

# ЭПИГЕНЕТИКА – ВЕЗДЕ И ВСЮДУ

---



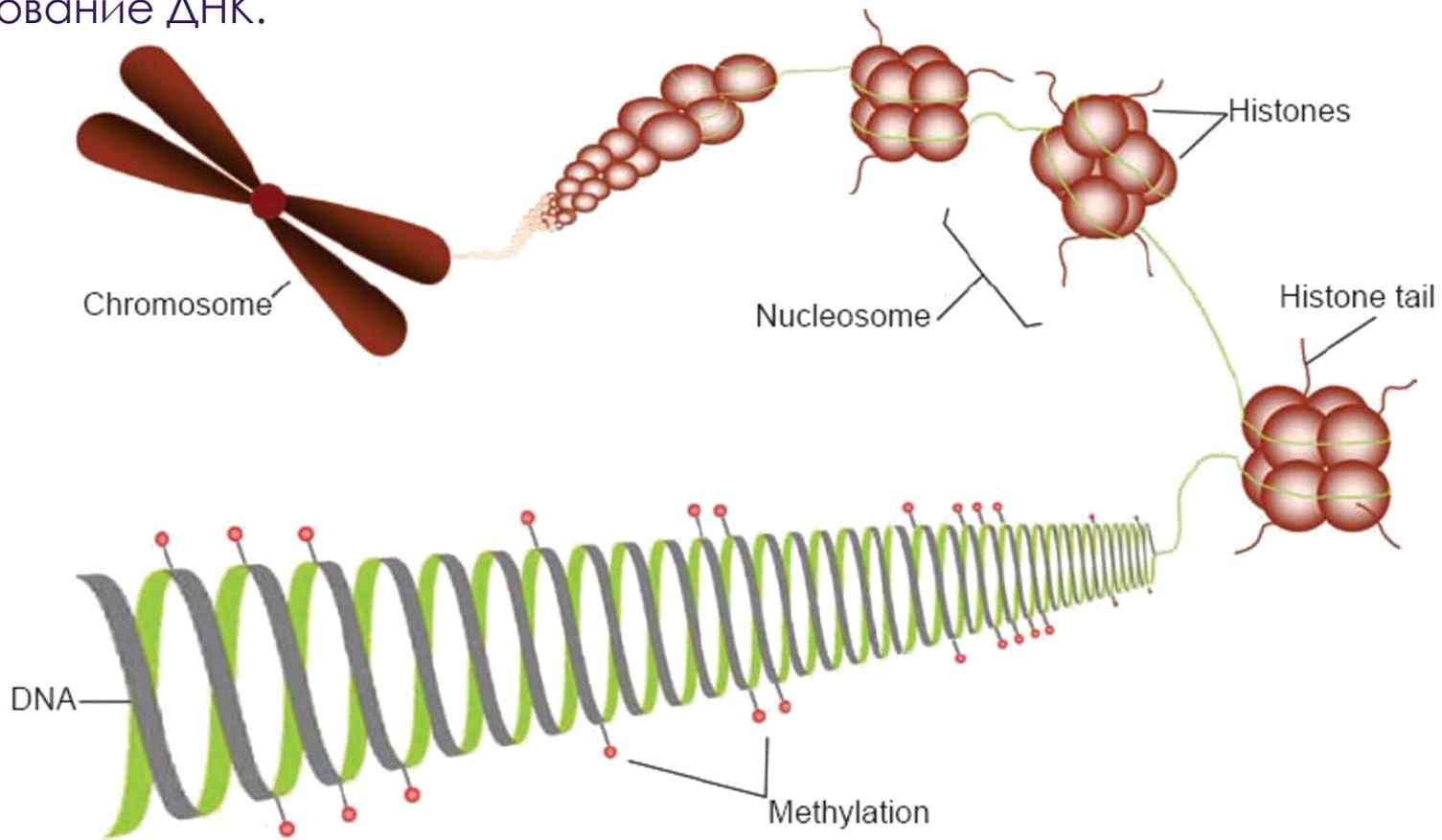
Вы можете, как в мирозданье,  
Пройдя все ярусы подряд,  
Сойти с небес сквозь землю...

... к эпигенетике

# Эпигенетика: кратко

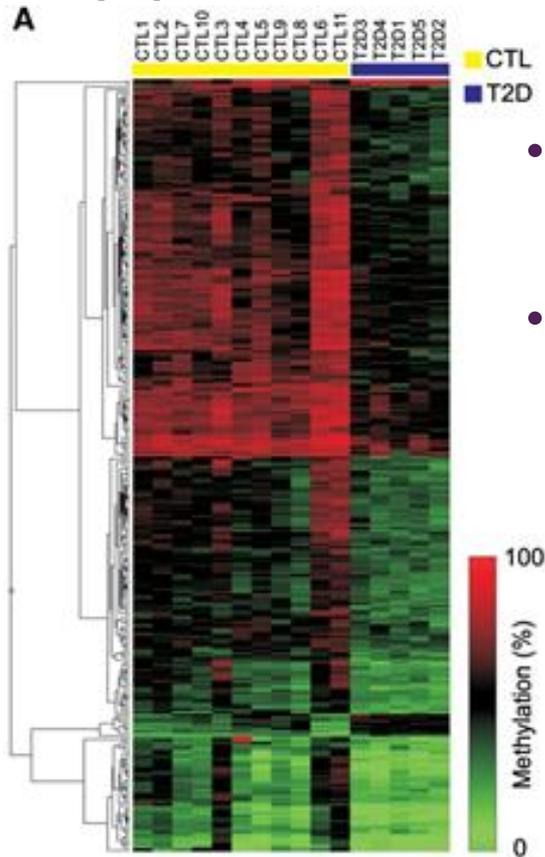
Эпигенетические модификации – это изменения в экспрессии генов, которые могут наследоваться и не являются основанными на изменениях в последовательности пар оснований ДНК.

- Модификации гистонов;
- Метилирование ДНК.

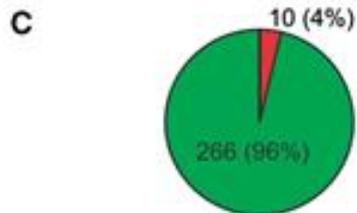
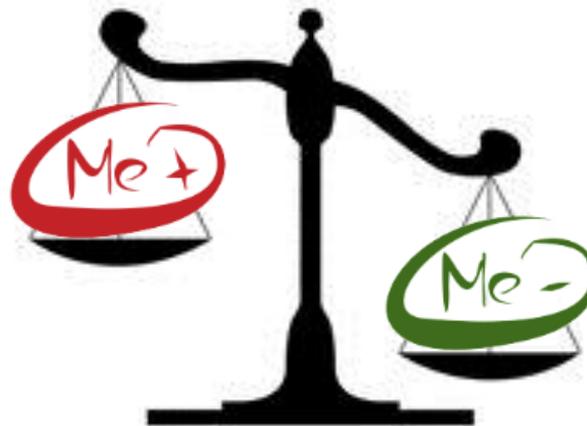


# Диабет

## DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients



- Определили 276 CpG сайтов, связанных с 254 промоторами генов.
- 266 из этих 276 CpGs (96%) - снижение уровня метилирования, 10 (4%) были гиперметилированы.



