

# Epigenetické mechanismy u rostlin

## Úvod – srovnání rostlin a živočichů

**Klasické epigenetické systémy:**

**transpozony, paramutace, nikleolární dominance**

**Transgeny a viry zprostředkované umlčování genů**

**Epigenetika ve vývojových procesech**

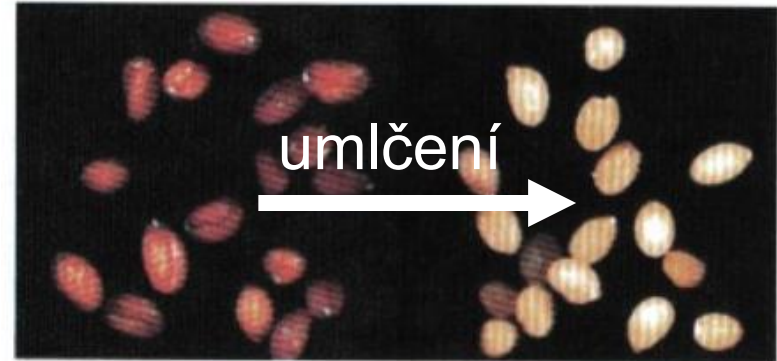
# Epigenetické monitorovací markery u rostlin



Expresse genu dihydroflavonol reduktázy (*DFR*) je požadována ke tvorbě tmavočervených květů, zatímco umlčování jeho promotoru dává vznik variegovanému světlému zbarvení – *Petunia hybrida*

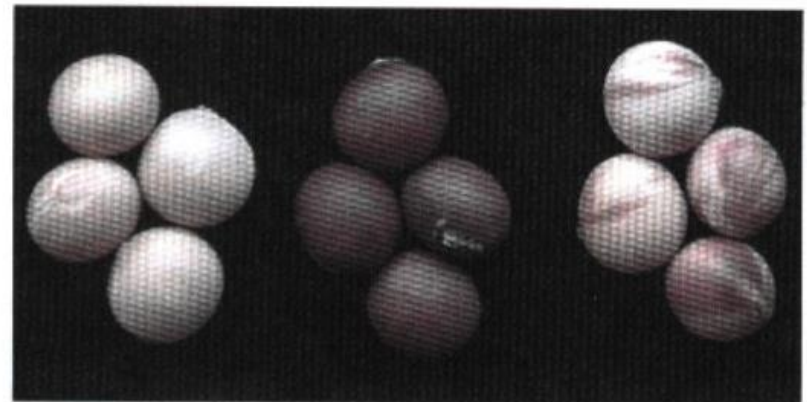
# Epigenetické monitorovací markery u rostlin

Exprese genu **chalkon syntázy** (*CHS*) vede ke tvorbě tmavých semen, umlčení promoru *CHS* způsobuje světlé zbarvení semen.



*Arabidopsis thaliana*

V kultivovaných varietách sóje je barva semen obvykle světlá díky přirozenému post-transkripčnímu umlčování *CHS* genu. Částečná reverze nastává po infekci rodičovské rostliny virem nesoucím *PTGS* supresor.



sója

# Epigenetické monitorovací markery u rostlin

Klasický model *Zea mays*,  
kukuřice:

Gen *B1* odpovídá za červenou pigmentaci, rostliny s paramutovaným *B1* jsou zelené.



Klasy se segregující inzercí transpozonu *Spm* v genu *B-Peru* požadovaném pro antokyanový pigment. Červená zrna jsou revertanty, ve kterých je *Spm* z genu excizován.

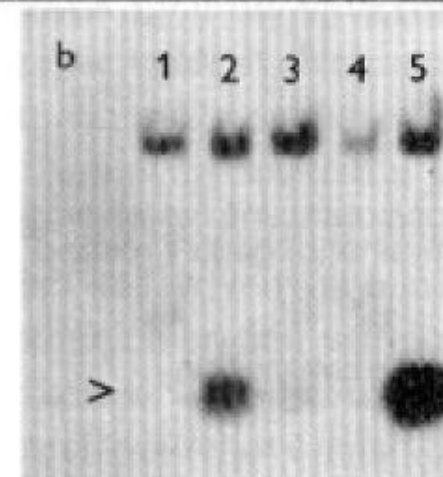
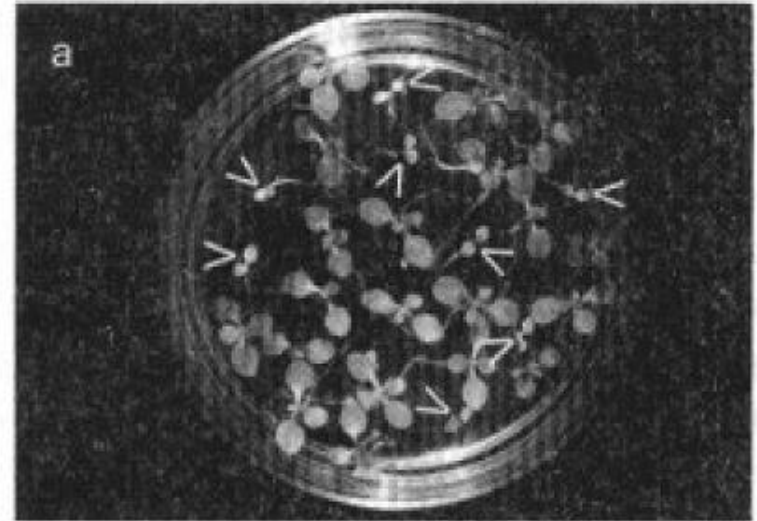




# Epigenetické monitorovací markery u rostlin

Klasický model tabák,  
*Nicotiana tabacum*:

(a) Potomstvo získané samoopylením rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*), do které byl vnesen neomycinfosfotransferázový gen (*nptII*) z *Escherichia coli*, navozující rezistenci ke kanamycinu. Semenáčky rostoucí na syntetickém médiu s kanamycinem segregují na kanamycin-rezistentní a kanamycin-senzitivní rostliny v mendelistickém statistickém poměru 3:1. U senzitivních rostlin se efekt kanamycinu projevuje retardovaným vývojem, blokováním syntézy chlorofylu a pozdější letalitou na úrovni vývinu děložních lístků (tyto rostlinky jsou označeny šipkami). (b) Biochemické stanovení enzymu neomycinfosfotransferázy v transgenních rostlinách tabáku. Proteinové extrakty z rostlin jsou elektroforeticky separovány v akrylamidovém gelu a na něm je *in situ* provedena „sendvičová“ reakce za přítomnosti substrátu (kanamycinu) a donoru fosfátových skupin ( $^{32}\text{P}$ -koncově značeného adenosintrifosfátu, ATP). Výsledný produkt, fosforylovaný kanamycin, označený šipkou, je vizualizován autoradiograficky na rentgenovém filmu. Vzorek v dráze číslo 1 je negativní kontrola (normální tabák), transgenní vzorky číslo 2 a 5 mají vysokou hladinu enzymu, vzorek číslo 3 je velmi slabě pozitivní a vzorek v dráze číslo 4 enzym neobsahoval (zjevně došlo k „umlčení“ transgenu).



NPTII

# Epigenetické mechanismy u rostlin

**Úvod – srovnání rostlin a živočichů**

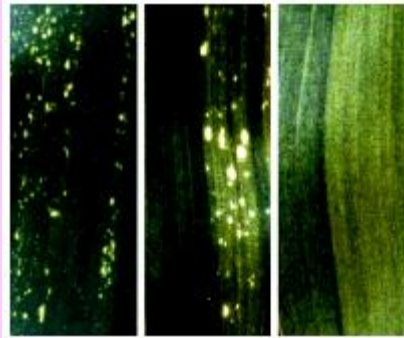
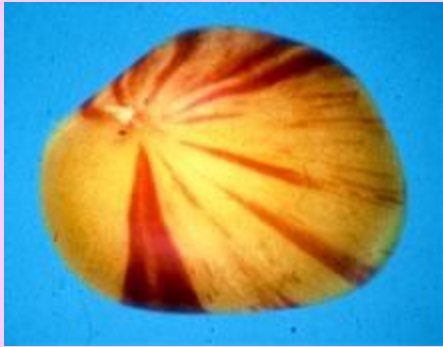
**Klasické epigenetické systémy:  
transpozony, paramutace, nukleolární  
dominance**

**Transgeny a viry zprostředkované  
umlčování genů**

**Epigenetika ve vývojových procesech**

# Cyklická aktivita transpozonů

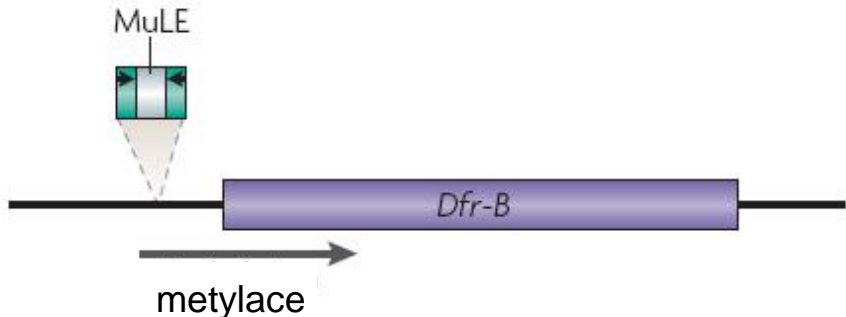
# DNA metyltransferázy zajišťují stabilitu genomu inaktivací parazitických mobilních elementů



