

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21:575.224:618.32

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТРИСОМИИ 16
В ПЛАЦЕНТАРНЫХ ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. Е. Н. Толмачёва*, А. А. Кашеварова, Н. А. Скрыбин, И. Н. Лебедев

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

Поступила в редакцию 16.10.2012 г.

Принята к печати 26.11.2012 г.

Сравнение профиля метилирования ДНК в плацентарных тканях эмбрионов с нормальным кариотипом и эмбрионов с трисомией хромосомы 16, выполненное с использованием платформы “Infinium HumanMethylation27 BeadChip” (“Illumina”, США), выявило существование множественных различий между внезародышевыми тканями с диплоидным и анеуплоидным кариотипом. Показано, что во внезародышевой мезодерме эмбрионов с трисомией 16 ДНК менее метилирована, чем у зародышей с нормальным кариотипом, тогда как в цитотрофобласте ДНК гиперметилирована. Присутствие дополнительной хромосомы влияет на эпигенетический профиль генома, изменяя уровни метилирования CpG-сайтов на всех хромосомах, при этом наибольшее число дифференциально метилированных локусов находится на самой хромосоме 16. Эпимутации в большинстве случаев тканеспецифичны. Гипометилированные гены в обеих тканях относятся к группам генов, ответственных за различные метаболические процессы, тогда как гиперметилированные отвечают за развитие, адгезию клеток, иммунный ответ и ответ на стимул.

Ключевые слова: хромосома 16, трисомия 16, цитотрофобласт, внезародышевая мезодерма, метилирование ДНК, дифференциально метилированные гены, метилочип “Infinium HumanMethylation27 BeadChip”.

EPIGENETIC EFFECTS OF TRISOMY 16 IN THE HUMAN PLACENTA, by E. N. Tolmacheva*, A. A. Kашеварова, N. A. Skryabin, I. N. Lebedev (Research Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia; *e-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru). The methylation profiles of the placental tissues of human embryos with normal karyotype and trisomy 16 were compared using Infinium HumanMethylation27 BeadChip array (Illumina, United States). Numerous differences between the extraembryonic tissues with diploid and aneuploid karyotypes were observed. The extraembryonic mesoderm of embryos with trisomy 16 appeared to be less methylated compared to the diploid tissue, whereas the cytotrophoblast of aneuploid embryos was hypermethylated. The presence of the supernumerary chromosome was shown to influence the epigenetic profile of the genome changing the level of methylation of CpG sites of all chromosomes. However, the biggest number of differentially methylated loci was found on the chromosome 16. Besides, more often the epimutations were tissue-specific. The hypomethylated genes in both tissues belong to the groups of genes responsible for different metabolic processes, whereas the hypermethylated genes control the processes of development, cell adhesion, immune response, and response to stimulus.

Keywords: trisomy 16, cytotrophoblast, extraembryonic mesoderm, DNA methylation, differentially methylated genes, Infinium HumanMethylation27 BeadChip array.

DOI: 10.7868/S002689841303018X

Эпигенетические модификации ДНК – важный механизм, регулирующий транскрипцию. Нарушение профиля метилирования ДНК в эмбриогенезе в результате воздействия каких-либо патологических факторов драматически сказывается на судьбе развивающегося организма. Ранние этапы онтогенеза человека характеризуются высокой частотой гибели эмбрионов, в половине случаев обусловленной геномными мутациями,

большой частью трисомией аутосом [1]. Избыточная доза какой-либо целой хромосомы может влиять на различные процессы в клетке, в том числе на профиль метилирования ДНК. Действительно, за последние годы aberrантно метилированные гены найдены в различных тканях эмбрионов и взрослых индивидов с трисомиями хромосом 18 и 21 [2–4].

Трисомия хромосомы 16 относится к наиболее частым хромосомным аномалиям, выявляемым у внутриутробно погибших зародышей че-

* Эл. почта: kate.tolmacheva@medgenetics.ru

ловека. Она встречается у 6–10% спонтанных абортусов I-го триместра беременности и составляет около 30% всех трисомий, регистрируемых в этой группе [5]. Среди всех клинически распознаваемых беременностей частота данной мутации достигает 1.5% [6]. Ранее мы показали, что избыточная доза хромосомы 16 влияет на такой эпигенетический процесс, как инактивация X-хромосомы [7]. Не исключено, что увеличение дозы этой хромосомы может спровоцировать модификации метилирования множества локусов генома, что в свою очередь приведет к остановке развития и гибели эмбриона. Кроме того, трисомия 16, выявляемая в клетках спонтанных абортусов, практически всегда обусловлена нерасхождением хромосом в первом делении мейоза у матери [5, 8]. Соответственно, запуск всей программы индивидуального развития, в том числе регулируемой эпигенетическими механизмами, начинается с трисомного кариотипа в зиготе.

В представленной работе с использованием платформы “Infinium HumanMethylation27 Bead-Chip” (“Illumina”, США) проведено сравнение профиля метилирования ДНК в плацентарных тканях эмбрионов с трисомией хромосомы 16 и с нормальным кариотипом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проведение настоящей работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН. Исследовали плацентарные ткани – цитотрофобласт хориона и внезародышевую мезодерму – 17 спонтанных абортусов с трисомией хромосомы 16 (9 мужского, восемь женского пола), а также пяти спонтанных (два мужского и три женского пола) и шести индуцированных (три мужского и три женского пола) абортусов с нормальным кариотипом (контрольная группа). Все спонтанные абортусы получены от женщин с диагнозом анэмбриония либо неразвивающаяся беременность. Анэмбрионии – группа спонтанных абортусов, эмбриональное развитие которых останавливается достаточно рано – на этапе дифференцировки внутренней клеточной массы. Критериями для постановки диагноза при ультразвуковом обследовании беременных женщин служило отсутствие сформированного эмбриона в полости плодного мешка и несоответствие размеров плодного мешка ожидаемым размерам на данном сроке беременности. Неразвивающиеся беременности – группа спонтанных абортусов, у которых выражены признаки задержки эмбриона в полости матки после остановки развития. Диагноз ставится в ходе динамического ультразвукового обследования беременных женщин, при этом используют следующие критерии: наличие сформированного зародыша в полости плодного

