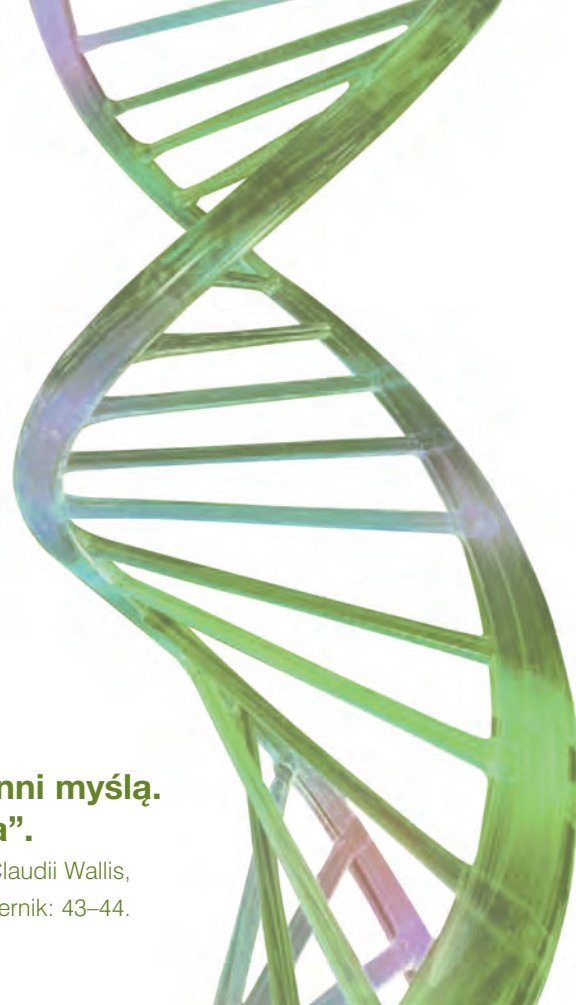


Rozdział 12

Epigenetyka i monoalleliczna ekspresja genów

Jeśli wiesz, że masz rację, to nie obchodzi cię, co inni myślą.
I tak przędzaj czy później „oliwa na wierzch wypływa”.

Barbara McClintock, cytowana w artykule Claudii Wallis,
„Honoring a modern Mendel”. *Time* (1983) Październik: 43–44.



W ogólnym zarysie

12.1 Wstęp

12.2 Markery epigenetyczne

Metylacja cytozyn w DNA znakuje geny przeznaczone do wyciszenia

Trwałe utrzymywanie modyfikacji histonów

Choroby. Ramka 12.1 Nowotwór a epigenetyka

12.3 Rodzicielskie piętno genomowe

Ustalenie i utrzymywanie piętna

Mechanizmy ekspresji monoallelicznej

Rodzicielskie piętno genomowe jest ważne dla prawidłowego rozwoju osobniczego

Pochodzenie rodzicielskiego piętna genomowego

Choroby. Ramka 12.2 Zespół łamliwego chromosomu X a metylacja DNA

Choroby. Ramka 12.3 Rodzicielskie piętno genomowe a zaburzenia rozwoju układu nerwowego

12.4 Inaktywacja chromosomu X

Przypadkowa inaktywacja chromosomu X u ssaków

Mechanizmy molekularne trwałego utrzymania inaktywacji chromosomu X

Czy wszystkie geny chromosomu X ulegają ekspresji monoallelicznej?

12.5 Fenotypowe objawy obecności transpozonów

Perspektywa historyczna: odkrycie transpozonów kukurydzy przez Barbarę McClintock

Transpozony DNA charakteryzują się szerokim spektrum gospodarzy

Transpozony DNA przenoszą się w inne miejsca na zasadzie „tnij i wklej”

Retrotranspozony przenoszą się w inne miejsca na zasadzie „kopiuj i wklej”

Niektóre retrotranspozony typu LTR są aktywne w genomach ssaków

Do retrotranspozonów nie oskrzydłonych sekwencjami LTR należą sekwencje SINE i LINE

Narzędzia. Ramka 12.1 Mutageneza transpozycyjna

Choroby. Ramka 12.4 Geny skaczące a choroby człowieka

12.6 Kontrola epigenetyczna transpozonów

Metylacja transpozonów

Formowanie heterochromatyny w procesie RNAi i RNA-zależnej metylacji DNA

12.7 Wykluczenie alleliczne

Powstawanie typu ptci drożdży – włączanie i wyciszenie

Przełączanie antygenowe u świrdrowców

Rekombinacja V(D)J i adaptacyjna odpowiedź immunologiczna

Choroby. Ramka 12.5 Choroby wywoływane przez świrdrowce: śpiączka afrykańska

Warto wiedzieć. Ramka 12.1 Czy system V(D)J powstał z transpozonu?

Podsumowanie rozdziału

Pytania kontrolne

Literatura uzupełniająca

Tabela 12.1 Monoalleliczna ekspresja genów w komórkach ssaczych

Geny	Chromosom	Wybór allelu
Geny piętnowane	Autosomalny	Nieprzypadkowy
Geny związane z inaktywacją chromosomu X	X	Przypadkowy
Geny immunoglobulin	Autosomalny	Przypadkowy
Geny receptorów komórek T	Autosomalny	Przypadkowy
Geny receptorów komórek NK (ang. <i>natural killer cells</i>)	Autosomalny	Przypadkowy
Gen interleukiny 2	Autosomalny	Przypadkowy

12.1 Wstęp

Komórki zazwyczaj zawierają po dwie kopie (allele) genów autosomalnych na chromosomach innych niż X i Y. Jeden z alleli jest dziedziczony od matki (allel matczynej), a drugi od ojca (allel ojcowski). W większości przypadków obie kopie genu ulegają w komórkach ekspresji. Istnieje jednak niewielka grupa genów, które ulegają ekspresji „monoallelicznej”, to znaczy, że transkrypcja przebiega preferencyjnie na matrycy tylko jednego allelu (tab. 12.1). Ekspresja genów monoallelicznych opiera się zwykle na przypadkowym wyborze przez komórkę jednego allelu danego genu, który potem zostaje przepisany na RNA i przetłumaczony na białko. Zjawisko to jest typowe dla komórek układu odpornościowego oraz komórek węchowych i stanowi gwarancję, że na powierzchni komórki prezentowany będzie tylko jeden rodzaj receptora. Inaczej jest w przypadku piętnowania genomowego („imprinting”, rodzicielskie piętno genomowe), w którym wybór aktywnego allelu nie jest przypadkowy i zależy od jego pochodzenia.

