

Daria Kostiniuk

# GENEETTINEN LEIMAUTUMINEN

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta  
Kandidaatintyö  
Tammikuu 2022

# TIIVISTELMÄ

Daria Kostiniuk: Geneettinen leimautuminen  
Kandidaattitutkielma  
Tampereen yliopisto  
Bioteknologia  
Tammikuu 2022

---

Geneettinen leimautuminen on epigeneettinen ilmiö, jossa geeni ilmentyy ainoastaan yhdestä alleelistä toisen alleelin olleessa hiljennetty. Alleelin aktiivisuus on riippuvainen siitä kummalta vanhemmalta se on peritty. Näin esimerkiksi paternaalisesti leimautunut geeni ilmentyy ainoastaan äidiltä periytyneestä alleelistä ja toisin päin. Eläimistä leimautuneita geenejä on ainoastaan tietyillä nisäkkäillä. Näiden nisäkkäiden geenien kokonaismäärään suhteutettuna leimautuneita geenejä on vain pieni, mutta merkitykseltään huomattava joukko.

Geneettinen leimautuminen on evolutiivisesti nuori ilmiö, jonka ilmaantumista on liitetty nisäkkäiden genomien toistojakso-osuuden laajentumiseen ja näin myös hyppivien geenien kiihtyneeseen vaeltamiseen ja monistumiseen. Hyppivien geenien sekvenssiominaisuudet, niiden kyky sijoittua genomien satunnaisiin kohtiin ja niiden vaeltamista vastustava itusolujen puolustus on voinut tuottaa leimoiksi (engl. *imprint*) kutsuttuja säätelyelementtejä. Olleessaan aktiivisessa tilassa leima aiheuttaa samassa kromosomissa sijaitsevan alleelin transkriptionaalista hiljentymistä muokkamalla kromatiinin järjestäytymistä tai saamalla aikaan epigeneettisen tason muutoksia. Epigeneettisen muutoksen tuloksena solun transkriptiokoneisto osaa käsitellä tietyn geenin eri alleeleja eri tavalla. Tällä hetkellä alleelin hiljentymiseen johtavista mekanismeista tunnetuimpia ovat ei-koodaava RNA-välitteinen ja eristyselementtivälitteinen.

Leimautuneiden geenien alleelien eroavat aktiivisuudet pohjautuvat siihen, että niihin kohdistuvien leimojen aktiivisuudet vastinkromosomeissa ovat toisilleen vastakkaiset. Leiman aktiivisuutta taas määrittävät epigeneettiset säätelyjärjestelmät, joista tässä asiansyhteydessä tutkituin on DNA-metylaatio. Leiman epigeneettinen tila ja näin myös sen vastinkromosomispesifinen aktiivisuus perustetaan sukupuolisidonnaisesti jo vanhempien siittiö- ja munasolukehityksen aikana. Leiman epigeneettinen tila säilyy aktiivisten mekanismien avulla myös hedelmöitymisen aikaisen globaalin epigenomin uudelleenohjelmoinnin jälkeen periytyen mitoottisten jakautumisten yhteydessä kehittyvän yksilön somaattisiin soluihin. Leiman epigeneettinen tila on stabiilisti periytyvä, mutta on samalla poistettavissa, mikä on välttämätöntä varsinkin sukusolukehityksen aikana tapahtuvan leimojen epigeneettisen tilan uudelleenohjelmoinnin kannalta.

Geneettinen leimautuminen on evolutiivisesti nuori ilmiö, joka eläimistä on kehittynyt ainoastaan istukkanisäkkäille ja pussieläimille. Perimmäiset syyt geenien leimautumiselle ovat hämärän peitossa, mutta on selvää, että geenien leimautuminen on edistänyt elävää poikaista synnyttävien nisäkkäiden reproduktiivisen strategian evoluutiota. Leimautuneet geenit säätelevät kasvua, kehitystä, sekä useita aineenvaihdunnallisia ja neurologisia prosesseja. Tämän lisäksi leimojen olleessa epigeneettisesti epävakojen alueita niiden uskotaan toimivan myös epigeneettisen muovautumisen kohteina. Näin ollen leimautuneet geenit saattavat aiheuttaa kehittyvän yksilön ilmiänsä muutosia vasteena ympäristöoloihin, mikä tekee niistä mielenkiintoisen tutkimuskohteen.

Avainsanat: geneettinen leimautuminen, epigeneettinen muovautuminen, nc886

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on tehty Tampereen yliopistossa bioteknologian tutkinto-ohjelmassa. Haluaisin erityisesti kiittää Molekulaarisen Epidemiologian ryhmän jäseniä Emma Raitoharju ja Saara Marttila korkeasta luottamuksesta ja mielenkiintoisesta aiheesta, joka käänsi minua molekulaarisen biologian ja epidemiologian puolelle. Haluaisin myös kiittää läheisimpiä ja ystäviä, jotka kannustuksellaan ja rakkaudellaan auttoivat minua jaksamaan.

Tampereella, 15.01.2022

Daria Kostiniuk

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1.</b>	<b>JOHDANTO .....</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>GENEETTINEN LEIMAUTUMINEN.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Geneettisen leimautumisen evoluutio.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b>Leimautuneiden geenien toiminto ja nisäkkään evoluutio .....</b>	<b>8</b>
2.2.1	Munasarja-aikapommihypoteesi .....	9
2.2.2	Konfliktihypoteesi .....	10
2.2.3	Hypoteesien kritiikki .....	10
<b>3.</b>	<b>GENEETTISEEN LEIMAUTUMISEEN LIITTYVÄT MOLEKULAARISET MEKANISMIT .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Epigeneettiset säätelyjärjestelmät .....</b>	<b>11</b>
3.1.1	DNA-metylaatio .....	11
3.1.2	Histonimodifikaatiot .....	12
3.1.3	Ei-koodaavat RNA:t.....	13
<b>3.2</b>	<b>Leiman perustaminen ja ylläpito .....</b>	<b>14</b>
3.2.1	Epigenomin uudelleenohjelmointi nisäkkään kehityksen aikana .....	14
<b>3.3</b>	<b>Leimautumisen mekanismit .....</b>	<b>17</b>
3.3.1	Ei-koodaava RNA-välitteinen mekanismi .....	17
3.3.2	Kromatiinin järjestäytyminen tumassa ja eristyselementtien rooli geneettisessä leimautumisessa	18
<b>4.</b>	<b>ERISTYSELEMENTTIEN ROOLIN SELVITTÄMINEN <i>nc886</i> GEENIN SÄÄTELYSSÄ.....</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>YHTEENVETO .....</b>	<b>23</b>
<b>6.</b>	<b>LÄHDELUETTELO .....</b>	<b>24</b>

# 1. JOHDANTO

Suurin osa istukallisen nisäkkään autosomaalisista geeneistä käyttäytyy Mendelin lakeja noudattaen, jolloin molemmilta vanhemmilta saadut geenikopiot ilmentyvät, alleeleistaan riippuen, dominanttisesti tai resessiivisesti. Epigenomi mahdollistaa poikkeukset tälle säännölle. Yksi tutkituimmista epigeneettisistä prosesseista on geneettinen leimautuminen (engl. *genetic imprinting*). Leimautuneet geenit ilmentyvät hemitsygoottisesti ja uniparentaalisesti, eli vain yhdestä geenikopiosta riippuen kummalta vanhemmalta se periytyy. Tällöin esimerkiksi maternaalisesti leimautunut geeni ilmennetään vain paternaalisesta alleelistä ja toisin päin. Leimautunutta geenikopiota transkriptio-naalisesti hiljennetään tai ilmennetään leimautumattomaan geenikopioon verrattuna poikkeuksellisella tavalla. Näin ollen isältä ja äidiltä periytyneet kromosomit ovat samanarvoisia geneettisesti, mutta eivät epigeneettisesti ja tämän seurauksena myöskään eivät toiminnallisesti (Barlow ja Bartolomei, 2014).

Leimautumista saavat aikaan epigeneettisesti muokatut genomiset alueet, eli leimat (engl. *imprint*). Leiman epigeneettinen tila perustetaan sukusoluissa niiden syntymisen aikana, minkä jälkeen se periytyy diploidiselle jälkeläiselle (Ferguson-Smith ja Bouch'his, 2018). Leima säätelee geenien hemitsygootista ilmentymistä saamalla aikaan kromosomikohtaisia epigeneettisiä ja kromatiinin kolmiulotteiseen rakenteeseen liittyviä muutoksia, jotka puolestaan saavat solun transkriptiokoneisto käsittelemään saman geenin kahta eri alleelia eri tavalla (Ferguson-Smith ja Bouch'his, 2018, Barlow ja Bartolomei, 2014)

Suhteellisen paljon leimautuneita geenejä osallistuu istukallisen nisäkkään alkion ja sikiön kasvun ja kehityksen säätelyyn, sekä vastasyntyneen fysiologian kehitykseen ja varhaiselle elämänvaiheelle elintärkeän käyttäytymisen määrittämiseen. Muuntogeenisten hiirien tutkimuksilla on myös selvitetty, että leimautuneet geenit osallistuvat yksilön aineenvaihdunnallisiin ja neurologisiin prosesseihin, sekä vaikuttavat yksilön sosiaaliseen käyttäytökseen. Geenistä riippuen, epigeneettiset leimautumishäiriöt voivat aiheuttaa harvinaisia oireyhtymiä, kuten Prader-Willin, Angelmanin, Silver-Russelin ja Beckwith-Wiedemannin oireyhtymiä tai altistaa yleisille sairauksille, kuten liikalihavuudelle, diabetekselle, psyykkisille häiriöille ja syövälle (Peters, 2014).

Epigeneettinen muovautuminen on genomien keino välittää ympäristöinformaatiota seuraavalle sukupolvelle ja sopeutua valitseviin ympäristön olosuhteisiin ajanjaksoksi, joka on suhteellinen ihmisen elämään. Eläintutkimukset ovat osoittaneet, että varsinkin meiosisin ja varhaisen alkiokehityksen aikana, jolloin epigeneettinen muovautuminen on aktiivisimmillaan, altistus ravitsemuksellisille, kemiallisille tai fysikaalisille tekijöille voi johtaa fenotyyppiin vaikuttaviin epigeneettisen tason muutoksiin (Aittomäki ym., 2016, Dolinoy., 2007). Näin olleen varhaisilla raskaudenaikaisilla olosuhteilla

voi olla suurta vaikutusta lapsen syntymänjälkeiseen ilmiöön. Ilmiölliset muutokset vasteena ympäristöoloihin välittävät epigeneettisesti epävakaita genomisia alueita. Epigeneettisesti epävakaita alueita joukkoon kuuluvat myös geenien leimautumista säätelevät alueet, kuten leimat (Dolinoy., 2007).

Hyvin selkeänä esimerkkinä potentiaalisesta ympäristöinformaatiosta sukupolven yli välittävistä geneettisistä alueista toimii *nc886* geeni. Ihmisillä *nc886* on metastabiilisti leimautunut ei-koodaava RNA 886 ilmentävä geeni (Carpenter ym., 2019, Zink ym., 2018, Lee, 2015). Geenin leimautumisen metastabiilius tarkoittaa sitä, että ihmisyksilöt voivat olla erilaisia sen leimautumisen suhteen ja tämän seurauksena myös ilmiöllisesti erilaisia. Useissa populaation otoksissa 75 % yksilöistä kantaa maternaalisesti leimautunutta ja 25 % yksilöistä kantaa bialleelisesti ilmentyvää *nc886* geeniä. Maternaalisen alleelin metylaatioilla, eli leimautumisella on selkeä yhteys *nc886* geenituotteen tasoihin. On havaittu, että *nc886* geenituotteen annosmäärällä on vaikutusta yksilön glukosimetaboliaan ja painoindeksiin, samoin kuin se, että äidin iällä, ravitsemustilalla, sekä sosioekonomisella statuksella voi olla vaikutusta hänen jälkeläisensä *nc886* geenin maternaalisen alleelin metyloitumiseen (Marttila ym., 2021).