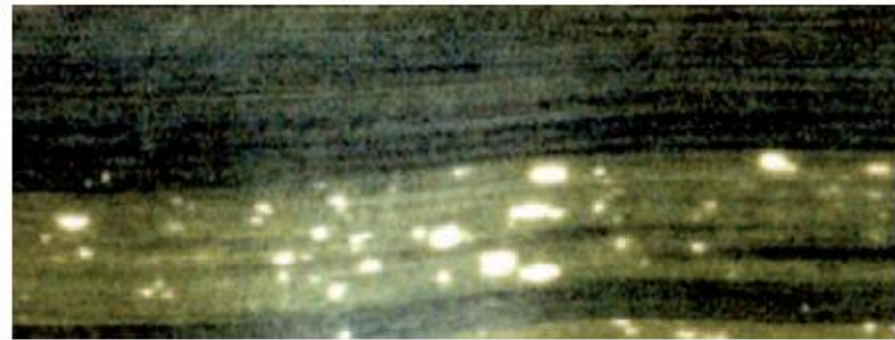
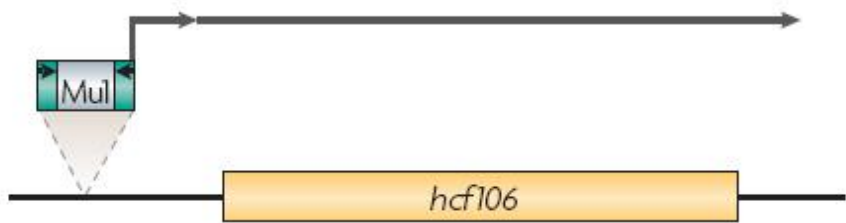
Barbara McClintock (1902–1992) Nina Fedoroff (Pennsylvania 1993) Rob Martienssen (Cold Spring 2001) Tim Bestor (NY 1998)



# Vliv transpozonů na genovou expresi (přilehlých oblastí chromozomů)



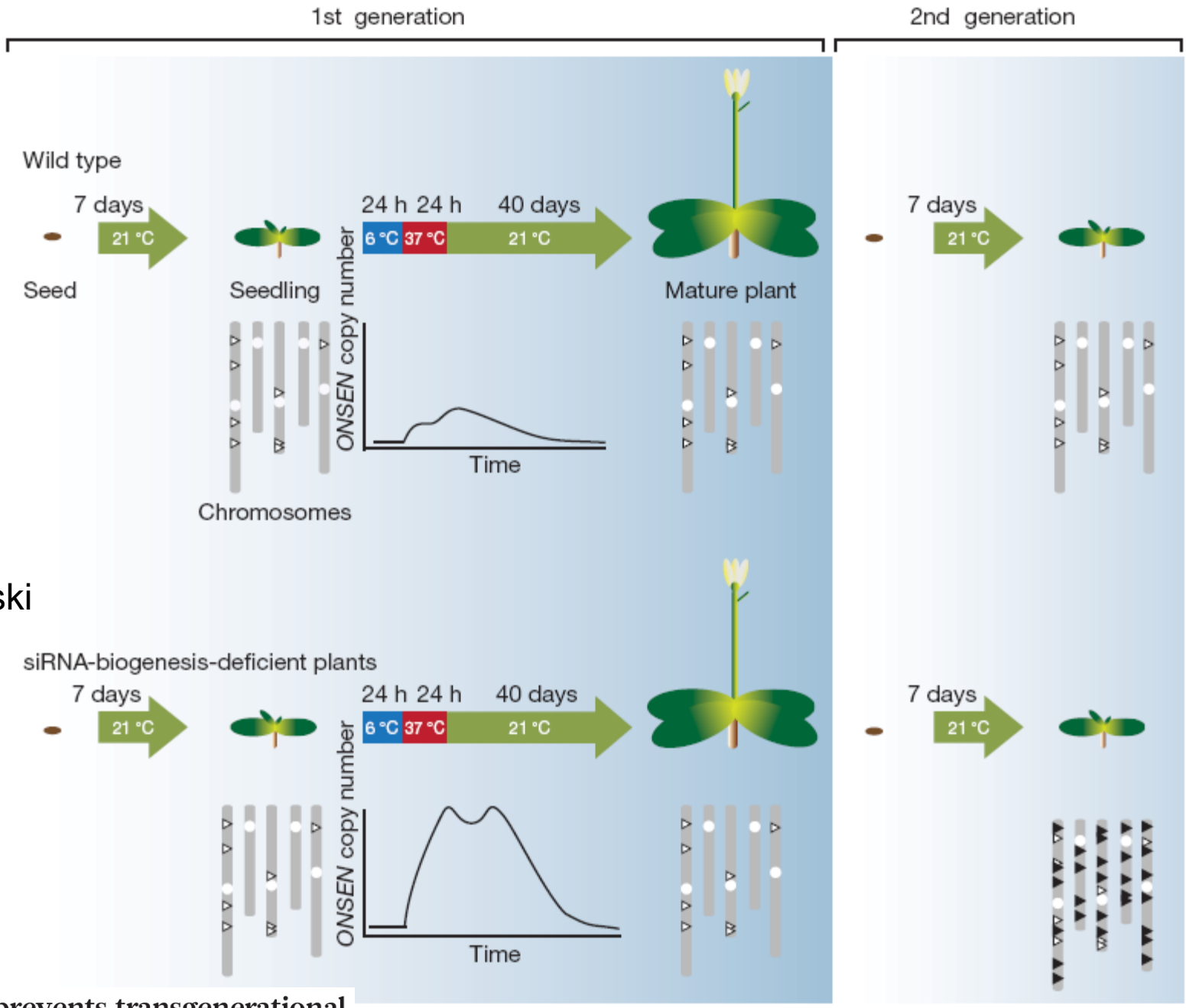
**Ektopická inaktivace dihydroflavonol-reduktázového genu (šíření metylačního umlčování) z transpozonu MuLE (bílé sektory v koruně *Ipomea purpurea*, pivojník, svlačcovité)**



**Ektopická aktivace metastabilních epialel pro světlé skvrny (hcf109) a nekrotické leze (les28) způsobená aktivním Mutátorovým transpozonem**



Jurek Paszkowski  
U of Geneva



**An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress**

Hidetaka Ito<sup>1\*†</sup>, Hervé Gaubert<sup>1\*</sup>, Etienne Bucher<sup>1\*†</sup>, Marie Mirouze<sup>1†</sup>, Isabelle Vaillant<sup>1†</sup> & Jerzy Paszkowski<sup>1</sup>

Paramutace



# PARAMUTACE

(ne) stabilně dědičné alelické interakce

paramutagenní  
alela



$R-st/R-st$

paramutovatelná  
alela



$R-r/R-r$

paramutagenní  
alela



$R-mb/R-mb$

x



$R-st/R-r$

x



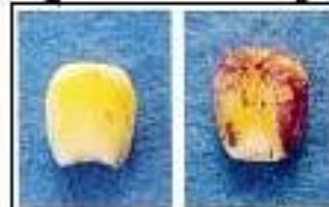
$R-r/R-mb$

křížení s "nulovou"  
recesivní samičkou

$r0/r0$



$R-st/r0$



$R-r'/r0$



$R-mb/r0$

epigeneticky pozměněná alela  $R-r!$



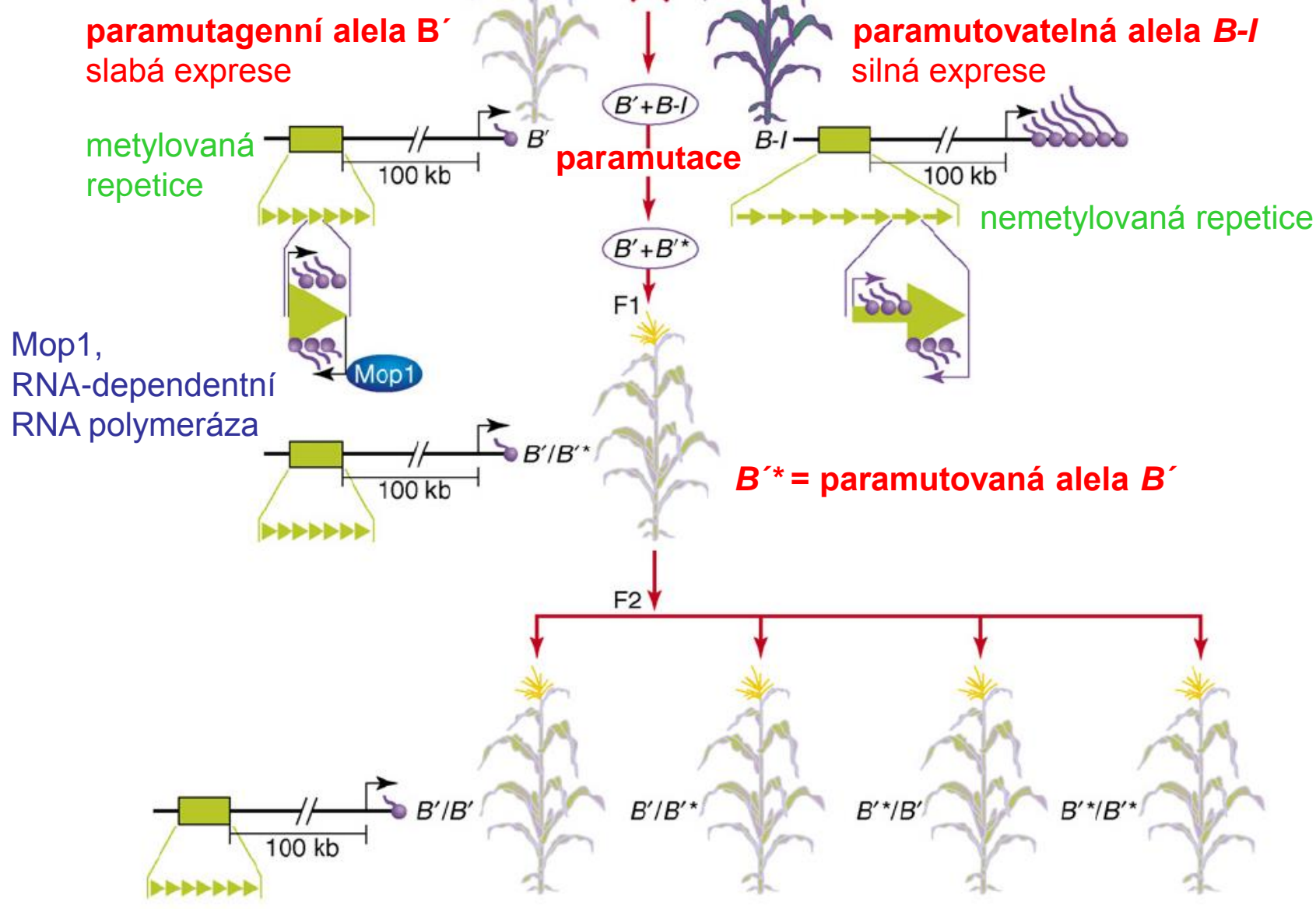
Mary Alleman  
(Duquesne U)



