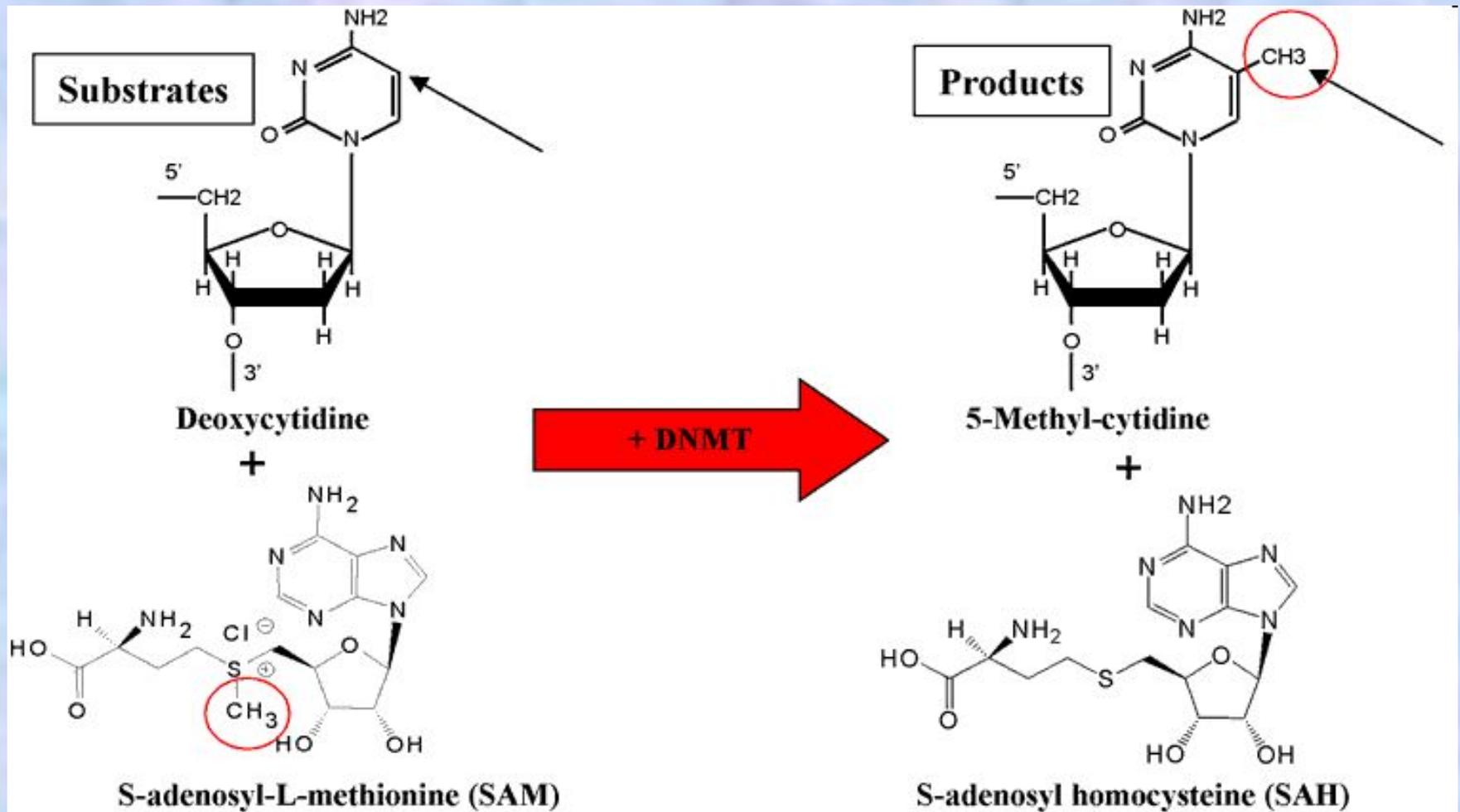


ЛЕКЦИЯ 4:

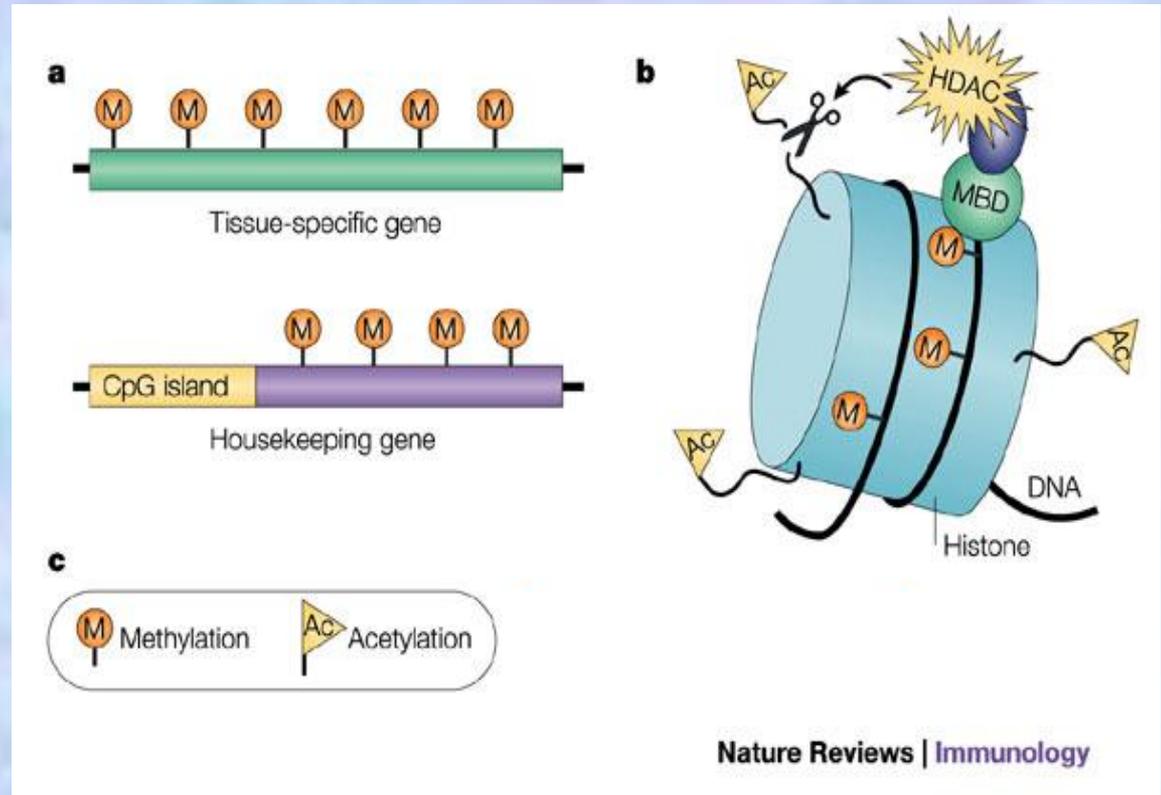
- Метилирование мтДНК

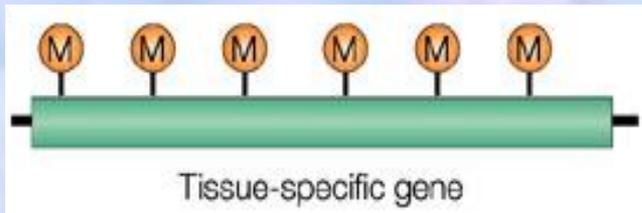
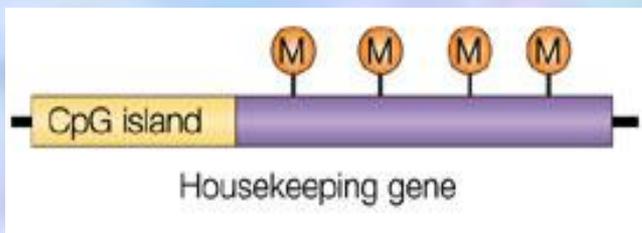
Метилирование ДНК



Метилирование ядерной ДНК

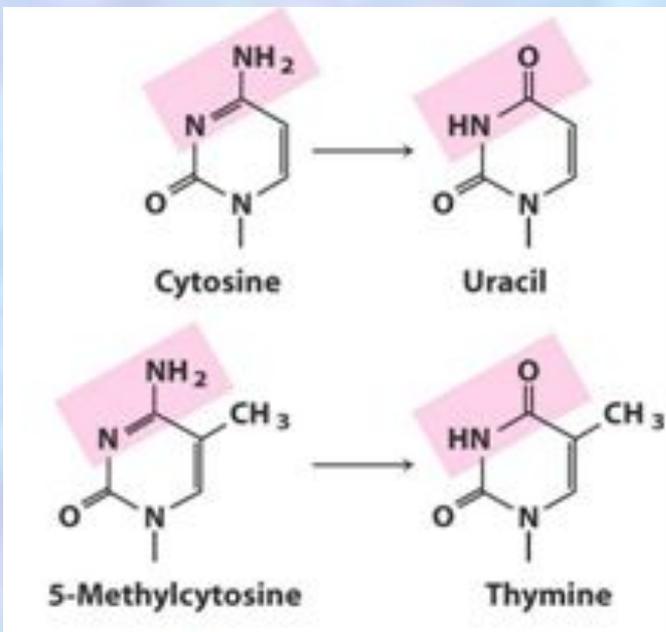
- Происходит преимущественно в CpG-участках ДНК
- Служит для регуляции транскрипции: метилирование ДНК в CpG-участках приводит к деацетилированию гистонов, что усиливает их связывание с ДНК.





Перед транскрипционно активными генами обычно существуют неметилированные CpG островки.

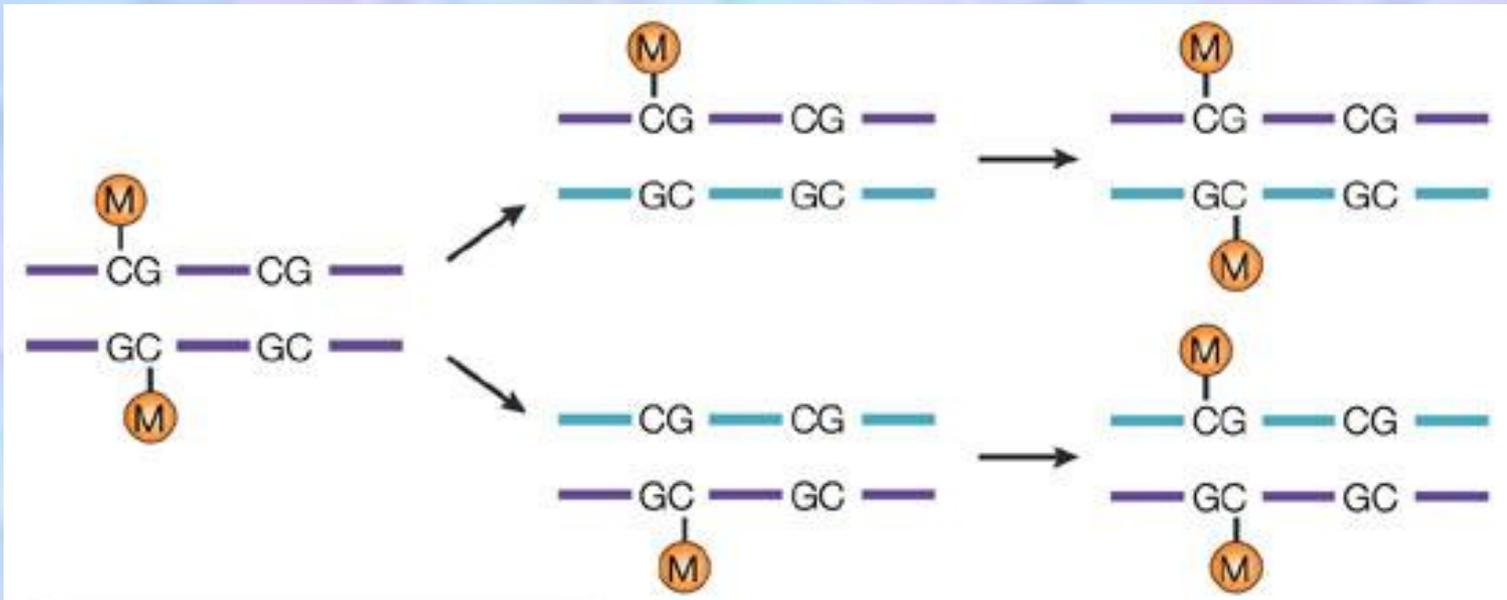
CpG в неактивных генах обычно метилированы для подавления экспрессии.



