

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ  
ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ КАК ФАКТОР РИСКА  
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ\***

Целью данного исследования явился поиск эпимутаций импринтированных локусов *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*, *IGF2/H19*, *PLAGL1*, *SNRPN* и *MEG3* при ранней внутриутробной гибели эмбрионов человека. Анализ статуса метилирования показал наличие эпимутаций в генах *KCNQ1OT1* и *PLAGL1*: 8 из 84 (9,5 %) и 9 из 87 (10,3 %) эмбрионов, соответственно, показали потерю импринтинга на материнских хромосомах, которая была обнаружена либо в экстраэмбриональной мезодерме, либо в цитотрофобласте хориона, что свидетельствует о соматическом происхождении эпимутаций на постимплантационных этапах развития. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют в пользу гипотезы о проявлении эпигенетической изменчивости в потомстве супружеских пар с проблемами в репродукции.

*Ключевые слова:* вспомогательные репродуктивные технологии, эпимутации импринтированных генов.

В последнее время накапливаются данные о повышенном риске рождения детей с болезнями геномного импринтинга после применения методов искусственного оплодотворения. На сегодняшний день известно 5 случаев рождения детей с синдромом Энгельмана (СЭ), 4 с синдромом Рассела – Сильвера (СРС) и 60 случаев с синдромом Видеманна – Беквита (СВБ) после применения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) [1]. В большинстве случаев отмеченные синдромы возникают спорадически, а молекулярные причины, лежащие в основе их формирования, могут быть различными. Так, делеции 15q11-q13 на материнской хромосоме, однопородительское наследование (ОРД) обоих гомологов хромосомы 15 от отца, точковые мутации в гене *UBE3A* наблюдаются в большинстве случаев СЭ. В редких случаях (около 5 %) обнаруживаются мутации в дифференциально метилированном центре импринтинга *SNURF-SNRPN* на хромосо-

ме 15 материнского происхождения. СВБ возникает в результате нарушения экспрессии импринтированных генов в регионе 11p15.5. Примерно у 20 % пациентов обнаруживается ОРД хромосомы 11 отцовского происхождения, в редких случаях отмечаются дупликации региона 11p15 на отцовском гомологе, инверсии или транслокации материнской хромосомы 11, в 5 % случаев имеется гиперметилирование импринтированного локуса *IGF2/H19*. В большинстве же случаев (60–70 %) причиной СВБ становится гипометилирование дифференциально метилированного регуляторного региона KvDMR1 в гене *KCNQ1OT1*. Причиной СРС может быть наличие у ребенка ОРД хромосомы 7 или дупликации 7p11.2-p13 материнского происхождения, гиперметилирование *PEG1/MEST* на отцовском гомологе хромосомы 7. Однако наиболее частым этиологическим нарушением оказывается гипометилирование импринтированного локуса *IGF2/H19* на хромосоме 11 отцовского происхождения. Несмотря на столь широ-

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08-04-01344) и государственных контрактов Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (№ П303 и П806).

кий спектр хромосомных, генных и эпигенетических аномалий, обуславливающих развитие болезней геномного импринтинга, у подавляющего большинства детей, рожденных после применения методов искусственного оплодотворения, для которых была проведена молекулярно-генетическая диагностика заболеваний, выявлены нарушения статуса метилирования импринтированных генов.

Среди гипотез, объясняющих подобное явление, доминирует предположение о том, что используемые для культивирования гамет и эмбрионов среды, а также протоколы гормональной гиперстимуляции яичников могут не обеспечивать нормального установления и поддержания импринтинга в период тотальных эпигенетических модификаций генома. Альтернативная точка зрения предполагает, что регистрируемые с повышенной частотой нарушения статуса метилирования (эпимутации) являются следствием искусственного преодоления некоторых репродуктивных барьеров у супружеских пар с бесплодием, ведущего к появлению скрытой эпигенетической мутационной изменчивости [2]. Однако до настоящего времени остается неизвестной частота подобных эпимутаций при нарушениях развития организма в естественных циклах, не связанных с применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Получение таких данных может явиться важным в объективной оценке эпигенетического риска, связанного с применением таких методов.