Geenin hemisyygottinen ilmentyminen yhden alleelin leimautumisen seurauksena on diploidisen solun normaalin, eli bialleelisen geeni-ilmentymisen käytännön vastaista. Poikkeuksellisen käytännön ylläpitäminen tiettyjen geenien osalta on kuitenkin tuonut vahvoja valikoivia etuja nisäkkäiden evoluutiossa, mikä on myös vaatinut monimutkaisten molekulaaristen järjestelmien kehitystä ja adaptaatiota. Tiettyjen geenien, kuten myös *nc886* geenin osalta leimautumisen molekulaarinen mekanismi on vieläkin epäselvä. Tämän kandidaattitutkielman tarkoituksena on tarkastella tämän geneettisen ilmiön evoluutiota, sekä leimautumiselle keskeisimpiä tapahtumia ja molekulaarisia mekanismeja. Tämän lisäksi kandidaattitutkielman lopuksi esitellään työn tuloksia, jonka päämääränä oli selvittää sellaisten säätelyelementtien toimintaa, joilla on potentiaalisesti merkitystä *nc886* geenin metastabiilissa leimautumisessa.

## 2. GENEETTINEN LEIMAUTUMINEN

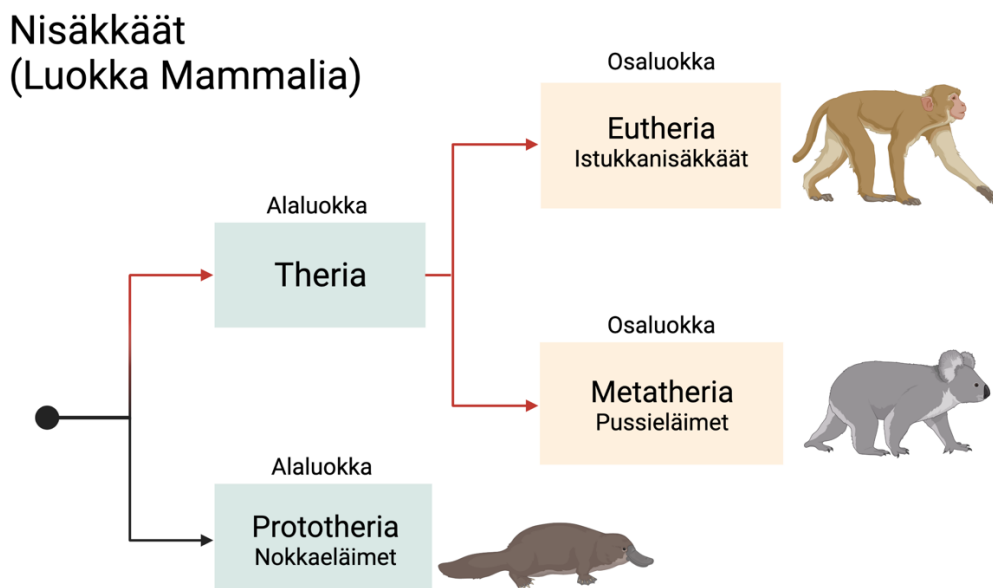
30 vuotta sitten hiirillä tehdyt itusolutkimukset antoivat viitteitä siitä, että maternaalinen ja paternaalinen genomi eivät osallistu alkion kehitykseen tasapuolisesti. Kahdesta paternaalisesta (androgeneettiset) ja kahdesta maternaalisesta (gynogeneettiset) esitumasta rakennettujen alkioden kehitys keskeytyi ja abortoituessaan niissä oli kehityshäiriöitä eri alkion rakenteissa. Gynogeneettiset alkiot epäonnistuivat kehittämään istukan kehityksestä vastaavia rakenteita, kun taas androgeneettiset alkiot epäonnistuivat kehittämään alkiodudosta. Jatkossa geneettinen leimautuminen antoi selityksen miksi gynogeneettiset ja androgeneettiset alkiot epäonnistuvat kehityksessä – osa embryonaalisesta kehityksestä vastaavista geeneistä ilmentyy hemisyygootisesti, eli vain toiselta vanhemmalta peritystä alleelistä. Tällöin gynogeneettiset ja androgeneettiset alkiot ilmentävät joko kaksinkertaisesti tai ei ollenkaan tiettyjä geenejä, minkä vuoksi istukkanisäkkäiden ja pussieläinten alkiot tarvitsevat molempien vanhempien genomia kehittyäkseen (Barlow ja Bartolomei, 2014, Renfree ym., 2012).

Myöhemmin kävi ilmi, että myös nisäkkäiden aikuisilla yksilöillä tietyt geenit ilmentyvät vain yhdestä alleelistä riippuen kummalta vanhemmalta se periytyy. Tähän mennessä leimautuneita geenejä ihmisellä on havaittu noin 100 kappaletta ja hiirellä noin 150 kappaletta (<https://www.genemprint.com/site/home>. Viitattu: 15.10.2021). Osa nisäkkäiden geeneistä on pysyvästi leimattu kaikissa kudoksissa. Osalle geeneistä taas on ominaista polymorfinen leimautuminen, jolloin geenin leimautuminen voi olla kudosspesifinen ja alkiokehityksen vaiheille spesifinen. Ihmisillä *nc886* on ainoa kirjallisuudessa kuvattu metastabiilisti leimautunut geeni. Metastabiili leimautuminen tarkoittaa sitä, että geeni voi olla leimattu tai bileellisesti ilmentyvä eri ihmisyksilöissä.

### 2.1 Geneettisen leimautumisen evoluutio

Geneettinen leimautuminen on evolutiivisesti nuori ilmiö, joka on ilmestynyt ja yleistynyt nisäkkäiden evoluution aikana. Ensimmäiset leimautuneet geenit, kuten *PEG10* (engl. *paternally expressed 10*), *IGF2* (engl. *insuline like growth factor 2*) ja *H19*, ilmestyivät vähintään 160 miljoona vuotta sitten, theria-nisäkäsala luokan evoluution aikana, eli ennen, kuin pussieläimet ja istukalliset nisäkkäät erkaantuivat omiksi metatheria- ja eutheria-osaluokikseen. Munimalla lisääntyvillä nisäkkäillä, eli prototheria-alaluokan nokkaeläimillä tai nokkasiileillä ei ole havaittu leimautuneita geenejä. Tämä entistä enemmän raajaa geneettisen leimautumisen ilmaantumisaikajankohdtaa, sillä nokkaeläinten erkaantuminen omaksi protetheria-alaluokaksi tapahtui ennen theria-alaluokan jakautumista metatheria- ja eutheria-osaluokkiin (Kuva 1) (Renfree ym., 2012).

Eri geenien leimautuminen on ilmaantunut theria-nisäkkäiden evoluution eri ajankohtina erilaisten valikoivien paineiden vuoksi. Tämä on johtanut siihen, että leimautuminen on hyvin polymorfinen sekä nisäkkäiden alaluokkien, että nisäkslajien välillä. Pussieläinten ja istukallisten nisäkkäiden eriytyvien evoluutioiden edetessä molemmille osaluokille on ilmaantunut kooltaan ja geenilokusiltaan erilaiset joukot leimautuneita geenejä. Istukallisilla nisäkkäillä leimautuneita geenejä on selvästi pussieläimiä enemmän (Renfree ym., 2012). Leimautumisen polymorfisuutta löytyy myös korkeammalta tasolta ja näin esimerkiksi laboratoriohiireltä, tyypilliseltä koe-eläimeltä, löytyy alle puolet ihmisen samalla tavalla leimautuneista geeneistä (Peters, 2014). Tämä kyseenalaistaa koehiirikannoilla saatujen leimautuneisiin geeneihin liittyvän tiedon soveltuvuutta ihmisen biologiaan.



**Kuva 1.** Mammalia-luokan jako alaluokkiin ja osaluokkiin evolutiivisesta näkökulmasta. Nuoliviiva punamustalla värigradientilla kuvastaa geneettisen leimautumisen potentiaalista ilmaantumisaikojen ajankohdasta. Punainen nuoliviiva osoittaa nisäksosaluokkiin, joilla on tunnetusti leimautuneita geenejä, kun taas musta nuoliviiva osoittaa nisäksalaluokkaan, joilla leimautuneita geenejä ei ole havaittu. Perustuu lähteeseen Renfree ym. (2012). Luotu käyttäen BioRender.com.

Leimautuneiden geenien ilmaantumista theria-alaluokan nisäkslajeissa on liitetty genomien toistojakso-osuuteen laajentumiseen. Eri nisäkslajien perimän toistojakso-osuus korreloi vahvasti leimautuneiden geenien määrän kanssa (Renfree ym., 2012). Tyypillisen eutheria-nisäksään perimän toistojaksojen prosentuaalinen osuus on n. 45 %. Suurin osa toistojaksoista kuuluu hyppiviin geeneihin, eli transposoneihin. Transposonit jaetaan niiden siirtymismekanismien perusteella retrotransposoneihin ja DNA-transposoneihin. Retrotransposoneilla on oma promoottorinsa, jolloin ne transkriptoituvat normaalilla tavalla, minkä jälkeen käänteiskopioijaentsyymi syntetisoi cDNA, eli yksijuosteista mRNA:lle komplementaarista DNA:ta. Retrotransposoniperäisillä cDNA:illa on kykyä insertoitua perimän satunnaisiin kohtiin. DNA-transposonien kyky siirtyä perimässä perustuu niiden



leikkautumiseen ja siirtymiseen yhdestä genomien alueesta toiseen. Tärkein ero kahden transposoniluokan välillä liittyy monistumiskykyyn (Aittomäki ym., 2016). Transposonien sattumanvarainen monistuminen ja siirtyminen on pääosin hyödytön riskipitoinen tapahtuma, joka on aktiivisimmillaan gametogeneesin aikana. Kuitenkin transposonien vaeltaminen genomissa on yksi nisäkkään evoluutiota ajavista voimista, joka saattoi myös aiheuttaa tiettyjen theria-nisäkkäiden geenien leimautumisen (Aittomäki ym., 2016, Renfree ym., 2012, Ferguson-Smith ja Surani, 2001).

