



CENUR
NORESTE



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

2da Clase

EPIGENÉTICA

Yasser V. Vega Requena

yassve2@gmail.com

Yasser.vega@cut.edu.uy

Prof. Adjunto
CENUR Noreste
UdelaR



Centro
Universitario
Rivera



SEDE TACUAREMBÓ

CENUR
NORESTE

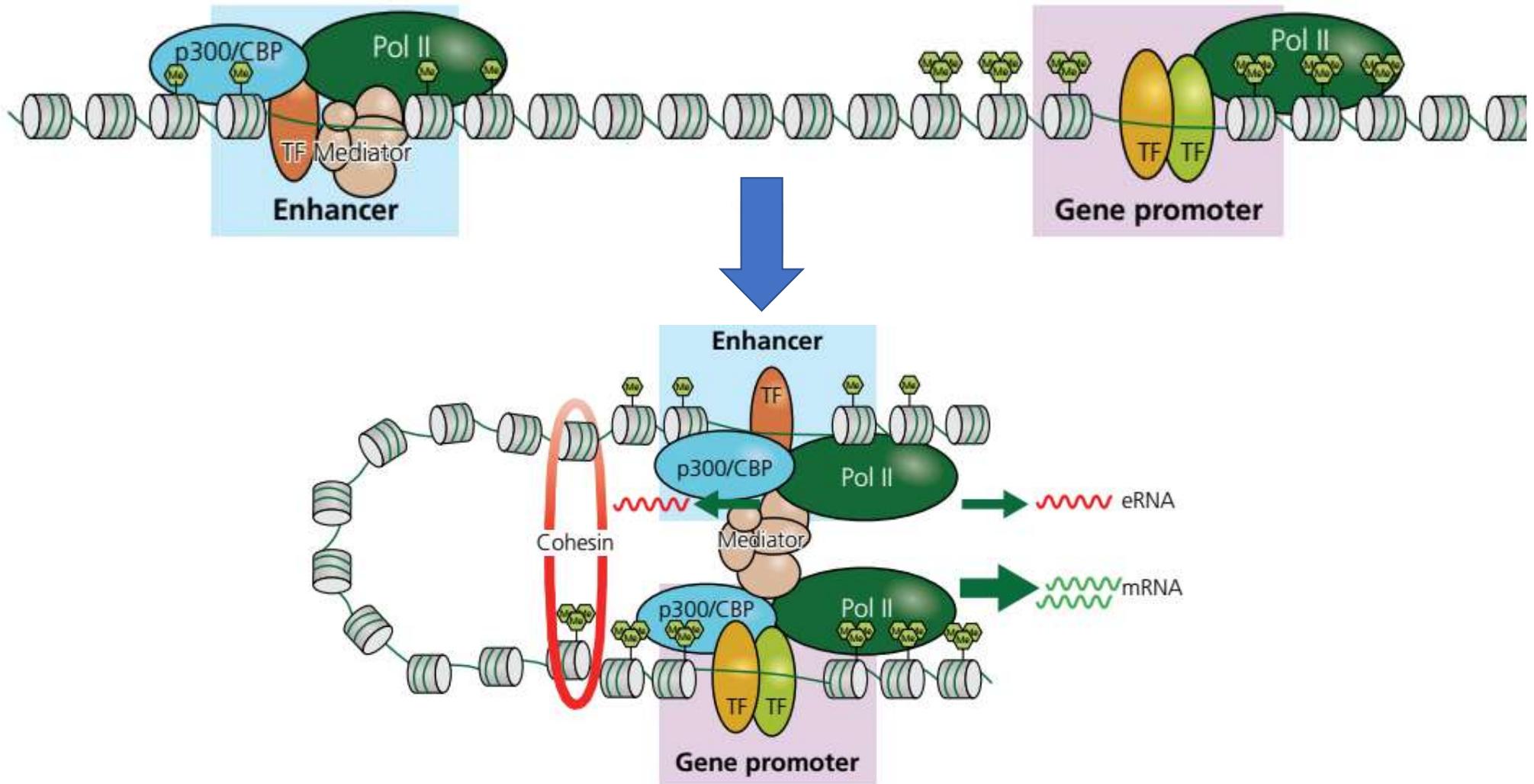


UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

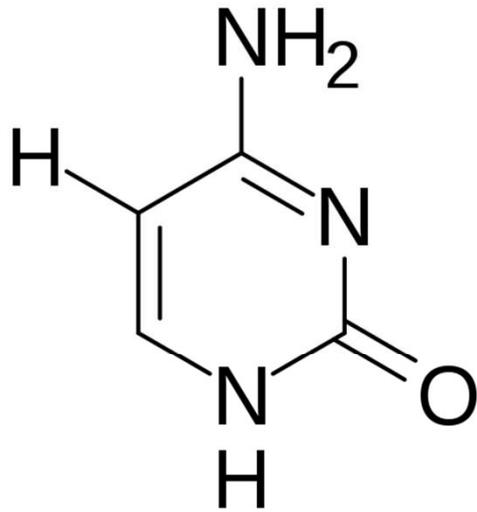
CONTENIDO

- Metilación del ADN y expresión génica
- Islas CpG
- Mecanismos de represión de la transcripción del ADN
- Síndrome de Rett
- Metilación del ADN en elementos repetitivos
- Función mutagénica de la metilación del ADN
- Desmetilación del ADN y desarrollo embrionario
- Metilación del ADN en la inactivación del X
- Síndrome del X Frágil.

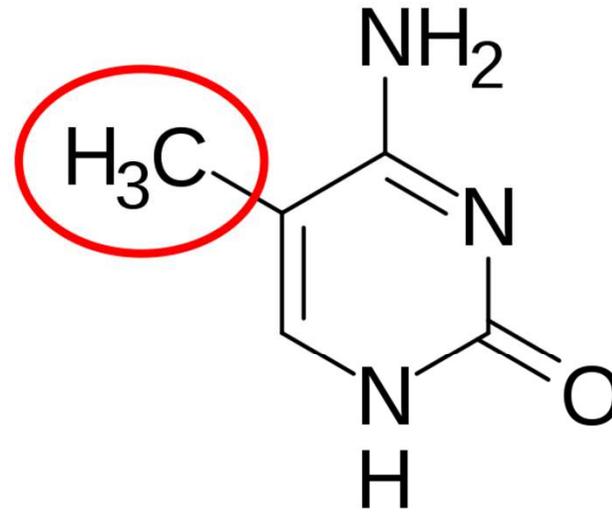
Mecanismo básico de la Transcripción del ADN



Metilación del ADN



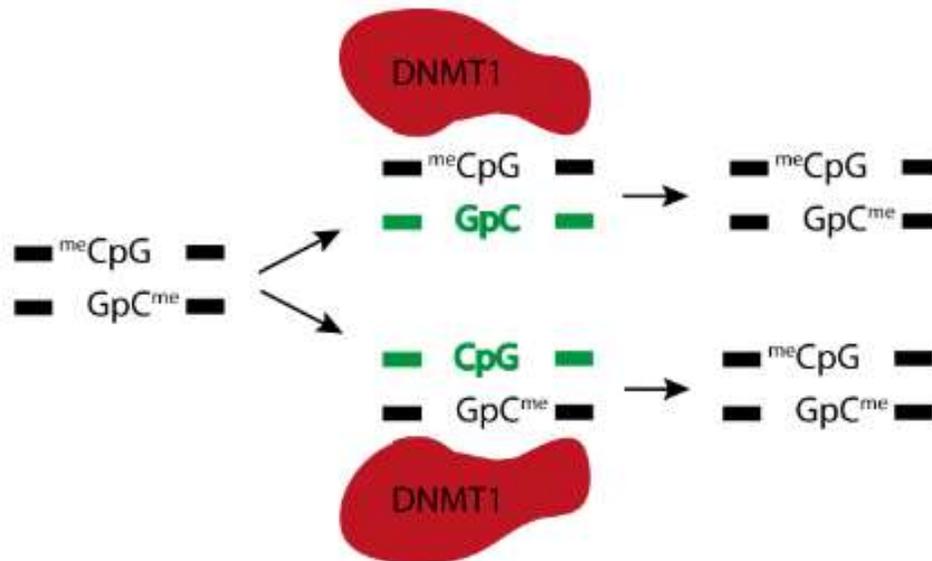
cytosine



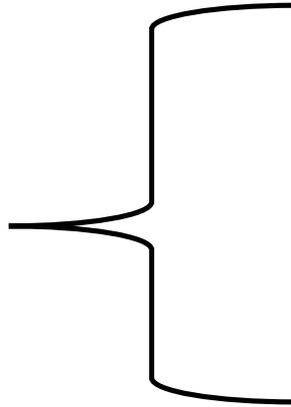
methylated
cytosine

5-metilcitocina

- Ocurre simétricamente en los dinucleótidos CpG.
- Metilación *de Novo* ocurre por la DNMT3a y DNMT3b.
- Entre un 70 -80 % de los CpG en los mamíferos están metilados.



Islas CpG



- Región de entre 300 a 3000 pb con contenido de GC > 50%.

