

Семинар 7
Немцова М.В.

Медицинская генетика

**Фармация Курс 3 ЦИОП «Медицина
будущего»**

**Импринтинг. Нарушения импринтинга
как причина наследственной патологии.
синдромы Прадера-Вилли, Ангельмана,
Видеманна-Беквита.**

Уровни эпигенетической регуляции

- 1. Геномный**
- 2. Хромосомный**
- 3. Генный**

Эпигенетические нарушения

- 1) Однородительская дисомия**
- 2) Аномалии метилирования промоторных и регуляторных областей гена;**

Для нормального развития организма необходим равный вклад обоих родителей.

1. Трансплантация пронуклеусов.

2. Патология у человека.

Пузырный занос – хорошо развиваются плацентарные структуры, нет эмбриональных структур

- два набора отцовских хромосом

Тератома - эмбриональная опухоль, включающая все три эмбриональных слоя и отсутствие плацентарной ткани

- два набора материнских хромосом.

3. Триплоидия.

$2n$ - отец + n - мать -> андроид: большая кистозная плацента, у плода: большая голова, маленькое веретенообразное тело, отставание в росте и развитии.

Если плод рождается, то, как правило, есть мозаицизм.

$2n$ - мать + n - отец -> гиноид: недоразвитая плацента, клеточная масса, эмбрион и плод не развивается.



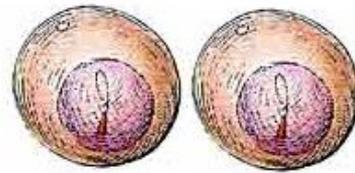
Эпигенетические изменения на геномном уровне



**нормальная
зигота**



**гиногенетическая
зигота**



зигота



10-суточные зародыши мыши



**нормальное развитие
эмбриональных структур**

**не развиваются
зародышевые
мембраны и плацента**



**андрогенетическая
зигота**



**не развиваются
эмбриональные структуры**

**нормальное развитие
зародышевых мембран и
плаценты**

Проявление эпигенетической патологии на хромосомном уровне – однородительская дисомия (ОРД)

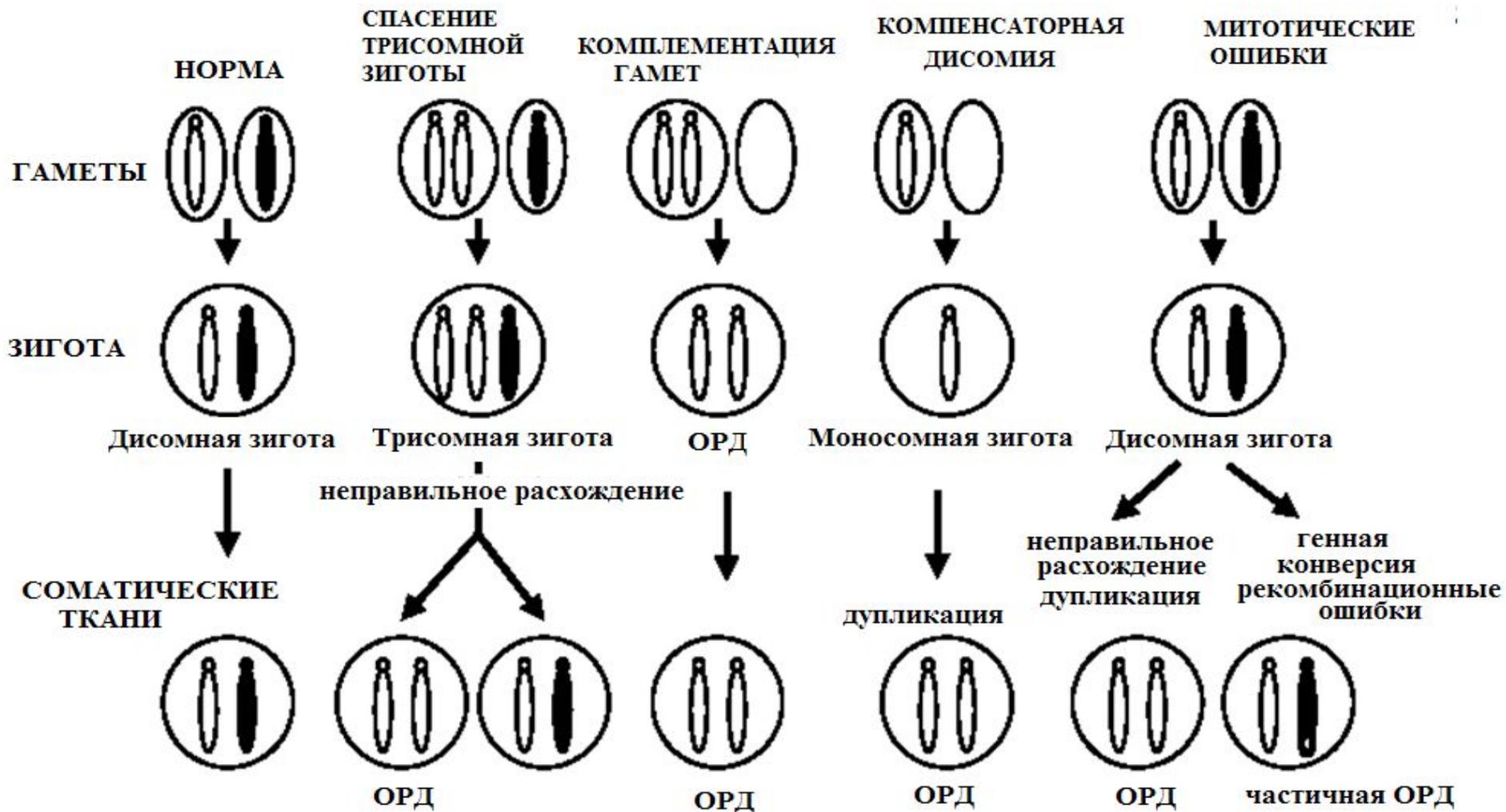
- **Однородительская дисомия, то есть наследование обеих копий целой хромосомы или ее части от одного родителя, при отсутствии соответствующего генетического материала от другого родителя.**
- изодисомия
- гетеродисомия

Исследования на мышах:

Разные хромосомы вносят различный вклад нормальное развитие плода. Дисомии по 1,3,4,8,9,10,13,15,16,18 и 19 не вызывали отклонений от нормального развития мышинных эмбрионов, а по 2,6,7,11,17 сопровождалась отклонениями от нормального развития и гибелью плода

Однородительская дисомия (ОРД)

- Однородительская дисомия - наследование обеих копий целой хромосомы или ее части от одного родителя, при отсутствии соответствующего генетического материала от другого



- материнская ОРД по хромосоме 2 => признаки дисэмбриогенеза и отставание в развитии;
- отцовская ОРД по длинному плечу хромосомы 6(q23 - q24) => неонатальный диабет;
- материнская ОРД по длинному плечу хромосомы 7 установлена при муковисцидозе;
- материнская ОРД по короткому плечу хромосомы 7 (*GRB10*) => синдром Сильвера – Рассела;
- материнская ОРД по хромосоме 14 => гипотония, черепно-лицевые аномалии, акромикрия, сколиоз, задержка физического, моторного и умственного развития;
- отцовская ОРД по хромосоме 14 => сильная умственная отсталость и скелетно-мышечные аномалии;
- материнская ОРД по хромосоме 16 => малый вес при рождении и врожденные аномалии;
- отцовская ОРД по длинному плечу хромосомы 20 (*GNAS1*) => псевдогипопаратирозидизм

Эпигенотип (импринт) - совокупность модификаций, которые по-разному маркируют родительские аллели и обеспечивают моноаллельный характер экспрессии импринтированных генов на хромосомах отцовского или материнского происхождения.

Геномный импринтинг - эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в процессе развития организма в зависимости от родительского происхождения гена, хромосомы или генома.

Импринтированный ген - ген, который дифференциально экспрессируется в зависимости от материнского или отцовского происхождения. Импринтированные гены в диплоидной клетке млекопитающих обычно экспрессируются только с одного аллеля.

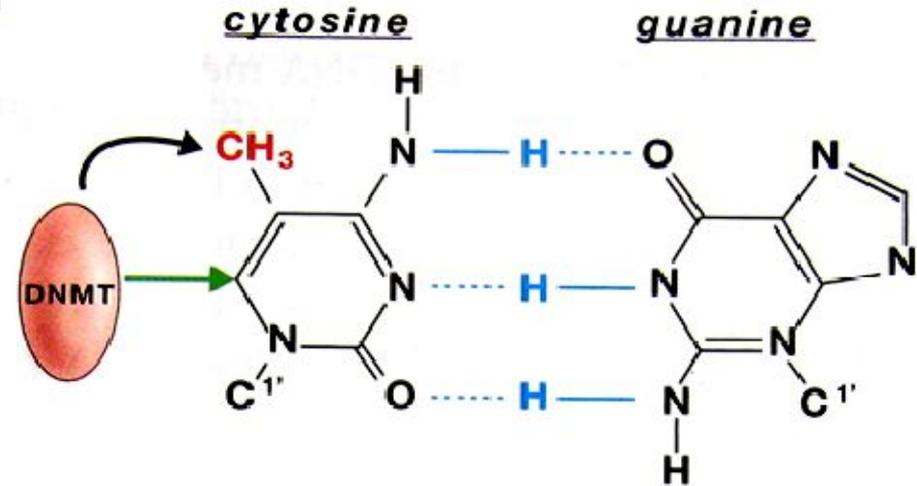
Установлено, что все известные импринтированные гены содержат области различного метилирования на двух родительских хромосомах, причем эти различия обязательны для их моноаллельной экспрессии.

Результаты экспериментов по изучению времени репликации импринтированных хромосомных доменов в S-фазе митоза подтверждают асинхронность репликации кластеров импринтированных генов на гомологичных хромосомах

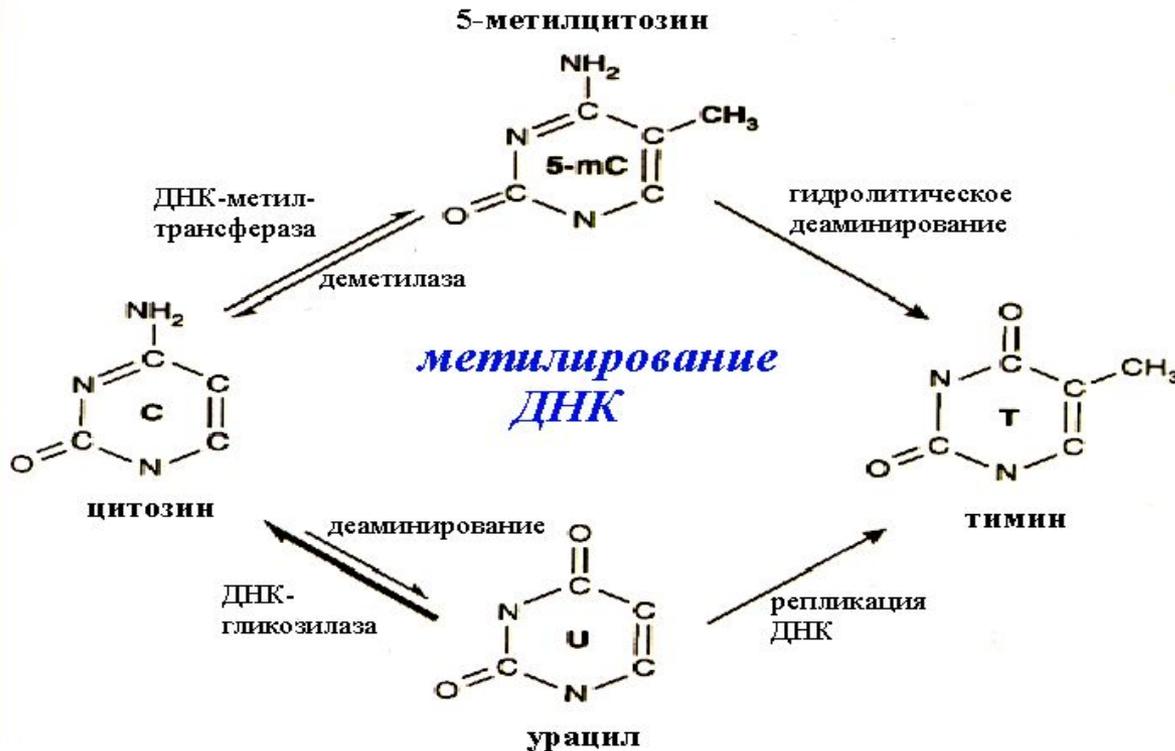
Метилирование у млекопитающих

1. Поддержание структуры хроматина и стабильности хромосом
2. Инактивация повторов и интегрированной чужеродной ДНК
3. Формирование тканеспецифичного паттерна экспрессии генов
4. Тканеспецифичное подавление генной экспрессии

a



b



Гиперметилованы:

- Сателлиты и рассеянные повторы
- Провирусные копии и транспозоны
- Транскрипционно неактивные гены

Гипометилованы:

- Транскрипционно активные гены

Характеристика CpG-островка

- **>200 пн, длина большинства -0.5-3 тпн.**
 - **Относительно высокий GC-состав (>50, обычно >60%), плотное расположение мотива CpG (один на 10 пн, в 10-20 раз выше, чем в среднем по геному) и его статистическая встречаемость**
 - **Как правило, содержат мотивы CCGCCC (сайты связывания транскрипционного фактора SP1)**
- У человека - около 45000 островков. 60% генов имеют с своим локусе, как минимум, один CpG островок. Практически у всех генов "домашнего хозяйства".**

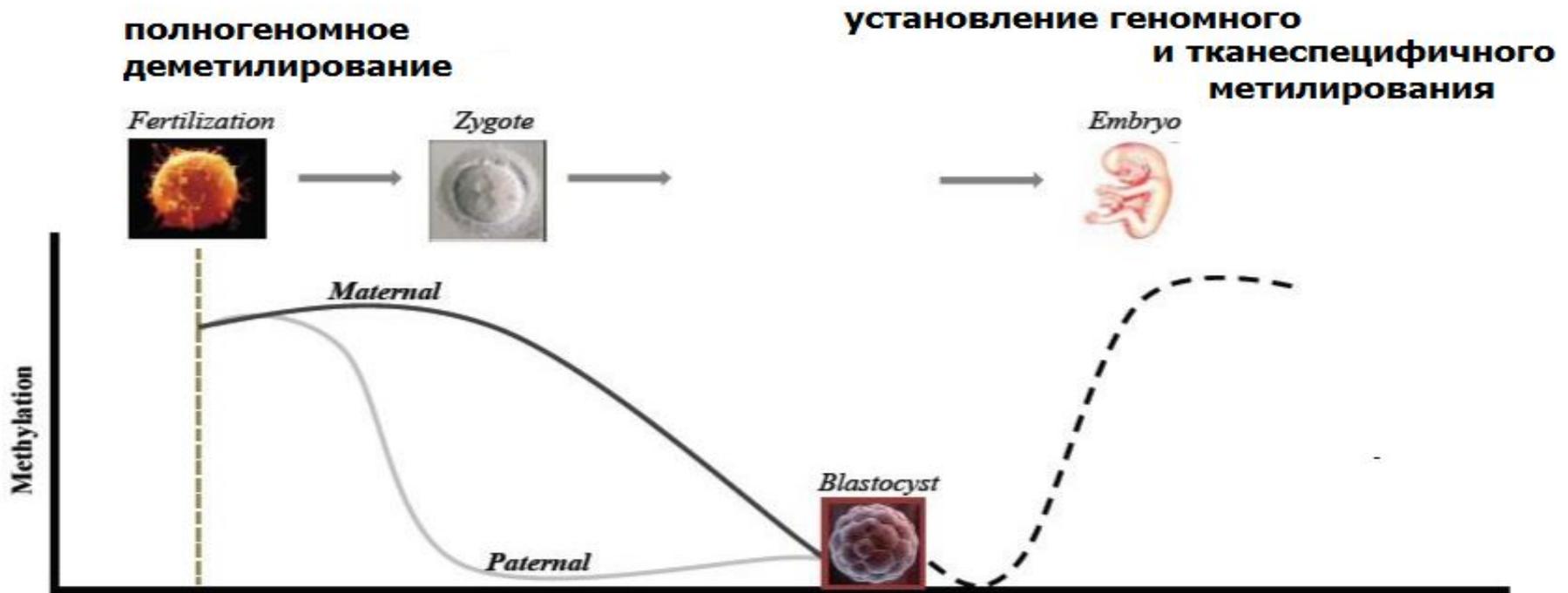
Почти все метилирования “стирается” в раннем эмбриогенезе за счет деметилирования и/или гидроксилирования метильных групп

- **Паттерн метилирования генома (распределение метилированных оснований) устанавливается заново в каждом поколении, в основном не наследуется**

- **После установления специфические паттерны метилирования поддерживаются в поколениях клеток, обеспечивая специфичность экспрессии генов**

- **При смене поколений происходит последовательное цикличное метилирование/деметилирование по множеству позиций в геноме**

Волны деметилирования в раннем эмбриогенезе



- Во время эмбрионального развития, в первичных половых клетках проходит полногеномное деметилирование, которое стирает предыдущие родительские отметки метилирования.
- После оплодотворения отцовский геном активно деметилируется, в то время как материнский геном пассивно деметилируется.
- Затем по всему геному происходит заново метилирование на обоих родительских геномах до имплантации.
- импринтированные гены сохраняют своё метилирование проходя через это репрограммирование, что позволяет наследовать специфичную для родителей моноаллельную экспрессию генов в соматических тканях в течение взрослой жизни.

