

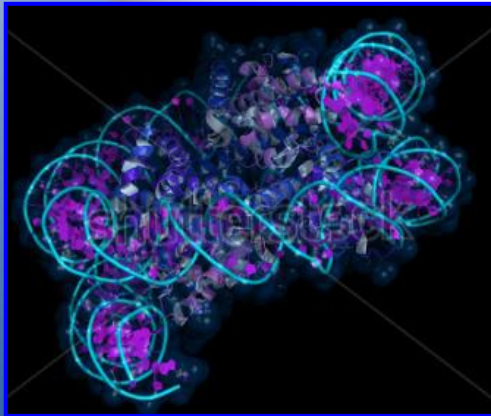
Remodelace chromatinu

Jana Šmardová

Jan Šmarda

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU



Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot

7. a 14.11.2019

Kovalentní modifikace histonů - pokračování 14.11.2019

Fosforylace histonů

Fosforylace histonů během mitózy

- fosforylace **H3** během mitózy (popsáno 1974, 1978) na serinu **S10** a **S28** (v sekvenčních motivech –ARKS–) spojena s **kondenzací chromozomů**
- kináza **Aurora B**
- nemá lokální omezení: začíná v heterochromatinových pericentrických oblastech a pokračuje podél celých chromozomů
- fosforylace začíná s nástupem mitózy, kulminuje v metafázi a rychle klesá po anafázi

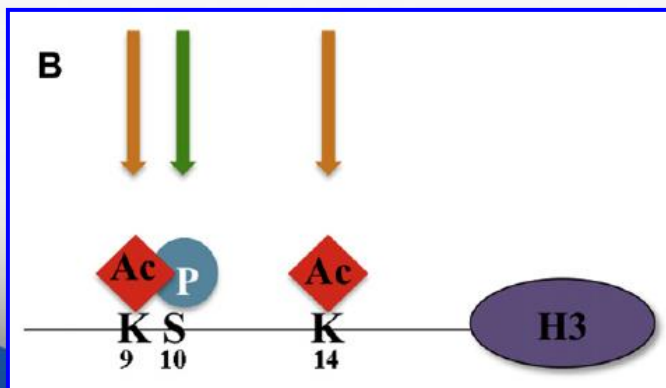
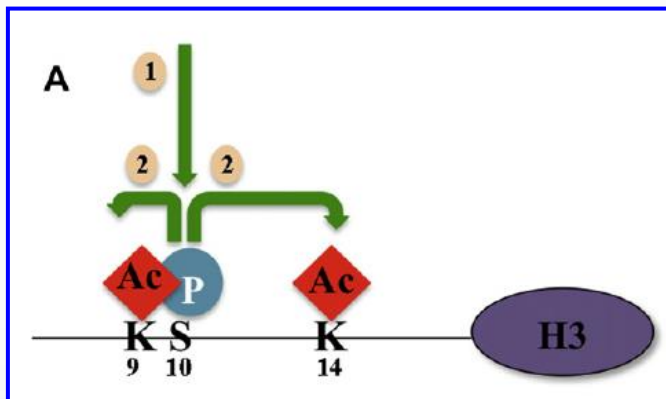


Fosforylace histonů: regulace transkripce

- fosforylovány především serinové a také threoninové zbytky
 - mitogenní signály spouštějí kaskádu MAP kináz:
Rsk-2 („*ribosomal subunit protein S6 kinase 2*“) fosforyluje **H3** na **S10**: tato fosforylace „**otevívá**“ strukturu chromatinu a umožňuje **aktivaci** (transkripci) genů spojených s buněčným dělením podle typu stimulace další, příbuzné histon kinázy – např. **MSK1** („*mitogen- and stress-activated kinase 1*“).
 - tato fosforylace H3 je lokálně omezena do oblastí cílových genů
- Jak je zajištěn tak odlišný způsob fosforylace H3 S10 (a jejího dopadu!) při aktivaci transkripce a při kondenzaci chromozomů??

Fosforylace histonů: regulace transkripce

- fosforylace histonů je **funkčně provázaná s acetylací**: fosforylace **H3 S10** a simultánní acetylace **K14** - 2 modely:

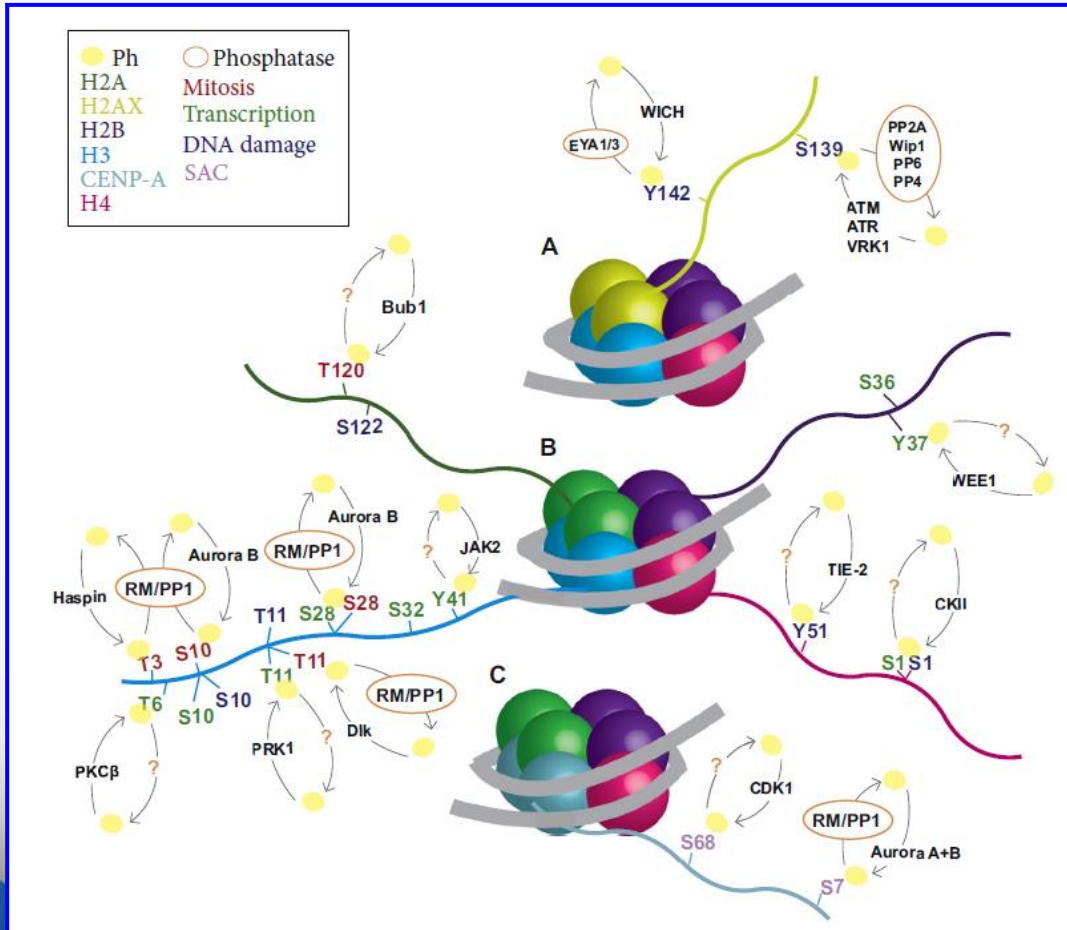


- synergistické kroky: fosforylace **H3 S10** (krok 1) umožňuje přístup acetyltransferáz (krok 2) a acetylaci **H3 K9** nebo **K14**
- nezávislé kroky: k fosforylaci **H3 S10** dochází na acetylovaném histonu **H3 K9** nebo **K14**, ale ty modifikace se navzájem nepodmiňují

Fosforylace histonu H3: regulátory a pozice

Regulators	Histone mark
<i>WRITERS</i>	
Aurora-B	H3S10, H3S28
Haspin	H3T3
Dlk/ZIP	H3T11
MSK1/2	H3S10, H3S28
IKK- α	H3S10
JNK	H3S10
PKA	H3S10
Akt	H3S10
Cot	H3S10
PIM1	H3S10
CDK8	H3S10
JAK2	H3Y41
PKC β	H3T6
PKC δ	H3T45
Chk1	H3T11
<i>Positively affected READERS</i>	
14-3-3	H3S10
Survivin	H3T3
IMJD2C	H3T11
<i>Negatively affected READERS</i>	
HP1 α , β and γ	H3S10
PcG	H3S28
TFIID	H3T3
LSD1	H3T6
<i>ERASERS</i>	
PP1	H3T3, H3T11, H3S10, H3S28
PP2A	H3S10

Fosforylace histonů

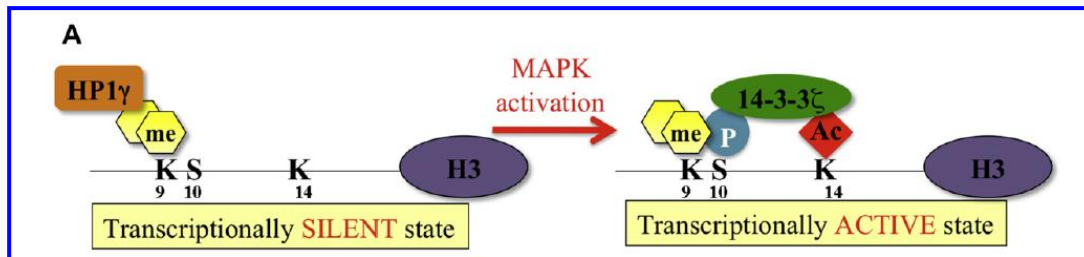


- AA zbytky fosforylované:
- během **mitózy**
 - během **transkripce**,
 - při **poškození DNA**
 - **kontrolní bod mitotického vřeténka**

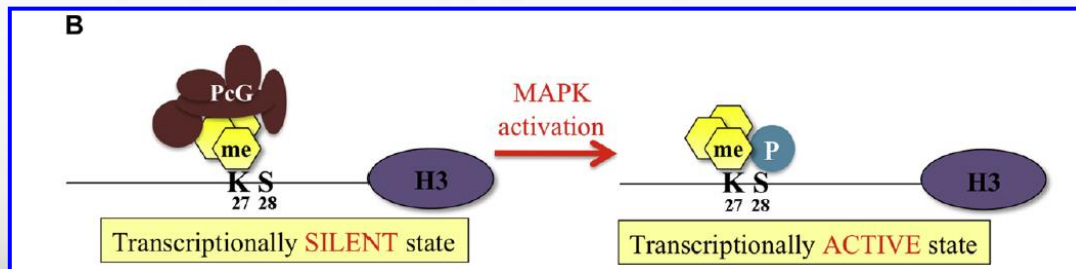
Fosforylace histonů: regulace transkripce

