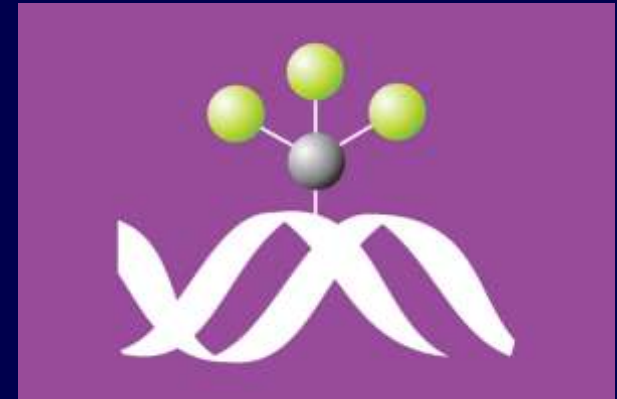
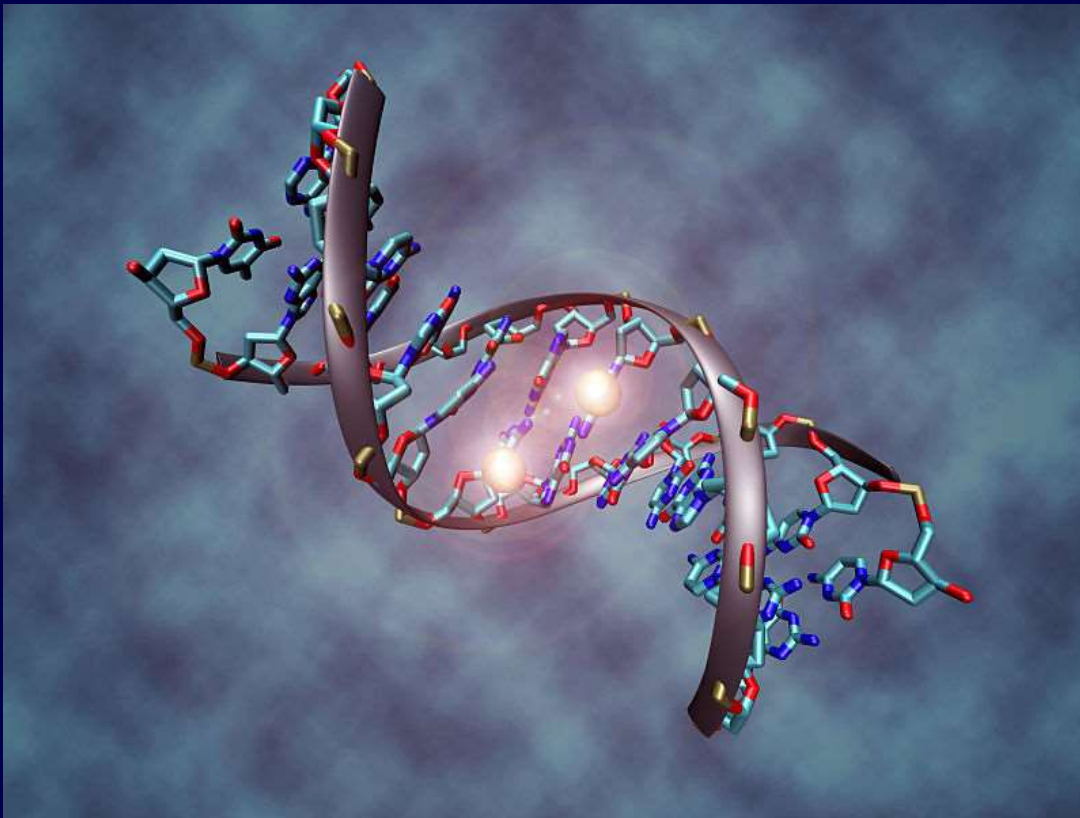
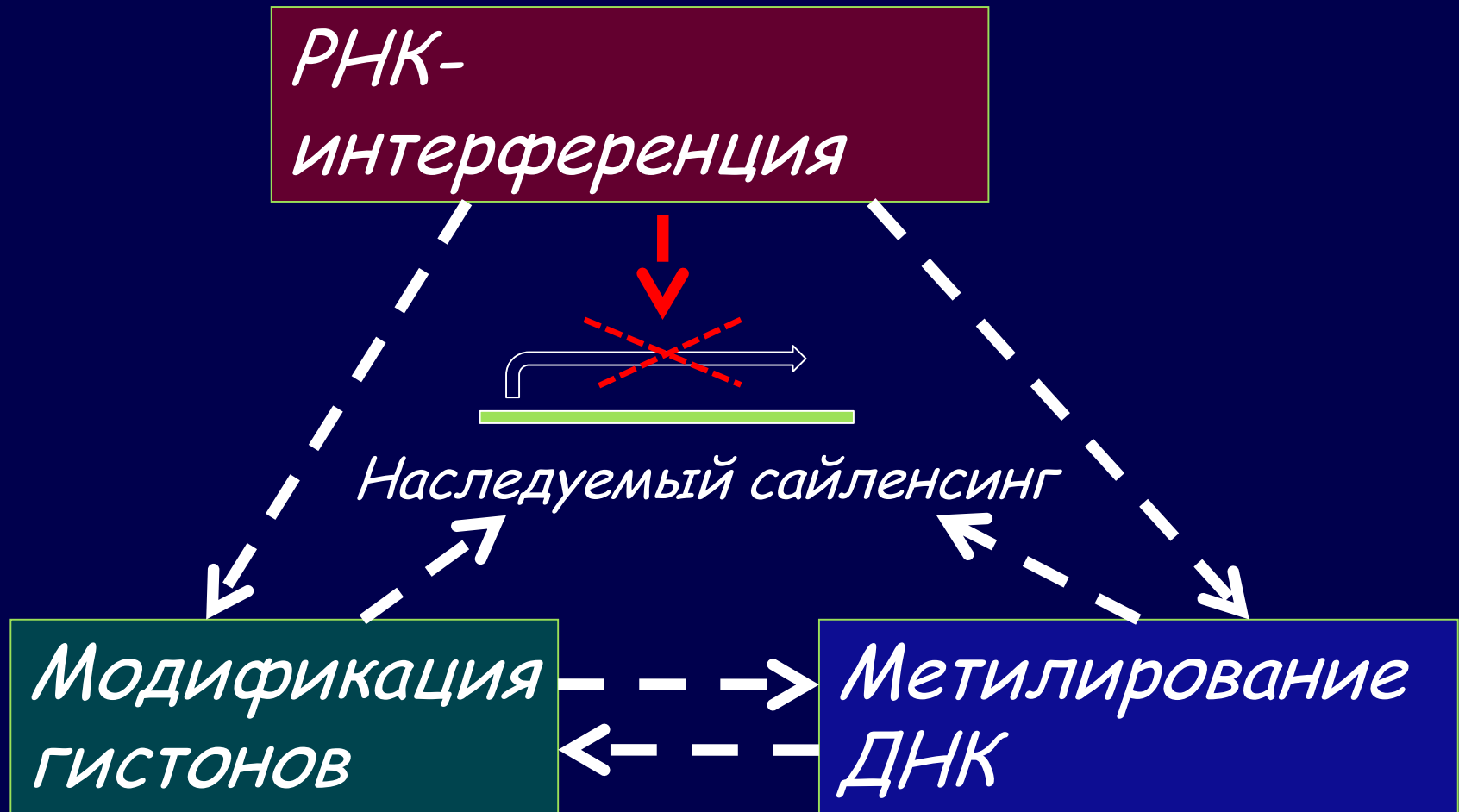


Метилирование ДНК и его роль в регуляции экспрессии генов

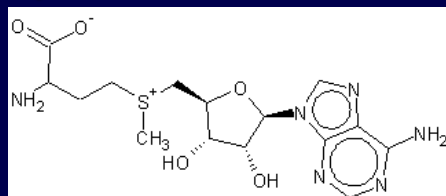


РНК-интерференция, модификация гистонов и метилирование ДНК взаимодействуют при эпигенетическом сайленсинге

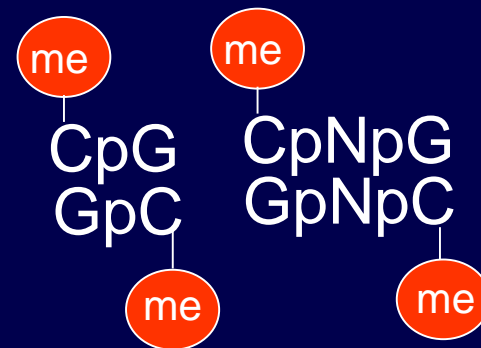
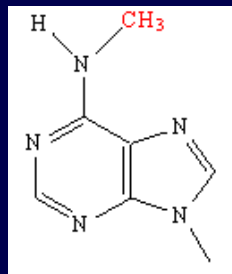
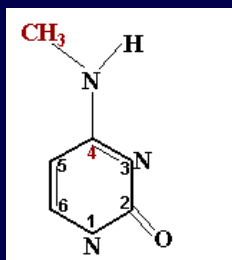


Метилирование цитозина и аденина

- Не нарушает способность к комплементарному взаимодействию, но стабилизирует двойную спираль ДНК и распознается многочисленными белками
- Происходит с участием S-аденозилметионина (SAM) (донор метильной группы), может происходить “спонтанно” без участия ферментов

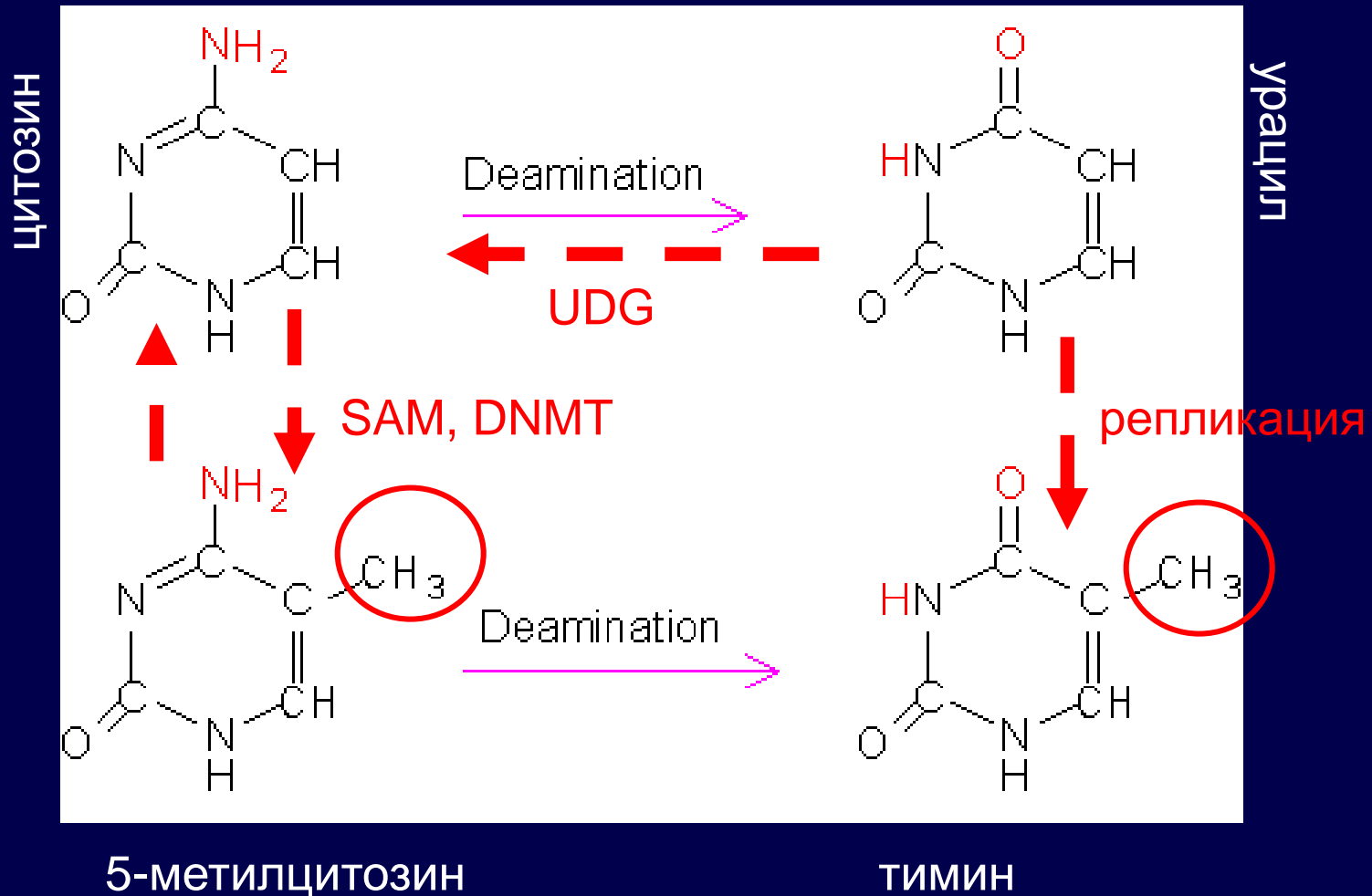


- В результате дезаминирования метилированного цитозина возникает тимин, что часто происходит в клетке и приводит к мутации, закрепляемой при репликации ДНК
- Наиболее эффективно “спонтанно” метилируется цитозин в мотиве CpG
- То же самое происходит в геномах *in vivo*, результат – элиминация мотивов CpG (у растений – CpNpG) (у позвоночных утеряно 75%)



Дезаминированию может подвергаться и неметилированный цитозин

Однако такое дезаминирование не приводит к мутации, т.к. дезоксиурацил репарируется UnG



Большинство актов метилирования *in vivo* как у прокариот, так и у эукариот происходит с участием ДНК-метилтрансфераз (DNMT)

Крупные (порядка 200 кДа) однодоменные Zn-зависимые ферменты

С-конец каталитический, N-конец регуляторный

Донором метильной группы всегда является SAM

m6A* - приводят к образованию N6-метиладенина (типичен для бактерий, позже выявлен у архей, простейших, растений, некоторых насекомых)

m4C* - приводят к образованию N4-метилцитозина

m5C - приводят к образованию C5-метилцитозина

**типичны для прокариот, но встречаются и у эукариот*

ДНК-метилазы прокариот

- Dam метилазы – метилируют аденин по положению N6 в мотивах типа CC(A/T)GG, компоненты PM-систем и участвуют в регуляции репликации
- Dcm метилазы – метилируют цитозин по положению C5 в мотивах GATC, компоненты PM-систем
- CcrM метилазы – метилируют цитозин по положению C5 в мотивах типа GAnTC, участвуют в регуляторных процессах, в т.ч. регуляции клеточного цикла и контроле вирулентности
- **все они сиквенс-специфичны**

Распространение модифицированных оснований у разных организмов

% от общего числа соответствующих ДНК-оснований		
	5-метилцитозин	N6-метиладенин
Вирусы эукариот и бактериофаги	Очень разное количество (до 20)	+
Бактерии	0.01-1.5 и более	0.02-0.7
Водоросли	0.2-3.5	0.1-0.6
Грибы	+	0-0.5 и более (до 5)
Простейшие		0.3-1
Растения	2-10 и более (до 30 у высших) Есть ферменты, которые метилируют не только CpG, но также CpHpG и CpH (H=A,C,T)	0.3-1
Беспозвоночные	0.1-2.5 (у <i>Drosophila</i> 0.05-0.1%, в большей степени CpT и CpA, чем CpG)	+
Позвоночные	0.7-3.5 и больше (до 6 у высших, у человека ~1%)	? (но много в РНК)

- У эукариот метилирование ДНК – один из ключевых механизмов регуляции онтогенеза и клеточной дифференцировки, а также подавления экспрессии чужеродных последовательностей и мобильных элементов
- Метилирование в основном происходит пострепликативно, **наименьшая суммарная активность метилаз - в G1 фазе клеточного цикла, увеличивается к S-фазе и опять падает в G2/M**
- Статус метилирования ДНК эукариот **обратим**, существует равновесие между метилированием и деметилированием
- Деметилирование может быть **активным** (катализируется ферментами) и **пассивным** (отсутствие метилирования в очередном цикле репликации)

