

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

ΜΑΡΙΑ ΤΖΕΤΗ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘ. ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ - ΕΚΠΑ

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών



“EPIGENETICS : over and above the Genetics”

- **Waddington CH 1942: Υπόθεση και εισαγωγή όρου**

- Η ανάπτυξη του οργανισμού, από μία αρχική μάζα μη διαφοροποιημένων κυττάρων σε διαφοροποιημένα κύτταρα και ιστούς, είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων γενετικών διαδικασιών
- Αλληλεπιδράσεις του κληρονομούμενου γονιδιώματος με άλλα ενδογενή και εξωγενή μόρια
- Η επιγενετική αποτελεί κλάδο της γενετικής που μελετά την βαθμιαία διαδικασία αλληλεπιδράσεων



**“EPIGENETICS : over and
above the Genetics”**

- Holliday R et al 1975, Riggs AD et al 1975: πρώτο μοριακό μοντέλο
- **Wu C & Morris JR 2001** περιγραφή μοντέλου που ισχύει έως σήμερα
- Επιγενετική είναι η μελέτη των αλλαγών στην έκφραση γονιδίων
- Epimutations: χημικές διεργασίες του DNA & χρωματίνης, χωρίς να επηρεάζεται η αλληλουχία του DNA
- Επιγονιδίωμα (EPIGENOME): επιγενετική κατάσταση του κυττάρου



Συσχέτιση γονιδιώματος (“hardware”) και επιγονιδιώματος (“software”) ?

- **κληρονομούμενο γονιδίωμα (DNA)**
 - Περιέχει απαραίτητες πληροφορίες για την παραγωγή πρωτεϊνών, αλλά ελέγχεται από το επιγονιδίωμα
- ↓ ↓ ↓ ↓
- ακόμη και χωρίς μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο, μπορεί να υπάρχει έκφραση κλινικού φαινοτύπου όταν και τα 2 αλληλόμορφα ενός γονιδίου δεν εκφράζονται στην σωστή ποσότητα, σωστή χρονική στιγμή και κατάλληλο κύτταρο & ιστό

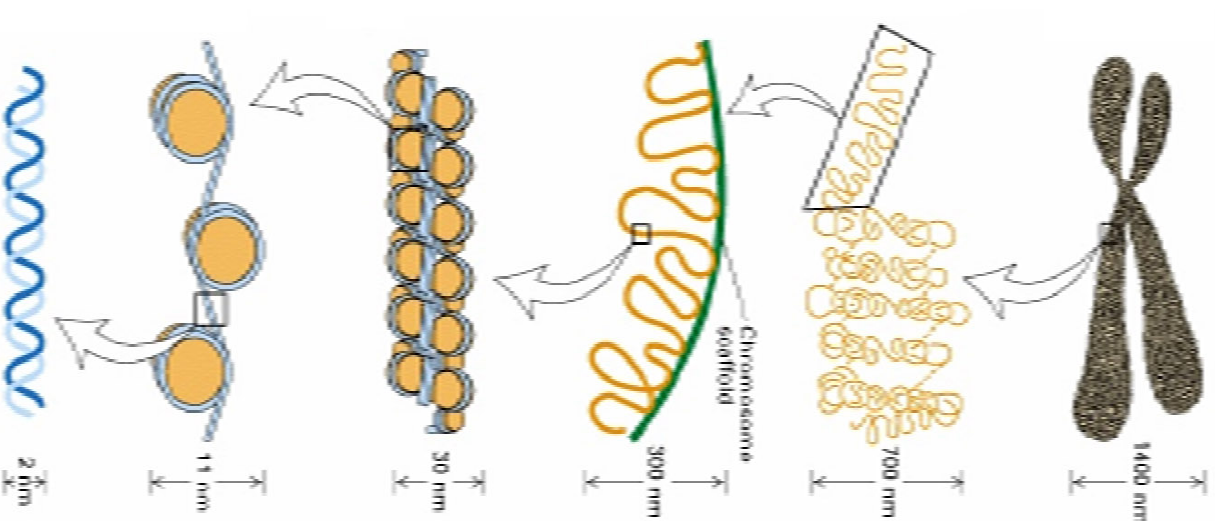
Επιγενετική μελετά τους τρόπους με τους οποίους τα κύτταρα αξιοποιούν το γονιδίωμα και ανταποκρίνονται στο περιβάλλον

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ



ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

- Αλλαγές ιστονών
 - μεθυλίωση DNA
 - μη-κωδικοποιούντα RNAs (miRNAs)
1. σημαντικό ρόλο στη δομή χρωματίνης
 2. Μεταγραφή DNA αντιγραφή-επιδιόρθωση
 3. έκφραση γονιδίων
- επιγενετικά ένζυμα “χημικοί διακόπτες” απάντηση στο περιβάλλον
- καθορίζουν εάν , πότε, που και πως ένα γονίδιο (ή σειρά γονιδίων) αποσιωπάται ή είναι ενεργό
- Η Υγεία επηρεάζεται όταν διαταραχθεί
- ✓ Η ισορροπία επιγενετικών ενζύμων και μηχανισμών από περιβαλλοντικούς παράγοντες



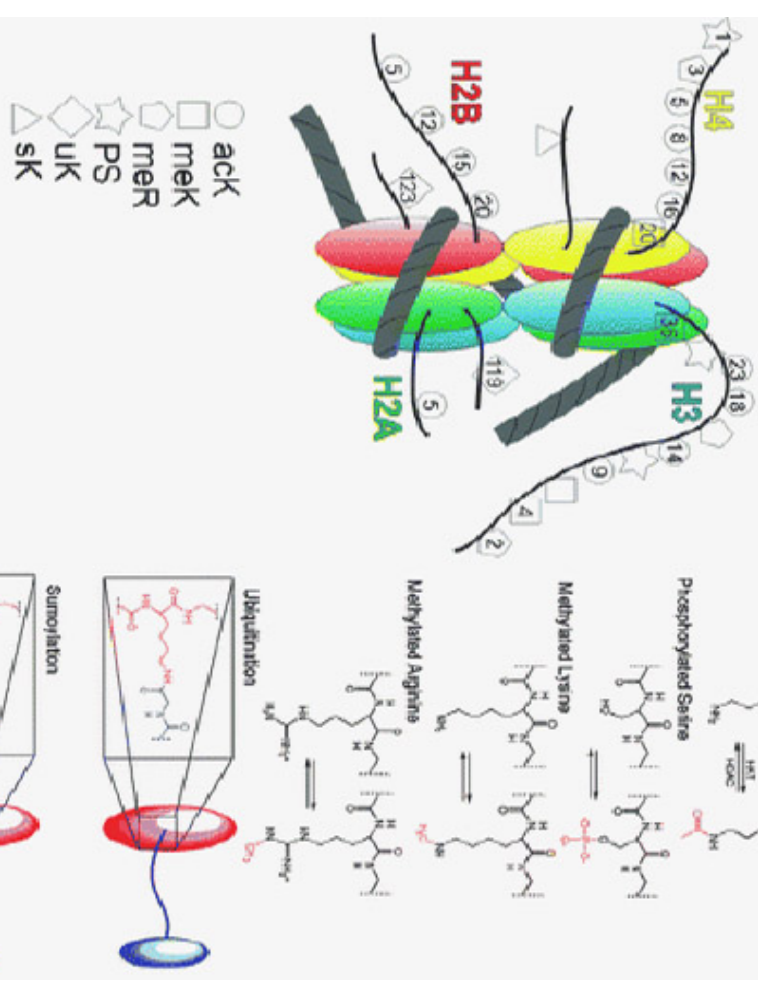
Μεθυλίωση DNA

- 1-2% του συνολικού DNA βρίσκεται μεθυλιωμένο
- Μεγαλύτερο ποσοστό μεθυλίωσης σε δινοκυλεοτίδια CpG συγκεντρωμένα σε νησίδες CpG (islands) (με μέγεθος ~ 1kb)
- ~ 50% CpG νησίδων εντοπίζονται μέσα ή κοντά στον εκκινητή γονιδίων, το 1^ο ή 2^ο εξόνιο ή ιντρόνιο
- >70% όλων των γονιδίων
- ~ 30 εκατομμύρια CpG μπορεί να υποβληθούν σε DNA μεθυλίωση
- ~10% των κοινών SNPs εντοπίζονται σε περιοχές με διαφορετική μεθυλίωση
- Μεταλλάξεις στο DNA μπορούν να αλλάξουν την φυσιολογική μεθυλίωση



Μεταβολές Ιστονών

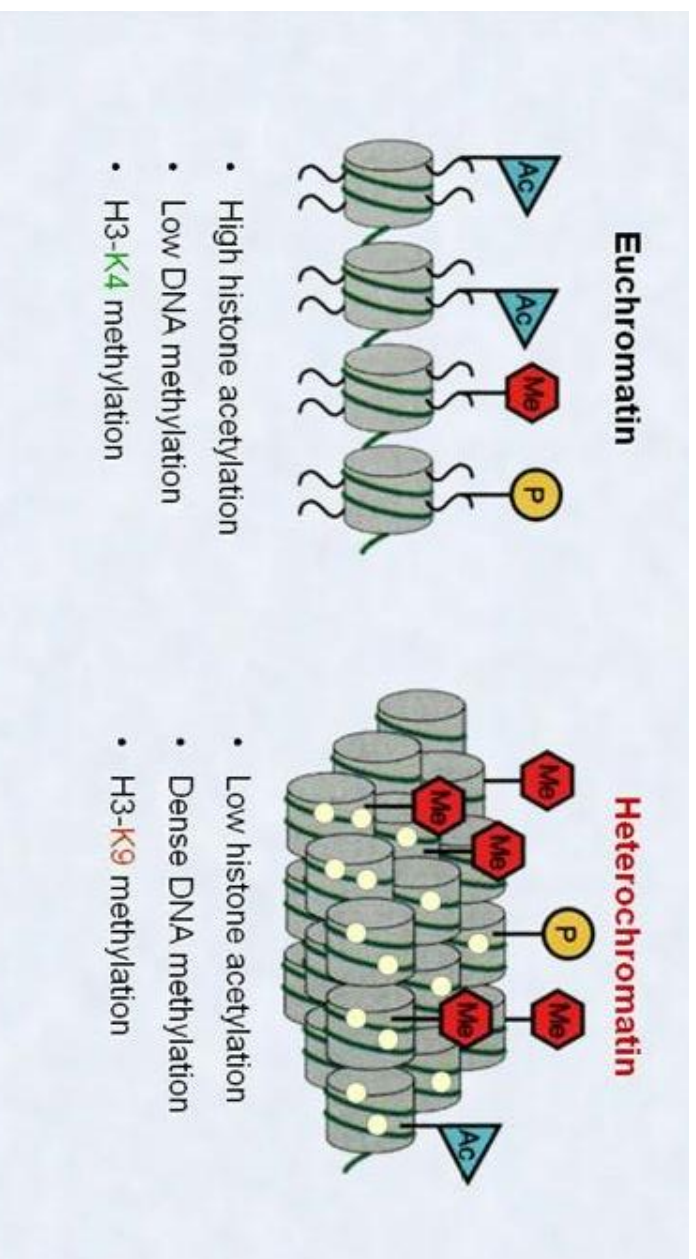
- ✓ Προσθήκες ή αφαιρέσεις μορίων στο αμινοτελικό άκρο (N-terminal) των ιστονών (H2A, H2B, H3 & H4)
- ✓ Καταλύονται από ένζυμα αντιθέτου δράσης
- ✓ Acetylation-apoacetylation (HATs, HDACs)
- ✓ methylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation
- ✓ ΚΩΔΙΚΑΣ ΙΣΤΟΝΩΝ
- ✓ Επηρεάζει το άνοιγμα και το κλείσιμο της χρωματίνης
- ✓ Η ισορροπία των ενζύμων ακετυλίωσης και ατεακετυλίωσης (HATs, HDACs) μπορεί να τροποποιηθεί από το περιβάλλον



Η μεθυλίωση του DNA και τροποποίηση των ιστονών βοηθούν στην υποδιαίρεση του γονιδιώματος σε περιοχές με διαφορετικό δυναμικό έκφρασης των γονιδίων

Euchromatin: υψηλή έκφραση γονιδίων → **μεταγραφή DNA** → **ενεργά γονίδια**

Heterochromatin: χαμηλή έκφραση γονιδίων → **αποσίπηση μεταγραφής DNA** → **ανενεργό γονίδιο**



Αλληλεπίδραση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και ακετυλίωσης των ιστονών

Transcriptionally Incompetent Heterochromatin	Transcriptionally Inducible Chromatin	Transcriptionally Competent Euchromatin
Histone Acetylation		
DNA Methylation		
Inactive X-chromosome Silenced Imprinted Genes Alu, LINES, SINES Pericentromeric Repeats	Environmentally Responsive Genes Developmentally Responsive Genes	Active Genes

Μεταγραφικά ενεργό DNA- **μη μεθυλωμένο DNA** και σε περιοχή ακετυλιωμένων ιστονών

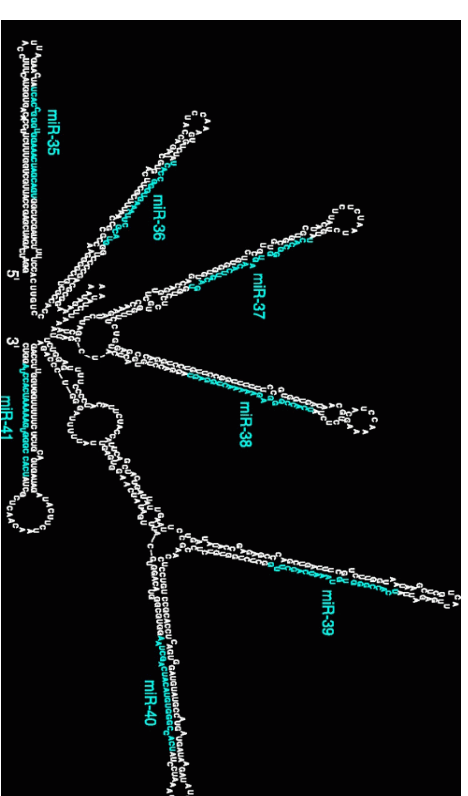
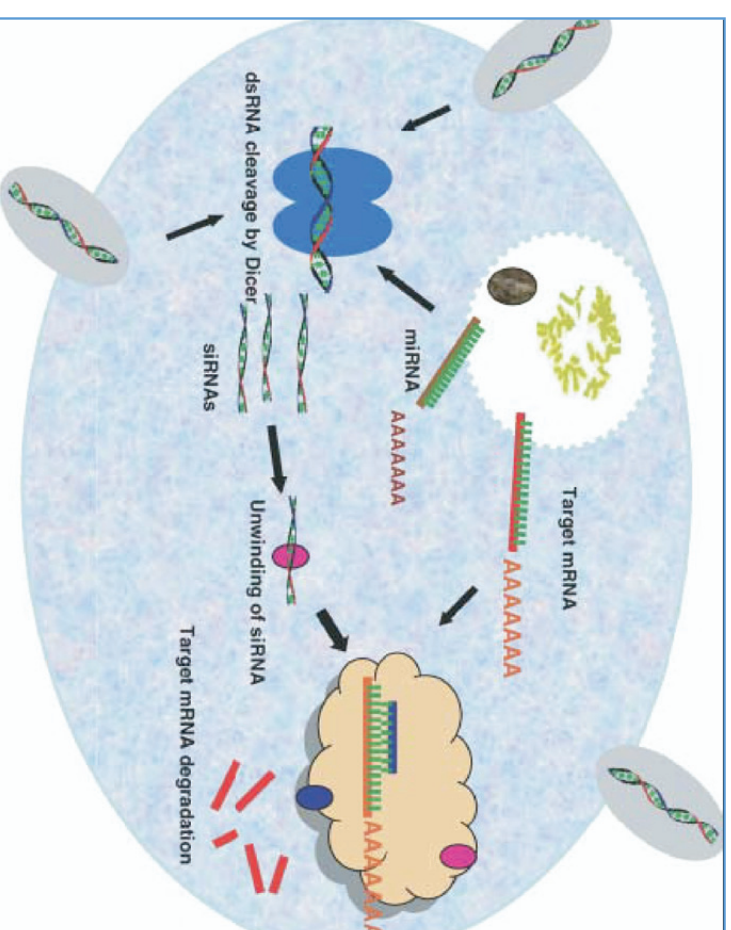
Μη μεταγραφικά ενεργό (**silent**) DNA- **μεθυλωμένο DNA** και σε περιοχή μη-ακετυλιωμένων ιστονών