Vicki Chandler  
(Arizona)

Alex Brink  
(Madison 1956)

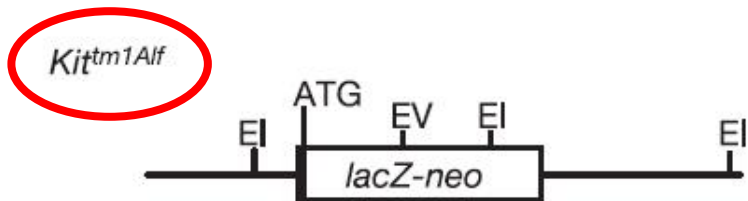
# Interalelické komunikace v lokusu *b1* u kukuřice







standardní alela *Kit* (tyrosin kinázový receptor)



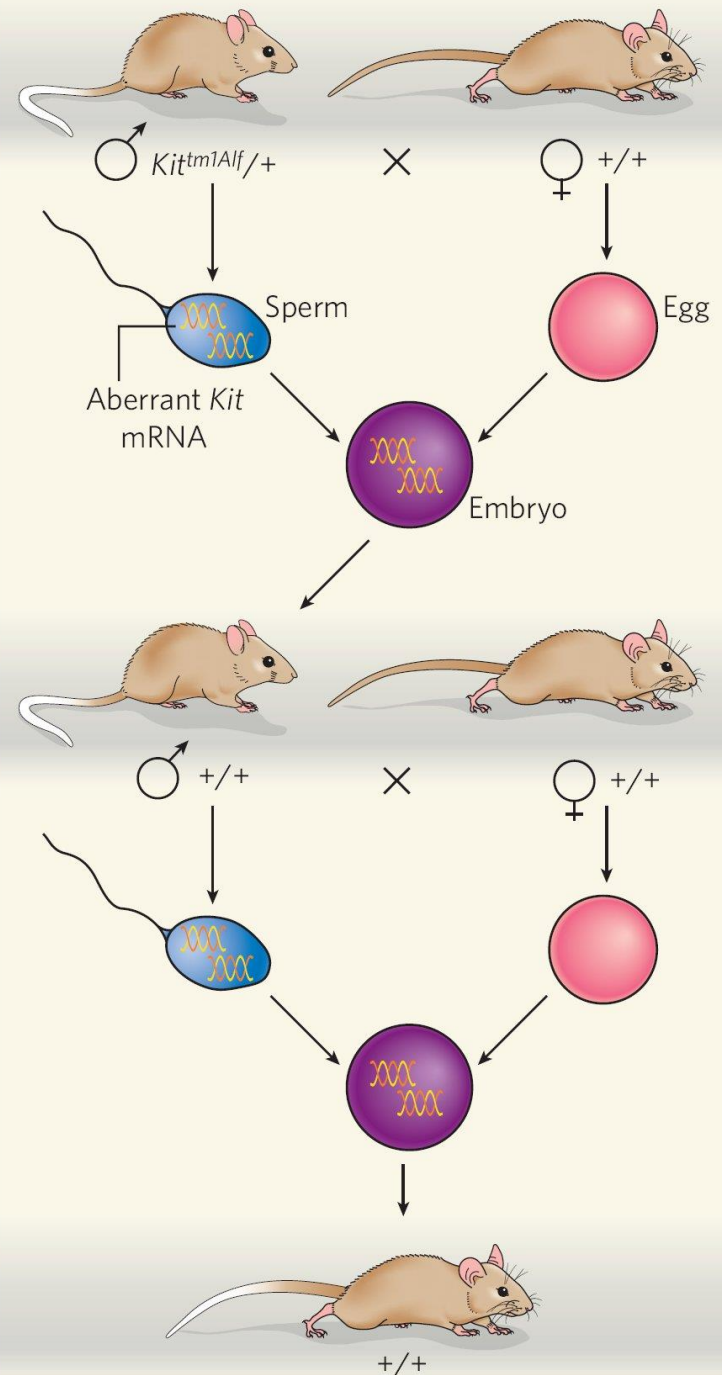
inzerční mutagenese s reportérem  
beta-galaktosidázy



Paramutace fungují i u myši ?

# Paramutable possibilities

Model for paramutation at *Kit* as proposed by Rassoulzadegan *et al.*



Vol 441 | 25 May 2006 | doi:10.1038/nature04674

nature

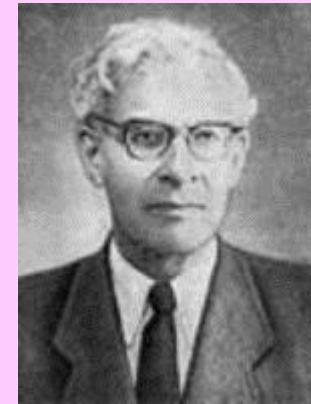
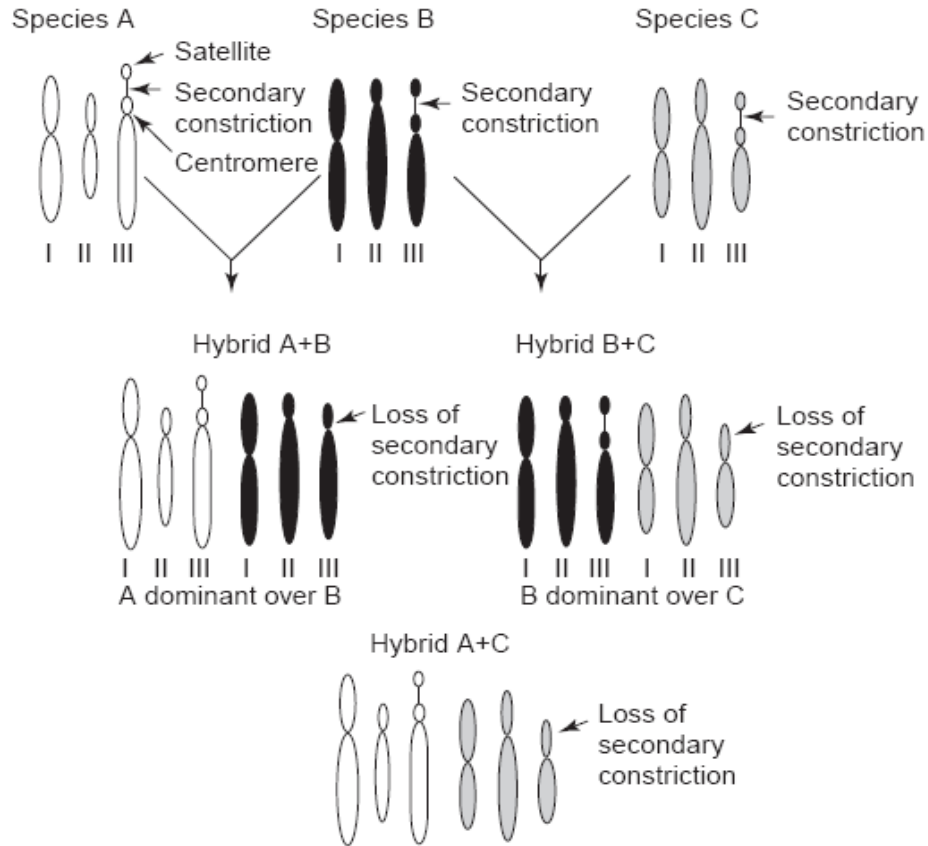
## RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse

Minoo Rassoulzadegan<sup>1,2</sup>, Valérie Grandjean<sup>1,2</sup>, Pierre Gounon<sup>3</sup>, Stéphane Vincent<sup>1,2,†</sup>, Isabelle Gillot<sup>1,2</sup> & François Cuzin<sup>1,2</sup>

Paramutation is a heritable epigenetic modification induced in plants by cross-talk between allelic loci. Here we report a similar modification of the mouse *Kit* gene in the progeny of heterozygotes with the null mutant *Kit*<sup>tm1Alf</sup> (a *lacZ* insertion). In spite of a homozygous wild-type genotype, their offspring maintain, to a variable extent, the white spots characteristic of *Kit* mutant animals. Efficiently inherited from either male or female parents, the modified phenotype results from a decrease in *Kit* messenger RNA levels with the accumulation of non-polyadenylated RNA molecules of abnormal sizes. Sustained transcriptional activity at the postmeiotic stages—at which time the gene is normally silent—leads to the accumulation of RNA in spermatozoa. Microinjection into fertilized eggs either of total RNA from *Kit*<sup>tm1Alf/+</sup> heterozygotes or of *Kit*-specific microRNAs induced a heritable white tail phenotype. Our results identify an unexpected mode of epigenetic inheritance associated with the zygotic transfer of RNA molecules.