В клетках млекопитающих действуют по крайней мере две системы метилирования, за которые отвечают разные метилазы

Метилирование *de novo*

вносит элементы изменчивости в профиль метилирования

Поддерживающее метилирование

обеспечивает поддержание уже сформированного профиля (уровень точности >99%)

Виды метилирования и деметилирования



ДНК-метилтрансферазы высших позвоночных

Dnmt1: поддерживающая метилаза

локализуется в фокусах репликации

спрединг в 3' направлении, способна проявлять активность метилазы *de novo*, но

сродство к полуметилированной ДНК на 1-2 порядка выше

есть несколько изоформ, в т.ч. соматическая и ооцитспецифичная

ЭСК, дефицитные по DNMT1, жизнеспособны

мутанты: эмбриональная летальность, глобальное гипометилирование, потеря импринтинга

Регуляторный домен обеспечивает доставку к репликативным комплексам активно делящихся клеток

Ассоциируют с разнообразными белками (*и последовательностями РНК?*):

- гистондеацетилазами (HDAC)
- репрессорами транскрипции, опухолевыми супрессорами (напр. pRb, RP58)
- продуктами генов некоторых онкобелков (напр. PML-RAR).
- белками, связывающими метилированный CpG (MeCP2/1, MBD2, MBD3) в комплексе с ферментами, модифицирующими хроматин

Dnmt2: оказался РНК-метилазой

в 2006 г. переименовали этот фермент TRDMT1 (tRNA aspartic acid methyltransferase 1)
метирует в основном некоторые транспортные РНК

ДНК-метилтрансферазы высших позвоночных

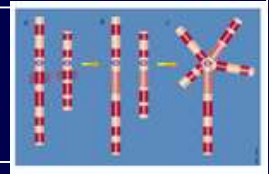
Dnmt3a: *de novo* метилаза

- но: *in vitro* одинаковая активность на полуметилированной и неметилированной ДНК – возможна поддерживающая активность
- мутанты: постнатальная летальность

Dnmt3b: *de novo* метилаза

- одинаковая активность на полуметилированной и неметилированной ДНК, предпочитает мини- и микросателлиты
- необходима для метилирования центромерных минисателлитных повторов

нарушение синтеза *Dnmt3b* – редкий ICF syndrome
(Immunodeficiency, Centromeric instability, Facial anomalies)



Dnmt3l

- гомологичен другим DNMT-белкам, но не имеет собственной каталитической активности
- поддерживает *de novo* метилазы Dnmt3a и Dnmt3b, способствуя связыванию этих ферментов с ДНК и стимулируя их активность
- ассоциирует с Dnmt3a и Dnmt3b, участвует в установлении импринтов во время гаметогенеза и репрессии транскрипции импринтированных генов
- у мутантов – мужская стерильность, экспрессия обоих аллелей импринтированных генов в гаметах

Метилирование ДНК
эукариот: биологическая
специфичность

Статус метилирования определяется структурой хроматина и локализацией ряда ферментативных комплексов и активно поддерживается!

Дефекты системы метилирования, в т.ч. активности белков, связывающихся с метилированной ДНК, приводят к тяжелым наследственным заболеваниям

Некоторые патологии, связанные с нарушением метилирования

Канцерогенез

Комплексные нарушения

- диабет 2 типа

Болезни, связанные с нарушением импринтинга

- синдром Beckwith-Wiedemann
- синдром Silver Russel
- синдром Prader-Willi
- синдром Angelman

Нейродегенеративные расстройства

- Синдром ломкой X-хромосомы
- ICF
- Синдром Ретта

У многих ДНК-вирусов эукариот метилирование ДНК необходимо для обеспечения репликации

ДНК Frog virus 3 (FV3) наиболее метилирована из всех известных вирусных ДНК (метилировано около 20% всех цитозинов)

5-азацитидин (ингибитор метилаз) не влияет на экспрессию вирусных генов в инфицированных клетках, но наблюдается неполная упаковка ДНК в преформированные капсиды, или капсиды вообще остаются пустыми, в итоге снижение продукции инфекционного FV3 в 100 раз и более

Метилирование происходит *de novo* в ядрах инфицированных клеток в CpG мотивах вирусной ДНК с участием клеточных DNMT, затем метилированная ДНК экспортируется в цитоплазму (Willis D.B., Granoff A. *Virology* 1980, Goorha R. et al., *Virology* 1984, Schetter C. et al. *J.Virol.* 1993)

Многие вирусы при инфицировании способны стимулировать повышение уровня экспрессии ДНК-метилтрансфераз клетки – хозяина (аденовирусы, герпесвирусы, папилломавирусы и пр.) (Hoelzer et al., *NAR* 2008)

Статус метилирования может значительно отличаться между интегрированной и реплицирующейся формами (Hoelzer et al., *NAR* 2008)

Метилирование ДНК: основные функции

(1) Поддержание структуры хроматина и стабильности хромосом

- сайленсинг повторенных и интегрированных чужеродных последовательностей
- механизм защиты против транскрипции чужеродной ДНК (в т.ч. паразитической)

В соответствии с этим, как правило, высоко метилированы:

- сателлиты и другие повторяющиеся последовательности
- транспозоны, провирусные копии
- последовательности, характерные для гетерохроматина

(2) Тканеспецифичное ненаследуемое долговременное подавление экспрессии генов на уровне транскрипции

- формирование профиля экспрессии, характерного для данного типа клеток

В соответствии с этим, как правило, высоко метилированы:

- транскрипционно неактивные гены (в гаметах – все, кроме экспрессируемых гаметоспецифично)
- онкогены
- импринтированные гены

И, как правило, гипометилированы:

- транскрипционно активные гены

(!) влияние метилирования на уровень экспрессии гена не всегда однозначно

Нормальное метилирование ДНК у позвоночных

- С в мотиве CpG обычно метилированы (50-90%, но обычно 70-80%, в клетках взрослых людей приблизительно 70%)
- метилирование С вне мотива CpG (выявлено в эмбриональных стволовых клетках) составляет незначительную долю (может быть результатом “проскакивания” метилаз)

Метилированные CpG

- либо являются одиночными (80% от общего состава, чаще всего в интронах, реже в промоторах тканеспецифичных генов, уровень варьирует в широких пределах)
- либо сконцентрированы в т.н. CpG островках (у человека около 45000)

Свойства CpG островков

- имеются в 60% генов, в том числе во всех генах “домашнего хозяйства”
- >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 (более 0.5 от статистической)
- понижено содержание гистона H1 в нуклеосомах, гистоны высоко ацетилированы
- как правило, содержат мотивы CCGCCC (сайты связывания транскрипционного фактора SP1)

У позвоночных метилирование островков используется для закрепления паттерна экспрессии, который может быть “выбран” иными способами. Установленный статус метилирования, как правило, стабилен и в дальнейшем поддерживается

	Культура мышечных клеток (в норме ген актина экспрессируется)	Культура фибробластов (в норме ген актина не экспрессируется)
Трансфекция неметилированной формой гена актина	Нормальная экспрессия	Пониженная экспрессия
Трансфекция полностью метилированной формой гена актина	Сайт-специфичное деметилирование, нормальная экспрессия	Экспрессия на фоновом уровне (как и эндогенный аналог)

При введении неметилированной ДНК в оплодотворенную яйцеклетку мыши метилируются почти все CG-пары

Некоторые островки не метилируются in vivo, но метилируются в клеточных культурах

CpG-островки и гены: варианты взаимного расположения

- в основном в промоторах и 5' районах генов
- связанные с промотором и первым экзоном
- внутригенные, не захватывающие старт транскрипции
- захватывающие последний экзон и 3'UTR
- межгенные
- некоторые островки могут захватывать практически весь ген

Особенности метилирования CpG-островков

- большинство либо гиперметилированы, либо гипометилированы
- внутригенные – чаще гиперметилированы, расположенные в промоторах – чаще гипометилированы

Внутренние экзоны генов млекопитающих обычно метилированы, в то время как внутренние экзоны генов высших растений – нет

У растений многое иначе, биологическая специфичность метилирования реализуется при помощи RdDM

Существуют как CpG-, так и CpNpG-островки

СрG островки в промоторах позвоночных

- в целом промоторы либо богаты, либо бедны СрG мотивами
- СрG островки перекрываются с $\approx 60\%$ всех промоторов РНК-полимеразы II млекопитающих, в т.ч. абсолютным большинством промоторов генов «домашнего хозяйства». В случае такого перекрывания практически все сайты связывания ТФ находятся в островках
- СрG в промоторах обычно неметилированы, что необходимо для транскрипции (метилирование обычно блокирует транскрипцию)

СрG-богатые промоторы:

- активность гена зависит от плотности метилирования (1 на 300 – заметное подавление, 1 на 100 – репрессия)
- островки, как правило, неметилированы (исключения – импринтированные гены, неактивная X-хромосома)
- инактивация, как правило, необратима

СрG- бедные промоторы:

- регулируются частично метилированием, частично другими механизмами
- инактивация обратима!

В целом СрG-островки - маркеры потенциальной транскрибируемости последовательности (но не обязательной транскрипции)

СрG островки в промоторах

	Мало СрG	Много СрG
Гиперметилирование	характерно	нехарактерно
Гипометилирование	нехарактерно	характерно

СрG островки вне промоторов

Зачем нужны? Гипотезы:

1) внутригенные островки являются потенциальными маркерами сайтов альтернативного сплайсинга (Majewski, Ott. Genome Research 2002)

СрG- энхансер сплайсинга? Непосредственно на границах экзон/интрон, кроме 3'конца последнего экзона (не сплайсируется) повышено содержание СрG мотива

2) СрG островки, удаленные от сайтов инициации транскрипции, способны связывать промотор-специфические ТФ (в частности, Sp1) и сами по себе служить сигналами инициации транскрипции (например, для регуляторных РНК) (Medvedeva et al. BMC Genomics 2010)

3) Служат участками инициации ремоделлинга хроматина

Выше GC-состав гена – шире спектр экспрессии

- и у животных, и у растений %GC для гена в целом связан с максимальным уровнем экспрессии в тканях
- %GC гена в основном обеспечивается внутригенными CpG-островками
- наличие 5'-концевого островка коррелирует с ширитой спектра экспрессии в разных тканях (у растений – экспрессия в каллусе)

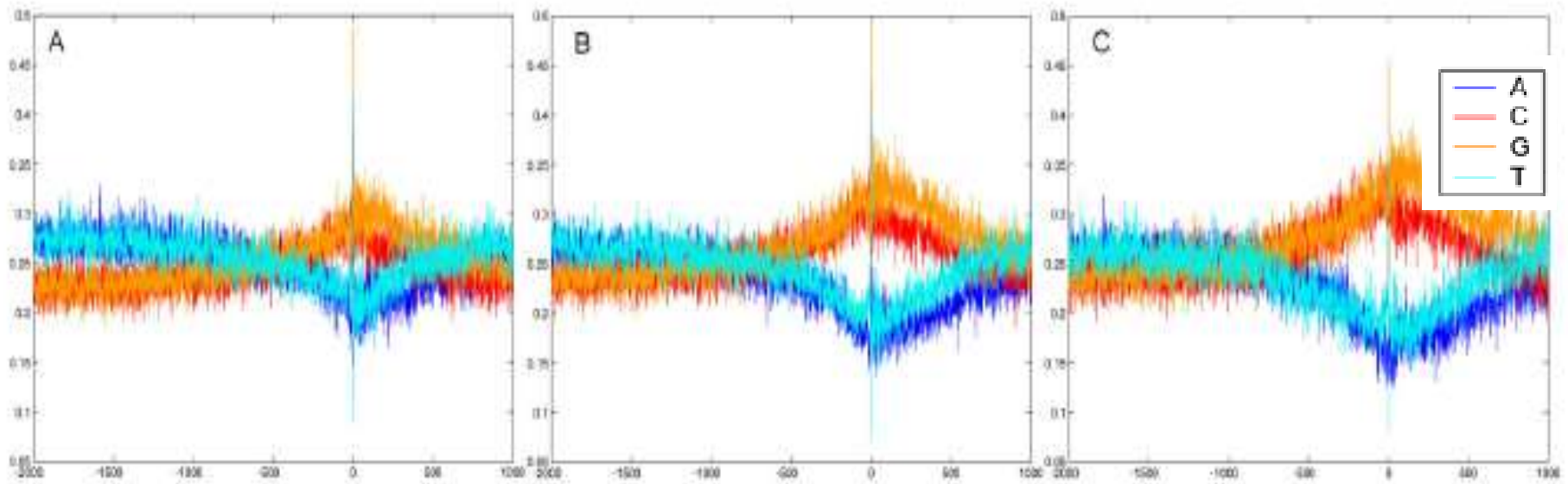
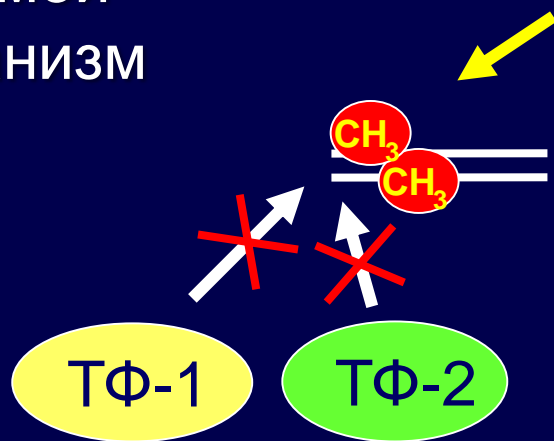


Figure 5
Nucleotide frequencies of three human gene groups: genes with a narrow expression pattern (A), a medium pattern (B), and a wide pattern (C).

Эффекты метилирования CpG на регуляцию экспрессии проявляются **на уровне транскрипции**

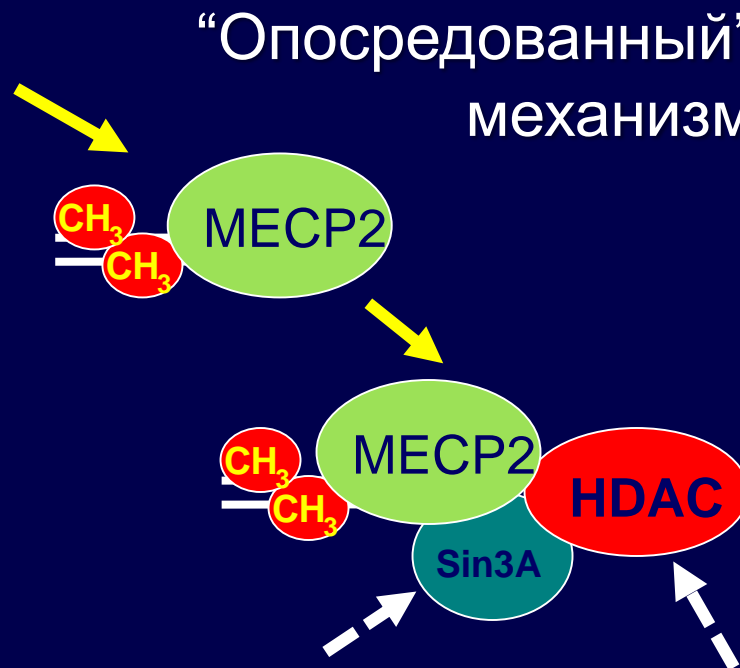
Метилирование ДНК ингибирует экспрессию генов с помощью двух (относительно) независимых механизмов

“Прямой” механизм



Непосредственное стерическое препятствие связыванию факторов транскрипции

“Опосредованный” механизм



Формирование “закрытой” структуры хроматина, локальный генный сайленсинг (метилирование стабилизирует закрытую структуру)

Sin3- консервативный репрессор транскрипции

Прямое влияние метилирования ДНК на транскрипцию – препятствие связыванию факторов транскрипции

