

IMPRINTING GENOMOWY U SSAKÓW: NAJNOWSZE DONIESIENIA

GENOMIC IMPRINTING IN MAMMALS: THE NEWEST REPORTS

Marcin MARCINIAK

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie

Streszczenie: Imprinting genomowy (rodzicielskie piętno genomowe) polega na epigenetycznej modyfikacji allelu danego genu w zależności od jego pochodzenia (od ojca lub od matki), a tym samym wyciszeniu jednego allelu. Różnice w genomach rodzicielskich powstają w trakcie gametogenezy jako specyficzne dla linii płciowej wzory metylacji DNA w określonych odcinkach chromosomów. Większość imprintowanych genów występuje w wyraźnych klastrach. W każdym z nich kodowana jest przynajmniej jedna cząsteczka RNA, która nie ulega translacji. Jak dotychczas udało się ustalić dwa mechanizmy wyciszania genów u ssaków dla zaledwie trzech imprintowanych klastrów. Wyniki uzyskiwane z analiz pozostałych imprintowanych genów pozwolą na stwierdzenie, czy faktycznie strategie oparte na antysensownym RNA i sekwencje insulatorowe są uniwersalne.

Słowa kluczowe: imprinting genomowy, klastry, centra piętnowania, insulatory, niekodujący RNA.

Summary: Experiments on androgenetic and gynogenetic mammalian embryos showed that both maternal and paternal genomes are needed for normal development. The existence of parental genomes non equivalency was proposed and term genomic imprinting was coined. Genomic imprinting is an epigenetic phenomenon that results in monoallelic expression of certain genes in a parent-of-origin-dependent manner. The mechanism by which imprinting is realized is cytosine methylation. DNA sequences that are modified with cytosine methylation are called imprinting control regions (ICRs). ICRs are usually located in CpG-rich regions close to promoters of imprinted genes and can regulate parent-specific gene expression bidirectionally over long distances. Allelic methylation marks are established during gametogenesis, following the erasure of preexisting DNA methylation in the primordial germ cells. In females, gene imprinting timing depends on oogenesis stage and oocyte dimension. For example, *Ndn* and *Snrpn* genes are imprinted during the primordial to primary follicle stages, while *Peg3* gene in secondary follicle. In males, imprinting of some genes (i.e. *H19*) is completed at spermatogonial stage of spermatogenesis, thus before meiosis occurs. Mouse model showed that most imprinted genes have non-random location and are clustered within imprinting regions of the genome. The first identified cluster of imprinted genes was that containing paternally expressed *Igf2* and maternally expressed *H19*. Transcription of these genes is regulated by physical contact between differentially methylated regions (DMRs) that contain insulators, activators and silencers. Disruption of *IGF2* imprinted expression (and also mutations in closely linked *KCNQ1* cluster) leads to congenital growth disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) in humans.

Other well studied examples of neurodevelopmental imprinting disorders are Prader-Willi (PWS) and Angelman (AS) syndromes. Both diseases could be caused by paternal and maternal uniparental disomies, deletions of the entire imprinting domain and mutations in imprinting centre, which leads to the failure of the imprinting mechanism *per se*. Clusters of imprinted genes contain multiple imprinted mRNA genes and at least one imprinted noncoding RNA. Imprinted genes are involved in various processes in cell. For example, some of them codes for transporters of organic cation (i.e. *Slc22a2*), basic and neutral aminoacids (*Slc38a4*) and potassium ions (*Kcnq1*). Other protein products of imprinted genes are involved in cell cycle control (i.e. *Cdkn1c*), intracellular signaling cascades (i.e. *Grb10*), creatine synthesis (*Gatm*) or endocrine pathways (i.e. *Igf2*, *Igf2r*). More than 25% of imprinted genes code for ncRNA (non-coding RNA). Among them are genes coding for antisense RNA (*Igf2r* coding for *Air*), small nucleolar RNA (snoRNA; i.e. *SNRPN* coding for *HBII-52* and *HBII-85*), microRNA (miRNA; i.e. *Rtl1* coding for *mir-127* and *mir-136*). So far, the silencing mechanisms has been determined for only three imprinted clusters and contain insulator- and RNA-mediated silencing. The results from other imprinted clusters are awaited to see whether only two types of basic imprinting mechanisms are present in mammals. The best tool in unravelling this secret will be genome-wide screening and knockout studies of particular imprinted genes in the mouse.

Key words: genomic imprinting, clusters, imprinting control regions, insulators, non-coding RNA.

WSTĘP

Kiedy odkryto strukturę helisy DNA, sprawa zdawała się być przesądzona: po rodzicach dziedziczymy homologiczne kopie nici DNA (czyli geny), które decydują o tym, jakich cech jesteśmy właścicielami. Jednak dalsze obserwacje nadały sprawie zupełnie nowy wymiar. Okazuje się bowiem, że chromosomy przekazane nam przez rodziców w komórkach rozrodczych nie są równocenne, lecz w pewien sposób napiętnowane (imprintowane). Niepodważalnych dowodów na istnienie imprintingu genomowego dostarczyły liczne doświadczenia z wykorzystaniem zarodków ssaków andro- (powstałych z połączenia dwóch przedjądrzy męskich) i gynogenetycznych (dwa przedjądrza żeńskie). Wskazały one jednoznacznie na konieczność posiadania przez zarodek materiału genetycznego obojga rodziców [52]. Do podobnych wniosków doprowadziły badania potomstwa heterozygotycznych nosicieli pewnych translokacji chromosomowych u myszy. Wykazały one, że do normalnego rozwoju niezbędne jest posiadanie pewnych konkretnych odcinków chromosomowych pochodzenia matczynego oraz innych pochodzenia ojcowskiego [66]. Piętnowanie genów powoduje ich monoalleliczną ekspresję w zależności od pochodzenia od jednego z rodziców. Za jeden z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko uważa się metylację DNA, jednak nie można wykluczyć innych czynników epigenetycznych (np. modyfikacja histonów) decydujących o modyfikacjach genomu odmiennych niż zmiana sekwencji nukleotydowej.

IMPRINTING GENOMOWY W KOMÓRKACH ROZRODCZYCH I W ZARODKU

Zapłodniona komórka jajowa ma zmetylowany DNA, który zlokalizowany jest w genach imprintowanych oraz w większości w sekwencjach niepodlegających

napiętnowaniu. Na wczesnych etapach rozwoju zarodka dochodzi do demetylacji tych ostatnich, podczas gdy geny imprintowane (oraz heterochromatyna centromerowa i niektóre retrotranspozony) nie podlegają temu zjawisku. W trakcie wędrówki komórek prąciowych do zawiązków gonad (lub bezpośrednio po niej) rozpoczyna się proces ich demetylacji, który zostaje ukończony przed etapem ich zatrzymania w profazie I podziału mejotycznego (oocyty) i mitozie (spermatogonia) [48, 81, 100]. Następnie w komórkach rozrodczych podczas gametogenezy dochodzi do zależnego od płci przywrócenia *de novo* metylacji. W procesie tym biorą udział metylotransferazy DNA (głównie DNMT3A i DNMT3B przy współudziale DNMT3L), które katalizują przeniesienie grupy metylowej z S-adenosyl-L-metioniny na piąty atom węgla cytozyny [3, 91].

