

# Epigenetická paměť

Vývojová genetika 2021

# Obsah

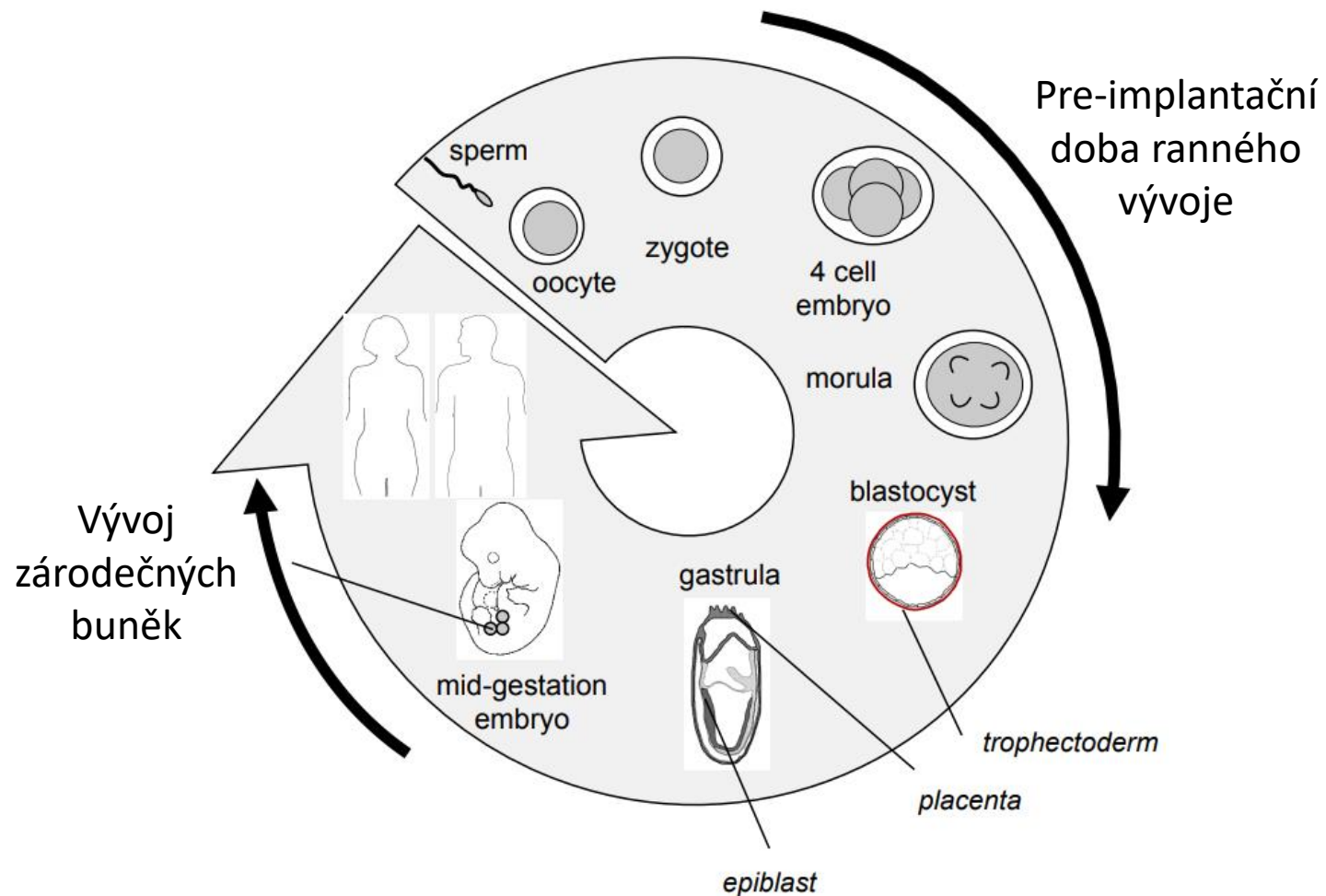
- Epigenetické reprogramování
  - Vývojové epigenetické změny u savců
  - Epigenetické změny navozené umělým zásahem
  - Vývojové epigenetické změny u rostlin
- Chromatin-remodelující proteiny – funkce histonové informace
- Paměťové proteiny a jejich funkce
  - Polycomb
  - Thrtorax
- Vývojové epigenetické změny u rostlin
  - Paramutace, RNAi
  - Úloha PcG proteinů

# Epigenetické reprogramování u savců

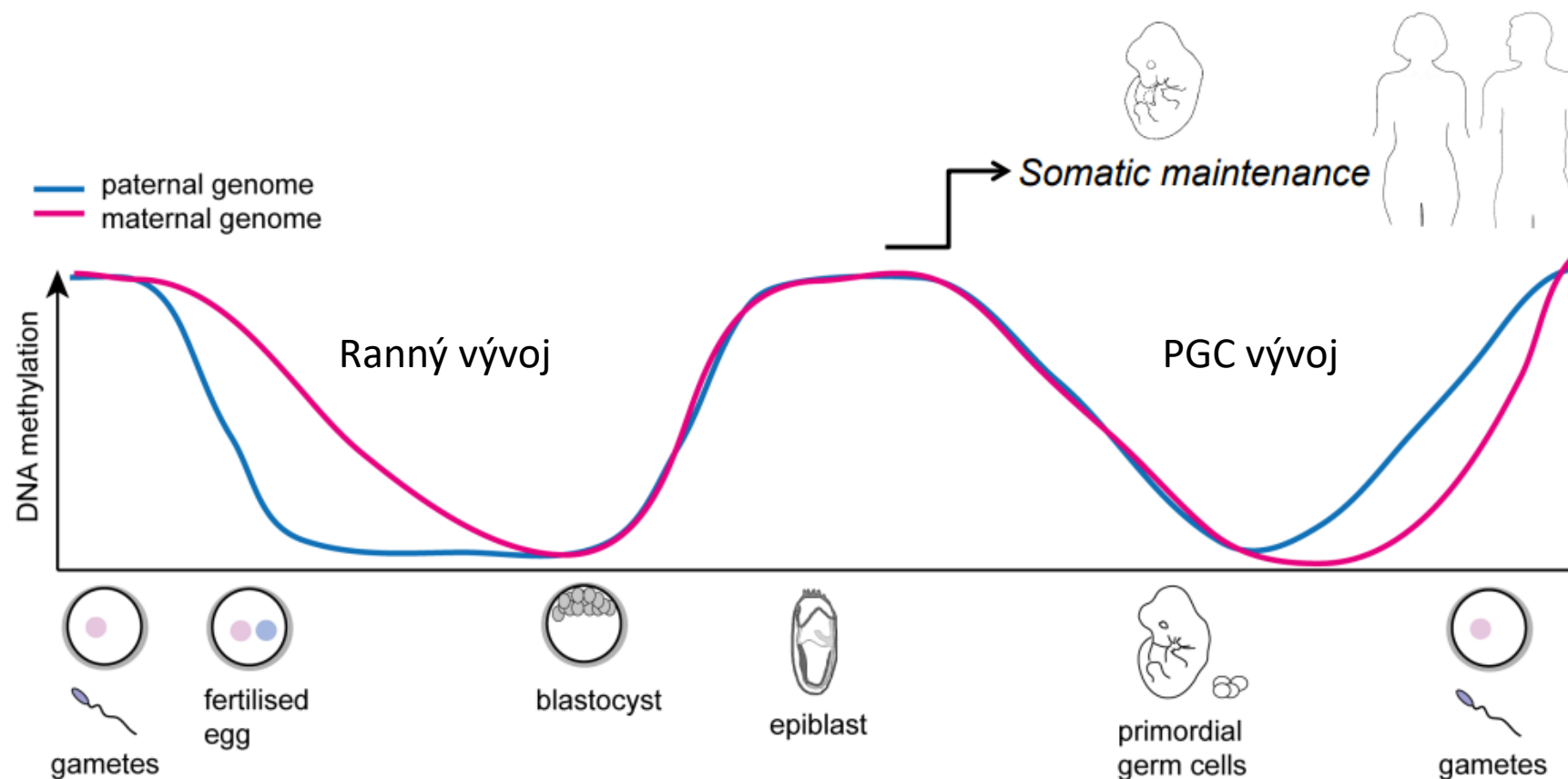
- Ke kompletnímu odstranění epigenetických značek dochází během vývoje u savců 2x

- Ranná fáze embryonálního vývoje
- Vývoj zárodečných buněk

= **doba sensitivity** k vlivům prostředí je nejsilnější **v období specifikace zárodečných buněk** a následně v první **fázi meiózy** (druhá fáze-dožívání oocytů a spermií, u člověka se liší-ženy 8-10 let, muži 9-12 let)



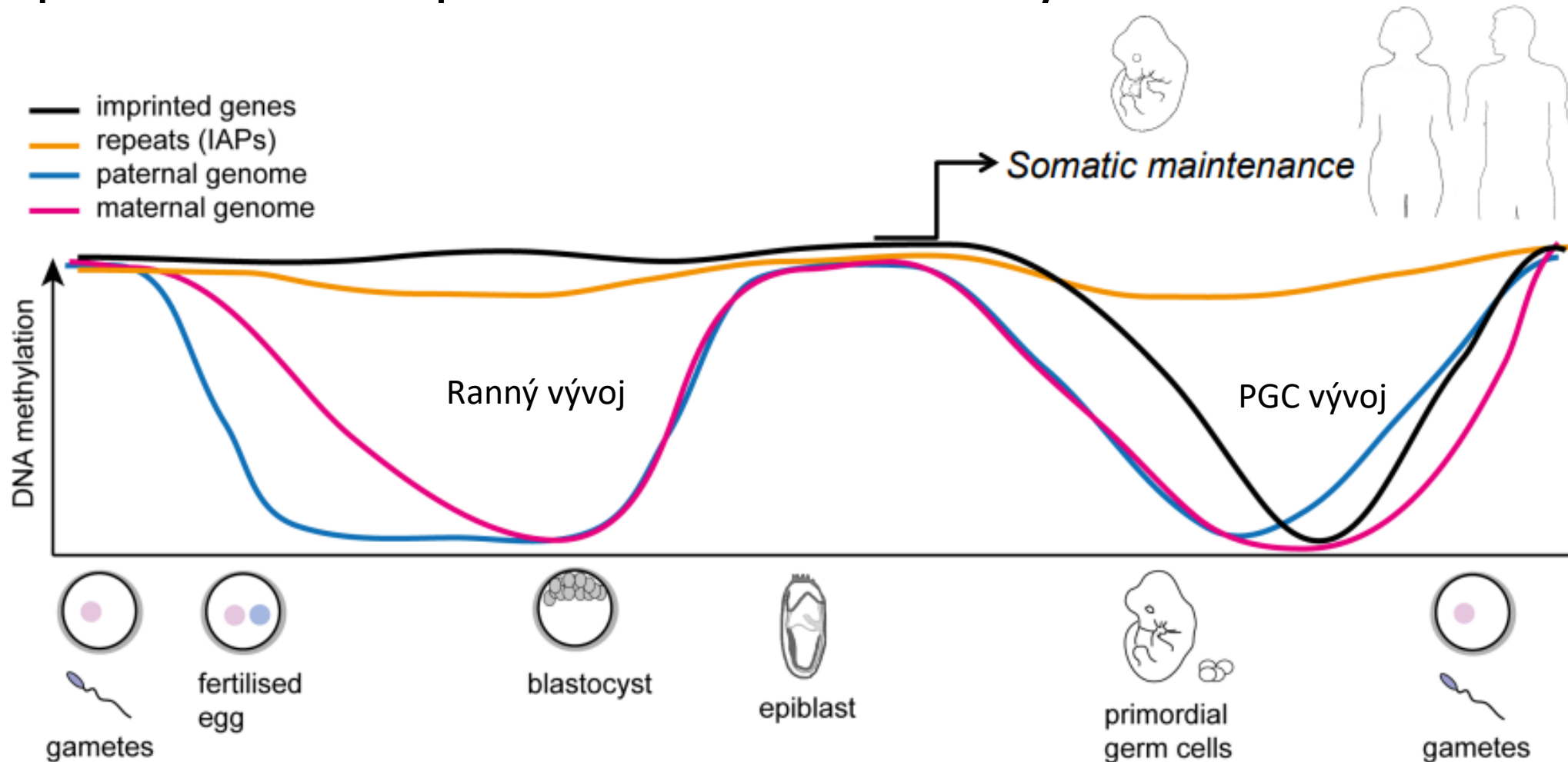
# Rozdíly ranného a PGC reprogramování



- Rychlá a aktivní demethylace paternálního genomu
- Pasivní demethylace maternálního genomu

- V pozdním vývoji je odstranění DNA methylace rozdílná během spermatogeneze a oogeneze

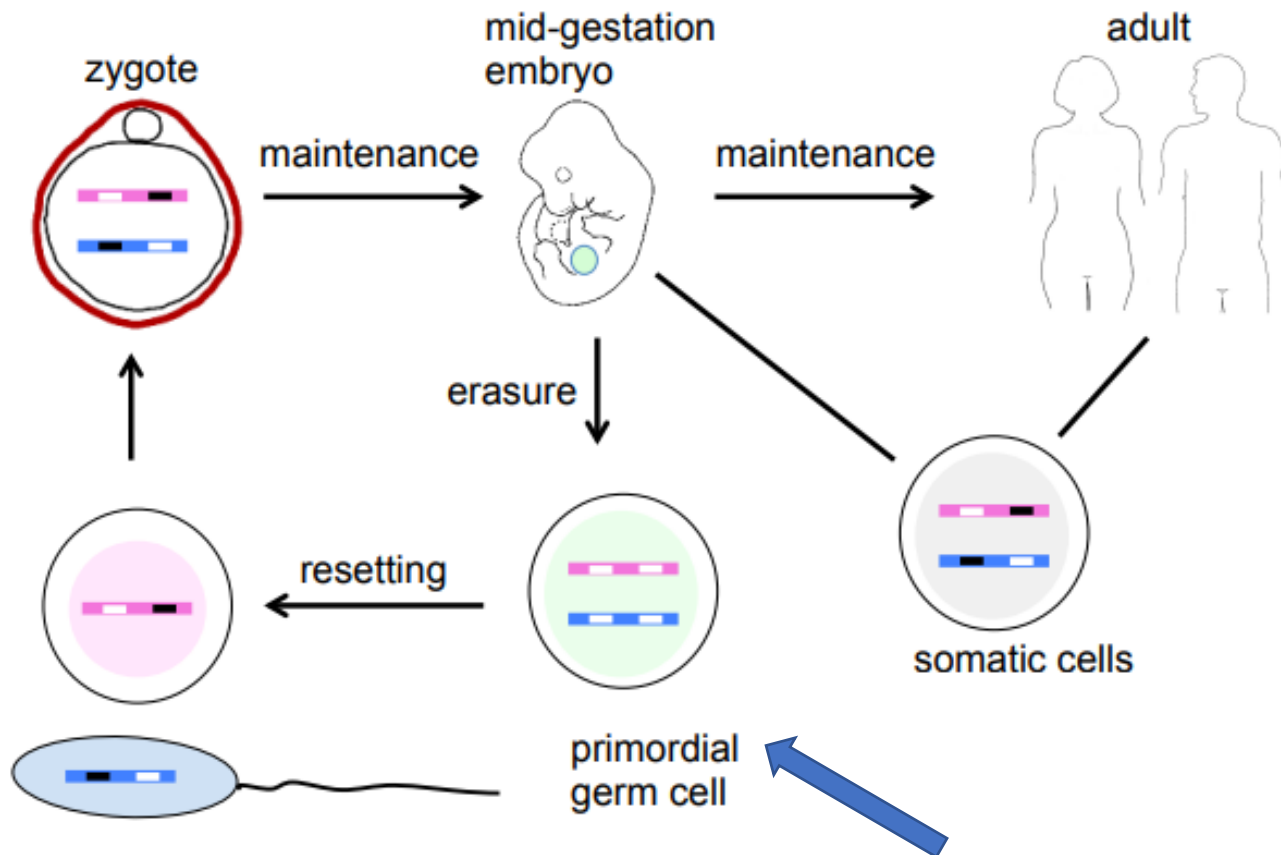
# Epigenetické reprogramování u savců – repetice a imprintované lokusy



