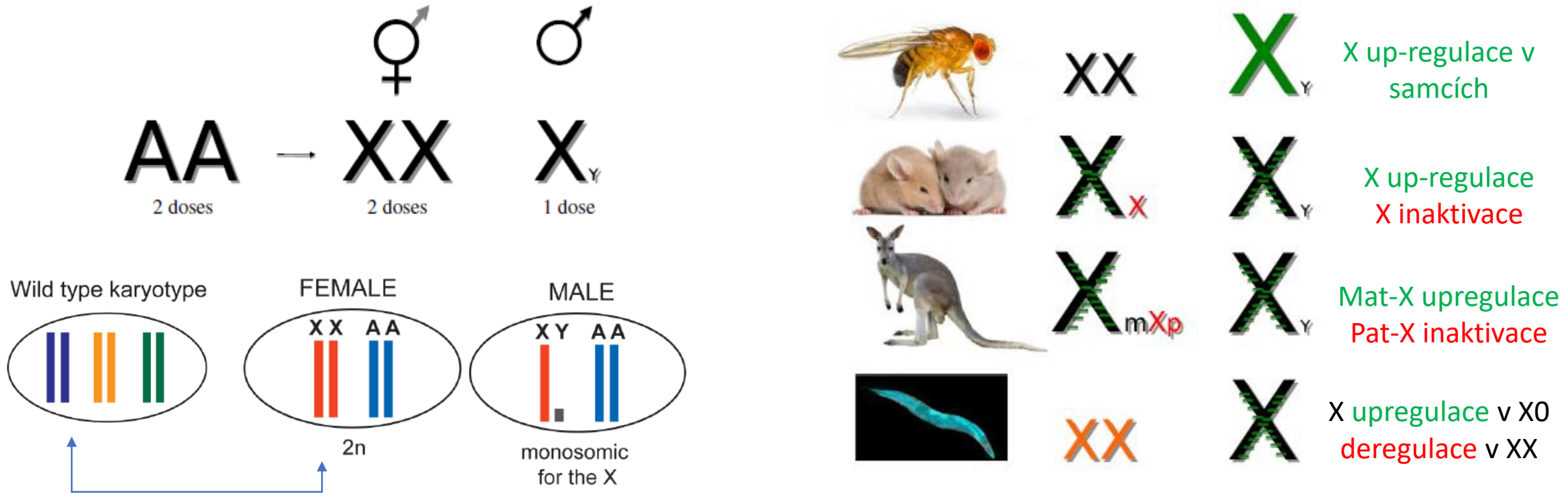


Epigenetika 15

Mechanismus dávkové kompenzace a jeho evoluce

Vývojová genetika 2022

Strategie vyrovnávající dávkově senzitivní expresi u rozdílných pohlaví



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

Muyle *et al.* 2022

Historie - objev dávkové kompenzace

- 1949 – Murray L. **Barr** a Ewart G. **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

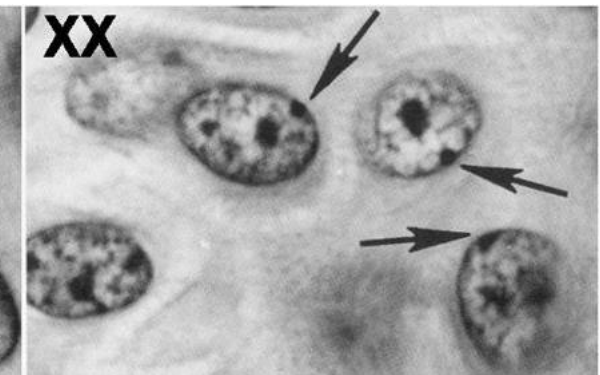
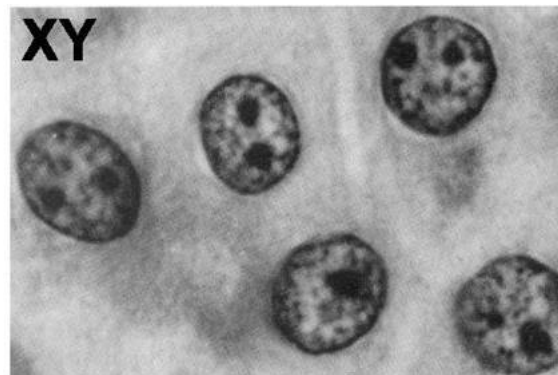
M. Barr a E. G. Bertram



S. Ohno

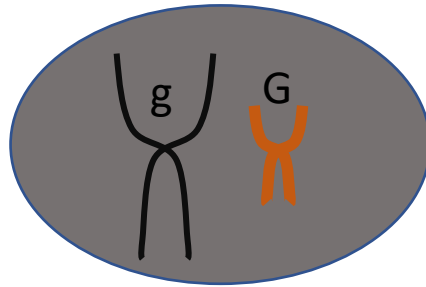
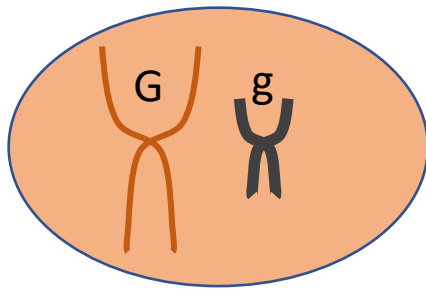


M. F. Lyon



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

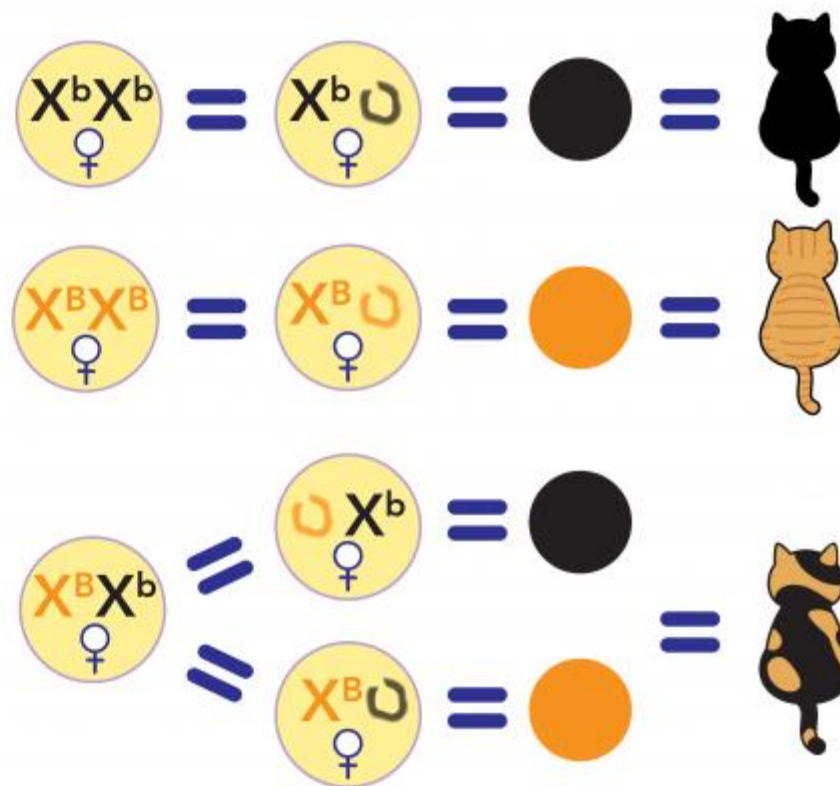
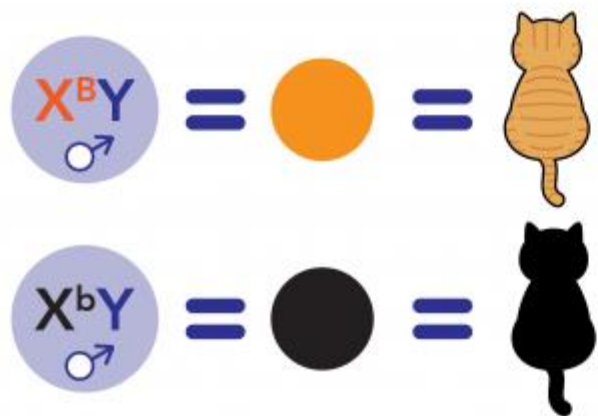