мешка; несоответствие крестцово-теменного размера эмбриона размеру, ожидаемому на текущем сроке беременности; отсутствие сердцебиения и двигательной активности эмбриона. Внезародышевые ткани индуцированных абортусов получены от здоровых женщин, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Продолжительность внутриутробного развития зародышей, определенная по дате последней менструации, составляла у спонтанных абортусов с трисомией хромосомы 16 в среднем 8.4 ± 1.8 недель, у абортусов с нормальным кариотипом – 9.6 ± 1.9 недель, у индуцированных абортусов – 8.7 ± 1.8 недель, и не различалась статистически значимо в сравниваемых группах ($p = 0.1$). Кариотип эмбрионов устанавливали с помощью стандартного метафазного анализа с использованием культур клеток внезародышевой мезодермы. Мозаичные варианты трисомии 16 верифицировали с помощью интерфазного FISH-анализа с центромероспецифичным ДНК-зондом D16Z1 в некультивированных тканях. Интерфазный FISH-анализ и приготовление суспензий интерфазных ядер некультивированных клеток внезародышевых тканей проводили согласно [9].

Геномную ДНК для анализа статуса метилирования выделяли из нативных (некультивированных) тканей зародыша после стандартной обработки протеиназой К в течение 16 ч при 37°C и экстракции смесью фенола и хлороформа. Цитотрофобласт хориона и внезародышевая мезодерма происходят из разных зародышевых листков, в норме они различаются профилем метилирования [10], поэтому эти плацентарные ткани мы анализировали отдельно.

Эпигенетический статус определяли с помощью метилочипа “Infinium HumanMethylation27 Bead-Chip” (“Illumina”, США), включающего 27578 CpG-динуклеотидов, локализованных в 14475 генах, согласно протоколу производителя [<http://www.illumina.com>]. Данные анализировали, используя пакет программ “GenomeStudio Methylation Module” (“Illumina”, США), который переводит интенсивность флуоресценции в количественную величину β (индекс метилирования), соответствующую отношению сигналов флуоресценции метилированных аллелей к сумме сигналов метилированных и неметилированных аллелей исследуемого локуса. Величина β непрерывна, она может принимать любое значение от 0 до 1, где 0 соответствует состоянию, когда все CpG-сайты в данном положении неметилированы, а 1 указывает на полное метилирование всех гомологичных CpG-динуклеотидов. Неметилированными считали CpG-динуклеотиды со значением $\beta < 0.2$, поскольку порог чувствительности метода составляет 20% [11], гиперметилированными – CpG-динуклеотиды со значением $\beta > 0.6$ [12].

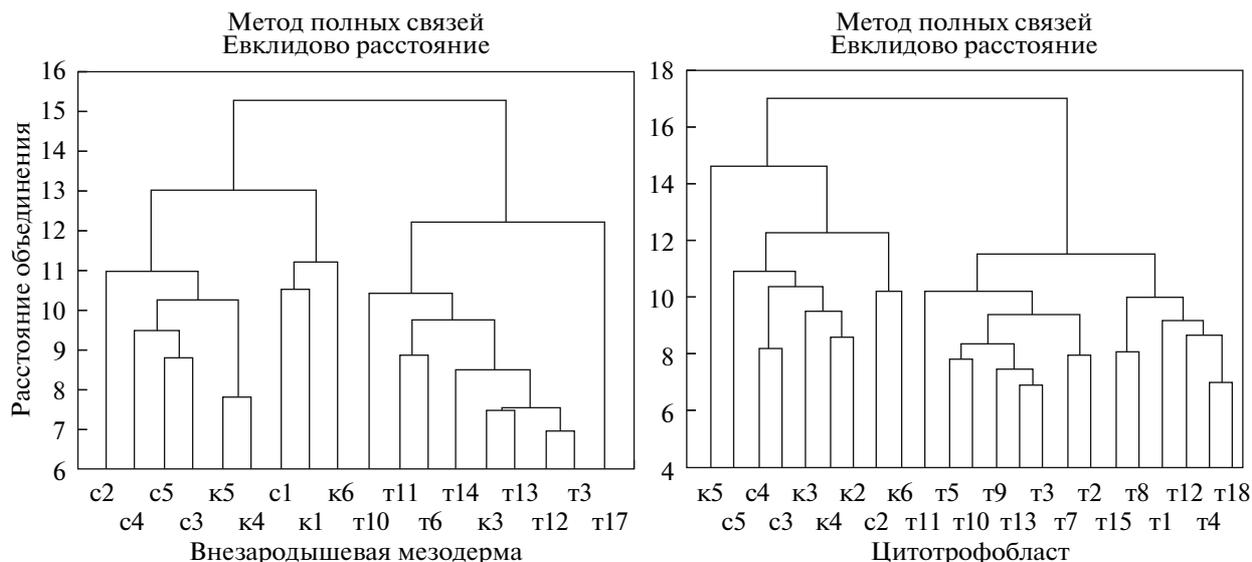


Рис. 1. Результаты иерархического кластерного анализа профиля метилирования ДНК в плацентарных тканях спонтанных и индуцированных абортусов; с – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, к – индуцированные абортусы с нормальным кариотипом (контроль), т – спонтанные абортусы с трисомией хромосомы 16.

Статистический анализ проводили с использованием веб-ресурса GenePattern [http://www.broad-institute.org/cancer/software/genepattern/]. Для идентификации дифференциально метилированных сайтов на аутосомах и X-хромосоме у эмбрионов мужского пола использовали медианный Т-тест. Поправку на множественность сравнений вводили с помощью метода FDR (False Discovery Rate). CpG-сайты считали дифференциально метилированными при значении $p < 0.01$. Большая часть генов на одной из X-хромосом у зародышей женского пола инактивирована, поэтому для анализа профиля метилирования X-хромосомы отбирали только те CpG-сайты, уровень метилирования которых в контрольной группе находился в диапазоне $\beta = 0.5 \pm 0.2$. Затем отобранные X-сцепленные сайты анализировали у каждого эмбриона женского пола с кариотипом 47,XX,+16. Дифференциально метилированными считали те, значение β у которых не соответствует диапазону 0.5 ± 0.2 .

