

Молекулярные механизмы нарушений импринтированных генов при патологии пре- и постнатального развития

Саженова Е.А. *, Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, 634050; *e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

Множественные эпимутации в импринтированных локусах изменяют баланс дозы генов материнского и отцовского происхождения. Это приводит к нарушению как эмбрионального, так и постнатального развития человека. Мультилокусность эпимутаций поднимает вопрос о причинах возникновения данного феномена, указывая на возможность существования особых регуляторных механизмов, централизованно контролирующих эпигенетический статус множества импринтированных локусов генома. Настоящий обзор посвящен новому классу генов (*NLRP2*, *NLRP5*, *NLRP7*, *KHDC3L*, *ZFP57* и *PADI6*), мутации в которых сопровождаются множественными эпимутациями в импринтированных локусах, как в ходе эмбрионального развития, так и при наследственных синдромах.

Ключевые слова: геномный импринтинг, гены контроля импринтинга, мультилокусные дефекты метилирования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Molecular mechanisms of disturbance of imprinted genes in pathology of pre-and postnatal development

Sazhenova E.A. *, Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050, Russia; *e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

Multiple epimutations in imprinted genes change the expression level of maternal and paternal genes. This leads to disturbance in embryonic and postembryonic human development. The phenomenon of multiple epimutations indicates the possibility of the existence of special mechanisms controlling the epigenetic status of multiple imprinted genome loci. Therefore, the study of these mechanisms is of interest. The following review is devoted to the new class of genes (*NLRP2*, *NLRP5*, *NLRP7*, *KHDC3L*, *ZFP57* and *PADI6*), mutations in which are accompanied by multiple epimutations in imprinted loci both during embryonic development and hereditary syndromes.

Keywords: genomic imprinting, spontaneous abortion, imprinting control genes, multilocus methylation defects.

Введение

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 [1].

В последние годы идентифицирован новый класс генов, мутации в которых сопровождаются множественными эпимутациями в импринтированных локусах, как в ходе эмбрионального развития, так и при наследственных синдромах: это эмбриональный стволовой клеточно-ассоциированный транскрипт 1 — *KHDC3L*; ген семейства цинковых пальцев — *ZFP57*; семейства

NOD-подобных (CATERPILLER) рецепторов человека — гены *NLRP2*, *NLRP5* и *NLRP7*; пептидиларгинин-деиминаза 16 — *PADI6* [2–6].

Систематизация имеющихся данных о генах, контролирующих установление и поддержание эпигенетического статуса импринтированных генов, является важным для понимания механизма взаимодействия генома и эпигенома. Этим процессам и посвящен настоящий обзор.

На возможность существования генетических факторов, детерминирующих появление эпигенетической изменчивости, указывают исследования, продемонстрировавшие роль мутаций в генах *NLRP7* и *KHDC3L* (*C6orf221*) при семейных и повторяющихся формах биродительского полного пузырного заноса (БППЗ), сопровождающегося глобальным нарушением установления метилирования импринтированных генов в оогенезе у матери [5, 7]. Сегодня БППЗ разделен на 2 типа:

I тип (OMIM 231090, 19q13.42) — БППЗ, сопровождающийся мутациями в гене *NLRP7*, а тип II (OMIM 614293, 6q13) — в гене *KHDC3L* [2].

В наших исследованиях были выявлены мутации в гене *NLRP7* у спонтанных абортусов I триместра эмбрионального развития, имеющих множественные эпимутации в импринтированных генах, которые были представлены в компаундном гетерозиготном или в гомозиготном состоянии с некоторыми известными полиморфными вариантами [8]. Анализ родительского происхождения показал, что новые, не описанные ранее мутации у трех эмбрионов были унаследованы от отцов, в то время как все полиморфные варианты имели материнское происхождение. Примечательно, что большинство из множественных эпимутаций в импринтированных генах были представлены постзиготическим гипометилированием материнских аллелей генов *PEG3*, *PEG10*, *DLK1*, *PLAGL1* и *KCNQ1OT1*, тогда как герминативное гиперметилирование отцовских аллелей гена *PEG1* было найдено исключительно у абортусов с мутациями гена *NLRP7* отцовского происхождения. Это свидетельствует в пользу того, что носительство мутаций в этих генах в супружеских парах с репродуктивными проблемами (привычное невынашивание беременности, отягощенный акушерский анамнез) может приводить к генерации в их гаметах или на ранних этапах внутриутробного развития зародыша множественных нарушений эпигенетического статуса импринтированных генов, несовместимых с нормальным течением онтогенеза.

