Epigenetičko utišavanje X kromosoma

Kralj, Ines

Undergraduate thesis / Završni rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:212986

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EPIGENETIČKO UTIŠAVANJE X KROMOSOMA

EPIGENETIC X CHROMOSOME INACTIVATION

SEMINARSKI RAD

Ines Kralj
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. PROCES UTIŠAVANJA X KROMOSOMA ... 2
3. XIC I NEKODIRAJUĆE RNA XIST I TSIX MOLEKULE ... 3
   3.1. DJELOVANJE I REGULACIJA XIST I TSIX RNA MOLEKULA ... 4
4. NASUMIČNA X INAKTIVACIJA – BROJANJE I IZBOR ... 7
5. PROMJENE U KROMATINSKOJ STRUKTURI Xi KROMOSOMA ... 9
6. UTISNUTA X INAKTIVACIJA ... 11
7. ZAKLJUČCI ... 13
8. LITERATURA ... 14
9. SAŽETAK ... 17
10. SUMMARY ... 18

1. UVOD

U somatskim stanicama sisavaca ženka ima dva velika, genima bogata X kromosoma (XX), dok mužjak ima jedan X kromosom i jedan manji, genima siromašan Y kromosom (XY). U mužjaka je X kromosom uvijek naslijeđen od majke, a Y kromosom od oca, dok je u ženki jedan X kromosom porijeklom majčin (Xm), a jedan očev (Xp). Ova razlika u kromosomima između spolova uobičajena je u sisavaca i mnogih drugih organizama te je sastavni dio biološkog mehanizma kojim se određuje spol.

Kada bi X-vezani geni bili eksprimirani podjednako sa svakog X kromosoma u ženki sisavaca, one bi proizvodile otprilike dvostruko više genskih produkata (RNA i proteina) određenih genima na X kromosomu nego što bi ih proizvodili mužjaci koji imaju u genotipu samo jedan X kromosom. Budući da većina gena na X kromosomu nema ulogu u određivanju spola i reprodukciji već su ključni za pravilan razvoj i vijabilnost stanica, ta razlika bi poremetila ravnotežu metabolizma u jednom ili drugom spolu. Stoga je u sisavaca (i nekih drugih skupina sa XY sustavom determinacije spola) evoluirao mehanizam kako bi ekspresiju X-vezanih gena u XY mužjaka i XX ženki doveo na podjednaku razinu te osigurao normalan razvitak stanica i organizma. HJ Muller 1931. naziva ovaj fenomen „kompenzacija doze“. Različite skupine organizama su razvile različite strategije za postizanje kompenzacije doze. Mary Lyon je 1961. predložila da se kod sisavaca takva kompenzacija postiže transkripcijskim utišavanjem gotovo svih gena jednog od dva X kromosoma ženki (Lyon, 1961), a to se zbiva tijekom ranog embrionalnog razvoja u procesu poznatom kao inaktivacija X kromosoma (*X-chromosome inactivation* - XCI). Izbor bilo očevog ili majčinog kromosoma za utišavanje je slučajan u svakoj stanici. Inaktivacija kromosoma se odvija gustim pakiranjem molekule DNA čime nastaje visoko kompaktna kromatinska struktura jasno vidljiva i prepoznatljiva u staničnoj jezgri nazvana spolni kromatin ili Barrovo tijelo. Ovakvom kondenzacijom DNA onemogućava se pristup regulacijskim proteinima na X kromosom te on postaje transkripcijski utišan. Utišavanje se potom stabilno nasljeđuje kroz naknadne diobe somatskih stanica pa je, kao rezultat tog procesa, svaka ženka mozaik stanica u kojima je jedan, ili majčinski ili očinski naslijeđen X kromosom utišan (Xi), dok drugi kromosom ostaje aktivan (Xa).

Inaktivacija X kromosoma iznimno je složen epigenetički proces tijekom kojega se, kako bi bio uspješan, mora: 1) odrediti broj X kromosoma u stanici i od njih samo jedan zadržati aktivan (proces brojanja); 2) odabrati koji X kromosom će biti inaktiviran (proces izbora); i 3) uspostaviti utišano stanje brzo i učinkovito tijekom ranog razvoja (proces

inicijacije inaktivacije X-kromosoma) (Starmer i Magnuson, 2009). Opseg, stabilnost i precizna regulacija procesa ukazuju na to da uključuje suradnju između nekoliko interagirajućih molekula i faktora, slično mnogim drugim epigenetičkim procesima.

2. PROCES UTIŠAVANJA X KROMOSOMA

Proces utišavanja X kromosoma odvija se u nekoliko faza i obuhvaća inicijaciju utišavanja, širenje inaktivnog stanja te njegovo održavanje. Početni koraci inaktivacije obuhvaćaju brojanje, izbor i početne faze smanjenja i sprječavanja transkripcije gena na X kromosomu (Starmer i Magnuson, 2009). Inicijacija utišavanja potaknuta je povećanom ekspresijom nekodirajuće RNA transkribirane s gena XIST sa samo jednog od dva X kromosoma ženke određenog za inaktivaciju (Xi) (Brown i sur., 1991). Ova nekodirajuća RNA prekriva X kromosom (Clemson i sur., 1996; prema Lee i sur., 1999) šireći utišavanje duž čitavog kromosoma i smanjujući ekspresiju gotovo svih njegovih gena, pokretanjem utišavanja kromosoma kroz regrutiranje kromatin modificirajućih enzima. Početni val utišavanja pak dovodi do regrutiranja dodatnih slojeva epigenetičkih modifikacija, stabilizirajući na taj način heterokromatinsku strukturu. X kromosom u tom procesu doživljava brojne promjene. Histoni prolaze kroz niz kemijskih izmjena na funkcionalno važnim mjestima, na primjer stupanj acetilacije na odabranim lizinima značajno pada, dok se metilacija na istim i nekim drugim lizinima povećava. Te se promjene uspostavljaju djelovanjem specifičnih enzima koji ciljaju utišani X kromosom. Nadalje, histonska varijanta makro-H2A zamjenjuje dio uobičajenog histona H2A na inaktivnom X kromosomu. Također, u utišavanje X kromosoma uključena je i metilacija DNA koja je važna za održavanje utišanog stanja. Sve te, i brojne druge promjene, daju inaktivnom X kromosomu vrlo karakterističnu kondenziranu strukturu. Inaktivno stanje X kromosoma se dalje održava tijekom stanične linije i traje tijekom cijelog života jedinke.