При дезаминировании ЦИТОЗИНА образуется УРАЦИЛ. Эта мутация репарируется эффективно.

5-МЕТИЛЦИТОЗИН при дезаминировании образует ТИМИН. Такая замена плохо поддается репарации (только [mismatch repair](#), а она крайне неэффективна).

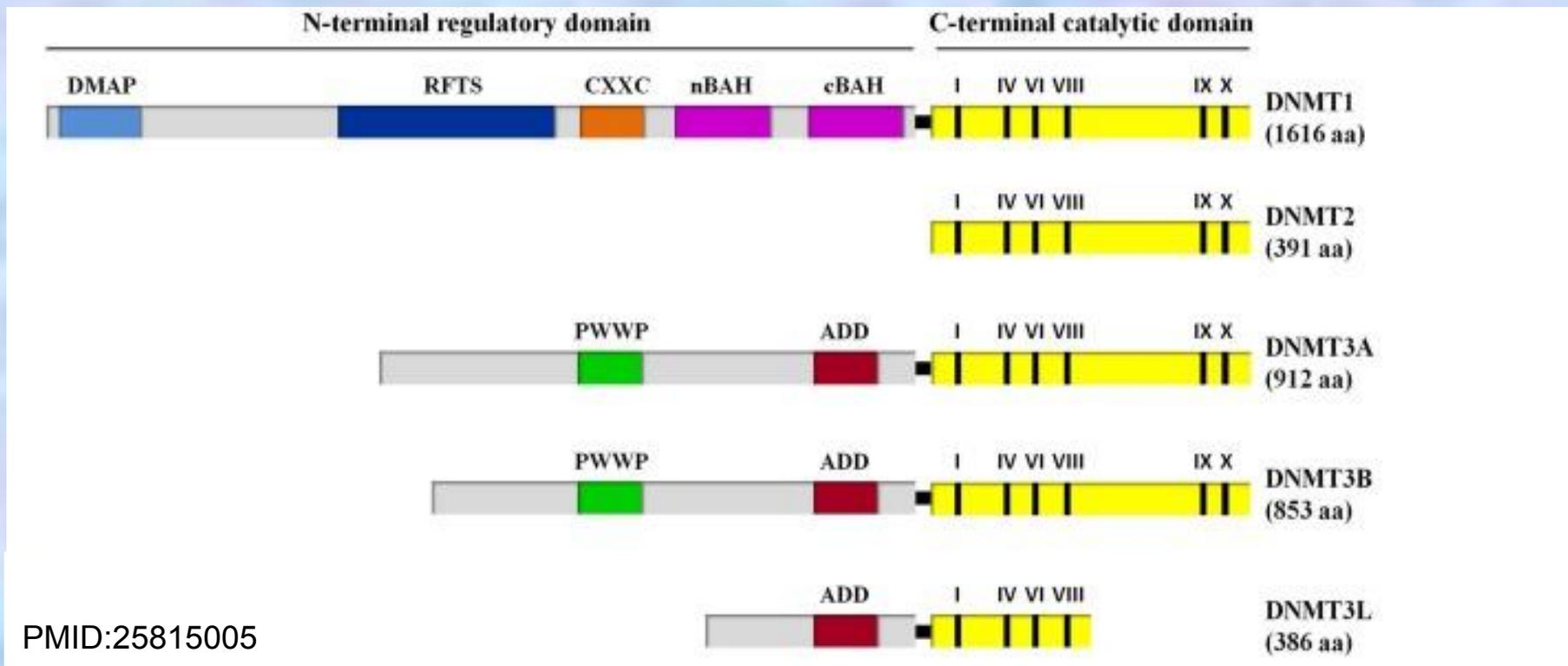
С течением времени метилированные CpG заменяются на TpG. Это может объяснить дефицит CpG в неактивных генах.



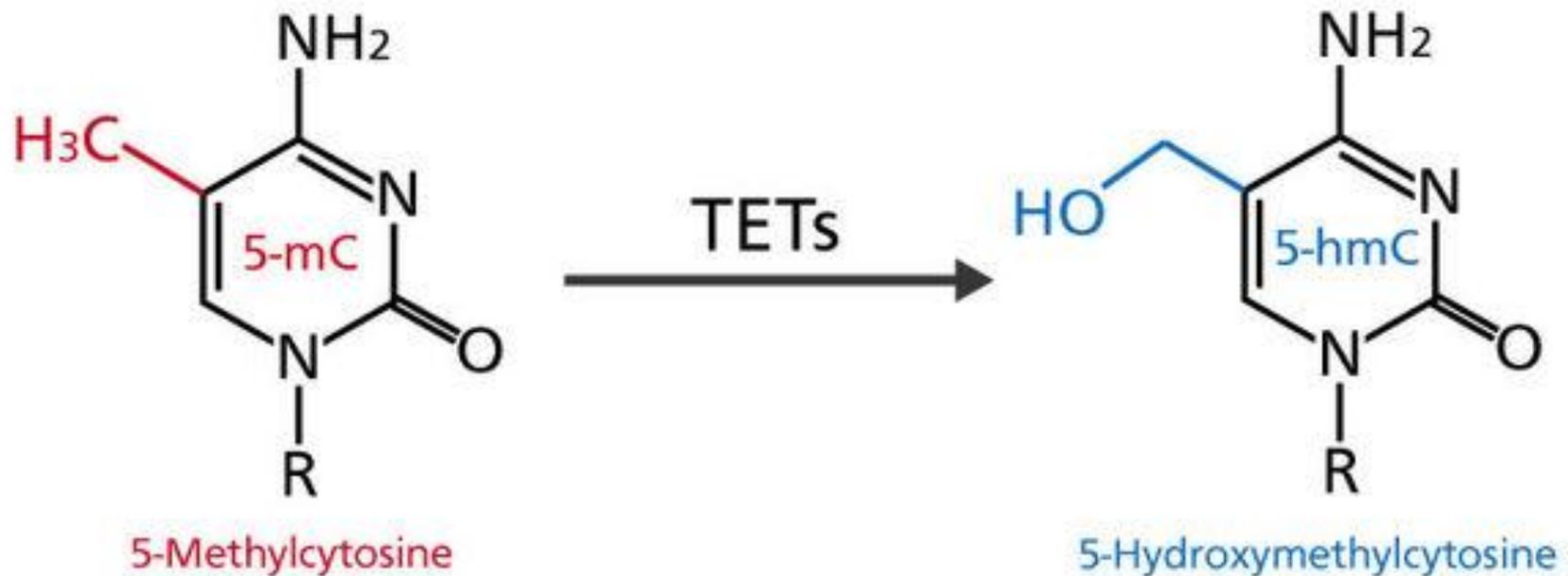
- В ядерной ДНК при эмбриогенезе метилирование осуществляют метилазы DNMT 3a и 3b
- Поддерживает паттерны метилирования в соматических клетках DNMT1

Изначальные паттерны метилирования создаются ДНК метилтрансферазами **DNMT3a** и **3b**, активно работающими в эмбриогенезе. **DNMT3L**, видимо, функционирует в качестве адаптерного белка в процессе метилирования ДНК в гаметогенезе.

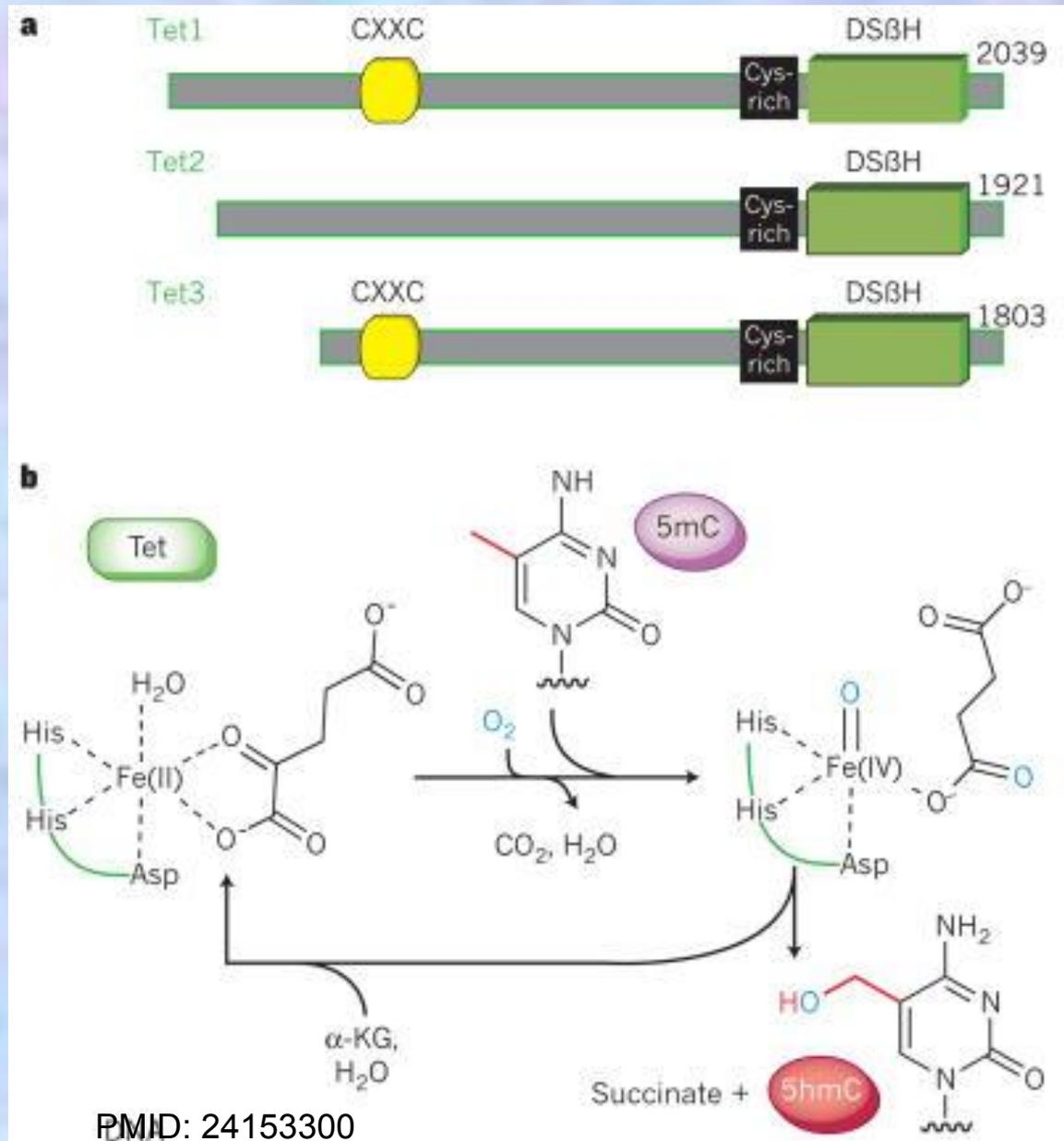
DNMT3a и **3b** (в меньшей степени DNMT1) обладают **de novo метилирующей активностью**. В процессе репликации образуются полуметилированные молекулы ДНК, а за восстановление и поддержание паттернов метилирования у млекопитающих отвечает **DNMT1**.

