

Эпигенетическая модификация X-сцепленных CNV в норме и патологии

Толмачёва Е.Н.^{1,2}, Кашеварова А.А.¹, Назаренко Л.П.^{1,2}, Скрыбин Н.А.¹, Фонова Е.А.¹,
Беляева Е.О.¹, Салюкова О.А.^{1,2}, Минайчева Л.И.¹, Павлова К.А.², Затула Л.А.², Лебедев И.Н.^{1,2}

¹ — Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск; e-mail: Kate.tolmacheva@medgenetics.ru

² — Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Томск

Актуальность: Процесс инактивации X-хромосомы в женском организме происходит равновероятно, тогда как отклонения в сторону преимущественной инактивации одного из родительских гомологов могут свидетельствовать о наличии в нём мутаций и приводить к развитию наследственной патологии у потомства. **Цель:** Идентификация X-сцепленных локусов, эпигенетические модификации которых могут компенсировать развитие патологического фенотипа. **Материалы и методы:** Обследовано 111 женщин с невынашиванием беременности и 47 женщин, не имеющих спонтанных аборт в анамнезе. С использованием метилчувствительной ПЦР и микроматричного хромосомного анализа проанализированы X-сцепленные вариации в числе копий повторов ДНК (CNV) в лимфоцитах периферической крови женщин с экстремальным смещением инактивации X-хромосомы. **Результаты:** Частота экстремального смещения X-инактивации среди женщин с невынашиванием беременности и в контрольной группе составила 9 и 4% соответственно ($p > 0,05$). У 8 женщин с экстремальным смещением инактивации и невынашиванием беременности идентифицированы X-сцепленные CNV в Xp11.23, Xp22.33, Xq24 и Xq28, а также проанализирован их генный состав. Показано, что большая часть идентифицированных CNV тем или иным образом связана с развитием X-сцепленных форм умственной отсталости. **Выводы:** Эпигенетическая модификация X-сцепленных CNV компенсирует их фенотипическое проявление у женщин-носительниц. В то же время, отсутствие компенсаторных эпигенетических модификаций может явиться фактором риска рождения ребенка с X-сцепленной формой наследственной болезни или нарушения эмбрионального развития, несовместимого с живорождением.

Ключевые слова: асимметричная инактивация X-хромосомы, CNV, невынашивание беременности.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-015-00437.

Epigenetic modification of X-linked CNV in norm and pathology

Tolmacheva E.N.^{1,2}, Kashevarova A.A.¹, Nazarenko L.P.^{1,2}, Skryabin N.A.¹, Fonova E.A.¹,
Belyaeva E.O.¹, Saliukova O.A.^{1,2}, Minaycheva L.I.¹, Pavlova K.A.², Zatula L.A.², Lebedev I.N.^{1,2}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: Kate.tolmacheva@medgenetics.ru

² — Siberian State Medical University, Tomsk

Introduction: The process of the X chromosome inactivation in females is random, while preferential inactivation of one of the parental homologues may indicate the presence of mutations in it and lead to the development of hereditary pathology in the offspring. **Aim:** Identification of X-linked loci the epigenetic modifications of which can compensate for the development of a pathological phenotype. **Materials and methods:** 111 women with miscarriage and 47 women with no history of spontaneous abortions were examined. Using methyl-sensitive PCR and array comparative genomic hybridization, X-linked copy number variations (CNV) were analyzed in blood lymphocytes of women with an extreme skewing of X chromosome inactivation. **Results:** The incidence of extreme skewing of X chromosome inactivation in women with miscarriage and in the control group was 9 and 4%, respectively ($p > 0.05$). In 8 women with an extreme skewing of inactivation and miscarriage X-linked CNVs at Xp11.23, Xp22.33, Xq24 and Xq28 were identified and their gene content was analyzed. It was shown that most of the identified CNVs were in one way or another associated with the development of X-linked forms of mental retardation. **Conclusions:** The epigenetic modification of X-linked CNVs compensates for their phenotypic manifestation in female carriers. At the same time, the absence of compensatory epigenetic/

Key words: skewed X-chromosome inactivation, CNV, miscarriage.