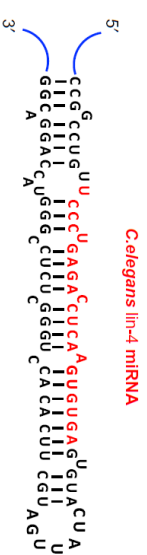
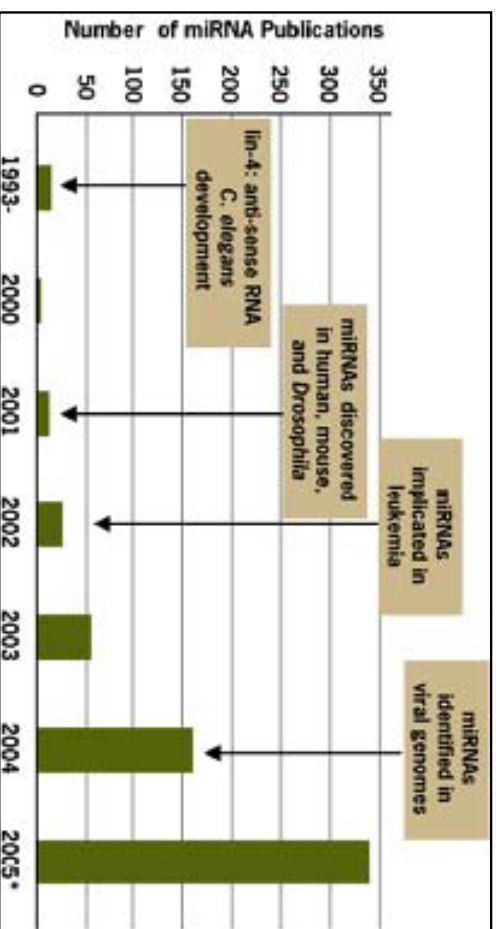
miRNAs

Τα miRNAs είναι

- μικρά, μη-κωδικά RNAs μεγέθους 19-25 νουκλεοτίδια
- ενδογενή ρυθμιστικά μόρια που ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση και ειδικότερα στη μετά-μεταγραφική ρύθμιση ~60% mRNAs
- ✓ Προκαλούν απενεργοποίηση των γονιδίων στόχων
- ✓ Συμμετέχουν στη διαφοροποίηση , ανάπτυξη και απόπτωση κυττάρων
- ✓ Συμβάλλουν στην παθολόγηση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων
- ✓ Συσχετίζονται με αρκετά χρόνια πολυπαραγοντικά νοσήματα



Ανακάλυψη των miRNAs



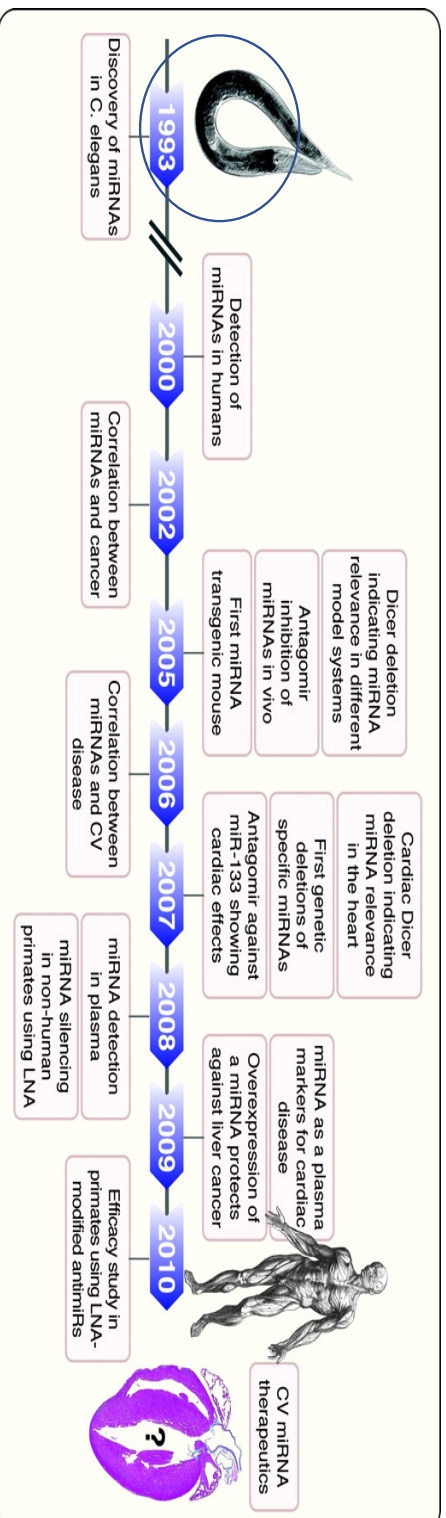
Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993

Victor Ambrose



- Το πρώτο miRNA γονίδιο που ταυτοποιήθηκε, το *lin-4*, θεωρήθηκε ότι ίσως ήταν μοναδικό φαινόμενο στο νηματώδη σκώληκα [*Caenorhabditis elegans*] και ρύθμιζε την εξέλιξη του κύκλου ζωής του νηματώδους σκώληκα
- Η κατανόηση της λειτουργίας των μικρών αυτών μορίων RNAs έχει ξεκινήσει τα τελευταία χρόνια όπως φαίνεται και με την αύξηση των δημοσιεύσεων
- Τα miRNA θεωρούμε πλέον ότι ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες





• Από το 1993 και μετά έχουν ταυτοποιηθεί miRNAs σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών

• 2000: Η πρώτη αναφορά miRNAs στον άνθρωπο



Latest miRBase blog posts

MicroRNA Gene Ontology annotations

You might have noticed some additional information on the mature miRNA pages in the last few weeks. See for example: http://mirbase.org/entry/mature?mature_acc=MI001000123 http://mirbase.org/entry/mature?mature_acc=MI001000069. The new section "QuickGO function" contains a set of high quality manual annotations of Gene Ontology terms for mature miRNAs, the vast majority of which came from the work of Hachisu-Hanay et al. (2018) (doi:10.1093/nar/gkx100). After repeated and unreasonable delay, miRBase 22 is finally released. As you might expect with such a long gap, the number of sequences in the database has jumped significantly — by over a third. The vast majority of the increase comes from new microRNA annotations in species not previously represented in the database. Indeed, there [...]

By [miRBase](#) (June 7, 2018)

miRNA count: 38539 entries

Release 22.1: October 2018

Search by miRNA name or keyword

Download published miRNA data

[Download page](#) | [FTP site](#)

miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The **miRBase database** is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed **pre-mi** in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed **miR**). Both mature and pre-mi sequences are available for **searching** and **downloading**, and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also **available for download**.
- The **miRBase Registry** provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about the naming service.

To receive email notification of data updates and feature changes please subscribe to the [miRBase announcements mailing list](#). Any queries about the website or naming service should be directed at mirbase@manchester.ac.uk.

miRBase is managed by the Griffiths-Jones lab at the Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester with funding from the [BBSRC](#). miRBase was previously hosted and supported by the [Wellcome Trust Sanger Institute](#).

References

If you make use of the data presented here, please cite the following articles in addition to the primary data sources:

- miRBase: from microRNA sequences to function.**
Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S.
Nucleic Acids Res 2019 47:D155-D162
- miRBase: annotating high-confidence microRNAs using deep sequencing data.**
Kozomara A, Griffiths-Jones S.
Nucleic Acids Res 2014 42:D68-D73



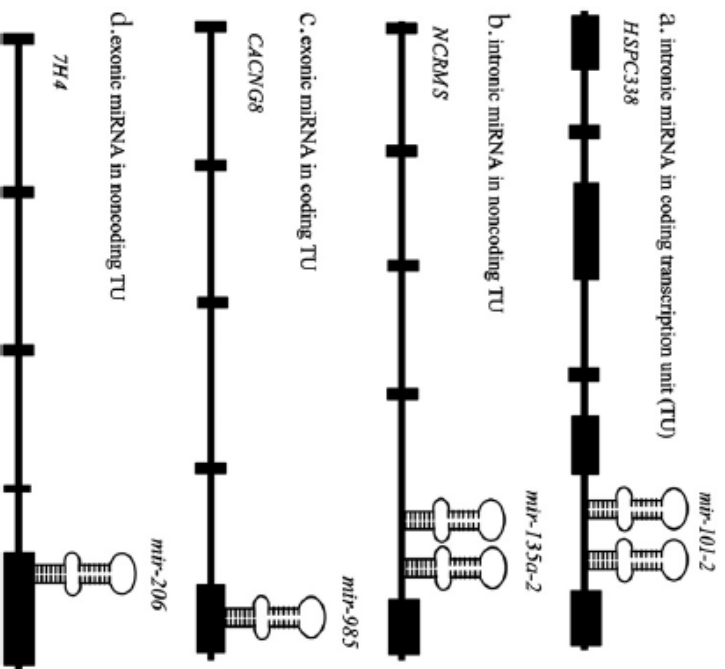
<http://www.mirbase.org/>

miRNA count: 38589 entries

Release 22.1: October 2018

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Res (2019)

Βιογένεση miRNA



Δημιουργούνται από **πρόδρομα miRNAs**

1. μεταγράφονται από τα ιντρόνια (μη κωδικοποιούν για πρωτεΐνες) γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες
2. Από μη μεταφραζόμενες περιοχές γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες
3. από γονίδια που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες
4. Από ψευδογονίδια-(decoys) αυξάνοντας συνήθως την σταθερότητα του mRNA που παράγεται από το ομόλογο κανονικό γονίδιο



Βιογένεση των miRNAs

Πυρήνας

Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II



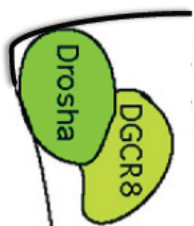
1

2

Primary-miRNA
Pri-miRNA

5' m⁷G 3'

3



4



Precursor miRNA

Pre-miRNA (≈70 νουκλεοτίδια)

5



6



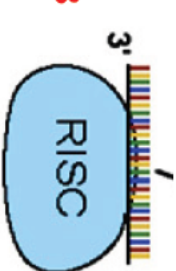
7



(≈22 νουκλεοτίδια)

Argonaute
proteins

8

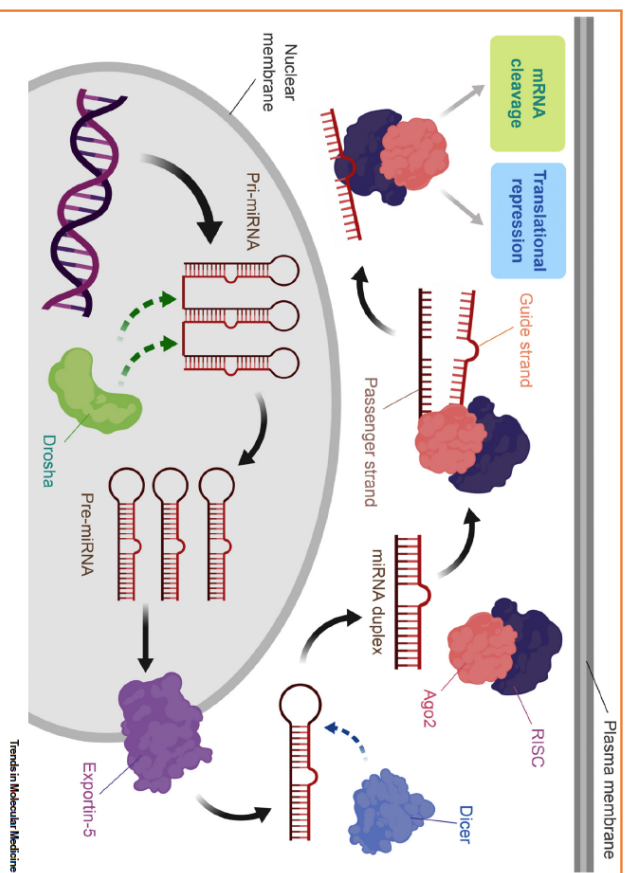


RISC = RNA-
induced silencing
complex

Κυταρόπλασμα



Μέτα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων μέσω miRNAs



- **miRNA cleavage:** guide strands με απόλυτη συμπληρωματικότητα συνήθως προσδένουν σε αλληλουχίες γονιδίων στόχων και επιτυγχάνεται διάσπαση του mRNA του γονιδίου στόχου
- **Translational repression:** guide strands μη απόλυτης συμπληρωματικότητας το miRNA προσδένει στην μη μεταφραζόμενη περιοχή στο 3' του γονιδίου στόχου καταστέλλοντας την μετάφραση του

• καταστολή της μετάφρασης των γονιδίων στόχων- **μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα mRNA**

• Κοινός μηχανισμός στο ζωικό βασίλειο

• Τα περισσότερα γονίδια των σπονδυλωτών έχουν στην μη-μεταφραζόμενη περιοχή στο 3' άκρο συντηρημένα μοτίβα τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε αλληλουχίες συμπληρωματικές για miRNAs

• Η συμπληρωματικότητα μεταξύ γονιδίων στόχων & miRNAs βασίζεται σε μία αλληλουχία μικρού μεγέθους 2-8 νουκλεοτιδίων "seed sequence"

• Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται και από διάφορους αλγόριθμους για την αποκάλυψη των γονιδίων στόχων των miRNAs

• miRNAs συμμετέχουν στην ρύθμιση ~60% των κωδικοποιουσών γονιδίων

• Ένα miRNA έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης σε ~200 γονίδια



Ταξινόμηση/ ονοματολογία των miRNAs

Acronym	Meaning	Example
3-letter prefix	Species	hsa (Homo sapiens)
pri-mir	Primary miRNA transcript	pri-mir-1
pre-mir	Precursor miRNA after processing by Drosha-DGCR8	pre-mir-1
mir	Mature miRNA	hsa-miR-1
3p or 5p	miRNA derived from 3' or 5' end of pre-miRNA	hsa-miR-10-5p
a or b	Related mature miRNA variants	hsa-let-7a hsa-let-7b
-1 or -2	Identical miRNAs from different genomic loci	hsa-miR-9-1 hsa-miR-9-2
* (star)	“passenger strand” frequently degraded	hsa-miR-9*



miRNAs

- Παίζουν σημαντικό ρόλο σε αναπτυξιακά μονοπάτια
- Πολλαπλασιασμό κυττάρων
- καθιέρωση σωματικής πολικότητας/ασυμμετρίας κατά την ανάπτυξη (Iys-6 στο *C. elegans*)
- απόπτωση
- έκφραση γονιδίων στους νευρώνες
- μορφογένεση εγκεφάλου
- διαφοροποίηση μυοκυττάρων
- διαίρεση αρχέγονων κυττάρων

- Απορύθμιση στην έκφραση των miRNAs λόγω μοριακών διαταραχών,
- Ελλείμματα/ δυπλασιασμοί γενωμικών περιοχών μεταγραφής των miRNAs
- Σημειακές μεταλλάξεις στα ένζυμα που συμμετέχουν στην βιογένεση των miRNAs
- Σημειακές μεταλλάξεις σε σημεία σύνδεσης στην αλληλουχία των γονιδίων στόχων των miRNAs

- αποτελεί ένα μονοπάτι πρόκλησης γενετικών νοσημάτων και καρκίνου



Γονιδιακή αποτύπωση

- ✓ Παρατηρείται μόνο στα θηλαστικά
 - ✓ Έχουν εντοπιστεί λιγότερα από 20 γονίδια
 - ✓ Συγκεντρώνονται κυρίως στα χρωμ. 11 και 15
 - ✓ Πιθανή σχέση με ορισμένα νοσήματα
- π.χ. πρώιμη εμφάνιση ν. Huntington από πάσχοντα πατέρα, πρώιμη εμφάνιση μυοτονικής δυστροφίας από πάσχουσα μητέρα*



Γονιδιακή αποτύπωση

- ✓ Πότε συμβαίνει; Εμβρυογένεση
- ✓ Που ; Χρωμοσωμικά τμήματα
- ✓ Γιατί ; Έλεγχος ανάπτυξης εμβρύου



