

Главный редактор
ГИНТЕР Е.К.
академик РАН, д.б.н., профессор
Заместители главного редактора
ПУЗЫРЕВ В.П.
академик РАН, д.м.н., профессор
БАРАНОВ В.С.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор

Ответственный секретарь
ИЖЕВСКАЯ В.Л.
д.м.н.

Редакционная коллегия
АРЧАКОВ А.И.
академик РАН, д.б.н., профессор
ВОЕВОДА М.И.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
ДУРНЕВ А.Д.
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор

ИВАНОВ В.П.
д.б.н., профессор
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.
д.м.н., профессор

КОЗЛОВА С.И.
д.м.н., профессор

КОПНИН Б.П.
д.б.н., профессор

КУЦЕВ С.И.
д.м.н.

КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)
академик Литовской АН, д.б.н., профессор

ЛИМБОРСКАЯ С.А.
д.б.н., профессор

МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)
доктор медицины и педиатрии (MD),
доктор философии по медицине и молекуляр-
ной генетике (PhD), профессор

МИХАЙЛОВА Л.К.
д.м.н., профессор

НАЗАРЕНКО Л.П.
д.м.н., профессор

НОВИКОВ П.В.
д.м.н., профессор

НОСИКОВ В.В.
д.б.н., профессор

РОГАЕВ Е.И.
д.б.н., профессор

РУБЦОВ Н.Б.
д.б.н., профессор

СВЕРДЛОВ Е.Д.
академик РАН, д.б.н., профессор

СЕРЕДЕНИН С.Б.
академик РАН, д.м.н., профессор

СМИРНОВ В.Н.
академик РАН, д.м.н., профессор

СТЕПАНОВ В.А.
д.б.н., профессор

ЧЕХОНИН В.П.
академик РАН, д.б.н., профессор

ЧУЧАЛИН А.Г.
академик РАН, д.м.н., профессор

Издатель:
ООО «Издательство «Гениус Медиа»
E-mail: genius-media@mail.ru

Адреса редакции:
115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1,
Федеральное государственное
бюджетное учреждение
Медико-генетический научный центр РАМН
Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02
E-mail: L_Tarlycheva@med-gen.ru

Внимание авторов и читателей:
Рукописи и иллюстрации не возвращаются. При
перепечатке материалов согласование с редак-
цией журнала «Медицинская генетика» обяза-
тельно. За содержание рекламных публикаций ответст-
венность несет рекламодатель.

© Российское общество медицинских генетиков
© Российская академия медицинских наук
© Медико-генетический научный центр РАМН
© ООО «Издательство «Гениус Медиа»

Тираж 200 экз.

Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2014 г. Том 13. №3 (141)

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Баранов В.С.

Проблемы системной генетики
некоторых частых многофакторных заболеваний3

Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.

Архитектура генома:
генетическое разнообразие и хромосомные болезни 11

Саженова Е.А., Лепшин М.В., Лебедев И.Н.

Множественные эпимутации импринтома
при нарушении репродукции человека 19

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иващенко Т.Э., Насыхова Ю.А., Гембицкая Т.Е., Орлов А.В., Черменский А.Г., Баранов В.С.

Анализ мутаций у больных муковисцидозом
методом полноэкзомного секвенирования гена *CFTR*28

Стрельников В.В., Танас А.С., Руденко В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В.

Геномный анализ метилирования ДНК
с использованием секвенирования нового поколения32

ИНФОРМАЦИЯ

Правила оформления статей
в журнале «Медицинская генетика»38

* Статьи подготовлены по материалам, представленным на Симпозиум
«Генетика человека, медицинская генетика и генетические модели для биомедицинских
исследований» в рамках VI Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров,
Ростов-на-Дону, 15–20 июня 2014 г.

Editor-in-Chief
GINTER E.K.
Deputy Editors-in-chief
PUZYREV V.P.
BARANOV V.S.

Executive editor
IZHEVSKAYA V.L.

Editorial Board
ARCHAKOV A.I.
VOEVODA M.I.
DURNEV A.D.
IVANOV V.P.
ILLARIOSHKIN S.N.
KOZLOVA S.I.
KOPNIN B.P.
KUTZEV S.I.
KUCINSKAS V.
LIMBORSKAYA S.A.
MACEK M. Jr.
MIKHAYLOVA L.K.
NAZARENKO L.P.
NOVIKOV P.V.
NOSIKOV V.V.
ROGAEV E.I.
RUBTZOV N.B.
SVERDLOV E.D.
SEREDENIN S.B.
SMIRNOV V.N.
STEPANOV V.A.
CHEKHONIN V.P.
CHUCHALIN A.G.

Publisher:
Genius Media Publishing Ltd
E-mail: genius-media@mail.ru

Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2014. Volume 13. №3 (141)

Content

REVIEWS

Baranov V.S.

Systemic Genetic of some common complex disorders3

Kashevarova A.A., Lebedev I.N.

Genome architecture:
genetic diversity and chromosomal diseases..... 11

Sazhenova E.A., Lepshin M.V., Lebedev I.N.

Multiple epimutations of imprintome
in human reproductive pathology 19

ARTICLES

**Ivashchenko T.E., Nasihova U.A., Gembitskaia T.E.,
Orlov A.B., Chermenskii A.G., Baranov B.S.**

Analysis of mutations in CF patients
using method of whole-exome sequencing of *CFTR* gene28

**Strelnikov V.V., Tanas A.S., Rudenko V.V.,
Kuznetsova E.B., Zaletaev D.V.**

Genomic DNA methylation analysis
with next-generation sequencing.....32

INFORMATION

Guidelines for Authors38

Проблемы системной генетики некоторых частых многофакторных заболеваний

Баранов В.С.

ФГБУ «НИИ АГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, РФ

Расшифровка генома человека вселяла надежду в быстрое решение многих проблем, связанных с диагностикой, профилактикой и лечением наследственных и ненаследственных многофакторных заболеваний (МФЗ). В отношении моногенных болезней эти ожидания быстро оправдались: были не только найдены причинные гены более 1500 наследственных болезней, но и установлены спектры их мутаций, разработаны удобные методы диагностики. Значительно сложнее оказалась проблема МФЗ. Очень скоро выяснилось, что полиморфизмы многочисленных генов-кандидатов, ассоциированных с МФЗ, могли объяснить их возникновение с вероятностью не более 10–15%. Причины «недостающей наследуемости», как считается в настоящее время, скрыты в системной биологии сложных фенотипических признаков. В обзоре дано определение и рассмотрены основные положения системной генетики, связанные с реализацией количественных признаков в онтогенезе. На примерах двух частых заболеваний — эндометриоза (ЭМ) и миомы матки (ММ) — рассмотрены возможности использования подходов системной генетики для анализа их патогенеза. Кратко рассмотрены генные сети ММ и ЭМ, результаты их исследования методом полногеномного скрининга ассоциаций (GWAS), анализа профилей метилирования и экспрессии, спектров регуляторных микроРНК, хромосомных и микрохромосомных перестроек. Приведены наиболее вероятные механизмы патогенеза ММ и ЭМ. Исходя из принципов системной генетики обсуждается схема эпигенетического ландшафта, предлагаемая для пояснения возможного патогенеза МФЗ.

Ключевые слова: геном, гены-кандидаты, комплексные болезни, эпигенетика, системная биология, эндометриоз, миома матки, обратный эпигенетический ландшафт

Введение

Триумф науки, связанный с расшифровкой генома человека, дополненный разработкой целого арсенала молекулярно-генетических методов его детального анализа, способствовал, стремительному внедрению генетики в медицину, появлению новой молекулярной медицины и клинической генетики и вполне закономерно породил иллюзию быстрого решения проблем диагностики, профилактики и лечения болезней человека [2, 6, 11]. Действительно, уже к 2006 г. были идентифицированы причинные гены более 1500 моногенных болезней, установлены спектры их мутаций, разработаны оптимальные алгоритмы молекулярно-генетической диагностики, в том числе и пренатальной [1]. Значительно сложнее обстояло дело с частыми МФЗ. В их патогенезе задействованы аллельные варианты многих генов и малопонятные провоцирующие факторы внешней среды, влияющие на их экспрессию. Поиск генов-кандидатов МФЗ методами сцепления (Lod Score) или функциональных ассоциаций давал неоднозначные и зачастую противоречивые результаты. Более оптимистично на первых порах выглядел метод GWAS (Genome Wide Association Studies — GWAS), позволивший на большом клиническом материале и с высокой достоверностью установить полиморфные сайты генома (SNP), тесно сцепленные со многими МФЗ. Начиная с 2007 г. на эту тему опубликовано свыше 350 работ, в которых зарегистрировано сцепление с 1640 SNP, ассоциированных с 89 сложными (комплексными) МФЗ. В настоящее время этим методом ис-

следованы сайты ассоциации и идентифицированы гены-кандидаты более 300 МФЗ [28].

К сожалению, период оптимизма был недолгим. Доминирующая в то время гипотеза о происхождении МФЗ как результате суммарного эффекта многих неблагоприятных полиморфизмов ассоциированных генов (common diseases — common polymorphisms) оказалась несостоятельной [3, 12]. Действительно, для большинства сложных признаков установленные полиморфизмы, объясняют менее 10% риска, а единичные выявленные маркеры увеличивают индивидуальный риск (OR) лишь в 1,1–1,5 раза [12]. Сделан вывод, что генетическое тестирование позволяет определить, относится ли человек к группе риска того или иного заболевания, но никак не даёт основания для окончательных прогнозов в отношении реализации предсказанных болезней у конкретного человека в будущем

Таким образом, лишь сравнительно небольшая доля наследственного риска, всего около 10–15%, может быть установлена при тестировании полиморфизма ассоциированных генов, но основные причины МФЗ остаются неизвестными. Значительная часть наследственных детерминант сложных признаков, включая МФЗ, остаётся нераскрытой даже при использовании самых современных методов генетического анализа. Данное обстоятельство и послужило поводом для определённых разочарований в возможностях анализа генетической составляющей сложных признаков, в реальности генетического тестирования наследственной предрасположенности к МФЗ [30]. С чем же связан парадокс

того, что выявленных, даже с помощью GWAS, генов-кандидатов и тесно сцепленных с заболеваниями SNP недостаточно для объективной оценки индивидуального риска конкретного МФЗ?

Проблема «исчезающей наследуемости» и системная генетика

Неожиданная для классической генетики проблема «исчезающей наследуемости» МФЗ в действительности таковой не является, если её рассматривать с позиции «динамического» генома, т.е. функциональной генетики. Аксиома генетики развития (феногенетики) заключается в том, что путь от гена к признаку (молекулярному, биохимическому, морфологическому) представляет собой непрерывный, прогрессивно усложняющийся многоэтапный и многоуровневый процесс [7, 9, 12]. На первом этапе информация, записанная в двумерной молекуле ДНК, транслируется в 3-мерную структуру белков, сообщество которых, организованное определённым образом, и формирует живую клетку, ткань и т.д. При этом каждый уровень обладает определённой автономностью, имеет свои характерные свойства и свою информационную ёмкость. Любой морфогенетический процесс, в том числе и каждое МФЗ, включают все уровни организации и сложные реакции их взаимодействия. Причиной болезни могут быть не только мутации, но и неблагоприятные сочетания полиморфных вариантов генома, ошибки регуляции функции генов и взаимодействия их продуктов. Таким образом, основной принцип системной генетики соответствует таковому феногенетики: исследованию процесса реализации генетической информации в развитии на разных уровнях организации живой материи. Исходя из этого принципа, поиск ответа на вопрос, почему значительная часть наследственности сложного фенотипического признака, включая МФЗ, не выявляется путём генетического тестирования, позволяет предположить несколько причин [18, 19]. Главные из них следующие:

- 1) GWAS-чипы даже очень высокой плотности не гарантируют идентификации всех SNP, ассоциированных с заболеванием;
- 2) полногеномные исследования не позволяют выявить главные гены-маркёры с частотой редких аллелей менее 0,5%;
- 3) стандартные варианты GWAS не позволяют установить метаболические пути патогенеза конкретного МФЗ и понять природу ген-генных взаимодействий;
- 4) панели генов-кандидатов МФЗ никак не учитывают вклад факторов внешней среды в развитие заболевания;
- 5) более 80% выявленных при GWAS SNP имеет внегенную локализацию, и причина их достоверной ассоциации с патологией остаётся в области догадок;
- 6) определённая часть «недостающей» наследуемости при МФЗ может быть результатом наличия в геномах 10% населения достаточно протяжённых (>500 КБ),

варьирующих по числу копий ДНК фрагментов, а также микрохромосомных перестроек, которые могут существенно нарушать работу генов;

7) важная роль в патогенезе МФЗ принадлежит эпигенетическим факторам, регулирующим активность генов, таким, как метлирование ДНК и гистонов, регуляторным микроРНК.

Таким образом, сегодня просматривается довольно много причин, объясняющих нехватку информации, при оценке предиктивного риска генетического тестирования МФЗ. Более того, складывается впечатление, что для разных МФЗ причины такой «исчезающей» наследуемости могут быть разными.

Понятие *системная генетика* близко примыкает к понятию *системная биология* (СБ) как междисциплинарной науке, направленной на изучение и моделирование сложных взаимосвязей в биологических системах с позиции целого организма (холизм/редукционизм) [17]. *Системная генетика* — раздел системной биологии, изучающий генетическую архитектуру сложных признаков, в том числе МФЗ, взаимосвязи генетических компонентов метаболических путей и функциональных модулей в развитии [36]. Каким образом подходы системной генетики могут быть применимы для изучения патогенеза частых МФЗ, таких, как ЭМ и ММ, рассмотрено ниже.

Системная генетика эндометриоза

Эндометриоз (ЭМ) — тяжёлое социально значимое МФЗ со сложной, до конца неясной этиологией, встречается с частотой от 10 до 25% у женщин репродуктивного возраста. Причиной заболевания является имплантация клеток эндометрия, заброшенных во время месячных в брюшную полость и их самопроизвольное разрастание с образованием доброкачественных гетеротопий — эндометриом [5, 14]. Число генов, определяющих развитие ЭМ, велико, а его генная сеть сложна и многообразна [4]. Она включает различные, функционально взаимосвязанные гены метаболизма (детоксикации), гены, ответственные за гормональную регуляцию, иммунный статус, воспаление, межклеточные взаимодействия, пролиферацию, эмбриональное развитие половой системы и др.

По обобщённым данным [32, 34, 42], число генов, протестированных методом случай—контроль, приближается к 100. Для многих из них (>50) была выявлена неслучайная ассоциация минорных аллелей с ЭМ. Однако результаты разных лабораторий часто не совпадали, что ставило под сомнение их научную ценность и требовало дополнительных проверок [34]. Тем не менее, результаты этих исследований имеют не только историческое значение, но позволяют существенно расширить представление о патогенезе заболевания, возможностях ранней диагностики и даже оптимизировать стратегию лечения [3].