Введение

Инактивация одной из X-хромосом в клетках женского организма необходима для компенсации различий дозы X-сцепленных генов между полами. Этот процесс является эпигенетическим и завершается после имплантации. Инактивация происходит равновероятно, то есть примерно в половине клеток инактивируется одна из X-хромосом, унаследованная от матери или от отца. Отклонения от равновероятной инактивации могут возникать первично из-за нарушений в центре инактивации в регионе Hq13.3 или вторично, уже после установления равновероятной инактивации вследствие мутаций на одной из X-хромосом, которые могут либо увеличивать, либо уменьшать скорость пролиферации и жизнеспособность пула клеток. Мутации в центре инактивации встречаются редко, чаще формируется вторичная асимметричная инактивация хромосомы X (skewed X-chromosome inactivation, sXCI). Одной из причин формирования sXCI, вероятно, могут быть и вариации числа копий участков ДНК (Copy Number Variations, CNV), особенно в тех случаях, когда в них задействованы гены, контролирующие процессы деления клетки и поддержания клеточного гомеостаза. Процесс инактивации может компенсировать проявление патологического фенотипа у матери-носительницы патогенетически значимого CNV за счет полной инактивации мутантной X-хромосомы. В то же время мутация может проявиться у ее потомков мужского пола, унаследовавших X-сцепленную CNV, или женского пола в случае равновероятной инактивации. В недавнем метаанализе было показано, что в случаях экстремальной sXCI (95% и выше), когда наблюдается практически полная инактивация одной из родительской X-хромосом, у женщин примерно в 4 раза возрастает риск повторных выкидышей [1]. Кроме того, асимметричная инактивация наблюдается у женщин-носительниц мутаций в генах некоторых тяжелых и редких X-сцепленных форм умственной отсталости, которые проявляются у их сыновей или братьев [2–4]. Целью настоящего исследования явилась идентификация X-сцепленных CNV, патогенетические эффекты которых могут быть компенсированы у женщин-носительниц за счет экстремального sXCI, но проявляться у ее потомков в виде X-сцепленного наследственного заболевания, либо вести к нарушению эмбрионального развития, несовместимого с живорождением.

Материал и методы

Исследование характера X-инактивации было проведено в 111 образцах ДНК из лимфоцитов периферической крови женщин, имеющих, по крайней мере, одного спонтанного абортуса с нормальным кариотипом, и 47 образцов ДНК, полученных от женщин, не имеющих спонтанных абортусов в анамнезе.

Для оценки характера инактивации X-хромосомы использовали стандартный метод, основанный на ме-

тилчувствительной ПЦР высокополиморфного экзона I гена рецептора андрогена (*AR*) и последующем фрагментном анализе [5]. Степень X-инактивации $\geq 90\%$ принималась как экстремальная асимметричная инактивация.

Молекулярное кариотипирование проводили методом сравнительной геномной гибридизации на микрочипах SurePrint G3 Human CGH array 4x180K, согласно протоколу производителя (Agilent Technologies, США).

Исследование выполнено с применением научного оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты и обсуждение

У 10 из 111 (9%) женщин с невынашиванием беременности и у 2 из 47 (4%) женщин контрольной группы уровень X-инактивации был $\geq 90\%$. Обе группы статистически значимо не отличались по частоте женщин с sXCI ($p = 0,33$). Эти цифры соответствуют данным, полученным в других исследованиях, где частота женщин с sXCI колебалась от 2 до 17% в выборках с невынашиванием беременности и от 1 до 9% в контрольной группе [1].

Далее мы провели поиск CNV у 8 женщин с невынашиванием беременности и sXCI $\geq 90\%$, при этом у 6 из 8 женщин (пациентки А–Д, таблица) уровень смещения был $\geq 95\%$, что указывает на практически полную инактивацию одной из родительских X-хромосом.

