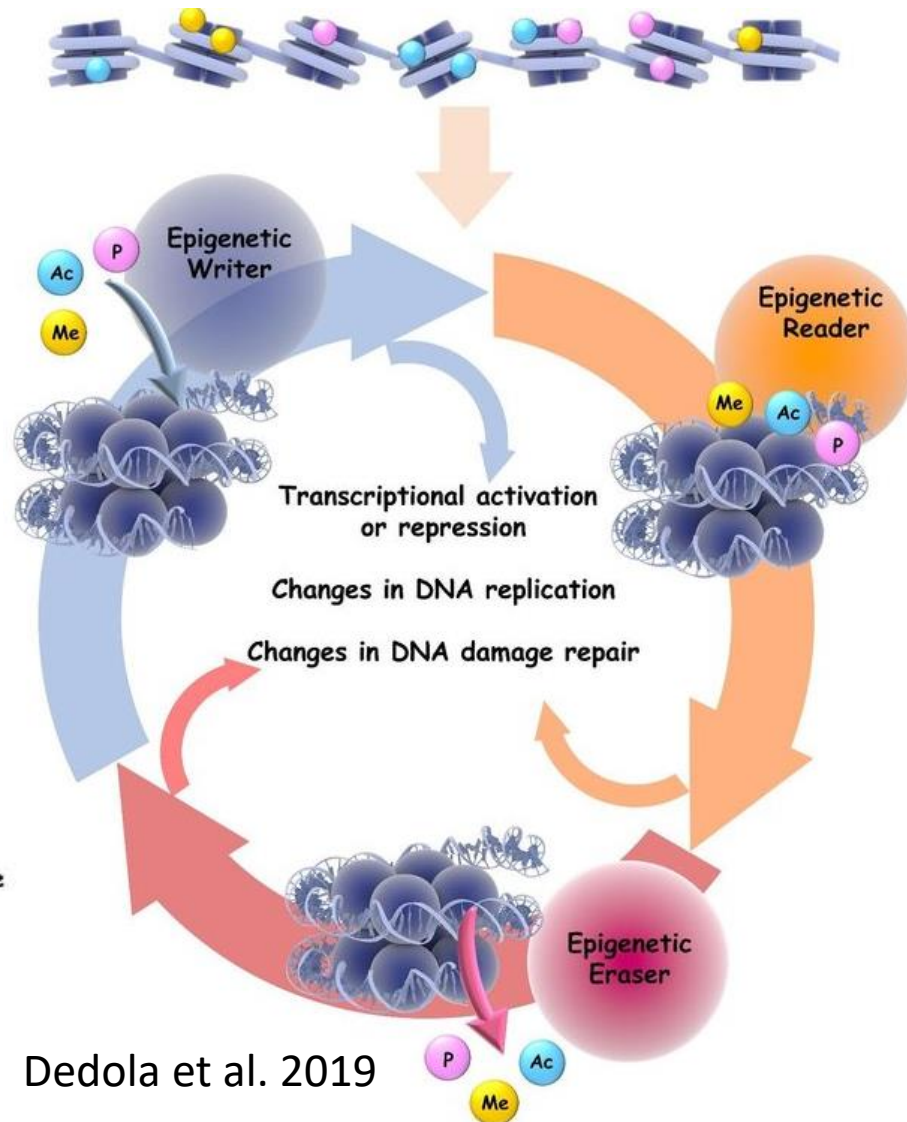
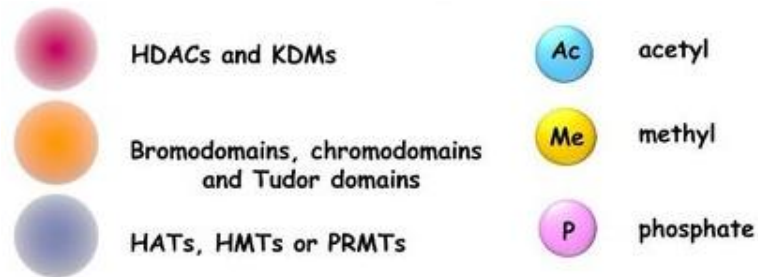
Vývojová genetika 2022

Obsah

- Chromatin-remodelující proteiny – funkce histonové informace
- Paměťové proteiny a jejich funkce
 - Polycomb
 - Thiritorax
- Epigenetické reprogramování
 - Vývojové epigenetické změny u savců
 - Epigenetické změny navozené umělým zásahem
 - Vývojové epigenetické změny u rostlin

„Writers, erasers and readers“

Acetyltransferázy
Methyltransferázy
Kinázy
Ubiquitinázy



→ Rozpoznání specifických histonových značek
→ Vazba dalších remodelujících proteinů a chromatin-modifikujících enzymů (změna funkce a architektury chromatinu-Swi, ISWI...)
→ PcG, TrxG paměťové proteiny?

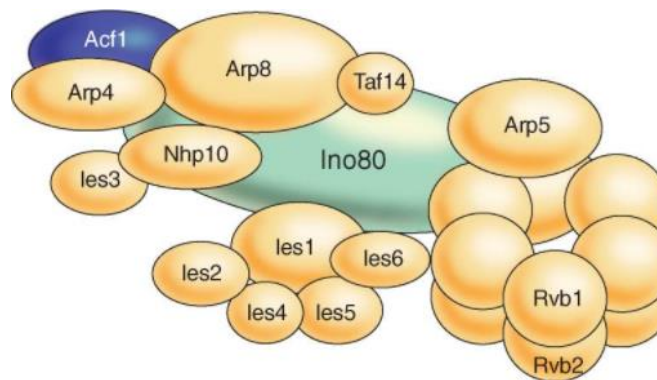
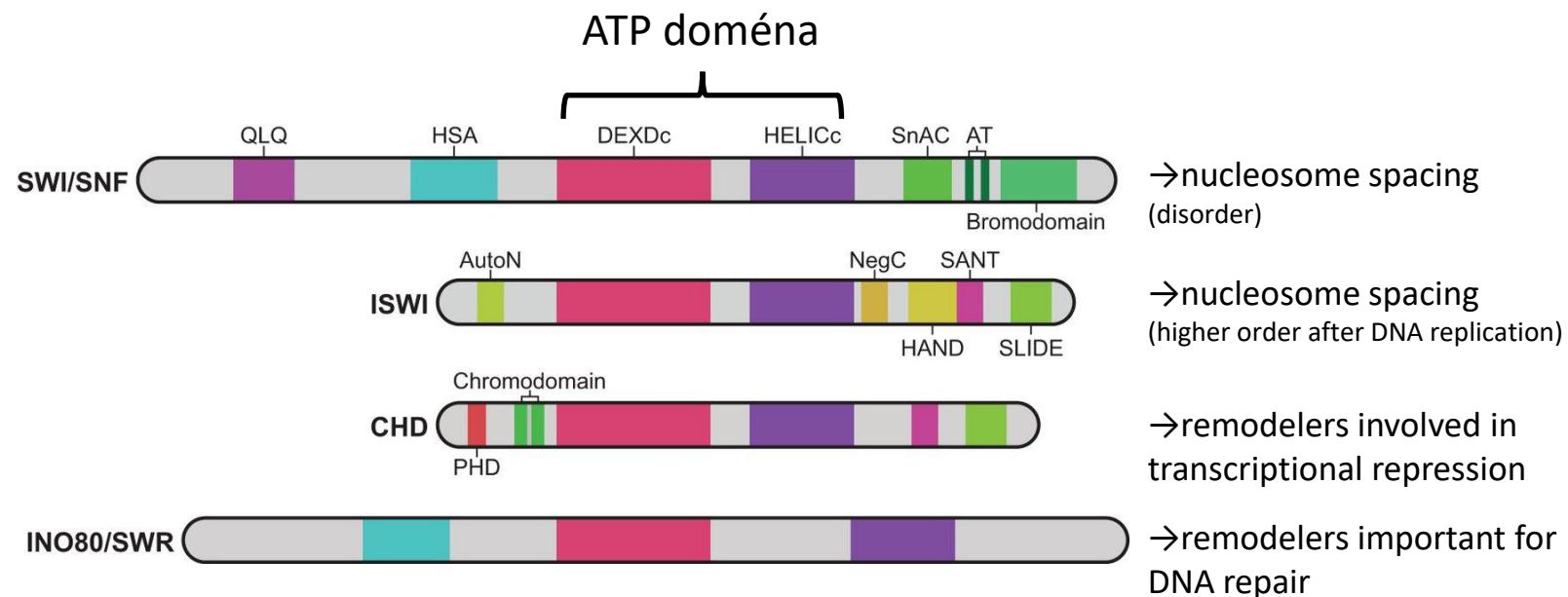
Deacetylázy
Demethylázy
Fosfatázy
Deubiquitinázy

Klasifikace chromatin modifikujících enzymů

- **Kovalentně modifikující komplexy** (předchozí přednáška)
 - Acetylázy/deacetylázy
 - Methylázy/demethylázy
 - Ubiquitinázy/deubiquitinázy
 - Kinázy/fosfatázy
 - aj.
- **ATP-dependentní chromatin modifikující komplexy**
 - Rozpoznávají histonové modifikace, některé komplexy mají schopnost vlastní modifikace a chromatinové organizace (např. HDAC a Chd3/4 – NURD komplex)
 - **Epigenetické faktory, které používají pro změnu chromatinu energii z hydrolýzy ATP**
 - SWI/SNF (SWItch/Sucrose non-fermentable) – někteří zástupci TrxG proteinu
 - ISWI (imitation of SWI)
 - CHD family (Chromodomain helicase DNA binding protein family)
 - INO80/SWR

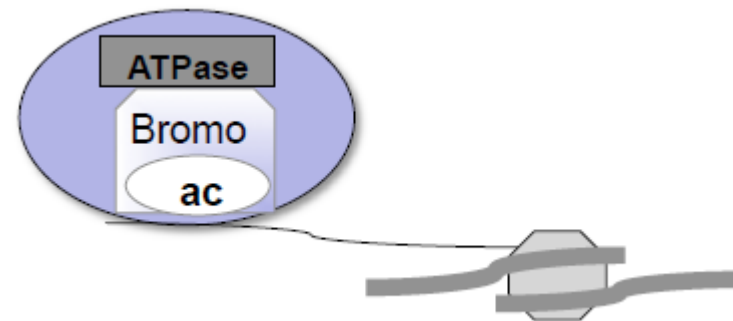
Srovnání chromatin remodelujících proteinů

- ATP-dependentní domény jsou typické pro všechny členy, ostatní domény rozlišují enzymy do jednotlivých pod-rodin
- Každý enzym se váže s několika dalšími podjednotkami vytvářející multi-proteinové komplexy, které mění pozici nukleozomu nebo strukturu chromatinu = otevřený x zavřený

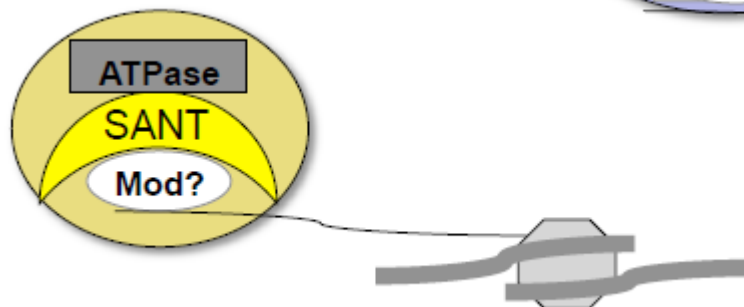


Tři hlavní typy chromatin remodelujících enzymů a jejich vztah k histonovým modifikacím

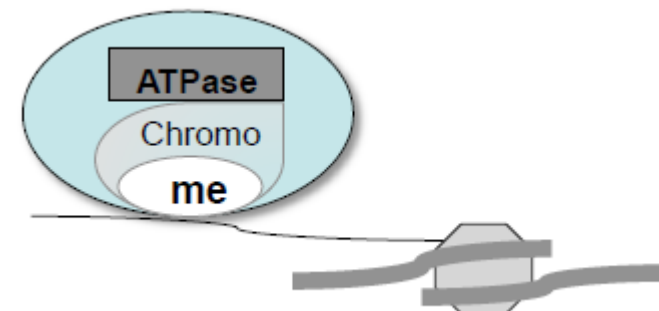
- SWI/SNF (SWItch/Sucrose non-fermentable)



- ISWI (imitation of SWI)

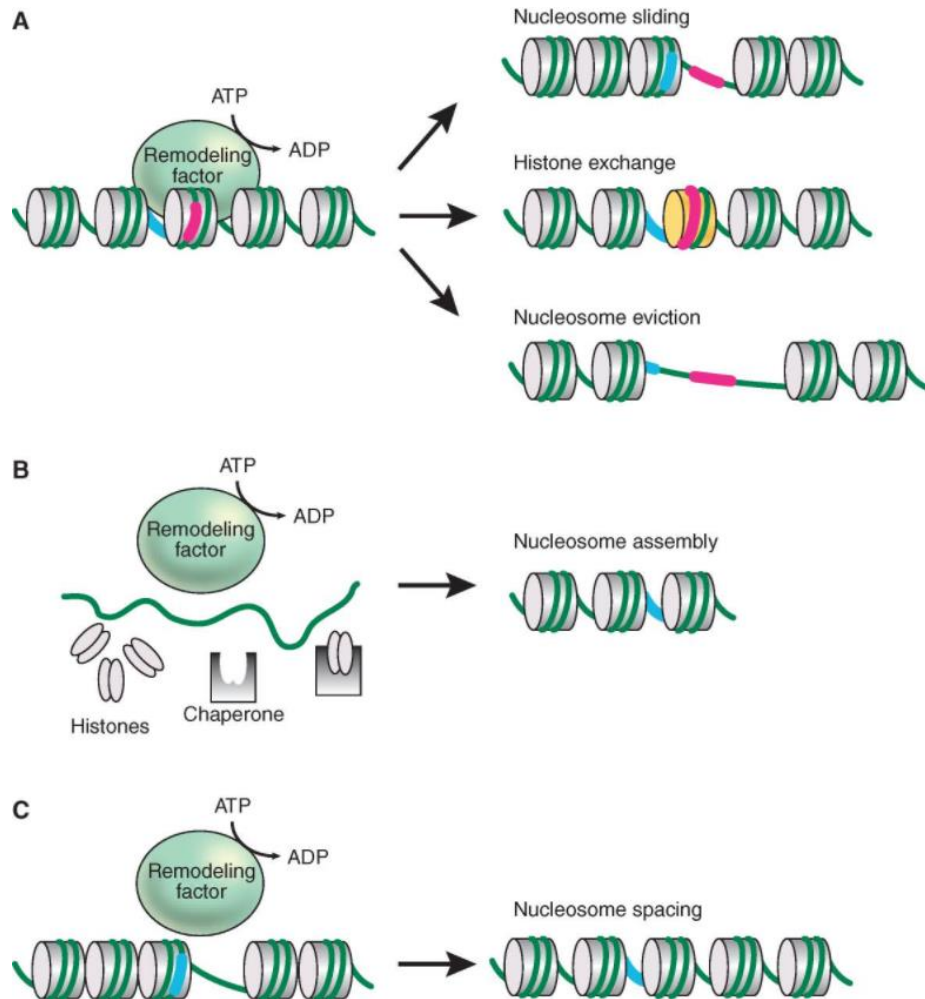


- CHD family (Chromodomain helicase DNA binding protein family)

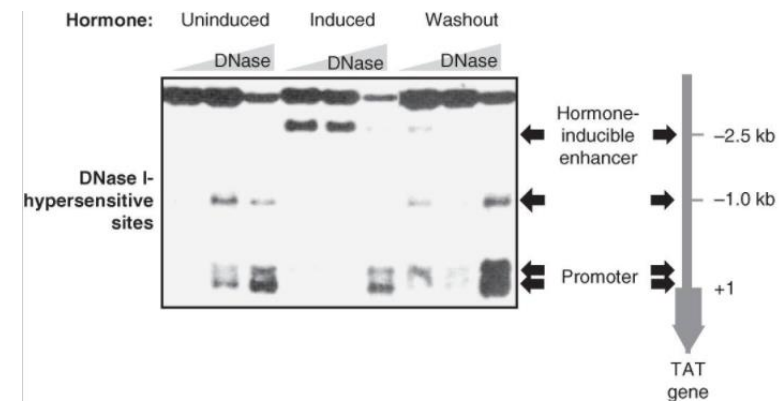


- Většina mutantů deficientní pro tyto komplexy je neviabilních (alespoň u živočichů)!

