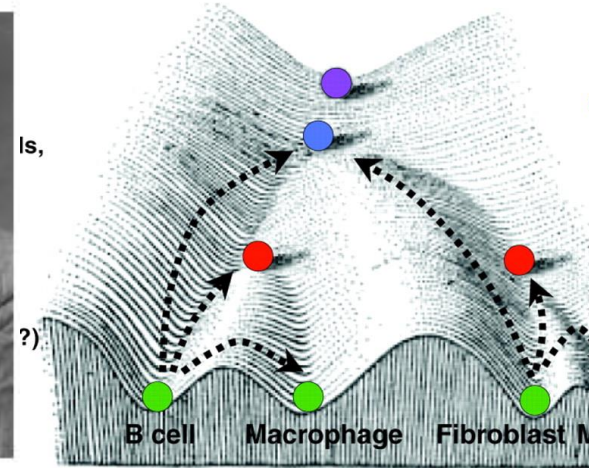
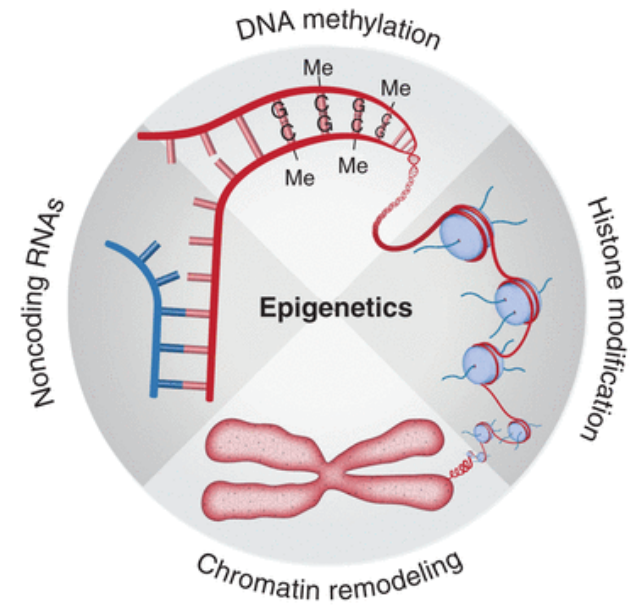


# 表观遗传调控

- 1942年: 英国发育学家 Waddington 首先提出 epigenetics 作为遗传学的分支学科, 用于解释从基因型到表型的发育过程中除遗传以外的机制。

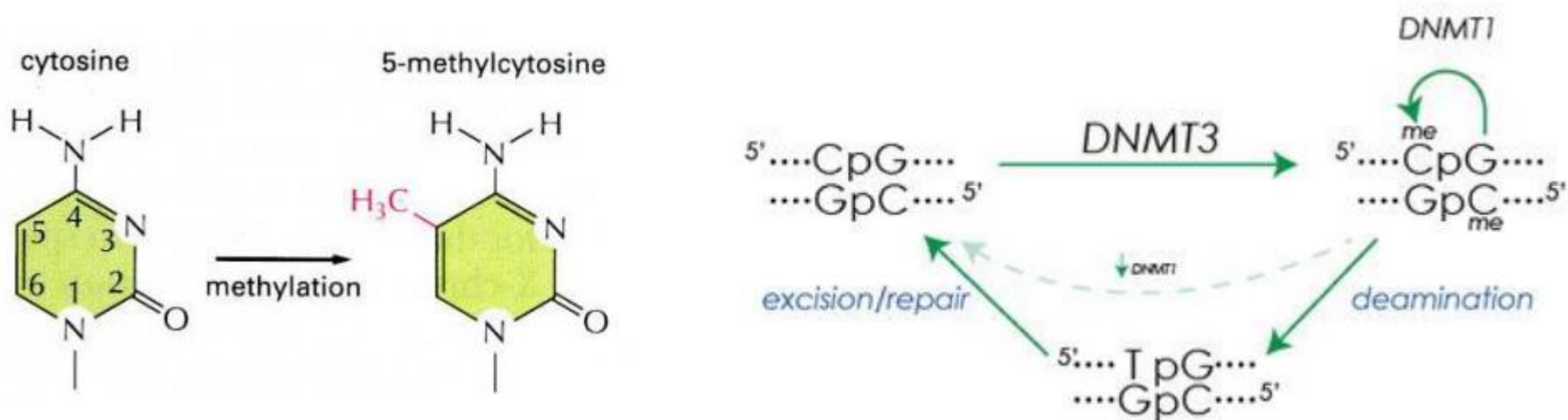


- 2007年: 由DNA甲基化、组蛋白修饰、RNA介导的基因沉默等造成的染色体结构适应性变异, 可改变染色体的表达活性, 但并不一定可遗传。---- Adrian Bird



# 一、DNA甲基化

- DNA序列中的胞嘧啶(C)能够被甲基化修饰，形成5-甲基胞嘧啶 (5mC);
- 催化DNA甲基化修饰的是DNA甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT);
- 哺乳动物细胞中，DNA甲基化主要发生在5'-CpG-3'中的C上;

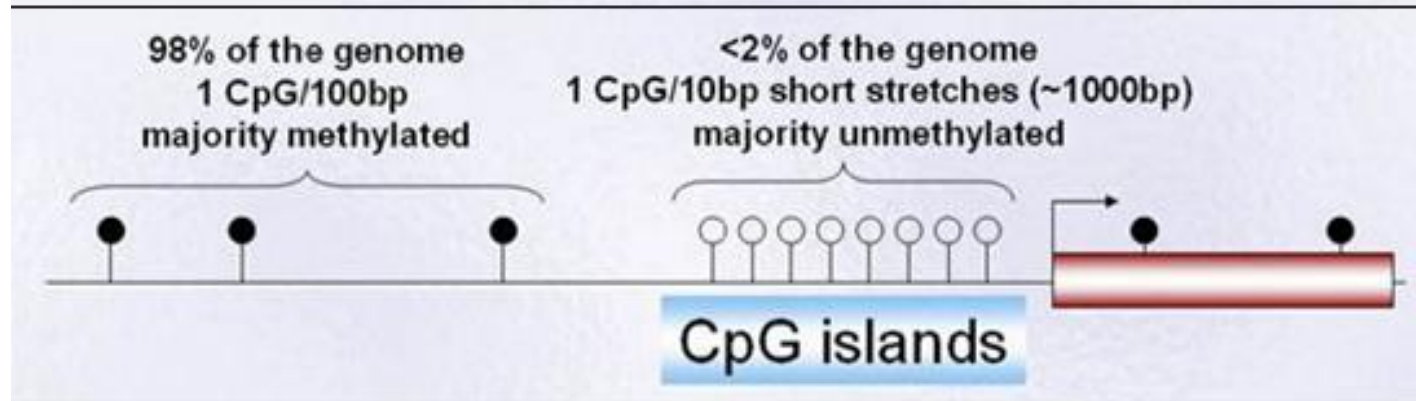


# Genomic distribution of DNA methylation

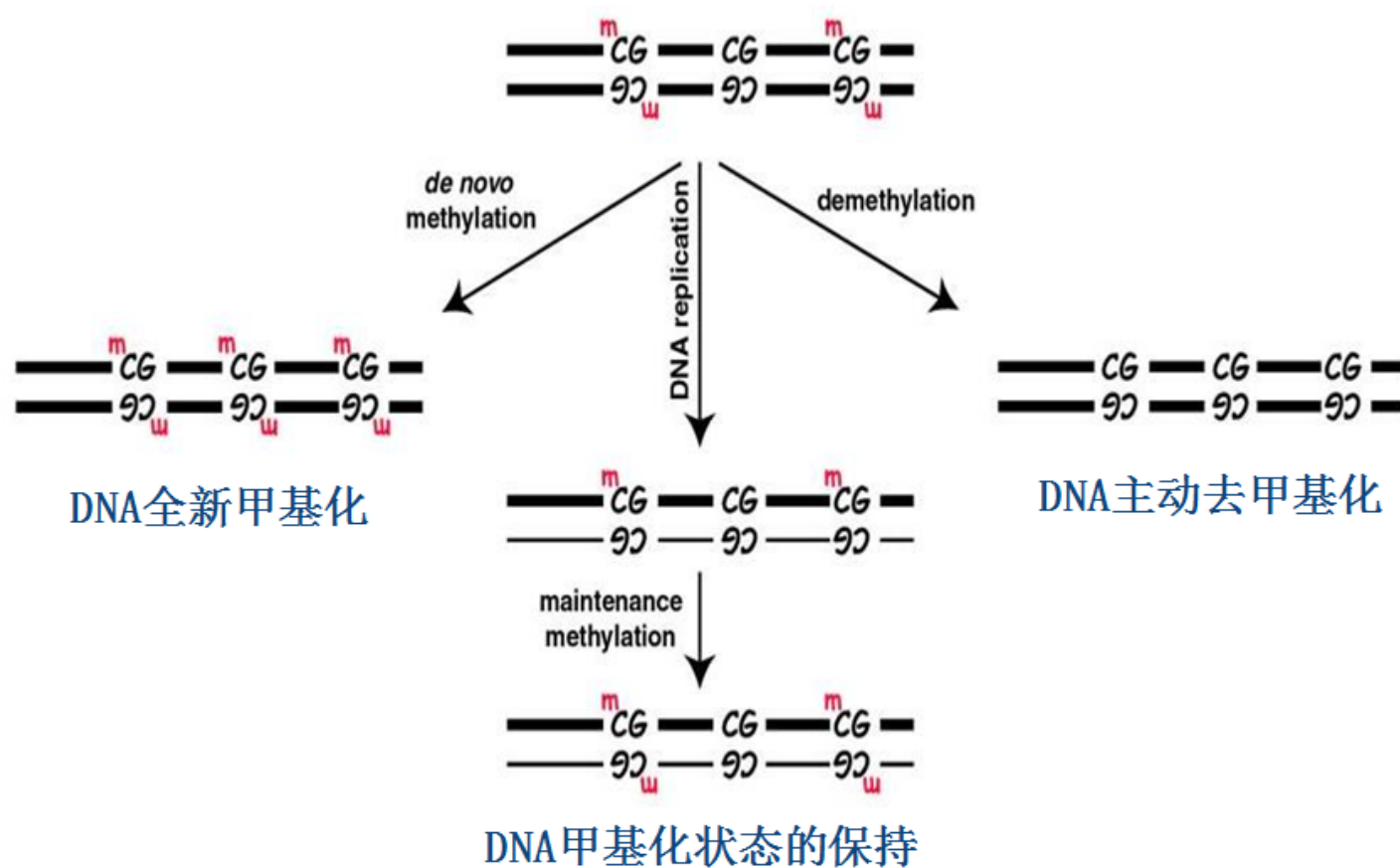
## Methyl-Cytosine



4% of all cytosines are methylated  
70-80% of all CpGs are methylated



- CpG二核苷酸在哺乳动物基因组中的分布显著不均匀。多数区域密度极低且多被甲基化修饰，少数区域呈现高密度分布且没有甲基化修饰；
- **CpG岛(CpG island)**: 哺乳动物基因组中，长度为0.3-3kb，富含CpG二核苷酸成分( GC含量> 50%) 的DNA序列。多位于基因上游的转录调控区域，与编码基因的表达密切相关。



动物中DNA 甲基转移酶有两种：

- 1) DNMT1：持续性DNA 甲基转移酶——作用于仅有一条链甲基化的DNA 双链，使其完全甲基化，可参与DNA 复制双链中的新合成链的甲基化；
- 2) DNMT3a、DNMT3b：从头甲基转移酶，它们可甲基化CpG，使其半甲基化，继而全甲基化。

