

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Katedra antropologie a genetiky člověka

Bakalářská práce



Epigenetické mechanismy

Veronika Šornová

Školitel: doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Epigenetické modifikace“ vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její část nebyla použita k získání jiného akademického titulu.

V Praze dne 12.5.2014

Veronika Šornová

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat své školitelce doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za ochotu, odborné rady, připomínky a za čas, který mi věnovala.

Abstrakt

Epigenetika je studium dědičných změn genové aktivity, které nejsou způsobeny změnou sekvence v DNA. Epigenetické mechanismy se mohou uplatnit na celé řadě úrovní, od transkripce až po translaci. Patří mezi ně metylace DNA, modifikace histonů, a s tím spojená modifikace chromatinu, a RNA interference. Výsledkem je změna konformace chromatinu vedoucí ke snížené nebo zvýšené expresi určitého genu, inaktivaci jednoho z chromosomů X nebo genovému imprintingu. Epigenetická regulace hraje důležitou roli v etiopatogenezi multifaktoriálních onemocnění. Na jejich vzniku se podílejí genetické predispoziční faktory (u autoimunitních chorob se jedná o geny hlavního histokompatibilního komplexu) a environmentální faktory, které působí na náš genom právě prostřednictvím epigenetických modifikací.

Klíčová slova:

Epigenetické mechanismy, metylace DNA, modifikace histonů, RNA interference, genomový imprinting, inaktivace chromozomu X, multifaktoriální onemocnění.

Abstract

Epigenetics is the study of heritable changes in gene activities that are not caused by changes in the DNA sequence. Epigenetic mechanisms can be employed at many levels, from transcription to translation. They include DNA methylation, histone modification, and with it connected chromatin modification, and RNA interference. The result is the change of chromatin conformation leading to decrease or increase of certain gene expression, X-chromosome inactivation or gene imprinting. Epigenetic regulation plays important role in etiopatogenesis of multifactorial diseases. Genetic predisposing factors (in autoimmune diseases there are genes of major histocompatibility complex) and environmental factors, which affect our genome just through epigenetic modifications, are involved in their manifestation.

Key words:

Epigenetic mechanisms, DNA methylation, histone modification, RNA interference, genomic imprinting, X-chromosome inactivation, multifactorial disease.

Obsah

1	Seznam použitých zkratek	7
2	Úvod	8
3	Historie	9
4	Metylace DNA	11
4.1	DNA metyltransferázy (DNMTs)	12
4.2	Metylační vzory	12
4.3	Demetylace DNA	13
5	Modifikace histonů	14
5.1	Sbalování chromatinu (kondenzace)	14
5.2	Euchromatin a heterochromatin	14
5.3	Metylace histonů	15
5.3.1	Histon metyltransferázy (HMTs)	16
5.4	Acetylace histonů	16
5.4.1	Histon acetyltransferázy (HATs)	16
5.4.2	Deacetylace histonů	17
6	RNA interference	18
6.1	Mechanismy jednotlivých typů malých RNA	18
6.1.1	Malé interferující RNA (siRNA)	18
6.1.2	MikroRNA (miRNA)	19
6.1.3	Piwi-interagující RNA (piRNA)	20
6.2	RISC (RNAi silencing complex)	20
7	Imprinting	21
7.1	Princip	21
7.2	Lidské patologie	22
8	Inaktivace chromosomu X	24
8.1	Vznik inaktivního chromosomu X	24
8.2	Patogeneze	25
9	Epigenetické mechanismy a jejich role v etiopatogenezi multifaktoriálních onemocnění	26
9.1	Autoimunitní onemocnění	26
9.2	Příčiny vzniku autoimunitního onemocnění	26
9.3	Vnitřní faktory	27

9.4	Vnější faktory	27
9.5	Choroby způsobené autoimunitním onemocněním.....	28
9.5.1	Diabetes mellitus I. typu (T1DM)	28
9.5.2	Roztroušená skleróza (RS)	29
9.6	Léčba autoimunitních chorob	30
10	Závěr.....	31
11	Seznam použitých obrázků	32
12	Seznam použité literatury.....	32

1 Seznam použitých zkratek

AS	Angelmanův syndrom
BWS	Beckwithův-Wiedemannův syndrom
DMRs	Differentially methylated regions
DNMTs	DNA metyltransferázy
HATs	Histon acetyltransferázy
HDACs	Histon deacetylázy
HED	Hypohidrotická ektodermální dysplazie
HLA	Human leukocyte antigen
HMTs	Histon metyltransferázy
ICs	Imprintovaná centra
Igf2	Insulin-like growth factor 2
Igf2r	Insulin-like growth factor 2 receptor
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
PRMT	Protein arginin metyltransferázy
PWS	Prader-Willi syndrom
RISC	RNAi silencing complex
RNAi	RNA interference
RS	Roztroušená skleróza
SAM	S-adenosyl-L-metionin
SRS	Silver-Russellův syndrom
T1DM	Diabetes mellitus I. typu
UPD	Uniparentální disomie
XIC	X chromozomové imprintované centrum
XIST	X-inaktivní specifický transkript

2 Úvod

Relativně mladým podoborem genetiky je epigenetika. Epigenetika se zabývá změnami v genové expresi, které nejsou dány změnou sekvence DNA. Může být dědičná. Typickým rysem epigenetiky je variabilní expresivita a nepravidelná penetrace. Míra penetrace vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou se určitý genotyp projeví ve fenotypu. Různá expresivita je dána silou, s jakou se určitý genotyp projevuje ve fenotypu.

Hlavními epigenetickými mechanismy jsou metylace DNA a modifikace histonů, které se podílejí na struktuře chromatinu, a dále RNA interference. Methylace DNA je nejstarší známá a nejlépe prozkoumaná modifikace, kdy dochází k přenosu metylové skupiny na cytosin nebo na adenin. Methylace je zásadní pro genový imprinting, což je epigenetický jev stanovující odlišnou expresi genu v závislosti na rodičovském (parentálním) původu příslušné alely (jedné ze dvou kopií genu). Následkem imprintingu dochází k expresi genu pouze na jednom z rodičovských chromosomů. Dále je methylace důležitá při inaktivaci jednoho z chromosomů X. Histony jsou zásadité chromatinové proteiny, na kterých při modifikaci dochází k acetylaci, metylaci, fosforylaci, ubiquitinaci nebo sumoylaci. Výsledkem těchto dějů je buď umožnění transkripce genu, nebo naopak jeho umlčení. Poslední a velmi důležitou epigenetickou regulací je RNA interference. Dochází při tom k ovlivnění transkripce i translace pomocí krátkých molekul RNA.

Rozvoj epigenetiky je velmi rychlý, a to hlavně v souvislosti s výzkumem etiopatogeneze nejrůznějších genetických chorob. Epigenetické mechanismy se zejména uplatňují v etiologii multifaktoriálních onemocnění. Tato literární rešerše má za cíl podrobněji popsat jednotlivé epigenetické modifikace a jejich význam pro lidskou genetiku a patologii genetických poruch.

3 Historie

Termín epigenetika byl poprvé použit až v první polovině 20. století britským biologem Conradem H. Waddingtonem, který zkoumal dědičnost živočichů. Sestavil model epigenetické krajiny ukazující na volbu vývojového rozhodnutí. Jedná se o hypotetickou krajinu, která má různé hrbolky, překážky. V horní části je umístěn míček a ten si vybere svůj směr dle členitosti terénu (model enviromentálních změn na specifický osud buňky). Míček se může ubírat směrem normálního fenotypu nebo cestou k alternativnímu fenotypu.

O fenotypové projevy genů se také zajímal zoolog a především vývojový biolog Ernst Hadorn. Jeho genetickým modelem byla octomilka, u které objevil špatnou funkci exprimovaných genů. Zjistil odlišnou expresi genů v různých buňkách, v jedněch docházelo k expresi a v jiných vůbec.

Dalším známým vědcem spolupodílejícím se na rozvoji epigenetiky byl molekulární biolog Arthur D. Riggs, který se zabýval metylací DNA. V roce 1975 navrhnul hypotézu, že chemické modifikace DNA jako je metylace, tedy přidání metylové skupiny na cytosin, ovlivňují genovou expresi. Tento předpoklad byl podpořen zjištěním, že na chromosomu je vysoká hustota metylovaných CpG, korelujících se subtelomerickými oblastmi a Giemsa-light bands. Většina z hypermetylovaných oblastí byla identifikována na místech kódujících geny. Např. v B buňkách je metylováno přibližně 10 % promotorů, přičemž tato metylace koreluje s nízkou genovou expresí (Rauch et al., 2009). Arthur D. Riggs se dále zabýval studiem náhodné inaktivace X chromosomu i použitím restričních enzymů v epigenetickém výzkumu.

Britský molekulární biolog Robin Holliday studoval vliv metylace DNA na expresi genů u normálních i u nádorových buněk. Jeho experimenty daly světu jasný důkaz, že DNA metylace je hlavní příčinou umlčování genů u savčích buněk. V roce 1987 vydal článek „Dědičnost epigenetických vad“ (The Inheritance of epigenetic defect), kde se zabývá vztahem regulace genové exprese a metylace cytosinu v DNA (Holliday, 1987).

Po roce 1987 docházelo k dalšímu a hlavně hlubšímu zkoumání epigenetiky a jejich mechanismů. Nezávisle na sobě v roce 1984 byl objeven genový imprinting. Zabývali se jím D. Solter a A. Surani a spol. Přímý důkaz předložila světu laboratoř A. Suraniho a spol. Pracovali s modelovým organismem myši v raném vývoji. Předpokládali, že k normálnímu vývoji je třeba exprese otcovské i mateřské alely. Proběhly pokusy s upravenými mateřskými a otcovskými genomy skrze pronukleus vaječných buněk a spermatických buněk, které ukázaly, že pro normální vývoj zárodku jsou nutné otcovské a mateřské genomy (Surani et al., 1984). Surani a spol. však nebyli s myšlenkou úplně uspokojeni. Po roce 1991 se jejich podezření potvrdilo objevem prvních imprintovaných genů. Nalezli maternální imprinting (paternální expresi) u genu *Igf2*, insulin-like growth factor 2 (DeChiara et al., 1991) a paternální imprinting (maternální expresi) u genu *Igf2r*, insulin-like growth factor 2 receptor