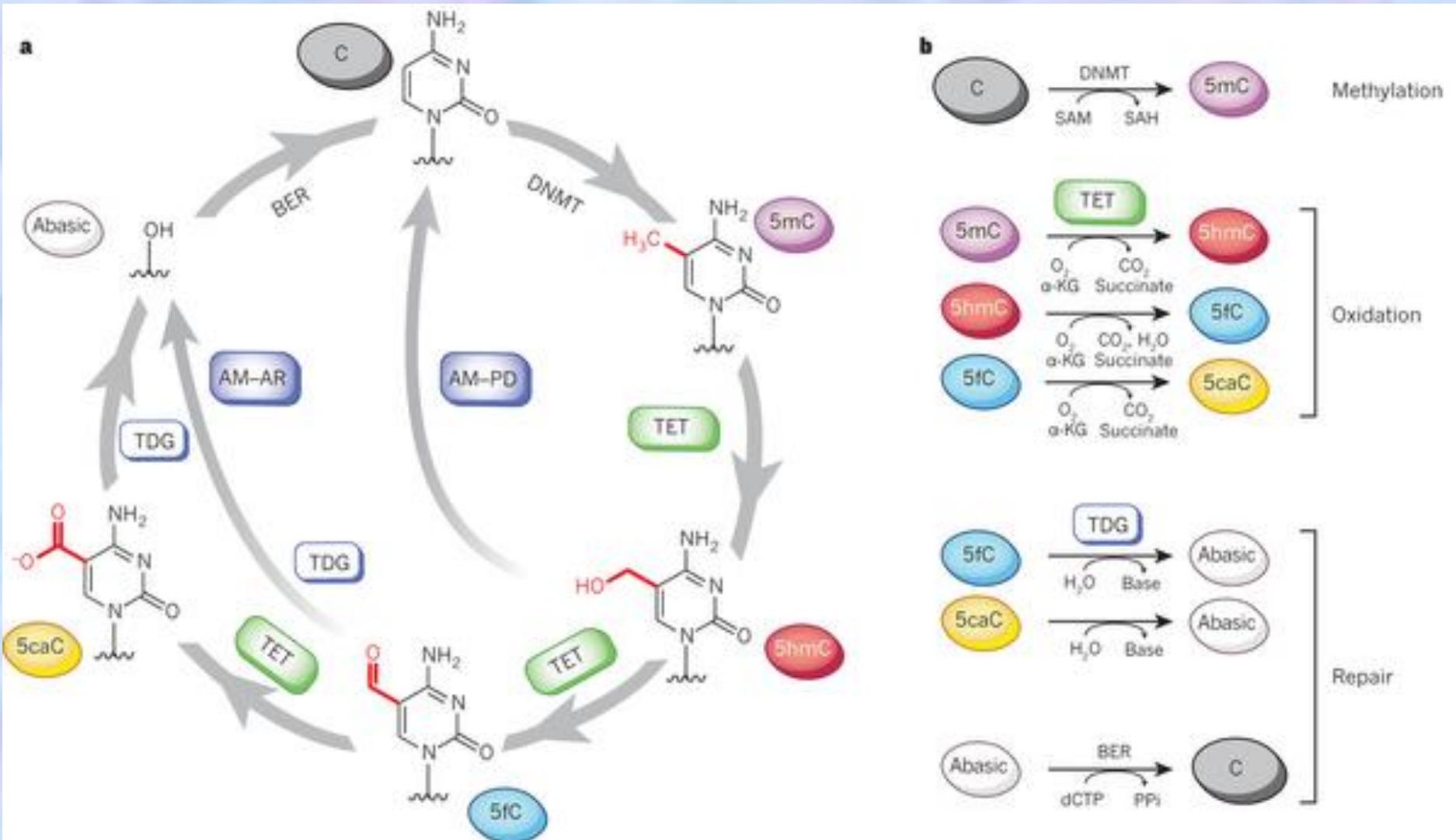


Под воздействием ферментов семейства ТЕТ (ten eleven translocation) происходит окисление 5mC с образованием 5-гидроксиметилцитозина (5hmC)

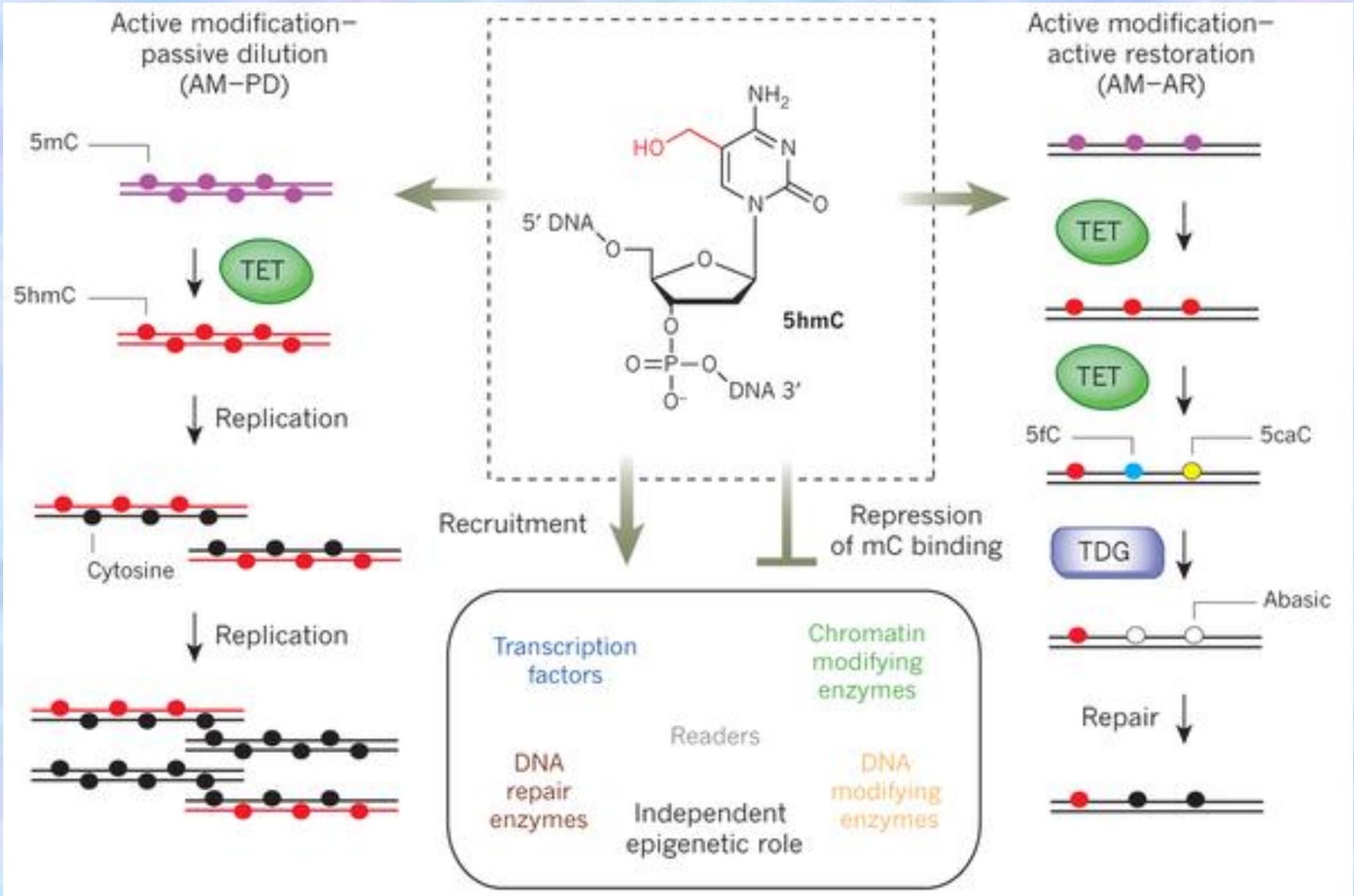


Структура и механизм работы ферментов семейства TET (ten eleven translocation)





PMID: 24153300



PMID: 24153300

Стохастическая модель метилирования

метилирование в каждом сайте - результат двух противоположных процессов – метилирования и деметилирования, зависящих от:

- активности ДНК метилтрансфераз
- ферментов семейства ТЕТ
- состояния хроматина

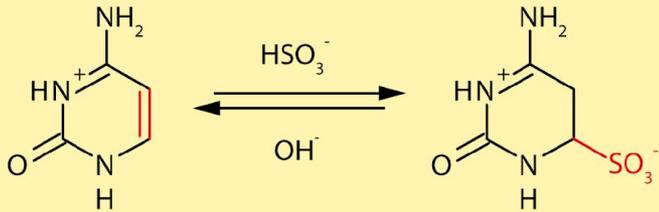
Бисульфитное секвенирование

Bisulfite-mediated conversion of cytosine to uracil

Sulphonation

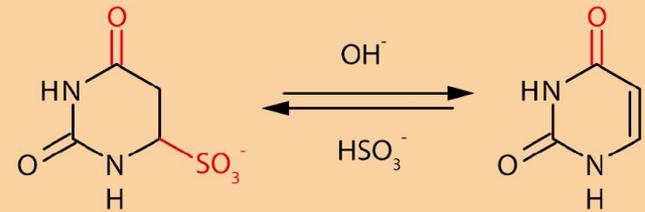
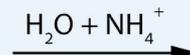
Hydrolytic deamination

Desulphonation



Cytosin

Cytosinsulphonate



Uracilsulphonate

Uracil

Tollefsbol T (ed.): Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. 1st edition. London, San Diego: Academic Press, 2011.

PM

Allele 1 (methylated)

---ACTCCACGG---TCCAT^mCGCT---
---TGAGGTGCC---AGGTAG^mCGA---

Allele 2 (unmethylated)

---ACTCCACGG---TCCATCGCT---
---TGAGGTGCC---AGGTAGCGA---

Bisulfite treatment

---AUTUUAUGG---TUUATCGUT---

---AUTUUAUGG---TUUATUGUT---

---TGAGGTGUU---AGGTAGCGA---

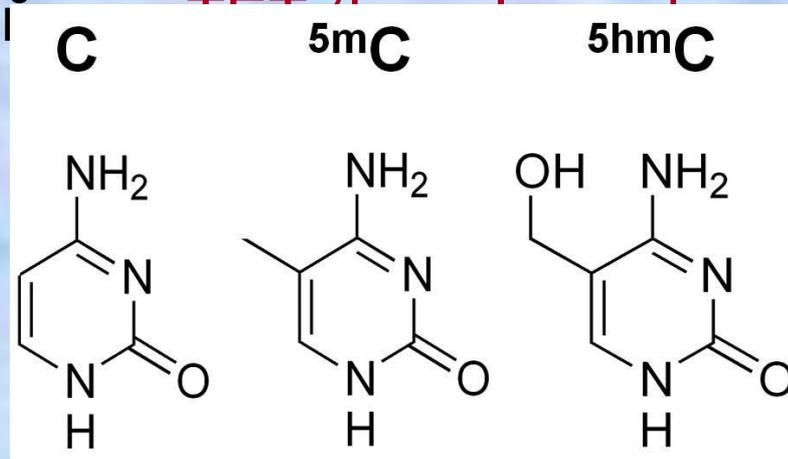
---TGAGGTGUU---AGGTAGUGA---

PCR

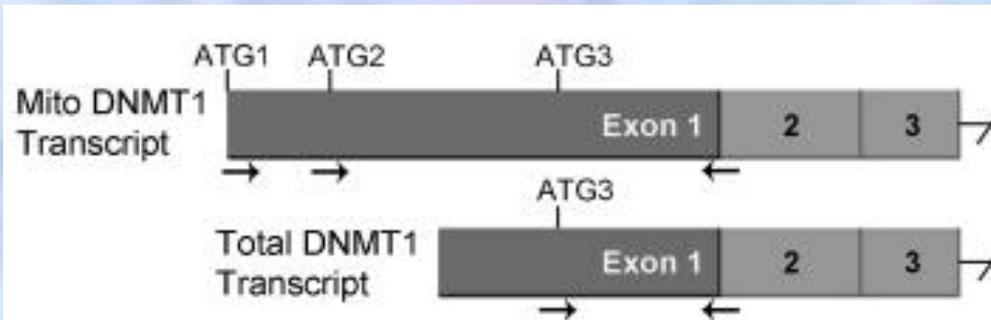
Differentiation of bisulfite-generated polymorphisms

Метилирование мтДНК

- Открыто в 1974 году
- До 2019 года были неизвестны точные места метилирования
- Неизвестна функциональная роль метилирования
- В 2010 году определен фермент, осуществляющий метилирование мтДНК - **DNMT1 (DNA methyltransferase 1)**
- В мт ДНК присутствует не только **5mC**, но и **5hmC**. Последний образуется из первого при окислении ферментами семейства **TET** (location)



Митохондриальная форма DNMT1



HUMAN DNMT1

X M N E C L G H R T H L P A N R G A W
 tga ATG₁ aat gaa tgc ctc ggg cac cgt gcc cac ctc cca gca aac cgt gga gct tgg

T S P L L R V G G V C A R L A H A C S L
 acg agc cca ctg ctc cgc gtg ggg ggg gtg tgt gcc cgc ctt gcg cat gcg tgt tcc ctg

G M A G S V P S F C T G Y R L
 ggc ATG₂ gcc GGC TCC GTT CCA TCC TTC TGC ACA GGG TAT CGC CTC

S P F G T S P P P P R P D W
 TCT CCG TTT GGT ACA TCC CCT CCT CCC CCA CGC CCG GAC TGG

G G R R R L R S S P L P I G
 GGT GGT AGA CGC CGC CTC CGC TCA TCG CCC CTC CCC ATC GGT

F R A K S R G A A A A A A A A
 TTC CGC GCG AAA AGC CGG GGC GCC TGC GCT GCC GCC GCC GCG

S A E S A E M P A R T A P A
 TCT GCT GAA GCC TCC GAG ATG₃ CCG GCG CGT ACC GCC CCA GCC

R V P T L A V
 CGG GTG CCC ACA CTG GCC GTC...

