

Inleiding Epigenetica: DNA is ook niet alles!

28e NIBI onderwijs conferentie
NATURE X NATURE
10-11 januari 2014



Gert Jan C. Veenstra
Moleculaire Ontwikkelingsbiologie
Radboud Universiteit Nijmegen



Wat is epigenetica ?

Oorspronkelijke, brede definitie:

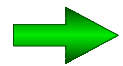
- “boven” het genetische
- “erfelijk” maar niet direkt gecodeerd in DNA

Epigenetica

Toepassingen, onderzoek, actualiteit

- Therapeutisch gebruik van stamcellen
 - ▶ Embryonale stamcellen, cloning
 - ▶ iPS cellen: Induced pluripotent stem cells
- Etiologie ziekten (kanker, aangeboren afwijkingen)
- Begrip genregulatie?

Epigenetica



- **Introductie: Relevantie epigenetica, wat is het?**
 - ▶ Embryogenese, stamcellen, cloning
 - ▶ Eén genoom, vele ‘epi’ genomen
- **Epigenetica – basics – wat is het?**
 - ▶ Histon modificaties
 - ▶ DNA methylering
- **Hoe cellen veranderen**
 - ▶ Chromatine en de revolutie in DNA sequencing technologie
 - ▶ Epigenetica en het begin van gen expressie tijdens de ontwikkeling

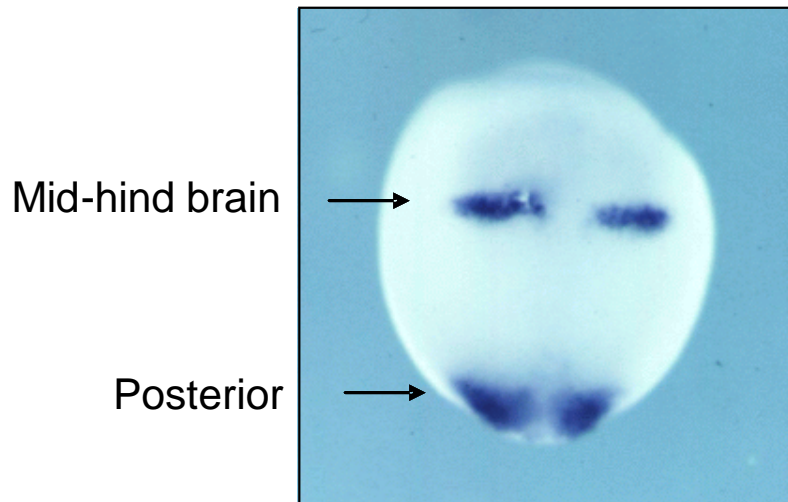
Waarom zijn cellen verschillend?

Hoe verschillen de cellen van elkaar in een organisme?

Kunnen ze veranderen?

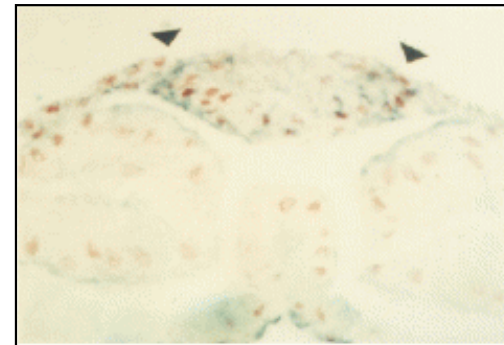
Expressie wordt primair gereguleerd op het niveau van transcriptie initiatie

Voorbeeld: Gelocaliseerde expressie tijdens embryogenese

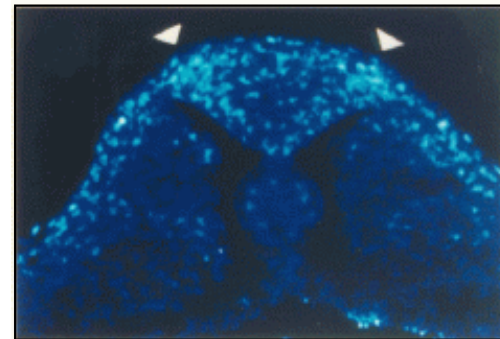


In situ hybridisation showing localized FGF3 (Int-2) expression at the mid-hind brain boundary and the posterior neural plate.

Dorsal view of late gastrula stage Xenopus embryo
(Tannahill et al., 1992)



Oct-1 RNA



Oct-1 protein

In situ hybridisation and immunofluorescence showing localized Oct-1 RNA and protein in the neural tube.

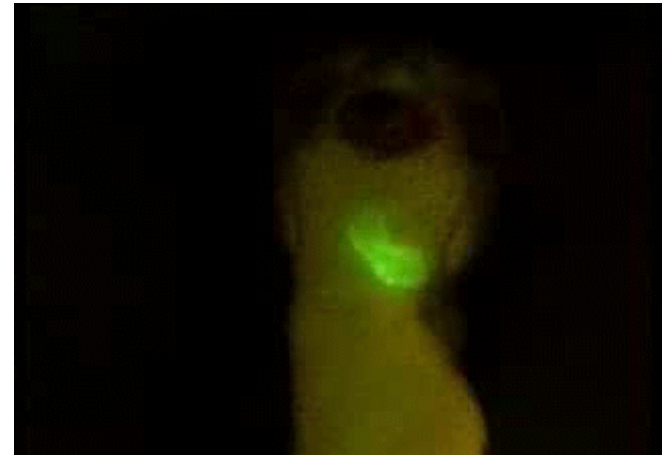
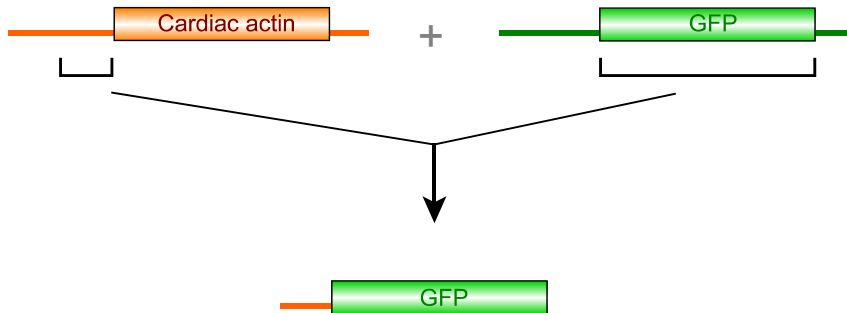
Transverse views of neurula stage Xenopus embryo
(Veenstra et al., 1995)

DNA sequenties reguleren genen op een cel-specifieke manier

Transgeen embryo

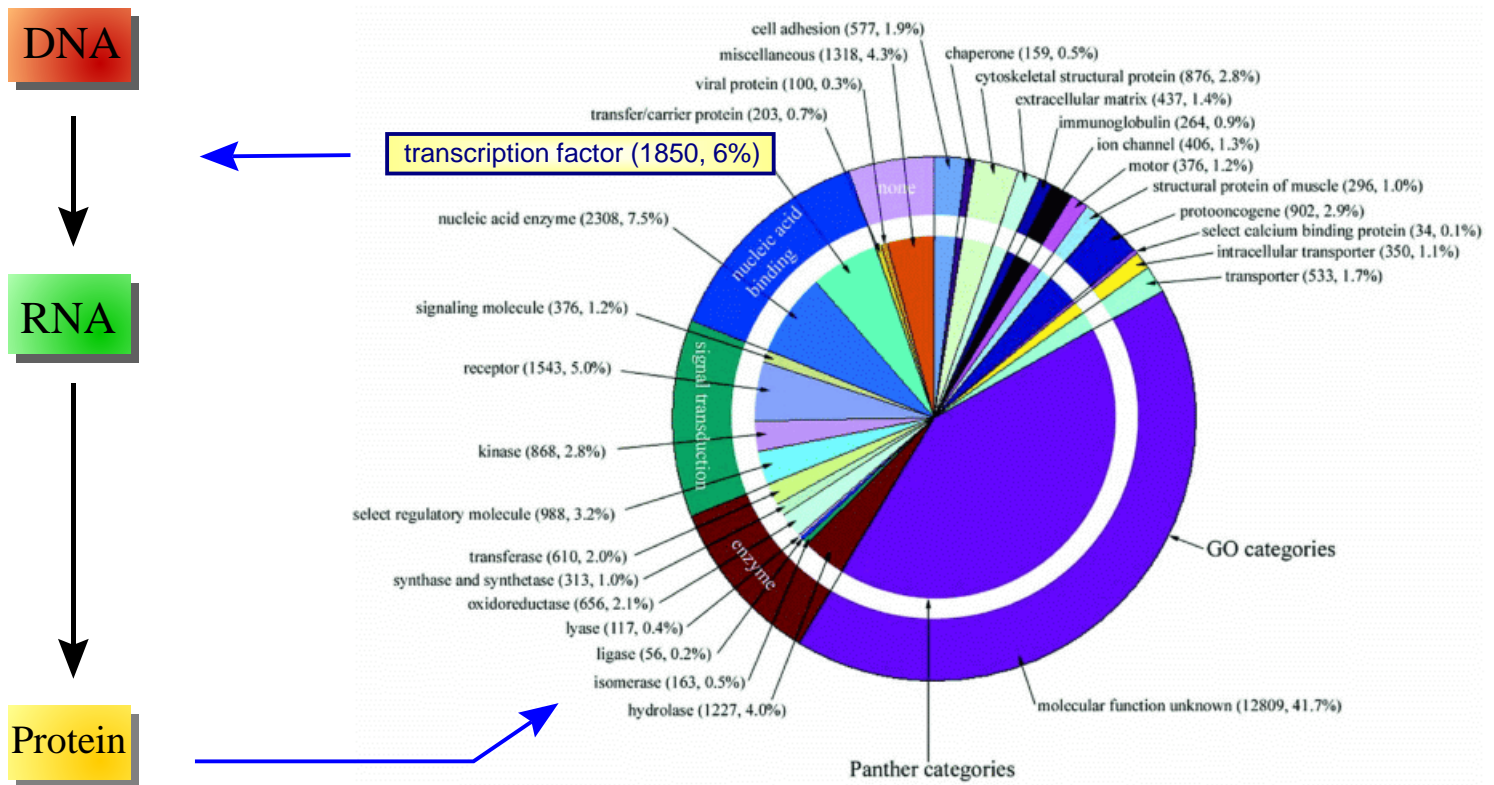
Promoter: afkomstig van *Cardiac actin* gen

Detectie: gen coderend voor *Green Fluorescent Protein (GFP)*



Gene expression

Transcription-initiation & the transcription machinery



Venter *et al.*, 2001, Science

Embryonale ontwikkeling Genregulatie in meercelligen

Meercelligen en genregulatie: Meer van hetzelfde?