Также наследование по отцовской линии мутации другого гена с предположительным контролем импринтинга было показано у пациента с синдромом Видеманна-Беквита (СВБ). Так, у пациента с СВБ и гипометилированием *KyDMR1* в сочетании с множественными эпимутациями в других импринтированных генах была обнаружена наследуемая по отцовской линии замена в гене *NLRP2* с.2077C>T (p.R693W), которая, согласно базе данных PolyPhen-2, может являться патогенетически значимой, и, кроме того, она отсутствовала в контрольной выборке [9]. В этом же исследовании секвенирование гена *NLRP2* выявило гетерозиготную замену с.1054G>A (P.I352S) у пациента с синдромом Рассела-Сильвера и гипометилированием *H19* и *MEST*. Замена не наблюдалась в 180 контрольных образцах. К сожалению, образцы ДНК родителей этого больного не были доступны для анализа. В то же время, описаны мутации в гене *NLRP2* у матерей пациентов с СВБ, сопровождающегося множественными эпимутациями как в *KCNQ1OT1*, так и в других импринтированных генах [10, 11].

Мутации в гене *NLRP5* были выявлены у матерей, потомки которых имели множественные эпимутации импринтированных генов в сочетании с идиопатической задержкой развития и аутизмом, а также в семьях с бесплодием и нарушением репродукции [4]. У 10% бо-

льных с синдромом Рассела-Сильвера выявлены множественные эпимутации в импринтированных генах, сочетающиеся с гипометилированием *IGF2/H19* (11p15.5). У матерей этих больных в некоторых случаях обнаруживается носительство мутации гена *NLRP5* или *PADI6* [11–13]. Интересным является тот факт, что мутации гена *PADI6* описаны у женщин с привычным невынашиванием беременности, имеющих в анамнезе пузырный занос [6].

Мутации в гене *ZFP57* описаны у пациентов с транзиторным неонатальным сахарным диабетом (ТНСД), имеющих гипометилирование множества импринтированных локусов [3]. Сегодня известно, что у 60% больных с ТНСД обнаруживают множественные эпимутации, представленные гипометилированием импринтированных генов *GRB10* (7p12), *MEST* (7p32.2), *KCNQ1OT1* (11p15.5) и *PEG3* (19p13.4) на хромосомах материнского происхождения в различных комбинациях. Более чем в половине случаев множественные эпимутации в импринтированных генах объясняются носительством у больных гомозиготных или компаундных гетерозиготных мутаций транскрипционного фактора *ZFP57* [14].

NLRP7 (*NALP7*, *NALP7/PYPAF3*, OMIM 609661, локус 19q13.42) является частью семейства белков CATERPILLER, негативным регулятором воспаления и апоптоза, ингибирует секрецию интерлейкина 1-бета, опосредованную активацией каспазы-1. *NLRP7* экспрессируется во всех тканях человека, исключая ткани сердца, головного мозга и скелетных мышц. *NLRP7* человека не имеет ортолога в геноме мыши, но, как полагают, возник эволюционно путем дупликации *Nlrp2*. Последовательность гена *NLRP7* богата Alu-повторами, которые составляют 48% интронных областей и могут формировать Alu-опосредованные делеции и перестройки внутри данного гена, которые возникают в 180 раз чаще, чем в среднем все известные мутации у человека. Эти повторы, возможно, были встроены в ген *Nlrp2/7* предка примата. Подобные мутации в гене *NLRP7* способны приводить к невынашиванию беременности у женщины [15].

