

# Epigenetska osnova genomskog imprintinga: Prader - Willi i Angelman

---

**Tomac, Helena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:121488>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine  
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Helena Tomac**

**Epigenetska osnova genomskog  
imprintinga: Prader-Willi i Angelman**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Helena Tomac**

**Epigenetska osnova genomskog  
imprintinga: Prader-Willi i Angelman**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2015.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Maje Vlahović i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

|        |                                                                          |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|
| 5hmC   | 5-hidroksimetil citozin                                                  |
| 5mC    | 5-metil citozin                                                          |
| ADP    | adenozin difosfat                                                        |
| AS     | Angelman sindrom                                                         |
| ATP    | adenozin trifosfat                                                       |
| CpG    | eng. cytosine-phosphate-guanine, citozin-fosfat-guanin                   |
| DMD    | eng. differentially methylated domain, različito metilirane domene       |
| DNA    | eng. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kiselina                |
| Dnmt   | DNA metil transferaza                                                    |
| Dppa3  | eng. developmental pluripotency-associated protein 3                     |
| EEG    | elektroencefalografija                                                   |
| eng.   | na engleskom jeziku                                                      |
| FISH   | fluorescentna in situ hibridizacija                                      |
| GERB   | gastroezofagelna refluksna bolest                                        |
| grč.   | na grčkom jeziku                                                         |
| HAT    | eng. histone acetyltransferase, histonska acetiltransferaza              |
| HDAC   | eng. histon deacetylase, histonska deacetilaza                           |
| ICR    | eng. imprinting control region, kontrolna regija imprintinga             |
| LCR    | eng. low copy repeats                                                    |
| MBD    | eng. methyl-CpG binding domain, domena koje veže metilirane CpG sekvence |
| miRNA  | eng. microRNA                                                            |
| mRNA   | eng. messenger RNA, glasnička RNA                                        |
| ncRNA  | eng. non-coding RNA, nekodirajuća RNA                                    |
| PCR    | eng. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom             |
| PWS    | Prader-Willi sindrom                                                     |
| RISC   | eng. RNA-induced silencing complex                                       |
| RNA    | eng. ribonucleic acid, ribonukleinska kiselina                           |
| siRNA  | eng. small interfering RNA, mala interferirajuća RNA                     |
| snoRNA | eng. small nucleolar RNA, mala nukleolarna RNA                           |
| TDG    | timin-DNA glikozilaza                                                    |
| TET    | eng. ten-eleven translocation, metil-citozin dioksigenaza                |
| UBE3A  | eng. ubiquitin protein ligase E3A                                        |
| UPD    | uniparentalna disomija                                                   |

## SADRŽAJ

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 1. SAŽETAK.....                                            | i  |
| 2. SUMMARY .....                                           | ii |
| 3. UVOD .....                                              | 1  |
| 4. EPIGENETSKI MEHANIZMI REGULACIJE GENSKE EKSPRESIJE..... | 2  |
| 4.1. Metilacija DNA .....                                  | 3  |
| 4.2. Modifikacije histona .....                            | 6  |
| 4.3. Nekodirajuće RNA i RNA interferencija .....           | 8  |
| 5. GENOMSKI IMPRINTING .....                               | 10 |
| 5.1. Otkriće imprintinga.....                              | 10 |
| 5.2. Karakteristike imprintiranih gena .....               | 12 |
| 5.3. Ciklus imprintinga tijekom života .....               | 13 |
| 5.4. Bolesti povezane s imprintingom .....                 | 15 |
| 6. SINDROMI PRADER-WILLI I ANGELMAN .....                  | 17 |
| 6.1. Kliničke karakteristike PWS-a .....                   | 17 |
| 6.2. Kliničke karakteristike AS-a .....                    | 20 |
| 6.3. Molekularne karakteristike PWS-a i AS-a .....         | 23 |
| 6.3.1. Genetska etiologija.....                            | 23 |
| 6.3.2. Struktura kromosomske regije 15q11-q13.....         | 26 |
| 6.3.3. Mehanizmi imprintinga PWS/AS regije .....           | 28 |
| 6.3.4. Molekularna dijagnostika.....                       | 31 |
| 7. ZAHVALE .....                                           | 33 |
| 8. LITERATURA.....                                         | 34 |
| 9. ŽIVOTOPIS .....                                         | 40 |

# 1. Sažetak

## Epigenetska osnova genomskog imprintinga: Prader-Willi i Angelman

Helena Tomac

Genomski imprinting je epigenetski fenomen u kojem aktivnost gena ovisi o roditeljskom podrijetlu. Imprintirani gen je eksprimiran samo s jednog roditeljskog alela, dok je alel naslijeđen od drugog roditelja utišan (inaktiviran). Ova monoalela ekspresija je u suprotnosti sa klasičnim mendelovskim nasljeđivanjem u kojem oba alela jednako doprinose fenotipu. Genomski imprinting se ostvaruje epigenetskim modifikacijama koje se događaju tijekom gametogeneze i ranog embrionalnog razvoja te uključuju kemijske modifikacije DNA, bez promjena u slijedu nukleotida. Tri glavne i međusobno povezane epigenetske modifikacije su: metilacija CpG dinukleotida, kovalentne modifikacije histona i RNA interferencija. Imprintirani geni su grupirani u domene koje su bogate CpG otocima. Prvi i najbolje opisani genetski poremećaji ljudi, povezani s genomskim imprintingom, su Prader-Willi sindrom i Angelman sindrom. Svaki od ovih sindroma ima karakterističan fenotip sa neurorazvojnim abnormalnostima i poremećajima ponašanja i funkcioniranja. Iako su klinički potpuno različita dva poremećaja, Prader-Willi i Angelman sindromi su uzrokovani delecijom iste regije na proksimalnom dugom kraku kromosoma 15 (q11-q13). Razlika je u roditeljskom podrijetlu zahvaćenog kromosoma: funkcionalni gubitak paternalno eksprimiranih gena uzrokovat će Prader-Willi sindrom, a gubitak maternalno eksprimiranog UBE3A gena u mozgu vodit će u Angelman sindrom. Imprintirana ekspresija gena u 15q11-q13 regiji regulirana je PWS/AS imprinting centrom (IC), koji sadrži dvije funkcionalne regije: PWS-SO i AS-SRO. Maternalni obrazac je povezan s metilacijom PWS-SRO i nemetiliranim AS-SRO, dok je paternalni obrazac karakteriziran nedostatkom metilacije PWS-SRO i metiliranim AS-SRO.

**Ključne riječi:** epigenetika, DNA metilacija, genomski imprinting, 15q11-13, Prader-Willi sindrom, Angelman sindrom

## 2. Summary

### Epigenetic basis of genomic imprinting: Prader-Willi and Angelman

Helena Tomac

Genomic imprinting is epigenetic phenomenon where gene activity is regulated according to parent of origin. Imprinted gene is expressed from only one allele, while the allele inherited from the other parent is silenced (inactivated). This monoallelic expression is in contrast to classical Mendelian inheritance where both alleles contribute to phenotype equally. Genomic imprinting is maintained by epigenetic modifications that occur during gametogenesis and early embryonic development and include chemical modifications to the DNA, with no alterations in the base sequence. Three main and interconnected epigenetic mechanisms are: methylation of CpG dinucleotides, covalent modifications of histones, and RNA interference. Imprinted genes are clustered into domains, rich in CpG islands. The first and best described human genetic disorders associated with genomic imprinting are Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. Each of these syndromes has its characteristic phenotype with neurodevelopmental abnormalities and behavioral and functional difficulties. Although clinically two distinct disorders, Prader-Willi and Angelman syndromes are caused by the deletion of the same region on the proximal long arm of chromosome 15 (q11-q13). The difference is the parental origin of the affected chromosome: functional loss of paternally expressed genes will cause Prader-Willi syndrome, and loss of maternal UBE3A expression in the brain will lead to Angelman syndrome. Imprinted expression of the genes in 15q11-q13 region is controlled by PWS/AS imprinting center (IC), comprising two functional regions: the PWS-SRO and the AS-SRO. The maternal state is associated with methylation of the PWS-SRO and unmethylated AS-SRO, while the paternal state is characterized with lack of methylation of the PWS-SRO and methylated AS-SRO.

**Key words:** epigenetics, DNA methylation, genomic imprinting, 15q11-13, Prader-Willi syndrome, Angelman syndrome

### 3. Uvod

Čovjek nasljeđuje po jedan od para homolognih kromosoma od svakog roditelja. Kod većine autosomnih gena fenotip je rezultat ekspresije oba alela. Međutim, postoji mala skupina gena koja odstupa od Mendelovih načela klasične genetike i sadrži gene eksprimirane samo s jednog alela, ovisno o tome od kojeg roditelja je naslijeđen, dok je alel naslijeđen od drugog roditelja utišan (Mann and Bartolomei, 1999). Proces obilježavanja gena tijekom gametogeneze koji omogućuje kasnije u odraslom organizmu razlikovanje koji alel je majčinog podrijetla, a koji očevog i sukladno tome monoalelnu ekspresiju, naziva se genomski imprinting (Nakao and Sasaki, 1996). Zbog različitog obilježavanja, genom majke i genom oca nisu funkcionalno jednaki te su oba genoma potrebna za normalan embrionalni razvoj, a što je i dokazano embriološkim manipulacijama na miševima (Ferguson-Smith, 2011).

Genomski imprinting ostvaruje se epigenetskim modifikacijama. Epigenetske modifikacije su nasljedne kemijske promjene koje nemaju utjecaj na slijed nukleotida genomske DNA, uspostavljaju se tijekom gametogeneze i preimplantacijskog embrionalnog razdoblja, a najvažnija od njih je diferencijalna metilacija DNA. Budući da su imprintirani geni podložni ne samo mutacijama primarne strukture DNA, već i poremećajima epigenetske regulacije, a njihova vulnerabilnost je još više potencirana monoalelnom ekspresijom, oni su uključeni u niz sindroma, poremećaja embrionalnog razvoja pa čak i karcinogenezu. Prvi genetski poremećaji ljudi za koje je ustanovljeno da uključuju imprintirane gene su Prader-Willi sindrom i Angelman sindrom. Analize pacijenata s ova dva sindroma su omogućile identificiranje genske osnove te bolje razumijevanje regulacije imprintiranih gena, što je od izuzetne važnosti radi bolje i ranije dijagnostike, genetskog savjetovanja i potencijalne genske terapije.

Cilj ovog preglednog rada je opisati epigenetski fenomen genomskog imprintinga kod ljudi, s posebnom pažnjom na epigenetske modifikacije i molekularne mehanizme kojima one ostvaruju regulaciju ekspresije gena, uključujući i imprintiranih, te prikazati ove procese na konkretnim primjerima dva najbolje proučena i okarakterizirana poremećaja imprintinga - Prader-Willi i Angelman sindromu.

#### 4. Epigenetski mehanizmi regulacije genske ekspresije

Epigenetika je područje genetike i molekularne biologije koje se bavi istraživanjem procesa koji mijenjaju ekspresiju gena, bez utjecaja na slijed nukleotida u molekuli DNA i pod uvjetom da se nastala promjena nasljeđuje na stanice kćeri tijekom mitoze i mejoze (Wu and Morris, 2001). Naziv epigenetika (*epi-* grč. iznad ili preko) je skovao britanski embriolog Conrad Waddington 1942. godine proučavajući diferencijaciju i održavanje specijaliziranih funkcija stanica nakon dijeljenja.

Svaka stanica tijela čovjeka sadrži identičnu genomsku DNA informaciju, no stanice se ipak međusobno izrazito razlikuju svojom strukturom i funkcijom zahvaljujući ekspresiji različitih gena u različitim stanicama. Regulacija koji će geni u pojedinoj stanici biti eksprimirani, a koji inaktivni može se okvirno podijeliti na dva načina. Prvi, temeljni način pripada tradicionalnom Mendelovom modelu nasljeđivanja i centralnoj dogmi molekularne biologije (Crick, 1970), a odnosi se na regulaciju transkripcije DNA putem transkripcijskih aktivatora i represora, te regulaciju stabilnosti glasničke RNA molekule (mRNA, eng. *messenger RNA*). Ovaj način regulacije je određen slijedom nukleotida u genomu i promjenama u tome slijedu, kao što su polimorfizmi i mutacije DNA.

Drugi, dodatni način regulacije genske ekspresije su epigenetske modifikacije. To su kovalentne kemijske reakcije koje mijenjaju molekulu DNA i njezinu kondenzaciju u kromatin, bez promjene primarne strukture odnosno slijeda nukleotida. Budući da je zgusnuti, visoko kondenzirani kromatin (tzv. heterokromatin) transkripcijski inaktivan, a slabo kondenzirani, raspršeni kromatin (tzv. eukromatin) transkripcijski aktivan, mijenjanjem stupnja kondenzacije, ove modifikacije određuju koji geni će se prepisivati, a koji ne. Glavne epigenetske modifikacije su metilacija CpG dinukleotidnih sekvenci DNA, posttranslacijske modifikacije histonskih N-terminalnih krajeva i proces RNA interferencije. Uspostavljeni obrasci epigenetskih modifikacija se nasljeđuju nakon diobe na stanice kćeri. Međutim, za razliku od DNA sekvence koja u svim stanicama kćerima ostaje ista, epigenetski obrasci su podložni promjenama i smatraju se glavnim načinom na koji vanjski, okolišni čimbenici, kao što su primjerice pušenje, prehrana i stres, mijenjaju aktivnost gena. Nastale promjene

nasljeđuju se nakon mitoze na stanice kćeri, tijekom mejoze s roditelja na potomke, a izgleda i transgeneracijski na sljedeće generacije potomaka (Trerotola et al., 2015).