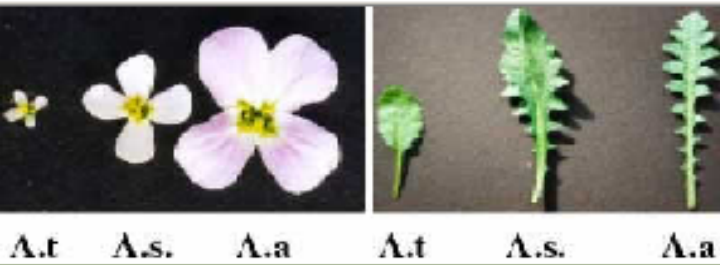
# Nukleolární dominace

# Jadéřková dominance



Prof. Michail Navašin (1928)  
*Crepis capillaris*  
(differential amphiplasty)



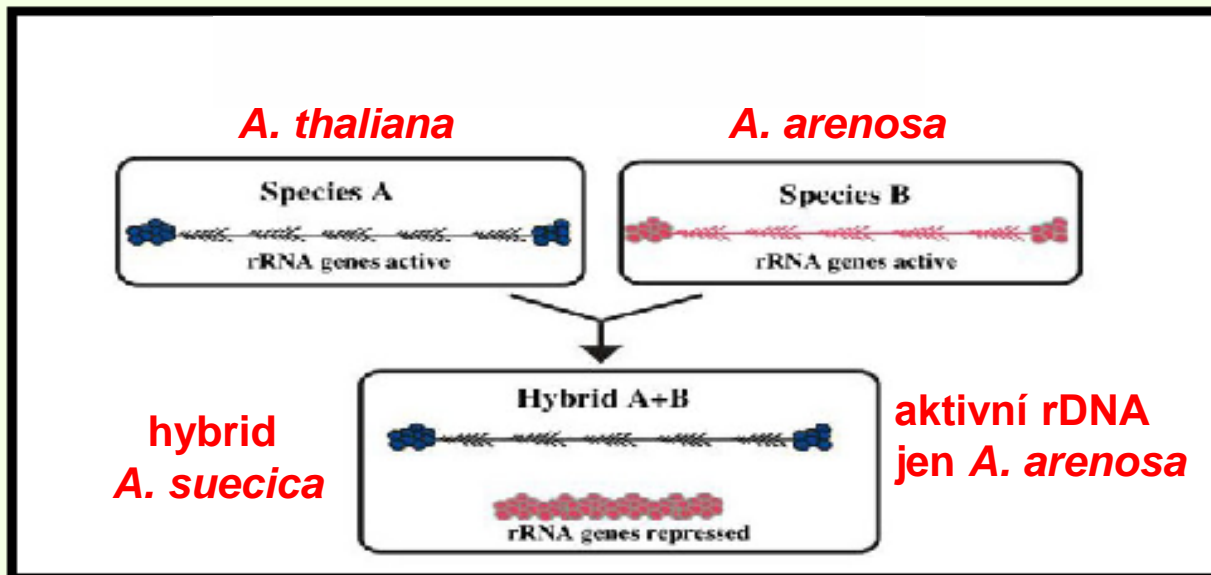


## Nucleolar Dominance

*Arabidopsis thaliana* x *A. arenosa* = *A. suecica*

In hybrids, genes inherited from both parents are typically expressed, producing intermediate phenotypes for characters such as flower or leaf morphology. This is true for *Arabidopsis thaliana* (A.t.), *Arabidopsis arenosa* (A.a) and their hybrid, *Arabidopsis suecica* (A.s.), as shown at the top left corner of this page. However, some genes are expressed from the chromosomes inherited from only one parent. An example is nucleolar dominance, an epigenetic phenomenon in hybrids which

describes the formation of a nucleolus (or nucleoli) on the chromosomes inherited from only one of the progenitors, regardless of whether that progenitor was the maternal or the paternal parent. Nucleolar dominance occurs in both the plant and animal kingdoms and is due to the expression of only one parental set of rRNA genes.

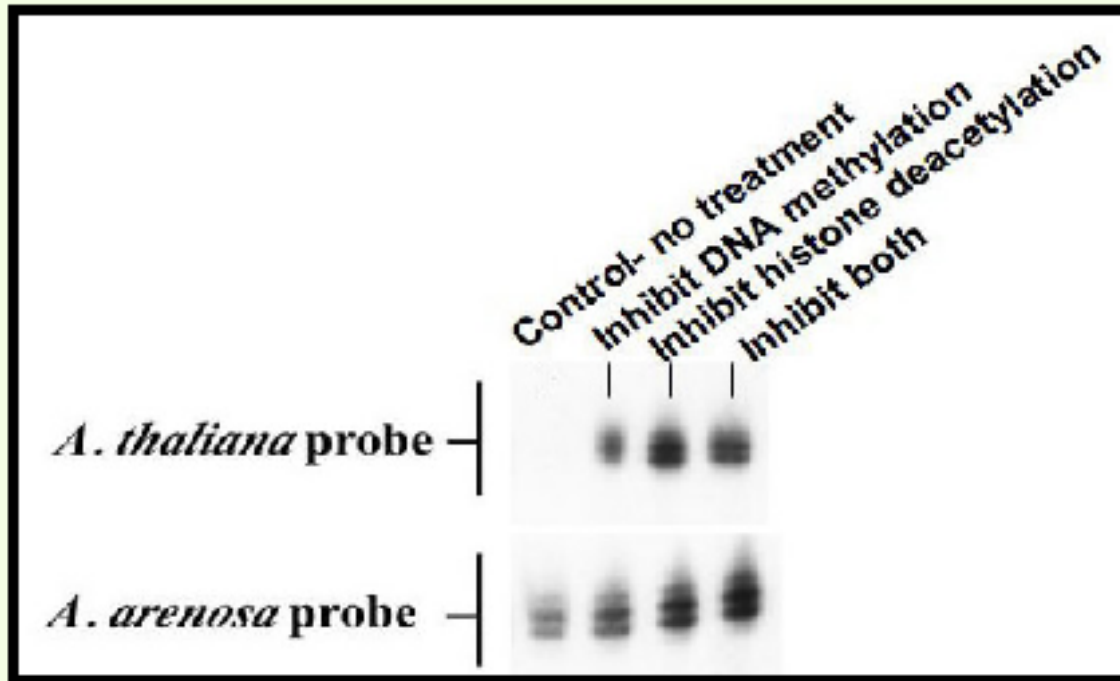


hybrid  
*A. suecica*

aktivní rDNA  
jen *A. arenosa*



## Nukleolární dominance je způsobována mechanizmy metylace DNA a modifikací histonů



Further study has shown that rRNA gene silencing involves concerted changes in DNA methylation and histone modification and we have proposed a model whereby DNA and histone modifications are each upstream of one another in a self-reinforcing, circular pathway. Changes in DNA methylation, histone acetylation and histone methylation are critical to the on-off switch mechanism that controls the number of active rRNA genes, both in hybrids displaying nucleolar

dominance and in non-hybrids that regulate the effective dosage of their rRNA genes in response to the physiological needs of the cell.

# Epigenetické mechanismy u rostlin

**Úvod – srovnání rostlin a živočichů**

**Klasické epigenetické systémy:  
transpozony, paramutace, nikleolární  
dominance**

**Transgeny a viry zprostředkované  
umlčování genů**

**Epigenetika ve vývojových procesech**

# Umlčování genů (kosuprese) transgenem

- **Transgeny mohou umlčovat endogenní geny**
- **Více kopií transgenů, více umlčování**
- **Zvláště účinné jsou obrácené repetice**
- **Umlčené geny jsou často metylovány**
- **Umlčování může být dědičné**
- **Umlčené geny mohou být paramutagenní**



# **Transkripční a post-transkripční umlčování (TGS and PTGS)**

- **Umlčování může být transkripční, post-transkripční či obojí**
- **Transkripční umlčování souvisí s metylací promotoru**
- **PTGS souvisí s metylací kódující sekvence**
- **Pro počátek umlčování není nezbytná metylace promotoru**
- **Methylace je nezbytná pro udržování umlčení**

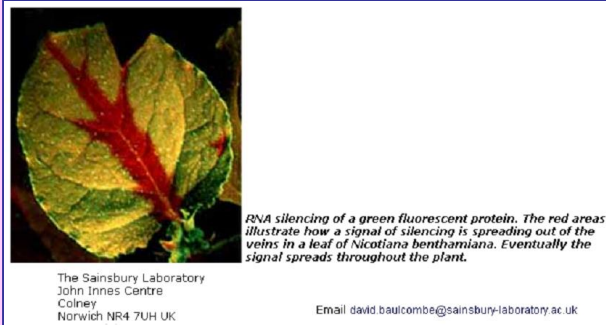
# PostTranskripční genové umlčování a RNA interference - spojitost ?