F F M M M



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

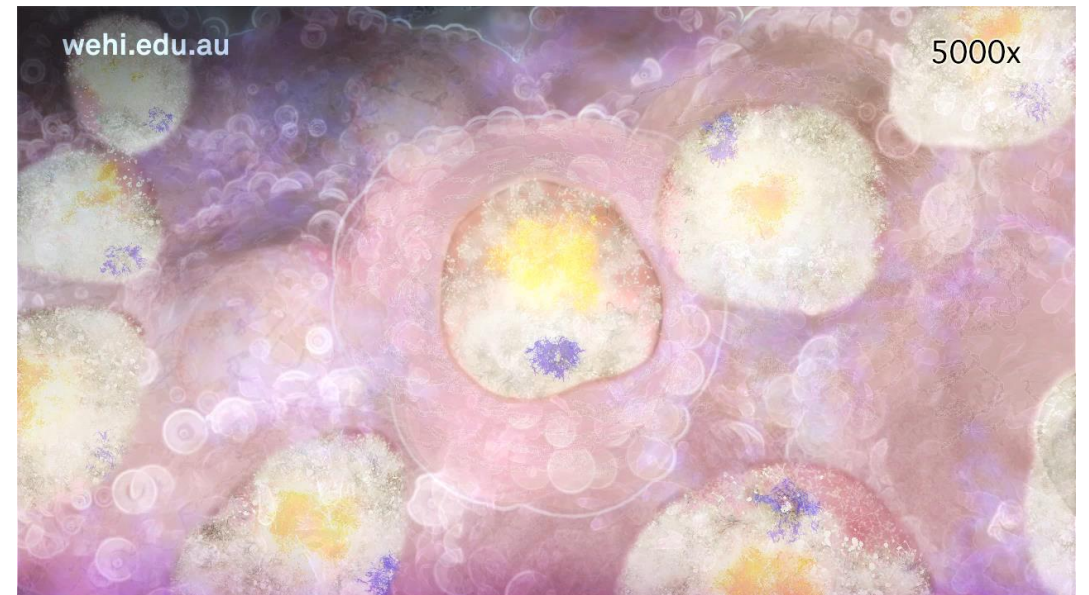
Genotyp Calico kočky a Tortie kocourů



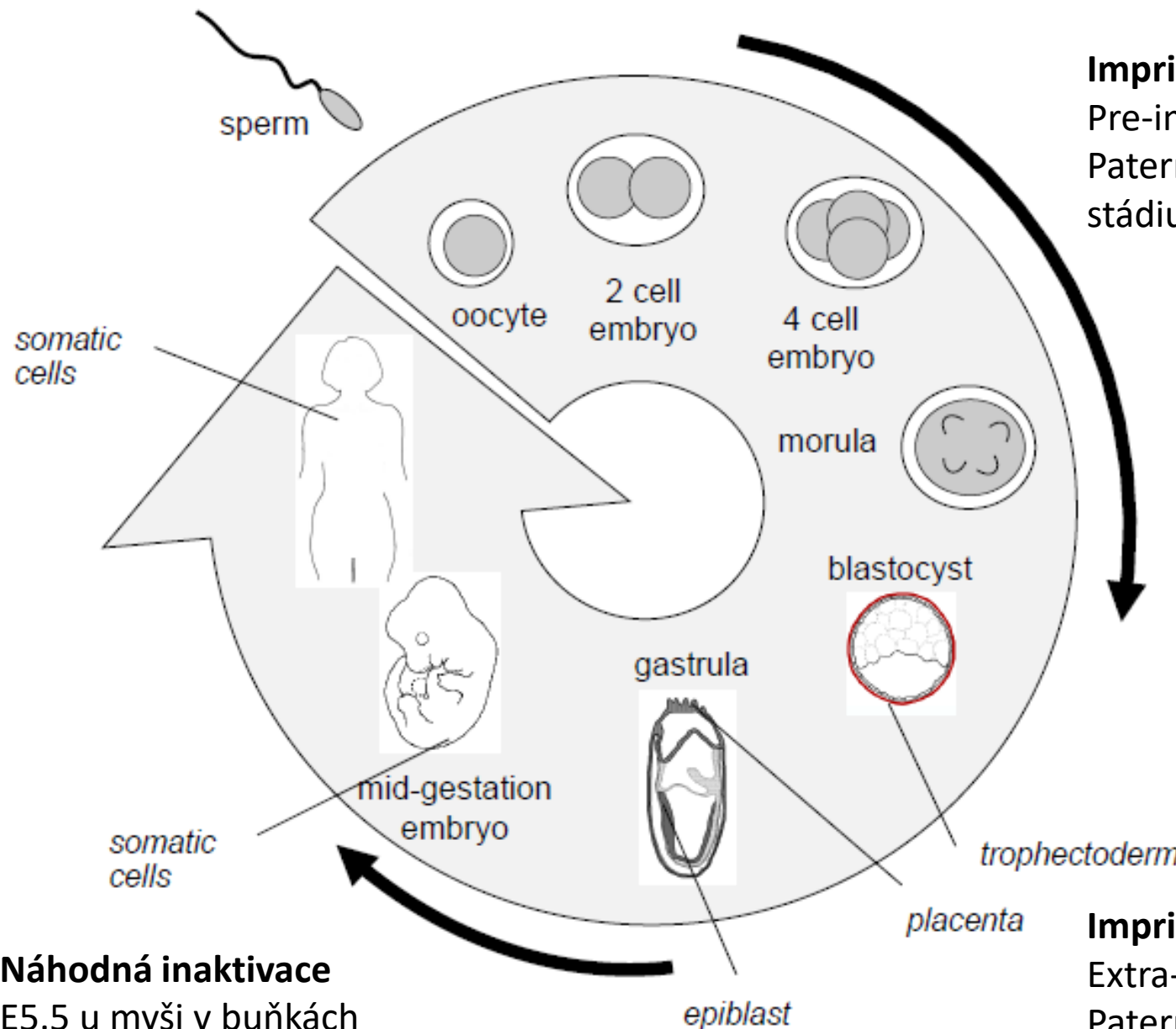
- Calico kočky se liší od Tortie tím, že mohou mít genetickou konstituci s bílým zbarvením („piebalding“) = absence melanocytů v některých oblastech kůže a srsti = autozomálně dominantní, dědičné
- Piebald fenotyp není albinismus! (ztráta tvořit pigment)

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

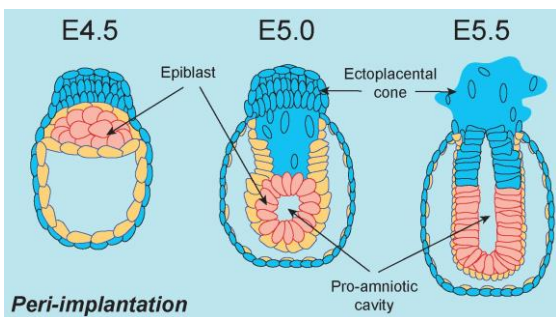


Náhodná inaktivace
 Udržovaná u
 somatických buněk
 během celého života



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

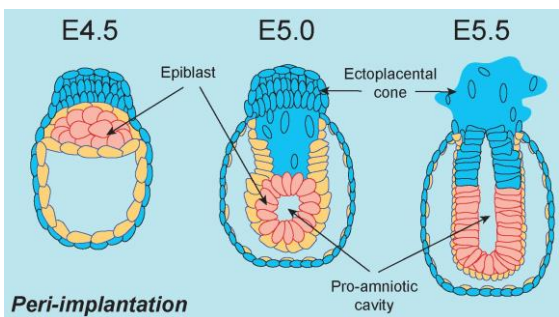
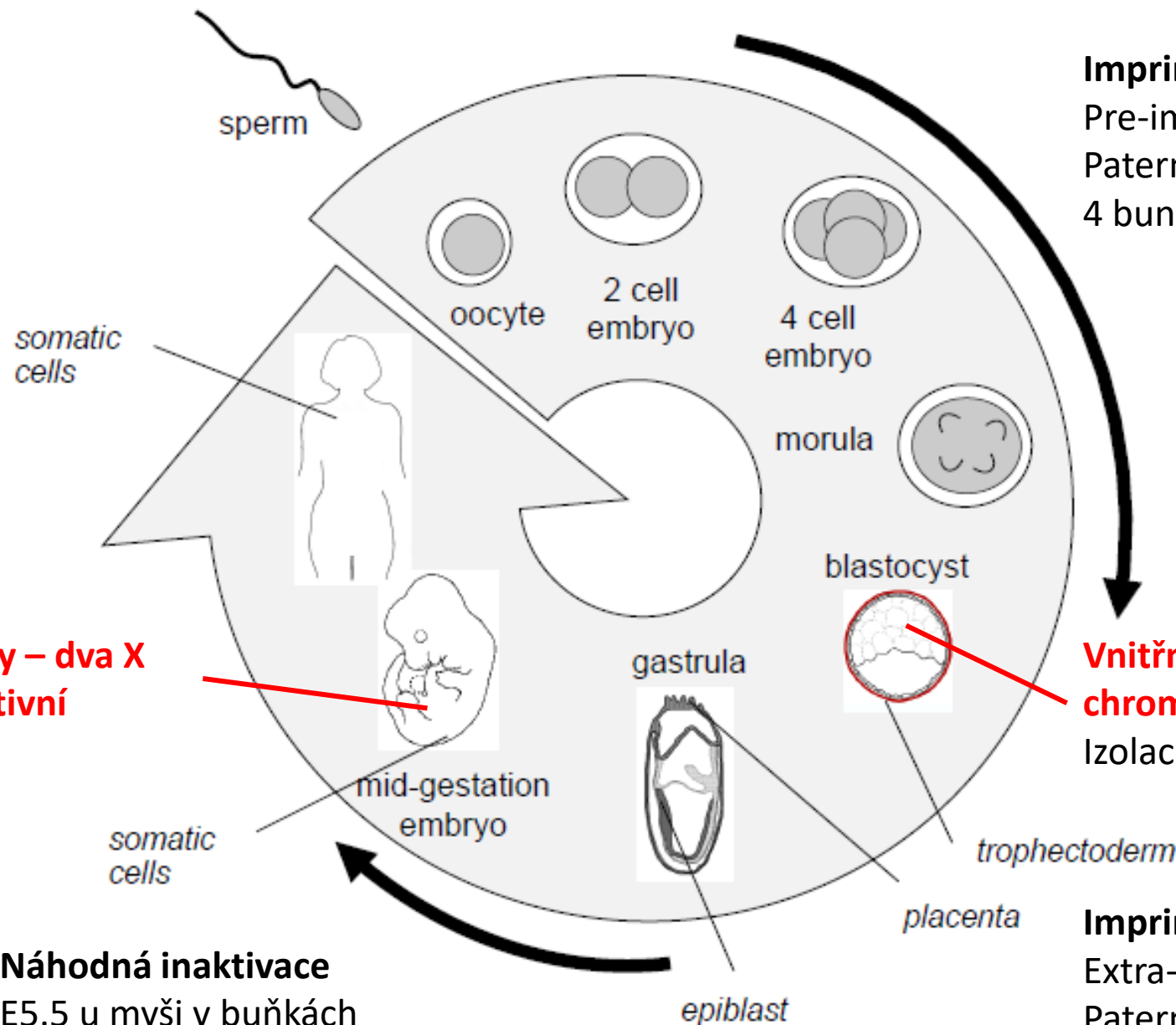
Náhodná inaktivace
 Udržovaná u
 somatických buněk
 během celého života

**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



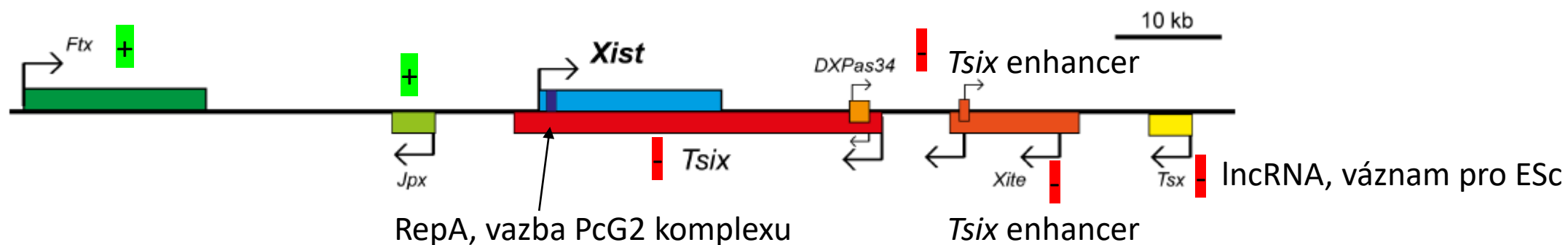
Náhodná inaktivace
 E5.5 u myši v buňkách
 epiblastu

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

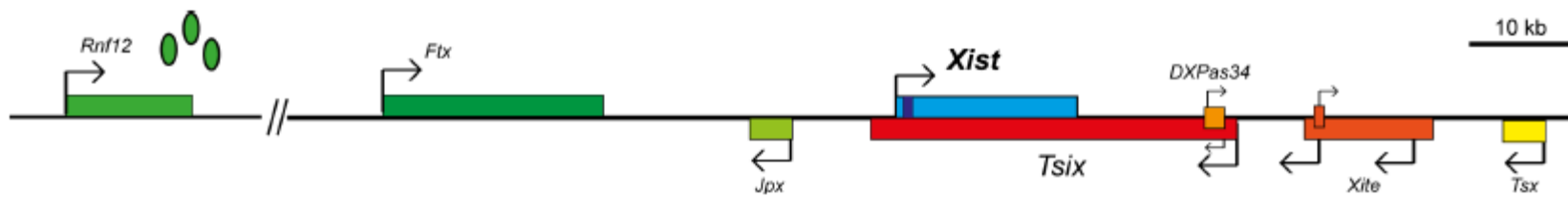
Determinace počtu X chromozomů

- 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
 - *Tsix* reguluje overexpresi *Xist* a brání letalitě plodu během ranného vývoje
 - *Ftx* (lncRNA, inhibice methylace *Xist* DNA promotoru) a *Jpx* (lncRNA, upregulace) pozitivně reguluje expresi



