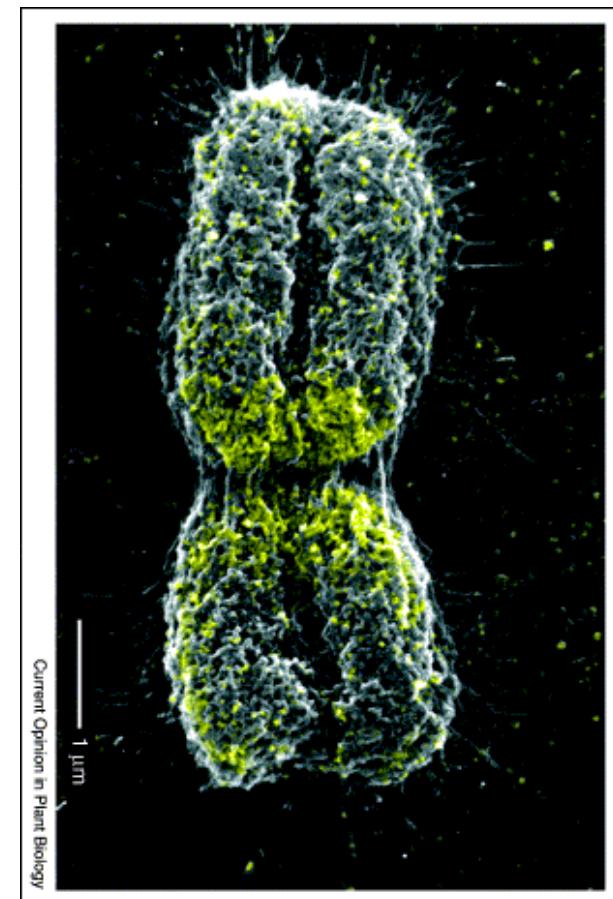


Štruktúra a funkcia eukaryotického chromozómu

- ▶ Úroveň skladania chromozómu
- ▶ Vplyv stupňa kondenzácie chromozómu na aktivitu génov;
- ▶ inaktivácia X chromozómu a kompenzácia génovej dávky; základné princípy epigenetiky, histónový kód.

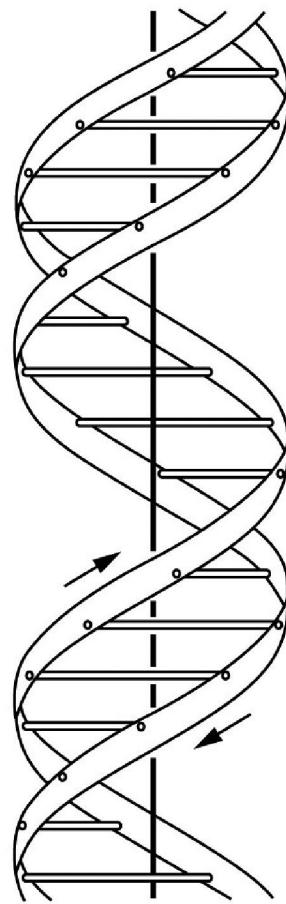


DNA u eukaryotov

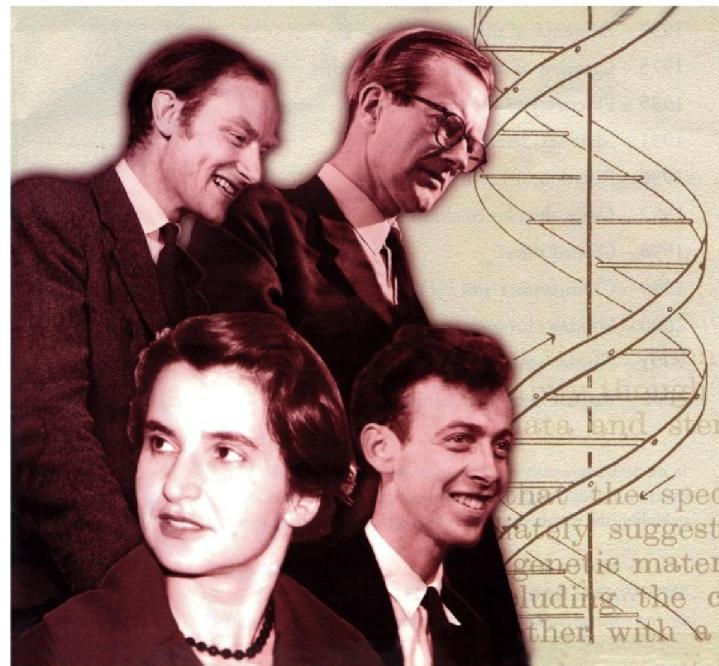
- ▶ Lokalizovaná v najmä jadre - 1869 Friedrich Miescher
- ▶ DNA asociovaná s proteínmi - 1870 - **chromozómy**: vláknité útvary v bunkovom jadre, ktoré sa delia a putujú do dcérskych buniek počas delenia bunky (z gréckych slov χρωμα (*chroma*, farba) a σωμα (*soma*, útvar))
⇒ chromozómová teória dedičnosti

DNA je genetickým materiálom buniek –

- ▶ 1943 Averyho-MacLeodov-McCartyho experiment
- ▶ 1952 Hershyho a Chaseovej experiment
- ▶ Chargaffove experimenty - pomer adenínu k tymínu a pomer guanínu a cytozínu je v DNA rovnaký
- ▶ 1953 – model DNA ako dvojzávitnice

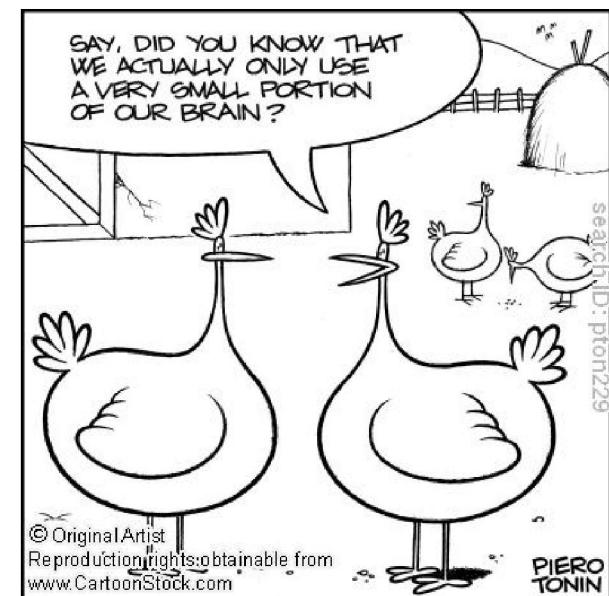
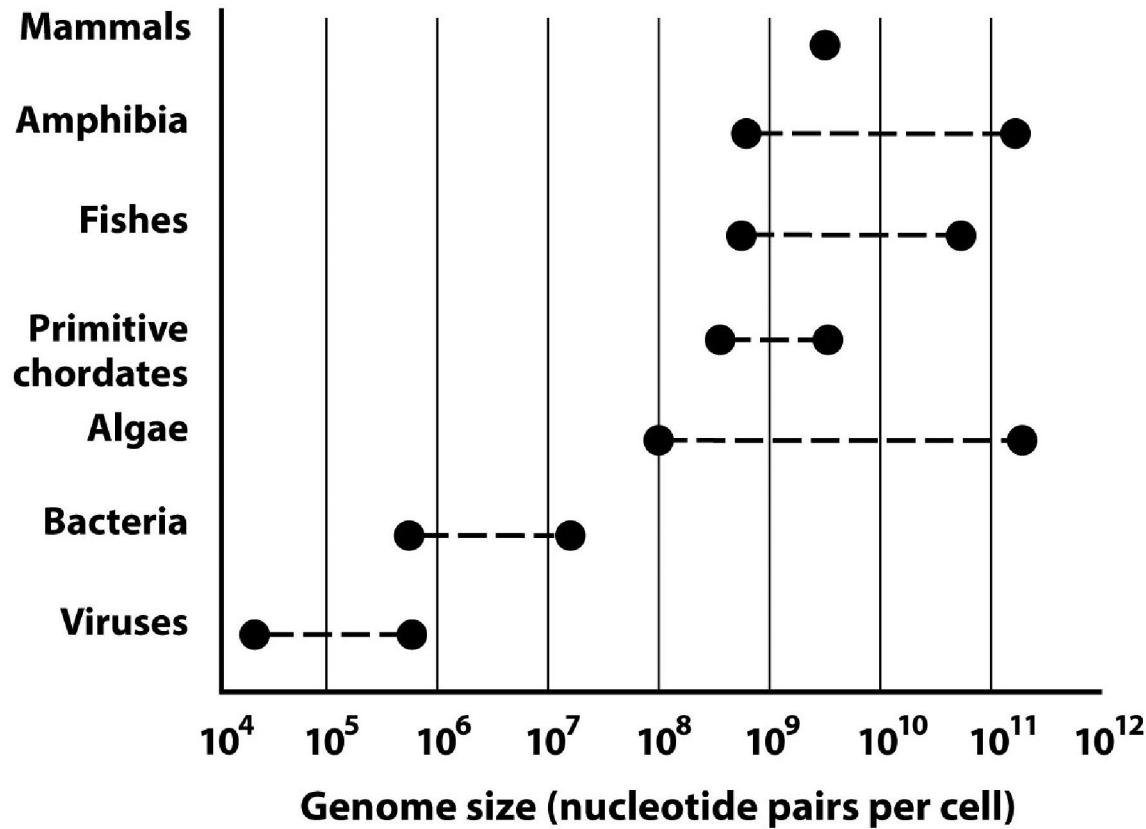


Double helix



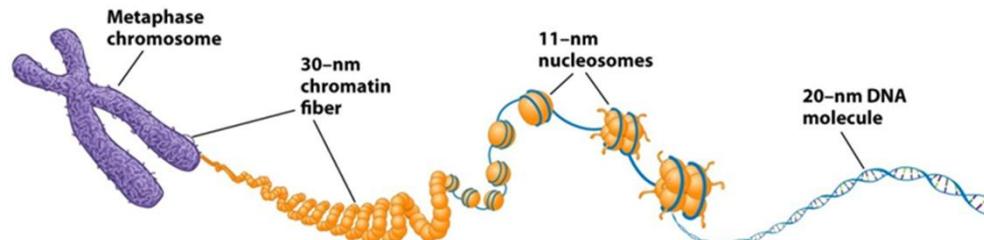
Nobelova cena za fyziológiu a medicínu 1962 pre Francisa Cricka, Jamesa Watsonu a Mauricea Wilkinsa za "their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material".

Vel'kost' genómu a jeho komplexita

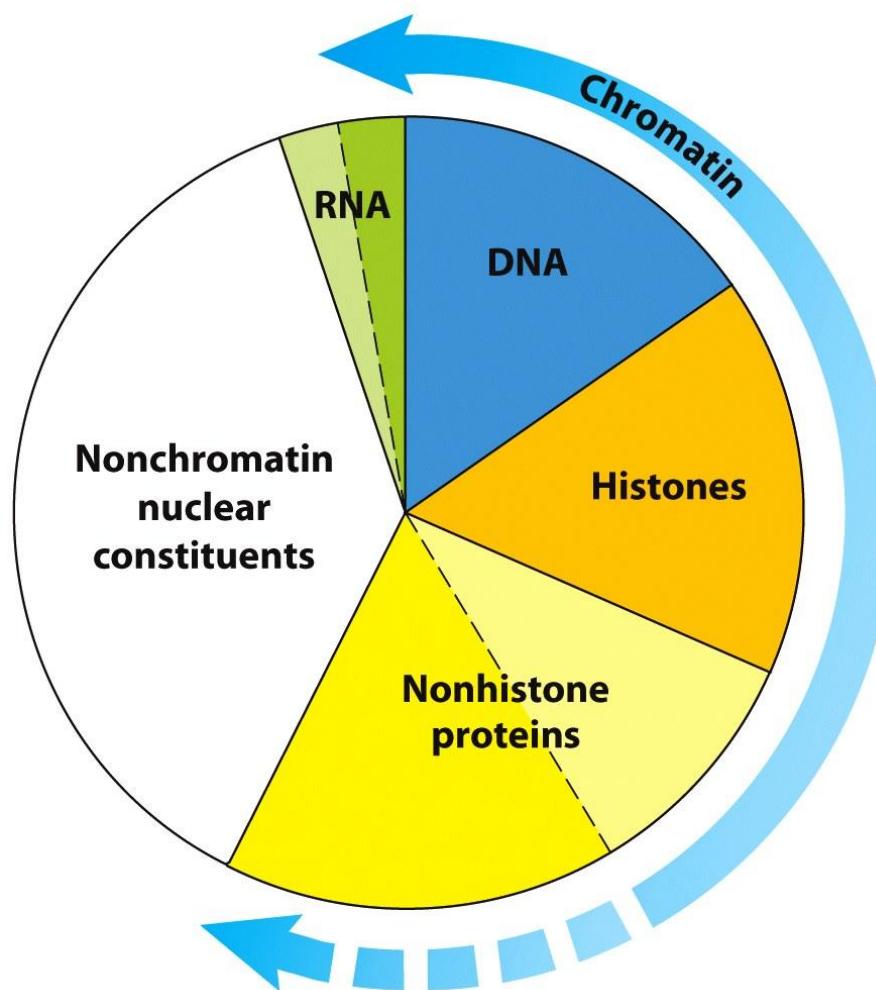


Úrovne skladania chromozómu

- ▶ 1 chromozóm obsahuje 1 až 20 cm DNA (10^4 až 2×10^5 μm)
- ▶ Počas metafázy zbalené do chromozómu s dĺžkou 1 – 10 μm
- ▶ Ako je to možné?

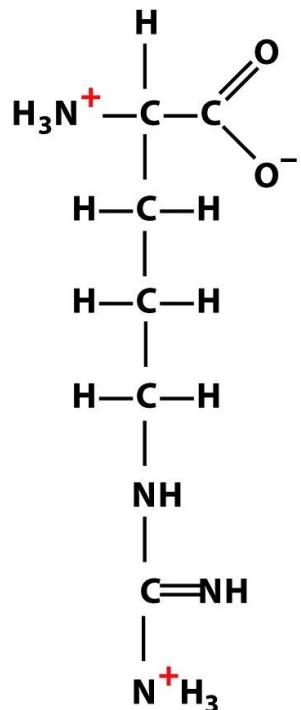


DNA asociovaná s proteínmi – chromatín

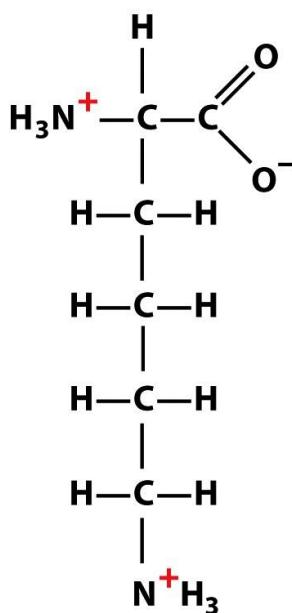


- **Chromatín** – farbitel'ný materiál v bunkovom jadre tvorený nukleoproteínmi a DNA
- Nukleoproteíny – históny a nehistónové proteíny

Histónové proteíny



Arginine

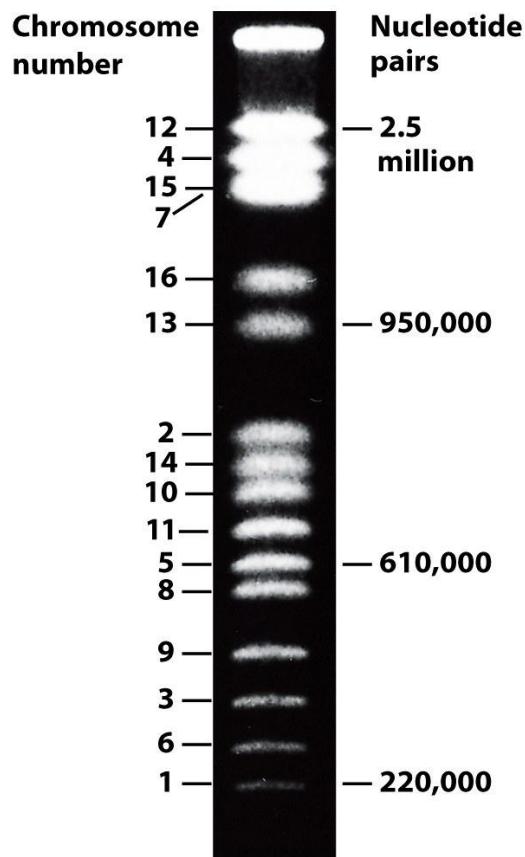


- ▶ Štruktúrna úloha v chromatíne
- ▶ Prítomné v ekvivalentných množstvách ku množstvu DNA
- ▶ Hlavné typy histónov: H1, H2a, H2b, H3 a H4
- ▶ Bázické proteíny (kladne nabité)
- ▶ 20-30% arginín a lyzín
- ▶ Vysoko evolučne konzervované
 - H2A, H2B, H3 & H4 vysoko evolučne konzervované- nájdené vo všetkých eukaryotických jadrach
 - H1 variabilnejší v rôznych druhoch