Для функциональной аннотации дифференциально метилированных генов использовали программу “WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit” на основе алгоритма анализа обогащенного набора генов (“Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)” [http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt]. Классификацию категорий генов проводили при помощи базы данных “Gene Ontology (GO)” [http://www.geneontology.org].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами измерен уровень метилирования 26201 CpG-динуклеотида, локализованного в 13967 аутосомных генах, и 960 сайтов в 556 X-сцеплен-

ных генах в восьми образцах внезародышевой мезодермы и в 14 образцах цитотрофобласта у спонтанных абортусов с трисомией 16, а также в этих же тканях у пяти внутриутробно погибших и шести индуцированных эмбрионов с нормальным кариотипом.

В результате иерархического кластерного анализа все образцы разделили на два кластера в зависимости от кариотипа эмбрионов и независимо от анамнеза, за исключением внезародышевой мезодермы у индуцированного абортуса (к3, рис. 1), что указывает на множественные различия профиля метилирования исследованных CpG-сайтов в плацентарных тканях нормальных и анеуплоидных эмбрионов.

С целью выявления дифференциально метилированных генов у эмбрионов с трисомией хромосомы 16 мы сравнили образцы, входящие в оба кластера, с помощью медианного Т-теста.

Во внезародышевой мезодерме эмбрионов с анеуплоидным кариотипом найдено 3445 дифференциально метилированных CpG-сайтов в 3080 генах, а в цитотрофобласте – 1116 сайтов, локализованных в 1031 гене (табл. 1). Распределение гипо- и гиперметилированных CpG-сайтов во внезародышевых тканях различалось статистически значимо: во внезародышевой мезодерме 87% дифференциально метилированных сайтов были гипометилированы, тогда как в цитотрофобласте гиперметилированы около 78% сайтов ($p < 0.001$). Большая часть дифференциально метилированных сайтов в обеих тканях находилась в CpG-богатых регионах – 86 и 63% соответственно (табл. 1). Дифференциально метилированными в обеих

Таблица 1. Дифференциально метилированные CpG-сайты, локализованные на аутосомах, в плацентарных тканях эмбрионов с трисомией хромосомы 16

CpG-сайты	Внезародышевая мезодерма	Цитотрофобласт
Гипометилированные	2985	250
Гиперметилированные	460	866
Одиночные CpG-нуклеотиды	460	411
CpG-нуклеотиды в составе CpG-островка	2985	705
Всего дифференциально метилированных сайтов	3445	1116

тканях были 236 сайтов (130 гипо- и 106 гиперметилированных).

Дифференциально метилированные сайты выявлены на всех аутосомах (табл. 2). Интересно, что на хромосоме 16 количество таких сайтов в обеих тканях было статистически значимо больше, чем

Таблица 2. Число дифференциально метилированных сайтов во внезародышевых тканях эмбрионов с трисомией хромосомы 16

Хромосома	Внезародышевая мезодерма	Цитотрофобласт
1	391/2877 (13.6%)	129/2754 (4.7%)
2	254/1688 (15%)	53/1614 (3.3%)
3	211/1505 (14.0%)	57/1444 (4.0%)
4	123/999 (13.3%)	31/945 (3.3%)
5	165/1146 (14.4%)	41/1099 (3.7%)
6	186/1473 (12.6%)	52/1399 (3.7%)
7	168/1249 (13.4%)	45/1194 (3.8%)
8	124/929 (13.3%)	28/887 (3.2%)
9	132/1060 (12.4%)	42/1032 (4.0%)
10	146/1032 (14.1%)	36/990 (3.6%)
11	220/1720 (12.8%)	86/1661 (5.2%)
12	162/1513 (10.7%)	59/1441 (4.1%)
13	72/491 (14.6%)	26/423 (5.5%)
14	118/824 (14.3%)	30/799 (3.7%)
15	105/817 (12.8%)	33/801 (4.1%)
16	228/1191 (19.1%)	113/1170 (9.7%)
17	209/1573 (13.3%)	81/1530 (5.3%)
18	35/392 (8.9%)	11/371 (3.0%)
19	198/1874 (10.4%)	78/1853 (4.2%)
20	90/878 (10.2%)	47/862 (5.4%)
21	35/308 (11.4%)	9/287 (3.1%)
22	73/641 (11.4%)	29/631 (4.6%)
X (для мужского пола)	33/1063 (3.1%)	15/1028 (1.5%)

Примечание. Приведено отношение числа дифференциально метилированных сайтов ко всем проанализированным CpG-сайтам на каждой хромосоме.

на других хромосомах ($p < 0.05$) – 113 в 105 генах в цитотрофобласте и 228 в 193 генах во внезародышевой мезодерме. Причем в цитотрофобласте 78% дифференциально метилированных сайтов на хромосоме 16 были гиперметилированными, тогда как во внезародышевой мезодерме большая часть таких сайтов (82%) гипометилирована, что отражает общую тенденцию эпигенетических модификаций у эмбрионов с трисомией 16.

Во внезародышевой мезодерме эмбрионов мужского пола найдено 33 гиперметилированных сайта в 31 гене на X-хромосоме, а в цитотрофобласте в 15 генах обнаружены 15 гиперметилированных сайтов, причем два дифференциально метилированных сайта в двух генах были гиперметилированными в обеих тканях.

Мы выделили функционально значимые группы дифференциально метилированных генов, локализованных на аутосомах. В цитотрофобласте дифференциально метилированные (гиперметилированные) гены по классификации “Gene Ontology” относятся к таким крупным функциональным группам, как GO:003502 – процессы развития, в том числе GO:0048856 – развитие анатомических структур, GO:0007275 – развитие многоклеточного организма; GO:0002376 – процессы иммунной системы – GO:0006955 – иммунный ответ, а также GO:0007155 – клеточная адгезия (рис. 2), тогда как большая часть гипометилированных генов входит в группы, отвечающие за различные метаболические процессы: GO:0044237 – клеточные метаболические процессы; GO:0043170 – метаболизм макромолекул. Кроме того, 33 гипометилированных гена относятся к группе генов клеточного цикла (рис. 2).

