

Molekulární biologie

6. Regulace genové exprese

Osnova

Řízení exprese bakteriálního genomu

Řízení exprese eukaryotického genomu

Hlavní zdroje:

S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4

Masarykova Universita Brno

ISBN 80-902562

B. Staveley, Principles of Cell Biology

Memorial University of Newfoundland

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

M. Muller, Biology of Cells and Organisms

University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Řízení exprese bakteriálního genomu

Část první: Řízení exprese bakteriálního genomu

- u bakterií nejčastěji regulace na úrovni **transkripce**
 - NE všechny promotory jsou si rovny - některé mají slabší afinitu k RNA-polymeráze než jiné
 - proto potřebují pomoc regulátorů (pozitivní nebo negativní)
 - vypínání a zapínání transkripce v reakci na okolní podmínky
 - nikdy není potřeba vyrábět všechny proteiny najednou
- buňky nikdy neplýtvají zbytečně energií**

Regulátory:

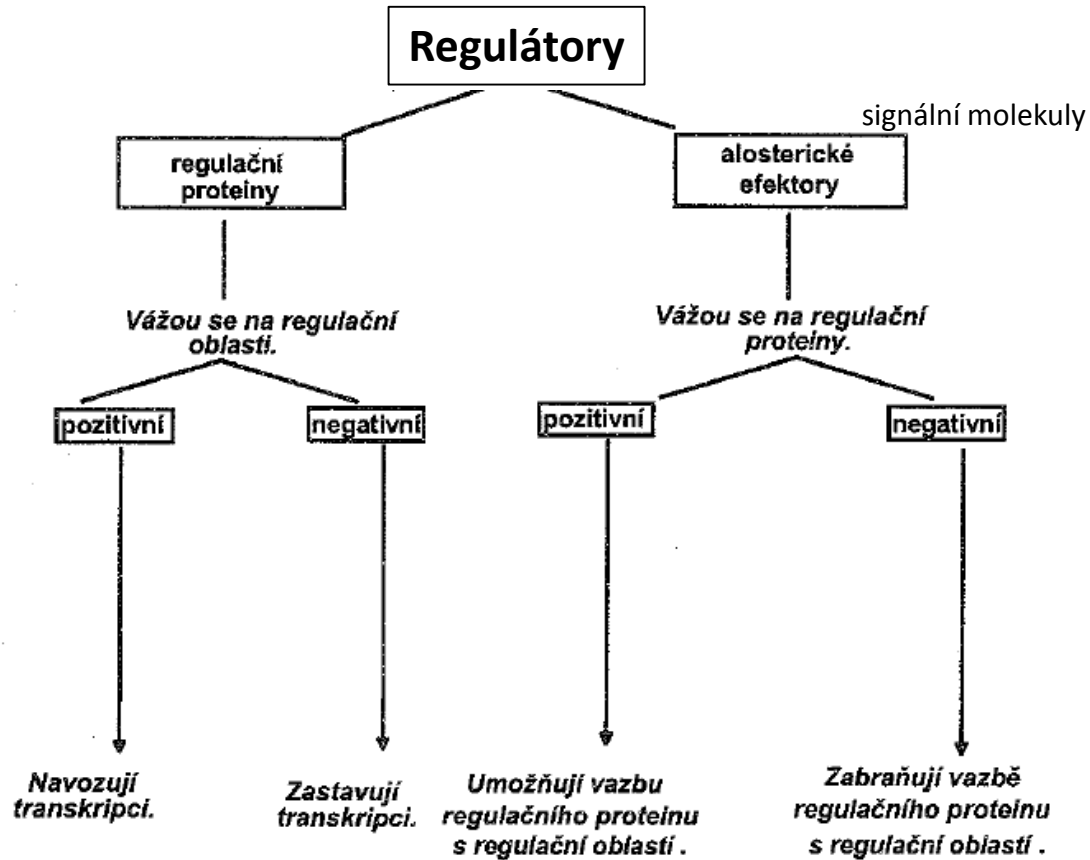
1. Regulační protein

- vážou se na regulační oblast DNA (promotor/operátor)
- 2 vazebná místa
 - a) pro rozlišení DNA promotoru/operátoru regulovaného genu
 - b) pro příslušnou signální molekulu
- po vazbě signální molekuly mění konformaci a tím afinitu k promotoru

2. Signální molekula (alosterický efektor)

- většinou malá a neschopná se přímo vázat na regulační oblast DNA (promotor/operátor)
- často **substrát (např. laktóza)** nebo **produkt (např. aminokyselina)** příslušného enzymu
- daný enzym se buď **zapne (β -galaktozidáza)** nebo **vypne (AA-syntetáza)**
- vazba na regulační protein (zprostředkovatel)

Signální molekula (alosterický efektor) a Regulační protein



*Systém regulace genů je zkoumán od roku 1961,
kdy **Jacques Monod** objevil lac operon (Nobelova cena 1968)*



www.nobelprize.org

Indukce syntézy proteinů

β -galaktozidáza (u *E. coli*)

- jeden z enzymů pro štěpení laktozy u *E. coli* (spolu s permeazou a transacetylázou)
- v prostředí kde je jediný zdroj uhlíku glukóza se enzym netvoří
- po přenosu do prostředí s jediným zdrojem uhlíku laktózou začnou syntetizovat β -galaktozidázu za 1min
- **Koreprese:** glukóza aktivně potlačuje syntézu β -galaktozidázy
 - samotná přítomnost laktozy nestačí, aby se začal tvořit enzym
 - tzn. za přítomnosti glukózy i laktozy zůstává laktoza nedotčena

Represe syntézy proteinů

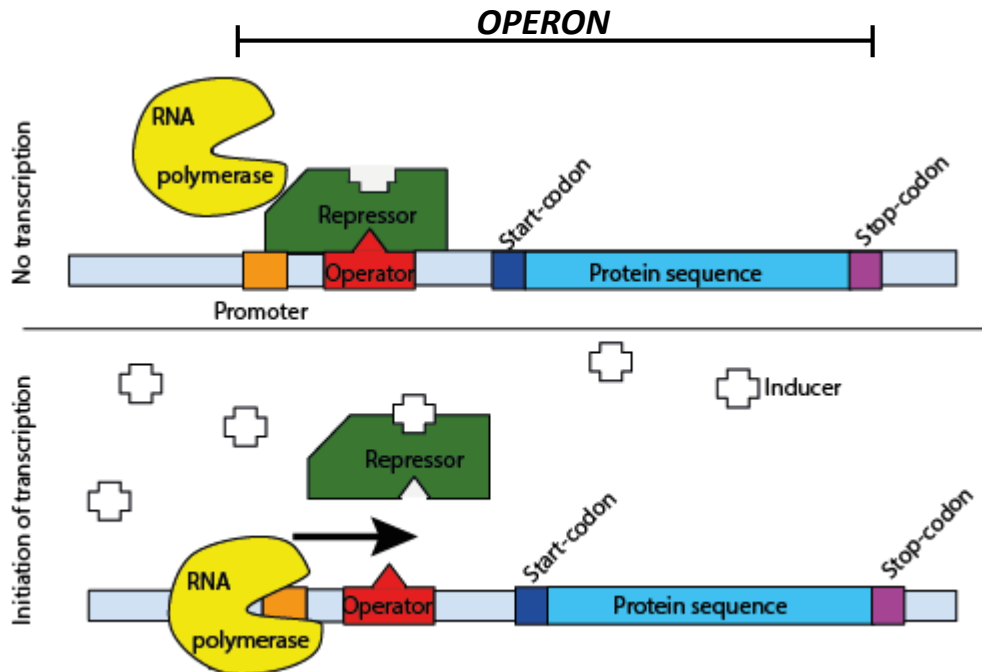
- syntéza enzymu potlačena metabolitem dané biochemické dráhy
- syntéza se zastavuje pokud se v buňce nahromadí metabolit do kritického množství (např. aminokyseliny)
- při poklesu pod kritickou mez se obnovuje

Regulace operonu

- Operon - transkripční jednotka, která obsahuje regulační místa "Promotor" a "Operátor" před strukturálními geny
- Operátor - úsek na operonu, kam se váže **repressor** → zastavení transkripce
- Slabé nekovalentní vazby

Represor (negativní regulační protein)

- Fyzicky brání RNA-polymeráze ve vazbě nebo pohybu na DNA
- Na represor se váže signální molekula
 - a) induktor - zabraňuje vazbě na operátor - probíhá transkripce
 - b) korepresor (není nezbytný) - podporuje vazbu na operátor - neprobíhá transkripce



Laktóзовý operon *E. coli* (*lac* operon)

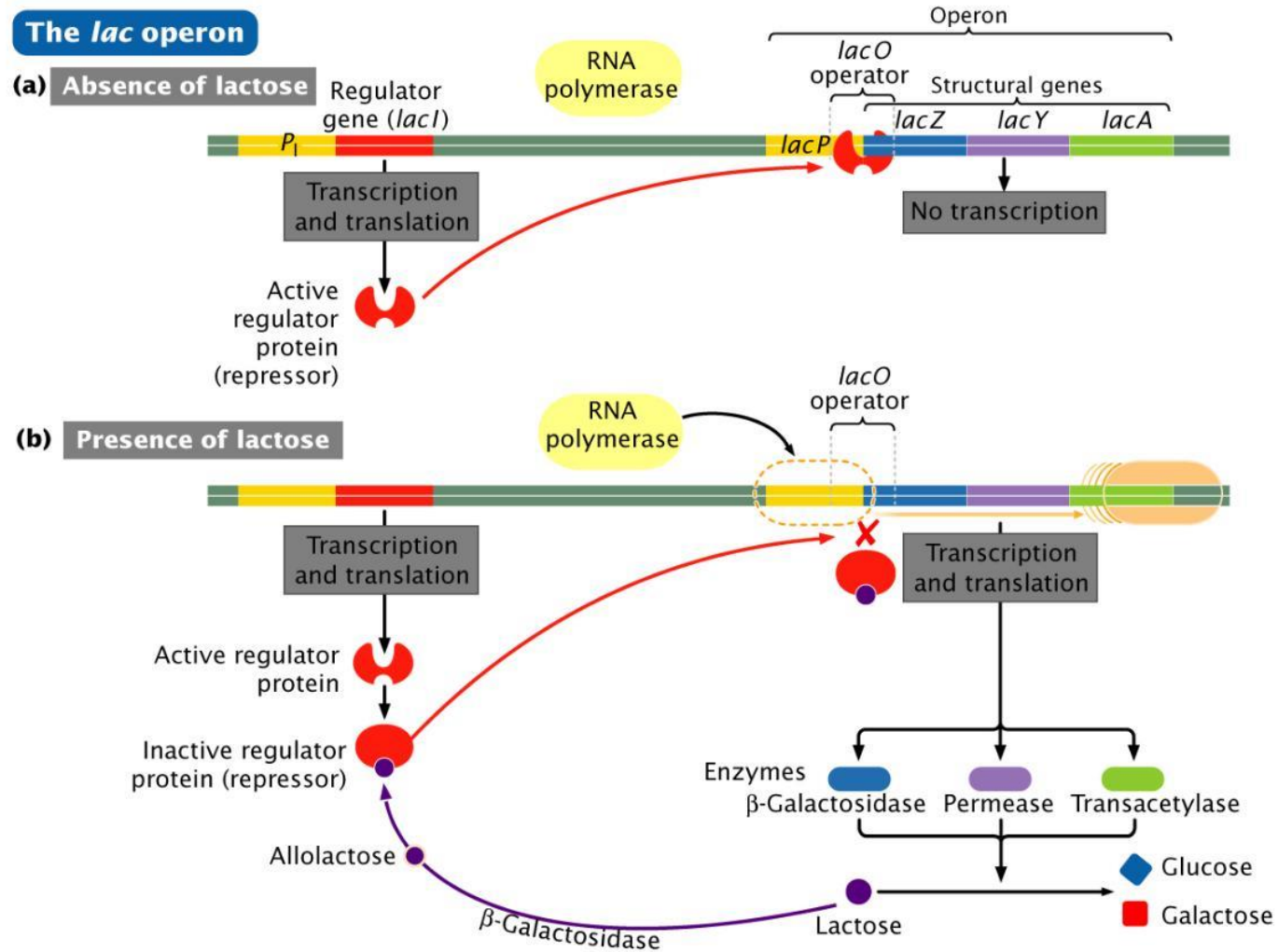
lacI - gen pro regulační protein (nachází se před strukturálními geny pro enzymy štěpící laktozu)

lacZ - gen pro β -galaktozidázu

lacY - gen pro Permeázu

lacA - gen pro Transacetylázu

Geny pro funkčně blízké proteiny se nachází na DNA v rámci jedné transkripční jednotky (operonu)



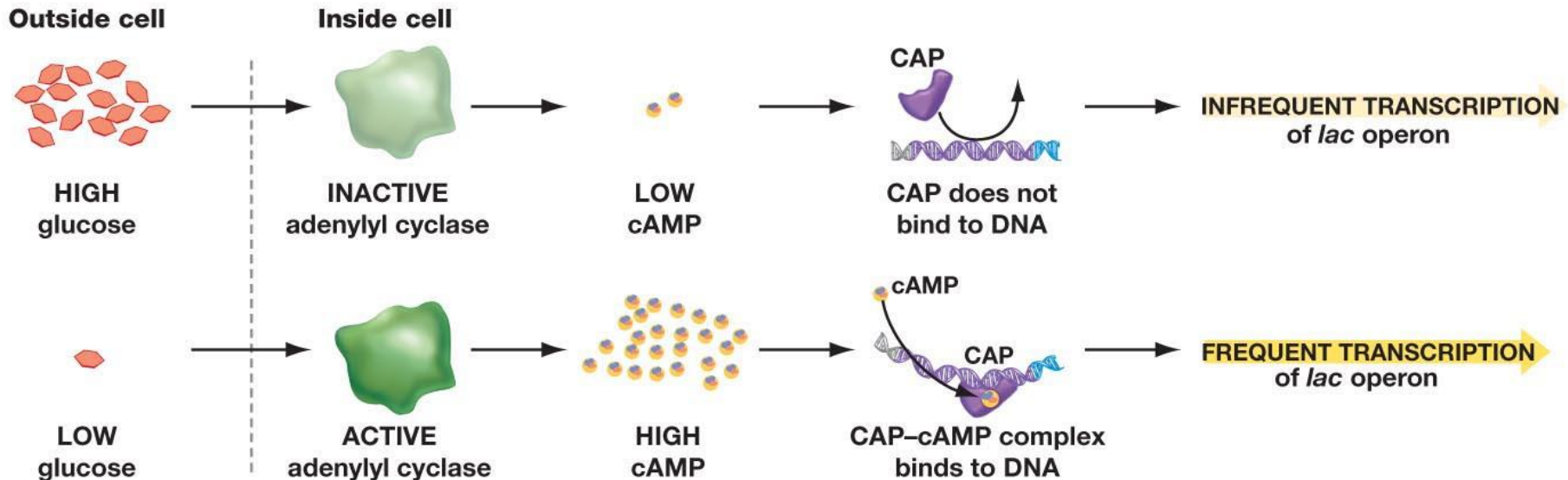
Fig_16-08 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

Laktózový operon *E. coli* (*lac operon*)

- glukóza je pro *E. coli* "sugar of choice" a dává jí přednost před laktozou
- samotná přítomnost laktozy nestačí, aby se začal naplno tvořit enzym
- musí být zároveň nepřítomná glukóza

- RNA polymeráza má sama o sobě slabou afinitu k promotoru *lac operonu*
- potřebuje pomoc pozitivního regulačního proteinu - CAP (catabolite activator protein)
- CAP se váže na promotor *lac operonu* pouze po aktivaci pomocí cAMP (signální molekula/alosterický ef.)
- Glukóza ovšem inhibuje tvorbu cAMP inhibicí enzymu adenyl cyklázy

(b) The amount of cAMP and the rate of transcription of the *lac operon* are inversely related to the concentration of glucose.