Suurin osa genomien CG-dinukleotideista, yleisimmistä metyyli transferaasien kohteista, sijaitsee transposonielementtien toistojaksoissa (Ferguson-Smith ja Surani, 2001). Tämän lisäksi näiden elementtien sekvenssien mukanaan voi kulkeutua ja monistua myös säätelyelementtejä, kuten promootoreita (Aittomäki ym., 2016), tai ne voivat satunnaisesti sijoittua säätelyelementtien läheisyyteen (Ferguson-Smith ja Surani, 2001). Ituradan solut ehkäisevät transposonielementteistä mahdollisesti aiheutuvaa haittaa epigeneettisin mekanismein, kuten transposoituvien elementtien metylaatiolla, kromatiinin kondensaatiolla ja ilmentymistä säätelevien ei-koodaavien RNA-molekyylien kohdistamisella (Renfree ym., 2012). Näin olleen transposonielementteihin ja potentiaalisesti myös niiden läheisyydessä sijaitsevien säätelyelementteihin kohdistuva itusolun puolustus on voinut tuottaa differentiaalisesti epigeneettisesti modifioituja alueita. Osa tällaisista alueista on voinut säilyä myös hedelmöitymisen jälkeen, mikä on voinut aiheuttaa leimojen syntymistä. Mielenkiintoista on myös se, että munasolun ja siittiön ituradan solut vastustavat eri transposonielementtejä eri mekanismein, mikä myös mahdollisti paternaalisen ja maternaalisen genomien asymmetrisyyttä ja geenien alleelikohtaista ilmentymistä (Ferguson-Smith ja Surani, 2001). On selvää, että leimojen sijoittuminen proteiinia tai säätely-RNA:ita koodaavien geenien viereen ja geeniryppäiden kokoonpano on ollut evolutiivisesti asteittainen tapahtuma. Kokonaisten geeniryppäiden leimautumisessa ja kokoonpanossa ovat voineet osallistua myös muut evoluutiota ajavat mekanismit, kuten genomien uudelleenjärjestäytyminen (Renfree ym., 2009).

## 2.2 Leimautuneiden geenien toiminto ja nisäkkään evoluutio

Tiettyjen geenien maternaalinen tai paternaalinen leimautuminen on liitetty nisäkkään lisääntymisstrategian evoluutioon. Theria-nisäkkään lisääntymisstrategian yksi tärkeimmistä erityispiirteistä on istukka. Useat leimautuneet geenit ilmentyvät theria-nisäkkäiden istukassa ja ovat välttämättömiä sen kasvulle ja kehitykselle. Tämän lisäksi istukassa ilmentyvien leimautuneiden geenien on osoitettu olevan vastuullisia ravinteiden siirrosta äidiltä jälkeläiselle. Näin esimerkiksi istukkanisäkkäillä ja pussieläimillä maternaalisesti leimautunut *PEG10* geeni on välttämätön istukan ravinto- ja kaasuvaihdosta vastaavien rakenteiden kehittymiselle, kuten laboratoriohiirillä tehdyt knockout-analyysit osoittivat. *PEG10* geenin tuottaman proteiinin molekulaarisen tason toiminto on kuitenkin vielä epäselvä (Renfree ym., 2012).

Theria-nisäkkään lisääntymisstrategiaan kuuluvat myös muut piirteet kuin istukka ja sen mahdollistama vivipariteetti, eli elävien poikasten synnyttäminen (Renfree ym., 2012). Osa näistä piirteistä on myös leimautuneiden geenien edustamaa. Merkittävä joukko leimautuneita geenejä vaikuttaa suoraan jälkeläisen sekä kohdun sisäisen, että syntymän jälkeisen kasvuun ollessaan kasvua edistäviä tai estäviä tekijöitä (Barlow ja Bartolomei, 2014). On myös sellaisia leimautuneita geenejä, jotka osallistuvat epäsuorasti jälkeläisen ravintovälitteiseen kasvuun ja kehitykseen. Tällaiset geenit vaikuttavat äidin fysiologiaan ja äidin ja jälkeläisen väliseen kommunikaatioon, tuottaen therianisäkkäiden lisääntymisstrategian muita piirteitä, kuten jälkeläisen imettämisen (Renfree ym., 2012). Tiettyjen geenien leimautumista pidetään eutheria-nisäkkään lisääntymisstrategian evoluution kannalta olennaisena ilmiönä. Tätä myös tukee se, että tällaisten geenien puuttuminen, kuten prototheria-nisäkkäillä, tai epätäydellinen sarja, kuten pussieleäimillä, korreloi näiden eläinten välisen lisääntymisstrategioiden eroavaisuuteen eutheria-nisäkkäisiin suhteutettuna.

Eläimillä diploidisuus toimii tärkeänä suojana resessiivisiä mahdollisesti haitallisia mutaatioita vastaan. Tiettyjen geenien kontekstissa diploidisuuden menettäminen ja tämän yläpito on kuitenkin ilmeisesti ollut suojan menettämisen arvoista, koska se on tuottanut vahvoja valikoivia etuja nisäkkäiden evoluutiossa. Perimmäiset syyt geneettisen leimautumisen ilmaantumiselle ovat kuitenkin hämärän peitossa (Peters, 2014, Dolinoy ym., 2007, Wilkins ja Haig, 2003). On kehitetty ainakin kolme eri hypoteesia geneettisen leimautumisen ilmaantumiselle perustuen muun muassa sellaisiin faktoihin, kuten leimautuneiden geenien ravintoaineiden siirtoon liittyviin rooleihin ja siihen, että eri vanhempien genomit ovat toiminnallisesti epätasa-arvoisia ja tarvitsevat toistensa täydennyksen tuottaakseen elinkelpoisen jälkeläisen (Renfree ym., 2012). Mikään hypoteeseista pysty selittämään geneettisen leimautumisen ilmaantumista kokonaisuudessaan, mutta jokainen antaa järkevän selityksen tiettyjen geenien leimautumiselle.

### 2.2.1 Munasarja-aikapommihypoteesi

Alkiokehitykseen kuuluu myös alkion ulkopuolisten kudosten, kuten istukan, ja alkiokudoksen muodostuminen. Geneettisen leimautumisen vuoksi maternaalinen ja paternaalinen perimä ilmentävät alkiokehityksen aikana eri geenejä ja käynnistävät näin alkion eri rakenteiden muodostumisen. Kuten hiiren itusolututkimuksilla on osoitettu, maternaalinen genomi osallistuu alkiokudosten muodostumiseen, kun taas paternaalinen genomi on välttämätön alkion ulkopuolisten kudosten kehitykselle. Tämä eri vanhemmilta peräisin olevien genomien toiminnallinen jako estää munasarjojen itusoluja kehittämästä pahanlaatuista, eli muun muassa invasiivisuuden vuoksi metastasoivaa, kasvainta. Munasarjojen itusolut voivat spontaanisti käynnistää embryonaalista kehitystä muistuttavaa prosessia ja seurauksena muodostaa kasvaimen, eli teratooman. Teratooman todennäköisyys malignisoitua on hyvin pieni sen vuoksi, että alkion ulkopuolisten kudosten kehitys on jätetty paternaalisen genomien kasvua edistävien geenien tehtäväksi. Tällöin munasolulla oletusarvoisesti ei ole

kykyä käynnistää hyvin invasiivisten alkion kudosten kehitystä. Munasarjojen teratooman hyvin harvinainen malignisoituminen on äidin elimistön kannalta hyvin hyödyllinen geneettisen leimautumisen suora tai epäsuoraa tulos, joka on antanut pohjan munasarja-aikapommi hypoteesille (engl. *ovarian time bomb hypothesis*) (Wilkins ja Haig 2003).

### 2.2.2 Konfliktihypoteesi

Konfliktihypoteesi (engl. *parental conflict hypothesis, kinship theory*) liittyy leimautuneiden geenien yleisimpään toimintoon – ravinteiden siirron säätelyyn äidiltä jälkeläiselle. Molemmat vanhemmat pyrkivät levittämään geenejä vain toisen vanhemman, eli äidin resurssien kustannuksella. Tällöin isän genomi pyrkii ”tuhlaamaan” äidin resursseja mahdollisimman terveen eli kilpailukykyisen jälkeläisen tuottamiseen. Äidin genomi taas pyrkii rajoittamaan yksittäisen jälkeläisensä kasvua, saadakseen omat rajalliset resurssinsa mahdollisimman tasapuoleiseen käyttöön jälkeläistensä kesken. Tällöin äidin ja isän genomeilla on erilaiset intressit niiden yhteisen jälkeläisen kasvun suhteen, mikä on havaittavissa myös leimautuneiden geenien toimintoista. Osa paternaalisesti ilmentyvistä geeneistä edistää jälkeläisen kasvua, kun taas osa maternaalisesti ilmentyvistä geeneistä rajoittaa jälkeläisen kasvua. Äidin resurssien käyttöön liittyvä vanhempien konflikti on saattanut toimia valikoivana paineena tiettyjen geenien leimautumiselle ja tämän hypoteesin idea on selkeästi johdettavissa useiden leimautuneiden geenien toiminnoista (Peters, 2014, Renfree ym., 2012, Wilkins ja Haig, 2003).

### 2.2.3 Hypoteesien kritiikki

Munasarja-aikapommihypoteesin tärkeimpänä heikkoutena on se, että selittäessään vain tietyn, hyvin spesifin toiminnon, se ei anna selitystä muiden geenien leimautumiselle. Vastoin kuin munasarja-aikapommihypoteesi, konfliktihypoteesi selittää myös sellaisten geenien leimautumista, joilla on potentiaalisesti merkitystä nisäkkään lisääntymisstrategian kehityksessä, ja jotka ilmentyvät myös ei-invasiivisissa kudoksissa. Konfliktihypoteesin kritisismi liittyy myös siihen, että se ei pysty selittämään kaikkien geenien leimaantumista (Wilkins ja Haig 2003). On selvää, että kaikkia hypoteeseja edustaa poikkeuksia. Leimautuneiden geenien toiminnot, jotka eivät liity näihin hypoteeseihin, ovat voineet olla seurausta tiettyjen geenien ei tarkoituksenmukaisesta leimautumisesta geeniryppäiden kokoonpanon aikana. Tällaisia geenejä sanotaan sivustaseuraajageeneiksi (engl. *bystander genes*) (Barlow ja Bartolomei, 2014, Wilkins ja Haig, 2003).

## 3. GENEETTISEEN LEIMAUTUMISEEN LIITTYVÄT MOLEKULAARISET MEKANISMIT

### 3.1 Epigeneettiset säätelyjärjestelmät

Epigeneettiset säätelyjärjestelmät ovat DNA-metylaatio, histonimodifikaatiot ja ei-koodaavat RNA:t. Epigeneettisten modifikaatioiden tarkoituksena on säädellä geenien aktiivisuutta solun tarpeiden mukaan DNA:n emäsjärjestystä muutamatta, myös leimautuneiden geenien tapauksessa. Differentiaalinen metylaatio on leiman yleisin tunnistusmerkki, mikä ei kuitenkaan kerro siitä, että DNA-metylaatio on ainoa epigeneettinen järjestelmä, joka määrittää leiman ja välittää sen toiminnan. Niinpä yksittäinen epigeneettinen järjestelmä toimii harvoin yksin, jolloin geenin ilmentymisen säätelyssä kaikki epigenomin komponentit toimivat yhdessä vaihtelevassa hierarkiassa. Seuraavaksi esitellyt epigeneettiset järjestelmät ja niiden yhdistelmien yhteistyö ovat tarpeellisia leiman pystyttämiseksi embryogeneesin aikana, periytyvyydessä meioottisen ja mitoottisen jakautumisen yhteydessä, sekä sen alleelispesifisten vaikutusten välittämisessä.