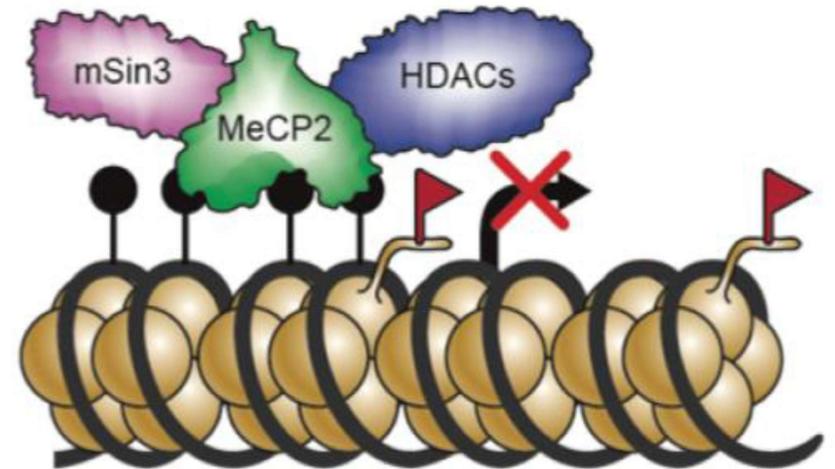
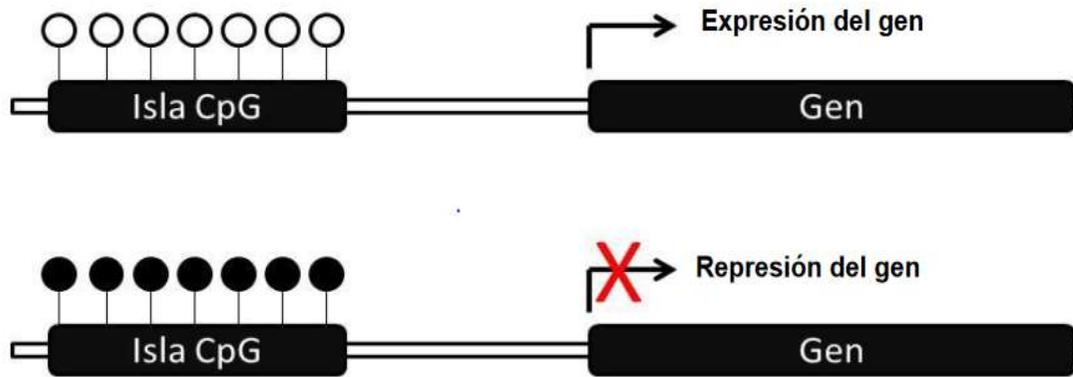
> 60 % de los genes humanos tienen un promotor con islas CpG.

```
CCCGGGTC CGGG CGGGGAAGAGCC CCTCAA CGGCAGGGCCCATC CGCGA
GAGGCCAG CGCCCC CGGCC CGTCCAGCCAGGCC CGCC CCTC CGCCCTG
GGCTGTCCCTC CGGGCCCTGCAC CGCCCTCCTGCTACTTGGAC CGCTTC
CTCA CGCCCTTCTCCACCC CGCGCG CCAGCCTCC CGCGCG CAG CGTGGGG
ATCT CGGCCAATAAAGGAGAAAGGG CGCG GCC CGTA CGCGCG CCAGGTG C
GTGGG CGAGAC CAGCTCA CGCCCCCTCCTCAGC CGCCAAGGCC CGGCC
ACAGCTGCCTGGCTGCAGTCAGAAG CGTAGCC CGAGACAAGGAAGGG CGC
CTTGACT CGCACTTTTGT CCGTT CGAA CGTTCTGCTCAGTGGTG CGTGG
AATG CGAG CGCGTCTTAAAT CGATGG CGCCTAGGAGTCCATGAAATA CG
GTACAGGCTTC CGG CGA CGGATGCCCG CCCCTCACCCA CGCTC CGCCCT
C CGGGGATGCCCA CCCCT CGTGG CGGTCC CGCC CGTCCC CGCG CAGG CG
CGCT CGGGCTGC CGCTGGCTCTT CGCA CGCG GCC ATGGC CGACTC CGAGC
TGCAGCTGGTGGAG CAG CGATC CGCAGCTTCC CGACTTCCCACCCCA
GG CGTGGTATTCAGGTGCA CGCACAGGC CGCCCT CGTGG CGCCC CGACCT
G CGGGCCTA CGGATGGGAG CGCGTGGCC CGCGACCTC CGGG CGGG CGGG
CGGGAACCT CGTCTTT CGCCCC CGGGCCCTGCCCTCCTT CGCCCC CGG
CGTCA CAGGCCCTGTCTTGGGTCCAGGACATCT CGCC CGTCTGAAGG
ACCC CGCCTCCTTC CGCGC CGCCAT CGGCCTCCTGG CGCGA CACTGAAG
G CGA CCA CGGGGC CGCAT CGACTACAT CGCAGG CGAGTGCC CAGTGGC
CGCATCTAGGG CGCTTC CGCCTCTG CGCGCG CGAGGGCAGCA CGTGGGC
TCTG CGCGTCTGCTTGGGGGAGGGCCCTTGGGGTGCTT CAGGGGG CGC CG
GGA CGGG CGC CGTGTCTGGGT CGCC CGGGAAGGGTGTGAGATGAGGCC
C CGAGGC CGC CGCGCTGTGCAGG CTTCTTCC CGCAGGTTC CGGGTCCC
AGCCCAGGACAGG CGTGC CGAGTTC CGGGTCACTGGTCTCCCTGGAG
TGCCCAAGCTGAATCCACAGGGCCAGCTGCCTTGTCTTCTGTTCCTTCT
CGAGCTGGTATTGAG CGCCTGCCA CGAGCCAGGCCCTTCCCTGGTGAAGA
TCA CGGAATGCCCA CCAAGGGAAGGGAGGCTGAGGCCCTC CGGGAGAGC
CCAAGAGGTGGCCAGGGGAAA CAGAGTGTCTGGC CGTCTTCCCTCTC
CTAGGGTGTGACAGCCACTCCCTGGACACTGCCCTGAGGAAAAG CGCCAG
CTCTTGTGGAGCCACAACACTGCCAGAGCTCCCTTCTCACCTCCTCAG
GAAGCCCTCCTGACTCCTCGCCAGGC CGGGCAGGGTTTCCCTGAG CGT
CCCCAACCATCACAGCTCAGGCCACT CGAGAGACTCCCTTTTATAGACA
GAAGCCCTGGTGCAGAGCTGCCTTTGAGAGTAAGCTGAGGCCTGTCAGGT
TTCTACAGCCAGTTACAGATGGGCTGCTCAGCTCAGAGAGAGGGGTGG
TGACTCCCCTAGGAACA CACAGCTAAGAAGTGGTCCCTTAAAAGACAGAC
CCAGGTCTGCACTCTGACTGGAAAGCAGCTC CGGGTAGGTGATGGGTAA
ATTCTTAAATGGGTGCATGTCACTGGCCCTTTCAGCTGGGAGCCAA CAGG
TACCCCTTGCAC CGGCCAACCTGGCCCTGGGATTTCCATGCTGC CG
AGTCACTCCTGTCACTTACCCTGACAGGCCTAGACTCC CGAGGCTTCTC
TTTGGCCCTCCCTGGCCAGGAGCTTGGACTGGGCTG CGTGTCTATC CG
AAAG CGGGGAAGCTGCCAGGCCCACTCTGTGGCCCTCCTATTCCCTGG
AGTA CGGGAAGGTAAGAGGGCTGGGTGGCCAGAGGAAGGGCAGGGCCAG
GCCAC CGTGGCCACTCTCCCCAGTTCTAAAAGGCTTCCCAGG CGTGTFC
AAGTGGAGCTGCTGTGGTTACAGTGGCCTTGGGAGCTCAGAGAGGTGAG
ACATAGGCTGGGCTCACACAGCCAGGTAACAGCAAGGTGGGGTTGGAGTC
AGGGTCTAGGGTGGCAGCTGCCAAGCTGTGCAACAAAGCTGTTTTCTG CG
GGAGGTGAGGACCA CACACCACTTCCCACTCCAGGCTGAGCTGGAGATT
CAGAAAAG CGCCCTGGAGCCAGGACAGAGGGTGGT CGT CGTGGATGATCT
GCTGGCCACTGGTGTAGGGTCTCCC CGCAGCCA ACTGCTGTGGCTCCA
AGGGCCTGGTGGGAGTGGGACAGGACCT CGCTGTGTGACATGGGATGCAG
CTTACTGTTTCCAGAGGGTGCCTGGTGGCCAGGC CGACACTTCTCTC
CCCATGCCTTCCCCTCCCCAACCCAGGGCTGGCCTGGAGCACCTGCTCT
CTGCAGCCAGGCCAACTGGGACCTCACCTCCCATCCCAGGAA CCA
GAA CGCTGCCCTGTGAGCTGCTGGG CGCCTGCAGGCTGAGGTCTGGAGT
G CGTGGCCCTGGTGGAGCTGACCT CGCTTAAGGGCAGGGAGAAGCTGGCA
CCTGTACCTTCTCTCTCTCTCTGAGTATGAGTGA CCA CAGGGCCTCCC
AGCCCCA CACTCTCAGCTGGATCCAGGGAATATCAGCCTTGGGCAACT
GCAGTGAC CAGGGGCAC CGGCTGCCACAGGGAA CACATTCCTTTGCTGG
GGTTCAG CGCCTCTCTGGGGCTGGAAGTGC AAAGCCTGGGGCAAAGCT
GTGTTTCAGCCA CACTGAA CCAAATTA CACACAG CGGGAGAA CGCAGTAA
ACAGCTTTC CCA C
```

Represión de la transcripción y metilación del ADN



Proteínas MBD (Methyl CpG Binding Domains)



Síndrome de RETT

Síndrome genético que afecta el desarrollo neurológico

Pérdida de la función de la proteína MeCP2

Se produce por mutaciones en el gen MeCP2

El gen MeCP2 se encuentra en el cromosoma X

Afecta 1:10.000 femeninas

Entre los primeros 6 a 8 meses pueden ser normales y después aparecen los primeros síntomas