Postoje dva oblika inaktivacije X kromosoma: nasumični i utisnuti (*imprinted*) (Avner i Heard 2001). Prilikom nasumične inaktivacije X kromosoma svaka stanica ima jednaku vjerojatnost inaktivacije bilo kojeg od dva X kromosoma (majčin ili očev), dok prilikom utisnutog načina inaktivacije X kromosoma sudbinu kromosoma određuje njegovo podrijetlo i utišava se uvijek očinski X kromosom. Od sisavaca, tobolčari koristite samo utisnuti način inaktivacije X kromosoma dok placentalni sisavci barem u nekim slučajevima koristite utisnuti način i to u izvanembrionalnim staničnim linijama, a u stanicama embrija reaktiviraju

očev X kromosom i zatim primjenjuju nasumični način inaktivacije (Mak i sur., 2004; prema Cheng i Disteche, 2004).

Smatra se da mišje embrionalne matične stanice (ES), kada su potaknute na diferencijaciju, provode nasumičnu inaktivaciju X kromosoma poput embrija u razvoju te stoga predstavljaju neprocjenjiv modelni sustav za proučavanje dinamike inaktivacije X-kromosoma i koriste se u većini eksperimenta (Avner i Heard, 2001).

3. XIC I NEKODIRAJUĆE RNA XIST I TSIX MOLEKULE

Inicijaciju utišavanja tijekom ranog razvoja kontrolira X inaktivacijski centar (Xic) (Lee i sur., 1996; prema Lee i sur., 1999), kompleksan lokus na X kromosomu, veličine približno 1 Mb, koji obuhvaća regiju u kojoj se nalazi nekoliko kontrolnih elemenata i najmanje četiri gena za koje se smatra da imaju ulogu u inaktivaciji X-kromosoma (Avner i Heard, 2001). X inaktivacijski centar izvorno je utvrđen kroz studije na strukturno abnormalnim X kromosomima kada se primijetilo da su određene X vezane sekvence potrebne *in cis* za inaktivaciju translokacija koje uključuju X-kromosom i neki od autosoma (Rastan i Robertson, 1985; prema Penny i sur., 1996). Ova regija je odgovorna za iniciranje X inaktivacije *in cis*: kromosomski fragment koji nosi Xic može biti inaktiviran, dok onaj u kojem Xic nedostaje ne može. Analizom kromosomskih translokacija koje su rezultirale inaktivacijom autosoma na koje se spojio fragment X kromosoma, Xic je mapiran na dužem kraku X-kromosoma (Xq13) u ljudi (Brown i sur., 1991) i miševa.

Godine 1991. otkriće jednoga gena smještenog unutar Xic regije, Xi specifičnog transkripta (Xist), značilo je revoluciju u razumijevanju inaktivacije X-kromosoma. XIST je jedini gen koji se prepisuje sa Xi, a ne prepisuje sa Xa u somatskim stanicama (Brown i sur., 1991). Kodira RNA molekulu koja igra ključnu ulogu u procesu izbora kao i u početnom širenju i uspostavi utišavanja na neaktivnom X kromosomu (Penny, 1996). Taj RNA transkript, dugačak čak 17 kb, nema značajan otvoreni okvir čitanja (Brown i sur., 1991) te ostaje u jezgri, oblažući budući inaktivni X kromosom (Brown i sur., 1992; prema Penny 1996), dok se na budućem aktivnom X kromosomu u muškoj i ženskoj stanici transkripcija sa XIST-a smanjuje i nakon nekog vremena gasi (Lee i sur., 1999). Oblaganje X kromosoma Xist RNA transkriptom primarni je signal za širenje inaktivnog stanja duž kromosoma koji potiče kaskadu kromatinskih promjena. U ljudi se, zahvaljujući alternativnom procesiranju 3' kraja gena, proizvode različite izoforme Xist RNA (Brown i sur., 1991). Uloga ovakve heterogenosti transkripata nije dosad posve razjašnjena.

U Xic regiji se nalazi i gen za drugu nekodirajuću RNA molekulu – Tsix (Lee i sur., 1999) koja igra ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena XIST. TSIX gen se preklapa sa XIST genom, ali se transkribira u antisense smjeru u odnosu na XIST gen, a mjesto inicijacije transkripcije nalazi se 15 kb nizvodno od 3' kraja XIST gena (Lee i sur., 1999). TSIX se proteže preko XIST-a u njegovu promotorsku regiju. Korelacija između ekspresije Tsix-a i nestabilne ekspresije Xist-a *in cis* navodi na zaključak da Tsix djeluje kao negativan regulator Xist-a.