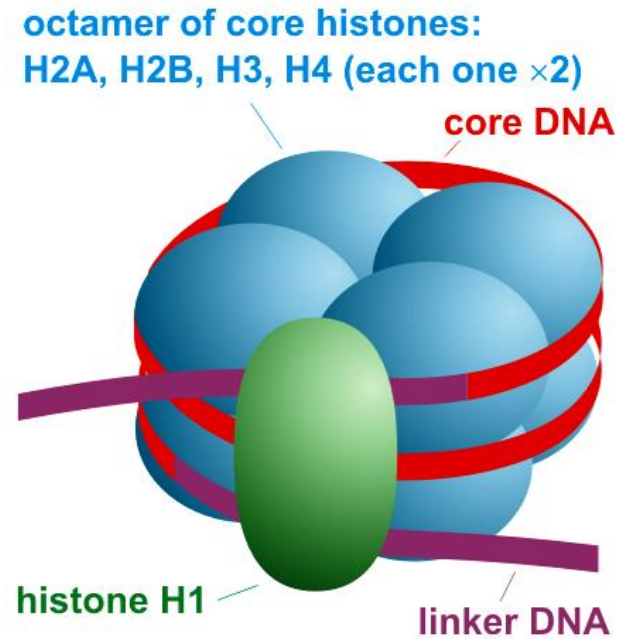
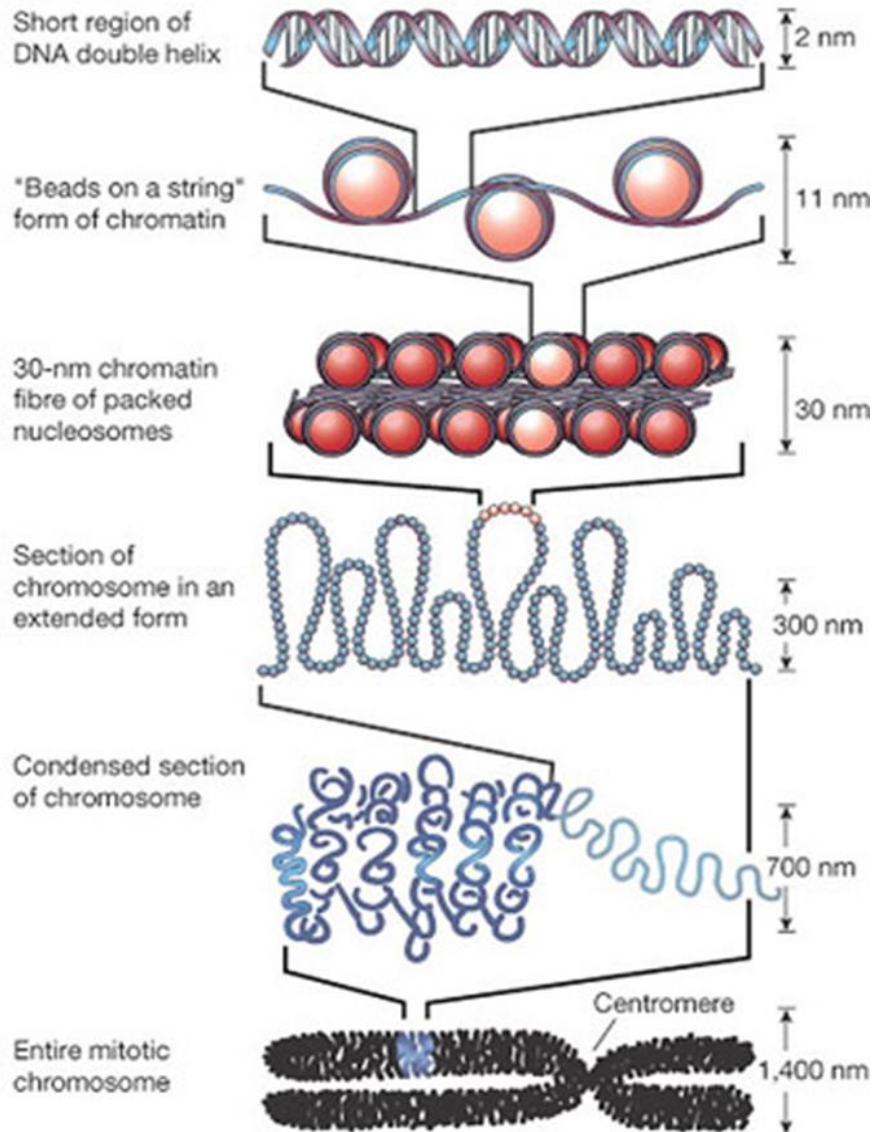


## 可能导致发育过程中DNA甲基化异常的物质：

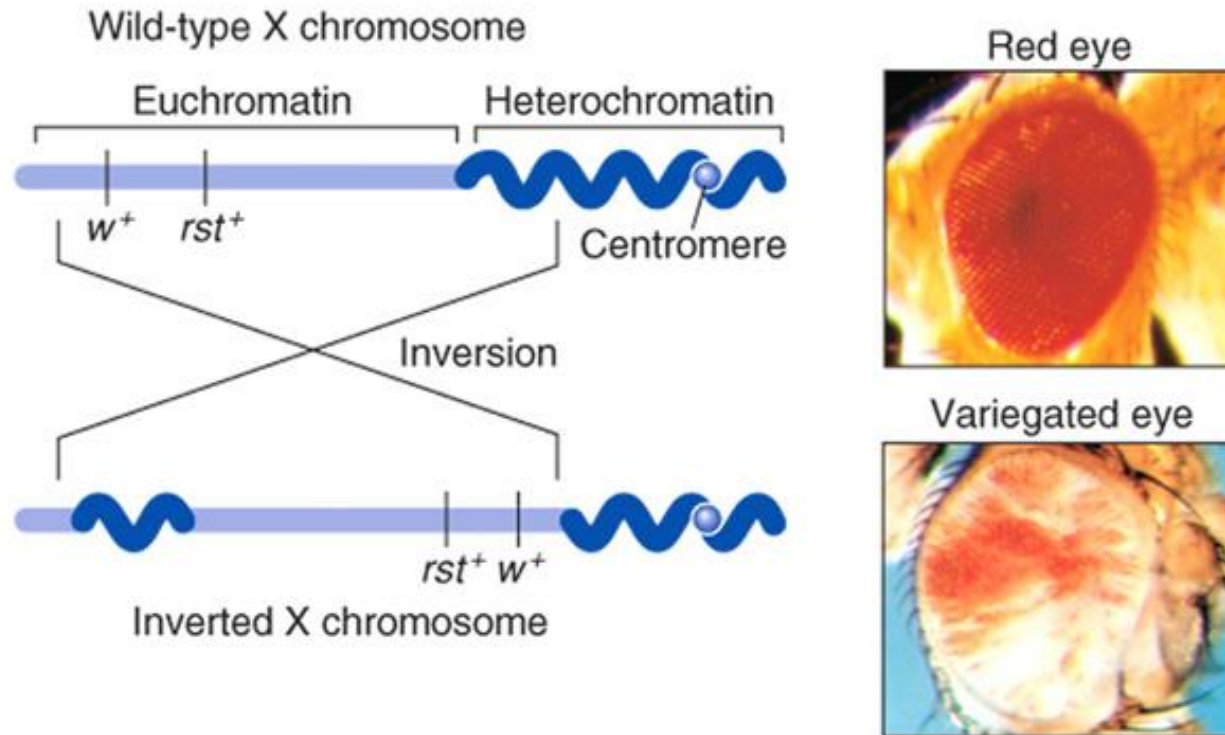
- **烟草烟雾：** 成人期形成的与吸烟有关的基因甲基化大多可逆，而胎儿期的烟雾暴露导致的基因甲基化大多是永久的；
- **甲醛：** 可作为甲基供体参与四氢叶酸循环，进而参与DNA甲基化；
- **酒精：** 阻碍叶酸的利用导致氨基酸代谢障碍，从而影响亚甲基四氢叶酸和胸腺嘧啶核苷合成，导致胎儿基因表达模式的改变；
- **镉：** 是DNA甲基转移酶抑制剂,但长时间的镉暴露也会导致DNA超甲基化和增强DNA甲基转移酶活性；
- **砷：** 宫内砷暴露会改变后代DNA甲基化水平并有剂量依赖性，可以诱导全基因组低甲基化或超甲基化。