Síndrome de RETT

Convulsiones

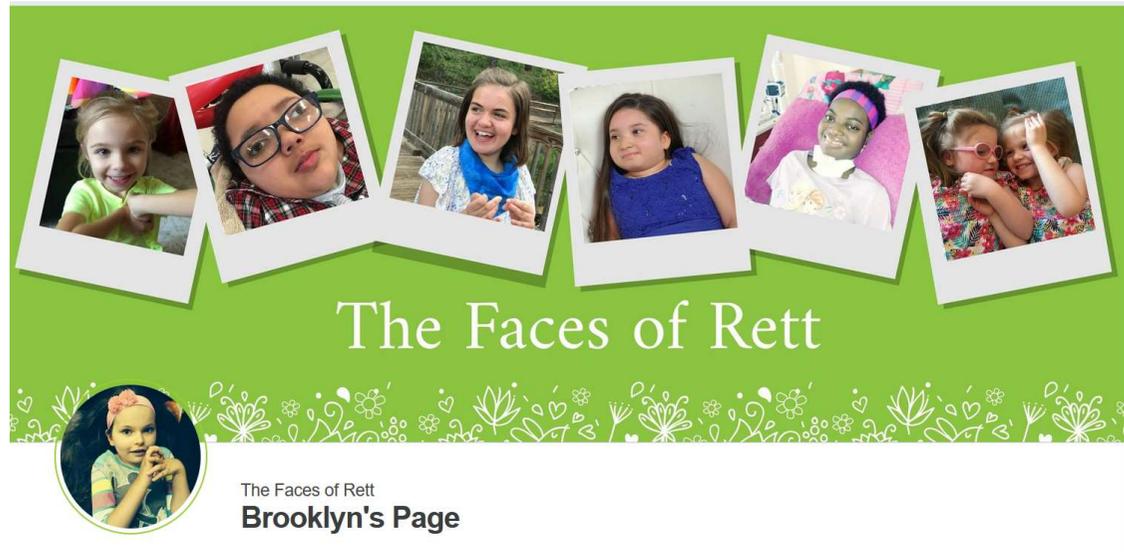
Rigidez muscular

Falta de habla

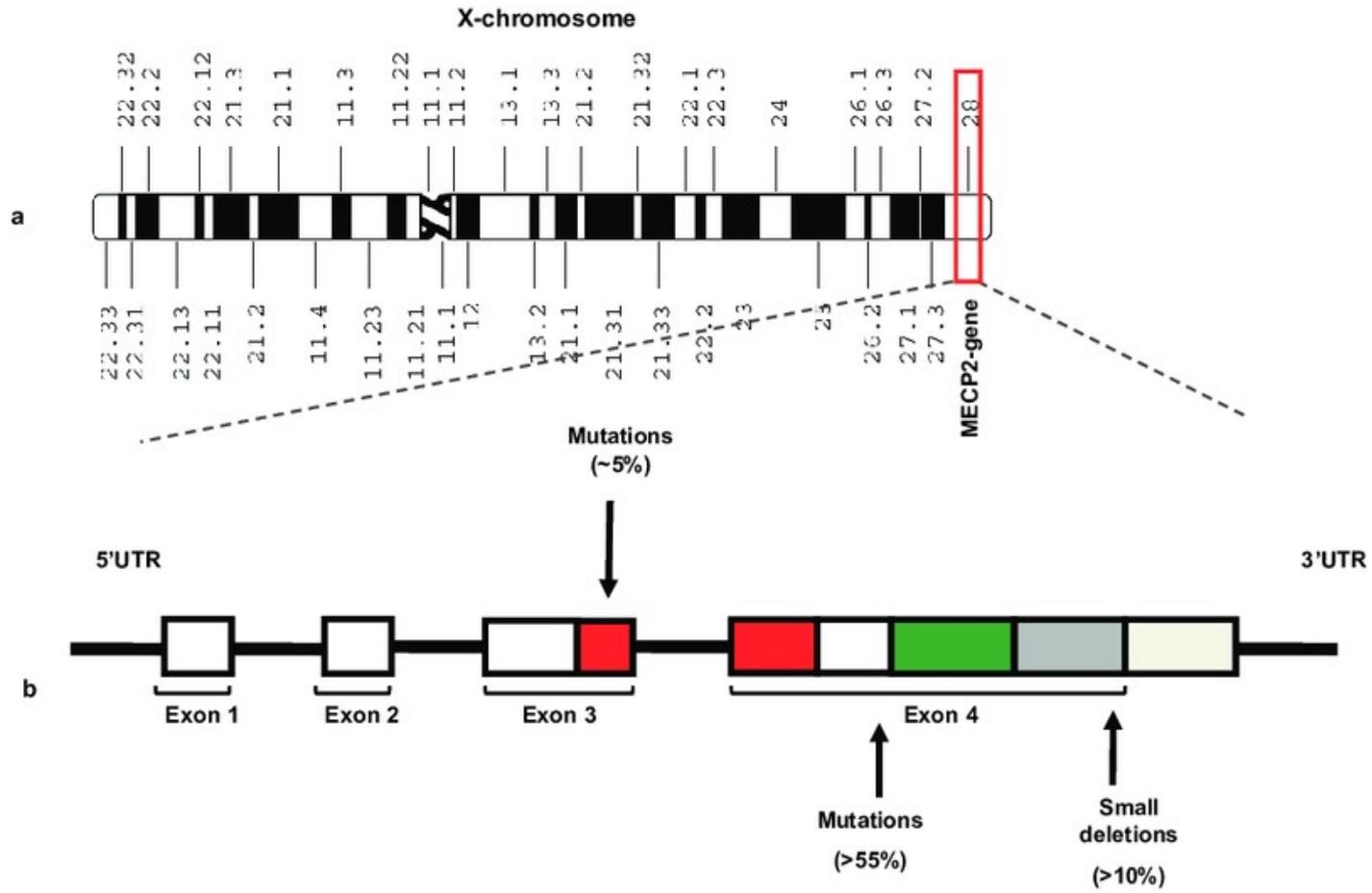
Escoliosis

Hiperventilación

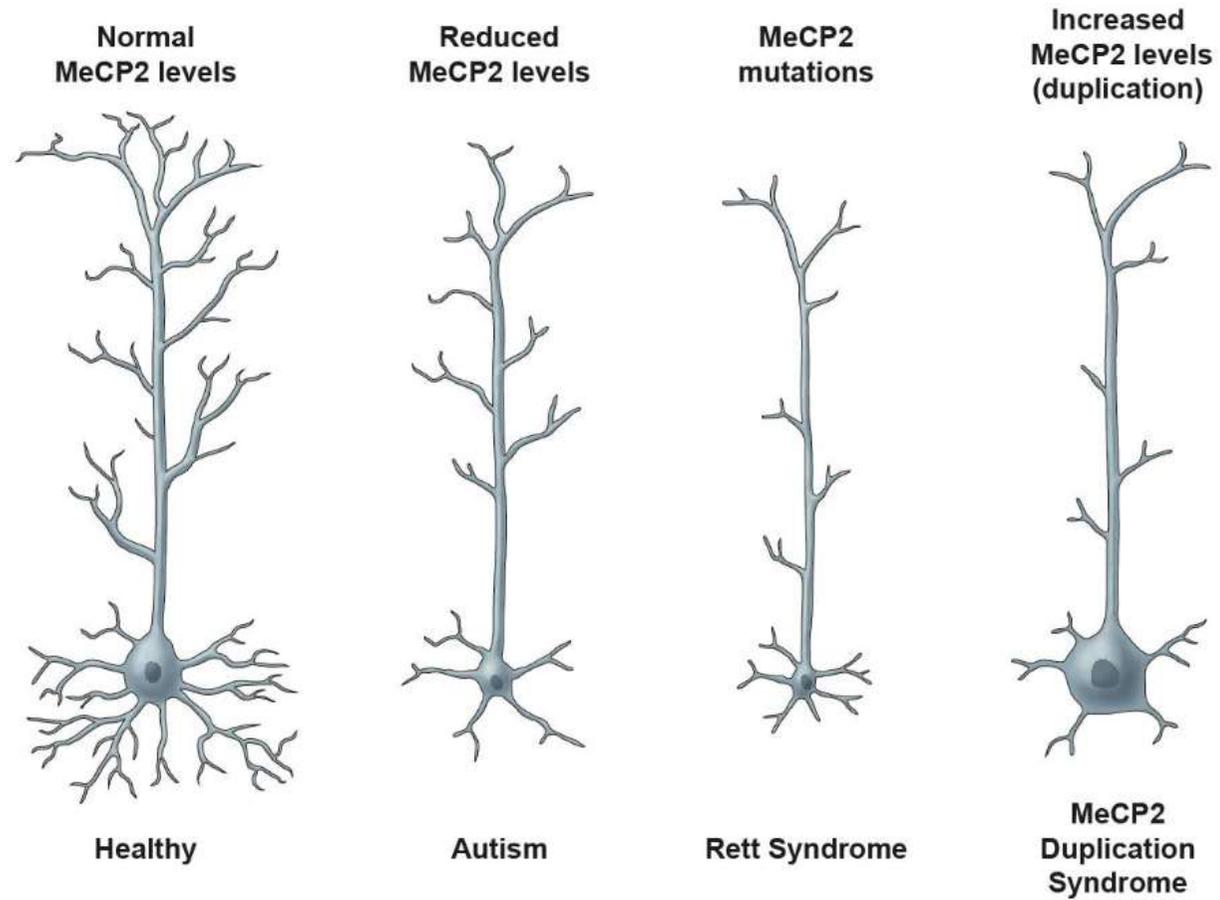
Fenotipo similar al autismo



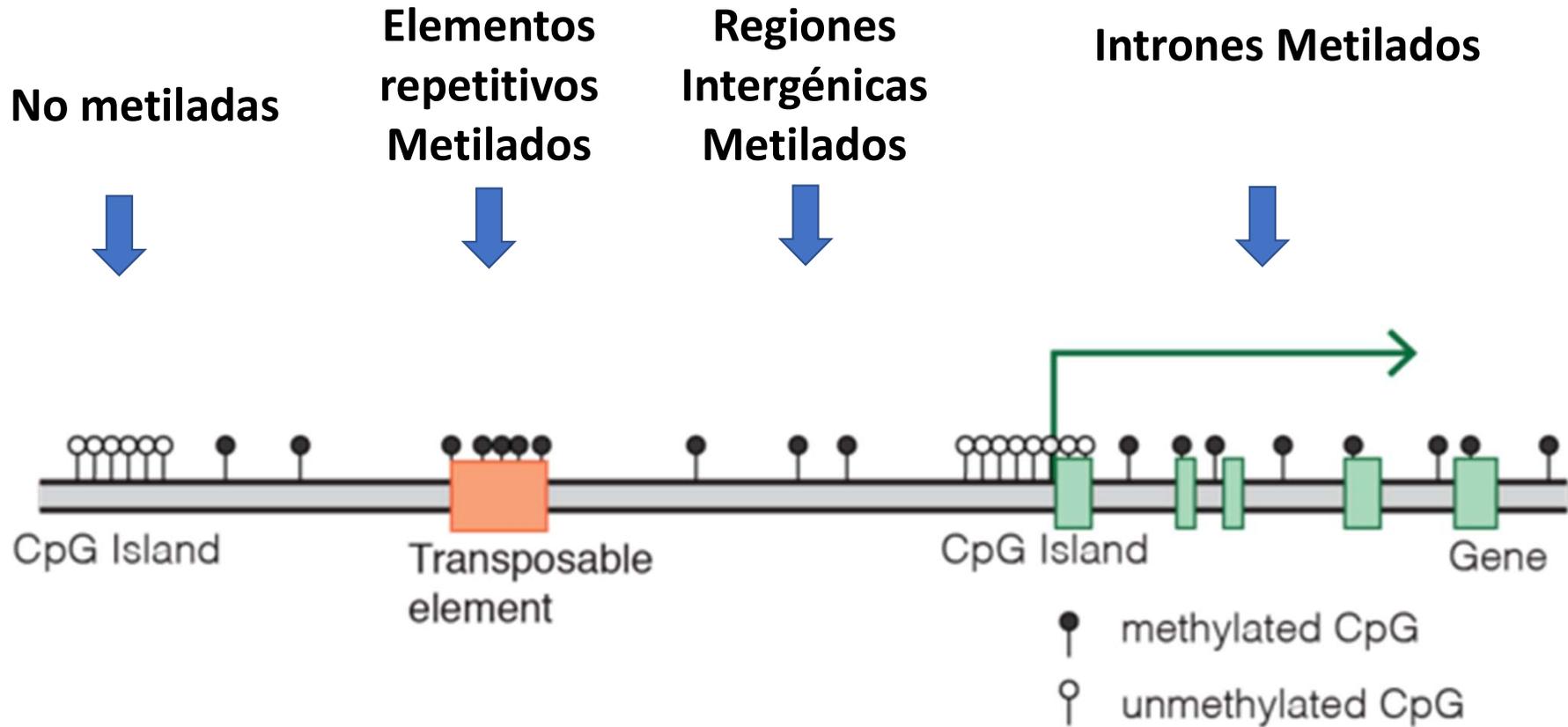
Síndrome de RETT



Síndrome de RETT



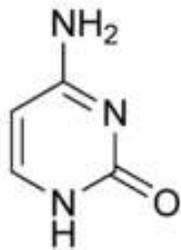
Metilación del ADN



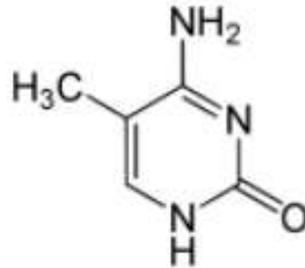
Función de la Metilación del ADN

Mutagénica

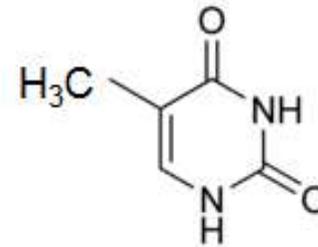
- Altas tasas de mutación
- CpG se observan en menor frecuencia de lo esperado menos de 1/5.



