

P8. Epigenetická paměť

Pojmy *epigenetika*, *epigenesis*, *epigenetický*, šířil od r. 1942 Conrad H. Waddington, profesor genetiky na universitě v Edinburghu, jako mechanismy ontogeneze; ve své vlivné učebnici embryologie z r. 1956 („*Principles of Embryology*“) napsal:

„*Perhaps the most satisfactory expression would be ,epigenetics‘. This is derived from Greek word epigenesis, which Aristotle used for the theory that development is brought about through a series of causal interactions between the various parts; this also reminds one that genetic factors are among the most important determinants of development*“.

Od té doby se zmíněné pojmy staly součástí běžného používání, byť v zúženém významu, jako *epigenetická paměť* (epigenetic memory).

V literatuře najdeme v této souvislosti sousloví *epi-* (ř., = nad-) *genetická dědičnost* (epigenetic heredity), tedy „*nad-dědičná dědičnost*“; pojem „*dědičnost*“ lépe použijeme např. ve spojení „*dědičnost epigenetických změn*“. Oddělíme tak relativně konservativní, primární (genetickou) úroveň od řady sekundárních, relativně plastických (indukovatelných) dědičných změn.

Epigenetickou paměť nyní rozumíme klonálně dědičné změny struktury buněčných složek,

- chemickou modifikaci DNA (Holliday 1987) (Bird 2002) ,
- modifikace bílkovinných složek chromatinu (Tordera, Sendra et al. 1993; Lachner, O'Sullivan et al. 2003)
- uspořádání transkripčně-aktivních nadmolekulárních komplexů (Wolffe 1994).

☞ *Tyto faktory ovlivňují expresi genů; od genetických regulací, založených na biochemických interakcích, se liší tím, že po ustavení fungují i v nepřítomnosti efektorů, jako přetrvávající konformační změny. V tom spočívá klonální dědičnost epigenetických stavů.*

☞ **Metylační modifikace DNA.**

V ranných etapách evoluce byla asi hlavní funkcí modifikace DNA obrana proti vstupu cizorodých sekvencí.

Tato funkce zůstala zachována u prokaryot jako základní obranný mechanismus (Bickle and Kruger 1993). Téměř vždy jde o enzymovou metylaci adeninu a/nebo cytosinu v určitých specifických (restrikčních) sekvencích DNA-metyltransferasami. U dnešních bakterií adenin-specifické DNA-metyltransferasy metylují dusík aminoskupiny adeninu. Jiné metyltransferasy metylují atom uhlíku cytosinu v poloze 5-, nebo exocyklický dusík aminoskupiny. Na

modifikovanou DNA reagují tzv. restriční endonukleasy (restriktasy), které rozpoznávají svoje štěpné (restriční) sekvence. „Vlastní“, „domácí“, DNA má tato místa chráněná svou metylasou, zatímco cizorodá, nechráněná DNA, při vstupu do buňky podléhá degradaci. Jiná kategorie restričních enzymů si počíná naopak: štěpí DNA jen s modifikovanými štěpnými místy.

Logiku těchto vztahů lze demonstrovat na příkladu dvou příbuzných bakteriálních kmenů, **A,B**, (např. *Staphylococcus pneumoniae*) a bakteriofága α , schopného lyzovat každý z nich.

Kmen **A** obsahuje metylačně-restriční systém: jeden enzym *metyluje* sekvence specifické pro endonukleasu (restriktasu), v našem příkladu *DpnII*; *DpnII* rozpoznává a štěpí jen *nemetylované* sekvence; „domácí“ metylačně-modifikovaná DNA je tedy chráněna. Nemetylovaný genom fága α je proto po vstupu do hostitelské buňky degradován (s výjimkou nepatrné „únikové“ frakce, α^* , s hostitelsky-metylovaným genomem).

Kmen **B** *nemetyluje* restriční sekvence a produkuje restriktasu (v našem příkladu *DpnI*), která štěpí tatáž *metylovaná* místa; „domácí“ nemetylovaná DNA je tedy chráněna, ale fágové částice α^* původem z A nemají šanci v B.

Pokud jde o *epigenetickou paměť*, zde máme její názorný, elementární příklad: ojedinelé fágové částice α^* , které unikly degradaci (restrikcí) v kmeni A, jsou modifikovány metylací, množí se proto nyní neomezeně na kmeni A; metylační modifikaci si uchovávají do té doby, než zabloudí na kmen B - většina α^* je pak degradována a jen nepatrná frakce přežije jako α . Tyto metylačně/demetylační cykly byly nazvány *hostitelskou modifikací* (host modification)

Metylace C-5 cytosinu nebyla nalezena u termofilů, kdy je využívána metylace aminoskupiny cytosinu. Tato skutečnost patrně souvisí s termolabilitou 5-metylcytosinu, jehož snadná tepelná deaminace vede k transicím 5-meC-G \rightleftharpoons T-A (k deaminaci metylované aminoskupiny cytosinu sice také v menší míře dochází, ale konečným produktem je uracil, rozpoznávaný opravným enzymem uracil-DNA glykosylasou).

Existují údaje o existenci thymin-DNA-glykosylasy v lidských buňkách, která rozeznává nesprávné párování T-G. Oba opravné enzymy, uracil-DNA-glykosylasa a thymin-DNA-glykosylasa, jeví evoluční příbuznost.

☞ *I v případě eukaryot plní metylace DNA ochrannou úlohu. V této souvislosti W. Doerfler (Doerfler 1991) předložil tři možnosti, kdy metylační modifikace umožňuje určit DNA -*

- k excisi a/nebo degradaci, pokud je součástí genomu,
- k degradaci a/nebo exkreci při vstupu do buňky,
- k cílené funkční inaktivaci „umlčením“ (tzv. „*silencing*“ genů).