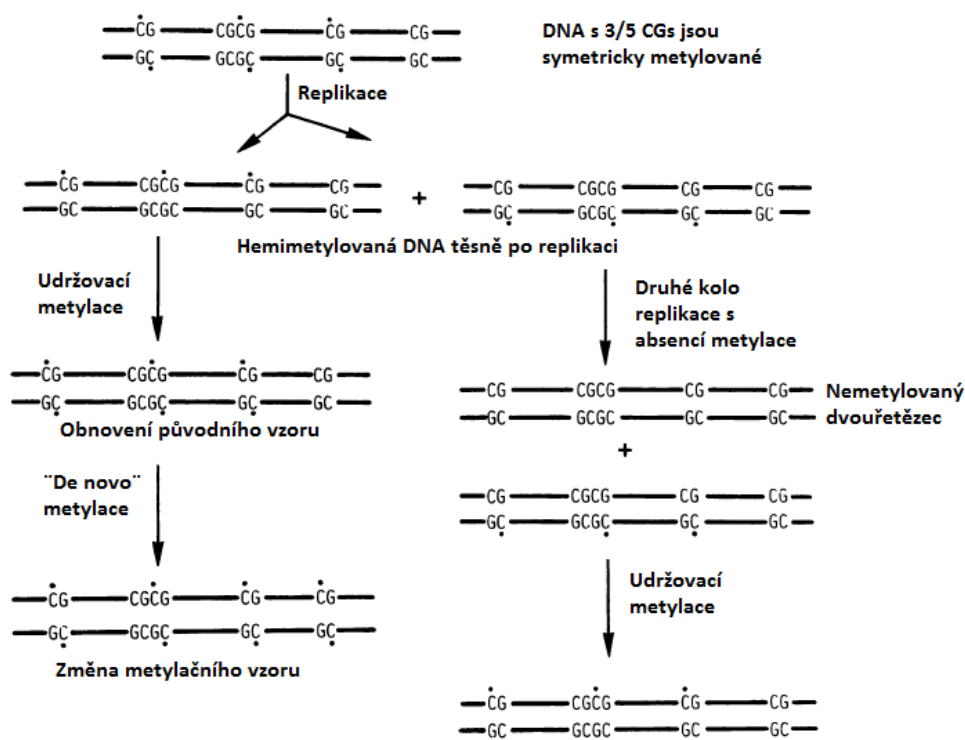
(Barlow et al., 1991) a genu *H19* kódujícího jednu z nejhojnějších RNA vyskytující se u vyvíjejícího se myšího embrya (Bartolomei et al., 1991).

Výzkum v oboru epigenetiky byl v roce 2006 ověnčen vavříny, neboť Andrew Z. Fire a Craig C. Mello obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu za objev RNA interference. Dokázali u háďátka obecného *Caenorhabditis elegans*, že v DNA může docházet k umlčování genů pomocí dvouvláknového vlákna RNA.

Epigenetika dnes patří k jednomu z nejvíce a nejrychleji se rozvíjejících oborů v molekulární biologii. Její poznatky jsou ověřovány a aplikovány v praxi, např. pro potřeby prevence, diagnostiky a terapie v medicíně.

4 Metylace DNA

Metylace pátého uhlíku v pyrimidinovém kruhu je nejčastější modifikací DNA u eukaryot. Je to proces, kdy dochází k navázání metylové skupiny z S-adenosyl-L-metioninu (SAM) na cytosin pomocí enzymu DNA metyltransferázy. Methylace DNA hraje důležitou roli při genové expresi u většiny eukaryotických organismů. Modifikace cytosinu, většinou na obou vláknech DNA, je specifickou značkou pro každý buněčný typ. Každá tkáň, tak získává určitý typ modifikace, která je zachována prostřednictvím buněčných dělení a enzymem udržovací DNA metyltransferázy zajišťující metylaci hemimetylovaného templátu DNA.



Obrázek 1: Udržovací a de novo metylace (upraveno podle Adams, 1990).

U bakterií je metylace adenosinu, na šestém uhlíku purinového kruhu, nebo cytosinu používána jako obranný mechanismus, kdy umožňuje rozeznání vlastní metylované DNA a cizí nemetylované DNA. Jakmile je nasyntetizované nové vlákno DNA, okamžitě je metylováno (Jeltsch, 2002). U lidí je metylace omezena na modifikaci cytosinu vyskytující se v oblastech genomu obsahující cytosin-guanin dinukleotidy (CpG). Distribuce CpG je v lidském genomu asymetrická. Lze najít bohatá místa s CpG i místa chudá na tyto nukleotidy. Oblasti s více než 200 páry bází s vysokou frekvencí CpG se nazývají CpG ostrůvky.

Metylace DNA se u lidí podílí na genomovém imprintingu, inaktivaci X chromosomu (lyonizace), regulaci specifických genů, kdy je přísně kontrolována exprese genu (von Känel a Huber, 2013).

4.1 DNA metyltransferázy (DNMTs)

Pro nezbytný vývoj savců je důležitá přítomnost třech metyltransferáz v buňkách. Jsou to udržovací metyltransferáza DNMT1 (DNA metyltransferáza 1) a de novo metyltransferázy DNMT3A a DNMT3B. Společně tyto enzymy mohou vytvářet nové metylační vzory a udržovat je díky buněčnému dělení. Proto tvoří základ stabilní epigenetické transkripční paměti. Analýza genového knockoutu v myších ukázala, že DNMT1, DNMT3A a DNMT3B jsou nezbytné pro životaschopnost organismu, jinak dochází k abnormálnímu vývoji či embryonálnímu úmrtí (Li et al., 1992).

DNMT1 metyluje zbytky CpG a přednostně hemimetylovanou DNA, ke které má velkou afinitu. Při replikaci udržuje metylační vzor v nově syntetizovaném řetězci, který je nezbytný pro epigenetickou dědičnost. DNMT1 je největší metyltransferáza s molekulární hmotností 184 kDa. Zvýšení aktivity DNMT1 může být docíleno sumoylací (Lee a Muller, 2009) nebo deacetylací (Peng et al., 2011).

DNMT3a a DNMT3b mají funkci de novo metylace DNA v raném vývoji u savců a jsou zásadní při vytváření DNA metylačních vzorů během vývoje (Okano et al., 1999). Tyto DNMTs jsou středně velké, jejich molekulární hmotnost je 100 až 130 kDa. Chyby v genech pro DNMTs mají fatální následky. Mutace v genu pro DNMT3b způsobuje ICF tzv. imunodeficiencie, centromerická nestabilita a obličejová anomálie (Xu et al., 1999). ICF syndrom je způsoben ztrátou metylace klasické satelitní DNA (také známé jako satelity 2 a 3) na pericentromerických oblastech chromosomů 1, 9 a 16.

V lidském genomu je kódována i metyltransferáza DNMT3L. Tato DNMT nemá vlastní enzymatickou aktivitu, ale je rozhodující pro určení metylačních vzorů v zárodečné linii (Kareta et al., 2006). DNMT3L je obecný stimulační faktor pro de novo metylaci u všech izoform DNMT3A (Chedin et al., 2002) a DNMT3B (Chen et al., 2005).

4.2 Metylační vzory

Metylační vzory jsou nastavené již v časném vývoji savců a jsou kopírovány pomocí dělení buněk. DNA metylační vzory jsou tkáňově specifické a zapojují se do procesů jako je lyonizace nebo genový imprinting. Pokud jsou vzory narušeny, dochází ke vzniku různých chorob.

Rakovinné buňky jsou charakterizovány masivní ztrátou metylace nebo hypermetylací DNA. Inaktivace genu p16 je spojená s de novo metylací na 5' CpG ostrůvku vyskytující se v buněčných liniích rakoviny prsu, prostaty, ledvin a karcinomu tlustého střeva (Herman et al., 1995). Dále se ukazuje, že abnormální metylace v CpG ostrůvku v 5' promotorové oblasti genu pro estrogenový receptor může způsobit některé karcinomy prsu (Ottaviano et al., 1994).

4.3 Demethylace DNA

Demethylace je děj, kdy dochází k odstranění metylové skupiny z 5-methylcytosinu. Tento proces může být buď pasivní, po replikaci není nový řetězec metylován, nebo aktivní na replikaci nezávislé. Pasivní proces může být např. léčba pomocí 5-azacytidinu u myelodysplastického syndromu. Azacytidin je chemický analog cytidinu, který se inkorporuje do DNA nebo RNA, kde působí jako hypometylační činidlo. Např. 5-azacytidin snižuje metylaci promotorů, redukuje proliferaci buněk a významně zmenšuje růst nádoru v IDH1 (izocitrát dehydrogenáza 1) mutantním gliomu (Borodovsky et al., 2013).

5 Modifikace histonů

Histony jsou kladně nabitě, bazické nukleoproteiny, které se podílejí na výstavbě chromatinu v jádře eukaryotních buněk. Jsou přítomny i u archebakterií, což naznačuje společný původ (Reeve et al., 2004). Mezi základní histony patří H1, H2A, H2B, H3 a H4. Jejich funkce je balení DNA, vzájemná interakce a interakce s jinými chromosomálními proteiny. Histony H3 a H4 mají vysoký obsah argininu (Moss et al., 1977). Histony H2A, H2B a hlavně H1 jsou bohaté na lysin. Existují i specifické varianty histonů, často specifické pro jednotlivé druhy.

5.1 Sbalování chromatinu (kondenzace)

Základní jednotkou chromatinu (komplex DNA a proteinů) je nukleosom, který objevil v roce 1974 americký biochemik Roger D. Kornberg. Jádro nukleosomu je tvořeno osmi histony, vždy po dvou molekulách H2A, H2B, H3 a H4, a dvouřetězcovou DNA obtočenou kolem histonového oktameru. Nukleosom tvoří 10 nm vlákno. Jednotlivé nukleosomy jsou poté spojovány pátým histonem H1. Následující struktura je nazývána 30 nm vlákno. Vlákno se stáčí do spirálovitě stočeného řetízku nukleosomů a tvoří tzv. solenoid (Finch a Klug, 1976). V histonovém oktameru se předpokládá, že kladně nabitě konce histonů se vážou na negativně nabitou DNA (Fletcher a Hansen, 1995). Acetylace histonů hraje důležitou roli při přechodu mezi 10 nm vláknem a 30 nm vláknem a v jeho udržování (Shahbazian a Grunstein, 2007). Vyšší řády kondenzace jsou spjaty se superspiralizací, která vede ke stabilizaci chromosomu. Kondenzace chromatinu představuje způsob, jak co nejvíce zmenšit délku řetězce DNA, aby se vešla do buňky a snadno se rozdělila.

5.2 Euchromatin a heterochromatin

V roce 1928 Emil Heitz popsal v cytologii na základě odlišné kondenzace heterochromatin a euchromatin. Tyto dvě struktury jsou základní funkční formou chromatinu.

Euchromatin je transkripčně aktivní oblast genomu, proto obsahuje hyperacetylované histony. Je méně kondenzovaný, méně barvitelný a replikuje se dříve než heterochromatin. V interfázi je většinou despiralizován.

Heterochromatin je geneticky inaktivní. V eukaryotických genomech obvykle obsahuje hypoacetylované histony. Existují dvě formy, fakultativní heterochromatin (epigenetická represe některých chromosomálních oblastí) a konstitutivní (vysoký obsah repetitivních sekvencí, vyšší obsah 5-metylcytosinu), který se obvykle vyskytuje v oblastech centromer a v subtelomerických oblastech. V jeho blízkosti může dojít k umlčení sousedících genů, což se nazývá poziční efekt.

