

Epigenetická informace

Mitoticky i meioticky děděné změny genové exprese, které nesouvisí se změnou primární struktury DNA

Epigenetickou kontrolu zprostředkovávají

- modifikace makromolekul; DNA a histonů:

METHYLACE DNA

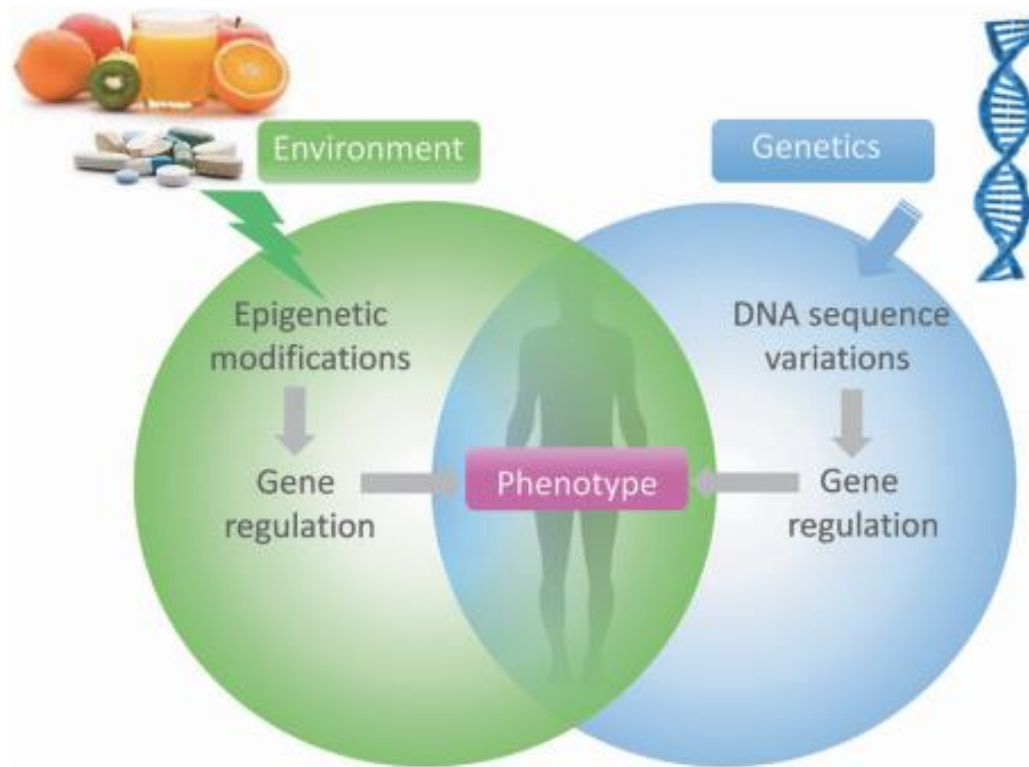
MODIFIKACE (methylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinace) histonových proteinů

- malé a nekódující molekuly RNA
- architektura chromatinu



Regulace aktivity a exprese genů během vývoje a diferenciaci, reakce na změněné podmínky

Spojka mezi genotypem a fenotypem



Ariv et al., Hypertension Res 2019

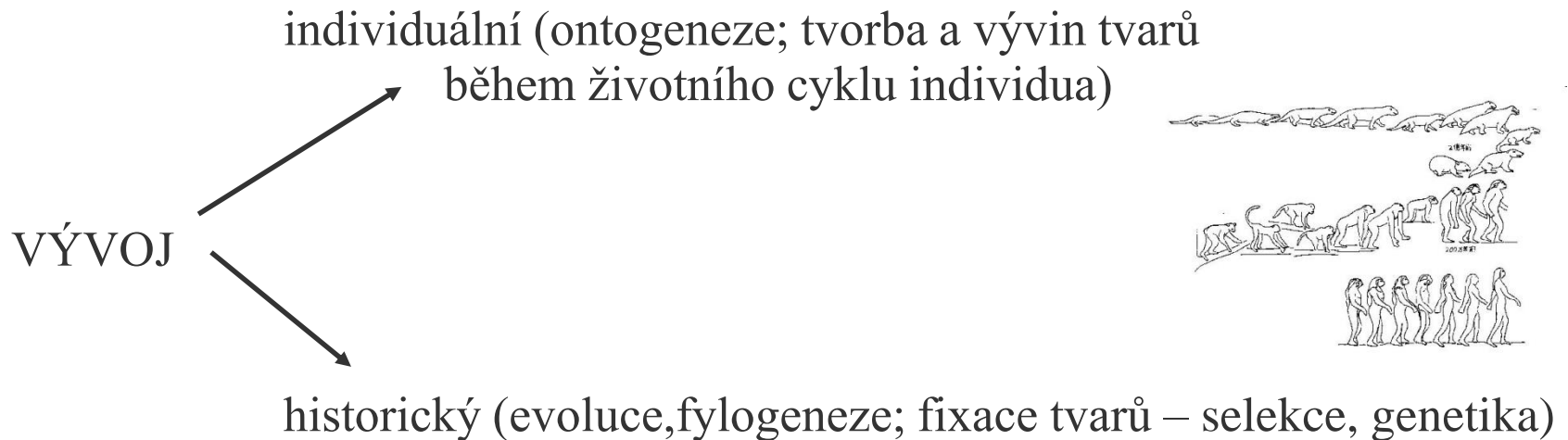
Historie termínu epigenetika

Epigeneze – Aristoteles, 384-322 př. n. l.

individuální vývoj organismů souvisí s postupným růstem jejich komplexity (individuální tvorba tvarů během ontogeneze)

X

Proreformismus – ontogeneze je řízena předem danými strukturami



Historie termínu epigenetika

Jean Baptiste Lamarck (1744-1829):

- první pokus o výklad evoluční teorie
- příroda se pod tlakem podmínek vyvíjí – teorie adaptivní evoluce
- adaptivní změny jsou dědičné (teorie dědičnosti získaných znaků)

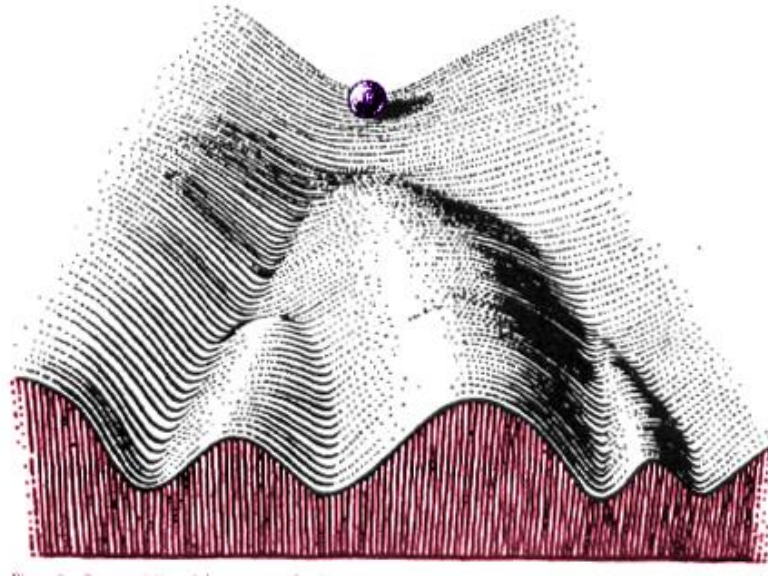
August Weismann (1834-1914):

- sledování dědičnosti indukovaných změn v somatické dráze
- teorie divergence zárodečné a somatické dráhy – Weismannova bariéra

Conrad Hal Waddington (1905-1975):

- „epigenetika“, výsledná podoba organismu není předem absolutně daná, vzniká postupnými kreativními procesy
- „epigenetická krajina“

epigenetická krajina



<http://chreoda.nosquare.net/?page=chreoda&action=history&time=20080812-1446.bak>

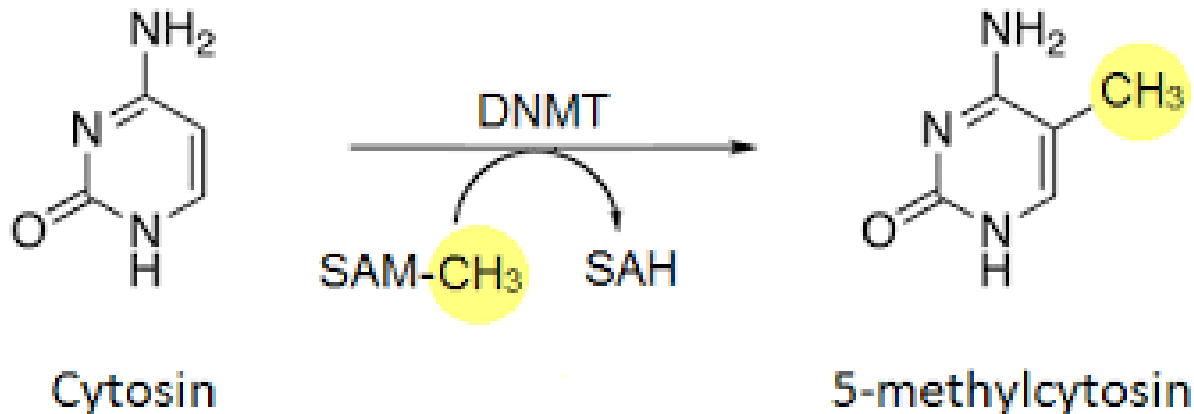
Richard B. Goldschmidt (1878-1958)

- fenotypová změna souvisí s vlivy prostředí
- vzniká jen omezený počet fenotypů

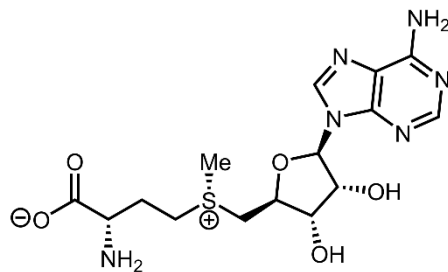
Methylace DNA

Modifikace cytosinu v poloze 5, nejčastější modifikace DNA u eukaryot

Postreplikativní modifikace



(B. Vyskot, Epigenetika 2010)



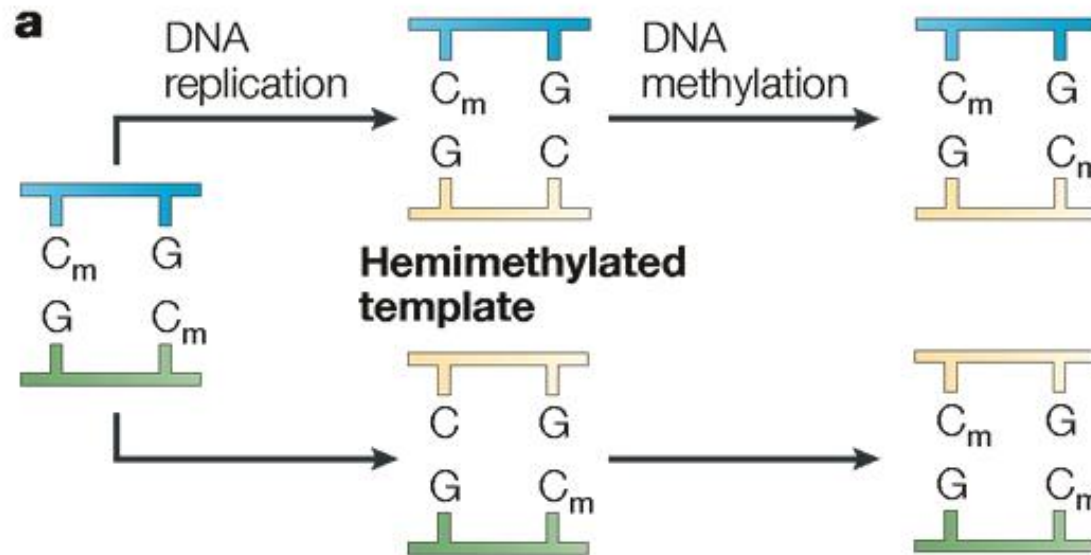
SAM – S-adenosyl-methionin; v transmethylační reakci se konvertuje na S-adenosyl-homocystein

Methylace DNA

Distribuce methylace v genomech:

Methylace C v **symetrických** sekvencích – klíčové pro dědičnost methylačního obrazu

- CpG (dublety)
- CpHpG (triplety; rostliny; H = A,T,C)



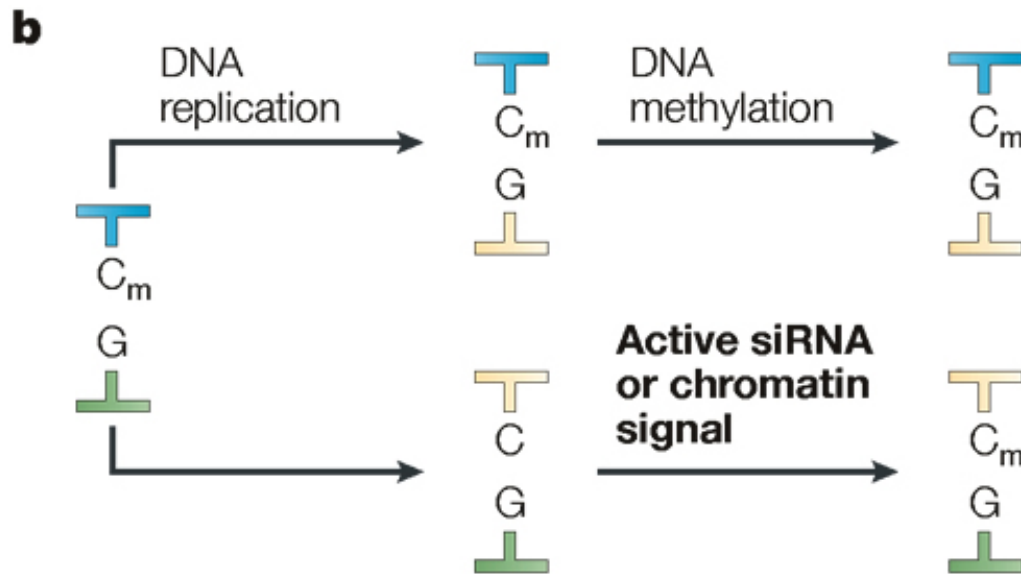
Methylace DNA

Distribuce methylace v genomech:

Methylace C v **symetrických** sekvencích – klíčové pro dědičnost methylačního obrazu

- CpG (dublety)
- CpNpG (triplety; rostliny)

Methylace C v **asymetrických** sekvencích (rostliny, omezeně u živočichů)

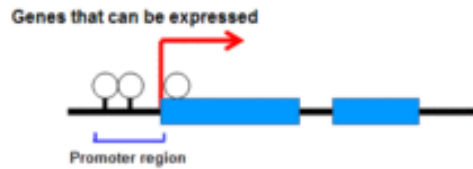


Chan et al., Nat Rev Genet 2005

Methylace DNA a exprese genů

UMLČENÍ GENU

TRANSKRIPČNÍ



Genes that can be expressed

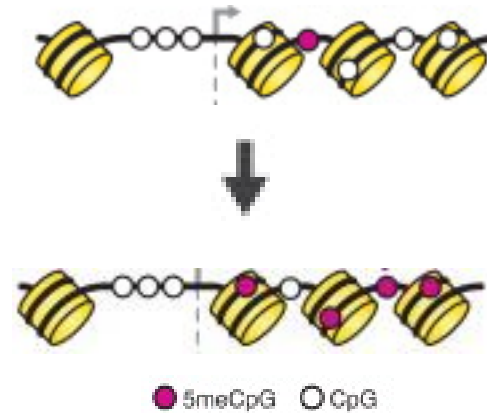


● M Methylated
○ Unmethylated

- inaktivní promotor (žádný transkript nebo pouze malé množství)

- methylace DNA v oblasti promotoru

POSTTRANSKRIPČNÍ

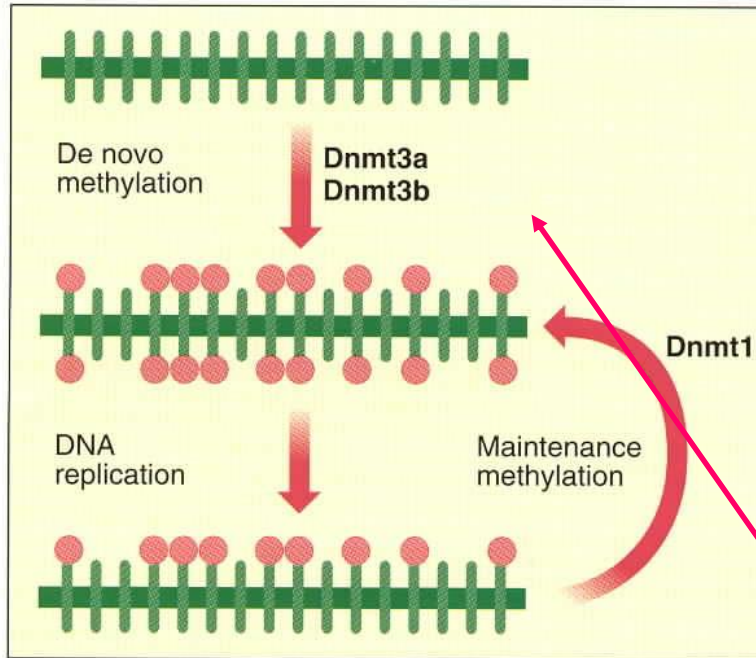


- normální transkripční aktivita promotoru

- nestabilní transkript

- methylace DNA v transkribované oblasti (hlavně na 3' konci genu)

Živočišné DNA methyltransferázy



(Bird A, Science, 1999)

Udržovací (maintenance):
methylace hemimetylovaných
vláken po replikaci DNA;
cytosiny v symetrických
motivech (správný embryonální
vývoj, imprinting, inaktivace chr. X)

de novo: methylace dosud
nemetylovaných úseků;
musí existovat podnět (třeba
přítomnost regulačních molekul
RNA-dokázáno pouze v rostlinách;
interakce DNA-DNA v repetičích;
neobvyklé struktury DNA)

Dnmt2 - u savců, rostlin;

Drosophila – slabá non-CG methylace v časných
fázích vývoje;

S. pombe – mutace, kóduje nefunkční

protein, ale je exprimován

2006 - v savčích buňkách
methyluje tRNA (Asp)

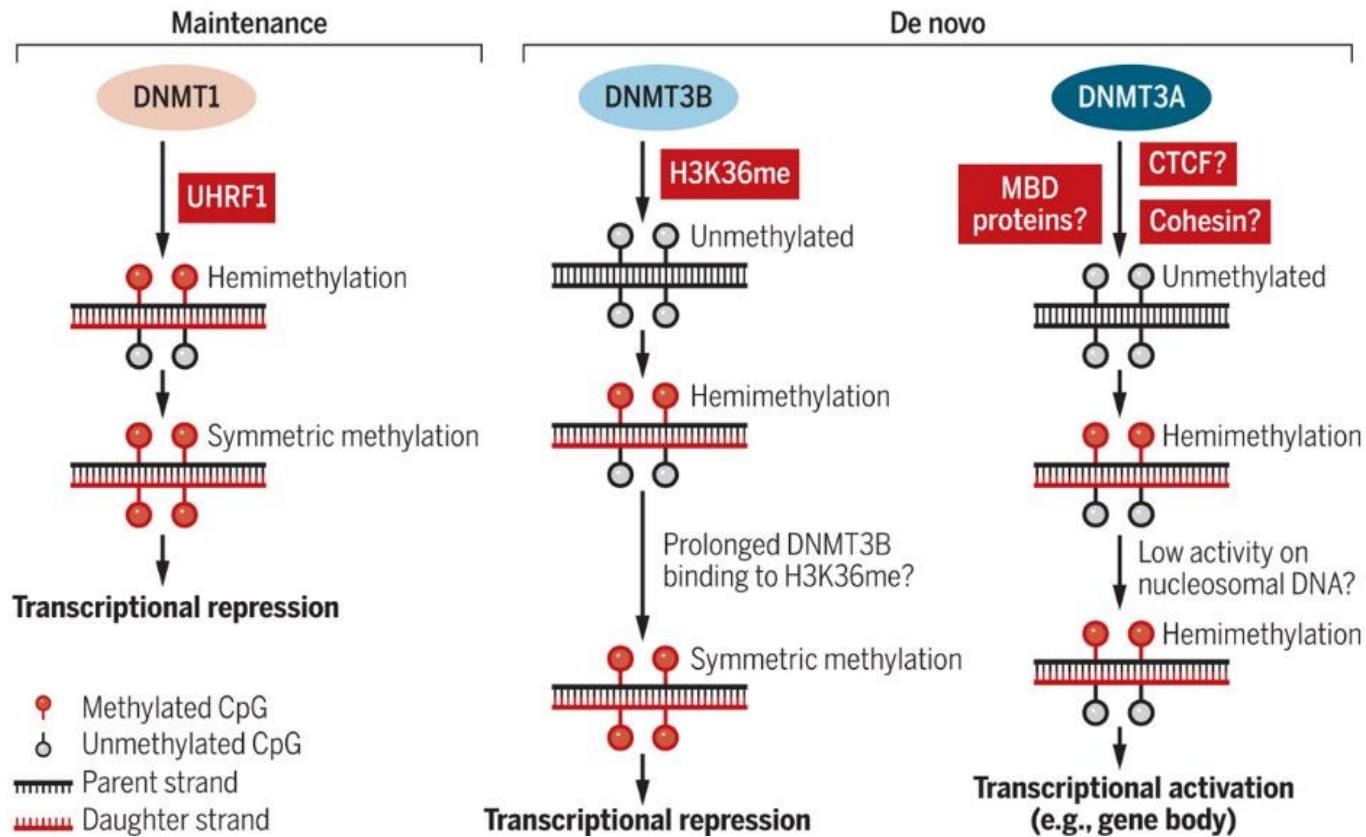
DnmtL – DNA methyltransferázový motiv, katalyticky inaktivní

Funkční kooperace s Dnmt3a/b, nezbytná pro genový imprinting

Živočišné DNA methyltransferázy

The fate of hemimethylated DNA

After DNA replication, hemimethylated CpGs are converted to symmetrical methylation by DNMT1. De novo symmetric methylation by DNMT3B is possibly mediated by H3K36me binding. DNMT3A maintains hemimethylated DNA at specific loci, potentially marked by CTCF-cohesin and MBD proteins.



Rostlinné DNA methyltransferázy

MET1 (Methyltransferase 1) - udržovací methylace cytosinů v dubletech CG; homolog Dnmt1

CMT3 (Chromomethylase 3) - methylace cytosinů v tripletech CHG; unikátní pro rostliny

DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2) - *de novo* methylace cytosinů ve všech sekvenčních motivech, musí existovat permanentní stimul – RNA?;

homolog Dnmt3 - jinak řazené podjednotky – příčina odlišné substrátové specifity?

DRM3 – VI, IX, X, I-V

Dnmt3 – I-VI, IX, X

(DDM1 (Decrease in DNA methylation 1) – kóduje protein, který je součástí komplexu remodelujícího chromatin, role v udržování CG i non-CH methylace)

Biologická role CpG a non-CpG methylace u rostlin

CG: zajišťuje stabilní epigenetický obraz

A.thaliana mutanty deficientní v udržování methylace CG – aktivace alternativních epigenetických mechanismů – non-CG methylace, H3K9Me2, architektura jádra (Mathieu O. et al, Cell 2007)

Nefunkční MET1 – poruší se celý epigenetický obraz, fenotypické defekty – přetrvávají i po obnovení funkce enzymu.



Biologická role CpG a non-CpG methylace u rostlin

CG: zajišťuje stabilní epigenetický obraz

A.thaliana mutanty deficientní v udržování methylace CG – aktivace alternativních epigenetických mechanismů – non-CG metylace, H3K9Me2, architektura jádra (Mathieu O. et al, Cell 2007)

Nefunkční MET1 – poruší se celý epigenetický obraz, fenotypické defekty – přetrvávají i po obnovení funkce enzymu.

Nefunkční CMT3 nebo DRM2 – bez fenotypu

Nefunkční CMT3 a DRM2 - fenotypové změny

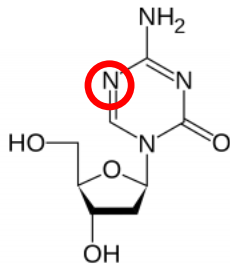
po obnovení funkcí enzymů se methylační i fenotypový obraz vrací k normálu

Demethylace DNA

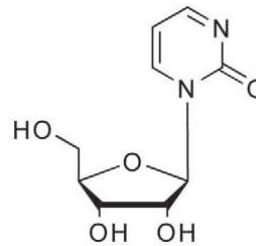
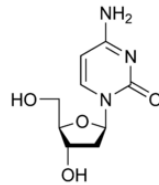
1. PASÍVNÍ – ne-funkce udržovacích methyltransferáz

Inhibitory DNA methyltransferáz

Analogy cytosinu:

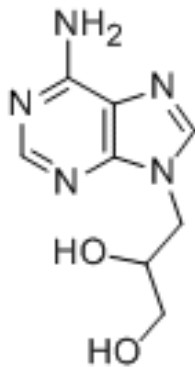


5-aza-deoxycytidine

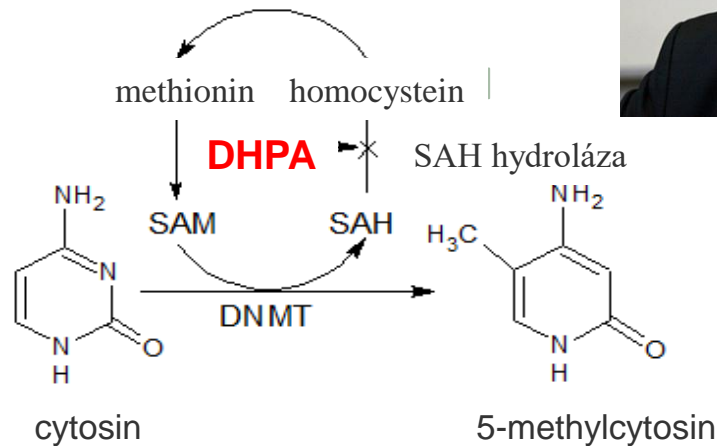


zebularine

DHPA:



(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin
(inhibitor SAH-hydrolázy)



Prof. Antonín Holý

Demethylace DNA

1. PASÍVNÍ – ne-funkce udržovacích methyltransferáz

2. AKTIVNÍ (v rostlinách)

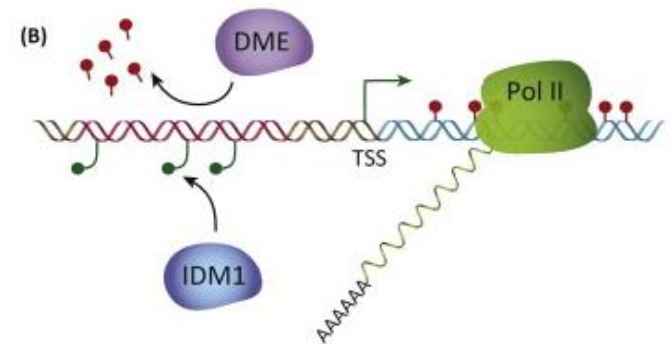
DEMETER (DME)