Úroveň metylace genů se podstatně liší, srovnáváme-li bezobratlé s obratlovci (Tweedie, Charlton et al. 1997) a rostlinami. Bezobratlí

se vyznačují nízkým obsahem 5-meC s lokalizací jen do některých genomových domén. Genom drozofily má metylovány jen ojedinělé dublety **CT** místo dubletů **CG**, běžně metylovaných v živočišných nebo rostlinných genomech. *Caenorhabditis elegans* má genom nemetylovaný a neobsahuje geny pro DNA-metylasy. Absence metylace genomů u některých taxonů je možná až druhotným (ztrátovým) jevem.

Genom *Schizosacharomyces pombe* obsahuje gen kodující protein homologní s prokaryotickými i eukaryotickými 5-meC-DNA metylasami, ale metylace DNA genomu kvasinky nebyla dosud prokázána (Wilkinson, Bartlet et al. 1995) .

Epigenetická paměť a epigenetické modifikace se mohou projevovat na úrovni chromatinových kódů a na úrovni posttranskripční kontroly exprese, mechanismy nezávislémi na metylaci DNA.

Eukaryota disponují několika typy DNA-metylasy (DNA-metyltransferas), ty však vždy metylují jen C-5 cytosinu (Adams 1990; Jeddeloh and Richards 1996). Restriktasy, jak je známe u prokaryot, v eukaryotických buňkách (dosud) nebyly nalezeny; excisní či degradativní funkce zde plní mechanismy jiného druhu a původu.

Primitivní způsob kontroly nadbytečných sekvencí a obrana proti vstupu cizorodých sekvencí byl zjištěn u neurospory (*Neurospora crassa*). Jde tzv. „ripping“ (RIP, **R**epeat **I**nduced **P**oint mutations (Selker, Fritz et al. 1993), kdy cizorodé nebo duplikované sekvence jsou premeioticky označeny metylací cytosinu v dubletech **CG** a následně podrobeny intenzivní deaminaci 5-meC (s transicemi **CG** ⇌ **TA**). Odlišný kontrolní mechanismus pro opakované sekvence nacházíme u jiné houby, *Ascobolus immersus*: metylace ostrůvků obsahujících motivy CpG uvnitř těchto genů vede ke zkráceným, nefunkčním transkriptům (Rossignol and Faugeron 1994).

Evolučně pokročilou obranou proti působení nadbytečných kopií genů a transgenů je „genomový imunitní systém“, *transkripční nebo posttranskripční „umlčení“*, genů metylací (gene silencing, (Matzke and Matzke 1998) (Matzke, Primig et al. 1989) (Vaucheret and Fagard 2001).

Savci k obraně proti vstupu cizorodé DNA ojediněle využívají i konvenční imunitní systém. DNA s nemetylovanými motivy PuPuCGPyPy, častými v prokaryotních genomech, aktivuje imunitní obranu proti bakteriálním infekcím; v genomech savců je cytosin v těchto motivech zpravidla metylován: PuPuC*GPyPy.

Obratlovci, na rozdíl od bezobratlých, mají genomy extensivně metylované, 60-90% CG dubletů obsahuje 5-meC. Díky extensivní metylaci vzrůstá pravděpodobnost transice $C \rightleftharpoons 5\text{-meC} \rightleftharpoons T$ (Duncan and Miller 1980). Každá taková transice, evolučně fixovaná, ochuzuje genom o dublety CG (ve srovnání s dublety GC); tento proces byl nazván *CG-supresí* (Cooper and Gerber-Huber 1985). V genomech kvetoucích rostlin je CG suprese mnohem méně vyjádřena, než v genomech živočichů.

Nehledě na extensivní metylaci jsou v genomech obratlovců obsaženy ostrovy nemetylované DNA, s dekonzenzovaným chromatinem, většinou v okolí tkáňově nespecifických, trvale exprimovaných genů (tzv. *CG*, nebo *CpG ostrovy*, (Bird 1986).

Kritický zlom ve využití metylační modifikace genomů živočichů patrně nastal na přechodu od bezobratlých k obratlovcům; již primitivní chordata (mihule) mají genom metylovaný stejným způsobem, jako vyšší obratlovci. Evoluce biologické komplexity souvisela s amplifikacemi sekvencí (genů), které umožnily diferenciaci jejich funkcí. Koevoluce metylačních mechanismů zajistila epigenetickou kontrolou genové dóze a kontrolu nad možným funkčním nesouladem (Flavell 1994) (Bird 1995).

☞ *U mnohobuněčných organismů byly obranné funkce metylace DNA rozšířeny o funkce regulační. Tento krok umožnil evoluci vývojových programů* (Barlow 1993).

Srovnáme tři typy regulačních systémů:

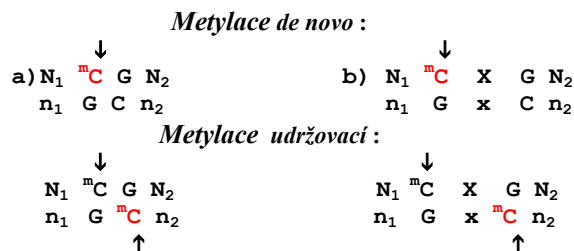
(a) „ON/OFF“ *regulace* (typ *lac operon E. coli*), ideální pro rychlou odpověď na vnější podněty. Funguje dočasně, jen v přítomnosti příslušného efektoru; je nepoužitelný pro udržení klonální stability.

(b) *regulace v sítích vztahů mezi geny*. Tyto regulace fungují na bázi molekulárních přepínačů a zětnovazebných smyček; umožňují existenci alternativních klonálních stavů (např. λ -lysogenních buněk; buněk typu α , *S. cerevisiae* a pod.) (D'Arvi and Casadesús 2002), mohou se uplatnit při zapínání homeotických regulací.

(c) *regulace na základě epigenetických faktorů*. Klonální paměť je důsledkem metylace genomu (Bird 2002) nebo modifikací proteinových komplexů; dědí se nezávisle na faktoru, který indukoval jejich ustavení.