Laktózový operon *E. coli* (*lac* operon)

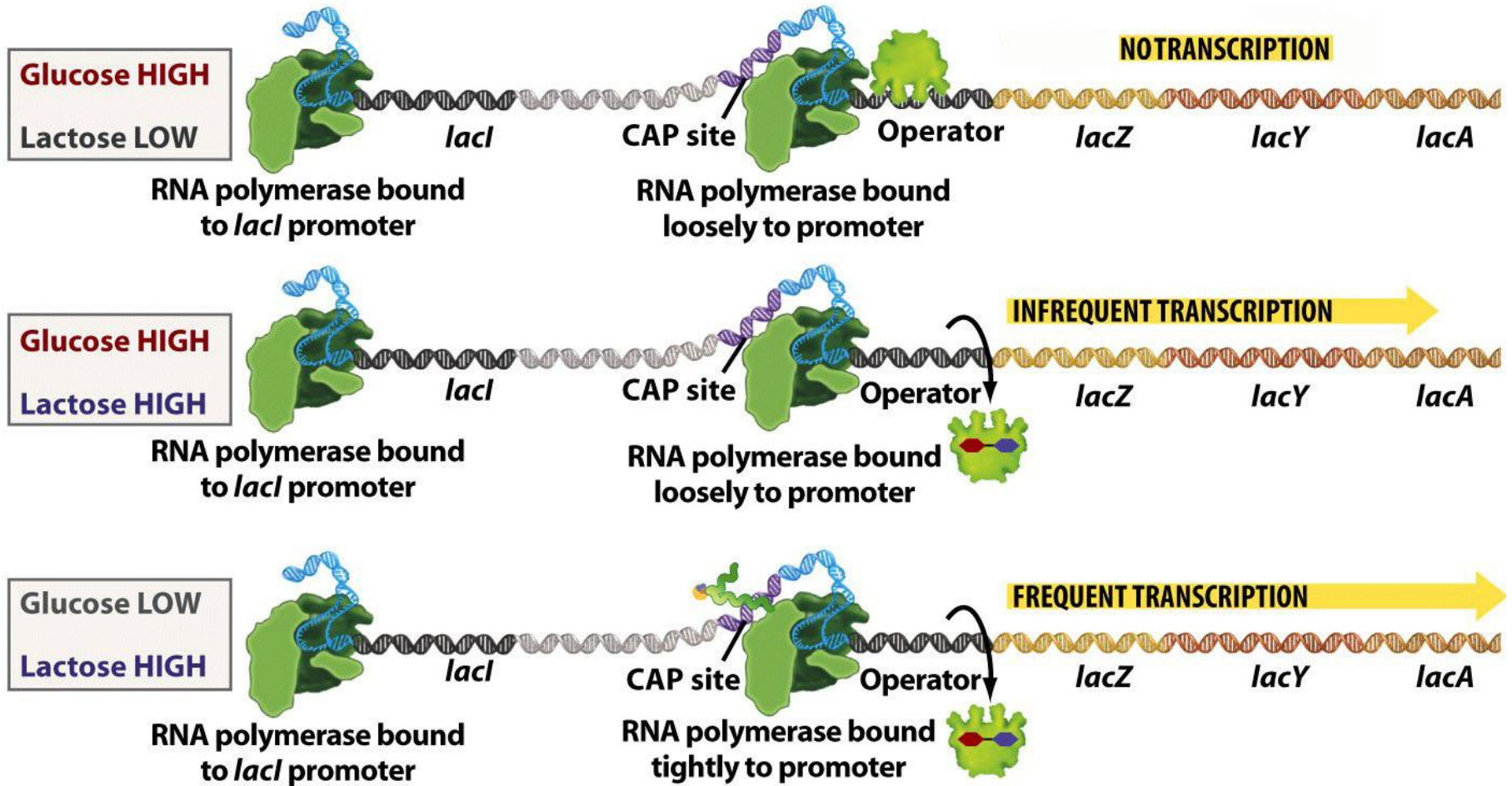
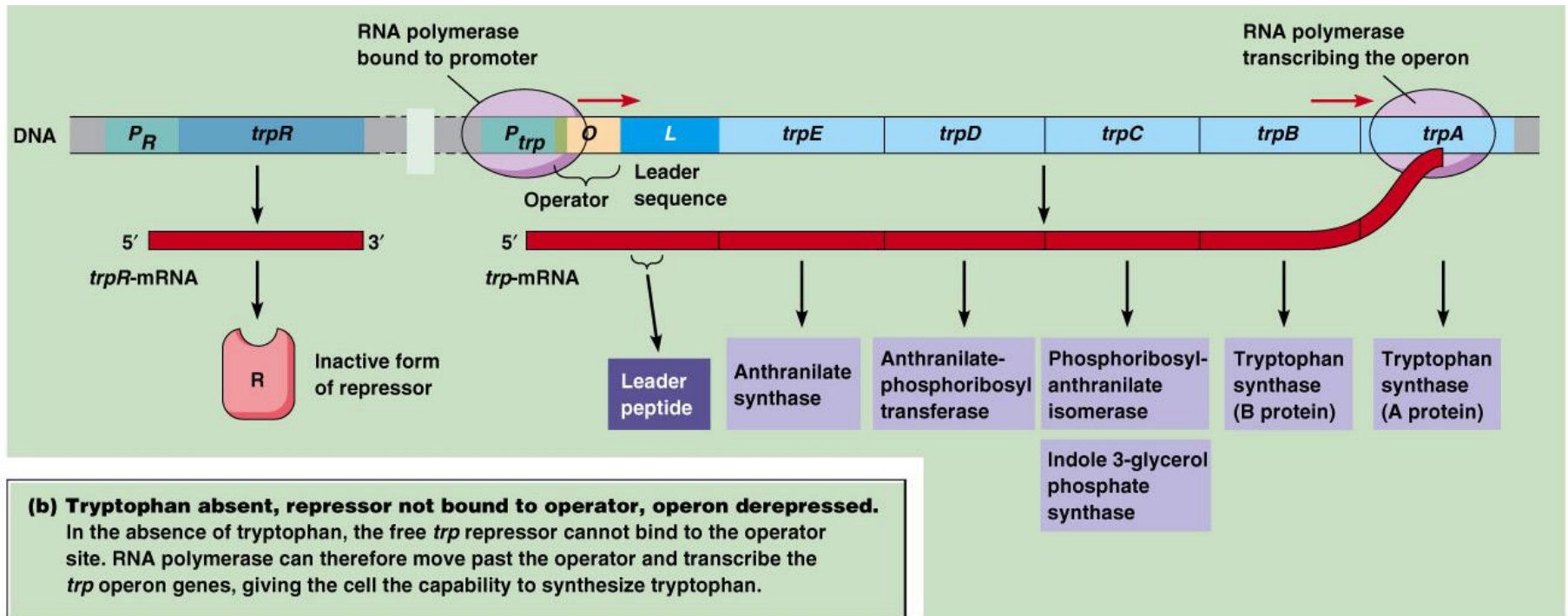


Figure 17-10 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Tryptofanový operon (trp operon)

- obsahuje 5 strukturních genů (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, and *trpA*), promotor (P_{trp}), operator (O), a vedoucí sekvenci (L)
- Pokud Tryptofan chybí - represor (kodován *trpR*) je inaktivní - transkripce probíhá

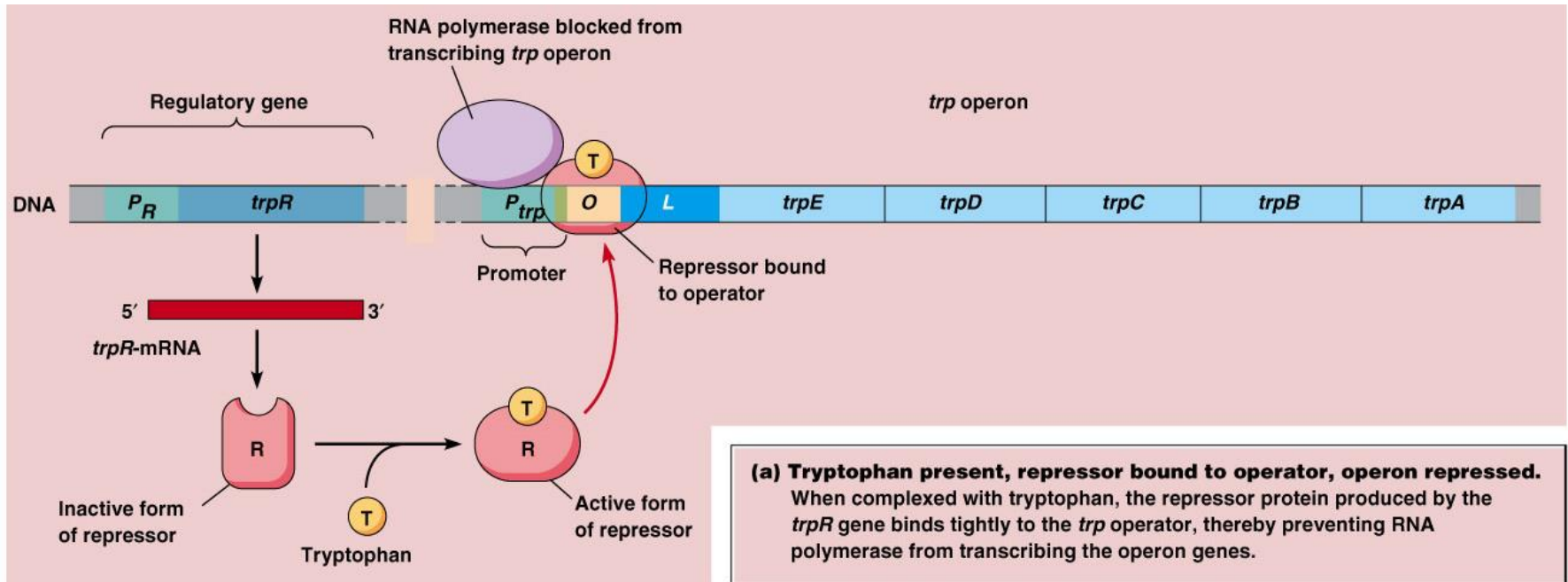


© 2012 Pearson Education, Inc.

Vedoucí sekvence DNA – úsek DNA v bakteriálních transkripčních jednotkách uložená mezi promotorem a prvním strukturním genem. Je v ní uložena Shine-Dalgarnova sekvence. Může obsahovat atenuátor.

Tryptofanový operon (*trp* operon)

- Pokud je Tryptofan přítomen, váže se na represor a represor vazbou na DNA zastaví transkripci
- - Exprese genů kodujících enzymy biochemické dráhy pro syntézu Tryptofanu je navíc ještě řízena tzv. atenuací

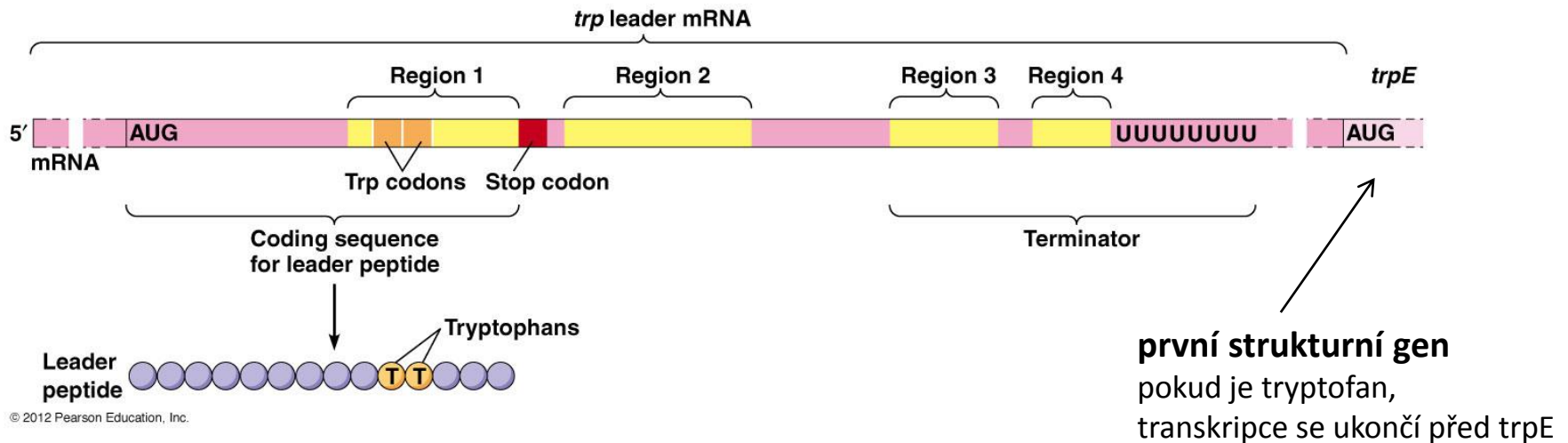


Atenuace

- Atenuátor - oblast ve vedoucí sekvenci DNA (překládá se)
- Pouze u prokaryot
- Spojení mezi transkripcí a translací u prokaryot umožňuje fungování kontrolního mechanismu atenuace
- Nascentní řetězec RNA je kousek dál simultánně překládán do proteinu
- Transkript *trp* operonu (mRNA) obsahuje 162 nukleotidů před prvním strukturálním genem *trpE*
- Tato vedoucí sekvence obsahuje "sensor" (neboli vedoucí peptid) o velikosti 14 AA

a) pokud je přítomen tryptofan - vytvoří se pouze vedoucí peptid

b) pokud není přítomen tryptofan - celý operon je přeložen a vytvoří se enzymy pro syntézu tryptofanu



Vedoucí sekvence DNA – úsek DNA v bakteriálních transkripčních jednotkách uložený mezi promotorem a prvním strukturálním genem. Je v ní uložena Shine-Dalgarnova sekvence. Může obsahovat atenuátor.

Mechanismus atenuace

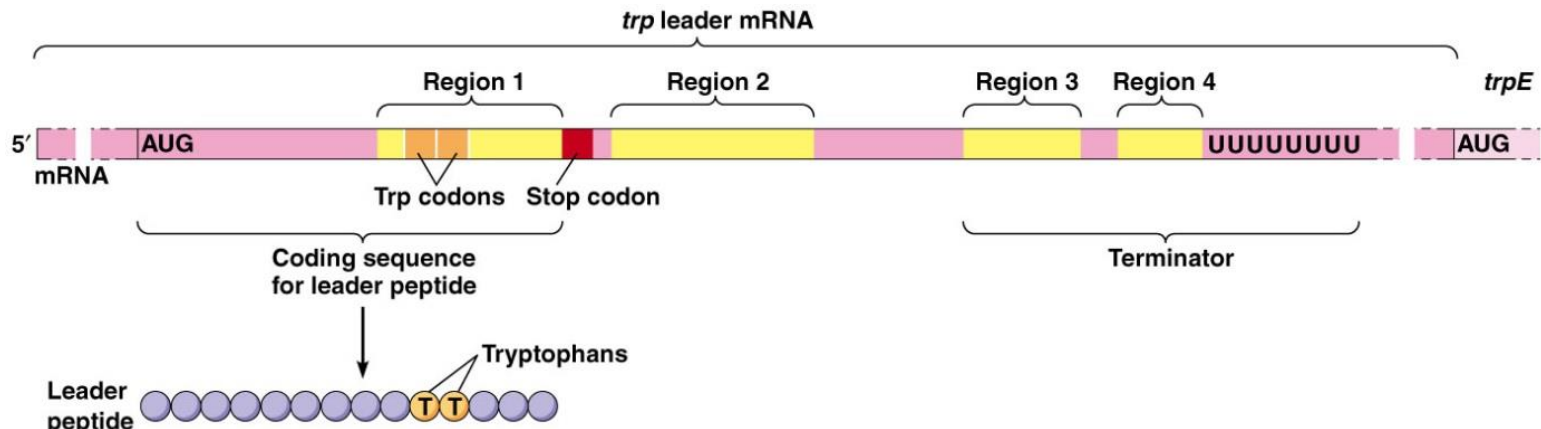
- vedoucí sekvence mRNA obsahuje 4 regiony, které jsou vzájemně kompatibilní a schopny tvořit vlásenky: 1+2, 2+3, 3+4
- regiony 3+4 jsou schopny tvořit terminační vlásenku - RNA-polymeráza se uvolňuje z DNA

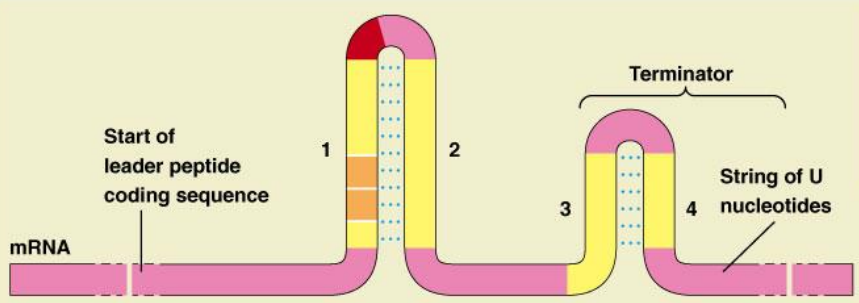
1. Nedostatek tryptofanu

- ribozom se zastaví na místě kodovaném pro tryptofan (region 1) čeká až přiletí tRNA
- ribozom fyzicky zablokuje pouze region 1. **Region 2 je volný** a vytvoří vlásenku s regionem 3
- nevzniká tedy terminační vlásenka 3+4 → translace pokračuje a enzymy pro syntézu nedostatkového tryptofanu jsou vyrobeny

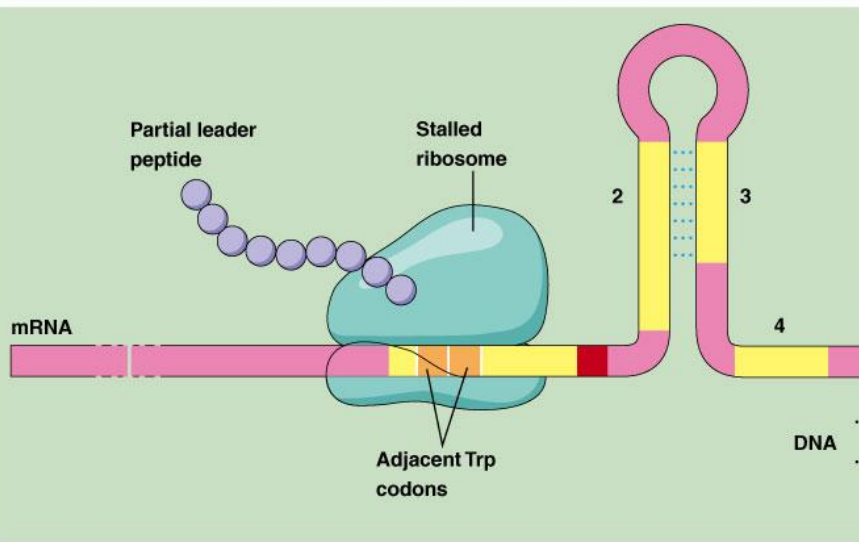
2. Dostatek tryptofanu

- ribozom se zastaví až ve stop kodonu - **blokuje region 2**
- vzniká terminační vlásenka 3+4 a RNA-polymeráza se uvolňuje
- výsledkem je pouze krátký vedoucí peptid (14 AA)



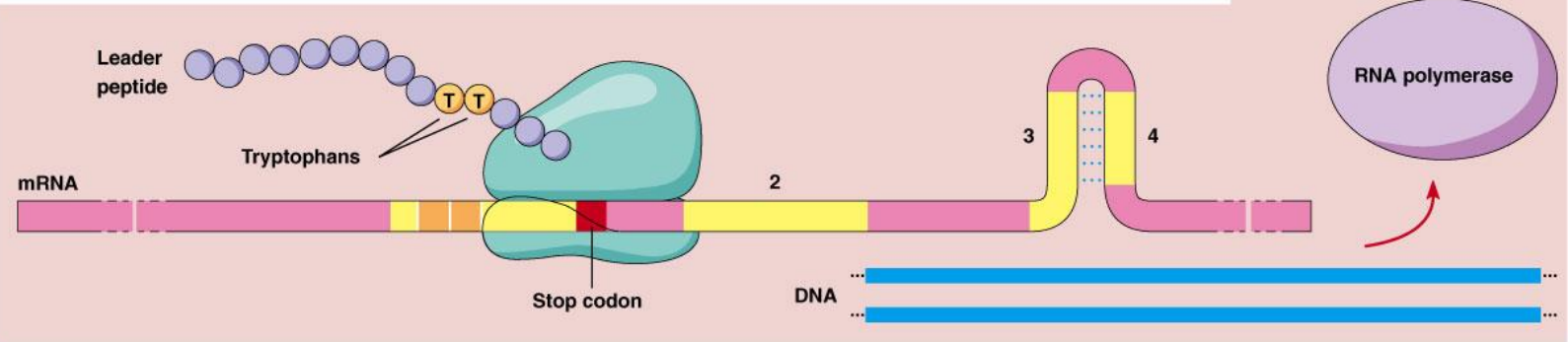


(a) The most stable secondary structure for *trp* leader mRNA. Attenuation depends on the ability of regions 1 and 2 and regions 3 and 4 of the *trp* leader sequence to base-pair, forming hairpin secondary structures. The 3–4 hairpin structure acts as a transcription termination signal.