В кариотипе обследованных женщин были обнаружены X-сцепленные микроделеции и микродупликации (таблица). У пациенток Б и Г были выявлены две перекрывающиеся микродупликации в субсегменте Xp22.33. Общая перекрывающаяся область микродупликации захватывала 5 генов: *PLCXDI*, *GTPBP6*, *PPP2R3B*, *LINC00685*, *SHOX*. Ген *PLCXDI* кодирует рецептор фосфодиэстеразы, который контролирует многие клеточные процессы путем регулирования уровня цитозольного кальция и/или активности протеинкиназ. Это один из кандидатных опухолево-супрессорных генов, трансфекция которого в клеточные линии злокачественной меланомы значительно снижает их пролиферативные способности [6]. Ген *GTPBP6* кодирует ГТФ-связывающий белок. Продукт гена *PPP2R3B* (PR48) — протеинфосфатаза 2, участвующая в негативной регуляции контроля клеточного роста и деления [7]. Ген *SHOX* входит в семейство гомеобоксов, а нарушение его экспрессии связывают с идиопатической задержкой роста [8]. Поскольку регион микродупликации Xp22.33 является псевдоаутосомным и избегает инактивации, то трудно объяснить каким образом обнаруженные CNV могут быть связаны с возникновением асимметричной X-инактивации. Возможно, что изменение дозы генов, входящих в CNV, каким-то образом может приводить

к компартиментализации клеток в ранней бластоцисте и смещению инактивации X-хромосомы после имплантации.

Помимо микродупликации Xp22.33 у пациентки Г была выявлена микродупликация Xq28 размером 783 т.п.н., захватывающая 16 генов, в том числе и ген *RAB39B*, а также кластер генов *F8* (таблица). El-Hattab с соавт. в 2011 году опубликовали работу по результатам микроматричного исследования четырех семей с X-сцепленными формами умственной отсталости и поведенческими проблемами. У четырех пациентов мужского пола из трех семей, в том числе 2 братьев, была выявлена дупликация размером около 0,5 млн п.н. в регионе Xq28. Дупликации захватывала район chrX: 153,7—154,2 млн п.н. (NCBI36/hg19). Все 3 матери, которые имели более слабую степень умственной отсталости и трудности в обучении, также имели микродупликацию в этом регионе. У всех женщин была выявлена асимметричная инактивация X-хромосомы, причем у двух женщин преимущественной инактивации под-

вергалась нормальная X-хромосома, а у одной — мутантная хромосома. Область делеции включала 9 генов, в том числе и *RAB39B* (OMIM#300774), затронутый CNV у обследованной нами пациентки Г. Кроме того, точки разрыва находились в непосредственной близости к генам *F8* (OMIM#300841). У всех 4 мальчиков с делецией Xq28 были когнитивные нарушения, агрессивное и/или гиперактивное поведение, рецидивирующие инфекции уха или пневмония, а также мягкие дизморфии лица, включая высокий лоб, широкое основание носа и толстую нижнюю губу. В четвертой семье была выявлена реципрокная микроделеция Xq28 у матери и ее дочери. У девочки отмечалась гиперактивность, невнимательность и трудности сенсорной интеграции. У обеих женщин была 100% асимметричная X-инактивация, а в анамнезе матери было еще 2 спонтанных аборта, на основании чего авторы предположили, что делеция приводит к гибели эмбрионов мужского пола [9].

Один из генов, попадающий в область dupXq28 у пациентки Г — *VBP1* (OMIM#300133). Продукт этого гена

Таблица

Спектр CNV в группе женщин с экстремальным смещением X-инактивации и репродуктивными потерями

№	Возраст	Анамнез	sXCI (%)	CNVs	Координаты (hg18)	Размер	Гены
Пациентка А	26	2 НБ	96	delXp11.23	chrX:47881447-47932977	52 т.п.н.	<i>ZNF630</i>
Пациентка Б	30	1 НБ	95	dupXp22.33	chrX:60701-1778860	1,7 млн п.н.	<i>PLCXD1, GTPBP6, LINC00685, PP2R3B, SHOX, CRLF2, CSF2RA, MIR3690, MIR3690-2, IL3RA, SLC25A6, ASMTL-AS1, ASMTL, P2RY8, AKAP17A, ASMT</i>
Пациентка В	26	6 НБ, 1 ЖР, 1 МА	100	delXq24	chrX:118555586-118794279	239 т.п.н.	<i>SLC25A43, SLC25A5-AS1, SLC25A5, CXorf56, UBE2A, NKRF, SEPT6, MIR766</i>
Пациентка Г	22	1 НБ	95	dupXp22.33	chrX:192689-908212	715 т.п.н.	<i>PLCXD1, GTPBP6, LINC00685, PPP2R3B, SHOX</i>
				dupXq28	chrX:154450164-155232907	782,7 т.п.н.	<i>VBP1, RAB39B, CLIC2, TMLHE-AS1, H2AFB2, H2AFB3, H2AFB1, F8A1, F8A3, F8A2, MIR1184-3, MIR1184-2, MIR1184-1, SPRY, VAMP7, IL9R</i>
Пациентка Д	25	1 НБ	97	dupXq28	chrX:153666039-153666485	447 т.п.н.	<i>GDI1</i>
Пациентка Е	34	3 НБ, 1 ЖР	90	dupXq28	chrX:153135707-153171472	35,77 т.п.н.	<i>L1CAM, AVPR2</i>
Пациентка Ж	35	2 НБ	94	delXq24	chrX:117509030-117545557	36,53 т.п.н.	<i>WDR44, MIR1277</i>
Пациентка З	30	2 НБ	90	dupXq28	chrX:153666039-153666485	447 т.п.н.	<i>GDI1</i>