Předobraz regulací s účastí metylace můžeme najít již u prokaryot (Messer and Noyer-Weidner 1988). Podrobně byla prozkoumáno působení metylázy *dam*, která metyluje adenin v sekvencích **GATC**. Metylaci nemá jen obranný význam, ale je zde nutnou komponentou v kontrole iniciace replikace genomu *E. coli* (Smith, Garland et al. 1985), v kontrole transkripce genů a transposice mobilních elementů. *Caulobacter crescentus*, mikroorganismus schopný dimorfické

diferenciace, kontroluje přepínání morfologických forem a replikaci svého genomu přesným načasováním metylace DNA v buněčném cyklu (Zweiger, Marczyński et al. 1994). Existují dva způsoby interakcí eukaryotických DNA metylas se sekvencemi DNA: metylace „*de novo*“ a metylace „udržovací“,



(N, n) , (X, x) , jsou libovolné komplementární báze; 5´-CG/CG-3´ , 5´-CXG/CxG-3´ , jsou palindromy rozpoznávané udržovacími DNA-metylasami: dublety CG metylasami živočišnými; dublety CG a triplety CXG metylasami rostlinnými.

V případě *metylace de novo* DNA metylasa umístí metylovou skupinu do nemetylovaných sekvencí za vzniku *hemimetylované* DNA, tj. DNA metylovaná pouze v jednom vlákně. V dalším replikačním cyklu se metylace přenesou i do dceřinného vlákna a reprodukuje se udržovací metylací. *Methylace DNA je reversibilní*: během ranného vývoje embrya jsou metylace rodičovsky metylovaných sekvencí nejdříve vymazány („*methylation erasement*“) a pak postupně *de novo* ustaveny. Tento proces umožňuje epigenetické programování vyvíjejícího se embrya. Diferenční metylací genů se nastaví přechodné i trvalé vzory pro různé vývojové dráhy. Tyto vzory jsou mitoticky reprodukovány v *determinovaných a diferencovaných* buňkách;

Dle Waddingtona

- *determinace* je latentní stadium, „předurčení“ k diferenciaci,
- *diferenciace* je proces, vedoucí k určitému vývojovému stadiu.

Methylace „udržovací“ (maintenance methylation) představuje podstatu epigenetické paměti. Udržovací metylace vyžaduje vzorovou metylaci v mateřském vlákně DNA (*hemimetylovanou* DNA jako templát); tento metylační vzor metylasa *po replikaci* cílové sekvence zkopíruje do dceřinného vlákna DNA. Distribuce metylací v genomech různých liniích somatických buněk ukazuje, že se metylace týká diferenční inaktivace tkáňově-specifických genů. Sekvence spojené s geny zajišťujícími základní buněčné funkce („*house keeping*“ geny) nejsou v genomech metylovány.

Methylace palindromů CXG, kde X=A,T nevybočuje ze schematu CG ⇌ ^mCG. V případě tripletů CXG, kde X=C, existují tři možnosti metylace CCG ⇌ C^mCG,

$m^m\text{CCG}$, $m^m\text{C}^m\text{CG}$; Prokázali jsme před časem, že v rostlinných genomech mohou koexistovat metylační vzory C^mCG , a $m^m\text{CCG}$. Metylační rostlinný systém je tedy flexibilní a nastavitelný. Zůstává otázkou kdy a jak je vybírán vnější cytosinový zbytek místo vnitřního; prvním krokem by mohla být úplná metylace tripletu ($m^m\text{C}^m\text{CG}$) následnou demethylací prostředního cytosinu. Nebo metylasa(metylasy) rozlišuje (rozlišují) oba cytosinové zbytky; nebo konečně, metylace typu $m^m\text{CCG}$ se tykají pouze čtyřnukleotidových palindromů CCGG .

Mechanismus metylace zahrnuje reakci cytosinu s enzymem, obsahujícím kofaktor S-adenosyl-methionin (S-AdoMet). S-AdoMet je donorem metylové skupiny a v reakci metylace je konvertován na S-adenosyl-homocystein. V komplexu [DNA-cytosin]•[Enzym•S-Adomet] dochází ke kovalentní vazbě složky [Enzym•S-Adomet] na 6-C cytosinu za vzniku dihydrocytosinového meziprojektu. Dalším reakčním krokem je přenos metylové skupiny na 5-C cytosinu a uvolnění enzymu a S-adenosylhomocysteinu. V této souvislosti je zajímavé, že ačkoli deriváty dihydrocytosinu jsou extrémně náchylné ke spontánní deaminaci, DNA-dihydrocytosin v komplexu s enzymem a kofaktorem je zcela stabilní. *Metylace tedy negeneruje $\text{CG} \rightarrow \text{TA}$ transice.*

Krystalografická analýza enzymového komplexu metylasy M.HhaI (*Haemophilus haemolyticus*) s rozpoznávanou sekvencí GCGC (methylace vede k modifikaci prvního cytosinového zbytku: $\text{GCGC} \rightarrow \text{G}^m\text{CGC}$) ukázala další podrobnosti metylačního procesu, jmenovitě dramatické konformační změny v DNA i enzymu: enzym obsahuje dvě vazebné domény; jedna doména (evolučně konstantní) váže S-AdoMet a obsahuje cysteinový zbytek, kterým se enzym dočasně kovalentně váže k cytosinu, druhá doména (evolučně proměnná) odpovídá za specifickou vazbu k sekvencím v řetězci DNA. V celém komplexu dochází k distorzi DNA a uvolnění cytosinu z páru CG ; cytosin se vytočí ven z dvojité spirály DNA; v této poloze je dostupný k metylaci (tento poznatek je v souladu s výsledky modelových experimentů s oligonukleotidy, obsahujícími CCG sekvence, kdy enzym upřednostňuje metylaci CG v nespárovaných místech).