Eukaryotický chromozóm

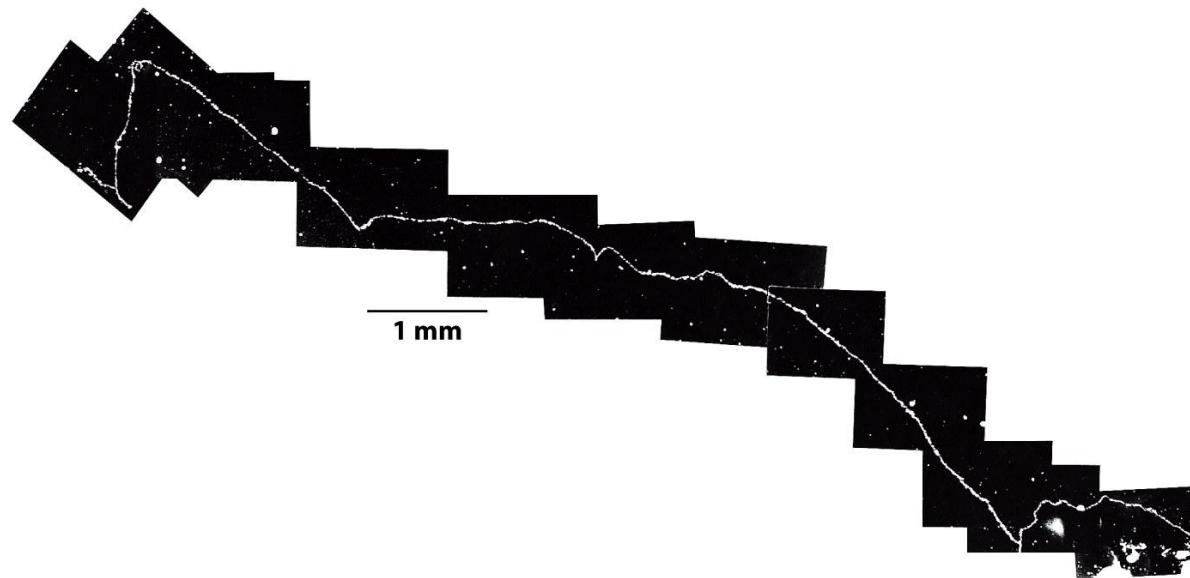
- ▶ Každý chromozóm obsahuje jednu molekulu DNA
- ▶ dôkazy: pulzná elektroforéza
- ▶ autorádiografia

Pulzná gélová elektroforéza môže separovať dlhé molekuly DNA



- ▶ Umožňuje separovať veľmi dlhé molekuly
- ▶ Striedavo sa aplikujú dve elektrické polia kolmo na seba
- ▶ Možno oddeliť jednotlivé chromozómy

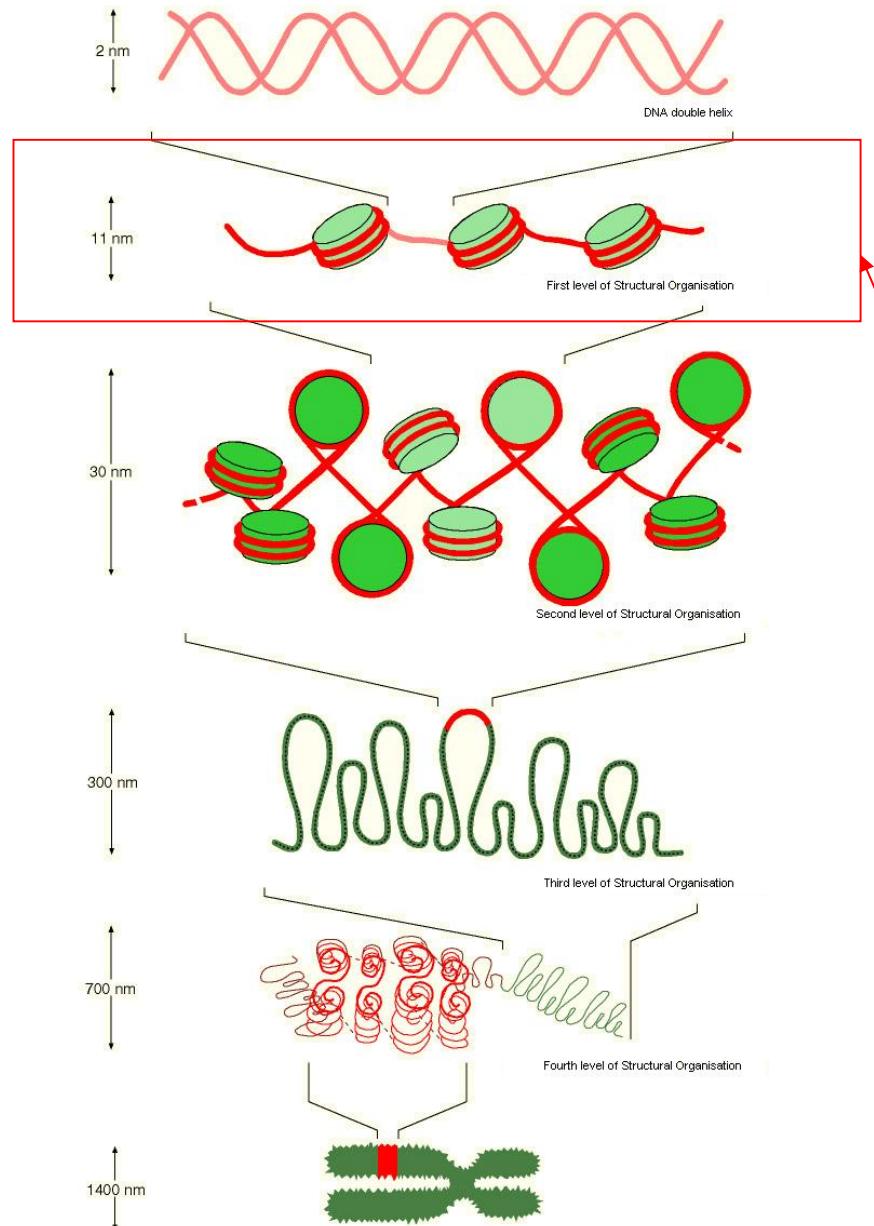
Autoradiography



- ▶ DNA is labeled with ^{3}H -thymidine, spread on a microscope slide, and covered with emulsion.
- ▶ Molecules nearly as long as a *Drosophila* chromosome are observed.
- ▶ These data support that each chromosome is one molecule of DNA.

Úrovne skladania chromozómu

- ▶ 1 chromozóm obsahuje 1 až 20 cm DNA (10^4 až 2×10^5 µm)
- ▶ Počas metafázy zbalené do chromozómu s dĺžkou 1 – 10 µm
- ▶ Ako je to možné?



Prvý stupeň
zbal'ovania DNA

-

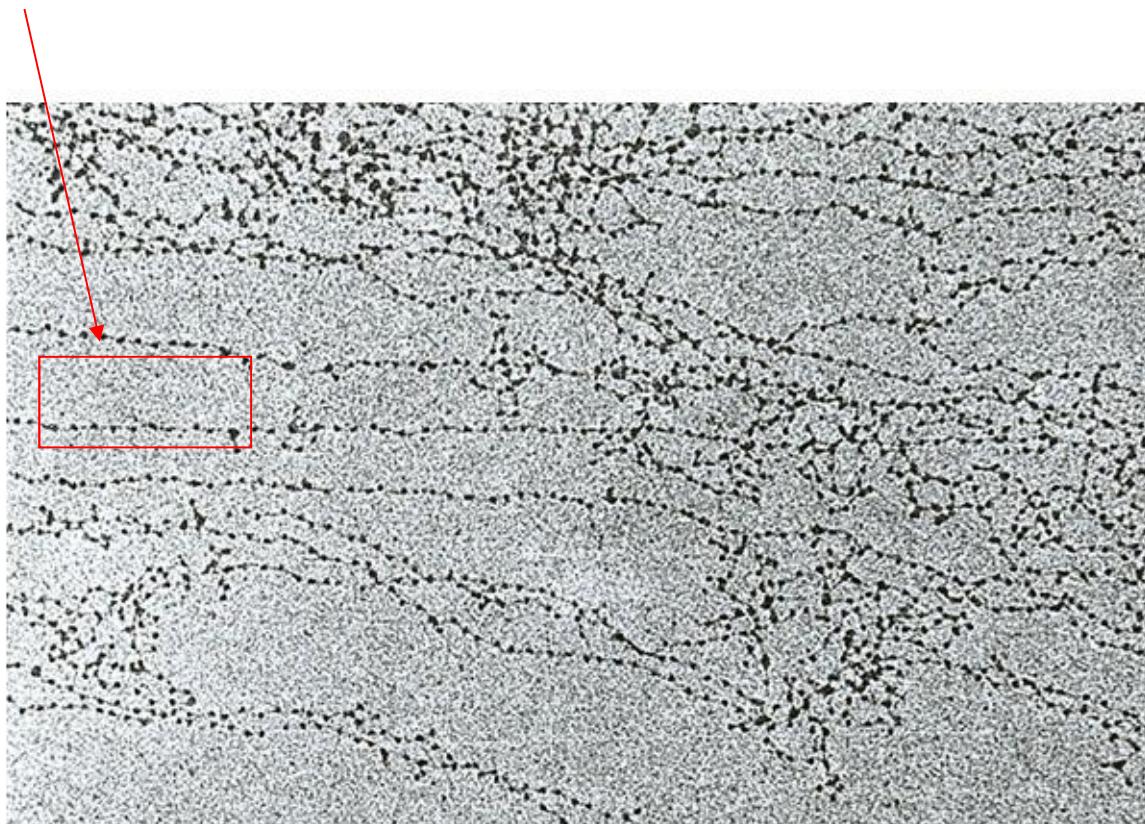
11 nm vlákno

beads-on-a-string

⇒ korálky na šnúrke

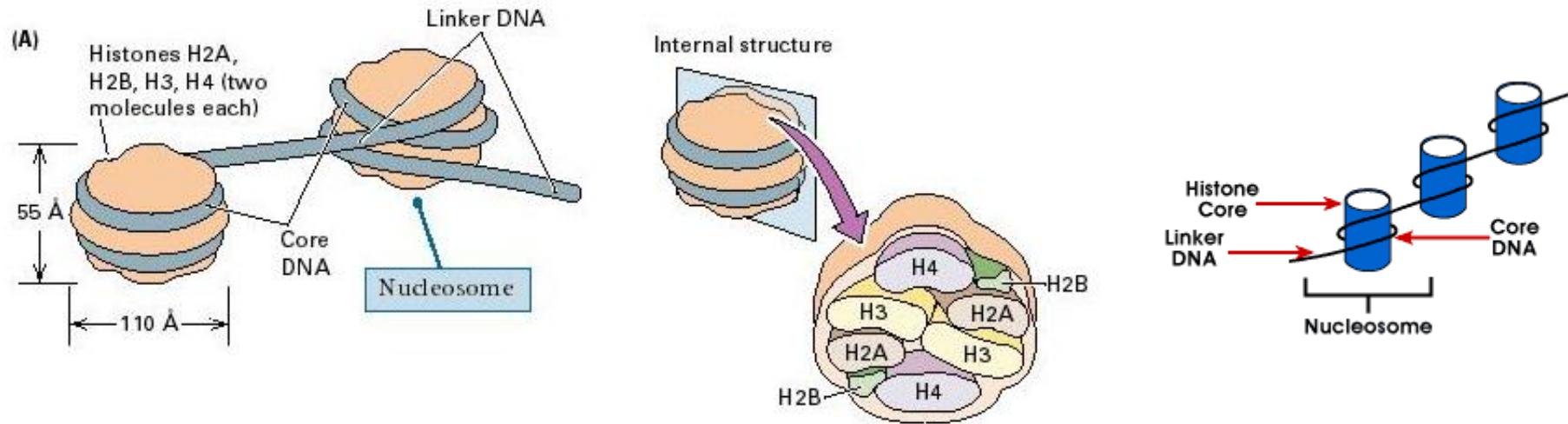
Pozorovania elektrónovým mikroskopom

- ▶ 10nm vlákno, „korálky na šnúrke“

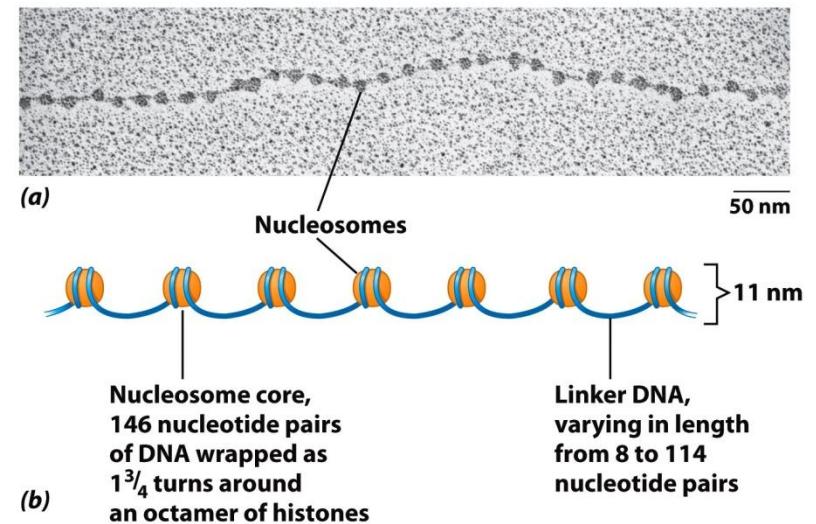


Courtesy of Dr. B. Hamkalo, University of California, Irvine. Noncommercial, educational use only.

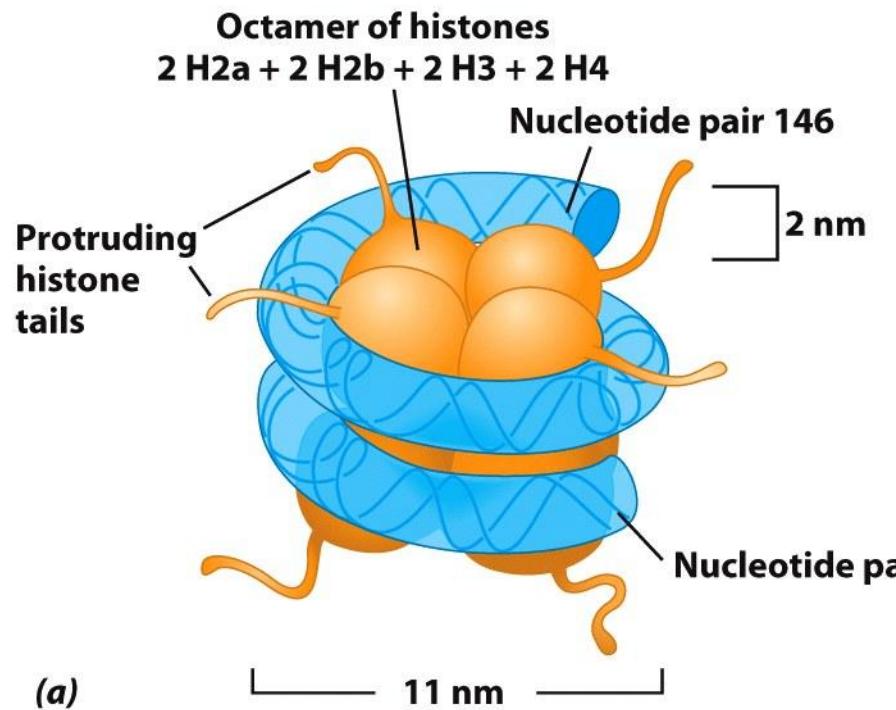
Nukleozóm – základná štruktúrna jednotka chromatínu



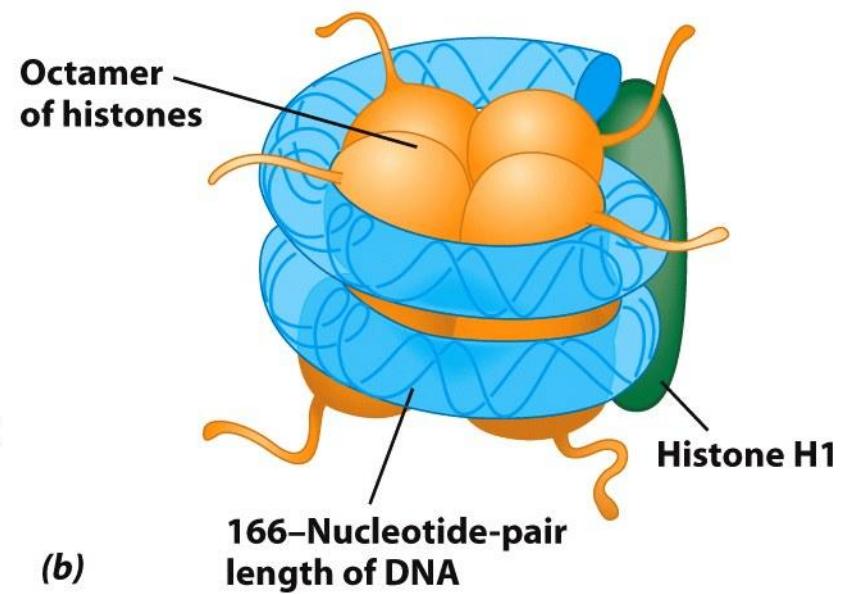
- Priemer nukleozómu 11 nm
- DNA (147 bp) sa otáča 1,65 krát okolo histónového oktaméru (po dve molekuly H2A, H2B, H3 a H4)
- Linkerová DNA = 8-114 bp (zvyčajne 55 bp)



