УДК: 575.224.29: 618.3

А.А. Кашеварова, Е.А. Саженова, И.Н. Лебедев, С.А. Назаренко

СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ ИМПРИНТИРОВАННОГО ГЕНА *SNRPN* ПРИ РАННЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ГИБЕЛИ У ЧЕЛОВЕКА

ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, Томск

Проведено исследование вклада явлений потери импринтинга и гиперметилирования промоторного региона импринтированного гена *SNRPN* в этиологию ранней эмбриональной летальности у человека. С помощью метилспецифичной полимеразной цепной реакции обследовано 40 эмбрионов человека с цитогенетически установленным нормальным кариотипом, внутриутробная гибель которых была подтверждена с использованием ультразвуковой диагностики беременных женщин. В качестве контрольной группы изучены 8 медицинских абортусов с нормальным кариотипом. Ни у одного из обследованных зародышей не выявлено изменений статуса метилирования гена *SNRPN*. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии заметного вклада эпигенетических модификаций промоторного региона *SNRPN* в этиологию ранней эмбриональной гибели у человека.

Ключевые слова: геномный импринтинг, потеря импринтинга, гиперметилирование ДНК, ранняя эмбриональная гибель

Для человека как биологического вида характерна чрезвычайно высокая частота репродуктивных потерь, при этом доминирующим фактором внутриутробного отбора являются геномные мутации — около половины спонтанных абортусов имеют числовые аномалии хромосомного набора [5]. Вместе с тем другая половина внутриутробно погибших зародышей с нормальным кариотипом представляет собой «белое пятно» в понимании генетических причин внутриутробной селекции. В последнее время интенсивно накапливаются данные, свидетельствующие о значительной роли не только генетических, но и эпигенетических процессов в регуляции раннего эмбрионального развития человека. Основу эпигенетических феноменов составляют наследуемые изменения функций гена, не связанные с нарушениями его первичной нуклеотидной последовательности [2]. Материальной основой подобных изменений являются ковалентные модификации хроматина — метилирование ДНК и посттрансляционные изменения гистонов. Среди эпигенетических явлений особое место занимает геномный импринтинг — механизм, обеспечивающий дифференциальную моноаллельную экспрессию генов в зависимости от родительского происхождения. К настоящему времени у человека идентифицировано около 70 импринтированных генов, значительная часть которых играет важную роль в обеспечении нормального эмбрионального и постнатального развития [12].

Нарушение функций импринтированных локусов может быть визуализировано через феномен однородительских дисомий (ОРД) — явления, при котором организм наследует две гомологичные хромосомы от одного из родителей. В результате однородительского наследования гомологов организм получает либо две копии функционально неактивных аллелей импринтированных генов, либо удвоенную дозу продукта экспрессирующихся аллелей. В исследованиях на мышах было показано, что ОРД по хромосомам, несущим импринтированные гены (2, 7, 11, 12, 17), приводит к ранней эмбриональной гибели [3]. Результаты аналогичных исследований на спонтанно абортированных зародышах человека, выполненные в том числе и в нашей лаборатории [1], напротив, свидетельствуют о незначительной роли ОРД в этиологии ранней эмбриональной летальности.

Следует отметить, что однородительское наследование хромосом является не единственным механизмом нарушения функций импринтированных локусов генома. Среди других механизмов следует отметить нарушения статуса метилирования промоторных регионов импринтированных генов. В случае гиперметилирования промотора активного аллеля в клетке полностью исчезают продукты конкретного импринтированного гена. При гипометилировании промотора неактивного алелля, напротив, наблюдается биаллельная экспрессия импринтированного локуса — явление «потери импринтинга». Очевидно, что подобные эпигенетические модификации (эпимутации) эквиваленты по своему фенотипическому эффекту однородительскому наследованию, однако

не связаны, как ОРД, с нарушениями сегрегации хромосом. В литературе известны данные о значимости указанных надмолекулярных изменений в патогенезе злокачественных новообразований [4], интенсивно накапливаются сведения о высоком риске эпимутаций среди детей, рожденных в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий [12]. Кроме того, имеются сообщения о формировании полного пузырного заноса биродительского происхождения в случае гипометилирования импринтированных генов материнского происхождения, в результате чего они приобретают отцовский эпигенотип [6].

