

Epigenetika 11

Metody

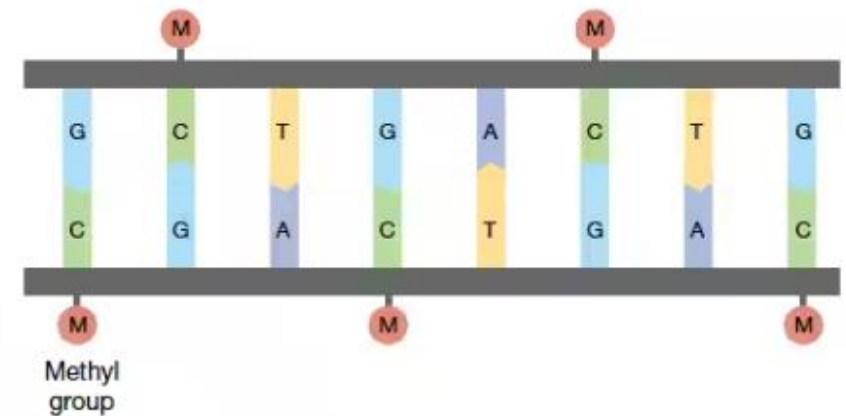
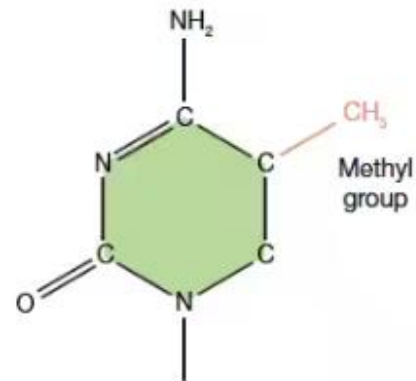


Obsah

- METODY

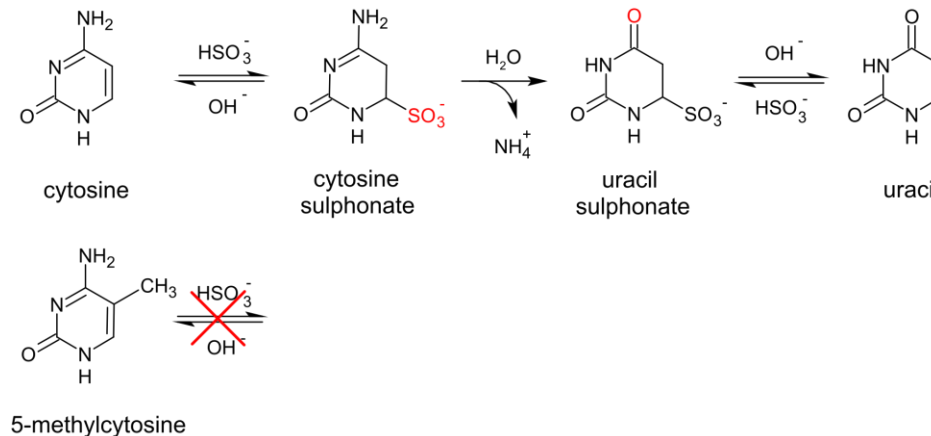
Obecné rozdělení

- **DNA methylační analýza**
 - Bisulfitové sekvenování, MSAP....
- DNA-protein interakce
 - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
 - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika
- 3D modelování



Bisulfitové sekvenování

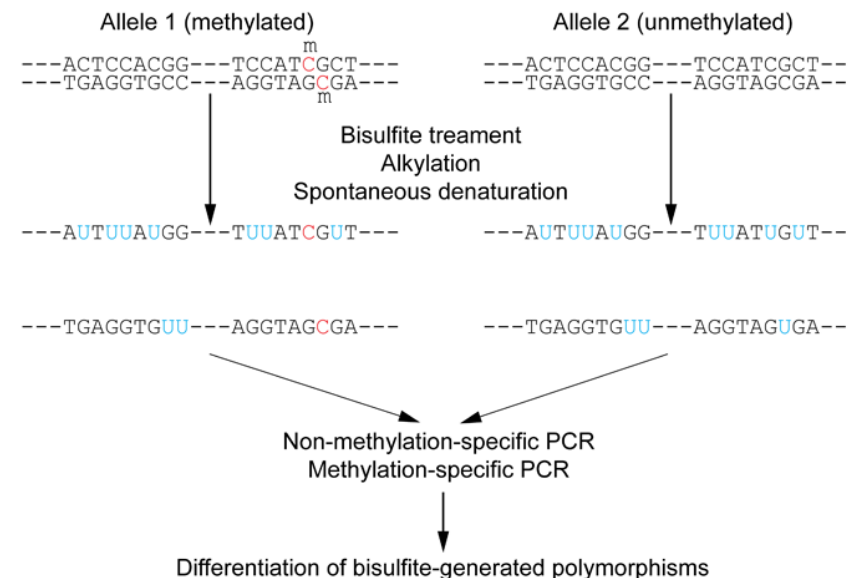
- Působení hydrogensířičitanu na **cytosin=konverze na U**
(methylované C zůstávají stejné)



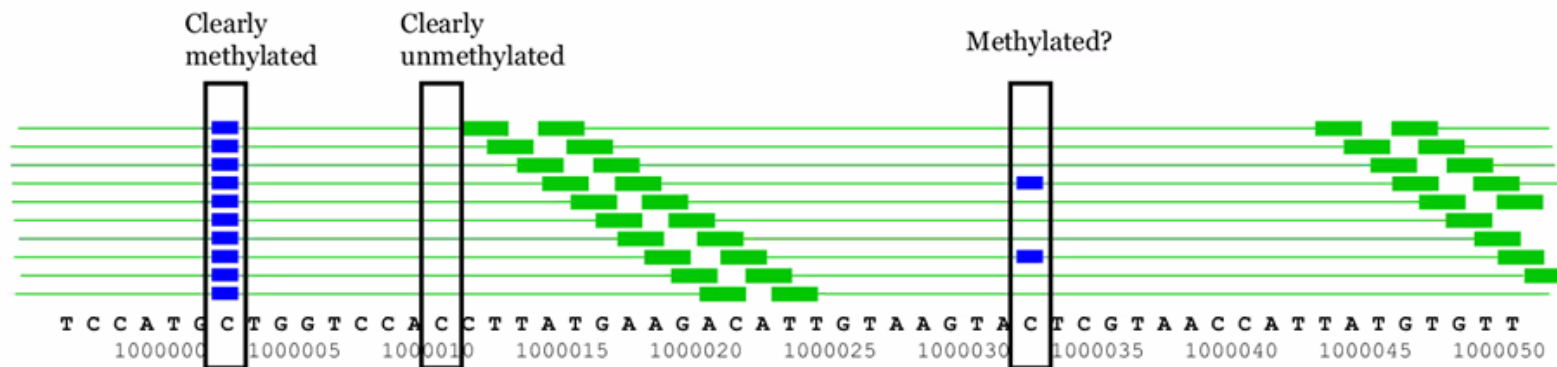
- Nutné porovnání proti referenční sekvenci, kterou analyzujeme

- **Nutnost referenčního genomu**

- Pro detekci ostatních modifikací (hmC, caC, fC) jsou nutné specifické reakce-**konvenční bisulfitové sekvenování nerozlišuje mC a hmC a caC/fC od nemethylovaného C**