Funkce ATP-nekleozom remodelujících komplexů



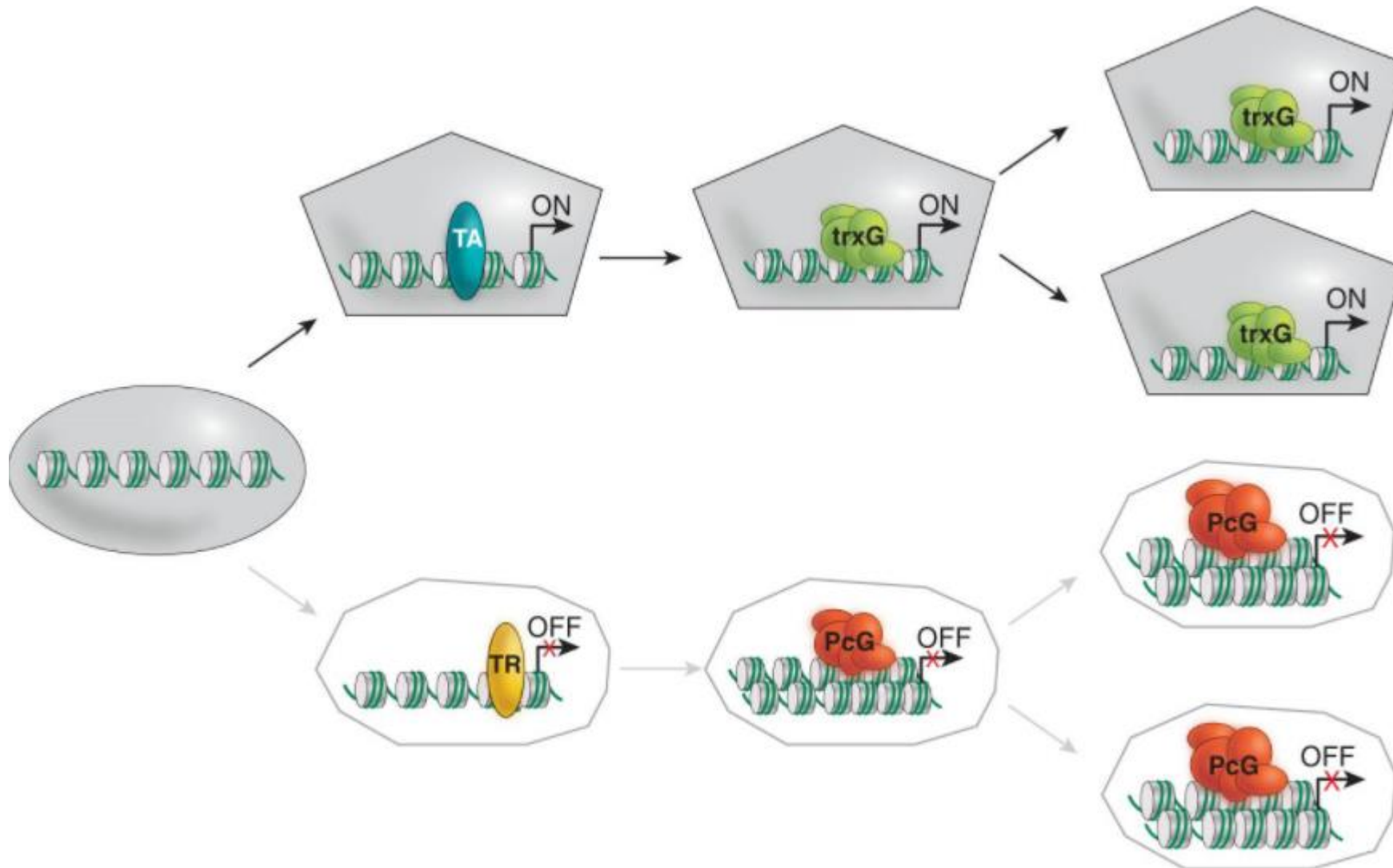
- Remodelující komplexy umožňují vyšší dostupnost transkripčním faktorům
 - Pohyb nukleozomu
 - Odstranění nukleozomu
 - Výměna za specifickou histonovou variantu (CENP-A, H3.3, λ -H2AX...)
- Sestavení nukleozomu
- Nukleozomová frekvence



Obsah

- Chromatin-remodelující proteiny – funkce histonové informace
- Paměťové proteiny a jejich funkce
 - Polycomb
 - Thrtorax
- Epigenetické reprogramování
 - Vývojové epigenetické změny u savců
 - Epigenetické změny navozené umělým zásahem
 - Vývojové epigenetické změny u rostlin

Koncept buněčné paměti – PcG proteiny



Pozitivní regulátory buněčné paměti

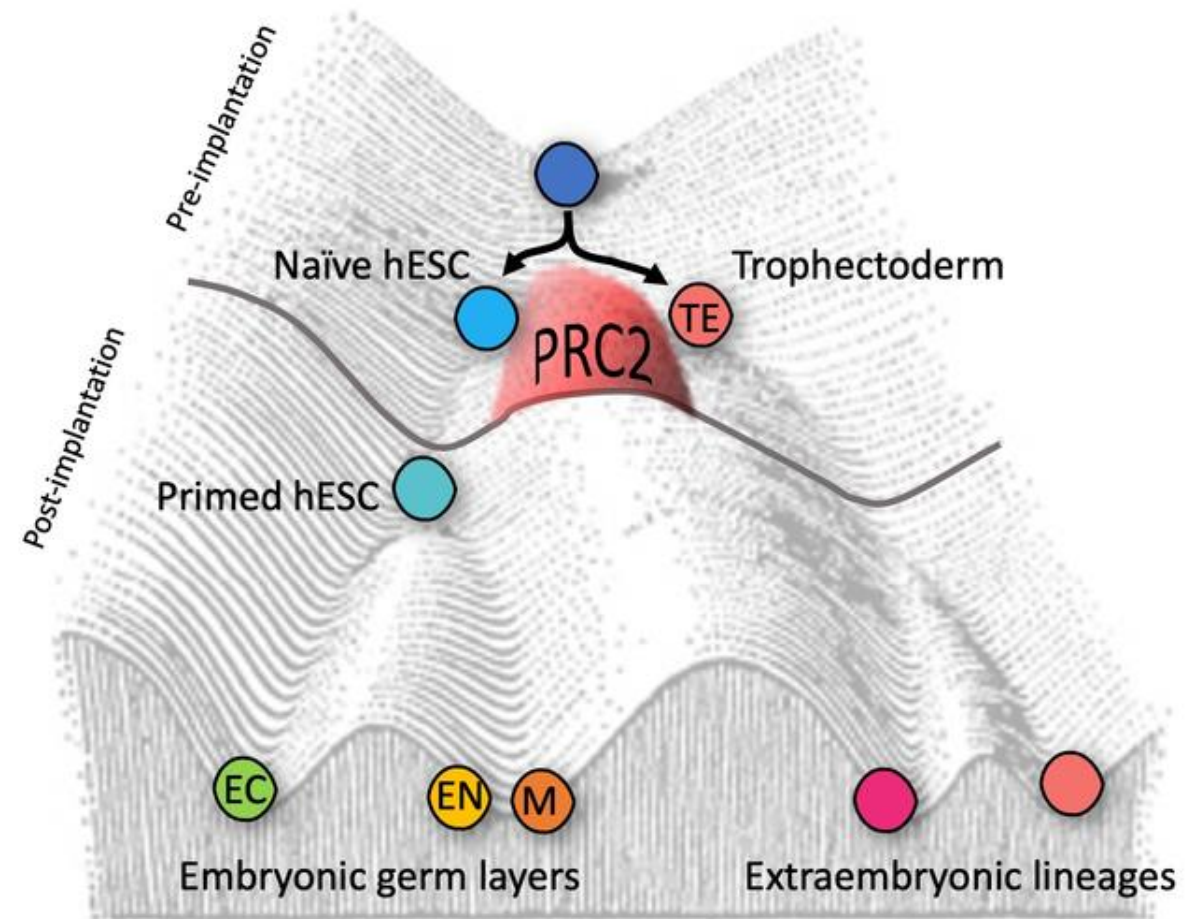
- TrxG

Negativní regulátory buněčné paměti

- PRC1
- PRC2

Polycomb proteiny

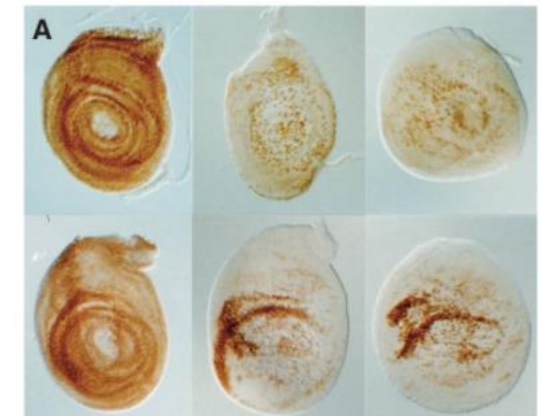
- „Polycomb group“ – **multiproteinové komplexy**, odpovědné za buněčnou paměť a **regulují expresi** během vývoje živočichů a rostlin
 - **Umlčení homeotických genů** – geny umlčeny PcG cestou jsou trvale deregulovány v buněčné linii (u rostlin VRN-PRC2, po vernalizaci zůstává umlčen do další generace)
- Tři zástupci, evolučně konzervované
 - PRC1 – Polycomb Repressive Complex 1 (H2AK119Ub1)
 - PRC2 – Polycomb Repressive Complex 2 (H3K27me3)
 - PhoRC – Pho Repressive Complex (vazba a specifikace PcG1 a PcG2)



PRC2 komplex – model *Drosophila*



Scr expression in leg imaginal discs



D. melanogaster



Wild type

PcG mutant

- **Hlavní jednotky PRC2**

- **Extra sex combs** (Esc) – zvyšuje aktivitu, neznámý mechanismus
- **Enhancer of Zeste** E(z) – hlavní část pro metylaci (SET doména)
- **Suppressor of Zeste** (Su(z)12) – katalytická aktivita
- **P55**

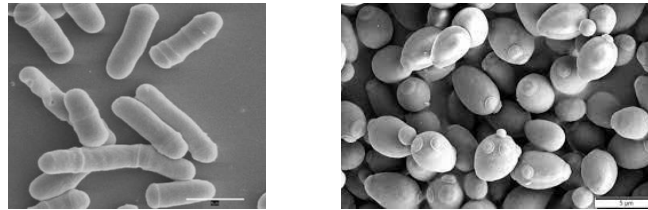
- Konzervovaná funkce v rostlinách i živočiších, **PRC2 katalyzuje H3K27me3** – důležitá modifikace pro vazbu PRC1, katalyzující H2AK119ub

- Obě značky mohou vázat ostatní chromatin re-modelující faktory, měnící strukturu chromatinu (ATP-dependentní faktory) nebo tvoří překážku pro transkripční faktory

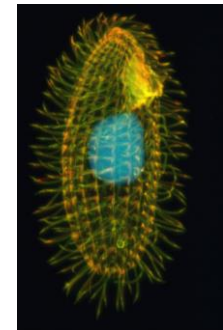
- **PCR2 má opačný mechanismus k H3K4me2** (aktivující modifikace) skrze RETINOBLATOMA-BINDING PROTEIN2

Evoluce PcG proteinů a determinace základní funkce

- **PcG proteiny se vyvinuly dříve v evoluci**, zřejmě v posledním společném předkovi všech eukaryot
- Absence v *S. pombe* a *S. cerevisiae* zřejmě produktem genové ztráty, neznámý důvod

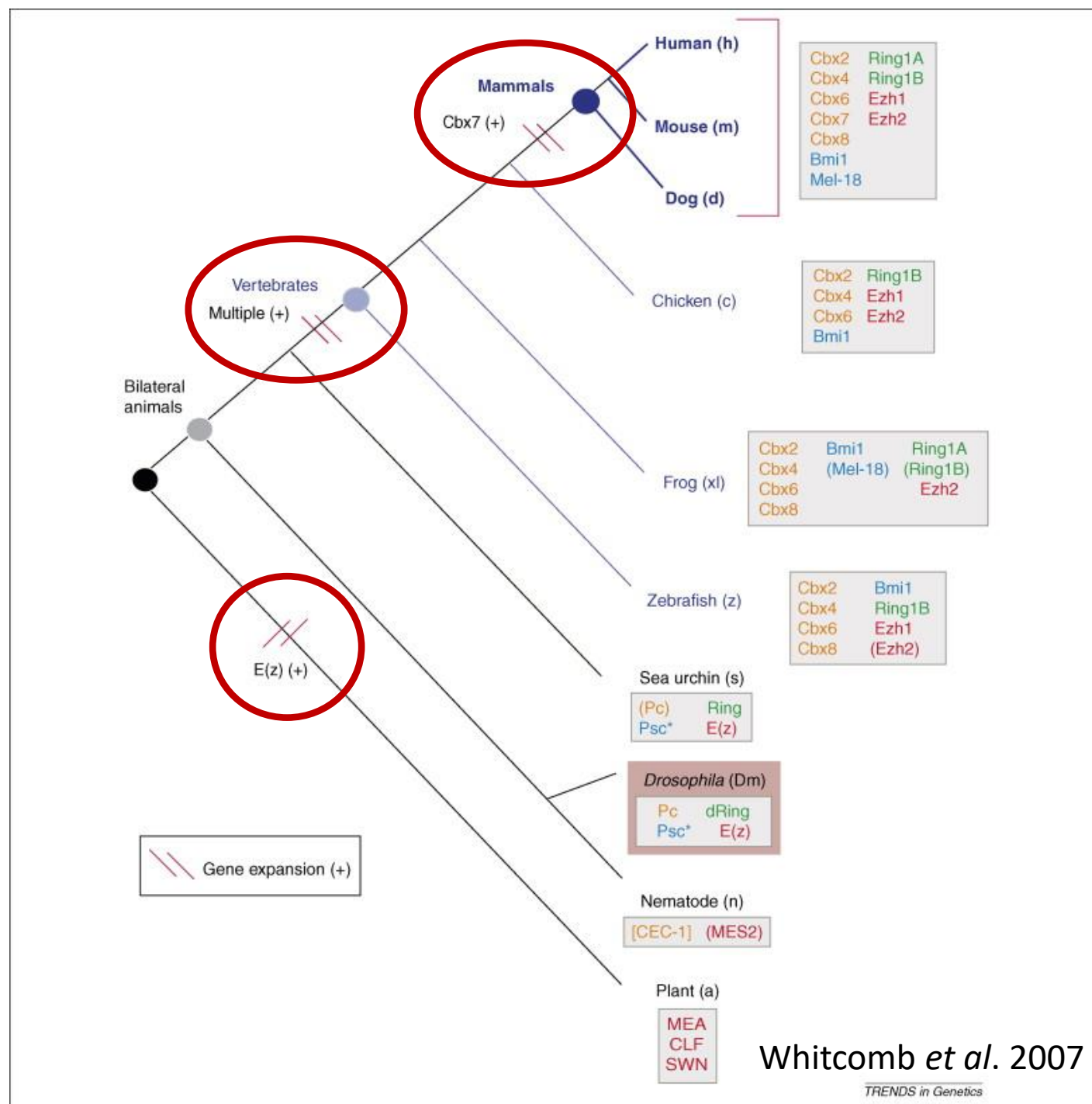


- Pro základní funkci PRC2 jsou **nejdůležitější podjednotky E(z) a p55** – determinováno na základě chybějících komplexů u modelových organismů
 - *Chlamydomonas reinhardtii* (jednobuněčný organismus) – absence Su(z)12
 - *Tetrahymena* – postrádá Su(z)15 a Esc
 - E(z) homolog katalyzuje H3K27me3 pomocí RNAi (navazuje metylace H3K9me3, pro kterou je esenciální)



Geny PcG proteinů jsou evolučně staré jednotky genomu

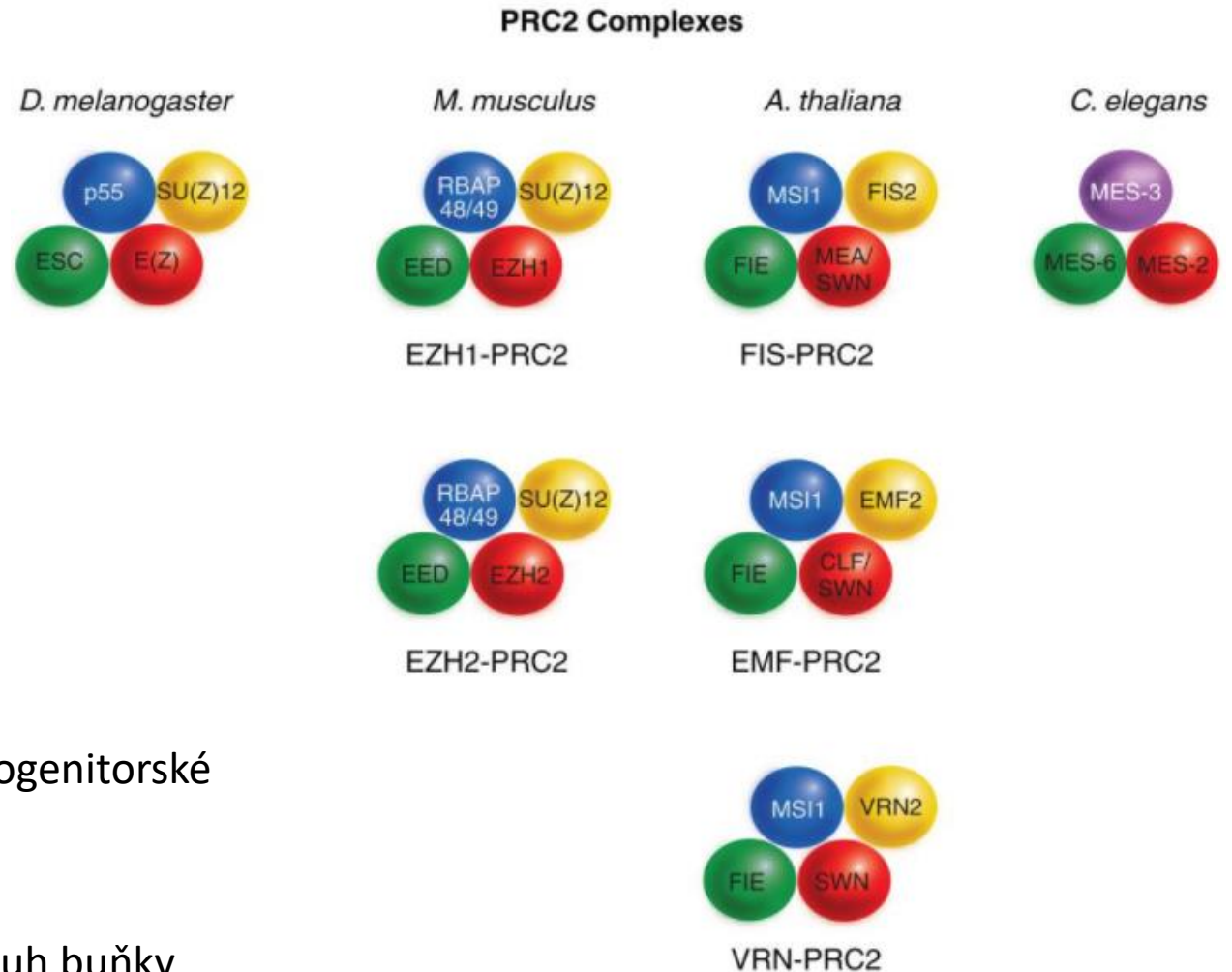
- **PcG-geny prodělaly několik duplikací**, již před rozdělením bezobratlých a obratlovců
 - Ztráta PRC1 u hadů
- **Paralogy PcG genů nemusí interagovat pouze s ostatními jednotkami PRC komplexů**, ale mohou řídit celou řadu funkcí
- Diverzifikace PcG genů zřejmě umožnila adaptivní rozpětí obratlovců během evoluce živočichů a savců
- Expanze PcG genů a jejich evoluce rovněž sledovala evoluci *trxG* a *Hox* genů, **studium koevoluce „high-level“ regulátorů umožňuje pochopit složitost a propojenost regulačních drah**