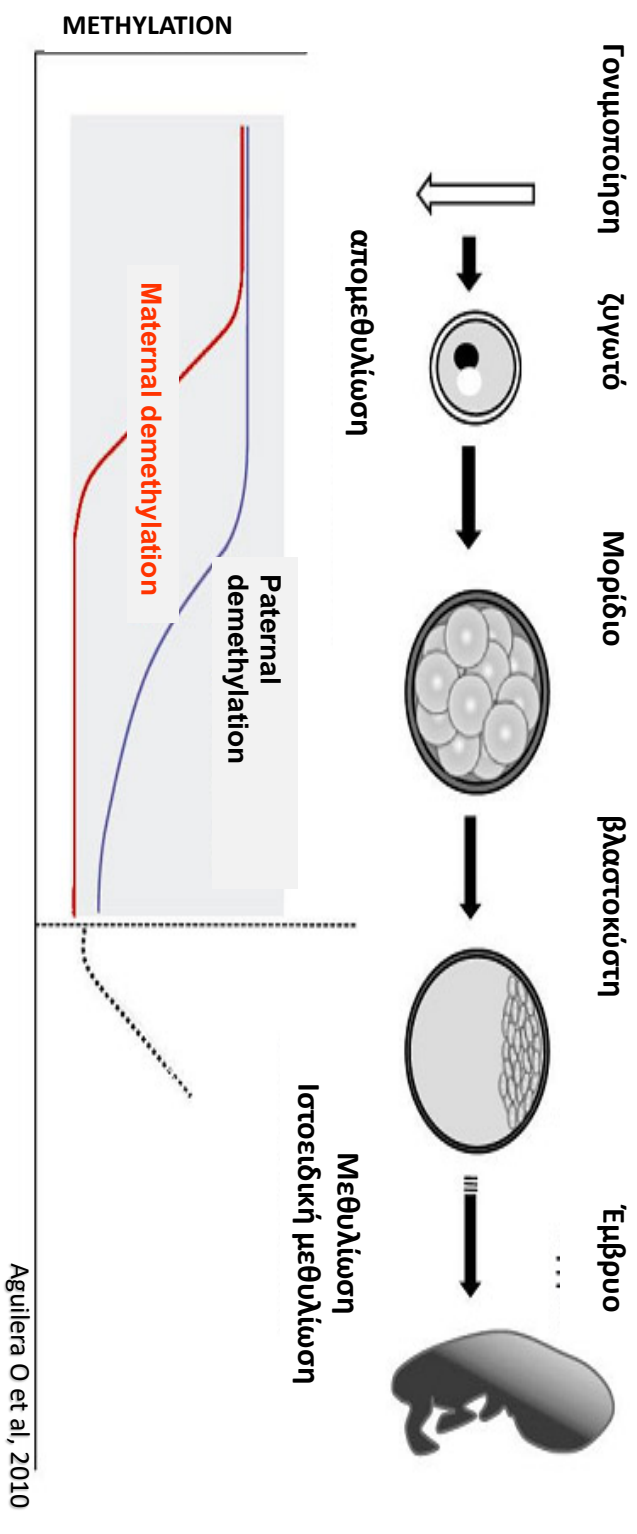
Επιγενετική και έμβρυο/ κύηση

Εξωσωματική γονιμοποίηση / επιγενετικές αλλαγές στο έμβρυο

Διατροφή μητέρας κατά την κύηση/ περιβαλλοντικοί παράγοντες και
επιγενετική



αλλαγές μεθυλίωσης DNA κατά την εμβρυογένεση



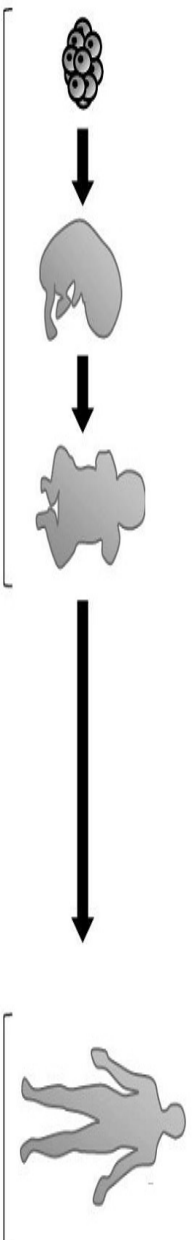
- Σβήσιμο μεθυλίωσης DNA ώρες μετά την γονιμοποίηση ➔ ενεργή απομεθυλίωση του πατρικού γονιδιώματος παθολογική απομεθυλίωση του μητρικού γονιδιώματος
- επανίδρυση μεθυλίωσης DNA (de novo) στο στάδιο βλαστοκύστης ➔ μιτωτικές διαιρέσεις- ιστοειδική μεθυλίωση

Ο επιγενετικός φαινότυπος κληρονομείται στις επόμενες γενεές
 “ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΝΗΜΗ”
 ΑΛΛΑ μπορεί να αλλάξει από την επίδραση του περιβάλλοντος



Περιβαλλοντικοί παράγοντες
συσσωρεύονται κατά την διάρκεια της ζωής
μπορεί να επηρεάσουν το επιγονιδίωμα και να προδιαθέτουν για νοσηρότητα

Εμβρυική ανάπτυξη και γαλουχία



➤ Έκθεση μητέρας σε διάφορους παράγοντες

➤ ειδικοί φαινότυποι της μητέρας και του πλακούντα

➤ Τρόπος ζωής /περιβάλλον διαμονής και εργασίας

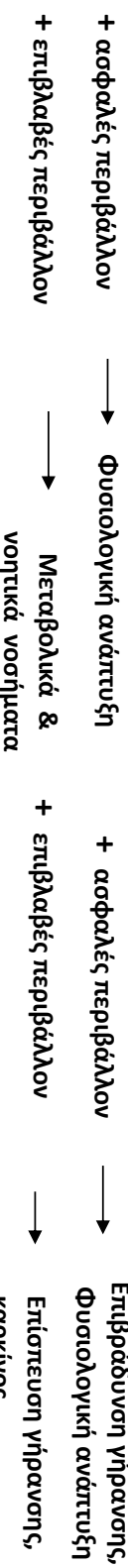
➤ Φαρμακολογικοί παράγοντες

➤ δίαιτα

➤ Toxics : alcohol,tobacco,asbestos...

Ακόμη και εάν το κληρονομούμενο γονιδίωμα είναι φυσιολογικό, υπάρχουν 2 διαφορετικά σενάρια

Ασφαρές ή επιβλαβές περιβάλλον στα πρώτα στάδια της ζωής



Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γονιδιακή αποτύπωση

- ✓ Αποτυπωμένο γονίδιο είναι αδρανοποιημένο
- ✓ Μητρική γονιδιακή αποτύπωση: Εκφράζεται το πατρικό γονίδιο
- ✓ Εάν λείπει το πατρικό δεν υπάρχει ενεργό γονίδιο



Γονίδια στα οποία παρατηρείται Γονιδιακή Αποτύπωση

- ✓ Σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης του εμβρύου
- ✓ Η ανάπτυξη του πλακούντα σχετίζεται με την έκφραση πατρικής προέλευσης γονιδίων
- ✓ Η ανάπτυξη του εμβρύου σχετίζεται με την έκφραση μητρικής προέλευσης γονιδίων



Θέση αποτυπωμένων γονιδίων

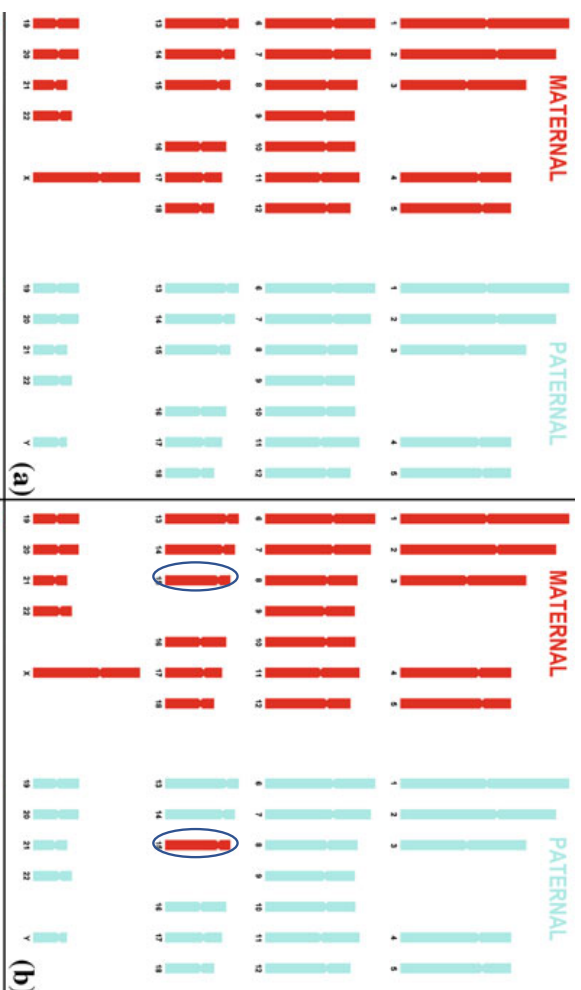
Συγκεντρώνονται κατά ομάδες :

✓ 11p15 τουλάχιστον 4 γονίδια

✓15q12 τουλάχιστον 6 γονίδια

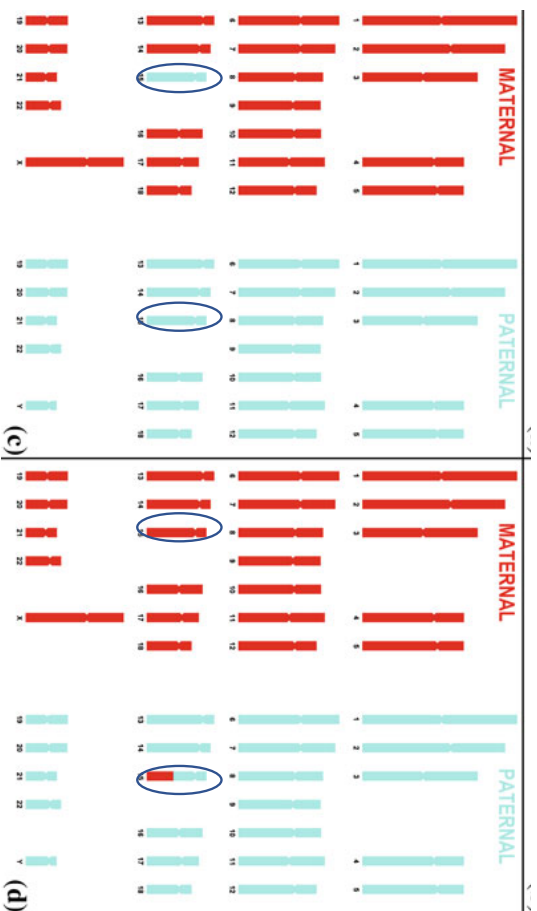
✓ Χρῶμος. 6, 7, 14 ; ἀγνωστος αριθμός γονιδίων





- Α) φυσιολογικά χρωμοσώματα 23 μητρικά/23 πατρικά
- Β) μητρική UPD(15)

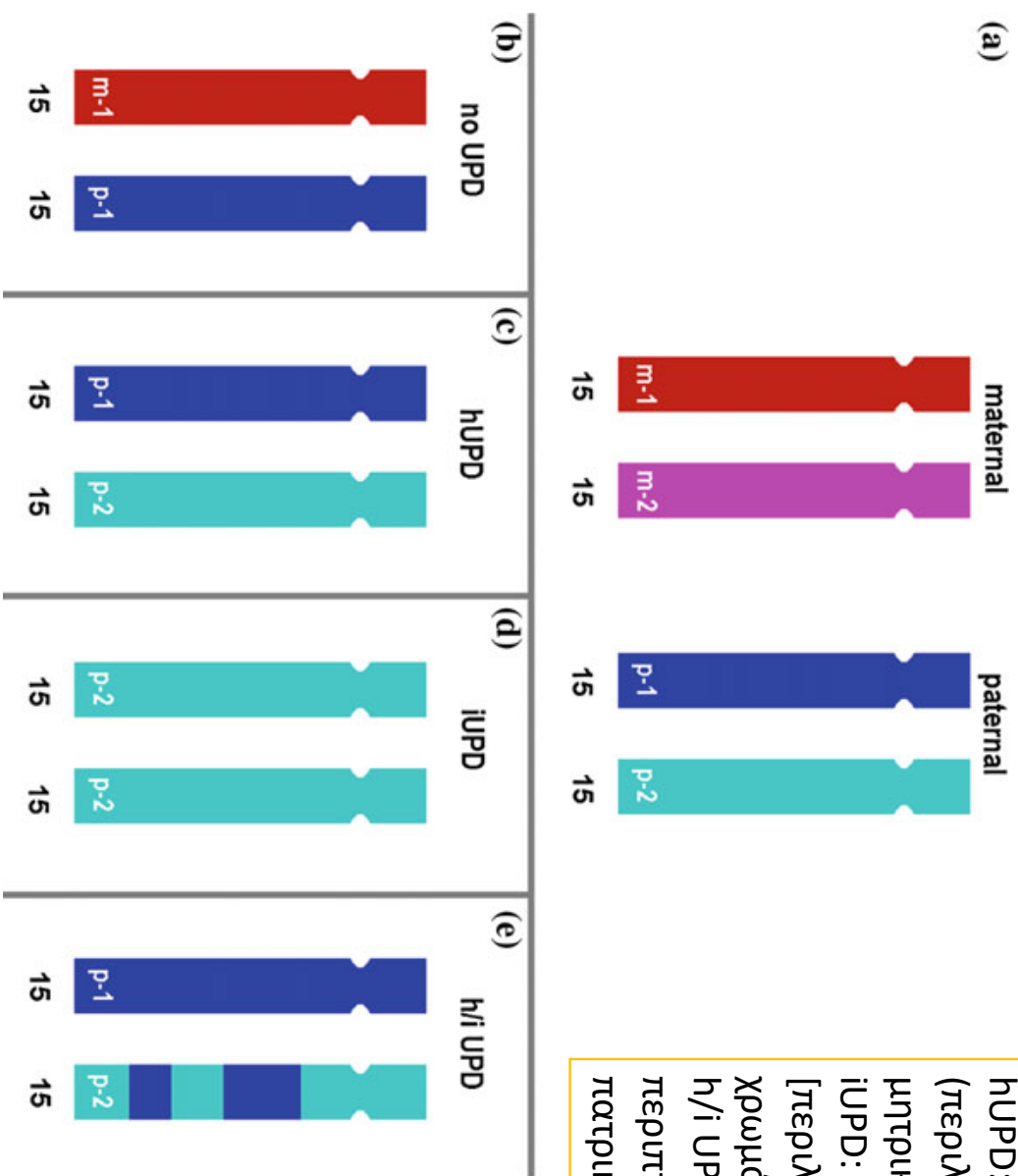


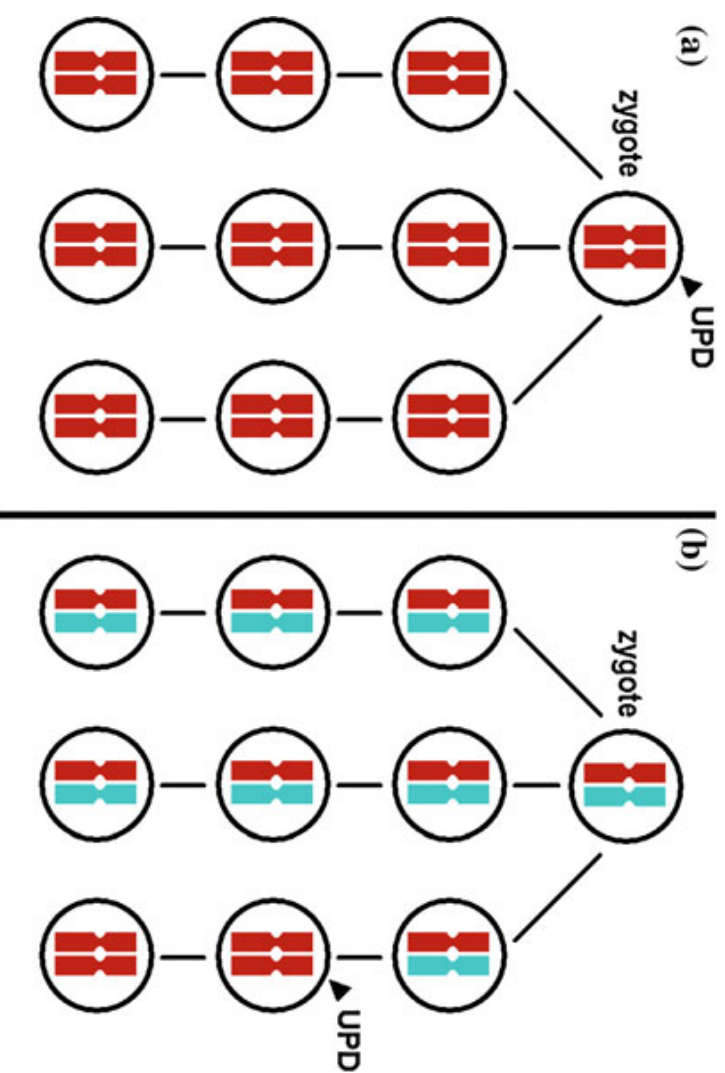


- C) πατρικό UPD(15)
- D) τμηματικό UPD(15)
- ολόκληρο μητρικό χρω.15 & τμήμα βραχέως σκέλους
- Απουσία βραχέως σκέλους πατρικού χρω.15



hUPD: hetero-UPD, ετερόδισωμία
(περιλαμβάνει και τα δύο πατρικά ή
μητρικά χρωμοσώματα)
iUPD: iso-UPD
[περιλαμβάνει το ίδιο μητρικό ή πατρικό
χρωμόσωμα σε δυο δόσεις]
h/i UPD: συνύπαρξη των παραπάνω
περιπτώσεων σε τμηματικό μητρικό ή
πατρικό χρωμόσωμα





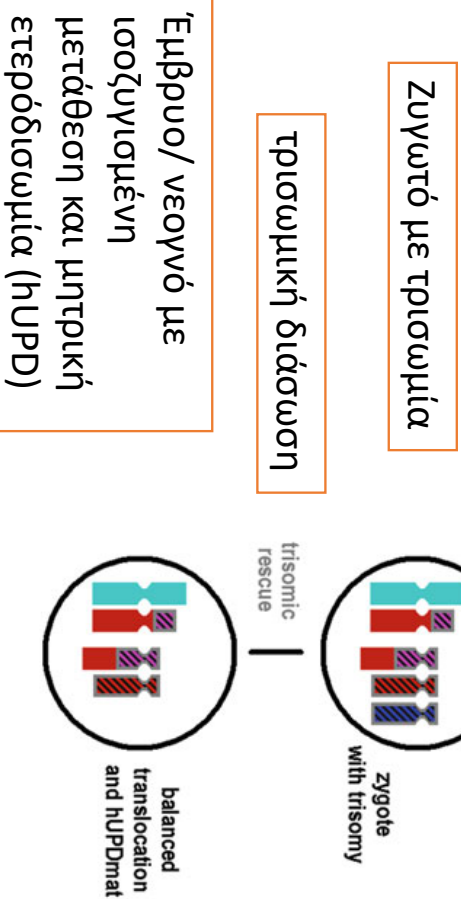
Μονογονεϊκή δισωμία (UPD) μπορεί να υπάρχει α) σε κάθε κύτταρο, σε όλα τα κύτταρα του σώματος και στην γενετική σειρά - λόγω σφάλματος κατά την μείωση.