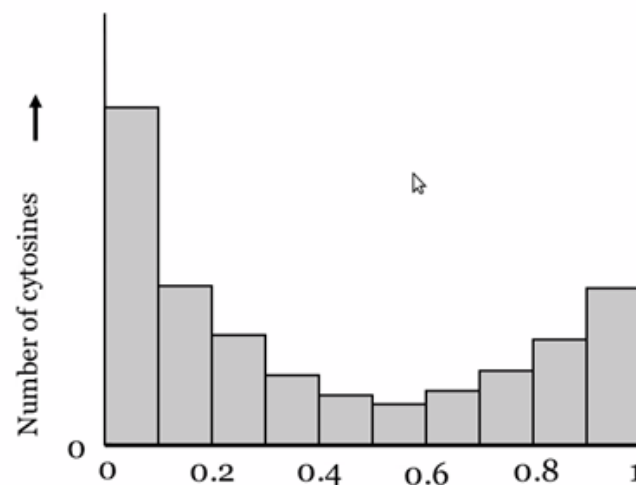


Výstup bisulfitového sekvenování



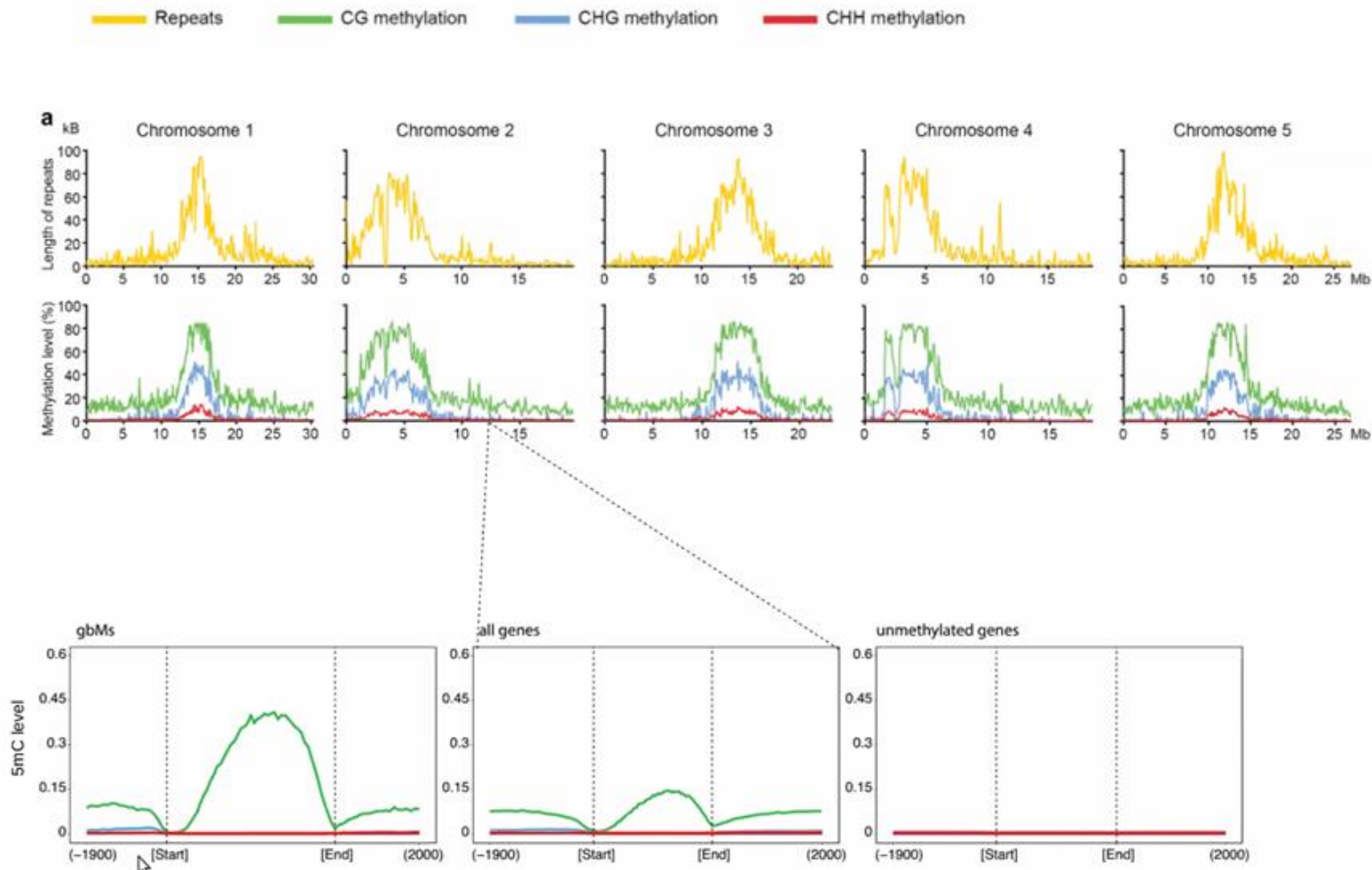
Frekvence
methylanovaných
bp na celkový
počet všech
contigů

Methylation level of a cytosine =

$$\frac{\text{Number of reads methylated}}{\text{Total number of reads (coverage)}}$$


Výpočet úrovně
methylace na
jenotky bp

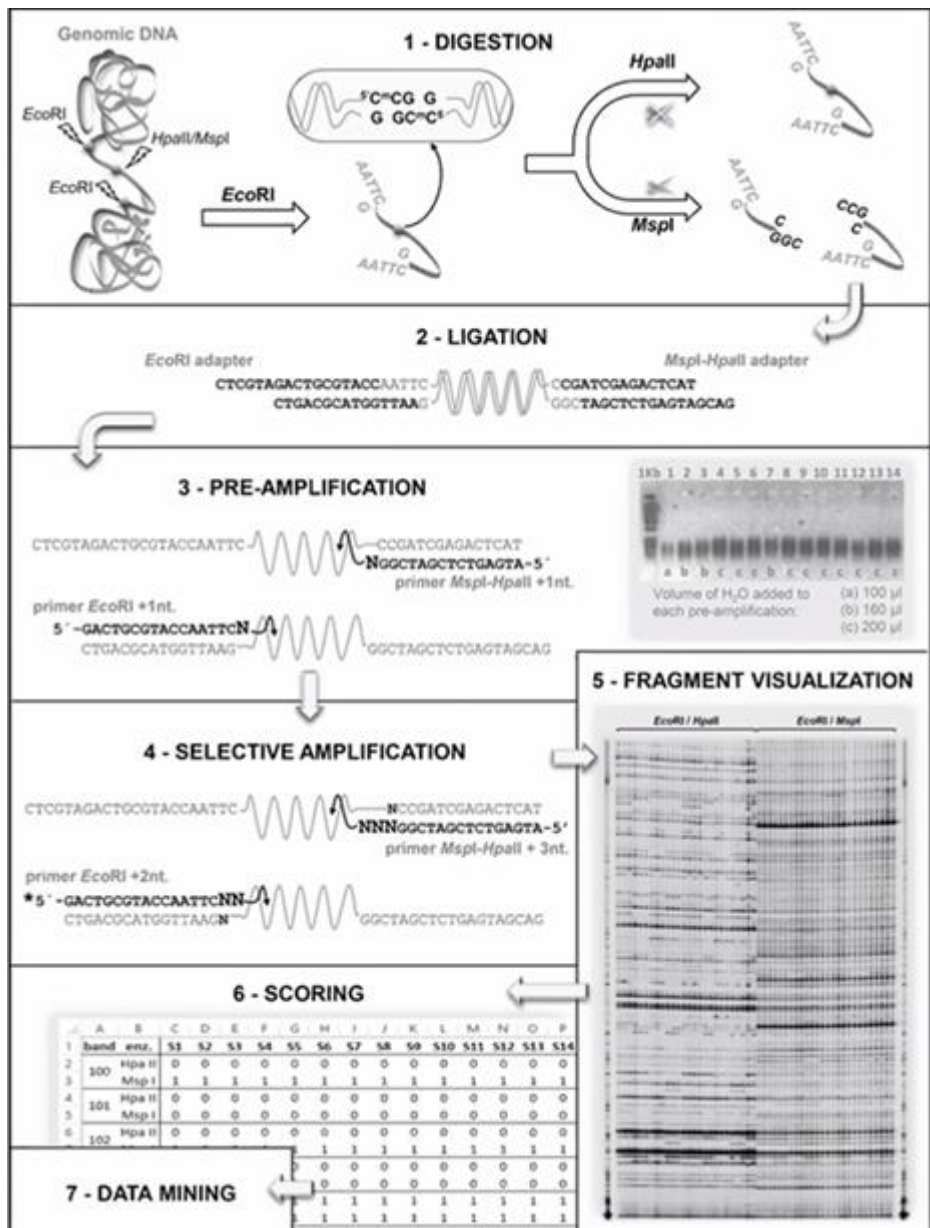
Vytváření methylomových map



Průměrná úroveň
methylace na
chromozom

Průměrná methyla na
TEs, gen, kb, Mbp atd.

MSAP



- **Restrikce pomocí methylačně sensitivních enzymů**
 - *MspI* a *HpaII* neštěpí sekvenci, pokud první C methylován
- **Pre-selektivní PCR amplifikace**
 - Ligace se specifickými primery
- **Selektivní PCR amplifikace**
 - Amplifikace specifických produktů
- **PCR produkt screening**
 - PAA nebo kapilárová elektroforéza
 - Případně další sonikace a příprava NGS knihovny
- **Výsledek**
 - Získání DNA methylace analyzovaných vzorků, v případě NGS nutná reference

MSAP+NGS technologie

- Identifikace regionů s odlišnou methylací (DMRs)
- Nutnost specifických softwarů
- Po specifické PCR-preamplifikaci
 - Tvorba NGS knihovny
 - Sekvenování
 - Analýza produktů



TABLE A4-1 Isoschizomer Pairs That Differ in Their Sensitivity to Sequence-specific Methylation

METHYLATED SEQUENCE ^b	ISOSCHIZOMER PAIRS ^a	
	CUT BY	NOT CUT BY
T ^{m5} CCGGA	<i>AccII</i>	<i>BspMII</i>
TC ^{m5} CGGA	<i>AccII</i>	<i>BspMII</i>
GGWC ^{m5} C	<i>AflI</i>	<i>AvaII (Eco47I)</i>
TCCGG ^{m6A}	<i>BspMII</i>	<i>AccII</i>
C ^{m5} CWGG	<i>BstNI (MvaI)</i>	<i>EcoRII</i>
GGTAC ^{m5} C	<i>KpnI</i>	<i>Asp718I</i>
C ^{m5} CGG	<i>MspI</i>	<i>HpaII (HapII)</i>
C ^{m4} CGG	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>
G ^{m6} ATC	<i>Sau3AI (FnuEI)</i>	<i>MboI (NdeII)</i>
TGGCG ^{m6A}	<i>Sbo13I</i>	<i>NruI</i>
RG ^{m6} ATCY	<i>XhoII</i>	<i>MflI</i>
CC ^{m5} CGGG	<i>XmaI (Cfr9I)</i>	<i>SmaI</i>

Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
 - Bisulfitové sekvenování, MSAP....
- **DNA-protein interakce**
 - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
 - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika
- 3D modelování



Příprava vzorku

↓
Pletivo/tkáň, buněčné útvary aj.

Fixace

↓
PFAM, Glutaraldehyd, EtOH...

Permeabilizace membrány

↓
Detergent

Blokace aj.

