

Εισαγωγή στην Επιγενετική

Γιώργος Δεδούσης
Καθηγητής

Ο όρος «επιγενετική» (epigenetics) πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον **Conrad Waddington** το 1942 για να περιγράψει αλλαγές που **ΔΕΝ** τροποποιούν την αλληλουχία βάσεων του DNA **ΑΛΛΑ** αλλάζουν τη λειτουργία του. Στα τέλη του 1930, ο Waddington δημιούργησε μοντέλα σχετικά με το πως προϊόντα της γονιδιακής ρύθμισης θα προκαλούσαν αναπτυξιακά φαινόμενα. Συγκεκριμένα μελέτησε τους μηχανισμούς ανάπτυξης της *Drosophila* μέσω συστηματικής ανάλυσης μεταλλάξεων που επηρεάζουν την μορφολογία των πτερών. (η έρευνα αυτή του έδωσε το βραβείο Nobel Ιατρικής το 1995). Σε μία πολύ δημιουργική περίοδο στα τέλη της δεκαετίας του 1930s, ανακάλυψε μεταλλάξεις που επηρέαζαν κυτταρικούς φαινοτύπους και έτσι έγραψε το πρώτο του σύγγραμμα της Αναπτυξιακής Επιγενετικής.

Συνοπτικά, η επιγενετική με την ευρεία έννοια του όρου αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου, τροποποιώντας το τελικό προϊόν του γονιδίου χωρίς αλλαγή της ακολουθίας του DNA, προσφέροντας ένα είδος μεταγραφικού ελέγχου, που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων.



Τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού έχουν κοινό γονότυπο, δηλαδή διαθέτουν ένα συγκεκριμένο κοινό αριθμό γονιδίων.



Η ανάπτυξη του οργανισμού είναι συνέπεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, της έκφρασης διαφορετικών γονιδίων σε κάθε κυτταρική σειρά και της μετάδοσης της ίδιας γενετικής πληροφορίας στα θυγατρικά κύτταρα.



Οι επιγενετικοί μηχανισμοί, που διαμορφώνουν την επιγενετική κατάσταση ενός οργανισμού, είναι απαραίτητοι για την κυτταρική διαφοροποίηση, μεταφέροντας την επιγενετική πληροφορία κατά την κυτταρική διαίρεση.



Η επιγενετική, όπως και η γενετική πληροφορία, κληρονομείται, αλλά σε αντίθεση με τη γενετική πληροφορία, **είναι αναστρέψιμη** (επιγενετική πλαστικότητα) και δύναται να επηρεαστεί από διάφορα ερεθίσματα ή περιβαλλοντικούς παράγοντες

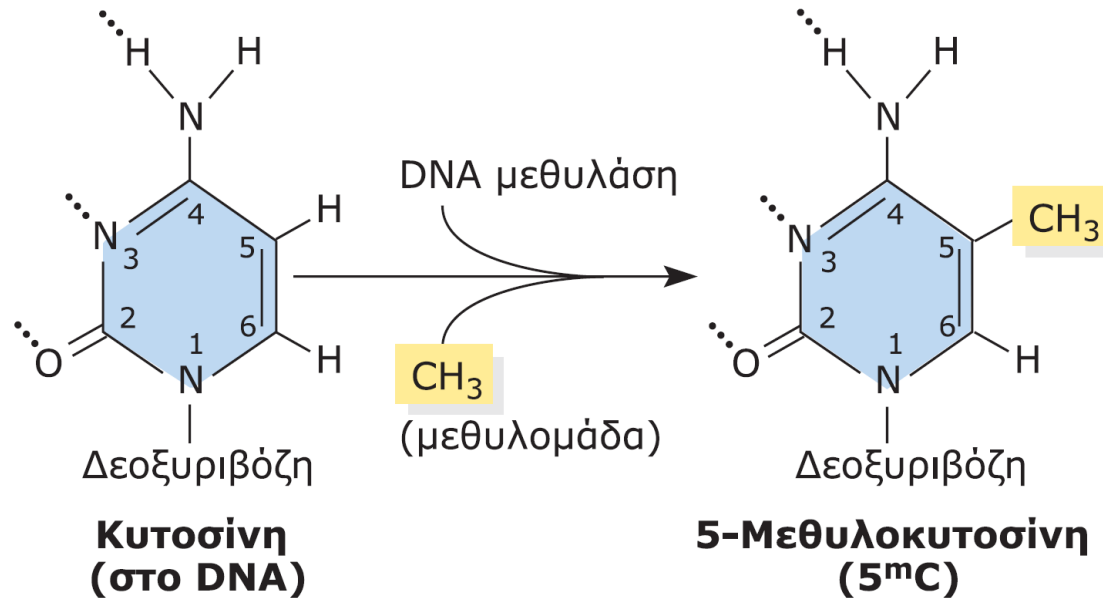
Επιγενετικοί μηχανισμοί

- ❑ Η επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος (**επιγονιδίωμα**) μεταβάλλεται δυναμικά στα κύτταρα των διάφορων ιστών, σε αντίθεση με την ακολουθία του DNA, που παραμένει σταθερή, και χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων σε συντονισμό μεταξύ τους, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων και διαμορφώνει διαφορετικούς φαινοτύπους σε διαφορετικά κύτταρα.
- ❑ Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί που διαμορφώνουν την επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος περιλαμβάνουν:
 - ❖ τη μεθυλίωση του DNA
 - ❖ την τροποποίηση των ιστονών
 - ❖ τα μη κωδικοποιούντα RNAs

Μεθυλίωση του DNA

□ Η μεθυλίωση του DNA, ο επιγενετικός μηχανισμός που έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα, περιλαμβάνει την προσθήκη μίας ομάδας μεθυλίου (CH_3) στο νουκλεοτίδιο κυτοσίνη. Συμβαίνει είτε σε δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης - γουανίνης (CpGs) κατά μήκος του γονιδιώματος, είτε σε περιοχές πλούσιες σε CpGs (νησίδες CpGs), όπως στους υποκινητές των γονιδίων, χρησιμοποιώντας ένζυμα της ομάδας των μεθυλομεταφορασών και διατηρείται κατά την κυτταρική μιτωτική διαίρεση.

Μετατροπή της κυτοσίνης του DNA σε 5-μεθυλοκυτοσίνη με τη δράση του ενζύμου DNA μεθυλάση



Η μεθυλίωση του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος εξασφαλίζει τη **χρωμοσωμική σταθερότητα**, την **αποφυγή χρωμοσωμικών μεταθέσεων** και τη **καταστολή της κινητικότητας των μεταθετών στοιχείων** (ακολουθίες DNA που μετακινούνται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο γονιδίωμα προκαλώντας μεταλλάξεις).

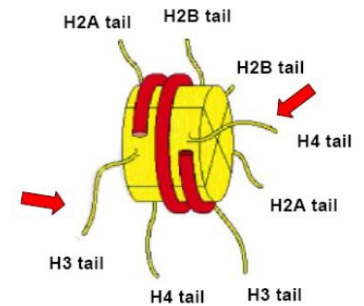
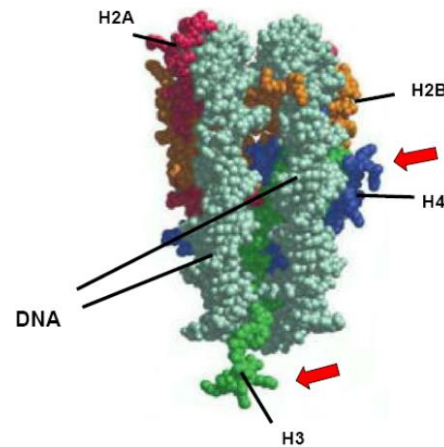
Στους υποκινητές των γονιδίων (νησίδες CpGs) έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική τους σιγή και την αναστολή έκφρασης της γενετικής πληροφορίας, διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην **κυτταρική διαφοροποίηση** και την **ανάπτυξη του εμβρύου**, στην **απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος** και στο **μηχανισμό της γονιδιακής αποτύπωσης**. Γονιδιακή αποτύπωση είναι το φαινόμενο σύμφωνα με το οποίο η έκφραση των δύο αλληλόμορφων ενός γονιδίου καθορίζεται από το φύλο του γονέα από το οποίο προέρχεται.

Τροποποίηση των ιστονών

Το **νουκλεόσωμα** είναι η βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης και αποτελείται από ένα **οκταμερές πρωτεϊνών**, των τεσσάρων πυρηνικών ιστονών (**H3, H4, H2A, H2B**), γύρω από το οποίο περιελίσσονται **147 ζεύγη βάσεων DNA**. Οι ιστόνες έχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της χρωματίνης. Κάθε τύπος ιστονών υποβάλλεται σε διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβάνοντας κυρίως την **ακετυλίωση, τη μεθυλίωση και τη φωσφορυλίωση**.

Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση συμβαίνουν στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών με τη δράση των ενζύμων ακετυλομεταφοράσες - αποακετυλάσες και μεθυλομεταφοράσες αντίστοιχα. Έτσι, για παράδειγμα, η προσθήκη ακετυλικής ομάδας σε ιστόνες συσχετίζεται με μεταγραφική δραστηριότητα, ενώ η αποακετυλίωση οδηγεί σε μεταγραφική σιγή. Οι τροποποιήσεις των ιστονών ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση.

Επιγενετικές τροποποιήσεις στις «ουρές» των Ιστονών επιφέρουν αλλαγές στη δομή της χρωματίνης



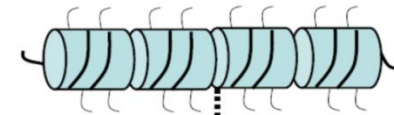
adapted from the Molecular Biology of The Cell, Alberts *et al*, 4th Ed

Μεταβάλλοντας τη διάταξη της χρωματίνης, οδηγούν σε ενεργοποίηση ή αποσιώπηση της μεταγραφής, έτσι ώστε η **ανοιχτή της δομή (ευχρωματίνη)** ισοδυναμεί με **ενεργό μεταγραφή**, ενώ η **συμπαγής χρωματίνη (ετεροχρωματίνη)** ισοδυναμεί με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

Η συμπύκνωση της χρωματίνης, εκτός από την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, σταθεροποιεί τη δομή των χρωμοσωμάτων και καταστέλλει την κινητικότητα των μεταθετών στοιχείων. Οι συνδυασμοί των τροποποιήσεων των ιστονών στο σύνολό τους συγκροτούν τον «**ιστονικό κώδικα**», που αντιστοιχεί στη δυναμικά μεταβαλλόμενη, μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή χρωματινική κατάσταση, που μεταβιβάζεται από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά του

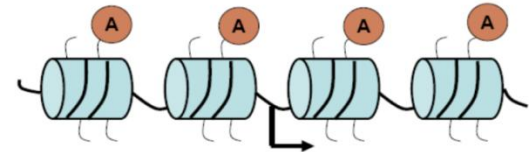
Ακετυλιώσεις Ιστονών διευκολύνουν τη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης

συμπυκνωμένη χρωματίνη, δεν ευνοεί τη μεταγραφή

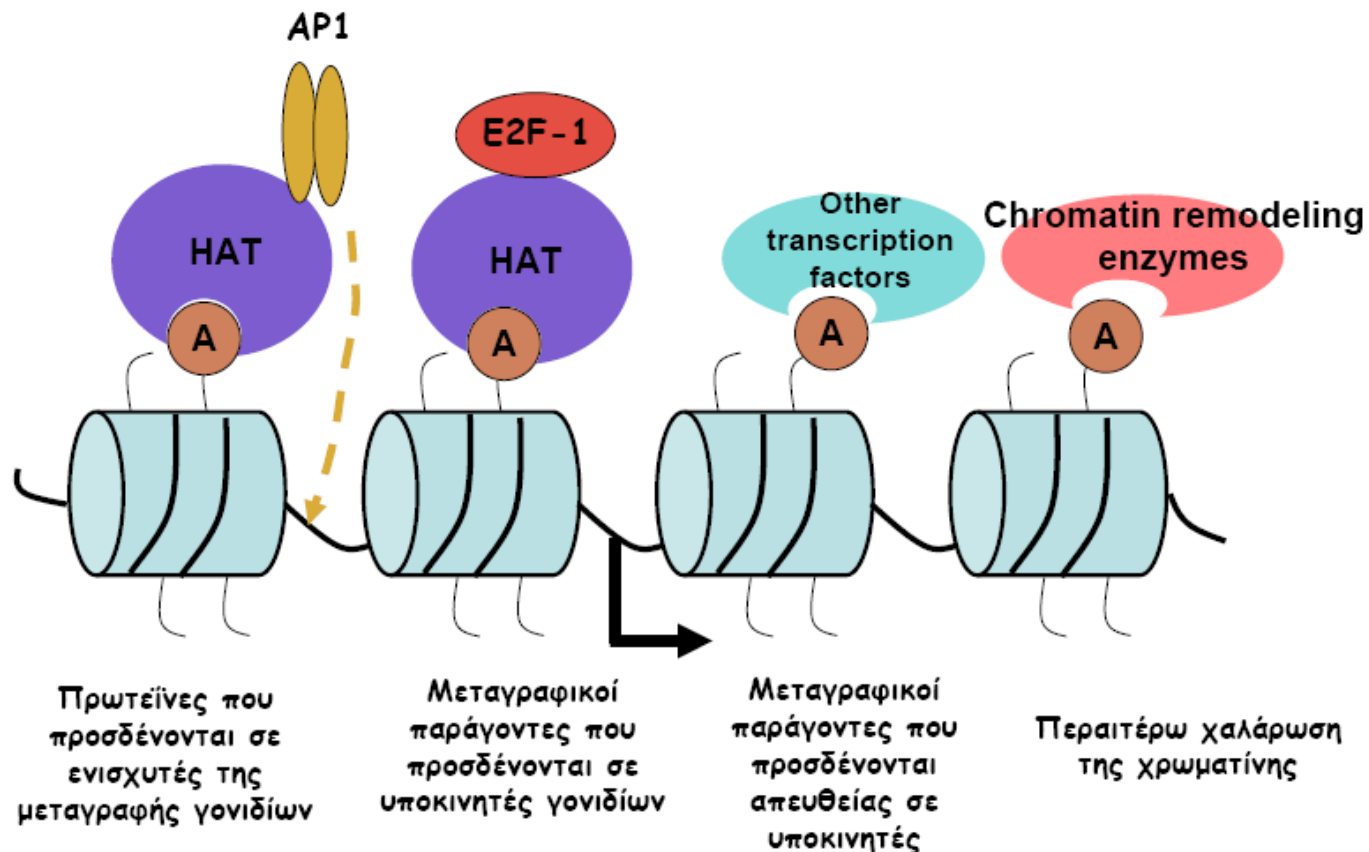


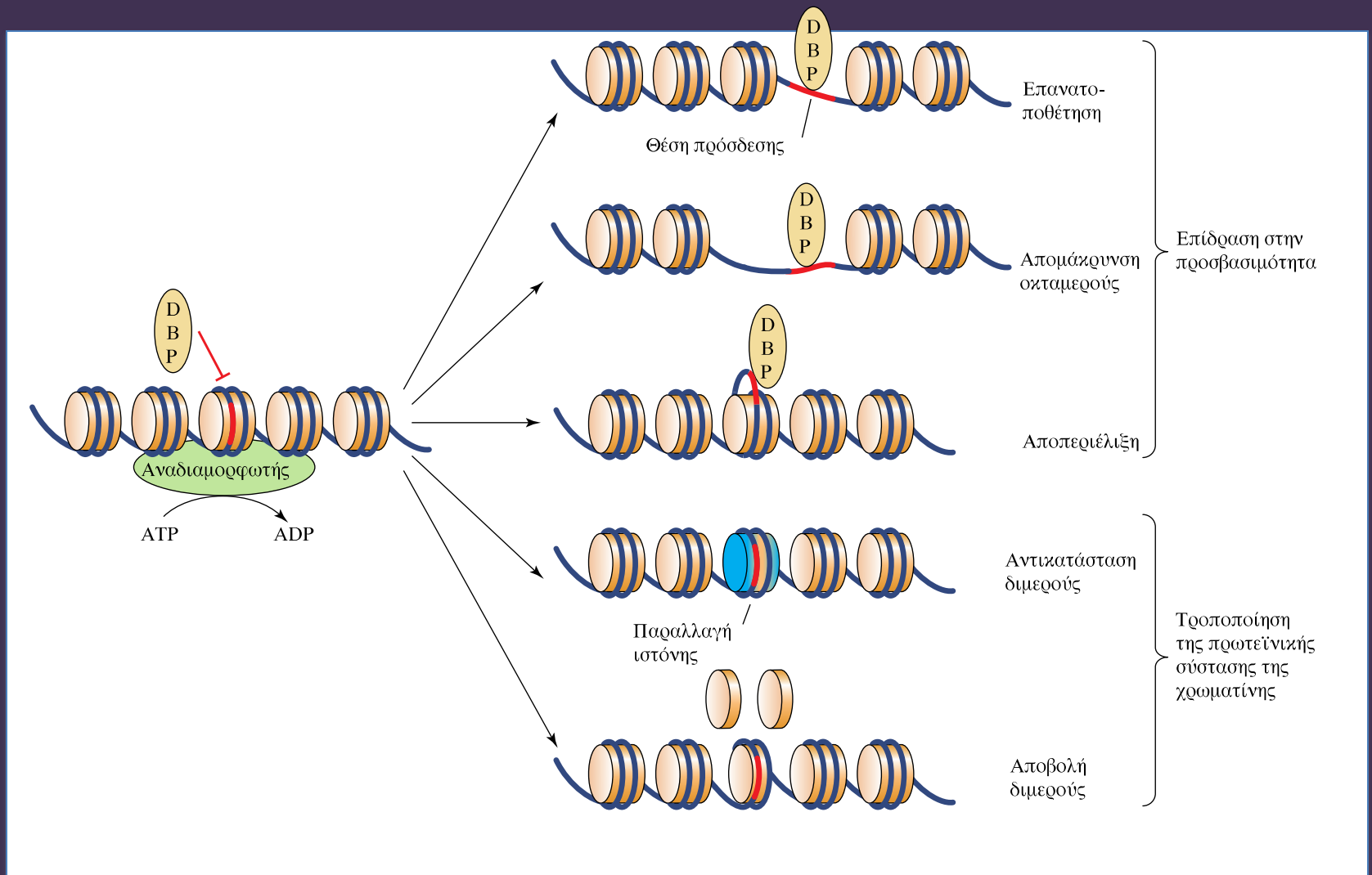
HAT
HDAC

χαλαρή χρωματίνη, επιτρέπει τη μεταγραφή

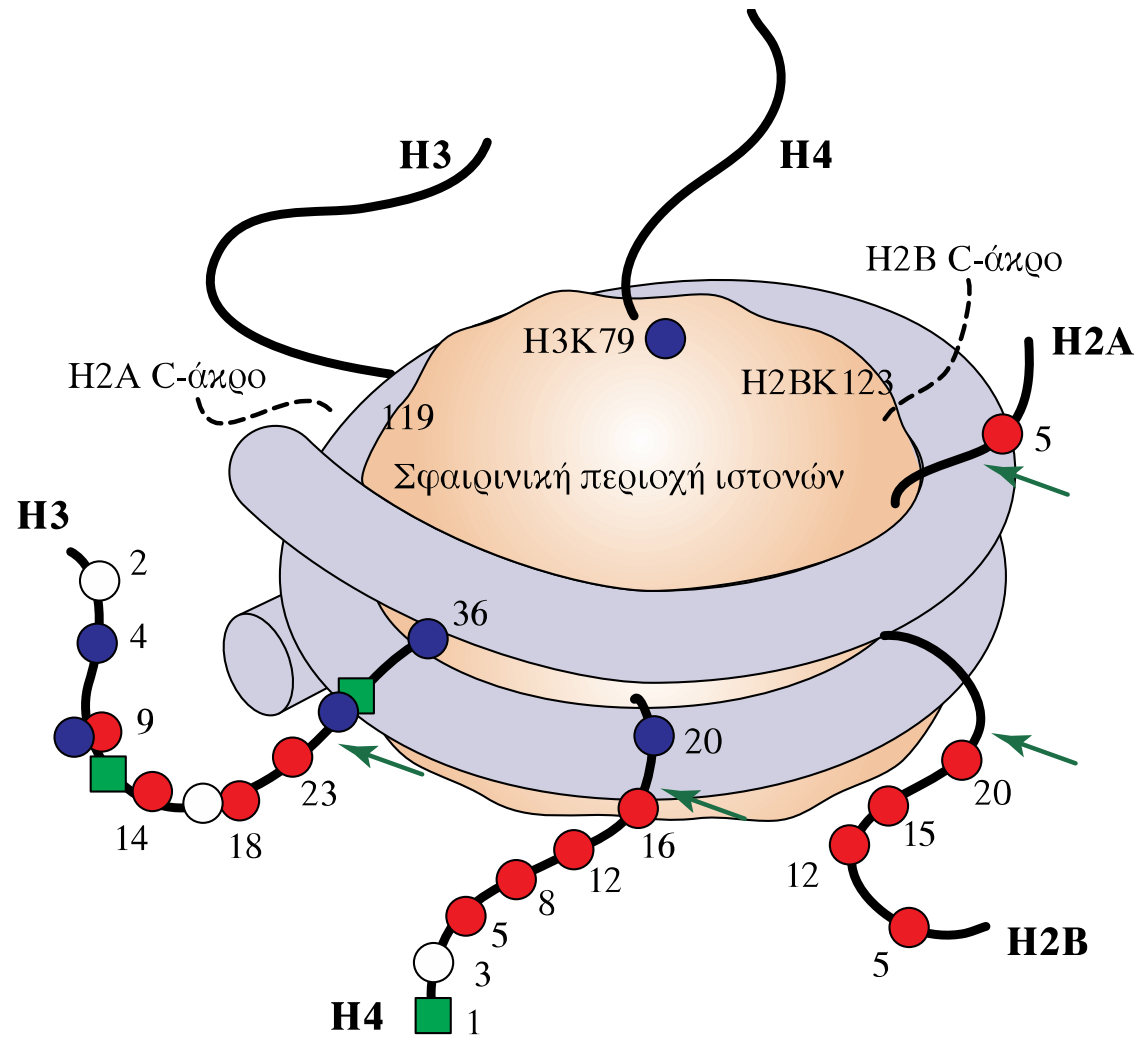


Ακετυλιώσεις Ιστονών στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων διευκολύνουν την προσέλκυση πρωτεϊνών που επάγουν τη μεταγραφή





Εικόνα 13.53. Βιοχημικές ενεργότητες-ATP εξαρτώμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Το ATP εξαρτώμενο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (πράσινο) μπορεί να επανατοποθετήσει, να εκτοπίσει και να ξεδιπλώσει νουκλεοσώματα, καθώς και να ανταλλάξει και να εκτοπίσει διμερή ιστονών. Οι ενεργότητες αυτές βοηθούν είτε να γίνει διαθέσιμη στις πρωτεΐνες που προσδέονται στο DNA (DBP) μία θέση του DNA που αρχικά ήταν καλυμμένη είτε να αλλάξει η σύσταση του νουκλεοσώματος αντικαθιστώντας το διμερές H2A.H2B με μία παραλλαγή ιστονών ή εκτοπίζοντας το.



Εικόνα 13.54. Οι τροποποιήσεις των ιστονών στο πυρηνικό σωματίο του νουκλεοσώματος. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τα κατάλοιπα των ιστονών που μπορούν να τροποποιηθούν και τα χρωματικά σύμβολα αναπαριστούν τις θέσεις που μπορούν να υποστούν τροποποιήσεις μετά τη σύνθεση των ιστονών. Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις στα άθικτα νουκλεοσώματα που μπορούν να τμηθούν από την τρυψίνη.

miRNAs ή siRNAs
(micro ή small interference)
ή non coding RNAs(ncRNAs)

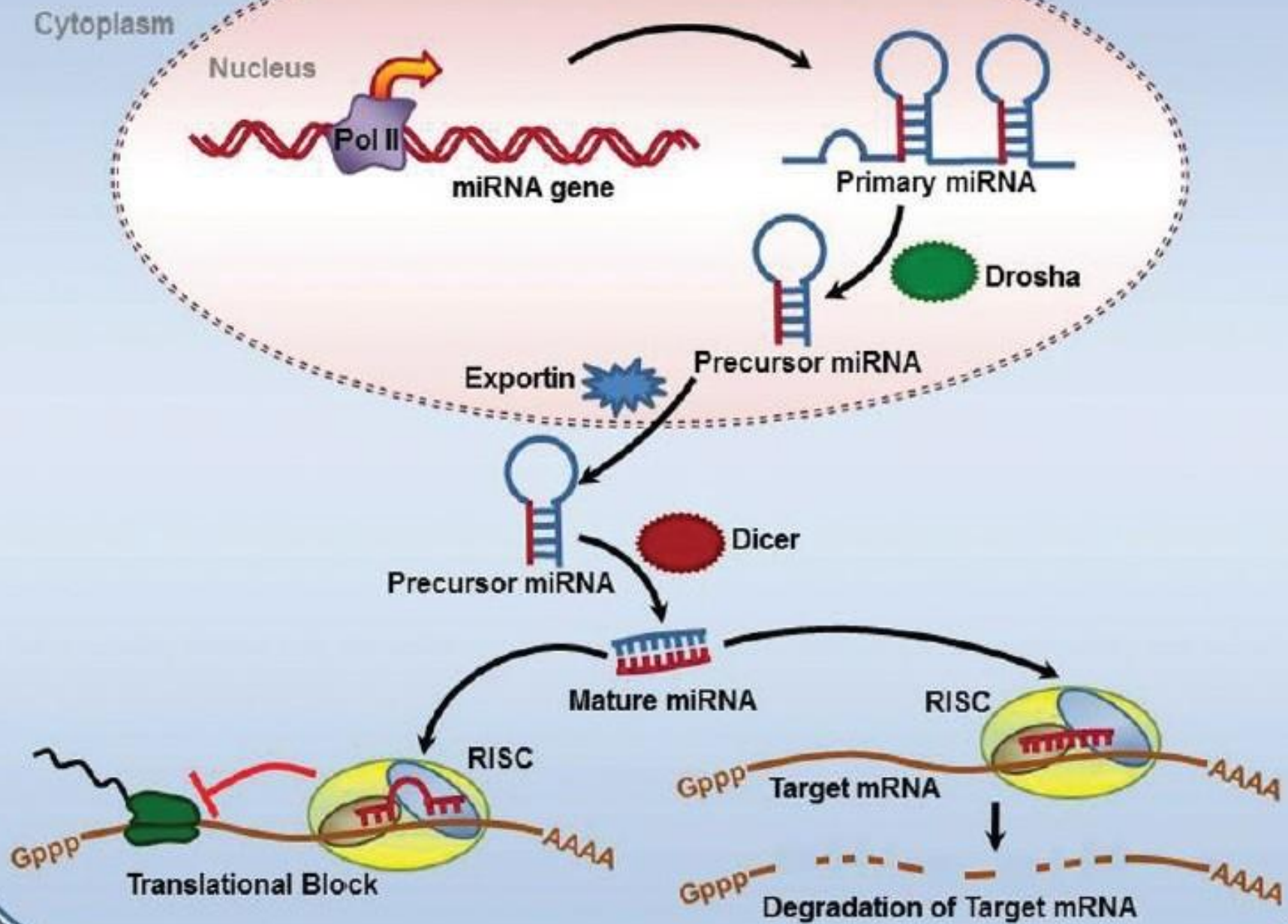
**Ένας τρίτος επιγενετικός
μηχανισμός που επηρεάζει την
έκφραση των γονιδίων.**

Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης από μόρια RNA

- Στα βακτήρια το περισσότερο DNA κωδικοποιεί πρωτεΐνες, αλλά στα ανθρώπινα ευκαρυωτικά κύτταρα, το περισσότερο DNA (μέχρι 98%) είναι "παρεμβαλλόμενο" και δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες.
- Το ερώτημα λοιπόν είναι ποια είναι η λειτουργία του μεταγραφόμενου RNA από αυτές τις αλληλουχίες.
- Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι το RNA αυτό δεσμεύεται σε άλλα mRNA και επηρεάζει τη μετάφραση τους ή δεσμεύεται σε πρωτεΐνες επηρεάζοντας τη γονιδιακή μεταγραφή.
- Το RNA αυτό ονομάζεται επεμβατικό RNA (**RNA interference (RNAi)**).