Возможность индуцировать эндометриоидные гетеротопии (ЭМГ) в экспериментах на обезьянах путём хронической интоксикации промышленным и сельскохозяйственным ядом диоксином [22] стимулировала активный поиск генов-кандидатов ЭМ среди генов системы детоксикации. Первое исследование на эту тему было опубликовано ещё в 1996 г. [16]. Последующие работы не только подтвердили наличие такой ассоциации и для ряда других генов метаболизма, но, что особенно важно, доказали потенцирующий ЭМ эффект сочетаний минорных аллелей нескольких разных генов этого метаболического пути, особенно при комбинации аллелей генов I и II фаз детоксикации [3, 4]. Не столько аллельные варианты отдельных генов системы детоксикации, сколько сочетания сразу нескольких неблагоприятных вариантов генов фазы 1 и фазы 2 детоксикации обнаруживают выраженную ассоциацию с ЭМ и, в определённой степени, определяют тяжесть патологического процесса.

Важное место в патогенезе ЭМ принадлежит нейро-эндокринной системе. Изучение гормональных механизмов при ЭМ позволило установить ассоциацию полиморфных вариантов генов эстрогеновых рецепторов α и β (*ER α* , *ER β*), а также гена рецептора прогестерона (*PR*) с развитием ЭМ в различных популяциях.

Обширные поражения внутренних органов ЭМГ (по типу метастазирования) происходят на фоне гормональных нарушений и истощения резервных возможностей иммунной системы, усиливающихся при тяжёлом течении заболевания. Существуют данные о повышении в перитонеальной жидкости у больных ЭМ уровня фактора некроза опухолей TNF, колониестимулирующего фактора (CSF), интерлейкина-1, интерлейкинов-6, -8 и -11 [13, 14].

Среди генов, контролирующих синтез этих иммунологических факторов, наиболее убедительная информация о связи с ЭМ получена в отношении генов интерлейкина-8 (*IL-8*), интерлейкина-6 (*IL-6*), фактора некроза опухолей (*TNF α*) и гена трансформирующего ростового фактора (*TGF- β*).

Другие гены-кандидаты, выявленные методом сцепления, включают гены *RASK*, *GALT*, *P53*, *APOA2*, *HOX10*, *HOX11*. Некоторые из них, такие, как *GALT*, *P53*, *HOX10*, *HOX11*, могут быть отнесены к «ранним генам», т.е. к генам, экспрессирующимся на ранних стадиях эмбриогенеза и участвующим в процессах морфогенеза женских репродуктивных органов. Мутации этих генов могут непосредственно влиять на трансформацию клеток нормального эндометрия в клетки ЭМГ [4].

Вместе с тем, многочисленные исследования по поиску функционально активных генов, ассоциированных с ЭМ, не привели к однозначным результатам. Даже при наличии достоверных данных по сцеплению (гены *CYP19C*, *TNFA*, *PR*PROGINS*) для одних популяций, при объединении результатов разных лабораторий (метаанализ) достоверность ассоциации исчезала.

Ранее использованные в генетике ЭМ методы тестирования функциональной активности и семейный анализ сцепления, проведённые на малых выборках и на разных популяциях, не обеспечивали необходимой достоверности результатов и их воспроизводимости в разных лабораториях.

Новые данные о генах-кандидатах ЭМ были получены методом GWAS. За исключением гена *HOX10*, ранее выявленного методом сцепления, остальные гены-кандидаты ЭМ, установленные методом GWAS (*CDKN2BAS*, *WNT4*, *NFE213*, *mir-148a*), были найдены впервые. Среди выявленных генов были гены-супрессоры опухолевого роста (*CDKN2B*, *CDKN2A* и *ARF*) и гены раннего (эмбрионального) развития женского репродуктивного тракта (*HOXA*, *HOXB*, *WNT4*) [34].

Важная информация о патогенезе ЭМ была получена и при анализе эпигенетической регуляции экспрессии выявленных генов-кандидатов. Так, сравнительный анализ показал наличие гиперметилирования промоторов генов *HOXA*, рецептора прогестерона (*PR*), *CYP2C19*, генов клеточной адгезии (кадгеринов), а также генов *CDKN2B* и *CDKN2A*, супрессия которых, как считают, играет важную роль в патогенезе ЭМ [21]. В то же время гены рецепторов эстрогенов (*ER β* , *F1*) оказались гипометилированы и имели повышенную экспрессию. Разрегулируемыми при ЭМ оказались также ген *CYR61* (обогатённый цитозином белок, связывающий гепарин) и онкосупрессор *P53*. Методом ПЦР в реальном времени установлены изменения экспрессионных профилей 14 разных генов. Нарушения функции многих генов при ЭМ связывают с действием повреждающих внешних факторов, влияющих на процессы метилирования.

В пользу «эпигенетической» теории патогенеза ЭМ, по мнению её автора Sun-Wei Guo [24], свидетельствуют:

1. Лечебный эффект при ЭМ ингибиторов деацетилазы гистонов, ведущих к активации некоторых генов-кандидатов;
2. Активация эстрогеновых рецепторов при одновременной репрессии прогестероновых рецепторов;
3. Дезрегуляция экспрессионного профиля многих генов;
4. Развитие эндометриом из единичных клеток, в которых произошли митотически наследуемые эпигенетические изменения;
5. Экспериментальная индукция ЭМ у обезьян с помощью диоксина.

Как следствие этих нарушений наступает разбалансировка эпигенетической регуляции генома клеток эндометрия, которая в настоящее время рассматривается в качестве основной причины возникновения заболевания [24].

Дополнительные данные о роли эпигенетических нарушений в патогенезе ЭМ получены и при сравнительном анализе спектров регуляторных микроРНК в нормальных клетках эндометрия и в клетках ЭМГ [41]. Различия выявлены в содержании более 50 различных

микроРНК, 27 из которых в клетках ЭМГ было увеличено, по сравнению с нормой, а 23 — снижено. Изменения содержания 6 микроРНК (в их числе miR145, miR99a, miR126) были отмечены в трёх независимых исследованиях [25]. Установлено также, что 12 miRNA сцеплены с метаболическими путями генов TNF α и ингибитора циклинзависимой киназы (CDKN). Эти гены, как уже отмечалось, ассоциированы с ЭМ и играют важную роль в процессах митотического цикла, клеточного роста и пролиферации [25].

Аргументы в пользу эпигенетической теории ЭМ получены и при анализе метаболических путей эндометриоидных клеток. При исследовании сигнальных механизмов ЭМ установлена важная роль метаболического пути MAPK/AKT, контролирующего пролиферацию клеток и энергетического обмена [26]. Гиперактивация этого пути типична для опухолевых процессов и связана с повышением синтеза ростовых факторов, гормонов и цитокинов. Предложена модель, согласно которой, повышенное содержание эстрадиола активирует метаболический путь P13K/AKT/MAPK/ERK/NF κ B, что ведёт к разбалансировке гормональных и пролиферативных процессов и иммунных механизмов в клетках ЭГТ. Причины активации этого метаболического пути различны. При ЭМ нарушаются не только этот, но и другие метаболические пути. Избыток цитокинов и эстрадиола приводит к увеличению активности ароматазы — фермента, контролирующего превращение эстрогена в эстрадиол, и соответственно, к дальнейшему увеличению концентрации эстрадиола в клетках ЭГТ, что, в конечном счёте, способствует их пролиферации и инвазии эпителия брюшины.

Рассматривая имеющиеся данные с позиции системной генетики, можно предположить, что вероятным первичным толчком к началу патологического процесса может быть локальное воспаление брюшины, связанное с попаданием инфекционных агентов из кишечника или с эндометриоидной тканью, попавшей в брюшную полость при менструации. Локальное воспаление приводит к активации гена TNF α и других цитокинов (IL-12, IL-4 и их рецепторов), дисрегуляции генов рецептора прогестерона, стероидогенного белка острой фазы, ферментов CYP2C19, супрессоров опухолевого роста CDKN2B и CDKN2A, ранних эмбриональных генов HOXA, WNT4 GALT, тогда как гены эстрогенов и их рецепторы остаются гипометилированы и, соответственно, гиперактивны. Дисрегуляция процесса метилирования и нарушение функция многих генов, ассоциированных с ЭМ, объясняются и разбалансировкой регуляторной активности многих микроРНК.

Предлагаемая последовательность событий — лишь один из многих возможных вариантов патогенеза ЭМ, рассматриваемых с позиции системной генетики. В действительности, патогенетические механизмы этого комплексного заболевания могут быть другими, значительно более сложными.

Системная генетика миомы матки

Миома матки — ММ (лейомиома) — одно из самых распространённых гинекологических заболеваний, которое диагностируется почти у 60% женщин старше 45 лет. Согласно современным представлениям, ММ — доброкачественная опухоль моноклонального происхождения, возникающая из гладкомышечных клеток миометрия [15]. Важная роль в патогенезе ММ принадлежит наследственной предрасположенности.

В настоящее время известно, что в развитии ММ важная роль принадлежит соматическим хромосомным aberrациям, таким, как: делеция участка длинного плеча хромосомы 7 (del(7)(q22q32)), трисомия по хромосоме 12, транслокация (t(12;14) (q14-15;q23-24)), структурные перестройки короткого плеча хромосомы 6 (6p21) и длинного плеча хромосомы 10 (10q22)) [35, 23]. При этом остаётся неизвестным, являются ли эти хромосомные перестройки первичными или они возникают вторично, уже после начала трансформации клеток нормального миометрия в опухолевые клетки. Важно, однако, обратить внимание, что хромосомные поломки и числовые нарушения возникают не случайно, а затрагивают локусы, в которых расположены гены *HMG2*, *HMG1*, *HMGIC*, ответственные за процессы транскрипции, пролиферации, конформации ДНК, гены репарации ДНК *RAD51B* и супрессии онкогенов *CUL1*. Однако отмеченные хромосомные нарушения встречаются менее чем в 30–40% всех миоматозных узлов.

В настоящее время известно, что генная сеть ММ включает более 50 генов, в том числе гены факторов роста (19), метаболизма стероидных гормонов (16), клеточной адгезии (8) и стабильности генома (8). Методом анализа функционального сцепления были найдены гены *ER*, *COMT*, *P53*, а также ген фумарат гидролазы *FH*, мутации которого зарегистрированы в 1,3% всех ММ. Важные гены-кандидаты ММ *HMG2*, *FASN*, *MED12* были найдены методом GWAS [29].

Особого внимания заслуживает ген *MED12*, картированный на длинном плече X-хромосомы (Xq13.1) [29]. Белок, кодируемый этим геном, входит в состав крупного (1,2 микродальтон) белкового комплекса, состоящего из 26 субъединиц, который контролирует активность многих генов и выполняет функцию посредника между РНК полимеразой 2 и факторами транскрипции — специфическими индукторами генной активности. Ген *MED12* включается на ранних стадиях эмбриогенеза, является важным звеном ряда метаболических (сигнальных) путей, регулирует развитие нервных клеток [8]. Мутации во 2-м экзоне гена *MED12* были выявлены в 70% образцов тканей ММ у женщин Финляндии [29] и практически с той же частотой у женщин с ММ из Северо-Западного региона РФ [10]. Дальнейшие исследования показали, что мутации в гене *MED12* отсутствуют при ММ с транслокацией t(12;14) и редко встречаются в сочетании с другими перестройками хромосом; разные ММ-узлы даже у одно-

го пациента могут состоять из клеток с разными мутациями в гене *MED12*; мутации *MED12* сопряжены с повышенной экспрессией «раннего» гена — *WNT4* и гена β -катанина, экспрессия которых в эксперименте вызывает ММ. Наконец, нами установлено, что мутации данного гена имеют соматическое происхождение и не встречаются в клетках нормального миометрия матки или в клетках крови больных с ММ [10].

Наконец, в 2013 г. была сделана интересная находка: почти у 40% ММ был обнаружено явление хромострипсиса — множественные разрывы хромосом, сопровождающиеся в дальнейшем случайным объединением образовавшихся фрагментов [31]. Данный феномен ранее был обнаружен в клетках злокачественных опухолей, а также при некоторых врождённых аномалиях [33, 27, 37].

Многочисленные исследования особенностей экспрессии генов в тканях ММ в сравнении с нормальным миометрием позволили выделить ряд генов, функции которых стабильно отличались от нормальных [8].

К генам с высоким уровнем экспрессии относятся гены факторов роста (*MEST*, *NEGF2*), гены факторов формирования экстрацеллюлярного матрикса (*MMP11*, *CSPG2*), ангиогенеза (*TMSNB*, *SFRP1*), а также многочисленные гены, контролирующие процессы дифференцировки и метаболизма клеток. Высокий уровень экспрессии генов мембранных рецепторов *CD24* также отражает серьёзные нарушения в процессах дифференцировки клеток миомы.

Гены с низким уровнем экспрессии — это гены метаболизма ретиноевой кислоты (*ADH1*), инсулиноподобного фактора роста-2 (*IGF-2*), тканевого ростового фактора (*TGF β*), гены тучных клеток (*TPSB2*, *CPA3*) и цитоскелета. Таким образом, для ММ характерен свой, отличный от нормального профиль экспрессии многих генов, контролирующих метаболизм гормонов и процессы клеточной пролиферации. Остаётся, однако, неясным, в какой мере эти гены могут быть причиной развития самой опухоли, а в какой они отражают динамику локального патологического процесса в миометрии.

Недавно при сравнительном исследовании спектров микроРНК в клетках ММ и в нормальном миометрии были выявлены существенные отклонения в содержании почти 50 различных микроРНК [20]. Были найдены микроРНК, содержание которых было в несколько раз выше (miR 483, miR 206, mi R494, miR 3766, miR 582) или ниже нормы (miR 217, miR486, miR451, miR144, miR320). Дальнейшие исследования в этом направлении направлены на поиск генов, функции которых подавляются находящимися в избытке микроРНК и генов, активность которых должна возрасть вследствие дефицита соответствующих микроРНК (см. выше). Анализ динамических изменений генной активности клеток ММ позволит приблизиться к пониманию первичных пусковых механизмов, лежащих в основе патогенеза частного МФЗ, каким является ММ.

Суммируя результаты комплексного системного анализа ММ, можно отметить, что патогенез ММ может быть различным и, скорее всего, согласно последним данным [31], происходит по одному из четырёх возможных сценариев:

1) биаллельная инактивация гена *FH* (фумарат гидралазы), приводящая к метаболическому стрессу;

2) хромотрипсис (множественные разрывы и случайное соединение хромосомных фрагментов), ведущий к возникновению химерных генов, апоптозу, старению клетки или к её опухолевой трансформации;

3) типичные частые транслокации, приводящие к активации генов *HMGA2* и *RAD51B* (онкогенный стресс);

4) и, наконец, мутации гена *MED12*, которые стимулируют экспрессию «раннего» гена — *WNT4* и гена β -катенина, активация которых в эксперименте вызывает ММ.

