

МУЛЬТИЛОКУСНЫЕ ЭПИМУТАЦИИ ИМПРИНТОМА ПРИ ПАТОЛОГИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Е. А. Саженова*, Н. А. Скрябин, Н. Н. Суханова, И. Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

Поступила в редакцию 24.05.2011 г.

Принята к печати 10.06.2011 г.

Геномный импринтинг — один из ключевых эпигенетических феноменов, вовлеченных в обеспечение эмбрионального развития плацентарных млекопитающих и человека. Молекулярные механизмы нарушения импринтинга при патологии пре- и постнатального онтогенеза в значительной степени связаны с аномалиями дифференциального метилирования импринтированных генов. В последнее время накапливаются данные о множественных нарушениях характера метилирования одновременно в нескольких импринтированных локусах при различных патологических состояниях, что поднимает проблему расшифровки структурно-функциональной организации импринтома и взаимодействия генов, подверженных импринтингу. В представленной работе проведен анализ характера метилирования ДНК 51 импринтированного гена в плацентарных тканях эмбрионов человека с остановкой внутриутробного развития. У каждого эмбриона выявлены множественные эпимутации, затрагивающие от четырех до 12 импринтированных генов. Большинство эпимутаций (78%) имели постзиготическое происхождение. Впервые установлено, что суммарная частота аномалий метилирования материнских и отцовских аллелей импринтированных генов, ведущих к подавлению развития зародыша, статистически значимо превышает частоту эпимутаций, потенциально стимулирующих процессы эмбриогенеза. Этот факт поддерживает на эпигенетическом уровне гипотезу “конфликта полов”, объясняющую появление импринтированной моноаллельной экспрессии генов в эволюции млекопитающих.

Ключевые слова: геномный импринтинг, импринтом, эпимутации, онтогенез.

MULTILOCUS EPIMUTATIONS OF IMPRINTOME IN THE PATHOLOGY OF EMBRYO DEVELOPMENT, by E. A. Sazhenova*, N. A. Skryabin, N. N. Sukhanova, I. N. Lebedev (Research Institute of Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia; *e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru). Genomic imprinting is one of the most significant epigenetic phenomena, which is involved in the support of eutherians and human embryo development. Molecular mechanisms of imprinting disturbance in the pathology of pre- and postnatal ontogeny are related to a considerable degree to aberrant DNA methylation of imprinted genes. At present time data about multiple abnormalities of DNA methylation arising simultaneously in several imprinted loci are accumulated. This fact brings up the problem of interpretation of imprintome structural and functional organization, as well as interaction of imprinted genes. At present study DNA methylation analysis of 51 imprinted genes in placental tissues of human spontaneous abortions was performed. The presence of several epimutations affected from four to 12 imprinted genes was observed in each embryo. Majority of epimutations (78%) had a postzygotic origin. It was shown for the first time that the total incidence of abnormal DNA methylation of maternal and paternal alleles of imprinted genes, which lead to suppression of embryo development, is significantly higher than the incidence of epimutations, which can lead to stimulation of ontogenesis processes. This fact supports at the epigenetic level the “sex conflict” hypothesis, which explains the appearance of monoallelic imprinted genes expression in the evolution of mammals.

Keywords: genomic imprinting, imprintome, epimutations, ontogeny.

Геномный импринтинг — процесс, дифференциально маркирующий материнские и отцовские копии генов в геноме организма и обеспечиваю-

щий их моноаллельную экспрессию в зависимости от родительского происхождения. Молекулярные механизмы данного явления связаны преимуще-

Принятые сокращения: ЦХ — цитотрофобласт хориона; ВМ — внезародышевая мезодерма; ОРД — однородительская дисомия; ТНСД — транзиторный неонатальный сахарный диабет; БППЗ — биродительский полный пузырный занос.

* Эл. почта: elena.sazhenova@medgenetics.ru

ственно с дифференциальным метилированием промоторных участков импринтированных генов и регуляторных последовательностей (центров импринтинга), которое устанавливается строго специфичным образом в гаметогенезе и поддерживается в соматических клетках на протяжении всей жизни организма. В геноме человека к настоящему времени идентифицировано около 70 импринтированных локусов, большинство из которых вовлечено в обеспечение внутриутробного развития через контроль клеточной пролиферации и дифференцировки плацентарных тканей, регуляцию метаболизма некоторых гормонов и факторов роста [1–3].

Ранние этапы онтогенеза человека характеризуются мощным действием естественного отбора. В среднем около 15–20% клинически распознаваемых беременностей заканчиваются спонтанными абортми в первом триместре. При этом примерно половина ранних репродуктивных потерь может быть обусловлена грубыми аномалиями кариотипа, выявляемыми в клетках внутриутробно погибших эмбрионов [4]. Остановка же развития зародышей с нормальным кариотипом фактически остается необъясненной в рамках существующих генетических концепций. Не исключено, что определенная селективная значимость могут обладать aberrантные эпигенетические модификации хроматина или эпимутации, не изменяющие нуклеотидную последовательность самого гена. По предварительным оценкам частота эпимутаций может на один–два порядка превышать среднюю частоту генных мутаций [5]. Первая серия работ, направленных на поиск механизмов нарушений дозы импринтированных генов при патологии эмбриогенеза, была связана с анализом феномена однородительских дисомий (ОРД) хромосом [6–9]. Однако эти исследования не увенчались заметным успехом, показав, что частота внутриутробно погибших эмбрионов с ОРД по хромосомам, содержащим импринтированные гены, не превышает 1%. Это обстоятельство позволило сформулировать, а впоследствии и доказать правильность гипотезы о том, что ожидаемый негативный эффект нарушений дозы импринтированных генов в эмбриогенезе человека может быть реализован не через достаточно редкий, с цитогенетической точки зрения, феномен ОРД, а через аномалии метилирования импринтированных последовательностей [10, 11].