## 二、染色质结构与组蛋白修饰

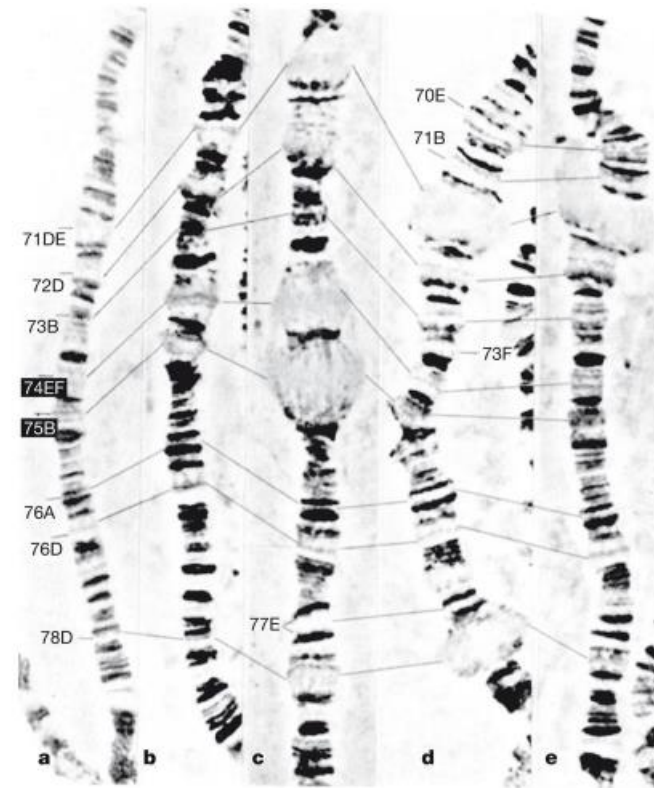


# Position-effect variegation



**斑点位置效应 (Position-effect variegation, PEV):** 当常染色质区基因人为转移到异染色质环境时, 其功能可能发生异常; 从而在个体中表现出正常和异常的混合性状。

## 果蝇唾液腺染色体 上的“puff”结构



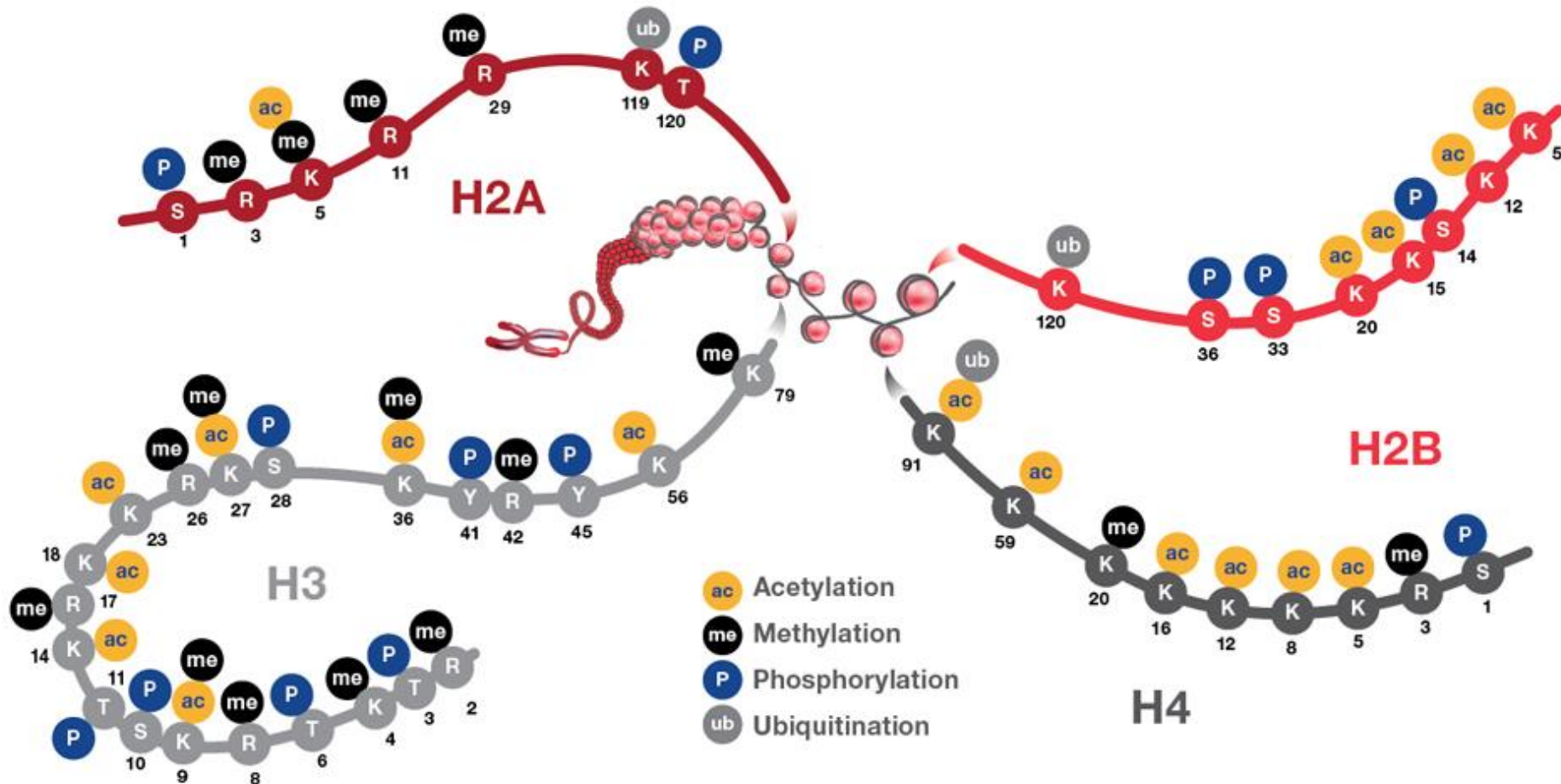
John T. Lis, *Nature* 450, 198-202(2007)

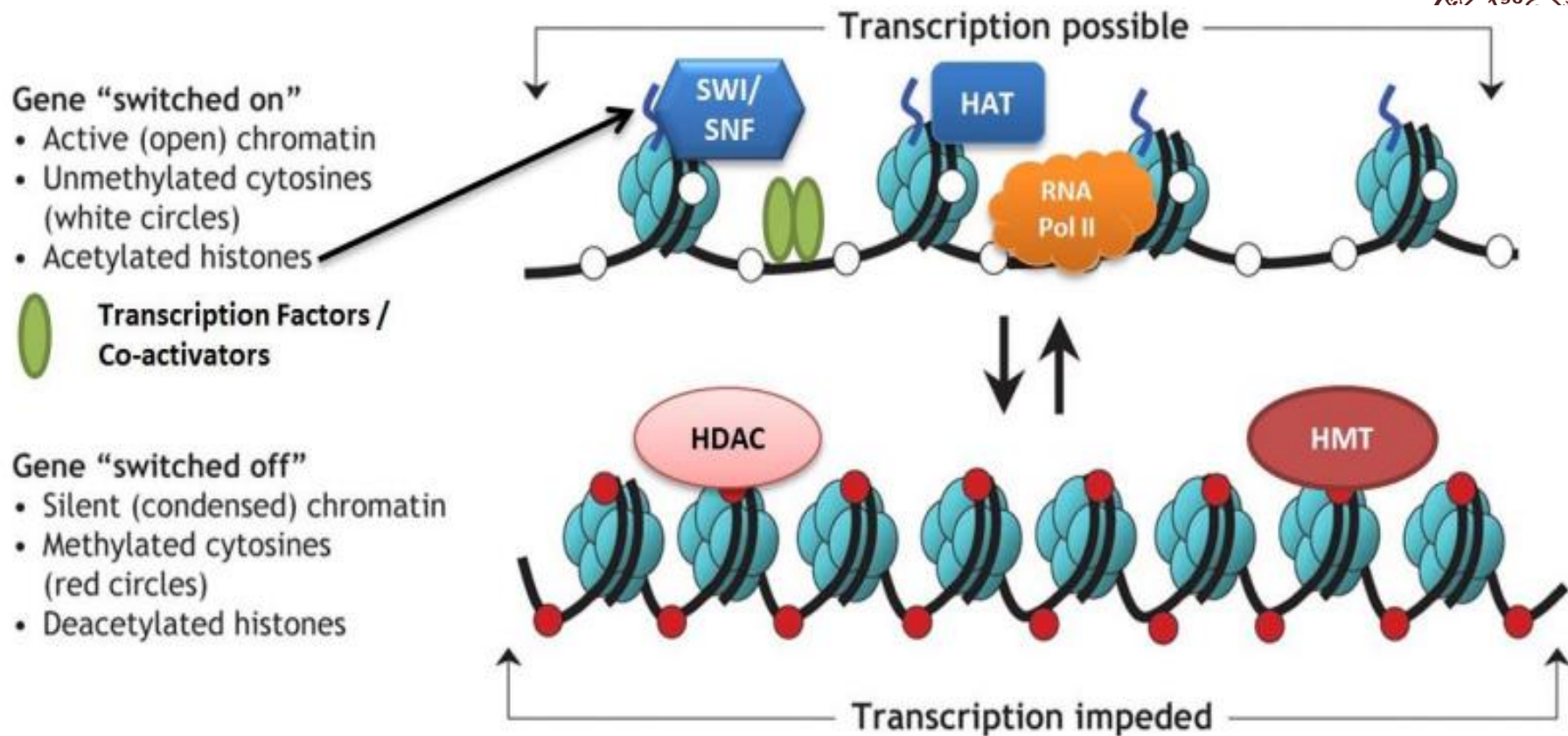
**染色质重塑 (chromatin remodeling):** 核小体包装程度在转录、复制、修复等过程中发生动态变化。影响染色质重塑的因素包括组蛋白的修饰与DNA甲基化。



# 组蛋白修饰:

乙酰化、磷酸化、糖基化、甲基化、泛素化

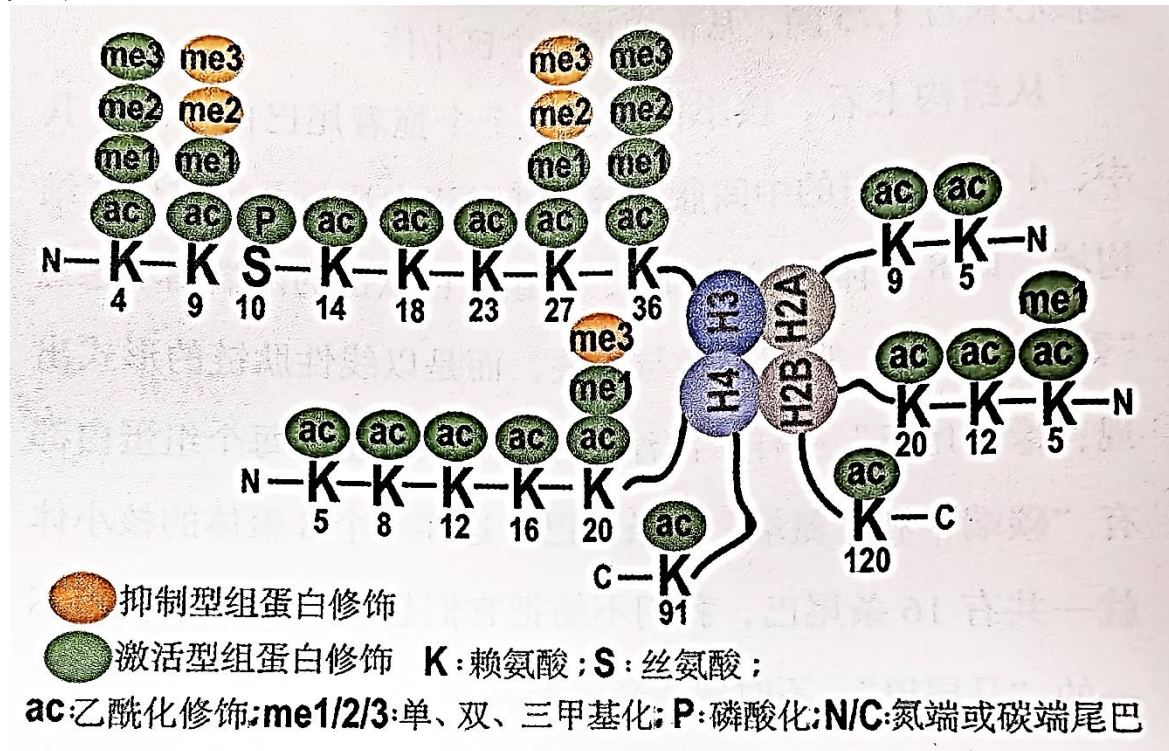




- HAT (histone acetyltransferase)与SWI/SNF染色质重构复合物促进组蛋白的乙酰化;
- HDAC (histone deacetylase)促进组蛋白的去乙酰化; HMT (histone methyltransferase) 促进组蛋白的甲基化;

# 组蛋白甲基化

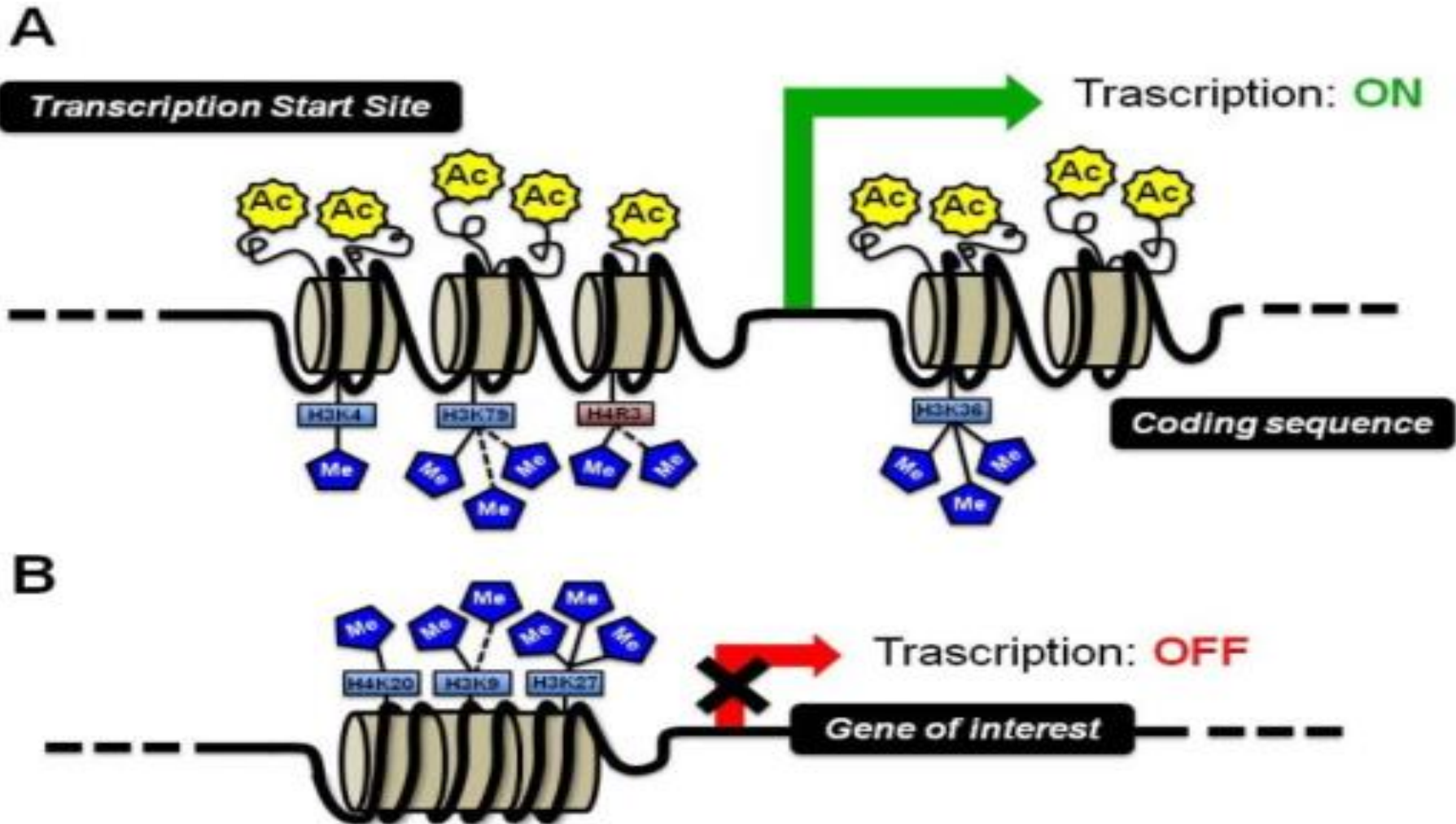
- 组蛋白的**赖氨酸**残基能够发生单、双、三甲基化，而**精氨酸**残基能够单、双甲基化
- 不同程度的甲基化极大地增加了组蛋白修饰和调节基因表达的复杂性。