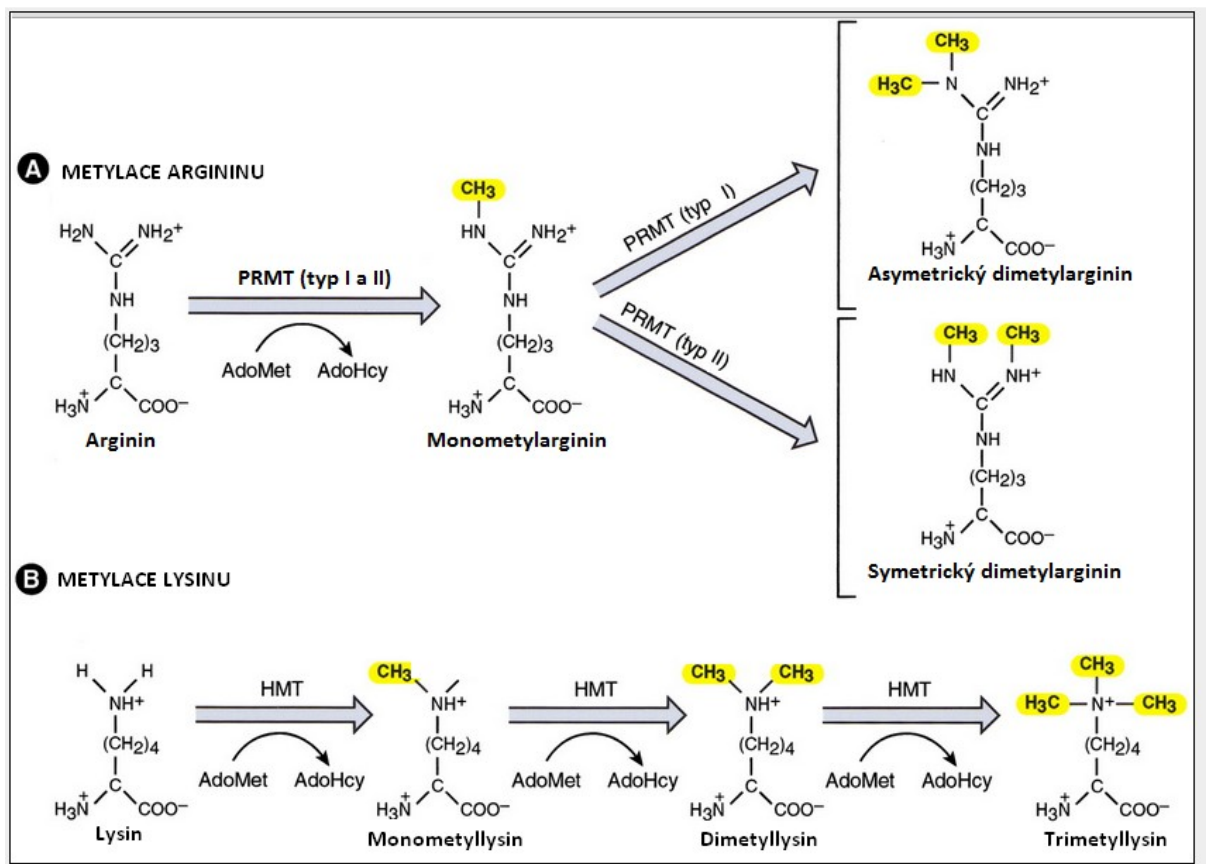
Z nukleosomu vybíhají aminoterminální konce nesoucí kladný náboj. Na těchto koncích histonů, a to na jejich aminokyselinových skupinách, probíhá většina posttranslačních modifikací. Mezi posttranslační modifikace se řadí metylace (přidání metylové skupiny), acetylace (přidání

acetylové skupiny), fosforylace (přidání fosfátu), ubiquitinace (přidání ubiquitinu), sumoylace a ADP-ribozylace.

Pravidla o tom, které modifikace a kterých aminokyselin vedou k aktivaci/inaktivaci genu, by měla být shrnuta do dosud hypotetického histonového kódu, který by měl odhalit složitou souhru mezi jednotlivými kovalentními posttranslačními modifikacemi na histonových koncích (Strahl a Allis, 2000) a stavem genové exprese. Přímý vztah k expresi genů byl prokázán, protože tyto modifikace vážou specifické regulační proteiny a proteinové komplexy, které se účastní transkripce, replikace, reparace a dalších epigenetických modifikací (DNA metylace).

5.3 Metylace histonů

Metylace histonů probíhá na argininovém zbytku na histonu H3 a lysinovém zbytku na histonech H3 a H4. Arginin může mít dvě formy, mono- nebo dimetylovanou, a lysin může mít tři formy, mono-, di- a trimetylovanou (obrázek 3). Histonová metylace jejich aminoterminálních konců, především na histonu H3, je spjata jak s aktivací genů, tak s represí genů. Zatímco metylace argininu na pozici 2, 17 a 26 a hlavně metylace lysinu na pozici 4, 36 a 79 je obvykle spojena s aktivací transkripce, metylace lysinu na pozici 9 a 27 vede většinou k její represí.



Obrázek 2: A) Metylace argininu, B) Metylace lysinu (upraveno podle Zhang a Reinberg, 2001). AdoHcy (S-adenosyl homocystein), AdoMet (S-adenosyl-L-mehtionin).

5.3.1 Histon metyltransferázy (HMTs)

Histon metyltransferázy (HMTs) jsou specifické pro rezidua lysinu nebo argininu a zajišťují přidání metylové skupiny. Tyto enzymy přenášejí metylovou skupinu ze SAM na histony H3 a H4.

Enzym katalizující přenos metylu na guanidinový dusík argininu se nazývá protein arginin metyltransferáza (PRMT). Arginin specifické metyltransferázy jsou rozděleny na dva typy podle symetrie dimethylace (obrázek 3A). Typ I katalizuje asymetrickou dimethylaci a typ II symetrickou dimethylaci. Do savčí rodiny proteinů PRMTs patří např. PRMT1 (Lin et al., 1996), PRMT3 s podstatně nižší aktivitou než PRMT1 (Tang et al., 1998) a CARM1 (koaktivátor asociující arginin metyltransferáza 1), který funguje jako sekundární koaktivátor způsobující zvýšenou transkripční aktivaci jaderných receptorů (Chen et al., 1999).

Evolučně konzervovaná SET doména se nachází u mnoho jaderných regulátorů i u HMTs specifických pro lysin (Rea et al., 2000). Na začátku 21. století byla objevena metyltransferázová aktivita Clr4 u *Schizosaccharomyces pombe* a jeho savčího homologu SUV39H1 (Lachner et al., 2001). Oba enzymy metylují lysin 9 histonu H3 (Nakayama et al., 2001). Tato prokázaná enzymatická reakce podporuje roli metylace histonů při heterochromatizaci (Rea et al., 2000).

5.4 Acetylace histonů

Obecně platí, že acetylace je spojená s transkripční aktivací v euchromatinu a s přestavbou chromatinu. Cílem modifikace je lysin.

Acetylace histonů způsobuje snížení pozitivního náboje histonového aminoterminálního konce, což má za následek méně kondenzovaný chromatin a zvýšenou transkripční aktivitu na DNA. Acetylace lysinu neutralizuje část kladného náboje v koncové části, tím dojde nejen k oslabení spojení histonů s DNA (Hong et al., 1993), ale také k oslabení vzájemné interakce nukleosomů (Fletcher and Hansen, 1996). Zeslabení nekovalentních vazeb destabilizuje strukturu a uspořádání nukleosomu. Tím se rozvolní struktura chromatinu a umožní se přístup k DNA jaderným faktorům, jako jsou proteiny transkripčních komplexů, které se zde navážou do promotorových a enhancerových oblastí. Acetylace vede ke genové aktivaci (Hebbes et al., 1988).

5.4.1 Histon acetyltransferázy (HATs)

Acetylace je katalyzována početnou rodinou enzymů histon acetyltransferáz (HATs). Donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A (acetyl-Co A), který předává svoji acetylovou skupinu na ϵ -aminoskupinu lysinu histonového příjemce.

HAT rodina se dělí do dvou tříd, HAT typu A a HAT typu B. Enzymy HATs typu A jsou lokalizovány v jádře a regulují genovou expresi pomocí acetylace nukleosomálních histonů v rámci chromatinu (Brownell a Allis, 1996). Tato skupina je funkčně charakteristická její bromodoménou (Dhalluin et al., 1999), důležitou k rozpoznání a k navázání acetylové skupiny na lysin na histonech.

Patří mezi ně Gcn5 (Brownell et al., 1996), p300-CBP (P300-CBP koaktivátorová rodina) a TAFII-250 (TBP-asociovaný faktor 250 kDa). Enzymy HATs typu B mají vysokou specifitu k volným histonům. Modifikují histony před začleněním do chromatinu a fungují mimo jádro (Brownell a Allis, 1996).

Jednou ze známých HAT typu B je histon acetyltransferáza 1 (HAT1). HAT1 je nezbytná pro diacetylaci nově syntetizovaných histonů H4 na lysinu 5 a 12 a rovněž je důležitá pro udržení acetylace H3 na lysinu 9, 18 a 27 během replikace a sbalování chromatinu. Tato modifikace může být klíčová při regulaci buněčné proliferace. Nepřítomnost HAT1 způsobuje chyby v opravě DNA a narušení stability genomu. Dále při absenci HAT1 dochází k defektům v plicích a v kranio-faciálním vývoji (Nagarajan et al., 2013).

5.4.2 Deacetylace histonů

Deacetylace je spjata s umlčováním genů, tedy s transkripční inaktivací ve fakultativním heterochromatinu a s přestavbou chromatinu.

5.4.2.1 Histon deacetylázy (HDACs)

Opačná reakce k acetylaci je deacetylace, které se účastní histon deacetylázy (HDACs). HDACs regulují mnoho biologických procesů včetně ovlivnění buněčného cyklu a nádorů.

Skupina HDACs se dělí do čtyř tříd (I – IV). Do I. třídy patří HDAC1, HDAC2, HDAC3 a HDAC8. Trochu komplexnější II. třída je rozdělena na IIa, kam patří HDAC4, HDAC5, HDAC7 a HDAC9, a na IIb, kam spadá HDAC6 a HDAC10. Prostá IV. třída obsahuje pouze HDAC11. Všechny tyto tři třídy sdílejí sekvenční a strukturní homologie v rámci katalytických domén a jejich katalytický mechanismus je závislý na přítomnosti zinku (Zn). Příkladem III. třídy jsou lidské Sirtuiny 1-7, jejichž katalytický mechanismus vyžadující přítomnost oxidované formy nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺).

5.4.2.2 Histon deacetylázové inhibitory

Vývoj inhibitorů HDAC k léčebnému využití je předmětem velkého zájmu výzkumných pracovníků. Zpočátku byly inhibitory hlavně zkoumány jako protinádorové léky pro léčbu rakoviny. HDAC inhibitory jsou schopny vyvolat apoptózu a zástavu buněčného cyklu. Jedním ze slibných chemoterapeutických látek by mohl být Thailandepsin A (TDP-A), který zastavuje buněčný cyklus a indukuje apoptózu u anaplastické rakoviny štítné žlázy (Weinlander et al., 2014).