В настоящее время получены первые данные об эпимутациях в центрах импринтинга и импринтированных генах у спонтанных абортусов [11–13], у плодов с внутриутробной задержкой развития [14], в случаях мертворождения после и без применения методов искусственного оплодотворения [15]. Анализ этих данных показывает, что, во-первых, эпимутации действительно могут быть одним из механизмов нарушений геномного

импринтинга, приводящих к патологии эмбрионального развития. Во-вторых, они возникают с относительно высокой частотой, обнаруживаясь у 4–18% спонтанных абортусов [11–13]. И, наконец, у некоторых эмбрионов выявляются аномалии эпигенетического статуса одновременно в нескольких импринтированных генах. Факт множественности эпимутаций хорошо известен и в случае биродительского полного пузырного заноса (БППЗ) — патологии, при которой классические признаки полного пузырного заноса андрогенетического происхождения регистрируются при нормальном биродительском диплоидном кариотипе [16]. Показано, что при БППЗ отмечается гипометилирование ряда импринтированных генов на хромосомах материнского происхождения. Как полагают, подобные эпимутации возникают вследствие нарушений метилирования импринтированных локусов в оогенезе, приводящих к наследованию потомства материнских хромосом с отцовским эпигенотипом.

Мультилокусность эпимутаций импринтированных генов, по всей видимости, не ограничена исключительно пренатальным периодом онтогенеза. В настоящее время множественные эпимутации описаны и при болезнях геномного импринтинга — синдромах Видеманна–Беквита [17], Рассела–Сильвера [18, 19], транзиторном неонатальном сахарном диабете (ТНСД) [20]. В случае ТНСД даже предложено выделить самостоятельный синдром “множественного материнского гипометилирования” [21]. Феномен мультилокусности эпимутаций поднимает проблему взаимодействия импринтированных генов и их участия в формировании клинических признаков заболеваний, а также позволяет обосновать положение о существовании “импринтома” — совокупности функционально связанных импринтированных генов в геноме человека, которые обладают специфическими эпигенетическими и онтогенетическими характеристиками и находятся под регуляторным контролем со стороны остального генома [22].

Следует отметить, что в большинстве работ регистрация множественности эпимутаций стала результатом анализа статуса метилирования нескольких кандидатных локусов, потенциально вовлеченных в патогенез того или иного заболевания. На принципиально новый уровень изучение структурно-функциональной организации импринтома выходит при использовании биочиповых технологий, обеспечивающих, прежде всего, непредвзятый подход к выбору импринтированных генов. Цель настоящей работы состояла в определении характера дифференциального метилирования ряда импринтированных генов при ранней внутриутробной гибели эмбрионов человека с применением метилочипа GoldenGate Methylation Cancer Panel I (“Illumina”, США). Эта

панель содержит 1505 CpG-динуклеотидов из 807 генов, включая 113 CpG-сайтов, локализованных в 51 импринтированном гене. Особенность чипа состоит в том, что большинство представленных в нем CpG-сайтов внутри импринтированных генов относятся к функционально значимым и их метилирование коррелирует с супрессией транскрипционной активности. Возможность использования данной платформы для оценки статуса метилирования импринтированных генов показана недавно при обследовании больного ТНСД, у которого гипометилирован импринтированный ген *PLAGL1*. Наличие эпимутации, выявленной предварительно с использованием метил-специфичной ПЦР, подтверждено и с помощью чипа [23].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обследовано 13 спонтанных абортусов I триместра беременности, полученных от женщин с клиническим диагнозом неразвивающаяся беременность. Продолжительность внутриутробного развития эмбрионов по данным ультразвукового обследования составила 8.3 ± 1.8 недель. Средний возраст матерей — 26.1 ± 5.4 лет. Все включенные в исследование эмбрионы имели нормальный кариотип, установленный с помощью стандартного метафазного анализа культур клеток внезародышевых тканей. У семи эмбрионов провести кариотипирование оказалось невозможным вследствие низкой пролиферативной активности клеток в культуре. Информация о хромосомном наборе таких зародышей получена с использованием методов сравнительной геномной гибридизации [24] и флуоресцентной *in situ* гибридизации [25] на интерфазных ядрах для исключения анеуплоидии и полиплоидии, соответственно, как наиболее частых геномных мутаций, приводящих к остановке внутриутробного развития.

С использованием метил-чувствительной и метил-специфичной ПЦР у двух эмбрионов, включенных в работу, ранее обнаружили гипометилирование центра импринтинга *KCNQ1OT1*, а у трех зародышей — гипометилирование *PLAGL1* на хромосомах материнского происхождения соответственно [11, 12].

В качестве контрольной группы использовали плацентарные ткани четырех медицинских абортусов I триместра беременности (7.8 ± 0.7 недель развития), полученные от здоровых женщин (средний возраст — 26.9 ± 1.9 лет), не желавших сохранить нормально протекавшую беременность. Продолжительность внутриутробного развития спонтанных и медицинских абортусов, а также возраст матерей в опытной и контрольной группах были практически одинаковыми. От всех супружеских пар получено информированное согласие. Проведение работы одобрено Комитетом

по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН (протокол № 2 от 22 апреля 2010 г.).