Defekty v metylační aktivitě mají zpravidla závažné důsledky pro vývoj organismu (Laird and Jaenisch 1996). Např. inaktivace myšského genu pro DNA metyltransferasu, která konstitutivně snížila obsah 5-meC v genomu vedla k abnormálnímu vývoji a letalitě na úrovni vývoje embrya, aniž ovlivnila proliferaci buněk *in vitro* (Li, Bestor et al. 1992). Podobná pozorování byla učiněna i u rostlin, kde demethylace genomu vede k vývojovým defektům.

Methylace autosomálních alel byla náhodně objevena při tkáňové kultivaci živočišných buněk. Některé genové mutace, indukované chemickými mutageny, vznikaly i revertovaly s nápadně vysokou frekvencí; později bylo zjištěno, že frekvence těchto reverzí může být ještě mnohonásobně zvýšena působením 5-azacytidinu (5-azaC), inhibitoru metylace. Správnou interpretací těchto pozorování bylo, že diploidní buňky jsou pro některé alely funkčně hemizygotní, a že jedna z obou alel je vratně inaktivována metylací. Pokud je funkční alela poškozena mutací, demethylace druhé, komplementární alely, může

vést k „reverzi“ (k funkční komplementaci); nebo naopak, pokud v jedné z alel dojde k mutaci, a druhá je následně *de novo* metylována, dojde ke změně, která se fenotypově projeví plnou ztrátou funkce. V této souvislosti se hovoří o *epigenetické hemizygotnosti a epimutacích*.

Zvláštním případem je epihemizygosita pro alely nesené chromosomy X v samičích somatických buňkách (viz dále inaktivace X). Např. jedna z alel genu *HGPRT* (pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu) vázaného na X je inaktivní, ale může být reaktivována 5-azaC.

☞ *Metylace DNA kontroluje diferenciální expresi alel v diploidních genomech; existuje*

- *imprinting* („vtištění“) *genů*, specifická metylační modifikace některých autosomálních alel (prokázána zatím jen u placentárních savců; (Murphy and Jirtle 2003) (Solter 1988),
- *inaktivace chromosomu X* u samic savců (Lewin 2008).

☞ *Imprinting autosomálních alel; v každé generaci, v průběhu diferenciace nové germinální linie, probíhá demetylace a následná de novo metylace určitých alel - gamety následně nesou imprint podle rodičovského původu: existují „otcovské alely“ imprintované v otcovské germinální linii a „mateřské alely“ imprintované v mateřské germinální linii; Somatické buňky odvozené ze zygoty mitoticky reprodukuje imprint obou rodičovských gamet (na primitivní, elementární úrovni nám tento cyklus připomíná hostitelská modifikace genomů bakteriofágů):*

Sledujme osud dvou myších genů *H19* a *Igf2*.

H19 přijímá otcovský imprint: $H19 \Rightarrow H19^*$,

Igf2 přijímá mateřský imprint: $Igf2 \Rightarrow Igf2^*$

- Epigenotyp spermií: $[H19^*, Igf2]$ (v somatických buňkách potomka bude epialela $H19^*$ inaktivní, funkční bude mateřská alela *H19*).

- Epigenotyp vajíček: $[H19, Igf2^*]$ (v somatických buňkách potomka bude funkční otcovská alela *Igf2*).

Vznik zygoty:

- po splynutí gamet budou mít somatické buňky konstituci

samičí somatické buňky $[2A; X^*/X; H19^*/H19; Igf2^*/Igf2]$,

samčí somatické buňky $[2A; X/Y; H19^*/H19; Igf2^*/Igf2]$,

podle typu spermie: $(A;X)$ nebo $(A;Y)$;

somatické buňky se budou vyznačovat diferenciální monoalelickou expresí vzhledem k *H19* a *Igf2* (a v samičím epigenotypu jednou inaktivní kopií chromosomu X^* , viz dále inaktivace X).

V germinální linii následné generace se uskuteční nový cyklus imprintingu:

1. *vymazání* původního imprintu: $\rightarrow [H19/H19; Igf2/Igf2]$;


2. *imprint* během oogeneze: $[H19/H19; Igf2^*/Igf2^*]$; \rightarrow vajíčka $[H19, Igf2^*]$,
nebo během spermatogeneze: $[H19^*/H19; Igf2/Igf2]$; \rightarrow spermie $[H19^*, Igf2]$.

U myši byly zatím nalezeny přibližně čtyři desítky imprintovaných genů. Odhaduje se, že celkový počet imprintovaných genů může dosáhnout ~ 0.3% savčích genů (tedy asi 100 genů).

Diskuse týkající se biologické úlohy imprintingu se vymyká našim cílům. Skutečnost, že byl imprint zjištěn jen u některých taxonů asi souvisí se selekcí genetických variant vývojových programů, v kontextu se vzrůstem komplexity. Např. podle jedné z hypotéz diferenciací alel na „otcovské“ a „mateřské“ poskytuje selekční výhody placentárním savcům, protože omezuje soutěž o živiny mezi embryem a placentou.

Mechanismus umožňující reprogramování otcovských a mateřských alel nebyl dosud jednoznačně objasněn. Nebyla nalezena obecná pravidla (například určité signální sekvence nebo chromatinový kód), která by jednotně definovala imprintovatelné sekvence.

Ani mechanismus nastavení vzorů pro determinaci a diferenciaci embryonálních buněk není dosud znám. V těchto případech se patrně uplatňují různé mechanismy a různá epigenetická nastavení: kombinace metylace DNA s modifikacemi chromatinu a klonálně dědičným uspořádáním transkripčních faktorů.