↓
BSA, případný enzymatický treatment

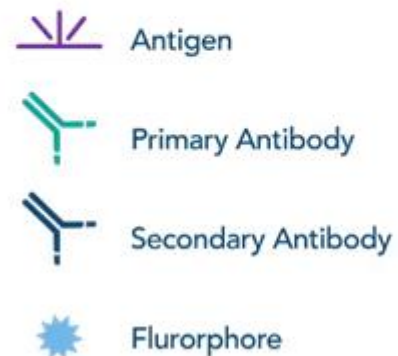
Inkubace protilátky

↓
Monoklonální vs. polyklonální

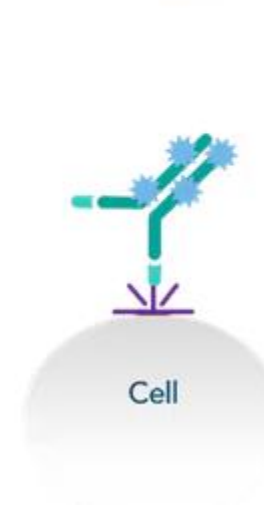
Vizualizace

Mikroskopie

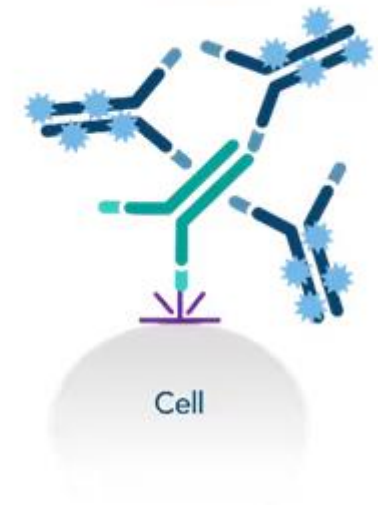
Princip imunolokalizace



Direct

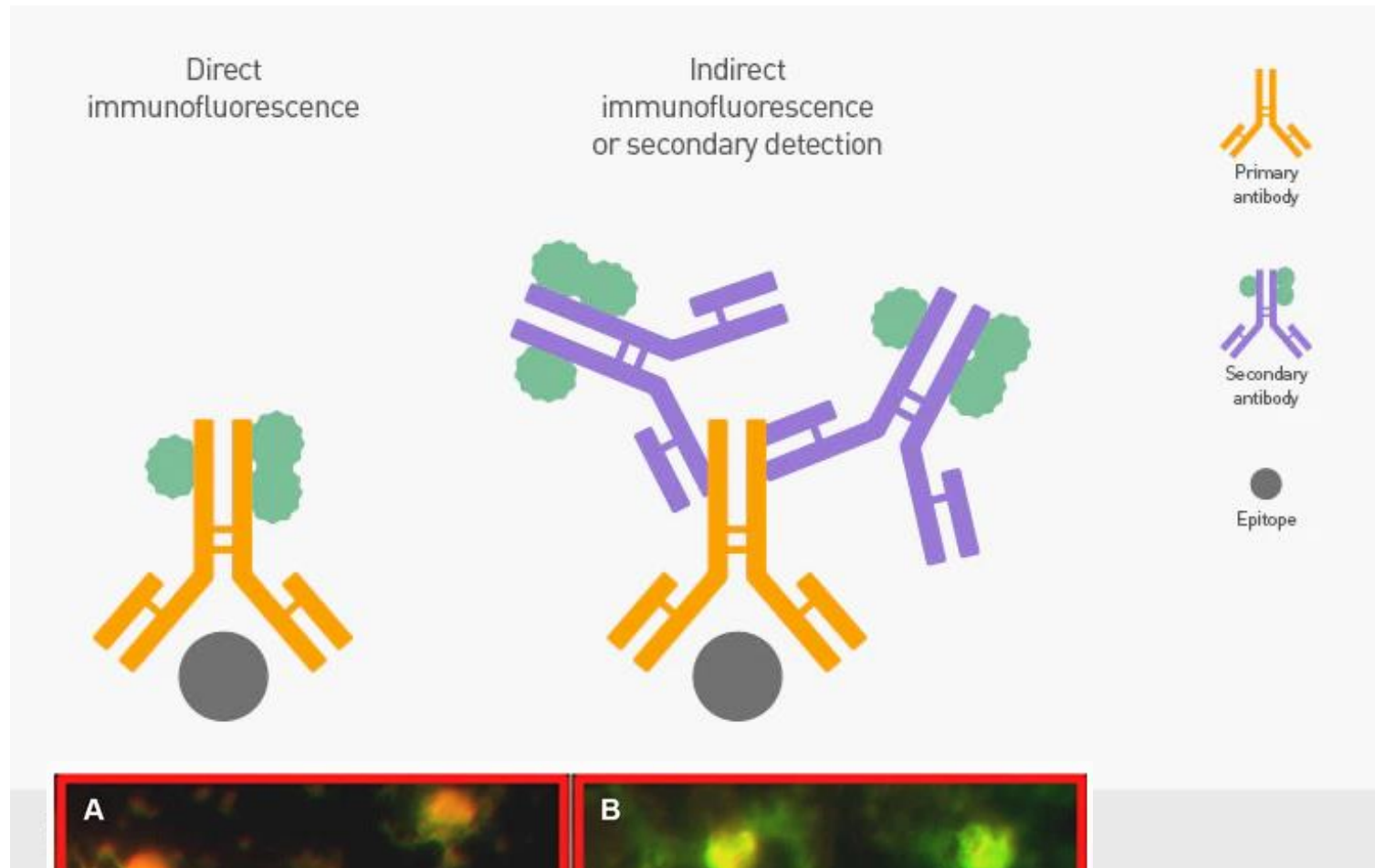


Indirect

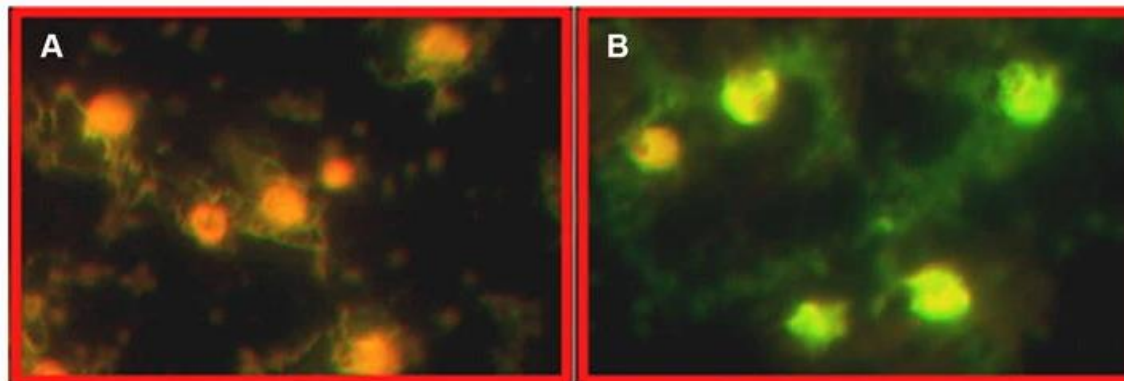


Přímé a nepřímé barvení

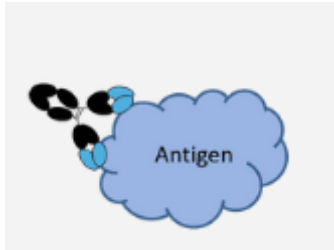
- Dražší
- Nižší citlivost
- Nižší pozadí



- Levnější
- Vyšší citlivost
- Nižší i vyšší pozadí



Becheva *et al.* 2018

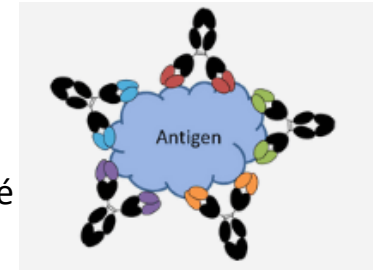


Monoklonální protilátky

- Ve srovnání s pAbs dražší
- Rozpoznají jeden epitop (váže se na specifické místo)
- Tvořeno jednou protilátkou

Polyklonální protilátky

- Levné pro produkci
- Mix různých protilátek
- Váží se na různé oblasti jedné molekuly
- Tolerantní na malé změny v epitopu cílené molekuly