Determinace počtu X chromozomů

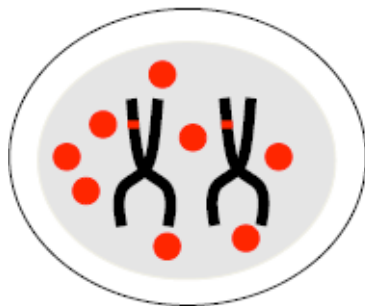
- Ne zcela popsáno, konsensus – **X-vázané faktory a autozomální faktory determinují počet (X:A)**
- Delece X-vázané oblasti (nekódující RNA) blízko *Xist* elementu vede k neúspěšné inaktivaci, autozomální faktory nejsou známy
- Gen *Rnf12* X-vázaný gen lokalizován před XIC
 - *Rnf12*/*Rlim* protein a jeho hladina jsou nutné pro pokračování inaktivace
 - E3 ubiquitin ligáza, motiv zinkové prstu



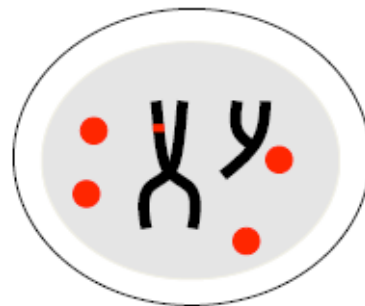
Úloha Rnf12/Rlim a determinace počtu X chromozomů

- 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

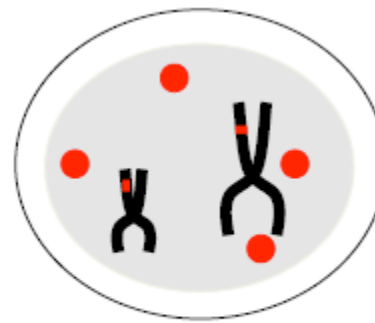


Female XX

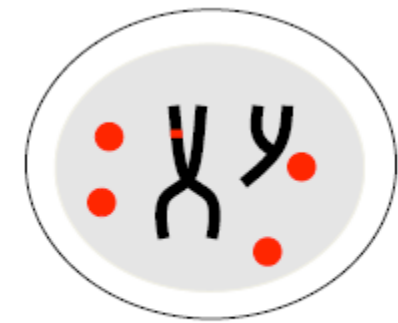


Male XY

1 X aktivní



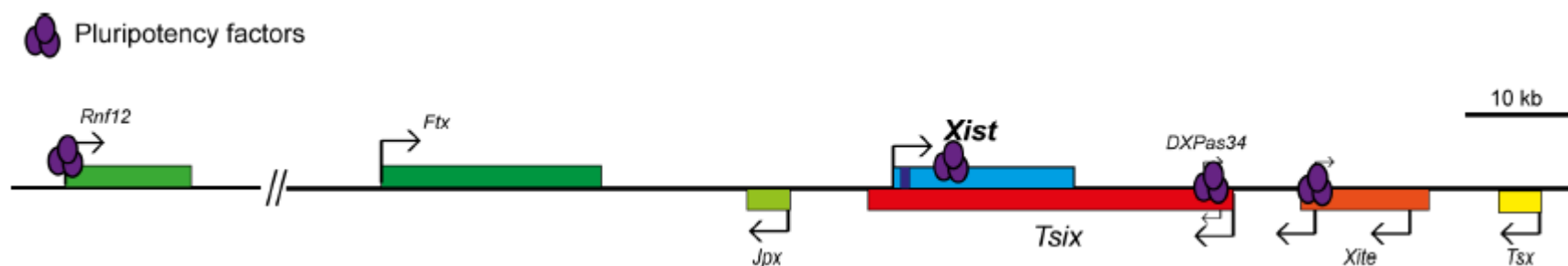
Female XX



Male XY

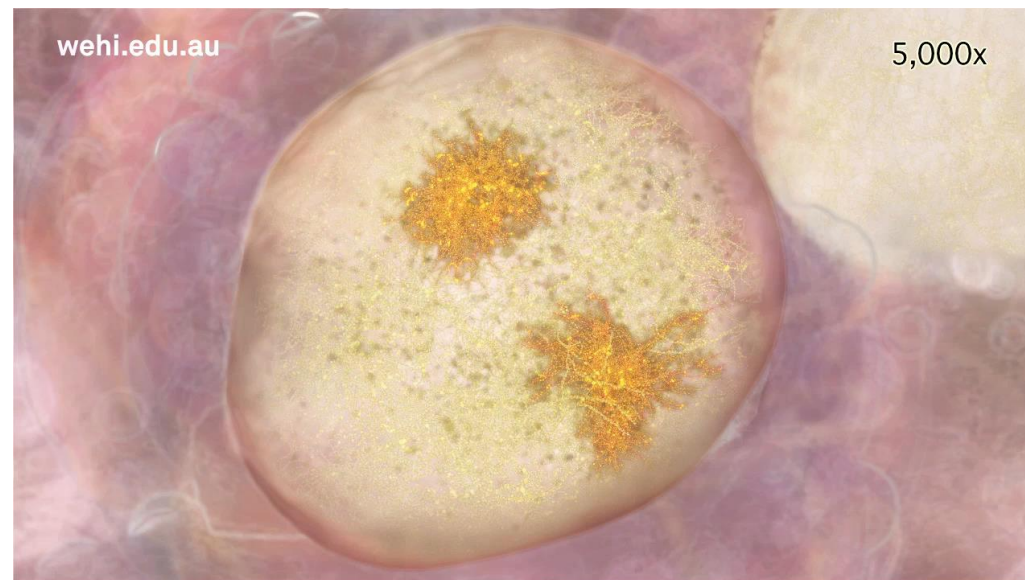
Determinace počtu X chromozomů

- 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*)

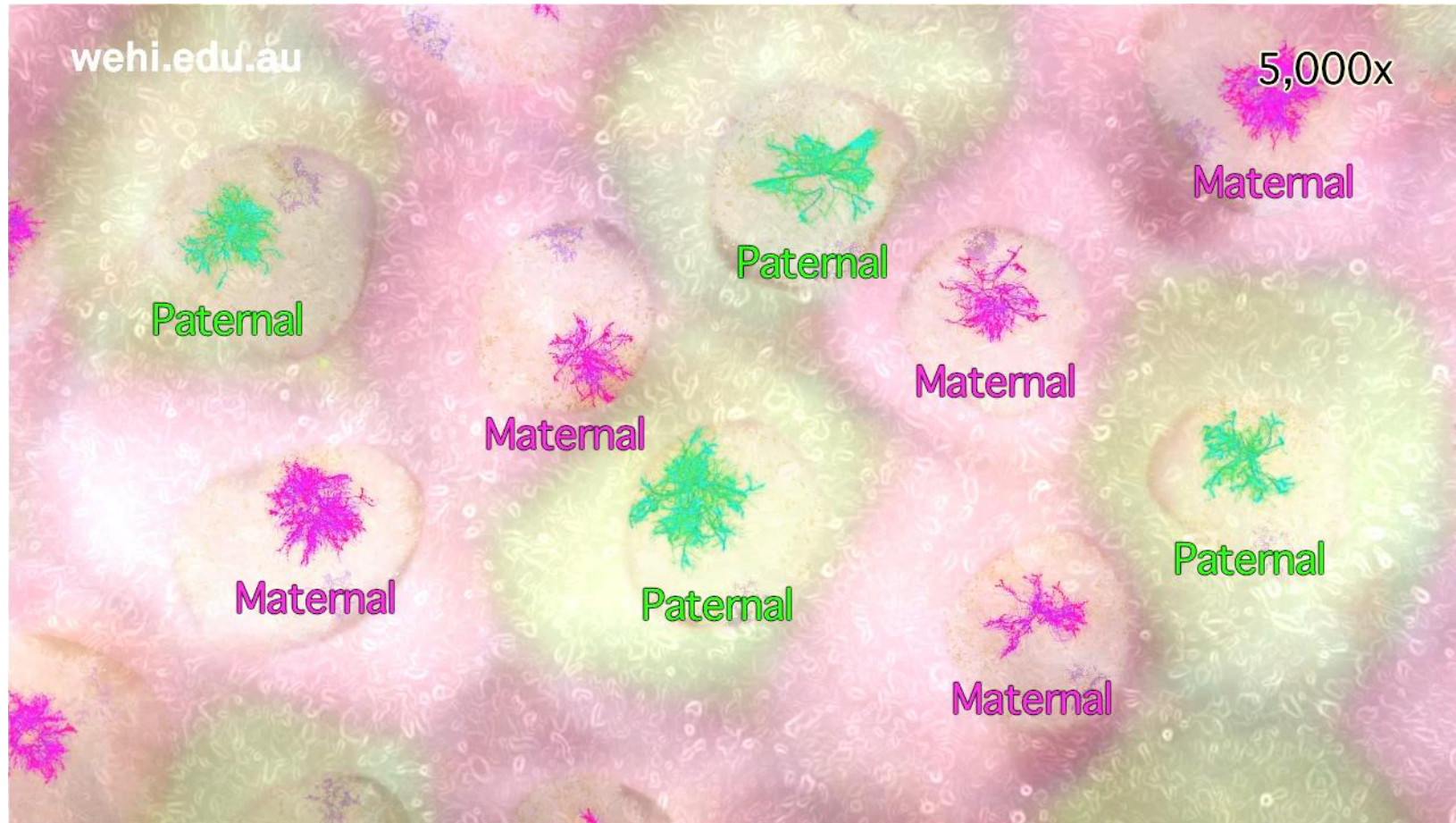


„X-chromosome kissing“ - výběr

- 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?