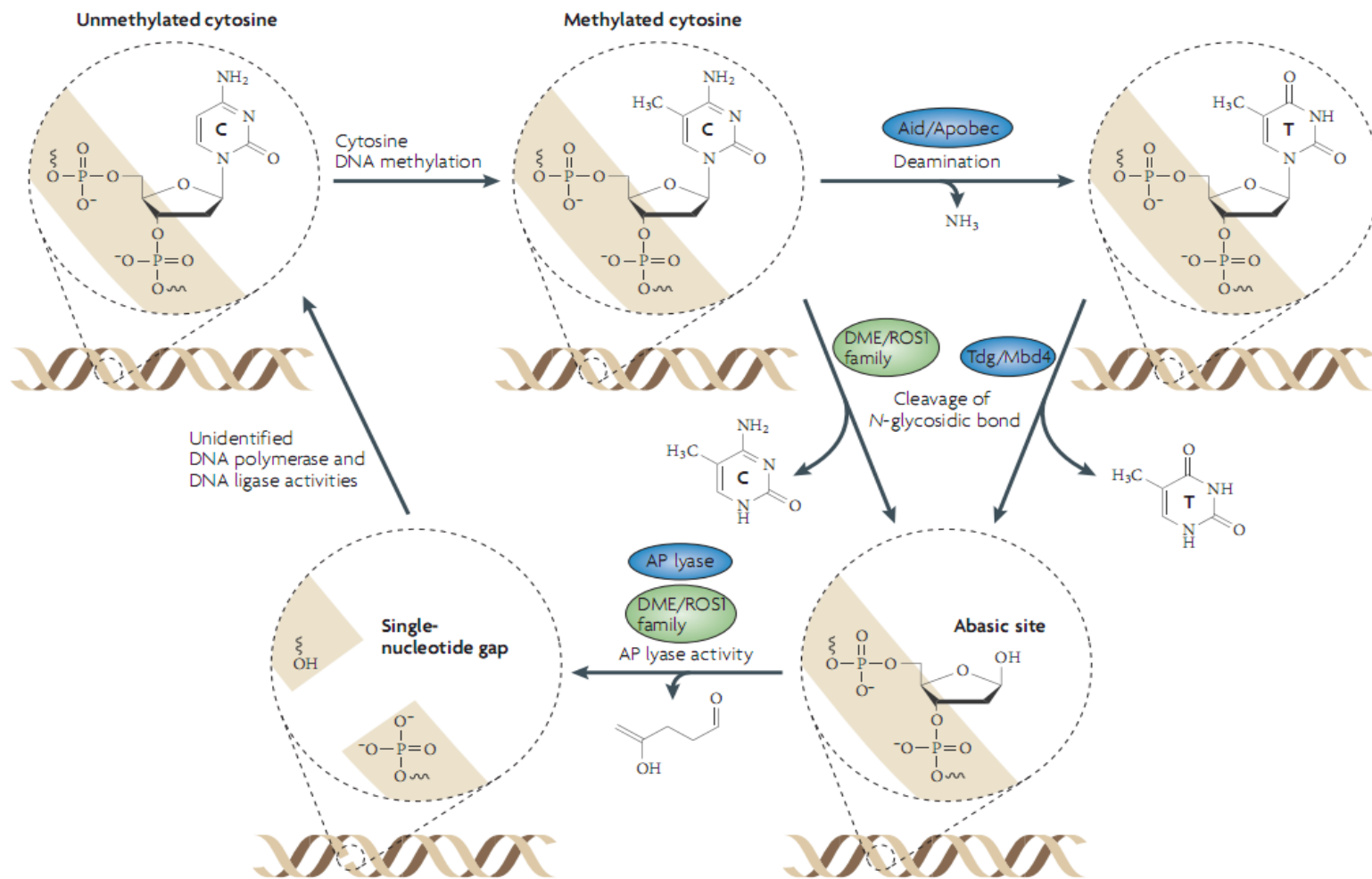
REPRESOR OF SILENCING (ROS)

DNA glykosylázová doména – odstraní 5-mC, lyáza otevře vlákno.
Polymerázy a ligázy doplní mezeru.

DME – vývoj rostliny; kontroluje parentální imprinting
genů v endospermu – hypomethylace promotorů maternálních
alel genů *MEA* (regulátor vývoje endospermu) a *FWA*
(transkripční faktor, podílí se na kontrole doby kvetení).

ROS – uvolňuje TGS transgenů s hypermetylovanými
promotory

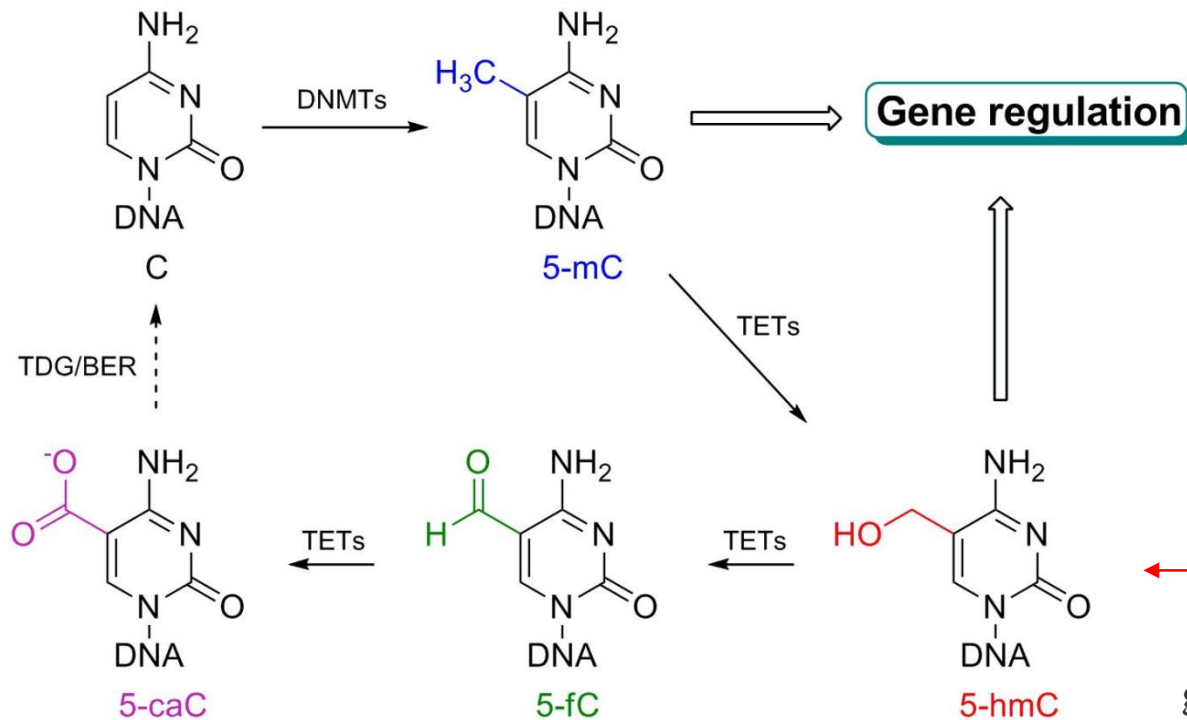




Demethylace DNA

1. PASÍVNÍ – ne-funkce udržovacích methyltransferáz

2. AKTIVNÍ (v živočišných buňkách)



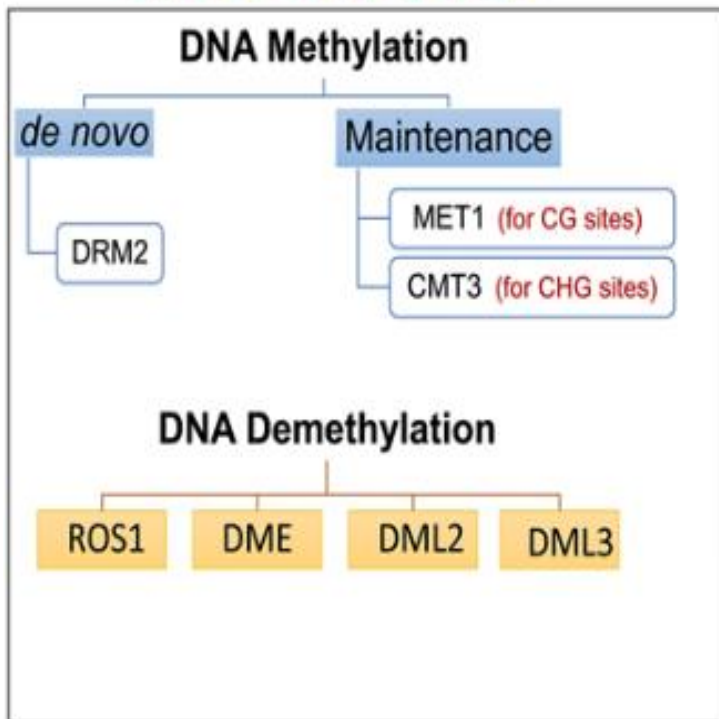
TET – methylcytosine dioxigenase

TDG /BER
thymin DNA glycosylase /
base excision repair

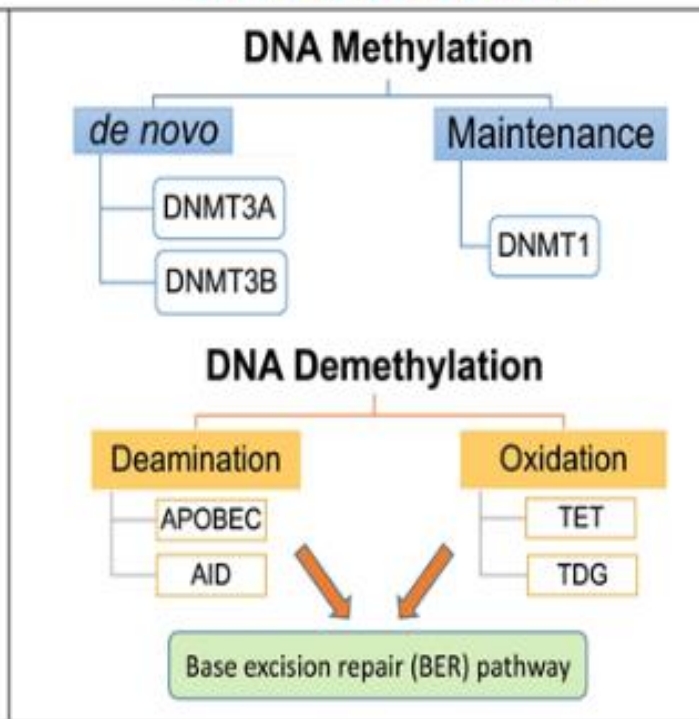
5 – hmC
2006 – objeven v myších
a lidských mozcích

Funkce (?) v regulaci exprese genů, korelace s acetylací histonů (pozitivní epigenetické značka)

