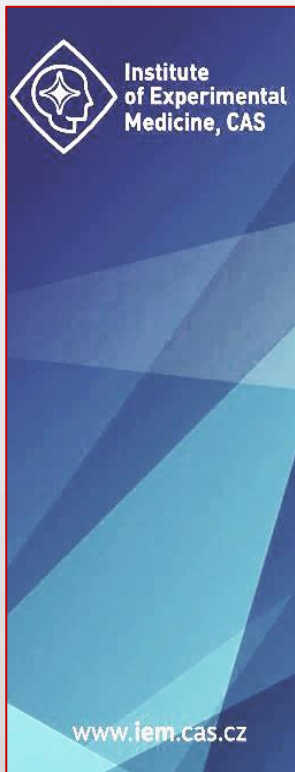


Význam epigenetické adaptace pro redukci negativních dopadů expozice ze znečištěného prostředí

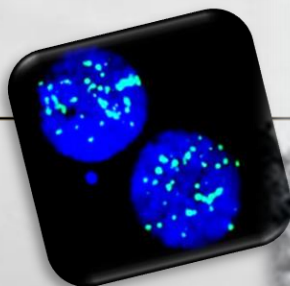
(poznatky z let 2005 – 2022)



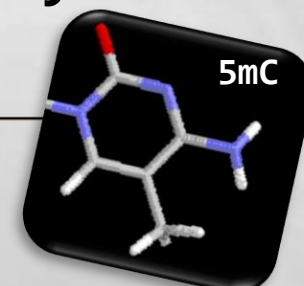
Mgr. Andrea Rössnerová, Ph.D.

Ústav experimentální medicíny, AV ČR, v.v.i.
Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Oddělení genetické toxikologie a epigenetiky



E-mail: andrea.rossnerova@iem.cas.cz



Komise pro životní prostředí AV ČR, 28.11. 2022, Národní 3, Praha 1

OBSAH PREZENTACE

- 1. ADAPTACE OBECNĚ
- 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022
 - VÝSLEDKY CYTOGENETICKÝCH STUDIÍ
 - VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ – BIOLOGICKÝCH STUDIÍ
 - Z PROJEKTU HAIE
- 3. ADAPTACE „VĚDECKY“ – CO JE ZNÁMO
- 4. EPIGENETICKÁ ADAPTACE – KAM JSME DOŠLI



1. ADAPTACE OBECNĚ

Obecná definice:

Adaptace = proces, při němž se daný organismus přizpůsobuje vnějším podmínkám a dalším faktorům, které panují v areálu jeho výskytu, s hlavním cílem - **přežít a udržet daný druh do dalších generací.**



Mimikry - Kamufláž - Biotop - Teplota - Potrava...

• 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

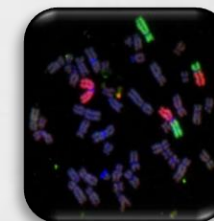
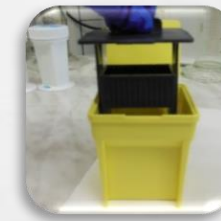
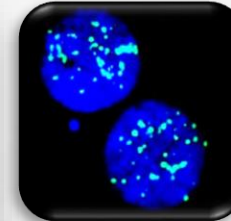
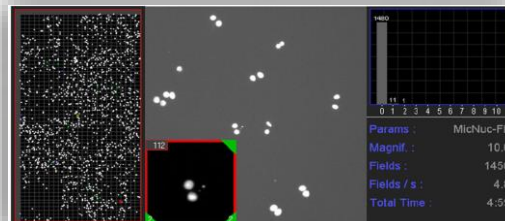
VÝSLEDKY CYTOGENETICKÝCH STUDIÍ

Metodiky

1A. Analýza mikrojader (MN): automatická obrazová analýza (celková MN)

1B. Analýza mikrojader: vizuální analýza + analýzou centromer (celková, CEN+ a CEN- MN)

2. Metoda FISH: barvení vybraných chromozomů (zejména stabilní translokace...)

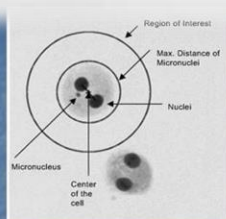


Metafer

Systém pro automatickou obrazovou analýzu

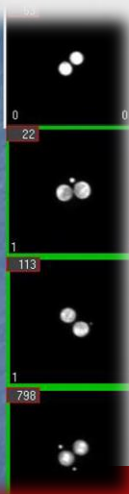
Giemsa a DAPI barvení

Rychlost

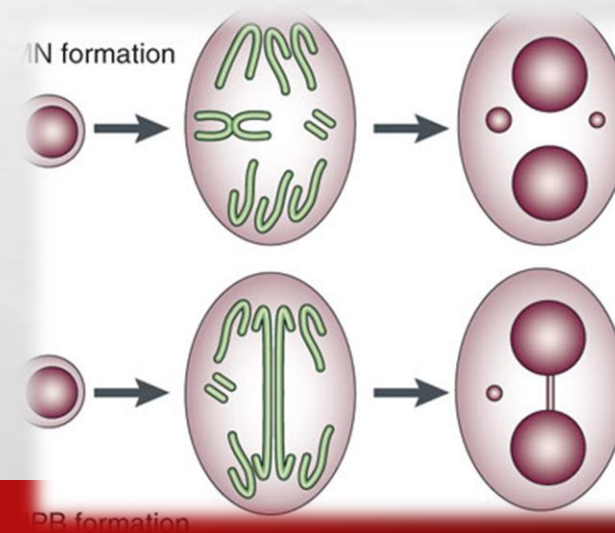
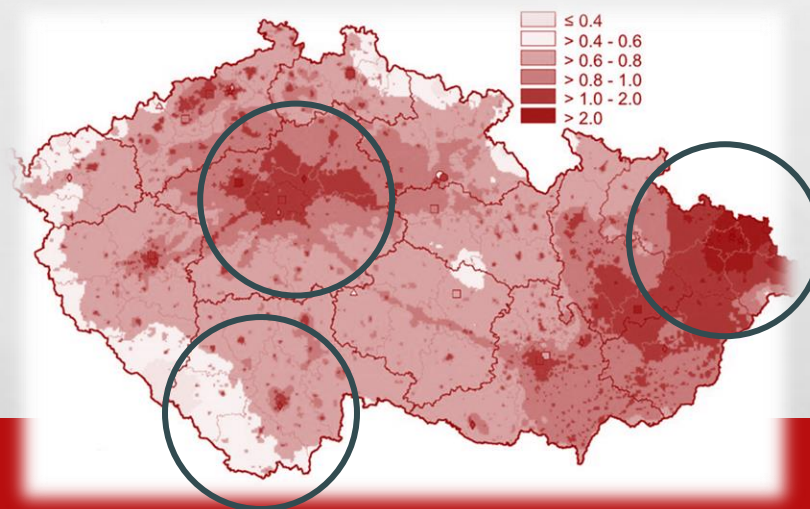


D. Varga 2004

Klasifikátor umožňuje na základě přednastavených parametrů vyhledávat dvoujaderné buňky s mikrojádry a bez nich



Lokality

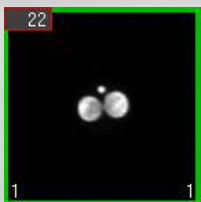
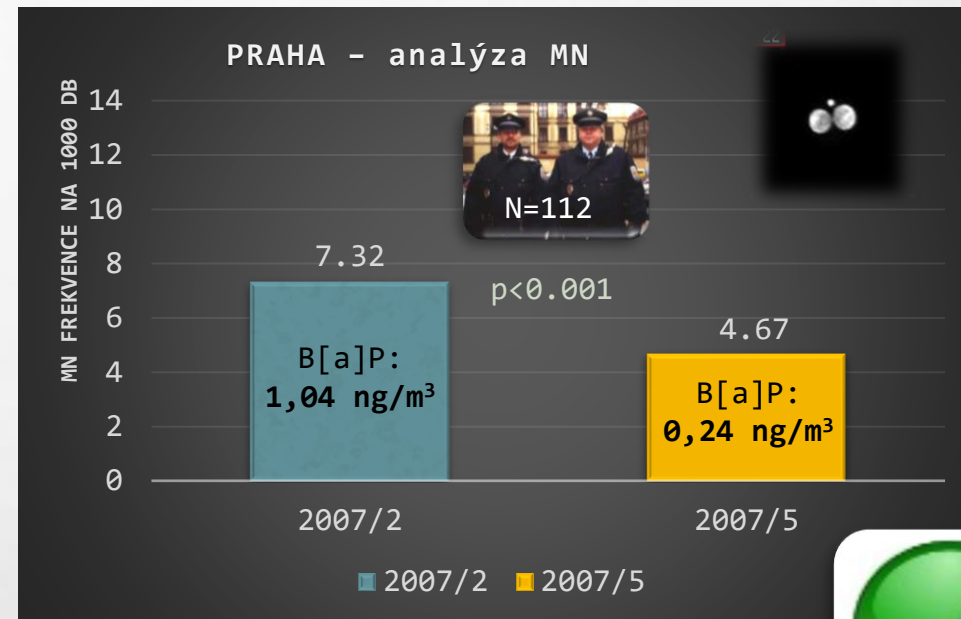
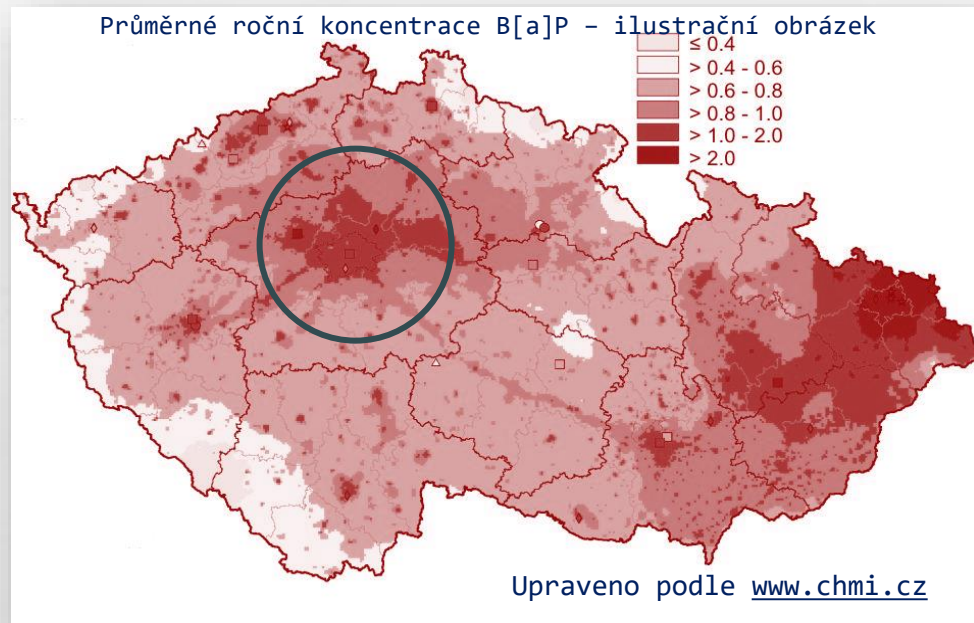