Deveault с соавт. обнаружили, что пациенты с мутациями *NLRP7* не в состоянии установить соответствующую воспалительную реакцию на различные антигены. Следовательно, у таких женщин андрогенетические blastocysts, которые являются полными аллотрансплантами, могут имплантироваться и развиваться, не отторгаясь. Возможно, что андрогенетические blastocysts образуются спонтанно *de novo* с некоторой частотой. Тем не менее, у женщин с активной иммунной системой андрогенетические клетки, скорее всего, погибают или останавливаются в развитии, и остаются незамеченными [16].

С другой стороны, Okada с соавт. [17] обнаружили, что нокдаун *NLRP7* путем РНК-интерференции приводил к снижению роста клеточной линии карциномы,

а значит этот ген может играть решающую роль в клеточной пролиферации. Кроме того, белок *nlrp7* может непосредственно влиять на статус метилирования импринтированных регионов путем связывания с эпитопом YY1 фактора транскрипции импринтированных дифференциально метилированных регионов [18].

KHDC3L (*C6orf221*, OMIM 611687, регион 6q13, мышинный гомолог *Filia*) — эмбриональный стволовой клеточно-ассоциированный транскрипт 1. Parry с соавт. показали максимальную экспрессию гена *KHDC3L* в зародышевом пузырьке ооцитов, снижение в метафазе II ооцитов и практически отсутствие экспрессии на 8-клеточной стадии эмбриона. Авторы отметили, что такая экспрессия является сходной с *NLRP7* и является типичной для генов, необходимых для ооцитов [2].

NLRP2 (*NALP2*, OMIM 609364, регион 19q13.42) кодирует цитозольный белок семейства *CATERPILLER*, Nod-подобный рецептор подсемейства *NALP*. Он супрессирует активность *NFKB1*, индуцируемую под действием фактора некроза опухоли и *CD40*. При связывании адаптерного белка *RYCARD* активирует провоспалительную каспазу 1, что приводит к внутриклеточному процессингу и образованию зрелой активной формы интерлейкинов 1 β и 18. Это обуславливает наличие воспалительной реакции, ведущей к программируемой клеточной смерти — пироптозу, при котором в результате активации каспазы 1 происходит нарушение целостности плазматической мембраны и быстрое высвобождение содержимого клетки [19]. Высокая экспрессия *NLRP2* была определена в ооцитах и зернистых клетках во время фолликулогенеза, которая снижалась у преимплантационных эмбрионов до зиготической активации генома, но белок оставался до стадии бластоцисты. С использованием РНК-интерференции обнаружено, что нокдаун *Nlrp2* у мыши не влияет на созревание ооцитов, но приводит к остановке эмбрионального развития на стадии двух клеток [20]. Показано, что *NLRP2* может выступать как критический регулятор качества ооцитов и способствовать возрастной потере фертильности у женщин.

NLRP5 (кодируется геном *NALP5*, OMIM 609658, 19q13.43, мышинный гомолог *Mater*) — цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства *NALP*, регулирует ранний эмбриогенез и апоптоз. *NLRP5* принимает участие в активации эмбрионального генома, деградация материнских продуктов и регулирование функционирования органелл [18]. Zhu с соавт. Клонировали ген *NLRP5* из фетального яичника человека. Они показали экспрессию гена *NLRP5* в эмбриональном яичнике, при отсутствии экспрессии на стадии 8 клеток эмбрионального развития [21].