Во внезародышевой мезодерме гиперметилированные гены входят в большую группу генов, продукты которых отвечают за процессы в многоклеточном организме (GO:0032501), в частности GO:0001816 – за выработку цитокинов, а также за ответ на внешний стимул (GO:0009605) и регуляцию иммунного ответа (GO:0050776). Большая часть дифференциально метилированных генов во внезародышевой мезодерме эмбрионов с трисомией 16 так же, как и в цитотрофобласте, отно-

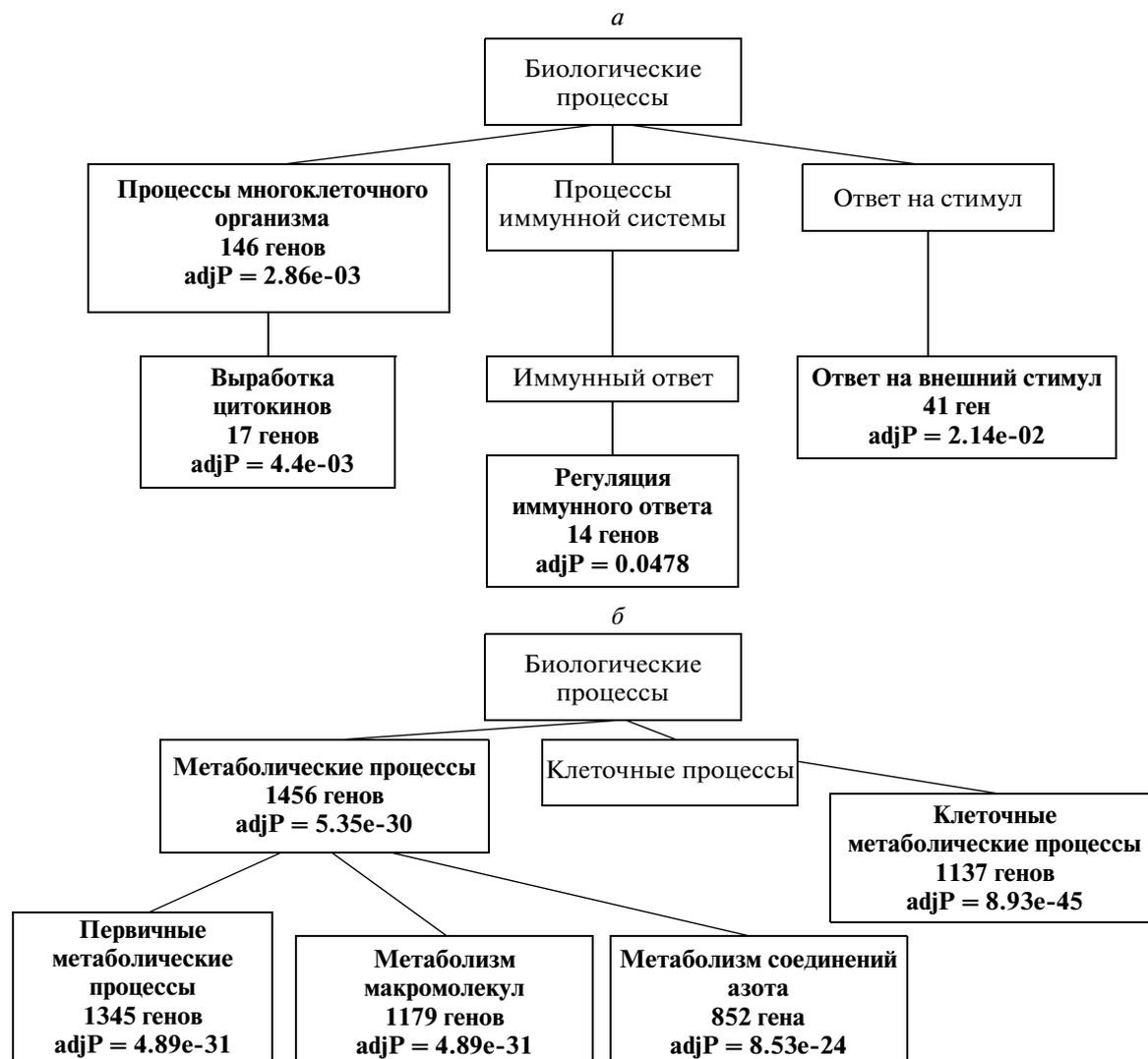


Рис. 2. Функционально значимые группы генов во внезародышевой мезодерме эмбрионов с трисомией хромосомы 16. *a* – Гиперметилированные гены; *б* – гипометилированные гены.

сится к группе генов, отвечающих за метаболические процессы (рис. 3).

Во внезародышевой мезодерме с равной вероятностью происходит инактивация отцовской или материнской X-хромосомы, тогда как в цитотрофобласте избирательно инактивируется отцовская X-хромосома [12]. С учетом этого, а также преимущественно материнского происхождения трисомии хромосомы 16 у эмбрионов женского пола с кариотипом 47,XX,+16, мы анализировали профиль метилирования X-хромосомы только во внезародышевой мезодерме. Из 1085 X-сцепленных CpG-динуклеотидов, представленных на чипе, удалось проанализировать 1079 (99.45%). Уровень метилирования 446 CpG-сайтов в контрольной группе соответствовал значению $\beta = 0.5 \pm 0.2$. После сортировки у зародышей женского пола с анеуплоидным кариотипом выявили от 47 до

123 дифференциально метилированных сайтов в 201 гене. У одного, двух и трех эмбрионов обнаружили 59, 53 и 35 сайтов, соответственно, а у четырех и более эмбрионов мы верифицировали 54 общих CpG-динуклеотида. Мы проанализировали биологические функции генов, дифференциально метилированных более чем у четырех эмбрионов. Эти гены входили в такие функциональные группы, как группы генов транспорта (GO:0006810), преобразования сигнала (GO:0007165), развития анатомических структур (GO:0048856), клеточных метаболических процессов соединений азота (GO:0034641), сборки клеточных компонентов (GO:0022607), ответа на стресс (GO:0006950), дифференцировки (GO:0030154) и пролиферации (GO:0008283) клеток.