Уровень метилирования CpG-динуклеотидов определяли в образцах геномной ДНК, выделенной из некультивированных клеток цитотрофобласта хориона (ЦХ) и внезародышевой мезодермы (ВМ) после стандартной обработки протеиназой К при 37°C и экстракции смесью фенол-хлороформ.

Анализ статуса метилирования выполнен с помощью метилочипа GoldenGate Methylation Cancer Panel I (“Illumina”) после бисульфитной модификации ДНК, согласно протоколу производителя. Полученные данные анализировали с использованием программного пакета Genome Studio Methylation Module (“Illumina”), который переводит интенсивность флуоресценции в количественную величину β , характеризующую долю метилированных CpG-динуклеотидов в общем числе гомологичных CpG-сайтов. Эта величина соответствует соотношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей и суммы флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей. Величина β непрерывная, она может принимать любое значение от 0 до 1, где 0 — состояние, когда все CpG-сайты в данном положении неметилированы, а 1 указывает на полное метилирование всех гомологичных CpG-динуклеотидов. Для каждого CpG-динуклеотида рассчитывали $\Delta\beta$ — разность в уровнях метилирования между CpG-локусом опытного и контрольного образцов. Значение $\Delta\beta$, равное 0.17, считается порогом чувствительности метода, позволяющим выявлять различия в уровне метилирования анализируемого сайта в сравниваемых группах при $p = 0.01$ [26].

Импринтированные гены характеризуются экспрессией только одного из гомологов, поэтому для их CpG-сайтов выбрано значение $\beta = 0.5$. Исходя из этого, анализировали только те CpG-динуклеотиды, уровень метилирования которых в контрольной группе находился в диапазоне 0.50 ± 0.17 . При регистрации эпимутаций у спонтанных абортусов исходили из того, что значение уровня метилирования в CpG-сайтах $\beta \leq 0.17$ соответствует гипометилированному состоянию локуса, а $\beta \geq 0.84$ — гиперметилированному. Напротив, неимпринтированные гены в норме характеризуются экспрессией обоих родительских аллелей, поэтому значение β для них выбрано равным $\beta \leq 0.17$. В контрольной выборке неимпринтированный ген считали метилированным при $\beta \geq 0.84$. Соответственно, в группе спонтанных абортусов гиперметилирование неимпринтированных генов регистрировалось при $\beta > 0.34$, а гипометилирование — при $\beta < 0.66$. Статистиче-

ский анализ проводили с использованием критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ статуса метилирования импринтированных генов в группе спонтанных абортусов выявил множественные эпимутации в каждом из обследованных эмбрионов. Число генов, затронутых эпимутациями, варьировало от четырех (эмбрион № 9) до 12 (эмбрион № 3) (табл. 1). У всех спонтанных абортусов наблюдалось мультилокусное как гипо-, так и гиперметилирование, за исключением трех зародышей (№ 1, 5 и 9), у которых эпимутации были представлены только гипометилированием (табл. 1).

Эпимутации затрагивали 18 CpG-динуклеотидов, относящихся к 16 импринтированным генам. В 12 CpG-сайтах отмечено гипо-, а в шести — гиперметилирование. Гипометилирование обнаружено в CpG-динуклеотидах таких импринтированных генов, как *GRB10*, *CPA4*, *PHLDA2*, *ZNF215* — экспрессирующихся в норме только с материнского гомолога, и *PLAGL1*, *PEG10*, *WT1*, *HTR2A*, *DLK1*, *GABRB3*, *KCNQ1* — функционирующих на отцовской хромосоме. Гиперметилирование выявлено в CpG-сайтах генов *INS*, *TRPM5*, *PWCR1*, *GABRA5* с отцовской экспрессией и только в одном CpG-динуклеотиде гена *H19*, экспрессирующегося с материнского гомолога (табл. 1). Частота эпимутаций в этих генах заметно варьировала. Так, гипометилирование двух CpG-динуклеотидов, локализованных в промоторе и экзоне гена *WT1*, обнаружено у 11 из 13 обследованных эмбрионов. В то же время, гипометилирование *PLAGL1* отмечено только у трех спонтанных абортусов. Примечательно, что это были именно те эмбрионы, эпимутации в данном локусе которых предварительно выявили с помощью метил-специфичной ПЦР (№ 1, 9, 13).

Большинство обнаруженных эпимутаций представлено гипометилированием неактивного импринтированного аллеля. В целом, во всех 113 CpG-динуклеотидах, проанализированных в обеих внезародышевых тканях спонтанных абортусов, aberrантное гипометилирование регистрировалось более чем в 2 раза чаще, чем гиперметилирование (3.8 и 1.7%, соответственно, $p < 0.001$). Частота гипометилирования аллелей материнского происхождения составила 2.4%, тогда как отцовских — 1.4% ($p < 0.001$). С другой стороны, aberrантное гиперметилирование активных аллелей импринтированных генов чаще регистрировалось на отцовских, чем на материнских хромосомах — 1.5 и 0.2% соответственно ($p < 0.001$).

Анализ распределения эпимутаций во внезародышевых тканях показал, что большая часть аномалий метилирования (104 из 133, или 78%)

была тканеспецифичной, т.е. обнаруживалась в пределах только одной из двух изученных тканей. Учитывая, что ЦХ и ВМ происходят из разных зародышевых листков (трофэктодермы и эпибласта), обособляющихся после имплантации blastоцисты и завершения периода глобального эпигенетического репрограммирования генома, можно сделать вывод о том, что большинство зарегистрированных эпимутаций возникают вследствие ошибок поддержания геномного импринтинга в соматических клетках развивающихся зародышей [10]. Здесь же следует подчеркнуть, что присутствие эпимутации в обеих тканях не позволяет однозначно говорить о ее гаметическом или соматическом происхождении, связанном с ошибками записи и поддержания геномного импринтинга.