Следующий ген с возможным контролем импринтинга — ген *ZFP57* (OMIM 612192, 6p22.1) кодирует белок, который имеет KRAB-домен, ассоциированный

с цинковыми пальцами типа Cys2His2. KRAB-домен транскрипционной репрессии действует через белок-белковые взаимодействия с *KAP1/TIF1b/Trim28*, которые могут начать *de novo* метилирование ДНК мыши во время эмбриогенеза. *Zfp57* необходим для поддержания статуса метилирования импринтированных генов, особенно во время эпигенетических волн перепрограммирования во время преимплантационного развития. Комплексом *ZFP57/TRIM28*-обеспечивается доставка ядерного белка *DNMT1* в регионы импринтируемых генов, что гарантирует устойчивость метилирования при репрограммировании [22]. В эмбриональных стволовых клетках *ZFP57* распознает метилированный CpG-содержащий мотив и рекрутирует комплекс, содержащий *TRIM28*, что привлекает H3K9 (гистон 3 по лизину 9) метилтрансферазу *SETDB1* и обеспечивает дополнительный контроль метилирования ДНК [23].

Ген *PADI6* (OMIM 610363, 1p36.13) кодирует один из посттрансляционных ферментов модификации белков, которые превращают остатки аргинина в остатки цитруллина в присутствии ионов кальция. *PADI6* имеет высокую экспрессию в ооцитах и низкую в других соматических тканях и в сперме [24].

Интересным фактом является то, что у млекопитающих в период фолликулярного развития ооциты накапливают значительное количество материнских РНК и белков, которые необходимы до начала зиготической активации генома. У мышей такая активация происходит на двухклеточной стадии, у человека — на стадии 4—8 клеток. Продукты генов *KHDC3L* (мышинный гомолог *Filia*), *NLRP5* (мышинный гомолог *Mater*), *NLRP7*, *OOEP* (известный также как фактор, расположенный в ооцитах, разрешающий эмбриональное развитие (мышинный гомолог *Floped*)) и *TLE6* входят в субкортикальный материнский комплекс (subcortical maternal complex, СМК), который является многопрофильным белковым комплексом, экспрессия генов которого необходима ооцитам и ранним эмбрионам млекопитающих для развития зиготы на первых клеточных делениях [21; 25; 26]. В рамках этого большого комплекса *Floped*, *Mater*, и *Tle6* взаимодействуют друг с другом, и *Filia* независимо связывается с *Mater*. Хотя транскрипты, кодирующие эти белки, деградируют во время созревания ооцита и овуляции, белки СМК сохраняются в раннем эмбрионе до стадии бластоцисты. Показано, что спаривание, оогенез, овуляция и оплодотворение у *Filia*-нулевых самок мышей проходят нормально, но снижается плодовитость примерно на 50%, что связано с задержкой эмбрионального развития. Эмбрионы имеют гиперплоидию из-за асимметричного деления хромосом в мейозе. Нулевые мутации генов *Mater*, *Floped* или *Tle6* у мыши приводят к остановке эмбрионального развития и женскому бесплодию [25].

Закключение

Таким образом, накопленные в литературе данные свидетельствуют о том, что множественные нарушения импринтинга, изменяющие баланс дозы генов материнского и отцовского происхождения, являются распространенным явлением и встречается как в пре-, так и в постнатальном развитии человека. Причиной формирования такой патологии может быть наличие мутаций в генах контролирующих импринтинг. Распространенность мутаций этих генов дает новое в понимании молекулярно-генетических механизмов, ответственных за контроль геномного импринтинга и взаимодействия генома с эпигеномом, а поиск мутаций в них может быть рассмотрен в качестве нового биомаркера для диагностики наследственных причин и профилактики болезней геномного импринтинга.