Przykładem monoallelicznej ekspresji genów u ssaków jest piętnowanie genomowe, inaktywacja chromosomu X oraz wykluczenie alleliczne. We wszystkich tych procesach uczestniczy mechanizm wyciszania epigenetycznego. W niektórych przypadkach wykluczenia allelicznego regulacja ekspresji odbywa się dodatkowo na drodze programowanej rearanżacji genów, czyli rearanżacji przebiegającej na poziomie DNA. Klasyczne przykłady takiego zjawiska obejmują: powstawanie typu płci u drożdży, przełączanie antygenowe u świdrowców i rekombinacje V(D)J w układzie odpornościowym ssaków. Podstawową funkcją metylacji DNA w komórkach eukariotycznych może być obrona genomu przed potencjalnie szkodliwym wpływem transpozonów. Przegląd typów transpozonów i konsekwencje fenotypowe ich przemieszczania się w obrębie genomu poprzedzają dyskusję na temat ich wyciszania epigenetycznego.

12.2 Markery epigenetyczne

Pytanie, w jaki sposób z pojedynczej komórki różnicuje się wiele różnych typów komórek budujących organizm wielokomórkowy, wciąż intryguje naukowców. Ogólny schemat zakłada, że ponad poziomem kodu genetycznego musi istnieć dodatkowa informacja regulatorowa – informacja epigenetyczna. Za pomysłodawcę terminu „epigenetyka” (gdzie „epi” oznacza „poza czymś” lub „w dodatku do”) uważa się biologa rozwoju, Conrada H. Waddingtona, jakkolwiek nazwa ta została użyta już co najmniej w roku 1896 przez niemieckiego biologa Wilhelma Augusta Oscara Hertwiga. W 1942 r. Waddington określił epigenetykę jako „gałąź biologii, która studiuje pojawianie się określonych fenotypów w wyniku oddziaływań pomiędzy genami i produktami ich ekspresji”.

W dzisiejszych czasach epigenetyka dotyczy głównie badań nad zmianami w ekspresji genów, które podlegają dziedziczeniu mitotycznemu i/lub mejotycznemu i nie są związane ze zmianą sekwencji DNA. Zainteresowanie epigenetyką nastąpiło po odkryciu przez Barbarę McClintock w latach 30.–40. ubiegłego wieku transpozonów u kukurydzy. Badania nad regulacją epigenetyczną u ssaków rozwijały się niezależnie od podobnych badań u roślin, a ich początek wiąże się z wyjaśnieniem na poziomie genetycznym inaktywacji chromosomu X przez Mary Lyon w 1961 roku. Większość procesów związanych z różnicowaniem się komórek jest inicjowanych i utrzymywanych dzięki zjawiskom epigenetycznym. Zmiany epigenetyczne, które zachodzą w trakcie różnicowania się komó-

rek, są zwykle wymazywane w liniach zarodkowych, aczkolwiek znane są przykłady przekazywania zmienności epigenetycznych w trakcie mejozy zarówno u roślin, jak i u zwierząt.

Klasyycznym przykładem zjawiska epigenetycznego są modyfikacje struktury chromatyny. U większości roślin i zwierząt głównym typem modyfikacji DNA są metylacje zasad azotowych – cytozyn. Wzory metylacji DNA są najlepiej poznanymi i opisanymi markerami genetycznymi, ale należy pamiętać, że istnieją również inne, ważne źródła regulacji epigenetycznej, do których należą modyfikacje histonów.

Metylacja cytozyn w DNA znakuje geny przeznaczone do wyciszenia

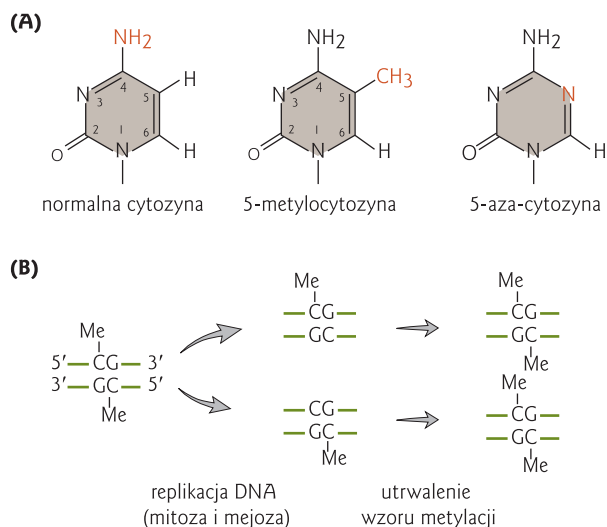
Metylacja cytozyny w DNA jest modyfikacją kowalencyjną. W procesie tym białka z rodziny metylotransferaz cytozynowych DNA katalizują reakcję przeniesienia grupy metylowej z *S*-adenozylometioniny na węgiel 5 w pierścieniu cytozyny (ryc. 12.1A). 5-metylocytozyna jest jedyną modyfikowaną zasadą powszechnie obecną u eukariotów, natomiast nie spotykaną lub występującą rzadko w komórkach drożdży, *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*. U ssaków DNA jest metylowany niemal wyłącznie w obrębie dinukleotydu CG, określane go często jako „CpG”, gdzie „p” oznacza grupę fosforanową. U roślin natomiast DNA jest metylowany w obrębie sekwencji CG lub CNG, gdzie „N” oznacza każdą zasadę. Zarówno u roślin, jak i u zwierząt metylacji podlegają reszty cytozyny na obu niciach podwójnej helisy DNA. Wzór metylacji DNA zostaje zachowany podczas replikacji DNA dzięki temu, że proces ten ma charakter semikonserwatywny (ryc. 12.1B). Po replikacji, podwójna helisa DNA jest „hemimetylowana”, co oznacza, że stara nić matrycowa jest metylowana, a nowo zsyntetyzowana nić jeszcze nie. Hemimetylowane miejsca są rozpoznawane przez metylotransferazy DNA, które następnie wprowadzają metylację we właściwych pozycjach na nowej nici DNA.