Таким образом, можно предположить, что негативный эффект нарушений импринтированных локусов генома на течение эмбрионального развития человека может быть визуализирован не только через феномен ОРД, но и через надмолекулярные изменения в структуре хроматина, связанные с ковалентным метилированием CpG-динуклеотидов в промоторной области. С целью проверки данной гипотезы мы провели пилотное исследование статуса метилирования гена *SNRPN* (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptid N — полипептид N малого ядерного рибонуклеопротеина) у внутриутробно погибших зародышей человека на ранних этапах развития. Этот ген локализован в регионе 15q11-q13 и содержит в своем промоторе так называемый центр импринтинга, устанавливающий и координирующий моноаллельную экспрессию кластера импринтированных генов хромосомы 15. В норме экспрессия *SNRPN* проходит исключительно с отцовского гомолога, в то время как на материнской хромосоме промотор данного гена оказывается метилированным и функционально неактивным [15].

Методика

В работе исследованы выборки кариотипически нормальных медицинских и спонтанных абортусов человека I триместра беременности. Спонтанные абортусы были разделены на две группы, различающиеся по степени тяжести нарушения эмбрионального развития: анэмбрионии (АЭ) и неразвивающиеся беременности (НБ). Объем выборок составил 9 зародышей при АЭ и 31 — при НБ. Срок, до которого продолжалось развитие плодных оболочек в полости матки, варьировал от 5 до 9 недель при АЭ и от 6 до 11 недель при НБ и составил в среднем 7,2±1,5 и 7,6±1,2 недели соответственно. В качестве контрольной группы обследованы 8 медицинских абортусов, полученных от здоровых женщин на 6-9-й неделях беременности, в среднем 7,8±0,4 недели, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Эмбриональный материал был собран за период с 1997 по 2003 гг. в ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН г. Томска, цитогенетически обследован и хранился в банке экстраэмбриональных тканей при -70 °С.

ДНК выделяли из цитотрофобласта хориона и экстраэмбриональной мезодермы по стандартной методике с последующей обработкой бисульфитом натрия, амплификацией методом метилспецифичной полимеразной цепной реакции [13] и визуализацией фрагментов в 3% агарозном геле в ультрафиолетовом свете на приборе «Gel-Doc» («Bio-Rad», USA).

Результаты

Для получения информации о статусе метилирования промоторного региона гена *SNRPN* на ранних стадиях эмбрионального развития были исследованы экстраэмбриональные ткани (цитотрофобласт хориона и экстраэмбриональная мезодерма) 8 медицинских абортусов. Показано, что статус метилирования этой области в разных экстраэмбриональных тканях медицинских абортусов одинаков: на электрофореграмме одновременно присутствуют продукты метилспецифичной амплификации материнского и отцовского аллелей, размером 174 и 100 п.о. соответственно *(Рисунок)*. Такая картина соответствует статусу метилирования промоторного региона гена *SNRPN* в соматических тканях здорового человека и рассматривается как норма.

На следующем этапе определяли статус метилирования промоторного региона гена *SNRPN* в разных экстраэмбриональных тканях (цитотрофобласт хориона и экстраэмбриональная мезодерма) 40 спонтанных абортусов. В результате проведенного анализа не обнаружено ни одного случая нарушения импринтинга гена *SNRPN* среди спонтанных абортусов по сравнению с

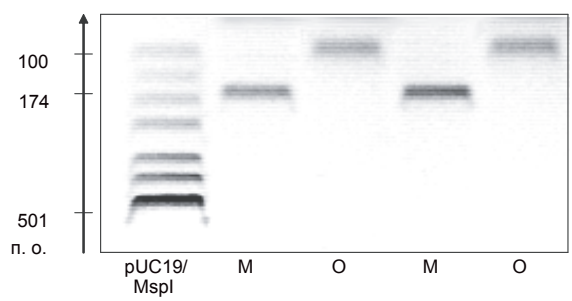

Рис. **Электрофоретический анализ продуктов метилспецифичной полимеразной цепной реакции гена *SNRPN***
Слева от электрофореграммы вертикальная ось, указывающая направление движения продуктов ПЦР снизу вверх. Отметки на оси: 501 (соответствует нижнему фрагменту pUC19/MspI), 174 (соответствует уровню фрагментов М), 100 (соответствует уровню фрагментов О). Первая вертикальная дорожка — pUC19/MspI; Вторая и четвертая вертикальные дорожки — М; Третья и пятая вертикальные дорожки — О. М — материнский аллель, О — отцовский аллель.