Заключение

Как следует из обзора существующих данных об ЭМ и ММ, эти два наиболее частых гинекологических заболевания имеют много общего, хотя поражённые клетки являются производными разных зародышевых листков (зародышевая энтодерма — ЭМ и мезодерма — ММ). Они относятся к доброкачественным опухолям, редко (<1%) перерождаются в злокачественные, имеют клональное происхождение (возникают из единичных клеток), их рост является гормонзависимым. Несмотря на сложные генные сети, характерными для клеток ЭМ и ММ являются супрессия антионкогенов, нарушения функций генов пролиферации, дифференцировки, регуляции клеточных циклов и репарации ДНК, активация генов неоангиогенеза, а также ранних эмбриональных генов. Причиной нарушения функциональной активности этих генов служат не только мутации и неблагоприятные полиморфные варианты и их сочетания, но, главным образом, нарушения эпигенетических механизмов регуляции (ошибки метилирования ДНК и гистонов, нарушения спектра регуляторных микроРНК). Многочисленные биохимические нарушения, сложные генные сети, многообразные механизмы эпигенетической регуляции позволяют предполагать, что причиной ММ и ЭМ могут быть различные факторы, вызывающие однотипные патологические изменения, итогом которых будут типичные ЭМГ при ЭМ или миоматозные узлы при ММ. Следовательно, в обоих случаях, несмотря на различия исходных причин, патологические процессы, лежащие в основе ММ и ЭМ, являются эквивалентными.

Для объяснения эффекта эквивалентности обратимся к классическому положению генетики развития *эпигенетическому ландшафту* — понятию, предложенному основателем эпигенетики Конрадом Уоддингтоном (рисунки) [40].

Согласно определению К. Уоддингтона, «эпигенетический ландшафт» — ветвящиеся пути (каналы), кото-

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА ЭНДОМЕТРИОЗА И МИОМЫ МАТКИ



Возможные эпигенетические механизмы патогенеза эндометриоза и миомы матки. Пояснения в тексте

рые проходит клетка в процессе дифференцировки. Направления этих каналов, их конечная стадия, результат дифференцировки зависят от действия многих внешних и внутренних факторов, суживающих на каждой развилке потенции клетки. В приложении к МФЗ, в нашем случае к ММ и ЭМ, это положение имеет два важных следствия:

- 1) изменения эпигенетического ландшафта могут менять программу развития клетки;
- 2) комбинации различных генетических и эпигенетических регуляторов могут приводить к однотипным изменениям программы дифференцировки, т.е. к канализованности процесса развития, следствием которого, в конечном счёте, может быть одно и то же заболевание.

Это означает, что патологический процесс может быть индуцирован изменениями программы развития клеток эндометрия или миометрия вследствие как действия внешних факторов, так и нарушений гормонального или иммунного гомеостаза или активации «ранних» генов, контролирующих деление клеток и приводящих к их метаплазии. При этом конечный результат будет одним и тем же. В случае ЭМ клетки эндометрия приобретают способность к инвазии брюшины, имплантации, индуцируют васкуляризацию и персистируют в виде ЭМГ. При ММ клетки миометрия под влиянием онкогенного (мутации гена *MED12*, активации ранних генов и генов пролиферации вследствие транслокаций и хромосомных перестроек, связанных с хромотрипсисом) или метаболического стресса (мутация в гене фумарат-гидролазы) на фоне гормональной дисрегуляции активно делятся и формируют миоматозные скопления (узлы).

Такой сценарии патогенеза ЭМ представляется особенно реальным, если первичным пусковым механиз-

мом ЭМ является дедифференцировка клеток нормального эндометрия, попавших при менструации в брюшную полость. В этих клетках вследствие отсутствия нормальной трофики может происходить спонтанное включение «ранних» генов (в случае ЭМ — генов *WNT4*, *HOXA*, *HOXB*, *GALT*). Именно эти гены, равно как ген *CDKN2BAS* — циклинзависимый киназный ингибитор генов-супрессоров опухолевого роста CDKN-2B, обнаружили особенно тесную ассоциацию с ЭМ [34]. При этом процесс трансформации клеток функционального эндометрия в клетки доброкачественной опухоли эндометриомы становится канализованным и на определённой стадии необратимым.

Таким образом, генетические программы, корректируемые и направляемые эпигенетическими факторами, лежат в основе патогенеза ЭМ.

Вполне вероятно, что подобный сценарий репрограммирования генома происходит и при ММ. Во всяком случае, согласно имеющимся данным, наиболее реальными генами-кандидатами ММ так же, как и при ЭМ, являются гены пролиферации, транскрипции и клеточной дифференцировки (*HMG2*, *HMG1*, *HMGIC*), экспрессия которых увеличена, онкосупрессор *CULT1* и ген репарации ДНК *RAD51B*, экспрессия которых подавлена, и ген *MED12*, мутации в котором сопряжены с повышенной экспрессией «раннего» гена — *WNT4* и гена β-катанина, экспрессия которых в эксперименте вызывает ММ.

В случае ММ ведущую роль в патогенезе скорее играют генные и хромосомные мутации, патологический эффект которых, как показывает анализ спектров микроРНК, также реализуется через нарушения процессов эпигенетической регуляции. Следовательно, досимптоматическое выявление и эпигенетическая коррекция функции генов-кандидатов может стать эффективным способом профилактики и лечения ЭМ и ММ. Заслуживает внимания разработка специальных статистических, биоинформационных методов анализа результатов комплексного генетического, иммунологического и эндокринологического обследования с целью разработки и совершенствования прогностических тестов, направленных на досимптоматическое и раннее выявление женщин групп высокого риска этих тяжёлых заболеваний.

Дальнейшие исследования методом полногеномного секвенирования и изучение функциональной активности генов-кандидатов ЭМ и ММ в норме и в условиях эпигенетических нарушений, связанных с ошибками процесса метилирования и дисрегуляцией микроРНК, представляют собой магистральный стратегический путь для решения проблемы этиологии и патогенеза ЭМ и ММ.

Список литературы

1. Айламазян Э.К., Баранов В.С. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных заболеваний. — М.: МЕДпресс-информ, 2006. — 417 с.
2. Баранов В.С. Программа «Геном человека» как научная основа профилактической медицины // Вестник РАМН. — 2000. — №10. — С. 27—37.
3. Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Баранова Е.В. и др. Генетический паспорт основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В.С. Баранова. — СПб.: «Изд-во Н-Л», 2009. — 452 с.
4. Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Швед Н.Ю., Крамарева Н.Л. Генетические аспекты профилактики и лечения эндометриоза // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 5. — Новосибирск: Альфа Виста, 2004. — С. 136—156.
5. Баскаков В.П., Цвелев Ю.В., Кира Е.Ф. Эндометриозидная болезнь. — СПб.: Издательство Н-Л, 2002. — 452 с.
6. Бочков Н.П. Вклад генетики в медицину // Рос. мед. вестн. — 2001. — №4. — С. 4—13.
7. Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. — СПб.: Борей Арт, 2000. — 262 с.
8. Егорова О.В., Бермишева М.А., Хуснутдинова Э.К., Глебова Н.Н. Современные представления о молекулярно-генетических основах миомы // Генетика. — 2007. — Т. 6, №10. — С. 11—15.
9. Корочкин Л.И. Действие генов в развитии. — М.: Наука, 1979. — 269 с.
10. Осиневская Н.С., Иващенко Т.Э., Долинский А.К. и др. Мутации гена MED-12 в клетках лейомиомы у женщин Северо-Западного региона РФ // Генетика. — 2013. — Т. 49, №12. — С. 1426—1431.
11. Пузырев В.П. Генетика мультифакториальных заболеваний — между прошлым и будущим // Мед. генетика. — 2003. — Т. 2. — С. 498—508.
12. Пузырев В.П. Феномно-геномные отношения и патогенетика многофакторных заболеваний // Вестн. РАМН. — 2011. — №9. — С. 17—27.
13. Сотникова Н. Ю., Анциферова Ю. С., Посисеева Л. В. Параметры функционального состояния лимфоцитов перитонеальной жидкости у женщин с наружным генитальным эндометриозом // Иммунология. — 2000. — №3. — С. 53—56.
14. Ярмолинская М.И., Тарасова М.А., Сельков С.А. и др. Наружный генитальный эндометриоз: Пособие для врачей / Под ред. Э.К. Айламазяна. — СПб.: Изд-во «Н-Л», 2010. — 84 с.
15. Ярмолинская М.И., Цыпурдеева А.А., Долинский А.К. и др. Миома матки: этиология, патогенез, принципы диагностики: Пособие для врачей / Э.К. Айламазян, В.Ф. Бежиняр (ред.). — СПб.: Изд-во «Н-Л», 2013. — 78 с.
16. Baranov V.S., Ivaschenko T., Bakay B., Aseev M.B. et al. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases // Hum. Genet. — 1996. — Vol. 97(4). — P. 516—520.
17. Bertalanffy L. «General System Theory, 1976, Foundation, Development and Perspective» George Brazzillier 1968. — 295 p.
18. Eicher E.E., Flint J., Gibson G., Kong A. et al. Missing heritability and strategies for finding the underlining causes of complex diseases // Nat. Rev. Genet. — 2010. — Vol. 11. — P. 446—450.
19. Feinberg A.P., Irizarry R.A., Fradin D., Aryee M.G. et al. Personalized epigenomics signatures that are stable over time and covary with body mass index // Science Translat. Med. — 2010. — Vol. 2, №49. — P. 49—67.
20. Georgieva B., Milev I., Minkov I. et al. Characterisation of the uterine leiomyoma microRNAome by deep sequencing // Genomics. — 2012. — Vol. 99. — P. 275—281.
21. Georgiou I., Syrrou M., Bouba I., Dalkalitsis N., Paschopoulos M., Navrozoglou I., Lolis D. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis // Fertil Steril. — 1999. — Vol. 72, №1. — P. 164—166.
22. Gibbons A. Dioxin tied to endometriosis // Science. — 1993. — Vol. 262, №5138. — P. 1373.
23. Gross K.L., Morton C.C. Genetics and the development of fibroids // Clin. Obstet. Gynecol. — 2001. — Vol. 44, №2. — P. 335—349.
24. Guo S.W. Epigenetics of endometriosis // Mol. Hum. Reprod. — 2009. — Vol. 10. — P. 587—607.
25. Hull M.L., Print C.G. Micro RNA in endometriosis // Endometriosis: Science and Practice / Giudice L.C., Johannes L. et al. (Eds) Blackwell Publ. Ltd. — 2012. — P. 173—183.
26. Kim J.J., Yin X. Signaling Pathways in Endometriosis // Endometriosis: Science and Practice / Giudice L.C., Johannes L. et al. Blackwell Publ. Ltd. — 2012. — P. 164—171.
27. Kloosterman W.P., Cuppen E. Chromotripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences // Curr. Opin. Cell. Biol. — 2013. — Vol. 25. — P. 341—348.
28. Luo Li., Peng Gang, Zhu Yun et al. Genome-wide gene and pathway analysis // Europ. J. Hum. Genet. — 2010. doi:10.1038/ejhg.2010. 62. — P. 1—9.
29. Makinen N., Mehine M., Tolvanen J., Kaasinen E. et al. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas // Science. — 2011. — Vol. 334. — P. 252—255.
30. Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J. et al. Finding the missing heritability of complex diseases // Nature. — 2010. — Vol. 461. — P. 747—753.
31. Mehine M., Kaasinen E., Makinen N. et al. // New England J. Med. — 2013. — Vol. 369, №1. — P. 43—53.
32. Montgomery G.W., Nyholt D.R., Zhao Z.Z., Treloar S.A., Painter J.N., Missmer S.A., Kennedy S.H., Zondervan K.T. The search for genes contributing to endometriosis risk // Hum. Reprod. Update. — 2008. — Vol. 14, №5. — P. 447—457.
33. Pelliester Fr. Chromotripsis: how does such a catastrophic event impact human reproduction? // Human Reproduction. — 2014. — doi:10.1093/humrep/deu003.
34. Rahmiloglu N., Missmer S.A., Montgomery G.W., Zondervan K.T. Insights into Assessing the Genetics of Endometriosis // Curr. Obstet. Gynecol. Rep. — 2012. — Vol. 1, №3. — P. 124—137.
35. Rein M.S., Friedman A.J., Barbieri R.L., Pavelka K. et al. Cytogenetic abnormalities in uterine leiomyomata // Obstet. Gynecol. — 1991. — Vol. 77, №6. — P. 923—926.
36. Sieberts S.K., Schadt E.E. Moving toward a system genetics view of disease // Mamm. Genome. — 2007. — July. — 18(6—7). — P. 389—401.
37. Stephens P.G., Grenman C.D., Fu B. et al. Massive genomic rearrangement acquired a single catastrophic event during cancer development // Cell. — 2011. — Vol. 144. — P. 27—40.
38. Swan M. Multigenetic condition risk assessment in direct-to consumer genomic service // Genet. Med. — 2010. — Vol. 12. — P. 279—288.
39. Waddington C.H. Principles of development and differentiation. — New York: Macmillan Publ. Co. Inc, 1966. — 375 p.
40. Zhao Z.Z., Croft L., Nyholt D.R. et al. Evaluation of polymorphisms target sites for microRNAs differentially expressed in endometriosis // Mol. Human Reprod. — 2011. — Vol. 17, №2. — P. 92—103.
41. Zondervan K.T., Cardon L.R. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies // Nat. Protoc. — 2007. — 2. — P. 2492—2501.

Systemic Genetic of some common complex disorders

Baranov V.S.

Ott's Institute of Obstetrics & Gynecology RAMS,
Mendeleevskaya line 3, Saint-Petersburg, Russian Academy of Sciences;
e-mail: Baranov@vb2475.spb.edu

Human genome deciphering in 2003 inspired mankind with hope of prompt solution of many problems confined to diagnostics, prevention and treatment of inherited and multifactorial disorders (MFD). These expectations quickly come to be truth for monogenic disorders. Causative genes and many mutations were identified for more than 1500 inherited disorders. The problem turned to be much more complicate while addressed to complex common disorders. Allelic polymorphisms as was repeatedly shown was responsible for less than 10–15% of inheritance. The reason for «missing inheritance» («missing heritability») could be found in systemic biology or systemic genetics of complex traits. Systemic genetic data available for two common diseases such as endometriosis and uterine leiomyoma are presented. The genetic nets and functional modules of endometriosis and leiomyoma studies by GWAS, analysis of methylation and expression profiles as well as miRNA turnover are briefly reviewed. Most plausible scheme of epigenetic landscape of endometriosis origin is suggested.