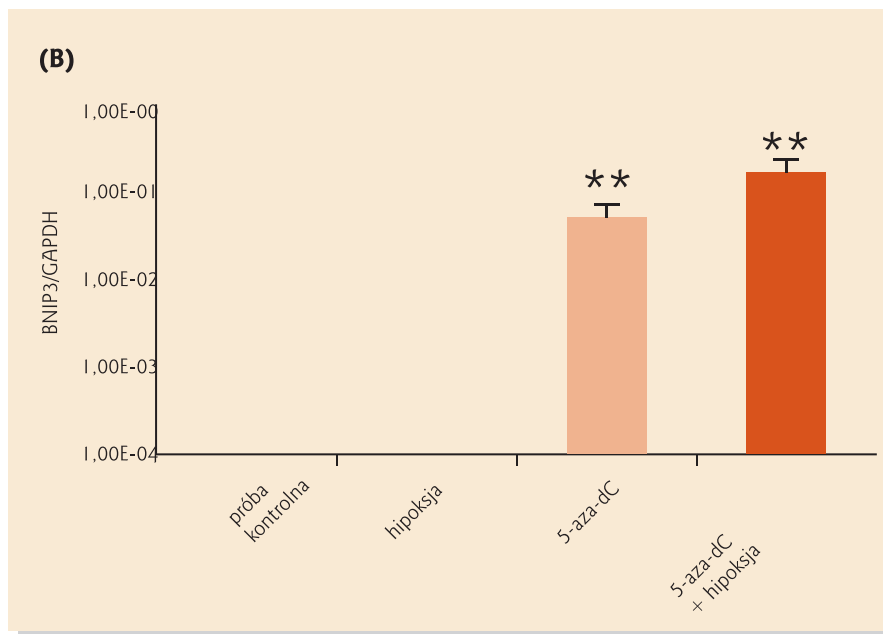
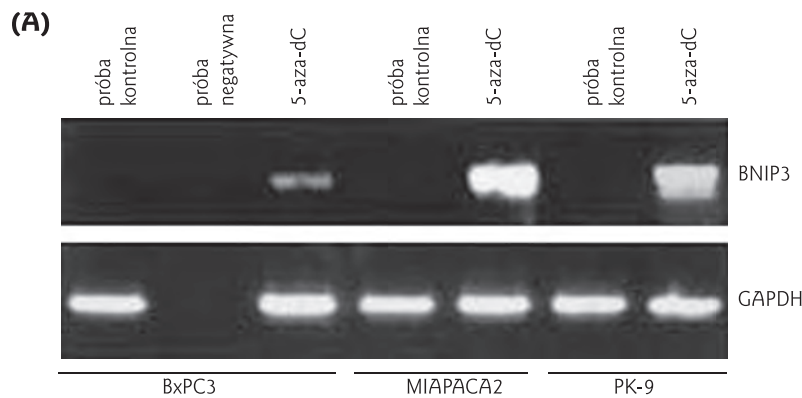
Metylacja jest metodą znakowania genów przeznaczonych do wyciszenia. W wielu genach większość miejsc CG ma stały wzór metylacji, niektóre miejsca podlegają jednak zmianom. Podstawowa zasada mówi, że geny, w obrębie których większość miejsc CG jest metylowanych (hipermetylacja), pozostają raczej nieaktywne, a geny, w których większość dinukleotydów CG pozostaje niemetylowana (hipometylacja), są zwykle aktywne. Nie jest to zasada ogólna, ponieważ okazało się, że niekiedy utrata metylacji DNA jest skorelowana ze zmniejszoną aktywnością genu.

Jedną z metod określenia, czy metylacja DNA wiąże się z aktywnością, czy też z wyciszeniem danego genu, jest potraktowanie kultury komórkowej modyfikowaną zasadą – 5-aza-cytozyną, zwykle w postaci nukleozydu 5-aza-deoksytydyny. 5-aza-cytozyna jest analogiem normalnej cytozyny i może być włączana do nici DNA podczas replikacji. Nie może jednak być metylowana, gdyż węgiel w pozycji 5 tej zasady jest zastąpiony azotem (ryc. 12.1A). Azot znajdujący się w tym miejscu jest natomiast silnym inhibitorem większości enzymów komórkowych, które dodają grupę metylową w pozycji 5 cytozyny. Podanie 5-aza-cytozyny prowadzi do utraty grup metylowych w różnych cytozynach w obrębie całego genomu. Pomimo takiego globalnego efektu często rozważa się użycie tego związku jako leku w te-

Ryc. 12.1 Dziedziczenie stanu metylacji.

(A) Porównanie wzorów chemicznych cytozyny normalnie występującej w DNA z 5-metylocytozyną i lekiem – 5-aza-cytozyną. (B) Replikacja metylowanego DNA prowadzi do powstania hemimetylowanych cząsteczek potomnych DNA. Metylotransferazy metylują cytozyny na podstawie stanu hemimetylacji symetrycznych motywów CG.





Ryc. 12.2 5-aza-deoksycytyna (5-aza-dC) indukuje ekspresję genu *BNIP3*. (A) Analiza poziomu ekspresji mRNA genu *BNIP3* metodą RT-PCR, pochodzącego z różnych linii komórek rakowych trzustki (BxPC3, MIAPACA2, PK-9) traktowanych 5-aza-dC w porównaniu z komórkami traktowanymi fosforanowym buforem solnym (próba kontrolna) (zob. ryc. 9.8D, metoda). (B) Analiza poziomu ekspresji genu *BNIP3* w komórkach rakowych trzustki z użyciem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Warunki hodowli komórek przedstawiono na diagramie. Z komórek izolowano RNA do dalszych analiz. Komórki hodowane w warunkach hipoksji (niedotlenienia) inkubowano w warunkach atmosfery zawierającej tylko 1% tlenu równoważony CO₂ i azotem. Normalizację sygnału ekspresji genu *BNIP3* prowadzono względem poziomu mRNA białka podstawowego metabolizmu komórkowego – GAPDH (dehydrogenazy aldehydu glicerolo-3-fosforanowego). Przedstawiono uśrednione wartości ± błąd standardowy (SEM, ang. standard error of mean). Zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji genu *BNIP3* w komórkach traktowanych 5-aza-dC w porównaniu z próbą kontrolną (**, P<0,01). (Przedrukowano z: Abe, T., Toyota, M., Suzuki, H. et al. 2005. Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *Journal of Gastroenterology* 40:504–510. Copyright © 2005 Springer-Verlag, za zgodą: Springer Science and Business Media).