Nucleosome core

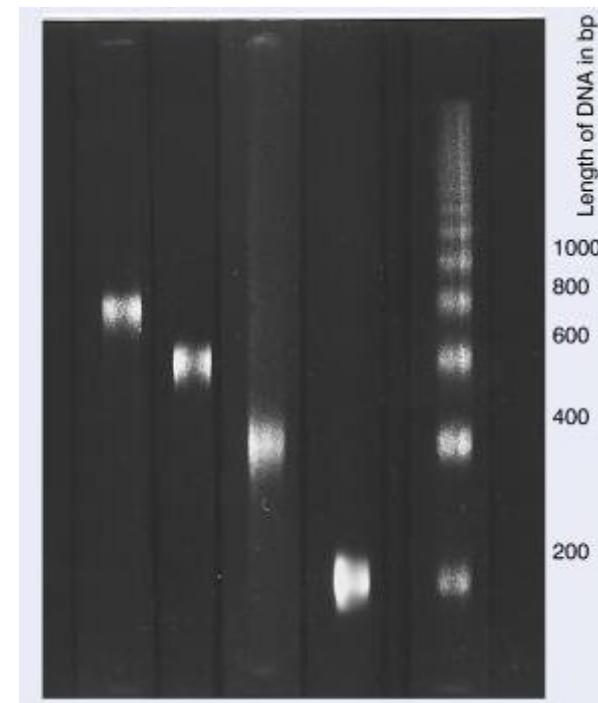


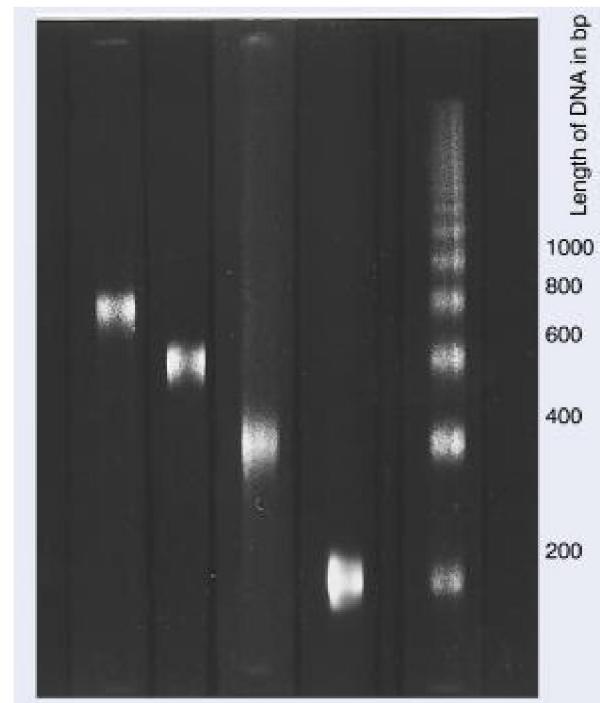
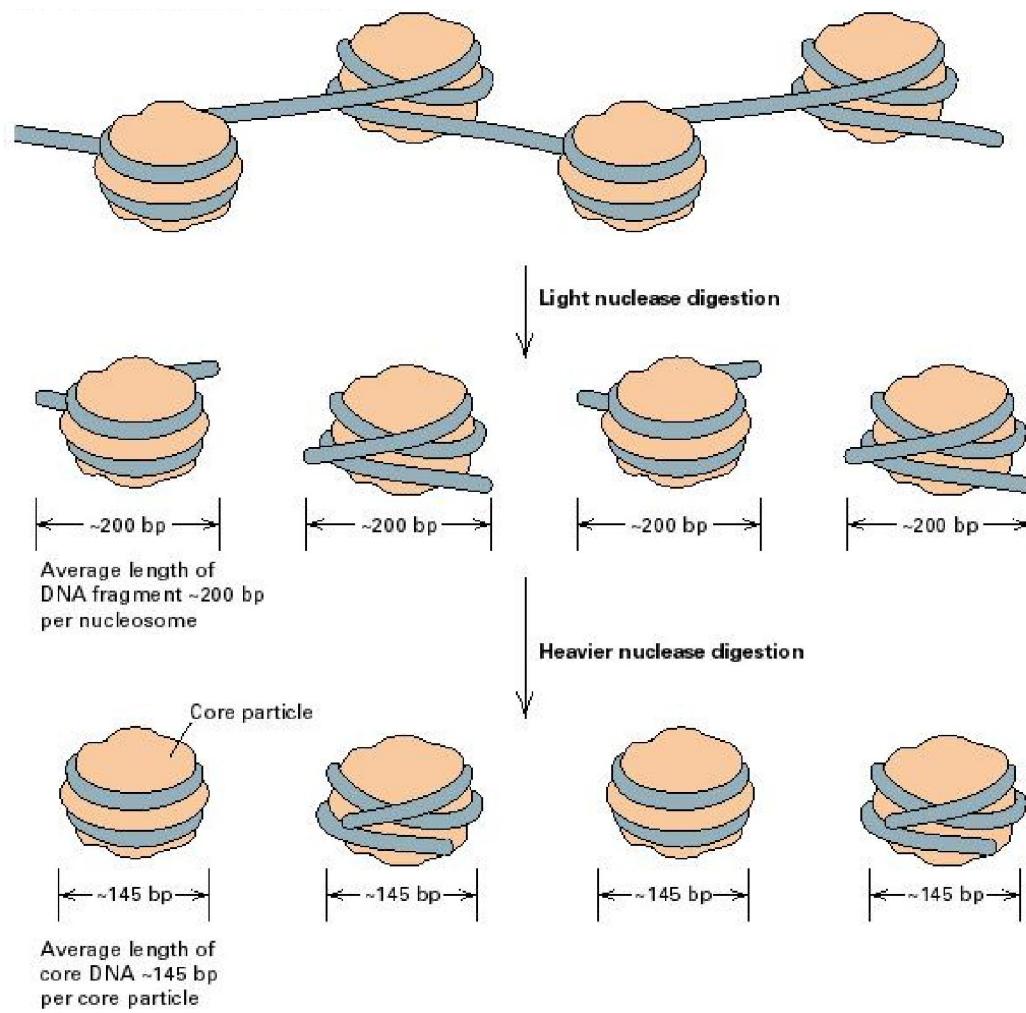
Complete nucleosome

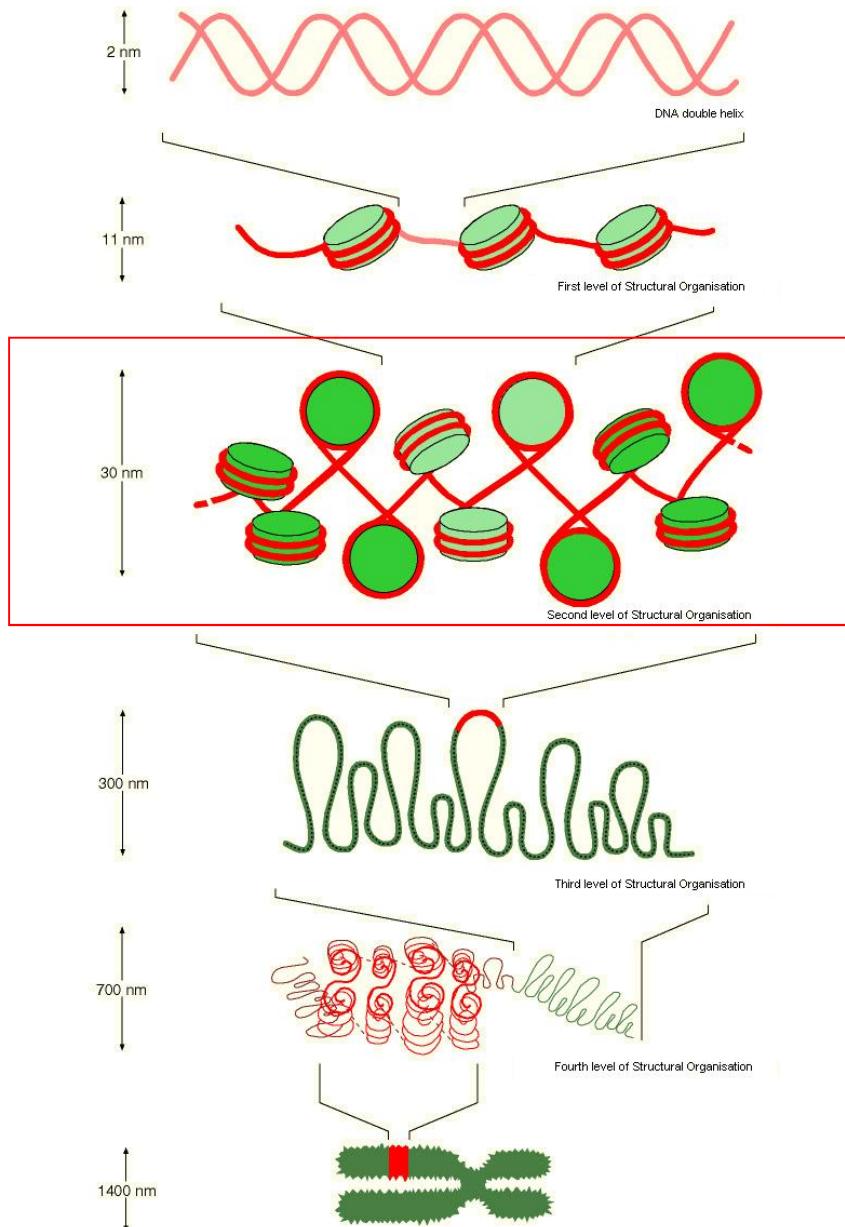


- ▶ Experiment: štiepenie DNA s nukleázou
- ▶ Elektroforéza štiepeného chromatínu

- Pravidelné rozloženie bandov na géli, cca každých 200 bp
- Históny sú rovnomerne distribuované na DNA a v miestach, kde sa viažu na DNA ju chránia pred účinkami nukleáz.







Druhý stupeň
zbal'ovania DNA

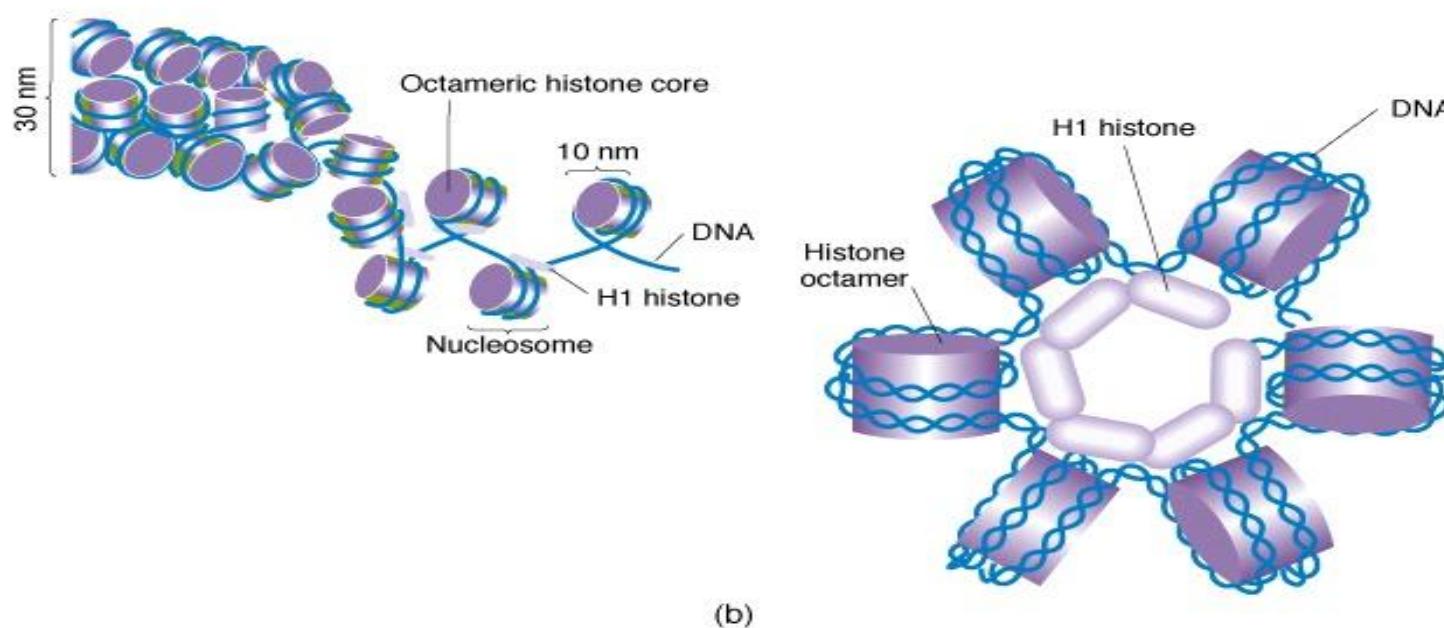
–
30 nm vlákno

solenoid

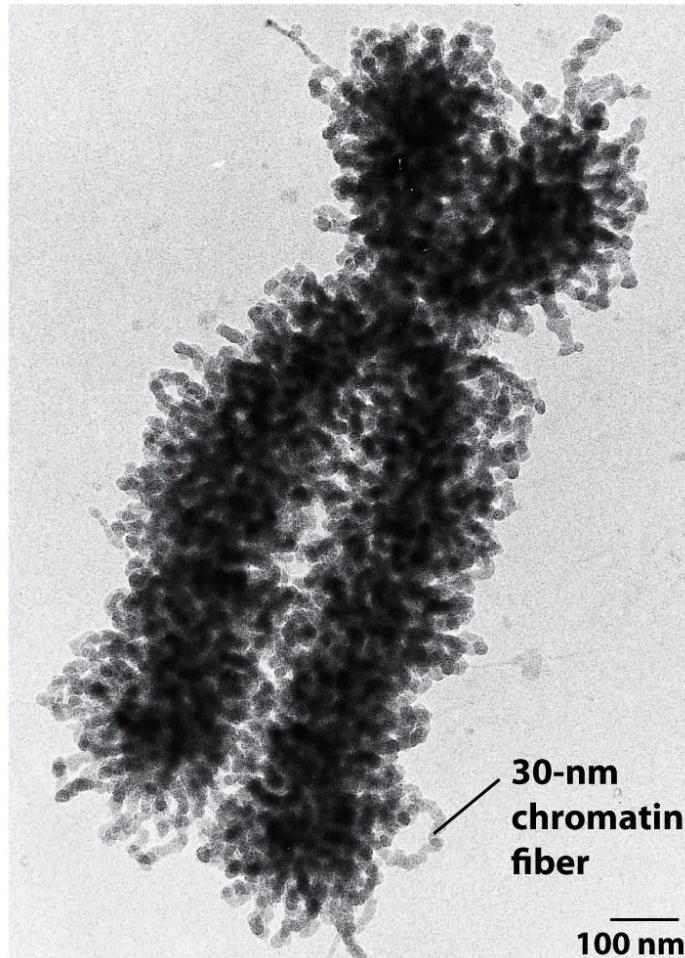
Sekundárna štruktúra

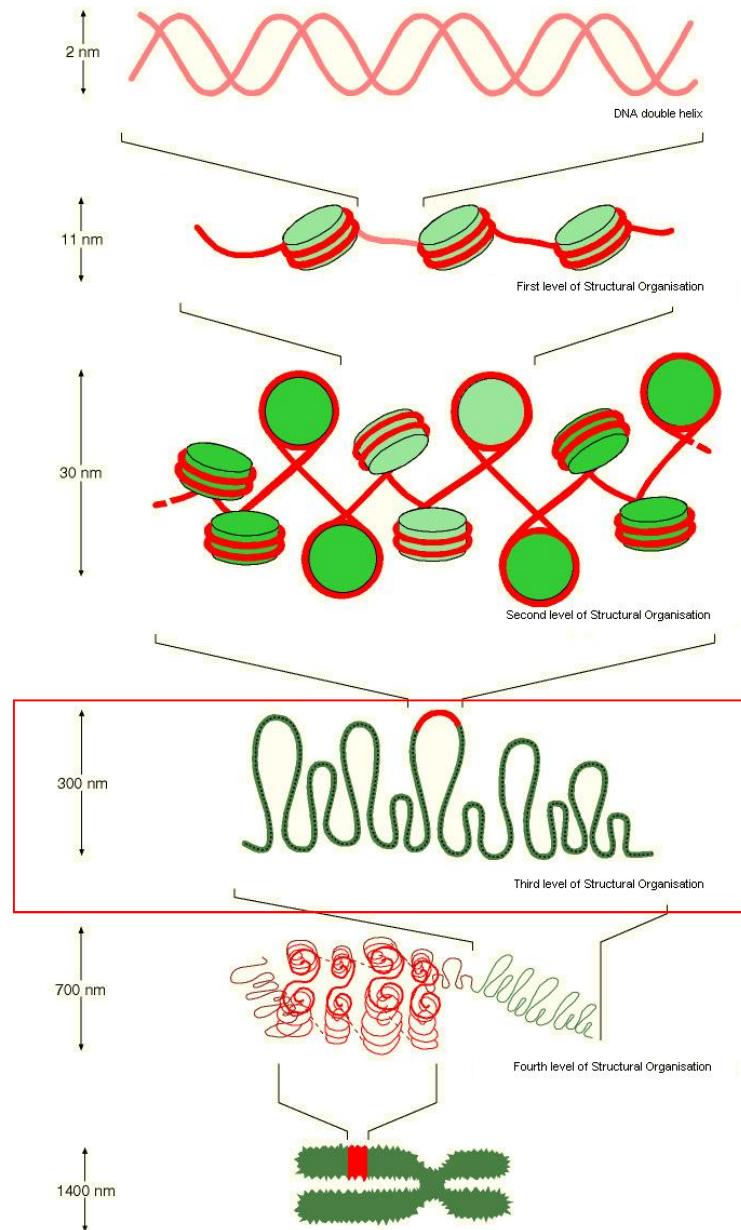
Histón H1 : esenciálny pre štruktúru solenoidu