Key words: human genome, complex disorders, epigenetics, systemic genetics, endometriosis, leiomyoma uteri. epigenetic landscape

Архитектура генома: генетическое разнообразие и хромосомные болезни*

Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики»
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук,
г.Томск, ул. Набережная р.Ушайки, 10; факс +7(3822) 51-37-44, e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Активное использование микрочиповых технологий в последние годы выявило новую форму структурной вариабельности генома — вариации числа копий ДНК (CNV). Установлено, что CNV являются важным фактором, участвующим в эволюции приматов, определяющим фенотипическое разнообразие между индивидами и популяциями, а также предрасполагающим ко многим патологическим состояниям: задержка развития, интеллектуальные нарушения, аутизм, шизофрения, ожирение, эпилепсия и др. В данном обзоре рассмотрены особенности архитектуры генома, предрасполагающие к возникновению микроделений и микродупликаций, механизмы образования этих аберраций, модели их клинического проявления и классификация фенотипических признаков.

Ключевые слова: структурная вариабельность генома, низкокопийные повторы ДНК, сегментные дупликации, вариации числа копий ДНК, синдромы реципрокных микроделений и микродупликаций

Введение

Структурная вариабельность генома проявляется на различных уровнях его организации: от одиночных нуклеотидов до микроскопически видимых крупных аберраций (более 5 Мб). Патогенетически значимые перестройки до 5 Мб, называемые *микроделениями* и *микродупликациями*, до развития широкогеномных молекулярно-цитогенетических технологий выявлялись методом таргетной флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием зондов на заранее известные области хромосом, субмикроскопические аномалии в которых ассоциированы с наследственными синдромами. Активное развитие широкогеномных технологий в течение последних лет привело к обнаружению значительного количества субмикроскопических перестроек размером от нескольких тысяч пар оснований до 5 Мб, которые были обозначены как вариации числа повторов (copy number variation — CNV) [36]. Показано, что CNV вовлечены в эволюцию человека, формирование генетического разнообразия между индивидами и возникновение генетических заболеваний [6, 46].

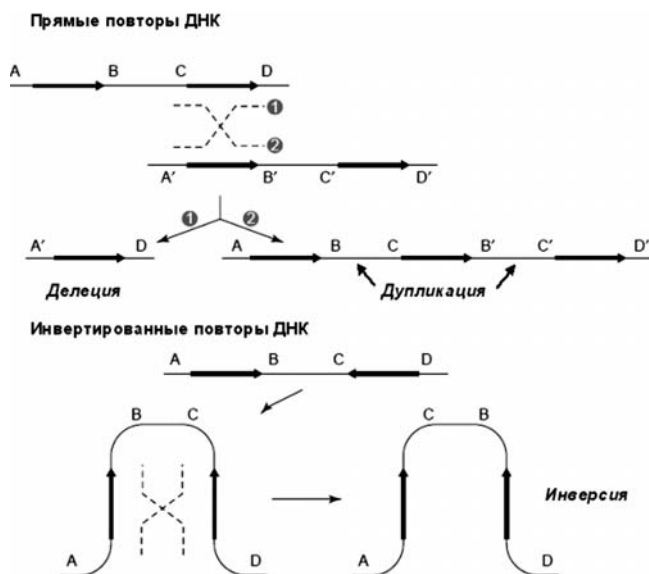
Несмотря на то, что CNV выявляются по всему геному, существуют области, наиболее предрасположенные к такого рода перестройкам. Этот феномен обычно связан с особенностями архитектуры генома, а именно, наличием низкокопийных повторов ДНК (low-copy repeats — LCRs) [44] или сегментных дупликаций [2]. LCRs могут вызывать рекуррентные делеции, дупликации и инверсии одинакового размера вследствие неправильного расположения хромосом или хроматид и

последующей неаллельной гомологичной рекомбинации (nonallelic homologous recombination — NAHR) между этими участками [44]. Что касается перекрывающихся нерекуррентных CNV различного размера, архитектура генома также может обуславливать их образование, но посредством других, недавно описанных механизмов — одного, основанного на процессе репликации и получившего название *опосредованной микрогомологией и индуцированной разрывами репликации* (microhomology-mediated break-induced replication — MMBIR) или второго — связанного с остановкой вилки репликации и переменной матрицы (fork stalling and template switching — FoSTeS) [11, 24].

Клиническая значимость CNV, главным образом, определяется размером перестройки, количеством генов внутри аберрации, наличием некодирующих регуляторных элементов и её происхождением. Большинство патогенетически значимых CNV содержат дозозависимый(ые) ген(ы), который приводит к развитию аномального фенотипического признака за счёт увеличения или уменьшения количества его белкового продукта. И, в отличие от моногенного заболевания, обусловленного единственным подобным геном, микроделеционные/микродупликационные синдромы [39] являются, как правило, смежными генными синдромами и развиваются в результате наличия CNV, содержащих два и более дозозависимых гена, что соответственно приводит к формированию более сложного фенотипа.

Некоторые фенотипические признаки, проявляющиеся в результате микроделений или микродуплика-

* Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (соглашение №8727), а также гранта 7 Рамочной программы Евросоюза «CHERISH» (2009—2012 гг., №223692).



Механизмы формирования структурных хромосомных aberrаций вследствие неаллельной гомологичной рекомбинации между сегментными дупликациями генома (по [28])

ции, могут демонстрировать менделевское наследование, как, например, при геномном импринтинге (синдромы Прадера—Вилли/Энгельмана) или мозаицизме (нейрофиброматоз I типа). Считается, что микродупликации являются вариантом триаллельного характера наследования [15].

Вариации числа копий ДНК

Широкогеномные исследования с высоким уровнем разрешения установили значительную субмикроскопическую структурную вариабельность в геноме. Помимо уже известной однонуклеотидной вариабельности (single nucleotide variation — SNV) или однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism — SNP) есть ещё целый ряд полиморфизмов — короткие tandemные повторы (short tandem repeat — STR), варьирующие по числу tandemных повторов (variable number tandem repeat — VNTR), вариации числа копий и локализации мобильных элементов. Эта структурная вариабельность возникает за счёт делеций, дупликаций, трипликаций, инсерций, несбалансированных криптохромических транслокаций и сбалансированных геномных инверсий. Недавние исследования показали, что геномы двух случайно выбранных человек отличаются по более чем 3,5 млн SNP (0,1%) и ещё значительнее, по не менее чем 1000 CNV размером от 500 п.н. до 1 Мб. Установлено, что не менее 38000 CNV размером, превышающим 100 п.н., составляют более 29% референсного генома человека [49]. Однако, несмотря на наличие современных технологий, позволяющих исследовать весь геном, точное число, положение, раз-

мер, генный состав и популяционную частоту CNV ещё предстоит установить.

Постоянно обновляющуюся информацию о CNV можно найти в Базе данных геномных вариантов Торонто (Database of Genomic Variants — DGV, <http://projects.tcag.ca/variation>). Клинически значимые CNV каталогизированы в Базе данных хромосомных дисбалансов и патологий у человека (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans — DECIPHER, <http://decipher.sanger.ac.uk/information>), а также в Регистре несбалансированных хромосомных aberrаций Европейской цитогенетической ассоциации (European Cytogenetics Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations — ECARUCA, <http://www.ecaruca.net>).

Молекулярные механизмы формирования CNV

Низкокопийные повторы и неаллельная гомологичная рекомбинация

Компьютерный анализ последовательности ДНК, проведённый в ходе проекта Геном человека (Human Genome Project — HGP, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml), показал, что LCRs, области с 90%-ной идентичностью в последовательности ДНК и размером более 1 кб (затрагивающие как повторяющиеся, так и уникальные последовательности), занимают примерно 4—5% гаплоидного генома человека. Низкокопийные повторы распространены по всему геному человека, в значительной степени концентрируясь в периферических и субтеломерных областях. Большинство LCRs возникло в процессе видообразования приматов [2].

LCRs более 10 кб и с более 95—97%-ной идентичной последовательностью могут индуцировать геномную нестабильность, предрасполагая к смещённому расположению хромосом и хроматид и далее к неаллельной гомологичной рекомбинации, также известной как неравный кроссинговер [44]. NAHR между однонаправленными сегментными дупликациями приводит к несбалансированным делециям или реципрокным дупликациям области генома, расположенной между ними, в то время как возникает сбалансированная инверсия, если LCRs противоположно ориентированы [28] (рисунок). Данный молекулярный механизм лежит в основе большинства рекуррентных (повторяющихся) перестроек мейотического происхождения, но, кроме того, LCRs также могут индуцировать нереккуррентные геномные aberrации в мейозе и митотические (соматические) ошибки репликации. Известно, что чем крупнее LCRs и более идентична их последовательность, тем чаще между ними возникают aberrации. Так, например, наиболее часто встречающийся синдром микроделеции 22q11.2 (велокардиофациальный синдром и синдром Ди Джорджи) возникает в результате потери участка длинного плеча хромосомы 22 между блоками повторов размером более 300 п.н. с идентичностью последовательности 99,7% [40]. С помощью биоинформационного подхода

ранее было предсказано существование 130 «горячих» областей размером от 50 т.п.н. до 10 м.п.н., фланкированных высоко гомологичными LCRs размером более 10 т.п.н. и предрасположенных к хромосомным мутациям [2, 42].

Негомологичное соединение концов

До недавнего времени совсем мало было известно относительно механизмов формирования нереккуррентных геномных перестроек. К таким механизмам можно отнести негомологичное соединение концов (nonhomologous end joining — NHEJ). Кроме основанных на рекомбинации механизмов для репарации одностречевой ДНК, NHEJ может быть использован для репарации двуниевых разрывов (double-strand breaks — DSBs). В данном случае сначала происходит обнаружение DSBs, затем между концами повреждённой ДНК образуются мосты, далее эти концы модифицируются и сшиваются [35]. В отличие от NAHR, механизм негомологичного соединения концов не требует наличия определённой архитектуры генома для репарации двуниевых разрывов. Продукты репарации часто содержат лишние случайные нуклеотиды в месте соединения концов ДНК, так называемый молекулярный шрам.

Опосредованные микрогомолгией ошибки репликации

Из-за отсутствия явных особенностей геномной архитектуры вблизи точек разрывов считалось, что NHEJ играет важную роль в формировании нереккуррентных геномных перестроек. Однако недавно описанные механизмы MMBIR и FoSTeS, основанные на ошибках репликации ДНК, также участвуют в формировании нереккуррентных CNV [11, 24]. Показано, что данные механизмы, главным образом, приводят к формированию сложных по структуре геномных аберраций, когда, например, делетированные и/или дублированные участки ДНК чередуются с областями с нормальной копийностью или с триплицированными. В этих моделях вилка репликации ДНК останавливается, отстающая нить ДНК отделяется от исходной матрицы и взаимодействует с другой ближайшей репликационной вилкой за счёт микрогомологии 3'-конца, инициируя дальнейший синтез ДНК [50].

Механизмы MMBIR/FoSTeS предположительно обуславливают возникновение перестроек в области Xq22 при болезни Пелицеуса—Мерцбахера [24], дубликации Xq28 [5], делеции и дубликации 17p11.2p12 [49] и др. Кроме того, показано, что данные механизмы могут приводить к формированию *de novo* CNV, ассоциированных с редкими заболеваниями [48]. Подробный компьютерный анализ архитектуры генома в области точек разрывов этих перестроек выявил особые конформации ДНК и избыток специфических мотивов и повторяющихся элементов, потенциально предрасполагающих к формированию CNV [48].

Частота и популяционные различия CNV

Локус-специфичная частота CNV варьирует от 10^{-4} до 10^{-5} , превосходя частоту точковых мутаций в 1000—10 000 раз [29]. За исключением перестроек на X-хромосоме, патогенные дубликации встречаются реже, чем делеции. Такую ситуацию можно объяснить тем, что дубликации сложнее выявить, фенотипически дубликации проявляются более мягко, а также отсутствием реципрокных дубликаций при интрахроматидной NAHR [44].

CNV, как правило, встречаются с одинаковой частотой в разных популяциях. Однако для отдельных синдромов, например для синдрома микроделеции 17q21.31 и синдрома Сотоса, показаны значительные различия в частотах между популяциями [18, 21]. В этих случаях популяционно-специфичные особенности архитектуры генома были выявлены у родителей пациентов. Например, ожидаемая частота синдрома микроделеции 17q21.31 в европейской популяции выше, чем в азиатской, поскольку делеция ассоциирована с 900 кб инверсией, носителями которой являются примерно 20% европейцев и только 1% азиатов [47]. Микроделеции, приводящие к синдрому Сотоса, чаще встречаются в японской популяции [21].

Выявление новых CNV

Подход «От генотипа»

Использование высокоразрешающих платформ для исследования больших групп пациентов во всем мире привело к определению новых синдромов микроделеций и микродубликаций и смене подхода «от фенотипа», при котором поиск гена заболевания велся в клинически однородной группе пациентов, на подход «от генотипа», когда проводится анализ перекрывающихся CNV в клинически гетерогенной группе пациентов. Последующее же более тщательное обследование пациентов может выявить общие фенотипические признаки и выделить новый синдром.

Рекуррентные CNV, предсказанные на основе структуры генома

Альтернативный подход, используемый для идентификации новых синдромов микроделеций и микродубликаций, опирается на знания об архитектуре генома человека и NAHR-механизме. Так, были статистически предсказаны 130 областей генома, которые могут быть нестабильными из-за фланкирующих их однонаправленных LCRs, и разработан микрочип, содержащий более 2000 ВАС клонов (bacterial artificial chromosome (BAC) — бактериальная искусственная хромосома), специфичных к предсказанным областям [42]. Таким образом, было выявлено 5 новых рекуррентных патогенных перестроек в областях 1q21.1, 15q13.3, 15q24, 17q12, 17q21.31 [43]. Все эти 5 микроделеций, а также в некото-

рых случаях позже обнаруженные реципрокные микро-дупликации были описаны в больших группах пациентов с различными патологическими состояниями, включая задержку развития, интеллектуальные расстройства, аутизм, эпилепсию, диабет MODY и шизофрению.

Нами также с помощью aCGH на микрочипах Agilent 60K были исследованы 84 ребёнка с умственной отсталостью (УО) неясной этиологии. Молекулярный диагноз в виде микроделеционного синдрома (МС) был поставлен шести пробандам: 15q24 (2 чел.), 16p11 (2 чел.), 16p12 и 22q11 МС. Еще у одного ребёнка была идентифицирована крупная делеция в области синдрома кошачьего крика. В геномах остальных 17 пациентов была обнаружена 21 потенциально патогенная хромосомная мутация. При сопоставлении наших данных с «горячими» областями CNV оказалось, что все выявленные МС и синдром кошачьего крика были предсказаны на молекулярном уровне. Кроме них с данными литературы пересекались обнаруженные нами впервые области потенциально патогенных del2q12.3 и dup10q11.21q11.22 [14]. Важно, что в случае NAHR возникают как делеции, так и реципрокные дупликации одного и того же участка, что имеет особое значение при поиске клинически значимых CNV.