Akumuliranje različitih epigenetskih promjena utječe na kompleksne fenotipske karakteristike kao što su visina, tjelesna kompozicija, brzina metaboliziranja hrane, plodnost, starenje itd. Također je uključeno u razvoj različitih multifaktorskih bolesti povezanih sa nasljeđem kao što su pojedini karcinomi, dijabetes tipa 2, pretilost, plućne i kardiovaskularne bolesti, metabolički poremećaji i neurološka oboljenja. Različiti epigenetski obrasci odgovorni su za razlike u fenotipu jednojajčanih blizanaca koje nastaju tijekom njihovog života (Fraga et al., 2005). Naime, oni nasljeđuju identičnu DNA informaciju od roditelja i na početku života njihovi metilacijski obrasci su jednaki, no ako su izloženi različitim okolišnim uvjetima, akumuliraju različite epigenetske modifikacije, koje zatim utječu na ekspresiju gena i ispoljavanje različitih fenotipskih karakteristika.

#### **4.1. Metilacija DNA**

Metilacija DNA je glavni i najbolje proučeni epigenetski mehanizam, koji ima ključnu ulogu u genomskom imprintingu, inaktivaciji X kromosoma i tkivno specifičnoj ekspresiji gena za vrijeme razvitka organizma (Moore et al., 2013). To je proces inaktivacije (utišavanja, eng. *silencing*) gena kovalentnim dodavanjem metilne (CH<sub>3</sub>) skupine na 5. ugljikov atom citozina, pri čemu nastaje baza 5-metil citozin (5mC). Ciljno mjesto je citozin koji se nalazi u dijelovima DNA u kojima iza citozina slijedi guanin, tzv. CpG dinukleotidnim sekvencama (od eng. *cytosine-phosphate-guanine*) (Shiota, 2004). Oko 80% CpG dinukleotida u ljudskom genomu je metilirano (Ziller et al., 2013). Područja DNA izrazito bogata CpG sekvencama nazivaju se CpG otocima, a definirana su duljinom većom od 500 parova baza te sadržajem nukleotida C+G većim od 55% (Waggoner, 2007). CpG otoci se najčešće nalaze na 5' kraju aktivnih gena, unutar promotorske regije i u nemetiliranom su stanju.

Mehanizmi kojim metilacija CpG sekvenci koči ekspresiju gena su izravno sprječavanje vezanja transkripcijskih faktora, ili privlačenje drugih proteina sa visokom afinitetom za 5mC koji će potom interferirati sa vezanjem transkripcijskih faktora. Proteini koji se vežu na 5mC su tzv. MBD proteini, UHRF proteini i proteini s motivom cinkovih prstiju (eng. *zinc-finger*

*proteins*). MBD proteini sadrže domenu za vezanje CpG sekvenci po čemu su i dobili ime (MBD, eng. *methyl-CpG binding domain*), a članovi ove proteinske obitelji su: MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2 i MBD3 (Hendrich and Bird, 1998). MBD proteini selektivno prepoznaju i reorganiziraju simetrično metilirane CpG sekvence, a jedan od načina na koji zaustavljaju transkripciju je preko modifikacija histona privlačenjem histonskih deacetilaza (Fuks et al., 2003). UHRF proteinska obitelj (od eng. *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain*) obuhvaća UHRF1 i UHRF2 (Moore et al., 2013), čija je primarna uloga zapravo vezanje na enzim Dnmt1 tijekom održavanja obrasca metilacije nakon replikacije DNA.

Donor metilne skupine je S-adenozil-L-metionin, a njen prijenos na DNA se odvija pomoću dvije obitelji DNA metiltransferaza (Dnmt): DNA metiltransferaze za održavanje metilacije (Dnmt1 obitelj) i *de novo* DNA metiltransferaze (Dnmt3 obitelj). U prošlosti je obitelji DNA metiltransferaza pripisavana i Dnmt2, no pokazalo se da ona nema katalitičku aktivnost, a otkrivena je njezina uloga u metilaciji transportne RNA (Dong et al., 2001, Goll et al., 2006).

Dnmt1 katalizira proces održavanja istog metilacijskog obrasca u stanicama kćerima nakon semikonzervativne replikacije DNA. Naime, novosintetizirani lanac, koji je nastao prema „kalupu“ starog, metiliranog lanca, je nemetiliran i njegova metilacija se događa naknadno, odmah nakon transkripcije. Dnmt1 je prisutna u visokim koncentracijama u stanicama koje se dijele, i to prvenstveno u replikacijskim rašljama, gdje specifično prepoznaje hemimetilirane CpG sekvence zahvaljujući interakciji s UHRF1 proteinom.

Dnmt3 obitelj sadrži dva aktivna *de novo* enzima, Dnmt3a i Dnmt3b, te jedan regulacijski faktor, Dnmt3L (Hashimoto et al., 2010). Dnmt3a i 3b nemaju afinitet prema hemimetiliranim sekvencama, već kataliziraju uspostavljanje novih metilacijskih obrazaca tijekom gametogeneze i postimplantacijskog perioda embrionalnog razvitka.

Da bi se uspostavili novi metilacijski obrasci potrebno je obrisati stare obrasce roditeljskih genoma. Tijekom stvaranja gameta odvija se prvi val demetilacije kojim se metilacijski obrasci brišu u čitavom genomu kako bi se uspostavili novi koji odražavaju spol potomka. Drugi val globalne demetilacije se događa nakon oplodnje, tijekom ranih mitotskih dioba prije implantacije, a pretpostavlja se da mu je svrha omogućavanje uspostavljanja totipotentnosti

zigote (Šerman et al., 2006). Međutim, ovaj val demetilacije zaobilazi imprintirane gene, čiji roditeljski obrasci ostaju sačuvani (Adalsteinsson and Ferguson-Smith, 2014). Nakon što su stari obrasci obrisani, u vrijeme implantacije blastociste, Dnmt3 enzimi započinju *de novo* metilaciju, a novi obrazac se vjerno prenosi na stanice kćeri tijekom somatskih dioba rastućeg organizma pomoću Dnmt1 enzima.

Brisanje obrazaca metilacije DNA, odnosno demetilacija, može se odvijati aktivno i pasivno. Do sada nije otkriven jedan enzim (demetilaza) koji bi direktno prekidao vezu između dva ugljika citozina i metilne skupine, ali je identificiran slijed reakcija kojima se demetilacija odvija. Aktivna demetilacija događa se neovisno o replikaciji i podrazumijeva uklanjanje 5-metil citozina (5mC) pomoću ezimske obitelji TET (od eng. *ten-eleven translocation*) metil-citozin dioksigenaza, čime nastaje 5-hidroksimetil citozin (5hmC) (Trerotola et al., 2015). Zatim se 5hmC, također pomoću TET enzima, konvertira u 5-formil citozin (5fC) i 5-karboksil citozin (5caC). 5fC i 5caC se izrezuju pomoću timin-DNA-glikozilaze (TDG) i zatim popravkom DNA, postupkom izrezivanja nukleotida bez baze, ponovno nastaje citozin (Kohli and Zhang, 2013). 5mC i 5hmC su podložni spontanoj deaminaciji u timidin odnosno hidroksi-metil uracil, koji također nakon popravka DNA izrezivanjem daju citozin (Messerschmidt et al., 2014). Pasivna demetilacija DNA odnosi se na postupan gubitak 5mC na novosintetiziranom lancu tijekom sukcesivnih replikacija DNA, zbog nedostatka ili destabilizacije enzima za održavanje metilacije, Dnmt1. U muškom pronukleusu odvija se aktivna demetilacija i završena je već prije prve replikacije DNA zigote, dok se u ženskom pronukleusu odvija sporija, pasivna demetilacija ovisna o replikaciji DNA (Dean et al., 2003).

Uspostavljanje i brisanje obrazaca metilacije DNA u zametnim je stanicama kao i u ranom embriju podložno utjecajima iz okoliša, čije se posljedice transgeneracijski nasljeđuju. Naime, istraživanja su pokazala da faktori okoline kao što su endokrini disruptori ili prehrana trudne majke siromašna folatima, ako djeluju u kritičnom razdoblju reprogramiranja, mogu izazvati poremećaje koji se mogu prenositi i na nekoliko slijedećih generacija (Šerman et al., 2006).

## 4.2. Modifikacije histona

Sljedeća epigenetska modifikacija su kovalentne posttranslacijske modifikacije aminokiselinskih ostataka na N-terminalnim krajevima histona. Histoni su globularni bazični proteini oko kojih je molekula DNA namotana i kondenzirana u nukleosome. Srž svakog nukleosoma je histonski oktamer, kojeg čine četiri histonska proteina (H2A, H2B, H3 i H4), svaki zastupljen po dva puta. Oko histonskog oktamera je namotano 147 parova baza dvolančane DNA. Nukleosomi su ponavljajuće strukturne jedinice kromatina, koje omogućuju zbijanje dugačke molekule DNA u visoko kondenzirani kromatin odnosno kromosome. Kao što smo već spomenuli, o stupnju kondenzacije kromatina ovisi dostupnost gena transkripcijskim faktorima i njihova ekspresija.

Histonski kod predstavlja jedinstvenu kombinaciju različitih posttranslacijskih kovalentnih modifikacija histona koje se događaju u slijedu ili u kombinaciji, na jednom ili više histonskih repova, i tako dovode do točno određenog biološkog učinka, npr. transkripcije (Strahl and Allis, 2000). Posttranslacijske modifikacije histonskih proteina su brojne i uključuju acetilaciju lizina, metilaciju lizina i arginina, fosforilaciju serina, treonina i tirozina; ubikvinaciju lizina, sumoilaciju lizina, citrulinaciju arginina, izomerizaciju prolina i druge. Ove reakcije se događaju prvenstveno na N-terminalnim krajevima (repovima, eng. *tails*) histona izloženima na površini nukleosoma.

Posttranslacijske modifikacije histona dvojako utječu na strukturu kromatina - fizikalnim i kemijskim reakcijama. Fizikalni utjecaj ostvaruju kroz elektrostatske interakcije i promjene raspodjele elektronskog naboja što mijenja konformaciju kromatina. Primjerice, acetilacija histona dovodi do neutralizacije pozitivnog naboja, a fosforilacija do dodavanja negativnog naboja, te budući da je DNA negativno nabijena, dolazi do međusobnog odbijanja zbog istoimenih naboja i time do dekonenzacije kromatina (Roth and Allis, 1992). Kemijski utjecaj ostvaruju interakcijama između histona i efektorskih proteina. Naime, kombinacija modifikacija na pojedinom histonu potiče ili inhibira vezivanje specifičnih nehistskih proteina i proteinskih kompleksa, a oni imaju svoju enzimatsku aktivnost (npr. remodelirajuće ATP-aze) koja dovodi do daljnjeg remodeliranja kromatina (Kouzarides, 2007).

Najučestalije i najbolje istražene modifikacije su acetilacija, fosforilacija i metilacija. Acetilacija histona se odvija na N-terminalnim krajevima lizinskih ostataka i povezana je s aktivacijom transkripcije gena. Proces acetilacije reguliraju dvije enzimske obitelji suprotnog djelovanja, histonske acetiltransferaze (HAT, eng. *histone acetyltransferase*) i histonske deacetilaze (HDAC, eng. *histon deacetylase*). Acetilacija N-terminalnih krajeva lizina neutralizira njegov pozitivni naboj, što smanjuje elektrostatsko privlačenje između histonskih repova i negativno nabijene DNA, te time dolazi do raspršivanja kromatina (nastaje eukromatin) i DNA na tom području postaje dostupna transkripcijskim faktorima i RNA polimerazi. Analogno tome, histonske deacetilaze će uklanjanjem acetilnih grupa sa lizinskih ostataka dovesti do jačeg privlačenja i nastanka kondenziranog, transkripcijski inaktivnog heterokromatina.

Sljedeća modifikacija histona je fosforilacija, reakcija katalizirana enzimima kinazama i fosfatazama. Najčešće se odvija na serinskim, treoninskim i tirozinskim proteinskim ostacima. Kinaze prenose fosfatnu skupinu sa molekule ATP-a na hidroksilnu skupinu ciljne aminokiseline, dodajući na taj način negativan naboj histonskim repovima, zbog čega dolazi do kondenzacije kromatina. Osim u regulaciji transkripcije gena, fosforilacija histona ima i važnu ulogu u kondenzaciji kromosoma tijekom stanične diobe (Koshland and Strunnikov, 1996).

Metilacija histona se najčešće odvija na lizin i argininu. Lizin može biti mono-, di- i trimetiliran, a arginin mono- i (simetrično ili asimetrično) di-metiliran (Bannister and Kouzarides, 2011). Za razliku od acetilacije koja je povezana s transkripcijski aktivnim kromatinom, metilacija može dovesti i do aktivacije i do represije transkripcije, ovisno na kojem lizinskom ostatku se odvija. Tako je metilacija lizina 4 na histonu H3 (H3K4) i lizina 36 na histonu H3 (H3K36) povezana s transkripcijski aktivnim kromatinom, a metilacija H3K9, H3K27 i H4K20 ima suprotan učinak i povezana je s visoko kondenziranim kromatinom (Bernstein et al., 2007).