Ovaj antisense par nekodirajućih RNA molekula - Xist i Tsix - važan je u regulaciji inaktivacije X kromosoma. Prije nego je signal koji inicira nasumičnu inaktivaciju X-kromosoma primljen, Xist i Tsix se prepisuju u malim količinama sa svih aktivnih X kromosomima u svakoj muškoj i ženskoj stanici (Lee i sur., 1999). Korištenjem fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), Xist RNA se može otkriti u embrionalnim matičnim (ES) stanicama kao dva mala, točkasta FISH signala u ženskim (XX) odnosno jedan točkasti FISH signal u muškim (XY) ES stanicama (Lee i sur., 1999). Količina Xist-a se dramatično povećava u ženskim, ali ne i muškim stanicama u periodu koji odgovara uspostavljanju utišavanja (Kay i sur., 1993; prema Plath i sur., 2002). U ženskim stanicama, nakon što je pokrenuta inaktivacija, Xist i Tsix preuzimaju različite sudbine na X-kromosomu koji će biti aktivan (Xa) i onome koji će se inaktivirati (Xi) (Lee i sur., 1999). Na X kromosomu koji će postati Xi povećava se transkripcija XIST gena (Panning i sur., 1997; prema Lee i sur., 1999) te se transkripti šire *in cis* s njihovog mjesta sinteze kako bi obložili čitav kromosom i uspostavili transkripcijsko utišavanje. Inaktivacija je u ovoj fazi reverzibilna, zahtjeva kontinuiranu Xist ekspresiju i još nije povezana s drugim obilježjima inaktivacije kao što su hipoacetilacija histona i kasna replikacija (Chow i sur., 2005). Istovremeno s procesom prekrivanja kromosoma sa Xist RNA molekulom, TSIX gen je utišan na Xi kromosomu (Lee i sur., 1999). Suprotno tome, povećane količine Tsix transkripta na Xa kromosomu suprimiraju gen Xist. Jača ekspresija TSIX i slabija ekspresija XIST gena je i dalje prisutna na Xa kromosomu u kratkom razdoblju nakon što je utišavanje Xi završeno te se s vremenom gasi (Lee i sur., 1999). Xist RNA oblaže Xi kromosom kroz sve kasnije diobe stanica, čime pridonosi održavanju utišavanja.

3.1. DJELOVANJE I REGULACIJA XIST I TSIX RNA MOLEKULA

Za pokretanje utišavanja XIST gen mora biti eksprimiran tijekom prvih 48 sati diferencijacije. Nakon 72 sata diferencijacije, nastavak utišavanja više nije ovisan o ekspresiji

XIST gena (Wutz i Jaenisch, 2000; prema Avner i Heard, 2001) i stječe se cijeli niz sekundarnih inaktivacijskih karakteristika. Njegovo djelovanje razvojno je ograničeno - indukcija u različito vrijeme tijekom razvoja dovodi do promjenjivog širenja i stabilnost inaktivacije, dok u kasnijim fazama diferencijacije oblaganje kromosoma Xist RNA molekulom više ne može izazvati inaktivaciju (Chow i sur., 2005). To navodi na zaključak da je utišavajući partner Xist-a prisutan samo u određenom razdoblju ili da je kromatin osjetljiv na Xist-posredovanu inaktivaciju samo tijekom ranog razvoja (Heard, 2005) zbog čega je pravilna prostorna i razvojna regulacija Xist ekspresije ključna.

U povećanju ekspresije XIST gena glavnu ulogu igraju transkripcijski i post-transkripcijski mehanizmi. Kvantitativni RT-PCR i „slot blot“ eksperimenti pokazali su razliku od 10 do 20 puta veće količine Xist RNA u ES stanicama u odnosu na ženske somatske stanice (Plath i sur., 2002). Također, u nediferenciranim ES stanicama RNA produkt se brzo razgrađuje i može se otkriti samo u malim količinama. Kako diferencijacija napreduje, u ženskim stanicama dolazi do stabilizacije Xist RNA na jednom od dva X kromosoma (Panning i sur., 1997; prema Lee i sur., 1999). Zreli Xist transkript u somatskim stanicama ima i 10 do 20 puta dulje vrijeme polu-života nego što je ono u embrionalnim stanicama (Panning i sur., 1997; prema Plath i sur., 2002). Ovakvo povećanje polu-života Xist RNA moglo bi se postići promjenama u samom Xist transkriptu ili promjenama u faktorima koji reguliraju njegovu stabilnost. Nekoliko istraživačkih skupina je ispitivalo mogućnost proizvodnje alternativnog transkripta koji posjeduje veću stabilnost (Plath i sur., 2002). Analize uz pomoću RT-PCR su pokazale da je glavni obrazac procesiranja RNA isti u ES stanicama i ženskim somatskim stanicama, (Panning i sur., 1997; prema Plath i sur., 2002) sugerirajući da u tom procesu tijekom utišavanja nema značajnih promjena. Ipak, alternativno procesiranje ovako velikog RNA transkripta teško je detektirati. Bio je predložen i atraktivan model u kojem bi se Xist transkripti mogli prepisivati s različitih promotora u nediferenciranim i diferenciranim stanicama (Johnston i sur., 1998; prema Plath i sur., 2002). Transkript s P1 somatskog promotora bi mogao biti urođeno stabilan, dok bi alternativni embrionalni promotor P0, koji se nalazi 6,6 kb uzvodno, mogao biti odgovoran za proizvodnju nestabilnih transkripta. Prilikom diferencijacije, diferencijalno korištenje P0 i P1 promotora na budućem Xi bi mogao pokrenuti proizvodnju stabilnog Xist transkripta. Međutim, kasnije studije nisu uspjele otkriti Xist transkripciju s P0, dok su se P1 transkripti pokazali nestabilni u ES stanicama, isključujući prethodnu hipotezu (Warshawsky, Stavropoulos, Lee, 1999; prema Plath i sur., 2002). Povećanje polu-života transkripta bi

moglo biti pod kontrolom razvojno regulirane proizvodnje faktora koji stabiliziraju RNA *in trans*. Visoka razina Xist RNA molekula proizvedena sa cDNA transgena u ES stanicama ima vrijeme polu-života ekvivalentno Xist RNA u somatskim stanicama i može obložiti i utišati kromosom *in cis* (Plath i sur., 2002). Ovi rezultati ukazuju na to da Xist RNA može sama regrutirati faktore potrebne za vlastitu stabilizaciju u ES stanicama.