Примечание. НБ — неразвивающаяся беременность, ЖР — живорожденный ребенок, МА — медицинский аборт

взаимодействует с белком Гиппеля-Линдау с образованием внутриклеточного комплекса. Белок *VBPI* имеет функцию шаперона и может играть определенную роль в транспортировке белка Гиппеля-Линдау из перинуклеарных гранул в ядро или цитоплазму. Белок Гиппеля-Линдау — супрессор опухолевого роста: при его недостатке наблюдается безудержный опухолевый рост в разных локализациях [8]. Соответственно, избыток продукта гена *VBPI* может тормозить пролиферацию клеток, способствуя формированию вторичной асимметричной инактивации X-хромосомы.

Микродупликации региона Xq28 разных размеров и разного генного состава также были выявлены у пациенток Д, Е и З. Причем у двух женщин были выявлены микродупликации, захватывающие ген *GDI1*, связанный с X-сцепленной формой когнитивного расстройства (ОМIM #300815). Белок относится к ингибиторам диссоциации ГДФ, которые регулируют обмен ГДФ-ГТФ членов семейства *gab*, небольших мономерных ГТФ-связывающих белков (mG-белков). Эти белки вовлечены в везикулярный обмен молекулами между клеточными органеллами. Продукт гена *GDI* замедляет скорость диссоциации ГДФ от *gab*-белков и высвобождает ГДФ из связанных с мембраной белков. Ген *GDI1* в основном экспрессируется в нервных и сенсорных клетках [8].

Кроме того, нами были выявлены микроделеции в регионе Xq24 у двух пациенток. Микроделеция у пациентки Г захватывала два гена *WDR44* и *MIR1277*. Продукт гена *WDR44* взаимодействует с *gab*-белком [8], а ген *MIR1277* кодирует одну из микроРНК, которая характеризуется высоким уровнем экспрессии в эмбриональных стволовых клетках и, как предполагают, связана с дифференцировкой, контролем клеточного цикла и запрограммированной гибелью клеток [10].

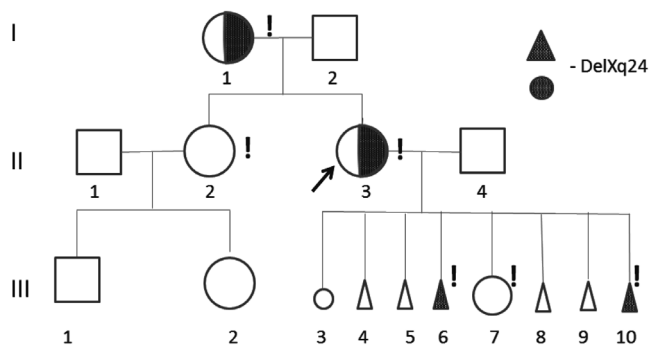
У соматически здоровой пациентки В была обнаружена микроделеция Xq24 размером 239 т.п.н., затрагивающая восемь генов: *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5*, *CXorf56*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPT6* и *MIR766*. В репродуктивном анамнезе 29-летней женщины было 8 самостоятельных наступивших беременностей в одном бра-

ке (рисунок), из которых первая закончилась медицинским прерыванием беременности по её желанию, четыре беременности оказались неразвивающимися, а две закончились самопроизвольными выкидышами на ранних сроках (5–7 недель). Одна беременность завершилась рождением здоровой дочери. Роды были оперативные и прошли в срок. При проведении клинико-генеалогического анализа со стороны пациентки отмечены случаи сердечно-сосудистых заболеваний и тромботических эпизодов.