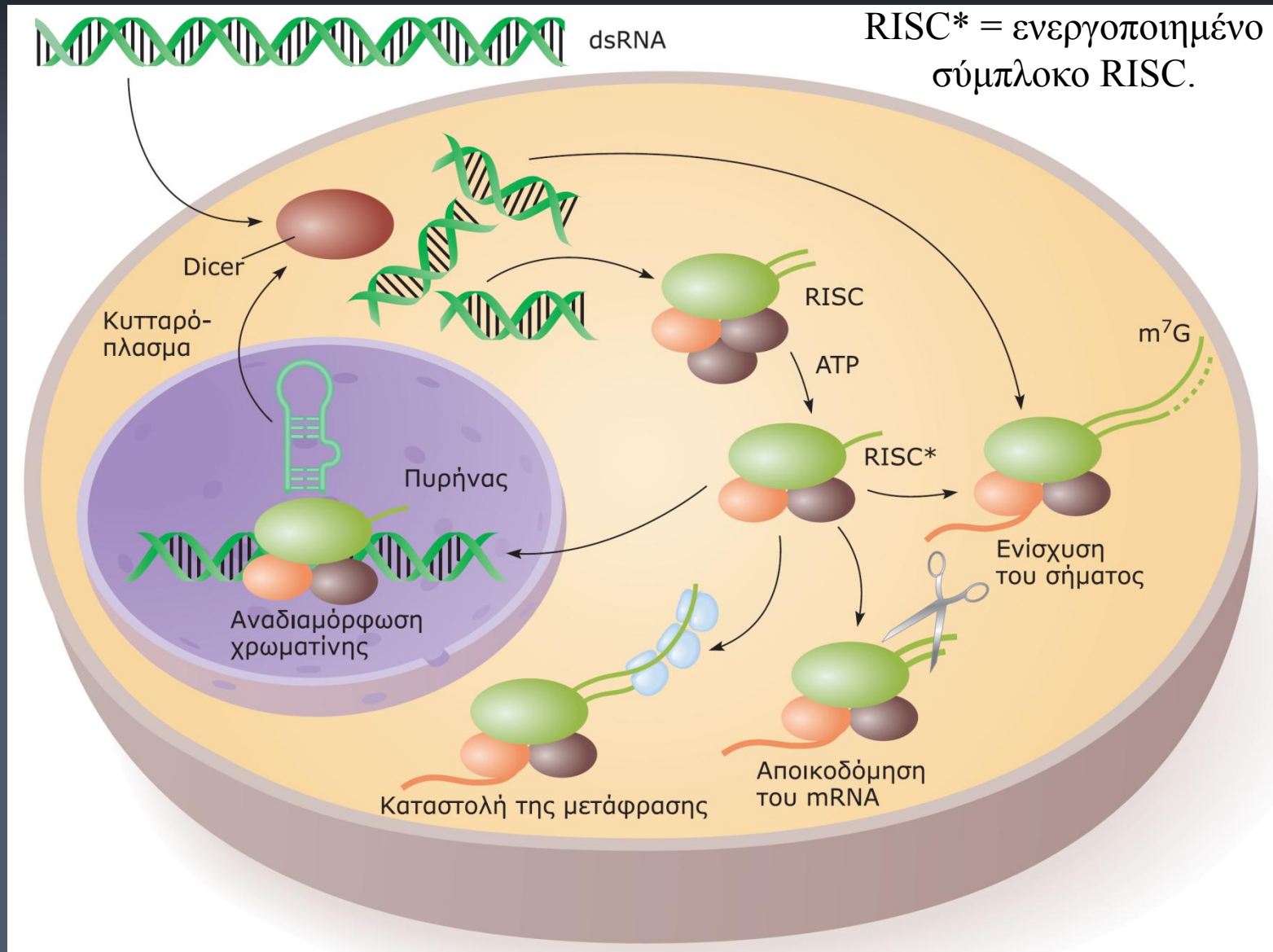
Μη κωδικοποιούμενα RNAs (ncRNAs)

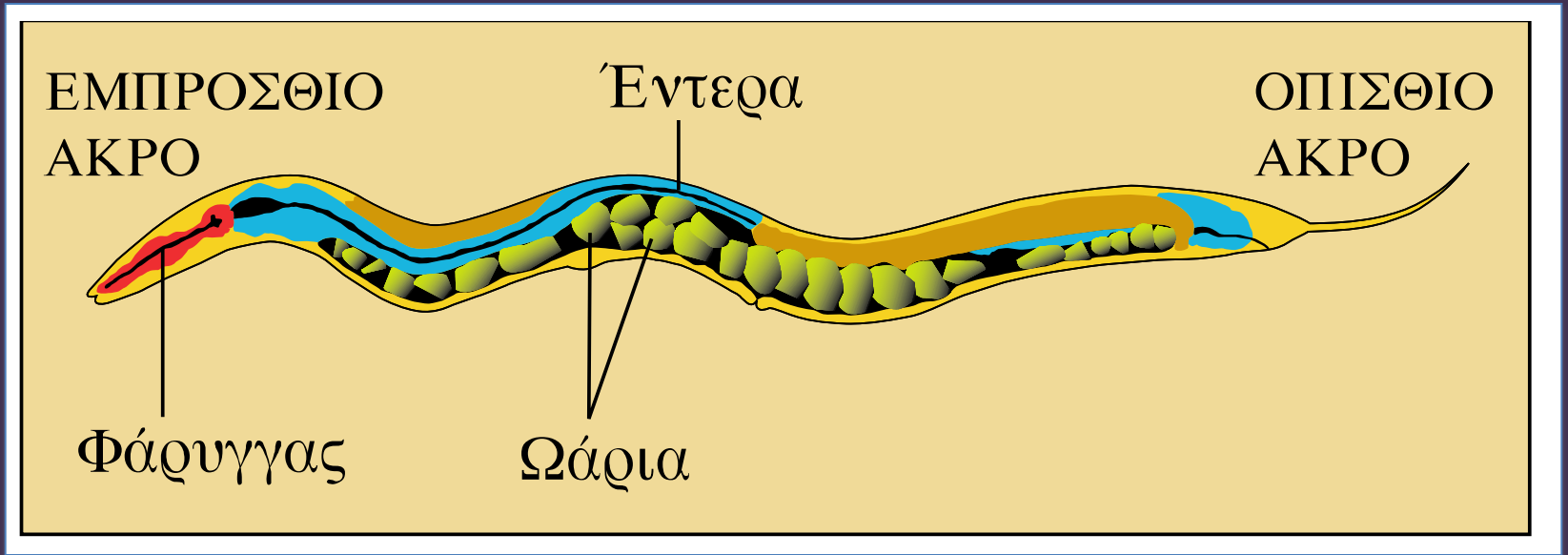
- ❑ Τα μη κωδικοποιούμενα RNA είναι λειτουργικά μόρια RNA, τα οποία δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνη. Έχουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της ακολουθίας, της δομής και της έκφρασης των αγγελιοφόρων RNA, επηρεάζοντας την έκφραση της πρωτεΐνης των αντίστοιχων γονιδίων.
- ❑ Ένα από τα σπουδαιότερα μη κωδικοποιούμενα RNA είναι το μικρό-RNA (miRNA), το οποίο με ταγράφεται από το γονιδίωμα του κυττάρου. Το μικρό-RNA έχει συμπληρωματική νουκλεοτιδική αλληλουχία με το στοχευόμενο αγγελιοφόρο RNA (mRNA), καταστέλλοντας τη μετάφρασή του. Αυτός ο βιολογικός μηχανισμός ονομάζεται RNA παρέμβαση (RNA interference - iRNA) και προκαλεί μετα - μεταγραφική καταστολή της γονιδιακής πληροφορίας.
- ❑ Τα λειτουργικά μικρομόρια RNA(miRNAs) έχουν ιδιαίτερη σημασία στην κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη, καθώς και στη διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας, ενώ από μελέτες σε πειραματόζωα φαίνεται ότι μέσω της μείωσης, μεταφέρουν την επιγενετική πληροφορία στο ζυγωτό και συνεπώς μπορούν να τη μεταβιβάσουν στις επόμενες γενιές.
- ❑ Επίσης, προκύπτει ότι τα 800 με 1000 μικρομόρια RNA (miRNAs), που έχουν μέχρι σήμερα αναγνωρισθεί, ρυθμίζουν περίπου το ένα τρίτο του ανθρώπινου μεταγραφώματος (transcriptome), το οποίο περιλαμβάνει όλα τα μόρια ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA). Από τους επιγενετικούς μηχανισμούς, που περιγράφηκαν παραπάνω, κανένας δε λειτουργεί ανεξάρτητα, ενώ υπάρχει ουσιαστική αλληλεπίδραση, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το περιβάλλον.
- ❑ Η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών και τα μη κωδικοποιούμενα RNAs (miRNAs) λειτουργούν με αμοιβαία συνεργασία μεταξύ τους, με σκοπό την έκφραση ή τη σιγή της γενετικής πληροφορίας.



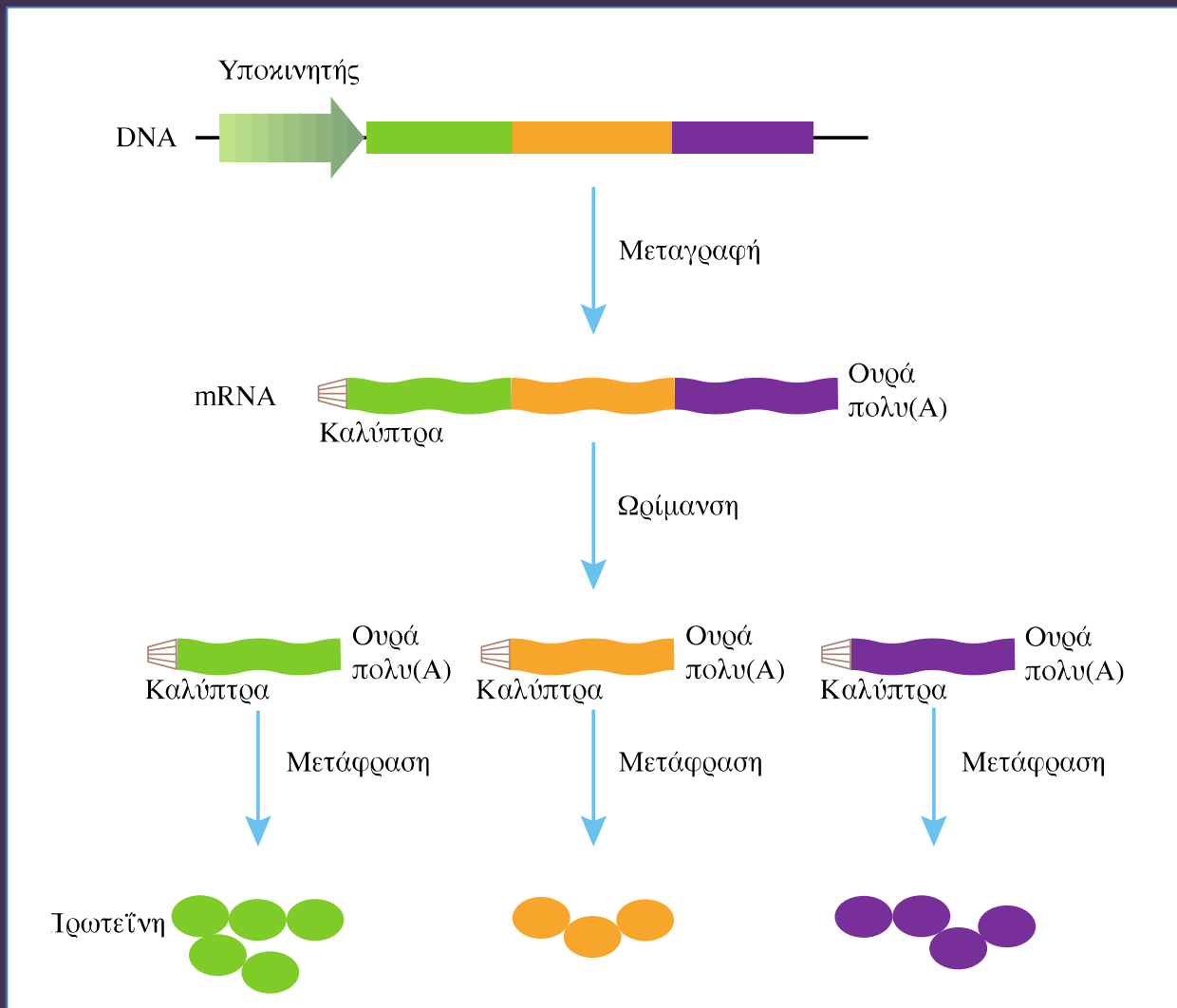
ΕΙΚΟΝΑ 20.18

Παρεμβολή RNA (RNAi) με βραχεία παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA).