Ochrana DNA methylace – úloha maternálních proteinů v oocytech

Liší se ve spermích a zralých vajíčkách

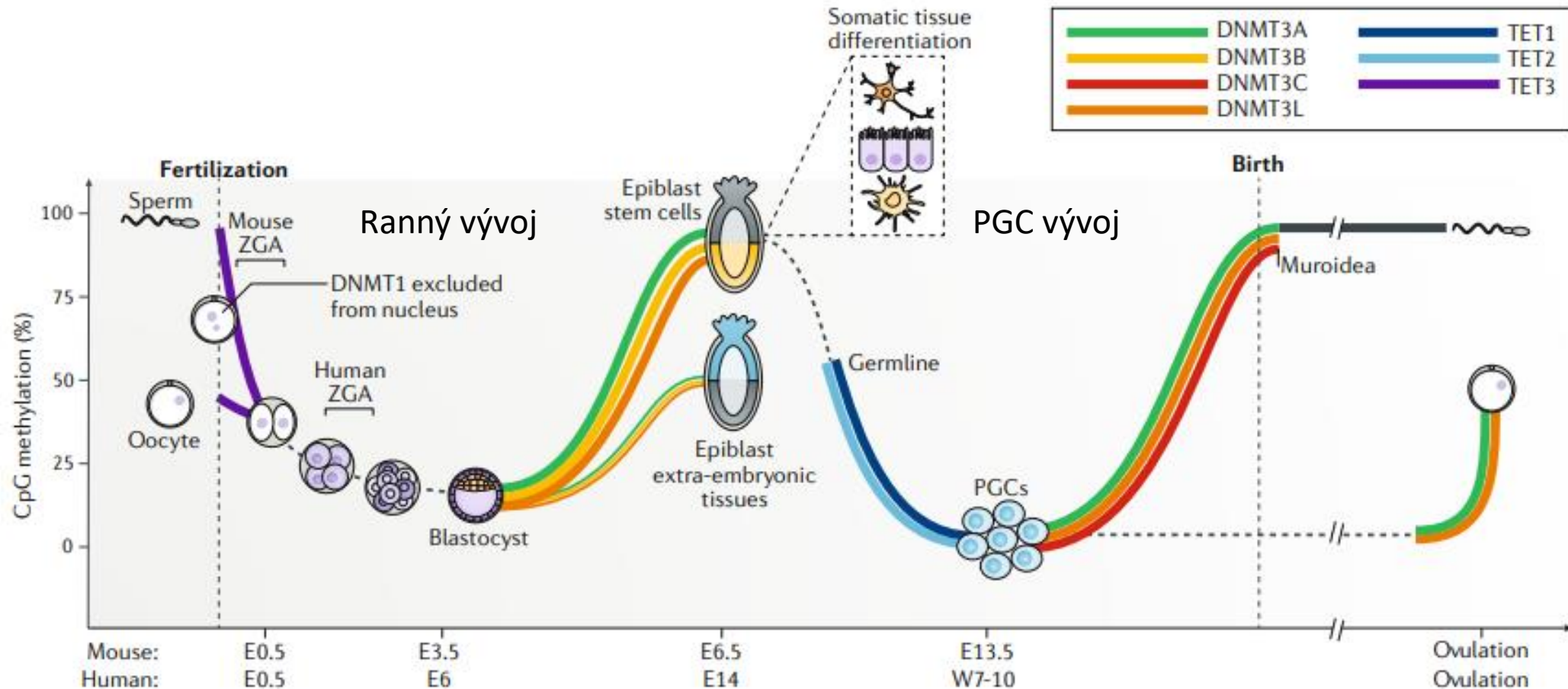
# Epigenetické reprogramování zárodečných buněk



Úloha maternálních faktorů

- Methylace na ICRs oblastech reguluje expresi imprintovaných lokusů- DMRs (=„differentially methylated regions“)
- Lokusy lišící se úrovní methylace mezi vzorky nebo alelami navzájem
  - tDMR – buněčně specifické
  - cDMR – rakovinné
  - dDMRs – vývojové
  - rDMR – reprogramované
  - AMR – alel-specifické
  - aDMR – věkově specifické

# Aktivita DNMT and TET enzymů během reprogramování



TET3, DNMT 3a, 3b – de-novo methylase



TET1, TET2

DNMT 3a, 3C a 3L

Greenberg 2019

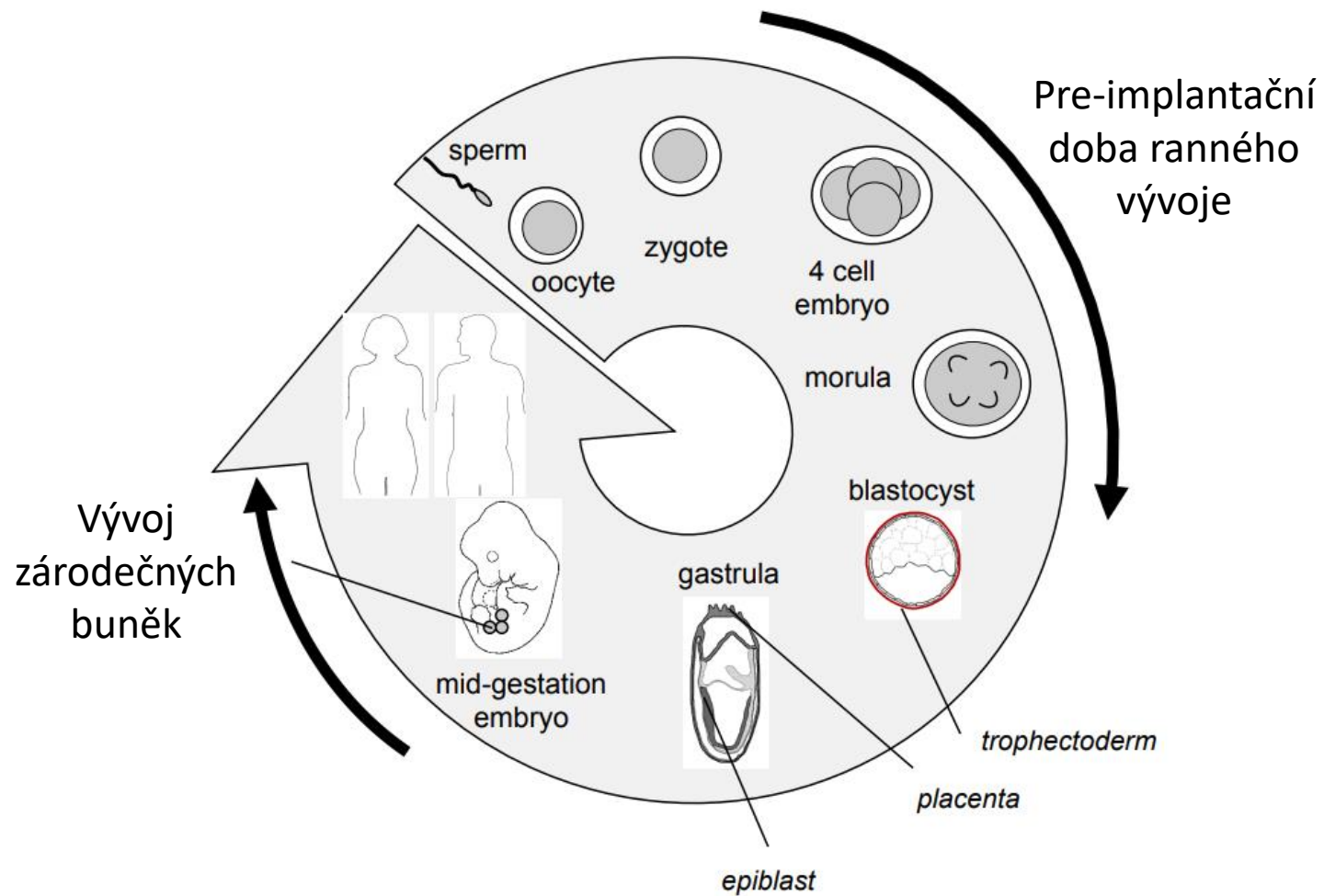
# Epigenetické reprogramování u savců shrnutí

- **Zárodečné buňky**

- Paternální a maternální genomy mají odstraněny všechny značky (reset)
- Repetice jsou umlčeny
- Imprintované geny mají odstraněný imprinting
  - Výhradně ve vajíčku
  - Výhradně ve spermích

- **Pre-implantační perioda**

- Paternální a maternální genomy mají odstraněny všechny značky (reset)
- Repetice zůstávají umlčeny
- Imprintované geny si ponechávají imprinting dle původu (úloha maternálních proteinů)



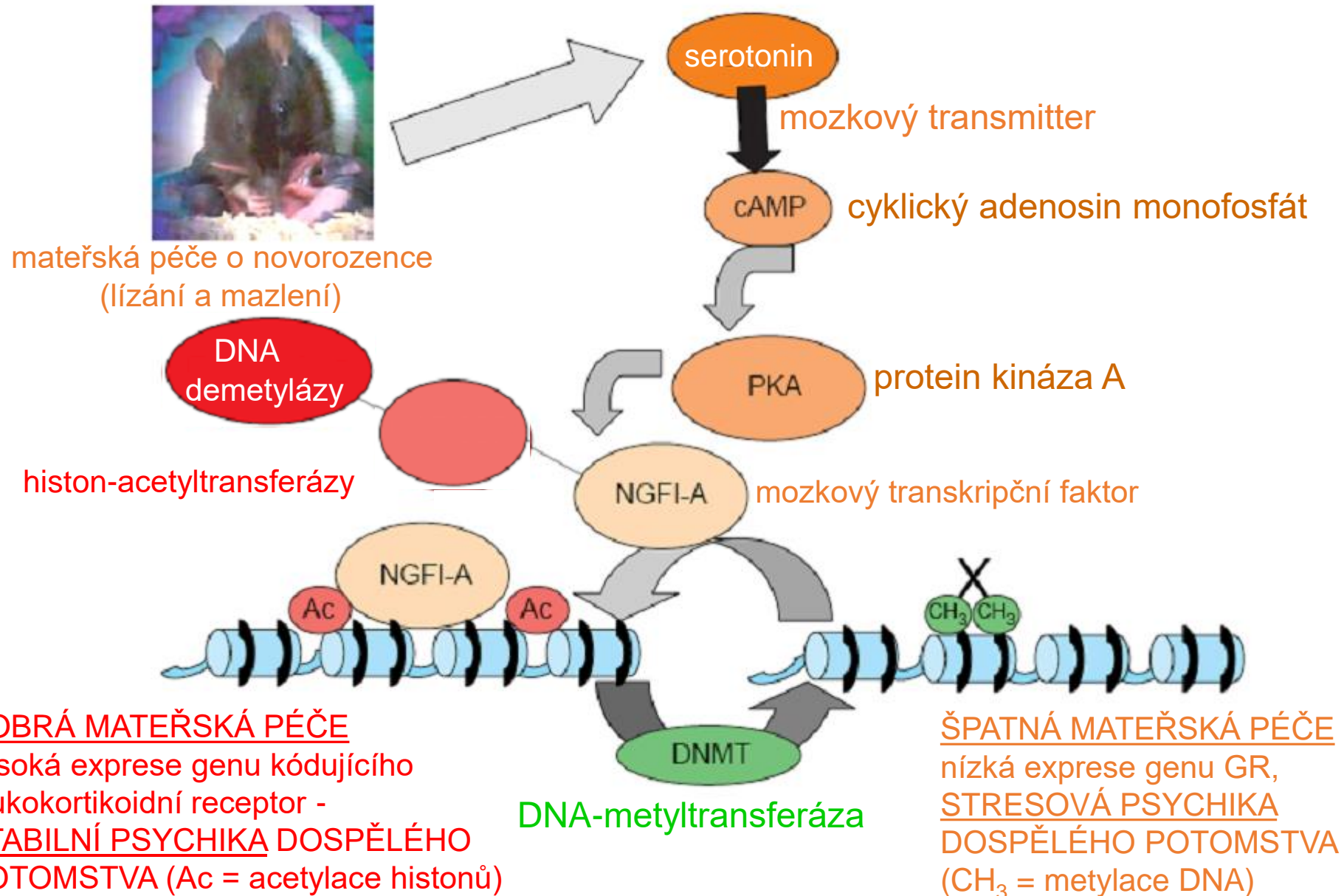


# Epigenetické změny navozené umělým zásahem

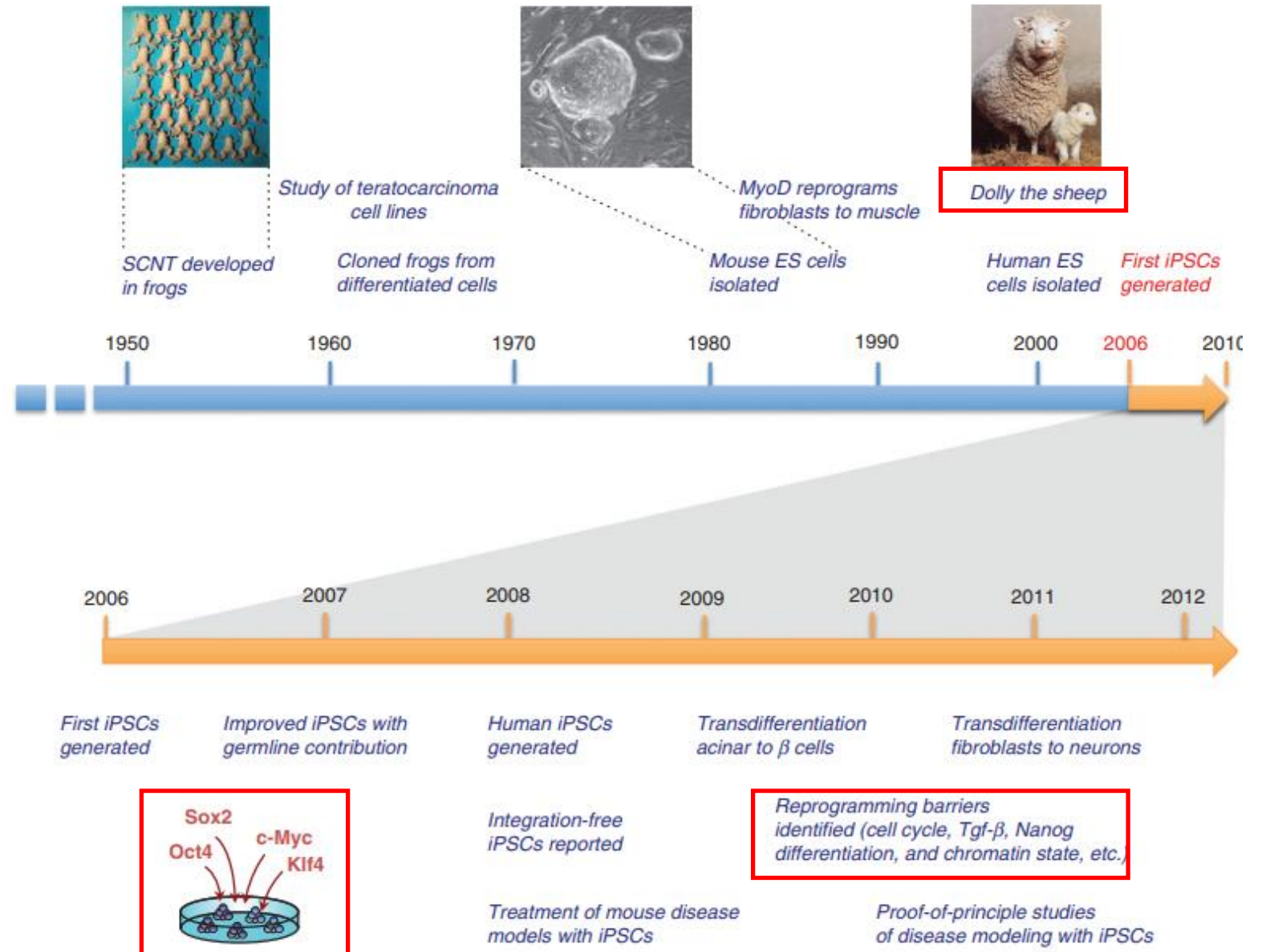
- Působení prostředí
  - Změny prostředí v průběhu citlivé periody
    - Överkalix
    - Holandský hladomor = „thrifty phenotype“
  - Dieta, maternální péče aj.
- Vědecky- nebo klinicky-navozené změny
  - ART, klonování, somatické reprogramování

# Maternální programování epigenetických stavů

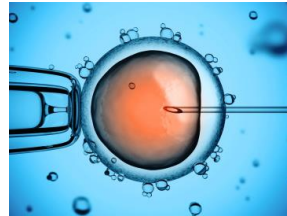
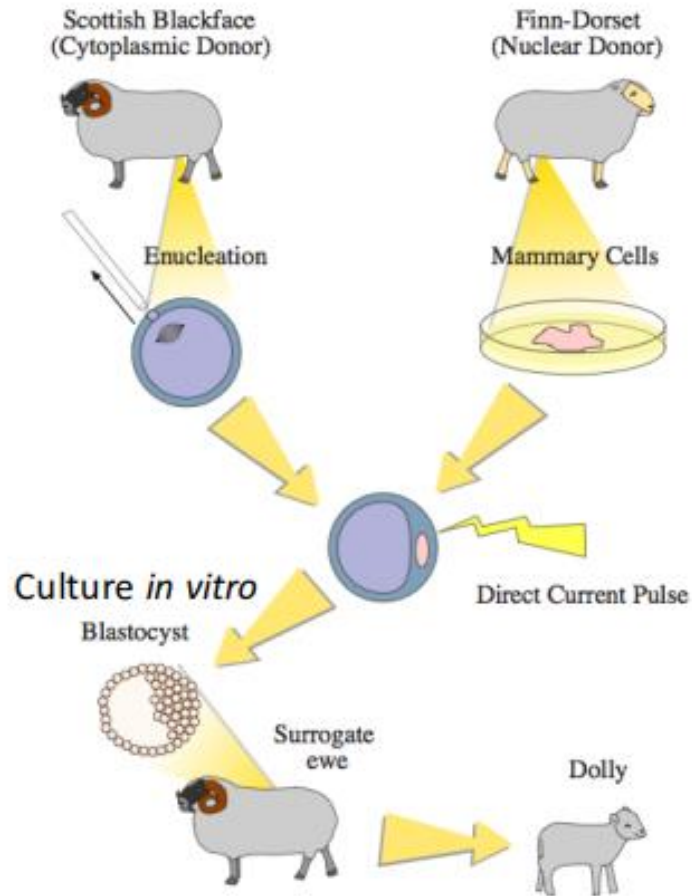
Maternální péče jako model „experience-dependent“ chromatinové plasticity