Mehanizmi kojima se obrasci posttranslacijskih kovalentnih modifikacija histona nasljeđuju na stanice kćeri i prenose transgeneracijski nisu do kraja razjašnjeni, ali poznato je da imaju indirektan utjecaj preko metilacije CpG sekvenci (Rose and Klose, 2014). Primjerice, nemetilirani lizin 4 na H3 histonu (H3K4) služi kao mjesto spajanja enzima Dnmt3a

(Trerotola et al., 2015) za kojeg smo spomenuli da katalizira *de novo* metilaciju ciljnih nukleotida. Nadalje, dimetilirani histon H3K9 ulazi u interakciju s Dppa3 proteinom (eng. *developmental pluripotency-associated protein 3*) i tako blokira aktivnost TET enzima, što sprječava proces aktivne demetilacije.

#### 4.3. Nekodirajuće RNA i RNA interferencija

Nekodirajuće RNA molekule (ncRNA, eng. *non-coding RNA*) su RNA koje se prepisuju, ali ne prolaze translaciju u proteine. Iako se prije smatralo da je fenotip definiran isključivo DNA sekvencom koja kodira za proteine, a da je ostala DNA „smeće“ nakupljeno u genomu tijekom evolucije, danas je jasna funkcija ncRNA u regulaciji transkripcije, translaciji, izrezivanju (eng. *splicing*) i genskoj ekspresiji.

Epigenetski važne ncRNA se mogu podijeliti u dvije skupine: male ncRNA (veličine od 20 do 30 nukleotida) koje sudjeluju u RNA interferenciji, i duge ncRNA (sastoje se od više od 200 nukleotida) koje su dio imprintiranih domena.

Najvažnije male dvolančane ncRNA molekule su: miRNA (eng. *micro RNA*), siRNA (eng. *short interfering RNA*) i piRNA (eng. *Piwi-interacting RNA*). Mehanizam kojim utječu na gensku ekspresiju se naziva RNA interferencija. To je proces posttranskripcijskog utišavanja ciljnih gena cijepanjem ili razgradnjom komplementarne jednolančane mRNA (Deng et al., 2014). Male ncRNA molekule se vežu na tzv. RISC proteinski kompleks (eng. *RNA-induced silencing complex*) unutar kojeg se dva lanca razdvoje kako bi jedan služio kao vodič RISC-a prema komplementarnom mRNA lancu (Du and Zamore, 2005). Zatim protein *Argonaute*, koji je aktivni dio RISC kompleksa, djeluje kao endonukleaza i cijepa mRNA te na taj način zaustavlja ekspresiju odgovarajućeg gena. Članovi *Argonaute* proteinske obitelji su Ago proteini i Piwi proteini. Ago proteini su ubikvitarni i vežu siRNA i miRNA, a Piwi proteini se nalaze pretežno u gametama i vežu piRNA (Hock and Meister, 2008).

Duge ncRNA sudjeluju u novačenju enzima koji modificiraju kromatin, u regulaciji transkripcije, posttranskripcijskoj regulaciji te služe kao prekursori siRNA. Najbolje istraženi primjeri djelovanja dugih ncRNA molekula su njihova uloga u inaktivaciji X kromosoma i u

genomskom imprintingu. Dvije duge ncRNA molekule, Xist i Tsix, sudjeluju u procesu inaktivacije nasumično odabranog X kromosoma kod žena tijekom ranog razvoja. Xist oblaže budući inaktivni X kromosom na kojem potiče metilaciju lizina na H3 histonu i time formiranje transkripcijski inaktivnog kromatina; dok njegova *antisense* RNA, Tsix, na budućem aktivnom X kromosomu potiče metilaciju DNA na promotorskoj regiji Xist RNA, sprječavajući na taj način aktivnost Xist na tom kromosomu i omogućujući ekspresiju X-vezanih gena (Mohammad et al., 2009).

Duge ncRNA nalaze se u velikom broju i u imprintiranim regijama genoma. Imprintirani geni najčešće dolaze u nakupinama (klasterima, eng. *clusters*) u genomu i iako se većinom sastoje od mRNA koje kodiraju za proteine, svaki klaster ima bar po jednu ncRNA. Imprintirane ncRNA su eksprimirane sa suprotnog alela od onog na kojem su eksprimirane mRNA u tom klasteru (O'Neill, 2005). Dakle, ako se u imprintiranoj domeni nasljeđenoj od oca ncRNA prepisuje, preostale mRNA u toj domeni će biti inaktivne, a istovremeno na kromosomu nasljeđenom od majke ncRNA se ne prepisuje, dok su mRNA eksprimirane. Zbog ovakvog obrasca ekspresije se pretpostavlja da prepisana imprintirana ncRNA dovodi do utišavanja susjednih gena koji kodiraju za proteine (Wan and Bartolomei, 2008).

## 5. Genomski imprinting

Čovjek nasljeđuje po jedan od para homolognih, autosomnih kromosoma od svakog roditelja te se pojedini gen sastoji od jednog alela majčinog i jednog alela očevog podrijetla. Genomski imprinting je epigenetski reguliran proces utišavanja jednog od alela, u ovisnosti o tome je li nasljeđen od majke ili oca, što dovodi do monoalelne ekspresije toga gena bez promjene u slijedu DNA. Time odstupa od Mendelovih načela klasične genetike prema kojima oba alela jednako utječu na fenotip. Postojanje genomskog imprintinga dokazano je embrionalnim i genetskim manipulacijama s mišjim zametcima. Iako je manji dio ljudskih gena imprintiran, oni su presudni za normalan rast i razvoj, a mutacije imprintiranih gena su odgovorne za razna patološka stanja i sindrome. Prve bolesti ljudi za koje je nađena povezanost s imprintingom bile su Prader-Willi sindrom i Angelman sindrom. Imprintirani geni se u genomu grupiraju u domene, a svaka domena je pod kontrolom imprinting centra koji je reguliran epigenetskim modifikacijama. Imprinting centri su bogati CpG dinukleotidima i različito su metilirani na očevom i majčinom kromosomu. Obrasci metilacije uspostavljaju se u majčnim i očevim gametama, održavaju se za vrijeme embriogeneze i u somatskim stanicama, a u vlastitim gametama se brišu i uspostavljaju se novi. Mnoga epigenetska načela i važnost epigenetskih modifikacija u ranom rastu i razvoju otkrivena su upravo zahvaljujući istraživanjima genomskog imprintinga.

### 5.1. Otkriće imprintinga

Proces genomskog imprintinga dokazan je kod sisavaca ranih 1980-ih godina eksperimentima kojima su laboratorijski napravljene mišje zigote od dva ženska ili dva muška pronukleusa, što je rezultiralo abnormalnim razvitkom i spontanim pobačajem odmah nakon implantacije (McGrath and Solter, 1984, Surani et al., 1984). Time je dokazano da su i majčin i očev genom neophodni za uredan embrionalni razvitak te da njihova funkcija nije jednaka. Na različitu ulogu roditeljskih genoma upućuju i abnormalne oplodnje kod ljudi, tzv. kompletna i parcijalna hidatiformna mola, kao i teratomi jajnika. Kompletna hidatiformna mola je karakterizirana diploidnim kariotipom u kojem su svi kromosomi paternalnog podrijetla, a nastaje oplodnjom jajne stanice koja je izgubila svoju DNA, spermijem koji tada udvostruči svoje kromosome. Rezultat je stvaranje nakupine ekstraembrionalnog tkiva bez razvijenog

embrija. Nadalje, diploidne stanice sa oba seta kromosoma maternalnog podrijetla nalaze se u teratomima jajnika u kojima dolazi do razvoja embrionalnih tkiva (endoderma, mezoderma i ektoderma), ali bez razvoja placente. Poznati su i ljudski triploidni zameci, koji redovito završavaju ranim spontanim pobačajem. Ako su triploidni zameci sačinjeni od dva seta paternalnih kromosoma i jednog seta maternalnih (androidi), rezultiraju stvaranjem velike cistično promijenjene placente (parcijalna hidatiformna mola), a ako su prisutna dva seta majčinih i jedan set očevih kromosoma (ginoidi), prisutna je mala nerazvijena placenta (Hall, 1990). Iz ovih opažanja slijedi zaljučak da je maternalni genom neophodan za rast i razvoj embrija odnosno fetusa, ali nije sposoban proizvesti ekstraembrionalna tkiva, dok je genom očevog podrijetla odgovoran za rast placente i fetalnih membrana (Clarke, 1990).

Osim na razini kompletnog genoma, dokazano je da se monoalelna ekspresija gena ovisna o roditeljskom podrijetlu, manifestira i na kromosomskoj i subkromosomskoj razini, te naposljetku i na razini pojedinog gena. Na razini kromosoma genomski imprinting je prvo dokazan pokusima na miševima u kojima su parenjem miševa s balansiranim translokacijama dobiveni potomci s uniparentalnom disomijom cijelog jednog kromosoma (Robertsonove translokacije) ili dijela kraka kromosoma (recipročne translokacije) (Cattanach and Kirk, 1985, Searle and Beechey, 1990). Uniparentalna disomija je pojava nasljeđivanja oba kromosoma istog homolognog para od samo jednog roditelja. Ova pojava na pojedinim kromosomima nije proizvela nikakav zapaženi učinak, dok je prisutna na drugim kromosomima utjecala na fenotip ili čak bila letalna. Time su identificirane i konkretne regije koje dovode do različitog učinka ovisno o tome jesu li oba kromosoma nasljeđena od oca ili majke. Ovi pokusi su jasno pokazali da se proces imprintinga ne odnosi na čitav genom.

Prvi imprintirani gen koji je identificiran je gen za Igf2r (eng. *insulin-like growth factor 2 receptor*) kod miševa 1991. godine (Barlow et al., 1991), a otkriće prvog imprintiranog gena kod ljudi, H19, uslijedilo je godinu dana kasnije (Zhang and Tycko, 1992). Od tada je identificiran čitav niz imprintiranih gena i kod miševa i kod ljudi.

## 5.2. Karakteristike imprintiranih gena

Od ukupno danas pretpostavljenih 20.000 gena koji čine ljudski genom, procjenjuje se da postoji oko 150 imprintiranih gena (Luedi et al., 2007). Iako imprintirani geni prema tome čine tek 0,75% ljudskog genoma, ustanovljeno je da su od iznimne važnosti za normalan fetalni rast i razvoj, a genetske i epigenetske promjene njihove strukture povezane su s raznim bolestima i poremećajima.

Imprintirani geni pokazuju tendenciju grupiranja u specifičnim regijama genoma, tzv. klasterima, koji mogu zauzimati i nekoliko megabaza DNA (Girardot et al., 2013). Pojedini klaster imprintiranih gena je pod zajedničkim nadzorom cis-regulacijske sekvence koja se naziva diferencijalno metilirana domena (DMD, od eng. *differentially methylated domain*) ili imprinting centar (IC) ili ponekad, kontrolna regija imprintinga (ICR, od eng. *imprinting control region*). Diferencijalno metilirane domene su velike nekoliko kilobaza i vrlo su bogate CpG dinukleotidima. Budući da dva alela imprintiranog gena sadrže istu DNA sekvencu (iznimka su individualni polimorfizmi), diferencijalno metilirane domene služe kao epigenetski biljezi po kojima se dva alela razlikuju jedan od drugog i „pamte“ jesu li maternalnog ili paternalnog podrijetla. Unutar ovih domena jedan roditeljski alel je visoko metiliran na većini CpG dinukleotida, dok je alel naslijeđen od drugog roditelja nemetiliran ili metiliran na malom broju CpG dinukleotida (Reinhart et al., 2002). Obrasci metilacije diferencijalno metiliranih domena uspostavljaju se tijekom oogeneze i spermatogeneze, ne podliježu valu globalne demetilacije tijekom ranih mitotskih dioba preimplantacijskog embrija i održavaju se tijekom razvoja u somatskim stanicama. Da je diferencijalna metilacija CpG nukleotida neophodna za genomski imprinting pokazali su pokusi na miševima kojima je mutiran gen za enzim za održavanje metilacije, Dnmt1, što je dovelo da promjene ekspresije imprintiranih gena (Li et al., 1993).

Još jedna karakteristika imprintiranih gena je asinkrona replikacija dva alela tijekom S faze staničnog ciklusa. Istraživanjem imprintiranih gena metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) pokazalo se da se većina alela paternalnog podrijetla replicira ranije od maternalnih alela, neovisno o tome koji alel je eksprimiran a koji utišan (Kitsberg et al., 1993), što odstupa od pravila primjećenog kod neimprintiranih gena da se eksprimirani geni repliciraju ranije. Nekoordinirano vrijeme replikacije uspostavlja se u gametama roditelja i

održava tijekom embrionalnog razvoja što upućuje na činjenicu da i asinkrona replikacija, neovisno o metilaciji DNA, služi kao epigenetski biljeg za razlikovanje roditeljskih alela (Simon et al., 1999).