V posledních letech se používání inhibitorů HDAC rozšířilo také i na neoncologická onemocnění. Při experimentu na krysích modelech s akutním zánětem plic byl použit Trichostatin A nebo suberoylanilid hydroxamové kyseliny, které zmírnily plicní zánět (Chen et al., 2014).

Léčba založená na inhibitech HDCA musí být přesně nadávkována, neboť nemá vždy kladné výsledky. Příkladem může být HDCA3, který je důležitý pro funkci Purkyňových buněk. Jeho úplná ztráta vyvolává ataxii (Venkatraman et al., 2014).

6 RNA interference

RNA interference (RNAi) je děj, při kterém molekuly RNA vazbou k jiné nukleové kyselině inhibují expresi genu. Tento mechanismus byl popsán v roce 1998 v článku „Silná a geneticky specifická interference dvoušroubovice RNA (dsRNA) v háďátku obecném *Caenorhabditis elegans*“ (Fire et al., 1998). V roce 2006 za tento objev dostali Andrew Fire a Craig C. Mello Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Dříve, než byla RNAi objasněna na molekulární úrovni, byla nazývána jako posttranskripční genový silencing (PTGS) nebo genový silencing.

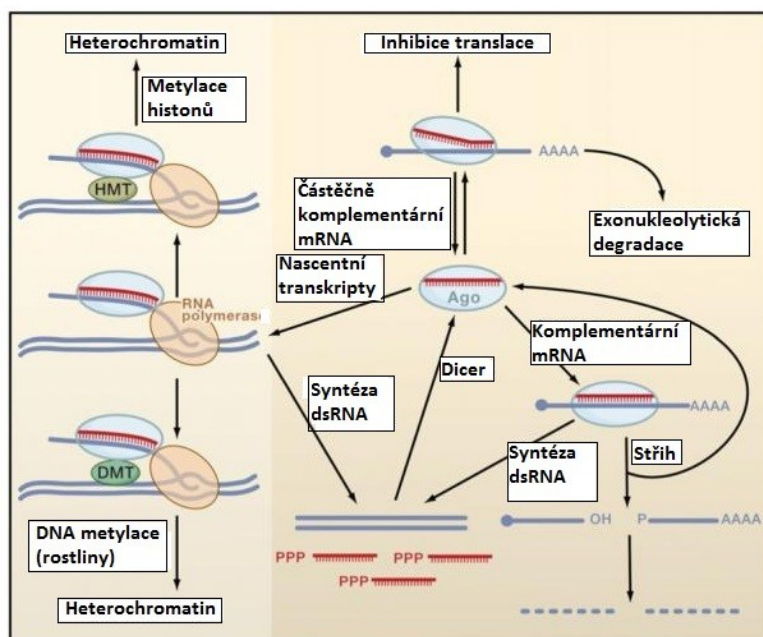
6.1 Mechanismy jednotlivých typů malých RNA

RNAi je významnou formou transkripčního a posttranskripčního umlčení genu, při kterém malé molekuly RNA vyvolávají degradaci homologních transkriptů. Tím je dosaženo ztráty funkce genu nebo snížení jeho aktivity. Již dříve bylo prokázáno, že umlčení genu je dědičné a může přetrvávat po generace od jeho počáteční indukce (Alcazar et al., 2008; Fire et al., 1998). Mezi nejvíce zkoumané krátké regulující RNA patří miRNA, siRNA a piRNA. Krátké RNA molekuly se vážou do proteinů skupiny Argonaut. Tvoří tím komplexnější struktury, které představují funkční jednotku.

6.1.1 Malé interferující RNA (siRNA)

Molekuly siRNA jsou převážně exogenního původu, odvozené od virů, transpozonů nebo transgenů. Existují i endogenní siRNA, párující sense a antisense RNA a pseudogenní duplexy.

Iniciaci RNAi zahajuje enzym Dicer, který patří do ribonukleázové rodiny RNáz III a obsahuje homologní oblasti s rodinou ARGONAUT. Tento enzym specificky štěpí dvouvláknitou dsRNA na kratší úseky (Bernstein et al., 2001). Tyto krátké vodící dsRNA, nazývané malé interferující RNA (siRNA), mají velikost 21 až 23 nukleotidů a jsou zcela komplementární s genem, který potlačují (Zamore et al., 2000). Následně jsou siRNA navázány na proteiny Argonaut a spolu s dalšími faktory vzniká ribonukleoproteinový komplex zvaný RISC (RNAi silencing complex). Molekula siRNA vede celý komplex k cílovým nukleovým kyselinám nesoucí komplementární sekvence. Pomocí nejrůznějších mechanismů zahrnujících např. inhibici translace, degradaci mRNA, modifikaci chromatinu (Volpe et al., 2002) a inhibici transkripce (Guang et al., 2010) umlčí genovou expresi.

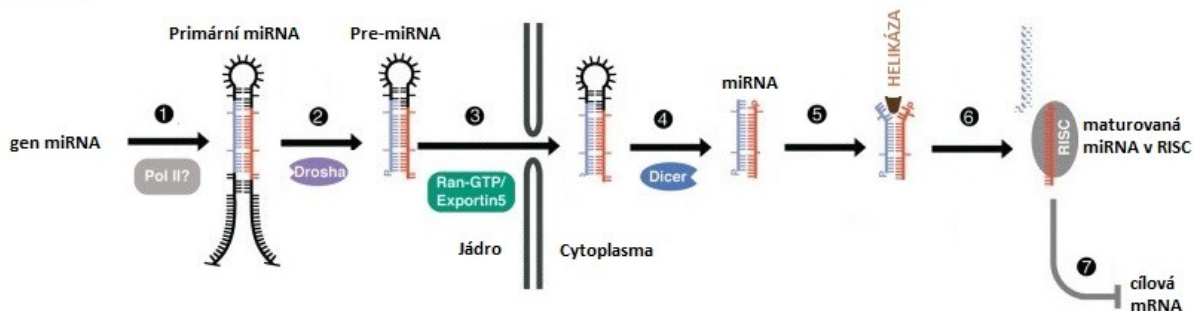


Obrázek 3: Mechanismy umlčování pomocí siRNA (upraveno podle Carthew a Sontheimer, 2009).

6.1.2 MikroRNA (miRNA)

MikroRNA jsou malé nekódující molekuly RNA, které fungují jako posttranskripční regulátory genové exprese. Molekuly miRNA jsou odpovědné za klíčové procesy ve vývoji (Le Guen et al., 2013), v buněčné symetrii (Johnston a Hobert, 2003) a proliferaci (Brennecke et al., 2003).

Geny pro miRNA jsou pomocí RNA polymerázy II transkribovány do RNA, která vytváří vlásenkové struktury, známé jako primární miRNA (Lee et al., 2004). Tato struktura je zpracována endonukleázou Drosha, která štěpí přesahující konce, a vzniká prekurzor miRNA, pre-miRNA (Lee et al., 2003). Pre-miRNA je následně transportována z jádra do cytoplasmy pomocí Exportinu-5 (Yi et al., 2003). V cytoplasmě je pre-miRNA rozpoznána enzymem Dicer, který štěpí vlásenku na druhém konci pre-miRNA, a vzniká miRNA (Lee et al., 2003). Zralý duplex miRNA je krátkodobý subjekt, protože je zachován pouze jeden ze dvou řetězců. Poté je miRNA navázána na protein Argonaut a tvoří RISC. V tomto komplexu miRNA působí jako adaptér, který specificky rozpoznává a reguluje jednotlivé mRNA (Carthew a Sontheimer, 2009). Některé miRNA inhibují proces translace vazbou na cílovou mRNA, jiné významně snižují množství mRNA v důsledku její zvýšené degradace (Wu et al., 2006).



Obrázek 4: Biogeneze miRNA (upraveno podle Bartel, 2004).

Rozdíl mezi miRNA a siRNA je v tom, že většina miRNA má vysoce přesné konce, naopak většina siRNA má různorodější koncové složení. Tento rys siRNA pravděpodobně zvyšuje specifitu na mRNA bez nutnosti přísnější komplementarity.

6.1.3 Piwi-interagující RNA (piRNA)

Jednovláknové piRNA jsou krátké RNA o velikosti 23 až 31 nukleotidů, které jsou vázány a funkčně spojeny na PIWI-like proteiny v efektorový komplex. Tato RNA má odlišnou biogenezi než miRNA a siRNA. Molekuly piRNA jsou produkovány z jednovláknových prekurzorů RNA pocházejících z transpozonových elementů. Piwi-like proteiny a piRNA fungují téměř výhradně v zárodečných buňkách živočichů (Bortvin, 2013). Odstranění piRNA vede k patologickým fenotypům zárodečných buněk a neplodnosti (Heyn et al., 2012). Jejich hlavní funkcí je umlčení transpozonových elementů a tím udržení genomové stability.

6.2 RISC (RNAi silencing complex)

RISC je komplex skládající se z krátké RNA a Argonaut proteinů, což je aktivní složka štěpící cílovou mRNA komplementárně navázanou na krátkou RNA. V experimentu na myším modelu bylo dokázáno, že savčí protein Argonaut2 v RISC má úlohu v navádění k cílové mRNA (Liu et al., 2004) a je zodpovědný za její štěpení (Meister et al., 2004).

7 Imprinting

Genomový imprinting (vtisk) je specifická epigenetická modifikace determinovaná pohlavím. Jde o reverzibilní děj vedoucí k funkčním rozdílům mezi paternálními a maternálními alelami. Genomový imprinting nespadá do klasické Mendelovské dědičnosti. Savci zdědí po rodičích dvě kompletní sady chromosomů, jednu od matky a druhou od otce. Většina autozomálních genů je funkčních, jak z maternálních, tak z paternálních alel. Pouze u imprintovaných genů dojde k expresi jen z jedné alely, neaktivní alela je imprintovaná. Pokud je gen exprimován výhradně z otcovské alely, je tento děj nazýván maternální imprinting. Naopak pokud je gen exprimován z mateřské alely, je tento děj nazýván paternální imprinting. Poprvé byl použit pojem imprinting v roce 1960 Helen Crousovou (Crouse, 1960), ale mechanismus imprintingu byl objeven až v roce 1984 (Surani et al., 1984). Od té doby je genomový imprinting s jeho mechanismy stále intenzivně zkoumán.

7.1 Princip

Imprinting je ustanoven během vývoje zárodečných buněk spermií a oocytů. Po oplození je udržován v chromosomech u organismu. U nového organismu v rané fázi jeho zárodečných buněk je imprinting vymazán. Následně je v pozdějším stádiu vývoje zárodečných buněk znovu ustanoven v závislosti na typu gamety (s chromosomem X či Y), ve které se nachází. Reprogramování v gametách má za úkol dodržovat základní pravidla imprintingu: stanovit příslušnou identitu specifického rodičovského původu pro další generaci (Reik a Walter, 2001).