MOUSE DNMT1

X P G G V G A S V A R M R T P F G H S
 tag cca gga ggt gtg ggt gcc tcc gtt gcg cgc ATG₁ cgc act ccc ttc ggg cat agc

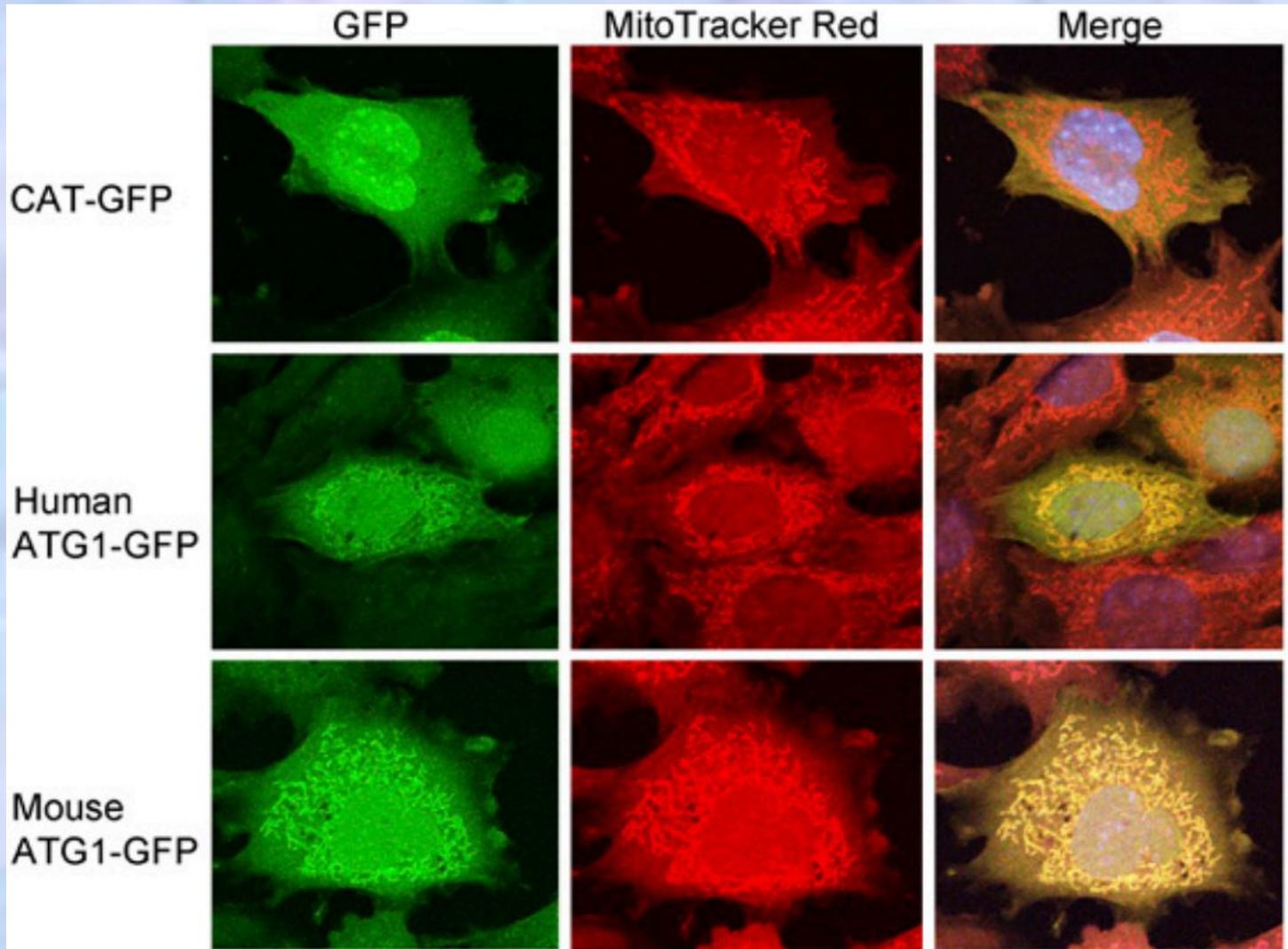
M V F P H S L A L C G T C C F R L R R
 ATG₂ gtc ttc ccc cac tct ctt gcc ctg tgt ggt aca tgc tgc ttc cgc tTG CGC CGC

P L P I G F R A R E K A G V
 CCC CTC CCA ATT GGT TTC CGC GCG CGC GAA AAA GCG GGG GTC

S F R A V L S S A T C K M P
 TCG TTC AGA GCT GTT CTG TCG TGT GCA ACC TGC AAG ATG₃ CCA

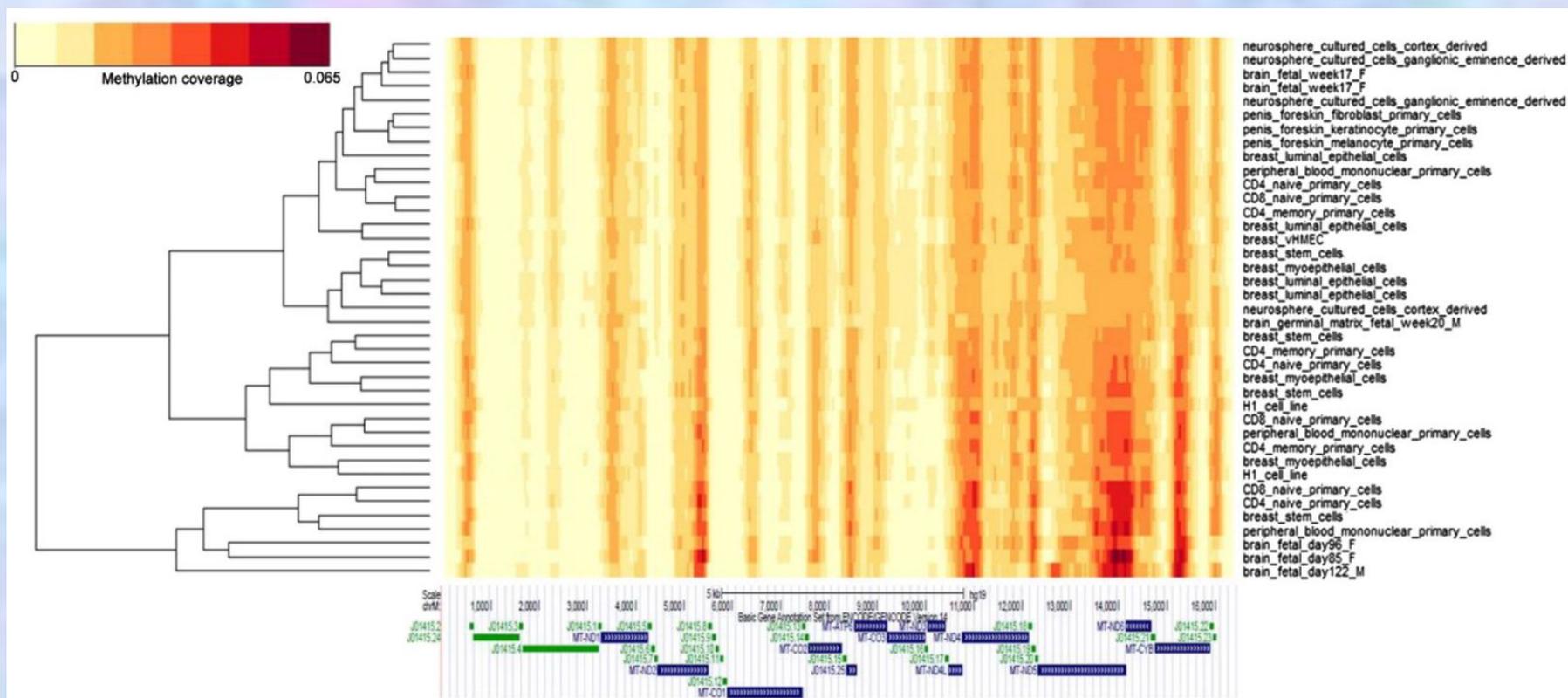
A R T A P A R V P A L A S
 GCG CGA ACA GCT CCA GCC CGA GTG CCT GCG CTT GCC TCC ...

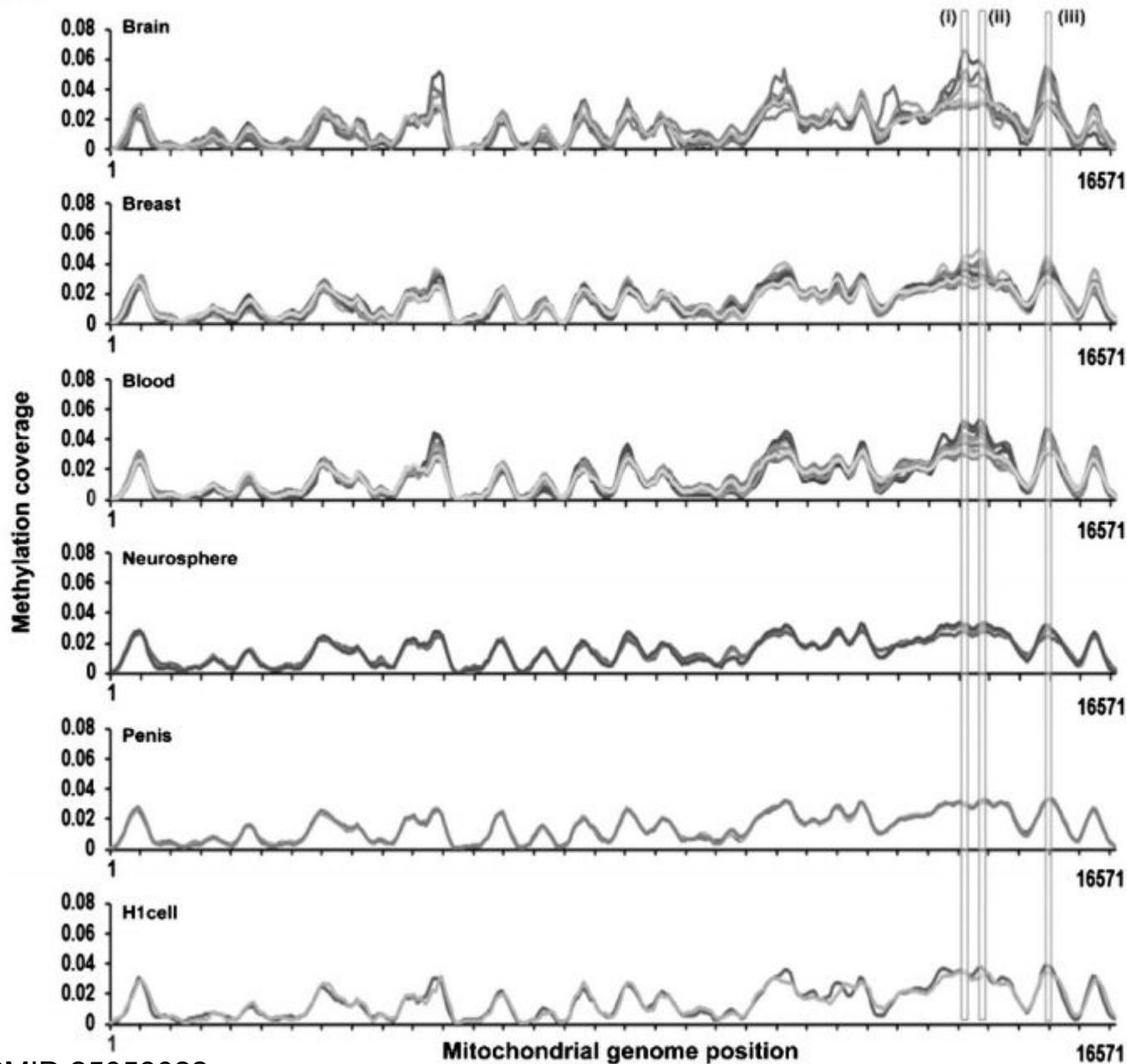
Лидерные пептиды DNMT1 слитые с GFP локализованы в митохондриях



PMID:21321201

Распределение 5mC по митохондриальному геному человека в разных клеточных линиях и тканях