Průměrné roční koncentrace B[a]P, ilustrační obr. (Upraveno podle www.chmi.cz)

2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY CYTOGENETICKÝCH STUDIÍ

1. STUDIE – PRAHA: ANALÝZA MN – 2/2007, 5/2007



• VÝSLEDKY **V SOULADU S** HYPOTÉZOU

(NIŽŠÍ EXPOZICE = NIŽŠÍ FREKVENCE POŠKOZENÍ)

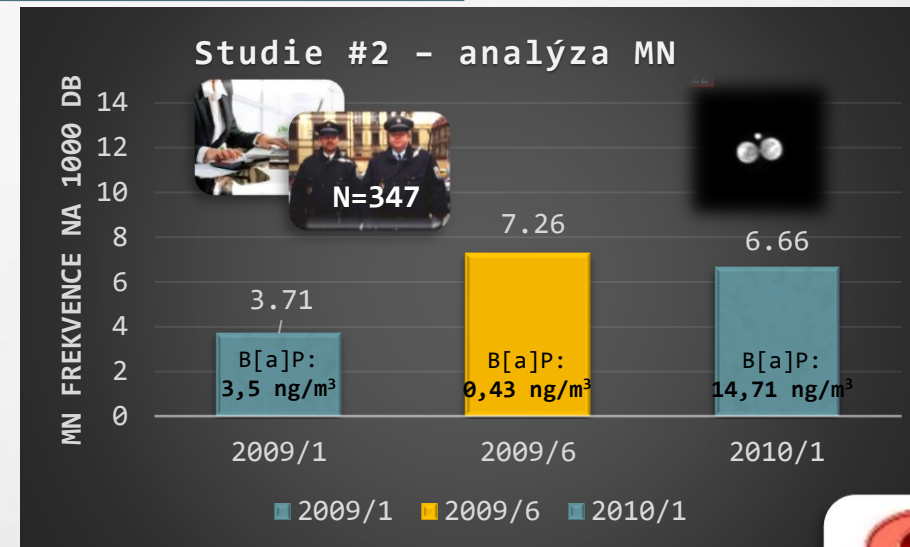
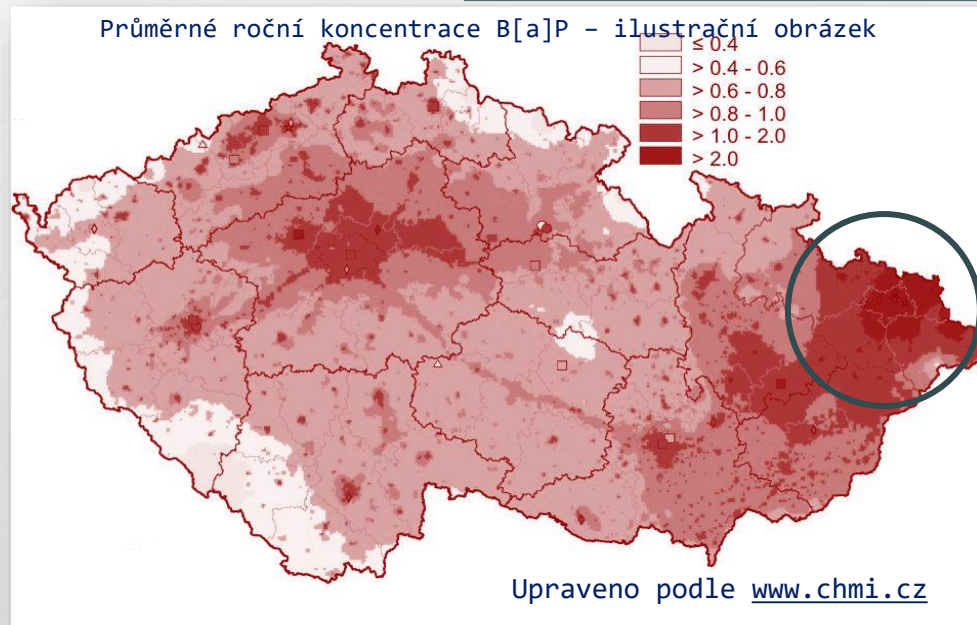
- Citlivost při nízkých personál. exp.: B[a]P: 0,24 – 1,04 ng/m³
- Vliv sezonní variability znečištění



2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY CYTOGENETICKÝCH STUDIÍ

2. STUDIE – OSTRAVA: ANALÝZA MN – 1/2009, 6/2009, 1/2010



• VÝSLEDKY **V ROZPORU** S HYPOTÉZOU

(NIŽŠÍ EXPOZICE = VYŠŠÍ FREKVENCE POŠKOZENÍ)