Proces imprintingu má čtyři hlavní mechanistické principy (Ferguson-Smith, 2011):

1. schopnost ovlivnit transkripci v somatických buňkách,
2. dědičnost v somatických buňkách,
3. vymazání imprintingu v rané fázi vývoje zárodečných buněk,
4. ustanovení imprintingu v pozdějším stádiu vývoje zárodečných buněk.

Princip imprintingu dané alely je založen na metylaci CpG dinukleotidů DNA a je spojen s umlčením transkripce. U obou rodičovských chromosomů existuje odlišná míra metylace (Stöger et al., 1993). Tyto odlišně metylované oblasti se nazývají „differentially methylated regions (DMRs)“. Jako výchozí bod slouží specifická metylace DNA pro stanovení vývojové dynamiky epigenetického programu na genech a hrající roli v evoluci epigenetického paradigmatu (Ferguson-Smith, 2011).

DMRs se dělí do dvou tříd, somatické a zárodečné. V zárodečné oblasti jsou klíčová metylovaná imprintovaná centra (ICs), nezbytná pro monoalelickou expresi (Thorvaldsen et al., 1998). Vymazání imprintingu v prvotních zárodečných buňkách zahrnuje ztrátu metylace i na ICs. Pozdější ustanovení imprintingu v zárodečných buňkách zahrnuje hlavně přeprogramování specifické DNA metylace v ICs (Ferguson-Smith, 2011). Pro vytvoření nové metylace v zárodečných DMRs je nutná de novo metyltransferáza DNMT3A a její regulační faktor DNMT3L (Kaneda et al., 2004).

Pokud má fungovat epigenetická paměť a zárodečná linie má zůstat po celou následující dobu vývoje organismu stabilní, musí být genomový imprinting odolný vůči přeprogramování. Příkladem faktoru pro udržení stability genomového imprintingu je gen *Zfp57* (Li et al., 2008) nebo faktor *PGC7/Stella*, který chrání před demethylací mateřského genomu po oplození (Nakamura et al., 2007).

7.2 Lidské patologie

Poruchy imprintingu vedou k manifestaci nejrůznějších chorob. Jejich příčinami jsou mikrodelece exprimovaného genu, uniparentální disomie imprintovaného genu, či bodové mutace. Uniparentální disomie (UPD) znamená, že oba dva chromosomy, nebo jejich části, se dědí výhradně pouze jen od jednoho z rodičů. Příkladem UPD je vzácné autozomálně recesivní onemocnění mandibuloakrální dysplazie, jejíž příčinou je maternální UPD chromosomu 1 (Bai et al., 2014). Mezi poruchy imprintingu patří: Prader-Willi syndrom (PWS), Angelman syndrom (AS), Beckwith-Wiedemann syndrom (BWS), Silver-Russell syndrom (SRS) a transientní novorozenecký diabetes mellitus.

Molekulární podstata syndromů PWS a AS je lokalizována do jedné oblasti dlouhého raménka chromosomu 15 (15q11-q13), u PWS více proximálněji a u AS více distálněji. U PWS chybí funkční paternální geny, konkrétně je zde nedostatek exprese malé nukleární RNA 116 (SNOD116). Naopak u AS chybí funkční maternální geny, konkrétně nedostatek exprese E6-AP ubiquitin-ligázy (UBE3A). (Ramsden et al., 2010).

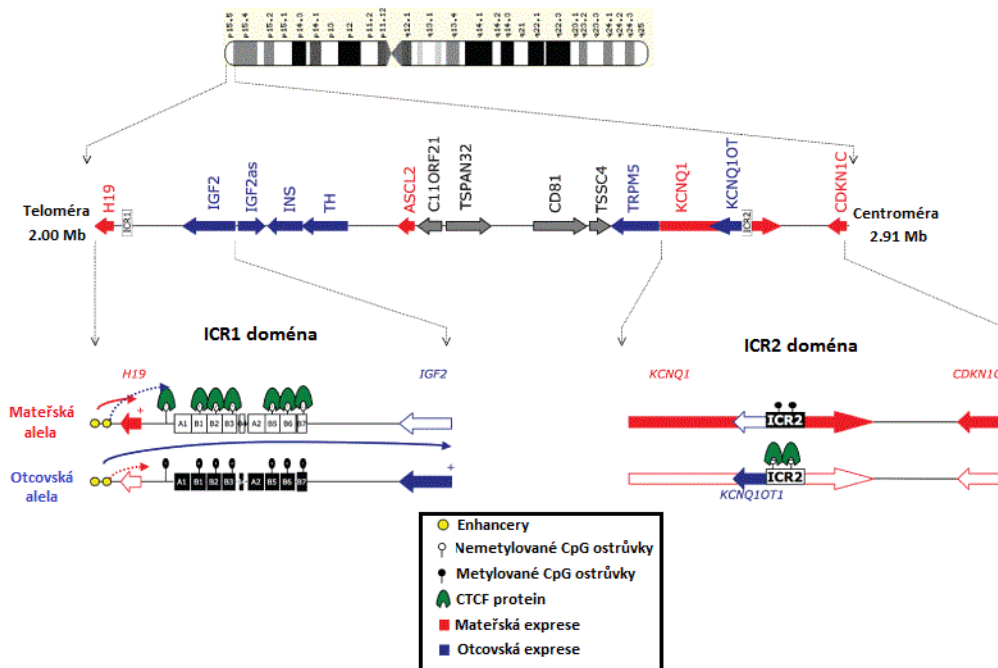
U BWS molekulární etiologie zahrnuje dysregulaci imprintingu růstových regulačních genů na chromosomu 11 (11p15.5). Oproti dvěma předcházejícím syndromům se u něho nachází zvýšená exprese *IGF2*, což je spojeno s abnormalitami růstu. Oblast 11p15.5 je rozdělena do dvou odlišných ICs, telomerická doména 1 a centromerická doména 2, které jsou od sebe odděleny neimprintovanou částí. BWS je způsobena epigenetickými nebo genetickými změnami, které narušují geny v jedné nebo v obou imprintovaných doménách (Choufani et al., 2010). Bylo zjištěno, že u 5 % případů se vyskytuje abnormální metylace IC1 mateřského chromosomu a nejčastější genetickou změnou je hypometylace IC2 mateřského chromosomu (Nordin et al., 2014).

Telomerická doména 1 obsahuje imprintované geny pro *IGF2* (exprimován z otcovské alely) a *H19* (exprimován z mateřské alely). IC1 pro doménu 1 je DMR nacházející se ve vzdálenosti 2 kb „upstream“ od *H19* (Vu et al., 2000). IC1 reguluje expresi *H19* a *IGF2* tím, že funguje jako chromatin „hraniční element“ tedy „izolátor“. Na mateřském chromosomu je IC1, podobně jako *H19*, nemetylovaný, což umožňuje vazbu proteinu zinkového prstu CTCF, vázající se na sekvenci izolátoru CCCTC. Tato vazba blokuje přístup jaderným proteinům k *IGF2* promotoru a následným enhancerům, ale *H19* gen, kódující antisense RNA, je transkribován. Oproti tomu na otcovském chromosomu je IC1

metylovaný, což brání nasednutí proteinu CTCF, takže IGF2 je exprimován, zatímco H19 je umlčen (Hark et al., 2000).

Centromerická doména 2 obsahuje dva imprintované geny KCNQ1OT1 (exprimován z otcovské alely) a CDKN1C (exprimován z mateřské alely). KCNQ1OT1 kóduje antisense RNA. (Cerrato et al., 2002). Na otcovském chromosomu je jeho 5' konec, který figuruje jako IC2 pro doménu 2, nemetylovaný což opět umožňuje vazbu proteinu zinkového prstu CTCF, a dochází k transkripci KCNQ1OT1. Tím negativně reguluje v cis expresi několik imprintovaných genů v doméně 2 (Horike et al., 2000). CDKN1C kóduje důležitý inhibitor cyklin-dependentní kinázy, p57KIP2, která inhibuje buněčnou proliferaci (Matsuoka et al., 1995). Mutace v CDKN1C představují predispozice ke vzniku nádorů (Costa-Guda et al., 2013).

Epigenetickým i klinickým opakem BWS je považován SRS. Jeho přesná etiologie není většinou známa, ale soudí se, že je heterogenní. Mezi hlavní příčiny SRS patří poruchy imprintovaných genů na chromosomu 11 (11p15.5), mateřská disomie nebo abnormality na chromosomu 7 (Monk et al., 2002). Většina pacientů s diagnostikovaným SRS má hypometylacii v H19 oblasti, které způsobují růstovou retardaci a asymetrii těla. Tento epigenetický defekt je zodpovědný za expresi H19 a následné snížení exprese IGF2, což způsobuje růstovou retardaci a asymetrii těla (Blik et al., 2006). V nedávné době byl zjištěn vzácný případ deficitu růstového hormonu GH u chlapce se SRS. Nedostatek GH není obvykle spojován se SRS, ale ukazuje se možnost terapeutického podání GH (Prasad et al., 2012). Také byl popsán případ de novo duplikace oblasti 11p13 obsahující geny související s klinickými příznaky SRS (Palumbo et al., 2014).



Obrázek 5: Chromosomální oblast 11p15 je rozdělena do dvou imprintovaných center – domén ICR1 a ICR2 (upraveno podle Demars a Gicquel, 2012)

8 Inaktivace chromosomu X

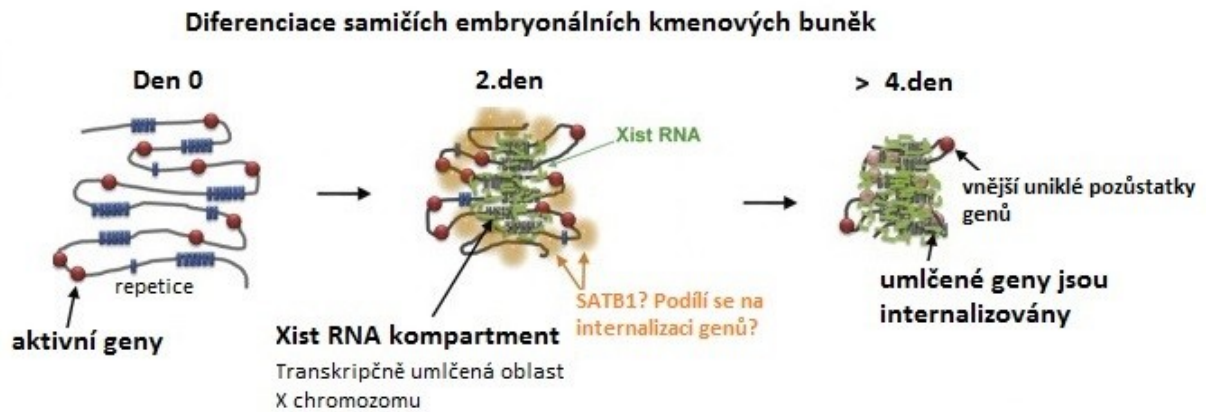
Jeden z běžných procesů v lidských buňkách je inaktivace chromosomu X. Tento děj se také nazývá lyonizace na paměť její objevitelky, anglické genetičky Mary Frances Lyon, která jej popsala v roce 1961. Jedná se o náhodnou inaktivaci jednoho ze dvou a více chromosomů X (Lyon, 1961). Po každém dalším dělení v dceřiných buňkách je inaktivován stejný chromosom. Inaktivace určitého chromosomu je děděna mezi buňkami v rámci jedince, ale není děděna mezi jedinci (nepřenáší se z rodičů na potomky). Inaktivací chromosomu X vzniká Barrovo tělísko (sex chromatin). Tuto heterochromatickou strukturu objevil kanadský výzkumník M. L. Barr v roce 1949 na periférii interfázního jádra. Je pozorovatelná pod světelným mikroskopem.