Tijekom razdoblja u kojem stabilna Xist RNA inicira utišavanje na Xi kromosomu, Xa kromosom nastavlja ekspresiju TSIX gena i nestabilnog Xist transkripta (Lee i sur., 1999). ES stanice s delecijom veličine 65 kb koja uključuje TSIX promotor proizvode veće količine Xist transkripta (Clerc i Avner, 1998; prema Lee i sur., 1999). Tsix može na transkripciju Xist RNA djelovati negativno putem vlastite transkripcije preko istog lokusa, antisense u odnosu na XIST. Tako sprječava efikasnu transkripciju sa XIST gena i smanjuje količinu funkcionalnih Xist RNA. Druga mogućnost je da sam Tsix transkript može utjecati na količinu Xist RNA aktivnom destabilizacijom Xist transkripata ili sprječavanjem da ti transkripti postanu u potpunosti aktivni (Plath i sur., 2002). Procesirani oblik Tsix RNA sadrži samo 2 kb dugo preklapanje sa zrelim Xist transkriptom unutar Xist domene ključne za utišavajuću aktivnosti (Sado i sur., 2000; prema Plath i sur,. 2002). Jedna mogućnost je da Tsix / Xist dupleks stimulira dvolančanu RNA-posredovanu razgradnju oba transkripta. Druga mogućnost je da Tsix transkripti ometaju Xist RNA smatanje, stvaranje kompleksa Xist ribonukleoproteina ili *cis*-širenje duž Xi kromosoma.

Iako Tsix RNA destabilizira transkripciju sa XIST gena *in cis*, ona nije strogo potrebna za blokiranje Xist RNA posredovanog utišavanja tijekom diferencijacije. Dokaz tome je da velika većina muških stanica bez Tsix funkcije i dalje održava svoj jedini X kromosom u aktivnom stanju (Plath i sur., 2002). Prema tome, moguće je da postoji blokirajući faktor neovisan od Tsix koji spriječava povećanje razine Xist RNA na Xa kromosomu.

Razlike u metilaciji promotora XIST na Xa i Xi-kromosomima sugeriraju ulogu metilacije DNA u kontroli Xist ekspresije (Norris i sur., 1994; prema Plath i sur., 2002). XIST promotor utišanog XIST alela na Xa kromosomu u somatskim stanicama je metiliran, dok je na Xi kromosomu u somatskim stanicama i na oba X kromosoma u nediferenciranim ES stanicama manje metiliran. Fenotip mutanata za DNA metiltransferazu 1 (*Dnmt1*) pokazao je da pravilna regulacija metilacije DNA sudjeluje u održavanju aktivnog Xa. XIST promotor pokazuje iznimno niske razine metilacije DNA u nediferenciranim muškim ES stanicama, *Dnmt1* mutantama, a tijekom diferencijacije ne mijenja stupanj metilacije (Beard i sur., 1995;

prema Plath i sur., 2002). Ove stanice posjeduju normalnu ekspresiju Xist RNA i nakon diferencijacije pokazuju oblaganje i utišavanje X-vezanih gena na pretpostavljenom Xa kromosomu. Uz to, mali ali značajan postotak muških i ženskih somatskih stanica u *Dnmt1* mutiranih embrija pokazuje ektopičnu inaktivaciju X-kromosoma (Panning i Jaenisch, 1996; prema Plath i sur., 2002). Ovi rezultati upućuju na to da se metilacija DNA primjenjuje na Xa kromosomu, najvjerojatnije suprimirajući Xist transkripciju i onemogućavajući daljni proces utišavanja X-kromosoma.

4. NASUMIČNA X INAKTIVACIJA – BROJANJE I IZBOR

Dva ključna procesa nasumične inaktivacije X-kromosma su brojanje i izbor. Najranije informacije o ovim procesima dobivane su iz studija aneuploidnih i poliploidnih stanica (Lyon, 1972; prema Starmer i Magnuson, 2009). Pošto stanice s različitim autosomalnim ploidijama imaju različiti broj aktivnih X kromosoma, zaključeno je da su autosomi uključeni u proces brojanja. Diploidne stanice gotovo uvijek održavaju jedan, a tetraploidne stanice dva aktivna X kromosoma iz čega se vidi da je konačan cilj inaktivacije jedan aktivan X kromosom po diploidnom setu autosoma (Starmer i Magnuson, 2009). U nasumičnoj inaktivaciji X-kromosoma, stanice sisavaca odrede jedan X kromosom kao aktivan, a zatim provedu inaktivaciju preostalih X kromosoma. Ljudske diploidne stanice mogu onesposobili i do četiri X kromosoma kako bi stvorile omjer jednog aktivnog X kromosoma po diploidnom setu autosoma (Gartler i sur., 2006; prema Starmer i Magnuson, 2009). U normalnom slučaju, XX stanice moraju odabrati između dva ekvivalentna X kromosoma i nasumično napraviti oznaku razlikovanja na samo jednom od njih, budućem Xa kromosomu.

Najjednostavniji model za tumačenje obilježavanja jednog X kao Xa kromosoma pretpostavlja da je blokirajući faktor (tako nazvan jer sudjeluje u blokiranju inaktivacije X-kromosoma) odgovoran za stvaranje ove oznake (Lyon, 1971; prema Starmer i Magnuson, 2009). Ovaj model ukazuje na to da je inaktivacija X kromosma zadano stanje, potisnuto vezanjem blokirajućeg faktora. Budući da se broj Xa kromosoma povećava s brojem setova autosoma, količina blokirajućeg faktora mora biti određena autosomalnom ploidijom tako da svaki diploidnih skup autosoma proizvodi dovoljno blokirajućeg faktora za odabir samo jednog Xa kromosma (Plath i sur., 2002). Tijekom procesa izbora, dva X kromosoma u ženskim stanicama se natječu za ograničavajuću količinu blokirajućeg faktora (Avner i Heard, 2001).