#### 3.1.1 DNA-metylaatio

Metylaatio on palautuva DNA:n kovalenttinen modifikaatio, jolloin sytosiininuklotidin heterosyklisen pyrimidiinrenkaaseen lisätään metyyliryhmää (-CH<sub>3</sub>). Nisäkkään soluissa metylaation yleisimpänä kohteena on CpG-dinuklotidissa sijaitseva sytosiini. Ihmisen genomissa on noin 30 miljoona CpG-dinukleotideja ja ne voivat sijaita yksittäisinä tai alueilla, jotka sisältävät tavallista enemmän CpG-kohtia, kuten transposonielementeissä ja niin sanotuissa CpG-saarekkeissa (engl. *CpG islands*, CGI) (Aittomäki ym., 2016). Intergeenisten alueiden, kuten toistojaksojen ja sentromeerien, CpG-dinukleotidit ovat melkein aina oletusarvoisesti metyloituja sekä embryogeneesin aikana että erilaistuneissa somaattisissa solussa (Zeng ja Chen, 2019). Intergeenisten alueiden metylaatio edistää näiden alueiden kromatiinin pakkautumista heterokromatiiniksi ja seuraksensa myös stabiilia transkriptionaalista hiljentyä.

CGI:t ovat 500–2000 bp pitkiä muuta genomia tiheämmin sytosiini- ja guaniininukleotideja sisältäviä alueita, joita ihmisen genomissa on noin 27 000 kappaletta. CGI:t sisältävät noin 50 % genomien CpG-kohdista (Aittomäki ym., 2016). CGI:n tyypillinen sijainti on geenin promoottorialueet, mutta niitä esiintyy myös muiden cis-vaikutteisten säätelyelementtien, kuten tehostajaelementtien (engl. *enhancer*) ja eristys-elementtien, läheisyydessä, mikä on olennaista varsinkin geneettisen leimautumisen säätelyssä (Dolinoy ym., 2007). Metyloituneen sytosiinin metyyliryhmän pääasiallisena toimintaperiaatteena on kolmiulotteisesti estää transkriptiokoneiston tai transkriptiotekijöiden

pääsyä säätelyelementtikohdeeseen, mikä puolestaan vaikuttaa, yleensä repressiivisesti, geenin ilmentymiseen (Aittomäki ym., 2016, Dolinoy ym., 2007).

DNA-metylaatio on ainoa epigeneettinen taso, jonka mitoottisen periytymisen mekanismi on tarkasti selvitetty. Metylaation periytyvyys perustuu semikonservatiivisen replikaatioon, jolloin emosolun jokainen DNA:n kaksoiskierteen juoste epigeneettisin modifikaatioinen periytyy molempiin tytärsoluihin ja joita käytetään mallina uuden juosteen rakentumiselle ja epigeneettisen profiilin perustamiselle. Metylaatiokuvioiden kopiontiin uuteen juosteeseen somaattisissa soluissa on erikoistunut Dnmt1-metyylitransferaasientsyymi (Zeng ja Chen, 2019, Aittomäki ym., 2016).

### 3.1.2 Histonimodifikaatiot

Kromatiinin päärakenneyksikkö on nukleosomi. Nukleosomi on oktameerinen proteiinikompleksi, joka koostuu kahdesta kopiosta neljää eri histoniproteiiniä (H2A, H2B, H3 ja H4) ja jonka ympärille kietoutuu noin 146 bp DNA:ta. Nukleosomeja yhdistää keskenään linkkerihistoni. Oktameerin histoniyksiköillä on N-terminaalisia häntiä, jotka ulottuvat tuman nukleosomista ulospäin. N-terminaalisen hännän aminohapot, varsinkin lysiini (lyhenne "K") ja arginiini (lyhenne "A") ovat lukuisten post-translaationaalisten kovalenttisten modifikaatioiden, kuten asetylaation, metylaation, fosforylaation, ubikitinylaation, sumylaation ja ADP-ribosylaation, kohteita. Modifikaatiot voivat esiintyä histonin hännän useissa aminohapoissa samanaikaisesti, mikä mahdollista histonimodifikaatioiden lukuisia vaikutuksiltaan erilaatuisia kombinaatioita (Aittomäki ym., 2015, Dolinoy ym., 2007).

Histonihäntien kovalenttisten modifikaatioiden tyypit ja niiden kombinaatiot vaikuttavat nukleosomin rakenteeseen ja seurauksena myös kromatiinin pakkautumisasteeseen. Kromatiinin pakkautumisaste vastaavasti vaikuttaa DNA-juosteen saattavuuteen säätelyproteiineille, kuten transkriptiotekijöille. Tällöin esimerkiksi nukleosomin histonihäntien asetylaatio on yhdistetty helposti lähestyttävään eukromatiinin ja aktiiviseen transkriptioon. Histonihännän metylaation vaikutukset kromatiinin pakkautumiseen ovat myös riippuvaisia siitä, mihin histonihännän aminohappoon se kohdistuu. Näin esimerkiksi metylaatio kohdassa H3K4 (histonin H3 hännän metylaatio lysiinissa, jonka järjestysnumero on neljä) tai H3K36 on liitetty eukromatiinin ja aktiiviseen transkriptioon, kun taas H3K9, H3K27 ja H4K20 ovat liitetty heterokromatiiniin ja geenin hiljentymiseen (Aittomäki ym., 2015, Wei ym., 2016). Jotkut proteiinit myös osaavat tunnistaa tiettyjä histonihäntien modifikaatioita, mikä kohdistaa niiden toimintaa siihen paikkaan kromatiinia, josta sellainen löytyy. Näin esimerkiksi hiljentävät histonimodifikaatiot, kuten H3K9 metylaatio, voivat aiheuttaa tietyn genomisen alueen metylaation rekrytoimalla paikalle DNA-metyylitransferaaseja (Lewis ja Reik 2004, Wei ym., 2016). Mielenkiintoista on, että tämä mekanismi ei ole yksisuuntainen. CpG-metylaatio eukromatiinissa voi aiheuttaa hiljentäviä histonimodifikaatioita ja seurauksena kromatiinin pakkautumista heterokromatiiniksi (Reverón-Gómez ym., 2018, Lewis ja Reik 2004).

Nukleosomit toimivat esteenä replikaatiohaarukan etenemiselle, minkä vuoksi replikaation aikana niitä jatkuvasti puretaan ja kootaan uudelleen. Koska replikaation aikana on meneillään aktiivinen histonien translaatio, tytärsolujen nukleosomit koostuvat uusien ja vanhojen histoniyksiköiden seoksesta. Histonimodifikaatioiden periytymisen mekanismit ovat vielä hyvin epäselviä. Kuitenkin periytymisen mekanismi näyttää perustuvan histonimodifikaatioiden säilymiseen vanhoissa histoniyksiköissä ja siihen, että ne päättyvät suunnilleen saman DNA-alueen ( $\pm 400$  emäsparia) nukleosomeihin tytärsolujen kromosomeissa. Tällöin periytyneitä epigeneettisiä modifikaatioita vanhoissa histoneissa on mahdollista käyttää mallina, kun uusiin histoniyksikköihin lisätään modifikaatioita (Reverón-Gómez ym., 2018). On myöskin hyvin mahdollista, että muut epigeneettiset järjestelmät, kuten DNA-metylaatio ja ei-koodaavat RNA:t, osallistuvat nukleosomiprofiilin perustamisessa tytärsolujen kromosomeissa.

### 3.1.3 Ei-koodaavat RNA:t

Suurin osa genomin transkripteista ei transloida proteiineiksi. Solun perustoimintoihin liitettyjen RNA:den, kuten siirtäjä-RNA:den ja ribosomaalisten RNA:den, lisäksi genomi koodaa muita ei-koodaavia säätely-RNA:ita, joita jaetaan niiden koon ja toiminnan perusteella eri alaluokkiin. Eri ei-koodaavat RNA:t (engl. *non-coding RNA*, ncRNA) ovat erikoistuneet muun muassa säätelytehtäviin, kuten geenien ilmentymisen säätely transkriptionaalisella ja post-transkriptionaalisella tasolla, samoin kuin muiden epigeneettisten säätelyjärjestelmien toiminnan ohjaaminen. Näiden toimintojen kannalta olennaisimmat ncRNA:t ovat pitkät ei-koodaavat RNA:t (lncRNA), mikro-RNA:t (miRNA) ja pienet häiritsevät RNA:t (engl. *small interfering RNA*, siRNA) (Wei ym., 2016).

Ribonukleaasientsyymeillä prosessoidut pienet ncRNA:t, kuten miRNA:t ja siRNA:t, ovat n. 19–25 nukleotidin pituisia pieniä RNA-molekyylejä, jotka säätelivät geenien ilmentymistä post-transkriptionaalisesti. Nämä ncRNA molekyylit sitoutuvat täysin tai osittain komplementaarisiin mRNA-kohteisiinsa, jolloin niiden translaatio estyy tai ne ohjautuvat hajotukseen. Yhdellä pienellä ncRNA:lla voi olla lukuisia mRNA-kohteita. miRNA ja siRNA:t toimivat kompleksissa argonauttiproteiinien kanssa, jolloin tämä toiminnallinen kokonaisuus kutsutaan RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*) hiljennyskomplekseksi (Wei ym., 2016, Aittomäki ym., 2015). RISC-hiljennyskompleksi välitteinen post-transkriptionaalisen tason hiljentäminen voi saada aikaan myös transkriptionaalisen tason muutoksia geenin ilmentymisessä, mikäli se kohdistuu esimerkiksi histonimodifikaatioita tai DNA-metylaatiota aikaansaavien proteiinien geenien hiljentämiseen (Wei ym., 2016).

Pitkät ei-koodaavat RNA:t ovat yli 200 nukleotidin pituisia ei-koodavia sääteliviä RNA-molekyylejä, jotka tavallisesti transkriptoituvat proteiinia koodaavien geenilokusten alueilta esimerkiksi häiriintyneen lukukehyksen tai ei-koodaavan (engl. *antisense*) juosteen transkription seurauksena (Wei ym., 2016). Pitkien ei-koodaavien RNA:den yleisempänä tehtävänä on säädellä proteiinia koodaavien geenien transkriptiota, useimmiten aiheuttaen niiden hiljentymistä. Yhtenä lncRNA:n keinona

saada geenin hiljentymistä on vaikuttaa sen kromatiiniin pakkautumiseen, rekrytoimalla paikkaspesifisesti kromatiinia muokkaavaa koneistoa. Ei-koodaavien RNA:den ja niiden vaikutusten mukaan lukien kromatiinia muokkaavien vaikutusten periytyvyyden uskotaan perustuvan siihen, että ne välittyvät emosolun sytoplasman mukaan tytärsoluihin (Aittomäki ym., 2015) sekä meioottisen että mitoottisen jakautumisen yhteydessä.

