

Индекс метилирования импринтированных генов *GRB10* и *GNAS* при нарушениях эмбрионального развития человека

Саженова Е.А.¹, Никитина Т.В.¹, Марков А.В.¹, Скрыбин Н.А.¹,
Васильев С.А.¹, Толмачева Е.Н.¹, Назаренко М.С.^{1,2}, Лебедев И.Н.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, 634050, e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, 634050

В настоящем исследовании в группе спонтанных абортусов I триместра беременности с нормальным кариотипом проведён анализ индекса метилирования импринтированных генов *GNAS* (*NESP55*) и *GRB10*. Исследование выполнено с использованием образцов экстраэмбриональной мезодермы 47 спонтанных абортусов и 45 индуцированных абортусов, составивших контрольную группу. Показано статистически значимое увеличение индекса метилирования импринтированного гена *NESP55* и снижение индекса метилирования гена *GRB10* у спонтанных абортусов. Исходя из функции исследуемых импринтированных генов можно предположить, что увеличение индекса метилирования гена *NESP55* и его снижение в *GRB10* могли усиливать подавление роста эмбриона и привести к остановке его развития.

Ключевые слова: геномный импринтинг, *GRB10*, *NESP55*, индекс метилирования, невынашивание беременности, спонтанные абортусы, эпимутации.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФАНО РФ по теме «Эпигенетический компонент соматической вариабельности генома при патологии ранних этапов онтогенеза человека» (№ госрегистрации: 0550-2014-0302) на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ) с использованием материалов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Methylation index of imprinted genes *GRB10* and *GNAS* in abnormal human embryo development

Sazhenova E.A.^{1*}, Nikitina T.V.¹, Markov A.V.¹, Skryabin N.A.¹,
Vasilyev S.A.¹, Tolmacheva E.N.¹, Nazarenko M.S.^{1,2}, Lebedev I.N.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050, Russia, *e-mail: elena.sazhenova@mail.ru

² Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russia

Present study analyzes the methylation index of the imprinted genes *GNAS* (*NESP55*) and *GRB10* in the group of first trimester spontaneous abortions with normal karyotype. The DNA samples derived from extraembryonic mesoderm of 47 spontaneous abortions and 45 induced abortions were examined. A significant increase in the methylation index of the imprinted gene *NESP55* and a decrease in *GRB10* in the spontaneous abortions were observed. Based on the function of this imprinted genes, it can be assumed that an increase in the methylation index of the *NESP55* gene and its decrease in *GRB10* could enhance the suppression of embryo growth and lead to a possible disturbance of embryo development.

Keywords: genomic imprinting, *GRB10*, *NESP55*, methylation index, pregnancy loss, spontaneous abortion, epimutations.

Введение

Невынашивание беременности — одна из актуальных проблем современного акушерства, которая, по некоторым оценкам, охватывает примерно 25% супружеских пар репродуктивного возраста, при этом в структуре самопроизвольного прерывания неуклонно растёт доля неразвивающейся беременности первого триместра [1]. Показано, что в 40—50% случаев причины спонтанного аборта у женщин (анатомические, иммунологи-

ческие, гормональные, цитогенетические нарушения и инфекционные заболевания) не обнаруживаются.

Репродукцию человека контролируют как генетические механизмы, так и эпигенетические факторы регуляции генов, одним из которых является геномный импринтинг — особый вид регуляции активности генов в зависимости от пола их передавшего. Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития и может оказывать влияние на степень экспрес-

сии генов, контролирующих рост эмбриона, процессы пролиферации и дифференцировки клеток и другие процессы внутриутробного развития плода [2]. Механизмы импринтинга преимущественно связаны с дифференциальным метилированием промоторных регионов импринтированных генов и регуляторных последовательностей (центров импринтинга), устанавливаемым строго специфичным образом в гаметогенезе и поддерживаемым в соматических клетках на протяжении всего онтогенеза [3].