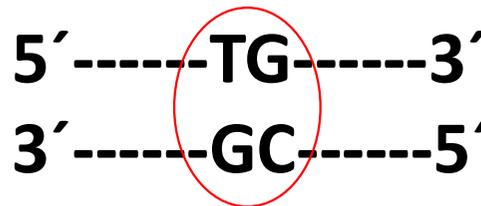
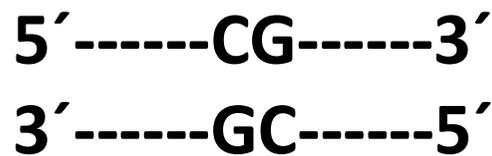
Cytosine



5-methyl Cytosine



Thymine

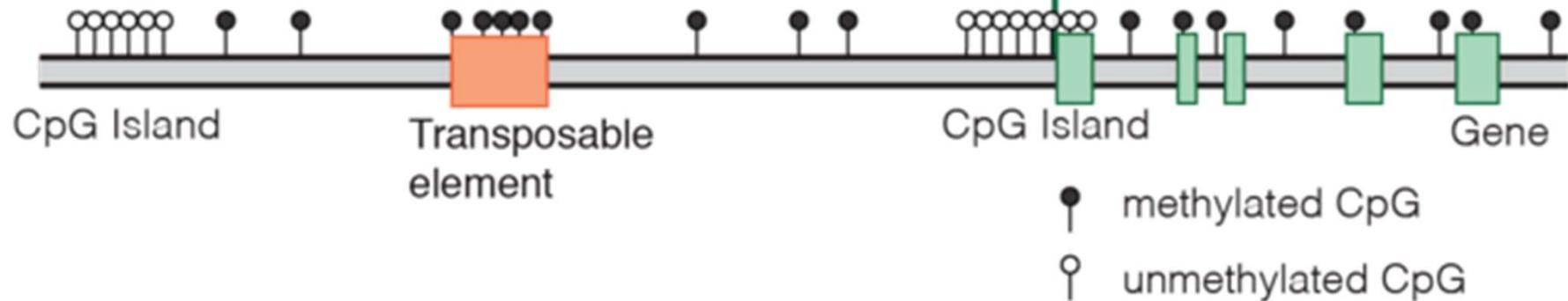


Función de la metilación del ADN en las regiones Intergénicas

- Silenciar sitios de inicio de transcripción críticos
- O sitios de splicing inadecuados

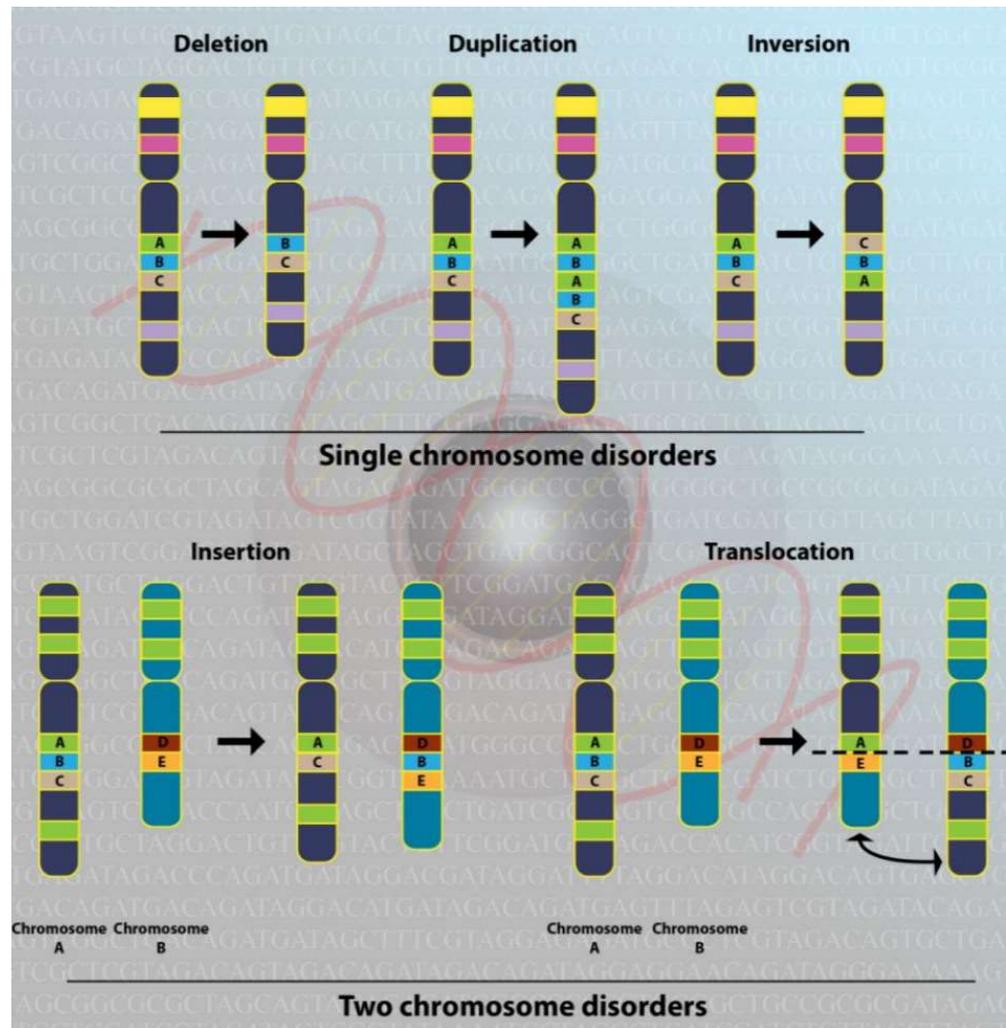


Estabilidad genómica



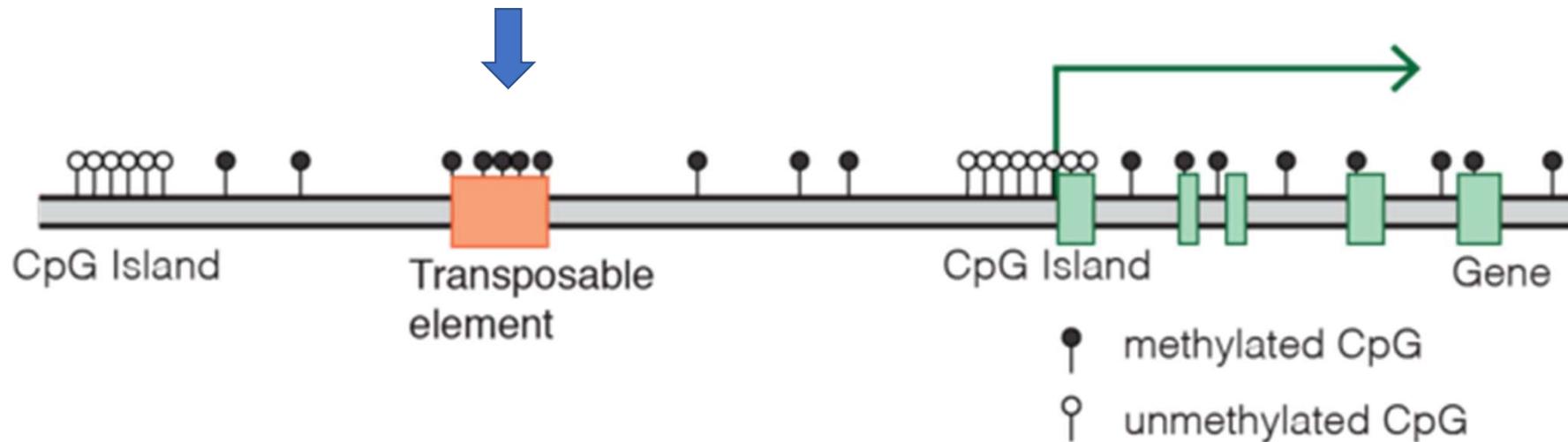
Células DNMT1 null presentan inestabilidad genómica