**David  
Baulcombe  
(Norwich)**



**Marjori  
Matzke  
(Vienna)**



„PostTranskripční genové umlčování se vyskytuje u rostlin a hub transformovaných cizí nebo endogenní DNA a má následek v redukované akumulaci RNA molekul se sekvenční podobností k introdukované molekule nukleové kyseliny.“

*Hamilton and Baulcombe, Science 286: 952, 1999*

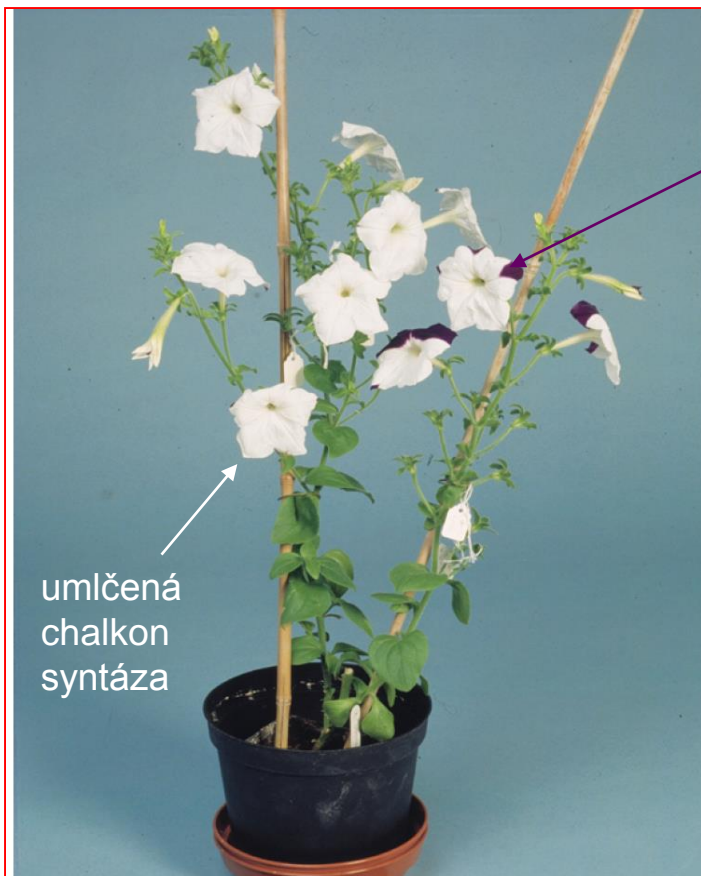


## RNAi Nobel ignores vital groundwork on plants

SIR — The Nobel prize, by recognizing the individuals behind breakthroughs, inspires all scientists to do great science. The discovery of RNA interference (RNAi) changed the face of gene regulation, a feat deservedly recognized with this year's Nobel Prize in Physiology or Medicine<sup>1</sup>.

As undergraduates, we witnessed with great excitement the discovery of gene silencing. At that time, almost all research in that area was being conducted by plant scientists, and as young plant biologists we were lucky to have front-row seats to this molecular drama.

Like all great advances, RNAi is turning out to be important in ways that could not have been guessed at even a decade ago. Therefore we were not surprised to discover that the topic was selected for this year's honour — but we were shocked that the plant scientists who were so crucial in discovering and communicating the underlying mechanism of RNAi were not awarded a share.

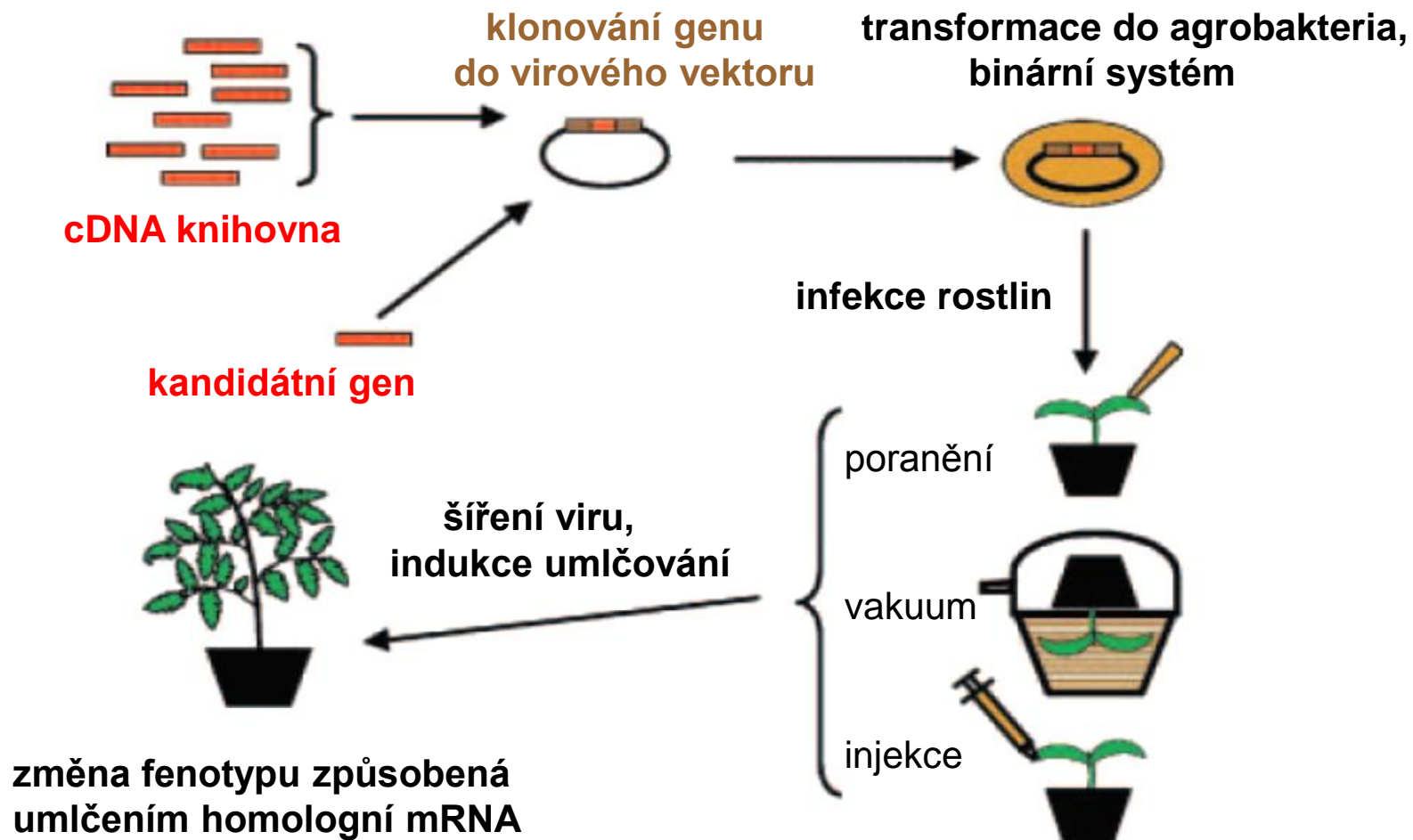


umlčená  
chalcon  
syntáza

aktivní  
chalcon  
syntáza

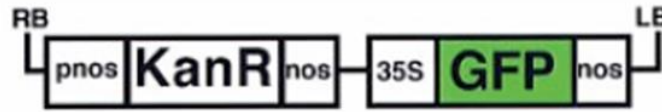
### RNA silencing in petunia.

The petunia plant was transformed with an additional copy of a gene (chalcone synthase) required for pigment production. The transgene activated RNA silencing so that expression of both the transgene and the endogenous gene was suppressed. The flowers would normally have been purple.