Мы провели молекулярно-генетический анализ в регионе Xq24 методом ПЦР в режиме реального времени у двух спонтанных абортусов мужского пола (III-6 и III-10, кариотип 46,XY), дочери и матери пациентки (рисунок). У обоих спонтанных абортусов и матери пациентки (I-1) была обнаружена микроделеция Xq24, тогда как у здоровой дочери (III-7) такой микроделеции не наблюдалось. У дочери отмечена равновероятная X-инактивация, тогда как у ее матери уровень sXCI составил 96%. Кроме того мы обследовали сестру пациентки и не выявили у нее делеции Xq24. XCI у нее также была равновероятной (60% / 40%) У сестры имеются два здоровых ребенка: мальчик и девочка. Таким образом, носительство микроделеции Xq24 в данной семье сопровождалось экстремальным смещением X-инактивации как минимум в двух поколениях.

Делеция в этом регионе X-хромосомы связана с двумя тяжелыми и редкими X-сцепленными синдромами [2–4]. Первый синдром связан с интеллектуальной недостаточностью типа Nascimento, или синдромом дефицита гена *UBE2A* (ОМIM #312180). Это заболевание характеризуется интеллектуальной недостаточностью от умеренной до тяжелой степени, задержкой двигательной активности, нарушением/отсутствием речи, множественными дизморфиями и обусловлено либо мутациями в гене *UBE2A*, либо делециями, захватывающими регион его локализации. Ген *UBE2A* кодирует белок — член семейства E2 убиквитин-конъюгирующих ферментов. Этот фермент необходим для пострепликативного восстановления повреждений ДНК и может играть роль в регуляции транскрипции. В семьях, несущих мутации, затрагивающие ген *UBE2A*, все описанные в литературе мужчины с мутантной X-хромосомой были больны, а женщины-носительницы были здоровы, но имели экстремальную sXCI [2, 3].

Второе недавно описанное заболевание также связано с задержкой интеллектуального развития (ОМIM #301013), а кандидатным для него является ген *CXorf56*, который был локализован в этом же регионе Xq24. Ген экспрессируется в головном мозге. Инсерция в этом гене, приводящая к появлению преждевременного стоп-кодона и бессмысленной мРНК, приводит к развитию семейной формы умственной отсталости. Verkerk с соавт. сообщили в 2018 году о большой голландской семье из 3 поколений, в которой 5 мужчин и 1 женщина имели слабую или умеренную интеллектуальную недо-



Родословная пациентки В.

I-1 — sXCI (95%); II-2 — равновероятная XCI; II-3 — sXCI (100%); III-7 — равновероятная XCI.

статочность. У двух мужчин были серьезные поведенческие проблемы, такие, как повсеместное расстройство развития, расстройство внимания, гиперактивность и трангрессивное поведение. Пациенты имели различные дизморфии лица. При этом так же, как и в случае синдрома дефицита *UBE2A*, болеют все носители мутации мужского пола, а женщины-носительницы имеют асимметричную XCI [4].