rapii nowotworów (Choroby. Ramka 12.1). Zastosowanie 5-aza-deoksycytyny *in vitro* okazało się skutecznym sposobem przywracania aktywności istotnych genów. Na przykład, metylacja rejonu promotorowego genu *BNIP3* (ang. *BCL2/adenowirus E1B interacting protein 3*) powoduje wyciszenie ekspresji tego genu w niektórych komórkach rakowych trzustki. Kiedy Tamaki Abe i współpracownicy potraktowali takie komórki rakowe 5-aza-deoksycytyną, ekspresja genu *BNIP3* została przywrócona, a to wywołało śmierć komórek w warunkach hipoksji (ryc. 12.2). Podob-

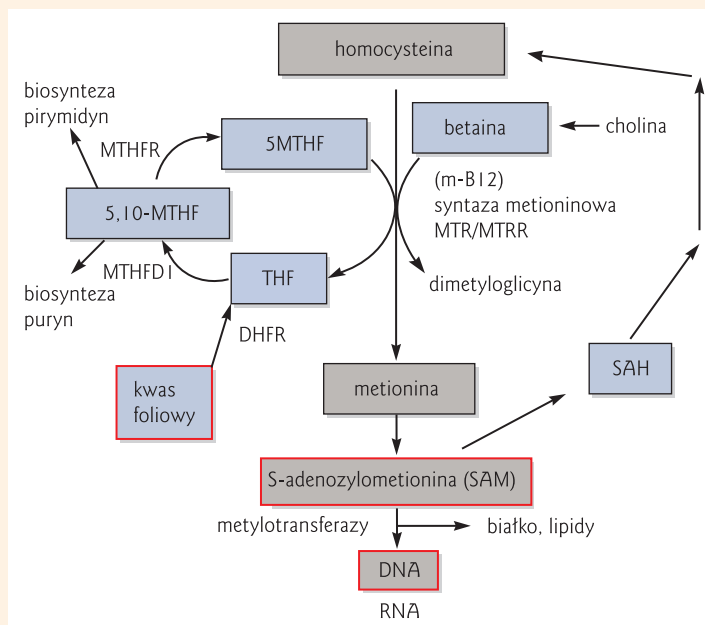


Pod względem epigenetycznym komórki rakowe charakteryzuje hipermetylacja wysp CpG i hipometylacja reszty genomu. Zbyt niski poziom metylacji w reszcie genomu może wywoływać aktywację onkogenów położonych w pobliżu, a zbyt częsta metylacja w obrębie wysp CpG – wyciszenie genów supresorowych nowotworów (zob. podrozdz. 17.2). Hipometylacja na skalę genomu może pobudzać ekspresję onkogenów. Jednak brak metylacji dotyczy głównie sekwencji powtórzonych DNA, zatem jako efekt najczęściej obserwuje się niestabilność chromosomów. Demetylacja na skalę genomu jest procesem, który postępuje wraz z wiekiem. Utrata miejsc metylowanych może więc w pewnym stopniu tłumaczyć zwiększoną zapadalność na raka osób w starszym wieku. Utrata reszt metylowych wiąże się również z niedożywieniem. Na przykład, *S*-adenozylometionina, pochodna kwasu foliowego, jest głównym donorem grup metylowych w komórce (ryc. 1). Wykazano, że brak kwasu foliowego w pożywieniu predysponuje organizm do zapadania na nowotwory.

Komórki rakowe, oprócz tego, że charakteryzują się nieprawidłowym wzorem metylacji DNA, posiadają również „naznaczone wzorem nowotworowym” histon H4. Takie „naznaczone” histony H4 znaleziono w komórkach nowotworowych wielu typów, począwszy od leukemii, po raka kości, szyjki macicy, prostaty czy jąder. W histonach tych obserwuje się brak jednej grupy acetylowej w lizynie 16 i trimetylowej w lizynie 20. W komórkach rakowych deacetylacja pojawia się głównie w obrębie sekwencji powtórzonych DNA, które również podlegają hipometylacji. Ze względu na brak acetylowanych histonów w komórkach rakowych, ogromne zainteresowanie w próbach reaktywacji wyciszonych genów supresorowych nowotworów wzbudziło użycie inhibitora deacetylazy histonowej (HDAC), samego lub w połączeniu z czynnikami demetylującymi DNA. Przeprowadzono już wiele prób klinicznych w celu określenia, czy inhibitory te są bezpieczne i czy przynoszą pożądany skutek w leczeniu różnych typów nowotworów.

Ryc. 1. Kwas foliowy i związane z nim ścieżki syntezy *S*-adenozylometioniny (SAM).

SAM jest donorem grup metylowych wprowadzanych do DNA i histonów. DHFR, reduktaza dihydrofolianu; MTHF, metylo-tetrahydrofolian; MTHFD, dehydrogenaza metylo-tetrahydrofolianu; SAH, *S*-adenozylhomocysteina; THF, tetrahydrofolian.