- v bezprostředním sousedství **S10** a **S28** jsou lysiny **K9** a **K27**, které mohou být metylovány a tak reprimovat transkripci
- navržena hypotéza „**fosfo/metyl přepnutí**“, podle které fosforylace serinů vede k dočasnému uvolnění represivních proteinů („čtenářů metylovaných lysinů“) a k aktivaci transkripce

Fosforylace histonů: regulace transkripce



- promotor reprimovaný vazbou proteinu **HP1γ** na dimetylovaný **H3K9me2** → fosforylace **H3S10** vede k uvolnění represoru HP1γ, acetylaci **H3K14** a vazbu **14-3-3ξ** → transkripce je aktivována i v přítomnosti „represivní“ značky **H3K9me2**



- promotor je reprimovaný vazbou proteinu **PcG** na trimetylovaný **H3K27me3** → fosforylace **H3S28** a uvolnění represoru PcG → transkripce je aktivována i v přítomnosti „represivní“ značky **H3K27me3**



Coffinův-Lowriho syndrom

- vrozené vývojové onemocnění spojené s těžkými psychomotorickými poruchami, obličejovými a progresivními skeletálními deformacemi
- příčinou je zárodečná mutace genu pro **Rsk-2** (fosforyluje vedle H3 také například CREB jako odpověď na některé mitogenní signály)
- gen je lokalizován na chromozomu X (Xp22.2); dědičnost dominantní, vázaná na X - retardace se výrazněji projevuje u mužů



Metylace histonů

Metylace histonů

- metylovány mohou být lysiny a argininy
 - argininy mohou být **mono-** a **di-metylovány**
 - lysiny mohou být **mono-**, **di-** a **tri-metylovány**
- různě metylované zbytky argininu a lysinu mění vazebnou afinitu mnoha proteinů k histonům

Metylace histonů - arginin

- **jaderné receptory** aktivují transkripci za účasti mnoha koaktivátorů (např. z rodiny proteinů p160); s nimi interaguje také metyltransferáza **CARM1** („*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*“)/**PRMT4**: metyluje zbytky **argininu** na **H3** a potencuje transaktivaci jadernými receptory
- histon metyltransferázy **PRMT1, 2, 3, CARM1/PRMT4** a **PRMT5/JBP1** metylují například **H4 R3, H3 R17**
- metyltransferázy **PRMTs** metylují také **nehistonové proteiny**
- popsána (například) **synergie** p300, CARM1 a PRMT1

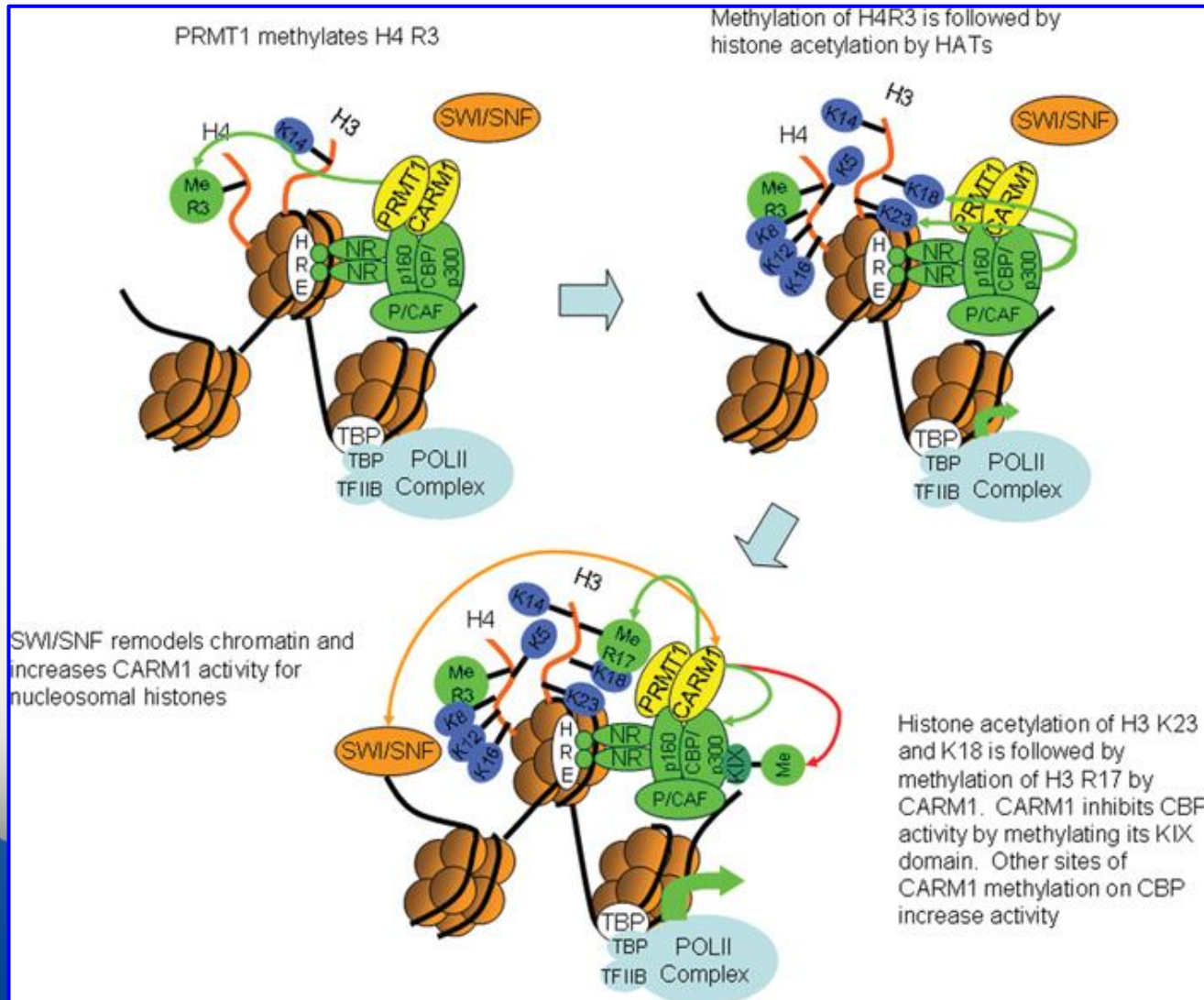
Metylace nehistonových proteinů

Model regulace specificity CBP/p300 by CARM1

- CBP funguje jako integrátor signálních drah: není příliš specifický, funguje jako aktivátor mnoha různých TF. Je v buňce přítomen v nízké hladině a faktory o něj soutěží (⇒ haploinsuficience).
- CARM1 interaguje s koaktivátory p160 a metyluje CBP/p300.
- Metylace CBP/p300 mění jeho specifitu: ztrácí afinitu k části TF (např. CREB, Myb), pro které funguje jako koaktivátor ⇒ zvyšuje se jeho afinita k ostatním TF (např. jaderným receptorům).
- Regulace transkripce aktivované jadernými receptory komplexem obsahujícím CARM1 a CBP/p300:
 1. acetylace histonů
 2. metylace histonů
 3. metylace CBP/p300 a další potencování acetylace histonů

Synergie p300, CARM1 a PRMT1

Aktivace transkripce genů prostřednictvím metylace argininů



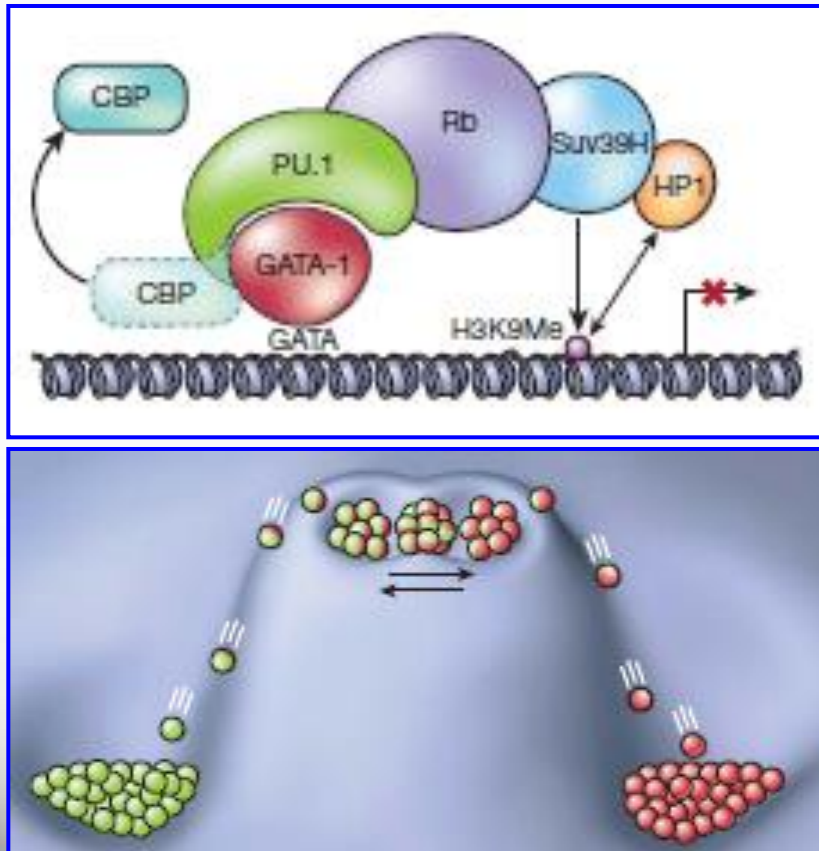
Litt M et al. *Biosci Rep*
29: 131-141, 2009

Metylace histonů - lysiny

- **Suv39H1** trimetyluje lysin K9 histonu **H3**
 - účastní se **genově specifické represe**: v komplexu s HDACs (např. pRB)
 - účastní se **represe pericentrického heterochromatinu** - za účasti proteinu **HP1** („*heterochromatin-associated protein-1*“).

- metylace K9 H3 **interferuje** s fosforylací S10
- metylace K9 H3 + hypoacetylace H4 = znak heterochromatinu

Paradigma **PU.1:GATA1**: kovalentní modifikace histonů



Jaký mechanismus je podstatou antagonismu **PU.1** a GATA1?
K aktivaci svých cílových genů v erytroidních buňkách potřebuje **GATA1** protein **CBP**. Vysoká hladina PU.1 ale odebírá CBP z vazby na GATA1. Naopak to vede k vazbě **Rb** a **Suv39H**, což vede k **metylaci K9 H3**, následnému navázání proteinu **HP1** a k výrazné (**aktivní!**) **represi** cílových genů.

