

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Molekulární mechanismus metylácie DNA a jej  
kooperácia s histónovými modifikáciami**

**Bakalárska práca**

Miroslav Auxt

Školitel: Jiří Hejnar PhD.  
Konzultant: Mgr. Filip Šenigl

Praha 2008

# Obsah

Abstrakt (Abstract).....	3
Kľúčové slová (Key words).....	3
ÚVOD.....	4
1 DNA metylácia a jej úlohy.....	5
1.1 Mechanizmus DNA metylácie.....	5
1.1.1 Výskyt metyl-cytozínu ( $m^5C$ ) a formovanie CpG ostrovov.....	6
1.1.2 Funkcia CpG ostrovov.....	7
1.2 DNA metyltransferázy.....	7
1.2.1 Štruktúra DNA metyltransferáz (Dnmts).....	8
1.3 De novo DNA metylácia.....	9
1.3.1 Štruktúra a funkcia:.....	10
1.4 Udržovacia DNA metyltransferáza.....	11
1.4.1 Štruktúra Dnmt1.....	11
1.5 DNMT2.....	11
1.6 Dnmt3L (DNA cytosin-like 5- methyltransferase).....	12
2 Histónové modifikácie.....	13
2.1 Metylácia histónov.....	14
2.1.1 Metylácia H3K9.....	14
2.1.2 Metylácia H3K4.....	14
2.1.3 Metylácia H3K79.....	15
2.2 Ubiquitinácia histónov.....	15
2.3 Acetylácia histónov.....	15
2.3.1 Histón acetyltransferázy.....	16
2.3.2 Histón deacetylázy.....	17
2.4 Fosforylácia histónov.....	17
2.4.1 Úloha fosforylácie.....	17
2.5 Histón H1.....	18
3 Mechanizmus transkripčného umlčovania.....	19
3.1 Faktory transkripčného umlčania.....	19
3.1.1 Metyl-CpG väzbové proteíny.....	19
3.1.2 Proteíny interagujúce s Dnmt.....	20
3.1.3 Histón modifikačné enzýmy.....	21
3.1.4 ATP závisle remodelačné komplexy.....	21
3.2 Modely DNA metylácie.....	22
3.2.1 DNA metylácia smerujúca k histónovej metylácii.....	22
3.2.2 Metylácia H3K9 smerujúca k metylácii DNA.....	22
4 Transkripčné umlčovanie retrovirusov.....	24
4.1 Vtáacie retrovirusové vektory.....	25
4.2 TRIM proteíny v úlohe epigenetického umlčovania.....	25
4.2 Daxx protein.....	26

## Abstrakt

Metylácia DNA kovalentne modifikuje cytozín v pozícii 5 vrámci cytozín-guanínových dinukleotidov, ktoré sú vo väčšej časti genómu rozptýlené a metylované. Len asi 1-2% genómu pozostáva z nemetylovaných dlhých CpG bohatých úsekov, ktoré sa označujú ako CpG ostrovy. Tie sú asociované s mnohými promotormi a ich stav rozhoduje o expresii asociovaného génu. Možu byť modifikované DNA metyláciou, ktorú katalyzujú enzýmy, tzv. metyltransferázy. *De novo* metyltransferáza metyluje nemodifikovanú DNA počas skorého embryonálneho vývoja, kým udržovacia metyltransferáza zachováva metylačný stav v dcérskych vláknach DNA počas replikácie. V kooperácii metylácie s niektorými histónovými modifikáciami, a to najmä metylácia H3K9 a deacetylácia H3 histónu, je možné vytvoriť akýsi model transkripčného umlčania na epigenetickej úrovni. Tým sa metylácia podieľa na regulácii transkripcie významných biologických procesov.

Kľúčové slová: metylácia DNA, metyltransferázy, CpG ostrovy, histodeacetylácia, metylácia H3K9

## Abstract

DNA methylation covalently modifies the position 5 of cytosine base in cytosine-guanine dinucleotides, which are dispersed and methylated in the majority of genome. Approximately 1-2% of genome consists of long nonmethylated CpG rich regions, which are named CpG island. These are associated with numerous promoters and their state is crucial for expression of adjacent gene. These genes can be modified by methylation, which is catalyzed by methyltransferases. *De novo* methyltransferases Dnmt3a, 3b methylate unmodified DNA during early embryonal development, whereas maintenance methyltransferase Dnmt1 keeps methylation status of the nascent strand during DNA replication. The co-operation between DNA methylation and some histone modifications, particularly methylation histone H3K9 and deacetylation of this histone, make it possible to establish a model of transcriptional silencing on epigenetic level. In this way, DNA methylation participates in regulation of basic biological processes.

Key words: DNA methylation, methyltransferases, CpG islands, histone deacetylation, H3K9 methylation

## ÚVOD

Genóm obsahuje informácie v dvoch formách. Genetickej a epigenetickej. Genetická informácia spočívajúca v sekvencii nukleotidov DNA dodáva plán vyhotovenia všetkých proteínov potrebných pre život. Epigenetická kontrola spočíva v tom, ako, kedy a kde bude genetická informácia realizovaná. Epigenetická modifikácia vypovedá o dedičných znakoch génovej expresie, pričom nezahŕňa zmeny v DNA sekvencii. Epigenetické zmeny sú reverzibilné a sú prenášané počas mitózy a meiózy. Jedným z mechanizmov podieľajúcich sa na regulácii na epigenetickej úrovni je DNA metylácia a histónová modifikácia. DNA metylácia kovalentne modifikuje cytozínové bázy vrámci CpG dinukleotidov. Spolu s metyláciou utvára histónová modifikácia, ako postranlačná modifikácia histónových proteínov, akýsi kód, ktorý poskytuje dedičnú informáciu buď pre neustálu génovú expresiu alebo génové umlčanie určitých oblastí DNA. Súhra týchto procesov smeruje k remodelácii chromatinovej štruktúry a tým k regulácii prístupnosti promotorových oblastí pre molekuly transkripčného aparátu. Metylácia DNA je dokonalou ochrannou bariérou na molekulárnej úrovni.

Epigenetické umlčovanie je procesom dynamickým a zahrňuje niekoľko krokov- iníciaia, udržanie a reaktivácia. Iniciačný krok spočíva v nasmerovaní modifikácie do určitej oblasti DNA. Táto fáza spočíva v *de novo* metylácii realizovanou Dnmt3a, Dnmt3b. Udržovacia fáza musí byť neustála, zahrňuje prenos značenia *de novo* formovaného chromatinu počas S-fázy každého bunkového cyklu. Tu je zase rozhodujúca aktivita udržovacej DNA metyltransferázy Dnmt1. Reaktivácia umlčanej oblasti môže byť experimentálne pozorovaná pri inhibícii faktorov udržovacej fázy.

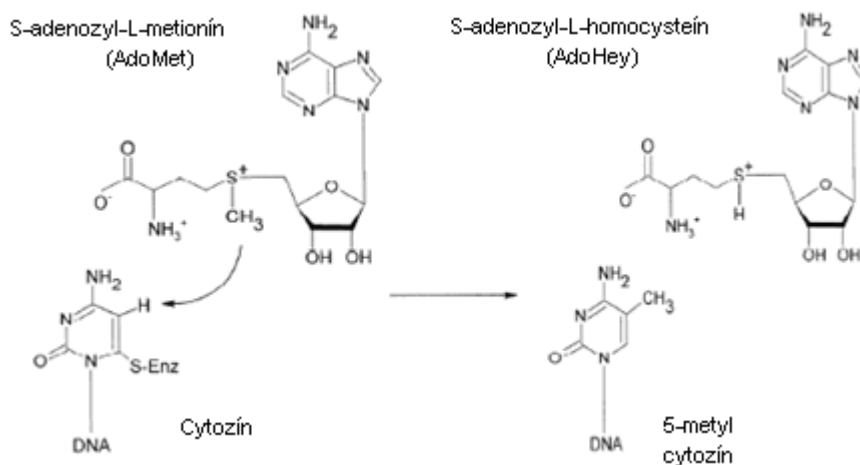
Metylácia DNA je prekážkou úspechu génovej terapie využívajúcej retrovírusové vektory. Expresia terapeutického génu po integrácii do genómu postupne klesá, počet metylovaných CpG sa zvyšuje. Preto študium metylácie je veľkou výzvou do budúcnosti pri tvorbe vhodnej anti-umlčovacej stratégie vo vektorovom designe.

# 1 DNA metylácia a jej úlohy

Metylácia DNA je stabilným a reverzibilným epigenetickým procesom, ktorý umlčeva génovú expresiu. Je esenciálna v regulácii mnohých biologických procesov. U cicavcov má metylácia neodmysliteľnú úlohu pre normálny embryonálny vyvoj (Li, Beard et al. 1993) Hrá veľmi dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie, X chromozomálnej inaktivácii, genotypovom imprintingu (Brockdorff N., 1997), chromatinovej modifikácii (Ng and Adrian 1999), umlčovaní endogénnych retrovírusov (Lavie, Kitova et al. 2005) a retrovírusových vektorov (Bestor T H., 2000). Na význam metylácie v regulácii génovej expresie tiež poukazuje fakt prítomnosti pozmenených DNA metylačných vzorcov počas genézy tumoru (Jones and Laird 1999).