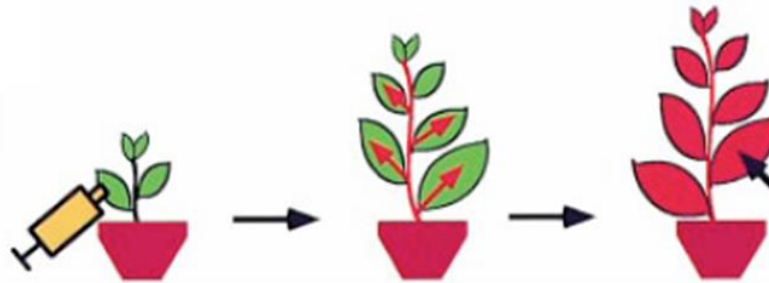


**Metoda VIGS (= virus-induced gene silencing) jako nástroj ke studiu funkce rostlinných genů**

primární transformace  
agrobakteriálním vektorem



injekce agrobakteria  
s virovou a GFP  
sekvencí DNA

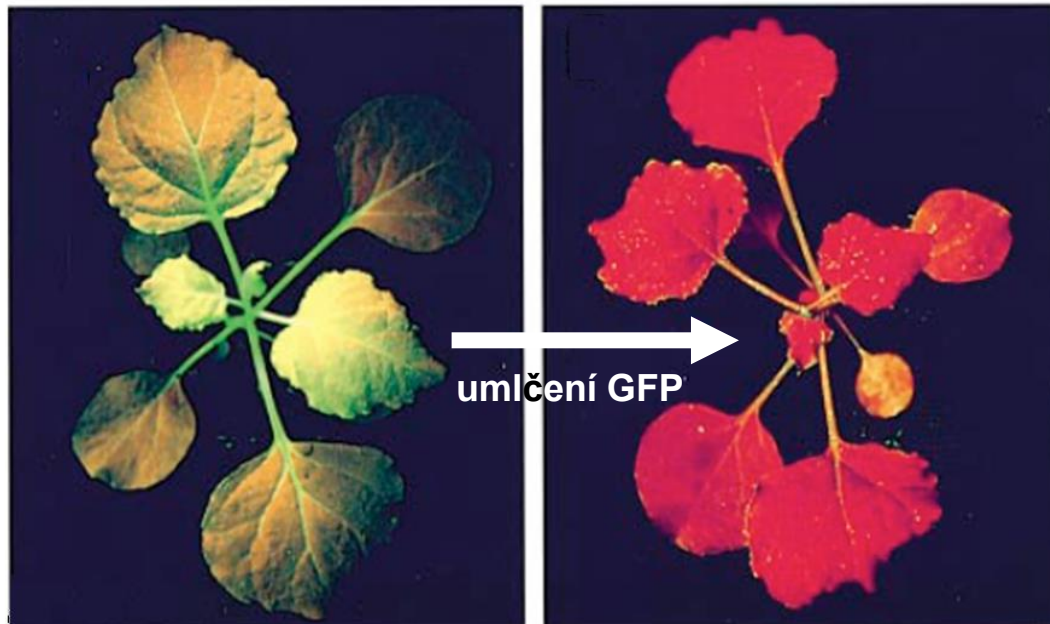


obranná reakce rostliny (RNAi),  
posttranskripční umlčování  
trans genu

systémové šíření  
virové sekvence

## UMLČOVÁNÍ TRANSGENU SEKUNDÁRNÍ AGROINFEKČÍ S VIROVÝM VEKTOREM

původní trans-  
genní rostlina  
exprimující  
zeleně  
fluoreskující  
protein



rostlina po posttranskripčním  
umlčení trans genu GFP

*Nicotiana benthamiana*

# MECHANISMY RNA INTERFERENCE U ROSTLIN

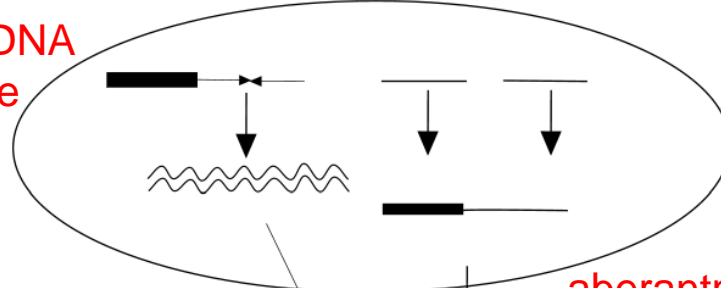
(hlavně posttranskripční umlčování, ale též transkripční):

miRNA jsou ssRNA obvykle endogenního původu, závislé na RDRP a fungují jako přirozené supresory translace na bázi částečné homologie s mRNA.

siRNA jsou dsRNA, u rostlin odpovídají za obranu vůči virům, štěpí perfektně homologní mRNA sekvence.

DNA metylace a suprese transkripce pozorovány u transgenů

obrácené DNA repetice



virová ssRNA



aberrantní RNA, vlásenková struktura (vnitřní homologie), exogenní dsRNA

RNA-dependentní RNA polymeráza tvoří dsRNA



Dicer štěpí dsRNA na kratší fragmenty (si-dsRNA)



small interfering ssRNA



RNA-induced silencing complex (RISC; Argonaut) potlačuje translaci nebo štěpí mRNA



# Epigenetické mechanismy u rostlin

**Úvod – srovnání rostlin a živočichů**

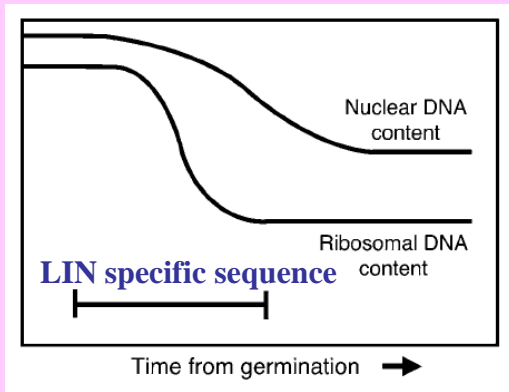
**Klasické epigenetické systémy:  
transpozony, paramutace, nikleolární  
dominance**

**Transgeny a viry zprostředkované  
umlčování genů**

**Epigenetika ve vývojových procesech**

# Meiotický přenos epigenetického stavu (fenotypu) aneb environmentální indukce dědičných změn

- genotropy u Inu (vliv podnebí a hnojení na větvení)



bez hnojení



bez hnojení  
F1, F2, ...



hnojení



bez hnojení  
F1, F2, ...





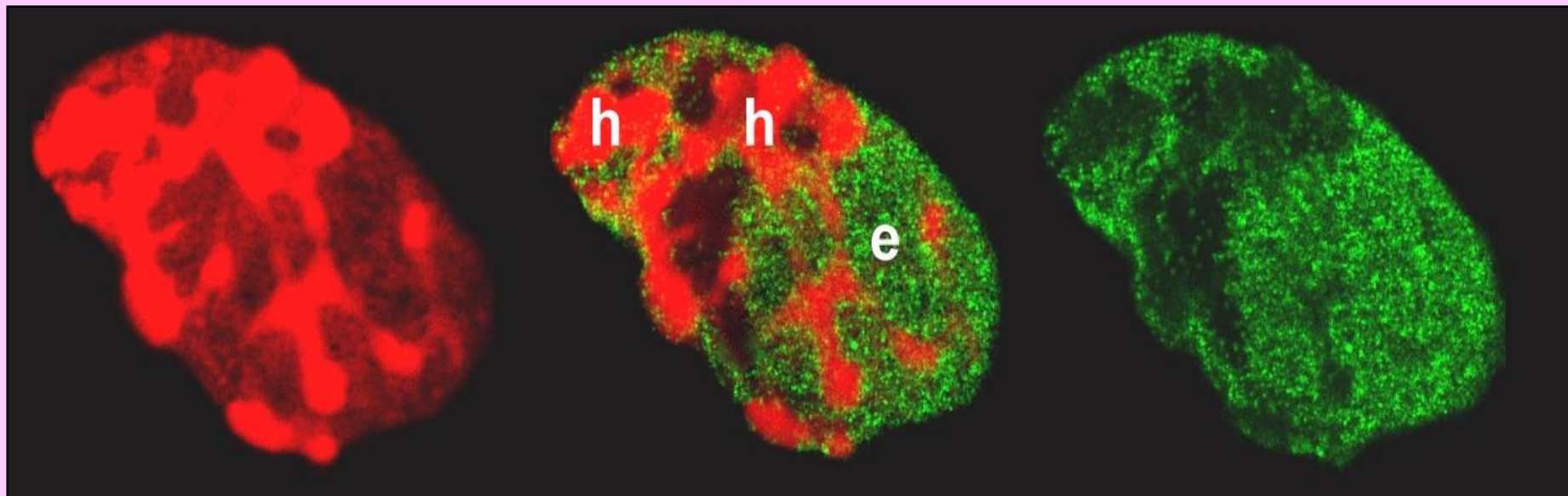
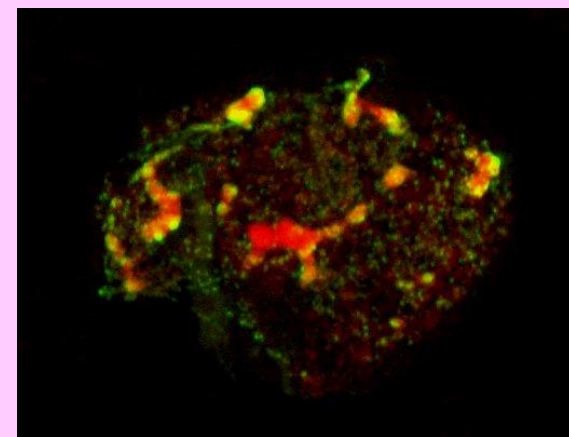


# *Gagea lutea* (Liliaceae)

## křivatec žlutý

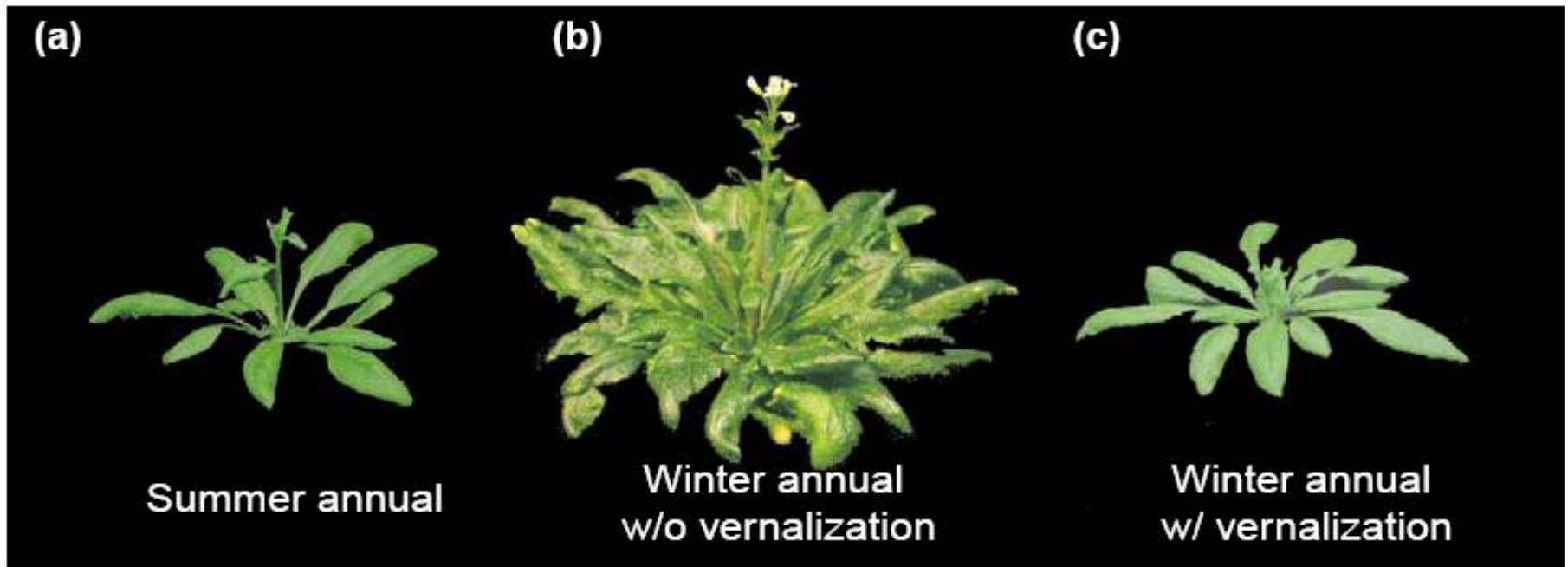
model studia tetrasporického  
zárodečného vaku (Fritillaria),  
endospermu a fakultativního  
heterochromatinu