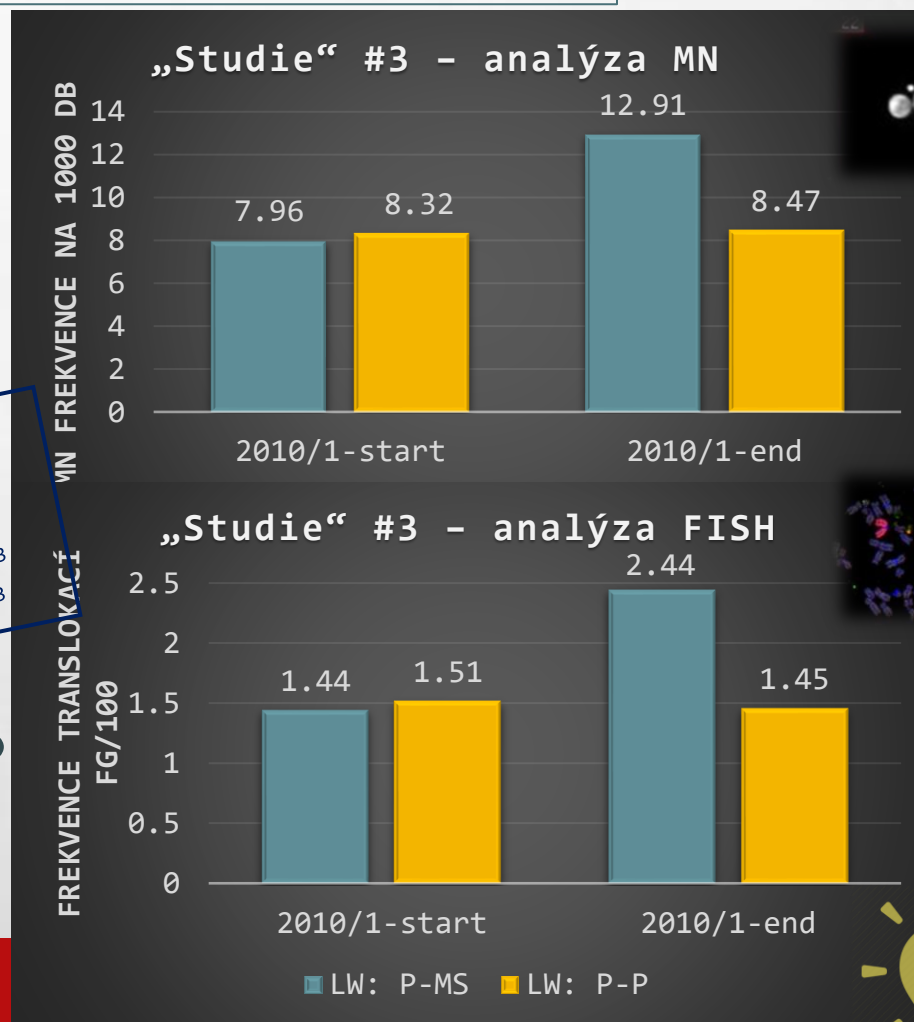
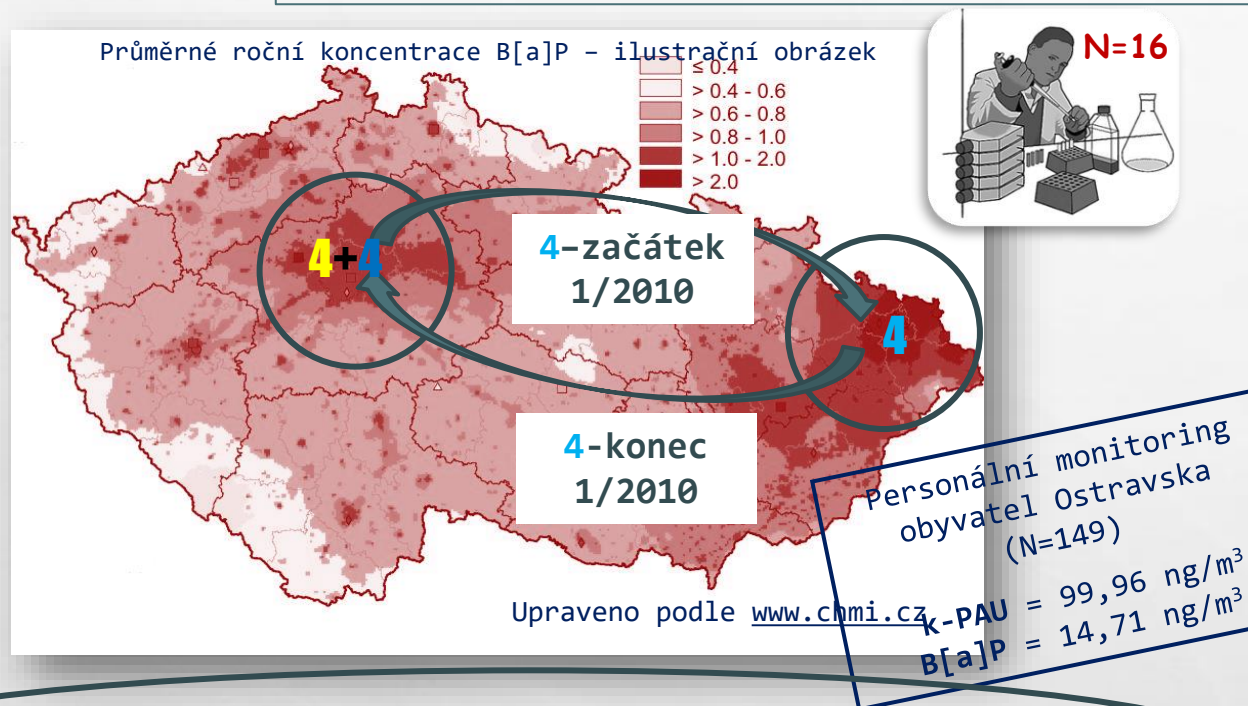
- V letním období s nejnižšími koncentracemi B[a]P: 0,43 ng/m³ jsou frekvence MN nejvyšší
- Vliv sezonní variability znečištění má opačný trend

#2 Rossner Jr. et al., Mutagenesis 28 (2013) 97-106.

2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY CYTOGENETICKÝCH STUDIÍ

3. („STUDIE“) EXPERIMENT – PRAHA-OSTRAVA-PRAHA: ANALÝZA MN a FISH – 1/2010 (3 týdny)

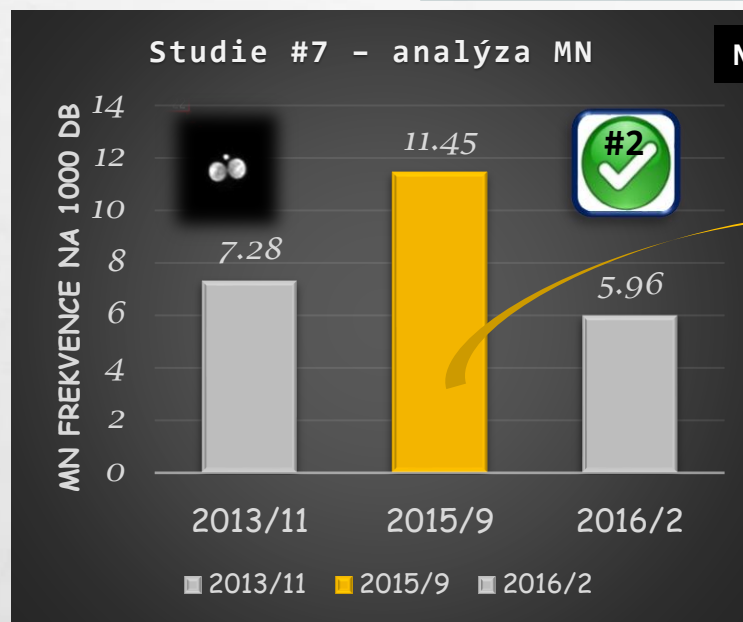


- Cca 50% nárůst poškození potvrzen u osob které **ZMĚNILY** prostředí (akutní expozice).
- Potvrzeno analýzou MN a FISH (hodnoceny vysoké počty buněk).
- Proč? Co je jinak? Adaptace obyvatel na prostředí? Jak to funguje?