создание iPSCs

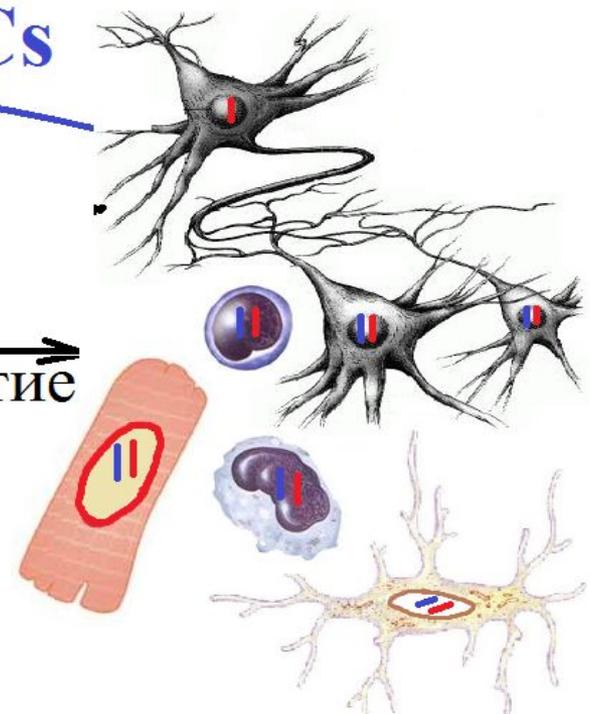
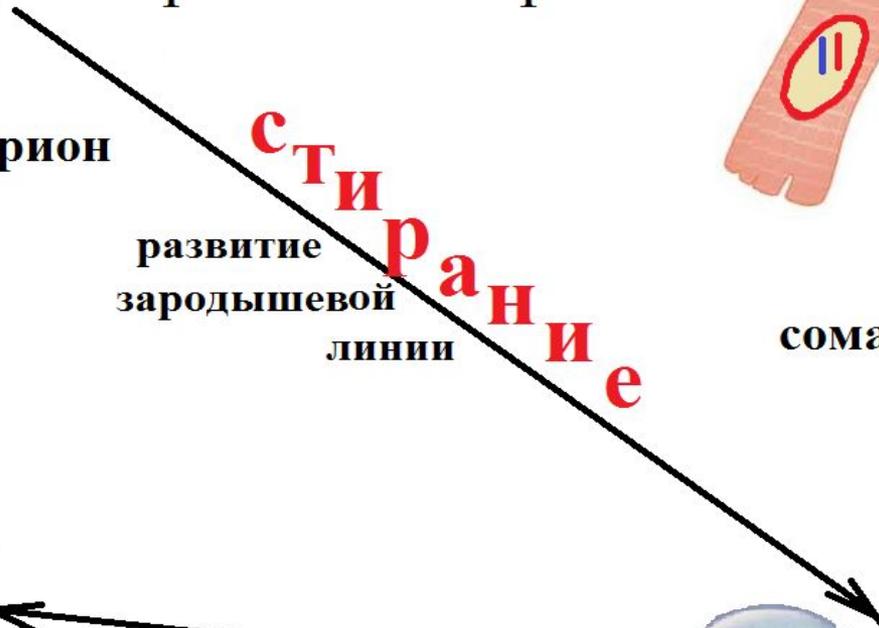


поддержание

эмбриональное развитие

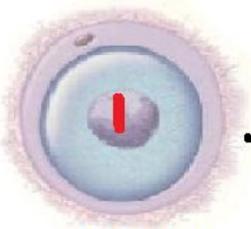
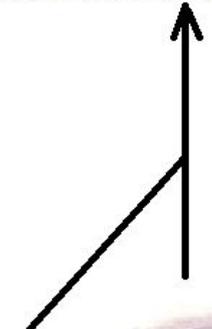


стирание
развитие зародышевой линии



соматические клетки

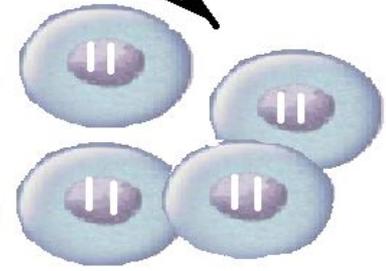
1-клеточный эмбрион



ооцит

гаметогенез

установление



первичные половые клетки



сперматозоид

Инактивация X-хромосомы

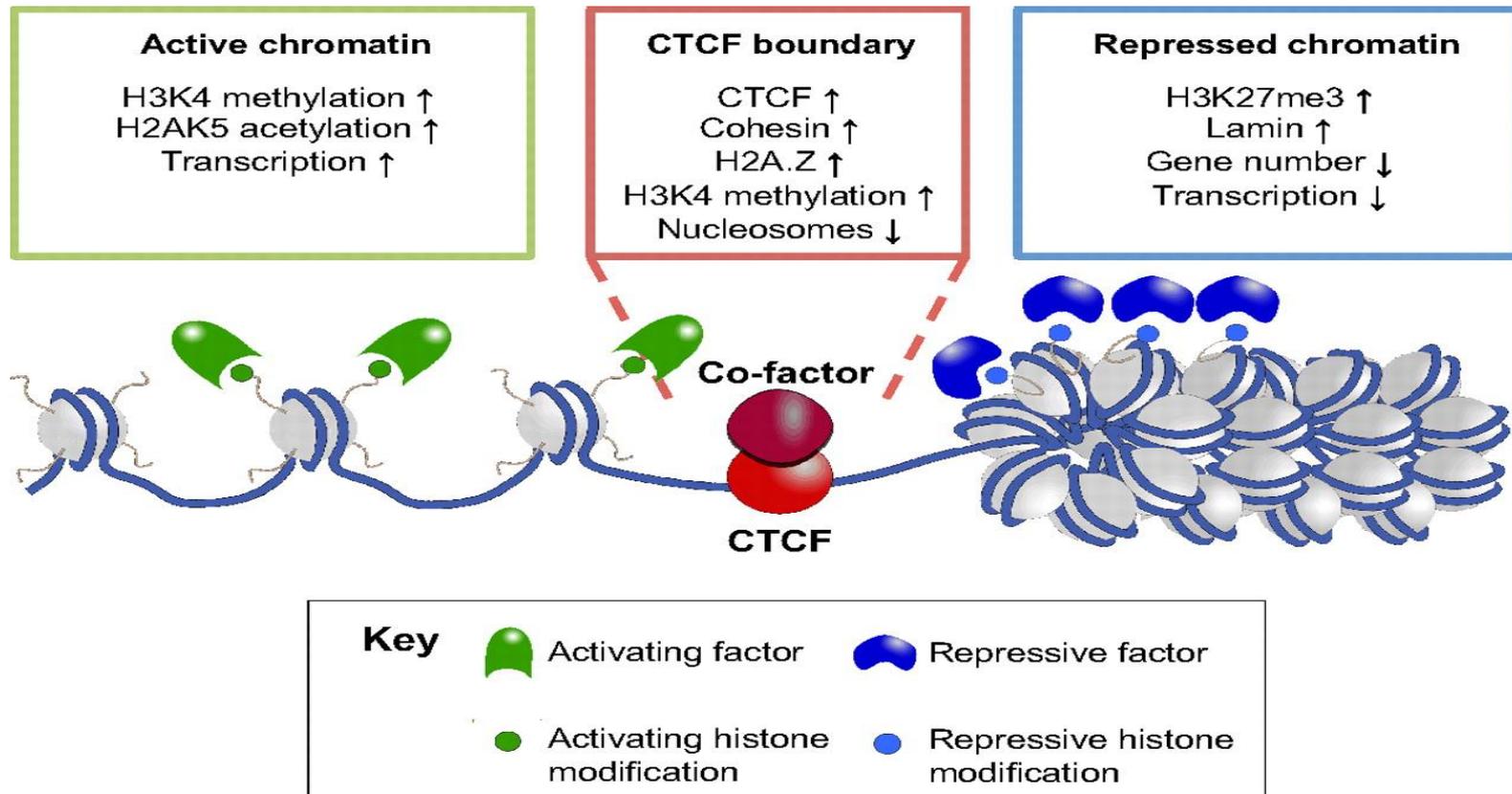
- У млекопитающих компенсация дозы X-хромосом между женщинами (XX) и мужчинами (XY) достигается за счет инактивации X-хромосомы (XCI), процесса, при котором одна из двух X-хромосом у самок транскрипционно инактивируется и неактивное состояние клонально передается через клеточные деления.
- Случайная и импринтинговая XCI контролируется областью X-хромосомы, обозначенной **центром инактивации X-хромосомы (XIC)**. Наиболее заметными компонентами XIC являются **Xist** и **Tsix** гены, которые кодируют длинные нкРНК. Высокая экспрессия Xist, как правило, связана с цис-инактивацией, в то время как Tsix экспрессируется только с активной X-хромосомы.

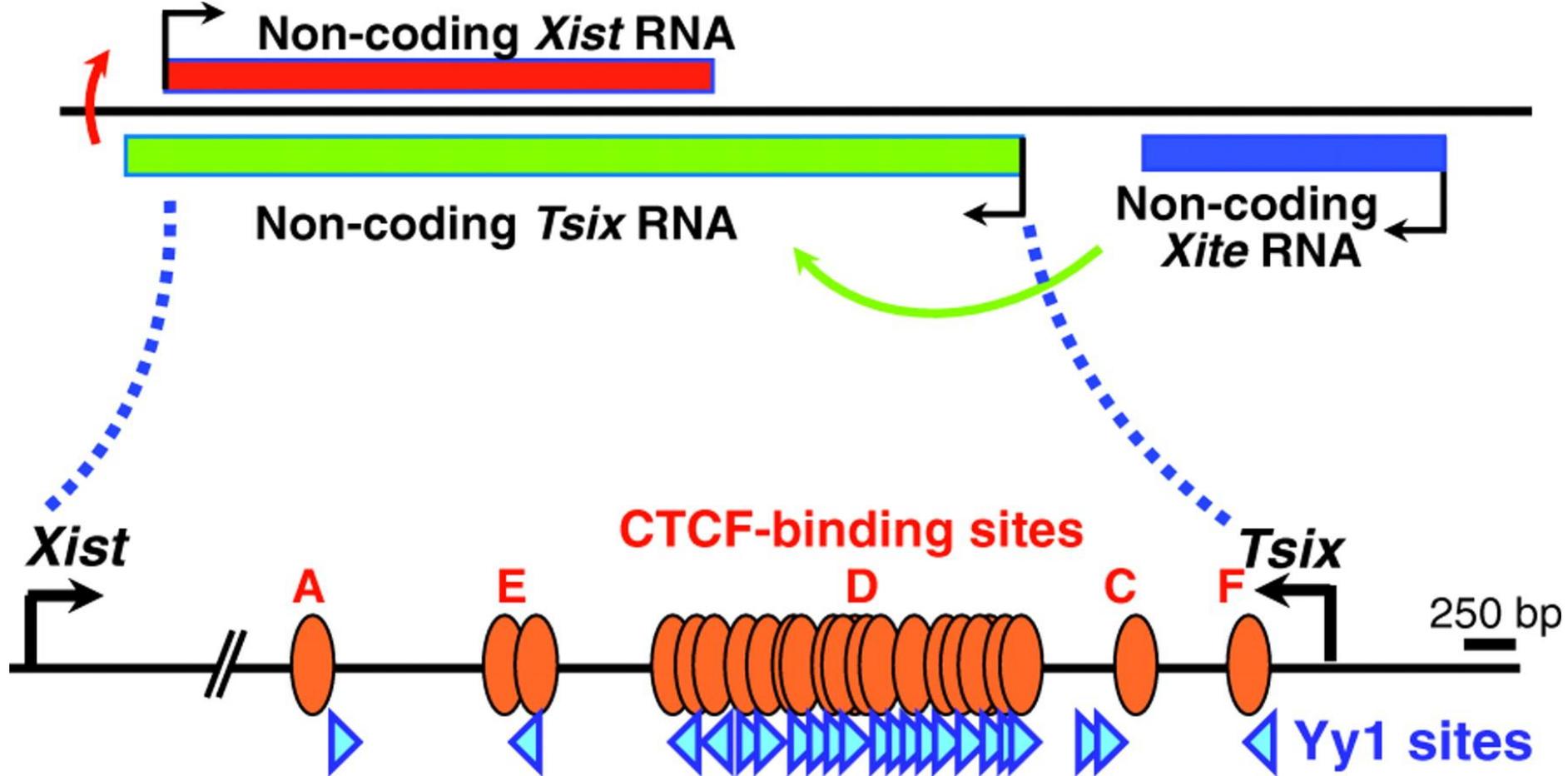
Инсуляторы — последовательности ДНК, особые регуляторные элементы, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения. Эта функция инсуляторов включает две активности.

Во-первых, они блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находится между ними. При этом инсулятор выполняет только разделительную функцию и не влияет на активность энхансера и промотора.



Во-вторых, инсулятор выполняет барьерную функцию для распространяющегося конденсированного хроматина. Существуют инсуляторы, выполняющие как одну из двух функций, так и обе. Инсуляторы представляют собой сайты связывания особых, инсуляторных белков.





Белок CTCF может блокировать энхансеры, препятствуя генной экспрессии. CTCF является первым обнаруженным белком, который необходим для нормального функционирования эпигенетической метки.

Модель X инактивация

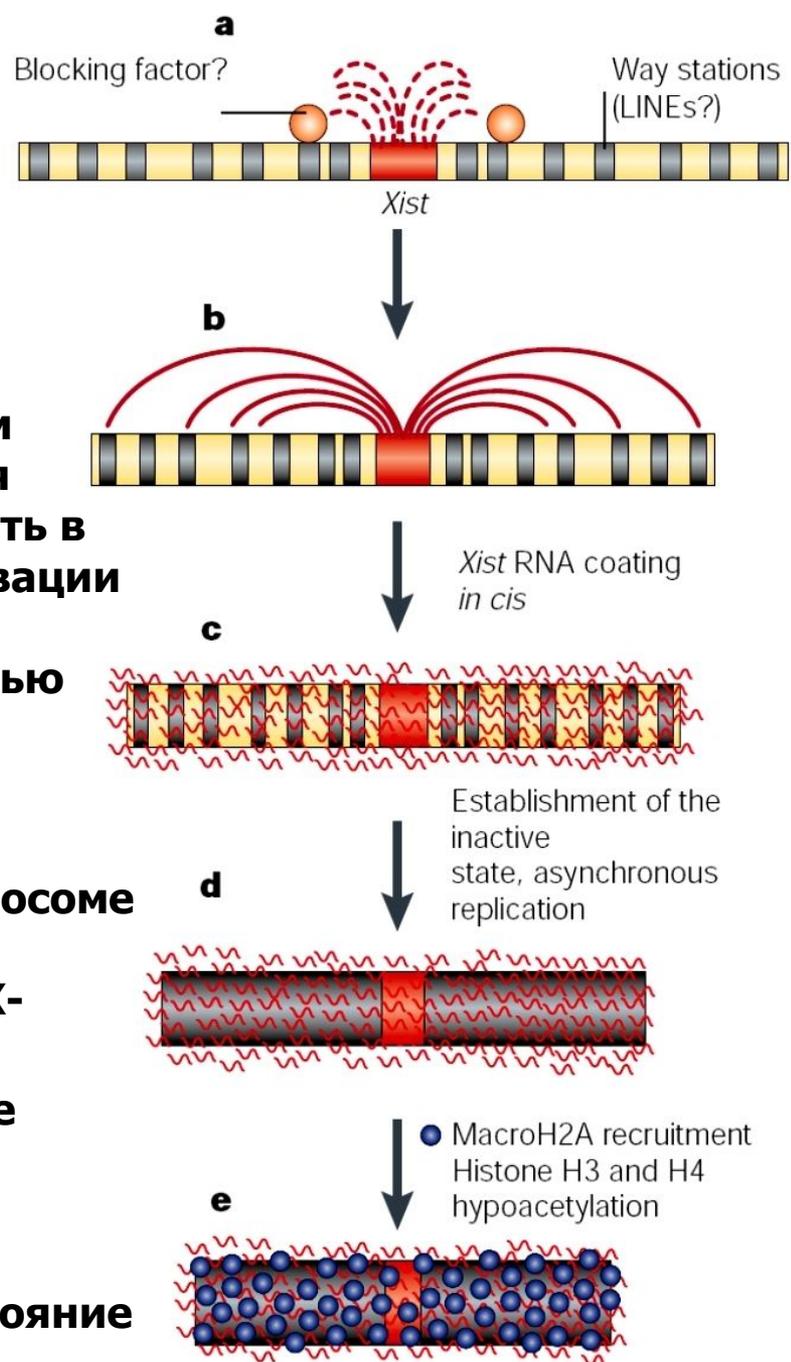
а) До инактивации Xist РНК экспрессируется в неустойчивом виде (пунктирные линии), что предполагает существование блокирующих факторов (красный), которые предотвращают повышающую регуляцию Xist и/или его связь с хромосомой.