 *Inaktivace chromosomu X* je mechanismem kontroly chromosomové dóze v genomech savců. V samčích somatických buňkách je jen jedna kopie chromosomu X a ta musí být funkční, neboť samci s genotypem (A,OY) nejsou životaschopní. V samičích somatických buňkách jsou k dispozici dvě kopie X; jedna z nich, inaktivována metylací, z kondenzuje do X-heterochromatinu, v interfázovém jádře dobře pozorovatelného jako tzv. Barrovo tělísko. Pokud je v samičích tělesných buňkách více než jeden X chromosom, jsou inaktivní všechny, kromě jednoho, platí „pravidlo inaktivace ($n-1$)“. Vysvětlení tohoto pravidla na molekulární úrovni dosud chybí. V rané fázi embryogeneze savců nejdříve dochází k reaktivaci všech kopií X.

- U *placentárních* savců pak každá buňka samičího embrya *náhodně* inaktivuje jeden z obou X chromosomů, nezávisle na ostatních buňkách. Výsledný *samičí organismus je tedy mozaikou*, obsahující přibližně stejný počet buněk s inaktivovaným otcovským nebo mateřským X chromosomem (mozaikovou expresi genů vázaných na pohlavní chromosom X lze makroskopicky sledovat na příklad u samičích heterozygot s mutantní alelou pro barvu srsti).

- U *vačnatců* místo náhodné inaktivace je přednostně *inaktivován X chromosom otcovského původu*.

Mechanismus, který odpovídá za inaktivaci lidského a myšího chromosomu X zahrnuje v první fázi expresi genu *Xist* (v lokusu *Xin*) u všech chromosomů X. Produkt, *Xist* RNA, se váže *in cis* na přilehlé inaktivační centrum *Xin* a odtud se šíří podél inaktivovaného chromosomu. Chromosom pokrytý *Xist* RNA je následně metylován a pokryt deacetylovanými histony. Výsledkem je heterochromatinisace inaktivních chromosomů. Transkripce genu *Xist* však přesto, jako jediná, v inaktivních chromosomech pokračuje (v aktivních chromosomech X je transkripce *Xist* vypnuta). Působením inhibitoru metylace DNA, 5-azaC, lze v inaktivních chromosomech X dosáhnout reaktivaci genů, například genu *HGPRT*.

„Smyslem“ inaktivace X je srovnání exprese genů v obou typech somatických buněk (XY), (XX), na stejnou úroveň. Jsou využívány i jiné kompenzační strategie: například poloviční úroveň exprese X u samic (*Cenorhabditis*), nebo zdvojnásobení exprese X u samců (drozofila), v obou případech bez inaktivace X.

☞ *V ranných fázích gametogeneze nebo embryogeneze savců dochází k vymazání metylačních vzorů*

- vývojově aktivních genů,
- alelicky-specifických imprintů.
- inaktivních X chromosomů.

☞ *Následné epigenetické změny*

- determinují dráhy diferencovaných buněčných linií,
- resetují imprint podle typu pohlaví,
- ustaví diferenciální inaktivaci X podle pravidla (n-1).

☞ *Během života jedince může docházet k umlčení nadbytečných kopií genů a transgenů.* Tyto mechanismy lze chápat jako projevy „genomového imunitního systému“ eukaryot; uplatňují se

- na úrovni transkripce, kdy metylace postihuje regulační sekvence a ruší jejich dostupnost pro transkripční faktory, takže je nepřímo inhibována syntéza mRNA (metylace DNA mohou, mimo jiné, iniciovat malé „nekódující“ RNA (ncRNA) podobně, jako v případě inaktivace chromosomu X).
- na post-transkripční úrovni, kdy dochází k inhibici nebo degradaci mRNA. V případě post-transkripční inhibice exprese ncRNA přímo interagují s mRNA.

Mezi epigenetické fenomény se dnes počítá i působení ncRNA. Množina ncRNA je neobyčejně různorodá a počet jejích členů, v důsledku intenzivního výzkumu posledních let, neustále narůstá. Namátkou uvedme malé nukleolární RNA (snoRNA) participující v modifikaci (editaci) jiných RNA; ncRNA v komplexu s proteiny se účastní signálních funkcí při translokaci proteinů; RNA je součástí telomerasy a RNasy P; ncRNA simulují tRNA a kontrolují translaci, nebo simulují promotory a modulují transkripci; iniciují inaktivaci chromosomu X, jak bylo výše zmíněno. Zatímco jen nepatrná část genomů (~ 1.5 – 3%) je vyjádřena souborem bučných proteinů (proteomem), proteiny-nekódující části genomů jsou rovněž významně transkribovány, tvoříc tzv. „RNom“; soubor rozličných typů RNA, díky strukturní a konformační flexibilitě, účastných v mnoha regulačních procesech. Uvedme v této souvislosti post-transkripční inaktivaci eukaryotických mRNA:

Primární transkript je sestříhem konvertován na mRNA (introny jsou transformovány na různé typy ncRNA); mRNA je úpak buď předlohou pro translaci, nebo - v případě post-transkripčního umlčení - se stane templátem pro RNA-dependentní RNA polymerasu, která vytvoří dvouvláknovou verzi mRNA, *dsRNA*. *dsRNA* již patří do kategorie tzv. interferujících RNA (RNAi); RNAi jsou zpravidla dále štěpeny na krátké fragmenty RNAsou „Dicer“. Tyto krátké (intermediární) dvouvláknové fragmenty (mohou se ještě zmnožit) interagují s komplementární sekvencí původní mRNA. Hybridní struktura je posléze degradována endo- a exonukleasou. (Podrobné údaje o různorodých mechanismech umlčení se vymykají našemu programu, ale najdeme je např. v souboru přehledných článků v časopise *Science* **296**, č. 5571, z r. 2002).

Regulační účinky metylace DNA jsou důsledkem fyzikálně-chemických změn DNA v místě metylové skupiny a v jejím okolí (Hausheer and al. 1989): metylace cytosinu náší do DNA lokální hydrofobicitu, vyvolává změny energetické, elektrostatické a následné změny konformace. Fyzikálně chemické a konformační změny pak určují vazebné vlastnosti chromatinu. *In vitro* experimenty s kuřecím β -globinovým genem ukazují, že metylace jeho promotoru již sama o sobě vede k lokální exkluzi nukleosomů z vazebných míst.