(b) When tryptophan is scarce the ribosome stalls, allowing a 2–3 “antiterminator” hairpin to form. The ribosome stalls when it encounters the two tryptophan (Trp) codons due to a shortage of tryptophan-carrying tRNA molecules. The stalled ribosome blocks region 1, so a 1–2 hairpin cannot form. Instead an alternative 2–3 hairpin is created, which prevents formation of the 3–4 termination hairpin. Therefore RNA polymerase can move on to transcribe the entire operon.

(c) When tryptophan is plentiful the ribosome continues, allowing the 3–4 transcription termination signal to form. The moving ribosome completes translation of the leader peptide and pauses at the stop codon, blocking region 2. As a result, the 3–4 structure forms and terminates transcription near the end of the leader sequence.

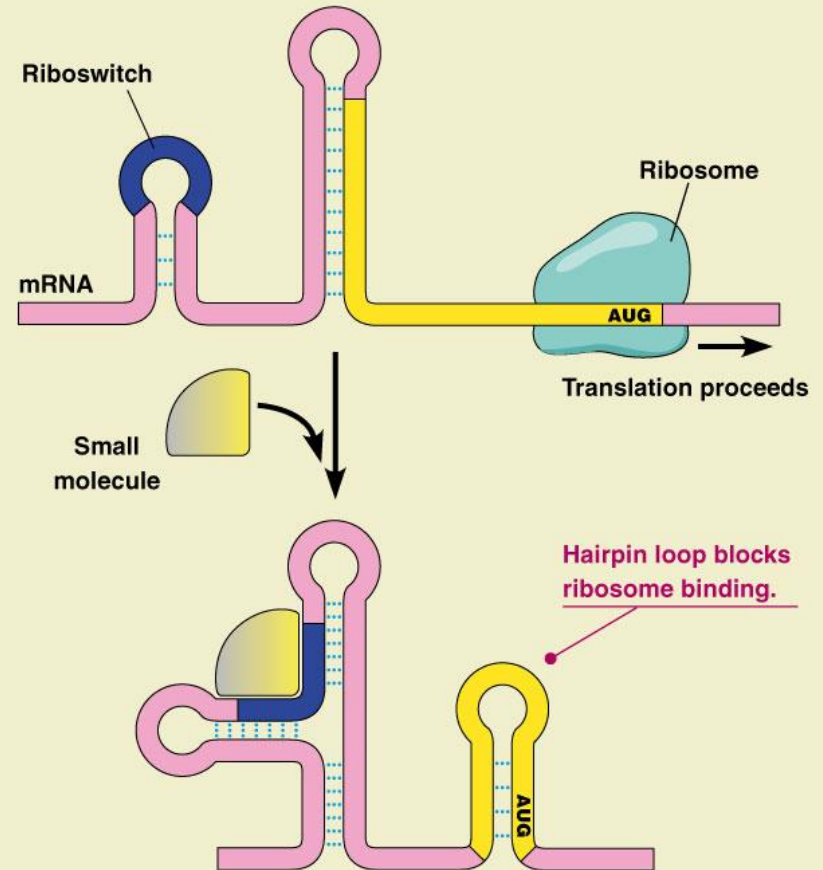
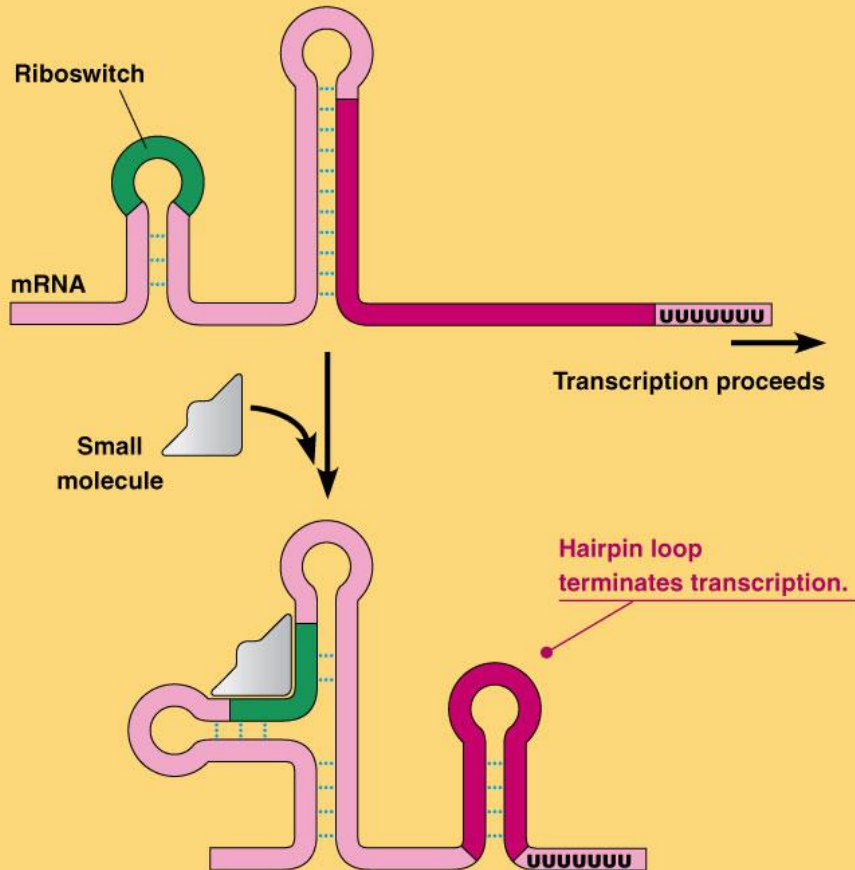


Riboswitch - další příklady

- regulační úsek na mRNA, který kontroluje produkci daného proteinu (může vázat signální molekuly)

(a) Transcription termination. Binding of a small molecule to a riboswitch in the leader sequence of some mRNAs triggers the formation of a hairpin loop that terminates transcription. FMN binding to the leader sequence of the mRNA transcribed from the *rib* operon of *B. subtilis* works in this way.

(b) Translation initiation. In other mRNAs, a small molecule binding to a riboswitch triggers formation of a hairpin loop containing the site where ribosomes normally bind, thereby interfering with translation initiation. In *E. coli*, this type of control is used by FMN to inhibit translation of mRNAs coding for enzymes involved in FMN synthesis.



Řízení exprese eukaryotického genomu

Část druhá: Řízení exprese eukaryotického genomu

Mnohem komplexnější než u prokaryot - příkladem je regulace exprese lidského genomu

- Všechny buňky mají stejnou DNA (s výjimkou gamet)
- V běžné buňce musí být téměř všechny geny vypnuty
- Většinou má každý gen několik regulátorů
- Lidská buňka obsahuje kolem 21 000 genů (původní odhad 100 000)

	chromosomes --diploid	base pairs	genome size (#genes)
fruit fly	8	1.65×10^8	13,600
Budding yeast	16	12,462,637	6,275
human	46	3.3×10^9	~21,000
human mitochondria		16,569	13
rice	24	4.66×10^8	46,022 -55,615
dog	78	2.4×10^9	~25,000
mouse	40	3.4×10^9	~23,000

http://www.edinformatics.com/math_science/human_genome.htm

Část druhá: Řízení exprese eukaryotického genomu

Exprese genů (tzn. "výroba proteinů")

1. Housekeeping geny

- exprimovány ve všech buňkách stále
- rutinní metabolické funkce, buňka se udržuje naživu

2. Geny exprimované při diferenciaci buňky

- zapnutí určité signální dráhy nezbytné pro diferenciaci
- zapnutí pouze po určitou dobu

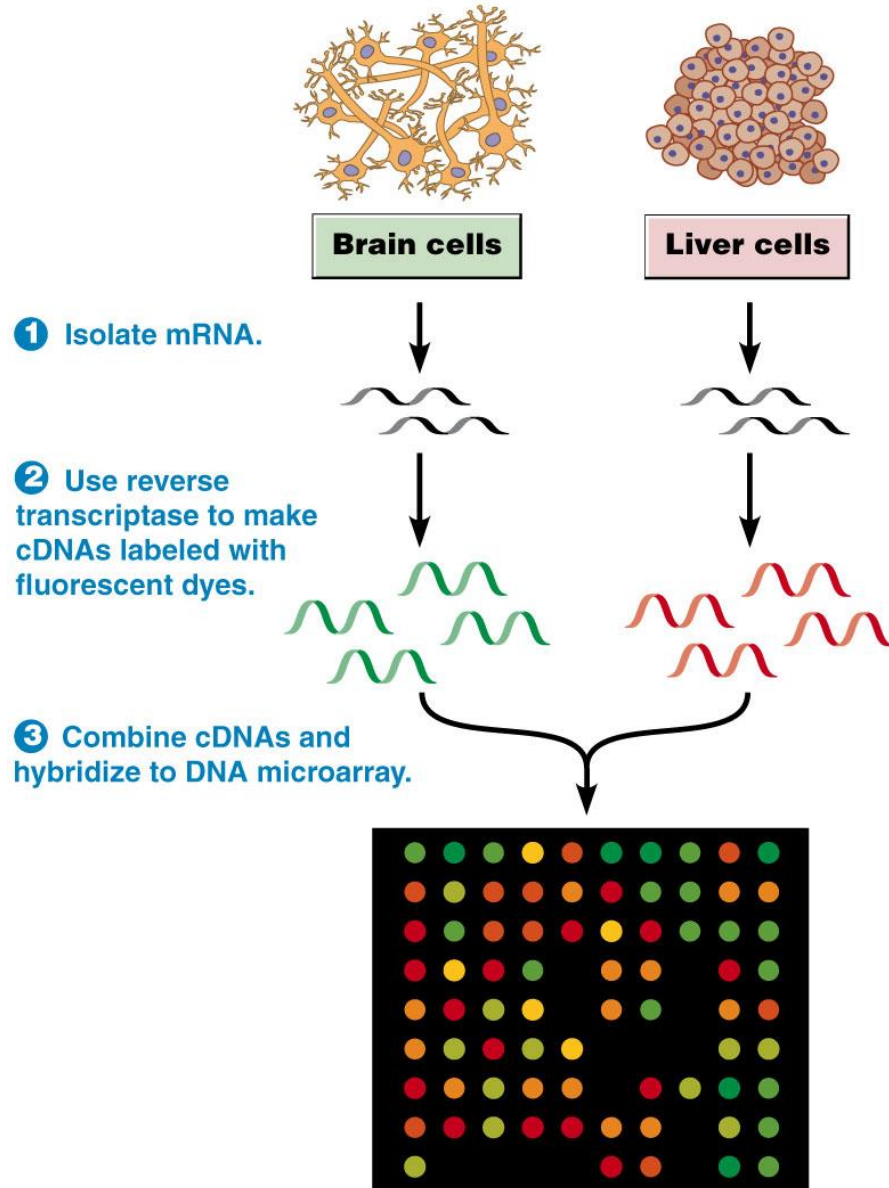
3. Geny nutné pro funkci specializované buňky

- stálá exprese pouze u určitého typu buněk
- např. syntéza protilátek v plazmatických buňkách (terminálně diferencovaný B-lymfocyt)

4. Geny zapnuté/vypnuté v reakci na okolní podmínky

- např. po signalizaci hormonem

V rozdílných tkáních jsou transkribovány odlišné geny (vzniká jiná mRNA)



Regulace genové exprese eukaryot

1. Chromatinová remodelace

- oblast chromozomu musí být otevřená aby měly enzymy a TF* přístup ke genu
- epigenetické modifikace:
 - methylace DNA
 - methylace a acetylace histonů

2. Transkripční kontrola

- vazba TF na regulační oblasti DNA
- vypínání/zapínání tvorby mRNA

3. Post-transkripční úpravy

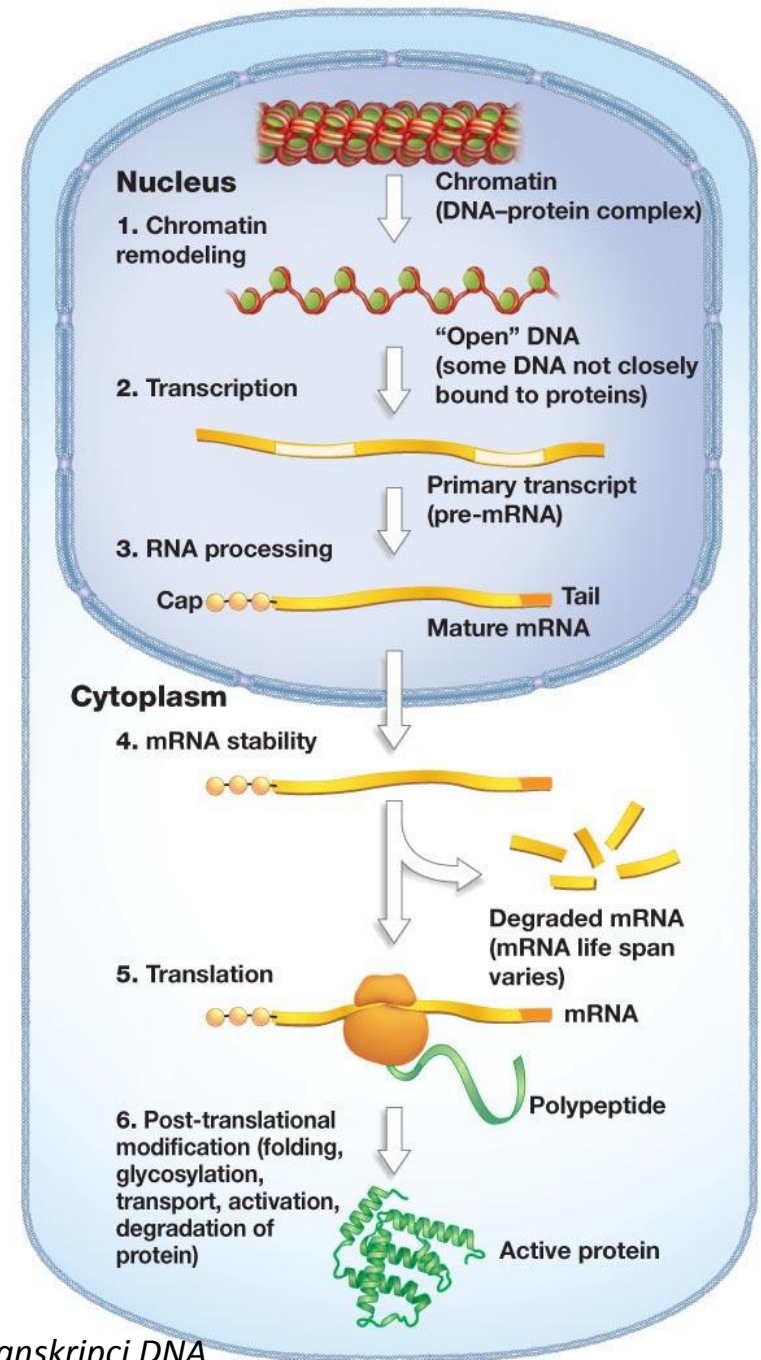
- zpracování pre-mRNA do mRNA - sestřih
- RNA interference (RNAi)

4. Kontrola translace

- Translační iniciační faktory regulují intenzitu translace

5. Posttranslační procesy

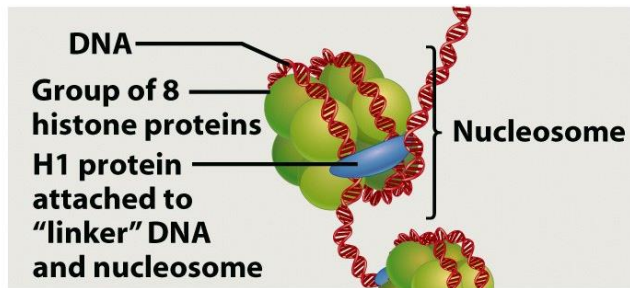
- modifikace proteinu do formy aktivního proteinu



