

Епігенетика: імплементация фундаментальних основ у клінічну практику

Д. О. Микитенко

2012

Зміст

- Епігенетика – загальні відомості
- Механізми епігенетики
 - Метилування ДНК та ремоделювання хроматину
 - Модифікатори
 - Гомоцистеїн як універсальний модифікатор
 - Порушення біологічних процесів метилування
 - Оксидативний стрес
 - Гомоцистеїнування білків
 - Потенціювання естроген-індукованого гормонального раку
 - Імпринтинг
 - Пріонізація білків
 - РНК-опосередковані модифікації
 - Інактивація Х-хромосоми
- Методи досліджень

Сестри Діон (нар. 1934)- п'ять однайцевих близнючок

Генетично ідентичні

Різні психотипи.....

Різні хвороби...

Різні долі....



Загальна інформація

- Епігенетика (єлі-над) – розділ медико-біологічної науки, що вивчає закономірності змін експресії генів чи фенотипу клітини, викликаних механізмами, що не пов'язані зі зміною послідовності ДНК.
- Епігенетика характеризує процес взаємодії організму із середовищем при формуванні фенотипу
- Історія питання
 - 1942 – Конрад Уоддінгтон – термін “Епігенетика” (похідне від “генетика” та “епігенез”) - концептуальна модель взаємодії генів зі своїм оточенням при формуванні фенотипу.
“...дослідження механізмів тимчасового та просторового контролю активності генів в процесі розвитку організмів...”

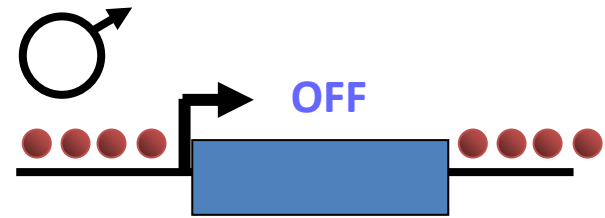
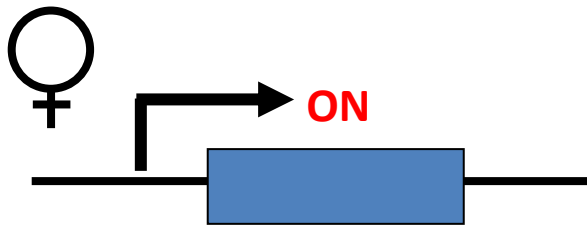


Епігенетичні процеси – норма чи патологія?

Епігенетика досліджує механізми, за допомогою котрих, на основі генетичної інформації, що міститься в одній клітині (зиготі), за рахунок різної експресії генів в різних типах клітин може відбуватися розвиток багатоклітинного організму, що складається із диференційованих клітин.

Епігенетичне наслідування

Імпринтинг – варіант епігенетичної спадковості, при якому специфічний характер диференційної активності генів визначається статтю організма, від кого вони успадковані.



Імпринтинг виходить за межі класичних правил Менделєвського наслідування.

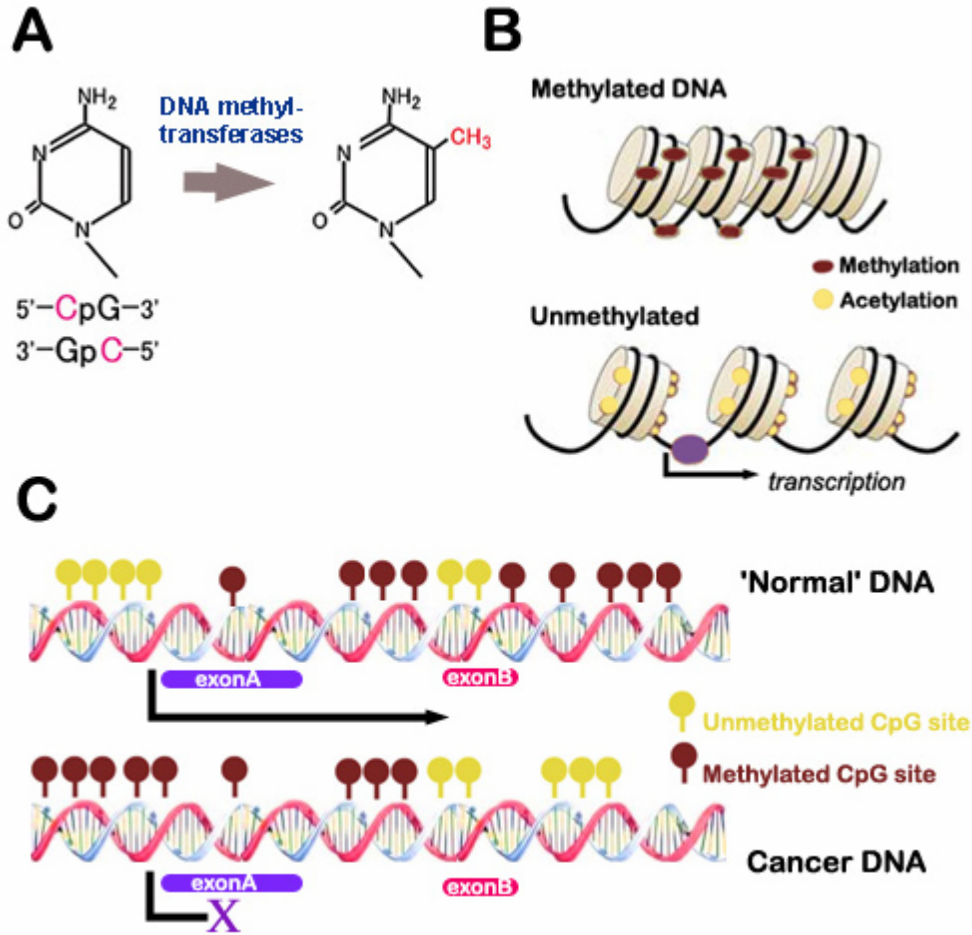
Ефекти епігенетики

- Геномний імпринтинг (та його порушення)
- Дифференцирование клеток
- Трансгенеративні епігенетичні ефекти
- Мутаційний процес
- Новоутворення
- Старіння організму
- Консервативність генетичної інформації

Механізми епігенетики

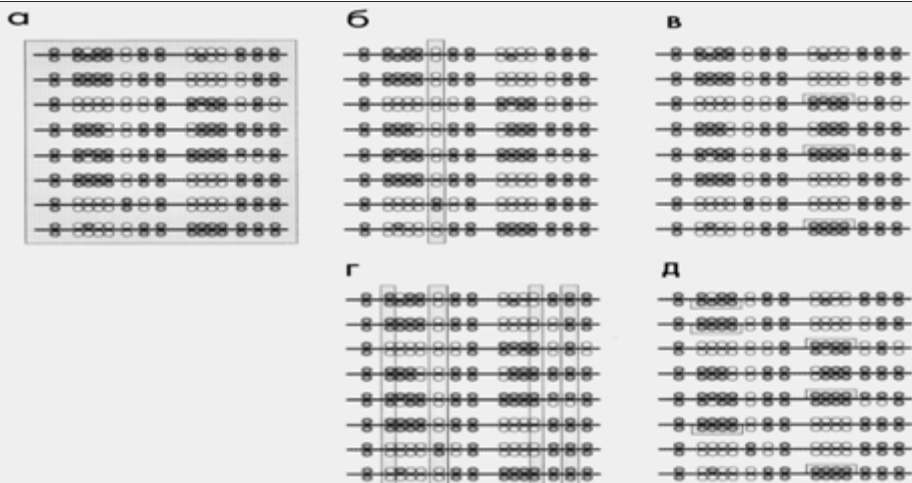
- Метилування ДНК
- Ремоделювання хроматину
- РНК-опосередковані модифікації
- Пріонізація білків
- Інактивація Х-хромосоми

Метилування ДНК



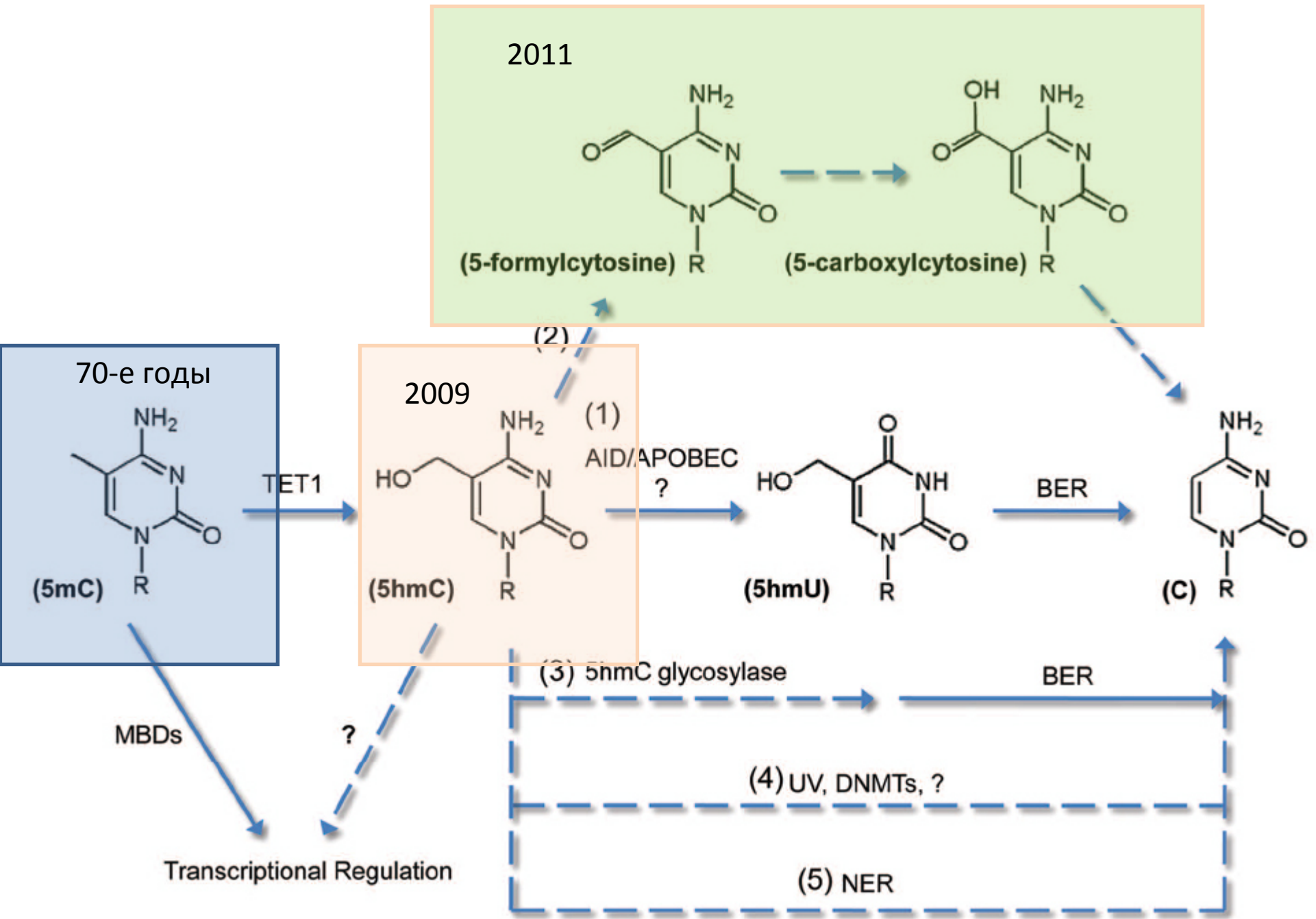
Термін	Дефініційне визначення поняття, характеристика
Метилування ДНК	Ензиматична модифікація цитозину (С), розташованого у 5' положенні до гуанозину (G) у CpG-динуклеотиді, що полягає у приєднанні метильної групи до вуглецю, призводячи до формування 5'-метилцитозину (5-mC)
Ступінь метилування геному	Загальна сума метильованих цитозинів чи CpG-динуклеотидів відносно їх загальної чисельності. Визначення цього показника має певне інформативне значення, але воно недостатнє для встановлення прогностичних та діагностичних маркерів та вивчення механізмів пухлинної прогресії, формування ФЛР тощо.
Рівень метилування ДНК	Усереднений показник метилування ДНК за одним конкретним CpG-динуклеотидом в обох ланцюгах геномної ДНК отриманого зразку. Інформація стосовно рівнів метилування окремих CpG-динуклеотидів є вкрай необхідною для встановлення кількісних відмінностей у метилуванні важливих регуляторних послідовностей.
Структура метилування ДНК (карта)	Характеристика статусу метилування певної послідовності CpG-динуклеотидів однієї спіралі ДНК. Наявність специфічних для окремих захворювань структур метилування ДНК дає можливість використовувати цей показник з діагностичною та прогностичною метою.
Профіль метилування ДНК	Характеристика всієї геномної ДНК за її множинними сайтами. Може бути визначена у вигляді профілю рівня чи структури метилування. Надає інформацію стосовно множинності сайтів геному, забезпечуючи унікальний підхід до молекулярної діагностики останнього.
Гіпометилування ДНК	Зниження рівня метилування ДНК у зразку за будь-яким окремим CpG-динуклеотидом чи групою CpG-динуклеотидів (чи навіть за всім геномом) у відношенні до контрольного зразку ДНК.
Гіперметилування ДНК	Підвищення рівня метилування ДНК в зразку за будь-яким окремим CpG-динуклеотидом чи групою CpG-динуклеотидів у відношенні до контрольного зразку ДНК.

Окремі категоріальні поняття



а) метилування геному в цілому;
 б) рівень метилування ДНК;
 в) структура метилування ДНК;
 г) профіль рівня метилування;
 д) профіль структури метилування

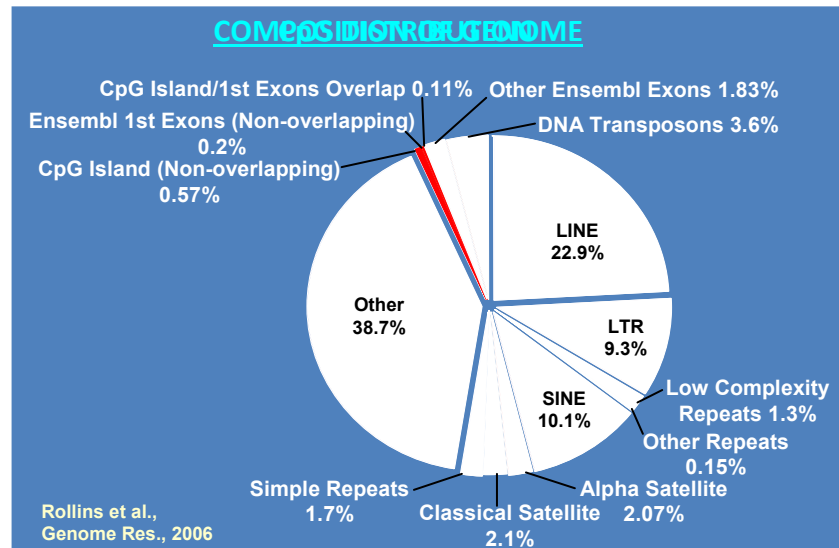
Микитенко Д. О., 2008



Поширення в геномі

У нормальних клітинах метилування зустрічається, в основному, в повторюваних фрагментах ДНК (сателітна ДНК, генетичні елементи, такі як LINES, SINES, ендегенні ретровіруси) та в кодуючій частині генів, за виключенням першого екзону.

У геномі ссавців зустрічаються короткі ділянки (фрагменти) довжиною 0,5-4 кВ, які збагачені вмістом CG-динуклеотидів і розміщені, в основному, в проксимальній частині регуляторної ділянки генів, відомі як CpG-острівці. Їх метилування призводить до репресії промотору, а отже, й інактивації функції всього гена.



N
O
R
M
A
L
C
E
L
L

C
A
N
C
E
R
C
E
L
L

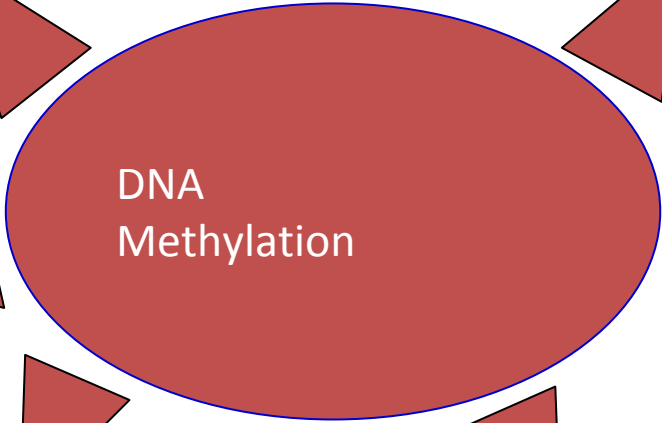
Organization of Chromatin in Active and Inactive States

Tissue Specific-Methylation

X-Chromosomes Inactivation

Genomic Imprinting

Silencing of Foreign DNA Sequences



Hypermethylation of CpG Islands of Tumor Suppressor Genes

Gene-specific hypomethylation

Global Genomic Hypomethylation



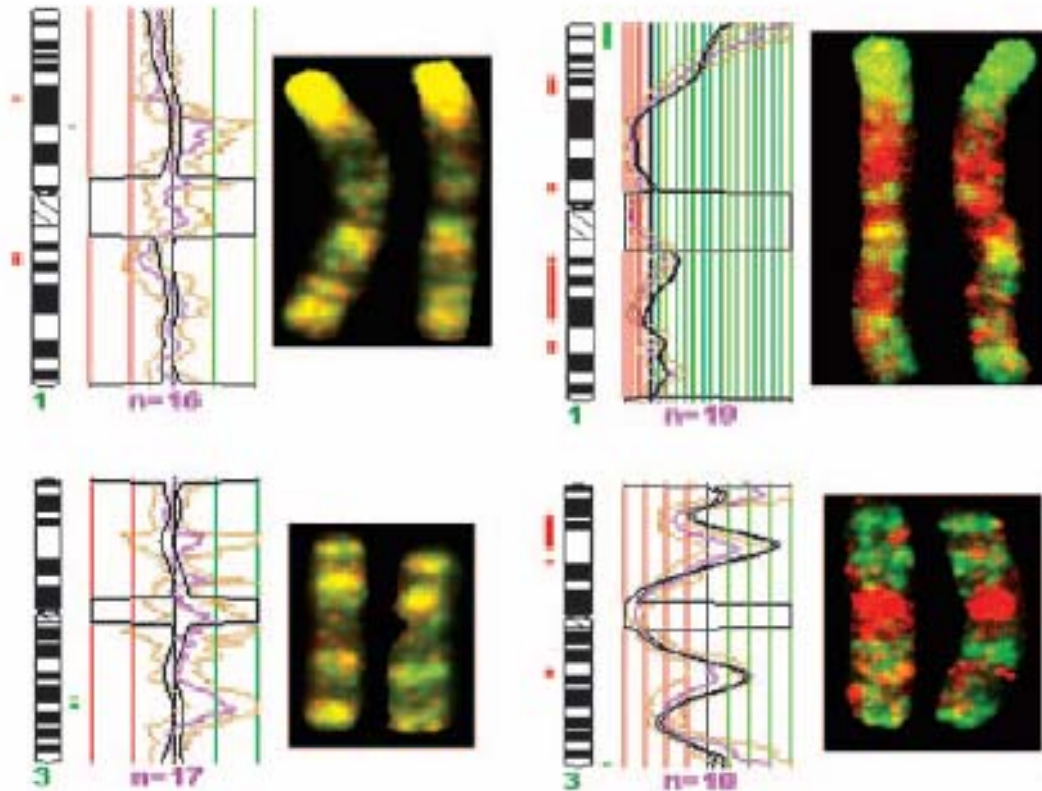
Disruption of the p16^{INK4a}/Rb, p53/p14^{ARF} and APC/ β -catenin Pathways, Defects in Mutation Repair Networks (hMLH1, BRCA1, MGMT) and Generation of Mutations, Loss of Apoptosis and Adherence Mechanisms

Chromosomal Instability, Aneuploidy Activation of Transposons, Gene Up-Regulation

Activation of oncogenes, loss of imprinting

Adapted from J Pathol (2002) 196: 1-7

Метилування ДНК у монозиготних близнюків у різному віці



Вік близнюків:

3 роки

50 років

Втрата метилування ДНК в ембріоні (миша) призводить до його загибелі на 10 день розвитку