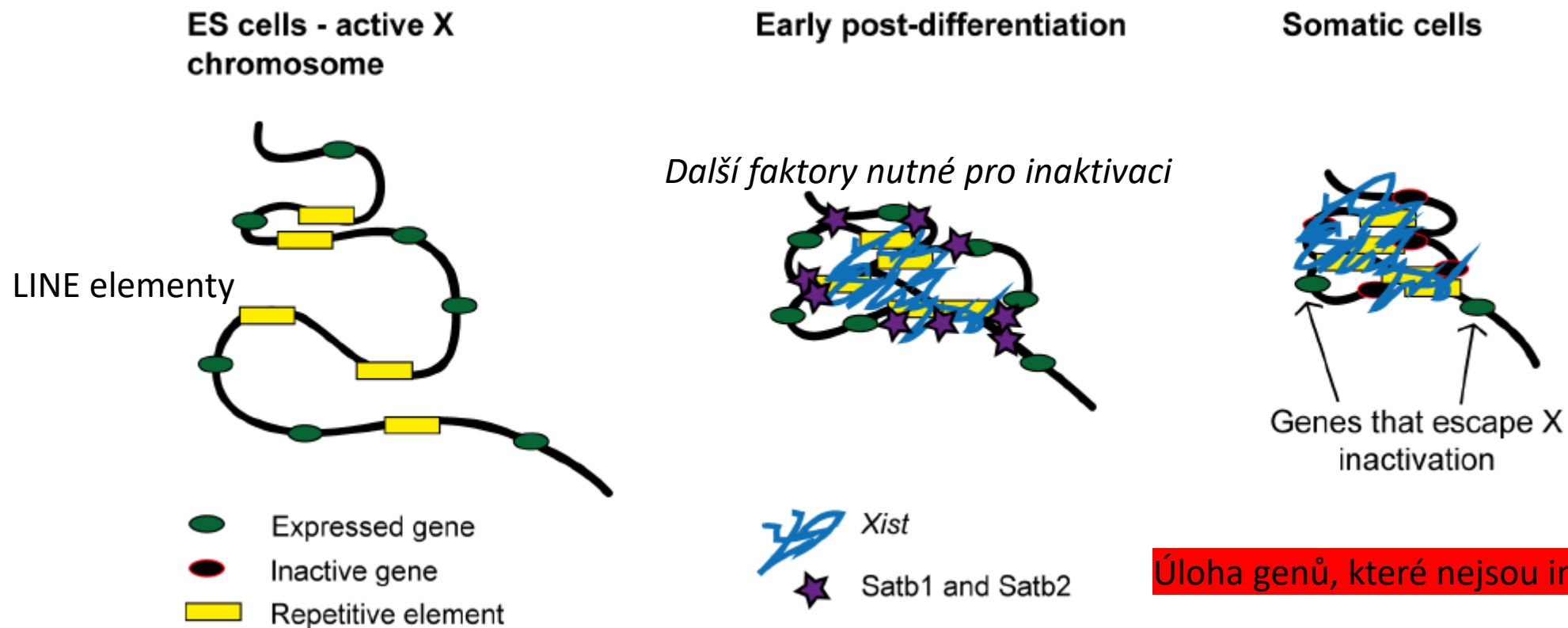
Epigenetická dědičnost X-inaktivace a důvod zbarvení *Callico* koček



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

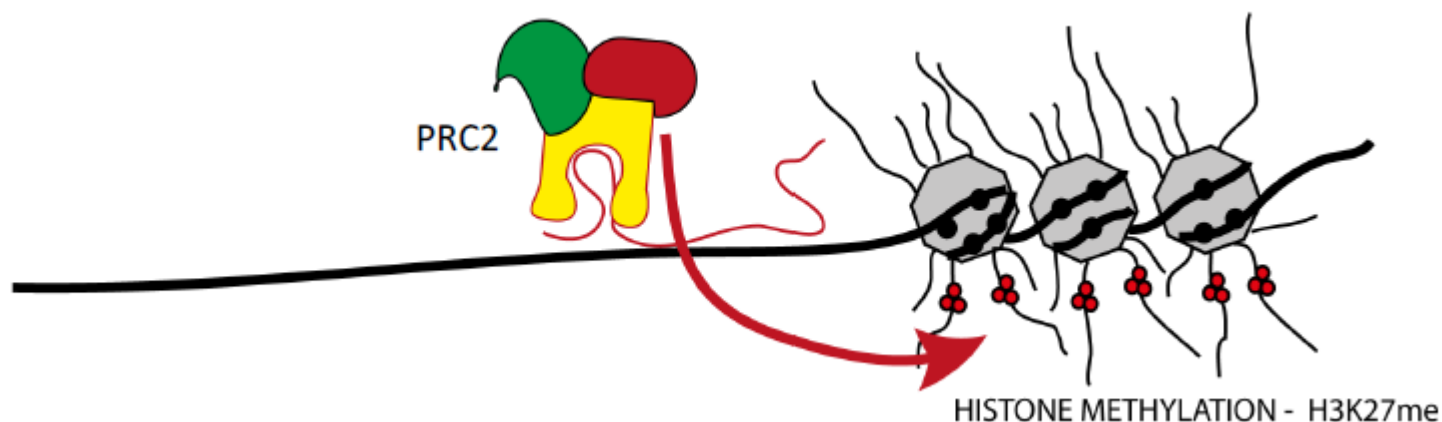
Iniciace a šíření X-inaktivace



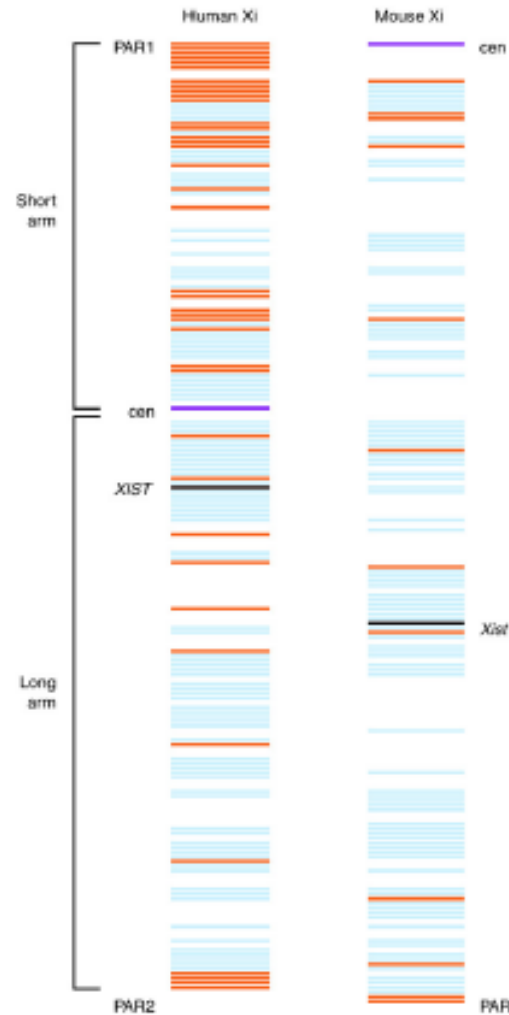
Úloha genů, které nejsou inaktivovány?