Diverzifikace PRC2 komplexu u hlavních modelových organismů

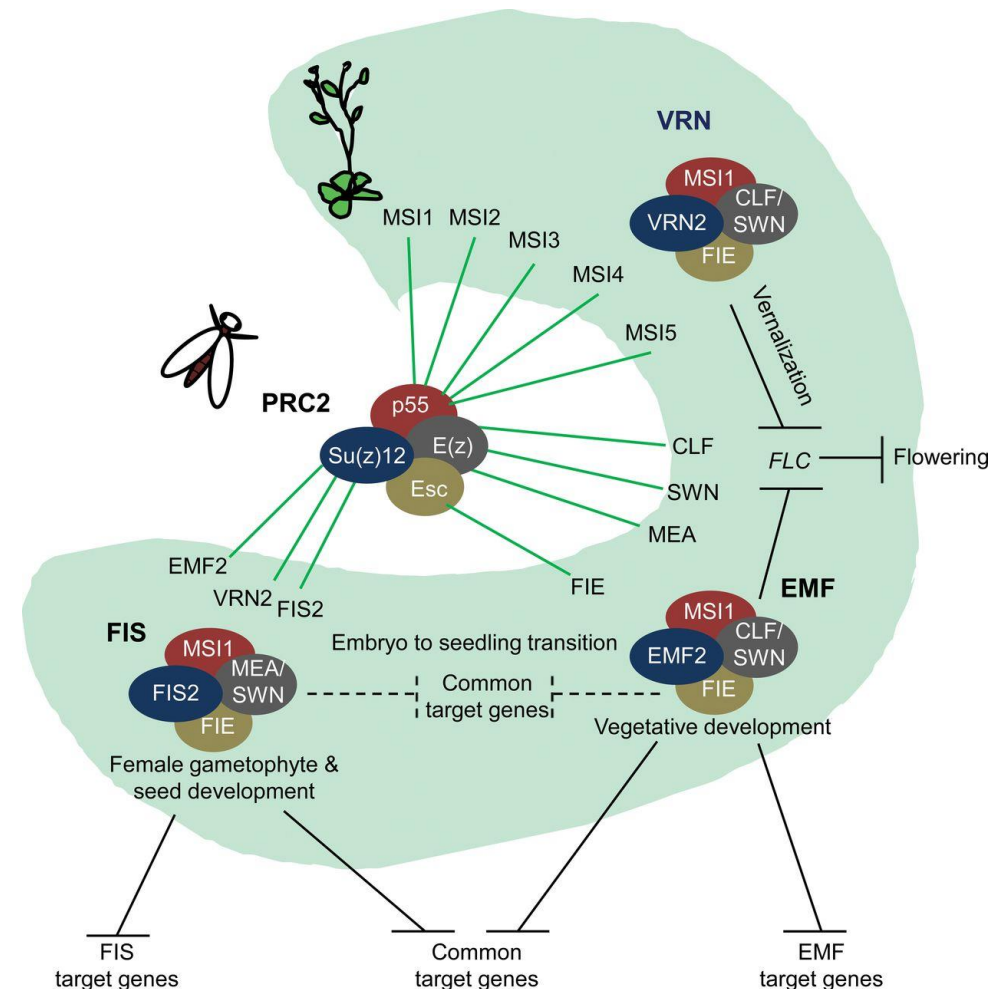
PRC2 komplexy regulují:

- **Transdeterminace** – změna linie kmenové nebo progenitorské buňky na její příbuzný typ
- **Transdiferenciace** – změna buněčné linie na jiný druh buňky bez potřeby dediferenciace jako přechodného stavu

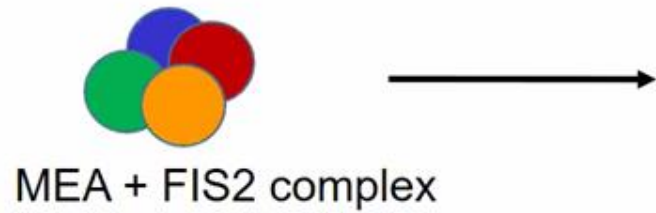


Funkce PRC2 proteinů u rostlin

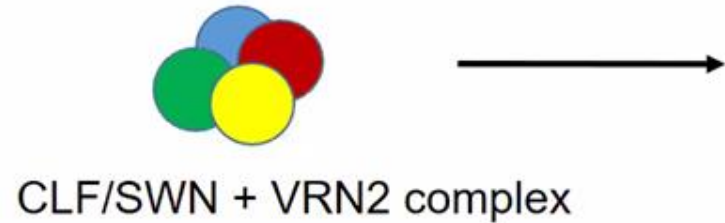
- U *Drosophila* PRC2 homologů v rostlinách došlo k několika duplikacím, které vytvořily celé genové rodiny
 - Vývoj gametofytu
 - Fertilizace
 - Vegetativní vývoj
 - Květní vývoj (květní indukce, květní determinace)
- **Extra sex combs (Esc)** = jediný homolog, FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)
- **Enhancer of Zeste E(z)** = CURLY LEAG (CLF), SWINGER (SWN), a FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)
- **Suppressor of Zeste (Su(z)12)** = EMBRYONIC FLOWER (EMF2), VERNALIZATION2 (VRN2) a MEDEA (MEA)
- **P55** = MULTICOPY SUPPRESSOR of IRA 1 – 5 (MIS1-5)



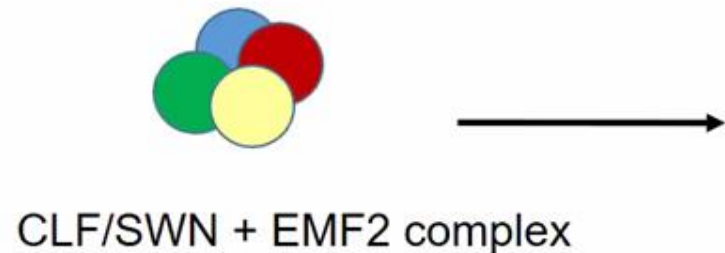
Úloha PRC2 komplexů při rostlinném vývoji – diverzifikace funkce pro přesnou regulaci klíčových vývojových stádií



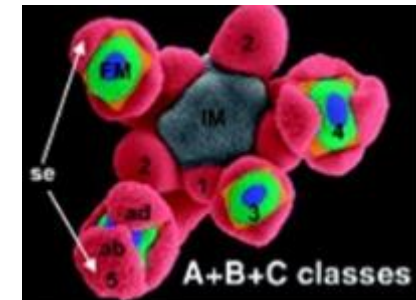
Vývoj semen



Tranzice kvetení



Květní organogeneze



Kontrola kvetení epigenetickým reprogramováním jako příklad buněčné paměti

Resetting *FLC* expression:

Silenced during gamete formation

Reactivated during fertilization or early embryogenesis

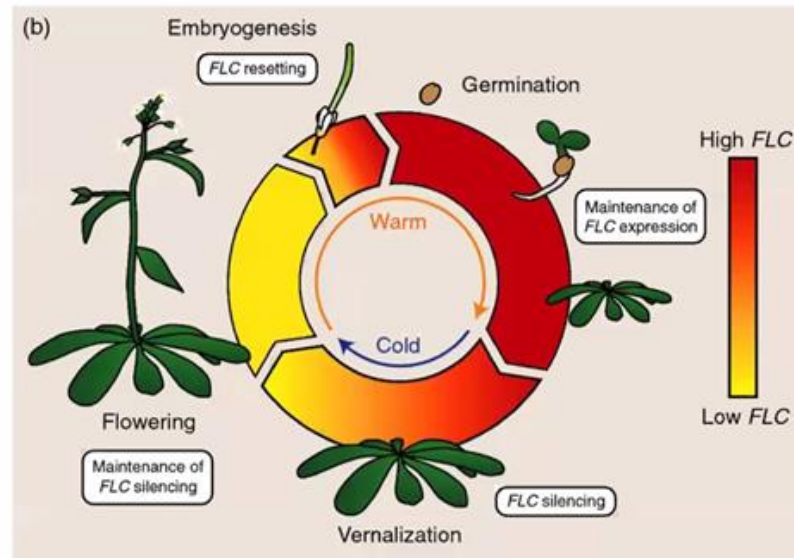
SWR1 incorporates H2A.Z variant

FLC maintained silenced:

Association with LHP1

FT is expressed

Flowering is induced



FLC expression:

H4 acetylation, H3K4me,
H3K36me, H2A.Z incorporation

FLC silencing

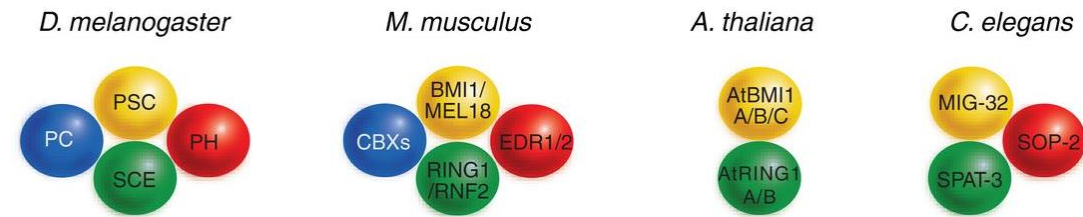
Activating marks removed

Silencing marks (H3K9me, H3K27me3) added

Konzervovaná doména PRC1 komplexu

B

PRC1 Complexes



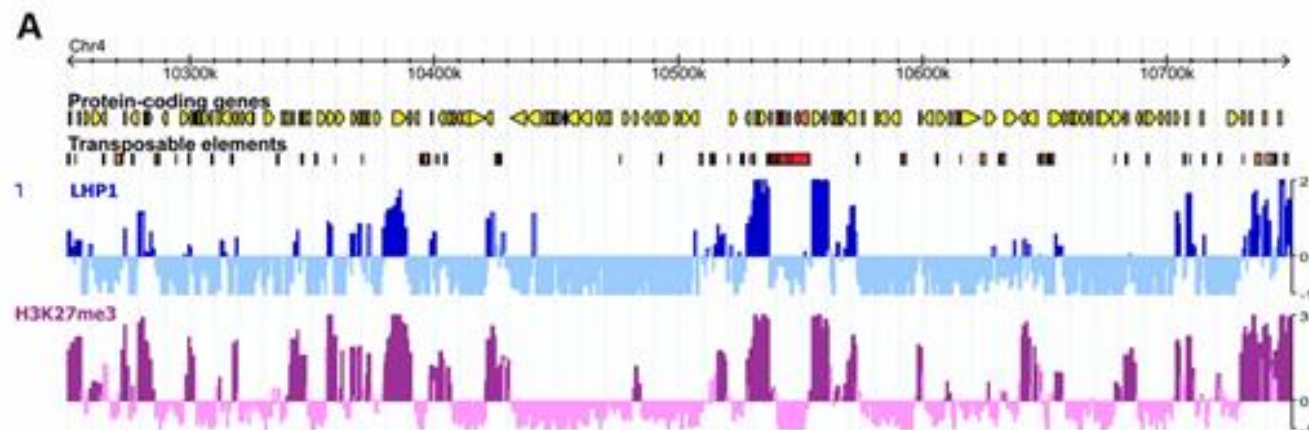
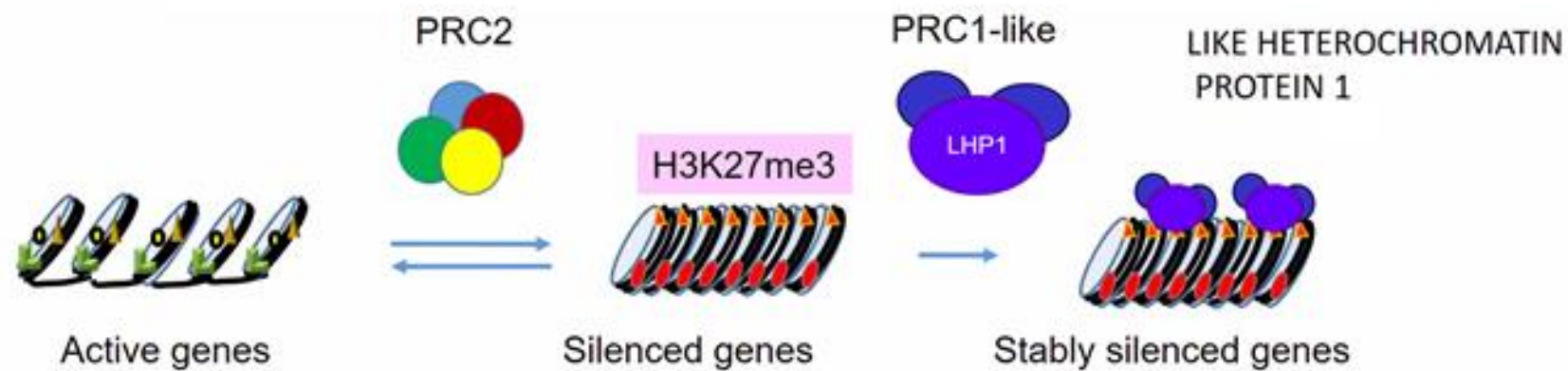
- **Drosophila**

- PC – vazba na H3K27me3
- Polyhomeotic (PH)
- Posterior sex combs (PSC) – přístup na chromatin (podobnost SU(z)12)
- Sex combs extra (SCE) – ubiquitinace H2K118/K119

- **U savců došlo k amplifikaci**, základní jednotky více konzervovány

- U rostlin silná divergence, podobnost funkce LHP1/TEL2 (LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1/TERMINAL FLOWER 2)

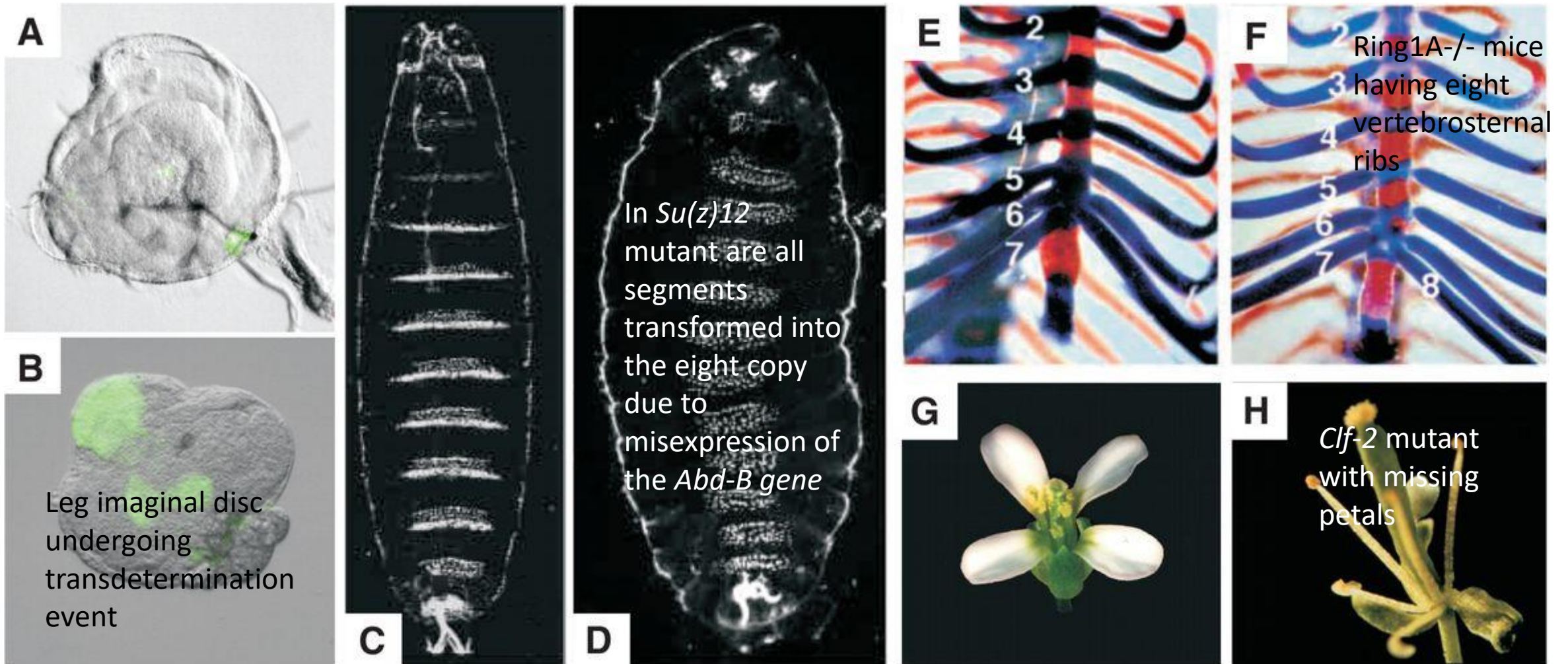
Funkce PRC2 a význam H3K27me3 při regulaci genové aktivity



LHP1 binds specifically to H3K27me3

- **Umlčení vývojových genů**, přechodný stav regulace
- Vazbou PRC1 proteinu dochází k trvalému umlčení, vazba dalších modifikujících faktorů
- H3K27me3 pouze v genových oblastech, konzervovaná distribuce

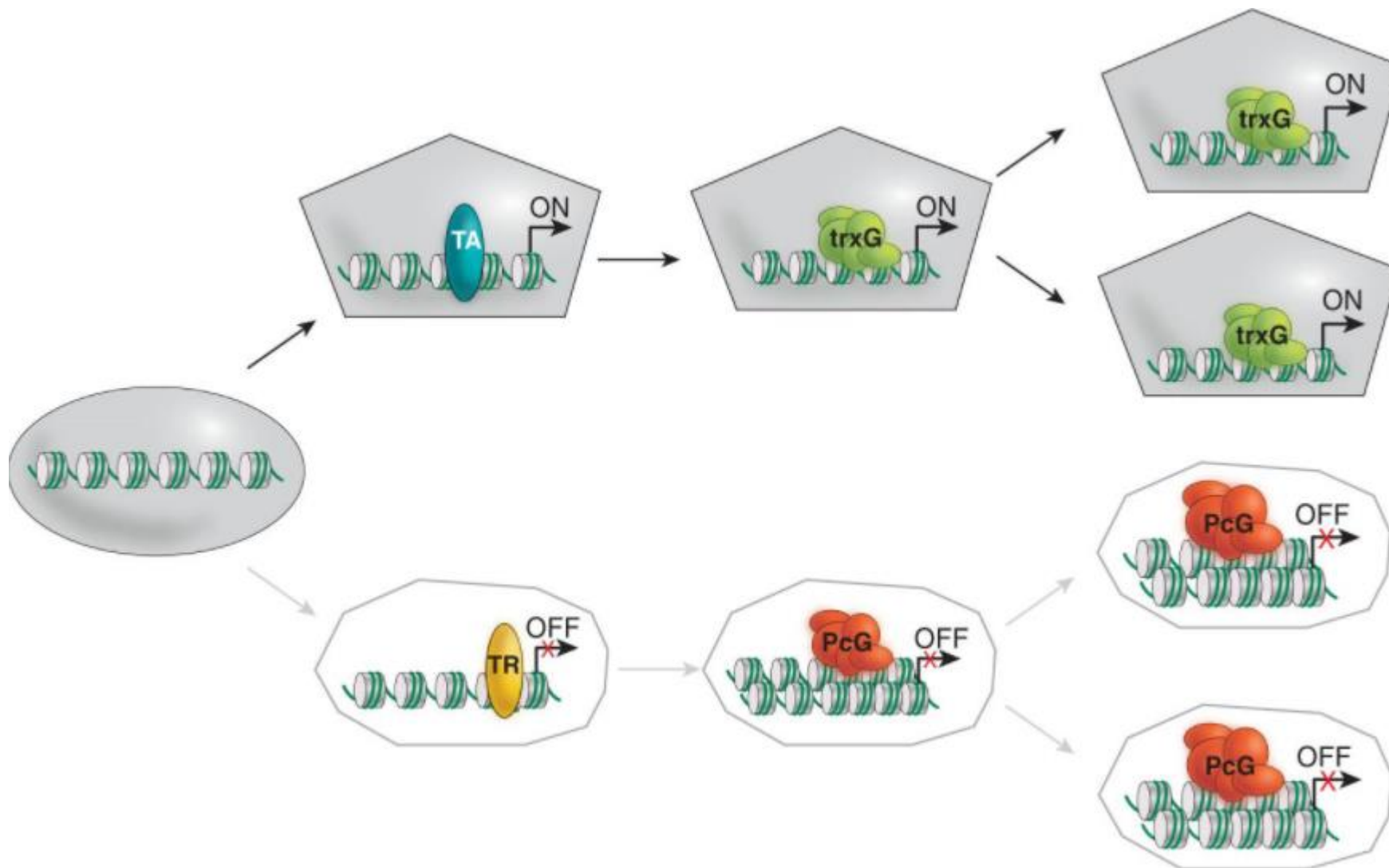
Úloha PcG proteinů v buněčné paměti



Homeotic mutation – mutation displacing body parts (homeosis)

