

Επιγενετικό αποτύπωμα και μοριακή απόκριση

Τότα Γιαρδόγλου, PhD

Επί-γενετική: Πέρα από τις κλασικές αρχές της γενετικής (over and above)

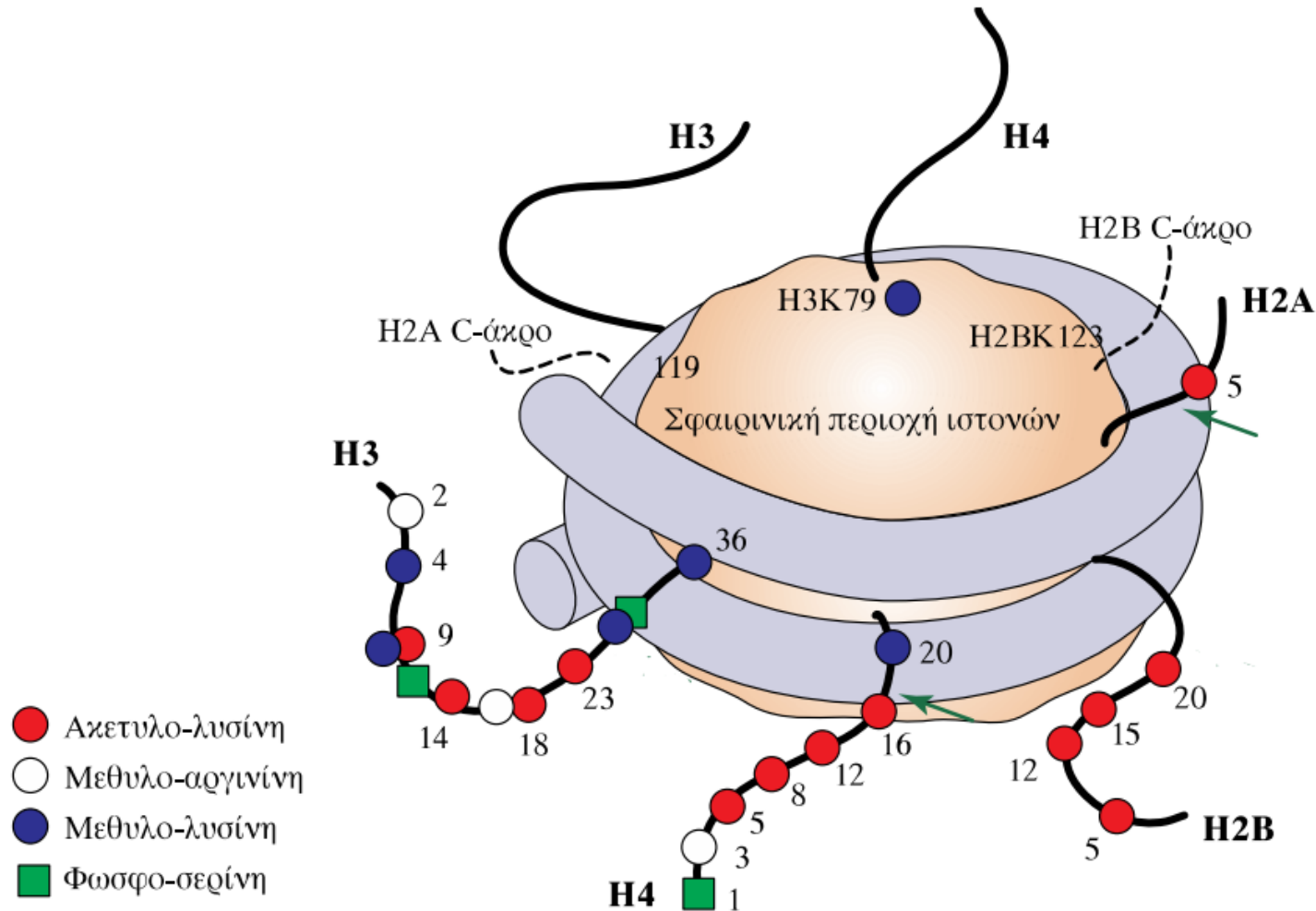


- **Conrad Hal Waddington (1905-1975)**

Εμβρυολόγος, γενετιστής και φιλόσοφος εισήγαγε τον όρο επιγενετική. Στο άρθρο του «The genetic assimilation of the bithorax phenotype», στο περιοδικό «*Evolution*» το 1956 κατάφερε να δείξει την ύπαρξη κληρονομικότητας χαρακτηριστικών ενός πληθυσμού σχετιζόμενη με αρχική έκθεση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

- Μεταγραφικός έλεγχος που τροποποιεί το τελικό προϊόν ενός γονιδίου χωρίς να επιφέρει αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του
- **Επιγενετική πλαστικότητα:** Κληρονομείται αλλά είναι αναστρέψιμη καθώς καθορίζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και ερεθίσματα
- Οι κύριοι μηχανισμοί επιγενετικής περιλαμβάνουν:
 - μεθυλίωση του DNA
 - τροποποίηση των ιστονών
 - μη κωδικοποιούντα RNAs (miRNA, ncRNA)

Τροποποίηση ιστονών, «ιστονικός κώδικας»



Κώδικας ιστονών → πρότυπο χημικών τροποποιήσεων που καθορίζει τις περιοχές του γονιδιώματος που θα εκφραστούν σε δεδομένη χρονική στιγμή

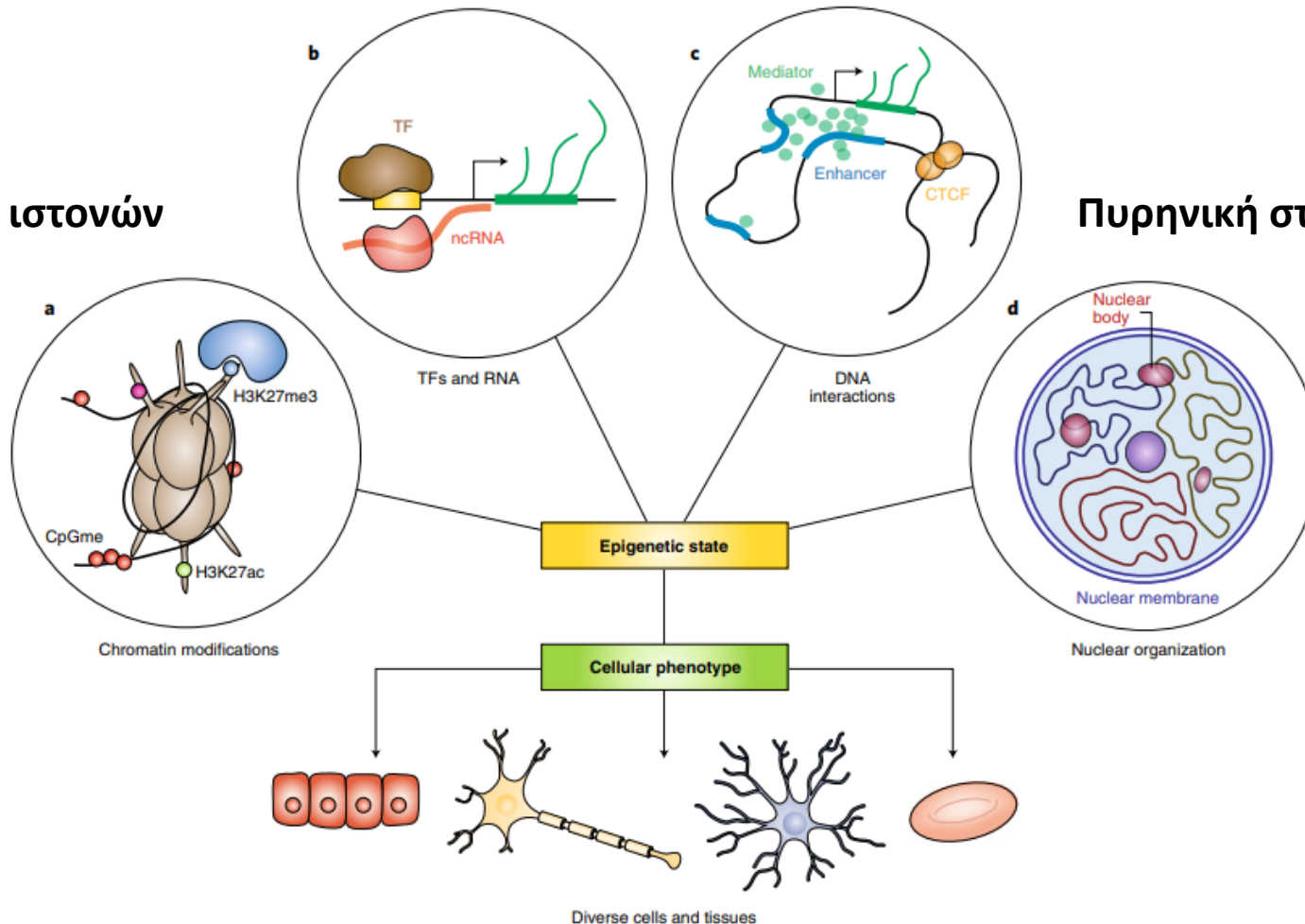
Κυτταρικοί επιγενετικοί μηχανισμοί

Μεταγραφικοί παράγοντες & ncRNA

DNA ρυθμιστικές αλληλουχίες

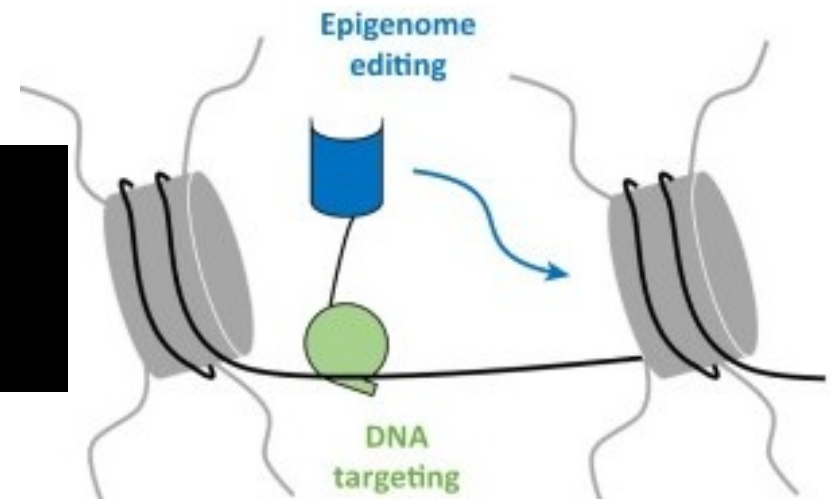
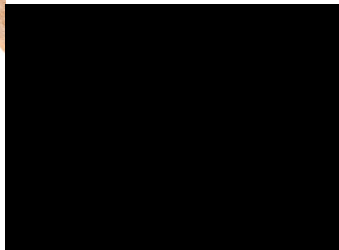
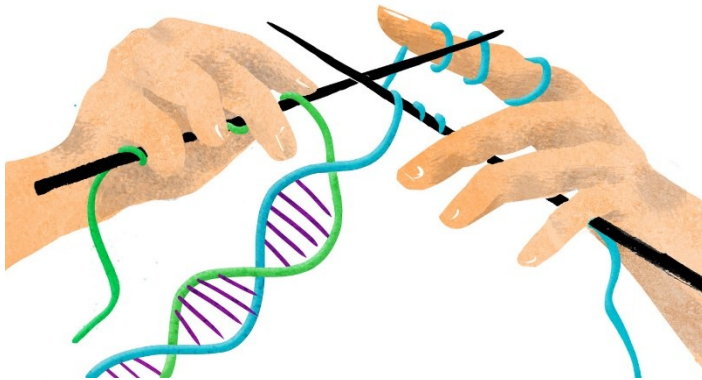
Κώδικας ιστονών

Πυρηνική στερεοδιάταξη



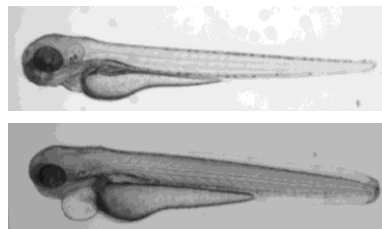
Γενετική - Επιγενετική

- Μπορούν τα εργαλεία κλασικής γενετικής τροποποίησης να χρησιμοποιηθούν ως μηχανισμοί επιγενετικής;

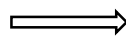


Κλασικές στρατηγικές γενετικής προσέγγισης

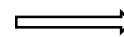
Ευθεία (forward) γενετική προσέγγιση: Μοριακή τεχνική που ξεκινά με παρατήρηση φαινοτύπου με στόχο την ταυτοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου



Μεταλλαγή



Φαινότυπος



Γονίδιο

ΕΥΘΕΙΑ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Διαλογή φαινοτύπου μεταλλαγμένου ατόμου
μετά από τυχαία μεταλλαξιγένεση



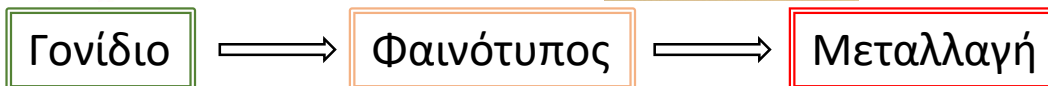
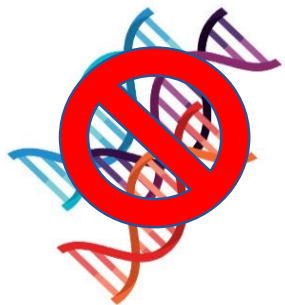
Ταυτοποίηση μεταλλαγμένου
υπεύθυνου αλληλομόρφου



Αλληλούχιση γονιδίου και
μελέτη της έκφρασής του



Αντίστροφη (reverse) γενετική προσέγγιση: Μοριακή τεχνική που ξεκινά με το γονίδιο άγνωστης λειτουργίας με στόχο τον χαρακτηρισμό του φαινοτύπου



ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

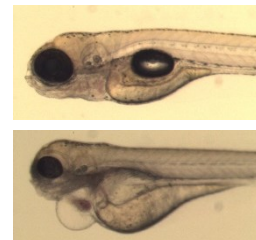
Στοχευμένη τροποποίηση αλληλουχίας γονιδίου-στόχου



Μελέτη φαινοτύπου μεταλλαγμένου ατόμου



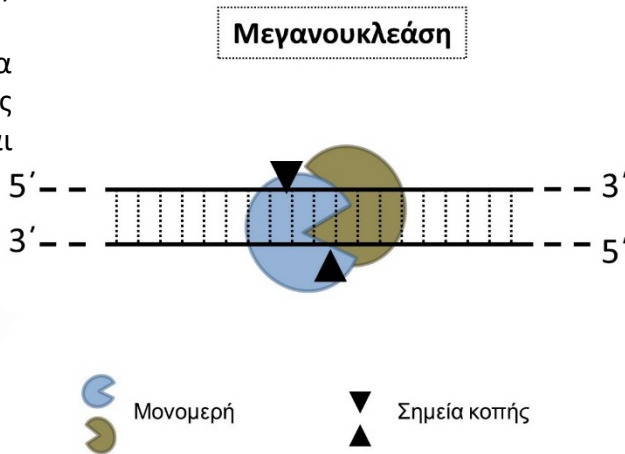
Λειτουργική ανάλυση γονιδίου-στόχου



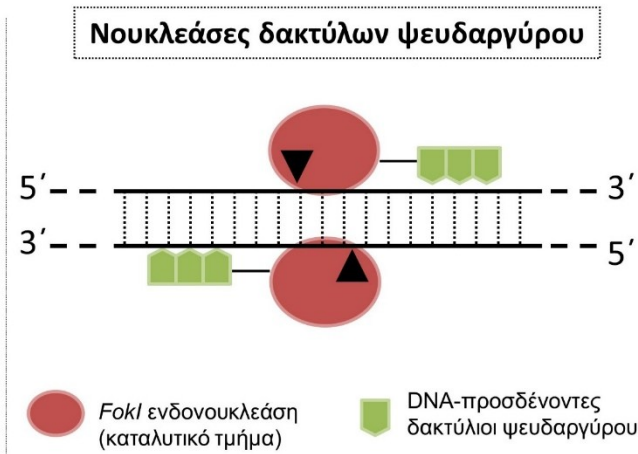
- **Knock-out:** συγκεκριμένη προσθήκη/αφαίρεση ή σημειακή αλλαγή (side-directed mutagenesis) για δημιουργία μη-λειτουργικών αλληλομόρφων
- **Knock-down:** αποσιώπηση έκφρασης ενός γονιδίου, χωρίς μόνιμη γονιδιακή παρέμβαση με χρήση RNAi (RNA interference) ή Morpholinos (ολιγομερίδια)
- **Knock-in:** πρόκειται για μια-προς-μια αντικατάσταση της αλληλουχίας του DNA μέσα σε μια συγκεκριμένη γενετική περιοχή
- **Overexpression:** υπερέκφραση ενός φυσιολογικού γονιδίου