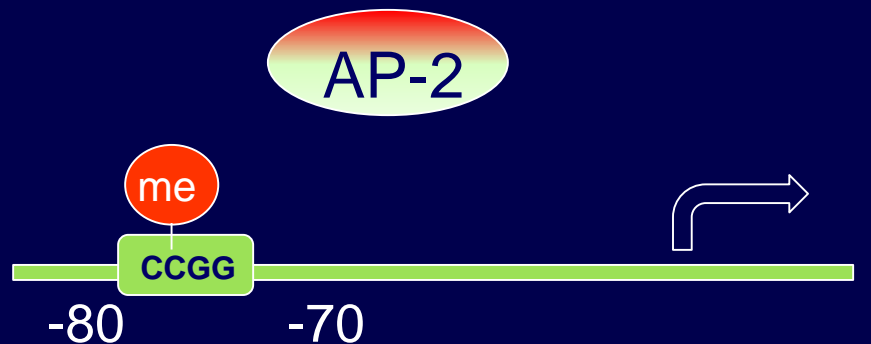
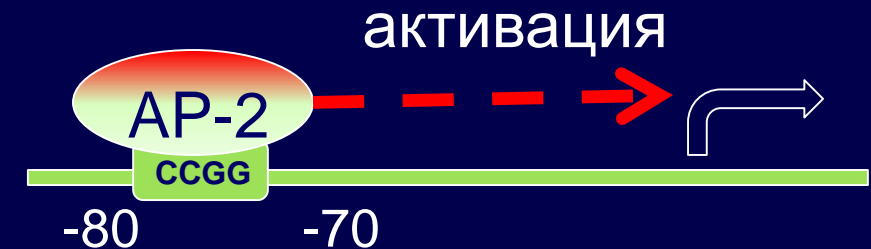
MBD – связывающие белки

MBD – **m**ethylated DNA **b**inding **d**omains

Метилирование подавляет связывание с ДНК ряда ТФ (таких, как NF-κB, MLTF, CREB, c-Мус, AP-2, EF2)

Пример: AP-2 активирует транскрипцию гена проэнкефалина человека

Для некоторых ТФ, например, AP-1, метилирование, напротив, создает новые сайты связывания



MBD-белки

MeCP-1

Конкурирует за связывание метилированной ДНК с факторами транскрипции в зависимости от плотности метилирования, а также может замещать гистон H1 в нуклеосомах

Связывается с последовательностью, содержащей несколько метильных групп

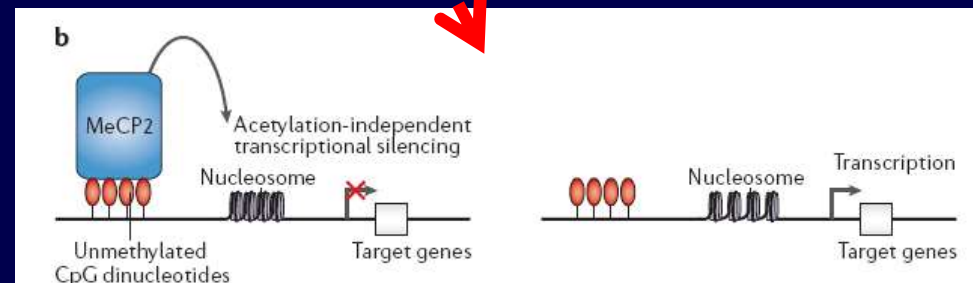
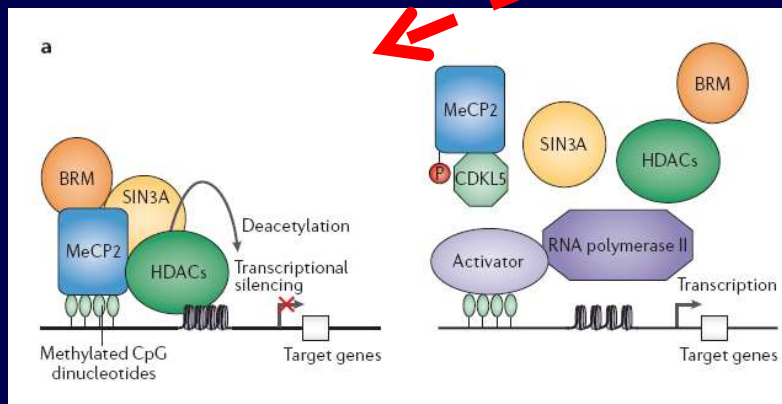
MeCP-2

В отличие от всех прочих MBD-белков, ген находится в X-хромосоме, подвержен X-инактивации

Концентрация высока в нейронах, участвует в созревании ЦНС и формировании синаптических связей

Может быть и репрессором, и активатором транскрипции, а также регулятором альтернативного сплайсинга (Young et al., PNAS 2005).

Связывается с последовательностью, содержащей хотя бы одну метильную группу, рекрутирует Sin3A и HDAC, может и непосредственно блокировать транскрипцию



Влияние MeCP2 на экспрессию своих мишеней может быть ДОВОЛЬНО ТОНКИМ

Table 2 | MeCP2 target genes

Gene	Species	Unigene cluster	Function	Tissue in which gene is expressed	Change in expression level caused by MeCP2	Reference
<i>BDNF</i>	Mouse	Mm.1442	Survival, neuronal plasticity	Cultured neurons	Upregulated ~2-fold	
<i>hairy2</i>	<i>Xenopus</i>	Xl.25977	Neuronal differentiation	Whole embryo	Downregulated ~2-fold	
<i>Fkbp5</i>	Mouse	Mm.276405	Hormonal signalling	Brain (74 days of age)	Upregulated 2.26-fold	
<i>IGF2</i>	Human	Hs.147470	Cell proliferation	Lymphoblastoid cells	Upregulated 2.21-fold	
<i>DLX5</i>	Human	Hs.99348	Transcription factor	Lymphoblastoid cells	Upregulated ~2-fold	
<i>Dlx5</i>	Mouse	Mm.4873	Transcription factor	Brain	Upregulated ~2-fold	
<i>Dlx6</i>	Mouse	Mm.5152	Transcription factor	Brain	Upregulated ~2-fold	
<i>Ube3a</i>	Mouse	Mm.9002	Proteolysis	Brain	Downregulated ~2-fold	
<i>UBE3A</i>	Human	Hs.22543	Proteolysis	Brain (2–20 years of age)	Downregulated ~2-fold	
<i>Sgk1</i>	Mouse	Mm.28405	Cellular stress response	Brain (74 days of age)	Upregulated 3.44-fold	
<i>MPP1</i>	Human	Hs.305360	Signal transduction	Lymphoblastoid cells	Upregulated 3.32-fold	

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DLX, distal-less homeobox; Fkbp5, FK506-binding protein 5; IGF2, insulin-like growth factor 2; MeCP2, methyl-CpG-binding protein 2; MPP1, palmitoylated membrane protein 1; Sgk1, serum/glucocorticoid kinase 1; Ube3a, ubiquitin protein ligase E3A.

Результат дефицита MeCP2 - синдром Ретта:



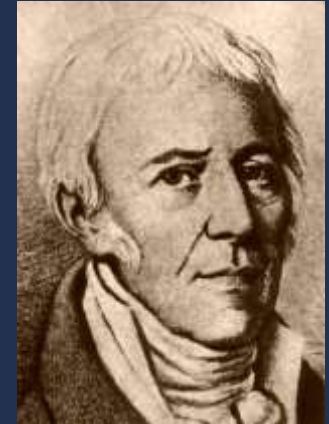
X-сцепленное нейродегеративное заболевание, смерть в 15-30 лет
 частота встречаемости 1:10,000-15,000 (только женщины)
 причина – мутация в гене, кодирующем MeCP2, результат - утрата
 генного сайленсинга многими локусами

<http://science.compulenta.ru/306074/>

Метилирование ДНК: наследование и поддержание

Большая часть (**почти все**) метилирования “стирается” в раннем эмбриогенезе за счет деметилирования и/или гидроксиглирования метильных групп (Iqbal et al., PNAS 2011)

Паттерн метилирования генома (рисунок распределение метилированных оснований) устанавливается заново в каждом поколении, в основном не наследуется, но есть и исключения – доказаны факты наследования статуса метилирования некоторых локусов



После установления специфические паттерны метилирования поддерживаются в поколениях клеток, обеспечивая специфичность экспрессии генов за счет формирования репрессирующих структур хроматина

Таким образом, при смене поколений происходит последовательное цикличное метилирование/деметилирование по множеству позиций в геноме

гаметы,
зигота

Метилированная ДНК

раннее
дробление



деметилирование



Деметилированная ДНК ("clean state"?)

дифференцировка



метилирование *de novo*
(волнами при имплантации
эмбриона)



Метилированная
ДНК



Метилированная
ДНК



Метилированная
ДНК



зрелые
соматические
клетки

Метилированная
ДНК



Метилированная
ДНК



Метилированная
ДНК



Поддерживающее метилирование активируется при каждом клеточном делении

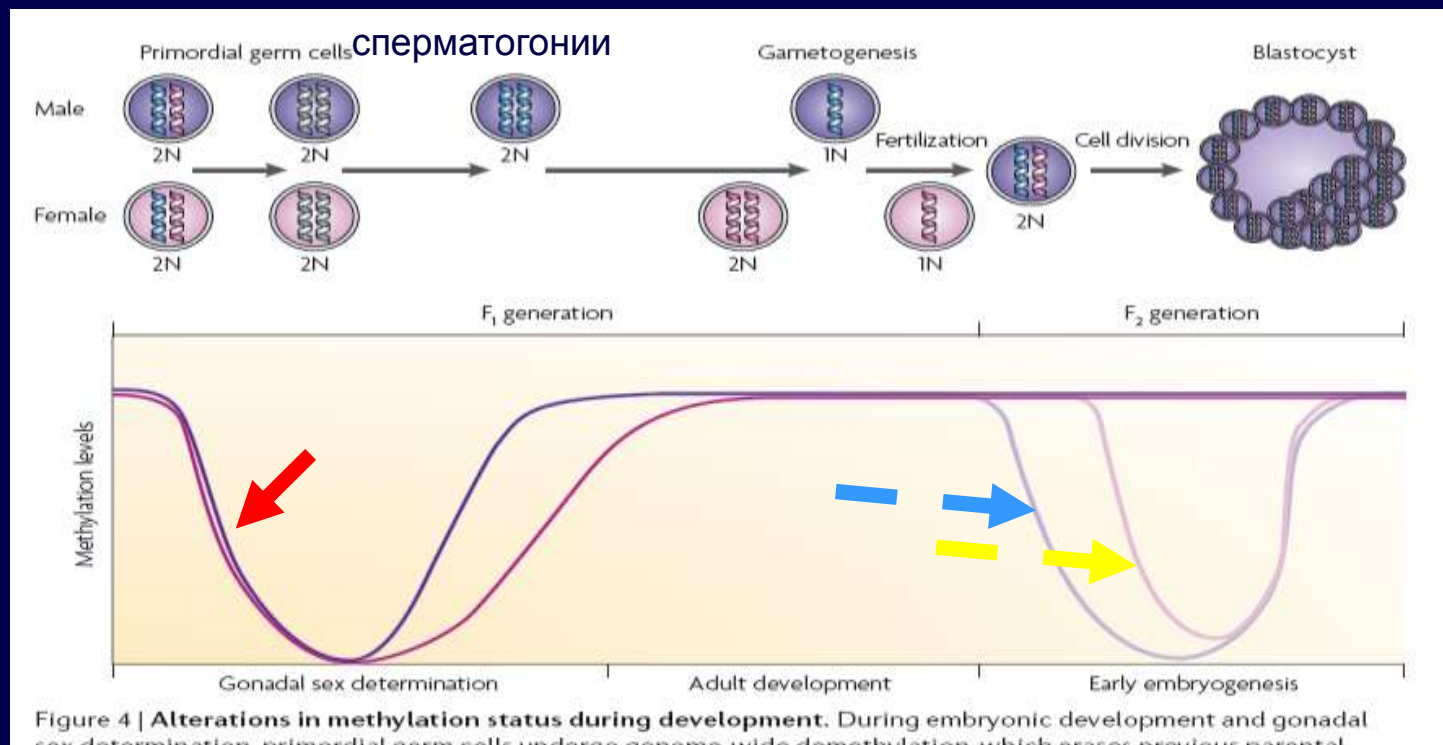
Фрагменты Оказаки : аденилируются у бактерий, у растений паттерны метилирования и его степень отличаются от лигированной ДНК!

Метилазы чувствительны к другим ингибиторам

Деметилирование ДНК

- Может носить глобальный характер (млекопитающие – ранние этапы развития зародыша, старение) или локус-специфический (геномный импринтинг, канцерогенез и др.)
- Длительное время в качестве кандидата на роль “ДНК-деметилазы” обсуждалась кандидатура MBD2 (активирует некоторые промоторы, необходима для формирования некоторых опухолей, необходимость для нормального роста клеток не доказана)
- Сейчас у млекопитающих предполагается механизм Base Excision Repair и активное участие ДНК-гликозилаз после ферментативных преобразований метилированного цитозина (см. напр. Nabel, Kohli, Science 2011) (у растений этот путь уже подтвержден), а также участие Dnmt3a и Dnmt3b (Ooi, Bestor, Cell 2008) и белка Gadd45a (Barreto et al., Nature 2007)
- Белки, ингибирующие НАТ, приводят к гиперметилированной закрытой структуре, ингибируют деметилирование
- Для активного локус-специфичного деметилирования необходима транскрипция РНК-полимеразой III! Перед ним происходит ацетилирование гистонов (Acetylation-Induced Transcription Is Required for Active DNA Demethylation in Methylation-Silenced Genes, D’Alessio et al., Mol.Cell.Biol. 2007)

Волны глобального метилирования и деметилирования ДНК

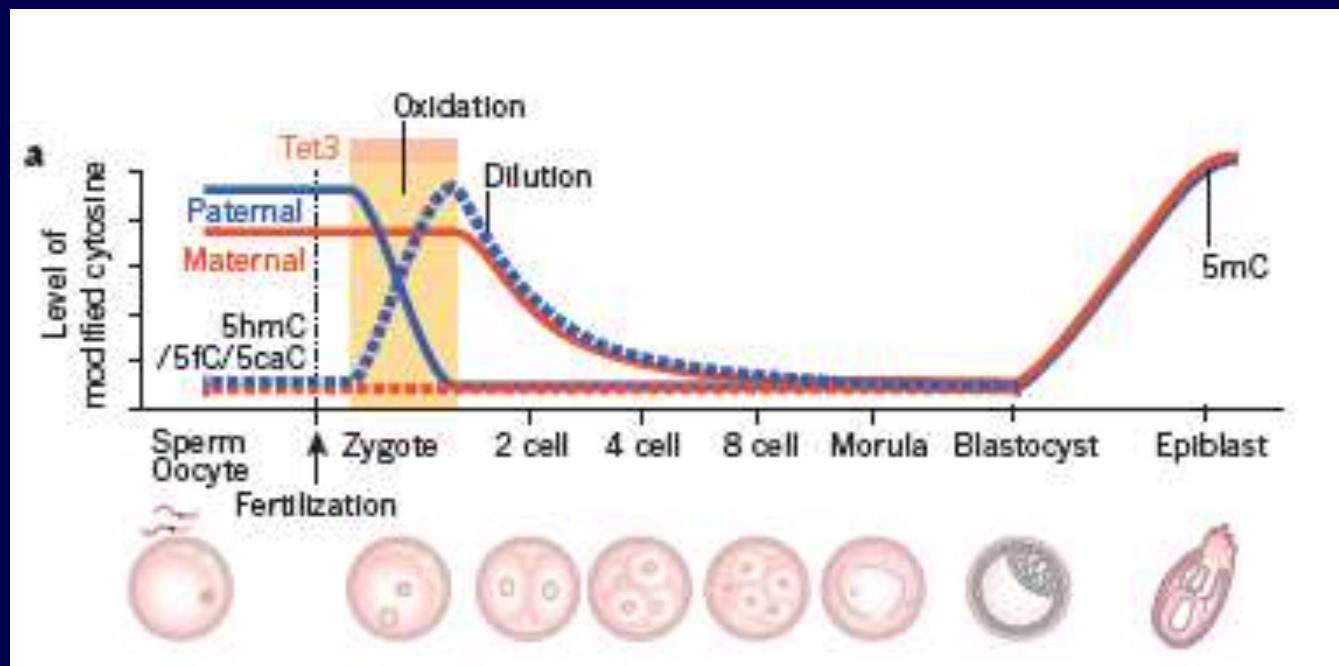


Стирание всего метилирования, включая импринты

После проникновения сперматозоида в яйцеклетку и перед слиянием отцовского и материнского геномов отцовский геном подвергается сложному ремоделингу, сопровождаемому быстрой утратой метилирования. Это деметилирование является активным и происходит в два этапа