### 5.3. Ciklus imprintinga tijekom života

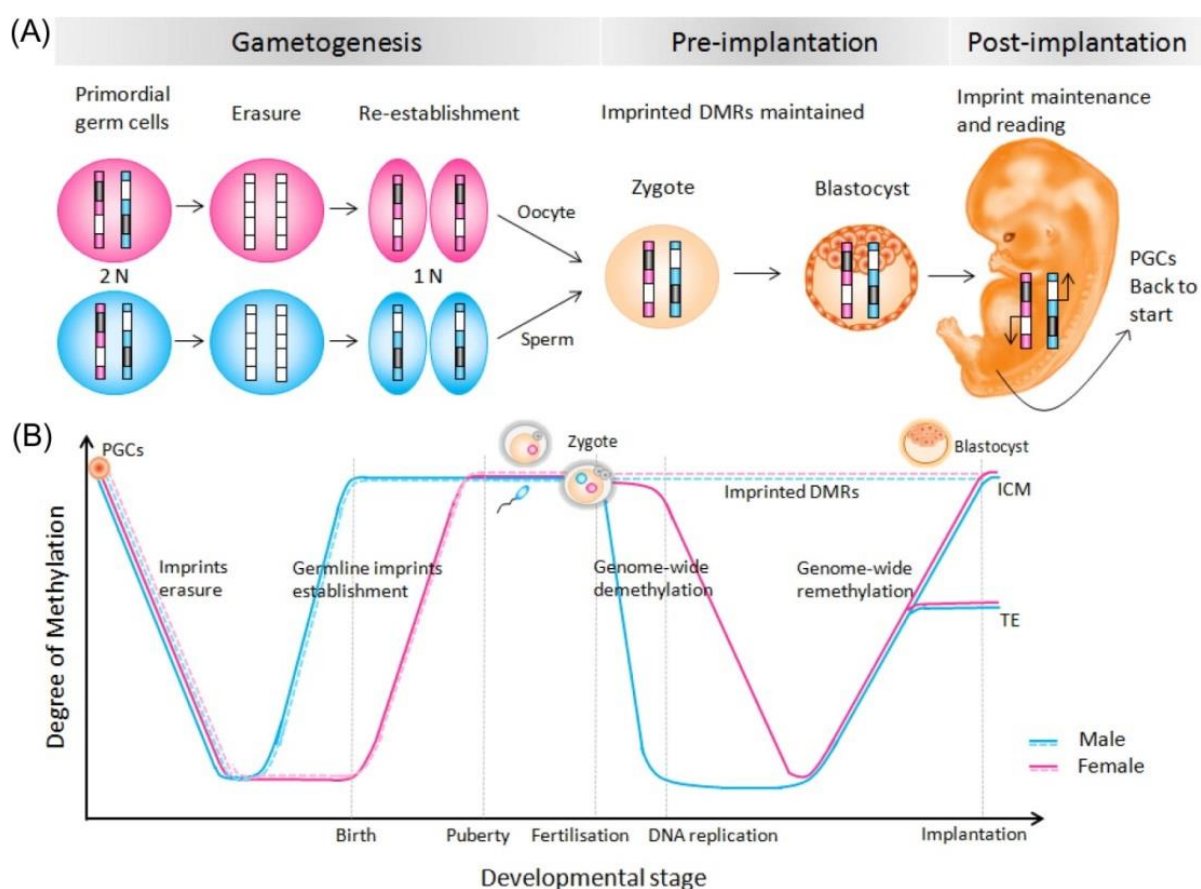
Iako se genomski imprinting ostvaruje djelovanjem više epigenetskih mehanizama, uključujući metilaciju DNA, modifikacije histona, asinkronu replikaciju i djelovanje dugih ncDNA, pokazalo se da je ključna sastavnica ovog procesa metilacija DNA (Brannan and Bartolomei, 1999). Budući da je metilacija pogodnija za istraživanja i mjerenja od modifikacija histona, najveći broj studija imprintinga opisuje upravo promjene obrazaca metilacije DNA u imprintiranim domenama tijekom kritičnih razdoblja u razvoju organizma (Horsthemke, 2010).

Ciklus imprintinga, odnosno ciklus metilacije DNA u imprintiranim domenama, tijekom života se sastoji od sljedećih faza (slika 1):

- brisanje starih obrazaca metilacije u spolnim prastanicama i uspostavljanje novih u kasnijim fazama gametogeneze
- nakon oplodnje održavanje obrasca za vrijeme embriogeneze i u odraslim somatskim stanicama
- brisanje i uspostavljanje novog obrasca u vlastitim gametama.

U spolnim prastanicama embrija dolazi do brisanja metilacijskih obrazaca u imprinting centrima (IC) ili diferencijalno metiliranim domenama (DMD). Metilacijski obrasci nasljeđeni od roditelja moraju se obrisati kako bi se u gametama budućeg organizma uspostavili novi, koji odražavaju spol embrija. Kao što je opisano u poglavlju 4.1., novi obrasci uspostavljaju se pomoću enzimske obitelji *de novo* DNA metiltransferaza, Dnmt3, u kojoj je ključan enzim Dnmt3a i njegov regulacijski faktor Dnmt3L. Kod muškaraca *de novo* metilacija u spolnim prastanicama započinje prije rođenja, u kasnom fetalnom razdoblju (Ferguson-Smith, 2011), za razliku od žena kod kojih započinje nakon rođenja i nastavlja se u rastućim oocitama tijekom reproduktivnog razdoblja života (Ishida and Moore, 2013). Još uvijek nije do kraja jasno na koji način Dnmt3a i Dnmt3L prepoznaju koje imprinting centre

treba metilirati u ženskim, a koje u muškima spolnim stanicama, ali novija istraživanja pokazuju da je ključan proces transkripcija u imprinting centru (Henckel et al., 2012) i postranslacijske modifikacije histona povezanih s IC-om, posebice metilacija lizina 4 na histonu H3 koja određuje hoće li Dnmt3a i Dnmt3L imati pristup IC-u (Sanli and Feil, 2015). Zrela jajna stanica i zreli spermij pokazuju visoki stupanj metilacije, a svoje obrasce prenose na potomke.



**Slika 1.** Stupnjevi metilacije DNA tijekom gametogeneze i ranog embrionalnog razvoja. Ružičasta boja prikazuje majčine kromosome, a plava očeve. Bijeli kvadratići predstavljaju nemetilirani alel, a crni metilirani. Crne strelice simboliziraju ekspresiju nemetiliranog alela. Puna crta na slici B prikazuje stupanj metilacije ukupnog genoma, a isprekidana crta metilaciju diferencijalno metiliranih domena (imprinting centara). ICM (eng. *inner cell mass*) - masa fetusa; TE (eng. *trophoblast endoderm*) - masa placente. Prema Ishida i Moore (2013).

Nakon oplodnje zrele jajne stanice zrelim spermijem, naslijeđeni obrasci metilacije se stabilno održavaju kroz diobe somatskih stanica tijekom rasta i razvoja. Naslijeđeni obrasci metilacije su otporni na globalnu demetilaciju koja se događa u muškom i ženskom pronukleusu odmah nakon oplodnje, kao i na globalnu remetilaciju u stadiju blastociste. Jedan od potencijalnih mehanizama koji štiti imprinting centre od demetilacije je Dppa3 (nazvan još i Stella ili PGC7) protein, prisutan u visokim koncentracijama u oocitama i ranom embriju, na način da inhibira konverziju 5mC-a u 5hmC u zigoti (Sanli and Feil, 2015). Ovaj protein prepoznaje i veže se na dimetiliran lizin 9 na H3 histonu (H3K9me2) koji je prisutan na kromatinu metiliranog alela imprinting centra (Nakamura et al., 2012). Obrasci metilacije se vjerno nasljeđuju na stanice kćeri tijekom replikacija DNA i mitozu, djelovanjem Dnmt1 enzima u sprezi s proteinom ZFP57 (eng. *zing finger protein 57*). Istovremeno sa održavanjem metilacije u somatskim stanicama, u spolnim prastanicama dolazi do brisanja ovih obrazaca i uspostavljanja novih, te se time ciklus imprintinga zatvara.

#### **5.4. Bolesti povezane s imprintingom**

Zbog ekspresije samo s jednog alela, imprintirani geni su vulnerabilni na genetske i epigenetske mutacije. Bolesti koje uključuju imprintirane gene su u općoj populaciji relativno rijetke, no često imaju vrlo teške kliničke slike, prvenstveno zahvaćajući rast i neurološki razvoj (Ishida and Moore, 2013). Prva bolest za koju je ustanovljena povezanost s imprintingom bila je Prader-Willi sindrom (Nicholls et al., 1989), a nedugo poslije isti mehanizam je ustanovljen i kod Angelman sindroma. Ostale bolesti povezane s imprintingom su: Beckwith-Wiedemann sindrom, Silver-Russell sindrom, Albrightova hereditarna osteodistrofija, uniparentalna disomija 14 te prolazni neonatalni dijabetes mellitus tipa 1. Osim ovih bolesti koje su isključivo uzrokovane poremećajem u pojedinom imprintiranom lokusu, postoje određeni multifaktorski poremećaji za koje se pretpostavlja da poremećaji imprintinga mogu biti jedan od etioloških faktora. Neki od tih poremećaja su intrauterino zaostajanje u rastu, niska porođajna težina, razni oblici karcinoma, pretilost, dijabetes te određeni neurološki i psihijatrijski poremećaji (autizam, shizofrenija i bipolarni poremećaj) (Butler, 2009).

Zadnjih godina postoji sve veći broj studija koje istražuju povećanu incidenciju poremećaja imprintinga kod djece koja su začeta medicinski potpomognutom oplodnjom. Pretpostavlja se da *in vitro* manipulacije spolnim stanicama i preimplantacijskim embrijima, koje se odvijaju upravo tijekom kritičnog razdoblja epigenetskog reprogramiranja, mogu uzrokovati pogreške u metilaciji DNA i imprintingu (Soejima and Higashimoto, 2013, Uyar and Seli, 2014).

## **6. Sindromi Prader-Willi i Angelman**

Prader-Willi sindrom (PWS; Mendelian Inheritance in Man (MIM): 17620) i Angelman sindrom (AS; MIM: 105830) su prve bolesti ljudi za koje je ustanovljeno da uključuju imprintirane gene, a poslužili su kao izvrstan model za objašnjavanje potencijalnih mehanizama i uloge genomskog imprintinga. To su dva klinički potpuno različita neurorazvojna, multisistemska poremećaja uzrokovana delecijom iste regije na dugom kraku kromosoma 15. Hoće li se razviti PWS ili AS ovisi o tome je li kromosom zahvaćen delecijom naslijeđen od majke ili oca. PWS je karakteriziran hiperfagijom, prekomjernom tjelesnom težinom, lakšim intelektualnim poteškoćama i hipogonadizmom, dok su obilježja AS-a teško intelektualno zaostajanje, veselo ponašanje sa čestim napadajima smijeha, ataktičan hod i problemi s govorom.

### **6.1. Kliničke karakteristike PWS-a**

Prader-Willi sindrom je kompleksni, neurorazvojni, multisistemski poremećaj čiji su skup karakteristika prvi opisali švicarski pedijatri Prader, Labhart i Willi 1956. godine, po kojima je ovaj sindrom i dobio ime. Prevalencija iznosi između 1 na 15 000 i 1 na 30 000 (Cassidy and Driscoll, 2009), a podjednako zahvaća oba spola. Glavne karakteristike su neonatalna hipotonija, hiperfagija, prekomjerna tjelesna težina, intelektualne poteškoće, hipogonadizam i druge endokrine insuficijencije.

Hipotonija je prisutna već intrauterino kada dovodi do smanjenih pokreta fetusa, polihdramnija te abnormalnog položaja pri porodu, kao što je stav zatkom, zbog čega je često potrebno instrumentalno dovršenje poroda ili carski rez (Cassidy and Driscoll, 2009).

Klinička slika u dojenačkoj dobi je znatno različita od one u kasnijem djetinjstvu i odrasloj dobi. Tijekom prvih mjeseci života, uz hipotoniju, prisutna je letargija, oslabljen refleks sisanja, tihi plač i nenapredovanje na težini koje najčešće zahtijeva posebne tehnike hranjenja kao što je postavljanje nazogastrične sonde. Hipotonija je vrlo karakterističan simptom te svu

djecu s neobjašnjenom hipotonijom u neonatalnom razdoblju treba testirati na Prader-Wili sindrom (Gunay-Aygun et al., 2001).

S vremenom se tonus mišića poboljša i uspostavi se normalno hranjenje, no u motoričkom razvoju primjećuje se kašnjenje; sjedenje nastupa s oko 12 mjeseci, a hodaње s 24 mjeseca. Nakon toga slijedi druga faza bolesti koju, usprkos dotadašnjim teškoćama s hranjenjem i nenapredovanjem na težini, karakterizira upravo suprotno: hiperfagija i nezasitan apetit. Ta faza najčešće počinje između 1. i 6. godine života. Zbog poremećaja u signaliziranju gladi i sitosti u hipotalamusu, oboljeli od Prader-Willi sindroma imaju konstantan osjećaj gladi, unose pretjerane količine hrane i pokazuju karakteristično, neobično ponašanje vezano uz hranu u vidu stalne preokupiranosti pronalaženjem hrane, ingestije nejestivih, zamrznutih ili trulih namirnica, te čak i otpadaka, krađe hrane ili novca kako bi si kupili hranu, a ako im skrbnici uskrate zahtjev za hranom javljaju se ispadi bijesa. Također, prag za povraćanje je vrlo visok. Sve to rezultira brzim i znatnim povećanjem tjelesne težine i, ako se kalorijski unos ne ograniči, s vremenom se razvija morbidna pretilost, sa svojim tipičnim komplikacijama (dijabetes tipa 2, hipertenzija, opstruktivna apneja u snu, kardiorespiratorna insuficijencija, edemi potkoljenica itd.).

Pacijenti s Prader-Wili sindromom imaju u većini slučajeva blagi ili umjereni stupanje intelektualnih poteškoća (prije poznato pod nazivom mentalna retardacija), a 8% ima graničan ili čak normalan kvocijent inteligencije (Laurier et al., 2015). Verbalne vještine su najčešće dobro razvijene, ali može biti prisutan loše artikuliran, nazalan ili nerazgovjetan govor.