## 1.1 Mechanizmus DNA metylácie

Metylácia ako modifikačný mechanizmus postihuje pozíciu 5' v cytozíme (C), vrámci cytozin-guanínových dinukleotidov (CpG). Výsledkom je 5' metylcytozín ( $m^5C$ ). Ten je považovaný za piatu bázu DNA. Okrem neho sú však známe i ďalšie metyláciou modifikované bázy: N6 metyladenín a N4 metylcytozín (Ting, Jair et al. 2004). Modifikácia DNA metyláciou je katalyzovaná enzýmom DNA 5-cytozín metyltransferázou (Dnmt). Ten prenáša metylovú skupinu z S-adenozyl-L-metionínu (AdoMet) na uhlík v pozícii 5' cytozínu v dinukleotidových CpG sekvenciách (obr. 1) (Adams et al. 1979). Metylačná modifikácia cytozínu stéricky nenaruša Watson/Crickovo párovanie báz. Metylová skupina je umiestnená vo veľkom žliabku DNA, kde je ľahko rozoznávaná proteínmi interagujúcimi s DNA (Albert 2002)



obr1. metylácia cytozínu na 5' metylcytozín. Zdrojom metylových skupín je AdoMet (upravené podľa Turek-Plewa J, Jagodziński PP., 2005). Metylačná reakcia katalyzovaná Dnmt vyžaduje formáciu dihydrocysteínového intermediátu, ktorý sa kovalentne viaže na enzým a uvoľňuje S-adenosyl-L-homocysteín ako produkt. V druhom kroku je kovalentná väzba prerušená a metyl-cytozín je uvoľnený. (Hermann, Gowher et al. 2004)

Prvé štruktúry získané röntgenovou difrakciou DNA-(cytozín-C5)-metyltransferázy v komplexe s DNA demonštrujú, že pri metylácii dochádza k vytočeniu cieľovej bázy (base flipping) z DNA helixu pred metyláciou. Vytočenie bázy spočíva v rotácii cytozínu okolo cukor-fosfátovej väzby. Tým sa cytozín dostáva do katalytického miesta enzýmu. Väzby párujúce bázy sú prerušené a poschodové (stacking) interakcie sa taktiež strácajú. Týmto istým spôsobom fungujú i opravné mechanizmy eukaryot- DNA glykozylázy. (Klimasauskas, Kumar et al. 1994)

### 1.1.1 Výskyt metyl-cytozínu (m<sup>5</sup>C) a formovanie CpG ostrovov

DNA metylácia na C5 pozícii cytozínu je jedinou známou kovalentnou modifikáciou DNA u metazoi, u ktorých sa 5-metylcytozín objavuje približne v 3-8% cytozínových zvyškoch, ktoré sa prevažne vyskytujú v krátkych kanonických sekvenciách 5'-GC-3'. (Hermann, Gowher et al. 2004). V genómovej DNA cicavčích buniek, 60-90% cytozínových zvyškov lokalizovaných vrámci CpG dinukleotidov je metylovaných. Cytozínová metylácia v CpG dinukleotidoch je veľmi dôležitý mechanizmus transkripčnej regulácie u stavovcov špeciálne v genóme cicavčích somatických buniek. CpG dinukleotidy sú v genóme prevažne rozptýlené a metylované. Približne 1-2% genómu pozostáva z nemetylovaných dlhých CpG bohatých úsekov, ktoré sú typicky 0,5-2 kb dlhé a zvyčajne asociované s udržovacími (housekeeping genes) a tkanivovo špecifickými génmi na ich 5' konci, a s 3' koncom niektorých tkanivovo špecifických génov. Tieto bohaté CpG úseky označujeme jako CpG ostrovy (CpGIs). Tento bimodálny somatický metylačný vzorec je pravdepodobne zavedený de novo metyláciou, ktorá monitoruje CpG ostrovy a hraničné promotorové oblasti počas skorého embryonálneho vývoja (Gardiner-Garden and Frommer 1987).

U ľudí a myší, približne 60% promotorových oblastí je kolokalizovaných s CpG ostrovmi. CpG ostrovy sú umiestnené na 5' konci jednotlivých génov. Sú lokalizované v prvom exóne a promotoroch mnohých génov. Táto konzistentná asociácia CpG ostrovov s 5' upstream oblasťami génov a metylácia cytozínových zvyškov bezprostredne súvisí

s reguláciou transkripcie a transkripčným umlčaním. Nemetylované CpG ostrovy udržujú susedné promotory transkripčne aktívne. Zároveň CpG ostrovy sú dôležité v ochrane housekeepingových génov pred *de novo* metyláciou a udržujú ich v aktívnom stave. Tým rozloženie CpG ostrovov vytvára akýsi vzorec expresie. V genómovom sekvencovaní CpG ostrovy tiež slúžia ako potenciálne značky k lokalizovaní jednotlivých génov (Antequera 2003).

### 1.1.2 Funkcia CpG ostrovov

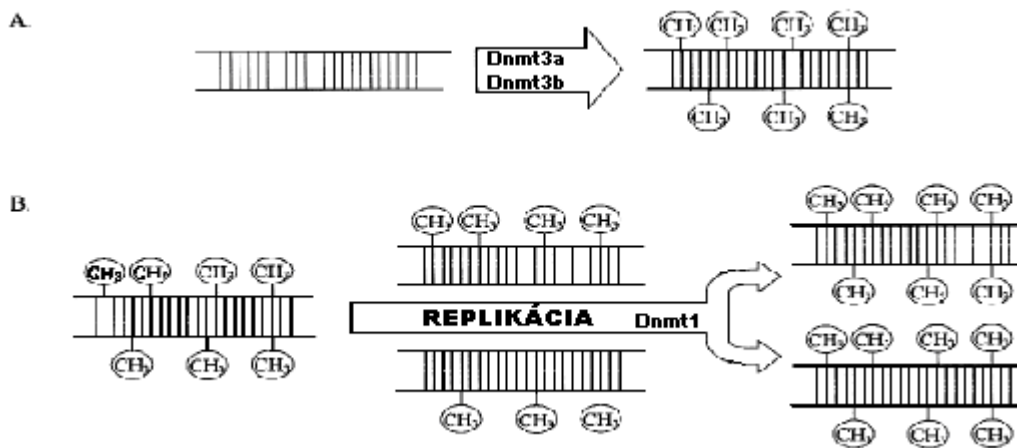
K výraznému objasneniu funkcie CpG ostrovov prispeli experimenty Macleoda a Mullinse v 1994. Málo bolo známe o schopnosti CpG ostrovov chrániť heterológne gény a zaistiť pozične nezávislú transkripciu susedných transgénov alebo retrovírusových vektorov. Použitý bol myšší adenín fosforybosyltransferázový gén *aprt*. Tento udržovací gén (housekeeping gene), ktorého expresia je neustála, obsahuje CpG ostrov zasahujúci do génového promotora. Zahrňuje prvé 2 exóny. Detailným skenovaním tohto CpG ostrovu sa zistilo, že jeho 5' GC bohatá oblasť je väzbovou oblasťou Sp1 transkripčného faktoru. Ten je po obecných transkripčných faktorech jedným z najdôležitejších. Deléciou alebo mutagenézou Sp1 miesta došlo k *de novo* metylácii CpG ostrovu a inaktivácii génu (Macleod, Charlton et al. 1994). Tieto poznatky sú využívané i v našom laboratóriu. *Apert* CpG ostrov bol inzertovaný do LTR vektoru odvodeného od Roussova sarkomového vírusu (RSV). RSV je vtáčí vírus, ktorý sa nereplikuje v cicavčích bunkách. V cicavčích bunkách zrejme chýbajú niektoré faktory úspešného zostavenia partikule alebo dochádza k pozmenenému zostrihu. Možným dôvodom je i chybné rozštiepenie polyproteínového produktu. Ďalej obsahuje vyšší počet CpG vrámci LTR a vedúcich sekvenciách, čo zvyšuje účinnosť metylácie. Bolo dokázané, že RSV-odvodený reportérový provírus spojený s myšším *aprt* CpG zostal transkripčne aktívny tak vo vtáčich ako i v cicavčích nepermisívnych bunkách. (Hejnar et al. 2001; Senigl et al. 2008)

## 1.2 DNA metyltransferázy

Metylácia cicavčej genómovej DNA je katalyzovaná DNA metyltransferázami (Dnmts), ktoré hrajú špeciálnu úlohu v regulácii génovej expresie a iniciácii chromatinovej remodelácie. Rodina eukaryotických DNMT má 5 členov. Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3L. (Kumar et al. 1994)

Rozdeľujeme ich do dvoch rodín (obr2):

- rodina de novo Dnmts - Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3L – efektívne metylujú C na m<sup>5</sup>C v postreplikačne nemetylovanvej DNA počas embryonálneho vývoja (obr.2A)
- udržovacia Dmmt - Dnmt1- modifikuje hemimetylovanú DNA počas replikácie (obr. 2B) (Bestor, T.H. 2000)



obr2. rodina metyltransferáz. sa delí do dvoch rodín. *De novo* (A) a udržovacia Dmmt (B) (upravené podľa Turek-Plewa J, Jagodziński PP., 2005.)