# Historie epigenetického reprogramování



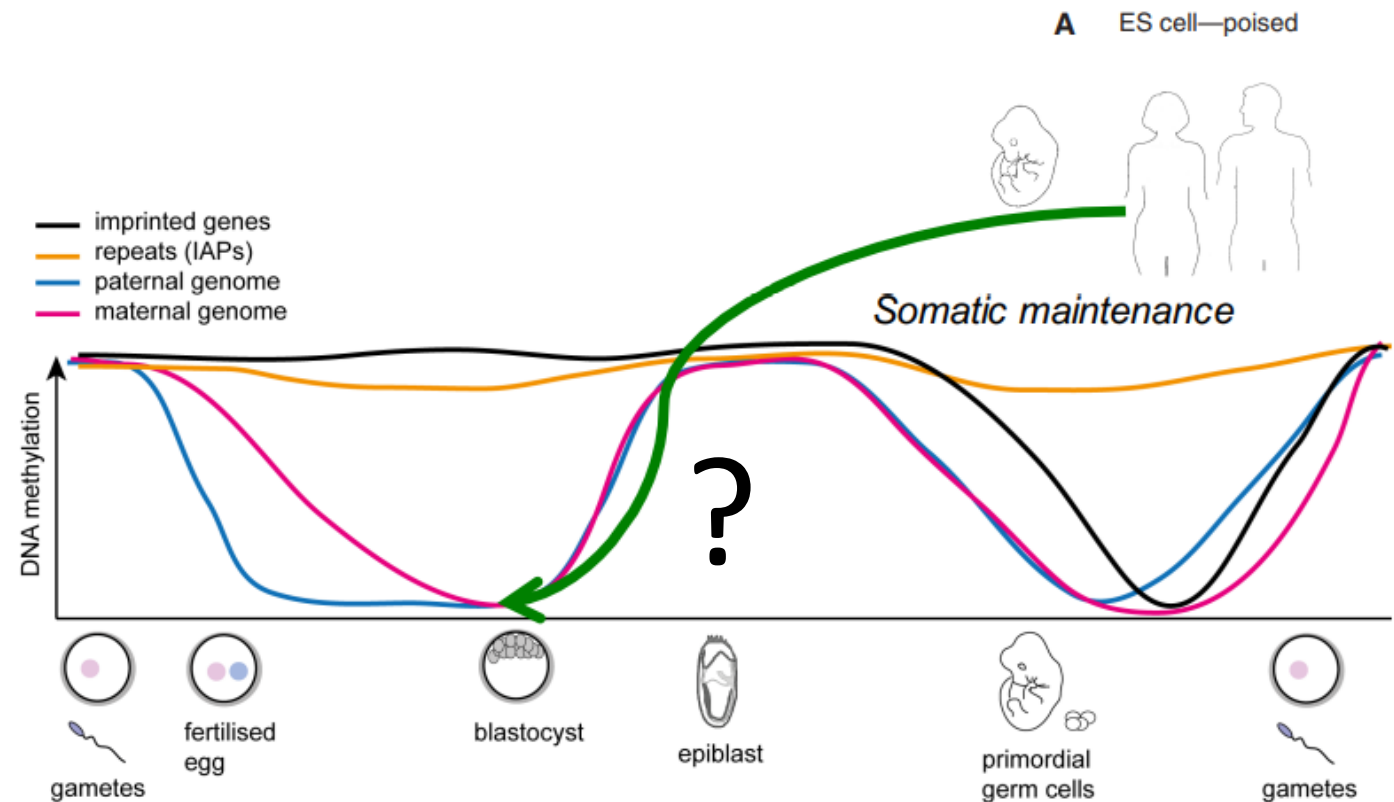
# Epigenetické reprogramování v somatickém buněčném jaderném přenosu (klonování) – ovečka Dolly



- Fúze buňky izolované z vemene genetické matky (Fin Dorset) a matky vajíčka (Blackface)
- **Odstranění buňky vajíčka před fúzí**, následná stimulace dělení – embryo vloženo do další matky Blackface
- **Věk stejný jako genetická matka**, Dolly byla jediná ovce z 277 pokusů, která přežila do dospělosti
- Jméno po americké zpěvačce – Dolly Parton

# Nízká úspěšnost klonování a epigenetické následky

- Velké efekty v potomstvu – velký plod, placenta
- **Nedostatečné nastavení imprintovaných lokusů**
  - Imprintované geny regulují růst, hlavně v placentě
  - Somatické jádro neprochází PGC reprogramováním (ICR lokusy nejsou „pře-nastaveny“, absence změny konformace chromatinu na úrovni gamet – protaminy?)
  - Efekt maternálních proteinů při ranném vývoji – eroze ICR methylace



# Odkaz ovečky Dolly

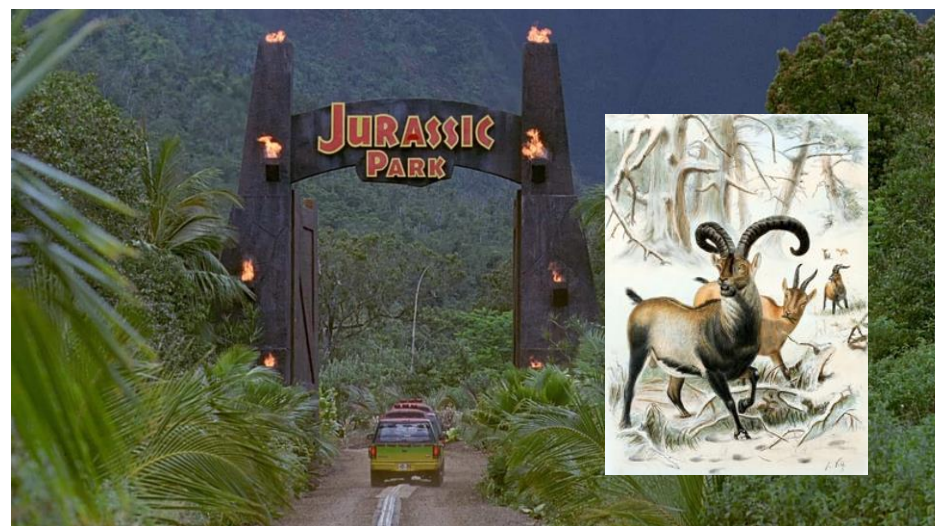
- **Další velká zvířata - prase, jelen, koně a skot**
- 2007 – tým, který klonoval ovečku Dolly zhodnotil, že klonování a jeho malý úspěch je nedostatečný pro člověka
- 2014 – čínští vědci dokázali mít 70 – 80% úspěšnost při klonování prasat
- **Výzkum kmenových buněk!**



## China cloning on an 'industrial scale'

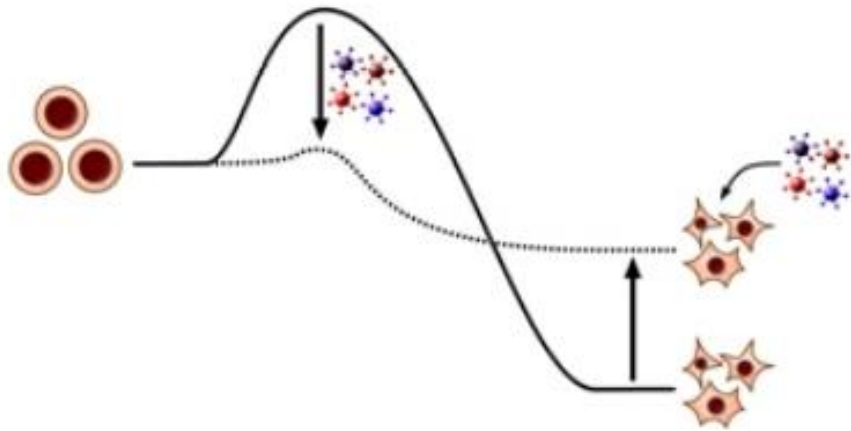
David Shukman  
Science editor

© 14 January 2014 | Comments



Klonování  
ohrožených  
druhů/druhů  
na pokraji  
vyhynutí?  
=kozorožec  
pyrenejský

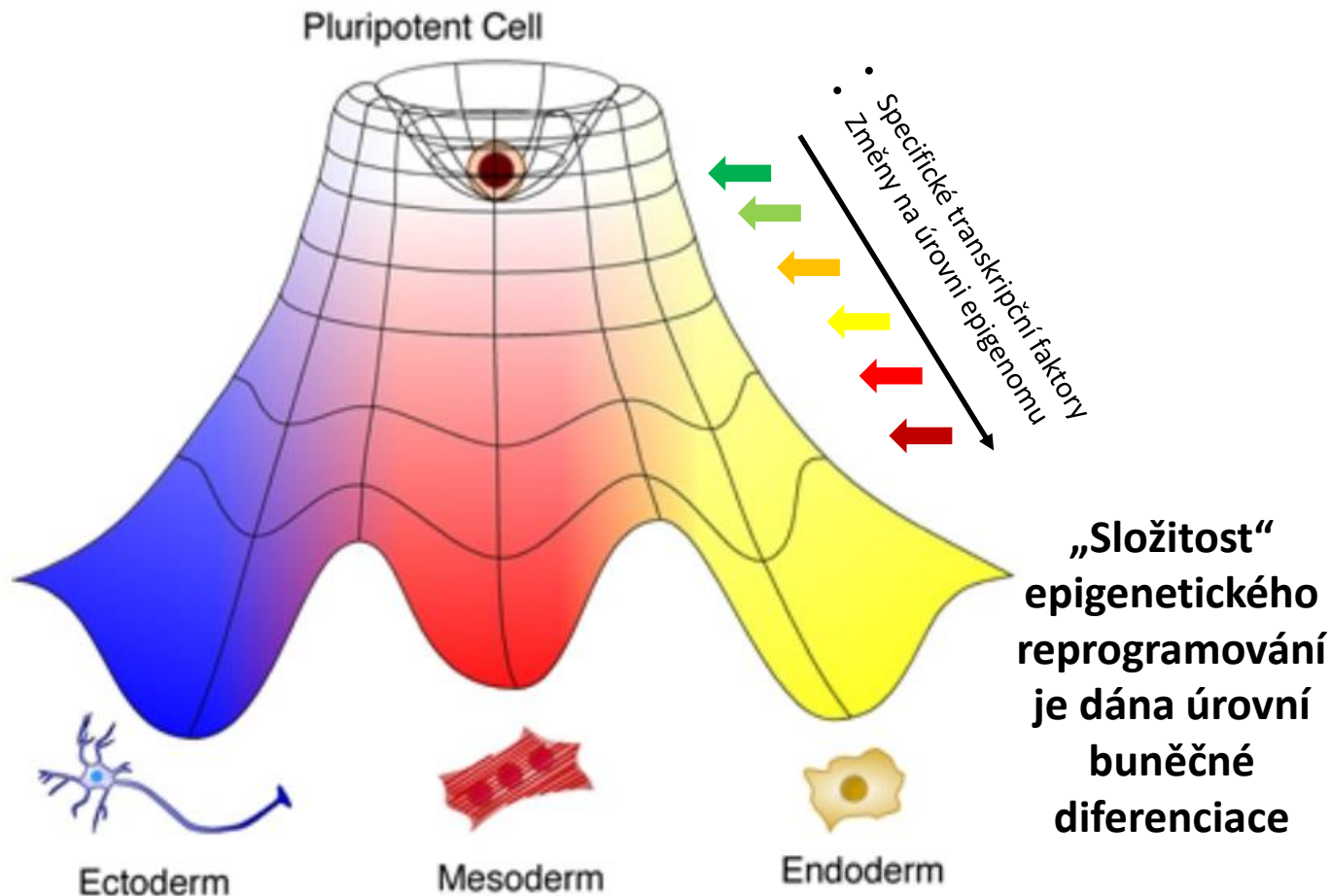
# Úspěšnost buněčného reprogramování a hlavní faktory vedoucí k pluripotenci



- Pro úspěšné reprogramování musí být kontrolovány a kombinovány specifické transkripční faktory – snížení pluripotentní bariéry
- Využití inhibičních látek pro zvýšení úspěšnosti – riziko globálního afektu a mutageneze?

- **c-Myc** – homologie onkogenu viru **Myelocytomatosis**, transkripční faktor obsahující helix-loop-helix a **motif zinkového prstu**, reguluje celou řadu pro-proliferativních genů
- **Oct4** – „octamere-binding transcription factor 4“ – aktivní jako maternální faktor v oocytech a v preimplantační periodě, **zabraňuje diferenciaci=udržuje pluripotenci**
- **Klf4** – „Krupple like factor 4“ – transkripční faktor, motif zinkového prstu, regulace telomerázy, kontrola buněčného cyklu a počtu centrozomů (**genetická stabilita**)
- **Sox2** – „sex determining region Y-box 2“, obsahuje HMG doménu, transkripční faktor pro **udržení pluripotence a dělení**, různé úrovně mohou vést k diferenciaci

# Epigenetické reprogramování somatických buněk



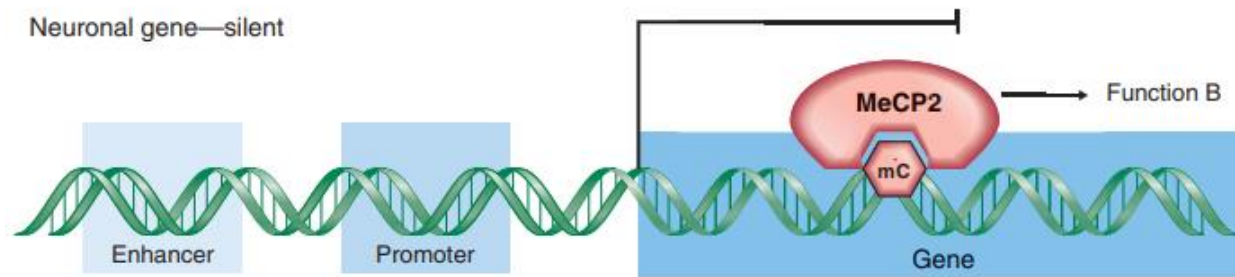
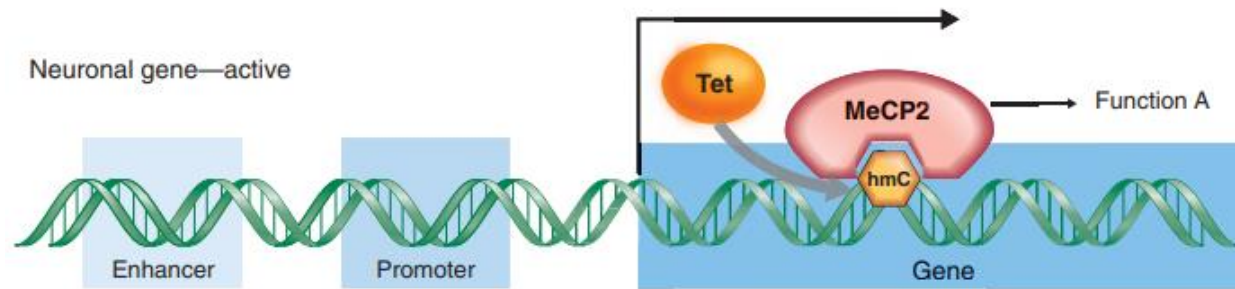
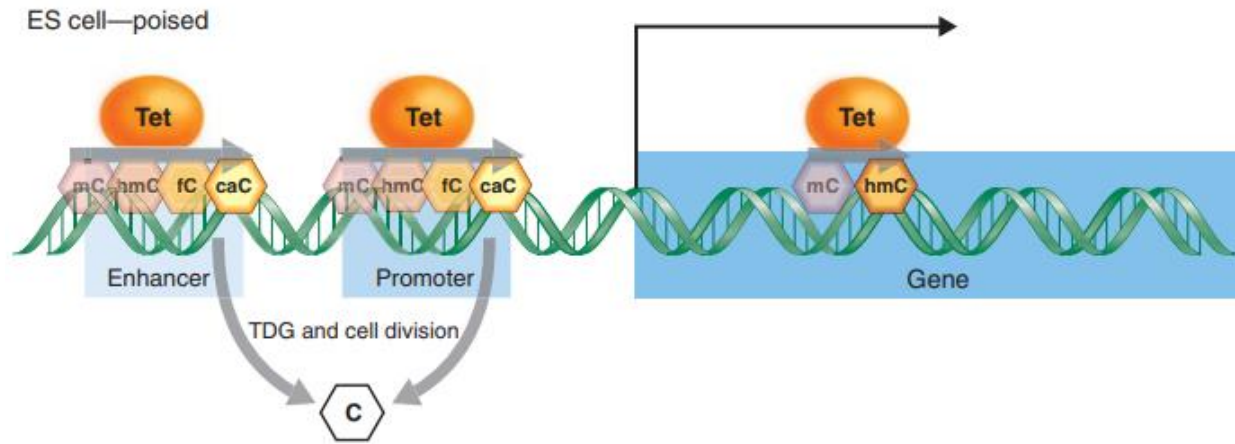
- Každá úroveň buněčné diferenciace vyžaduje

- Změnu stávajících modifikací
- Kontrola buněčného plánu (vnitřní plán)
- Kontrola buněčného plánu ve vztahu k okolí
- Získání nových modifikací

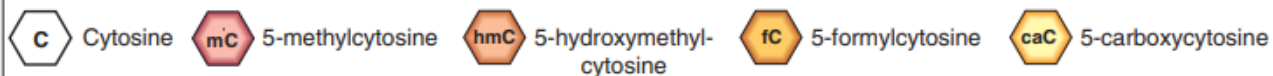
- Uměle vyvolané reprogramování vyžaduje

- Odstranění typově specifických modifikací
- Obnovení modifikací udržujících pluripotentní stav
- Obnovení stavu chromatinu
- Udržení imprintovaných oblastí
- Odstranění XCI (u samic)
- Specifita epigenetických a „dosud“ neznámých faktorů?