Εξέλιξη εργαλείων γονιδιωματικής προσέγγισης

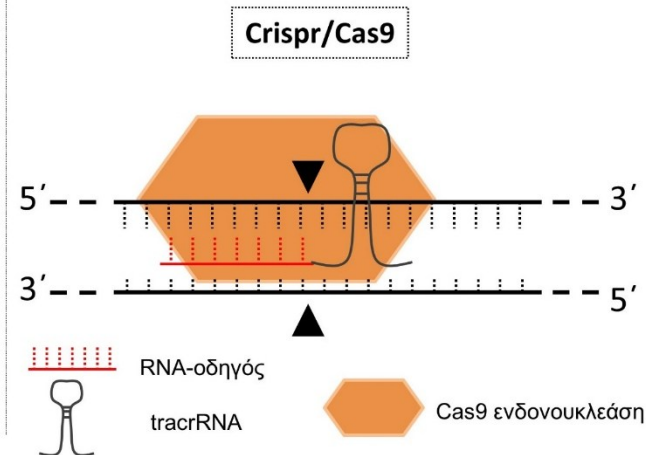
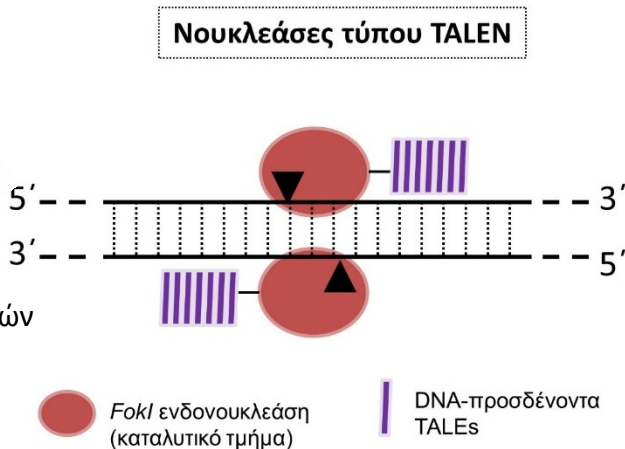
- Αναγνωρίζουν ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με μεγάλα σημεία τομής με >14ζβ και κόβουν



- Κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου αναγνωρίζει 3-4 ζβ
- ZFPs συνδυάζονται με την καταλυτική περιοχή του περιοριστικού ενζύμου *FokI*
- Διμερισμός ZFN



- Συνδυασμός TALE πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν από μία βάση
- Καταλυτική περιοχή του περιοριστικού ενζύμου *FokI*



Shared Nobel Chemistry Prize, 2020



Jennifer A. Doudna

Born in the USA, 1964

University of California, Berkeley, USA

Howard Hughes Medical Institute

Emmanuelle Charpentier

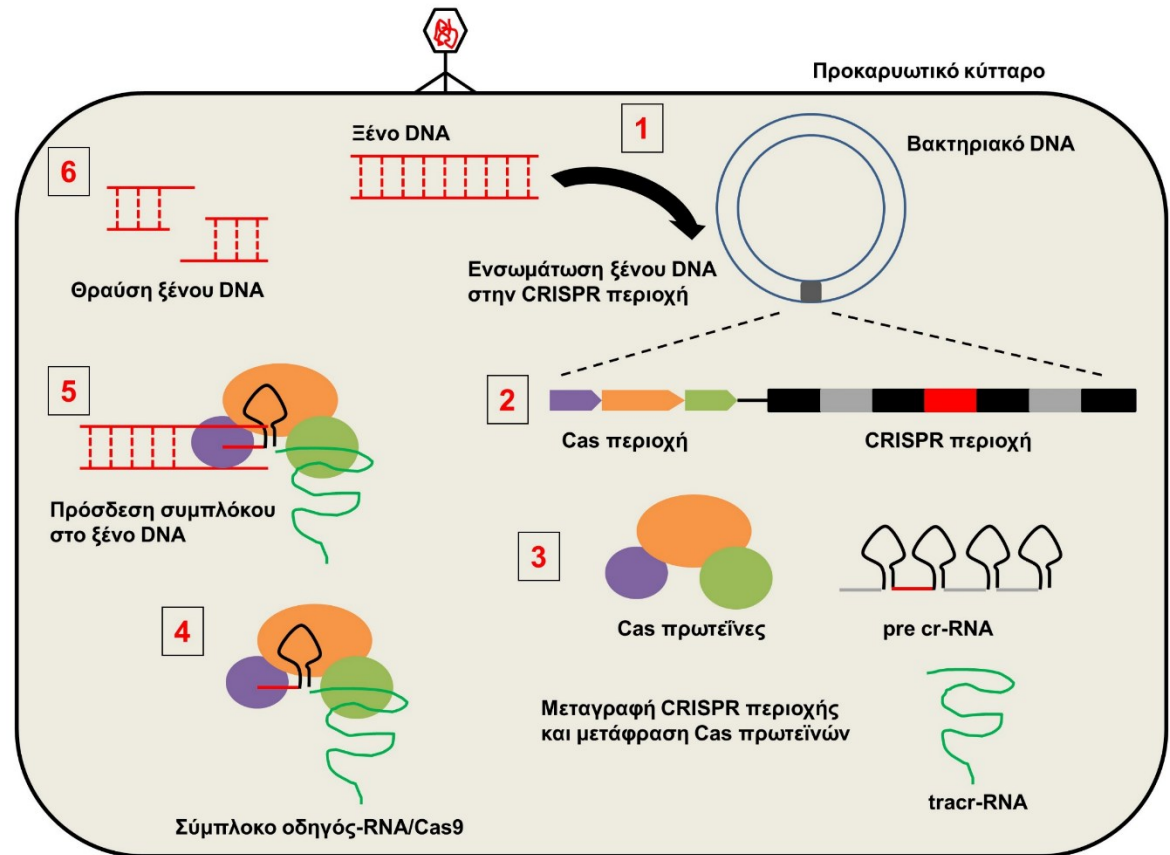
Born in France, 1968

Max Planck Unit for the Science

of Pathogens, Germany

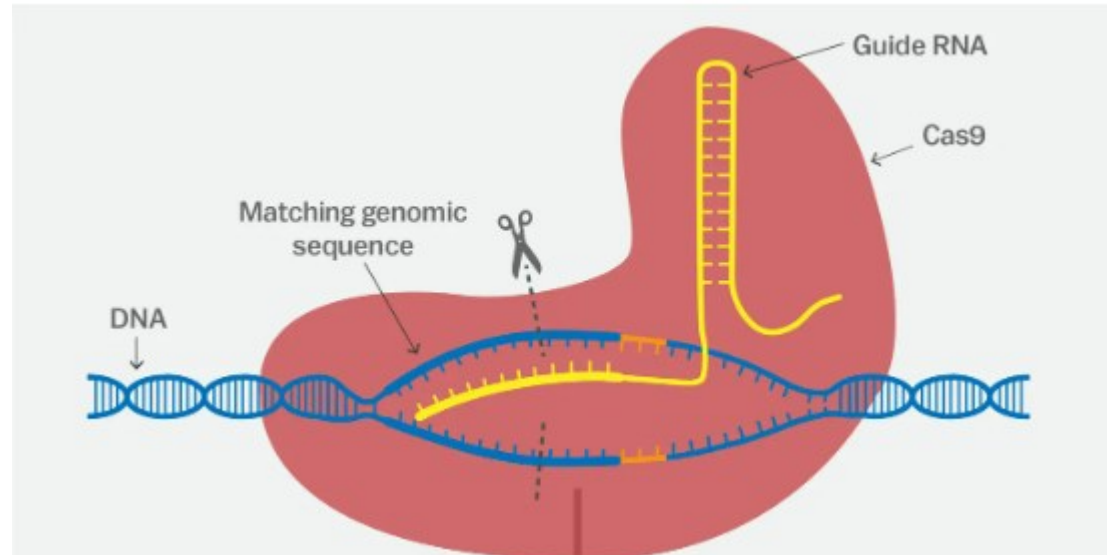
Φυσική άμυνα των βακτηρίων

- Ξενικό DNA ενσωματώνεται στο βακτηριακό γονιδίωμα (στην CRISPR περιοχή)
- Η CRISPR περιοχή μεταγράφεται στο τελικό crRNA (crispr RNA/ξενικό RNA)
- Δημιουργείται το σύμπλοκο Cas9 ενδονουκλεάση/crRNA/tracrRNA (trans-activating crRNA)
- Η Cas9 “κόβει” το ξενικό DNA στην συμπληρωματική περιοχή της crRNA αλληλουχίας

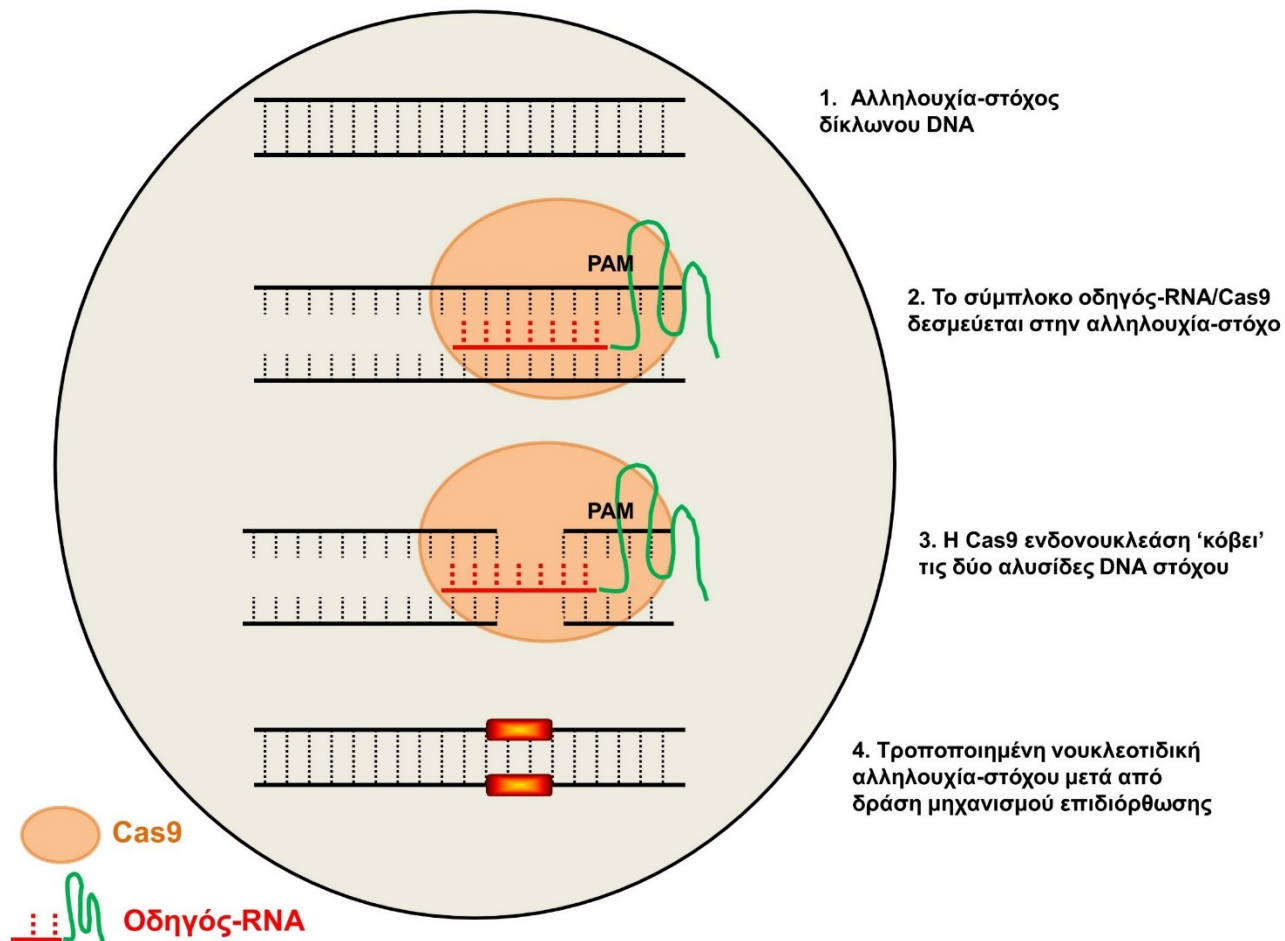


CRISPR/Cas9: CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS/CRISPR ASSOCIATED NUCLEASE 9

- *guide RNA*: Συμπληρωματικό της περιοχής-στόχου
- *sgRNA (single guide RNA)*: Ο οδηγός RNA συνδυασμός του crRNA και tracrRNA σε ένα ενιαίο μόριο
- *PAM seq*: NGG μετά την περιοχή-στόχο για Cas9
- *Cas9 ενδονουκλεάση*: προκαλεί θραύση έλικας DNA