б) Экспрессия Xist РНК повышается посредством регуляции и стабилизации, или высвобождения блокирующего фактора. LINEs может участвовать в распространении (спрединге) процесса инактивации X, либо включая Xist через связь с нуклеопротеидными комплексами, или с помощью другого механизма.

с) Стабилизированные Xist РНК покрывает X-хромосому.

г) Транскрипционное молчание генов на X-хромосоме происходит в результате РНК Xist покрытия и быстрого перехода к отсроченной репликации X-хромосомы.

д) Деацетилирование гистонов и метилирование промоторов генов X-хромосомы, а также использование вариантного гистона macroH2A, преобразует хромосому, покрытую Xist РНК в стабильно неактивное и конденсированное состояние хроматина.



Методы анализа метилирования

1. Метилчувствительная ПЦР (NotI, EagI, SacII, HpaII, HhaI)

аналитическая чувствительность - 1: 2000

2. Метилспецифическая ПЦР

Трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na

аналитическая чувствительность - 1: 1000

3. MethylLight – метилспецифическая ПЦР в реальном времени

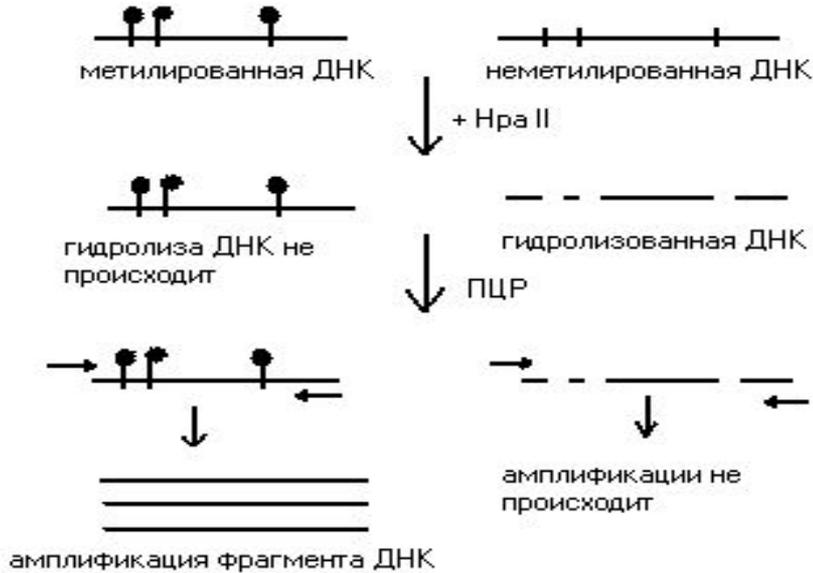
аналитическая чувствительность - 1: 10000

4. Метилспецифическое секвенирование

5. Биологические микрочипы

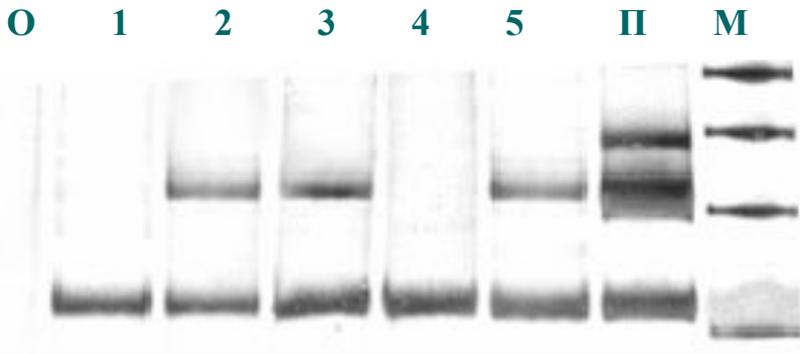
Метилчувствительная ПЦР

Схема МЧ-ПЦР



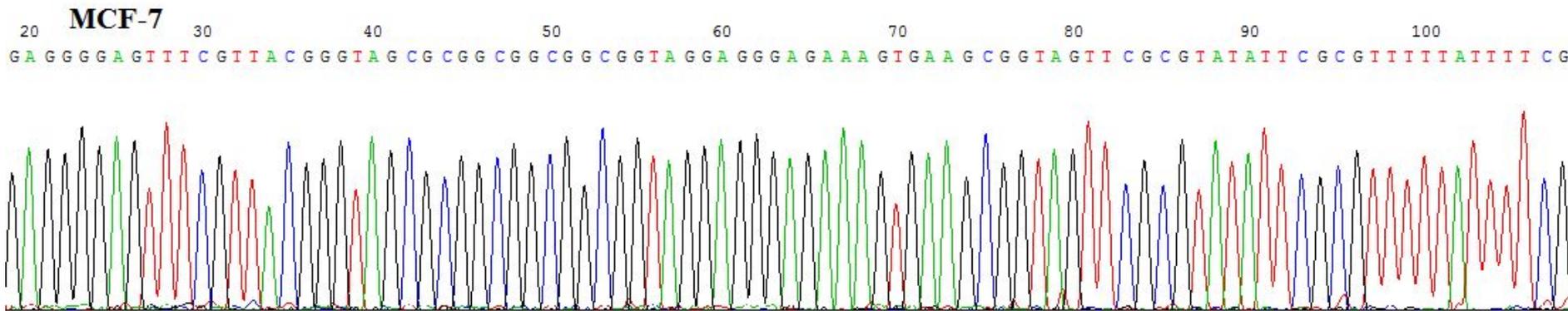
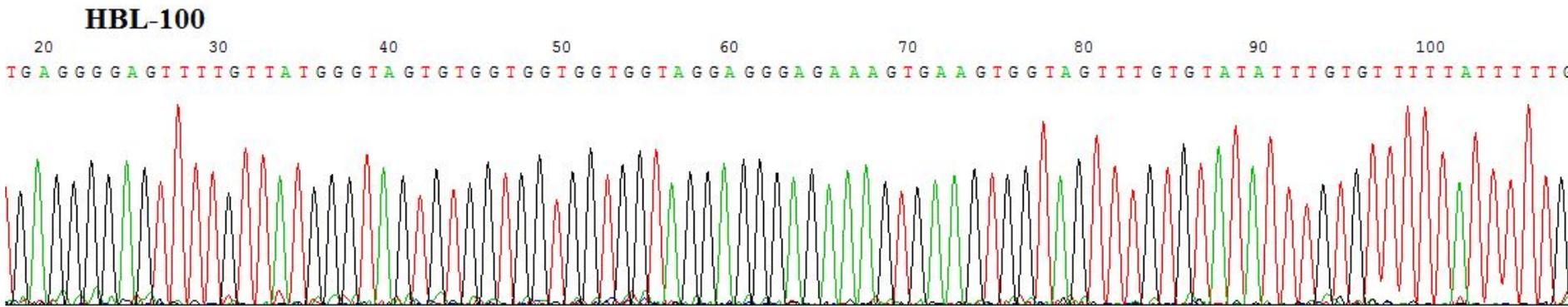
Метил-чувствительные рестриктазы

BstHNI (HhaI)	GCG↑C C↓GCG
HpaII	C↑CGG GGC↓C
AclI	AA↑CGTT TTGC↓AA
BsePI	G↑CGCGC CGCGC↓G



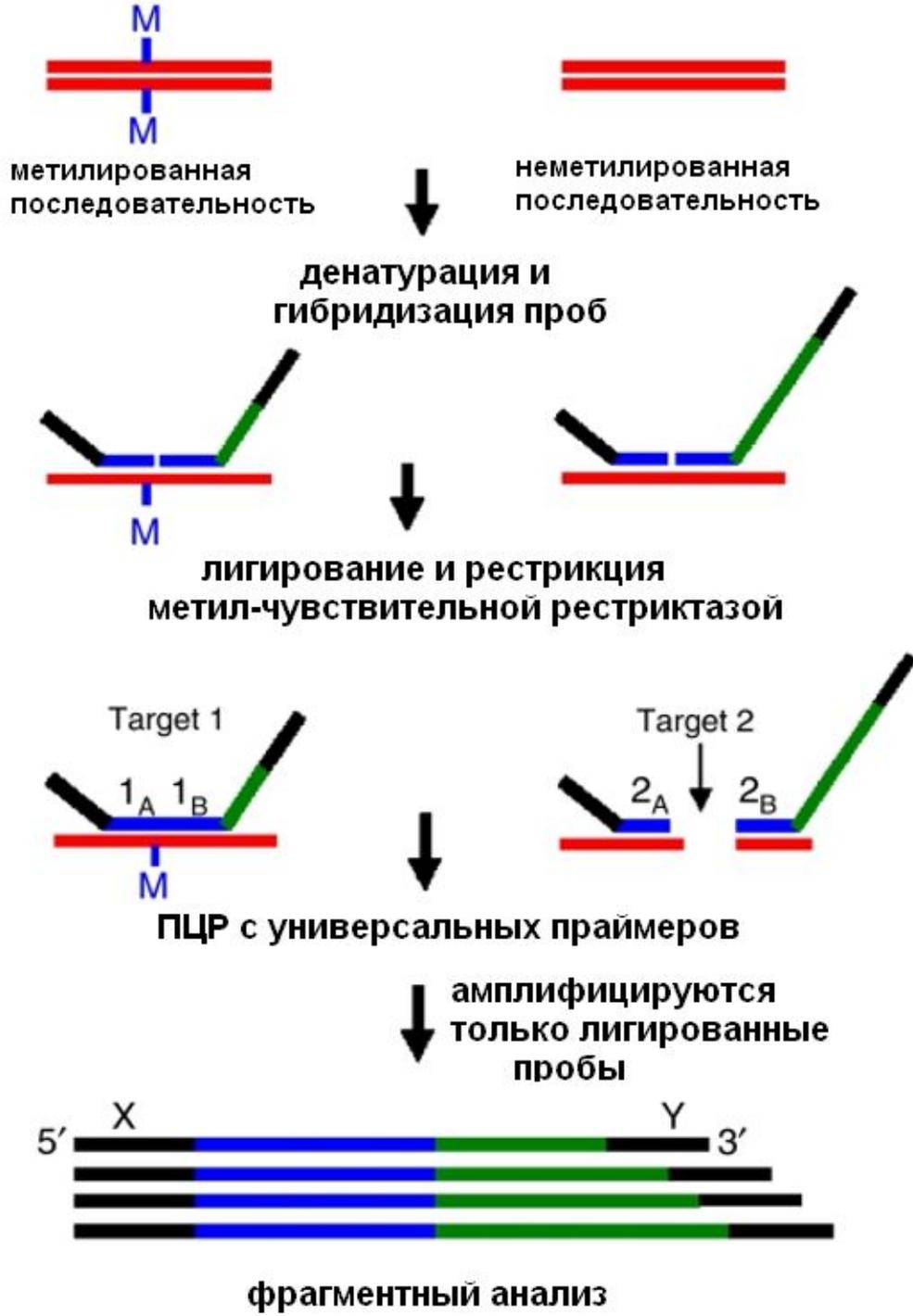
Анализ метилирования гена *p16* методом МЧ-ПЦР в образцах ОЛ.

Часть эндонуклеаз II типа (рестриктаз) чувствительны к метилированию – они не могут взаимодействовать с ДНК, если в сайте узнавания есть 5-метилцитозин. Неметилированные аллели будут гидролизованы, а метилированные – нет.



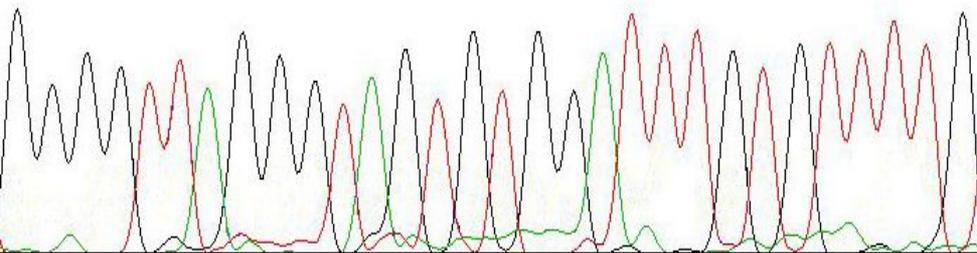
Результаты метил-специфического секвенирования CpG-островка, расположенного в промоторе *PAK1* в культурах клеток HBL-100 и MCF-7.

В результате бисульфитной конверсии не метилированные цитозины, расположенные в CG-динуклеотидах трансформировались в тимин в культуре HBL-100, а метилированные цитозины не подверглись трансформации в культуре MCF-7.

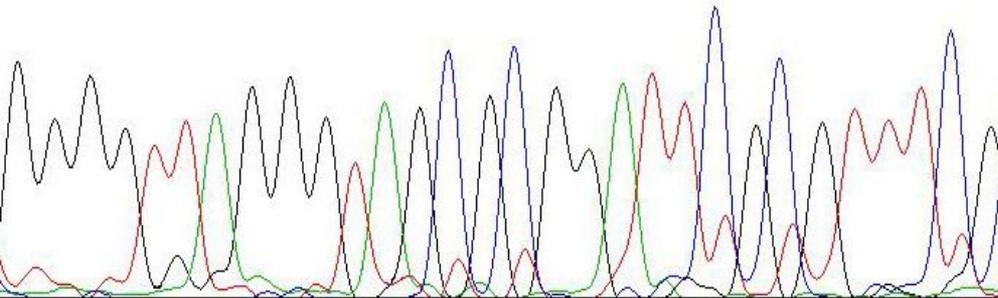


Бисульфитное секвенирование

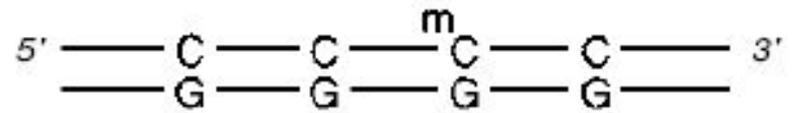
110 120 130
 G G G G T T A G G G T A G T G T G G A T T T G T G T T T T G



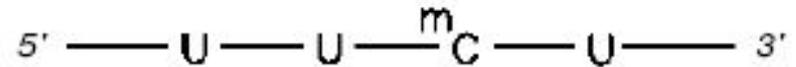
110 120 130
 G G G G T T A G G G T A G C G C G G A T T C G C G T T T C G