- Eigenschappen van cellen zijn
- Genexpressie is
- Genetische informatie is

Embryonale ontwikkeling

Genregulatie in meercelligen

Meercelligen en genregulatie: Meer van hetzelfde?

- Eigenschappen van cellen zijn *verschillend*
- Genexpressie is *verschillend*
- Genetische informatie is *identiek*

Embryonale ontwikkeling

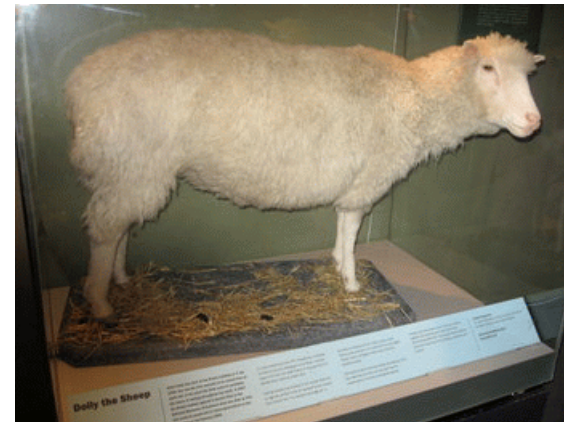
Genregulatie in meercelligen

Meercelligen en genregulatie: Meer van hetzelfde?

- Eigenschappen van cellen zijn *Verschillend*
- Genexpressie is *Verschillend*
- Genetische informatie is *identiek*



Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. J.B. Gurdon (1962)
Developmental Biology 4: 256-273



Dolly (5 juli 1996 – 14 februari 2003) was het eerste gekloonde schaap en ook 's werelds eerste kloon van een volwassen dier.
[http://nl.wikipedia.org/wiki/Dolly_\(schaap\)](http://nl.wikipedia.org/wiki/Dolly_(schaap))



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

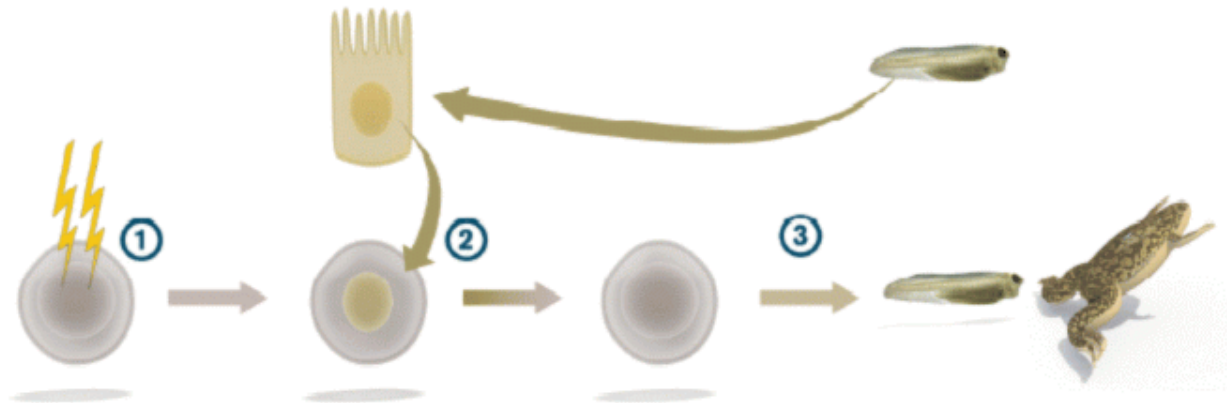
Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka



Sir John B. Gurdon

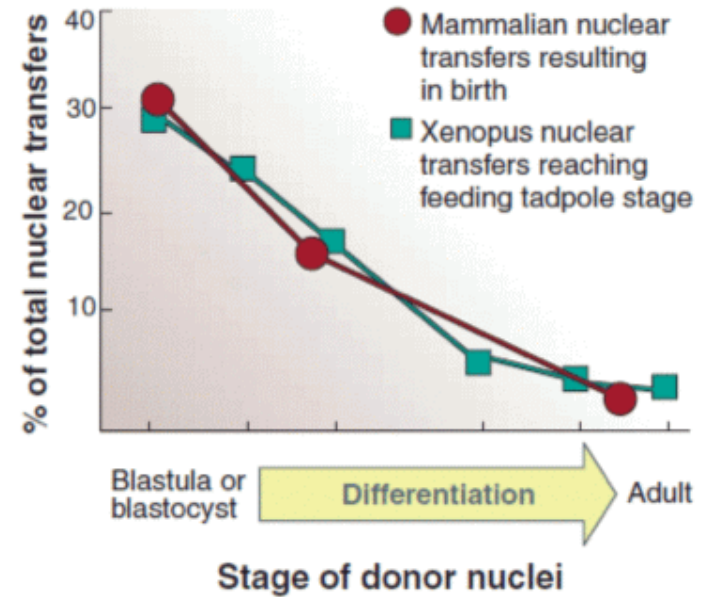
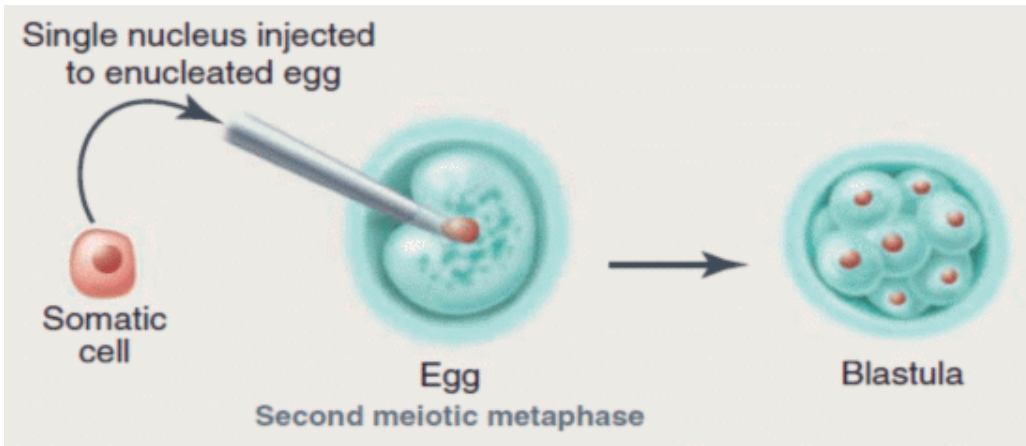