**Цель** нашего исследования заключалась в поиске нарушений эпигенетического статуса импринтированных локусов *SNURF-SNRPN*, *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*, *IGF2/H19*, *PLAGL1* и *MEG3* при ранней внутриутробной гибели эмбрионов человека. Основным критерием включения генов в данное исследование было наличие опубликованных случаев с эпимутациями у детей, родившихся с использованием методов искусственного оплодотворения. Кроме того, учитывался недавно описанный феномен нарушений эпигенетического статуса ряда импринтированных генов при СББ, транзиторном неонатальном сахарном диабете и особо выделенном синдроме «материнского гипометилирования» [3].

## Материал и методы

Обследованы спонтанные абортусы первого триместра беременности, полученные от женщин с клиническими диагнозами анэмбриония и неразвивающаяся беременность. Структура и объем исследуемых выборок представлены в таблице (см. ниже). Информация об акушерско-гинекологическом анамнезе матерей была получена из медицинских направлений на цитогенетическое обследование абортивного материала. В качестве контрольной группы были изучены плацентарные ткани медицинских абортусов первого триместра беременности, полученных от здоровых женщин, не желавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Для проведения настоящего исследования было получено информированное согласие от всех супружеских пар. Данное исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН (протокол № 2 от 22.04.2010).

Анализ дифференциального метилирования импринтированных генов и центров импринтинга проводили в образцах геномной ДНК, выделенных из некультивированных тканей цитотрофобласта хориона (ЦХ) и экстраэмбриональной мезодермы (ЭМ), как производных зародышевых листков, отличающихся по характеру эпигенетического репрограммирования генома на ранних этапах. Выделение ДНК осуществляли по стандартной методике с использованием протеиназы К с последующей очисткой фенол / хлороформом. Далее проводили метил-специфичную или метил-чувствительную ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров и условий, описанных в литературе [4–9]. После амплификации фрагменты ДНК фракционировали в 2 %-м агарозном геле и визуализировали в проходящем УФ свете с использованием геледокументирующей системы GelDoc («Bio-Rad», США).

## Результаты исследования и обсуждение

Статус метилирования импринтированных локусов *CDKN1C* и *IGF2/H19*, расположенных на хромосоме 11 (11p15.5), а также *SNURF-SNRPN* (15q11-q13) и *MEG3*

## Структура и объем исследованных выборок

Локусы	Группа эмбрионов	Число эмбрионов			Продолжительность внутри-утробного развития (недель)	Возраст матерей (лет)
		ЭМ	ЦХ	обеткани		
IGF2/H19 (ЦИ1)	Гиперплазия трофобласта ( $n = 30$ )	28	28	26	8,5 ± 1,6	25,3 ± 5,0
	Дегенерация клеточных культур <i>in vitro</i> ( $n = 30$ )	30	30	30		
	Медицинские абортусы (контроль, $n = 24$ )	24	24	24	9,6 ± 0,24	26,9 ± 1,9
KCNQ1OT1 (ЦИ2)	Гиперплазия трофобласта ( $n = 30$ )	28	28	26	8,5 ± 1,6	25,3 ± 5,0
	Дегенерация клеточных культур <i>in vitro</i> ( $n = 54$ )	50	54	50		
	Медицинские абортусы (контроль, $n = 24$ )	24	24	24	9,6 ± 0,24	26,9 ± 1,9
CDKN1C	Гиперплазия трофобласта ( $n = 30$ )	28	28	26	8,5 ± 1,6	25,3 ± 5,0
	Дегенерация клеточных культур <i>in vitro</i> ( $n = 30$ )	30	30	30		
	Медицинские абортусы (контроль, $n = 24$ )	24	24	24	9,6 ± 0,24	26,9 ± 1,9
SNURF-SNRPN	Гиперплазия трофобласта ( $n = 30$ )	28	28	26	8,5 ± 1,6	25,3 ± 5,0
	Дегенерация клеточных культур <i>in vitro</i> ( $n = 30$ )	30	30	30		
	Медицинские абортусы (контроль, $n = 24$ )	24	24	24	9,6 ± 0,24	26,9 ± 1,9
PLAGL1	Гиперплазия трофобласта ( $n = 34$ )	30	30	26	8,3 ± 1,8	26,1 ± 5,4
	Дегенерация клеточных культур <i>in vitro</i> ( $n = 53$ )	50	53	50		
	Медицинские абортусы (контроль, $n = 30$ )	30	30	30	8,9 ± 0,4	26,9 ± 1,9
MEG3	Гиперплазия трофобласта ( $n = 34$ )	30	30	26	8,3 ± 1,8	26,1 ± 5,4
	Дегенерация клеточных культур <i>in vitro</i> ( $n = 53$ )	50	53	50		
	Медицинские абортусы (контроль, $n = 30$ )	30	30	30	8,9 ± 0,4	26,9 ± 1,9