- H1 sa viaže na linkerovú DNA a spôsobuje špiralizáciu nukleozómov
- Histón H1 má centrálnu doménu, ktorá sa viaže na vlastný nukleozóm a dve ramená, ktoré sa viažu na susedné nukleozómy
- 1 otočka solenoidu = 6 nukleozómov



Human Metaphase Chromosomes

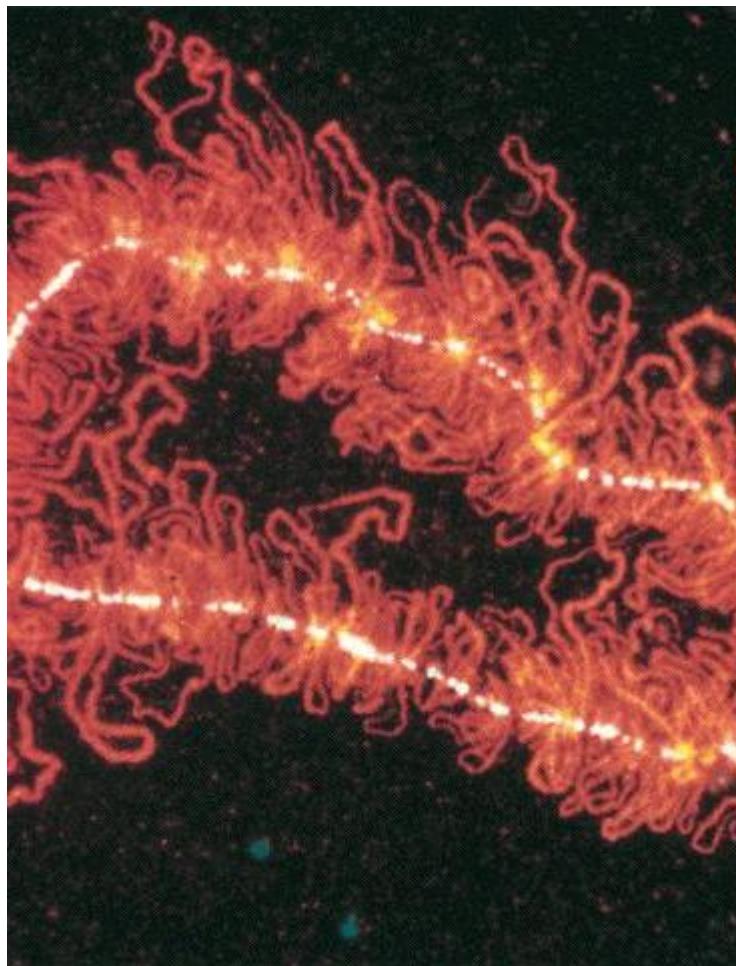




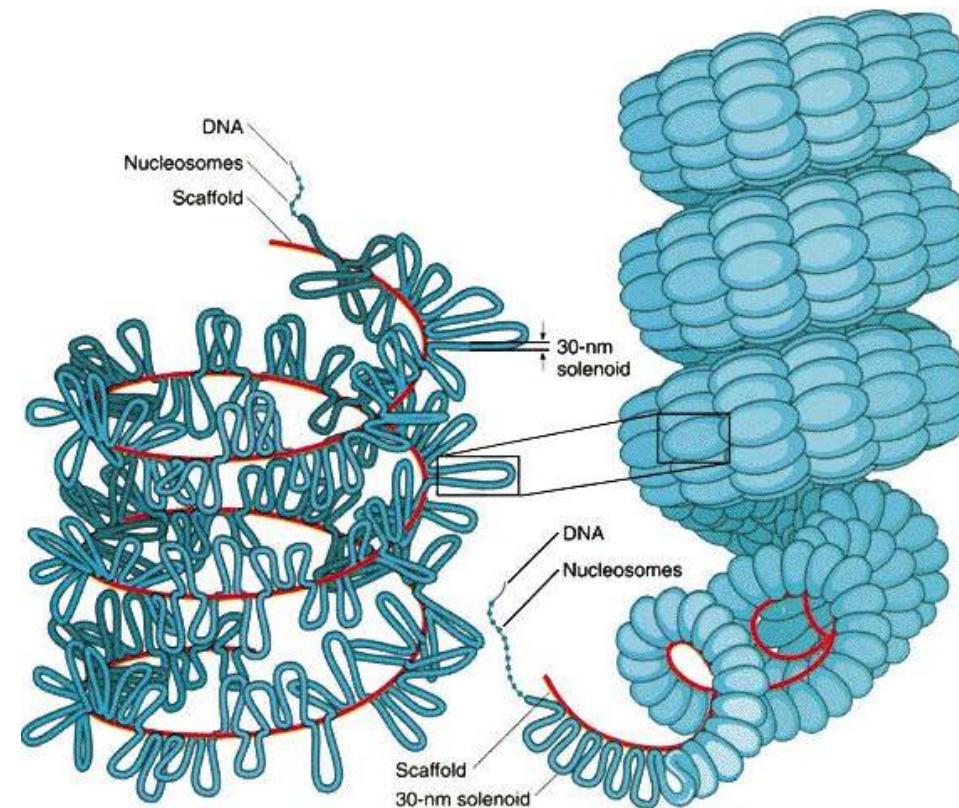
Tretí stupeň
zbal'ovania DNA

Terciálna štruktúra

- ▶ 300 nm chromatínové vlákno (radiálne slučky)
- ▶ Nehistónové proteíny - tvoria lešenie, na ktoré sú pripojené chromatínové slučky
 - ➡ jadrová matrix (alebo chromozómové lešenie)



Nehistónové proteíny tvoria lešenie (central scaffold). Laterálne slučky tvorené DNA asociovanou s histónovými proteínmi.

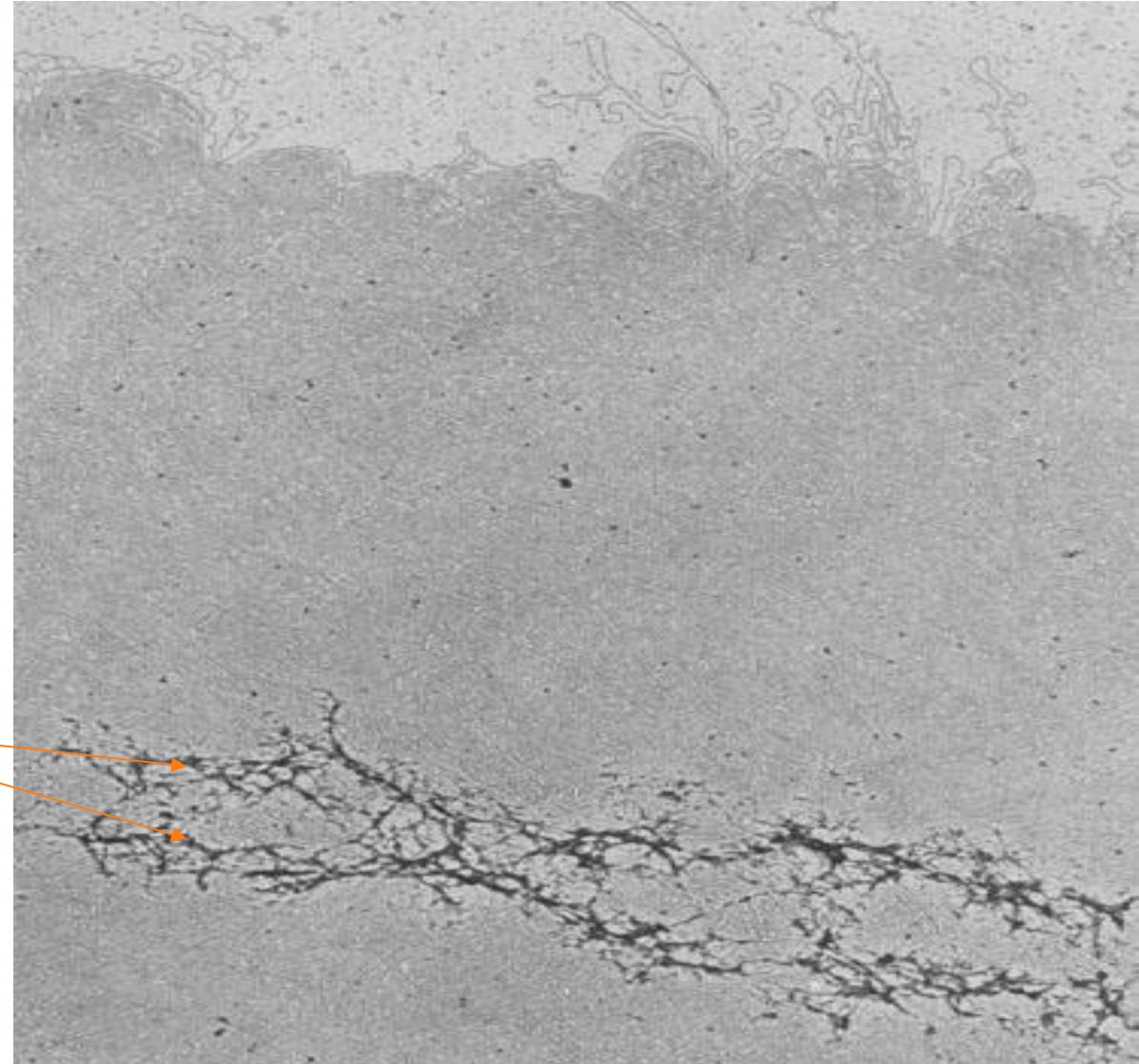


Elektrónmikroskopická snímka eukaryotického chromozómu

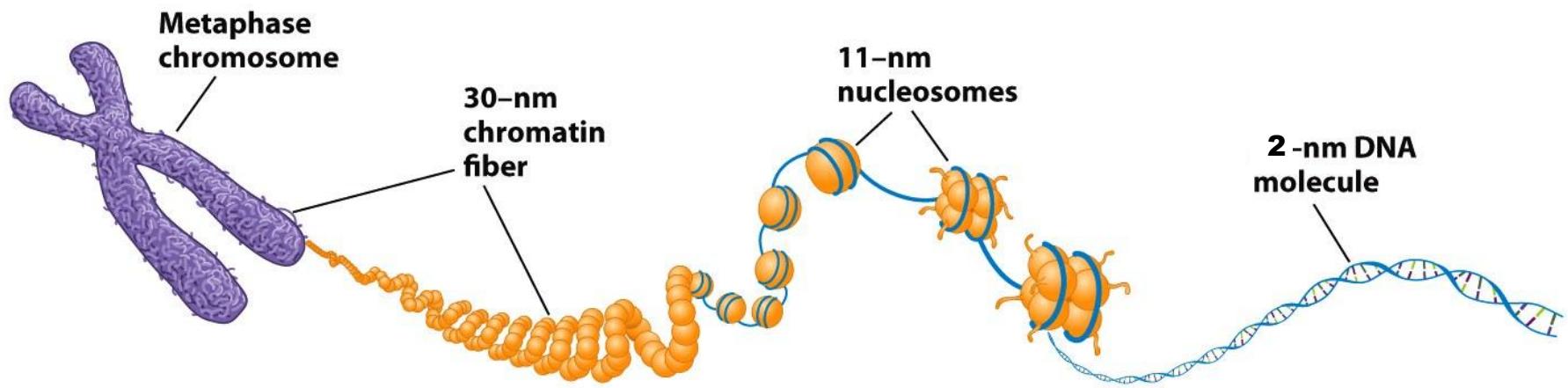
Fotografia X
chromozómu
zbaveného histónov –
DNA, ktorá vytvára
slučky, je pripojená k
centrálному lešeniu.

slučky DNA

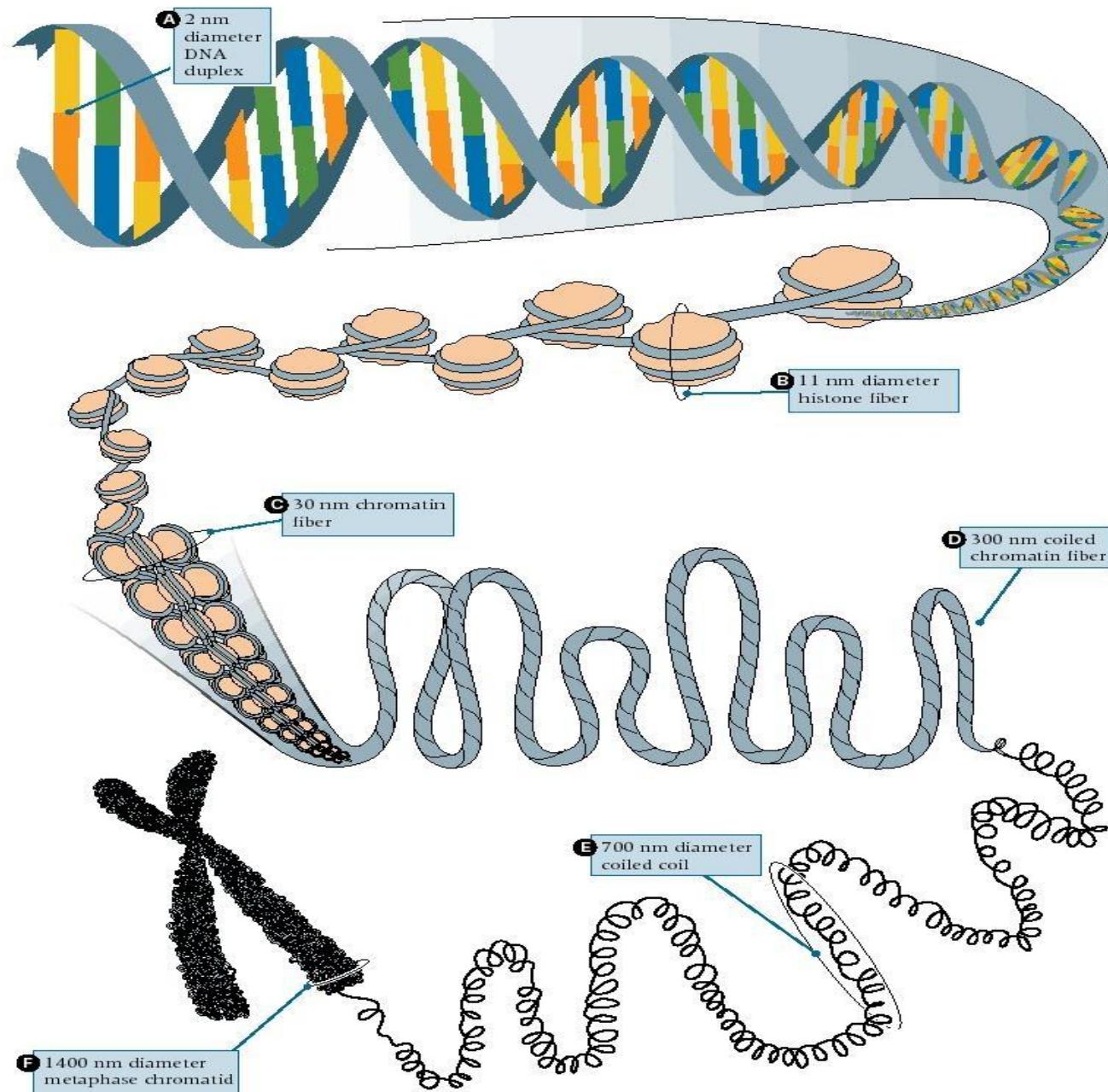
Proteínové
lešenie tvorené
nehistónovými
proteínm



Úrovne zbalovania DNA - zhrnutie



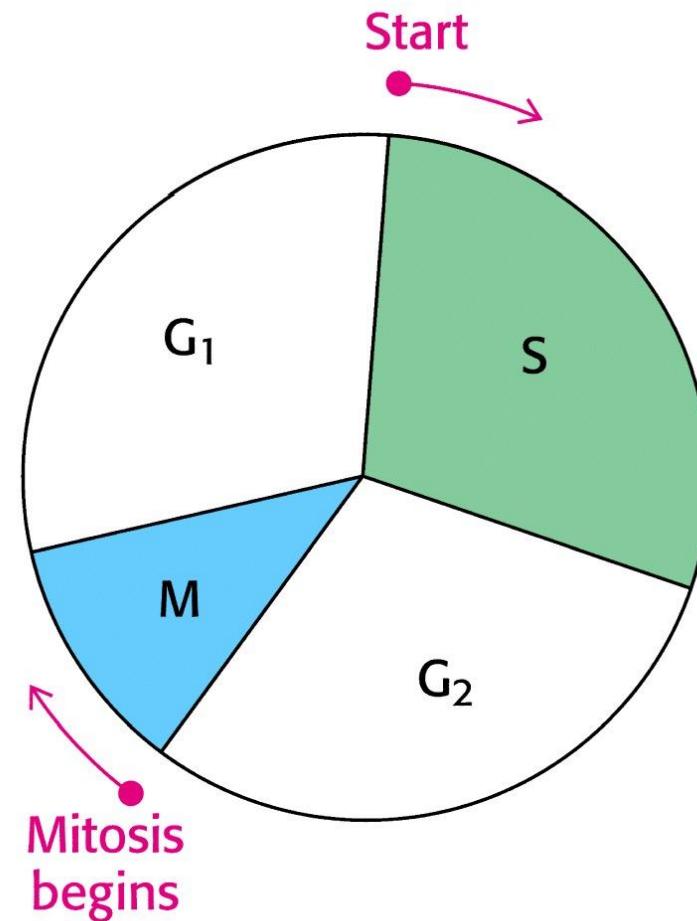
- ▶ 2-nm dvojvláknová molekula DNA
- ▶ 11-nm nukleozómy
- ▶ 30 nm chromatínové vlákno
- ▶ usporiadanie okolo centrálneho lešenia



Zbalenie DNA umožňuje vytvoriť chromozóm 10000 krát kratší ako je dĺžka samotnej DNA.