Shinya Yamanaka



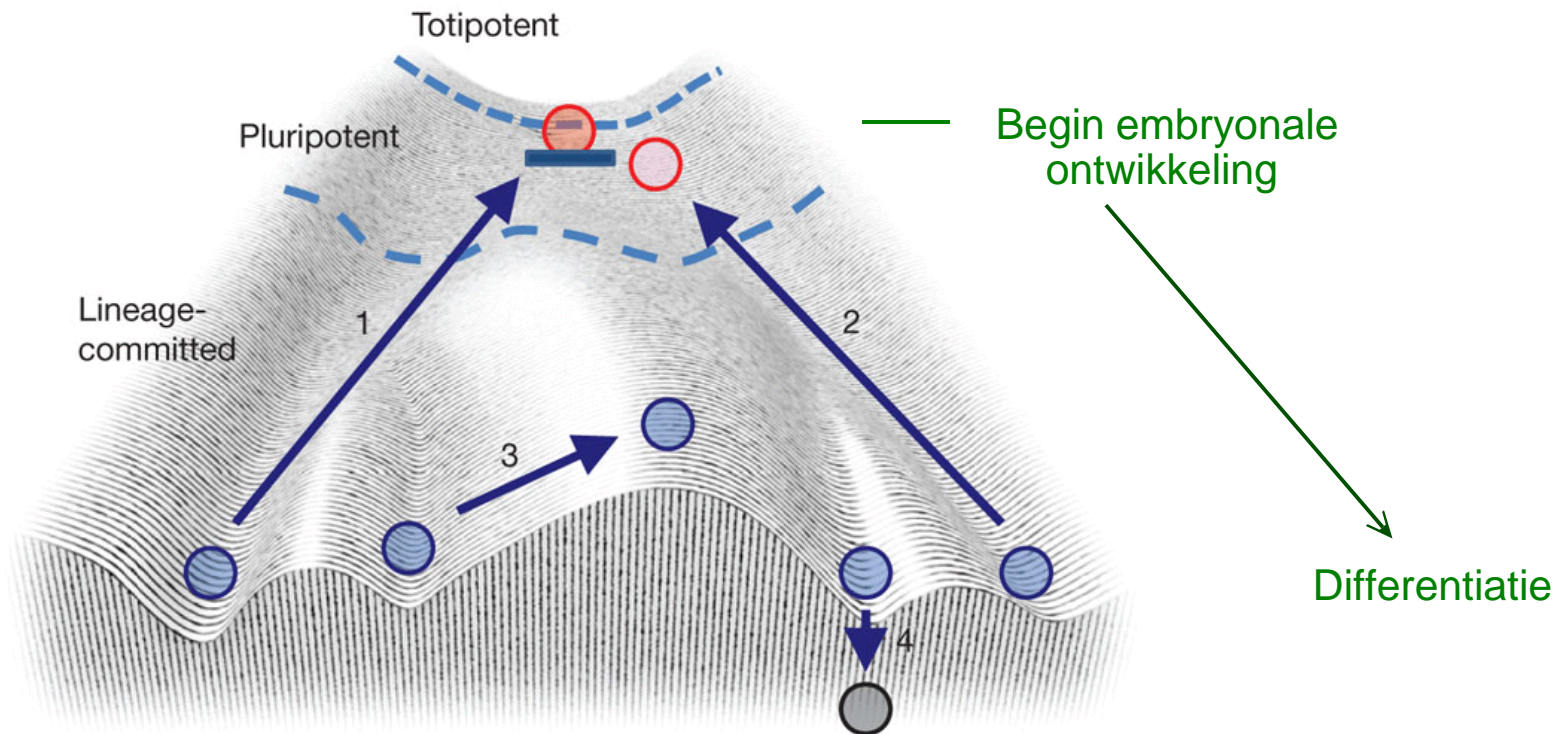
Herprogrammeren

Celkerntransplantatie:
Reset van de genetische code, ontwikkeling volledig organisme



Epigenetisch landschap

Cellen tijdens de ontwikkeling als knikers op een helling
Barrières voor herprogrammeren

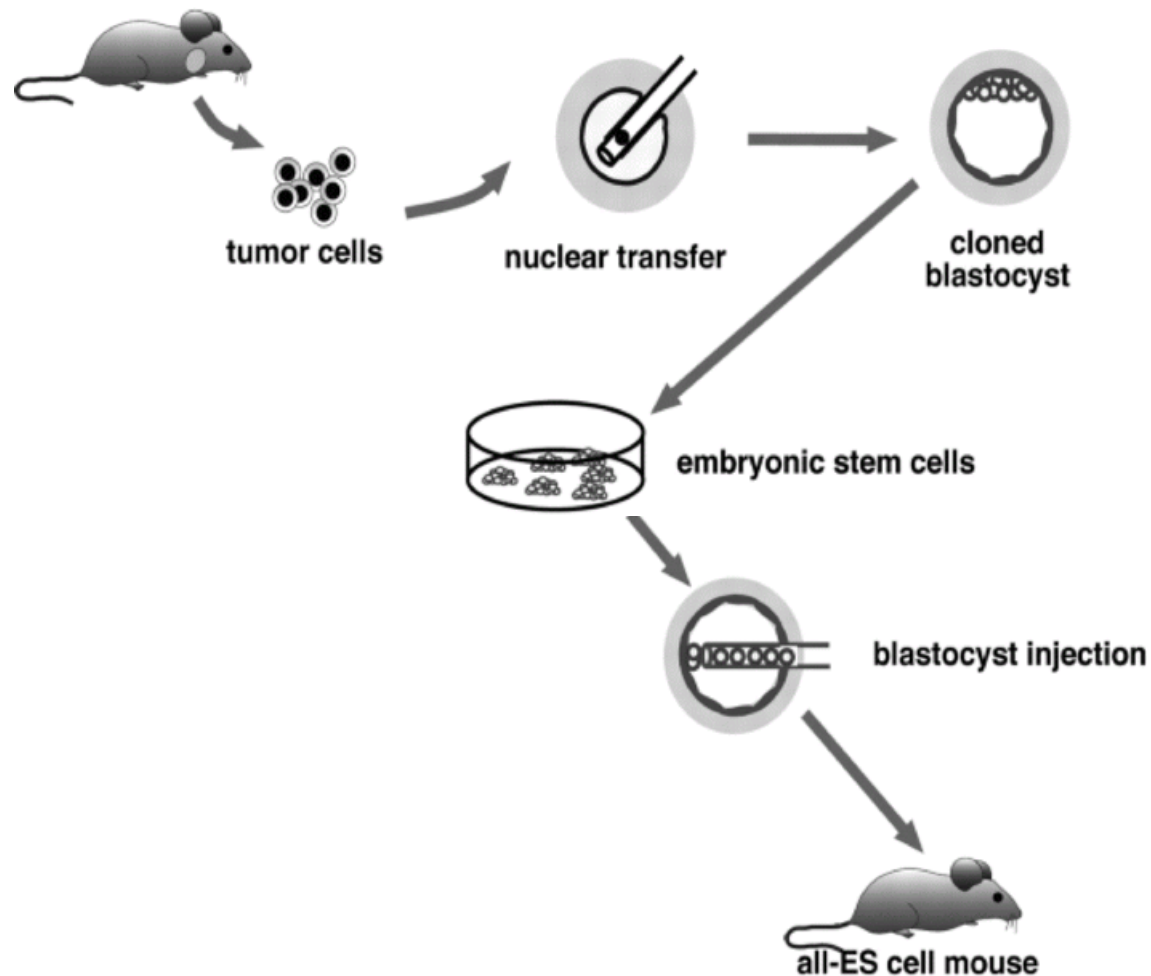


Melanoma cellen kunnen – *in principe* – veranderen in de alle normale cel typen

Oocyten hebben vermogen tot herprogrammeren:

“Epigenetic remodelling”

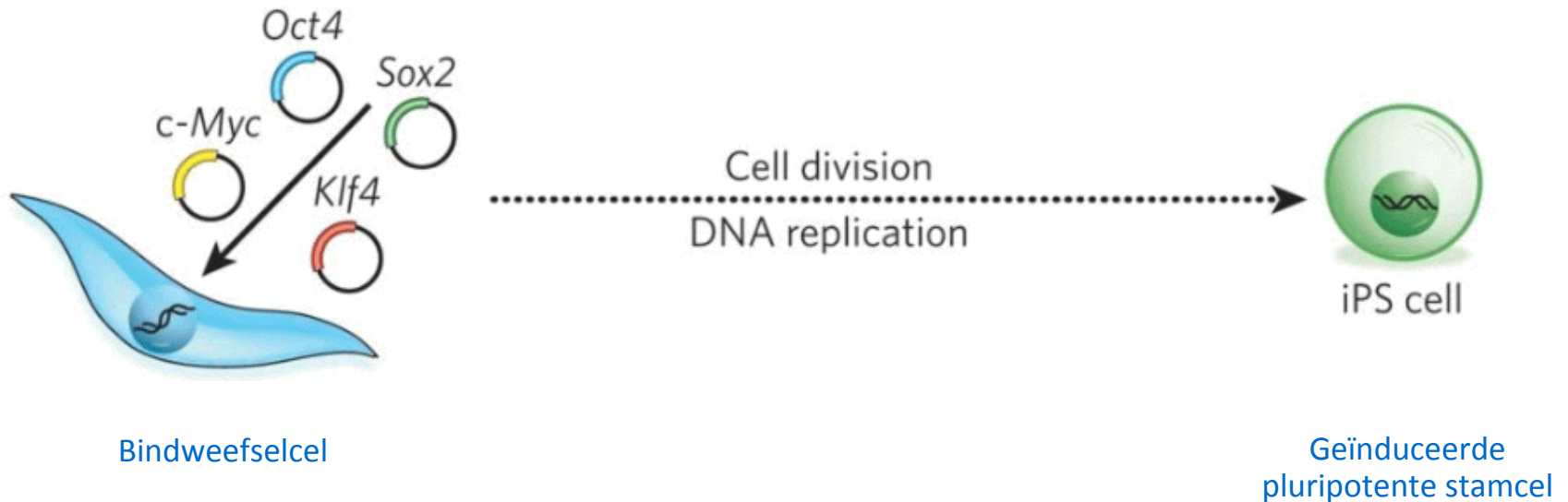
Conclusie: Vooral epigenetische veranderingen in melanoma