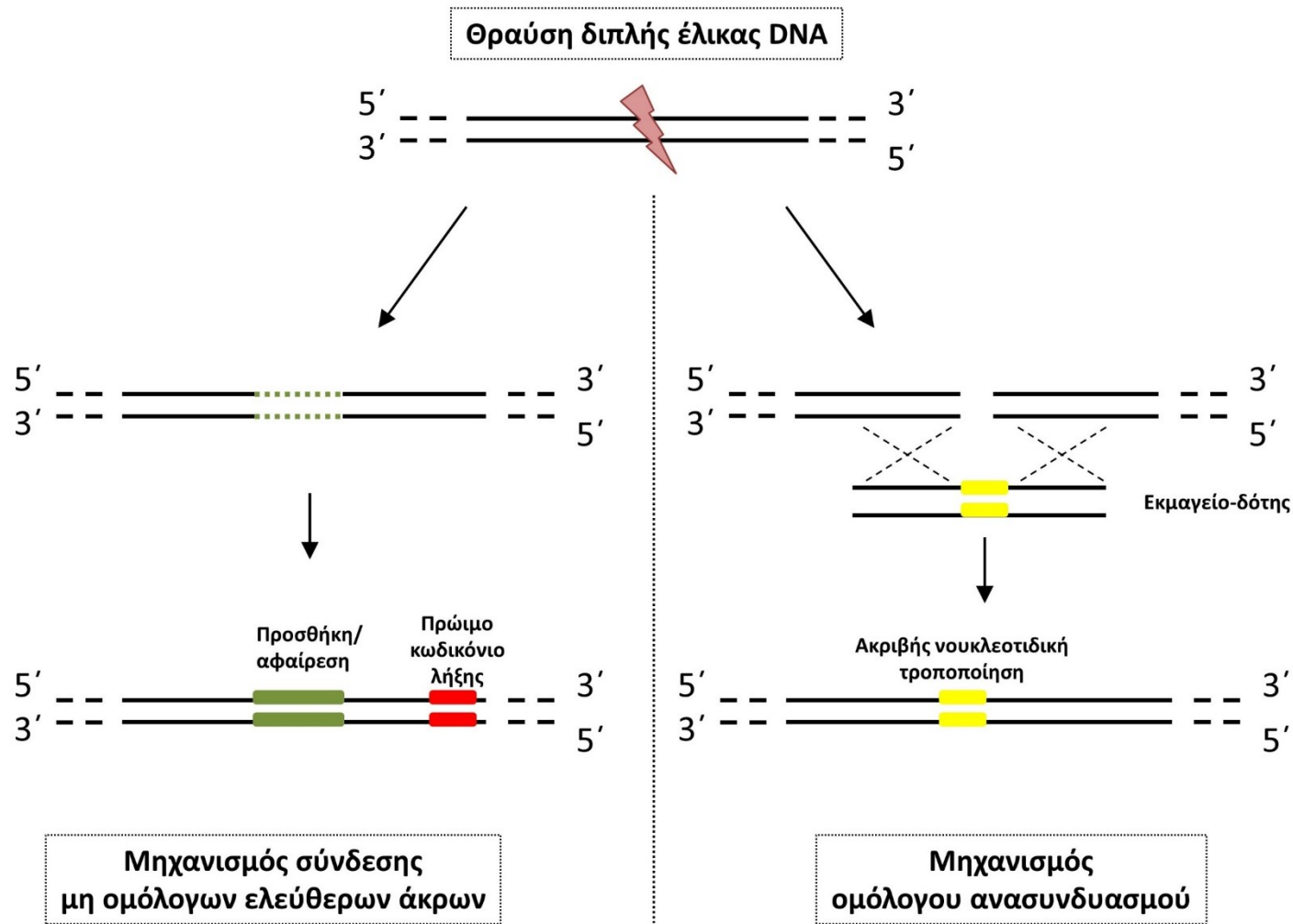


Σύστημα CRISPR/Cas9 ως μοριακό εργαλείο



<https://youtu.be/4YKFw2KZA5o>

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης



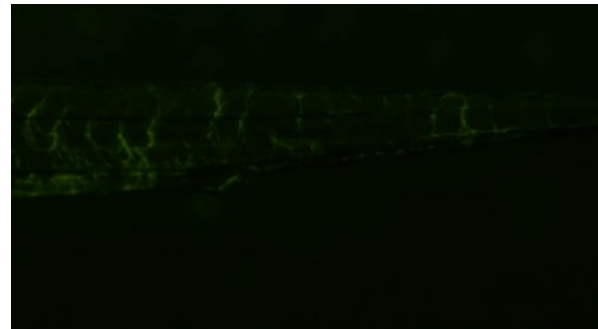
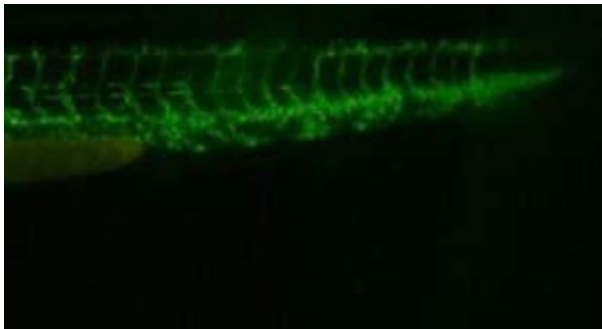
Εφαρμογές CRISPR/Cas9 τεχνολογίας

Μικροενέσεις οδηγού RNA (sgRNA) EGFP+ Cas9 mRNA σε *Tg(flk:gfp)* διαγονιδιακά zebrafish έμβρυα στο στάδιο ενός κυττάρου

Non-injected



Injected



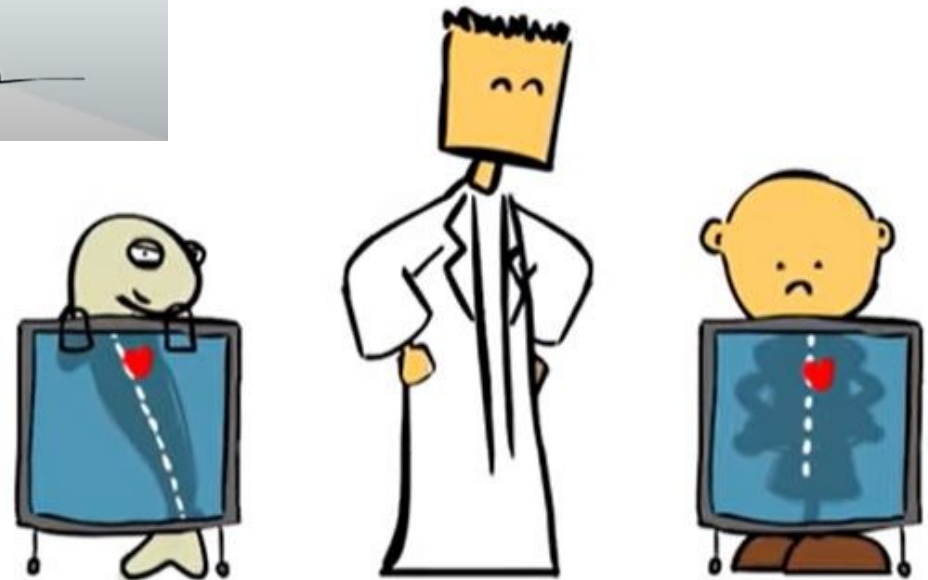
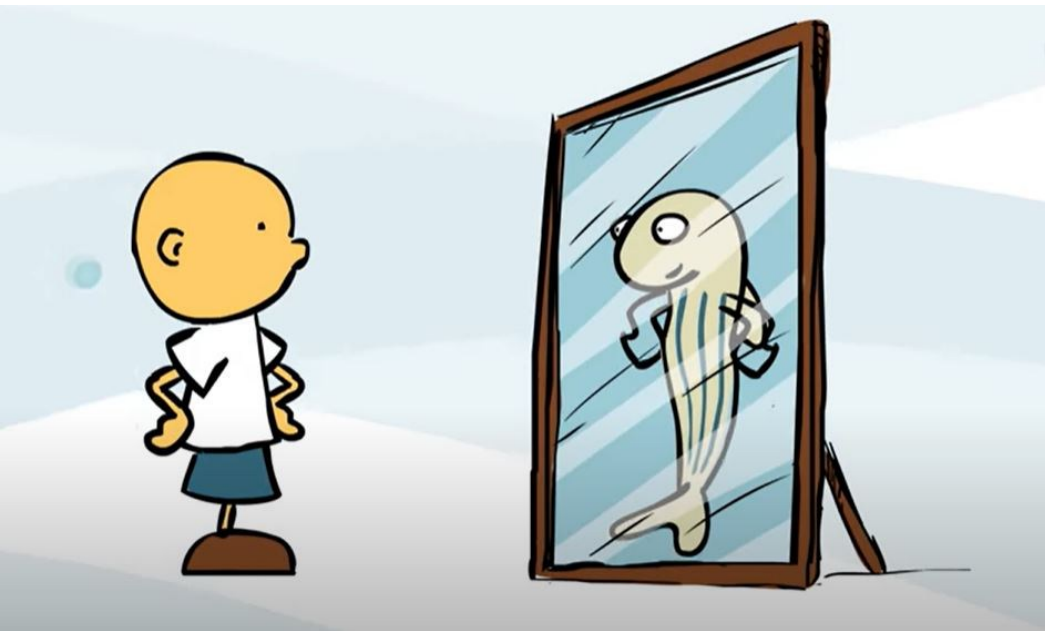
Zebrafish ως πειραματικό ζώο μοντέλο

Ανάπτυξη Zebrafish τις πρώτες 12hpf, 1996



(Karlstom and Kane, 2017
The company of Biologist)

Zebrafish ως πειραματικό ζώο μοντέλο

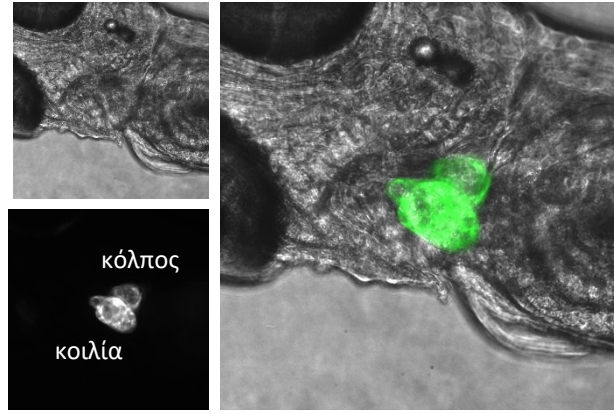


Frames from “*Be Healthy as a Fish*” movie by Lukasz Szozda

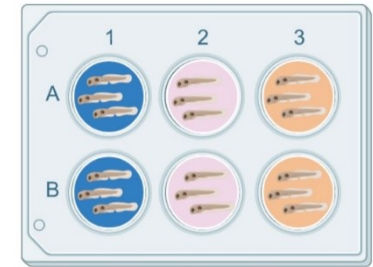
Zebrafish ως πειραματικό ζώο μοντέλο



Εξωτερική γονιμοποίηση

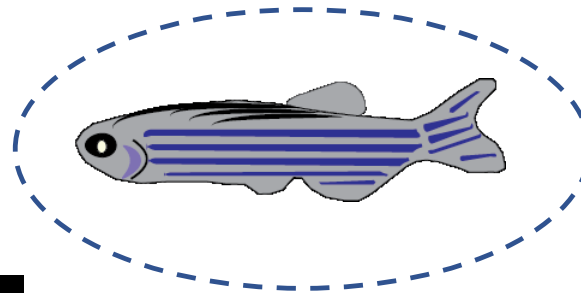


Διαγονιδιακές σειρές

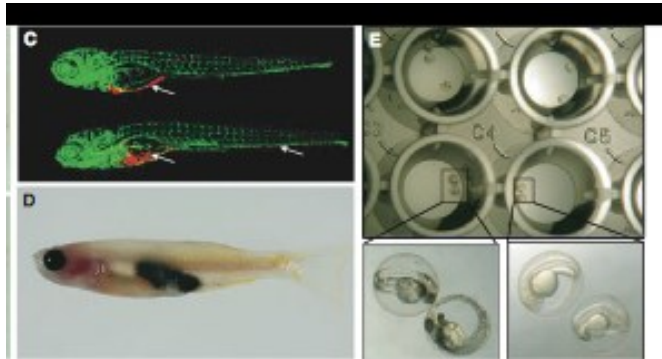


Τοξικολογικές/Φαρμακευτικές μελέτες

- └ Ταχεία ανάπτυξη
- └ *Ex utero* γονιμοποίηση και ανάπτυξη
- └ Μεγάλος αριθμός εμβρύων

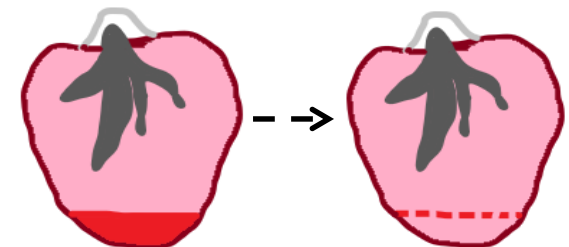


- └ Μικρό μέγεθος
- └ Οπτική διαφάνεια εμβρύων
- └ Γενετική ομολογία με ανθρώπινο γονιδίωμα



Patton et al. 2010

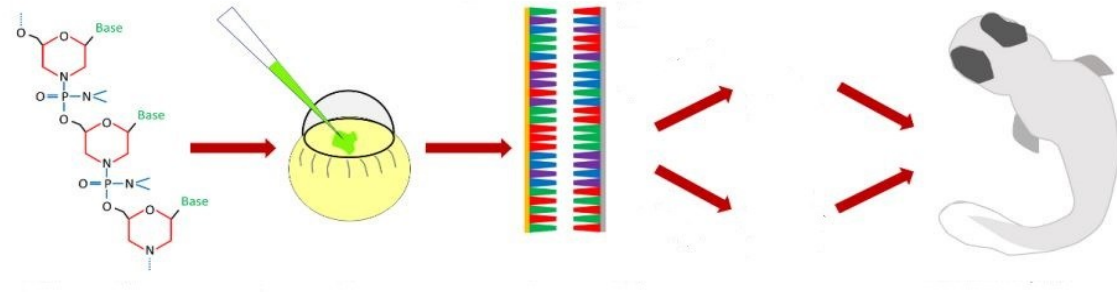
Μεταμοσχεύσεις καρκινικών κυττάρων



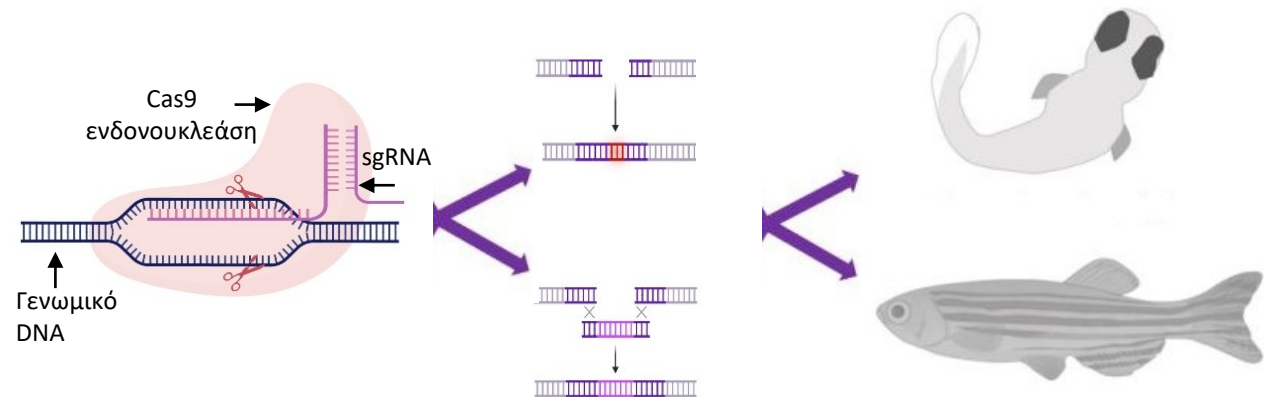
Αναγεννητική ικανότητα ιστών

Zebrafish ως πειραματικό ζώο μοντέλο

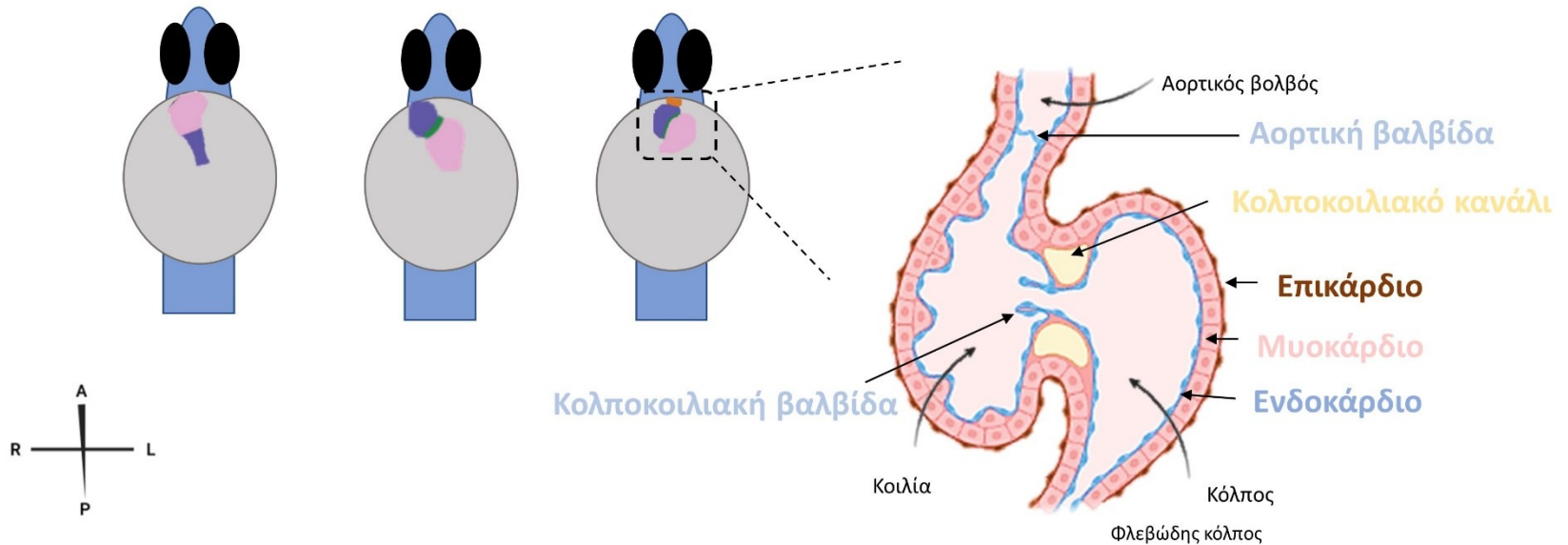
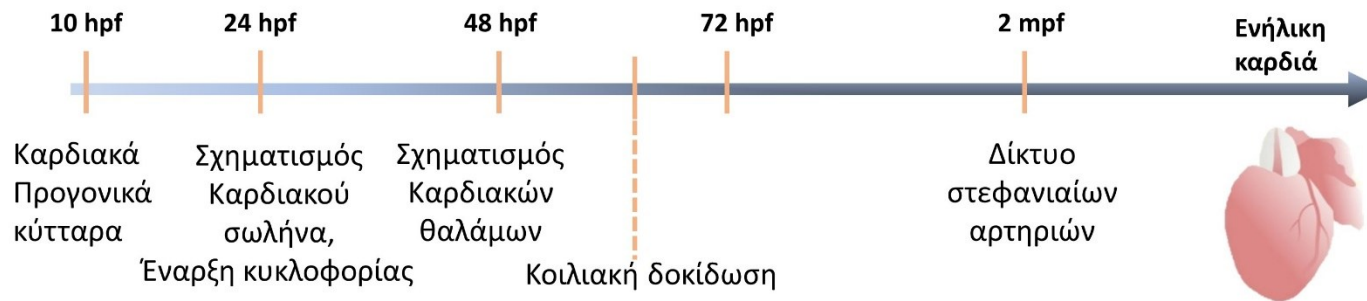
- Αποσιώπηση έκφρασης γονιδίου [Morpholino αντισημαίνοντα ολιγονουκλεοτίδια (MO)]