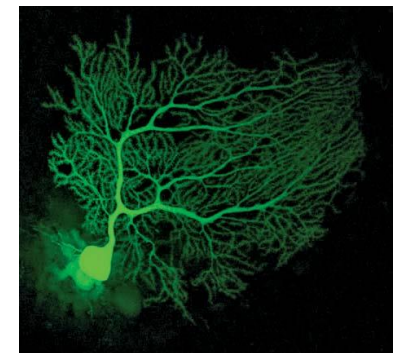
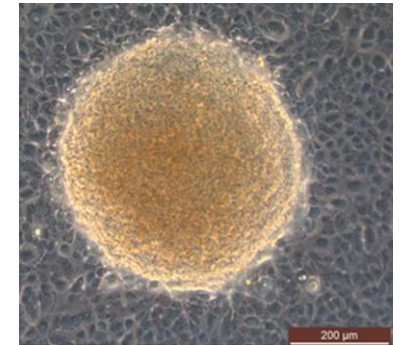


**Modifications of the cytosine base**

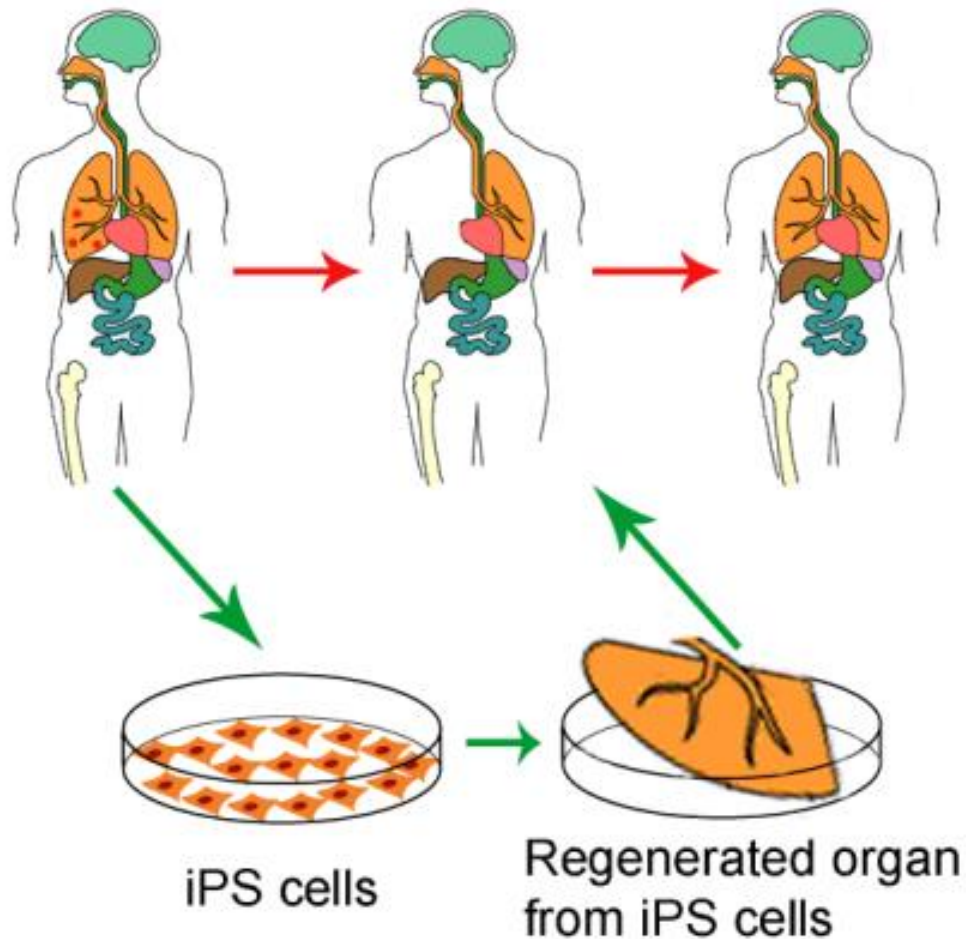


# Specifita modifikací cytosinu - úloha?

- Neznámý kontext funkce při buněčné diferenciaci – úloha?
- Oxidace 5mC na jeho deriváty v ES buňkách – možná blokáce udržovacích methyláz
- Oxidační deriváty 5mC mohou měnit funkci/expresi některých genů u terminálně diferenciovaných buněk (Purkyňovi buňky)



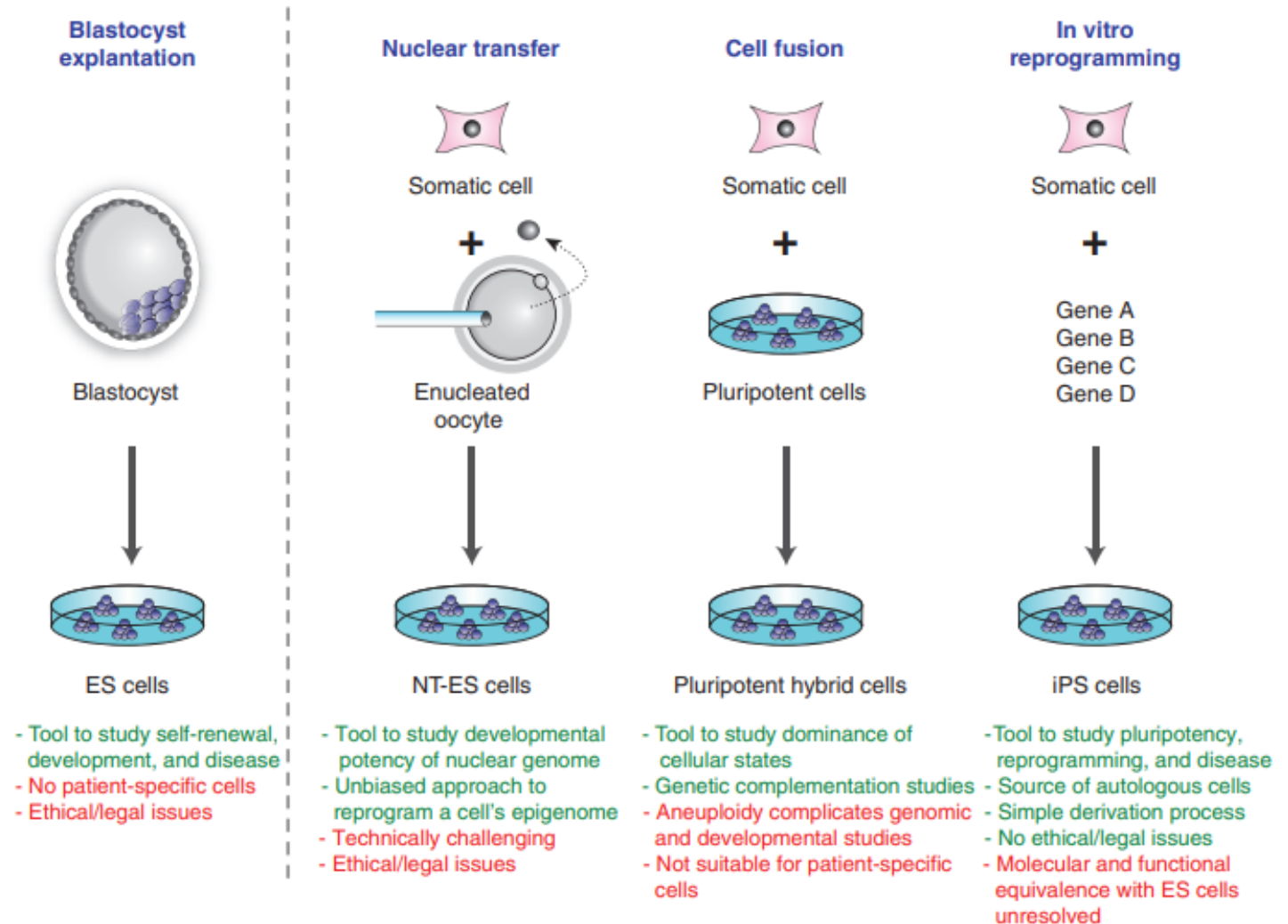
# Epigenetické reprogramování a úspěšnost klonování



- Globální transkriptomické změny mezi klony naznačují velké abnormality na epigenetické úrovni regulace (stejný genotyp – rozdílnost v úrovních exprese)
- Vyšší úspěšnost dosažena přidáním látek, které narušují epigenetický stav buňky (inhibitory methyláz aj.)
- Využití
  - iPS – „embryonic stem cell-like pluripotent cell“ odvozené ze somatické buňky
  - Terapie – získání kmenových buněk pacienta s určitou poruchou, regenerace orgánů?
- Etika – bez podpory se nemůže vyvíjet, chybí placenta=není embryo

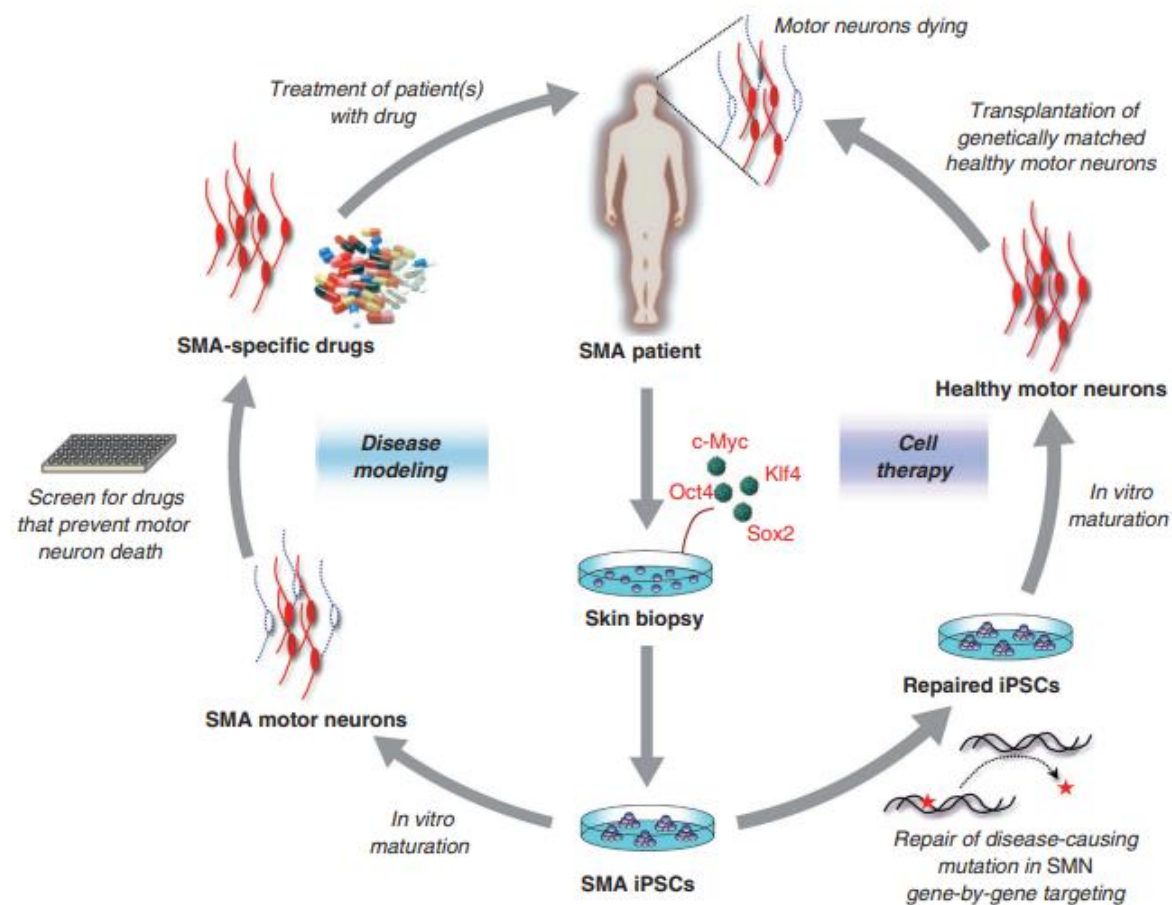
# Zdroj pluripotentních buněk

- Kultivace buněk blastocysty
- Jaderný přenos do oocyty
- Buněčná fúze
- iPS (*in vitro* reprogramování – retrovirový vektor – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*)
- iPS reprogramování a dediferenciace není identická k *in vivo* oplození a materiálu

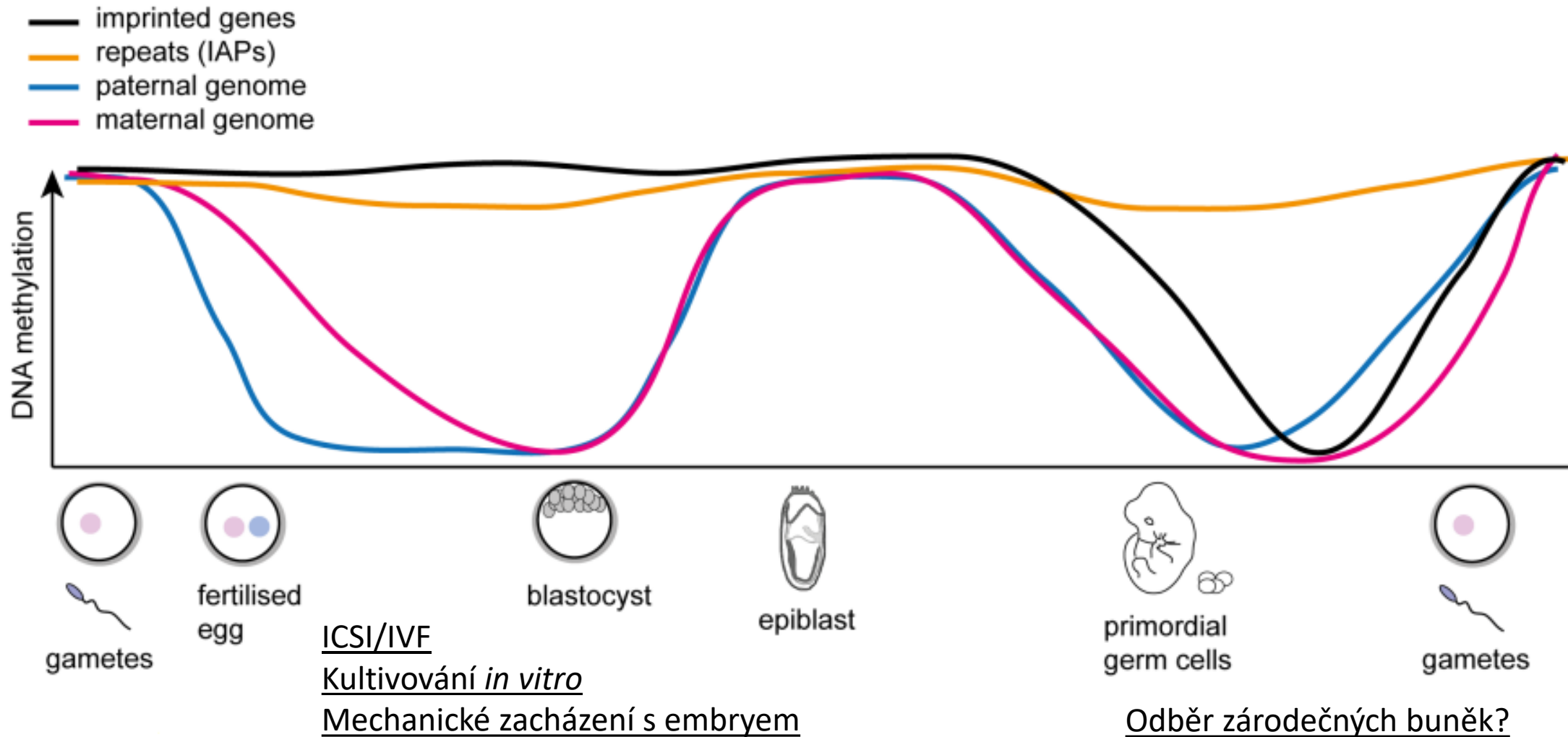


# Možné terapeutické využití iPS

- Dva příklady iPS pro léčbu SMA (spinální svalová atrofie)
  - Maturace SMA-iPSCs v neuronové buňky a hledání nových látek inhibujících degeneraci motorických neuronů
  - Oprava mutací postihující geny vedoucí k SMA a transplantace opravených motorických neuronů zpět do pacienta