Plant

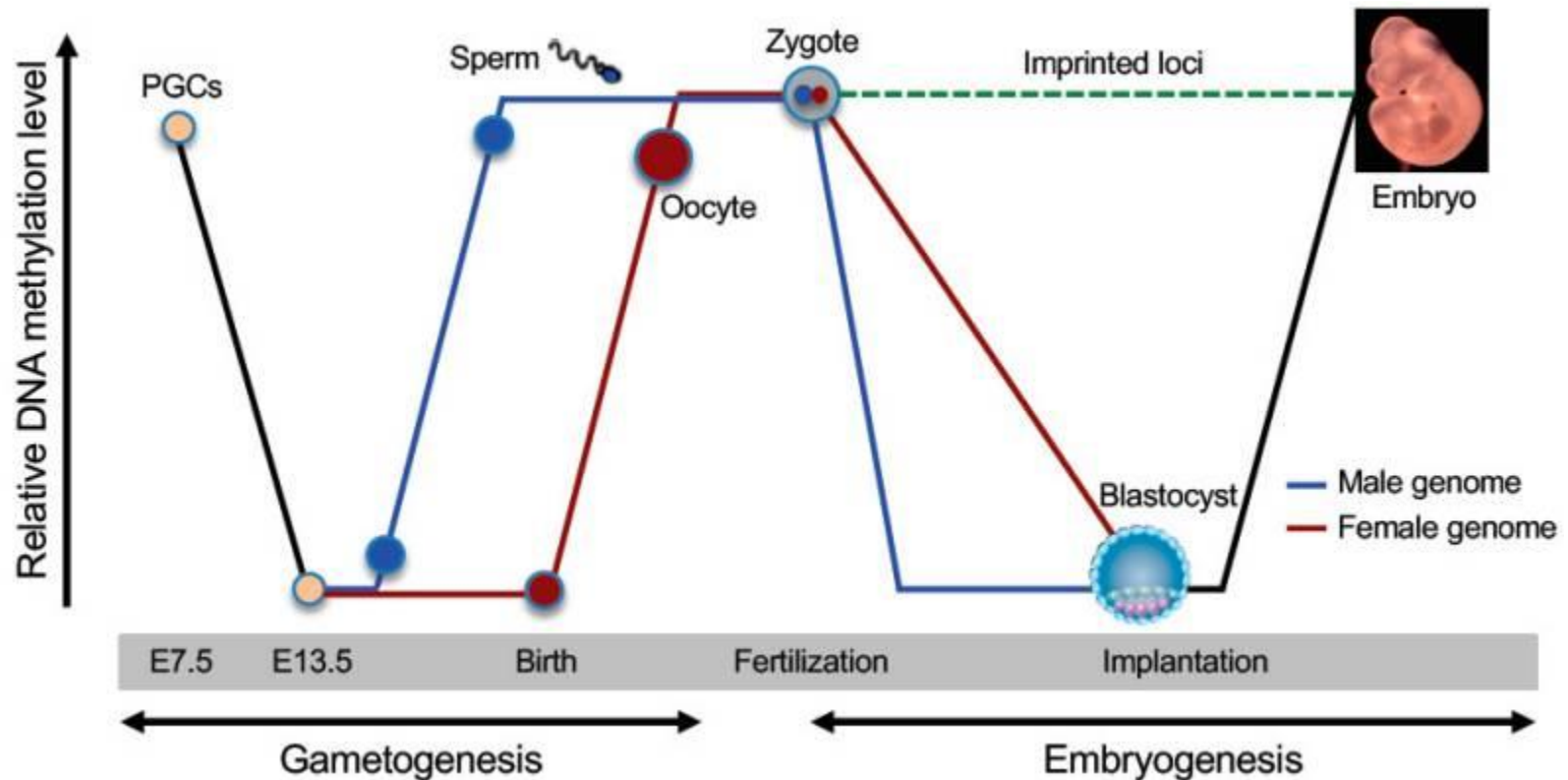


Mammals



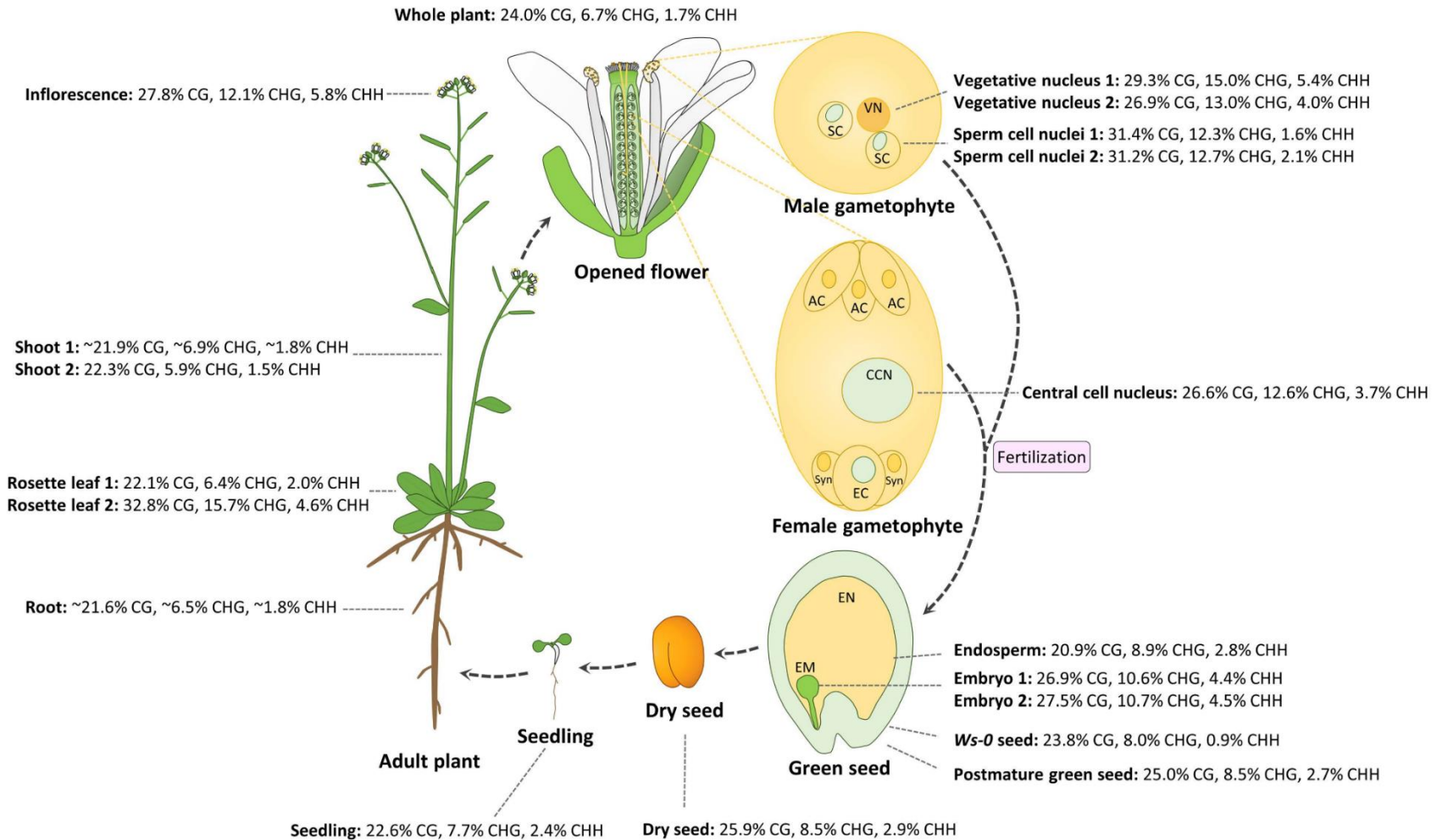
(Elhamamsy, Cell Biochem Funct 2016)

Změny methylace DNA během vývoje - savci



(Zeng and Chen, Genes 2019)

Změny methylace DNA během vývoje - rostliny



(Han et al., Plants 2019)

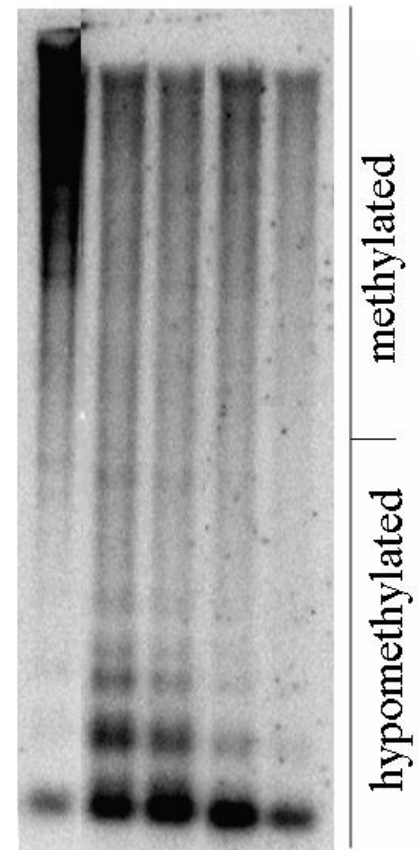
METODY STUDIA METHYLACE DNA

- Digestce methylačně citlivými restričními endonukleázami**
- v rozpoznávací sekvenci mají cytosin, neštěpí, pokud je methylován

CG: HpaII mC^mCGG
CfoI G^mCGC
SmaI CC^mCGGG
TaiI A^mCGT

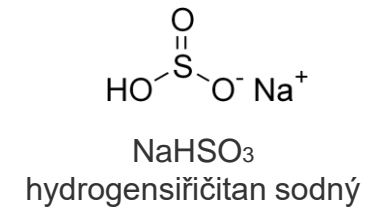
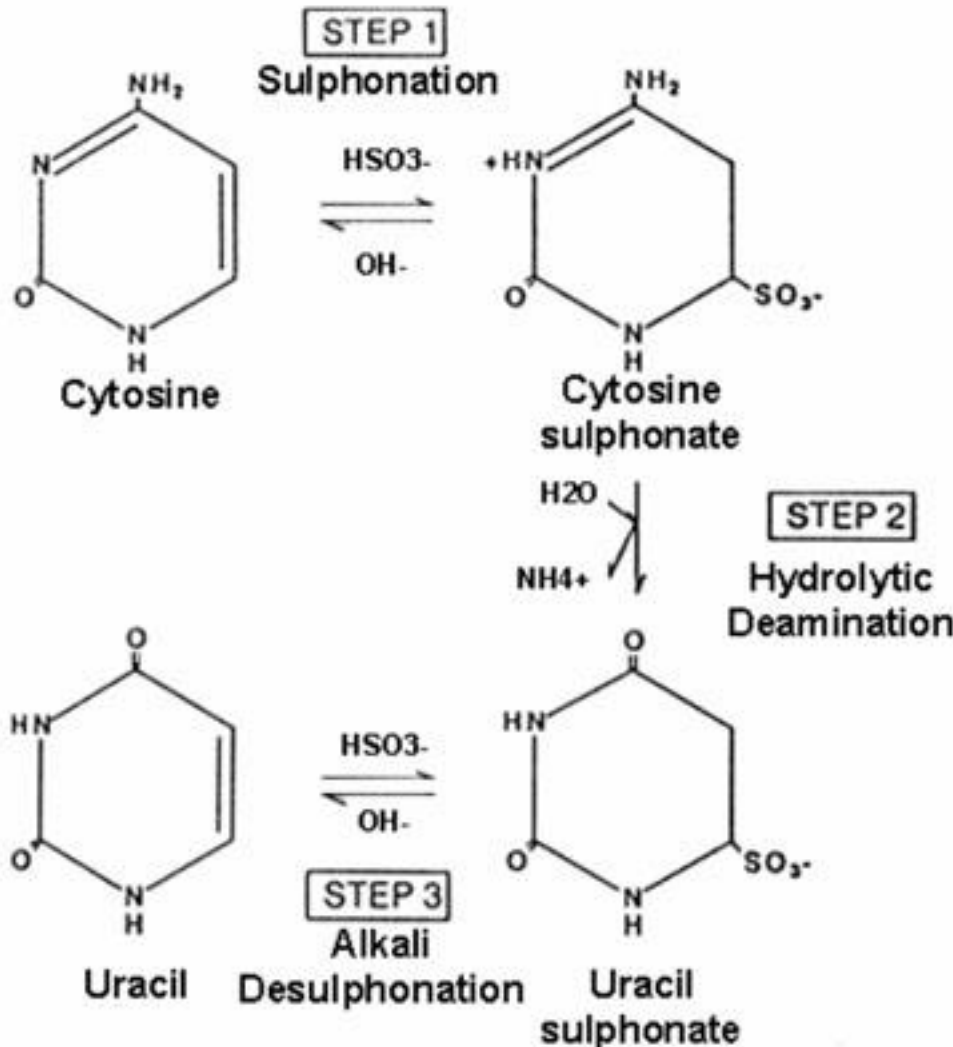
CNG: MspI $mCCGG$

CHH: Sau96I $GG(A/T)^mC^mC$
(záleží na tom, co v sekvenci následuje)



Metody studia methylace DNA

2. Modifikace DNA bisulfitem - cytosiny kovertovány na uracily, ¹⁴C nereagují.



Metody studia methylace DNA

2. Modifikace DNA bisulfitem

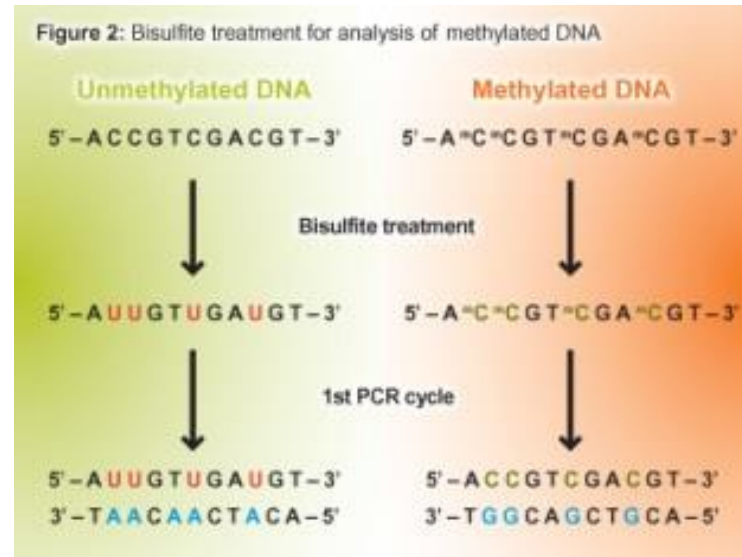
cytosiny kovertovány na uracily,
^mC nereagují.

Modifikovaná DNA je namnožena pomocí PCR, uracily se párují s adeninem jako thyminy. Primery musí amplifikovat modifikovaný i nemodifikovaný templát; amplifikuje se každé vlákno zvlášť – nejsou komplementární.