Regija unutar Xic potrebna za posredovanje aktivnosti blokirajućeg faktora naziva se element brojanja. Interakcija blokirajućeg faktora s elementom brojanja na pretpostavljenom Xa kromosomu čini prvu molekularnu razliku između dva X kromosoma, omogućujući stanicama daljnje razlikovanje budućeg Xa od Xi kromosoma. Posljedica ove interakcije je interferencija sa Xist RNA utišavajućom funkcijom na tom kromosomu zbog čega je element brojanja osnovni *cis* element potreban za odabir Xa kromosoma (Plath i sur., 2002). Ovaj element se nalazi unutar dvodijelne domene duge 20kb i locirane 3' od XIST genaa (Clerc i Avner, 1998; prema Avner i Heard, 2001). Njezinom delecijom u XO ES stanicama dolazi do neprikladne inaktivacije jedinog X kromosoma. Iako mehanizam brojanja nije u potpunosti jasan, moguće je da uključuje metilaciju histona H3 na poziciji lizina 4 unutar XIST gena, koja je izmijenjena u toj deleciji (Chow i sur., 2005).

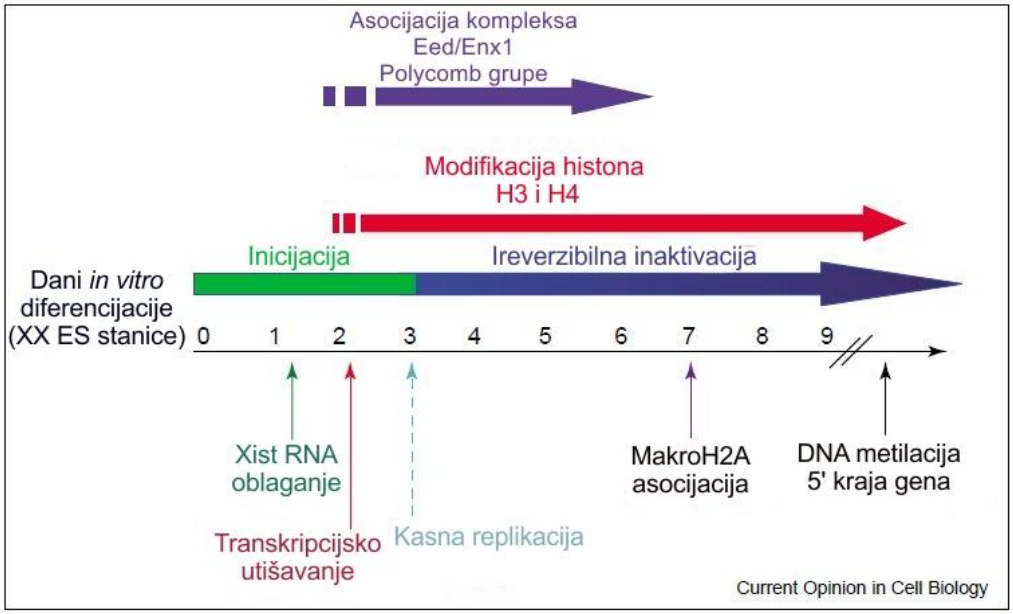
Elementi izbora djeluju *in cis* utjecanjem na afinitet elementa brojanja za interakciju s blokirajućim faktorom. Xist RNA je element izbora koji negativno utječe na vjerojatnost interakcije blokirajućeg faktora sa *cis* elementom brojanja. Ovo, za izbor negativno djelovanje, može biti lokalna manifestacija utišavajuće aktivnosti Xist ribonukleoproteinskog kompleksa djelujući na kromatinsku strukturu ili dostupnost elementa brojanja. Mutacije koje dovode do povećanja količine Xist transkripta uzrokuju preferentnu inaktivaciju kromosoma s tim mutacijama (Plath i sur., 2002). Transkripcija Tsix-a destabilizacijom Xist RNA te smanjenjem količine aktivne Xist RNA kao i količine funkcionalnih Xist kompleksa utječe na poticanje Xa stanja. Promjene u Tsix ekspresiji dovode do iskrivljenog obrasca inaktivacije. Delecije TSIX promotora rezultiraju u preferentnom utišavanju mutiranog kromosoma (Lee, 2000; prema Chow i sur., 2005), a povećana Tsix ekspresija inhibira inaktivaciju izmijenjenog X kromosoma (Stavropoulos, 2001; prema Chow i sur., 2005). Sličan efekt pokazuje i Xite, još jedna ne kodirajuća RNA čiji gen sadrži pojačivač za TSIX gen i modulira njegovu ekspresiju kao pozitivni regulator (Ogawa, Lee, 2003; prema Chow i sur. 2005). Ovi rezultati upućuju na to da Tsix u nasumičnoj X inaktivaciji sudjeluje u regulaciji izbora, ali ne i brojanja.

Mutacije koje dovode do poremećaja u brojanju uzrokuju inaktivaciju X kromosoma u muškim stanicama, ili sprječavaju utišavanje u inače normalnim ženskim stanicama. Mutacije koje uzrokuju poremećaj samo u izboru ne uzrokuju ektopičnu inaktivaciju u muškim stanicama, ali u stanicama s više X kromosoma osiguravaju inaktivaciju ili mutiranog X kromosoma u svim stanicama ili X kromosoma divljeg tipa u svim stanicama (Starmer i Magnuson, 2009). Iz toga je vidljivo da je uspješno brojanje preduvjet za izbor.