Частота гипометилирования импринтированных аллелей в ВМ составила 5.0%, а в ЦХ — 2.6%. Точно также, частота гиперметилирования в ВМ (2.7%) заметно превышала этот показатель в ЦХ (0.7%). Таким образом, частота аномалий метилирования в ВМ оказалась существенно выше, чем в ЦХ — 7.7 и 3.3% соответственно ($p < 0.001$). Поскольку ВМ происходят из эпибласта, из которого впоследствии формируются и все зародышевые ткани, полученные данные свидетельствуют о том, что нарушения эмбрионального развития у человека в большей степени ассоциированы с эпимутациями импринтированных генов в зародышевом листке, дающем начало развитию собственно эмбриональных тканей, а не внезародышевых органов.

При анализе статуса метилирования в контрольной группе медицинских абортусов отмечено, что CpG-динуклеотиды в пределах 11 импринтированных генов (*TP73*, *ATP10A*, *SLC22A3*, *ASCL2*, *SGCE*, *SNURF*, *SNRPN*, *ZNF264*, *COPG2*, *NDN* и *MKRN3*) оказались гипометилированными ($\beta < 0.17$), тогда как в восьми генах (*USP29*, *SLC22A2*, *GNAS*, *GABRG3*, *SLC22A18*, *DIRAS3*, *HBII-52* и *ZIM2*), напротив, зарегистрировано гиперметилирование ($\beta > 0.83$). Возможно, на изученном этапе эмбриогенеза эти гены в плацентарных тканях имеют другой уровень метилирования, отличный от теоретически ожидаемого (0.50 ± 0.17). Существуют факты, подтверждающие это утверждение, так показано гипометилирование гена *TP73* в нормально развивающейся плаценте [27]. Тканеспецифический импринтинг (например, гена *UBE3A*, импринтированного только в гиппокампе и клетках Пуркиньи головного мозга) также может указывать на правильность этого утверждения [28]. Кроме того, считается, что геномный импринтинг в плацентарных тканях человека — это динамическое явление, которое формируется, возможно, в отличие от традиционных представлений, даже после первого триместра беременности [29]. Предполагается

Таблица 1. Уровень метилирования импринтированных генов у спонтанных абортусов

Ген (регион)	СpG-сайт	Аллель	Ткань	Контроль β	Эмбрионы												
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>PLAGL1</i> (6q24)	E68R	отц	цх	0.73										0.08			
			вм	0.67	0.17												
<i>GRB10</i> (7q21)	P496R	мат	цх	0.35			0.16										
			вм	0.36			0.12				0.06	0.14			0.16		0.16
<i>PEG10</i> (7q21)	P978R	отц	цх	0.52	0.17						0.17			0.12			
			вм	0.42	0.13		0.13	0.07		0.17		0.14		0.17	0.12	0.14	0.12
<i>CPA4</i> (7q32)	E20F	мат	цх	0.35	0.07	0.15		0.10	0.15		0.14	0.10	0.09		0.15		
			вм	0.34			0.12	0.13		0.09	0.15					0.13	
<i>H19</i> (11p15)	P1411R	мат	цх	0.57			0.87										
			вм	0.59		0.86	0.87		0.86		0.84			0.88		0.86	
<i>INS</i> (11p15)	P804R	отц	цх	0.38			0.92					0.88					
			вм	0.36		0.94	0.95			0.85	0.96		0.84	0.95		0.95	
<i>KCNQ1</i> (11p15)	P546R	отц	цх	0.34				0.07			0.06	0.15	0.09		0.15		
			вм	0.37			0.12	0.11		0.13							
<i>TRPM5</i> (11p15)	P721F	отц	цх	0.66			0.85										
			вм	0.41		0.85	0.91				0.87		0.85		0.87		
<i>WT1</i> (11p15)	P853F	отц	цх	0.40									0.16		0.06		
			вм	0.37			0.06	0.09		0.04	0.01	0.09			0.14	0.15	0.11
<i>PHLDA2</i> (11p15)	E32F	отц	цх	0.40	0.14							0.11		0.10			
			вм	0.35	0.06	0.10	0.12	0.14		0.07	0.04	0.08			0.07		0.06
<i>ZNF215</i> (11p15)	P622F	мат	цх	0.34	0.16										0.16		
			вм	0.34	0.11		0.13	0.14	0.08	0.12	0.05		0.14			0.12	0.16
<i>HTR2A</i> (13q14)	P71R	мат	цх	0.34		0.16		0.08			0.16	0.15	0.12	0.06	0.15		0.14
			вм	0.34			0.07				0.10				0.13	0.17	
<i>DLK1</i> (14q32)	P853F	отц	цх	0.38	0.15					0.16							
			цм	0.34	0.05		0.09		0.10	0.02						0.08	0.15
<i>PWCR1</i> (15q11)	E227R	отц	цх	0.34													
			вм	0.30	0.11		0.09	0.11	0.11	0.09	0.05				0.14	0.12	0.10
<i>GABRB3</i> (15q11)	P811F	отц	цх	0.56			0.92					0.87					
			вм	0.59		0.90	0.94	0.85		0.88	0.85	0.89		0.90	0.92	0.87	0.93
<i>GABRA5</i> (15q11)	P92F	отц	цх	0.45			0.14		0.16			0.16					
			вм	0.43		0.14					0.11	0.16			0.15		0.15
<i>GABRA5</i> (15q11)	P862R	отц	цх	0.69			0.86					0.87					
			вм	0.69		0.85	0.90					0.92		0.88	0.89	0.85	0.89
			отц	цх	0.66			0.86									
	P1016F		вм	0.64			0.84	0.89				0.90					0.88

Примечание. Курсивом выделено гипометилирование; жирным – гиперметилирование; отц/мат – ген с отцовской/материнской экспрессией соответственно; вм – внезародышевая мезодерма; цх – цитотрофобласт хориона; контроль – среднее значение β в плацентарных тканях медицинских абортусов.