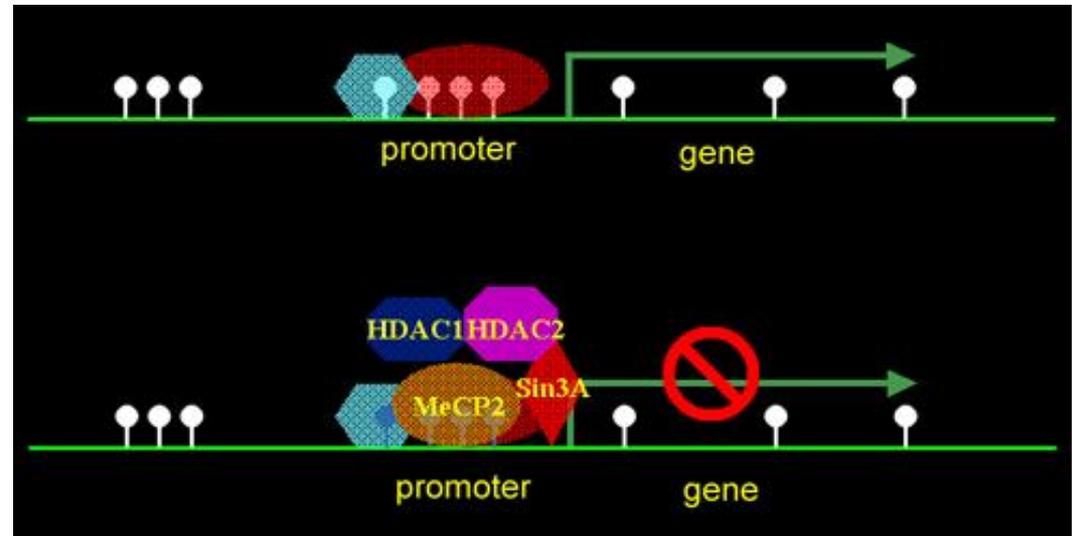
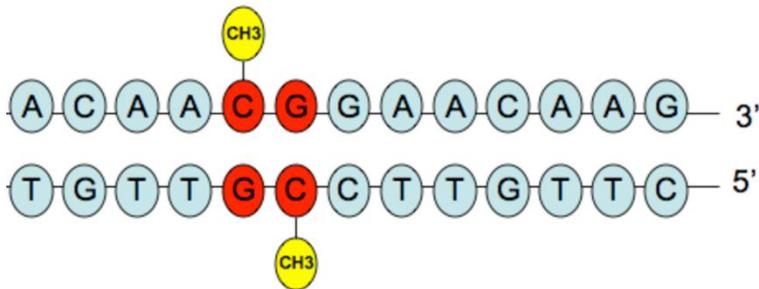
**276 Differentially methylated CpGs:**

- Hypomethylated
- Hypermethylated



# Острова CpG

- CpG островки характеризуются содержанием CpG динуклеотида  $\sim 2,4-3,6\%$ , в то время как остальная часть генома имеет ниже встречаемость CpG,  $\sim 1\%$
- CpG динуклеотиды вне CpG островков преимущественно метилированы ( $\sim 90\%$ ), CpG сайты в CpG островках преимущественно неметилированы (6-8%),  $\Rightarrow$  относительно небольшие изменения в проценте метилирования (2-3%) в CpG сайтах CpG островков – **большое** влияние на экспрессию генов



# Поиск островков CpG

- Программа для поиска островков CpG EMBOSS CpGPlot <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>

**EMBOSS CpGPlot/CpGReport/Isochore**

Program:  Window:  Step:  Obs/Exp:  MinPC:  Length:  Reverse:  Complement:

Enter or Paste a nucleic acid Sequence (at least 100bp) in any format:

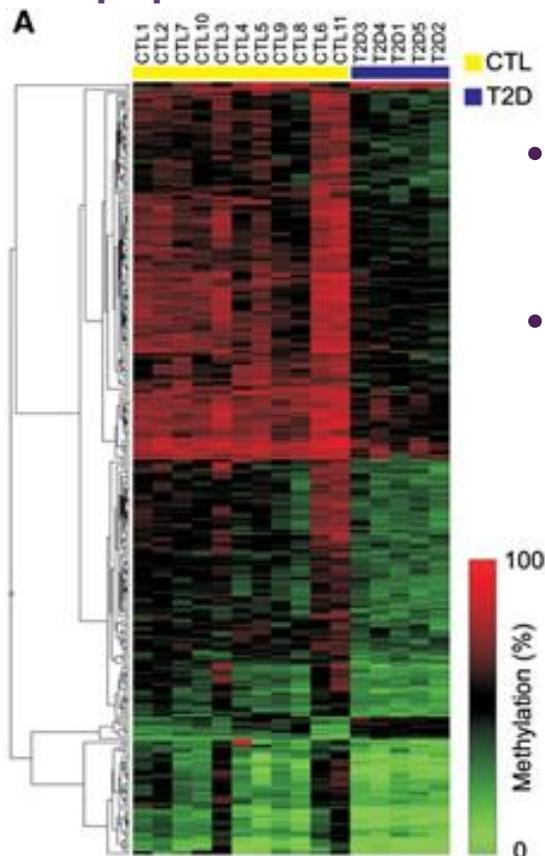
Upload a file:

1 800  
CpG Island 1  
801 1600  
1601 1820

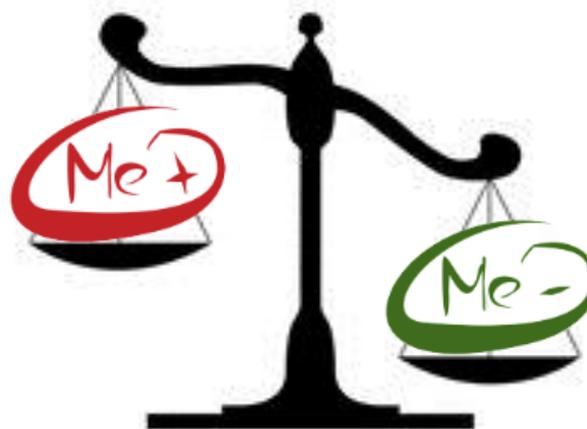
Select lower limits: %GC=50, ObsCpG/ExpCpG=0.60, Length=500, Distance=100  
CpG island 1 start=1, end=868, %GC=58.9, ObsCpG/ExpCpG=0.607, Length=868

# Диабет

## DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients



- Определили 276 CpG сайтов, связанных с 254 промоторами генов.
- 266 из этих 276 CpGs (96%) - снижение уровня метилирования, 10 (4%) были гиперметилированы.