Εικόνα 15.1



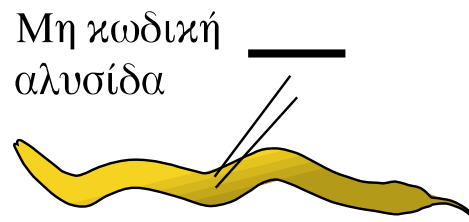
Εικόνα 15.2



3 ώρες



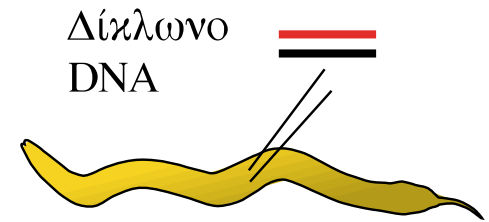
Φυσιολογική κίνηση



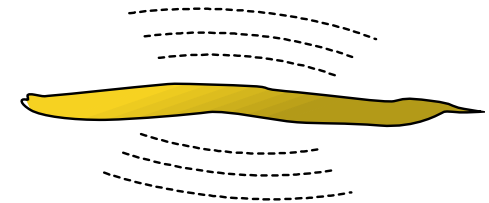
3 ώρες



Φυσιολογική κίνηση



3 ώρες



Συσπάσεις

Εικόνα 15.3



Επεμβατικό RNA

- Το **Επεμβατικό RNA** ή *RNA interference* ή *RNAi*) είναι ένας μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στην οποία το RNA καταστέλλει την έκφραση συμπληρωματικών προς αυτών γονιδίων. Φυλογενετικά ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να έχει προέλθει από πρώιμους αντιικούς μηχανισμούς ανοσίας και παίζει σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση, εξελικτική βιολογία και διατήρηση του γονιδιώματος.
- Οι Fire και Mello βραβεύθηκαν το 2006 με το *Νόμπελ στην Ιατρική* για την έρευνά τους και τις ανακαλύψεις τους στο επεμβατικό RNA

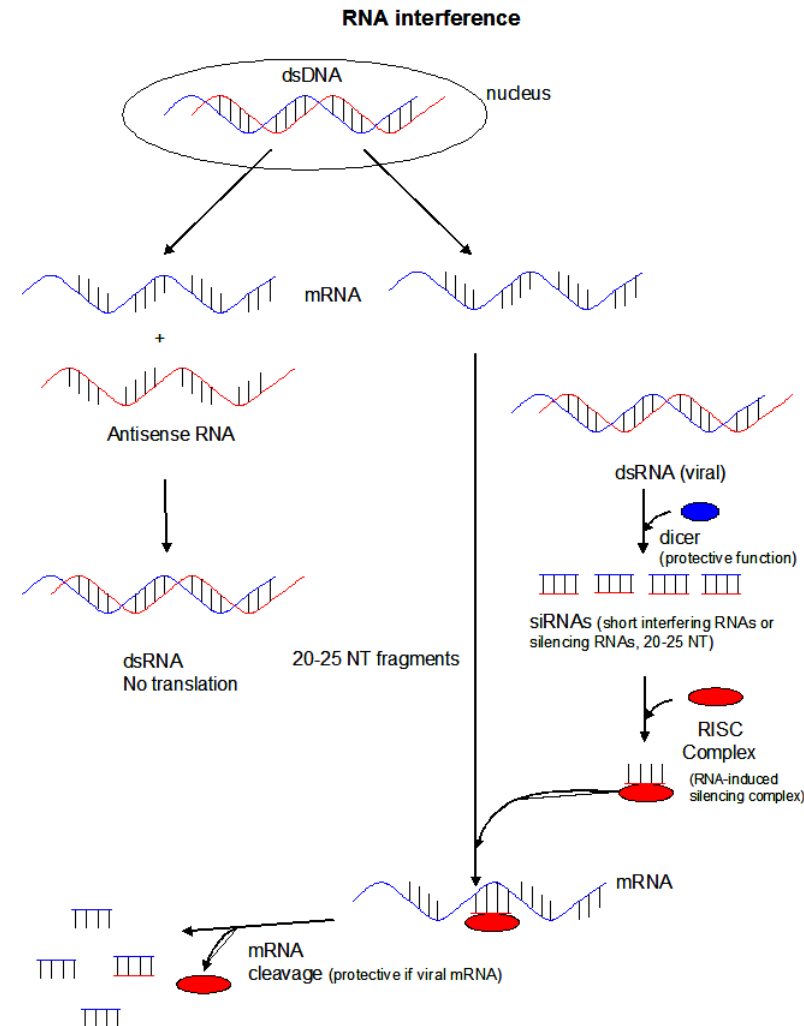


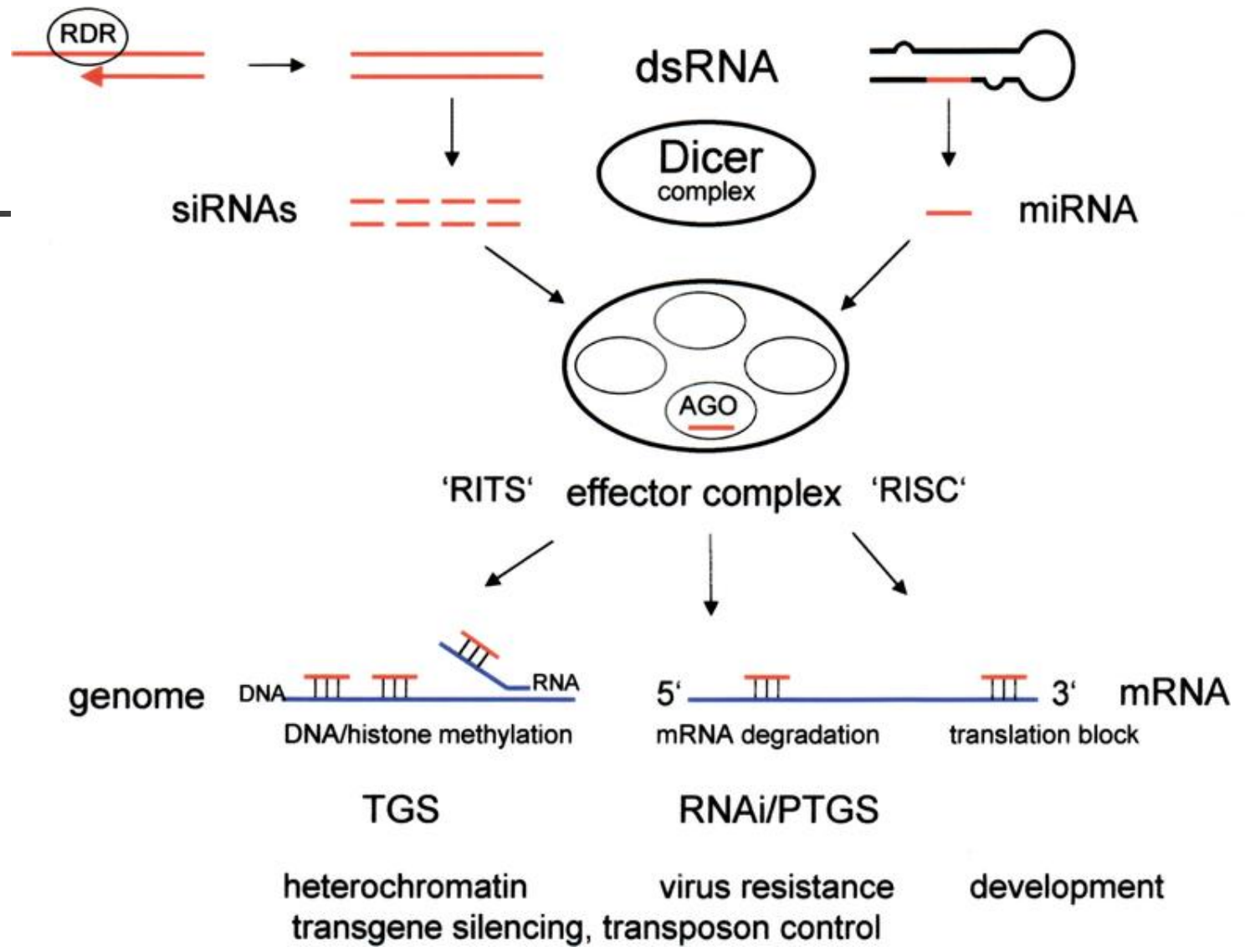
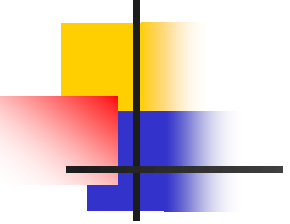
Ο μηχανισμός RNAi

- Ο μηχανισμός RNAi άρχεται από το ένζυμο *dicer*, το οποίο διασπά την διπλή αλυσίδα RNA (dsRNA) για να δημιουργήσει κοντά θραύσματα διπλής αλυσίδας 20–25 ζευγαριών βάσεων.
- Το ειδικό αυτό RNA ανακαλύφθηκε όταν παρατηρήθηκε ότι τόσο η *sense* όσο και η *antisense* ακολουθία του RNA, ήταν εξίσου αποτελεσματικές στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.
- Παρασκευάσματα οποιουδήποτε τύπου (υποθετικά) μονόκλωνου RNA περιείχε προσμίξεις μικρών ποσοτήτων δίκλωνου RNA.
- Μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι το δίκλωνο RNA αποικοδομείται (με δαπάνη ATP) παράγοντας ολιγονουκλεοτίδια μήκους 21-23 βάσεων. Αυτά τα μικρά τμήματα RNA ονομάστηκαν siRNA (short interference RNA). Δημιουργούνται με αποκοπές στα 3' άκρα ενός μεγαλύτερου δίκλωνου RNA και προκύπτουν siRNA θραύσματα, (δίκλωνα) με ανισοτελή άκρα μήκους 2 βάσεων.

Μικρό επεμβατικό RNA; short interfering or silencing RNAs (siRNAs)

- Τα siRNAs δημιουργούνται όταν το **dicer** κόβει **ικκό** δίκλωνο RNA σε επιμολυσμένα κύτταρα. (οι ιοί παράγουν κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους δίκλινα τμήματα RNA).
- Αυτά διαφέρουν από τα miRNA στο ότι τα siRNA δεν προέρχονται από μεταγραφή σε γονίδιο του ξενιστή.
- Το **Dicer** δρα τεμαχίζοντας τα δίκλινα RNA σχηματίζοντας μικρά δίκλινα RNA 20 και 25 νουκλεοτιδικών ζευγαριών που ονομάζονται **siRNAs**.
- Αυτά στη συνέχεια δεσμεύονται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται **RISC (RNA-induced silencing complex)**, το οποίο προάγει το ξετύλιγμα των siRNA.
- Η αναστολή συμβαίνει όταν το σύμπλοκο RISC τεμαχίζει το σύμπλοκο RISC-siRNA- mRNA
- Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να συνδέεται με αμυντικούς μηχανισμούς των επιμολυσμένων με ιό κύτταρα αναστέλλοντας τη μετάφραση του ιικού mRNA.