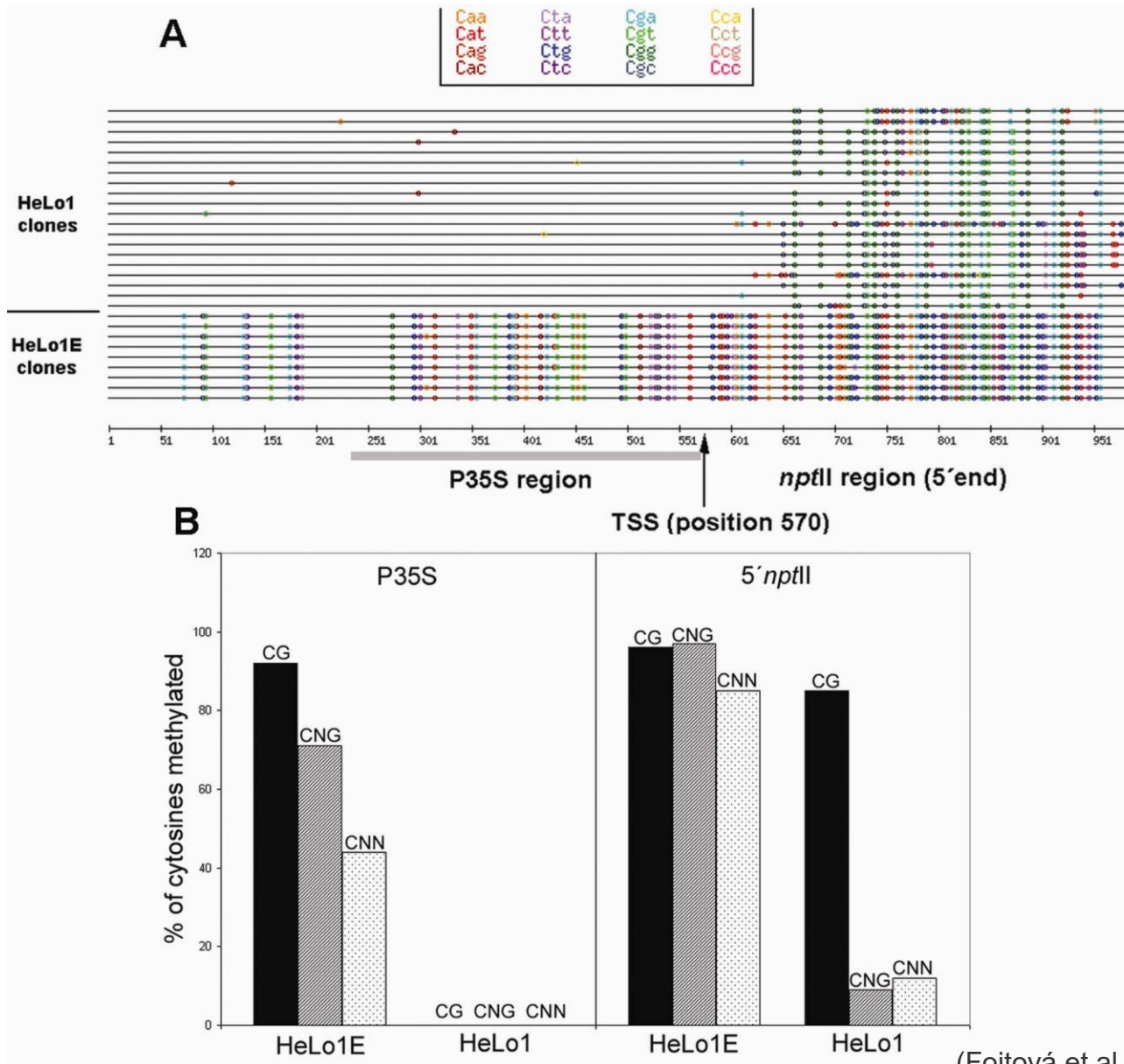
PCR produkt se klonuje a sekvenuje – cytosiny jsou pouze tam, kde byly původně ^mC.

Výhoda analýzy:

- informace o lokalizaci
- methylovaných cytosinů v celé sekvenci, ne pouze v konkrétním restrikčním místě



Metody studia methylace DNA



3. Sekvenování DNA po modifikaci bisulfitem, imunoprecipitace pomocí protilátek proti ^mC nebo afinitní purifikace pomocí ^mC vazebného proteinu

Výsledky analýzy genomu *Arabidopsis*:

- cca 20% cytosinů v genomu je methylovaných
- nejvíce ^mC je v transpozonech a repetitivních sekvencích
- nejméně methylované jsou promotory endogenních genů
- asi 1/3 genů obsahuje „body methylation“ (CG místa na 3' konci kódující oblasti)

Modifikace histonů

Methylace - např. lysin v poloze 9 na histonu H3 (H3K9)

Distribuce euchromatinových a heterochromatinových značek v *Arabidopsis thaliana* a myši (podle Fransz *et al.*, 2006)



Modifikace	Stupeň	<i>A. thaliana</i>		myš	
		euchromatin	heterochromatin	euchromatin	heterochromatin
H3K9	mono	-	+	+	-
	di	-	+	+	-
	tri	+	-	-	+
H4K20	mono	-	+	+	-
	di	+	-	+	-
	tri	+	-	-	+
5m-C		-	+	-	+



Jde o druhově- a dokonce lokus-specifické, dynamické modifikace

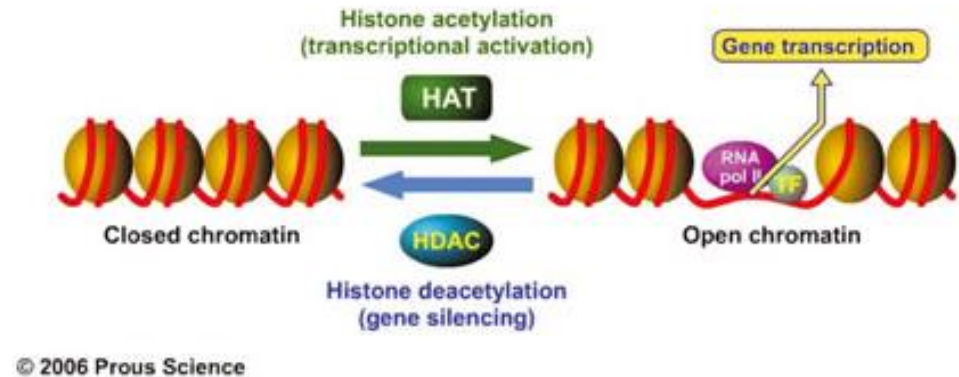
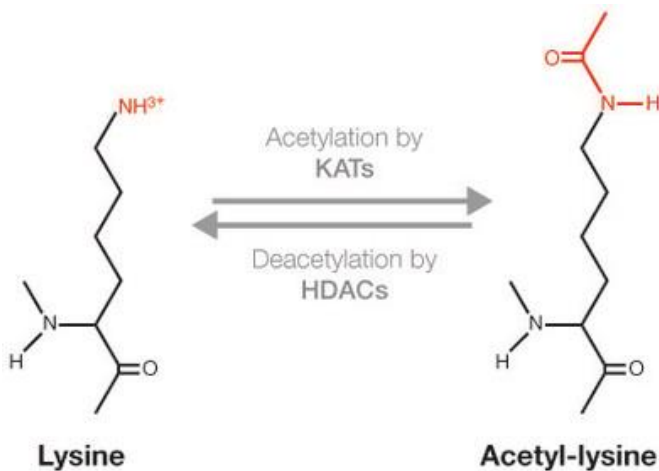
Modifikace histonů

Acetylace – přidavek acetylové skupiny kompenzuje kladný náboj lysinových zbytků – oslabení interakcí mezi DNA a histony

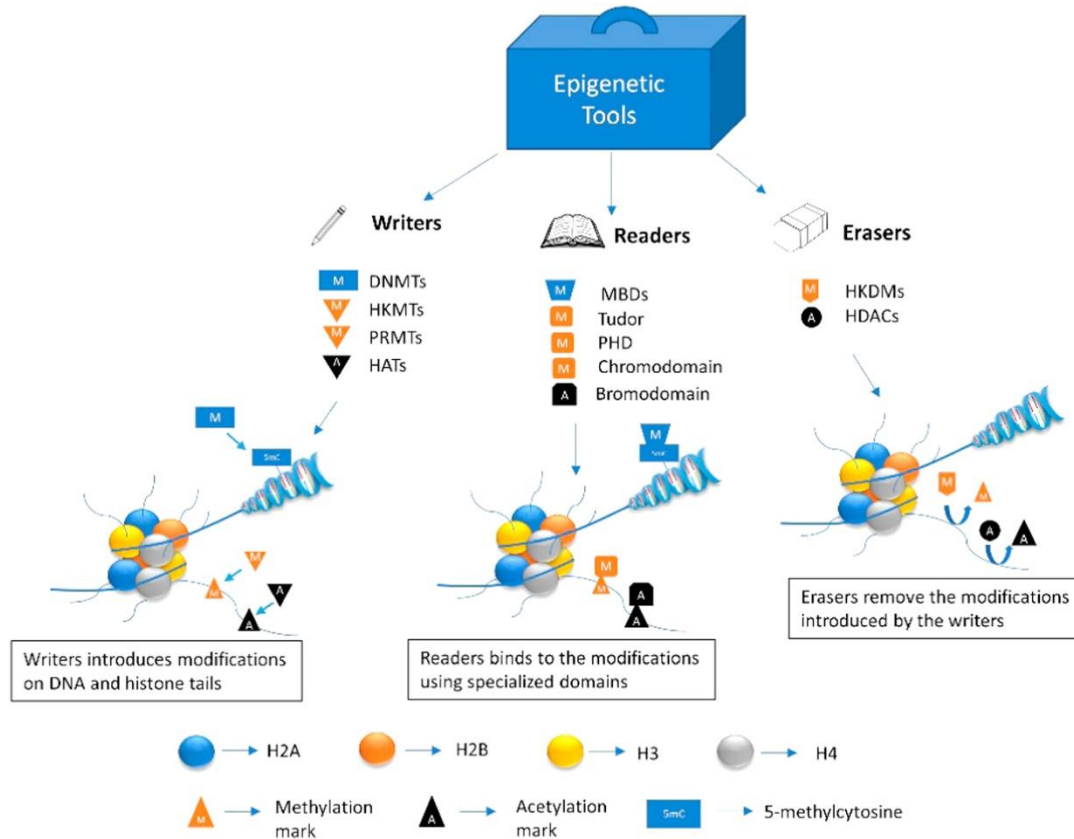


Acetylovaný chromatin – euchromatin
Deacetylovaný chromatin – heterochromatin

**Enzymy: histon acetyltransferázy
histondeacetylázy**



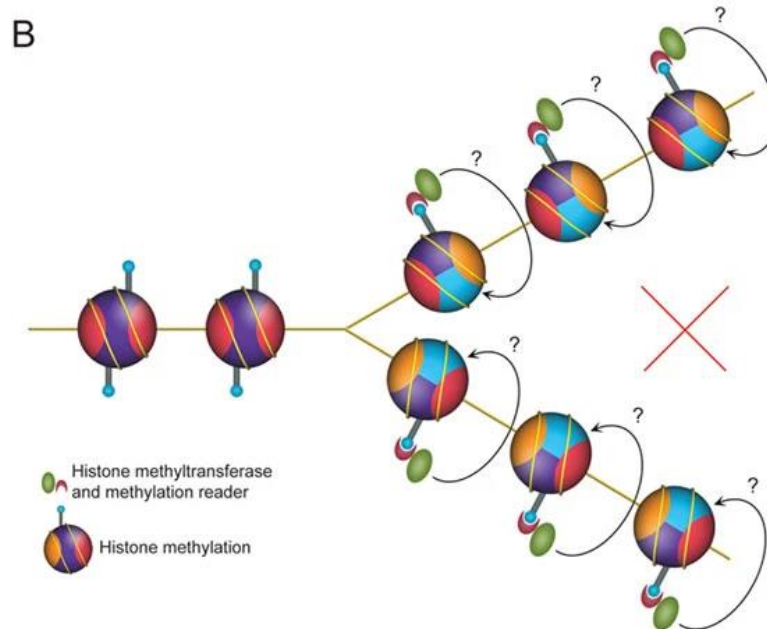
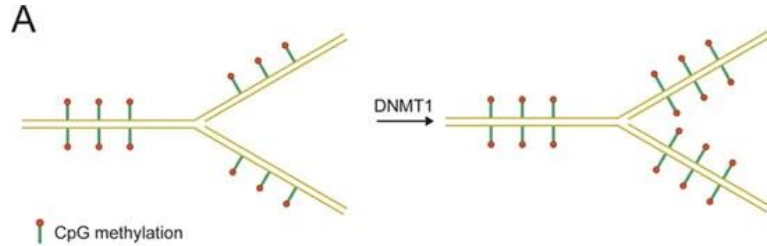
Writers, readers, erasers



Biswas and Rao, Eur J Pharmacol 2018

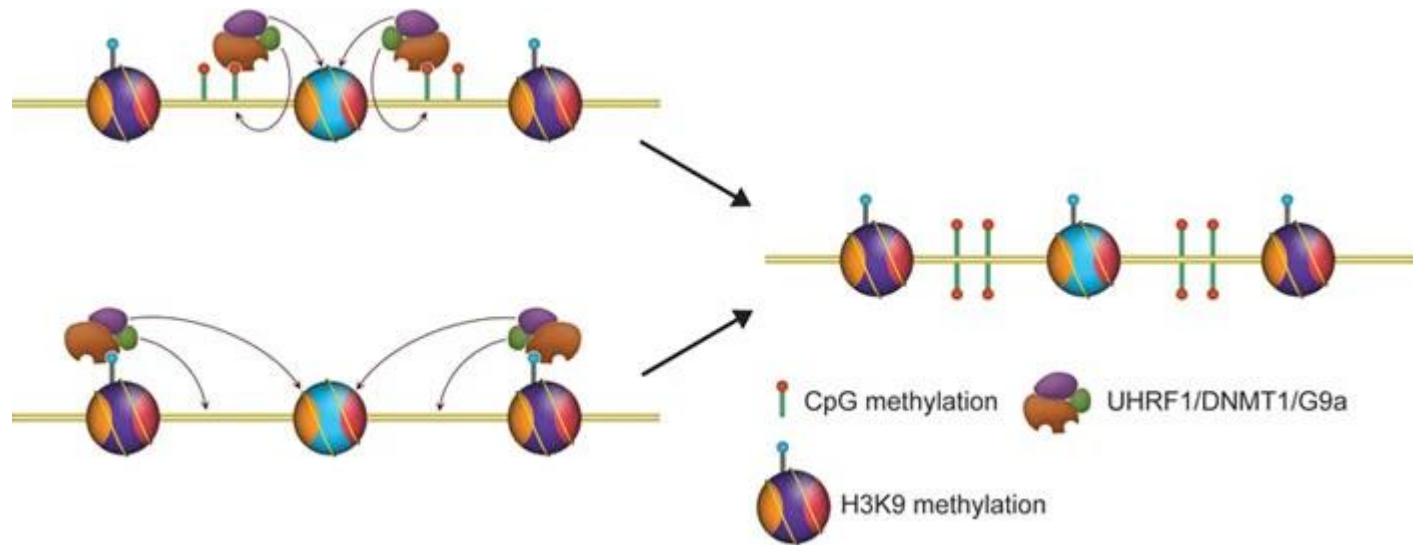
Epigenetic tools. A representation of epigenetic writers, readers and erasers. These enzymes and protein domains carry out most of the epigenetic modifications on DNA and histone tails. Apart from the enzymes and protein domains highlighted here, other enzymes and protein domains are also available. DNMTs – DNA methyltransferases, HKMTs – Histone lysine methyltransferases, PRMTs – Protein arginine methyltransferases, HATs – Histone acetyltransferases, MBDs – Methyl-CpG-binding domains, PHD – Plant homeodomain, HKDMs – Histone lysine demethylases, HDACs – Histone deacetylases.