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

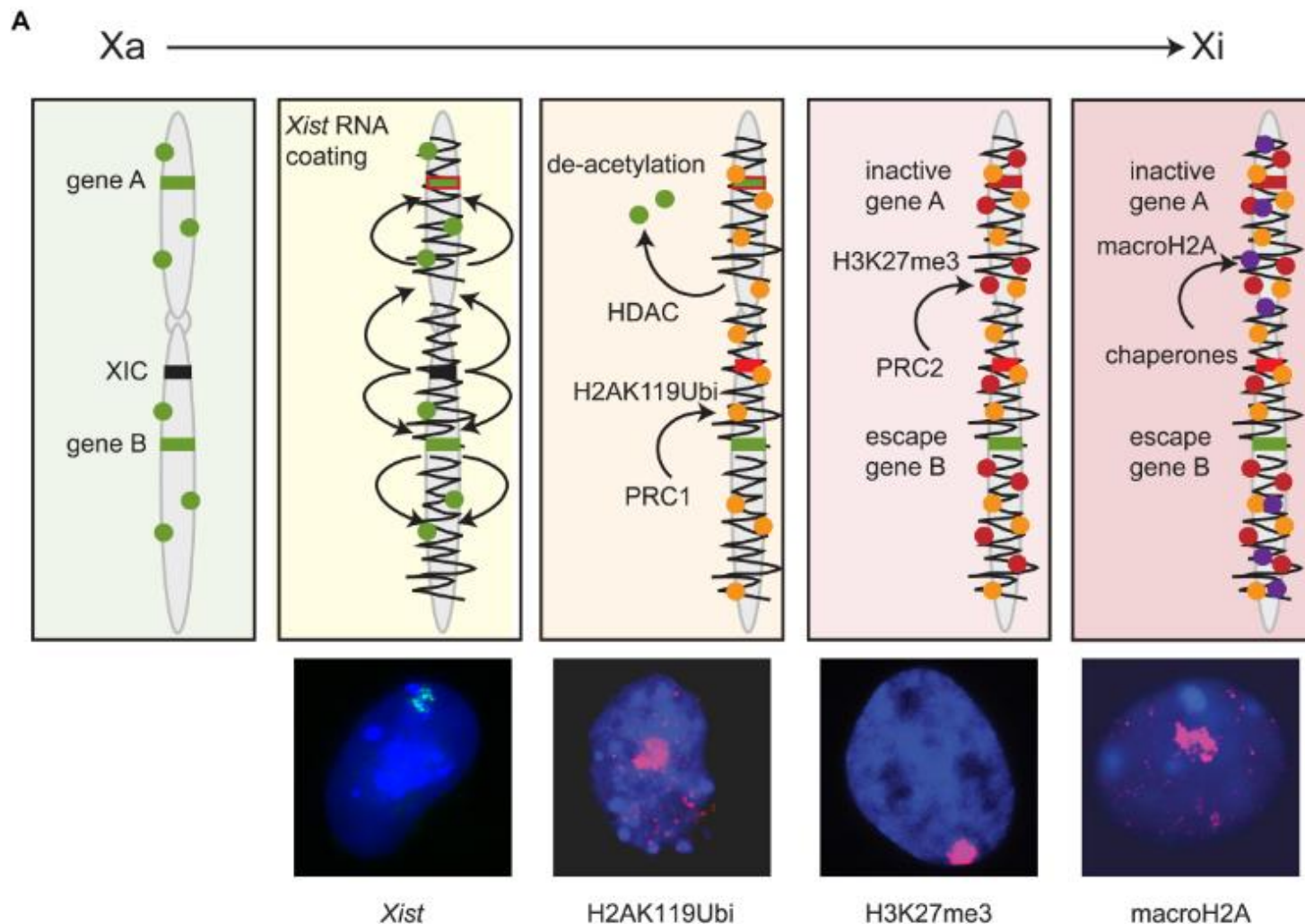


Neúplná X-inaktivace



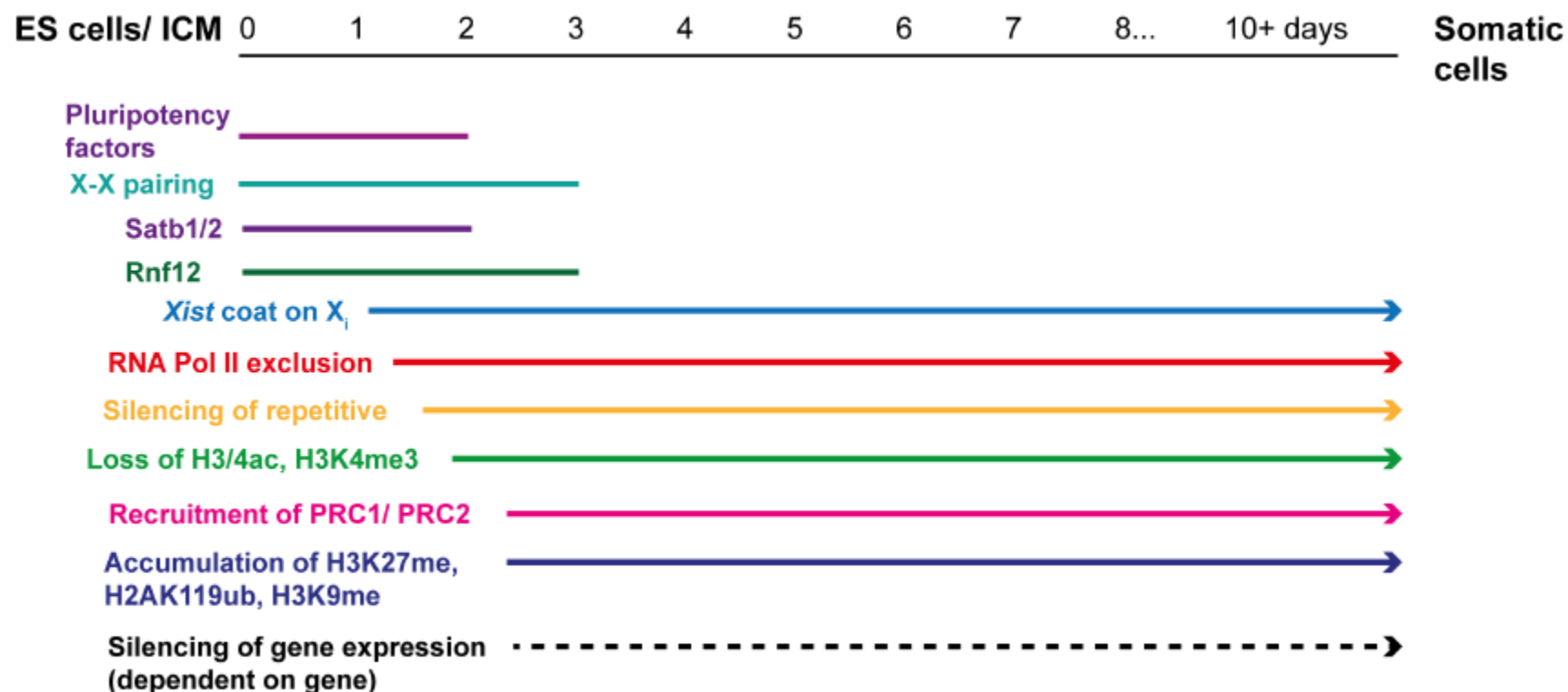
- Nejsou zahrnuty v „sex chromatin body“
- Geny PAR
- Non-PAR mají 2x vyšší expresi
- Poruchy regulace genů, které přiléhají k XIC, jsou zdrojem X-vázaných chorob
 - Rettův syndrom
 - Mutace nebo ztráta genu MeCP2 – mentální poruchy, důležitý v nervových buňkách pro regulaci specificky methylačně obohacených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

Faktory ovlivňující DC a neúplnou X-inaktivaci



- **Evoluční historie X chromozomu** (geny starší oblasti) – geny s neúplnou inaktivací podléhají konzervovaným elementům
 - **PcG**
 - **ANC**
 - **TADs + CTCF vazebná místa**
- DC sensitive geny (geny spojené s onemocněním) a geny nemající Y-homolog
- Neúplná/nedokonalá evoluce X-umlčovacího mechanismu?

Shrnutí X-inaktivace a hlavních událostí

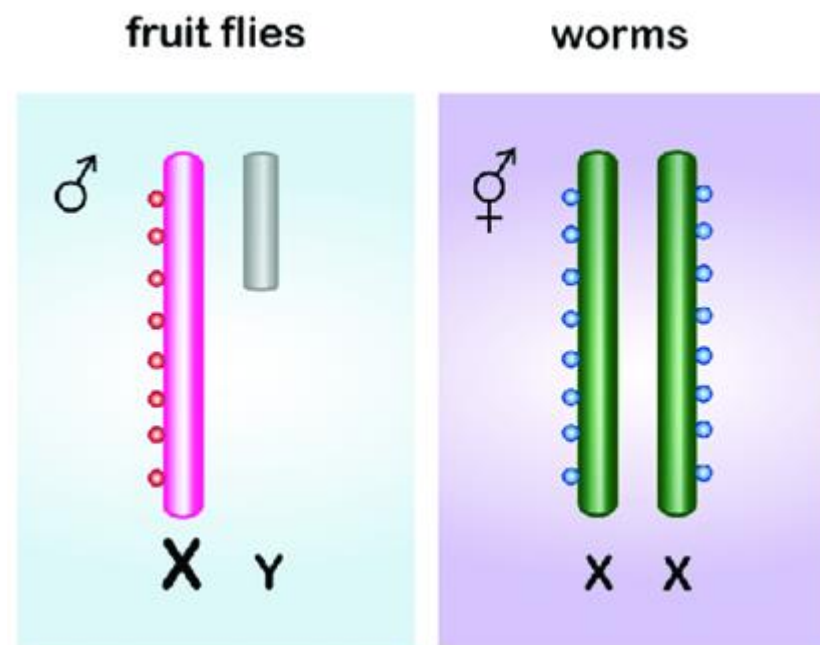


- Pro udržení nutná aktivita Dnmt1, vazba Smchd1 (SMC třída proteinů)

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

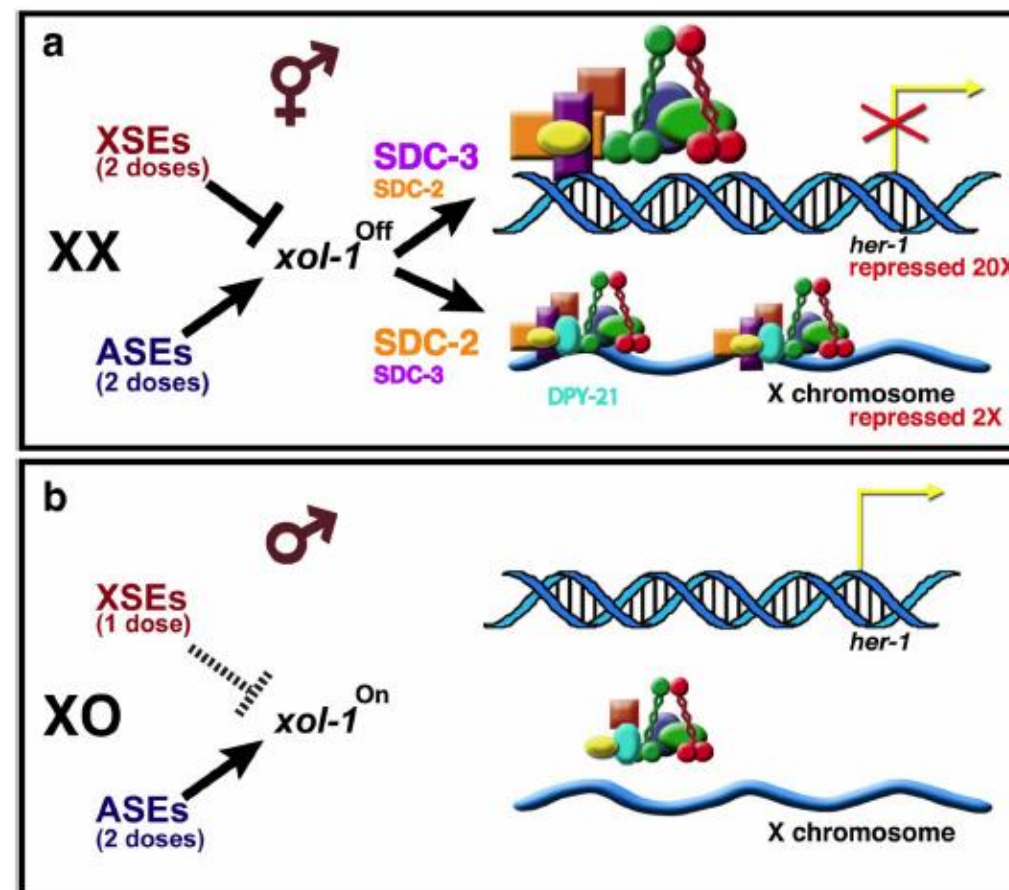


De-regulace obou chromozomů

- 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?

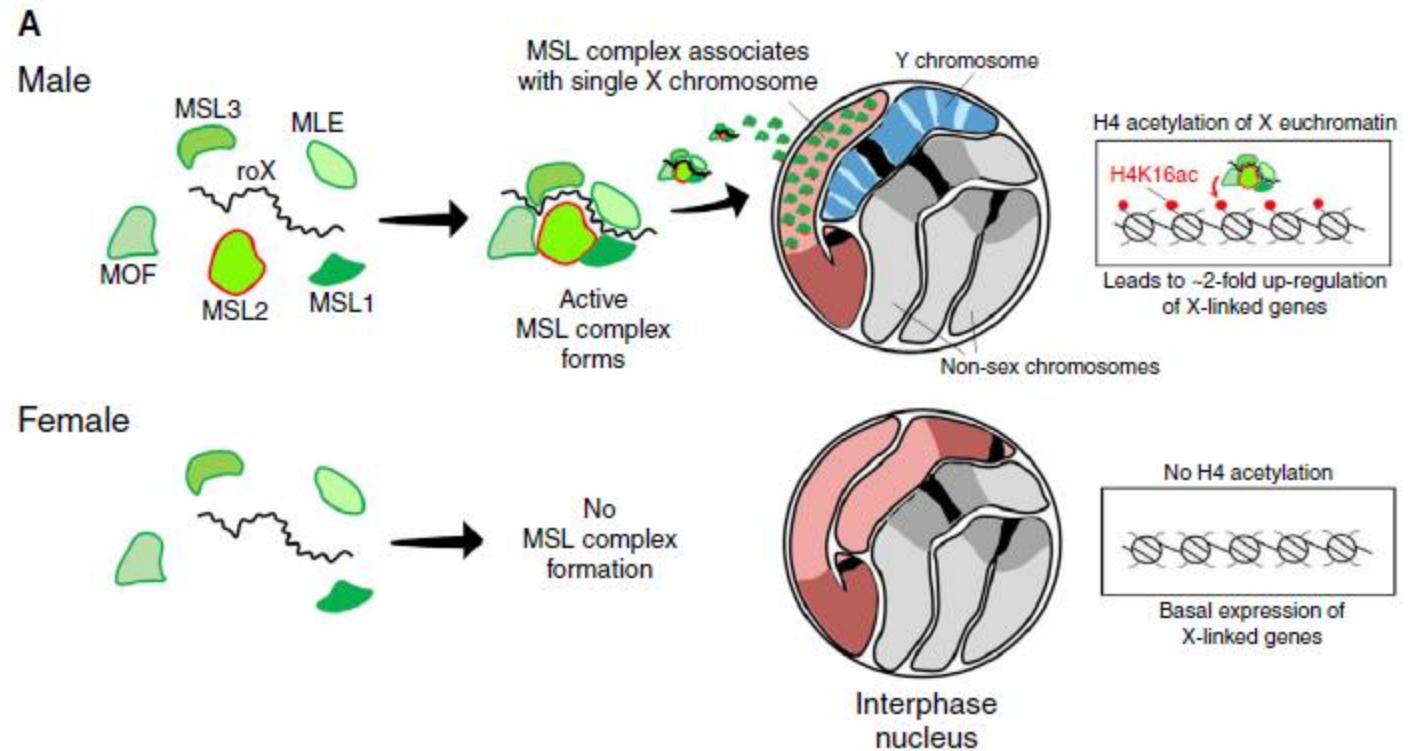
Funkce dávkové kompenzace v *C. elegans*