Herprogrammeren

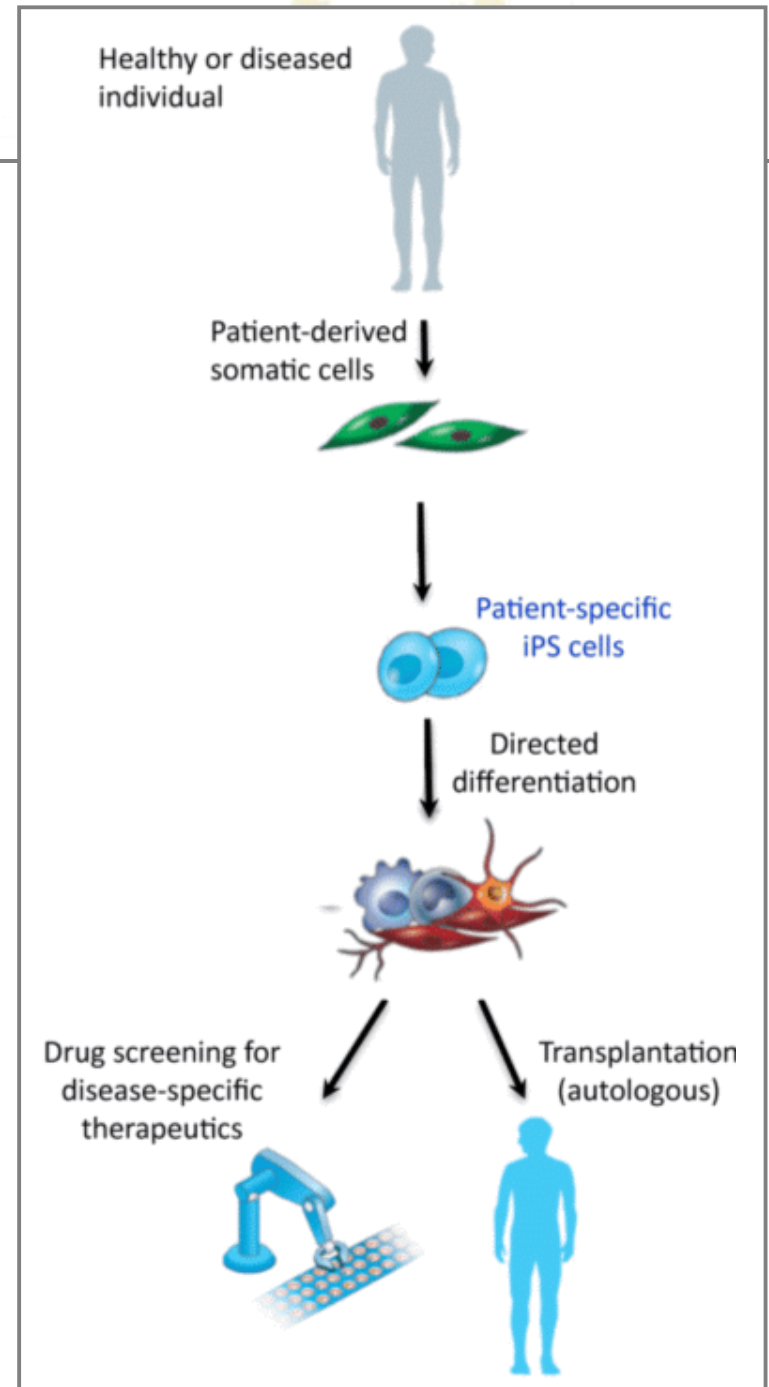
Expressie van vier genen:
Reset van de genetische code, cellen worden pluripotent

Transcription-factor transduction



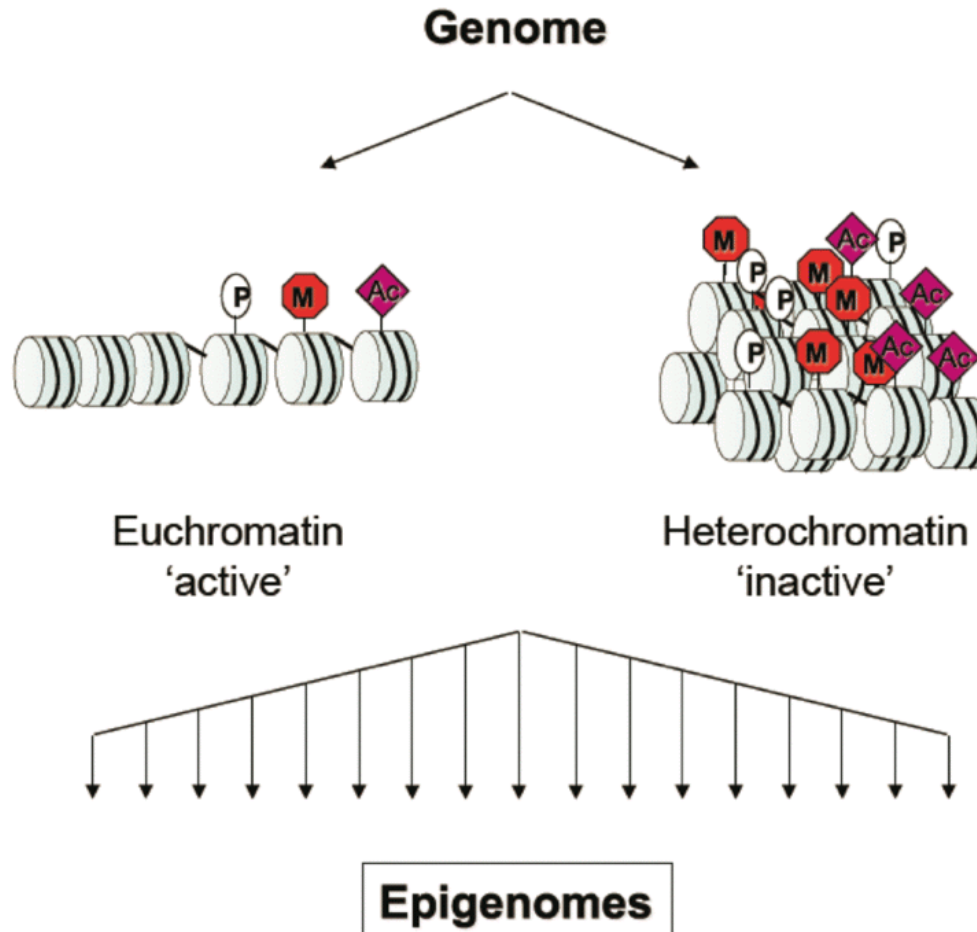
Herprogrammeren

Medische toepassingen



Epigenetica, selectief gebruik van informatie

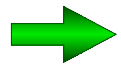
Eén genoom, vele 'epi'genomen:
Cellen hebben hetzelfde genoom, maar verschillende epigenetische regulatie



Epigenetica

- **Introductie: Relevantie epigenetica?**

- ▶ Embryogenese, stamcellen, cloning
- ▶ Eén genoom, vele ‘epi’ genomen



- **Epigenetica – basics – wat is het?**

- ▶ Histon modificaties
- ▶ DNA methylering

- **Hoe cellen veranderen**

- ▶ Chromatine en de revolutie in DNA sequencing technologie
- ▶ Epigenetica en het begin van gen expressie tijdens de ontwikkeling

Wat is epigenetica ?

Babylonische spraakverwarring

Oorspronkelijke, brede definitie:

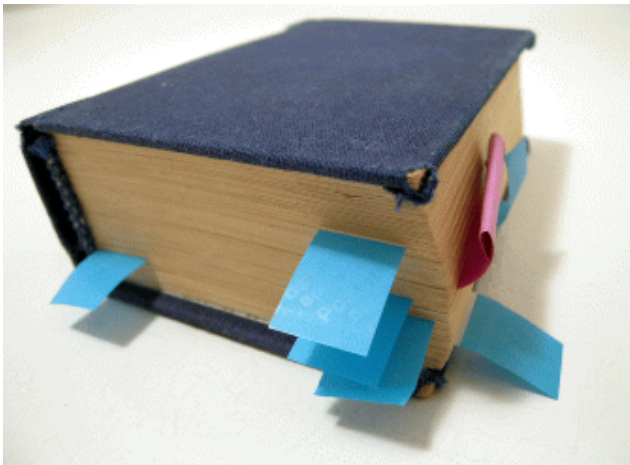
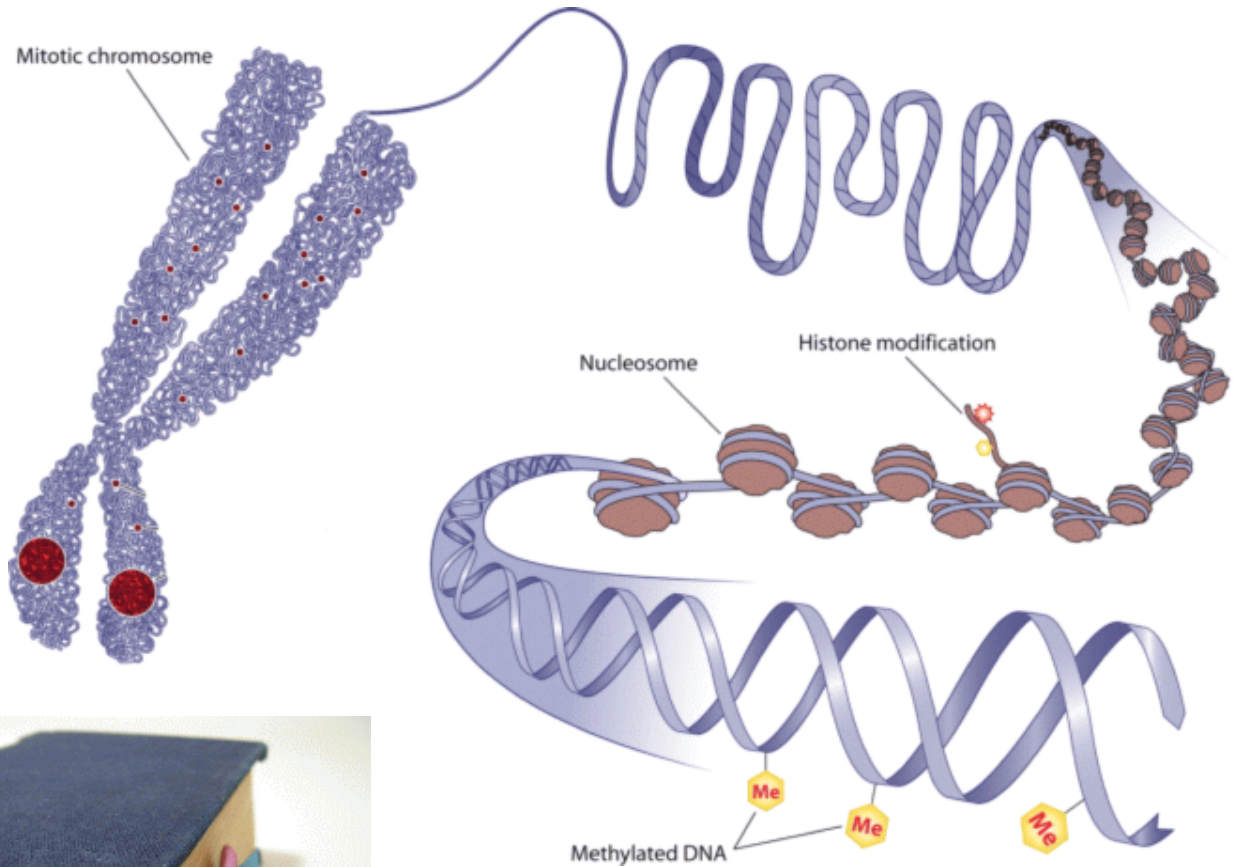
- “boven” het genetische
- “erfelijk” maar niet direkt gecodeerd in DNA