(14q32) у всех обследованных эмбрионов в обоих типах плацентарных тканей соответствовал норме. В то же время статус метилирования в регуляторном центре импринтинга KCNQ1OT1 (11p15.5) и в гене PLAGL1 (6q23-q24) отличался от нормаль-

ного состояния. У 8 из 84 обследованных спонтанных абортусов (9,5 %) было зарегистрировано гипометилирование KCNQ1OT1 на материнском гомологе. Свидетельством гипометилирования явилось отсутствие на электрофореграмме продукта метил-чув-

ствительной ПЦР размером 400 п. н., соответствующего материнскому метилированному аллелю. У 7 из 8 спонтанных абортусов с эпимутациями выявленные нарушения статуса метилирования затрагивали только одну ткань, т. е. обнаруживались либо в ЭМ (5 эмбрионов), либо в ЦХ (2 зародыша). Еще у одного зародыша для обследования оказалась доступной только ЭМ.

Анализ импринтинга гена *PLAGL1* продемонстрировал гипометилирование данного локуса на материнском гомологе у 9 из 87 (10,3 %) обследованных спонтанных абортусов. Как и в случае с эпимутациями в *KCNQ1OT1*, потеря импринтинга затрагивала только одну ткань и обнаруживалась либо в ЭМ (5 эмбрионов), либо в ЦХ (3 эмбриона). У одного эмбриона для анализа был доступен только ЦХ. Тканеспецифичность эпимутаций в локусах *KCNQ1OT1* и *PLAGL1* указывает на их соматическое происхождение и свидетельствует о нарушении процессов поддержания геномного импринтинга на материнских хромосомах в клетках развивающихся эмбрионов на постимплантационных этапах онтогенеза.

Принципиально важным является тот факт, что, по крайней мере в отношении локуса *KCNQ1OT1*, нарушения статуса метилирования которого являются основной причиной развития СВБ у детей, родившихся после ЭКО или ИКСИ, выявленные нами эпимутации выходят за временные границы манипуляций с гаметам и эмбрионами в искусственных средах, проводимых в рамках процедур ВРТ. Иными словами, возникновение эпимутаций импринтированных генов с относительно высокой частотой (порядка 10 %) может наблюдаться и в естественных репродуктивных циклах. Это положение, в свою очередь, поддерживает гипотезу о проявлении скрытой генетической (или эпигенетической) изменчивости в потомстве супружеских пар с нарушениями репродукции.

Примечательно, что у двух эмбрионов соматические эпимутации были выявлены как в локусе *PLAGL1*, так и в центре импринтинга *KCNQ1OT1*, при этом они были ограничены ЭМ и затрагивали материнские хромосомы. Интересно также отметить, что у матерей данных эмбрионов не было ни одной благополучно завершённой беременности. В одном случае женщина имела 4 спонтанных выкидыша, в другом – два

спонтанных аборта и одного мертворожденного ребенка.

В обследованных нами выборках частотаотягощенного акушерского анамнеза (ОАА) у матерей, имевших спонтанных абортусов с эпимутацией и без эпимутации в *KCNQ1OT1*, не отличалась – 43 % (3 из 7 женщин) и 42 % (21 из 50 женщин) соответственно. В расчет были включены только те женщины, которые имели две и более незавершённые беременности. В то же время при изучении анамнеза женщин, имевших спонтанный выкидыш с признаками гиперплазии трофобласта, была отмечена тенденция к увеличению частоты ОАА в случае выявления эпимутации. У 3 из 5 женщин (60 %) со спонтанными абортусами, несущими эпимутации, имелись повторные случаи невынашивания беременности, тогда как среди 16 женщин с эмбрионами без эпимутаций ОАА был зарегистрирован только у четырех (25 %,  $P = 0,18$ ). Что касается гена *PLAGL1*, то эпимутации в нем в тканях зародыша статистически значимо чаще регистрировались в группе женщин с ОАА, имевших три и более спонтанных аборта: 33,3 % в группе с эпимутациями и только 7,7 % без эпимутаций ( $P < 0,05$ ).

