

ЭПИГЕНЕТИКА

Часть 2

ИМПРИНТИНГ И НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПАТОЛОГИЯ У ЧЕЛОВЕКА

Геномный импринтинг - эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в процессе развития организма в зависимости от родительского происхождения гена, хромосомы или генома.

Эпигенотип (импринт) - совокупность модификаций, которые по-разному маркируют родительские аллели и обеспечивают моноаллельный характер экспрессии импринтированных генов на хромосомах отцовского или материнского происхождения.

Импринтированный ген - ген, который дифференциально экспрессируется в зависимости от материнского или отцовского происхождения. Импринтированные гены в диплоидной клетке млекопитающих обычно экспрессируются только с одного аллеля.

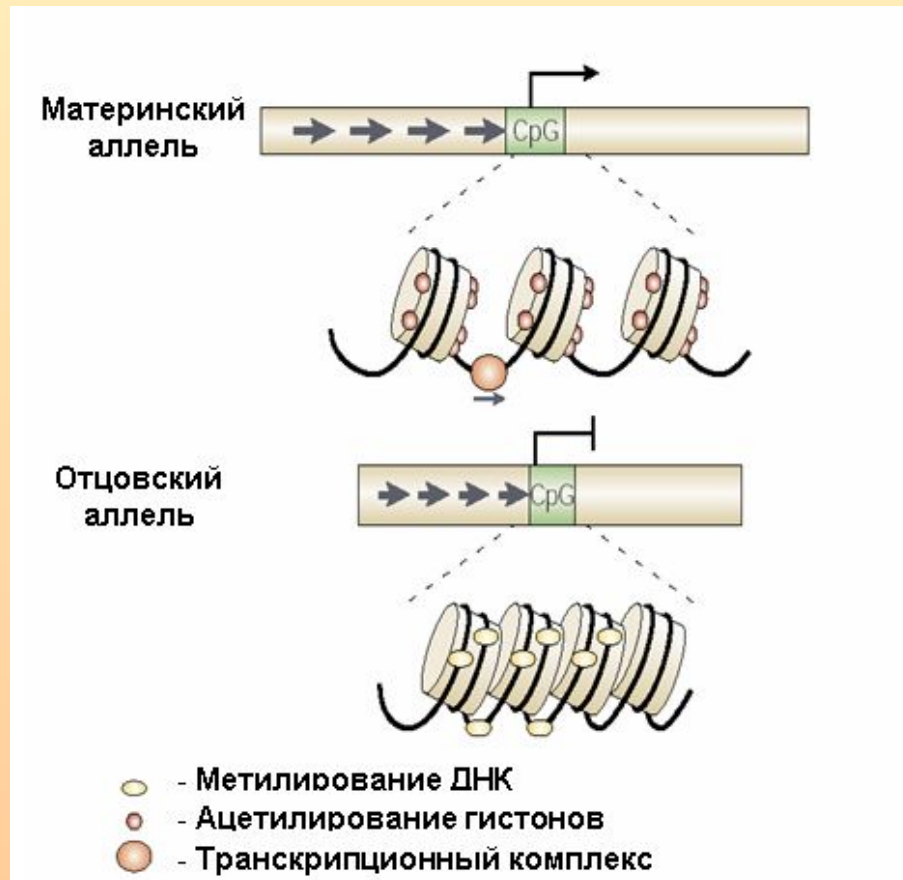
Геномный импринтинг

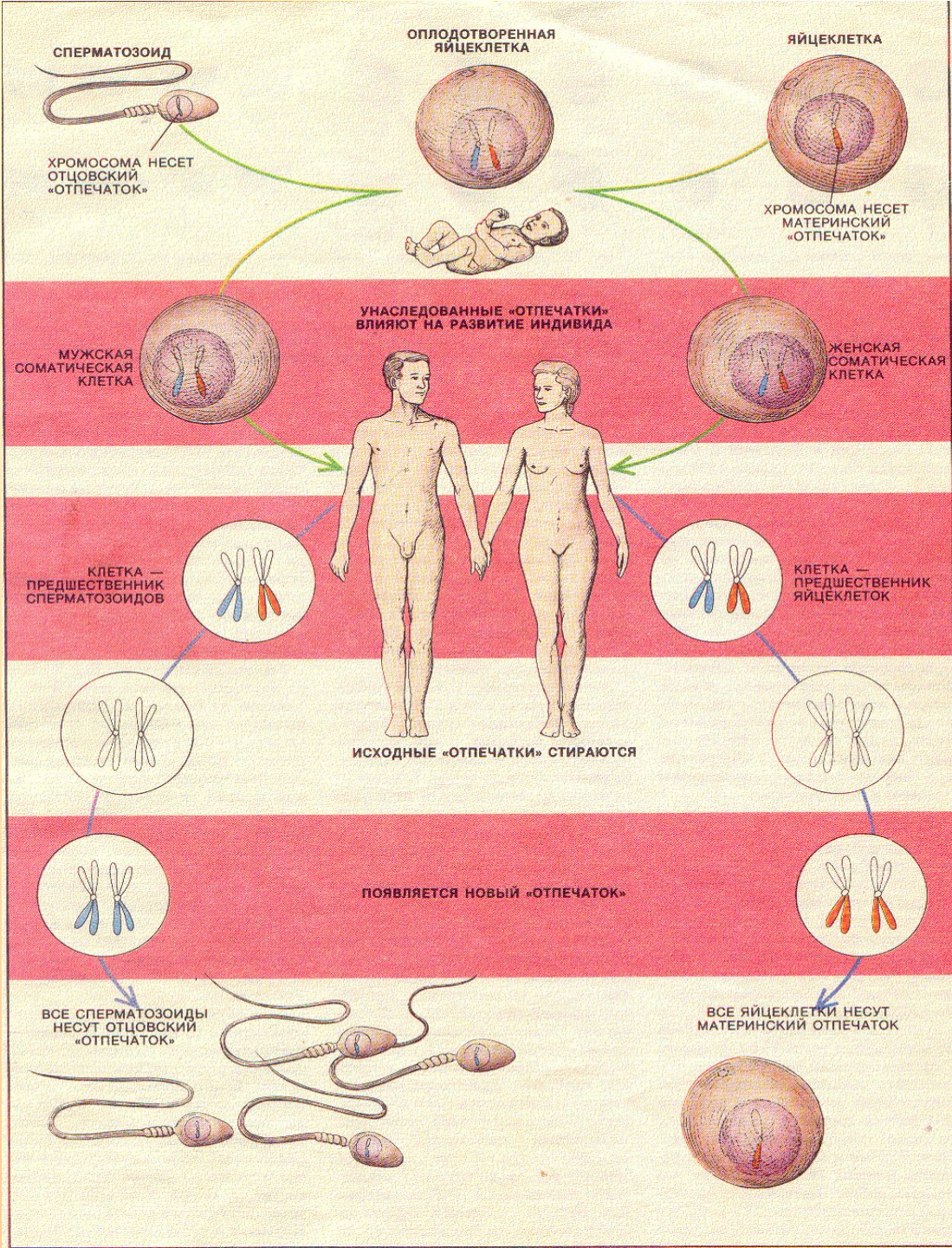
Эпигенетический феномен, дифференцирующий материнские и отцовские копии генов в геноме организма. Подобная дифференцировка обуславливает моноаллельную экспрессию импринтированных генов в зависимости от пола родителя, их передавшего.

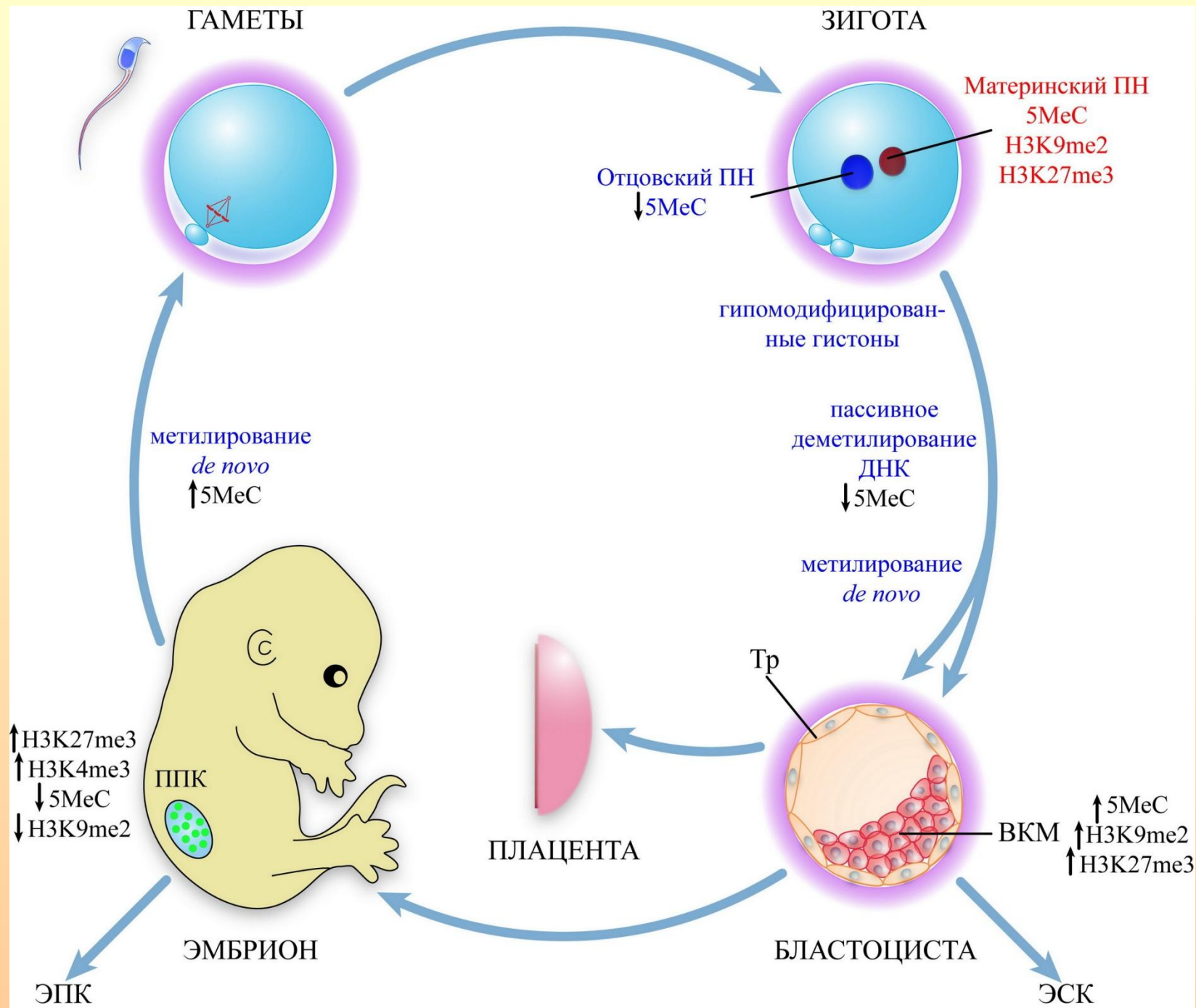


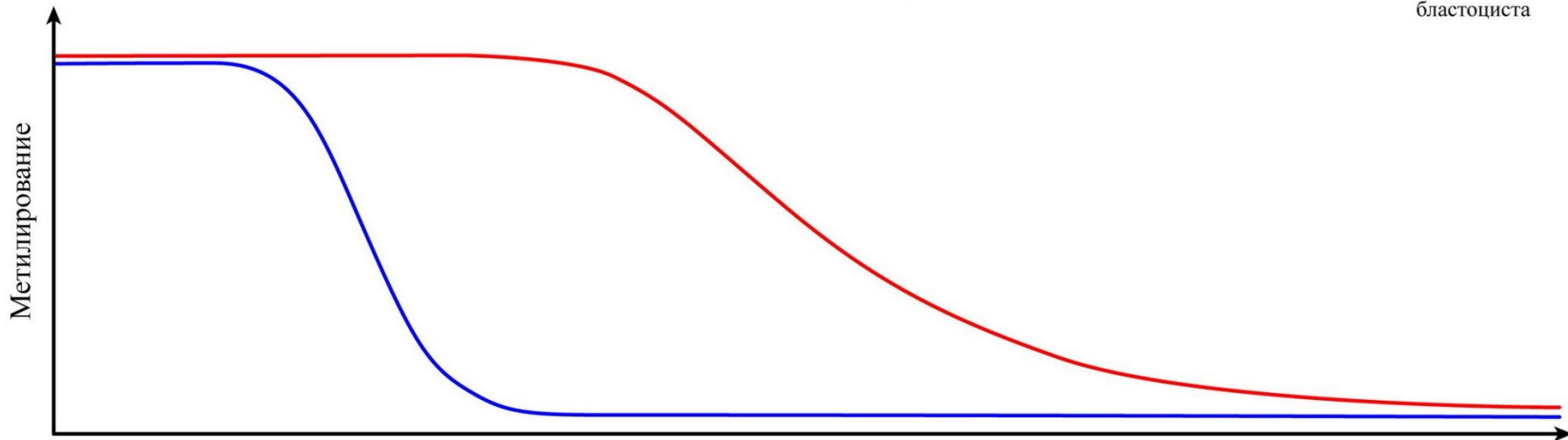
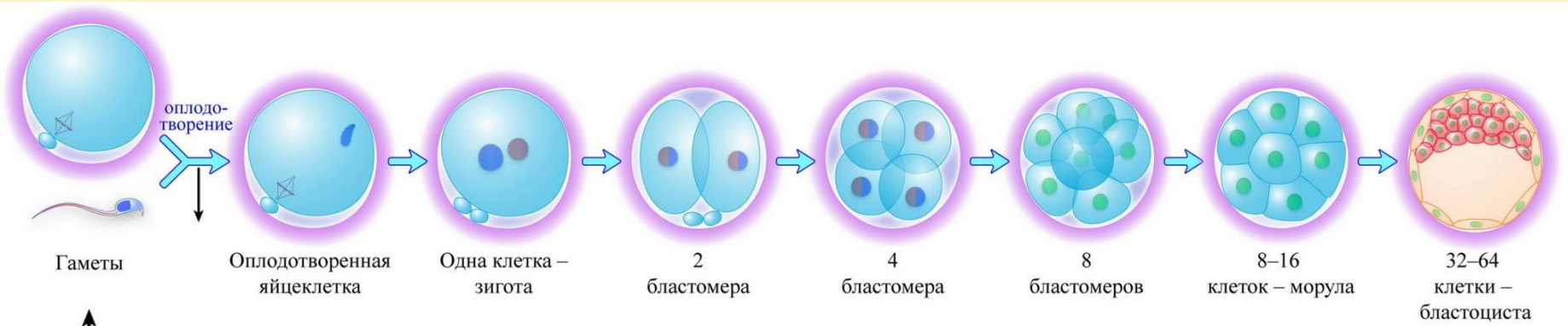
Helen Crouse

В 1960 году предложила термин «хромосомный импринтинг»

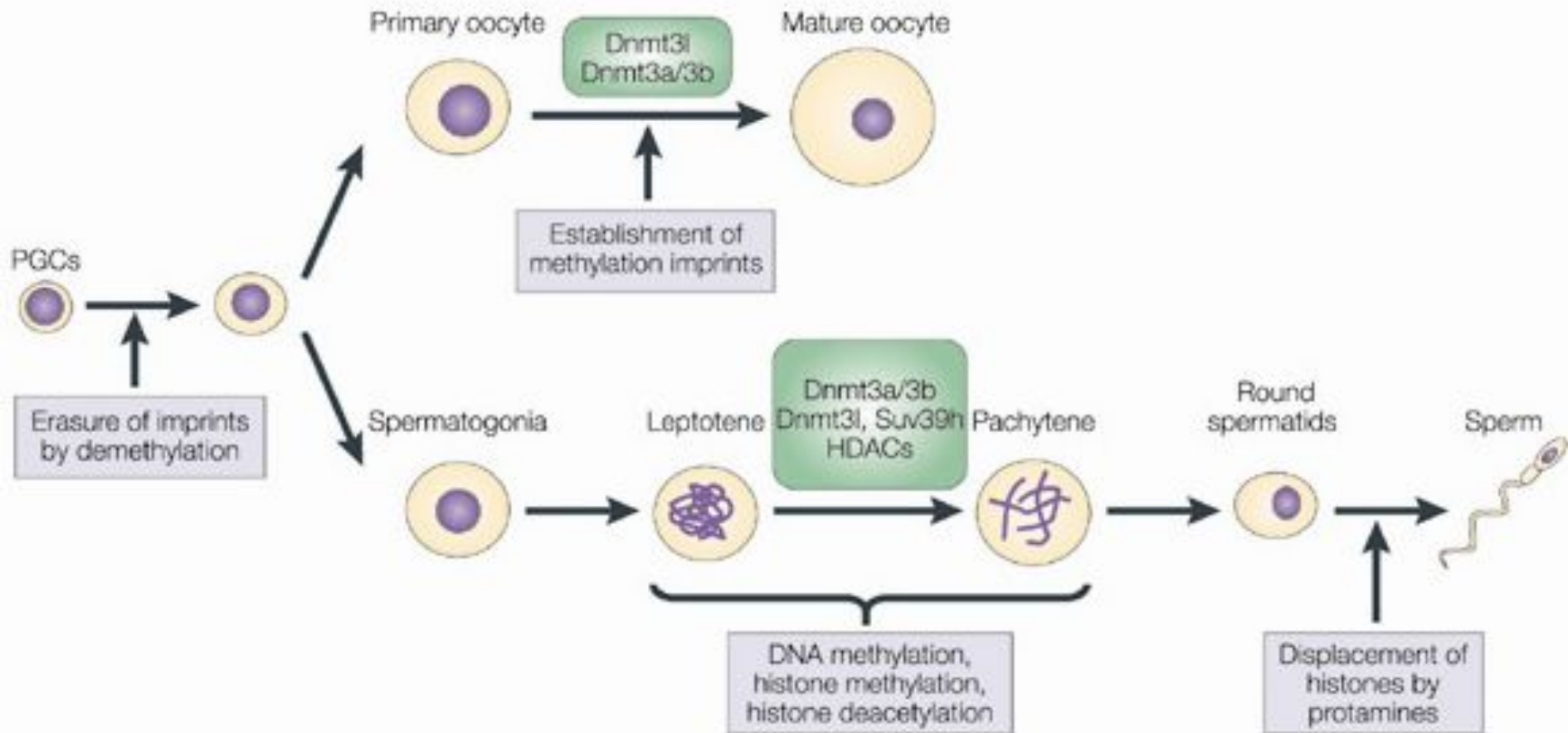


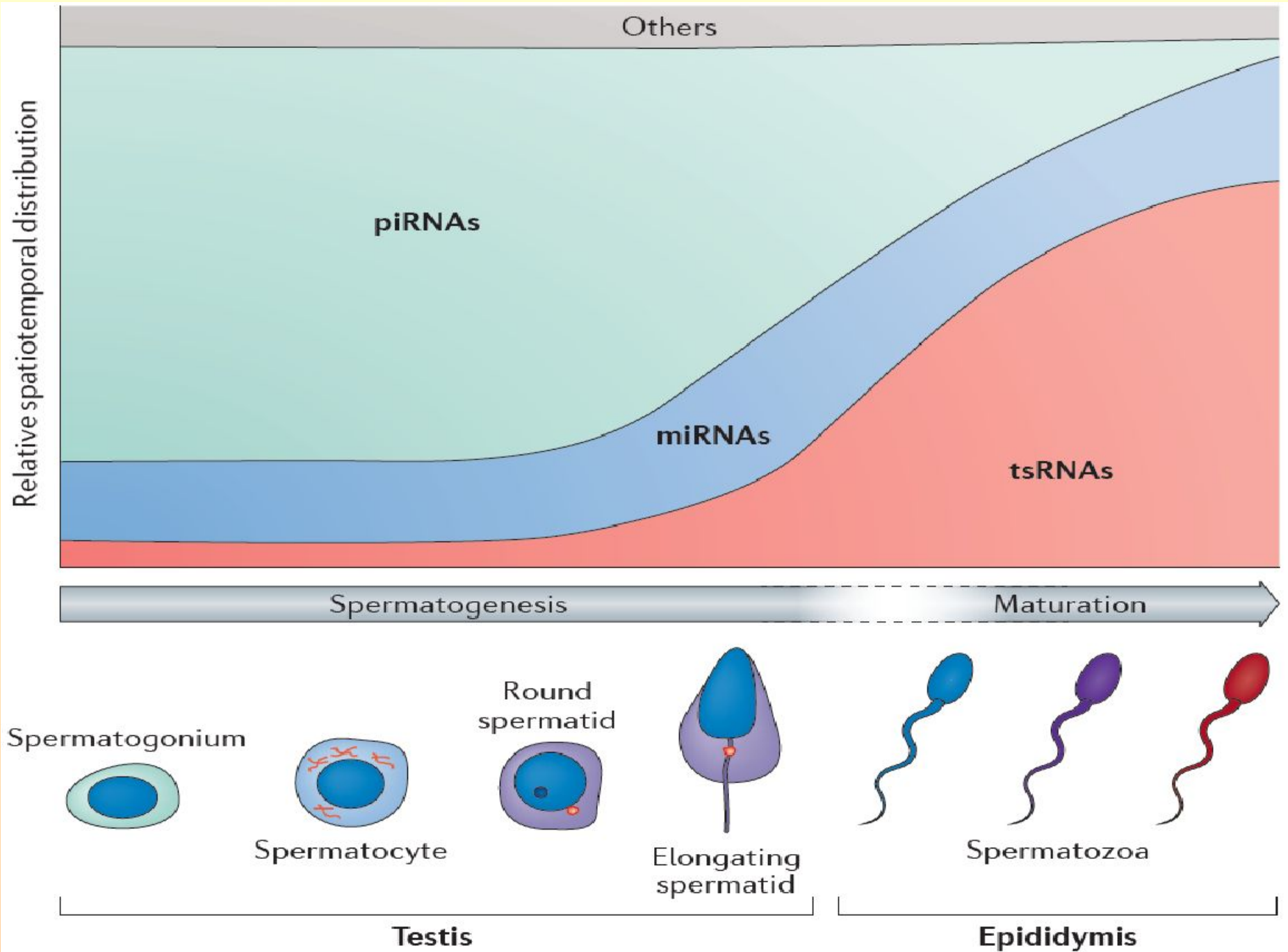


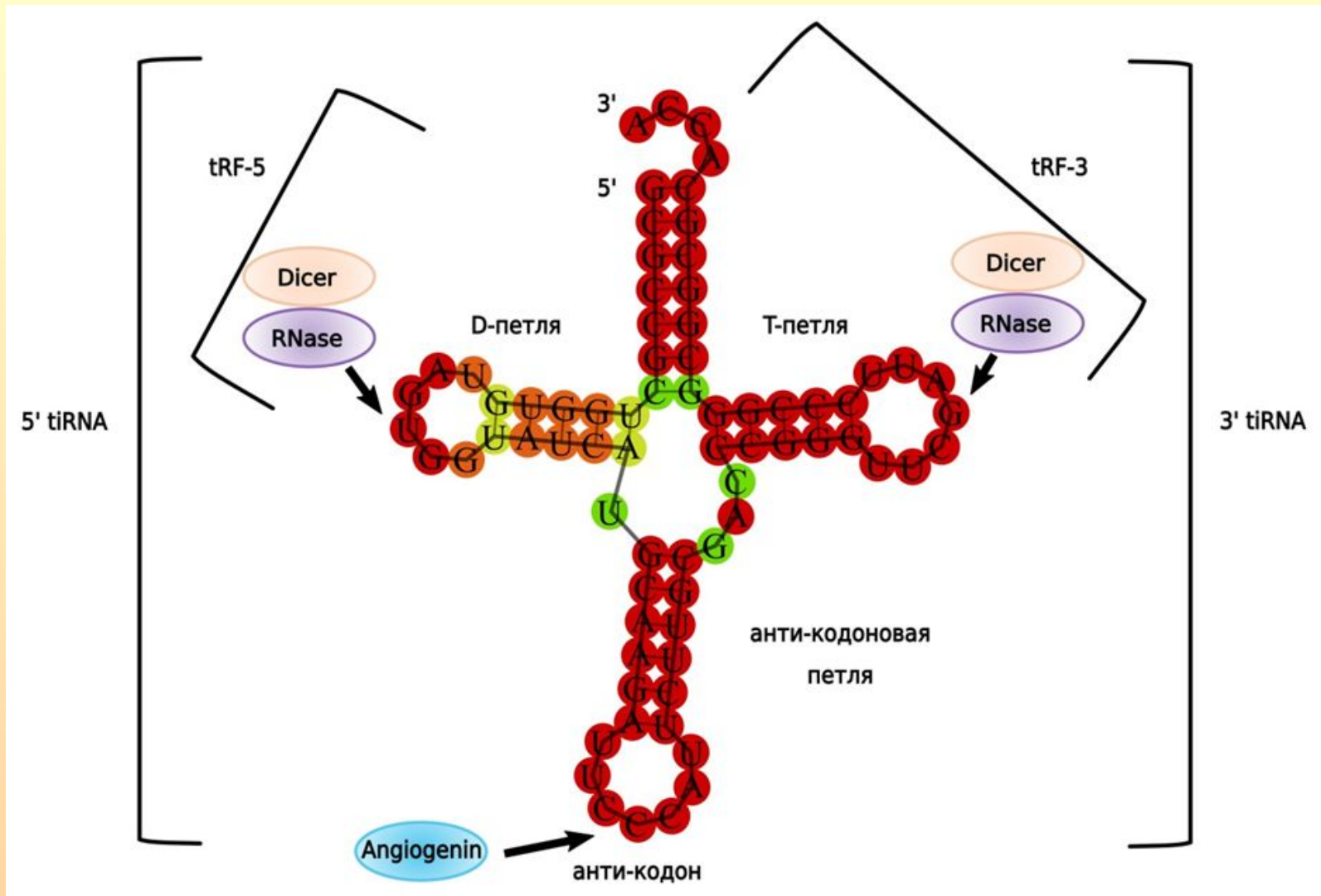




Метилирование/демети́лирование в процессе гаметогенеза







Стресс-активируемая рибонуклеаза Angiogenin разрезает зрелую tРНК в антикодоновой петле, что дает две половинки, которые и представляют собой tiRNAs. Дальнейший процессинг приводит к получению tRF-3s и tRF-5s, выполняющих функцию микроРНК.

- Несколько сотен важных для развития малых РНК соматического происхождения доставляются в сперматозоид специальным классом нановезикул эпидидимуса, называемых эпидидимосомами. Эпидидимус является ключевым участником формирования эпигенома спермы, т.к. может включать РНК из экзосом соматического происхождения.

- Состав РНК сперматозоидов отражает образ жизни и несет в себе "память" отцовского опыта; эта «память» на основе РНК передается потомству как приобретенные характеристики, способные повлиять на здоровье и общую биологическую судьбу потомства.

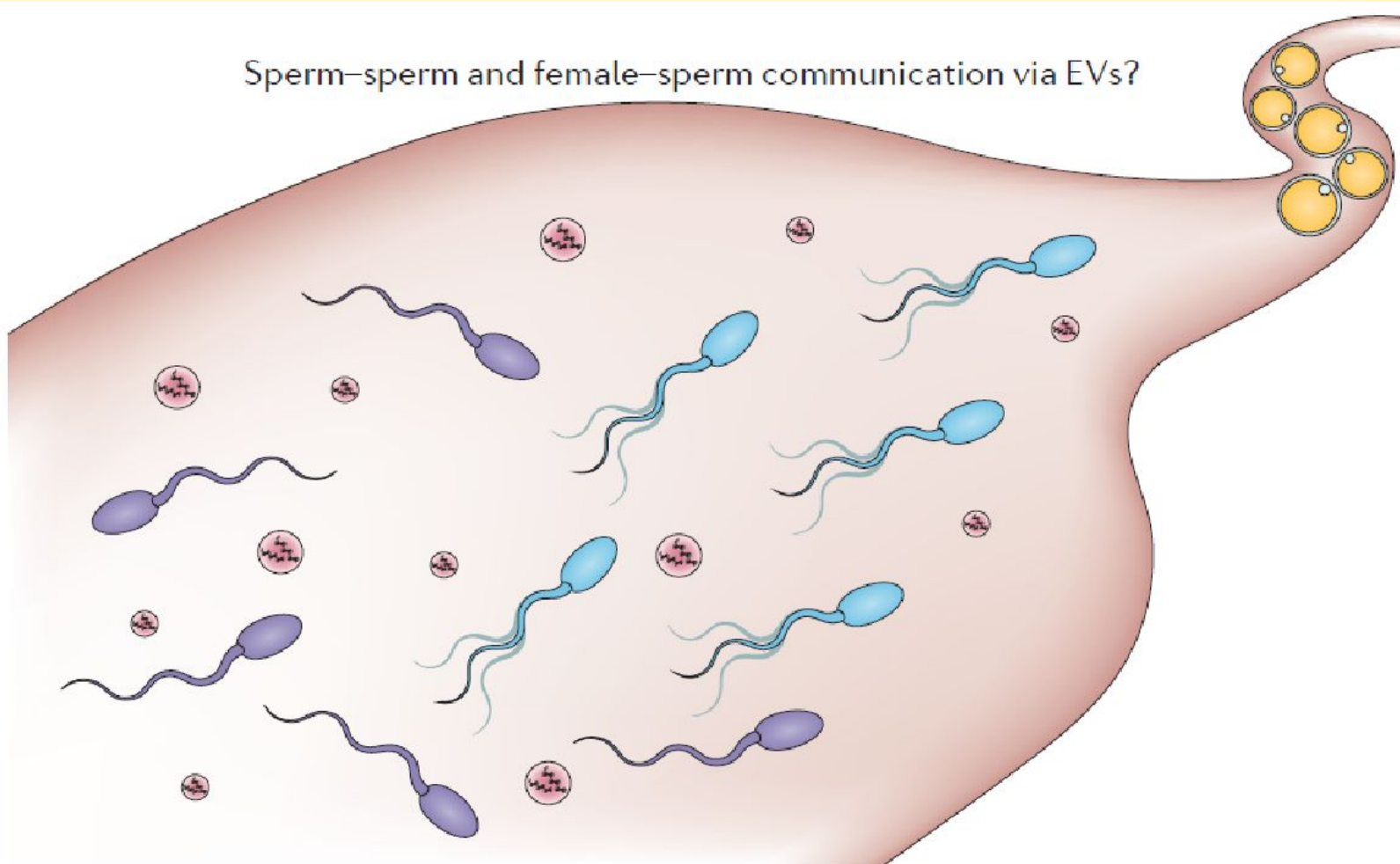
- Недавние эксперименты показали потенциал РНК сперматозоидов в качестве трансгенерационных модификаторов, свойства которых появились в ответ на условия окружающей среды или стресса, включая диету, сигаретный дым, чувствительность к запаху и когнитивные и поведенческие условия.

- В результате убедительных экспериментов показано, что РНК является трансгенерационным модификатором - потомство из нормальных зигот, в которые вводили РНК сперматозоидов, повторяет фенотипические черты животных-доноров РНК.

- РНК, поставляемые сперматозоидами при оплодотворении выполняют регуляторные функции и ремоделируют профиль экспрессии генов в ранних эмбрионах.

Нановизикулы – переносчики нкРНК.

Sperm–sperm and female–sperm communication via EVs?



Oocyte



Male 1
sperm



Male 2
sperm



EVs containing
regulatory RNAs

Барьер Вейсмана – миф!

Телегония на марше:

(проявление признаков первого самца у потомства в животном мире)

самцовый организм является движителем эволюции, несмотря на некоторую генетическую ущербность.

Телегония

В XIX в. лорд Мортон, близкий друг Ч. Дарвина отважился на биологический опыт: скрестил чистопородную кобылу с жеребцом-зебры. Потомства не получилось, однако спустя два года, после скрещивания с самцом своей породы у кобылы родились жеребята с едва заметными полосами на крупе. Мортон назвал это явление телегонией. Дарвин считал это проявлением архаичного признака, присущего предку рода лошадиных.

Телегония (с древнегреческого τῆλε – «далекий» и γένος – «рождение») - это проявление признаков первого самца у потомства в животном мире, даже если при спаривании в первый раз не наступала беременность. Вера в телегонию в основном распространена у племенных заводчиков и селекционеров. Известные факты:

- чистопородные собаки и кошки при случке с беспородными, дают в последующем «плохое» потомство, поэтому даже при единичной вязке, таких животных «выбраковывают»;
- среди профессиональных голубятников существует жестокий обычай сворачивать голову самке голубя, если она имела контакт с сизарем - «диким» представителем семейства голубиных.

Для нормального развития необходим равный вклад обоих родителей.

Трансплантация пронуклеусов.

Андрогенетические зиготы - нормальное развитие зародышевых мембран и плаценты, практически нет развития эмбриональных структур.

Гиногенетические зиготы - нормальное развитие эмбриональных структур и плохое - зародышевых мембран и плаценты.

Патология у человека.

Пузырный занос - гидатиформный моль. Нет эмбриональных структур - два набора отцовских хромосом ($22+X$)

Тератома - эмбриональная опухоль, включающая все три эмбриональных слоя и отсутствие плацентарной ткани - два набора материнских хромосом.

Триплоидия.

$2n$ - отец + n - мать \rightarrow андроид: большая кистозная плацента, у плода: большая голова, маленькое веретенообразное тело, синдактилия, отставание в росте и развитии. Если плод рождается, то, как правило, есть мозаицизм.

$2n$ - мать + n - отец \rightarrow гиноид: недоразвитая плацента, клеточная масса, эмбрион и плод не развивается.