**276 Differentially methylated CpGs:**

- Hypomethylated
- Hypermethylated



# Гены, меняющие паттерны метилирования при диабете

- Являются ли изменения генно специфичными, или глобальное понижение уровня метилирования?
- 41 ген - значительная разница в экспрессии между контролем и диабетом.
- 3 категории:
  - гены, связанные с дисфункцией и смертью;
  - гены содействующие адаптации к измененной ситуации в метаболизме;
  - не известная функция.

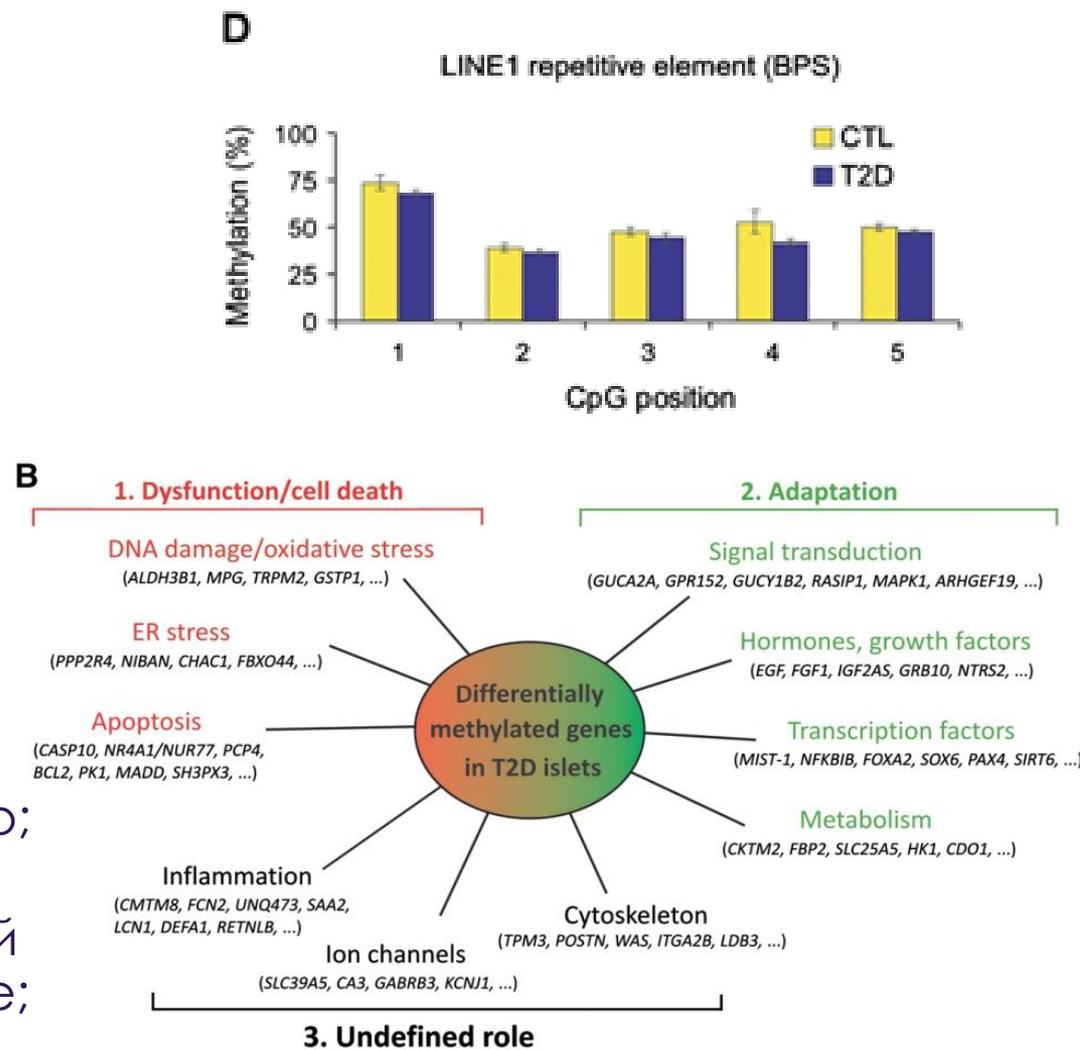


Figure 1 from Michael Volkmar *et al.*

*The EMBO Journal*

31 January 2012 doi:10.1038/emboj.2011.503

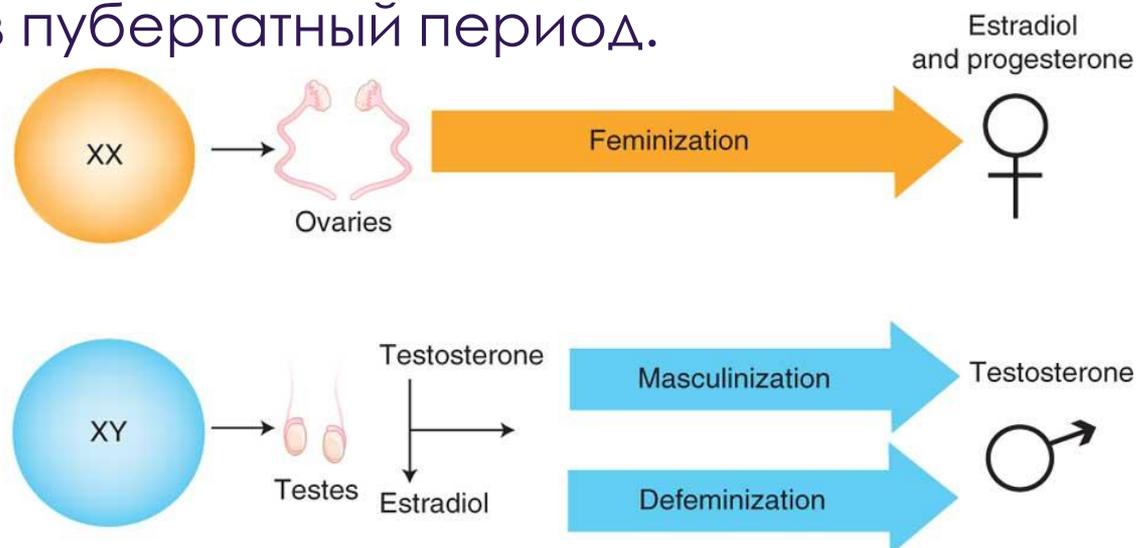
# Итак I

# ERGO

- Общий скрининг – даёт определённую картину паттернов метилирования в разных тканях. Этот паттерн метилирования весьма специфичен для различных патологий.
- Результаты скрининга есть в публикациях, по этому можно подобрать любой интересующий при определённой патологии ген, и играть с ним дальше как угодно.
- Поиск островков в пределах промотерного региона интересующего гена – достаточно простая процедура, возможная как с помощью онлайн-программ так и с помощью установленного на компьютер софта.