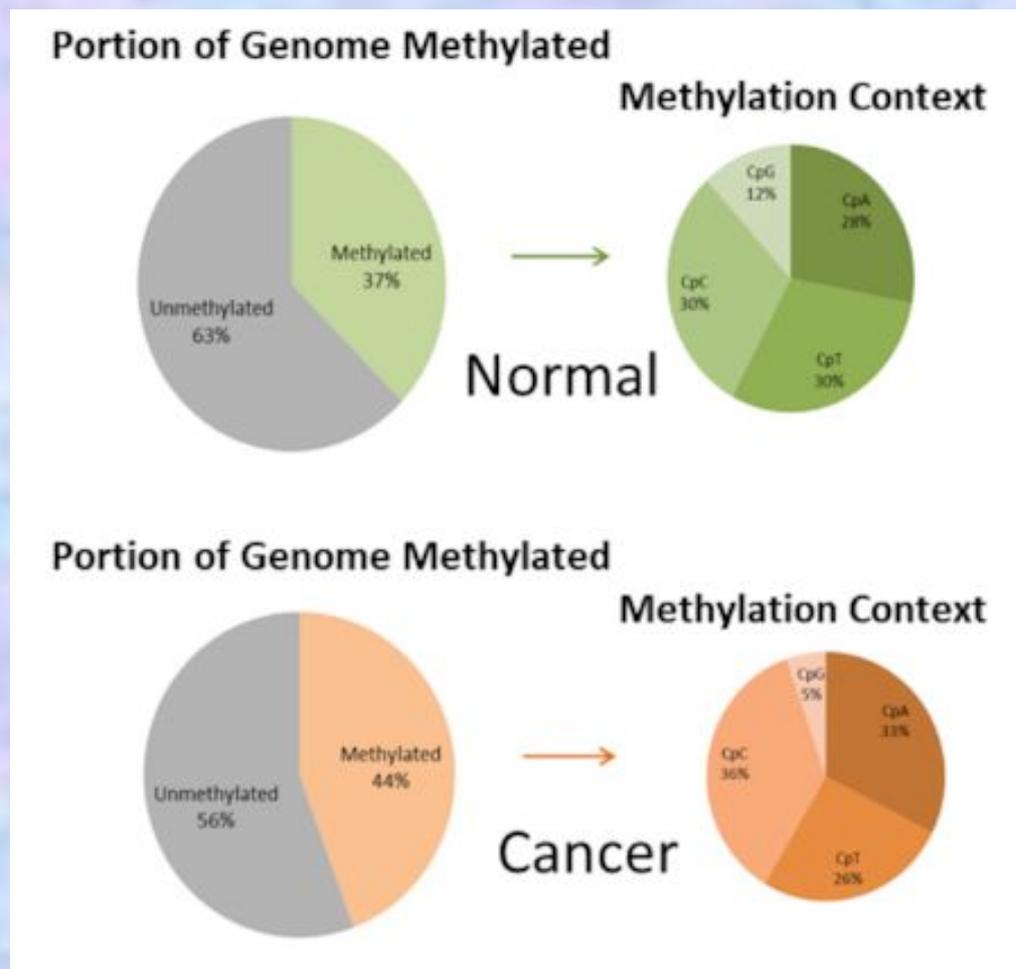




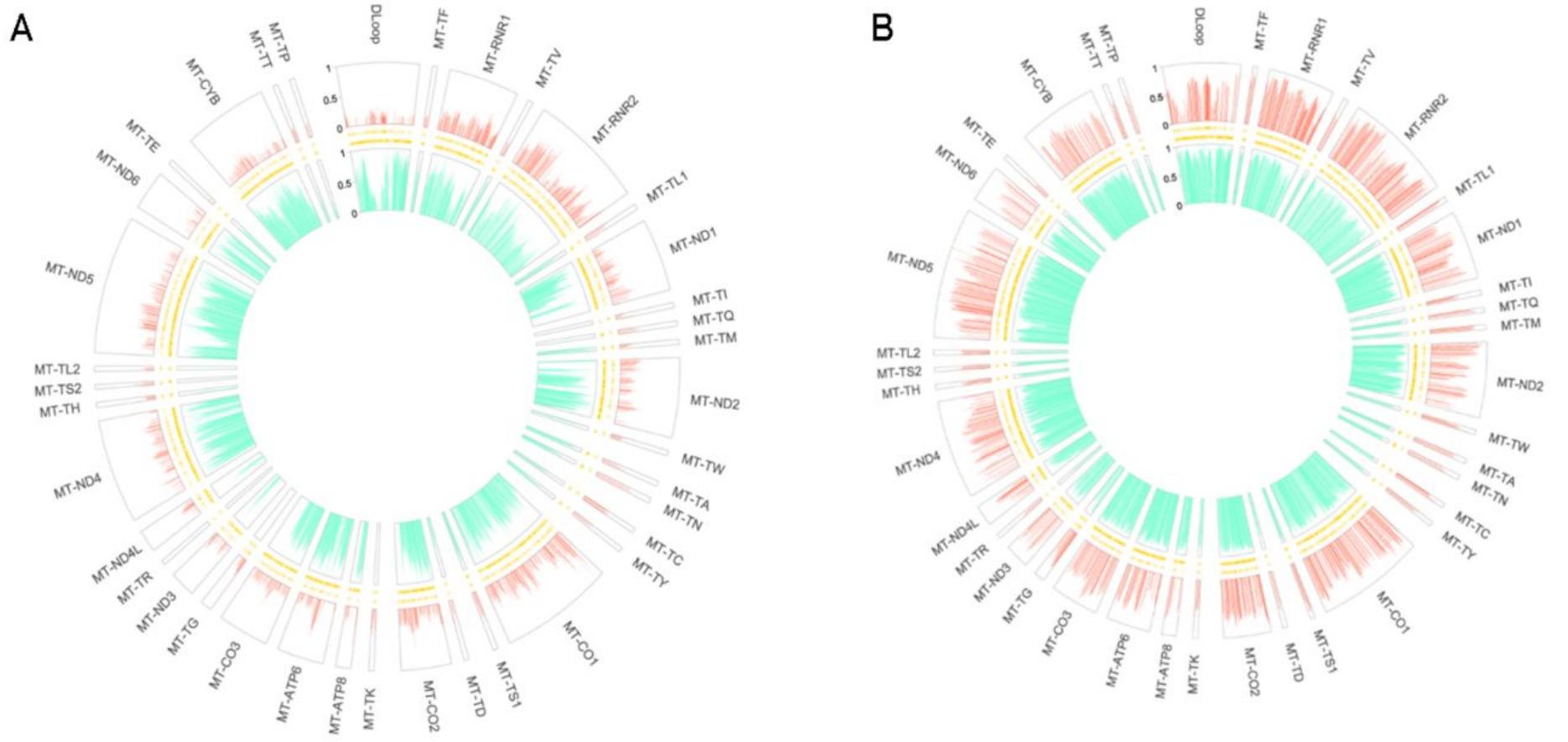
Профиль метилирования консервативен, за исключением трех областей:

- 14050-14150,
- 14350-14450,
- 15450-15550

Метилирование мтДНК происходит в основном не по CpG-сайтам



Метилирование мтДНК происходит по-разному в нормальных и раковых клетках



А – гепатоциты

В – раковые клетки печени

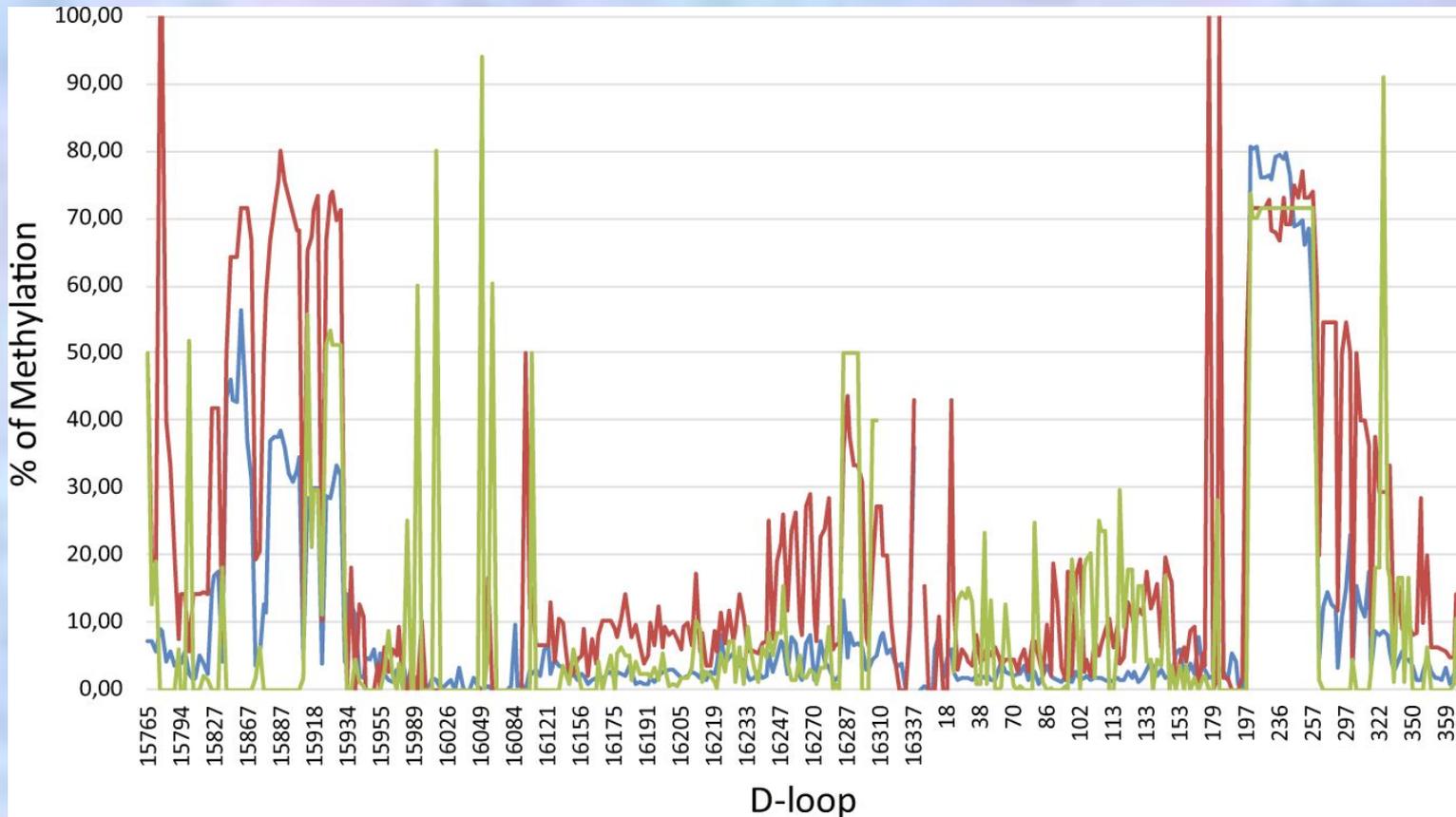
Внешнее кольцо – H-цепь

Внутр.кольцо – L-цепь

PMID: 31665742

Первая работа с определением метилирования мтДНК с разрешением 1 нуклеотид (2019 г.)