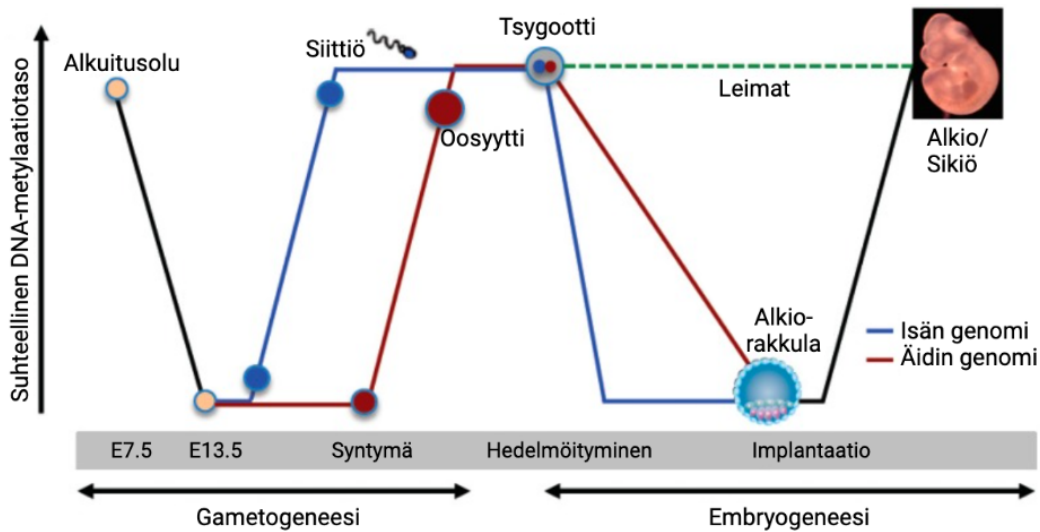
## 3.2 Leiman perustaminen ja ylläpito

Leiman epigeneettinen tila perustetaan gametogeneesin aikana haploidisissa sukusoluissa, minkä jälkeen se ja sen vaikutukset periytyvät jälkeläisen diploidisiin somaattisiin soluihin. Leiman tyypillinen ja vaikutuksista selkein epigeneettinen modifikaatio on DNA-metylaatio. Tällöin leima sijaitsee eri tavalla metyloidulla alueella (engl. *germline differentially methylated region*, gDMR). gDMR:ien epigeneettinen tila luodaan gametogeneesin aikana. Geenien leimautumisessa varsinaisten gDMR:ien yhteistyössä toimivat myös muut somaattiset DMR:t. Somaattisten DMR:ien epigeneettinen tila perustetaan hedelmöitymisen jälkeen ennen implantaatiota, mikä on yleensä gDMR:ien ohjaama (Lewis ja Reik, 2005). Leiman gDMR:n epigeneettisen tilan sukupolvien välinen periytyminen, kuten myös sen ja somaattisten DMR:ien epigeneettisten tilojen ylläpito alkion varhaisen kehityksen aikana on poikkeuksellista muun genomien metylaatiotilaan suhteutettuna. Tämä sen vuoksi, että gametogeneesin ja varhaisen embryogeneesin aikana epigenomi käy kaksi globaalia uudelleenohjelmointiaaltoa, joihin kuuluvat demetylaatio ja *de novo* metylaatio vaiheet. Leimojen periytyminen kokonaiskuvan oivaltaminen on tärkeä, koska se antaisi ymmärrystä, siitä millaisten molekulaaristen mekanismien välityksellä informaatio ympäristöolosuhteista voi siirtyä sukupolvien yli.

### 3.2.1 Epigenomin uudelleenohjelmointi nisäkkään kehityksen aikana

Saman yksilön kaikilla soluilla on sama perimä muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Solun aintulaatuisen identiteetti määräytyy, kun epigeneettiset modifikaatiot ohjaavat sen tyypille ominaista perimän transkriptionaalista tulkintaa ja asettavat esteitä sen erilaistumispotentialille. Alkiokehityksen aikana totipotentit ja pluripotentit solut mitotoisesti jakautuessaan asteittaisesti hankkivat epigeneettisiä modifikaatioita, perustaen somaattisten solujen identiteettiä. Terminaalisesti erilaistuneiden somaattisten solujen varsinkin DNA-metylaatioon pohjautuva identiteetti on pysyvä ja tytärsoluihin periytyvä. Kuitenkin nisäkkään kehitykseen kuuluvat vähintään kaksi ajanjaksoa – gametogeneesi ja varhainen embryogeneesi, joiden aikana epigenomi käy globaalia uudelleenohjelmointia (Kuva 2). Molemmat uudelleenohjelmointiaallot koostuvat kahdesta vaiheesta – demetylaatiosta ja *de novo* metylaatiosta. Uudelleenohjelmointiaaltojen tarkoituksena on palauttaa ga-

meettien ja niistä muodostuvan tsygootin erilaistumispotentiali. Tämän lisäksi uudelleenohjelmointiaaltojen aikana perustetaan sukupuolisidonnaiset leimat ja ylläpidetään niiden ja muiden alueiden sukupolven yli välittyvät epigeneettiset modifikaatiot (Zeng ja Chen, 2019).



**Kuva 2.** Kuva ilmaisee DNA-metylaatiotasojen muutokset hiiren gametogeenin ja embryogeenin aikana. Gametogeenin kuuluva uudelleenohjelmointiaalto tapahtuu varhaisen embryogeenin aikana (hiiriäalkiossa päivinä E7.5–13.5). Tällöin alkuitusolut poistavat suuremman osan metylaatiosta mukaan lukien alkio kudoksesta perityt sukupuolisidonnaiset leimat. Siittiöiden alkuitusolujen de novo metylaatio tapahtuu heti demetylaatiovaiheen jälkeen ja on valmis ennen pojan syntymistä. Oosyyttien de novo metylaatio tapahtuu tytön syntymän jälkeen ja on valmis ennen hänen sukukypsyyttänsä. Embryogeeniin liittyvä uudelleenohjelmointiaalto tapahtuu hedelmöitymisen jälkeen. Oosyytin esituma käy hitaampaa asteittaista passiivista demetylaatiota ja siittiön esituma käy nopeampaa aktiivista demetylaatiota. Molempien äidiltä ja isältä perittyjen genomien demetylaatiot ovat valmiita alkion implantaation mennessä. Kuvan vihreä katkoviiva kuvastaa leimojen metylaatiotilan säilymistä, eli seuraavaan sukupolven siirtymistä, tsygootin genomien globaalien demetylaatioprosessin huolimatta. Alkion pluripotentit solut erilaistuessaan asteittaisesti metyloivat genominsa, mikä näkyy myös solujen nousseista metylaatiotasosta alkion implantaation jälkeen. Kuva on muokattu Zeng ja Cheng (2019) pohjalta.

Demetylaatio voi tapahtua aktiivisella – entsyymeihin pohjautuvalla mekanismilla, ja passiivisella – DNA:n replikaatiosta riippuvaisella mekanismeilla. Aktiivinen demetylaatio tapahtuu riippumattomasti solun jakautumisesta, TET-entsyymien (engl. *ten-eleven translocation enzymes*) välityksellä. TET-entsyymit hapettavat sytosiiniemästä, minkä jälkeen TDG-entsyymi (engl. *thymine DNA glycosylase*) tunnistaa sytosiinin hapettuneen välimuodon ja korvaa se metyloitumattomalla sytosiinilla. Passiivinen demetylaatio tapahtuu solun replikaation ja proliferaation yhteydessä. Passiivisen demetylaation aikana metylaatioprofiilin kopiointi replikoituneeseen juosteeseen epäonnistuu tapahtumaa ajavien entsyymien, kuten DNMT1 ja UHRF1, puutteen vuoksi. Tällöin passiivisen demetylaation aikana proliferoituneessa solu vähitellen menettää ainakin metylaatioon perustuvaa



epigenomiaan. Leimat ovat vastustuskykyisiä passiiviselle demetylaatiolle, koska niiden epigeneettinen tila säilytetään aktiivisten mekanismien avulla. Itse asiassa samojen mekanismien vastuulla on myös ylläpitää leimojen epigeneettinen tila varhaisen alkiokehityksen aikana ja somaattisissa soluissa. *De novo* metylaation taas uskotaan tapahtuvan useiden eri gametogeneesi- ja embryogeneesivaiheille spesifisten metyyli transferaasien, kuten DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C ja DNMT3L ja niiden lukuisten isoformien avulla (Zeng ja Chen, 2019). Osa sekä demetylaatioon että *de novo* metylaatioon liittyvistä mekanismeista ovat vielä tuntemattomia ja tutkimuksen alla.

Hiirialkiossa kehityspäivänä E7.5 alkuitusolut (engl. *primordial germ cells*, PGC) saavat alkunsa epiblastisolukosta, eli alkion varhaisen kehityksen somaattisesta kudoksesta. Tällöin ensimmäisen gametogeneesin aikana tapahtuvan uudelleenohjelmointiaallon tarkoituksena on pyyhkiä pois PGC:den epiblastisolun, mitoottisen jakautumisen kautta välittynyt, identiteetti ja perustaa sukusoluille ominaisen identiteetin, mukaan lukien sukupuolisidonnaiset leimat. Alkuitusolujen demetylaatio perustuu sekä passiivisen, että aktiiviseen demetylaatioon. Hiirialkiossa E7.5 kehityspäivästä alkaen PGC:t menettävät suurimman osan epigenomeistaan passiivisen demetylaation johdosta, kiivaasti jakautuessaan, vaeltaessaan epiblastisolukosta kohti sukurauhasia. Kun PGC:iden proliferaatio hidastuu alkaa aktiivinen demetylaatio, joka poistaa suojan alla olevat epigeneettiset merkit, mukaan lukien somaattisesta epiblastisolukosta peräiset leimat. E13.5 kehityspäivän mennessä hiirialkion PGC:den metylaatiotasot saavuttavat miniminsä (Zeng ja Chen, 2019).

*De novo* metylaatio ituradan soluissa tapahtuu sukupuolispesifisesti eri ajanjaksoissa. Embryogeneesin aikana ennen meioottista jakautumista molemmat sukusolulinjat käyvät sukusolupopulaation laajentumisen (engl. *mitotic expansion*). Miehen ituradan solut alkavat *de novo* metylaationsa heti demetylaation jälkeen mitoottisen sukusolupopulaation laajentumisen yhteydessä. Spermatozoidien epigeneettinen profiili perustuu lopullisesti ennen pojan syntymistä. Naisen ituradan solujen uudelleen metylaatio tapahtuu mitoottisen sukusolupopulaation laajentumiseen jälkeen, syntymäjälkeisen primaarisen oosyytin kasvuvaiheen aikana (Zeng ja Chen, 2019). Gameettien *de novo* metylaation aikana perustuvat sukupuolisidonnaisten leimojen epigeneettiset tilat ja sukusolujen erilaistumis potentiaaleja rajoittavat epigeneettiset modifikaatiot (Fraser ja Lin, 2016). On vielä hämärän peitossa miten eri sukusolut tunnistavat niille spesifisten leimojen alueita kohdistukseen juuri niihin metylaatiota perustavia entsyymejä. Tähän mennessä sukusoluspesifisten leimojen perustamisessa uskotaan osallistuvan spesifisiä *de novo* metyyli transferaaseja houkuttelevia histonimodifikaatioita, kuten H3K4 metylaatio, tai alueella tapahtuvaa transkriptio (Zeng ja Chen, 2019, Barlow ja Bartolomei, 2014).

Hedelmöitymisen aikana vanhempien genomit yhdistyvät toiminnalliseksi kokonaisuudeksi tuottaakseen jälkeläisen. Varhaisen embryogeneesin aikana tapahtuvan epigenomin uudelleenohjelmointiaallon tarkoituksena on poista gameettien erilaistumis potentiaaleja rajoittavat epigeneettiset

modifikaatiot palauttaakseen tsygootin totipotentiuttaan, eli kykyä perustaa yksilön ja ekstraembryonaalisen kudoksen kaikkia solutyyppejä. Heti hedelmöitymisen jälkeen, ennen genomien fuusiota, siittiön esituma käy nopeata aktiivista demetylaatiota ja maternaalinen genomi käy passiivista demetylaatiota alkion ensimmäisten jakautumisten yhteydessä. Embryogeneesiin liittyvä toinen *de novo* metylaatioaalto tapahtuu hiiriätkiossa päivinä E4.5 – E6.5 (Zeng ja Chen, 2019).