Células DNMT1 nulo presentan inestabilidad genómica



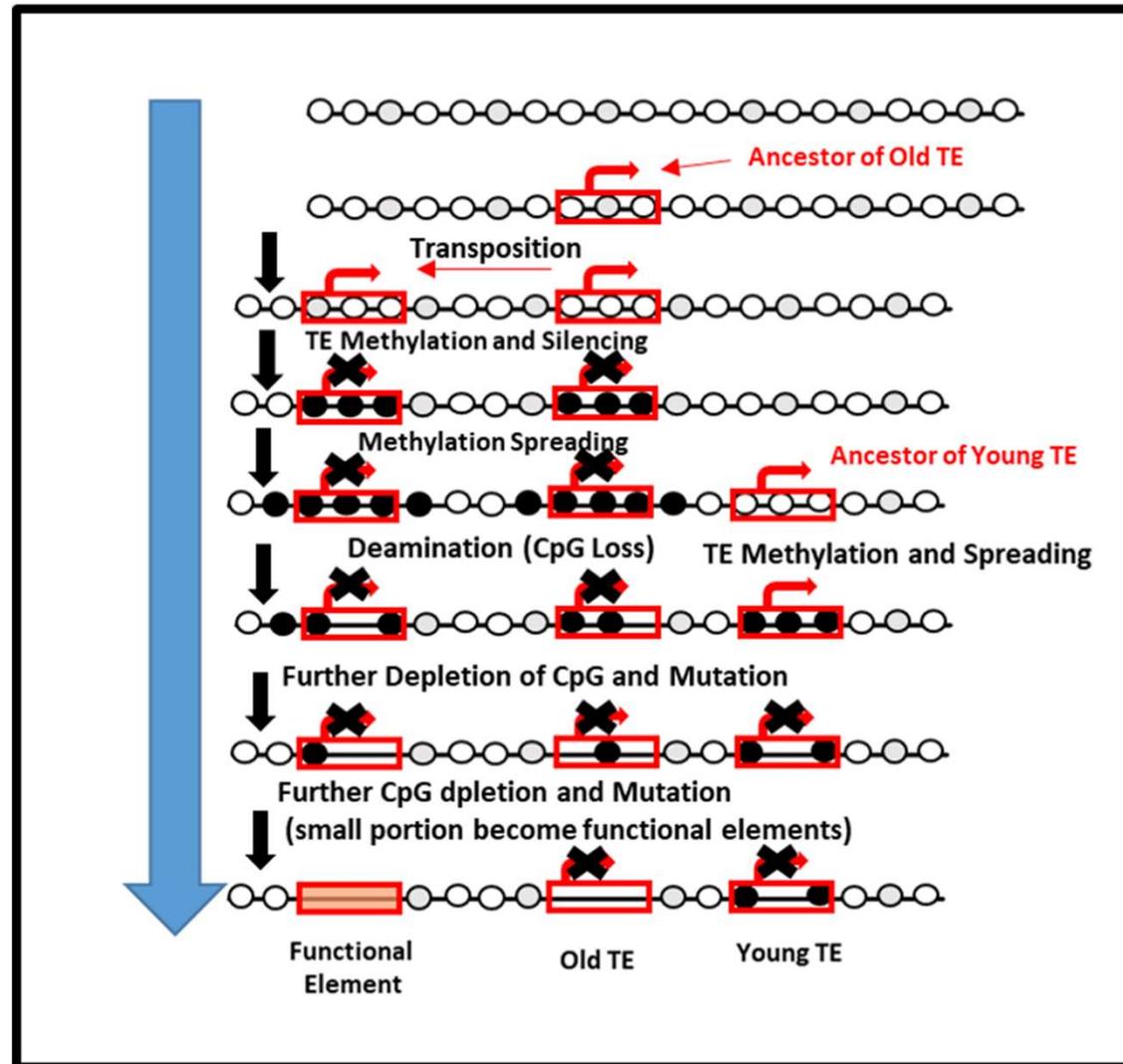
Función de la Metilación del ADN en los elementos repetitivos

- Prevenir la transposición
- Prevenir la errores de recombinación
- Generar mutaciones que permitan prevenir la transposición



Metilación del ADN en los elementos repetitivos

- Han contribuido a la expansión del genoma.
- Permitido la creación de nuevos elementos funcionales.
- Contribuyen a la diseminación de la metilación.



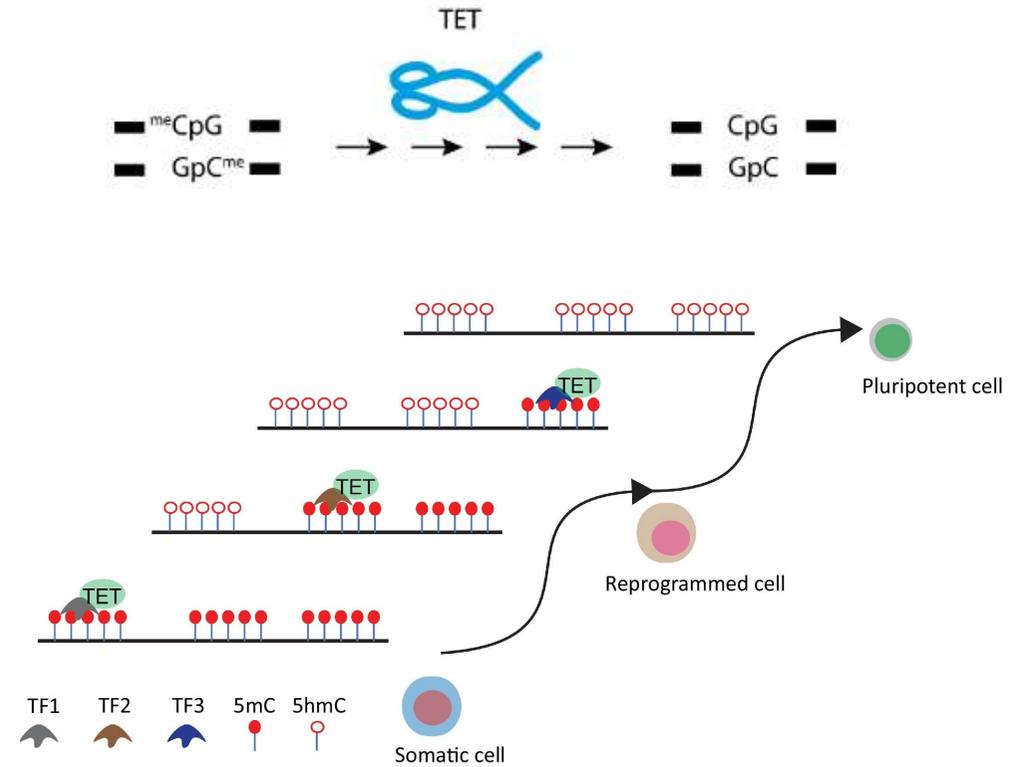
Desmetilación del ADN

Pasiva

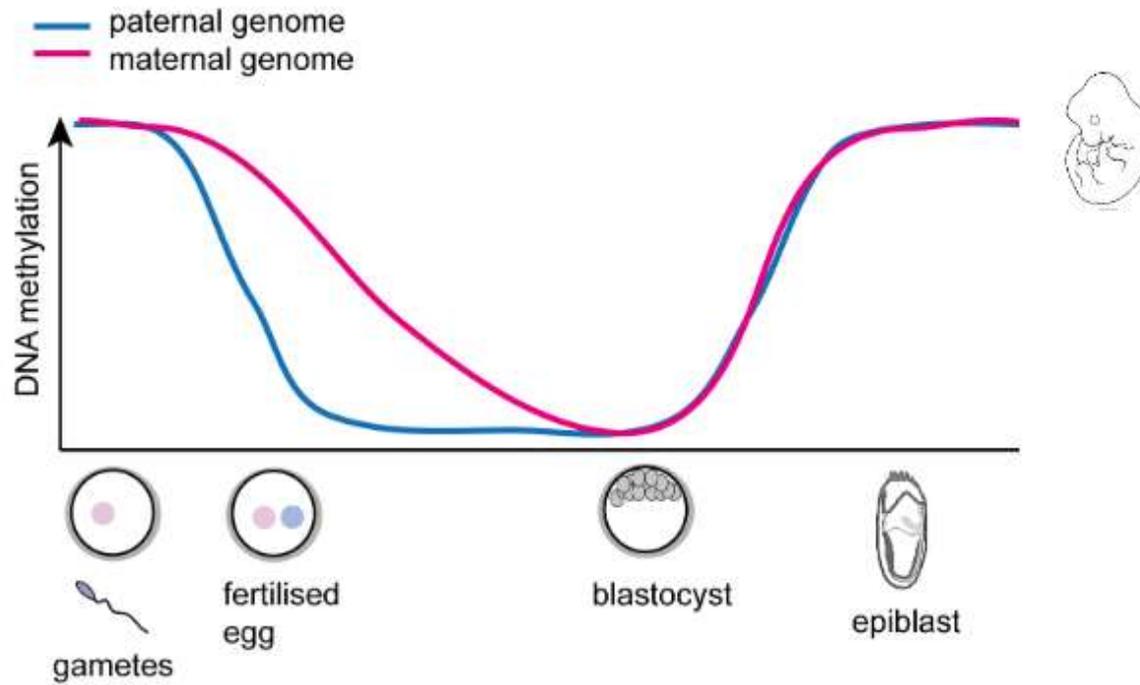
Se va perdiendo la metilación en cada división celular y por ausencia de DMT1