Grossniklaus 2013

Koncept buněčné paměti – TrxG proteiny



Pozitivní regulátory buněčné paměti

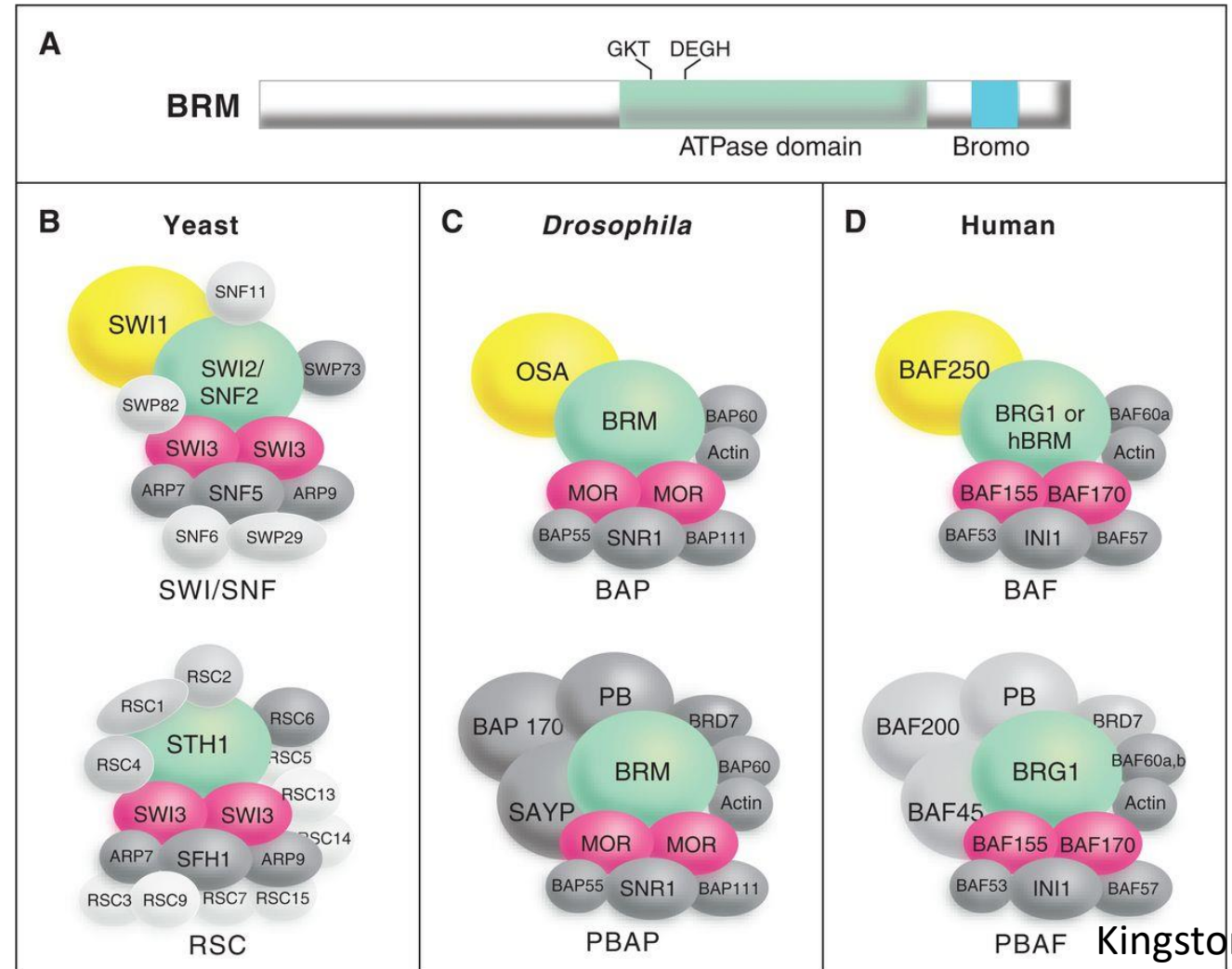
- TrxG

Negativní regulátory buněčné paměti

- PRC1
- PRC2

SWI/SNF rodina chromatin remodelujících proteinů u modelových organismů

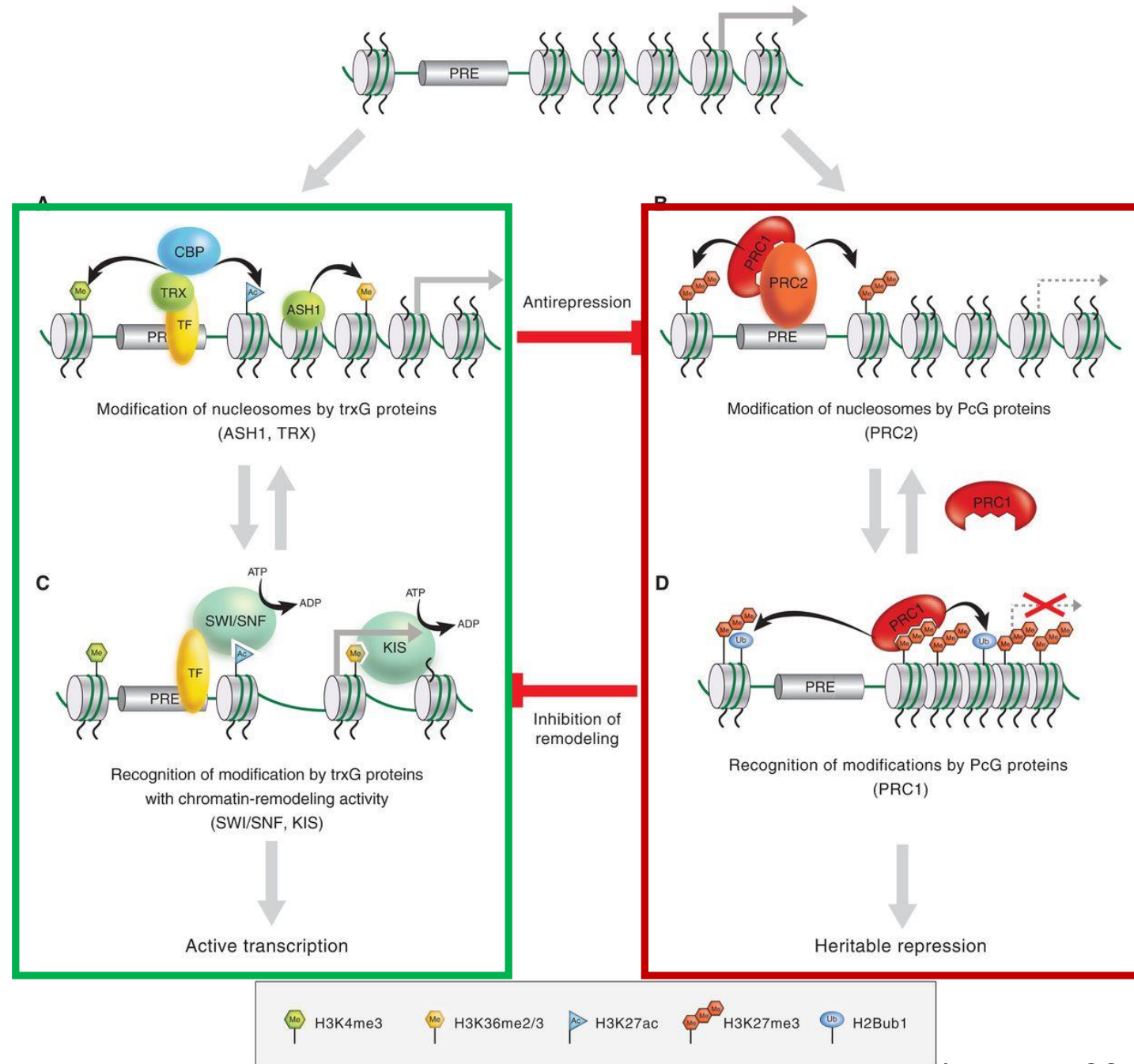
- Oproti PcG proteinům, TrxG jsou více divergované
- Někteří členové TrxG patří např. do SWI/SNF rodiny
- Funkce „readers and writers“
- Rodina BRM
 - Všichni členové mají ATPase a Bromo-doménu (afinita acetylovaných residuí)
 - Každá jednotka obsahuje gen SWI/SNF rodiny a alespoň 8 dalších podjednotek



Known function	Organism			Complexed with non-trxG proteins?
	Drosophila	Human	Yeast	
ATP-dependent chromatin remodeling	BRM	BRG1/HBRM	Swi2/Snf2, Sth1	Yes (5–10) ^a
	OSA	BAF250	Swi1/Adr6	Yes (5–10)
	MOR	BAF155, BAF170	Swi3, Rsc8	Yes (5–10)
	SNR1	hSNF5/INI1	Snf5, Sfh1	Yes (5–10)
	Kismet (KIS)	CHD7	–	NK
Histone methyltransferases	Trithorax (TRX)	MLL1, MLL2, MLL3	Set1	Yes (5–20)
	Absent, small or homeotic 1 (ASH1)	MILL4, hSET1 hASH1	–	NK
Mediator subunits	Kohtalo (KTO)	TRAP230	Srb8	Yes (13–24)
	Skuld (SKD)	TRAP240	Srb9	Yes (13–24)
Cohesin subunit	Verthandi (VTD)	Rad21	Scc1/Rad21	Yes (>3)
Transcription factor	Trithorax-like (TRL)	BTBD14B	–	No
Growth factor receptor	Breathless (BTL)	FGFR3	–	NK
Other	Sallimus (SLS)	Titin		NK
	ASH2	hASH2L ^b	Bre2	Yes (5–20)

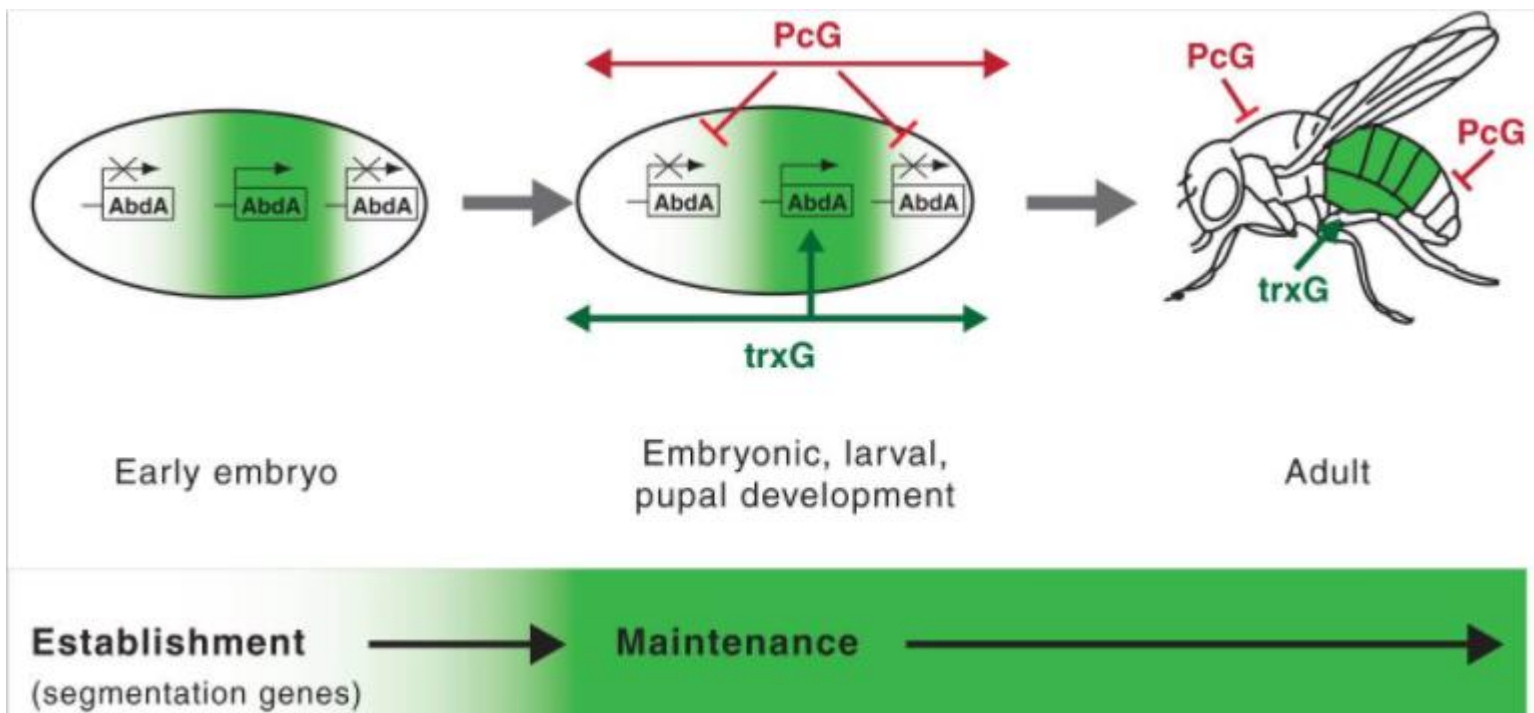
Srovnání TrxG a PcG interakcí

- Obě rodiny obsahují proteiny, které **kovalentně modifikují histony a nekovalentně modifikují chromatin**
- Modifikace mohou nebo nemusí zvyšovat afinitu TrxG komplexů (SWI/SNF and KIS), PcG (PRC2 and PRC1) a jiných faktorů vedoucím k **aktivnímu nebo umlčenému chromatinu**

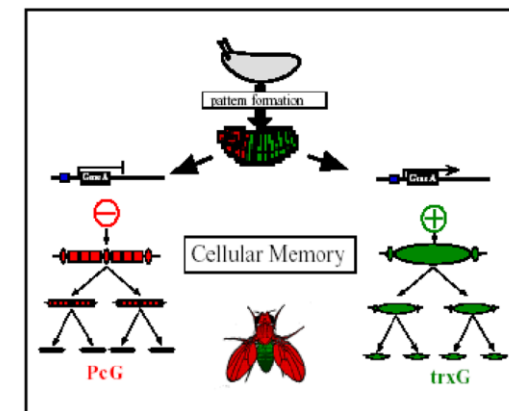
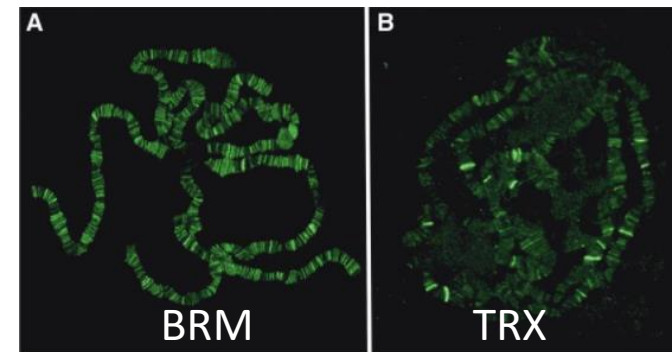


Úloha segmentačních proteinů Thritorax a Polycomb při vývoji larvy drozofily

- Hranice *abd-A* a ostatních *Hox* genů jsou nastaveny paměťovými proteiny *trxG* a *PcG* a „off“ „on“ expresním stavem, dělicích embryo do 14 segmentů