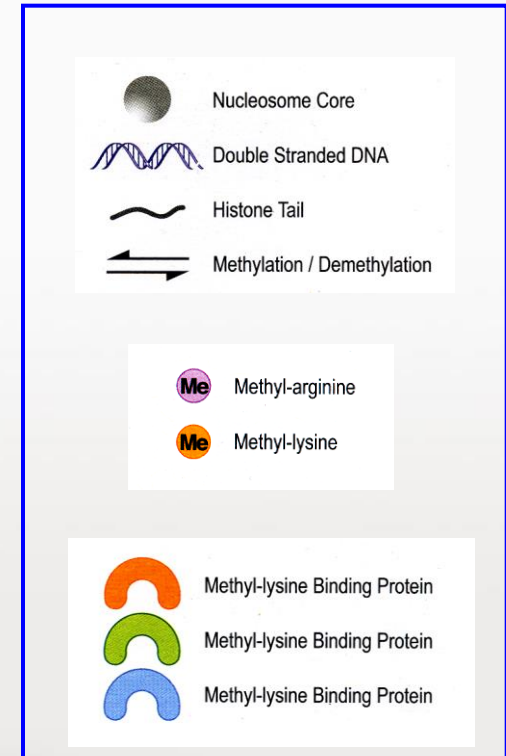
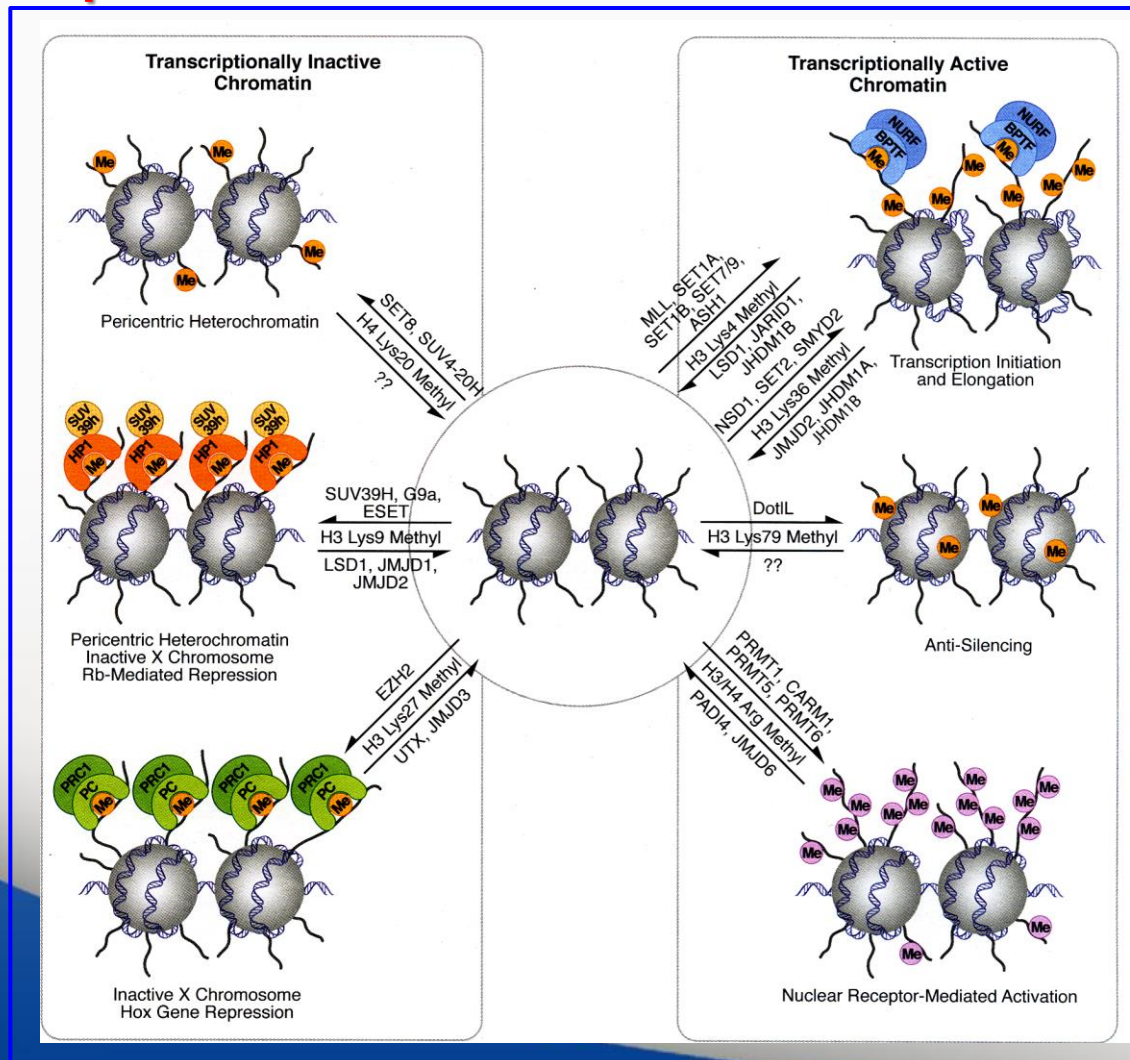
myeloidní buňky
(PU.1)

erytroidní buňky
(GATA1)

Methylace histonů

represe

aktivace



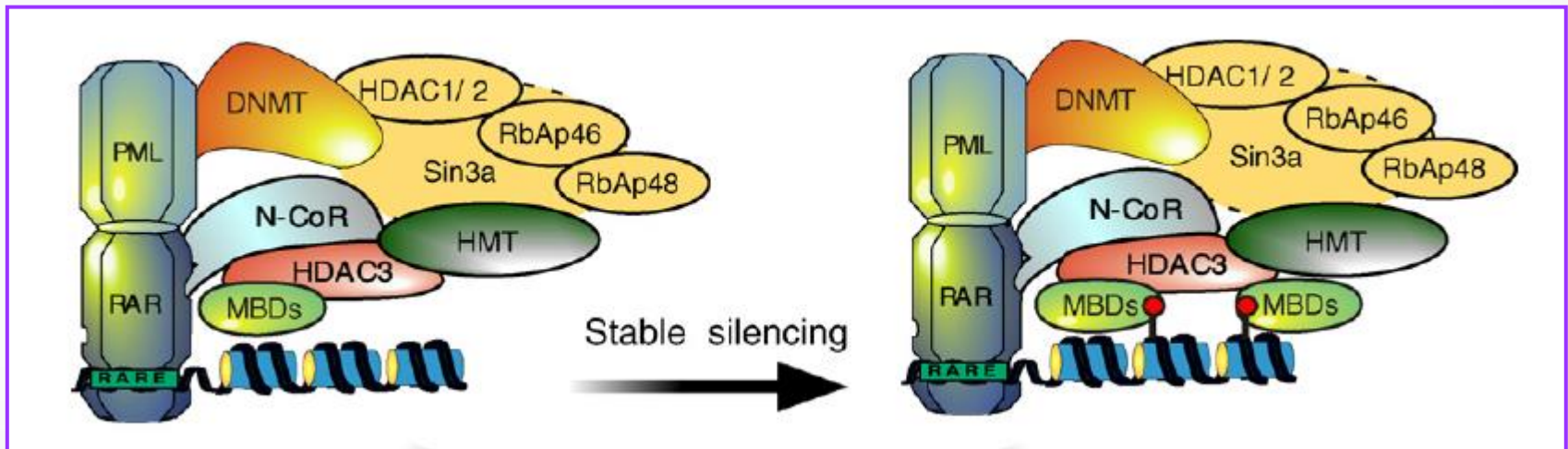
Trimetylace histonů na lysinech

- trimetylace **lysínu 4** histonu **H3** (**H3K4me3**) je detekována v promotorech transkripčně **aktivních** genů, zatímco...
 - trimetylace **lysínu 9** histonu **H3** (**H3K9me3**) a **lysínu 27** histonu **H3** (**H3K27me3**) je přítomna v promotorech transkripčně **reprimovaných** genů
- modifikace **H3K9me3** a **H3K27me3** představují klíčový umlčovací mechanismus v savčích buňkách; H3K9me3 pracuje ve spojení s metylací DNA, zatímco H3K27me3 obvykle funguje bez spojení s metylací DNA
- **společný** (tj. dvojznačný) výskyt modifikace **H3K4me3** a **H3K27me3** v promotorech některých genů (např. v kmenových buňkách) jsou znakem vývojově důležitých genů („fenotypová **plasticita**“)

Metylace DNA a metylace histonů

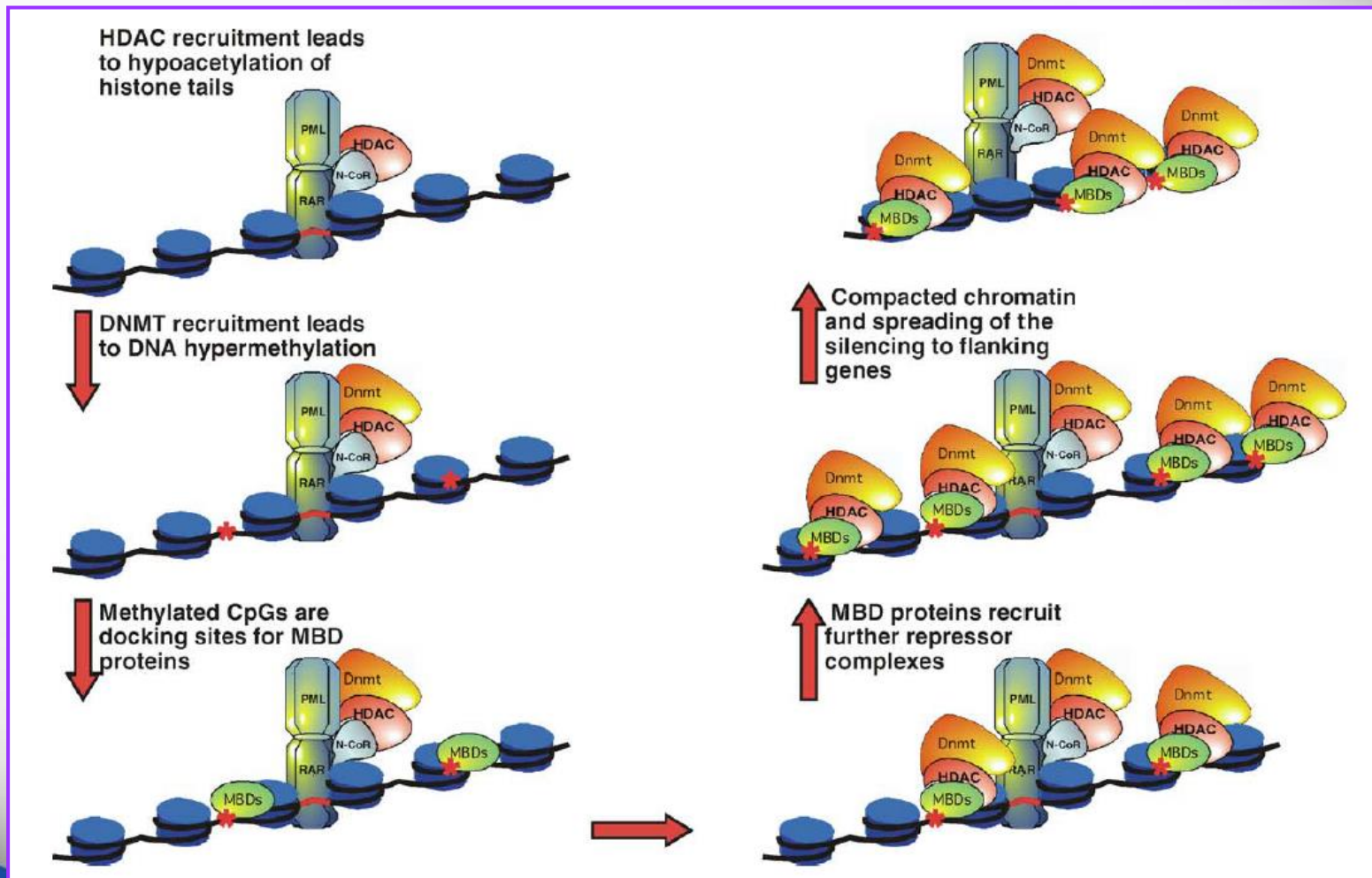
- některé **histonmetyltransferázy** (HMTs; např. G9a, Suv39H1) mohou **směřovat / navádět DNA metyltransferázy** (DNMTs) do specifických oblastí genomu a přispívat tak ke stabilitě umlčení některých genů

