

Molekulární procesy po fertilizaci- normální či abnormální po ART ?

Aleš Hampl

Již více jak MILION dětí bylo na světě počato pomocí ART

ART jako zdroj zvýšeného rizika:



- **Kongenitální malformace** (Ericson and Kallen, Human Reprod, 2001)
- **Neurologické dysfunkce** (Stromberg at el., Lancet, 2002)
- **Opožděný vývoj** (Schieve et al., N England J Med, 2002)
- **Nádorová onemocnění** (Bruinsma et al., Hum Reprod, 2000)
- **další**



Kontroverzní nálezy

Čím by se daly abnormality vysvětlit ?

Dány jednoduše značným počtem dětí,
které byly počaty pomocí ART

Jsou následkem stavu rodičů
(věk, důvod neplodnosti, jiné znaky)

Jsou výsledkem fenoménů, které jsou specificky
asociovány s ART, a které by bylo možno eliminovat

Např. abnormální GENOMICKÝ IMPRINTING

Co je IMPRINTING ?

1984 - odhalení, že parentální kopie autosomálních chromosomů nejsou funkčně shodné (Barton et al. ; McGrath and Solter)

Pro zdárný vývoj nestačí samotná diploidie; je nutná přítomnost genomu matky i otce, jejichž příspěvek se vzájemně liší

= **epigenetický proces** (nemění sekvenci DNA):

- **modifikuje expresi některých genů** (dnes: 50 - člověk, 75 - myš)
- **je stabilní - přenositelný v mitóze**
- **je zprostředkován více různými mechanismy** (metylace CpG dinukleotidů [cytozin-fosfo-guanin], acetylace histonů, jiné modifikace chromatinu, ???)
- **je typický pro placentální savce** (nebyl detegován u vejcorodých savců ani u obratlovců mimo savce)
- **vyskytuje se jak plošně v celém organismu, tak tkáňově specificky** (gen *Igf2* je v celém organismu exprimován paternálně, některé oblasti mozku však vykazují bialelickou expresi)

Jaké geny podléhají imprintingu ?

Kódující proteiny

(přenašeče signálu, regulátory proliferace, regulátory transkripce)

Kódující nepřekládané RNA

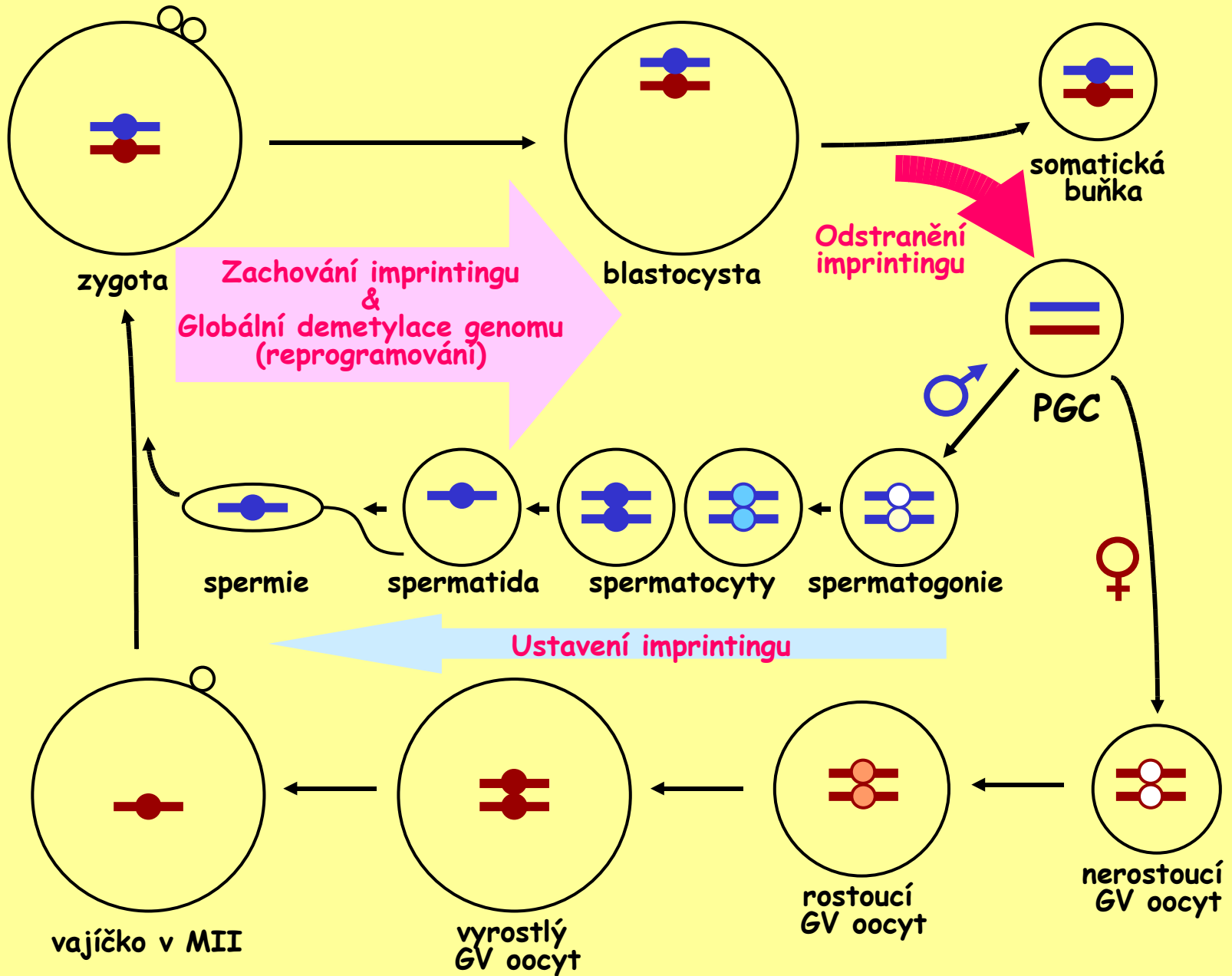
(sense RNA, antisense RNA, micro RNA)