• 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

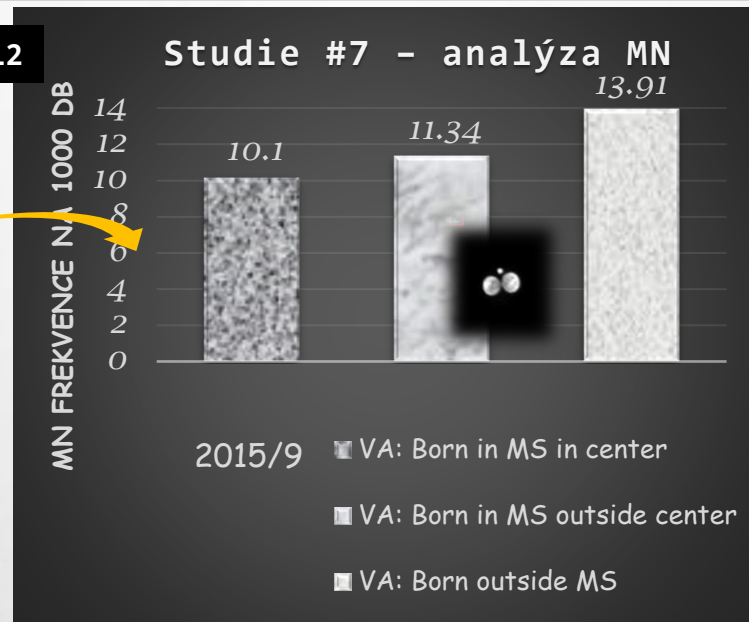
VÝSLEDKY CYTOGENETICKÝCH STUDIÍ

4. STUDIE – Zpět do OSTRAVY: analýza MN vs. původ



5.45 ng/m³ 0.86 ng/m³ 3.50 ng/m³

B[a]P koncentrace – personální monitoring



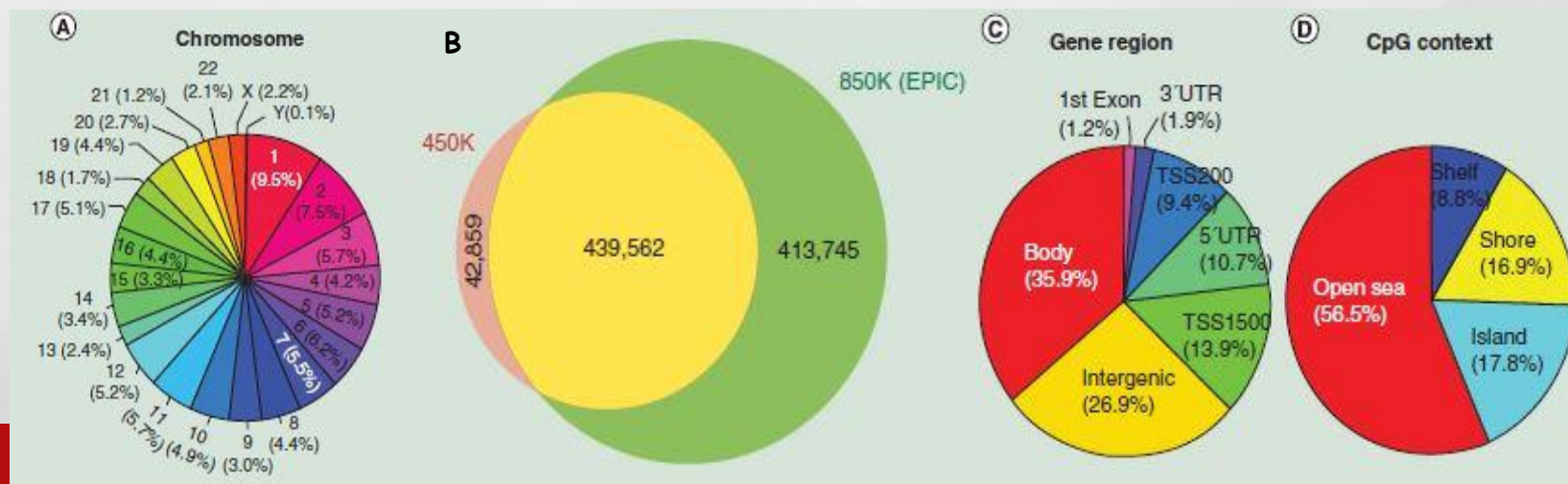
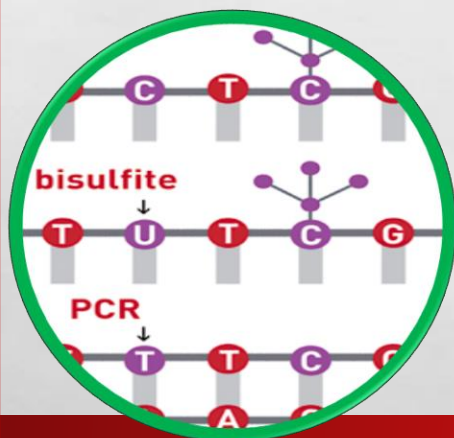
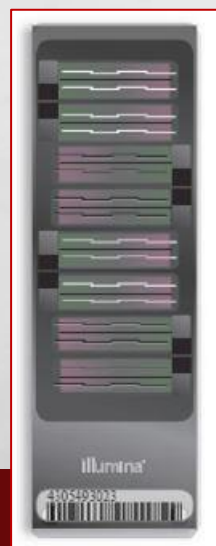
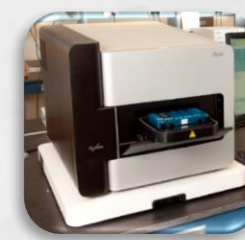
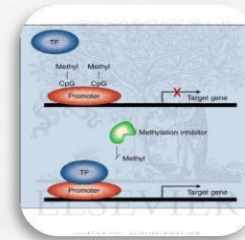
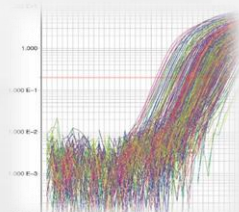
- Výsledky potvrdily trendy poškození DNA zjištěné ve studii #2 a naznačily význam „místa narození“ pro budoucí citlivost DNA k jejímu poškození v průběhu života.
- Je zde souvislost s předchozí expozicí a expozicí v období prenatálního vývoje. Význam PAR!
- Osoby narozené v Ostravě jsou lépe adaptované na znečištěné ovzduší. Mechanismus – epigenetická adaptace???

• 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ - BIOLOGICKÝCH STUDIÍ

Metodiky

1. Transkriptomické: genová exprese (celogenomová-array, individuální geny-RT PCR)
2. Epigenetika: metylace DNA (array pro 27K a 850K CpG)

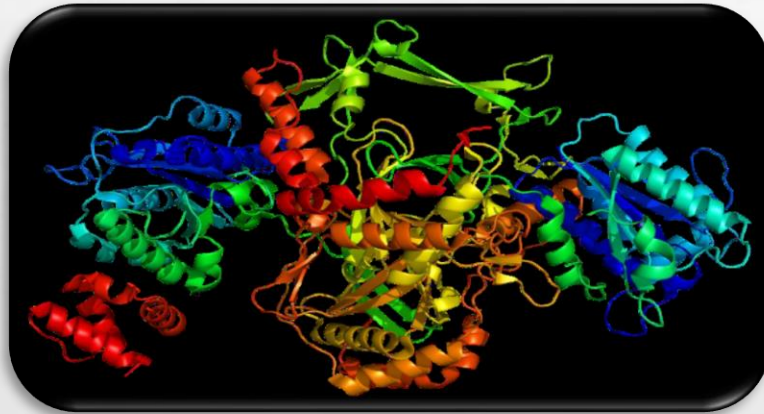


• 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ - BIOLOGICKÝCH STUDIÍ

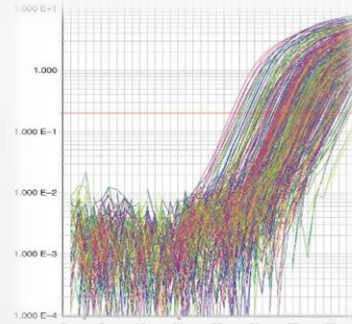
N = 139 (qRT-PCR)
N = 466 (čipy)

5. + 6. STUDIE – OSTRAVA x PRAHA: porovnání GENOVÉ EXPRESE

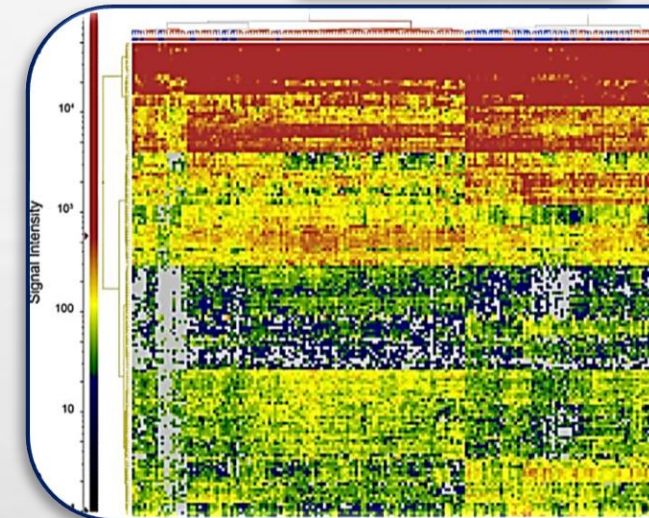
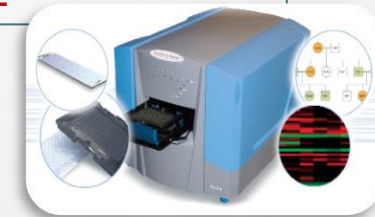
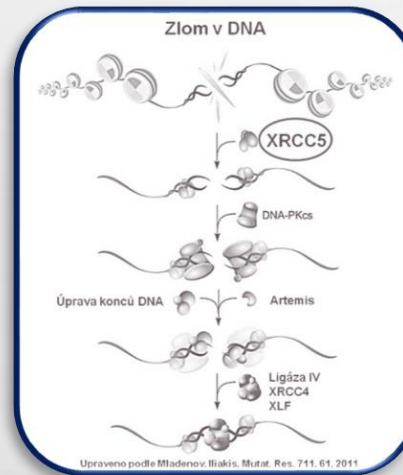


- XRCC5 gen koduje protein Ku80 – význam při reparaci (NHEJ)
- **Eprese XRCC5 je ve vzorcích z Ostravy nad medianem**

"Zjistili jsme, že u lidí žijících v Ostravě vykazuje jeden z reparačních genů, které zajišťují opravu DNA, vyšší aktivitu než u Pražanů," říká Pavel Rössner z Ústavu experimentální medicíny Akademie věd.



NHEJ



- **Signifikantní rozdíly v GE mezi regiony.**

Vědci už díky Nohavicovi vědí, jak říkat genu proti smogu

Ostragen

23. listopadu 2011 14:57

Písníkář a skladatel Jaromír Nohavica možná vymyslel pojmenování pro gen, jehož větší aktivita zajišťuje lidem na Ostravsku lepší obranu před smogem. Zatímco dosud vědci používali zavedený odborný název XRCC5, díky Nohavicovi mluví o Ostragenu.

#5 P. Rossner Jr. a kol.: Mutat. Res. 713 (2011) 76-82.

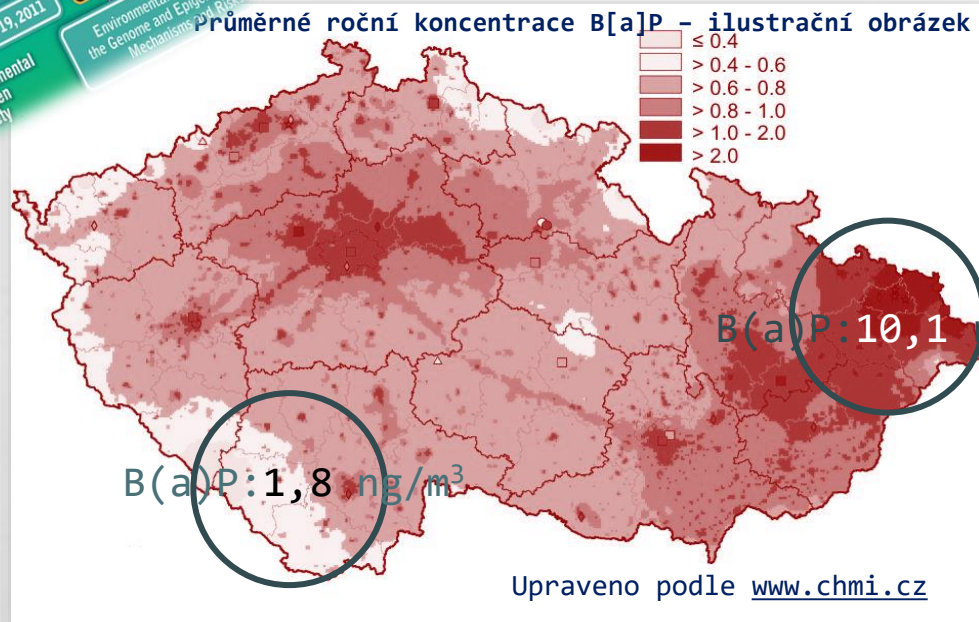
#6 P. Rossner Jr. a kol.: Mutat. Res. 780 (2015) 60-70.