медицинскими. И, соответственно, не выявлено различий в статусе метилирования данного гена в производных различных зародышевых листков.

Данные по частоте встречаемости явления потери импринтинга и гиперметилирования промоторных областей импринтированных генов среди внутриутробно погибших эмбрионов человека в литературе нами не обнаружены. Интенсивно накапливаются результаты исследования эпигенетических нарушений при опухолевой патологии. Так, например, изменение импринтинга гена *IGF2* описано при более чем 20 различных типах опухолей, в том числе при раке печени, груди, поджелудочной железы, толстой кишки [8]. Потеря импринтинга *IGF2* встречается в 30% случаев у больных колоректальным раком [11], в 50-70% случаев при опухоли Вильмса и эмбриональном почечном раке [10]. Исходя из этих данных, средняя частота встречаемости данного явления при патологических фенотипах составляет около 47,8%. В норме же, по данным Хенгми с соавторами [11], потеря импринтинга гена *IGF2* отмечена у 10% практически здоровых людей. Эта величина совпадает с полученной при исследовании статуса метилирования данного гена в лимфоцитах периферической крови у японцев [9]. Другим вариантом нарушения импринтинга является гиперметилирование промоторных областей импринтированных генов, также наиболее активно изучаемое при опухолях [4]. Справедливо предположить, что данные изменения, затрагивающие импринтированные гены, контролирующие пролиферацию и дифференцировку тканей трофобласта и собственно эмбриона на ранних стадиях онтогенеза, могут приводить и к ранней гибели зародыша.

В нашем исследовании не было обнаружено ни одного случая нарушения импринтинга среди спонтанных абортусов человека I триместра беременности. Вероятно, изменение статуса метилирования центра импринтинга на хромосоме 15 человека не оказывает заметного влияния на течение внутриутробного периода онтогенеза.

С целью определения возможных негативных эффектов нарушений статуса метилирования промотора импринтированного гена на течение эмбрионального развития мы дифференцировали спонтанных абортусов на две группы, различающиеся по степени тяжести нарушений эмбриогенеза. При проведении исследования мы не обнаружили изменений статуса метилирования гена *SNRPN* в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях с различной степенью нарушений дифференцировки — как в случае АЭ, при которых дифференцировка производных эпибласта блокируется уже на этапе обособления внутренней клеточной массы, так и при НБ с более продолжительной степенью развития эпибласта. Как АЭ, так и НБ характеризуются хорошо развитой плацентой, тогда как при АЭ сформированный эмбрион в полости матки отсутствует, а при НБ развитие эмбриона полностью останавливается при продолжающейся беременности.

В своем исследовании мы также выполнили анализ статуса метилирования гена *SNRPN* в цитотрофобласте хориона и экстраэмбриональной мезодерме. Цитотрофобласт является стволовой линией клеток плацентарных тканей, тогда как экстраэмбриональная мезодерма является производной эпибласта, дифференцирующегося из внутренней клеточной массы бластоцисты. Можно предположить, что поскольку геномный импринтинг в значительной степени ответственен за контроль взаимоотношений «мать-плод», то его нарушения именно в плацентарных тканях, по сравнению с тканями собственно эмбриона, могут быть ассоциированы с гибелью зародышей человека на ранних этапах эмбрионального развития. Дополнительным аргументом, обосновывающим необходимость исследования статуса метилирования гена *SNRPN* отдельно в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях, является независимость протекания процессов метилирования в них друг от друга [7]. Метилирование активно идет в эмбриональной эктодерме и мезодерме, дающих начало эмбриону. В то время как трофобласт, участвующий в образовании плаценты, долго остается гипометилированным. Учитывая разную скорость метилирования и возможные дефекты ферментов ДНК-метилтрансфераз, участвующих в поддержании статуса метилирования импринтированных генов, кажется целесообразным изучить статус метилирования импринтированных генов в производных разных зародышевых листков. Однако в результате проведенного исследования нарушения статуса метилирования как в цитотрофобласте, так и в экстраэмбриональной мезодерме выявлены не были.