Выявление дозозависимых генов

При некоторых патологиях спектр наблюдаемых фенотипических аномалий может быть результатом нарушения функционирования одного дозозависимого гена. Отсутствие белка, кодируемого одним аллелем гена, приводит к снижению этого продукта примерно на 50% и развитию аномальных фенотипических признаков, что получило название *гаплонедостаточности*, т.е. состояния, когда пониженного уровня белка недостаточно для обеспечения его нормальной функции. И, наоборот, в результате дупликации целого гена или мутаций, приводящих к приобретению белковым продуктом новых функций, увеличивается его количество или активность, соответственно, даже при отсутствии физиологического активатора, или развивается нечувствительность к негативным регуляторам.

В отличие от моногенных заболеваний, показано, что некоторые патологические состояния, особенно задержка развития, интеллектуальные нарушения и врождённые пороки развития, являются результатом субмикроскопических хромосомных перестроек, содержащих несколько генов, по меньшей мере два из которых являются дозозависимыми и обычно работают независимо друг от друга. В случае таких протяжённых делеционных и дупликационных синдромов (например, Лангера—Гидиона, Поточки—Шейфер и др.) фенотипические проявления являются результатом нарушения дозы этих генов, локализованных в областях перестроек [39].

Поскольку CNV часто содержат много генов, выявление такой аберрации у пациента может способствовать идентификации новых дозозависимых генов, обуславливающих заболевание. Подробное клиническое описание пациентов, создание линий модельных животных, повторяющих фенотипические признаки патологии, и/или выявление точковых мутаций в кандидатных генах необходимы для определения моно- или полигенной природы заболевания. Следующие кандидатные гены были ассоциированы с микроделеционными и микродупликационными синдромами: *CREBBP* — синдром Рубинштейна—Тэйби [34], *UBE3A* — синдром Ангельмана [31], *MECP2* — синдром Ретта [1], *NSD1* — синдром Сотоса [20] и др.

Распространённые заболевания и редкие *de novo* CNV

Несмотря на то, что такие заболевания, как шизофрения, задержка развития и интеллектуальные расстройства, встречаются с высокой частотой, генетический вклад в этиологию этих состояний определен лишь частично. Применение широкогеномных молекулярно-цитогенетических технологий привело к выявлению редких патогенных *de novo* CNV, ассоциированных с большинством указанных патологий [10, 13]. Некоторые аберрации обнаружены у нескольких пациентов, например микроделеции и микродупликации 1q21.1 при задержке развития и интеллектуальных нарушениях, аутизме, шизофрении, микро- и макроцефалии, соответственно [4, 13, 33]; микроделеции 15q13.3 с вовлечением гена *CHRNA7* у пациентов с нейроразвивающимися расстройствами и задержкой нервно-психического развития, включая задержку развития и интеллектуальные расстройства, задержку речи, эпилепсию (около 1%), шизофрению, биполярное расстройство, тревожность, расстройство настроения, антисоциальное поведение [13]; микроделеции и микродупликации 16p11.2 у пациентов с аутизмом (около 1%) и шизофренией [19, 32]. Интересно, что аутизм чаще ассоциирован с микроделециями 16p11.2 и макроцефалией, в то время как шизофрения — с микродупликациями 16p11.2 и микроцефалией, в отличие от микроделеций и микродупликаций 1q21.1. Этот феномен был описан в диаметральной модели поведенческих фенотипов аутистического и психотического спектров при реципрокных «сестринских» геномных нарушениях [7]. Согласно этой модели, диаметральные CNV могут индуцировать контрастные фенотипы, ассоциированные с расстройствами аутистического и психотического спектров, отражая эволюцию мозга [8].

Патогенные CNV также были выявлены при других таких распространённых заболеваниях, как болезнь Альцгеймера (микродупликации гена предшественника амилоида *APP*) [37], болезнь Паркинсона (микродупликации и микротрипликации гена *SNCA*) [12], панкреатит [25] и др.

Клиническое значение CNV

Механизмы формирования клинических фенотипов

Наиболее часто микроделеция или микродупликация приводят к формированию клинических признаков заболевания путём изменения копий дозозависимых генов, локализованных в области перестройки [45]. В то же время, существуют и другие механизмы влияния CNV на проявление патологии [30]. Во-первых, точки разрывов абберрации могут нарушать кодирующую последовательность гена [38] или приводить к возникновению нового гибридного гена путём слияния двух других [27]. Последний механизм часто наблюдается при раке. Во-вторых, через CNV могут удаляться или дублироваться регуляторные элементы гена (например, тканеспецифичные энхансеры), изменяющие функционирование гена при неизменной белоккодирующей последовательности. Такой эффект был описан, главным образом, при сбалансированных транслокациях [26] и микроделециях [3], при которых точки разрывов расположены на расстоянии примерно 1 м.п.н. выше или ниже относительно кодирующей последовательности гена заболевания [16]. Так, была обнаружена микродупликация размером 590 кб, включающая регуляторный элемент ZRS в интроне 5 гена *LMBR1* [26], расположенный на расстоянии примерно 1 Мб до интактного гена *SHH*, мутации в котором ассоциированы с трехпалланговым большим пальцем и полисиндактилией [17]. Микродупликация размером 5,5 т.п.н. в некодирующей последовательности, расположенной примерно 110 т.п.н. ниже гена *BMP2* на хромосоме 20p12.2, показана в двух семьях с брахидактилией типа A2 [9]. Дупликация регуляторных последовательностей в безгенной области ДНК выше гена *SOX9* размером около 2 м.п.н. выявлена в четырёх неродственных семьях с признаками синдрома Кука [23].

Кроме изменения числа копий дозозависимых генов, микроделеция может приводить к проявлению рецессивных мутаций или функциональных полиморфизмов на втором интактном аллеле [22]. И, наконец, оба типа CNV могут индуцировать формирование аномальных фенотипических признаков, затрагивая дозозависимый ген, например, посредством внутригенных перестроек в доминантном гене, расположенном на аутосоме или на хромосоме X.

На данный момент существует три модели, описывающие формирование CNV-ассоциированных фенотипов [10]:

- моногенная;
- простой цис-эпистаз;
- сложный цис-эпистаз.

Моногенная модель предполагает, что заболевание возникает в результате нарушения дозы одного гена. Примером может служить наследственная мотосенсорная нейропатия Шарко—Мари—Тус, тип 1А. В основе данного заболевания могут лежать дупликация гена

PMP22, а также точковые мутации в нём. В то же время реципрокная делеция данного гена ассоциирована с прогрессирующей наследственной нейропатией с подверженностью параличу от сдавления.

Модель простого цис-эпистаза показывает, что дисфункция одного гена необходима и достаточна для развития патологии; однако нарушение работы этого «главного» гена модулируется посредством эпистатического воздействия других генов в области CNV. Известно, что как уменьшение, так и увеличение дозы *TBX1* в результате делеции или дупликации 22q11.2 приводит к развитию основных признаков велокардиофациального синдрома и синдрома Ди Джорджи. В то же время, пациенты с точковой мутацией в гене *TBX1* не имеют интеллектуальных расстройств, в отличие от пробандов с делецией или дупликацией 22q11.2. Возможно, что *TBX1* подвергается цис-эпистазу, в результате чего развиваются когнитивные расстройства.

Модель сложного цис-эпистаза заключается в том, что патологический фенотип является результатом нарушением дозы нескольких генов, вовлечённых в CNV. Некоторые гены, локализованные в области абберрации, приводят к формированию специфических эндотипов, тогда как другие демонстрируют сложные аддитивные или мультипликативные взаимодействия.

Анализ известных реципрокных CNV и ассоциированных с ними клинических признаков позволил выделить три основные группы реципрокных CNV-индуцированных синдромов: зеркальные, идентичные, уникальные [10].

Зеркальные фенотипы. К наиболее распространённым примерам этого класса синдромов относятся синдромы микроделеций и микродупликаций 1q21.1, 3q29, 16p11.2, 17q11.2. Зеркальными являются не все клинические признаки, но определённые, такие, как размер головы (микро- и макроцефалия — при абберациях в области 1q21.1, 3q29, 16p11.2), метаболический гомеостаз (16p11.2, 17q11.2), психиатрические расстройства (1q21.1, 16p11.2). Кроме того, при синдромах микроделеции и микродупликации 17q11.2 обнаружена коморбидность между метаболическим гомеостазом и расстройством сна. При микроделеции (синдром Смит—Магенис) наблюдаются ожирение и нарушение сна, тогда как при микродупликации (синдром Поттоки—Лупски) — неспособность набрать вес и приступы апноэ во сне.

Идентичные фенотипы. В данном случае ключевые фенотипические признаки при микроделеции и микродупликации совпадают. Например, микроделеция 22q11.2 приводит к велокардиофациальному синдрому и синдрому Ди Джорджи, проявляющихся врождёнными пороками сердца, нёбо-глочной недостаточностью, гипопаратиреозом, аплазией или гипоплазией тимуса, аномалиями мочеполового тракта, черепно-лицевыми аномалиями, плохой обучаемостью и психиатрическими расстройствами. При микродупликации 22q11.2 клини-

ческие проявления могут отсутствовать либо быть сходными с описанными при микроделеции: пороки сердца, нёбо-глоточная недостаточность, гнусавость и урогенитальные аномалии.

Уникальные фенотипы. Уникальными признаками считаются те, которые развиваются только при одном типе аберрации и не встречаются при реципрокной перестройке. Так, эпилепсия ассоциирована с микроделцией 16p11.2 и не встречается при микродупликацией этой области.

При использовании aCGH для выявления причин умственной отсталости у детей нами также были обнаружены две реципрокные аберрации — микроделеция и микродупликация области 3p26.3, в обоих случаях затрагивающие единственный ген контактин 6 (*CNTN6*) [14]. CNV в данной области встречаются в литературе, однако, как правило, они более протяжённые и включают, кроме контактина 6, ещё ряд других рядом расположенных генов. Несмотря на наличие описания пациентов, страдающих нарушением интеллектуального развития и имеющих аберрацию в области 3p26.3, самостоятельный синдром микроделеции или микродупликации 3p26.3 пока не выделен. В нашем случае особое значение имеет то, что обе перестройки содержат единственный ген *CNTN6*, экспрессирующийся в мозге и отвечающий за формирование межклеточных взаимодействий. Важно также то, что оба пациента имеют нарушение интеллектуального развития, расстройство внимания и нарушения речи. К общим фенотипическим аномалиям относятся вытянутая форма черепа, эпикант, широкая переносица, высокое (готическое) нёбо, нарушение осанки, аномалии половой системы. Также у обоих пациентов были диагностированы признаки гипертензионно-гидроцефального синдрома. Есть у пробандов и уникальные признаки. Например, у пациента с микроделцией были отмечены детская абсансная эпилепсия, клинодактилия V пальца кисти, длинные пальцы стоп, сандалевидная щель стопы, низкорослость смешанного генеза. У пациента с микродупликацией дополнительно выявлены большой рот, полные губы, укороченный фильтр, аномалии ушной раковины, гипермобильность суставов. Только умственная отсталость, наблюдаемая у обоих пациентов, может быть обусловлена нарушением функции гена *CNTN6*, количество продукта которого может быть недостаточно (делеция) или избыточно (дупликация) для нормальной реализации контролируемых им процессов. В то же время, оказалось, что условно здоровый отец ребёнка с микродупликацией 3p26.3 также имеет микродупликацию этой области, содержащую только контактин 6. Однако перестройка у отца несколько больше, чем у ребёнка. Возможно, что существует некоторый модифицирующий фактор, совместно с микродупликацией 3p26.3 обуславливающий развитие заболевания. Мальчик с микроделцией 3p26.3 является сиротой, поэтому определение происхождения данной аберрации не представляется возможным.

Важно подчеркнуть, что факторами, осложняющими анализ фенотипических эффектов CNV, являются их неполная пенетрантность и значительная вариабельность признаков. Кроме того, описание sibсов или родителей часто отсутствует или представлено скудно. Слабо выраженные клинические признаки часто не диагностируются, и исследование aCGH не назначается, что приводит к недооценке количества дупликаций, чаще проявляющихся умеренными фенотипами. Также именно дупликации характеризуются более вариабельной экспрессивностью по сравнению с делециями. Дупликации чаще наследуются, в то время как делеции чаще возникают *de novo*.

Список литературы

1. Amir R.E., Van den Veyver I.B., Wan M. et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23, №2. — P. 185—188.
2. Bailey J.A., Yavor A.M., Massa H.F. et al. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly // *Genome Res.* — 2001. — Vol. 11, №6. — P. 1005—1017.
3. Beysen D., Raes J., Leroy B.P. et al. Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 77, №2. — P. 205—218.
4. Brunetti-Pierri N., Berg J.S., Scaglia F. et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities // *Nat. Genet.* — 2008. — Vol. 40, №12. — P. 1466—1471.
5. Carvalho C.M., Zhang F., Liu P. et al. Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — Vol. 18, №12. — P. 2188—2203.
6. Carvalho C.M., Zhang F., Lupski J.R. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genomic disorders: a window into human gene and genome evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Vol. 107. — P. 1765—1771.
7. Crespi B., Summers K., Dorus S. Genomic sister-disorders of neurodevelopment: an evolutionary approach // *Evol. Appl.* — 2009. — Vol. 2. — P. 81—100.
8. Crespi B., Stead P., Elliot M. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Comparative genomics of autism and schizophrenia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Vol. 107. — P. 1736—1741.
9. Dathe K., Kjaer K.W., Brehm A. et al. Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2 // *Am. J. Hum. Genet.* — 2009. — Vol. 84, №4. — P. 483—492.
10. Golzio C., Katsanis N. Genetic architecture of reciprocal CNV // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2013. — Vol. 23, №3. — P. 240—248.
11. Hastings P.J., Ira G., Lupski J.R. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation // *PLoS Genet.* — 2009. — Vol. 5, №1. — e1000327.
12. Ibanez P., Bonnet A.M., Debarges B. et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease // *Lancet.* — 2004. — Vol. 364, №9440. — P. 1169—1171.