Список литературы

1. Da Silva-Santiago SC, Pacheco C, Rocha TC et al. The linked human imprintome v1.0: over 120 genes confirmed as imprinted impose a major review on previous censuses. *Int J Data Min Bioinform*. 2014;10(3): 329-56
2. Parry DA, Logan CV, Hayward BE Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate *c6orf221* as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *Am. J. Hum. Genet*. 2011; 89(3): 451-458.
3. Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V et al. Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes. *Hum. Mutat*. 2013; 34(4): 595-602.
4. Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL et al. Mutations in *NLRP5* are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans. *Nat. Commun*. 2015; 6: e8086.
5. Sanchez-Delgado M, Martin-Trujillo A, Tayama C et al. Absence of Maternal Methylation in Biparental Hydatidiform Moles from Women with *NLRP7* Maternal-Effect Mutations Reveals Widespread Placenta-Specific Imprinting. *PLoS Genet*. 2015; 11(11): e1005644.
6. Qian J, Nguyen NM, Rezaei M et al. Biallelic *PADI6* variants linking infertility, miscarriages, and hydatidiform moles. *Eur J Hum Genet*. 2018; 26(7):1007-1013.
7. Moein-Vaziri N, Fallahi J, Namavar-Jahromi B et al. Clinical and genetic-epigenetic aspects of recurrent hydatidiform mole: A review of literature. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018; 57(1): 1-6.
8. Sazhenova EA, Lebedev IN Evidence of *NLRP7* mutations in etiology of mutations methylation defects of imprinted genes in spontaneous abortions from women with recurrent pregnancy loss. *Eur Med J Reprod Health*. 2016; 2(1): 36-37.
9. Eggermann T, Leisten I, Binder G Disturbed methylation at multiple imprinting loci: an increasing observation in imprinting disorders. *Epigenomics*. 2011; 3(5): 625-637.
10. Meyer E, Lim D, Pasha S et al. Germline mutation in *NLRP2* (*NALP2*) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet*. 2009; 5(3): e1000423.
11. Begemann M, Rezwan FI, Beygo J et al. Maternal variants in *NLRP* and other maternal effect proteins are associated with multi-locus imprinting disturbance in offspring. *J Med Genet*. 2018; 55(7): 497-504.
12. Prickett AR, Ishida M, Bohm S et al. Genome-wide methylation analysis in Silver-Russell syndrome patients. *Hum. Genet*. 2015; 134(3): 317-333.
13. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, et al. Epimutations of the *IGDMR* and the *MEG3-DMR* at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet*. 2015; 23(8): 1062-1067.
14. Boonen SE, Mackay DJ, Hahnemann JM et al. Transient neonatal diabetes, *ZFP57* and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care*. 2013; 36: 505-512.
15. Reddy R, Nguyen NM, Sarabay G et al. The genomic architecture of *NLRP7* is Alu rich and predisposes to disease-associated large deletions. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24(10): 1516.
16. Deveault C, Qian JH, Chebaro W et al *NLRP7* mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(5): 888-897.
17. Okada K, Hirota E, Mizutani Y et al. Oncogenic role of *NALP7* in testicular seminomas *Cancer Sci*. 2004; 95: 949-954.
18. Mahadevan S, Wen S, Wan YW et al. *NLRP7* affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(3): 706-716.
19. Kinoshita T, Wang Y, Hasegawa M, Imamura R et al. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1 β secretion. *J Biol Chem*. 2005; Jun 10; 280(23): 21720-5.
20. Peng H, Chang B, Lu C *Nlrp2*, a maternal effect gene required for early embryonic development in the mouse. *PLoS One*. 2012; 7: e30344.
21. Zhu K, Yan L, Zhang X et al Identification of a human subcortical maternal complex. *Mol Hum Reprod*. 2015; 21(4): 320-329.
22. Messerschmidt DM, de Vries W, Ito M et al. *Trim* is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. *Science*. 2012; 335 (6075): 1499-1502.
23. Smith ZD, Meissner A DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013; 14(3): 204-220.
24. Xu Y, Shi Y, Fu J et al. Mutations in *PADI6* Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. *Am J Hum Genet*. 2016; Sep 1; 99(3): 744-752.
25. Bebbere D, Masala L, Albertini DF et al. The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure? *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(11):1431-1438.
26. Monk D, Sanchez-Delgado M, Fisher R *NLRPs*, the subcortical maternal complex and genomic imprinting. *Reproduction*. 2017; 154(6): 161-170.