Рабочая гипотеза настоящего исследования базировалась на двух основных предположениях. Во-первых, нарушения импринтированной экспрессии гена *SNRPN* у мышей вследствие ОРД сопровождаются эмбриональной гибелью [15]. Учитывая эволюционную консервативность геномов млекопитающих, возможно, что подобные летальные эффекты могут наблюдаться и у человека. Во-вторых, принимая во внимание достаточно низкий вклад (1,8%) собственно ОРД в гибель эмбрионов человека [1], можно допустить, что летальный эффект нарушений геномного им-

принтинга связан скорее с надмолекулярными изменениями в структуре хроматина, чем с аномалиями сегрегации хромосом, приводящими к формированию ОРД. Однако было бы неправильно полностью исключать вклад ОРД в структуру ранней эмбриональной гибели человека, поскольку до сих пор не выявлено ни одного случая нарушения импринтинга по хромосомам 11, 12, 18 и 19 ни среди живорожденных индивидов, ни среди эмбрионов. Вероятно, данные нарушения могут приводить к прерыванию беременности на еще более ранних этапах.

Результаты анализа статуса метилирования гена *SNRPN* у 40 внутриутробно погибших зародышей человека с нормальным кариотипом не продемонстрировали никаких отклонений от нормального состояния, свойственного как проанализированным нами нормальным зародышам человека, так и характерному для постнатального онтогенеза. Такой результат может свидетельствовать о следующем. Во-первых, эпигенетические механизмы, в отличие от генетических факторов, определяющие гибель эмбрионов в результате нарушения экспрессии импринтированных локусов, существенно различаются у млекопитающих, далеко отстоящих друг от друга на эволюционной лестнице. Вполне возможно, что сам феномен геномного импринтинга, появившийся у млекопитающих примерно 150 млн лет назад, до сих пор остается объектом эволюционных преобразований. Во-вторых, функционирование гена *SNRPN* у человека, возможно, не является критическим для нормального протекания эмбрионального развития. Это подтверждается оригинальными данными, полученными при анализе сегрегации импринтированных локусов в нескольких поколениях родословной [14]. В своем исследовании А.К. Наумова с соавторами проверяли гипотезу о том, что отклонение от Менделевской сегрегации аллелей «1:1» среди потомков связано с нарушением импринтированной экспрессии генов, передаваемых от бабушек и дедушек к их внукам. Изменение отношения «1:1» может быть связано с селекцией до оплодотворения (мейотический драйв), во время и после оплодотворения (эмбриональная гибель). Нарушение импринтинга может происходить как вследствие неспособности удалить родительский эпигенотип в гаметогенезе, так и при дефектах установления эпигенотипа *de novo* в клетках зародышевой линии и в соматических тканях. В исследование А.К. Наумова с соавторами взяли гены, предположительно критические для эмбрионального развития, и проследили наследование этих генов в трех поколениях. Отклонение от соотношения «1:1» было обнаружено для генов регионов 11p15.5, 11p13, а также для материнских аллелей локусов 6q25-q27 и 11p15 и отцовских аллелей локуса 7q11-12. В данных районах расположены импринтированные гены, необходимые для развития зародыша, влияющие на эмбриональный рост или экспрессирующиеся в плаценте. По-видимому, действительно, нарушение импринтинга этих генов может привести к эмбриональной гибели. Отклонение от Менделевского соотношения не было обнаружено для генов, вероятно, не являющихся критическими для эмбрионального развития, расположенных в районе 13q14 и 15q11-q13.

Несмотря на отсутствие заметного вклада нарушений статуса метилирования промотора *SNRPN* в этиологию ранней эмбриональной гибели у человека, дальнейшее продолжение исследований, в частности по другим импринтированным областям генома, представляется целесообразным. Основанием для этого служат накапливающиеся данные о возможном возникновении такой патологии, как полный пузырный занос при нормальном (биродительском) кариотипе, однако с гипометилированием импринтированных локусов на материнских хромосомах [6]. Интересно отметить, что гипометилирование дифференциально метилированного региона гена *KCNQ1OT* и *SNRPN* на материнских хромосомах зарегистрировано и у детей с синдромами Видемана-Беквита и Энгельмана, родившихся в результате использования процедур вспомогательных репродуктивных технологий [12]. Не исключено, что в основе нарушений эмбрионального периода развития человека лежат еще не изученные типы аберраций эпигенетического контроля онтогенеза.