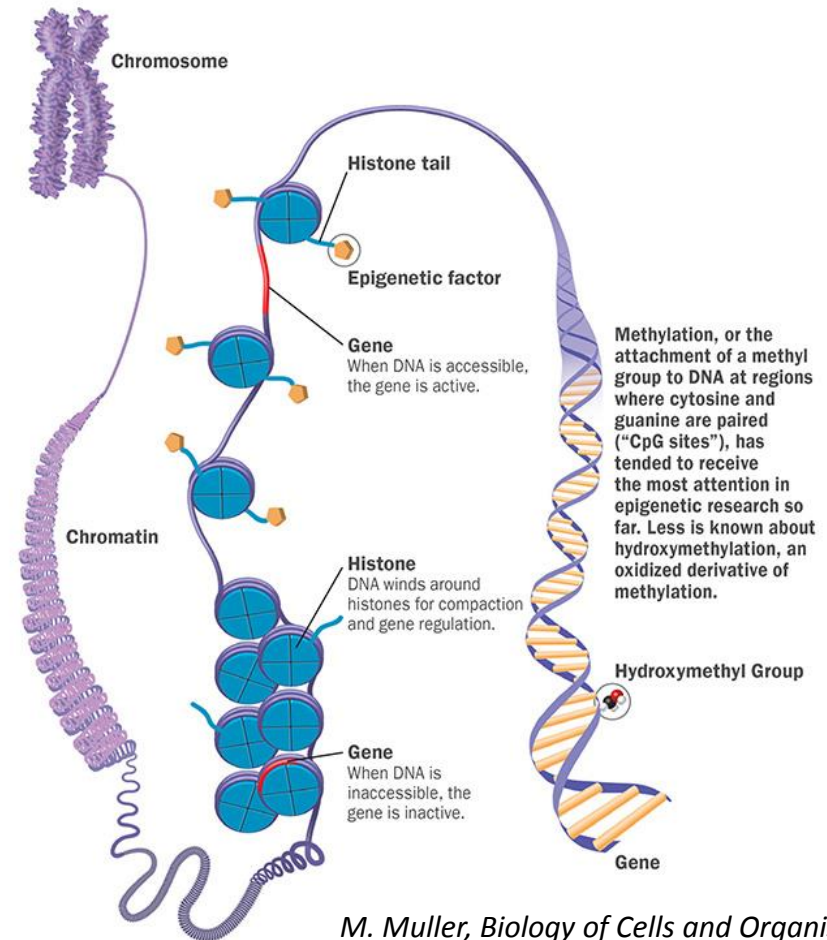
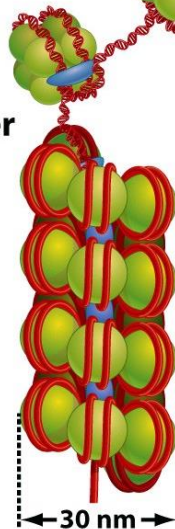
* TF (Transkripční faktor): protein schopný spouštět či jinak regulovat transkripci DNA

Chromatinová remodelace

- oblast chromozomu musí být otevřená (dekondenzovaná) aby měly enzymy a TF přístup ke genu
- chromozom je tvořen komplexem histonových proteinů a DNA, nazývaným **CHROMATIN**
- transkripce může proběhnout, pouze pokud se "zabalený" **heterochromatin** dekondenzuje do "rozbaleného" **euchromatinu**
- Chromatinové remodelace patří mezi nejtypičtější **epigenetické modifikace**



(c) 30-Nanometer fiber



M. Muller, *Biology of Cells and Organisms*
University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Chromatinová remodelace

- **Chromatin-remodeling complexes** - skupina proteinů, které mění strukturu chromatinu

- **KONDENZACI** a **DEKONDENZACI** chromatinu zajišťují enzymy:

1. Histon acetyl transferázy (HAT)

- rozbalují (dekondenzují) chromatin do euchromatinu

2. Histon deacetylázy (HDAC)

- zabalují (kondenzují chromatin)
do heterochromatinu

3. Dnmt (DNA methyltransferázy)

- Methylace DNA (Cytosinu)
- Zabalují chromatin

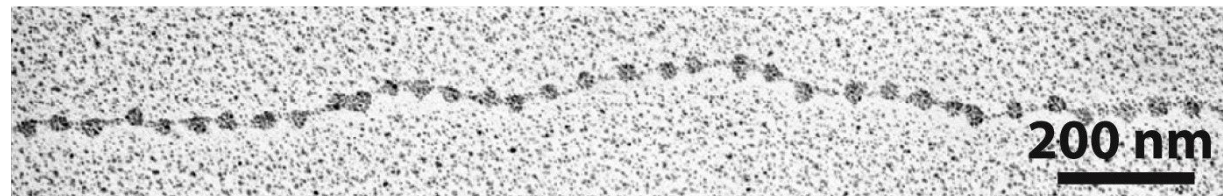
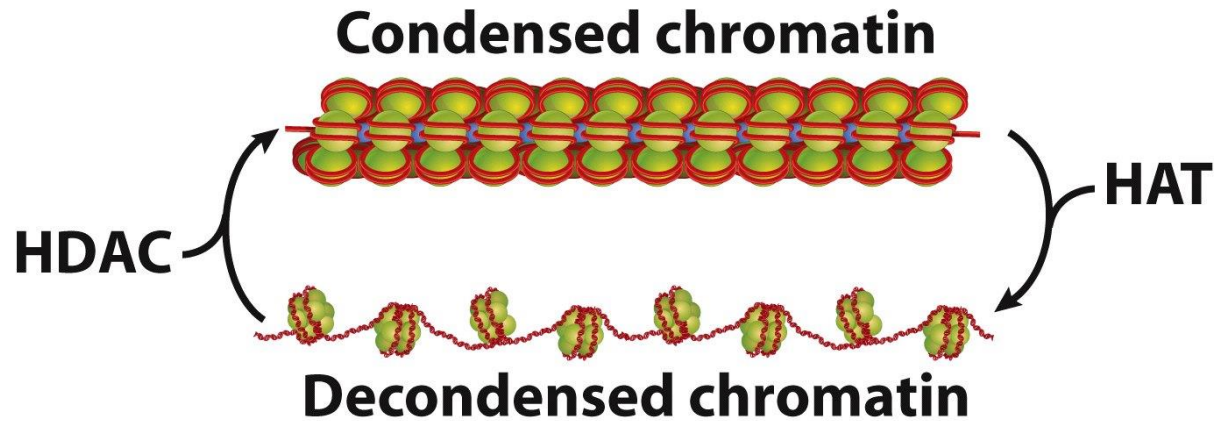
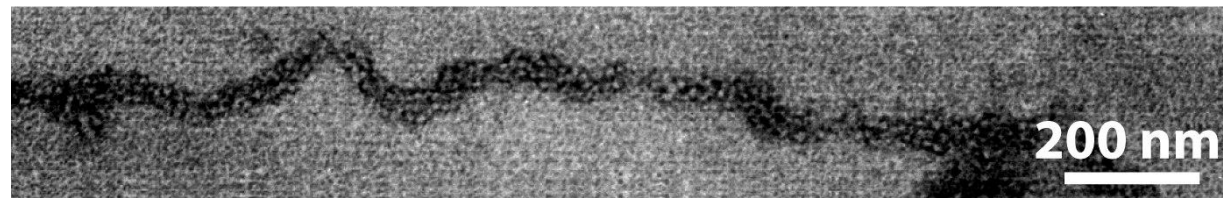


Figure 18-4 Biological Science, 2/e

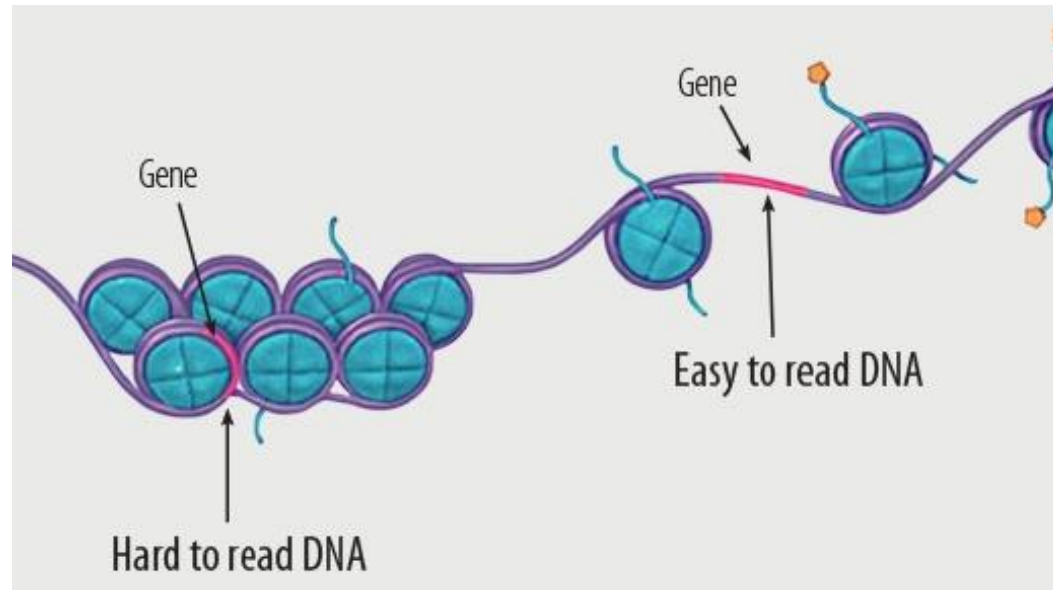
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Chromatinová remodelace - EPIGENETIKA

"Studuje změny v genové expresi (buněčného fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA, ale mohou být dědičné"

DNA sekvence (A, C, T, G) je jako manuál a epigenetické modifikace jako zvýrazňovače, které podtrhují různými barvami různě důležité části v jednotlivých buňkách

Na rozdíl od DNA sekvence se epigenetické značky mění během vývoje a v reakci na vnější okolnosti a mohou se též dědit



Chromatinová remodelace - EPIGENETIKA

- hlavně kovalentní modifikace a) DNA a b) histonů
- tyto bývají synonymem pro "epigenetiku"
- mezi epigenetické regulátory řadíme též siRNA a miRNA (souhrnně RNA interference - RNAi)

a) modifikace DNA

- methylace cytosinu

- inhibuje transkripci
- umlčení exprese

- Dnmt (DNA methyltransferáza)
- v CpG ostrůvcích**

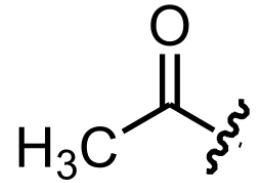
b) modifikace histonových proteinů

- methylace nebo acetylace

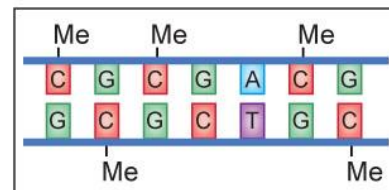
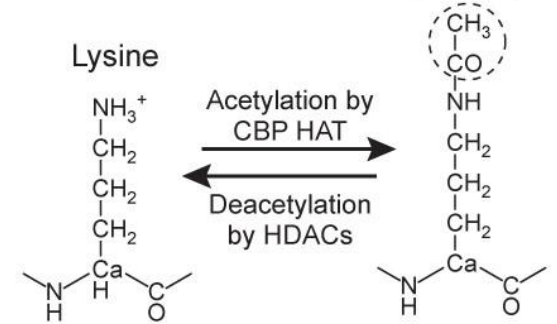
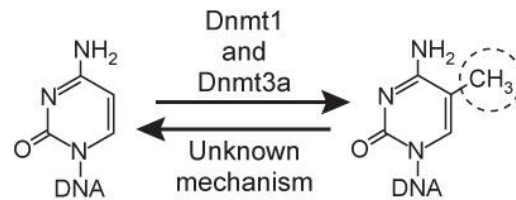
- hlavně acetylace lysinu

- aktivuje transkripci

- HAT a HDAC



Acetylated lysine



*Dawson and Kouzarides, Cell 2012

**CpG ostrůvky: nukleotidy C a G vedle sebe na stejné DNA řetězci (cytosin - fosfát - guanin)

Histonový kód

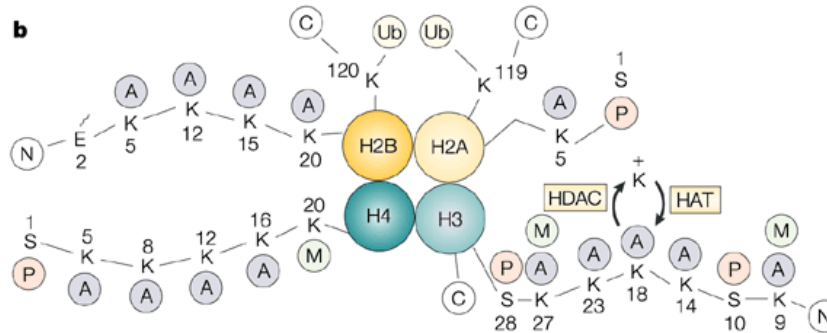
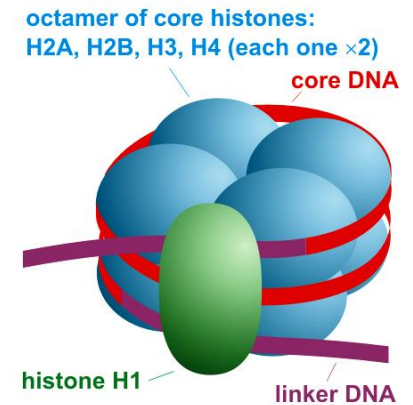
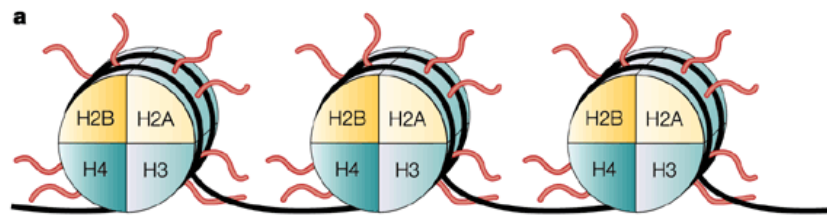
Hypotéza, že informace kódovaná v DNA je částečně řízena chemickými modifikacemi histonů

- spolu s DNA methylacemi tvoří *epigenetický kód*

- zatímco DNA kód mají všechny somatické buňky stejný, histonový a epigenetický kód je specifický pro každou buňku či tkáň

- modifikovány bývají N-konce, které vyčnívají z nukleozomu

- nejčastěji bývá modifikován lysin (K)



Nature Reviews | Cancer

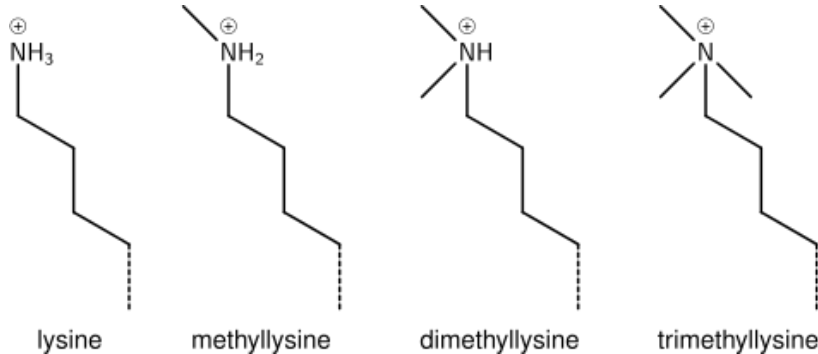
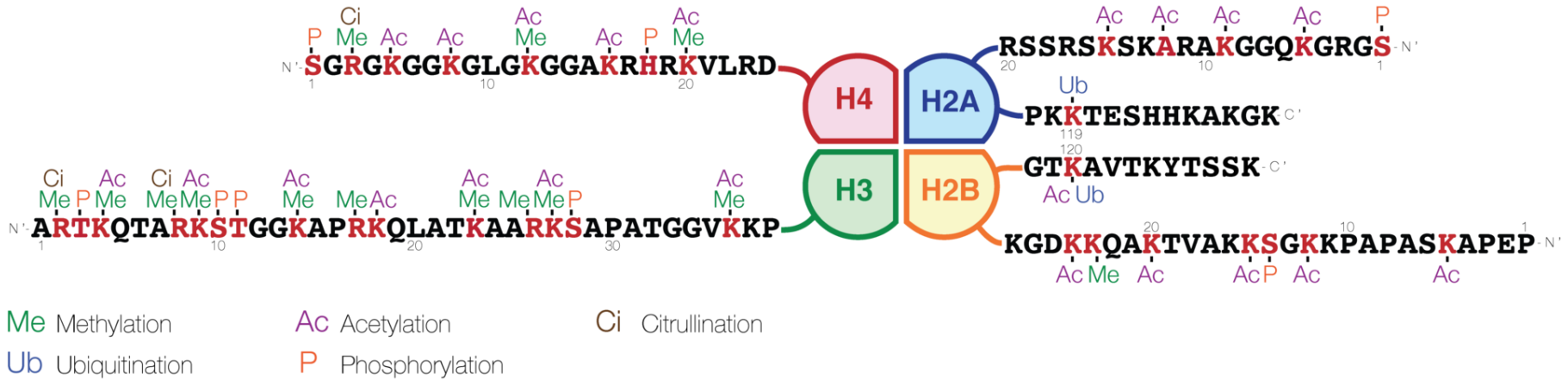
Nukleozom: skládá se z osmi histonových proteinů (2 od každého ze 4 druhů: H2A, H2B, H3 a H4) a z navinutého řetězce DNA dlouhého 147 nukleotidů

Histony: proteiny, okolo kterých je omotána DNA. 5 druhů (H1, H2A, H2B, H3 and H4)

Nomenklatura histonových modifikací

1. Jméno histonu (např. H3)
2. Jednopísmenná zkratka aminokyseliny (např. K pro lysin) a pozice AA v proteinu (počítáno od N'-konce)
3. Typ modifikace (Me: methyl, P: phosphate, Ac: acetyl, Ub: ubiquitin)
4. Počet modifikací (pouze methyl může mít více - až tři - kopie na AA zbytek)

Příklad: **H3K4me1** značí monomethylaci čtvrté AA od N'-konce (lysinu - K) na proteinu H3



Příklady známých histonových modifikací

Acetylace histonu vede k rozvolnění chromatinu a aktivaci exprese

Na rozdíl od methylace DNA neplatí, že methylace histonu vždy znamená umlčení (represi) exprese genu

Type of modification	Histone						
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H4K20	H2BK5
mono-methylation	activation ^[6]	activation ^[7]		activation ^[7]	activation ^{[7][8]}	activation ^[7]	activation ^[7]
di-methylation	activation	repression ^[3]		repression ^[3]	activation ^[8]		
tri-methylation	activation ^[9]	repression ^[7]		repression ^[7]	activation, ^[8] repression ^[7]		repression ^[3]
acetylation		activation ^[9]	activation ^[9]				

[Video: Histonové modifikace](#)

V kostce:

HDAC - Histon deacetylázy

potlačují expresi

HDAC1, HDAC2, HDAC2...