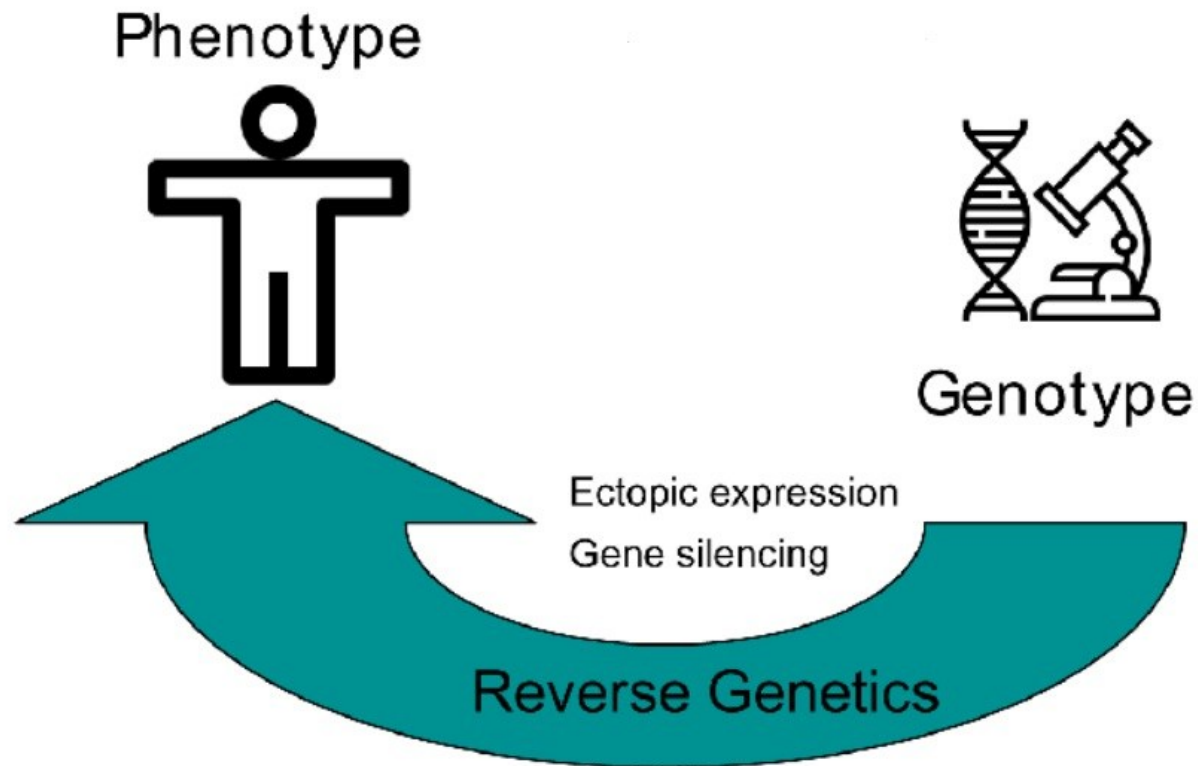
- Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών



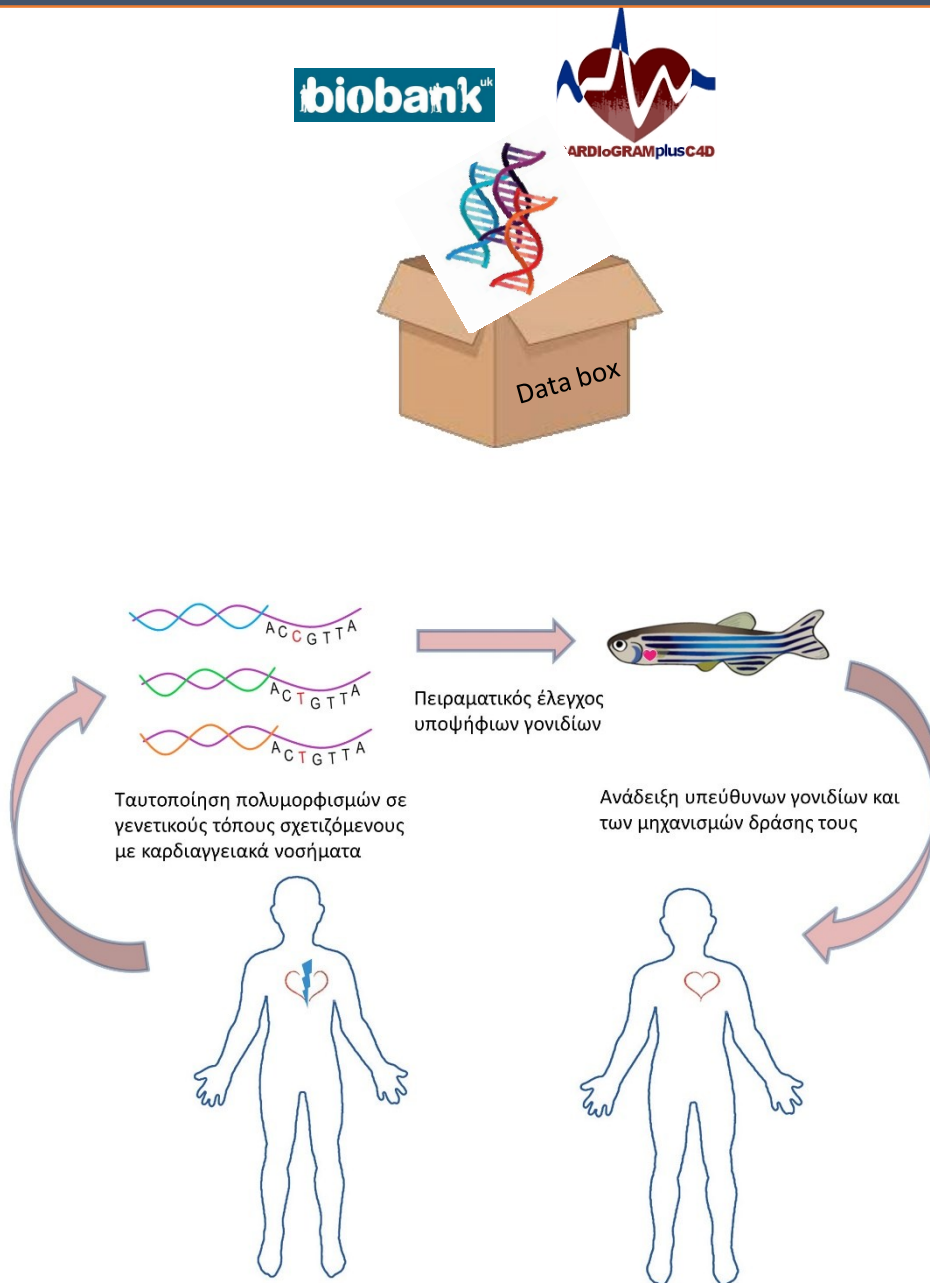
Ανάπτυξη καρδιάς του μοντέλου zebrafish



Αντίστροφη γενετική προσέγγιση



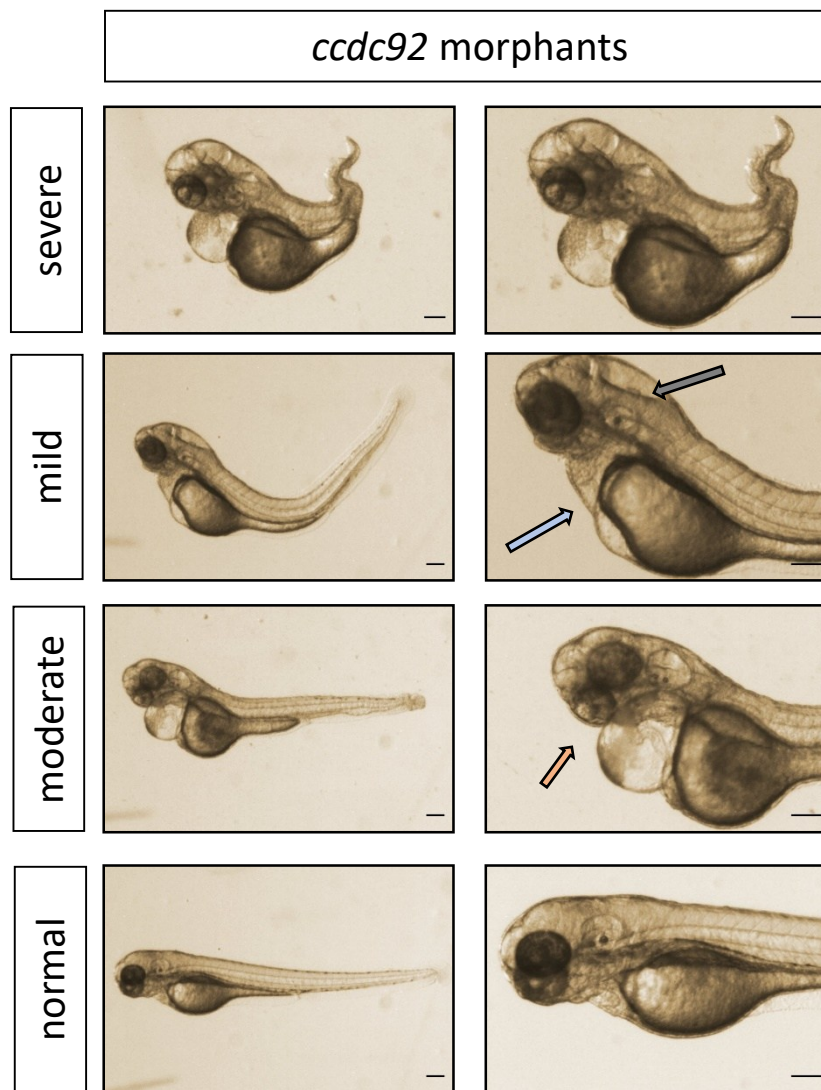
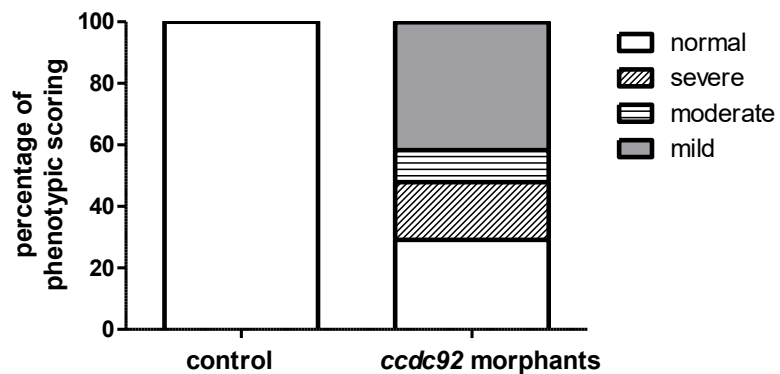
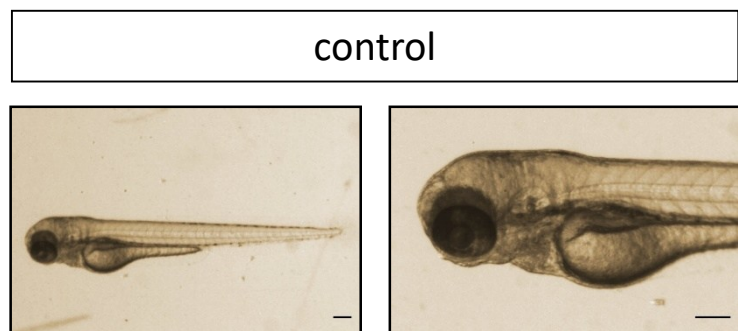
Υποψήφια προς μελέτη γονίδια



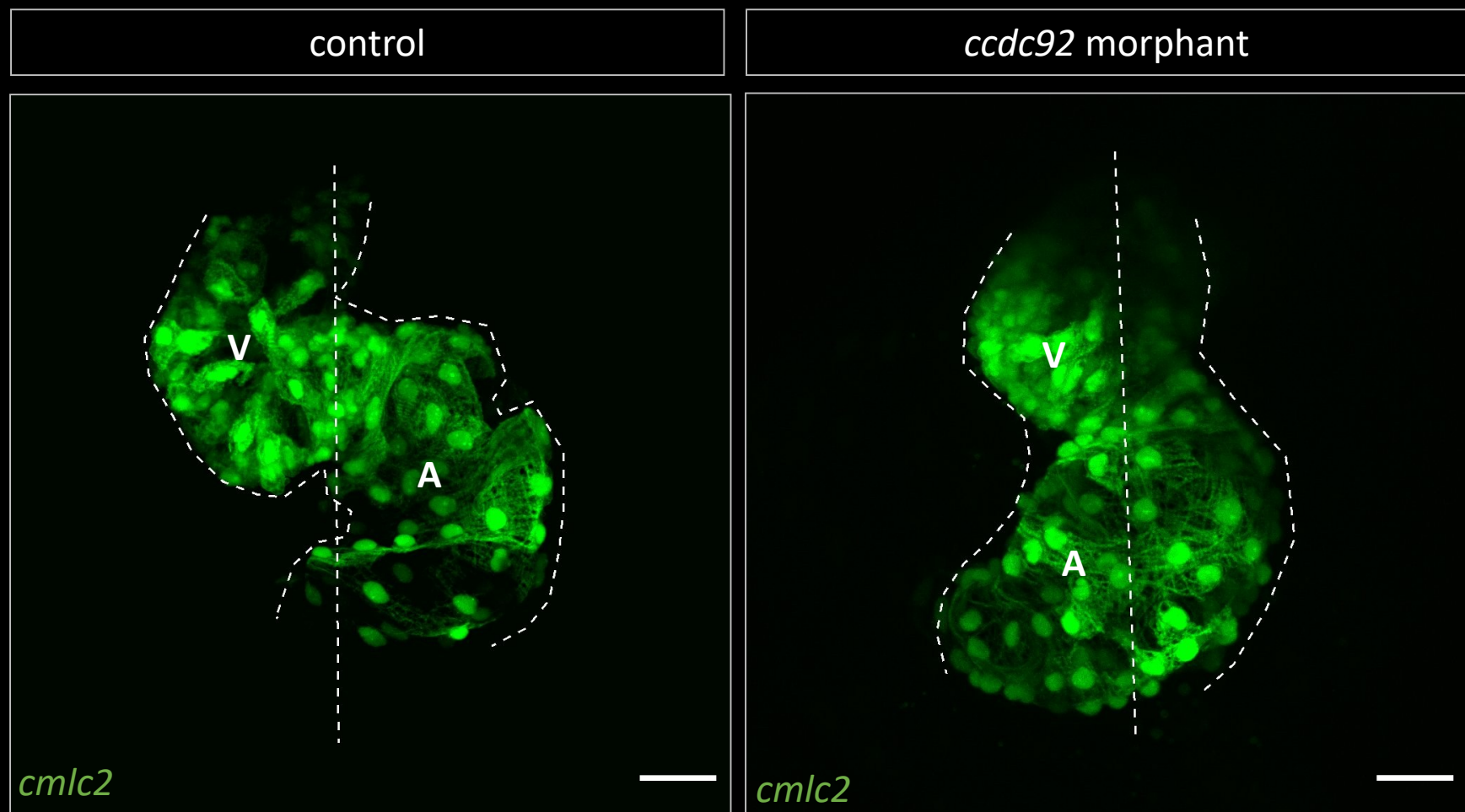
Candidate genes	Lead SNP
PCSK9	rs11206510
PPAP2B	rs17114036
MIA3	rs17464857
WDR12	rs6725887
APOB	rs515135
CCDC92	rs11057401
CFDP1	rs77505915
LIPG	rs2000813
TCF21	rs12190287
ANGPTL4	rs116843064
PECAM1	rs6504218
TGFB1	rs8108632

unpublished data

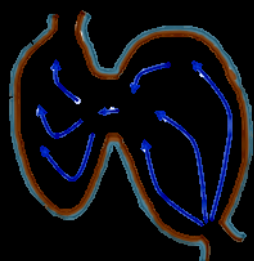
Μορholino-επαγόμενη *ccdc92* αποσιώπηση προκαλεί ανάπτυξη καρδιακού φαινοτύπου