β) UPD μπορεί να υπάρχει μόνο σε μερικά σωματικά κύτταρα. Αυτό οφείλεται σε σφάλμα κατά την μίτωση, μετά την δημιουργία του ζυγώτου. Εάν όμως αυτό συμβεί στην αρχή της εμβρυογένεσης, μπορεί όλα τα κύτταρα του εμβρύου να παρουσιάζουν UPD; Είναι πολύ δύσκολο έως και αδύνατο να ξεχωρίσει κάποιος το UPD που προκύπτει από μειωτικό σφάλμα από εκείνο που προκύπτει από το μιτωτικό UPD. Ένα επίκτητο UPD μπορεί να περιορίζεται σε ένα μόνο ιστό.



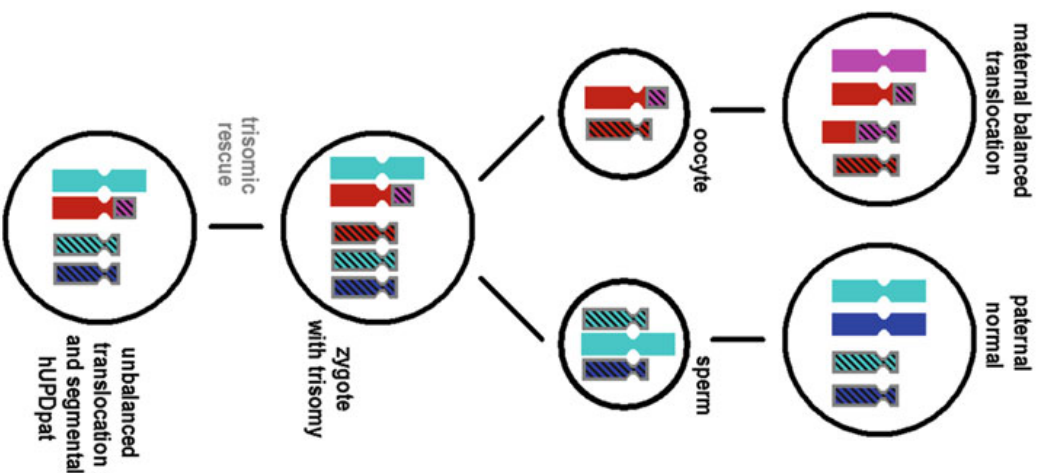


Μητρική
Ισοζυγισμένη
μετάθεση



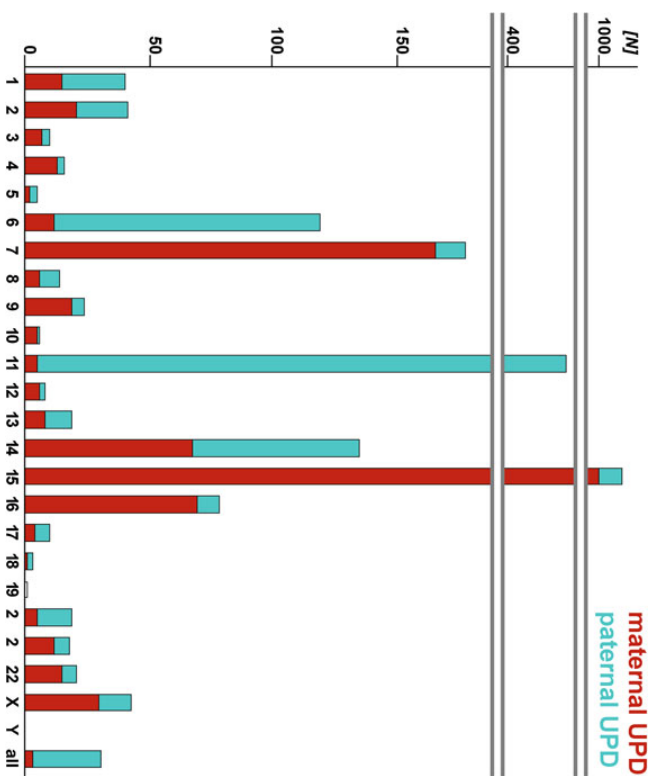
Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

(α)



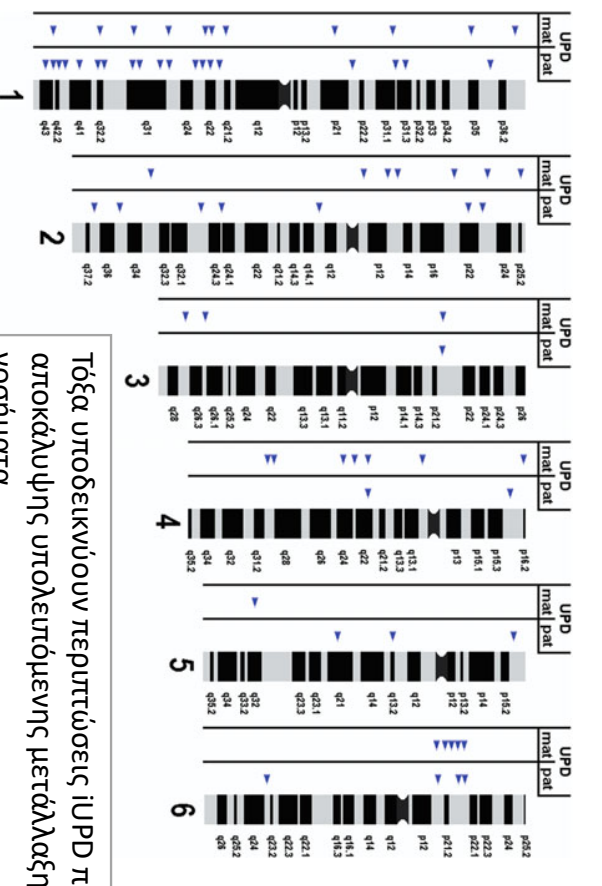
(b)

Έμβρυο/ νεογνό με μη
ισοζυγισμένη
μετάθεση και
τμηματική πατρική
ετερόδισωμία (hUPD)

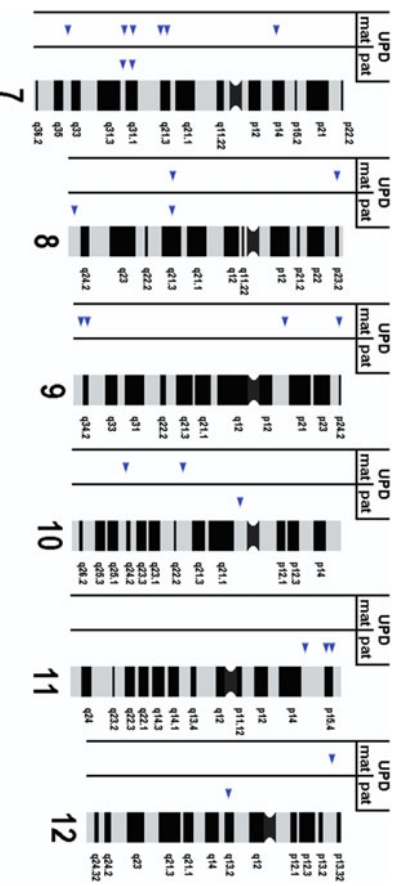
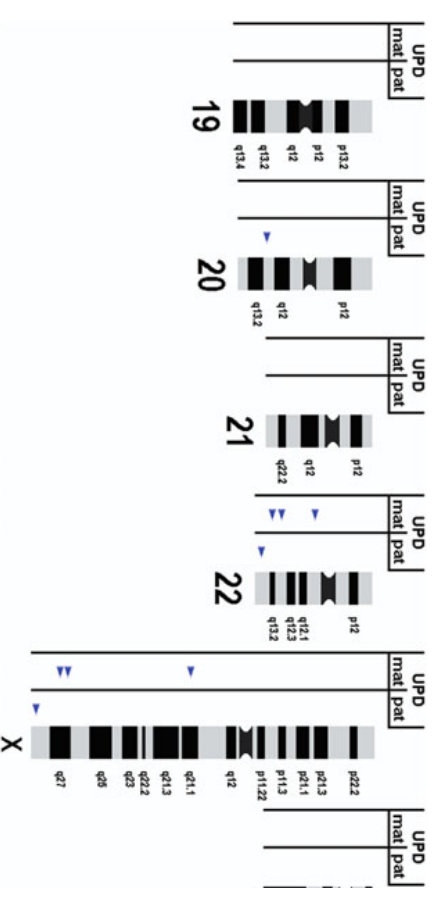
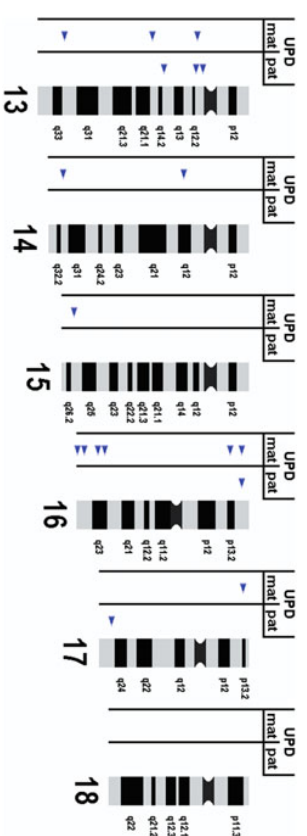


- ✓ Συχνότητα UPD σε νεογνά 1/3,500 (0.029 %) [Robinson, 2000]
- ✓ Μία περίπτωση iUPD σε 676 μάρτυρες (0.14 %) (SNP-aCGH) [Keller et al., 2009]
- ✓ iUPD βρέθηκε 1/2,024 (0.05 %) αποβολές, θνησιγενή έμβρυα, και έμβρυα με δυσμορφίες (SNP-aCGH); [Pertile et al., 2012]





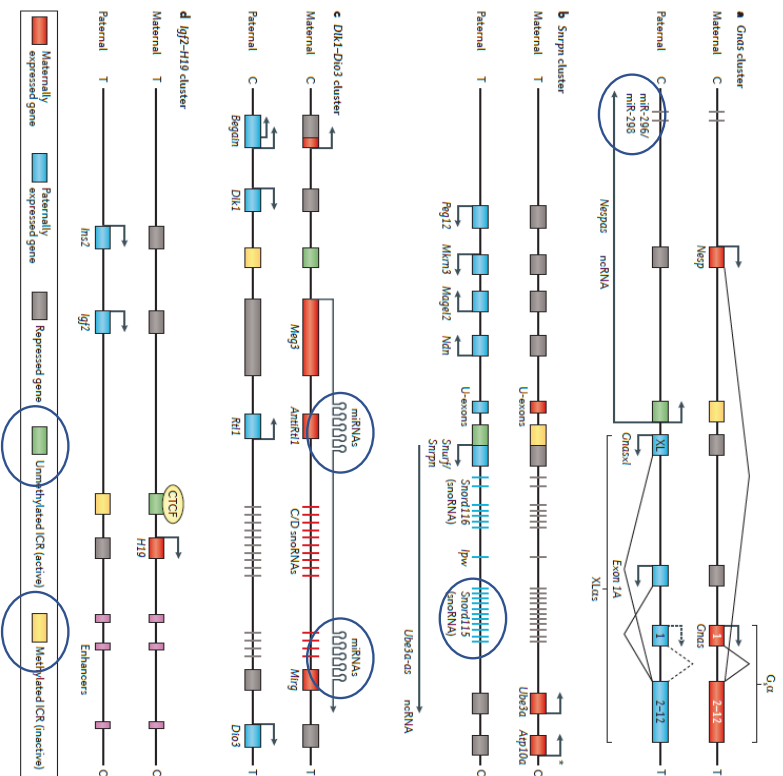
Τόξα υποδεικνύουν περιπτώσεις iUPD που λόγω αστοκάλυψης υπολειπόμενης μετάλλαξης οδηγούν σε νοσήματα.



- DMD γονίδιο Xp21.1: Μικρή δυστροφία Duchenne muscular dystrophy, 2 περιπτώσεις (Quan et al. 1997; Liehr 2014c)
- F9 γονίδιο Xq27.1: αιμορροφιλία B (Sellner and Price 2005), and
- FMR1 γονίδιο Xp27.1: σ. Ευθραστού X (Fragile X syndrome), 2 περιπτώσεις (Papenhausen et al. 2011).



Imprinted genes (αποτυπωμένα γονίδια)



Πατρικά αποτυπωμένα γονίδια συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εμβρύου σε αντίθεση με τα μητρικά, συμβάλλουν και στην σωστή ανάπτυξη του πλακούντα



- Οργανωμένα σε ομάδες
- Όλες οι ομάδες περιέχουν
 - Γονίδια που εκφράζονται από το μητρικό ή πατρικό αλληλόμορφο
 - γονίδια που κωδικοποιούν ncRNAs (miRNAs) τα οποία είναι ρυθμιστές έκφρασης
 - ιστοειδικούς εκκληητές
 - **ICR** - ειδικές περιοχές αποτύπωσης, επηρεάζουν την έκφραση του πατρικού ή μητρικού αλληλομόρφου λόγω τροποποίησης του κωδικά ιστονών και μεθυλίωσης του DNA
- **Διαφορετική έκφραση αλληλομόρφων πατρικής ή μητρικής προέλευσης για >80 γονίδια (imprinted genes)**
- Διαταραχή αποτύπωσης
- α. μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια (γενετικός μηχανισμός)
- β. Μονογονεϊκή δισωμία (UPD) ή μερική μονογονεϊκή δισωμία
- γ. διαφθοροποίηση της μεθυλίωσης του DNA σε αποτυπωμένες (imprinted) περιοχές (DMR)

➤ **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ:** ατώλεια ή πρόσθετη έκφραση του αποτυπωμένου γονιδίου ή του συμπλέγματος αποτυπωμένων γονιδίων