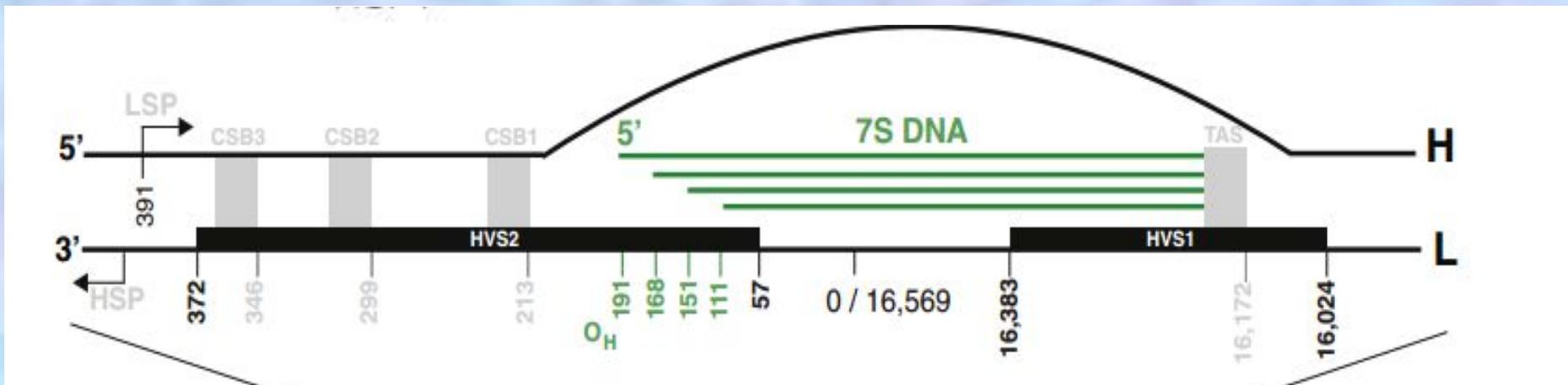
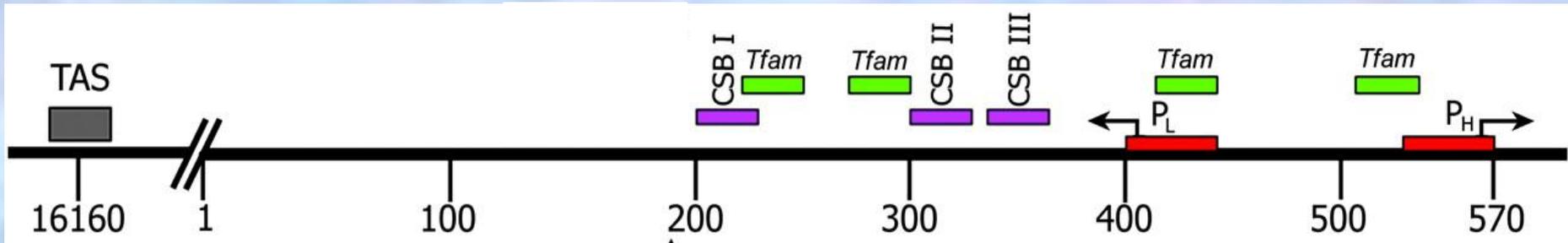
Уровень метилирования мтДНК повышается в ходе процессов развития



Синий – зигота
Красный – бластоциста
Зеленый – гранулезная клетка (соматическая)

И так не только в D-петле, а по всей мтДНК.

- Метилирование мтДНК в области D-loop преимущественно происходит не в CpG последовательностях.
- Метилирование в D-loop в основном происходит в области промоторов и CSB участков => возможно, метилирование регулирует транскрипцию и/или репликацию.

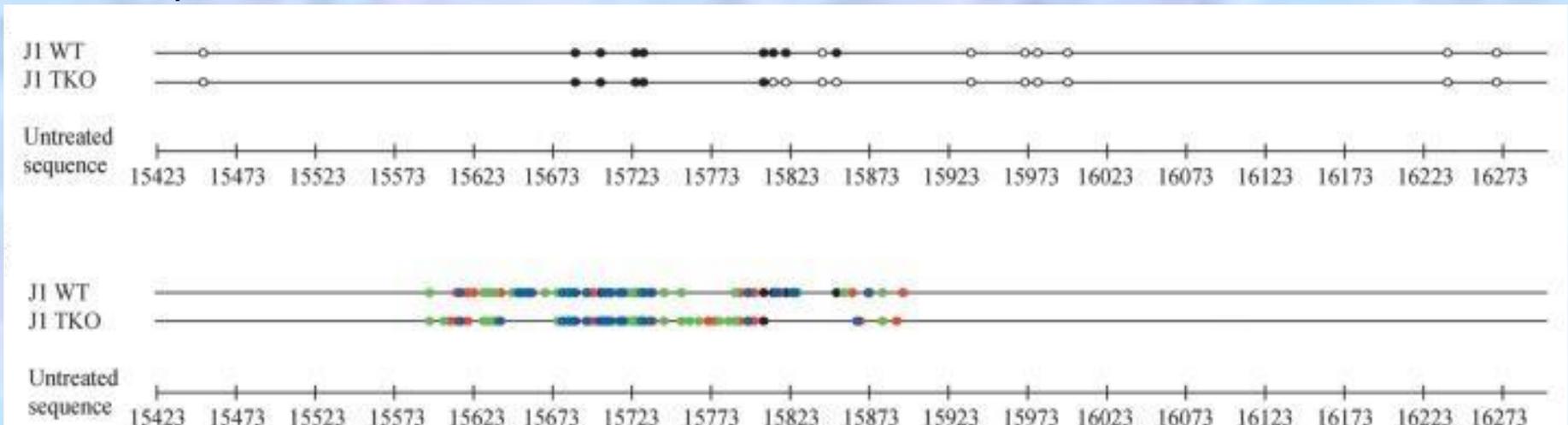


Одновременная инактивация DNMT3a, 3b и DNMT1 уменьшает CpG метилирование в D-loop и слабо влияет на метилирование в других сайтах.

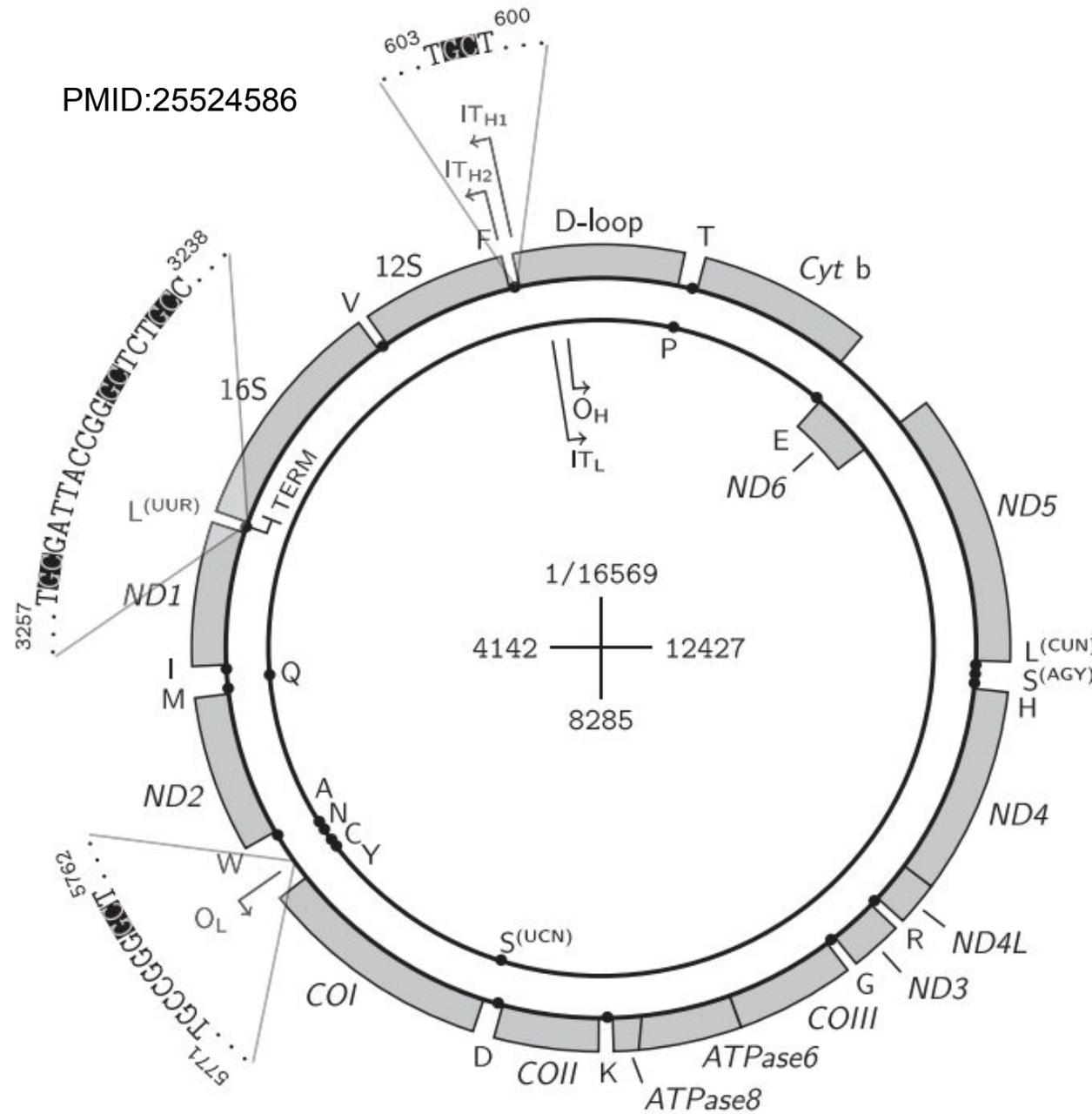
Метилирование в эмбриональных стволовых клетках мыши:

Wt – дикий тип

ТКО - тройной делетант *Dnmt1*^{-/-}, *Dnmt3a*^{-/-}, and *Dnmt3b*^{-/-}



PMID:25524586

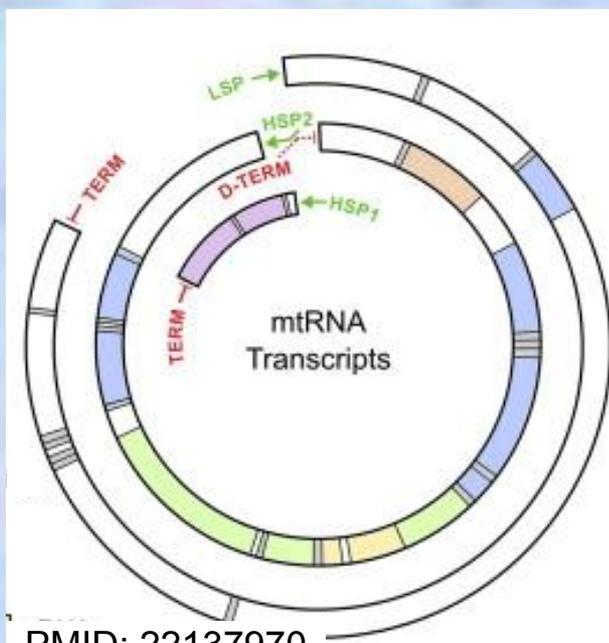
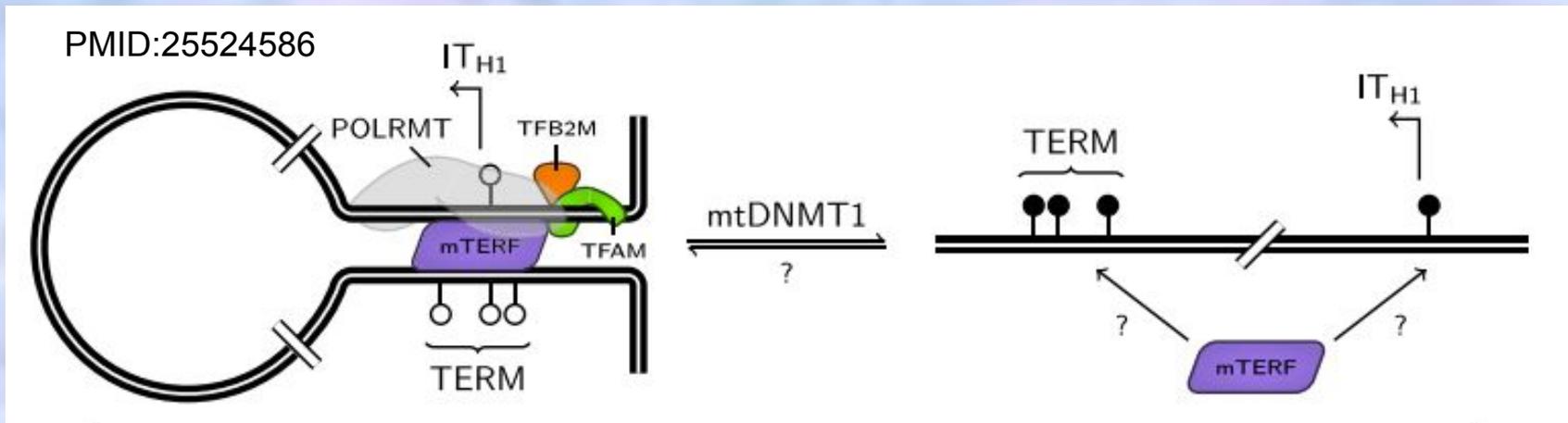