APL: „gene lock-up“



- Příklad zprostředkování epigenetického umlčování genů: Protein PML-RAR (patologicky) přechodně reprimuje cílové geny RAR. Přivádí do oblasti HDACs a DNMT a navozuje stabilní umlčení těchto cílových genů.

APL: „gene lock-up“



Metylace DNA a metylace histonů

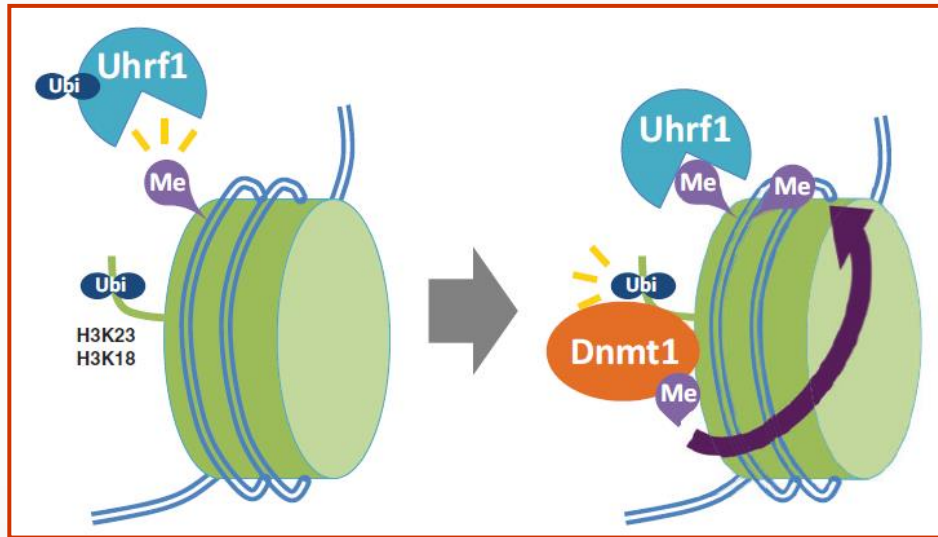
- některé **histonmetyltransferázy** (HMTs; např. G9a, Suv39H1) mohou **směřovat** / **navádět DNA metyltransferázy** (DNMTs) do specifických oblastí genomu a přispívat tak ke stabilitě umlčení některých genů
- **transkripční umlčování** (*během procesu kancerogeneze*)
 1. mono-, di- a tri-metylace H3K27
 2. ubikvitinace H2AK119
 3. metylace DNA

Stahl M. et al. *PLOS Genet* **2016**, DOI:10.1371/journal.pgen.1006193

Ubikvitinace histonů

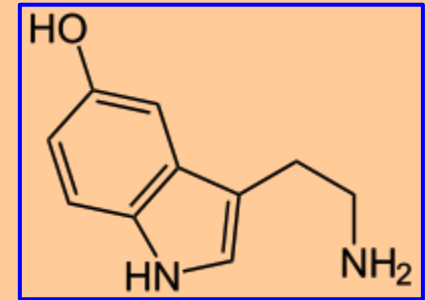
- **mono**ubikvitinace, a to na C-konci histonů: **K119** histonu **H2A** a **K123** histonu **H2B**
- spojeno s **transkripčně aktivním** nebo naopak **reprimovaným** (**H2A K119**) stavem chromatinu
- **poly**ubikvitinace histonů je také integrální součástí **oprav DNA**
 - jako odpověď na poškození DNA (DSBs) jsou ubikvitinovány histony **H2A** a **H2AX** na **K63** (histon ubikvitin ligázou **RNF8**);
 - tato ubikvitinace:
 - reprimuje elongaci mRNA
 - má tendenci se šířit (amplifikovat) podél chromozomu od místa DS zlomu, což by mohlo vést k nekontrolovanému umlčení genů; proto následuje její aktivní – regulované - zastavení

Ubikvitinace histonů



- Během **replikace DNA** nemůže být metylované vlákno replikované kanonickým replikačním systémem, a tak se tvoří hemimetylovaná DNA. K ní se specificky váže ubikvitinligáza **Uhfr1** a ubikvitinuje **H3K23** a/nebo **H3K18**. To přivádí Dnmt1, která následně metyluje DNA.

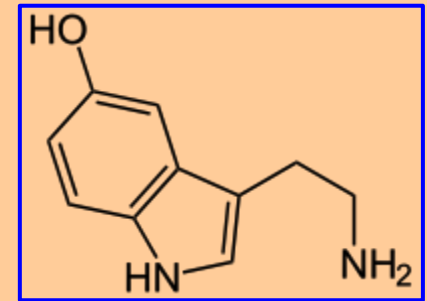
Serotonylace histonů



Serotonin (5-HT)

- neurotransmitter
- účastní se procesů, které se podílejí na vzniku nálad; jeho nedostatek může způsobovat deprese, poruchy spánku, podrážděnost, agresivitu, bipolární poruchu, chorobnou úzkost...
- podporuje kontrakce hladkého svalstva a krevní srážlivost (význam při krvácivých poraněních)

Serotonylace histonů: „Can the brain have happy chromatin?“



Serotonin (5-HT)

1. funguje prostřednictvím nekovalentních interakcí s příslušnými cytoplazmatickými receptory (typu GPCR), které následně aktivují signální kaskády
2. receptor-independentně: transglutamináza 2 (**TGM2**) kovalentně váže serotonin (a další monoaminové substráty, včetně dopaminu, histaminů,..) na:
 - nejružnější proteiny (včetně např. malých GTPáz)
 - histony: **glutamin** 5 histonu H3: **H3Q5(5-HT)**

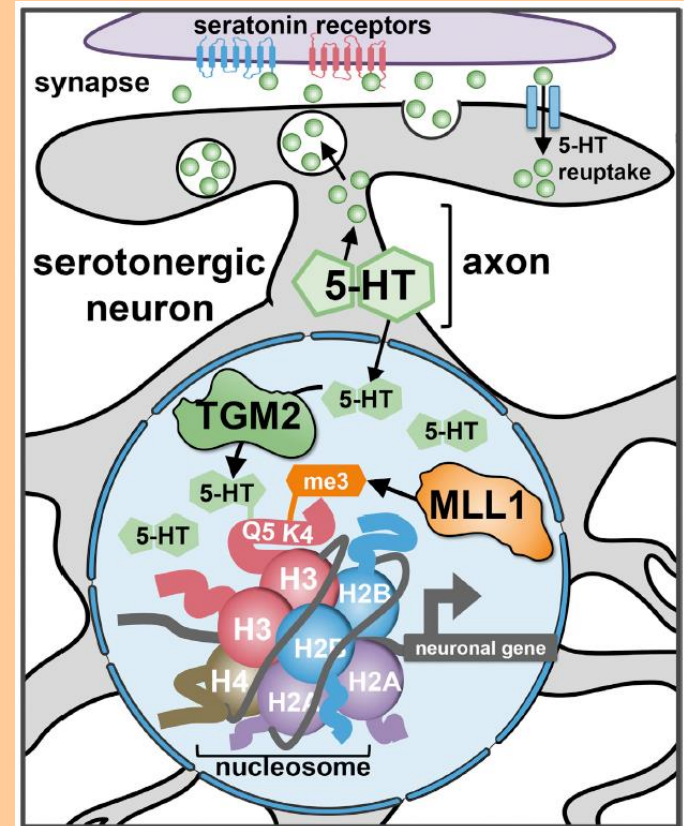
Serotonylace histonů

H3Q5(5-HT)

- během diferenciacce neurálních progenitorů
- spekuluje se, že ovlivňuje transkripci
- objevuje se společně s H3K4me3, která je znakem aktivní transkripce (tyto dvě modifikace se navzájem nepodmiňují)
- **H3Q5(5-HT)**/ H3K4me3 stimulují vazbu TFIID k chromatinu

spekulace

- změny modifikací chromatinu by mohly být molekulární podstatou kognitivních funkcí, emocí a dalších funkcí mozku



Mechanismus účinku kovalentních modifikací histonů

1. modifikace = redukce pozitivního **náboje** histonů → oslabení interakcí mezi histony a DNA
 2. modifikace → **sterická** inhibice kondenzace chromatinu vyššího stupně
- ? fosforylace, metylace, ubikvitinace... histonů spojena s kondenzací a/nebo represí transkripce, ale také s aktivací transkripce; některé modifikace mohou být aktivující i reprimující ?