Далее из всех дифференциально метилированных сайтов, локализованных в CpG-островках, мы

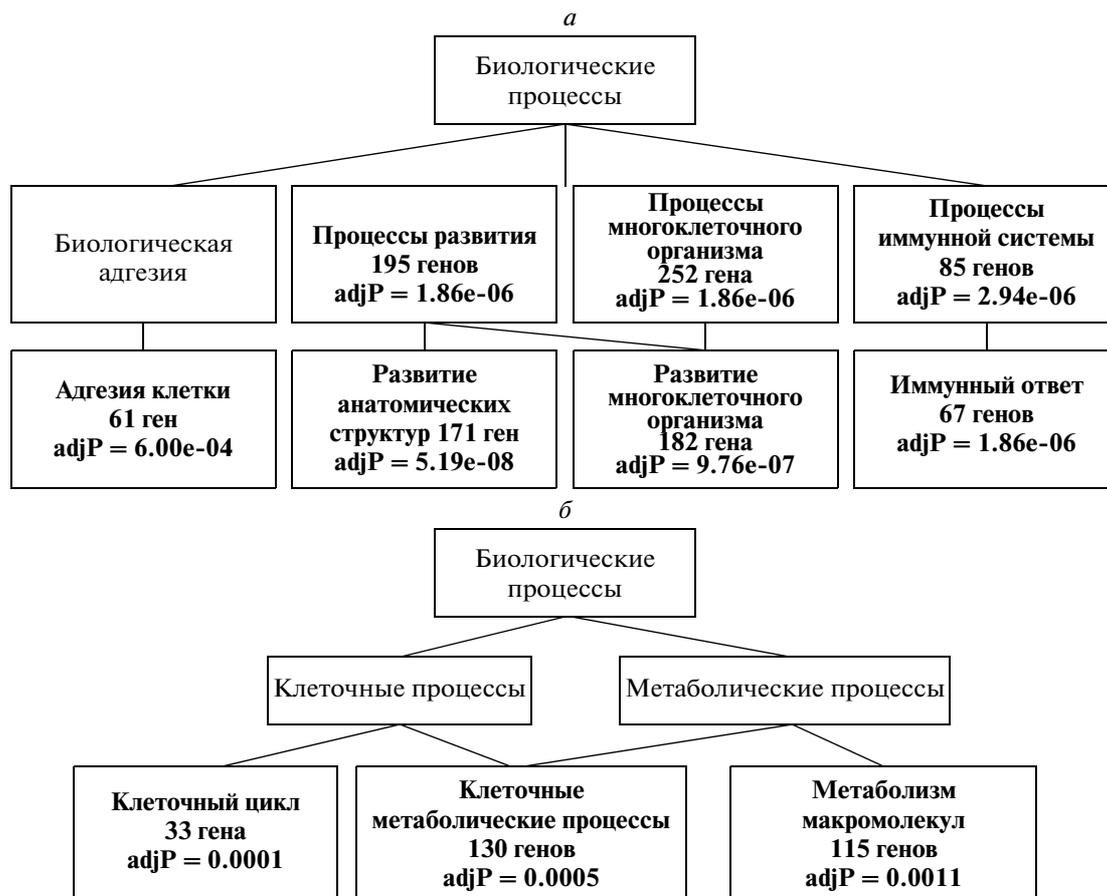


Рис. 3. Функционально значимые группы генов в цитотрофобласте хориона эмбрионов с трисомией хромосомы 16. *a* – Гиперметилированные гены; *б* – гипометилированные гены.

отобрали CpG-сайты, неметилированные в контрольной группе ($\beta < 0.2$) и гиперметилированные ($\beta > 0.6$) у эмбрионов с трисомией хромосомы 16. С учетом этих критериев установлено дифференциальное метилирование 28 сайтов в 26 генах цитотрофобласта (табл. 3). Сайтов с такой разницей в уровне метилирования во внезародышевой мезодерме не найдено. Значения β у остальных дифференциально метилированных сайтов и в цитотрофобласте, и во внезародышевой мезодерме располагались в интервале 0.2–0.6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установление и поддержание тканеспецифичных профилей экспрессии генов в ходе развития многоклеточного организма тесно связано с действием факторов транскрипции и эффектов эпигенетических модификаций. В число последних входит метилирование ДНК – процесс, устанавливаемый, в первую очередь, в течение эпигенетического репрограммирования генома. Сверхчисленная хромосома может быть одним из фак-

торов, влияющих на процесс эпигенетического репрограммирования.

К настоящему времени всего лишь в нескольких работах приведены результаты широкомасштабного анализа профиля метилирования генома в образцах с анеуплоидным кариотипом, выполненного с использованием микрочиповых технологий. Изучены трисомии хромосом 18 и 21 – хромосомных нарушений, наиболее распространенных у новорожденных [2, 3]. С использованием той же платформы, что и в нашей работе (“Infinium HumanMethylation27 BeadChip”), показано, что aberrантные модификации генов имеют тканеспецифичный характер, а дополнительная хромосома оказывает *транс*-эффект на эпигенетические модификации генома [2–4]. В зависимости от типа тканей и статистических методов обработки результатов в разных работах приведено разное число дифференциально метилированных генов. Так, изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах периферической крови 29 больных синдромом Дауна [2], выполненное с использованием иерархического кластерного анализа, не выявило значительных различий между образцами с

трисомным кариотипом и контрольной группой (20 образцов), но обнаружило 108 дифференциально метилированных генов. Среди них оказались гены, которые экспрессируются на высоком уровне в нормальных Т-лимфоцитах и гемопоэтических стволовых клетках [2]. В образцах ворсин хориона (цитотрофобласте) трех эмбрионов с трисомией 21 идентифицировано 404 дифференциально метилированных гена [4]. Дифференциально метилированные гены, выявленные в цитотрофобласте при трисомии 21, в норме регулируют развитие нервной и сердечно-сосудистой системы, почек и кишечника, а также черепно-лицевых структур, т.е. тех органов и систем, развитие которых часто нарушено при синдроме Дауна.