Leimojen epigeneettinen tila säilyy siitä huolimatta, että molempien vanhempien genomit menettävät suurimman osan metylaatioistaan alkion implantaation menneessä. Tällä hetkellä tunnetaan ainakin kaksi mekanismia, joiden avulla leiman epigeneettinen tila voi säilyä. ZFP57 sinkkisormiproteiiniin perustuva mekanismi ylläpitää leiman DMR:n metylaatioita, ja STELLA-proteiiniin perustuva ehkäisee sen poistumista aktiivisen demetylaation aikana (Zeng ja Chen, 2019). ZFP57 tunnistaa metyloituneita TGCCGC-motiiveja, joita löytyy osasta leimojen DMR aluetta. ZFP57 rekrytoi leiman paikalle KAP1-proteiinia, joka saa aikaan heterokromatiinia. Paikkaspesifinen heterokromatiini puolestaan houkuttelee metyyli transferaaseja, jotka stabiloivat leiman metylaatiota. (Zeng ja Chen, 2019, Ferguson-Smith ja Bourchis, 2018). STELLA-proteiini välitteinen mekanismi puolestaan ehkäisee leiman aktiivista demetylaatiota, estämällä TET-entsyymien pääsyä leimojen läheisyyteen (Zeng ja Chen, 2019).

### 3.3 Leimautumisen mekanismit

Leima on vastakkaiskromosomeissa differentiaalisesti modifioitu epigeneettinen alue, joka saa aikaiseksi yksittäisten geenien tai geeniryppäiden leimautumista. Leima, toisin sanoin ICR (engl. *imprintin control region*), voi koostua useammasta cis-vaikutteisesta IC-säätelyelementistä (Lewis ja Reik, 2004). Useimmiten yksittäisten geenien leimautuminen perustuu siihen, että niiden IC-elementin sijainti keskittyy geenin promoottorialueelle. Tällöin geenin promoottorialueen DMR saa aikaan sen hiljentymistä jommastakummasta alleelistä (Barlow ja Bartolomei, 2014). Geeniryppäiden leimautuminen ulottuu monimutkaisemmalle tasolle, kuin yksittäisten geenien alleelispesifinen hiljentäminen. Geeniryppäiden leimautuminen on ohjattu sellaisten IC-alueiden avulla, jotka muuttavat geeniryppään geenien ilmentymistä säätelevien elementtien aktiivisuutta. Tällä tavalla ICR:t saavat aikaan kromatiinin kolmiulotteisen järjestäytymiseen ja epigeneettisiin muutoksiin pohjautuvan leimautumisen (Lewis ja Reik, 2006). Ei-koodaava RNA-välitteinen ja eristys-elementtivälitteinen mekanismi ovat yleisempiä geeniryppäiden ilmentymisen säätelyssä.

#### 3.3.1 Ei-koodaava RNA-välitteinen mekanismi

Leimautuneille geeniryppäille on ominaista ilmentää vähintään yhtä ncRNA:ta. Yleisemmin tällainen ncRNA kuuluu lncRNA-luokkaan. Harvemmassa geeniryppästä ilmentyy myös pieniä ncRNA:ita, kuten miRNA- ja siRNA-molekyylejä (Barlow ja Bartolomei, 2014). ncRNA-välitteisellä mekanismilla leimautuneissa geeniryppäissä IC-alue keskittyy ilmentyvän ncRNA:n promoottorille,

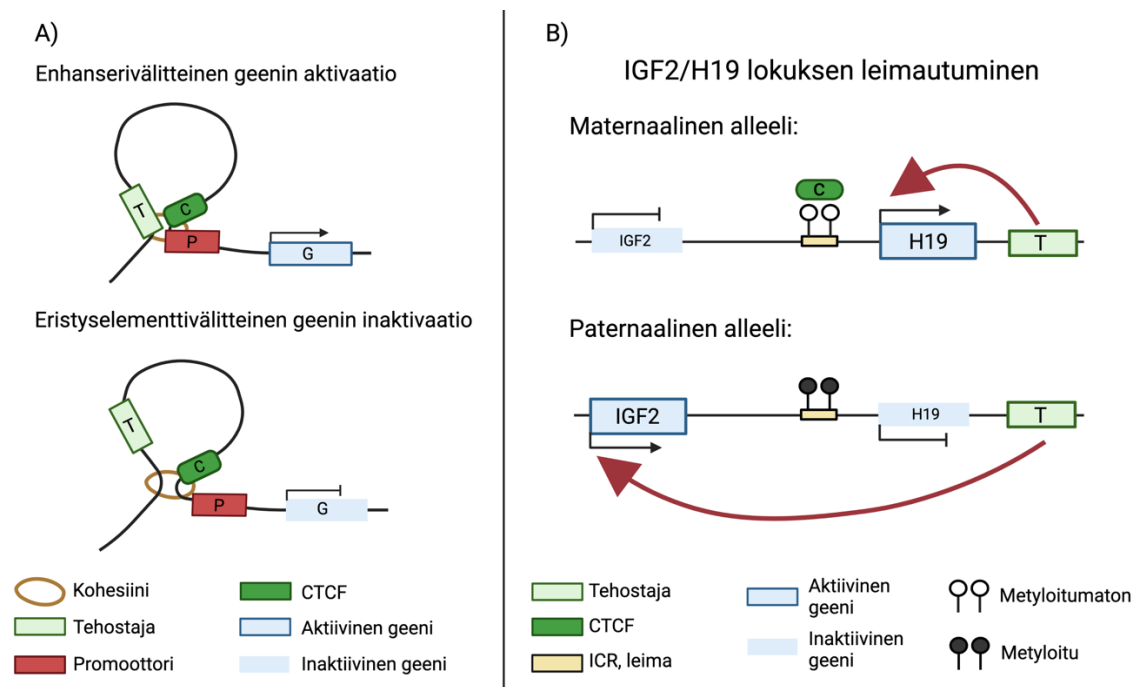
joka yleisemmin sijaitsee toisen leimatun geenin intergeenisellä alueella. Tällöin IC-alueen DMR aiheuttaa ncRNA:n ilmentymistä leimautuneesta alleelistä. Sen lisäksi, että ncRNA:n transkriptio häiritsee sen päällekkäin olevan geenin transkriptiota, ei-koodaavalla transkriptilla on usein omaa leimautumiseen liittyvää toimintonsa. Näin esimerkiksi IGF2/Air geeniryppään Air lncRNA saa muut samaan geeniryppään kuuluvat *Slc22a2* ja *Slc22a3* geenit hiljaisiksi, kuten knockout-analyysit osoittivat (Lewis ja Reik, 2004). Muutamien geeniryppäiden ncRNA:t vaikuttavat post-translatoonaisesti muiden geenien ilmentymiseen, kuten IGF2/H19 lokuksen miRNA:ksi prosessoitu H19 transkripti.

### 3.3.2 Kromatiinin järjestäytyminen tumassa ja eristyselementtien rooli geneettisessä leimautumisessa

Kromatiini on hyvin pitkä tiiviisti solutumaan pakattu DNA-molekyylien joukko. Solutyypistä ja sen erilaistumisesta riippuen kromatiinin on vaihtelevasti vuorovaikuttava itsensä kanssa muun muassa sen vuoksi, että toiminnallisesti tärkeät säätelyelementit sijaitsevat usein suurilla etäisyyksillä kohteistaan. Mikäli tällaiset vuorovaikutukset perustuisivat kromatiinin diffuusion ja sen osien sattumaisen törmäilyyn, olisivat toivotut ja tarkat kontaktit hyvin epätodennäköisiä. Jotta kromatiinin vuorovaikutukset eivät olisi sattuman varassa, kromatiini on järjestäytynyt solutyypispesifisten lyhyen ja pitkän kantaman vuorovaikutusten avulla. Pitkän kantaman vuorovaikutuksiin kuuluvat topologisesti assosioituneet domeenit, eli TAD:t (engl. *topologically associated domains*). TAD:t ovat kromatiinin mikroympäristöjä, joiden sisällä tietty kromosomin alue vuorovaikuttaa itsensä kanssa enemmän, kuin tämän TAD:n ulkopuolisen alueen kanssa (Kim ym., 2015, Downen ym., 2015). TAD:t ovat keskimäärin noin seitsemän geeniä sisältäviä kromatiinin silmukkarakenteita, joiden keskimääräinen pituus on noin 0,8 Mbp. TAD:ien sisällä muodostuu myös pienempiä silmukoita – geenisilmukoita (engl. *gene loops*) (Downen ym., 2015) tai sub-TAD:ja. Geenisilmukoiden alue eristetään muusta TAD:sta, jotta saadaan kohdistettua tarkemmat geenilokuksen tason lyhyen kantaman vuorovaikutukset. TAD:ien lisäksi geenien aktiivisuuden kannalta tärkeät kromatiinin alueet ovat tumalevyyn assosioituneet domeenit, eli LAD (engl. *lamina associated domains*). LAD:t ovat transkriptionaalisesti hiljennettyjä kromatiinin alueita, jotka ovat tiukassa vuorovaikutuksessa tumalevyn kanssa. Näin olleen geenisäätelyn tutkittaessa on tärkeä ottaa huomioon myös kromatiinin avaruudellinen järjestäytyminen ja sen osien vuorovaikutukset, koska niillä on suurta vaikutusta geenin aktiivisuuteen (Kim ym., 2015).

TAD-, geenisilmukka- ja LAD-alueita yleensä rajaavat eristyselementeiksi (engl. *insulator*) kutsutut genomikomponentit. Eristyselementtien aktiivisuus on riippuvainen CTCF (engl. *CCCTC-binding factor*) sinkkisormiproteiinista. Nisäkkäillä CTCF proteiini on hyvin konservoitu, noin 60 000 genomien kohtaan sitoutuvaa proteiini (Kim ym., 2015). CTCF:n sinkkisormidomeenit tunnistavat eris-

tyselementin CpG-pitoista motiivia ja sitoutuvat siihen sen ollessa metyloitumaton. TAD:ien ja geenisilmukoiden tapauksessa kaksi eristyselementtiin sitoutunutta CTCF-proteiinia tai yksittäinen CTCF apuproteiinien, kuten kohesiinin, avustamana muodostaa kromatiinisilmukan. Geenisilmukan muodostumisen tarkoituksena on yleensä välittää tehostajaelementti-promoottori vuorovaikutusta (Kuva 3, A). LAD:ien ja TAD:ien sisäisten heterokromatiinialueiden tapauksessa eristyselementteihin sitoutuneiden CTCF-proteiinien tarkoituksena on estää heterokromatiinin leviämistä inaktiivisen alueen ulkopuolelle (Downen ym., 2015, Kim ym., 2015).