Štruktúra chromozómu sa mení počas bunkového cyklu

Počas interfázy
chromatínová siet'



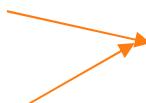
Individuálne
chromozómy v
mitóze a meióze

Štruktúra chromozómu sa mení v závislosti od stavu chromatínu

- Chromatín nie je rovnako kompaktný pozdĺž celého chromozómu – v dôsledku toho farbivá, ktoré reagujú z DNA vytvárajú rôznu intenzitu farbenia

Kondenzovaný stav

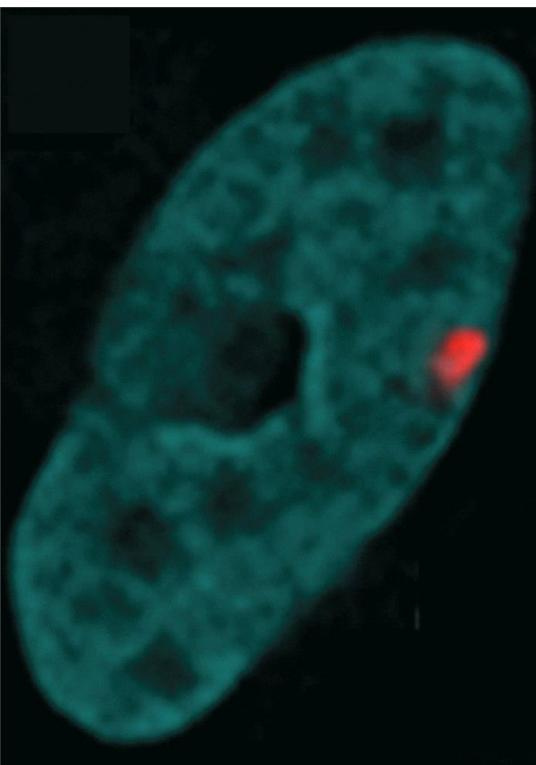
Dekondenzovaný stav



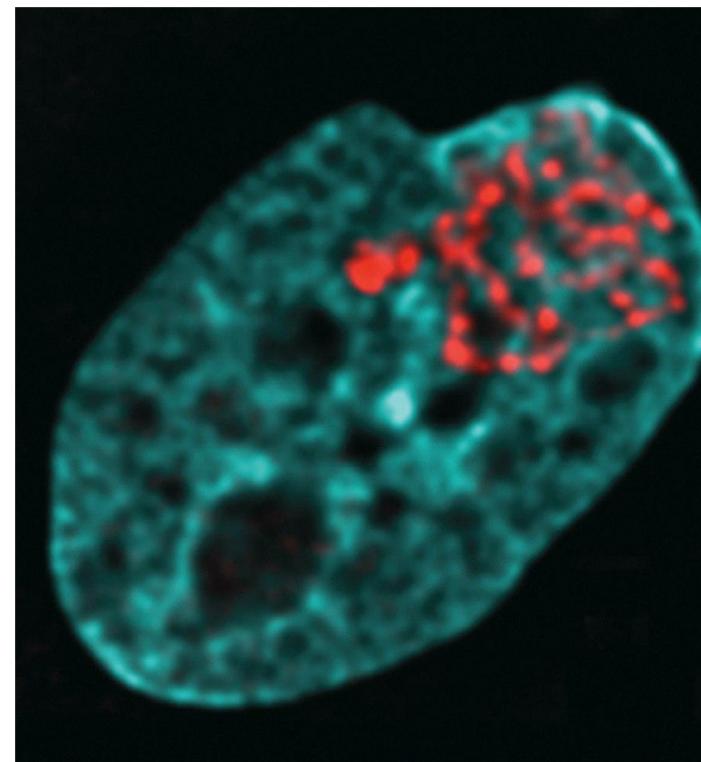
Základom je špiralizácia a dešpiralizácia

Dve formy chromatínu (na základe farbenia)

- 1. Euchromatín – aktívne transkribované regióny, bez repetitívnych sekvenčí**
- 2. Heterochromatín**



100 Mb DNA v heterochromatíne

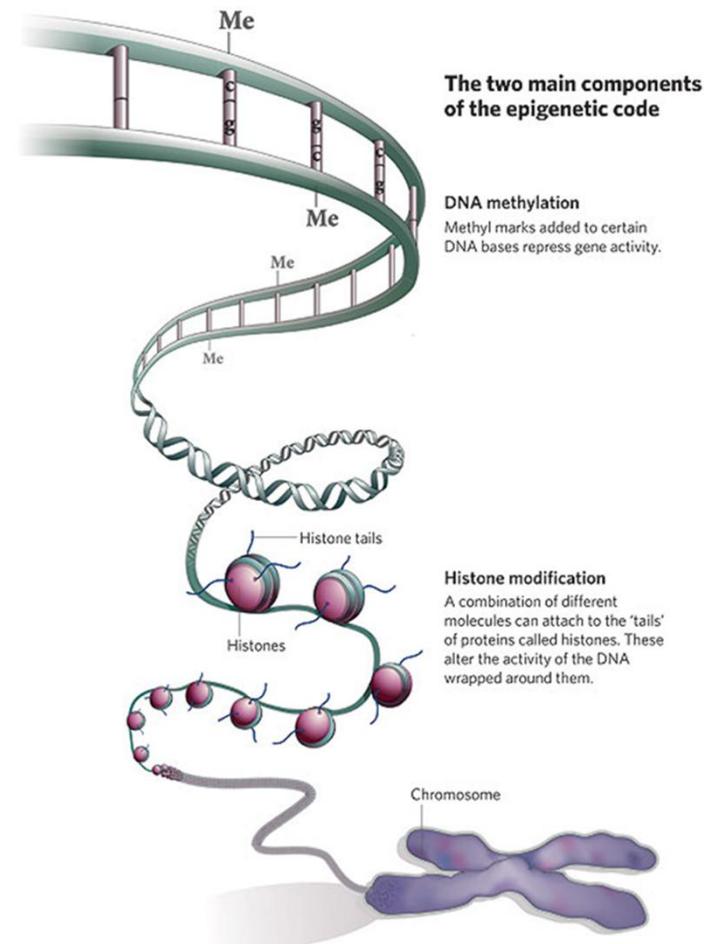


100 Mb DNA v euchromatíne

Tumbar et al. (1999)
J. Cell Biol. 145:1341

Organizácia chromozómu a génová expresia

► Vlastnosti chromozómov ovplyvňujú expresiu génov – remodeling chromatínu.



- ▶ Euchromatín obsahuje väčšinu eukaryotických génov.
- ▶ Keď sú eukaryotické gény umelo prenesené do heterochromatínových oblastí, majú tendenciu fungovať abnormálne alebo nefungujú vôbec
⇒ **pozičný efekt (pozičná variabilita expresie).**

- ▶ **Heterochromatín** – tmavo sfarbené oblasti, replikované na konci S fázy, transkripčne neaktívne gény, repetitívne oblasti DNA

Konštitutívny heterochromatín – prítomný vo všetkých bunkách na rovnakých miestach na oboch homologických chromozónoch

- pozostáva najmä z repetitívnej DNA a oblastí v okolí centroméry

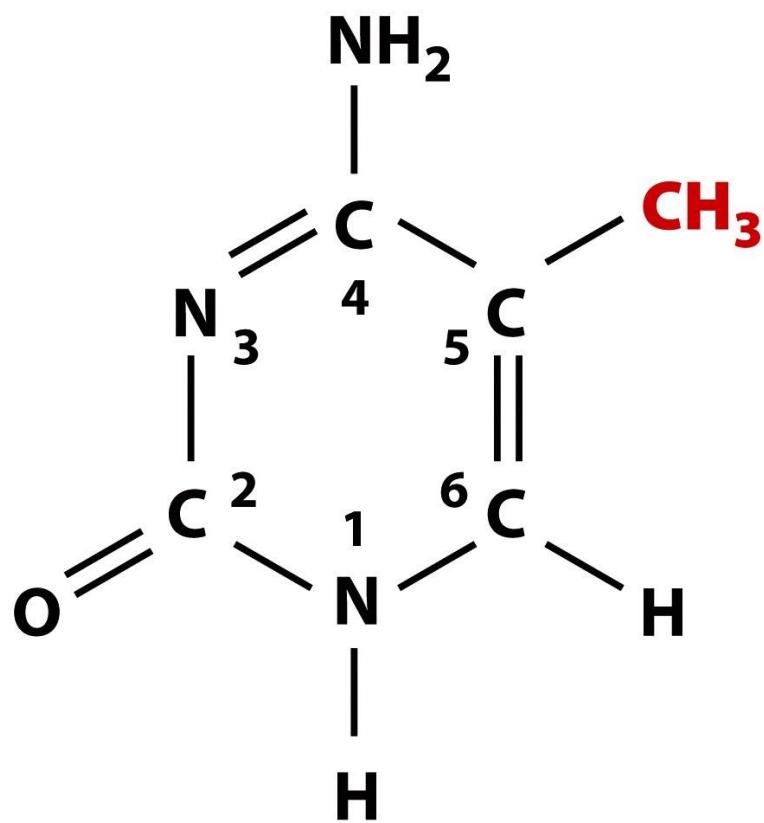
Fakultatívny heterochromatín – rôzny v rôznych typoch buniek, počas vývinových štádií alebo aj medzi dvoma homologickými chromozómami

- kondenzované a preto inaktívne oblasti euchromatínu, napr. Barrovo teliesko u žien

Remodeling chromatínu – modifikácia štruktúry chromatínu

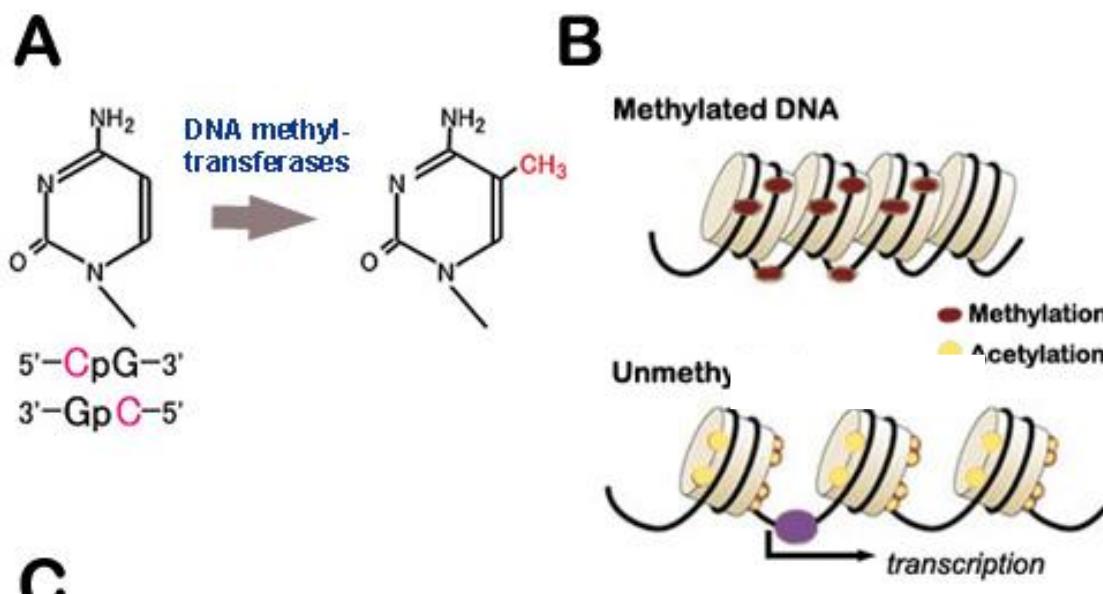
- ▶ Metylácia DNA
- ▶ Histónové modifikácie
- ▶ Chromatín remodelujúce komplexy
- ▶ Nekódujúca RNA

Metylácia DNA



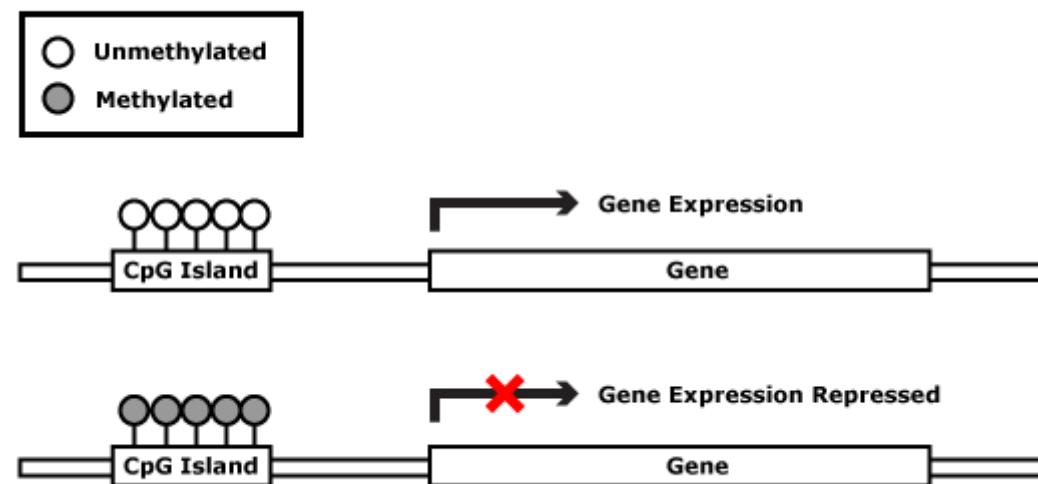
- ▶ Najviac metylovaný cytozín v sekvenciách CG (mCpG).
- ▶ Restrikčný enzym *HpaII* rozpoznáva a štiepi sekvenciu CCGG, ale iba v prípade, keď cytozín nie je metylovaný – rozdielne profily restrikčných fragmentov.

Metylácia DNA



CpG ostrovy

- ▶ Distribúcia CpG dinukleotidov je nerovnomerná.
- ▶ väčšina CpG ostrovov sa nachádza v blízkosti počiatkov transkripcie, cytozíny sú tu metylované len vzácnne (nemetylovaný stav napomáha transkripcii).



Gene Silencing – umlčovanie génov

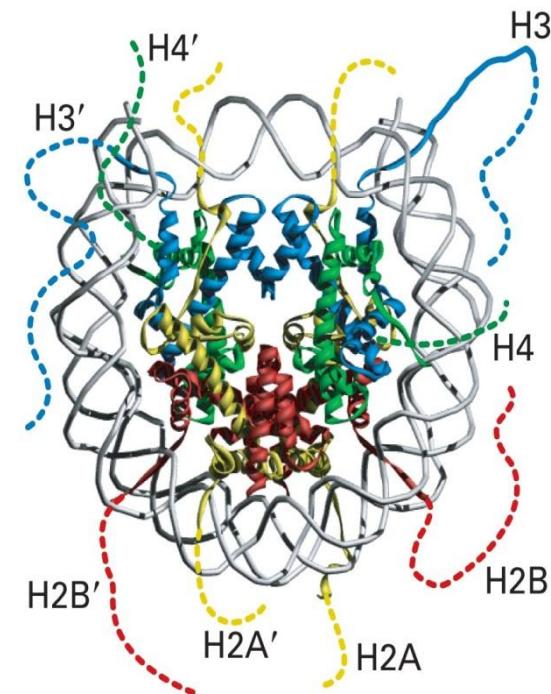
- ▶ Väčšina eukaryotických génov je transkripčne neaktívna v určitých fázach a určitých bunkách.
- ▶ Chemická modifikácia nukleotidov – typická pre cicavcov
- ▶ 40 % cicavčieho genómu tvoria GC páry, z nich 2-7% metylovaných

Metylovaná DNA je spojená s represiou transkripcie

- ▶ Inaktívny chromozóm X u samíc cicavcov je silne metylovaný.
- ▶ Oblasti cicavčích genómov obsahujúce repetitívne sekvencie sú metylované.
- ▶ Proteíny, ktoré reprimujú transkripciu, sa viažu na metylovanú DNA.
- ▶ DNA methylácia u cicavcov je zodpovedná za imprinting, pri ktorom je expresia génu kontrolovaná rodičovským pôvodom.

Modifikácia histónov – úloha pri regulácii génovej expresie.