Нарушение дифференциального метилирования импринтированных генов приводит к эпимутациям, которые могут быть представлены как aberrантным гиперметилированием экспрессируемого аллеля, так и, напротив, гипометилированием инактивированного аллеля. В первом случае происходит полная потеря продукта импринтированного гена в клетке, тогда как во втором — наблюдается увеличение дозы гена вследствие установления его биаллельной экспрессии [4].

Ранее нами был проведен широкогеномный анализ статуса метилирования импринтированных локусов при нарушении эмбрионального развития человека с использованием микрочипа «GoldenGate Cancer Panel I» (Illumina). В результате установлены спектр и частота эпимутаций импринтированных генов и их вклад в нарушение ранних этапов онтогенеза, определены импринтированные гены, затронутые множественными эпимутациями. Это гены *DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10*, *PEG1/MEST*, *PHLDA2*, *WT1*, *ZNF215*, *HTR2A*, *INS*, *H19*, *TRPM5*, *GNAS*, *SNURF-SNRPN*, *GRB10*, *ATP10A* и *CPA4* [5]. Репликативное исследование статуса метилирования 7 импринтированных генов (*DLK1*, *PEG10*, *PLAGL1*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *GRB10* и *PEG1/MEST*) в расширенных выборках эмбрионов подтвердило результаты микрочипового анализа [6]. Эпимутации в генах *GNAS* и *GRB10* были идентифицированы как в широкогеномном исследовании с использованием микрочипа, так и на расширенной выборке (в отношении гена *GRB10*).

Ген *GRB10* (OMIM: 601523) расположен на хромосоме 7 в регионе p12.2. Продукт гена принадлежит к адаптерным белкам, которые взаимодействуют с рядом рецепторов тирозинкиназ и сигнальных молекул, с рецепторами инсулина и инсулиноподобного фактора роста. Избыточная экспрессия некоторых изоформ кодируемого белка ингибирует активность тирозинкиназы и, таким образом, подавляет рост клеток.

Ген *GNAS* (OMIM: 139320, 20q13.3) — сложный locus с точки зрения эпигенетической регуляции, который кодирует один биаллельный (*Gsa*) и четыре моноаллельных (*NESP55*, *GNAS-AS1*, *XLsa* и *A/B*) транскрипта. С отцовского аллеля экспрессируется исключительно *XLAS*, с материнского — *NESP55*, в то время как биаллельно экспрессируется *Gsa*. Промоторы данных транскриптов разделены 11 т.п.н.. В зависимости от тка-

ни осуществляется либо биаллельная, либо моноаллельная экспрессия. Так, например, в большинстве тканей транскрибируются оба аллеля с образованием *Gsa*. В нейроэндокринных тканях головного и спинного мозга, сердце, почках, легких, мышцах экспрессируется материнский аллель локуса *GNAS*, продуктом которого является *NESP55* [7]. Промотор *NESP55* имеет специфический дифференциально метилированный регион (ДМР), который подвергается метилированию на отцовском аллеле, поэтому экспрессия идет только с материнской хромосомы. *NESP55* участвует в регуляции процессов метилирования ДМР *GNAS*, что влияет на экспрессию данного локуса [8].

Цель настоящего исследования — анализ индекса метилирования одного из импринтированных локусов гена *GNAS* (*NESP55*) и *GRB10* в выборке спонтанных абортусов (СА) I триместра беременности с нормальным кариотипом.

Экспериментальная часть

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИМГ ТНИМЦ (протокол №2 от 22 апреля 2010 г.). От всех супружеских пар было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Работа проведена с использованием образцов внезародышевой (экстраэмбриональной) мезодермы 47 СА I триместра с нормальным кариотипом. В качестве контроля исследована внезародышевая мезодерма 45 медицинских абортусов (МА) I триместра беременности. Внезародышевая мезодерма является производной эпибласта, дающего начало наружному зародышевому листку, поэтому данная ткань ближе по происхождению к эмбриональным структурам, чем другие плацентарные ткани. Продолжительность внутриутробного периода развития определялась по дате последней менструации и составила для СА — $7,64 \pm 1,24$ недель и для МА — $7,69 \pm 1,27$ недель, и статистически значимо не различалась ($p = 0,8$).