5. PROMJENE U KROMATINSKOJ STRUKTURI XI KROMOSOMA

Oblaganje X-kromosoma molekulom Xist RNA popraćeno je raznolikim modifikacijama kromatina Xi kromosoma. Brojni faktori koji djeluju *in trans* uključeni su u prevođenje Xist signala i uspostavljanje heterokromatskog stanja. Proteini Eed/Enx iz grupe Polikomb proteina prijelazno se vežu uz inaktivirajući X ubrzo nakon Xist ekspresije te su odgovorni za metilaciju histona H3 na poziciji 27 lizina (H3K27) koja predstavlja znak važan za regrutiranje faktora potrebnih za stvaranje stabilnog, inaktivnog heterokromatina (Silva i sur., 2003; prema Heard, 2005). Druge kromatinske promjene također se odvijaju ubrzo nakon pojave Xist transkripta te uključuju demetilaciju histona H3 na poziciji 4 lizina i deacetilaciju na pozicijama 9 i 27 lizina. Ove modifikacije histona prethode uspostavljanju sljedećih oznaka koje osiguravaju uspostavljanje heterokromatskog stanja (Plath i sur., 2003; prema Chow i sur., 2005). Enzimi odgovorni za navedene epigenetičke promjene nisu potpuno poznati, ali su vjerojatno dio većeg Polikomb vezanog kompleksa, koji uključuje Eed/Enx. Polikomb proteini Ring1A/B također se prijelazno vežu s inaktivirajućim X kromosomom posredujući ubikvitinizaciju histona H2A (Fang i sur., 2004; prema Chow i sur., 2005). Također, lokalizirani Xist bitan je za akumulaciju varijanata histona macro H2A1 i 2 na inaktivnom X kromosomu, odnosno za formiranje makrokromatinskog tijela (*macrochromatin body* - MCB) (Costanzi i Pehrson, 1998; prema Avner i Heard, 2001). Budući da je formiranje MBC relativno kasni događaj (pojavljuje se nekoliko dana nakon prve pojave Xist transkripata i prvih znakova inaktivacije X kromosoma), pretpostavlja se da je važnije za održavanje nego za započinjanje heterokromatinizacije (Mermoud i sur., 1999; prema Chow i sur., 2005).

Sinergističko djelovanje histonskih modifikacija, histonskih varijanti, ne-histonskih proteina i Xist RNA molekula odgovorno je za formiranje utišanog kromatina koji je jače kondenziran, odlikuje se kasnom replikacijom krajem S faze te zauzima poziciju u interfaznoj jezgri karakterističnu za utišani kromatin. Ovi mehanizmi se, osim što djeluju sinergistički, preklapaju u djelovanju kako bi održali stabilno i klonalno nasljedno utišano stanje (Cszankovski i sur., 2001; prema Heard, 2005). Kinetika ovih događaja je prikazana na slici 1.



Slika 1. Kinetika inaktivacije X kromosoma u ES stanicama žene tijekom diferencijacije. Prikazana su vremena pojave različitih događaja koji karakteriziraju nasumičnu inaktivaciju X kromosoma. Naznačene su najranije vremenske točke u kojima se ove promjene mogu detektirati, kao i vremenski periodi koji odgovaraju fazi Xist RNA ovisne inicijacije i fazi Xist RNA neovisne ireverzibilne inaktivacije. Preuzeto iz Heard, 2004.

Metilacija DNA se čini iznimno važna za stabilnost i održavanje utišavanja gena na X kromosomu. Primjena DNA demetilirajućih agensa na ljudske hibridne somatske stanice koje sadrže Xi kromosom u uvjetima *in vitro* rezultira reaktivacijom više gena (Mohandas i sur., 1981; prema Plath i sur., 2002). Kada se slična istraživanja provedu na mišjim somatskim staničnim linijama, dolazi i do 20-erostrukog povećanja reaktivacije X-vezanih gena (Csankovszki i sur., 2001; prema Plath i sur., 2002). Još veći učinak je zabilježen nakon delecije Dnmt1 gena što rezultira cjelogenomskom hipometilacijom koja dovodi do 1500-erostrukog povećanja reaktivacije X-vezanih GFP transgena (Csankovszki i sur., 2001; prema Plath i sur., 2002).

6. UTISNUTA X INAKTIVACIJA

Tijekom utisnute X inaktivacije, očev X kromosom se preferentno utišava u stanicama placente (izvanembrionalno tkivo) placentalnih sisavaca i u svim stanicama tobolčara, kao što su oposumi i klokani (Avner i Heard, 2001). Utisnuta X inaktivacija rezultira odgovarajućom naknadom doze zbog stereotipnog genetičkog doprinosa roditelja embriju: majke uvijek daju X kromosom, a očevi određuju spol zigote s obzirom koji kromosom će doći u gametu (X ili Y). Stoga, ako je svaki Xp predodređen da se inaktivira (sadrži utisak), normalan ženski embrij inaktivira jedan X kromosom, a muški embrij, koji ne posjeduje Xp i nema potrebu za naknadom doze, ne utišava svoj jedini X. Utiskivanje je pod kontrolom epigenetičkih modifikacija genoma koje su uspostavljene u roditeljskim zametnim stanicama, često u obliku različite metilacije DNA na CpG dinukleotidima u *cis*-regulatornim DNA sekvencama (Avner i Heard, 2001). Utisak X-inaktivacije bi mogao biti specifičan znak poticanja utišavanja Xp u spermatociti i/ili specifična oznaka blokiranja X inaktivacije Xm kromosoma u oociti. Iako je očev X kromosom predodređen za inaktivaciju, očev utisak se može nadjačati kako bi se omogućila nadoknada doze u slučaju kada su dva očinska X kromosoma prisutni u jednoj stanici (Avner i Heard, 2001). Za razliku od ove očite reverzibilnosti utiska na očinskom X kromosomu, majčin X kromosom inicijalno nosi stabilan utisak za odupiranje inaktivaciji i ostaje aktivan i u ženskim embrijima s mutiranim alelom XIST na očinskom X kromosomu koji se stoga ne može deaktivirati (Marahrens i sur., 1997; prema Avner i Heard, 2001). Ovi embriji, zbog neuspostavljanja kompenzacije doze, umiru ubrzo nakon implantacije. Isti slučaj je i s embrijima koji su disomični za majčin X kromosom (Goto i Takagi, 1999; prema Avner i Heard, 2001). Iako su Xist i Tsix RNA važne za utisnutu inaktivaciju kod miša, zanimljivo je da tobolčari nemaju homolog XIST gena. To otvara pitanje kako se postiže utisnuta inaktivacija u tobolčara bez upotrebe Xist RNA molekula. Jedan mogući mehanizam uključuje oznake pre-utišavanja očevog X kromosoma u muškoj zametnoj lozi u procesu kojim se oba spolna kromosoma inaktiviraju tijekom mejoze. Tako bi se neaktivno stanje X kromosoma moglo prenijeti na sljedeću generaciju (Avner i Heard, 2001). S evolucijske točke gledišta, takav oblik naslijeđenog utišavanja bi jednostavno i ekonomično postigao nadoknadu doze u ženskim embrijima jer samo ženke nasljeđuju X kromosom od oca. U kasnoj fazi blastociste se te oznake uklanjaju s unutarnje stanične mase od koje će nastati embrio jer dolazi do ponovne aktivacije očinskog X kromosoma kako bi se mogla provesti nasumična inaktivacija (Chow i sur., 2005).