BRM je asociován s RNA PolII

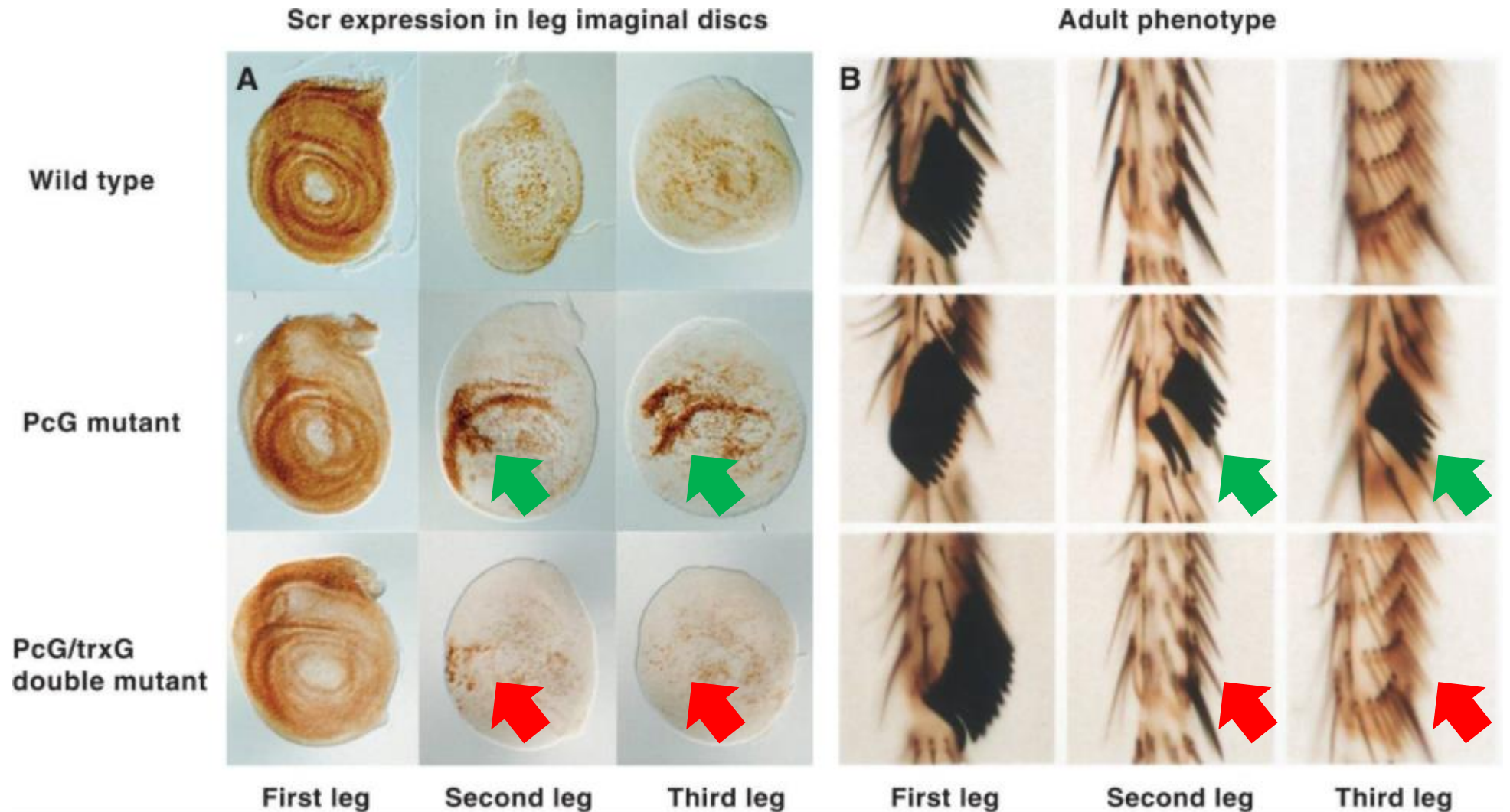


trxG mutace blokuje aktivaci Hox genů v PcG mutantech

- Normální vývoj

- Aktivace Hox genů v PcG mutantech

- Absence Hox genů v důsledku mutace trxG



Obsah

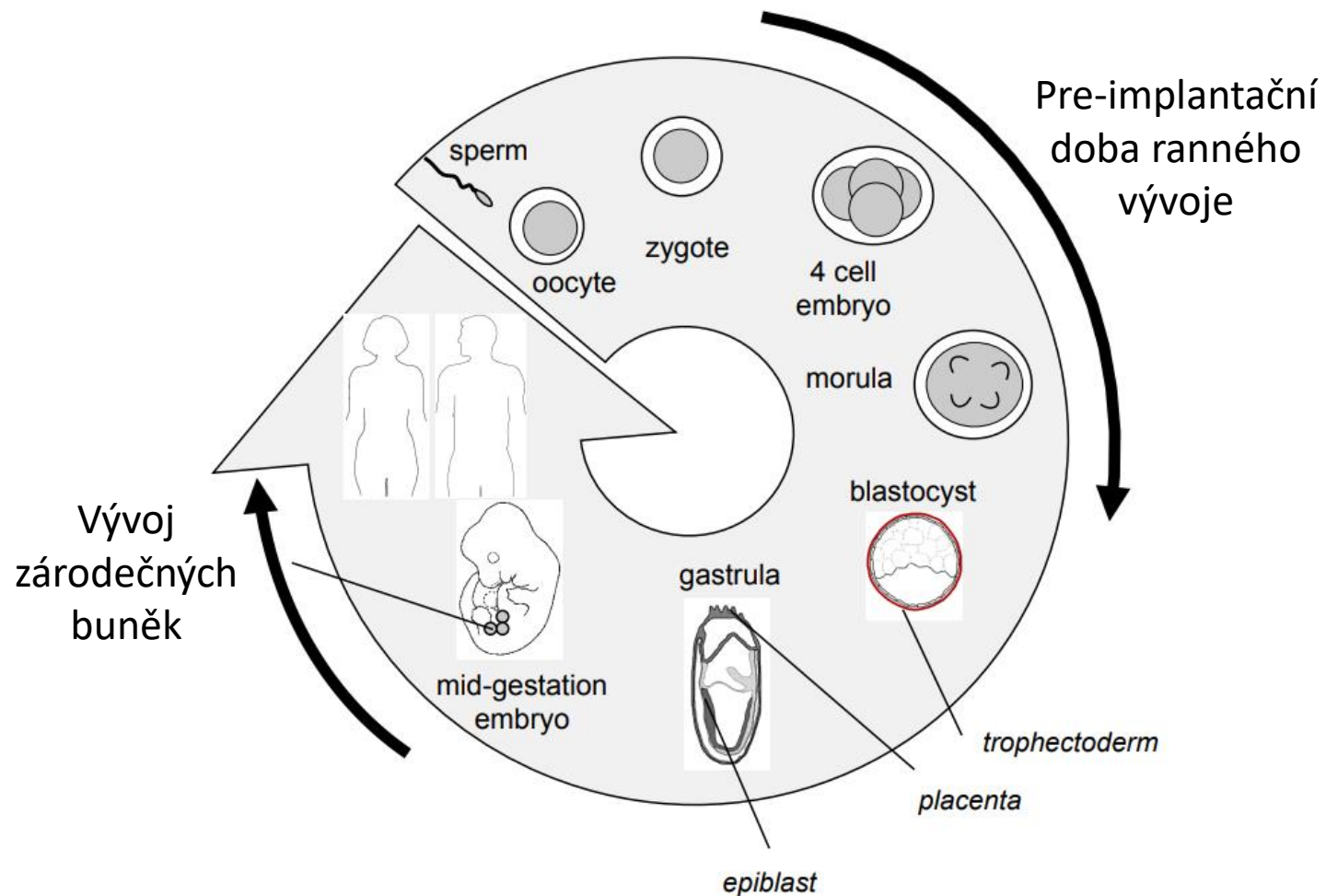
- Chromatin-remodelující proteiny – funkce histonové informace
- Paměťové proteiny a jejich funkce
 - Polycomb
 - Thiritorax
- Epigenetické a buněčné reprogramování
 - Vývojové epigenetické změny u savců
 - Epigenetické změny navozené umělým zásahem
 - Vývojové epigenetické změny u rostlin

Epigenetické reprogramování u savců

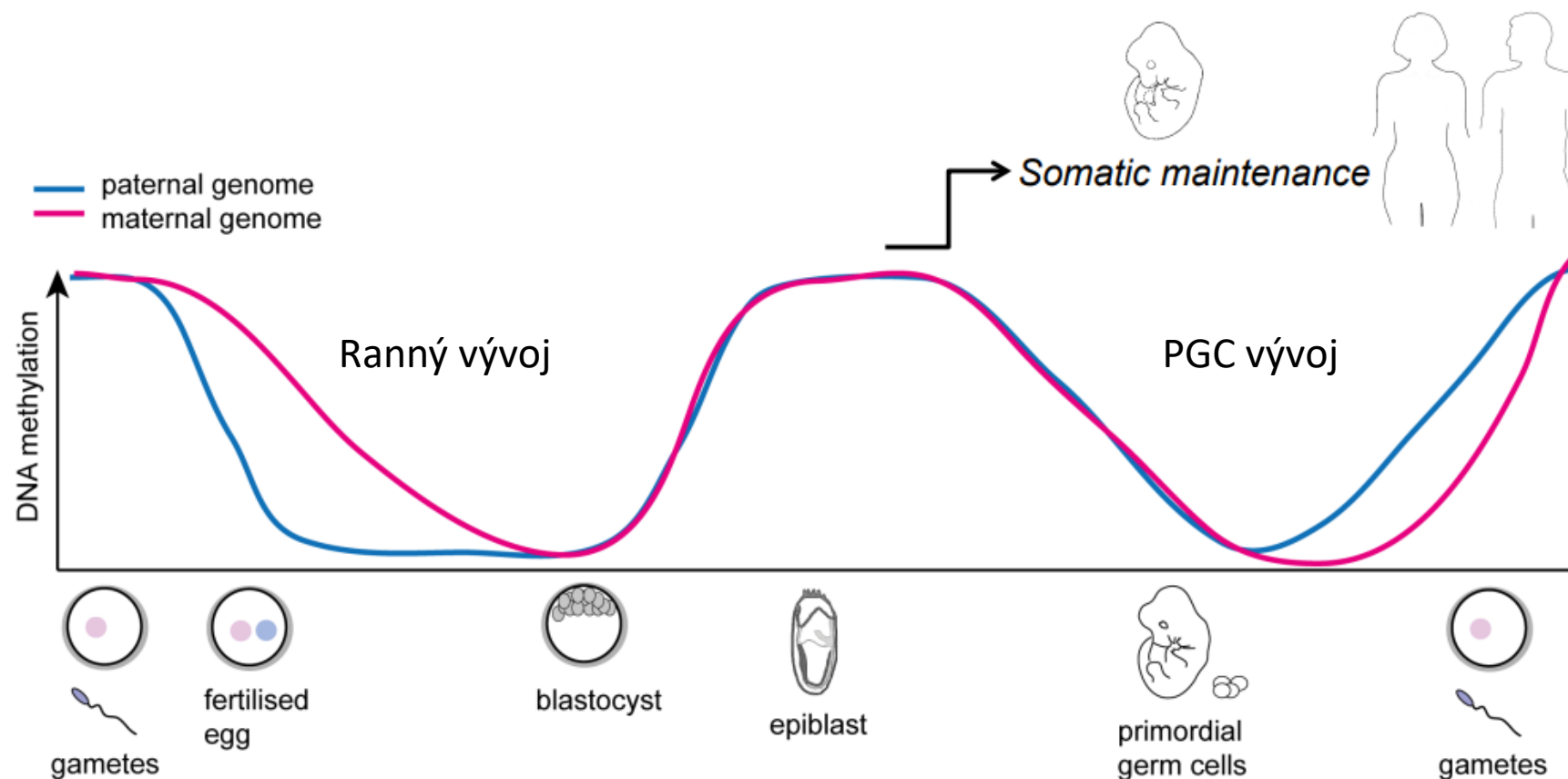
- Ke kompletnímu odstranění epigenetických značek dochází během vývoje u savců 2x

- Ranná fáze embryonálního vývoje
- Vývoj zárodečných buněk

= **doba sensitivity** k vlivům prostředí je nejsilnější **v období specifikace zárodečných buněk** a následně v první **fázi meiózy** (druhá fáze-dožívání oocytů a spermií, u člověka se liší-ženy 8-10 let, muži 9-12 let)



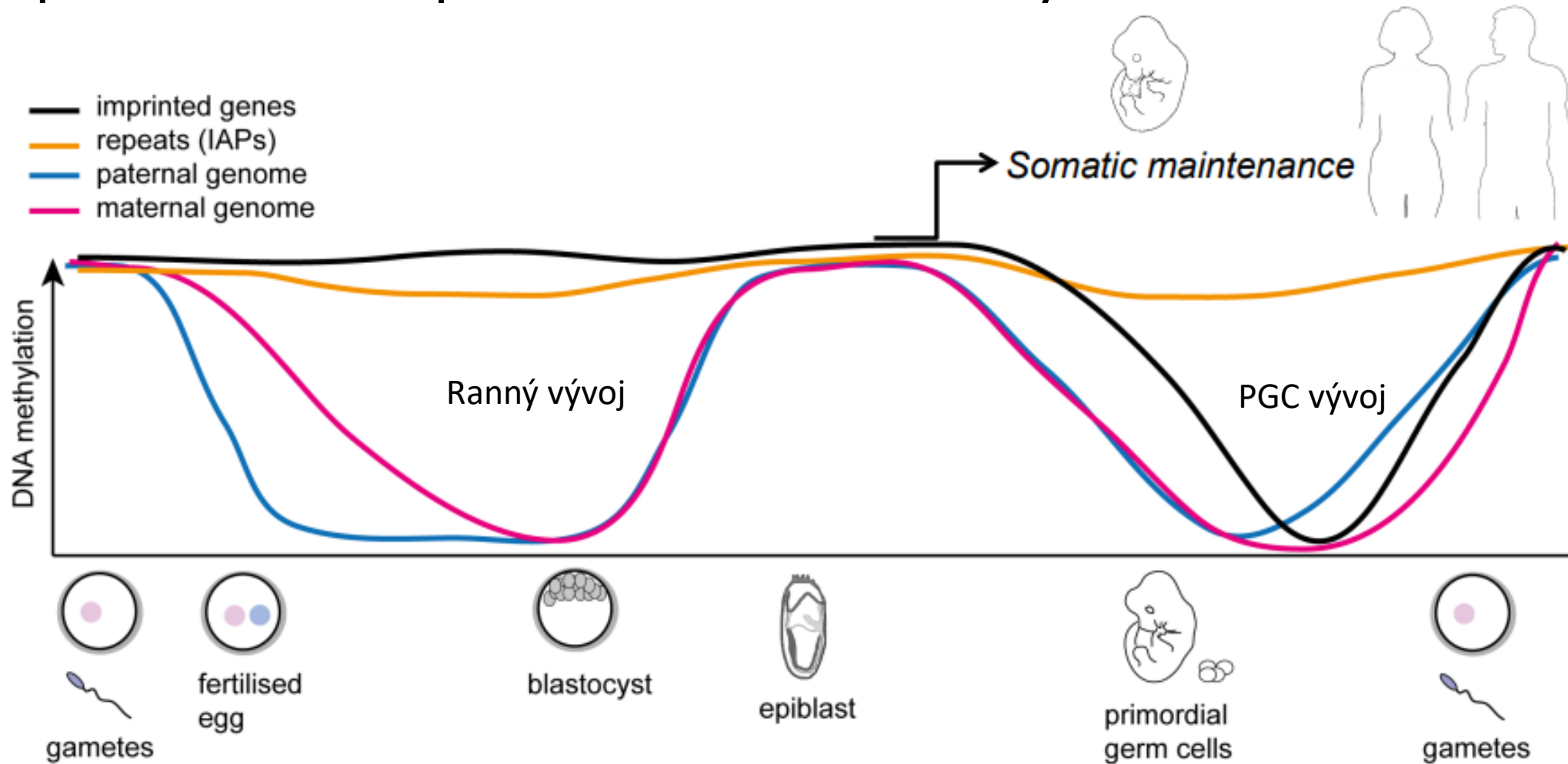
Rozdíly ranného a PGC reprogramování



- Rychlá a aktivní demethylace paternálního genomu
- Pasivní demethylace maternálního genomu

- V pozdním vývoji je odstranění DNA methylace rozdílná během spermatogeneze a oogeneze

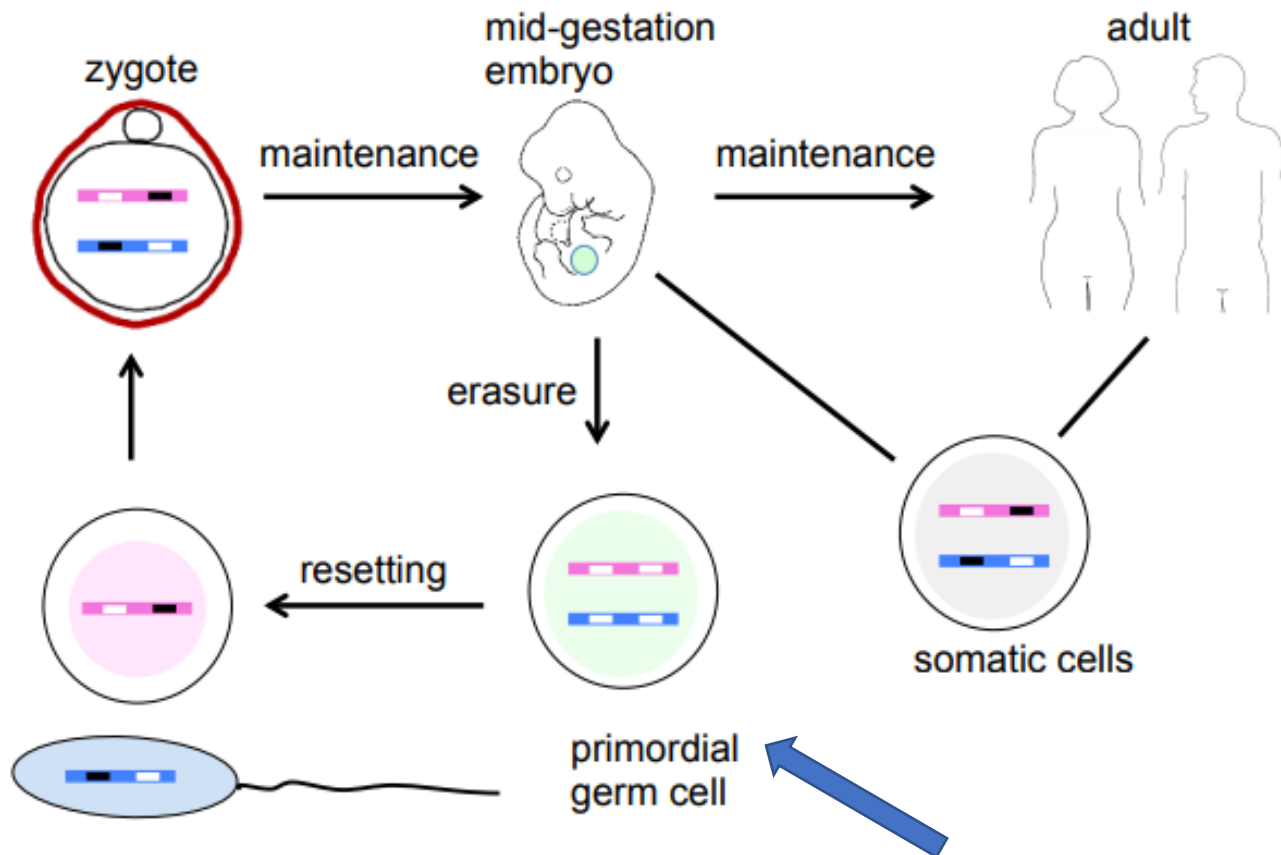
Epigenetické reprogramování u savců – repetice a imprintované lokusy