### 1.2.1 Štruktúra DNA metyltransferáz (Dnmts)

Cicavčie Dnmts obsahujú prinajmenšom tri štruktúrne oblasti . N terminálna regulačná doména zodpovedná za lokalizáciu Dnmt v jadre. C terminálna je vlastnou katalytickou doménou. Centrálna časť štruktúry pozostáva z glycin lyzínových motívov (obr.3)

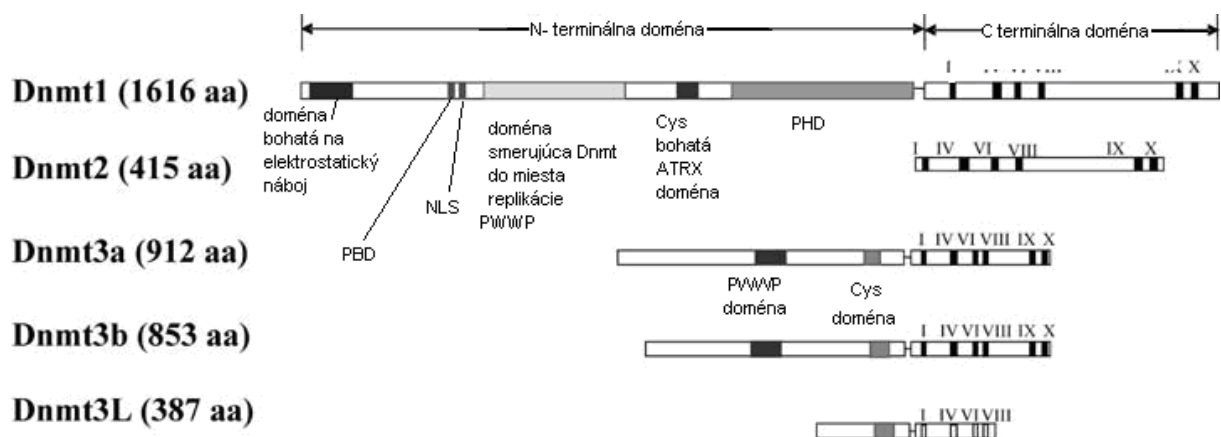
1. N terminálna doména hrá regulačnú úlohu. Je možné ju rozdeliť na niekoľko ďalších domén
  - PBD doména (proliferating cell nuclear antigen binding domain)- bunková proliferačná jadrová antigena väzbová doména
  - NLS (nuclear localization signal) jadrový lokalizačný signál
  - ATRX doména- cysteín bohatý DNA väzbový motív zinkového prstu, zrejme rozpoznáva symetricky metylovanú DNA a tým dochádza k rozšíreniu metylácie z už existujúcich metylovaných CpG na okolité nemetylované sekvencie (Ordway and Curran 2002)
  - PHD doména- polybrómová homologická doména



- PWWP doména- tetrapeptidová chromatín väzbová doména, esenciálna pre väzbu Dnmt k chromatínu. (Obr. 3) (Araujo, Croteau et al. 2001)

2. C terminálna doména obsahuje šesť konzervatívnych motívov

- I - podieľa sa na tvorbe AdoMet väzbového miesta
- IV - viaže Cytozín do aktívneho miesta
- VI- obsahuje glutamínový aminokyselinový zvyšok slúžiaci ako protónový donor
- VIII- neznáma funkcia
- IX- udžuje štruktúru väzbového miesta
- X- participuje na formácii AdoMet miesta (Hermann, Gowher et al. 2004)



Obr3 (upravené podľa Turek-Plewa J, Jagodziński PP., 2005.)

### 1.3 De novo DNA metylácia

Dnmt3a a Dnmt3b vykazujú vysoký stupeň primárnej štruktúrnej homológie. Sú kódované odlišnými génmi mapovanými na chromozóme 2p23 a 20q11.2 (Xie, Wang et al. 1999). Tieto metyltransferázy metylujú CpG dinukleotidy bez uprednostnenia na hemimetylovanú DNA. Sú teda zodpovedné za de novo metyláciu. Tá sa uskutočňuje najmä počas embryonálneho vývoja. Ich aktivita je redukovaná počas diferenciácie embryonálnych buniek a zostáva nízka v dospelých somatických tkanivách (Okano, Bell et al. 1999).

### 1.3.1 Štruktúra a funkcia:

Architektúra Dnmt3a, 3b enzýmov je zhodná so všeobecnou štruktúrou Dnmts (Obr.3) PWWP doména oboch enzýmov pravdepodobne interaguje s chromatinom, a tak regulačná oblasť týchto enzýmov môže viazať rôzne transkripčné represory (Qiu, Sawada et al. 2002). Dnmt3a môže viazať korepresor RP58, onkogénny faktor PML-RAR alebo HP1 protein, kým Dnmt3b môže byť asociovaná s Sin3a, koenzýmom KIF4A, SUMO-1/Ubc 9 a ATP dependentným chromatinovým remodelačným proteínom. Môžu taktiež interagovať s Dnmt1 a aktivovať HDAC1, ktorá deacetyluje histony a reprimuje transkripciu. Kelly a Trasler v roku 1994 objavili, že Dnmt3a je zodpovedná za vytvorenie de novo metylačných vzorcov počas prenatálneho vývoja mužských pohlavných buniek. Zatiaľ čo Dnmt3b participuje na zachovaní de novo metylácie v skorých fázach mitózy mužských pohlavných buniek. (Kelly, T.L.J. and Trasler, J.M. 2004). Táto odlišnosť vo funkcii počas gametického vývoja poukazuje na dôležitosť prítomnosti oboch funkčných enzýmov. Okrem toho Dnmt3a má nižší stupeň tranferázovej aktivity v porovnaní s Dnmt1. Toto by mohlo naznačovať, že Dnmt3a potrebuje ku svojej plnej aktivite ďalšie koaktivátory. Metylácia Dnmt3a je preferovaná do oblastí, ktoré sú ohraničené pyrimidínmi. I keď Dnmt3a je vysoko špecifická pre metyláciu CpG dinukleotidov, metyl cytozín sa objavuje i v CpA a CpT dinukleotidoch. Význam týchto modifikácií je zatiaľ neznámy (Hermann, Gowher et al. 2004).

Mutácie vrámci Dnmt3b génu môžu byť asociované s imunodeficientnými ochoreniami a centromérovou nestabilitou (Gowher, Liebert et al. 2005) Znáмым ochorením je ICF (imunodeficiency, centromere instability, facial abnormalitie syndrom). Jedná sa o autozomálne recesívne ochorenie. Jedinci s ICF syndrómom zvyčajne nesú mutácie v C terminálnej doméne *de novo* metyltransferázy Dnmt3b. Klasická satelitná DNA v somatických bunkách je veľmi silno metylovaná na cytozínových zbytkoch ale u pacientov s ICF syndrómom je vo všetkých tkanivách nemetylovaná. Pericentromerický heterochromatin niektorých chromozómov (1,9,16) sa predlžuje. Stáva sa náchylným na zlomy a nesprávne spojenia. Chromatinové abnormality zahŕňajú kompletne nemetylovanú DNA v pericentrických oblastiach chromozómov 1,9,16 (Xu, Bestor et al. 1999).

## 1.4 Udržovacia DNA metyltransferáza

Dnmt1 je hlavný enzým zodpovedný za udržiavanie metylačných vzorcov počas replikácie. Počas eukaryotickej replikácie genómovej DNA, je približne 40 miliónov CpG dinukleotidov metylovaných len v jednom reťazci v *de novo* syntetizovanej DNA. Tieto hemimetylované CpG úseky musia byť metylované presne pre zachovanie vzorca metylácie. Dnmt1 je lokalizovaná v replikačnej vidličke a metyluje *de novo* syntetizované vlákno. In vitro bolo dokázané, že aktivita metyltransferázy je 5 až 40 krát väčšia pri hemimetylovanom vlákne ako pri nemetylovanom (Hermann, Goyal et al. 2004).

### 1.4.1 Štruktúra Dnmt1

DNMT1 pozostáva prinajmenšom z troch najdôležitejších elementov. Prvá časť- N terminálna oblasť o veľkosti 621 aminokyselinových zvyškov, nie je esenciálna pre funkciu metyltransferázy (Pradhan and Esteve 2003). Jej funkcia spočíva najmä v interakcii s inými proteínmi. Napr. PCNA (proliferating cell nuclear antigen), SNF2- člen rodiny enzýmov remodelujúcich chromatin (hsSNF2H), inhibitor cyklin dependentnej kinázy (p21WAF1), E2F1 transkripčný faktor, HDAC1, HDAC2 (Ng and Bird 1999). N terminálna doména tiež rozoznáva MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 a HP1 proteín. Interakcie DNMT1 s týmito supresorovými proteínmi naznačuje, že je dôležitou súčasťou komplexu, ktorý potláča transkripciu. N terminálna doména hrá regulačnú úlohu. pozostáva z bunkovej proliferatívnej jadrovej antigenej väzbovej domény (PBD), jadrového lokalizačného signálu (NLS), ATRX- oblasť cystein bohatých DNA väzbových proteínov motívu zinkového prstu, polybrómovej homológnej domény (PHD) napomáha pri smerovaní Dnmt1 do miesta replikácie. Tetrapeptidová doména PWWP, dôležitá pre väzbu DNMT s chromatinom (obr.4) (Bestor 2000)

## 1.5 DNMT2

DNMT2- je najmenšou cicavčou DNA methyltransferázou. Bola identifikovaná v roku 1998. Pozostáva výhradne z C terminálnej domény a nevlastní regulačnú N terminálnu doménu. Táto katalytická doména neprejavuje *de novo* alebo udržovaciu metyltransferázovú aktivitu v embryonálnych bunkách alebo dospelých bunkách (Pradhan and Esteve 2003).