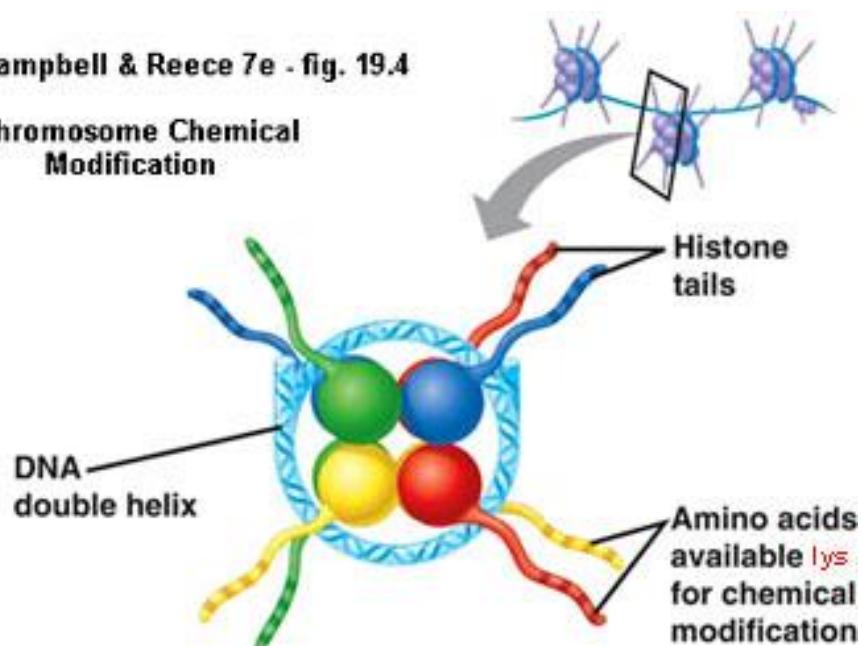
- flexibilné N-terminálne, resp. C-terminálne konce (H2A, H2B), histónov (19-39 AK zvyškov) – „histone tails“
- úloha pri kondenzácii z konformácie „beads-on-a-string“ do 30-nm vlákna
- okrem toho posttranslačné modifikácie, napr. acetylácia, methylácia, fosforylácia, ubiquitinácia, ADP ribozylácia – histónový kód



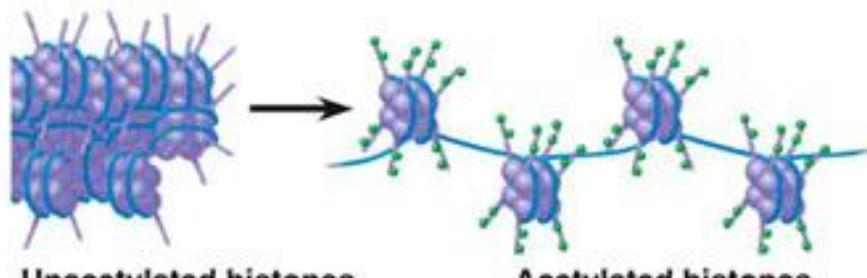
Histónový kód

Campbell & Reece 7e - fig. 19.4

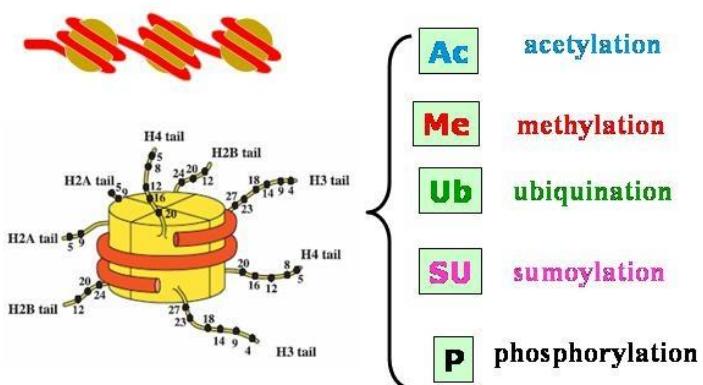
Chromosome Chemical Modification



(a) Histone tails protrude outward from a nucleosome



(b) Acetylation of histone tails promotes loose chromatin structure that permits transcription



The figure illustrates nucleosome models and major posttranslational modifications which play essential roles in gene expression regulation and disease processes

Acetylácia histónov

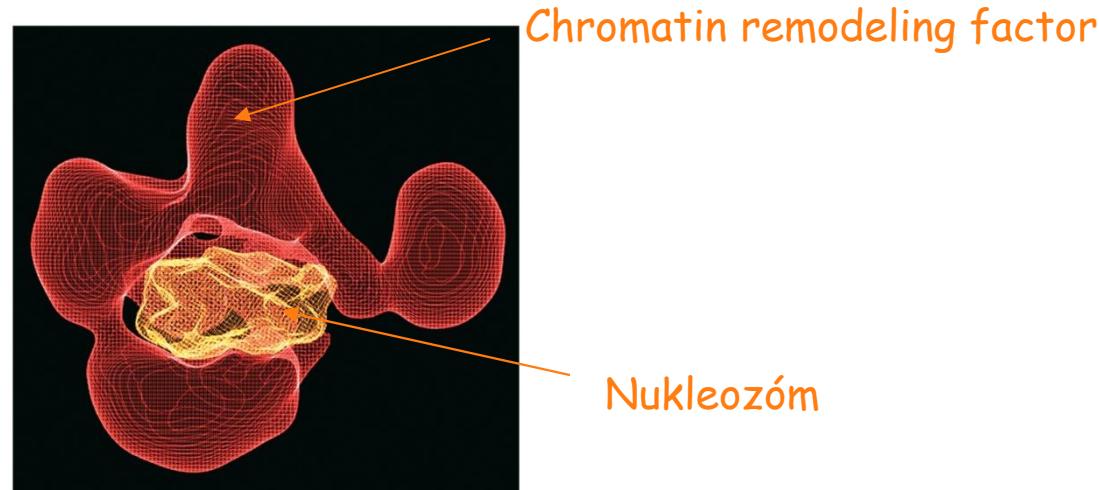
- ▶ Acetylácia lyzínu na N-terminálnom konci histónu vedie k dekondenzácii chromatínu
⇒ tým sa umožní transkripcia a replikácia

- ▶ Enzýmy histón acetyltransferázy (HAT)
- ▶ Transkripčná kontrola génovej expresie
- ▶ Metylácia lyzínu zabraňuje acetylácii

Reverzný remodeling

- ▶ Aktívny chromatín môže byť inaktivovaný pomocou biochemických modifikácií histónov
 - Histón deacetylázy (HDAC) odstraňujú acetylové skupiny z histónových proteínov.
 - Histón methyl transferázy (HMT) pridávajú metylové skupiny na histónové proteíny.
- ▶ DNA methyl transferázy (DNMT) pridávajú metylové skupiny na nukleotidy a tým inaktivujú transkripciu.

Chromatín remodelujúce faktory



- využívajú energiu z hydrolýzy ATP na preusporiadanie nukleozómov v chromatíne

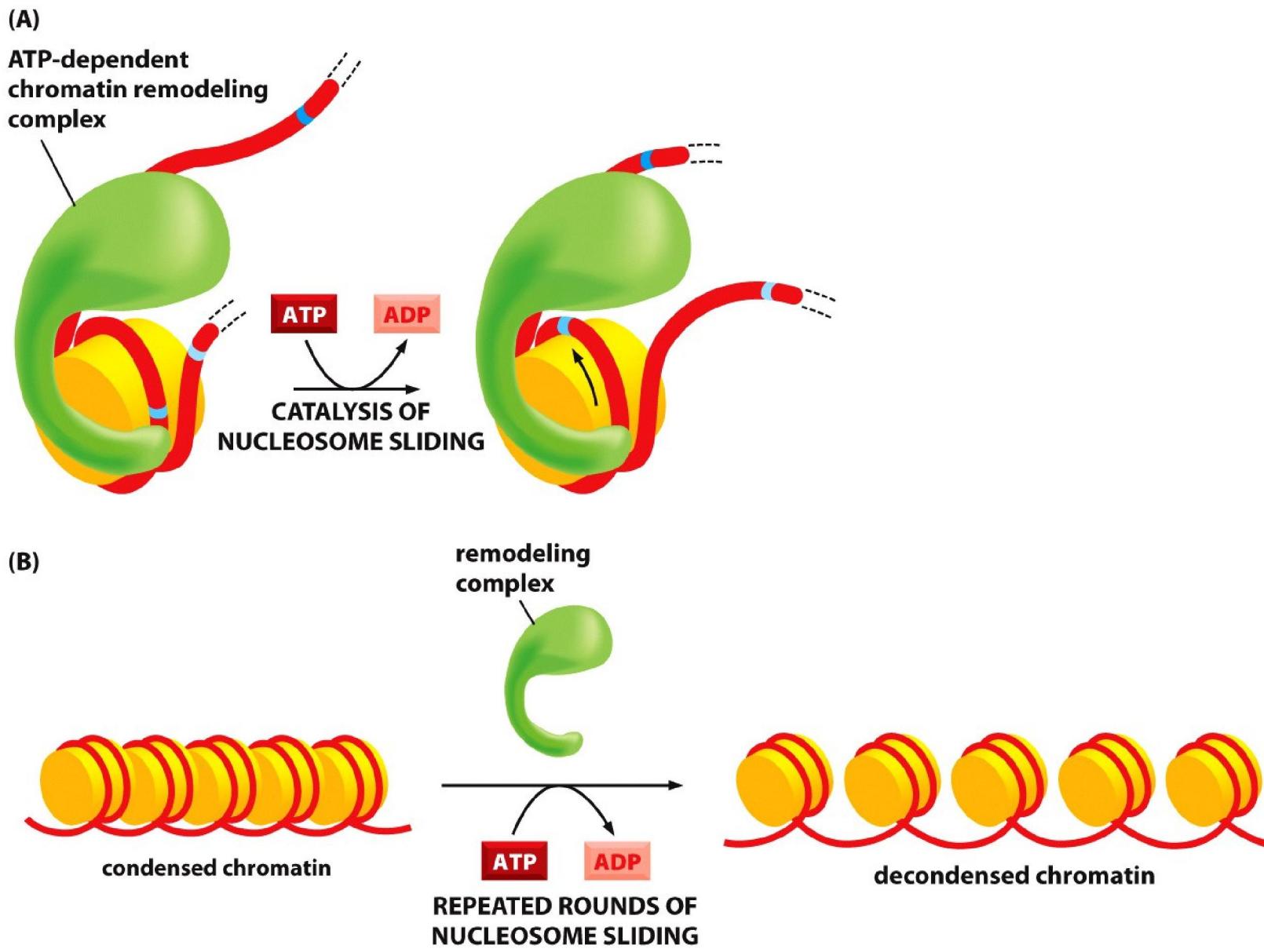
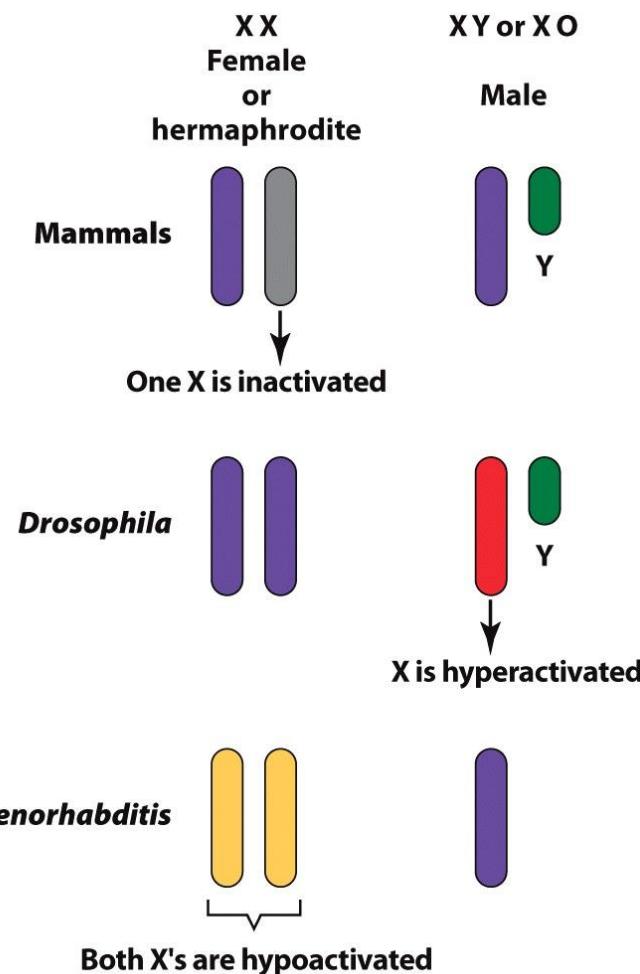


Figure 5-27 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

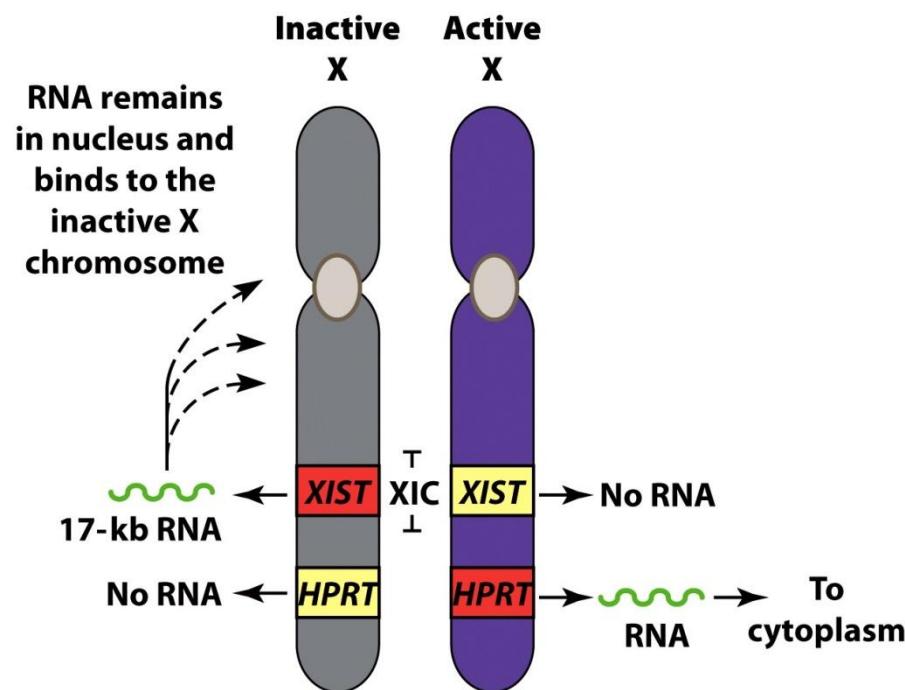
Aktivácia a inaktivácia celých chromozómov

Cicavce, drozofila a červy majú odlišné spôsoby kompenzácie rôznych dávok chromozómov X u samcov a samíc.

Kompenzácia dávky pre gény lokalizované na X chromozóme



X-inaktivácia u cicavcov



- ▶ X inaktivácia začína v X inaktivačnom centre (XIC) a postupuje oboma smermi ku koncom chromozómu.
- ▶ Gén pre X inactive specific transcript (*XIST*) zostáva aktívny.
- ▶ *XIST* kóduje funkčnú RNA, ktorá zostáva v jadre asociovaná s X chromozómom.

Inaktívny X chromozóm



- ▶ Inaktívny X chromozóm je pokrytý *Xist* transkriptom.
- ▶ Inaktívny X chromozóm je kondenzovaný do Barrovho telieska, ktoré je asociované s jadrovou membránou.
- ▶ Inaktívny X chromozóm sa replikuje neskôr ako ostatné chromozómy.
- ▶ Inaktívny X chromozóm má špeciálnu štruktúru chromatínu a neobsahuje acetylovaný histón H4.

Poznámka: napriek inaktivácii jedného X chromozómu, genotyp X0 má značný fenotypový prejav – Turnerov syndróm

Epigenetika

- ▶ Rovnaký genotyp ≠ rovnaký fenotyp
- ▶ Termín epigenetika definuje všetky mitotické a meiotické dedičné zmeny v expresii génov, ktoré samotné nie sú kódované v sekvencii DNA. Ovplyvňujú fenotyp bez zmeny genotypu.

Epigenetika

- ▶ Epigenetika - zmena vo fenotype, ktorá je dedičná, ale nie je spôsobená mutáciou.
- ▶ Táto zmena je skôr podobná vypnutiu alebo zapnutiu ako stupňovitej zmene a musí byť dedičná aj keď sa zmenia podmienky, ktoré ju vyvolali.
- ▶ Napr. aj priónové ochorenia alebo prepínanie lytického a lyzogénneho cyklu u *E. coli* alebo inaktivácia X chromozómu u žien môžu byť považované za epigenetickú zmenu.