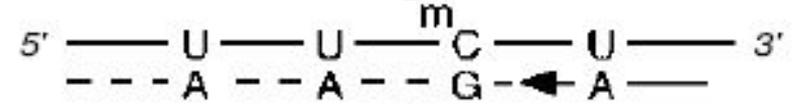
геномная ДНК



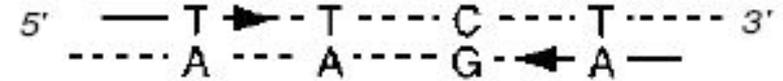
обработка бисульфитом натрия



ПЦР - первый цикл



ПЦР



секвенирование
ПЦР-продукта

после бисульфита

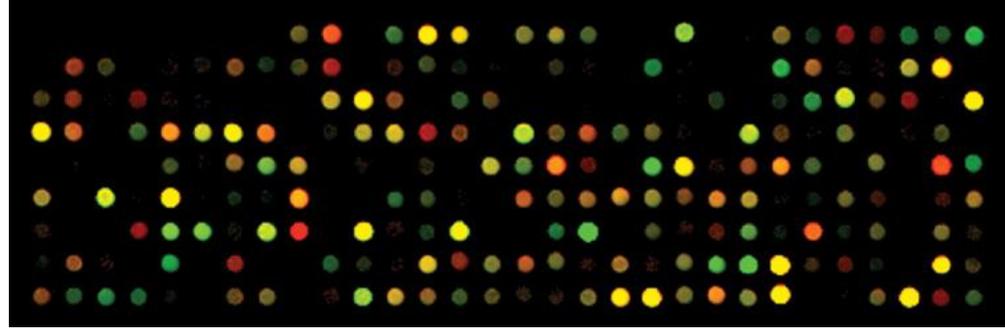
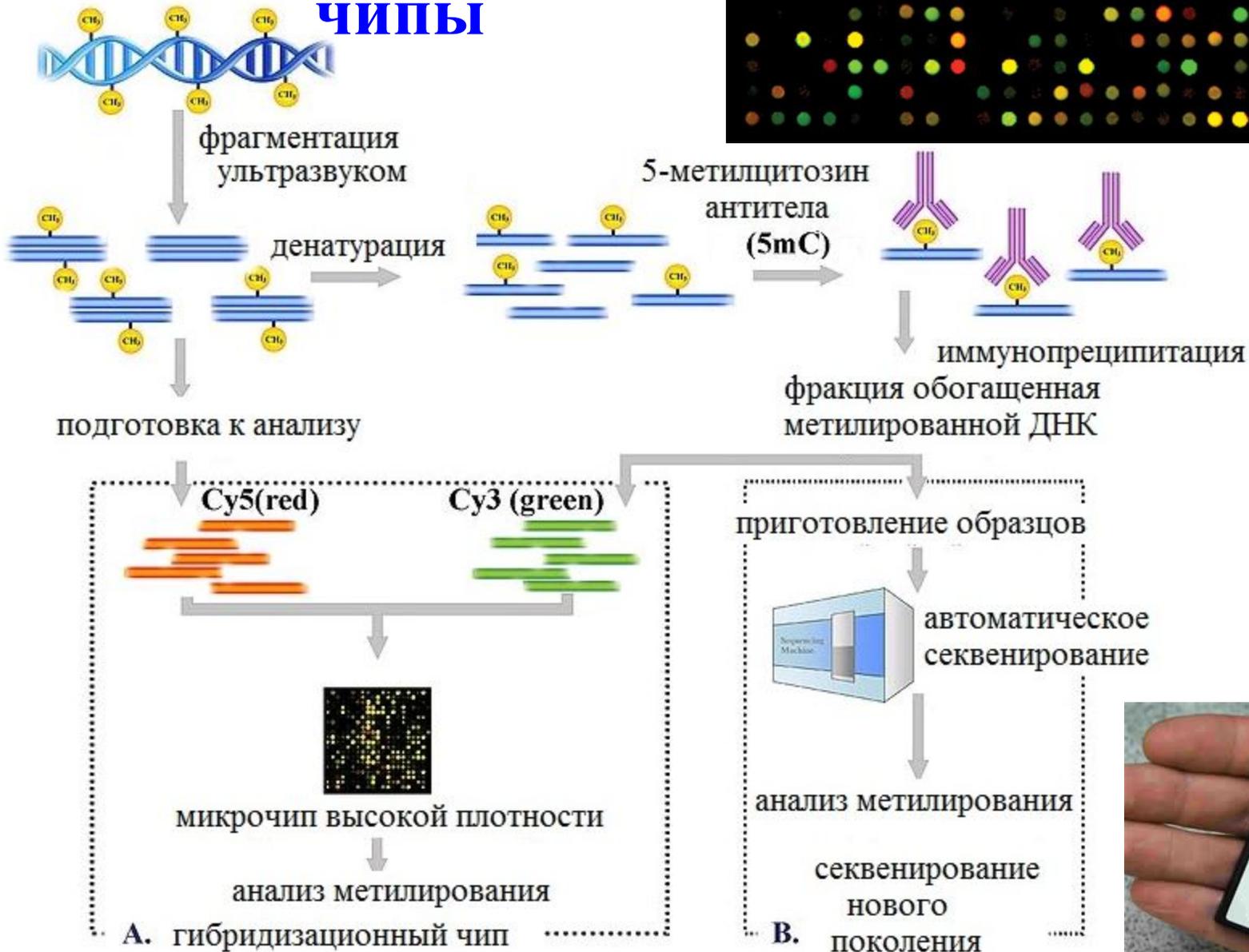
без обработки



метилированный
цитозин

Метильные ДНК-

ЧИПЫ



Метилирование ДНК вовлечено в широкий круг биологических процессов, которые включают регуляцию экспрессии тканеспецифичных генов, клеточную дифференцировку, геномный импринтинг, инактивацию X-хромосомы, регуляцию структуры хроматина, репликацию ДНК, канцерогенез, латентный период у вирусов.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Болезни импринтинга

**Синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана –
хромосома 15(q11.2-q13)**

Синдром Видеманна-Беквита - хромосома 11p15.5

Синдром Сильвера-Рассела – хромосомы 7p11.2 и 11p15.5

Наследственная остеодистрофия Олбрайт – хромосома 20q13

Транзиторный неонатальный диабет - хромосома 6q24

"La Monstrua" vestida



"La Monstrua" desnuda



CARREÑO DE MIRANDA, Juan (1614-1685) Eugenia Martínez Vallejo

Синдром Прадера-Вилли (15q11-q13)

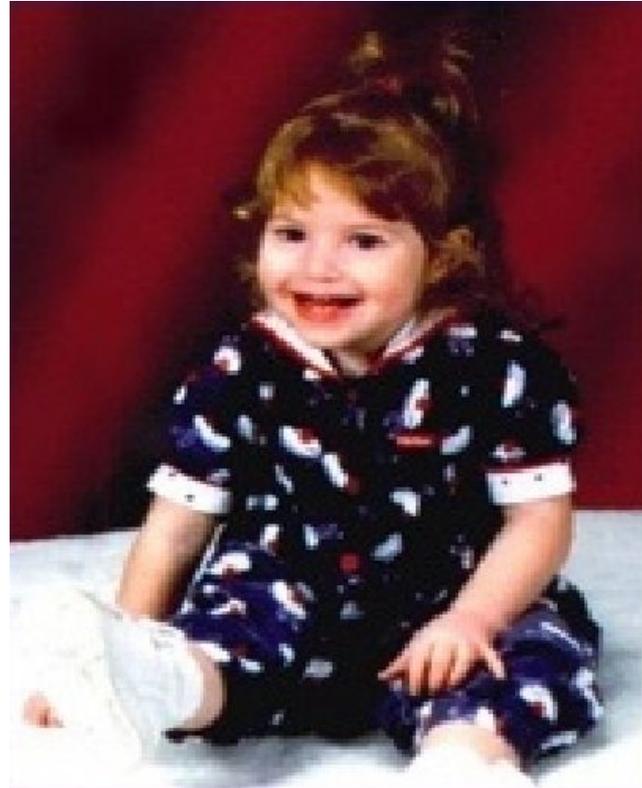


Ожирение, мышечная гипотония, низкий рост, гипогонадизм умственная отсталость различной степени выраженности

признаки дизэмбриогенеза: долихоцефалия, гипертелоризм, эпикант, микрогнатия, высокое небо, миндалевидный разрез глазных щелей, диспластичные ушные раковины, аномалии дерматоглифики

Частота синдрома в популяции 1:10-20 тыс.

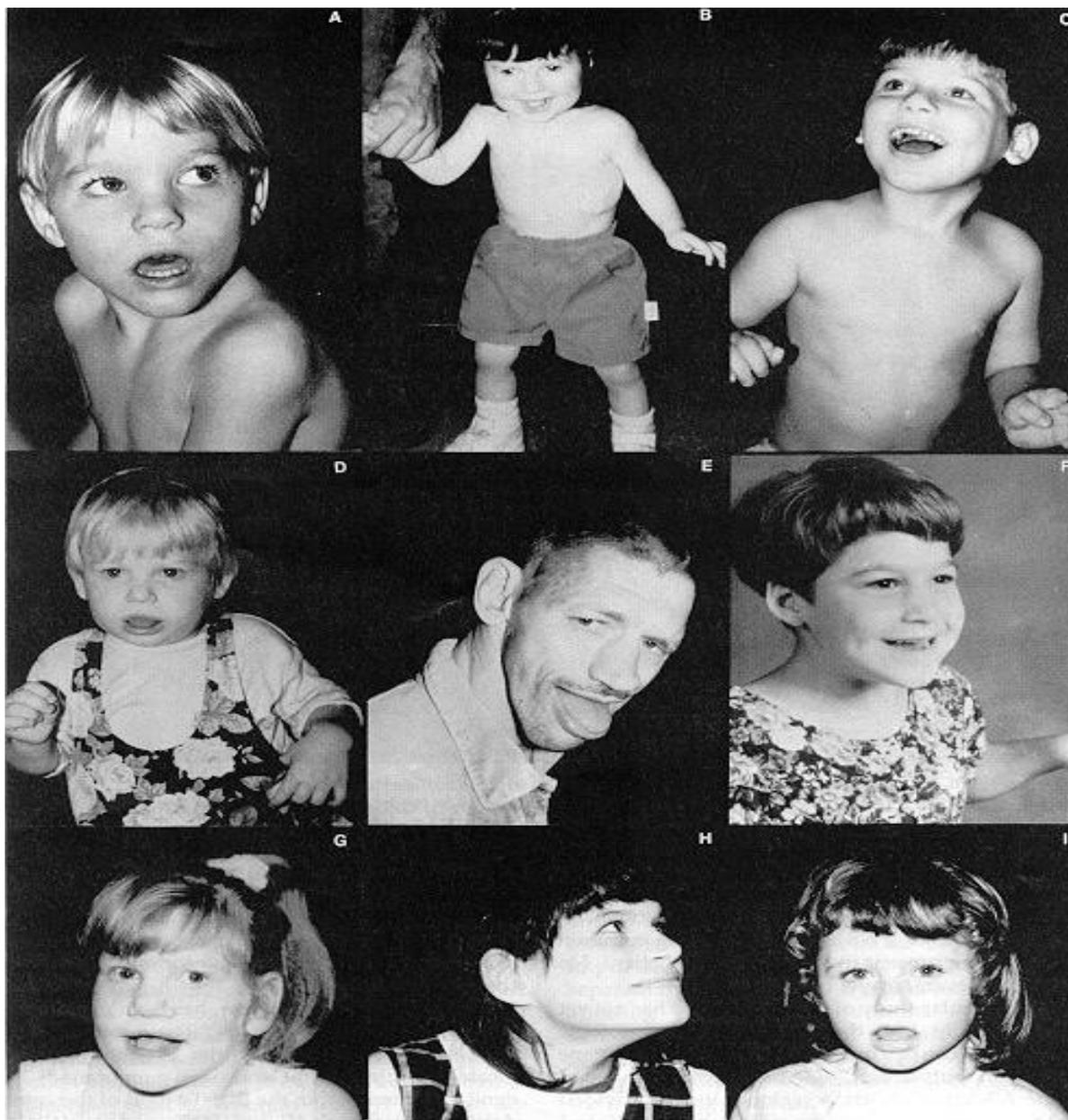
Синдром Ангельмана (15q11-q13)



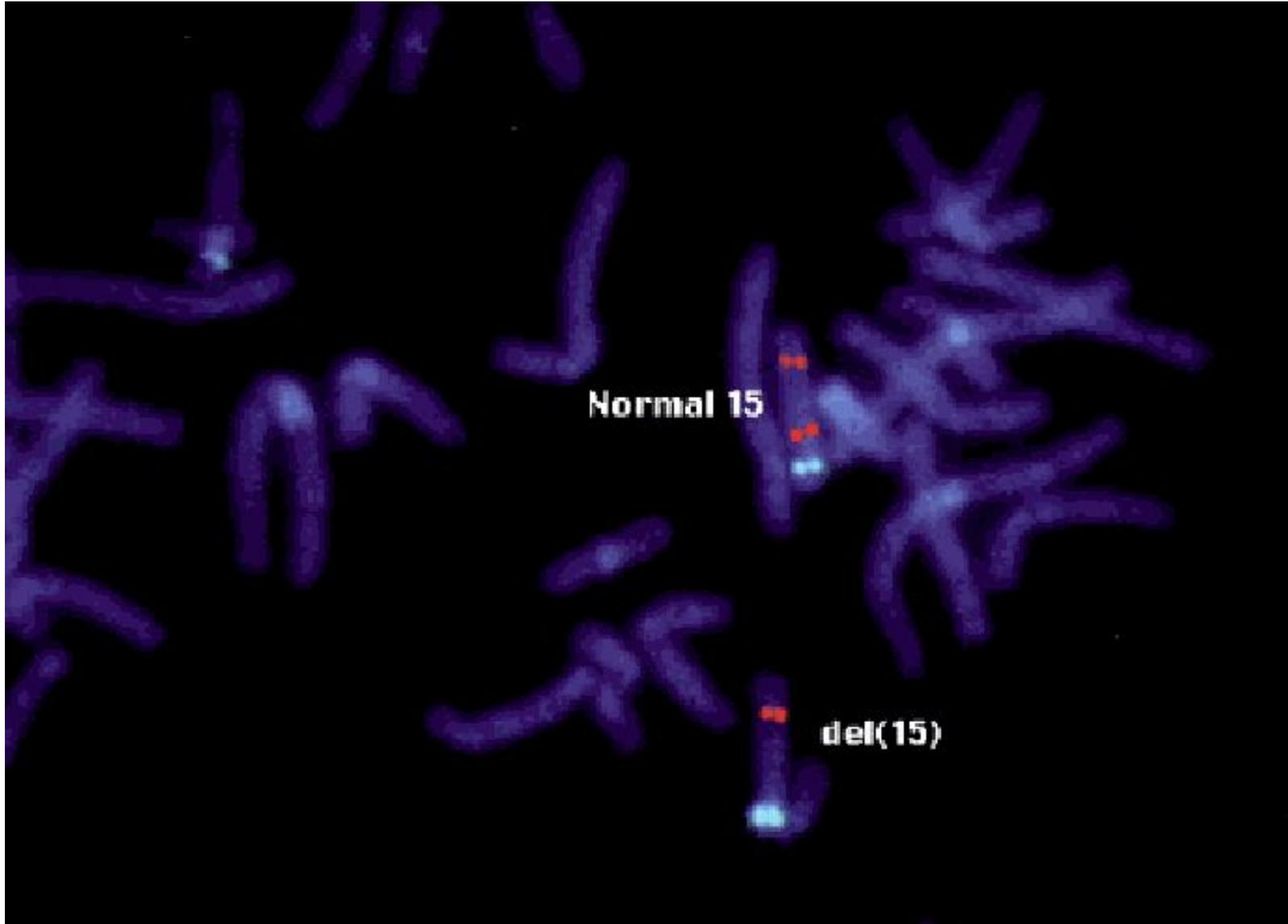
- неврологические проявления: тяжелая задержка умственного и моторного развития, атаксия, гипотония, судорожная готовность, гиперрефлексия и гиперкинезия, приступы неконтролируемого смеха, хлопанье в ладоши.
- микробрахицефалия с уплощенным затылком, большая нижняя челюсть, приоткрытый рот с выступающим языком, макростомия,
- редко растущие зубы,
- гипопигментация