Материнский геном после оплодотворения подвергается пассивному деметилированию (с запаздыванием относительно деметилирования отцовского генома)

Волны глобального метилирования и деметилирования ДНК



- 1) Фермент Tet3 окисляет 5mC в отцовском геноме (образуется 5hmC)
- 2) Продукты окисления “разбавляются” в ходе репликации, подвергаясь постепенной репарации в ходе многоступенчатых ферментативных реакций (в материнском геноме “разбавление” касается 5mC)
- 3) На стадии бластоцисты *de novo* метилазы восстанавливают паттерны метилирования как в отцовском, так и в материнском геномах

Последовательные реакции при деметилировании ДНК

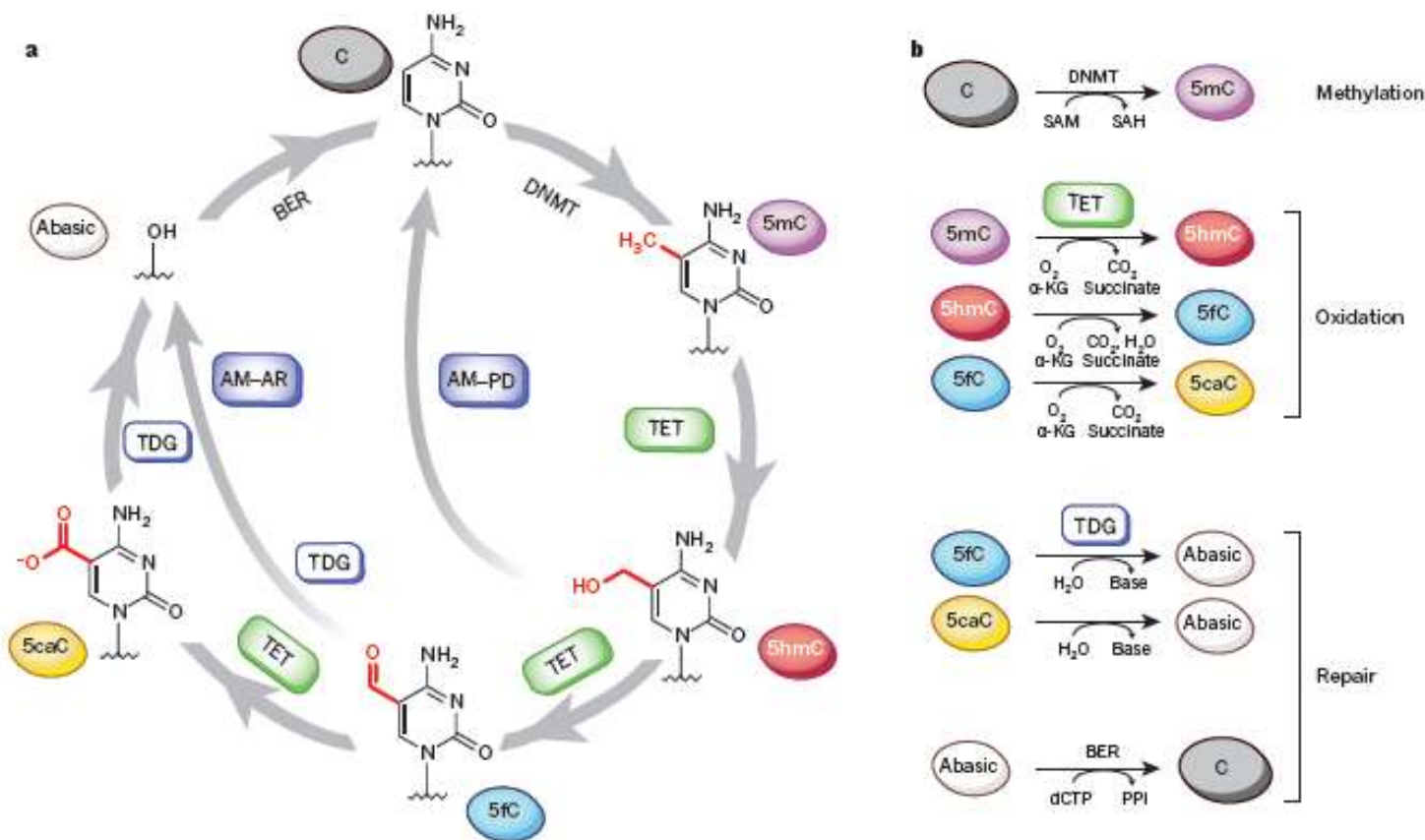
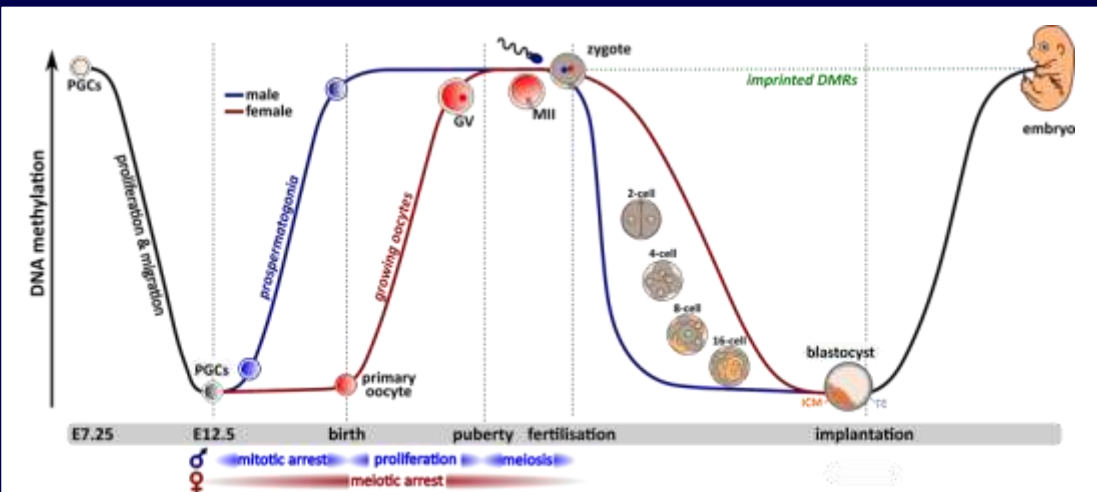


Figure 2 | A complete pathway for dynamic modifications of C. **a**, A biochemically validated pathway for modification of C within DNA is shown. 5mC bases, introduced by DNA methyltransferase (DNMT) enzymes, can be oxidized iteratively to 5hmC, 5fC and 5caC. In the pathway of active modification (AM) followed by passive dilution (PD), 5hmC is diluted in a replication-dependent manner to regenerate unmodified C. For clarity, PD of highly oxidized 5fC and 5caC is not depicted. In the pathway of AM followed by active restoration (AR), 5fC

or 5caC is excised by TDG generating an abasic site as part of the base excision repair (BER) process that regenerates unmodified C. **b**, The individual reactions in the pathway are shown with all reactants depicted. The BER pathway involves excision of the abasic site, replacement of the nucleotide using unmodified deoxycytidine triphosphate (dCTP) by a DNA polymerase (generating pyrophosphate, PPI) and ligation to repair the nick. α -KG, α -ketoglutarate; SAM, S-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine.

Волны глобального метилирования и деметилирования ДНК



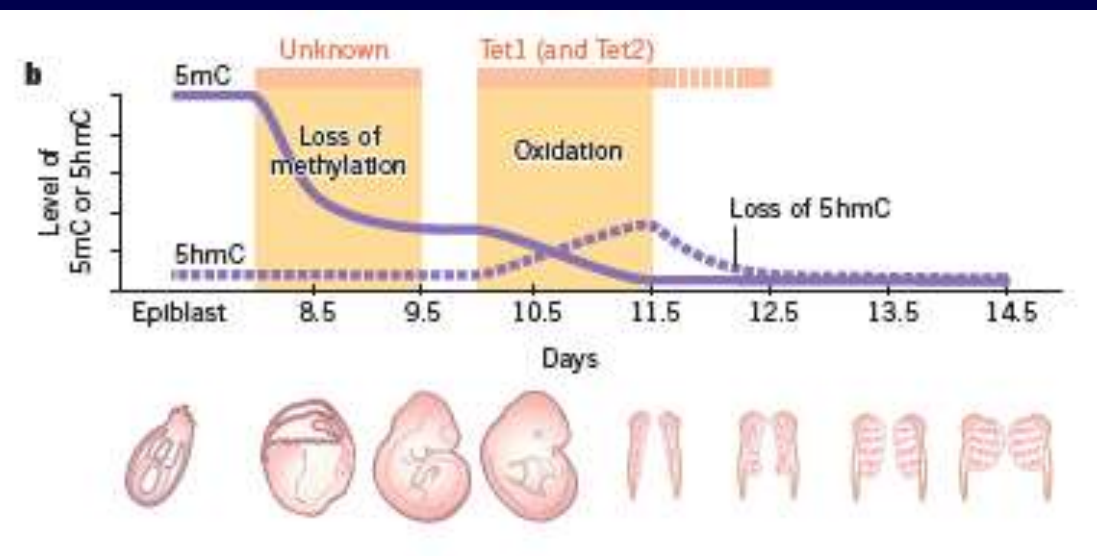
Х-инактивация отцовской X-хромосомы (стадия 4 клеток)

Волна глобального деметилирования

После имплантации активное ступенчатое метилирование, все тканеспецифичные CpG островки метилируются, многие CpG островки домашнего хозяйства защищены от метилирования

В трофобласте уровень метилирования остается относительно низким

В дальнейшем – локальное деметилирование при дифференцировке клеток.
Установление гено- и ткане-специфичных паттернов метилирования



В примордиальных зародышевых клетках глобальное деметилирование происходит в три этапа:

- 1) Большая часть 5mC утрачивается пассивно
- 2) Оставшиеся 5mC окисляются Tet – белками
- 3) Продукты окисления подвергаются последующему “разбавлению”

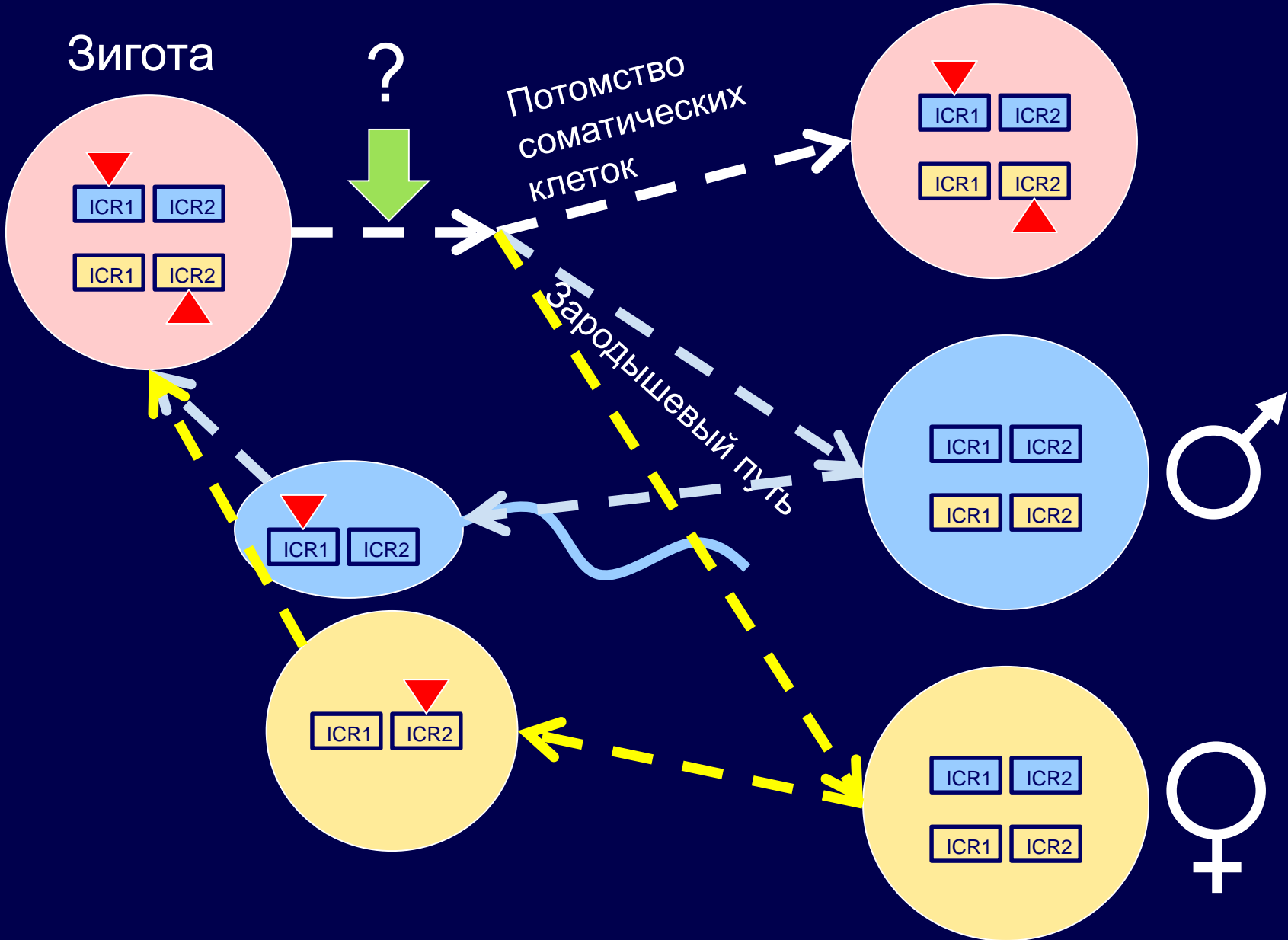
По: Kohli, Zhang, Nature 2013

Геномный импринтинг и метилирование

- Некоторые гены активны или неактивны в зависимости от того, от родителя какого пола поступил данный аллель
- Показан для млекопитающих, растений (импринтинг отдельных генов), насекомых и грибов (импринтинг целых хромосом)
- В геноме млекопитающих в последние годы с помощью NGS выявлено >1000 импринтированных локусов, в основном в мозгу (Gregg et al., Science 2010)
- Статус импринтинга устанавливается в клетках полового пути
- В каждом поколении импринт, унаследованный от родителя противоположного пола, стирается и вновь устанавливается в развивающихся клетках зародышевой линии
- Импринтированные аллели неактивны из-за сайленсинга, связанного с метилированием и модификацией гистонов. Установление сайленсинга определяется дифференциальным метилированием
- Метилирование происходит в т.н. контрольных участках импринтинга (ICR's - imprinting control (choice) regions)
- Для нормального функционирования необходимы обе копии гена (основное препятствие для партеногенеза у млекопитающих)
- Дефекты импринтинга или отсутствие одного импринта приводят к заболеваниям