Štruktúra DNMT2 napovedá, že tento enzým by sa mohol uplatňovať pri rozpoznávaní DNA chýb, DNA rekombinácii a pri mutačných opravách. (Okano, Xie et al. 1998)

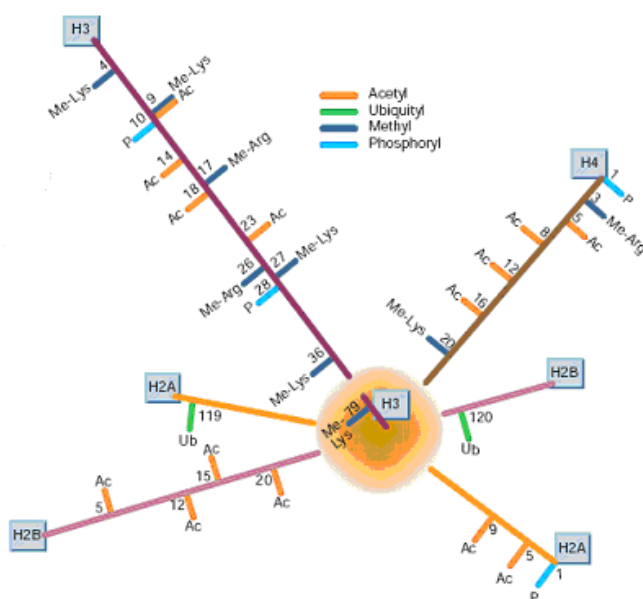
## **1.6 Dnmt3L (DNA cytosin-like 5- methyltransferase)**

Patrí do Dnmt3 rodiny. Proteín, ktorému chýba metytransferázová aktivita. Musí kooperovať s ostatnými *de novo* Dnmts. Má ale regulačnú funkciu. Je exprimovaný v postnatálnom vývoji samičej bunkovej línie, počas utvárania metylačných vzorcov. Obsahuje funkčný nukleárny lokalizačný signál (NLS), ďalej ATRX motív zinkového prstu. Prvý je zodpovedný za jeho lokalizáciu do jadra a druhý sa uplatňuje pri väzbe na DNA. Hlavnou úlohou DNMT3L je aktivácia HDAC1. Tým sa podieľa na histónovej deacetylácii, chromátinovej remodelácii (Deplus, Brenner et al. 2002). DNMT3L je nevyhnutný pri samičom imprintingu. Svojou C terminálnou doménou posilňuje činnosť *de novo* Dnmt3a a 3b a tým zvyšuje afinitu väzby na DNA. Interakcia s Dnmt1 nebola pozorovaná. Dnmt3L vlastní rastlinnú homeodoménu. Je nepostrádateľná pri metylácii DMR (differently methylated region) samčích imprintovaných génov a napomáha pri *de novo* metylácii po implantácii embrya do maternice (Suetake, Shinozaki et al. 2004)

## 2 Histónové modifikácie

Chromatínová štruktúra spočíva v asociácii genómovej DNA a histónových proteínov. Nukleozóm je základnou opakujúcou sa jednotkou kompaktnej štruktúry chromatínu. Pozostáva zo 146 bp DNA omotanej okolo oktamerického histónového jadra. Nukleozomálne jadro je tvorené dvomi kópiami histónových proteínov H2A, H2B, H3 a H4. Každý nukleozóm je spojený so svojim susedom krátkym spojovníkom DNA o veľkosti 80 bp. Tento bazálny polynukleozomálny reťazec je kompaktovaný do vlákna o priemere 30 nm. Nukleozomálna DNA je okrem toho kompaktovaná asociáciou so spojovacím histónom H1. Na kompaktnej štruktúre sa podieľajú i ďalšie nehistónové proteíny. (Felsenfeld and Groudine 2003).

N konce histónových proteínov vyčnievajúce z nukleozomálneho jadra podliehajú post- translačným modifikáciám. Tieto modifikácie spôsobujú zmeny chromatínovej štruktúry a hrajú veľmi dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie. Tieto modifikácie sú signálmi pre väzbu špecifických proteínov. Medzi najdôležitejšie histónové modifikácie patrí acetylácia lyzínu, fosforylácia serínu a treonínu, metylácia arginínu a lyzínu, poslednou je ubiquitinilácia lyzínu (obr 4). Acetylácia a fosforylácia sú reverzibilnými a dynamickými procesmi. Sú asociované s inducibilnou expresiou jednotlivých génov. Zatiaľ čo metylácia, je stabilnejšou modifikáciou. Modifikácie histónov v konečnom dôsledku vytvárajú histónový kód, ktorým sa ustáľuje euchromatínová a heterochromatínová štruktúra (Iizuka and Smith 2003).

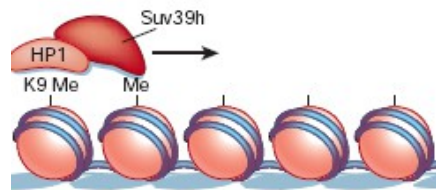


Obr4. Prehľad histónových modifikácií (Felsenfeld and Groudine 2003)

## 2.1 Metylácia histónov

### 2.1.1 Metylácia H3K9

Lyzínové a arginínové aminokyselinové zvyšky sú modifikované početnou metyláciou. Napr. Lys4, Lys9, Lys27, Lys36, Lys79 na H3 a Lys20 na H4 (Sims, Nishioka et al. 2003). Lyzínové zvyšky môžu byť modifikované metyláciou niekoľkonásobne, mono- di-, tri. Táto diferenciálna metylácia dodáva funkčnú diverzitu každému metyllyzínu (metLys). Dôležitým poznatkom k porozumeniu metylácie lyzínu je štúdium Su(var) génu, ktorý kóduje histon metyltransferázu. Biochemické analýzy ľudského homológa Suv39H1 ukazujú, že jeho enzymatickou aktivitou dochádza k špecifickej metylácii H3 histónu v pozícii Lys9 (Rea, Eisenhaber et al. 2000). Nukleozomálna metylácia na aminokyselinovom zvyšku lyzínu 9 histónu 3 (H3K9) je dôležitým signálom inaktívneho chromatinu. Je špecificky rozoznávaný chromodoménom heterochromatínového proteínu 1 (HP1) (Nakayama, Rice et al. 2001) Tento proteín do tejto oblasti rekrutuje histónmetyltransferázový enzým Suv 39h. Následne dochádza k metylačnej vlne, ktorá modifikuje ďalšie lyzíny (obr5).



obr5. Metylácia histónu H3 K9 (Felsenfeld and Groudine 2003)

### 2.1.2 Metylácia H3K4

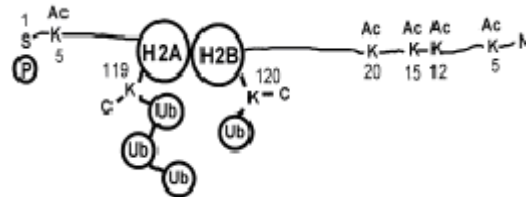
Táto chromatinová modifikácia je chromatinovou značkou aktívnych génov. Biochemické štúdie ukazujú, že metylácia H3K4 zabraňuje väzbe cicavčieho komplexu histondeacetylázy (HDAC) v komplexe s NURD ku chromatinu. (Lachner and Jenuwein 2002). H3K4 asociuje s chromatin remodelujúcim enzýmom Isw1p (Santos-Rosa H, et al. 2003)

### 2.1.3 Metylácia H3K79

Bolo zistené, že táto modifikácia je u cicavcov rozpoznávaná DNA opravným proteínom 53BP1. Okrem toho lokalizácia tohto proteínu do dvojreťazcových zlomov vyžaduje aktivitu H3K79 metyltransferázy Dot1L. (Huyen, Zgheib et al. 2004)

## 2.2 Ubiquitinácia histónov

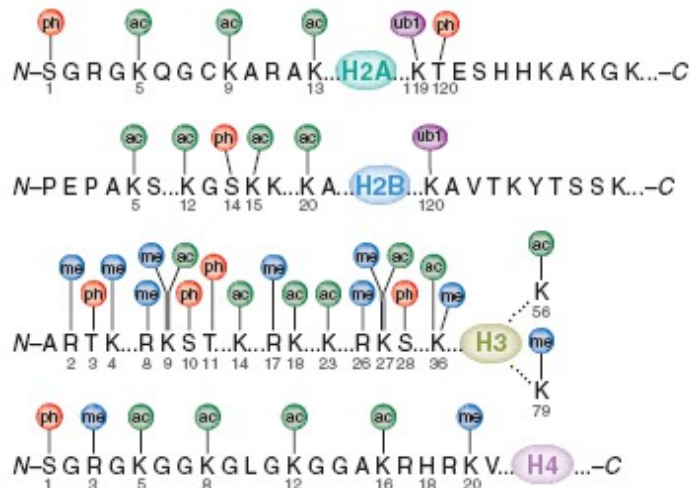
Históny H2A, H2B, H3 a ich varianty sú reverzibilne ubiquitinované. U vyšších eukaryot, histón H2A je prevažne monoubiquitinovaný v pozícii Lys119. Karboxylový koniec ubiquitínu, vysoko konzervovaného 76 aminokyselinového proteínu, je pripájaný na  $\epsilon$ - amino skupinu lyzínu (H2AK119, H2BK120) (obr 6). Reakcia je katalyzovaná ubiquitin ligázou E3. Ubiquitinovú skupinu prenáša E1 aktivačný enzým. E2 konjugačný enzým je potrebný pre modifikáciu určitých substrátov. Ubiquitinovaný histón H2A sa v nukleozomálnej štruktúre vyskytuje veľmi málo, jeden na 20 nukleozómov. Históny H2B a H2A modifikované ubiquitínom sú asociované s transkripčne aktívnym stavom. (Spencer and Davie 1999)



Obr 6. ubiquitinácia histónu H2A, H2B (Spencer and Davie 1999)