# Половые различия в мозге

- Половые различия в мозге определяются в критический период развития, ново-синтезированный тестостерон превращается в эстрадиол и влияет на мозг.
- Отличия ♂ от ♀ - маскулинизация и дефеминизация определённых областей мозга.
- Половые различия закладываются в процессе развития, но активируются в пубертатный период.



## Developmental and Hormone-Induced Epigenetic Changes to Estrogen and Progesterone Receptor Genes in Brain Are Dynamic across the Life Span

Jaclyn M. Schwarz,\* Bridget M. Nugent,\* and Margaret M. McCarthy

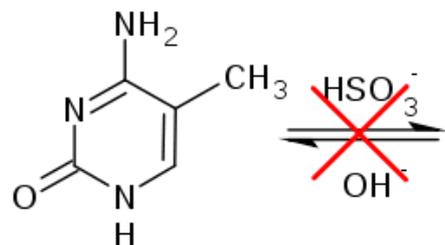
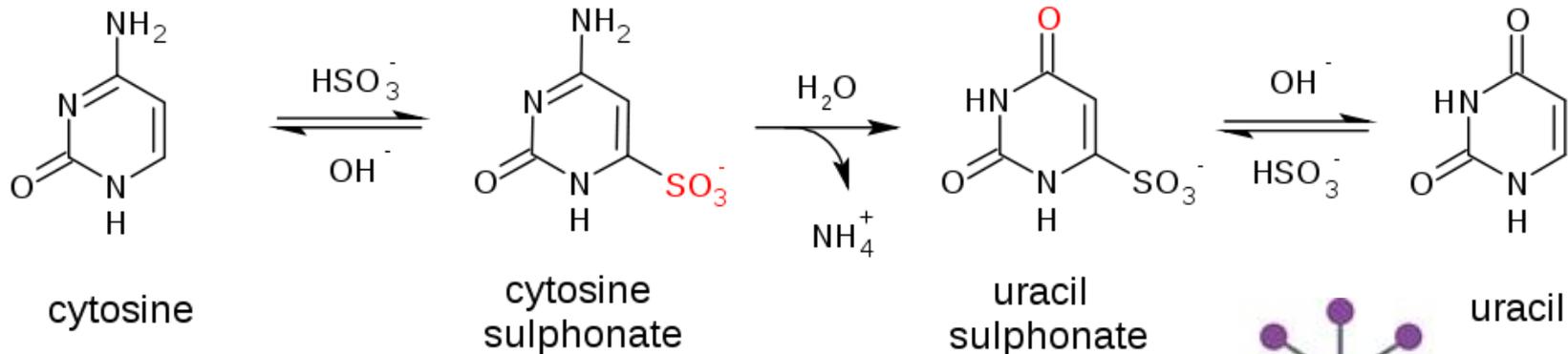
Program in Neuroscience (J.M.S., B.M.N., M.M.M.) and Departments of Physiology (M.M.M.) and Psychiatry (M.M.M.), University of Maryland, Baltimore, Maryland 21201

# Гормоны: различия ♀ и ♂

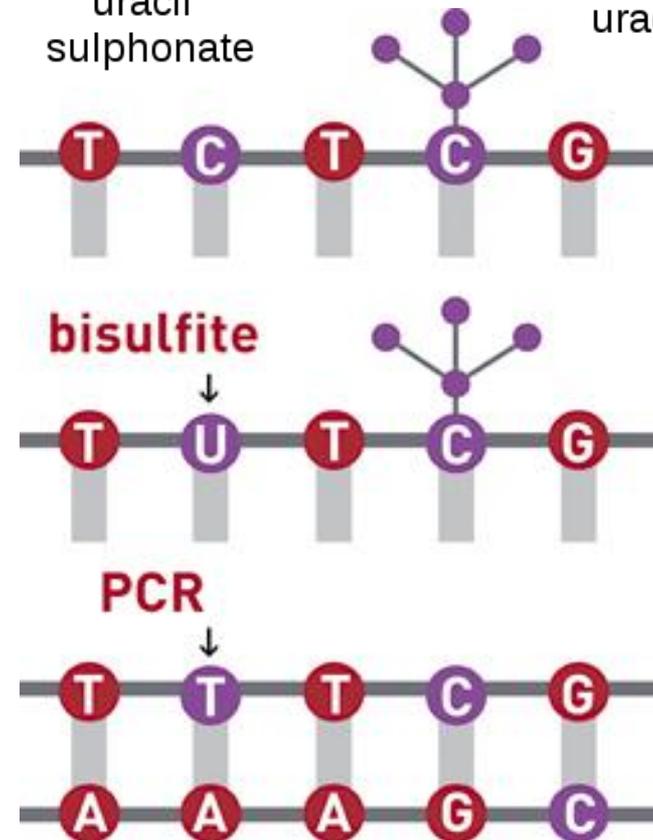
- Рецепторы гормонов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) различно экспрессируются в преоптической области (POA) и медиобазальном гипоталамусе (MBH).
- Как короткое воздействие гормонов в критический период развития приводит к половым различиям в мозге?
- Предположение: неонатальный эстрадиол приводит к разному уровню метилирования промоторных регионов генов ER- $\alpha$ ,  $\beta$ -ER и PR нейронов в POA и MBH.
- Авторы смотрели уровни метилирования у ♂, ♀ и самок, которым вводили эстрадиол.