Dědičnost histonových modifikací



semikonzervativní model

Dědičnost histonových modifikací



„piggy back“ model

Vztah mezi methylací DNA a modifikacemi histonů

1. Heterochromatinová modifikace H3K9me2 rekrutuje další enzymové aktivity (histodeacetylázu, HP1, DNA methyltransferázy) —————> tvorba kompaktního uspořádání a fixace heterochromatinového stavu
2. V *Arabidopsis thaliana* byly vyřazeny geny pro histon methyltransferázy (SUVH4, SUVH5, SUVH6) —————> aktivace transpozonů spojená s jejich hypomethylací
3. Proteiny obsahující Jumonji doménu jsou schopny odstraňovat methylové skupiny z histonů. V *Arabidopsis* byl identifikován protein IBM1 s Jumonji doménou, který reguluje (snižuje) hladinu methylace CNG v transkribovaných oblastech
4. „piggy – back“ model vs. *de novo* methylace DNA řízená modifikacemi histonů

Biologická úloha RNA

mRNA – kopíruje genetickou informaci z molekuly DNA, přenáší ji do místa, kde dojde k překladu do struktury proteinu

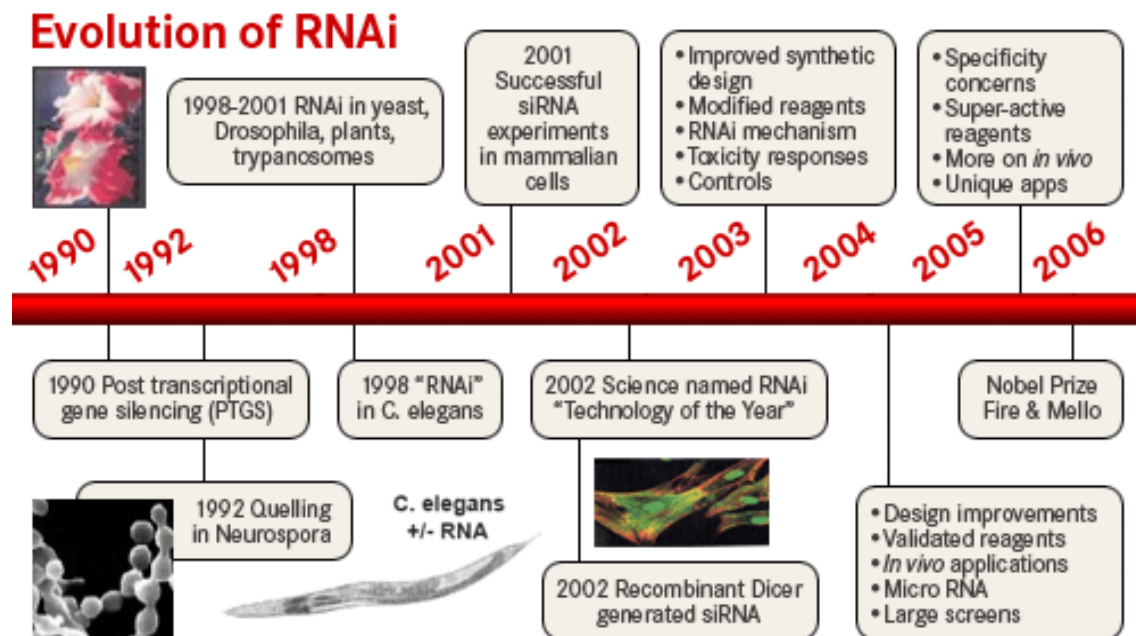
tRNA – překládá kód sekvence bází do sekvence aminokyselin. cca 80 nukleotidů, koncová sekvence –CCA, na ni se váže příslušná AK

rRNA – tvoří (s proteiny) ribozom.
Prokaryota: 5S, 16S, 23S
Eukaryota: 5S, 5.8S, 18S, 28S

ribozym – (**Ribonucleic acid enzyme**), RNA s katalytickou funkcí
Nobelova cena za chemii (1989)
23S rRNA ve velké podjednotce ribozomu katalyzující syntézu peptidové vazby (peptidyl transferáza)
RNázaP – štěpí RNA, maturace tRNA
→ představa RNA světa v jistém stádiu evoluce, kdy byly molekuly RNA hlavními biologickými katalyzátory

RNA INTERFERENCE - SHRNUTÍ

Dlouhá dvouvláknová RNA (**dsRNA**; >200 nt) může umlčet expresi cílových genů v různých organismech (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, rostliny). Dlouhé dsRNA vstupují do metabolické dráhy nazývané RNA interference (**RNAi**). Dvouvláknová RNA je v reakci katalyzované enzymem **Dicer** štěpena na úseky dlouhé 20-25 nukleotidů, tzv. krátké interferující RNA (**siRNA**). siRNAs jsou začleněny do komplexu obsahující enzymy s ribonukleázovou aktivitou zvaného „RNA-induced silencing complexes“ (**RISC**). Dvouvláknové siRNA jsou rozvolněny, čímž dochází k aktivaci komplexu. siRNA navádějí RISC k molekulám RNA s komplementární sekvencí a dochází ke štěpení těchto molekul, a to blízko středu úseku, který je navázán k vláknu siRNA.



<http://courses.biology.utah.edu/bastiani/3230/DB%20Lecture/Lectures/WormRNAi.html>

**Začalo to červem.....,
ale na počátku byly kytky**

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998 → **PTGS**

Guo, Kempthues, 1995

Fire, Mello, 1998 → **RNAi**

Vlastnosti procesu RNA interference:

* vlastní interferující molekulou je dsRNA (ne antisenseRNA)

* efekt je vysoce specifický

* velice potentní (několik molekul dsRNA v buňce stačí pro vyvolání efektivní odpovědi)

* mobilní (je možno indukovat interferenci v buňkách a tkáních vzdálených od místa injektáže)



KAREN TWISS/HUMPHREYS

A lighter shade of failure? Attempts to deepen the purple hue of petunias by genetic modification produced unexpected results. Rather than heightening pigmentation, an inserted gene switched colour production off, creating variegated blooms (inset).



BLANK (2012), 279-280 (2010)

PTGS is now thought to be an ancient self-defence mechanism evolved to combat infection by viruses and transposons

Šlechtění petunií – zintenzivnění barvy květů.

Logický přístup – více kopií příslušného genu (chsA) – vyšší exprese

ALE



žíhané rostliny až zastavení syntézy barviva

KOSUPRESE

-přítomnost transgenu vede k omezení exprese homologních (trans)genů



**Začalo to červem.....,
ale na počátku byly kytky**

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998 —————→ **PTGS**

Guo, Kempfues, 1995

Fire, Mello, 1998 —————→ **RNAi**

Vlastnosti procesu RNA interference:

* vlastní interferující molekulou je dsRNA (ne antisenseRNA)

* efekt je vysoce specifický

* velice potentní (několik molekul dsRNA v buňce stačí pro vyvolání efektivní odpovědi)

* mobilní (je možno indukovat interferenci v buňkách a tkáních vzdálených od místa injektáže)

INJEKTÁŽE *Caenorhabditis elegans* (hád'átka obecné)

1.

+ **asRNA** → **zablokování
exprese**

+ **sense RNA** → **zablokování
exprese**

XX

- analogie s pokusy na petuniích
- saturace translačních faktorů ☹

2.

+ **mix sense a antisense RNA** → **několikanásobně vyšší
umlčovací efekt**

- základem interference je dsRNA
- existence amplifikačního kroku

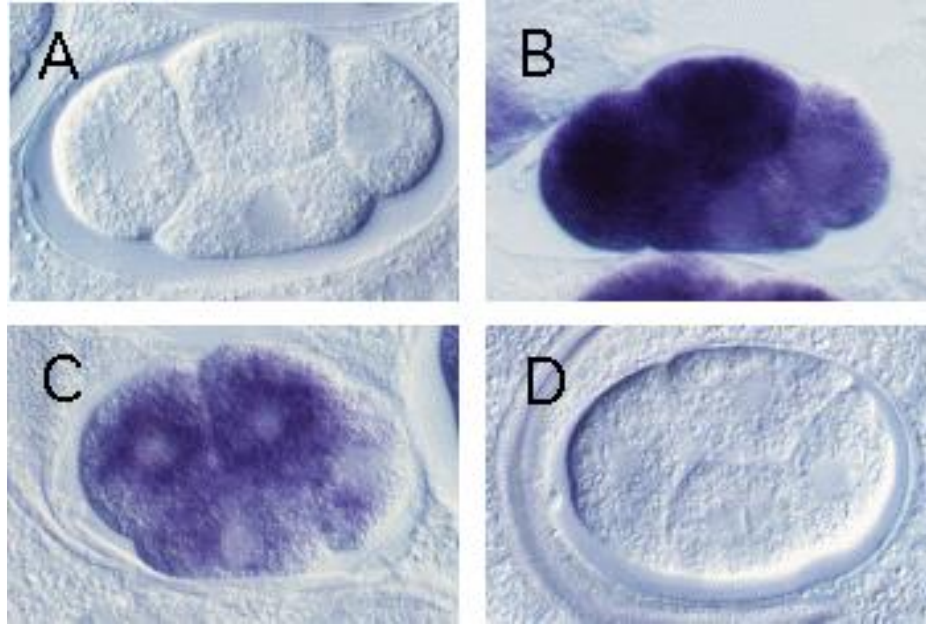


Figure 1. Effects of *mex-3* RNA interference on levels of the endogenous mRNA. Nomarski DIC micrographs show in situ hybridization of 4-cell stage embryos. (A) Negative control showing lack of staining in the absence of the hybridization probe. (B) Embryo from uninjected parent showing normal pattern of endogenous *mex-3* RNA (purple staining). (C) Embryo from parent injected with purified *mex-3* antisense RNA. These embryos (and the parent animals) retain *mex-3* mRNA, although levels may be somewhat less than wild type. (D) Late 4-cell stage embryo from a parent injected with dsRNA corresponding to *mex-3* ; no *mex-3* RNA is detected.

Each embryo is approximately 50 μm in length.

(For details see: Fire et al. '98 "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* " *Nature* 391: 806-11)

**Začalo to červem.....,
ale na počátku byly kytky**

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998 —————→ **PTGS**

Guo, Kempfues, 1995

Fire, Mello, 1998 —————→ **RNAi**

Vlastnosti procesu RNA interference:

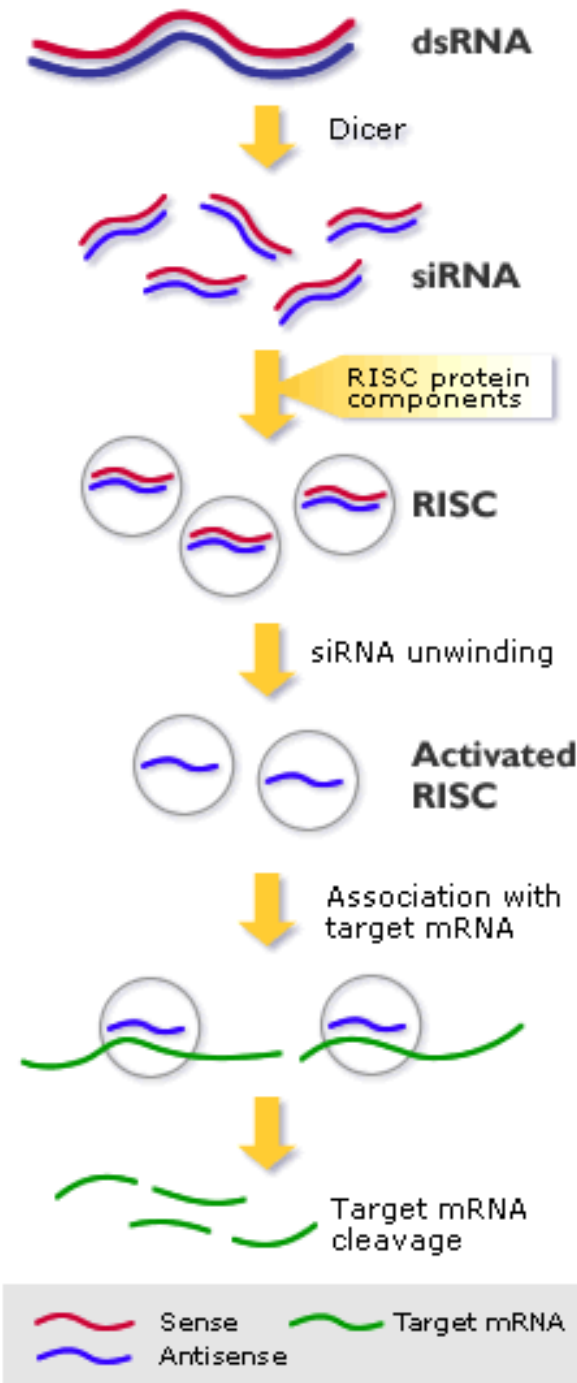
* vlastní interferující molekulou je dsRNA (ne antisenseRNA)

* efekt je vysoce specifický

* velice potentní (několik molekul dsRNA v buňce stačí pro vyvolání efektivní odpovědi)