Moderne, moleculaire definitie:

- markering van “actief” of “inactief” DNA
- filter van genetische informatie

Epigenetica

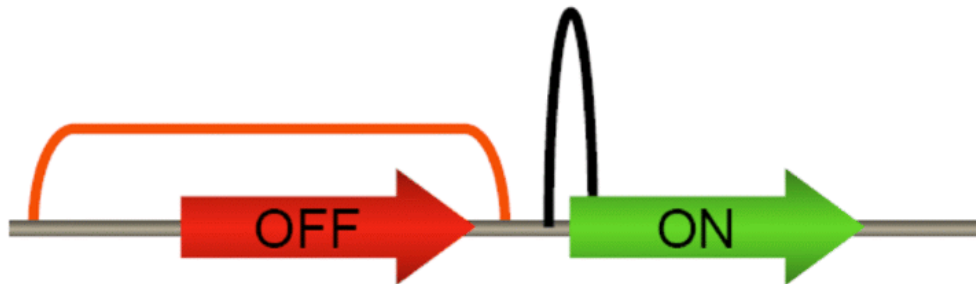
Veranderingen op
chromosomen



Chemische veranderingen op chromosomen als
boekenleggers van de genetische code

Markering van het genoom voor activatie en repressie

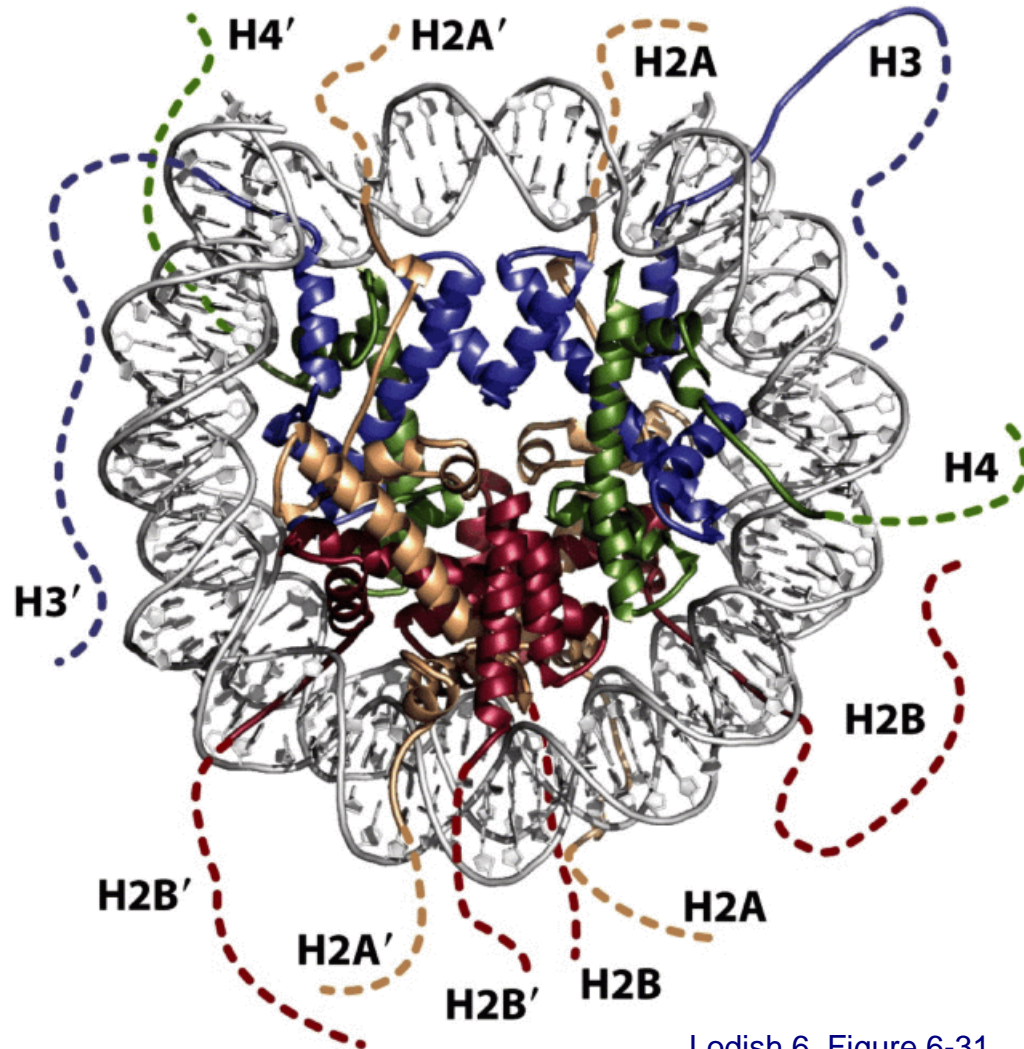
- Twee epigenetische systemen
 - ▶ DNA methylering (stabiel, leidt tot histon modificaties)
 - ▶ Histon modificaties (post-translationeel)
- Beïnvloeden transcriptionele activiteit
 - ▶ Toegankelijkheid DNA (compactie)
 - ▶ Binding regulatoire eiwitten



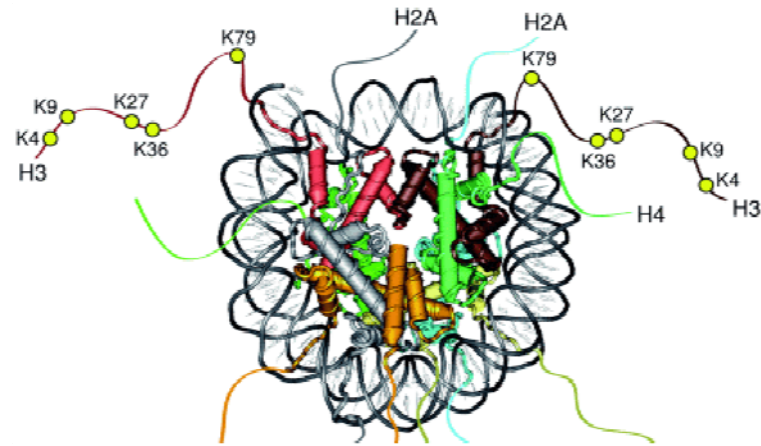
Histon N-termini doelwit van regulatie

Toegankelijkheid van DNA gereguleerd door post-translationele modificaties

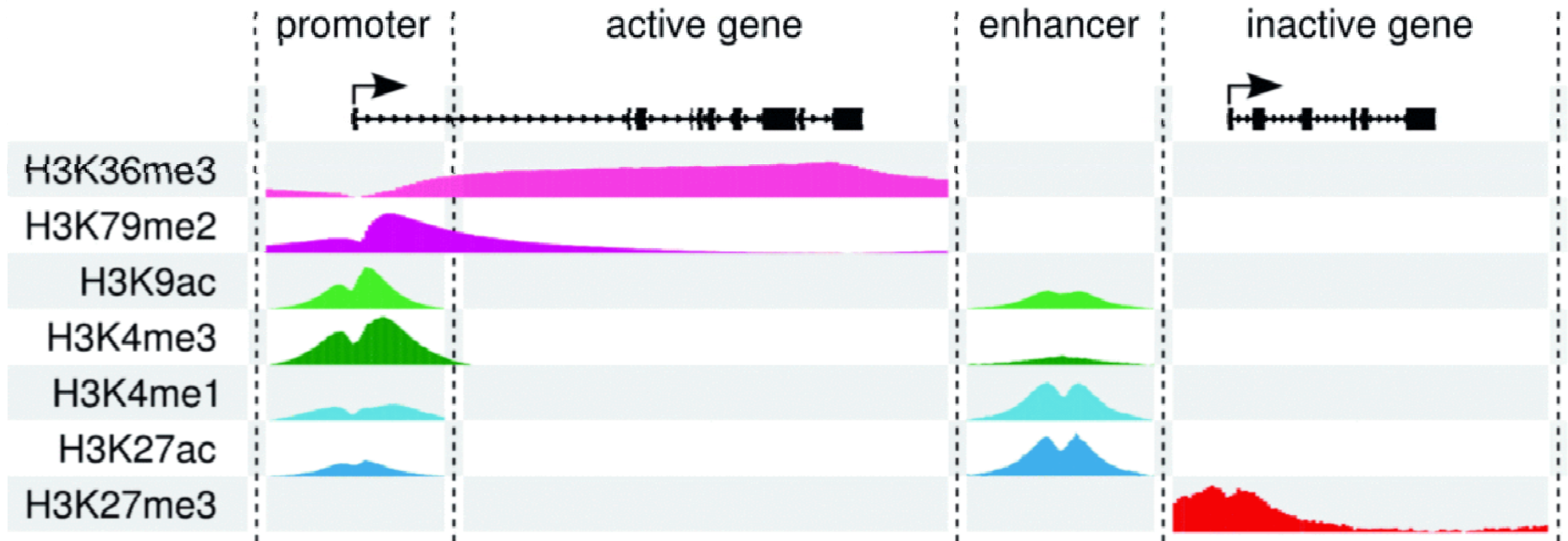
Nucleosoom:
146 bp DNA + octamer
- 2x histone H2A
- 2x histone H2B
- 2x histone H3
- 2x histone H4