Kontrolují:

Růst & Neurobehaviorální znaky

Typický příklad: Peg3 - paternálně exprimovaný transkripční faktor - ovlivňuje jednak růst plodu a jednak sací reflex

„Životní cyklus“ imprintingu



Je aberantní imprinting (EPIMUTACE) zdrojem onemocnění ?

• Prader-Willi syndrom	1
• Angelman syndrom	3
• Beckwith-Wiedemann syndrom	50
• Transientní neonatální diabetes	50

Procento postižených,
u nichž byl nalezen
defekt v imprintingu
(namísto defektu
v sekvenci DNA)

Primordiální germinální buňky

- Odstranění imprintingu

Neovlivněno ART

Vyvíjející se gamety

- Ustavení imprintingu
- Vytvoření molekulárních předpokladů pro procesy odehrávající se v časně embryogenezi

Vyvíjející se embrya

- Zachování imprintingu
- Globální demethylace genomu

Ovlivněno ART

Molekulární mechanismy zodpovědné za metylaci & demetylaci DNA ?

Metylace - poměrně dobře poznána

- **enzymy DNA metyltransferázy**
(5 genů, mnoho izoformem)

Dnmt1o

- forma, jejíž exprese je specifická pro oocyt
 - u myši je zodpovědná za udržení metylace imprintovaných genů
- v období mezi 8mi a 16ti buněčným stádiem vývoje embrya
- myši deficientní v Dnmt1o hynou během embryogeneze
 - Dnmt1o podléhá intracelulární translokaci - abnormální translokace následkem ART je jedním hypotetickým důvodem abnormalit v metylaci DNA



Demethylace - dosud velká otázka

- **žádné zodpovědné enzymy nejsou známy**
- **aktivní x pasívní**
(aktivní - bez DNA syntézy; typicky u paternálního genomu před zygotickou fúzí)

Jeden příklad za všechny

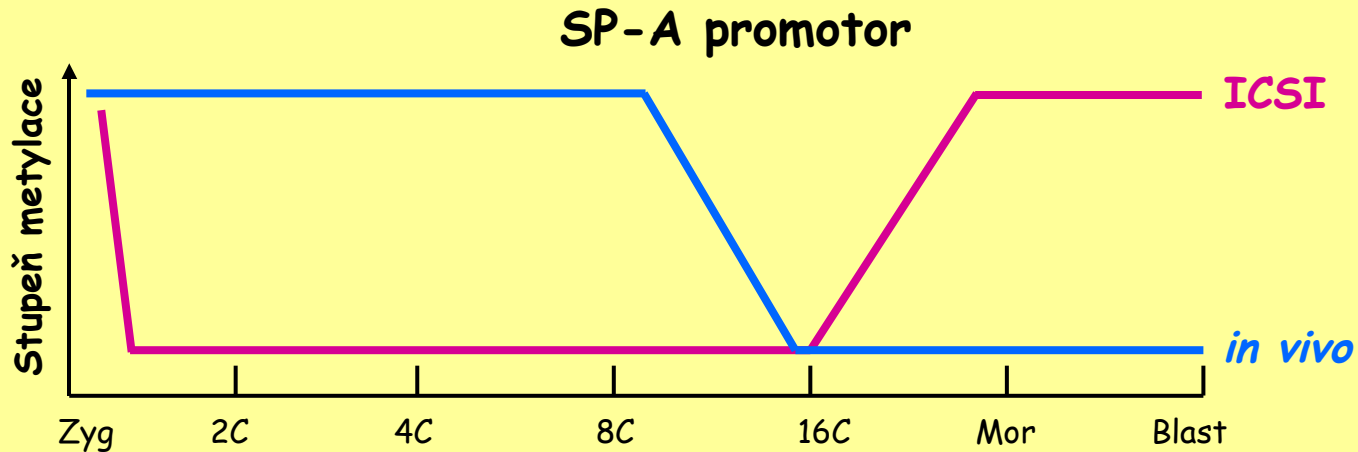
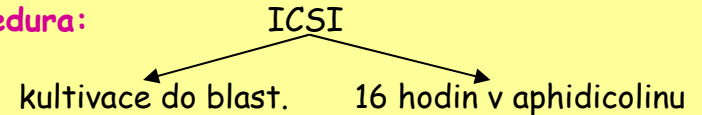
(Zhang et al., MRD, 2005)