## 2.3 Acetylácia histónov

Acetylácia histónov je intenzívne študovaná a ukazuje sa, že je úzko spojená s procesom génovej expzie, stabilitou gnómu a tvorbou nukleozómov. Keďže históny obsahujú podiel bázičných aminokyselinových zvyškov, ktoré sú kladne nabité, za fyziologických podmienok sú priťahované elektrostatickou interakciou k negatívne nabitej DNA. Na základe tohto princípu dochádza k tvorbe kompaktnej nukleozomálnej štruktúry (Shahbazian and Grunstein 2007). Acetylácia histónov je modifikácia, ktorá neutralizuje pozitívny náboj cieleného lyzínu a vyskytuje sa na špecifických lyzínoch všetkých 4 histónov. (obr.7) Acetylová skupina pochádza z Acetyl-CoA. Je prenášaná na  $\epsilon$ - amin lyzínu. (Bhaumik, Smith et al. 2007)



Obr7.prehľad modifikácií acetyláciou- zelené krúžky (Bhaumik, Smith et al. 2007)

K acetylácii dochádza na N terminálnej histónovej doméne. Ide o špecifické pripojovanie acetylových (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) skupín na lyzínové aminokyselinové zbytky. Acetylácia histónových koncov ruši vysoký stupeň kondenzácie chromátinu. (Garcia-Ramirez, Rocchini et al. 1995). Analýza chromátinového vlákna v prepisovaných génoch potvrdzuje prítomnosť tejto modifikácie. Dôsledkom acetylácie podieľajúcej sa na destabilizácii chromátinovej štruktúry je posilňovanie transkripcie. Ďalej napomáha interakciám transkripčných faktorov s nukleozomálnou DNA (Tse, Sera et al. 1998)

### 2.3.1 Histón acetyltransferázy

Enzýmy katalyzujúce histónovú acetyláciu sú histón acetyltransferázy (HAT) a deacetylázy (HDAC). Asociujú s veľkým množstvom koaktivátorov a korepresorov. Rekrutovaná HAT stimuluje transkripciu z chromátinového templátu niekoľkými mechanizmami. HAT rekrutovaná promotor väzbovým aktivátorom spôsobuje lokálnu acetyláciu histónových i nehistónových chromozomálnych proteínov. V prípade, že je rekrutovaná enhancerom, alebo lokus kontrolným väzbovým aktivátorom dochádza k rozsiahlej acetylácii. Može formovať preiniciačný komplex. Ukázalo sa, že mnohé transkripčné koaktivátory, jako napr Gcn5/PCAF, CBP/p300 a SRC-1 vlastnia vnútornú HAT aktivitu ako súčasť bromodomény (Ikeda, Steger et al. 1999)



### 2.3.2 Histón deacetylázy

Histónová acetylácia môže byť obrátená spätočnou enzymatickou aktivitou histondeacetylázou (HDAC). Vedie k represii daného génu, zvýšením kondenzácie chromatínu. Poznáme dve skupiny histon deacetyláz. Kvasinkové – Rpd3, Hos1, Hos 2. Cicavčie- HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4. Mnohé transkripčné korepresory jako napr. mSin3A, NuRD/MI-2 obsahujú podjednotky s HDAC aktivitou. (Spencer and Davie 1999)

## 2.4 Fosforylácia histónov

Históny sú často fosforylované v špecifických fázach bunkového cyklu. Pripájanie fosfátových skupín na aminokyselinové histónové zvyšky v rôznych pozíciách je katalyzované skupinou niekoľkých kináz. Fosforylácia histónu H2A je indukovaná signálmi poškodenia DNA (Foster and Downs 2005). Fosforylácia histónu H2B je katalyzovaná u ľudí Mst1 (mammalian sterile-20-like kinase). Fosforylácia histónu H3S10 a H3S28 počas mitózy je regulovaná Aurora kinázou. Iné kinázy ako napr MSK/RSK/Jil môžu sprostredkovať fosforyláciu histónu H3 Ser10 počas génovej expície. Mitotická kináza cdc-2 fosforyluje H1 v skorej profáze a a vrcholu dosahuje počas metafázy. (Nowak and Corces 2004).

### 2.4.1 Úloha fosforylácie

Fosforylácia serínu H4S1 má evolučne konzervovanú úlohu v chromozómovej kompaktácii počas neskorších fáz vývoja gamet. (Krishnamoorthy, Chen et al. 2006). Zdá sa, že práve fosforylácia je nevyhnutná pri prechode z interfázového stavu do mitotického stavu chromatínu. Fosforylované serínové zvyšky H4S1, H2AS1 boli detekované v mitotickom chromatíne cicavcov. Mitotická H4/H2A fosforylácia veľmi úzko súvisí s chromatinovou kondenzáciou, ktorá je taktiež sprevádzaná výraznou hyperfosforyláciou H1 a H3. Nižší stupeň fosforylácie H4/H2A bol identifikovaný v S-fáze. (Barber, C.M. et al 2004). Fosforylácia H2AX sa objavuje po exponovaní bunky DNA poškodzujúcim agens. Jej prítomnosť je nevyhnutná pri opravách DNA. H3S10 fosforylácia hrá dôležitú úlohu pri transkripcii. Asociuje hlavne s génovou aktiváciou. Väčšina týchto modifikácii sa objavuje hneď po aktivácii Ras-Map kinázovej dráhy a po indukci rastovými faktormi (Nowak and Corces 2004).

## 2.5 Histón H1

H1 histón sa podieľa na vyššej kondenzácii chromatinovej štruktúry. Tento spojovací histón zrejme bráni vstupu PCAF (p300/CBP HAT associated factor, p300/CBP-Hat koaktivátor) a ďalším HATs do cieľovej oblasti acetylácie. Tento faktor môže priamo acetylovať oligonukleozomálne štruktúry. H1 a H5 históny špecificky inhibujú acetyláciu mono- a oligonukleozómov a tým inhibuje transkripciu. V in vitro prípadoch je transkripčná aktivácia spojená s odstránením H1 histónu (Laybourn and Kadonaga 1991). Väzbu histónu H1 zrejme reguluje acetylácia histónu H4 počas zostavovania nukleozomálnych jednotiek. (Perry and Annunziato 1991). Bolo tiež preukázané, že v prípade hyperacetylovaných génov, ktoré obsahovali H1 dochádza tiež k inhibícii transkripcie. Fosforyláciou H1 dochádza k znižovaniu afinity ku chromatinu (Lee, H. L., and T. K. Archer. 1998).

### 3 Mechanizmus transkripčného umlčovania

Euchromatínová štruktúra často obsahuje acetylované históny a metylovaný H3K4. Narozdiel od euchromatínu základnými charakteristikami heterochromatínu sú: prítomnosť metylovanej DNA, deacetylovaný a metylovaný H3K9. (Turek-Plewa J, Jagodziński PP., 2005)

Formácia heterochromatínovej štruktúry pravdepodobne začína deacetyláciou H3K9 prostredníctvom HDAC, čo umožňuje metyláciu H3K9. Metylovaný H3K9 je rozoznávaný HP1 proteínom., ktorý stabilizuje kondenzovanú formu heterochromatínovej štruktúry. (Li 2002)

#### 3.1 Faktory transkripčného umlčania

##### 3.1.1 Metyl-CpG väzbové proteíny

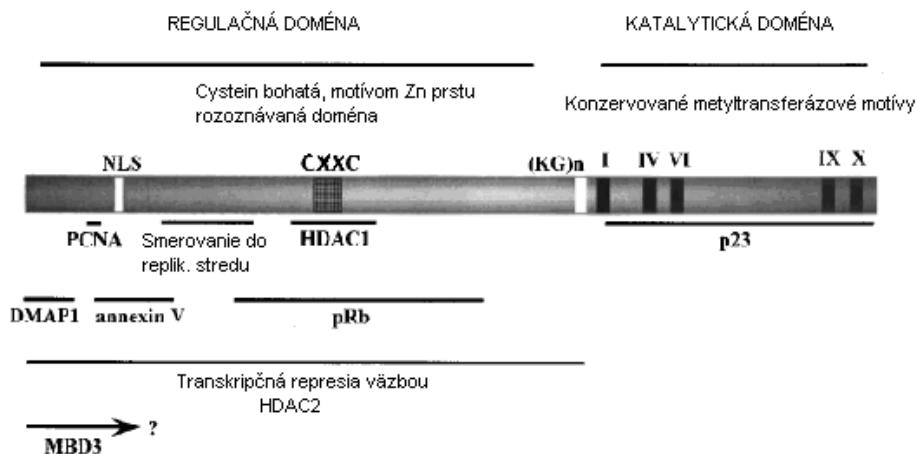
Cytozínová metylácia a postrančné modifikácie amino koncov histónov dotvára epigenetický vzorec génovej regulácie. Spoločne s metyl-CpG väzbovými (MBD) proteínmi sa zúčastňuje na formácii transkripčne inaktívneho stavu chromatínu. Poznáme prinajmenšom 6 cicavčích MBD proteínov. Je to MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, Kaiso pre transkripčnú represiu, a MBD4 jako opravná thymin glykosylaza. MBDs symetricky viažu metylované CpG sekvencie. MeCP2 viaže metylovanú DNA *in vitro* a *in vivo*. Na N- konci obsahuje metyl-CpG-väzbovú doménu (MBD), v strede sa nachádza doména potláčajúca transkripciu (TRD-transcription repression domain). TRD doména reprimuje transkripciu nezávisle na ostatných sekvenciách MeCP2. Väzbou tejto domény s korepresorom Sin3a dôjde k naviazaniu HDAC do komplexu. Dôsledkom týchto interakcií je priamy vzťah medzi DNA metylačne závislým transkripčným umlčaním a modifikáciou chromatínu deacetyláciou histónu (Jones, Veenstra et al. 1998). MBD2 obsahuje čiastočne prekrývajúcu sa MBD a TRD. MBD2 je metyl väzbová komponenta MeCP1, krotý sa viaže do husto metylovanej oblasti DNA. Spolu s MBD3 je integrálnou komponentou Mi-2 ATPase/NuRD komplexu asociovaného s HDAC. MBD4 obsahuje metylväzbovú doménu podobnú ako v MeCP2, C terminálna doména je homológna s bakteriálnym DNA opavným enzýmom. Táto doména vykazuje DNA N glykozidázovú aktivitu v G-T chybné párovaných oblastiach. Je teda ideálny pre opravu bodových mutácií vzniknutých spontánou deamináciou 5 metylecytozínu na

tymín. Kaiso, ktorému chýba MBD doména, viaže metylované CGCG prostredníctvom domény zinkového prstu. Odlišné metyl CpG väzbové proteíny môžu rekrutovať ďalšie chromatín remodelujúce proteíny a transkripčné regulačné komplexy k metylovanej DNA (Li 2002)