Ochrana DNA methylace – úloha maternálních proteinů v oocytech

Liší se ve spermích a zralých vajíčkách

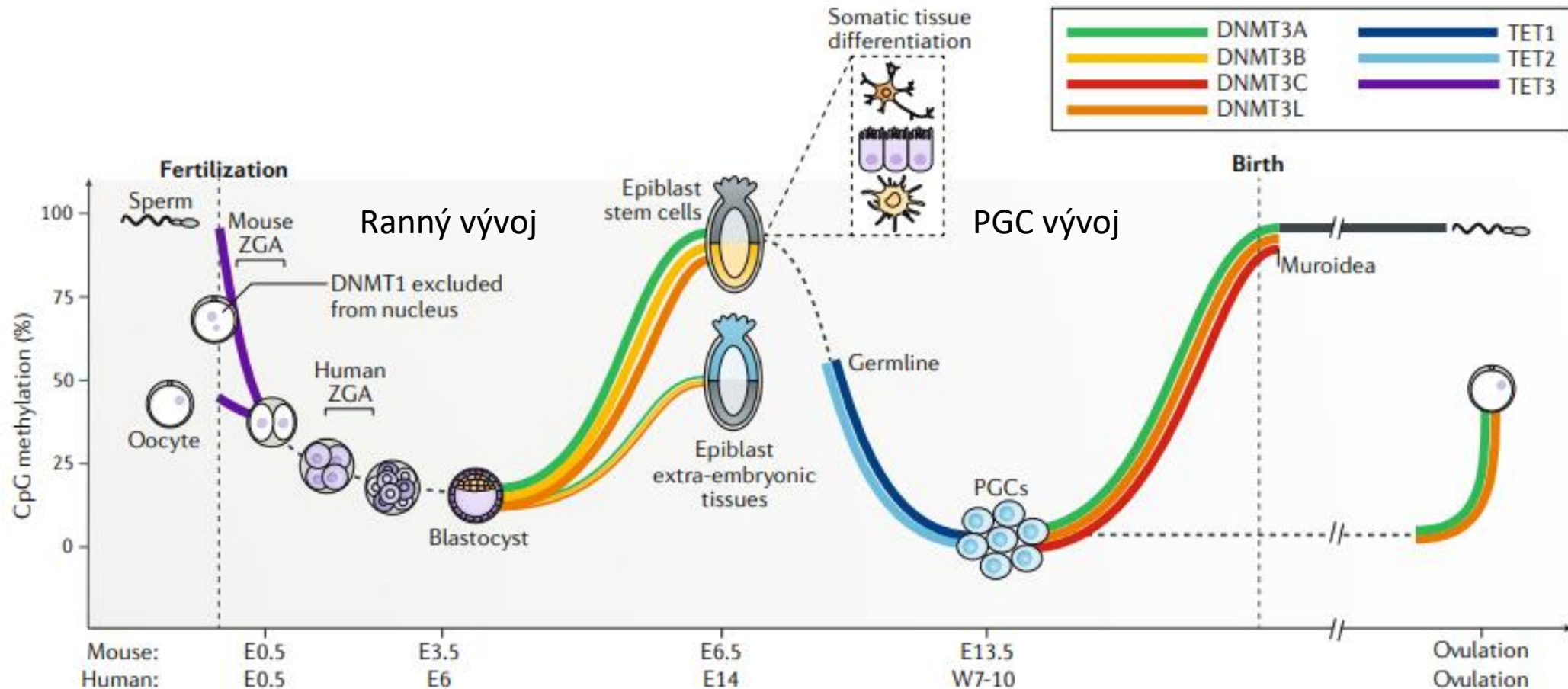
Epigenetické reprogramování zárodečných buněk



- Methylace na ICRs oblastech reguluje expresi imprintovaných lokusů- DMRs (=„differentially methylated regions“)
- Lokusy lišící se úrovní methylace mezi vzorky nebo alelami navzájem
 - tDMR – buněčně specifické
 - cDMR – rakovinné
 - dDMRs – vývojové
 - rDMR – reprogramované
 - AMR – alel-specifické
 - aDMR – věkově specifické

Úloha maternálních faktorů

Aktivita DNMT and TET enzymů během reprogramování



TET3, DNMT 3a, 3b – de-novo methylase



TET1, TET2

DNMT 3a, 3C a 3L

Greenberg 2019

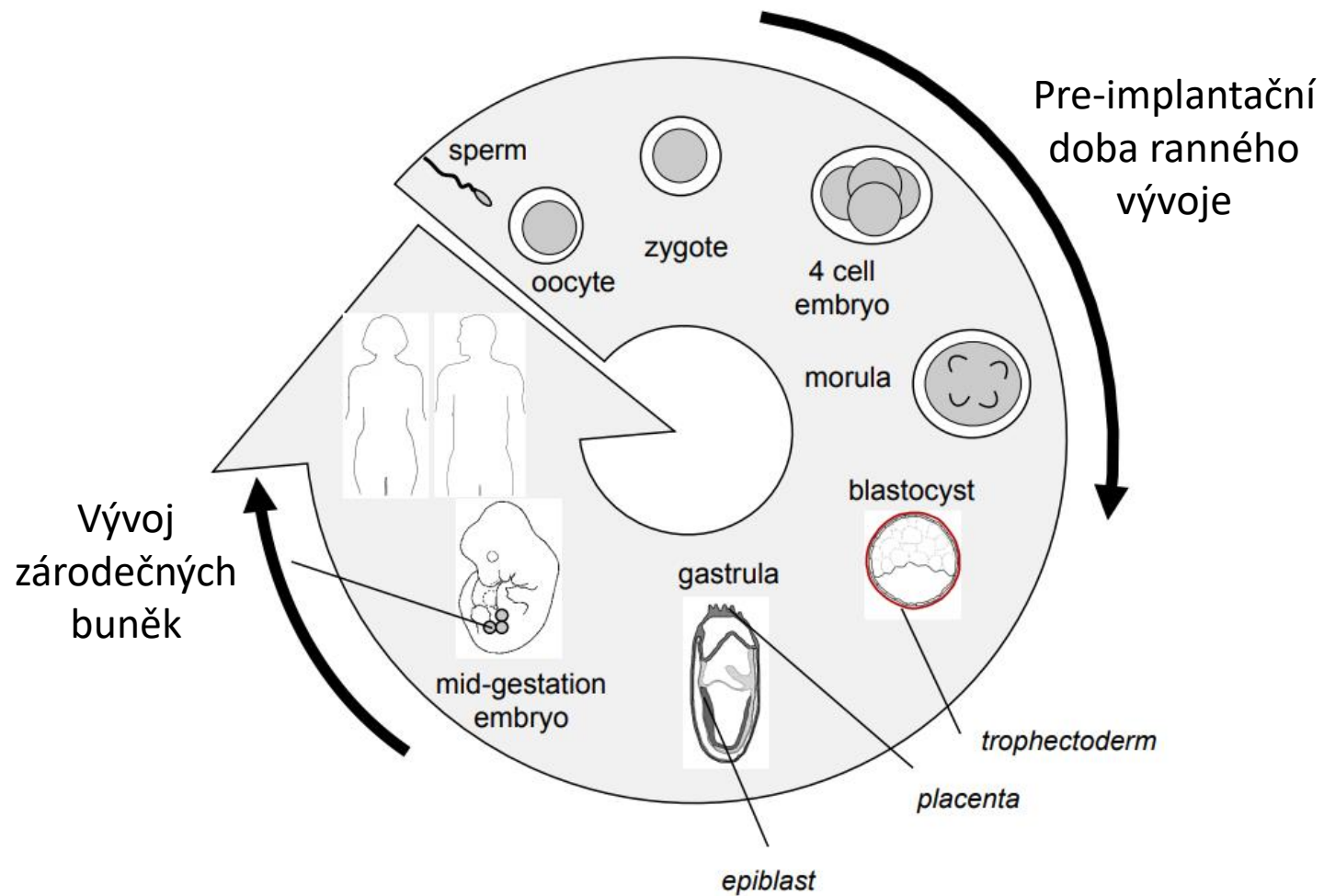
Epigenetické reprogramování u savců shrnutí

- **Zárodečné buňky**

- Paternální a maternální genomy mají odstraněny všechny značky (reset)
- Repetice jsou umlčeny
- Imprintované geny mají odstraněný imprinting
 - Výhradně ve vajíčku
 - Výhradně ve spermích

- **Pre-implantační perioda**

- Paternální a maternální genomy mají odstraněny všechny značky (reset)
- Repetice zůstávají umlčeny
- Imprintované geny si ponechávají imprinting dle původu (úloha maternálních proteinů)

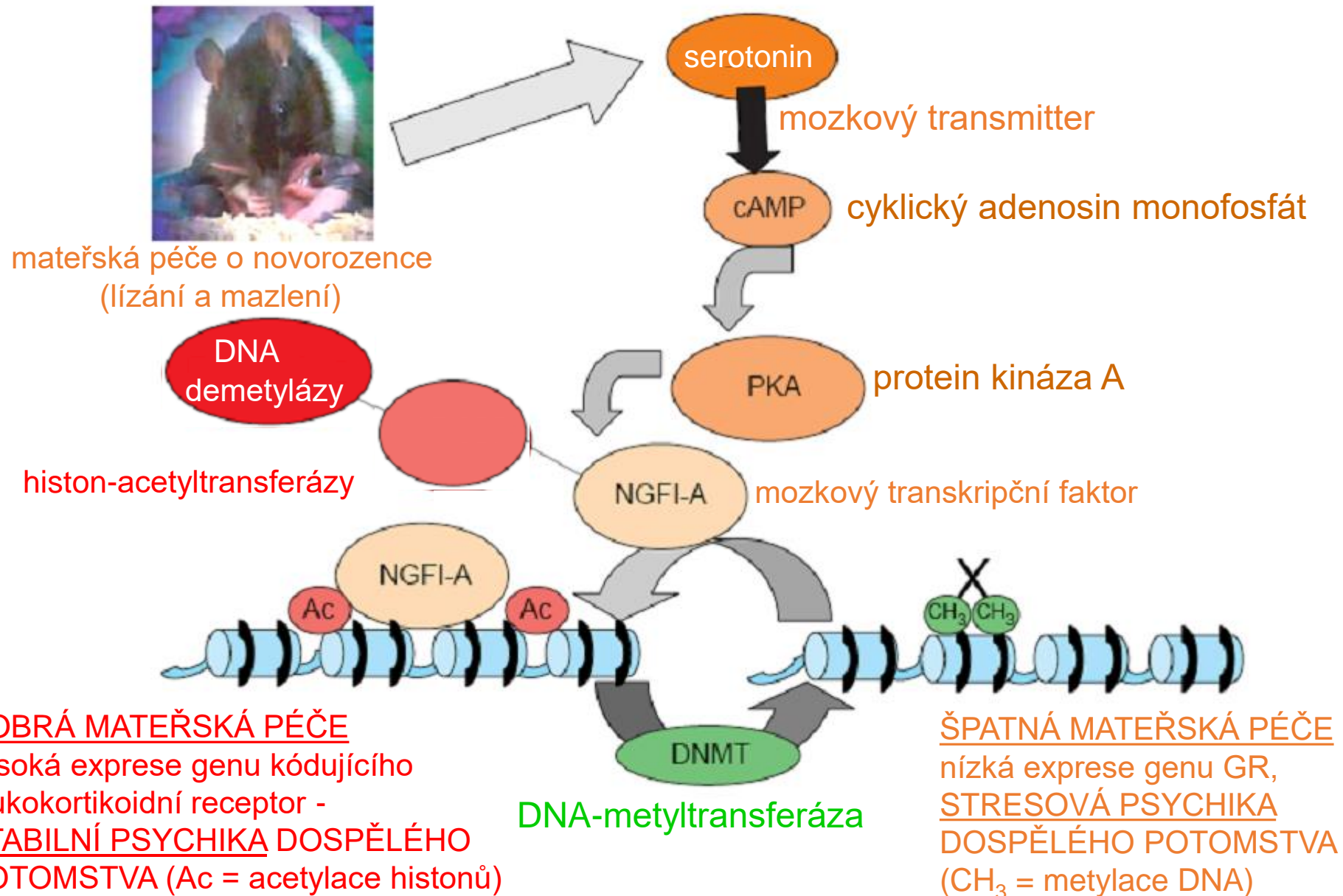


Epigenetické změny navozené umělým zásahem

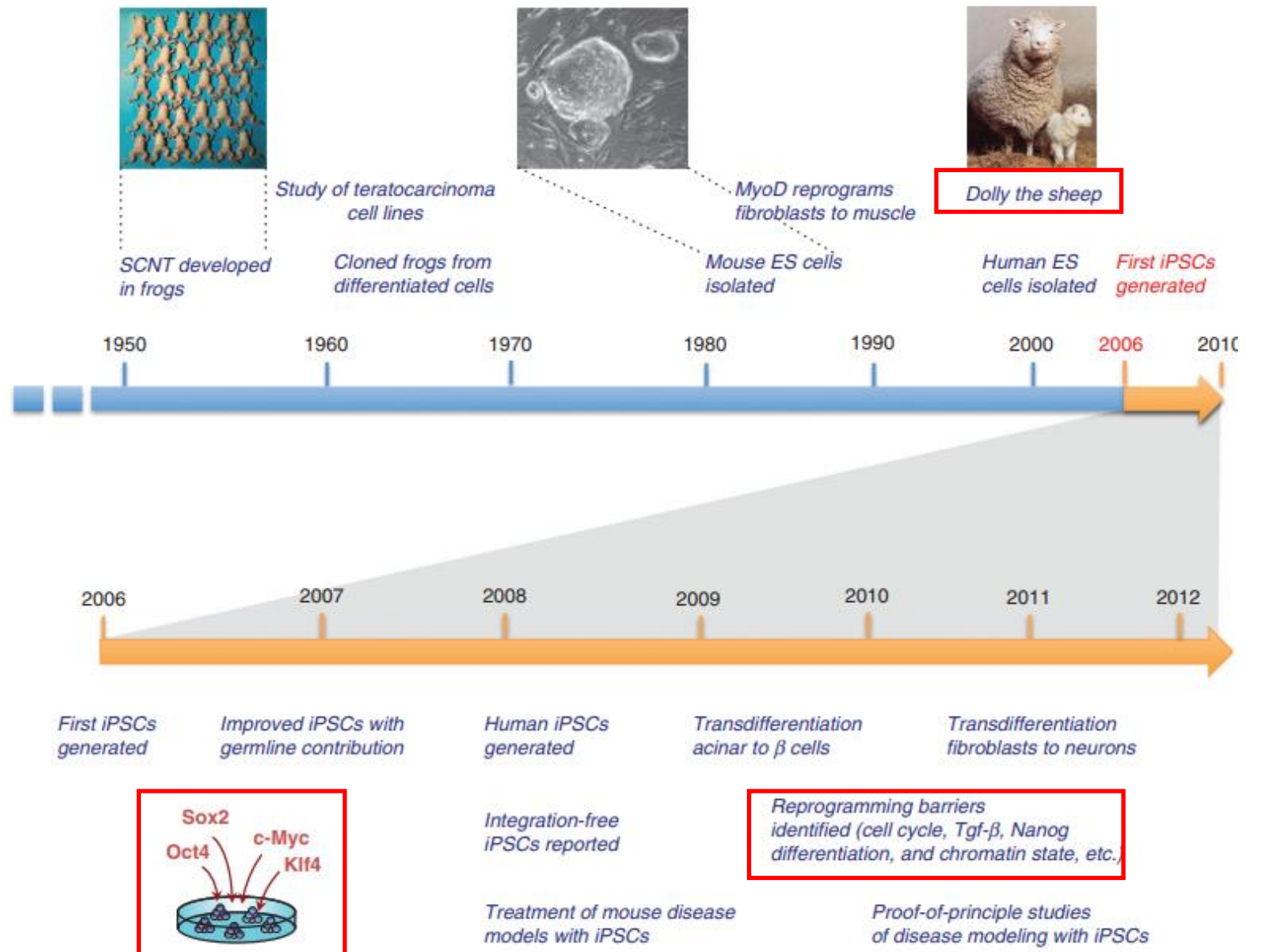
- Působení prostředí
 - Změny prostředí v průběhu citlivé periody
 - Överkalix
 - Holandský hladomor = „thrifty phenotype“
 - **Dieta, maternální péče aj.**
- **Vědecky- nebo klinicky-navozené změny**
 - ART, klonování, somatické reprogramování

Maternální programování epigenetických stavů

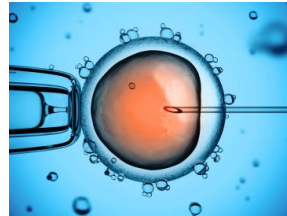
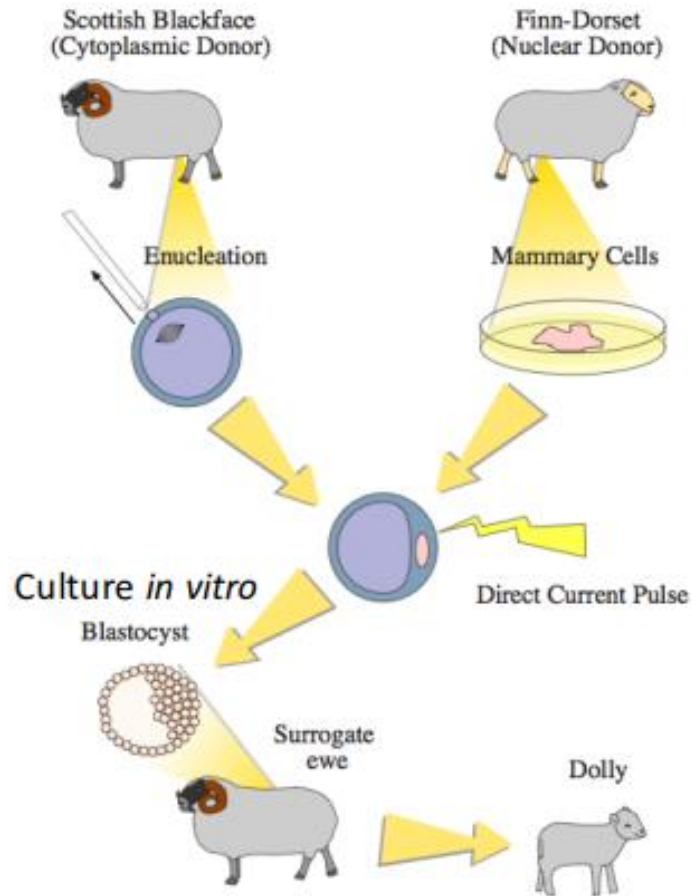
Maternální péče jako model „experience-dependent“ chromatinové plasticity