Li et al, 1992, Cell

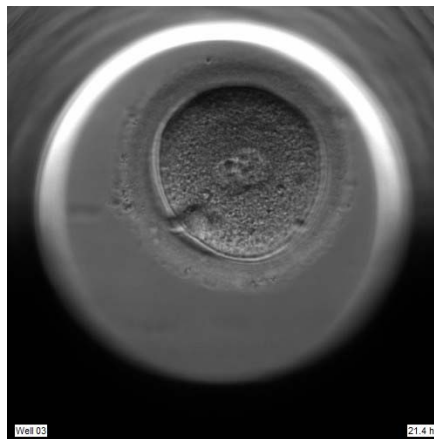
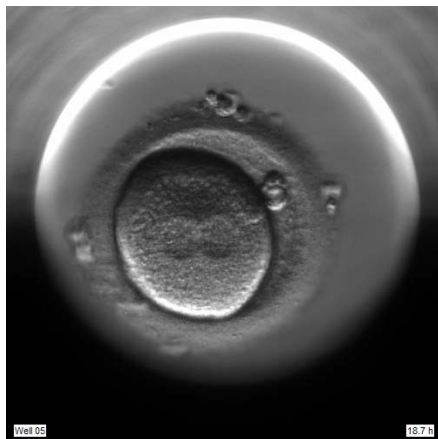
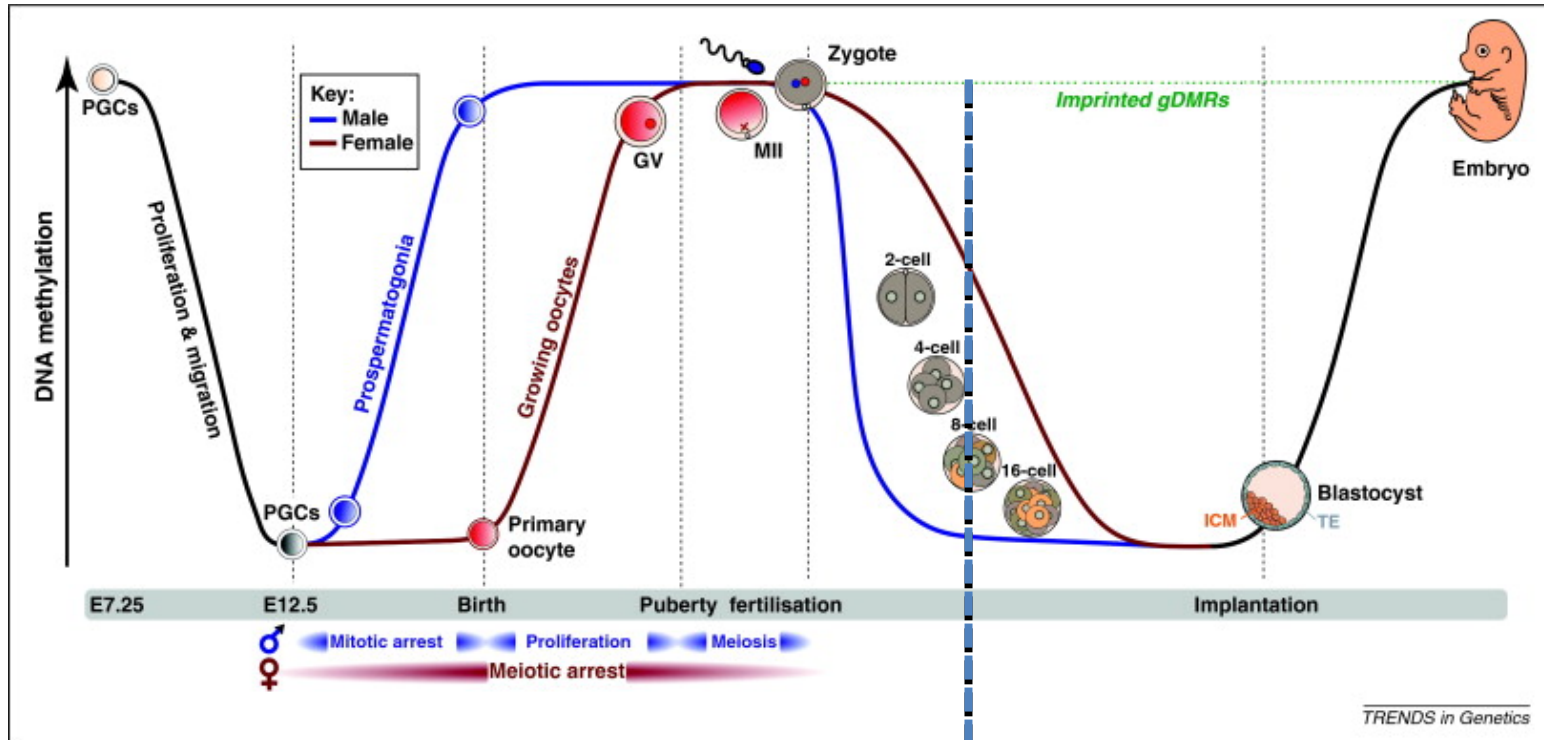


Метилування ДНК є необхідним інструментом
Регуляції геному для нормального розвитку організму



Значення диференційного метилування окремих сайтів ДНК?

Метилування геному в процесі онтогенезу



При проведенні ПГД необхідний вибір ембріонів:

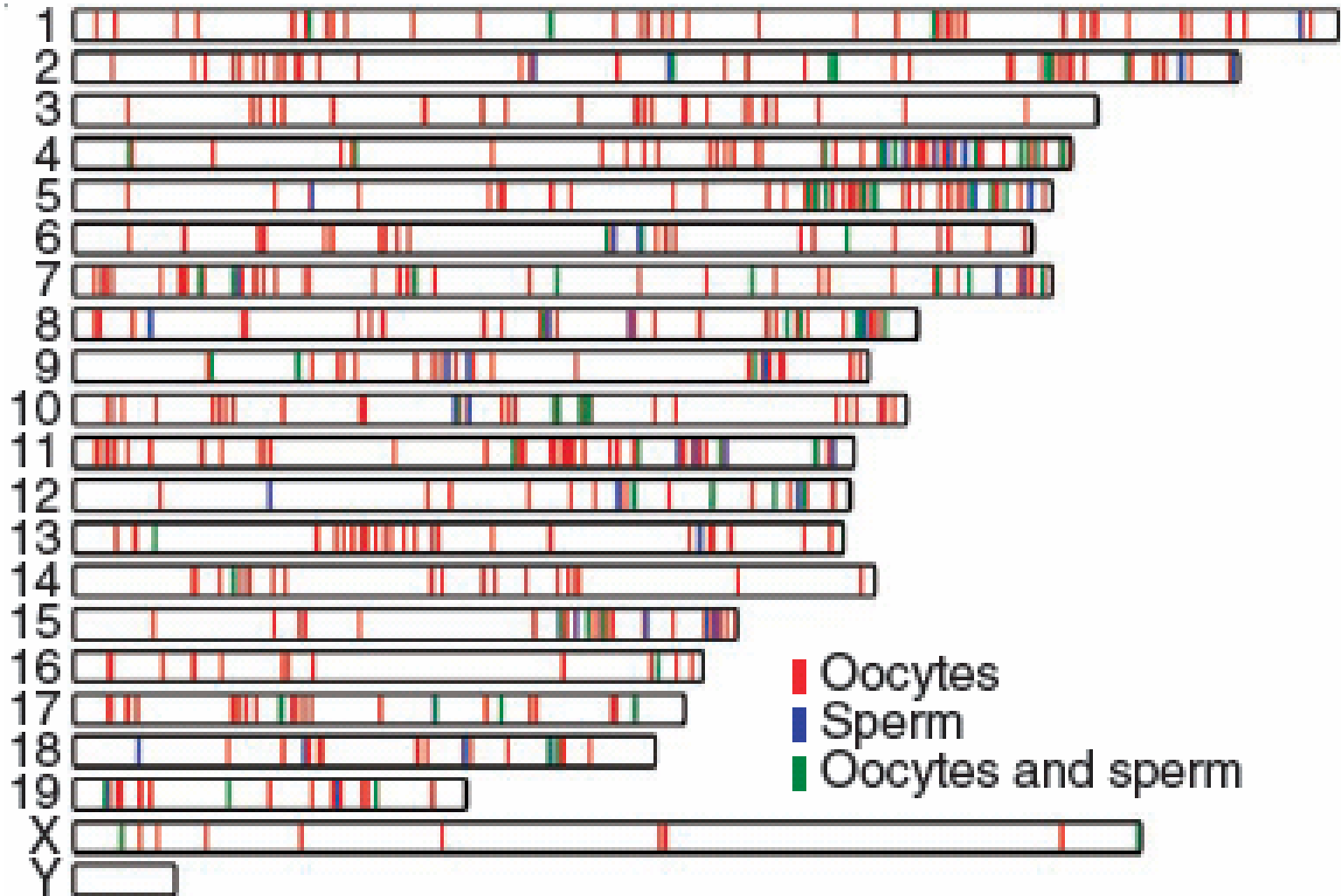
РОЗДІЛНО-ОВУЛЯЦІЙНА КЛІНІКА «АВА-ПЕТЕР»

- По даним Munne (2003) на 3 сутки:
 - 22% ембріонів останавливаються в розвитку
 - 27% ембріонів отстають в розвитку
 - 33% ембріонів хорошого качества
 - До стадії бластоцисти – 5 сутки – розвиваються 40% ембріонів.

MOLECULAR
 NADIYA Diagnostics Lab

CLINIC OF REPRODUCTIVE MEDICINE
 IYA

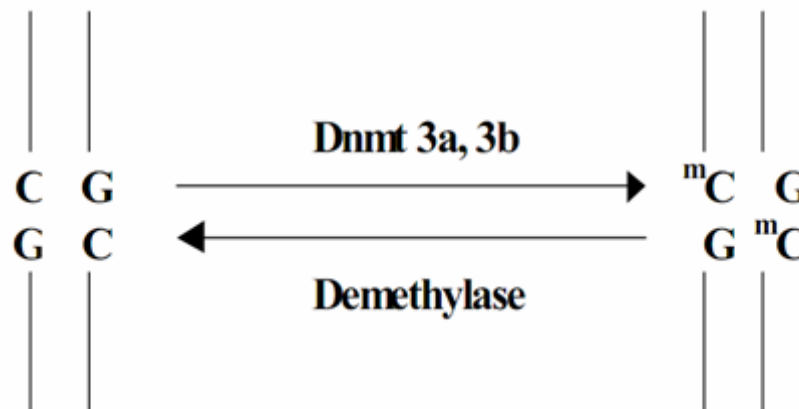
Диференційний профіль метилування зрілих статевих клітин



ДНК-метилтрансферази

- редокс-чутливі ферменти.
- DNMT1 - підтримувальне метилування *in vivo*, відповідає за правильний розвиток ембріону, імпринтинг, інактивацію X-хромосоми та відновлення структури метилування ДНК після її реплікації. Вона в найбільшій кількості присутня в соматичних клітинах і локалізується у фокусах реплікації ДНК, взаємодіє з ядерним антигеном проліферуючих клітин (PCNA).
- DNMT3a та DNMT3b - метилування *de novo*. Експресуються в ембріональних клітинах і на низькому рівні в соматичних клітинах дорослої особи.
- DNMT 3L наявна в статевих клітинах і взаємодіє з DNMT3a та DNMT3b за їх спільної участі в імпринтингу батьківських генів.
- DNMT2 виявляється в усіх типах клітин, але не проявляє ферментативної активності, тому її функція ще має бути встановлена.

Взаємовідношення між різними видами метилтрансфераз (*de novo* та підтримувальними) й процесами деметилування є важливим.



Порушення функції ДНК-метилтрансфераз

1. Порушення балансу-окисно-відновних процесів в організмі
2. Дефіцит субстрату
3. Ефект дози гену (анеуплоїдії, незбалансовані геномні перебудови в локусах, де картовані одноіменні кодуючі гени)
4. Мутації генів

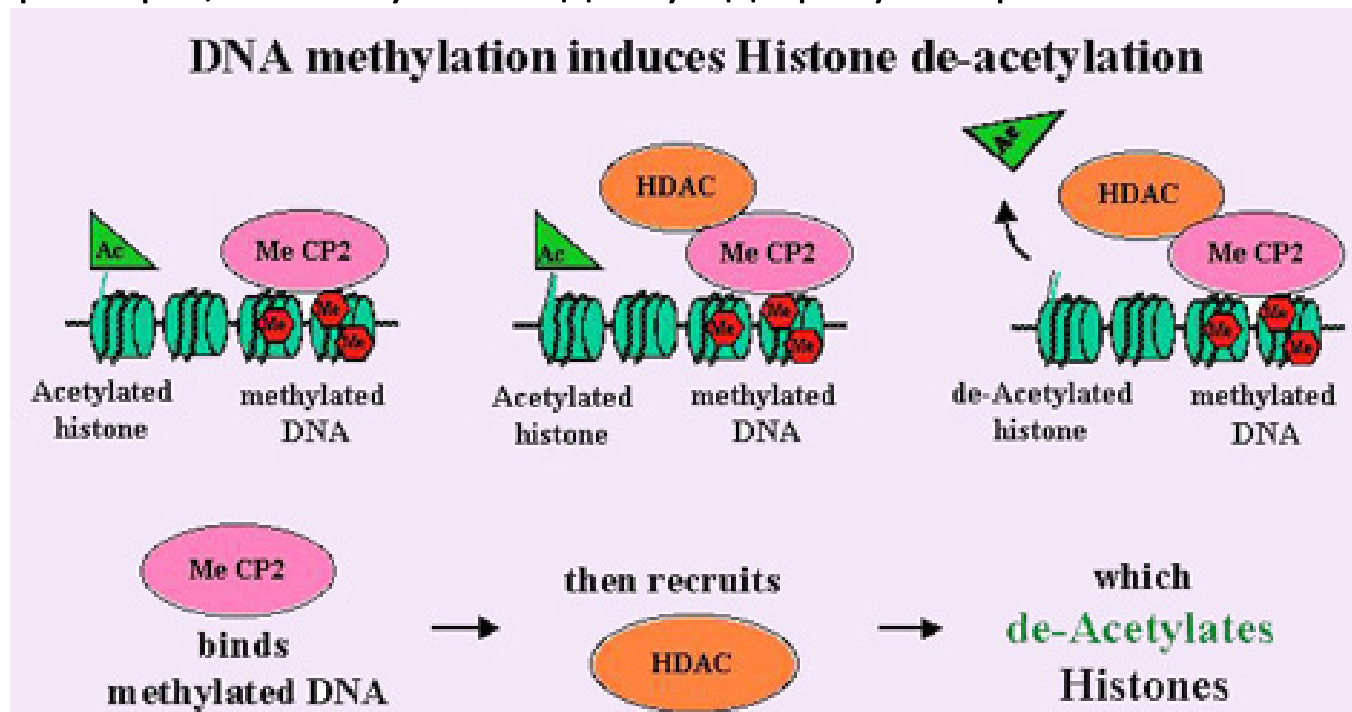
мутація гена DNMT3B викликає розвиток синдрому ICF (Immunodeficiency–centromeric instability–facial anomalies) :

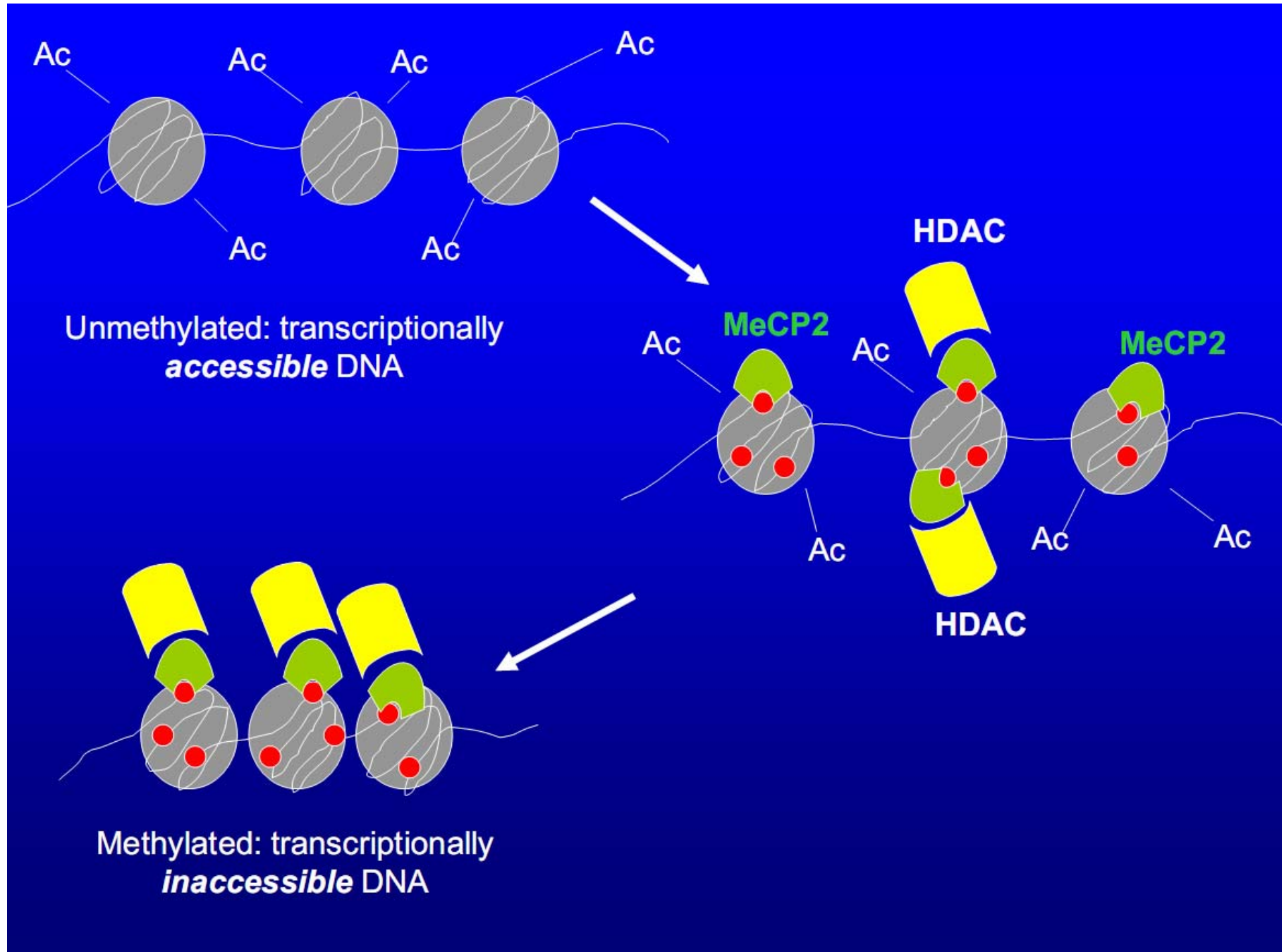
- нестабільність центромерних ділянок хромосом,
- Імунодефіцит
- аномалії обличчя.

Синтез мутованого ферменту сприяє порушенням метилування *de novo* і в результаті викликає гіпометилування юкстаце-нтромерного гетерохроматину, в першу чергу, 1-ої, 16-ої та X-хромосоми, спричиняючи чисельні хромосомні порушення, наприклад, аномальну деконденсацію хроматину, спарювання, розділення та розпад перицентромерних ділянок хромосом.

Механізми репресії транскрипції генів

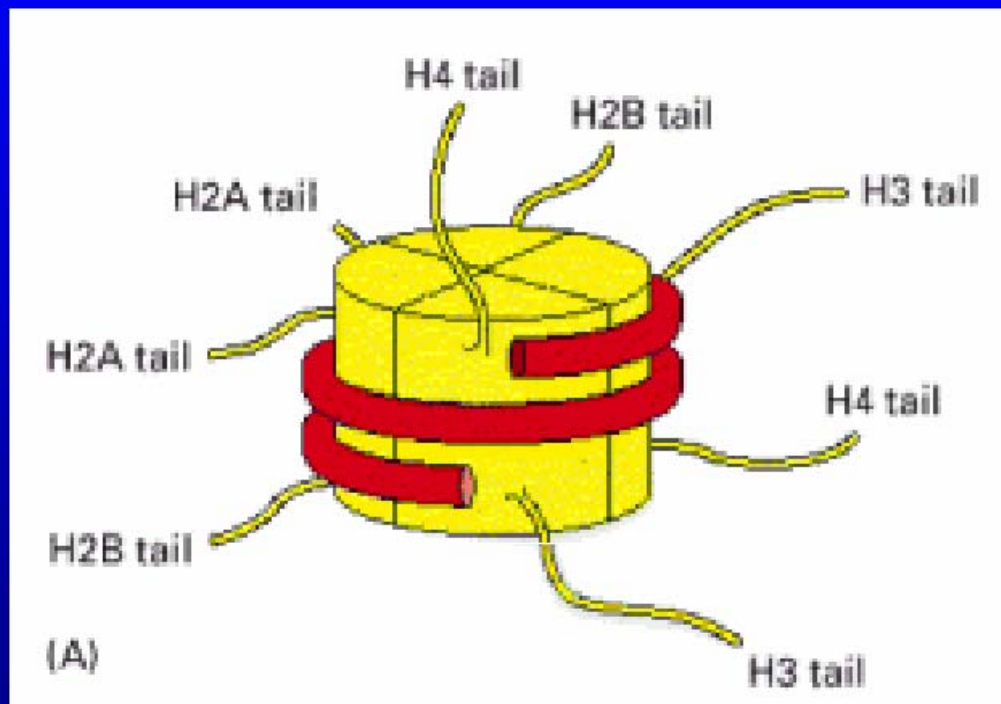
- метилування безпосередньо інгібує зв'язок транскрипційних факторів з їхніми сайтами впізнання, що містять CpG-острівці, які найчастіше знаходяться в районах промоторів генів, поширюючись на перший екзон гена;
- залучення метил-зв'язуючих білків чи білкових комплексів, відповідно MeCP2 та MeCP1, які, специфічно зв'язуючись з метильованими CpG-ділянками, можуть непрямим шляхом інгібувати зв'язування транскрипційних факторів, обмежуючи їх доступ до регуляторних елементів.





Варіанти ремоделювання гістонів

Histone Modifications



~146 bp DNA

Histone octamer core

Варіанти ремоделювання гістонів

HISTONE CODE

MARK	RELEVANT SITES	FUNCTION
Acetylated lys	H3 (9, 14, 18, 56) H4 (5, 8, 13, 16) H2A, H2B	Activation
Phosphorylated Ser/Thr	H3 (3, 10, 28) H2A, H2B	Activation
Methylated Arg	H3 (17, 23) H4 (3)	Activation
Methylated Lys	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27) H4 (20)	Activation Repression
Ubiquitylated Lys	H2B (120) H2A (119)	Activation Repression
Sumoylated Lys	H2B (6/7) H2A (126)	Repression

Чи можуть набуті признаки
передаватися нащадкам?