Роль геномного импринтинга в раннем развитии млекопитающих



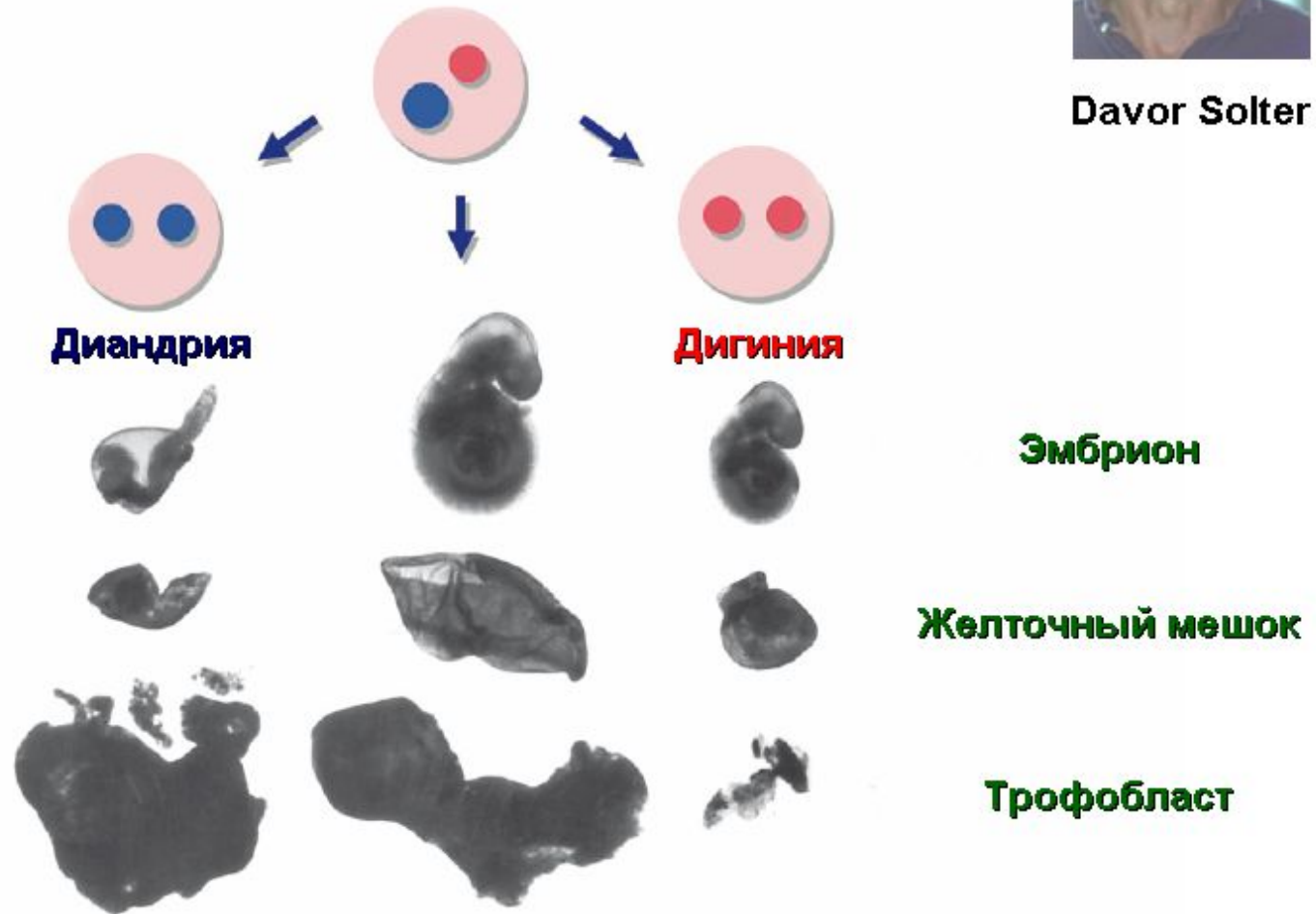
Azim Surani

Surani *et al.*, 1984; McGrath, Solter, 1984



Davor Solter

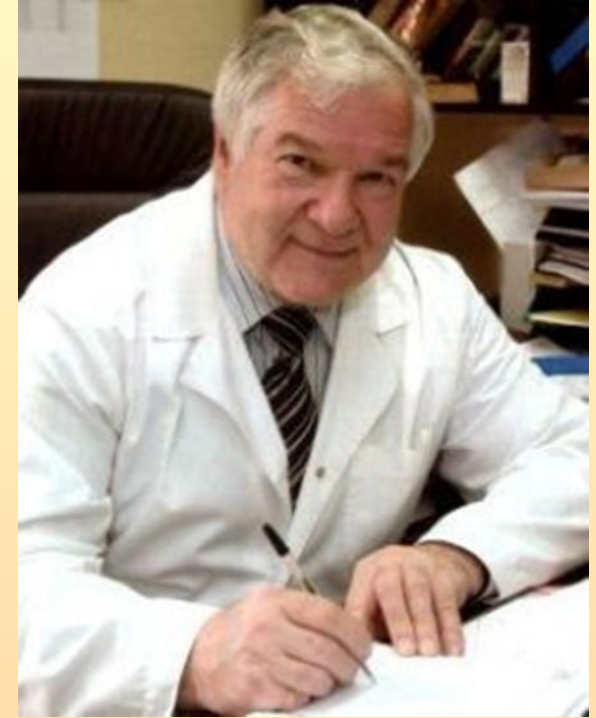
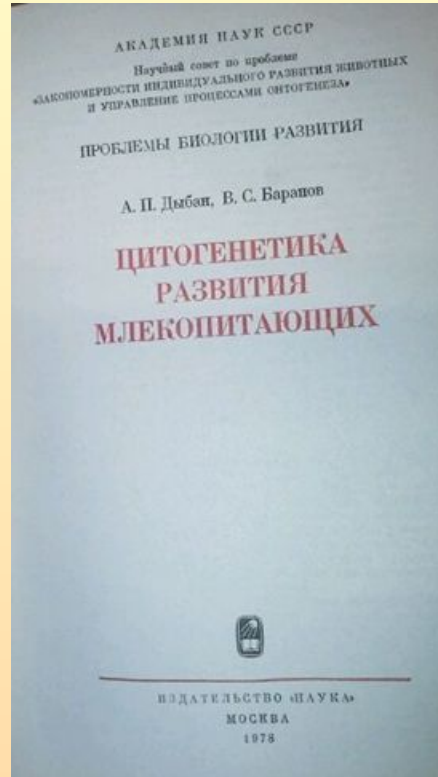
Нормальная диплоидная зигота



Наши основоположники



А.П. Дыбан, 1922-2002



В.С. Баранов

А.П. Дыбан и В.С.Баранов внесли значительный вклад в экспериментальную цитогенетику развития млекопитающих, создали новую технику хромосомного анализа ранних зародышей млекопитающих, что позволило детально проанализировать влияние числовых и структурных хромосомных aberrаций на ключевые звенья эмбриогенеза. На основании полученных данных удалось сформулировать новые представления о роли различных хромосом в раннем развитии и о сочетанном участии генов и эпигеномных факторов в контролирующих механизмах раннего эмбриогенеза млекопитающих.

Однородительская дисомия.

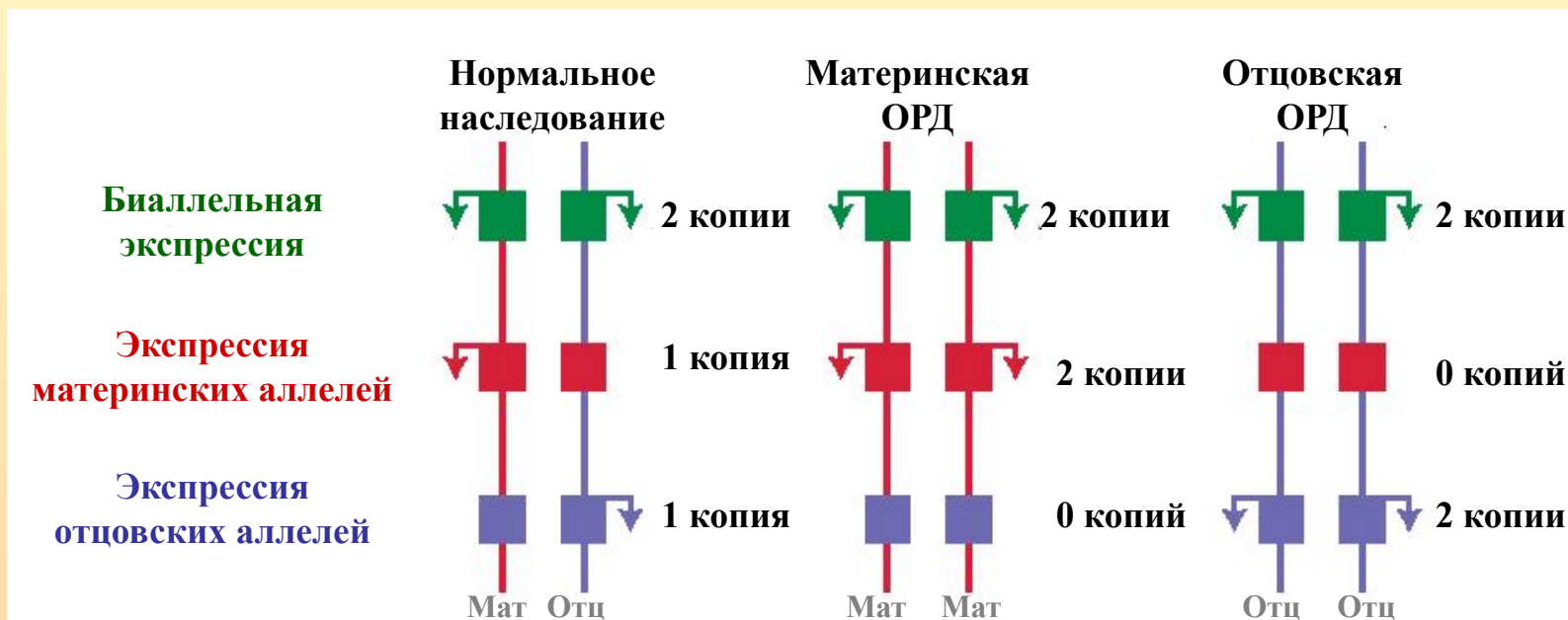
На мышинных транслокационных гибридах, несущих отдельные хромосомные участки, имеющие как отцовское, так и материнское происхождение, показано, что, либо потомство отличается по альтернативным признакам (хромосомы 2 и 11 - гиперактивны-гипоактивны, маленькие-большие 70%-130%), либо не жизнеспособно. У мышей отцовская дупликация и материнская делеция проксимальной части короткого плеча хромосомы 6 фенотипически не проявляется, а материнская дупликация и отцовская делеция летальны на ранних сроках эмбрионального развития. То же с хромосомами 2p и 7p.

В двух случаях муковисцидоза, сопровождавшегося задержкой умственного и физического развития было показано, что обе хромосомы 7 имели материнское происхождение.

Частичная три- и тетрасомия по проксимальной части длинного плеча хромосомы 15 приводят, либо к фенотипу с-ма Прадера-Вилли, либо к необычному аномальному фенотипу.

Частичная трисомия хромосомы 11p , унаследованная от отца приводит к фенотипическим проявлениям синдрома Видеманна-Беквита, а от матери – к синдрому Сильвера-Рассела.

Однородительская дисомия (ОРД) хромосом



Изменение дозы импринтированных генов –
«потеря импринтинга»

Механизмы формирования ОРД у человека.

1) Комплементация гамет – дополнение нуллисомной по определенной хромосоме набора одной гаметы дисомной по этой же хромосоме другой гаметы (1:3000 гамет).

2) Коррекция трисомии до дисомии, т.е. слияние одной дисомной и одной нормальной гамет и формирование трисомной зиготы с элиминацией в последующих делениях дробления той хромосомы, которая содержалась в нормальной (моносомной) гамете.

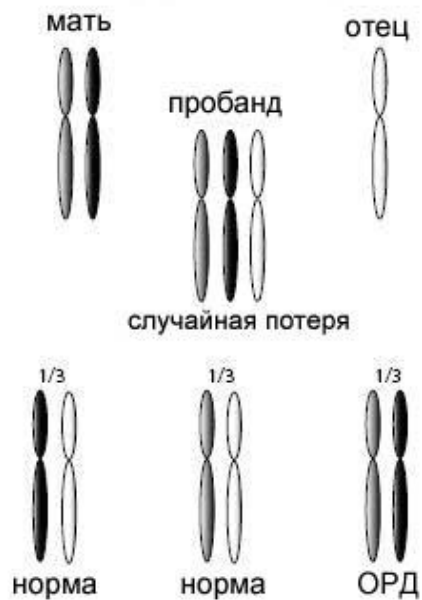
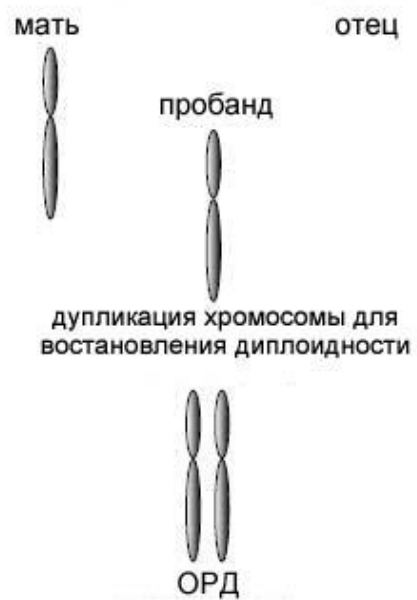
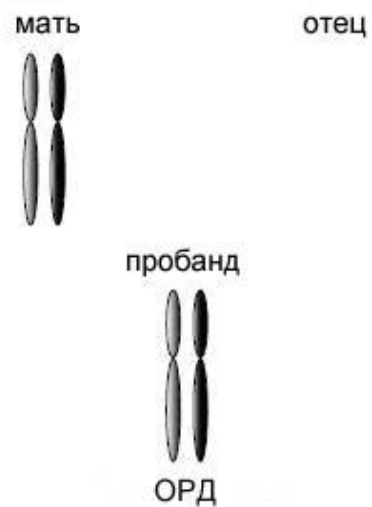
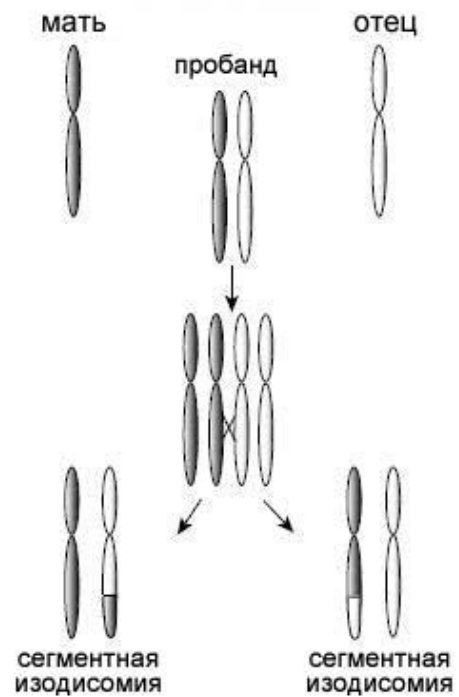
3) Коррекция моносомии до дисомии возможна при слиянии нормальной и нуллисомной гамет с образованием моносомной зиготы и последующей дупликацией моносомной хромосомы.

4) Соматическая рекомбинация - обмен между хроматидами гомологичных хромосом в соматических клетках. Это ведет к ОРД по отдельным хромосомным районам.

Эти механизмы обеспечивают возникновение ОРД двух типов:

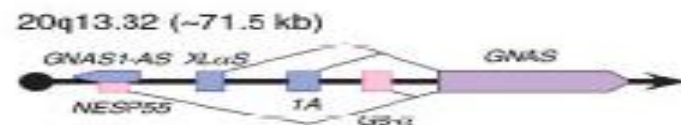
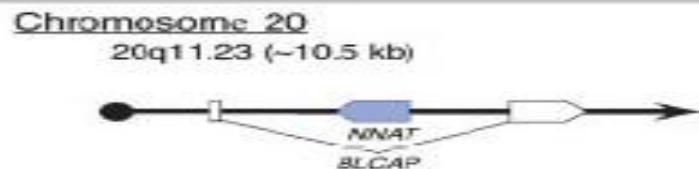
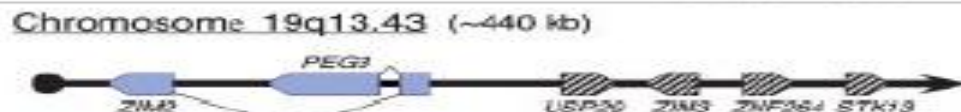
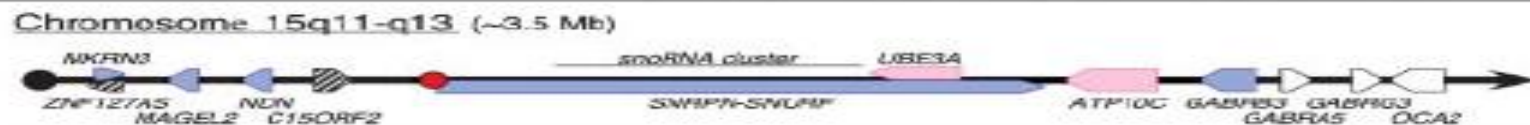
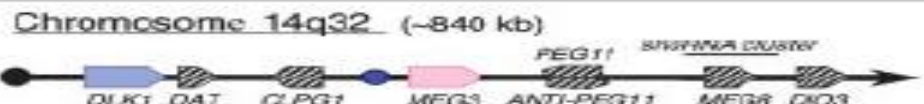
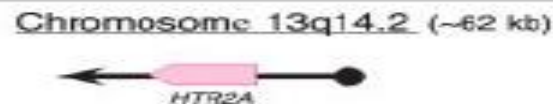
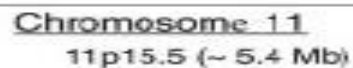
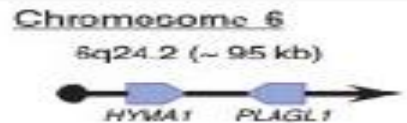
1) гетеродисомию - наследование двух разных гомологичных хромосом от одного из родителей (возникает по механизмам 1 и 2);

2) изодисомию - наследование от одного из родителей двух копий одной и той же хромосомы. Этот тип ОРД возникает путем коррекции моносомии до дисомии.

A**B****C****D**

ОРД по целым хромосомам или их фрагментам выявлены при анализе наследственной патологии и у человека.

- материнская ОРД по хромосоме 2 => признаки дисэмбриогенеза и отставание в развитии;**
- отцовская ОРД по длинному плечу хромосомы 6(q23 - q24) => неонатальный диабет;**
- материнская ОРД по длинному плечу хромосомы 7 установлена при муковисцидозе;**
- материнская ОРД по короткому плечу хромосомы 7 (*GRB10*) => синдром Сильвера – Рассела;**
- материнская ОРД по хромосоме 14 => гипотония, черепно-лицевые аномалии, акромикрия, сколиоз, задержка физического, моторного и умственного развития;**
- отцовская ОРД по хромосоме 14 => сильная умственная отсталость и скелетно-мышечные аномалии;**
- материнская ОРД по хромосоме 16 => малый вес при рождении и врожденные аномалии;**
- отцовская ОРД по длинному плечу хромосомы 20 (*GNAS1*) => псевдогипопаратирозидизм**



Предполагается, что геном человека содержит не менее 200 импринтированных генов. На сегодняшний день их около 150, имеющих тканеспецифическую моноаллельную экспрессию.

Болезни импринтинга

Синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана –

хромосома 15(q11.2-q13)

Синдром Видеманна-Беквита - хромосома 11p15.5

Синдром Сильвера-Рассела – хромосомы 7p11.2 и 11p15.5

ОРД (материнская/отцовская) - хромосома 14

Наследственная остеодистрофия Олбрайт – хромосома 20q13

и псевдогипопаратирозидизм тип 1a и 1b

Транзиторный неонатальный диабет - хромосома 6q24

Редкие болезни импринтинга

Синдром Мартина-Белл – хромосома Xq27.3

"La Monstrua" vestida



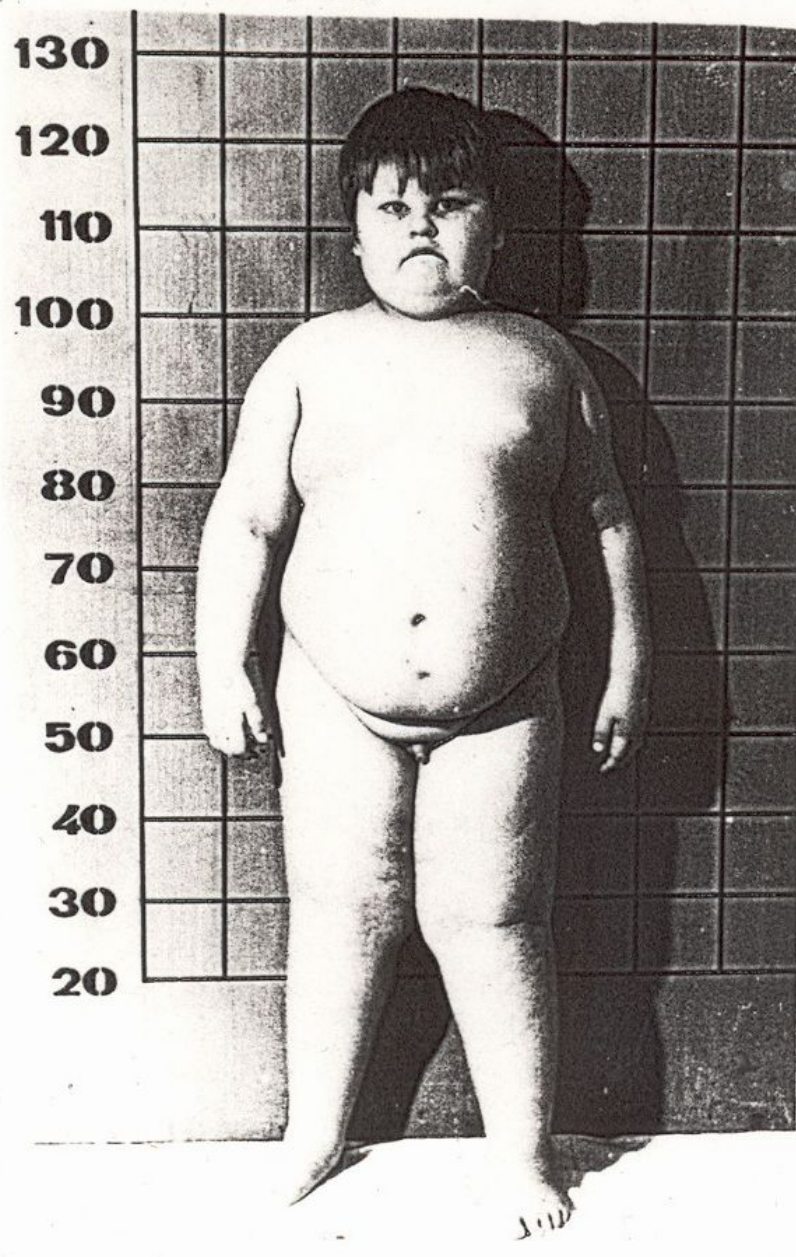
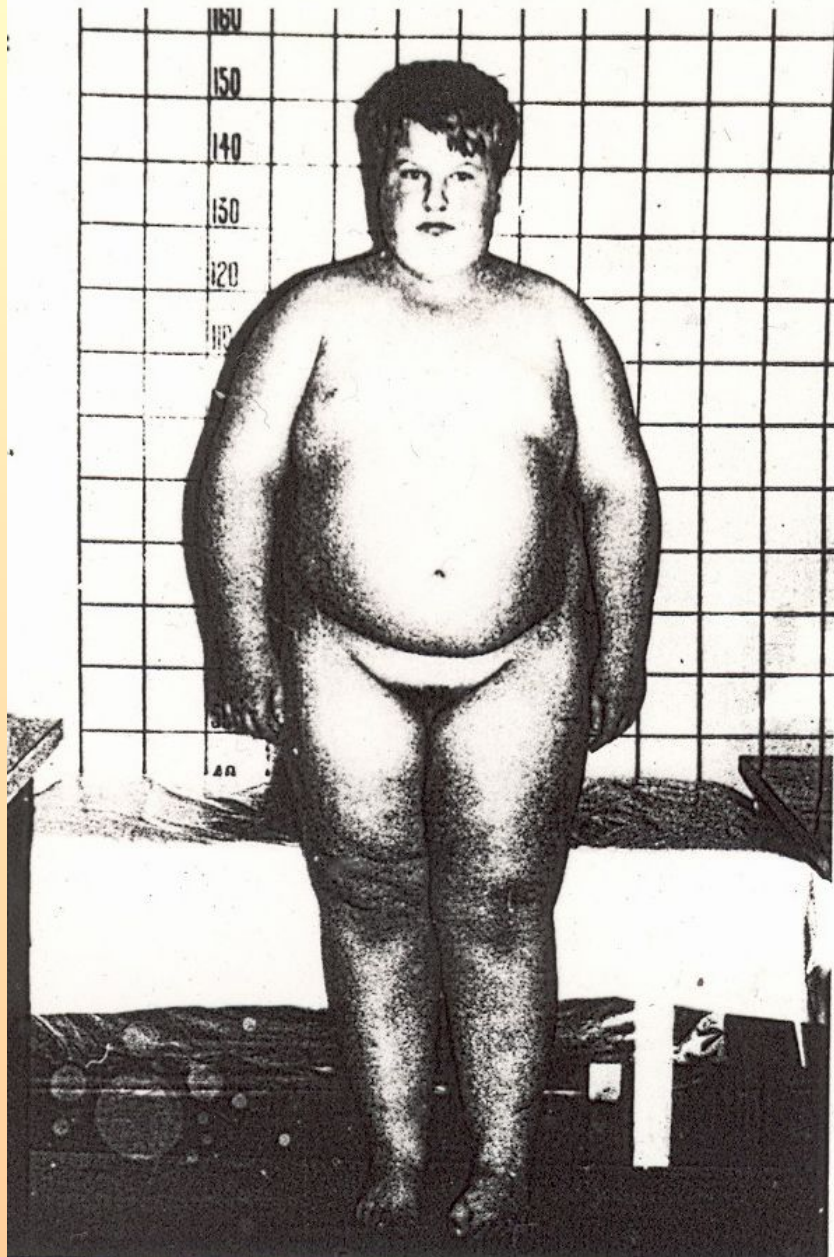
"La Monstrua" desnuda



CARREÑO DE MIRANDA, Juan (1614-1685) Eugenia Martínez Vallejo

В музее Прадо в Мадриде есть пара картин придворного художника XVII столетия Хуана Карреньо де Миранда с названиями «La Monstrua vestida» и «La Monstrua desnuda» («Одетый монстр» и «Раздетый монстр»). На картинах изображена очень толстая пятилетняя девочка Евгения Мартинес Валлехо с синдромом Прадера-Вилли.

СИНДРОМ ПРАДЕРА-ВИЛЛИ

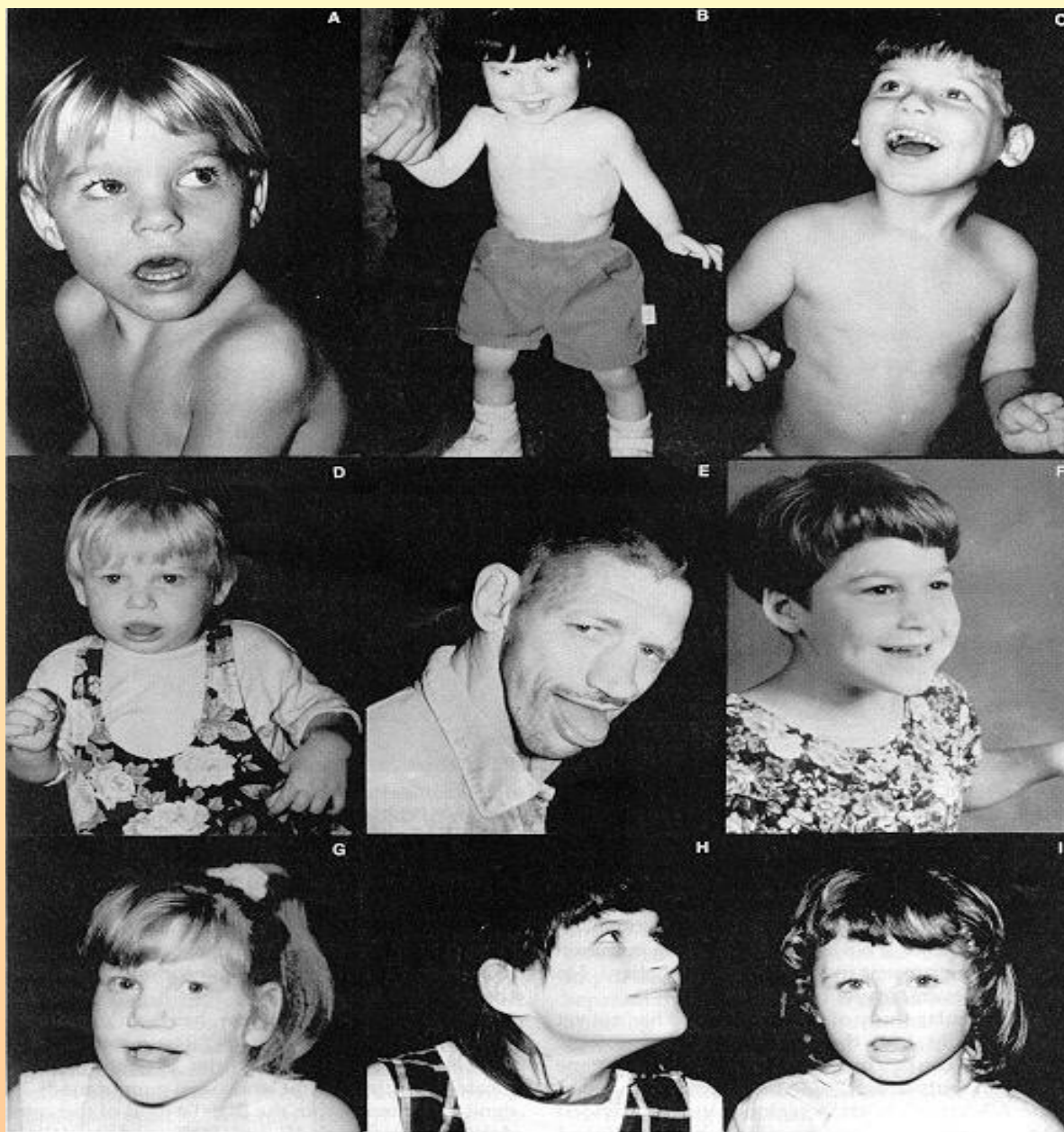


Синдром Прадера-Вилли



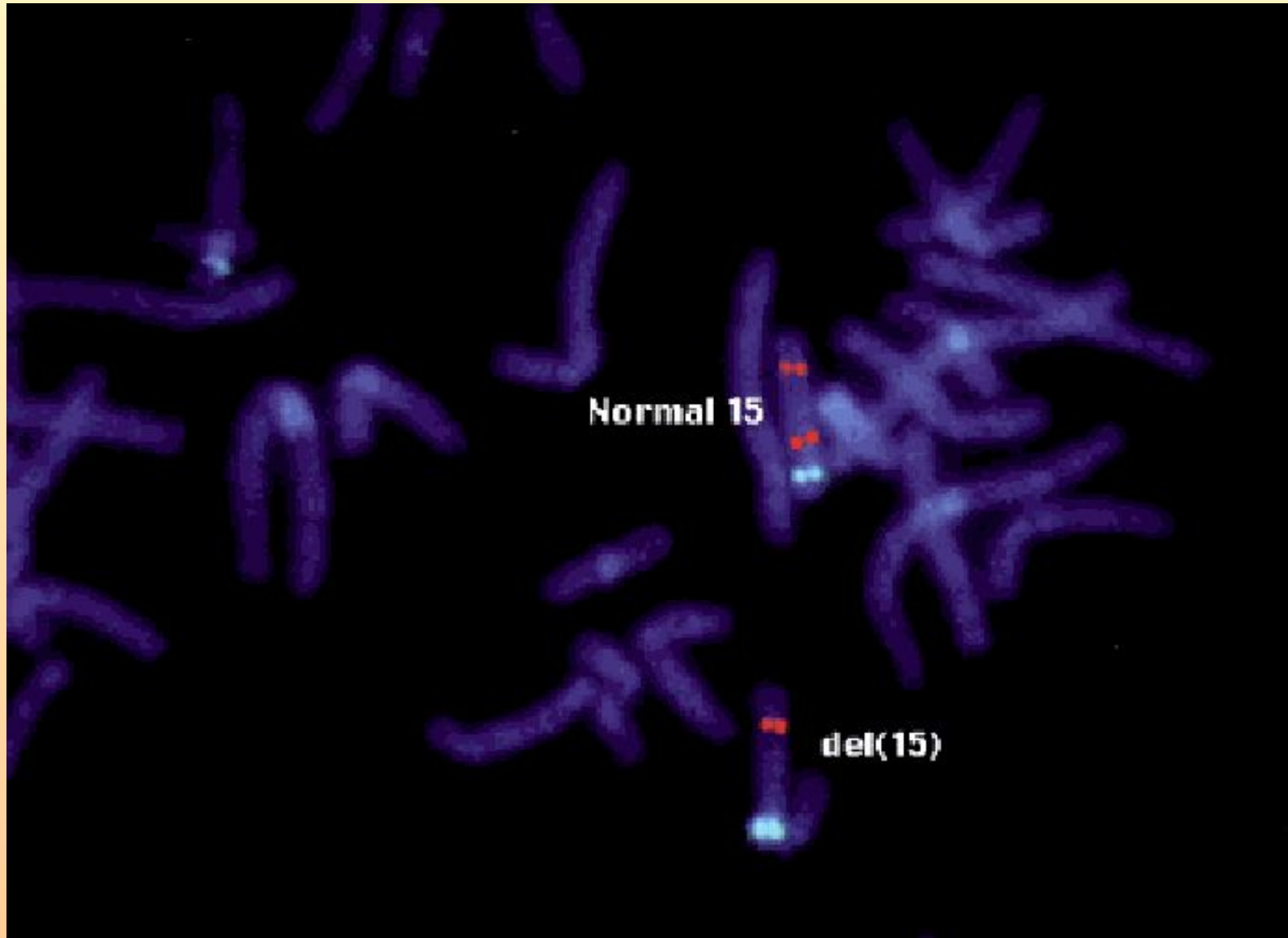
Клинические признаки: ожирение, мышечная гипотония, низкий рост, гипогонадизм, гипогенитализм, умственная отсталость различной степени выраженности. Частота: 1 на 10 000 новорожденных.