- 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 až 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

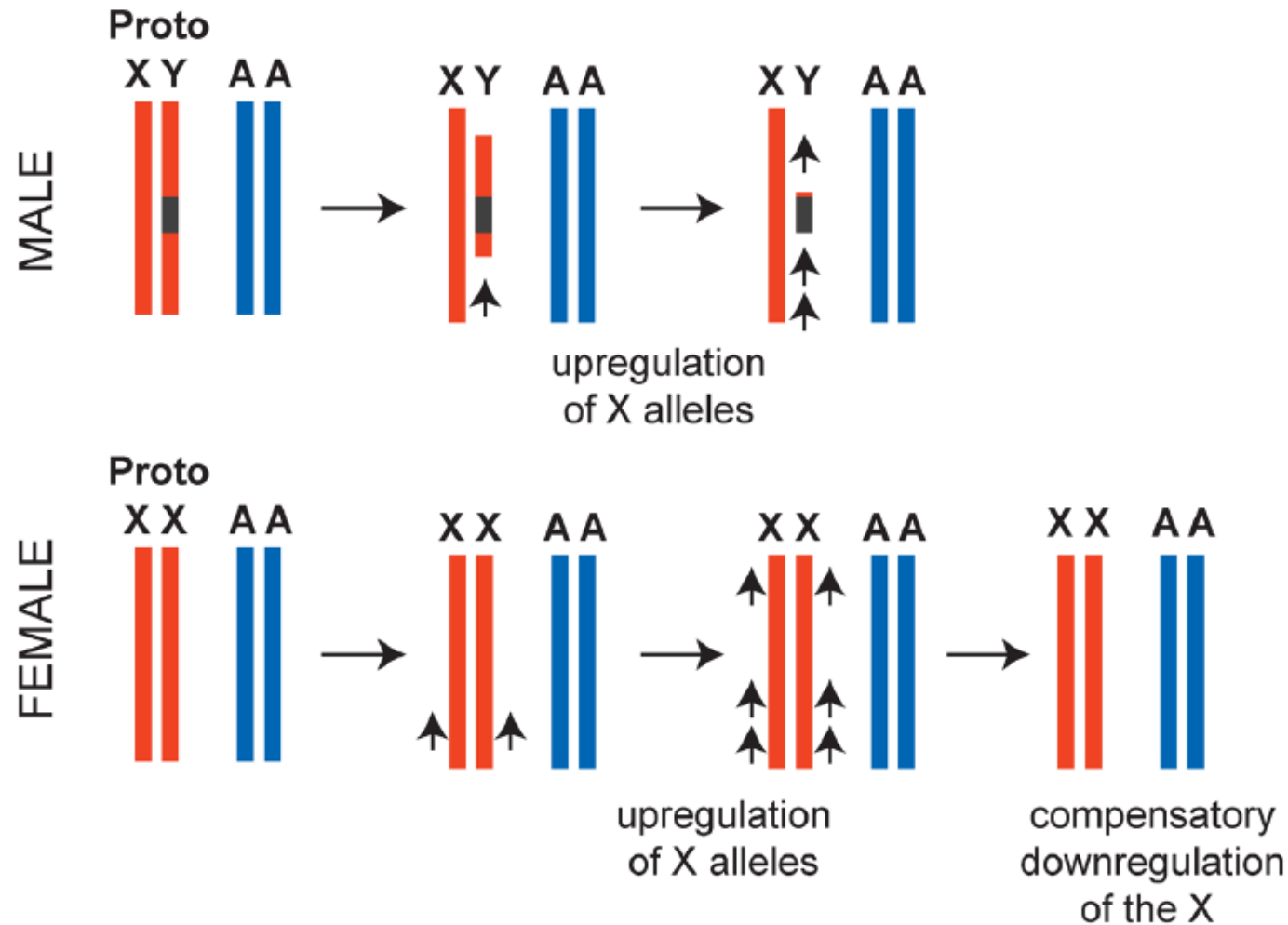


Dávková kompenzace u *Drosophila melanogaster*

- 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



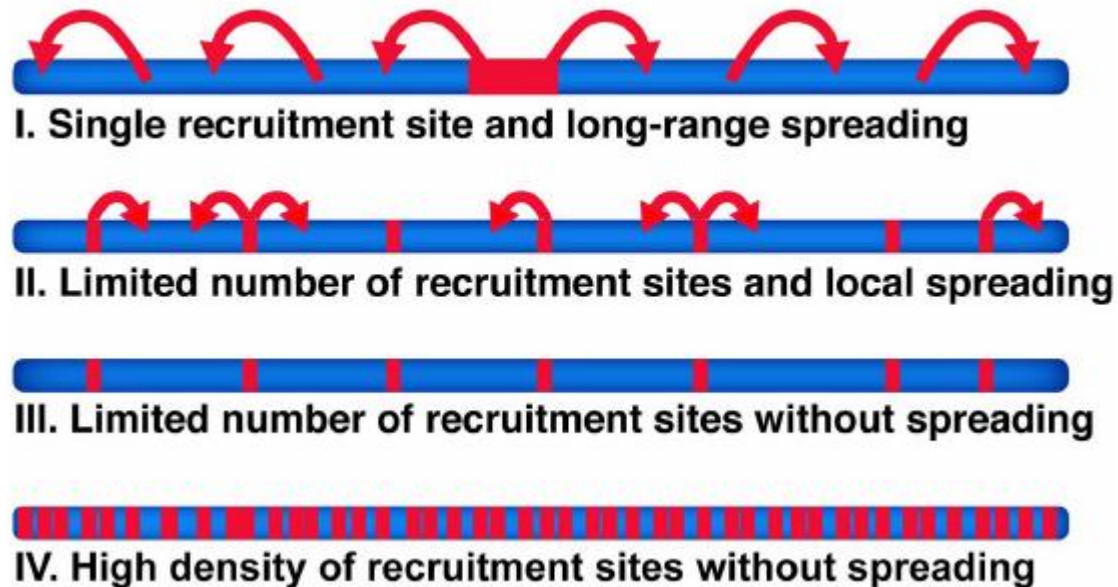
Cesta vedoucí k překonání X-vázané „haploinsuficience“ a DC mechanismu



- 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

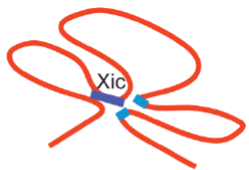
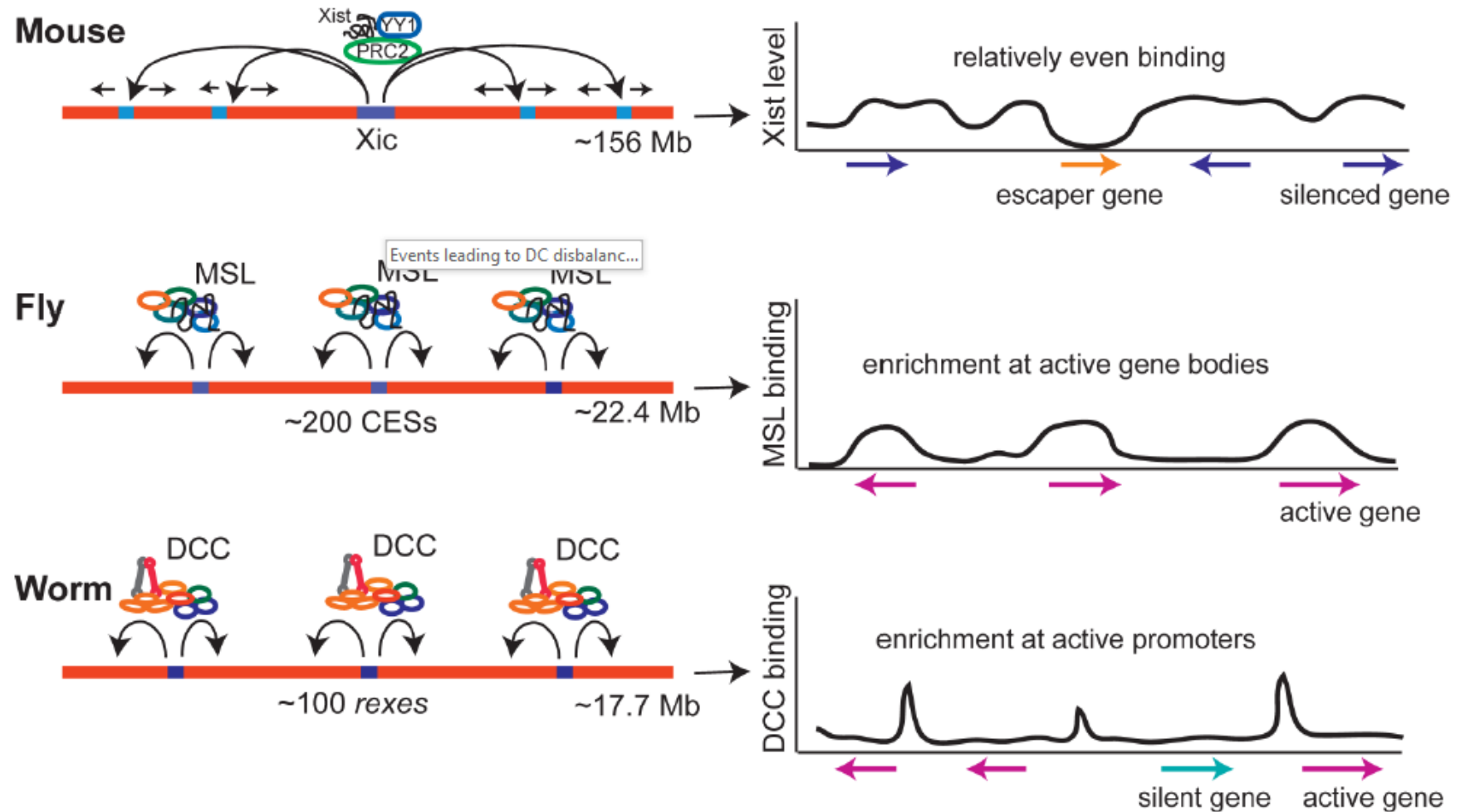