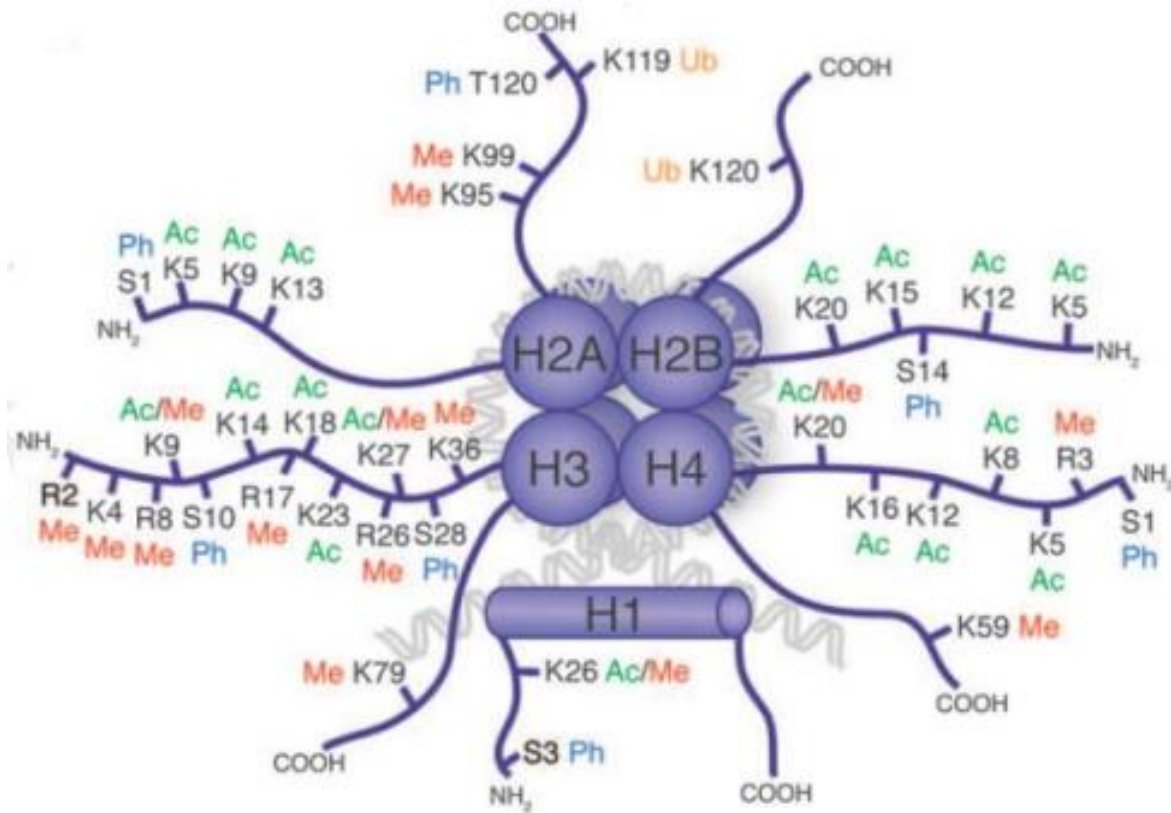




H3K9、H3K27: 乙酰化激活; 甲基化沉默;

H3K4、H3K79: 甲基化激活

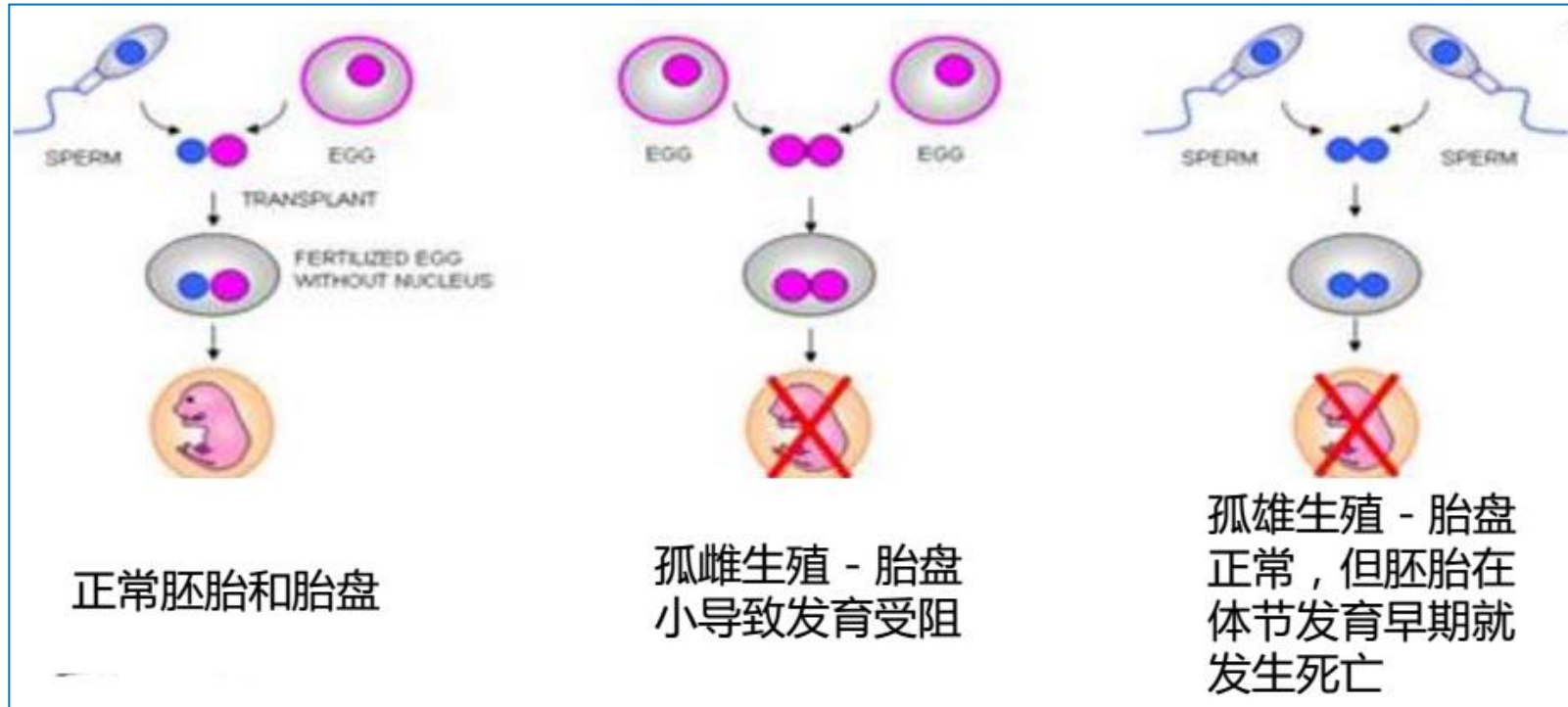




- 组蛋白通过多种修饰方式灵活调控染色质的结构与功能，这些能被识别的修饰信息的总和称为**组蛋白密码**。
- 组蛋白并非只是一种包装蛋白，而是在DNA和细胞其他组分之间构筑了一个**动态的功能界面**。



### 三、基因组印记

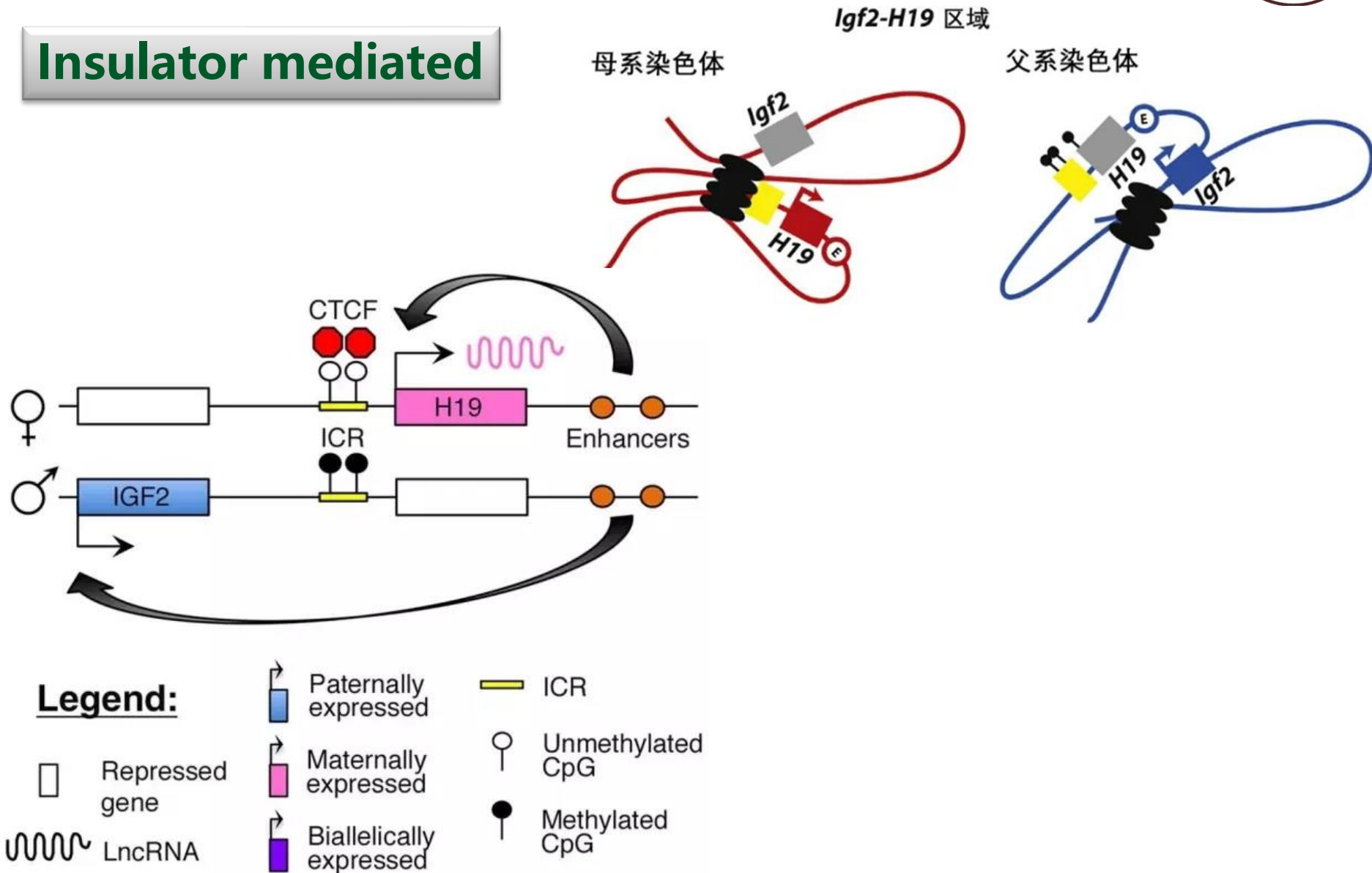


- 哺乳动物父本和母本的基因组在胚胎发育过程中具有不同的作用，都是胚胎正常发育所必需的；——“父母冲突理论”
- 区别父本和母本基因组的关键就是“印记”。基因组印记是调控胚胎早期发育和胚后生长的重要表观遗传机制。