# Бисульфитное изменение



5-methylcytosine

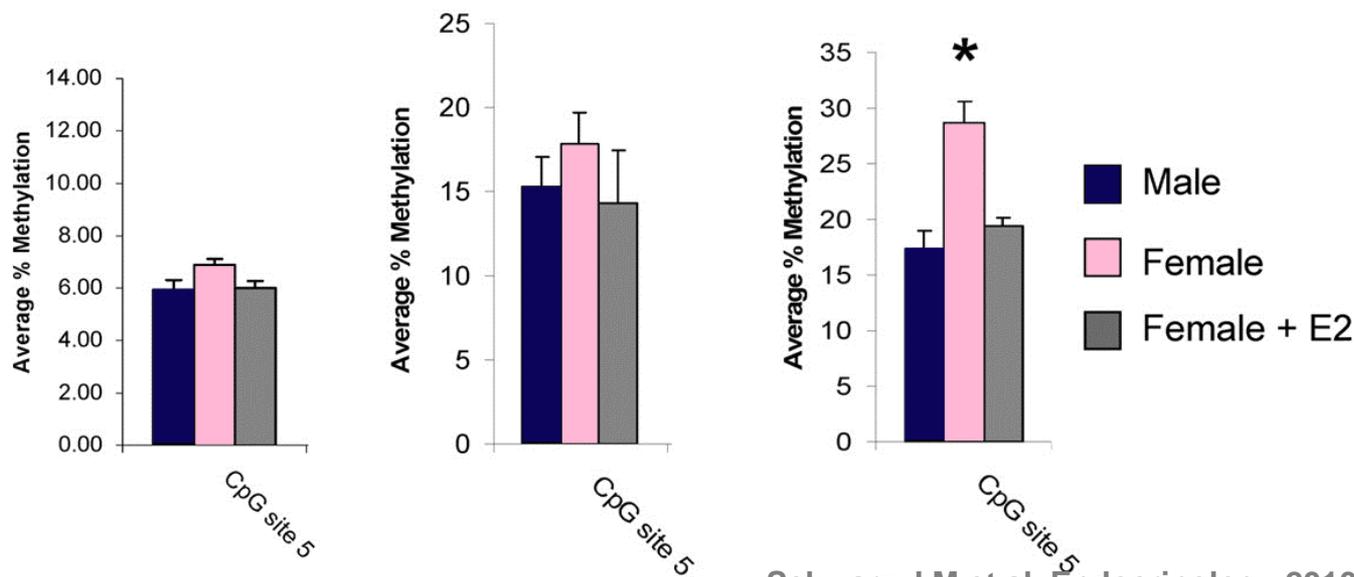


- Основная реакция для определения метилирования цитозина

## Гены рецепторов изменяют паттерны метилирования

- CpG островки в промоторных регионах ER- $\alpha$ ,  $\beta$ -ER и PR генов различно метилированы в онтогенезе.
- Половые различия в уровне метилирования промотора ER- $\alpha$  сохраняются после неонатального воздействия эстрадиола.
- Обработка самок эстрадиолом вызывала паттерны метилирования, идентичные самцам.

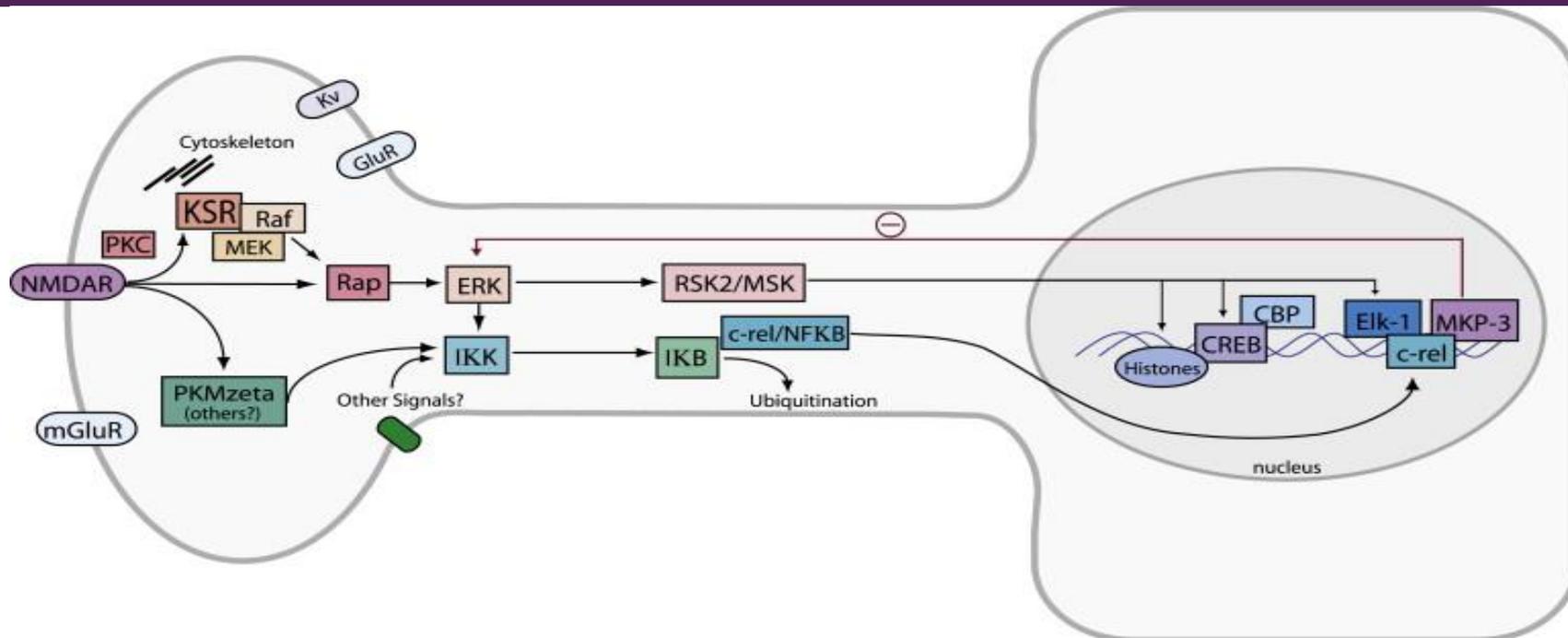
**Postnatal Day 1    Postnatal Day 20    Postnatal Day 60**



## Итак II

# ERGO

- Одноразовое действие гормонов – продолжительные изменения.
  - Как это происходит – неизвестно пока.
  - Возможно эпигенетические механизмы играют роль.
- 
- Бисульфитная конверсия – относительно простой метод, с помощью которого легко изучать как отдельные сайты метилирования, так и достаточно большие участки генома.