Цитогенетический анализ проводили путём культивирования внезародышевой мезодермы с последующим стандартным кариотипированием метафазных хромосом. Для образцов, не пролиферирующих в культуре, использовали сравнительную геномную гибридизацию (CGH) для установления кариотипа эмбриона с последующей флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) для исключения полиплоидии.

Геномную ДНК выделяли из некультивированных клеток внезародышевой мезодермы после стандартной обработки протеиназой К при 37°C и экстракции фенол/хлороформом. Для бисульфитной конверсии ДНК использовали набор EZ DNA methylation Direct Kit («Zymo Research», США), согласно протоколу производителя.

Значение индекса метилирования гена *NESP55* в группах индуцированных и спонтанных абортусов

| СрG-динуклеотиды | Индекс метилирования, МА | | | Индекс метилирования, СА | | | p |
|------------------|--------------------------|-------|-------------|--------------------------|-------|------------|-------|
| | Значение | | | Значение | | | |
| | Мин. | Макс. | Среднее | Мин. | Макс. | Среднее | |
| СрG1 | 29,6 | 66,5 | 43,5 ± 8,3 | 36,2 | 75,3 | 49,9 ± 7,1 | <0,01 |
| СрG2 | 29,5 | 65,5 | 43,2 ± 8,6 | 35,8 | 79,8 | 50,0 ± 8,1 | <0,01 |
| СрG3 | 29,9 | 62,1 | 41,7 ± 7,7 | 39,9 | 76,4 | 49,7 ± 7,6 | <0,01 |
| СрG4 | 29,4 | 64,6 | 43,0 ± 8,3 | 35,7 | 84,4 | 49,5 ± 8,0 | <0,01 |
| СрG5 | 26,6 | 70,9 | 42,3 ± 11,3 | 32,7 | 73,5 | 47,7 ± 9,8 | <0,05 |
| СрGср | 29,3 | 65,1 | 42,7 ± 9,6 | 37,7 | 77,9 | 49,4 ± 7,8 | <0,01 |

Примечание. Мин. — минимальное значение индекса метилирования, Макс. — максимальное значение индекса метилирования, СрGср — среднее значение индекса метилирования по пяти СрG.

Индекс метилирования определяли путем пиросеквенирования пяти СрG-динуклеотидов для гена *NESP55* и восьми для *GRB10*, расположенных в ДМР, на пиросеквенаторе PyroMark Q24 («Qiagen», Германия).

Последовательность праймеров для гена *NESP55*:

биотин-5'-AGAGTTTTAGGGAAGGGGAGGA-3' (прямой),

5'-ACTAACCTAAATCCATAAAAACAAA-3' (обратный),

5'-GTTGTAAGTTAAAGAAGTT-3' (секвенирующий праймер).

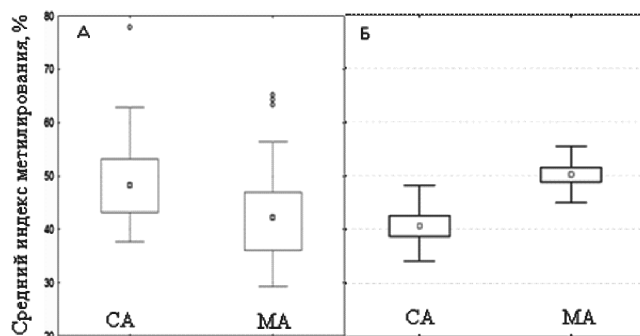
Последовательность праймеров для гена *GRB10*:

5'-AAGATTAATAATGGTTATATAATATTGTTTTATGGTTGG-3' (прямой),

5'-CCCCCCTCTCCAAATACTCAAAT-3'- биотин (обратный),

5'-GGTAGGGGTTTTGTAGTT-3' (секвенирующий праймер).