• 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ - BIOLOGICKÝCH STUDIÍ

7. STUDIE - OSTRAVA x PRACHATICKO: porovnání METYLACE DNA

3/2010



N=200



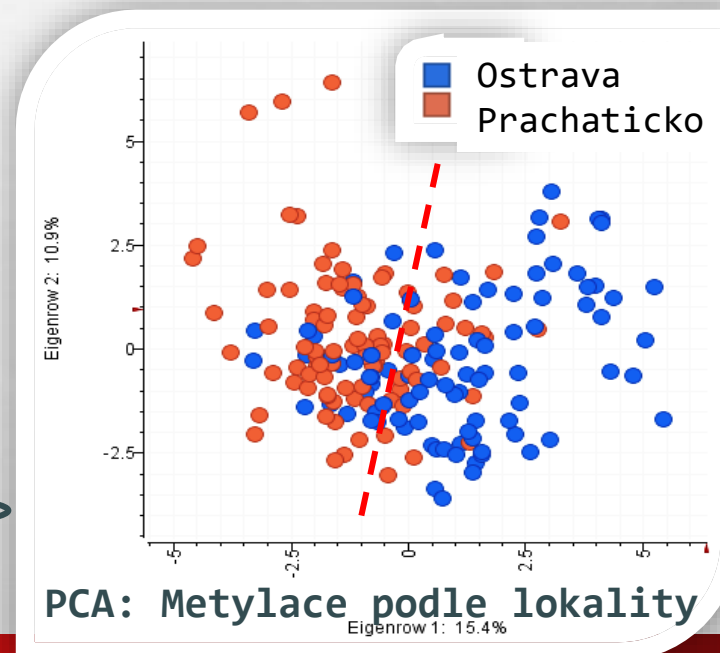
Metylce DNA může řídit funkci genů

METYLACE DNA

OFF

ON

GENOVÁ EXPRESE



- Array - Illumina Infinium Human Methylation 27K BeadChips pro stanovení až 27 578 CpG ve více než 14 000 genech
- **PROKÁZÁNY VÝZNAMNÉ ROZDÍLY V METYLACI DNA MEZI LOKALITAMI**
- 9961 Signifikantně rozdílně metylovaných míst (58 CpG velmi významné rozdíly).

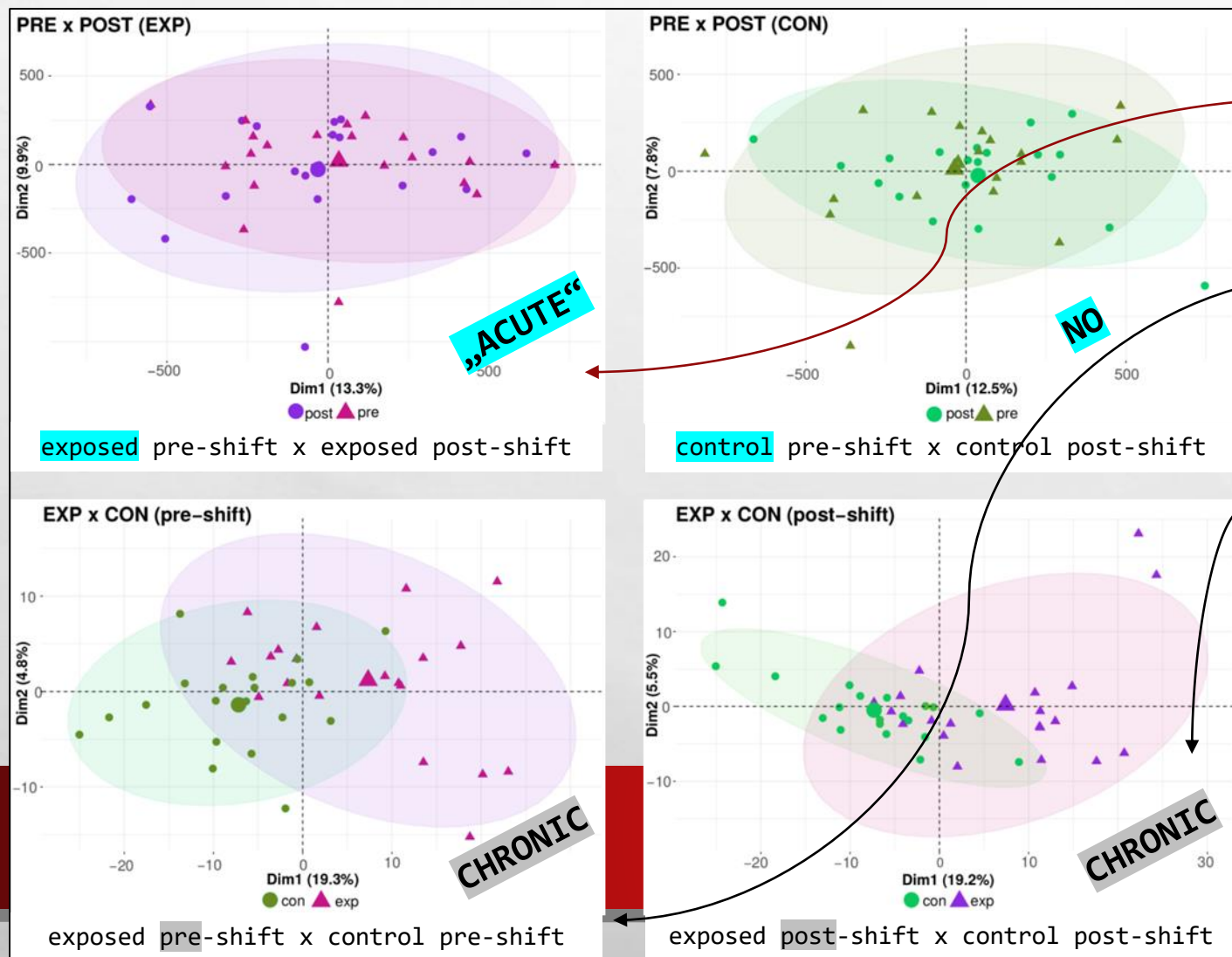
#7 Rossnerova et al., Mutat. Res. (2013) 741-742, 18-26.

2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ - BIOLOGICKÝCH STUDIÍ

8. STUDIE: ANALÝZA METYLACE DNA - expozice nanočásticím

DNA metylační profily u osob exponovaných nanočásticím v rámci pracovních aktivit (vs. kontroly) – odběry 2018.



- Akutní expozice (krátkodobá, den) bez změn v metylačním vzoru DNA.
- Chronická expozice (dlouhodobá, roky) signifikantní změny v metylaci DNA.



341 CpG míst hypometylovaných
364 CpG míst hypermetylovaných

- Změny v genech souvisejících s:
 - metabolismem lipidů
 - imunitním systémem
 - plicními funkcemi
 - signálními drahami
 - nádorovými onemocněními
 - detoxifikací xenobiotik

#8 Rossnerova, A. & Honkova, K.
et al. IJMS 2020, 21, 2420.

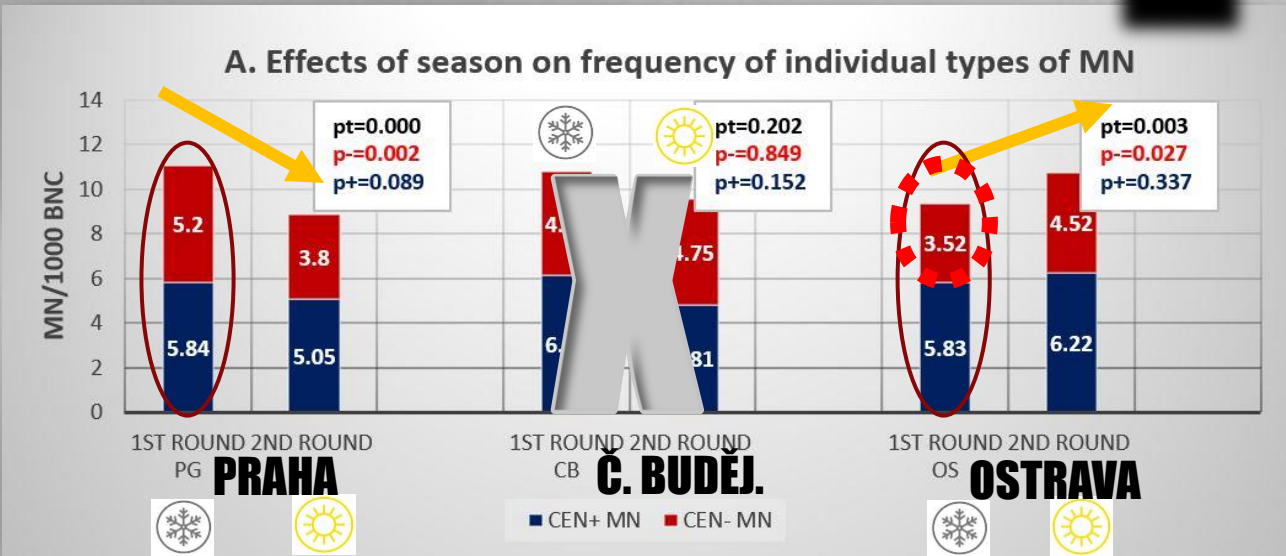
2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