Взрослый организм

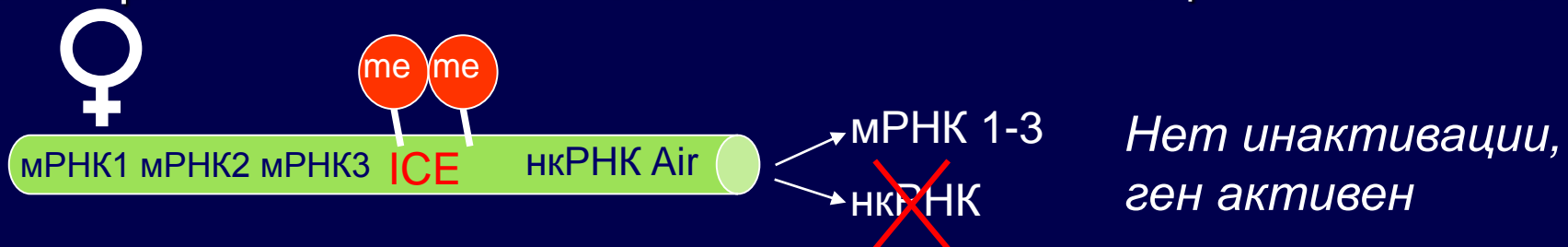
Зигота



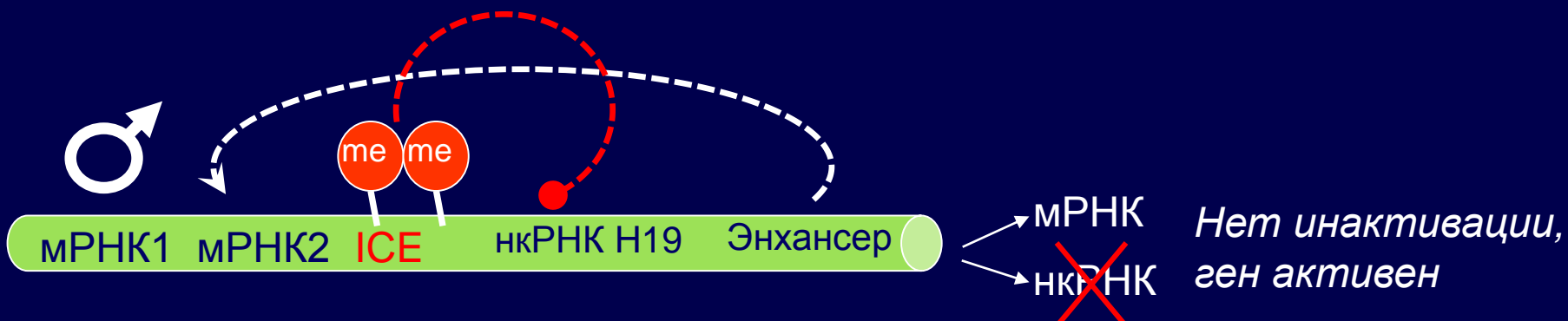
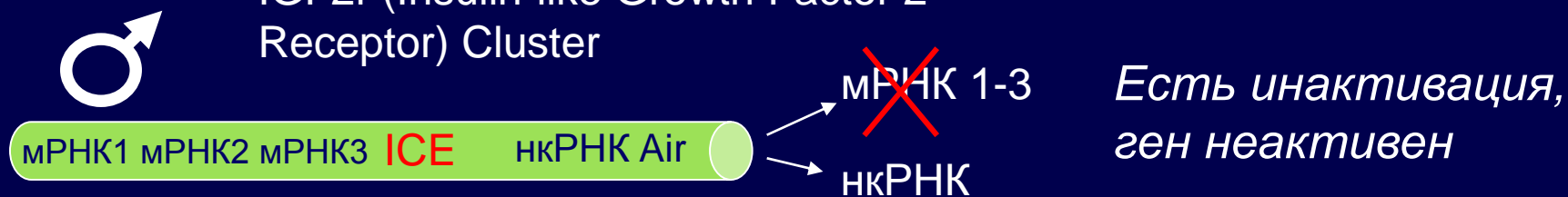
Свойства импринтированных генов млекопитающих

- В основном (80%) расположены в кластерах, часто - с последовательностями, кодирующими нкРНК. **Для импринтированных генов в кластерах характерен импринтинг по одному и тому же типу**
- Характерны повторенные элементы, CpG островки, энхансерные мотивы, CTCF-связывающие элементы
- Экспрессия в диплоидных клетках по родительскому типу (импринтированный ген, активный на хромосоме, пришедшей от матери, будет активен на соответствующей хромосоме и неактивен на варианте хромосомы, пришедшем от отца, у всего потомства)
- Но: **импринтированный ген не обязательно будет импринтирован на всех стадиях развития и/или во всех тканях!**
- Механизмы импринтинга являются эпигенетическими, связаны с метилированием и перестройкой хроматина. Не путать с другими генами с родительским типом наследования (Y-сцепленные, митохондриальные и т.п.)
- Импринты модифицируют гены регуляторных элементов широкого спектра действия, участвующие в регуляции развития
- **Ортологичные гены у разных видов (например, человек и мышь) не обязательно, но как правило импринтируются по типу того же пола**

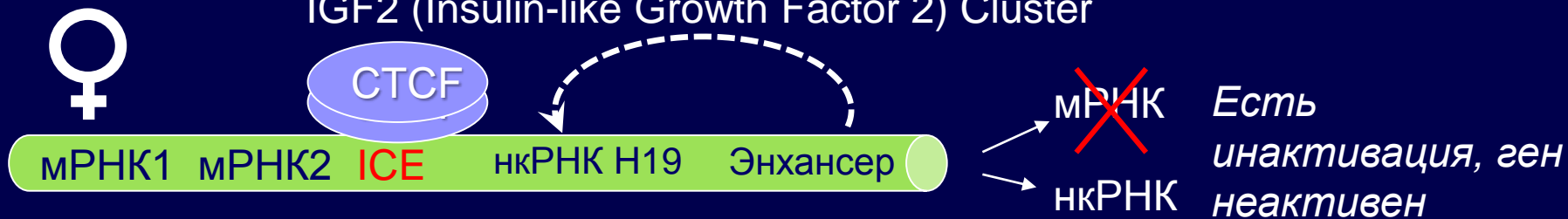
Метилирование DMR может способствовать и активации генов в кластере



IGF2r (Insulin-like Growth Factor 2 Receptor) Cluster

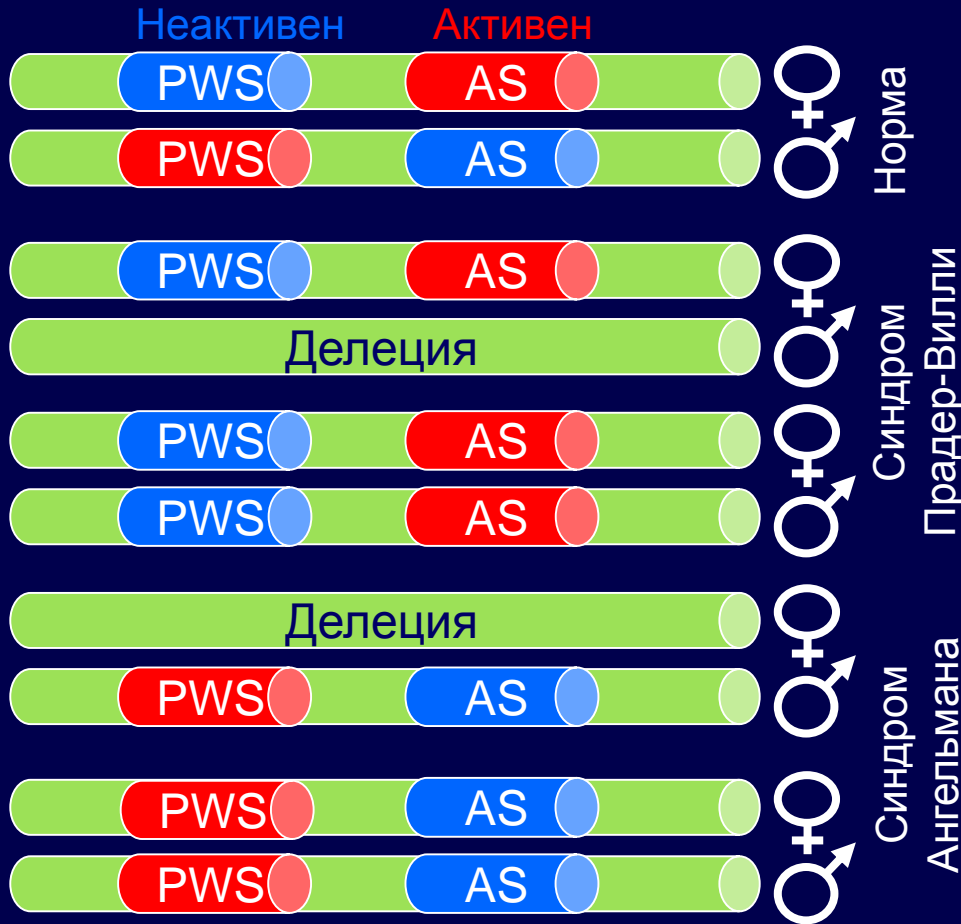


IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2) Cluster



Дефекты геномного импринтинга

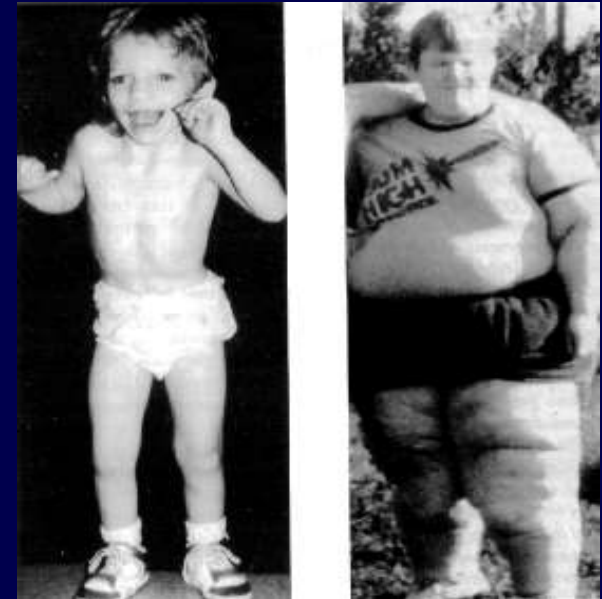
Дефекты функционирующих аллелей, не инактивированных импринтингом, или отсутствие одного импринта могут приводить к наследственным заболеваниям
Синдромы Ангельмана и Прадер-Вилли (1:10000-15000) связаны с различными вариантами метилирования отцовских и материнских аллелей двух близкорасположенных локусов на длинном плече 15 хромосомы



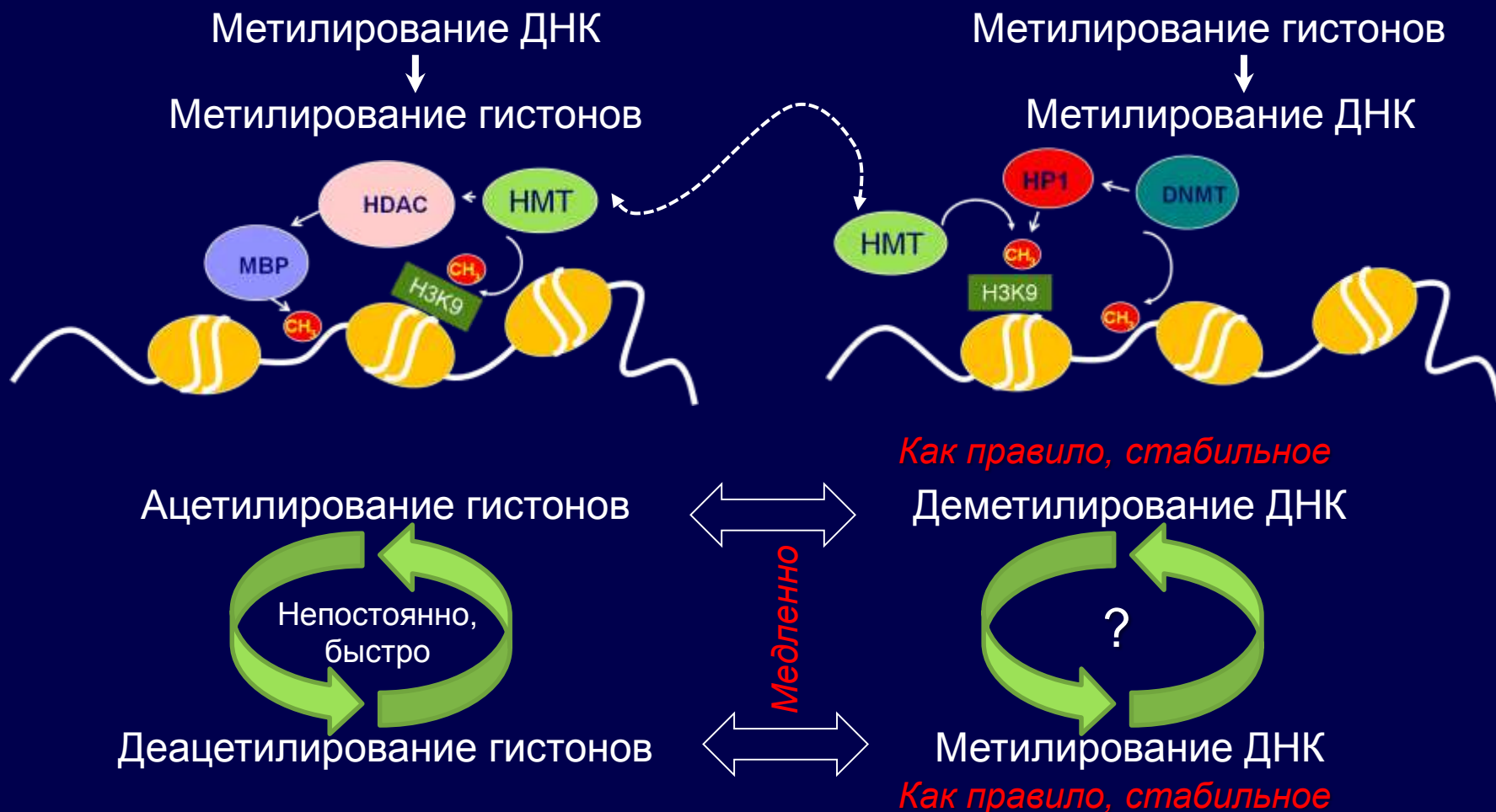
Больные с синдромами:

Angelman (слева) - серьёзная умственная отсталость, припадки, нарушения речи, неуместный смех

Prader-Willi (справа) - умственная отсталость, ожирение, неразвитые половые железы, низкий рост



Молекулярные метки взаимодействуют между собой при поддержании и перемене эпигенетического статуса



Metivier R. et al. *Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter* (Nature 2008): динамические циклы активного метилирования-деметилирования промотора гена pS2/TFF1, регулируемые эстрогенами и сопровождающиеся изменением транскрипционного статуса

Нарушения метилирования ДНК: связь с канцерогенезом и старением

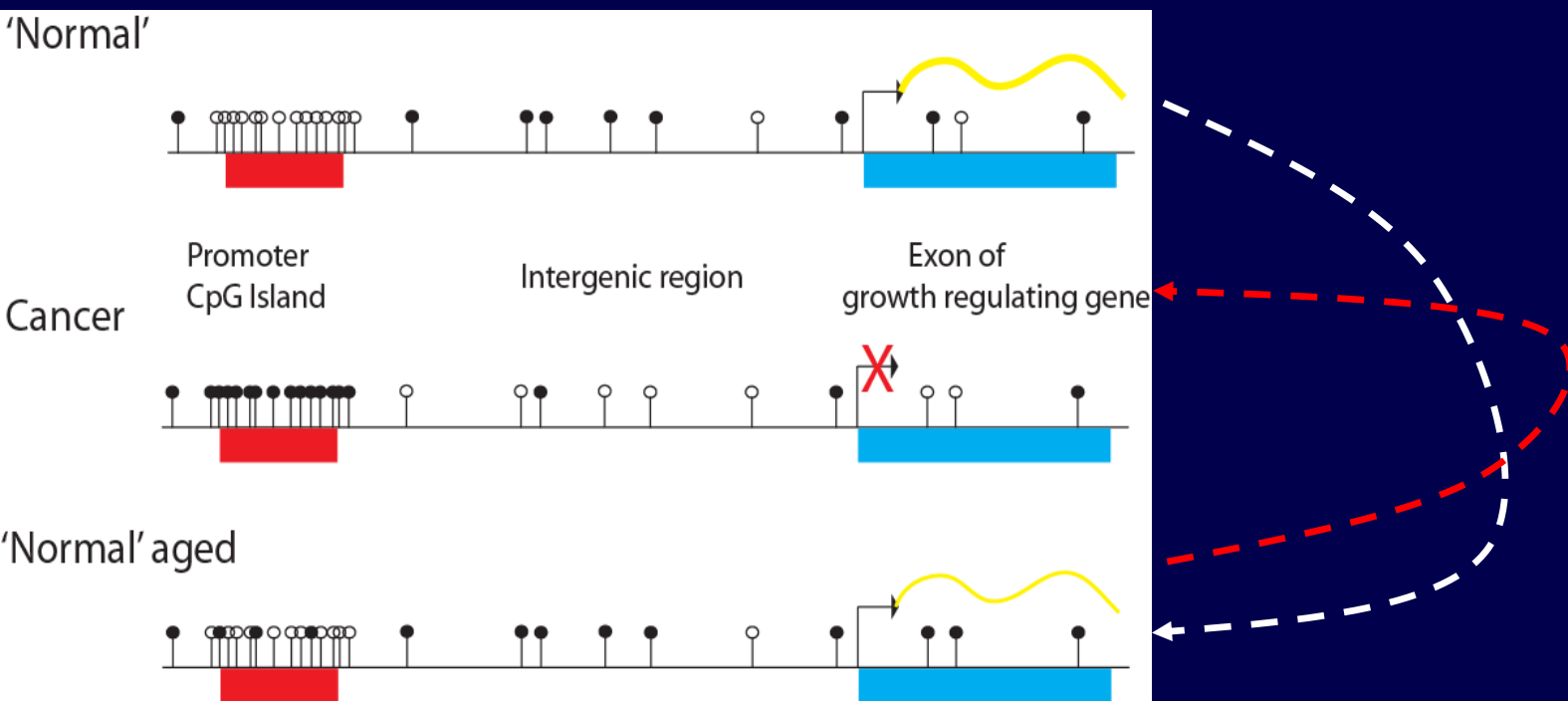


Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. PNAS 2005

Исследование 80 пар однояйцевых близнецов в возрасте 3-74 года выявило очевидную зависимость количества различий в профилях метилирования геномов и паттернов экспрессии генов от возраста пары...