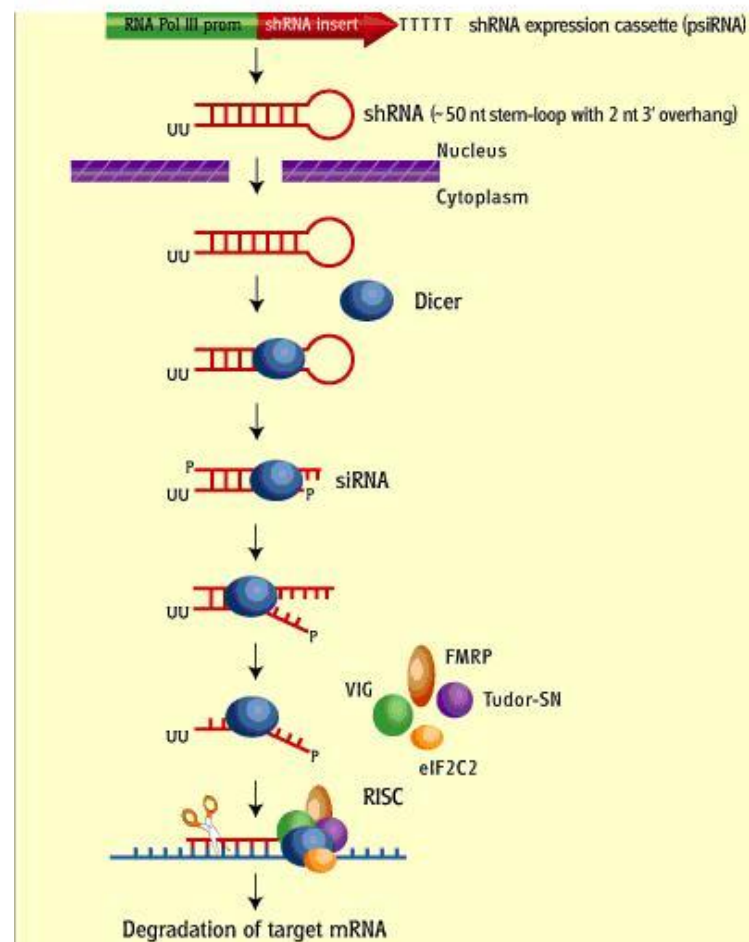




Τα siRNAs μπορούν επίσης να δεσμεύονται σε mRNA στόχους του ξενιστή δημιουργώντας δίκλινα RNA σύμπλοκα αναστέλλοντας τελικά την μετάφραση

- Η τεχνική αυτή έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει τις λειτουργίες των προϊόντων γονιδίων στο νηματώδη σκώληκα, *C. elegans*.
- Αυτός ο οργανισμός έχει περίπου 20,000 γονίδια που κωδικοποιούν αντίστοιχες πρωτεΐνες.
- Η ερευνητική ομάδα του Kamathk έθρεψαν τα σκουλήκια αυτά με βακτήρια *E. Coli*, τα οποία είχαν μετασηματιστεί με πλασμιδιακό DNA σχεδιασμένο να παράγει dsRNA.
- Κατά τη μεταγραφή μία από τις αλυσίδες ήταν συμπληρωματικές, στις αλληλουχίες του mRNA του σκώληκα

Γονιδιακή αποσιώπηση με RNAi σε κύτταρα θηλαστικών, χρησιμοποιώντας shRNA



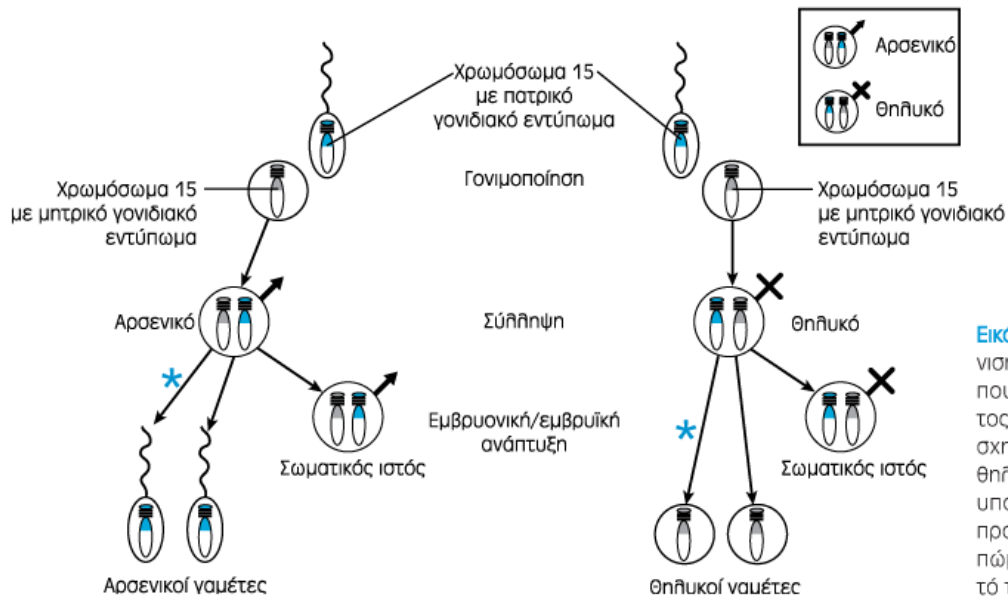


Αποτελέσματα αποσιώπησης

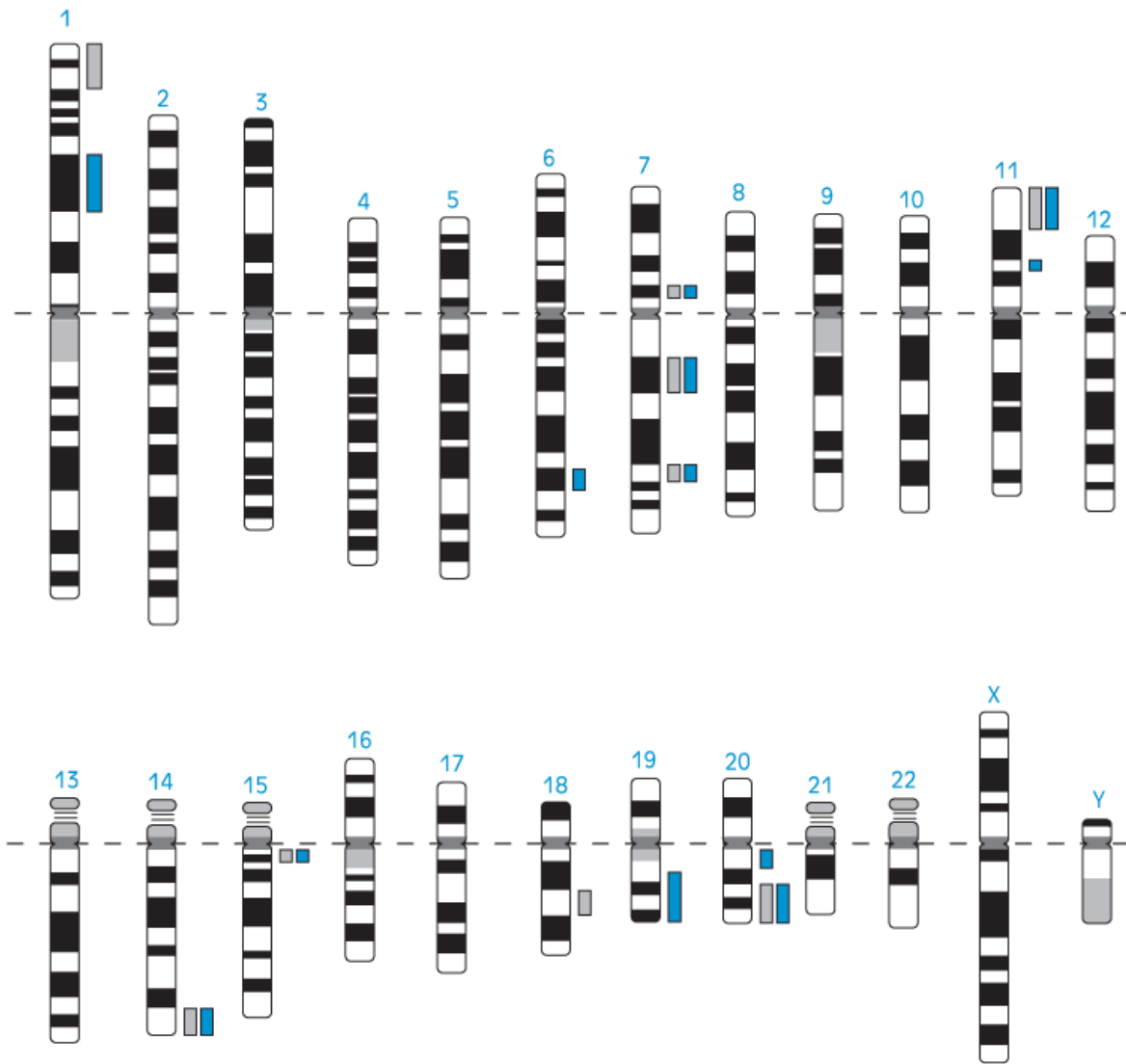
- Τα πλασμίδια που περιείχαν 17,000 διαφορετικά dsRNA κωδικοποιημένα γονίδια κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για να απαλείψουν τη γονιδιακή έκφραση (σχηματίζοντας σύμπλοκα dsRNA από το mRNA).
- Από τα 1700 πειράματα με dsRNA πήρανε αποτελέσματα αλλαγής στον φαινότυπο του οργανισμού.
- Τα γονίδια των οποίων η απενεργοποίηση ήταν θνησιγενής ήταν γενικά αυτά που είχαν αντιστοιχία με άλλων οργανισμών, ενώ εκείνα που δεν είχαν θνησιγενή δράση είχαν περισσότερη ομολογία με αντίστοιχα ανώτερων οργανισμών.
- Κοίταξαν επίσης σε ποια γονίδια επηρεάστηκε ο μεταβολισμός των λιπιδίων ενσωματώνοντας μία φθορίζουσα ουσία η οποία δεσμεύεται στις εναποθέσεις λιπιδίων στον οργανισμό.
- Περίπου 300 γονίδια βρέθηκαν να επηρεάζουν τον φθορισμό και κατ'επέκταση να ρυθμίζουν την εναπόθεση λίπους στον οργανισμό.

Παράδειγμα φυτού στο οποίο τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις χρωστικές έχουν κατασταλεί με RNAi. Το αριστερό φυτό είναι ο θετικός μάρτυρας, το δεξιό περιέχει τρανσγονίδια που καταστέλλουν τα γονίδια της χρωστικής του λουλουδιού.

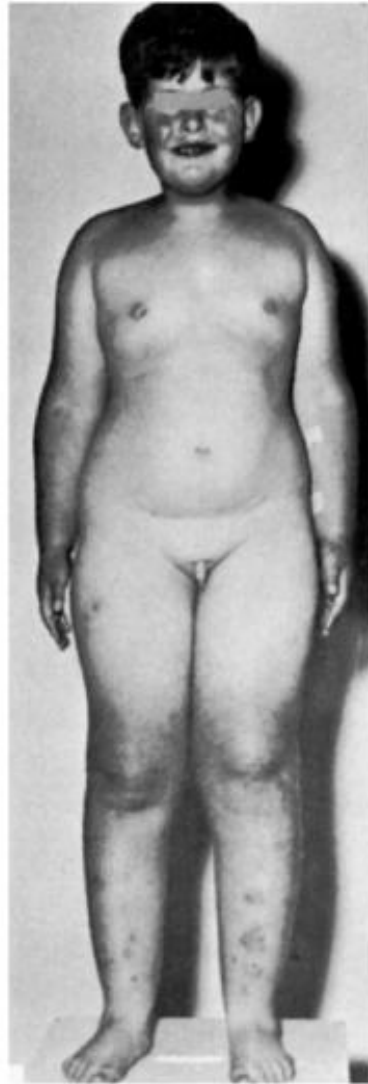




Εικόνα 5-13 ■ Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής του προτύπου γονιδιωματικού εντυπώματος στη γαμετική σειρά κατά τον σχηματισμό των αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Ο αστερίσκος υποδεικνύει τη μετατροπή του προτύπου γονιδιωματικού εντυπώματος του ενός φύλλου σε αυτό του άλλου φύλλου.



Εικόνα 5-14 ■ Χάρτης περιοχών του γονιδιώματος του ανθρώπου που υπόκεινται σε γονιδιωματικό εντύπωμα. Οι χρωμοσωματικές περιοχές, με ένα ή περισσότερα γονίδια, που εκφράζονται μόνο από το χρωμόσωμα μητρικής προέλευσης, απεικονίζονται με γκρι, ενώ οι χρωμοσωματικές περιοχές, με ένα ή περισσότερα γονίδια, που εκφράζονται μόνο από το χρωμόσωμα πατρικής προέλευσης, με μπλε. Σε κάποιες περιοχές εντοπίζονται ομάδες γονιδίων, κάποια από τα οποία εκφράζονται μόνο από το πατρικό αλληλόμορφο (δηλαδή παρουσιάζουν μητρικό αποτύπωμα) και κάποια άλλα μόνο από το μητρικό αλληλόμορφο (δηλαδή παρουσιάζουν πατρικό αποτύπωμα). (Βασισμένο στο Morison IA, Ramsay JP, Spencer HC: A census of mammalian imprinting. Trends Genet 21: 457-465, 2005).



Εικόνα 5-15 ■ Σύνδρομο Prader-Willi. *Αριστερά:* Τυπικό προσωπείο ενός προσβεβλημένου αγοριού εννέα ετών (Από: Pettigrew AL, Gollin SM, Greenberg F et al: Duplication of proximal 15q as a cause of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 35: 333-349, 1990. Copyright © 1990, Wiley-Liss, Inc. Ανατύπωση με άδεια των John Wiley and Sons, Inc.) *Δεξιά:* Παχυσαρκία, υπογοναδισμός, βραχεία άκρα, κοντό ανάστημα και αναπτυξιακή καθυστέρηση σε ένα προσβεβλημένο αγόρι 9,5 ετών (Από: Jones KL: *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1988, p173).