Z PROJEKTU HAIE

9. STUDIE: ZPĚT K CYTOGENETICE – analýza typu poškození v lokalitách a obdobích

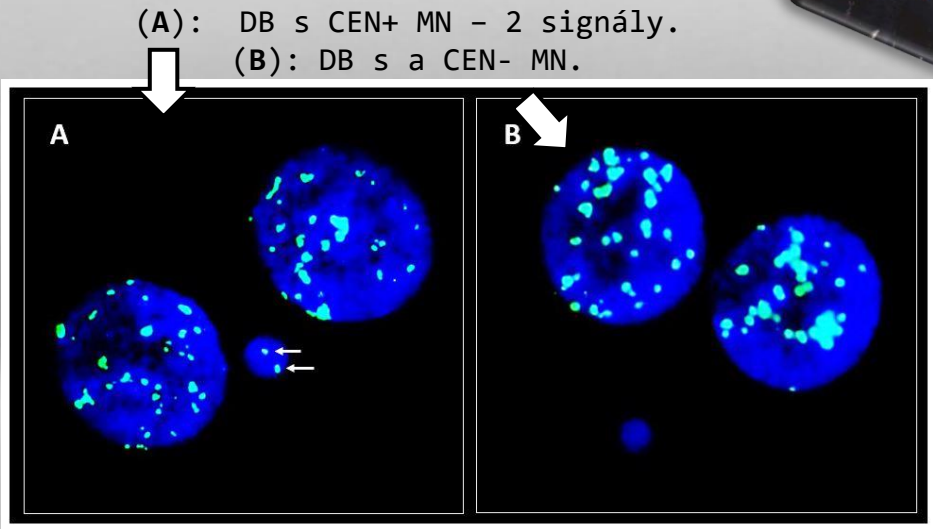


✓ Trendy frekvencí celkových MN potvrzeny



Nové z této studie:

- ✓ Signifikantně nižší frekvence celkových MN v Ostravě po zimním období ($p=0.006$) je způsobena **signifikantně nižší frekvencí CEN- MN (zlomů)** ($p=0.001$).
- ✓ Frekvence CEN+ MN (ztrát) jsou srovnatelné.



Profil původu účastníků studie:

Bydliště v lokalitě	Praha	Ostrava
N (ANO/NE)	34/21	35/19
Narození v lokalitě		
N (Město/Kraj/Dále)	12/12/31	27/24/3

✓ Ostravská skupina je z hlediska původu (i vzdálenosti trvalého pobytu od místa práce) **konzistentnější**.



• 2. VÝZKUM VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ NA INTEGRITU A FUNKCI GENOMU: 2005 – 2022

Z PROJEKTU HAIE

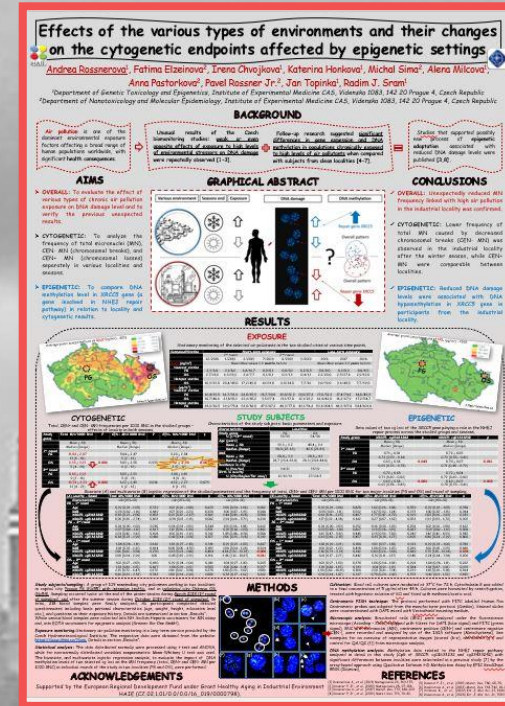
9.+10. STUDIE: ZPĚT K CYTOGENETICE – 1. propojení s výsledky metylace DNA – gen *XRCC5*

✓ Odlišnosti v metylaci genu *XRCC5* NHEJ dráhy v souvislosti s integritou genomu potvrzeny

V Ostravě signifikantně nižší úroveň metylace v genu *XRCC5*: cg23433242, cg01633232
zvýšená možnost reparačních procesů
snížená frekvence CEN- MN

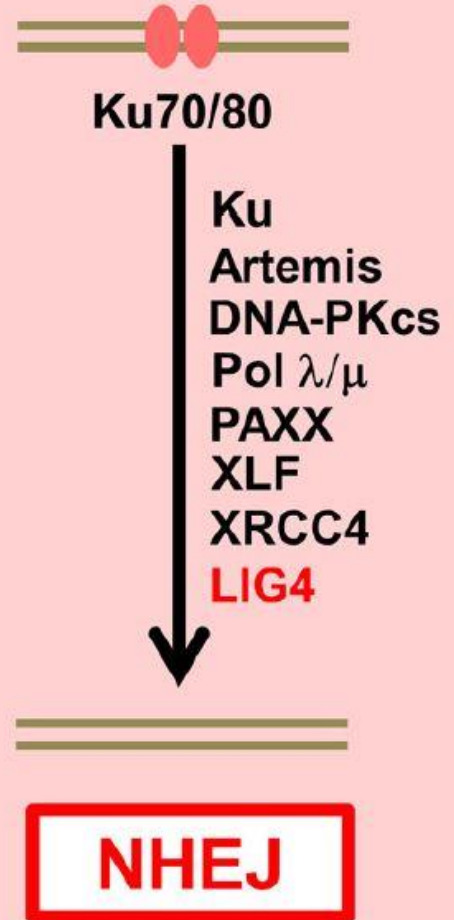
Potvrzeno bivariátní log. regresí pro obě cg:
cgXXXXXXXX, OR (95% CI), p
cg23433242, 4.86 (1.52 – 15.53), 0.008
cg01633232, 3.46 (1.12 – 10.67), 0.031

A multivariátní log. regresí (+věk a BMI) pro 1 cg:
cgXXXXXXXX, OR (95% CI), p
cg23433242, 3.79 (1.10 – 13.06), 0.035



<https://youtu.be/EtW9xnch2eU>

MAJOR MAMMALIAN REPAIR PATHWAY



NHEJ

Další CpG místa v *XRCC5* se signifikantními rozdíly v metylaci DNA: cg26891362, cg09977847, cg23784996 (celkem 14,3%: 5 z 35 analyzovaných)

Pannunzio et al., J. Biol. Chem. 2018, 293(27), 10512–10523.

#9 Rossnerova, A. et al., under review in Environmental Pollution.

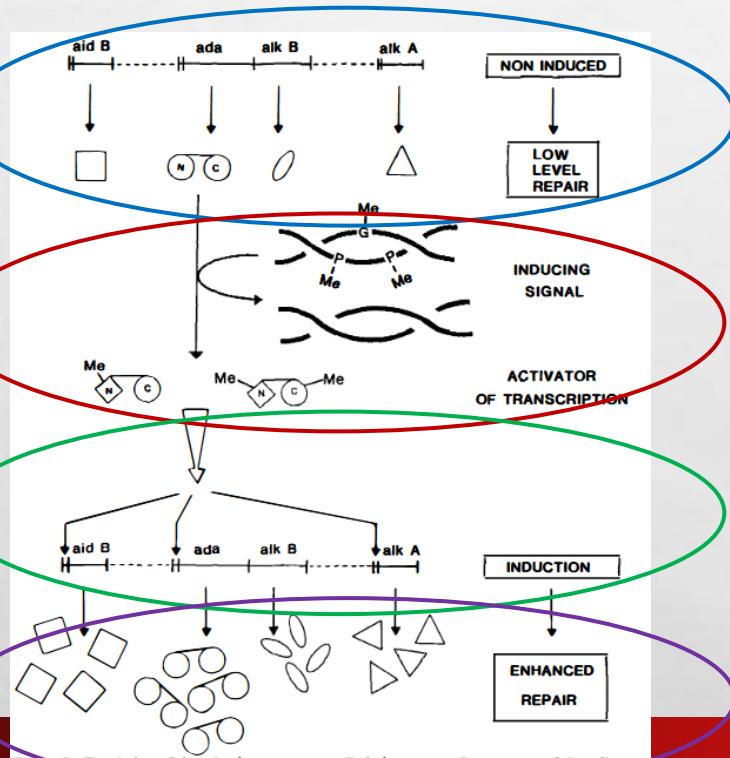
#10 Honkova, K. et al. IJMS 2022, 23, 1666.



• 3. ADAPTACE „VĚDECKY“ – CO JE ZNÁMO

Wikipedia: The adaptive response is a form of direct DNA repair in *E. coli* that protects DNA from damage by external agents... It is initiated against alkylation... *E. coli* can adapt to the presence of the mutagen, rendering subsequent treatment with high doses of the same agent less effective. This mechanism has four related genes, also known as “SOS genes”: *ada*, *alkA*, *alkB*, and *aidB*, each one working in specific residues, all regulated by Ada protein.