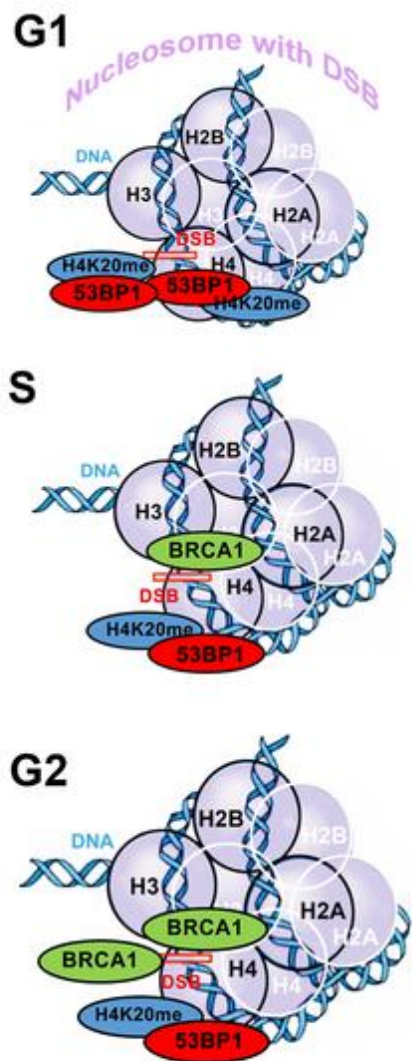


**Monoclonal Antibodies
(mAbs)**

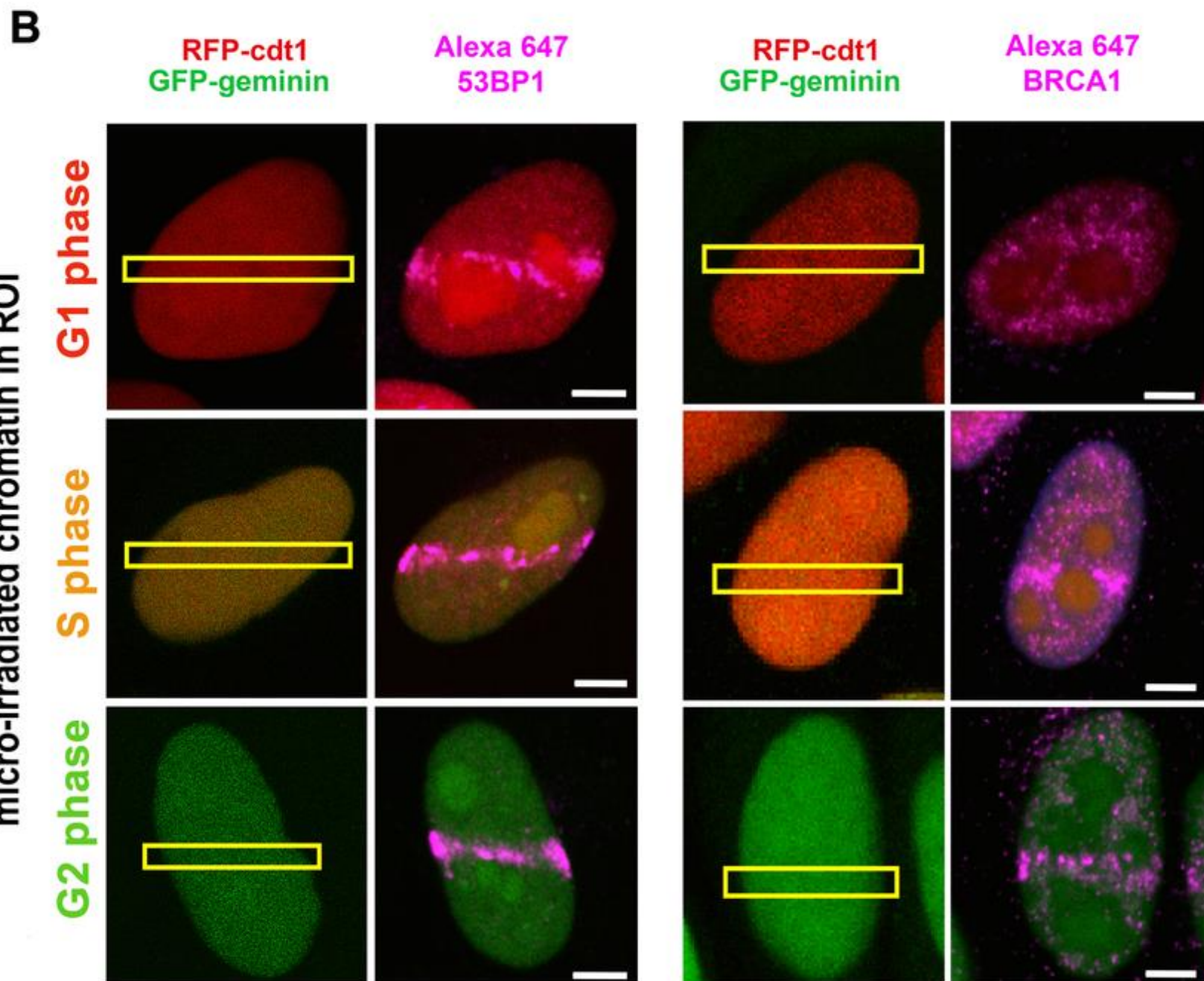


**Polyclonal Antibodies
(pAbs)**

A
53BP1 / H4K20me / BRCA1

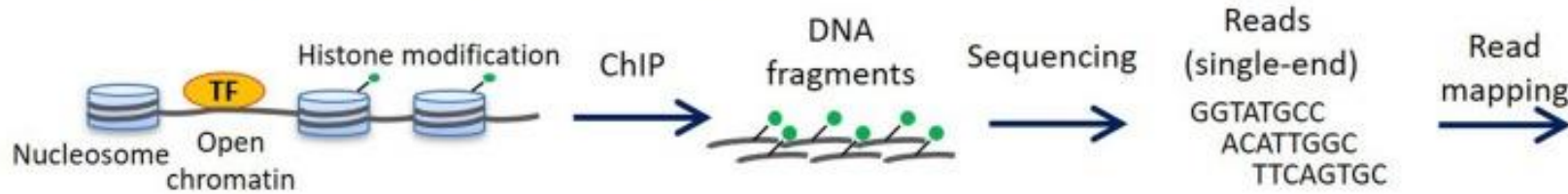


micro-irradiated chromatin in ROI

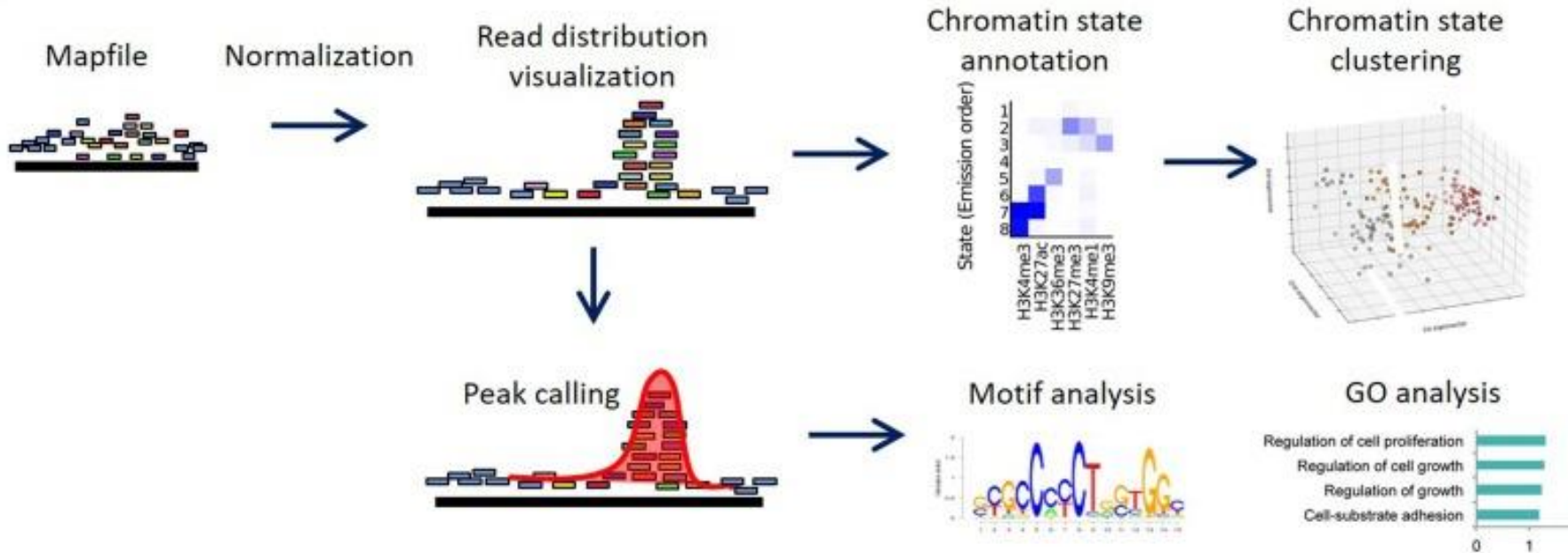


Chip-seq analýza

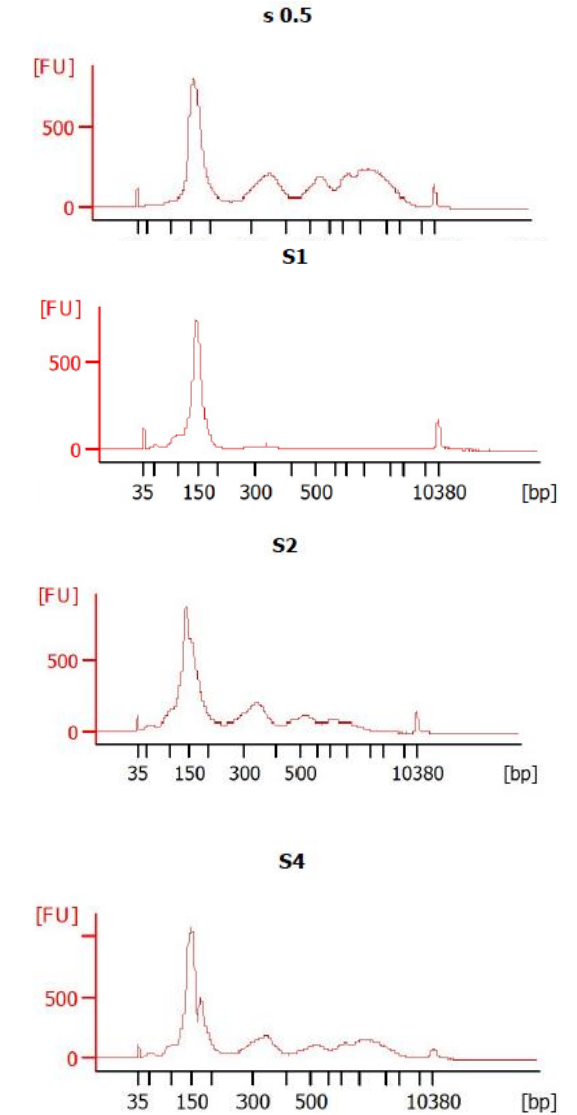
(A) Sample preparation and sequencing



(B) Computational analysis

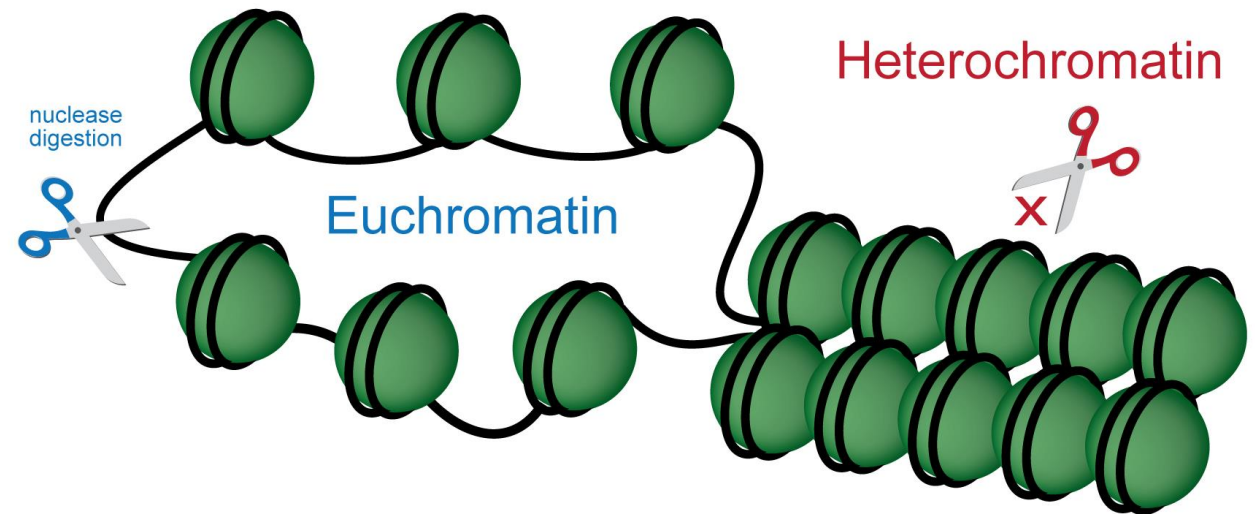


Koncentrační řada pro Mnasové štěpení



Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
 - Bisulfitové sekvenování, MSAP....
- DNA-protein interakce