Перекрывающаяся микроделеция в регионе Xq24 была обнаружена нами в независимом исследовании у мальчика с задержкой умственного и моторного развития. Эта микроделеция с координатами chrX:118557756-118725305 (hg18) имела размер 168 т.п.н. и в нее вошли пять генов: *CXorf56*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPT6* и *MIR766*. Мать пробанда имела микроделецию в этом же регионе X-хромосомы и экстремальную sXCI, равную 98%. Мальчик от второй беременности. Первая беременность у женщины была прервана по медицинским показаниям (МВПР: гастрошизис, деформация лучезапястных суставов) на сроке 13 недель. Эмбрион не был обследован. У больного ребенка при текущем обследовании в возрасте 2 лет 5 мес. отсутствуют возрастная моторика, речь, отмечается задержка психического развития, диффузная мышечная гипотония, гиперсаливация. Обращают на себя внимание следующие фенотипические особенности: макроцефалия, брахицефальная форма черепа, открытый / незарощенный большой родничок, редкие светлые мягкие волосы, высокий лоб с выступающими буграми, гипертелоризм, монголоидный разрез глаз, глубоко посаженные глаза, голубоватые склеры, широкая запавшая переносица, широкий короткий нос с гипоплазией крыльев, открытые кпереди ноздри, длинный фильтр с выраженными колоннами, макростомия, открытый рот, высокое небо, тонкая верхняя губа, микроретрогнатия, полные щеки, макротия, диспластические мягкие уши с угловым антихеликсом и недоразвитой спиралью и козелком слева, продольные насечки на обеих мочках, короткая широкая шея, поперечная ладонная складка на обеих ладонях, длинные пальцы кистей и стоп, на левой ноге — полидактилия (добавочный 5-й палец), брахидактилия 2-го пальца, контрактура правого коленного сустава, плоско-вальгусные стопы, левосторонний крипторхизм, уменьшенный пенис. Большая часть симптомов соответствует, описанной в литературе клинической картине синдрома Nascimento, но у этого больного не наблюдается камптодактилии, нарушения осанки (кифоз, сколиоз, лордоз), гипоспадии и косоглазия. Но так как синдром очень редкий и в настоящее время в мировой литературе описано менее 20 больных с различными вариантами мутаций в регионе Xq24, то эти отличия вполне объяснимы. У нашего пациента присутствовали клинические черты, свойственные как синдрому дефицита *UBE2A*, так и му-

тации в гене *CXorf56*, что вполне объяснимо, учитывая то, что мальчик имел нуллисомию и того, и другого генов.

В заключение интересно отметить, что большая часть выявленных нами X-сцепленных CNV у женщин с экстремальным sXCI и невынашиванием беременности оказалась связана с редкими формами синдромальной умственной отсталости у живорожденных. Кроме того, экстремальная sXCI у таких женщин свидетельствует о пониженной жизнеспособности пула клеток, имеющих активную мутантную X-хромосому. То есть CNV потенциально могут приводить к гибели эмбриона, а эпигенетические механизмы компенсируют последствия изменения дозы генов у женщины-носительницы. В то же время, пока остается открытым вопрос о том, какие механизмы приводят к рождению ребенка с X-сцепленной формой умственной отсталости в одном случае и к эмбриолетальности в другом.

Список литературы

1. Sui Y., Chen Q., Sun X. Association of skewed X chromosome inactivation and idiopathic recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015 Aug;31(2):140-148.
2. Thunstrom A., Sodermark L., Ivarsson L., Samuelsson L., Stefanova M. *UBE2A* deficiency syndrome: a report of two unrelated cases with large Xq24 deletions encompassing *UBE2A* gene. *Am J Med Genet A*. 2015 Jan;167A(1):204-210.
3. Tsurusaki Y., Ohashi I., Enomoto Y. et al. A novel *UBE2A* mutation causes X-linked intellectual disability type Nascimento. *Hum Genome Var*. 2015 Jrn;4:17019.
4. Verkerk A.J.M.H., Zeidler S., Breedveld G. et al. *CXorf56*, a dendritic neuronal protein, identified as a new candidate gene for X-linked intellectual disability. *Eur J Hum Genet*. 2018 Apr;26(4):552-560.
5. Толмачёва Е.Н., Васильев С.А., Саженова Е.А. и др. Асимметричная инактивация X-хромосомы у внутриутробно погибших эмбрионов человека. *Цитология*. 2015, 57(11): 808-812.
6. Mithani S.K., Smith I.M., Califano J.A. Use of integrative epigenetic and cytogenetic analyses to identify novel tumor-suppressor genes in malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2011 Aug;21(4):298-307.
7. Yan Z., Fedorov S.A., Mumby M.C., Williams R.S. PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol Cell Biol*. 2000 Feb;20(3):1021-1029.
8. База данных GENE: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> 1.08.2018
9. El-Hattab A.W., Fang P., Jin W. et al. Int22h-1/int22h-2-mediated Xq28 rearrangements: intellectual disability associated with duplications and in utero male lethality with deletions. *J Med Genet*. 2011 Dec;48(12):840-850.
10. Morin R.D., O'Connor M.D., Griffith M. et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*. 2008 Apr;18(4):610-621.