Частота синдрома в популяции составляет 1:20000

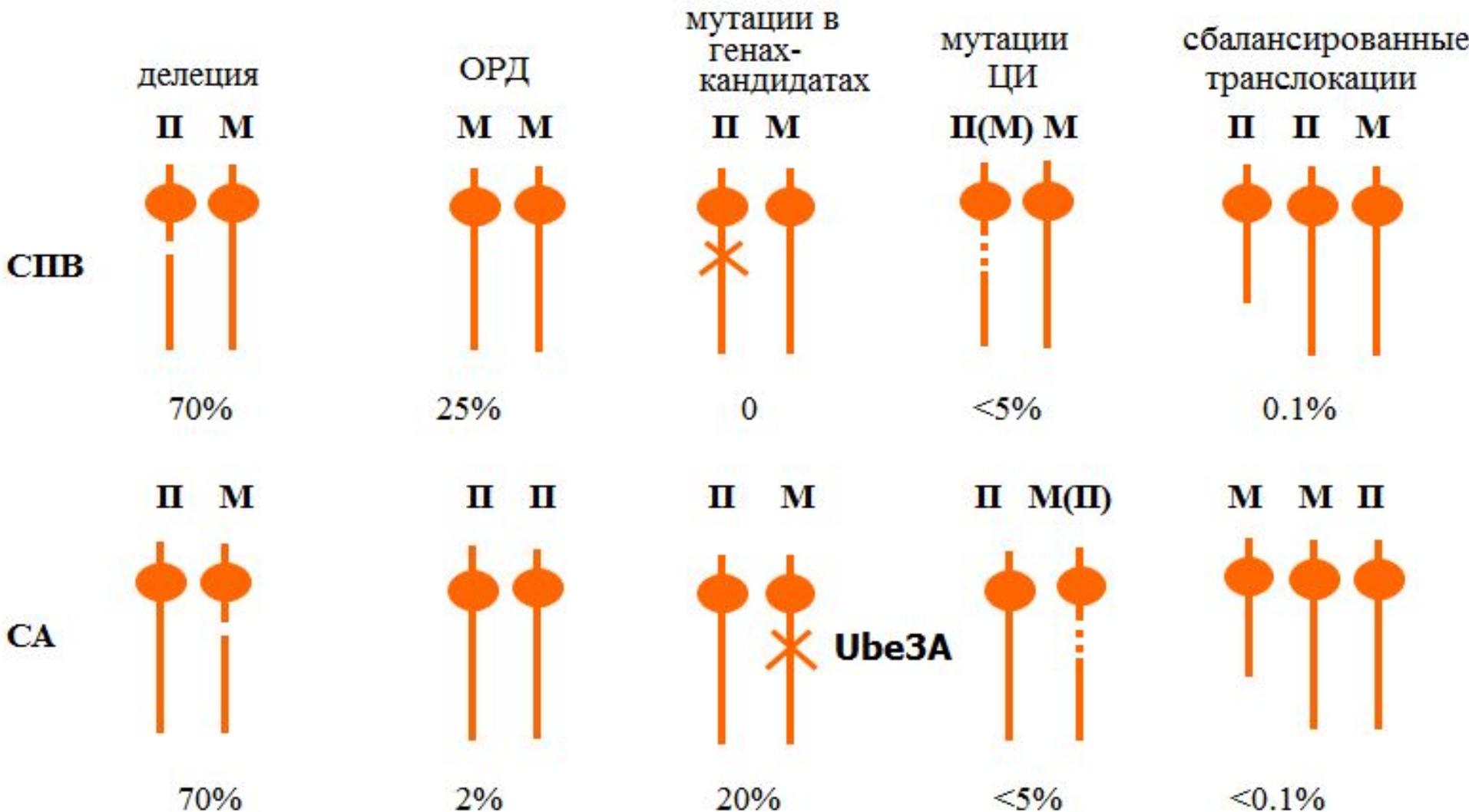
Синдром Ангельмана

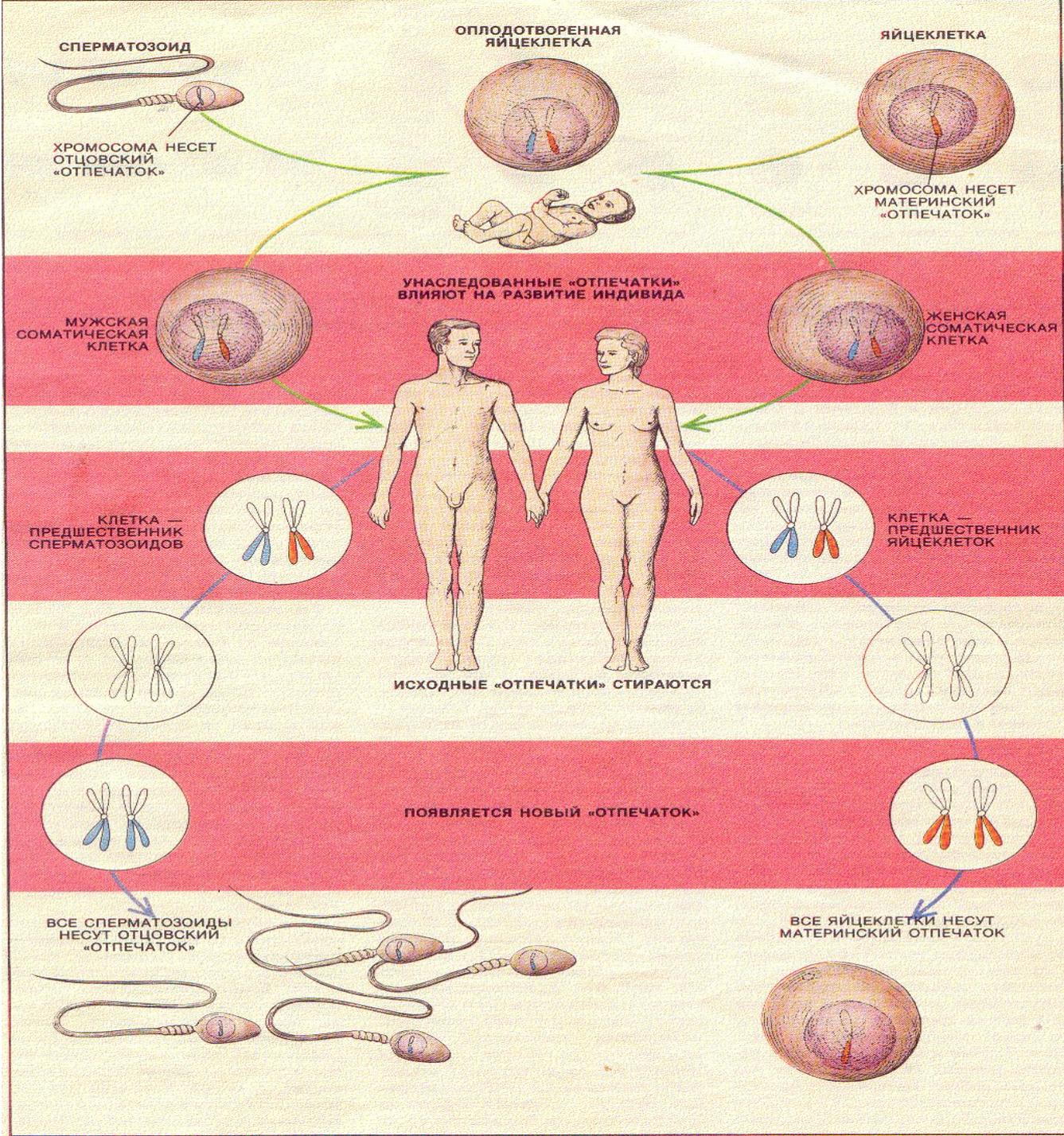


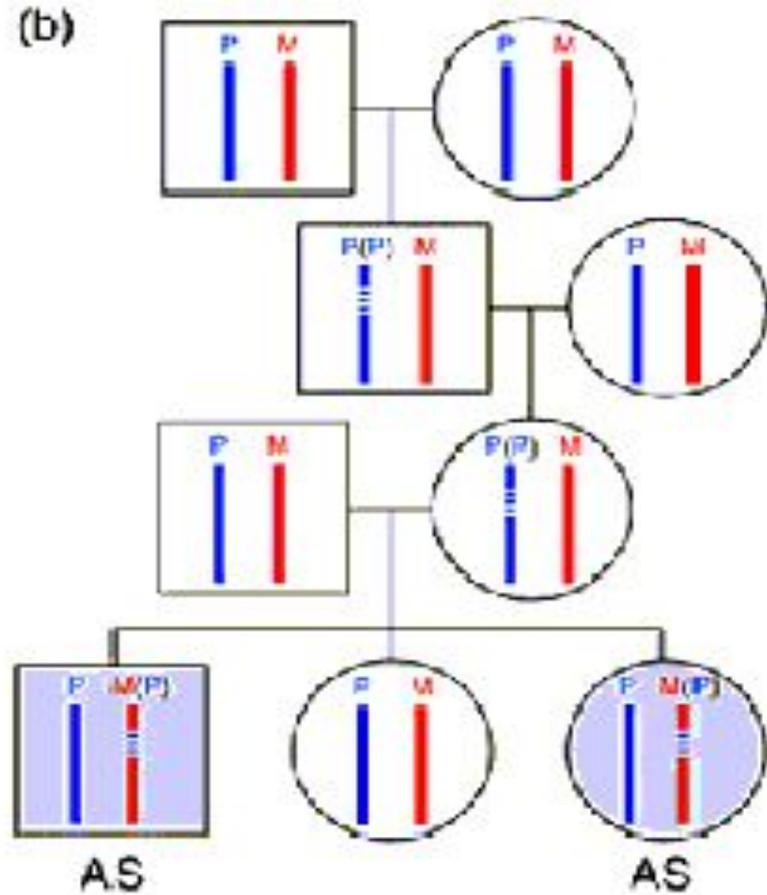
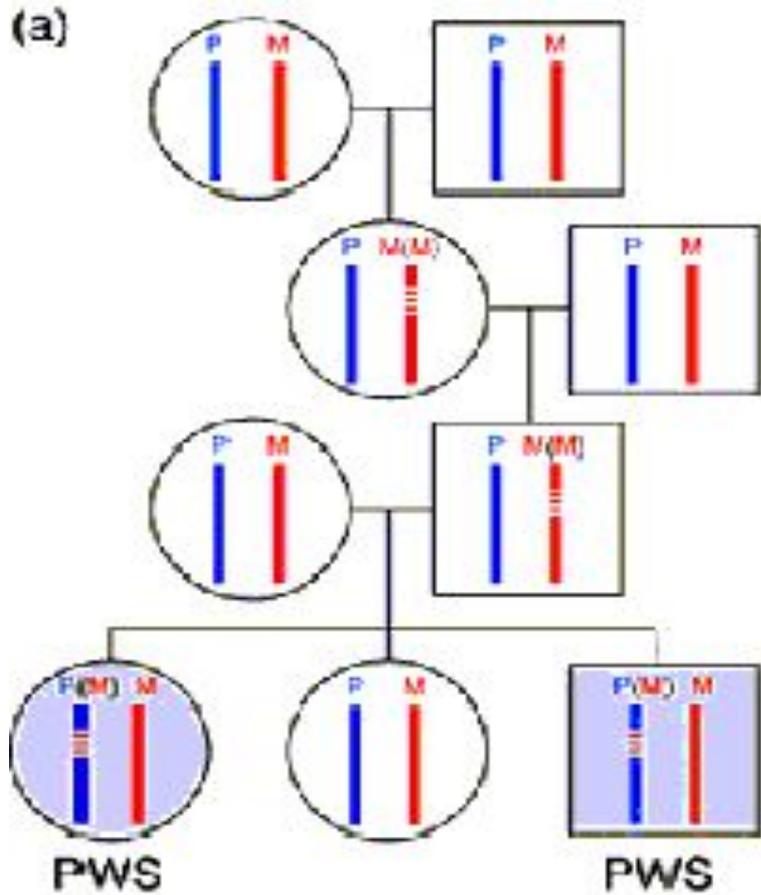
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОДЕЛЕЦИЙ ХРОМОСОМЫ 15q11.2 ПРИ СИНДРОМАХ ПРАДЕРА-ВИЛЛИ И АНГЕЛЬМАНА МЕТОДОМ FISH (ДНК-зонд SNRPN).



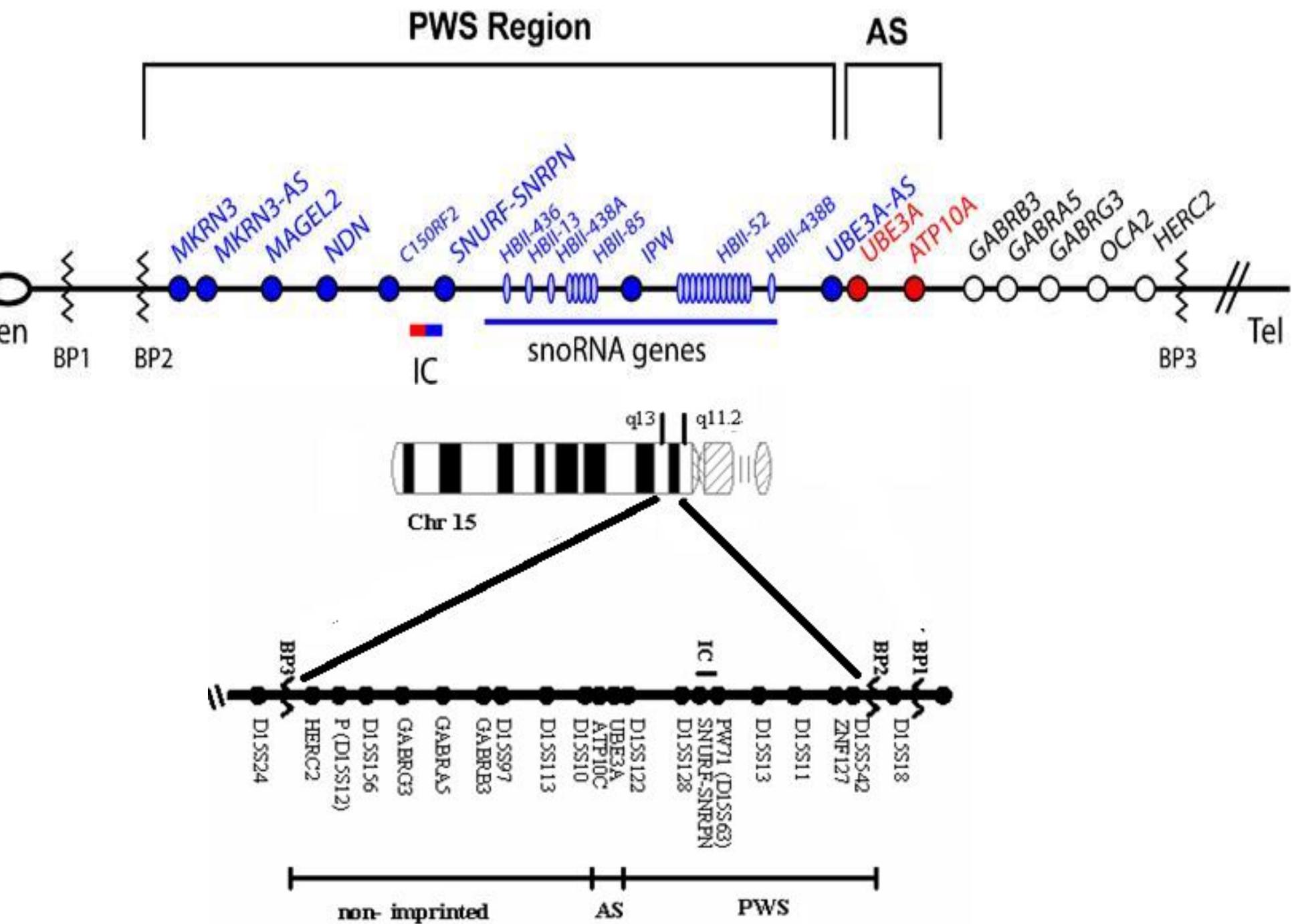
Молекулярные причины СПВ и АС







Наследование мутаций центра импринтинга, приводящих к невозможности переключения импринта в герминальных клетках: (а) - СПВ: если мутация возникает во втором поколении у женщины, то она фиксирует материнский импринт М(М), который передается без фенотипических последствий следующему поколению; однако у мужчины мутация блокирует стирание женского импринта, поэтому 50% его потомков будут иметь СПВ и эпигенотип Р(М); (б) - СА: отцовский импринт Р(Р) фиксируется и может передаваться без аномалий фенотипа через мужчин, но в герминальных клетках женщины мутация не позволяет изменить эпигенотип М(Р), что приводит в 50% случаев к рождению ребенка с СА.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РАЙОНА q11-q13 ХРОМОСОМЫ 15