- **基因组印记 (genomic imprinting)**: 指基因组在传递遗传信息的过程中, 通过基因组的化学修饰 (DNA的甲基化; 组蛋白的甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化等) 而使基因或DNA片段被标识的过程;
- 被印迹的基因会随着其来自父源或母源而表现不同, 即源自双亲的两个等位基因中一个不表达或表达很弱;
- 印记的存在使得基因组在一些基因座上成为了功能上的“单倍体”, 在遗传过程中表现出特殊的效应。表现为非孟德尔式遗传, 正反交结果不同;
- 人类中已鉴定的印记基因超过100个, 印记基因数据库:  
<http://www.geneimprint.com>

# Mechanism of genomic imprinting: 1

## Insulator mediated

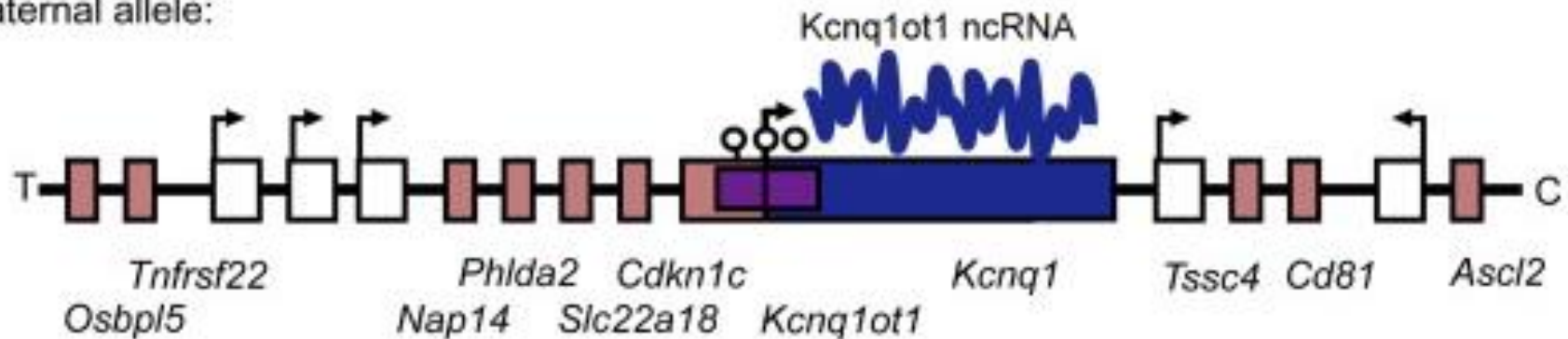


# Mechanism of genomic imprinting: 2

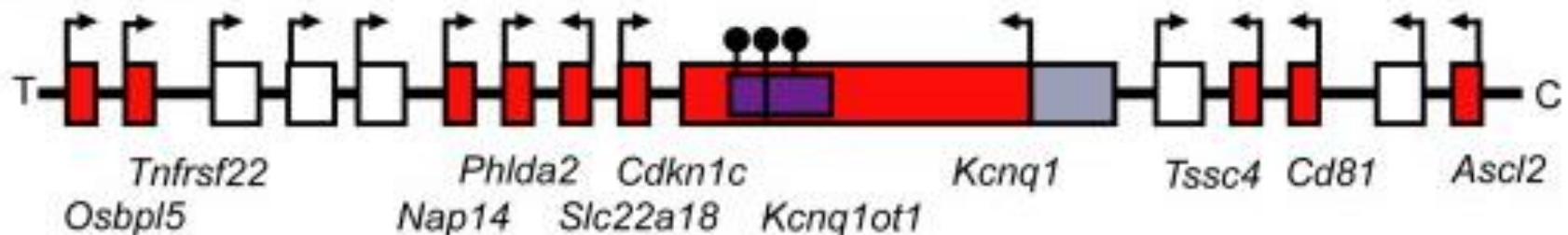
## ncRNA mediated

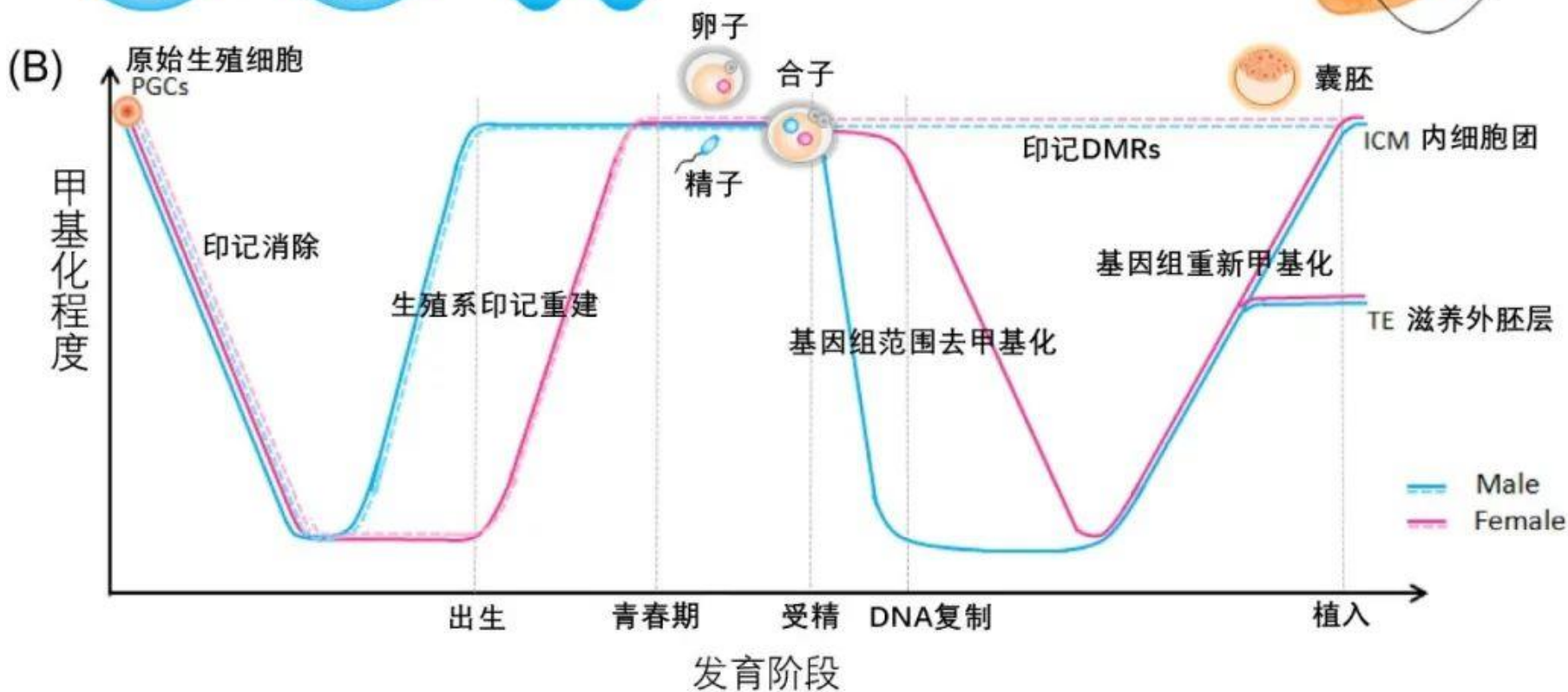
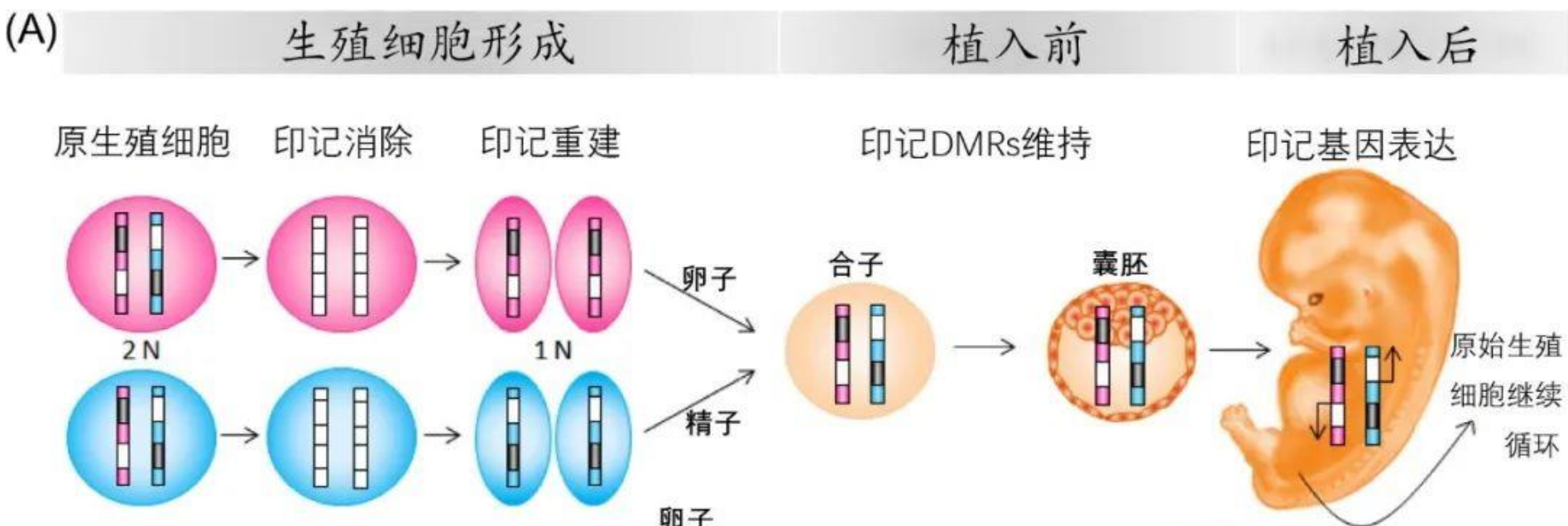
### ncRNA Model of Imprinting: The Kcnq1 Domain

Paternal allele:



Maternal allele:









## 四、RNA介导的基因表达调控

**RNA干扰 (RNA interferece):** 指与靶基因序列同源的双链RNA所诱导一种序列特异性的转录后基因沉默现象。

- **siRNA ( small interfering RNA)**

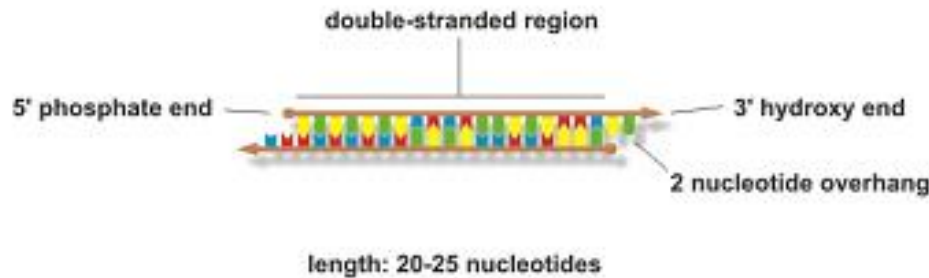
- **miRNA (microRNA)**


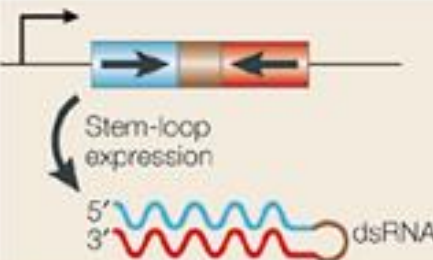
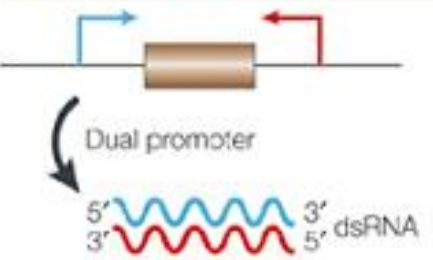

## *I. siRNA*



1990年, Rich Jorgensen将强启动子控制的Chalcone synthase gene转入淡紫色的矮牵牛花, 希望加深紫色。结果许多花出现杂色, 甚至紫色消失。

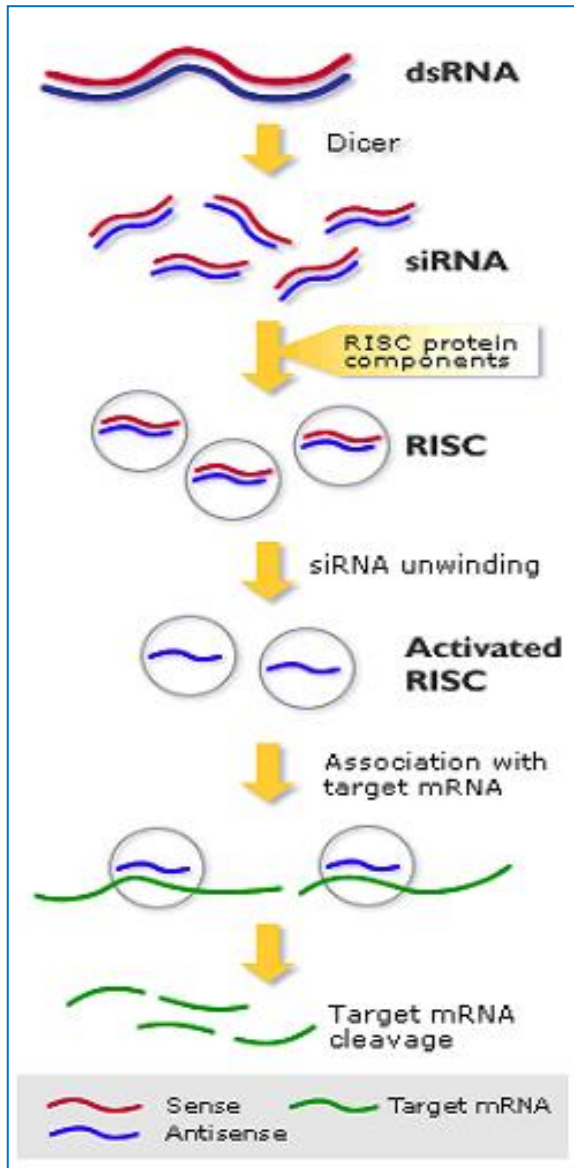
# siRNA (small interfering RNA)



Method	Organism	Pros
 dsRNA	<i>C. elegans</i> <i>Drosophila</i> Trypanosomes	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fast</li><li>• Effective</li><li>• Works in many systems</li></ul>
 Stem-loop expression	<i>C. elegans</i> <sup>77</sup> <i>Drosophila</i> <sup>55</sup> Trypanosomes <sup>78</sup> Plants <sup>79</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stable</li><li>• Inducible</li><li>• Tissue specific</li></ul>
 Dual promoter	Trypanosomes <sup>78,80</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stable</li><li>• Inducible</li><li>• Tissue specific</li></ul>
 VIRUS	Plants	<ul style="list-style-type: none"><li>• Most common technique in plants</li></ul>

- 为双链RNA分子，全长20-25nt, 3' 末端具有2bp突出的粘性末端；序列与靶基因之间高度同源；
- 常见来源：
  - 1) 人工合成和直接注射；
  - 2) RNA病毒入侵；
  - 3) 基因组中反向重复序列的转录产物；
  - 4) 同一基因的双向转录产物；

# siRNA介导的RNAi过程



- dsRNA经过**核酸酶Dicer**的加工成为siRNA;
- siRNA被组装至RNA诱导的基因沉默复合体 (**RNA-induced silencing complexes, RISC**)中, RISC由内切核酸酶、外切核酸酶及解旋酶等多种蛋白组成。在RISC复合物中, 双链的siRNA发生解旋, 正义链被降解, 反义链被保留;
- siRNA的反义链与靶mRNA配对结合;
- 互补结合的mRNA被RISC复合物中的RNase切割降解mRNA, 从而抑制基因表达;

Double-stranded RNA  
sense



antisense



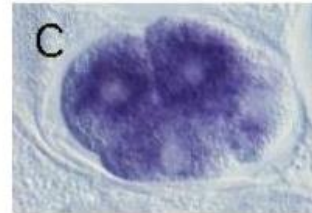
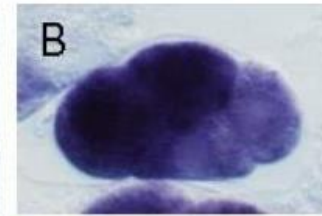
inject



*C. elegans*

Neg. control

Uninjected



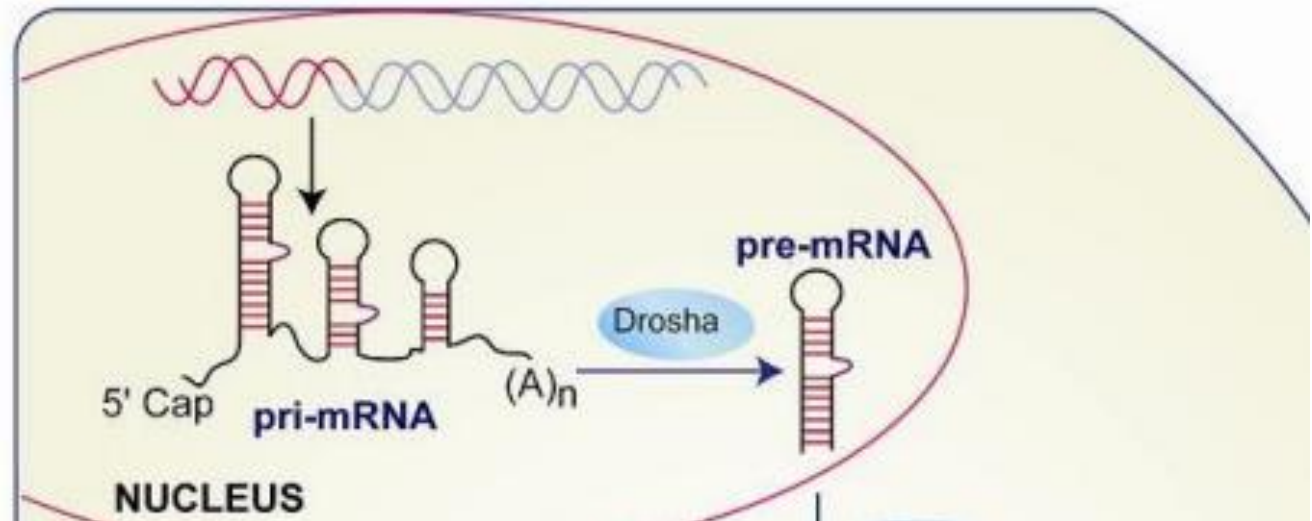
Antisense RNA dsRNA

Mex-3 mRNA detection in embryos  
by *in situ* hybridization

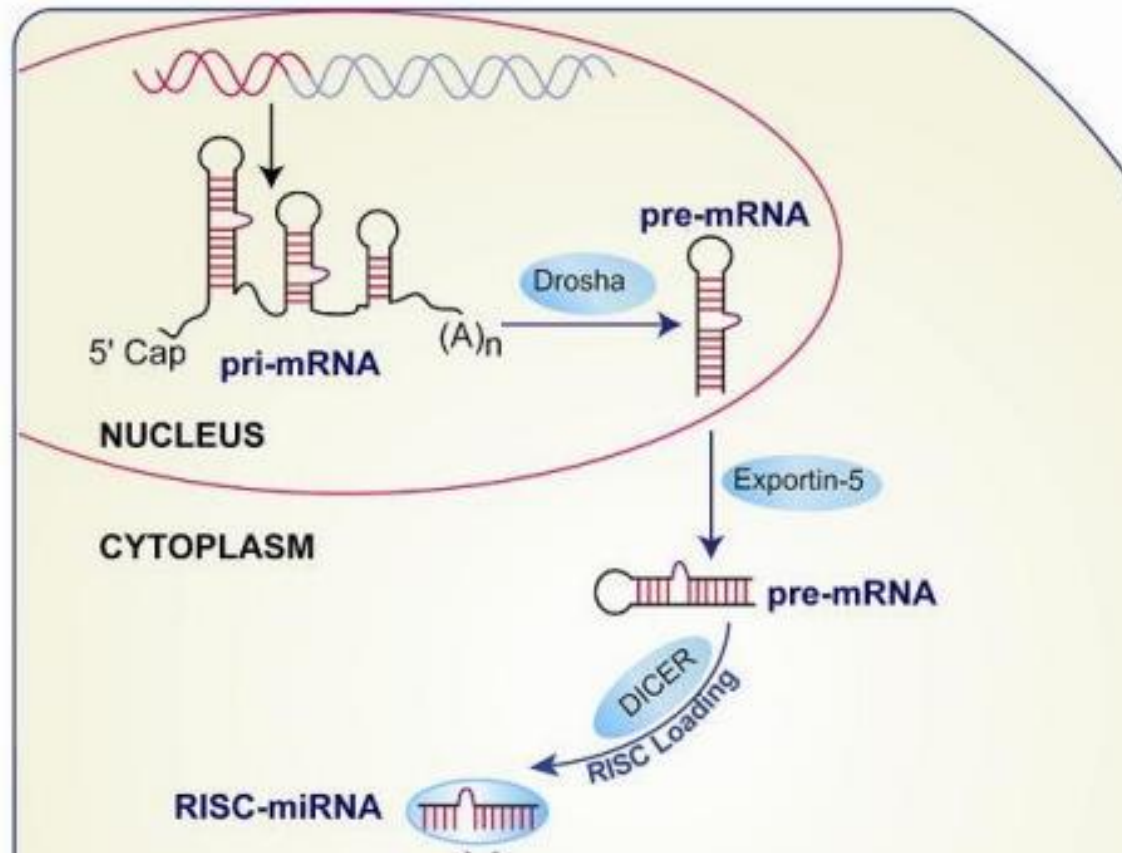
- **siRNA具有级联放大作用：**一方面siRNA可作为一种特殊引物，在RNA依赖RNA聚合酶(RdRp)作用下以靶mRNA为模板合成dsRNA，新合成的RNA可继续被降解形成新的siRNA；另一方面，RNA干扰产生的双链RNA片段还能够继续组装到RISC中，降解mRNA。