Индекс метилирования определяли как отношение метилированного цитозина к сумме метилированных и неметилированных цитозинов с использованием пакета программ PyroMark Q24. Сравнение уровней метилирования в группах исследования проводилось с использованием t-критерия Стьюдента и анализа главных компонент в программе «Statistica».



Распределение индексов метилирования локуса *NESP55* (А) и *GRB10* (Б) в группах спонтанных (СА) и медицинских (МА) абортусов.

Результаты

Индекс метилирования был определен в пяти СрG-динуклеотидах гена *NESP55* и в восьми СрG-сайтах гена *GRB10* внутри групп МА и СА (табл. 1, 2). Для гена *NESP55* в контрольной выборке минимальный и максимальный индекс метилирования составил 26,6% и 70,9%, и был обнаружен в пятом СрG. Среди СА данные показатели составили 32,7% в пятом СрG и 84,4% в четвертом СрG соответственно. Сравнение среднего показателя индекса метилирования СрG в анализируемых группах показало, что в контрольной группе его минимальное значение соответствовало 41,7 ± 7,7% в третьем СрG, максимальное 43,5 ± 8,3% в первом, со средним значением по всем СрG сайтам — 42,7 ± 9,6%. Для группы СА данные показатели находились в пределах 47,7 ± 9,8% в пятом СрG и 50,0 ± 8,1% во втором СрG, со средним значением — 49,4 ± 7,8% соответственно (табл. 1).

В целом, анализ индекса метилирования гена *NESP55* показал его статистически значимое увеличение в группе СА как по отдельным анализируемым СрG-сайтам, так и в целом по пяти СрG динуклеотидам (p<0,05, табл. 1, рисунок). Увеличение индекса метилирования может приводить к снижению экспрессии гена, а значит к уменьшению количества продуцируемого белка.

Индекс метилирования гена *GRB10* в контрольной группе варьировал в пределах от 29,5% в четвертом СрG до 71,0% в пятом СрG. В выборке СА минимальное значение этого показателя соответствовало 20,0% в четвертом, максимальное — 59,5% в восьмом СрG. Среднее значение индекса метилирования в контрольной группе находилось в пределах от 49,3 ± 9,2% в третьем СрG до 51,3 ± 6,1% в первом СрG, со средним показателем по всем СрG 50,2 ± 4,4%. В выборке СА данные значения составили 37,9 ± 7,7% в первом СрG, 41,8 ± 7,6% во втором, со средним уровнем в этой группе 40,6 ± 6,5% соответственно (табл. 2, рисунок). В целом индекс метилирования у СА по сравнению с МА для *GRB10* был статистически значимо ниже как по отдельным СрG, так и в среднем по группам (p<0,01). Снижение индекса мети-

Значение индекса метилирования гена *GRB10* в группах индуцированных и спонтанных абортусов

| CpG-динуклеотиды | Индекс метилирования, МА | | | Индекс метилирования, СА | | | p |
|------------------|--------------------------|-------|------------|--------------------------|-------|------------|-------|
| | Значение | | | Значение | | | |
| | Мин. | Макс. | Среднее | Мин. | Макс. | Среднее | |
| CpG1 | 42,0 | 64,5 | 51,3 ± 6,1 | 21,9 | 49,3 | 37,9 ± 7,7 | <0,01 |
| CpG2 | 42,7 | 64,9 | 49,8 ± 5,2 | 29,2 | 55,0 | 41,8 ± 7,6 | <0,01 |
| CpG3 | 42,1 | 60,6 | 49,3 ± 9,2 | 27,2 | 54,3 | 41,7 ± 8,1 | <0,01 |
| CpG4 | 29,5 | 65,4 | 49,5 ± 6,9 | 20,0 | 55,5 | 41,1 ± 9,1 | <0,01 |
| CpG5 | 38,9 | 71,0 | 50,5 ± 6,5 | 25,8 | 58,4 | 39,9 ± 9,4 | <0,01 |
| CpG6 | 41,3 | 63,1 | 50,4 ± 5,0 | 24,3 | 57,2 | 41,3 ± 8,4 | <0,01 |
| CpG7 | 36,0 | 67,0 | 50,4 ± 6,2 | 23,9 | 57,5 | 40,7 ± 7,8 | <0,01 |
| CpG8 | 34,4 | 60,4 | 50,3 ± 5,8 | 20,4 | 59,5 | 41,0 ± 8,5 | <0,01 |
| CpGср | 49,3 | 51,3 | 50,2 ± 4,4 | 36,9 | 41,9 | 40,6 ± 6,5 | <0,01 |