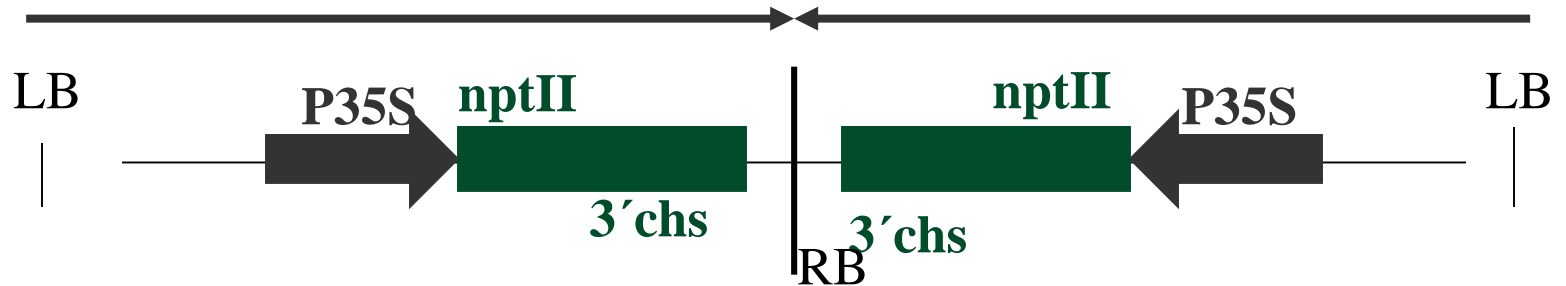
* mobilní (je možno indukovat interferenci v buňkách a tkáních vzdálených od místa injektáže)

Molekulární základ RNAi



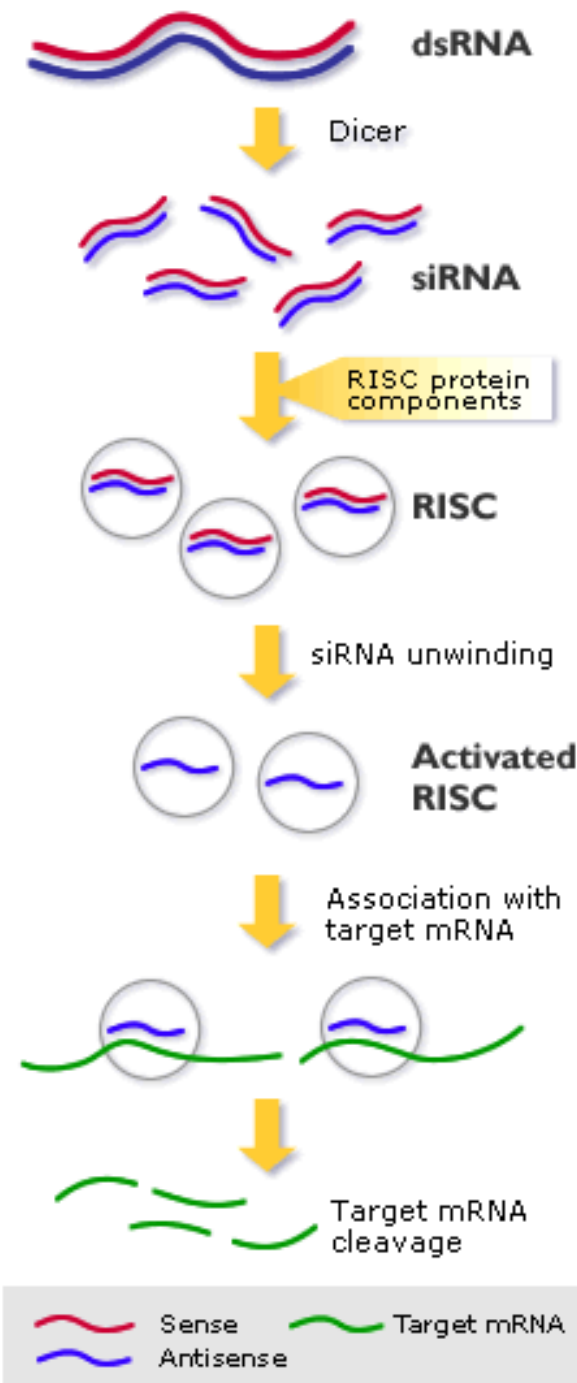
VZNIK dsRNA:

- pokud je transgen uspořádán jako invertovaná repetice – transkripce přes střed IR



- aberantní molekuly mRNA - předčasně terminované, nesprávně procesované - substrát pro RdRP (RNA-dependent RNA polymerase)
 - katalyzuje syntézu dsRNA
 - (nebyla identifikována u *Drosophila*, u obratlovců nedávno)

Molekulární základ RNAi



DICER

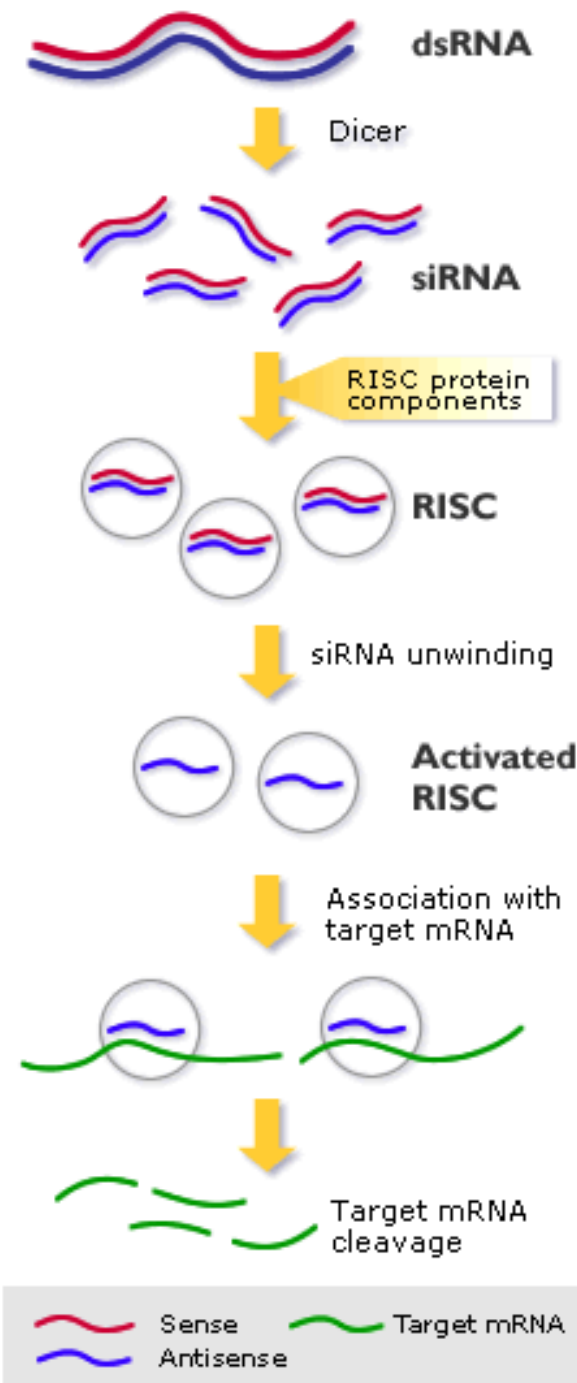
- vlastní iniciátor umlčení, identifikován v *Drosophila*
- RNase III-like enzym (N-konec: helikázová doména, C-konec: RNaseIII doména a dsRNA vazebný motiv)
- štěpení molekul dsRNA → siRNA (21 - 25 nt)
- evolučně konzervativní (houby, živočichové, rostliny)
- ATP - dependentní nukleáza, funguje procesivně, ATP využívá k translokaci podél substrátu
- *C. elegans* s mutací v genu kódujícím DICER – fenotypové defekty, důkaz zapojení RNAi do regulace vývojových procesů

Živočichové, *C. elegans*, *S. pombe* – jeden DICER protein

Drosophila – dva DICER

Rostliny – čtyři!, mutace mají dramatický vliv na vývoj rostliny

Molekulární základ RNAi



RISC

- RNA-induced silencing complex, efektorový komplex, destrukce cílové mRNA
- aktivace RISC
- jednovláknové siRNA - na základě komplementarity bazí navádí komplex k cílovému místu
- helikáza, nukleázy s endo- a exo- aktivitou, protein recA (homology searching activity)

ARGONAUTE – proteinová rodina, interakce s Dicer, součást komplexu RISC.

Proteiny rodiny ARGONAUT (Ago)

Bazické proteiny (schopnost vazby na RNA)

PAZ doména – protein-proteinové interakce

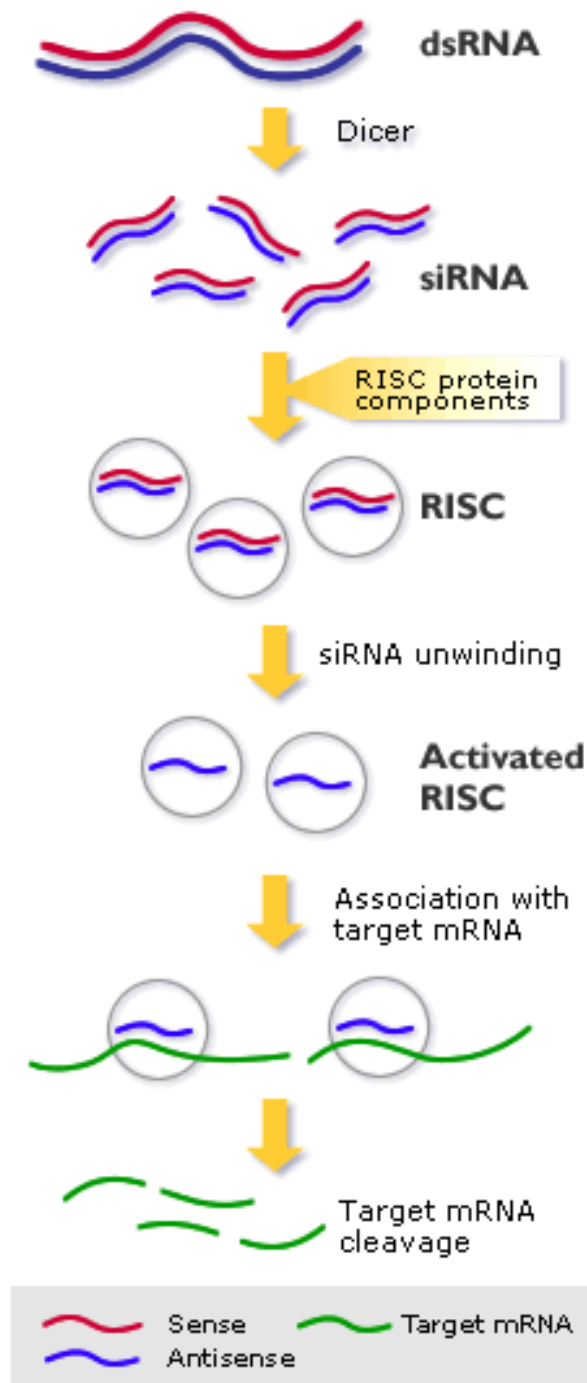
asi přispívá i k vazbě siRNA

PIWI doména – vazba siRNA v RISC

Účastní se produkce siRNA, jejich „nasměrování“ do příslušného efektorového komplexu i vlastní degradace mRNA, u rostlin procesu RDDM.

Multigenové rodiny (Arabidopsis – 10 členů, Drosophila – 4, C. elegans – 3, člověk – 7, myš - 8).

Molekulární základ RNAi

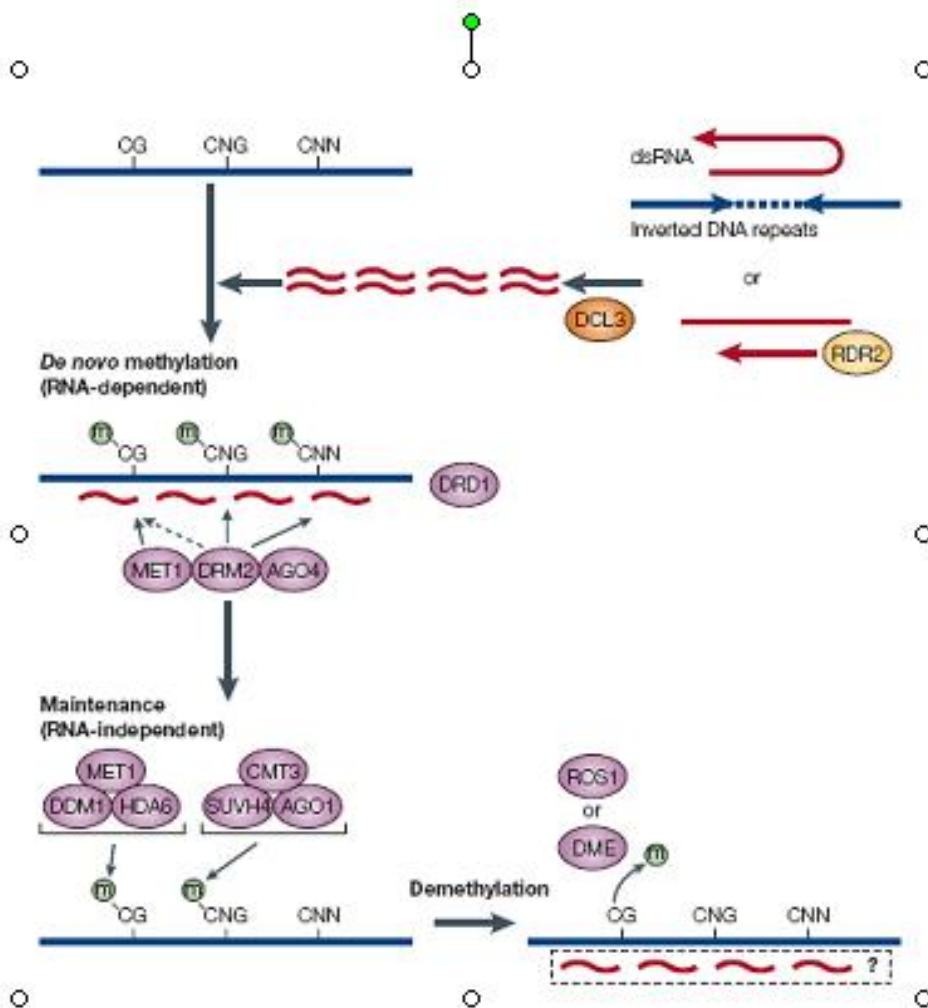


RDDM (**RNA-directed DNA** **methylation**); **v rostlinách**

v rostlinách infikovaných
rekombinantními viroidy
nesoucími min. 300 nt
homologie s kódující sekvencí
→ methylace a PTGS

pokud je homologie
s promotorem → TGS

RDDM



- Vznik dsRNA transkripce přes IR (RNA pol II nebo RNA pol IV) vznik ze ssRNA (RdRP-RDR2)
- dsRNA je procesována DICER, vznikající molekuly řídí metylaci DNA v komplementárních sekvencích (MET1 podílí se na CG *de novo* DRM2 *de novo* všechny kontexty DRD1 chromatin remodelující protein)
- RNA nezávislý proces uchování methylačního obrazu (kromě CNN)