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών



Table 1 | **Human imprinted syndromes and corresponding mouse models**

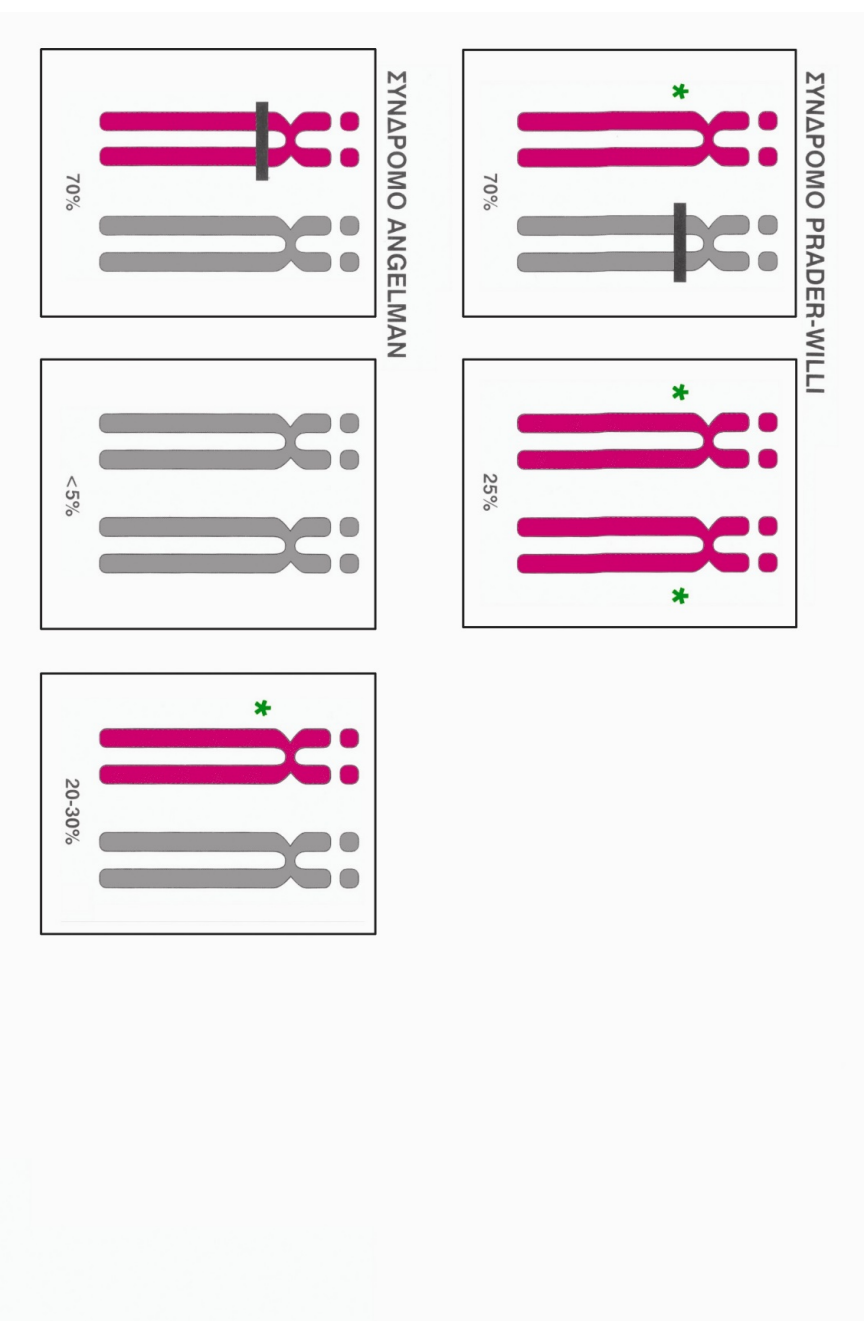
Human syndrome	Location	Major features	Causes
Pseudo-hypoparathyroidism type 1a (OMIM 103580)	20q13.3	Dysmorphism, obesity, cognitive impairment, end-organ resistance to PTH (which results in hypocalcemia and hyperphosphatemia) and resistance to other hormones. ¹³¹	Maternal inactivating mutations of <i>GNAS</i> result in 50% expression of non-imprinted <i>GNAS</i> , which causes the dysmorphic phenotype AHO; loss of imprinted <i>GNAS</i> expression causes obesity and hormone resistance
Pseudo-hypoparathyroidism type 1b (OMIM 603233)	20q13.3	End-organ resistance to PTH (which results in hypocalcemia and hyperphosphatemia) and occasional resistance to TSH. ¹³¹	Lack of maternal <i>GNAS</i> methylation imprinting results in loss of expression of imprinted <i>GNAS</i>
Prader–Willi syndrome (OMIM 176270)	15q11–13	Developmental delay, poor suckling, hyperphagia, obesity, hypogonadism, cognitive impairment and characteristic behavioural profile (which includes temper tantrums and obsessive–compulsive features). ^{133,134}	Loss of paternal expression of up to 11 genes in 15q11–13 mainly as a result of paternal deletion or MatUPD15; rare imprinting defects
Angelman syndrome (OMIM 105830)	15q11–13	Developmental delay, microcephaly, severe intellectual disability, absent or limited speech, gait ataxia, sleep disturbance, characteristic EEG and behavioural profile with happy demeanour. ¹³³	Loss of maternal expression of <i>UBE3A</i> mainly due to maternal deletion, <i>UBE3A</i> mutation or PatUPD15; rare imprinting defects
Beckwith–Wiedemann syndrome (OMIM 130650)	11p15.5	Prenatal and/or postnatal overgrowth, enlarged tongue (macroglossia), abdominal wall defects (omphalocele), placental overgrowth and predisposition to embryonal tumours (for example, Wilms tumour)	Complex: mostly epigenetic errors that lead to silencing of <i>CDKN1C</i> or biallelic expression of <i>IGF2</i> and silencing of <i>H19</i> ; inactivating mutations in <i>CDKN1C</i> ; PatUPD11
Silver–Russell syndrome (OMIM 180860)	Up to 65% of cases map to 11p15.5, and 10% of cases show MatUPD7	Dysmorphism, IUGR and postnatal growth retardation	Complex: in cases of 11p15.5, hypomethylation of <i>H19</i> DMR results in silencing of <i>IGF2</i> and biallelic expression of <i>H19</i> ; <i>MEST</i> and <i>GAB10</i> are candidates for MatUPD7 cases
Transient neonatal diabetes mellitus type 1 (OMIM 601410)	6q24	Neonatal hyperglycaemia and IUGR. ¹³²	Overexpression of <i>PLAG1</i> and <i>HYMA1</i>
MatUPD14 syndrome	14q32	Prenatal and postnatal growth retardation, premature puberty and obesity	Loss of paternal expression of <i>DLK1</i> and <i>RTL1</i> (REF: 139)
PatUPD14 syndrome	14q32	Dysmorphism, placentomegaly and excessive amniotic fluid (polyhydramnios)	Increased expression of <i>RTL1</i> (REF: 140)

ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ

- **σ. Angelman/Prader-Willi**
- **σ. Beckwith-Wiedemann**
- **σ. Silver-Russell**
 - Διαταραχές μεθυστικής
- Διαφορετική έκφραση από τα αλληλία που κληρονομούνται από το πατρικό ή μητρικό χρωμόσωμα
- Το κέντρο αποτύπωσης (IC) ρυθμίζει την έκφραση πατρικής ή μητρικής προέλευσης γονιδίων

Τζιής,
V

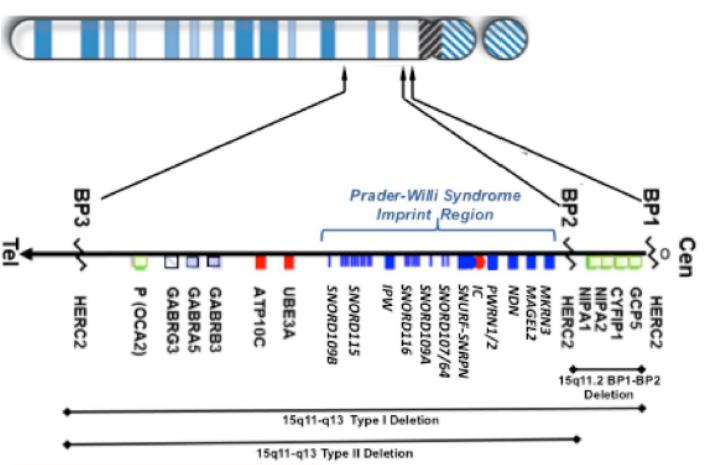
Peters J, 2014



Μοριακή Βάση των συνδρόμων Prader-Willi και Angelman
πατρικό Χρωμόσωμα μητρικό Χρωμόσωμα — έλλειψη μεθυλίωση

- **σ. Angelman (1:20000-1:12000)** : σοβαρή ψυχοκινητική διαταραχή, αταξία στο βάδισμα, μικροκεφαλία, επιληπτικές κρίσεις, ευερέθιστος, χαρούμενος χαρακτήρας (happy puppet)

- **σ. Prader-Willi (1:30000-1:10000)** : σοβαρή νευροαναπτυξιακή διαταραχή, χαρακτηριστικό προσωπείο (επίμηκες πρόσωπο, λεπτό άνω χείλος), υποτονία, χαμηλό ανάστημα, υπερφαγία, υπογοναδισμός



Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

- **15q11-13**
- **AS**: μοριακές διαταραχές
 - 70% έλλειμμα μητρικού χρ15
 - 2% πατρική δισωμία χρωμοσώματος 15 (διαταραχή αποτύπωσης)
 - 5-10% μετάλλαξη στο UBE3A γονίδιο (αποτύπωση κυρίως σε νευρικό σύστημα)
 - 1% έλλειμμα του κέντρου αποτύπωσης (IC)
 - 3% επιγενετική διαταραχή κέντρου αποτύπωσης (IC)
- **PW**: μοριακές διαταραχές
 - 65-70% έλλειμμα πατρικού χρ15
 - 25-35% μητρική δισωμία χρωμοσώματος 15 (διαταραχή αποτύπωσης)
 - 1-5% επιγενετική διαταραχή κέντρου αποτύπωσης (IC)
 - Διάφορα μικρό-ελλείμματα και μεταθέσεις

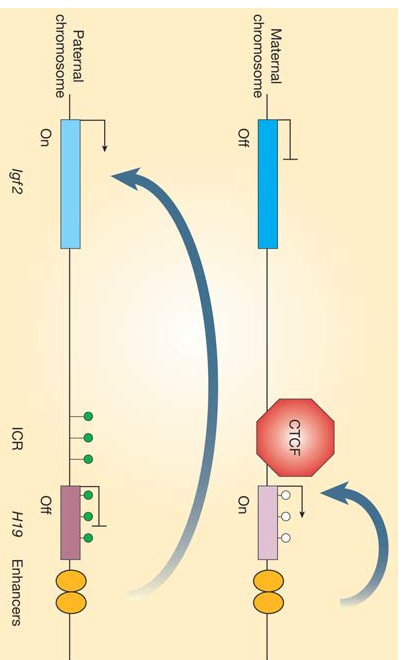
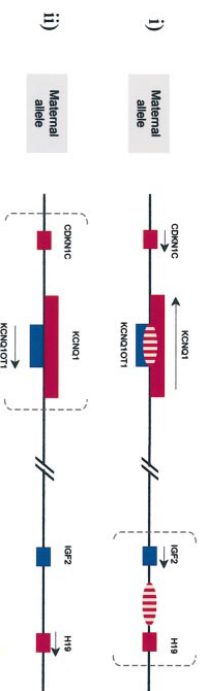


• **σ. Beckwith-Wiedemann** (~1:15000)(11p15.5)

- Υτέρ ανάπτυξη (προ ή μετά-γεννητικά)
- Μακρογλωσσία
- Ομφαλοκήλη
- Νεογνική υπογλυκαιμία
- Οργανομεγαλία
- Εμβρυικοί όγκοι (~7%) (wilms & ραβδομυοσάρκωμα)

• **σ. Silver-Russell** (~1:54000) (χρ 7 & 1)

- Ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης (IUGR)
- Δυσκοιλία σίτισης
- Μακροκεφαλία και μικρό τριγωνικό προσώπείο
- Ασυμμετρία άκρων
- Άλλες ελάσσονες δυσμορφίες
- Μαθησιακές δυσκολίες, ψυχοκινητική καθυστέρηση (34%) (πιο συχνές σε μητρική δισωμία χρ7)



σ. Beckwith-Wiedemann (1:15000) 11p15.5

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

- 20% πατρική δισωμία χρωμοσώματος 11
- 2% δυτλασιασμός πατρικού χρωμοσώματος (11p15.5)
- 5% μεταλλάξεις στο *CDKN1C* (40% των οικογενών περτυτώσεων)
- 50% επιγενετική διαταραχή κέντρου αποτύπωσης 1 (IC1) (απώλεια μητρικής μεθυλίωσης γονιδίου *KCNQ1*)
- 5% επιγενετική διαταραχή κέντρου αποτύπωσης 2 (IC2) (επιπλέον μητρική μεθυλίωση)
- 1% επιγενετικές διαταραχές και στα 2 κέντρα αποτύπωσης IC1 & IC2

σ. Silver-Russell (~1:54000) (χp7 & 11)

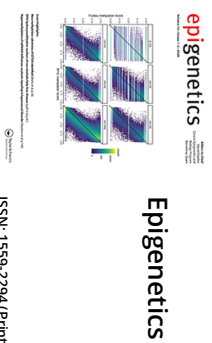
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

- 1-2% μητρική δισωμία χρωμοσώματος 11 (11p15.5)
- 37-63% διαταραχές μεθυλίωσης χρωμοσώματος 11 (υπομεθυλίωση κέντρου αποτύπωσης IC1; *IGF2*)
- 5-10% μητρική δισωμία χρωμοσώματος 7 (mUPD7) (imprinted genes: *GRB10*, *MEST*)
- 1-2% Δυτλασιασμοί χρωμοσωμάτων 7 ή 11p15
 - Μικρό-έλλειμμα 12q14, δακτυλιοειδές 15, έλλειμμα 15q



The health of children conceived by ART: ‘the chicken or the egg?’ **Human Reproduction Update, Vol.25, No.2 pp. 137–158, 2019**

Advanced Access publication on February 12, 2019 doi:10.1093/humupd/dmz001



Επιγενετικές τροποποιήσεις λόγω διαδικασιών
εξωσωματικής γονιμοποίησης και υγεία των παιδιών
που προέρχονται από εξωσωματική



Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

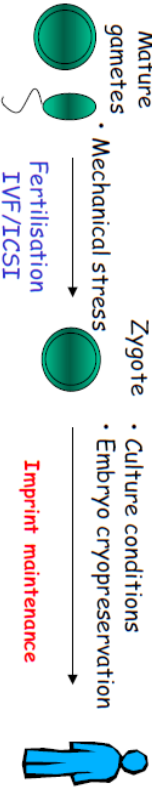
ΔΕΔΟΜΕΝΑ



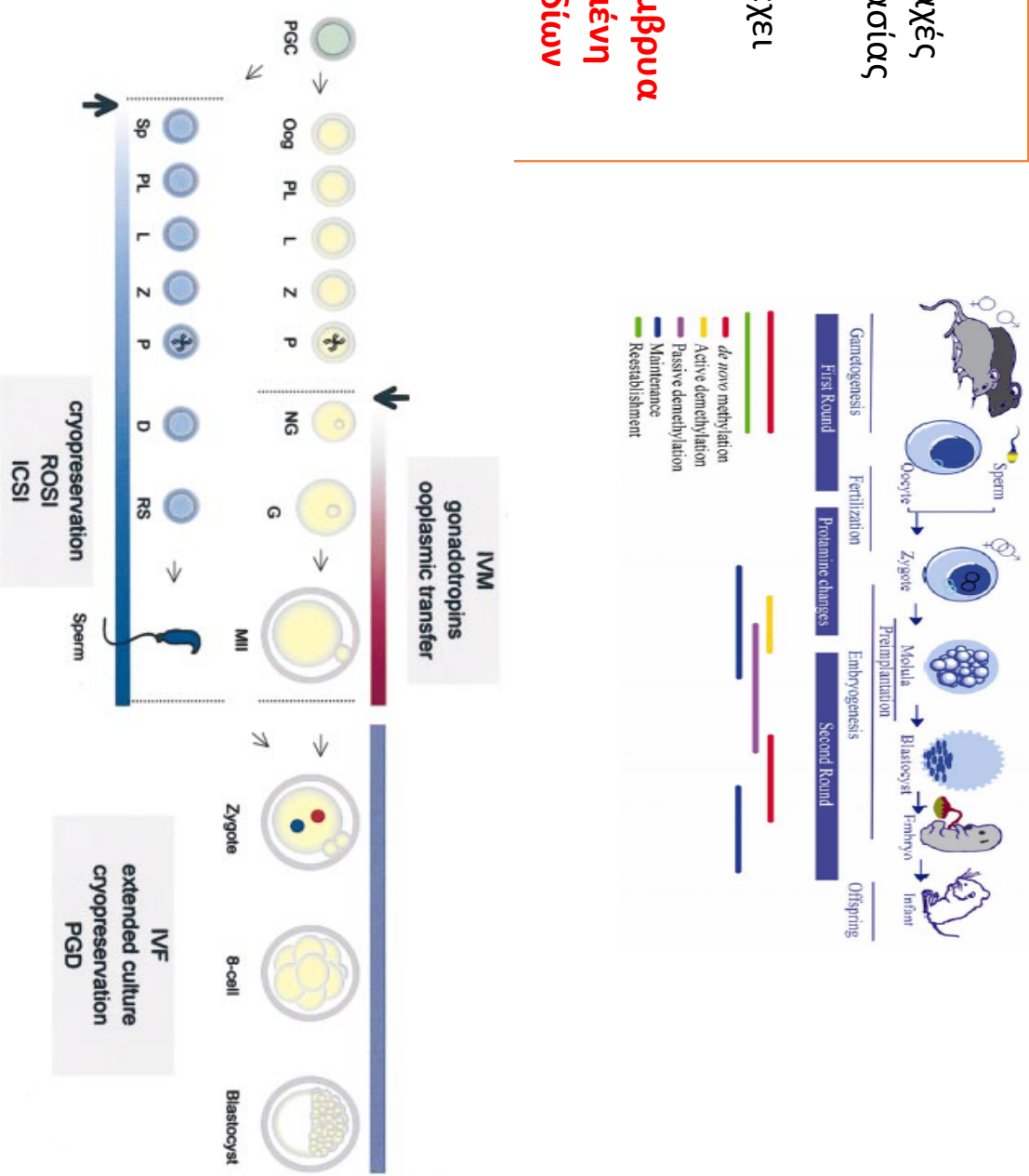
- 1st IVF μωρό γεννήθηκε >30χρόνια
- >6 εκατομμύρια γεννήσεις μετά από ART
- αύξηση χρήσης της μικρογονιμοποίησης (ICSI)
- Ανθρώπινα ωκύτταρα αποκτούν χρωμοσωμικές διαταραχές όσο αυξάνεται η ηλικία της μητέρας
- >30% των γυναικών που καταφεύγουν σε ART είναι >35χρ.
- Η διαδικασία ART περιλαμβάνει επεμβάσεις (αλλαγή της φυσιολογικής διαδικασίας) σε πολλά στάδια της αναπαραγωγής
- Μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης επιγενετικών νοσημάτων λόγω διαταραχής στη δημιουργία και συντήρηση της αποτύπωσης κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, γονιμοποίησης και της εμβρυικής ανάπτυξης
- Αύξηση κινδύνου εμφάνισης επιγενετικών νοσημάτων μετά από ART