Как и в ядерной ДНК в мтДНК мало динуклеотидов CpG – 435 на 16659

4747 остатков C расположены вне CpG

CpG в некоторых регуляторных областях защищены от метилирования

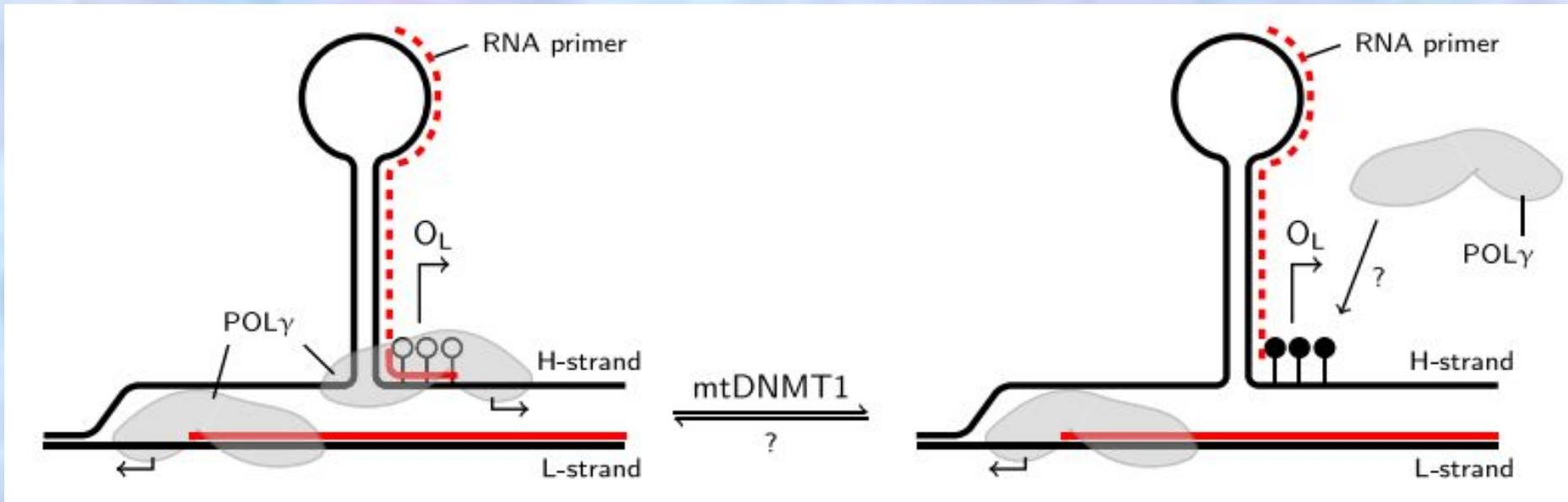
Возможная регуляция транскрипции с помощью метилирования



СрG в области TERM защищены от метилирования (*in vitro*) предположительно из-за связывания с белком MTERF – основным фактором терминации транскрипции.

Возможная регуляция репликации с помощью метилирования

PMID:25524586



Когда происходят изменения в метилировании мтДНК?

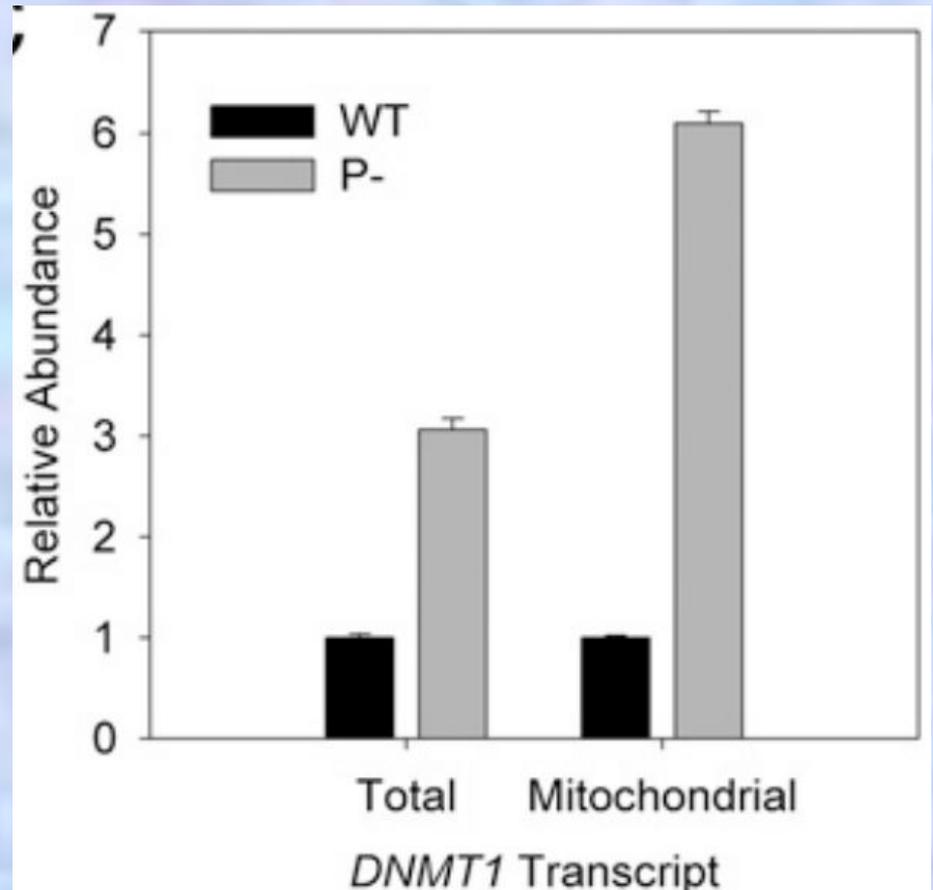
- В ответ на изменения во внешней среде (загрязнение воздуха, окислительный стресс)
- Различные онкологические заболевания могут сопровождаться гиперметилированием мтДНК
- Возможно, изменение метилирования связано со старением

- Гиперметилирование генов 12S рРНК, Phe-тРНК и области D-петли наблюдалось у рабочих, профессиональная деятельность которых связана с длительной работой на загрязненном воздухе
- Экспрессия mtDNMT1 регулируется факторами транскрипции, активирующимися при окислительном стрессе:
 - **NRF1** - Nuclear respiratory factor 1
 - **PGC1 α** - PPAR γ (peroxisome-proliferator-activated receptor γ) co-activator-1 α

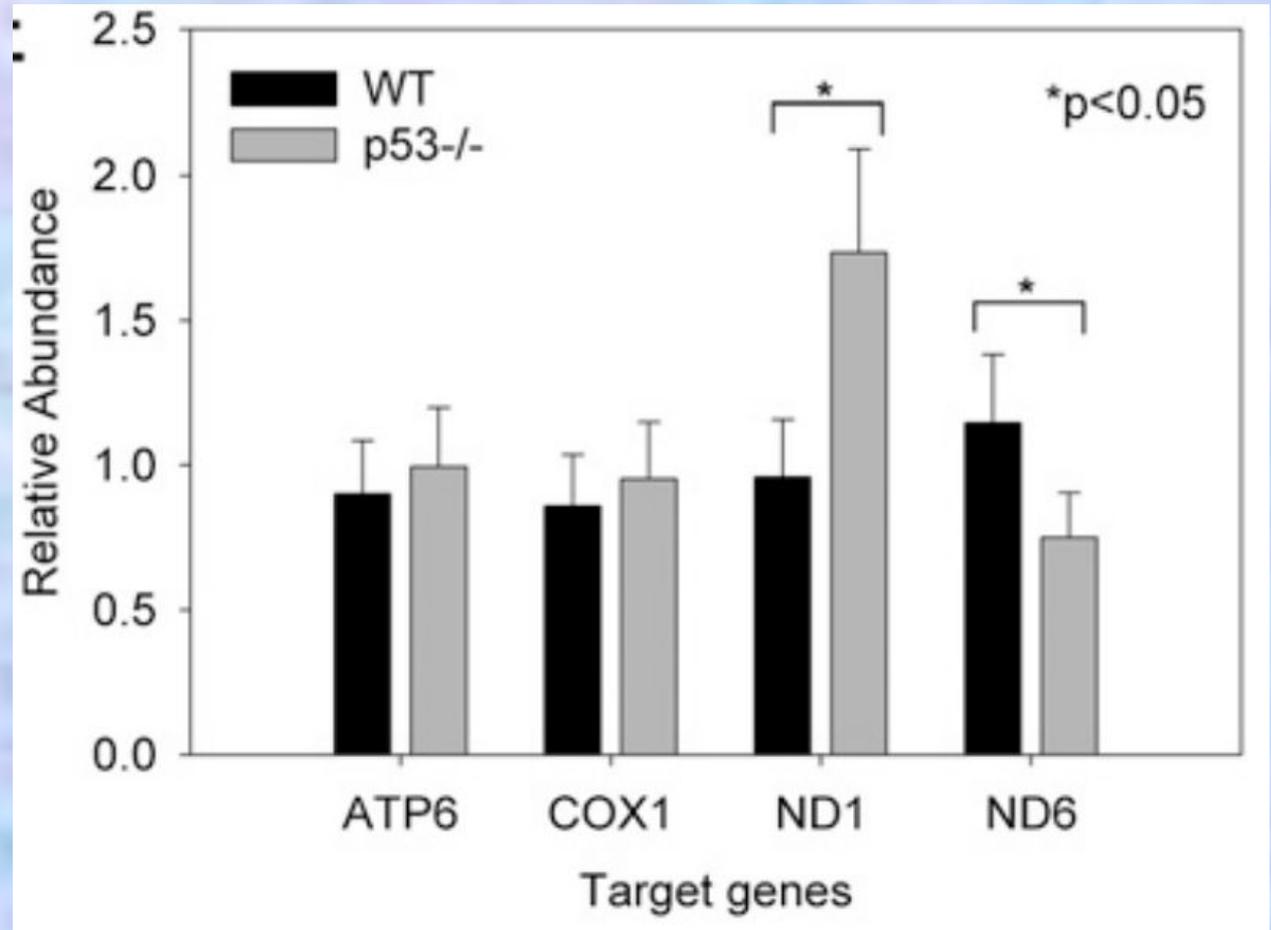
окислительный стресс => PGC1 α \uparrow => NRF1 \uparrow => транскрипция многих ядерных генов, работающих в митохондриях \uparrow (в том числе и *dnmt1*)

p53 снижает экспрессию mtDNMT1

в клетках без p53
количество mtDNMT1
увеличивается в 6 раз



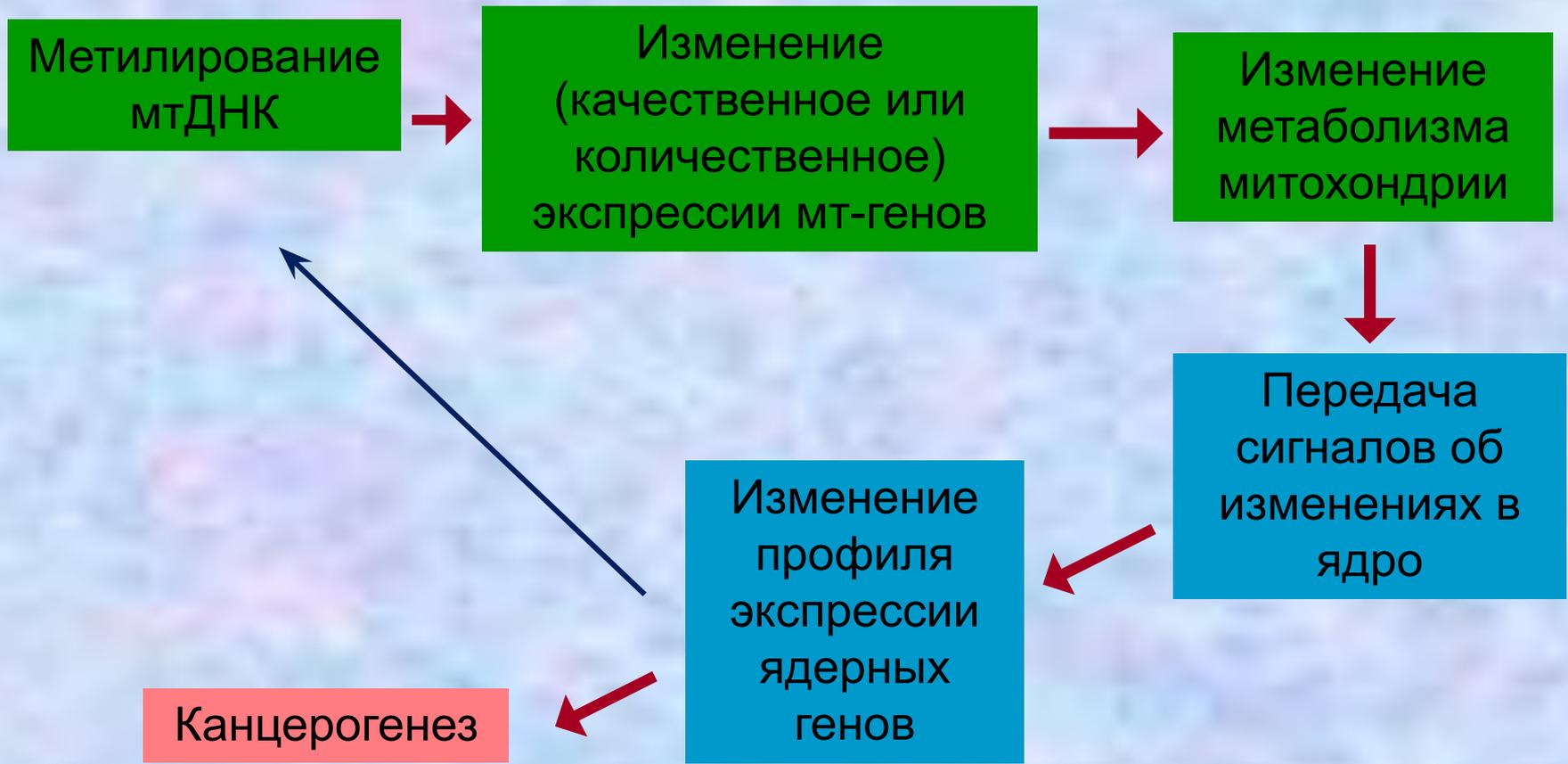
В p53-/- клетках изменена экспрессия некоторых генов мтДНК