Historie buněčného reprogramování



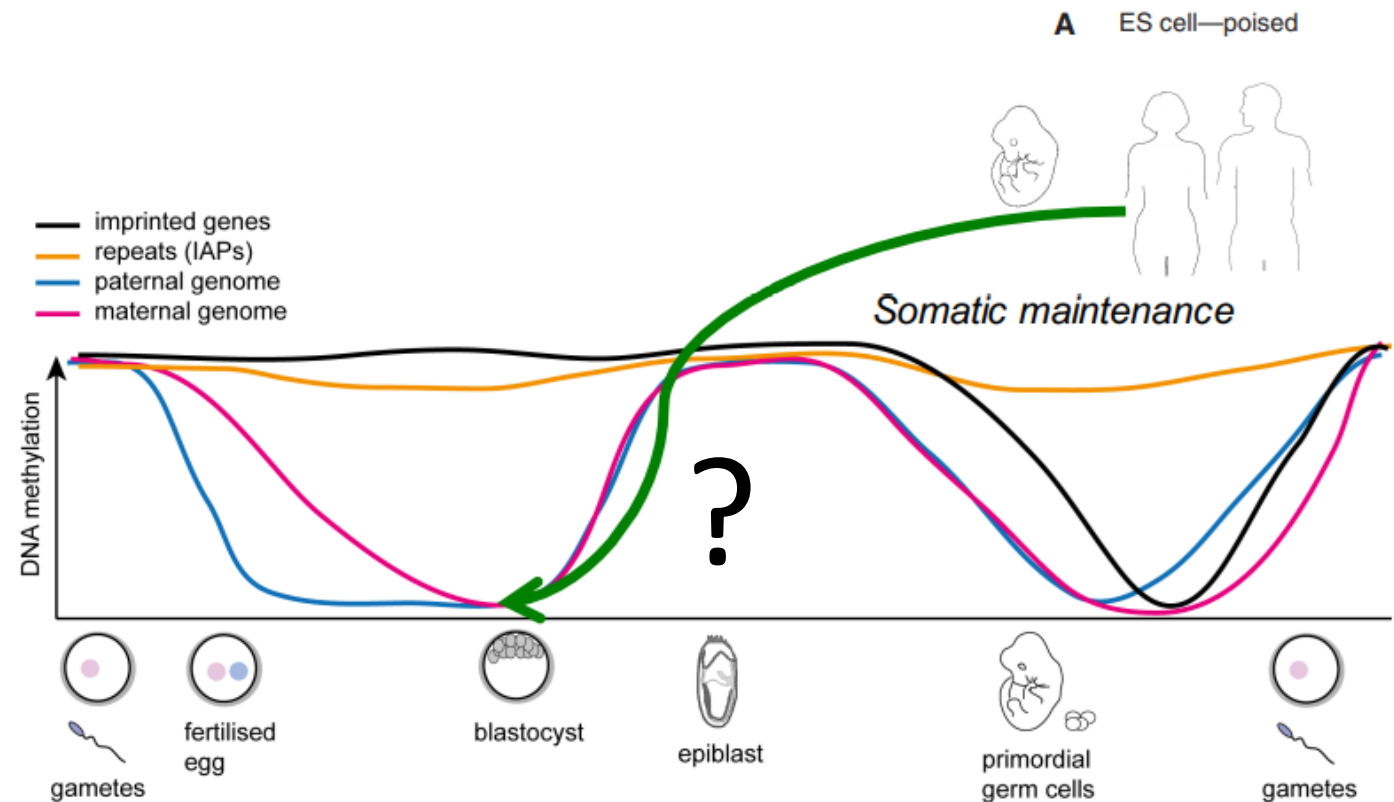
Epigenetické reprogramování v somatickém buněčném jaderném přenosu (klonování) – ovečka Dolly



- Fúze buňky izolované z vemene genetické matky (Fin Dorset) a matky vajíčka (Blackface)
- **Odstranění buňky vajíčka před fúzí**, následná stimulace dělení – embryo vloženo do další matky Blackface
- **Věk stejný jako genetická matka**, Dolly byla jediná ovce z 277 pokusů, která přežila do dospělosti
- Jméno po americké zpěvačce – Dolly Parton

Nízká úspěšnost klonování a epigenetické následky

- Velké efekty v potomstvu – velký plod, placenta
- **Nedostatečné nastavení imprintovaných lokusů**
 - Imprintované geny regulují růst, hlavně v placentě
 - Somatické jádro neprochází PGC reprogramováním (ICR lokusy nejsou „pře-nastaveny“, absence změny konformace chromatinu na úrovni gamet – protaminy?)
 - Efekt maternálních proteinů při ranném vývoji – eroze ICR methylace



Odkaz ovečky Dolly

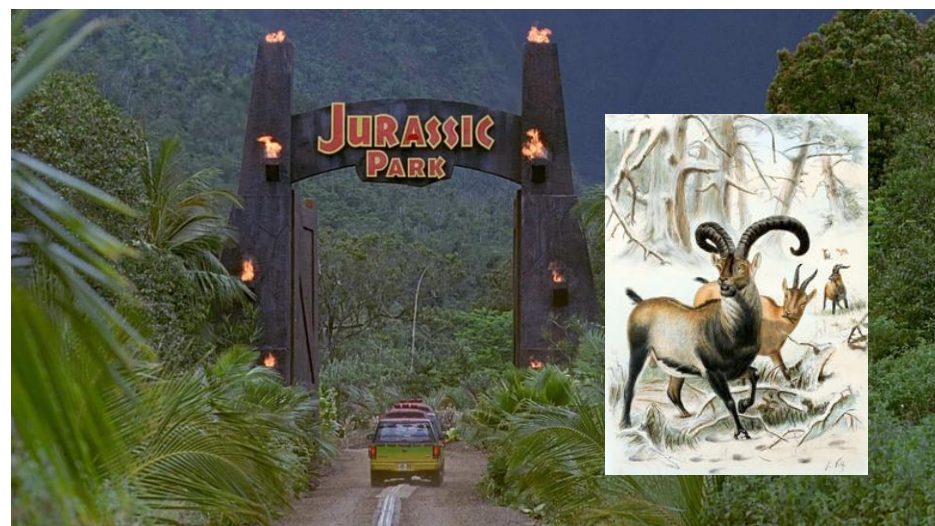
- **Další velká zvířata - prase, jelen, koně a skot**
- 2007 – tým, který klonoval ovečku Dolly zhodnotil, že klonování a jeho malý úspěch je nedostatečný pro člověka
- 2014 – čínští vědci dokázali mít 70 – 80% úspěšnost při klonování prasat
- **Výzkum kmenových buněk!**



China cloning on an 'industrial scale'

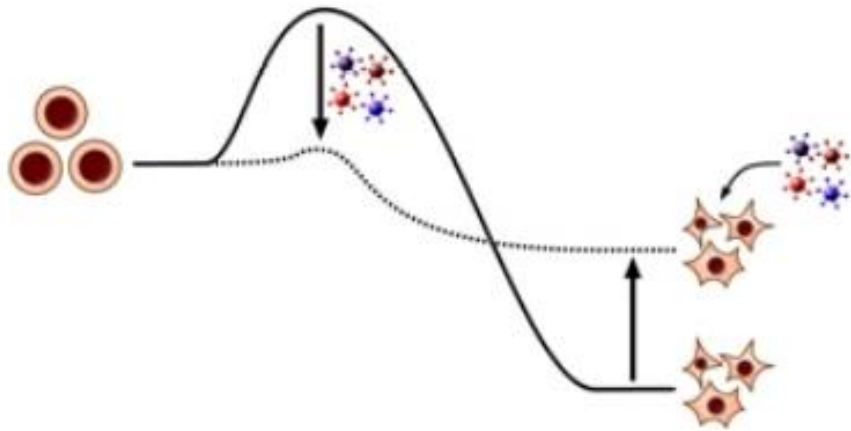
David Shukman
Science editor

© 14 January 2014 | Comments



Klonování
ohrožených
druhů/druhů
na pokraji
vyhynutí?
=kozorožec
pyrenejský

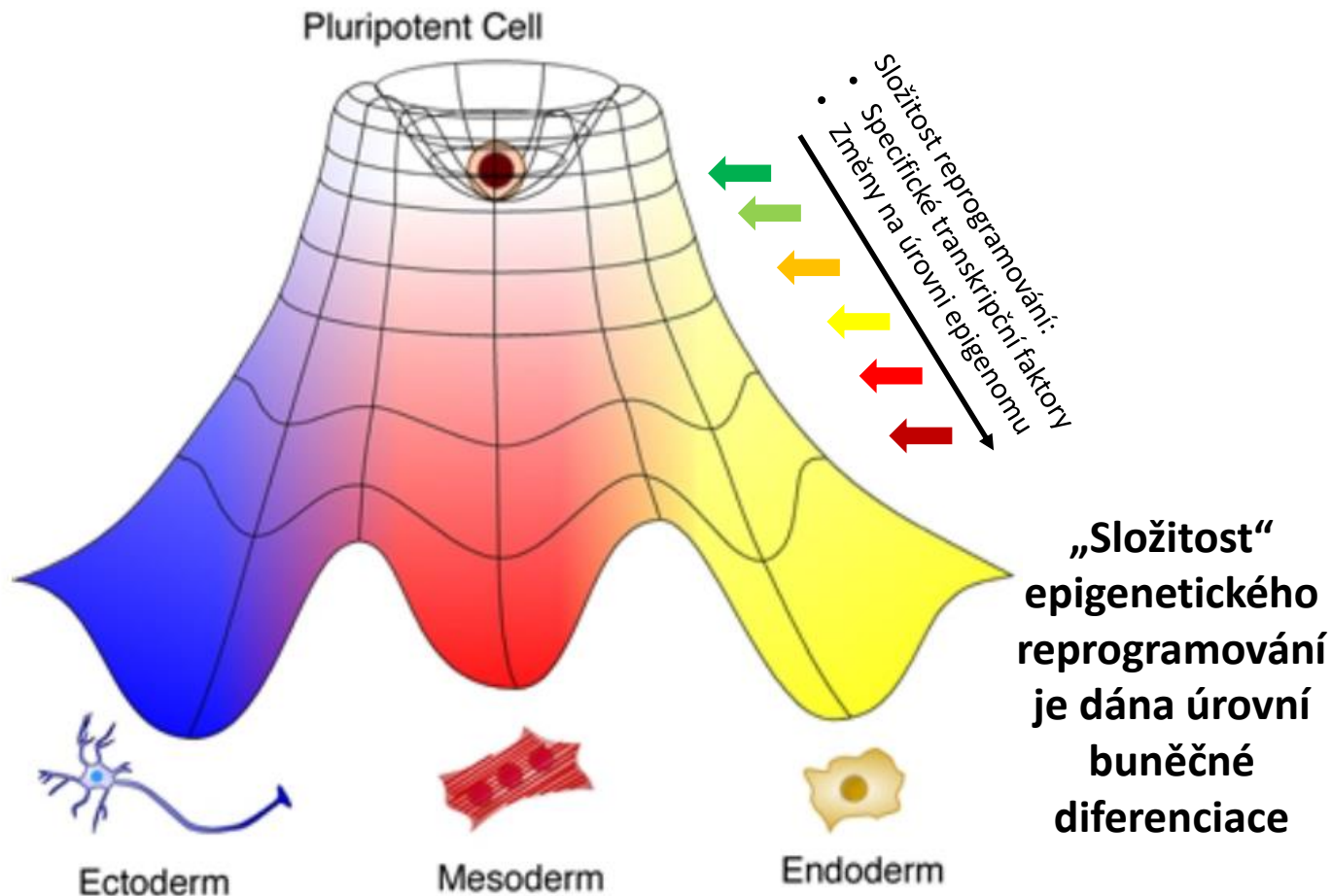
Úspěšnost buněčného reprogramování a hlavní faktory vedoucí k pluripotenci



- Pro úspěšné reprogramování musí být kontrolovány a kombinovány specifické transkripční faktory – snížení pluripotentní bariéry
- Využití inhibičních látek pro zvýšení úspěšnosti – riziko globálního afektu a mutageneze?

- **c-Myc** – homologie onkogenu viru **Myelocytomatosis**, transkripční faktor obsahující helix-loop-helix a **motif zinkového prstu**, reguluje celou řadu pro-proliferativních genů
- **Oct4** – „octamere-binding transcription factor 4“ – aktivní jako maternální faktor v oocytech a v preimplantační periodě, **zabraňuje diferenciaci=udržuje pluripotenci**
- **Klf4** – „Krupple like factor 4“ – transkripční faktor, motif zinkového prstu, regulace telomerázy, kontrola buněčného cyklu a počtu centrozomů (**genetická stabilita**)
- **Sox2** – „sex determining region Y-box 2“, obsahuje HMG doménu, transkripční faktor pro **udržení pluripotence a dělení**, různé úrovně mohou vést k diferenciaci

Epigenetické reprogramování somatických buněk

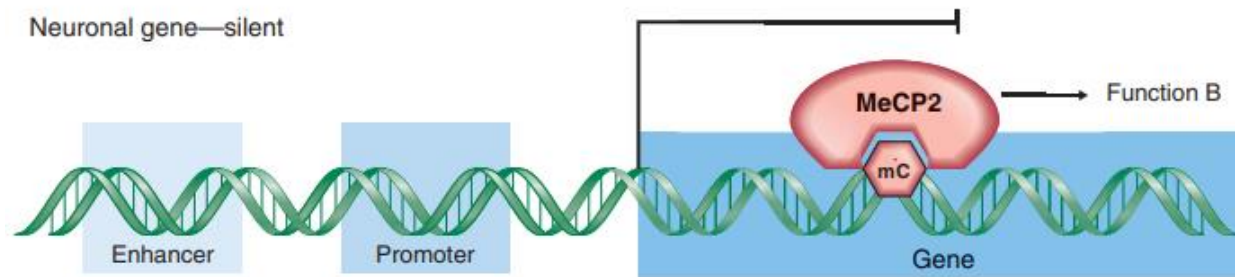
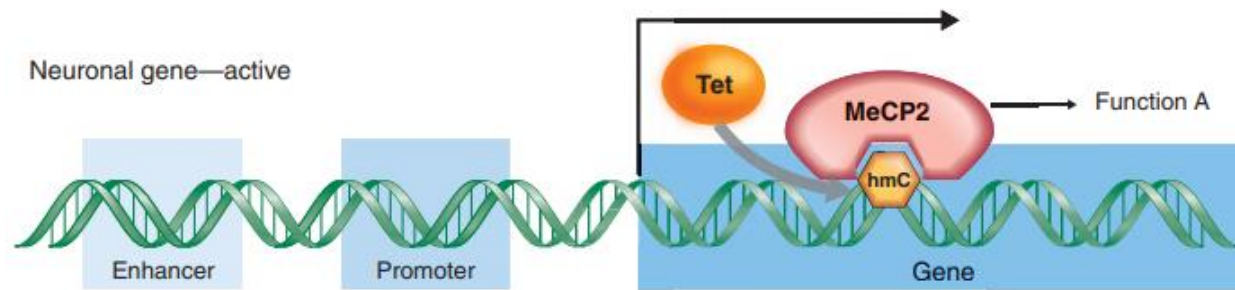
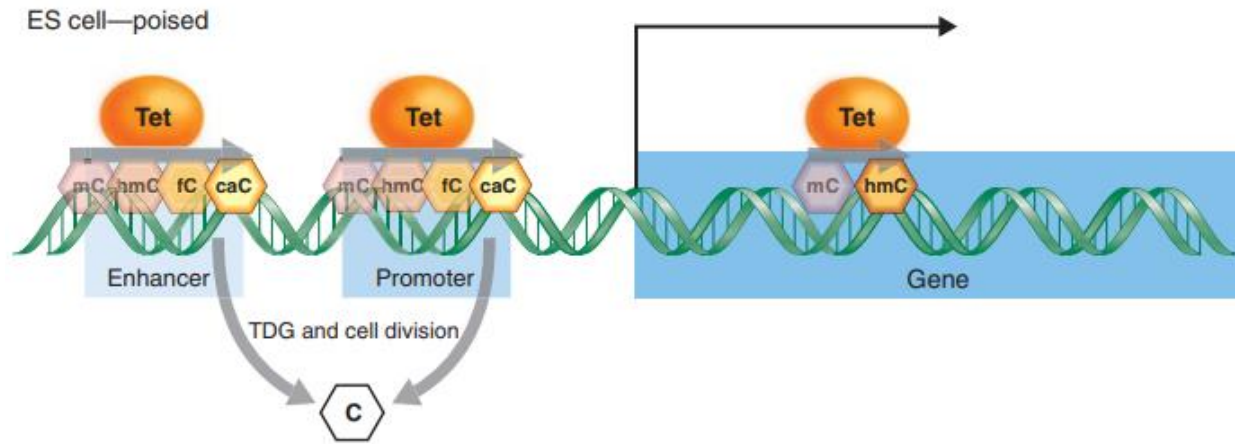


- Každá úroveň buněčné diferenciace vyžaduje

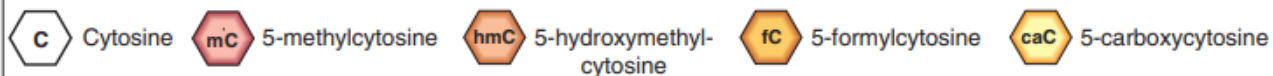
- Změnu stávajících modifikací
- Kontrola buněčného plánu (vnitřní plán)
- Kontrola buněčného plánu ve vztahu k okolí
- Získání nových modifikací

- Uměle vyvolané reprogramování vyžaduje

- Odstranění typově specifických modifikací
- Obnovení modifikací udržujících pluripotentní stav
- Obnovení stavu chromatinu
- Udržení imprintovaných oblastí
- Odstranění XCI (u samic)
- Specifita epigenetických a „dosud“ neznámých faktorů?