- Модель – гиппокамп-зависимое формирование памяти инициируется активацией рецепторов (NMDA), что приводит к притоку кальция, активации сигнальных путей, и изменению транскрипции генов, отчасти благодаря изменениям структуры хроматина, таким как метилирование ДНК и модификации гистонов

# Эпигенетика и память

- Авторы впервые заинтересовались, влияет ли метилирование ДНК на формирование памяти у взрослых ЦНС с помощью контроля транскрипции определённых генов в гиппокампе?
- Изменены ли уровни DNMT mRNA в гиппокампе после обучения (страх)?
  - Животные подвергшиеся ассоциативному шок обучению – увеличение DNMT3a и 3b мРНК в области CA1.
- Нужна ли DNMT активность для формирования памяти?
- DNMT ингибитор 5-aza-deoxycytidine (5-AZA), zebularine (zeb)

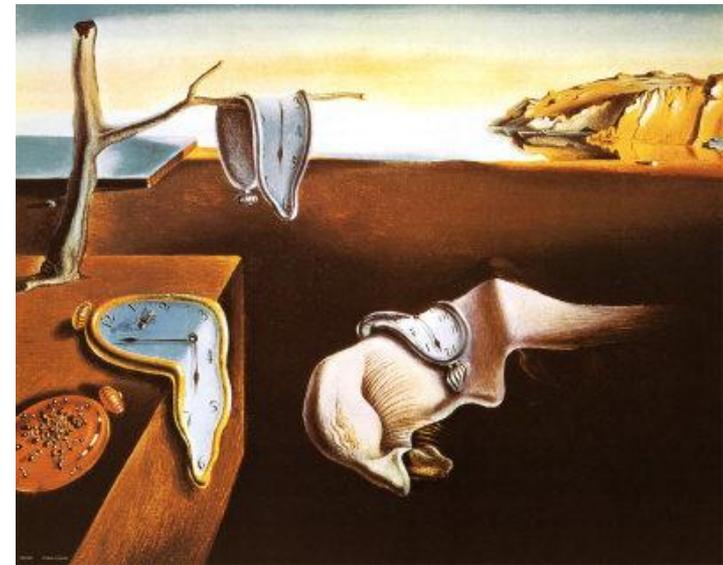
Neuron

Article

## Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation

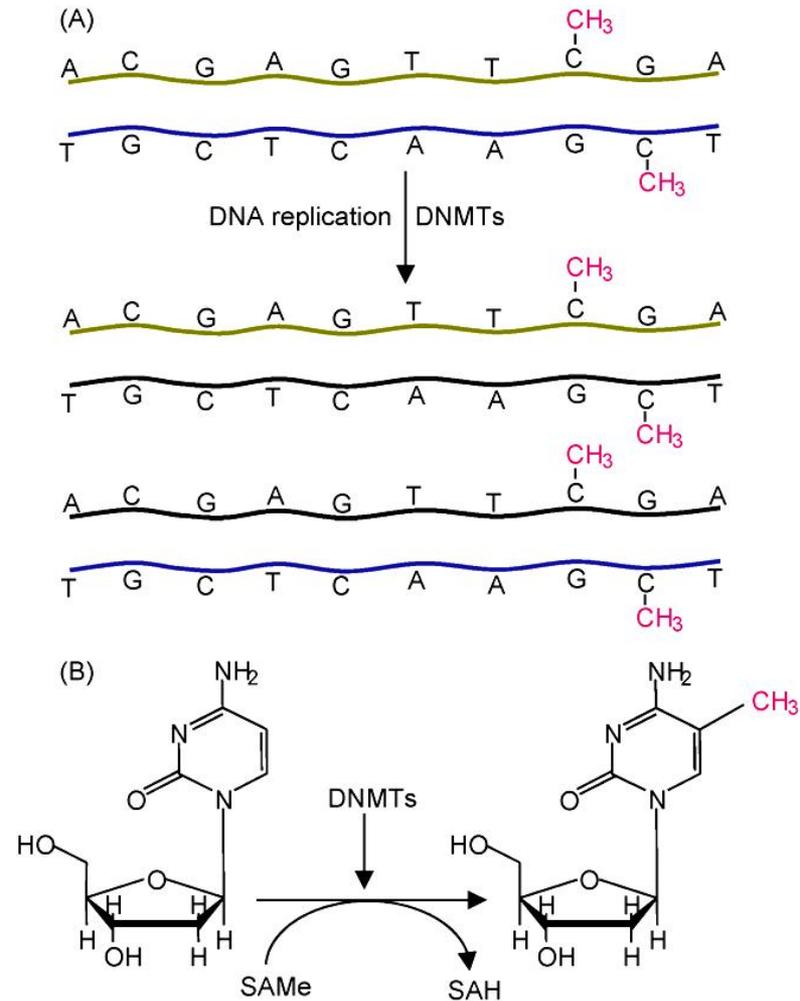
Courtney A. Miller<sup>1</sup> and J. David Sweatt<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Department of Neurobiology and the Evelyn F. McKnight Brain Institute, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

DOI 10.1016/j.neuron.2007.02.022



# ДНК метилтрансферазы (DNMT)

- Ферменты, ответственные за метилирование ДНК в CpG нуклеотидах.
- Используют S-adenosyl-L-methionine (SAMe) в качестве донора метильных групп.
- У млекопитающих обнаружены DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B и DNMT3L.
- DNMT1 – ответственна за копирование и поддержание метилирования хромосом в течение редупликации ДНК.



# Эпигенетика и память

- Авторы впервые заинтересовались, влияет ли метилирование ДНК на формирование памяти у взрослых ЦНС с помощью контроля транскрипции определённых генов в гиппокампе?
- Изменены ли уровни DNMT mRNA в гиппокампе после обучения (страх)?
  - Животные подвергшиеся ассоциативному шок обучению – увеличение DNMT3a и 3b mRNA в области CA1.
- Нужна ли DNMT активность для формирования памяти?
- DNMT ингибитор 5-aza-deoxycytidine (5-AZA), zebularine (zeb)