$5n = 180$



Vernalizace

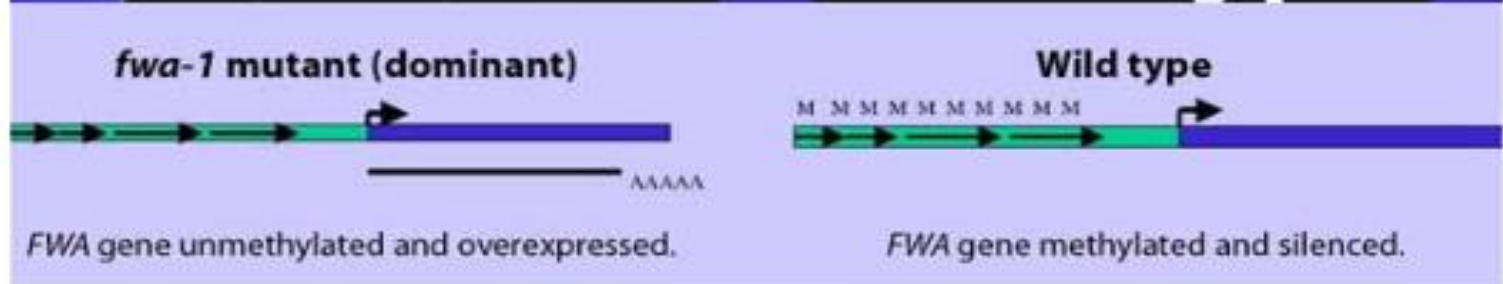
# Meioticky NEpřenášený epigenetický stav ovlivněný prostředím - vernalizace



Flowering behavior of summer- and winter-annual types of *Arabidopsis thaliana*.

- (a) Summer-annual types of *Arabidopsis* flower rapidly without vernalization treatment. In contrast, winter-annual types, which have functional *FRI* and *FLC* alleles,
- (b) flower very late without vernalization and
- (c) flower rapidly, like a summer annual, if vernalized.

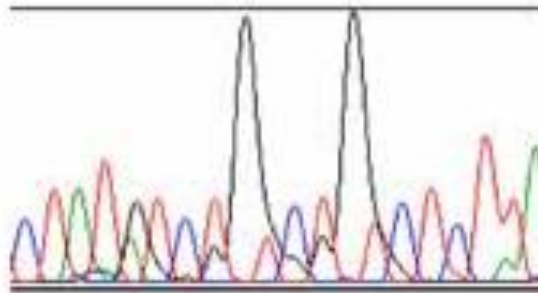
# Methylace DNA a řízení květních procesů



# Katastrální gen *SUPERMAN*

*clark kent* hypermetylovaná  
alela genu *SUP*

CTATG ..... T.....T.....CTTA



standardní alela genu *SUP*  
(nemetylovaná)

CTATG ..... C.....C.....CTTA



genomové (sířičitanové) sekvenování

Proteiny POLYCOMB



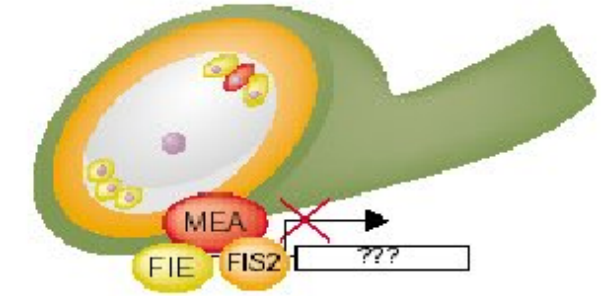
**kvetení**

**vývoj gametofytu**

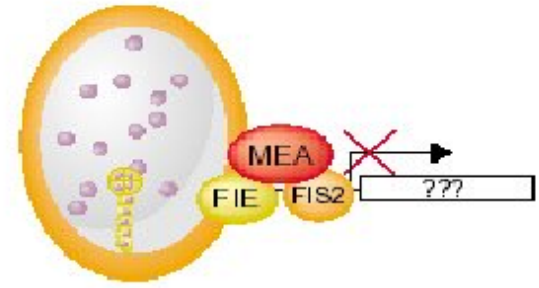
# Úlohy komplexů POLYCOMB v životním cyklu rostlin

**před oplozením**

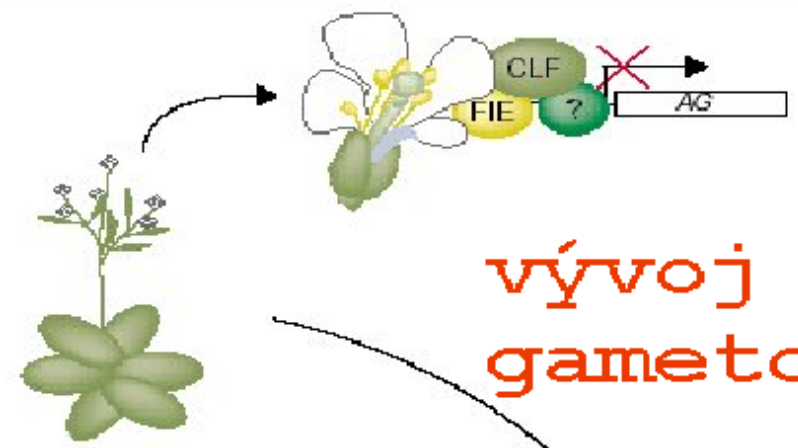
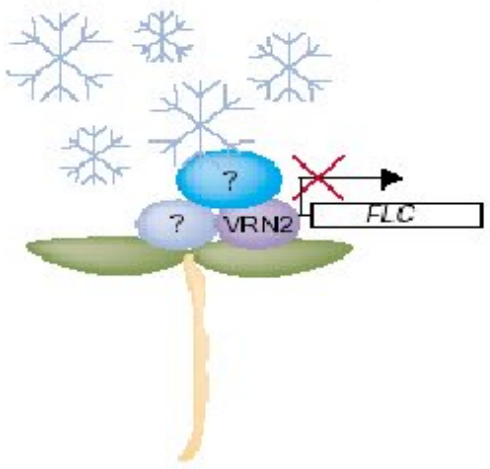
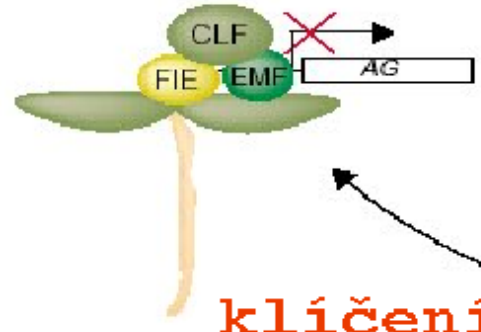
**vernalizace**



**po oplození**

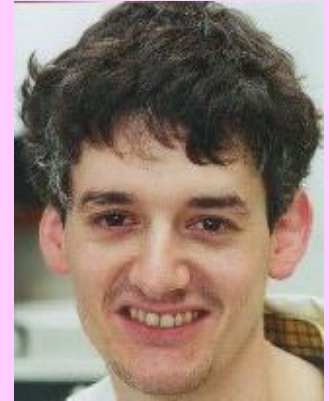


**klíčení**



# Proteiny skupiny POLYCOMB

- jsou antagonisty (represory) homeotických genů s homeoboxem či MADS doménou
- specifikují místo účinku homeotických transkripčních faktorů



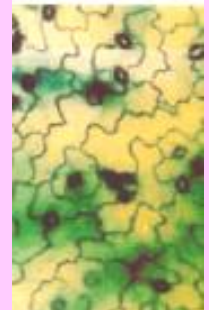
Justin Goodrich  
(Edinburgh)

## *Arabidopsis CURLY LEAF versus AGAMOUS*



listy  
wild-typu

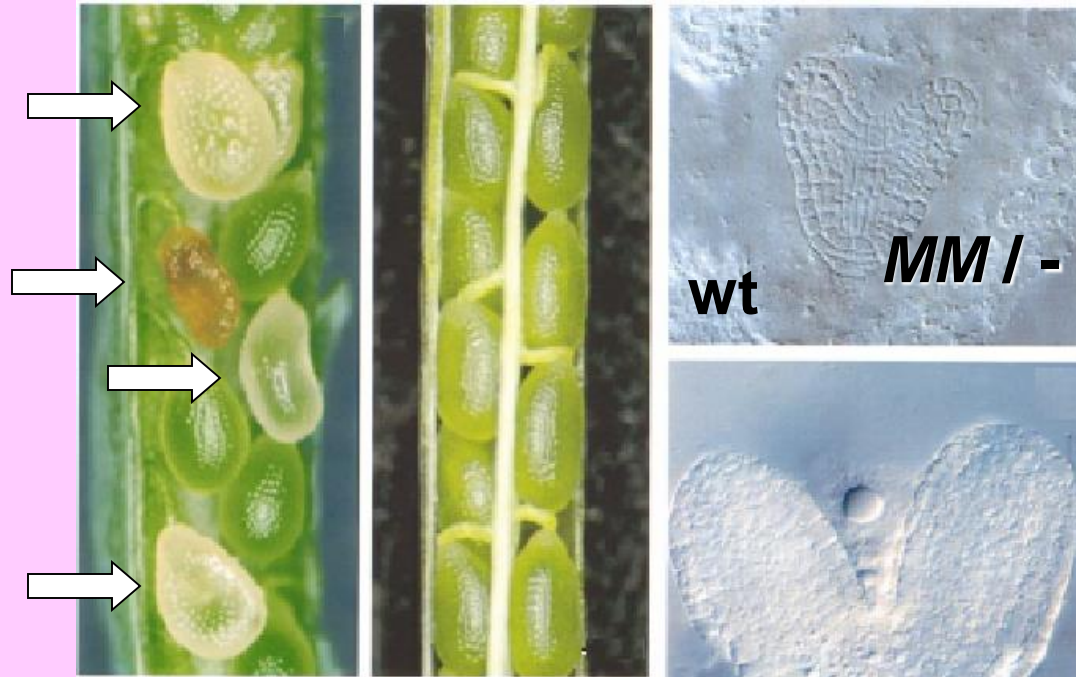
listy mutace *clf* :  
ektopická  
exprese květního  
genu *AG*