Demetylace genů u králičích embryí získaných ICSI

Analyzované sekvence:

- Centromerová satelitní sekvence *Rsat IIE*
- Promotorová oblast „Surfactant” proteinu A (*SP-A*)

Procedura:



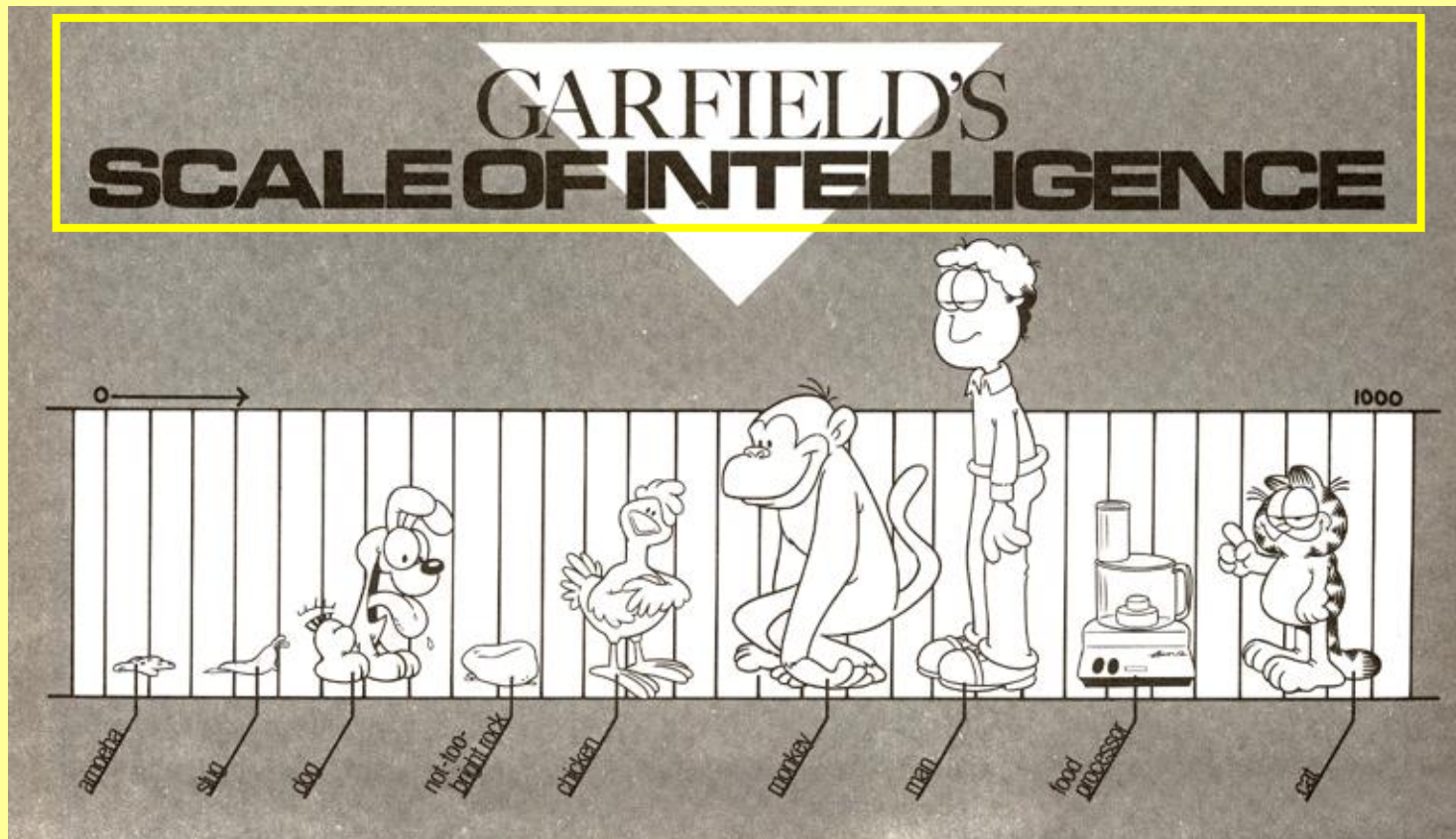
- Demetylace před prvním rozdělením (ICSI) je aktivní proces
- Podobné platí i pro *Rsat IIE*
- Ani jedna z analyzovaných sekvencí nepodléhá imprintingu

1.

Molekulární mechanismy řídící vývojové procesy jsou nesmírně výkonné a dávají organismu obrovskou míru plasticity

2.

Díky lidskému intelektu jsme každý den o kousek blíž jejich poznání



Děkuji za pozornost