Анализируя результаты, полученные нами при обследовании спонтанных абортусов, следует отметить, что эпимутации центра импринтинга *KCNQ1OT1* обнаруживаются у 60 % больных с СВБ, рожденных в естественных циклах, и выявлены практически у всех детей с этим синдромом, родившихся в результате применения ЭКО или ИКСИ. Кроме того, было показано, что эпимутации *KCNQ1OT1* могут сопровождаться гипометилированием других импринтированных последовательностей в хромосомных регионах 6q24, 7q32 и 15q13. Частота таких случаев достигала 37 % после ЭКО и только 6,4 % у детей с СВБ, рожденных без его применения [10]. Действительно, в нашем исследовании также было выявлено два эмбриона с гипометилированием импринтированных локусов *KCNQ1OT1* и *PLAGL1*. Как правило, СВБ является спорадическим, однако в одной семье было описано два ребенка с этим заболеванием, родившихся без использования процедур ЭКО, которые имели эпимутации локуса *KCNQ1OT1*. Примечательно, что у матери пробандов была идентифицирована мутация сдвига рамки считывания в гене *NLRP2*,

расположенного в 19q13.4, который может быть вовлечен в установление импринтинга в оогенезе [11].

Гипометилирование в гене *PLAGL1* является у детей с транзиторным неонатальным сахарным диабетом (ТНСД). В то же время данный синдром может сопровождаться и гипометилированием в *KCNQ1OT1*, а эпимутации *PLAGL1* могут вносить вклад и в формирование некоторых признаков СВБ через нарушение экспрессии локусов *CDKN1C* и *KCNQ1OT1*. Данные наблюдения свидетельствуют о существовании особого метаболического пути, объединяющего эти гены, и участвующего в регуляции клеточного роста [12; 13]. Продуктом гена *PLAGL1* является транскрипционный фактор, вовлеченный в контроль клеточного цикла и аутокринную регуляцию секреции инсулина в поджелудочной железе. Он подавляет клеточный рост и экспрессируется только с отцовского гомолога. Поэтому гипометилирование этого гена может привести к уменьшению пролиферативной активности клеток.

### Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют возможность возникновения эпимутаций импринтированных генов и центров импринтинга с повышенной частотой в естественных циклах, свидетельствуя в пользу гипотезы о проявлении эпигенетической изменчивости в супружеских парах с проблемами в репродукции и особенно с привычным невынашиванием беременности. Безусловно, популяционная частота болезней геномного импринтинга является чрезвычайно низкой, и поэтому нет оснований для проведения преимплантационного скрининга эмбрионов на предмет эпигенетических нарушений [1]. Более того, такой анализ представляет ряд существенных методических затруднений, связанных с исследованием характера метилирования ДНК в единичных клетках. Вместе с тем накапливающиеся данные о молекулярно-генетических основах нарушений установления и поддержания геномного импринтинга (мутации в генах контроля импринтинга, полиморфизмы в импринтированных центрах) [11; 14; 15] открывают перспективу диагностики носительства таких му-

тационных вариантов в супружеских парах с нарушениями репродукции.