Moment nakładania imprintingu podczas oogenezy zależy od stadium pęcherzyka jajnikowego i wielkości oocytu, a nie od wieku osobnika. Istnieją geny, które ulegają napiętnowaniu już na etapie pęcherzyków pierwotnych lub pierwszorzędowych (*Snrpn*, *Znf127*, *Ndn*), podczas gdy inne (*Peg3*, *Igf2r* i *p57^{KIP2}*) przechodzą ten proces na etapie pęcherzyka drugorzędowego. Zdarzają się też takie, które imprinting nabywają znacznie później, w stadium pęcherzyka antralnego (*Impact*) lub przedowulacyjnego (*Peg1*) [21, 48, 62]. Warto więc tu zauważyć, że prowokowanie superowulacji, która nieodzwrotnie związana jest z różnymi technikami rozrodu wspomaganego, może przyczyniać się do produkcji oocytów bez właściwie nałożonego imprintingu, przynajmniej dla niektórych genów [77].

W porównaniu z oogenezą, informacje na temat nakładania imprintingu podczas spermatogenezy są uboższe. Z badań nad genem *H19* [20] oraz analizy ekspresji genów i nokautów dla metylotransferaz DNA [95] wiadomo, że proces ten rozpoczyna się już na etapie spermatogoniów i dla niektórych genów (m.in. *H19*) jest już na tym etapie kompletny. Jego zakończenie najprawdopodobniej ma miejsce w stadium okrągłych spermatyd, ponieważ zapłodnienie z ich udziałem prowadzi już do normalnego rozwoju zarodków myszy [55].

Komórki somatyczne utrzymują wzorce metylacji przez cały okres rozwoju embrionalnego oraz w późniejszym życiu osobnika, chociaż wzór metylacji może być tracony lub zmieniany w niektórych tkankach. Dzieje się tak np. z wątrową owiec i człowieka, w której w okresie życia płodowego gen *Igf2* wykazuje ekspresję zależną od płci, podczas gdy w dorosłym życiu ekspresja ta jest bialleliczna [53].

ROZMIARY IMPRINTINGU W GENOMIE

Mimo iż pierwszy imprintowany gen odkryto na początku lat 90., dokładna liczba takich genów nadal nie została poznana. Jak dotąd, udało się zidentyfikować 73 imprintowane geny u myszy, z czego 36 wykazuje ekspresję matczyną, a 37 ojcowską [72]. Istnieją jednak doniesienia o istnieniu co najmniej 600 [49], a nawet 2114 potencjalnie imprintowanych genów u myszy [61].

U myszy geny podlegające imprintingowi nie są rozmieszczone w sposób równomierny w genomie. Większość z nich występuje w klastrach (ang. *clusters*), które mają wspólne elementy *cis*-regulatorowe. Do rzadkości należą geny występujące pojedynczo. Około połowa znanych genów ulegających imprintingowi u myszy zlokalizowana jest na chromosomie nr 7 i zorganizowana w przynajmniej pięć wyraźnych imprintowanych domen, z których każda zawiera zarówno geny ulegające ekspresji z allelu ojcowskiego, jak i matczynego [98].

Sekwencje DNA odpowiedzialne za nakładanie imprintingu określane są jako centra piętnowania lub ICRs (ang. *Imprinting Control Regions*). Są one zlokalizowane zwykle w regionach bogatych w dinukleotydy CpG w pobliżu sekwencji promotorowych imprintowanych genów i przejawiają różny wzorzec metylacji w zależności od tego, czy dany allel pochodzi od ojca czy od matki. Należy jednak zaznaczyć, że ojcowskie DMRs (określane również jako DMDs) (ang. *Differentially Methylated Region/Domains*) zawierają mniej metylowanych wysp CpG w porównaniu z matczynymi [37]. Przegląd znanych ICRs wskazuje, że regiony te często zawierają sekwencje repetytywne ułożone tandemowo. Z badań nad genami *Snrpn*, *Igf2r* i *Kcnq1* wiadomo, że podstawowa jednostka składająca się z 18–170 pz i powtórzona 6–9 razy może być miejscem przyłączenia czynników transkrypcyjnych [73]. Należą do nich np. CTCF (ang. *CCCTC-binding factor*) specyficzny m.in. dla centrum piętnowania domeny imprintowanej *H19/Igf2* oraz czynnik YY1 dla DMR genu *Peg3*.

KLASTER IGF2/H19

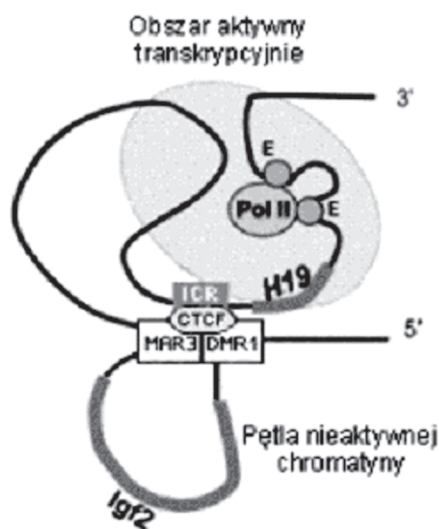
Ten najwcześniej odkryty klaster imprintowanych genów dostarczył, jak dotychczas, najwięcej informacji na temat mechanizmów ich zachowania. Transkrypcyjna regulacja najważniejszych genów tego klastra, czyli genów *H19* i *Igf2*, odbywa się dzięki fizycznemu kontaktowi pomiędzy DMRs. Te zróżnicowane pod względem wzoru metylacji obszary genomu zawierają oprócz aktywatorów i wyciszaczy także sekwencje insulatorowe (ang. *insulators*), które potrafią hamować ekspresję genów poprzez oddzielanie ich od enhanserów [39, 47]. Do wyciszenia *H19* i aktywowania *Igf2* na chromosomie ojcowskim wymagana jest metylacja ojcowskiego chromosomu w ICR zlokalizowanym 2 kb w kierunku 5' od *H19*. Natomiast brak metylacji w matczynym chromosomie w DMR genu *H19* prowadzi do ekspresji matczynego *H19* i wyciszenia *Igf2* w trakcie rozwoju [88].