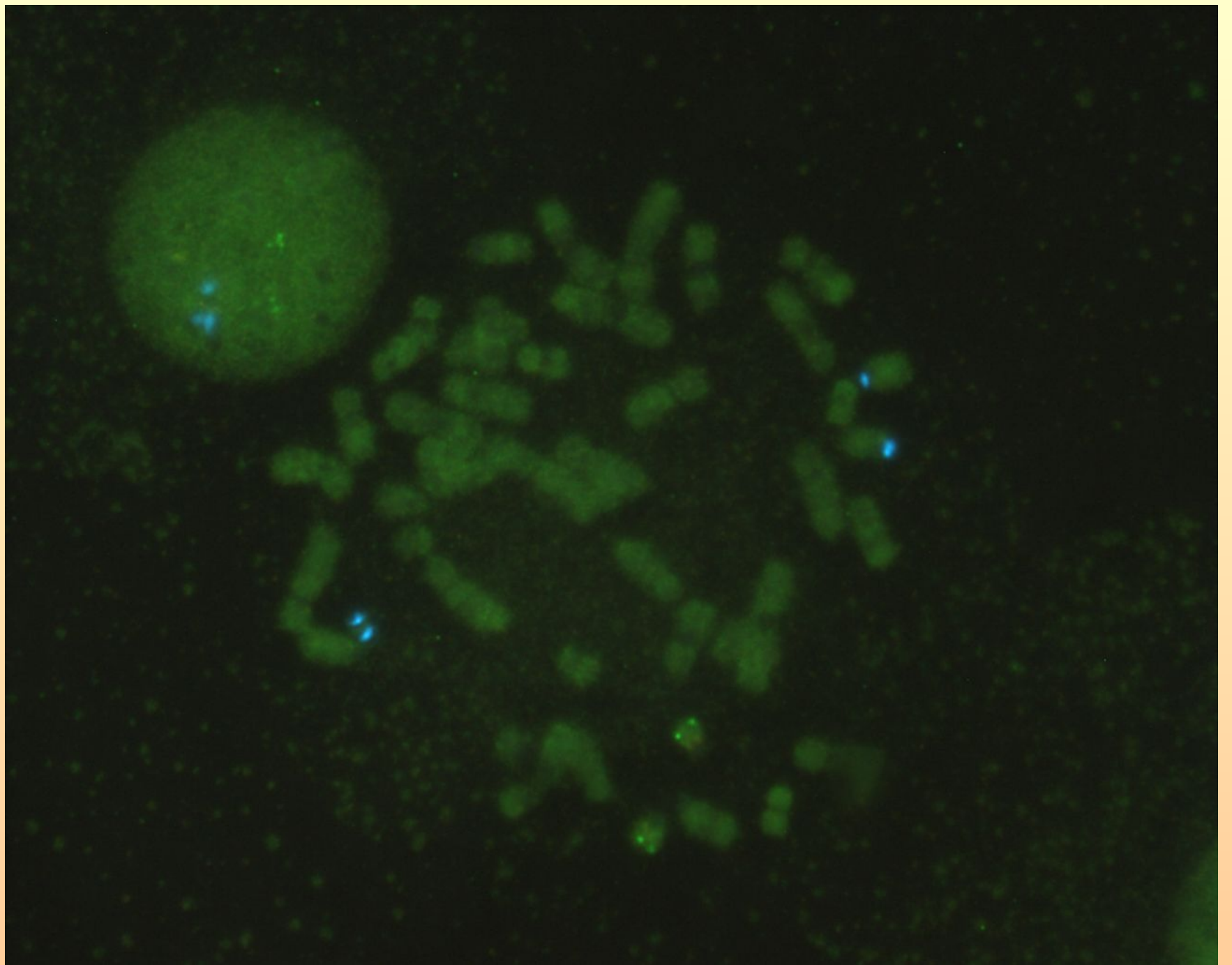
Синдром Ангельмана



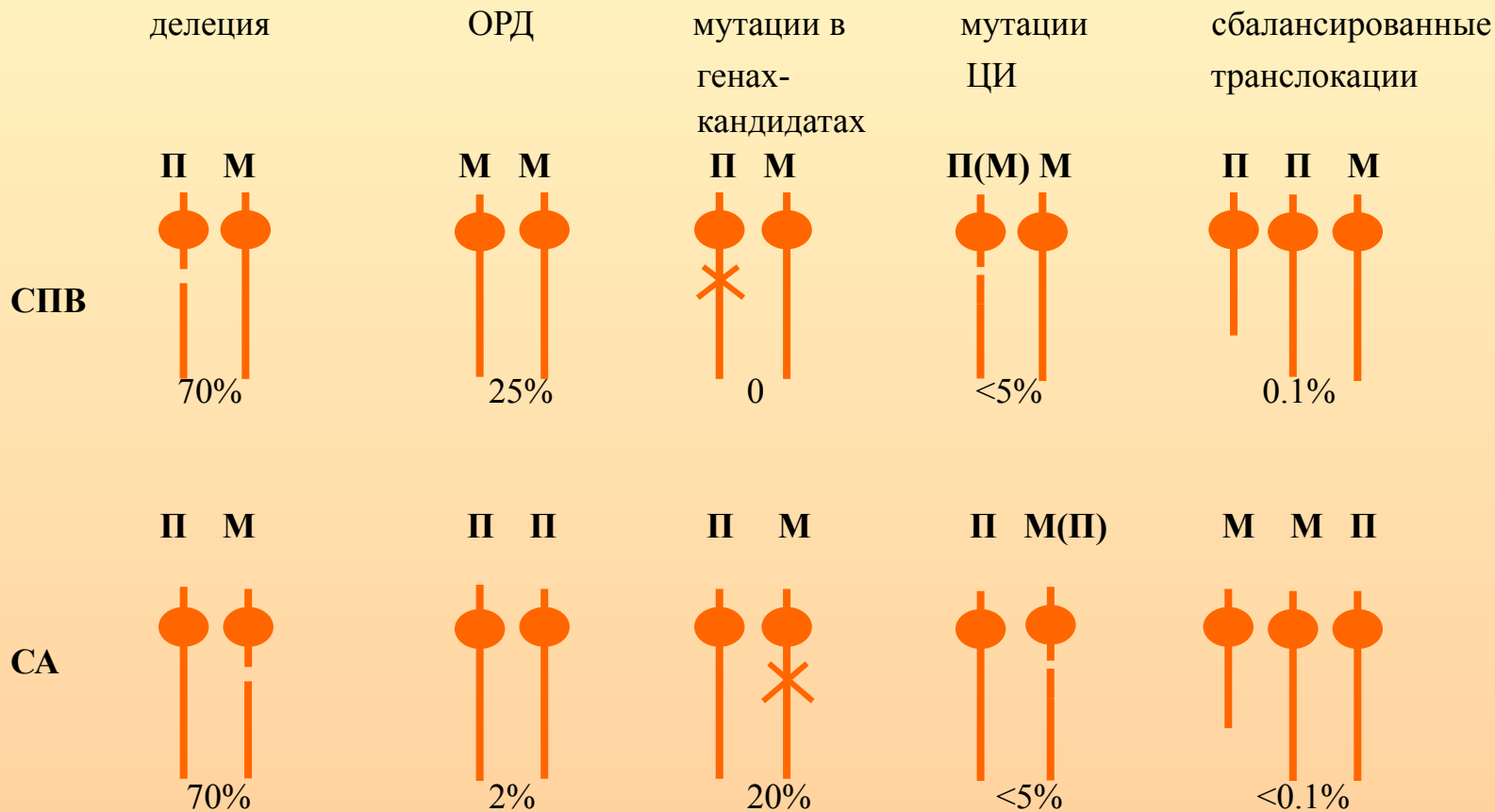


**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОДЕЛЕЦИЙ ХРОМОСОМЫ 15q11.2
ПРИ СИНДРОМАХ ПРАДЕРА-ВИЛЛИ И АНГЕЛЬМАНА
МЕТОДОМ FISH (ДНК-зонд SNRPN).**

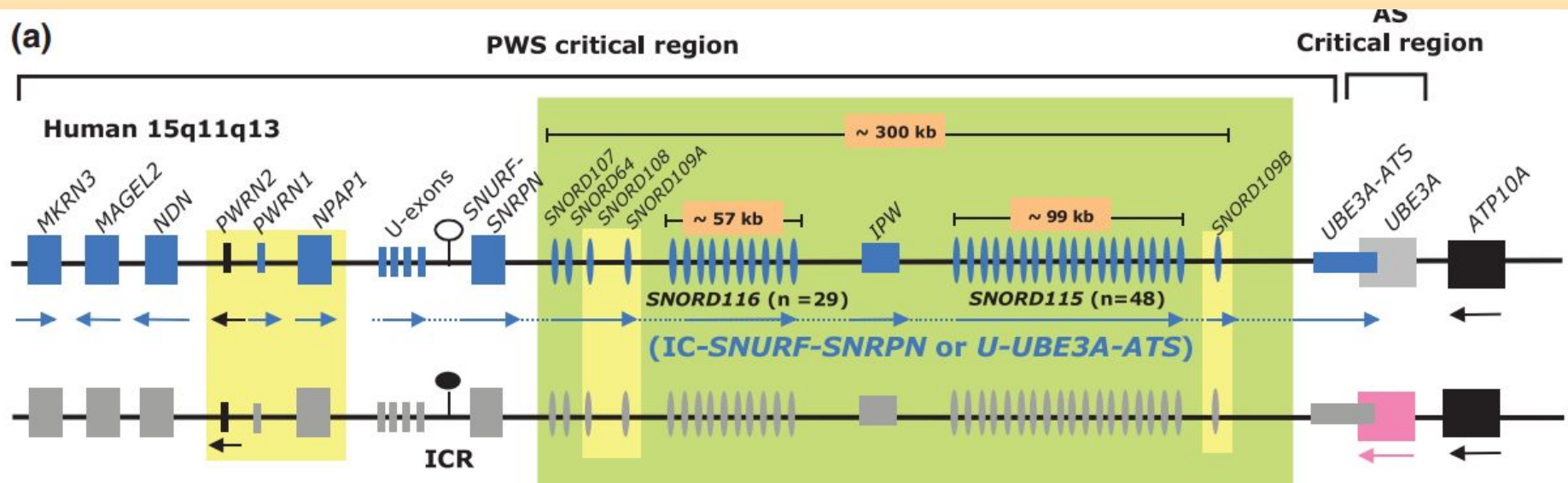
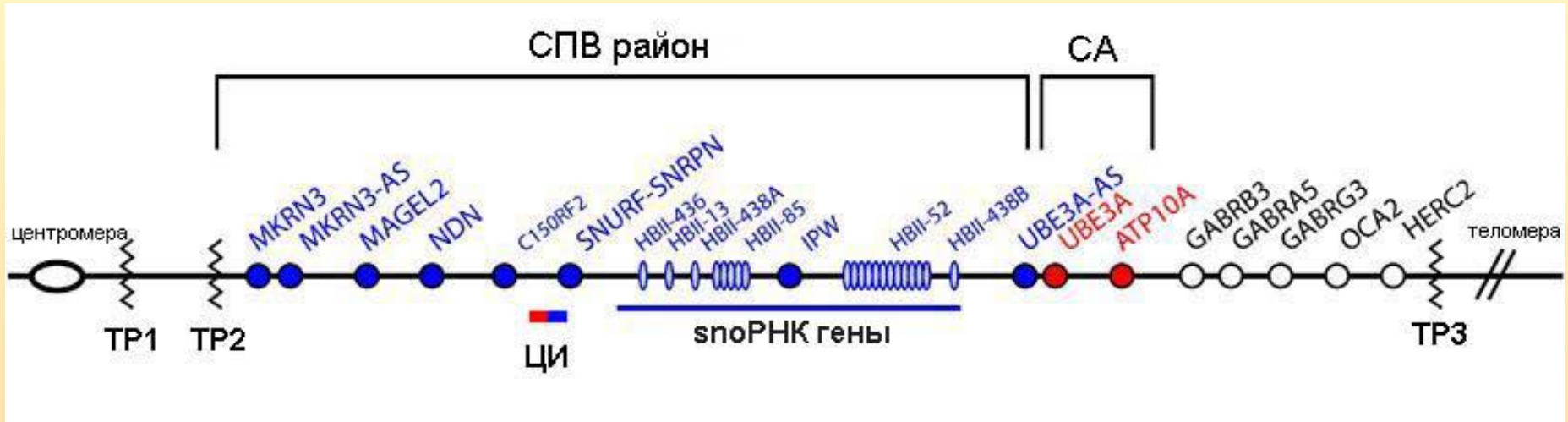




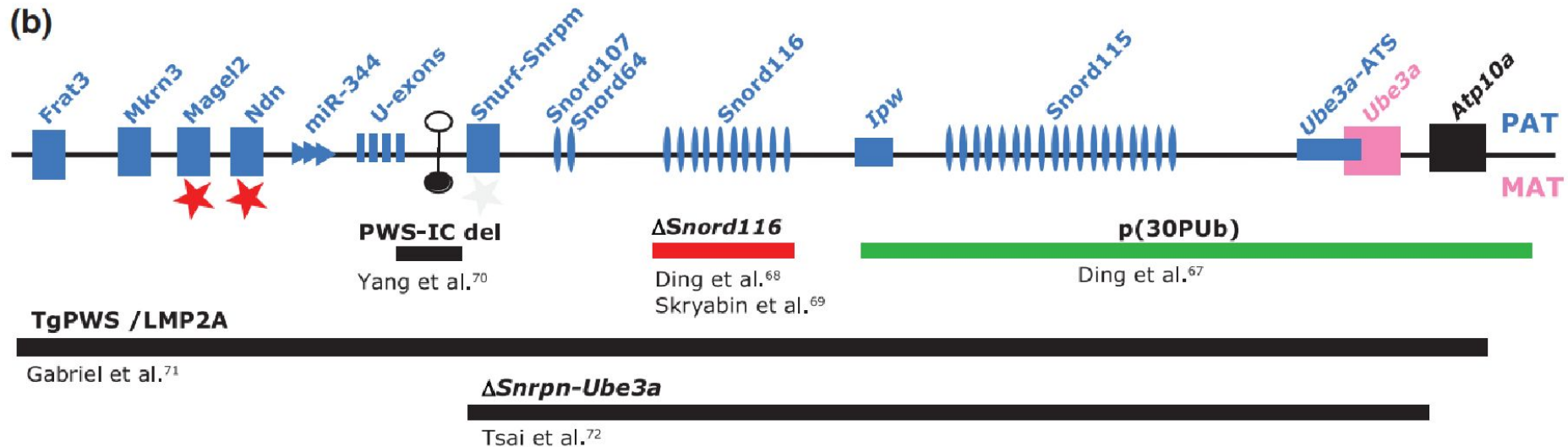
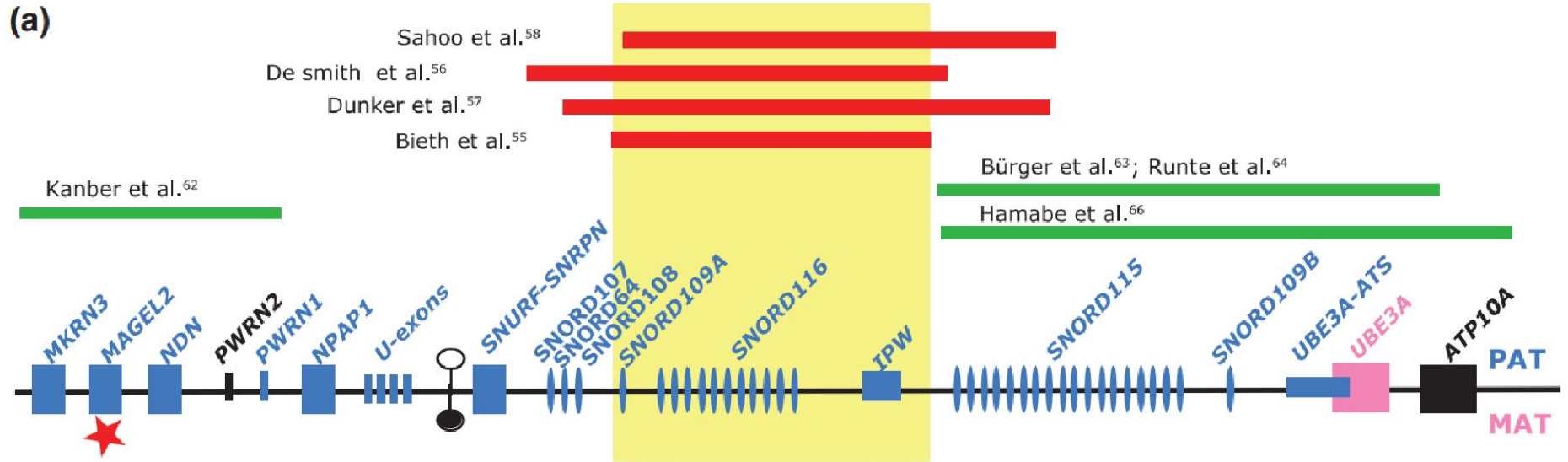
Причины, приводящие к СПВ и СА.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РАЙОНА ХРОМОСОМЫ 15(q11-q13)

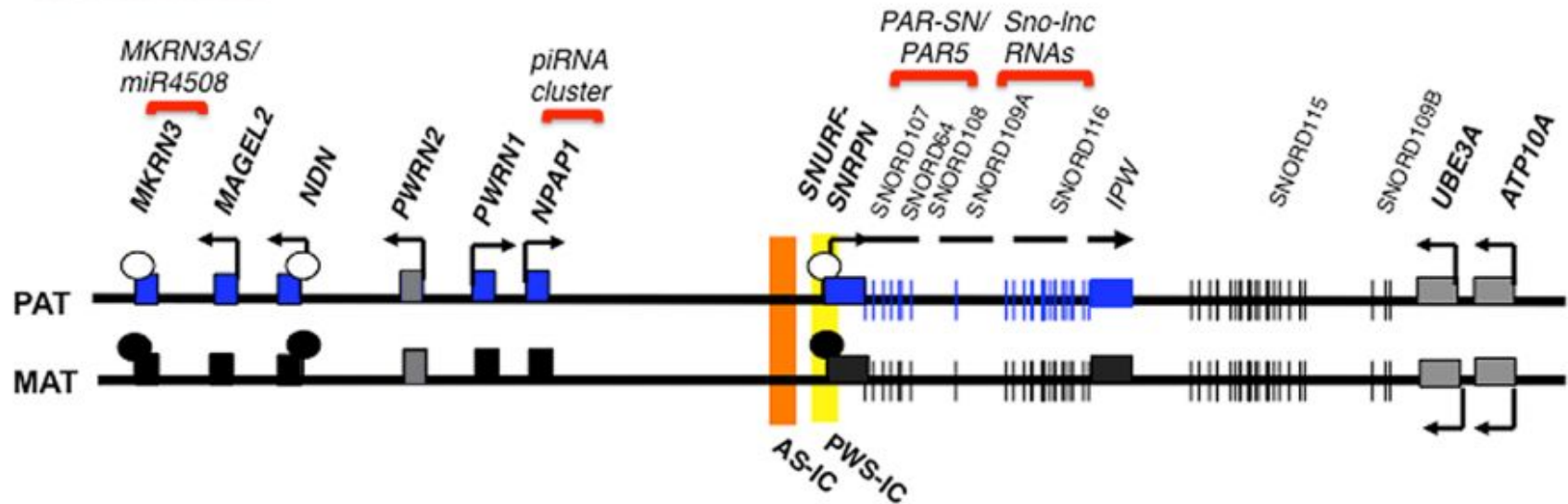


Доказательство, что делеция гена SNORD116 может вызывать синдром Прадера-Вилли



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РАЙОНА ХРОМОСОМЫ 15(q11-q13)

Non-neurons



Neurons

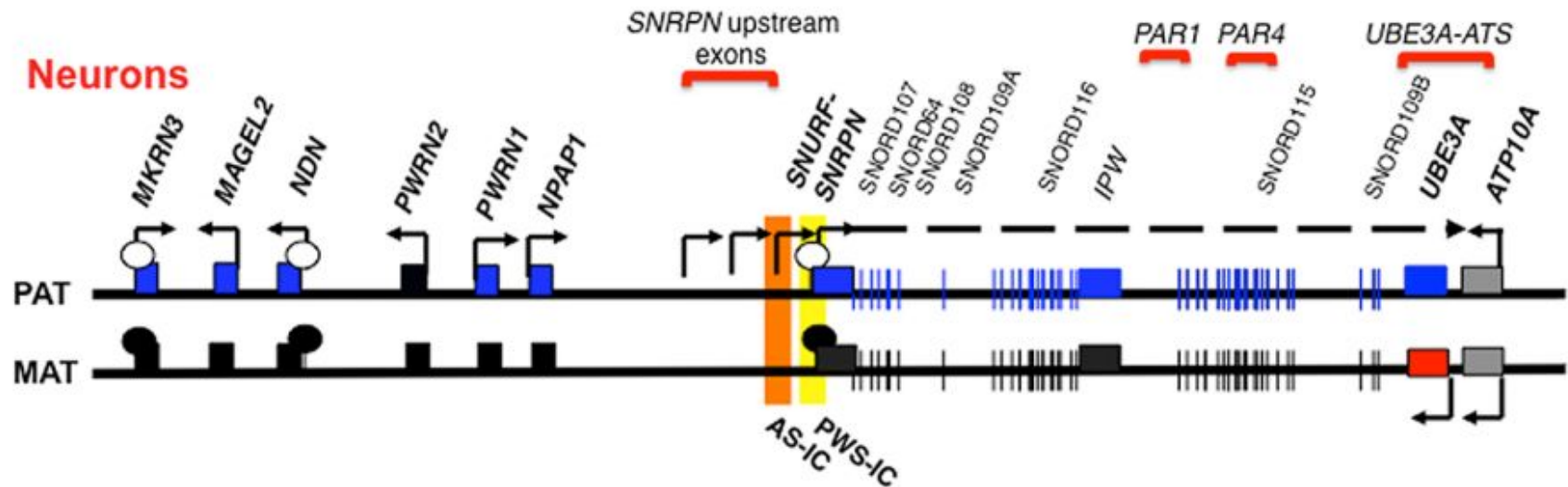
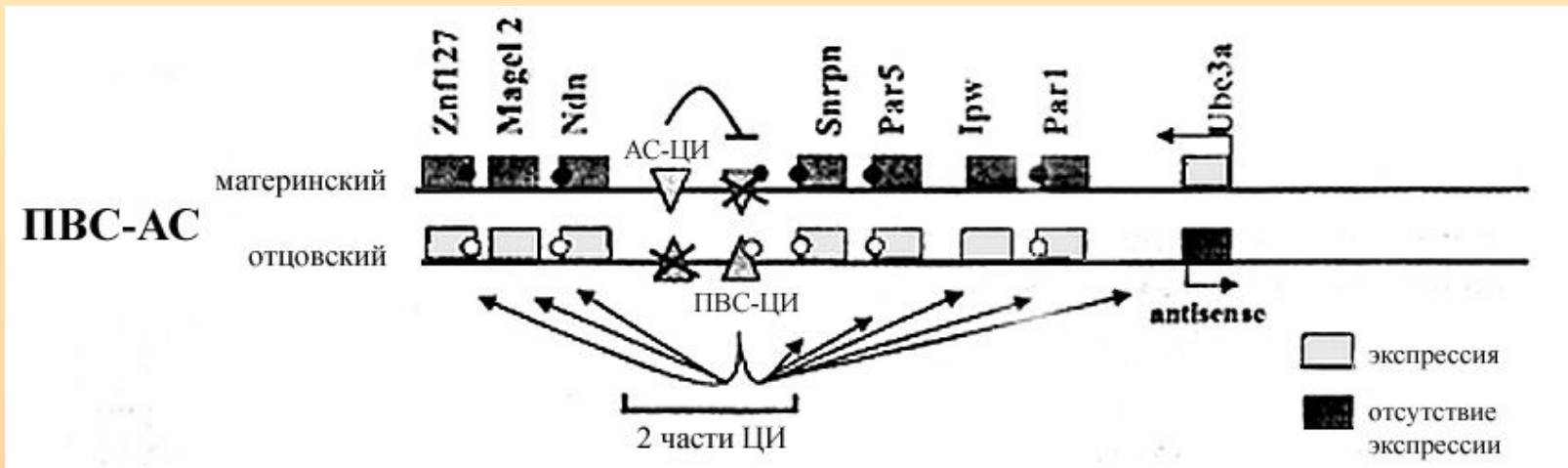
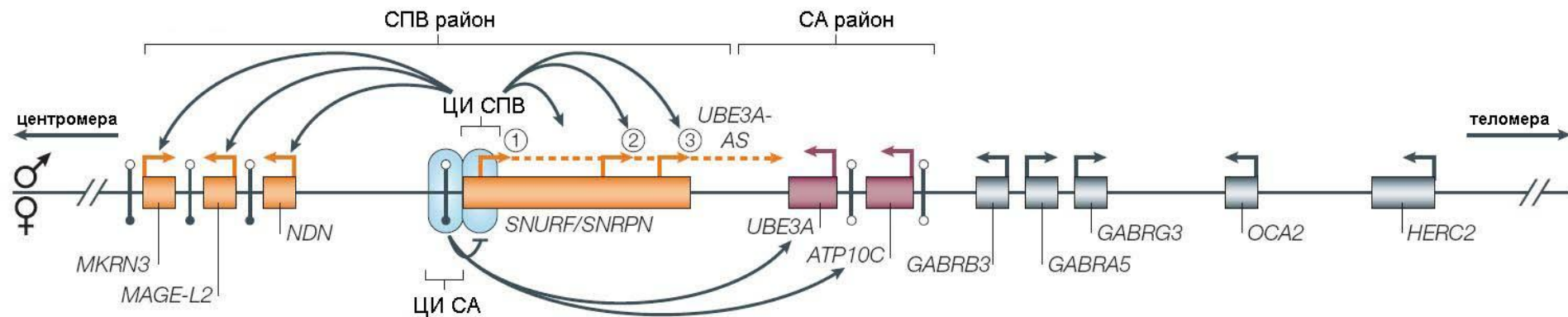
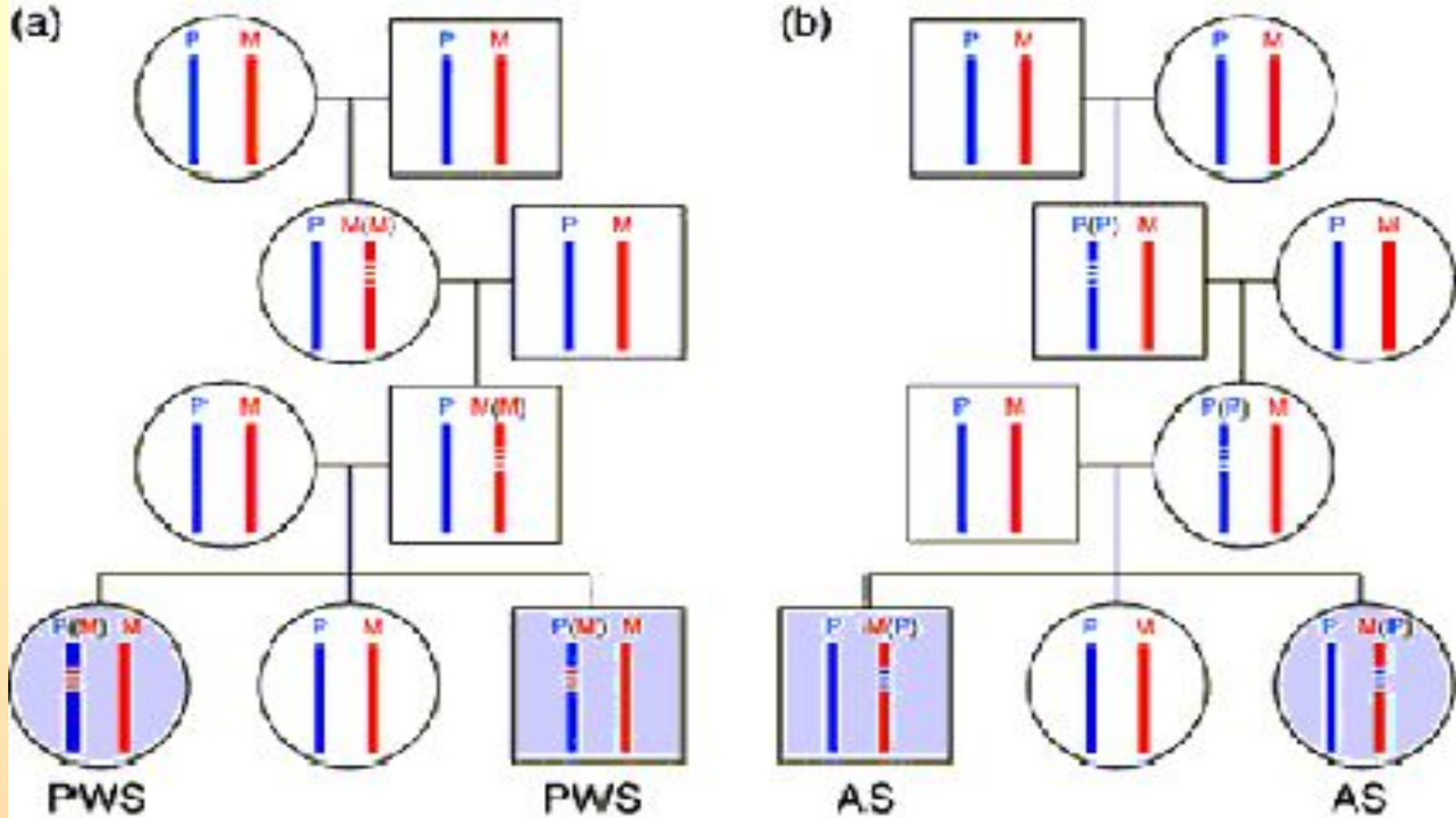


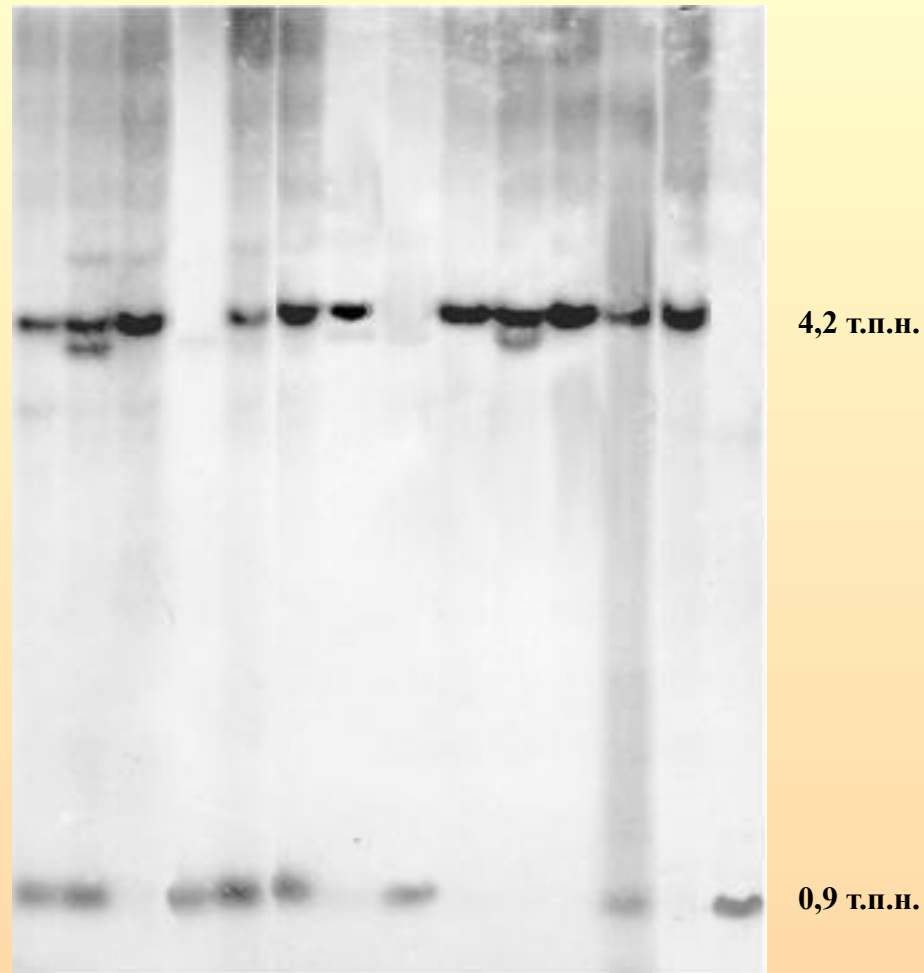
Схема функционирования центра импринтинга при синдромах Прадера-Вилли и Ангельмана



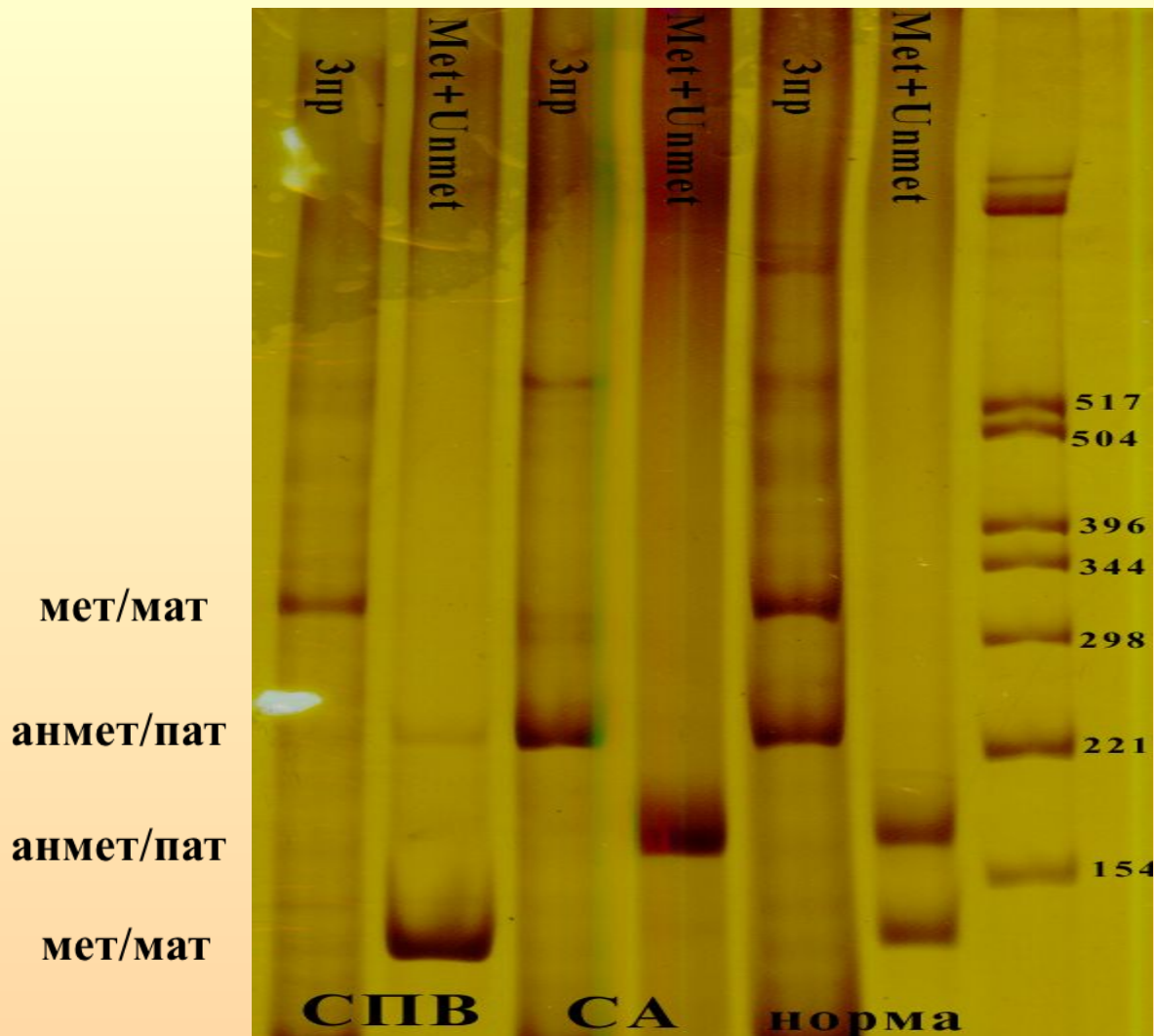
ЦИ имеет две основных функции: 1) переключение женского импринта на мужской или, наоборот, в гаметогенезе и 2) поддержание экспрессии или инактивации импринтированных генов критического района в течение жизни.