также, что плацентарные ткани сильно подвержены внешним воздействиям и уровень метилирования в них может изменяться [13]. Очевидно и то, что метилирование ДНК не единственный молекулярный и эпигенетический маркер импринтированных генов. Интересно отметить, что аналогичные данные о гипо- или гиперметилованном состоянии ряда импринтированных сайтов в нормальных тканях получены в выполненном с использованием той же самой биочиповой платформы обследовании большого с ТНСД [23].

При изучении семейных случаев БППЗ и обследовании некоторых больных с ТНСД обнаружено, что эпигенетические изменения при этих патологиях затрагивают исключительно импринтированные гены, тогда как другие неимпринтированные гены эпимутациями не затрагиваются [23, 30]. В нашей работе показано, что нарушения характера метилирования встречаются и в неимпринтированных локусах. Используемый метилочип содержит 1392 CpG-динуклеотидов, локализованных в 756 неимпринтированных генах. Нарушение метилирования отмечено в 38 CpG-сайтах 36 неимпринтированных генов спонтанных абортусов, при этом 34 гена оказались гиперметилованными (*CYP2E1*, *HTR1B*, *KRAS*, *MMP7*, *HDAC9*, *CDH13*, *ARHGDI1B*, *FGFR3*, *CXCL9*, *PGR*, *DLG3*, *EFNB1*, *G6PD*, *SNCG*, *ASCL2*, *AOC3*, *VAMP8*, *CTAG2*, *LEFTY2*, *FRK*, *CRIP1*, *WNT10B*, *TIMP1*, *ETS1*, *SFN*, *ERN1*, *TGFB2*, *PDGFRA*, *PARP1*, *PTK7*, *p16*, *BAX*, *EPHB1*, *IGSF4C*), и только в двух генах (*S100A4* и *CTAG2*) зарегистрировано гипометилирование.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Геномный импринтинг — эпигенетический феномен, играющий заметную роль в обеспечении нормального внутриутробного развития плацентарных млекопитающих и человека. Вместе с тем, до недавнего времени молекулярные механизмы реализации ожидаемых негативных эффектов нарушений функций импринтированных генов в эмбриогенезе человека оставались неясными. Как уже отмечено выше, попытки оценить частоту ОРД по хромосомам, содержащим известные импринтированные гены, в выборках спонтанных абортусов не привели к решению обозначенной проблемы. Впоследствии понимание эпигенетической природы импринтинга позволило обосновать и подтвердить гипотезу о роли аномалий статуса метилирования ДНК импринтированных генов в этиологии нарушений внутриутробного развития.

К настоящему времени опубликован ряд работ, указывающих на наличие эпимутаций импринтинга у спонтанных абортусов, плодов с внутриутробной задержкой развития и в случаях мертворождений (табл. 2). Особого внимания за-

служивает нарушение характера метилирования одновременно в нескольких импринтированных генах. Так, в нашей работе у двух спонтанных абортусов зарегистрированы эпимутации центра импринтинга *KCNQ1OT1* и гена *PLAGL1* [12]. Примечательно, что женщины в этих двух семьях не имели ни одной благополучно завершённой беременности: у одной было четыре спонтанных выкидыша, у другой — два спонтанных аборта и один мертворожденный ребенок.

В другой работе при анализе уровня метилирования двух генов, экспрессирующихся с материнских хромосом (*H19* и *MEG3*), и четырех генов, активных на отцовских хромосомах (*KCNQ1OT1*, *NESP55*, *PEG3* и *SNRPN*), у 4% спонтанных абортусов и в 18% случаев мертворождений выявлено множественное гиперметилование импринтированных генов в мышечной ткани [13]. Находки мультилокусных эпимутаций подкрепляются и данными экспрессионного анализа. Так, изучение характера экспрессии четырех импринтированных генов (*IGF2*, *PEG10*, *PHLDA2*, *CDKN1C*) в тканях спонтанных абортусов и мертворожденных выявило нарушение экспрессии гена *PHLDA2* в первом триместре, всех четырех генов — во втором, и гена *PEG10* в третьем триместре беременности по сравнению с контрольной группой [31]. Здесь, однако, следует отметить, что экспрессия импринтированных генов в плацентарных тканях человека может иметь некоторые особенности. В частности, при определении уровня мРНК 14 импринтированных генов в образцах нормальной плаценты, полученных на первом триместре беременности, зарегистрирована потеря импринтинга в той или иной степени, т.е. появление биаллельной экспрессии всех изученных генов [29]. Заметная вариабельность уровня метилирования импринтированных генов в плацентарных тканях нормально развивающихся эмбрионов контрольной группы отмечена и в нашей работе.