KO-EXISTENCE RNAi a methylace DNA

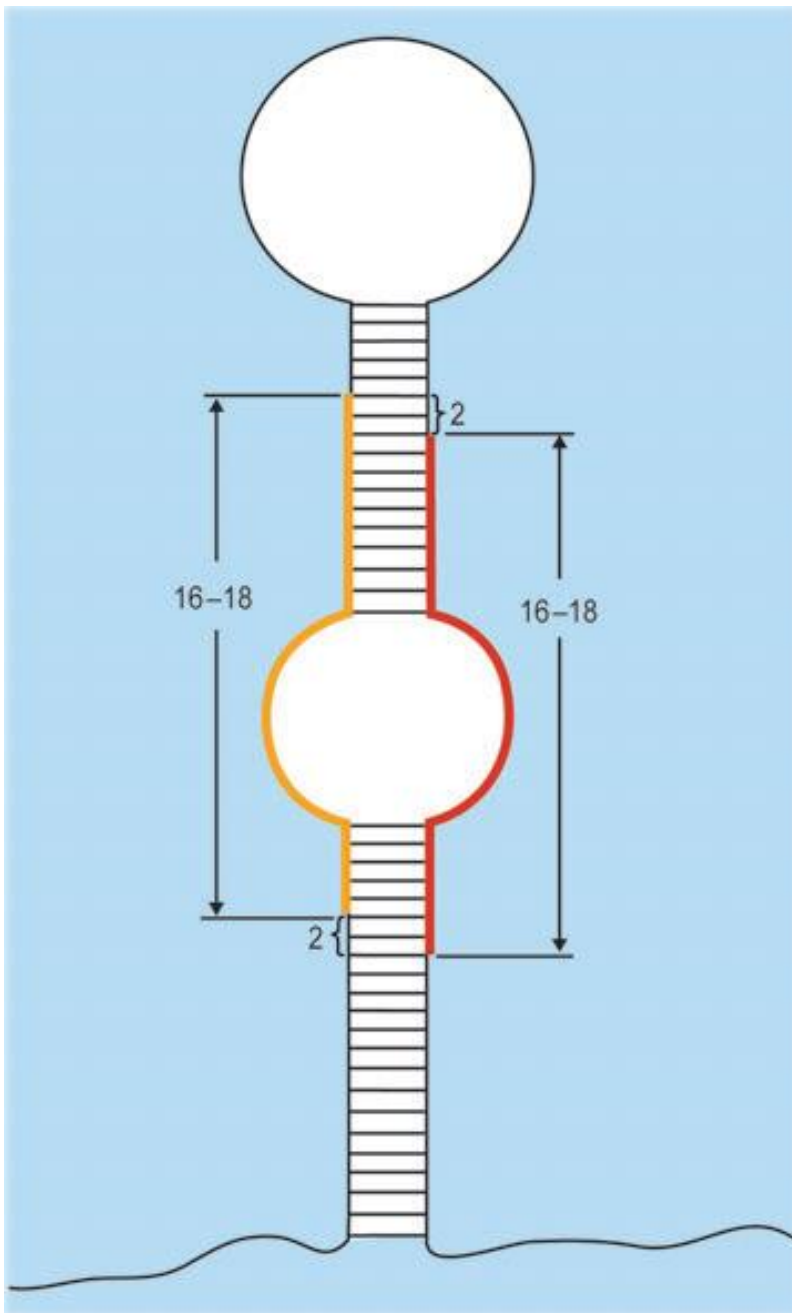
Rostliny, obratlovci, *Neurospora* - methylovaná DNA a RNAi

Drosophila, *S. pombe* – RNAi a Dnmt2 (?)

C. elegans – RNAi, ale nemá gen pro DNA methyltransferázu

S. cerevisiae – nemá methylaci ani RNAi

Methylace DNA není univerzálním epigenetickým regulačním mechanismem
existence alternativních mechanismů
produkty genů skupiny Polycomb / Tritorax - udržení genů
ve vypnutém / zapnutém stavu



microRNA

endogenní malé molekuly RNA, kódovány geny **ODLIŠNÝMI** od těch, jež regulují.

21 nt, vazba na parciálně komplementární místa na 3' netranslatovaném konci cílové mRNA - represe translace.

Vznik z vlásenkového prekursoru (70 bp), přepisován z intergenových oblastí.

Živočichové – jeden prekursor společný pro několik miRNA.

Rostliny – každá miRNA má svůj prekursor, maturované miRNA jsou methylované (HEN1).

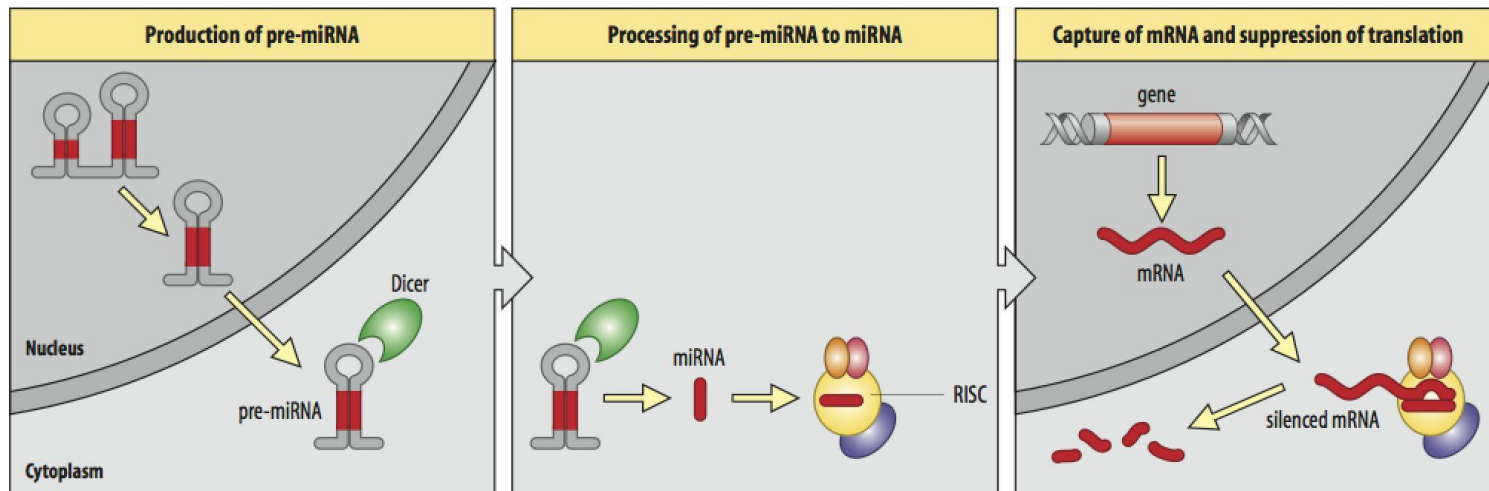
microRNA

ROSTLINY

- degradace mRNA (AGO1)
- vysoká komplementarita s cílovou sekvencí
- 2/3 regulují expresi transkripčních faktorů

ŽIVOČICHOVÉ

- represe translace cílové sekvence spojená s její destabilizací
- limitovaná komplementarita s cílovou sekvencí
- širokospektrý účinek (vývoj)



siRNA A HETROCHROMATIN

Heterochromatin obsahuje repetitivní sekvence a transpozony, transkripčně umlčená oblast.

(Trans)geny inzertované do heterochromatinových oblastí – umlčení (*Drosophila* – PEV).

RNAi – významná role ve formování a umlčení heterochromatinu

X

„umlčený“ heterochromatin není transkribován

RNAi a heterochromatin

Mutantní forma kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*,
blokována RNAi (mutace v genech Dicer, Rdp1, ago)
→ neschopnost tvorby heterochromatinových struktur
v centromerách během buněčného dělení

(Volpe et al., 2002, Science)

Mutantní formy *Tetrahymena thermophila*



molekuly siRNA jsou nezbytné pro procesy rearrangementu
DNA v průběhu konjugace jader

(Mochizuki et al., 2002, Cell)

Telomerové transkripty

Telomery jsou typický heterochromatin (?) (epigenetické modifikace, neobsahují geny, telomere position effect (TPE))

→ transkripčně neaktivní

V savčích buňkách – TERRA (Telomeric Repeat containing RNA)

100 bp – 9 kb

v jaderné frakci

UUAGGG repeticie

(jenom slabý signál pro CCCUAA)

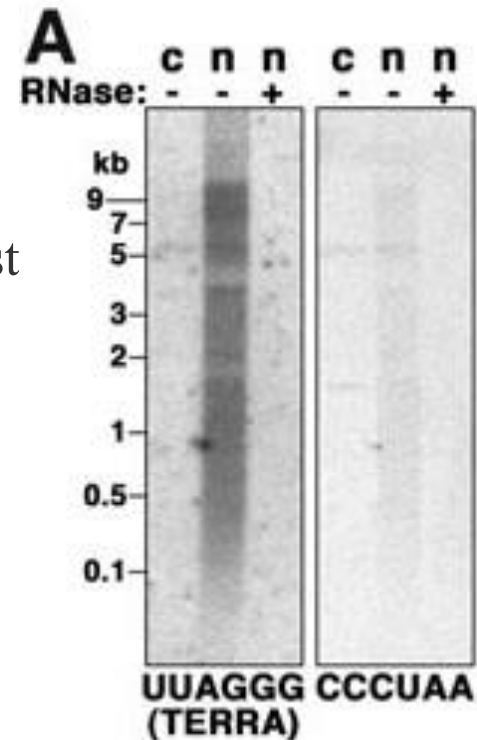
počátek transkripce v subtelomerické oblast

aspoň část jich zůstává asociována

s telomerami

in vitro experimenty: TERRA ovlivňují

aktivitu telomerázy



RNA polymerázy

RNA pol. I – syntéza pre-rRNA 45S (28S, 18S, 5.8S rRNA)

RNA pol. II – prekursorů mRNA, ncRNA, miRNA

RNA pol. III – tRNA, 5S rRNA a ostatní krátké RNA v jádře a cytoplasmě

RNA polymerázy v mitochondriích a chloroplastech

V rostlinách – **RNA polymeráza IV**

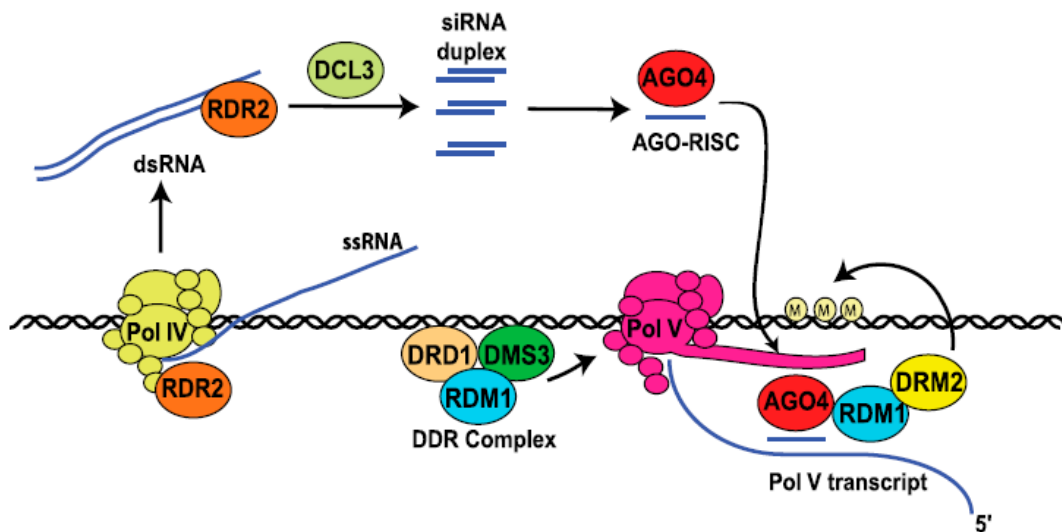
transkripce heterochromatinových oblastí (intergenové sekvence, repete)

vznikají krátké transkripty

substráty pro RDRP

RNA polymeráza V

transkripty zapojené do procesu RDDM



A model for RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. RNA Pol IV transcripts are used as templates by the Pol IV-interacting protein RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2). DICER-LIKE 3 (DCL3) cleaves resulting dsRNAs into 24-nt siRNA products, one strand of which is loaded into an ARGONAUTE 4 (AGO4) RISC complex. Independent of siRNA biogenesis, the DDR complex enables transcription by RNA Pol V, whose nascent transcripts serve as scaffolds for the binding of AGO-RISC complexes. AGO4 also interacts with the C-terminal domain of the Pol V largest subunit and RDM1. In turn, RDM1 interacts with the de novo DNA methyltransferase DRM2.

https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1_ELE