Epigenetická krajina – Conrad H. Waddington

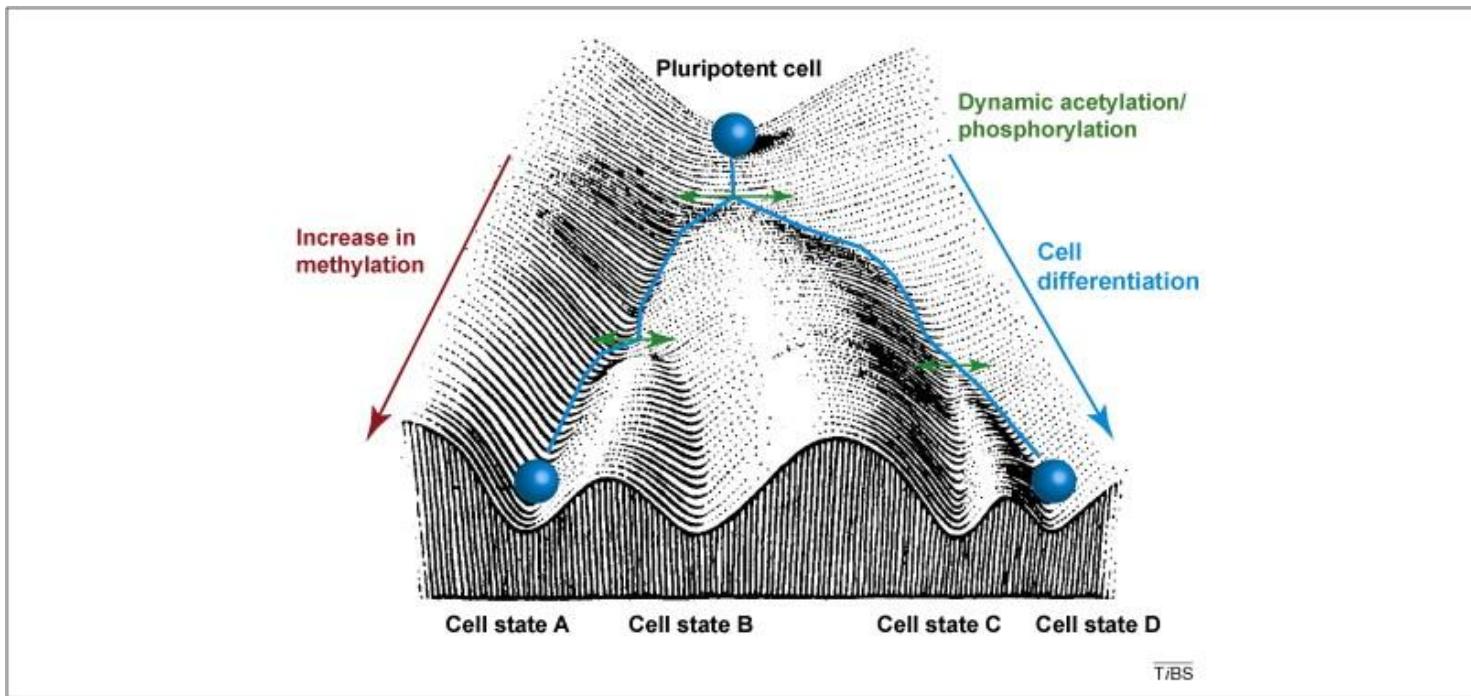


Figure : Integrating different histone modification types in Waddington's Epigenetic Landscape. The model presented by Conrad Waddington shows how a cell becomes more and more determined during development and that the possibility for differentiation decrease...

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.006>

Nie je včela ako včela...



© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.

Nie je včela ako včela...

Kráľovná a robotnice – rovnaký genotyp, odlišný fenotyp



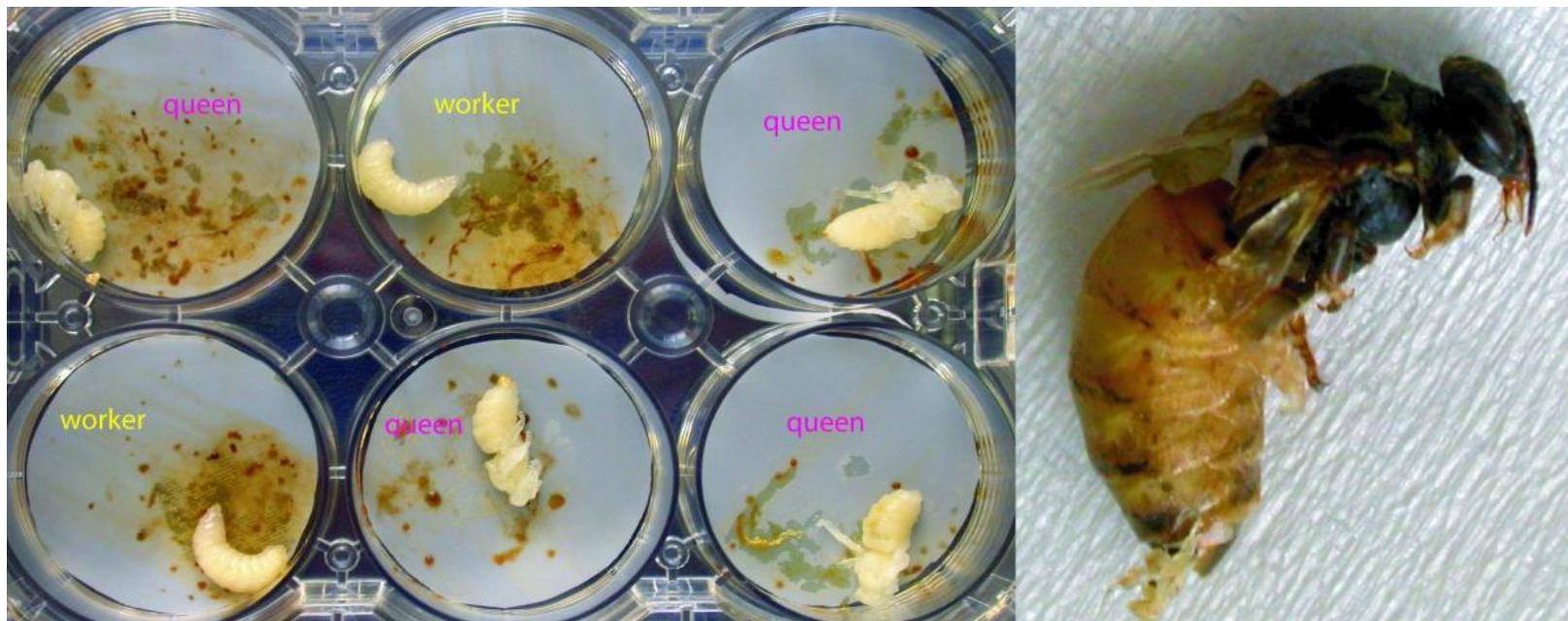
	robotnica	kráľovná
Hmotnosť tela	100 mg	250 mg
Dosiahnutý vek	38-140 dní	1-3 roky
Peľový vačok	Áno	Nie
Voskové žľazy	Áno	Nie
Počet vaječníkov	2-12	150-180

Nie je včela ako včela...

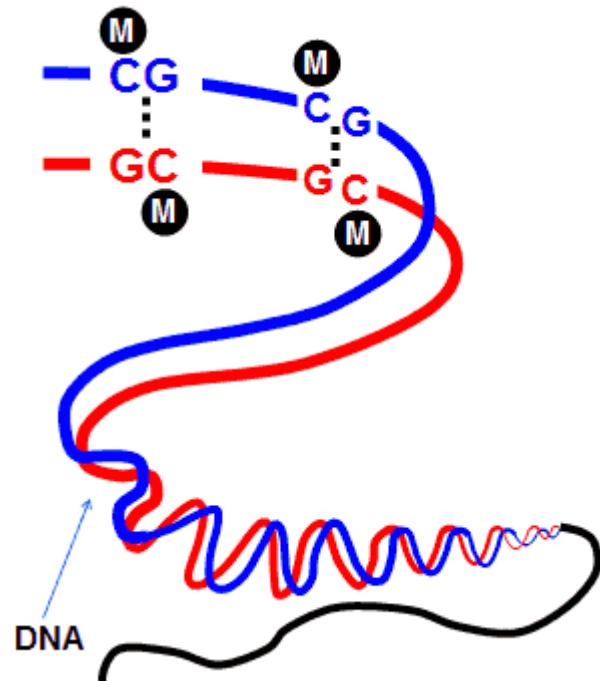
diploidná
samičia
XX larva

standardná výživa → robotnica
materská kašička → kráľovná
inhibícia methylácie DNA → kráľovná

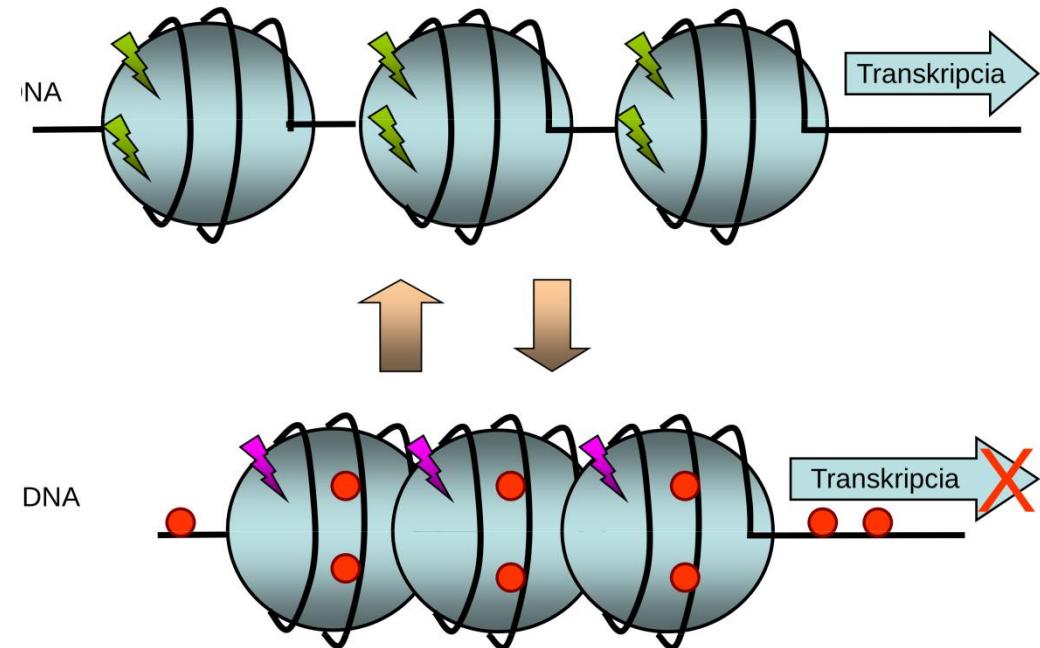
robotnica
kráľovná
kráľovná



Akú úlohu hrá methylácia DNA v regulácii gémovej expresie?



Zabránenie expresii génov
v metylovaných oblastiach

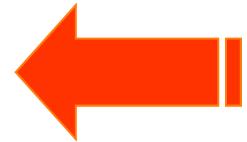
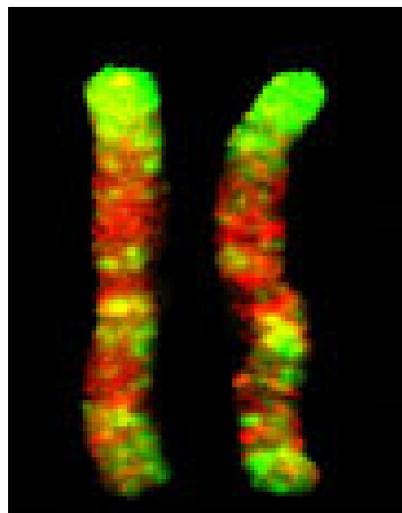
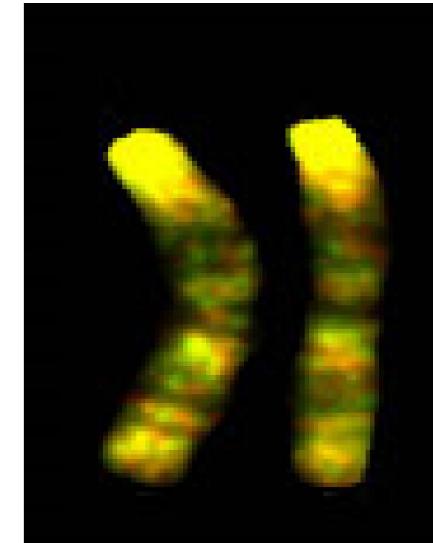


Nie je včela ako včela...

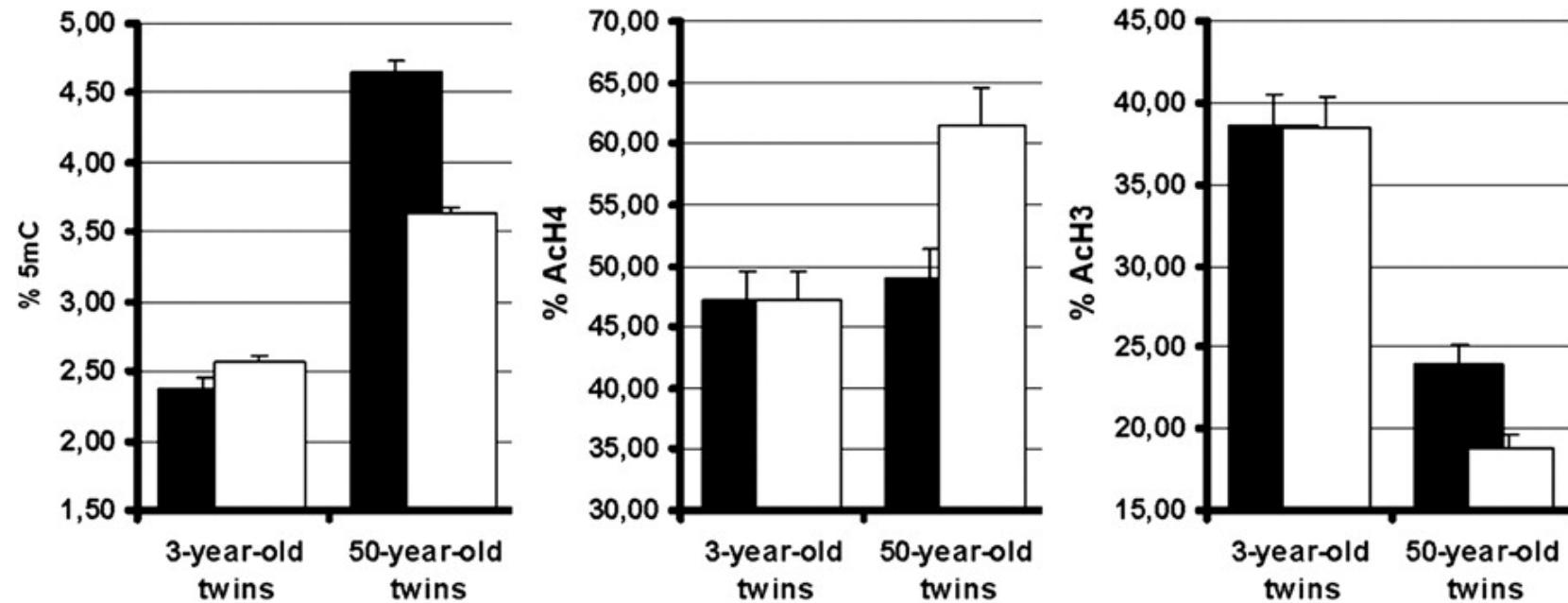


Materská kašička spôsobuje preprogramovanie génov !

Monozygotné dvojčatá sú geneticky identické, ale...



Na veku závislé epigenetické zmeny u monozygotných dvojčiat



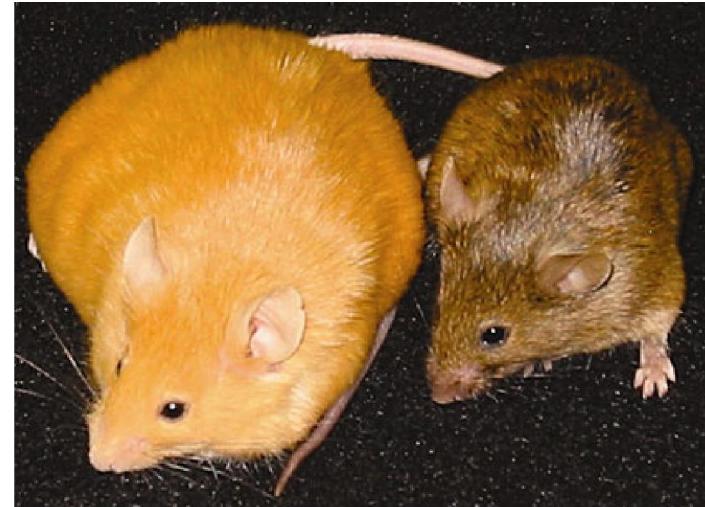
Vplyv veku na epigenóm monozygotných dvojčiat

- Počas prvých rokov života sa MZ dvojčatá epigeneticky nelíšia
- Staršie MZ dvojčatá vykazujú významné rozdiely v epigenóme:
 - ❖ Zmenený celkový obsah a distribúcia 5-metylcytozínu v DNA
 - ❖ Zmeny v acetylácii histónov ovplyvňujúce génovú expresiu.

Nie je myš ako myš...



Nie je myš ako myš...