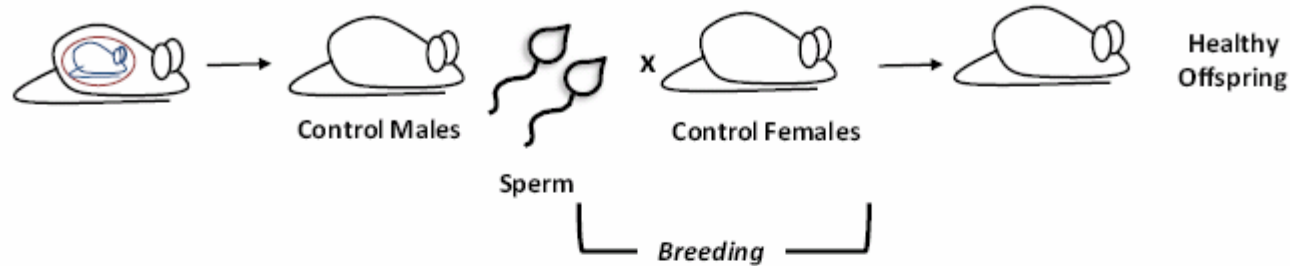
Anne C. Ferguson-Smith^{1,2,*} and Mary-Elizabeth Patti^{3,*}

¹Department of Physiology, Development, and Neuroscience, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EG, UK

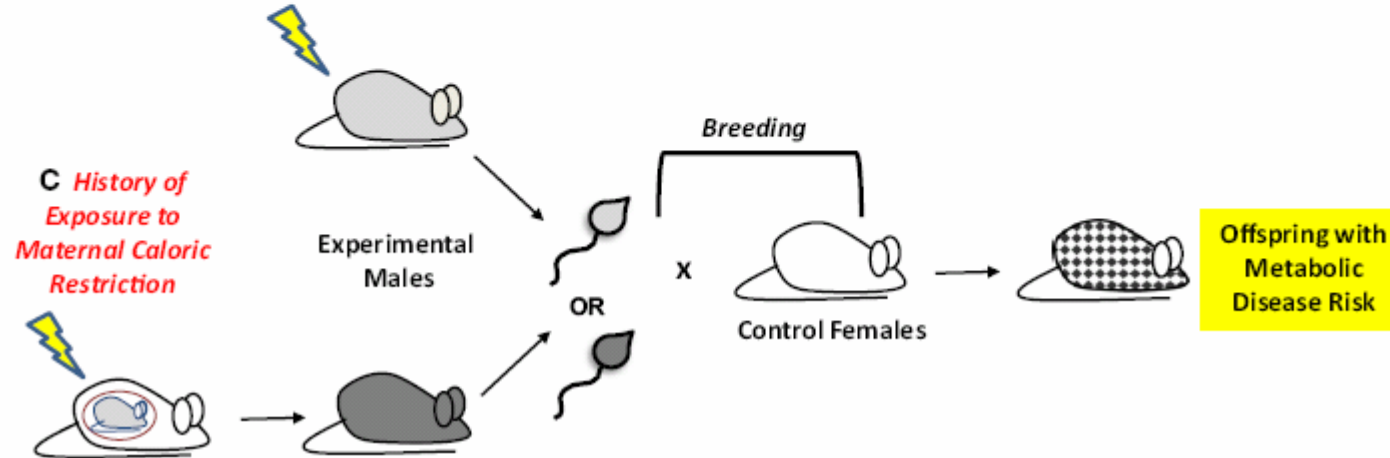
²Singapore Institute for Clinical Sciences, Brenner Centre for Molecular Medicine, 30 Medical Drive, Singapore

³Research Division, Joslin Diabetes Center and Harvard Medical School, 1 Joslin Place, Boston, MA 02215, USA

A Control development and postnatal nutrition in fathers.



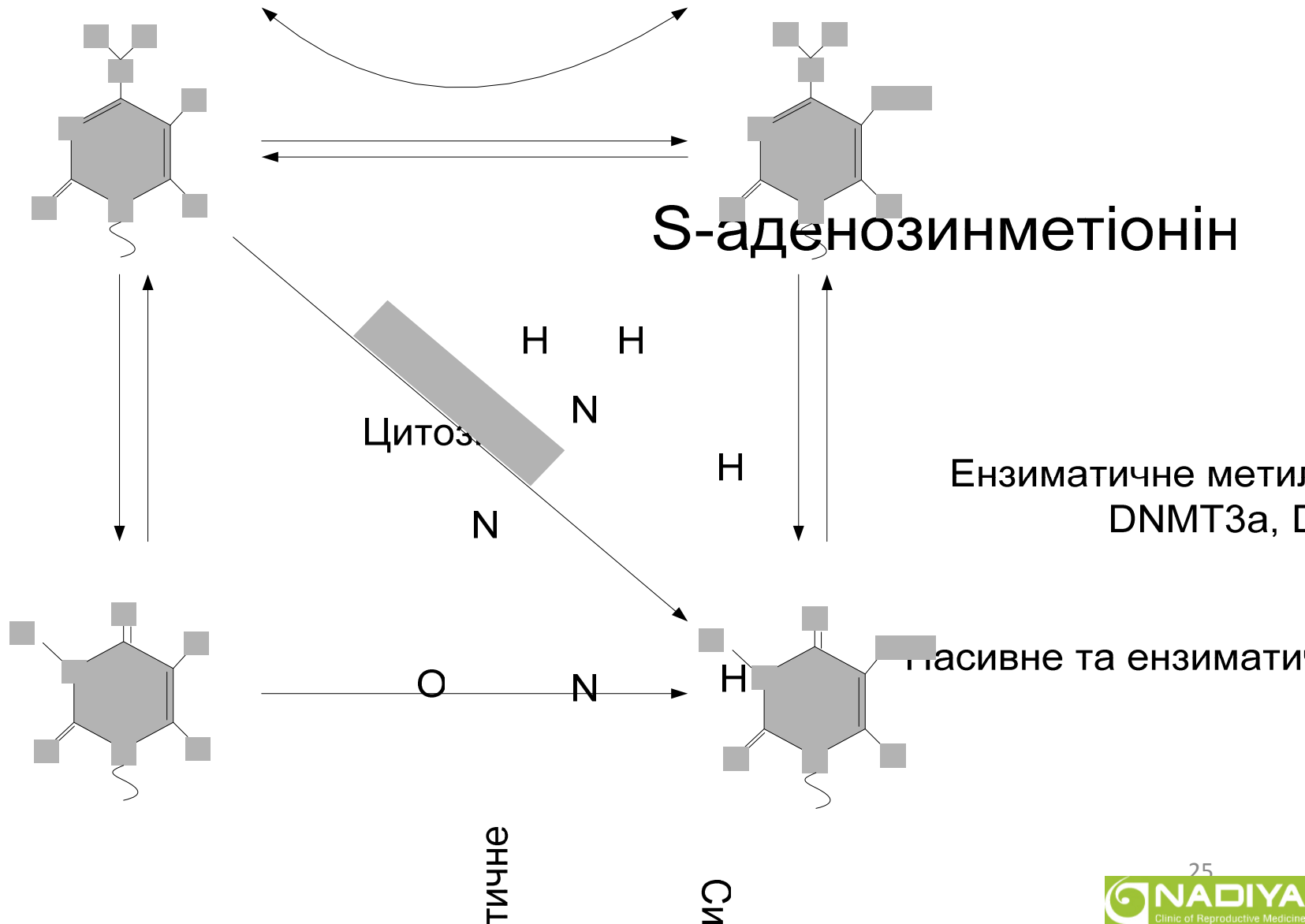
B Current High Fat or Low Protein Diet



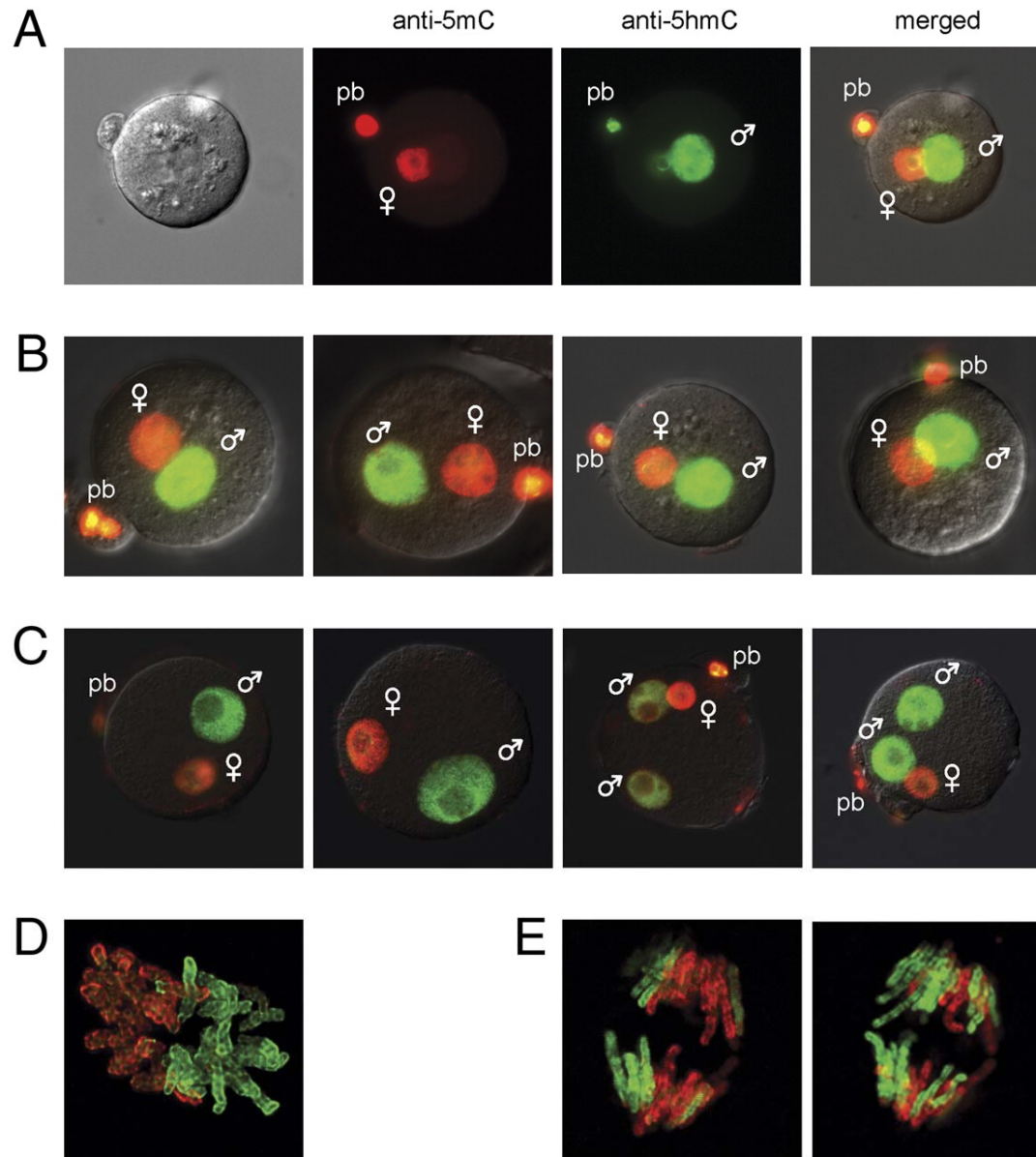
C History of Exposure to Maternal Caloric Restriction



C-T мутації, обумовлені метилуванням



Динаміка 5-гідрокси метилцитозину в пронуклеусі зиготи миші



DNA Methylation: Inhibitors

- 5-azacytidine*
- 2-deoxy-5-azacytidine*
- siRNA (Dnmt1, 3a, 3b)
- Decitabine (MDS)
- Zebularine (Cancer)
- Procainamide (Dnmt1)
- Hydralazine (PKC δ)
- Diet
- UV light

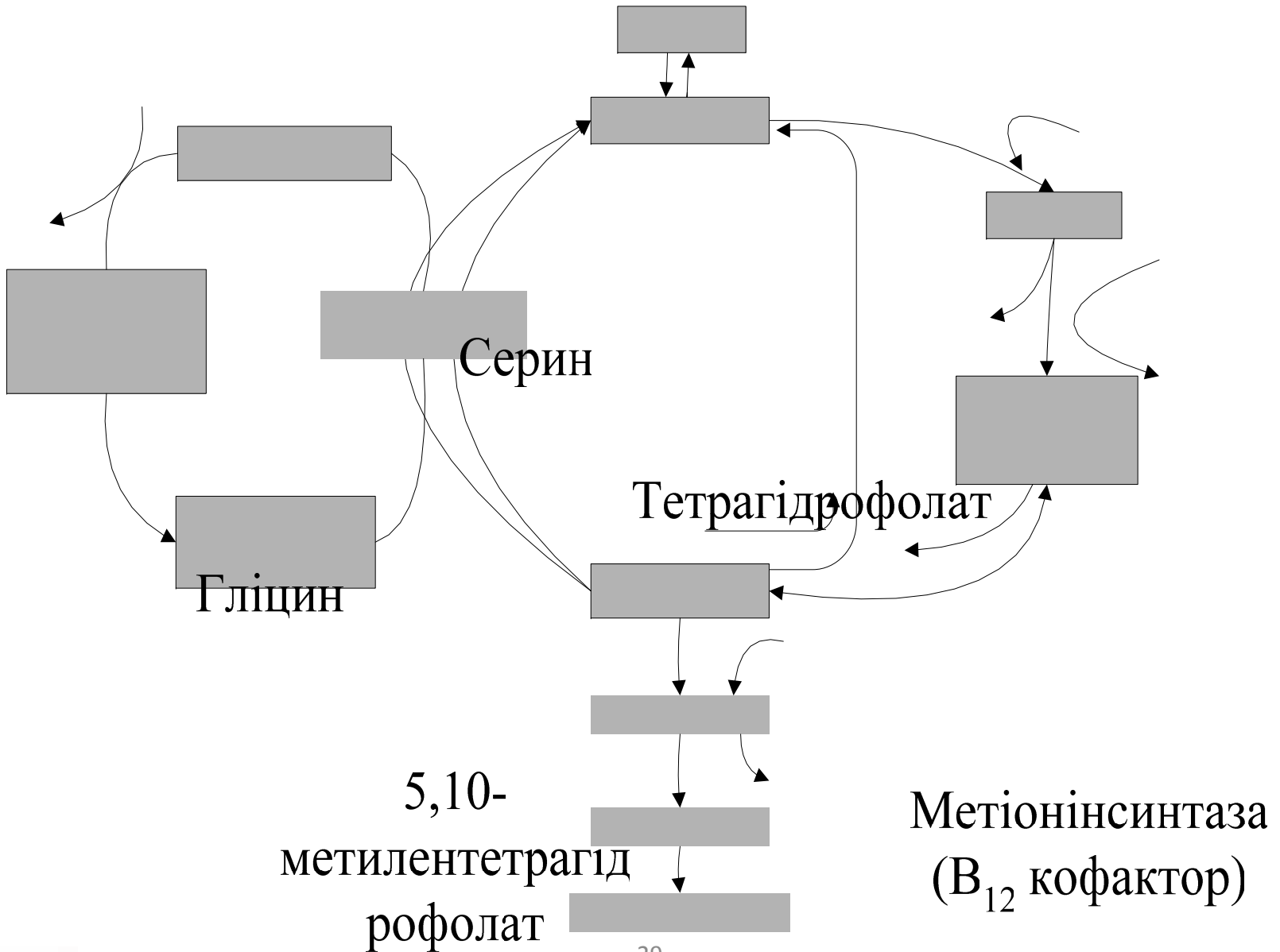
**Also DNA synthesis inhibitors, narrow window between DNA methylation inhibition and DNA synthesis inhibition.

*Unstable in aqueous media.

“Histone” Deacetylase Inhibitors

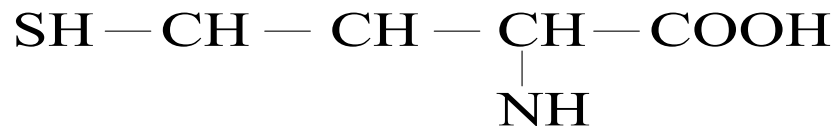
- Trichostatin A
- Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)
- Sodium butyrate / phenylbutyrate
- Valproic acid
- *Acetylation and deacetylation modifies the activity of proteins involved in transcription, nuclear transport, and the cytoskeleton as well as histones*

Метаболізм



Історія відкриття

Гомоцистеїн – сірковмісна амінокислота, що не зустрічається в природних білках, які вживаються з їжею, а є проміжним продуктом обміну амінокислот метіоніну та цистеїну.



Вперше отримана: L. Butz та V. du Vigneau у 1932 р.

Референтні значення (*WHO*):

Нормальний рівень: < 10 мкМ/л

Субнормальний рівень: 10-15 мкМ/л

Гіпергомоцистеїнемія: легка: 15-25 мкМ/л

помірна: 25-30 мкМ/л

важка: > 30 мкМ/л

2

Захворювання, асоційовані з гіпергомоцистеїнемією

- Серцево-судинні захворювання
 - АТ, ІХС, І.М., атеросклероз, атеротромбоз, інсульти
- Захворювання системи крові
- Неврологічні захворювання
 - Хвороба Альцгеймера
- Захворювання нирок
- Захворювання щитоподібної залози
- Онкологічні захворювання
 - Рак простати, легень, РМЗ, яєчників
- Патологія вагітності
- Вроджені аномалії
 - Дефекти нервової трубки, вовча паща (Cleft Palate), с-м Дауна* (???)

*) D.S.Rosenblatt. *Am J Clin Nutr*, 1995
James et al. *Am J Clin Nutr* 1999;70:429-30

A. Chango et al. *British J of Nutr*, 2005

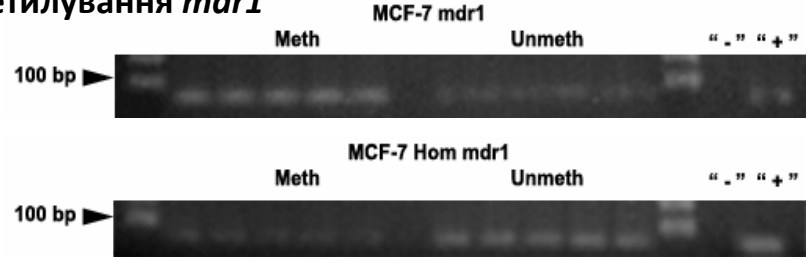
Kenneth F. Trofatter , *Pregnancy and Childbirth*, 2007

Патофізіологічні ефекти гомоцистеїну

- Порушення біологічних процесів метилування
- Оксидативний стрес
- Гомоцистеїнування білків
- Потенціювання естроген-індукованого гормонального раку

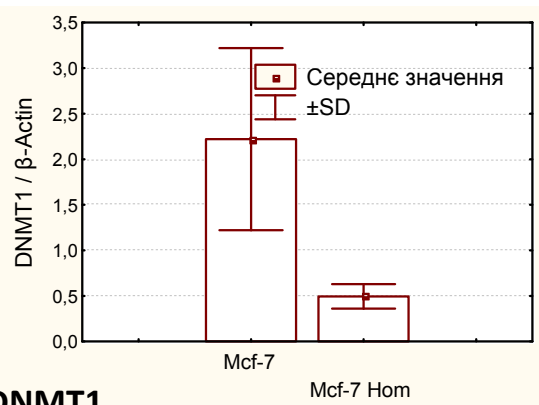
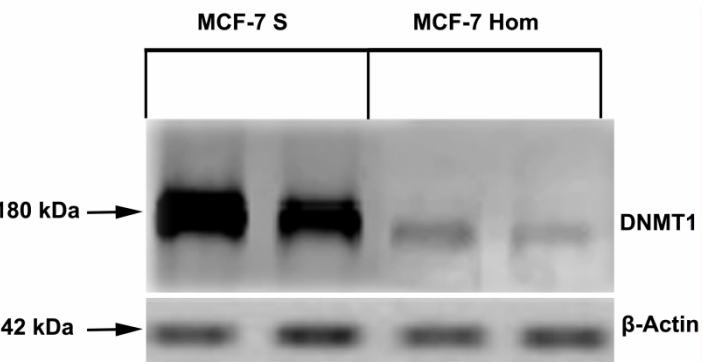
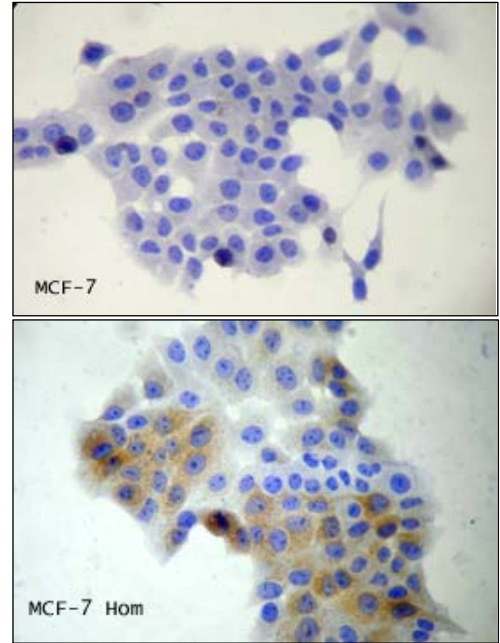
Зміни метилування гена *mdr1* та експресії Р-гр під впливом ГОМОЦИСТЕЇНУ

Метилування *mdr1*

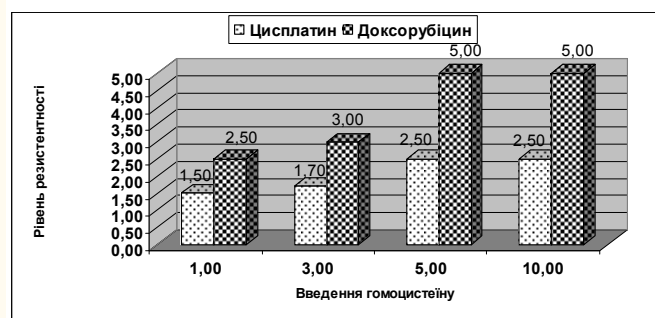


Ген	Статус метилування промотору гена	
	MCF-7	MCF-7/Hom
<i>mdr1</i>	гіперметильований.	гіпометильований .
<i>GSTp</i>	гіперметильований.	гіпометильований .
<i>tp53</i>	гіпометильований	гіперметильований.
<i>tp73</i>	гіпометильований	гіперметильований.
<i>bcl-2</i>	гіпометильований	гіперметильований.
<i>CDH1</i>	гіпометильований	гіперметильований.