Existuje vztah mezi metylací DNA a modifikací histonů (acetylací lysinu), zpravidla jako příčina a následek - viz indukovanou *metylací DNA a deacetylací histonů při inaktivaci chromosomu X*. Naopak, aktivní *nemetylované CpG ostrovy* s dekondensovaným chromatinem obsahují *acetylované histony*.

Aminokyseliny histonů mohou být post-translačně modifikovány (acetylovány, fosforylovány, metylovány, ubiquitinylovány); tím se stávají flexibilním regulačním faktorem. Např. fosforylace linkerového histonu H1 doprovází kondensaci metafázových chromosomů. Mimořádný význam pro kontrolu konformace chromatinu má acetylace histonů H2A, H2B, H3, H4, tvořících nukleosomové částice. Acetylace se týká lysinu v jejich N-terminálních částích, které vyčnívají z nukleosomového oktameru. Acetylací se neutralisuje pozitivní náboj vázaný na ϵ -aminoskupinu lysinu a N-terminální vlákna se pevně přimknou k negativně nabitě DNA vyvolávající kondensaci celého komplexu.

Histon H2A má jeden acetylovatelný lysinový zbytek, H2B, H3, H4 po čtyřech.

Byly popsány dva typy proteinů, které interagují s DNA metylovanou v sekvencích CpG: proteiny **MeCP1** a **MeCP2**. Decetylace histonů je hlavní příčinou chromatinové represe genů, **MeCP2** propojuje metylaci DNA s deacetylací histonů.

☞ *Dědičnost konformací chromatinu. Epigenetika molekulárních komplexů.* Nejen metylace DNA, ale i chromatinové struktury mohou být klonálně dědičné. Buď oba modifikační procesy jsou společně koordinovány, nebo způsob lokálního uspořádání a modifikace nukleosomů jsou klonálně dědičné samy o sobě (viz replikátory s periodickou strukturou a omezenou dědičnou pamětí).

Dokladem je jev posiční inhibice genů, translokovaných do oblasti heterochromatinu v genomu drozofily (genom není metylovaný standardním způsobem v dubletech CpG): náhodná translokace v průběhu diferenciaci v některé linii buněk může způsobit viditelnou fenotypovou změnu (variegaci), která svědčí nejen o replikaci translokovaného genu ale i o reprodukci heterochromatinových bloků v jeho okolí. Podobně, imprinting drozofilích genů je resetován nikoli na úrovni DNA, ale na úrovni chromatinových struktur. Kromě strukturního chromatinu mohou být klonálně reprodukovány i komplexy transkripčních faktorů, specificky vázané k určitým transkribovaným doménám. Mechanismus reprodukce proteiových komplexů s DNA je důsledkem specifických kooperativních interakcí a mechanismů samouspořádání:

Například replikace transkripčního komplexu (TF1:TF2) v souvislosti s jeho klonální dědičností a genem G; (RS, regulační sekvence):

[TF1:TF2 - RS] - G

a) Replikace komplexu:

Klon 1: [TF1 ... - RS] - G; Klon 2: [... TF2 - RS] - G;

b) Post-replikativní kooperativní doplnění:

Klon 1: [TF1:TF2 - RS]- G; Klon 2: [TF1:TF2 - RS]- G;

9.1 Dědičnost epigenetických znaků a evoluce

Dosud jsme uvažovali o epigenetické paměti a epigenetických regulacích jako o *výsledku, nikoli příčině evoluce*.

Někteří badatelé však zastávají názor, že konvenční mutace nejsou jediným zdrojem evolučních změn, a že „adaptivní mutace“, spolu s epigenetickými jevy přímo souvisí s evolučním procesem (Jablonka, Lamb et al. 1998)

Připomeňme si, že se pojem *adaptace* často používá a směšuje v několika významech:

-*adaptace genetická* je důsledkem přírodního výběru, v tomto smyslu má evoluční význam

-*adaptace fyziologická* je rychlou odezvou na externí stimuly, souvisí s regulačními mechanismy a nemusí bezprostředně korelovat s genetickou variabilitou v populaci. Šíře regulačních možností je ovšem dána genetickým základem organismu;

-*adaptace* vývojová je zpožděnou odezvou na vnější stimuly; rovněž souvisí s regulačními změnami, tentokrát ale na úrovni ontogenetických programů.

„*Adaptivními* („inteligentními“) *mutacemi*“ jsme se zabývali v kapitole o genetické variabilitě (viz P4.) Příkladně jsme se k přesvědčení, že i v tomto případě jsou adaptace důsledkem *selekce z nesespecifických* genetických změn, vyvolaných indukci lokálně-zvýšené mutability. Adaptace, které se původně jeví jako nenáhodné a účelné, při podrobné analýze byly vždy převoditelné na darwinovský princip výběru z variability.

Připomeňme si, že „*lamarckovské bytosti*“ se *účelně* adaptují na změny prostředí a současně, na základě informací z prostředí, *cíleně* mění svůj genotyp.

U „*darwinovských bytostí*“ žádná změna v rámci dědičné variability není účelná, adaptivní *a priori*; o tom co je a co není adaptivní rozhoduje pouze výběr *ex post*. Darwinovské bytosti se nemohou účelně měnit, protože darwinovská evoluce nepředpokládá cílevědomý přenos informace ve směru (a) [prostředí \Rightarrow soma \Rightarrow germinální linie], či na úrovni molekulární: (b) [prostředí \Rightarrow protein \Rightarrow RNA \Rightarrow DNA]. Komunikační bariéra (a) je nazývána Weismannovou bariérou; bariéra (b) plyne z Crickova centrálního „dogmatu“ molekulární biologie o jednosměrnosti toku genetické informace od nukleových kyselin k proteinům.