Poremećena endokrina funkcija hipotalamusa dovodi do hipogonadizma, insuficijencije nadbubrežne žlijezde, manjka hormona rasta i hipotiroidizma. Hipogonadizam se očituje već pri rođenju. Kod ženske novorođenčadi prisutna je hipoplazija malih usana i klitorisa, a kod muške kriptorhizam i malo spolovilo. Pubertet kasni, a ukoliko se ne provodi nadomjesna terapija spolnim hormonima, sekundarne spolne karakteristike se ne razviju u potpunosti te izostaje i pubertetski zamah rasta. I muškarci i žene s Prader-Willi sindromom su infertilni.

Fenotipske karakteristike, uz centralni tip pretilosti i povećanu količinu masnog tkiva, su niža prosječna visina, manje dismorfije lica (smanjen bifrontalni promjer, vjeđni rasporak

bademastog oblika, tanka gornja usna), male i uske šake sa ravnim ulanarnim rubom (slika 2.b), mala stopala, koljena u valgusu (slika 2.c) te hipopigmentirana koža i kosa.



**Slika 2.** Dijete s Prader-Willi sindromom. Prema: Cataletto et al. (2011).

Zbog oštećenog kognitivnog funkcioniranja, kao i potrebe za stalnim nadzorom nad unosom hrane te prisutnih komorbiditeta, odrasli pacijenti nisu sposobni za samostalan život, većina živi u obiteljskoj kući uz skrb roditelja, dok dio živi u institucionalnom smještaju (Laurier et al., 2015). Glavni uzrok obolijevanja i smrtnosti je pretilost (Schrander-Stumpel et al., 2004, Lioni et al., 2012). Ako se tjelesna težina kontrolira i održava što bliže normalnoj, opće zdravlje može biti vrlo dobro, a životni vijek produžen. Lijek za ovaj sindrom ne postoji, ali rana dijagnoza i nadomjesna terapija hormonom rasta poboljšavaju mišićno-koštanu tjelesnu kompoziciju i kvalitetu života općenito (Whitman et al., 2002).

## 6.2. Kliničke karakteristike AS-a

Angelman sindrom je neurorazvojni poremećaj prvi put opisan 1960-ih godina od strane engleskog pedijatra Harryja Angelmana koji je ovu djecu nazvao „*happy puppet children*“ (sretne lutke) zbog ataktičnih pokreta ruku i nogu te čestih, neizazvanih napadaja smijeha. Osim karakterističnog ponašanja, Angelman je kod ove djece opisao teško intelektualno zaostajanje kao i odsustvo govora (1965). Od 1982. godine za ovaj poremećaj upotrebljava se naziv Angelman sindrom (Williams and Frias, 1982.). Procjenjuje se da prevalencija Angelman sindroma iznosi oko 1 na 15 000 (Petersen et al., 1995, Buckley et al., 1998.).

Spektar kliničkih obilježja Angelman sindroma je vrlo širok, a glavna obilježja su teške intelektualne poteškoće, zaostajanje u psihomotornom razvoju, ataksija, veselo i hiperaktivno ponašanje sa učestalim, nemotiviranim paroksizmima smijeha, odsustvo verbalnog izražavanja, epileptički napadi sa karakterističnim EEG nalazom, mikrocefalija i manje dismorfije lica (Williams et al., 2006). Pridružena obilježja mogu biti gastrointestinalni problemi (GERB, opstipacija), spljošten zatiljak, protruzija jezika, prognatizam, široka usta i široko razmaknuti zubi, poremećaji sna, skolioza, hipopigmentacija, povećana osjetljivost na toplotu, itd.

Djeca sa Angelman sindromom imaju normalan intrauterini rast i razvoj, a ni u novorođenačkom periodu nema prisutnih patoloških značajki u fizikalnom statusu, osim blage hipotonije koja ponekad može biti prisutna. Problemi se počinju javljati u dojenačkom razdoblju u obliku slabog sisanja, regurgitacije želučanog sadržaja i gastroezofagealnog refluksa (Cassidy and Schwartz, 1998). Međutim, problemi sa hranjenjem nisu toliko izraženi kao što je slučaj kod djece s Prader-Willi sindromom.

U drugoj polovici prve godine života počinje se zamjećivati zaostajanje u psihomotornom razvoju; sjedenje, stajanje i hodanje nastupaju kasnije od uobičajenog vremena. Za ovaj sindrom nije karakteristična regresija, dakle jednom stečene vještine se ne gube (Thibert et al., 2013). Najveći razvojni nedostatak je govor. Kod većine oboljelih verbalno izražavanje je potpuno odsutno, komuniciraju eventualno ispuštanjem zvukova i gestikuliranjem, a tek manji dio ima vokabular od nekoliko riječi (Andersen et al., 2001). Kod svih oboljelih prisutne su

teškoće u intelektualnom funkcioniranju i to najčešće teškog i vrlo teškog stupnja, a mentalna i razvojna dob ostaje na razini 2-godišnjeg djeteta (Brun Gasca et al., 2010). Počevši od dojenačke dobi pa kroz cijeli život prisutno je veselo, sretno, hiperaktivno i druželjubivo ponašanje sa učestalim napadajima smijanja koje je pretjerano i neadekvatno s obzirom na poticaj.

Djeca s Angelman sindromom u dojenačkom razdoblju nemaju upadljivih dismorfija u tjelesnom izgledu, no s vremenom se razvija tipičan fenotip kojeg čine mikrocefalija, spljošten okciput, prognatizam, široka usta, široko razmaknuti zubi, protruzija jezika i hipopigmentirana, svijetla koža (slika 3).



**Slika 3.** Karakterističan fenotip pacijenata s Angelman sindromom.

Prema: Dagli et al. (1993).

Hod je nesiguran, ataktičan i na širokoj osnovi, sa pojačanim tonusom mišića nogu (slika 3.d). Tijekom hodanja dolazi do istovremene aktivacije agonističkih i antagonističkih skupina mišića, a ruke su podignute i flektirane u laktu uz prisutne brze pokrete pljeskanja i trzanja, od čega i dolazi usporedba sa lutkama (marionetama).

U neurološkom statusu se nalazi hipotonija trupa i hipertoniya distalnih dijelova ekstremiteta te pojačani refleksi. Od ranog djetinjstva javljaju se generalizirani epileptički napadaji, najčešće u vidu mioklonih grčeva, atipičnog absansa, toničko-kloničkih grčeva te atoničkih napadaja (Thibert et al., 2013), a pojava epileptičnog statusa je vrlo česta. Tijekom adolescencije se učestalost i intenzitet epileptičkih napadaja smanjuju. Karakteristika Angelman sindroma je i poremećen ciklus budnosti i sna. Većina oboljele djece ima smanjenu potrebu za snom i često se budi po noći energična i spremna za igru. Poremećaji cirkadijanog ritma predstavljaju jedan od najvećih problema obitelji i osobama koje skrbe o ovoj djeci.

Odrasli sa Angelman sindromom nisu sposobni za samostalan život, a dio njih je i vezan za invalidska kolica, no mogu se samostalno hraniti i uz nadzor obavljati manje kućanske poslove (Laan et al., 1996). Dobrog su općeg zdravlja, a očekivani životni vijek ne razlikuje se znatno od normalnog.

### 6.3. Molekularne karakteristike PWS-a i AS-a

Iako je iz opisanih kliničkih karakteristika vidljivo da su Prader-Willi sindrom i Angelman sindrom potpuno različita dva poremećaja, oni dijele zajedničku molekularnu osnovu. Oba sindroma su u većini slučajeva posljedica delecije iste domene dugog kraka kromosoma 15, unutar regije q11-q13. Međutim, ako se delecija nalazi na kromosomu nasljeđenom od majke, manifestirat će se Angelman sindromom, a ako je istom delecijom zahvaćen kromosom nasljeđen od oca, fenotip će odgovarati Prader-Willi sindromu (Glenn et al., 1997). Razlog zašto identična delecija daje dva različita fenotipa nalazi se u postojanju dvije domene imprintiranih gena, PWS (od Prader-Willi sindrom) i AS (od Angelman sindrom), koje se nalaze unutar regije 15q11-q13, a čija ekspresija ovisi o tome je li alel nasljeđen od oca ili majke. U zdravoj jedinki alel nasljeđen od majke ima aktivne gene unutar AS domene, a gene unutar PWS domene utišane; dok je na alelu paternalnog podrijetla obrnuto, regija PWS je eksprimirana, a AS inaktivna. Kada se dogodi delecija, ovisno o tome koja je domena bila funkcionalna na izgubljenom alelu, razvit će se klinički sindrom. Ako je izgubljen očev alel, nedostajat će aktivna PWS regija i razvit će se Prader-Willi sindrom. Analogno tome, ako je izgubljen majčin alel, neće postojati aktivna AS domena i posljedica će biti Angelman sindrom. Ekspresija gena u PWS i AS domeni je regulirana dvodijelnim imprinting centrom i epigenetskim modifikacijama kojima on podliježe.

#### 6.3.1. Genetska etiologija

Postoji više genetskih i epigenetskih promjena u regiji 15q11-q13 koje mogu uzrokovati gubitak funkcionalnih alela i rezultirati Prader-Willi ili Angelman sindromom.

Prader-Willi sindrom, odnosno, nedostatak funkcionalne očeve kopije regije 15q11-13, može biti posljedica:

- *de novo* delecije 15q11-q13 paternalnog podrijetla (u 70% slučajeva)
- maternalne uniparentalne disomije (29%)
- poremećaja imprintinga (očev kromosom ispoljava maternalni imprint) (1%).

Angelman sindrom, odnosno, nedostatak funkcionalne majčine kopije regije 15q11-13, može nastati kao rezultat:

- *de novo* delecije 15q11-13 maternalnog podrijetla (70%)
- točkaste mutacije UBE3A gena unutar 15q11-q13 (5-10%)
- majčinog kromosoma 15 koji ima paternalni imprint (3-5%)
- paternalne uniparentalne disomije (1-2%).

Delecija je najčešći uzrok u oba sindroma, a u najvećem broju slučajeva se radi o velikim *de-novo* delecijama, veličine 5 do 7 Mb, koje zahvaćaju i PWS/AS imprintiranu domenu kao i niz neimprintiranih gena (Buiting, 2010). Delecije se događaju tijekom mejotičke rekombinacije DNA između dva homologna kromosoma ili između različitih regija istog kromosoma 15, na specifičnim lomnim točkama kromosoma (BP, od eng. *breakpoints*), koje su karakterizirane blokovima ponavljajućih sekvenci veličine 250-400kb (LCR, od eng. *low copy repeats*). Bliže centromeri nalaze se dvije glavne proksimalne točke loma, BP1 i BP2, a bliže telomeri se nalazi najčešća distalna točka loma, BP3 (Butler, 2009) (slika 4). U rjeđim slučajevima, moguće su i dodatne distalne točke loma, BP4 i BP5 (Elena et al., 2012). Ovisno o veličini delecije i mjestu na kojem se nalazi točka loma, postoje dvije vrste karakterističnih delecija, tip I i tip II. Delecija tipa I se proteže se od BP1 do BP3 (veličine oko 6 Mb), a delecija tipa II od BP2 do BP3 (oko 5,3 Mb). Budući da je delecija tipa I je veća i obuhvaća dodatna 4 neimprintirana gena, povezana sa većim brojem abnormalnosti i težom kliničkom slikom (Bittel et al., 2006, Williams et al., 2010).

Uniparentalna disomija je drugi genetski poremećaj po učestalosti koji dovodi do PWS-a, dok je u AS-u sporadičan slučaj. Maternalna uniparentalna disomija u PWS-u je karakterizirana nasljeđivanjem obje kopije homologa 15 od majke, umjesto jedne majčine, a jedne očeve kopije. Javlja se kao posljedica nerazdvajanja tijekom mejoze I u majčinim gametama i zatim gubitka očevog kromosoma 15 nakon oplodnje, u tzv. *rescue* (spašavajućem) događaju kojim se izbjegava spontani pobačaj ranog embrija kojeg bi uzrokovala trisomija kromosoma 15 (Angulo et al., 2015). Za razliku od maternalne uniparentalne disomije, koja je u većini slučajeva heterodisomična i posljedica je greške u mejozi u majčinim gametama; paternalna je u gotovo svim slučajevima izodisomična, što znači da su naslijeđene dvije identične kopije jednog homolognog kromosoma, a u većini slučajeva je posljedica duplikacije očevog

kromosoma 15 u somatskim stanicama nakon oplodnje; dakle pogreška nastaje u postzigotnom razdoblju, a ne u gametama (Robinson et al., 2000).