Примечание. Мин. — минимальное значение индекса метилирования, Макс. — максимальное значение индекса метилирования, CpGср — среднее значение индекса метилирования по восьми CpG.

лирования гена *GRB10* могло привести к увеличению экспрессии данного гена, а значит к увеличению количества белка.

Методом анализа главных компонент показано, что уровень метилирования гена *NESP55* одного СА отличался от остальных СА и МА в сторону увеличения процента метилирования его CpG-сайтов. Для гена *GRB10* выявлено два СА с отличным уровнем метилирования в сторону гипометилирования.

Обсуждение

В геноме человека в настоящее время идентифицировано около 100 импринтированных генов, что составляет не более 1% генома [9], из них 50% локусов вовлечены в регуляцию эмбрионального и постнатального роста, 20% — в нейробиологические процессы, для остальных 30% генов биологическая роль неизвестна.

Изучение геномного импринтинга у животных показало, что отцовский генетический вклад важен для развития плаценты, а материнский необходим для развития самого эмбриона [10]. В настоящем исследовании двух импринтированных генов показано значимое увеличение индекса метилирования *NESP55* и снижение *GRB10* у СА I триместра эмбрионального развития, что могло привести к снижению экспрессии гена *NESP55* и увеличению экспрессии *GRB10*. Эти гены экспрессируются в норме только с материнского гомолога и важны в первую очередь, для развития самого эмбриона.

Нейроэндокринный секреторный белок 55 (*NESP55*) состоит из 241 аминокислотного остатка и принадлежит к семейству гранинов, которые участвуют в эндокринных и нейроэндокринных сигнальных путях. Гранины контролируют доставку пептидов, гормонов, нейротрансмиттеров и факторов роста. *NESP55* является биомаркером эндокринных и нейроэндокринных опухолей,

а также принимает участие в клеточном росте. Наибольшая его экспрессия наблюдается в нервных тканях (головной и спинной мозг, надпочечники, различные адреналопродуцирующие клетки). Показано, что сверхэкспрессия этого гена приводит к увеличению роста клеток [11]. В настоящем исследовании мы наблюдали увеличение индекса метилирования, что могло стать причиной подавления пролиферации клеток и, как следствие, привести к остановке эмбрионального развития.

GRB10 — белок, связывающий рецептор фактора роста. Белковый продукт *GRB10* взаимодействует с рецепторами инсулина и инсулиноподобного фактора роста через SH2-домен, подавляя активность тирозинкиназы, которая участвует в стимуляции ростовой активности инсулина и инсулиноподобных факторов роста I и II, воздействуя на эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Таким образом, *GRB10* оказывает супрессирующее влияние на рост, увеличенная доза этого гена может способствовать подавлению роста клеток [12]. В настоящем исследовании показано снижение индекса метилирования данного гена, что могло негативно действовать на рост эмбриона.

Таким образом, исходя из функции исследуемых импринтированных генов, можно предположить, что увеличение индекса метилирования *NESP55* и его снижение в *GRB10* могло усиливать подавление роста эмбриона и привести к остановке его развития.