Meyer et al. 2005

- Z hlediska evoluce DC vazebných elementů byly předpovězeny 4 různé modely
 - Regulace přes *Cis-acting* elementy na dlouhé vzdálenosti
 - Více „*cis-acting*“ elementů a šíření dalšího umlčování lokálně
 - Více „*cis-acting*“ elementů bez šíření inaktivace
 - Vícenásobné šíření inaktivace *in-cis* na krátké vzdálenosti

Podobnost specifikace DCC vazby a šíření mezi modelovými organismy

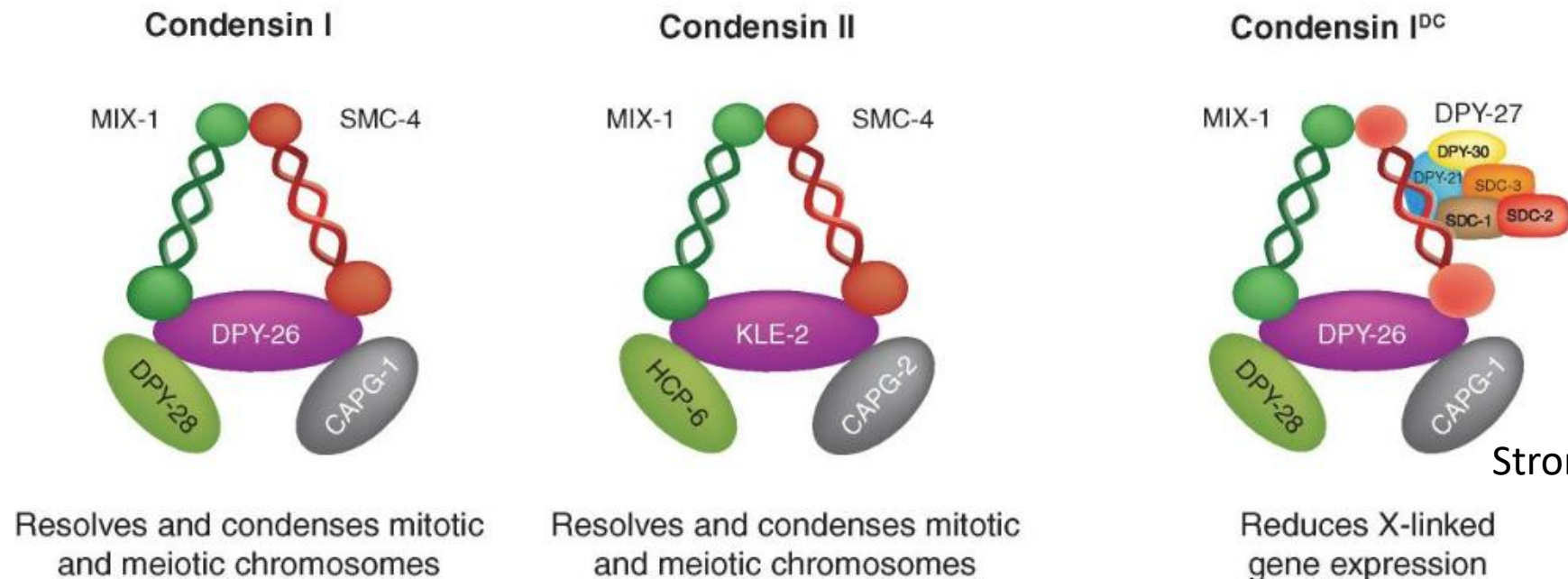
- Podobně jako TFs, DCC s váže do oblastí s nízkou nukleozomální hustotou (MSL se váže na více otevřená místa chromatinu, označená H3K36me3)
- Není známo, jak přesně je DCC lokalizován na X chromozom, možná role několika faktorů
 - Histonová varianta (H2A.Z)
 - Pol II – „pushing“
 - Chromozomální interakce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



Three dimensional interactions may aide Xist spreading

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

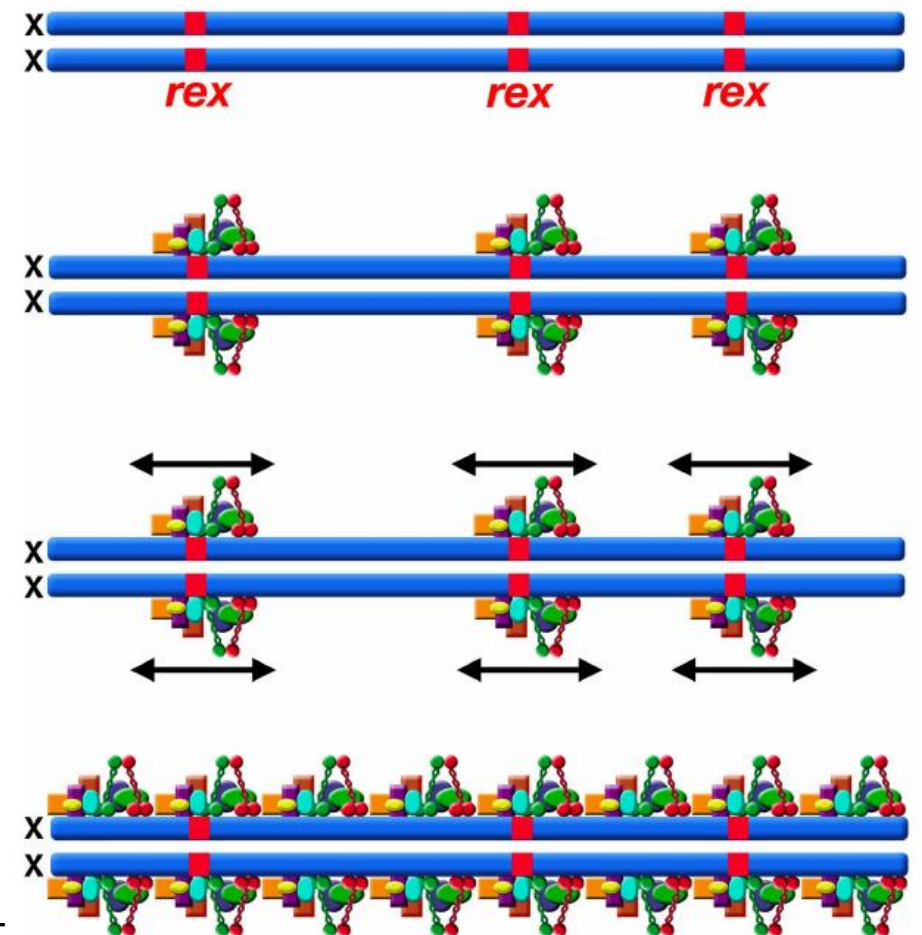
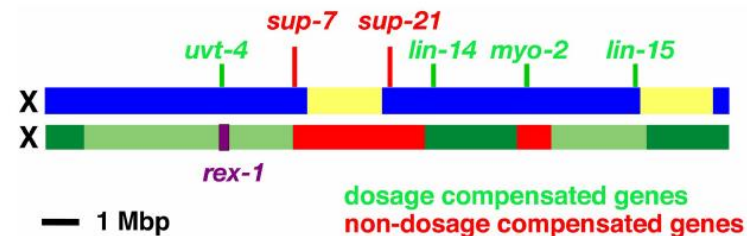
- DC-kondenzin geny v *C. elegans* mají podobnost s geny kódující 13S kondenzin komplex, který je esenciální pro rozlišení a organizaci mitotických a meiotických chromozomů u člověka, kvasinky a dalších druhů = využití existujícího mechanismu
- DC komplex v *Caenorhabditis* se vyvinul ještě s dalšími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



Strome *et al.* 2014

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

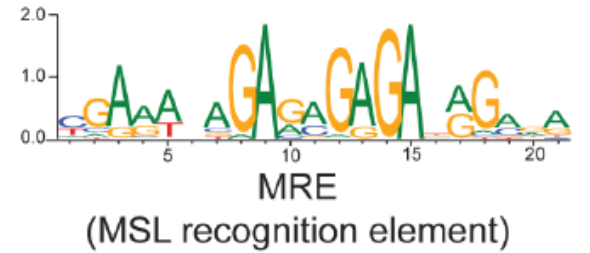
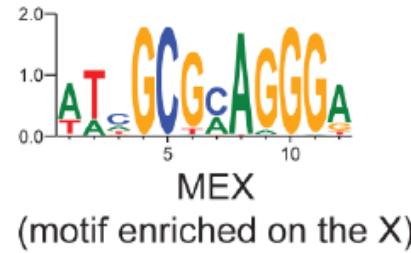
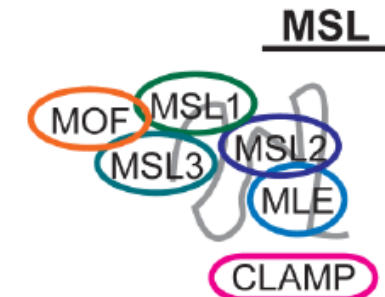
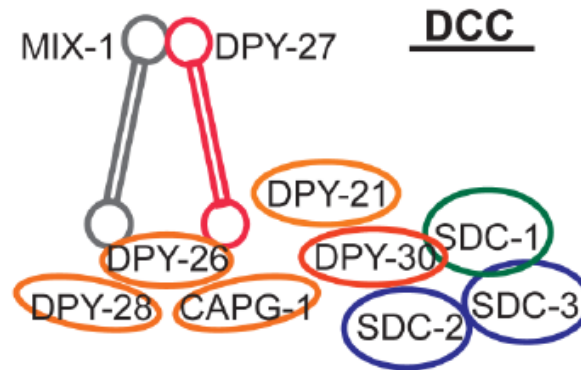
- X chromozom obsahuje několik XRE (X rozpoznávajících elementů)
- XRE se liší od ostatních míst v genomu změnou v bp, tak aby DCC specificky rozpoznal pouze X chromozom
- DCC po vazbě na XRE se šíří *in cis* na další místa X chromozomu