DMR genu *H19* jest sekwencją docelową dla białka CTCF mającego 11 motywów palców cynkowych, dzięki którym potrafi wiązać się do czterech miejsc na niemetylowanym matczynym DMR dla genu *H19*. Przyłączenie CTCF stwarza fizyczną barierę na matczynym allelu, która uniemożliwia interakcję enhanserów zlokalizowanych w kierunku 3' od genu *H19* z promotorami *Igf2* [15, 39, 89]. W procesie tym pośredniczą: DMR1, który jest wrażliwym na metylację wyciszaczem

oraz MAR3 (ang. *Matrix Attachment Region*). Otaczają one gen *Igf2* i przyczyniają się do jego wypełnienia, co czyni ten fragment DNA niedostępny dla polimerazy RNA II (ryc. 1).

W porównaniu z danymi na temat klastra *Igf2/H19* myszy, informacje na temat jego ludzkiego odpowiednika są fragmentaryczne. Ludzki DMR genu *H19* zawiera siedem miejsc wiążących CTCF, z których tylko jedno (szóste) wydaje się pełnić kluczową rolę w regulacji ekspresji *H19* i *IGF2* [90].

O ile proces piętnowania genów *Igf2* i *H19* jest bardzo wnikliwie analizowany, o tyle badania nad ekspresją trzeciego z genów omawianego klastra, czyli *Ins2*, są poszłakowe. Dotychczas uzyskane dane wskazują na ekspresję ojcowskiego *Ins2* w obrębie woreczka żółtkowego u ludzi i myszy oraz zagadkową, monoalleliczną ekspresję w grasicy człowieka [58].



RYCINA 1. Model wyciszania genu *Igf2* w matczynym allelu (E – enhansery, Pol II – Polimeraza RNA II) [39, zmienione]

FIGURE 1. Model of *Igf2* silencing of maternal allele (E – enhancers, Pol II – RNA polymerase II) [39, changed]

YY1 – NOWY CZYNNIK KONTROLUJĄCY CENTRA PIĘTNOWANIA

YY1 jest białkiem typu Gli-Kruppel mającym motyw palców cynkowych, które wiąże się do DMRs genów *Peg3*, *Xist*, *Tsix* i *Nespas* [31, 32, 33]. Sekwencja CGCCATnTT (n oznacza dowolny nukleotyd) rozpoznawana przez YY1 znajduje się bardzo blisko promotorów lub pierwszych intronów omawianych genów. Świadczy to o bliskim, aczkolwiek nie do końca jeszcze poznany związek z procesem transkrypcji [31]. Przyłączenie YY1 do wspomnianej sekwencji genów *Peg3*, *Xist* i *Tsix* powoduje zwiększenie wydajności transkrypcyjnej ich promotorów, czego najlepszym dowodem jest sekwencja DXPas34 leżąca w pobliżu głównego promotora genu *Tsix*. Nie jest ona niezależnym enhanserem, ale enhansery leżące w jej pobliżu wymagają jej do swojej aktywności [85, 93]. Co więcej, miejsca wiążące YY1 omawianych genów wykazują orientację zgodną z kierunkiem przebiegu ich transkrypcji [31]. Wydaje się to potwierdzać wcześniejsze obserwacje, zgodnie z którymi YY1 potrafi wyginać cząsteczkę DNA w rejonach promotorowych. Powoduje to zmianę przestrzennych oddziaływań pomiędzy aktywatorami transkrypcji a pozostałymi składnikami podstawowego kompleksu transkrypcyjnego i w konsekwencji zahamowanie lub aktywację procesu transkrypcji [34].

Białko YY1 wykazuje znaczny konserwatyzm wśród kręgowców, a jego homologi, które zaangażowane są w przyłączanie białek z grupy Polycomb, wykryto u *Drosophila*

melanogaster. Liczne badania wskazują, że YY1 ssaków może spełniać podobne funkcje jak jego homolog u owadów [84]. Kompleksy białek Polycomb u ssaków zaangażowane są w utrzymywanie imprintowanych domen w stanie trwałego i dziedzicznego wyciszenia, co może sugerować, że zarówno YY1, jak i białka z grupy Polycomb mogą być zaangażowane w ustanawianie sygnałów imprintingu dla ICRs genów *Peg3*, *Xist*, *Tsix* i *Nespas* podczas gametogenezy [31, 32].

FUNKCJA IMPRINTOWANYCH GENÓW

Geny imprintowane są zaangażowane w różnorodne procesy komórkowe i brak jest wspólnego ogniwa łączącego ich funkcje. Na przykład, niektóre geny imprintowane kodują białka biorące udział w transporcie kationów organicznych (w tym ksenobiotyków) (*Slc22a2*, *Slc22a3* [4]), aminokwasów obojętnych i zasadowych (*Slc38a4* [56]), jonów potasu (*Kcnq1* [92]), inne zaangażowane są w syntezę kreatyny (*Gatm* [76]) oraz kontrolę cyklu komórkowego (*Cdkn1c* [2]). Niektóre z nich kodują podjednostkę α białek G, przez co uczestniczą w sygnalizacji zależnej od cAMP (*Gnas* [99]), inne należą do wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej poprzez wiązanie się do aktywowanych receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej oraz oddziaływanie z kinazami Raf1 i MEK1 (*Grb10* [60]). Jeszcze inne uczestniczą w endo- i parakrynej komunikacji międzykomórkowej wpływając na rozwój zarówno pre-, jak i postnatalny (*Ins1* i *Ins2* [16], *Igf2* i *Igf2r* [19]).

Analiza mutantów pod względem imprintowanych genów wskazuje, że utrata funkcji genów wykazujących ojcowską ekspresję wiąże się często z opóźnieniem tempa wzrostu przeciwieństwie do analogicznej sytuacji związanej z genami matczynymi, kiedy dochodzi do jego przyspieszenia [70]. Jedynym wyjątkiem wydaje się być gen *Gtl2*, którego produkt pomimo matczynej ekspresji, w przypadku mutacji prowadzi do opóźnienia tempa wzrostu. Związane jest to najprawdopodobniej z wyciszeniem sąsiadującego z nim genu *Dlk1*, który wykazuje ekspresję allelu ojcowskiego [78, 86].

Powyższe obserwacje zgodne są z hipotezą konfliktu materiału genetycznego ojca i matki, który wyjaśnia genezę powstania imprintingu [59]. W populacjach poligamicznych, w których samica może kopulować z więcej niż jednym samcem, w interesie osobnika męskiego jest posiadanie dużego, zdrowego, dobrze rozwiniętego potomstwa, które wygrałoby konkurencję z potomstwem innego samca. Z perspektywy samicy natomiast przetrwanie oznacza możliwość posiadania większej liczby miotów i pozostawienie bardziej licznego potomstwa. W jej interesie jest więc optymalizacja pomiędzy wielkością młodych a ich liczbą [22, 23].