Inaktivace chromosomu X je typická pro ženy s normálním karyotypem 46, XX. Někteří vědci se domnívají, že se jedná o kompenzaci dvojité genové dávky pohlavních chromosomů X a tedy dvojité exprese genů na nich lokalizovaných (Deng et al., 2011). Jiní badatelé však tuto hypotézu zavrhnou (Xiong et al., 2010). Lyonizace může probíhat i u mužů, např. Klinefelterův syndrom má karyotyp 47, XXY a nadpočetný chromosomů X je inaktivován. Muži s normálním karyotypem 46, XY nemají inaktivní chromosom X.

8.1 Vznik inaktivního chromosomu X

K inaktivaci dochází v rané fázi embryogeneze v somatických buňkách (Lyon, 1961). Náhodná inaktivace je často popisována jako vícestupňový proces zahrnující výběr chromosomu, iniciaci a šíření umlčování inaktivního chromosomu a poté udržení v inaktivním stavu. Na inaktivaci se hlavně podílejí XIC (X chromosomální inaktivační centrum) a XIST (X-inaktivní specifický transkript). XIC je oblast na chromosomu X, která zahajuje inaktivaci a ta pak pokračuje podél celé jeho délky.

V rámci XIC se nachází specifický lokus zvaný XIST, který je rozhodující pro X inaktivaci. Je přepisován pouze na neaktivním chromosomu X (Brown et al., 1991). Jeho produktem je nekódující RNA, která se podílí na heterochromatizaci, tvorbě Xist RNA mraku kolem inaktivovaného chromosomu X. Bylo prokázáno, že je to rozhodující faktor při výběru chromosomu X a šíření umlčování budoucího inaktivního chromosomu (Marahrens et al., 1998). Nicméně mechanismus, kterým Xist RNA umlčuje geny na chromosomu, je zatím nejasný. Bylo zjištěno, že před úplným vypnutím genů na neaktivním chromosomu dojde k eliminaci RNA polymerázy II a transkripčních faktorů (Chaumeil et al., 2006). Poté následuje ztráta aktivních a navození umlčovacích chromatinových markerů, které se vyskytují v uspořádaném sledu událostí a zahrnují např. trimetylaci histonu H3 na lysinu 27 (H3K27me3) pomocí Polycomb komplexu PRC2, metylace promotorových oblastí a vazbu represivní histonové varianty macroH2A (Chow a Heard, 2009). Výsledkem je inaktivní chromosom X.



Obrázek 6: Diferenciace samičích embryonálních kmenových buněk. Xist mrak indukuje tvorbu transkripčně umlčeného repetitivního kompartmentu. Jelikož jsou geny umlčeny, jsou tedy do tohoto kompartmentu začleněny. Možný mediátor pro tuto internalizaci může být matrix-asociovaný protein SATB1 (upraveno podle Chow a Heard, 2009).

Antisense ke genu Xist je gen Tsix. Jeho produktem je nekódující RNA dlouhá 40 kb, která je přepisována „downstream“ přes lokus Xist (Lee et al., 1999). Tsix zabraňuje hromadění Xist na jednom z chromosomů X a tím udržuje aktivní euchromatinový stav zvoleného chromosomu.

8.2 Patogeneze

Možné patologie zapříčiněné inaktivací chromosomu X jsou způsobené tím, že dojde k umlčení nepoškozeného chromosomu. Porucha se tedy může projevit tam, kde zůstal aktivní defektní chromosom X. U heterozygotních žen je důsledkem buněčný mosaicismus.

X-vázaná ektodermální dysplazie je dědičná nemoc jinak nazývána Christův-Siemensův-Tourainův syndrom (CST). Je charakterizována velkou a komplexní skupinou onemocnění jako jsou hypotrichóza (ztráta nebo snížení hustoty vlasů), hypodontie (ztráta zubů) a hypohidróza (snížení produkce potu nebo úplná ztráta pocení). Nejčastější ektodermální onemocnění je hypohidrotická (nebo anhidrotická) ektodermální dysplazie (HED), která byla prokázána jako recesivní X-vázaná choroba (Zonana et al., 2000). Některé případy mají mírné příznaky, jiné závažnější.

Nejběžnější příčinou jsou mutace v genu pro ektodysplasin-A (EDA), ale mohou být příčinou i mutace v genu pro ektodysplasin-A receptor (EDAR), nebo v genu pro ektodysplasin-A receptor asociovaný adapter (EDARADD). Neutrální substituce A1270G (výměna alaninu na pozici 1270 za glycin), odpovídající nukleotidové záměně v exonu 9 genu EDA1, je ve vazebné nerovnováze se substitucí Tyr343Cys v extracelulární doméně EDA, která vede k HED (Kobiela et al., 2003). Kauzální mutací byla také zjištěna substituce A1045G v genu ED1 (Zhang et al., 2007) či hypermetylace v promotorové oblasti genu EDA (Yin et al., 2013).

9 Epigenetické mechanismy a jejich role v etiopatogenezi multifaktoriálních onemocnění

Multifaktoriální choroby jsou dnes zkoumány po celém světě. Řada vědeckých týmů bádá nad jejich etiopatogenezi (soubor příčin a mechanismů, které vedou ke vzniku a rozvoji onemocnění), aby detailněji na molekulární úrovni pochopili příčinu nemoci a dovedli jí tak lépe léčit. Vlivy u multifaktoriálních chorob, které přispívají k rozvoji nemoci, jsou genetické (zděděné) nebo environmentální. Mezi environmentální faktory patří např. životní styl, výživa, infekce (virová či bakteriální), hygienické podmínky, znečištěné ovzduší, změny podnebí, UV záření, atd. Vnější faktory jsou nezbytné ke spuštění multifaktoriálních onemocnění. K multifaktoriálním onemocněním se řadí autoimunitní choroby, kdy tělo rozpoznává své vlastní buňky jako cizí a jeho imunitní systém je napadá a ničí.

9.1 Autoimunitní onemocnění

O autoimunitním onemocněním hovoříme tehdy, když autoimunitní reakce vede k poškození vlastních tkání. Reakce může být buď humorální (látková), nebo buněčná. Nastane-li humorální autoimunitní reakce, dojde k tvorbě autoprotilátek a výsledkem je tkáňové poškození cytotoxickými mechanismy nebo tvorba a ukládání imunokomplexů (spojení protilátek a antigenů). Buněčná autoimunitní reakce vede k tvorbě zánětu, který je vyvolán aktivací makrofágů, cytotoxickými (Tc) a pomocnými (Th) T lymfocyty a jejich cytokiny. Autoimunitní onemocnění vzniká postupně a jednotlivé fáze rozvoje choroby mohou trvat měsíce nebo roky.

9.2 Příčiny vzniku autoimunitního onemocnění

Hlavním rysem autoimunitního onemocnění je zánět, proto se v současné době častěji používá označení IMID (immune mediated inflammatory disorders), což v českém překladu znamená imunitou zprostředkované zánětlivé poruchy. Příčinou pro vznik autoimunitního onemocnění je prolomení autotolerance (schopnost organismu tolerovat jemu vlastní struktury). Na vzniku porušené imunitní tolerance a následné dysbalance imunitního systému se podílí více faktorů, které se dělí na faktory vnitřní (genetické) a vnější (environmentální). Tyto faktory se navzájem kombinačně doplňují, někdy v etiologii převládají faktory genetické, jindy faktory zevního prostředí.

9.3 Vnitřní faktory

Vnitřní faktory jsou dány genetickou predispozicí. Konkordantní výskyt chorob je u jednovaječných dvojčat, pravděpodobnost propuknutí nemoci u obou dvojčat se pohybuje mezi 25 – 70 % (Stefan et al., 2014; Svendsen et al., 2013). Hlavním genetickým predispozičním faktorem vzniku autoimunitních chorob je hlavní histokompatibilitní komplex (major histocompatibility complex = MHC), u člověka nazývaný lidské leukocytární antigeny (human leukocyte antigens = HLA). Dalšími genetickými faktory jsou geny kódující T buněčné receptory (T cell receptors = TCR), těžké řetězce imunoglobulinů (Ig), cytokiny, složky komplementu, proteiny regulující apoptózu a aktivaci buněk, či geny spojené s imunodeficity.

Geny kódující HLA se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu (oblast 6p21). Rozeznáváme dvě hlavní skupiny těchto transmembránových molekul, HLA I. a II. třídu. Antigeny HLA I. třídy jsou detekovány na všech jaderných buňkách a jsou rozpoznávány cytotoxickými CD8+ T lymfocyty (Tc). Oproti tomu antigeny HLA II. třídy jsou konstitutivně detekovány pouze na antigen-prezentujících buňkách, jako jsou makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty, a jsou rozpoznávány pomocnými CD4+ T lymfocyty (Th).

U řady autoimunitních chorob je známá asociace s určitým haplotypem nebo s predispozičními alelami HLA I. třídy a pak hlavně HLA II. třídy. V případě HLA I. třídy je nejznámější asociace HLA-B27 s Bechtěrevovou ankylozující spondylitidou, kdy 95% všech pacientů je pozitivních na tento antigen. Přesný mechanismus této predispozice však zatím není znám, i když existuje celá řada hypotéz (Zambrano-Zaragoza et al., 2013). V případě HLA II. třídy, které predisponují pro všechny ostatní autoimunity, jsou nejčastější predispoziční antigeny HLA-DR3 a HLA-DR4. Příkladem je diabetes mellitus, u kterého jsou tyto antigeny hlavním rizikovým faktorem (Gillespie et al., 2014).

9.4 Vnější faktory

Mezi vnější faktory predispozice k autoimunitním chorobám patří zejména nedostatečná antigenní stimulace (tzv. hygienická hypotéza), která vede k imunitní dysbalanci a k reakci proti strukturám vlastního těla. Důležitou preventivní roli hraje kojení, které má trvat minimálně 6 měsíců a které umožňuje optimální rozvoj střevní slizniční imunity u kojence. Rovněž mateřské mléko, na rozdíl od kravského, není imunogenní a nevyvolává patologické zkřížené reakce. Obsahuje protilátky, které v prvních měsících života

chrání před infekcí. Ukazuje se, že delší doba kojení může souviset s nižším rizikem vzniku diabetu 2. typu (Jäger et al., 2014).