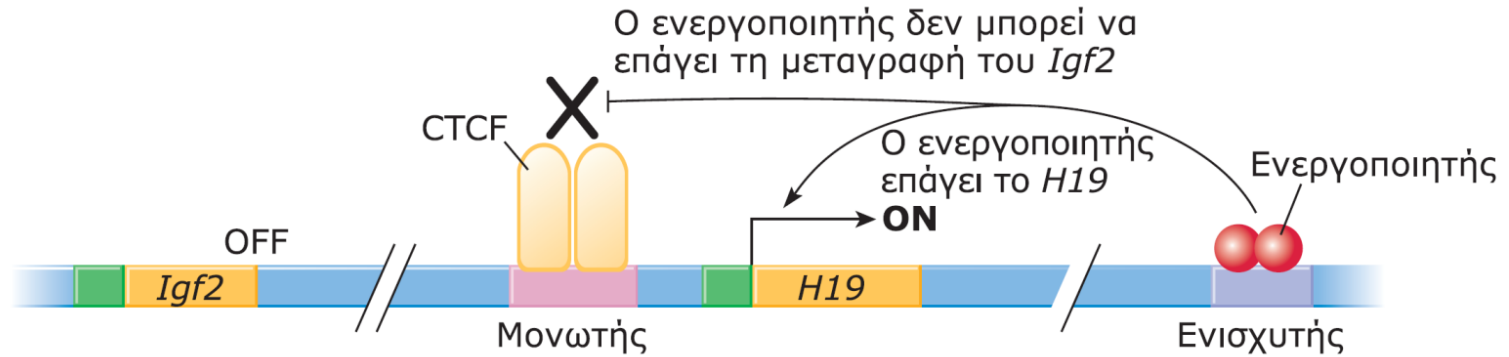
Εικόνα 5-16 ■ Κορίτσι τεσσάρων ετών με σύνδρομο Angelman. Προσέξτε τη στάση του παιδιού και τη θέση των άνω άκρων του. Συγκρίνατε αυτόν τον φαινότυπο με αυτόν του συνδρόμου Prader-Willi στην Εικόνα 5-15. Βρήπε κείμενο για συζήτηση (Ευγενική προσφορά: Jan M. Friedman, Magenis RE, Toth-Fejel S, Allen LJ, et al: Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. *Am J Med Genet* 35: 333-349, 1990. Copyright © 1990, Wiley-Liss, Inc. Ανατύπωση με άδεια των John Wiley and Sons, Inc.).



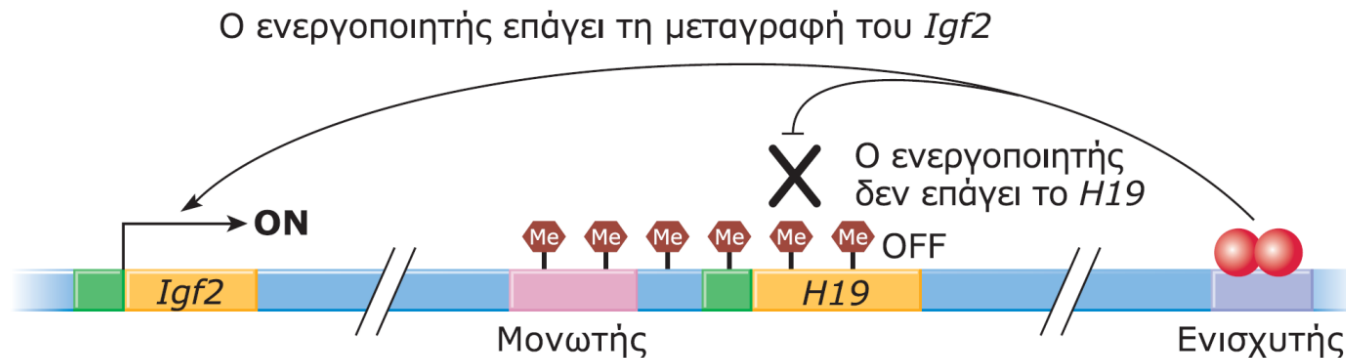
ΕΙΚΟΝΑ 20.16

Μοντέλο εντυπώματος των γονιδίων *Igf2* και *H19*.

α) Μητρικό χρωμόσωμα



β) Πατρικό χρωμόσωμα



Παραδείγματα εφαρμογής επιγενετικών μηχανισμών (II)

- Δημιουργία ετεροχρωματίνης στα κεντρομερή
- Απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος σε κύτταρα θηλαστικών



Συνεργασία επιγενετικών μηχανισμών

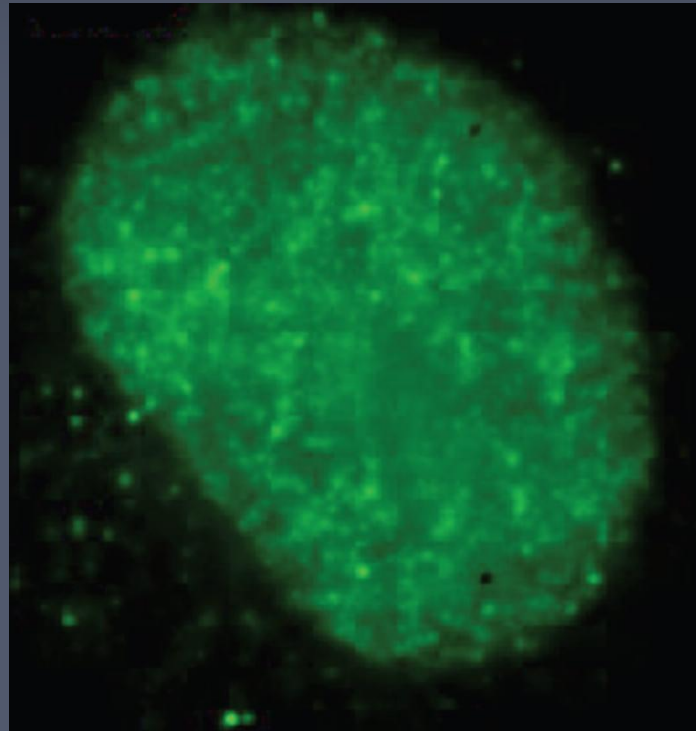
- Όλοι οι μηχανισμοί που αναφέραμε

1. τροποποίηση ιστονών
2. μεθυλίωση DNA
3. mi RNAs

λειτουργούν σε αμοιβαία συνεργασία με σκοπό την έκφραση των γονιδίων που πρέπει.

Κεφάλαιο 20

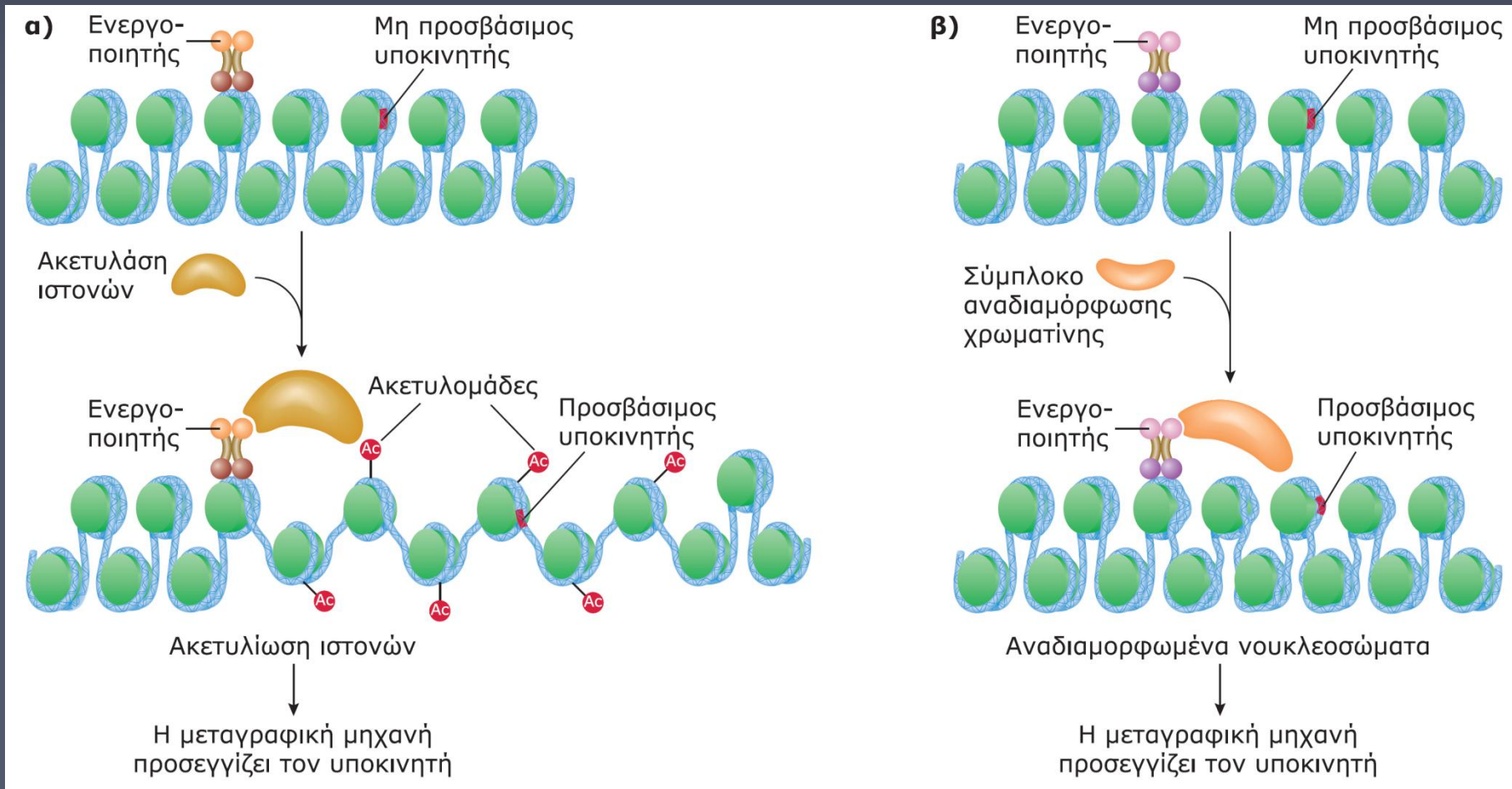
Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

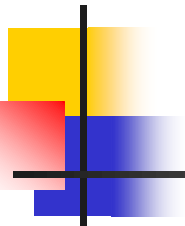


Πυρίνας ανθρώπινου μεσοφασικού κυττάρου στον οποίο παρατηρούμε, με ανοσοφθορισμό, τη διάστικτη κατανομή της απακετυλάσης των ιστονών (HDAC).

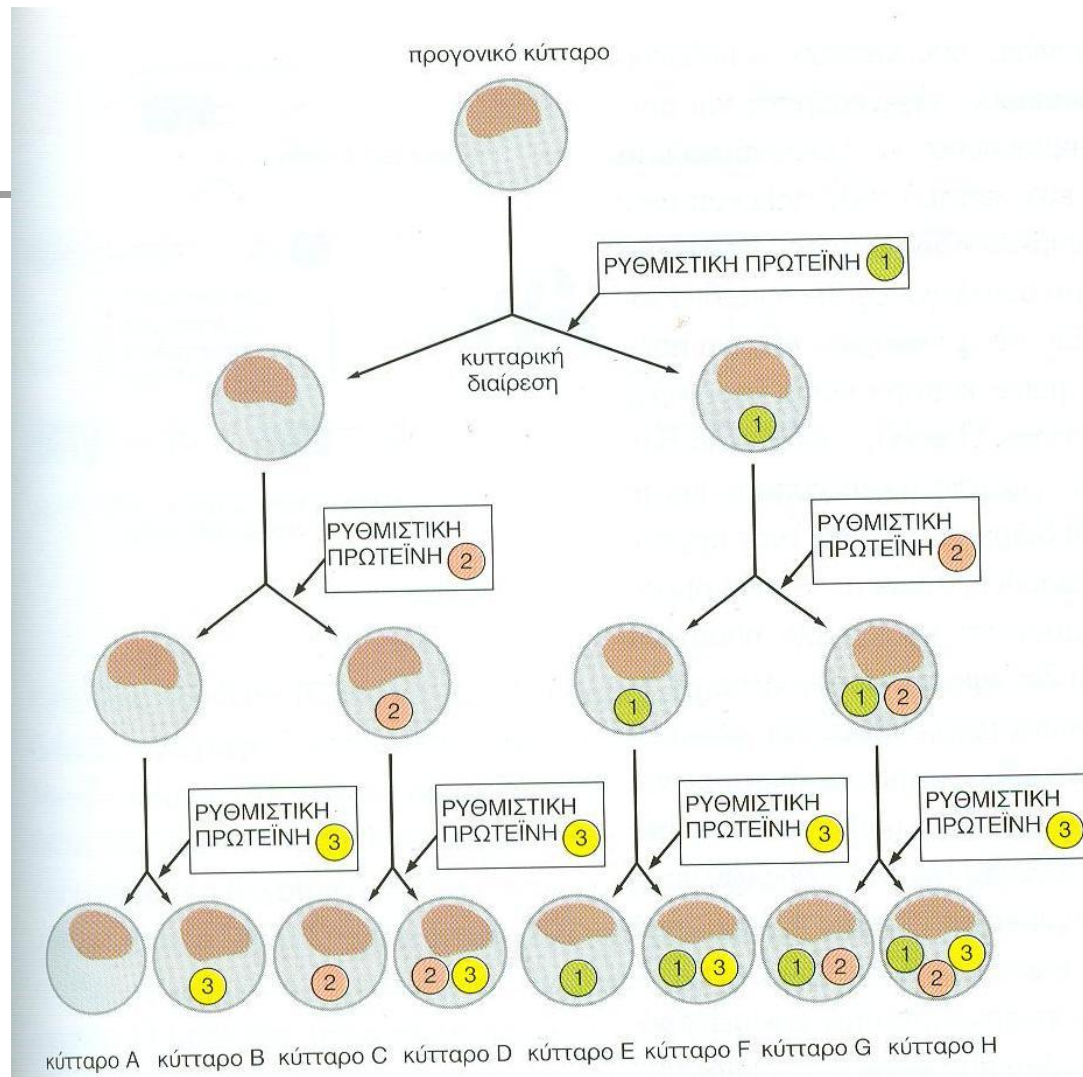
ΕΙΚΟΝΑ 20.3

Ρύθμιση της αρχιτεκτονικής δομής της χρωματίνης από (α) ακετυλάσες ιστονών και (β) σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων. Και στις δύο περιπτώσεις, το αποτέλεσμα είναι η πρόσβαση του μεταγραφικού μηχανισμού στον υποκινητή.