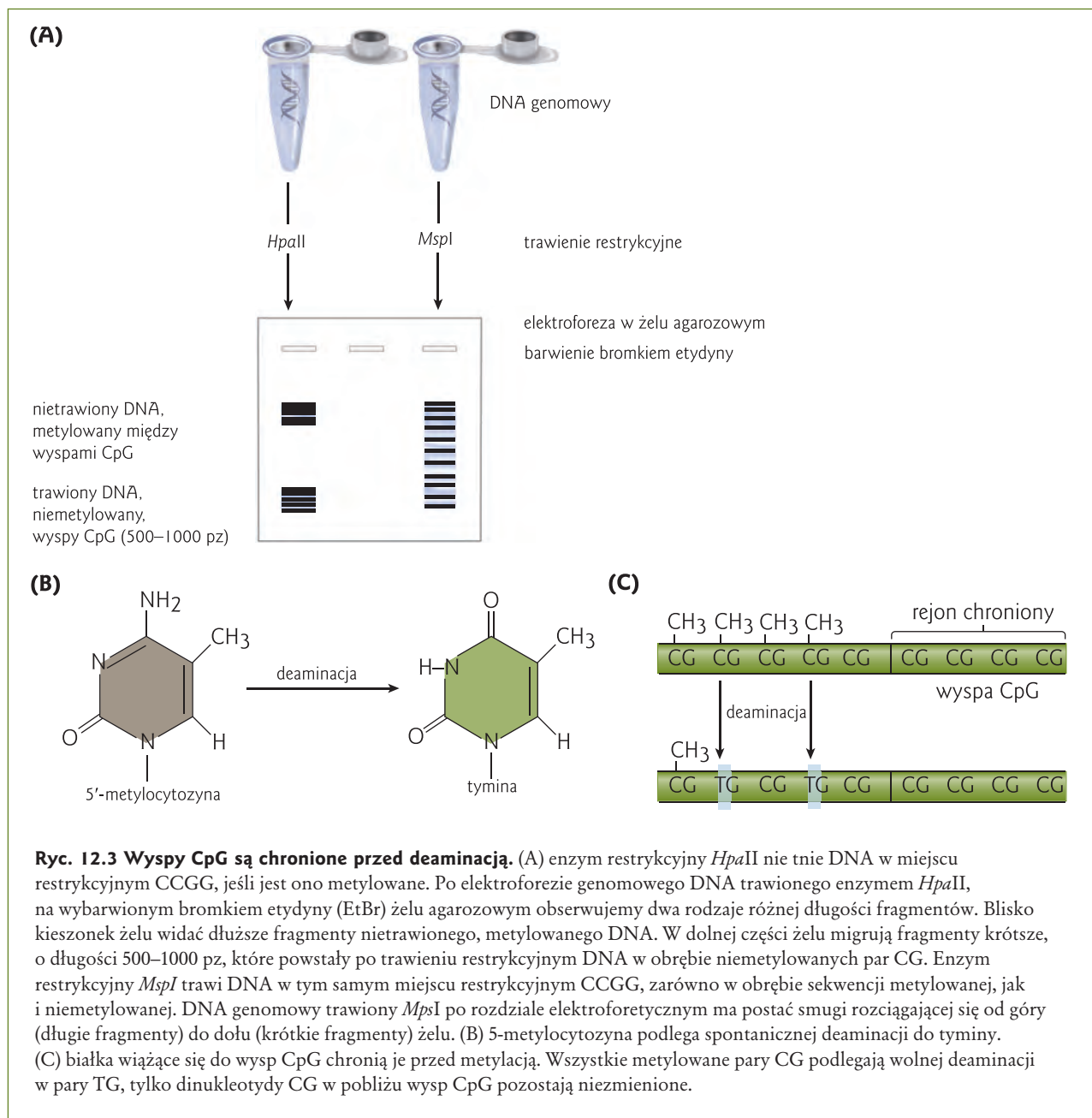


ny eksperyment wykonano, aby pokazać po raz pierwszy, że informacja epigenetyczna może modulować ekspresję genów, przy nie zmienionej sekwencji DNA, jak się to dzieje w klasycznych mutacji. Na przykładzie roślinnych i zwierzęcych kultur tkankowych udowodniono, że przeważająca liczba różnych mutantów nie powstała w wyniku prawdziwych mutacji, ponieważ po potraktowaniu 5-aza-deoksycytyną powracały one do form wyjściowych.

Większość 5-metylowanych cytozyn znajduje się w genomie w obrębie retrotranspozonów lub innych sekwencji powtórzonych (zob. podrozdz. 12.5). Na tej podstawie sugeruje się, że metylacja powstała w wyniku ewolucji mechanizmu obronnego gospodarza przed tymi elementami i zapobiega rearanżacjom chromosomów. W genomie ssaków metylowanych jest zwykle około 70–80% dinukleotydów GC. Pozostałe pary GC występują w grupach nazywanych „wyspami CpG”, położonych w pobliżu końca 5' genów i są chronione przed metylacją (ryc. 12.3).

Wyspy CpG znajdują się w pobliżu promotorów

Wyspy CpG to niewielkie rejony bogate w pary CG (o długości 1–2 kpz). W genomie ludzkim znajduje się około 50 000 takich wysp. Znaleźć je można w pobliżu promotorów około 40–50% genów podstawowego metabolizmu komórkowego. Wyspy CpG zidentyfikowano po raz pierwszy dzięki ich podatności na trawienie enzymem



restrykcyjnym *HpaII*, który rozcina DNA w obrębie niemetylowanej sekwencji CCGG. Po trawieniu DNA genomowego enzymem *HpaII* otrzymuje się krótkie fragmenty, które powstają w wyniku rozcięcia niemetylowanych rejonów DNA (ryc. 12.3A). Podczas rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym fragmenty te migrują jak oderwane „wyspy” do długich, niestrawionych fragmentów metylovanego DNA. 5-metylocytozyna, w przeciwieństwie do cytozyny, jest bardzo wrażliwa na spontaniczną deaminację C→T, prowadzącą do powstania dinukleotydów TG (ryc. 12.3B). W konsekwencji, genom ssaków w toku ewolucji pozbywał się stopniowo par CG. Wyspy CpG są natomiast chronione przed spontaniczną deaminacją, gdyż normalnie nie ulegają metylacji (ryc. 12.3C). Istotnym wyjątkiem od tej reguły są wyspy CpG znajdujące się w obrębie genów piętnowanych, genów związanych z inaktywacją chromosomu X lub w transpozonach.

Trwałe utrzymywanie modyfikacji histonów

Acetylacje i metylacje histonów to ważne modyfikacje pośredniczące w regulacji transkrypcji (zob. podrozdz. 11.6). Wiele z tych potranslacyjnych modyfikacji zostaje zachowanych po podziałach komórkowych. Proces dziedziczenia epigenetycznego nie jest jeszcze do końca poznany. Białka uczestniczące w modyfikacjach histonów wchodzi często w skład tych samych kompleksów, które prowadzą metylację DNA. Zasadniczo, hipocetylacja i hipermetylacja histonów jest charakterystyczna dla tych rejonów DNA, których sekwencje są metylowane i nieaktywne pod kątem ekspresji.

Badania epigenomu – ogólnogenomowego wzoru metylacji i innych markerów epigenetycznych – pozwoliły zauważyć ogromne zróżnicowanie poziomu ekspresji genów w komórkach zdrowych i chorych. Na przykład, wadliwy wzór metylacji DNA i modyfikacji histonów wykryto w ludzkich komórkach rakowych (Choroby. Ramka 12.1) oraz u pacjentów z niedorozwojem umysłowym związanym z zespołem łamliwego chromosomu X (Choroby. Ramka 12.2).