Изучение профиля метилирования различных плацентарных и эмбриональных тканей при трисомии 18 выявило 17 дифференциально метилированных сайтов в коже четырех плодов и 15 дифференциально метилированных локусов в цитотрофобласте пяти эмбрионов [3, 4]. Вероятно, дополнительная хромосома 18 не влияет существенно на эпигенетический профиль генома. В нашей работе мы анализировали профиль метилирования ДНК у эмбрионов с три-

сомией 16. Результаты иерархического кластерного анализа всех образцов указывали на то, что профиль метилирования CpG-сайтов в плацентарных тканях зародышей с трисомией 16 значительно отличается от профиля у эмбрионов с нормальным кариотипом. Сравнение уровней метилирования каждого CpG-сайта во внезародышевых тканях эмбрионов с анеуплоидным и нормальным кариотипом выявило дифференциальное метилирование 13% сайтов во внезародышевой мезодерме и 4% — в цитотрофобласте анеуплоидных зародышей ($p < 0.01$). Дифференциально метилированные сайты были преимущественно тканеспецифичными, и только меньшая их часть (7% во внезародышевой мезодерме и 21% в цитотрофобласте) найдена в обеих тканях.

В онтогенезе млекопитающих известно два периода, в ходе которых происходят события, предрасполагающие к возникновению эпимутаций с высокой частотой. Первый этап — это деметилирование и последующее метилирование *de novo*, протекающие в примордиальных и зрелых половых клетках. Зрелые мужские и женские гаметы становятся гиперметилированными по сравнению с клетками соматических тканей [14]. Второй этап — деметилирование на ранних этапах

Таблица 3. Функциональные категории генов с дифференциально метилированными сайтами в плацентарных тканях человека при трисомии 16

Биологический процесс	Ген
GO:0008152, метаболические процессы	<i>DPP7, HSPA1A, HTRA1, TRIM50C 74, NES, NOL3, PDZD3, SLC3A1, SLMAP, THBS4, TIMP3</i>
GO:0032501, процессы многоклеточного организма	<i>DOC2A, HSPA1A, NES, NPTX2, SLMAP, SMOC1, THBS4, TIMP3</i>
GO:0050896, ответ на стимул	<i>GPX7, HSPA1A, HTRA1, NES, P2RY6, PDZD3, SMOC1, THBS4, TIMP3</i>
GO:0006950, ответ на стресс	<i>ADRB3, CDKN2A, FANCG, FOSL1, GPX7</i>
GO:0002376, процессы иммунной системы	<i>CDKN2A, HLA-B, HSPA1A, THBS4</i>
GO:0048856, развитие анатомических структур	<i>ALX4, CDKN2A, DOC2A, ENPEP, FANCG, HLA-B, ZNF135</i>
GO:0032502, процессы развития	<i>DOC2A, NES, SMOC1, THBS4, TIMP3</i>
GO:0006810, транспорт	<i>CDKN2A, DOC2A, SLC3A1, TM6SF1, TRPV6</i>
GO:0007154, клеточные коммуникации	<i>DOC2A, HTRA1, NPTX2, P2RY6, PDZD3, SMOC1</i>
GO:0030154, дифференцировка клеток	<i>ADRB3, CDKN2A, FANCG, HLA-B</i>
GO:0007049, клеточный цикл	<i>CDKN2A, FANCG, FOSL1, NES</i>
GO:0008219, клеточная смерть	<i>ALX4, CDKN2A, FOSL1</i>
GO:0008283, пролиферация клеток	<i>CDKN2A, ENPEP, FOSL1, HSPA1A, NES, THBS4</i>
GO:0040007, рост	<i>ADRB3, CDKN2A, HSPA1A, HTRA1</i>
GO:0007165, преобразование сигнала	<i>ADRB3, CDKN2A, HLA-B</i>
GO:0007155, адгезия клетки	<i>CDKN2A, SMOC1, THBS4</i>
GO:0009790, эмбриональное развитие	<i>ALX4</i>

развития сразу же после оплодотворения. Деметилированию подвергается большинство генов (за исключением импринтированных), и это состояние сохраняется до стадии бластоцисты. Затем при разделении зародышевых листков начинается установление тканеспецифичного метилирования генов. В подавляющем большинстве случаев трисомия 16 у спонтанных абортусов возникает вследствие ошибки первого деления мейоза у матери [5]. Таким образом, эффект сверхчисленной хромосомы может реализоваться как в течение первой волны эпигенетического репрограммирования генома в процессе созревания ооцита, так и во время деметилирования зиготы и метилирования *de novo* после имплантации. Наличие общих дифференциально метилированных тканей в обеих тканях может указывать на то, что эпимутации в этих сайтах произошли либо в процессе мейоза, либо на первых этапах дробления зиготы. Однако большая часть дифференциально метилированных сайтов при трисомии 16 тканеспецифичны, т.е. большинство эпимутаций возникают в процессе установления метилирования *de novo* после разделения зародышевых листков. Связано ли это с эффектом трисомии, вызывающей эпимутации в соматических клетках, либо это результат адаптации генома к существованию в условиях трисомии? Мы не можем сделать на этот счет какого-либо вывода, но несомненно, что трисомия хромосомы 16 влияет на эпигенетический профиль генома.

Несмотря на то, что в плацентарных тканях эмбрионов с трисомией 16 дифференциально метилированные гены локализованы на всех хромосомах, мы выявили явное накопление aberrантно метилированных сайтов на самой хромосоме 16, что не наблюдали в предыдущих исследованиях. Таким образом, с одной стороны, дополнительная хромосома 16, как и хромосомы 21 и 18, оказывает *транс*-эффект на эпигенетический профиль генома, а с другой, мы наблюдаем множественные модификации метилирования ДНК в *цис*-положении. На хромосоме 16 найдены как гипо-, так и гиперметилированные гены, причем в цитотрофобласте гиперметилирована большая часть дифференциально метилированных генов. Интересно, что анализ паттерна метилирования хромосомы 16 в цитотрофобласте при трисомии 16 методом ник-трансляции *in situ*, опосредованной метилчувствительной рестриктазой HpaII, выявил гиперметилирование гетерохроматинового блока на одной из двух хромосом 16 материнского происхождения [1]. Предполагается, что таким образом может происходить частичная компенсация дисбаланса, обусловленного дополнительной хромосомой 16. Но в этом случае подобная компенсация ограничивается только цитотрофобластом, тогда как по нашим данным во внезародышевой мезодерме гипометилирована