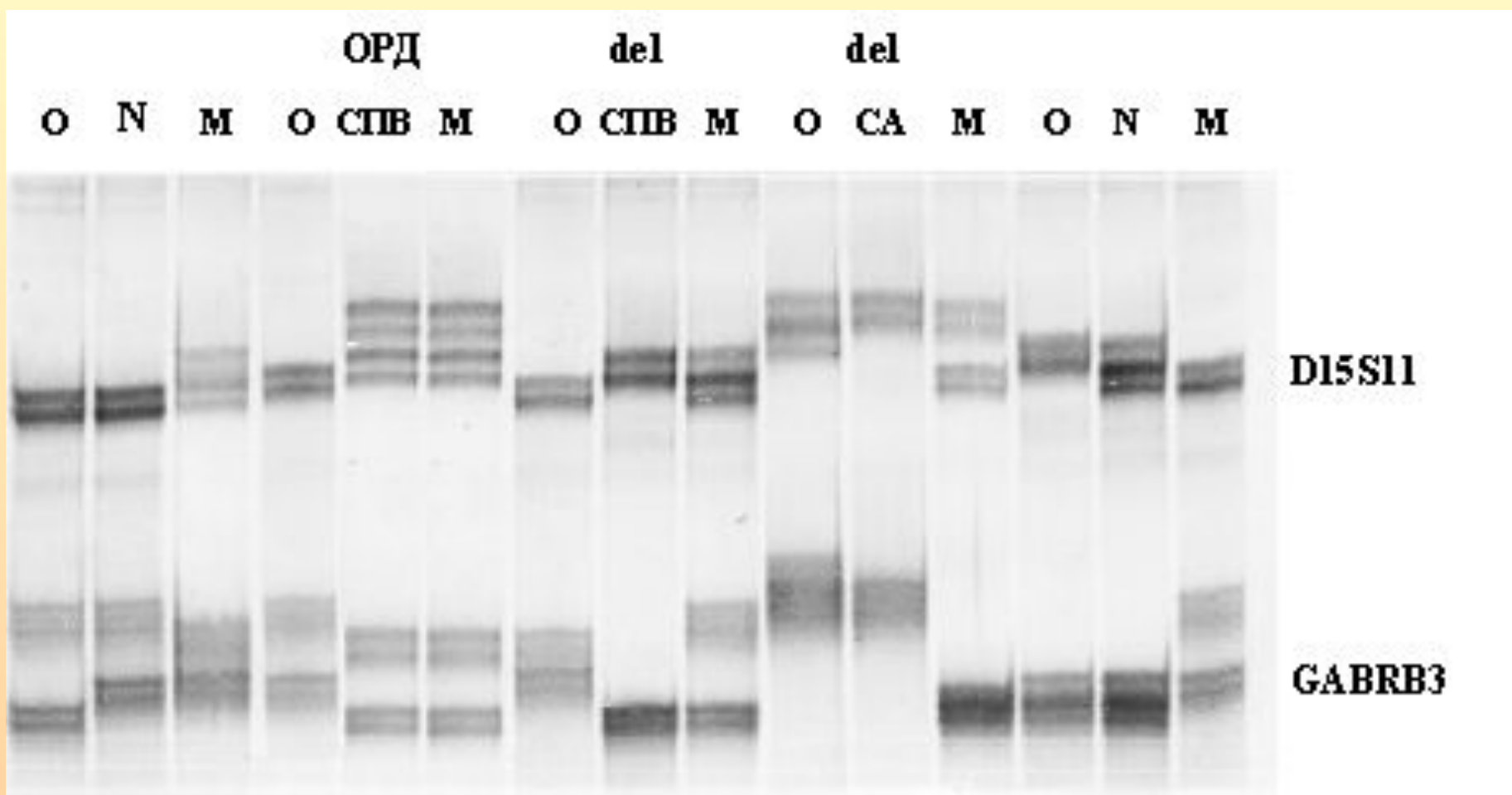
Наследование мутаций центра импринтинга, приводящих к невозможности переключения импринта в герминальных клетках: (а) - СПВ: если мутация возникает во втором поколении у женщины, то она фиксирует материнский импринт М(М), который передается без фенотипических последствий следующему поколению; однако у мужчины мутация блокирует стирание женского импринта, поэтому 50% его потомков будут иметь СПВ и эпигенотип Р(М); (б) - СА: отцовский импринт Р(Р) фиксируется и может передаваться без аномалий фенотипа через мужчин, но в герминальных клетках женщины мутация не позволяет изменить эпигенотип М(Р), что приводит в 50% случаев к рождению ребенка с СА.



Анализ аллельного метилирования промоторной области гена *SNRPN* методом блот-гибридизации с использованием рестриктаз *NotI*, *XbaI* и ДНК-зонда “экзон α ”. Фрагмент длиной 4,2 т.п.н. соответствует метилированному материнскому, а 0,9 т.п.н – неметилированному отцовскому аллелю. Дорожки 1,2,5,6,12 - норма; 3,7,9,10,11 – пациенты с СПВ; 4,8,14 – пациенты с СА.



Анализ аллельного метилирования промоторной области гена *SNRPN* методом метилспецифической ПЦР. В дорожки с четными номерами нанесены продукты ПЦР, полученные в реакции с двумя парами праймеров - Met и Unmet. В дорожках с нечетными номерами – продукты амплификации в системе с тремя праймерами. Длины фрагментов ДНК указаны в парах нуклеотидов М - маркер длины фрагментов ДНК Puc19/HpaII.



Синдром Беквита-Видеманна (11p15)



Клинические признаки: макросомия, макроглоссия при рождении, пупочная грыжа, насечки на ушах, гипогликемия, гемигипертрофия, висцеромегалия (гепатомегалия, нефромегалия, панкреомегалия)

У пациентов часто развиваются опухоли – нефробластомы, карциномы надпочечников, гепатобластомы. Частота 1 на 10 000 -12 000





Молекулярная организация хромосомного района 11p15.5

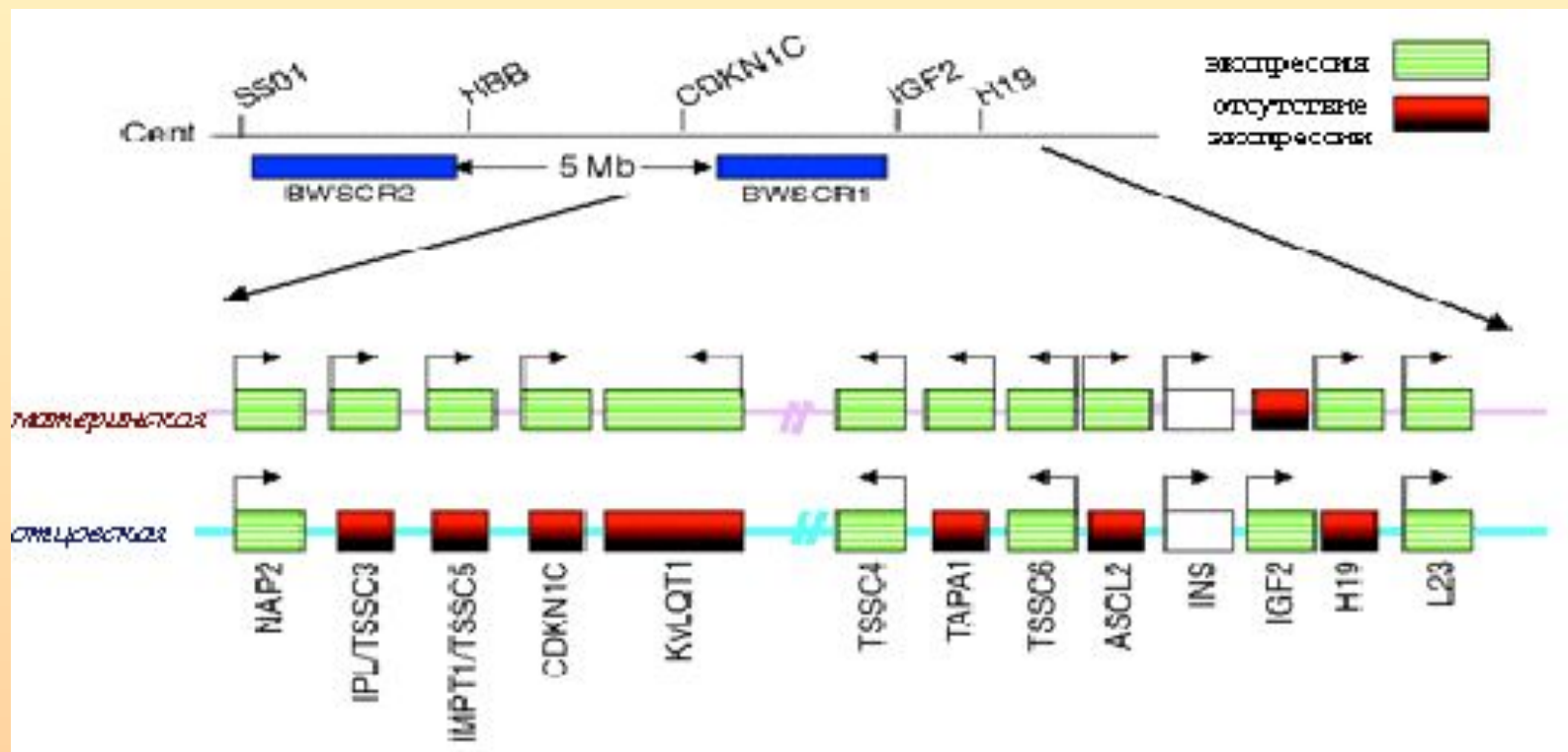
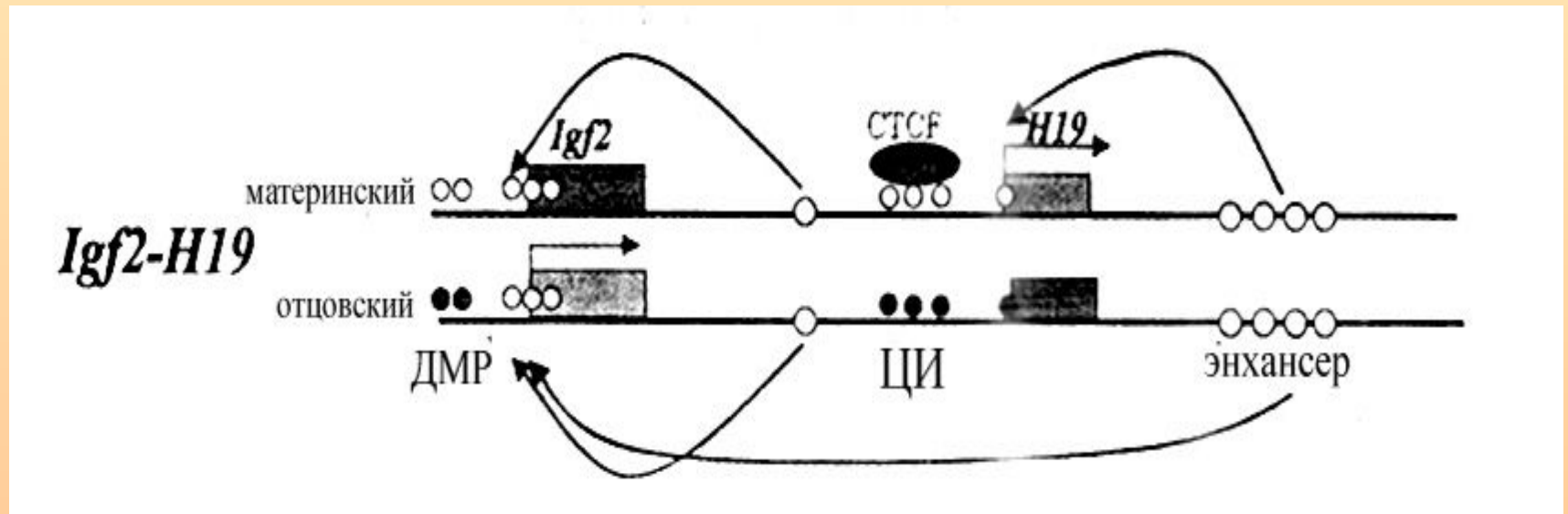
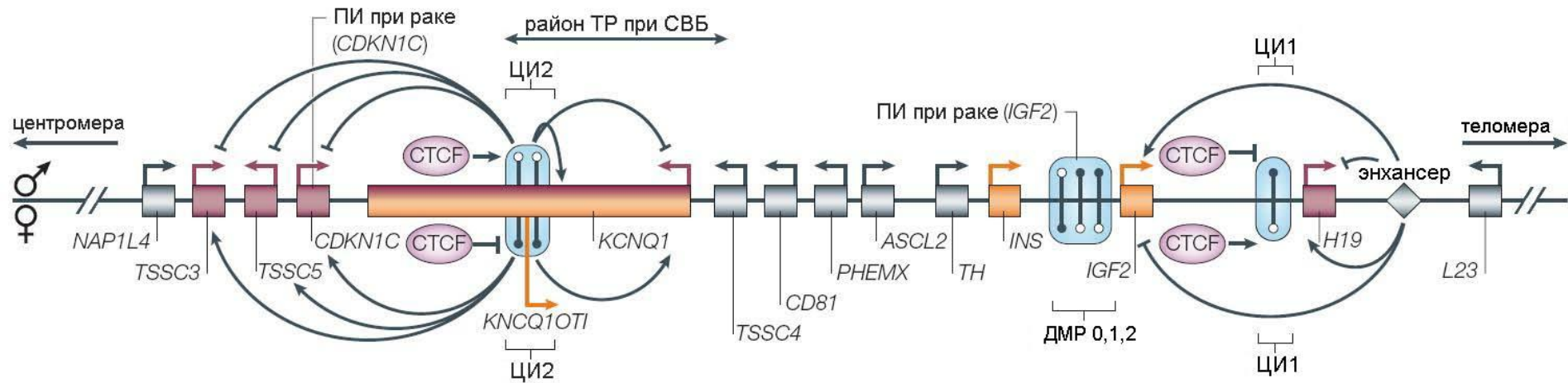
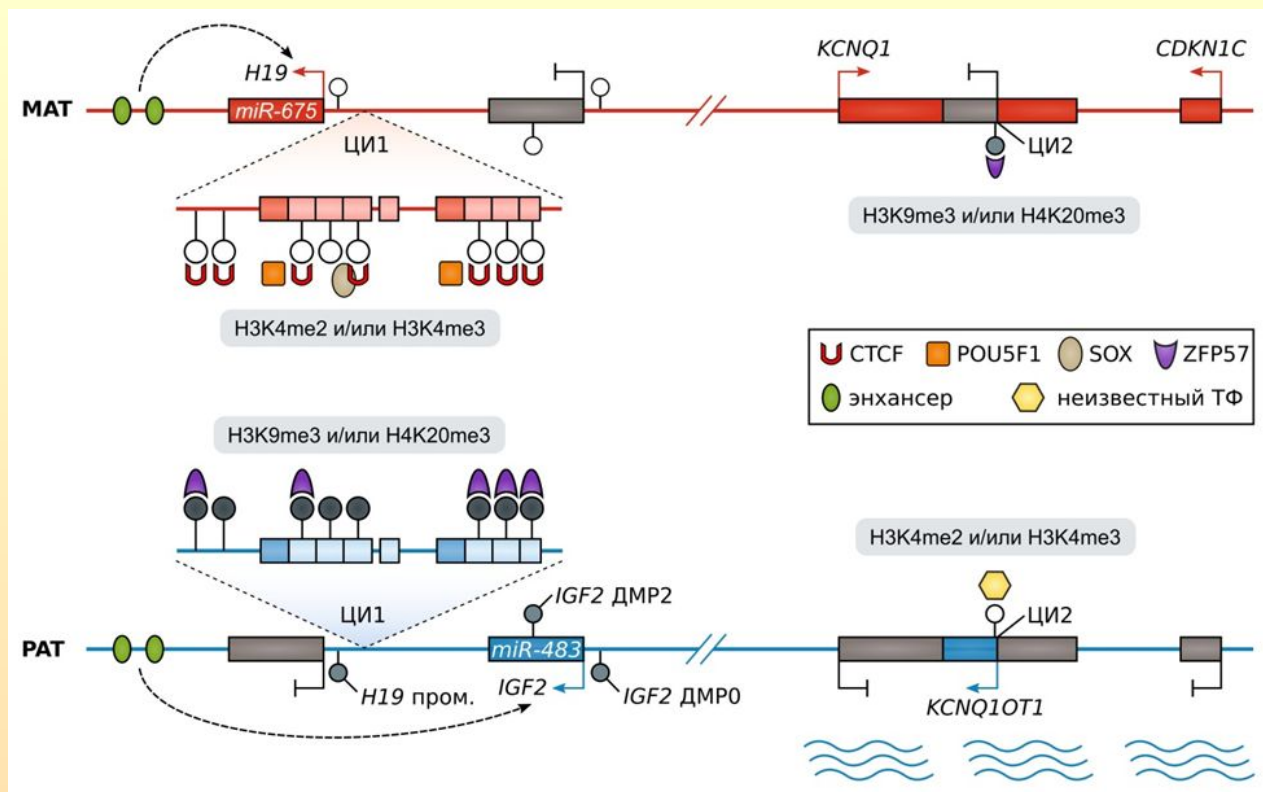


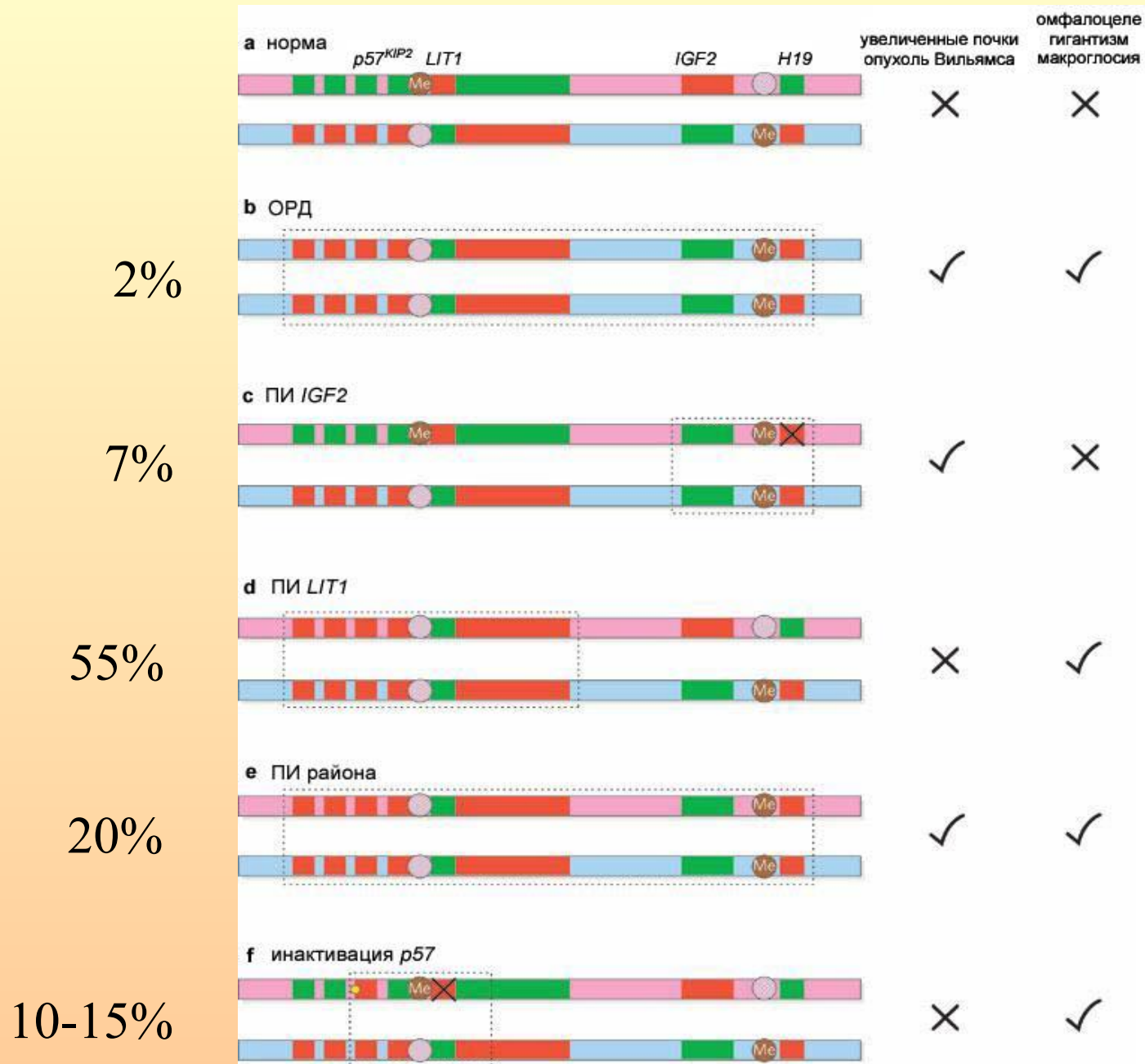
Схема организации и функционирования центра импринтинга 1 и 2 при синдроме Видеманна-Беквита



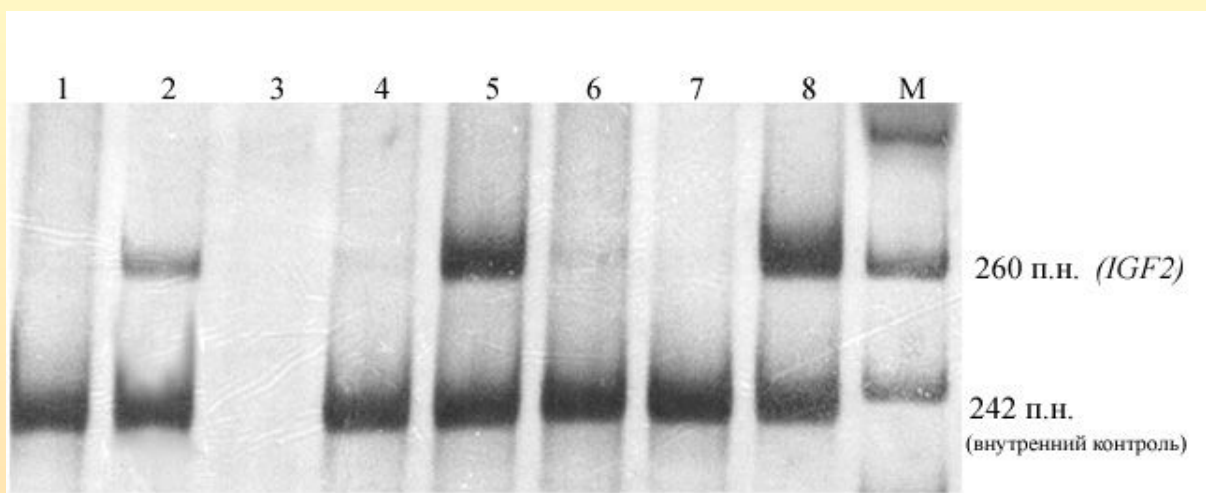


Структурно-функциональная организация ЦИ1 и ЦИ2. Энансеры (зеленые овалы) стимулируют транскрипцию днРНК H19 и внутригенной микроРНК miR-675 на материнской хромосоме (MAT), а на отцовской хромосоме (PAT) стимулируют IGF2 и внутригенную miR-483. ЦИ1, содержит тандемные повторы, которые связывают факторы транскрипции (ТФ) CTCF, POU5F1 и SOX2 и поддерживают неметилированный статус материнского аллеля, тогда как ZFP57 поддерживает метилированный статус отцовского аллеля. ЦИ1 и ЦИ2 характеризуются различными конфигурациями хроматина на родительских хромосомах, с репрессивными метками гистонов (H3K9me2, H3K9me3 и H4K20me3) на метилированном аллеле и активирующими метками H3K4me2 и H3K4me3, на неметилированном аллеле. Вторичные ДМР (промотор H19 (пром), IGF2 ДМР0 и IGF2 ДМР2) метилированы на отцовской хромосоме. В ЦИ2 (KCNQ1OT1) ДМР в сайте старта транскрипции метилирован на материнской хромосоме и определяет материнскую экспрессию KCNQ1 и CDKN1C. На отцовской хромосоме днРНК KCNQ1OT1 транскрибируется (волнистые синие линии) и инактивирует in cis экспрессию кодирующих генов этого района. На материнской хромосоме метилирование ЦИ2 и промотора KCNQ1OT1 поддерживается посредством ZFP57, в то же время, еще неизвестный ТФ поддерживает транскрипцию KCNQ1OT1 на отцовском аллеле.

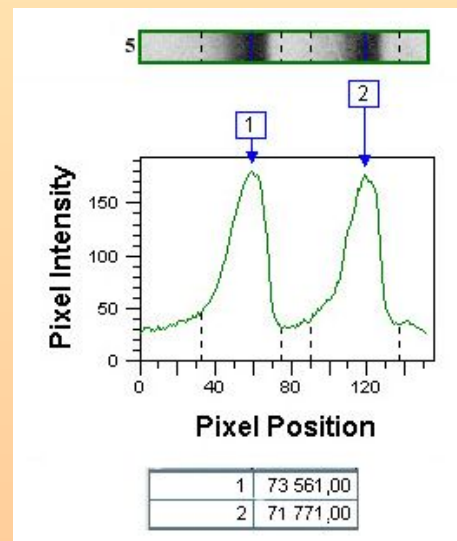
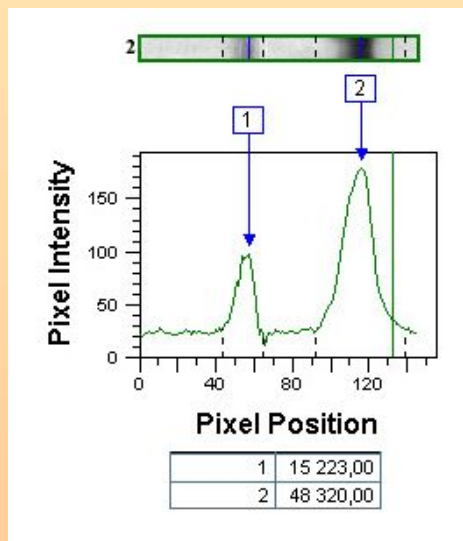
Гено-фенотипические корреляции при СВБ



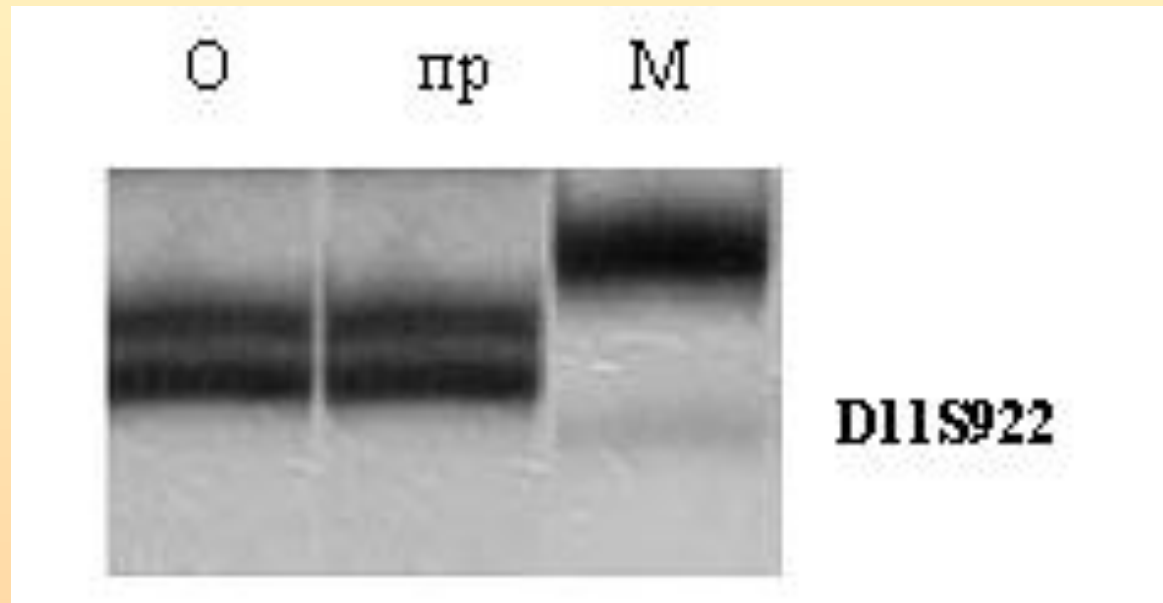
Молекулярная диагностика аллельного метилирования *IGF2* при СВБ



Сравнение данных денситометрии дорожек 2 и 5



Однородительская дисомия при СВБ



Синдром Рассела-Сильвера



Пренатальная и постнатальная задержка роста;

Треугольное лицо с выступающим лбом;

Клинодактилия или брахидактилия;

Макроцефалия;

Скелетная асимметрия;

Мышечная гипотрофия;

Гипотония

Хромосомные перестройки, затрагивающие хромосомы трис.1q42, 7, 8, 11p15, 15q26.3, 17q24 и 18

Мат ОРД 7 (5-15% случаев), тандемные дупликации 7p11.2-p13.

1) 7p11.2-p13 (*GRB10* - ингибитор роста); 2) 7q31-qter (*MEST*);
3) 7q21.3 - *PEG10*

В 30-65% случаев обнаруживается гипометилирование *H19* на отцовской хромосоме 11.

7p11.2-p13. У человека отцовская экспрессия *GRB10* установлена в головном и спинном мозге, материнская – в скелетных мышцах, в остальных тканях ген экспрессируется биаллельно. Мышиный ген импринтирован, экспрессируется с материнской хромосомы во всех тканях кроме мозга, где экспрессируется отцовский аллель. Делеции материнского аллеля гена приводят к увеличению роста у потомства, свидетельствуя о его функции, как негативного регулятора роста.

7q32.2 содержит 5 импринтированных генов, включая гены *MEST*, *COPG2IT1*, *MESTIT1*, которые экспрессируются с отцовской хромосомы, а *CRA4* и *KLF14* – с материнской. *MEST* имеет две изоформы, одна из которых экспрессируется с отцовского аллеля, а вторая (использующая альтернативный первый экзон) экспрессируется биаллельно во всех тканях, кроме плаценты. Нокаут гена у мышей приводит к малому размеру потомства.

7q21.3 содержит гены *PEG10* и *SGCE*, имеющих отцовскую экспрессию, *PPP1R9A* экспрессируется с материнского аллеля в эмбриональных скелетных мышцах и экстраэмбриональных тканях, а ген *TFP12* экспрессируется с материнского аллеля в плаценте. Делеции *PEG10* у мышей приводят к ранней эмбриональной гибели.

Схема эпигенетической патологии при СРС (гипометилирование *H19* на отцовской хромосоме 11)

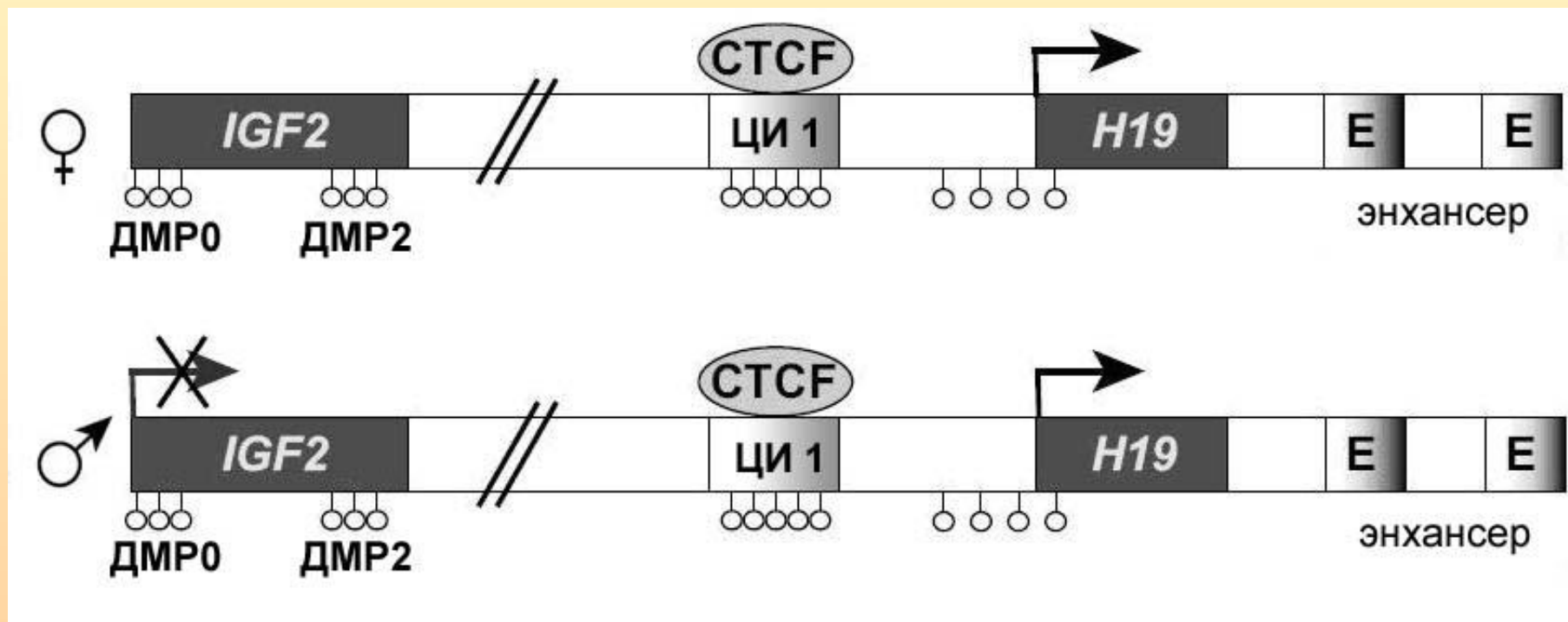
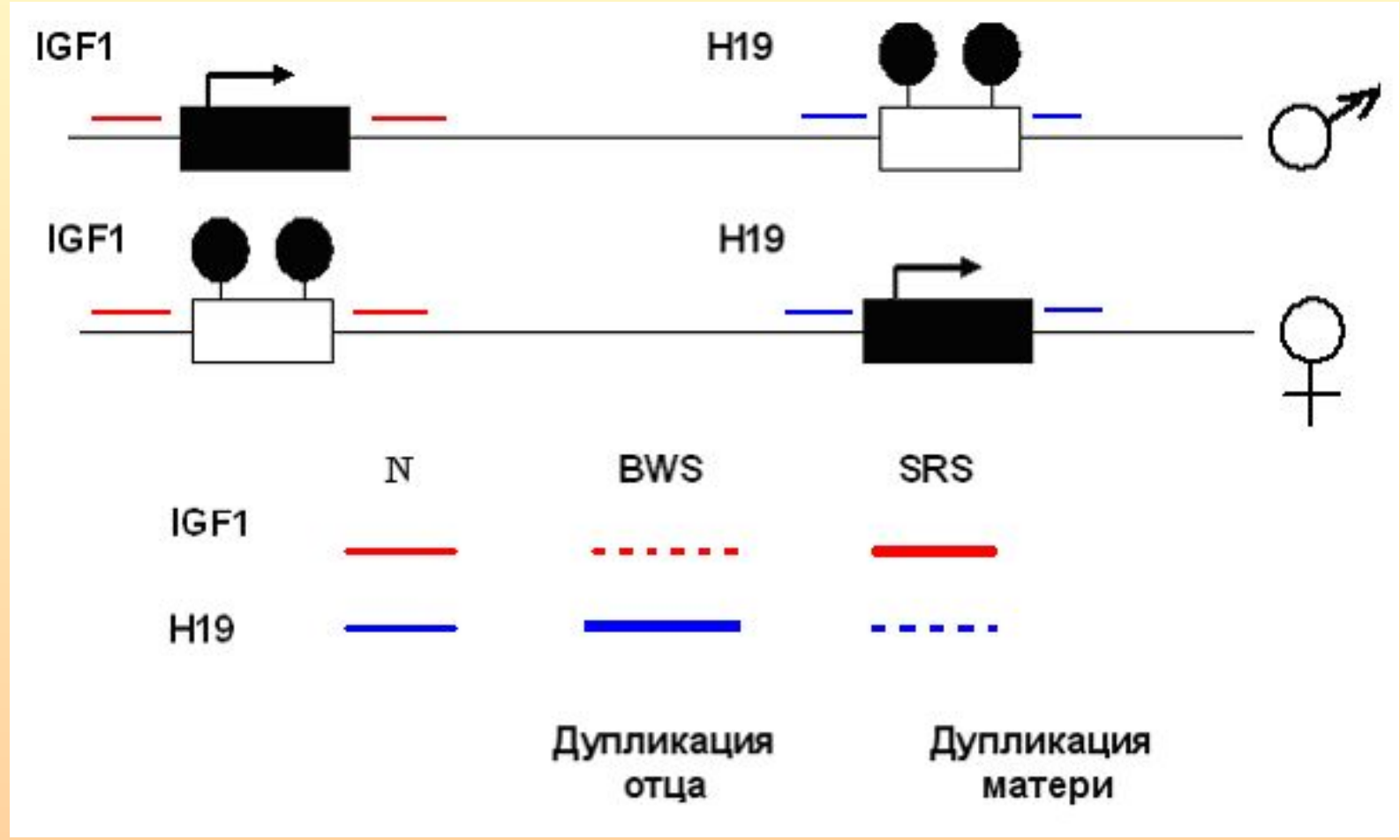
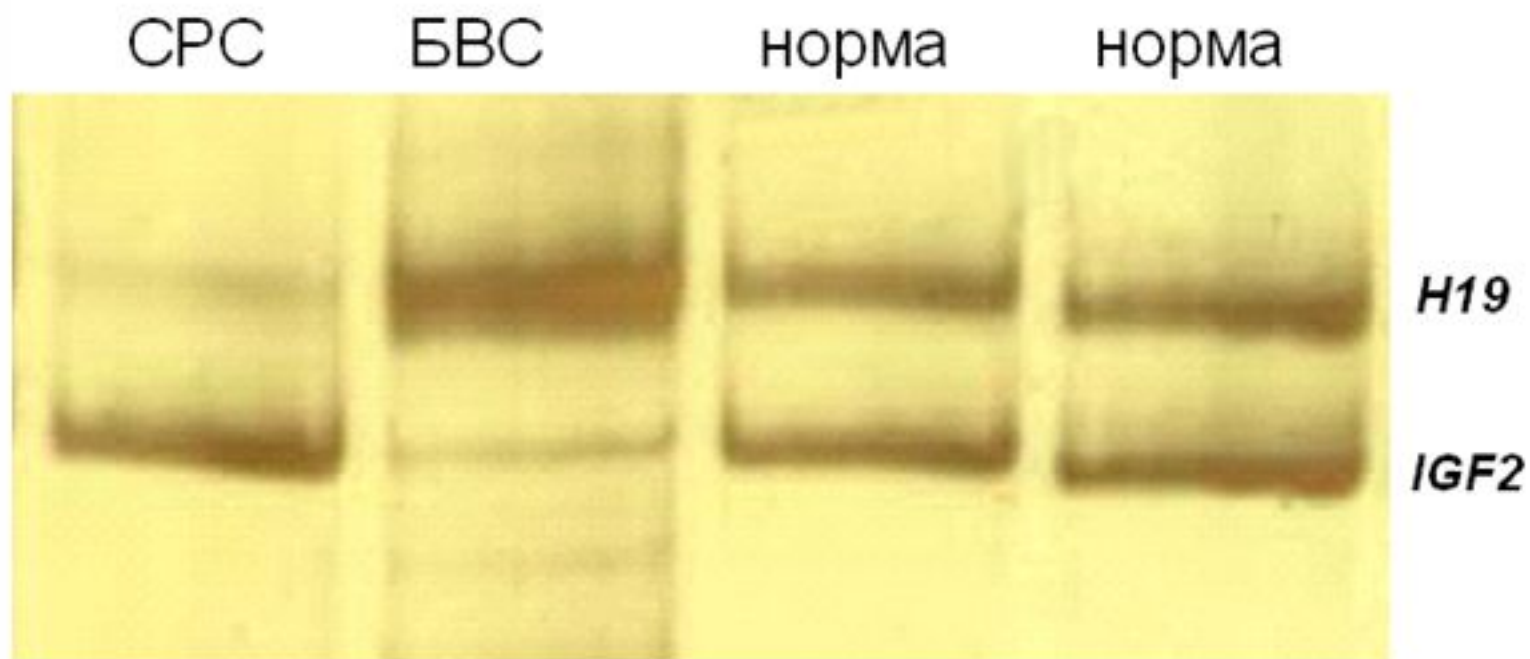