12.3 Rodzicielskie piętno genomowe

Rodzicielskie piętno genomowe dotyczy niewielkiej grupy genów i polega na tym, że ekspresja piętnowanego genu zachodzi tylko z jednego z dwóch rodzicielskich chromosomów. U podłoża tego zjawiska leży instrukcja genetyczna – piętnowanie – określona w komórkach linii zarodkowych rodziców. Instrukcja ta ma postać zróżnicowanej metylacji dwóch rodzicielskich alleli piętnowanego genu.

Zjawisko piętnowania genomowego opisano na razie u ssaków, nie badano jeszcze pod tym kątem innych kręgowców. Obecnie znanych jest około 80 różnych genów u ssaków, które podlegają piętnowaniu. Geny te pełnią zwykle ważne funkcje rozwojowe, a utrata piętna wiąże się z szeregiem chorób genetycznych i pewnymi nowotworami u ludzi (tab. 12.2, Choroby. Ramka 12.3). Niemal wszystkie geny piętnowane zgrupowane są w genomie w zespoły. W obrębie tych zespołów znajduje się zwykle co najmniej jeden gen, który podlega ekspresji z allelu matczynego, i jeden gen, podlegający ekspresji z allelu ojcowskiego. Nie wydaje się, aby istniała jakaś szczególna reguła rządząca kierunkiem transkrypcji lub rozkładem w genomie genów piętnowanych, pochodzących z allelu matczynego w stosunku do tych, piętnowanych ojcowsko. Regulacja ekspresji genów wchodzących w skład takich zespołów przebiega w sposób skoordynowany w drodze metylacji długich (do 100 kbp), międzygenowych rejonów DNA kontrolujących piętnowanie, zwanych ICR – rejonami kontrolnymi piętnowania (ICR, ang. *imprinting control region*) (zwanych też inaczej „rejonami o zróżnicowanej metylacji” albo „centrami piętnowania”) (ryc. 12.4). Rejony ICR są odpowiedzialne za ustalenie zróżnicowanego piętna i jego utrzymanie podczas rozwoju. Są one bogate w dinukleotydy CG, a wiele z nich odpowiada wyspom CpG. Podczas gametogenezy reszty cytozyny w obrębie wycisanego allelu piętnowanego genu są naznaczane do metylacji, podczas gdy allel ulegający ekspresji zwykle pozostaje względnie niemetylowany. Wyciszony allel jest następnie chroniony podczas wczesnej embriogenezy przed globalną demetylacją, co prowadzi do monoallelicznej ekspresji genu w późniejszym okresie rozwoju (zob. niżej).

Zjawisko piętnowania genetycznego występuje również u roślin kwiatowych. Mechanizm kontroli metylacji DNA jest w tym przypadku inny niż u ssaków – nie zaobserwowano globalnej demetylacji podczas żadnego z okresów rozwoju rośliny, a piętnowanie prowadzi do usunięcia znaczników metylacji na jednym z alleli. Piętnowane pozycje u roślin nie są dziedziczone i wydają się ograniczone do bielma, które nie przekazuje materiału genetycznego następnym pokoleniom.