Regulace adaptivní odpovědi u *Escherichia coli* (Lindahl et al., 1988)



1. V buňce je přítomna nízká hladina proteinu Ada (N-C) zajišťující pouze bazální úroveň reparaace.
2. Po působení alkylačních látek a vazbě na DNA dochází rovněž k vazbě alkylové skupiny na Ada protein (C doména s cysteinem v pozici 321 přijímá ireverzibilně alkylovou skupinu z O6-MeG, O6-EtG, O4-MeT, N doména s cysteinem v pozici 69 má roli transkripčního aktivátoru).
3. Afinita aktivovaného Ada k promotoru genů kontrolovaných adaptivní odpovědí má za následek zvýšenou expresi genů *aidB*, *ada*, *alkB*, *alkA*
4. Produkty uvedených genů hrají významnou roli v reparačních procesech (př.: *alkA* - glykosylasa II - odstraňování alkylovaných bází za vzniku AP míst).

• 3. ADAPTACE „VĚDECKY“ – CO JE ZNÁMO

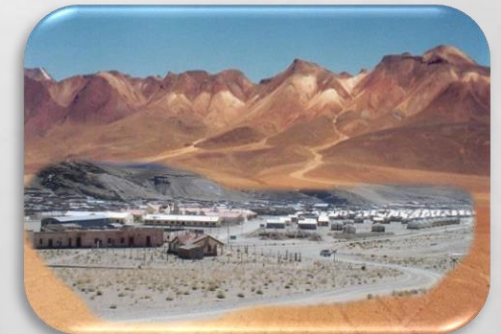
ADAPTACE a GENETICKÉ FAKTORY – ARGENTINA/EXPOZICE ARSENU

1. Vahter et al., 1995, Natarajan et al., 1996

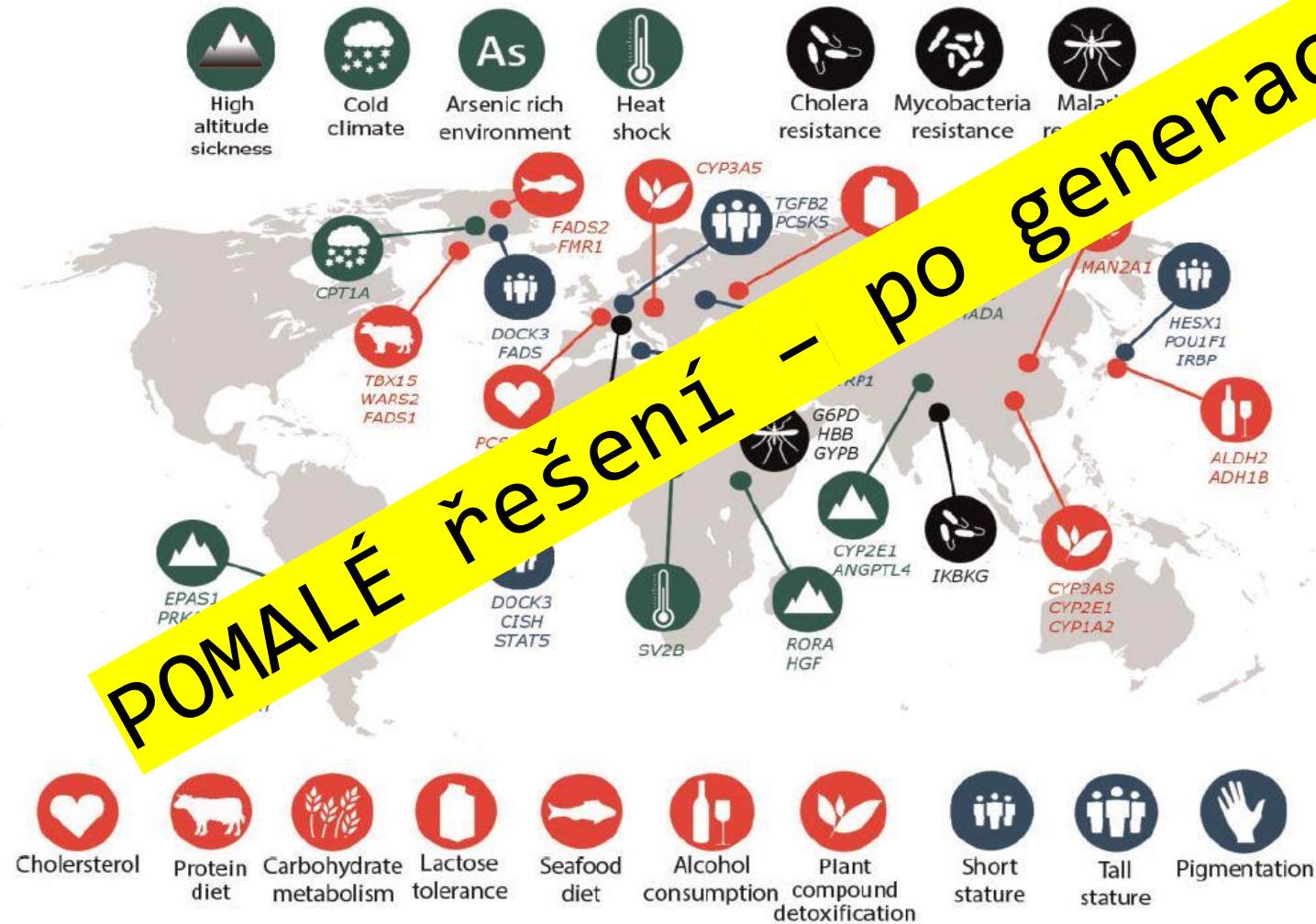
- Původní obyvatelstvo Salta Province (San Antonio Cobres, Argentina)
- Dlouhodobá expozice vysokým koncentracím arsenu z pitné vody (prokázaný lidský karcinogen)
- Hodnocení chromosomálních aberací, včetně translokací – nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi exponovanou a kontrolní populací
- Biochemickou analýzou moči byl zjištěn unikátní, velmi efektivní a rychlý metabolismus arsenu

2. Schlebusch et al., 2015

- Zpět do Argentiny, naměřené hodnoty arsenu ve vodě přesahují více než 20x limity doporučené WHO
- Analýza vlasů mumifikované osoby ukázala na vysoké expozice populace již před cca 7 000 lety
- Zjištěna specifická varianta genu *AS3MT* (arsenite methyltransferase – 13 specifických SNP)