### Список литературы

1. Owen C. M., Segard J. H. Imprinting disorders and assisted reproductive technology // *Semin. Reprod. Med.* 2009. Vol. 27. P. 417–428.
2. Horsthemke B., Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective // *Hum. Reprod. Upd.* 2005. Vol. 11. P. 473–482.
3. Mackay D. J., Boonen S. E., Clayton-Smith J., Goodship J., Hahnemann J. M., Kant S. G., Njolstad P. R., Robin N. H., Robinson D. O., Siebert R., Shield J. P., White H. E., Temple I. K. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus // *Hum. Genet.* 2006. Vol. 120. P. 262–269.
4. Kubota T., Das S., Christian L. S., Baylin S. B., Herman J. G., Ledbetter D. H. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis // *Nat. Genet.* 1997. Vol. 16. P. 16–17.
5. Engel J. R., Smallwood A., Harper A., Higgins M. J., Oshimura M., Reik W., Schofield P. N., Maher E. R. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome // *J. Med. Genet.* 2000. Vol. 37. P. 921–926.
6. Poon L. L., Leung T. N., Lau T. K., Chow K. C. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma // *Clin. Chem.* 2002. Vol. 48. P. 35–41.
7. Li Y., Hirokazu N., Ohno T. Aberrant DNA methylation of p57kip2 gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype // *Blood.* 2002. Vol. 100. P. 2572–2577.
8. Abdollahi A., Pisarcik D., Roberts D., Weinstein J., Cairns P., Hamilton T. C. *LOT1 (PLAGL1/ZAC1)*, the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24–25, is epigenetically regulated in cancer // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 6041–6049.
9. Murphy S. K., Wylie A. A., Coveler K. J., Cotter P. D., Papenhausen P. R., Sutton V. R., Shaffer L. G., Jirtle R. L. Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy // *Hum. Mutat.* 2003. Vol. 22. P. 92–97.
10. Lim D., Bowdin S. C., Tee L., Kirby G. A., Blair E., Fryer A., Lam W., Oley C., Cole T., Brueton L. A., Reik W., Macdonald F., Maher E. R. Clinical and molecular genetic features

of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies // *Hum. Reprod.* 2009. Vol. 24. P. 741–747.

11. Meyer E., Lim D., Pasha S., Tee L. J., Rahman F., Yates J. R., Woods C. G., Reik W., Maher E. R. Germline Mutation in *NLRP2* (*NALP2*) in a Familial Imprinting Disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome) // *PLoS Genet.* 2009. Vol. 5. P. e1000423 (1–5).

12. Arima T., Kamikihara T., Hayashida T., Kato K., Inhoe T., Shirayoshi Y., Oshimura M., Soejima H., Mukai T., Wake N. *ZAC*, *LIT1* (*KCNQ1OT1*) and *p57<sup>KIP2</sup>* (*CDKN1C*) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. P. 2650–2660.

13. Mackay D. J., Hahnemann J. M., Boonen S. E., Poerksen S., Bunyan D. J., White H. E., Durston V. J., Thomas N. S., Robinson D. O., Shield J. P., Clayton-Smith J., Temple I. K. Epimutation of the TNDM locus and the Beckwith-Wiedemann syndrome centromeric locus

in individuals with transient neonatal diabetes mellitus // *Hum. Genet.* 2006. Vol. 119. P. 179–84.

14. Ostojic S., Perez N., Volk M., Kapovic M., Peterlin B. Genetic Predisposition to Idiopathic Recurrent Spontaneous Abortion: Contribution of Genetic Variations in *IGF-2* and *H19* Imprinted Genes // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008. Vol. 60. P. 111–117.

15. Mackay D. J., Callaway J. L., Marks S. M., White H. E., Acerini C. L., Boonen S. E., Dayanikli P., Firth H. V., Goodship J. A., Haemers A. P., Hahnemann J. M., Kordonouri O., Masoud A. F., Oestergaard E., Storr J., Ellard S., Hattersley A. T., Robinson D. O., Temple I. K. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57* // *Nat. Genet.* 2008. Vol. 40. P. 949–951.

Материал поступил в редколлегию 23.06.2010

E. A. Sazhenova, I. N. Lebedev

#### ЕПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИМПРИНТИРУЕМЫХ ГЕНОВ КАК ФАКТОР РИСКА ПРИ СОДЕЙСТВОВАНИИ РЕПРОДУКТИВНЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ

The aim of the present investigation was the search of epimutations of imprinted regions *KCNQ1OT1*, *CDKN1C*, *IGF2/H19*, *PLAGL1*, *SNRPN* and *MEG3* in samples of first-trimester spontaneous abortions after non-ART pregnancies. DNA methylation analysis have revealed epimutations in *KCNQ1OT1* and *PLAGL1* loci: 8 of 84 (9.5 %) and 9 of 87 (10.3 %) spontaneous abortions respectively have loss of imprinting (LOI) on maternal chromosomes. LOI was confined by the extraembryonic mesoderm or the cytotrophoblast, allows suggesting independent sporadic epigenetic events in various embryonic germ layers after its differentiation. Thus our data provide evidence, that environmental effects alone couldn't explain induction of epimutation linked with subsequent developmental complications.

*Keywords:* assisted reproductive technology, epimutations of imprinted genes.