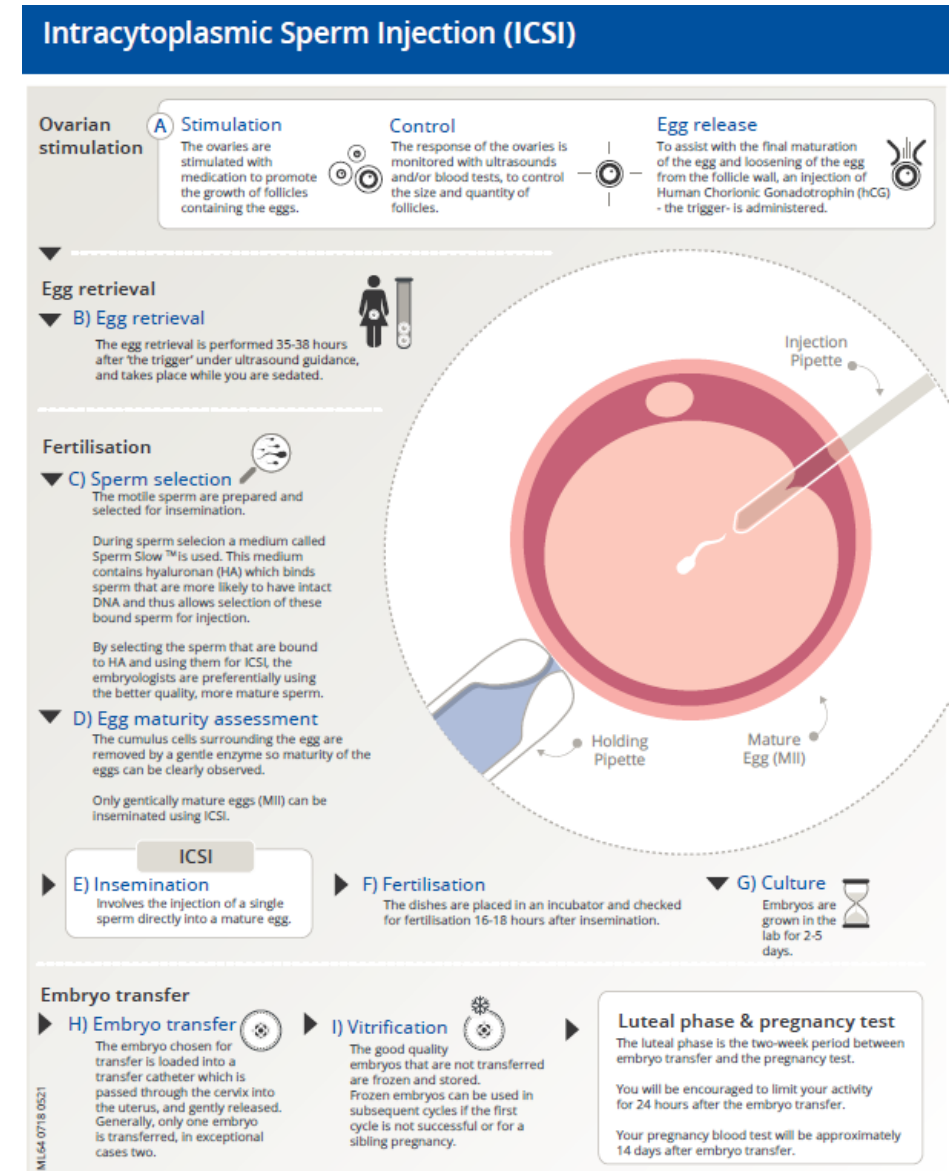


# Změny v epigenetickém reprogramování v důsledku ART



# Změny v epigenetickém reprogramování v důsledku ART

- Efekt ICSI („Intracytoplasmic Sperm Injection“) nebo IVF („In Vitro Fertilisation“) –
  - nárůst v počtu BWS a AS syndromů (ICSI) – maternálně přenosné (1/300 000), u ART dětí nízké riziko
- Možné problémy s fertilitou, závislé na věku matky
  - Narušení sensitivní periody
  - Změna efektu maternálních proteinů z důvodu odběru oocytů – možná eroze DNA methylace a imprintovaných lokusů během ranného vývoje
  - Transgenerační efekt?

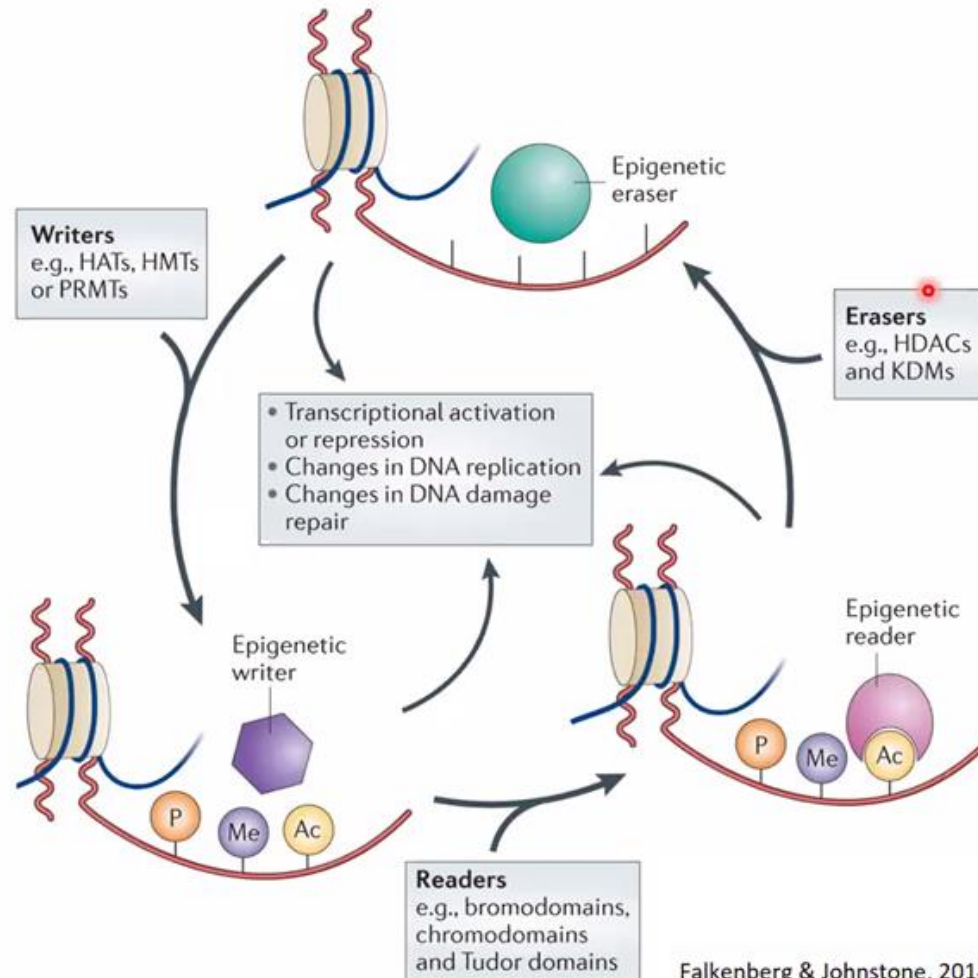


# Obsah

- Epigenetické reprogramování
  - Vývojové epigenetické změny u savců
  - Epigenetické změny navozené umělým zásahem
  - Vývojové epigenetické změny u rostlin
- Chromatin-remodelující proteiny – funkce histonové informace
- Paměťové proteiny a jejich funkce
  - Polycomb
  - Thrtorax
- Vývojové epigenetické změny u rostlin
  - Paramutace, RNAi
  - Úloha PcG proteinů

# „Writers, erasers and readers“

Acetyltransferázy  
Methyltransferázy  
Kinázy  
Ubiquitinázy



Deacetylázy  
Demethylázy  
Fosfatázy  
Deubiquitinázy

→ Rozpoznání specifických histonových značek

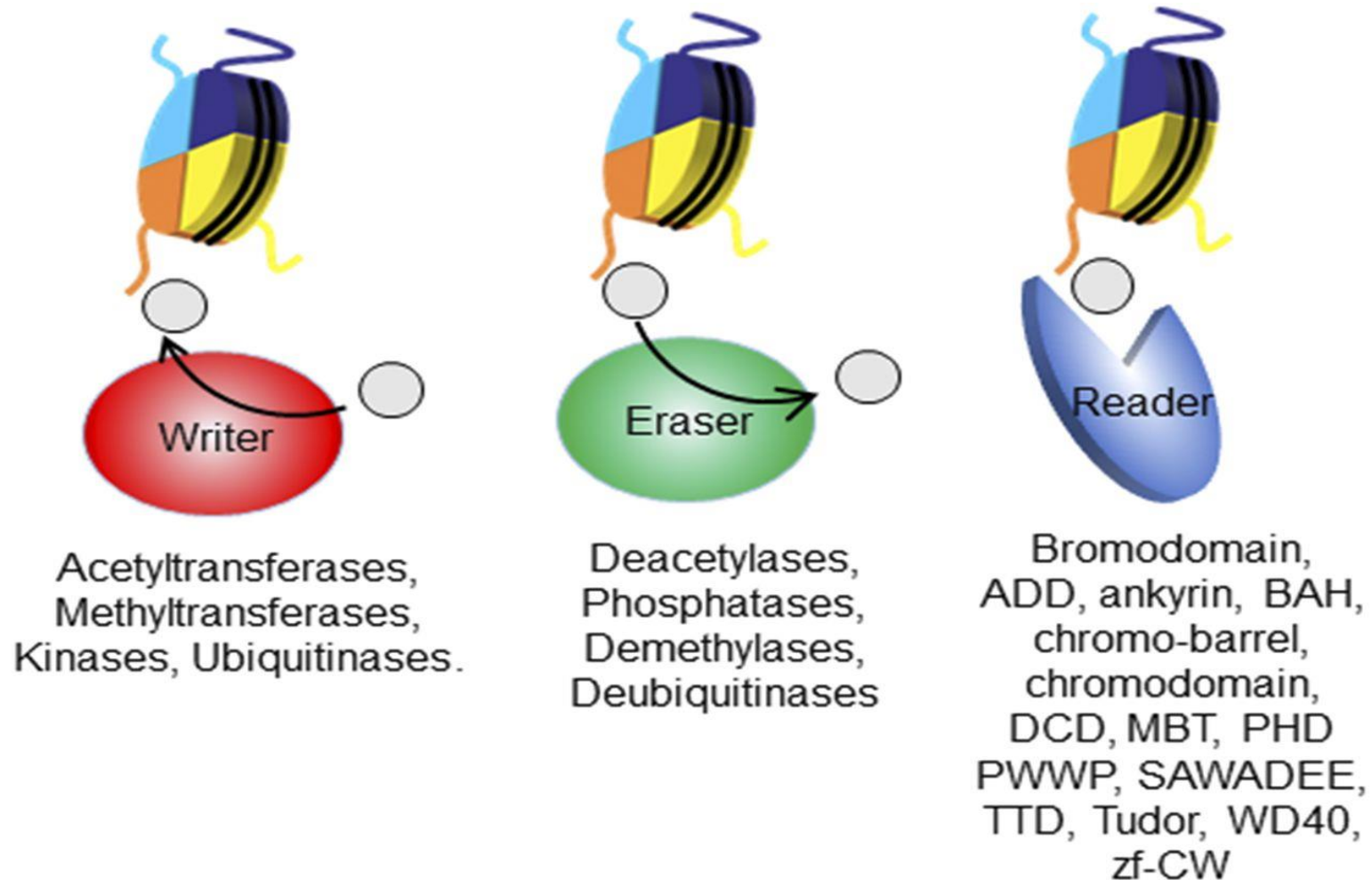
→ Vazba dalších remodelujících proteinů a chromatin-modifikujících enzymů (změna funkce a architektury chromatinu-Swi, ISWI...)



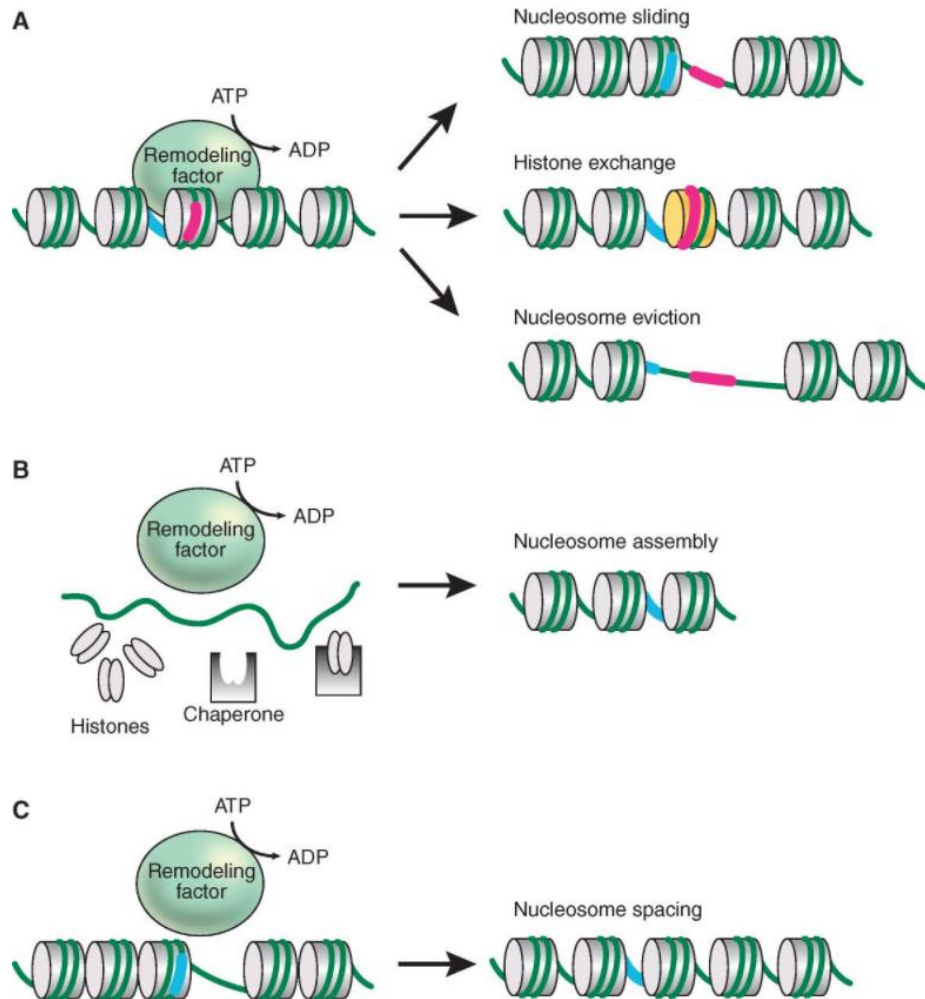
# Klasifikace chromatin modifikujících enzymů

- Kovalentně modifikující komplexy
  - Acetylázy/deacetylázy
  - Methylázy/demethylázy
  - Ubiquitinázy/deubiquitinázy
  - Kinázy/fosfatázy
  - aj.
  
- ATP-dependentní chromatin modifikující komplexy

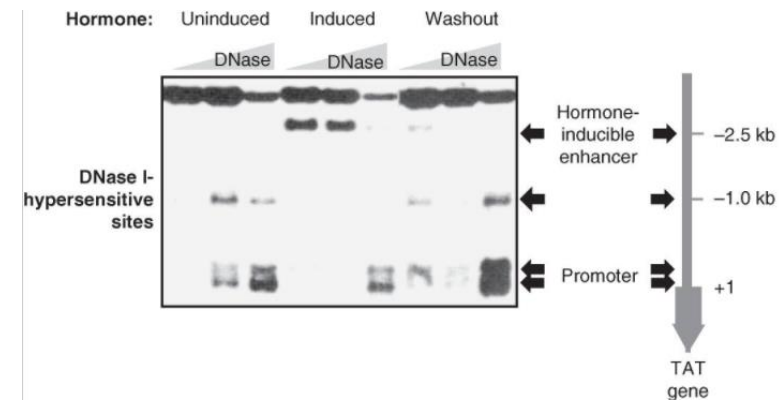
# Základní rozdělení enzymů v dráze posttranslačních histonových modifikací (PTMs)



# Funkce ATP-nekleozom remodelujících komplexů

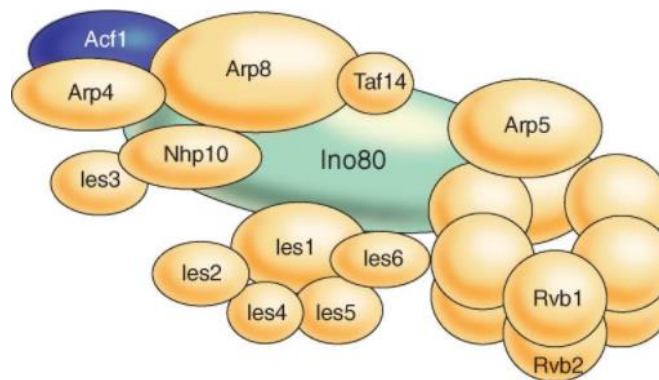
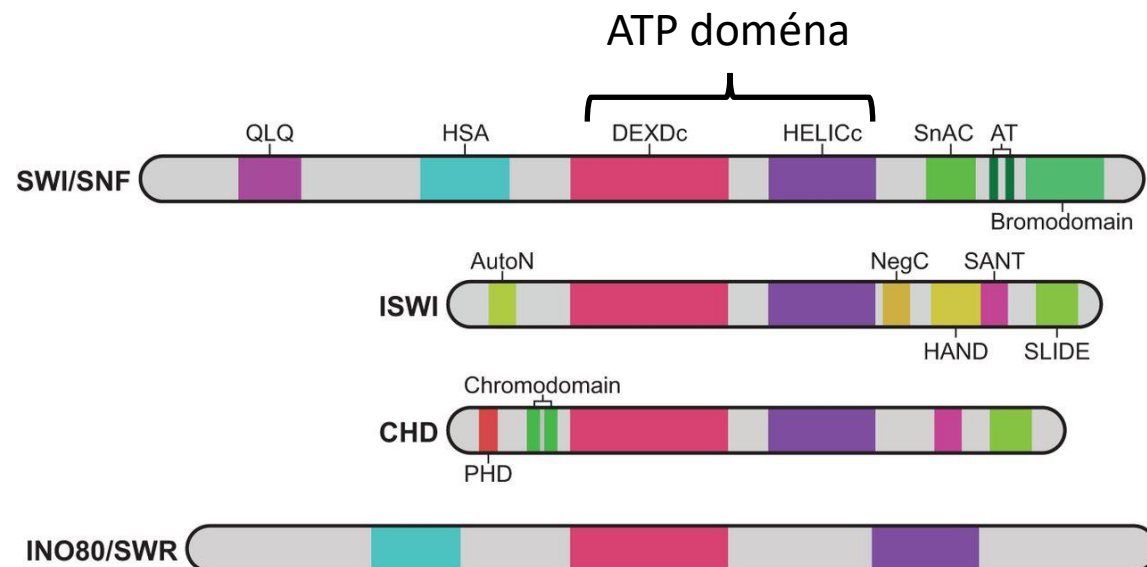