Διαδικασία εξωσωματικής υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ART-ICSI



- Διαφορές γενωμικής αποτύπωσης
- Ωάρδια: πιο ευάλωτα σε επιγενετικές διαταραχές διότι η ολοκλήρωση της επιγενετικής διαδικασίας συμβαίνει αμέσως μετά την γονιμοποίηση
- Σπερματοζωάρια: η επιγενετική διαδικασία έχει ολοκληρωθεί πριν τις παρεμβάσεις ART
- ✓ **περισσότερες επιγενετικές διαταραχές σε έμβρυα μετά από ART οφείλονται σε διαφοροποιημένη έκφραση των μητρικά αποτυπωμένων γονιδίων**



LOS (Large Offspring Syndrome)

- Η πρώτη αναφορά σύνδεσης ART με επιγενετικές διαταραχές ήταν το LOS (1995) σε μοσχάρια
 - υπερανάπτυξη, μεγάλη γλώσσα, ελαττώματα στο κοιλιακό τοίχωμα
 - Προσομίωση με το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (BWS)
- Παρατηρήθηκε σε μοσχάρια ως αποτέλεσμα της εξωσωματικής διαδικασίας (in vitro) της ωρίμανσης των ωαρίων και καλλιέργεια εμβρύων
- Αποδόθηκε στην υπομεθυλίωση του γονιδίου *igf2r*
- Περαιτέρω μελέτες σε έμβρυα ποντικών και μοσχαριών με μεθοδολογία μελέτης έκφρασης γονιδίων (RNAseq) απεδείξε ότι υπάρχει γενικευμένη διαταραχή στην μεθυλίωση-αποτύπωση-έκφραση σε >20 αποτυπωμένα γονίδια η οποία ήταν ιστοειδική
 - Υπομεθυλίωση του γονιδίου *MLNAT* στο νεφρό (ίσως υπεύθυνο για την εμφάνιση όγκου Wilms σε παιδιά με BWS)
 - Υπομεθυλίωση και αύξηση έκφρασης του πατρικού αντιγράφου του γονιδίου *PLAGL1* (ρυθμιστής εμβρυικής ανάπτυξης) σε μυϊκό ιστό και νεφρό
 - Μειωμένη έκφραση του FBXO40 (αρνητικός ρυθμιστής έκφρασης του IGF1 συμμετέχει στην διαφοροποίηση μυϊκού ιστού)



Διαταραχές αποτύπωσης

Disease	Reference	No. of cases	Technology performed	Loss of imprinting	Country
Beckwith–Wiedemann	DeBaun <i>et al.</i> (2003)	7	IVF and ICSI	<i>KCNQ1OT1</i> and <i>H19</i>	USA
	Gicquel <i>et al.</i> (2003)	6	IVF and ICSI	<i>KCNQ1OT1</i>	France
	Maher <i>et al.</i> (2003)	6	IVF and ICSI	<i>KCNQ1OT1</i>	UK
	Bonduelle <i>et al.</i> (2002)	1	ICSI	ND	Belgium
	Boerigter <i>et al.</i> (2002)	1	IVF and ICSI	ND	–
	Olivrennes <i>et al.</i> (2001)	1	IVF and ICSI	ND	–
	Koudstaal <i>et al.</i> (2000)	1	IVF and ICSI	ND	The Netherlands
	Sutcliffe <i>et al.</i> (1995a)	1	IVF	ND	UK
	Orstavik <i>et al.</i> (2003)	1	IVF	<i>SNRPV</i>	Norway
	Cox <i>et al.</i> (2002)	2	ICSI	<i>SNRPV</i>	Germany
Angelman	MRC Working Party (1990)	1	IVF	ND	UK

BWS: 24 περιπτώσεις, 15 IVF+ICSI
AS: 3 περιπτώσεις, ICSI
SR: 1 περίπτωση, IVF





Table II Reports on the incidence of imprinting disorders after human IVF.

Reference	Type of study	N cases	% IVF in cases	% IVF in ref	Estimated risk	Type of IVF	Molecular defect
Beckwith – Wiedemann syndrome							
DeBaun et al. (2003)	Case series	65	4.6	0.76	6.1	IVF and ICSI	5/6 LOM KCNQ1OT1 gDMR ^c 1/6 GOM HI9 DMR 1/6 no imprint defect
Maher et al. (2003)	Case series	149	4.0	0.997	4.0*	IVF (n = 3) and ICSI (n = 3)	2/6 LOM KCNQ1OT1 gDMR 4/6 not analysed
Gicquel et al. (2003)	Case series	149	4.0	1.3	3.1*	IVF (n = 4) and ICSI (n = 2)	6/6 LOM KCNQ1OT1 gDMR
Halliday et al. (2004)	Case control	37	10.8	0.67	16.1*	IVF (n = 3) and ICSI (n = 1)	3/4 LOM KCNQ1OT1 gDMR 1/4 not analysed
Chang et al. (2005)	Case series	341	5.6 ^a	–	–	IVF (n = 5) and ICSI (n = 5) ^a	NA
Sutcliffe et al. (2006)	Survey	209	2.9–7.6 ^b	0.8	3.6–9.5 ^{b*}	IVF (n = 1) and ICSI (n = 5)	6/6 LOM KCNQ1OT1 gDMR
Doombos et al. (2007)	Survey	71	5.6	0.92	6.1*	IVF (n = 4)	4/4 LOM KCNQ1OT1 gDMR

Γενικός κίνδυνος 3.1~16.1

IVF ή IVF + ICSI → BWS

- όχι η διαδικασία ART αλλά και η **υπογονιμότητα** αιτία αύξησης κινδύνου εμφάνισης BWS
- RR 5.2 (95% CI 1.6-7.4) (Vermeiden et al., 2013)
- Επιπολασμός στον γενικό πληθυσμό ~1/15,000 οπότε για κάθε 2,700 IVF/ICSI γεννήσεις θα πρέπει να αναμένουμε 1 παιδί BWS

Silver-Russell Syndrome (SRS)

- 13 περιπτώσεις παιδιών που γεννήθηκαν μετά από IVF/ICSI
 - (Blek et al., 2006; Galli-Tsinopoulou et al., 2008; Chopra et al., 2010; Kagami et al., 2007)
 - 10/13 → υπομεθυλίωση του γονιδίου *H19* (*ncRNA*)
 - 1/13 → υπερμεθυλίωση του πατρικού *MEST*
- Άλλες αιτίες:
 - 5-10% μητρική δισωμία Chr 7 (imprinted genes: *GRB10*, *MEST*)
 - αριθμός περιπτώσεων πολύ μικρός για ασφαλή συμπεράσματα



Reference	Type of study	N cases	% IVF in cases	% IVF in ref	Estimated risk	Type of IVF	Molecular defect
Angelman Syndrome							
Cox et al. (2002)	Case series	2	–	–	–	ICSI (n = 2)	2/2 LOM SNRPN
Orstavik et al. (2003)	Case report	1	–	–	–	ICSI (n = 1)	1/1 LOM SNRPN
Ludwig et al. (2005)	Survey	79	3.8	–	–	ICSI (n = 3)	1/3 LOM SNRPN 2/3 maternal deletion 15q11
Sutcliffe et al. (2006)	Survey	75	0	0.8	–	–	–
Doombos et al. (2007)	Survey	63	0	0.92	–	–	–

- Δημοσιεύσεις ανέφεραν αυξημένο επιπολασμό της σφαλμάτων αποτύπωσης σε ασθενείς με σ. Angelman από υπογόνιμα ζευγάρια και προτείνουν ότι η διέγερση ωοθηκών, αντί του ICSI, μπορεί να αυξήσει περαιτέρω τον κίνδυνο
- Επιπλέον, ορισμένες από τις διαταραχές αποτύπωσης που φαίνεται να συνδέονται με ART μπορεί να είναι ήδη παρούσες στους γαμέτες ανδρών με υπογονιμότητα που χρησιμοποιούνται για ICSI

6 AS περυπτώσεις με ICSI
7 AS περυπτώσεις από πρόκληση
ωοθηλακιορρυξίας χωρίς ICSI (Sutcliffe et al., 2006; Doombos et al., 2007)



Prader-willi syndrome

- Πολύ λίγα περιστατικά από τις μέχρι τώρα μελέτες
 - 3 περιπτώσεις PWS-ART
- Μεγάλη μελέτη στις ΗΠΑ (Gold et al., 2014)
 - ART-γεννήσεις ανάμεσα σε **1,884 PWS** πληθυσμό
 - (εκ των οποίων 20 με IVF, ICSI, και ZIFT- zygote intrafallopian transfer)
 - ήταν **1.1%** (20/1,884; 95% CI 0.6%–1.6%)
 - Εάν συμπεριληφθούν όλες οι διαδικασίες ART
 - (+ υπερδιερεύνηση ωθηκών)
 - (44/1,884) ανέρχεται σε **2.3%**
 - Μητρική δισωμία UPD/διαταραχές μεθυσίωσης κέντρου αποτύπωσης [55.6% (10/18) vs 34.2% (421/1,232) σε φυκώσεις]
 - Οφείλεται σε αυξημένη ηλικία της μητέρας ή την διαδικασία ART?
- Μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένη ηλικία μητέρας αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα μητρικής 15 UPD [Matsubara et al. (2011); Whittington et al. (2007)]



ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

- παιδιά από IVF στην Σουηδία (n = 31,850) → 1 BWS, 2 SRS και 4 PWS
- DANIA: Danish National Cohort (n = 6,052) → κανένα με αποτυπωμένο νόσημα
- ΓΑΛΛΙΑ: French cohort IVF παιδιά (n = 15,162) → 6 BWS
 - Συχνότητα BWS στον γενικό πληθυσμό → ~ 1/15,000
 - Αποτελέσματα τείνουν προς ↑ κινδύνου μετά από ART

Kallen et al., 2005, 2010b; Viot et al., 2010; Amor and Halliday, 2008



Γενετικά νοσήματα ή συγγενείς ανωμαλίες που σχετίζονται με μονογονεϊκή δισωμία

Μητρική UPD 15	σ. Prader-Willi
Πατρική UPD 15	σ. Angelman
Πατρική UPD 11	σ. Beckwith-Wiedemann
Μητρική UPD 7	σ. Silver-Russell
Πατρική UPD 6	Παροδικός νεογνικός διαβήτης
Μητρική UPD 14	Χαμηλό ανάστημα, πρόωρη ήβη
Πατρική UPD 14	Νανισμός, σκελετική δυσπλασία
Μητρική UPD 16	Καθυστερήση ανάπτυξης, ανωμαλίες καρδιάς



Μελέτες Διαφοροποίησης μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα σε αίμα ομφάλιου λώρου ή πλακούντα ή δείγματα τροφολάπτξης σε έμβρυα από IVF

Table 1. Studies using genome-wide approaches to investigate epigenetic differences due to ART.

Study	Number of samples	Technical Approach	Genes/regions	Tissue	Outcome	Reference
Katani <i>et al.</i> , 2009	10 IVF and 13 naturally conceived	Illumina GoldenGate array	1536 CpG sites in 736 genes	Cord blood, Placenta	Lower mean methylation of IVF at CpG sites in placenta Higher mean methylation of IVF at CpG sites in cord blood	[10]
Campubi <i>et al.</i> , 2013	73 ART and 121 naturally conceived	Illumina GoldenGate methylation array, Bisulfite PCR, Pyrosequencing	25 imprinted DMRs	Cord blood, Placenta	No significant differences in methylation between the two groups	[73]
Castillo-Fernandez <i>et al.</i> , 2017	47 IVF and 60 naturally conceived twins	MeDIP-seq	9,592,803 bins (cord blood), 9,285,089 bins (CBMC)	Cord blood, CBMC	Significant methylation differences in <i>TNP1</i> , <i>C9orf3</i> and <i>H19/GFF2</i> regions	[91]
Melamed <i>et al.</i> , 2015	10 ART and 8 naturally conceived	Illumina Infinium Human Methylation27K array	27,578 CpGs	Cord blood	733 (2.7%) CpGs significantly different between the two groups. Hypomethylation of 63.2% of the significantly differentially methylated sites in ART	[86]
Haji <i>et al.</i> , 2017	34 IVF, 89 ICSI and 53 naturally conceived	Illumina Infinium Human Methylation50K BeadChip assay, Pyrosequencing	428,227 CpGs, <i>ATG4C</i> , <i>BAZ2B</i> , <i>SNORD114-9</i>	Cord blood	Significant methylation differences in 4730 (0.11%) CpGs between the groups. Hypermethylation of <i>ATG4C</i> in ICSI and IVF. Significant methylation difference in <i>SNORD114-9</i> CpG between ICSI and controls.	[88]
Estill <i>et al.</i> , 2016	94 ART (UI/ICSI) and 43 naturally conceived	Illumina Infinium Human Methylation50K BeadChip assay	394,454 probes	Fetal blood	Significant difference in methylation profiles of the groups.	[87]
Litzky <i>et al.</i> , 2017	18 IVF, 79 subfertile and 158 naturally conceived	Illumina Infinium Human Methylation50K BeadChip assay	42 genes (1730 CpGs)	Placenta	No significant relationship between CpG methylation and fertility status.	[89]
Choufani <i>et al.</i> , 2018	44 ART and 44 naturally conceived	Illumina Infinium Human Methylation50K BeadChip assay, Pyrosequencing	414,320 probes, <i>LINE-1</i>	Placenta	No statistically significant methylation differences between the two groups.	[90]
Xu <i>et al.</i> , 2017	5 IVF, 5 NIPT and 5 naturally conceived	Illumina Infinium Human Methylation50K BeadChip assay	485,148 probes	CVS (first trimester)	No significant differences in overall methylation between the groups.	[95]

MS-PCR: Methylation specific PCR; MSED-qPCR: Methylation sensitive enzymatic digestion associated with real-time PCR; SeqOMA: Sequence – based quantitative methylation analysis; COBRA: combined bisulfite PCR restriction analysis; SNUPE: single nucleotide primer extension; IP RP HPLC: ion pair reverse phase high performance liquid chromatography; MS-SNUPE: Methylation sensitive single nucleotide primer extension; COH: Controlled ovarian hyperstimulation; MSQ-PCR: Methylation sensitive quantitative polymerase chain reaction; MeDIP: Methylated DNA immunoprecipitation; CBMC: Cord blood mononuclear cells; LUWA: Luminometric methylation assay; Bio-COBRA: Combined bisulfite restriction analysis coupled with Agilent 2200 TapeStation platform; NIPT: non-IVF fertility treatments

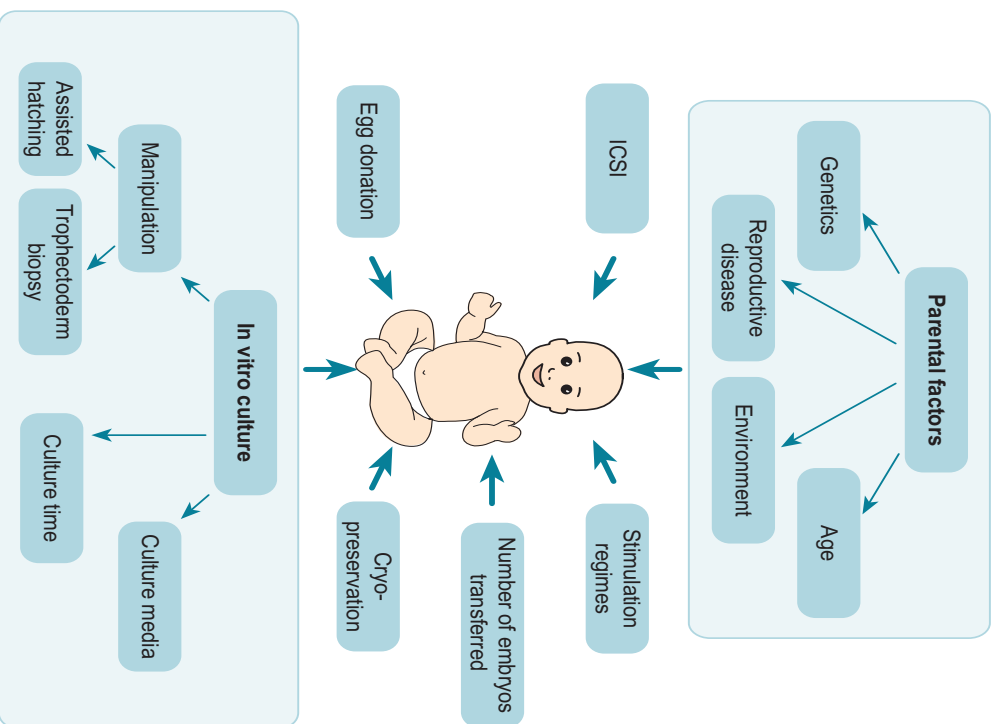


Μελέτες γονιδίων με επιγενετικές
Τροποποιήσεις λόγω ART (εξωσωματικής
γονιμοποίησης)

Table 2. Genes epigenetically perturbed by ART identified by studies using whole genome approaches.