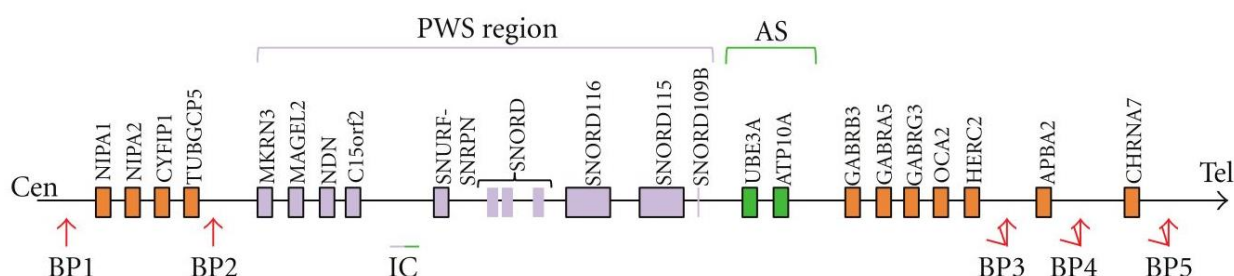
Manji dio slučajeva PWS-a i AS-a je uzrokovan poremećajem imprintinga u užem smislu. To je situacija u kojoj dijete ima jedan kromosom 15 od majke i drugi homologni kromosom 15 od oca, ali oni nose krivi obrazac metilacije. Zbog krivog obrasca aktivirani su aleli koji bi trebali biti utišani, ili obrnuto, utišani su aleli koji bi trebali biti aktivni. Ako očev kromosom nosi maternalni obrazac metilacije odnosno imprintinga, PWS regija će biti metilirana na oba alela, te će rezultat biti razvoj PWS-a. Ako kromosom majčinog podrijetla nosi očev obrazac imprintinga, UBE3A gen na tom alelu će biti utišan; a budući da je i na očevom alelu normalno inaktivan, zbog nedostataka aktivne kopije UBE3A razvit će se AS. Poremećaji imprintinga mogu nastati zbog pogreške u brisanju metilacijskog obrasca u spolnim prastanicama, pogreške u uspostavljanju novog metilacijskog obrasca u gametama ili pogreške u održavanju tog metilacijskog obrasca u somatskim stanicama nakon oplodnje (Horsthemke and Wagstaff, 2008). Ove pogreške mogu biti posljedica primarnih ili sekundarnih epimutacija. Primarne epimutacije nastaju bez promjene u sekvenci DNA i predstavljaju uzrok kod velike većine pacijenata s poremećajima imprintinga, 86% pacijenta s PWS i 91% s AS (Buiting et al., 2003). U rijedim slučajevima, pogreške mogu biti posljedica mutacije DNA (sekundarne epimutacije), najčešće u obliku mikrolelecije dijela PWS/AS imprinting centra (Buiting, 2010, Horsthemke, 2010). Ova mikrolelecija može nastati *de novo* u spolnim prastanicama i tada rizik da će sljedeće dijete oboljeti od PWS ili AS nije povećan. Mikrolelecija u PWS/AS-IC-u može biti naslijeđena od roditelja suprotnog spola, „tihog“ nosioca mutacije, te tada postoji 50%-tni rizik za ponovno rađanje bolesnog djeteta. Iako mikrolelecije PWS/AS imprinting centra sudjeluju u etiologiji tek vrlo malog postotka ovih sindroma, poslužile su za identificiranje njegove strukture i shvaćanje mehanizama regulacije imprintinga.

Za razvoj kompletnog fenotipa Angelman sindroma dovoljna je mutacija samo jednog, UBE3A, gena (Kishino et al., 1997), za razliku od PWS-a koji se smatra poligenским poremećajem. Stoga se uzrocima AS-a pridružuje i točkasta mutacija UBE3A gena na majčinom kromosomu. Intrakromosomske mutacije koje su identificirane su insercije, delecije, nonsense, missense i splice site mutacije, a najčešće nastaju *de novo*. U oko 20% slučajeva mutaciju nosi majka na alelu koji je naslijedila od oca (Clayton-Smith and Laan,

2003) te tada postoji 50%-tni rizik da će sljedeće dijete također nasljediti mutaciju i razviti AS.

### 6.3.2. Struktura kromosomske regije 15q11-q13

Kromosomska regija 15q11-q13 veličine je 4Mb i unutar nje se nalaze dvije domene imprintiranih gena pod nazivom PWS (prema Prader-Willi sindromu) i AS (prema Angelman sindromu) koje se protežu na 2Mb, zatim imprinting centar (IC), te geni eksprimirani s oba alela (slika 4).



**Slika 4.** Shematski prikaz kromosomske regije 15q11-q13. Regija PWS (Prader-Willi sindrom) prikazana je ljubičastom bojom, a AS regija zelenom. Crvene strelice pokazuju najčešća mjesta delecije, tzv. točke loma (BP, od eng. breakpoint). Narančastom bojom prikazani su geni koji su eksprimirani sa oba roditeljska alela. Cen označuje smjer prema centromeri, a tel prema telomeri. Prema: Elena et al. (2012).

PWS regija sadrži gene eksprimirane samo sa očeve kopije homolognih alela, a to su: MKRN3 (eng. *makorin ring finger protein 3*, član proteinske obitelji koja ima funkciju ubikvitin ligaze), MAGEL2 (eng. *MAGE-like protein 2*, MAGE predstavlja tumorski melanomski antigen), NDN (eng. *necdin*, supresor rasta eksprimiran u postmitotičkim neuronima), C15orf2 (eng. *chromosome 15 open reading frame 2*, eksprimiran samo u testisima i fetalnom mozgu, a daje protein nepoznate funkcije), te zatim SNURF-SNRPN i veći broj gena koji se prepisuju u male nukleolarne RNA molekule (snoRNA, od eng. *small nucleolar RNA* ili SNORD, one vode metilaciju i pseudouridilaciju rRNA molekula) (Rabinovitz et al., 2012). SNURF/SNRPN (SNURF-SNRPN upstream reading frame, SNRPN-small nuclear ribonucleoprotein N) lokus se prepisuje u veliki bicistronički transkript, koji kodira za dva proteina, SNURF i SNRPN. SNURF je mali polipeptid

nepoznate funkcije lokaliziran u staničnoj jezgri, a SNRPN je mali nuklearni ribonukleoprotein koji sudjeluje u izrezivanju (eng. *splicing*) mRNA u mozgu (Chamberlain, 2013). Osim RNA koja kodira za ova dva proteina, SNUFR/SNRPN transkript sadrži i antisense UBE3A (UBE3A-ATS), zatim duge nekodirajuće RNA i snoRNA. Nije pronađen jedan specifičan gen koji bi bio odgovoran za sve fenotipske karakteristike Prader-Willi sindroma, te se smatra da su one rezultat poremećaja barem nekoliko gena ove regije. Međutim, pokazalo se da je ključan lokus, odgovoran za veći dio fenotipa, genski klaster SNORD116 koji pripada skupini nekodirajućih snoRNA molekula, a nalazi se unutar SNURF/SNRPN lokusa (Cassidy et al., 2012).

Manja, AS regija, sastoji se od UBE3A (eng. *ubiquitin ligase E3A*) i ATP10A (eng. *aminophospholipid-transporting ATPase*) gena. Nedostatak ekspresije majčine kopije UBE3A gena u mozgu uzrokovat će razvoj Angelman sindroma (Kishino et al., 1997). To je gen koji kodira za ubikvitin proteinsku ligazu E3A, enzim potreban za degradaciju proteina i za sinaptičko potenciranje u ranom razvoju mozga. Za razliku od paternalno eksprimiranih gena PWS regije, koji pokazuju imprintirani obrazac ekspresije u svim tkivima (osim C15orf2 gena), UBE3A gen je u većini tkiva eksprimiran s oba alela, a isključivo u mozgu je eksprimiran samo s majčine kopije, dok je očev alel UBE3A u mozgu utišan (Bird, 2014). Predominantna mjesta u mozgu u kojima je UBE3A aktivan su hipokampus i Purkinjeove stanice malog mozga (Clayton-Smith and Laan, 2003), što objašnjava simptome Angelman sindroma. Drugi gen AS regije, ATP10A, kodira za ATPazu koja sudjeluje u transportu aminofosfolipida i također je eksprimiran samo s majčinog kromosoma u mozgu (Meguro et al., 2001). Za razvoj Angelman sindroma dovoljna je mutacija samo UBE3A gena (Kishino et al., 1997), no smatra se da ako uz nju postoji i mutacija ATP10A gena, klinička slika će biti nešto teža (Herzing et al., 2001).

Unutar PWS regije, proksimalno od SNURF-SNRPN gena, nalazi se dvodijelni imprinting centar (PWS-IC/AS-IC), na području veličine oko 100kb. Ovaj imprinting centar koordinirano regulira cijelu PWS/AS regiju. PWS-IC/AS-IC je otkriven i lokaliziran proučavajući spomenutu malu skupinu PWS i AS pacijenata sa regionalnim poremećajem imprintinga kao rezultatom mikroleucije (Brannan and Bartolomei, 1999) (za razliku od većine drugih imprintiranih domena koje su otkrivene inženjeringom tzv. „knock-out“ miševa). Sastoji se od dva funkcionalna dijela, PWS-SRO i AS-SRO (od eng. *shortest region*

*of overlap*). To su najkraće regije u kojoj se preklapaju mikrolelecije nađene kod ove skupine pacijenata. Dakle, u ovoj skupini svi pacijenti sa AS su imali deletiran AS-SRO, a svi pacijenti s PWS deletiran PWS-SRO.

Kromosomska regija 15q11-q13 sadrži i nekoliko gena koji ne podliježu imprintingu, a također mogu biti zahvaćeni delecijom. Proksimalno od PWS/AS imprintirane regije, odnosno unutar ili pored proksimalnih točaka loma BP1 i BP2, nalaze se neimprintirani geni GOLGA8E, TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2 i NIPA1 (Chai et al., 2003). Distalno od PWS/AS regije se nalaze geni za GABA receptore (GABRB3, GABRA5 i GABRG3), zatim gen za okulokutani albinizam tipa 2 (OCA2), HERC2 gen i GOLGA8. Ovi geni su eksprimirani sa oba roditeljska alela (slika 4, narančasto), i iako nisu odgovorni za nastanak PWS i AS, mogu utjecati na njihove fenotipske karakteristike ili samostalno uzrokovati druge genetske poremećaje, kao što je primjerice autizam (Buiting, 2010).

### **6.3.3. Mehanizmi imprintinga PWS/AS regije**

Mehanizmi koji omogućuju genomski imprinting u PWS/AS regiji, odnosno monoalelnu ekspresiju gena ovisnu o roditeljskom podrijetlu, su kompleksni i nisu do kraja razjašnjeni, no poznato je da uključuju zajedničko djelovanje nekoliko epigenetskih modifikacija. Te modifikacije su diferencijalna metilacija PWS/AS regije tijekom gametogeneze i održavanje tog obrazca u somatskim stanicama, antisense transkripcija, kovalentne modifikacije histona i asinkrona replikaciju homolognih kromosoma 15 tijekom staničnog ciklusa.

Svim procesima imprintinga upravlja spomenuti dvodijelni PWS/AS imprinting centar, sastavljen od dvije funkcionalne komponente, PWS-SRO, odgovorne za održavanje paternalnog epigenetskog obrazca u somatskim stanicama; te AS-SRO, potrebne za uspostavljanje maternalnog epigenetskog obrasca tijekom oogeneze ili nakon oplodnje.

PWS-SRO regija čini glavni dio PWS-IC-a i obuhvaća promotor i prvi egzon SNURF-SNRPN gena (Ohta et al., 1999). PWS-SRO sadrži nakupinu CpG dinukleotidnih sekvenci koje su na kromosomu očevog podrijetla nemetilirane (aktivne), a na majčinom kromosomu hipermetilirane (utišane) (Gurrieri and Accadia, 2009). Nemetiliran PWS-SRO u somatskim

stanicama dvosmjerno kontrolira transkripciju gena paternalnog alela u čitavoj PWS/AS regiji: kontrolira aktivaciju paternalno eksprimiranih gena PWS regije (MKRN3, MAGEL2, NDN, SNUFR/SNRPN) i neizravno kontrolira ekspresiju UBE3A gena u AS regiji aktiviranjem njegove antisense RNA (Rabinovitz et al., 2012).

UBE3A-antisense (UBE3A-ATS) gen se prepisuje u veliki transkript zajedno sa SNURF/SNRPN i nekoliko snoRNA. UBE3A-ATS se prepisuje u obrnutom (antisense) smjeru od UBE3A i na očevom kromosomu u mozgu inaktivira UBE3A iz AS domene, vjerojatno mehanizmom transkripcijske kolizije dvaju polimeraza (Meng et al., 2013). Dakle, ekspresija imprintiranog UBE3A gena nije vezana za diferencijalnu metilaciju CpG sekvenci promotora tog gena, već je regulirana svojom antisense RNA molekulom kodiranom u PWS regiji (Rougeulle et al., 1998, Buiting, 2010). Budući da je Angelman sindrom uzrokovan nedostatkom ekspresije UBE3A gena zbog delecije majčinog alela, znanstvenici već dugo vremena, zbog potencijalnog terapijskog učinaka, pokušavaju pronaći načine za aktivirati normalno utišan UBE3A gen s očevog alela, a jedan od predloženih načina je upravo zaustavljanje prepisivanja antisense RNA, UBE3A-ATS, s paternalnog alela umetanjem genske stop kasete nizvodno od tog gena, što je zasada uspješno učinjeno u miševima (Meng et al., 2013).