Отклонения в метилировании могут быть равноценны мутациям и в том числе приводить к канцерогенным эффектам

Аберрантные паттерны метилирования могут не возникать “мгновенно”, а являться результатом кумулятивных и **обратимых** эффектов (локальное гиперметилирование, локальное и общее гипометилирование)



Канцерогенным эффектом может обладать не только гиперметилирование, но и гипометилирование – зависит от контекста

Эпигенетические aberrации, ассоциированные с опухолями, обычно представляют собой комплекс разнообразных ИЗМЕНЕНИЙ

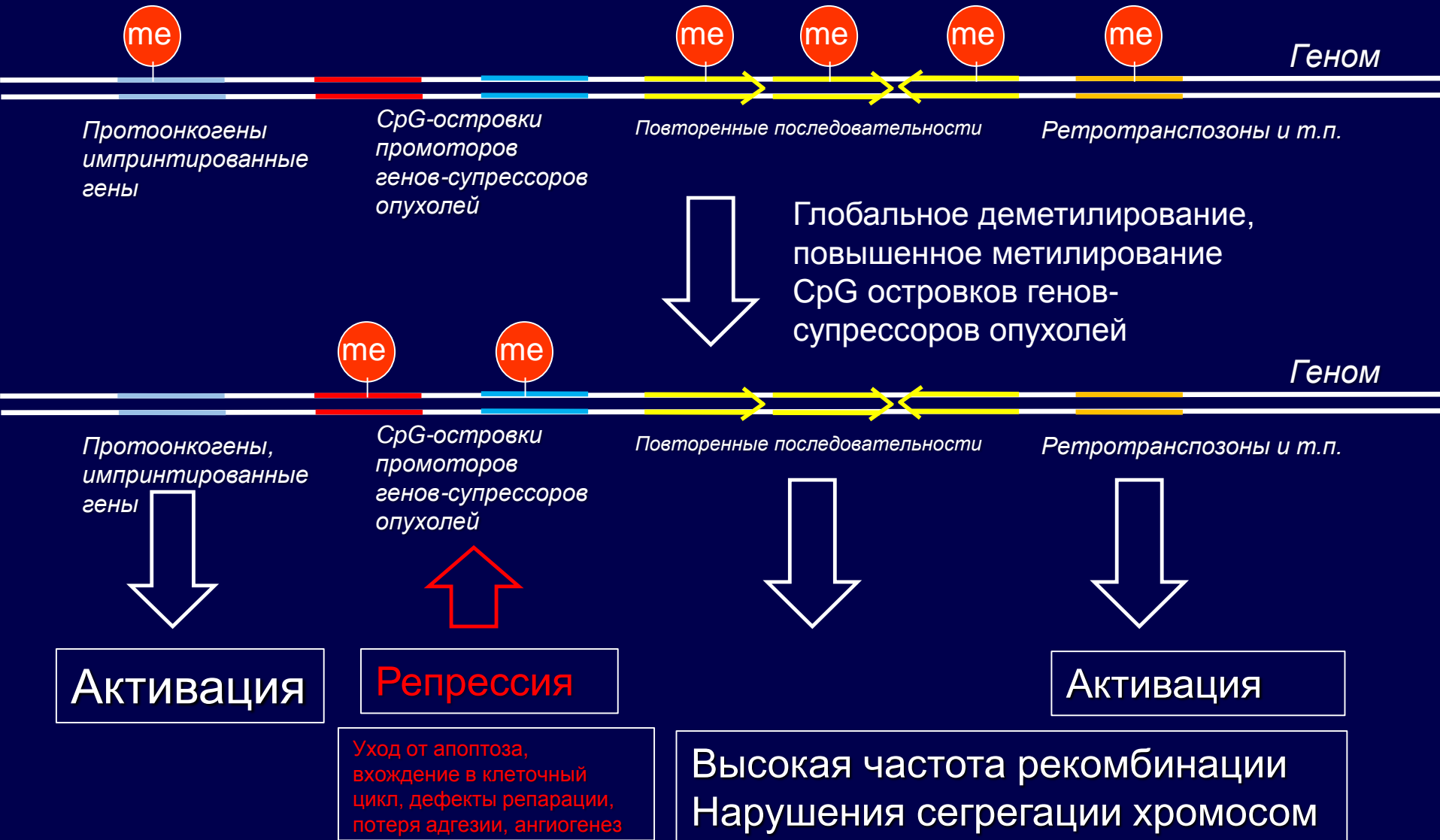
Table 1. Epigenetic Aberrations among Different Tumor Types.*

Type of Cancer	Epigenetic Disruption
Colon cancer	CpG-island hypermethylation (<i>hMLH1</i> , <i>p16^{INK4a}</i> , <i>p14^{ARF}</i> , <i>RARB2</i> , <i>SFRP1</i> , and <i>WRN</i>), hypermethylation of miRNAs (<i>miR-124a</i>), global genomic hypomethylation, loss of imprinting of <i>IGF2</i> , mutations of histone modifiers (<i>EP300</i> and <i>HDAC2</i>), diminished monoacetylated and trimethylated forms of histone H4
Breast cancer	CpG-island hypermethylation (<i>BRCA1</i> , E-cadherin, <i>TMS1</i> , and estrogen receptor), global genomic hypomethylation
Lung cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>DAPK</i> , and <i>RASSF1A</i>), global genomic hypomethylation, genomic deletions of <i>CBP</i> and the chromatin-remodeling factor <i>BRG1</i>
Glioma	CpG-island hypermethylation (DNA-repair enzyme <i>MGMT</i> , <i>EMP3</i> , and <i>THBS1</i>)
Leukemia	CpG-island hypermethylation (<i>p15^{INK4b}</i> , <i>EXT1</i> , and <i>ID4</i>), translocations of histone modifiers (<i>CBP</i> , <i>MOZ</i> , <i>MORF</i> , <i>MLL1</i> , <i>MLL3</i> , and <i>NSD1</i>)
Lymphoma	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>p73</i> , and DNA-repair enzyme <i>MGMT</i>), diminished monoacetylated and trimethylated forms of histone H4
Bladder cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> and <i>TPEF/HPP1</i>), hypermethylation of miRNAs (<i>miR-127</i>), global genomic hypomethylation
Kidney cancer	CpG-island hypermethylation (<i>VHL</i>), loss of imprinting of <i>IGF2</i> , global genomic hypomethylation
Prostate cancer	CpG-island hypermethylation (<i>GSTP1</i>), gene amplification of polycomb histone methyltransferase <i>EZH2</i> , aberrant modification pattern of histones H3 and H4
Esophageal cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4b}</i> and <i>p14^{ARF}</i>), gene amplification of histone demethylase <i>JMJD2C/GASC1</i>
Stomach cancer	CpG-island hypermethylation (<i>hMLH1</i> and <i>p14^{ARF}</i>)
Liver cancer	CpG-island hypermethylation (<i>SOCS1</i> and <i>GSTP1</i>), global genomic hypomethylation
Ovarian cancer	CpG-island hypermethylation (<i>BRCA1</i>)

Esteller M.
NEJM 2008

Выявлено множество генов, экспрессия которых подавлена за счет локального гиперметилирования промоторов при разных формах рака у человека. По профилю гиперметилирования можно классифицировать тип опухоли

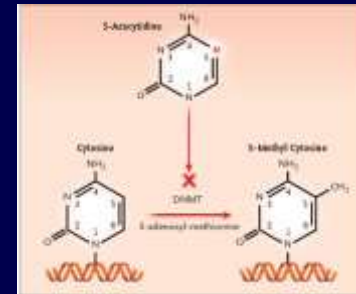
Метилирование и канцерогенез



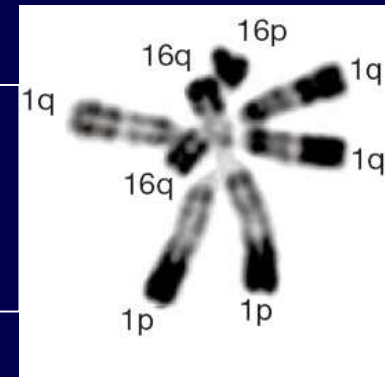
+ "классические" точечные мутации

Опухолеспецифичное гипометилирование

- Показана индукция образования разнообразных опухолей путем гипометилирования, а также анеуплоидии и транслокации в культуре клеток за счет подавления DNMT1 и DNMT3b
- *Следствие гипометилирования – дестабилизация хромосом (анеуплоидия, дупликации, транслокации, активация мобильных элементов), потеря импринтинга*
- В опухолях гипометилированы повторенные, сателлитные и прицентромерные последовательности
- Ингибиторы DNMT (такие, как 5-азацитидин) стимулируют опухолеобразование и метастазирование
- Стимуляторы метилирования ДНК (например, SAM) препятствуют опухолевой трансформации



Мутация DNMT3b при синдроме ICF (Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies syndrome): гипометилирование сателлитной ДНК, аномальные прицентромерные районы хромосом 1, 9, 16



Не обязательно подавляется метилаза – возможно облегчение деметилирования за счет (локального) изменения структуры хроматина

Статус метилирования промоторов некоторых “генов домашнего хозяйства” меняется при раке, а других - нет

Промоторы могут быть в большей или меньшей степени “защищены”, уровень метилирования может быть подвержен “тонкой настройке”

Существуют ингибиторы деметилирования (пример – INHATs), которые связываются со специфическими промоторами и ингибируют ацетилирование гистонов и деметилирование. Их экспрессия может специфично регулироваться

Статус метилирования разных промоторов может поддерживаться с разной степенью “надежности”. Факт: обработка TSA индуцирует деметилирование не всех метилированных генов– опухолевых супрессоров

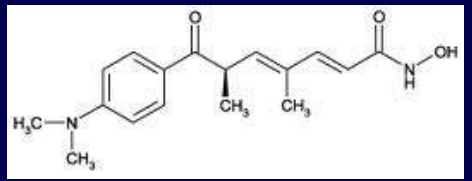
Ядерный белок Lsh (из семейства SNF2/helicases) взаимодействует с модификациями гистонов в прицентромерном ГХ и регулирует уровни метилирования, влияя на доступность хроматина для ряда ДНК-связывающих белков, в т.ч. DNMT. Вовлечен в метилирование *de novo* и метилирование гистонов; ассоциирует с DNMT3a и 3b. Известны летальные мутации, при умеренных нарушениях экспрессии наблюдается гипометилирование ряда как повторов, так и уникалов (например, ген β -глобина) при сохранении активности метилаз, задержка роста и раннее старение, изменение экспрессии ряда генов

INHAT subunits (inhibitors of histone acetyltransferases) (Set/Taf1-b, pp32 и др.) ингибируют ацетилирование, защищая гистоны от HAT

Участки ДНК, связанные с INHATs, защищены от деметилирования

При ингибировании HDAC происходит гиперацетилирование гистонов, INHATs не связываются с такими гистонами, стимулируется деметилирование

TSA (trichostatin A) - противогрибковый антибиотик, ингибитор клеточного цикла, противоопухолевый агент, сильнейший известный ингибитор HDAC

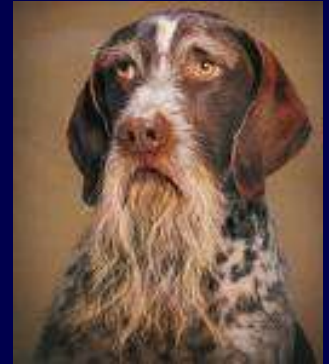


Активация Ингибирование

Изменения метилирования ДНК при старении

Чем длиннее характерная продолжительность жизни у вида животного, тем медленнее снижается у этого вида уровень метилирования с возрастом

Метилирование, связанное со старением:
воздействует только на небольшую часть генома человека
тканеспецифично
в ткани, на которую оно воздействует, затрагивает
как экспрессируемые, так и неэкспрессируемые гены



Формирование aberrantных паттернов метилирования:

гипометилирование в стареющих клетках и тканях (в целом)
но: гиперметилирование CpG-островков в стареющих клетках и тканях

Такие же разнонаправленные изменения метилирования характерны для раковых клеток (Esteller 2007)

Метилирование ДНК: подходы к анализу

Метилирование ДНК как инструмент исследования и средство терапии—
общие соображения:

ДНК-метилирование – широко распространенный, но не универсальный долгосрочный механизм регуляции экспрессии
У эукариот - всегда в комбинации с другими эпигенетическими механизмами

Специфическое воздействие *in vivo* затруднительно

Ряд патологий вызван нарушением ДНК-метилирования, при этом различия в метилировании специфического локуса могут быть не только качественными, но и количественными

Паттерны метилирования содержат большое количество уже известных и еще не выявленных диагностических маркеров

Большинство методов анализа метилирования ДНК основаны на комбинации следующих подходов:

Связывание метилированных цитозинов со специфическими белками

Использованием эндонуклеаз, чувствительных к метилированию

Бисульфитная модификация (изменение последовательности ДНК в сайтах метилирования)

Влияние метилирования на поведение ДНК при HPLC (high performance(pressure) liquid chromatography)