Katani et al., 2009	Melamed et al., 2015	Estill et al., 2016	Haji et al., 2017	Castillo-Fernandez et al., 2017
ACBD4	HIST1H2AD	PTK2	ABL2	ACTR3
ACVR1B	HNRPA0	PYV	ADAMDEC1	ATG4C
APOE	HSPATL	RAE11L	C9orf762	BAZ2B
ARNT	IDH1	RANBP1	CHIA	C17orf98
BCAN	IGF2AS	RPE65	CPA2	C21orf128
BMI1	IL6	RPL7A	GNAS	E1F4E2
BMP1	IRX3	RP515	HIST2H2AB	ELL2P1
CARHSP1	KLF7	RP518	HOP	EMR4P
CEBPA	KRT5	SEPHS1	IL5	GNAS
CHEK2	LAMC1	SERPINF1	IL9	GUSBP6
CLDN6	LBX2	SHC1	KCNMB3	HERC3
COL3A1	LEFTY2	SHC2	KIAA0355	HM13
COL6A3	LRRCA7	SHC3	MGMT	KBTBD4
COPG2	LYPLA2	SLC22A2	MPP7	L3MBTL
CPA4	MARK14	SNAI2	MPZ	LINC00189
CXCL12	MCMS	SOX1	NEUROD6	MIR1296
CYP26C1	MDH1	SOX14	NRIP2	MIR215
DES	MEOX1	STAT3	NTNG2	MIRLET7C
DGCR8	MEST	TAT	OR252	MTHFD2P1
DLG7	MGC3101	TBX20	PDE6C	NAP1L5
DLX1	MUC3B	TGDF1	POLR1C	PEG10
DLX2	MYH11	TJP1	PRCP	SGCE
DPT3	MYL2	TJP3	PRSS22	SNORD11
DPPA4	NASP	TNNI1	PTH	SNORD114-9
EFEMP2	NNAT	TRIM8	RASSF5	STX19
EGF	NODAL	TTR	RNF185	
EGFR	ONECUT1	UBE2I	RUNX3	
ESRRB	ORC1L	USF1	SERPINA6	
FGF5	OTX2	UTF1	SERPINB5	
FGFR2	PABPC4	WNT5A	SLC2A9	
FOXD3	PAX4	ZFP42	SRMS	
FURIN	PDPK1		TESSP1	
GNAS	PEG10		UGT2B4	
GPR176	PIK3CA			
GPR19	PMAIP1			
GRB10	PRDX3			
GTI2	PRKCI			
GYLL1B	PSMB6			
H1FNT	PSMC3			NCOA7





Berntsen et al., 2019

- Γονεικοί παράγοντες
 - Γενετικοί
 - Ηλικία
 - Περιβάλλον
 - Ηλικία
- ART
 - Μέθοδος εξωσωματικής (ICSI?)
 - Ορμονοθεραπεία
 - Κατάψυξη
 - Δότες
 - Αριθμός εμβρύων που μεταφέρονται για εμφύτευση
 - Υλικά καλλιέργειας
 - Χρόνος σε καλλιεργητικό υλικό



Συμπεράσματα IVF

- Δεν υπάρχουν ακόμη ασφαλή συμπεράσματα για την σύνδεση ART και εμφάνιση συνδρόμων διαταραχής αποτύπωσης (BWS, AS & PW)
 - Λίγα περιστατικά
 - Το πιο κοινό σύνδρομο αποτύπωσης είναι το BWS (3-6% αύξηση)
 - Δημοσίευση με 1.316.500 φτ γεννήσεις & 14.894 μετά από ART παρατήρησε έως και 9X αύξηση κινδύνου εμφάνισης BWS
 - Ίσως η περιοχή 11q15 πιο ευαίσθητη σε επιγενετικές διαταραχές
 - Περισσότερο ευθύνεται η διαταραχή αποτύπωσης των μητρικών γονιδίων
- Δεν είναι γνωστό ποια στάδια της διαδικασίας ART ευθύνονται περισσότερο για τις επιγενετικές διαταραχές
 - **Γοναδοτροπίνες για διέγερση ωοθηκών**: μπορεί να ευθύνονται: πρόωρη απελευθέρωση των ωαρίων που δεν είχαν ολοκληρώσει τη διαδικασία αποτύπωσης (*Shi and Haaf 2002 σε έμβρυα ποντικών*)
 - **Διάφορα καλλιεργητικά υλικά**: μεταβάλλουν αποτύπωση σε ποντίκια και τα πρόβατα καθώς και η παρατεταμένη καλλιέργεια μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης (*Doherty et al., 2000; Khosla et al., 2001; Young et al., 2001*)

Επιγενετική και έμβρυο/ κύηση

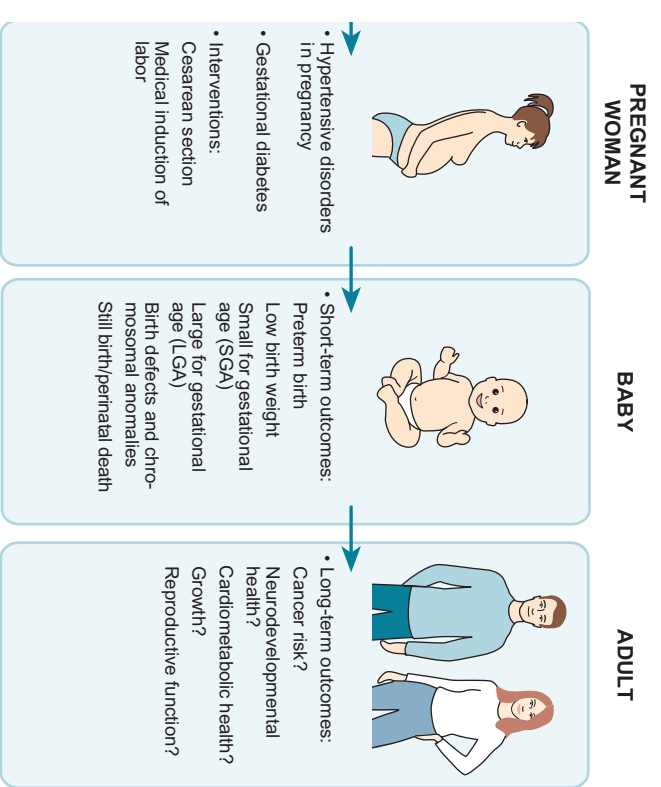
Εξωσωματική γονιμοποίηση / επιγενετικές αλλαγές στο έμβρυο

Διατροφή μητέρας κατά την κύηση/ περιβαλλοντικοί παράγοντες και
επιγενετική



Διατροφή μητέρας κατά την κύηση/ περιβαλλοντικοί παράγοντες και επιγενετική

- Το εμβρυϊκό επιγονιδίωμα είναι πιο ευαίσθητο κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης
- Ένα σφάλμα κατά την διάρκεια του κρίσιμου αυτού σταδίου μπορεί να έχει επιζήμιες επιπτώσεις στους απογόνους (παθολογικός φαινότυπος)
- Το περιβάλλον της μήτρας επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου μέσω επιγενετικής αναδιαμόρφωσης
- Η διατροφή, σωματομετρικοί δείκτες (BMI), άγχος της μητέρας κ.α. επιδρούν στο έμβryo μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων και αποτελούν παράγοντες αυξημένου κινδύνου για «μεταβολικό σύνδρομο»



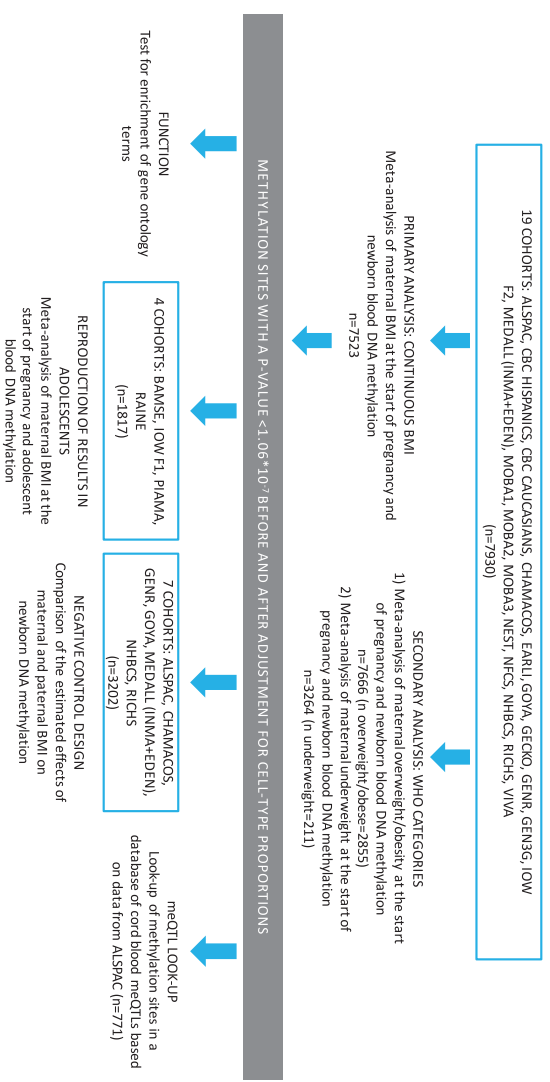
ΒΜΙ: μάζα σώματος -κύηση

- Η μητρική παχυσαρκία παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου σε απογόνους
 - Αντίσταση στην ινσουλίνη
 - Αυξημένη αρτηριακή πίεση
 - Αθυροσκήληρωση
- Μεγάλη μελέτη από Ολλανδία (1944-1945)-κατά την περίοδο λιμού έδειξε ότι η κακή διατροφή κατά την περίοδο της κύησης οδήγησε σε
 - Απογόνους με αυξημένο ΒΜΙ
 - Αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό
 - Αυξημένος κίνδυνος για αντίσταση στην ινσουλίνη
- Κακή μητρική διατροφή κατά το 2^ο τρίμηνο της κύησης οδήγησε σε
 - Νεογνά με χαμηλούς σωματομετρικούς δείκτες
 - Μειωμένη περίμετρο κεφαλής
- κακή διατροφή στην αρχή της κύησης οδήγησε σε
 - Σε τρυπτάσιο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου



Διατροφή μητέρας κατά την κύηση/ περιβαλλοντικοί παράγοντες και επιγενετική

- Μελέτη μετά-ανάλυσης συνδυασμού μητρικού BMI στην αρχή της κύησης και επιγονιδίωμα απογόνων [PACE (pregnancy and childhood epigenetics) consortium] περιέλαβε 19 διαφορετικές κοορτές [9,300 ζεύγη μητέρας/νεογνού]
 - 1,817 ζεύγη μητέρας-νεογνού σύγκριση μητρικού BMI στη αρχή της κύησης & μεθυλίωμα ενήλικων απογόνων



Διατροφή μητέρας κατά την κύηση/ περιβαλλοντικοί παράγοντες και επιγενετική

- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
 - Μητρικό BMI στην αρχή της κύησης συνδέεται με *μικρή διαφοροποίηση* της μεθυλίωσης σε 86 περιοχές του γονιδιώματος στο νεογνό. Από αυτές μόνο 8 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές
 - Ίσως οι μεγαλύτερες διαφορές να βρίσκονται όταν το μητρικό BMI είναι πολύ αυξημένο ή ελαττωμένο
 - Αυξημένο μητρικό BMI στην αρχή της κύησης συνδέθηκε με υπομεθυλίωση των γονιδίων *PTPRN2*, *IRX3* & *VIPR2* σε αίμα νεογνών

Table 5. A summary of the 8 sites where there is strongest evidence for a causal intrauterine effect of maternal BMI on newborn blood DNA methylation

CHR	CPG	Coordinate	Nearest gene	Illumina annotated gene	Relation to CPG island	Relation to gene	β^a at birth	P at birth	β^a at adolescence	P at adolescence
17	cg09243648	45944464	SP6				-6.0E-04	1.1E-09	-2.0E-05	8.9E-01
20	cg13403462	32256071	NECAB3	ACTL10/NECAB3	South shore	Body, 1 st Exon	-1.4E-03	2.4E-09	-1.6E-03	4.1E-03
1	cg20594982	976707	ACRN	ACRN	Island	Body	-1.0E-03	5.2E-09	-1.2E-03	1.5E-03
8	cg18144647	41113257	SFRP1				-5.2E-04	1.1E-08	-5.6E-04	9.1E-03
1	cg14528056	155194782	GABP1	GABP1	North shelf	Body	5.1E-04	1.5E-08	2.9E-04	1.7E-01
6	cg01963618	1102332	LINC01622	LOC285768		TSS1500	-3.5E-04	2.4E-08	-1.8E-04	1.9E-01
2	cg05113927	27531244	UCN	UCN	Island	TSS200	-6.1E-04	3.9E-08	-5.9E-04	9.4E-03
16	cg05635274	2866901	PRSS21	PRSS21	North shore	TSS1500	-4.8E-04	5.0E-08	-3.7E-04	2.1E-01

^aDifference in offspring DNA methylation beta value per 1 kg/m² increase in maternal pre-pregnancy BMI.

Γενικά η διαφοροποίηση μεθυλίωσης του γονιδιώματος κατά 25% οφείλεται σε γενετικούς, μόνο παράγοντες και 75% σε συνδυασμό γονοτύπου και *in utero* περιβαλλοντικών παραγόντων & μητρικού BMI



miRNAs & παχυσαρκία μητέρας-νεογνού

- 13 κυκλοφορούντα miRNAs έδειξαν διαφοροποίηση στην έκφραση στην σύγκριση φυσιολογικών και κυήσεων με αυξημένο μητρικό BMI
- Τα περισσότερα από αυτά τα miRNAs συσχετίζονται με διαφορετικό μητρικό μεταβολισμό (αύξηση BMI, αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξημένα λιπίδια στην κυκλοφορία)
- Τα miR29c, miR128a, miR221, miR340, miR423-5p, miR652 βρέθηκαν να σχετίζονται και με το βάρος του εμβρύου, νεογνού και πλάκούνται
- Τα miR29c, miR128a, miR221 βρέθηκαν ως σημαντικοί δείκτες πρόβλεψης βάρους νεογνού μέχρι τον 6^ο μήνα



Περιβαλλοντικοί παράγοντες Μητρικό στρες/ κάπνισμα/αλκοόλ

- Ο άξονας υποθάλαμου-θυροειδούς-επινεφριδίων υπόκειται σε επινενετικές τροποποιήσεις προκαλούμενες από στρες μέσω ρύθμισης των γλυκοκορτικοειδών και απόκριση σε κορτιζόλη
- Τα κύρια γονίδια του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού είναι τα
 - *NR3C1* (υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών)
 - *HSD11b1* & *HSD11b2* (ένζυμα μετατροπής της κορτιζόλης σε κορτιζόνη)
- Το πρότυπο μεθυλίωσης αυτών των γονιδίων μελετήθηκε σε μετα-ανάλυση και συνδέθηκε με ρύθμιση μεταβολισμού κορτιζόλης στον πλακούντα, δυσμενείς μητρικές εκθέσεις & υγεία νεογνού
 - Υψηλή διακύμανση βάρους νεογνού και μεθυλίωση των παραπάνω γονιδίων
 - Η μεθυλίωση του υποκινητή του *HSD11b2* ήταν στατιστικά υψηλότερη σε νεογνά με ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης (IUGR) ενώ χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης συνδέθηκαν με αυξημένη παχυσαρκία στα νεογνά
 - Μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του *NR3C1* συνδέθηκαν με διαβήτη κύησης και παχύσαρκα νεογνά



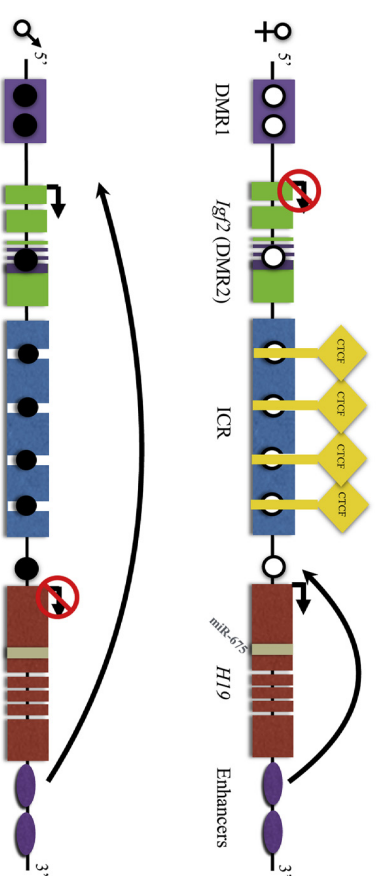
Περιβαλλοντικοί παράγοντες Μητρικό στρες/ κάπνισμα/αλκοόλ