HAT - Histon acetyl transferázy

aktivují expresi

Gcn5, CBP/p300, PCAF, SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ...

Histon methyltransferázy

aktivují/potlačují exp.

Suv39H, CARM1, PRMT1...

DNMT - DNA methyltransferázy

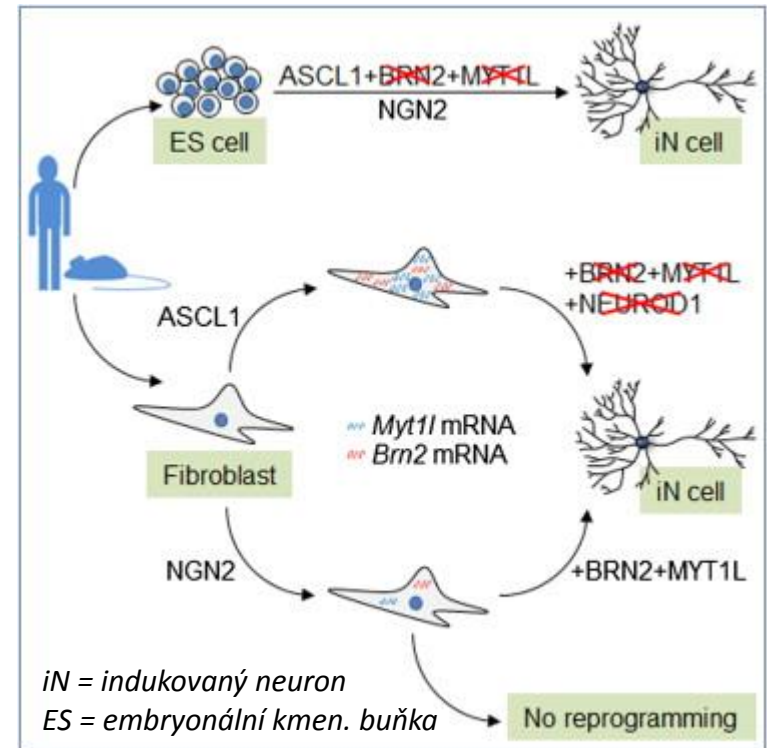
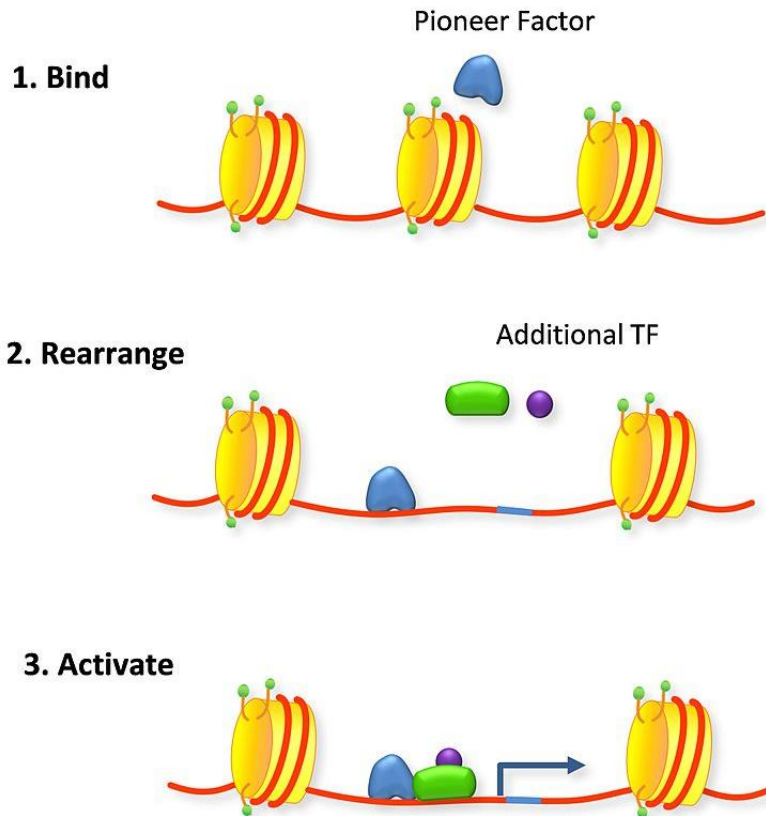
potlačují expresi

DNMT1, DNMT3...

Pioneer Transcription Factor (TF)

TF, který se dokáže vázat na kondenzovaný (uzavřený) heterochromatin

- objeven r. 2002*
- účastní se zejména zahájení diferenciace a aktivace buněčně-specifických genů
- příkladem je pioneer transkripční faktor ASCL1, který zahajuje (trans)diferenciaci do neuronu** (navíc MYT1L zajišťuje vypnutí non-neuronálních genů; např. fibroblastových při transdiferenciaci)



* Cirillo et al., 2002, "Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4". *Molecular Cell*. 9 (2): 279–89.

** Wapinski 2013; Chanda 2014

EPIGENETIKA

epigenetické změny mohou být ovlivněny okolními podmínkami (věkem, nemocí, výživou...)

Vzrůstající epigenetické rozdíly v průběhu života u monozygotických dvojčat*

- dvojčata jsou po narození epigeneticky identická, avšak po několika letech lze detekovat rozdíly v genomické distribuci 5-methylcytosinu DNA a acetylaci histonů
- rozdíly se zvětšují pokud mají dvojčata rozdílný životní styl nebo nežijí spolu*

EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Epigenetické změny způsobené prenatálním vystavením hladomoru**

- okolní podmínky mohou u lidí způsobit epigenetické změny které přetrvají po celý život
- testování DNA methylace u genu IGF2 mezi sourozenci stejného pohlaví
- lidé prenatálně vystavení hladu během hladomoru v Holandsku 1944-1945
- snížená methylace DNA v genu pro insulin-like growth factor II (IGF-2)
- zvýšená náchylnost k obezitě a srdečním onemocněním či schizofrenii

* *Fraga et al., PNAS 2005*

** *Heijmans et al., PNAS 2008*

EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Rozdíl mezi včelí královnou a dělnicí

- včelí královna a dělnice mají shodný genom
- rozdíly v methylaci DNA u více než 550 genů



Královská výživa

- "Royal jelly" je látka, produkovaná včelími dělnicemi pro výživu larev, určených za královny
- tyto larvy jsou geneticky identické s ostatními, vyrůstají v tzv. "Queen cup"
- tato dieta mj. utlumuje expresi DNA methyltransferase **Dnmt3**
- experimentální umlčení genu Dnmt3 pomocí RNA interference (RNAi) u larvy vedlo k vývoji v královnu u 72% larev*



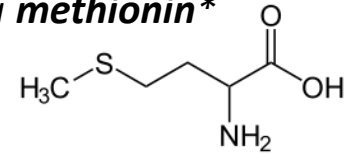
<http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/nutrition/>

* Kucharski et al., Science 2008

EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Výživa hraje velkou roli v methylačním statusu i u člověka

Zdrojem methyl-skupiny (-CH₃) pro methylaci DNA u člověka je esenciální aminokyselina **methionin***



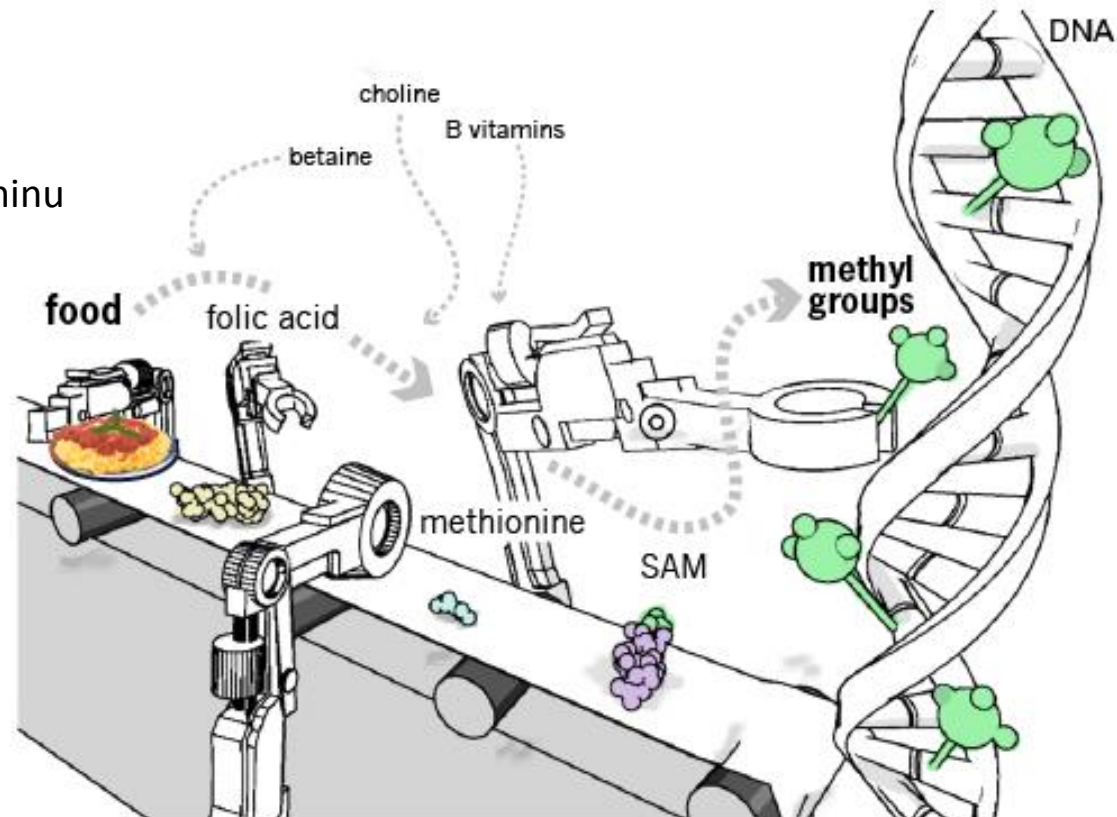
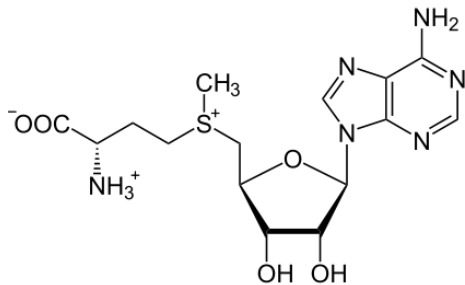
B-komplex (soubor vitamínů B):

Působí jako koenzymy a donory -CH₃ v metabolismu methioninu

- Kyselina listová (folic acid; folate; Vitamín B9)
- Vitamíny B12 a B6
- Cholin (též označován jako B4)

S-Adenosyl methionine (SAM)

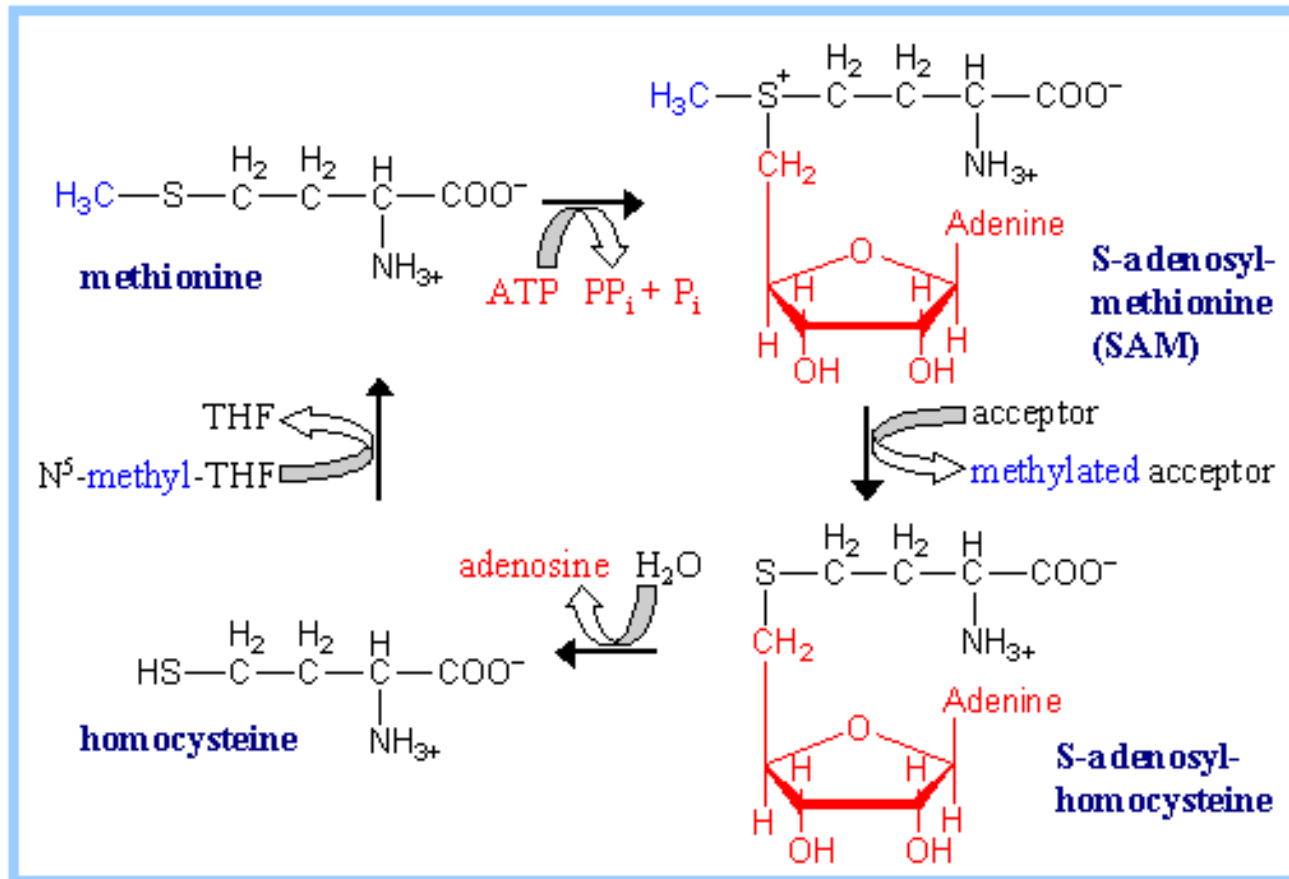
- meziprodukt při získávání -CH₃ z methioninu
- též výživový doplněk



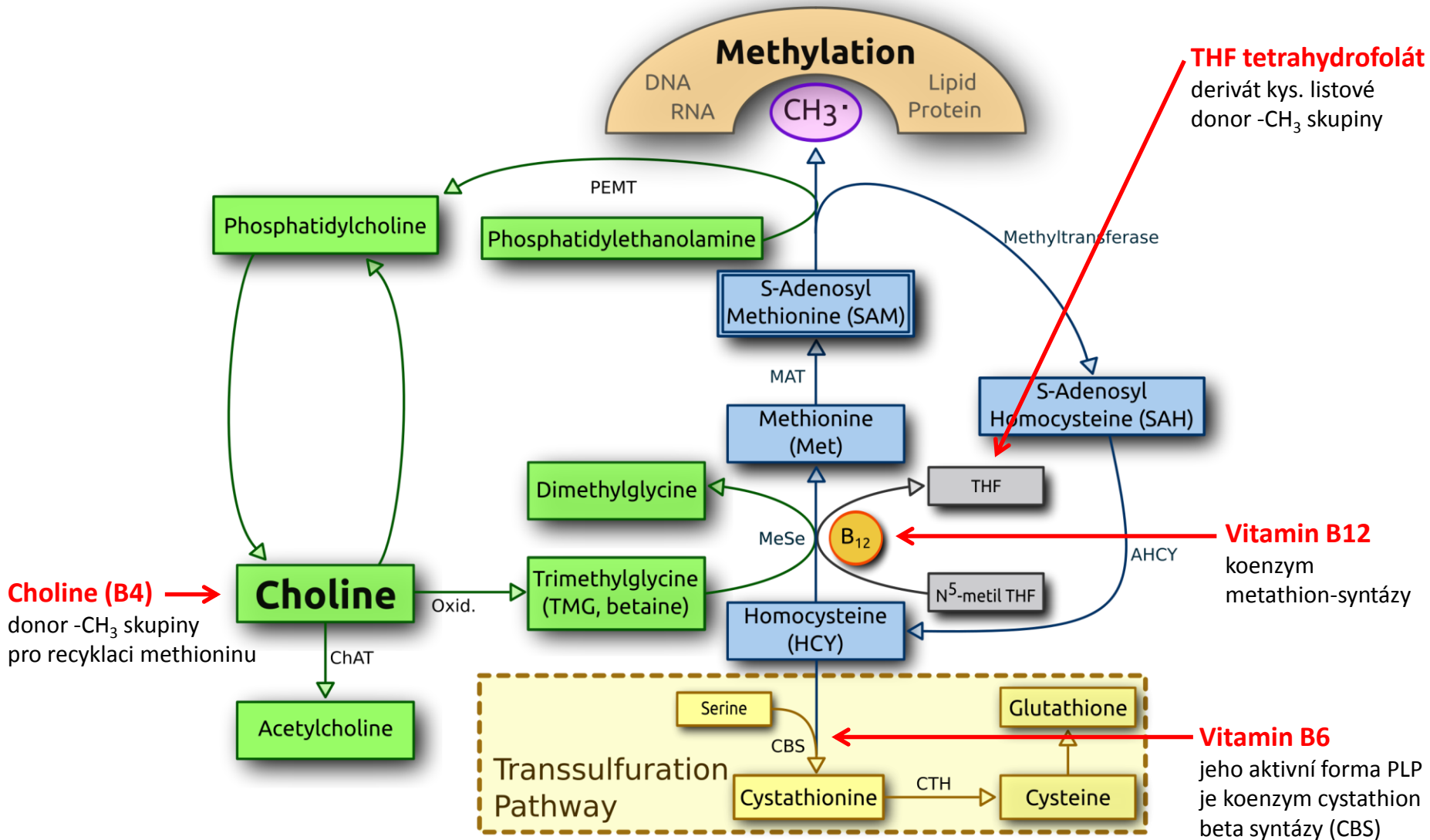
EPIGENETIKA A VÝŽIVA - KDE SE BERE METHYL SKUPINA?