Histon H3 modificaties

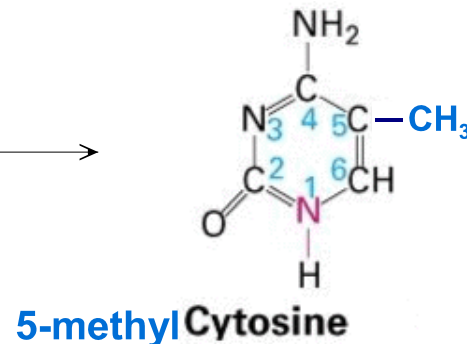
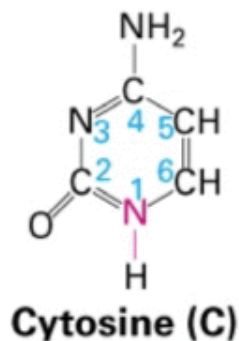


- Sleutelrol histon N-terminale uiteinden
- Modificaties aangebracht en verwijderd door enzymen ('writers', 'erasers')
- Modificaties herkend en gebonden door andere eiwitten ('readers')



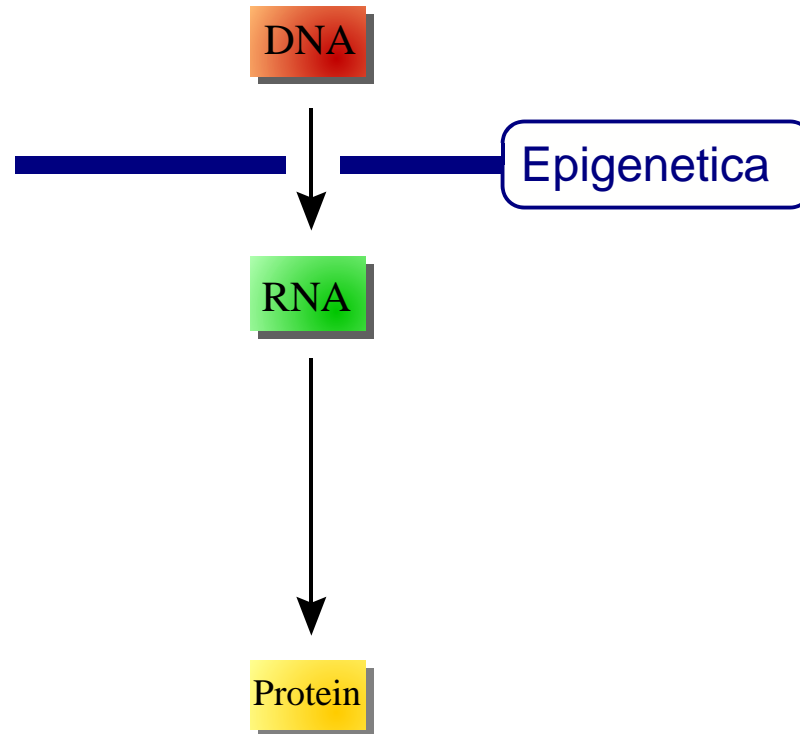
Genomische DNA methylation

- CG dinucleotiden (planten, meeste dieren)
- Tot > 90% van alle CpGs (zoogdieren)
- Epigenetisch mechanisme
- Transcriptionele repressie, Hypoacetylering van histonen
 - ▶ Heterochromatine
 - ▶ Imprinting (zoogdieren)
 - ▶ X chromome inactivatie
 - ▶ Afweer parasitaire sequenties (retrotransposons)
 - ▶ Chromosoom stabiliteit



Is DNA nu alles ('nature') of is er meer ('nurture')?

Epigenetica: Filter van genetische informatie
Van belang voor ontwikkeling en differentiatie, ziekte en evolutie



Hoe verschillen de cellen van elkaar in een organisme?



Epigenetische modificaties (histon modificaties, DNA methylering):
Markering van DNA, genen (boekenlegger)
Hetzelfde DNA (boek) anders gebruikt (filter)

Epigenetica

- **Introductie: Relevantie epigenetica?**

- ▶ Embryogenese, stamcellen, cloning
- ▶ Eén genoom, vele ‘epi’ genomen

- **Epigenetica – basics – wat is het?**

- ▶ Histon modificaties
- ▶ DNA methylering



- **Hoe cellen veranderen**

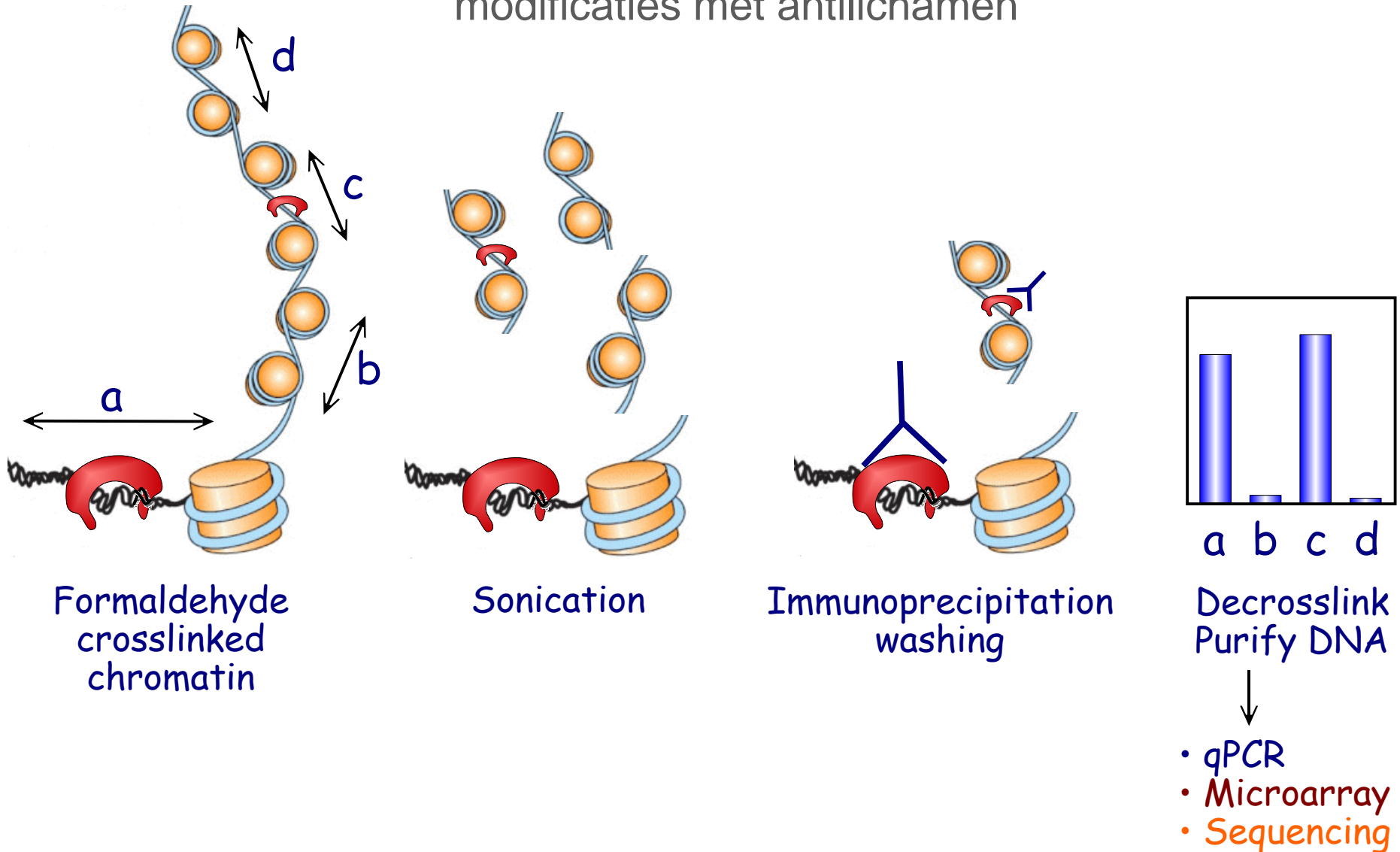
- ▶ Chromatine en de revolutie in DNA sequencing technologie
- ▶ Epigenetica en het begin van gen expressie tijdens de ontwikkeling

Epigenetic remodeling:

Hoe kunnen we het bestuderen?

Chromatine immunoprecipitatie (ChIP)

Detectie van chromatine-geassocieerde eiwitten en histon modificaties met antilichamen



Revolutie in sequencing technologie

Transformeert het veld van genomics

- Sanger sequentie bepaling
 - ▶ Relatief korte stukken DNA (~600 bp)
 - ▶ DNA klonering noodzakelijk

- Ge-automatiseerde Sanger sequencing
 - ▶ Grootschalig, duur
 - ▶ Sequencing van uiteinden van BACs, and subklonen daarvan
 - ▶ Shotgun sequencing
 - ▶ Assembleren menselijk genoom (en vele andere)

- Next generation sequencing
 - ▶ High-throughput (tot honderden miljoenen korte 'reads' van 50-100 bp)
 - ▶ Identificatie / Census benadering
 - ▶ Characterisering van genomen

ChIP-sequencing

Genoom-breed in kaart brengen van histon modificaties en binding eiwitten aan DNA

- Chromatine immunoprecipitatie (ChIP)
- DNA fragment opzuivering
- Next Generation Sequencing (tientallen miljoenen reads)
- Mapping naar referentie genoom
- Quantitatieve analyse

Epigenetic remodeling:

Hoe kunnen we het bestuderen?