 - Imunolokalizace, Chip-seq
- **Chromatinová analýza**
 - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika
- 3D modelování



ATAC-seq („assay for transposase-accessible chromatin“)

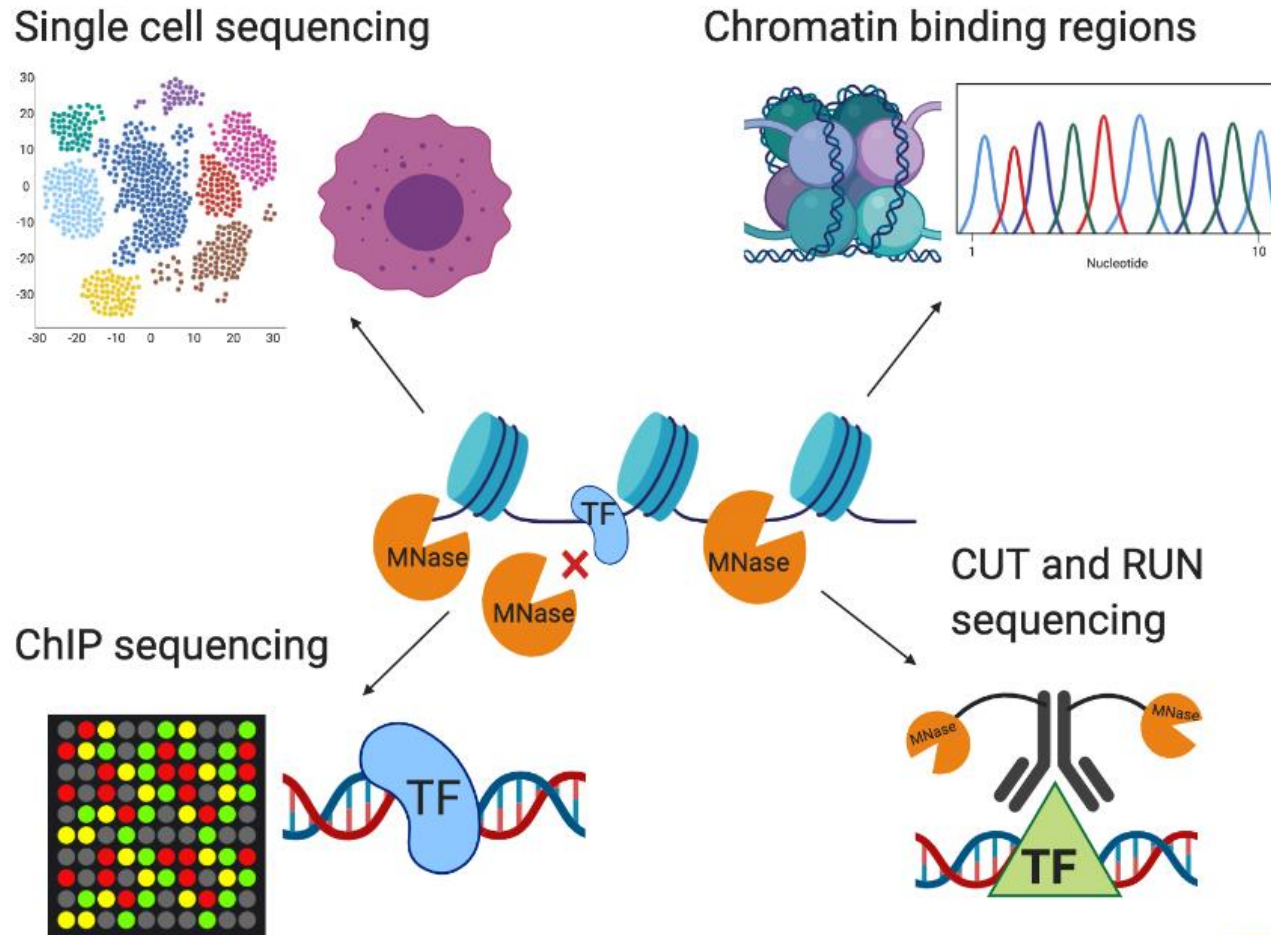
- Nukleozomové mapování
- Vazba transkripčních faktorů
- Detekce faktorů související s nemocemi
- Komparativní epigenomika
- Regulace buněčné specifikace



illumina official website

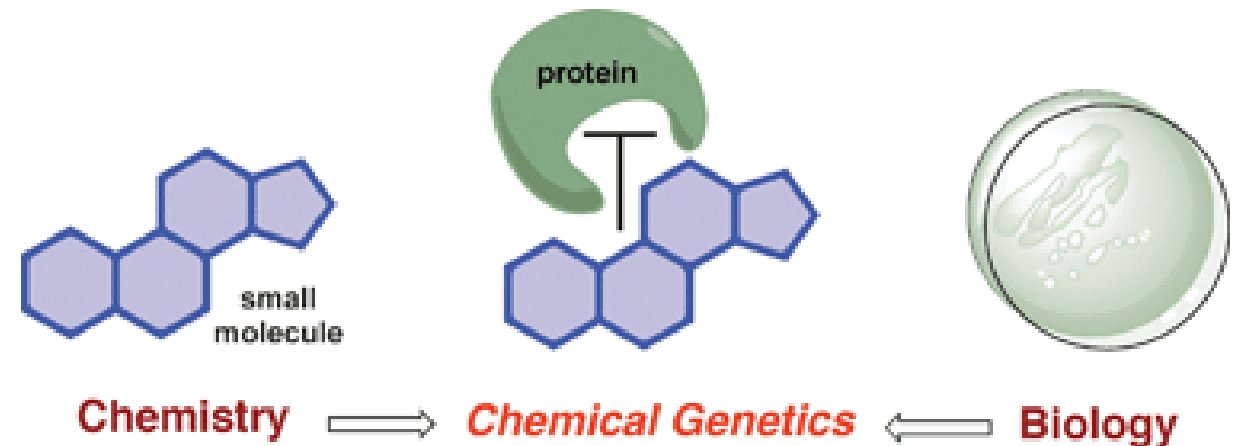
gDNA je exponována vysoce aktivní transposáze → fragmentace DNA v otevřených oblastech → tagování se sekvenčními primery

MNase-seq („micrococcal nuclease digestion“)