Utisnuto utišavanje se prvi put javlja u svim stanicama u ranom embriju placentalnih sisavaca prije implantacije u maternicu. Činjenica da evolucijski stariji sisavci, kao što su tobolčari, utišavaju samo očeve X kromosome navodi na pretpostavku da utisnuto utišavanje predstavlja evolucijski stariji oblik X inaktivacije (Graves, 1996; prema Avner i Heard, 2001). Ovaj oblik utišavanja se javlja prije pojave XIST i TSIX gena, a kasnije dovodi do evolucije nasumčnog utišavanja u placentalnih sisavaca.

Razlog evolucije nasumične inaktivacije bi mogao biti u prednosti koju ona pruža u slučaju nepovoljnih mutacija gena na majčinom X kromosomu, pri čemu postoji 50% šanse da će se defektni kromosom inaktivirati te takvi embriji imaju mozaični uzorak s obzirom na gensku ekspresiju, dok će u utisnutoj inaktivaciji takav kromosom uvijek ostati aktivan što može biti presudno za vijabilnost embrija.

7. ZAKLJUČCI

Središnja uloga u epigenetičkom procesu inaktivacije X kromosoma pripada Xist RNA molekuli, kontroli XIST gena i slijedu događaja koji se odvijaju nakon njegove ekspresije. Zbog iznimne važnosti odvijanja ovog procesa za pravilan razvoj jedinke postoje brojni mehanizmi koji osiguravaju njegovo uspješno odvijanje te održavanje utišanog stanja X-kromosoma. Ti mehanizmi su predmet intenzivnih istraživanja kako bi dobili što jasniji i detaljniji pogled u proces uspostavljanja stabilnog utišanog stanja. Oni obuhvaćaju neke bitne i evolucijski sačuvane sustave primjerice Polikomb proteine i modifikacije histona koje srećemo u brojnim drugim epigenetičkim procesima, kao i zamjene uobičajenih histona histonskim varijantama i najbitnije – korištenje nekodirajućih RNA Xist i Tsix u regulaciji i pružanju primarnog signala za proces utišavanja. Iako nisu poznati svi detalji, djelovanje, regulacija i međusobne interakcije ovih RNA molekula tijekom brojanja i izbora jedan su od najuzbudljivijih aspekata čitavog procesa utišavanja X kromosoma. Također, vrlo je zanimljiv i aspekt evolucije ovog procesa od utisnutih prema složenim nasumičnim mehanizmima, njihove sličnosti i razlike.

Daljnjim istraživanjem i boljim razumijevanjem ovog procesa omogućava se razumjevanje svih epigenetičkih procesa, a takva saznanja imaju veliku praktičnu primjenjivost. Ipak, na putu do potpunog razumjevanja svih molekularnih mehanizama koji usmjeravaju X kromosom u dvije različite sudbine preostaju još mnogi izazovi.

8. LITERATURA

Avner, P. i Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: Counting, choice and initiation. *Nature Reviews Genetics* 2, 59–67

- Costanzi, C. & Pehrson, J. R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599–601
- Goto,Y. & Takagi, N. (1999) Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental imprinting. *Chromosome Res.* 7, 101–109
- Graves, J. A. (1996) Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Annu. Rev. Genet.* 30, 233–260
- Marahrens, Y., Panning, B., Dausman, J., Strauss, W. &Jaenisch, R. (1997) Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* 11, 156–166
- Wutz, A. & Jaenisch, R. (2000) A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol. Cell* 5, 695–705

Brown, C. J. i sur. (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349, 38–44

Brown, C. J. i sur. (1991) Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* 349, 82 – 84

Cheng, M. K. i Disteche, C. M. (2004) Silence of the fathers: Early X inactivation. *BioEssays* 26, 821–824

- Mak W, et al. (2004) Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303, 666–669

Chow, J.C., Yen, Z., Ziesche, S. M. i Brown, C. J. (2005) Silencing of the mammalian X chromosome *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 69–92

- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y. (2004) Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X-inactivation. *J. Biol. Chem.*279, 52812–15
- Lee, JT. (2000) Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects at Tsix. *Cell* 103, 17–27
- Ogawa Y, Lee JT. (2003) *Xite*, Xinactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Mol. Cell*. 11, 731–43
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, i sur. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300, 131–35
- Stavropoulos N, Lu N, Lee JT. (2001) A functional role for *Tsix* transcription in blocking *Xist* RNA accumulation but not in X-chromosome choice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10232–37

Heard, E. (2005) Epigenetics of the inactive X chromosome. *Curent opinion in Genetics & Development* 15, 482-489