В литературе увеличение индекса метилирования или гиперметилирование гена *NESP55* было показано в составе множественных эпимутаций импринтированных генов, как в группе СА II триместра беременности и мертворождений, так и при биродительском полным пузырным заносе (БППЗ). Так, при анализе плодных тканей было обнаружено статистически значимое увеличение индекса метилирования импринтированных генов

у 4% (2 из 55) СА II триместра эмбрионального развития и в 18% (10 из 57) случаев мертворождений [13]. Кроме гена *NESP55*, авторы анализировали ген *MEG3*, который так же, как и изучаемый в данном исследовании ген экспрессируется с отцовского аллеля, и гены *H19*, *LIT1*, *PEG3* и *SNRPN*, экспрессирующиеся в норме с материнского гомолога. Хэйворд с соавторами, обследуя 11 семей с БППЗ, кроме гиперметилирования гена *NESP55*, показали гипометилирование *ZAC* и *LIT1* [14].

Биаллельная экспрессия гена *GRB10* является одной из причин синдрома Рассела-Сильвера (СРС), который характеризуется в том числе и выраженной пре- и постнатальной задержкой роста [15]. Гиперметилирование гена *NESP55* является одной из причин псевдогипопаратиреоза, сопровождающегося задержкой умственного и физического развития [16]. Частота этих синдромов в разных популяциях составляет 1:10 000—30 000 для СРС и 1:150 000 для псевдогипопаратиреоза. Гипометилирование гена *GRB10* наблюдается примерно 10—20% случаев СРС и связано с однородительским наследованием или дупликацией участка хромосомы 7 материнского происхождения. Таким образом, в редких случаях подобное нарушение метилирования анализируемых в данном исследовании генов *NESP55* и *GRB10* встречается и у живорожденных индивидов. В настоящем исследовании мы обнаружили одного из 47 СА с гиперметилированием гена *NESP55*, что составило 2,13% от обследуемой выборки и двух из 47 СА с гипометилированием *GRB10* (4,26%). Обнаруженные в настоящем исследовании статистически значимые отличия по индексу метилирования импринтированных генов между СА и МА свидетельствует о том, что в пренатальном периоде происходит отбор против эмбрионов с подобными нарушениями.

Список литературы

1. Радзинский ВЕ. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС / ВЕ Радзинский. М.: Редакция журнала StatusPraesens. 2015; 48 с.
2. Elhamamsy A.R. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. J Assist Reprod Genet. 2017; 34(5): 549-562.
3. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome—lessons from genomic imprinting. Genes. 2014; 5(3): 635-655.
4. Лебедев ИН, Саженова ЕА. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией. Генетика. 2008; 44(10): 1356-1373.
5. Саженова ЕА, Скрябин НА, Суханова НН, Лебедев ИН. Мультилокусные эпимутации импринтома при патологии эмбрионального развития человека. Молекулярная биология. 2012; 46(2): 204-213.
6. Саженова ЕА, Никитина ТВ, Скрябин НА и др. Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности. Генетика. 2017; 53 (3): 364-377.
7. Turan S, Bastepe M. The *GNAS* complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. Horm Res Paediatr. 2013; 80(4): 229-241.
8. Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N et al. Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. Genes Dev. 2009; 23(1): 105-17.
9. Каталог импринтированных генов и родительских эффектов у человека и животных. университет Отаго — Режим доступа: <http://igc.otago.ac.nz>.
10. Babak T, DeVeale B, Tsang EK et al. Genetic conflict reflected in tissue-specific maps of genomic imprinting in human and mouse. Nat Genet. 2015; 47 (5): 544-549.
11. Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK et al. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. Endocr Rev. 2011; 32: 755-797.
12. Yu Y, Yoon SO, Poulgiannis G et al. Phosphoproteomic analysis identifies *Grb10* as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. Science. 2011; 332: 1322-1326.
13. Pliushch G, Schneider E, Weise D et al. Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. Am. J. Pathol. 2010; 176(3): 1084-1090.
14. Hayward BE, De Vos M, Talati N et al. Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole. Hum. Mutat. 2009; 30(5): 629-639.
15. Grafodatskaya D, Choufani S, Basran R et al. An update on molecular diagnostic testing of human imprinting disorders. J. Pediatr. Genet. 2017; 6(1): 3-17.
16. Kelsey G. Imprinting on chromosome 20: tissue-specific imprinting and imprinting mutations in the *GNAS* locus. Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet. 2010; 154(3): 377-386.