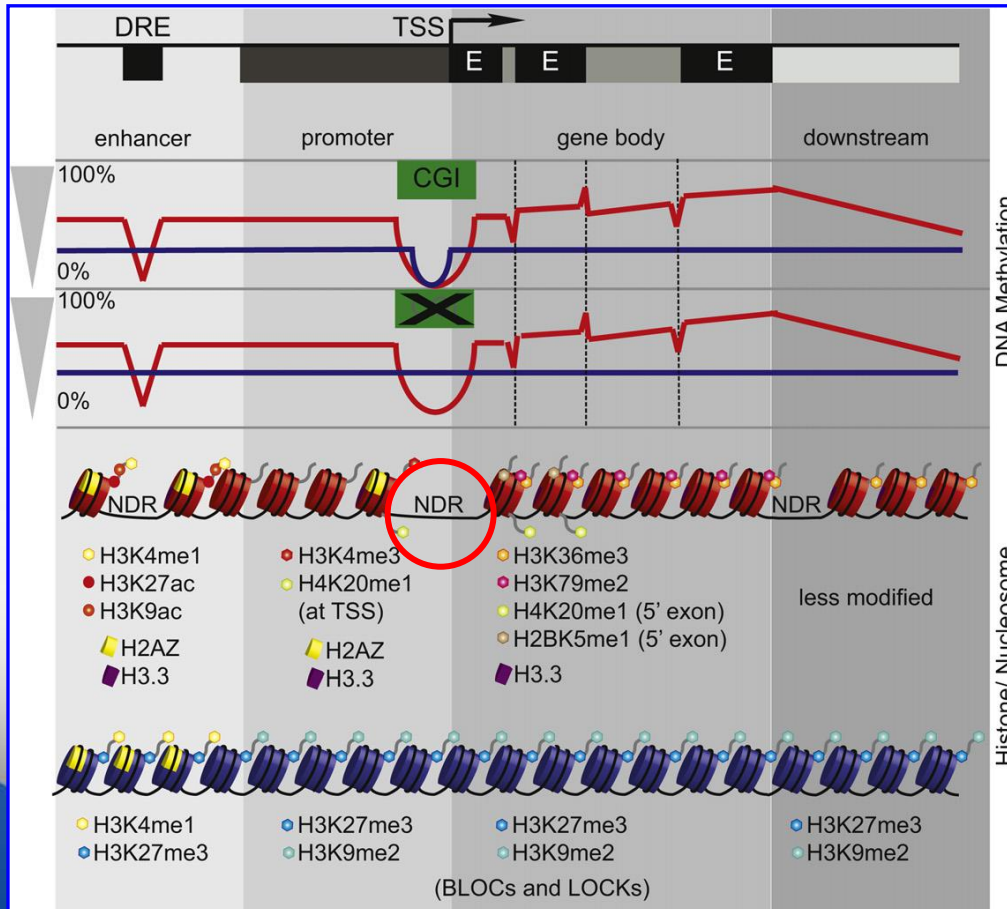
3. Hypotéza histonového kódu

Hypotéza „histonového kódu“

- konkrétní kovalentní modifikace nebo jejich kombinace (konfigurace) představují **specifické značky** pro **specifické proteinové komplexy** („readers“) s odlišnými funkcemi („formátování textu genetické informace“)
- komplexní epigenetické rozlišení odlišných oblastí genomu, například:
 - promotory: H3K4me3
 - enhancery: H3K3me1
 - aktivní regulační oblasti: H3K9ac, H3K27ac
 - transkribované oblasti: H3K79me2, H4K20me1
 - oblasti reprimované Polycomb: H3K27me3
 - pericentrický heterochromatin: H3K9me3
- nikoli kód ve smyslu povelů, ale bohatý, dynamický „**crosstalk**“

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

ATP-dependent chromatin remodelující komplexy



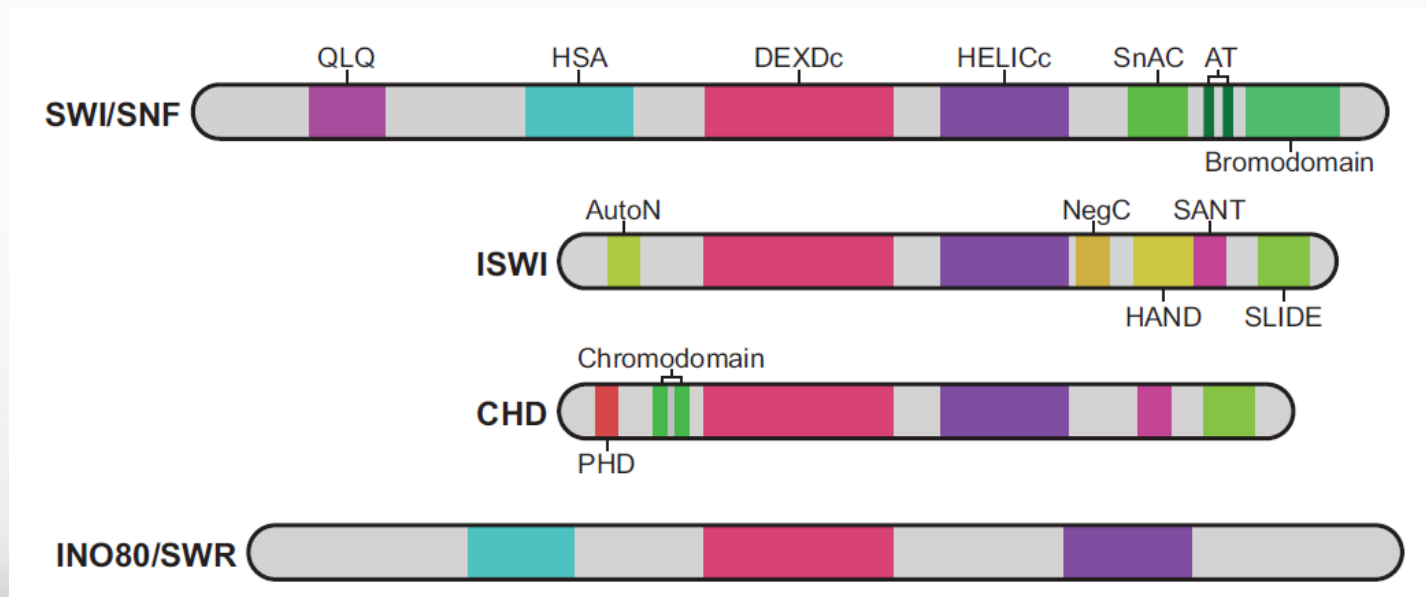
- pozice a hustota nukleozomů ovlivňuje úroveň přístupnosti DNA pro proteiny
- **NDR** – „*nucleosome depleted regions*“
- aktivní geny mají v oblasti před začátkem transkripce – v oblastech, kde se váží TFs - NDRs
- reprimované geny je obvykle nemají

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

- **multiproteinové komplexy**, které mění konformaci histonů a DNA v nukleozomu, tj. strukturu/pozici nukleozomů; využívají k tomu energii z **hydrolýzy ATP**
 - **SWI/SNF, RSC, NURF, CHRAC, ACF, FACT, Mi-2/NuRD,...**
- klasifikují se do čtyř rodin na základě sekvenční podobnosti ATPázové domény:
 - **SWI/SNF** (*switch/sucrose-non-fermenting*)
 - **ISWI** (*imitation switch*)
 - **CHD** (*chromodomain-helicase-DNA binding*)
 - **INO80** (*inositol requiring 80*)

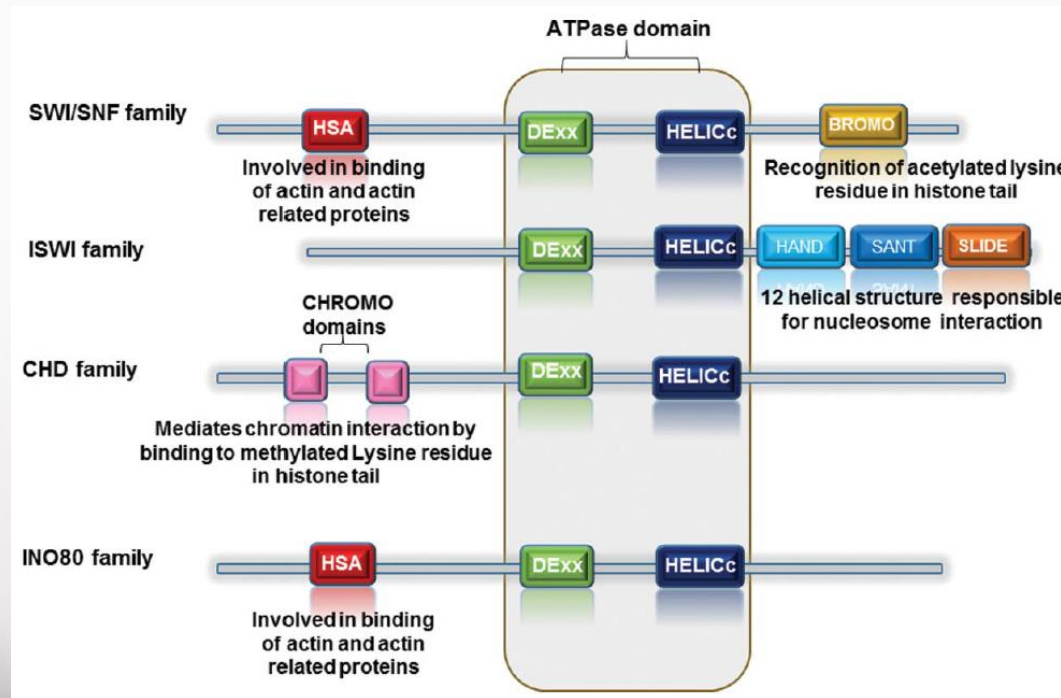
ATP-dependent chromatin remodeling complexes

domain structure of ATPase subunit of four families of ATP-dependent chromatin remodeling complexes