### 3.1.2 Proteíny interagujúce s Dnmt

- PCNA- proliferačný bunkový jadrový antigén- Interaguje s väzbovými miestami na N konci Dnmt1 a smeruje ju do replikačného stredu. Posilňuje procesivitu replikácie a asociuje s vedúcim i opožďujúcim sa vláknom DNA ako svorkový proteín. Interakcia s Dnmt1 je dôležitá pri remetylácii *de novo* nasyntetizovaného dcérskeho vlákna pred kondenzáciou do chromatínu.
- p23- fosforoteín asociovaný s cytoplazmatickou formou progesterónového receptru. Interaguje s katalytickou doménou Dnmt1. Spolu s inými chaperónovými proteínami napomáha správne foldingu katalytickej domény Dnmt1. Sprostredkováva interakciu v jadrovej matrix a aktínovými filamentami.
- AnnexinV- väzba s N terminálnym koncom Dnmt1. Zakotvuje Dnmt1 v jadrovej matrix
- HDAC1 –interakcia, represia transkripcie
- HDAC2- remodelace a represia transkripcie
- DMAP1- interakcia s N koncovou oblasťou Dnmt1 a posilňuje HDAC aktivitu. Reprimuje transkripciu.
- pRB- tumor supresorový gén. Viaže transkripčný faktor E2F-1. V jeho prítomnosti dochádza k nasmerovaniu metylácie do genómových oblastí obsahujúcich väzbové miesto pre E2F-1.
- MBD3

(Robertson 2001, obr.8)



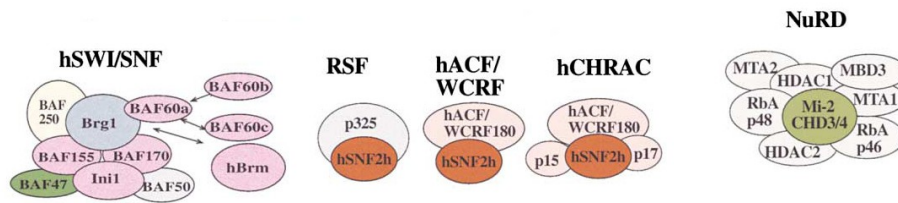
Obr.8 Proteíny viažúce DNMT1 (Robertson 2001)

### 3.1.3 Histón modifikačné enzýmy

Modifikácie histónov na ich amino terminálnych koncoch, ako acetylácia, fosforylácia, metylácia a ubiquitynilácia má podstatnú úlohu v génovej regulácii. Kombinácie týchto modifikácií determinuje aktivitu príslušného génu. Poznáme niekoľko tried histón metyltransferáz. Veľmi významná je H3K4 metyltransferáza a päť H3K9 metyltransferáz- Suv39h1, Suv39h2, G9a, ESET/SetDB1, Eu-HMTáza1. Ďalej je to niekoľko koaktivátorov, ktoré majú vnútornú histon acetyltransferázovú aktivitu. Jako napr: Gcn5, p300/CBP, PCAF, TAF250 a rodina p160 jadrových receptorov. (Li 2002)

### 3.1.4 ATP závisle remodelačné komplexy

ATP závisle remodelačné komplexy (obr9.) využívajú ATP hydrolyzu na zvýšenie prístupnosti nukleozomálnej DNA, čo je základná požiadavka v niektorých fázach transkripcie. V cicavčích bunkách sú prítomné tri komplexy chromatín remodelačných prteínových komplexov- SWI/SNF/Brm, ISWI a Mi-2/NuRD. Obsahujú odlišné katalytické ATP-ázové podjednotky a asociované proteíny. (Narlikar, Fan et al. 2002)

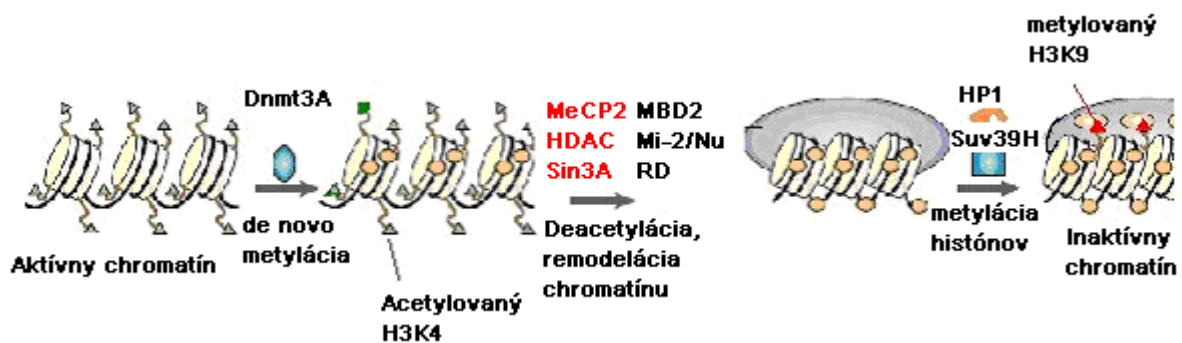


Obr9. Cicavčie ATP závislé remodelačné komplexy (upravené podľa Narlikar, Fan et al. 2002)

## 3.2 Modely DNA metylácie

### 3.2.1 DNA metylácia smerujúca k histónovej metylácii

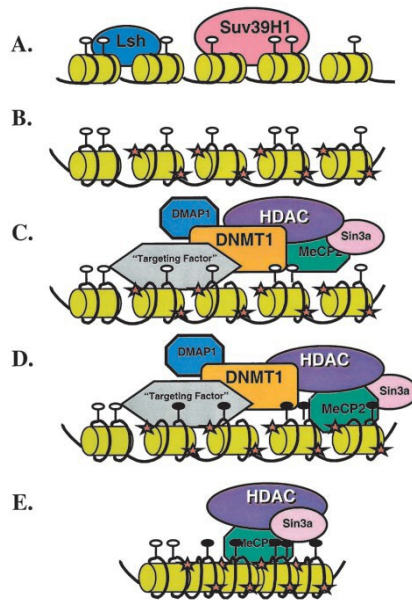
DNA metylačné vzorce sú zavádzané prostredníctvom de novo metylácie. Tú zabezpečujú metyltransferázy Dnmt3a. Komplex MeCP2-sin3A-HDAC je rekrutovaný do miesta metylácie. Indukuje sa HDAC aktivita. Chromatín je následne rozoznávaný histón metyltransferázami Suv39h1, h2 alebo G9a, ktoré metylujú H3K9 a stabilizujú inaktívny stav chromatínu. Ďalším komplexom účastniacim sa na metylácii je MBD2- NuRD (obr.10). (Li 2002)



obr.10 Model DNA metylácie (pozmienené od Li 2002)

### 3.2.2 Metylácia H3K9 smerujúca k metylácii DNA

Rôzne faktory sa podieľajú na transkripčnej represii prostredníctvom DNA metylácie. SNF-2 ATP-áza (Lsh) uvoľňuje DNA histónové kontakty. Histón metyltransferáza (Suv39H1) metyluje H3K9. Táto metylácia vedie k chromatínovej modifikácii, ktorá je permissívna pre CpG metyláciu. Sekvenčne špecifické DNA väzbové proteíny môžu smerovať CpG metyltransferázu do príslušného miesta. Príkladom takéhoto faktoru je pRb a PML-RAR (promyeoloidný faktor). Dnmt sa priamo viaže na HDAC, ktorá je v komplexe s MBD ako napr MeCP2. DNMT1 tiež asociuje s DMAP1- (HDAC nezávislý transkripčný represor). Ďalej prebieha vlastná metylácia. Vytvárajú sa väzbové oblasti pre MBDs. Tie zostávajú asociované s daným lokusom. Tým je chromatínová modifikácia nezávislá na DNA metylácii. (Ordway and Curran 2002)



Obr6. H3K9 metylácia smerujúca k metylácii CpG (Ordway and Curran 2002)