(Připomeňme si, že sám Darwin již v prvním vydání *Původu druhů* nevyklučoval vliv prostředí na evoluci; dokonce v následných vydáních tuto možnost zdůrazňoval. Ale vždy, na rozdíl od Lamarcka, jen jako náhodnou, neúčelovou intervenci).

Uvažme nyní *zpětné vazby* mezi prostředím a genomem.

Metylace DNA a jiné epigenetické modifikace genomů umožňují, aby organismy reagovaly na vstupy z prostředí – díky tomu mohou organismy projevit fenotypovou adaptivní plasticitu (Agrawal 2001). Avšak, aby se prostředím indukovaná epigenetická změna stala evolučně významnou, musí procházet germinální linií a meiosou bez změny a musí být reprodukována a fixována v dalších generacích. Existují ojedinělé epialely, které podmínku splňují (Richards 2006).

Darwinovské paradigma evoluční význam těchto *prezygotických* epimutací principiálně nevyklučuje v tom smyslu, že dědičně fixované epigenetické změny mohou ovlivnit *rozsah i směr (strukturu) populační variability*.

Jsou popsány případy, kdy došlo ke změnám fenotypu myši nebo krysy v důsledku působení externích faktorů (včetně mateřské péče) na vyvíjející se embryo či fetus. Tyto indukované fenotypové změny však byly omezeny na jedinou generaci (cit. Richards).

Vývojová strategie protistů a rostlin nevyžaduje germinální dráhu pro diferenciaci gamet. Průniku informace z prostředí do genomů tedy nestojí v cestě Weismannova bariéra. V souvislosti s dynamikou rostlinných genomů (P5) jsme uvedli případy tzv. genotrofů a somaklonální variability, kdy se odpovědi na externí podněty jeví

jako reakce lamarckovského typu. Ale i v těchto případech vždy existují přesvědčivé experimentální podklady pro vysvětlení těchto jevů v rámci darwinovské evoluční teorie

Podobně jako v případě živočichů však existují ojedinělé rostlinné epialely - na příklad metylačně-inaktivovaný „aktivátor“ *Ac* v genomu kukuřice, které procházejí beze změny meiosou a představují potenciální zdroj genomové nestability.

☞ Základní otázka se soustřeďuje na problém, zda epigenetické mechanismy umožňují *lamarckovskou evoluci*, tedy evoluci podle schématu

1. *fenotypová adaptace* ($F \Rightarrow F'$)
2. *korespondující odpověď genotypu* ($G \Rightarrow G^*$)
2. *reprodukce G^* & F' v následných generacích*: ($G^* \Rightarrow G^*$), ($G^* \Rightarrow F'$).

Tento příčinný vztah mezi adaptivní změnou fenotypu a korespondující epigenetickou modifikací genů nebyl dosud prokázán. Základním mechanismem, eliminujícím možnost mezigeneračního přenosu indukovaných epigenetických změn je vymazání parentálních epigenetických vzorů v ranných vývojových stádiích embrya.

Nastavení signálů pro *postzygotické epigenetické modifikace* je mezigeneračně dědičné; tato dědičnost zajišťuje znovunastavení (reseting) imprintů pro spuštění nových cyklů vývoje.

Signály pro reseting se týkají *dědičnosti konformací* v určitých genomových doménách, nikoli dědičnosti jejich *primární struktury* (viz například případ modifikace centra *Xin* v samičích buňkách, kontrolujícího inaktivaci jedné kopie pohlavního chromosomu X).

Náhodné epimutace mohou být účinně korigovány na primární genetické úrovni meiotickými genovými konverzemi (Bird 2002).

☞ *Omezení mezigeneračního přenosu epigenetických imprintů a epimutací brání informačnímu chaosu, který by byl nevyhnutelným následkem jejich nekontrolovaného hromadění. „Dědičnosti získaných vlastností“ je takto určen marginální význam.*

Byť epigenetické jevy nemají ten bezprostřední evoluční význam, který jim přisuzují neolamarckisté, otevřely novou dimenzi pro regulaci vnitrobuněčných a mezibuněčných vztahů (Colot and Rossignol 1999).

Z hlediska ontogeneze, *odchytky ve struktuře epigenetické paměti* mohou *kanalizovat postzygotický vývoj* do alternativních drah

epigenetického prostoru. Taková změna směru ontogeneze může sekundárně otevřít nové vnitřní podmínky i pro změnu spektra (obsahu) genetické variability. Pokud změněné spektrum genetických změn vyhovuje vnitřní i vnější selekci, selekcí může dojít k fixaci změn ontogenetických programů.

A. Konvenční schema selekce modifikovaných ontogenetických programů:

Výchozí forma, mutace v germinální linii, změna spektra genetické variability (nové alely); meiosa ⇒ gamety + nové alely

⇒ gamety + nové alely ⇒ zygota, nový genotyp ⇒

⇒ embryogeneze + vnitřní selekce; vnější selekce, ⇒ nová evoluční forma

B. Epigenetické intervence a vznik modifikovaných ontogenetických programů:

Výchozí forma, meiosa ⇒ gamety ⇒ zygota ⇒ postzygotické epigenetické modifikace ⇒

⇒ alternativní vývojové dráhy + vnitřní selekce ⇒

⇒ genetická kanalizace = preference určité podmnožiny mutací (změna spektra genetické variability) + vnitřní selekce + vnější selekce ⇒ nová evoluční forma

☞ Někteří autoři uvádějí tzv. *genetickou asimilaci*, jev studovaný a popsáný C.H. Waddingtonem v 50. letech (Waddington, 1962), jako příklad indukce specifických dědičných změn vlivem prostředí, tedy jako příklad lamarckovského procesu.

C.H. Waddington vystavil vyvíjející se drozofily zvýšené teplotě (40°C) a sledoval fenotypové změny vznikající v těchto nefysiologických podmínkách. Zaměřil se na změny struktury křídla, na specifický fenotyp „cross-veinless“. Opakování cyklů selekce vycházejících ze změněných forem postupně vedlo k obohacování populace o tento fenotyp, až ke vzniku geneticky fixované změny, odpovídající mutaci *cross-veinless*.