Η αποσιώπηση *ccdc92* έκφρασης επιδρά στη φυσιολογική μορφογένεση της καρδιάς



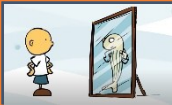
cardiomyocytes



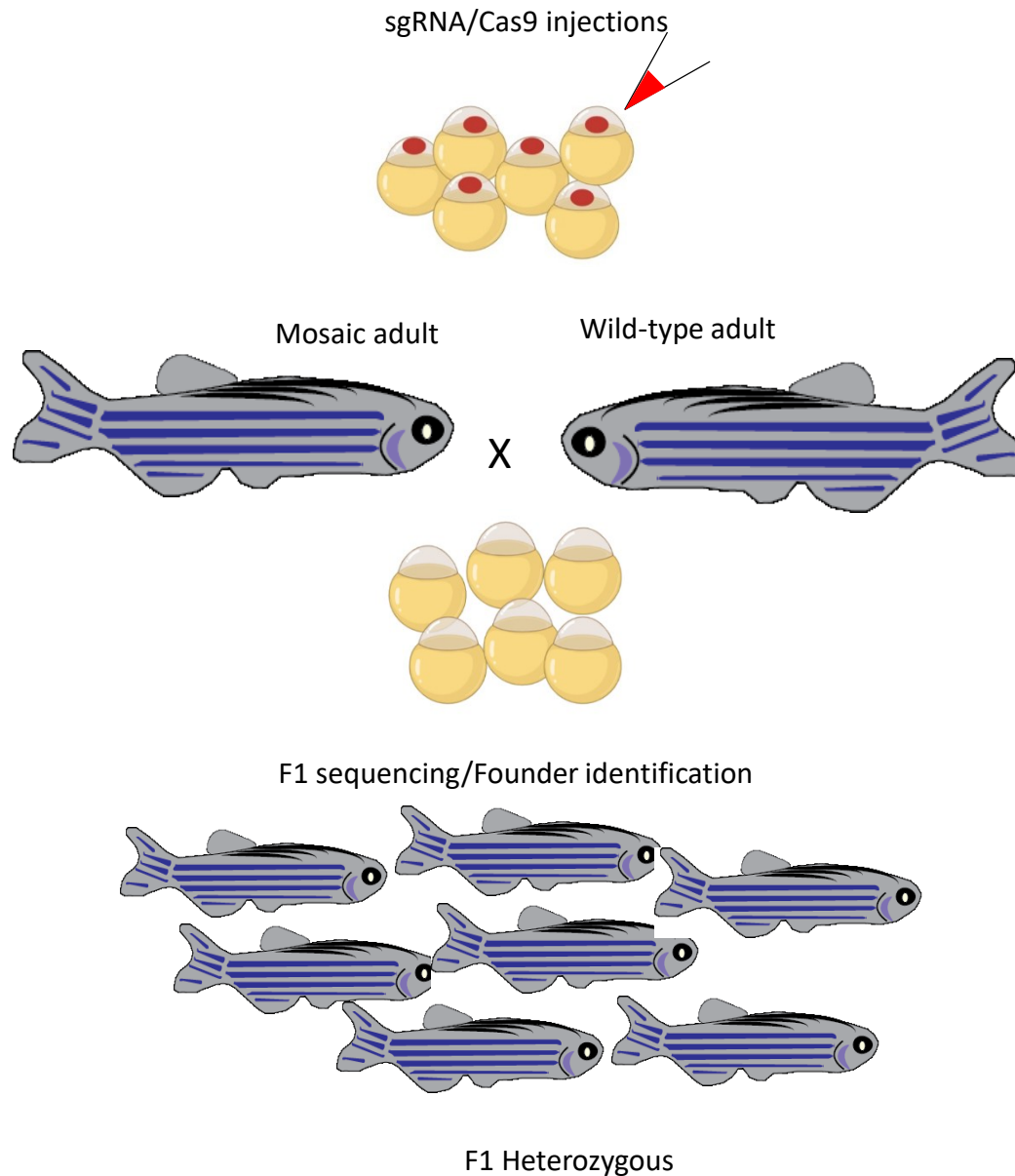
- Myocardium
- Endocardium
- Blood flow

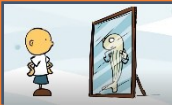


Giardoglou, PhD, 2022

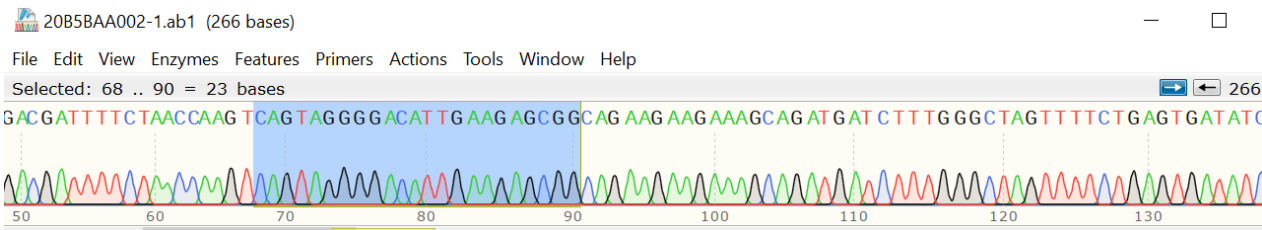
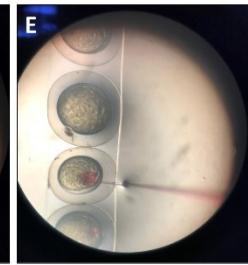
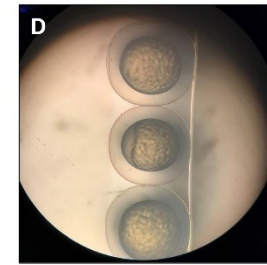
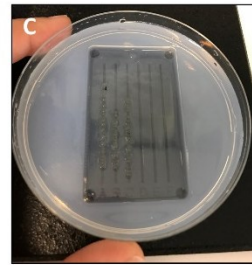
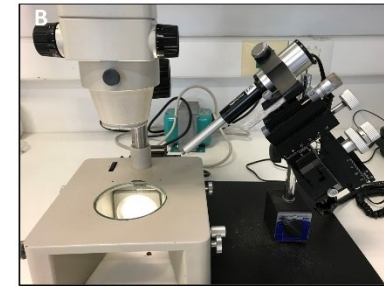
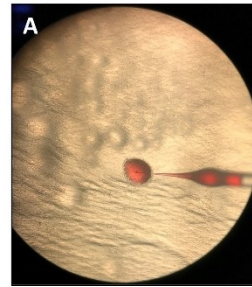


Δημιουργία διαγονιδιακών πειραματόζων

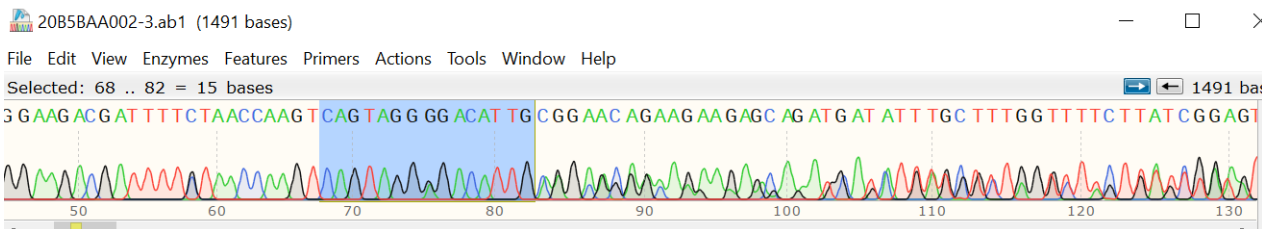




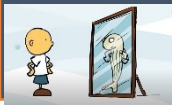
Δημιουργία διαγονιδιακών πειραματοζώων



Αγρίου τύπου (wt)



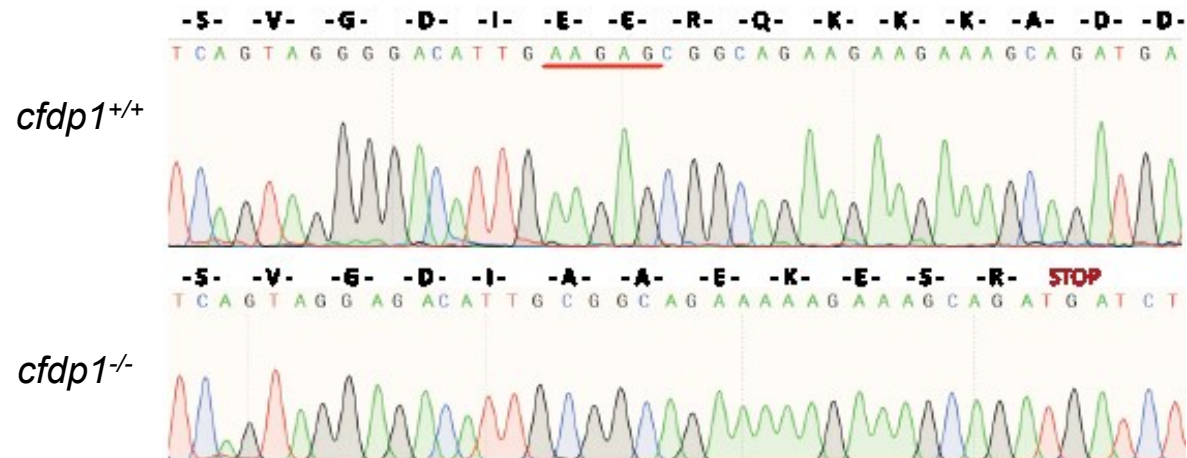
Ετερόζυγο (het)



Δημιουργία διαγονιδιακών πειραματοζώων



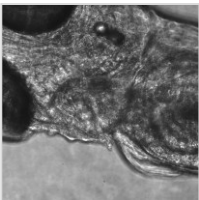
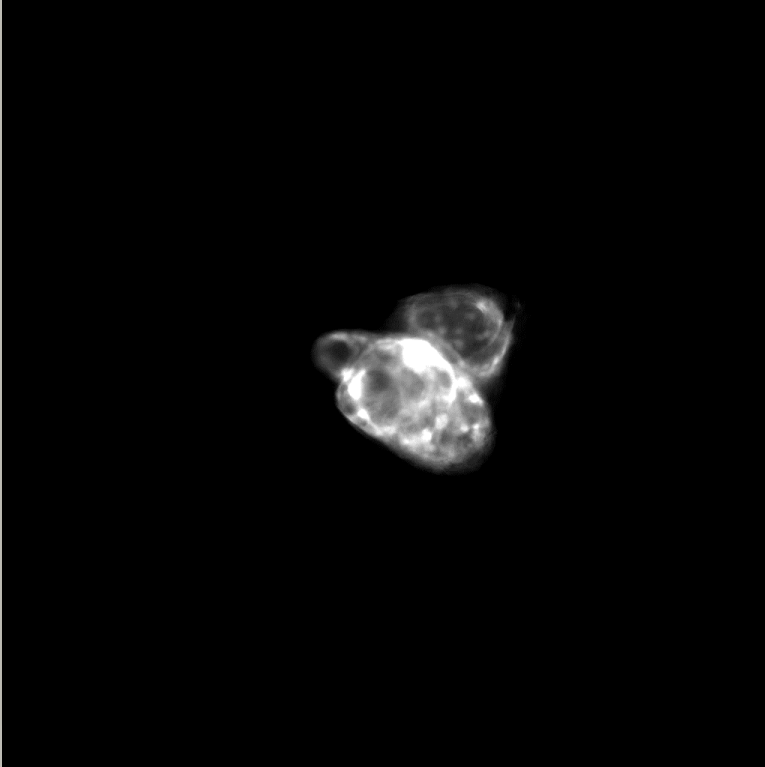
cfdp1^{+/+} GAGTCAGTAGGGGACATTGAAGAGCGGCAGAAAGAAGAAAGCAGATGATCTTTGGGCTAGT
cfdp1^{-/-} GAGTCAGTAGGAGACATT-***-GCGGCAGAAAAAGAAAGCAGATGATCTTTGGGCTAGT



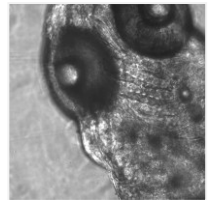
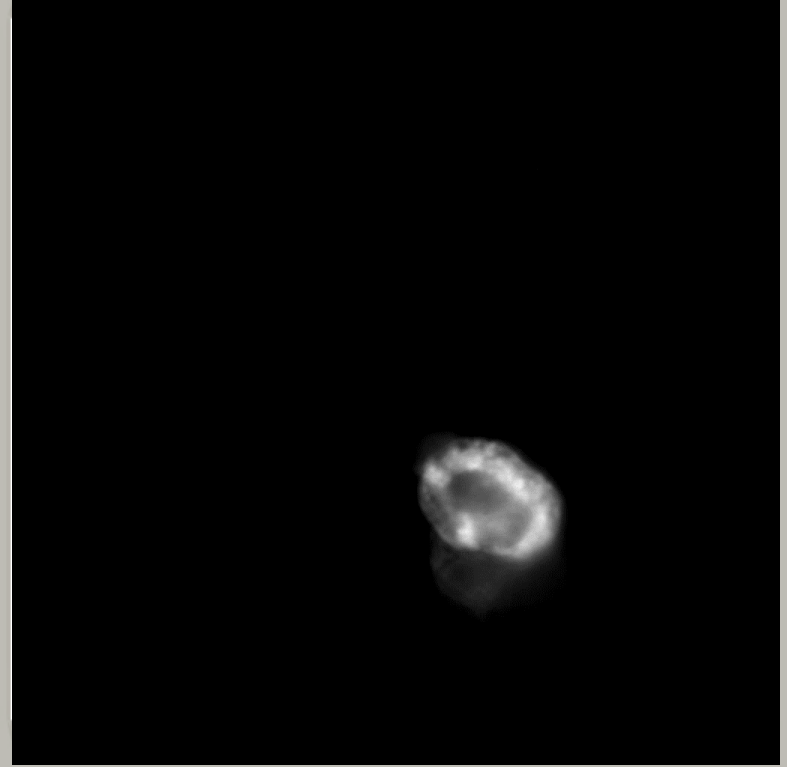
cfdp1 μεταλλαγμένα έμβρυα εμφανίζουν καρδιακές αρρυθμίες