**Kuva 3. A)** Eristyselementtiin sitoutunut CTCF-proteiini kohesiinin yhteistyössä voi estää tai edistää geenin ilmentymistä muotoilemalla erilaisia geenisilmukan rakenteita. Geenin luenta aktivoiva silmukka edistää tehostajaelementin vuorovaikutusta promoottoriin sijoittamalla ne toistensa läheisyyteen. Geenin luenta inaktivoiva silmukka estää tehostajaelementin vuorovaikutusta promoottoriin sijoittamalla se promoottorista erilliseen topologiseen rakenteeseen. Perustuu lähteeseen Kim ym. (2015). **B)** IGF2/H19 lokuksen leimautuminen perustuu eristyselementtivälitteiseen leimautumismekanismiin. Maternaalisessa alleelissa metyloitumaton ICR sitoo CTCF proteiinia estäen tehostajaelementin vuorovaikutusta IGF2 geenin promoottorin kanssa, minkä seurauksena tehostajaelementin vaikutus kohdistuu H19 geenin ja se aktivoituu. Vastaavasti paternaalisessa alleelissa metyloitu ICR ei sido CTCF proteiinia, mikä edistää IGF2 geenin aktivaatiota tehostajaelementin välityksellä. IGF2/H19 lokuksen leimautuminen ja sen geenien alleelikohtainen ilmentyminen perustuu samankaltaiseen kromatiinin muotoutumiseen, kuin kuvassa A) on esitelty. Perustuu lähteisiin Lewis ja Reik (2004) ja Kim ym. (2015). Luotu käyttäen BioRender.com.

Eristyselementti voi sijaita leimautumista säätelevän ICR-alueella. Tällöin ICR:n epigeneettinen tila ja seurauksena CTCF:n sitoutuminen muotoilevat geenisilmukan rakennetta vaikuttaen tehostajaelementti-promoottori vuorovaikutukseen tietyn geenin kohdalla. Hyvänä esimerkkinä eristysele-

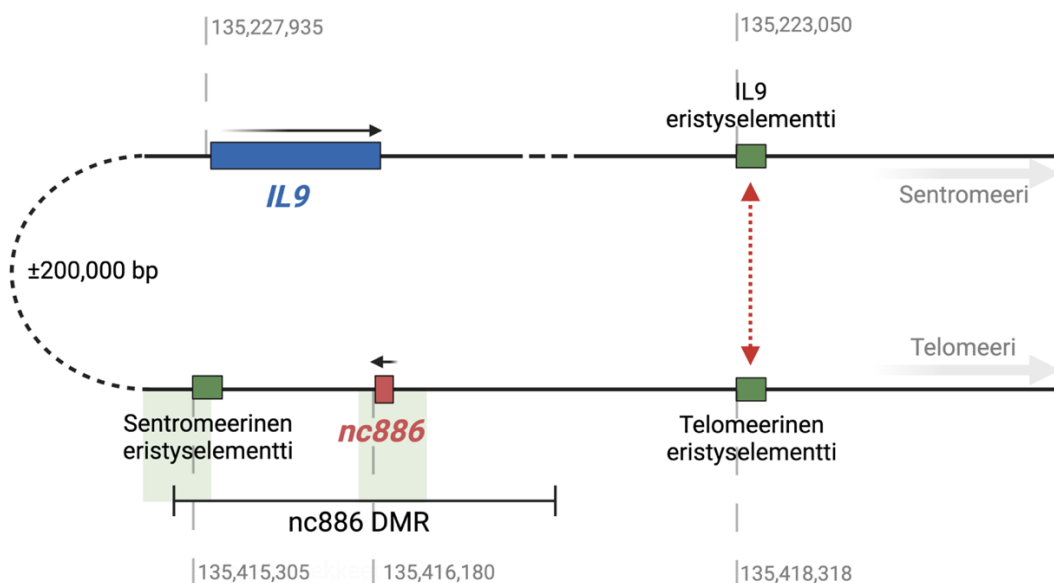
mentti-välitteisestä leimautumista toimii IGF2/H19 geenilokus (Kuva 3, B). IGF2/H19 geenilokuksessa *IGF2* geenin promoottorin ja tehostajaelementin välillä sijaitsee eristyselementti, johon kohdistuu ICR. Paternaalisessa alleelissa ICR on metyloitu, mikä estää CTCF:n sitoutumista ja seurauksena edistää *IGF2* geenin promoottorin vuorovaikutusta sen alavirrassa sijaitsevan tehostajaelementin kanssa, jolloin aktivoituu *IGF2* geenin transkriptio. Maternaalisessa alleelissa taas metyloitumaton eristyselementti sitoo CTCF proteiinia, mikä estää *IGF2* geenin promoottorin vuorovaikutusta tehostajaelementin kanssa. Tällöin *IGF2* geenin transkriptio estyy ja tehostajaelementin vuorovaikutus siirtyy *H19* geenin promoottorin alueelle, jolloin sen transkriptio aktivoituu (Lewis ja Reik, 2004).

## 4. ERISTYSELEMENTTIEN ROOLIN SELVITTÄMINEN *nc886* GEENIN SÄÄTELYSSÄ

Ihmisen *nc886* (engl. *non-coding 886*, vtRNA2-1) geeni sijaitsee kromosomissa 5q31.1 ja koodaa 102 nukleotidiä pitkää ei-koodaavaa RNA 886:ta. Ribonukleaasientsyymi pilkkoo RNA 886 vielä kahdeksi pituutensa vuoksi miRNA:ksi luokiteltaviksi tuotteeksi. Tällöin *nc886* geenillä on yhteensä kolme toiminnallista RNA-tuotetta. Kyseessä oleva geeni on osa noin 1,9 kb pitkää DMR aluetta, jonka ylä- ja alavirrassa sijaitsee kaksi CTCF-proteiinista riippuvaista eristyselementtiä. Ihmisillä *nc886* geenin maternaalinen alleeli on metastabiilisti leimautunut, kun taas paternaalinen alleeli on aina metyloitumaton (Lee, 2015, Zink ym., 2018, Carpenter ym., 2019). Useissa populaatio-otoksissa noin 75 % yksilöistä kantaa leimautunutta, eli metyloitunutta, maternaalista alleelia ja 25 % yksilöistä kantaa ei-metyloitunutta geeniä sen molemmista alleeleistaan. Eri populaatio-otoksissa leimautunutta *nc886* geeniä kantavien ja metyloitumatonta *nc886* geeniä kantavien yksilöiden osuudet vaihtelevat jonkin verran, viimeisten olleessa aina vähemmistö. Nykyisten tietojen mukaan *nc886* on ainoa ihmisillä esiintyvä metastabiili epialleeli. Tämän geenin metastabiilin leimautumisen taustalla olevat mekanismit ovat vielä hämärän peitossa. Potentiaalisina *nc886* DMR:n metylaatioon vaikuttavina elementteinä toimivat sen läheisyydestä löytyvät eristyselementit (Marttila ym., 2020, Carpenter ym., 2019). Tämän tutkielman tarkoituksena on esitellä työn tuloksia, jonka tarkoituksena oli selvittää miten *nc886* geenin DMR-alueetta ympäröivät eristyselementit mahdollisesti osallistuvat *nc886* geenin leimautumisessa ja ilmentymisen säätelyssä.

Kyseessä olevan metastabiilin epialleelin terveydellisiä vaikutuksia, sekä sen metylaatioprofiilin muodostumista olisi helpointa tutkia lyhytikäisten koe-eläinten interventiotutkimuksilla. Kuitenkin *nc886* geeni on evolutiivisesti nuori, jolloin sen toiminnallinen ja ihmisen sekvenssin nähden samankaltainen muoto löytyy ainoastaan kädellisiltä. Kädellislajien välisen evolutionaarisen etäisyyden

kasvaessa sekvenssisamankaltaisuus vähenee, jolloin ihmisen sekvenssin nähden samankaltaisin *nc886* geeni löytyy ainoastaan ihmisapinoista. Mielenkiintoista on, että ihmisapinojen *nc886* geeni näyttää olevan normaalisti maternaalisesti leimautunut. Kyseessä oleva geeni löytyy myös muutamasta jyrsijälahkoa edustavasta jäsenestä, kuten marsulta, kaljurotalta ja muutamasta oravaperheen jäsenestä. Jyrsijöiden *nc886* geenin samanlaisuusprosentti ihmisen sekvenssin nähden on vähän yli 80 %, jolloin niiden geenin sekvensseistä löytyy runsaasti yksittäisten emäsparien mutaatioita. Mishra P. toteuttaman analyysin mukaan ainakin marsun *nc886* geeni ei ole leimautunut. On kuitenkin otettava huomioon, että analyysi on toteutettu käyttäen puutteellista dataa (Kostiniuk ym., 2021).



**Kuva 4.** Tutkielman työn havaintoihin perustuva kuva mahdollisesta *nc886* geenin ja *IL9* geenin läheisyydessä olevien eristyselementtien vuorovaikutuksesta. Kuvassa on myös esitelty *nc886* geenin DMR-alue, sitä rajaavia eristyselementtejä ja CpG-saarekkeita (vaaleanvihreällä). Geenien ja eristyselementtien koordinaatit perustuvat *h19* genomien kokonpanoon. Perustuu lähteeseen Rosenbloom ym. (2013). Luotu käyttäen BioRender.com.

Näin olleen *nc886* on evolutiivisesti nuori ja on mahdollisesti metastabiilisti leimautunut ainoastaan ihmisillä, minkä vuoksi interventiotutkimukset koe-eläimillä eivät ole kannattavia. Luotettavimmat tiedot *nc886* geenin yhteyksistä yksilön terveyteen antaisivat vain kädellisten ja ihmisten kohorttiodoihin perustuvat tilastolliset tutkimukset. Ylipäätään geenin metylaatioprofiilin syntymekanismia on mahdollista selvittää tai vahvistaa muun keinoin tehtyjä havaintoja ainoastaan ihmisapinojen solulinjatutkimuksilla, mikä on oma haasteensa. Tämän työn *nc886* geenin eristyselementtien toimintojen selvittämiseen on käytetty aikaisemmin saatua tutkimustietoa (Marttila ym., 2021, Carpenetr ym., 2019, Lewis ja Reik, 2014), sekä vapaasti saatavissa oleva sekvenssi- (Howe ym.,

2021, Ziebarth ym., 2013) ja ChiA-PET-dataa (engl. *chromatin analysis by paired-end tag sequencing data*) (Rosenbloom ym., 2013).

Noin 1000 bp:n etäisyydellä *nc886* geenin sentromeerisesta päästä sijaitsee eristyselementti, jolla on selkeä CTCF-proteiinin tunnistama sitoutumismotiivi. Ihmisillä sentromeerinen eristyselementti kuuluu osaksi *nc886* geenin DMR-aluetta (Carpenter ym., 2019). Sentromeerisen eristyselementin ympäristön differentiaalinen metylaatio voinee kertoa siitä, että CTCF-proteiini on kykyinen sitoutumaan ainoastaan yhteen eristyselementin alleeleista. Kyseessä oleva eristyselementti on evoluutiivisesti nuori ja se on konservoitunut ainoastaan sellaisilla kädellisillä, joilta löytyy *nc886* geenin leimautunut tai metastabiilisti leimautunut muoto, eli muun muassa ihmisapinoilla. Jyrsijöillä, joilla on *nc886* geeni ei ole havaittu sentromeerista eristyselementtiä, eikä CTCF-proteiinin sitoutumismotiivia. Tällöin voidaan olettaa, että kädellisten sentromeerisen eristyselementin ilmaantuminen on mahdollisesti johtanut *nc886* geenin leimautumiseen (Kostiniuk ym., 2021).