Mezi vyvolávající faktory klinických projevů autoimunitního postižení se řadí infekce, stres, farmaka, chemikálie a UV záření.

9.5 Choroby způsobené autoimunitním onemocněním

V zásadě se autoimunitní onemocnění dělí na dvě velké skupiny, autoimunity systémové a orgánově specifické. Hranice mezi nimi není příliš ostrá a často se navzájem prolínají.

Systémová autoimunitní onemocnění jsou převážně způsobena imunokomplexovým typem poškození tkání. Patří sem např. systémový lupus erythematosus (multiorgánové onemocnění projevující se bolestmi kloubů, postižením ledvin, kůže a centrální nervové soustavy), revmatoidní artritida (zánětlivé postižení kloubů), systémová sklerodermie (onemocnění projevující se zbledením prstů, fibrózou kůže a orgánů) a dermatomyositida.

Orgánově specifická autoimunitní onemocnění jsou lokalizovaná k určitému orgánu. Dochází ke tkáňovému poškození, které je způsobené T lymfocyty nebo autoprotilátkami. Z buněčných autoimunit sem patří např. diabetes mellitus I. typu (autoimunitní reakce proti beta-buňkám pankreatu), Addisonova nemoc (autoimunitní reakce proti kůře nadledvin), roztroušená skleróza (autoimunitní reakce proti myelinu mozkových tkání) a psoriáza (autoimunitní reakce proti kožním antigenům). Typickým zástupcem humorální autoimunity je myasthenia gravis (produkce autoprotilátek proti acetylcholinovému receptoru) či Graves-Basedowova choroba (produkce autoprotilátek proti thyreotropnímu receptoru štítné žlázy).

9.5.1 Diabetes mellitus I. typu (T1DM)

Diabetes mellitus I. typu (T1DM) je způsobený autoimunitní destrukcí beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které produkují inzulínu. Manifestuje se zpravidla v dětství a v mladém věku. Existuje typ, který vzniká u dospělého člověka a nazývá se latentní autoimunitní diabetes dospělých (LADA). Postihuje ženy i muže stejnou měrou.

Nejvýznamnější a nejsilnější genetické riziko k T1DM mají jedinci s genotypem HLA-DR3-DQ2 a HLA-DR4-DQ8 (Singal a Blajchman, 1973). Diagnostickým kritériem pro T1DM je přítomnost autoprotilátek proti specifickým antigenům beta buněk pankreatu včetně inzulínu, glutamát dekarboxylázy (GAD) a protein tyrosin fosfatázy (islet antigen 2 = IA-2).

K predispozičním environmentálním rizikům se řadí nedostatečná antigenní stimulace, virové infekce nebo nedostatek vitamínu D (Holick, 2004). Byly dále zjištěny určité perinatální vlivy, které mohou přispět ke zničení autotolerance a k vývoji diabetu. Příkladem jsou prodělání zarděnek v době těhotenství, preeklampsie (těhotenská toxikóza) a krátký gestační věk.

9.5.2 Roztroušená skleróza (RS)

První člověk, který v roce 1868 popsal roztroušenou sklerózu (RS) jako samostatnou chorobu, byl francouzský neurolog Jean-Martin Charcot. Jde o onemocnění, kdy dochází k rozpadu myelinové pochvy kolem axonů. Imunitní buňky rozpoznávají myelin jako cizorodou strukturu a destrukují ho. Rozpad myelinu způsobuje zpomalení přenosu nervového vzruchu a to vede k typickým příznakům, jako jsou poruchy zraku, svalová slabost, potíže s koordinací pohybů a rovnováhou, problémy s myšlením a pamětí, pocity mravenčení, píchání nebo necitlivost.

Nejčastěji jsou postižováni mladí dospělí ve věku od dvaceti do čtyřiceti let a dvakrát častěji to bývají ženy než muži (Duquette et al., 1992). Nemoc se však může vyskytovat i u mladších jedinců; u 2 % pacientů před dosažením desátého roku života a u 5 % pacientů před dosažením šestnácti let. Celková průměrná délka života od vzniku onemocnění je nejméně 25 let (Compston a Coles, 2002).

Predispozice k chorobě je dána opět souhrnným působením genetických a environmentálních faktorů. Nejvíce přispívají k rozvoji nemoci alely HLA DRB1*1501, DRB5*0101 a DQB1*0602 (Kaushansky et al., 2012). Mezi vnější faktory patří různé klimatické podmínky (sluneční záření, déšť, teplota) a geografické jevy (přítomnost stopových prvků). Dalším faktorem jsou mastné kyseliny. Předpokládá se, že RS souvisí s konzumací zvířecích tuků chudých na nenasycené mastné kyseliny. Nemoc je tedy běžná v západní Evropě a severní Americe, kde je konzumace zvířecích tuků vysoká, a není tak častá v Asii, jižní Evropě, černé Africe a Japonsku, kde naopak je konzumace zvířecích tuků nízká (Dick, 1976).

9.6 Léčba autoimunitních chorob

Ve většině případů není známa primární příčina onemocnění, a proto je jedinou možností nasazení imunosupresivních látek, které nespecificky potlačují aktivitu lymfocytů a působí protizánětlivě. Nejvíce používané léky na systémové autoimunitní onemocnění jsou kortikosteroidy, azathioprin, cyklofosfamid a methotrexát. Může být použita substituční léčba, jako je např. podání inzulínu u diabetu.

10 Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní zásadní poznatky o epigenetice. Epigenetické mechanismy byly postupně objevovány ve druhé polovině 20. století. Je zřejmé, že 21. století nám otevírá nové možnosti pro ještě lepší prozkoumání jejich regulace a podrobnější odhalení všech procesů, podílejících se na tomto fascinujícím ději.

Nejlépe je prozkoumána metylace DNA na CpG dinukleotidech. Methylace je závislá na třech hlavních enzymech, jsou to metyltransferázy DNMT1, DNMT3a a DNMT3b. DNMT1 má hlavní funkci při udržení metylačního vzoru v nově syntetizovaném vlákně DNA. Zásadní pro vývoj a vytvoření vzorů během ontogeneze jsou de novo metyltransferázy DNMT3a a DNMT3b.

Změna konformace chromatinu je dána hlavně modifikací histonových proteinů. Cílem modifikací je rozvolnění nebo kondenzace dané oblasti chromosomu, tedy aktivace (transkripce) nebo inhibice genové exprese. Pokud se přidá acetylová skupina na lysinové zbytky histonů, dojde k rozvolnění chromatinové struktury, a tím i k transkripci genu. Protikladem je deacetylace, kdy je chromatin kondenzovanější, čímž je i gen umlčen. Methylace histonů je znakem jak aktivace, tak inhibice genové exprese. Methylace argininu je spjata s aktivací transkripce. Methylace lysinu může aktivovat nebo inhibovat transkripci v závislosti na tom, na které pozici histonu dojde k metylaci. Jednou z velmi zkoumaných oblastí je léčba založená na inhibitech enzymů histon deacetyláz HDCA. Jsou předmětem studia hlavně u protinádorové léčby, ale také u terapeutických intervencí u psychiatrických, metabolických i autoimunitních chorob, avšak výsledky nejsou pokaždé uspokojivé.

Z hlediska možného využití se zdá nejperspektivnější RNAi. Je to oblast epigenetiky, která nabízí obrovské využití v prevenci, diagnostice a terapii řady závažných nemocí. Rozlišují se tři základní typy krátkých RNA: miRNA, siRNA a piRNA. Molekuly miRNA představují slibný preventivní marker, který by se mohl snadno stanovovat v moči nebo krvi pacienta pro potřeby prevence a diagnostiky. Molekuly siRNA naopak by mohly být léčebně použity na molekulární úrovni tak, že by ovlivňovaly aktivitu daných genů ve specifických buňkách.

Problematika multifaktoriálních chorob, mezi které se řadí autoimunitní onemocnění postihující asi 4 % populace, je složitá. Jejich rozvoj je závislý jak na genetických, tak na environmentálních faktorech. U jednotlivých pacientů je velmi důležitý individuální přístup, neboť příčiny a rozvoj mohou být variabilní, lišící se od jedince k jedinci. Příznaky se nemusí vždy projevit v plném rozsahu a tím i prognóza nemoci může být odlišná.

11 Seznam použitých obrázků

Adams, R.L. (1990). DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem. J.* 265, 309–320.

Bartel, D. (2004). MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655.

Demars, J., and Gicquel, C. (2012). Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes. *Clin. Genet.* 81, 350–361.

Chow, J., and Heard, E. (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 359–366.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.

12 Seznam použité literatury

Alcazar, R.M., Lin, R., and Fire, A.Z. (2008). Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 180, 1275–1288.

Bai, S., Lozada, A., Jones, M.C., Dietz, H.C., Dempsey, M., and Das, S. (2014). Mandibuloacral Dysplasia Caused by LMNA Mutations and Uniparental Disomy. *Case Rep. Genet.* 2014, 508231.

Barlow, D.P., Stöger, R., Herrmann, B.G., Saito, K., and Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349, 84–87.

Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351, 153–155.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.

Bliek, J., Terhal, P., van den Bogaard, M.-J., Maas, S., Hamel, B., Salieb-Beugelaar, G., Simon, M., Letteboer, T., van der Smagt, J., Kroes, H., et al. (2006). Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 604–614.

Borodovsky, A., Salmasi, V., Turcan, S., Fabius, A.W.M., Baia, G.S., Eberhart, C.G., Weingart, J.D., Gallia, G.L., Baylin, S.B., Chan, T.A., et al. (2013). 5-azacytidine reduces methylation, promotes differentiation and induces tumor regression in a patient-derived IDH1 mutant glioma xenograft. *Oncotarget* 4, 1737–1747.

Bortvin, A. (2013). PIWI-interacting RNAs (piRNAs) - a mouse testis perspective. *Biochem. Biokhimiā* 78, 592–602.

Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25–36.

Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., and Willard, H.F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349, 38–44.

Brownell, J.E., and Allis, C.D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 176–184.

Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell* 84, 843–851.

Cerrato, F., Vernucci, M., Pedone, P. V, Chiariotti, L., Sebastio, G., Bruni, C.B., and Riccio, A. (2002). The 5' end of the KCNQ1OT1 gene is hypomethylated in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Genet.* 111, 105–107.

Compston, A., and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. *Lancet* 359, 1221–1231.

Costa-Guda, J., Soong, C.-P., Parekh, V.I., Agarwal, S.K., and Arnold, A. (2013). Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. *Horm. Cancer* 4, 301–307.

Crouse, H. V (1960). The Controlling Element in Sex Chromosome Behavior in *Sciara*. *Genetics* 45, 1429–1443.

DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849–859.