AS-SRO regija se nalazi 35kb proksimalnije od SNRPN lokusa, dio je AS-IC-a i aktivna je na maternalnom alelu gdje je odgovorna za metilaciju PWS-SRO regije u oocitama, inaktivirajući na taj način paternalne gene na budućem maternalnom alelu. Metilaciju CpG sekvenci PWS-SRO lokusa u maternalnom alelu katalizira *de novo* metiltransferaza Dnmt3a, uz pomoć regulacijskog faktora Dnmt3L (Chedin et al., 2002). Nije sa sigurnošću utvrđeno događa li se uspostavljanje obrasca metilacije tijekom gametogeneze ili nakon oplodnje, budući da istraživanja daju oprečne rezultate. Kao i kod ostalih imprintiranih domena, održavanje ovog obrasca metilacije tijekom staničnih dioba održava Dnmt1. Metilirana PWS-SRO regija nužna je za ekspresiju UBE3A i time izbjegavanje nastanka Angelman sindroma, jer ne dozvoljava transkripciju UBE3A-ATS (Chamberlain and Lalande, 2010). Iako je jasno da delecija AS-SRO na maternalnom kromosomu ima za posljedicu gubitak DNA metilacijskog obrasca u PWS-SRO regiji, još uvijek nije utvrđen precizan mehanizam kojim AS-SRO ostvaruje svoj utjecaj. Predloženi potencijalni mehanizmi su: omogućavanje metilacije CpG sekvenci ili metilacije histona tijekom oogeneze, ili sprječavanje brisanja

metilacijskog obrazaca u toj regiji tijekom preimplantacijskog embrionalnog razvoja. U svakom slučaju, AS-SRO ima direktan utjecaj na metilaciju i inaktivaciju PWS-SRO regije, ali ne i obrnuto: PWS-SRO nema utjecaj na metilaciju AS-SRO regije (Perk et al., 2002).

Osim diferencijalno metiliranih CpG sekvenci, nekoliko lokusa unutar 15q11-q13 regije u somatskim stanicama pokazuje i različit obrazac kovalentnih histonskih modifikacija u ovisnosti o roditeljskom podrijetlu. SNRPN promotor unutar PWS-IC regije nasljeđene od majke ima trimetilirani lizin 9 na histonu H3 (H3K9me3) i trimetiliran lizin 20 na histonu H4 (H4K20me3) (Wu et al., 2006), za koje smo na početku spomenuli da su obilježja kondenziranog, transkripcijski inaktivnog kromatina. Za razliku od toga, u PWS-IC regiji nasljeđenoj od oca SNRPN promotor ima dimetiliran i trimetiliran lizin 4 na histonu H3 (H3K4me2 i me3) i acetilirane histone H3 i H4 (Chamberlain, 2013), dakle karakteristike aktivnog kromatina. Također, metilacija H3K4 je važna i tijekom uspostavljanja obrazaca imprintinga u zametnim stanicama. Naime, pretpostavlja se da metiliran H3K4 štiti DNA od *de novo* metilacije, što je utemeljeno na saznanju da Dnmt3a i Dnmt3L imaju niži afinitet prema kromatinu koji nosi ovu histonsku modifikaciju (Ooi et al., 2007). Isto tako, demetilacija H3K4, koja je katalizirana lizinskom demetilazom KDM1B, enzimom visoko eksprimiranim tijekom kasne faze oogeneze, neophodna je za *de novo* metilaciju pojedinih maternalnih diferencijalno metiliranih domena (Ciccone et al., 2009). Ova saznanja su pokazala da su modifikacije histona vrlo važna preteča metilacije DNA u zametnim stanicama te je međuovisnost metilacije DNA i histonskih modifikacija dvosmjerna: modifikacije histona mogu usmjeriti metilaciju DNA, a metilacija DNA može služiti kao predložak za pojedine modifikacije histona nakon replikacije DNA (Cedar and Bergman, 2009).

Asinkrona replikacija je još jedna epigenetska modifikacija koja potencijalno utječe na imprinting PWS/AS regije (Simon et al., 1999, Perk et al., 2002). Vrijeme replikacije PWS/AS regije uspostavlja se tijekom gametogeneze na način da se alel nasljeđen od oca uvijek u svakoj stanici replicira rano u S fazi staničnog ciklusa, a majčin alel u kasnoj S fazi. Jedan od mogućih mehanizama kojim vrijeme replikacije utječe na nasljedne promjene kromatina je djelovanjem preko deacetilacije histona. Naime, enzim Dnmt1, osim što ima funkciju održavanja obrazaca metilacije CpG dinukleotida, ulazi u interakciju s histonskom deacetilazom (HDAC2) i to isključivo tijekom kasne S faze. Zatim, nakon što replikacija završi, potencira deacetilaciju novosintetiziranih acetiliranih histona (Rountree et al., 2000).

Kasna replikacija majčinog alela PWS/AS regije odgovorna je za deacetilaciju histona PWS-SRO regije, potpuno neovisno o AS-SRO, koji je inače neophodan za metilaciju PWS-SRO (Perk et al., 2002).

#### 6.3.4. Molekularna dijagnostika

Razlike u metilaciji DNA ovisne o roditeljskom podrijetlu su osnova za potvrdu kliničke dijagnoze PWS-a i AS-a. Analiza metilacije se izvodi pomoću *Southern blot*-a ili PCR-a specifičnog za metilaciju, na 5' kraju SNURF-SNRPN lokusa, odnosno na promotoru i prvome egzonu toga gena, dakle PWS-SRO regiji. Zdravi pojedinci imaju prisutna dva alela za PWS-SRO, majčin alel sa metiliranim CpG otocima, i očev, nemetilirani alel. Ovom pretragom se uspješno dijagnosticira 99% pacijenata s PWS-om (Kalsner and Chamberlain, 2015), kod kojih se detektira samo jedan, metilirani majčin alel. Za razliku od toga, samo 70 do 75% pacijenata sa AS-om se uspješno detektiraju analizom metilacije, kada se pronalazi jedan nemetilirani alel očevog podrijetla (Buiting, 2010). Ako klinička slika upućuje na AS, a analiza metilacije daje uredan rezultat, potrebno je sekvencionirati UBE3A gen te utvrditi postoji li mutacija.

Budući da se analizom metilacije ne otkriva koja je molekularna etiologija, potrebne su daljnje pretrage kako bi se utvrdilo radi li se o deleciji, uniparentalnoj disomiji ili poremećaju imprintinga u užem smislu. Delecije se otkrivaju metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije sa SNURF-SNRPN probom ili sve češće kromosomskom *microarray* analizom (Kalsner and Chamberlain, 2015). Ako nije nađena delecija, provodi se analiza polimorfizama na uzorcima DNA od probanda i njegovih roditelja, s ciljem utvrđivanja uniparentalne disomije. U specijaliziranim laboratorijima može se učiniti sekvencioniranje imprinting centra za mali dio pacijenata kod kojih je uzrok primarna ili sekundarna epimutacija.

Osim analize metilacije CpG otoka SNURF-SNRPN lokusa, sve popularnija u prvoj liniji molekularne dijagnostike je MLPA (eng. *multiplex ligation-dependent probe amplification*), čija je prednost to što sadrži 5 proba umjesto samo jedne (1 za NDN i 4 probe za SNRPN) te može detektirati delecije i razlikovati ih od uniparentalne disomije (Dawson et al., 2015).

Molekularnu etiologiju je važno identificirati radi pouzdanijih informacija o prognozi i radi genetskog savjetovanja o riziku ponavljanja iste bolesti u obitelji.

## **7. Zahvale**

Na kraju ovog diplomskog rada želim posebno zahvaliti svojoj mentorici, prof.dr.sc. Maji Vlahović, na velikodušnoj pomoći i usmjeravanju pri pisanju rada, te članovima Povjerenstva, prof.dr.sc. Floriani Bulić-Jakuš i prof.dr.sc. Ljiljani Šerman.

Također, zahvaljujem svojim roditeljima Ani i Franji, sestri Patriciji, bratu Franu Domagoju i baki Agati, na bezuvjetnoj podršci i osloncu tijekom cijelog mog školovanja.

## 8. Literatura

- Adalsteinsson, B. T. and Ferguson-Smith, A. C. (2014) 'Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting', *Genes (Basel)*, 5(3), pp. 635-55.
- Andersen, W. H., Rasmussen, R. K. and Stromme, P. (2001) 'Levels of cognitive and linguistic development in Angelman syndrome: a study of 20 children', *Logoped Phoniatr Vocol*, (no. 1), pp. 2-9.
- Angelman, H. (1965) "'Puppet" children: a report on three cases', *Dev Med Child Neurol*, pp. 681-688.
- Angulo, M. A., Butler, M. G. and Cataletto, M. E. (2015) 'Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings', *J Endocrinol Invest*.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2011) 'Regulation of chromatin by histone modifications', *Cell Res*, 21(3), pp. 381-95.
- Barlow, D. P., Stoger, 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(6304), pp. 84-7.
- Bernstein, B. E., Meissner, A. and Lander, E. S. (2007) 'The mammalian epigenome', *Cell*, 128(4), pp. 669-81.
- Bird, L. M. (2014) 'Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects', *Appl Clin Genet*, 7, pp. 93-104.
- Bittel, D. C., Kibiryeva, N. and Butler, M. G. (2006) 'Expression of 4 genes between chromosome 15 breakpoints 1 and 2 and behavioral outcomes in Prader-Willi syndrome', *Pediatrics*, 118(4), pp. e1276-83.
- Brannan, C. I. and Bartolomei, M. S. (1999) 'Mechanisms of genomic imprinting', *Curr Opin Genet Dev*, 9(2), pp. 164-70.
- Brun Gasca, C., Obiols, J. E., Bonillo, A., Artigas, J., Lorente, I., Gabau, E., Guitart, M. and Turk, J. (2010) 'Adaptive behaviour in Angelman syndrome: its profile and relationship to age', *J Intellect Disabil Res*, 54(11), pp. 1024-9.
- Buckley, R. H., Dinno, N. and Weber, P. (1998.) 'Angelman syndrome: Are the estimates too low?', *Am J Med Genet*, pp. 285-390.
- Buiting, K. (2010) 'Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome', *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 154C(3), pp. 365-76.
- Buiting, K., Gross, S., Lich, C., Gillessen-Kaesbach, G., el-Maarri, O. and Horsthemke, B. (2003) 'Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect', *Am J Hum Genet*, 72(3), pp. 571-7.
- Butler, M. G. (2009) 'Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review', *J Assist Reprod Genet*, 26(9-10), pp. 477-86.
- Cassidy, S. B. and Driscoll, D. J. (2009) 'Prader-Willi syndrome', *Eur J Hum Genet*, 17(1), pp. 3-13.
- Cassidy, S. B. and Schwartz, S. (1998) 'Prader-Willi and Angelman syndromes. Disorders of genomic imprinting', *Medicine*, (no. 2), pp. 140-151.
- Cassidy, S. B., Schwartz, S., Miller, J. L. and Driscoll, D. J. (2012) 'Prader-Willi syndrome', *Genet Med*, 14(1), pp. 10-26.
- Cataletto, M., Angulo, M., Hertz, G. and Whitman, B. (2011) 'Prader-Willi syndrome: A primer for clinicians', *Int J Pediatr Endocrinol*, 2011(1), pp. 12.
- Cattanach, B. M. and Kirk, M. (1985) 'Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice', *Nature*, 315(6019), pp. 496-8.
- Cedar, H. and Bergman, Y. (2009) 'Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms', *Nat Rev Genet*, 10(5), pp. 295-304.

- Chai, J. H., Locke, D. P., Greally, J. M., Knoll, J. H., Ohta, T., Dunai, J., Yavor, A., Eichler, E. E. and Nicholls, R. D. (2003) 'Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons', *Am J Hum Genet*, 73(4), pp. 898-925.
- Chamberlain, S. J. (2013) 'RNAs of the human chromosome 15q11-q13 imprinted region', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4(2), pp. 155-66.
- Chamberlain, S. J. and Lalande, M. (2010) 'Neurodevelopmental disorders involving genomic imprinting at human chromosome 15q11-q13', *Neurobiol Dis*, 39(1), pp. 13-20.
- 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(26), pp. 16916-21.
- Ciccone, D. N., Su, H., Hevi, S., Gay, F., Lei, H., Bajko, J., Xu, G., Li, E. and Chen, T. (2009) 'KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints', *Nature*, 461(7262), pp. 415-8.
- Clarke, A. (1990) 'Genetic imprinting in clinical genetics', *Dev Suppl*, pp. 131-9.
- Clayton-Smith, J. and Laan, L. (2003) 'Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects', *J Med Genet*, 40(2), pp. 87-95.
- Crick, F. (1970) 'Central dogma of molecular biology', *Nature*, 227(5258), pp. 561-3.
- Dagli, A. I., Mueller, J. and Williams, C. A. (1993) 'Angelman Syndrome', in Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Wallace, S.E., Amemiya, A., Bean, L.J.H., Bird, T.D., Dolan, C.R., Fong, C.T., Smith, R.J.H. & Stephens, K. (eds.) *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Dawson, A. J., Cox, J., Hovanes, K. and Spriggs, E. (2015) 'PWS/AS MS-MLPA Confirms Maternal Origin of 15q11.2 Microduplication', *Case Rep Genet*, 2015, pp. 474097.
- Dean, W., Santos, F. and Reik, W. (2003) 'Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer', *Semin Cell Dev Biol*, 14(1), pp. 93-100.
- Deng, Y., Wang, C. C., Choy, K. W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Chung, T. K. and Tang, T. (2014) 'Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies', *Gene*, 538(2), pp. 217-27.
- Dong, A., Yoder, J. A., Zhang, X., Zhou, L., Bestor, T. H. and Cheng, X. (2001) 'Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA', *Nucleic Acids Res*, 29(2), pp. 439-48.
- Du, T. and Zamore, P. D. (2005) 'microPrimer: the biogenesis and function of microRNA', *Development*, 132(21), pp. 4645-52.
- Elena, G., Bruna, C., Benedetta, M., Stefania, D. C. and Giuseppe, C. (2012) 'Prader-willi syndrome: clinical aspects', *J Obes*, 2012, pp. 473941.
- Ferguson-Smith, A. C. (2011) 'Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm', *Nat Rev Genet*, 12(8), pp. 565-75.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C. and Esteller, M. (2005) 'Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(30), pp. 10604-9.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P. and Kouzarides, T. (2003) 'The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation', *J Biol Chem*, 278(6), pp. 4035-40.
- Girardot, M., Feil, R. and Lleres, D. (2013) 'Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications', *Epigenomics*, 5(6), pp. 715-28.
- Glenn, C. C., Driscoll, D. J., Yang, T. P. and Nicholls, R. D. (1997) 'Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes', *Mol Hum Reprod*, 3(4), pp. 321-32.

- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. and Bestor, T. H. (2006) 'Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2', *Science*, 311(5759), pp. 395-8.
- Gunay-Aygun, M., Schwartz, S., Heeger, S., O'Riordan, M. A. and Cassidy, S. B. (2001) 'The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria', *Pediatrics*, 108(5), pp. E92.
- Gurrieri, F. and Accadia, M. (2009) 'Genetic imprinting: the paradigm of Prader-Willi and Angelman syndromes', *Endocr Dev*, 14, pp. 20-8.
- Hall, J. G. (1990) 'Genomic imprinting: review and relevance to human diseases', *Am J Hum Genet*, 46(5), pp. 857-73.
- Hashimoto, H., Vertino, P. M. and Cheng, X. (2010) 'Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation', *Epigenomics*, 2(5), pp. 657-69.
- Henckel, A., Chebli, K., Kota, S. K., Arnaud, P. and Feil, R. (2012) 'Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells', *EMBO J*, 31(3), pp. 606-15.
- Hendrich, B. and Bird, A. (1998) 'Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins', *Mol Cell Biol*, 18(11), pp. 6538-47.
- Herzing, L. B., Kim, S. J., Cook, E. H., Jr. and Ledbetter, D. H. (2001) 'The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression', *Am J Hum Genet*, 68(6), pp. 1501-5.
- Hock, J. and Meister, G. (2008) 'The Argonaute protein family', *Genome Biol*, 9(2), pp. 210.
- Horsthemke, B. (2010) 'Mechanisms of imprint dysregulation', *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 154C(3), pp. 321-8.
- Horsthemke, B. and Wagstaff, J. (2008) 'Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region', *Am J Med Genet A*, 146A(16), pp. 2041-52.
- Ishida, M. and Moore, G. E. (2013) 'The role of imprinted genes in humans', *Mol Aspects Med*, 34(4), pp. 826-40.
- Kalsner, L. and Chamberlain, S. J. (2015) 'Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 Duplication Syndromes', *Pediatr Clin North Am*, 62(3), pp. 587-606.
- Kishino, T., Lalande, M. and Wagstaff, J. (1997) 'UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome', *Nat Genet*, 15(1), pp. 70-3.
- Kitsberg, D., Selig, S., Brandeis, M., Simon, I., Keshet, I., Driscoll, D. J., Nicholls, R. D. and Cedar, H. (1993) 'Allele-specific replication timing of imprinted gene regions', *Nature*, 364(6436), pp. 459-63.
- Kohli, R. M. and Zhang, Y. (2013) 'TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation', *Nature*, 502(7472), pp. 472-9.
- Koshland, D. and Strunnikov, A. (1996) 'Mitotic chromosome condensation', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, pp. 305-33.
- Kouzarides, T. (2007) 'Chromatin modifications and their function', *Cell*, 128(4), pp. 693-705.
- Laan, L. A., den Boer, A. T., Hennekam, R. C., Renier, W. O. and Brouwer, O. F. (1996) 'Angelman syndrome in adulthood', *Am J Med Genet*, 66(3), pp. 356-60.
- Laurier, V., Lapeyrade, A., Copet, P., Demeer, G., Silvie, M., Bieth, E., Coupaye, M., Poitou, C., Lorenzini, F., Labrousse, F., Molinas, C., Tauber, M., Thuilleaux, D. and Jauregi, J. (2015) 'Medical, psychological and social features in a large cohort of adults with Prader-Willi syndrome: experience from a dedicated centre in France', *J Intellect Disabil Res*, 59(5), pp. 411-21.
- Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. (1993) 'Role for DNA methylation in genomic imprinting', *Nature*, 366(6453), pp. 362-5.
- Lionti, T., Reid, S. M. and Rowell, M. M. (2012) 'Prader-Willi syndrome in Victoria: mortality and causes of death', *J Paediatr Child Health*, 48(6), pp. 506-11.

- Luedi, P. P., Dietrich, F. S., Weidman, J. R., Bosko, J. M., Jirtle, R. L. and Hartemink, A. J. (2007) 'Computational and experimental identification of novel human imprinted genes', *Genome Res*, 17(12), pp. 1723-30.
- Mann, M. R. and Bartolomei, M. S. (1999) 'Towards a molecular understanding of Prader-Willi and Angelman syndromes', *Hum Mol Genet*, 8(10), pp. 1867-73.
- McGrath, J. and Solter, D. (1984) 'Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes', *Cell*, 37(1), pp. 179-83.
- Meguro, M., Kashiwagi, A., Mitsuya, K., Nakao, M., Kondo, I., Saitoh, S. and Oshimura, M. (2001) 'A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome', *Nat Genet*, 28(1), pp. 19-20.
- Meng, L., Person, R. E., Huang, W., Zhu, P. J., Costa-Mattioli, M. and Beaudet, A. L. (2013) 'Truncation of Ube3a-ATS unsilences paternal Ube3a and ameliorates behavioral defects in the Angelman syndrome mouse model', *PLoS Genet*, 9(12), pp. e1004039.
- Messerschmidt, D. M., Knowles, B. B. and Solter, D. (2014) 'DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos', *Genes Dev*, 28(8), pp. 812-28.
- Mohammad, F., Mondal, T. and Kanduri, C. (2009) 'Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs', *Epigenetics*, 4(5), pp. 277-86.
- Moore, L. D., Le, T. and Fan, G. (2013) 'DNA methylation and its basic function', *Neuropsychopharmacology*, 38(1), pp. 23-38.
- Nakamura, T., Liu, Y. J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y. and Nakano, T. (2012) 'PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos', *Nature*, 486(7403), pp. 415-9.
- Nakao, M. and Sasaki, H. (1996) 'Genomic imprinting: significance in development and diseases and the molecular mechanisms', *J Biochem*, 120(3), pp. 467-73.
- Nicholls, R. D., Knoll, J. H., Butler, M. G., Karam, S. and Lalande, M. (1989) 'Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome', *Nature*, 342(6247), pp. 281-5.
- O'Neill, M. J. (2005) 'The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals', *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1, pp. R113-20.
- Ohta, T., Gray, T. A., Rogan, P. K., Buiting, K., Gabriel, J. M., Saitoh, S., Muralidhar, B., Bilienska, B., Krajewska-Walasek, M., Driscoll, D. J., Horsthemke, B., Butler, M. G. and Nicholls, R. D. (1999) 'Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome', *Am J Hum Genet*, 64(2), pp. 397-413.
- Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S. P., Allis, C. D., Cheng, X. and Bestor, T. H. (2007) 'DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA', *Nature*, 448(7154), pp. 714-7.
- Perk, J., Makedonski, K., Lande, L., Cedar, H., Razin, A. and Shemer, R. (2002) 'The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center', *EMBO J*, 21(21), pp. 5807-14.
- Petersen, M. B., Brondum-Nielsen, K., Hansen, L. K. and Wulff, K. (1995) 'Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish county', *Am J Med Genet*, (no. 3), pp. 261-262.
- Rabinovitz, S., Kaufman, Y., Ludwig, G., Razin, A. and Shemer, R. (2012) 'Mechanisms of activation of the paternally expressed genes by the Prader-Willi imprinting center in the Prader-Willi/Angelman syndromes domains', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(19), pp. 7403-8.
- Reinhart, B., Eljanne, M. and Chaillet, J. R. (2002) 'Shared role for differentially methylated domains of imprinted genes', *Mol Cell Biol*, 22(7), pp. 2089-98.
- Robinson, W. P., Christian, S. L., Kuchinka, B. D., Penaherrera, M. S., Das, S., Schuffenhauer, S., Malcolm, S., Schinzel, A. A., Hassold, T. J. and Ledbetter, D. H. (2000) 'Somatic segregation

- errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15', *Clin Genet*, 57(5), pp. 349-58.
- Rose, N. R. and Klose, R. J. (2014) 'Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation', *Biochim Biophys Acta*, 1839(12), pp. 1362-72.
- Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1992) 'Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role?', *Trends Biochem Sci*, 17(3), pp. 93-8.
- Rougeulle, C., Cardoso, C., Fontes, M., Colleaux, L. and Lalande, M. (1998) 'An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript', *Nat Genet*, 19(1), pp. 15-6.
- Rountree, M. R., Bachman, K. E. and Baylin, S. B. (2000) 'DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci', *Nat Genet*, 25(3), pp. 269-77.
- Sanli, I. and Feil, R. (2015) 'Chromatin mechanisms in the developmental control of imprinted gene expression', *Int J Biochem Cell Biol*.
- Schrander-Stumpel, C. T., Curfs, L. M., Sastrowijoto, P., Cassidy, S. B., Schrander, J. J. and Fryns, J. P. (2004) 'Prader-Willi syndrome: causes of death in an international series of 27 cases', *Am J Med Genet A*, 124A(4), pp. 333-8.
- Searle, A. G. and Beechey, C. V. (1990) 'Genome imprinting phenomena on mouse chromosome 7', *Genet Res*, 56(2-3), pp. 237-44.
- Shiota, K. (2004) 'DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals', *Cytogenet Genome Res*, 105(2-4), pp. 325-34.
- Simon, I., Tenzen, T., Reubinoff, B. E., Hillman, D., McCarrey, J. R. and Cedar, H. (1999) 'Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development', *Nature*, 401(6756), pp. 929-32.
- Soejima, H. and Higashimoto, K. (2013) 'Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders', *J Hum Genet*, 58(7), pp. 402-9.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000) 'The language of covalent histone modifications', *Nature*, 403(6765), pp. 41-5.
- Surani, M. A., Barton, S. C. and Norris, M. L. (1984) 'Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis', *Nature*, 308(5959), pp. 548-50.
- Šerman, A., Vlahović, M., Šerman, L. and Bulić-Jakuš, F. (2006) 'DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals', *Coll Antropol*, 30(3), pp. 665-71.
- Thibert, R. L., Larson, A. M., Hsieh, D. T., Raby, A. R. and Thiele, E. A. (2013) 'Neurologic manifestations of Angelman syndrome', *Pediatr Neurol*, (no. 4), pp. 271-279.
- Trerotola, M., Relli, V., Simeone, P. and Alberti, S. (2015) 'Epigenetic inheritance and the missing heritability', *Hum Genomics*, 9(1), pp. 17.
- Uyar, A. and Seli, E. (2014) 'The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders', *Curr Opin Obstet Gynecol*, 26(3), pp. 210-21.
- Waggoner, D. (2007) 'Mechanisms of disease: epigenesis', *Semin Pediatr Neurol*, 14(1), pp. 7-14.
- Wan, L. B. and Bartolomei, M. S. (2008) 'Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators', *Adv Genet*, 61, pp. 207-23.
- Whitman, B. Y., Myers, S., Carrel, A. and Allen, D. (2002) 'The behavioral impact of growth hormone treatment for children and adolescents with Prader-Willi syndrome: a 2-year, controlled study', *Pediatrics*, 109(2), pp. E35.
- Williams, C. A., Beaudet, A. L., Clayton-Smith, J., Knoll, J. H., Kyllerman, M., Laan, L. A. and Magenis, R. E. (2006) 'Angelman syndrome 2005: Updated consensus for diagnostic criteria', *Am J Med Genet*, (no. 5), pp. 413-418.
- Williams, C. A., Driscoll, D. J. and Dagli, A. I. (2010) 'Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome', *Genet Med*, 12(7), pp. 385-95.
- Williams, C. A. and Frias, J. L. (1982.) 'The Angelman ("happy puppet") syndrome', *Am J Med Genet*, (no. 4), pp. 453-460.

- Wu, C. and Morris, J. R. (2001) 'Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence', *Science*, 293(5532), pp. 1103-5.
- Wu, M. Y., Tsai, T. F. and Beaudet, A. L. (2006) 'Deficiency of Rbbp1/Arid4a and Rbbp1l1/Arid4b alters epigenetic modifications and suppresses an imprinting defect in the PWS/AS domain', *Genes Dev*, 20(20), pp. 2859-70.
- Zhang, Y. and Tycko, B. (1992) 'Monoallelic expression of the human H19 gene', *Nat Genet*, 1(1), pp. 40-4.
- Ziller, M. J., Gu, H., Muller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T., Kohlbacher, O., De Jager, P. L., Rosen, E. D., Bennett, D. A., Bernstein, B. E., Gnirke, A. and Meissner, A. (2013) 'Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome', *Nature*, 500(7463), pp. 477-81.

## 9. Životopis

---

### OSOBNJE INFORMACIJE

**Helena Tomac**

 Zagreb, Republika Hrvatska

 +385989511550

 helena.tomac@gmail.com

Datum rođenja 10/05/1988

Mjesto rođenja Virovitica

---

### OBRAZOVANJE

2007-2015 Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2003-2007 Gimnazija Petra Preradovića, Virovitica, prirodoslovno-matematički smjer

1995-2003 OŠ Ivane Brlić-Mažuranić, Virovitica

---

### AKTIVNOSTI

2012-2015 instruktor, Studentska Ekipa Prve Pomoći (StEPP)

2010 Student Work and Travel Program, Los Angeles, SAD

---

### STRANI JEZICI

engleski napredno u govoru i pismu