Activa

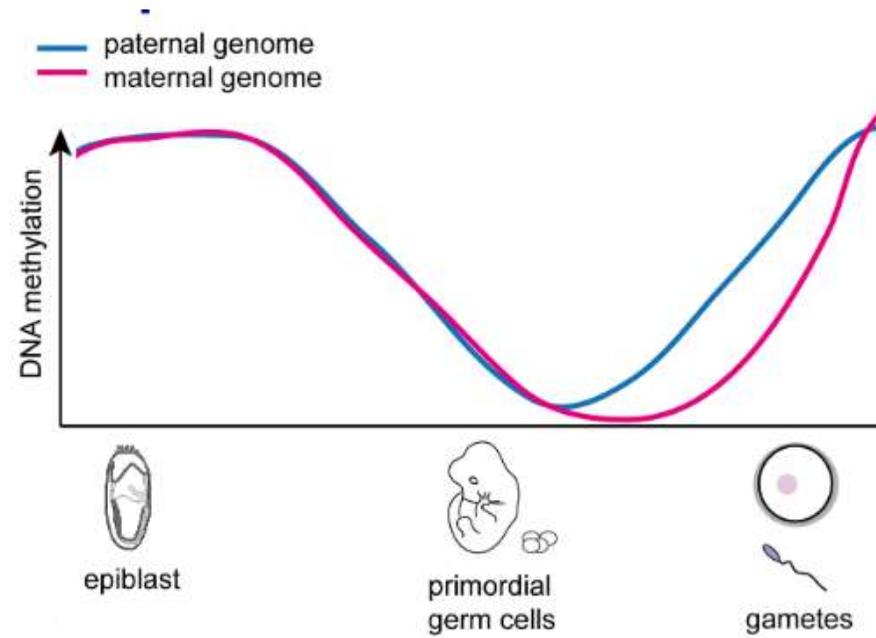
Mediante procesos enzimáticos TET



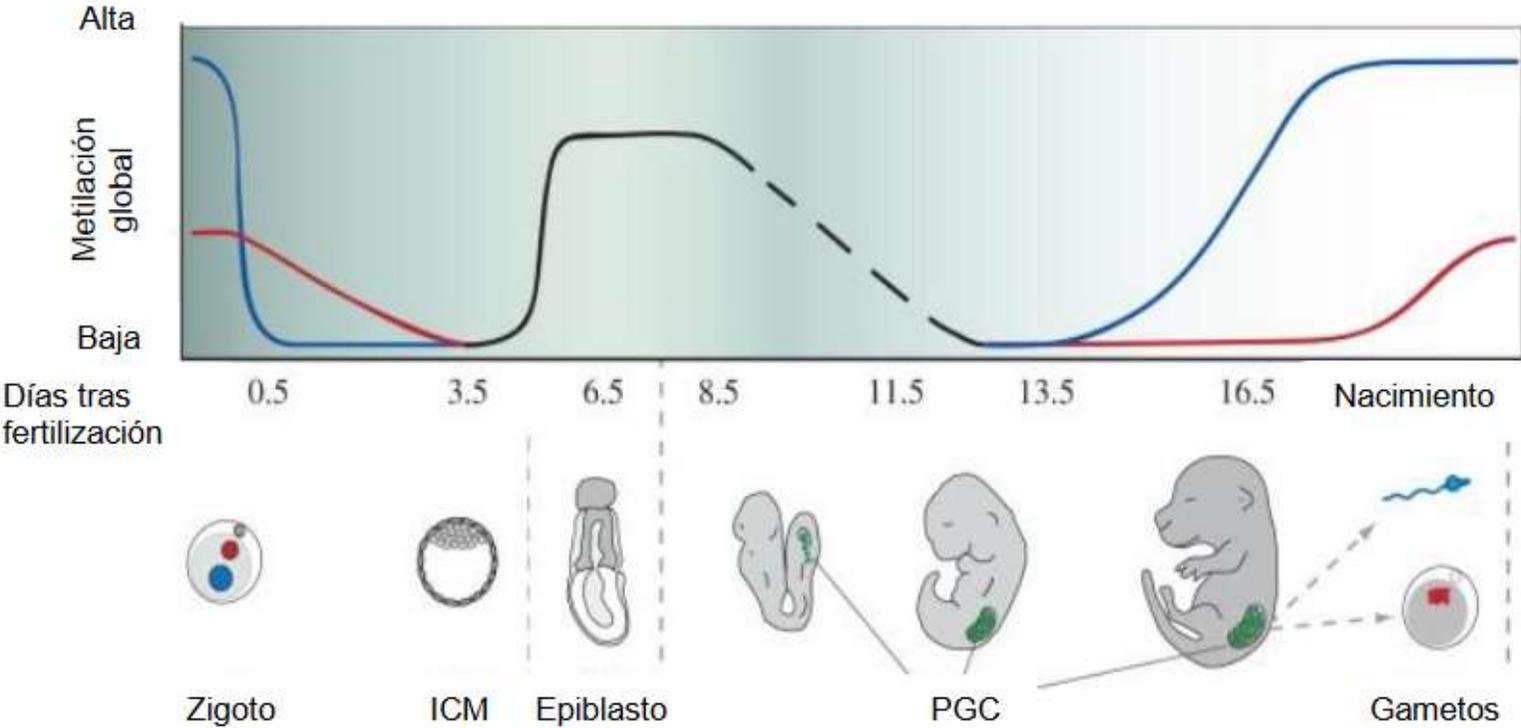
Desmetilación del ADN



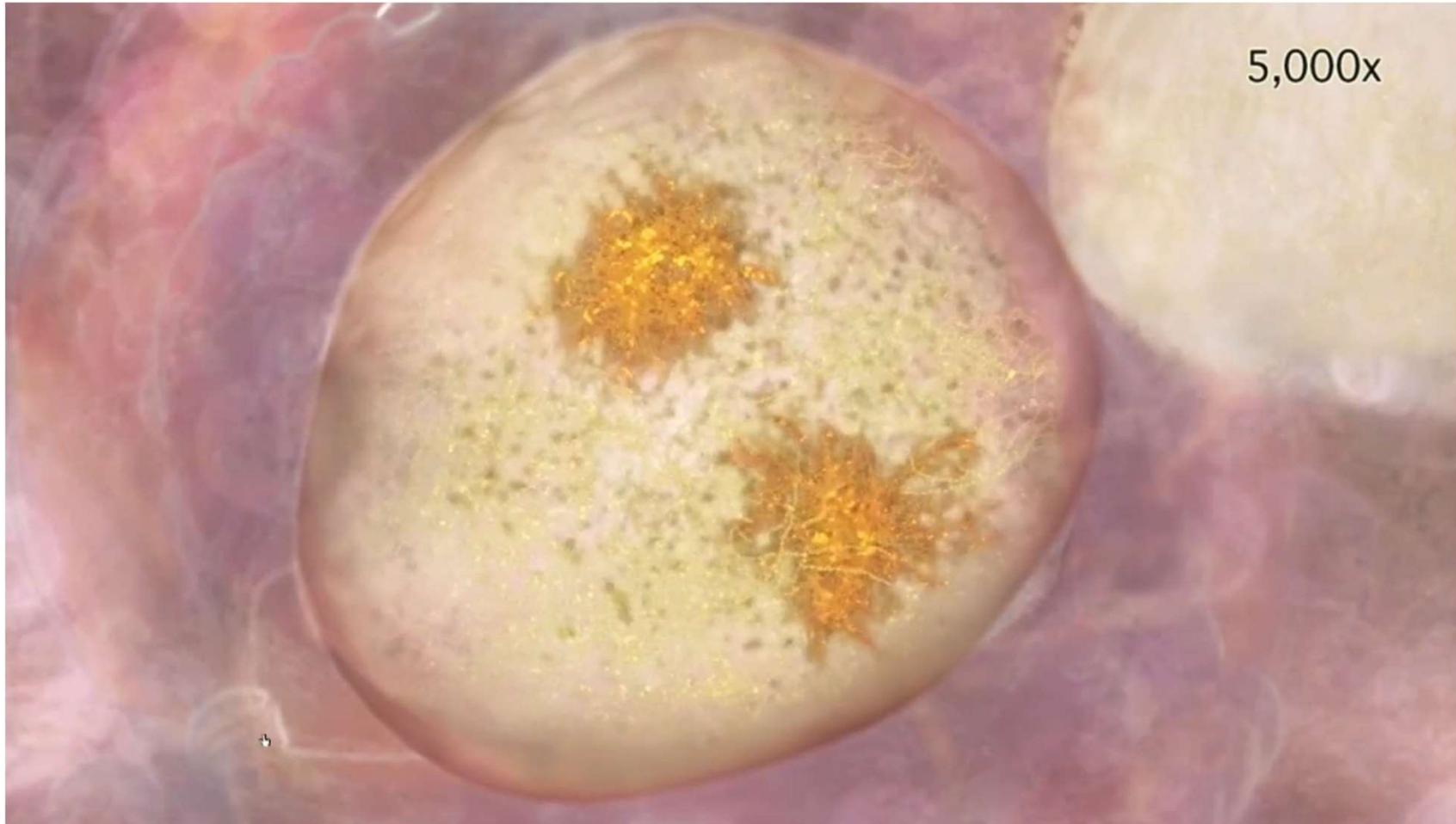
Desmetilación del ADN



Reprogramación Epigenética

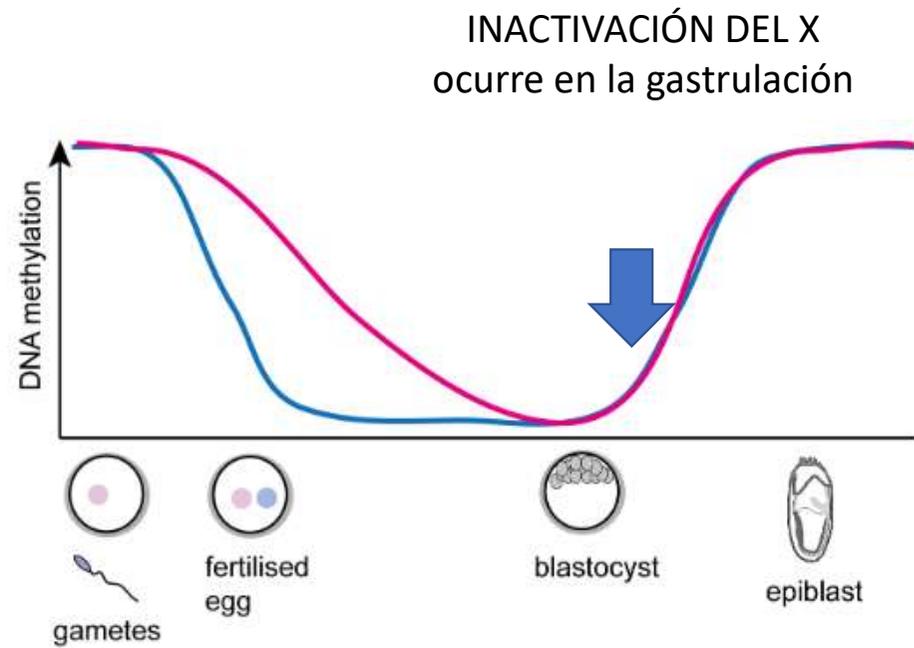
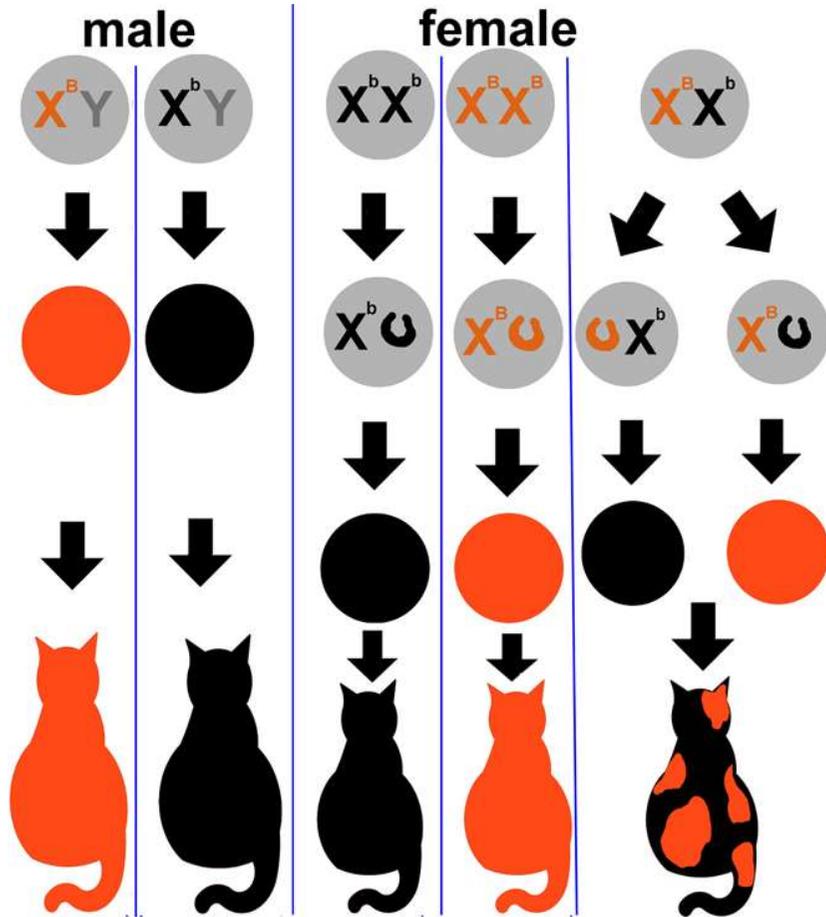