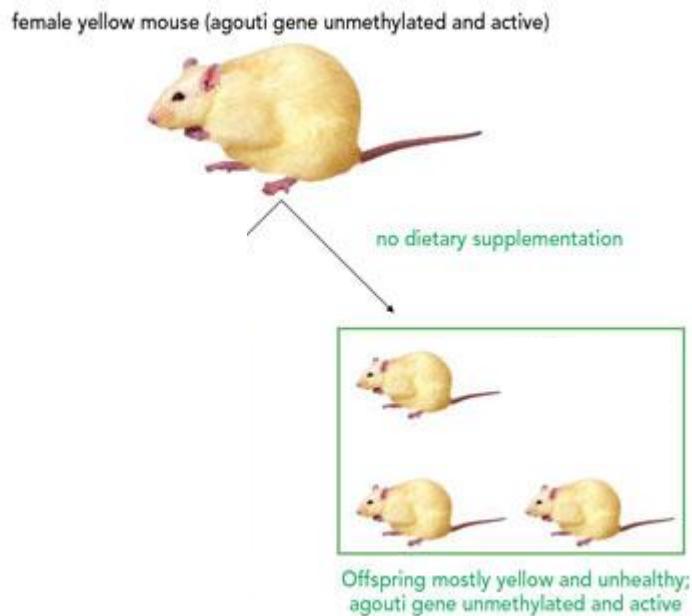
- ▶ Tieto myši sú geneticky identické, ale fenotypom sa výrazne líšia.
- ▶ Žlté sfarbenie a sklon k obezite je u myší podmienené alelou génu *agouti* (nositelia tejto alely majú aj väčšiu predispozíciu na rakovinu a cukrovku).
- ▶ Agouti proteín sa viaže na receptor melanokortínu a bráni tvorbe hnedého sfarbenia. Rovnaký receptor sa nachádza aj v mozgu myší, kde ovplyvňuje prijem potravy a veľkosť tela.

Nie je myš ako myš...

Kríženie:

**žltá, tučná myš (*agouti*) x žltá tučná myš (*agouti*)
+ normálna, bežná strava**

Potomstvo: žlté tučné myši (*agouti*)

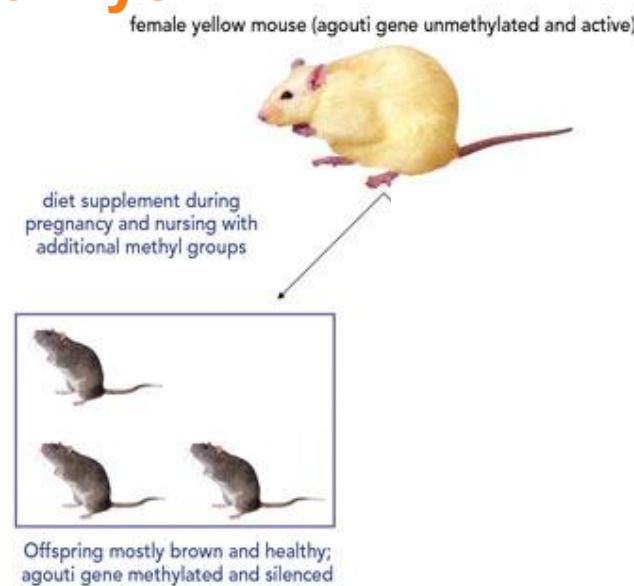


Nie je myš ako myš...

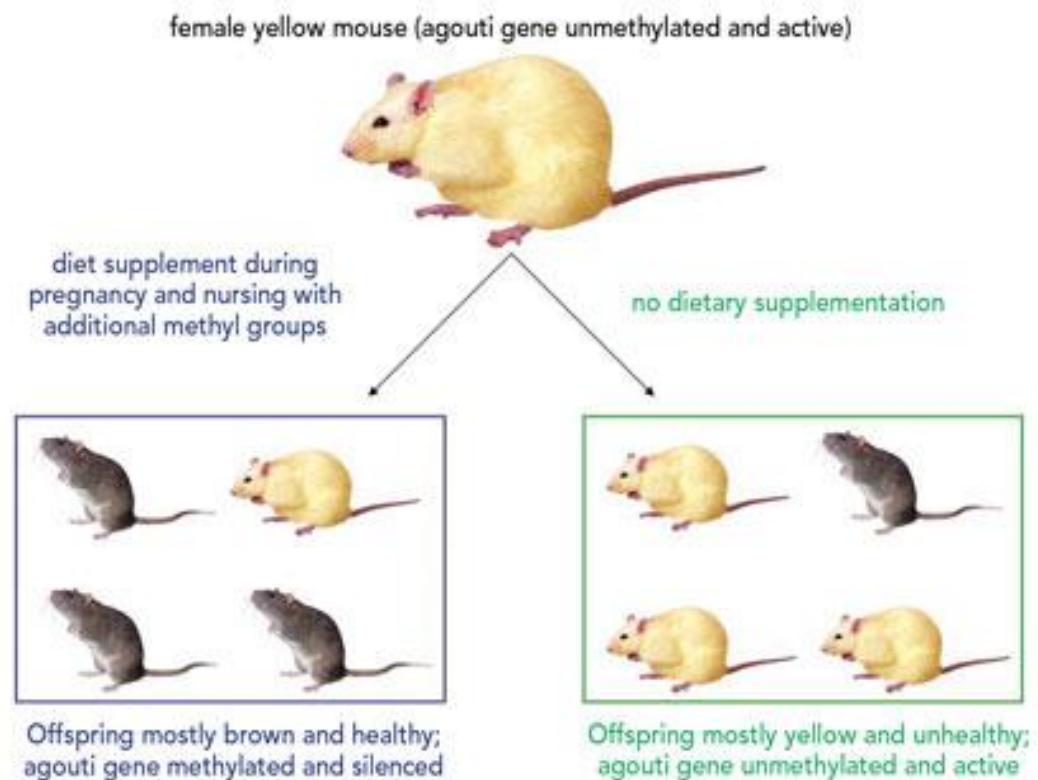
Ale! Kríženie:

žltá, tučná myš (*agouti*) x žltá tučná myš (*agouti*)
+ okrem bežnej stravy vitamínové doplnky (B12,
kyselina listová, betaín, cholín)

Potomstvo: chudé hnede myši

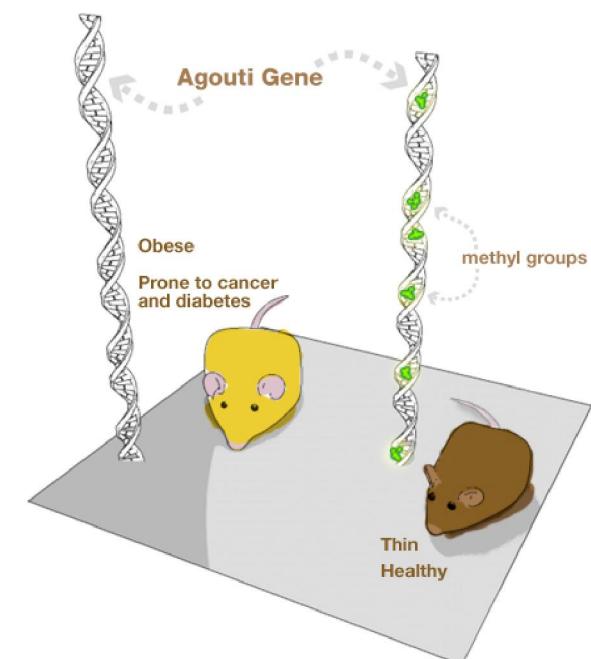
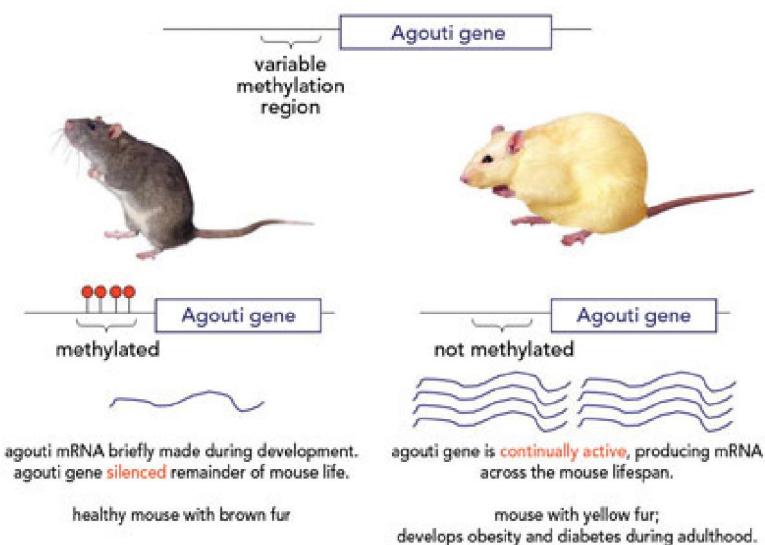


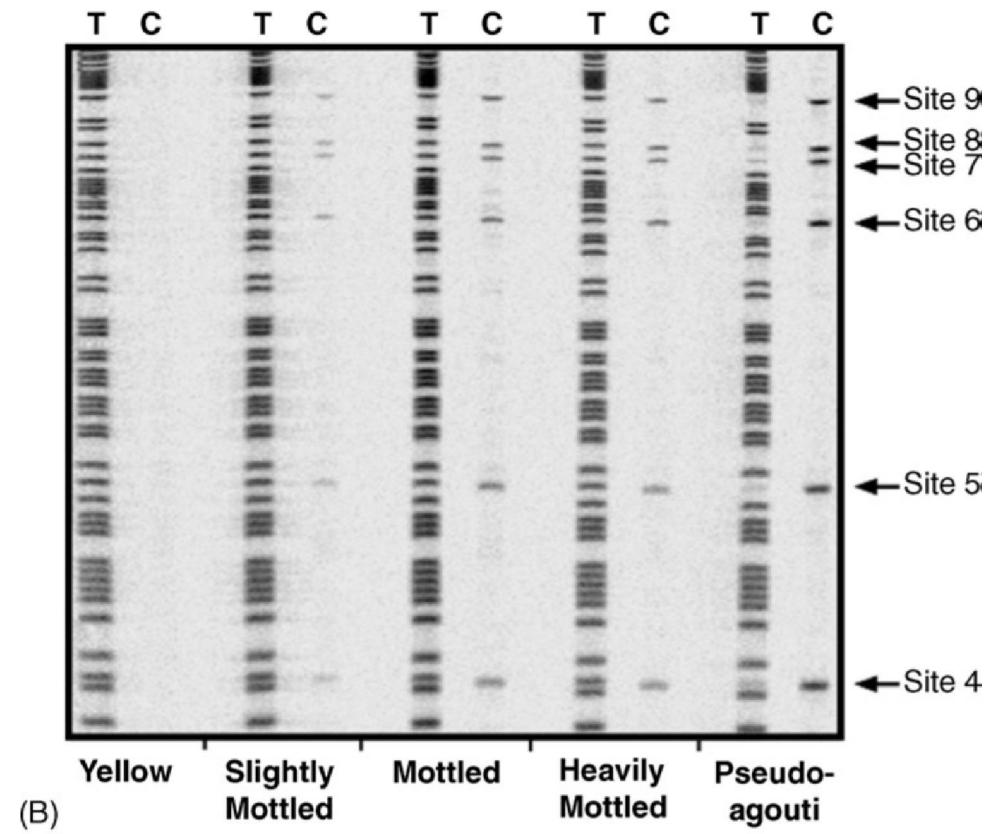
Ako je to možné?



Ako je to možné?

- ▶ U oboch myší je alela *agouti* prítomná v genóme
- ▶ Zmena v potrave však spôsobila jeho vypnutie





Sfarbenie srsti slúži ako ukazovateľ stupňa methylácie

Od genetiky k epigenetike...

- ▶ Rovnaký genotyp ≠ rovnaký fenotyp
- ▶ Nejde o zmeny v sekvencii DNA (mutácie)
- ▶ grécka predpona epi- znamená nad, cez
- ▶ Myši – vhodný model na štúdium reprogramovania buniek

Všetko je však omnoho komplikovanejšie...

- ▶ v ľudskom tele je asi 100 miliárd buniek, t.j. približne 200 epigenómov
- ▶ HUGO – Human genome project – sekvencia ľudského genómu je známa
- ▶ „máme mapu, ale potrebujeme zistit‘, ktoré cesty sú otvorené a ktoré zatvorené“

Projekt ľudského epigenómu



- Cieľom HEP je identifikovať všetky chemické zmeny a vzťahy... ktoré sprostredkovávajú realizáciu DNA kódu. Vďaka týmto informáciám bude možno lepšie porozumieť procesom, akými sú prirodzený vývin, starnutie, karcinogenéza a rozvoj iných ochorení, ako aj vplyvu environmentálnych faktorov na ľudské zdravie.

Epigenetic diseases

Disease	Symptom	Aetiology
ATR-X syndrome	Intellectual disabilities, α -thalassaemia	Mutations in <i>ATRX</i> gene, hypomethylation of certain repeat and satellite sequences
Fragile X syndrome	Chromosome instability, intellectual disabilities	Expansion and methylation of CGG repeat in <i>FMR1</i> 5' UTR, promoter methylation
ICF syndrome	Chromosome instability, immunodeficiency	<i>DNMT3b</i> mutations, DNA hypomethylation
Angelman's syndrome	Intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11–13 (maternal)
Prader–Willi syndrome	Obesity, intellectual disabilities	Deregulation of one or more imprinted genes at 15q11–13 (paternal)
BWS	Organ overgrowth	Deregulation of one or more imprinted genes at 11p15.5 (e.g. <i>IGF2</i>)
Rett syndrome	Intellectual disabilities	<i>MeCP2</i> mutations
α -Thalassaemia (one case)	Anaemia	Methylation of α 2-globin CpG island, deletion of <i>HBA1</i> and <i>HBQ1</i>
Various cancers	Microsatellite instability	<i>De novo</i> methylation of <i>MLH1</i>
	Disruption of Rb, p53 pathway, uncontrolled proliferation	<i>De novo</i> methylation of various gene promoters
	Disruption of SWI–SNF chromatin remodelling complex	Mutations in <i>SNF5</i> , <i>BRG1</i> , <i>BRM</i>
	Overexpression of <i>IGF2</i> , silencing of <i>CDKN1C</i>	Loss of imprinting
Leukaemia	Disturbed haematopoiesis	Chromosomal translocations involving HATs and HMTs
Rubinstein–Taybi syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in CREB-binding protein (histone acetylation)
Coffin–Lowry syndrome	Intellectual disabilities	Mutation in <i>Rsk-2</i> (histone phosphorylation)

Čo všetko môže vplyvať na epigenóm?

- ▶ Strava
- ▶ Liečivá
- ▶ Environmentálne polutanty
- ▶ Fajčenie
- ▶ Alkohol
- ▶ STRES

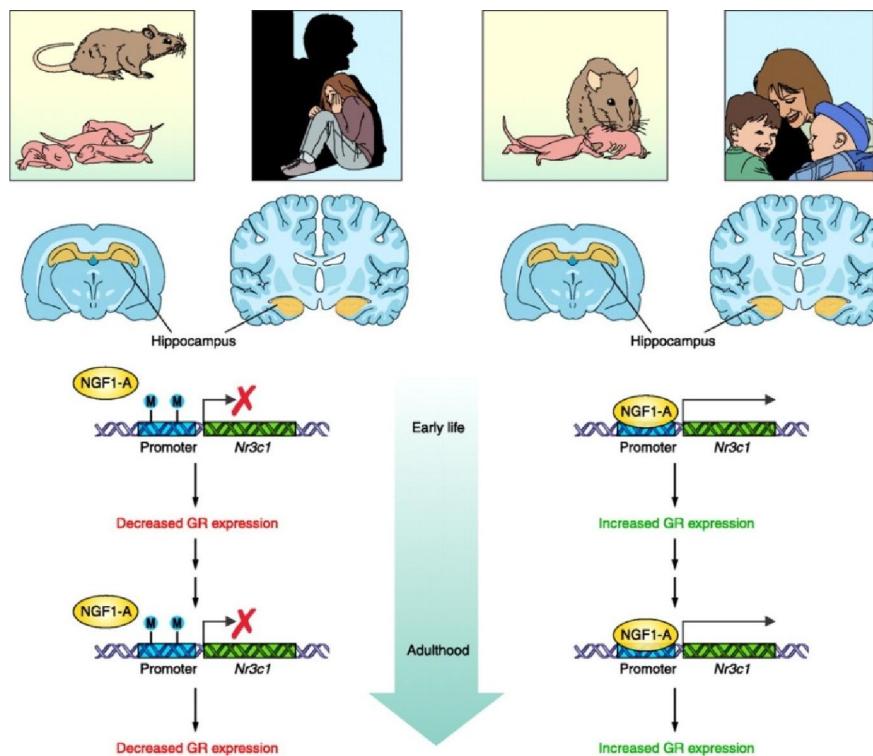
- ▶ ...zmenená metylácia tumor supresorových génov a onkogénov môže viest' k vzniku rakoviny

Bisfenol A

- ▶ Chemická látka, ktorá sa nachádza v plastových fl'ašiach
- ▶ Zmenená methylácia DNA u myší (znížená o 31%), vývin obéznych, žltých myší
- ▶ Nie všetky myši boli obézne, t.j. vystavenie myší bisfenolu A negarantuje vznik tučnej, žltej myši, ale zvyšuje pravdepodobnosť vzniku takejto myši!!!
- ▶ Doplnenie stravy o látky prinášajúce metylové skupiny (kyselina listová, vitamín B12) pôsobilo proti redukcii DNA methylácie.

Avšak nielen strava je dôležitá...

- ▶ Materinská starostlivosť po narodení ovplyvňuje psychické vlastnosti potomkov



Genóm máme vo vlastných rukách

- ▶ Sloboda (nie sme „otrokmi“ vlastných génov), ale hlavne zodpovednosť
- ▶ Cca 20% génov podlieha epigenetickému riadeniu, t.j. takmer každý piaty gén sa dá ovplyvniť prostredím

Mechanizmy epigenetických procesov