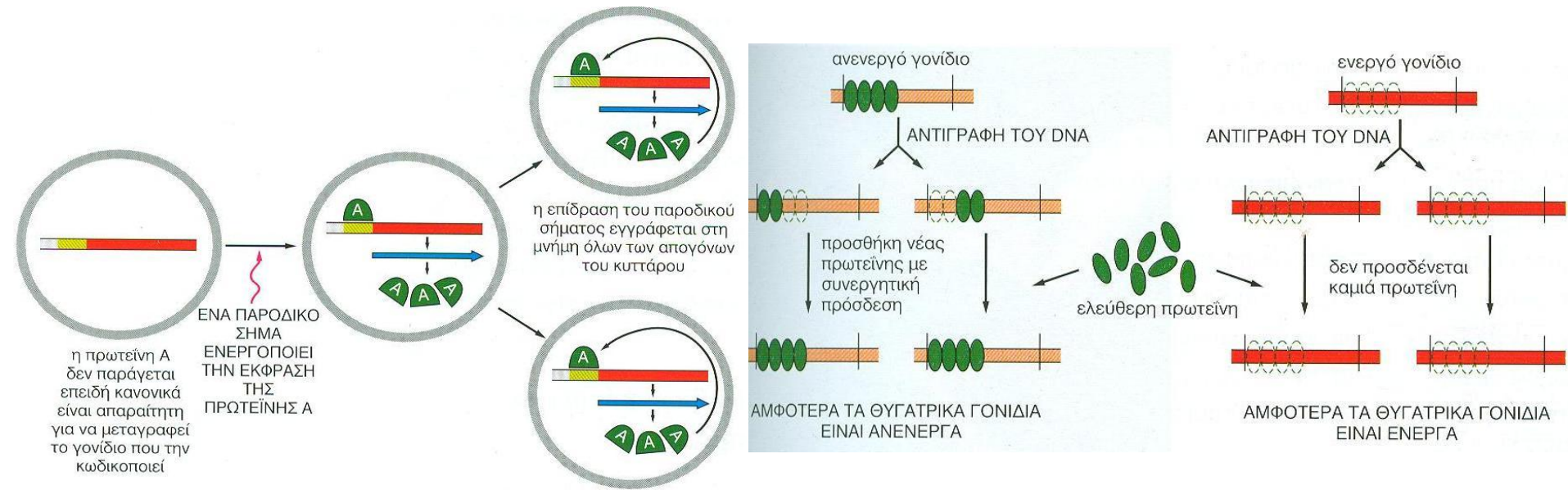




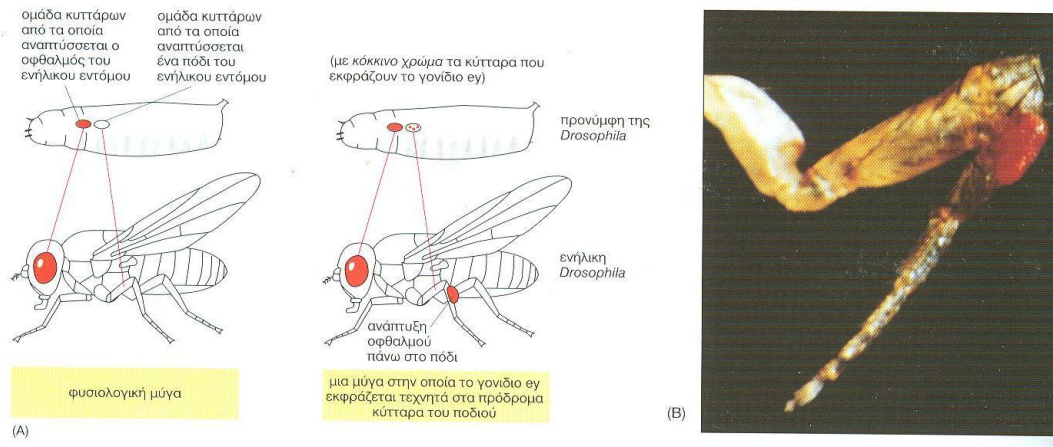
■ Στην εικόνα αυτή φαίνεται επίσης ότι χάρη στις δυνατότητες που προσφέρουν ο συνδυαστικός έλεγχος και οι κοινές ρυθμιστικές αλληλουχίες, μια περιορισμένη ομάδα γονιδιακών ρυθμιστικών πρωτεϊνών μπορεί να ελέγξει την έκφραση ενός πολύ μεγαλύτερου αριθμού γονιδίων.



Σταθερά πρότυπα έκφρασης των γονιδίων μπορεί να μεταβιβασθούν στα θυγατρικά κύτταρα



Η έκτοπη αυτή έκφραση οδήγησε σε ανάπτυξη οφθαλμών στο μέσο των ποδιών



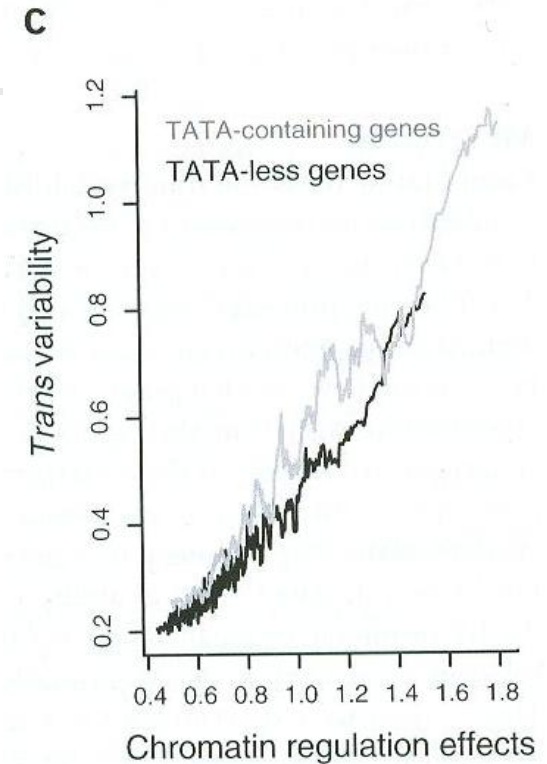
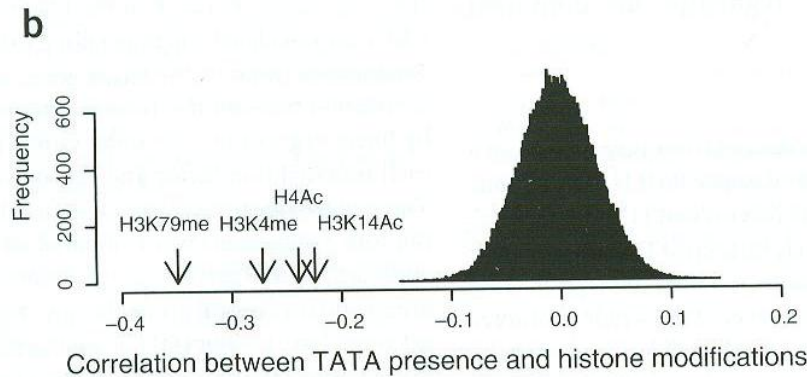
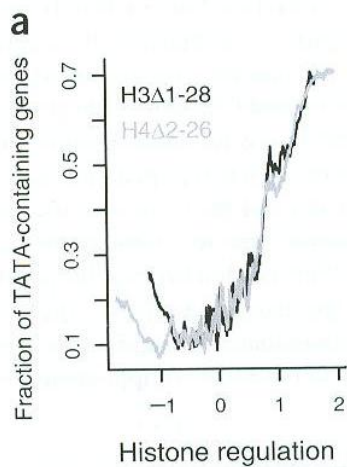
- Η έκφραση του γονιδίου *ey* της *Drosophila* στα πρόδρομα κύτταρα του ποδιού πυροδοτεί την ανάπτυξη ενός οφθαλμού πάνω στο πόδι. (A) Απλουστευμένα σχεδιαγράμματα που δείχνουν το αποτέλεσμα της φυσιολογικής έκφρασης του γονιδίου *ey* (αριστερά) και της έκτοπης έκφρασης του με τεχνητό τρόπο σε πρόδρομα κύτταρα των ποδιών (δεξιά). (B) Φωτογραφία ενός ανώμαλου ποδιού που περιέχει ένα έκτοπο οφθαλμό.



Ο ρόλος της αλληλουχίας TATA στην γονιδιακή έκφραση

- Τα γονίδια που περιέχουν TATA κουτί στους υποκινητές τους δείχνουν αυξημένη διακύμανση και εξελισιμότητα σε σχέση με την έκφραση τους.
- Τα αίτια αυτής της αυξημένης διακύμανσης της γονιδιακής έκφρασης στα γονίδια αυτά δεν οφείλεται
 - ούτε στην αλληλουχία του υποκινητή καθώς οι αλληλουχίες αυτές είναι αρκετά συντηρητικές σε σχέση με τους υποκινητές που δεν περιέχουν TATA κουτί
 - αλλά ούτε και στον αριθμό ή στο είδος των θέσεων δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων μιας και είναι παρόμοιοι μεταξύ των υποκινητών που διαθέτουν ή όχι TATA κουτί

Η μεγάλη διακύμανση της έκφρασης των γονιδίων που περιέχουν την αλληλουχία TATA οφείλεται στις ρυθμιστικές δράσεις της χρωματίνης



- (a) Το ποσοστό της αλληλουχίας TATA στα γονίδια σε σχέση με την διαφορετική ευαισθησία στη δράση των νουκλεοσωμάτων
- (b) Η συσχέτιση της συχνότητας της αλληλουχίας TATA και των τροποποιήσεων των ιστονών
- (c) Η συσχέτιση της διακύμανσης και των χρωματινικών δράσεων μελετήθηκαν ξεχωριστά για τα γονίδια που περιέχουν αλληλουχία TATA και ξεχωριστά για εκείνα που δεν περιέχουν.

Ο ρόλος της χρωματίνης

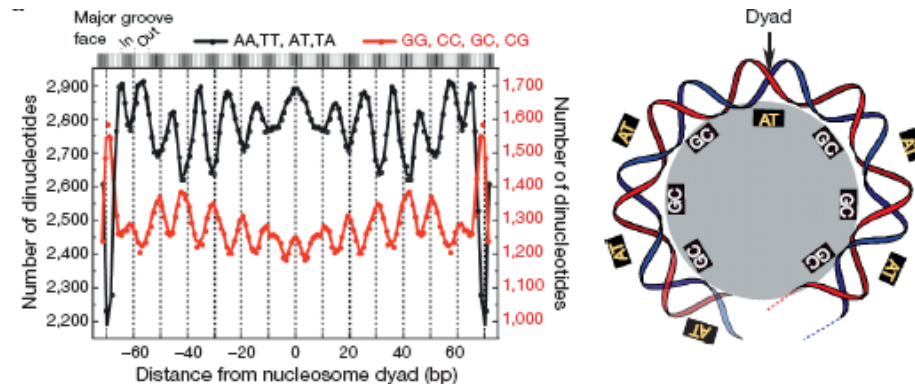
- Η φύση του ευκαρυωτικού DNA τείνει να διατηρεί τα γονίδια σε καταστολή
 - Για να δράσουν οι μεταγραφικοί παράγοντες πρέπει η σφιχτή δομή της χρωματίνης να χαλαρώσει. Ένα παράδειγμα είναι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο **Swi/Snf**, το οποίο ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στη ζύμη.
 - Μεταλλάξεις στα συστατικά του συμπλόκου έχει σαν αποτέλεσμα στην μείωση της ενεργότητας συγκεκριμένων γονιδίων στόχων.
 - Βρέθηκε αργότερα ότι μεταλλάξεις στα γονίδια των ιστονών αποκατέστησε τη φυσιολογική δραστικότητα σε αυτά τα γονίδια στόχους, που σημαίνει ότι, οι μεταλλάξεις στα γονίδια των ιστονών αντιστάθμισε την δράση των μεταλλάξεων στα γονίδια των Swi/Snf.

Θέσεις μετάφρασης και περιφοράς των νουκλεοσωμάτων Το παράδειγμα του γονιδιώματος του *Saccharomyces cerevisiae*

- Όπως προαναφέραμε η θέση των νουκλεοσωμάτων στο DNA είναι συγκεκριμένη και οποιαδήποτε εναλλακτική τοποθέτηση ακόμα και μερικών νουκλεοτιδίων μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση
 - Μετά από αλληλούχιση του DNA των 322.000 ξεχωριστών νουκλεοσωμάτων του ***Saccharomyces cerevisiae*** που περιέχει την ιστόνη H2A.Z ανιχνεύθηκαν νέες «υπογραφές» των θέσεων των νουκλεοσωμάτων.