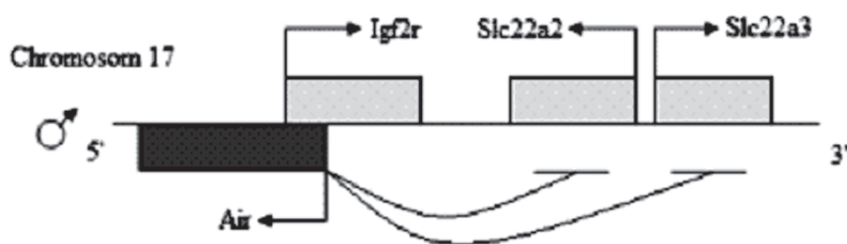
RNA niekodujący

Ponad 25% [70] imprintowanych genów koduje ncRNA (ang. *non-coding RNA*). Geny te można podzielić na kilka kategorii. Pierwszą stanowią imprintowane geny

kodujące RNA, który jest antysensowny w stosunku do transkryptów genów kodujących białka na tym samym chromosomie. Należą tu (jako pierwszy w każdej parze podano RNA antysensowny) *Nespas/Nesp*, *Ube3a-ats/Ube3a*, *Kcnqot1/Kcnq1* oraz *Zim3/Usp29* [30, 42, 64, 97]. Dla wszystkich – z wyjątkiem *Zim3/Usp29* – antysensowny RNA pochodzi z allelu ojcowskiego. Dobrym tego przykładem jest *Igf2r*, który jak większość imprintowanych genów występuje w klastrze z innymi genami. Kluczową rolę w kontroli ich imprintingu pełni DMR mieszczący się w drugim intronie genu *Igf2r*, który jednocześnie zawiera promotor dla niekodującego, antysensownego *Air* RNA, który częściowo pokrywa się z transkrypcją genu *Igf2r*. Odpowiada on za wyciszenie genów tego klastra w układzie *cis* [64, 68, 82] (ryc. 2). Mechanizm, dzięki któremu *Air* RNA wycisza sąsiednie geny, nie jest do końca wyjaśniony. Sugeruje się, że działa on w sposób analogiczny do ncRNA genu *Xist*, który naznacza chromosom X przeznaczony do inaktywacji, dzięki czemu umożliwia rekrutację czynników (m.in. białek z grupy Polycomb) warunkujących przebieg heterochromatyzacji. Podobny sposób działania przypisuje się *Kcnq1ot1* RNA, który wycisza geny klastra *Kcnq1* [67].

Do drugiej grupy zaliczamy gen *Zfp127*. Antysensowny RNA (*Zfp127as*), który powstaje w wyniku transkrypcji z ojcowskiego allelu, działając w układzie trans powoduje wyciszenie transkryptu matczyńskiego genu [25].

Trzecią grupę stanowią imprintowane geny kodujące tzw. mały jąderkowy RNA – snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*). Wielkość ich waha się pomiędzy 60 a 300 nukleotydów i można je podzielić na dwie duże grupy określane jako C/D oraz H/ACA. Katalizują one odpowiednio metylację 2'-*O*-rybozy oraz pseudourydylację różnych rRNA, snRNA (ang. *small nuclear*) i mRNA wpływając na ich modyfikację [36, 51]. Do tej grupy zaliczamy m.in. liczne snoRNA specyficzne dla klastra SNRPN, z których *HBII-52* oraz *HBII-85* wykazują imprinting ojcowski i mają wpływ na występowanie Zespołu Pradera-Willego [14, 18, 35, 75]. Należą tu również trzy grupy snoRNA charakterystyczne dla klastra DLK1-GTL2, które są transkryptami części intronowych genu *MEG8* [8].



RYCINA 2. Organizacja imprintowanych genów mysiego klastra *Igf2r* wraz z przyjętym modelem ich wyciszenia z udziałem *Air* RNA (strzałki wskazują przebieg transkrypcji)

FIGURE 2. Organisation of imprinted genes in mouse *Igf2r* cluster with the model of *Air* RNA induced silencing (arrows indicate transcriptional orientation)

Ostatnią grupę stanowią tzw. mikroRNA – miRNA (ang. *micro RNA*). Jest to grupa jednoniciowych, niekodujących RNA, które występują u wszystkich wielokomórkowych Eukaryota i regulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Geny kodujące miRNA mogą występować pojedynczo lub w policistronowych skupiskach, w intronach genów lub w obszarach pozagenowych. Jeśli zlokalizowane są w intronie, to korzystają z promotora i elementów regulatorowych genu gospodarza. Regulacja genów zorganizowanych w formy policistronowe jest przypuszczalnie wspólna, podobna do operonów bakteryjnych [45, 46]. Aktywną formę miRNA stanowią fragmenty długości 21–25 nukleotydów [51], które w połączeniu z wielobiałkowym kompleksem RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*) łączą się z fragmentem 3'-UTR (ang. *UnTranslated Region*) genu docelowego. W zależności od stopnia komplementarności dochodzi do degradacji mRNA (w przypadku pełnej zgodności) lub tylko zahamowania translacji przy zachowaniu integralności transkryptu (gdy sparowanie zasad nie jest dokładne) [65].

Najlepiej poznaną domeną imprintowanych genów kodujących miRNA jest klaster Dlk1-Gtl2. Dwaj jego przedstawiciele, *mir-127* i *mir-136* są ulegającymi ekspresji po matce antysensownymi RNA w stosunku do ojcowskiego genu *Rtl1* [12, 80]. Pozostałe (w liczbie 44) ulegają transkrypcji z części intronowych i/lub egzonowych genów *Mirg* i *Ev1* lub z obszarów międzygenowych tego klastra. Ze względu na zdolność wiązania się niektórych z nich do polirybosomów podejrzewane są one o hamowanie translacji [79].

Interesującym doniesieniem, które poszerza wiedzę na temat mechanizmów kontroli genu *H19*, jest wyizolowanie z jego transkryptu 23-nukleotydowego miRNA oznaczanego jako *miR-675* [6]. Wydaje się być wysoce prawdopodobne, że *miR-675* jest czynnikiem obniżającym ekspresję *H19* w specyficznych komórkach i tkankach. Nasuwa to przypuszczenie, że funkcja transkryptu *H19* pełnej długości nie ogranicza się tylko do hamowania procesu nowotworzenia [27] i wpływu na żywotność zarodków [5], ale również wielu innych procesów.

GŁÓWNE ZABURZENIA IMPRINTINGU

Zespół Pradera-Willego i Zespół Angelmana

Zespół Pradera-Willego (PWS) i Zespół Angelmana (AS) to zaburzenia neurofizjologiczne powstające w wyniku nieprawidłowej ekspresji imprintowanych genów zlokalizowanych na chromosomie 15q11-13 u człowieka. PWS charakteryzuje się obniżonym napięciem mięśniowym, opóźnieniem rozwoju psychoruchowego, dysmorficzną twarzą, hipogonadyzmem oraz żarłocnością i otyłością po drugim roku życia [94]. AS cechuje się atakami drgawek, dziwacznymi, nieskoordynowanymi ruchami, niepohamowanymi wybuchami śmiechu (tzw. „syndrom szczęśliwej kukielki”), zaburzeniami mowy lub jej zupełnym brakiem oraz poważnym opóźnieniem w rozwoju [10]. U podłoża genetycznego tych zaburzeń leżą różne mechanizmy, do których można zaliczyć delecje całego imprintowanego obszaru, jak i poszczególnych

jego genów, matczyne (wywołujące PWS) i ojcowskie (wywołujące AS) disomie uniparentalne oraz mikrodelecje w obrębie centrum piętnowania [11].