Získání methyl-skupiny z aminokyseliny methioninu

- probíhá ve všech buňkách těla, zejména v játrech
- příjemci methyl-skupiny jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy...
- methionin zbavený $-CH_3$ se v těle recykluje přes homocystein přidáním $-CH_3$ za účasti tetrahydrofolátu (THF), B12 a cholinu (a jeho metabolitu betainu)



EPIGENETIKA A VÝŽIVA - KDE SE BERE METHYL SKUPINA?



EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Nutrient	Food Origin	Epigenetic Role
Methionine	Sesame seeds, brazil nuts, fish, peppers, spinach	SAM synthesis
Folic Acid B9	Leafy vegetables, sunflower seeds, baker's yeast, liver	Methionine synthesis
Vitamin B12	Meat, liver, shellfish, milk	Methionine synthesis
Vitamin B6	Meats, whole grain products, vegetables, nuts	Methionine synthesis
SAM-e (SAM)	Popular dietary supplement pill; unstable in food	Enzymes transfer methyl groups from SAM directly to the DNA
Choline B4	Egg yolks, liver, soy, cooked beef, chicken, veal and turkey	Methyl donor to SAM
Betaine	Wheat, spinach, shellfish, and sugar beets	Break down the toxic byproducts of SAM synthesis

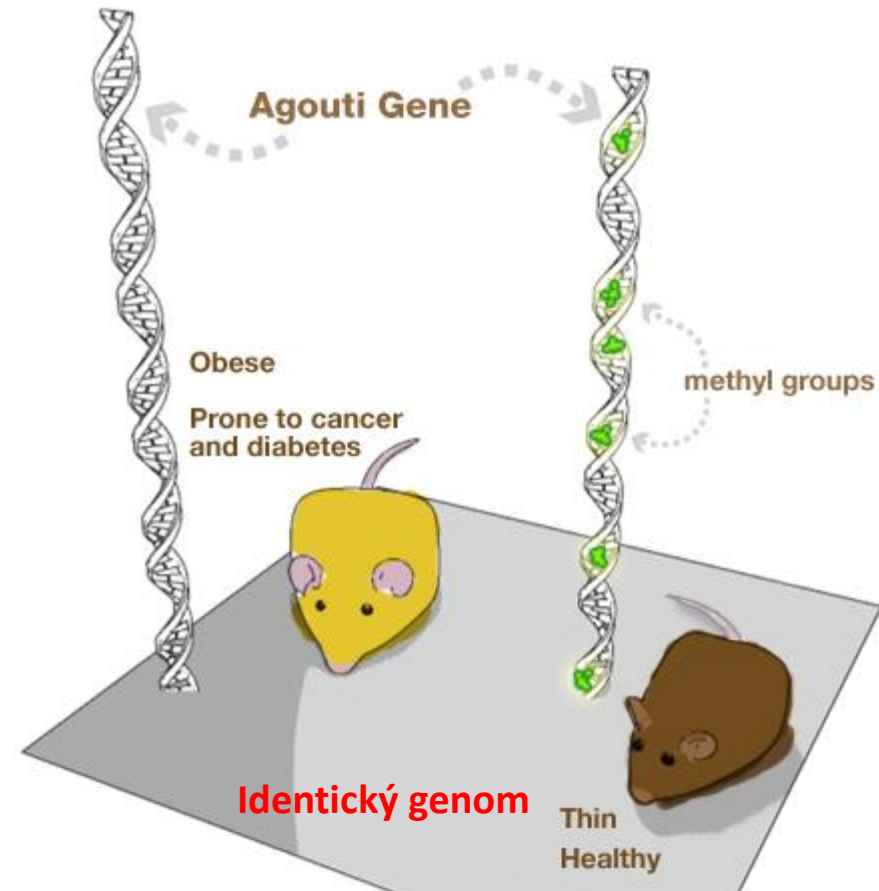
EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Výživa bohatá na zdroj methylové skupiny (cholin a folát) ovlivňuje methylaci DNA hlavně v prenatálním vývoji

- některé regiony genomu pak zůstávají odmethylovány (zapnuty) po celý život
- methyl-deficientní dieta v dospělosti vede také ke snížení methylace DNA, ale je reverzibilní

Gen *Agouti*

- vyskytuje se u všech savců
- normálně je u myši **zamethylován**:
 - hnědá srst, normální váha
- pokud je u myši **odmethylován**:
 - žlutá srst, obezita
 - sklony k diabetu a rakovině
- při krmení žluté myši v březosti stravou bohatou na zdroj methyl-skupin se narodili hnědí potomci, zdraví po celý život (žluté matce už tato dieta nepomohla)



EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Bisphenol A (BPA)

- sloučenina k výrobě plastů (plastové láhve, plechovky)
- snižuje metylaci DNA (prokázáno na *Agouti* genu u myší*)
 - BPA podávané matkám, potomstvo bylo žluté a obézní
 - pokud však zároveň s BPA krmili methyl-rich dietou - potomstvo hnědé a neobézní

These Two Mice are Genetically Identical and the Same Age



While pregnant, both of their mothers were fed Bisphenol A (BPA) but **DIFFERENT DIETS**:

The mother of this mouse received a **normal mouse diet**

The mother of this mouse received a diet **supplemented** with choline, folic acid, betaine and vitamin B12

EPIGENETIKA

Genomický imprinting (vtiskování)

- exprese alely závisí na pohlaví rodiče, od něhož byla zděděna
- např. pro určitý gen je exprimována pouze otcovská alela (nemethylovány u spermií)
- mateřská alela v oocytech je methylována
- děj musí být reverzibilní, aby při tvorbě spermií byly obě alely nemethylovány

- morfologická, anatomická i etologická odlišnost samice muly a samice mezka
- identický genom

Mula

kříženec samce osla se
samici koně

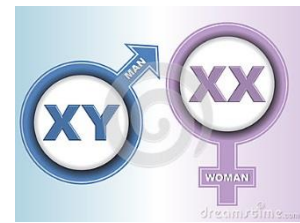


Mezek

kříženec samice osla se
samcem koně

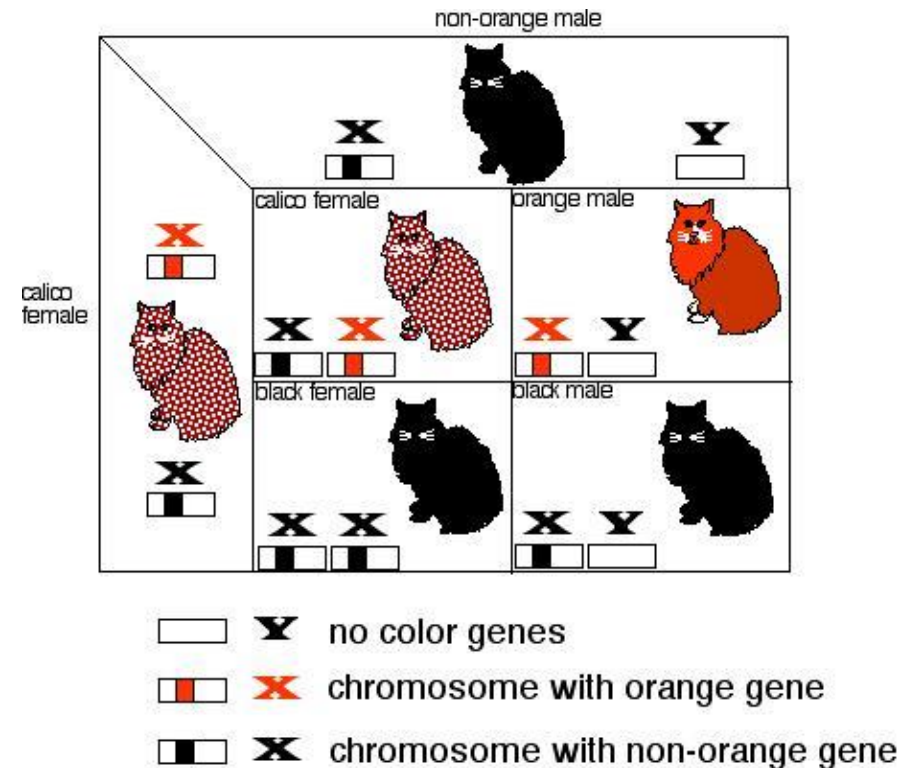
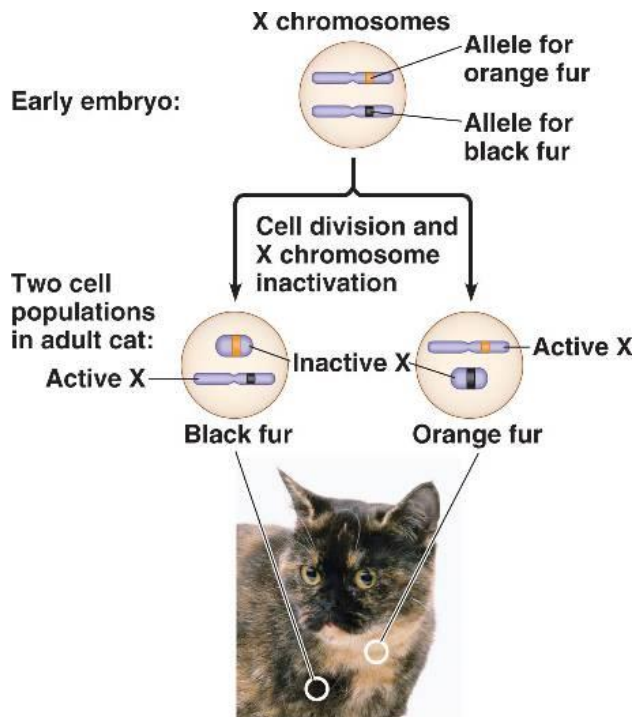


EPIGENETIKA - X-inactivation



Proces, při kterém je inaktivována jedna z kopií X-chromozomu u samic savců

- k umlčení transkripce dochází zabalením do **heterochromatinu**, nepřístupného transkripci
 - důvod: zabránit aby samice měly dvojnásobnou expresi genů na X-chromosomu než samci
 - u placentálních savců (člověk) je volba X-chromosomu pro inaktivaci náhodná (ve fázi raného embrya)
 - vačnatci mají vždy umlčen otcovský X-chromozom
- Vizuální manifestace inaktivovaného X-chromozomu: na X-chromozomu se nachází gen pro zbarvení srsti kočky (strakaté jsou vždy samice a říká se jim "calico")



EPIGENETIKA - X-inactivation

- jedná se o epigenetickou změnu, která vede ke změně fenotypu
- X-inaktivace je reverzibilní u zárodečných buněk
- Ženy často přenašečky chorob vázaných na X-chromozom (u heterozygotek je ten nemocný X-chromozom inaktivován*), ale ve vajíčku se reaktivuje
- Muž má X vždy aktivní (100% zdravý nebo 100% nemocný)

**Nebo je vypnutý u části buněk, takže má choroba mírnější formu*

EPIGENETIKA - X-inactivation

- každá ženská somatická buňka obsahuje aktivní (Xa) a inaktivní (Xi) chromozom
- Xi neexprimuje většinu genů

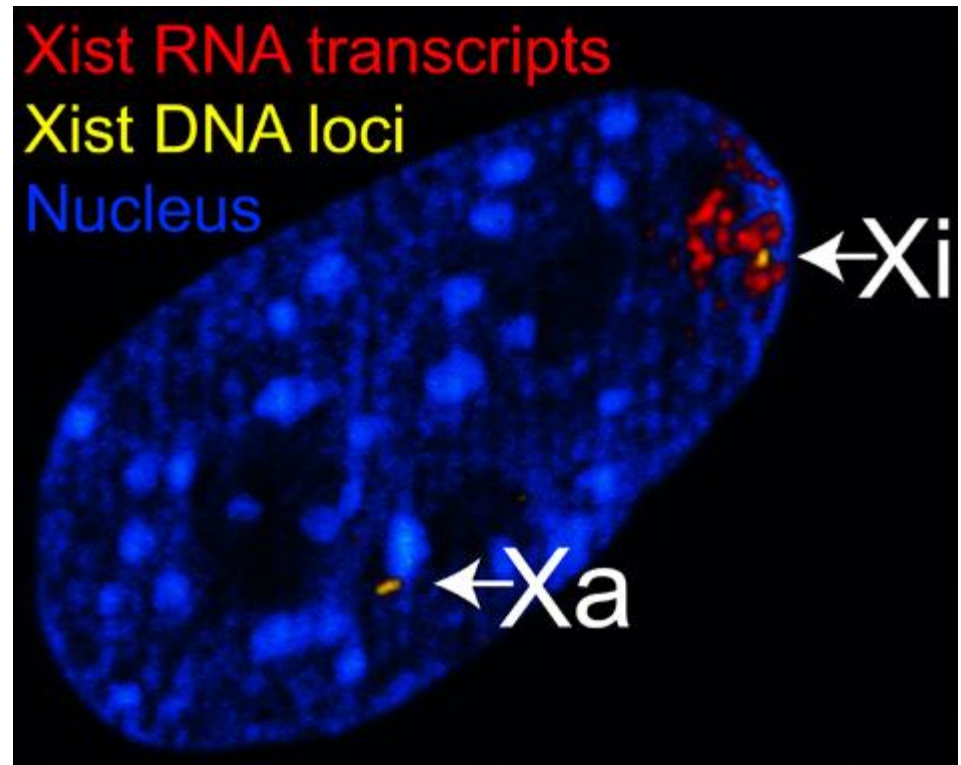
Xist (*X-inactivation specific transcript*)

- hlavní gen zodpovědný za inaktivaci X-chromozomu je exprimován Xi chromozomem
- přepisuje se do nekódující RNA
- váže se na oblasti bohaté na aktivní geny - euchromatin - a inaktivuje je

Xi má na rozdíl od Xa:

- vyšší hladiny methylace DNA
- nízké hladiny histonové acetylace
- nízkou 4-methylaci lyzinu na histonu H3 (H3K4)

Xa	aktivní chromozom
Xi	inaktivní chromozom



EPIGENETIKA A RAKOVINA

Methylace DNA

- U nádorových buněk je pozorována **celková hypomethylace genomu**
- avšak 5-10% normálně nemetylovaných CpG ostrůvků **na promotorech** je v **rakovinných buňkách abnormálně methylováno**
- **hypermethylace na promotorech** ovlivňuje jak expresi proteinů tak nekodující regulační RNA
- důležité je prostorové rozložení DNA methylací:
 - methylace DNA na promotoru inhibuje transkripci
 - methylace DNA uvnitř genů transkripci tolik nevadí

Modifikace histonů

- Aktivační a represivní modifikace se mohou vyskytovat na stejném histonu - BIVALENTNÍ DOMÉNY
- HISTONE CROSSTALK: kombinace aktivačních a represivních modifikací vede k různé míře aktivace nebo inhibice exprese

Hypermethylace: Methylační inaktivace tumor-supresorů (p53)

Hypomethylace: Aktivace onkogenů

EPIGENETIKA A RAKOVINA

Léčba cílená na epigenetiku

Roku 1983 byly poprvé popsány změny v methylaci DNA, související s **rakovinou tlustého střeva***

- pozorovány specifické vzorce v methylaci určitých genů
- srovnání s nezasazenou okolní tkání
- u 4 z 5 pacientů byla pozorována hypomethylace v rakovinných buňkách
- progresivní hypomethylace u metastazujících pacientů

- DNA hypo- a hypermethylace a změny v acetylaci histonů byly pozorovány u **rakoviny prostaty****

- Ovlivnění velkého množství genů

Epigenetická regulace hraje důležitou roli i v dalších typech rakoviny: děložního čípku, leukemie...