Podobně byl uspořádán experiment s drozofilními vajíčky, vystavenými působení par eteru (nemutagenního prostředku používaného v experimentech s drozofilou k narkotizaci). Waddington se tentokrát zaměřil se na fenotypové změny typu „bithorax“. Další cykly šlechtění v týchž podmínkách, vycházející jedinců typu bithorax, opět vedly k narůstání podílu těchto forem v populaci potomstva. Nakonec dospěl až ke geneticky fixovaným mutacím *bithorax*.

☞ V případě genetické asimilace se naopak jedná o neobyčejně významný objev kterým byla poprvé prokázána možnost směrovaného ovlivnění odolnosti („robustness“; Wagner, 2005) epigenetického prostoru proti deformacím v důsledku mutační zátěže.

Dnes víme, že tuto odolnost zajišťují geneticky podmíněné, pleiotropicky působící, „tlumící“ funkce - například chaperony typu

Hsp90. Narušení těchto funkcí může uvolnit skryté mutace, změnit strukturu vnitrodruhové variability a otevřít cestu k modifikovaným formám. V souladu s populačně-genetickým modelem S. Wrighta (viz P7.) takto může dojít k evolučně významné směřované selekci.

Literatura

- Adams, L. P. (1990). "DNA methylation." Biochem. J. **265**: 309-320.
- Agrawal, A. A. (2001). "Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species." Science **294**: 321-326.
- Barlow, D. P. (1993). "Methylation and imprinting: From host defense to gene regulation?" Science **260**: 309-310.
- Bickle, T. A. and D. H. Kruger (1993). "Biology of DNA restriction." Microbiol. Rev. **57**: 434-450.
- Bird, A. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**: 209-213.
- Bird, A. (1995). "Gene number, noise reduction and biological complexity." TIG **11**: 94-100.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes and Development **16**: 6-21.
- Colot, V. and J.-L. Rossignol (1999). "Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device." BioEssays **21**: 402-411.
- Cooper, D. N. and S. Gerber-Huber (1985). "DNA methylation and CpG suppression." Cell Differ. **17**: 199-205.
- D'Arvi, R. and J. Casadesús (2002). "Memory in bacteria and phage." BioEssays **24**: 512-518.
- Doerfler, W. (1991). "Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism." Biol. Chem. Hoppe-Seiler **372**: 557-564.
- Duncan, B. K. and J. H. Miller (1980). "Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA." Nature **287**: 560-561.
- Flavell, R. B. (1994). "Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 3490-3496.
- Hausheer, F. E. and e. al. (1989). "Computational analysis of structural and energetic consequences of DNA methylation." Carcinogenesis **10**: 1131-1137.

- Holliday, R. (1987). "The inheritance of epigenetic defects." Science **238**: 163-169.
- Jablonka, E. et al. (1998). "Lamarckian" mechanisms in darwinian evolution." TREE **13**: 206-210.
- Jeddeloh, J. A. and Richards (1996). "m³CCG methylation in angiosperms." The Plant J. **9**: 579-586.
- Lachner, M., R. J. O'Sullivan, et al. (2003). "An epigenetic road map for histone lysine methylation." J. Cell Sci. **119**: 2117-2124.
- Laird, P. W. and R. Jaenisch (1996). "The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics." Annu. Rev. Genet. **30**: 441-464.
- Lewin, B. (2008). Genes IX. Boston,, Jones and Bartlett.
- Li, E., T. H. Bestor, et al. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell **69**: 915-926.
- Matzke, M. A. and A. J. M. Matzke (1998). "Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular responses." Cell. Mol. Life Sci. **54**: 94-103.
- Matzke, M. A., M. Primig, et al. (1989). "Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants." EMBO J. **8**(643-648).
- Messer, W. and M. Noyer-Weidner (1988). "Timing and targeting the biological functions of dam methylation in *Escherichia coli*." Cell **54**: 735-737.
- Murphy, S. K. and R. Jirtle (2003). "Imprinting evolution and the price of silence." BioEssays **25**: 577-588.
- Richards, E. J. (2006). "Inherited epigenetic variation - revisiting soft inheritance." Nature Rev. Genet., Advance Online Publ., 14 March: 1-7.
- Rossignol, J. L. and G. Faugeron (1994). "Gene inactivation triggered by recognition between DNA repeats." Experientia **50**: 307-347.
- Selker, E. U., D. Y. Fritz, et al. (1993). "Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*." Science **262**(1724-1728).
- Smith, D. W., A. M. Garland, et al. (1985). "Importance of state of methylation of oriC GATC sites in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*." EMBO J. **4**: 1319-1326.
- Solter, D. (1988). "Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes." Annu. Rev. Genet. **22**: 127-146.
- Thompson, J. D. (1991). "Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change." TREE **6**: 246-249.

- Tordera, V., R. Sendra, et al. (1993). "The role of histones and their modification in the informative content of chromatin." Experientia **49**: 780-788.
- Tweedie, S., J. Charlton, et al. (1997). "Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary." Mol. Cell. Biol. **17**: 1469-1475.
- Vaucheret, H. and M. Fagard (2001). "Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators." TIG **17**: 29-35.
- A. Wagner, *Robustness and Evolvability in Living Systems*, Princeton Univ. Press, 2005.
- Waddington, C.H (1962). *Principles of Embryology*. G. Allen & Unwin; Macmillan, London and New York
- Wilkinson, C. R. M., Bartlet, R., et al. (1995). "The fission yeast gene *pmt1+* encodes a DNA methyltransferase homologue." Nucleic Acids Res. **23**: 203-210.
- Wolffe, A. P. (1994). "Inheritance of chromatin states." Developmental Genet. **15**: 463-470.
- Zweiger, G., G. Marczynski, et al. (1994). "A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell." J. Mol. Biol. **235**: 472-485.