- Remodelující komplexy umožňují vyšší dostupnost transkripčním faktorům
  - Pohyb nukleozomu
  - Odstranění nukleozomu
  - Výměna za specifickou histonovou variantu (CENP-A, H3.3,  $\lambda$ -H2AX...)
- Sestavení nukleozomu
- Nukleozomová frekvence

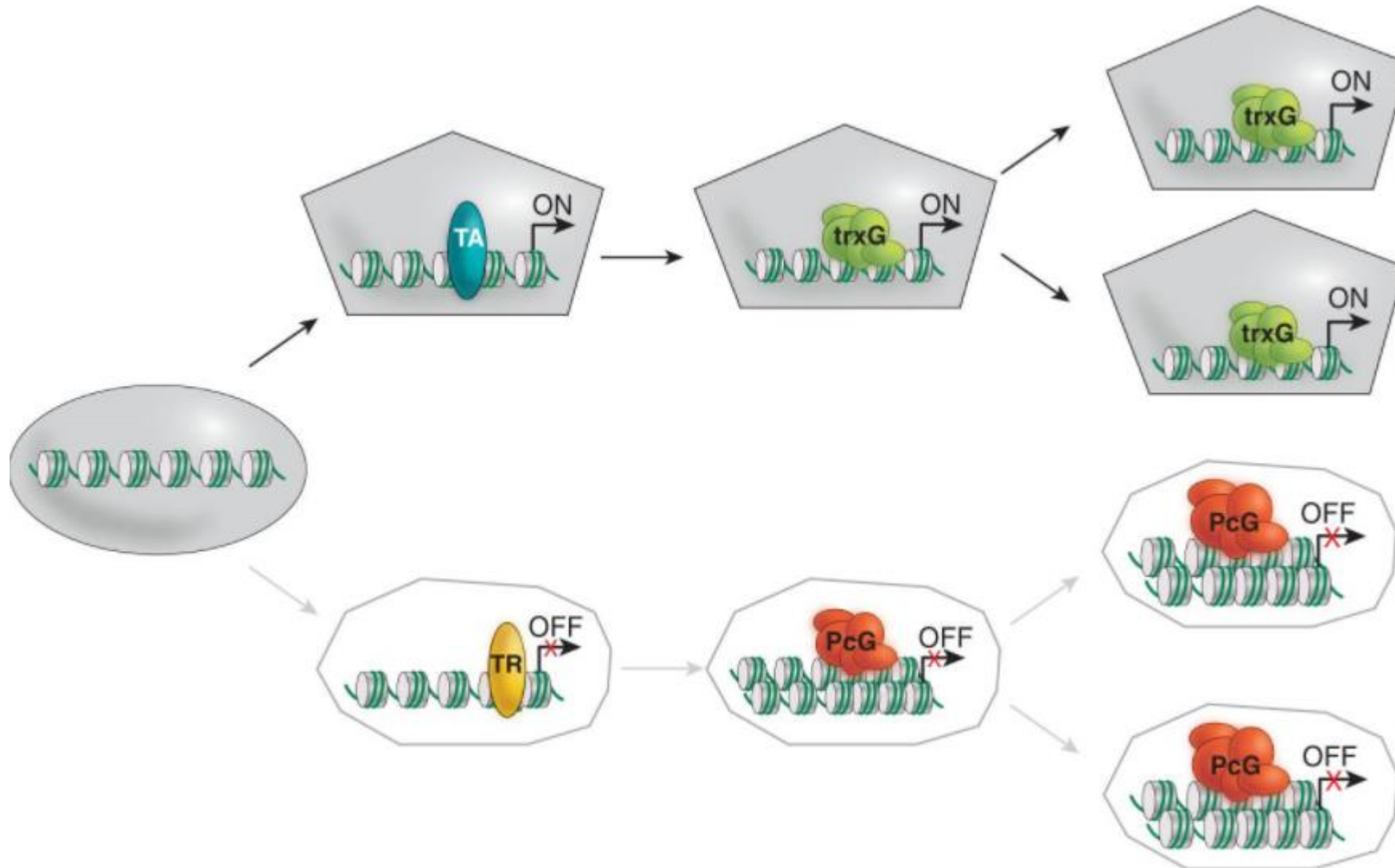


# Srovnání chromatin remodelujících proteinů

- ATP-dependentní domény jsou typické pro všechny členy, ostatní domény rozlišují enzymy do jednotlivých pod-rodin
- Každý enzym se váže s několika dalšími podjednotkami vytvářející multi-proteinové komplexy, které mění pozici nukleozomu nebo jejich strukturu

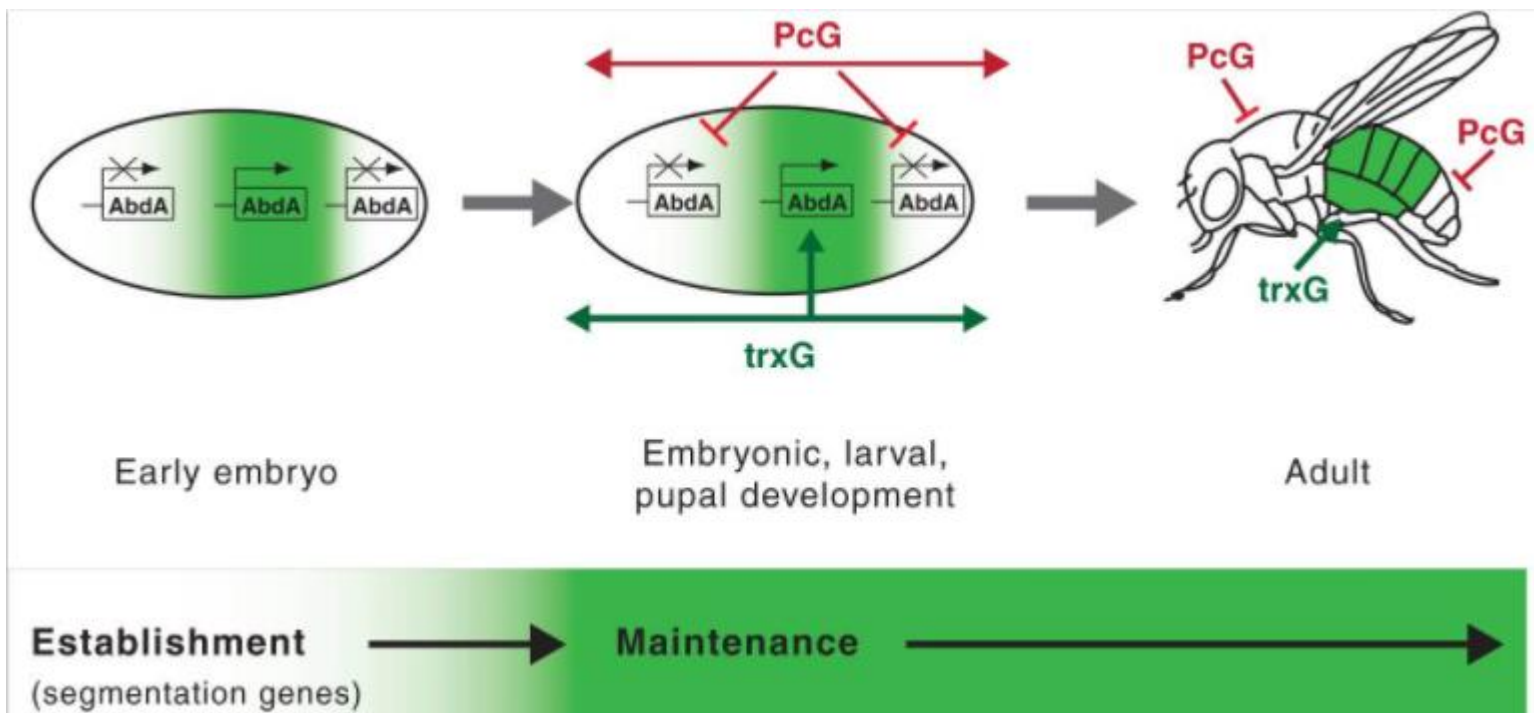


# Koncept buněčné paměti

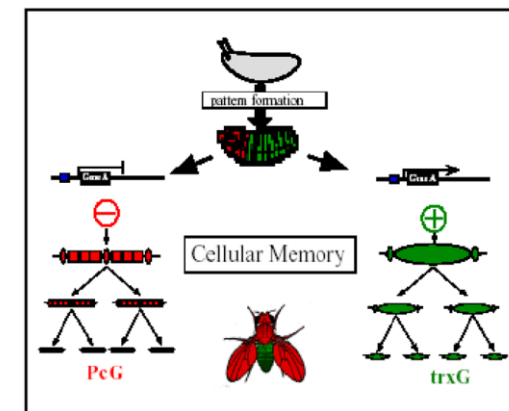
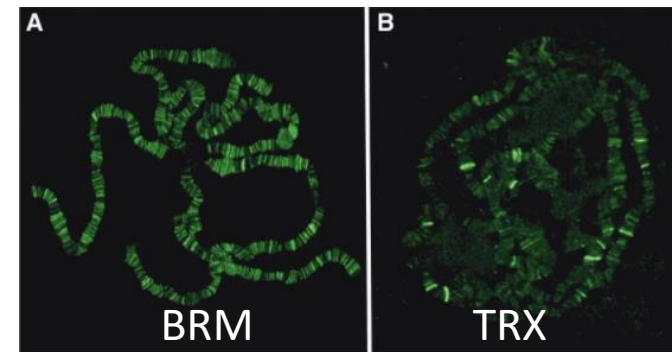


# Úloha segmentačních proteinů Thritorax a Polycomb při vývoji larvy drozofily

- Hranice *abd-A* a ostatních *Hox* genů jsou nastaveny paměťovými proteiny *trxG* a *PcG* a „off“ „on“ expresním stavem, dělicích embryo do 14 segmentů