- Cszankovski G., Nagy A., Jaenisch R. (2001) Synergysm of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153, 773-784
- Silva J. i sur. (2003) Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transiet recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev. Cell* 4, 481-495

Lee, J.T., Davidow, L.S., Warshawsky, D. (1999) *Tsix*, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation centre. *Nature Genetics* 21, 400–404

- Clemson, C.M., McNeil, J.A., Willard, H., Lawrence, J.B. (1996) XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: Evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* 132, 259–275
- Lee J.T., Strauss W.M., Dausman J.A., Jaenisch R.(1996) A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell* 86, 83–94
- Panning, B., Dausman, J. & Jaenisch, R. (1997) X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* 90, 907–916

Lyon, M. F. (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373

Penny, G. D. i sur. (1996) Requirement for *Xist* in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131–137

- Brown, C. J. i sur. (1992) The human *XIST* gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 71, 527−542
- Rastan S, Robertson EJ. (1985) X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. J Embryol Exp Morphol 90, 379-388

Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D. A., Panning, B. (2002) Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. Annu. Rev. Genet. 36, 233–78

- Beard C, Li E, Jaenisch R. (1995) Loss of methylation activates *Xist* in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* 9, 2325–34
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. (2001) Synergism of *Xist* RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* 153, 773–84
- Johnston, C. M. i sur. (1998) Developmentally regulated Xist promoter switch mediates initiation of X inactivation. *Cell* 94, 809–817
- Kay GF, Penny GD, Patel D, Ashworth A, Brockdorff N, Rastan S. (1993) Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. Cell 72, 171–82
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. 1981. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211, 393–96
- Norris DP, Patel D, Kay GF, Penny GD, Brockdorff N, i sur. (1994) Evidence that random and imprinted *Xist* expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* 77, 41–51
- Panning, B., Dausman, J. & Jaenisch, R. (1997) X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* 90, 907–916
- Panning B, Jaenisch R. (1996) DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev.* 10, 1991–2002
- Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E. (2000) X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. Dev. Biol. 225, 294–303
- Warshawsky D, Stavropoulos N. i Lee J. T. (1999) Further examination of the Xist promoter-switch hypothesis in X inactivation: evidence against the existence and function of a P0 promoter. Proc. *Natl Acad. Sci. USA* 96, 14424–14429

Starmer, J. i Magnuson, T. (2009) A new model for random X chromosome inactivation. *Development* 136, 1-10

- Gartler, S. M., Varadarajan, K. R., Luo, P., Norwood, T. H., Canfield, T. K. and Hansen, R. S. (2006) Abnormal X: autosome ratio, but normal X chromosome inactivation in human triploid cultures. *BMC Genet*. 7, 41
- Lyon, M. F. (1972) X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 47, 1-35.
- Lyon, M. F. (1971) Possible mechanisms of X chromosome inactivation. *Nature New Biol.* 232, 229-232

9. SAŽETAK

Inaktivacija X kromosoma je složeni epigenetički proces koji dovodi do utišavanja jednog od dva X kromosoma u somatskim stanicama ženki sisavaca s ciljem kompenzacije doze X vezanih gena među spolovima. Glavnu ulogu u ovom procesu ima Xic regija na X kromosomu. Ona sadrži XIST gen s kojeg se transkribira glavni signal za utišavanje - nekodirajući Xist RNA transkript. Proces utišavanja X-kromosoma se odvija u nekoliko koraka i obuhvaća uzajamnu interakciju nekodirajućih molekula RNA Xist i Tsix, različitih modifikacije histona, metilacije DNA, i drugih mehanizama u regulaciji transkripcije gena. Prilikom inaktivacije X kromosom se pakira u kompaktnu kromatinsku strukturu koja se održava kroz daljnje stanične diobe. Dva oblika inaktivacije X kromosoma su nasumični i utisnuti. Prilikom utisnutog načina inaktivacije X kromosoma za utišavanje je uvijek predodređen X kromosom naslijeđen od oca, dok se prilikom nasumične inaktivacije mehanizmima brojanja i izbora nasumično odabire bilo majčinski ili očinski kromosom za inaktivaciju. Točnije, pomoću blokirajućeg faktora, na jednom od X kromosoma se onemogućava inaktivacija, dok se preostali X kromosom(i) inaktivira(ju) kako bi se postigao omjer jednog aktivnog X kromosoma po diploidnom setu autosoma u stanici. Utisnuta inaktivacija se odvija kod tobolčara te u izvanembrionalnom tkivu placentalnih sisavaca, dok se u stanicama embrija placentalnih sisavaca odvija nasumična inaktivacija.

10. SUMMARY

X chromosome inactivation is a complex epigenetic process that leads to silencing of one of two X chromosomes in somatic cells of female mammals in order to compensate dosage of X-related genes between the sexes. Major role in this process belongs to Xic region of X chromosome. It contains the XIST gene from which the main signal that drives silencing is transcribed - noncoding Xist RNA transcript. Implementation of silencing occurs in several steps and involves the mutual interaction of non-coding antisense RNA Xist and Tsix, DNA methylation, histone modifications, and other mechanisms for regulation of transcription. The result is condensation of the X chromosome and formation of compact chromatin structure that is maintained through further cell division. Two forms of X chromosome inactivation are random inactivation and imprinted inactivation. In the imprinted mode the X chromosome inherited from the father is predisposed for silencing, while in the random mode mechanism of counting and choice randomly selects either the maternal or paternal chromosome for inactivation. Specifically, by using a blocking factor on one of the X chromosomes, it prevents its inactivation, while the remaining X chromosome(s) inactivate in order to achieve a ratio of one active X per diploid set of autosomes in cell. Imprinted inactivation occurs in marsupials and extra-embryonic placental mammalian tissues, whereas in cells of placental mammalian embryos random inactivation occurs.