ATP-dependent chromatin remodeling complexes

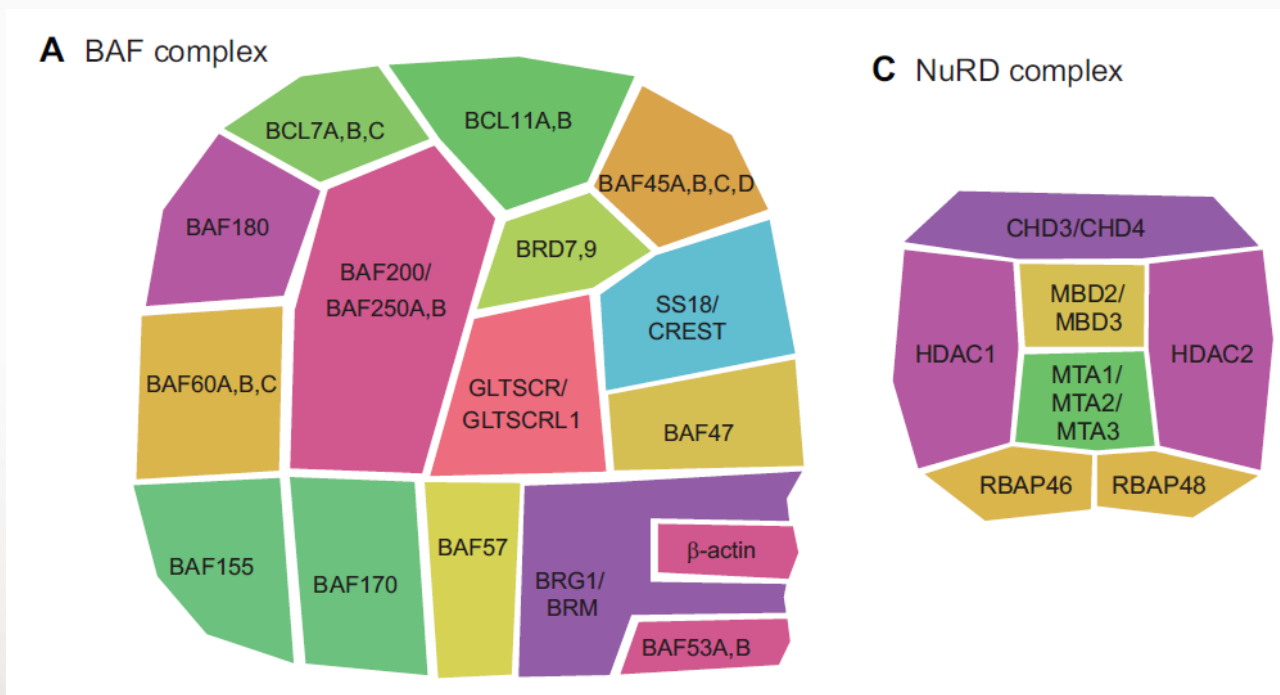
domain structure of ATPase subunit of four families of ATP-dependent chromatin remodeling complexes



ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

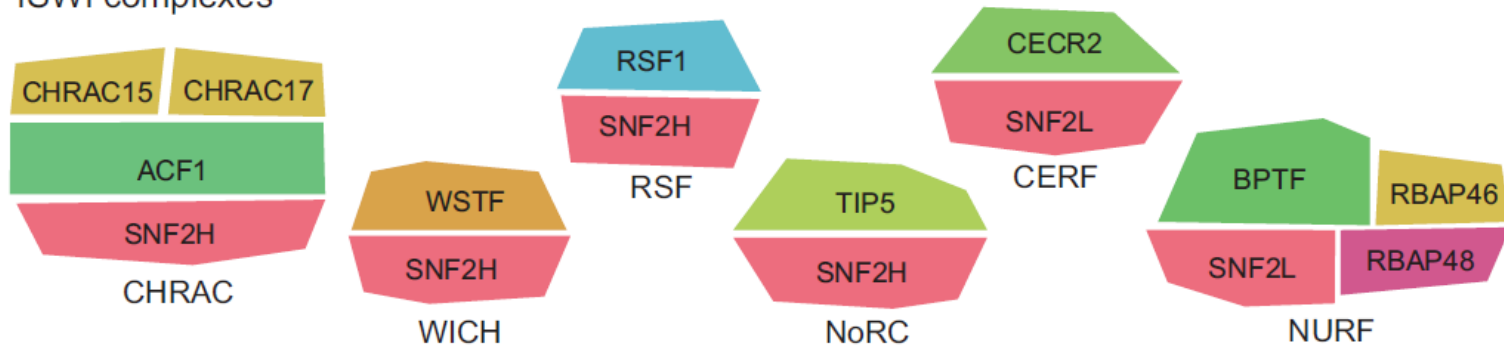
- ATPázová podjednotka váže a hydrolyzuje ATP, asociované podjednotky modulují katalytickou aktivitu ATPázy a určují genovou specifitu
- sestavování různých kombinací ATPázových podjednotek a asociovaných podjednotek tvoří různé ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy s tkáňově a buněčně specifickými funkcemi

Struktura některých ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů

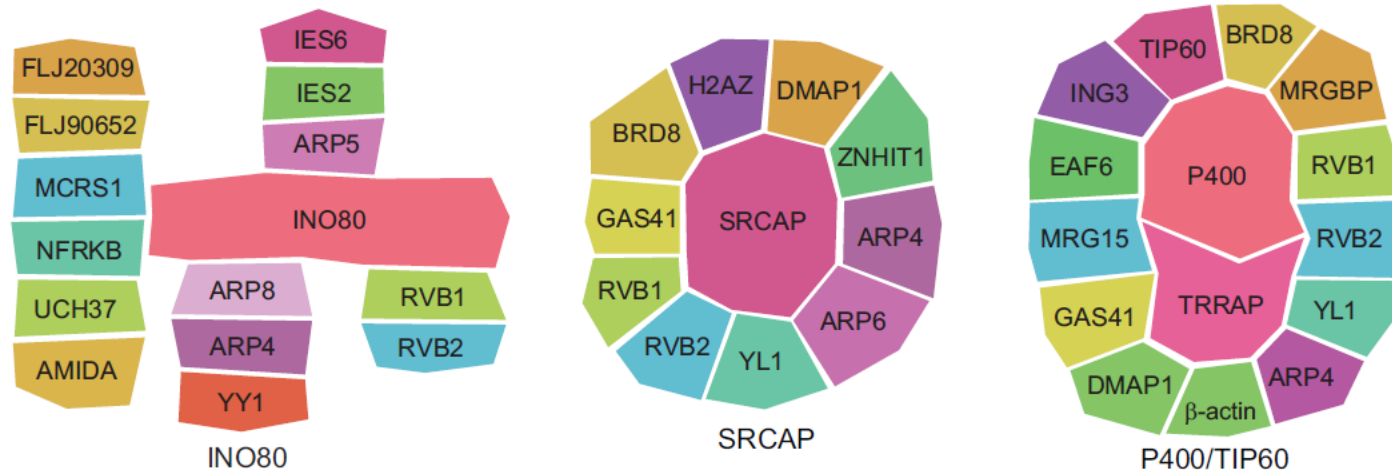


Struktura některých ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů

B ISWI complexes



D INO80/SWR complexes



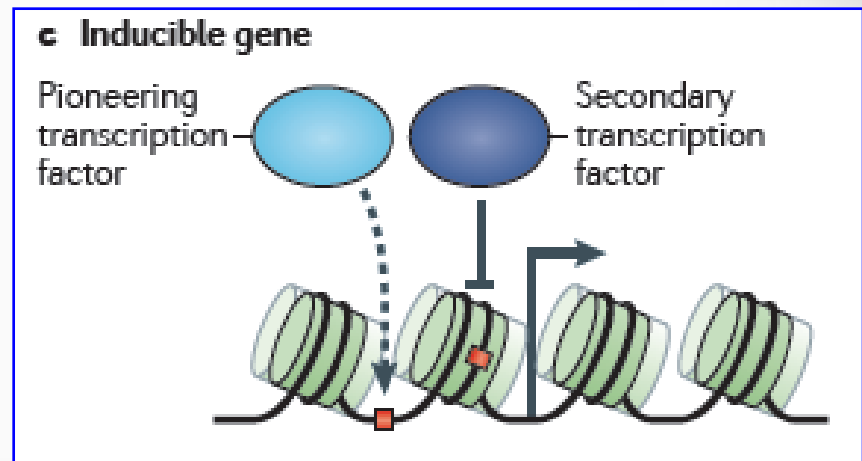
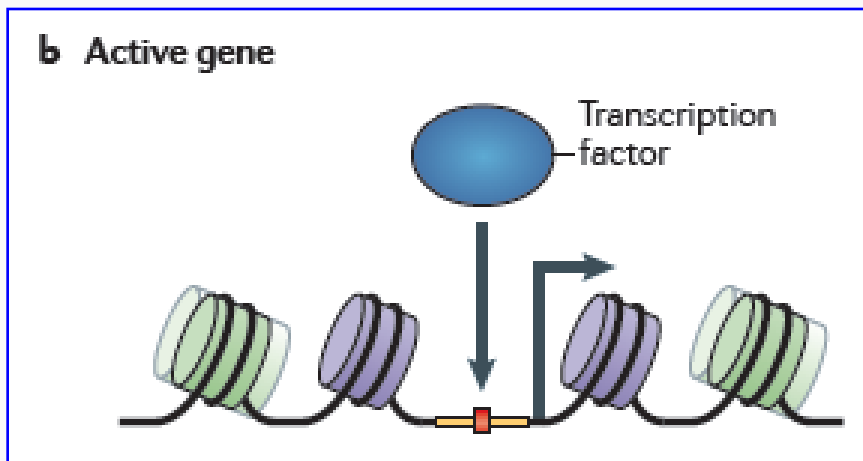
ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

- aktivita ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů je obecně nutná všude tam, kde se proměňuje uspořádání nukleozomů, pro udržování chromatinové plasticity
- zda participuje na aktivaci nebo represi, záleží více na rovnováze ostatních ko-aktivujících nebo ko-reprimujících aktivit, tj. na struktuře komplexu (asociovaných podjednotek) a jeho dalších interakcích
- (podle novějších pozorování ADCHRK stimulují transkripci skupiny genů a simultánně inhibují nepatřičnou expresi jiných genů...)

Hota a Bruneau. *Development* 143:2882-2897, 2016

⇒ jejich součinnost nutná pro aktivátory i represory

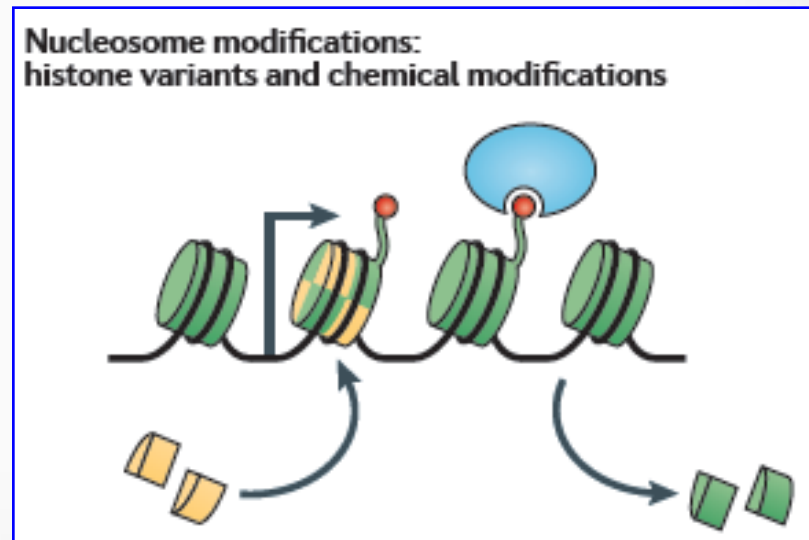
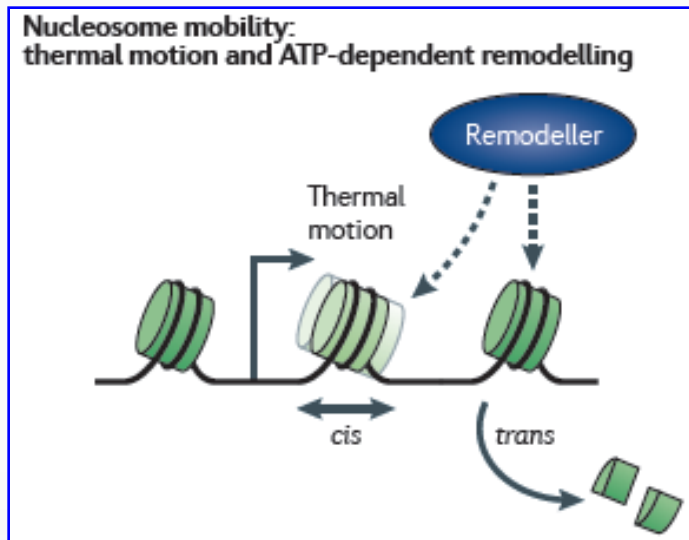
Struktura chromatinu a transkripční aktivita genů