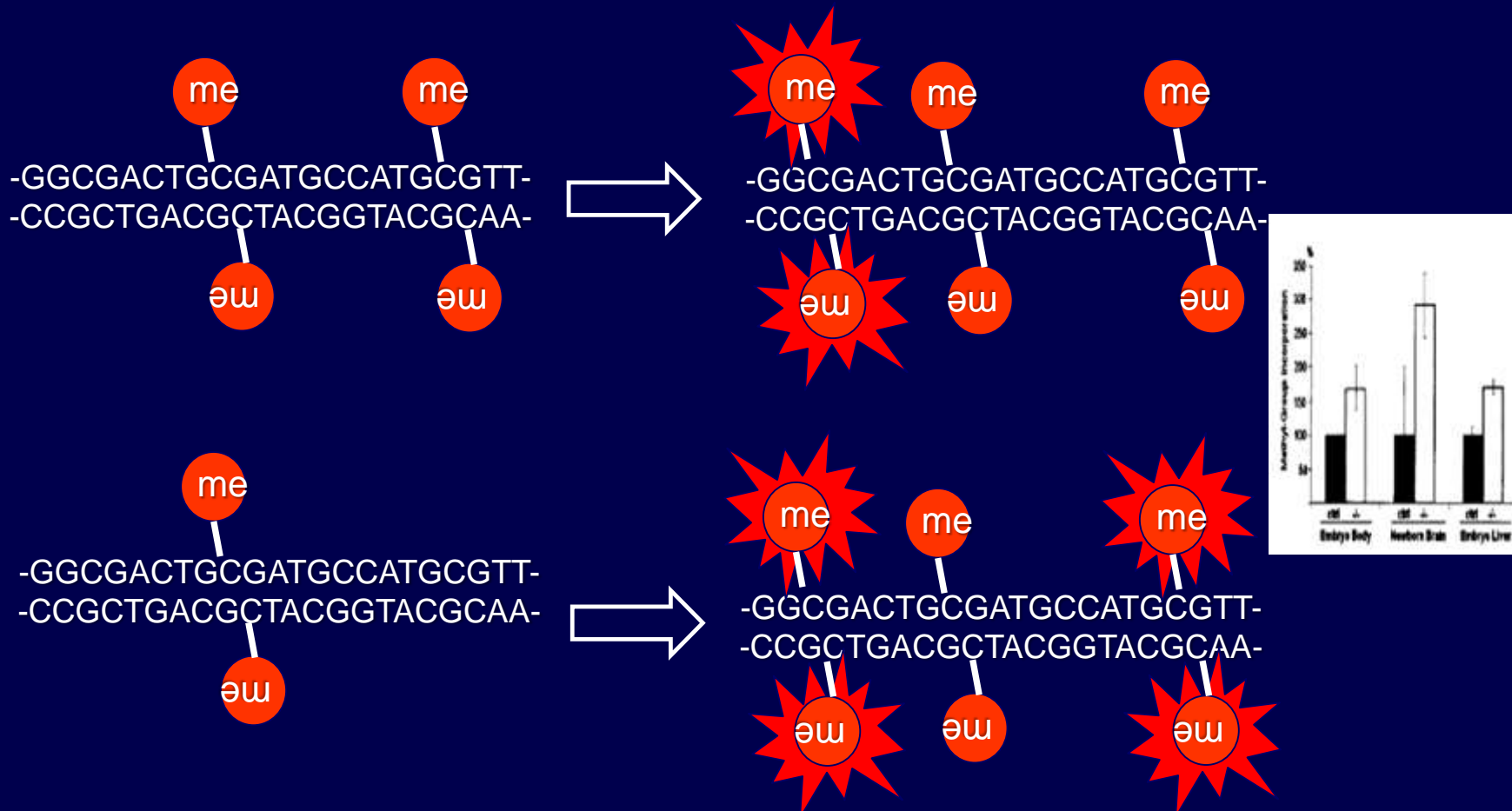
Анализ метилирования ДНК

Виды анализа	Примеры подходов
Глобальное метилирование (в масштабе генома, отдельных хромосом или их фрагментов)	Cytosine Extension Assay Бисульфитное секвенирование повторов HPLC Methyl Acceptance Assay Метод ДНК-комет
Геноспецифичное, ген-кандидат неизвестен	Связывание 5mC-специфичных антител (Me(thy)DIP) Метил-чувствительная рестрикция Бисульфитное секвенирование RGLS (Restriction Landmark Genome Scanning)
Геноспецифичное, ген-кандидат (или несколько кандидатов) известен, количественный анализ	Анализ после амплификации Клональное или параллельное секвенирование GOOD Assay Рестрикционный анализ с денситометрией
Геноспецифичное, ген-кандидат известен, качественный анализ	MethyLight MSP HRM (High Resolution Melting) прямое бисульфитное секвенирование

Анализ метилирования ДНК

Methyl Acceptance Assay

Геномная ДНК метилируется *in vitro* метилазой (например, SssI CG methylase) с использованием радиоактивно-меченого SAM в качестве донора метильной группы

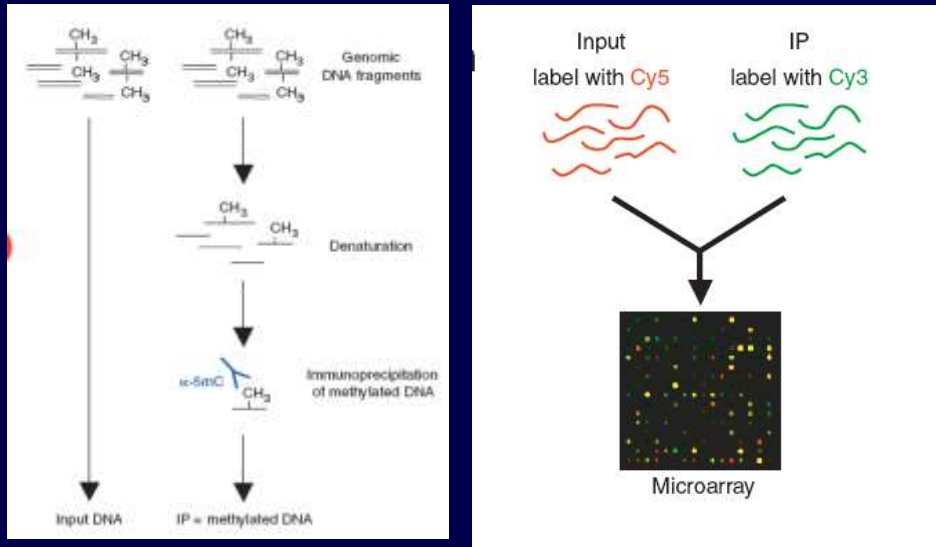


Используется для сравнительной оценки общего уровня метилирования

Анализ метилирования ДНК

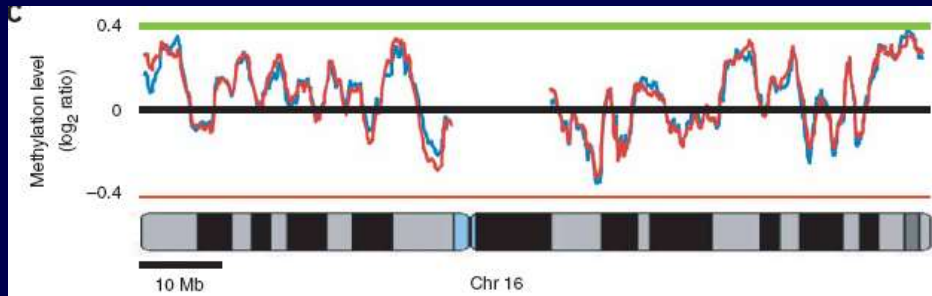
Me(thyl)DIP (Methylated DNA immunoprecipitation)

Используются антитела к 5-метилцитозину, связанные с ними фрагменты ДНК иммунопреципитируются на чип. Требуется много ДНК и антител



Контрольная порция ДНК метится флуоресцентным красителем Cy5, иммунопреципитированная – красителем Cy3

Изначально разработан (фирмой Affymetrix) для сравнительной оценки общего уровня метилирования, но в комбинации с другими методами может использоваться для получения информации о локальном статусе метилирования



MeDIP-chip и MeDIP-seq

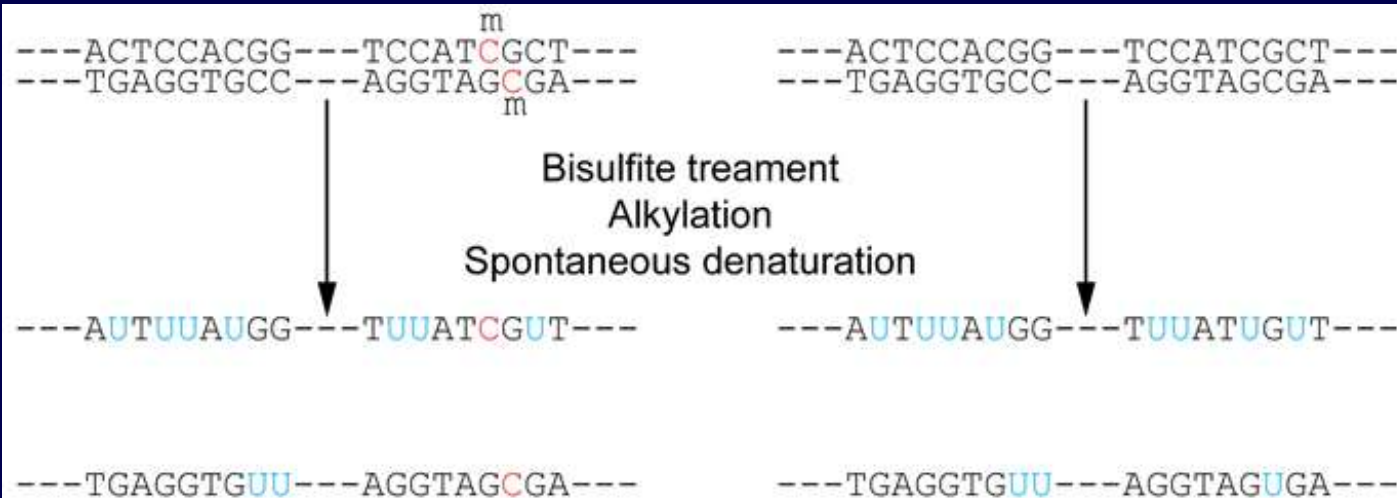
MIRA (methylated CpG island recovery assay) – обогащение препарата метилированной фракцией за счет высокоаффинного связывания с комплексом MBD2b/MBD3L и последующей хроматографической очистке

Анализ метилирования ДНК

Модификация бисульфитом Na: превращение неметилированного цитозина в урацил

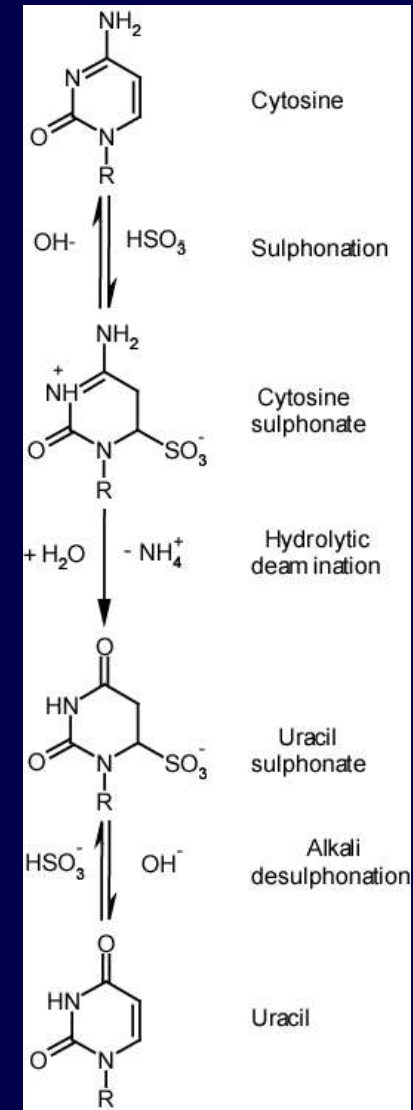
Метилированный аллель

Неметилированный аллель



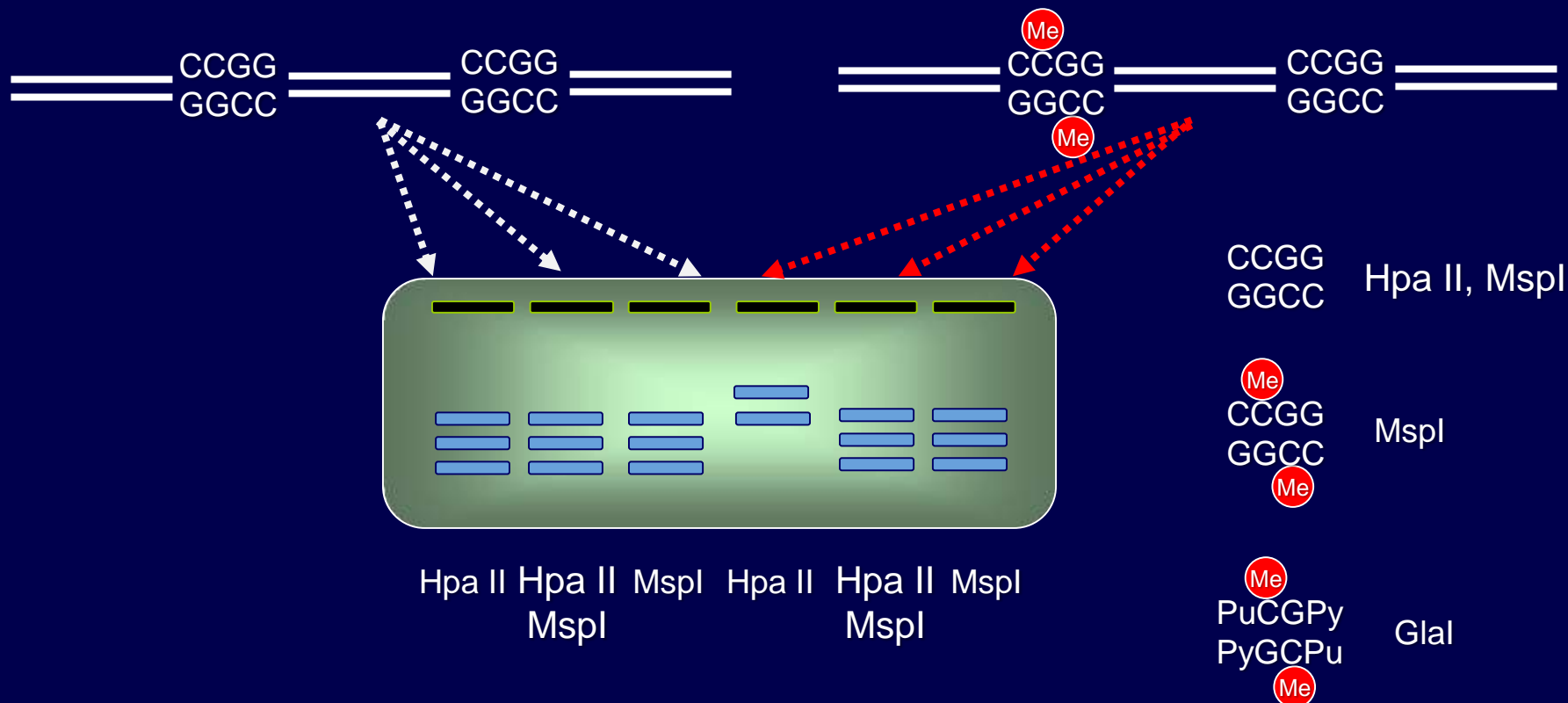
Секвенирование
 (сравниваем модифицированную
 последовательность с немодифицированной)
 или ПЦР