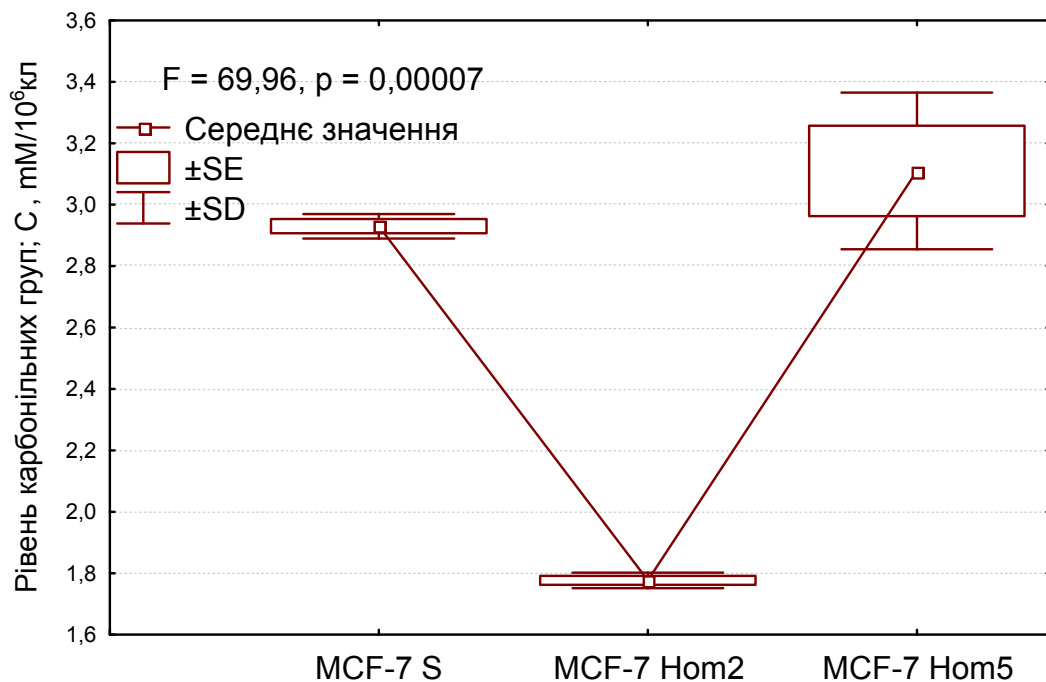
Експресія Р-гр



Експресія DNMT1

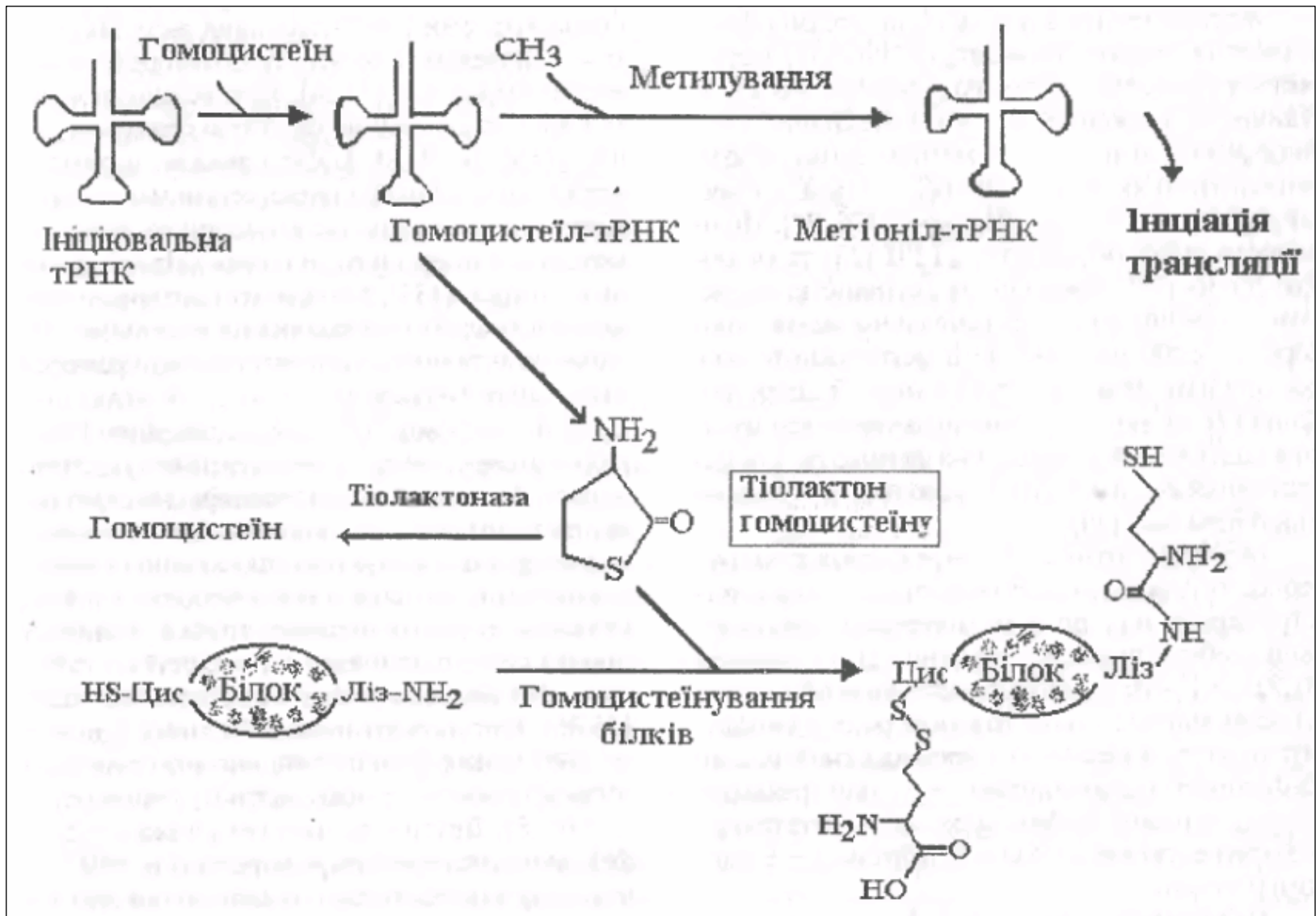


Інтенсивність процесів окисної модифікації білків

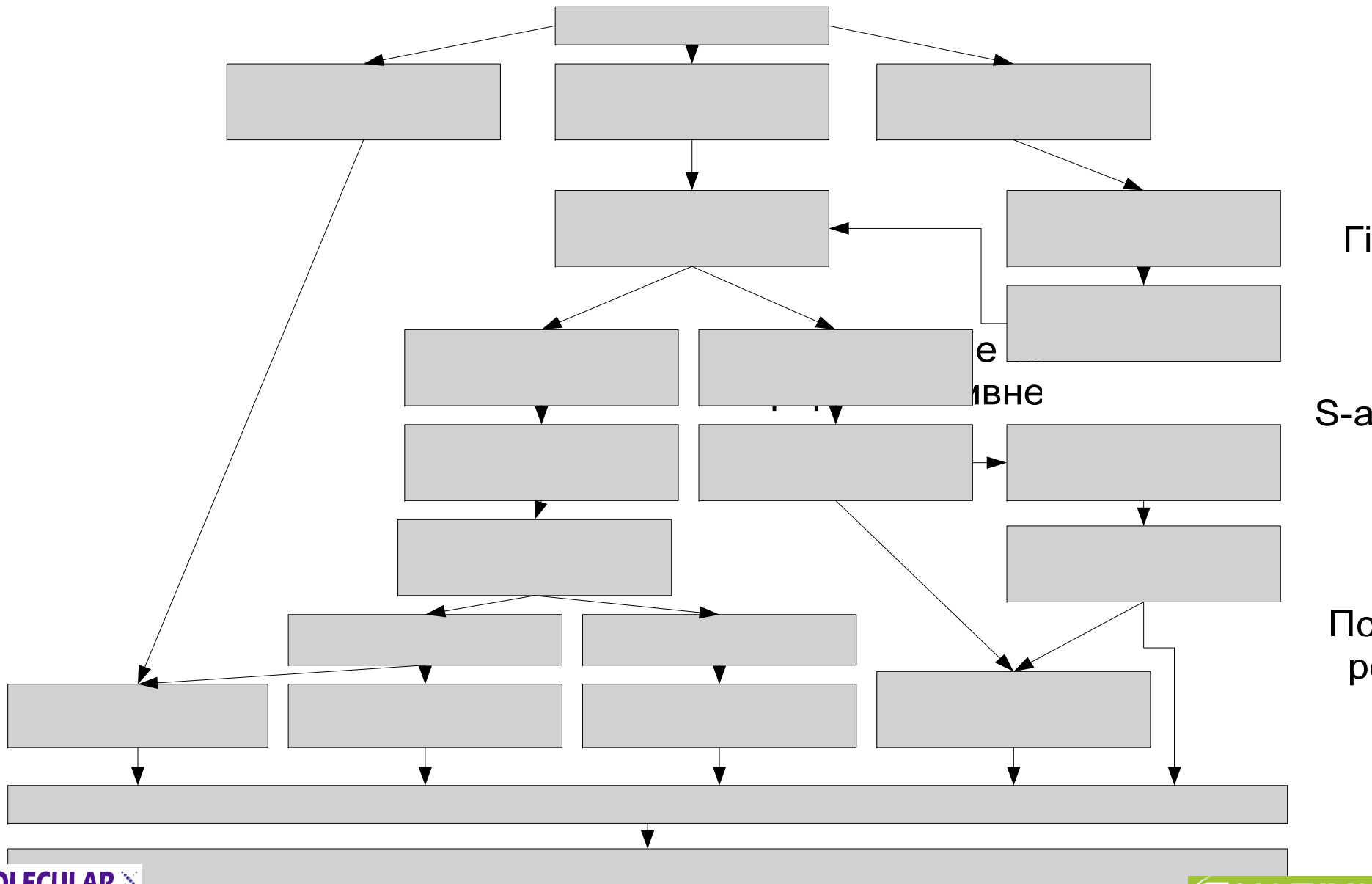


Клітинна лінія	Рівень карбонільних груп в мМ на 1 млн клітин при довжині хвилі 370 нм, ± SD			P
	вихідні	2 пасажи з НОМ	5 пасажів з НОМ	
MCF-7	2,93±0,04	1,78±0,03	3,11 ± 0,26	F(2,6) = 69,96; P < 0,001

Гомоцистеїнування білків



Узагальнена блок-схема впливу підвищених концентрацій гомоцистеїну на перебіг пухлинного процесу



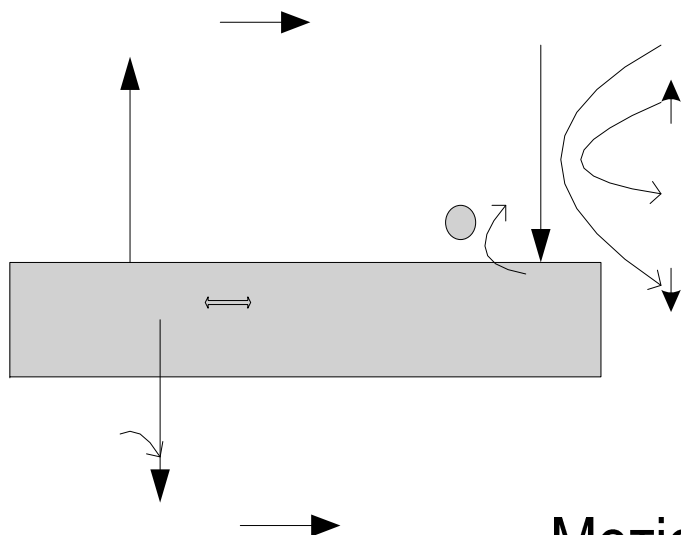
Гі

е
ІВНЕ

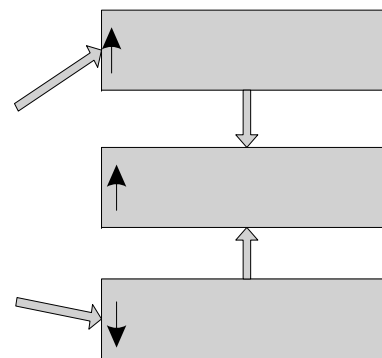
S-a

По
р

Потенціювання естроген-індукованого гормонального раку



Метіонін



S-аденозилметіонін

B_{12}
Фолати

Катехол-*O*-
метилтранс-
фераза

Гіпергомоцистеїнемія та вагітність

- Клінічні прояви: ранній початок та/чи важкий перебіг гестозу, фетоплацентарна недостатність, відшарування плаценти (OR=3.0), внутрішньоутробна затримка розвитку або загибель плоду (Vollset S.E. et al., 2009).
- Гіпергомоцистеїнемія може призводити до:
 - а) порушення та активації ендотеліальних клітин → мікротромбози (Ellison et al., 2004);
 - б) посилення агрегації тромбоцитів → порушення процесів імплантації, плацентації та фетоплацентарного кровообігу (OR=5,0; M.d.R.Rodríguez-Guillén et al., 2009).

На пізніх термінах вагітності спостерігають:

- а) виникнення генералізованої мікроангіопатії → пізній гестоз (OR від 2.0 до 20.9) з розвитком важких станів (Vollset et al., 2009);
 - б) розвитку хронічної внутрішньоутробної гіпоксії плоду;
 - в) народження дітей із низькою вагою та зниженим функціональним резервом усіх життєзабезпечуючих систем (Murphy et al., 2004).
- Гіпергомоцистеїнемія може супроводжуватися розвитком вторинних аутоімунних реакцій (антифосфоліпідний синдром???)

Гомоцистеїн та вагітність

Мета-аналіз зв'язку між преєклампсією та деякими метаболічними порушеннями

METABOLIC DEFECT	ODDS RATIO
Folate deficiency	1.2
Hyperhomocysteinemia	20.9
Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms	2.6

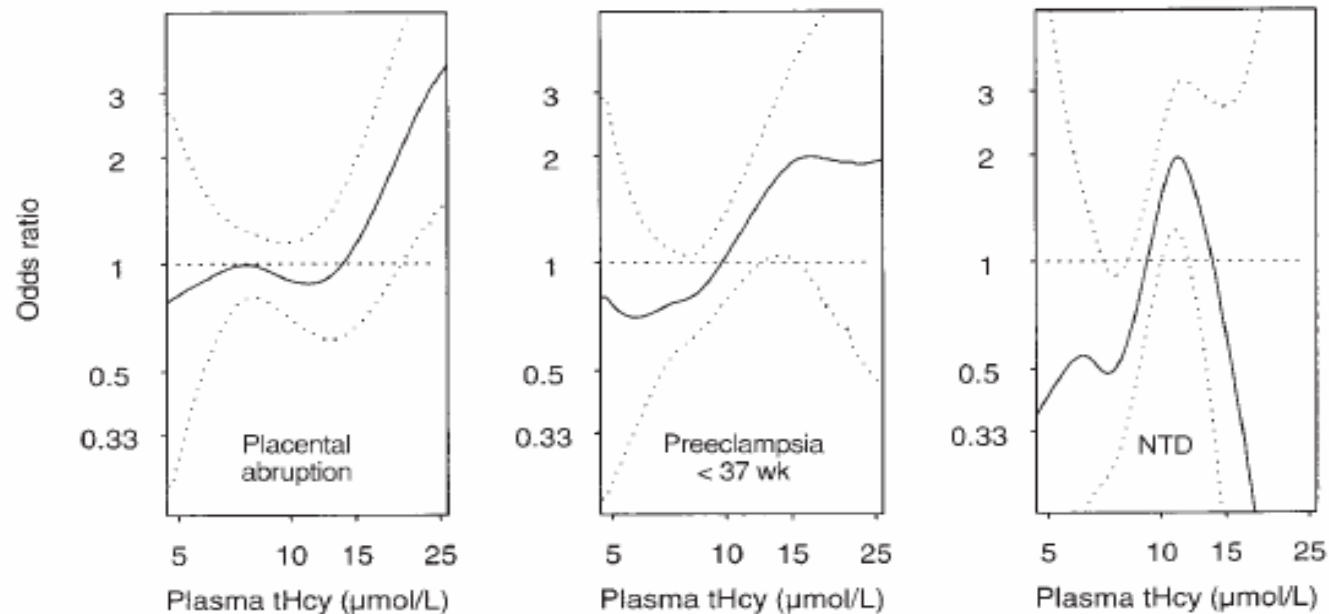
L. Wilkins-Haug, 2003

MTHFR 677C>T AND 1298A>C POLYMORPHISMS AND RISK OF SPONTANEOUS ABORTIONS

Polymorphisms	All	
	OR [†]	95% CI
MTHFR 677C>T*		
CC+CT	1.0	--
TT	5.0	1.2, 20.9
MTHFR 1298A>C ^{‡§}		
AA	1.0	-
AC	5.5	1.1, 26.6

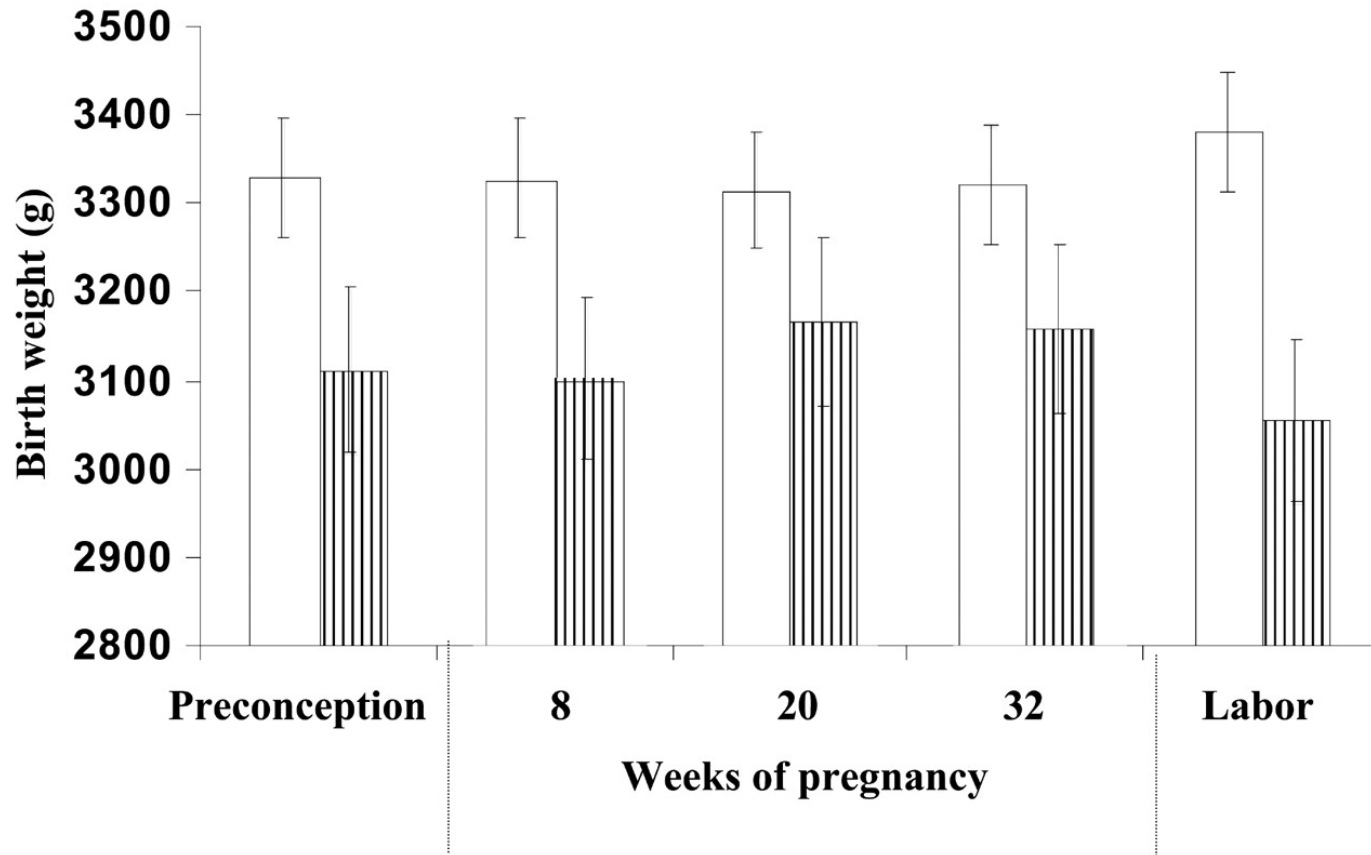
María del Rosario Rodríguez-Guillén et al., 2009

Dose-response relation between log plasma total homocysteine (tHcy) and the risk of placental abruption, preeclampsia in pregnancies <37 wk gestation, and neural tube defects



Stein Emil Vollset et al. 2009

Mean (SE) birth weight according to tertile of maternal tHcy



Murphy, M. M. et al. Clin Chem 2004;50:1406-1412

Clinical Chemistry

Characteristics of the 5883 women in 1992–1993 and their 14492 pregnancies during the period from 1967 to 1996 according to quartile of plasma total homocysteine (tHcy)¹

Characteristic	All	tHcy quartile (μmol/L)			
		3.6–7.5	7.6–8.8	8.9–10.6	10.7–78
Age at first birth (y) ²	23.3 ± 4.3 ³	23.9 ± 4.5	23.6 ± 4.4	23.1 ± 4.2	22.7 ± 3.9
Number of children	2.5 ± 0.9	2.5 ± 0.9	2.4 ± 0.9	2.5 ± 0.9	2.5 ± 0.9
Pregnancies in 1980 or later (%) ²	33	38	34	30	29
Ever smokers (%) ²	62	51	59	65	71
Coffee > 5 cups/d (%) ²	39	26	35	42	51
University or college education (%) ²	26	33	28	24	21
No use of vitamins (%) ²	23	17	22	24	27
Cholesterol > 6.5 mmol/L (%) ²	12	9	11	12	14
Diastolic blood pressure > 90 mm Hg (%)	9	9	8	10	10

¹ Blood pressure, smoking status, educational level, and vitamin use are based on 5881, 5877, 4960, and 4311 women, respectively, with available data on these characteristics.