*Nc886* geenin telomeerisesta päästä 2000 bp etäisyydellä sijaitsee toinen eristyselementti. Ihmisellä telomeerinen eristyselementin ympäristön CpG-kohdat ovat pääosin metyloitumattomia. Tämän lisäksi CTCF-sitoutumismotiivista puuttuu CpG-kohta, joka inaktiivisessa eristyselementissä estää CTCF-proteiinin sitoutumista. Tällöin eristyselementin aktiivisuutta mahdollisesti säätelee kromatiinin pakkautuminen (Kim ym., 2015). Selkärankaisilla telomeerinen eristyselementti on erityäin konservoitunut ja on evoluutiivisesti *nc886* geeniä vanhempi. Tämä antaa vihjeitä siitä, että eristyselementillä on *nc886* geenistä erillinen toiminto. Vapaasti saatavilla olevan K652-solulinjan ChiA-PET datan perusteella on nähtävissä, että telomeerisen eristyselementin CTCF-proteiini on vuorovaikutuksessa *nc886* geenin ylävirrassa n. 200 000 bp:n päässä sijaitsevan eristyselementin ja siihen sitoutuneen CTCF-proteiinin kanssa. 200 kb päässä oleva eristyselementti sijaitsee *IL9* geenin ylävirrassa. *Nc886* geenin telomeerisen ja *IL9* geenin eristyselementtien CTCF-proteiinivälitteinen vuorovaikutus ChA-PET-datan mukaan saa aikaiseksi sub-TAD:n, TAD:n tai geenisilmukan (Kostiniuk ym., 2021, Rosenbloom ym., 2013). Näin olleen *IL9* geenin läheisyydessä sijaitsevat säätelyelementit, kuten tehostajaelementit, saattavat säädellä myös *nc886* geenin aktiivisuutta. *IL9* ja *nc886* geenin eristyselementtien vuorovaikutusta tukee myös se, että ainoat *nc886* geenin tuotteiden tasoihin vaikuttavat ja sen DMR:n ulkopuolella sijaitsevat SNP:t (engl. *single nucleotide polymorphism*) löytyvät *IL9* geenin lokuksen läheisyydestä (Marttila ym., 2021).

Näin olleen *nc886* geenin 1,0 kb:n ja 2,0 kb:n päässä olevat CTCF-proteiinista riippuvaisilla eristyselementeilla on mahdollisesti merkitystä sen ilmentymisen säätelyssä, sekä mahdollisesti sen metylaatioprofiilin perustamisessa. Eristyselementtien hypotetisoidut toiminnat, sekä niiden konservoitumisasteet eri eläinlajeissa eivät kuitenkaan antaa suoraa vastausta siitä, miten *nc886* geenin maternaalinen alleeli leimautuu kädellislajeissa ja miksi ihmisillä *nc886* on metastabiilisti leimautunut. Eristyselementit, jotka ympäröivät *nc886* geeniä ovat loistavat knockout-analyysien kohteet ihmisen solulinjoilla tehdyille lisätutkimuksille.

## 5. YHTEENVETO

Geneettinen leimautuminen johtaa geenin ilmentymiseen vain sen yhdestä alleelistä riippuen kummalta vanhemmalta se periytyy. Geneettisen leimautuminen seurauksena siitiön ja munasolun genomit ovat toiminallisesti epätasa-arvoisia ja tarvitsevat toistensa komplementaation tuottaakseen elinkelpoisen jälkeläisen. Eläimillä geneettinen leimautuminen on evolutiivisesti nuori ilmiö (Barlow ja Bartolomei, 2014). Geenien leimautumisen oletetaan olevan transposonielementtien monistumisen ja vaeltamisen seurausta. Näyttää siltä, että tiettyjen geenien leimautuminen erilaisien valikoivien paineiden seurauksena on johtanut therianisäkkäiden lisääntymisstrategian kehittymiseen (Renfree ym., 2012). Leimautuneilla geeneillä on myös olennaista roolia aikuisen yksilön fysiologisissa prosesseissa. Tästä seuraa, että tällaisten geenien leimautumishäiriöt voivat johtaa oireyhtymiin tai altistaa yleisimmille sairauksille (Peters, 2014, Dolinoy ym., 2007)

Leimat ovat geenien hemitsygoottista ilmentymistä sääteleviä elementtejä. Eigeneettiset modifikaatiot säätelevät leimojen aktiivisuutta. Tällöin isältä ja äidiltä perityt genomit ovat asymmetrisiä leimojen epigeneettisen tilan suhteen. Leiman sukupuolisidonnainen epigeneettinen tila perustetaan gametogeneesin aikana, minkä jälkeen se siirtyy jälkeläiseen varhaisen embryogeneesin aikana tapahtuvan epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin huolimatta. Leiman perustumista ja sen epigeneettisen tilan siirtymistä sukupolven yli säädellään usean monimutkaisen molekulaarisen prosessin avulla, joista osa on vieläkin epäselvä (Zeng ja Chen, 2019, Ferguson-Smith ja Burchis, 2018, Barlow ja Bartolomei, 2014).

Leima saa aikaan yksittäisten geenien tai geeniryppäiden alleelikohtaista hiljentymistä tai normaalisti ilmentyvään alleeliin verrattuna poikkeuksellista ilmentymistä. Leiman vaikutus perustuu siihen, että se saa aikaan epigeneettisten tasojen ja kromatiinin järjestäytymisen muutoksia, jotka vaikuttavat vain tarkoituksenmukaiseen alleeliin yhden kromosomin sisällä. Tällä hetkellä tunnetaan ainakin kaksi leimautumisen mekanismia – lncRNA- ja eristys-elementtivälitteinen. Leiman vaikutuksen seurauksena solun transkriptiokoneisto osaa käsitellä saman geenin kahta eri alleelia eri tavalla yhden tuman sisällä (Kim ym., 2015, Lewis ja Reik, 2004)

Geenin alleelikohtaista ilmentymistä säätelevän leiman epävakaaat epigeneettiset modifikaatiot, sekä leimautumista säätelevien epigeneettisten järjestelmäyhdistelmien ja niitä ohjaavien molekulaaristen mekanismien monimutkaisuus tekee leimautuneista geeneistä bialleelisti ilmentyviä geenejä herkempiä ympäristötekijöiden vaikutuksille (Dolinoy ym., 2007). Näin ollen tietyt leimautuneet geenit mukaan lukien *nc886* ovat potentiaalisia epigeneettisen muovautumisen kohteita ja ympäristöinformaation välittäjiä, mikä tekee tästä geenistä mielenkiintoisen tutkimuskohteen (Marttila ym., 2021, Carpenter ym., 2019).



## 6. LÄHDELUETTELO

Aittomäki, K., Moilanen, J., Perola, M., & Aarnisalo, A. A. (2016). *Lääketieteellinen genetiikka*. Kustannus Oy Duodecim.

Barlow, D. P., & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2), a018382–a018382. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382>.

Carpenter, B. L., Zhou, W., Madaj, Z., DeWitt, A. K., Ross, J. P., Gronbaek, K., Liang, G., Clark, S. J., Molloy, P. L., & Jones, P. A. (2018). Mother–child transmission of epigenetic information by tunable polymorphic imprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 115(51), E11970–E11977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815005115>

Kostiniuk D., Tamminen H., Mishra P., Marttila S., & Raitoharju E. (2021). Methylation pattern of nc886 in non-human mammals. bioRxiv 2021.12.03.471165; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471165>

Dolinoy, D. C., Das, R., Weidman, J. R., & Jirtle, R. L. (2007). Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatric Research*, 61(5 Pt 2), 30R–37R. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e31804575f7>

Downen, Fan, Z. P., Hnisz, D., Ren, G., Abraham, B. J., Zhang, L. N., Weintraub, A. S., Schuijers, J., Lee, T. I., Zhao, K., & Young, R. A. (2014). Control of Cell Identity Genes Occurs in Insulated Neighborhoods in Mammalian Chromosomes. *Cell*, 159(2), 374–387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.030>

C. Ferguson-Smith, & M. Azim Surani. (2001). Imprinting and the Epigenetic Asymmetry between Parental Genomes. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 293(5532), 1086–1089. <https://doi.org/10.1126/science.1064020>

Ferguson-Smith, A. C., & Burchis, D. (2018). The discovery and importance of genomic imprinting. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.42368>

Fraser, R., & Lin, C.-J. (2016). Epigenetic reprogramming of the zygote in mice and men: on your marks, get set, go. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(6), R211–R222. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0376>

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*. 2002;12(6).

Kevin L Howe, Premanand Achuthan, James Allen, Jamie Allen, Jorge Alvarez-Jarreta, M Ridwan Amode et al. *Ensembl. Nucleic Acids Res.* 2021, vol. 49(1):884–891PubMed PMID: 33137190. [doi:10.1093/nar/gkaa942](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942)

Kim, Yu, N.-K., & Kaang, B.-K. (2015). CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental & Molecular Medicine*, 47(6), e166–e166.

Landgraf, Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., ... Inman, J. (2007). A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*, 129(7), 1401–1414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>

Lee. (2015). A Novel Type of Non-coding RNA, nc886, Implicated in Tumor Sensing and Suppression. *Genomics & informatics*, 13(2), 26–30.

Lewis, A., & Reik, W. (2006). How imprinting centres work. *Cytogenetic and Genome Research*, 113(1-4), 81–89. <https://doi.org/10.1159/000090818>

Marttila, S., Viiri, L. E., Mishra, P. P., Kühnel, B., Matias-Garcia, P. R., Lyytikäinen, L. P., Ceder, T., Mononen, N., Rathmann, W., Winkelmann, J., Peters, A., Kähönen, M., Hutri-Kähönen, N., Juonala, M., Aalto-Setälä, K., Raitakari, O., Lehtimäki, T., Waldenberger, M., & Raitoharju, E. (2021). Methylation status of nc886 epiallele reflects periconceptual conditions and is associated with glucose metabolism through nc886 RNAs.

Peters, J. (2014). The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Reviews. Genetics*, 15(8), 517–530. <https://doi.org/10.1038/nrg3766>

Renfree, M. B., Hore, T. A., Shaw, G., Graves, J. A. M., & Pask, A. J. (2009). Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 241–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150026>

Renfree, Suzuki, S., & Kaneko-Ishino, T. (2013). The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philosophical Transactions. Biological Sciences*, 368(1609), 20120151–20120151. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0151>

Reverón-Gómez, González-Aguilera, C., Stewart-Morgan, K. R., Petryk, N., Flury, V., Graziano, S., Johansen, J. V., Jakobsen, J. S., Alabert, C., & Groth, A. (2018). Accurate Recycling of Parental Histones Reproduces the Histone Modification Landscape during DNA Replication. *Molecular Cell*, 72(2), 239–249.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.010>

Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C.-S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology Reports*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>

Wilkins, J. F., & Haig, D. (2003). What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature Reviews. Genetics*, 4(5), 359–368. <https://doi.org/10.1038/nrg1062>

Zeng, Y., & Chen, T. (2019). DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes*, 10(4), 257–. <https://doi.org/10.3390/genes10040257>

Ziebarth JD, Bhattacharya A, Cui Y. CTCFBSDB 2.0: A database for CTCF-binding sites and genome organization. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1).

Zink, Magnusdottir, D. N., Magnusson, O. T., Walker, N. J., Morris, T. J., Sigurdsson, A., Hall-dorsson, G. H., Gudjonsson, S. A., Melsted, P., Ingimundardottir, H., Kristmundsdottir, S., Alexandersson, K. F., Helgadottir, A., Gudmundsson, J., Rafnar, T., Jonsdottir, I., Holm, H., Eyjolfsson, G. I., Sigurdardottir, O., ... Stefansson, K. (2018). Insights into imprinting from parent-of-origin phased methylomes and transcriptomes. *Nature Genetics*, 50(11), 1542–1552. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0232-7>