* *Feinberg and Vogelstein, Nature 1983*

** *Li et al., J Natl Cancer Inst 2005*

EPIGENETIKA A RAKOVINA

- Léčiva se zaměřují na reverzi epigenetických změn vedoucích ke vzniku rakoviny
- Nespecifické a s vedlejšími účinky
- Musí být **cílená na daný typ rakoviny** (např. nefunkční tumorsupresor, nebo hyperaktivní onkogen)

1. Inhibitory DNA methyltransferáz (Dnmt)

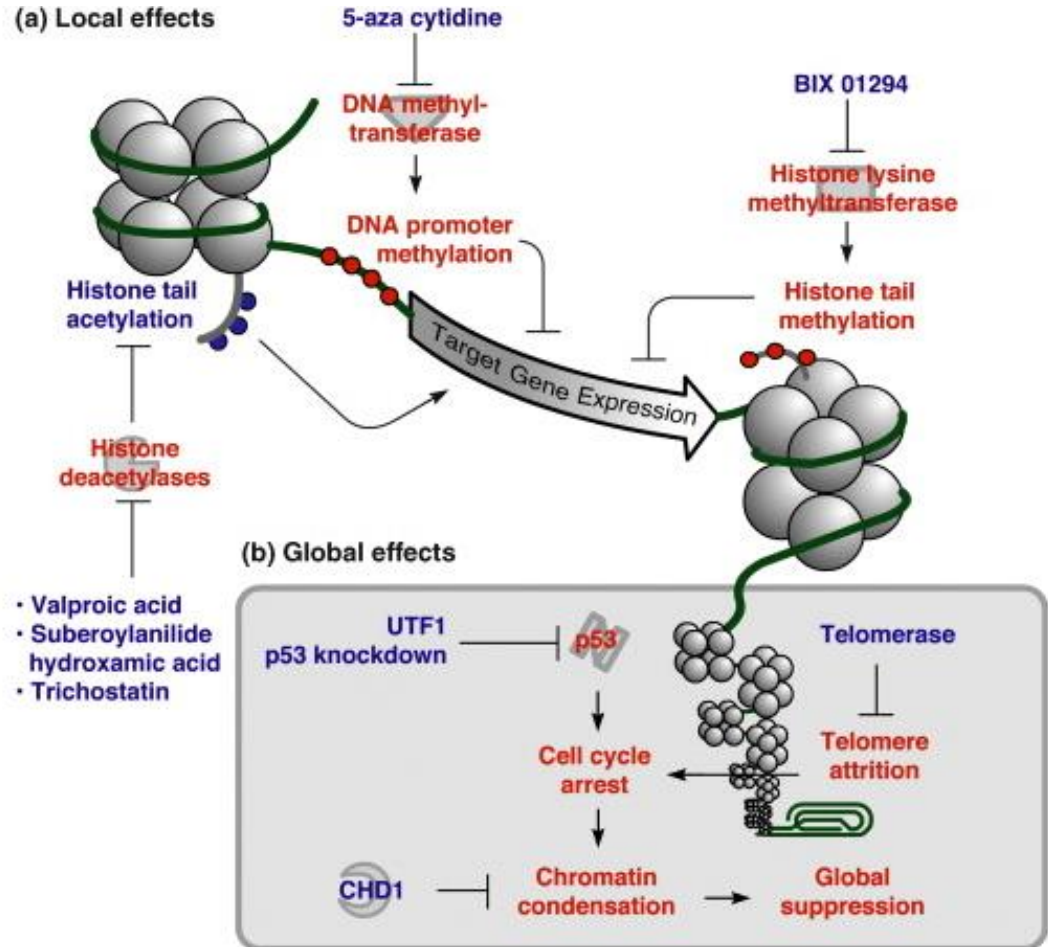
- hypometylační efekt
- **nastartování** transkripce tumorsupresorů
- azacitidine, decitabine

2. Inhibitory histon acetyltransferáz (HAT)

- **inhibice** transkripce onkogenů
- vorinostat, romidepsin

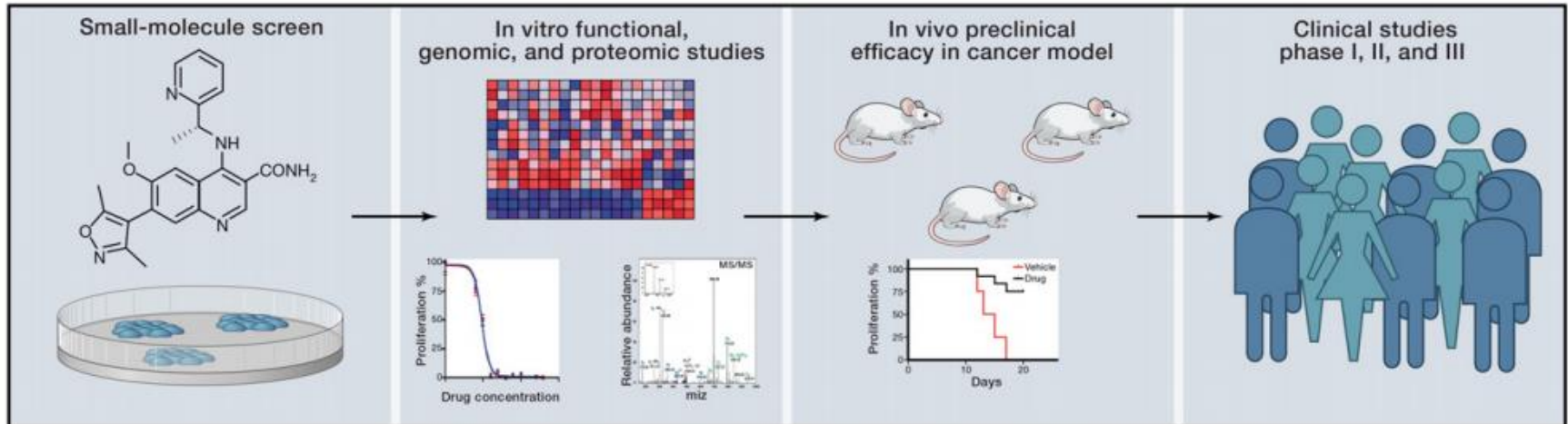
3. Inhibitory histon deacetyláz (HDAC)

- kyselina valproová, trichostatin
- **podpora** exprese genů spojených s apoptozou - zpomalení progresu rakoviny
- též indukce diferenciaci u nezralých buněk (např. při leukemiích)

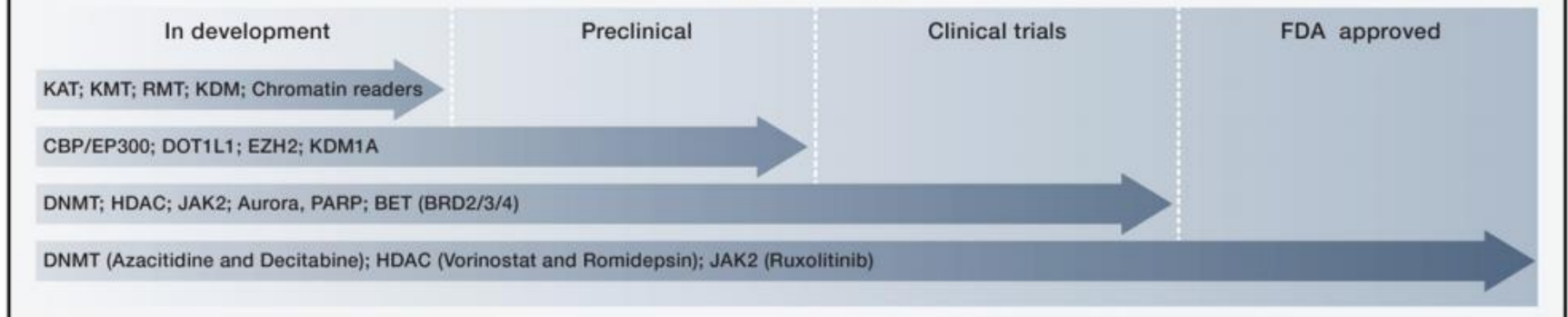


Vývoj léčiv pro epigenetickou terapii

1. Kandidátní malé molekuly jsou nejprve testovány na rakovinných buňkách *in vitro* (inhibice proliferace, indukce apoptozy, cell-cycle arrest)
2. Zjištění potenciálních signálních drah, které jsou zodpovědné za daný pozorovaný efekt (např. expresní microarrays)
3. Účinné látky jsou testovány na zvířecích modelech s rakovinou (zjištění *in vivo* terapeutického účinku - survival, a dále toxicitu, vedlejší účinky a farmakokinetické vlastnosti dané látky)
4. Kandidátní molekuly jsou do klinických studií



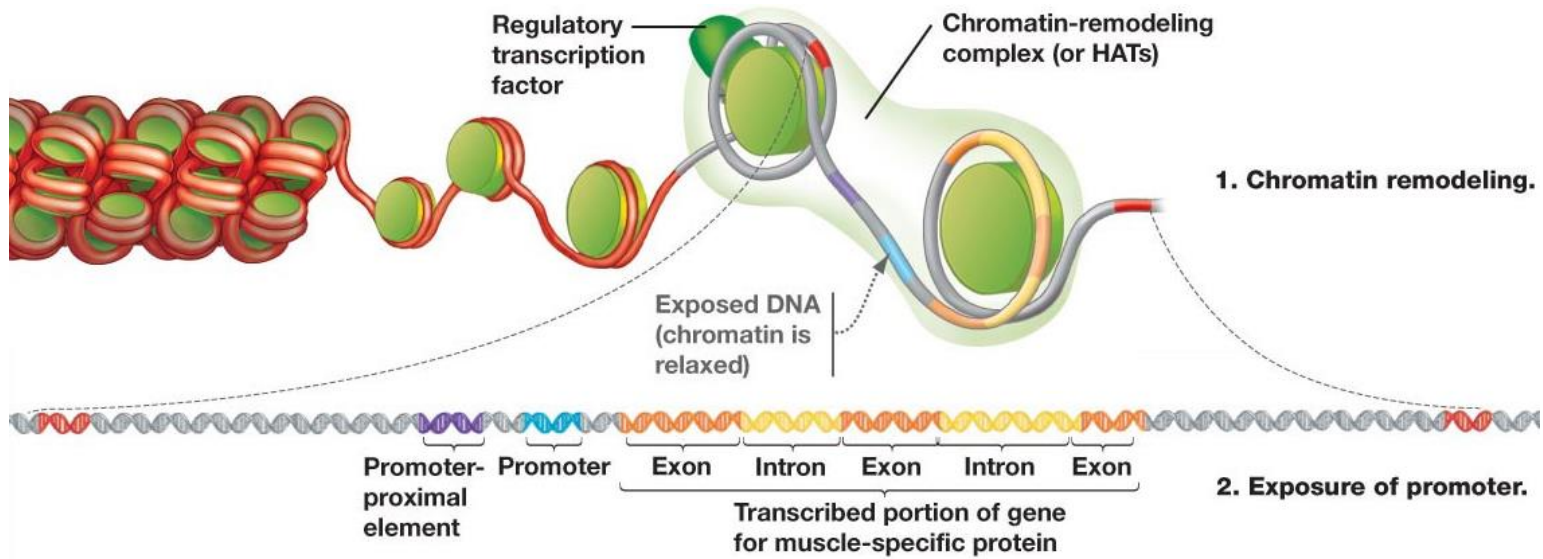
Current States of Epigenetic Targets for Inhibitors



Transkripční kontrola

podobně jako u prokaryot se RNA-polymeráza (větš. II) váže na oblast promotoru

1. remodelace chromatinu odhalí promotor



Transkripční kontrola

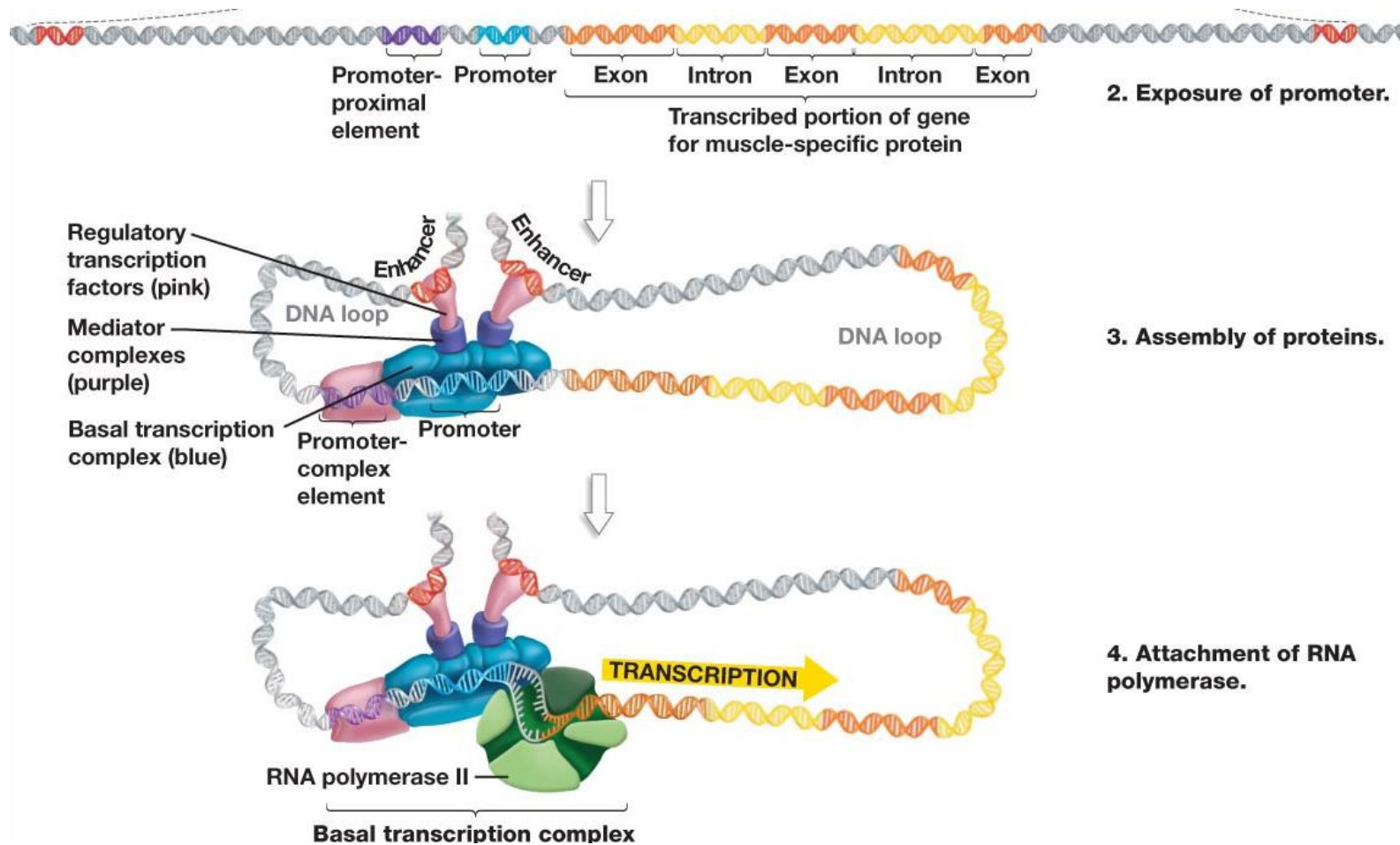
podobně jako u prokaryot se RNA-polymeráza (větš. II) váže na oblast promotoru

2. bazální TFs (modrá) se váží na promotor

3. regulační TFs (růžová) se vážou na enhancery (červená oblast), silencery nebo na promotor-proximální elementy (fialová oblast). DNA může tvořit vlásenku.

4. bazální a regulační TFs dohromady tvoří **INICIAČNÍ KOMPLEX**

5. RNA-polymeráza II se váže na promotor a je aktivována - **BAZÁLNÍ TRANSKRIPČNÍ KOMPLEX**



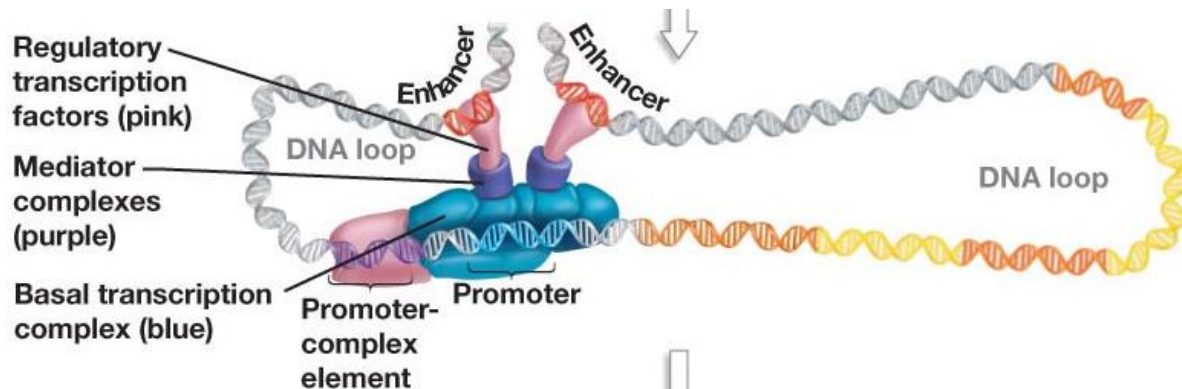
Transkripční Faktory

1. Bazální a obecné transkripční Faktory (TFs)

- ve všech eukaryotických buňkách
- nezbytné pro transkripci, ale neposkytují žádnou regulaci
- Bazální: TFIIA, TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF
- Obecné: Oct1, CT1, SPF
- nejdůležitější je TFIID a jeho podjednotka TBP (TATA binding protein)
- interagují s promotorem
- TFIID je první protein, který se váže na DNA při zahájení transkripce (tvorbě iniciačního komplexu)

2. Regulační Transkripční Faktory (TFs)

- též zvané aktivátory iniciace transkripce
- jsou **hlavními regulačními mechanismy genové exprese u eukaryot**
- proteiny jež se vážou na
 - a) enhancery (zesilovače transkripce)
 - b) silencers
 - c) promoter-proximální elementy
- jsou specifické pro určité geny (nebo rodiny genů)



Funkční klasifikace transkripčních faktorů

1. Konstitutivně aktivní

- Přítomné stále ve všech buňkách
- Bazální a obecné TFII A-H, Sp1, NF1...