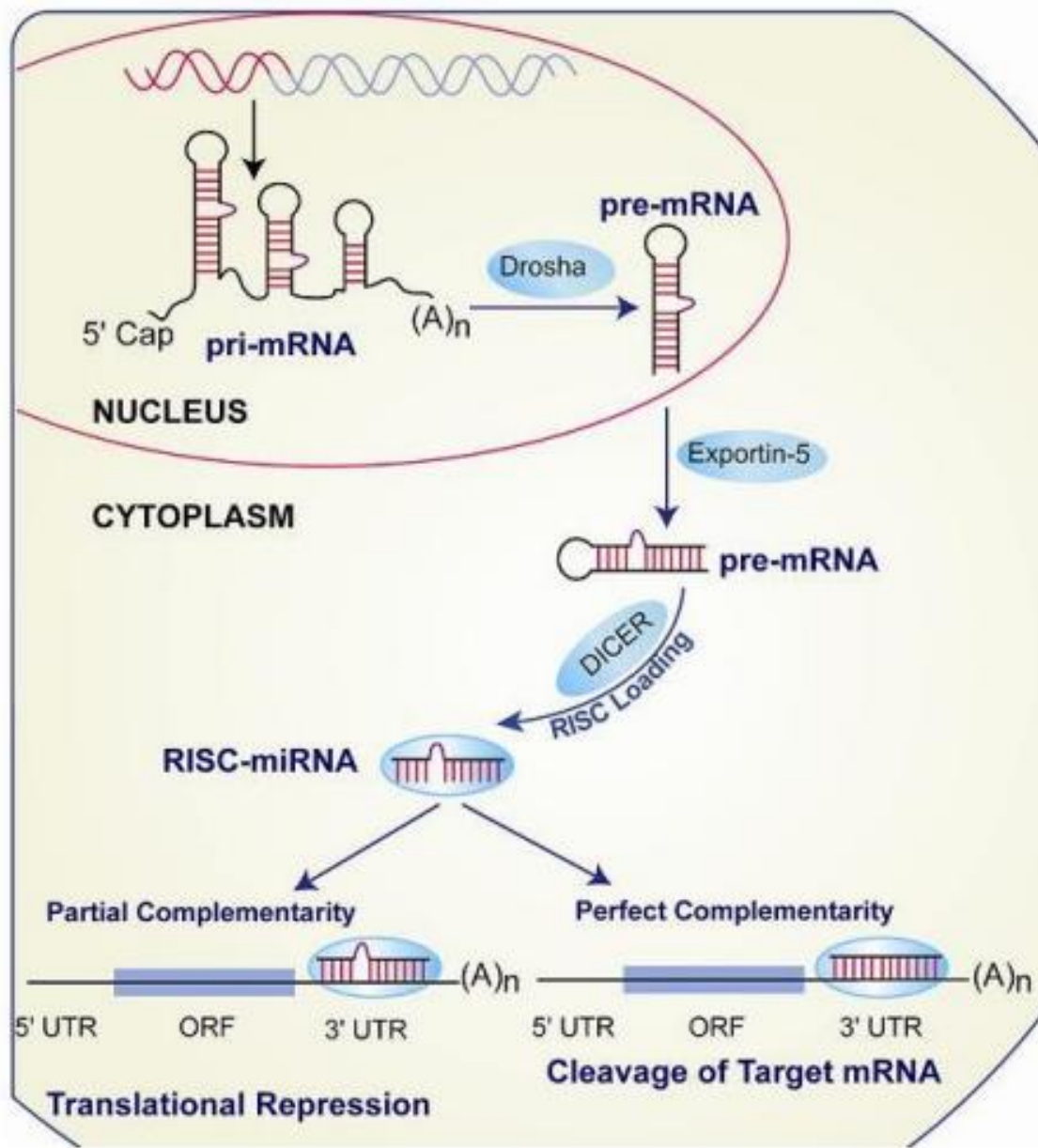
## II. *microRNA*



- 由基因组序列编码，被**RNA聚合酶II**转录产生的miRNA基因产物被称为初级miRNA(primary miRNA)；
- 初级miRNA经过核酸酶**Drosha**的加工形成前体miRNA(preursor miRNA)。前体miRNA约为70nt, 呈茎环结构；

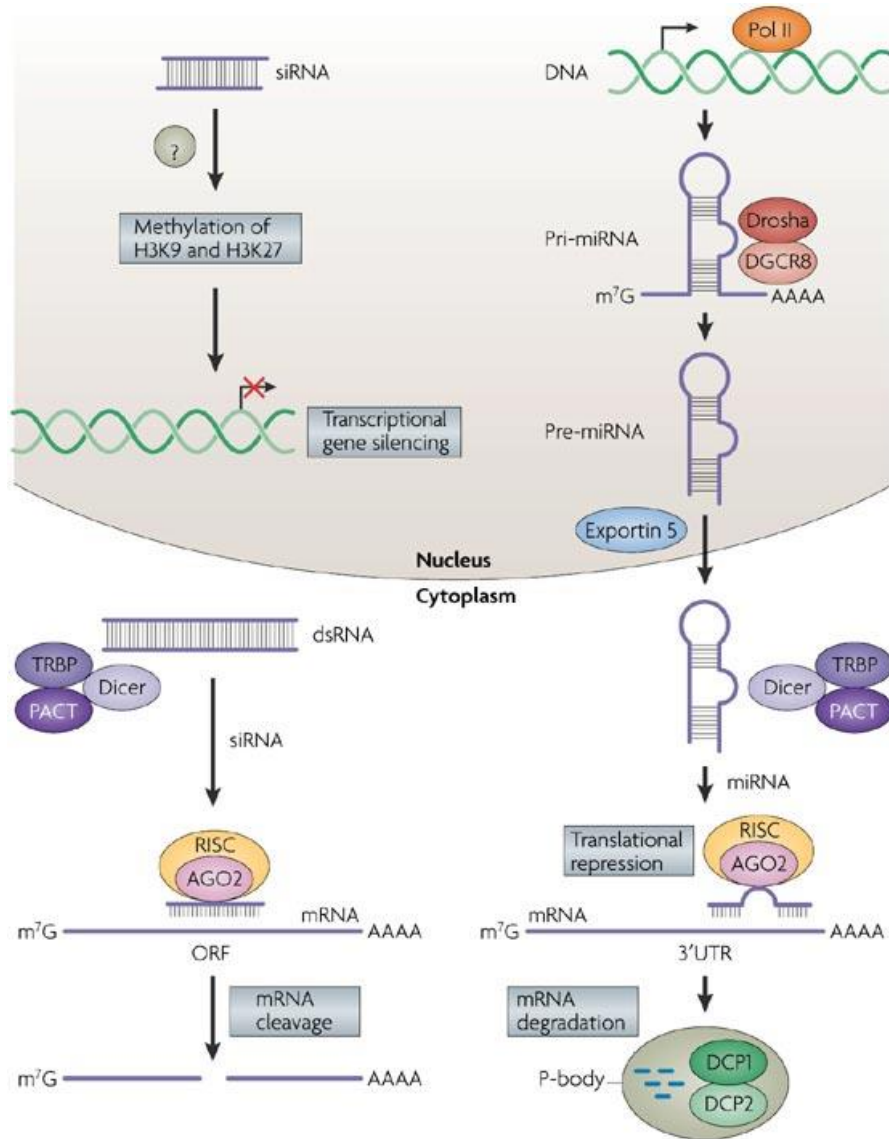


- 前体miRNA经**Exportin-5**蛋白转运到胞质中，在核酸酶Dicer的继续加工下形成成熟的miRNA: **18-25nt**, 3'末端2bp突出，但**内部不完全配对**;
- 成熟miRNA在解旋酶作用下打开双链，其中一条链被包装到**RISC**复合物中;

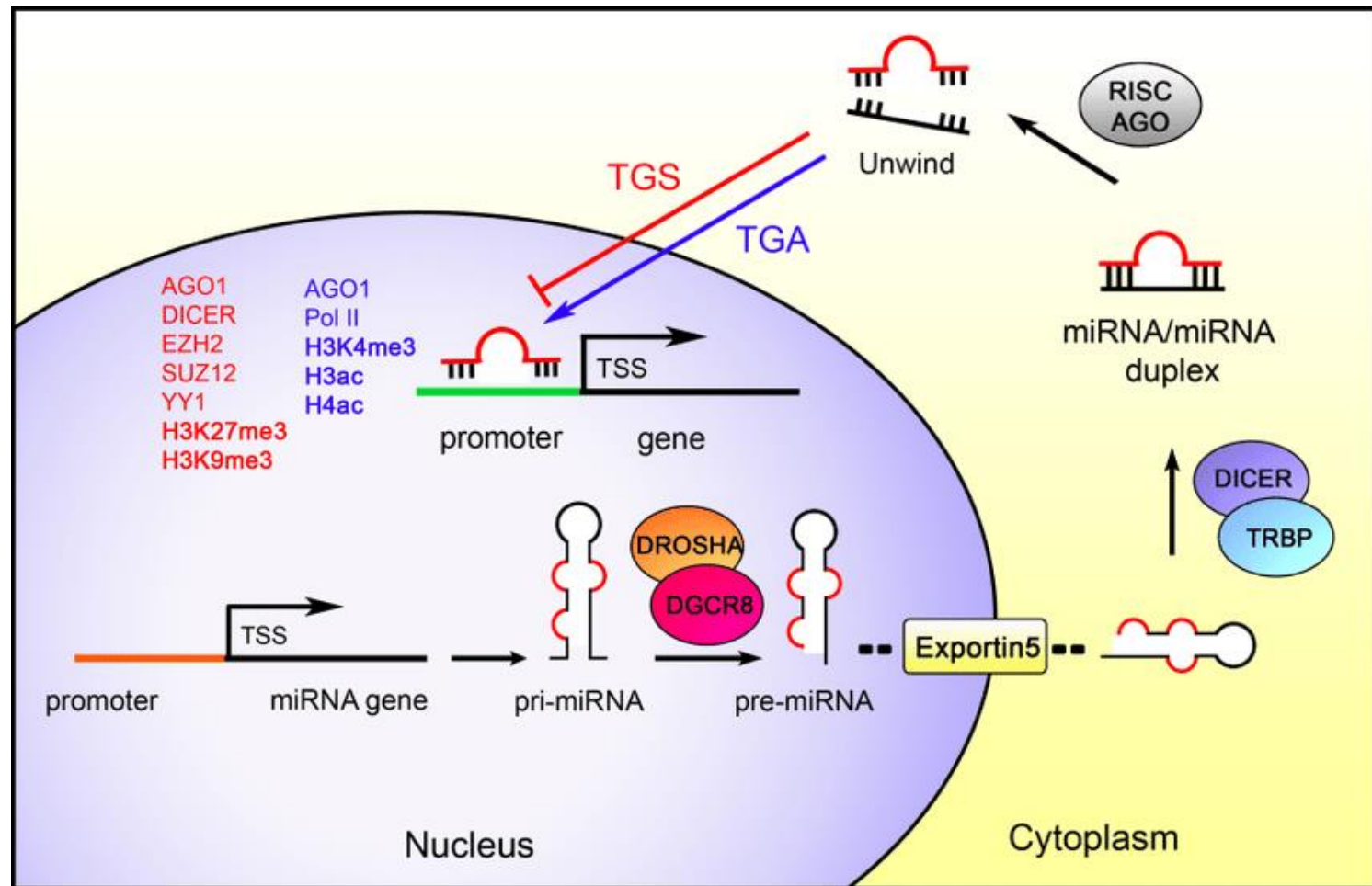


- miRNA对基因表达调控的方式取决于它与靶mRNA的匹配程度：如果miRNA不能与靶mRNA完全匹配，miRNA-RISC复合物则发挥抑制翻译的作用；如果miRNA与靶mRNA完全互补，miRNA-RISC复合物则能够降解靶mRNA（与siRNA相同）；
- 一条miRNA可以调控多个基因，而一个基因也可以受到多个miRNA的调节。