13. International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia // *Nature*. — 2008. — Vol. 455, №7210. — P. 237–241.
14. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Skryabin N.A. et al. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability // *Gene*. — 2014. — Vol. 536, №1. — P. 145–150.
15. Katsanis N., Ansley S.J., Badano J.L. et al. Triallelic inheritance in Bardet–Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder // *Science*. — 2001. — Vol. 293, №5538. — P. 2256–2259.
16. Kleinjan D.A., van Heyningen V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease // *Am. J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 76, №1. — P. 8–32.
17. Klopocki E., Ott C.E., Benatar N. et al. A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome // *J. Med. Genet.* — 2008. — Vol. 45, №6. — P. 370–375.
18. Koolen D.A., Sharp A.J., Hurst J.A. et al. Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome // *J. Med. Genet.* — 2008. — Vol. 45, №11. — P. 710–720.
19. Kumar R.A., KaraMohamed S., Sudi J. et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism // *Hum. Mol. Genet.* — 2008. — Vol. 17, №4. — P. 628–638.
20. Kurotaki N., Imaizumi K., Harada N. et al. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome // *Nat. Genet.* — 2002. — Vol. 30, №4. — P. 365–366.
21. Kurotaki N., Harada N., Shimokawa O. et al. Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: low copy repeats possibly mediate the common deletion // *Hum. Mutat.* — 2003. — Vol. 22, №5. — P. 378–387.
22. Kurotaki N., Shen J.J., Touyama M. et al. Phenotypic consequences of genetic variation at hemizygous alleles: Sotos syndrome is a contiguous gene syndrome incorporating coagulation factor twelve (FXII) deficiency // *Genet. Med.* — 2005. — Vol. 7, №7. — P. 479–483.
23. Kurth I., Klopocki E., Stricker S. et al. Duplications of noncoding elements 5' of SOX9 are associated with brachydactyly-anonychia // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41, №8. — P. 862–863.
24. Lee J.A., Carvalho C.M., Lupski J.R. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders // *Cell*. — 2007. — Vol. 131, №7. — P. 1235–1247.
25. Le Marechal C., Masson E., Chen J.M. et al. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38, №12. — P. 1372–1374.
26. Lettice L.A., Horikoshi T., Heaney S.J. et al. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99, №11. — P. 7548–7553.
27. Lifton R.P., Dluhy R.G., Powers M. et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension // *Nature*. — 1992. — Vol. 355, №6357. — P. 262–265.
28. Lupski J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits // *Trends Genet.* — 1998. — Vol. 14, №10. — P. 417–422.
29. Lupski J.R. Genomic rearrangements and sporadic disease // *Nat. Genet.* — 2007. — Vol. 39. — S.43–47.
30. Lupski J.R., Stankiewicz P. Genomic disorder mechanisms elucidated by breakpoint analysis of 17p rearrangements // *PLoS Genet.* — 2005. — Vol. 1. — e49.
31. Matsuura T., Sutcliffe J.S., Fang P. et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome // *Nat. Genet.* — 1997. — Vol. 15, №1. — P. 74–77.
32. McCarthy S.E., Makarov V., Kirov G. et al. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41, №11. — P. 1223–1227.
33. Mefford H.C., Sharp A.J., Baker C. et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 359, №16. — P. 1685–1699.
34. Petrij F., Giles R.H., Dauwerse H.G. et al. Rubinstein–Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP // *Nature*. — 1995. — Vol. 376, №6538. — P. 348–351.
35. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations // *Mutagenesis*. — 2000. — Vol. 15, №4. — P. 289–302.
36. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R. et al. Global variation in copy number in the human genome // *Nature*. — 2006. — Vol. 444. — P. 444–454.
37. Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G. et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38, №1. — P. 24–26.
38. Rujescu D., Ingason A., Cichon S. et al. Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — Vol. 18, №5. — P. 988–996.
39. Schmickel R.D. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes // *J. Pediatr.* — 1986. — Vol. 109, №2. — P. 231–241.
40. Shaikh T.H., Kurahashi H., Saitta S.C. et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis // *Hum. Mol. Genet.* — 2000. — Vol. 9. — P. 489–501.
41. Sharp A.J., Locke D.P., McGrath S.D. et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome // *Am. J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 77, №1. — P. 78–88.
42. Sharp A.J., Hansen S., Selzer R.R. et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38, №9. — P. 1038–1042.
43. Stankiewicz P., Lupski J.R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders // *Trends Genet.* — 2002. — Vol. 18, №2. — P. 74–82.
44. Stankiewicz P., Sen P., Bhatt S.S. et al. Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of FOXF1 cause alveolar capillary dysplasia and other malformations // *Am. J. Hum. Genet.* — 2009. — Vol. 84, №6. — P. 780–791.
45. Stankiewicz P., Lupski J.R. Structural variation in the human genome and its role in disease // *Annu. Rev. Med.* — 2010. — Vol. 61. — P. 437–455.
46. Stefansson H., Helgason A., Thorleifsson G. et al. A common inversion under selection in Europeans // *Nat. Genet.* — 2005. — Vol. 37, №2. — P. 129–137.
47. Vissers L.E., Bhatt S.S., Janssen I.M. et al. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — Vol. 18, №19. — P. 3579–3593.
48. Zhang F., Gu W., Hurles M.E. et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* — 2009. — Vol. 10. — P. 451–481.
49. Zhang F., Khajavi M., Connolly A.M. et al. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41, №7. — P. 849–853.

Genome architecture: genetic diversity and chromosomal diseases

Kashevarova A.A., Lebedev I.N.

Federal State Budget Institution Research Institute of Medical Genetics,
Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences,
Tomsk, 634050, Russia;
e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Widespread use of microarray-based technologies during the past decades has revealed the new form of structural genomic variation — DNA copy number variation (CNV). CNV have been shown to participate in primate evolution, to determine phenotypic differences between individuals and populations as well as to predispose to many diseases: developmental delay, intellectual disability, autism, schizophrenia, obesity, epilepsy, and others. In this review genome architecture, underlying microdeletion and microduplication origin, mechanisms of formation of these aberrations, models of their clinical manifestation, and classification of phenotypes are discussed.

Key words: structural genomic variation, low copy repeats (LCRs), segmental duplications, DNA copy number variations (CNV), reciprocal microdeletion and microduplication syndromes

Множественные эпимутации импринтома при нарушении репродукции человека

Саженова Е.А., Лепшин М.В., Лебедев И.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики»
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук,
Томск, 634050, e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Геномный импринтинг является ключевым феноменом, вовлечённым в регуляцию внутриутробного развития. Показано, что не однородительская дисомия, нарушающая дозу импринтированных генов на уровне хромосом, а множественные эпимутации импринтированных генов могут быть причиной остановки эмбрионального развития человека. Очерчен круг генов с материнским эффектом (*NLRP7* и *C6orf221/KHDC3L*), ответственных за формирование эпимутаций в импринтированных генах у человека. Рассмотрены вопросы влияния геномного импринтинга на применение вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: импринтом, множественные эпимутации импринтированных генов, вспомогательные репродуктивные технологии

Введение

Некоторая часть генома млекопитающих и человека подвергается импринтингу — явлению функциональной неэквивалентности аллелей, активность которых зависит от их родительского происхождения. Геномный импринтинг устанавливается в результате эпигенетических модификаций хроматина, и, прежде всего, метилирования ДНК, происходящих строго специфичным образом в оогенезе и сперматогенезе и выключающих экспрессию одного из двух родительских аллельных генов. В результате такой частичной функциональной гаплоидизации потомства наблюдается разное фенотипическое проявление мутаций, унаследованных от матери или отца.

К настоящему времени в геноме человека обнаружено около 90 импринтированных локусов [49]. Совокупность импринтированных последовательностей ДНК, или «импринтом» [25], представляет собой наиболее удобную модельную систему для изучения роли эпигенетических процессов в регуляции эмбрионального развития человека.

Во-первых, большинство импринтированных генов вовлечено в обеспечение внутриутробного развития через контроль клеточной пролиферации и дифференцировки плацентарных тканей, регуляцию метаболизма некоторых гормонов и ростовых факторов [45].

Во-вторых, для человека характерна высокая частота репродуктивных потерь: 15—20% клинически распознаваемых беременностей заканчиваются спонтанными абортами, а 2—3% женщин имеют привычное невынашивание беременности, характеризующееся наличием трех и более спонтанных аборт. Половина ранних репродуктивных потерь сопровождается аномалиями кариотипа, а причина остановки остальной части зароды-

шей с нормальным кариотипом до сих пор не определена [8]. В то же время, определённой селективной значимостью могут обладать aberrантные эпигенетические модификации генома, частота которых, по предварительным оценкам, на один-два порядка превышает среднюю частоту генных мутаций [22].

В-третьих, периоды гаметогенеза и преимплантационные этапы развития млекопитающих характеризуются глобальными изменениями эпигенетической организации генома, нарушения которой потенциально могут обеспечивать формирование аномальных эпигенотипов, поддерживающих долговременные изменения генной экспрессии [31].

Таким образом, исследование эпигенетических нарушений на модели импринтированных генов расширяет возможности молекулярно-генетического анализа различных по своей функциональной значимости эпимутаций.

Импринтинг обнаружен только у млекопитающих и цветковых растений. В растениях импринтированные гены расположены, прежде всего, в эндосперме — плацентоподобной ткани, которая окружает и питает эмбрион во время его развития [17]. Вместе с тем, у беспозвоночных, в частности у некоторых видов насекомых, описан сходный феномен, рассматривающийся как родительский эффект проявления генов [34].

Геномный импринтинг и нарушения эмбрионального развития человека

Способность гена сохранить эпигенетическую маркировку, «отпечаток» его родителей, является превосходным примером прямого влияния родителей на развитие млекопитающих через передачу эпигенотипа.

Значимость геномного импринтинга для эмбрионального развития млекопитающих была впервые показана в работах по трансплантации пронуклеусов у мышей [32]. В этих экспериментах выявлена ранняя летальность эмбрионов, сформированных только из двух женских (гиногенетических) или двух мужских (андрогенетических) пронуклеусов. Развитие гиногенетических зародышей останавливалось, как правило, на стадии бластоцисты. Они имели видимый эмбрион, но плохо развитую плаценту. Развитие андрогенетических особей только в 20% случаев доходило до стадии бластоцисты, и в этом случае наблюдалось недоразвитие эмбриона с нормальным развитием внезародышевых структур. Подобные наблюдения обнаружены и у человека, в случае полного пузырного заноса — выраженной кистозной дегенерации ворсин хориона при отсутствии развития самого эмбриона. Установлено, что в основе развития данной патологии лежит псевдодиплоидный набор хромосом исключительно отцовского происхождения. Такой набор может формироваться либо в результате оплодотворения спермием яйцеклетки матери, утратившей гаплоидный геном, с последующей дубликацией хромосом сперматозоида, либо в результате диспермии — оплодотворения яйцеклетки, не содержащей хромосом матери, двумя разными сперматозоидами, а также, если в оплодотворении принимает участие диплоидный сперматозоид [26].

Результаты исследований показали функциональную неэквивалентность гаплоидных наборов отцовского и материнского происхождения. У потомка могут быть дифференциально выключены материнские гены, отвечающие преимущественно за развитие экстраэмбриональных структур, и отцовские локусы, ответственные за развитие зародыша. Эти данные легли в основу гипотезы «конфликта полов», предложенной Haig и Graham в 1991 г. [19], согласно которой, геномный импринтинг есть результат закрепления разных стратегий репродуктивного поведения самок и самцов в популяции. Поэтому для нормального развития эмбриона геном должен иметь два гаплоидных набора хромосом взаимно дополняющих друг друга — и отцовского, и материнского происхождения. Эти данные объясняют тот факт, что ни у одного из известных видов млекопитающих не описан партеногенез. Гибель диплоидных партеногенетических зародышей обусловлена нарушением у них баланса аутоматических аллельных материнских и отцовских импринтированных локусов.

Среди механизмов, нарушающих дозу импринтированных генов на уровне хромосом, традиционно рассматривают однородительскую дисомию (ОРД) — ошибочное наследование потомком двух гомологичных хромосом от одного родителя. Это явление было теоретически обосновано Engel в 1980 г. [15]. ОРД сопровождается фенотипическими эффектами в том случае, если она затрагивает хромосомы или их участки, несущие импринтированные локусы, вследствие чего нарушается мо-

ноаллельный характер их экспрессии. В результате ОРД происходит либо полное отсутствие генного продукта (функциональная нуллисомия), либо сверхэкспрессия аллельных генов и оба эти события сопровождаются аномалиями развития организма. С другой стороны, в результате ОРД может возникать гомозиготизация хромосомного материала, приводящая к проявлению рецессивных мутаций.

В 1994 г. Cattanaach и Jones показали наличие летального эффекта ОРД по хромосомам 2, 6, 7 и 12 у эмбрионов мыши [10]. В это время начались систематические исследования ассоциации ОРД с эмбриолетальностью у человека [42]. Нами также был проведён поиск ОРД по хромосомам 2, 9, 11, 15, 16, 19, 20 и 21 у 87 спонтанных абортусов с нормальным кариотипом [2]. Большинство взятых в анализ хромосом имели синтетические с хромосомами мыши участки с ортологичными импринтированными генами, ОРД по которым у мышей приводит к эмбриональной гибели. Однако ни у одного из обследованных нами эмбрионов ОРД обнаружено не было. Таким образом, в опубликованных исследованиях, в общей сложности проведён поиск ОРД у 305 спонтанных эмбрионов и только у 7 (2,3%) из них была обнаружена ОРД. Это хромосомы — 7 (2 случая), 9, 14, 16 и 21, но только для хромосом 7, 14 и 16 известно о наличии импринтированных генов на этих хромосомах. Следовательно, частота ОРД составляет менее 1% от обследованных эмбрионов. Кроме того, в литературе имеются сообщения о наличии ОРД по этим хромосомам у живорождённых индивидов. Так, Bjorck с соавторами описали здоровую женщину в возрасте 34 лет с материнской изодисомией хромосомы 9 [9], а Tiranti с соавторами сообщили о монозиготных близнецах с ОРД по хромосоме 9 и аутоматомно-рецессивным синдромом Лейха, возникшем в результате гомозиготизации мутантного гена [41]. Yamazawa с соавторами показали ОРД хромосомы 14 отцовского происхождения при синдроме Кагами (колоколообразная грудная клетка и задержка умственного развития) [46]. ОРД хромосомы 16 материнского происхождения была ассоциирована с врождённым пороком сердца [36]. Rogan с соавторами описали нормального ребёнка с материнской ОРД по хромосоме 21 [40]. Изодисомия по хромосоме 21 отцовского происхождения также не сопровождалась какими-либо фенотипическими особенностями [39]. Таким образом, поскольку обнаруженные варианты ОРД найдены и у живорождённых индивидов без явных фенотипических аномалий, остаются открытыми вопросы о том, существует ли причинно-следственная связь между ОРД и гибелью эмбриона, являются ли эти события не зависимыми друг от друга или оба они возникают вследствие другого нарушения (например, трисомии в части клеток зародыша). Полученные данные свидетельствуют о том, что, во-первых, ОРД по хромосомам, имеющим синтетические с хромосомами мыши участки с ортологичными импринтированными генами, не вносят заметного вклада

в гибель зародышей человека на ранних этапах развития. Во-вторых, механизмы, детерминирующие эмбрио-летальность в результате нарушения экспрессии импринтированных локусов, могут существенно различаться у млекопитающих, далеко отстоящих друг от друга на эволюционной лестнице, что позволяет сделать вывод о селективной нейтральности однородительского наследования хромосом в пренатальном периоде развития.