Locus PWS/AS znajduje się pod kontrolą dwuczęściowego centrum piętnowania (PWS-IC i AS-IC) zlokalizowanego w regionie 5' genu *SNRPN* i/lub w regionie przyległym do tego obszaru. PWS-IC stanowi miejsce wiązania różnych białek regulatorowych, z których NRF-1 poprzez regulację homeostazy glukozy i funkcjonowania mitochondriów [7] wydaje się uzasadniać niektóre z objawów PWS (zaburzenia metabolizmu, otyłość) [74]. PWS-IC odpowiedzialne jest za ustalenie i utrzymanie ojcowskich epigenotypów w komórkach somatycznych, natomiast AS-IC jest wymagane do ustalenia matczyńskich epigenotypów podczas oogenezy poprzez negatywną regulację PWS-IC [24, 69].

PWS powstaje w wyniku utraty ekspresji grupy genów ojcowskich, do których zaliczamy *SNRPN*. Koduje on dwa polipeptydy o nie do końca poznanej funkcji oraz długi transkrypt RNA, który podlega alternatywnemu splicingowi i zawiera *UBE3A-ATS* (ang. *Antisense Transcript*) oraz liczne snoRNA [42, 75]. Jeden z nich *HBII-52* zaangażowany jest w kontrolę alternatywnego splicingu mRNA dla receptora serotoniny, czym przyczynia się do powstania odmiennej izoforny tego białka u ludzi chorych pozbawionych tego małego RNA [35].

Oprócz *SNRPN* również inne geny ojcowskie leżą u podłoża PWS. Należą do nich *NDN* i *MAGEL2* o podobnych do siebie wzorach ekspresji. Najprawdopodobniej działają one jako czynniki antyapoptotyczne dla neuronów na wczesnych etapach rozwoju układu nerwowego, jak również wpływają na wzrost aksonalny czuciowych neuronów rdzeniowych oraz być może na otyłość [1, 38, 43, 44, 63]. Dodatkowo *NDN* bierze udział w różnicowaniu neuronów GABA-ergicznych [40]. Listę zamykają *MKRN3* oraz *ZNF127* kodujący antysensowny RNA [25].

AS powstaje w wyniku utraty ekspresji matczyńskich genu *UBE3A* spowodowanego zarówno zaburzeniami w centrum piętnowania i w konsekwencji nieprawidłową syntezą *UBE3A-ATS* [24], jak i znacznie częściej delacjami w obrębie samego genu. Nie jest wykluczone również, że w powstaniu choroby uczestniczy sąsiadujący z *UBE3A* gen *ATP10C* ulegający ekspresji z matczyńskim allelem [54], dla którego nie udowodniono jednoznacznie możliwości kontroli przez *UBE3A-ATS*.

Zespół Beckwitha-Wiedemanna

Zespół Beckwitha-Wiedemanna (BWS) powstaje w wyniku nie zrównoważonej ekspresji genów w pozycji 11p15.5 u człowieka. Charakteryzuje się przede wszystkim gigantyzmem pre- i/lub postnatalnym, przerostem języka, ubytkiem powłok jamy brzusznej oraz wysokim ryzykiem wystąpienia nowotworu embrionalnego (szczególnie guza Wilmsa) [50].

Geny biorące udział w powstawaniu BWS podzielone są na dwie wyraźne, imprintowane domeny. Pierwszą stanowi klaster *KCNQ1* z przynajmniej ośmioma imprintowanymi genami (*PHLDA2*, *SLC22A18*, *CDKN1C*, *KCNQ1*, *KCNQ1ot1*, *TSSC4*, *CD81* oraz *ASCL2*) leżącymi bliżej centromeru, natomiast druga to wcześniej omawiany klaster *IGF2/H19* położony bardziej dystalnie [9]. Etiologia BWS jest

bardzo złożona i obejmuje różne mechanizmy genetyczne. Około 10–20% przypadków powodowane jest ojcowską disomią uniparentalną (UPD) odcinka 11p15.5, natomiast duplikacje pochodzenia ojcowskiego i translokacje pochodzenia matczynego stanowią 1–2% [50, 96]. Utrata imprintingu powodująca ekspresję *IGF2* z obydwóch alleli pojawia się u 20–50% pacjentów z BWS i czasem jest związana z hipermetylacją lub wyciszeniem *H19* [26, 71, 83]. Mutacja w matczynym genie *CDKN1C* (*p57^{KIP2}*) leży u podłoża 40% rodzinnych i 5% sporadycznych przypadków [41]. Większość przypadków stanowi jednak utrata metylacji matczynych wysp CpG w obrębie KvDMR1 stanowiącym centrum piętnowania. Ten zróżnicowany metylacyjnie region leży w obrębie 10 intronu genu *KCNQ1* i zawiera promotor dla wykazującego ojcowską ekspresję niekodującego RNA (*KCNQ1ot1*), który jest transkrybowany antysensownie w stosunku do matczynego genu *KCNQ1* oraz dwa miejsca wiązania CTCF. W związku z tym uważa się, że KvDMR1 poprzez aktywność insulatora (lub wyciszacza) i/lub *KCNQ1ot1* regulują negatywnie ekspresję genów klastra *KCNQ1* na chromosomie ojcowskim [13, 15, 17, 28, 29, 87].

Podobnie jak w przypadku NRF-1 i locus PWS/AS, również centrum piętnowania klastra *KCNQ1* współdziała z licznymi białkami regulatorowymi. Jednym z nich jest ZAC, białko kontrolujące przebieg cyklu komórkowego i proces nowotworzenia, czym przypomina aktywnością *CDKN1C*. Fakt bezpośredniego wiązania się ZAC do wysp CpG i kontroli transkrypcji *KCNQ1ot1* wskazuje na potencjalną jego rolę w powstawaniu BWS [2].