## 4 Transkripčné umlčovanie retrovírusov

Génový prenos prostredníctvom retrovírusových vektorov a ich vylepšovanie je stredobodom vývoja v génovej terapii. Dôležitým cieľom je vývoj úspešného a bezpečného vektoru, ktorý prenáša terapeutický gén. Retrovírusové vektory majú niekoľko výhod oproti iným vektorom. Najdôležitejšou výhodou je ich replikačná stratégia. Tá spočíva v prepise ssRNA na dsDNA prostredníctvom reverznej transkripcie, ktorú si daný vírus prináša vo vírovej kapside. Vírová DNA sa následne stabilne integruje do hostiteľského genómu. Schopnosť integrácie do hostiteľského genómu zaručuje, že daný terapeutický gén nebude stratený a pri bunkovom delení bude prenášaný do dcérskych buniek. To znamená, že vektory odvodené od retrovírusov môžu byť použité k stabilným modifikáciám genómu v bunkovej populácii. Na druhej strane so schopnosťou retrovírusov integrovať sa do hostiteľského genómu rastie i možnosť inzerčnej mutagenézy, spočívajúcej v aktivácii potenciálnych onkogénov. Naviac náhodná integrácia vedie ku kolísavému stupňu expresie daného terapeutického génu. Úspešnosť závisí na integračnej preferencii. Od dôb kedy sa začali používať replikačne defektné retrovírusové vektory je toto riziko výrazne nižšie. Ďalej pravdepodobnosť týchto dôsledkov je výrazne redukovaná rôznymi vektorovými modifikáciami, používanie samoinaktivujúcich vektorov (self-inactivating) a vektorov odvodených od neonkogénnych retrovírusov (Anson 2004). Ďalším problémom, s ktorým sa génová terapia potýka je postupné vyhasínanie expresie terapeutického génu, ktorý bol do genómu transportovaný za pomoci vektoru. Retrovírusové vektory sú transkripčne umlčované. Retrovírusová transkripcia prebieha z LTR (long terminal repeats). Tieto oblasti krátko po integrácii podliehajú umlčovaniu. Toto špecifické umlčovanie spočíva v bohatej *de novo* cytozínovej metylácii v CpG dinukleotidoch retrovírusových LTR a vo výraznej remodelácii chromatinu na heterochromatínový stav. Remodelácia je charakteristická represívnym histónovým kódom, ktorý zahŕňa deacetylovaný H3 a prítomnosť H1 spojovacieho histónu (Ellis and Yao 2005). Jedným z modelov umlčovania je dvojfázový proces. Prvý HDAC iniciuje chromatinovú kondenzáciu prostredníctvom deacetylácie H3. Druhou je zrejme DNA metylácia, aktivujúca do miesta metylácie MeCP2 a ďalšie faktory, ktoré uzatvárajú umlčaný stav (Lorincz, Schubeler et al. 2001)

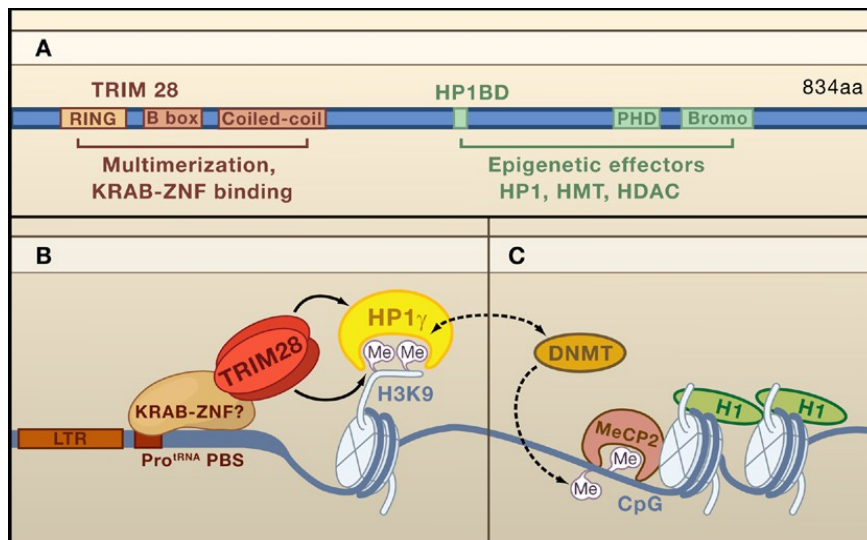
## 4.1 Vtáčie retrovírusové vektory

Vírusové vektory odvodené od vtáčieho sarkómového a leukemického vírusu (ASLV) zrejme predstavujú najbezpečnejšie retrovírusové vektory. Na rozdiel od iných retrovírusových vektorov ich integračná špecifita je takmer náhodná. Ich pôvod však predstavuje potenciálny problém. Vtáčie bunky majú menej odolnú bariéru proti heterológny elementom. Je menej účinná a nedochádza k umlčovaniu retrovírusov integrovaných do vtáčieho genómu. Bola dokázaná účinná heterotransmisia vtáčích buniek cicavčím C retrovírusom, patriaci do skupiny retikuloendoteliálnych vírusov (REV) (Svoboda et al., 2003). Na druhej strane heterotransmisia cicavčích buniek vtáčimi retrovírusmi nebola pozorovaná. Účinná obrana cicavčích buniek zapríčiňuje extrémne transkripčné umlčanie retrovírusových vektorov, tým veľmi výrazne klesá účinnosť génového prenosu. Tento jav sa vyskytuje hlavne u retrovírusov vtáčieho pôvodu v bunkách cicavcov. A tu je zdroj potreby tvorby protiumlčovacej stratégie v navrhovaní vektorov. Jedným z možných mechanizmov zodpovedných za ASLV umlčovanie je DNA metylácia. Bolo preukázané, že tak ako endogénne retrovírusy i retrovírusové vektory sú výrazne metylované. Metylácia sa neustaľuje okamžite, ale v priebehu týždňov po infekcii dochádza k výraznému rastu metylovaných CpG dinukleotidov, čím dochádza k postupnému vyhasínaniu aktivity prenášaného génu (He, Yang et al. 2005). Za zmienku stojí niekoľko ďalších mechanizmov transkripčného umlčovania retrovírusov.

## 4.2 TRIM proteíny v úlohe epigenetického umlčovania

TRIM28 korepresorový proteín sa viaže do primer väzbovej oblasti (PBS) retrovírusu v embryonálnych kmeňových bunkách. Epigenetické umlčanie retrovírusovej transkripcie je v úzkej spolupráci s dimetylačným signálom H3K9. Ten je rozoznávaný HP1 proteínom. Do oblasti PBS je rekrutovaný niekoľkými odlišnými proteínmi s motívmi zinkového prstu (KRAB-ZNF). Jedná sa o DNA väzbové domény schopné rozoznávať veľké DNA motívy. Trim 28 zahajuje epigenetické umlčanie rekrutovaním HDAC, histón metyltransferáz a HP1 proteínov. HDAC zaisťuje, že H3K9 je deacetylovaný a prístupný pre HMT, ktorá ho modifikuje väzbou divoch metylových skupín. Následnou interakciou HP1 proteínu s DNMT dochádza k metylácii CpG. Tie sú špecificky rozpoznávané MeCP2. Na tejto umlčovacej mašinérii sa uplatňuje i histón H1, ktorého prítomnosť bola tiež dokázaná v transkripčne

umľanom stave retrovírusu. Ten podporuje chromatinovú kondenzáciu a dochádza k umľaniu. (obr.11)(Ellis, Hotta et al. 2007)



Obr.11- regulácia retrovírusového umľania TRIM sprostredkovanou epigenetickou kaskádou (Ellis, Hotta et al. 2007)

## 4.2 Daxx protein

Ľudský Daxx protein funguje ako transkripčný korepresor. Interaguje s veľkým množstvom jadrových DNA väzbových proteínov kritických pre transkripčnú represiu. Ako jadrový protein sa podieľa na interakcii s promyelotickým leukemickým proteínom (PML-RAR), ktorý je priamou súčasťou signálnej kaskády Fas závislej apoptózy. (Hollenbach, McPherson et al. 2002) Bolo dokázané, že protein Daxx je väzbovým partnerom HDAC1. Tento komplex po skorej infekcii interaguje s vektorovou DNA prostredníctvom integrázového proteínu. Zdá sa, že Daxx/HDAC komplex zohráva úlohu v iniciácii epigenetického umľania retrovírusovej DNA. (Poleshko, Palagin et al. 2008)

## **Záver**

Objav DNA metylácie sa datuje do roku 1964. Gold a Hurwitz identifikovali prvú DNA metyltransferázu v baktérii *Escherichia coli*. I po päťdesiatych rokoch je DNA metylácia podrobená detailným výskumom v rôznych biologických procesoch. Jej uplatnenie je veľmi široké. Je esenciálnou pre normálny embryonálny vývoj. Hrá dôležitú úlohu v inaktivácii X chromozómu a genotypovom imprintigu. Prispieva k imobilizácii cicavčích transpozónov. Reprimuje transkripciu ľudských endogénnych retrovirusových elementov. Štúdium metylácie je intenzívne i v oblasti génovej terapie. Tu je hlavným úsilím vývoj účinného a bezpečného vektoru pre prenos terapeutického génu. Retrovírusy sú veľmi účinným nástrojom tohto zámeru. Hlavným problémom je riziko možného poškodenia a nežiadúcej transaktivácie génov v blízkosti integrovaného miesta vektoru odvodeného od retrovírusov. V našom laboratóriu sa už dlhý čas venuje veľké úsilie vektorovému designu. Zdá sa, že jedným z najbezpečnejších vektorov vo všetkých týchto ohľadoch sú vektory odvodené od vtáčieho sarkómového a leukemického vírusu. Hlavným problémom úspechu je ich výrazná metylácia v cicavčích bunkách. V budúcnosti sa môj ďalší záujem bude sústrediť hlavne na štúdium úlohy cicavčích metyltransferáz v skorom účinku umlčania vektoru zvýšením ich expresie, testovanie účinku cicavčích Dnmts na *de novo* metylácii a umlčianí vektoru vo vtáčích bunkách a poslednou otázkou je, či pri umlčaní je nutná prítomnosť oboch *de novo* i udržovacích metyltransferáz.

## **PodĎakovanie**

Chcel by som poďakovať hlavne svojmu školiteľovi Jiřímu Hejnarovi PhD., za možnosť pracovať v skvelom laboratóriu. Ďalej chcem poďakovať svojmu konzultantovi Mgr. Filipovi Šeniglovi za jeho korekciu a cenné informácie pri spisovaní bakalárskej práce. Ďakujem svojim rodičom a súrodencom za pomoc a morálnu podporu. Všetkým priateľom a známym, ktorí mi držia palce.