Схема молекулярной диагностики СРС и СВБ



Молекулярная диагностика аномального метилирования при СРС и СВБ



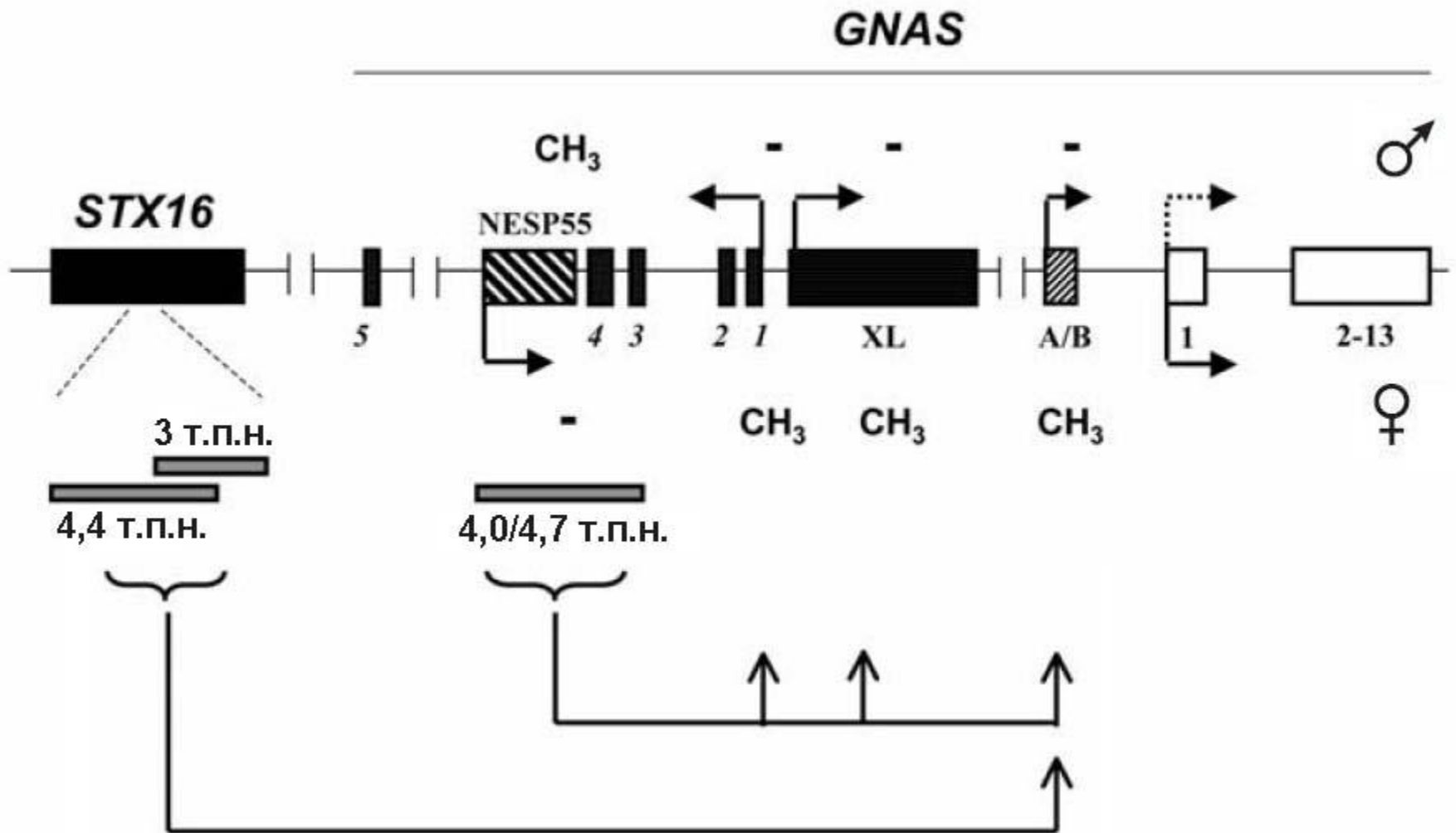
Псевдогипопаратиреоз 1в

Редкое наследственное заболевание костной системы, имитирующее гипопаратиреоз и характеризующееся нарушением обмена кальция и фосфора. Частота в популяции 1:100-150 тыс. человек.



**низкий рост; круглое лицо;
задержка нервно-психического
развития; скелетные аномалии;
низкое содержание кальция в
сыворотке крови; высокий уровень
паратиреоидного гормона в крови;
снижение экскреции с мочой
фосфатов и цАМФ.**

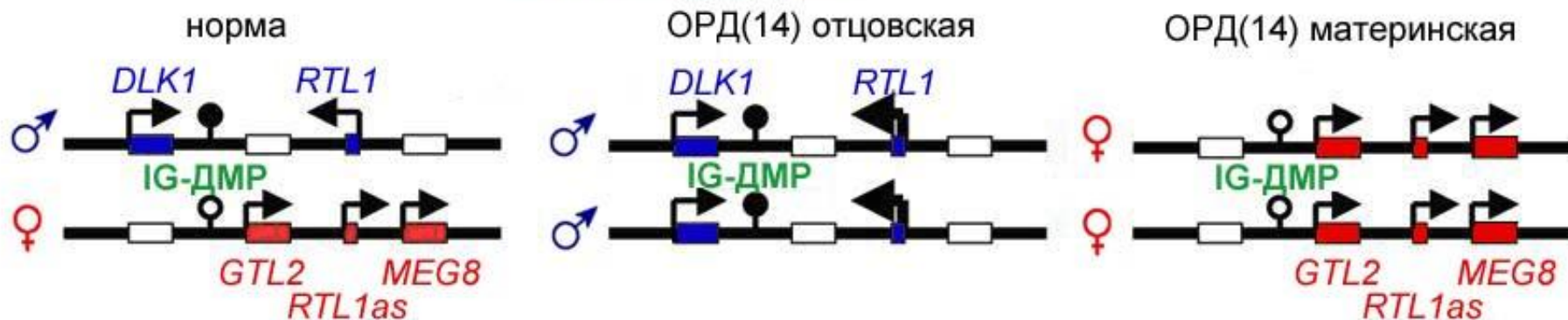
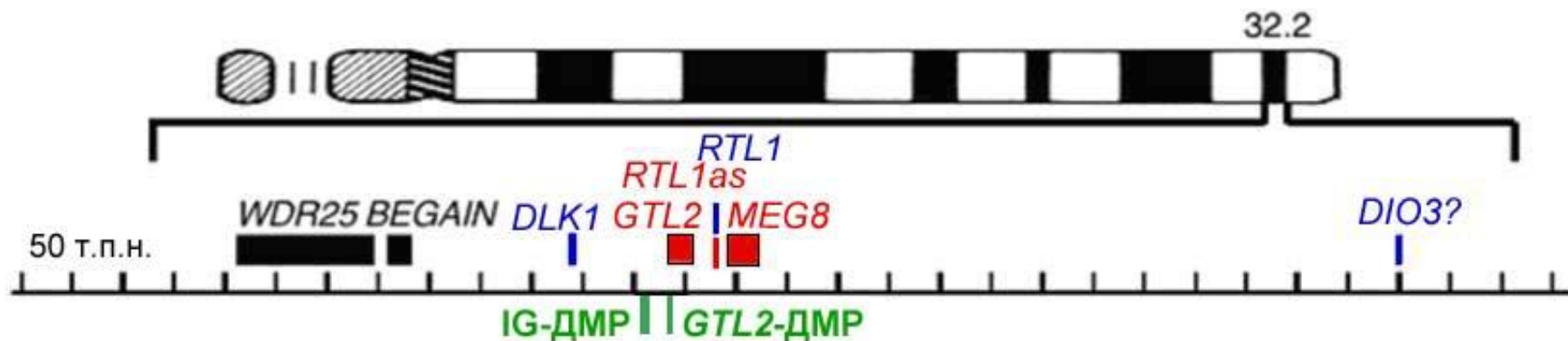
Псевдогипопаратиреозидизм 1в проявляется гипокальциемией и гиперфосфатемией в результате резистентности к ПТГ. Описаны как спорадические, так и семейные случаи заболевания, причем последние наследуются аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью. Анализ больших семей показал, что резистентность к ПТГ развивается только в том случае, если дефект наследуется по материнской линии. У пациентов с ПГП 1а, как правило, выявляются мутации в *GNAS* (кодирует α -субъединицу белка, связывающего гуанин), а у пациентов с ПГП 1в таковых не обнаружено. В то же время у последних обнаруживается потеря метилирования РДМ локуса *GNAS* (20q13.2), особенно в области альтернативного экзона *A/B*, что приводит к биаллельной экспрессии *A/B*-транскрипта.



Структурная молекулярная патология, которая приводит к нарушению функционирования импринтированного локуса *GNAS*. Делеция 3 т.п.н. гена *STX16* нарушает элемент, устанавливающий или поддерживающий метилирование РДМ А/В. Делеции РДМ *NESP55* повреждают элемент, контролирующий импринтинг всего локуса *GNAS* на материнской хромосоме. CH₃ – наличие метилирования.

Район хромосомы 14q32.2 содержит кластер импринтированных генов: часть экспрессируется с отцовской хромосомы – *DLK1*, *RTL1* и *DIO3*, а другие - *GTL2*, *RTL1as* и *MEG8* – с материнской. *DLK1*- регулирует дифференцировку преадипоцитов, экспрессируется в нейроэндокринных тканях, особенно в корковом слое надпочечников. *RTL1*- ретротранспозон-подобный ген, экспрессирующийся в плаценте и позднем фетальном периоде. *DIO3*- йодтиронин дейодиназа 3 типа имеет несколько транскриптов: один, молекулярной массой 2,1 т.н. экспрессируется в плаценте, фетальной печени и матке, другой – 3,2 т.н. – в яичках, мочевом пузыре и матке, третий – 4,8 т.н. – в сердце и скелетных мышцах. Функция гена *GTL2* неизвестна, но в интронах выявлен сайт связывания белка CTCF и кластер малых ядрышковых РНК, что предопределяет его регуляторные функции. Функции *RTL1as* и *MEG8* неизвестны.

ОРД отцовского происхождения (с-м Кагами-Огата) очень редка (30 случаев) характеризуется лицевыми аномалиями, маленькой колоколо-подобной грудиной, аномалиями брюшной стенки и полигидрамнионом. Колоколо-подобная грудина является патогномичным признаком, зачастую летальным. В нескольких случаях, имеющих сходный фенотип, ОРД не обнаружено, но выявлены гиперметилирование и микроделеции импринтированного района на материнской хромосоме. Материнская ОРД (50 пациентов) (с-м Темпл) характеризуется пренатальной и постнатальной задержкой роста, гипотонией, лицевыми аномалиями, маленькими руками и ранним пубертатным периодом.



Импринтированный район хромосомы 14q32.2 и экспрессия импринтированных генов. Гены, имеющие отцовскую экспрессию, обозначены синим цветом, материнскую - красным. *WDR25* и *BEGAIN* экспрессируются биаллельно. Межгенный ДМР (IG-ДМР) и *GTL2*-ДМР обозначены зеленым цветом. В норме импринтированные гены поддерживают моноаллельную экспрессию в соответствии с родительским происхождением метилирования ДМР. При ОРД отцовского происхождения импринтированные гены экспрессируются биаллельно, причем *RTL1* гиперэкспрессируется в отсутствие *RTLas*. При ОРД материнского происхождения импринтированные гены также экспрессируются биаллельно.

Некоторые миРНК млекопитающих импринтированы. У мыши *miR-127* и *miR-136* транскрибируются как антисмысловые к реципрокно импринтированному транспозон-подобному гену (*Rtl1*) и экспрессируются, соответственно, с материнской и отцовской хромосом. Кроме того, соседние районы содержат кластеры мякРНК и миРНК, экспрессирующиеся с материнской хромосомы. Можно предполагать, что эти миРНК играют роль в процессе импринтинга, либо осуществляя аллель-специфическую модификацию хроматина, либо адресно воздействуя на определенные транскрипты.

У человека *miR-127* и *miR-136* расположены в импринтированном районе хромосомы 14q32. Отсутствие их экспрессии сопровождается аномалиями развития.

The imprinted *DLK1-DIO3* domain

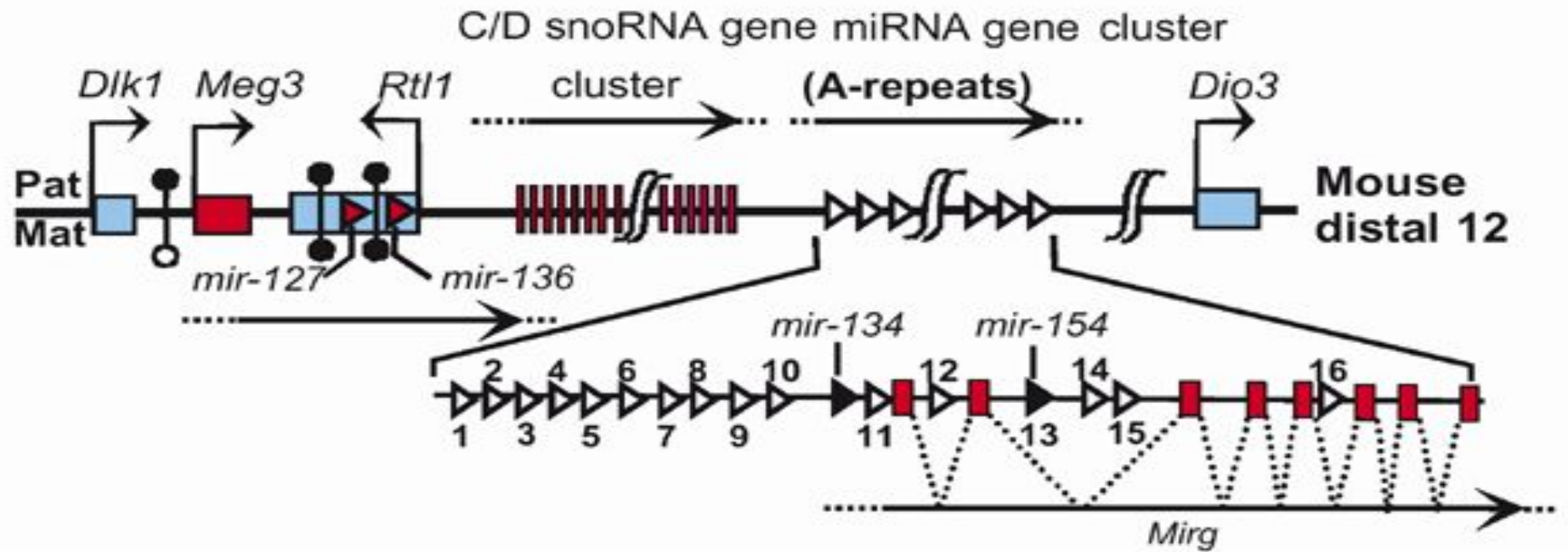
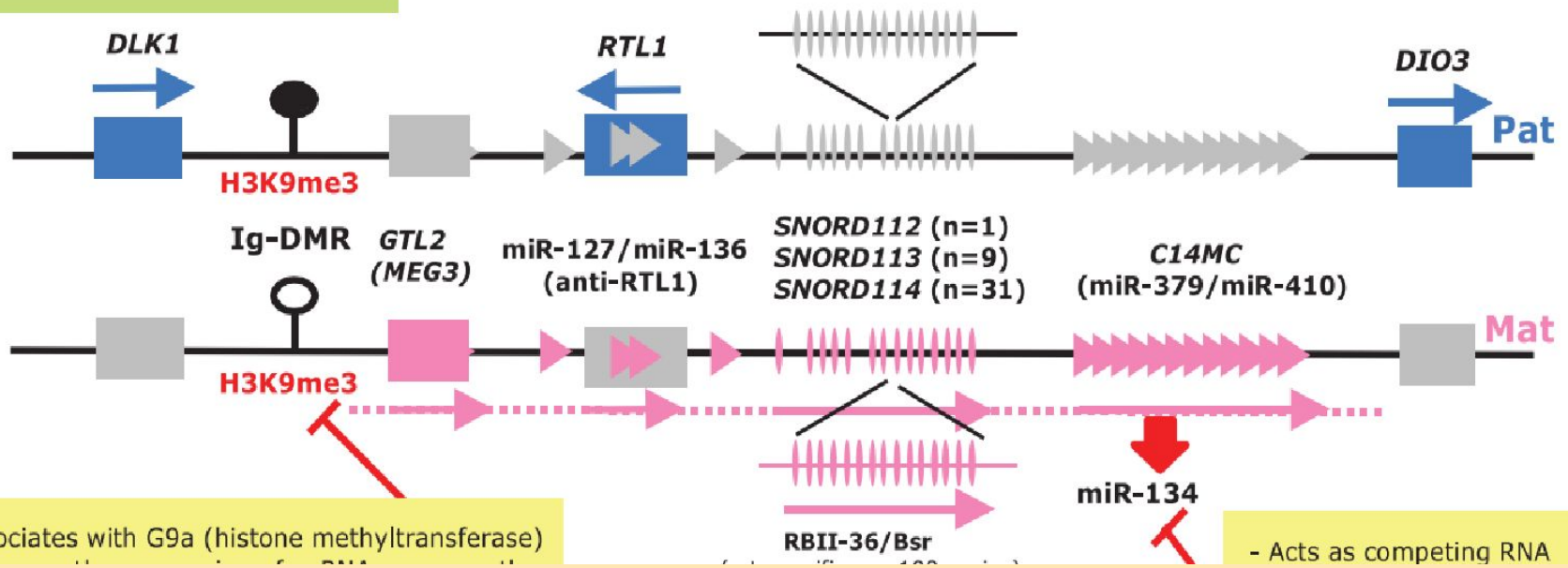
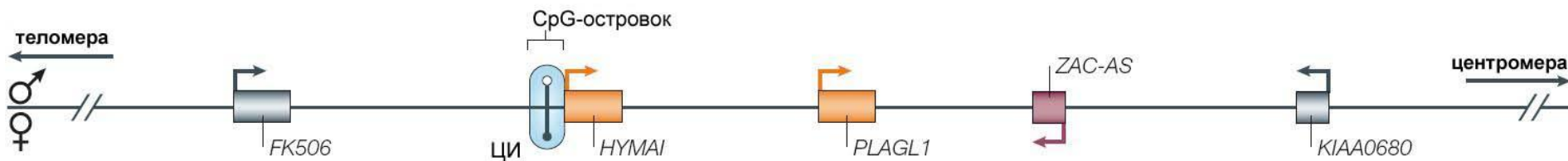
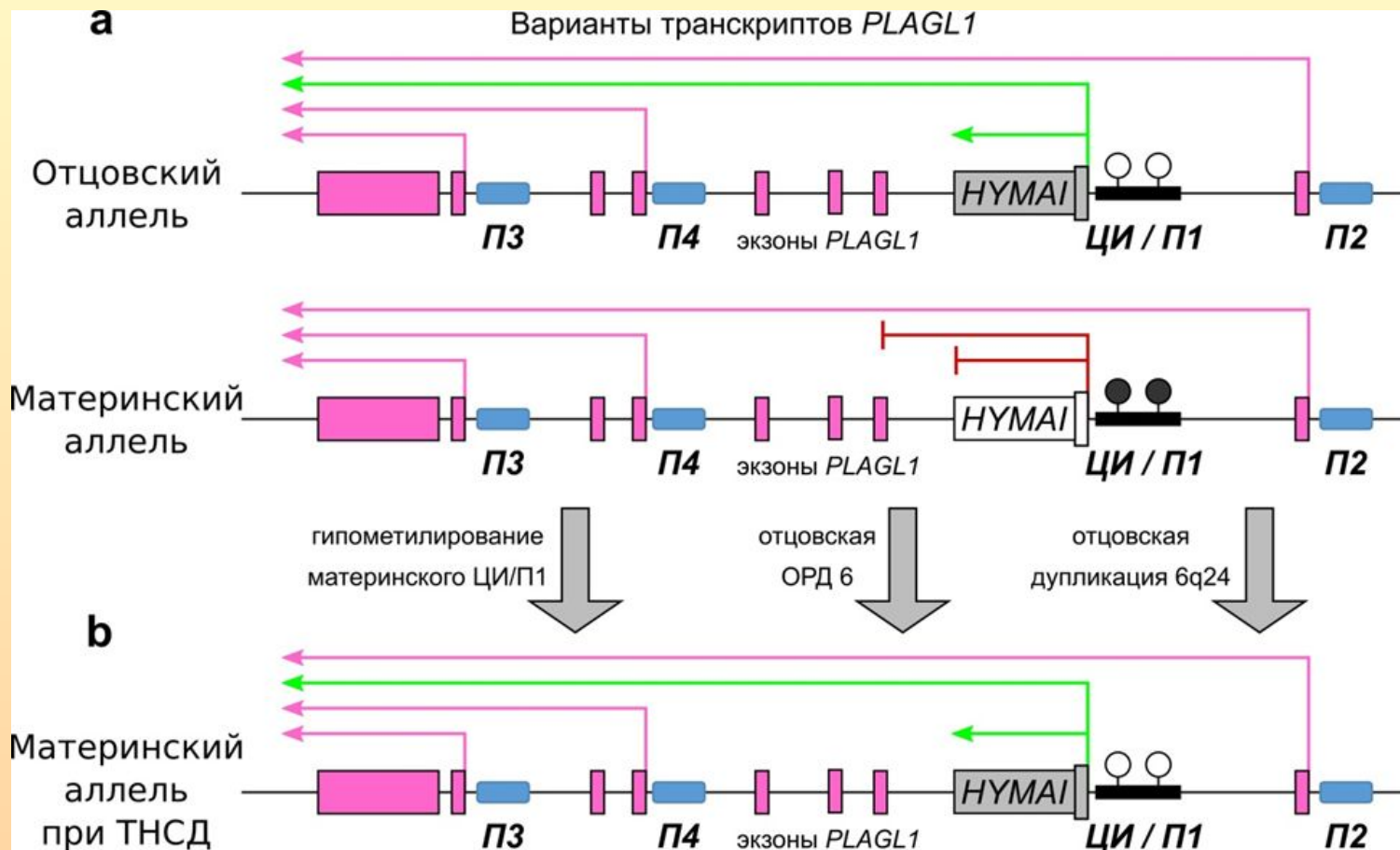


Схема молекулярной организации импринтированного района 6q24.



Транзиторный неонатальный диабет редкое заболевание (частота 1:500000 новорожденных), которое проявляется гипергликемией, глюкозурией, сильной дегидратацией организма и задержкой роста. В небольшом количестве описанных семейных случаев наследование было исключительно отцовское и ассоциировалось с дупликацией района хромосомы 6q24. ТНД является результатом двойной дозы отцовского эпигенотипа, который в 30% возникает в результате отцовской дупликации, отцовской ОРД по хромосоме 6 – в 41% и в 29% - в результате гипометилирования РДМ на материнской хромосоме. *ZAC/PLAGL1*.

Структура импринтированного района 6q24.2 и варианты экспрессии генов при ТНСД



Розовые прямоугольники и стрелки – биаллельно экспрессирующиеся последовательности; зеленые стрелки – отцовская экспрессия; черные и белые кружки – метилированное и неметилированное состояние ЦИ; П1 – П4 промоторные районы

Описано более 10 пациентов с СВБ, у которых, помимо материнского гипометилирования СВБ-ЦИ2 обнаружена потеря метилирования по другим локусам. У 6 пациентов с ТНД, кроме материнского гипометилирования РДМ на хромосоме 6q24, выявлены и другие локусы гипометилирования. Была описана семья (близкородственный брак), в которой две дочери имели фенотипические проявления ТНД с некоторыми признаками СВБ. При исследовании статуса метилирования импринтированных районов установлено, что потеря метилирования произошла не только в импринтированном районе *ZAC* (6q24), но и в районах *KCNQ1OT1* (11p15.5), *GRB10* (7p11.2–p12), *PEG3* (19q13), *PEG1/MEST* (7q32) и *NESPAS* (20q13). Предполагается, что в семье имеет место некий аутосомно-рецессивный дефект, повреждающий механизмы метилирования у потомства, или нарушен процесс установления импринтинга в ооцитах.

В 2008 г. было установлено, что причиной такого многолокусного гипометилирования РДМ могут быть мутации в гене *ZFP57*, расположенном в 6p22.1. Ген является транскрипционным репрессором и его основная роль – поддержание импринтированного метилирования ДНК на самых ранних клеточных стадиях развития.

Импринтинг и вспомогательные репродуктивные технологии

Наиболее распространенная патология:

С-м Ангельмана – 20 случаев

С-м- Прадера-Вилли – 13 случаев

С-м Видеманна-Беквита – 60 случаев

(риск увеличивается в 14 раз)

56 пациентов имели эпимутацию ЦИ2

(потеря импринтинга по LIT 1)

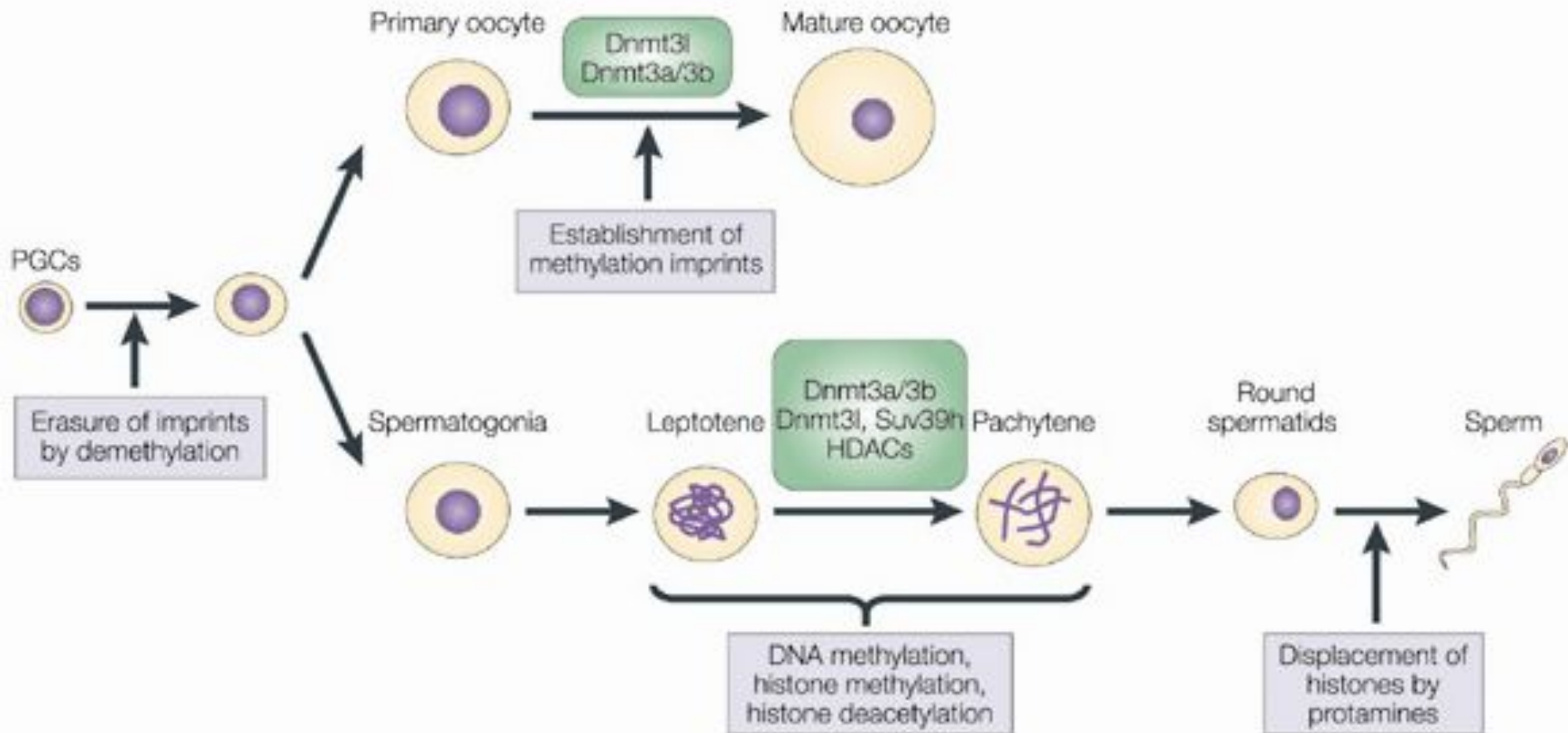
Синдром Сильвера-Рассела - 5

Целый ряд причин может приводить к эпигенетическим аномалиям: 1) бесплодие само по себе; 2) процесс стимуляции овуляции; 3) физические манипуляции с эмбрионом в процессе оплодотворения *in vitro* (IVF), введение сперматозоида в яйцеклетку (ICSI), непосредственно перенос эмбриона; 4) особенности культивирования эмбриона *in vitro*. Эти критические манипуляции совпадают с очень тонкими эпигенетическими процессами стирания, установления и поддержания метилирования на ранних этапах формирования гамет, оплодотворения и раннего эмбриогенеза. Большинство случаев связано с нарушением метилирования материнского аллеля.

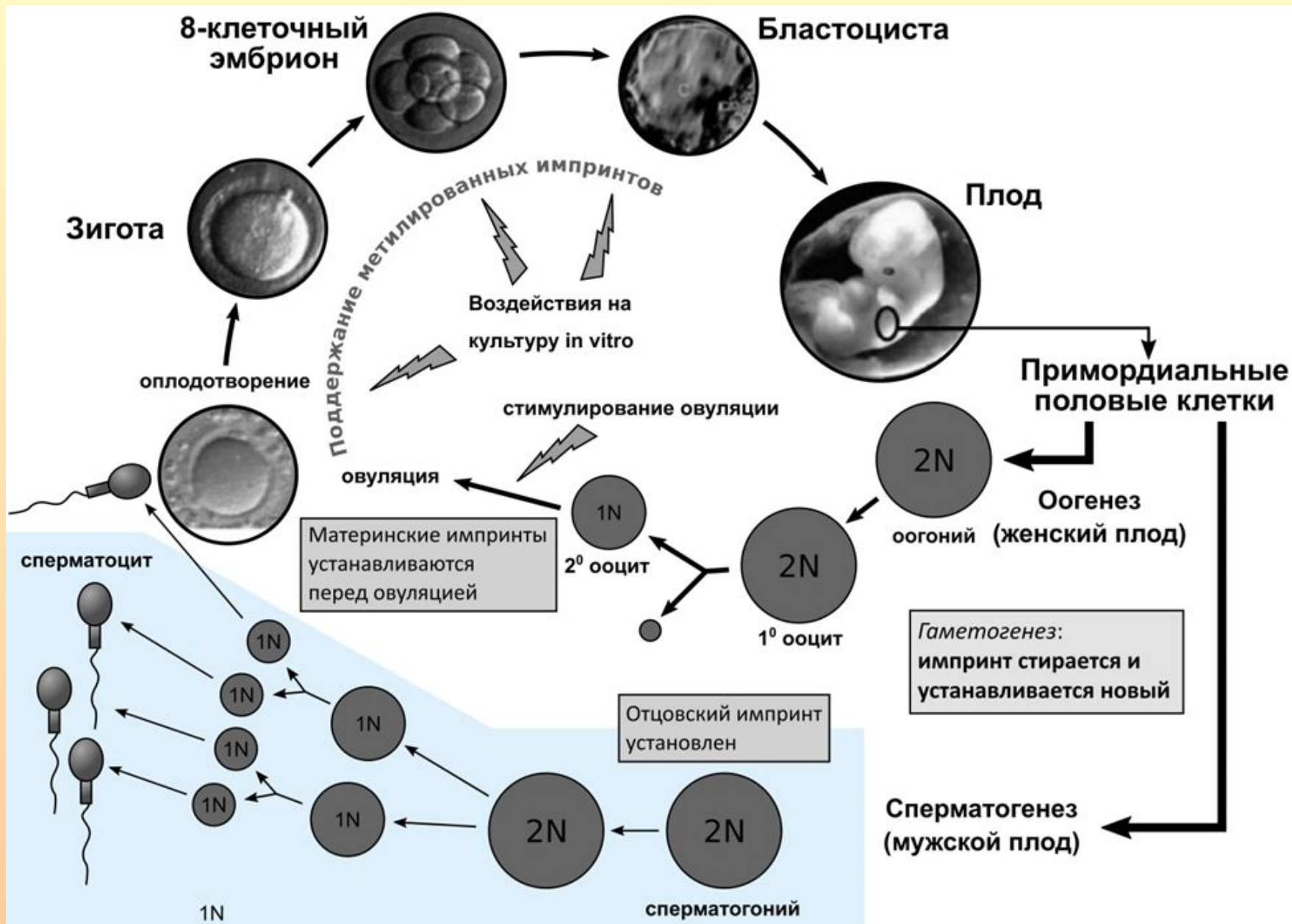
Материнский геном может быть более подвержен дефектам импринтинга и метилирования в течение преимплантационного периода, когда эмбрион полностью зависит от условий культивирования *in vitro*.