большая часть дифференциально метилированных генов. С другой стороны, стоит отметить, что и в нашей работе, и ранее [1] анализировали плацентарные ткани эмбрионов, полученных от женщин с диагнозом анэмбриония или неразвивающаяся беременность, когда нарушено развитие эмбриона, а не хориона. Известно, что у человека развитие хориона существенно опережает развитие производных эпибласта. Более того, до определенной степени оно не зависит от развития самого зародыша. Ворсинки хориона могут оставаться в матке жизнеспособными в течение нескольких недель после резорбции самого зародыша [1]. Вероятно, именно гиперметилирование CpG-сайтов на дополнительной хромосоме в цитотрофобласте может способствовать сохранению жизнеспособности этой плацентарной ткани. Кроме того, большая часть дифференциально метилированных генов, локализованных на других хромосомах, в цитотрофобласте эмбрионов с анеуплоидным кариотипом также гиперметилирована, и основные функциональные группы гиперметилированных генов регулируют процессы развития анатомических структур многоклеточного организма и иммунного ответа, что может быть не критичным для развития хориона в первом триместре беременности. В то же время, во внезародышевой мезодерме — производной эпибласта, гипометилирована большая часть дифференциально метилированных генов, к тому же эпигенетические нарушения затрагивают гораздо больше генов, чем в цитотрофобласте.

Из большого числа дифференциально метилированных генов стоит проанализировать функции тех, уровень метилирования которых нарушен во всех образцах с анеуплоидным кариотипом (гипо- либо гиперметилированных во всех образцах). Рассмотрим функции некоторых генов, связанных с процессами развития и дифференцировки тканей, с апоптозом, репарацией ДНК и клеточным циклом.

Ген *NOL3* локализован на хромосоме 16. Продукт этого гена, известный как ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain), относится к ингибиторам апоптоза. Этот белок действует на оба основных сигнальных каскада апоптоза, с одной стороны, специфически ингибируя каспазы 2 и 8, а с другой, препятствуя освобождению цитохрома С. Уровень ARC регулируется белком p53. Повышение уровня p53 в клетке при окислительном стрессе приводит к снижению экспрессии ARC и одновременно к транскрипционной активации генов *PUMA* и *Bad*, что, в свою очередь, запускает апоптоз [15].

Продукт гена *HSPA1* относится к белкам теплового шока семейства Hsp70. Синтез этих белков индуцируется в ответ на воздействие различных стрессовых факторов — повышения температуры, инфекций, воспаления, химических веществ

и др. Hsp70 выполняет в клетке множество функций — проявляет шаперонную активность, стимулирует иммунный ответ, участвует в транспорте и протеасомозависимой деградации белков, в образовании множественных белковых комплексов и проведении внутриклеточных сигналов. Одна из важных функций Hsp70 — супрессия апоптоза. Этот белок на разных этапах инактивирует компоненты двух главных сигнальных каскадов апоптоза — митохондриального и пути рецепторов фактора некроза опухолей (TNF), таких как JNK-киназа, каспазный каскад, Bid-зависимые пути [16].

Ген FANCG — один из 13 генов, мутации в которых приводят к развитию аутосомно-рецессивного заболевания — анемии Фанкони, характеризующейся повышенной нестабильностью генома в ответ на действие ДНК-повреждающих агентов, а также склонностью к образованию опухолей. FANCG-белки контролируют процесс репарации ДНК по типу гомологичной рекомбинации [17]. Восемь белков FANCG-семейства образуют коровый комплекс в ядре, который обладает предполагаемой убиквитин-Е3-лигазной активностью. В ответ на повреждения ДНК, индуцируемые различными агентами, такими как митомицин С, ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, а также пострепликативными ошибками в S-фазе клеточного цикла, этот белковый комплекс способствует моноубиквитинированию FANCD2. Моноубиквитинированный FANCD2 переносится к местам репарации ДНК, где колокализуется с белками, участвующими в гомологичной рекомбинации [18]. Белок FANCG участвует также в запуске пострепликативной репарации, он может быть вовлечен в контроль клеточного цикла, в частности, в задержку клеточного цикла в фазах G1 и G2 в ответ на ионизирующее и ультрафиолетовое излучение. Показано, что отсутствие гена FANCG в клетках-предшественниках нейронов приводит к их вступлению в апоптоз [18].

Продукт гена SMOC1 принадлежит к семейству белков SPARC (Secreted acid cysteine rich glycoprotein) — белков межклеточного матрикса, участвующих в клеточной дифференцировке при морфогенезе и регенерации ткани. Молекулярные функции белка SMOC1 в развитии млекопитающих изучены пока недостаточно, но показано, что он участвует в процессах дифференцировки и развития различных клеток половых органов в эмбриогенезе мыши [19]. В число генов, регулирующих развитие органов, входит и гомеобокс-содержащий ген *ALX4*. Гомеобокс-содержащие гены кодируют факторы транскрипции с общим ДНК-связывающим доменом, известным как гомеодомен. Эти белки регулируют дифференцировку, пролиферацию и миграцию эукариотических клеток различного типа, активируя или репрессируя экспрессию каскада генов-мишеней.

Ген ALX4 относится к Aristaless-родственным генам — генам белков с гомеодоменом, которые играют важную роль в регуляции эмбриогенеза у позвоночных. Метилирование промоторной области этого гена ассоциировано с несколькими типами рака, в том числе с нейробластомой, раком толстой и прямой кишки и рабдомиобластомой [20].

Ген NES кодирует нестин, белок промежуточных филаментов, основных, наряду с микротрубочками и актиновыми микрофиламентами, компонентов цитоскелета в клетках эукариот. Нестин способствует разборке фосфорилированного виментина промежуточных филаментов в течение митоза и, возможно, играет роль в транспорте и распределении промежуточных филаментов и других клеточных соединений в дочерние клетки. Нестин активно синтезируется клетками-предшественниками глии и нейронов центральной и периферической нервной системы в эмбриогенезе млекопитающих. Экспрессия гена *NES* выявлена в миогенных предшественниках скелетных мышц и сердца, а также при развитии зубной колбы, семенников, волосяных фолликулов кожи [21]. Таким образом, нестин необходим для деления, дифференцировки и миграции различных стволовых клеток в эмбриогенезе, а у взрослого организма ген нестина экспрессируется лишь в небольших клонах клеток-предшественников.