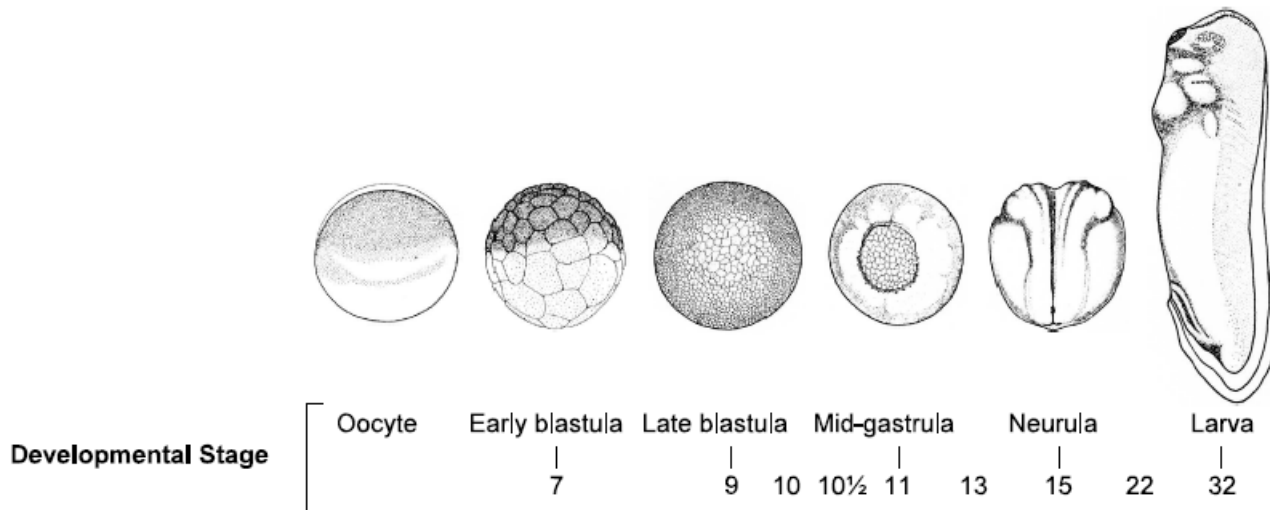
Wat gebeurt er tijdens ontwikkeling en differentiatie?

Genregulatie tijdens de embryonale ontwikkeling

Xenopus als embryo model systeem

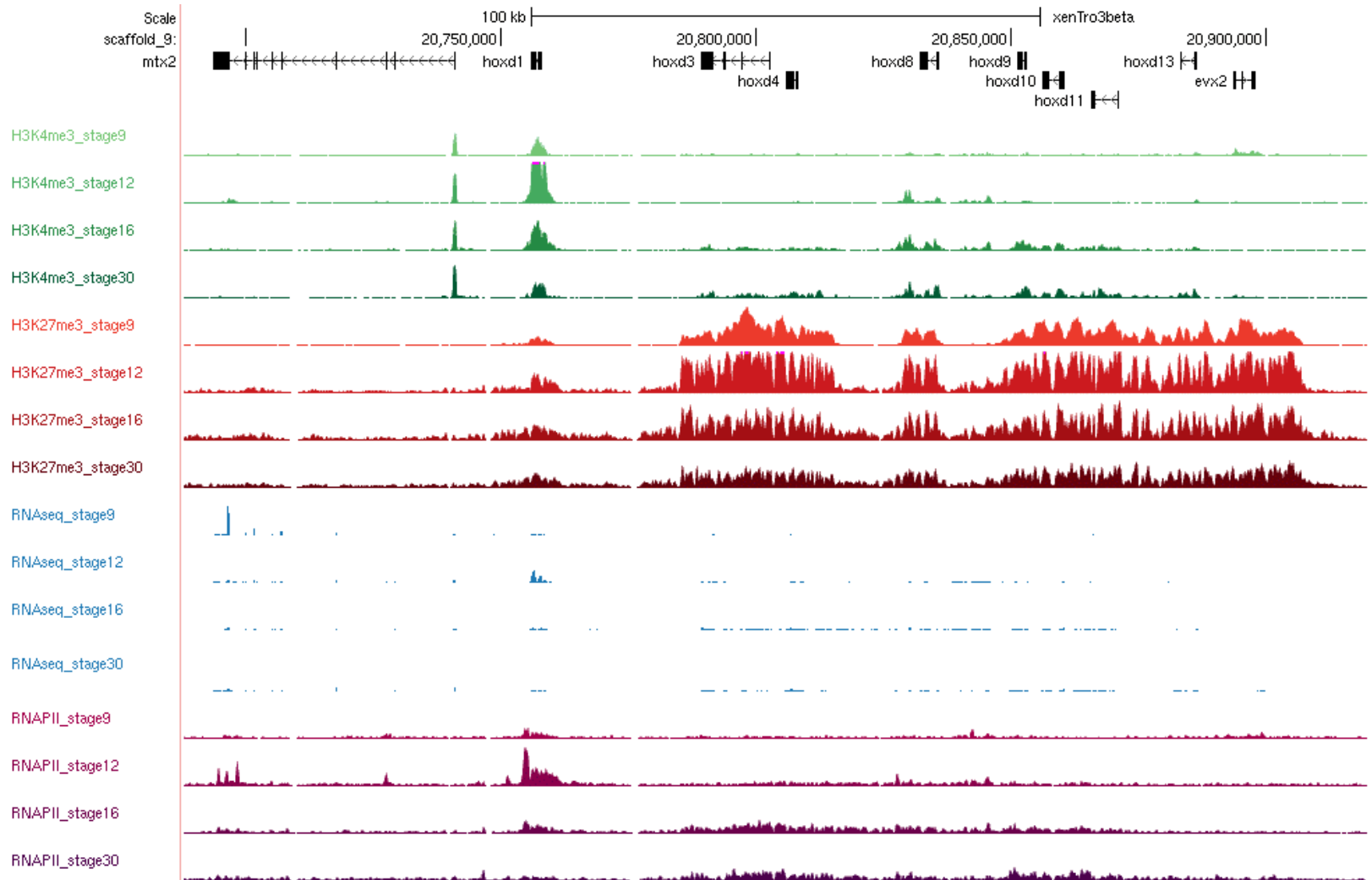
Waarom?

- Vertebraat
- Manipulatie expressie
- Externe ontwikkeling
- Aantal eieren / embryos



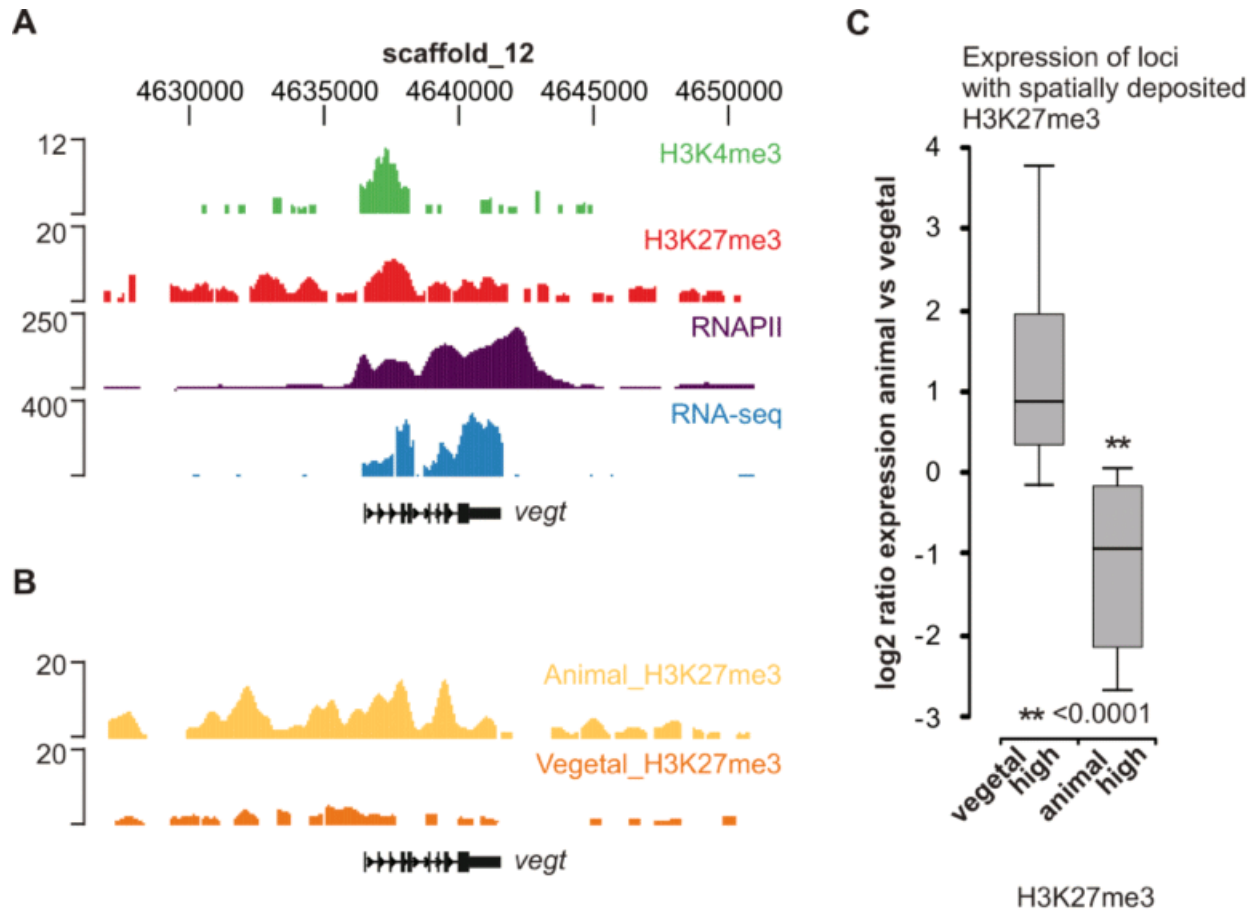
Epigenetisch 'landschap' rond *hoxd* cluster