• 3. ADAPTACE „VĚDECKY“ – CO JE ZNÁMO



PŘÍKLADY **GENETICKY** PODMÍNĚNÉ ADAPTACE

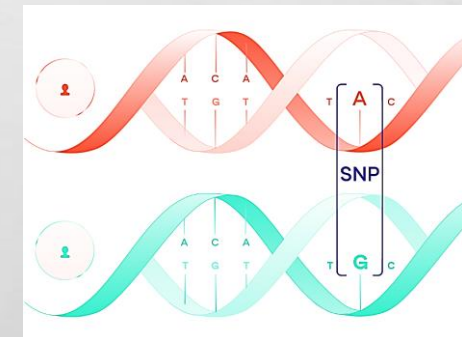
Podmínky prostředí

Onemocnění

Výživa

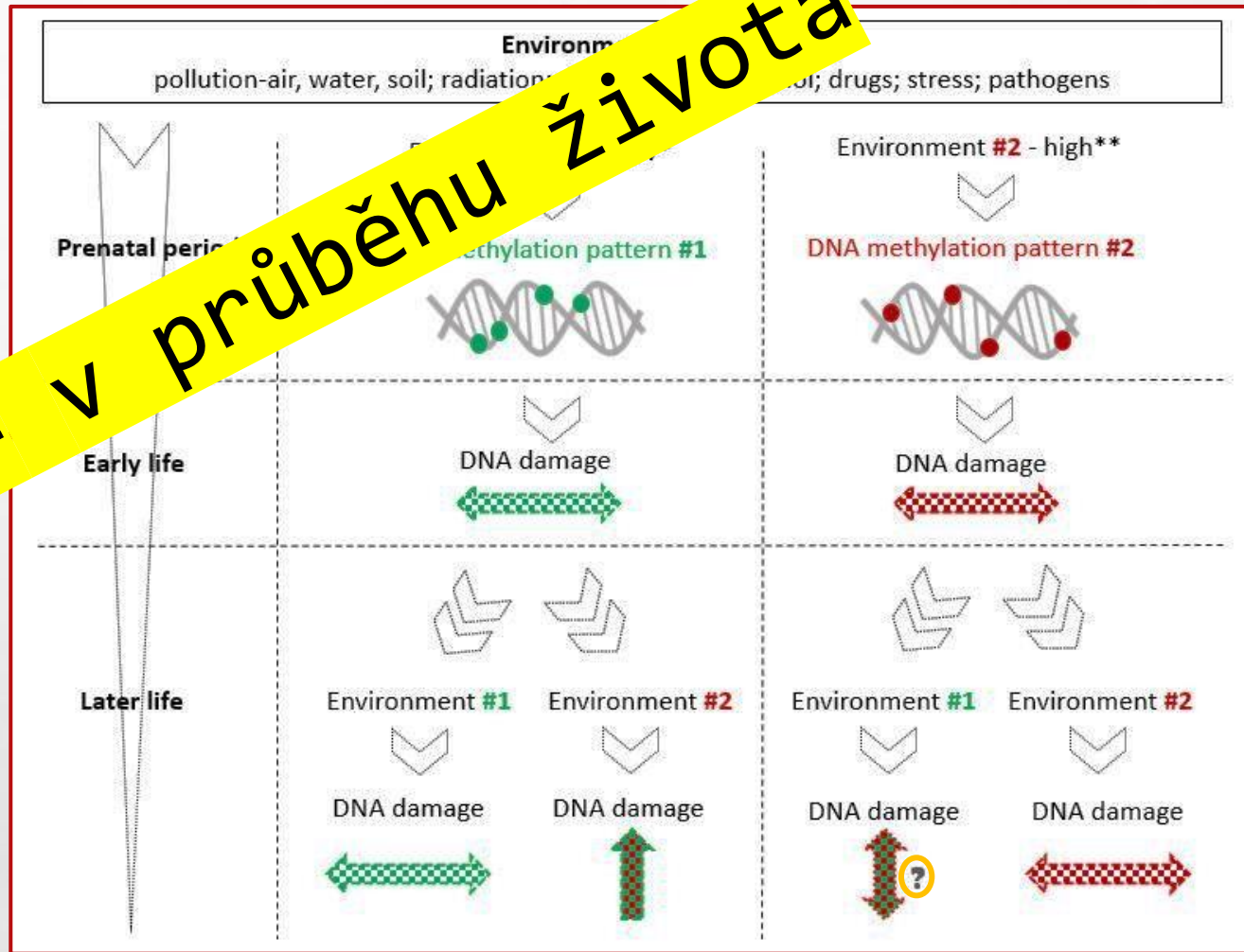
Další

Specifický fenotyp pro dlouhodobé podmínky v lokalitě - SNP



Elhaik E. et al., *Genome Biology and Evolution*, 2017.
<https://medium.com/@sanogenetics/snp-of-the-week-58e23927c188>

- 4. **EPIGENETICKÁ** ADAPTACE – KAM JSME DOŠLI – OD PRENATÁLNÍHO OBDOBÍ



ČTK 25.10. 2022, <https://www.novinky.cz>

Příklady různých kombinací změn prostředí a jejich potenciálních dopadů na genom
- význam prenatální expozice.

4. EPIGENETICKÁ ADAPTACE – KAM JSME DOŠLI – V PRŮBĚHU ŽIVOTA



55th Congress of the European Societies of Toxicology
Toxicology – Science Providing Solutions

8 – 11 September, 2019
FINLANDIA HALL, HELSINKI, FINLAND

WWW.EUROTOX2019.COM

S08

Session

Monday, 9 September, 2019

3:00 p.m. – 5:00 p.m. Veranda 2

Human adaptation to environmental pollution: dose-response relationship revisited

Session chair: Rossner, Pavel, (Czech Republic); Wallace, Heather, (Aberdeen, UK)



International Journal of
Molecular Sciences

#12



Review

The Molecular Mechanisms of Adaptive Response
Related to Environmental Stress

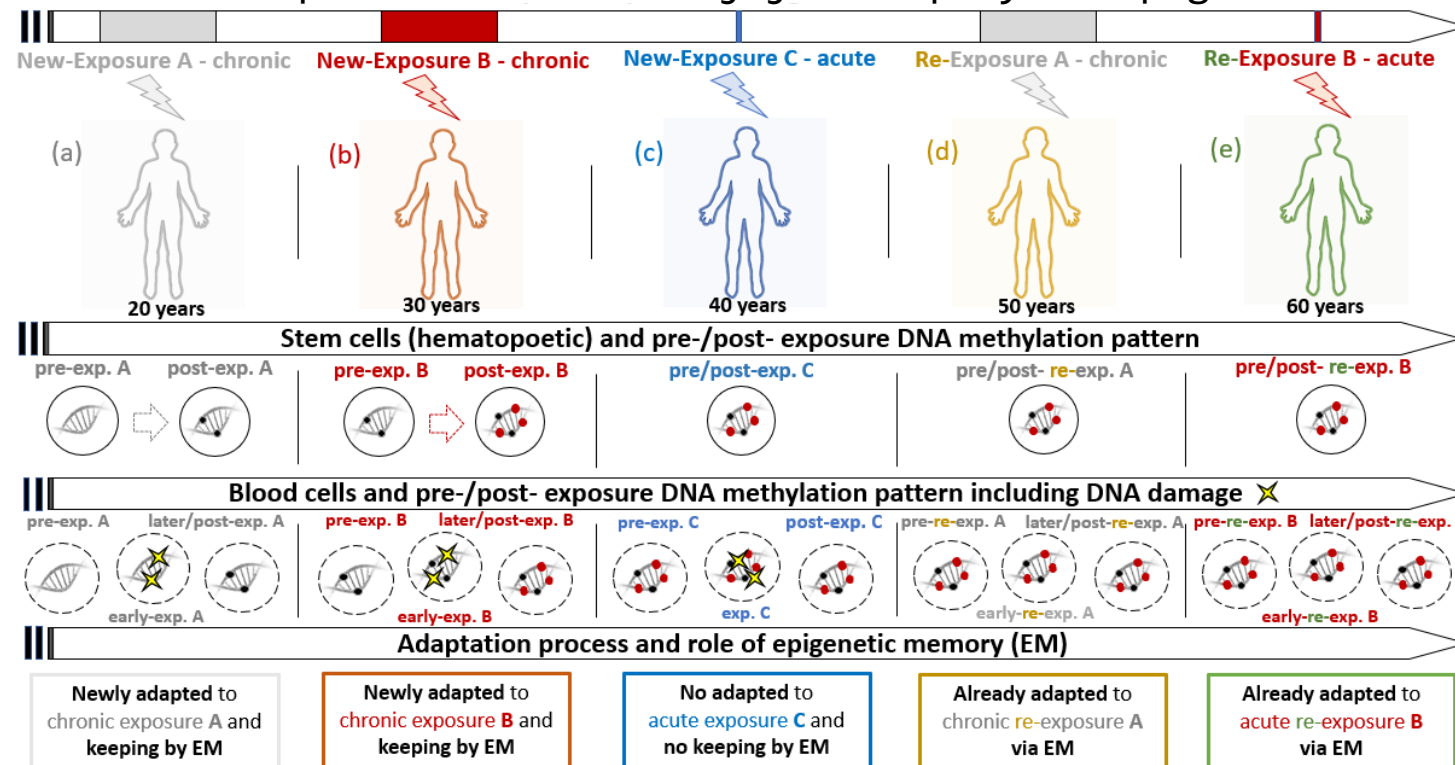
Andrea Rossnerova¹, Alberto Izzotti^{2,3}, Alessandra Puliero^{4,*}, Aalt Bast^{5,6}, S. I. S. Rattan⁷
and Pavel Rossner⁸

Model procesu epigenetické
adaptace k podmínkám prostředí
v průběhu života a způsobu
jejího uchování s pomocí
epigenetické paměti (EM).

Univerzálnost mechanismu



Různé expoziční scénáře a jejich dopady na epigenom.



- (a) Nová adaptace chronické expozici A a její uchování pomocí EM.
- (b) Nová adaptace chronické expozici B a její uchování pomocí EM.
- (c) Bez adaptace akutní expozici C a bez uchování pomocí EM.
- (d) Již proběhlá adaptace a chronická re-expozice A, využití EM.
- (e) Již proběhlá adaptace a akutní re-expozice B, využití EM.

• 3. ADAPTACE „VĚDECKY“

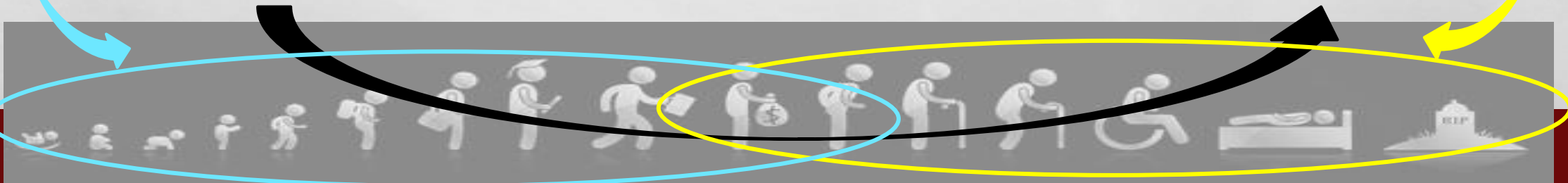
Epigenetická adaptace v průběhu života = optimalizace funkce genů
ve vztahu k prostředí a faktorům životního stylu - probíhá neustále s různou intenzitou
Změny jsou **pozitivní** i **negativní** a záleží co převáží...

+ Pozitivní změny

Optimalizace funkce genů:
reparačních mechanismů,
signálních drah,
funkce imunitního systému,
metabolismu xenobiotik...

- Negativní změny

V genech asociovaných s
různými onemocněními:
neurodegenerativními,
nádorovými...



Epigenetická adaptace je klíčovým mechanismem pro udržení integrity a funkce genomu (přežití).

PODĚKOVÁNÍ

Velký dík všem **současným i bývalým kolegům z ÚEM AV ČR, v.v.i.**
a řadě kolegů ze spolupracujících pracovišť.



Aktuální grantová podpora:

Projekt HAIE: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000798) a NANOEX2:#22-08358S.



DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST!