² Significant linear trend across tHcy quartiles, *P* < 0.001.

Stein Emil Vollset et al. 2009

Гіпергомоцистеїнемія та вроджені вади розвитку плоду

- Гомоцистеїн здатний вільно проникати крізь плаценту та може спричиняти прямий тератогенний і фетотоксичний вплив
 - виникнення дефектів нервової трубки, зокрема, аненцефалії та спинномозкової кили (Nathalie M.J. et al., 2001)
 - розщеплення губи й/або піднебіння
 - у важких випадках: помутніння та підвивих кришталика ока (Njälsson R. et al., 2007); олігофренія різного ступеню.
- Порушення нормальної сегрегації хромосом в процесі мейозу та підвищення ризику народження дитини з трисомією 21 в 2,6 рази (K.Trofatter , 2007)

Причина чи наслідок ???

Причини підвищення рівня гомоцистеїну

- Підвищення надходження метіоніну
- Недостатність вітамінів (Фолієвої кислоти, Віт.гр.В)
- Шкідливі звички (паління, кава, спиртні напої)
- Фармакологічні препарати (метотрексат, протисудомні препарати, оксид азоту, метформін, H₂-антагоністи, еуфілін)
- Інтеркурентні захворювання (псоріаз, ниркова недостатність, цукровий діабет, лейкоз, гіпотиреоз, захворювання ШКТ, що супроводжуються порушенням всмоктування вітамінів (синдром мальабсорбції))
- Поліморфізм гена *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTRR*, *MTR*
- Віковий фактор

Чинники зниження рівня гомоцистеїну

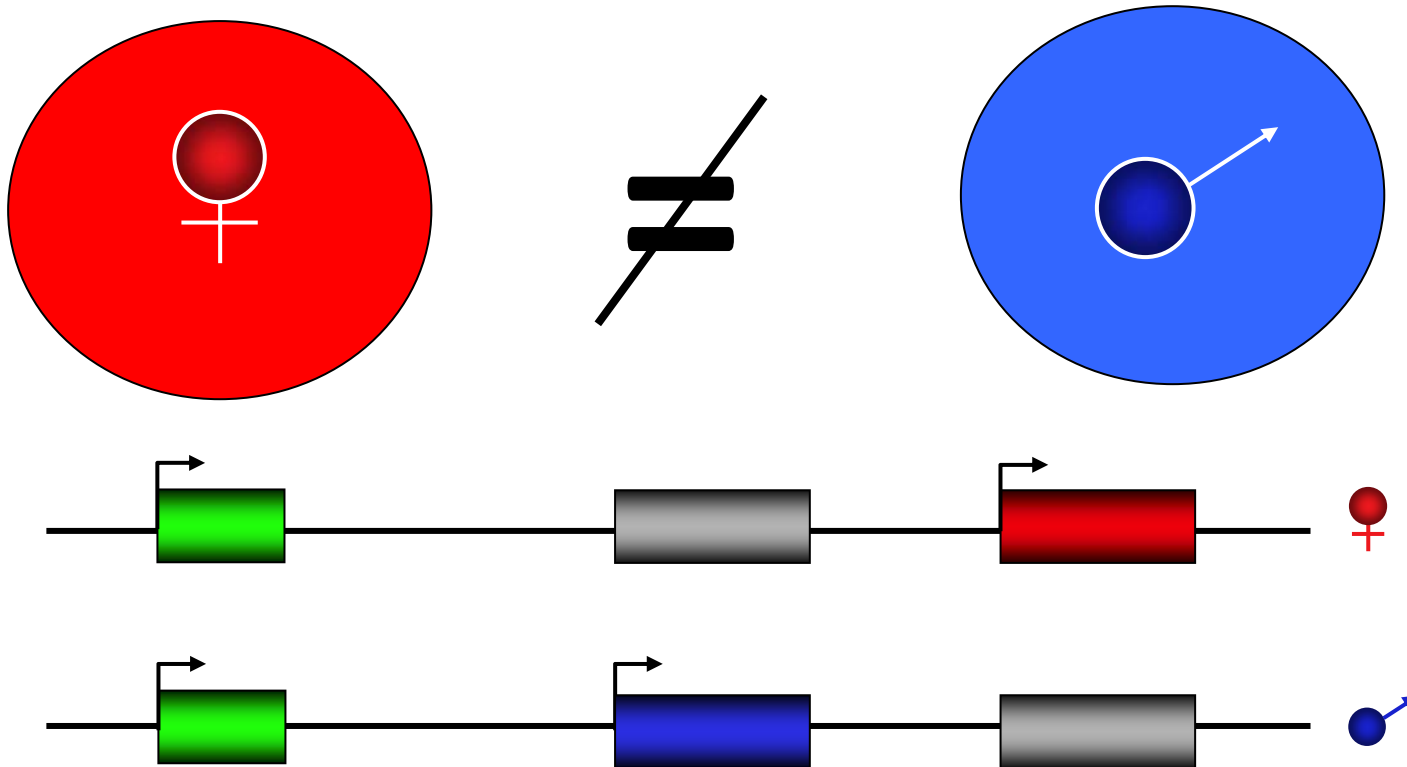
- Помірні фізичні навантаження
- Алькоголь у малих дозах
- Вітаміни (ф.к., B₁, B₆, B₁₂)
- *Вагітність*

Лікування гіпергомоцистеїнемії

- Дієта (обмежуються ікра, соя, тверді сири, бринза, м'ясо, птиця, яйця, риба, горіхи, насіння, бобові, крупи)
- Вітаміни групи B (включно із фолієвою кислотою)
- Антиагрегантна терапія
- Симптоматична терапія

Імпринтинг

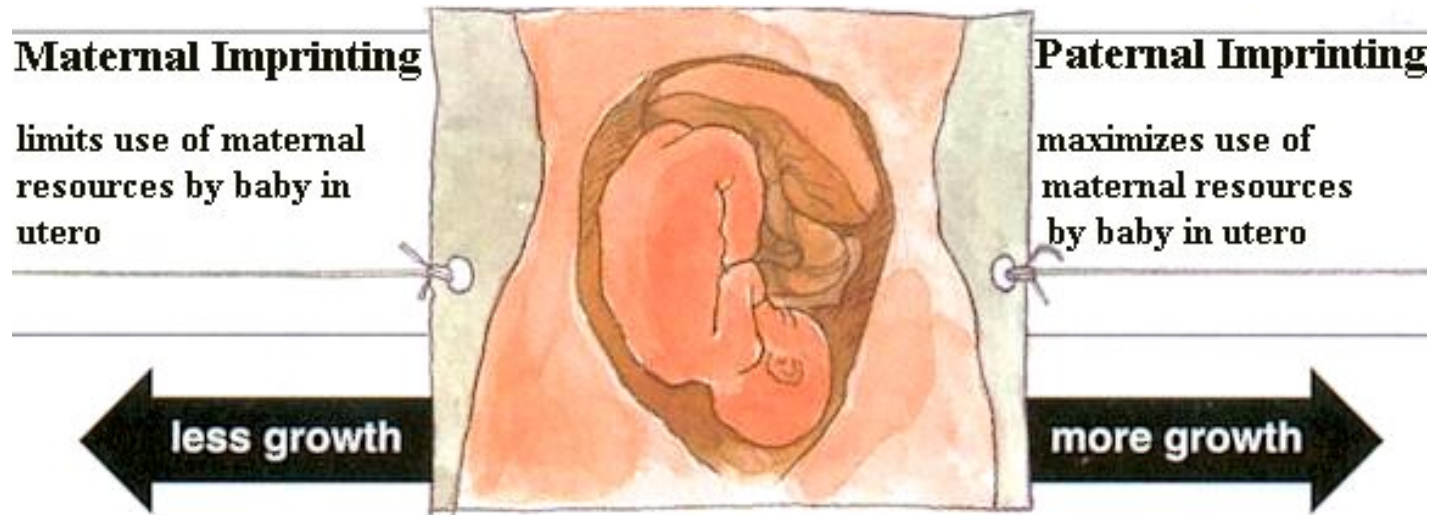
Материнський та батьківський геноми функціонально НЕ ідентичні



Материнський аллель Отцовський аллель
Отцовський аллель

Материнський аллель

Функціональне значення імпринтінгу в пренатальному періоді



Механізм розпізнавання ділянок імпринтінгу

1. Розпізнання молекулярних маркерів

імпринтінгових ділянок (Neuman B. et al. Characteristics of imprinted genes/Nat Genet. 1995. vol. 9)

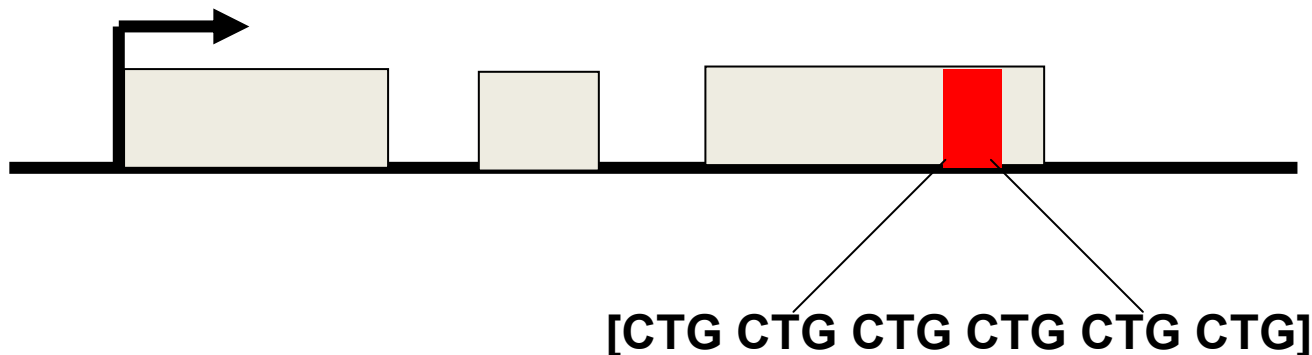
2. Функціонування протизмістовних транскриптів

(Wutz A. et al. Imprinted expression of the Igf2r gene .../ Nature. – 1997. Vol. 386, N. 6652)

Молекулярні маркери імпринтінгових ділянок

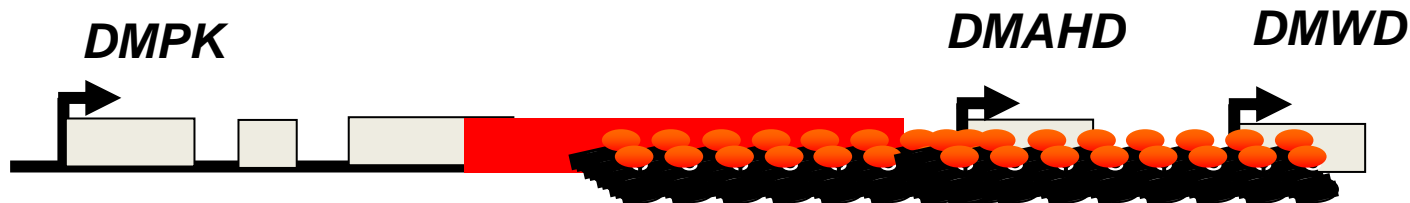
Myotonic Dystrophy

DMPK: Muscle Protein Kinase, chromosome 19

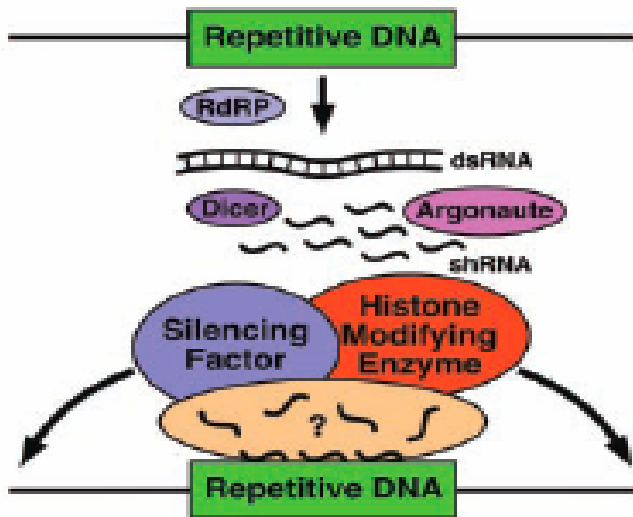
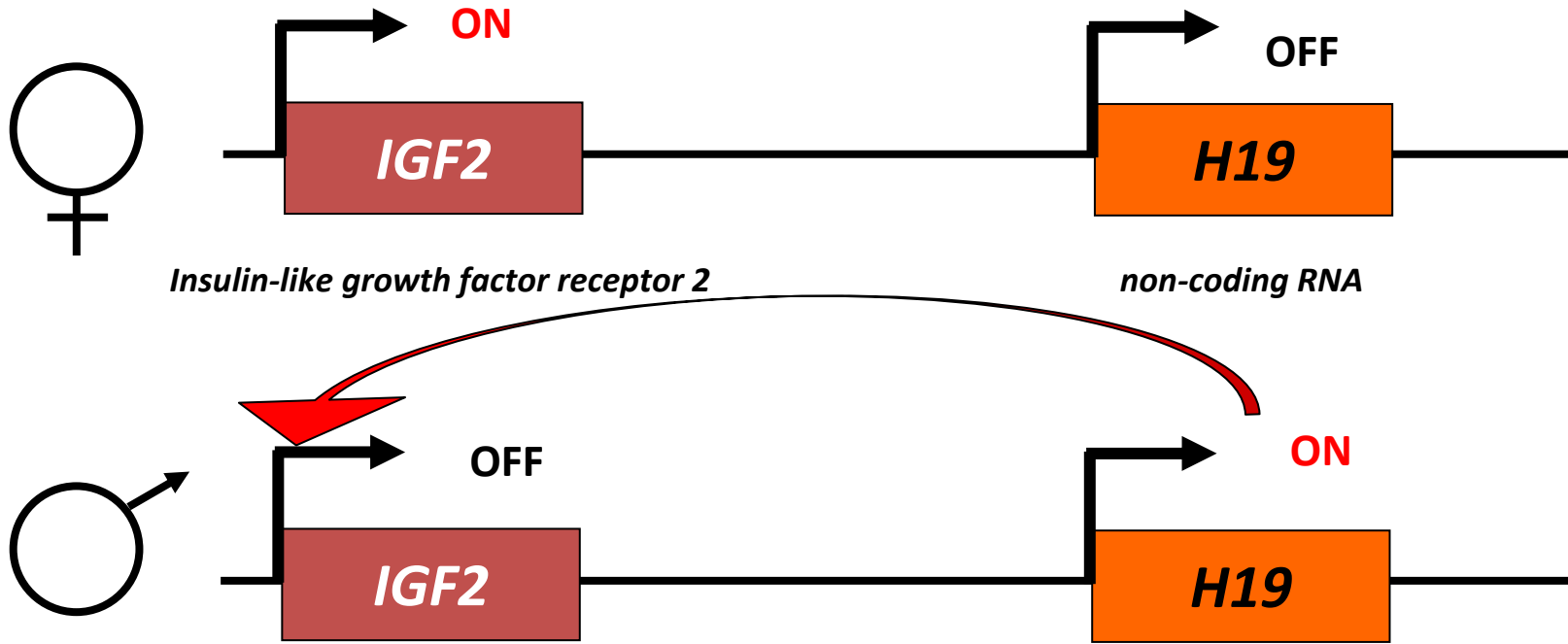


Normal: 5-27 repeats

Affected individuals: 50-1000+ bp



Протизмістовні транскрипти



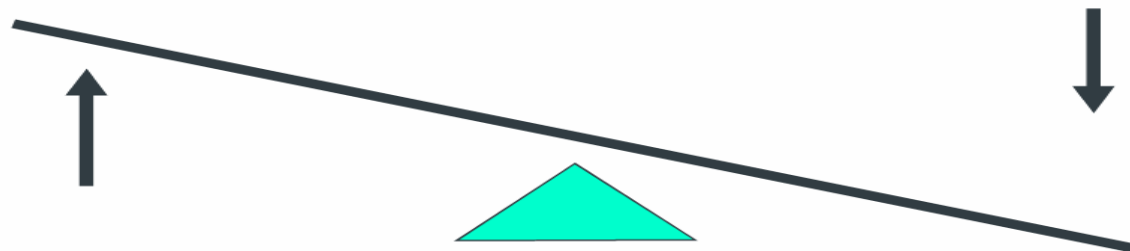
Wutz A. et al. Imprinted expression of the Igf2r gene .../ Nature. – 1997. Vol. 386, N. 6652

Grewal and Jia *Nature Reviews Genetics* 8, 35–46 (January 2007) | doi:10.1038/nrg2008

Збалансована регуляція



Порушення імпринтінгу



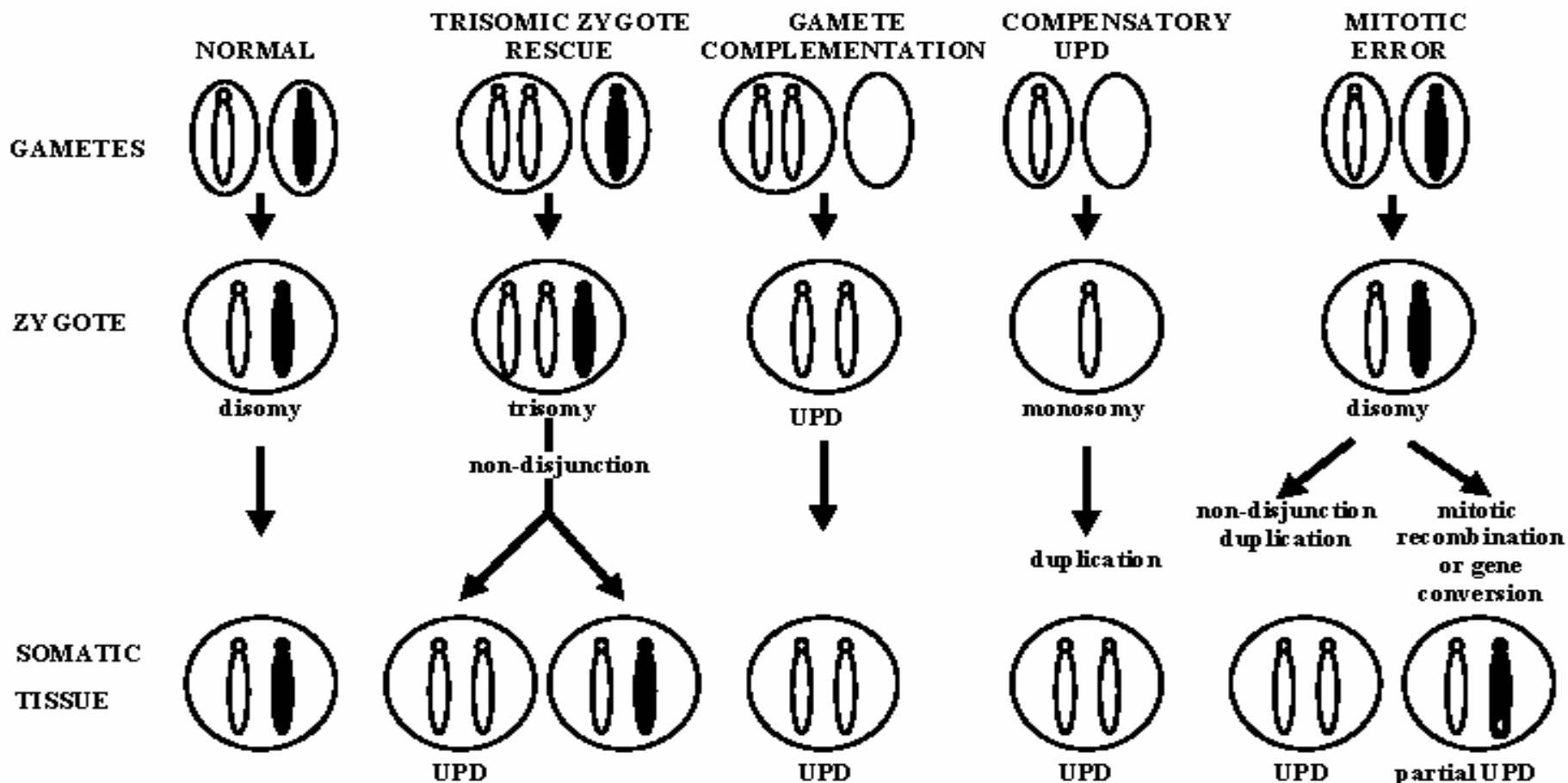
Порушення імпринтінгу

- Патологічні стани при порушенні імпринтінгу
 - Геномний рівень
 - хорионепітеліома
 - Хромосомний рівень
 - Встановлено: 7, 10, 11, 14, 15
 - Припускається: 1, 2, 5, 6, 16, 19, 20, 22
 - Генний рівень