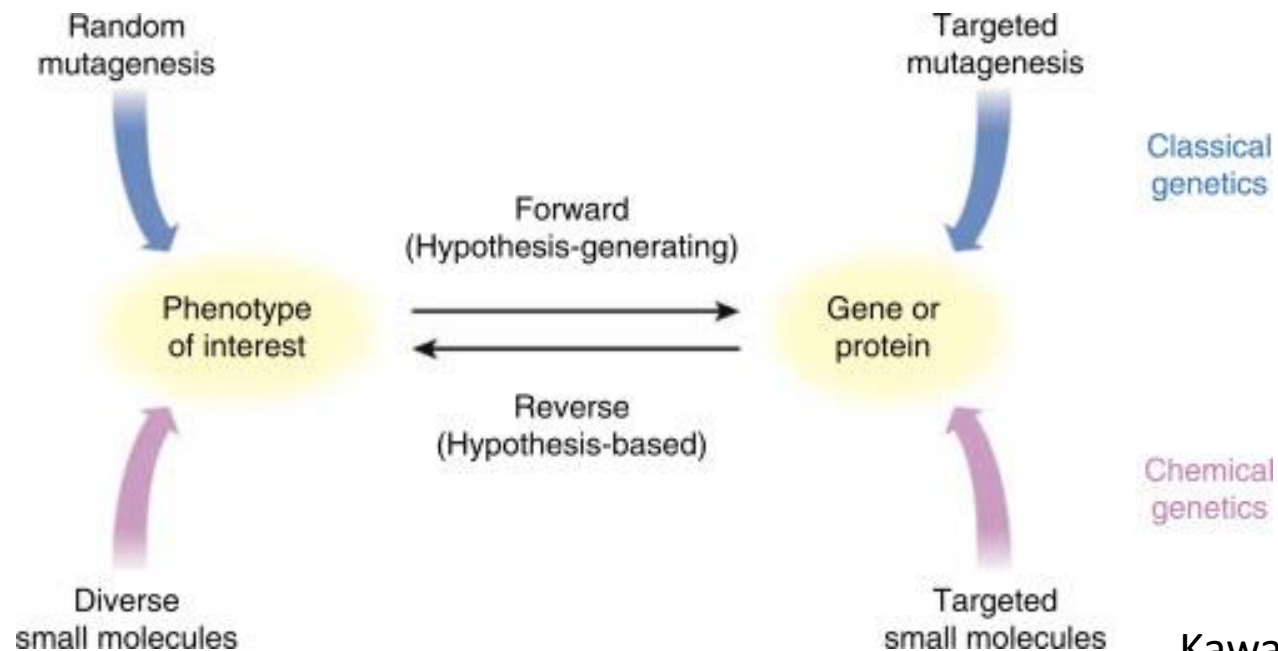
Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
 - Bisulfitové sekvenování, MSAP....
- DNA-protein interakce
 - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
 - ATAC-seq, MNase-seq
- **Chemická genetika**
 - 3D modelování



Chemická genetika

- **Aplikace chemických látek** pro studium fenotypu nebo genové regulační dráhy
- Chemická epigenetika neinterferuje s DNA (ne primárně)



Chemické látky ovlivňující DNA

Table 1. Major drugs used in plant DNA damage repair studies

Drugs	Mechanism of action	Induced damage	Key references
Replication blocking agents			
Hydroxyurea (HU)	RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE and CATALASE 2 inhibition	dNTP pool depletion	De Schutter et al., 2007; Cools et al., 2010; Spadafora et al., 2011
Aphidicolin	DNA POLYMERASE α inhibition	replication blocking	Cook et al., 2013
Inhibitor of DNA synthesis in organelles			
Novobiocin	inhibition of DNA GYRASE in organelles	replication blocking	Cappadocia et al., 2010
Alkylating agents			
1-Ethyl-1-nitrosourea	ethylation of bases (mostly T)	AT→TA transversions, AT→GC transitions	Gichner et al., 2003; Cooper et al., 2013
Ethyl methanesulfonate	ethylation of G→O ⁶ -ethylG	GC→AT transitions	Kim et al., 2006; Abe et al., 2012; Nordstrom et al., 2013
Methyl methanesulfonate	methylation of N7- and O ⁶ -dG, N3-dA and N4-dT	TA→GC transversions, AT→GC transitions	Bagherieh-Najjar et al., 2005; Mannuss et al., 2010
Mitomycin C	G-specific 5'-CpG-3' double-alkylation	G-G or G-A interstrand crosslinks	Bleuyard et al., 2005; Mannuss et al., 2010; Da Ines et al., 2013
Cisplatin	1,2-intrastrand d(GpG) and d(ApG) adducts	G-G or G-A intrastrand crosslinks	Jamieson and Lippard, 1999; Mannuss et al., 2010
Radiomimetic drugs			
Bleomycin (bleocin)	metal-dependent free radical production	DSB, SSB at 5'-GC-3' or 5'-GT-3' sequences	Ma et al., 2009; Pecinka et al., 2009; Lang et al., 2012
Zeocin	most likely similar to bleomycin	DSB	Adachi et al., 2011

DSB = Double strand break; SSB = single strand break.

Chemické látky ovlivňující chromatin a DNA methylaci

Table 2. Drugs for chromatin research

Inhibitors	DNA methylation	Histone H3 modifications ^a			Chromatin condensation	Transposon expression	Gene expression	Pol II activity	Key references
		K4me3	K9me2	K27me3					
Methyl-group biosynthesis inhibitors and methionine antagonists									
Sulfamethazine	↓	n.a.	↓	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Zhang et al., 2012
S-Dihydroxypropyladenine	↓	↑	↓	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Baubec et al., 2010
3-Deazaneplanocin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Foerster et al., 2011
L-Ethionine	↓	n.a.	n.a.	n.a.	↓	n.a.	n.a.	n.a.	Fajkus et al., 1992
DNA methylation inhibitors									
Zebularine	↓	↑	↓	n.a.	↓	↑	n.a.	n.a.	Baubec et al., 2009
5-Azacytidine	↓	n.a.	↓	n.a.	↓	↑	↑ 73; ↓ 52 ^b	n.a.	Chang and Pikaard, 2005
Histone deacetylase inhibitors									
Trichostatin A and sodium butyrate	–	–	↓	n.a.	n.a.	–	↑ 2; ↓ 34 ^b	n.a.	Chang and Pikaard, 2005; Baubec et al., 2010
Sirtinol (putative)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑ 138 ^c	n.a.	Grozinger et al., 2001; Zhao et al., 2003
Inhibitors of RNA polymerase II									
α-Amanitin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↓	Haag et al., 2012
Actinomycin D	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↓	Narsai et al., 2007
Unknown mode of action									
Genistein	↓	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	↑	n.a.	n.a.	Arase et al., 2012

↑ = Increase; ↓ = decrease; – = no change; n.a. = not analyzed.

^a At normally silenced loci.

^b Out of 7,800 *Arabidopsis* genes analyzed [Chang and Pikaard, 2005].

^c Out of 23,000 *Arabidopsis* genes analyzed, number of down-regulated genes not specified [Zhao et al., 2003].

Analýza nových genů regulujících epigenetické procesy u myši

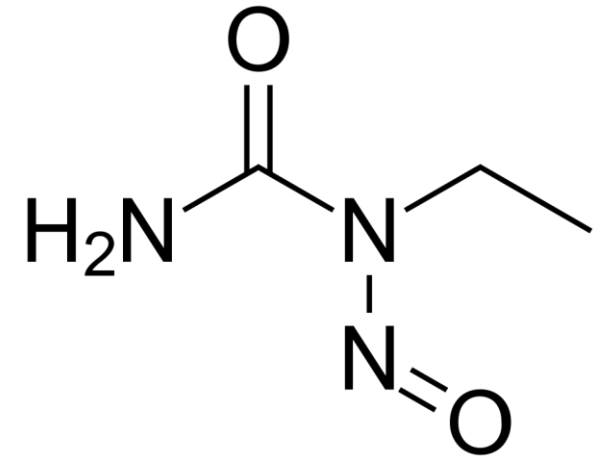
- **Analýza X-chromozomové inaktivace**

- Existence 4 XCE alel (a, b, c, d) s různou expresí=pravděpodobností X chromozom inaktivace (d=nejsilnější alela, slabá IC)
- Analýza ENU ovlivněných myši ukázala změnu v první X inaktivaci (E6.5 – 7.5) a změnu v maternální selekci X
- Nalezené mutace umožnili nalézt 3 autozomální oblasti, které nepřímo ovlivňují X-vázané geny s neúplnou inaktivací nebo geny odpovědné za volbu parentálního X