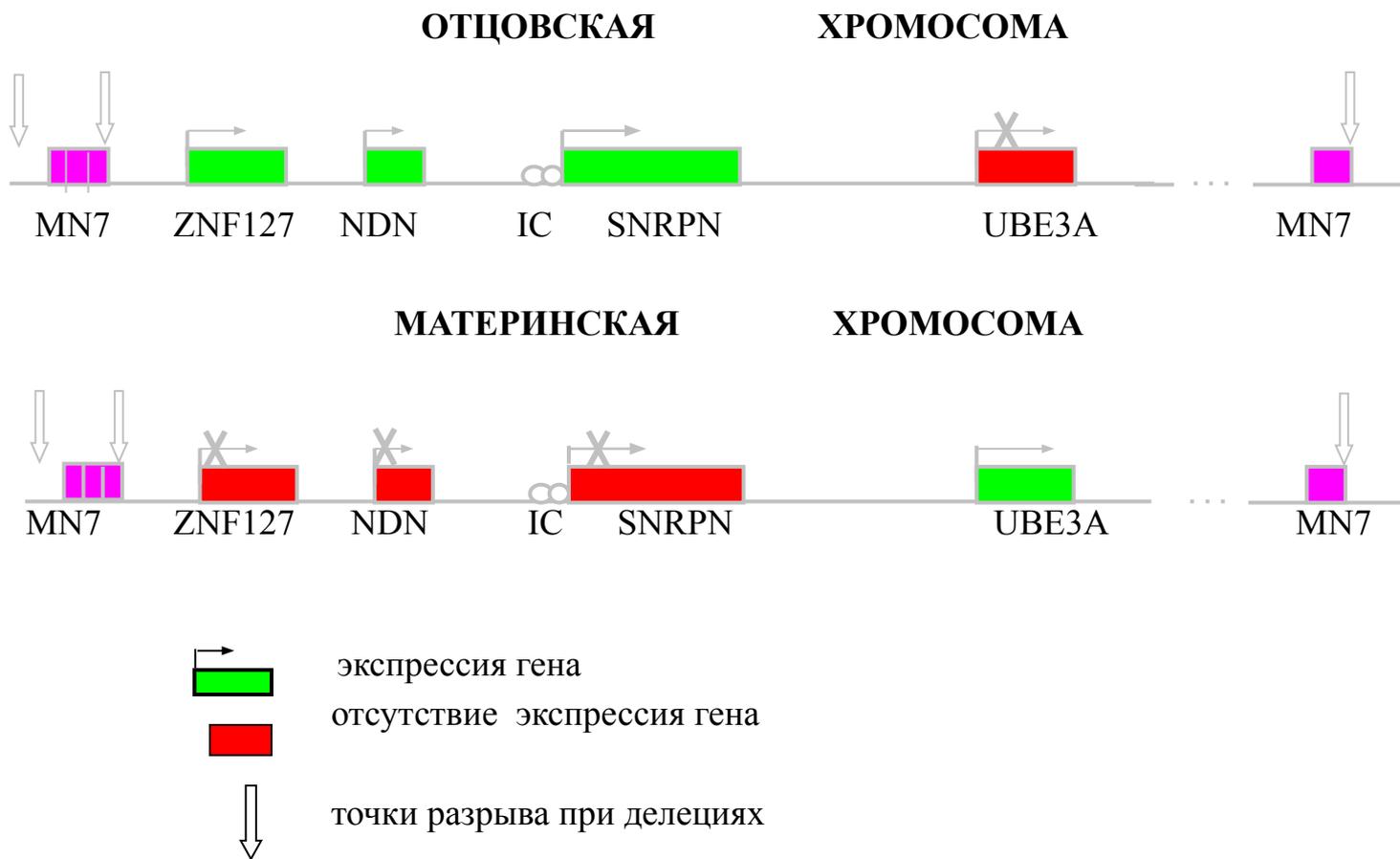
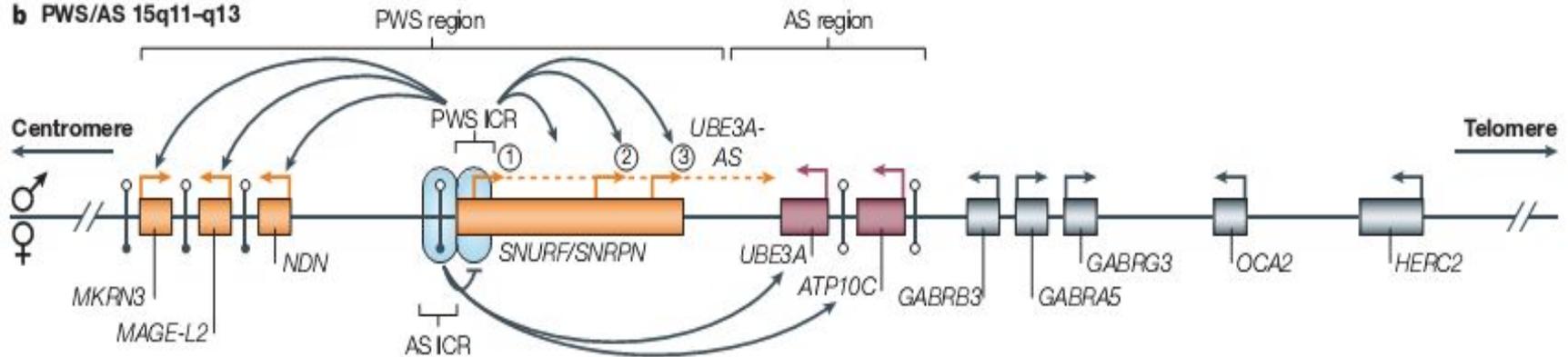
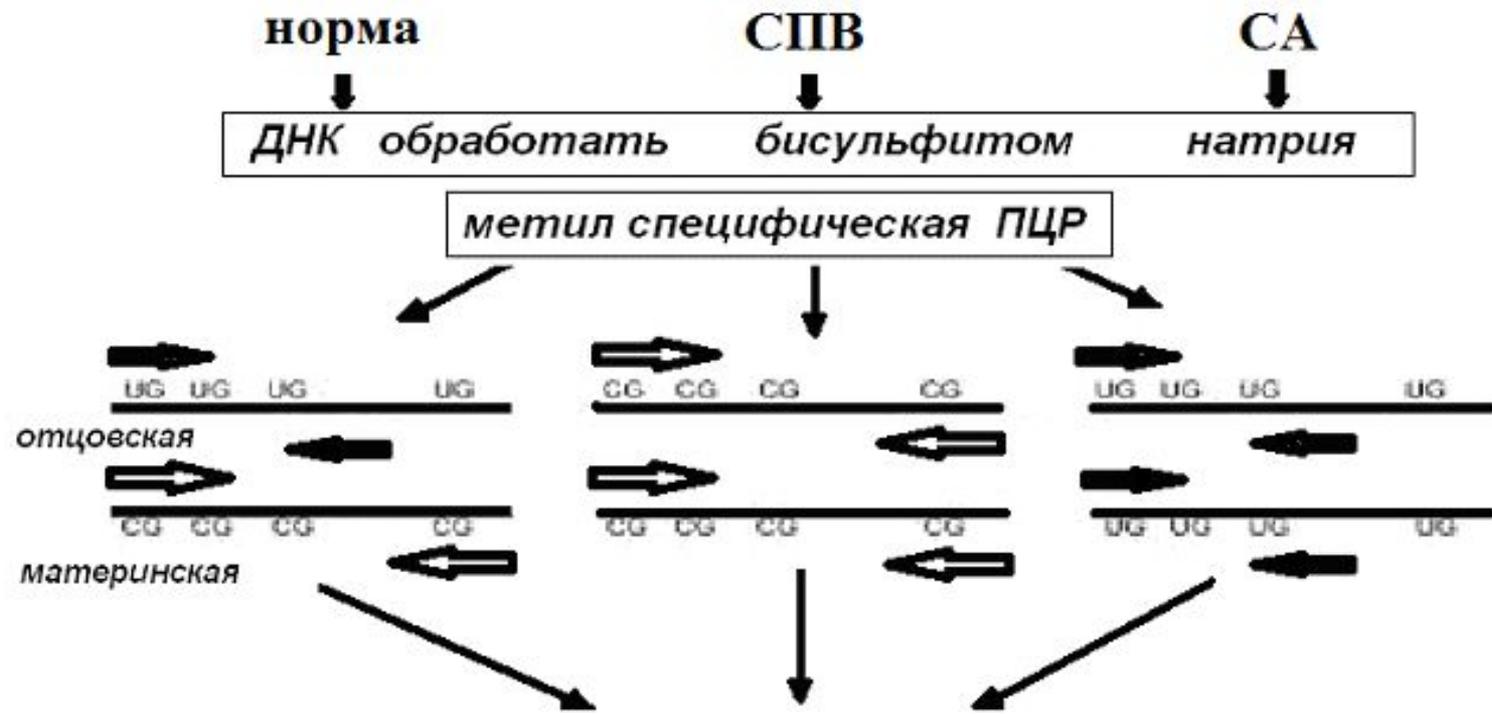


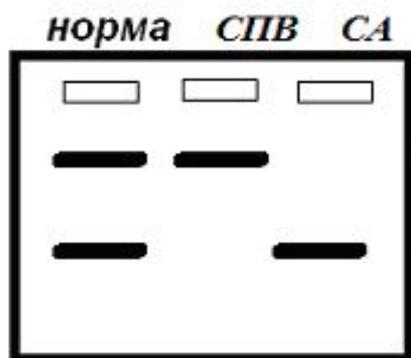
Схема функционирования центра импринтинга при синдроме Прадера-Вилли



Объектом регуляции для ЦИ являются гены, которые в норме активны на отцовской хромосоме, в том числе и антисмысловый транскрипт гена *UBE3A*. Экспрессия *UBE3A* регулируется через функцию антисмыслового транскрипта *UBE3A-AS* (*antisense*), т.е. активация *UBE3A* на материнской хромосоме является следствием подавления транскрипции антисмысловой цепи на этой же хромосоме. Согласно данной модели прямым назначением ЦИ-СПВ является установление (в гаметогенезе) и поддержание (в соматических тканях) активной транскрипции генов на отцовской хромосоме. В случае наследования делеции ЦИ-СПВ от отца возникает фенотип СПВ и наблюдается биаллельная транскрипция *UBE3A* как следствие инактивации *UBE3A-AS* на отцовской хромосоме. Роль ЦИ-СА сводится к отмене функции ЦИ-СПВ в овогенезе и сдерживанию тех процессов, которые реализуются под контролем ЦИ-СПВ в сперматогенезе. Поэтому в результате делеции ЦИ-СА становится невозможной инактивация «отцовских» генов на материнской хромосоме (в том числе *UBE3A-AS*), а значит и активация гена *UBE3A*. При наследовании такой делеции от матери наблюдается биаллельная экспрессия «отцовских» генов и биаллельное «молчание» гена *UBE3A*.



Продукты МС-ПЦР в геле



материнский аллель

отцовский аллель

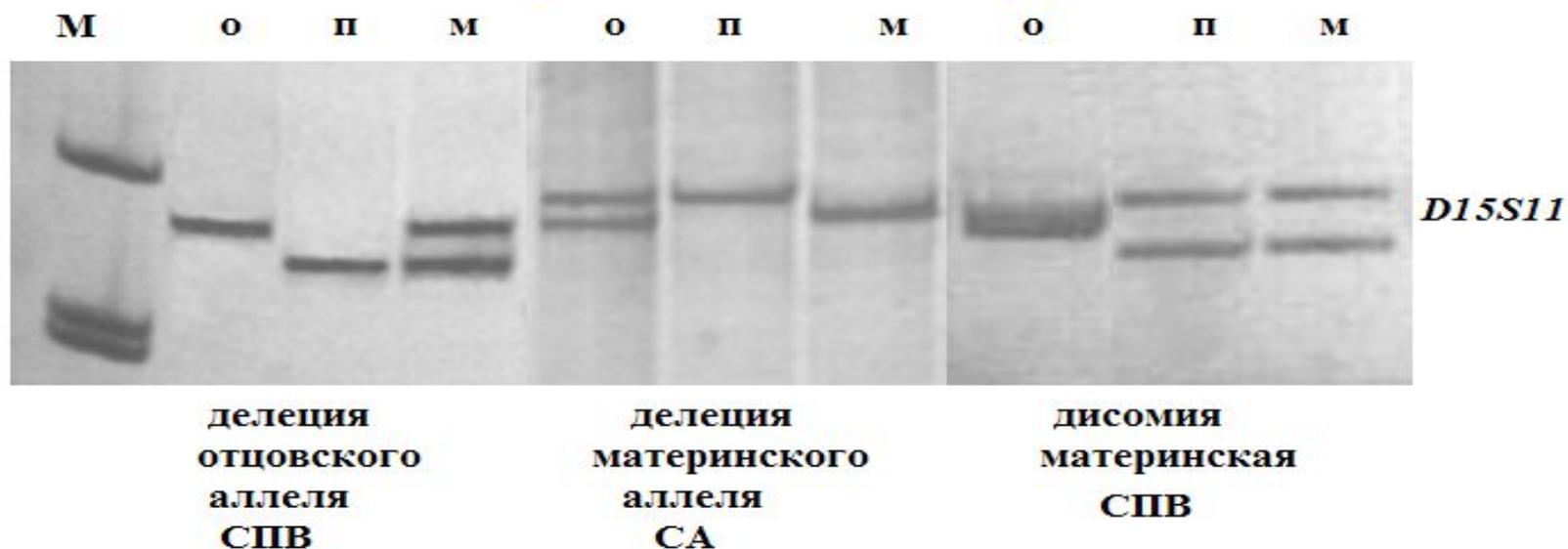


специфические праймеры на отцовскую хромосому

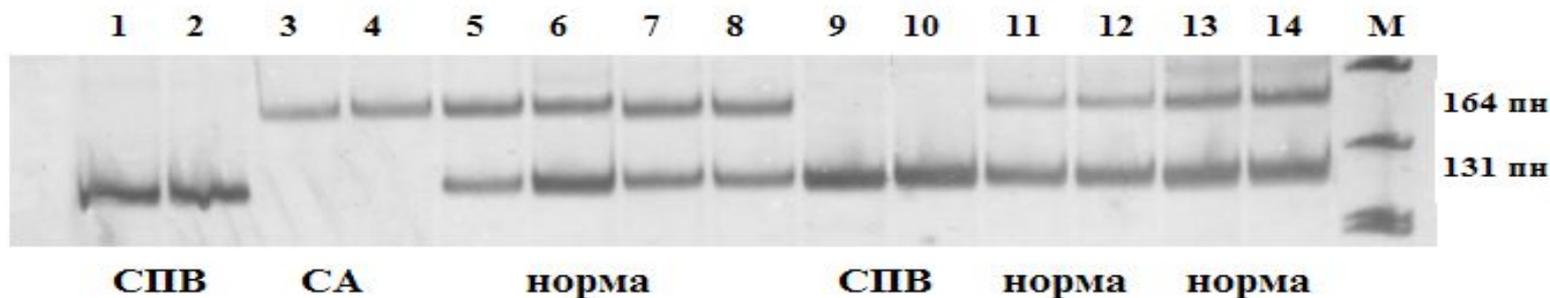
специфические праймеры на материнскую хромосому