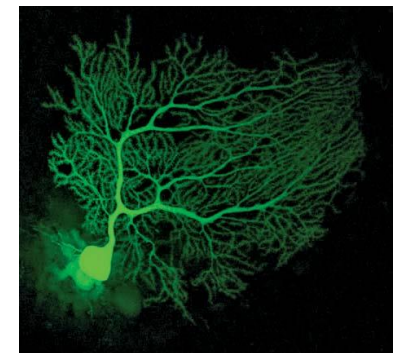
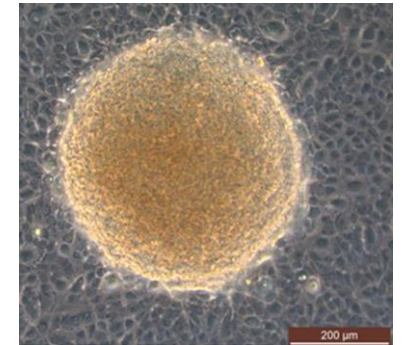


Modifications of the cytosine base

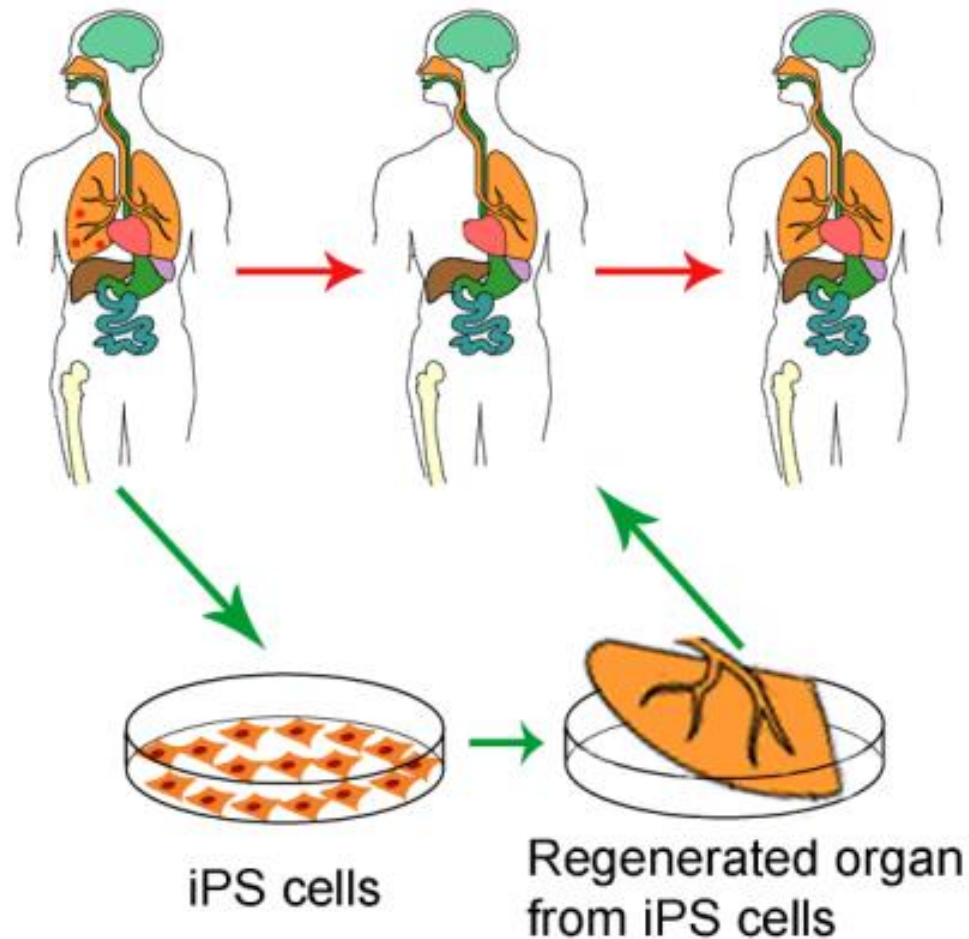


Specifita modifikací cytosinu - úloha?

- Neznámý kontext funkce při buněčné diferenciaci – úloha?
- Oxidace 5mC na jeho deriváty v ES buňkách – možná blokáce udržovacích methyláz
- Oxidační deriváty 5mC mohou měnit funkci/expresi některých genů u terminálně diferenciovaných buněk (Purkyňovi buňky)



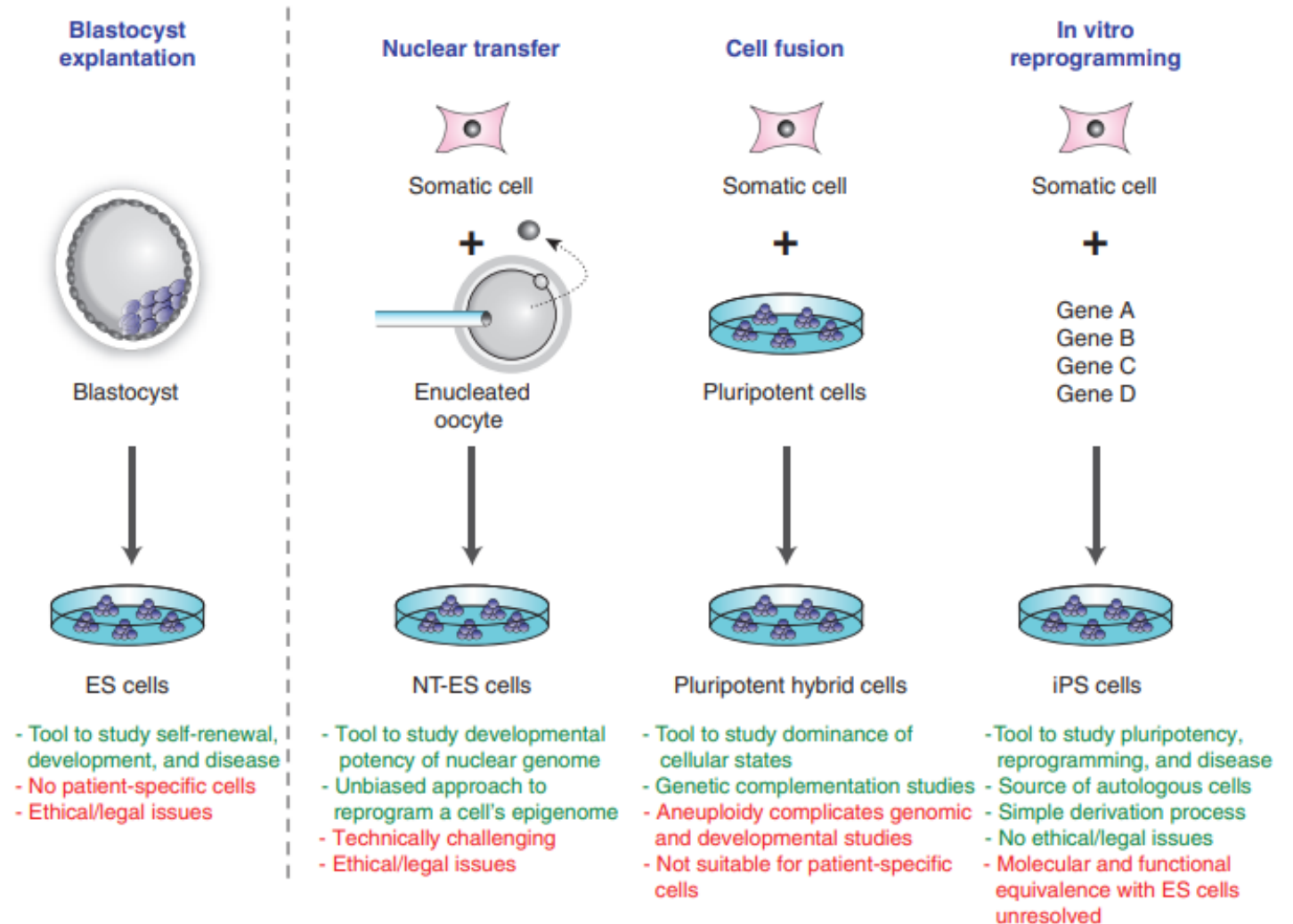
Epigenetické reprogramování a úspěšnost klonování



- Globální transkriptomické změny mezi klony naznačují velké abnormality na epigenetické úrovni regulace (stejný genotyp – rozdílnost v úrovních exprese)
- Vyšší úspěšnost dosažena přidáním látek, které narušují epigenetický stav buňky (inhibitory methyláz aj.)
- Využití
 - iPS – „embryonic stem cell-like pluripotent cell“ odvozené ze somatické buňky
 - Terapie – získání kmenových buněk pacienta s určitou poruchou, regenerace orgánů?
- Etika – bez podpory se nemůže vyvíjet, chybí placenta=není embryo

Zdroj pluripotentních buněk

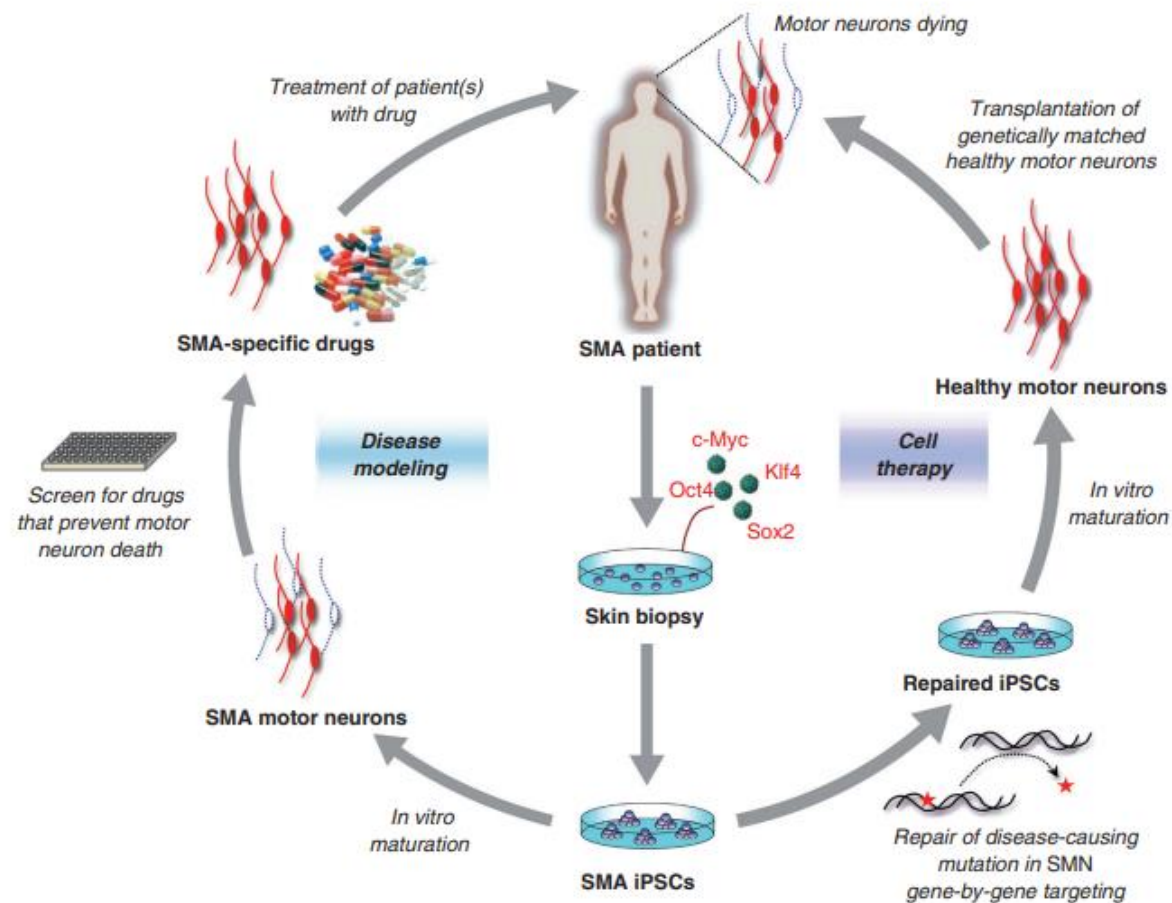
- Kultivace buněk blastocysty
- Jaderný přenos do oocytu
- Buněčná fúze
- iPS (*in vitro* reprogramování – retrovirový vektor – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*)
- iPS reprogramování a dediferenciace není identická k *in vivo* oplození a materiálu



Možné terapeutické využití iPS

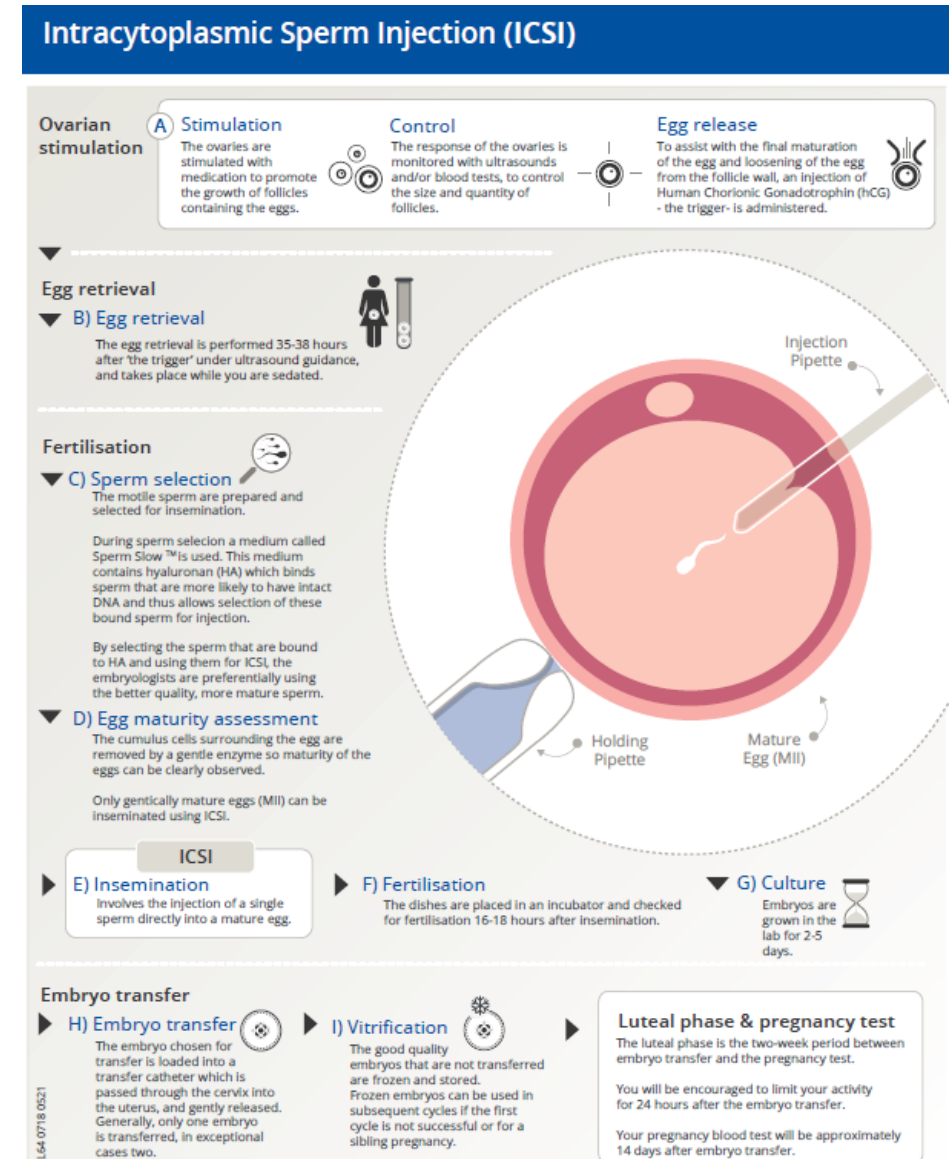
- Dva příklady iPS pro léčbu SMA (spinální svalová atrofie)

- Maturace SMA-iPSCs v neuronové buňky a hledání nových látek inhibující degeneraci motorických neuronů
- Oprava mutací postihující geny vedoucí k SMA a transplantace opravených motorických neuronů zpět do pacienta

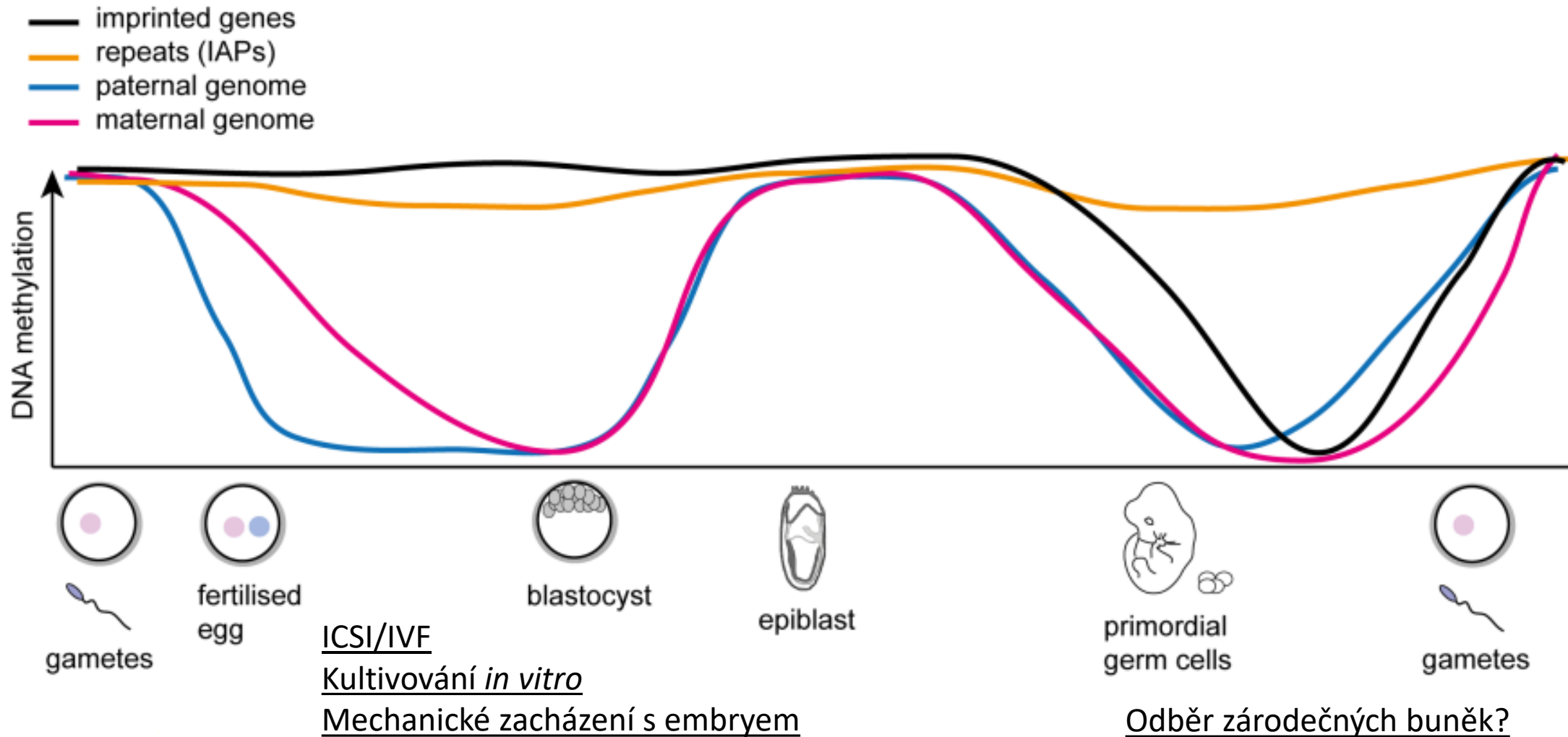


Změny v epigenetickém reprogramování v důsledku ART

- Efekt ICSI („Intracytoplasmic Sperm Injection“) nebo IVF („In Vitro Fertilisation“) –
 - nárůst v počtu BWS a AS syndromů (ICSI) – maternálně přenosné (1/300 000), u ART dětí nízké riziko
- Možné problémy s fertilitou, závislé na věku matky
 - **Narušení sensitivní periody**
 - Změna efektu maternálních proteinů z důvodu odběru oocytů – možná eroze DNA methylace a imprintovaných lokusů během ranného vývoje
 - **Transgenerační efekt?**



Změny v epigenetickém reprogramování v důsledku ART



Děkuji za pozornost!