BRM je asociován s RNA PolII

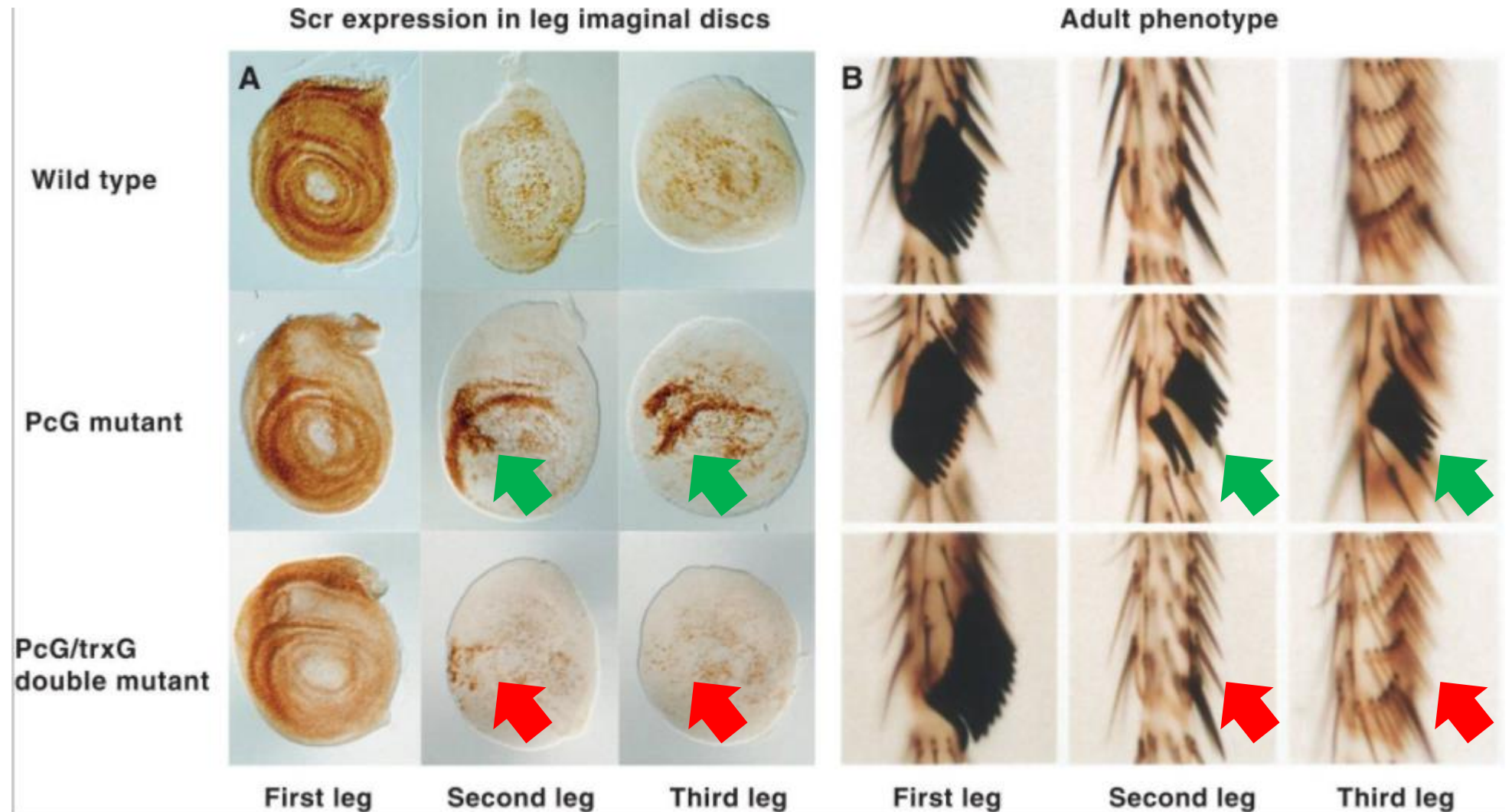


# trxG mutace blokuje derepresi Hox genů v PcG mutantech

- Normální vývoj

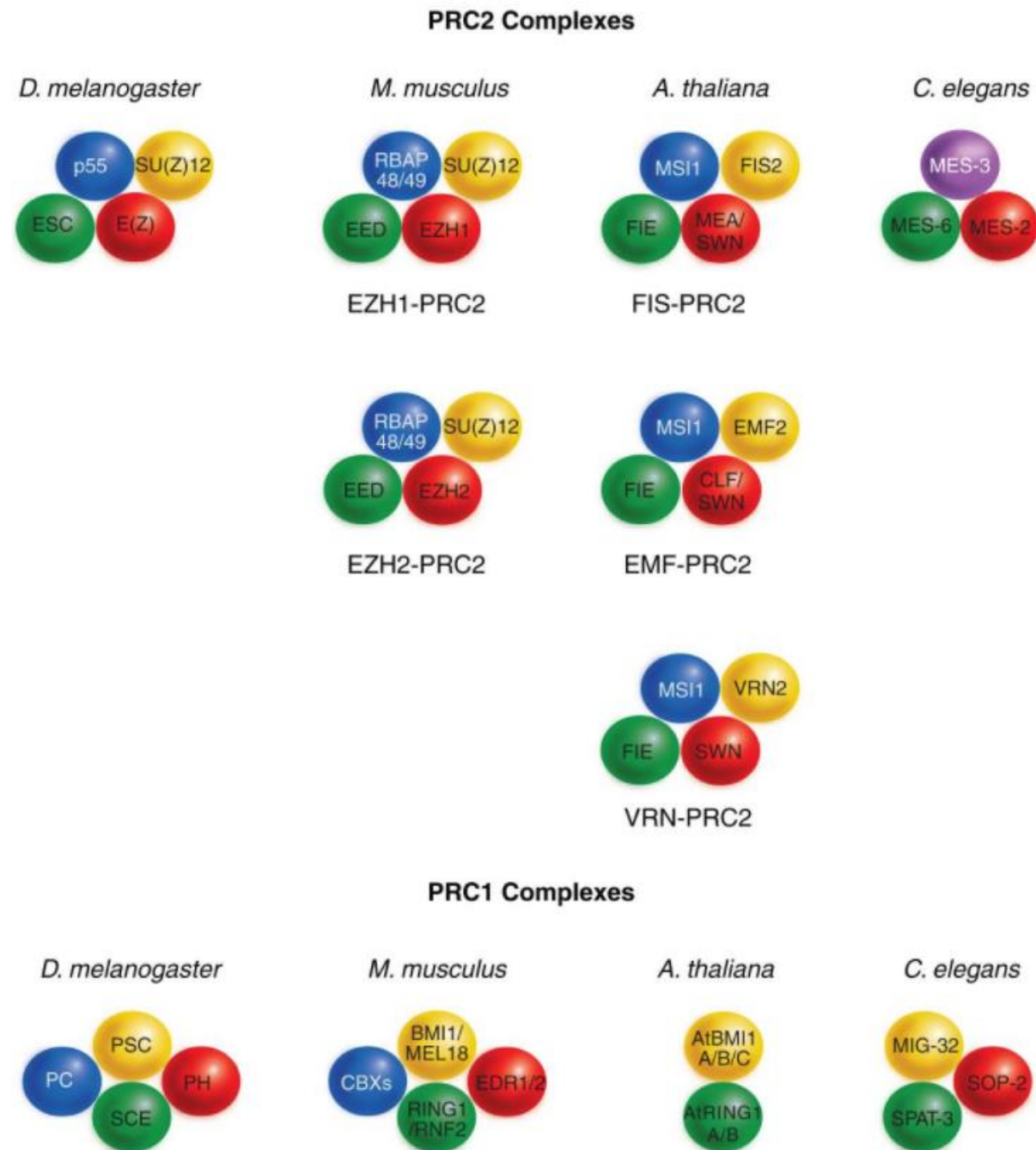
- Aktivace Hox genů v PcG mutantech

- Absence Hox genů v důsledku mutace trxG



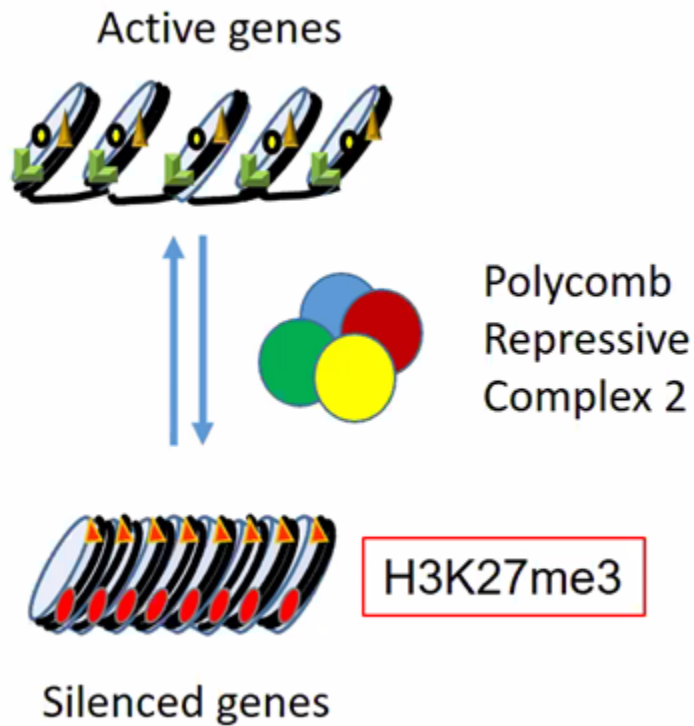
# Polycomb proteiny





- „Polycomb group“ – multiproteinové komplexy, udržují expresi během vývoje u živočichů a rostlin udržením buněčné paměti na úrovni transkripčního umlčení
- Tři zástupci, evolučně konzervované
  - PRC1 – Polycomb Repressive Complex 1 (H3K27me2 a H3K27me3)
  - PRC2 – Polycomb Repressive Complex 2 (H2AK119Ub1)
  - PhoRC – Pho Repressive Complex (vazba a specifikace PcG1 a PcG2)



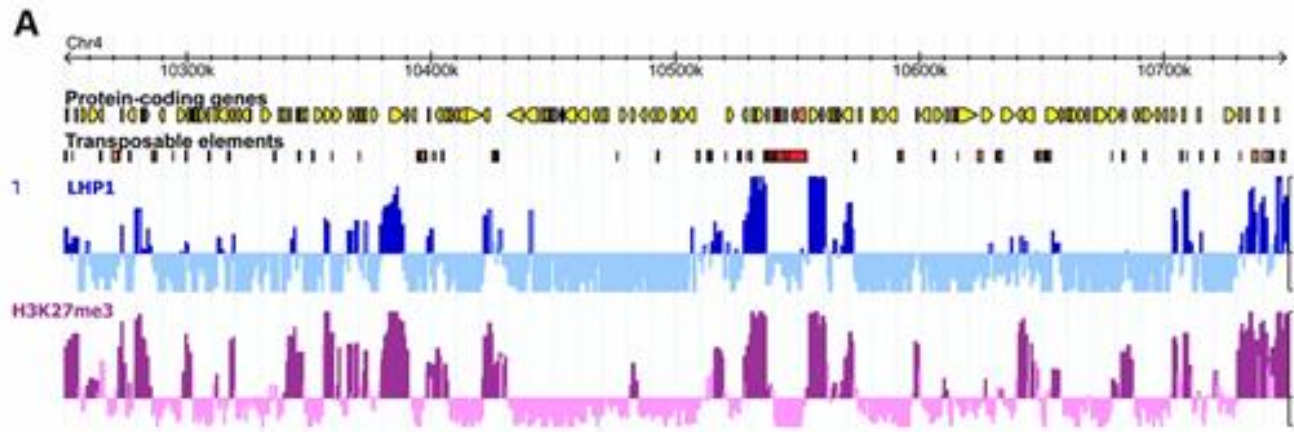
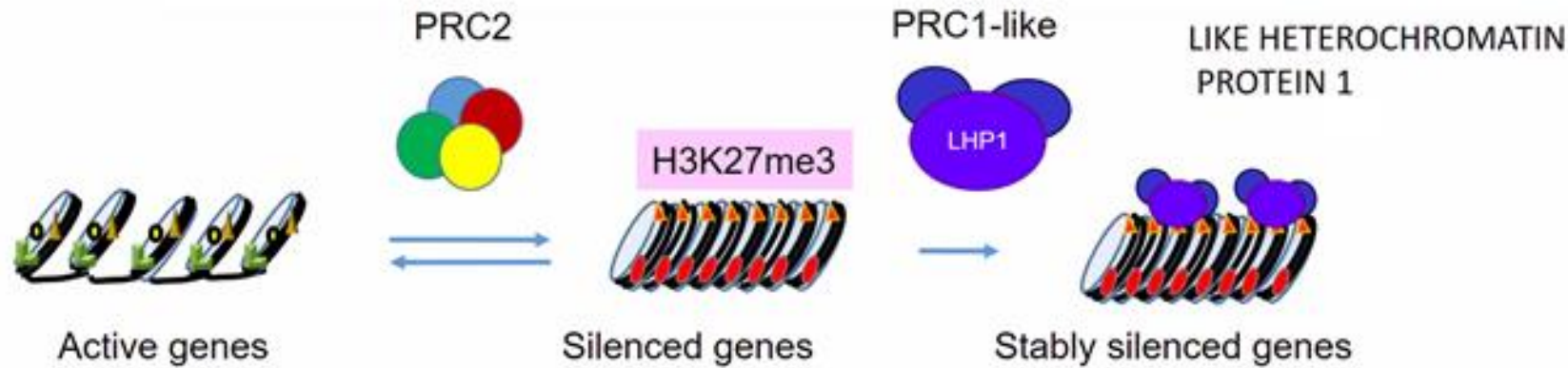


# Srovnání PRC2 komplexu a udržení H3K27me3 u rostlin a drozofily



Drosophila PRC2			
			
E(Z) (methylase)	ESC	SU(Z)12	NURF55
Arabidopsis PRC2			
CURLY LEAF (CLF)	FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)	FERTILIZATION- INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)	MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1,2,3,4,5)
MEDEA (MEA)		EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2)	
SWINGER (SWN)		VERNALIZATION 2 (VRN2)	

# Význam H3K27me3 při regulaci genové aktivity

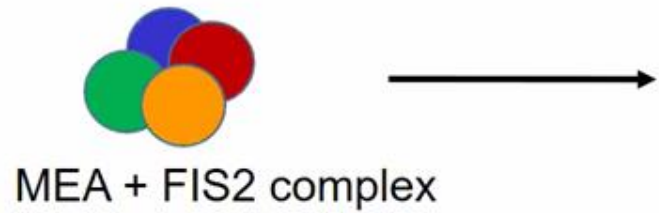


LHP1 binds specifically to H3K27me3

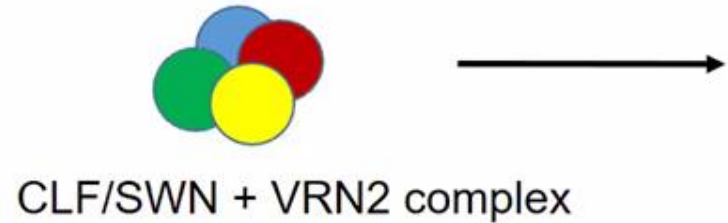
# Obsah

- Epigenetické reprogramování
  - Vývojové epigenetické změny u savců
  - Epigenetické změny navozené umělým zásahem
  - Vývojové epigenetické změny u rostlin
- Chromatin-remodelující proteiny – funkce histonové informace
- Paměťové proteiny a jejich funkce
  - Polycomb
  - Thiritorax
- Vývojové epigenetické změny u rostlin
  - Paramutace, RNAi
  - Úloha PcG proteinů

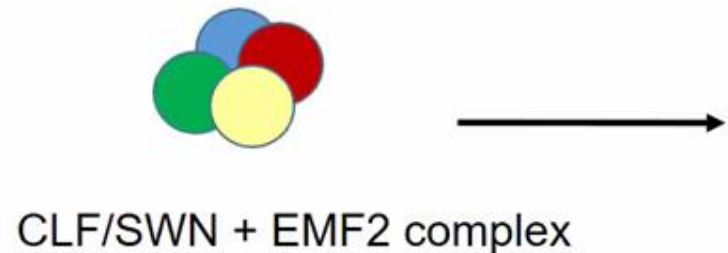
# Úloha PRC2 komplexů při rostlinném vývoji



Vývoj semen

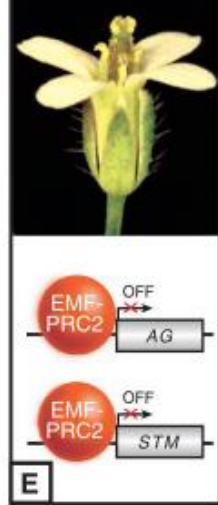
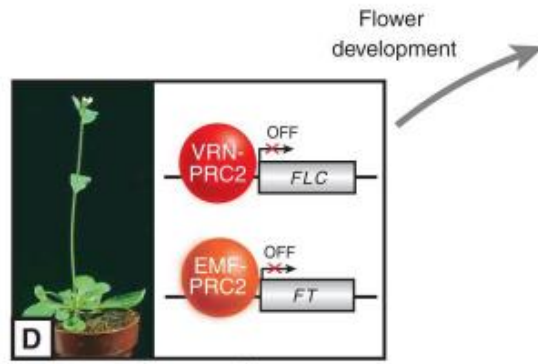


Tranzice kvetení



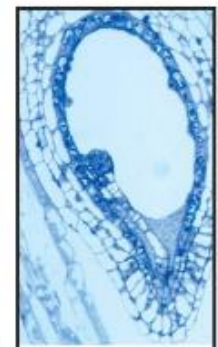
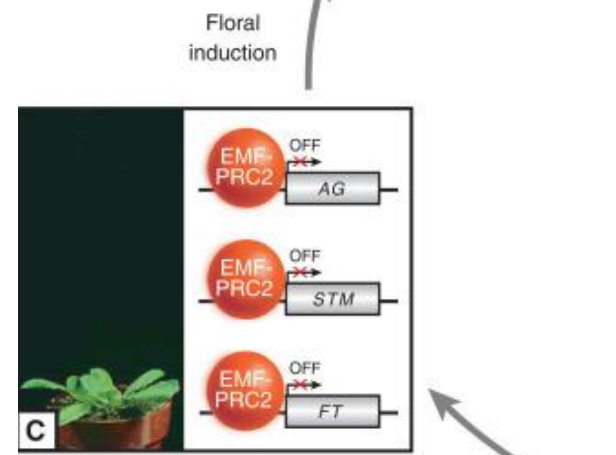
Květní organogeneze

VRN PRC2 spouští kvetení  
 umlčením květního  
 represoru *FLC*, EMF PRC2 je  
 uvolněn z *FT* genu=kvetení je  
 zahájeno

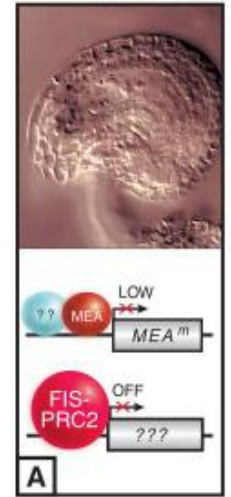


EMF PRC2 reguluje expresi  
*STM* a *AG* genů, které řídí  
 květní determinaci a identitu  
 květních orgánů/vývin  
 květních orgánů

EMF-PRC2 je represor *FT*  
 alely regulující kvetení a  
 květních genů *AG+STM*



Vegetative  
 growth



FIS-PRC2 kontroluje expresi  
 neznámého faktoru, který  
 kontroluje dělení centrální  
 buňky (*fiss*  
 mutace=proliferace), *MEA* je  
 potřebný k nízké expresi  
 matMEA

FIS-PRC2 kontroluje dělení  
 embrya a endospermu po  
 oplození, udržuje nízkou  
 expresi mat genu *PHE1*,  
 udržuje/podílí se na utišení  
*patMEA* alely+a obou alel  
*FUS3*

Fertilization

# Kontrola kvetení epigenetickým reprogramováním

## Resetting *FLC* expression:

Silenced during gamete formation

Reactivated during fertilization or early embryogenesis

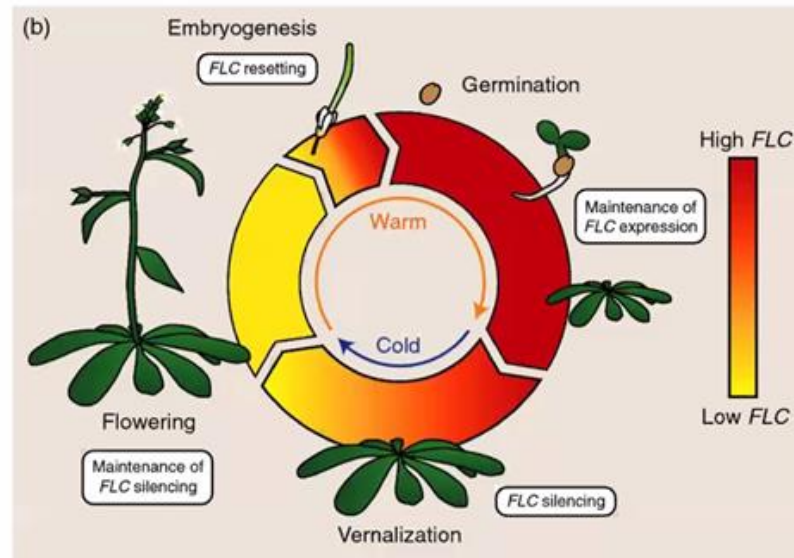
SWR1 incorporates H2A.Z variant

## *FLC* maintained silenced:

Association with LHP1

FT is expressed

Flowering is induced



## *FLC* expression:

H4 acetylation, H3K4me,

H3K36me, H2A.Z incorporation

## *FLC* silencing

Activating marks removed

Silencing marks (H3K9me, H3K27me3) added

# Proteiny skupiny POLYCOMB

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

*Arabidopsis CURLY LEAF versus AGAMOUS*



Justin Goodrich  
(Edinburgh)



listy  
wild-typu



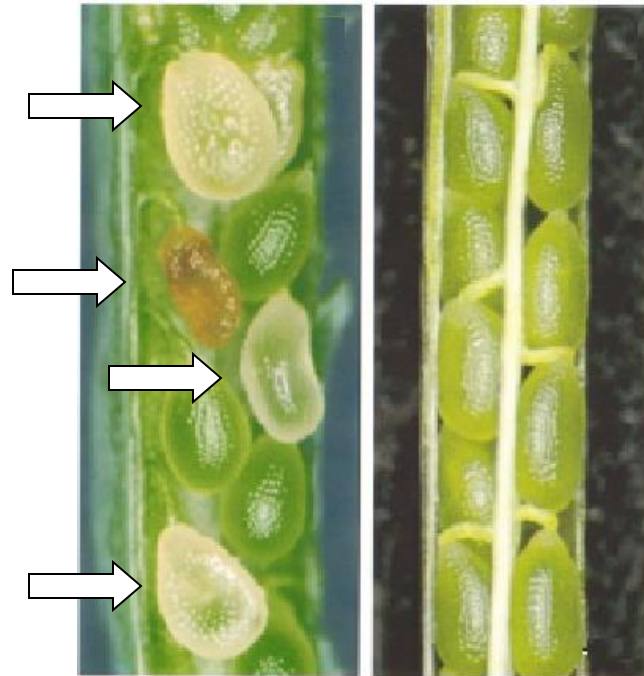
listy mutace *clf* :  
ektopická  
exprese květního  
genu *AG*



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



Ueli Grossniklaus  
(Zurich 1998)