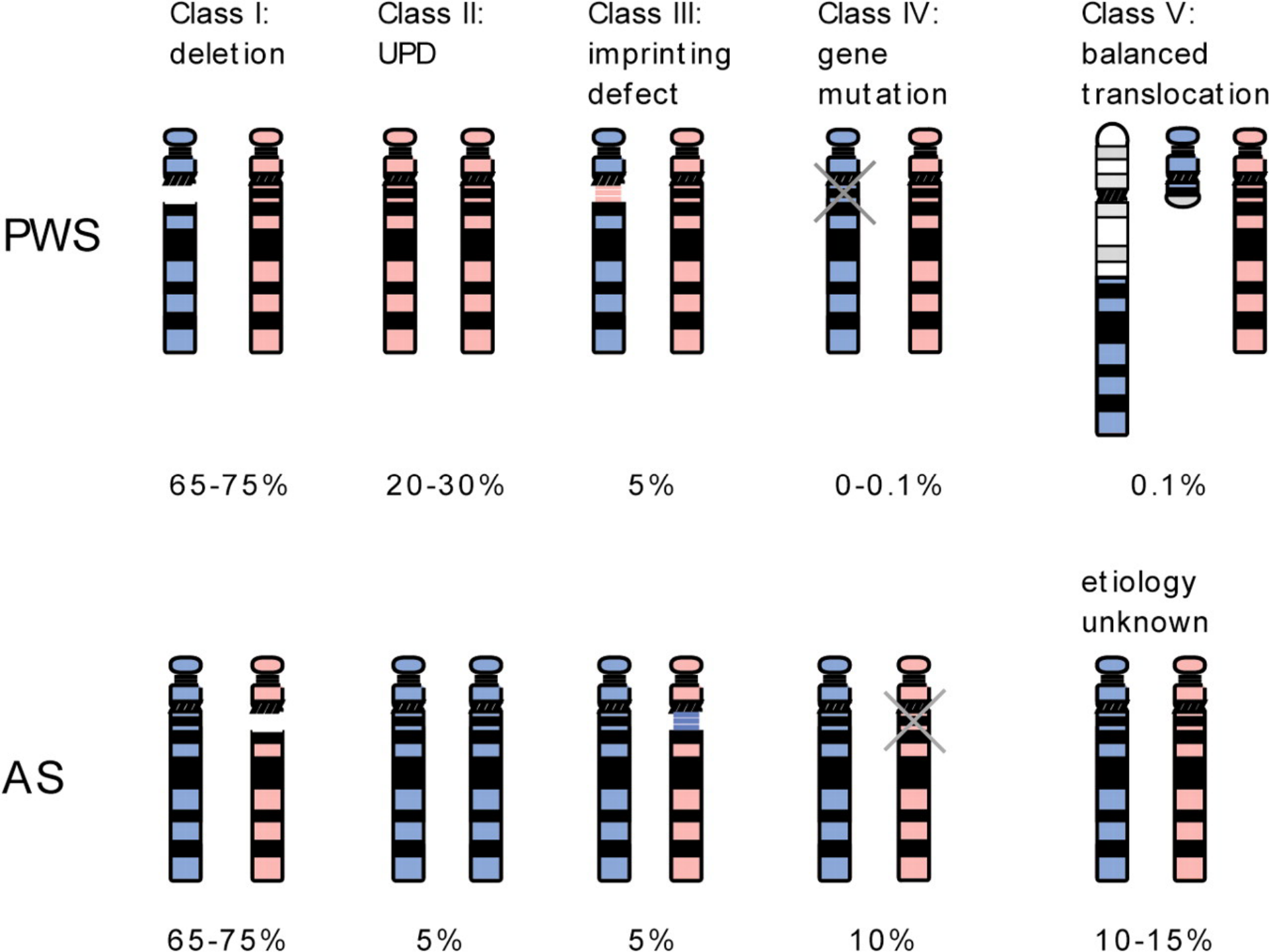
Деякі хвороби імпринтінгу

Upd(1)mat	NOEY2
Upd(2)mat	ВЗРП
Upd(4)mat	Вн.утробная гибель плода
Upd(6)pat	Диабет новорожденных
Upd(7)mat	Синдром Сильвера-Рассела
Upd(7)pat/mat	Муковисцидоз, лицевые дизморфии
Upd(11)pat	Синдром Беквита-Видемана
Upd(14)mat	Преждевременное половое созревание, Вн.утробная гибель плода
Upd(14)pat	Карликовость
Upd(15)mat	Синдром Прадера-Вилли
Upd(15)pat	Синдром Ангельмана
Upd(15)pat/mat	Значимых отклонений в развитии плода не опеределается
Upd(16)mat	ВЗРП
Upd(20)mat	ВЗРП
Upd(21)mat	Вн.утробная гибель плода
	ICF-синдром
	Синдром Ретта
	Болезни тринуклеотидных повторов

Механізм утворення однобатьківських дисомій



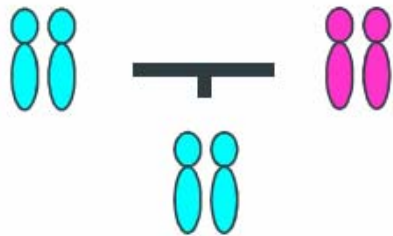
H. Kokkonen. Genetic changes of chromosome region 15q11-q13 in Prader-Willi and Angelman syndromes in Finland. Acta Universitatis Ouluensis. Medica, 2003



Транзиторний діабет новонароджених

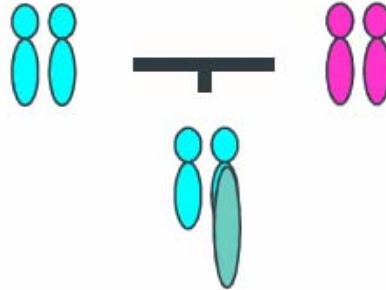
Гіперекспресія гену *PLAGL1*

(1) paternal UPD6



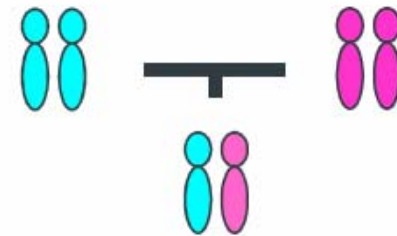
40.5%

(2) Paternal duplication



40.5%

(3) Loss of methylation



19%

K. Temple. Genomic imprinting. Univ of Southampton, 2009

Епігенетичні порушення при ДРТ

Angelman's syndrome (*neurogenetic disease*)

Cox et al, 2002: 2 cases after ICSI

Beckwith-Wiedemann syndrome (*human large baby syndrome*)

Sutcliffe et al, 1995: 1 case after cryopreserved ET

Olivennes et al, 2001: 1 case after IVF

DeBaun et al, 2002: 2 cases after IVF

4 cases after ICSI (ejacul. sperm)

1 case after ICSI (testic. sperm)

Maher et al, 2003: 3 cases after IVF

3 cases after ICSI

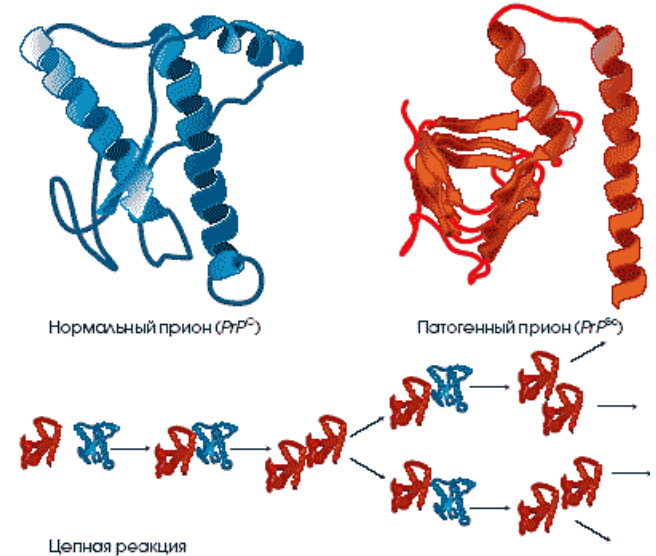
Retinoblastoma

Moll et al, 2003: 5 cases after IVF

(c) Tarlatzis B. C. Health of children born after ICSI. 2005

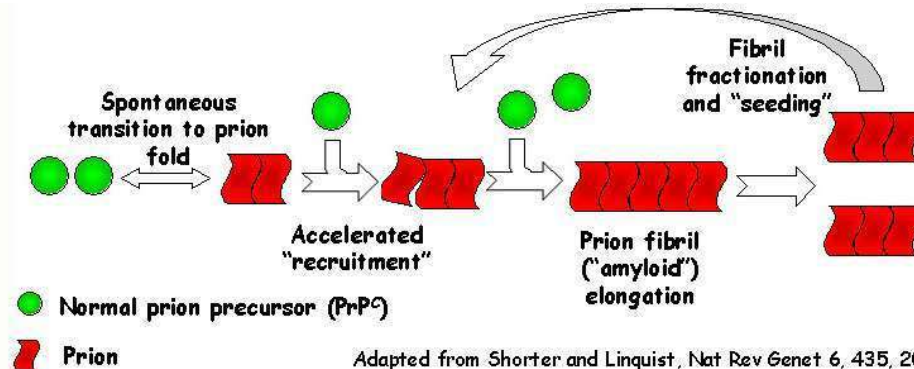
Прионизация белков

- Прионы - особый класс инфекционных агентов, чисто белковых, не содержащих нуклеиновых кислот, вызывающих тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных (т. н. «медленные инфекции»).
- Прионный белок, обладающий аномальной трёхмерной структурой, способен прямо катализировать структурное превращение гомологичного ему нормального клеточного белка в себе подобный (прионный), присоединяясь к белку-мишени и изменяя его конформацию.



Прионы — единственные инфекционные агенты, размножение которых происходит без участия нуклеиновых кислот.

Прионы отличаются составом аминокислот, характерных для данного вида, определяемых видовым геном прионового белка, а также так называемыми посттрансляционными модификациями или степенью гликозилирования базовой белковой цепочки.



Adapted from Shorter and Linquist, Nat Rev Genet 6, 435, 2005

РНК-опосередковані модифікації

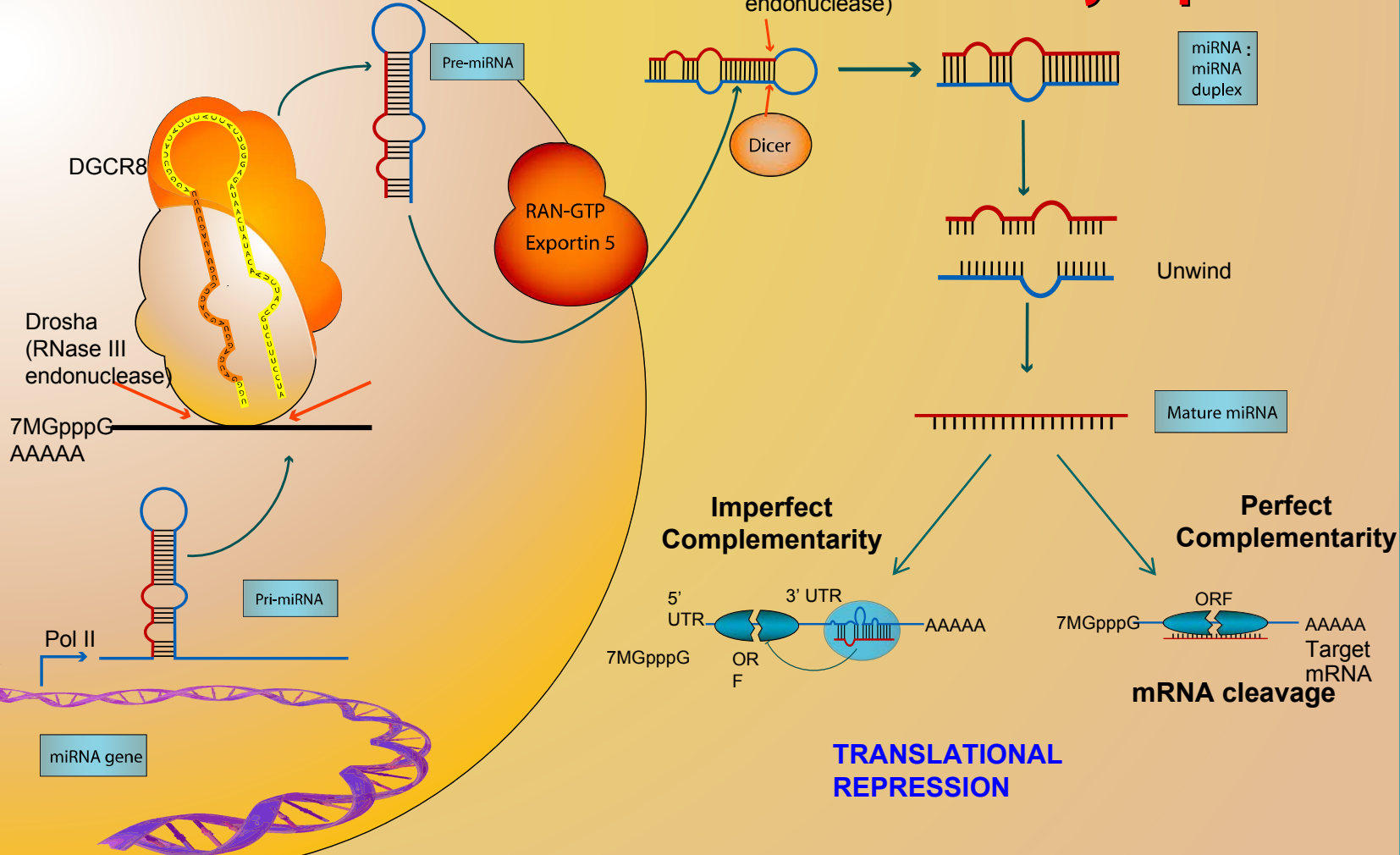
RNA-mediated

Nucleus

Cytoplasm

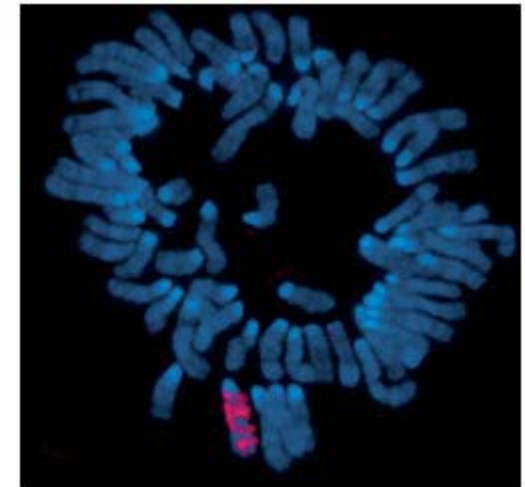
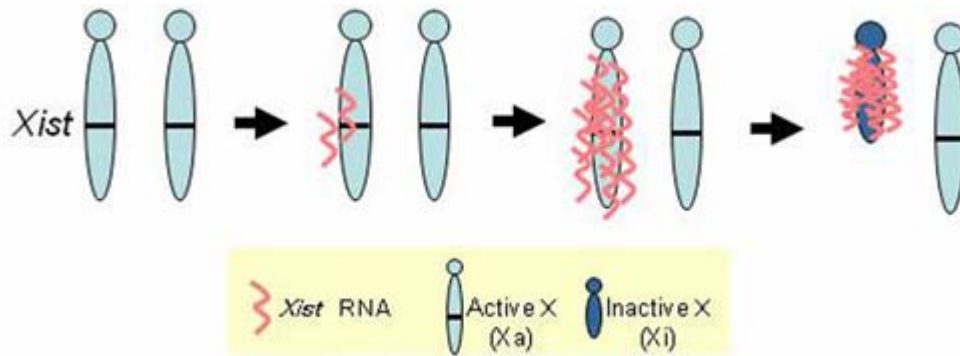
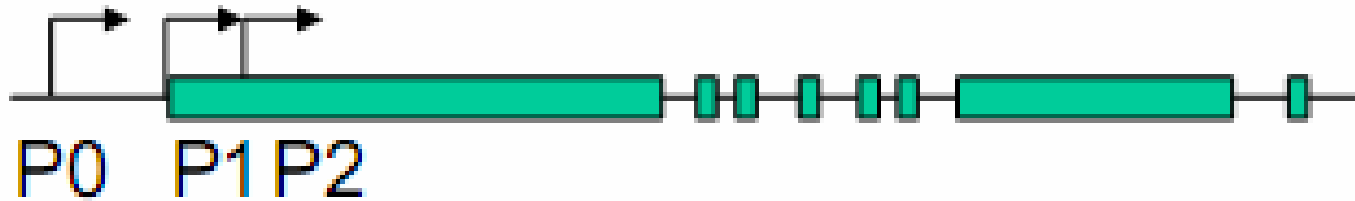
- RNA
- RNA
- RNA
- RNA

-3.0



Інактивація Х-хромосоми

Ген *Xist*



K. Temple. Genomic imprinting. Univ of Southampton, 2009

2007 Nature Publishing Group, Ng, K., et al., *Xist* and the order of silencing, EMBO reports 8, 34–39.

Key X^P = paternal X X^m = maternal X

[Red hatched box] = cell with inactive maternal X

[Blue box] = cell with inactive paternal X

[Box with X] = inactivated X

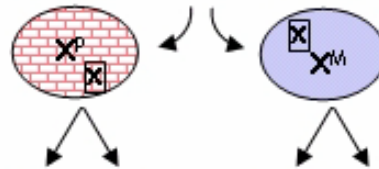
Zygote



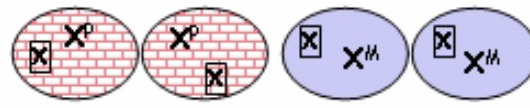
Early embryo



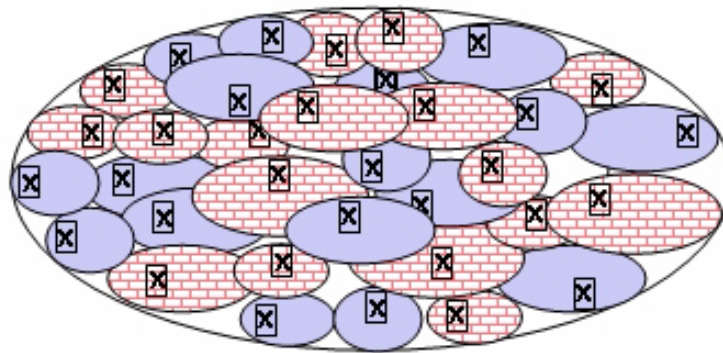
Random X-chromosome inactivation in each cell



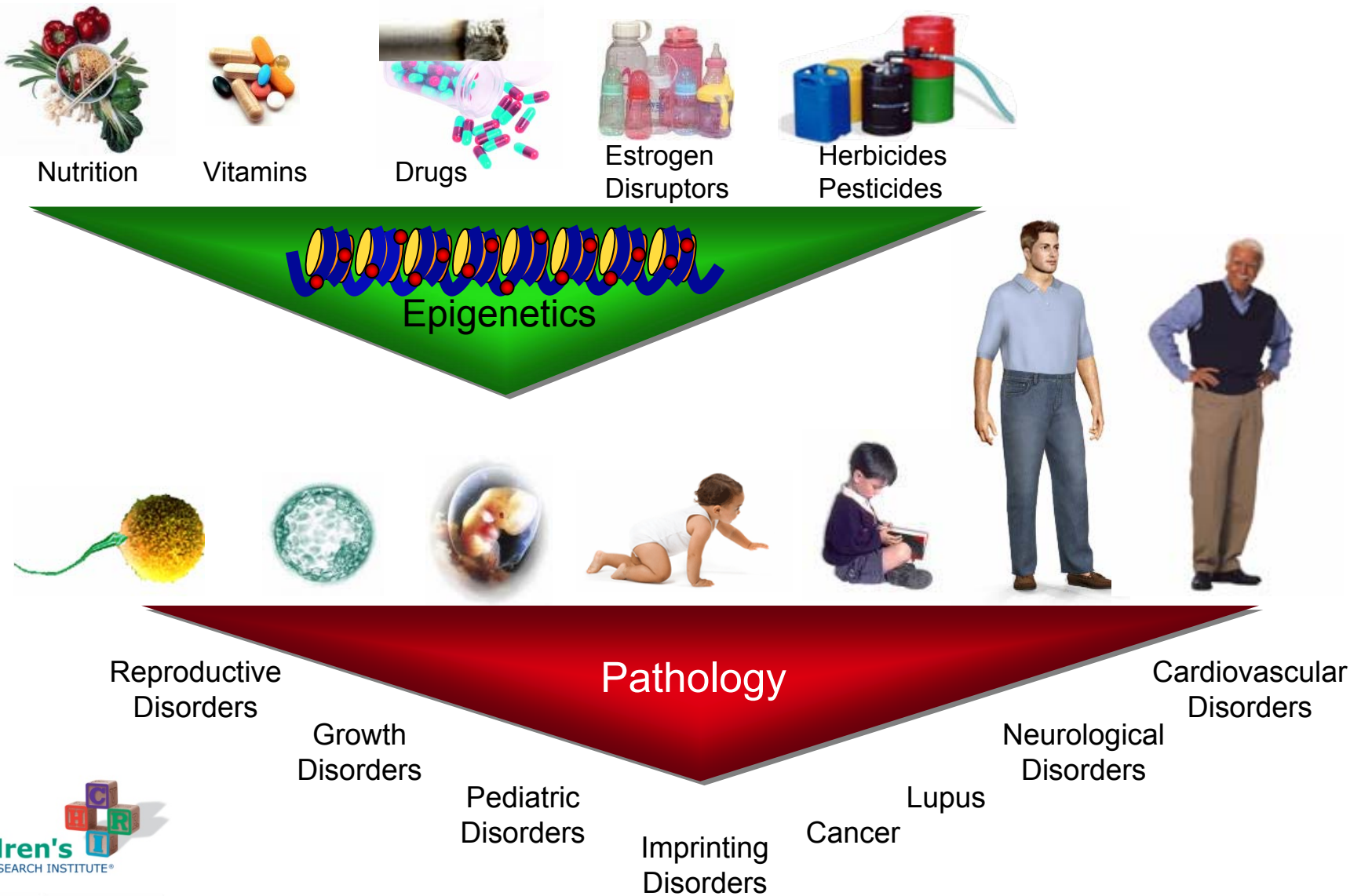
Fixed inactivation in all descendant cells



Adult female with the paternal X active in some cells and the maternal X active in other cells.