H3K4me3 (actieve promotor), H3K27me3 (repressie), RNA, RNAPII (RNA polymerase)



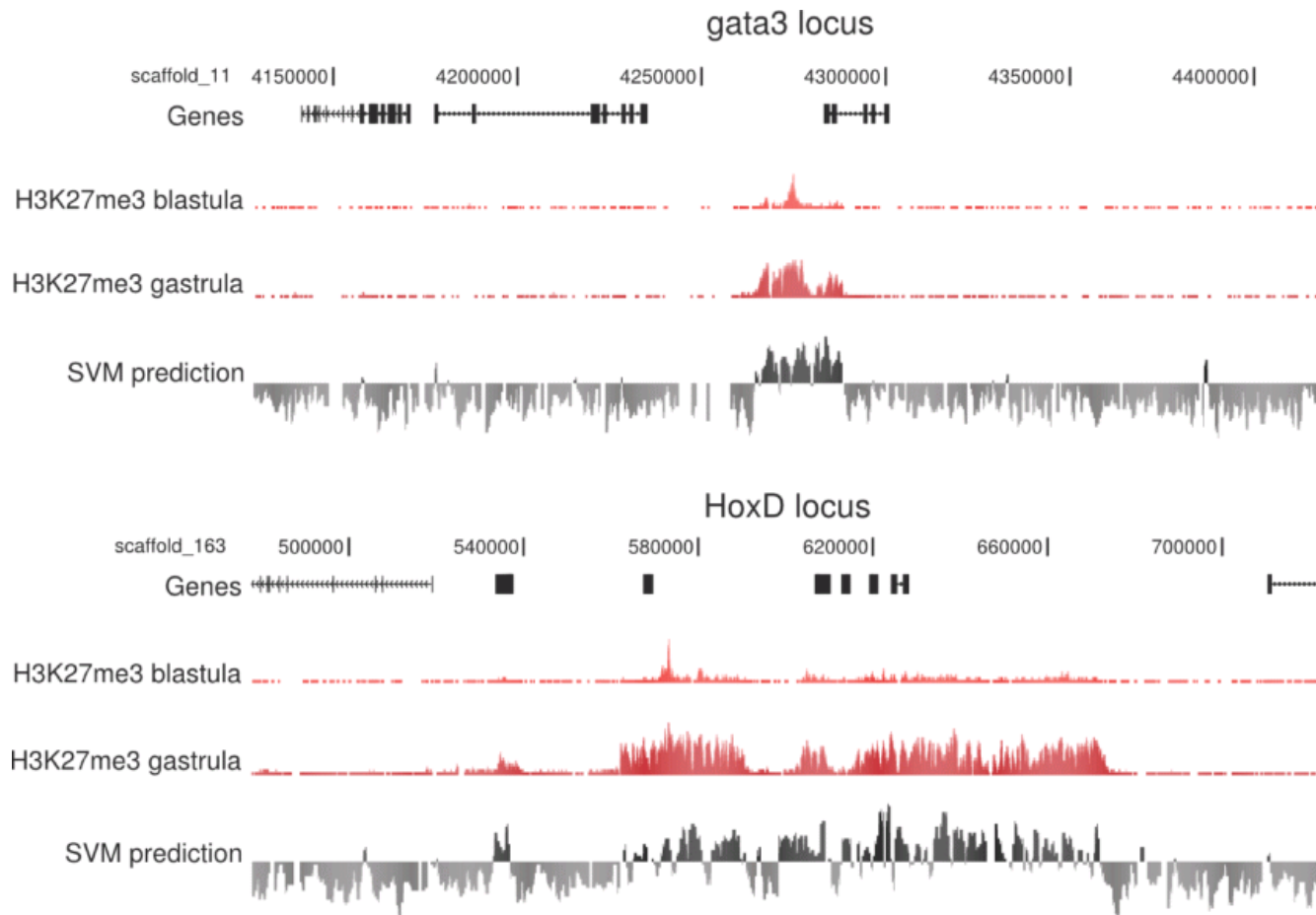
H3K4 en H3K27 methylering in verschillende cellen

H3K27 methylering onderdrukt *vegt* expressie in vegetal pole cellen



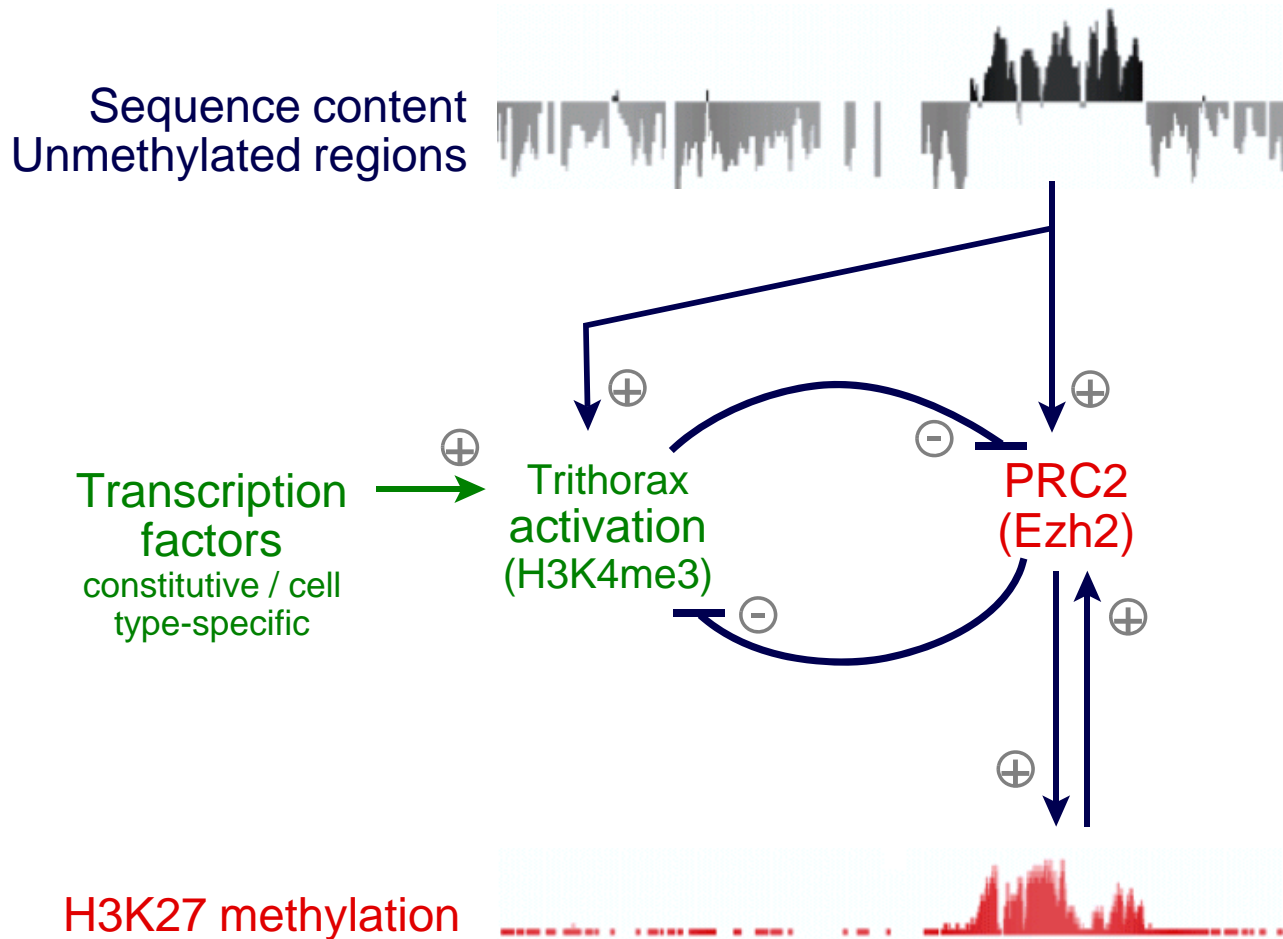
H3K27me3 voorspeld aan de hand van DNA sequentie

Support Vector Machine (machine learning) getraind op deel van data, voorspelt de rest

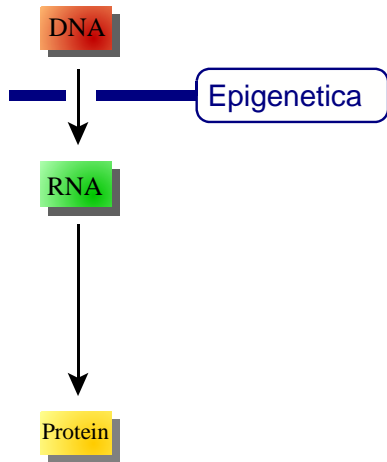


Samenspel van DNA sequentie en verschillende epigenetische modificaties bepaalt genexpressie

Afwezigheid van DNA methylering: DNA sequenties die gereguleerd worden
Wisselwerking tussen activatie en repressie



Epigenetica Samenvatting



- Eén genoom, vele ‘epi’ genomen
- Epigenetische mechanismen
 - ▶ Histon-modificaties (activerend en onderdrukkend)
 - ▶ DNA methylering (onderdrukkend)
 - ▶ Enzymen: ‘write’, ‘erase’
 - ▶ Bindende eiwitten: uitlezen (‘read’) → effecten
- Regulatie
 - ▶ Ontwikkeling en differentiatie
 - ▶ Ontspoord in kanker
 - ▶ Manipuleerbaar (medicijnen, leefgewoonten)