Молекулярная диагностика СПВ и СА

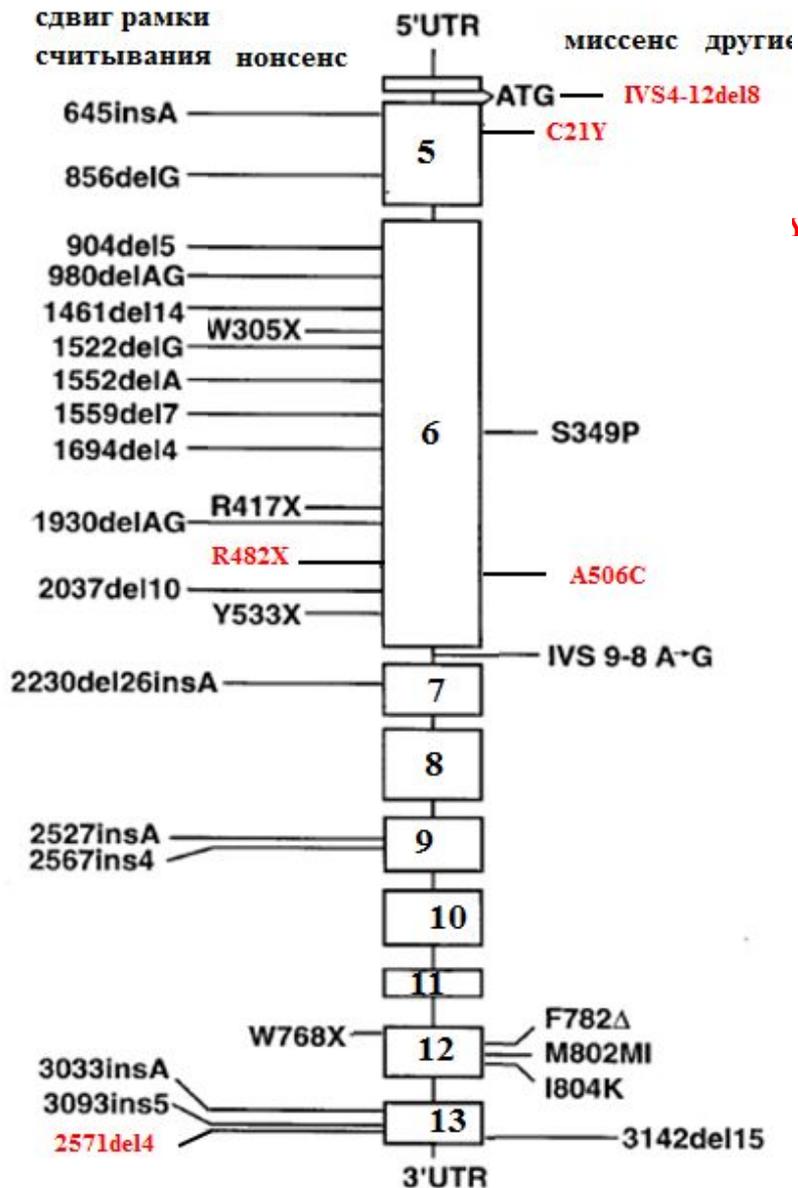
анализ микросателлитного полиморфизма



анализ аллельного метилирования



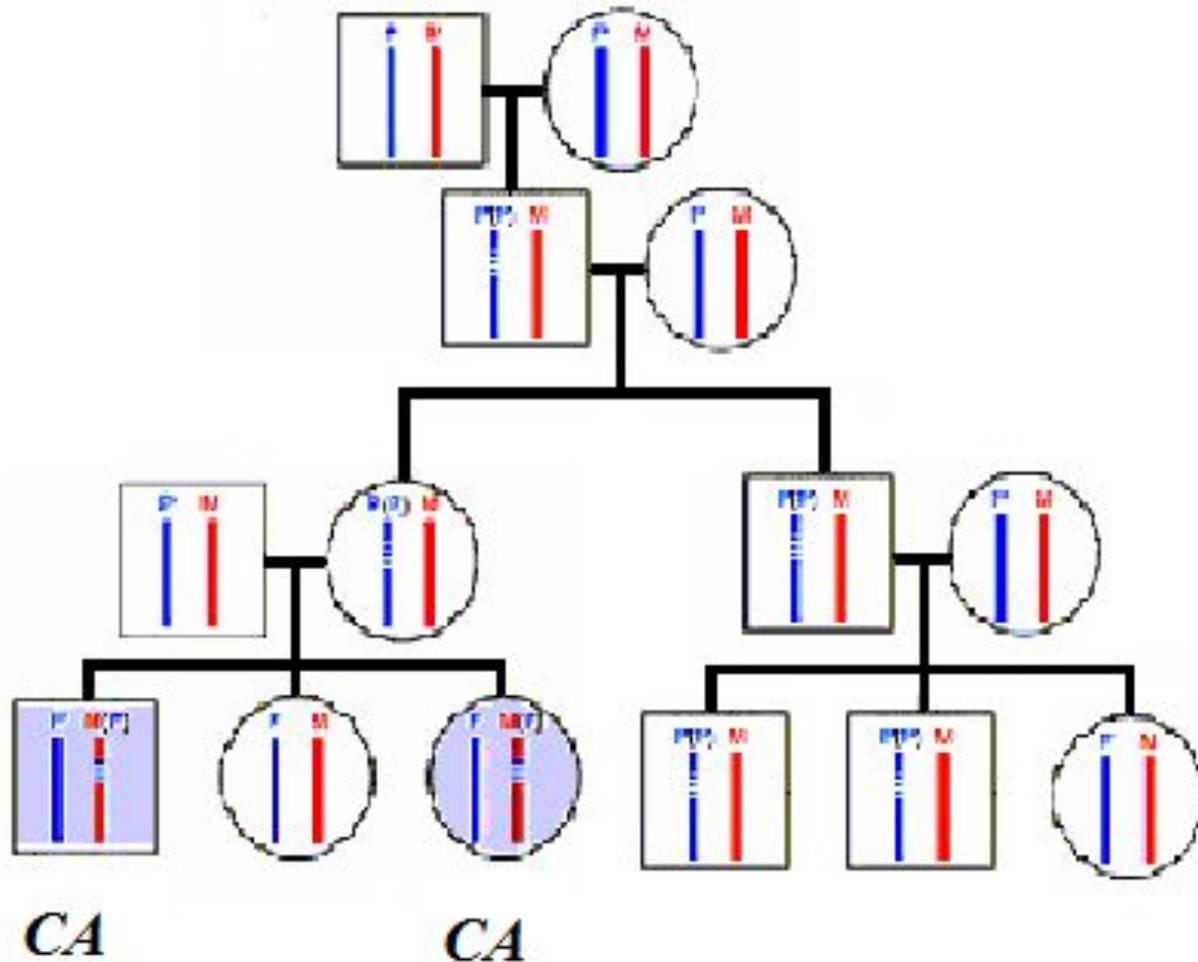
Ген UBE3A



Белок E6-AP, продукт гена *UBE3A*, входит в состав мультиферментного комплекса, обеспечивающего присоединение к цитоплазматическим белкам молекулы небольшого белка убиквитина (состоящего из 76 аминокислот), после чего они становятся мишенями для деградации в протеосомах. Мишенями для убиквитин-зависимого протеолиза становятся большинство неправильно свернутых, денатурированных и других аномальных белков.

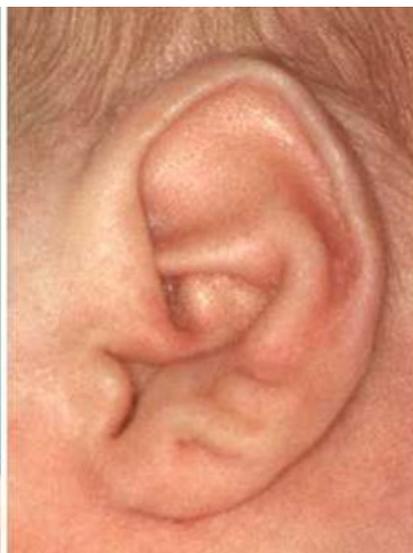
Помимо участия в процессе убиквитинирования белок E6-AP служит транскрипционным коактиватором для рецепторов стероидных гормонов. E6-AP функционирует одновременно как убиквитин-лигаза и как транскрипционный фактор. Обе эти активности независимы друг от друга, поскольку регуляция транскрипции опосредуется N-концевым доменом, а убиквитинирование сопряжено с C-концевой частью белка.

Отклонение от менделевского наследования при нарушениях в ЦИ и мутациях в гене *UBE3A*



Синдром Видемана –Беквита

Частота в популяции 1:10-12 тыс. Характерны пупочная грыжа, макроглоссия, гигантизм (средняя масса при рождении – 3900 г), гипоплазия средней трети лица, гемигипертрофия, висцеромегалия, гемангиомы на лбу, нефробластомы, гепатобластомы и др.



Microcephaly

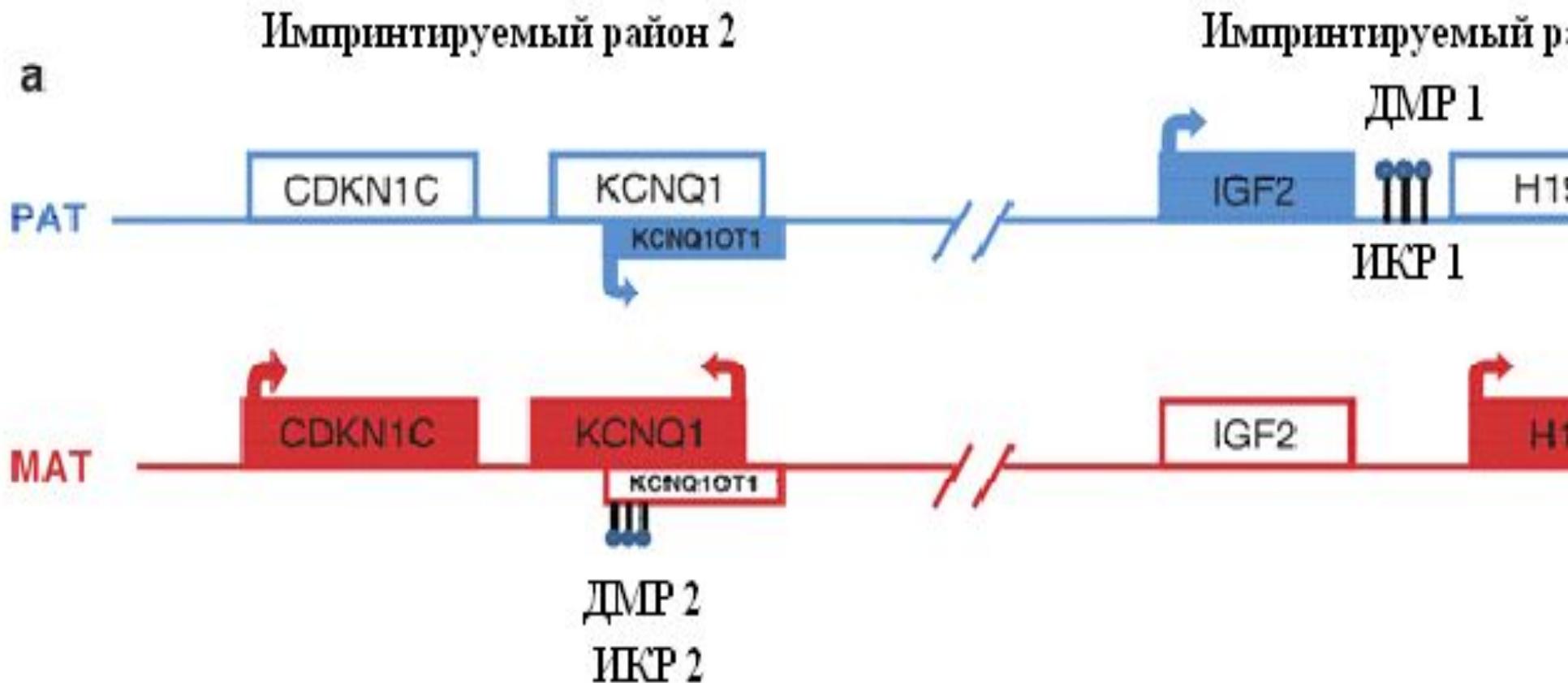


Macroglossia



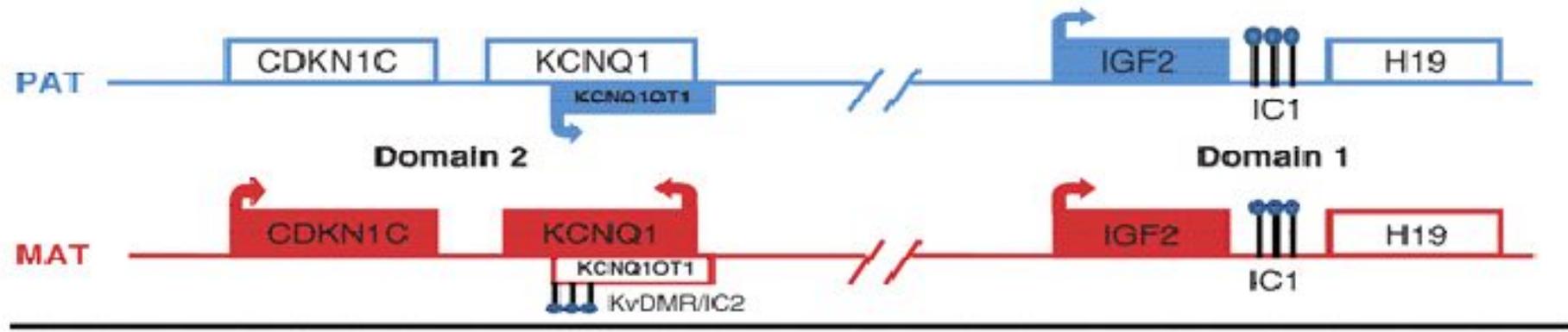
Umbilical hernia

Нормальная организация кластеров импринтированных генов на хромосоме 11 (11p15)



Нарушения кластера импринитрованных генов критического района 11p15

гиперметилирование H19

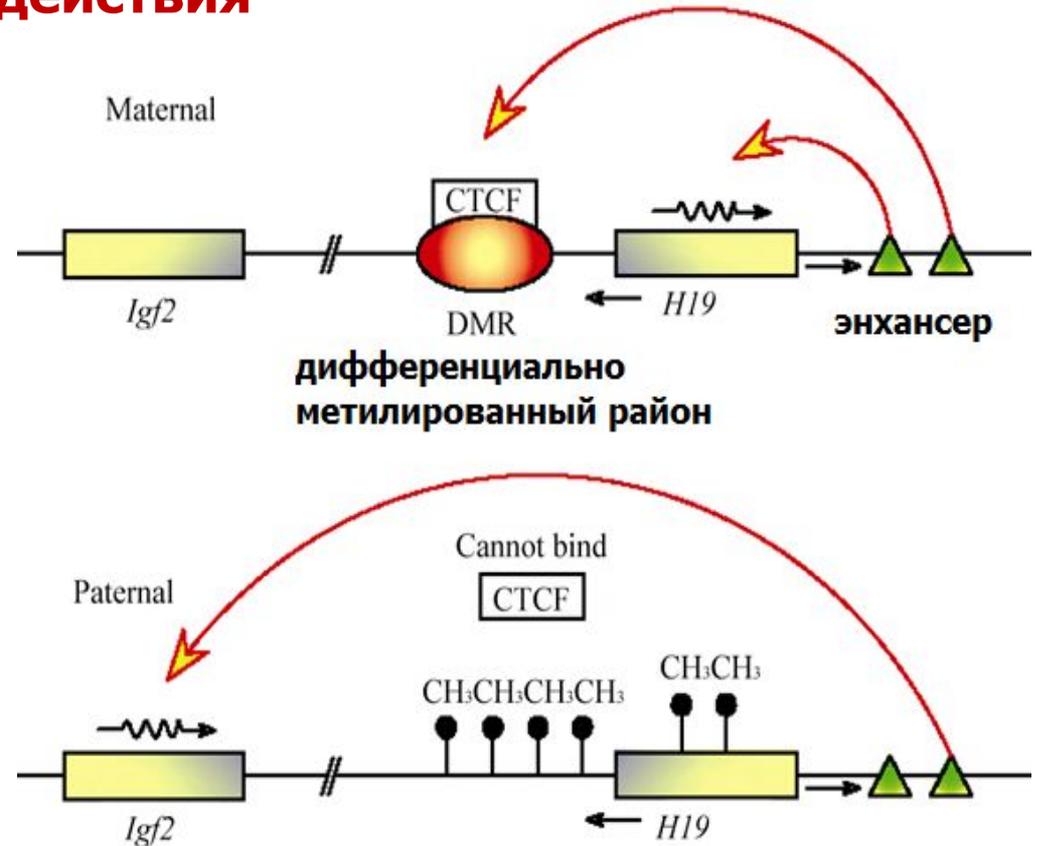


гипометилирование KCNQ1OT1



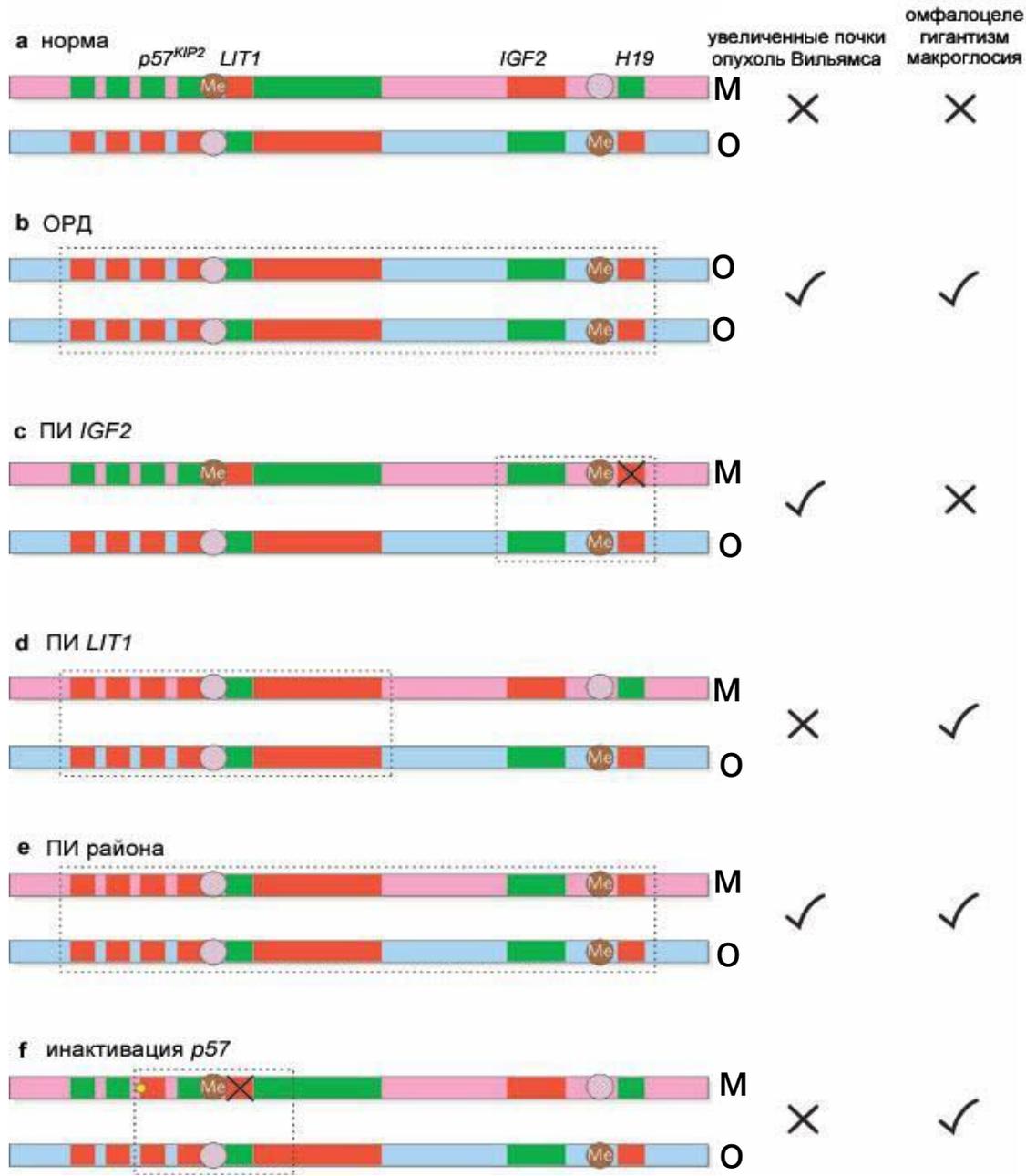
Молекулярный механизм действия центра импринтинга

Гены *H19* и *IGF2* тесно сцеплены, противоположно импринтированы и их экспрессия регулируется общим энхансером, расположенным в 3' области *H19*. В нескольких т.п.н. от 5' области *H19* был обнаружен дифференциально метилированный район, который является ключевым - СВБ-ЦИ1. В метилированном состоянии на отцовской хромосоме он требуется для выключения *H19*, а на материнской хромосоме, будучи не метилированным, он участвует в выключении *IGF2*.