Учитывая эпигенетическую природу импринтинга, можно предположить, что ожидаемые негативные эффекты нарушений функций импринтированных генов в раннем эмбриогенезе человека будут связаны не с достаточно редкими ошибками сегрегации хромосом, ведущими к формированию ОРД, а с aberrантными эпигенетическими модификациями хроматина или эпимутациями, не изменяющими нуклеотидную последовательность самого гена. Очевидно, что в отношении затрагиваемого гена эффекты эпимутаций будут функционально эквивалентны ОРД хромосом, содержащих импринтированные гены. Так, в случае гипометилирования импринтированного аллеля на неактивном родительском гомологе произойдёт его активация и установление биаллельной экспрессии. Напротив, эпимутации, связанные с гиперметилированием активного аллеля, приведут к полному исчезновению продуктов импринтированного гена в клетке. Эпимутации могут возникнуть вследствие ошибок эпигенетического репрограммирования в гаметах родителей, т.е. быть гаметическими. Соматические эпимутации формируются соответственно в соматических клетках на хромосомах как материнского, так и отцовского происхождения на постзиготических этапах развития в доимплантационный период, когда в процессе глобального эпигенетического репрограммирования генома импринтированные гены оказываются не защищены от него.

Множественные эпимутации импринтированных генов при патологии эмбрионального развития

Впервые присутствие эпимутаций импринтированных генов, выступающих причиной остановки эмбрионального развития человека, было описано в 1999 г. в случае биродительского полного пузырного заноса (БППЗ, Biparental Complete Hydatidiform Mole) [21], источником которого стало глобальное гипометилирование импринтированных на материнских гомологах генов и центров импринтинга *KCNQ1OT1*, *PEG1*, *PEG3/ZIM2*, *SNURF-SNRPN*, *GNAS*, что приводило к формированию отцовского эпигенотипа и, как следствие, к фенотипически полному пузырному заносу при нормальном биродительском кариотипе зиготы. Было установлено, что БППЗ обусловлен эпимутациями, а именно нарушениями установления метилирования и записи геномного импринтинга в оогенезе у матери [44].

Нами был проведён поиск нарушений эпигенетического статуса локусов, импринтированных в норме на

материнском (*SNURF-SNRPN*, *KCNQ1OT1*, *PLAGL1*) и на отцовском (*CDKN1C*, *IGF2/H19* и *MEG3*) гомологах, при ранней внутриутробной гибели эмбрионов человека [3, 4]. Было показано, что статус метилирования *CDKN1C* и *IGF2/H19*, расположенных на хромосоме 11 (11p15.5), а также *SNURF-SNRPN* (15q11-q13) и *MEG3* (14q32) у всех обследованных эмбрионов соответствовал норме. В то же время, статус метилирования в регуляторном центре импринтинга *KCNQ1OT1* (11p15.5) и в гене *PLAGL1* (6q23-q24) отличался от нормального состояния. У 8 из 84 обследованных спонтанных абортусов (9,5%) было зарегистрировано гипометилирование *KCNQ1OT1* на материнском гомологе. Анализ импринтинга гена *PLAGL1* продемонстрировал гипометилирование данного локуса на материнской хромосоме у 9 из 87 обследованных эмбрионов (10,3%). В обоих локусах был показан соматический характер эпимутаций, что свидетельствовало о нарушении процессов поддержания геномного импринтинга на материнских хромосомах в клетках развивающихся эмбрионов на постимплантационных этапах онтогенеза. У двух эмбрионов соматические эпимутации были выявлены как в локусе *PLAGL1*, так и в центре импринтинга *KCNQ1OT1*. У матерей этих эмбрионов не было ни одной благополучно завершённой беременности. В одном случае женщина имела 4 спонтанных выкидыша, в другом — два спонтанных абортуса и одного мертворождённого ребёнка. Также было отмечено, что эпимутации в гене *PLAGL1* статистически значимо чаще регистрировались в группе женщин с привычным невынашиванием беременности (три и более спонтанных аборта), чем без него ($p < 0,05$).

Эпимутации импринтированных генов при патологии эмбрионального развития были выявлены и другими исследователями. Так, у спонтанных абортусов III триместра беременности и мертворождённых детей среди анализируемых генов и центра импринтинга *H19*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *SNRPN*, *MEG3* и *NESP55* гиперметилирование от 2 до 5 импринтированных локусов было выявлено у 4% абортусов и 18% мертворождённых [37]. Анализ экспрессии импринтированных генов *IGF2*, *PEG10*, *PHLDA2* и *CDKN1C* при внутриутробной гибели эмбрионов и плодов показал повышенную экспрессию гена *PHLDA2* в I триместре, повышенную экспрессию всех исследованных генов во II триместре и сниженную экспрессию *PEG10* в III триместре беременности [14]. Diplas с соавторами в выборке плацентарных тканей при беременностях с внутриутробной задержкой развития плода показали гипометилирование генов *PLAGL1*, *DLK1*, *H19* и *SNRPN* [13]. Авторами также были обнаружены сниженная экспрессия генов *PHLDA2*, *ILK2*, *NNAT*, *CCDC86*, *PEG10* и повышенная экспрессия *PLAGL1*, *DHCR24*, *ZNF331*, *CDKAL1*.

Следует отметить, что до недавнего времени как в наших исследованиях, так и в работах других авторов поиск эпимутаций проводился с позиции анализа статуса метилирования кандидатных локусов, нарушение эк-

спрессии которых, как предполагалось, может негативным образом сказываться на течении эмбрионального развития. Принципиально новый уровень изучения эпигенетической изменчивости импринтированных генов появился с использованием биочиповых технологий, обеспечивающих, прежде всего, непредвзятый подход к выбору импринтированных генов. Поэтому для определения роли эпимутаций импринтинга при ранней внутриутробной гибели эмбрионов человека нами было проведено исследование характера дифференциального метилирования ряда импринтированных генов у спонтанных абортусов I триместра беременности с применением метилочипа GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina, США) [5]. Эта панель содержит 1505 CpG-динуклеотидов 807 генов, включая 113 CpG-сайтов, локализованных в 51 импринтированном гене. Особенностью чипа является то, что большинство представленных в нем CpG-сайтов внутри импринтированных генов являются функционально значимыми и их метилирование коррелирует с супрессией транскрипционной активности.

В ходе исследования нами было показано наличие множественных эпимутаций от 4 до 12 импринтированных генов, у каждого из 13 обследованных эмбрионов. Эпимутации были представлены как гипо- (3,8%), так и гиперметилированием (1,7%). Гипометилирование затрагивало CpG-сайты таких импринтированных генов, как *GRB10*, *CPA4*, *PHLDA2*, *ZNF215* — экспрессирующихся в норме только на материнском гомологе и *PEG10*, *PLAGL1*, *WT1*, *HTR2A*, *DLK1*, *GABRB3*, *KCNQ1* — функционирующих в норме только на отцовской хромосоме. Гиперметилирование было обнаружено в CpG-сайтах генов *INS*, *TRPM5*, *PWCR1*, *GABRA5* с отцовской экспрессией и только в одном CpG-динуклеотиде гена *H19*, экспрессирующегося в норме с материнского гомолога. Большинство эпимутаций (78%) имели постзиготическое происхождение. Было установлено, что суммарная частота аномалий метилирования материнских и отцовских аллелей импринтированных генов, ведущих к супрессии развития зародыша (3,9%), статистически значимо превышает частоту эпимутаций, потенциально стимулирующих процессы эмбриогенеза — 1,6% ($p < 0,01$). Данный факт является первым доказательством, поддерживающим на эпигенетическом уровне гипотезу «конфликта полов», объясняющую появление импринтированной моноаллельной экспрессии генов в эволюции млекопитающих. Более того, полученные нами данные свидетельствуют о том, что эпимутации импринтированных генов значительно более часто встречаются именно во внезародышевой мезодерме (7,5%), производной эпибласта, из которого формируются все эмбриональные ткани, чем в цитотрофобласте хориона, который имеет происхождение из трофобластической оболочки — наружного слоя бластоцисты (частота эпимутаций — 3,3%, $p < 0,01$).

В этом же исследовании нами было показано, что наряду с мультилокусными эпимутациями импринтированных генов, каждый эмбрион имеет множественные эпимутации и в неимпринтированных генах. Было обнаружено, что 34 неимпринтированных гена имели гипер-, а 2 — гипометилирование. Согласно базе данных Gene Ontology [50], большинство из этих генов, наряду с импринтированными локусами, оказываются вовлеченными в процессы клеточной пролиферации и дифференцировки, апоптоза, роста клеток и обеспечения эмбрионального развития. Полученные данные указывают на то, что совокупность импринтированных генов в геноме человека (импринтом) является не изолированной, а интегрированной в остальной эпигеномной системой.

По совокупности всех опубликованных случаев в литературе множественные эпимутации были выявлены у 49 из 419 обследованных спонтанных абортусов. Поэтому суммарная оценка вклада множественных эпимутаций в нарушение эмбрионального развития была определена на уровне 11,7% [1]. Если сравнить её с данными по возможному вкладу ОРД в эмбриолетальность (менее 1%), то очевидным становится вклад множественных эпимутаций в данную патологию. Частота эпимутаций отдельных импринтированных генов варьировала от 1,8% для гена *MEST* до 53,8% в случае *WT1*. Частота эпимутаций импринтированных генов, затрагивающих материнские гомологи, которая складывается из гиперметилирования активных материнских аллелей — 7,2% и гипометилирования в норме метилированных материнских аллелей — 16%. В отношении эпимутаций на отцовских аллелях: на гипометилирования инактивированных отцовских аллелей пришлось 10,0%, на долю гиперметилирования отцовских аллелей — 18,4%. Таким образом, эпимутации на отцовских локусах импринтированных генов возникают чаще (28,4%), чем на материнских (23,2%).

Эпигенетические нарушения геномного импринтинга после применения вспомогательных репродуктивных технологий

Сегодня вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) стали стандартным вмешательством для семейных пар с проблемами репродукции, так как они обладают высокой эффективностью и низким риском осложнений [18]. Так, по данным ежегодного конгресса Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) с момента первой публикации в 1978 г. о ВРТ, их использование во всем мире значительно возросло, а в 2013 г. достигло 5 млн и приближается к 1—4% от числа всех новорожденных в развитых странах мира [6, 11].

Начиная с 2002 г. появилась серия статей, в которых выражалась обеспокоенность по поводу возможного увеличения случаев нарушения геномного импринтинга

у детей, рождённых после ВРТ. Опыты на животных показали наличие связи между ВРТ и нарушением геномного импринтинга, что дало возможность предположить наличие аналогичной связи у человека [28].

В последнее время накапливаются данные о рождении детей с болезнями геномного импринтинга после применения методов искусственного оплодотворения. Сейчас известно о четырёх случаях рождения детей с синдромом Энгельмана (СЭ), 4 с синдромом Рассела—Сильвера (СРС) и более 60 случаев с синдромом Видеманна—Беквита (СВБ) после применения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) [11]. Во всех случаях возникновения этих заболеваний у пациентов были описаны эпимутации импринтированных генов и центров импринтинга (ЦИ).

В связи с этим, важно тщательно исследовать ассоциации между ВРТ и импринтингом. Анализ этого вопроса осложняется изменчивостью протоколов ВРТ и низкой популяционной частотой болезней геномного импринтинга. В этом разделе мы анализируем имеющиеся фактические данные, касающиеся связи между ВРТ и нарушением импринтинга, включая СВБ, СЭ, СРС, транзиторный неонатальный сахарный диабет (ТНСД), а также спонтанные абортусы.

При использовании ЭКО и ИКСИ наблюдалось рождение детей с такими болезнями геномного импринтинга, как СРС, СЭ, СВБ. В большинстве случаев, без применения ВРТ, отмеченные синдромы возникают спорадически, а молекулярные причины, лежащие в основе их формирования, могут быть различными (делеции, ОРД, мутации в импринтированных генах и ЦИ). Так, делеции 15q11-q13 на материнской хромосоме, ОРД обоих гомологов хромосомы 15 от отца, точковые мутации в гене *UBE3A* наблюдаются в большинстве случаев СЭ. В редких случаях (около 10%) обнаруживаются мутации в дифференциально метилированном ЦИ *SNURF-SNRPN* на хромосоме 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 ребёнка 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 центра импринтинга *IGF2/H19* на хромосоме 11 отцовского происхождения [30].

Несмотря на столь широкий спектр хромосомных, генных и эпигенетических аномалий, у всех больных детей с болезнями геномного импринтинга, рождённых после применения методов искусственного оплодотворения, для которых была проведена молекулярно-генетическая диагностика заболеваний, выявлены нарушения статуса метилирования импринтированных генов и ЦИ, причём гипометилирование наблюдается на материнских в норме метилированных аллелях, а гиперметилирование отмечено на отцовском гомологе [23].

Среди гипотез, объясняющих нарушение геномного импринтинга у детей после применения ВРТ, 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 [22].

Эпигенетическое репрограммирование ДНК имеет решающее значение для установления и поддержания импринтинга как во время развития зародышевых клеток, так и в предимплантационный период, которые являются двумя потенциально уязвимыми к ВРТ стадиями. Большинство данных, связывающих ВРТ и изменённый статус метилирования, обнаружены на материнском аллеле. В то же время, ВРТ вряд ли могут вызывать дефекты импринтинга на отцовском аллеле, так как он устанавливается раньше, чем на материнском. В частности, исследования показали, завершение создания отцовского импринтинга в диплоидных сперматогониях [7] и, по меньшей мере, одно исследование показало нормальный импринтинг в сперматогониях, полученных из семенных канальцев бесплодных мужчин [20]. При анализе эпигенетического репрограммирования в ооцитах было предположено, что метилирование части импринтированных генов происходит в первичном фолликуле. В связи с этим, механизмы импринтинга у матери могут быть уязвимы для стимуляции яичников. Кроме того, по крайней мере, в одной работе [24] было показано на крысах, что материнский геном может быть более уязвим к дефектам метилирования, чем отцовский во время предимплантационного развития.

В связи с тем, что использование ВРТ ассоциируют с повышенным риском рождения детей с болезнями геномного импринтинга, приведем результаты сравнения частот различных патологий у детей, рождённых как в естественных циклах, так и после ВРТ. По данным ежегодного конгресса Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE), в 2012 г. рождение детей после ВРТ достигло 5 млн [6]. Частота рож-

дения детей с СЭ в популяции составляет 1 : 12 000 — 1 : 20 000, из них у 4% наблюдается нарушение эпигенетического статуса импринтированных генов, таким образом, частота рождения больных детей с дефектом геномного импринтинга составит $(1 : 12\,000 - 1 : 20\,000) \times 4\%$, т.е. 1 : 300 000 — 1 : 500 000 [35]. В то же время, за весь период применения ВРТ было зафиксировано 5 детей с СЭ, что соответствует рождению 5 : 5 000 000, т.е. одного больного ребёнка на миллион процедур ВРТ. Частота СВБ в популяции 1 : 13 700 [23]. В 50% случаев наблюдается гипометилирование *KCNQ1OT1* на материнском гомологе хромосомы 11, характерное для детей с СВБ, рождённых после ВРТ. Поэтому частота данной патологии в естественных циклах составила $(1 : 13\,700) \times 50\%$, т.е. 1 : 27 400, в отличие от больных после ВРТ 60 больных на 5 000 000 процедур ВРТ — 1 : 84 000. СРС встречается в популяции с частотой 1 : 10 000, в то же время, гипометилирование *CI IGF2/H19* наблюдается в 38% случаев [6], что составляет $(1 : 10\,000 - 38\%, \text{ т.е. } 1 : 26\,315)$. В связи с тем, что зарегистрировано всего 4 ребёнка с СРС, рождённых после использования ВРТ, частота составляет $4 : 5\,000\,000 = 1 : 1\,250\,000$, что значительно меньше значений в популяции. Таким образом, не доказано повышение частоты рождения детей с болезнями геномного импринтинга после использования ВРТ.