- Το κάπνισμα κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης εκθέτει το νεογνό σε τοξίνες με αποτέλεσμα την κακή ομφαλο-πλακουντιακή κυκλοφορία, οξειδωτικό στρες και διαφοροποιήσεις στην έκφραση γονιδίων
 - Ο υποδοχέας του *NR3C1* (υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών) γονιδίου βράθηκε υπομεθυλωμένος σε δείγματα πλακούντα νεογνών που είχαν εκτεθεί σε τοξίνες καπνού
 - Η διαφοροποιημένη μεθυλίωση 8 νησίδων CpG στο γονίδιο *GF11* & 2 στο γονίδιο *NEUROG1* σχετιστηκαν με το βάρος του νεογνού
 - Συγκεκριμένα η διαφοροποιημένη μεθυλίωση 3 νησίδων CpG στο γονίδιο *GF11* μπορούσε να δικαιολογήσει σε ποσοστό 12-19% το κατά 202gr χαμηλότερο βάρος γέννησης νεογνών από μητέρες που κάπνιζαν
- Η χρήση αλκοόλ κατά την κύηση έχει βρεθεί ότι διαφοροποιεί νευροαναπτυξιακά μονοπάτια προκαλώντας το σ. εξάρτησης νεογνών από αλκοόλ (FASD)
 - Σε νεογνά με FASD βρέθηκε διαφοροποίηση μεθυλίωσης σε αποτυπωμένα γονίδια ή σε περιοχές που ελέγχουν την αποτύπωση αυτών των γονιδίων



H19/ μονοπάτι & IUGR

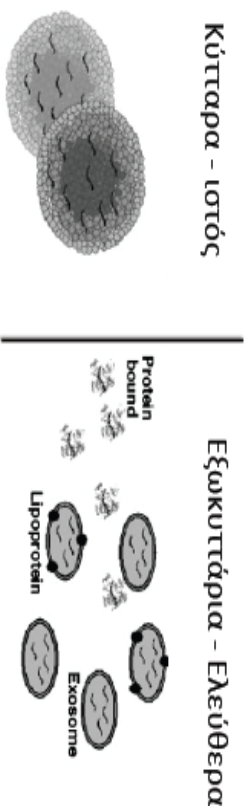
- Το *H19* είναι ένα μεγάλο μη κωδικοποιόν μόριο RNA (lncRNA) που εκφράζεται από το μητρικό αλληλόμορφο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και στη συνέχεια καταστέλλεται η έκφραση του στην πρώιμη νεογνική ζωή
- Ο υποδοχέας του *H19* περιέχει πολλές περιοχές διαφοροποιημένης μεθυλίωσης καθώς και πολλά σημεία πρόσδεσης παραγόντων ενίσχυσης ή καταστολής της μεταγραφής
- Η έκφραση του *H19* στον πλακούντα ρυθμίζεται και από το miR675 (βρίσκεται στο 1^ο ιντρόνιο του *H19* γονιδίου)
- Μειωμένη έκφραση του *H19* στον πλακούντα συνδέθηκε με ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης (IUGR) & μεταβολικό σύνδρομο σε μεγαλύτερη ηλικία



Μεθοδολογία Μοριακού ελέγχου/ μεθυλίωση/ miRNAs



Μεθοδολογία μελέτης / miRNAs

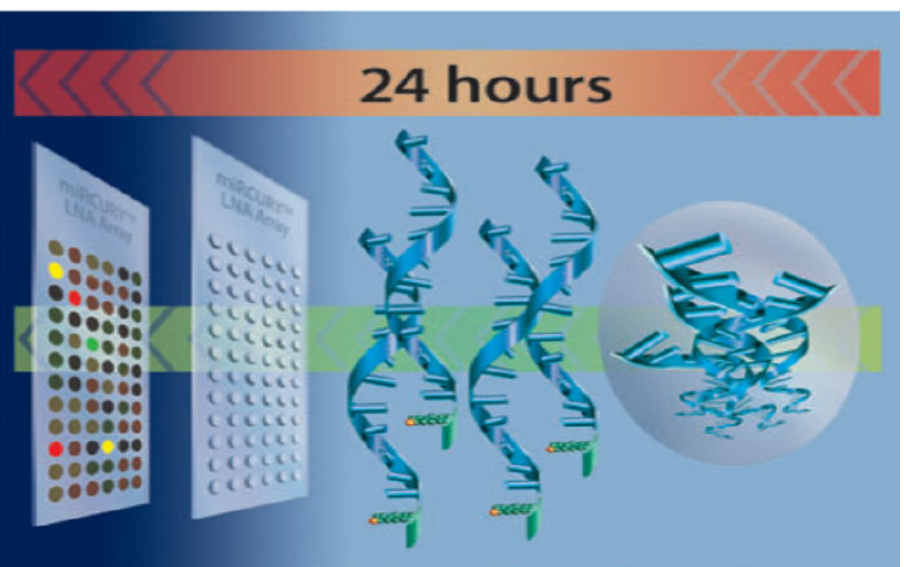


1. Απομόνωση ολικού RNA ή miRNA
• η ομοιογένεια των περιστατικών που εξετάζονται (ασθενείς και μάρτυρες)
• η ομοιογένεια των δειγμάτων που λαμβάνονται (είτε πρόκειται για κύτταρα, ιστό, εξωκυττάρια υγρό κ.τ.λ.)
• η μεθοδολογία για την απομόνωση των RNAs
2. Ποιοτική αξιολόγηση & ποσοτικοποίηση

1. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος σε μεγάλη κλίμακα (Large Scale profiling) για τον εντοπισμό των miRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων
 - a. Με μικροσυστοιχίες έκφρασης [SurePrint G3 Human miRNA, 8X60K platform (miRBase release 21.0, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) containing probes for the detection of 2549 human miRNAs]
 - b. qRT-PCR (ποσοτικό PCR)
 - c. NGS (miRNA expression profile αλλά και σύγκριση με τα αντίστοιχα mRNA)
2. Τελική αξιολόγηση (μέσω βιοπληροφορικών προγραμμάτων) της διαγνωστικής, προγνωστικής ή και θεραπευτικής σημασίας των miRNAs ως πιθανών βιοδεικτών



Βήματα για ένα πείραγμα miRNA

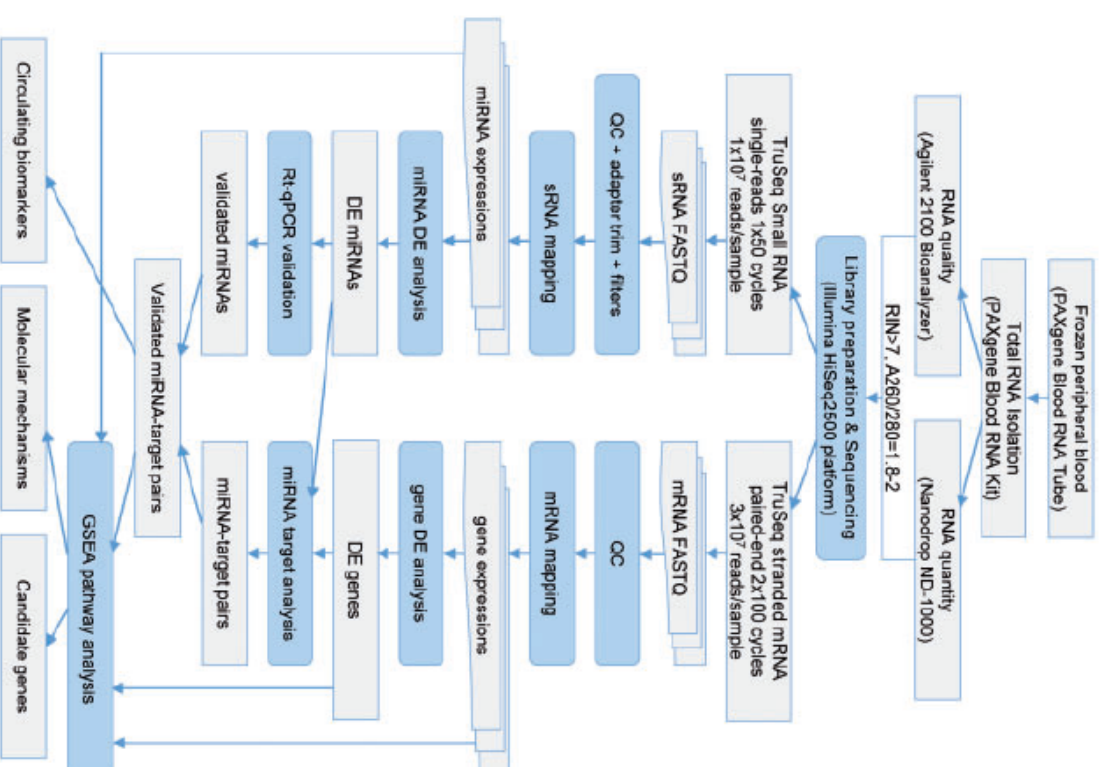


Προετοιμασία του δείγματος RNA (1-10 µg ολικού RNA)

Σήμανση του υποκλάτη RNA με Cy3 ή/και Cy5 φθορίζουσες χρωστικές

Υβριδοποίηση 20-24 ώρες

Οπτικοποίηση και βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων

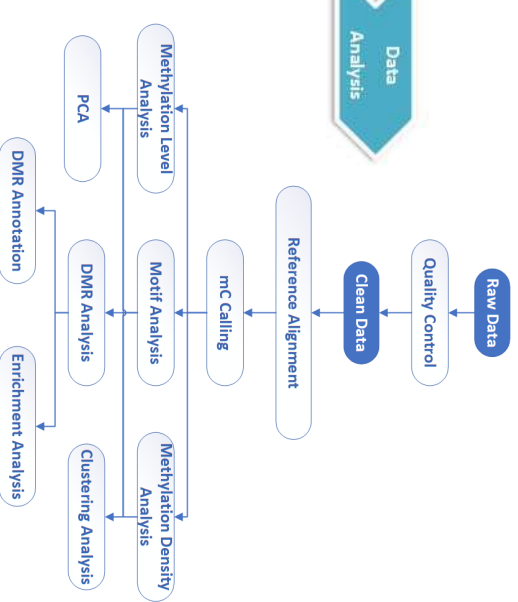
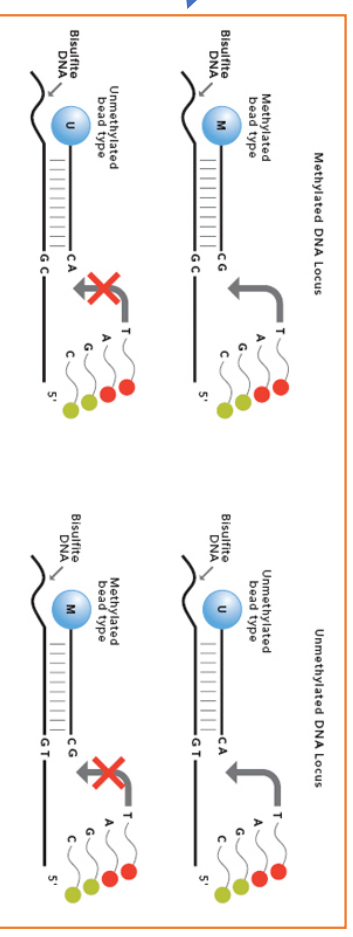


Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών



Μεθοδολογία ελέγχου περιοχών με διαφοροποιημένη μεθυλίωση σε όλο το γονιδίωμα

- Με μικροσυτοιχίες (illumina)
- Agilent methylation arrays
- Agilent: ανάλυση μεθυλωμένου DNA με ανοσοκατακρίμηση [immunoprecipitation (MDIP)].
 - 28,500 CpG islands with median resolution of 97 bp.
- Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS)

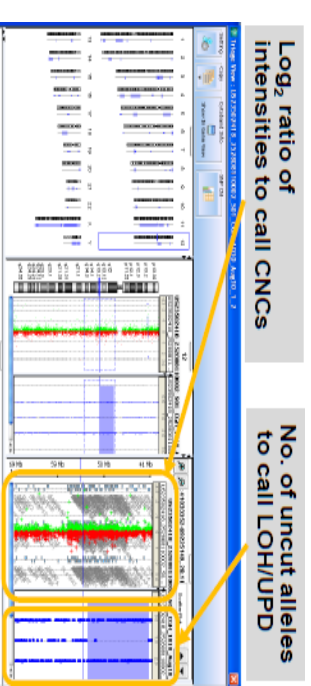
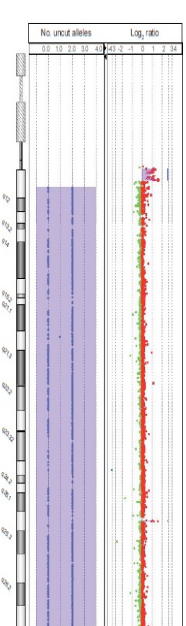


Huang, K., & Fan, G. (2010). DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view. *Regenerative medicine*, 5(4), 531-544.



Μεθοδολογία μοριακού ελέγχου/ προεμφυτευτική γενετική διάγνωση/προγεννητική διάγνωση

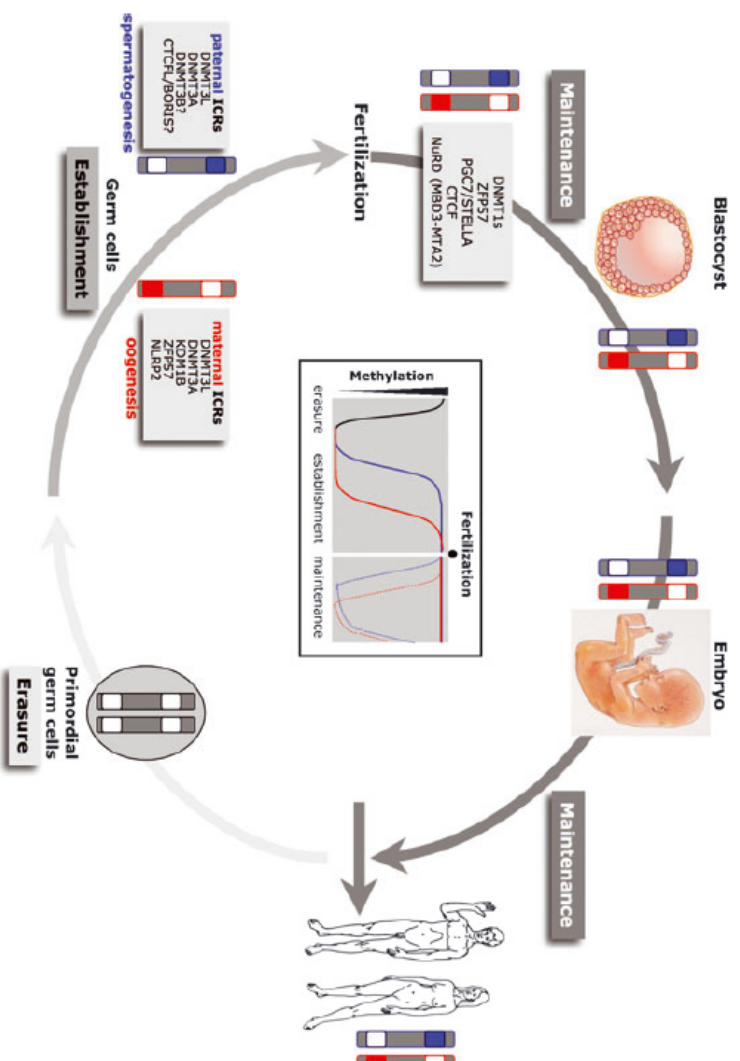
- ΠΓΔ (PGD) για μονογονιδιακές διαταραχές όπου η μοριακή διαταραχή είναι γνωστή (πχ CDKN1C-BWS)
- ΠΓΔ για σύνδρομα αποτύπωσης, μπορεί να ελέγξει με έμβryo (οικογενειακή μελέτη) την μονογονεϊκή δισωμία
- Στο εγγύς ίσως μέλλον WGS για ΠΓΔ εύρεση de novo μεταλλάξεων
- ΠΔ υπάρχουν περισσότερες επιλογές
 - Ειδική μεθοδολογία για εξέταση μεθυσίωσης του γονιδιώματος (PLAGL1, IGF2R, GRB10, MEST, ICR1, ICR2, SNRPN.....)
 - **Ειδικές υψηλής ευκρίνειας μικροσυστοιχίες (array-CGH) με ικανότητα εντοπισμού μονογονεϊκής δισωμίας**
 - **Ελαείμματα και μικροδευλασιασμούς**



Genomic status	Genotype	No. uncut allele
Normal diploid genome	AA, AB, BB	0, 1, 2
Diploid genome with copy neutral LOH or UPD	AA, BB	0, 2
Hemizygous LOH	A, B	0, 1
Amplification: e.g. trisomy	AAA, AAB, ABB, BBB	0, 1, 2, 3

- Περιοχές LOH εντοπίζονται με στατιστικά σημαντική μείωση ετεροζυγωτίας, γενωμικών περιοχών





ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