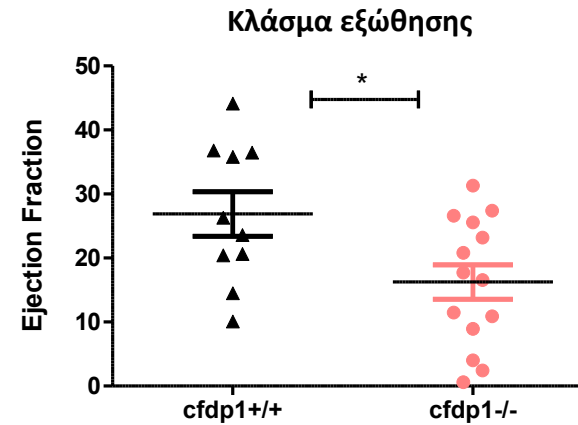
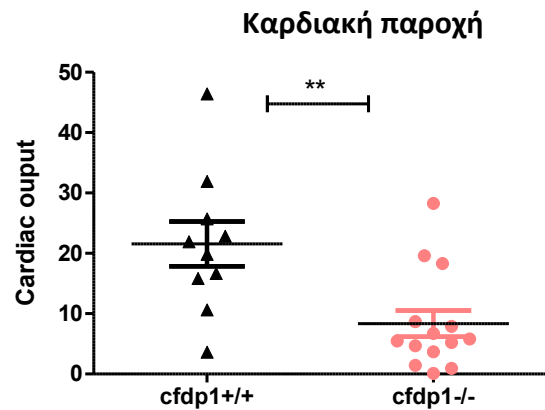
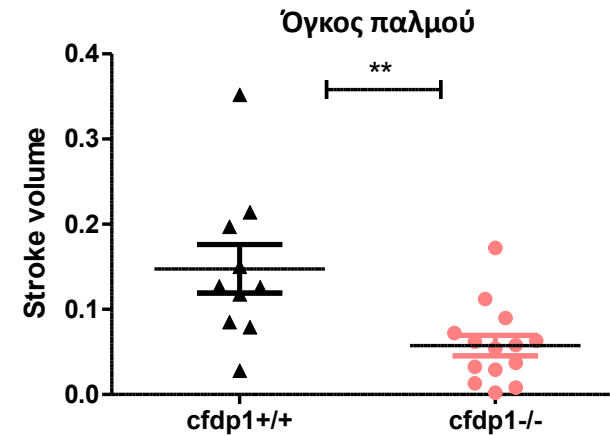
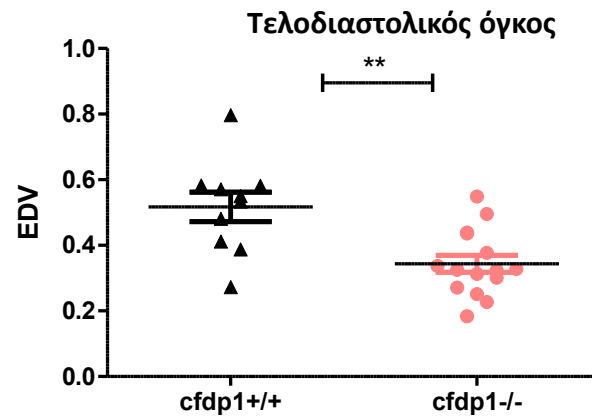
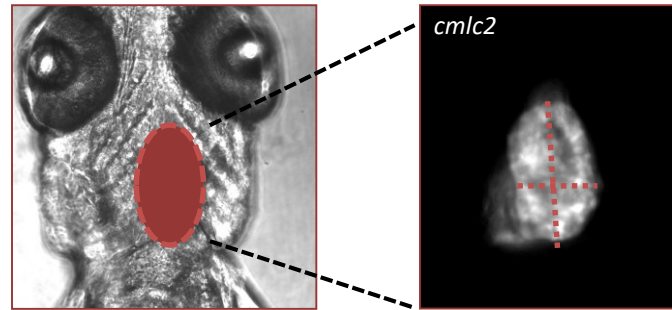
cfdp1^{+/+}



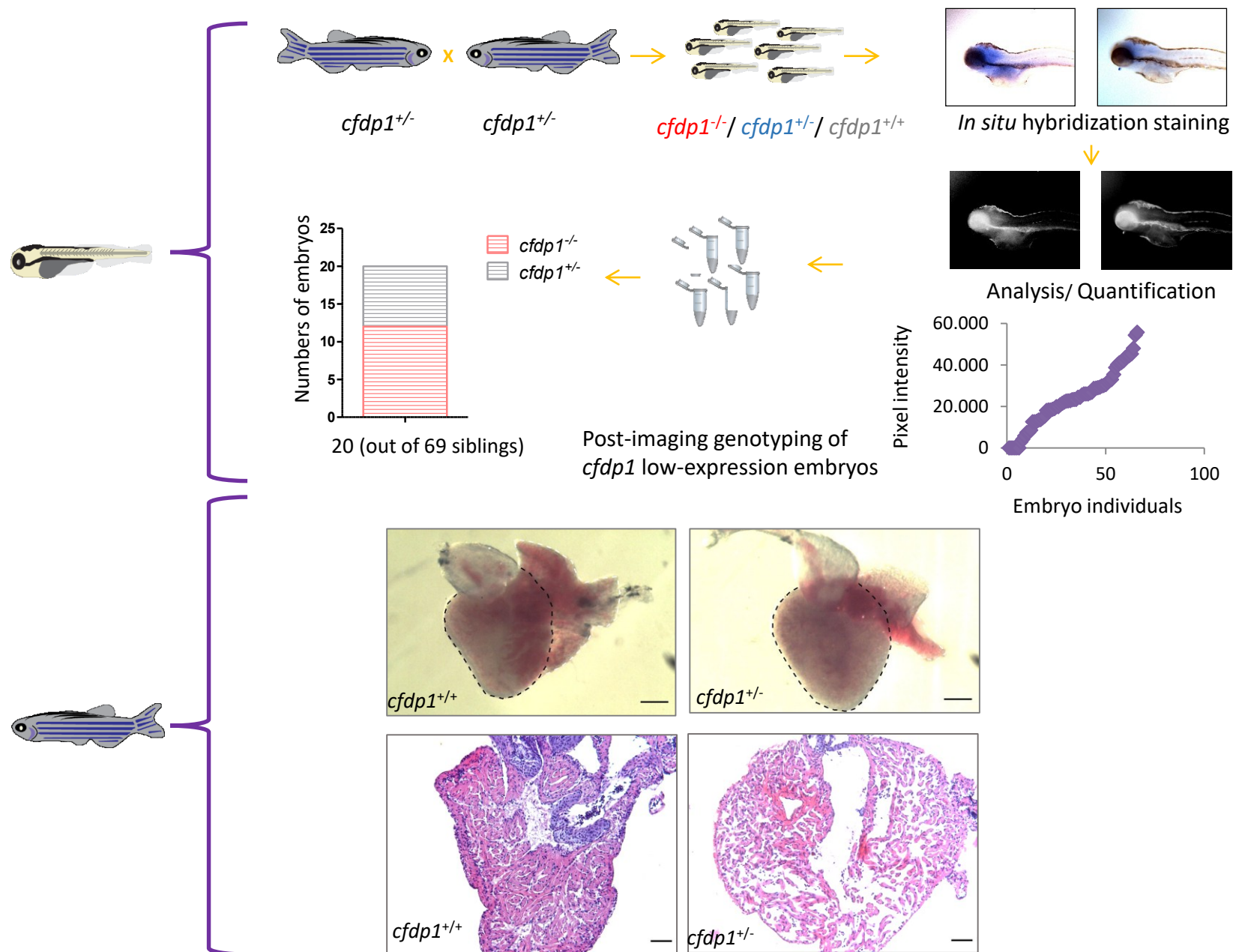
cfdp1^{-/-}

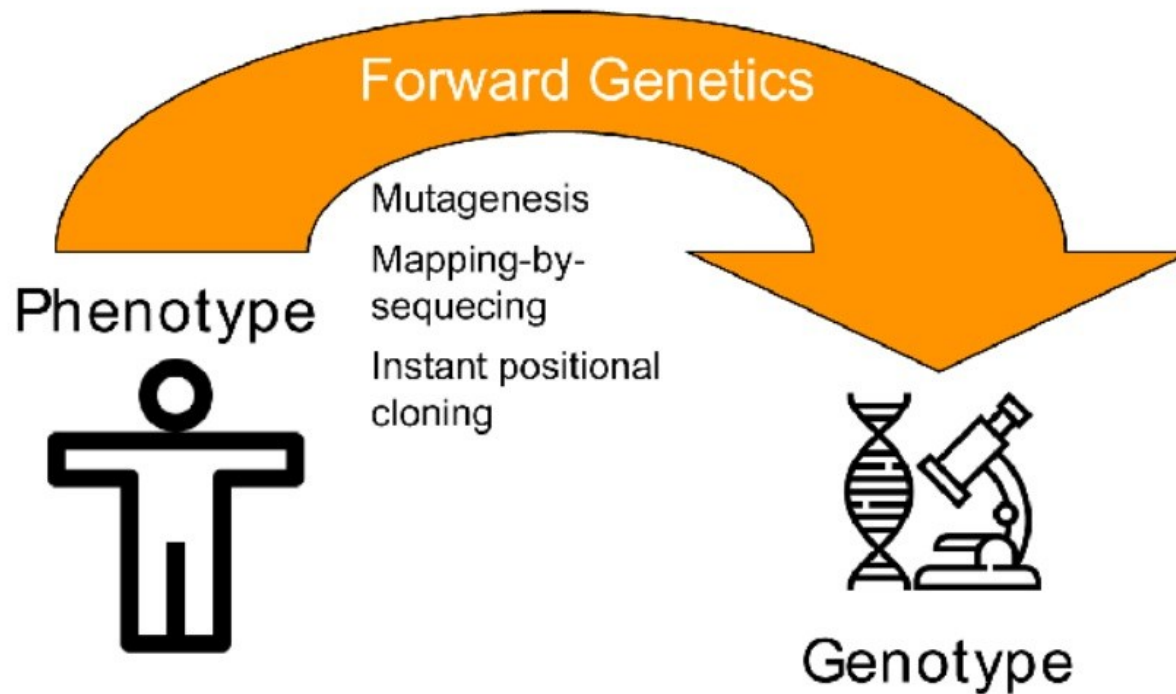


cfdrp1 μεταλλαγμένα έμβρυα εμφανίζουν μειωμένη καρδιακή λειτουργία

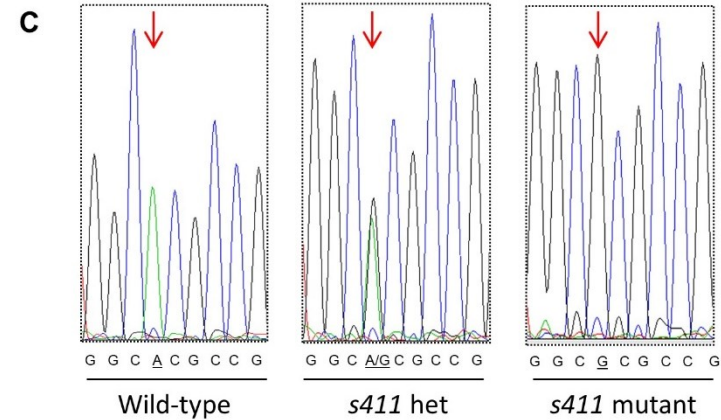
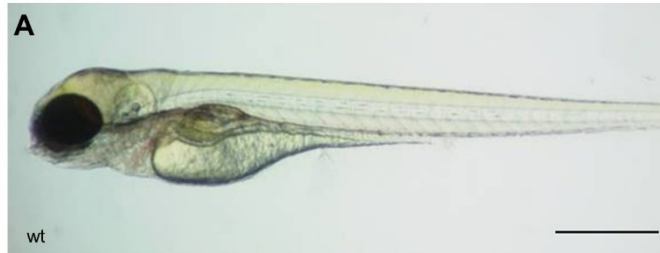


Ετερογένεια στα *cfdp1* ετερόζυγα άτομα



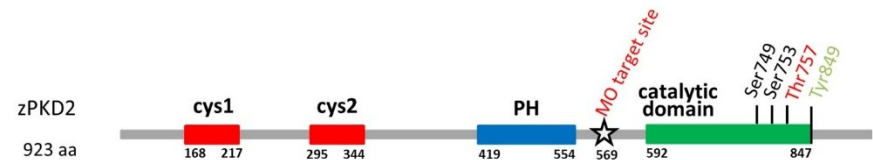


Μετάλλαξη στο γονίδιο *prkd2* επιφέρει στένωση στο σημείο εξώθησης



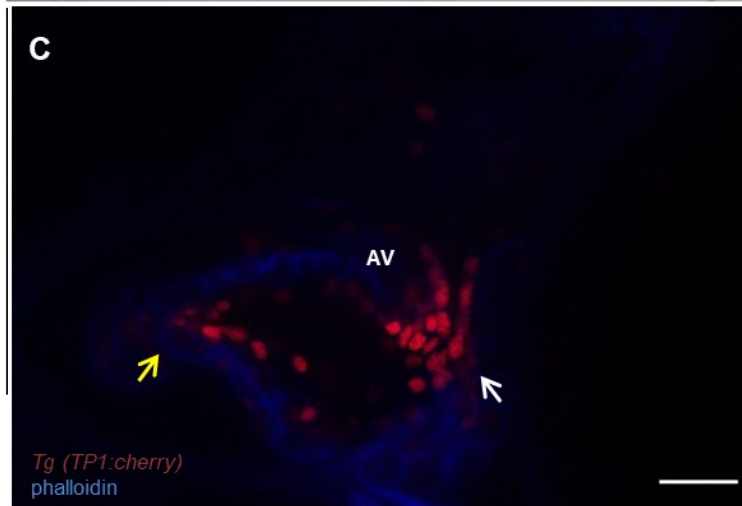
D

<i>Zebrafish</i>	718	LKPENVLLASADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	767
<i>Homo sapiens</i>	675	LKPENVLLASADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	724
<i>Pan troglodytes</i>	716	LKPENVLLASADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	765
<i>Canis lupus familiaris</i>	702	LKPENVLLASADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	751
<i>Bos Taurus</i>	518	LKPENVLLSSADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	567
<i>Mus musculus</i>	676	LKPENVLLASADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	725
<i>Rattus norvegicus</i>	676	LKPENVLLASADPPFQVKLCDFGFARIIGEKSFRRSVVGT	PAYLAPEVLL	725

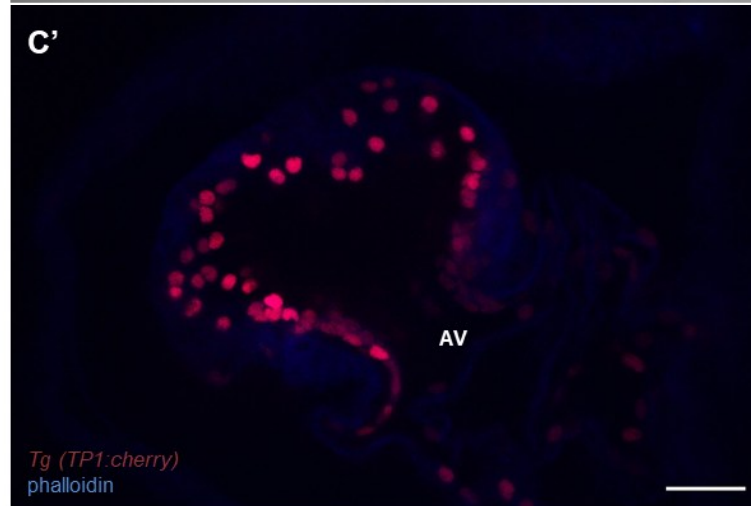
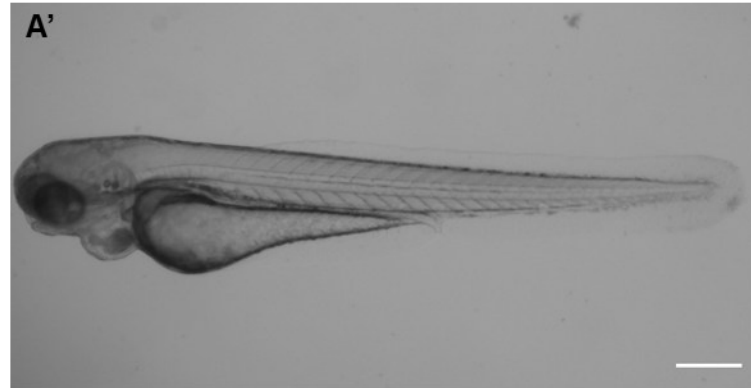