Tabela 12.2 Piętno genomowe a choroby związane z rozwojem układu nerwowego

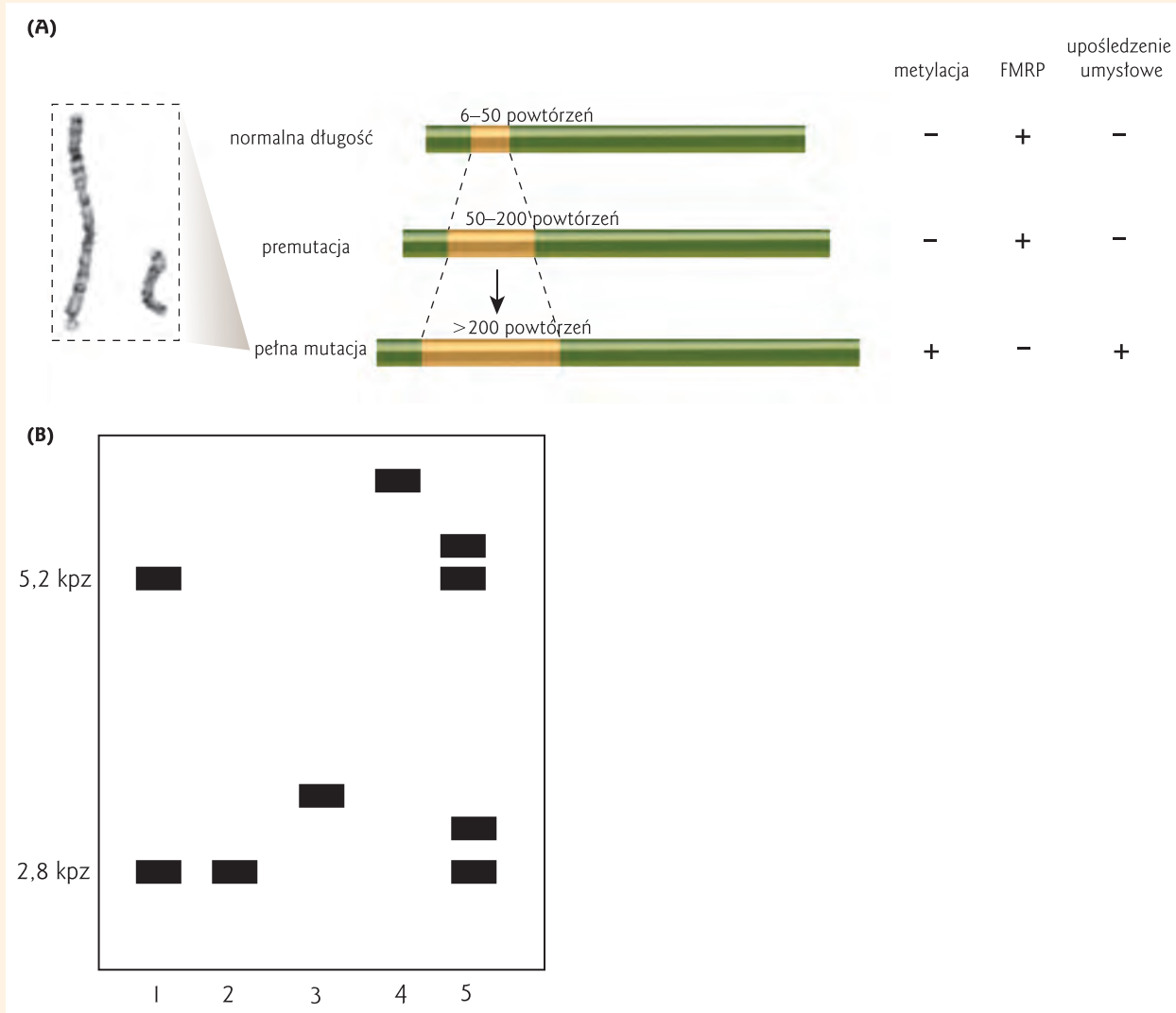
Choroba i częstość występowania	Objawy	Mechanizm genetyczny	Wpływ na działanie znanych lub przypuszczalnych genów
Zespół Pradera–Willega (PWS): raz na 25 000 urodzeń	Trudności w karmieniu niemowląt wywołane ich słabymi zdolnościami motorycznymi Duża nadwaga Zachowania obsesyjno-kompulsywne (myślenie o jedzeniu 24 godziny na dobę) Hipogonadyzm (niedorozwój genitaliów) Zaburzenia zachowania Lekkie upośledzenie umysłowe Charakterystyczny wygląd twarzy (małe, wąskie usta) Możliwa normalna długość życia przy kontrolowanej wadze ciała	Defekt piętnowania w locus PWS/AS na chromosomie 15 Utrata alleli(u) ojcowskich spowodowana: delecją (65–75% przypadków), dysomią jednorodzielską (20–30%), mutacją w rejonie ICR ($\leq 5\%$)	Wiele genów ulegających ekspresji z alleli ojcowskich, znajdujących się w obrębie rejonu piętnowanego; Niepewna rola w PWS genów: <i>MKRN3</i> , <i>MAGEL2</i> , <i>NDN</i> , <i>SNURF-SNRPN</i> geny <i>HBII</i> snoRNA
Zespół Angelmana (AS) (znany także pod nazwą zespołu „szczęśliwych marionetek”): raz na 15 000–20 000 urodzeń	Padaczka Upośledzenie umysłowe (brak mowy) Spowolniony rozrost głowy Marionetkowy chód Nienaturalnie szerokie usta Napady śmiechu bez powodu Zachowania przypominające autystyczne Nadpobudliwość Zaburzenia snu Możliwa normalna długość życia	1) Defekt piętnowania w locus PWS/AS na chromosomie 15 Utrata alleli matczynych spowodowana: delecją (65–75% przypadków) dysomią jednorodzielską ($\leq 5\%$) mutacją w rejonie ICR ($\leq 5\%$) 2) Mutacja w genie <i>UBE3A</i> (~10% przypadków)	<i>UBE3A</i> : ulega ekspresji z allelu matczynego w sposób specyficzny dla pewnych rejonów mózgu; Koduje regulator degradacji białek
Zespół Retta: jedna na 15 000 kobiet	Ciągłe, rytmiczne załamywanie palców i plectenie dłoni Upośledzenie umysłowe Padaczka Niski wzrost Problemy oddechowe Autyzm Neurodegeneracja i zniszczenie mięśni (chorzy poruszają się na wózku inwalidzkim już w wieku szkolnym)	Mutacja w genie <i>MeCP2</i> na chromosomie X: Prowadzi do utraty piętnowania genu antysensowego <i>UBE3A</i> i obniżonej ekspresji białka <i>UBE3A</i> w mózgu	<i>MeCP2</i> (ang. metyl-CpG-binding protein 2) białko 2 wiążące metylo-CpG

Ustalenie i utrzymywanie piętna

Piętnowanie ulega przeprogramowaniu lub jest „zerowane” w komórkach zarodkowych podczas wymazywania znaczników metylacji w DNA pierwotnych komórek zarodkowych (ryc. 12.4 na s. 402). Prawdopodobnie odbywa się to w aktywnym procesie demetylacji, w którym uczestniczą nie znane dotąd enzymy. Następnie, piętnowane geny przyjmują różne wzory metylacji w plemnikach i komórkach jajowych, które są przekazywane podczas podziałów komórkowych. Metylacja stanowi doskonały znacznik piętnowania z tego powodu, że wzór metylacji może być ustalany *de novo* w jednej z gamet. Kiedy różne wzory metylacji już raz się pojawią, to będą one automatycznie utrwalane przez metylotransferazę 1 (DNMT1, ang. *DNA methyltransferase 1*). Po zapłodnieniu, podczas replikacji, DNMT1 działa preferencyjnie na hemimetylowane miejsca w DNA, co pozwala utrzymać wzór metylacji w trakcie podziałów komórkowych. W większości rejonów ICR metylacja alleli pochodzi od komórek jajowych, a tylko w przypadku niektórych jest ustalana podczas spermatogenezy. Znaczący postęp w zrozumieniu, jak wzory metylacji są ustalane, a następnie utrwalane, przyniosły badania na mutantach mysich typu knock-out (zob. ryc. 15.7). Okazało się, że badania takie można przeprowadzić na mutantach z warunkowym unieczynnieniem genu (ang. conditional knock-out), gdyż bezwarunkowe uszkodzenie genu DNMT1 jest letalne już na poziomie embrionalnym.



Zespół łamliwego chromosomu X a metylacja DNA



Ryc. 1. Zwiokrotnienie trinukleotydowych powtórzeń w zespole łamliwego chromosomu X. (A) schematyczne przedstawienie różnych alleli genu *FMRI*, których długość zależy od liczby powtórzeń sekwencji CGG. Obok pokazano, czy allele te są metylowane, czy z genu powstaje białko oraz czy występowanie poszczególnych alleli wiąże się z upośledzeniem umysłowym. (Wstawka) Chromosomy X i Y chłopca z zespołem łamliwego chromosomu X, widoczny jest „odłamany” fragment. (Fotografia dzięki: Barbara Jackson i Rebecca Galczynski, Kennedy Krieger Institute, Baltimore, Maryland). (B) Schemat przedstawiający wynik analizy łamliwego chromosomu X techniką Southern. Ścieżka 1 – kobieta zdrowa, ścieżka 2 – mężczyzna zdrowy, ścieżka 3 – mężczyzna z premutacją, ścieżka 4 – mężczyzna z pełną mutacją, ścieżka 5 – kobieta z 18 i ~80 powtórzeniami, widać brak aktywności jednego chromosomu X. (Zmodyfikowano z: Maddalena, A., Richards, C. S., McGinniss, M. J., Brothman, A., Desnick R. J., Grier, R. E., Hirsch, B., Jacky, P., McDowell, G. A., Popovich, B., Watson, M., Wolff, D. J. 2001. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American college of Medical Genetics. *Genetics in Medicine* 3:200–205.)