Η αλληλουχία του DNA καθορίζει τη θέση των νουκλεοσωμάτων

- Υπάρχει μία τάση επανάληψης των δινουκλεοτιδίων AA/TT σε μεσοδιαστήματα 10 ζευγαριών βάσεων και στο ενδιάμεσο υπάρχουν δινουκλεοτίδια GC
- Μία σχετικά μεγάλη πυκνότητα δινουκλεοτιδίων GC και ένα έλλειμμα AT δινουκλεοτιδίων 3-4 βάσεις από τα όρια του κάθε νουκλεοσώματος;



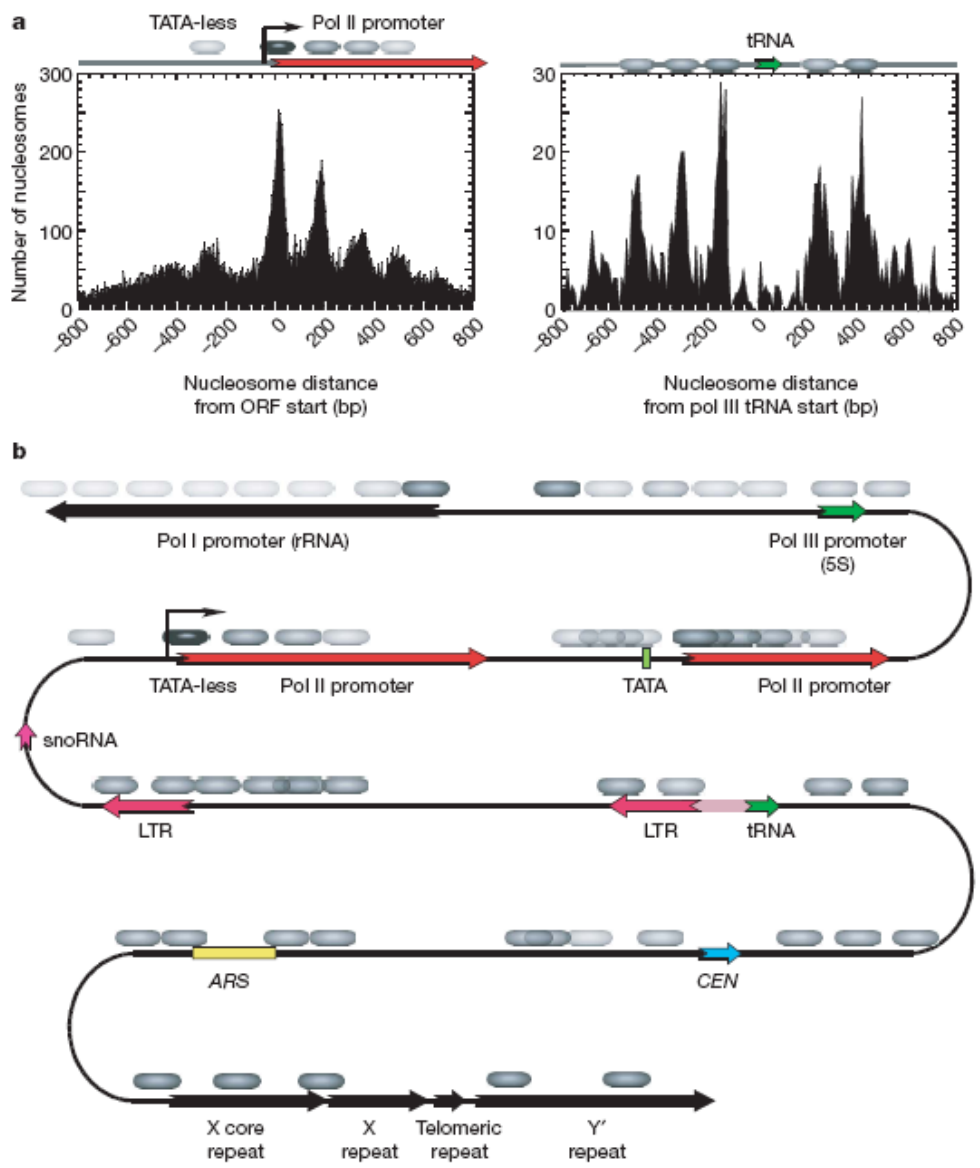


Η γεωγραφική τοποθέτηση των H2A.Z νουκλεοσωμάτων στη γειτονιά των χρωμοσωμικών στοιχείων

- Οι επαναλήψεις στα τελομερίδια και οι περιοχές του κεντρομεριδίου περιέχουν H2A.Z νουκλεοσώματα σε συγκεκριμένες θέσεις οι οποίες απείχαν 200 ζεύγη βάσεων σε σχέση με την κανονικότητα των 165 ζευγών βάσεων
- Δύο H2A.Z νουκλεοσώματα είναι παρόντα στον υποκινητή της ροI στις θέσεις +13 και -415, δημιουργώντας μία περιοχή 268 ζευγών βάσεων ελεύθερη νουκλεοσωμάτων.
- Οι υποκινητές που διαθέτουν TATA αλληλουχίες παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή νουκλεοσωμάτων από εκείνους που δεν έχουν. Πράγματι οι υποκινητές που δεν διαθέτουν αλληλουχίες TATA που είναι και η πλειοψηφία των υποκινητών των γονιδιωμάτων, είχαν κανονική αρχιτεκτονική περιλαμβάνοντας ενδιάμεση ενδο-νουκλεοσωμική αλληλουχία 165 ζευγών βάσεων. Σε αντίθεση εκείνοι που διαθέτουν αλληλουχία TATA δεν είχαν κανονική αρχιτεκτονική.



- Για την έναρξη της μεταγραφής στη θέση έναρξης του πλαισίου ανάγνωσης απαιτείται η προσωρινή απομάκρυνση των νουκλεοσωμάτων, για να μπορέσει να εισέλθει η πολυμεράση.
- Στη συνέχεια και αφού δεσμευθεί στο DNA η πολυμεράση, τα νουκλεοσώματα επανατοποθετούνται στις αρχικές τους θέσεις.



Η ένταση της σκίασης των κυλινδρικών στοιχείων υποδηλώνει τα σχετικά επίπεδα των H2A.Z

Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth

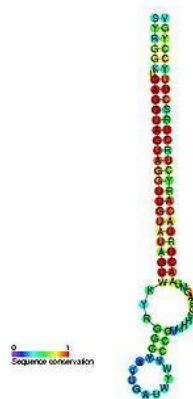
Guillaume Lettre^{1,2}, Anne U Jackson^{3,25}, Christian Gieger^{4,5,25}, Fredrick R Schumacher^{6,7,25}, Sonja I Berndt^{8,25}, Serena Sanna^{3,9,25}, Susana Eyheramendy^{4,5}, Benjamin F Voight^{1,10}, Johannah L Butler², Candace Guiducci¹, Thomas Illig⁴, Rachel Hackett¹, Iris M Heid^{4,5}, Kevin B Jacobs¹¹, Valeriya Lyssenko¹², Manuela Uda⁹, The Diabetes Genetics Initiative²⁴, FUSION²⁴, KORA²⁴, The Prostate, Lung Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial²⁴, The Nurses' Health Study²⁴, SardiNIA²⁴, Michael Boehnke³, Stephen J Chanock¹³, Leif C Groop^{12,14}, Frank B Hu^{6,7,15}, Bo Isomaa^{16,17}, Peter Kraft⁷, Leena Peltonen^{1,18,19}, Veikko Salomaa²⁰, David Schlessinger²¹, David J Hunter^{1,6,7,15}, Richard B Hayes⁸, Gonçalo R Abecasis³, H-Erich Wichmann^{4,5}, Karen L Mohlke²² & Joel N Hirschhorn^{1,2,23}

Δεδομένα από 15,000 άτομα με δεδομένα GWA και από 10,000 επιπλέον, συνολικά **25.000** άτομα

Table 1 Summary association results for 29 SNPs genotyped in the follow-up panels

Chromosome (position)	SNP	MAF (allele) ^a	Meta-analysis <i>P</i> beta (s.e.m.) ^b	Meta-analysis heterogeneity <i>I</i> ^{2c} (%)	Follow-up <i>P</i> beta (s.e.m.) ^b	Follow-up heterogeneity <i>I</i> ^{2c} (%)	Combined <i>P</i> beta (s.e.m.) ^d	USHT <i>P</i> OR (95% CI) ^e	Nearby genes ^f
Validated associations (combined <i>P</i> < 5 × 10⁻⁷)									
3 (142588268)	rs724016	0.48 (G)	5.0 × 10 ⁻¹² 0.461 (0.070)	0	2.5 × 10 ⁻¹¹ 0.307 (0.051)	71	8.3 × 10 ⁻²² 0.365 (0.038)	7.8 × 10 ⁻⁸ 1.4 (1.2–1.6)	<i>ZBTB38</i>
12 (64644614)	rs1042725	0.49 (T)	2.6 × 10 ⁻¹¹ -0.403 (0.070)	8	1.7 × 10 ⁻¹⁰ -0.493 (0.077)	0	2.7 × 10 ⁻²⁰ -0.484 (0.051)	4.2 × 10 ⁻⁶ 0.8 (0.7–0.9)	<i>HMGA2</i>
6 (142745570)	rs4896582	0.27 (A)	3.2 × 10 ⁻⁸ -0.397 (0.077)	0	6.3 × 10 ⁻¹² -0.365 (0.058)	24	2.4 × 10 ⁻¹⁸ -0.378 (0.051)	2.2 × 10 ⁻⁵ 0.8 (0.7–0.9)	<i>GPR126</i>
6 (26341366)	rs10946808	0.28 (G)	3.3 × 10 ⁻⁸ -0.448 (0.083)	40	1.9 × 10 ⁻¹⁰ -0.314 (0.058)	63	3.8 × 10 ⁻¹⁷ -0.358 (0.045)	3.4 × 10 ⁻⁸ 0.7 (0.7–0.8)	<i>HIST1H1D</i>
20 (33370575)	rs6060369	0.36 (C)	1.9 × 10 ⁻¹⁰ 0.454 (0.077)	0	1.3 × 10 ⁻⁷ 0.410 (0.077)	0	1.4 × 10 ⁻¹⁶ 0.435 (0.051)	0.012 1.2 (1.0–1.3)	<i>GDF5-UQCC</i>
4 (146007626)	rs1492820	0.48 (G)	3.6 × 10 ⁻⁸ -0.435 (0.077)	0	3.9 × 10 ⁻⁵ -0.218 (0.051)	0	1.2 × 10 ⁻¹¹ -0.288 (0.038)	0.002 0.8 (0.7–0.9)	<i>HHIP</i>
14 (91529711)	rs8007661	0.30 (T)	8.9 × 10 ⁻⁸ -0.486 (0.090)	0	0.0015 -0.326 (0.102)	n.a.	5.5 × 10 ⁻¹⁰ -0.416 (0.064)	0.64 1.0 (0.9–1.1)	<i>TRIP11-ATXN3</i>
6 (105514355)	rs314277	0.13 (A)	5.9 × 10 ⁻⁹ 0.608 (0.109)	0	0.035 0.230 (0.102)	0	1.1 × 10 ⁻⁸ 0.410 (0.077)	0.26 1.1 (0.9–1.3)	<i>LIN28B</i>
19 (2121954)	rs12986413	0.45 (T)	2.0 × 10 ⁻⁵ 0.333 (0.077)	23	3.7 × 10 ⁻⁴ 0.275 (0.077)	60	2.9 × 10 ⁻⁸ 0.307 (0.051)	0.20 1.1 (1.0–1.2)	<i>DOT1L</i>
15 (82077496)	rs2562784	0.17 (G)	2.9 × 10 ⁻⁵ 0.307 (0.083)	3	5.5 × 10 ⁻⁴ 0.397 (0.115)	n.a.	6.4 × 10 ⁻⁸ 0.339 (0.064)	0.28 1.1 (1.0–1.2)	<i>SH3GL3-ADAMTSL3</i>
8 (57318152)	rs9650315	0.13 (T)	9.6 × 10 ⁻⁶ -0.474 (0.102)	46	0.010 -0.352 (0.134)	26	3.8 × 10 ⁻⁷ -0.429 (0.083)	9.0 × 10 ⁻⁶ 0.7 (0.6–0.8)	<i>CHCHD7-RDHE2</i>
7 (91901556)	rs2040494	0.50 (C)	4.8 × 10 ⁻⁵ -0.288 (0.077)	29	0.0020 -0.237 (0.077)	0	3.8 × 10 ⁻⁷ -0.262 (0.051)	0.18 0.9 (0.8–1.0)	<i>CDK6</i>

Αρκετά από αυτά τα γονίδια, 5 από τα 16 (**31%**) αποτελούν θέσεις στόχους για τα **let-7 micro-RNAs**, σε σχέση με το **2%** των γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα.



Τα let-7 micro-RNAs όπως όλα τα mi-RNAs είναι μη κωδικοποιούσα RNA, τα οποία μεταγράφονται ως πρόδρομα **70** νουκλεοτιδίων, μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου με την επίδραση του ενζύμου Dicer ωριμάζουν σε **22** νουκλεοτίδια και προκαλούν αποσιώπηση της έκφρασης μέσω της δέσμησης τους στο **3' UTRs** των m-RNAs