Μεταλλαγή στο *prkd2* (T757A) προκαλεί εκτοπική έκφραση Notch σηματοδοτικού μονοπατιού

sibling embryo



s411 mutant



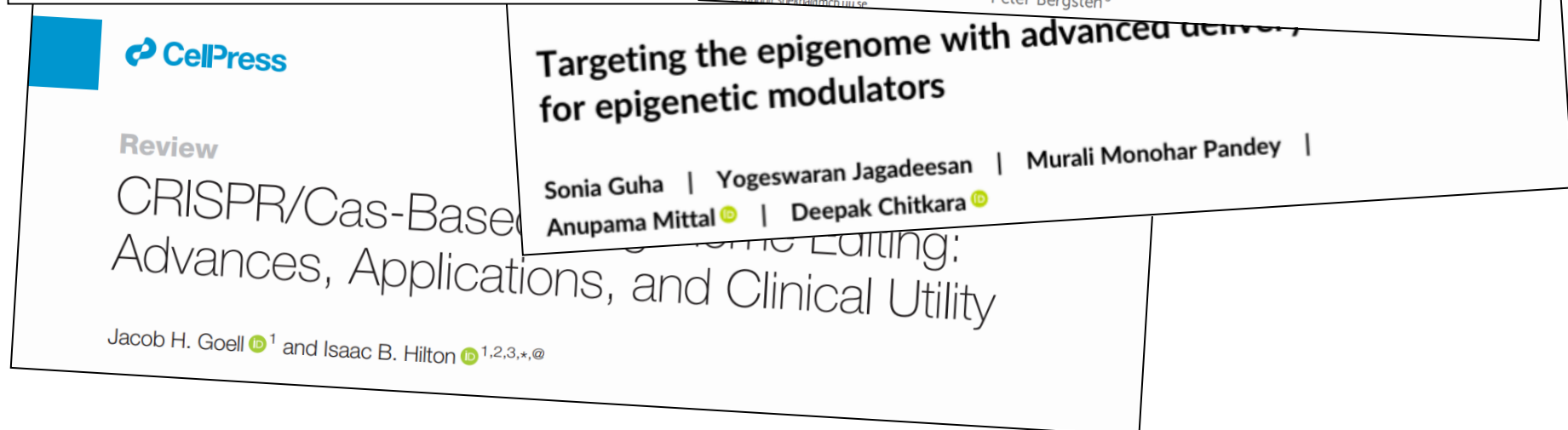
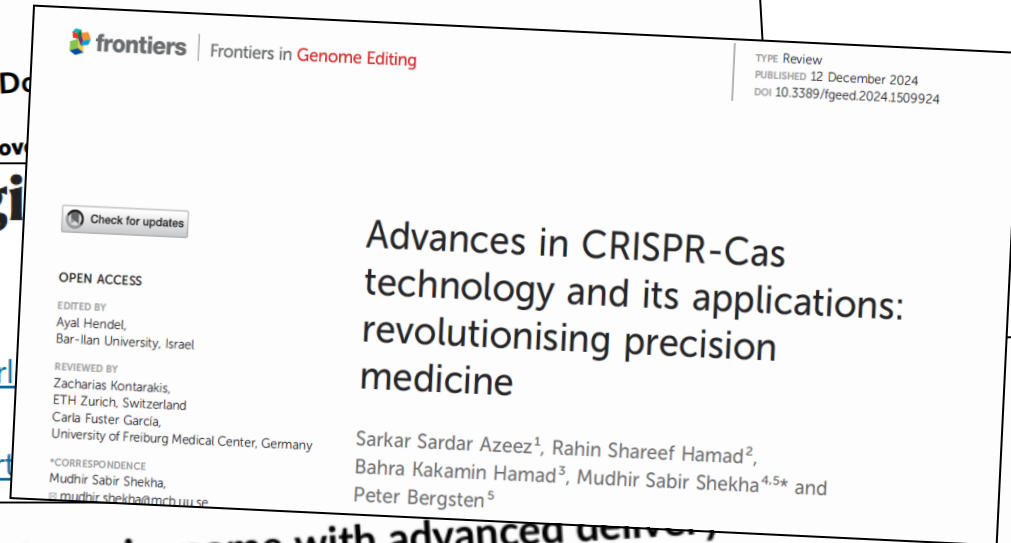
Εφαρμογές CRISPR/Cas9 σε επιγενετικές τροποποιήσεις



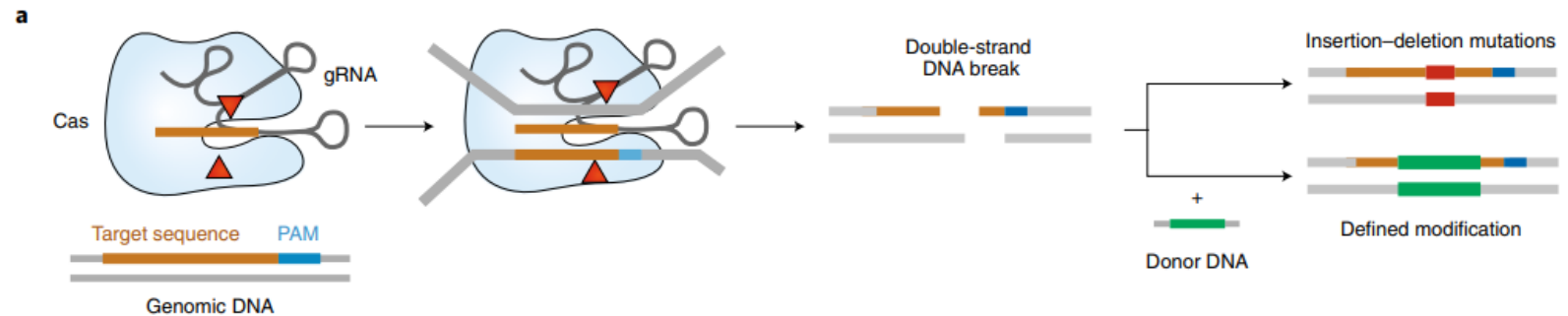
Epigenome editing technology in medicine

[Sean R. McCutcheon](#), [Dahlia Rohm](#), [Nahid Iglesias](#) & [Charles](#)

[Nature Biotechnology](#) **42**, 1199–1217 (2024) | [Cite this article](#)

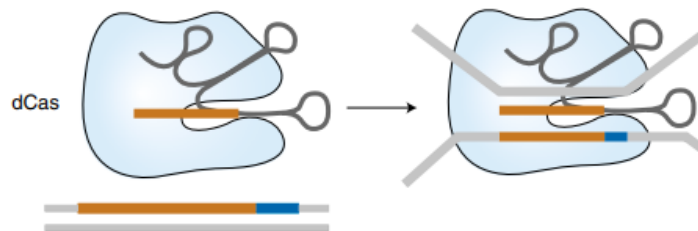


Εφαρμογές CRISPR/Cas9 σε επιγενετικές τροποποιήσεις

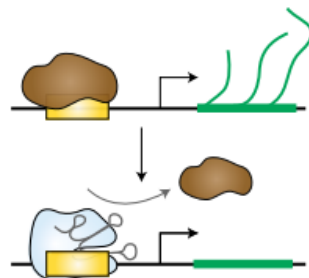


Η **deactivated or dead Cas9 (dCas9)** συνδέεται στο DNA αλλά χάνει την ιδιότητα της νουκλεάσης

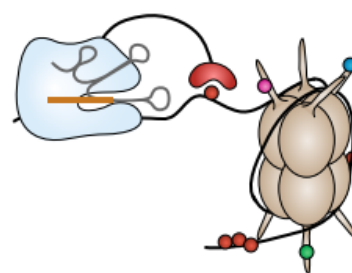
dCas-gRNA binding to genomic DNA



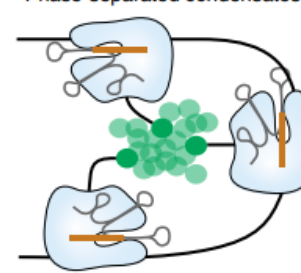
(i) dCas-mediated occlusion of TFs



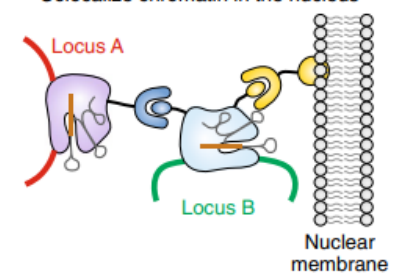
(ii) Write or erase chromatin marks



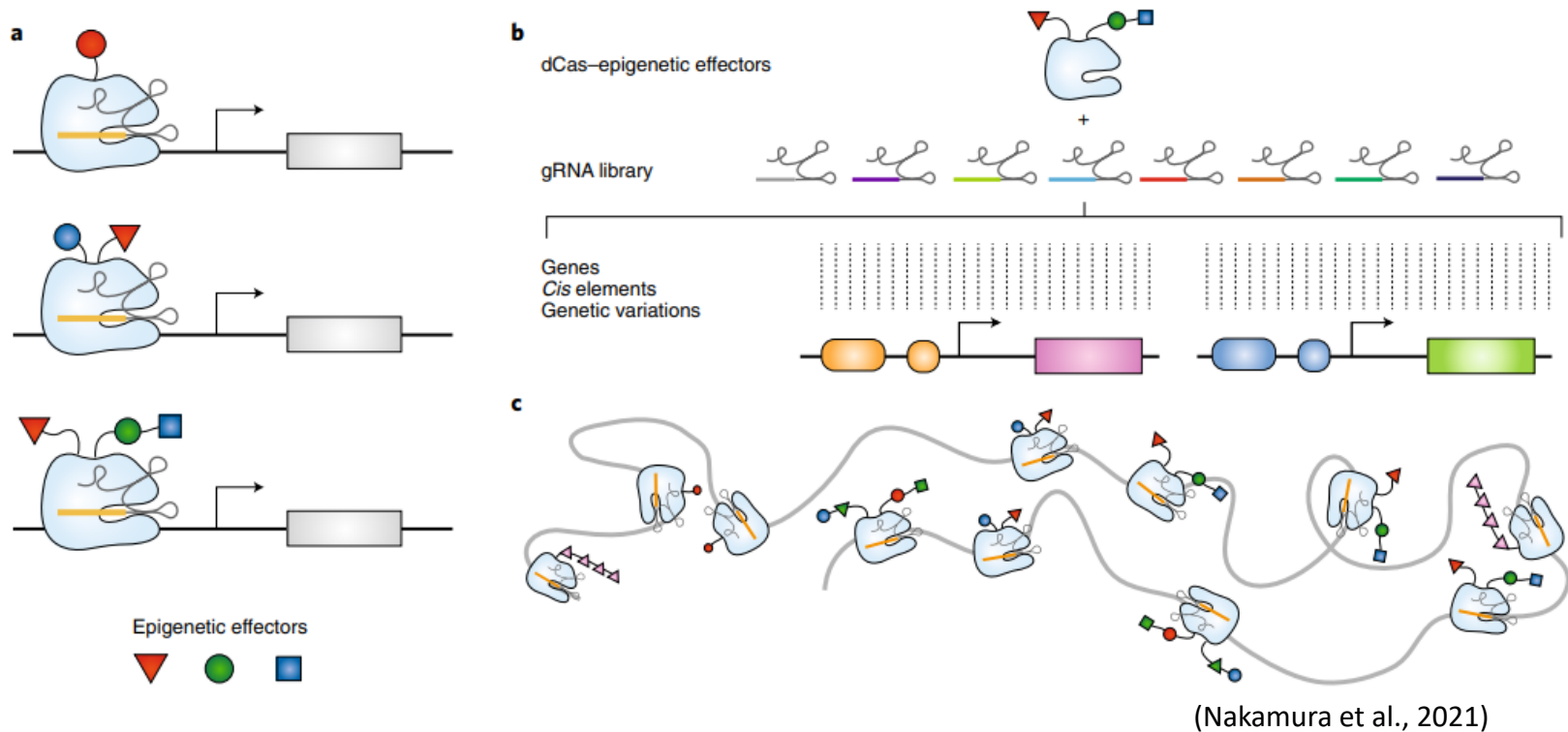
(iii) Phase-separated condensates



(iv) Colocalize chromatin in the nucleus



Εφαρμογές CRISPR/Cas9 σε επιγενετικές τροποποιήσεις



A. Συνδυασμός διαφορετικών επιγενετικών παραγόντων

B. Συνδυασμός διαφορετικών gRNAs

Γ. Συνδυαστική δράση κατά μήκος του γονιδιώματος με στόχο τη ρύθμιση του Επιγονιδιώματος (επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος) και της λειτουργίας των γονιδίων

(Nakamura et al., 2021)