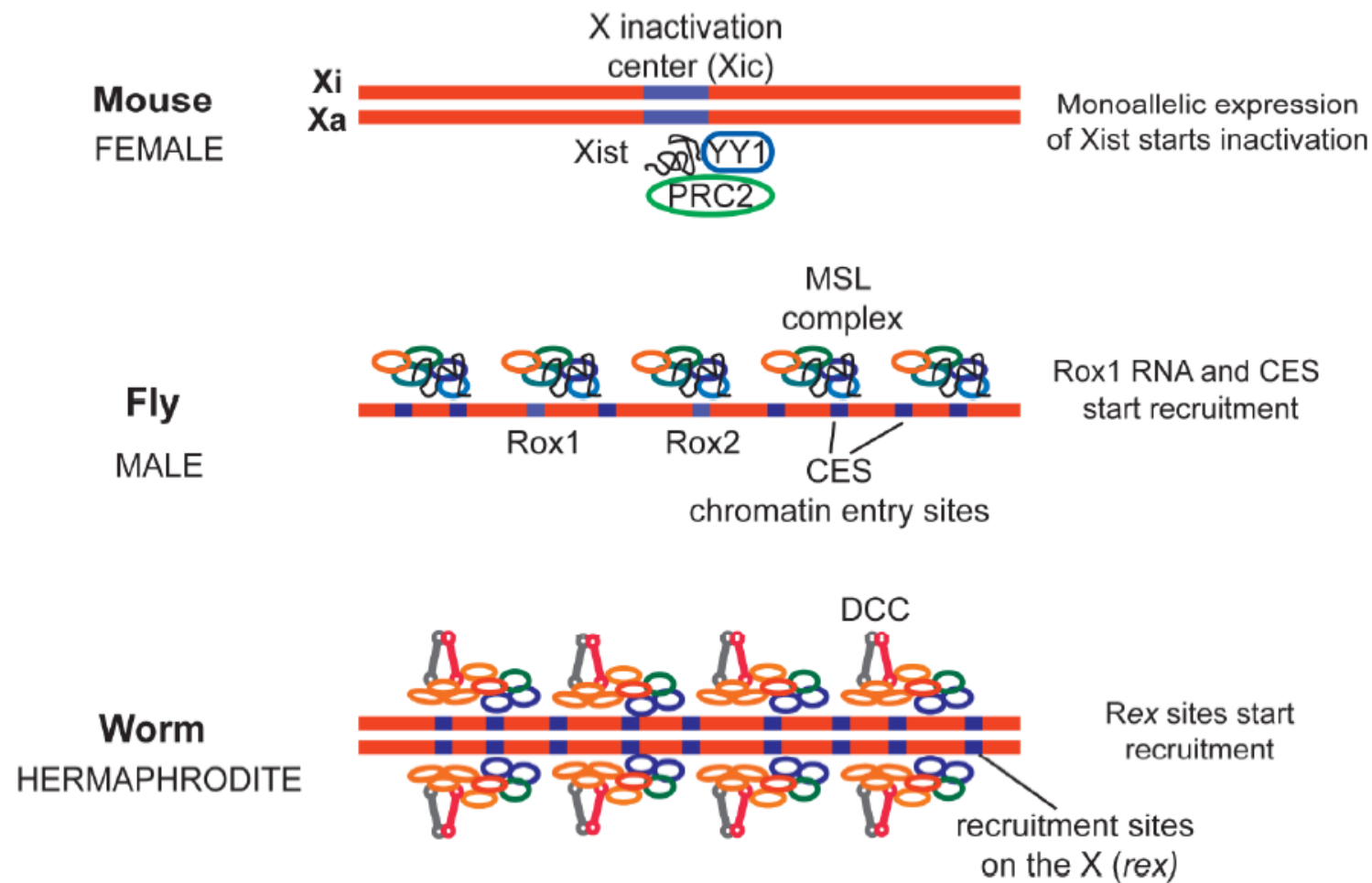
Meyer *et al.* 2005

Podobnost a rozdíly DCC vazebných míst mezi *Drosophilou* a *C. elegans*

- XRE – X chromozom rozpoznávající element
- MRE – motiv obohacený na X chromozomu
- 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

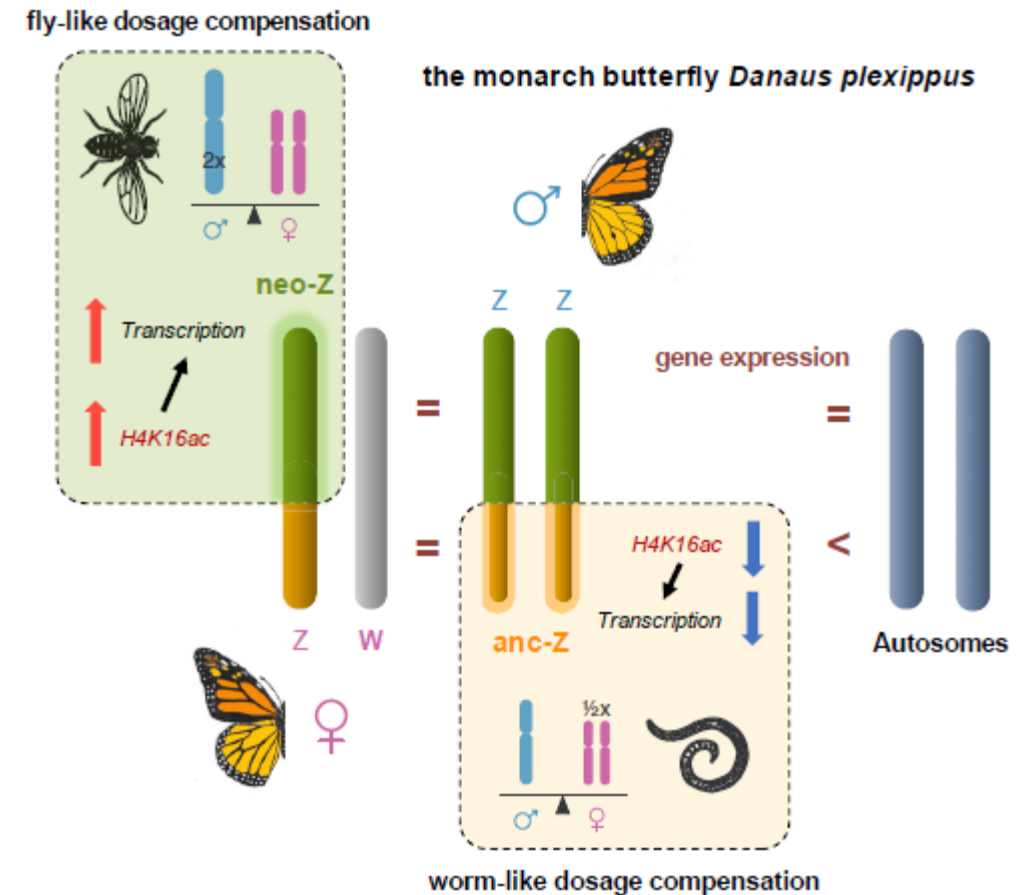


Celkové srovnání X chromozom inaktivace mezi modelovými druhy podporuje model vzniku šíření *in cis* a kontaktů na dlouhé vzdálenosti

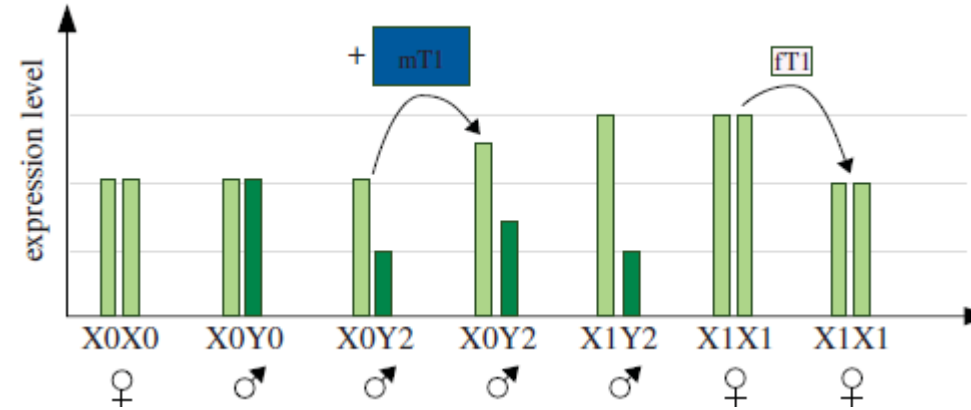
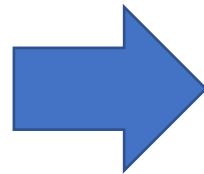
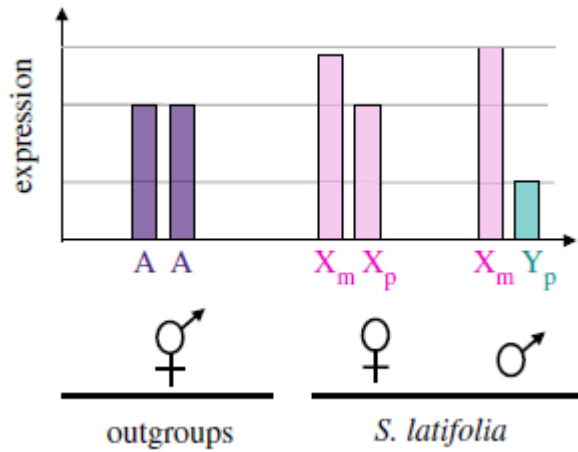


Koevoluce DC mechanismů a možné varianty u ostatních organismů – model dichotomie DC mechanismu u monarchy stěhovavého

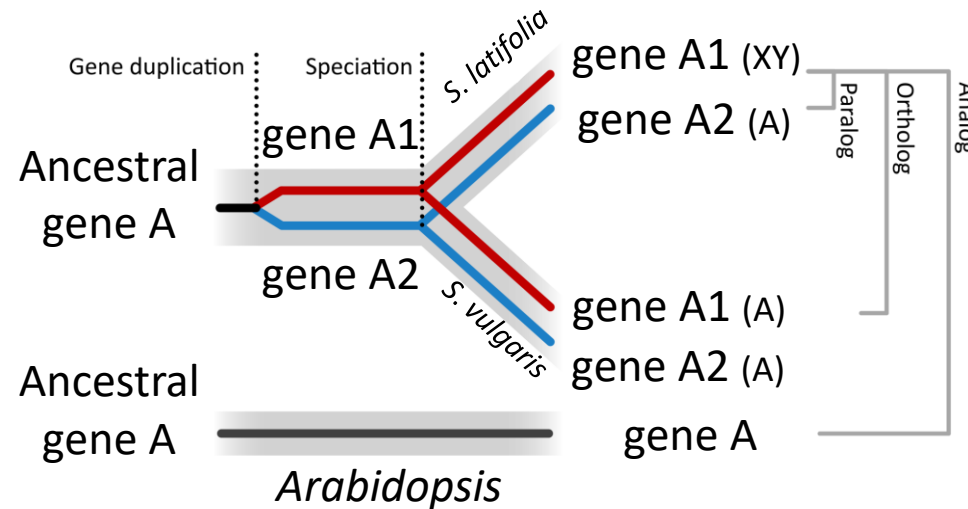
- **Ancestrální část Z chromozomu má nižší expresi a nižší úroveň H4K16ac („*C. elegans* like DC“)**
- **Nové neo-Z oblasti jsou up-regulovány = jsou obohaceny H4K16ac („*Drosophila* like DC“)**
- **Mechanismus rozporující evoluční hypotézu – nové pohl. chromozomy získávají DC mechanismus ancestrálního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



DC mechanismus u rostlin – mladé pohlavní chromozomy jsou ideálním modelem pro studium kompenzačního mechanismus



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



Muyle *et al.* 2022

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

Děkuji za pozornost!