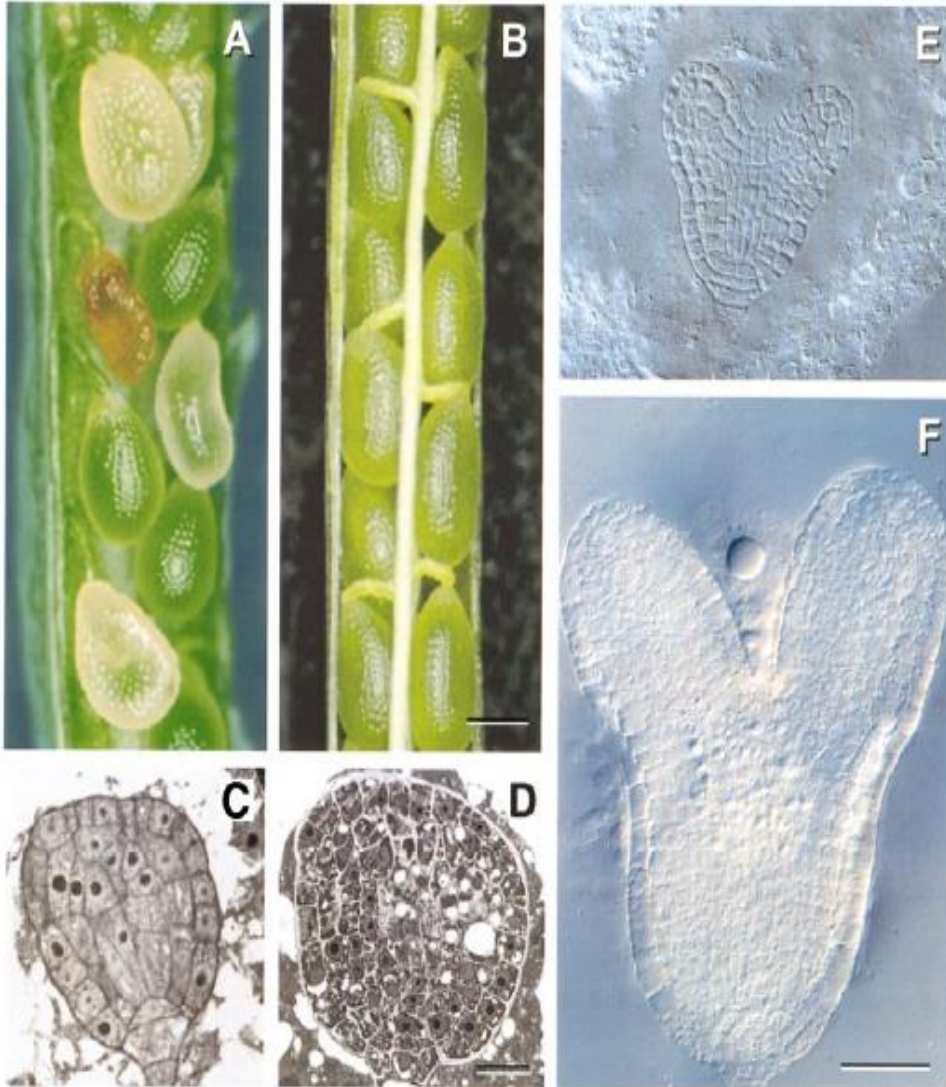


maternální wt-alela: kontrola  
(redukce) embryonální proliferace





# Fenotyp mutace *medea*



- embryo odvozené z vajíčka *medea* nadměrně roste a umírá v průběhu desikace semene
- letalita embrya je nezávislá na paternálním příspěvku a dávce genu
- embryo vykazuje zvýšenou buněčnou proliferaci na úkor endospermu

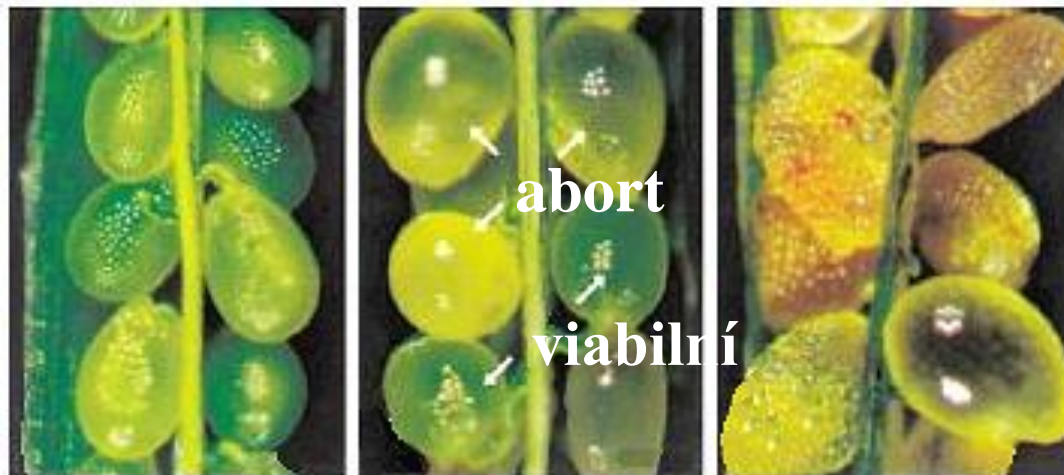
# DEMETER řídí maternální expresi genu *MEDEA*



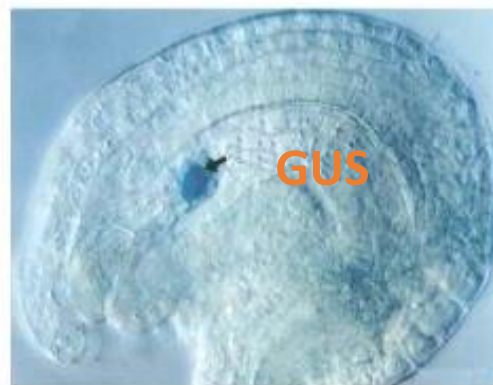
*DME / DME*

*dme / DME*

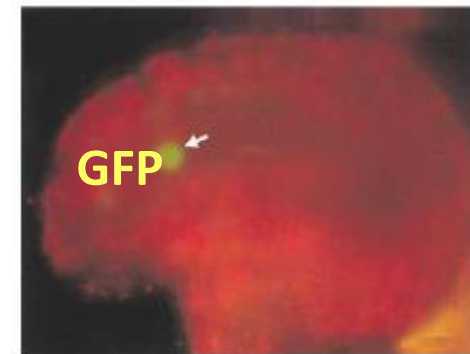
*dme / dme*

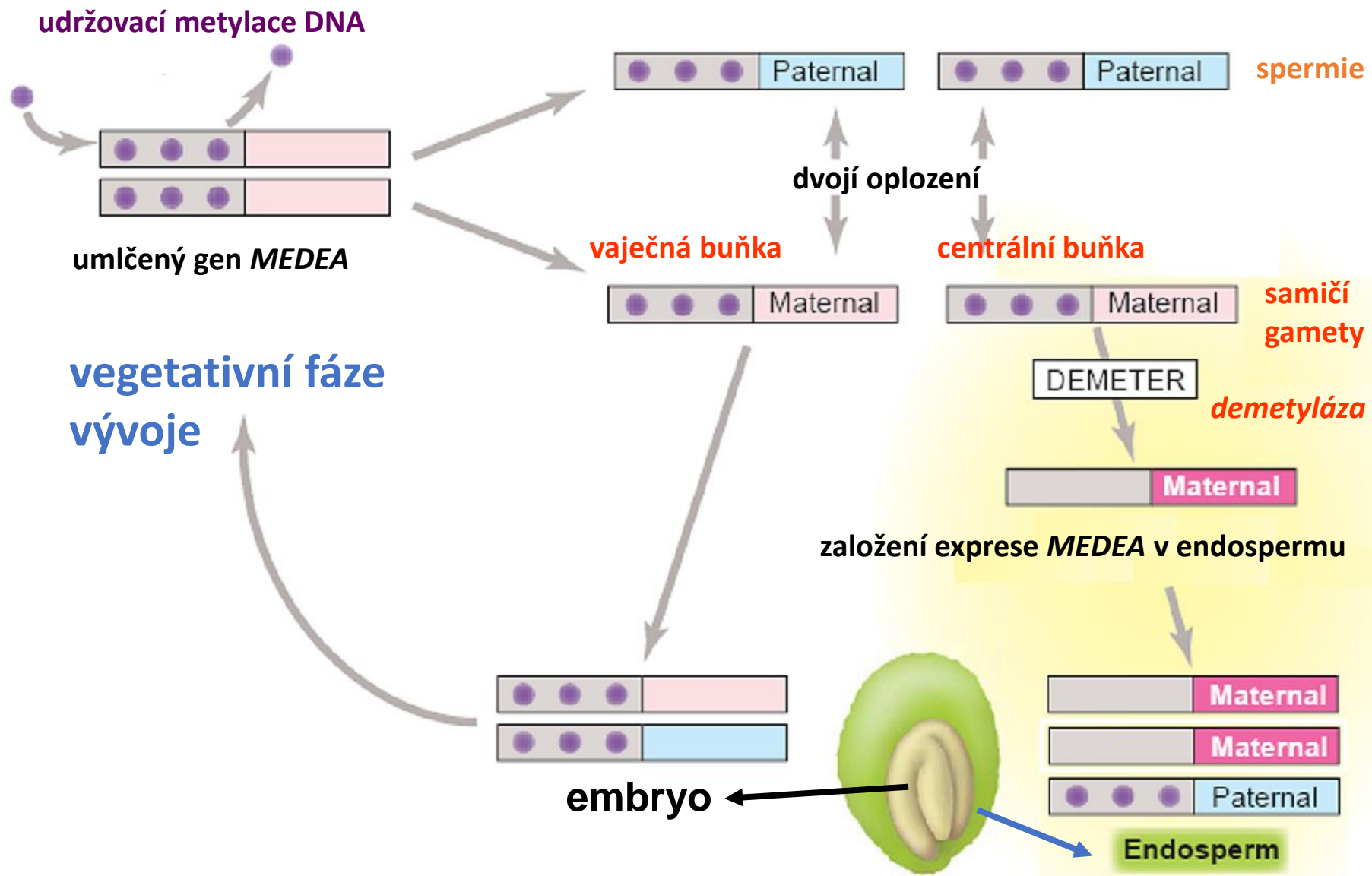


Steve Jacobsen  
(UCLA 2002)



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





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

# Imprintované geny u rostlin

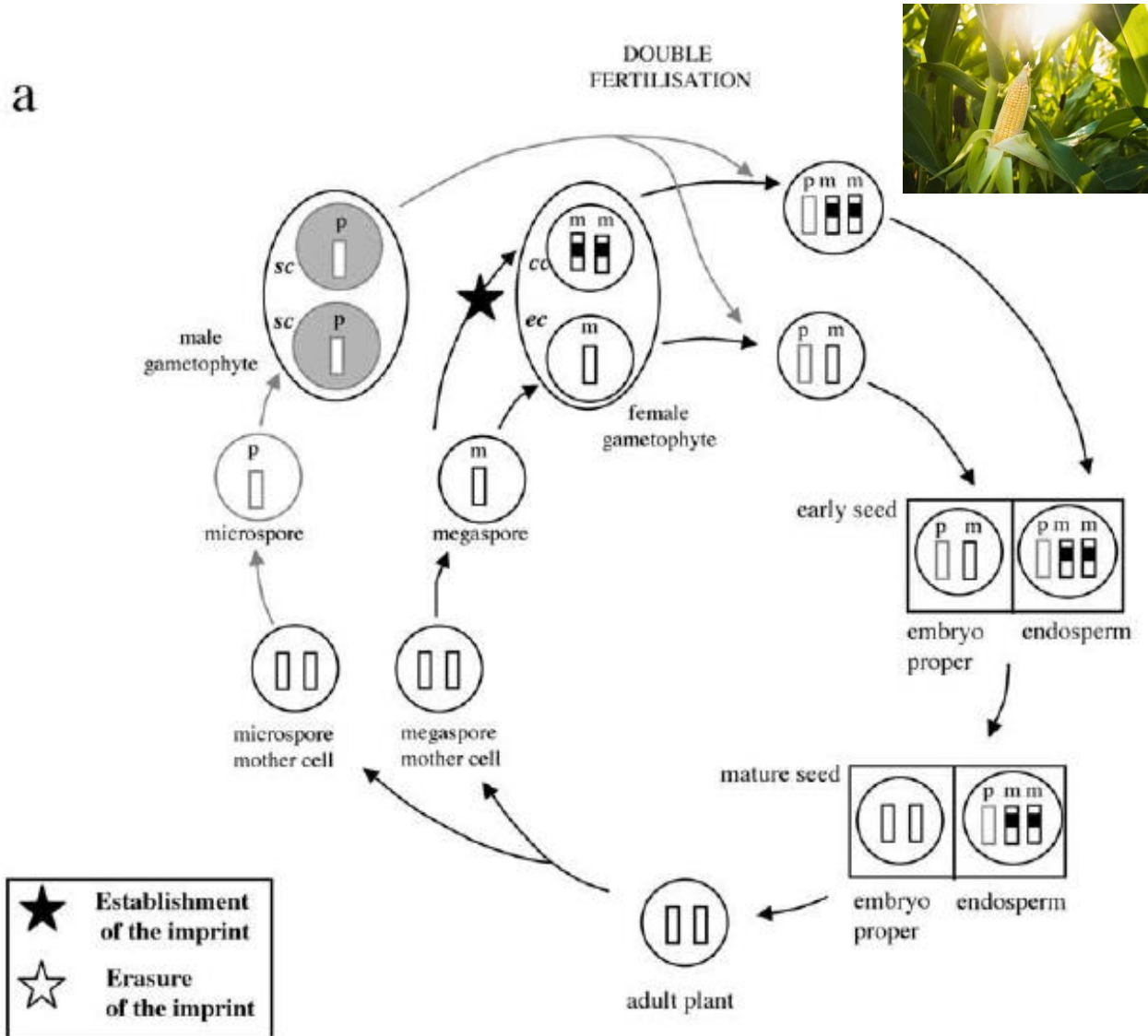
---

<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>

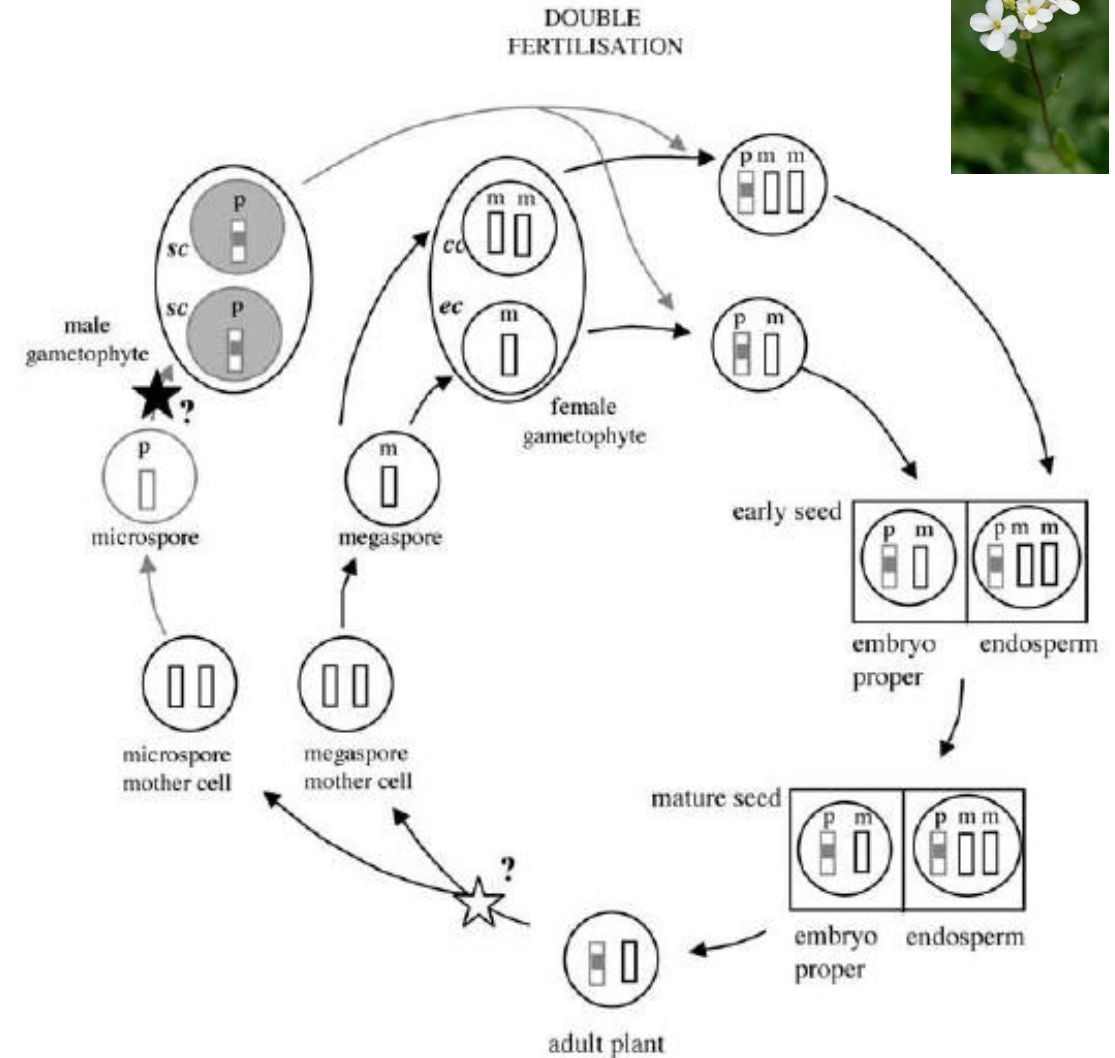
---

Imprinting v endospermu *r1* a *dzt-1* lokusů, *zein* a *tubulin* genů

a



Imprinting genu *MEDEA*



**Děkuji za pozornost!**