## Zoznam použitých skratiek

AdoMet	S- adenoszyl-L-metionín
ASLV	vtáčie sarkómové a lukózne vírusy
ATPasa/NURD	ATP závislý nukleozomálny remodelačný komplex
ATRX	cysteínový motív zinkového prstu v štruktúre Dnmt1
CpG	cytozín-guanínový dinkukleotid
CpGI	CpG ostrovy
Dnmt	DNA metyltransferáza
DMAP1	proteín asociujúci s Dnmt1
E2F1	transkripčný faktor
HDAC	históndeacetyláza
HP1	heterochromatínový proteín 1
H3K9	histón H3, aminokyselinový zvyšok lyzín 9
ICF	syndróm imunodeficiencie, centromérovej nestability a abnormalít tváre
Isw1p	remodelačný komplex
LTR	dlhé koncové repetitívne sekvencie
MBD	metyl väzbová doména, súčasť MBD proteínov
MeCP2	metyl cytozín väzbový proteín 2
m <sup>5</sup> C	5' - metylcytozín
NLS	jadrový lokalizačný signál
PBD	doména viažúca jadrový proliferálny bunkový antigén (PCNA)
PCNA	proliferálny bunkový jadrový antigén
PCAF	p300/Creb väzbový faktor
PHD	polybrómová homológna doména
PML-RAR	promyeloidný faktor
PWWP	aminokyselinový motív prolín-tryptofán-tryptofán-prolín
P21Waf1	inhibítor cyklín dependentnej kinázy
pRB	tumor supresový retinoblastomický faktor
SNF2	rodina enzýmov remodelujúcich chromatín
Suv39h	histonmetyltransferáza
TRD	transkripčná represívna doména

## Zoznam citovanej literatúry

- Adams, R. L., E. L. McKay, et al. (1979). "Mouse DNA methylase: methylation of native DNA." *Biochim Biophys Acta* 561(2): 345-57.
- Albert, J. (2002). "Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases." *ChemBioChem* 3(4): 274-293.
- Anson, D. (2004). "The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery." *Genetic Vaccines and Therapy* 2(1): 9.
- Antequera, F. (2003). "Structure, function and evolution of CpG island promoters." *Cell Mol Life Sci* 60(8): 1647-58.
- Araujo, F. D., S. Croteau, et al. (2001). "The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus." *J Biol Chem* 276(10): 6930-6.
- Barber, C.M. et al (2004). The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* 112, 360–371
- Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." *Hum. Mol. Genet.* 9(16): 2395-2402.
- Bestor T H., (2000), Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest.* 105(4): 409–411
- Bhaumik, S. R., E. Smith, et al. (2007). "Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis." *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 1008-16.
- Brockdorff, N., Convergent themes in X chromosome inactivation and autosomal imprinting .
- Deplus, R., C. Brenner, et al. (2002). "Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase." *Nucl. Acids Res.* 30(17): 3831-3838.
- Ellis, J., A. Hotta, et al. (2007). "Retrovirus silencing by an epigenetic TRIM." *Cell* 131(1): 13-4.
- Ellis, J. and S. Yao (2005). "Retrovirus Silencing and Vector Design: Relevance to Normal and Cancer Stem Cells?" *Current Gene Therapy* 5: 367-373.
- Felsenfeld, G. and M. Groudine (2003). "Controlling the double helix." *Nature* 421(6921): 448-53.
- Foster, E. R. and J. A. Downs (2005). "Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair." *FEBS J* 272(13): 3231-40.

- Garcia-Ramirez, M., C. Rocchini, et al. (1995). "Modulation of chromatin folding by histone acetylation." *J Biol Chem* 270(30): 17923-8.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* 196(2): 261-82.
- Gowher, H., K. Liebert, et al. (2005). "Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L." *J Biol Chem* 280(14): 13341-8.
- He, J., Q. Yang, et al. (2005). "Dynamic DNA Methylation and Histone Modifications Contribute to Lentiviral Transgene Silencing in Murine Embryonic Carcinoma Cells." *J Virol*. 79(21): 13497-13508.
- Hermann, A., H. Gowher, et al. (2004). "Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases." *Cell Mol Life Sci* 61(19-20): 2571-87.
- Hermann, A., R. Goyal, et al. (2004). "The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites." *J Biol Chem* 279(46): 48350-9.
- Hollenbach, A. D., C. J. McPherson, et al. (2002). "Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek." *J Cell Sci* 115(16): 3319-3330.
- Huyen, Y., O. Zgheib, et al. (2004). "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." *Nature* 432(7015): 406-11.
- Iizuka, M. and M. M. Smith (2003). "Functional consequences of histone modifications." *Curr Opin Genet Dev* 13(2): 154-60.
- Ikeda, K., D. J. Steger, et al. (1999). "Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes." *Mol Cell Biol* 19(1): 855-63.
- Jones, P. A. and P. W. Laird (1999). "Cancer-epigenetics comes of age." *Nat Genet* 21(2): 163-167.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, et al. (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nat Genet* 19(2): 187-91.
- Klimasauskas, S., S. Kumar, et al. (1994). "HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix." *Cell* 76(2): 357-69.
- Krishnamoorthy, T., X. Chen, et al. (2006). "Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis." *Genes Dev*. 20(18): 2580-2592.
- Kumar, S., X. Cheng, et al. (1994). "The DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nucleic Acids Res* 22(1): 1-10.

- Lachner, M. and T. Jenuwein (2002). "The many faces of histone lysine methylation." *Curr Opin Cell Biol* 14(3): 286-98.
- Lavie, L., M. Kitova, et al. (2005). "CpG Methylation Directly Regulates Transcriptional Activity of the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2)." *J. Virol.* 79(2): 876-883.
- Laybourn, P. J. and J. T. Kadonaga (1991). "Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II." *Science* 254(5029): 238-45.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." *Nat Rev Genet* 3(9): 662-73.
- Li, E., C. Beard, et al. (1993). "Role for DNA methylation in genomic imprinting." *Nature* 366(6453): 362-365.
- Lorincz, M. C., D. Schubeler, et al. (2001). "Methylation-Mediated Proviral Silencing Is Associated with MeCP2 Recruitment and Localized Histone H3 Deacetylation." *Mol. Cell. Biol.* 21(23): 7913-7922.
- Macleod, D., J. Charlton, et al. (1994). "Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island." *Genes Dev.* 8(19): 2282-2292.
- Nakayama, J., J. C. Rice, et al. (2001). "Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly." *Science* 292(5514): 110-3.
- Narlikar, G. J., H.-Y. Fan, et al. (2002). "Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription." *Cell* 108(4): 475-487.
- Ng, H.-H. and B. Adrian (1999). "DNA methylation and chromatin modification." *Current Opinion in Genetics & Development* 9(2): 158-163.
- Ng, H. H. and A. Bird (1999). "DNA methylation and chromatin modification." *Curr Opin Genet Dev* 9(2): 158-63.
- Nowak, S. J. and V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." *Trends in Genetics* 20(4): 214-220.
- Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* 99(3): 247-57.
- Okano, M., S. Xie, et al. (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nat Genet* 19(3): 219-20.
- Ordway, J. M. and T. Curran (2002). "Methylation matters: modeling a manageable genome." *Cell Growth Differ* 13(4): 149-62.
- Perry, C. A. and A. T. Annunziato (1991). "Histone acetylation reduces H1-mediated nucleosome interactions during chromatin assembly." *Exp Cell Res* 196(2): 337-45.



- Poleshko, A., I. Palagin, et al. (2008). "Identification of Cellular Proteins That Maintain Retroviral Epigenetic Silencing: Evidence for an Antiviral Response." *J. Virol.* 82(5): 2313-2323.
- Pradhan, S. and P.-O. Esteve (2003). "Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression." *Clinical Immunology* 109(1): 6-16.
- Qiu, C., K. Sawada, et al. (2002). "The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds." *Nat Struct Biol* 9(3): 217-24.
- Rea, S., F. Eisenhaber, et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." *Nature* 406(6796): 593-9.
- Robertson, K. D. (2001). "DNA methylation, methyltransferases, and cancer." *Oncogene* 20(24): 3139-55.
- Senigl, F., J. Plachy, et al. (2008). "The Core Element of a CpG Island Protects Avian Sarcoma and Leukosis Virus-Derived Vectors from Transcriptional Silencing." *J. Virol.* 82(16): 7818-7827.
- Shahbazian, M. D. and M. Grunstein (2007). "Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation." *Annu Rev Biochem* 76: 75-100.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka, et al. (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." *Trends Genet* 19(11): 629-39.
- Spencer, V. A. and J. R. Davie (1999). "Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression." *Gene* 240(1): 1-12.
- Suetake, I., F. Shinozaki, et al. (2004). "DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction." *J. Biol. Chem.* 279(26): 27816-27823.
- Ting, A. H., K. W. Jair, et al. (2004). "Mammalian DNA methyltransferase 1: inspiration for new directions." *Cell Cycle* 3(8): 1024-6.
- Tse, C., T. Sera, et al. (1998). "Disruption of Higher-Order Folding by Core Histone Acetylation Dramatically Enhances Transcription of Nucleosomal Arrays by RNA Polymerase III." *Mol. Cell. Biol.* 18(8): 4629-4638.
- Xie, S., Z. Wang, et al. (1999). "Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family." *Gene* 236(1): 87-95.
- Xu, G. L., T. H. Bestor, et al. (1999). "Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene." *Nature* 402(6758): 187-91.