Pozice nukleozomů:

- **b:** v promotoru konstitutivně exprimovaného genu pravděpodobně vysoký obsah AT snižuje pravděpodobnost vytvoření stabilního nukleozomu;
- **c:** v promotoru reprimovaného genu je oblast pro vazbu TF obsazena nukleozomem; pro aktivaci transkripce je nezbytná „mobilizace“ nukleozomů

Mobilita a stabilita nukleozomů



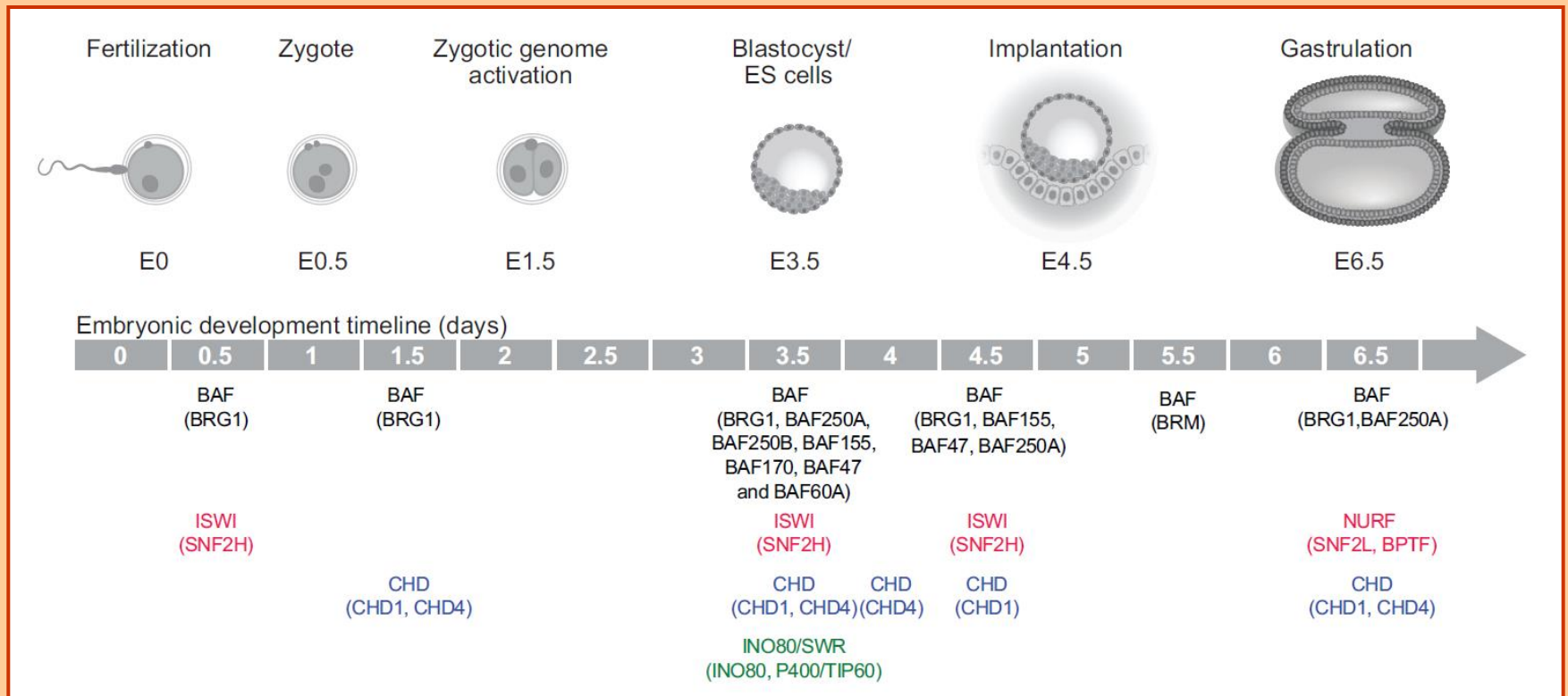
Pozice nukleozomů je ovlivněna:

- působením-ATP dependentních remodelujících komplexů;
- složením histonového oktameru a modifikací histonů: přítomnost histonových variant (**žlutě**) a postranlační modifikace histonů (**červeně**) ovlivňují afinitu k chromatin-modifikujícím proteinům (**modře**)

„ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development“

- tkáňově specifické podjednotky ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů často tvoří **unikátní** komplexy, které spolupracují s transkripčními faktory specifickými pro buněčné linie
- ty je přivádějí do regulačních míst v genomu, kde remodelují chromatin a usnadňují vazbu transkripčních faktorů a tak regulují **lineage-specific** genovou transkripci

„ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development“



Hypotéza “průkopnických (pioneer) faktorů“

- sekvenčně specifické transkripční faktory stojí na vrcholu hierarchie buněčné regulace

Průkopnické faktory

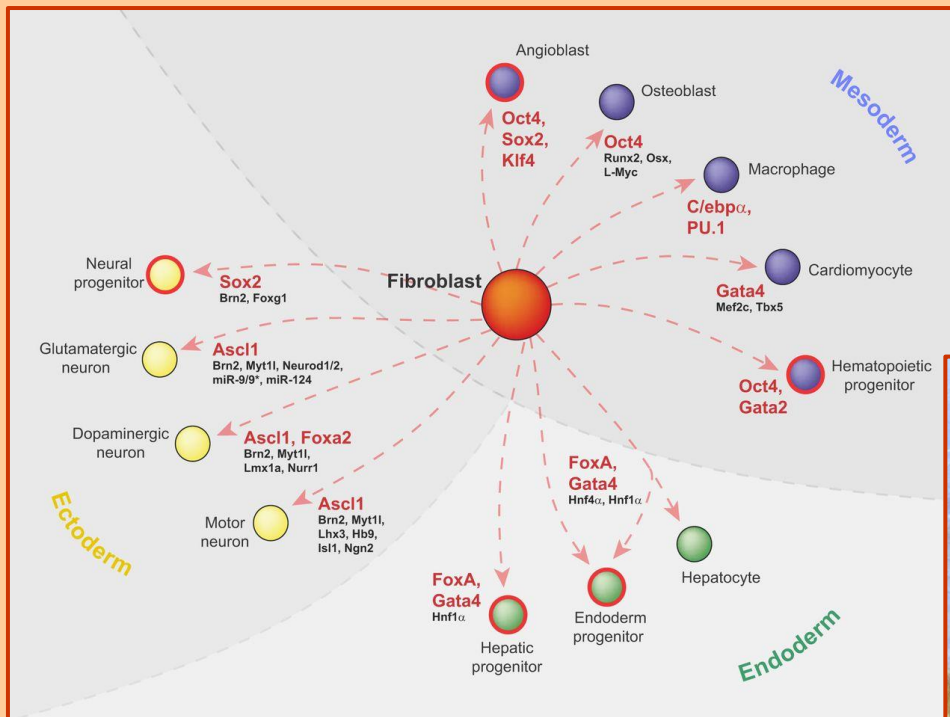
- určují, reprogramují buněčný „osud“, linii
- schopné interakce s „tichým“, nepozměněným chromatinem, iniciují aktivaci transkripčního programu, který vede ke změně buněčného osudu
- verbují aktivátory a represory, které samy nejsou schopné interagovat s „tichým“ chromatinem

Morris SA. *Development* 143:2696-2705, 2016

Henikoff S a Ramachandran S. *Mol Cell* 71:191-194, 2018

Hypotéza “průkopnických (pioneer) faktorů”

1. určují, reprogramují buněčný „osud“, linii
2. schopné interakce s „tichým“, nepozměněným chromatinem, iniciují aktivaci transkripce



sekvenčně specifické transkripční faktory
+
ATP dependentní chromatin remodelující komplexy



„ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development“

- tkáňově specifické podjednotky ATP-dependentních chromatin remodelujících komplexů často tvoří **unikátní** komplexy, které **spolupracují s transkripčními faktory** specifickými pro buněčné linie
- ty je přivádějí do regulačních míst v genomu, kde remodelují chromatin a usnadňují vazbu transkripčních faktorů a tak regulují **lineage-specific** genovou transkripci

Histonové varianty

Histonové varianty

- Vedle hlavních typů histonů existují histonové varianty, např. **H3.3** (liší se od H3 pouze ve 4 aminokyselinách) a **H2A.Z**, které jsou preferenčně přítomny v oblastech transkripčně aktivního chromatinu.
- Jsou kódovány nezávislými geny. Jsou exprimovány a inkorporovány v závislosti na průběhu buněčného cyklu, nezávisle na expresi kanonických histonů.
- Ovlivňují, mění stabilitu nukleozomů.
- histon **CENP-A** je specifický pro centromerické oblasti
- histon **macroH2A**: inaktivní chromozom X
- histon **γ H2AX**: dvouřetězcové zlomy DNA