Inactivación del cromosoma X Metilación del ADN



Metilación del ADN (Inactivación del X)

Gatos Calicó

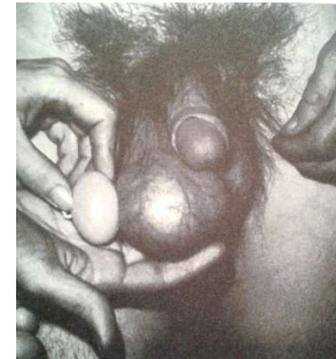


SÍNDROME X FRÁGIL

24

CARACTERÍSTICAS MÁS FRECUENTES

- Cara alargada con frente amplia y mentón prominente
- Pabellones auriculares grandes y salientes
- Hiperlaxitud articular
- Macroorquidismo



RESEÑA HISTÓRICA SÍNDROME X FRÁGIL

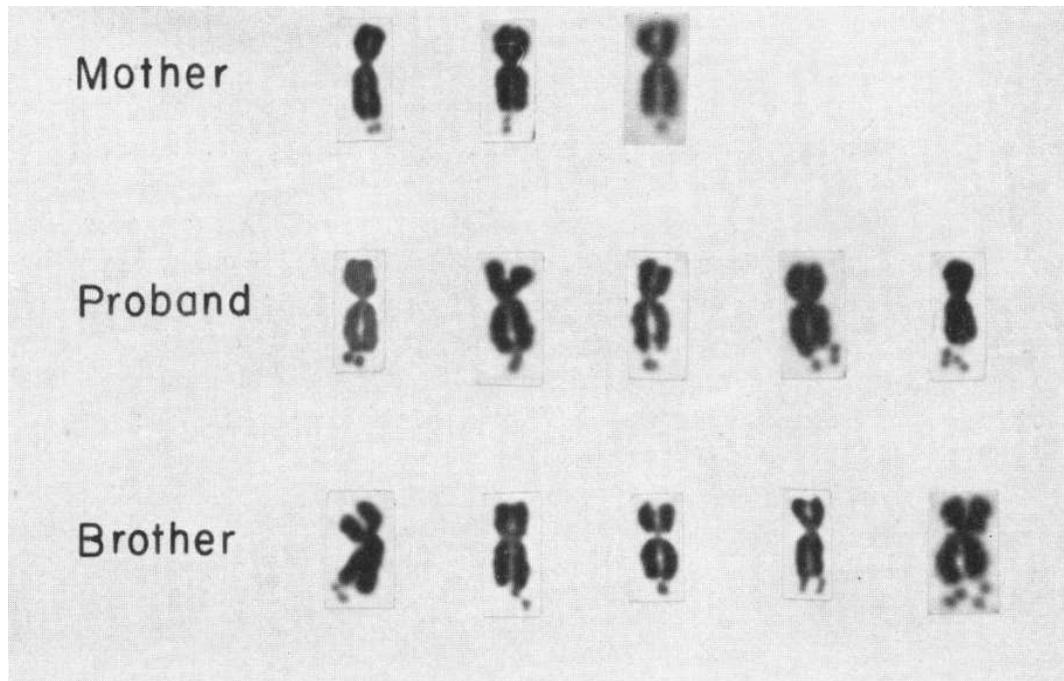


FIG. 4.—The satellites appeared symmetrically at the end of the chromatids (*left*), with displacement of one satellite to the other chromatid (*left center*), as a single centrally placed satellite (*center*) or rarely as tandem satellites (*right*).



1969, **Opitz y col.**



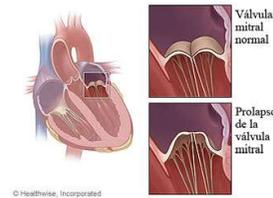
S. M-B

(Lubs, 1969)

American Journal of Human Genetics 21 (3): 231-244.

FENOTIPO FISICO EN VARONES

- Estrabismo
- Soplo cardiaco (prolapso mitral)
- Piel fina
- Macrocefalia
- Anomalías en la boca, con paladar elevado y dientes apiñados
- Disminución en la curvatura de la bóveda plantar
- Alrededor de un 15% de pacientes con SXF presenta epilepsia suelen desaparecer antes de cumplir los 20 años



NIÑOS Y VARONES ADULTOS CON LA MUTACIÓN

- C.I: Discapacidad intelectual moderada a severa
- Trastorno de atención
- Hiperactividad
- Evitación del contacto visual
- Estereotipias



FENOTIPO CONDUCTUAL

NIÑAS Y MUJERES ADULTAS CON LA MUTACIÓN COMPLETA

- 30 y un 50%
- Alteración del aprendizaje
- Timidez y las dificultades en las relaciones sociales
- Problemas de atención e impulsividad
- Ansiedad , fobias
- El lenguaje → 1,8 años



TIPOS DE MUTACIONES EN *FMR1*

29

1- Expansión de trinucleótidos CGG >200

2- Deleciones en las repeticiones CGG.
Coffee y col., 2008

3- Disensa. p.Ile304Asn
De Boulle y col., 1993

4- Delección 1 pb. Exón 5. c.373delA.
Proteína truncada
Lugenbeel y col., 1995



FRONTERA DE METILACIÓN
-800 a -650
Normal

A Distinct DNA-Methylation Boundary in the
5'- Upstream Sequence of the *FMR1* Promoter Binds
Nuclear Proteins and Is Lost in Fragile X Syndrome

Anja Naumann,¹ Norbert Hochstein,^{1,4} Stefanie Weber,¹ Ellen Fanning,² and Walter Doerfler^{1,3,4}

We have discovered a distinct DNA-methylation boundary at a site between 650 and 800 nucleotides upstream of the CGG repeat in the first exon of the human *FMR1* gene. This boundary, identified by bisulfite sequencing, is present in all human cell lines and cell types.



Cambios en la secuencia

Naumann y col., 2009

FRONTERA DE METILACIÓN
-800 a -650
Metilada

A Distinct DNA-Methylation Boundary in the
5'- Upstream Sequence of the *FMR1* Promoter Binds
Nuclear Proteins and Is Lost in Fragile X Syndrome

Anja Naumann,¹ Norbert Hochstein,^{1,4} Stefanie Weber,¹ Ellen Fanning,² and Walter Doerfler^{1,3,*}

We have discovered a distinct DNA-methylation boundary at a site between 650 and 800 nucleotides upstream of the CGG repeat in the first exon of the human *FMR1* gene. This boundary, identified by bisulfite sequencing, is present in all human cell lines and cell types.

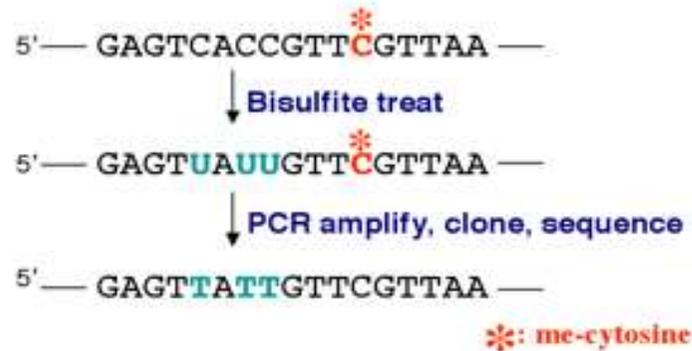
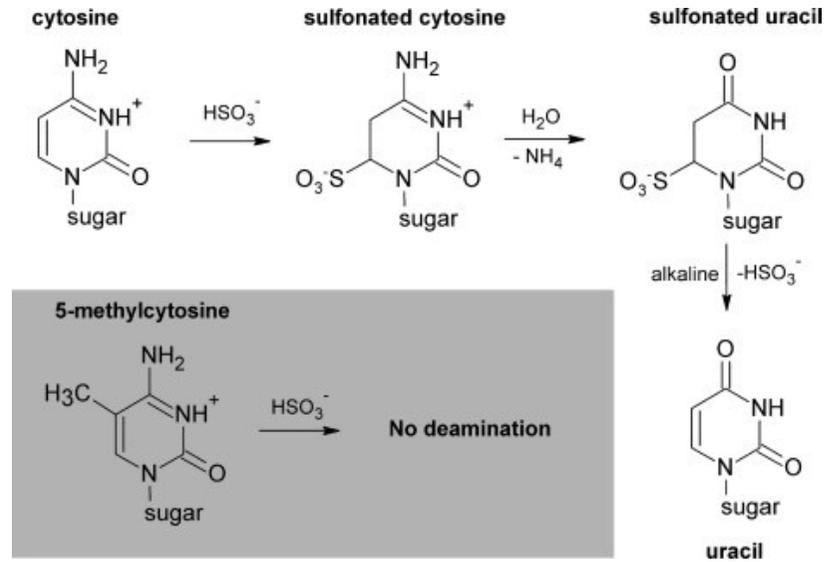
32