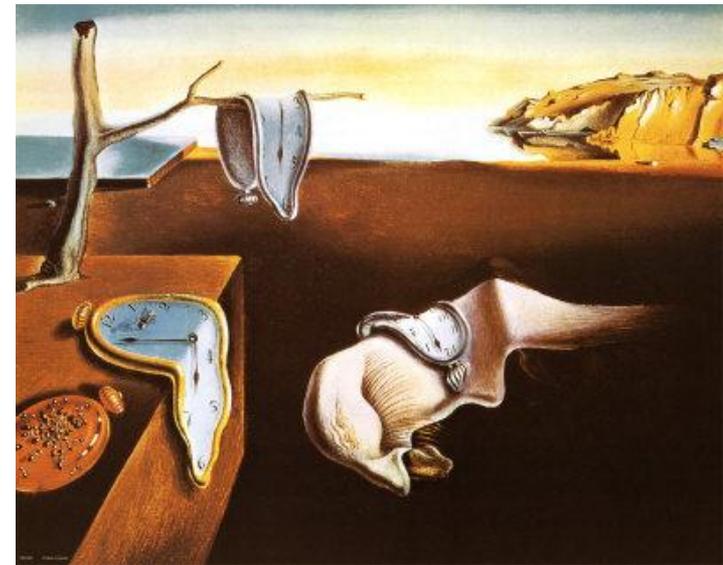
Neuron

Article

## Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation

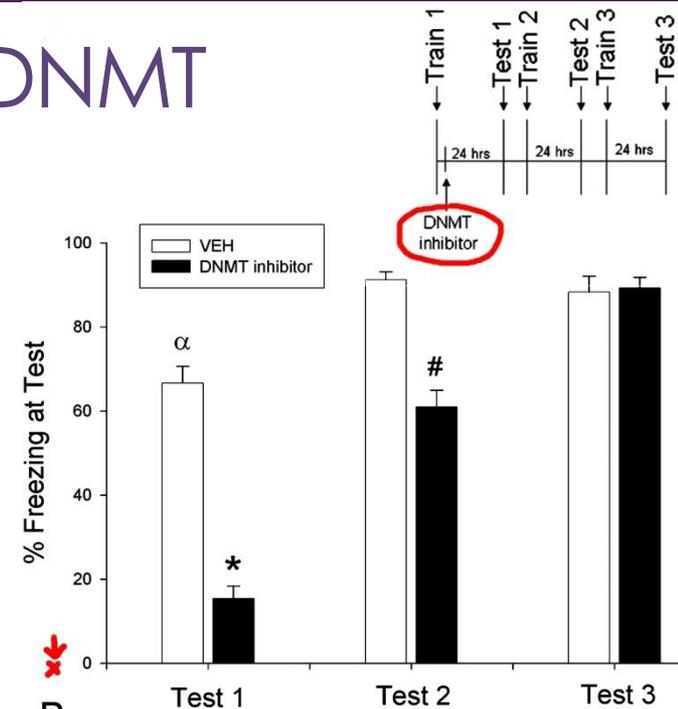
Courtney A. Miller<sup>1</sup> and J. David Sweatt<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Department of Neurobiology and the Evelyn F. McKnight Brain Institute, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

DOI 10.1016/j.neuron.2007.02.022

Cell  
PRESS

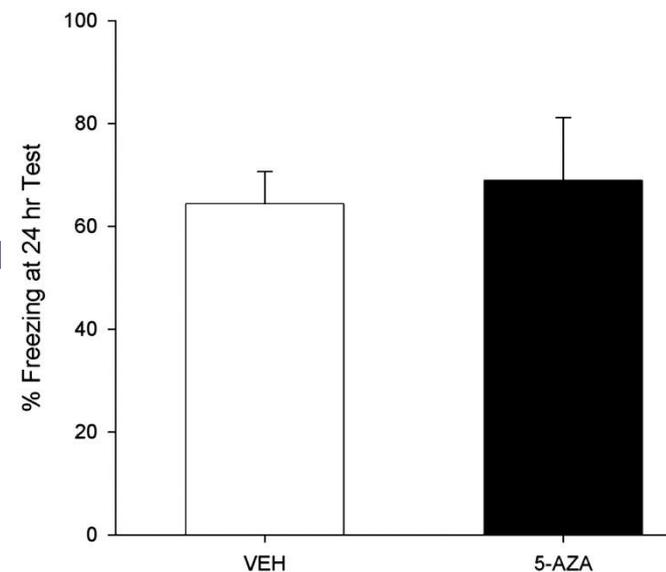
# Результаты ингибирования DNMT

- 24 часа спустя (test day 1), животные с DNMT ингибитором – значительно меньше замирания, связанного со страхом.
- На сколько постоянны эффекты ингибиторов DNMT на формирование памяти?
  - 48 часа спустя (test day 2) – реагируют так же, как и контрольные крысы.
- Ингибитор утилизируется до конца?
  - После 6 часов формирования памяти вкололи ингибитор DNMT, результат – как контроль так и экспериментальные животные одинаково реагировали.



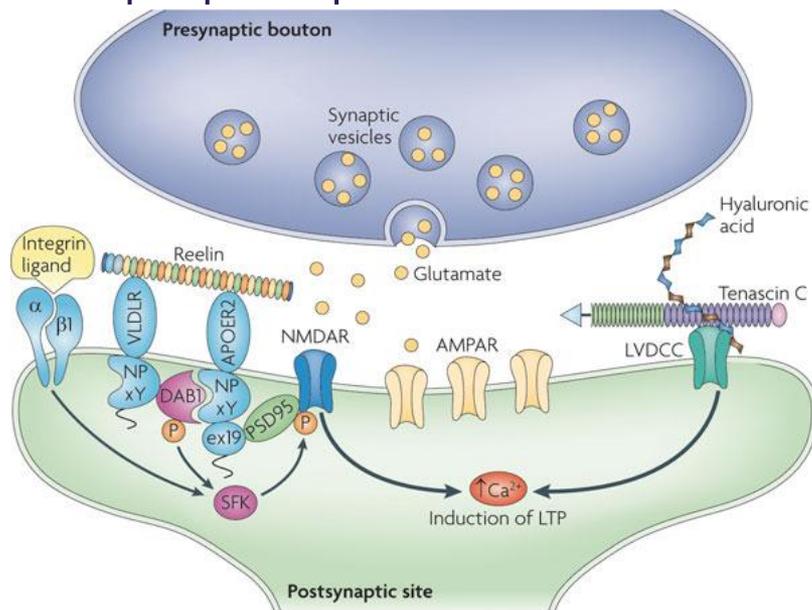
✖

B

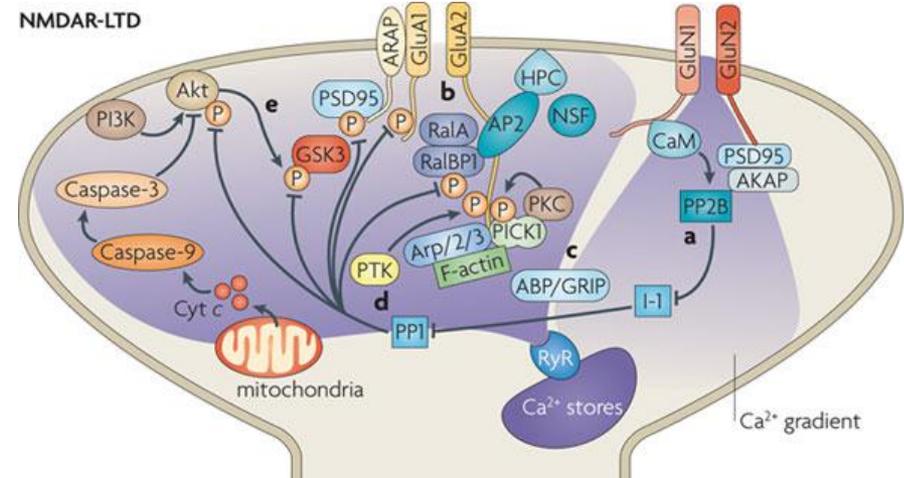


# Белки, участвующие в LTP и LTD

- Протеиновая фосфатаза 1 (PP1) – суппрессор памяти, в активном состоянии приводит к LTD. Угнетение PP1 повышает LTP, поддерживает память.
- Reelin – увеличивает LTP, нарушения его функционирования приводит к проблемам в формировании памяти.