- *Momme*

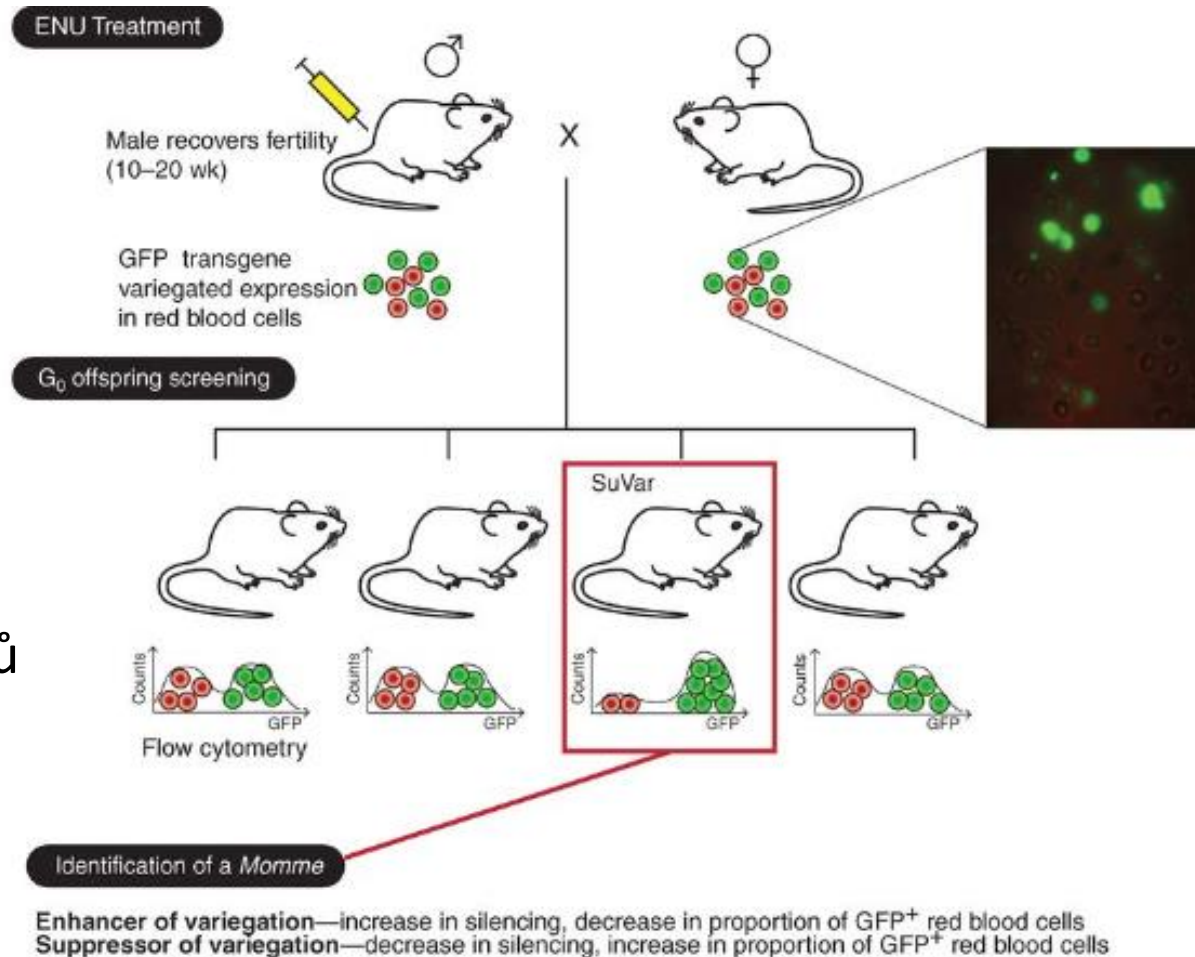
ENU

- vysoce toxický mutagen působící 1 mutaci/700 různých oblastí
- Účinky hlavně ve spermatocytech



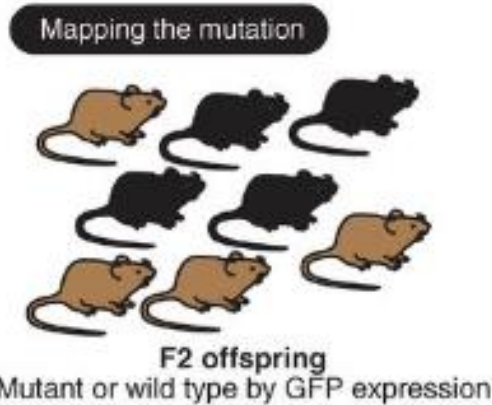
Momme – hledání genů odpovědných za epigenetické reprogramování

- Vystavení specifický GFP linií ENU chemické mutagenезi v pozadí variabilní exprese (úroveň exprese je nižší v důsledku metastabilní epigenetické variability=podobné pozičnímu efektu u octomilky)
 - Objev 30 možných kandidátů regulujících různé úrovně epigenetických změn, dominantní mutace

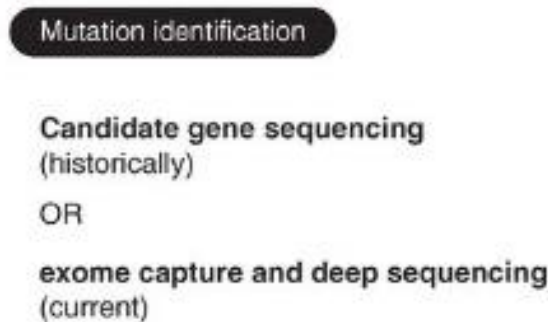


Momme – genetické mapování kauzálních mutací

- Mutantní potomstvo s různou úrovní transgenní exprese je použito pro genetické mapování



- Bodová mutace je analyzována pomocí exomového čtení (myši DNA exonové sekvence jako proby pro odhalení lokusu v kombinaci s NGS)

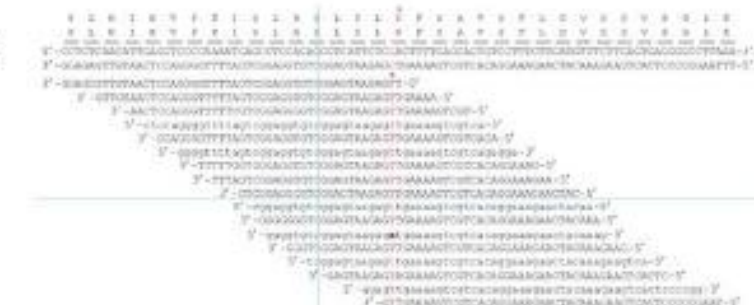
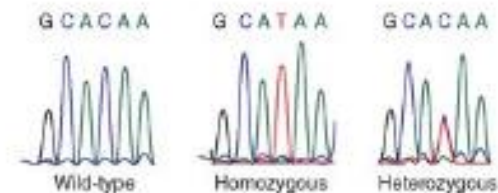


Positional cloning

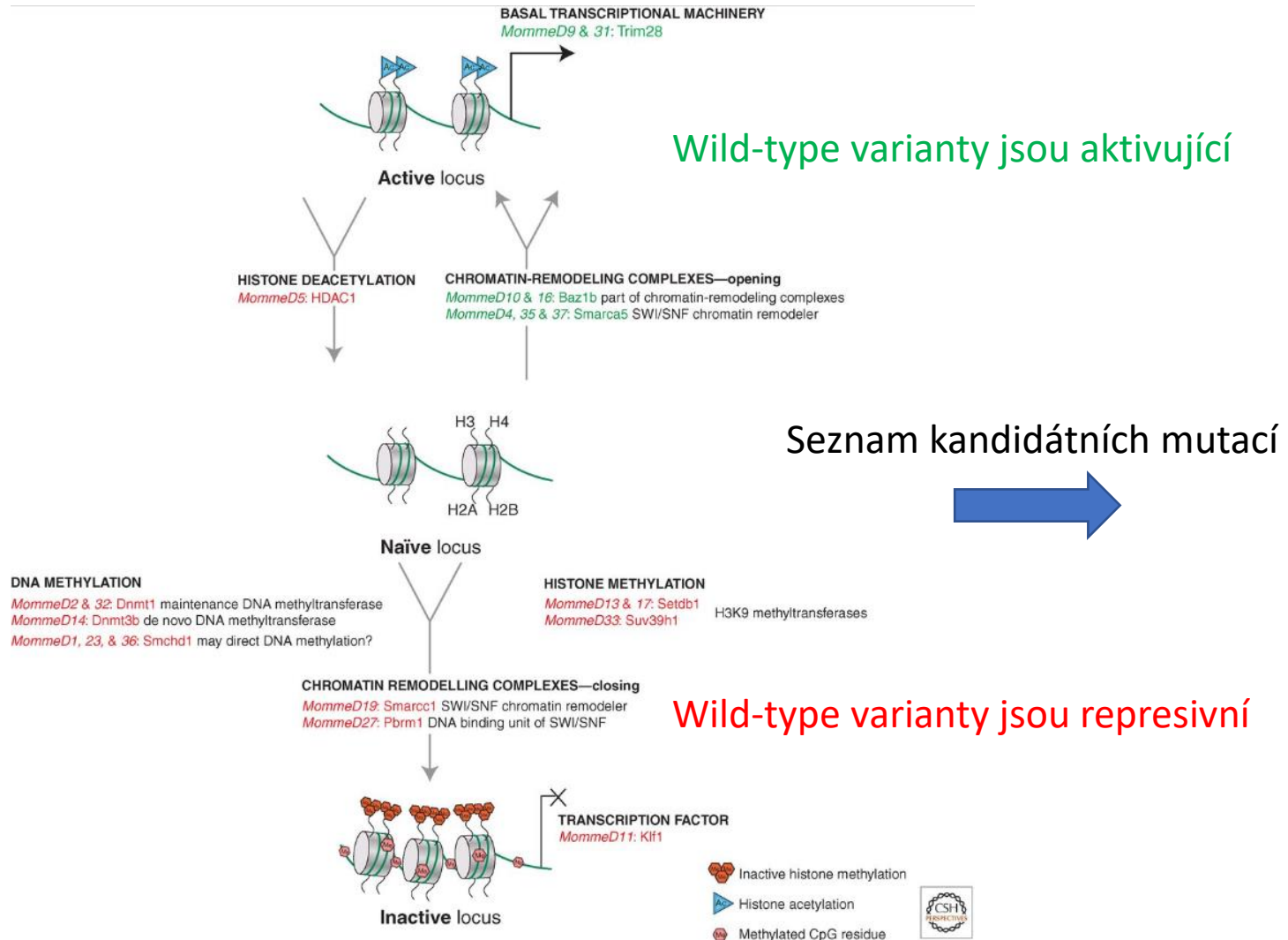
Microsatellite markers (historically)
OR
SNP array (current)

Fine mapping

MARKER	CHR	MUTANT	WILD TYPE	
rs1238543	4	■	■	
rs9872356	4	■	■	
rs1238745	4	■	■	3.2 Mb
rs1238875	4	■	■	
rs1245349	4	■	■	
# mice		155 12 8 2	110 10 3 2	



Výsledek Momme mutantní linie



Wild-type varianty jsou aktivující

Seznam kandidátních mutací



Wild-type varianty jsou represivní

Table 1.
 Summary of Momme mutants produced in dominant screen for modifiers of epigenetic reprogramming