# siRNA vs. miRNA



- miRNA由基因组编码，而大多数siRNA来自外源RNA；
- miRNA参与正常情况下生长发育基因调控，而siRNA一般只有在病毒或其它dsRNA诱导情况下才产生siRNA；
- miRNA在翻译水平也起作用，而siRNA仅有降解mRNA作用；
- miRNA与靶mRNA可以不完全配对，而siRNA完全配对；
- 一个miRNA可以调节多个mRNA，而siRNA一般都是特异性的。



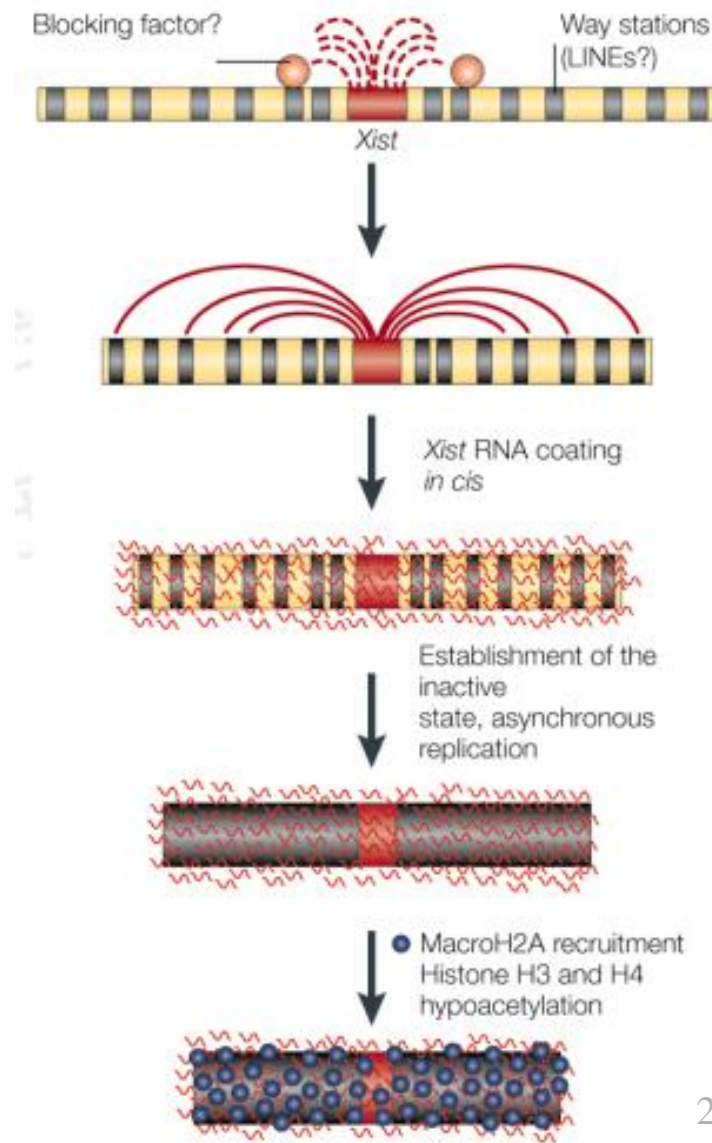
**MicroRNAs regulate gene transcription.** Nuclear miRNAs can mediate both transcriptional gene silencing (TGS) and transcriptional gene activation (TGA) by targeting gene promoters. In the figure, black arrows indicate the miRNAs biogenesis pathway, and red and blue lines represent miRNAs translocated back to the nucleus to mediate TGS or TGA, respectively. Chromatin modifications are represented in bold.



# X失活机制 —— lncRNA介导的表观调控

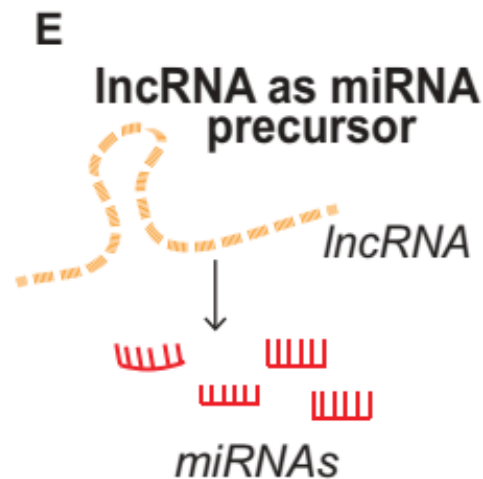
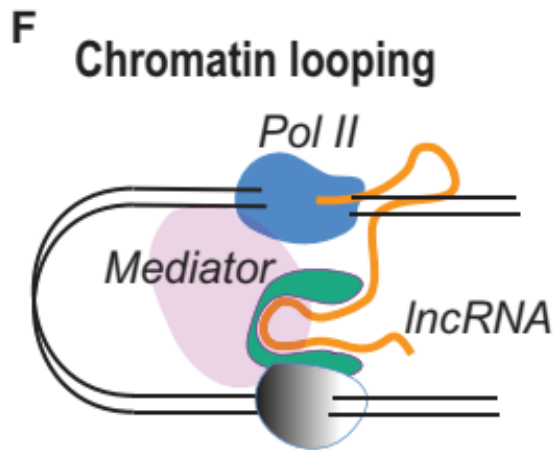
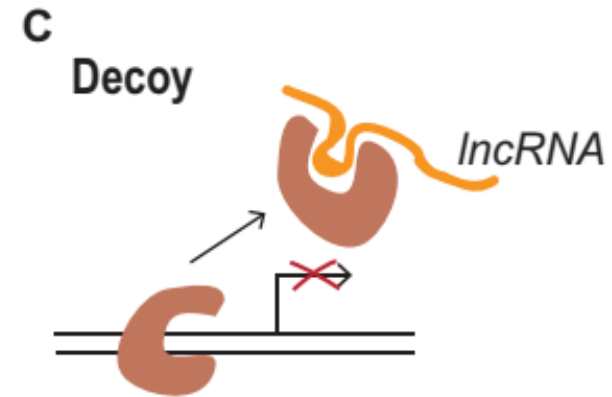
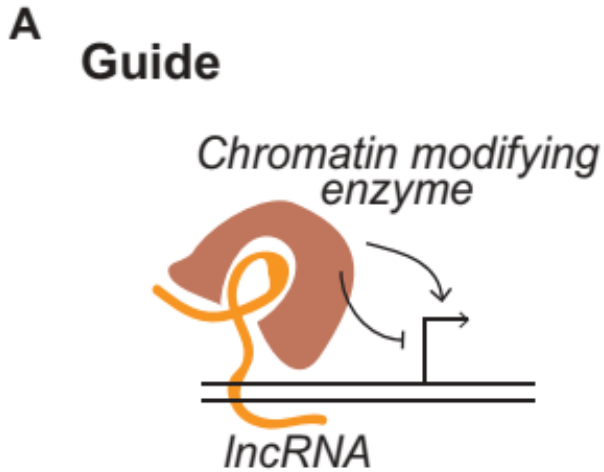
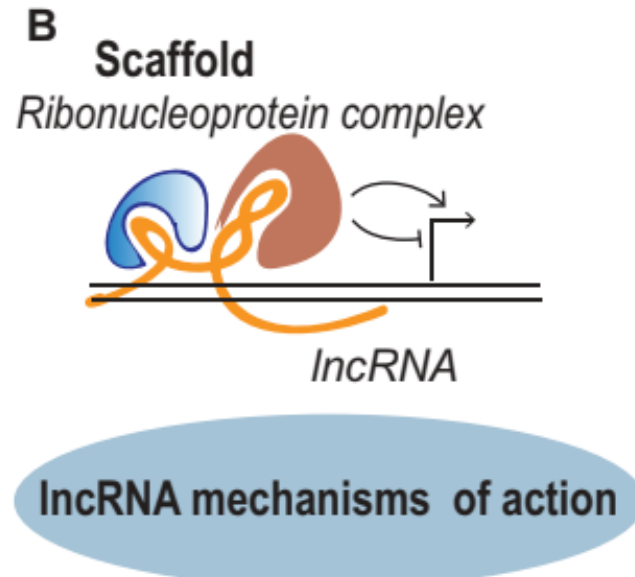


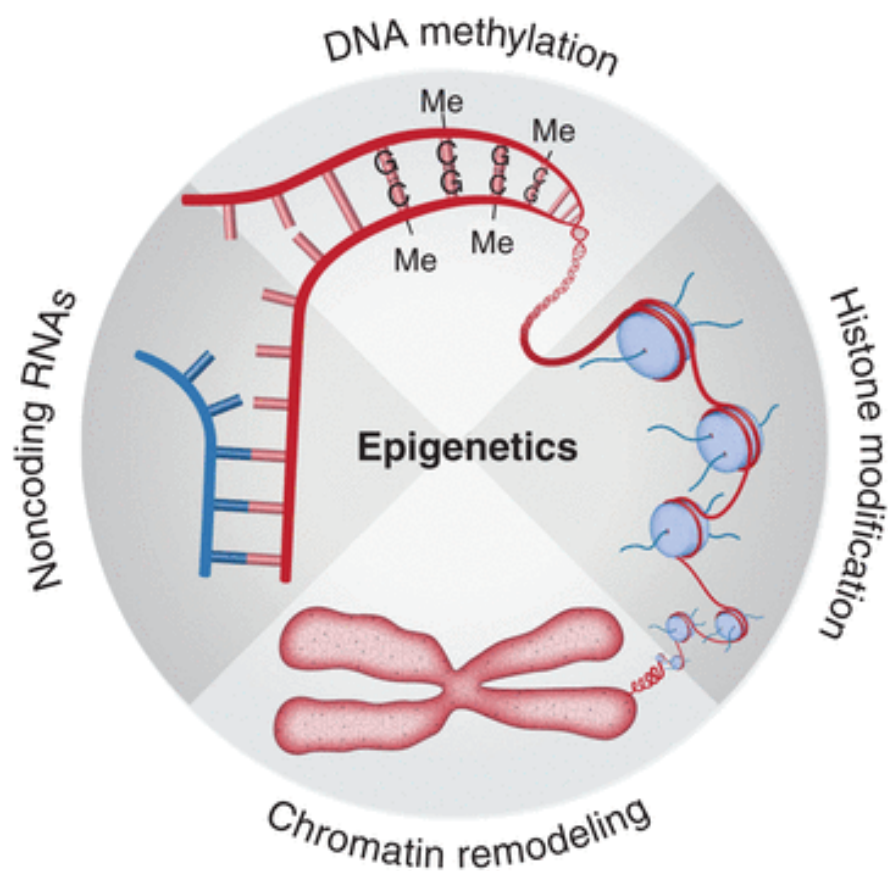
- X染色体随机失活由X失活中心 (X inactivation center, Xic)调控，缺少Xic的X染色体不能失活；
- Xic位点包含许多X失活的调节基因，其中Xist基因编码 Xist RNA，负责起始X染色体的失活；
- 在发生失活的X染色体上，转录表达的 Xist RNA包裹在 X染色体上，并从Xic向两端扩展，并诱发X染色体上的DNA甲基化和组蛋白修饰，建立和维持X染色体的失活状态；
- 在没有失活的另一条X染色体上，Xist DNA的转录被阻断因子沉默。





# lncRNA mechanisms of action





*Dynamic!*

经典遗传：稳定、静态

表观修饰：灵活、动态

动静结合共同构成神奇的生命密码！