# Parentální imprinting u rostlin : maternální efekt genu *MEDEA*

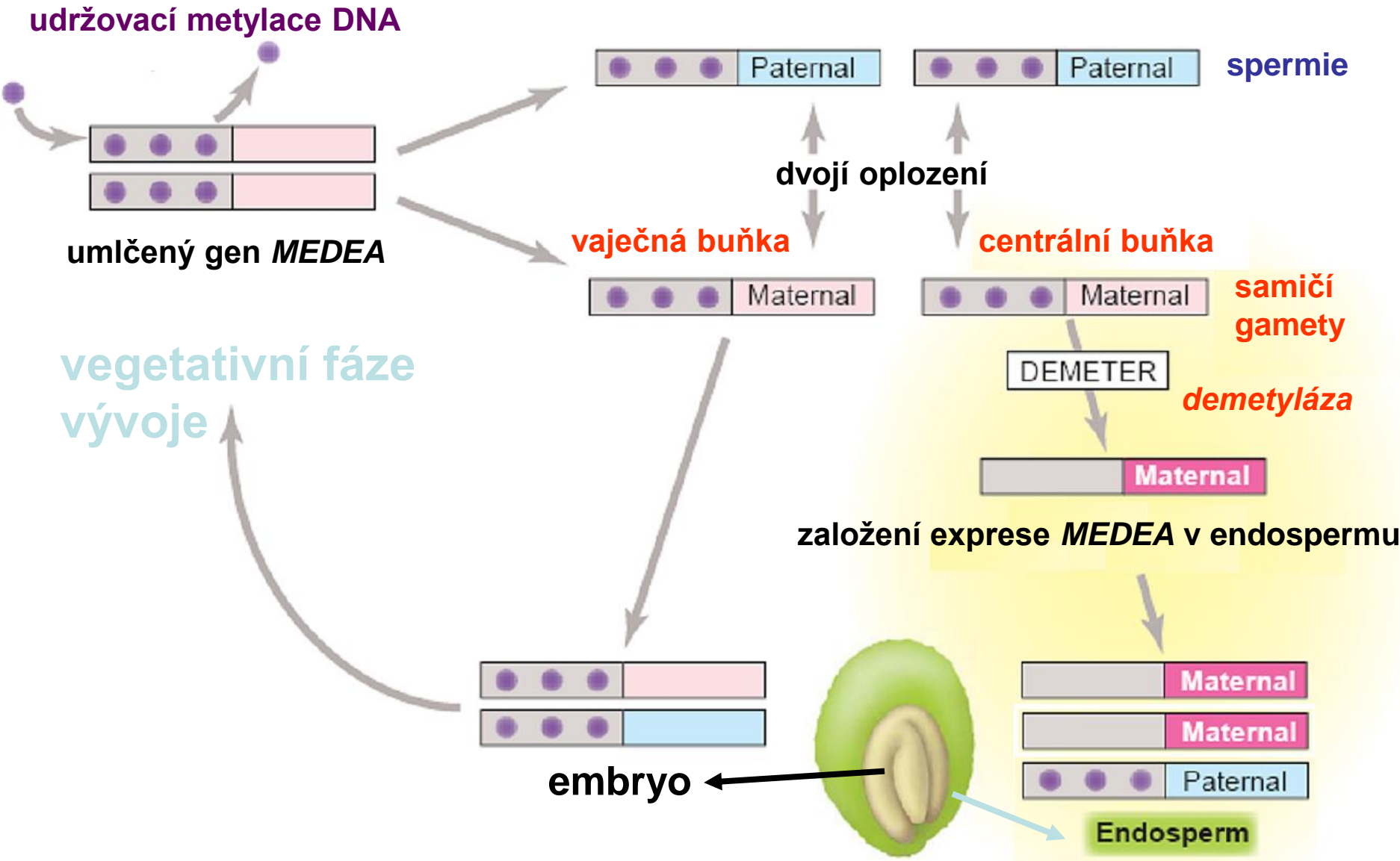


Ueli Grossniklaus  
(Zurich 1998)



maternální wt-alela: kontrola  
(redukce) embryonální proliferace

**... pohádka o Otesánkovi,  
aneb infanticida**



**Irreversibilní demethylace genu *MEDEA* v samičím gametofytu *Arabidopsis* (konvergentní evoluce se savčím imprintingem)**



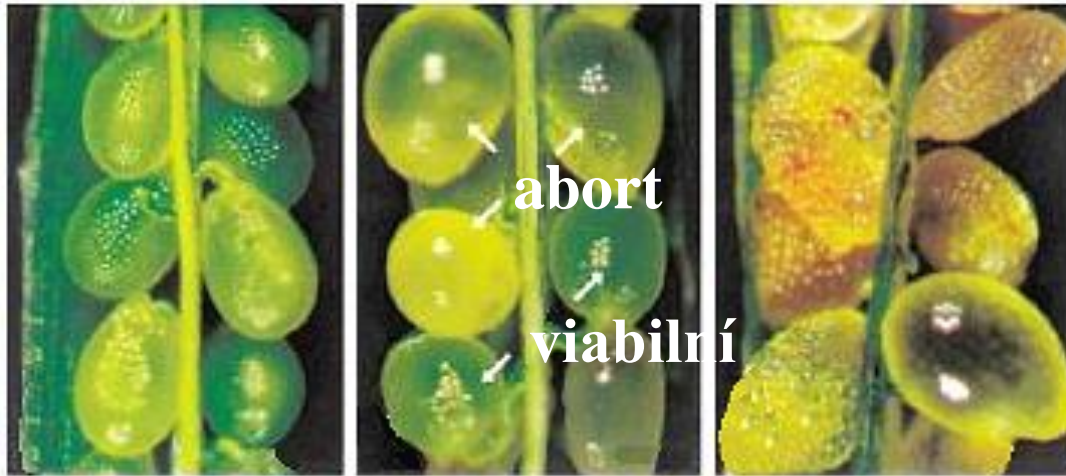
# DEMETER řídí maternální expresi genu *MEDEA*



*DME / DME*

*dme / DME*

*dme / dme*

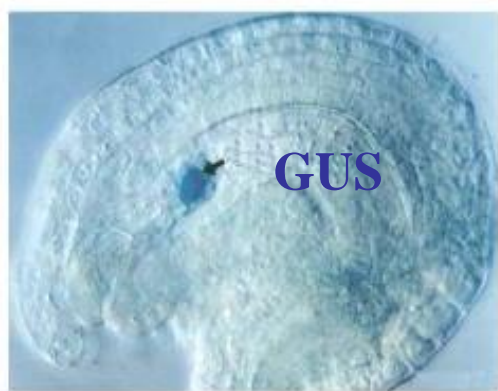


abort

viabilní

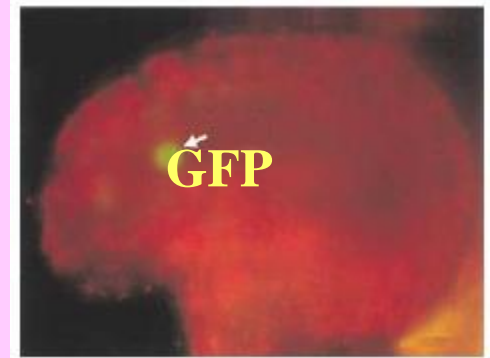


Steve Jacobsen  
(UCLA 2002)



GUS

exprese  
*DME*  
v centrální  
buňce  
samičího  
gametofytu  
(DNA glykosyláza?)



GFP

# Imprintované geny u rostlin

<i>Gen</i>	<i>druh</i>	<i>exprese</i>	<i>mechanismus</i>	<i>funkce</i>
<i>MEDEA</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>maternální</i>	<i>Polycomb</i>	<i>remodelování chromatinu</i>
<i>PHERES1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>paternální</i>	<i>Polycomb</i>	<i>transkripční faktor</i>
<i>FWA</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>maternální</i>	<i>DNA-metyltransferáza</i>	<i>transkripční faktor</i>
<i>FIS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>maternální</i>	<i>DNA-metyltransferáza</i>	<i>remodelování chromatinu</i>
<i>FIE</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>maternální</i>	<i>?</i>	<i>remodelování chromatinu</i>
<i>AGL80</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>maternální</i>	<i>?</i>	<i>transkripční faktor</i>
<i>AtFH5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>maternální</i>	<i>?</i>	<i>regulace aktinu</i>
<i>FIE1</i>	<i>kukuřice</i>	<i>maternální</i>	<i>DNA-metyltransferáza</i>	<i>remodelování chromatinu</i>
<i>FIE2</i>	<i>kukuřice</i>	<i>maternální</i>	<i>DNA-metyltransferáza</i>	<i>remodelování chromatinu</i>
<i>R</i>	<i>kukuřice</i>	<i>maternální</i>	<i>?</i>	<i>syntéza pigmentu</i>

... Oidipovský komplex