-ND6 (L-цепь) ↑

-ND1 (H-цепь) ↓

Возможная связь метилирования мт ДНК с онкологическими заболеваниями



Возможная связь метилирования мт ДНК со старением

- Метилирование цитозина в тканях мозга человека уменьшается в соответствии со стадией развития в областях перед генами – ND6 и ATP6.
- В мтДНК из коры мозга мышей с возрастом увеличивается количество 5hmC, но не 5mC. В мозжечке таких изменений нет. При этом количество транскриптов митохондриальных генов ND2, ND4, ND4L, ND5 и ND6 с возрастом увеличивается в коре, но не в мозжечке. Связаны ли между собой увеличение 5hmC и возрастание уровня транскрипции генов, кодирующих компоненты I комплекса неясно.
- Старение влияет на экспрессию генов ферментов, участвующих в образовании 5mC (mtDNMT1) и 5hmC (TET1-TET3):
 - В коре с возрастом уменьшается уровень мРНК mtDNMT1 и не меняется уровень мРНК TET1-TET3
 - В мозжечке с возрастом увеличивается уровень мРНК TET2 и TET3 и не меняется уровень мРНК mtDNMT1.

Эпигенетические процессы вызывают возрастные нарушения в функционировании митохондрий

Дыхательная цепь пожилых людей работает менее эффективно, чем в молодости, что приводит к формированию «старческого» фенотипа клеток.

Группе проф. Хаяши (PMID: 26435399) удалось восстановить нормальное функционирование дыхательной цепи в клетках со «старческим» фенотипом => причиной были изменения в экспрессии генов, а не мутации.

Показали эпигенетическое снижение экспрессии ядерного гена **GCAT**, (глицин С-ацетилтрансфераза), этот фермент участвует в биосинтезе глицина в митохондриях.

Добавление глицина в среду фибробластам со «старческим» фенотипом частично восстанавливало работу дыхательной цепи.

В образовании глицина в митохондриях участвует также продукт гена SHMT2 – сериновая гидроксиметилтрансфераза.

Сравнили количества мРНК SHMT2 в фибробластах молодых и пожилых людей. У пожилых наблюдалось значимое снижение уровня этой мРНК.

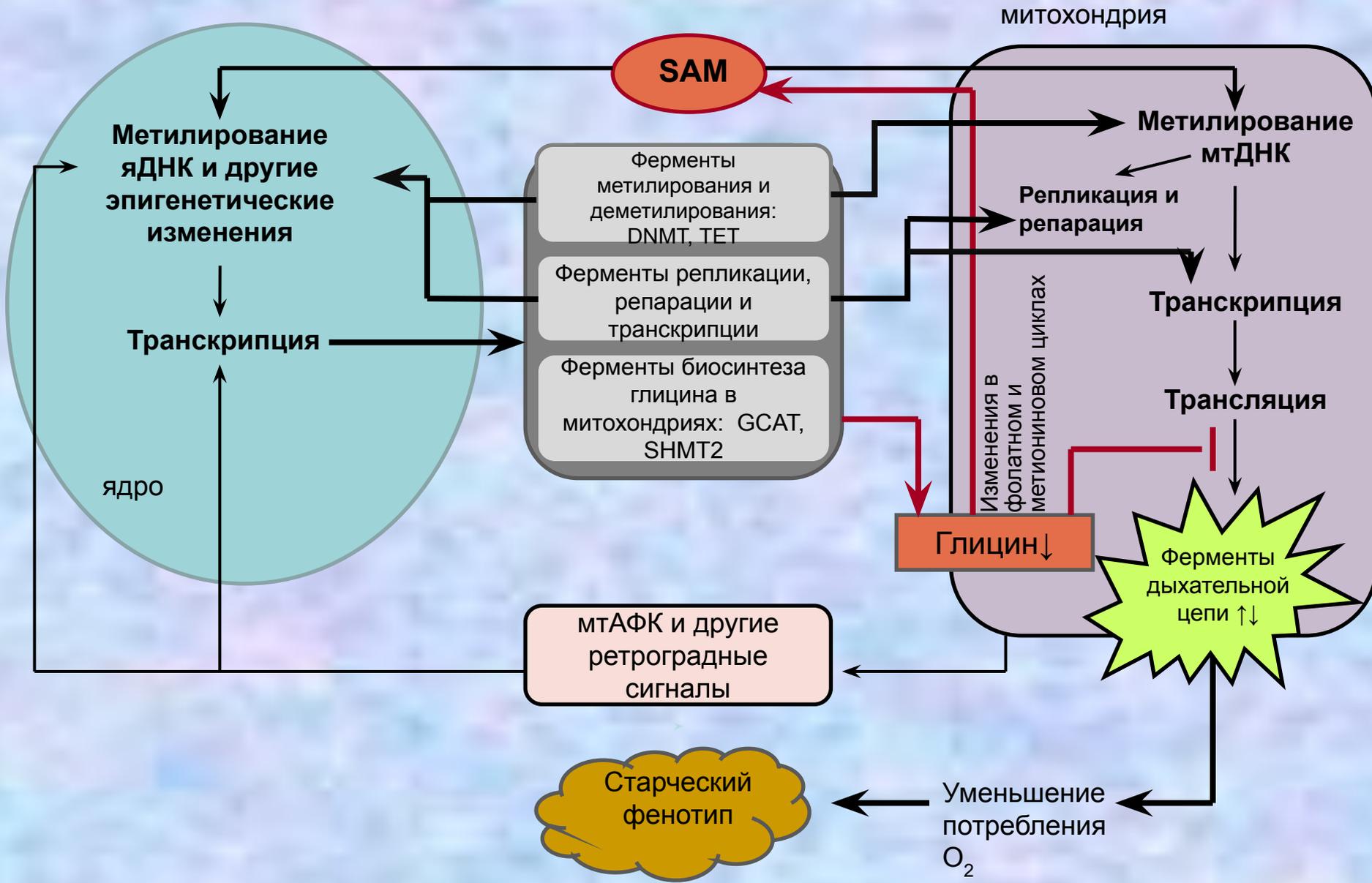
В случае экспериментального снижения экспрессии GCAT и/или SHMT2 в фибробластах молодых пациентов с помощью shRNA и siRNA соответственно, возникали нарушения в работе дыхательной цепи, характерные для «старческого фенотипа».

С возрастом происходит изменение экспрессии генов, продукты которых вовлечены в митохондриальный метаболизм, в частности, в образование глицина из серина (SHMT2) и L-треонина (GCAT).

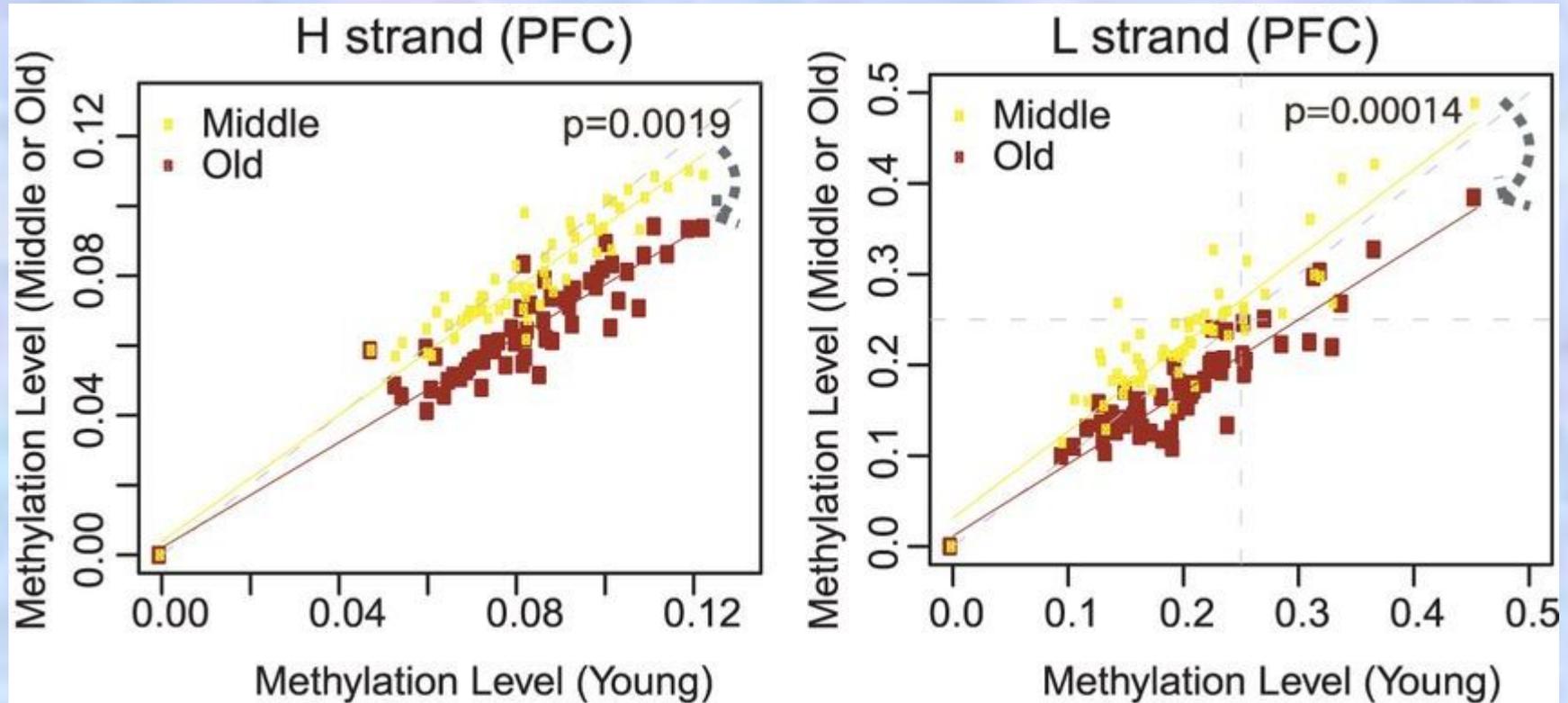
Недостаток глицина в митохондриях => нарушения митохондриальной трансляции => формирование дефектов дыхательной цепи => «старческий фенотип».

митохондриальный и цитоплазматический фолатные циклы, в которых работает SHMT, сопряжены с метиониновым циклом, в котором из метионина синтезируется SAM – донор метильных групп в реакциях метилирования как митохондриальной, так и цитоплазматической ДНК.

Возрастные эпигенетические изменения в митохондриях и ядре → изменение экспрессии ядерных и/или митохондриальных генов → изменение метаболизма митохондрий → формирование старческого фенотипа



Уровень метилированности мтДНК статистически значимо снижается с возрастом



1. Метилирование ядерной ДНК осуществляют ферменты DNMT3a, 3b и DNMT1
2. Метилирование мтДНК осуществляет митохондриальная форма DNMT1, возможно есть и другие метилтрансферазы
3. Метилирование мтДНК в области D-loop преимущественно происходит не в CpG последовательностях
4. Метилирование в D-loop в основном происходит в области промоторов и CSB участков
5. Метилирование может регулировать транскрипцию и/или репликацию мтДНК
6. Метилирование мтДНК может быть связано со старением, канцерогенезом, некоторыми заболеваниями.