В ряде случаев установлена материнская ОРД. Этот факт имеет логическое обоснование: нерасхождение хромосом характерно для возрастных женщин, которые составляют значительную группу, прибегающую к ВРТ.

Метилирование/демети́лирование в процессе гаметогенеза



Критические этапы гаметогенеза и раннего эмбриогенеза, могущие привести к эпигенетической патологии при ВРТ



Синдром Мартина-Белл



Синдром Мартина-Белл



- normal structure
- broad forehead
- elongated face
- large prominent ears
- strabismus (crossed eyes)
- highly arched palate
- hyperextensible joints
- hand calluses
(from self-abuse)
- pectus excavatum
(indentation of chest)
- mitral valve prolapse
(benign heart condition)
- enlarged testicles
- hypotonia (low muscle tone)
- soft, fleshy skin
- flat feet
- seizures (in about 10 percent)



Наследование СМБ носит необычный характер: передача заболевания происходит через фенотипически нормальных мужчин (нормальные трансмиттеры); дочери нормальных трансмиттеров никогда не бывают умственно отсталыми и никогда или почти никогда не имеют ломкого сайта на X-хромосоме, однако в следующем поколении треть женщин умственно субнормальны, а их сыновья, в свою очередь, как правило, оказываются больными. Братья клинически нормальных мужчин-носителей маркерной хромосомы имеют низкий риск заболевания СМБ, в то время как для их внуков и правнуков риск значительно выше. Такой необычный характер наследования СМБ получил название парадокса Шерман

Ломкость X-хромосомы

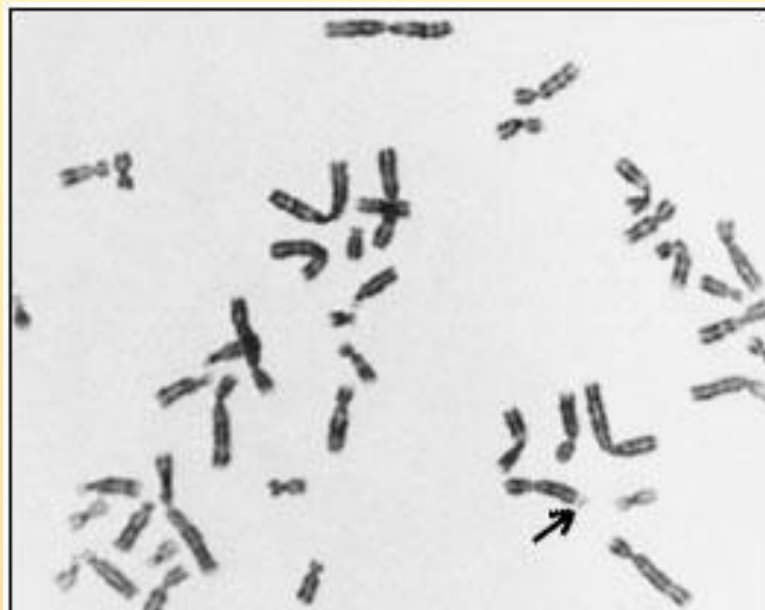
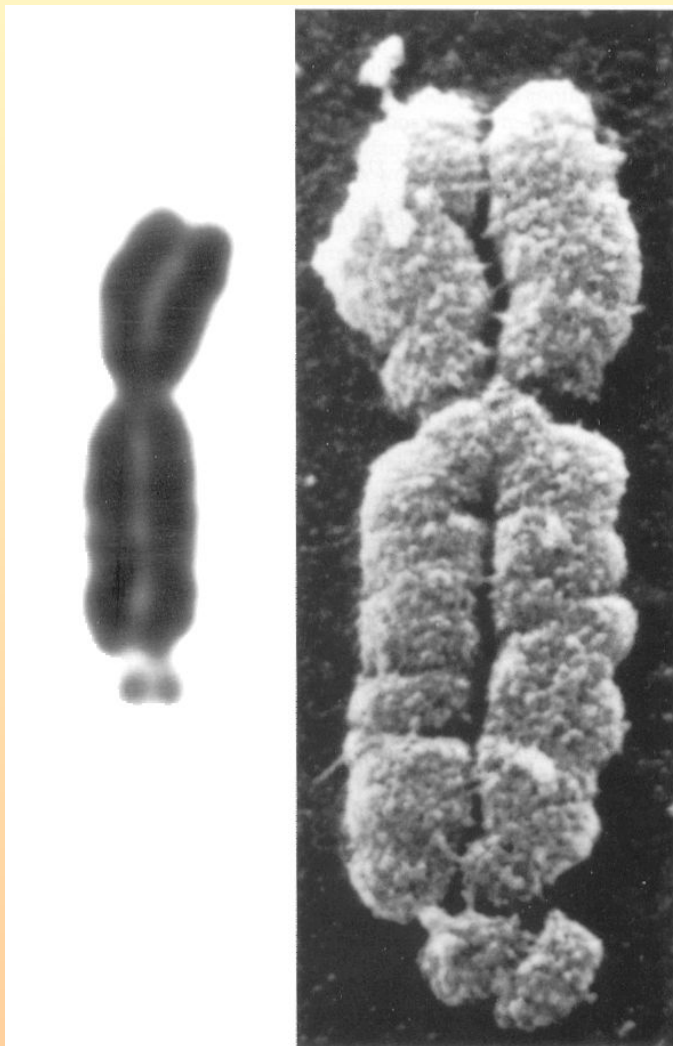
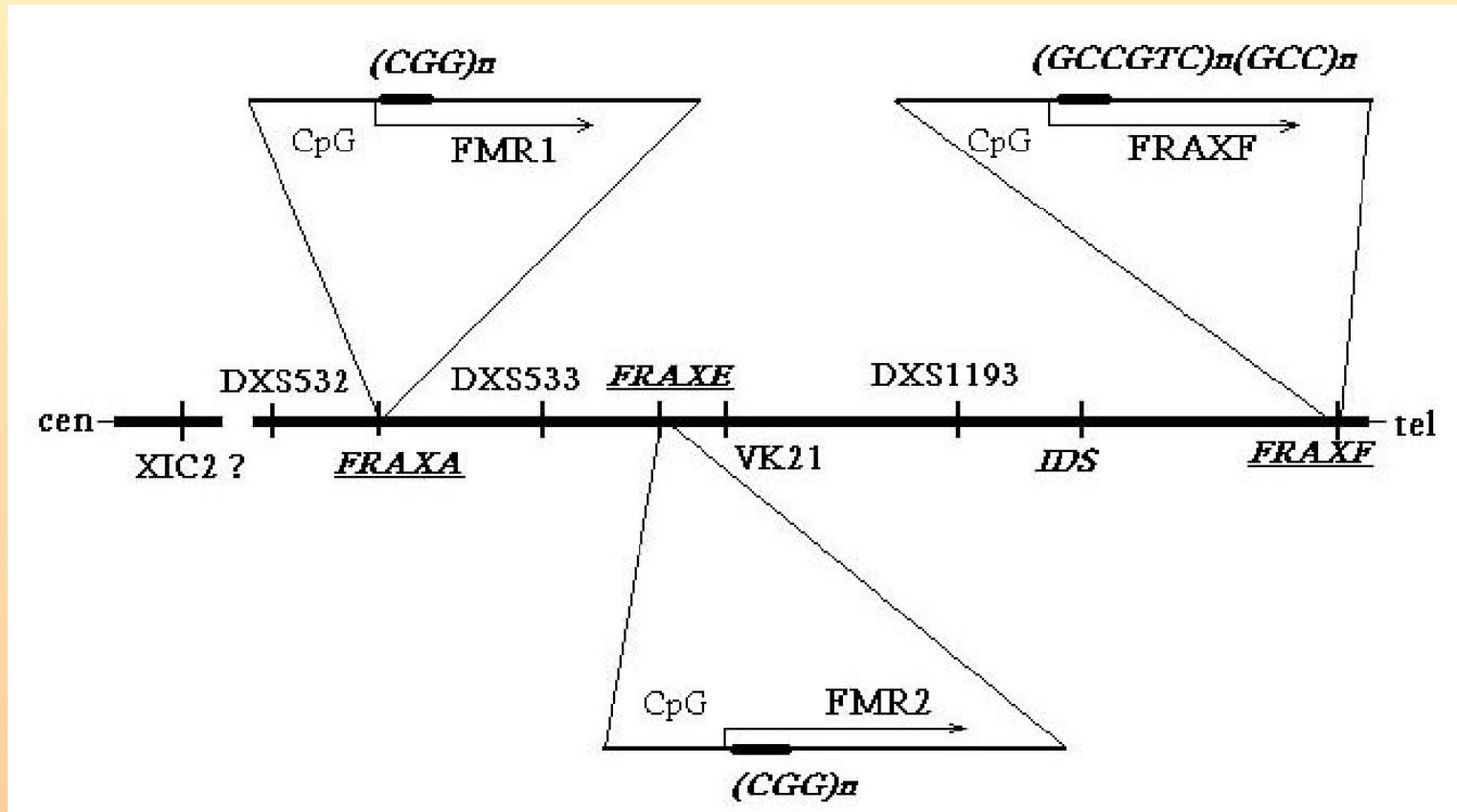


Figure 1. Cytogenetic fragile site associated with fragile X syndrome appears as a nonstaining gap (arrow) near the tip of the long arm of the X chromosome in this Giemsa-stained chromosome spread. The gap is induced by special tissue-culture conditions, in which cells are deprived of a substrate they require for DNA synthesis. In fragile X males the gap can be demonstrated in not more than 50% of X chromosomes analyzed, and in females not more than 30%. Hence, findings may sometimes be inconclusive, especially for prenatal testing. Discovery that the mutation shared by virtually all patients with fragile X syndrome is an expansion of a CGG trinucleotide has made genetic diagnosis far more precise.

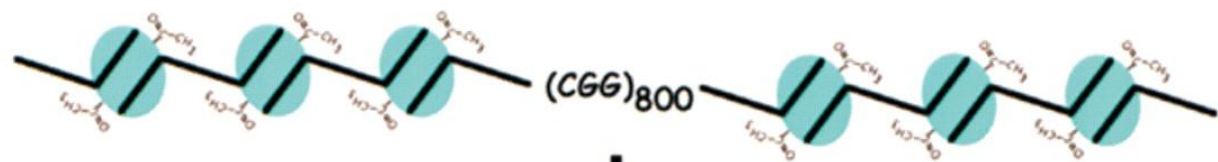
Схема расположения фолатчувствительных ломких сайтов на X-хромосоме



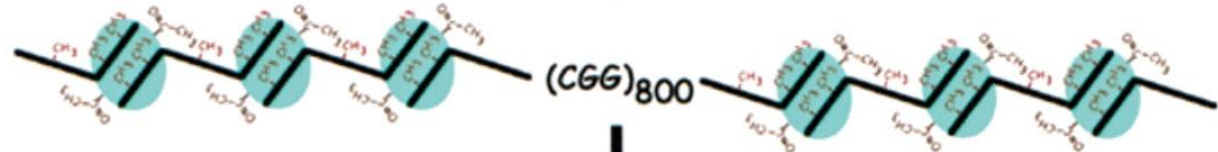
Синдром Мартина-Белл

	Число триплетов CGG	Метилирование промотора гена <i>FMR1</i>	Фенотип СМБ
норма	2-54	-	-
премутация	55-230	-	-
полная мутация	>230	+	+

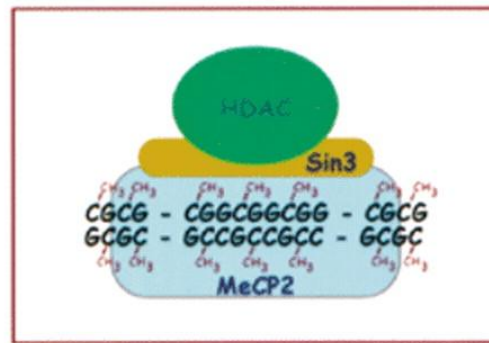
Аллели в состоянии премутации выявляются у всех нормальных трансмиттеров и, по крайней мере, у 80% бессимптомных носительниц. Нормальные трансмиттеры всегда передают своим дочерям премутацию в неизменном виде. В то же время, премутации, передаваемые женщинами, в 80% случаев трансформируются в полные мутации, причём вероятность такой трансформации прямо зависит от размера премутации. Полная мутация выявляется практически у всех больных обоего пола и у 20% бессимптомных носительниц.



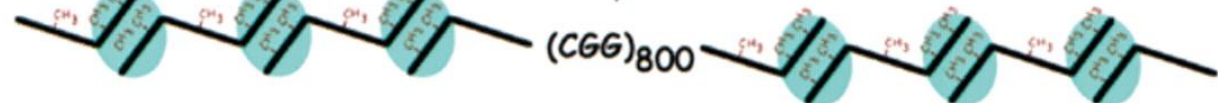
A



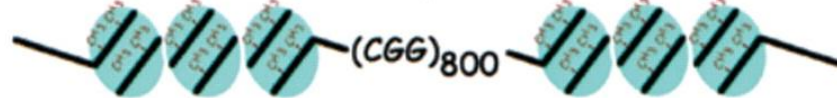
B



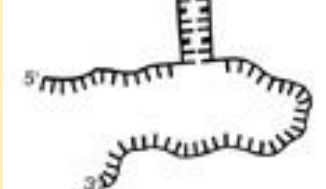

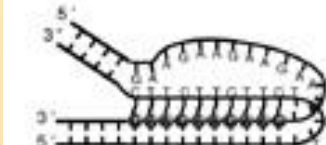
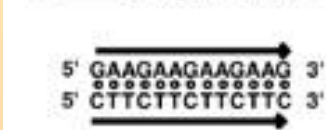
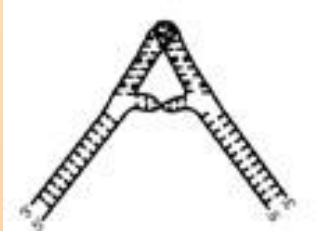
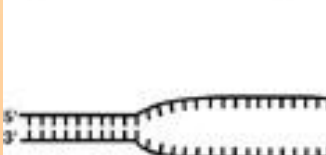
C

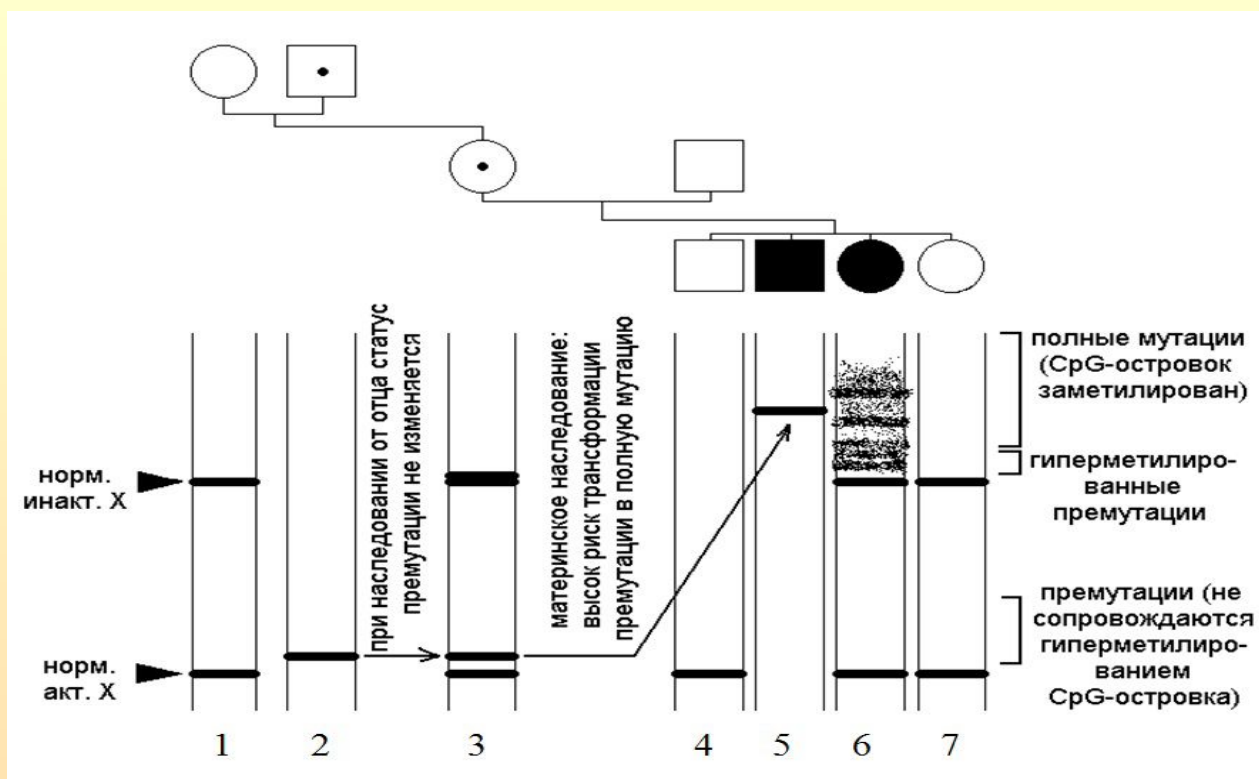


D



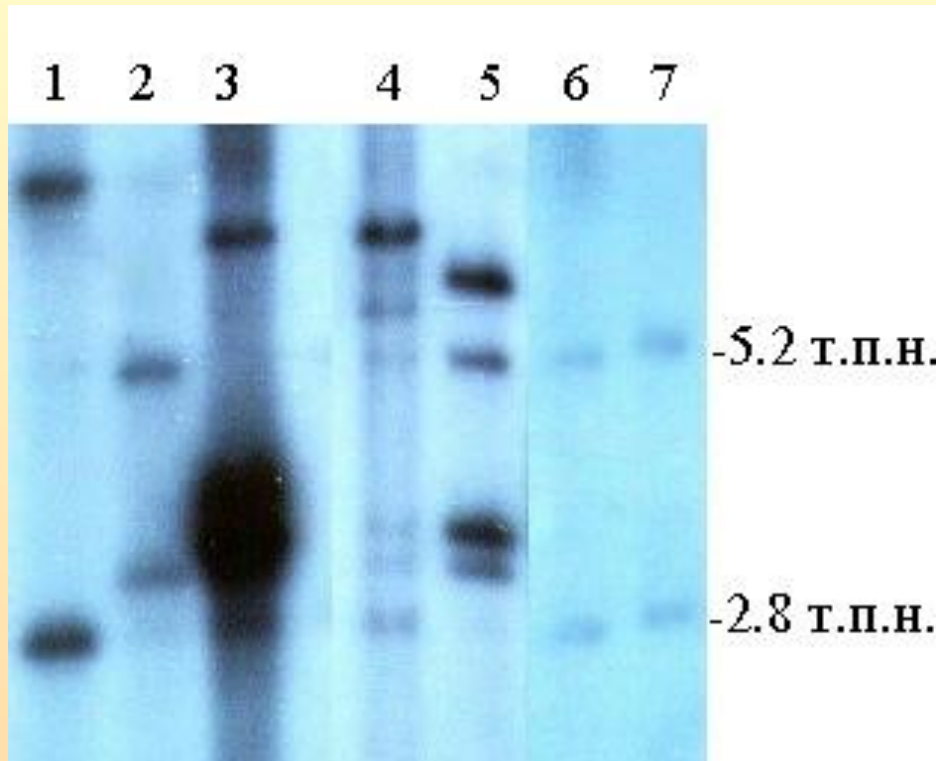
Potential Mutagenesis Associated With Alternative DNA Structures

	Alternative Structure	Repeat	Involvement of Alternative Structure in Mutagenesis & Genetic Instability
	single-strand hairpins	CGG CCG CTG CAG	promotes deletions in the template strand promotes additions in the nascent strand (expansions)
	quadruplex DNA	CGG GGT	blocks to DNA replication (promote misalignment)
	intramolecular Py-Pu-Py triplex	GAA	strong block to replication (promotes misalignment) mutations associated with triplex sequences
	parallel strand DNA	GAA	?
	slipped strand DNA, folded slipped strand DNA	CGG CCG CTG CAG	strong block to replication (promotes misalignment)
	Unwound DNA	ATTCT	NOT EXPECTED TO BLOCK REPLICATION

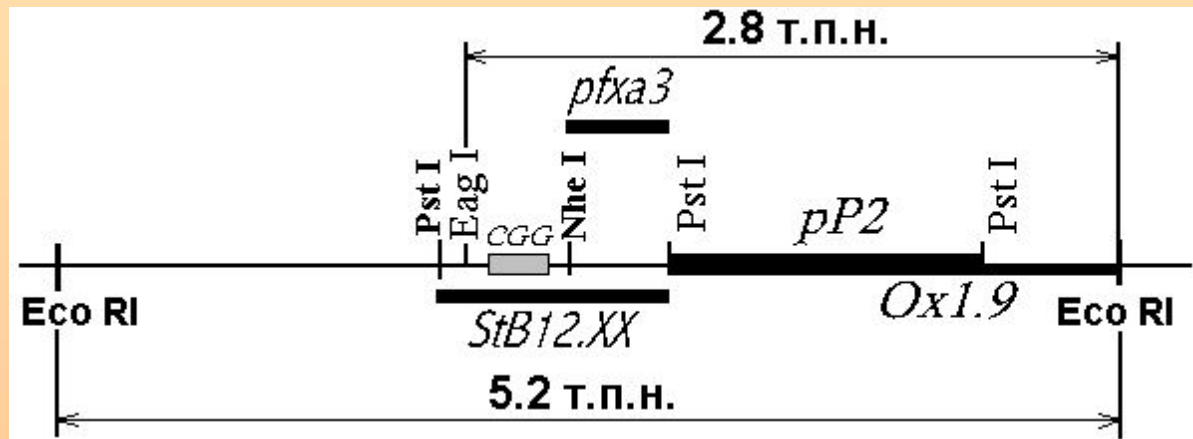


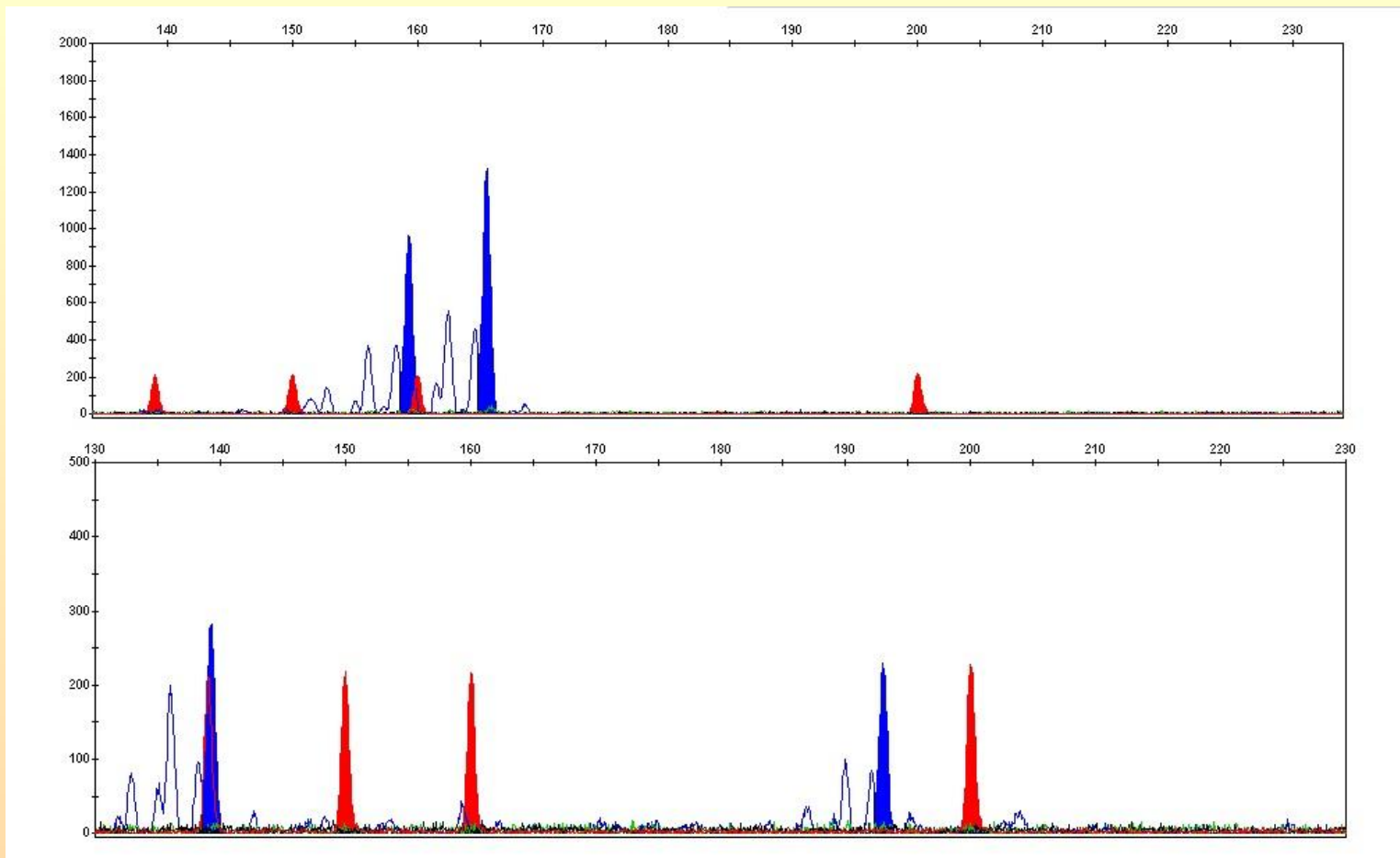
Гипотетическая родословная и результаты блот-гибридизации по Саузерну, иллюстрирующие применение системы EcoRI+EagI/StB12.3 в диагностике СМБ. 1, 7 - нормальные женщины; в каждой из этих дорожек видны по две полосы, что отражает наличие двух X-хромосом. Отмечены положения фрагментов, получаемых с нормальных активных и с нормальных инактивированных X-хромосом. 4 - нормальный мужчина; в дорожке - одна полоса, соответствующая единственной X-хромосоме. В приведённом здесь гипотетическом случае (наиболее типичном) больные (дорожки 5,6) имеют деда - нормального трансмиттера (дорожка 2), передавшего премутацию своей дочери (дорожка 3). Наследование премутации от матери сопровождается амплификацией CGG-повтора. В данном случае показана трансформация премутации в полную мутацию у двух сибсов (дорожки 5,6). Полиморфизм полных мутаций проявляется различиями в характере гибридационного сигнала в каждом конкретном случае. В дорожке 5 показана полная мутация, проявляющаяся отчётливой полосой, мигрирующей в геле на относительно короткое расстояние. В дорожке 6 представлен вариант со множеством полос на фоне шмера - размытой полосы с нечёткими контурами. Возможен также вариант (здесь не показан) выявления только размытого шмера, отражающего широкий разброс длин фрагментов ДНК вследствие соматической гетерогенности.

ДНК-диагностика синдрома Мартина-Белл

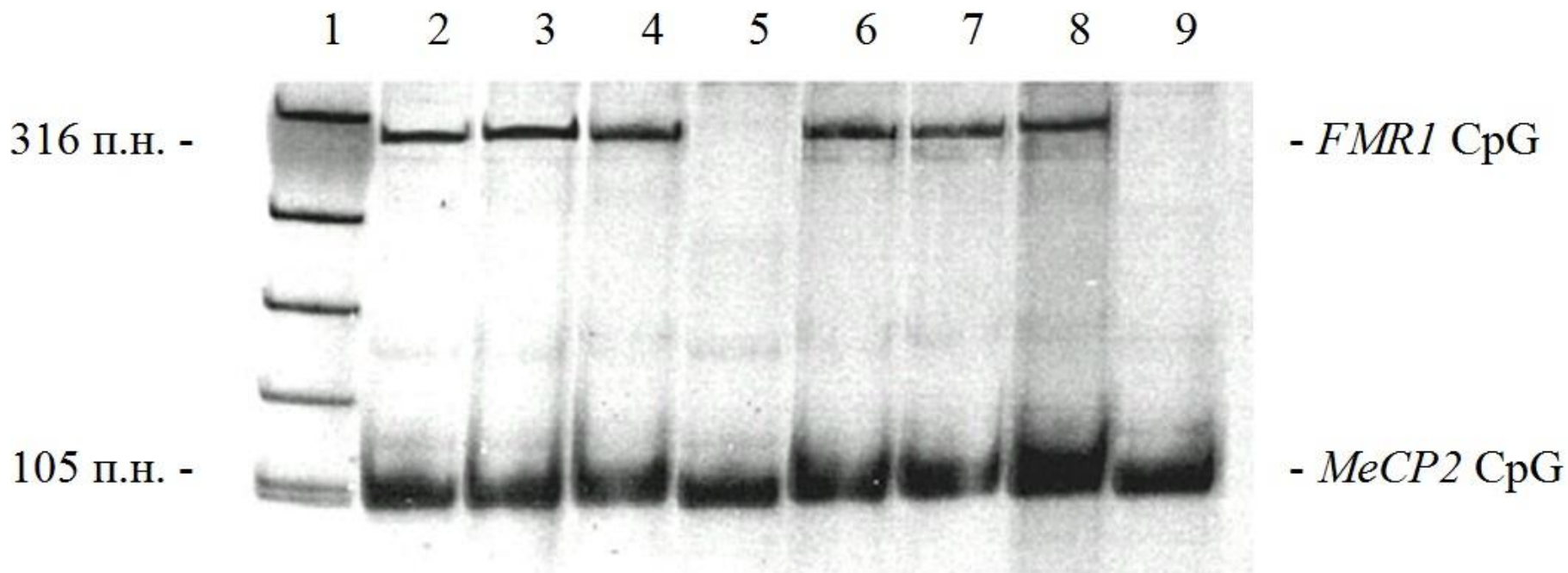


Анализ ДНК здоровых и больных индивидов, обработанной рестриктазами *EcoRI* и *EagI*, методом гибридизации по Саузерну с ДНК-зондом *Ox1.9*. 1,2,4,6 - матери больных СМБ (в дорожке 6 - шмер, соответствующий полной мутации). 3,5 - больные мужского пола. 7 - образец ДНК здоровой женщины.



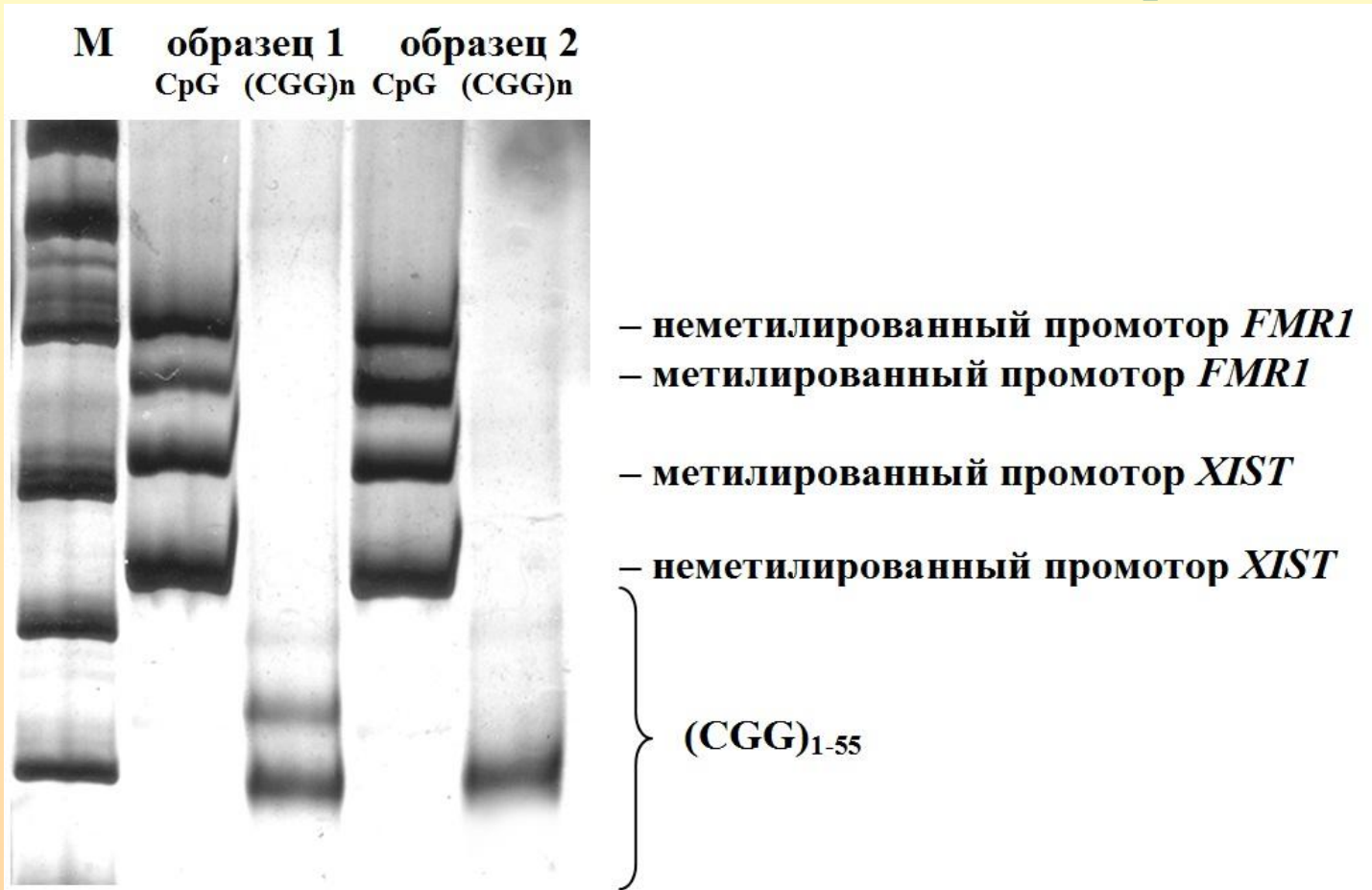


Детекция длин CGG-повторов в первом экзоне *FMR1* методом МС-ПЦР с флуоресцентно меченым праймером. Продукты ПЦР разделены денатурирующим капиллярным электрофорезом. По осям абсцисс отложены длины ПЦР-продуктов в нуклеотидах. Красные пики – фрагменты маркеров длины ДНК. Синие пики – продукты амплификации области CGG-повтора *FMR1*. Верхняя панель – повтор в гетерозиготном состоянии, (CGG)32,34. Нижняя панель – повтор в гетерозиготном состоянии, (CGG)25,43.