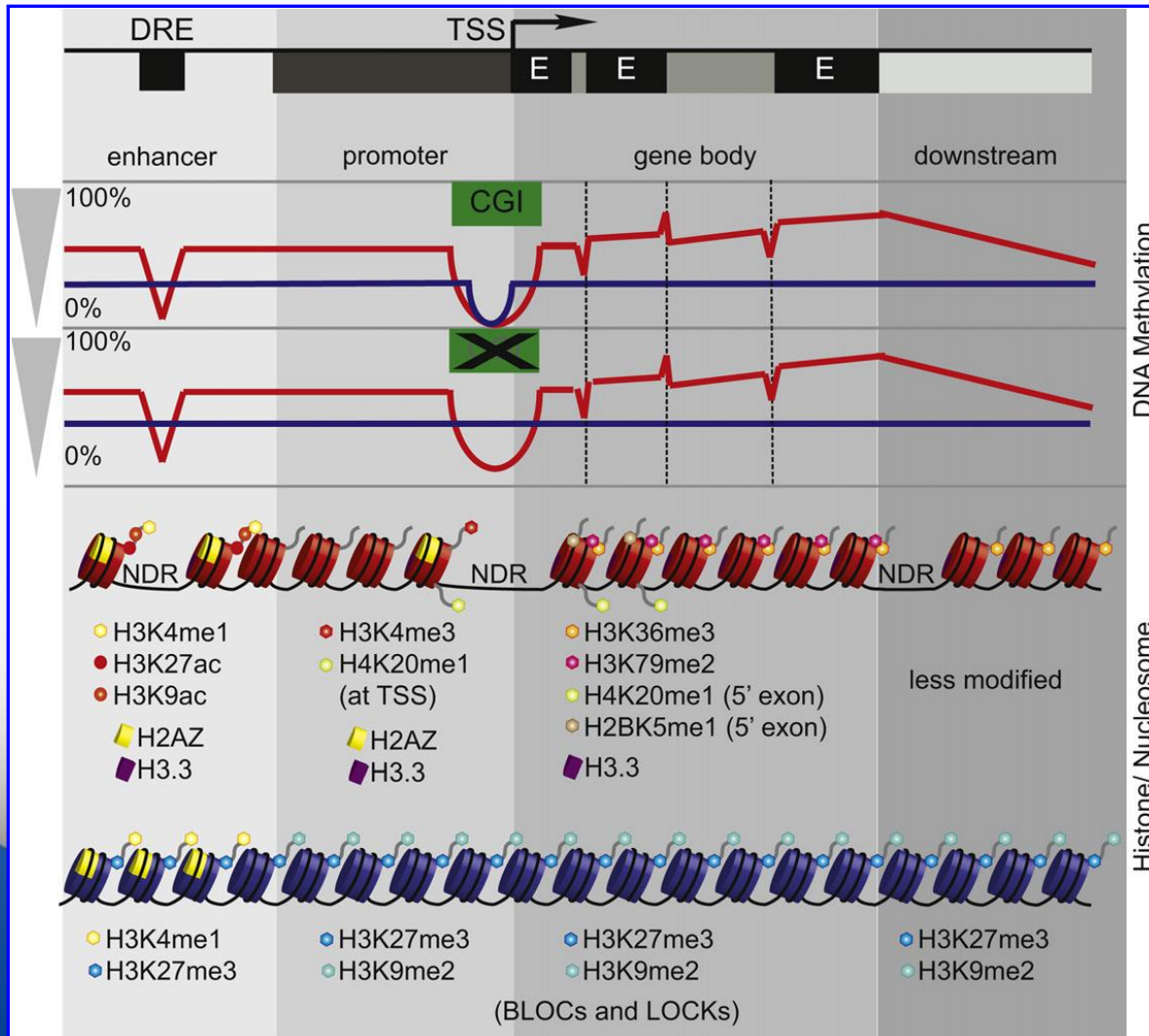
Nekódující RNA

Nekódující RNA

- významné modulátory regulace chromatinu a genové exprese
- asi 90% genomu je aktivně transkribováno, ačkoliv pouze 2% představují geny kódující proteiny!!
- **malé ncRNAs**: tRNAs, rRNAs, miRNAs (micro), piRNA (piwi interacting), snoRNAs (small nuclear)
- **dlouhé lncRNAs**: mRNA-like transcripty, které nekódují proteiny, lincRNAs (long intergenic non-coding); např. XIST a TSIX, které se podílejí na umlčování chromozomu X
- **T-UCRs**: transcribed ultraconserved regions

Součinnost jednotlivých typů přestavby chromatinu

Komplexní epigenetické rozlišení odlišných oblastí genu

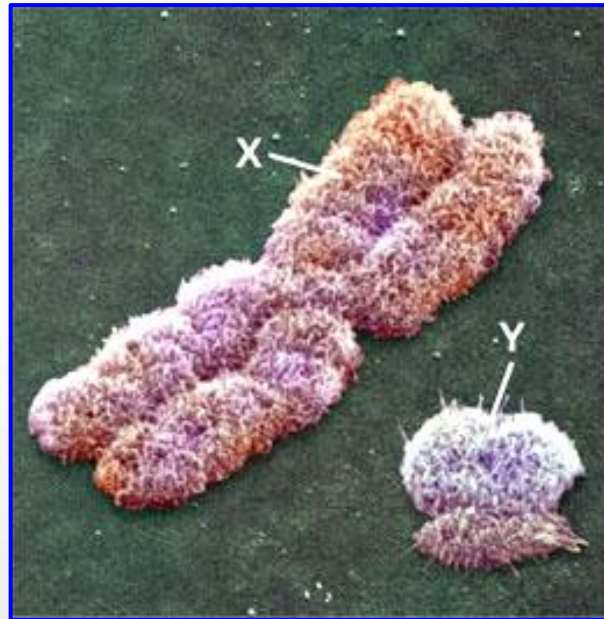


	intergenic	heterochromatin
DNA Methylation	100%	0%
Histone/ Nucleosome	<ul style="list-style-type: none"> H3K9me3 H4K20me3 	<ul style="list-style-type: none"> H3K9me3 H3.3

Hassler MR a Egger G, 2012

Inaktivace chromozomu X

X chromozom
~ 900-1500 genů



Y chromozom
~ 70 genů

Inaktivace chromozomu X



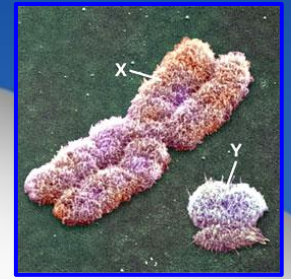
Kompenzace dávky genů

- inaktivace jednoho chromozomu X (XCI) v samičích buňkách (→ Barrovo tělísko/tělíska)
- část genů (asi 20-30%) uniká inaktivaci, k jejich přepisu dochází na aktivním i inaktivním X; v samičích buňkách je jejich exprese vyšší, což zřejmě vede k vývoji pohlavních rozdílů

Xic - inaktivační centrum CH X (*X-inactivation center*)

- v proximální části dlouhého raménka, v pozici Xq13
- obsahuje neobvyklý gen **xist** (*X-inactive-specific transcript*)
- produktem *xist* je dlouhá nekódující RNA (lncRNA; první objevená ~1990), která zůstává uvnitř jádra v asociaci s inaktivním X

Inaktivace chromozomu X



tsix – antisense transkript *Xist*, regulátor *xist*

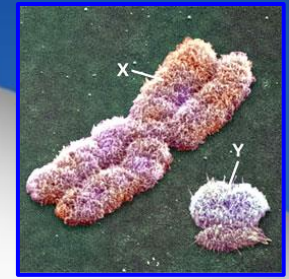
U nediferencovaných buněk v časném embryu, kdy jsou všechny chromozomy X aktivní:

- *xist* i antisense *tsix* jsou oba exprimovány

Diferenciační signály během vývoje ⇒

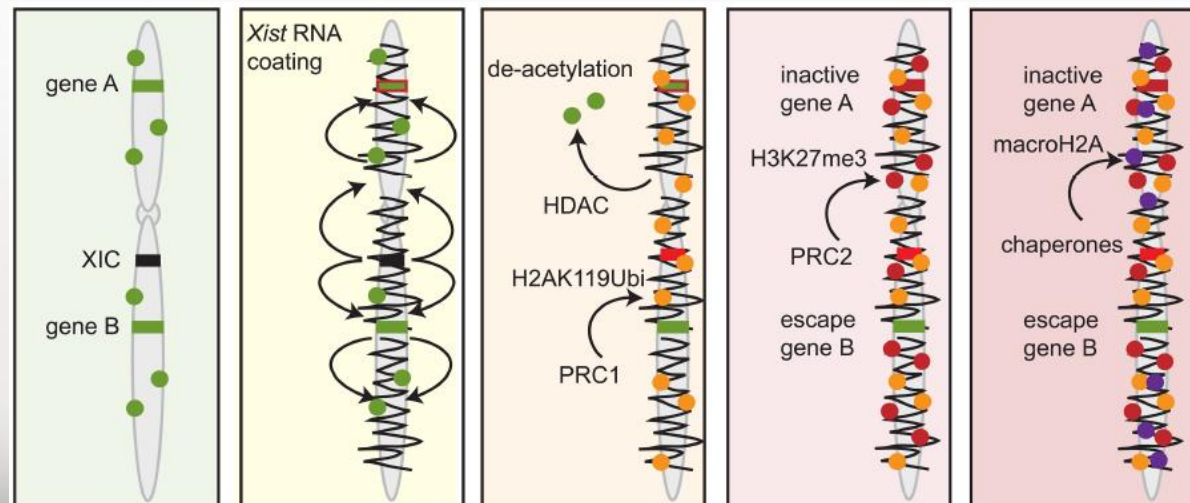
- na jednom X je suprimována exprese *tsix*, zatímco pokračuje exprese *xist* → budoucí inaktivní X
- na druhém X pokračuje exprese jak *xist* tak *tsix* → budoucí aktivní X

Inaktivace chromozomu X



Průběh inaktivace chromozomu X:

1. upregulace *xist* a následný **Xist RNA coating** - netranslatovaná RNA pokryje povrch inaktivovaného chromozomu X → **připojení polycomb silencing complexes 1 a 2 PRC1 a PRC2**
2. deacetylace H3K27ac (**HDAC3**) + ubikvitinace H2K119Ubi (**PRC1**)
3. trimetylace H3K27me3 (**PRC2**)
4. inkorporace histonu **macroH2A** a **DNA metylace CpG ostrůvků (DNMT3B)**





Přestavba chromatinu a nádorová onemocnění

Rose a Oakley: Nová biologie: po moderní syntéze

Biology Direct



Review

Open Access

The new biology: beyond the Modern Synthesis

Michael R Rose*¹ and Todd H Oakley²

Address: ¹Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Irvine, CA, 92697-2525 USA and ²Department of Ecology, Evolution, and Marine Biology, University of California, Santa Barbara, CA 93106-9610 USA

Email: Michael R Rose* - mrose@uci.edu; Todd H Oakley - oakley@lifesci.ucsb.edu

* Corresponding author

- „Někteří považují pohled na život, jak ho vytváří rodičí se biologie 21. století, za **bolestně komplikovaný**, až **perverzní**. My si myslíme, že historická komplexita a univerzalita, o kterých nyní víme, že jsou pro život charakteristické, jsou inspirací a výzvou.“

Rose MR, Oakley TH. *Biology Direct* **2007**; doi:10.1186/1745-6150-2-30