Продукт гена THBS4 относится к семейству тромбоспондинов — кальций-связывающих белков внеклеточного матрикса. Он регулирует адгезию, миграцию и пролиферацию клеток, а также организацию цитоскелета. Высокий уровень экспрессии THBS4 отмечен в сердце, скелетных мышцах, коже, легких, поджелудочной железе, Т-лимфоцитах и т.д. Предполагают, что *THBS4* может быть геном-супрессором опухолевого роста. Промоторная область гена содержит CpG-островок, метилирование которого подавляет экспрессию гена [22].

Ген FOSL1 входит в семейство генов *Fos*, кодирующих белки с так называемой лейциновой застеежкой. Белки этого семейства вместе с белками семейства JUN образуют фактор транскрипции AP-1. Фактор AP-1 обеспечивает ответ клеток на действие факторов роста, цитокинов, нейротрансмиттеров и других межклеточных сигнальных молекул. Функции AP-1 тесно связаны с процессами пролиферации и трансформации клеток [23]. Кроме того, белок FOSL1 непосредственно участвует в процессе эндovasкулярной инвазии трофобласта в стенки спиральных артерий децидуальной оболочки матки [24]. Уровень ядерного FOSL1 возрастает в ходе дифференцировки клеток трофобласта. Нокаут этого белка вызывает нарушение экспрессии ряда генов, регулирующих ремоделирование эндovasкулярной инвазии.

Таким образом, при изучении профиля метилирования ДНК во внезародышевых тканях эмбрионов с нормальным и анеуплоидным кариотипом нами впервые показано, что трисомия хромосомы 16 связана с эпигенетическими модификациями множества локусов генома, а также выявлены функциональные группы генов, изменение статуса метилирования которых может драматически сказаться на эмбриональном развитии.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЗАО “Геноаналитика” (г. Москва) за проведение гибридизации на метилочипе и первичную статистическую обработку результатов гибридизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (ГК № П 806, П 1161 и П 8062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. 2007. *Цитогенетика эмбрионального развития человека*. Санкт-Петербург: Изд-во Н-Л.
2. Kerkel K., Schupf N., Hatta K., et al. 2010. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet.* **6**(11), e1001212.
3. Yuen R.K., Neumann S.M., Fok A.K., et al. 2011. Extensive epigenetic reprogramming in human somatic tissues between fetus and adult. *Epigenet. Chromatin.* **4**(7). doi: 10.1186/1756-8935-4-7.
4. Eckmann-Scholz C., Bens S., Kolarova J., Schneppenheim S., et al. 2012. DNA-methylation profiling of fetal tissues reveals marked epigenetic differences between chorionic and amniotic samples. *PLoS One.* **7**(6), e39014.
5. Griffin D.K. 1996. The incidence, origin and etiology of aneuploidy. *Int. Rev. Cytol.* **167**, 263–296.
6. Hassold T., Jacobs P. 1984. Trisomy in man. *Annu. Rev. Genet.* **18**, 69–97.
7. Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Суханова Н.Н., Харьков В.Н., Лебедев И.Н. 2011. Асимметричная инактивация X-хромосомы у эмбрионов человека с мозаичной трисомией хромосомы 16. *Генетика.* **47**(3), 401–405.
8. Hassold T., Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* **2**(4), 280–291.
9. Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V., et al. 2004. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**(7), 513–520.
10. Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Лебедев И.Н. 2011. Профиль метилирования ДНК в плацентарных тканях человека. *Молекуляр. биология.* **45**(3), 538–545.
11. Bibikova M., Le J., Barnes B., et al. 2009. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay. *Epigenomics.* **1**(1), 177–200.
12. Rakyanc V.K., Down T.A., Thorne N.P., et al. 2008. An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Res.* **18**(9), 1518–1529.
13. Vasques L.R., Klocker M.N., Pereira L.V. 2002. X chromosome inactivation: how human are mice? *Cytogenet. Genome Res.* **99**, 30–35.
14. Kim K., Friso S., Choi S.-W. 2009. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J. Nutr. Biochem.* **20**(12), 917–926.
15. Li Y.Z., Lu D.Y., Tan W.Q., et al. 2008. p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein ARC. *Mol. Cell Biol.* **28**(2), 564–574.
16. Garrido C., Brunet M., Didelot C., et al. 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* **5**(22), 2592–2601.
17. Wilson J.B., Yamamoto K., Marriott A.S., et al. 2008. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene.* **27**(26), 3641–3652.
18. Sii-Felice K., Etienne O., Hoffschir F., et al. 2008. Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J.* **27**(5), 770–781.
19. Pazin D.E., Albrecht K.H. 2009. Developmental expression of Smc1 and Smc2 suggests potential roles in fetal gonad and reproductive tract differentiation. *Dev. Dyn.* **238**(11), 2877–2890.
20. Mahoney S.E., Yao Z., Keyes C.C., Tapscott S.J., Diede S.J. 2012. Genome-wide DNA methylation studies suggest distinct DNA methylation patterns in pediatric embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas. *Epigenetics.* **7**(4), 400–408.
21. Michalczyk K., Ziman M. 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* **20**(2), 665–671.
22. Greco S.A., Chia J., Inglis K.J., et al. 2010. Thrombospondin-4 is a putative tumour-suppressor gene in colorectal cancer that exhibits age-related methylation. *BMC Cancer.* **10**, 494.
23. Турпаев К.Т. 2006. Роль фактора транскрипции AP-1 в интеграции внутриклеточных сигнальных путей. *Молекуляр. биология.* **40**(6), 945–961.
24. Kent L.N., Rumi M.A., Kubota K., Lee D.S., Soares M.J. 2011. FOSL1 is integral to establishing the maternal-fetal interface. *Mol. Cell Biol.* **31**(23), 4801–4813.