СВБ-ЦИ1 содержит инсулятор, блокирующий или модулирующий доступ энхансера к промоторным районам генов. В активном состоянии СВБ-ЦИ1 эффективно блокирует взаимодействие энхансера с промоторным районом *IGF2*, который не может экспрессироваться на материнской хромосоме. На отцовской хромосоме СВБ-ЦИ1 метилирован, не имеет возможности связываться с CTCF и не препятствует возможности активации *IGF2* энхансером. В то же время, будучи метилированным, он вызывает инактивацию *H19* на отцовской хромосоме. CTCF является первым обнаруженным белком, который необходим для нормального функционирования эпигенетической метки.

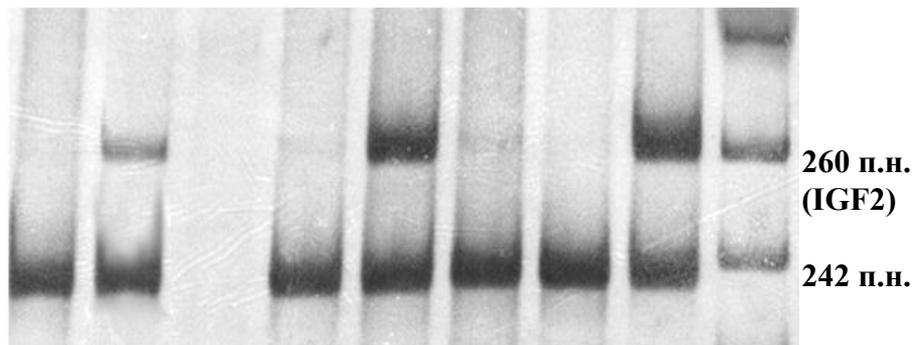
Гено-фенотипические корреляции при СВБ



Молекулярно-генетическая диагностика синдрома Видемана-Беквита

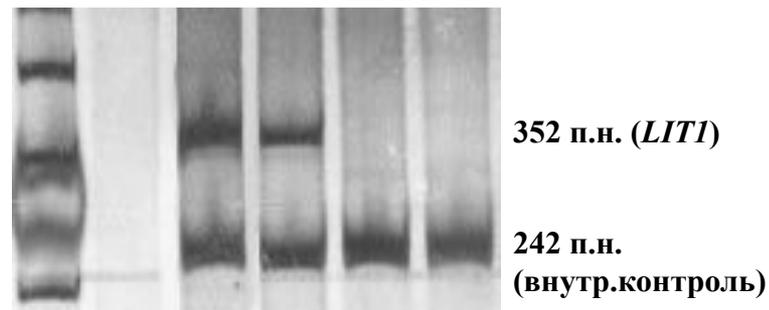
Диагностика аллельного метилирования генов

IGF2



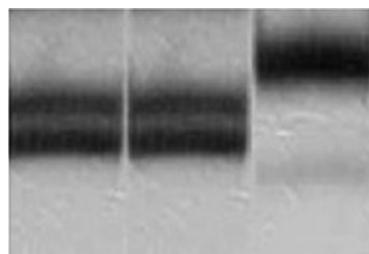
1 2 3 4 5 6 7 8 9
5, 8 – норма; 3 - отрицательный контроль.
1, 4, 6, 7 - пациенты с СВБ;
2 - пациент с СВБ (мозаицизм);

LIT1



М 1 2 3 4 5
1 – негативный контроль;
2 – норма;
3,4,5 – пациенты с СВБ.

Пример однородительской дисомии у пациента с СВБ



Микросателлитный маркер
D11S922

♂ пр ♀



Синдром Рассела-Сильвера

Пренатальная и постнатальная задержка
роста;

Треугольное лицо с выступающим лбом;

Клинодактилия или брахидактилия;

Макроцефалия;

Скелетная асимметрия;

Мышечная гипотрофия;

Гипотония

Хромосомные перестройки, затрагивающие хромосомы
1, 7, 8, 11 (11p15), 15, 17 и 18

Мат ОРД 7 (5-15% случаев), тандемные дупликации 7p11.2-p13.

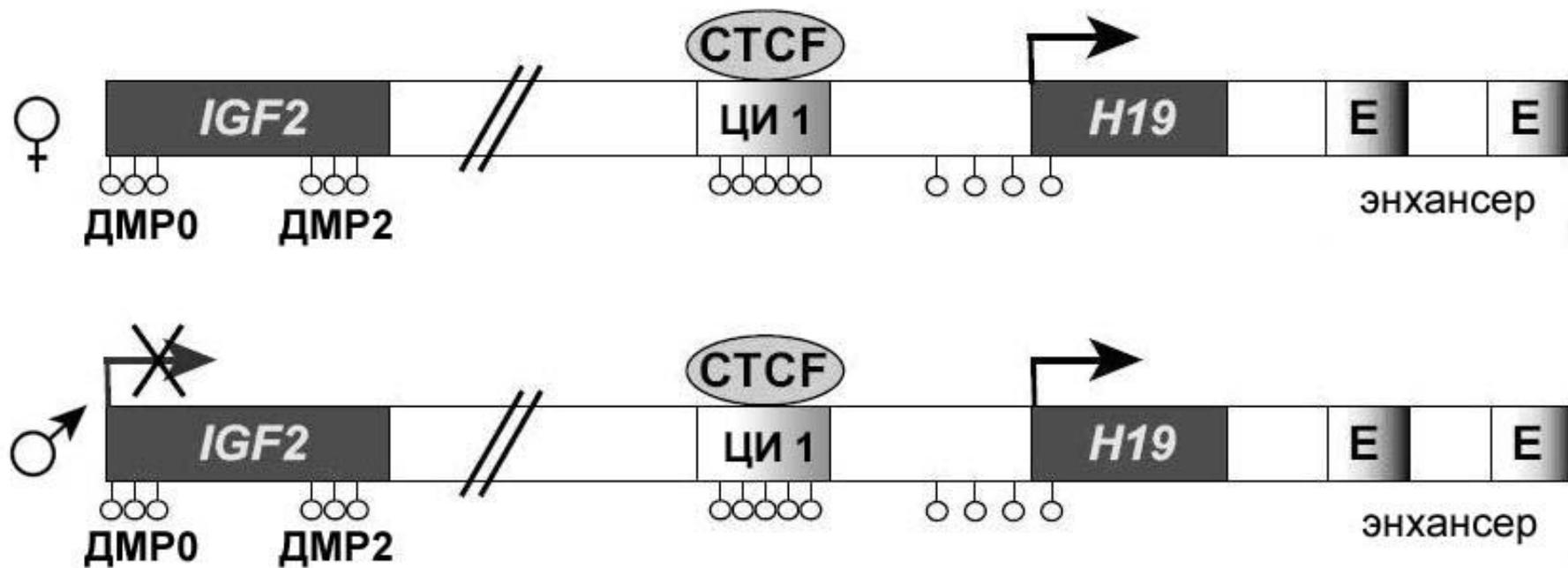
1) 7p11.2-p13 (*GRB10* - ингибитор роста); 2) 7q31-qter (*MEST*);
3) 7q21.3 - *PEG10*

В 30-65% случаев обнаруживается гипометилирование
H19/IGF2 на отцовской хромосоме 11.

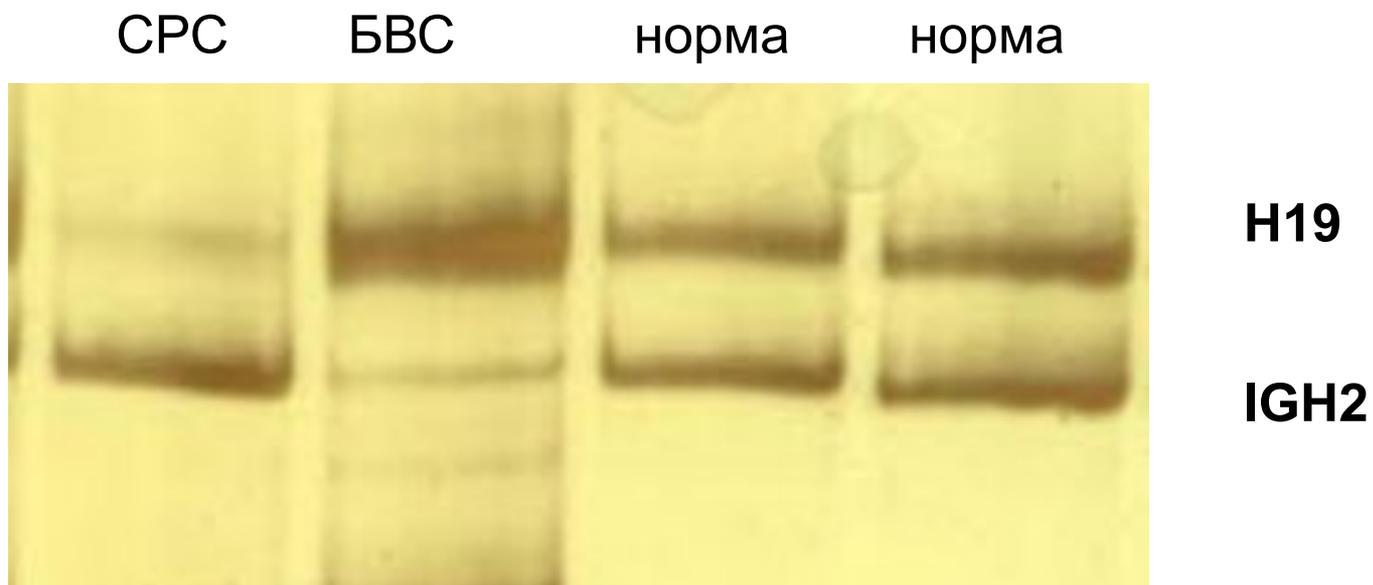


Рисунок 2а и 2б

Схема эпигенетической патологии при СРС (гипометилирование *H19* на отцовской хромосоме 11)



Молекулярная диагностика синдромов Сильвера-Рассела и Беквита-Видемана (11p15)



Многолокусная ПЦР

7p11.2-p13. У человека отцовская экспрессия *GRB10* установлена в головном и спинном мозге, материнская – в скелетных мышцах, в остальных тканях ген экспрессируется биаллельно. Мышиный ген импринтирован, экспрессируется с материнской хромосомы во всех тканях кроме мозга, где экспрессируется отцовский аллель. Делеции материнского аллеля гена приводят к увеличению роста у потомства, свидетельствуя о его функции, как негативного регулятора роста.

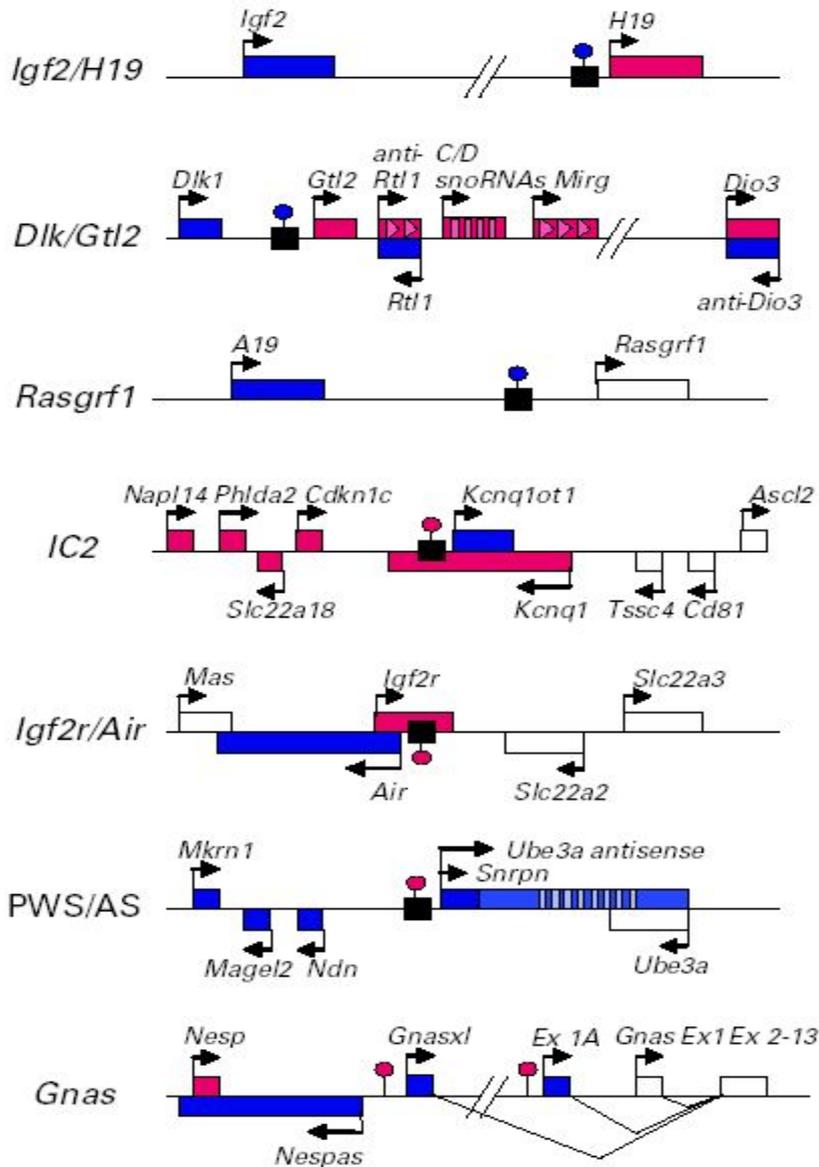
7q32.2 содержит 5 импринтированных генов, включая гены *MEST*, *COPG2IT1*, *MESTIT1*, которые экспрессируются с отцовской хромосомы, а *CPA4* и *KLF14* – с материнской. *MEST* имеет две изоформы, одна из которых экспрессируется с отцовского аллеля, а вторая (использующая альтернативный первый экзон) экспрессируется биаллельно во всех тканях, кроме плаценты. Нокаут гена у мышей приводит к малому размеру потомства.

7q21.3 содержит гены *PEG10* и *SGCE*, имеющих отцовскую экспрессию, *PPP1R9A* экспрессируется с материнского аллеля в эмбриональных скелетных мышцах и экстраэмбриональных тканях, а ген *TFP12* экспрессируется с материнского аллеля в плаценте. Делеции *PEG10* у мышей приводят к ранней эмбриональной гибели.

Молекулярно-генетические причины синдромов Беквита-Видемана и Сильвера-Рассела

Тип повреждения	СБВ		ССР	
структурные повреждения хромосом	отцовская дупликация	1%	материнская дупликация	4%
	Инверсии и транслокации	1%	-	
однородительская дисомия 11p15	отцовская	10-20%	материнская	-
потеря импринтинга 11p15 - аномалии метилирования <i>IGF2</i> и <i>H19 KvL (LIT1)</i>	гиперметилирование <i>H19</i>	2%	гипометилирование <i>H19</i>	20-30%
	гипометилирование <i>IGF2</i>	25-50%	гиперметилирование <i>IGF2</i>	?
	гипометилирование <i>KvDMR</i>	50%	-	-
Мутации <i>CDKN1C</i>	спорадические	5-10%	-	-
	наследственные	25%	-	-
Другие причины			материнская дисомия или дупликация 7p	10%
	неизвестные	20%	неизвестные	45-70%

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРА ИМПРИНТИНГА



1. Регулирует импринтированные гены в кластере *in cis*;
2. Имеет дифференциальное аллельное метилирование;
3. Имеет различную аллельную структуру хроматина (гиперчувствительность к ДНКазе I, метилирование гистона H3 и ацетилирование гистонов H3 и H4);
4. Способен действовать как инсулятор с использованием белка CTCF;
5. Содержит некодирующие РНК.