Name	Effect on variegation	Homozygous lethality	Gene	Mutation	Chromosome	Reference(s)	Human homol
<i>MommeD1</i>	Suppressor	Females E10, some male adults viable	<i>Smcnd1</i>	C → T makes Stop	Chr 17	Blewitt et al. 2005, 2008	SMCHD1, mutated FSHD2
<i>MommeD2</i>	Suppressor	E8-E9	<i>Dnmt1</i>	C → A in Exon 25, Thr → Lys	Chr 9	Chong et al. 2007	DNMT1
<i>MommeD4</i>	Enhancer	E17-E18	<i>Smarca5</i>	T → A in Exon 12, Trp → Arg	Chr 8	Blewitt et al. 2005; Chong et al. 2007	SMARCA5
<i>MommeD5</i>	Enhancer	E8-E9	<i>Hdac1</i>	7 bp Del in Exon 13, Frameshift	Chr 4	Blewitt et al. 2005; Ashe et al. 2008	HDAC1
<i>MommeD6</i>	Suppressor	E6-E8	<i>D14Abbie</i>	T → C in Exon, Leu → His	Chr 14	Blewitt et al. 2005; Ashe et al. 2008; L Daxinger and E Whitelaw, pers. comm.	FAM208A
<i>MommeD7</i>	Enhancer	E18.5	<i>Hbb</i>	T → C in poly (A) signal	Chr 7	Brown et al. 2013	HBB β-thalassa
<i>MommeD8</i>	Enhancer	Some viable adults	<i>Rlf</i>	G → T Exon 8, Cys-Phe in Zn finger	Chr 4	Ashe et al. 2008; L Daxinger and E Whitelaw, pers. comm.	RLF

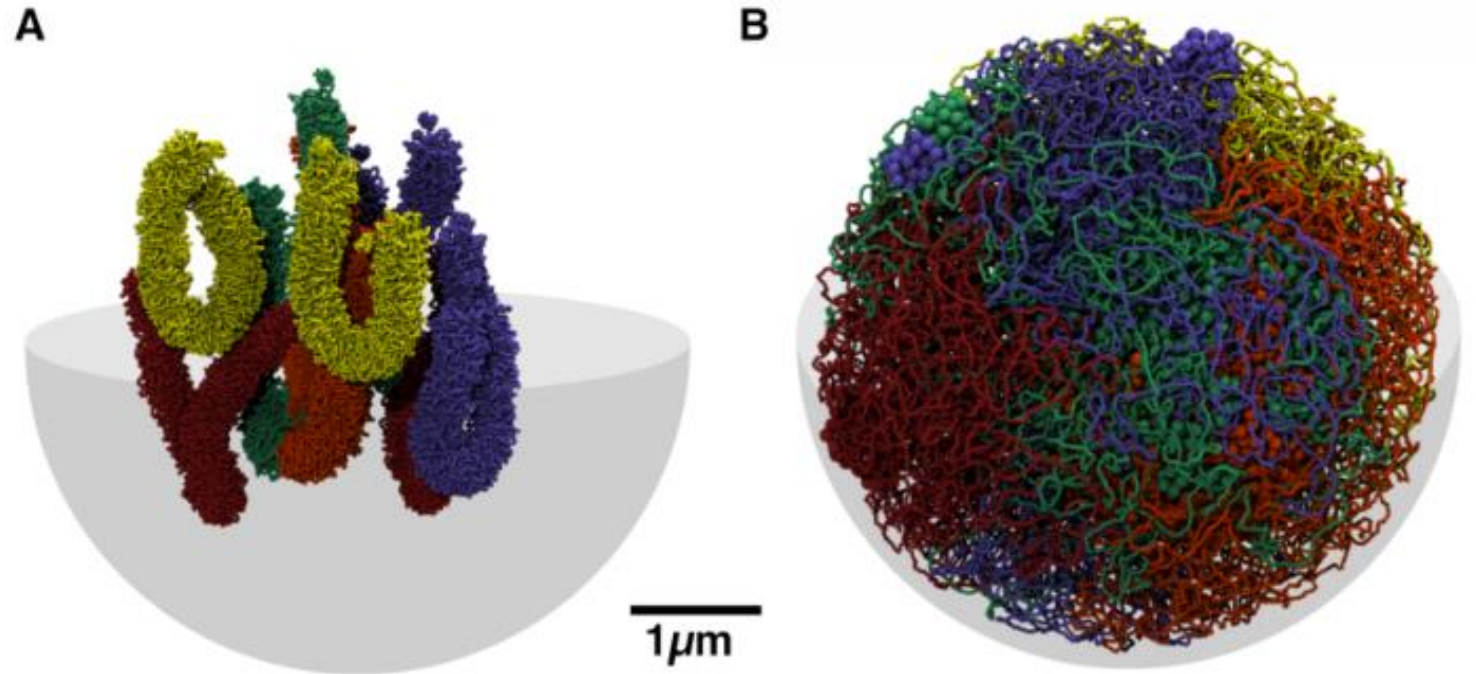
Obecné rozdělení

- DNA methylační analýza
 - Bisulfitové sekvenování, MSAP....
- DNA-protein interakce
 - Imunolokalizace, Chip-seq
- Chromatinová analýza
 - ATAC-seq, MNase-seq
- Chemická genetika
- **3D modelování**



Epigenetické *in silico* modelování a 3D rekonstrukce jádra

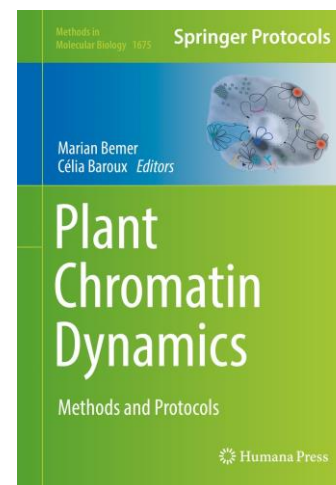
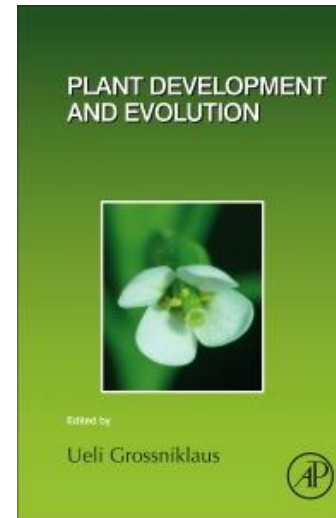
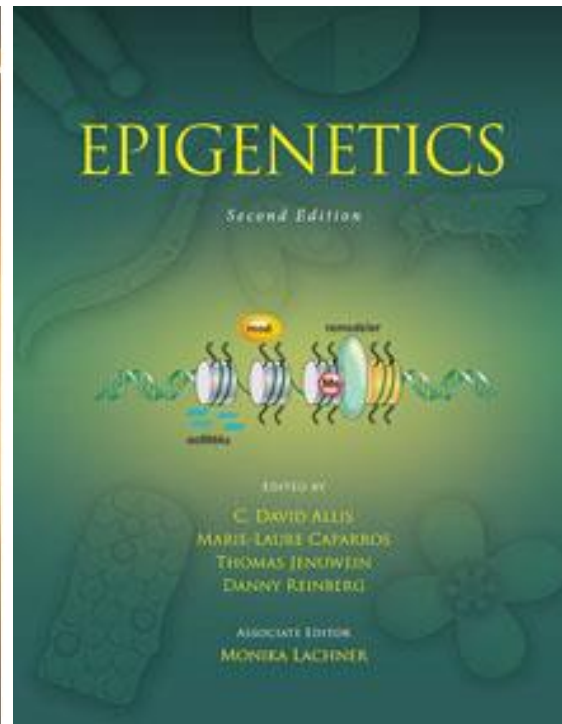
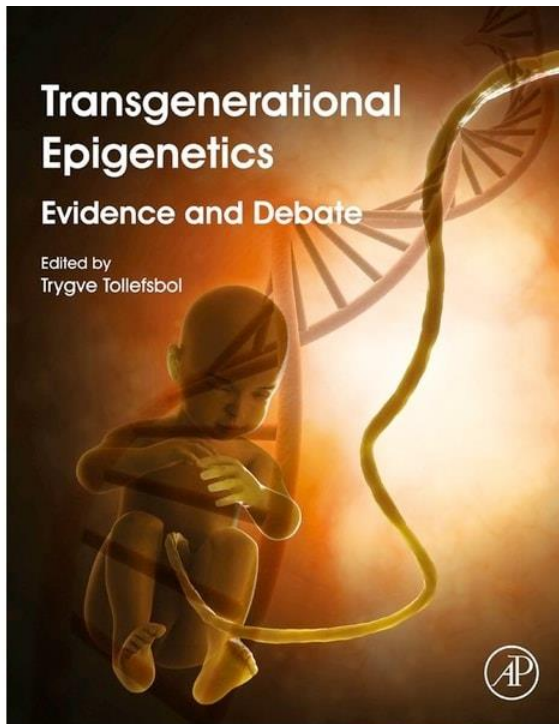
- Analýza genomu
 - ChIP-seq
 - Hi-C
- Simulační analýza
 - Model biopolymeru
 - Jednotlivé chromozomy
- 3D modelování
 - Celý genom
- Validace dat
 - Hi-C data
 - Mikroskopie
 - TADs



Stefano *et al.* 2021

- Jedná se o propojení všech uvedených metod a jejich *in silico* vizualizace, **možné u modelových organismů!**

Doporučená literatura/online kurzy



100% Free

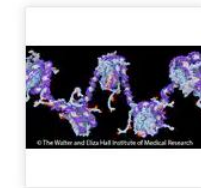
Start Learning with Free Courses

Free online courses from the world's top universities and companies.

coursera

Explore

epigenetics



Epigenetic Control of Gene Expression

The University of Melbourne

Course

★★★★★ 4.8 (732) | 41k students

Mixed



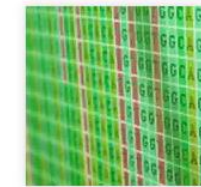
Cancer Biology

Johns Hopkins University

Specialization

★★★★★ 4.8 (7 724) | 200k students

Beginner



Plant Bioinformatic Methods

University of Toronto

Specialization

★★★★★ 4.7 (1 764) | 100k students

Beginner