Тем не менее, основным результатом настоящей работы следует признать обнаружение множественных нарушений характера метилирования импринтированных локусов генома при патологии эмбрионального развития человека. В отличие от всех опубликованных к настоящему времени данных, полученных при изучении статуса метилирования импринтированных генов, отобранных по тем или иным причинам, нами с помощью непредвзятого подхода, обеспеченного использованием метилочипа, установлена мультилокусность эпимутаций. Как итог, нами впервые идентифицированы эпимутации в 11 импринтированных генах (*GRB10*, *CPA4*, *WT1*, *ZNF215*, *HTR2A*, *KCNQ1*, *GABRB3*, *INS*, *TRPM5*, *PWCR1*, *GABRA5*). Очевидно, что дальнейшие исследования позволят установить или уточнить роль перечисленных генов в обеспечении нормального эмбрионального развития человека.

Множественность нарушений характера метилирования ДНК, регистрируемая у каждого обследованного эмбриона, затрагивает вопрос о возможных механизмах возникновения таких эпимутаций. Интересно, что аномалии метилирования во всех проанализированных импринтированных генах, кроме *DLK1* и *PLAGL1*, выявлены либо в одной, либо в обеих внезародышевых тканях. В генах *DLK1* и *PLAGL1* эпимутации найдены только в одной ткани – в ЦХ или ВМ. Для анализа происхождения эпимутаций весьма удобно использовать ЦХ и ВМ, поскольку обособление этих тканей происходит уже после имплантации бластоцисты и завершения периода глобального гипометилирования генома. Таким образом, присутствие эпимутации в одной ткани может указывать на ее постимплантационное проис-

хождение, связанное с нарушением механизмов поддержания геномного импринтинга в соматических клетках зародыша [10]. Если же эпимутации найдены в двух тканях, то однозначный вывод об их происхождении сделать невозможно. Так, например, гиперметилирование может быть результатом нарушений стирания импринтинга в зародышевой половой линии у одного из родителей, либо следствием независимого метилирования импринтированного CpG-сайта в разных тканях. Вероятность последнего события представляется весьма низкой, но полностью его исключить нельзя. Точно также, гипометилирование в обеих тканях может быть результатом ошибок установления импринтинга при созревании гамет у одного из родителей, либо следствием нарушений защиты метилированных неэкспрессируемых

Таблица 2. Спектр эпимутаций и нарушений экспрессии импринтированных генов при патологии эмбрионального развития человека

Регион	Ген	Экспрессирующийся аллель	Гипометилирование или биаллельная экспрессия	Гиперметилирование или исчезновение экспрессии
6q24	<i>PLAGL1</i>	отц	CA I триместра [12; *]; ВЗРП [14]	
7q21	<i>GRB10</i>	мат	CA I триместра [*]	
7q21	<i>PEG10</i>	отц	CA I [*] и II триместра [31]	CA III триместра [31]; ВЗРП [14]
7q32	<i>CPA4</i>	мат	CA I триместра [*]	
11p13	<i>WT1</i>	отц	CA I триместра [*]	
11p15	<i>KCNQ1</i>	мат	CA I триместра [*]	
11p15	<i>KCNQ1OT1</i>	отц	CA I триместра [11]	CA I [15], I II триместра и мертворожденные [13]
11p15	<i>INS</i>	отц		CA I триместра [*]
11p15	<i>TRPM5</i>	отц		CA I триместра [*]
11p15	<i>H19</i>	мат	ВЗРП [14]	CA I триместра [15; *], III триместра и мертворожденные [13]
11p15	<i>IGF2</i>	отц	CA II триместра [31]	
11p15	<i>CDKN1C</i>	мат	CA II триместра [31]	
11p15	<i>PHLDA2</i>	мат	CA I и II триместра [31]; CA I триместра [*]	
11p15	<i>ZNF215</i>	мат	CA I триместра [*]	
13q14	<i>HTR2A</i>	мат	CA I триместра [*]	
14q32	<i>DLK1</i>	отц	CA I триместра [*]; ВЗРП [14]	
14q32	<i>MEG3</i>	мат		CA III триместра и мертворожденные [13]
15q11	<i>PWCR1</i> (<i>SNORD116</i>)	отц		CA I триместра [*]
15q11	<i>SNRPN</i>	отц		CA III триместра и мертворожденные [13]
15q11	<i>GABRB3</i>	отц	CA I триместра [*]	
15q11	<i>GABRA5</i>	отц		CA I триместра [*]
19q13	<i>PEG3</i>	отц		CA III триместра и мертворожденные [13]
20q13	<i>NESP55</i>	мат		CA III триместра и мертворожденные [13]

*Настоящее исследование.

Примечание. ВЗРП – внутриутробная задержка развития плода; СА – спонтанные абортусы; отц/и мат – ген с отцовской/материнской экспрессией соответственно.

аллелей от волны полного деметилирования генома в соматических клетках при эпигенетическом репрограммировании на предимплантационном этапе развития.

В нашей работе 78% зарегистрированных эпимутаций оказались тканеспецифичными, что свидетельствует о нарушении механизмов стабильного воспроизводства дифференциального метилирования импринтированных генов в соматических клетках зародышей. Потенциальные факторы, обеспечивающие подобные нарушения, могут стать предметом дальнейших специальных исследований, направленных на поиск молекулярных механизмов генерации множественных эпимутаций. Особый интерес может представлять поиск мутаций в гене поддерживающей ДНК-метилтрансферазы (*DNMT1*) или в локусах, ассоциированных с возникновением эпимутаций в импринтированных генах — *NRLP7* (*NALP7*), *NRLP2*, *ZFP57* [32–34].