ПЦР-тест на метилирование промоторной области гена *FMR1* (МЧ-ПЦР). 1 – Маркёр молекулярной массы. 2,3 – ДНК здоровой женщины. 4,5 и 8,9 – ДНК здоровых мужчин. 6,7 – ДНК больного СМБ мужского пола. В нечетных дорожках матрицей для ПЦР служили образцы геномной ДНК, предварительно обработанной *NhaI*, в четных в качестве матрицы использована интактная геномная ДНК. Наличие ПЦР-продукта длиной 316 п.н. в нечетной дорожке говорит о метилированном состоянии промотора *FMR1*. Метилированное состояние, определяемое в ДНК здоровых женщин, объясняется участием метилирования в обеспечении инактивации одной из X-хромосом в порядке дозовой компенсации.

Анализ метилирования и длин CGG-повтора гена *FMR1* у пациентов женского пола методом метилспецифической ПЦР.

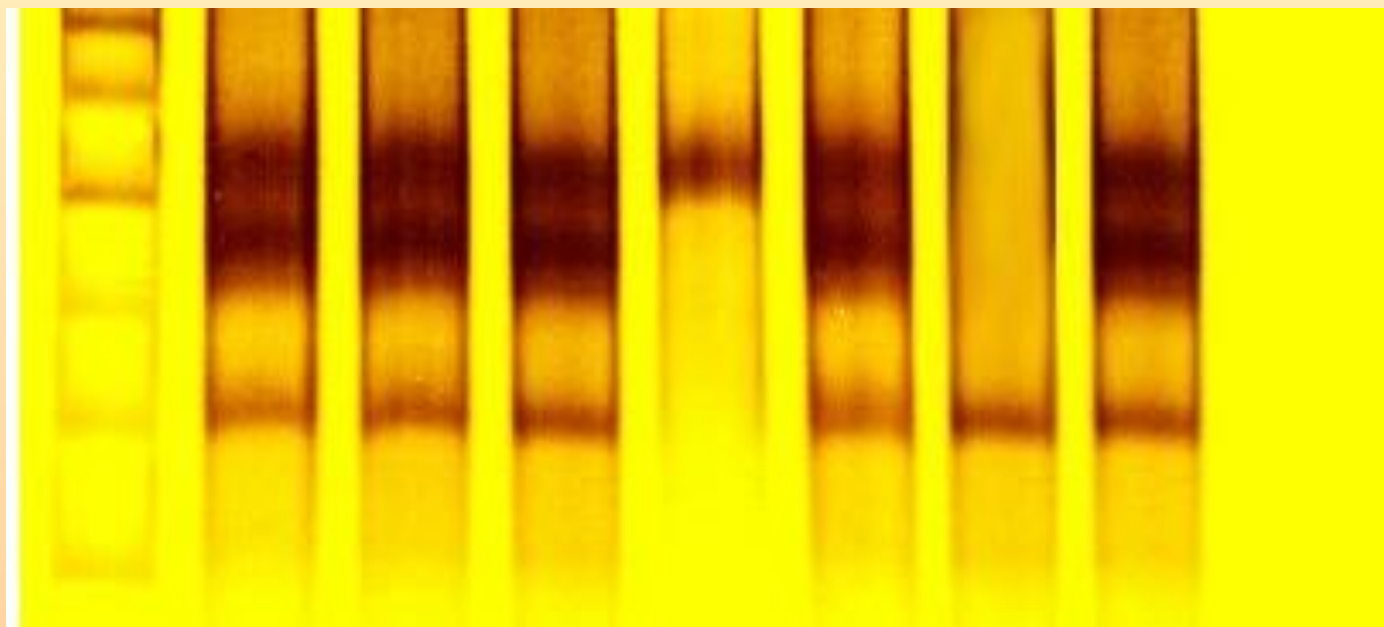


Образец 1 – здоровая девочка, повтор CGG в гетерозиготном состоянии в пределах нормы. Образец 2 – пациентка с полной мутацией *FMR1*: превышение интенсивности сигнала метилированного промотора *FMR1* при сохранении соотношения метилированный/неметилированный промотор *XIST*; один аллель CGG-повтора в пределах нормы, второй (соответствующий полной мутации) не амплифицируется. М – маркер молекулярного веса.

Анализ метилирования CpG-островков

FRAXA, *FRAXE* и *FRAF*

1 2 3 4 5 6 7 8 9



FRAXA

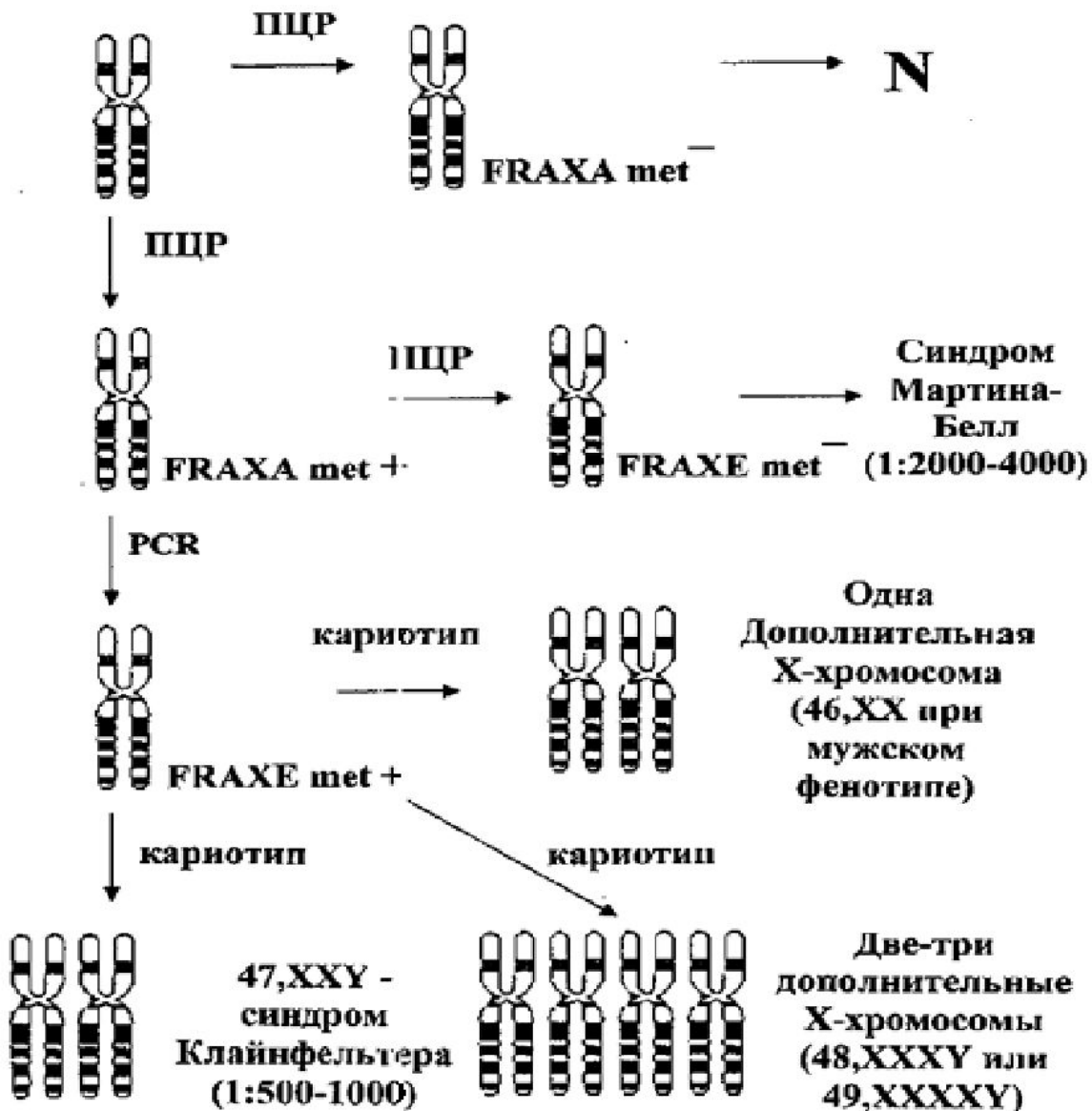
FRAF

FRAXE

1 – маркер молекулярного веса; 2,3 – ДНК нормальной женщины; 4,5 – ДНК пациента *FRAXA*; 6,7 – ДНК пациента *FRAXE*; 8,9 – ДНК нормального мужчины
(нечетные номера – гидролизованная метил-чувствительной рестриктазой *HpaI* ДНК, четные – не гидролизованная ДНК)

**Алгоритм
неонатального
скрининга
мальчиков на
основе анализа
метилования
CpG-островков
FRAXA,
FRAXE и
FRAXF.**

**Алгоритм неонатального скрининга мальчиков
(X-сцепленные аномалии; 1:500-1000)**



хромосома 1

1p36.32 (~103 kb)

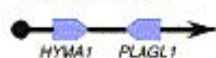


1p31.2 (~5 kb)



хромосома 6

8q24.2 (~95 kb)



6q25.3 (~905 kb)



хромосома 7

7p12.2 (~203 kb)



7q21.3 (~1 Mb)

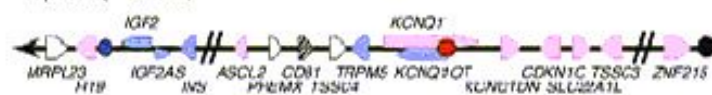


7q32.2 (~89 kb)

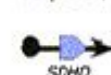


хромосома 11

11p15.5 (~5.4 Mb)



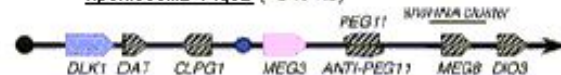
11q23.1 (~9 kb)



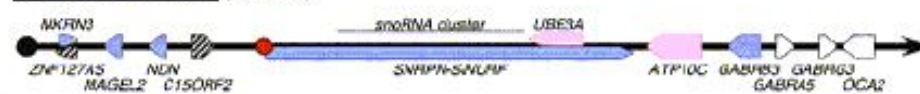
хромосома 13q14.2 (~62 kb)



хромосома 14q32 (~840 kb)



хромосома 15q11-q13 (~3.5 Mb)



хромосома 18q21.1 (~2 kb)

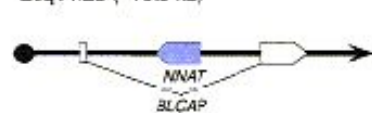


хромосома 19q13.43 (~440 kb)



хромосома 20

20q11.23 (~10.5 kb)



20q13.32 (~71.5 kb)



Предполагается, что геном человека содержит 100 – 200 импринтированных генов. На сегодняшний день их около 100

Характерные черты импринтированных генов

1. Кластеризация.

Импринтированные гены распределены не случайным образом в геноме, а встречаются группами, причем в кластерах имеются гены, экспрессирующиеся как с материнской, так и с отцовской хромосомы.

Кластер в коротком плече хромосомы 11p15.5 (2 м.п.н.) содержит 6 генов имеющих материнскую экспрессию: *p57^{KIP2}*, *KvLQT1*, *ASCL2/HASH2*, *ORCTL2*, *IPL/TSSC3/BWR1C*, *H19* и два - отцовскую: *LOT1* и *IGF2*.

Кластер в проксимальном районе длинного плеча хромосомы 15q11.2 (4 м.п.н.) содержит гены, имеющие отцовскую экспрессию: *ZNF127*, *NDN*, *SNRPN*, *PAR-SN*, *PAR5*, *IPW*, *PAR1*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*, и только два - материнскую: *UBE3A/E6-AP*, *ATP10C*.

Общие черты кластеров:

- 1) гены распределены на достаточно большом расстоянии;
- 2) наличие в кластере генов, экспрессирующихся только с отцовской или материнской хромосомы;
- 3) наличие генов, которые продуцируют не кодирующую РНК;
- 4) наличие повторяющихся последовательностей

2. Консервативность импринтинга.

Характер импринтинга генов *H19*, *IGF2*, *p57KIP* и *SNRPN* идентичен у человека и мыши.

3. Асинхронность репликации ДНК импринтированных генов.

Импринтированные гены имеют асинхронную репликацию, показанную в кластерах импринтированных генов с использованием гибридизации *in situ*. Но временной характер репликации может варьировать в различных клетках, подобно мозаичному эффекту положения.

4. Онтогенетическая и тканевая регуляция импринтинга.

INS2 импринтирован только в экстраэмбриональных тканях мышиногo эмбриона, но экспрессируется биаллельно в клетках поджелудочной железы;

KvLQT1 экспрессируется с материнского аллеля во всех тканях кроме сердца;

E6-AP - экспрессируется биаллельно во всех тканях, а в мозге - только с материнского аллеля;

IGF2R и ***MASH2*** биаллельно экспрессируются на ранних стадиях эмбриогенеза у мыши, а на поздних стадиях развития активным остается только материнский аллель.

IGF2 имеет отцовскую экспрессию в большинстве тканей, но оба аллеля экспрессируются в choroid plexus и leptomeninges в течение развития мозга и в зрелом состоянии. Кроме того, ***IGF2*** в процессе развития экспрессируется с трех различных промоторов.

Отдельные клетки трофобласта плаценты содержат неимпринтированный ***H19***, но на более поздних стадиях развития экспрессия становится полностью моноаллельной.

Практически все импринтированные гены содержат повторы, в частности, первый интрон гена *SNRPN* содержит структурно консервативные G-обогащенные повторы, а ген *MAGEL2* содержит прямые 21- нуклеотидные повторы, расположенные в промоторной области. По-видимому, повторяющиеся последовательности могут быть вовлечены в установку импринтинга и/или метилирования конкретного гена. Они могут служить мишенью для маркирования определенного аллеля за счет организации вторичной структуры ДНК, уникальной для одного из аллелей. Показано, что повторяющиеся последовательности создают некие свернутые структуры, узнаваемые гетерохроматин-специфическими белками. Выявлены некоторые характерные особенности таких повторов. Во-первых, между ними нет гомологии, во-вторых, длина единицы повтора может быть различной и, в-третьих, возможно любое расположение повторяющихся последовательностей по отношению к гену (рядом с геном в 5'-районе, в 3'-нетранслируемой области, внутри интрона или в кодирующей части). Дифференциально метилированные районы в некоторых случаях перекрываются с районами, с которых транскрибируются некодирующие и антисмысловые РНК, причем транскрипты включают блоки тандемных повторов. Роль таких РНК не ясна, но предполагается, что они осуществляют регуляторные функции в импринтированных районах.

5. Импринтированные гены кодируют как белки, так и только РНК.

Некоторые импринтированные гены не кодируют белков, но кодируют консервативную РНК.

H19 кодирует РНК, аккумулирующуюся в больших количествах в течение развития фетальных тканей мезодермального и эндодермального происхождения.

XIST. Транскрипция гена с инактивированной X-хромосомы в экстраэмбриональных тканях заставляет предполагать регуляторную роль импринтированной РНК.

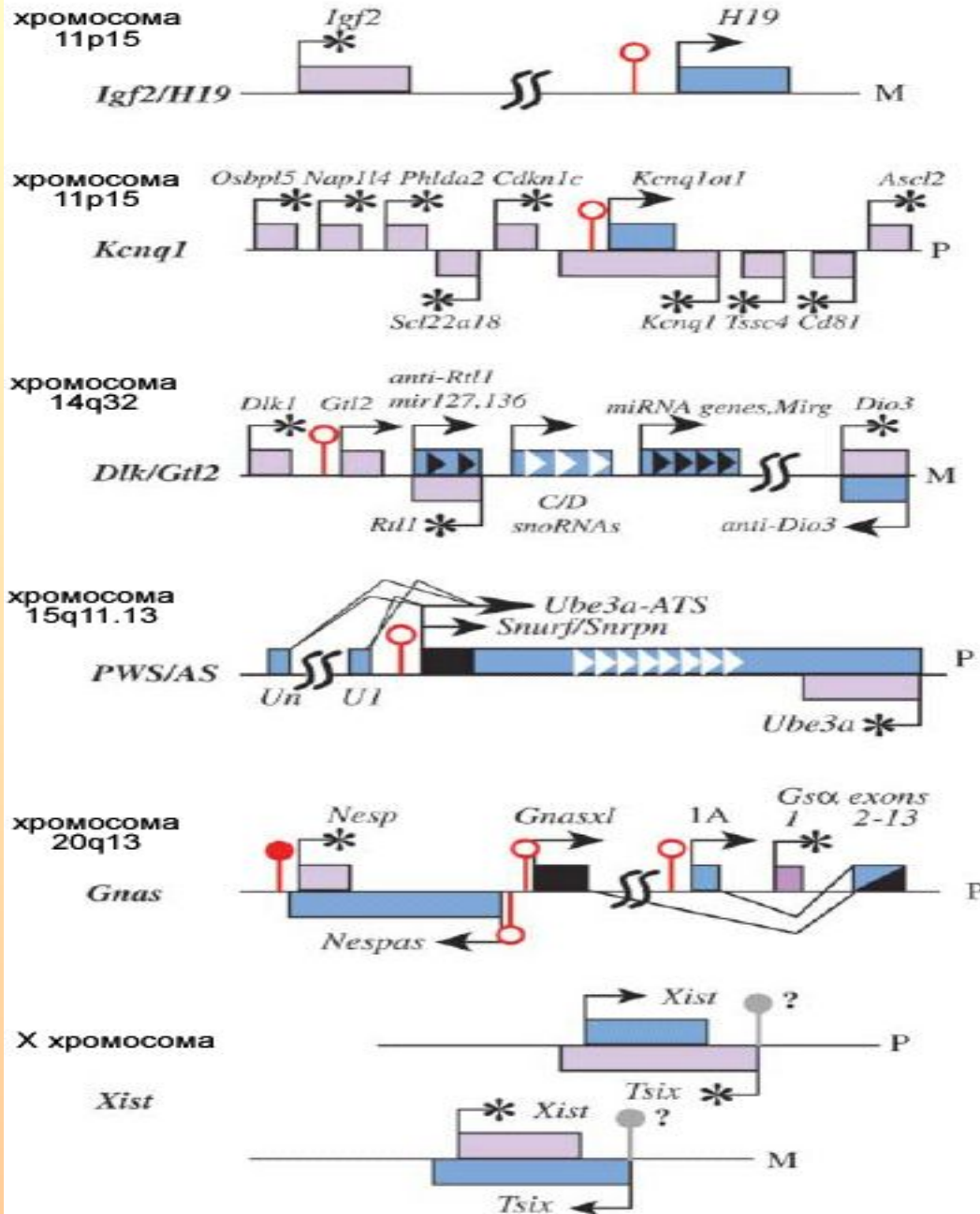
IPW, *PAR-SN*, *PAR1* и *PAR5* экспрессируются с отцовской хромосомы и дают только РНК.

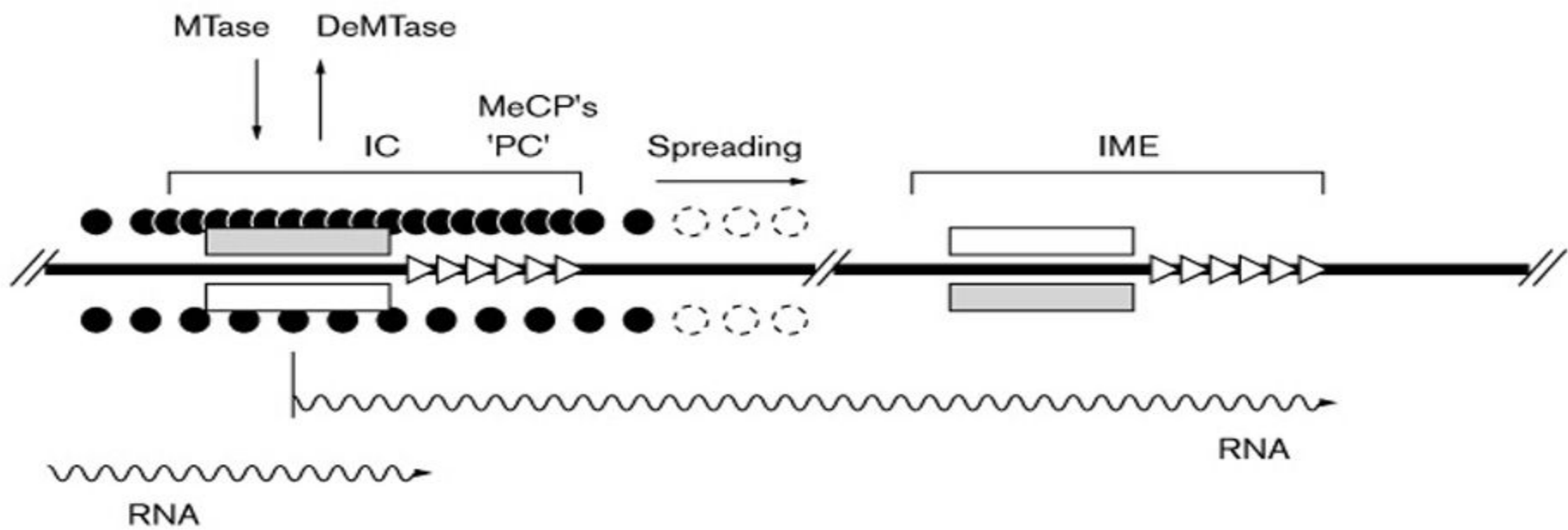
Общие черты РНК-кодирующих генов:

- 1) большие первый и последний экзоны и маленькие внутренние экзоны;
- 2) консервативны по нуклеотидной последовательности;
- 3) предсказанная вторичная структура РНК - стебель-петля.

Все это свидетельствует в пользу того, что эти РНК имеют биологическую функцию, необходимую в эволюции.

Некодирующие РНК импринтированных районов

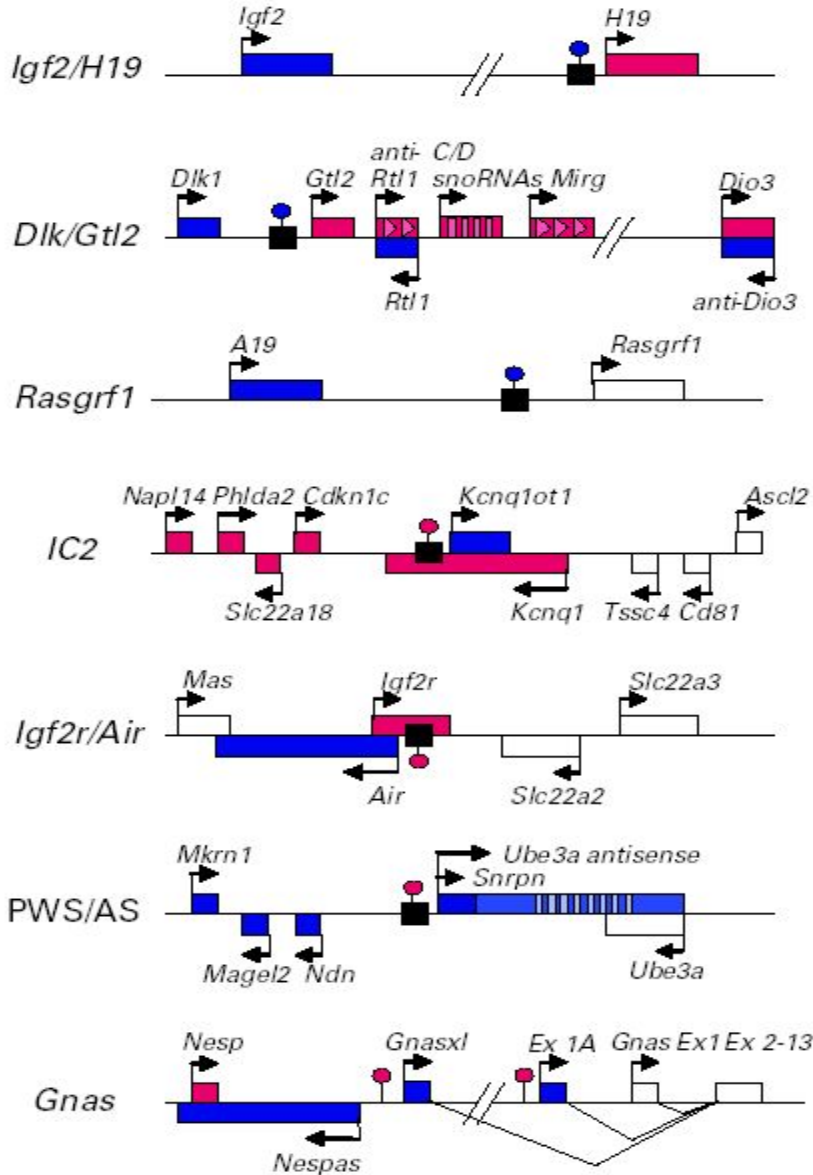




Общая модель организации импринтированного района.

IC – центр импринтинга; IME – элемент, поддерживающий импринтинг. Центр импринтинга состоит из дифференциально метилированного района (заштрихованный прямоугольник соответствует метилированию, не заштрихованный – отсутствию метилирования) и кластера прямых повторов. IME организован аналогично. Транс-действующие факторы, такие как метилтрансфераза (MTase), деметилаза (DeMTase), метилцитозин связывающиеся белки (MeCPs), Polycomb-подобные хроматиновые белки (PC), ответственные за долговременную инактивацию генов, взаимодействуют с IC и приводят к метилированию/ деметилированию не только IC, но и окружающих районов (spreading). Различная плотность заштрихованных кружочков отражает различия в структуре хроматина. Район IC может совпадать с началом транскрипции РНК (РНК). Транскрипция регулируется эпигенетическим состоянием IC. Транскрипт (РНК) может достигать IME в случае образования вторичных хроматиновых структур, сближающих два района. По мере транскрипции участка IME происходит его метилирование. Однако, если IC и IME располагаются под действием хроматиновых факторов достаточно близко физически, то нельзя исключить изменение эпигенотипа. Эпигенотип IC может подвергаться влиянию РНК-транскриптов других цис-расположенных элементов (РНК'). Прямые повторы могут представлять собой локальные связывающие элементы, распространяющие эпигенетическую модификацию.

ХАРАКТЕРНЫЕ ЧЕРТЫ ЦЕНТРОВ ИМПРИНТИНГА



1. Регулируют импринтированные гены в кластере *in cis*;
2. Имеют дифференциальное аллельное метилирование;
3. Имеют различную аллельную структуру хроматина (гиперчувствительность к ДНКазе I, метилирование гистона H3 и ацетилирование гистонов H3 и H4);
4. Способны действовать как инсультаторы с использованием белка CTCF;
5. Содержат промоторы некодирующих РНК.

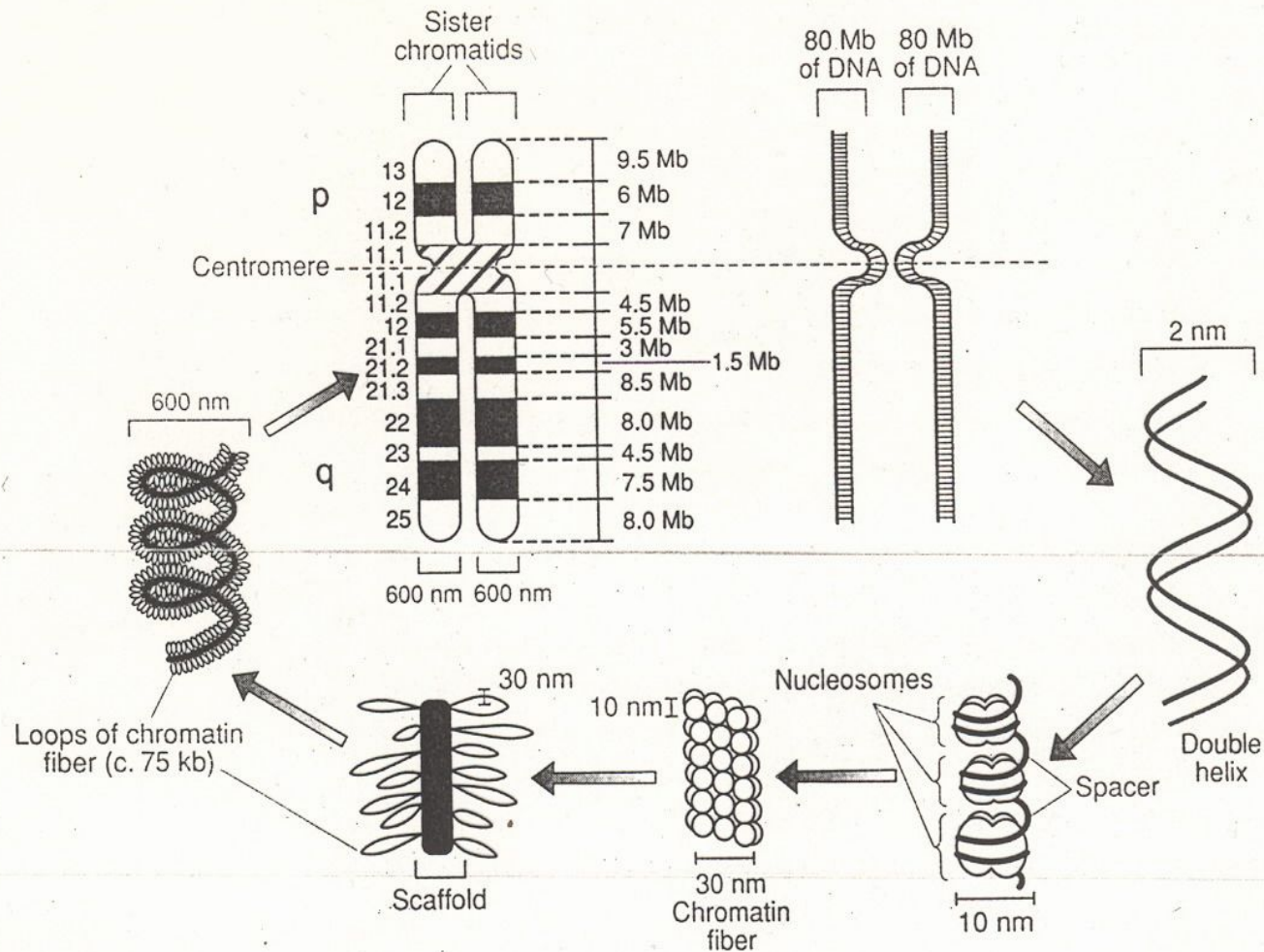
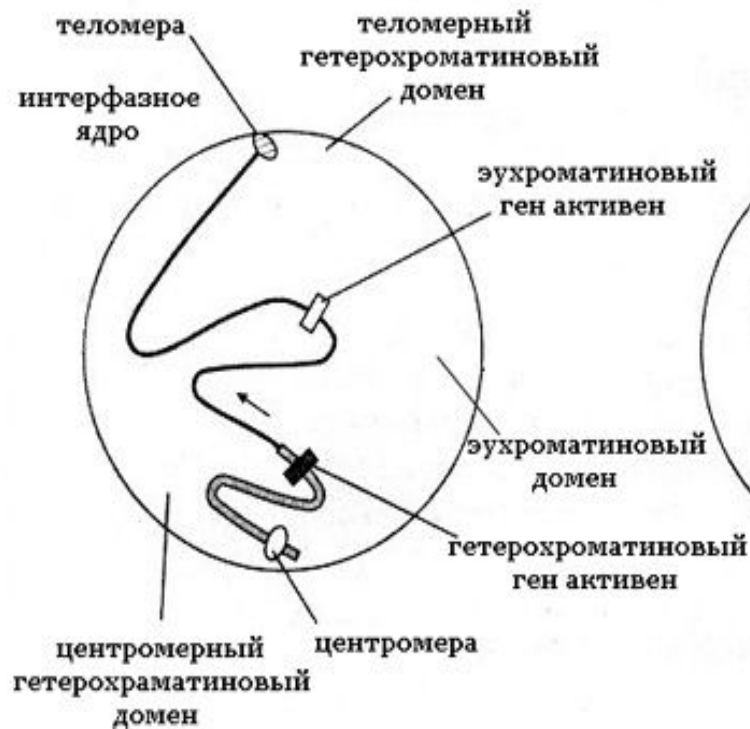


Figure 2.3: From DNA duplex to metaphase chromosome (human chromosome 17, G-banding, 400 band preparation).

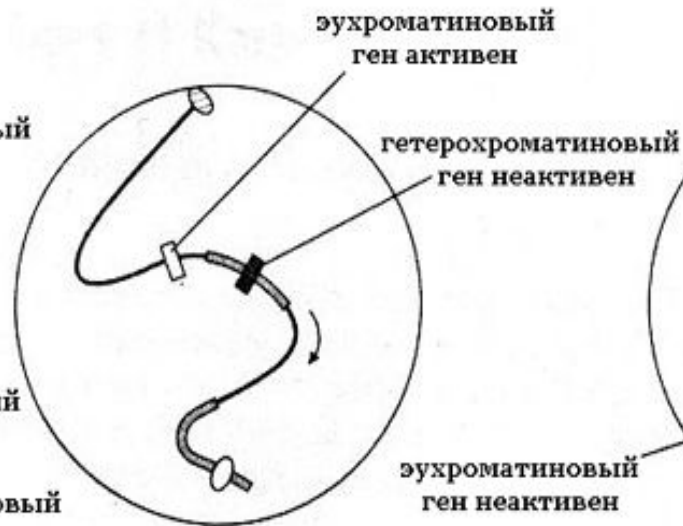
Estimated packaging ratios (the degree of compaction of the linear DNA duplex) for human chromosomes are as follows: 1:6 for nucleosomes, 1:36 for the 30 nm fiber and 1: approximately 50 000–100 000 for the metaphase chromosome. Presently, it is uncertain whether the DNA at the centromere of the metaphase chromosome has been delayed in its replication unlike the rest of the chromatid, or whether full DNA replication has occurred in the S phase and the constriction at the centromere is due to some other cause.