ZAKOŃCZENIE

Aby zrozumieć w pełni znaczenie imprintingu u ssaków, konieczne jest określenie pełnych jego rozmiarów i fizjologicznych procesów, w jakich bierze on udział. Przeszukiwanie całego genomu (ang. *genome-wide screens*) oraz badanie nokautów pojedynczych genów u myszy będą kluczowymi narzędziami w osiągnięciu tego celu. Większość naszej wiedzy na temat imprintingu pochodzi z badań na myszy laboratoryjnej, ale należy podkreślić, że bieżące informacje na temat tego zjawiska u człowieka wyraźnie wskazują na pewne różnice, zwłaszcza w łożysku. Dobrym tego przykładem jest klaster *Kcnq1*. U myszy koduje on 14 imprintowanych transkryptów, z których 8 ulega w łożysku ekspresji z allelu matczynego, podczas gdy u człowieka występuje ich tylko 6, z czego 5 wykazuje matczyną ekspresję. Rozbieżności w liczbie genów wynikają najprawdopodobniej z różnic w długości ciąży oraz liczby potomstwa. U myszy większa liczba imprintowanych genów w łożysku zwiększyła jego wydajność, co w pewien sposób zrekompensowało krótki okres rozwoju. U ludzi ciąży z reguły są pojedyncze, w przeciwieństwie do myszy, gdzie występuje zwiększona szansa na konkurencję pomiędzy osobnikami w macicy. Brak współzawodnictwa wśród płodów ludzkich uwolnił łożysko od konieczności utrzymywania imprintingu na wysokim poziomie. Dzięki temu większy nacisk mógł zostać położony na imprinting genów odpowiedzialnych w rozwoju postnatalnym za adaptacje

i zachowanie [57]. Pełne zrozumienie imprintingu w populacjach heterozygotycznych pozwoli na stwierdzenie, na ile nasze obecne hipotezy są dla nich prawdziwe.

LITERATURA

- [1] ANDRIEU D, MEZIANE H, MARLY F, ANGELATS C, FERNANDEZ PA, MUSCATELLI F. Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. *BMC Dev Biol* 2006; **6**: 56.
- [2] ARIMA T, KAMIKIHARA T, HAYASHIDA T, KATO K, INOUE T, SHIRAYOSHI Y, OSHIMURA M, SOEJIMA H, MUKAI T, WAKE N, ZAC, LITI (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 2650–2660.
- [3] BIERMANN K, STEGER K. Epigenetics in male germ cells. *J Androl* 2007; **28**: 466–480.
- [4] BOURDET DL, PRITCHARD JB, THAKKER DR. Differential substrate and inhibitory activities of ranitidine and famotidine toward human organic cation transporter 1(hOCT1; SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3). *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **315**: 1288–1297.
- [5] BRUNKOW ME, TILGHMAN SM. Ectopic expression of the H19 gene in mice causes prenatal lethality. *Genes Dev* 1991; **5**: 1092–1101.
- [6] CAI X, CULLEN BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007; **13**: 313–316.
- [7] CAM H, BALCIUNAITE E, BLAIS A, SPEKTORA, SCARPULLA RC, YOUNG R, KLUGER Y, DYNLACHT BD. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* 2004; **16**: 399–411.
- [8] CAVAILLE J, SEITZ H, PAULSEN M, FERGUSON-SMITH AC, BACHELLERIE JP. Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1527–1538.
- [9] CERRATO F, SPARAGO A, DI MATTEO I, ZOU X, DEAN W, SASAKI H, SMITH P, GENESIO R, BRUGGEMANN M, REIK W, RICCIO A. The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome: autonomous imprinting of the telomeric domain of the distal chromosome 7 cluster. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 503–511.
- [10] CLAYTON-SMITH J, LAAN L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 2003; **40**: 87–95.
- [11] DAVIES W, ISLES AR, WILKINSON LS. Imprinted genes and mental dysfunction. *Ann Med* 2001; **33**: 428–436.
- [12] DAVIS E, CAIMENT F, TORDOIR X, CAVAILLE J, FERGUSON-SMITH A, COCKETT N, GEORGES M, CHARLIER C. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol* 2005; **15**: 743–749.
- [13] DIAZ-MEYER N, DAY CD, KHATOD K, MAHER ER, COOPER W, REIK W, JUNIEN C, GRAHAM G, ALGARE, DER KALOUSTIAN VM, HIGGINS MJ. Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2003; **40**: 797–801.
- [14] DING F, PRINTS Y, DHAR MS, JOHNSON DK, GARNACHO-MONTERO C, NICHOLLS RD, FRANCIS U. Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mamm Genome* 2006; **16**: 424–431.
- [15] DU M, BEATTY LG, ZHOU W, LEW J, SCHOENHERR C, WEKSBERG R, SADOWSKI PD. Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 1927–1939.
- [16] DUVILLIE B, CORDONNIER N, DELTOUR L, DANDOY-DRON F, ITIER JM, MONTHIOUX E, JAMI J, JOSHI RL, BUCCHINI D. Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5137–5140.
- [17] FITZPATRICK GV, PUGACHEVA EM, J-Y SHIN, ABDULLAEV Z, YANG Y, KHATOD K, LOBAENKOV VV, HIGGINS MJ. Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 2636–2647.

- [18] GALLAGHER RC, PILS B, ALBALWI M, FRANCKE U. Evidence for the role of PWCRI/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 669–678.
- [19] GICQUEL C, LE BOUC Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 2006; **65**: 28–33.
- [20] HARTMANN S, BERGMANN M, BOHLE RM, WEIDNER W, STEGER K. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006; **12**: 407–411.
- [21] HIURA H, OBATA Y, KOMIYAMA J, SHIRAI M, KONO T. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells* 2006; **11**: 353–361.
- [22] ISLES AR, HOLLAND AJ. Imprinted genes and mother-offspring interactions. *Early Hum Dev* 2005; **81**: 73–77.
- [23] IWASA Y. The conflict theory of genomic imprinting: how much can be explained? *Curr Top Dev Biol* 1998; **40**: 255–293.
- [24] JOHNSTONE KA, DUBOSE AJ, FUTTNER CR, ELMORE MD, BRANNAN CI, RESNICK JL. A human imprinting centre demonstrates conserved acquisition but diverged maintenance of imprinting in a mouse model for Angelman syndrome imprinting defects. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 393–404.
- [25] JONG MT, GRAY TA, JI Y, GLENN CC, SAITOH S, DRISCOLL DJ, NICHOLLS RD. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 783–793.
- [26] JOYCE JA, LAM WK, CATCHPOOLE DJ, JENKS P, REIK W, MAHER ER, SCHOFIELD PN. Imprinting of IGF2 and H19: lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1543–1548.
- [27] JUAN V, CRAIN C, WILSON C. Evidence for evolutionarily conserved secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 1221–1227.
- [28] KANDURI C, FITZPATRICK G, MUKHOPADHYAY R, KANDURI M, LOBANENKOV V, HIGGINS M, OHLSSON R. A differentially methylated imprinting control region within the Kcnq1 locus harbors a methylation-sensitive chromatin insulator. *J Biol Chem* 2002; **277**: 18106–18110.
- [29] KANDURI C, THAKUR N, PANDEY RR. The length of the transcript encoded from the Kcnq1ot1 antisense promoter determines the degree of silencing. *EMBO J* 2006; **25**: 2096–2106.
- [30] KIM J, BERGMANN A, WEHRI E, LU X, STUBBS L. Imprinting and evolution of two Kruppel-type zinc-finger genes, ZIM3 and ZNF264, located in the PEG3/USP29 imprinted domain. *Genomics* 2001; **77**: 91–98.
- [31] KIM JD, HINZ AK, BERGMANN A, HUANG JM, OVCHARENKO I, STUBBS L, KIM J. Identification of clustered YY1 binding sites in imprinting control regions. *Genome Res* 2006; **16**: 901–911.
- [32] KIM JD, HINZ AK, CHOO JH, STUBBS L, KIM J. YY1 as a controlling factor for the Peg3 and Gnas imprinted domains. *Genomics* 2007; **89**: 262–269.
- [33] KIM J, KOLLHOFF A, BERGMANN A, STUBBS L. Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 233–245.
- [34] KIM J, SHAPIRO DJ. In simple synthetic promoters YY1-induced DNA bending is important in transcription activation and repression. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 434–4348.
- [35] KISHORE S, STAMM S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 2006; **311**: 230–232.
- [36] KISS AM, JADY BE, BERTRAND E, KISS T. Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 5797–5807.
- [37] KOBAYASHI H, SUDA C, ABE T, KOHARA Y, IKEMURA T, SASAKI H. Bisulfite sequencing and dinucleotide content DMR analysis of 15 imprinted mouse differentially methylated regions (DMRs): paternally methylated DMRs contain less CpGs than maternally methylated DMRs. *Cytogenet Genome Res* 2006; **113**: 130–137.
- [38] KURITA M, KUWAJIMA T, NISHIMURA I, YOSHIKAWA K. Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2006; **26**: 12003–12013.
- [39] KURUKUTIS, TIWARI VK, TAVOOSIDANA G, PUGACHEVA E, MURRELL A, ZHAO Z, LOBANENKOV V, REIK W, OHLSSON R. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10684–10689.
- [40] KUWAJIMA T, NISHIMURA I, YOSHIKAWA K. Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins. *J Neurosci* 2006; **26**: 5383–5392.