Как уже отмечено, множественные эпимутации импринтированных генов не ограничены пренатальным периодом онтогенеза. Они описаны и при классических заболеваниях геномного импринтинга — синдромах Рассела–Сильвера, Видеманна–Беквита, ТНСД [17–21], и затрагивают разнообразие импринтированных локусы. Этот факт поднимает проблему взаимодействия импринтированных генов в формировании фенотипических признаков. Кроме того, встает вопрос взаимодействия импринтированных генов и с остальным геномом. Действительно, один из заметных результатов выполненной работы — обна-

ружение аномалий метилирования и в ряде неимпринтированных генов. Большинство из этих генов, наряду с импринтированными локусами, вовлечены в процессы клеточной пролиферации и дифференцировки, апоптоза, роста клеток и обеспечения эмбрионального развития (табл. 3). Эти данные позволяют рассматривать импринт как не изолированную, а интегрированную в эпигеном систему.

Очевидно, что для систематизации эпигенетической изменчивости импринтома на разных этапах онтогенеза человека необходимо дальнейшее накопление данных. Вместе с тем, проведенное исследование акцентирует внимание на возможных механизмах селективного действия эпимутаций импринтированных генов в раннем эмбриогенезе. Так, одна из наиболее признанных гипотез, объясняющая появление моноаллельной импринтированной экспрессии генов в эволюции млекопитающих, — это гипотеза “конфликта полов”, предложенная Haig и Graham в 1991 году [35]. Согласно этой гипотезе, геномный импринтинг есть результат закрепления разных стратегий репродуктивного поведения самок и самцов в популяции. Интересно, что характер экспрессии большинства известных импринтированных генов поддерживает это предположение [2]. Так, импринтированные гены, продукты которых супрессируют развитие плацентарных тканей, транскрибируются в основном с хромосом материнского происхождения, что в рамках рассматриваемой гипотезы расценивается как экономия ресурсов материнского организма для обеспечения последующих беременностей. В то же время

Таблица 3. Участие импринтированных и неимпринтированных генов с эпимутациями в биологических процессах

Процесс*	Ген	
	импринтированный	неимпринтированный
Эмбриональное развитие (GO:0009790)	<i>DLK1</i>	<i>ASCL2, EFNБ1, PDGFRA, PTK7, TGFB2, WNT10B</i>
Клеточная дифференцировка (GO:0030154)	<i>DLK1, INS, PEG10, WT1</i>	<i>ASCL2, BAX, DLG3, EFNБ1, EPHБ1, ETS1, FGFR3, FRK, G6PD, HDAC9, KRAS, PDGFRA, PGR, PTK7, S100A4, SFN, TGFB2, TIMP1, WNT10B</i>
Клеточная пролиферация (GO:0008283)	<i>HTR2A, INS, WT1</i>	<i>ASCL2, CDH13, CRIP1, DLG3, EFNБ1, ETS1, FGFR3, FRK, MMP7, PDGFRA, PGR, SFN, TGFB2, TIMP1, WNT10B</i>
Апоптоз (GO:0008219)	<i>HTR2A, INS, PEG10, PHLDA2, WT1</i>	<i>BAX, CDH13, ERN1, ETS1, FGFR3, SFN, TGFB2, TIMP1, WNT10B</i>
Клеточный рост (GO:0040007)	<i>INS, WT1</i>	<i>CDH13, FGFR3, LEFTY2, PARP1, SFN, TGFB2, WNT10B</i>
Репродукция (GO:0000003)	<i>WT1</i>	<i>PDGFRA, PGR, TGFB2, WNT10B</i>
Транспорт (GO:0006350)	<i>GABRA5, GABRB3, GRB10, HTR2A, INS, TRPM5</i>	<i>BAX, CDH13, HTR1B, LEFTY2, SNCG, TGFB2, TIMP1, VAMP8</i>
Клеточный цикл (GO:0007049)	<i>INS</i>	<i>CDH13, ERN1, ETS1, SFN, TGFB2</i>

* Классификация категорий генов согласно базе данных “Gene Ontology” [http://www.geneontology.org].