Differentiation of bisulfite-generated polymorphisms



Анализ метилирования ДНК

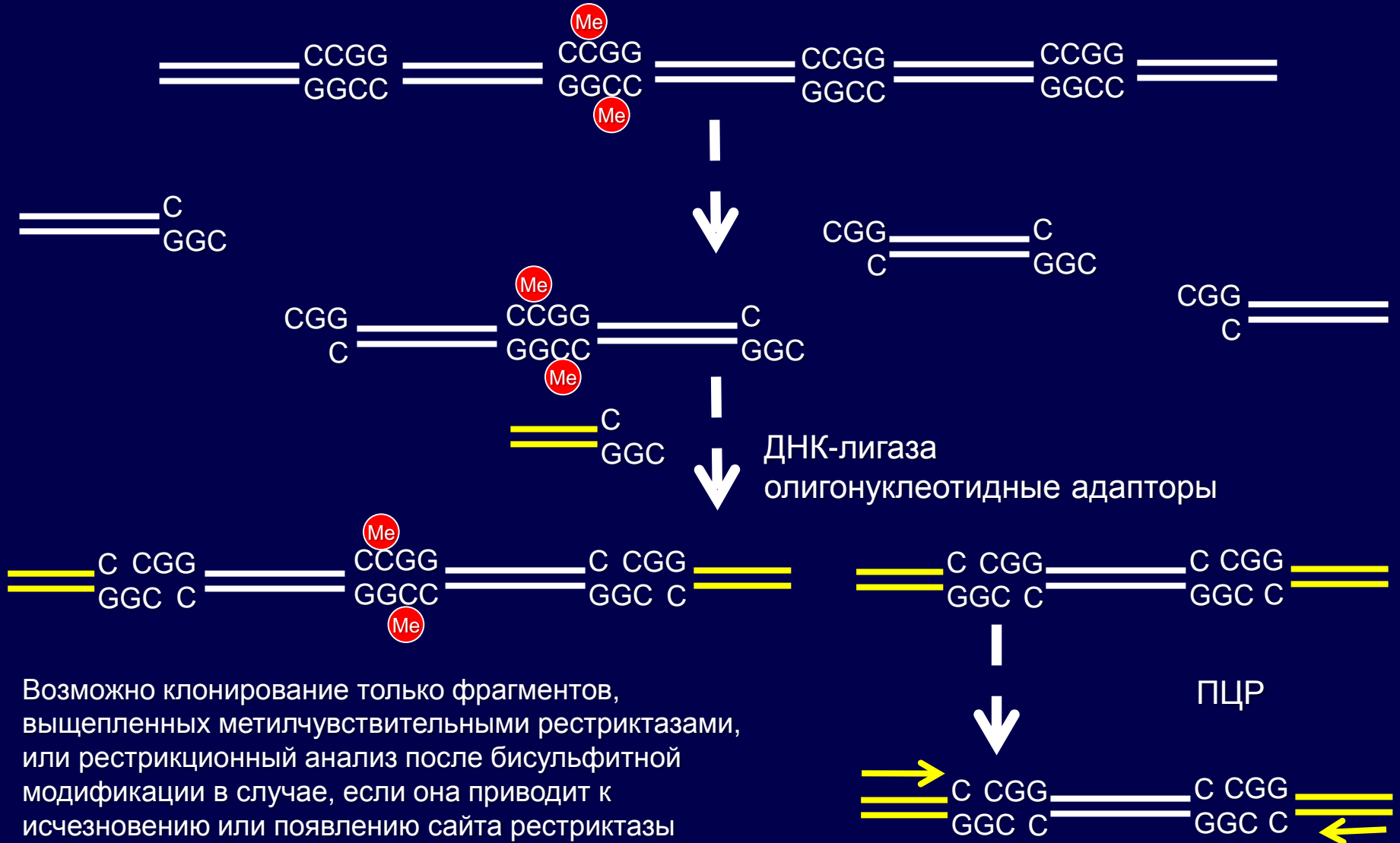
Картирование позиций метилирования с использованием метилчувствительных эндонуклеаз с последующим электрофорезом, Саузерн-блот гибридизацией с зондами на повторы, ПЦР и т.п.



Для “грубого” анализа распределения метилированных CpG можно использовать параллельное расщепление геномной ДНК чувствительными и нечувствительными к метилированию рестриктазами. Использование метилчувствительных рестриктаз позволяет обогатить препарат метилированными последовательностями.

Анализ метилирования ДНК

Использование метилчувствительных рестриктаз



Возможно клонирование только фрагментов, выщепленных метилчувствительными рестриктазами, или рестрикционный анализ после бисульфитной модификации в случае, если она приводит к исчезновению или появлению сайта рестриктазы

Анализ метилирования ДНК

После бисульфитной модификации анализируемая последовательность меняется

Варианты дальнейшего сравнения последовательности без модификации и с модификацией:

- Амплификация и прямое секвенирование
- Амплификация и клональное или параллельное секвенирование
- Амплификация и рестрикционное картирование
- Амплификация с адапторами, расщепление ДНКазами и масс-спектрометрия
- Мечение и дифференциальная гибридизация на чипах
- ...

Варианты дальнейшего сравнения проб ДНК, отличающихся в результате обработки метилчувствительными или метилспецифичными рестриктазами:

- Сравнительная молекулярная гибридизация
- Мечение и дифференциальная гибридизация на чипах
- Расщепление метилнечувствительной рестриктазой
- ...

Анализ метилирования ДНК

Метод “ДНК-комет” – анализ метилирования в отдельных клетках (адаптация)

Лизис клеток в геле (как правило, щелочные условия), получение нуклеоидов (соль+детергент)



Гидролиз ДНК метилчувствительными рестриктазами или комбинациями



Электрофорез, EtBr, микроскопия

200x увеличение

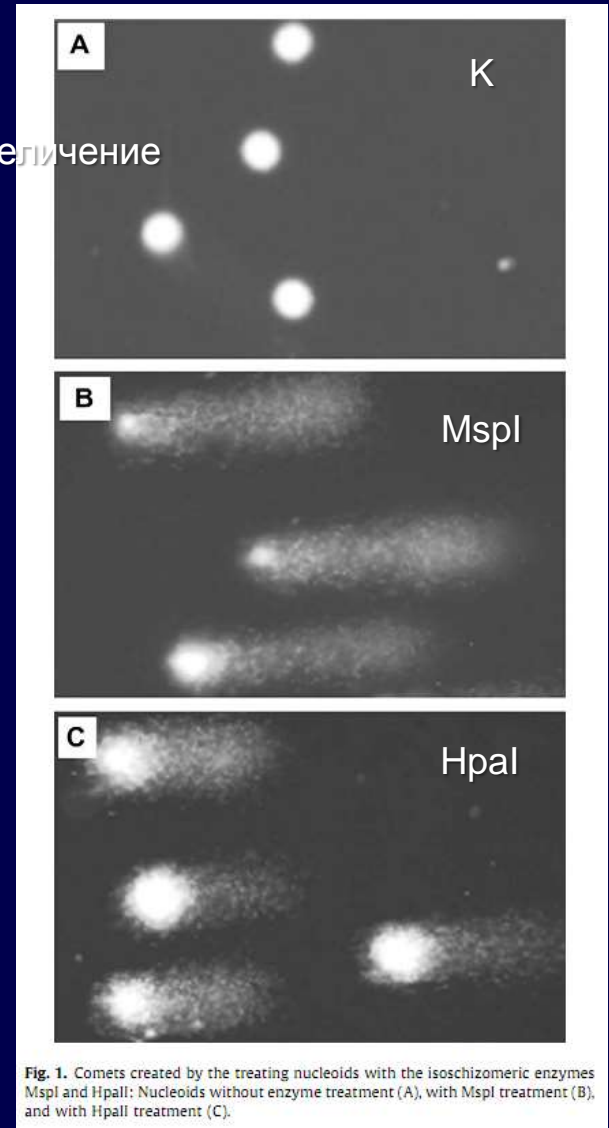
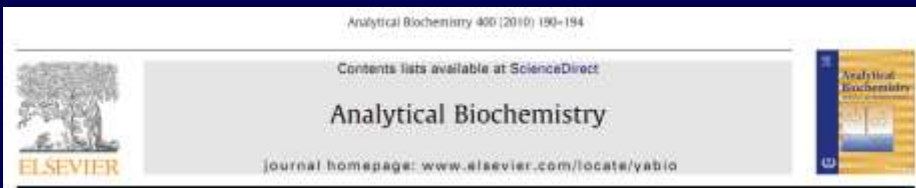


Fig. 1. Comets created by the treating nucleoids with the isoschizomeric enzymes MspI and HpaII: Nucleoids without enzyme treatment (A), with MspI treatment (B), and with HpaII treatment (C).



Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay

Johannes F. Wentzel^{a,*}, Chrisna Gouws^a, Cristal Huysamen^b, Pieter J. Pretorius^a

^aDivision for Biochemistry, School of Physical and Chemical Sciences, North-West University, Potchefstroom 2520, South Africa

^bStatistical Consultant Services, North-West University, Potchefstroom 2520, South Africa

In conclusion, we have shown that the comet assay can be successfully modified to determine changes in the level of global and regional DNA methylation in single cells. This modification further expands the versatility of the comet assay by increasing the variety of observations that can be made in one experiment. Because DNA methylation was shown to be a tissue-specific event [18], this modification of the comet assay provides the opportunity to study the DNA methylation status of single cells that are prepared from different tissues under various physiological conditions [21].

Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)

Анализ профилей метилирования тысяч локусов одновременно
Анализ aberrантных профилей метилирования, делеций, амплификаций, изменения экспрессии при развитии, в т.ч. в масштабе генома

При необходимости связать RLGS спот со специфической геномной последовательностью применяются специфические методы клонирования ("RLGS spot cloning")
Есть ограничения по чувствительности

Гидролиз ДНК метилчувствительными рестриктазами (например, *NotI* и *AscI*)



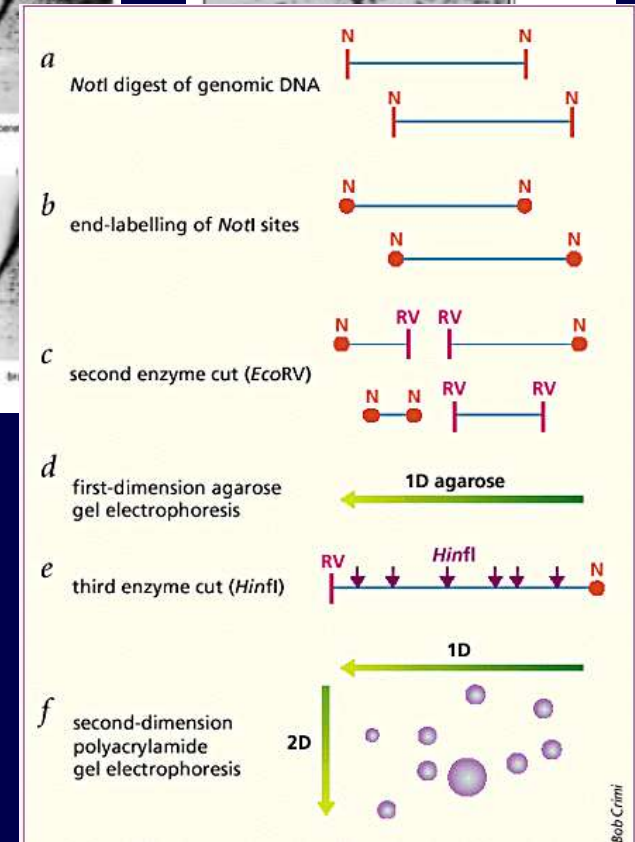
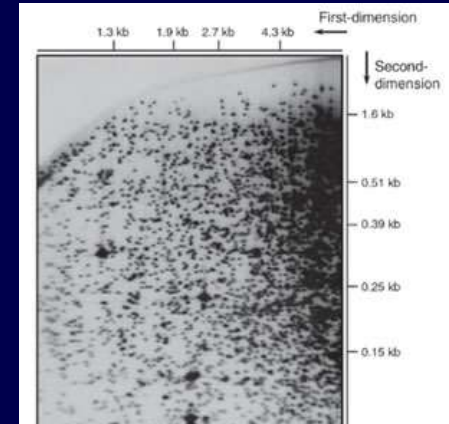
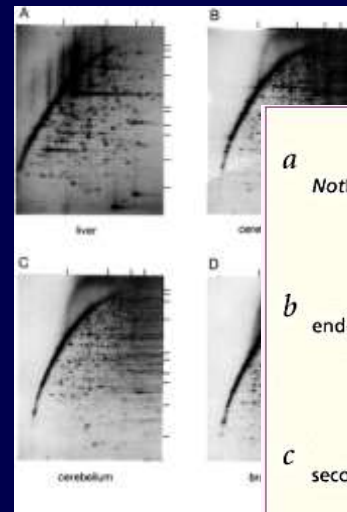
Радиоактивное мечение (например, P^{32})



Двухмерный (2D) электрофорез



Сравнение радиоавтографов, анализ "спотов" (до тысяч на одном автографе)



Методы, основанные на ПЦР:

оценка глобального уровня метилирования, если амплифицируются высокоповторяющиеся элементы (Alu, LINE)

(+) сниженные требования к количеству и качеству анализируемой ДНК

При наличии “гена-кандидата”



Количественный анализ:

амплификация метилированных и неметилированных аллелей происходит с одинаковой эффективностью (требование одинаковой эффективности – ключевое требование количественного анализа метилирования!)

уровень метилирования в локусе оценивается различными способами, возможен мультилокусный анализ

Чувствительный анализ (MSP):

амплификация метилированных и неметилированных аллелей происходит с разной эффективностью (праймеры перекрываются с позициями метилирования)

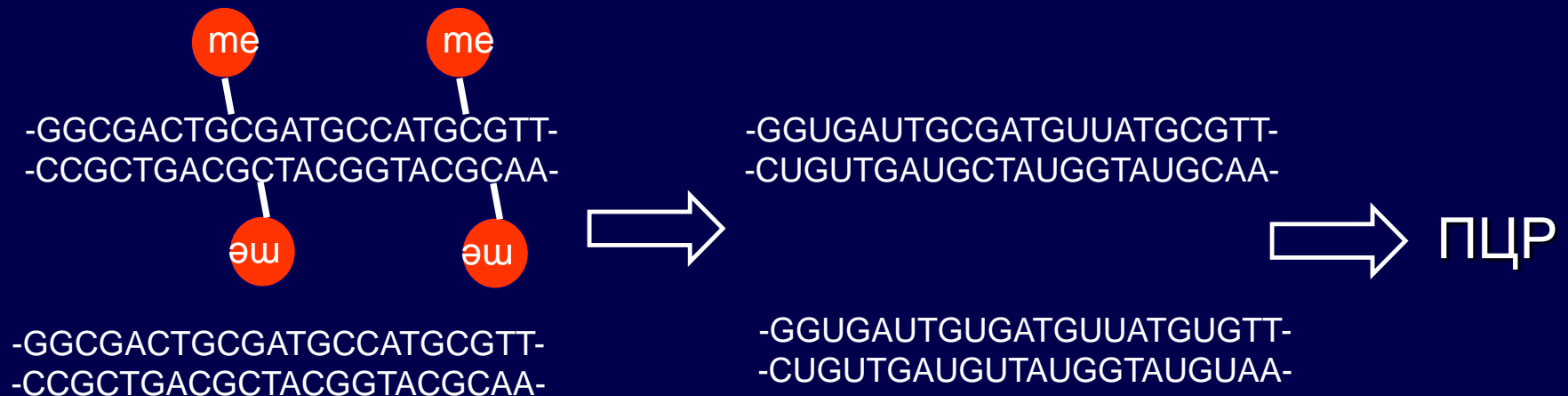
чувствительность к метилированию может быть достигнута по-разному, но, как правило, используется бисульфитная модификация



Анализ метилирования ДНК

MSP (methyl sensitive PCR)

После бисульфитной модификации проводится ПЦР с двумя наборами праймеров – один специфичен к модифицированной последовательности, другой – к немодифицированной



- (+) высокая чувствительность: возможна детекция метилированного аллеля при 1000кратном избытке неметилированного
- (+) возможна полуколичественная оценка (real-time PCR), но нет надежных количественных методов (не метод выбора для количественных оценок уровня метилирования)
- (+) невысокие требования к количеству и качеству проб
- (-) анализ только полностью (не)метилированных аллелей, тогда как ситуация далеко не всегда такова
- (-) высокие требования к дизайну праймеров

Метилирование ДНК - summary:

- Метилирование ДНК широко распространено у прокариот и эукариот, а также их вирусов
- Функции – защита от экспрессии чужеродных последовательностей, регуляция репликации, специфичная регуляция транскрипции генов
- Метилирование является одним из механизмов долговременной эпигенетической регуляции экспрессии генов эукариот
- Механизмы регуляции, вовлекающие метилирование, тесно связаны с другими механизмами эпигенетической регуляции
- В ходе формирования клеток зародышевой линии и в раннем развитии происходят изменения статуса метилирования в масштабе генома
- Статус метилирования многих последовательностей изменяется с возрастом. Нарушения метилирования могут приводить к разнообразным патологиям
- Доступны методы анализа метилирования, в т.ч. в масштабе генома
- Основное прикладное применение знаний о метилировании в ближайшее время – онкодиагностика
- Перспективы использования в терапевтических целях – пищевые добавки, стимулирующие общее метилирование, ингибиторы метилаз и деметилаз в частных случаях терапии развивающихся опухолей.
Проблема – плейотропные эффекты

Не всегда понятно, что делать с накапливающейся информацией по позициям метилирования, их специфичности и консервативности — ее необходимо обрабатывать и определять биологические функции модификаций!



Благодарю за внимание!
Вопросы?