Заключение

Результаты проведенного исследования указывают на то, что изменение статуса метилирования промоторного региона гена *SNRPN* не вносит заметного вклада в гибель кариотипически нормальных зародышей человека в период с 5-й по 11-ю недели эмбрионального развития. Вероятно, этот ген не является критическим для нормального течения раннего эмбриогенеза. Тем не менее не исключено, что нарушения функций других импринтированных генов через механизмы эпимутаций могут приводить к эмбриональной летальности у человека. Для решения вопроса о наличии внутриутробного отбора при эпимутациях импринтированных локусов у человека необходимо дальнейшее накопление материала на более значительных по объему выборках спонтанных абортусов, а также с включением в анализ тех импринтированных генов, функционирование которых существенно для эмбрионального развития.

METHYLATION STATUS OF THE IMPRINTED *SNRPN* GENE IN HUMAN SPONTANEOUS ABORTIONS

A.A. Kashevarova, E.A. Sazhenova, I.N. Lebedev, S.A. Nazarenko

The loss of imprinting and promoter region *SNRPN* hypermethylation contribution into the aetiology of early human embryo lethality were studied. Forty human embryos were analysed by methyl-specific PCR-test. Normal karyotype was observed in all studied embryos after conventional cytogenetic analysis. Embryo death was confirmed by ultrasound diagnosis of pregnant women. Eight karyotypically normal induced abortions were investigated as a control group. No cases of aberrant imprinting of *SNRPN* gene were found. Our dates suggest that aberrant imprinting of the *SNRPN* gene promoter region doesn't play a significant role in prenatal selection of human embryos with normal karyotype.

Литература

1. Оценка роли однородительской дисомии в ранней эмбриональной летальности человека / Т.В. Никитина, Е.А. Саженова, Н.Н. Суханова и др. // Онтогенез. — 2004. — Т. 3. — № 4. — С. 297-306.

2. *Bird, A.* DNA methylation patterns and epigenetic memory / A. Bird // Gen. and Develop. — 2002. — Vol. 16. — P. 6-21.

3. *Cattanach, B.M.* Genomic imprinting in the mouse: Implications for gene regulation / B.M. Cattanach, J. Jones // J. Inher. Met. Dis. — 1994. — Vol. 17. — № 4. — P. 403-421.

4. Costello, J.F. Methylation matters / J.F. Costello, C. Plass // J. Med. Genet. — 2001. — Vol. 38. — P. 285-303.

5. Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism / D.K. Griffin, E.A. Millie, T.J. Hassold, M.V. Zaragoza // Am. J. Med. Genet. — 1997. — Vol. 72. — P. 297-301.

6. *Devriendt, K.* Hydatidiform mole and triploidy: the role of genomic imprinting in placental development / K. Devriendt // Hum. Reprod. Update. — 2005. — Vol. 11. — № 2. — P. 137-142.

7. DNA methylation of the extraembrionic tissues: an in situ study on human metaphase chromosomes / N. Kokalj-Vokac, A. Zagorac, M. Pristovnik et al. // Chromos. Res. — 1998. — Vol. 6. — P. 161-166.

8. *Dnmt1* overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality / D. Biniszkiewicz, J. Gribnau, B. Ramsahoye et al. // Mol. Cell. Biol. — 2002. — Vol. 22. — № 7. — P. 2124-2135.

9. Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal populations / T. Sakatani, M. Wei, M. Katoh et al. // Biochem. Biophis. Res. Commun. — 2001. — Vol. 283. — P. 1124-1130.

10. *Feinberg, A.P.* DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms /A.P. Feinberg, H. Cui, R. Ohlsson // Sem. Cancer Biol. — 2002. — Vol. 12. — P. 389-398.

11. *Hengmi, C.* Loss of *IGF2* imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk / C. Hengmi, M. Cruz-Crrea, F.M. Giardiello // Science. — 2003. — Vol. 299. — P. 1753-1755.

12. *Maher, E.R.* Imprinting and assisted reproductive technology / E.R. Maher // Hum. Mol. Genet. — 2005. — Vol. 14. — Review Issue 1. — R. 133-138.

13. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis / T. Kubota, S. Das, L.S. Christian et al. // Nat. Genet. — 1997. — Vol. 16. — P. 16-17.

14. *Naumova, A.K.* Imprinting and deviation from Mendelian transmission ratios / A.K. Naumova, C. Greenwood, K. Morgan // Genome. — 2001. — Vol. 44. — P. 311-320.

15. *Nicholls, R.D.* Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes / R.D. Nicholls, J.L. Knepper // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. — 2001. — Vol. 2. — P. 153-175.