- [41] LAM WW, HATADA I, OHISHI S, MUKAI T, JOYCE JA, COLE TR, DONNAI D, REIK W, SCHOFIELD PN, MAHER ER. Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 1999; **36**: 518–523.
- [42] LANDERS M, BANCESCU DL, LE MEUR E, ROUGEULLE C, GLATT-DEELEY H, BRANNAN C, MUSCATELLI F, LALANDE M. Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 3480–3492.
- [43] LEE S, KOZLOV S, HERNANDEZ L, CHAMBERLAIN SJ, BRANNAN CI, STEWART CL, WEVRICK R. Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-Willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1813–1819.
- [44] LEE S, WALKER CL, KARTEN B, KUNY SL, TENNESE AA, O'NEILL MA, WEVRICK R. Essential role for the Prader-Willi syndrome protein ncdin in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 627–637.
- [45] LEE Y, JEON K, LEE JT, KIM S, KIM VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; **21**: 4663–4670.
- [46] LIN SL, MILLER JD, YING SY. Intronic MicroRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol* 2006; **4**: 26818.
- [47] LOPES S, LEWIS A, HAJKOVA P, DEAN W, OSWALD J, FORNE T, MURRELL A, CONSTANCIA M, BARTOLOMEI M, WALTER J, REIK W. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 295–305.
- [48] LUCIFERO D, MANN MR, BARTOLOMEI MS, TRASLER JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 839–849.
- [49] LUEDI PP, HARTEMINK AJ, JIRTLE RL. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 2005; **15**: 875–884.
- [50] MAHER EA, REIK W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 2000; **105**: 247–252.
- [51] MATTICK JS, MAKUNIN IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 121–132.
- [52] McGRATH J, SOLTER D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; **37**: 179–183.
- [53] McLAREN RJ, MONTGOMERY GW. Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. *Mamm Genome* 1999; **10**: 588–591.
- [54] MEGURO M, KASHIWAGIA, MITSUYA K, NAKAO M, KONDO I, SAITOH S, OSHIMURA M. A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* 2001; **28**: 19–20.
- [55] MIKI H, LEE J, INOUE K, OGONUKI N, NOGUCHI Y, MOCHIDA K, KOHDA T, NAGASHIMA H, ISHINO F, OGURA A. Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *J Reprod Dev* 2004; **50**: 131–137.
- [56] MIZUNO Y, SOTOMARU Y, KATSUZAWA Y, KONO T, MEGURO M, OSHIMURA M, KAWAI J, TOMARU Y, KIYOSAWA H, NIKAIDO I, AMANUMA H, HAYASHIZAKI Y, OKAZAKI Y. Asb4, Ata3, and Dcn are novel imprinted genes identified by high-throughput screening using RIKEN cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 1499–1505.
- [57] MONK D, ARNAUD P, APOSTOLIDOU S, HILLS FA, KELSEY G, STANIER P, FEIL R, MOORE GE. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 6623–6628.
- [58] MOORE EM, ABU-AMERO SN, BELL G, WAKELING EL, KINGSNORTH A, STANIER P, JAUNIAUX E, BENNETT ST. Evidence that insulin is imprinted in the human yolk sac. *Diabetes* 2001; **50**: 199–203.
- [59] MOORE T, HAIG D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 1991; **7**: 45–49.
- [60] NANTEL A, MOHAMMAD-ALI K, SHERK J, POSNER BI, THOMAS DY. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10475–10484.
- [61] NIKAIDO I, SAITO C, MIZUNO Y, MEGURO M, BONO H, KADOMURA M, KONO T, MORRIS GA, LYONS PA, OSHIMURA M, HAYASHIZAKI Y, OKAZAKI Y, RIKEN GER GROUP, GSL MEMBERS. Discovery of imprinted transcripts in the mouse transcriptome using large-scale expression profiling. *Genome Res* 2003; **13**: 1402–1409.
- [62] OBATA Y, KONO T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5285–5289.