METODO: SECUENCIACIÓN CON BISULFITO

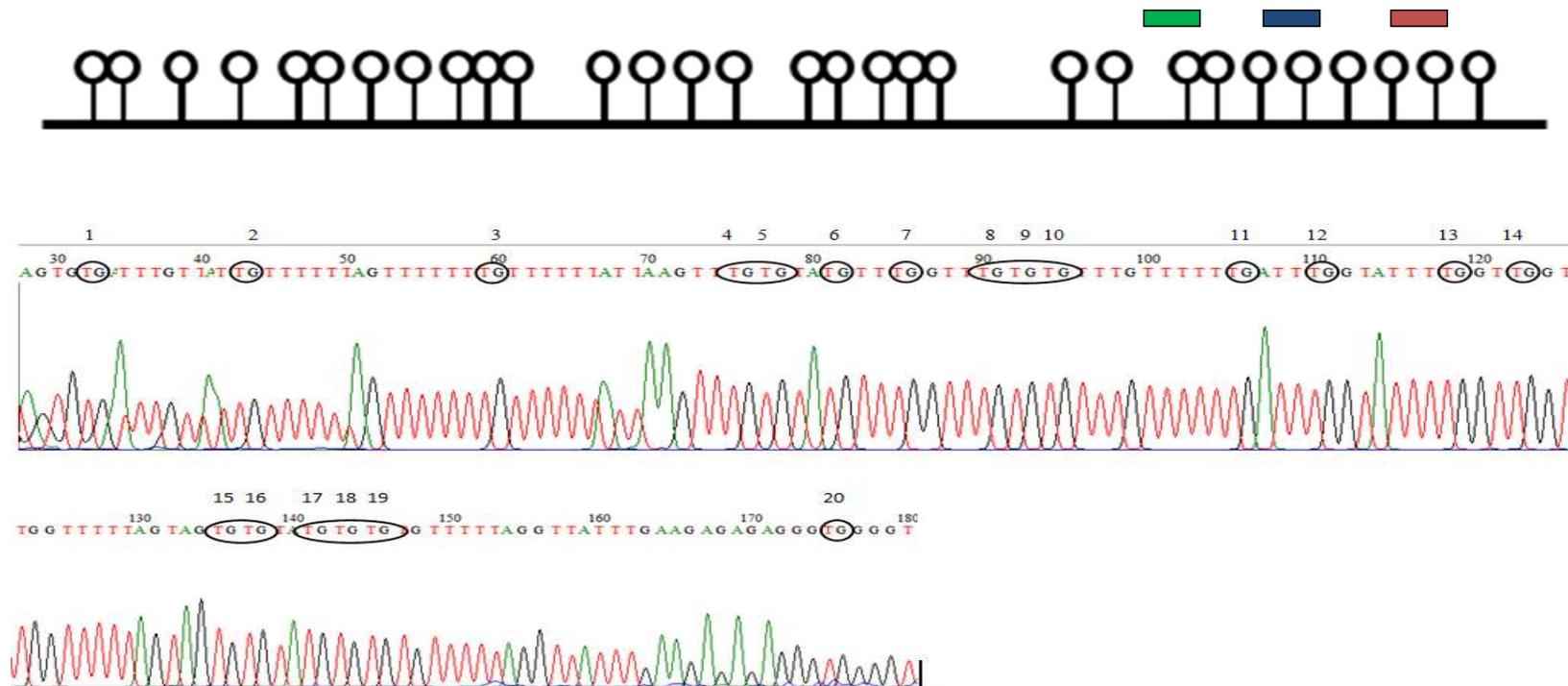
33

Tratamiento del ADN con bisulfito de sodio



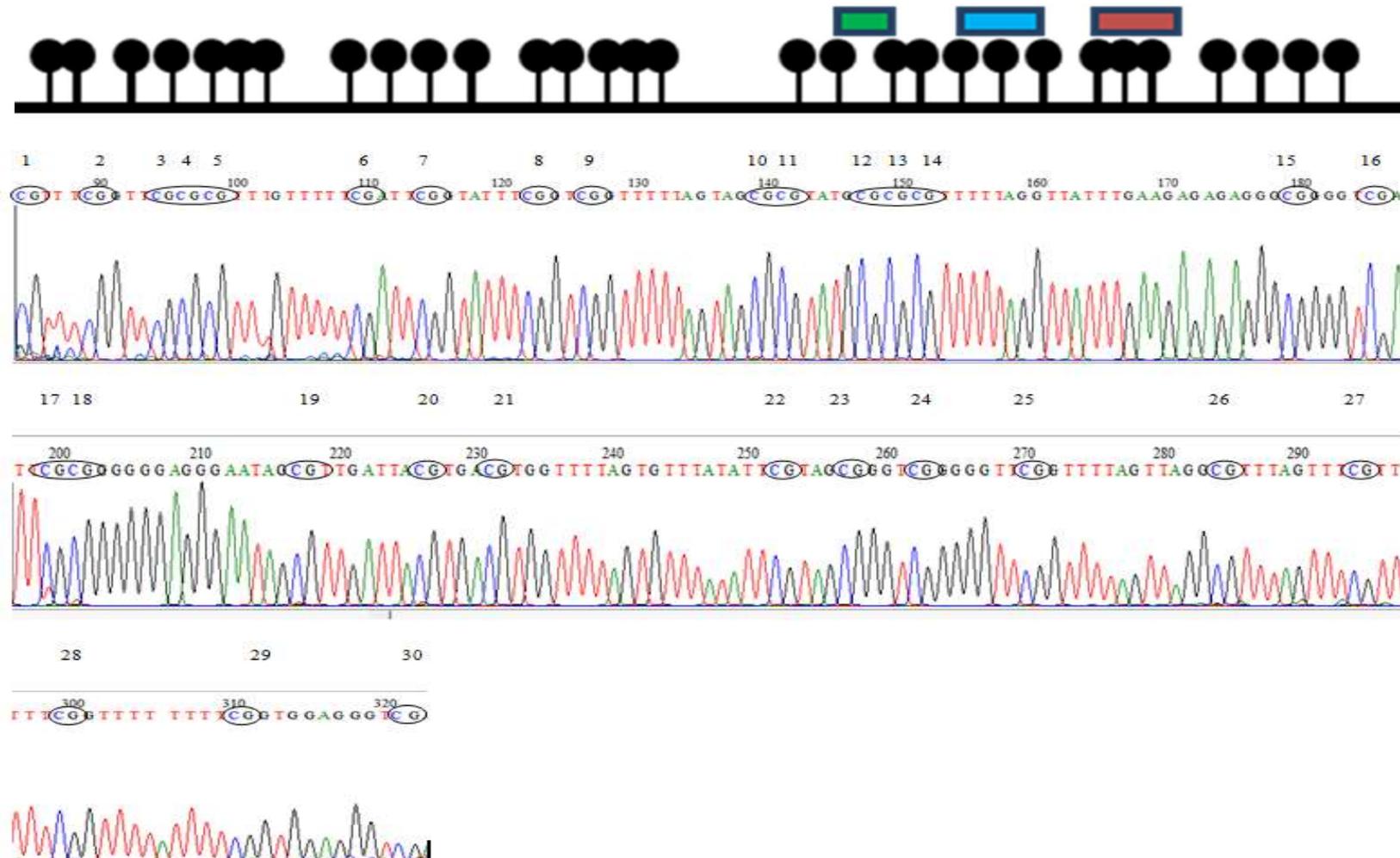
Secuenciación con bisulfito de la región promotora del gen *FMR1*

24 pacientes
22 a 34 repeticiones CGG



Pacientes 5 y 22
> 200 CGG

Secuenciación con bisulfito de la región promotora del gen *FMR1*.

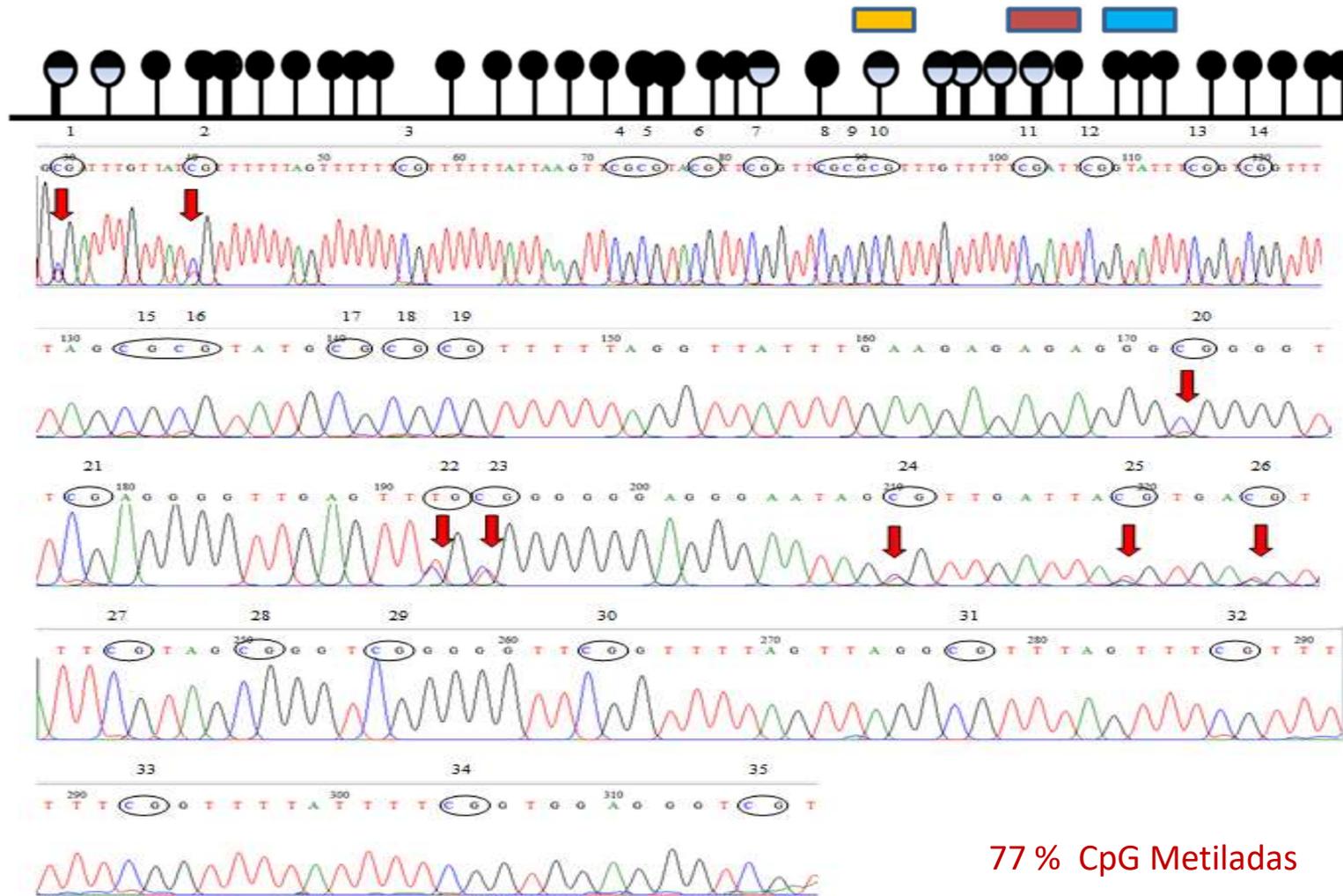


RESULTADOS

37

Secuenciación con bisulfito de la región promotora del gen *FMR1*.

Paciente 7
30 CG



RESUMEN SOBRE LA METILACIÓN DEL ADN

- Ocurre principalmente en los dinucleótidos CpG.
- Si ocurre en un promotor se asocia con silenciamiento o inactivación de un gen.
- Ayuda a mantener la estabilidad genómica.
- Es mantenida por la acción de DNMT.

RESUMEN SOBRE LA METILACIÓN DEL ADN

- Es mitóticamente heredable por la acción de DNMT1.
- Puede ser removida pasiva o activamente (TET).
- Alteración en la producción de MeCP2 produce el síndrome de Rett.
- Es uno de los mecanismos de inactivación del cromosoma X.
- Alteración de la metilación del promotor de FMR1 produce el síndrome del X Frágil.



Centro
Universitario
Rivera



SEDE TACUAREMBÓ

CENUR
NORESTE



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

2da Clase

EPIGENÉTICA

Yasser V. Vega Requena

yassve2@gmail.com

Yasser.vega@cut.edu.uy

Prof. Adjunto
CENUR Noreste
UdelaR