Deng, X., Hiatt, J.B., Nguyen, D.K., Ercan, S., Sturgill, D., Hillier, L.W., Schlesinger, F., Davis, C.A., Reinke, V.J., Gingeras, T.R., et al. (2011). Evidence for compensatory upregulation of expressed X-linked genes in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 43, 1179–1185.

Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496.

Dick, G. (1976). President's address. The etiology of multiple sclerosis. *Proc. R. Soc. Med.* 69, 611–615.

Duquette, P., Pleines, J., Girard, M., Charest, L., Senecal-Quevillon, M., and Masse, C. (1992). The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 19, 466–471.

Ferguson-Smith, A.C. (2011). Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat. Rev. Genet.* 12, 565–575.

- Finch, J.T., and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1897–1901.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fletcher, T.M., and Hansen, J.C. (1995). Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 25359–25362.
- Fletcher, T.M., and Hansen, J.C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 6, 149–188.
- Gillespie, K.M., Aitken, R.J., Wilson, I., Williams, A.J.K., and Bingley, P.J. (2014). Early onset of diabetes in the proband is the major determinant of risk in HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 siblings. *Diabetes* 63, 1041–1047.
- Guang, S., Bochner, A.F., Burkhart, K.B., Burton, N., Pavelec, D.M., and Kennedy, S. (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature* 465, 1097–1101.
- Le Guen, C.L., Friedman, J.R., and Hand, N.J. (2013). Novel targets of miR-30, a microRNA required for biliary development. *F1000Research* 2, 197.
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486–489.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* 7, 1395–1402.
- Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.P., Davidson, N.E., Sidransky, D., and Baylin, S.B. (1995). Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 55, 4525–4530.
- Heyn, H., Ferreira, H.J., Bassas, L., Bonache, S., Sayols, S., Sandoval, J., Esteller, M., and Larriba, S. (2012). Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. *PLoS One* 7, e47892.
- Holick, M.F. (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79, 362–371.
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238, 163–170.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., and Bradbury, E.M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 305–314.

- Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T.C., Shirayoshi, Y., and Oshimura, M. (2000). Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2075–2083.
- Chaumeil, J., Le Baccon, P., Wutz, A., and Heard, E. (2006). A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev.* *20*, 2223–2237.
- Chedin, F., Lieber, M.R., and Hsieh, C.-L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16916–16921.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., and Stallcup, M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* *284*, 2174–2177.
- Chen, H.-Y., Li, L., and Fu, Z.-J. (2014). Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid attenuate ventilator-induced lung injury. *Pharmazie* *69*, 55–59.
- Chen, Z.-X., Mann, J.R., Hsieh, C.-L., Riggs, A.D., and Chédin, F. (2005). Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J. Cell. Biochem.* *95*, 902–917.
- Choufani, S., Shuman, C., and Weksberg, R. (2010). Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* *154C*, 343–354.
- Chow, J., and Heard, E. (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 359–366.
- Jäger, S., Jacobs, S., Kröger, J., Fritsche, A., Schienkiewitz, A., Rubin, D., Boeing, H., and Schulze, M.B. (2014). Breast-feeding and maternal risk of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. *Diabetologia*.
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* *3*, 274–293.
- Johnston, R.J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *426*, 845–849.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* *429*, 900–903.
- Von Känel, T., and Huber, A.R. (2013). DNA methylation analysis. *Swiss Med. Wkly.* *143*, w13799.
- Kareta, M.S., Botello, Z.M., Ennis, J.J., Chou, C., and Chédin, F. (2006). Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *J. Biol. Chem.* *281*, 25893–25902.
- Kaushansky, N., Altmann, D.M., David, C.S., Lassmann, H., and Ben-Nun, A. (2012). DQB1*0602 rather than DRB1*1501 confers susceptibility to multiple sclerosis-like disease induced by proteolipid protein (PLP). *J. Neuroinflammation* *9*, 29.

- Kobiela, A., Kobiela, K., Biedziak, B., and Trzeciak, W.H. (2003). A novel mutation A1270G of the EDA1 gene causing Tyr343Cys substitution in ectodysplasin-A in a family with anhidrotic ectodermal dysplasia. *Acta Biochim. Pol.* *50*, 255–258.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116–120.
- Lee, B., and Muller, M.T. (2009). SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity. *Biochem. J.* *421*, 449–461.
- Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat. Genet.* *21*, 400–404.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051–4060.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* *69*, 915–926.
- Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., and Ferguson-Smith, A.C. (2008). A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev. Cell* *15*, 547–557.
- Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* *271*, 15034–15044.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F. V, Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437–1441.
- Lyon, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* *190*, 372–373.
- Marahrens, Y., Loring, J., and Jaenisch, R. (1998). Role of the Xist Gene in X Chromosome Choosing. *Cell* *92*, 657–664.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* *9*, 650–662.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *15*, 185–197.
- Monk, D., Bentley, L., Hitchins, M., Myler, R.A., Clayton-Smith, J., Ismail, S., Price, S.M., Preece, M.A., Stanier, P., and Moore, G.E. (2002). Chromosome 7p disruptions in Silver Russell syndrome: delineating an imprinted candidate gene region. *Hum. Genet.* *111*, 376–387.

- Moss, T., Stephens, R.M., Crane-Robinson, C., and Bradbury, E.M. (1977). A nucleosome-like structure containing DNA and the arginine-rich histones H3 and H4. *Nucleic Acids Res.* *4*, 2477–2485.
- Nagarajan, P., Ge, Z., Sirbu, B., Doughty, C., Agudelo Garcia, P.A., Schleder, M., Annunziato, A.T., Cortez, D., Kenner, L., and Parthun, M.R. (2013). Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS Genet.* *9*, e1003518.
- Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 64–71.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* *292*, 110–113.
- Nordin, M., Bergman, D., Halje, M., Engström, W., and Ward, A. (2014). Epigenetic regulation of the *Igf2/H19* gene cluster. *Cell Prolif.*
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.
- Ottaviano, Y.L., Issa, J.P., Parl, F.F., Smith, H.S., Baylin, S.B., and Davidson, N.E. (1994). Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* *54*, 2552–2555.
- Palumbo, O., Mattina, T., Palumbo, P., Carella, M., and Perrotta, C.S. (2014). A de novo 11p13 Microduplication in a Patient with Some Features Invoking Silver-Russell Syndrome. *Mol. Syndromol.* *5*, 11–18.
- Peng, L., Yuan, Z., Ling, H., Fukasawa, K., Robertson, K., Olashaw, N., Koomen, J., Chen, J., Lane, W.S., and Seto, E. (2011). SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4720–4734.
- Prasad, N.R., Reddy, P.A., Karthik, T.S., Chakravarthy, M., and Ahmed, F. (2012). A rare case of Silver-Russell syndrome associated with growth hormone deficiency and urogenital abnormalities. *Indian J. Endocrinol. Metab.* *16*, S307–9.
- Ramsden, S.C., Clayton-Smith, J., Birch, R., and Buiting, K. (2010). Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med. Genet.* *11*, 70.
- Rauch, T.A., Wu, X., Zhong, X., Riggs, A.D., and Pfeifer, G.P. (2009). A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 671–678.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593–599.
- Reeve, J.N., Bailey, K.A., Li, W.-T., Marc, F., Sandman, K., and Soares, D.J. (2004). Archaeal histones: structures, stability and DNA binding. *Biochem. Soc. Trans.* *32*, 227–230.

- Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2, 21–32.
- Shahbazian, M.D., and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 75–100.
- Singal, D.P., and Blajchman, M.A. (1973). Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22, 429–432.
- Stefan, M., Zhang, W., Concepcion, E., Yi, Z., and Tomer, Y. (2014). DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J. Autoimmun.* 50, 33–37.
- Stöger, R., Kubicka, P., Liu, C.G., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H., and Barlow, D.P. (1993). Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 73, 61–71.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Surani, M.A.H., Barton, S.C., and Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550.
- Svendsen, A.J., Hjelmberg, J. V., Kyvik, K.O., Houen, G., Nielsen, C., Skytthe, A., and Junker, P. (2013). The impact of genes on the occurrence of autoantibodies in rheumatoid arthritis. A study on disease discordant twin pairs. *J. Autoimmun.* 41, 120–125.
- Tang, J., Gary, J.D., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1998). PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 273, 16935–16945.
- Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1998). Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Igf2*. *Genes Dev.* 12, 3693–3702.
- Venkatraman, A., Hu, Y.-S., Didonna, A., Cvetanovic, M., Krbanjevic, A., Bilesimo, P., and Opal, P. (2014). The histone deacetylase HDAC3 is essential for Purkinje cell function, potentially complicating the use of HDAC inhibitors in SCA1. *Hum. Mol. Genet.*
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S., and Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833–1837.
- Vu, T.H., Li, T., Nguyen, D., Nguyen, B.T., Yao, X.M., Hu, J.F., and Hoffman, A.R. (2000). Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human *IGF2-H19* imprinted region. *Genomics* 64, 132–143.
- Weinlander, E., Somnay, Y., Harrison, A.D., Wang, C., Cheng, Y.-Q., Jaskula-Sztul, R., Yu, X.-M., and Chen, H. (2014). The novel histone deacetylase inhibitor thailandepsin A inhibits anaplastic thyroid cancer growth. *J. Surg. Res.*
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4034–4039.

Xiong, Y., Chen, X., Chen, Z., Wang, X., Shi, S., Wang, X., Zhang, J., and He, X. (2010). RNA sequencing shows no dosage compensation of the active X-chromosome. *Nat. Genet.* *42*, 1043–1047.

Xu, G.L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J., and Viegas-Péquignot, E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* *402*, 187–191.

Yamanaka, T., Wong, H.K., Tosaki, A., Bauer, P.O., Wada, K., Kurosawa, M., Shimogori, T., Hattori, N., and Nukina, N. (2014). Large-scale RNA interference screening in Mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One* *9*, e93891.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.

Yin, W., Ye, X., Fan, H., and Bian, Z. (2013). Methylation state of the EDA gene promoter in Chinese X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia carriers. *PLoS One* *8*, e62203.

Zambrano-Zaragoza, J.F., Agraz-Cibrian, J.M., González-Reyes, C., Durán-Avelar, M. de J., and Vibanco-Pérez, N. (2013). Ankylosing spondylitis: from cells to genes. *Int. J. Inflam.* *2013*, 501653.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* *101*, 25–33.

Zhang, H., Quan, C., Gao, M., Xiao, F.-L., Lu, W.-S., Shen, Y.-J., Zhou, F.-S., Yang, S., and Zhang, X.-J. (2007). [Genetical diagnosis in a family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* *29*, 201–204.

Zhao, Y.Y., Liu, F., Yang, G., and You, M.S. (2011). PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. *Insect Mol. Biol.* *20*, 97–104.

Zonana, J., Elder, M.E., Schneider, L.C., Orlow, S.J., Moss, C., Golabi, M., Shapira, S.K., Farndon, P.A., Wara, D.W., Emmal, S.A., et al. (2000). A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am. J. Hum. Genet.* *67*, 1555–1562.