Доменная организация хроматина в ядре

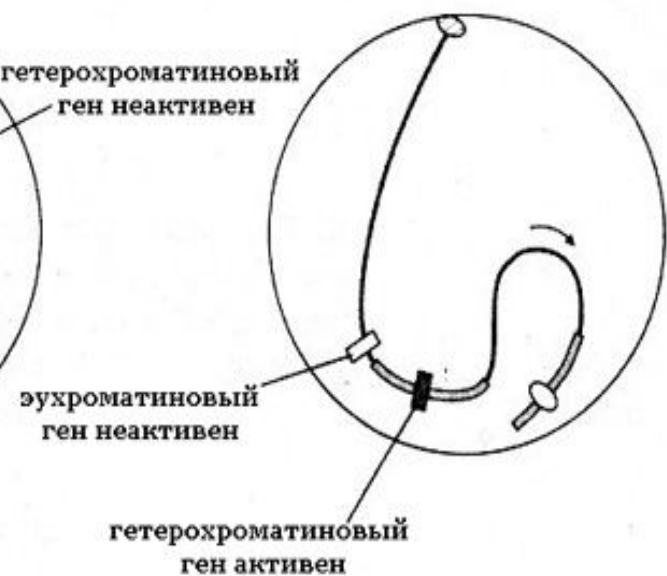
(а) нормальное положение хромосомы

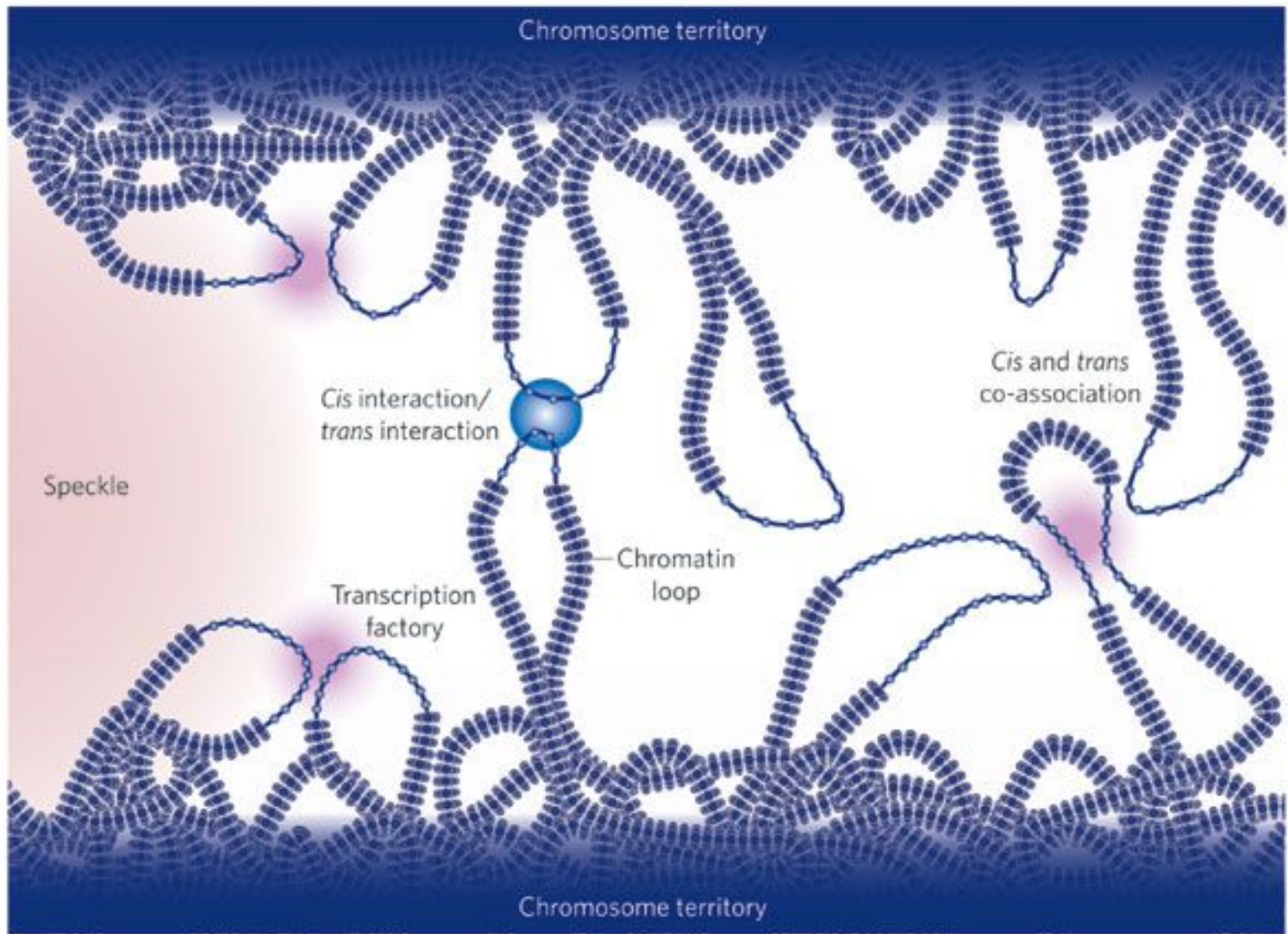


(б) ядро с генами в эухромативном домене



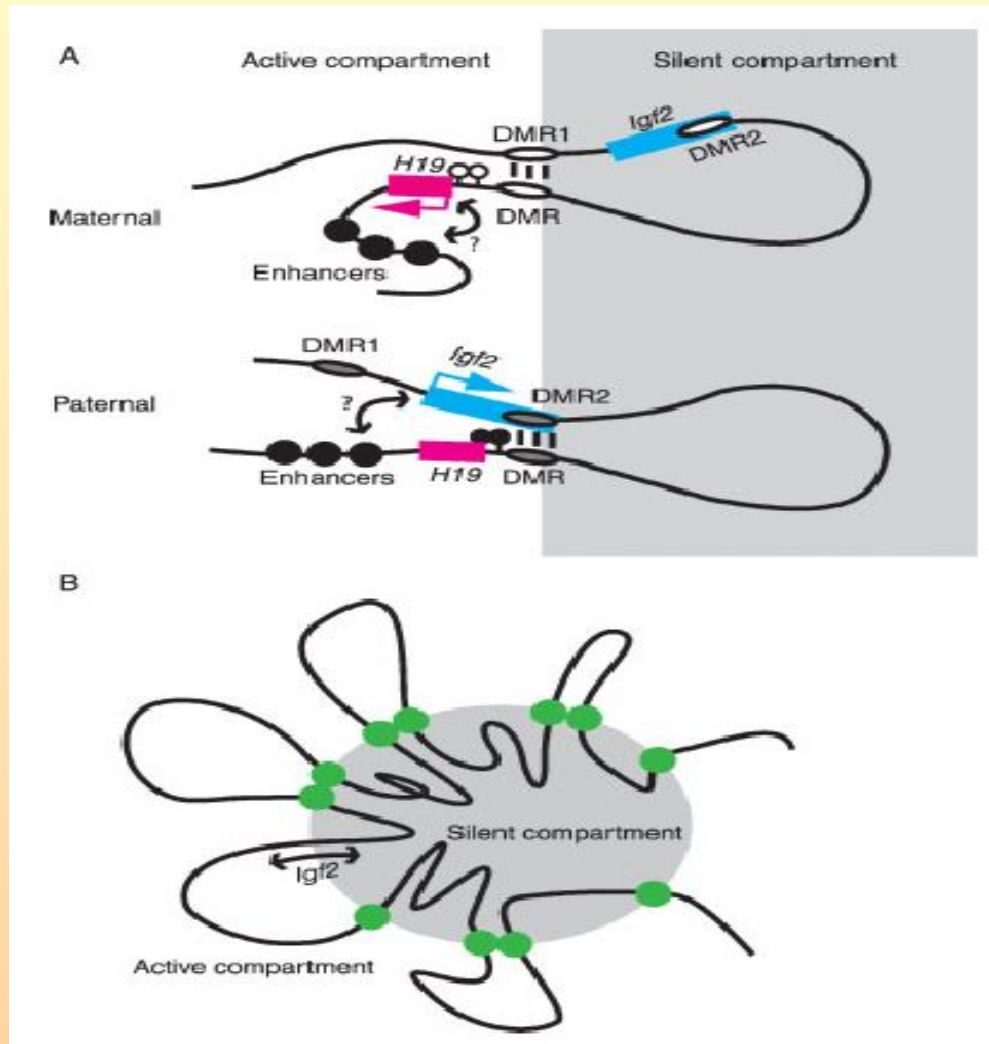
(в) ядро с генами в гетерохромативном домене





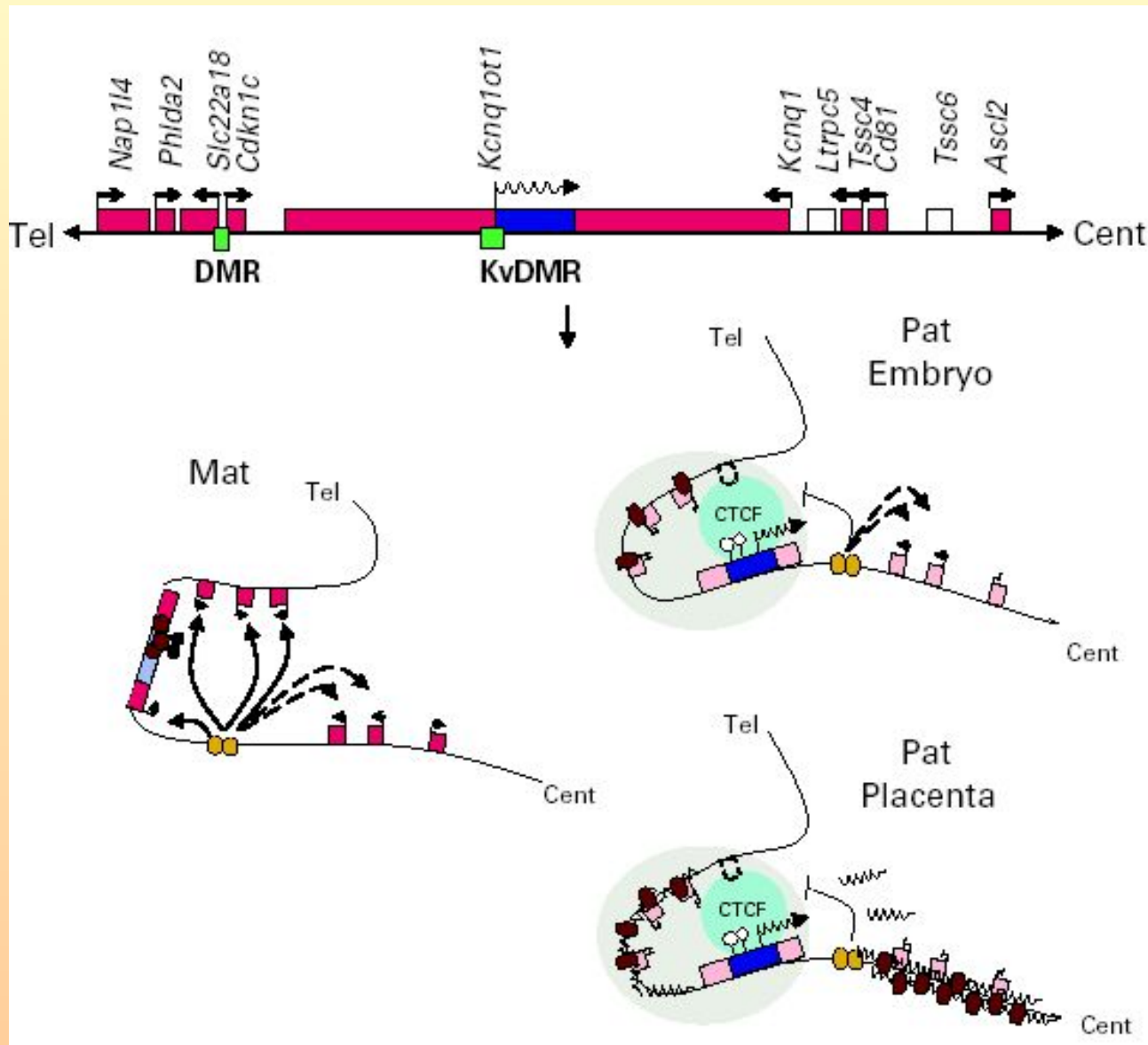
Подвижность генов – важный фактор их регуляции.
Кластеры активных генов - 150-200 т.п.н., расстояние между кластерами
~ 70 м.п.н. *in cis*

ПЕТЛЕВАЯ МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ИМПРИНТИРОВАННОГО РАЙОНА

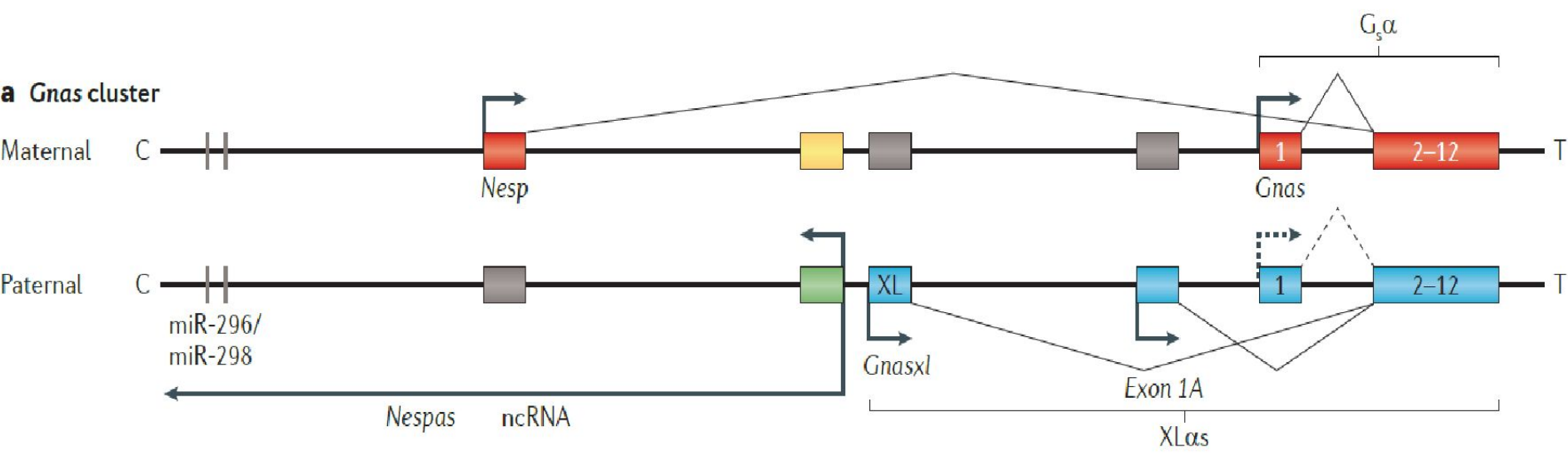


Центры импринтинга выполняют функцию перемещения двух дифференциально метилированных аллелей в различные субъядерные компартменты, которые различаются по времени репликации и соответствуют характеристикам эухроматиновых и гетерохроматиновых доменов.

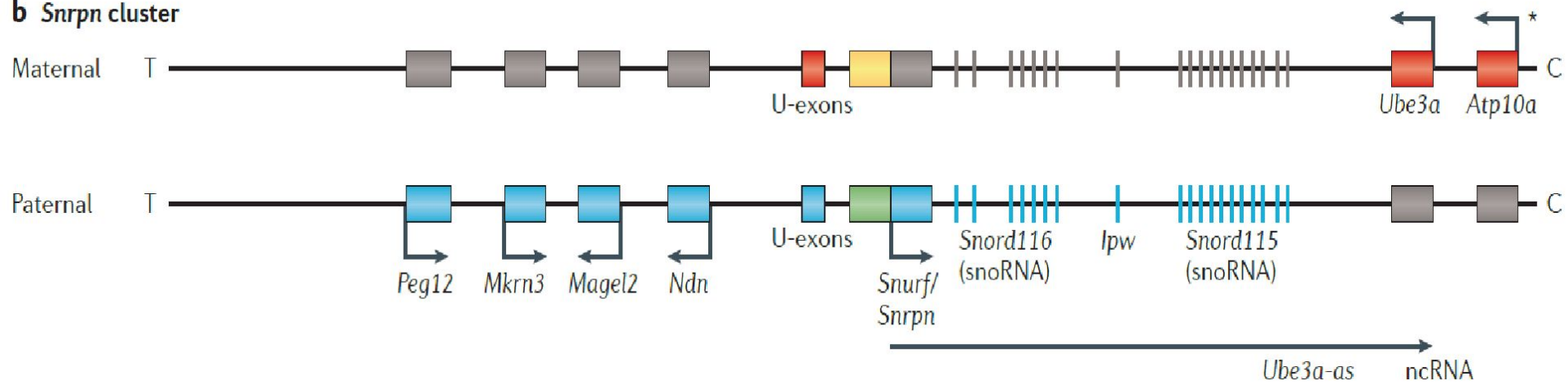
ПЕТЛЕВАЯ МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ИМПРИНТИРОВАННОГО РАЙОНА



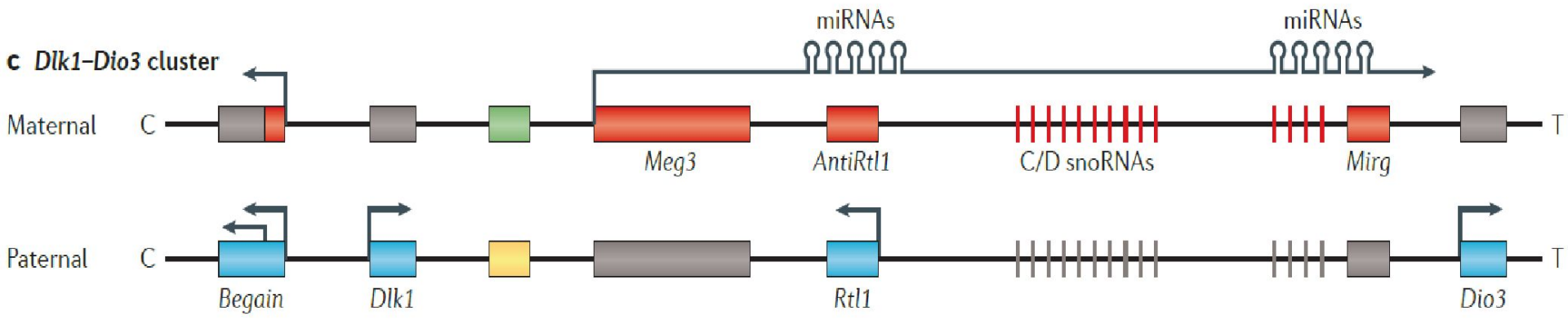
a Gnas cluster



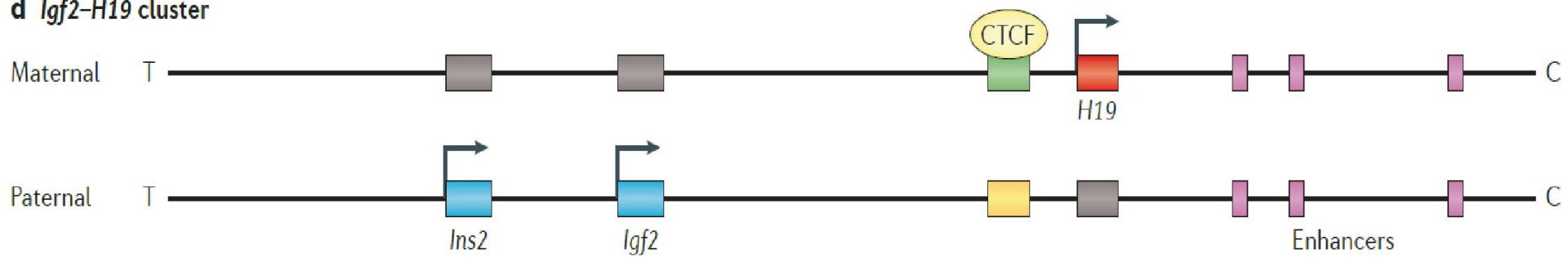
b *Snrpn* cluster



c *Dlk1-Dio3* cluster



d *Igf2-H19* cluster



Однородительская дисомия и ранняя эмбриолетальность

Характеристика выборки	Число эмбрионов	Случаи ОРД	Источник информации
Анэмбриония, без цитогенетического анализа	23	ОРД(21)мат ОРД(21)мат в сочетании с трисомиями 7 и 9	Henderson <i>et al.</i> , 1994
Спонтанные абортусы: - I триместра, без цитогенетического анализа	18	0	Shaffer <i>et al.</i> , 1994
- с нормальным кариотипом	35	0	Smith <i>et al.</i> , 1998
- 6-22 нед. с нормальным кариотипом	71	ОРД(9)мат ОРД(21)мат	Fritz <i>et al.</i> , 2001
- с нормальным кариотипом	24	Мат. сегм. гетеродисомия 16pter-D16S3107 и изодисомия D16S3018-qter	Kondo <i>et al.</i> , 2004
- с кариотипом 46,XX (анализ наследования X-хромосомы)	52	0	Евдокимова, Назаренко, 2000
- с нормальным кариотипом	81	Сегм. ОРД(14q)отц ОРД(7q)мат	Tsukishiro <i>et al.</i> , 2005
Неразвивающиеся беременности и анэмбрионии с нормальным кариотипом	87	0	Никитина с соавт., 2004
Всего:	305	7 (2,3%)	

Целый ряд заболеваний по характеру наследования и проявлениям может возникать вследствие импринтинга.

Синдром Вильямса с тяжелыми проявлениями - делеция 7q11.23 материнской хромосомы;

Болезнь Гиршпрунга - мутация гена *RET* (10q11.2) материнского происхождения;

НФ 2 с тяжелым течением - мутация гена *SCN* (22q12) материнского происхождения;

Шизофрения в более тяжелых формах наследуется по отцовской линии;

Семейная гипертрофическая кардиомиопатия в основном передается по материнской линии;

Spina bifida в два раза чаще передается матерями, чем отцами;

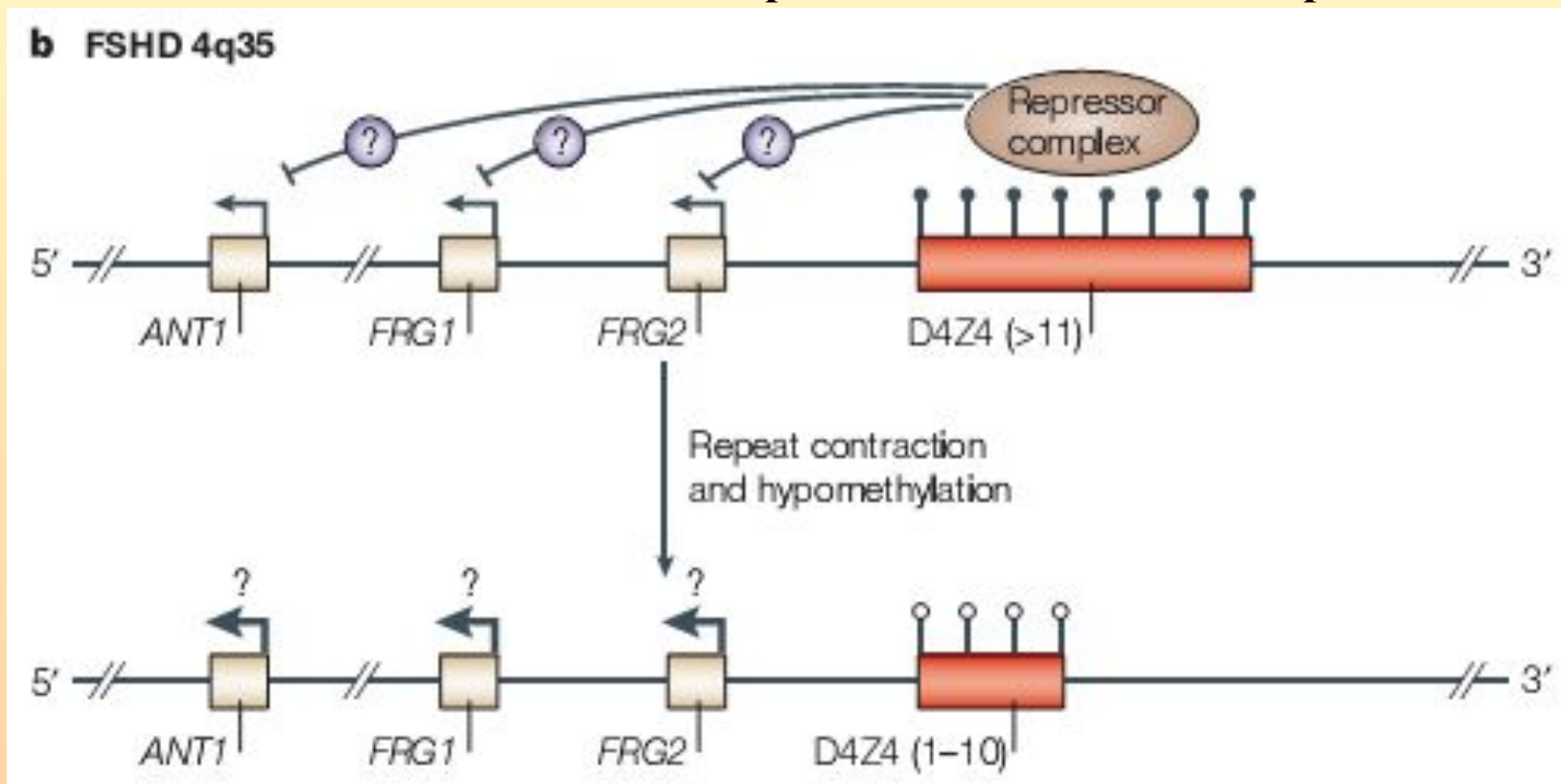
Псориаз проявляется в более тяжелой форме, если наследуется от отца;

Синдром Туретта и поликистоз почек проявляются раньше и в более тяжелых формах, если наследуются от матери;

Эпилепсия в более тяжелой форме наследуется от матери.

Схема регуляции экспрессии генов при лице-плече-лопаточной мышечной дистрофии.

В норме 11-150 копий повтора (3,3 т.п.н.),
а при патологии – 1-10 повторов.

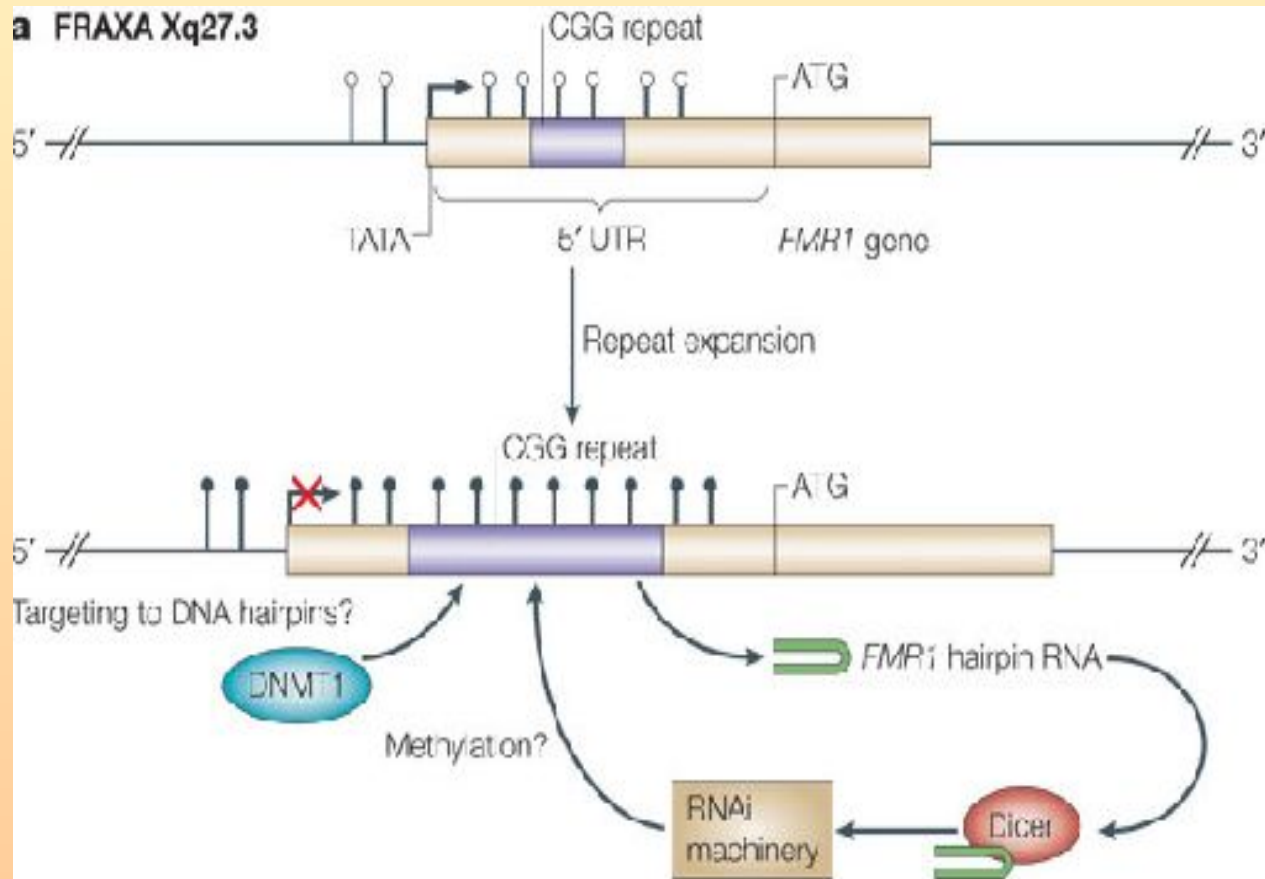


Гиперэкспрессия гена *ANT1* индуцирует апоптоз, характерный для мышечных дистрофий. Ген *FRG1* вовлечен в процессинг РНК. Функция гена *FRG2* неизвестна, но он вызывает изменения морфологии трансфицированных миобластов.

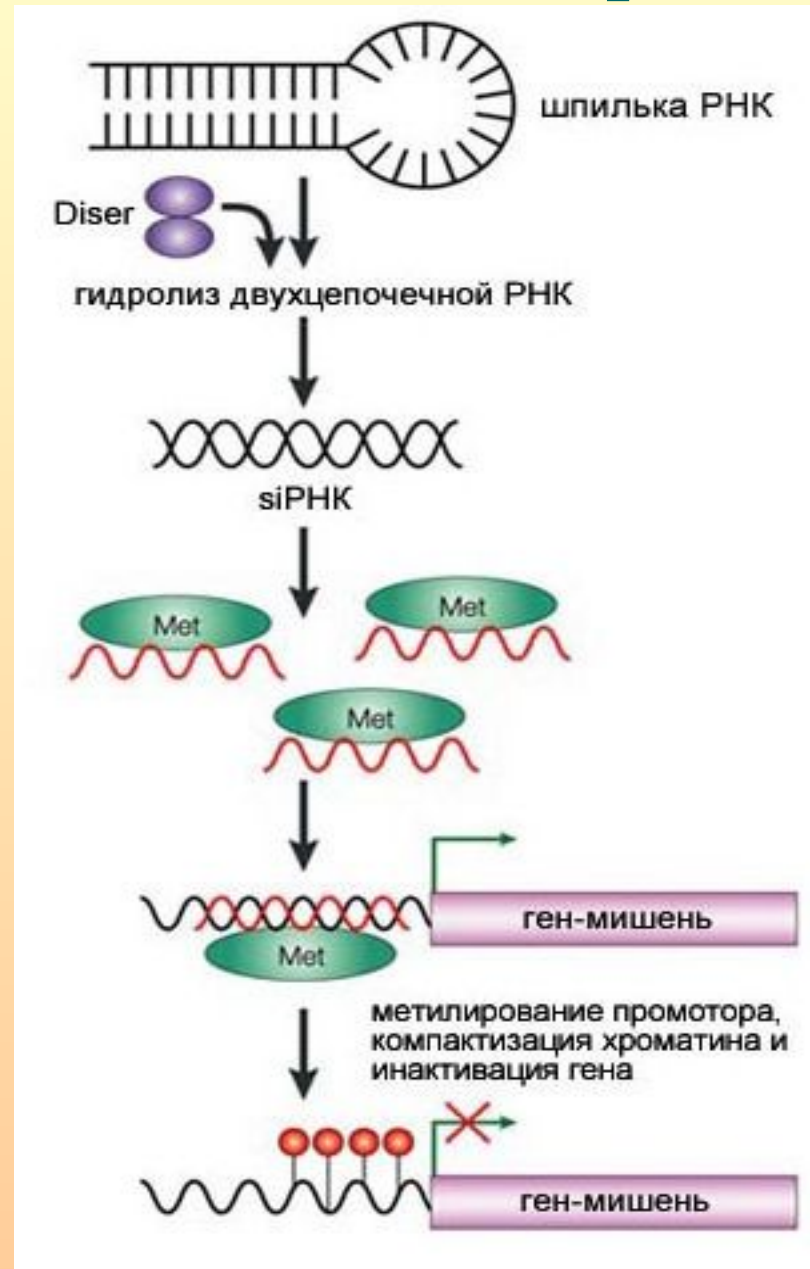
Синдром ломкой X хромосомы (возможный сценарий)

CGG повтор в 5' НТР гена *FMR1* в результате экспансии вызывает:

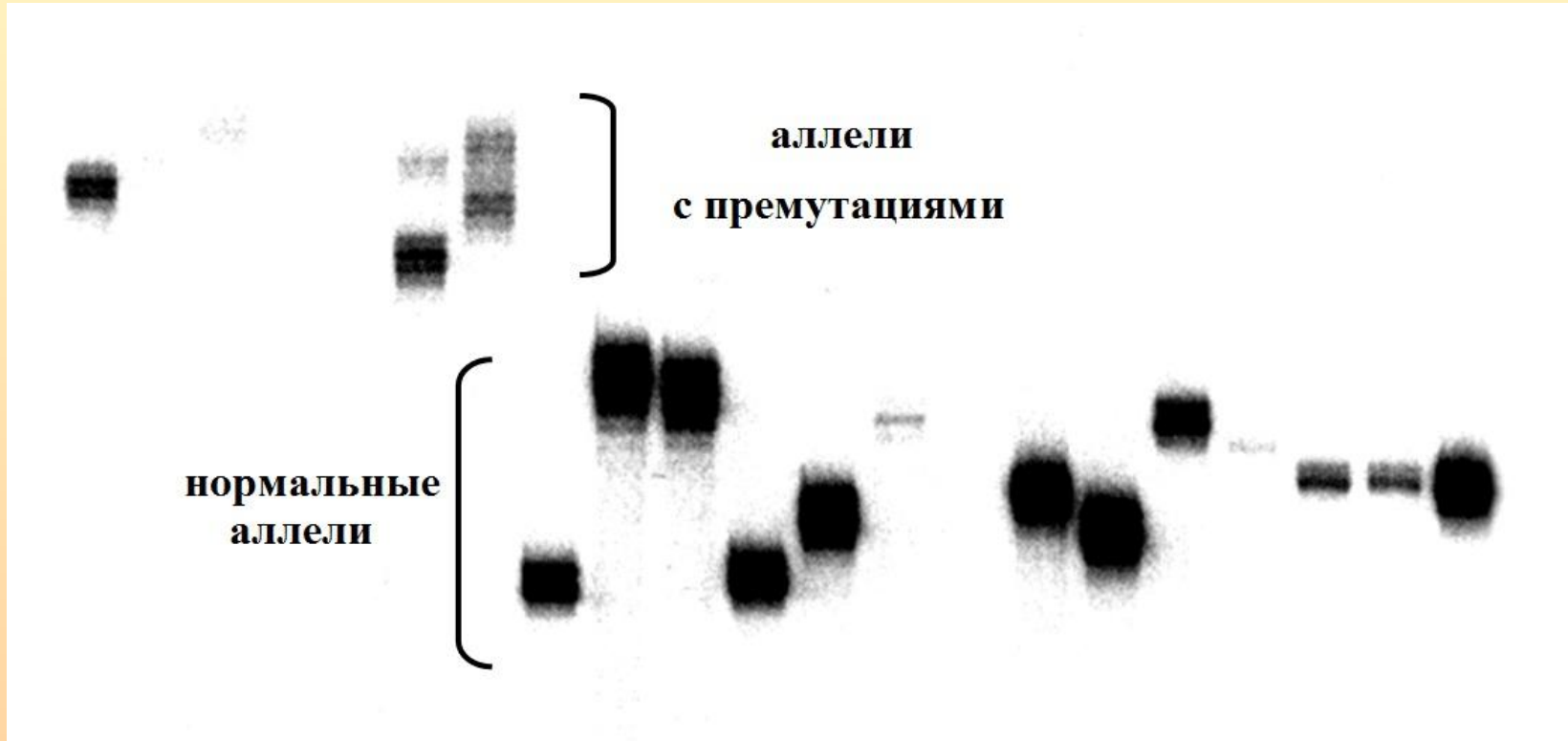
- а) образование шпилечных структур;
- б) запуск процессов РНК-интерференции;
- в) метилирование *de novo*



Метилирование ДНК посредством siРНК



ПЦР области тринуклеотидного повтора *FMR1* (CGG)_n



Детекция длин CGG-повторов в первом экзоне *FMR1* методом ПЦР с последующей блот-гибридизацией продуктов амплификации и радиоавтографией.