Zespół łamliwego chromosomu X a metylacja DNA

CHOROBY. RAMKA 12.2



Opóźnienie w rozwoju umysłowym związane z zespołem łamliwego chromosomu X, jak sama nazwa wskazuje, jest chorobą sprzężoną z chromosomem X. Jest to najczęstsza dziedziczna postać upośledzenia umysłowego i dotyka średnio jednego na 4000 mężczyzn. Osoby dotknięte chorobą mają charakterystyczny wygląd: duży obwód głowy (makrocefalia), długą i wąską twarz z nienaturalnie dużymi uszami oraz obniżone napięcie mięśniowe (hipotonia). Stopień upośledzenia umysłowego może być różny, od łagodnego do głębokiego. U kobiet zespół łamliwego chromosomu X zdarza się średnio raz na 7000 żywych urodzeń. Ale tylko około 30% z nich ma symptomy choroby. Wszystkie kobiety dotknięte chorobą wykazują łagodne upośledzenie umysłowe. Objawy u kobiet są mniej dotkliwe, ponieważ istnieje 50% szans na to, że wadliwy chromosom X będzie nieaktywny (zob. podrozdz. 12.4). Pod względem genetycznym osoby dotknięte zespołem łamliwego chromosomu X cechuje obecność zwielokrotnionych trinukleotydomych powtórzeń sekwencji CGG w obrębie rejonu 5'UTR genu *FMR1*, ulokowanego na chromosomie X (ryc. 1).

Konsekwencje występowania zwielokrotnionych, trinukleotydomych powtórzeń

Zwielokrotne, trinukleotydomowe powtórzenia często nie pojawiają się od razu, ale raczej dopiero po kilku pokoleniach. Jeśli liczba powtórzeń wynosi od około 50 do 200, produkowane jest aktywne białko *FMR1*, a osoby nie wykazują żadnych symptomów choroby. Jeśli jednak liczba powtórzeń przekroczy 200, osoby cierpią na zespół łamliwości chromosomu X. Niekiedy liczba powtórzeń może nawet przekraczać 1000. Zwielokrotnienie trinukleotydomych powtórzeń powoduje hipermetylację DNA i hipocetylację histonów w rejonie promotorowym genu *FMR1*, co zmienia strukturę chromatyny i w konsekwencji prowadzi do za-

hamowania ekspresji genu *FMR1*. Gen *FMR1* koduje cytoplazmatyczne białko FMRP (ang. *fragile X mental retardation protein*) wiążące RNA, związane z dojrzewaniem i rozwojem neuronów.

Testy diagnostyczne na obecność zespołu łamliwego chromosomu X

Nazwa „łamliwy chromosom X” wzięta się stąd, że u większości pacjentów na jednym z końców chromosomu X (w łamliwym miejscu) widać jakby „zwisający, odtamany” fragment chromosomu (ryc. 1A). Identyfikację łamliwego chromosomu X u osób chorych prowadzi się z użyciem testów cytogenetycznych (chromosomowych). Jednakże, wielu nosicieli choroby ma normalnie wyglądające chromosomy X. Najbardziej wiarygodnym testem okazała się bezpośrednia analiza DNA, podczas której określa się liczbę powtórzeń CGG w rejonie 5'UTR genu *FMR1*. Oceny tej można dokonać stosując technikę PCR lub Southern (ryc. 1B) (zob. Narzędzia. Ramka 8.3 i 8.7). Startery do reakcji PCR są tak zaprojektowane, aby oskrzydlały rejon DNA zawierający powtórzenia. Ich liczbę w każdym allelu szacuje się na podstawie długości uzyskanych produktów PCR. Jednakże, wydajność reakcji PCR maleje w miarę wzrostu liczby powtórzeń CGG, a przy dużej ich liczbie produkty PCR mogą być w ogóle niewykrywalne. Dlatego w takich przypadkach wykonuje się eksperyment typu Southern, który pozwala na precyzyjne wykrycie alleli o każdej długości. Dodatkową korzyścią tej techniki jest to, że długość rejonu powtórzeń, jak i poziom metylacji, może być badany jednocześnie. Użycie enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację pozwala odróżnić allele metylowane od niemetylowanych. Wadą metody Southerna jest brak możliwości precyzyjnego określenia długości alleli, ponadto metoda ta jest bardziej czasochłonna i wymaga większej ilości DNA niż w reakcji PCR.

Do napiętnowania genów *de novo* wymagana jest aktywność metylotransferazy DNMT3a oraz jej kofaktor, białko DNMT3L. Dokładnie nie wiadomo, jak ustalane są różne wzory metylacji w komórkach jajowych i plemnikach. Przypuszcza się, że poszczególne rejonu ICR wiążą jakieś czynniki białkowe i w ten sposób są chronione przed metylacją albo w oocytach, albo w plemnikach. Na przykład, odkryte niedawno białko BORIS (ang. *brother of the regulator of imprinted sites*), wiążące DNA i zawierające domenę palca cynkowego, występuje specyficznie w jądrach i może pełnić funkcję w ustalaniu *de novo* wzoru metylacji w plemnikach. Białko BORIS wiąże się do tych samych miejsc w DNA co białko wiążące się z motywem sekwencji CCCTC, CTCF (ang. *CCCTC-binding factor*), uczestniczące w utrzymaniu i odczytywaniu znaczników metylacji. Białka BORIS i CTCF posiadają takie same domeny palców cynkowych, prawdopodobnie powstały one w procesie duplikacji jednego genu w genomie. Ekspresja jednego z nich wyklucza ekspresję drugiego, co sugeruje, że pełnią one podobne funkcje w ściśle regulowanych procesach rozwojowych.