2. Regulační

a) Vývojové (buněčně specifické) – exprese přísně kontrolována, ale jakmile dojde k aktivaci, nepotřebují další aktivaci – GATA, HNF, PIT-1, MyoD, Myf5, Hox, Winged Helix

b) signal-dependentní – vyžadují externí signalizaci pro aktivaci

1 extracelulárním ligandem (endokrinní nebo parakrinní) – vazba na DNA v jádře

2 intracelulárním ligandem (autokrinní) – např. p53 – vazba na DNA v jádře

3 závislé na membránovém receptoru – nutná signalizační kaskáda vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru (fosforylace)

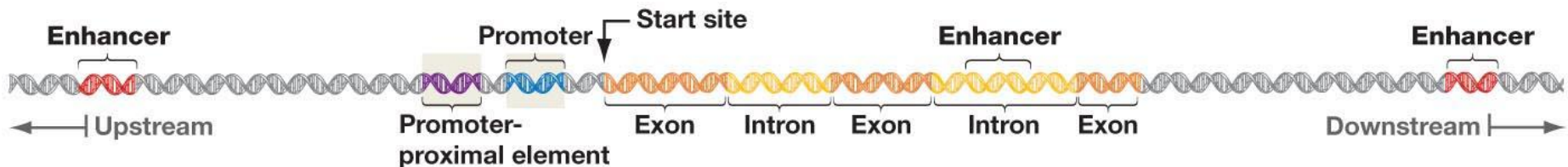
Kontrolní elementy

Promoter-proximální elementy

- vždy umístěny v blízkosti promotoru
- na rozdíl od promotoru unikátní pro každý gen
- tyto oblasti na DNA umožňují vazbu specifických regulačních TFs
- díky PPE je eukaryotická buňka schopná rozlišovat mezi jednotlivými geny a regulovat expresi

Enhancery a silencery

- zvyšují nebo snižují míru transkripce
- také genově specifické
- mohou sousedit s promotorem nebo se nacházet uvnitř transkripční jednotky
- často bývají umístěny daleko od promotoru (10-100 bazí), pak se tvoří DNA vlásenka
 - po směru transkripce (downstream)
 - proti směru transkripce (upstream)
- nefungují pokud se vzdálí miliony bazí od promotoru či na jiný chromozom



Transkripční kontrola

Zapínání a vypínání určitých genů v určitých buňkách pravděpodobně regulováno unikátními kombinacemi:

1. vazebných míst na DNA (promotor, promoter-proximální elementy, silencers a enhancers)
a
2. transkripčních faktorů

Analogie s bankovní schránkou

- klíč bankéře - stejný pro všechny schránky, ale sám o sobě větš. nefunkční - **BAZÁLNÍ FAKTOR**
- můj klíč - specifický pro určitou schránku, ale sám o sobě ji neotevře - **REGULAČNÍ FAKTOR**

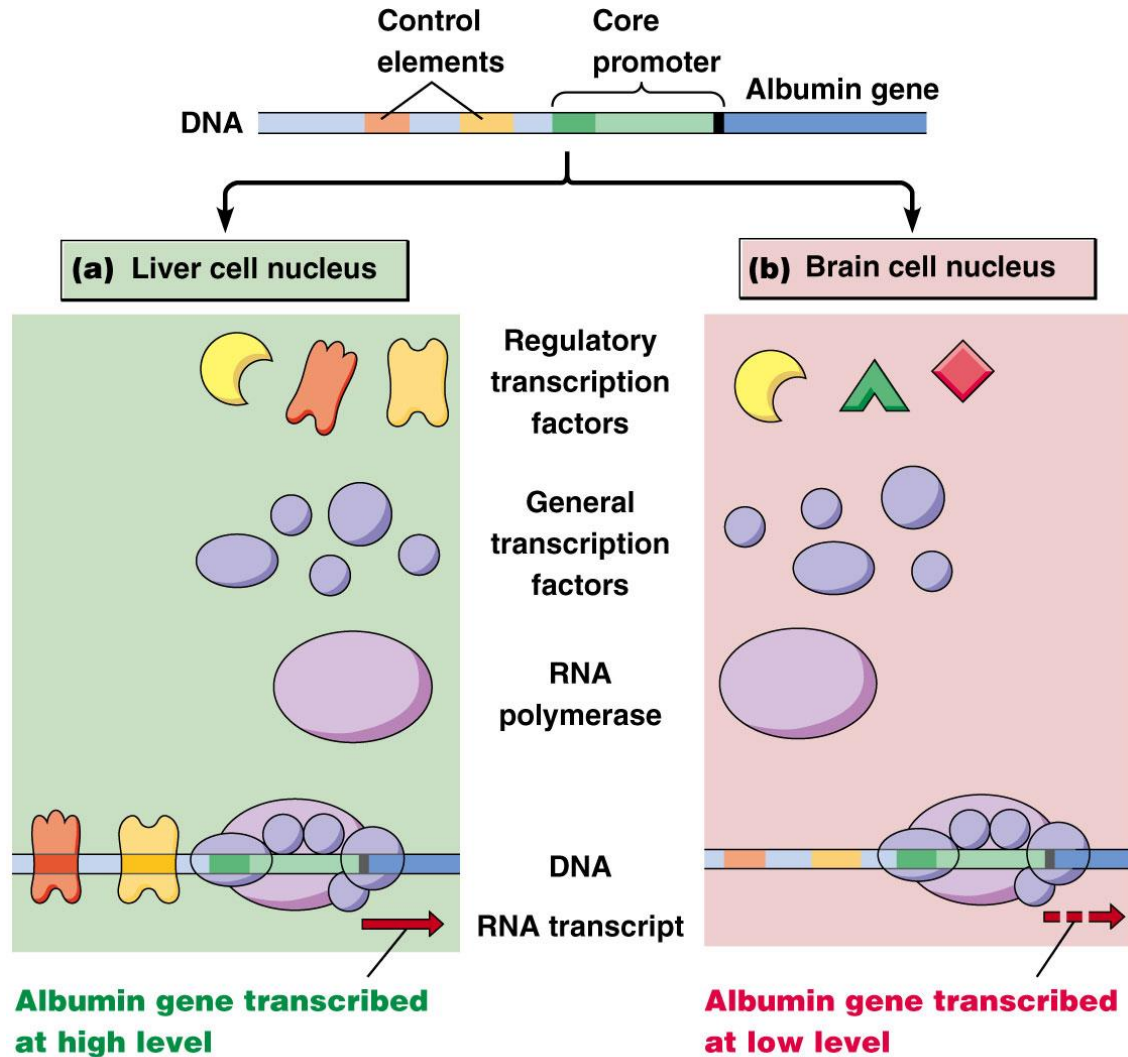


Transkripce genu pro albumin*

Všechny buňky obsahují RNA-polymerázu a **bazální (obecné) TFs**

Jaterní buňky obsahují **regulační TFs** rozpoznávající všechny kontrolní elementy pro albuminový gen (enhancery/silencery/promotor-proximální elementy)

Regulační TFs mozkových buněk nerozpoznávají všechny kontrolní elementy albuminového genu



© 2012 Pearson Education, Inc.

* Albumin: protein krevní plazmy, tvoří 60 % všech plazmatických bílkovin. Důležitý při transportu látek krví (mastné kyseliny, minerály, léky). Syntetizován v játrech.

Extracelulární signál (hormon) spouští expresi genů specifických pro svalovou buňku

EXTRACELLULAR SIGNALS TRIGGER CELL-SPECIFIC GENE EXPRESSION.

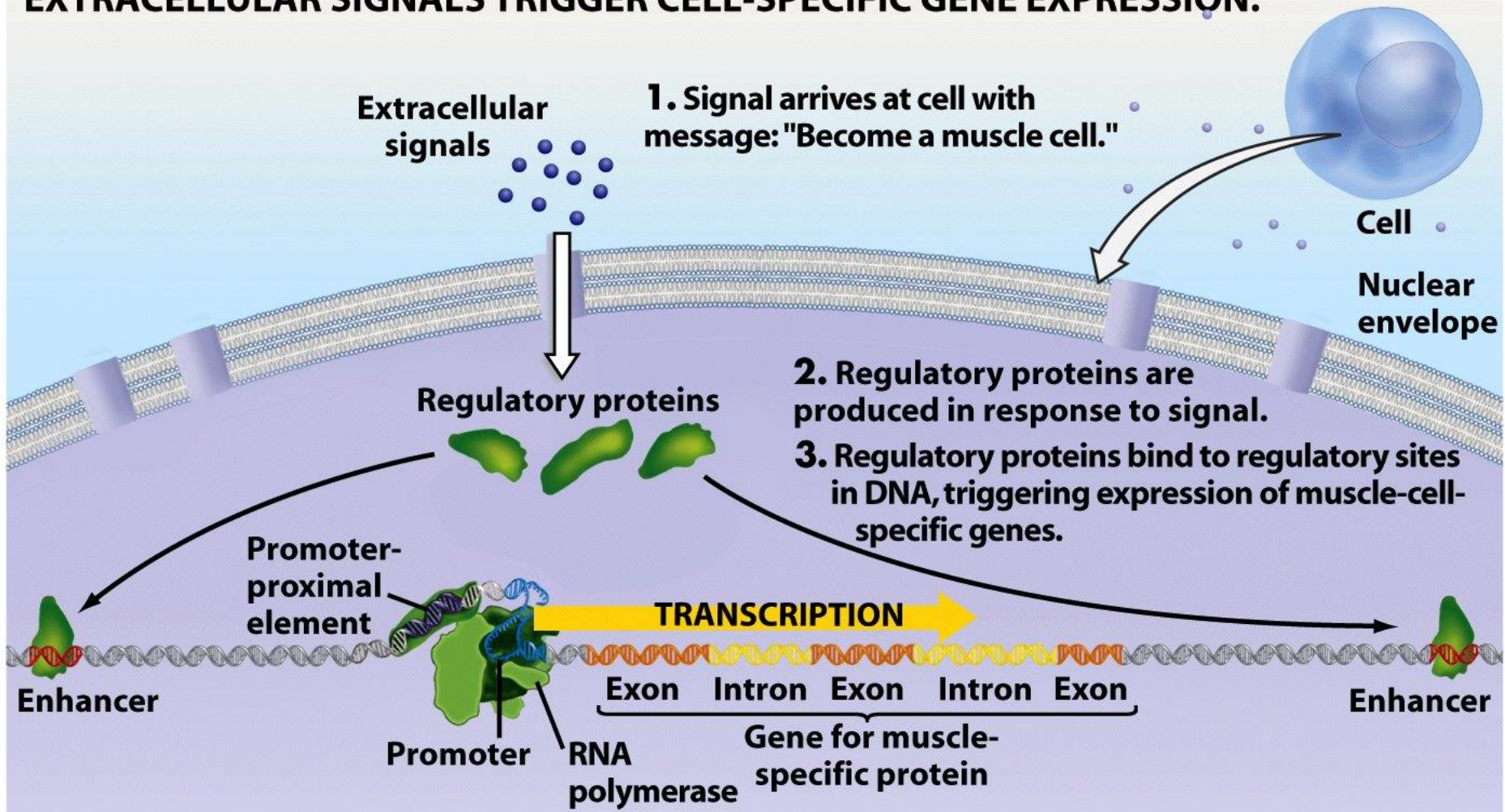


Figure 18-9 Biological Science, 2/e

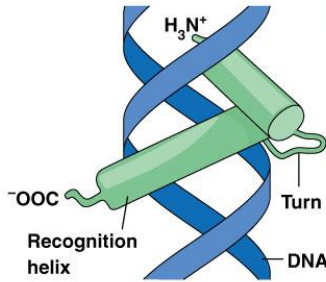
Jak se proteiny vážou k DNA?

- nejčastěji vazba α -helixu s větším žlábkem DNA
- nekovalentní vazby: vodíkové můstky a iontové vazby
- **sequence-specific recognition**

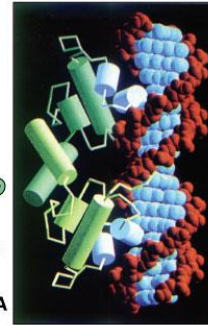
Motivy vazby:

a) Helix-turn-helix

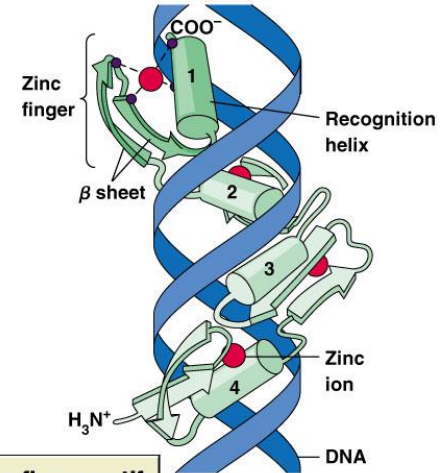
- 2 α -helixy spojené krátkou otáčkou



(a) Helix-turn-helix motif



Phage λ repressor bound to DNA



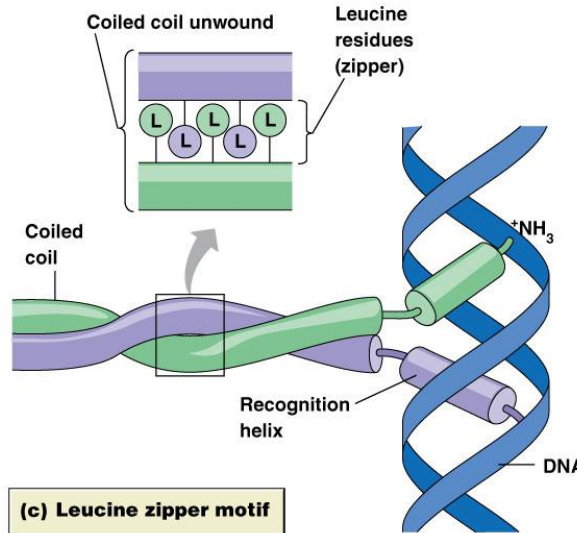
(b) Zinc finger motif

b) Zinkové prsty

- 1 α -helix a 2 antiparalelní β -listy, vše spojené atomem zinku
- více jednotek (zinkových prstů)

c) Leucinový zip

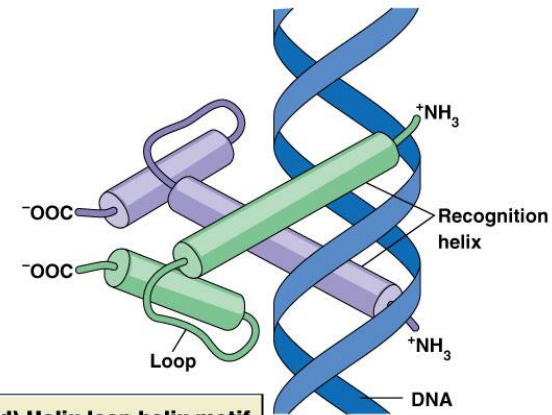
- 2 α -helixy se okolo sebe ovinují díky pravidelně uspořádaným leucinům



(c) Leucine zipper motif

d) Helix-loop-helix

- kratší a delší α -helix v dimeru



(d) Helix-loop-helix motif

SUMMARY TABLE 18.1 **Regulating Gene Expression in Bacteria and Eukaryotes**

Level of Regulation	Bacteria	Eukaryotes
Chromatin remodeling	<ul style="list-style-type: none"> Limited packaging of DNA Remodeling not a major issue in regulating gene expression. 	<ul style="list-style-type: none"> Extensive packaging of DNA Chromatin must be opened for transcription to begin.
Transcription	<ul style="list-style-type: none"> Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to the promoter Sigma interacts with promoter. 	<ul style="list-style-type: none"> Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to and far from promoter Large basal transcription complex interacts with promoter. Mediator complex required.
RNA processing	<ul style="list-style-type: none"> None documented 	<ul style="list-style-type: none"> Extensive processing: alternative splicing of introns addition of 5' cap and 3' tail
mRNA stability	<ul style="list-style-type: none"> Some RNA interference documented 	<ul style="list-style-type: none"> For many genes, RNA interference limits life span or translation rate.
Translation	<ul style="list-style-type: none"> Regulatory proteins bind to mRNAs and/or ribosome and affect translation rate. 	<ul style="list-style-type: none"> Regulatory proteins bind to mRNAs and/or ribosome and affect translation rate.
Post-translational modification	<ul style="list-style-type: none"> Folding by chaperone proteins Chemical modification (e.g., phosphorylation) may change activity. 	<ul style="list-style-type: none"> Folding by chaperone proteins Chemical modification (glycosylation, phosphorylation) Ubiquitination targets proteins for destruction by proteasome.