- [63] O'NEILL MA, FAROOQI IS, WEVRICK R. Evaluation of Prader-Willi Syndrome gene *MAGEL2* in severe childhood-onset obesity. *Obes Res* 2005; **13**: 1841–1842.
- [64] O'NEILL MJ. The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 113–120.
- [65] OUELLET DL, PERRON MP, GOBEIL LA, PLANTE P, PROVOST P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* 2006; **4**: 69616.
- [66] PALDI A. Genomic imprinting: could the chromatin structure be the driving force? *Curr Top Dev Biol* 2003; **53**: 115–138.
- [67] PAULER FM, BARLOW DP. Imprinting mechanisms – it only takes two. *Genes Dev* 2006; **20**: 1203–1206.
- [68] PAULER FM, STRICKER SH, WARCZOK KE, BARLOW DP. Long-range DNase I hypersensitivity mapping reveals the imprinted *Igf2r* and *Air* promoters share cis-regulatory elements. *Genome Res* 2005; **15**: 1379–1387.
- [69] PERK J, MAKENDONSKI K, LANDE H, CEDAR H, RAZINA, SHEMER R. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *EMBO J* 2002; **21**: 5807–5814.
- [70] PETERS J, BEECHEY C. Identification and characterisation of imprinted genes in mouse. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004; **2**: 320–333.
- [71] PRAWITT D, ENKLAAR T, GARTNER-RUPPRECHT B, SPANGENBERG C, OSWALD M, LAUSCH E, SCHMIDTKE P, REUTZELD, FEES S, LUCITO R, KORZON M, BROZEK I, LIMON J, HOUSMAN DE, PELLETIER J, ZABEL B. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4085–4090.
- [72] REGHA K, LATOS PA, SPAHN L. The imprinted mouse *Igf2r/Air* cluster – a model maternal imprinting system. *Cytogenet Genome Res* 2006; **113**: 165–177.
- [73] REINHART B, PAOLONI-GIACOBINO A, CHAILLET JR. Specific differentially methylated domain sequences direct the maintenance of methylation at imprinted genes. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 8347–8356.
- [74] RODRIGUEZ-JATO S, NICHOLLS RD, DRISCOLL DJ, YANG TP. Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human *SNURF-SNRPN* locus. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 4740–4753.
- [75] RUNTE M, HUTTENHOFER A, GROSS S, KIEFMANN M, HORSTHEMKE B, BUITING K. The *IC-SNRF-SNRPN* transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for *UBE3A*. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 2687–2700.
- [76] SANDELL LL, GUAN XJ, INGRAM R, TILGHMAN SM. *Gatm*, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4622–4627.
- [77] SATO A, OTSU E, NEGISHI H, UTSUNOMIYA T, ARIMA T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007; **22**: 26–35.
- [78] SCHUSTER-GOSSLER K, SIMON-CHAZOTTES D, GUENET JL, ZACHGO J, GOSSLER A. *Gtl2lacZ*, an insertional mutation on mouse chromosome 12 with parental origin-dependent phenotype. *Mamm Genome* 1996; **7**: 20–24.
- [79] SEITZ H, ROYO H, BORTOLIN ML, LIN SP, FERGUSON-SMITHAC, CAVAILLE J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. *Genome Res* 2004; **4**: 1741–1748.
- [80] SEITZ H, YOUNGSON N, LIN SP, DALBERT S, PAULSEN M, BACHELLERIE JP, FERGUSON-SMITHAC, CAVAILLE J. Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. *Nat Genet* 2003; **34**: 261–262.
- [81] SKWALES AKE, SPEARS N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction* 2005; **130**: 389–399.
- [82] SLEUTELS F, ZWART R, BARLOW DP. The non-coding *Air*RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 2002; **415**: 810–813.
- [83] SPARAGO A, RUSSO S, CERRATO F, FERRAIUOLO S, SELICORNIA, SCHWIENBACHER C, NEGRI NI M, FERRERO GB, SILENGO MC, ANCHINI C, LARIZZA L, RICCIO A. Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 254–264.
- [84] SRINIVISAN L, ATCHISON ML. YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev* 2004; **18**: 2596–2601.
- [85] STAVROPOULOS N, ROWNTREE RK, LEE JT. Identification of developmentally specific enhancers for *Tsix* in the regulation of X chromosome inactivation. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 2757–2769.

- [86] STECHINA EY, CARR MS, GLICK EA, YEVTODIYENKO A, APPELBE OK, SCHMIDT JV. Loss of imprinting at the Dlk1-Gtl2 locus caused by insertional mutagenesis in the Gtl2 5' region. *BMC Genet* 2006; **7**: 44.
- [87] THAKUR N, TIWARI VK, THOMASSIN H, PANDEY RR, KANDURI M, GONDOR A, GRANDE T, OHLSSON R, KANDURI C. An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the Kcnq1 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 7855–7862.
- [88] THORVALDSEN JL, DURAN KL, BARTOLOMEI MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev* 1998; **12**: 3693–3702.
- [89] THORVALDSEN JL, FEDORIW AM, NGUYEN S, BARTOLOMEI MS. Developmental profile of H19 differentially methylated domain (DMD) deletion alleles reveals multiple roles of the DMD in regulating allelic expression and DNA methylation at the imprinted H19/Igf2 locus. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 1245–1258.
- [90] TOST J, JAMMES H, DUPONT JM, BUFFAT C, ROBERT B, MIGNOT TM, MONDON F, CARBONNE B, SIMEONI U, GRANGE G, KERJEAN A, FERRE F, GUT IG, VAIMAN D. Non-random, individual-specific methylation profiles are present at the sixth CTCF binding site in the human H19/IGF2 imprinting control region. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 5438–5448.
- [91] TUREK-PLEWA J, JAGODZIŃSKI P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005; **10**: 631–647.
- [92] VALLON V, GRAHAMMER F, VOLKI F, SANDU CD, RICHTER K, REXHEPAJ R, GERLACH U, RONG Q, PFEIFER K, LANG F. KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 17864–17869.
- [93] VIGNEAU S, AUGUI S, NAVARRO P, AVNER P, CLERC P. An essential role for the DXPas34 tandem repeat and Tsix transcription in the counting process of X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 7390–7395.
- [94] WATTENDORF DJ, MUENKE M. Prader-Willi syndrome. *Am Fam Physician* 2005; **72**: 827–830.
- [95] WEBSTER KE, O'BRYAN MK, FLETCHER S, CREWETHER PE, AAPOLA U, CRAIG J, HARRISON DK, AUNQ H, PHUTIKANIT N, LYLE R, MEACHEM SJ, ANTONARAKIS SE, DE KRETZER DM, HEDGER MP, PETERSON P, CARROLL BJ, SCOTT HS. Meiotic and epigenetic defects in Dnm3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4068–4073.
- [96] WEKSBERG R, SMITH AC, SQUIRE J, SADOWSKI P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 61–68.
- [97] WILLIAMSON CM, SKINNER JA, KELSEY G, PETERS J. Alternative non-coding splice variants of Nespas, an imprinted gene antisense to Nesp in the Gnas imprinting cluster. *Mamm Genome* 2002; **13**: 74–79.
- [98] WOOD AJ, OAKEY RJ. Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *Genetics* 2006; **2**: 1677–1685.
- [99] XIE T, PLAGGE A, GAVRILOVA O, PACK S, JOU W, LAI EW, FRONTERAM, KELSEY G, WEINSTEIN LS. The alternative stimulatory G protein alpha-subunit XLalphas is a critical regulator of energy and glucose metabolism and sympathetic nerve activity in adult mice. *J Biol Chem* 2006; **281**: 18989–18999.
- [100] YAMAZAKI Y, LOW EW, MARIKAWA Y, IWAHASHI K, YANAGIMACHI R, BARTOLOMEI MS, McCARREY JR, YANAGIMACHI R. Adult mice cloned from migrating primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11361–11366.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 21.01. 2008 r.

Przyjęto: 05.05. 2008 r.

Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu,

ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków

e-mail: marcin.marciniak@uj.edu.pl