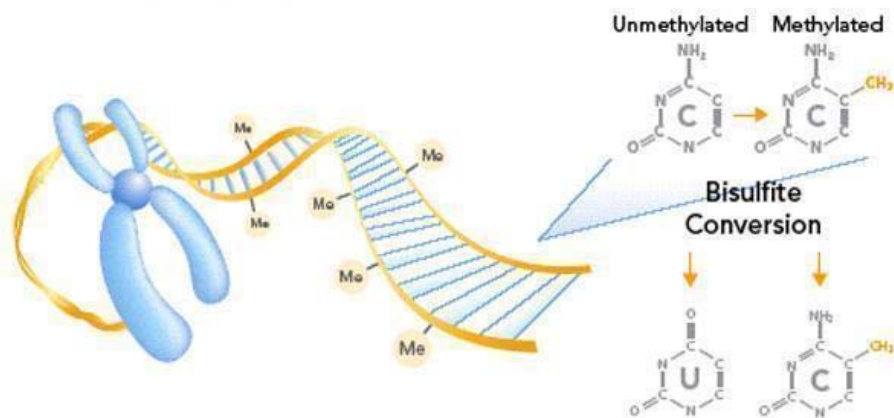


Epigenetics: Mediator of Environment, Development, and Disease



Епігенетика: методи досліджень

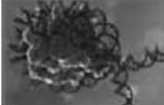
- Визначення тотального вмісту d^mC
 - Зворотньо-фазова ВЕРХ
 - ELISA
- Чутливий до метилування рестрикційний аналіз
- Бісульфітне секвенування
- Специфічна до метилування ПЛР (MSP)
- COBRA (комбінований бісульфіт-рестрикційний аналіз)
- ms-SNUPE (Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension)
- Імунопреципітація ДНК (MeDIP та MeDIP-seq)
- Імунопреципітація хроматину



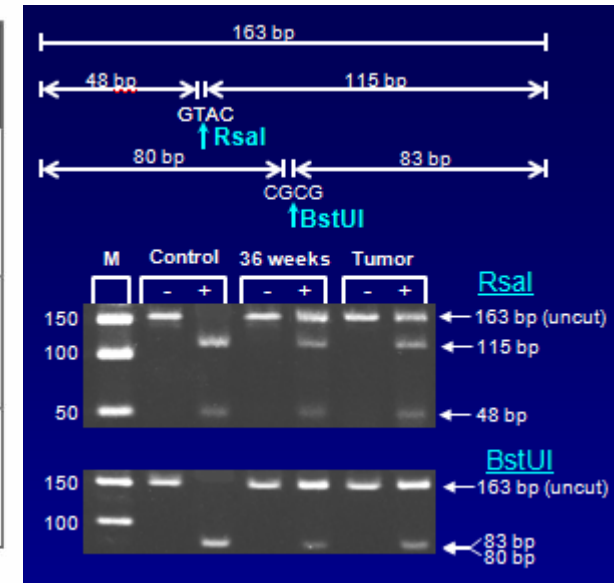
Courtesy of Illumina

Чутливий до метилування рестрикційний аналіз

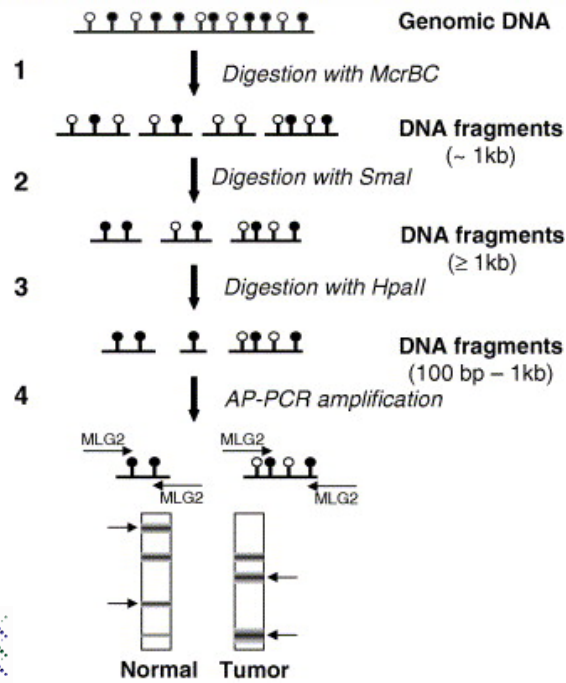
Table 4A: Methylation Sensitive Restriction Enzymes

	METHYLATION SENSITIVITY	SEQUENCE	NEB #	ISOSCHIZOMER
DpnII	Cleaves dam sites** which lack adenomethylation and is blocked by complete dam methylation and probably by hemi-methylation	5'... ▼ GATC...3' 3'...CTAG... ▲ 5'	R0543	MboI DpnII
HpaII	Will not cleave methylated CpG sites	5'... ▼ C ▲ CGG...3' 3'...GGCC... ▲ 5'	R0171	MspI
MspI	Not methylation sensitive	5'... ▼ C ▲ CGG...3' 3'...GGCC... ▲ 5'	R0106	HpaII

** dam sites: methylation at the N6 position of the adenine in the sequence GATC (GmATC).

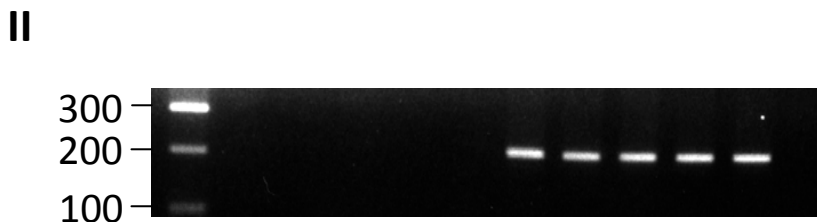
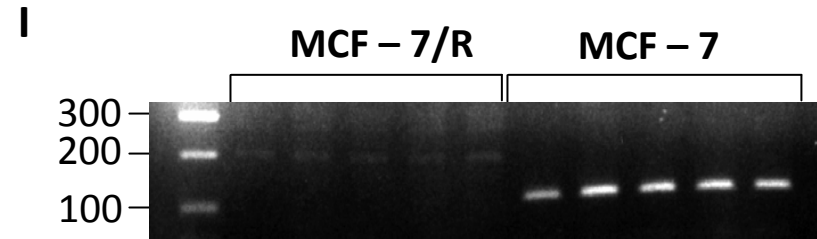
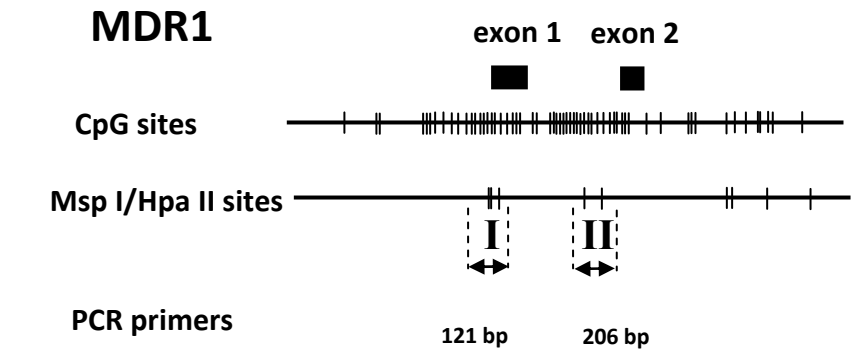


Погрібний І., Микитенко Д., 2006

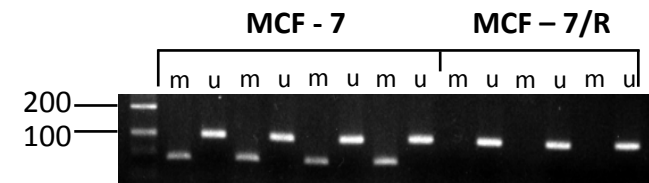


Специфічна до метилування ПЛР

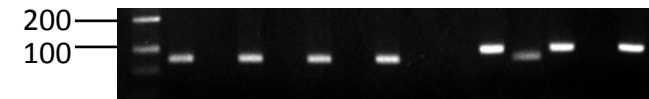
METHYLATION STATUS OF PROMOTER IN MDR1, MGMT, GSTP1 AND Upa GENES IN MCF-7 AND MCF-7/R CELLS



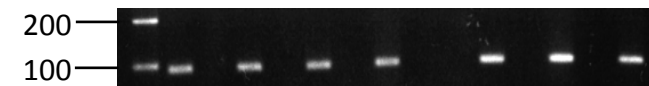
MGMT



GSTP1

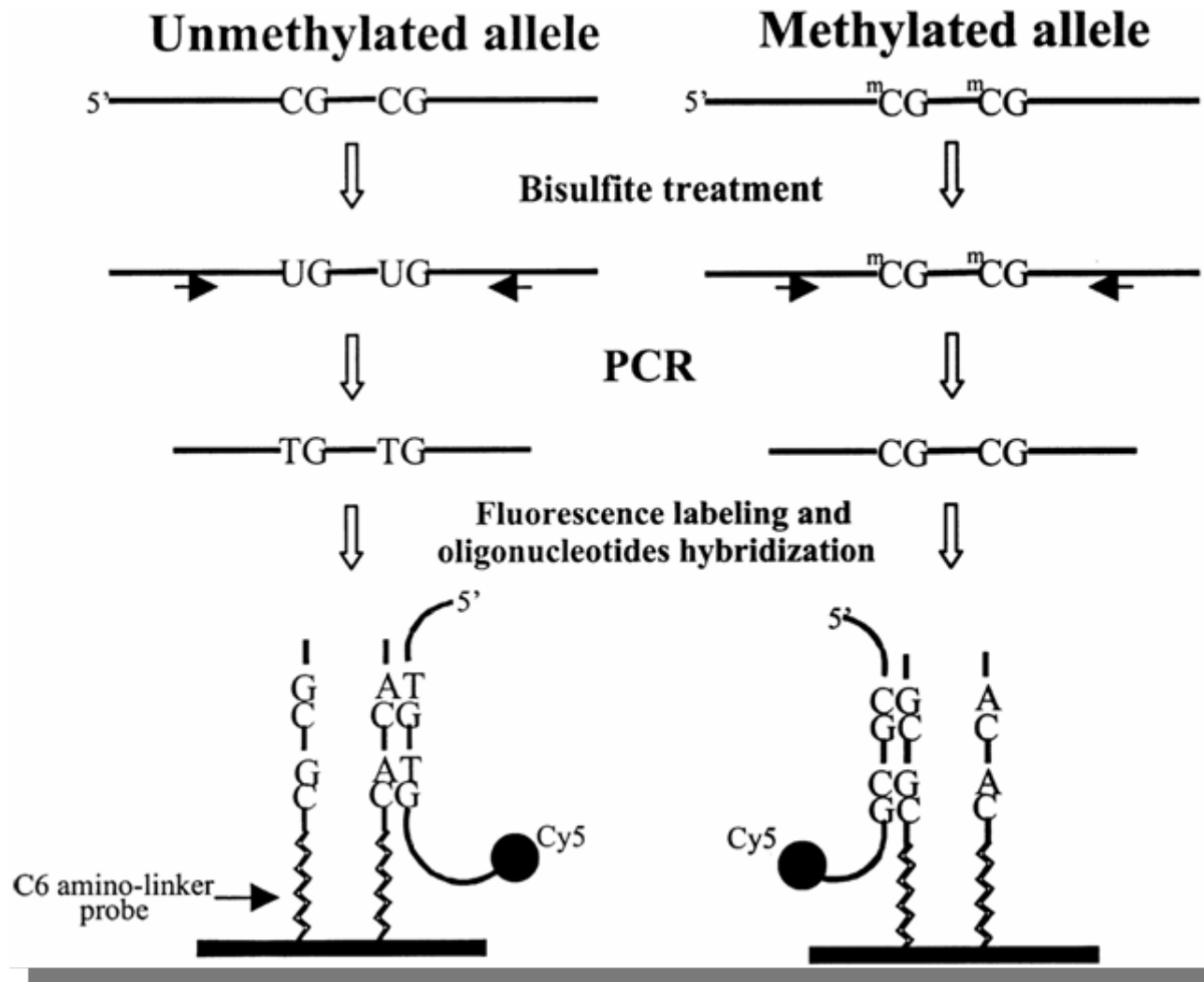


Upa



Погрібний І., Микитенко Д., 2006

Schematic outline for analysis of DNA methylation based on oligonucleotide microarray.



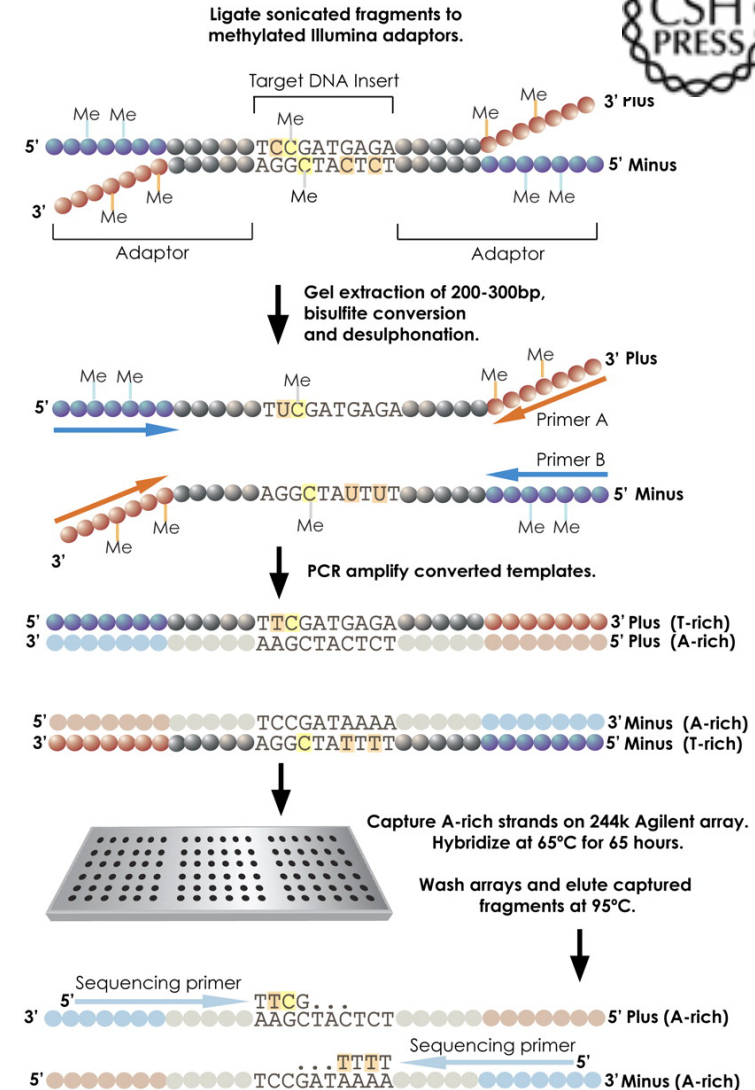
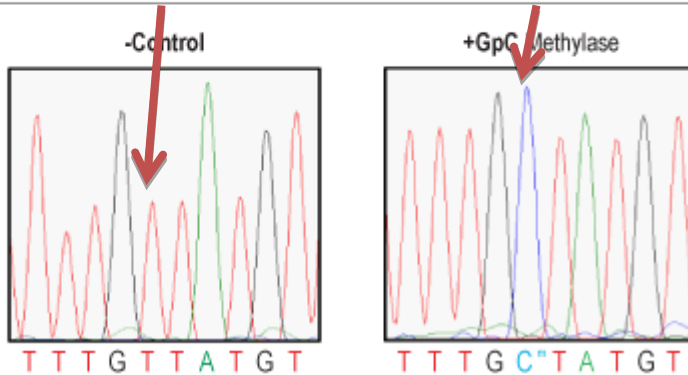
Gitan R S et al. Genome Res. 2002;12:158-164



Бісульфітне секвенування



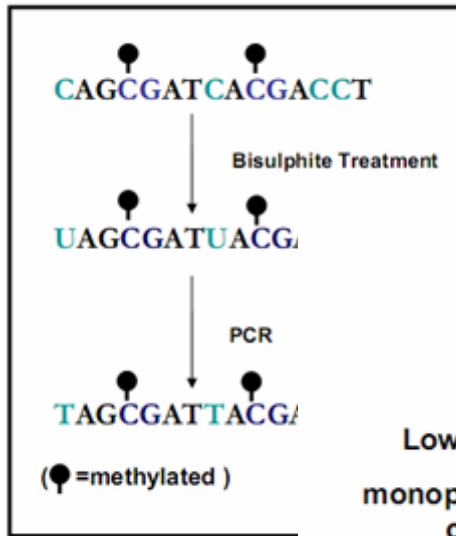
	Original Sequence	+GpC Methylase
Non-converted	CTCGCCATGT	CTCGC ^{Me} CATGT
Bisulfite-converted	TTTGTATGT	TTTGC ^{Me} TATGT



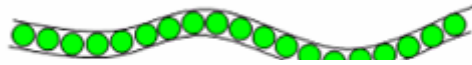
Sequence recovered strands on Illumina GA2, yielding T-rich reads.