гены, которые, напротив, стимулируют развитие плаценты, экспрессируются с хромосом, наследуемых от отца, что должно обеспечивать вынашивание как можно большего числа потомков. Соответственно, ожидаемый негативный эффект эпимутаций импринтированных генов должен складываться из гипометилирования материнских аллелей, приводящих к потере импринтинга и к увеличению дозы супрессорных факторов, а также из гиперметилирования отцовских аллелей, обуславливающих полное отсутствие продукта импринтированного гена, стимулирующего процессы развития. Действительно, как показывают результаты нашей работы, суммарная частота аномалий метилирования материнских и отцовских аллелей импринтированных генов (3.9%), ведущих к подавлению развития зародыша, статистически значимо превышает частоту эпимутаций, потенциально стимулирующих процессы эмбриогенеза (1.6%, $p < 0.001$). Этот факт служит эпигенетическим свидетельством в пользу гипотезы “конфликта полов”. Более того, полученные нами данные свидетельствуют о том, что эпимутации импринтированных генов значительно более часто встречаются именно во внезародышевой мезодерме, производной эпибласта, из которого формируются все эмбриональные ткани. Таким образом, можно сделать вывод о том, что эпигенетическая изменчивость импринтированных генов в соматических клетках зародышей и есть тот самый молекулярный механизм, который обуславливает ожидаемый негативный эффект нарушения их дозы при патологии эмбрионального развития человека.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЗАО “Геноаналитика” (Москва) за проведение гибридазации на метилочипах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (государственный контракт № П303 и № П806).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://igc.otago.ac.nz> – Каталог импринтированных генов и родительских эффектов у человека и животных.
2. Туско В., Morison I.M. 2002. Physiological functions of imprinted genes. *J. Cell Physiol.* **192**(3), 245–258.
3. Moore G., Oakey R. 2011. The role of imprinted genes in humans. *Genome Biol.* **12**(3), 106.
4. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. 2007. *Цитогенетика эмбрионального развития человека*. СПб.: Н-Л, 639 с.
5. Horsthemke B. 2006. Epimutations in human disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **310**, 45–59.
6. Никитина Т.В., Саженова Е.А., Суханова Н.Н. и др. 2004. Оценка роли однопородительской дисомии в ранней эмбриональной летальности человека. *Онтогенез.* **35**(4), 238–246.
7. Henderson D.J., Sherman L.S., Loughna S.C., et al. 1994. Early embryonic failure associated with uniparental disomy for human chromosome 21. *Hum. Mol. Genet.* **3**(8), 1373–1376.
8. Fritz B., Aslan M., Kalscheuer V., et al. 2001. Low incidence of UPD in spontaneous abortions beyond the 5th gestational week. *Eur. J. Hum. Genet.* **9**(12), 910–916.
9. Smith M., Creasy M.R., Clarke A., Upadhyaya M. 1998. Sex ratio and absence of uniparental disomy in spontaneous abortions with a normal karyotype. *Clin. Genet.* **53**(4), 258–261.
10. Лебедев И.Н., Саженова Е.А. 2008. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией. *Генетика.* **44**(10), 1356–1373.
11. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. 2008. Эпимутации центра импринтинга KCNQ10T1 хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека. *Генетика.* **44**(12), 1609–1616.
12. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. 2010. Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности. *Мед. генетика.* **9**(11), 34–39.
13. Pliushch G., Schneider E., Weise D., et al. 2010. Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *Am. J. Pathol.* **176**(3), 1084–1090.
14. Diplas A.I., Lambertini L., Lee M.J., et al. 2009. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics.* **4**(4), 235–240.
15. Zechner U., Pliushch G., Schneider E., et al. 2010. Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception. *Mol. Hum. Reprod.* **16**(9), 704–713.
16. van den Veyver I.B., Al-Hussaini T.K. 2006. Biparental hydatidiform moles: a maternal effect mutation affecting imprinting in the offspring. *Hum. Reprod. Upd.* **12**(3), 233–242.
17. Blik J., Verde G., Callaway J., et al. 2009. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including *PLAGL1* and *GNAS* loci in Beckwith–Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 611–619.
18. Azzi S., Rossignol S., Steunou V., et al. 2009. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith–Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4724–4733.
19. Turner C.L.S., Mackay D.M., Callaway J.L.A., et al. 2010. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 648–655.
20. Mackay D.J.G., Hahnemann J.M.D., Boonen S.E., et al. 2006. Epimutation of the TNDM locus and the Beckwith–Wiedemann syndrome centromeric locus in

- individuals with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Genet.* **119**, 179–184.
21. Boonen S.E., Pörksen S., Mackay D.J.G., et al. 2008. Clinical characterisation of the multiple maternal hypomethylation syndrome in siblings. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 453–461.
 22. Cooper W.N., Constância M. 2010. How genome-wide approaches can be used to unravel the remaining secrets of the imprintome. *Brief. Funct. Genomics.* **9**, 315–328.
 23. Martin-Subero J., Bibikova M., Mackay D., et al. 2008. Microarray-based DNA methylation analysis of imprinted loci in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Am. J. Med. Genet.* **15(24)**, 3227–3229.
 24. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., et al. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* **258(5083)**, 818–821.
 25. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. 1992. *Human cytogenetics. A practical approach.* N.Y.: Oxford Univ. Press, **1**, 274 p.
 26. Ladd-Acosta C., Pevsner J., Sabunciyar S., et al. 2007. DNA methylation signatures within the human brain. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 1304–1315.
 27. Frost J.M., Moore G.E. 2010. The importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet.* **6(7)**, e1001015–e1001022.
 28. Gustin R.M., Bichell T.J., Bubser M., et al. 2010. Tissue-specific variation of *Ube3a* protein expression in rodents and in a mouse model of Angelman syndrome. *Neurobiol. Dis.* **39(3)**, 283–291.
 29. Pozharny Y., Lambertini L., Ma Y., et al. 2010. Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **202(391)**, e1–e8.
 30. Djuric U., El-Maarri O., Lamb B., et al. 2006. Familial molar tissues due to mutations in the inflammatory gene, *NALP7*, have normal postzygotic DNA methylation. *Hum. Genet.* **120**, 390–395.
 31. Dória S., Sousa M., Fernandes S., et al. 2010. Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal deaths. *Epigenetics.* **5(5)**, 444–450.
 32. Murdoch S., Djuric U., Mazhar B., et al. 2006. Mutations in *NALP7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat. Genet.* **38(3)**, 300–302.
 33. Meyer E., Lim D., Pasha S., et al. 2009. Germline mutation in *NLRP2 (NALP2)* in a familial imprinting disorder (Beckwith–Wiedemann syndrome). *PLoS Genet.* **5(3)**, e1000423.
 34. Mackay D.J.G., Callaway S.M., Marks H.E., et al. 2008. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57*. *Nat. Genet.* **40**, 949–951.
 35. Haig D., Graham C. 1991. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell.* **64**, 1045–1046.