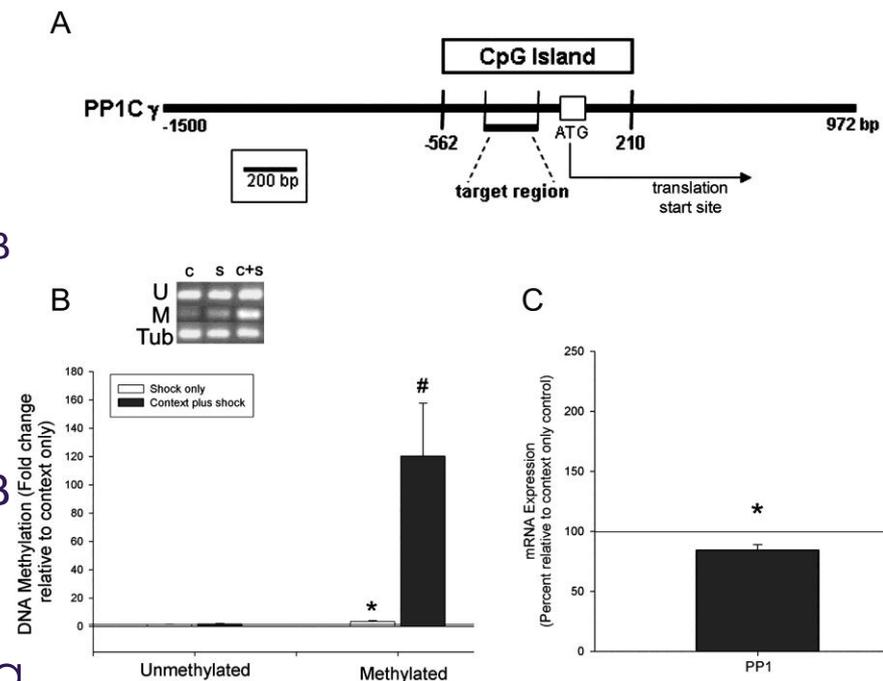
Nature Reviews | Neuroscience



Nature Reviews | Neuroscience

# Изменение уровня метилирования ДНК

- Через час после обучения резкое увеличение метилирования PP1 гена.
- Приводит ли увеличенное метилирование PP1 к изменениям в транскрипции гена?
  - более низкие уровни PP1 мРНК в области CA1 час после тренировки.
- снижает ли DNMT ингибитор уровень метилирования ДНК в локусе PP1?
  - в течение одного часа после обучения и инъекции ингибитора – увеличение неметилированного PP1.



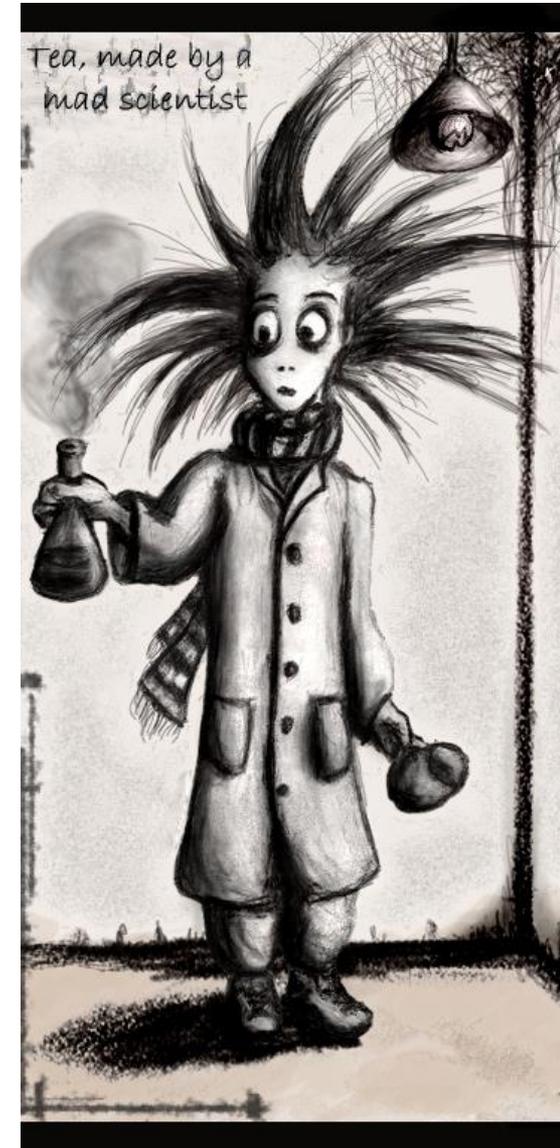
## Интересные выводы

# ERGO

- Способность животных учиться задаче через 24 часа после инъекции DNMT ингибитора => изменения метилирования ДНК во взрослой ЦНС не обязательно постоянны, а могут быть динамическими.
  - Метилирование ДНК во взрослом гиппокампе не играет определенную роль в хранении долговременной памяти, так как изменения обратимы в течении 24 часов.
  - Скорее всего, некоторые гены должны быть активированы и другие заглушены для нормального формирования памяти. Метилирование ДНК возможно играет роль в этом процессе.
- 
- Изучать уровни метилирования легко с помощью добавления ингибиторов DNMT.

# Глобальные выводы

- Эпигенетика – везде и повсюду, участвует во многих процессах и изменяется при патологиях, при чём по разному изменяется при разных патологиях.
- Изучать эпигенетические механизмы и особенности – очень интересно, а главное возможно!
- Главное – идея + найти подходящий объект исследований = замечательные публикации (например, в Neuron).



# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

---

Они всегда, везде и всюду,  
Но их не видишь никогда,  
Под их контролем всюду буду,  
Нас жизнь связала навсегда...