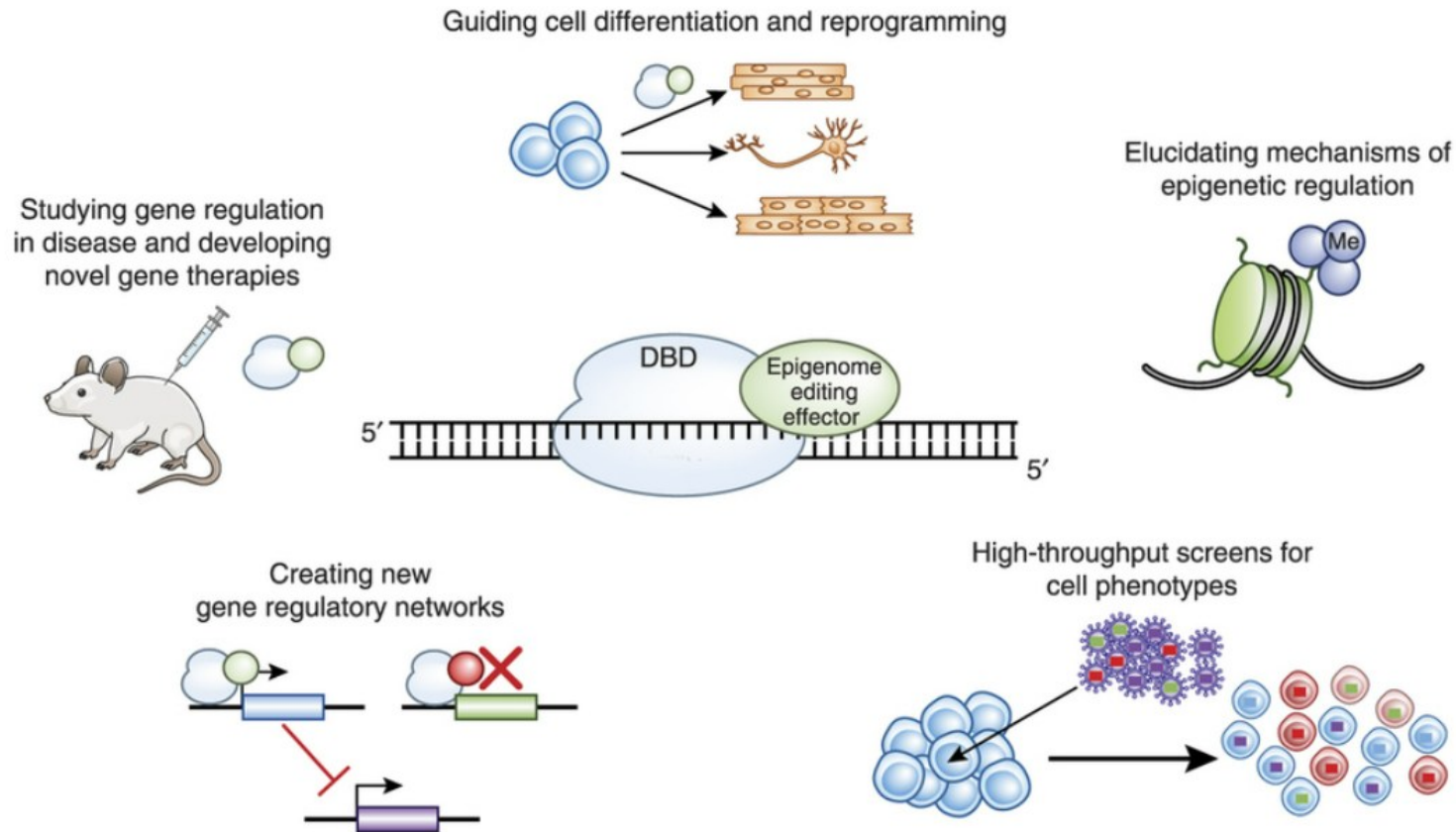
Επιγενετικοί παράγοντες

Table 1 Epigenetic effector domains used for targeted epigenetic editing

Gene regulation	Epigenetic effector	Enzymatic activity	Chromatin modification	Genes targeted
Repression	G9a	Methyltransferase	H3K9me2	<i>VEGF-A, Her2INeu, Fosb, E-Cadherin, Neruog, Grm2</i>
	Suv39h1	Methyltransferase	H3K9me3	<i>VEGF-A, Her2INeu, Neruog, Grm2</i>
	DNMT3 (A, A/L)	Methyltransferase	DNA methylation	<i>VEGF-A, SOX2, Maspin, EpCAM, CDKN2A, ARF, Cdkn1a, IL6ST, BACH2</i>
	LSD1	Demethylase	H3K4me2	<i>Gene enhancers</i>
	SIRT6, SIRT3	Deacetylase	H3K9ac	<i>Neruog, Grm2</i>
	KYP	Methylase	H3K9me1	<i>Neruog, Grm2</i>
	TgSET8	Methylase	H3K20me	<i>Neruog, Grm2</i>
	NUE	Methylase	H3K27me3	<i>Neruog, Grm2</i>
	HDAC8	Deacetylase	H4K8ac	<i>Neruog, Grm2</i>
	RPD3	Deacetylase	H4K8ac	<i>Neruog, Grm2</i>
	Sir2a	Deacetylase	H4Kac	<i>Neruog, Grm2</i>
	Sin3a	Deacetylase	H3K9ac	<i>Neruog, Grm2</i>
Activation	TET1	Deoxygenase	DNA demethylation	<i>ICAM-1, RHOXF2, BRCA1, RANKL, MAGEB2, MMP2</i>
	TET2	Deoxygenase	DNA demethylation	<i>ICAM-1, EpCAM</i>
	TET3	Deoxygenase	DNA demethylation	<i>ICAM-1</i>
	TDG	Glycosylase	DNA demethylation	<i>Nos2</i>
	p300	Acetylase	H3K27ac	<i>IL1RN, MYOD1, OCT4, HBE, HBG, ICAM-1</i>
	PRDM9	Methyltransferase	H3K4me3	<i>EpCAM, ICAM-1, RASSF1a, PLOD2</i>
	Dot1L	Methyltransferase	H3K79me	<i>EpCAM, PLOD2</i>

(Cano-Rodriguez *et al.*, 2016)

Εφαρμογές CRISPR/Cas9 σε επιγενετικές τροποποιήσεις

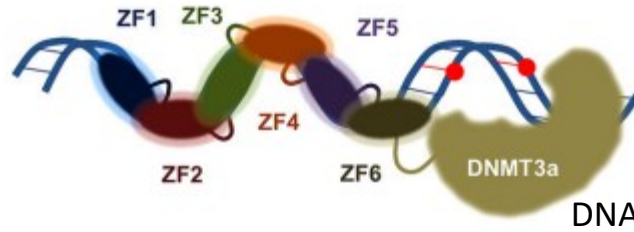


Marina Corral Spence/Nature Publishing Group

Δημιουργία συνθετικών ενζύμων που μπορούν να τροποποιήσουν με μεγάλη ακρίβεια συντελεστές του επιγονιδιώματος, όπως την τροποποίηση των ιστονών και τη μεθυλίωση του DNA σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος.

ZF και TALE ως εργαλεία για επιγενετικές τροποποιήσεις

a



Zinc Finger Proteins: 1 ZF = 3 bps
Targeted DNA methylation with DNMT3a

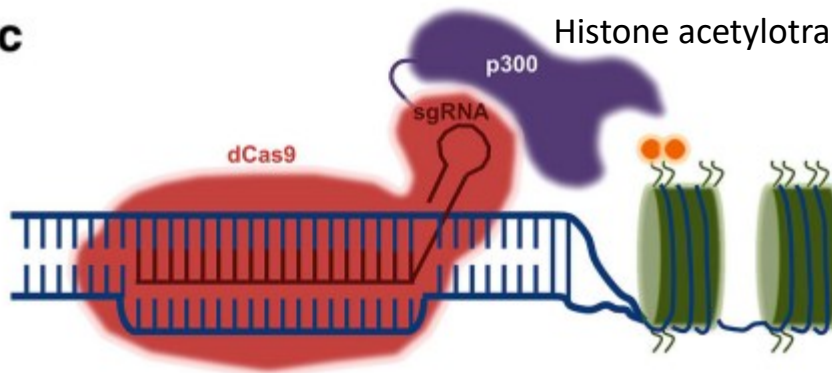
b



Oxidizing enzyme
for DNA methylation

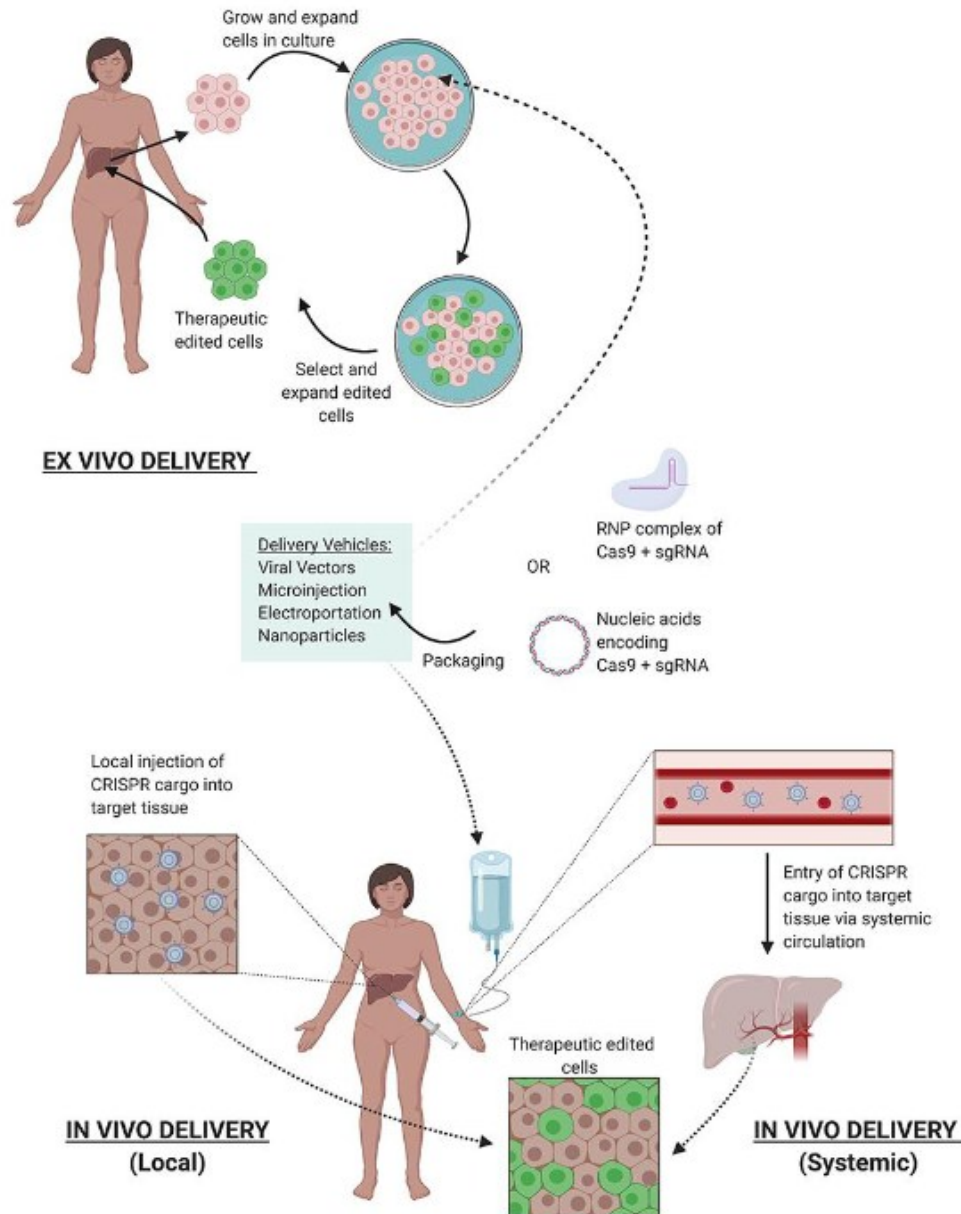
TALEs: 1 TALE = 1 bps
Targeted DNA demethylation with TET1

c



CRISPR-dCas9:
sgRNA complementary to DNA
Targeted Histone modifications
with p300

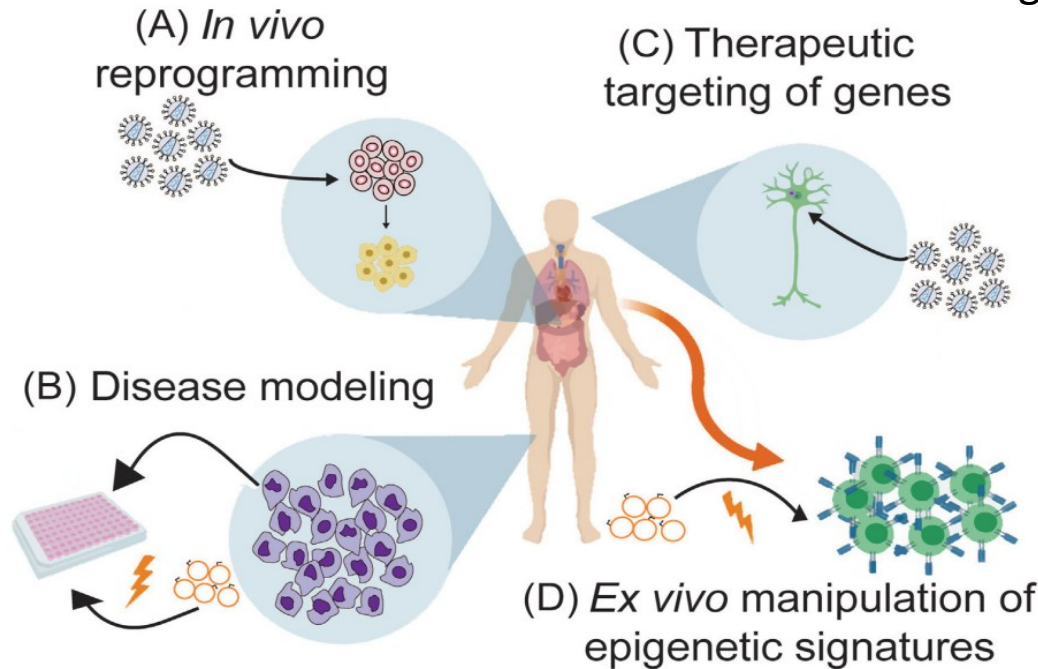
CRISPR/Cas9 στη γονιδιακή θεραπεία



Εφαρμογές επιγενετικών τροποποιήσεων σε ασθένειες

Epigenetic editors are delivered to cells within the body to target genes enabling cell reprogramming or differentiation

Genes are targeted with epigenetic editors that restore a healthy phenotype within a specific cell type in vivo through viral delivery of DNA



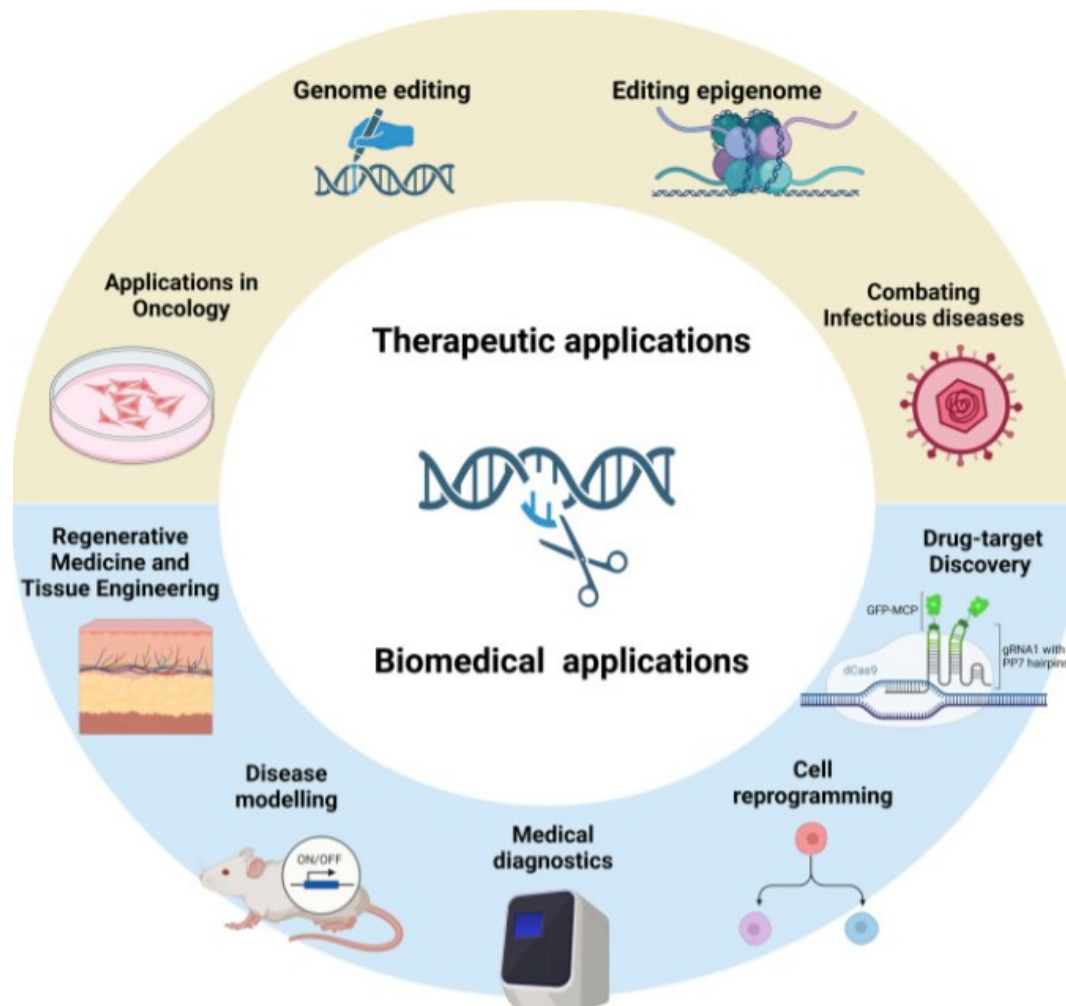
Trends In Biotechnology

Patient-derived cells are isolated, cultured, and epigenome editors are introduced for disease modeling via viral transduction

Patient cells are isolated and epigenetic editors are introduced ex vivo such that cells acquire a desired phenotype. They are then re-injected into the patient as autologous cell therapies

(Goel et al., 2021)

Εφαρμογές CRISPR/Cas9 στην Ιατρική Ακριβείας



Happy epigenome editing