Copyright © 2009 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

High resolution melting for *methylation analysis*



Saturating dsDNA binding dye
e.g. LCGreen Plus™



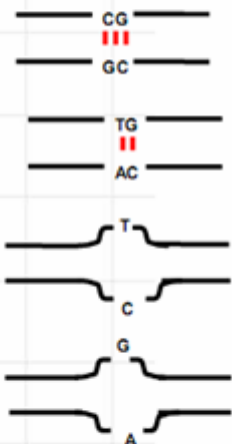
Highest T_m:
monophasic melt curve

Methylated
(100%)



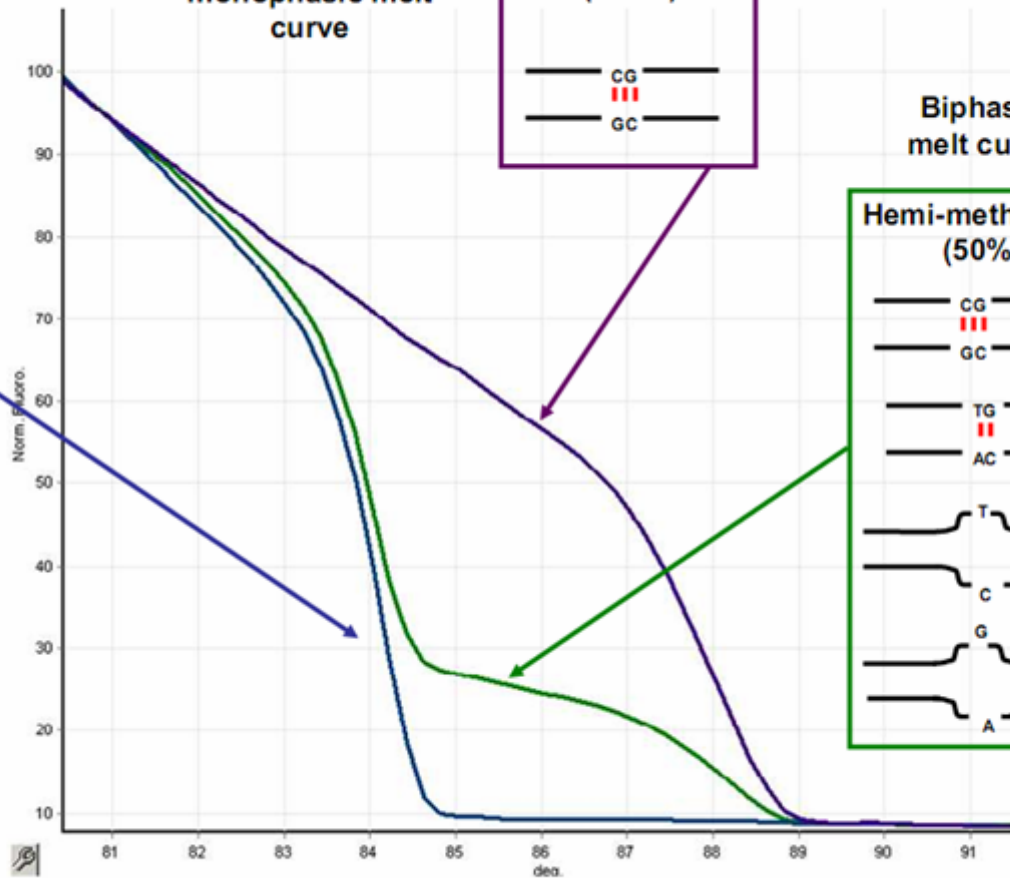
Biphasic
melt curve

Hemi-methylated
(50%)

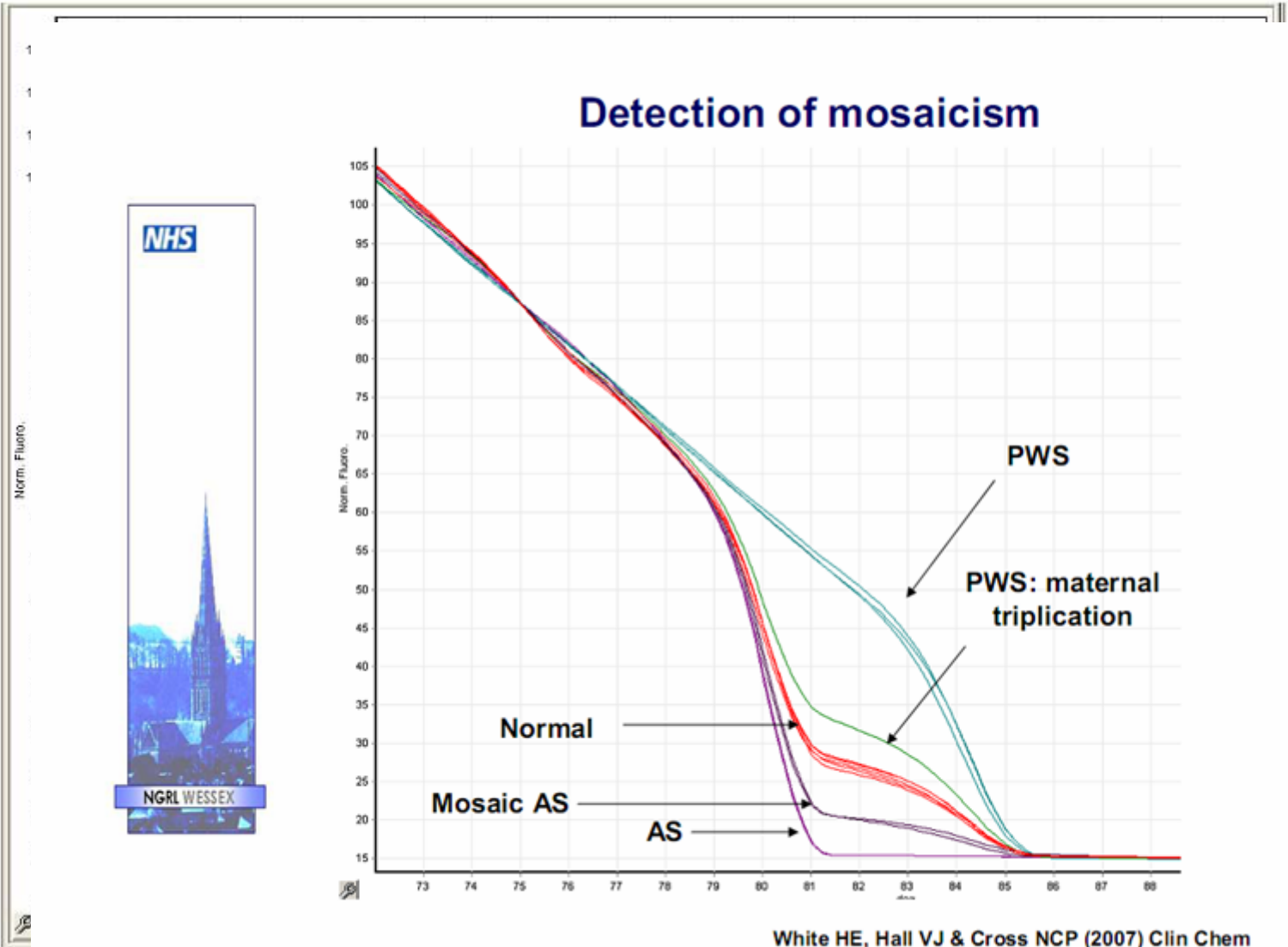
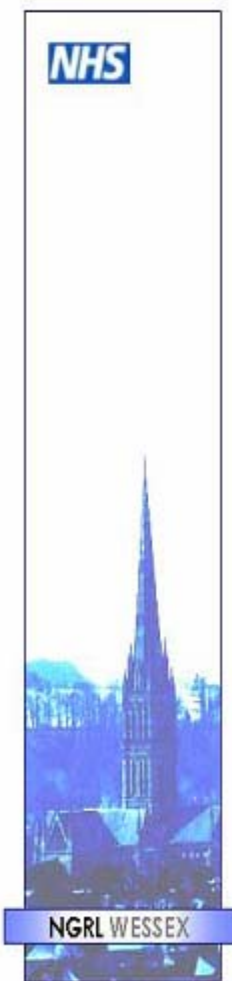


Lowest T_m:
monophasic melt curve

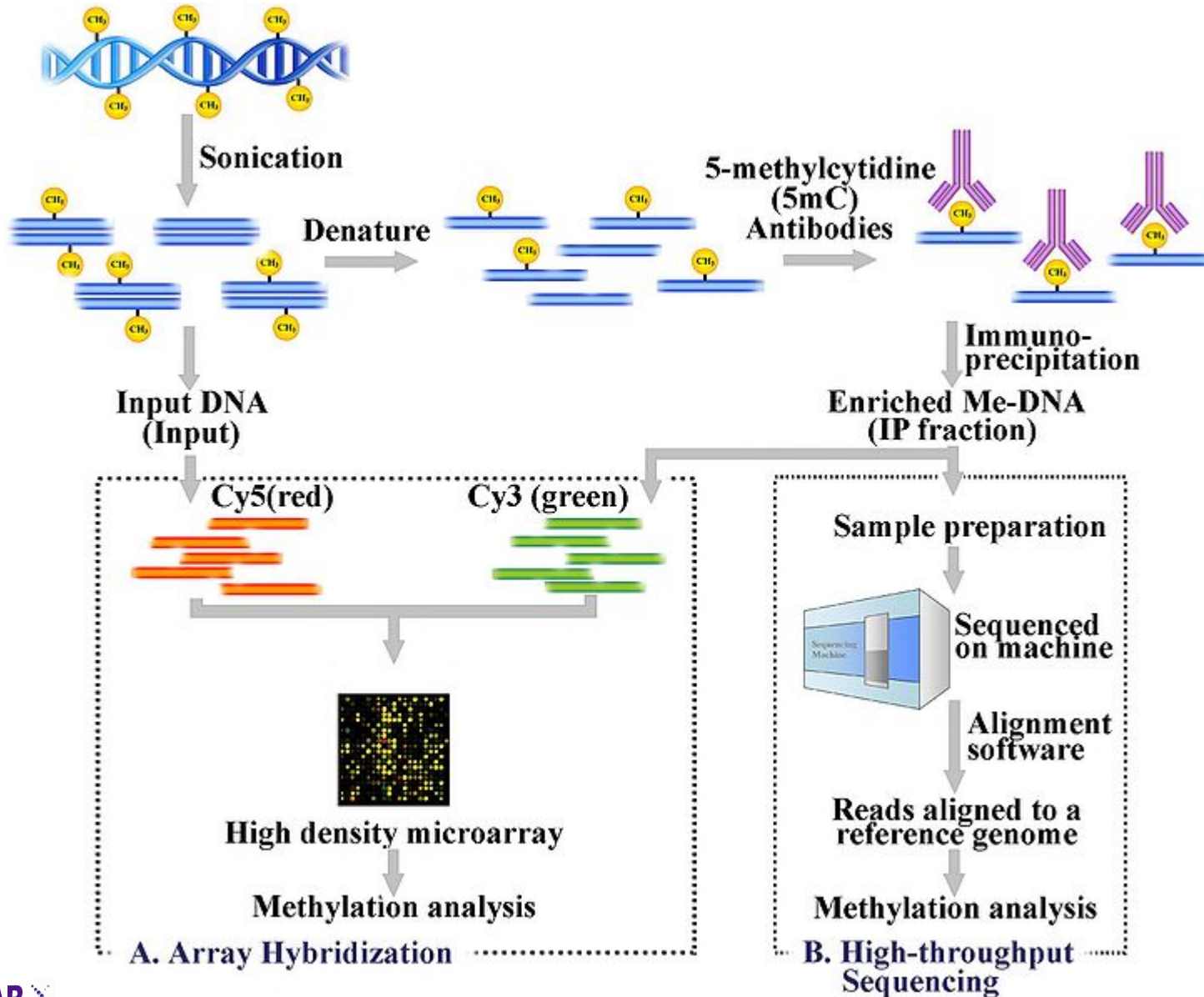
Unmethylated
(0%)



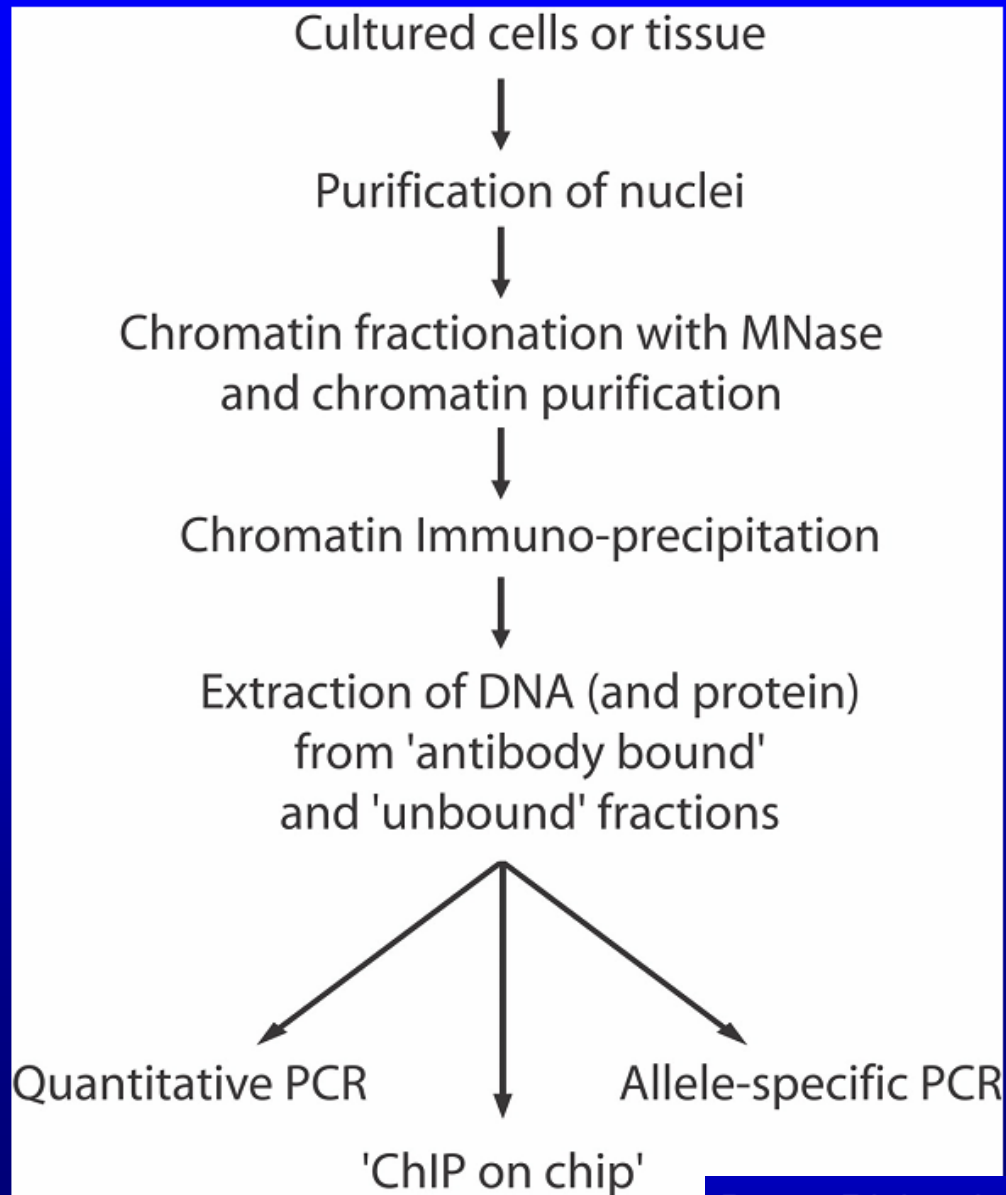
HRM for diagnosis of PWS / AS: Analysis of SNRPN promoter



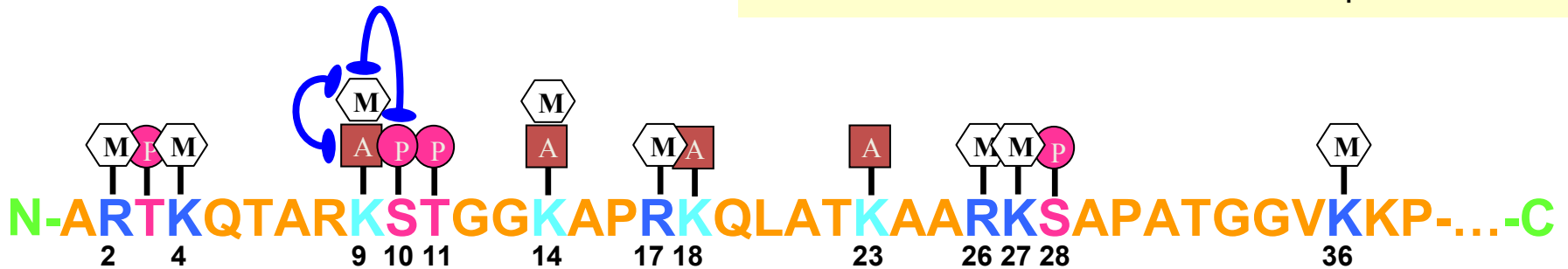
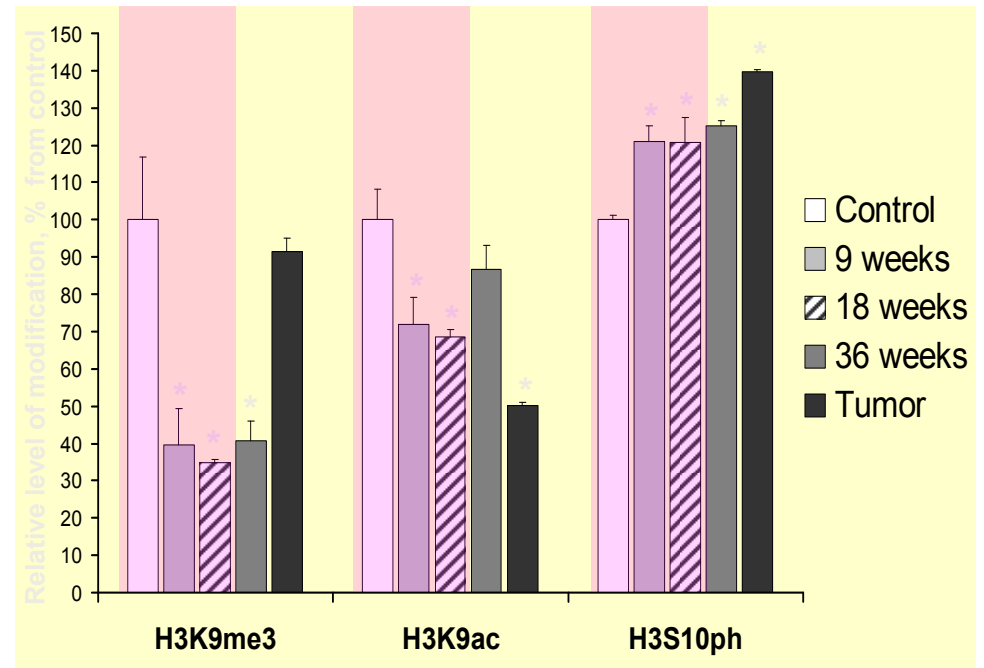
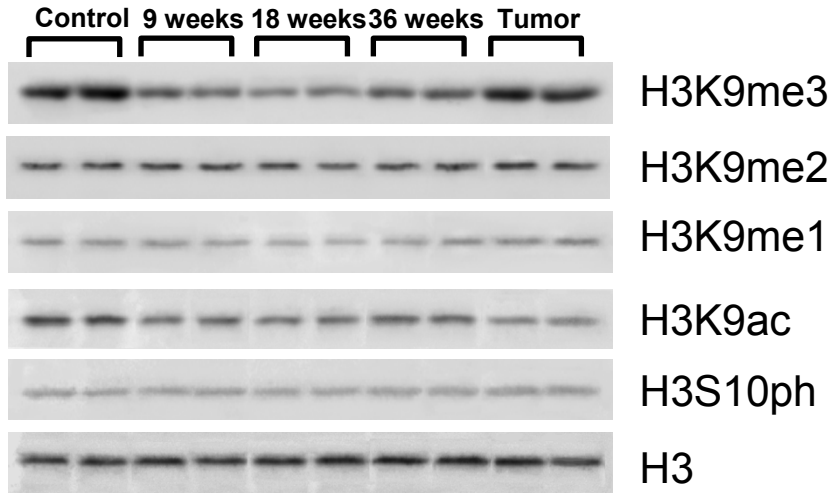
Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)



Chromatin Immunoprecipitation



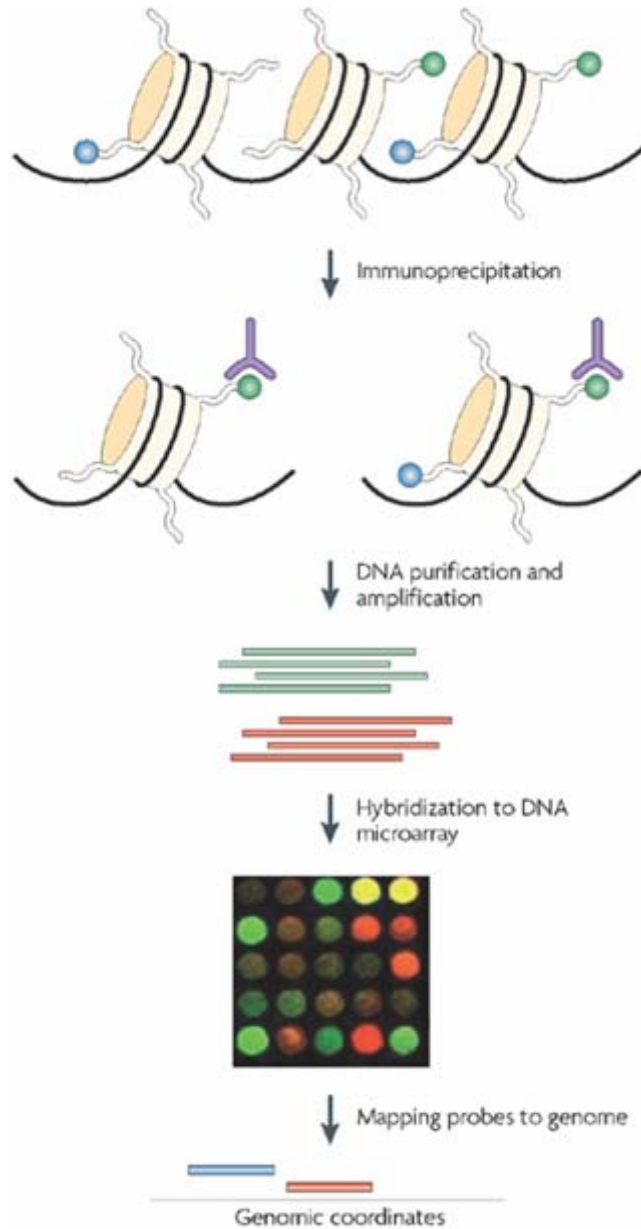
ALTERATIONS OF HISTONE H3 MODIFICATIONS IN THE LIVER OF F344 RATS DURING METHYL DEFICIENCY



Interplay between H3K9me3, H3K9Ac, and H3S10ph

i. Pogribny, 2007

ChIP-on-chip



Nature Reviews | Genetics

Міфотворчість

exploring today's touch therapies

MASSAGE

ISSUE 190 • MARCH 2012 www.massagemag.com

RUN A PAPERLESS PRACTICE

ORTHOPEDIC MASSAGE FOR PAIN RELIEF

SPECIAL

HOW TO FIND NEW CLIENTS

SOMATIC ARCHAEOLOGY

MAKE YOUR OWN AROMATHERAPY BLENDS!

MASSAGE REDUCES SCARS & STRETCH MARKS

WHY BUY CRUELTY-FREE PRODUCTS?

ANNUAL GREEN ISSUE

Choose Organic!

Career Opportunities!
Massage Envy
CAREERS™

Details on page 45

RESEARCH: MASSAGE THERAPY REDUCES HAND PAIN

“...The integration of standard massage practices and the knowledge of the biology of adversity will change our minds, our physiology, our epigenetics—and hence our massage practice.”

March 2012



*“Our goal is to preserve the past
using 21st century technology”
James Dewey Watson*

Дякую за увагу

(044) 592 21 78

E-MAIL: d.mykytenko@genetics.kiev.ua

Клініка репродуктивної медицини

«НАДІЯ»

www.ivf.com.ua