Также не было зарегистрировано различий в частоте эпимутаций импринтированных генов у спонтанных абортусов в беременностях без и после проведения ВРТ. Так, в естественных циклах остановки эмбрионального развития эпигенетические нарушения, а именно гипометилирование *KCNQ1OT1* и *PLAGL1*, встречаются с частотой около 10% [3, 4]. При анализе статуса метилирования импринтированных генов *PEG1*, *H19*, *LIT1* и *SNRPN* у абортусов после и без применения ВРТ не было показано статистически значимых различий в уровне метилирования данных генов [48]. В то же время, при оценке уровня метилирования *H19*, *MEG3*, *LIT1*, *MEST*, *NESP55*, *PEG3* и *SNRPN* в цитотрофобласте хориона у спонтанных эмбрионов после (42 образца) и без (29 эмбрионов) применения ВРТ в генах *LIT1* и *H19* частота гипометилирования была статистически значимо выше у абортусов после ВРТ [47]. Поэтому, возможно, что супружеские пары с проблемами репродукции могут являться носителями мутаций в генах, контролирующих статус метилирования импринтированных генов.

Эти наблюдения обусловили существенно возросший интерес к эпигенетическим процессам, происходящим на самых ранних этапах эмбрионального развития, и их возможным модификациям при осуществлении различных процедур ВРТ. Понимание причин и механизмов возникновения эпимутаций становится актуальной задачей для всех специалистов в области генетики и репродуктивной медицины, поскольку её решение позволит достичь необходимой безопасности используемых методов.

Нарушения генетического контроля эпигенома при остановке эмбрионального развития

Анализ родословных женщин с БППЗ показал наличие повторяющихся случаев как данной патологии, так и классических вариантов полного и частичного пузырного заноса в пределах родословной, а также присутствие в анамнезе у одной женщины нескольких событий пузырного заноса. Это позволило предположить ауто-сомно-рецессивный характер наследования БППЗ по материнской линии. И действительно, полногеномные ассоциативные исследования продемонстрировали сцепление БППЗ, сопровождающееся глобальным нарушением установления метилирования импринтированных генов в ооцитах у матери, с регионом 19q13.42, а именно с геном *NLRP7* (*NALP7*) [33].

Впоследствии было показано, что действительно мутации в гене *NLRP7* могут быть ассоциированы с семейными и рецидивирующими случаями пузырного заноса. На сегодняшний день в данном гене практически во всех экзонах и интронах зарегистрированы мутации, ассоциированные с БППЗ [29].

Интересным фактом является обнаружение при БППЗ на материнских аллелях не только гипо-, но и гиперметилирования импринтированных генов. Так, среди 11 семей с БППЗ Hayward с соавторами в четырёх из них выявили гипометилирование материнских в норме метилированных генов *ZAC* и *LIT1* и гиперметилирование *NESP55*, экспрессирующегося с материнского гомолога. В ходе анализа гена *NLRP7* было зафиксировано 8 ранее не описанных мутаций [20].

Также показано, что мутации в гене *NLRP7* несут риск возникновения БППЗ при наличии их только у матери [29]. Так, авторы описали женщину с БППЗ, имеющую в исследуемом гене нонсенс-мутацию с.295G>T (p.Glu99X) в гомозиготном состоянии и миссенс-мутацию с.1970A>T (p.Asp657Val) в гетерозиготном. Ее сестра и брат имели компаундные гетерозиготы по этим мутациям, но только у брата не было нарушений репродуктивной функции. Их отец был гетерозиготен по p.Asp657Val, а мать — по p.Glu99X и имела в анамнезе одну замершую беременность. Авторы сделали вывод, что мутации в гене *NLRP7* не влияют на развитие плода при наследовании их от отца, но несут риск возникновения БППЗ при наличии их у матери.

NALP7 является частью семейства белков CATERPILLER и участвует в воспалении и апоптозе во время клеточных реакций на инфекцию, являясь негативным регулятором интерлейкина 1β, обеспечивающего инвазию трофобласта в матку в период имплантации [27]. *NALP7* может быть геном с материнским эффектом, так как, с одной стороны, продукты таких генов необходимы ооцитам для поддержания раннего эмбрионального развития до тех пор, пока не будет активирован эмбриональный геном. Такие гены не влияют на овуляцию и оплодотворение, но отсутствие продукта гена ведёт к прекращению развития эмбриона. Родитель-

ский эффект относится к генетическим явлениям, когда фенотип потомства обусловлен генетической мутацией в родительских генах, а не мутациями в самом эмбрионе, такие гены участвуют в эмбриональном развитии до включения собственных генов зародыша.

С другой стороны, существует альтернативная гипотеза, согласно которой вовлечение гена *NALP7* в патогенез БППЗ может быть связано с его участием в воспалении и аутоиммунном ответе. Deveau с соавторами [12] обнаружили, что пациенты с мутациями в *NALP7* не в состоянии установить соответствующую воспалительную реакцию на различные антигены. Следовательно, у таких женщин андрогенетические бластоцисты, которые являются полными аллотрансплантами, могут имплантироваться и развиваться, не отторгаясь. Возможно, что андрогенетические бластоцисты образуются спонтанно *de novo* с некоторой частотой. Тем не менее, у женщин с активной иммунной системой андрогенетические эмбрионы, скорее всего, погибают или останавливаются в развитии.

Мутации в гене *NLRP7* не всегда обнаруживаются в БППЗ. Поэтому, по-видимому, возможна генетическая гетерогенность БППЗ. И, действительно, позже была показана ассоциация мутаций гена *C6orf221/KHDC3L* (6q13) с БППЗ. Так, в выборке 14 семей с БППЗ без мутаций в *NLRP7* были описаны гомозиготные замена с.3G>T и делеция с.322_325delGACT, а также компаундная гетерозигота с.1A>G; с.322_325delGACT в трех семьях. Эти данные говорят о том, что мутации в гене *KHDC3L*, который экспрессируется в ооцитах, могут быть одним из факторов развития БППЗ. Кроме того, мутации в этом гене были найдены ещё у шести женщин с семейными БППЗ [16].

Белок *KHDC3L* принадлежит к семейству *KHDC1*, члены которого содержат нетипичный домен *KH* (последовательности нуклеиновых кислот) и не могут поэтому канонически связываться с РНК и однопочечной ДНК, участвуя, таким образом, в регуляции транскрипции и трансляции [43].

Мутации в гене *NLRP7* выявлены у 48–60% и в *C6orf221/KHDC3L* у 14% пациентов с повторяющимися пузырными заносами. Таким образом, на сегодняшний день известно о двух генах с материнским эффектом, мутации в которых ответственны за нарушение эмбрионального развития у человека, а именно в формировании семейных случаев пузырного заноса [38].

Заключение

Мы все больше приходим к пониманию роли геномного импринтинга в развитии млекопитающих и человека, механизмов реализации нарушений геномного импринтинга, которые формируются не через ошибки сегрегации хромосом (ОРД), а посредством множественных эпимутаций импринтома. Эти эпимутации возникают либо вследствие ошибок эпигенетического репро-

граммирования в гаметах родителей, либо на постзиготических этапах развития, связанных, в первую очередь, с нарушением защиты импринтированных генов от глобального эпигенетического репрограммирования генома, протекающего в соматических клетках в доимплантационный период. Кроме того, множественные эпимутации показаны и в неимпринтированных генах, что говорит о том, что импринтом является не изолированной, а интегрированной в эпигеном системой. Эпимутации регистрируются на хромосомах как материнского, так и отцовского происхождения. В то же время наличие множественных эпимутаций позволяет предположить существование общего механизма контроля импринтинга. И действительно, сейчас открыт новый класс генов, мутации в которых ассоциированы с возникновением множественных нарушений эпигенетического статуса импринтированных локусов генома у человека. Это гены с материнским эффектом (*NLRP7* и *C6orf221/KHDC3L*), продукты которых вовлечены в поддержание эпигенетического статуса импринтированных генов. К сожалению, механизмы действия генов, контролирующих геномный импринтинг при различных патологиях, недостаточно изучены. Поэтому дальнейшее накопление знаний о таких генах позволит использовать методы преимплантационной генетической диагностики для выбора генетически и эпигенетически нормальных эмбрионов и, следовательно, повысит вероятность для пациентов иметь здоровое потомство.

Список литературы

1. Лепшин М.В., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Множественные эпимутации импринтированных генов в геноме человека и наследственная патология // Генетика. — 2014. — Т. 50, №3. — С. 253–272.
2. Никитина Т.В., Саженова Е.А., Суханова Н.Н. и др. Оценка роли однородительской дисомии в ранней эмбриональной летальности человека // Онтогенез. — 2004. — Т. 35, №4. — С. 238–246.
3. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации центра импринтинга *KCNQ1OT1* хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека // Генетика. — 2008. — Т. 44, №12. — С. 1609–1616.
4. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности // Медицинская генетика. — 2010. — Т. 9, №11. — С. 34–39.
5. Саженова Е.А., Скрябин Н.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. Мультилокусные эпимутации импринтома при патологии эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. — 2012. — Т. 46, №2. — С. 204–213.
6. Adamson D.G., Zegers-Hochschild F., Ishihara O. ICMART World Report: Preliminary // European Society for Human Reproduction and Embryology Annual Meeting. — 2012. — P. 214–222.
7. Allegrucci C., Thurston A., Lucas E., Young L. Epigenetics and the germline // Reproduction. — 2005. — Vol. 129, №2. — P. 137–149.
8. Bastos R., Ramalho C., Doria S. Prevalence of chromosomal abnormalities in spontaneous abortions or fetal deaths // Acta Med Port. — 2014. — Vol. 27, №1. — P. 42–48.
9. Bjorck E.J., Anderlid B.M., Blennow E. Maternal isodisomy of chromosome 9 with no impact on the phenotype in a woman with

- two isochromosomes: i(9p) and i(9q) // *Am. J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 87. — P. 49–52.
10. Cattanach B.M., Jones J. Genetic imprinting in the mouse: implications for gene regulation // *J. Inherit. Metab. Dis.* — 1994. — Vol. 17. — P. 403–420.
11. Chiba H., Hiura H., Okae H., Miyauchi N., Sato F., Sato A. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technology // *Pediatr. Int.* — 2013. — Vol. 55, №5. — P. 542–549.
12. Deveau C., Qian J.H., Chebaro W.A. et al. *NLRP7* mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation // *Hum. Molec. Genet.* — 2009. — Vol. 18. — P. 888–897.
13. Diplas A.I., Lambertini L., Lee M.J. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas // *Epigenetics.* — 2009. — Vol. 4, №4. — P. 235–240.
14. Doria S., Sousa M., Fernandes S. et al. Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal deaths // *Epigenetics.* — 2010. — Vol. 5. — P. 444–450.
15. Engel E. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect isodisomy // *Am. J. Med. Genet.* — 1980. — Vol. 6. — P. 137–143.
16. Fallahian M., Sebire N.J., Savage P.M., Seckl M.J., Fisher R.A. Mutations in *NLRP7* and *KHDC3L* confer a complete hydatidiform mole phenotype on digynic triploid conceptions // *Hum. Mutat.* — 2013. — Vol. 34. — P. 301–308.
17. Gehring M. Genomic imprinting: insights from plants // *Annu. Rev. Genet.* — 2013. — Vol. 47. — P. 187–208.
18. Grafodatskaya D., Cytrynbaum C., Weksberg R. The health risks of ART // *EMBO Rep.* — 2013. — Vol. 14, №2. — P. 129–135.
19. Haig D., Graham C. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor // *Cell.* — 1991. — Vol. 64. — P. 1045–1046.
20. Hartmann S., Bergmann M., Bohle R.M., Weidner W., Steger K. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis // *Mol. Hum. Reprod.* — 2006. — Vol. 12, №6. — P. 407–411.
21. Hayward B.E., De Vos M., Talati N. et al. Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole // *Hum. Mutat.* — 2009. — Vol. 30, №5. — P. 629–639.
22. Horsthemke B., Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective // *Hum. Reprod. Upd.* — 2005. — Vol. 11. — P. 473–482.
23. Ishida M., Moore G. The role of imprinted genes in humans // *Molecular aspects of medicine.* — 2013. — Vol. 34. — P. 826–840.
24. Jacob S., Moley K.H. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies // *Pediatr. Res.* — 2005. — Vol. 58, №3. — P. 437–446.
25. Jirtle R.L. Epigenomics, imprinting and disease susceptibility // *Pharmacogenomics.* — 2008. — Vol. 9, №12. — P. 1791–1795.
26. Kajii T., Ohama K. Androgenetic origin of hydatidiform mole // *Nature.* — 1977. — Vol. 268. — P. 633–634.
27. Kinoshita T., Wang Y., Hasegawa M. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1 β secretion // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, №23. — P. 720–725.
28. Koerner M.V., Barlow D.P. Genomic imprinting — an epigenetic gene-regulatory model // *Curr. Opin. Genet.* — 2010. — Vol. 20. — P. 164–170.
29. Landolsi H., Rittore C., Philibert L. *NLRP7* mutation analysis in sporadic hydatidiform moles in Tunisian patients: *NLRP7* and sporadic mole // *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 2012. — Vol. 136, №6. — P. 646–651.
30. Lim D., Bowdin S.C., Tee L. Clinical and molecular genetic features of Beckwith–Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies // *Hum. Reprod.* — 2009. — Vol. 24, №3. — P. 1–7.
31. Macdonald W.A., Mann M.R. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation // *Mol. Reprod. Dev.* — 2014. — Vol. 81, №2. — P. 126–140.
32. McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes // *Cell.* — 1984. — Vol. 37. — P. 179–183.
33. Murdoch S., Djuric U., Mazhar B. Mutations in *NALP7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38. — P. 300–302.
34. Murphy S.K., Jirtle R.L. Imprinted genes as potential genetic and epigenetic toxicologic targets // *Environ. Health Perspect.* — 2000. — Vol. 108, №1. — P. 5–11.
35. Odom L.N., Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* — 2010. — Vol. 17, №6. — P. 517–522.
36. O’Riordan S., Greenough A., Moore G.E. Case report: uniparental disomy 16 in association with congenital heart disease // *Prenat. Diagn.* — 1996. — Vol. 16, №10. — P. 963–975.
37. Pliushch G., Schneider E., Weise D. Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths // *Am. J. Pathol.* — 2010. — Vol. 176, №3. — P. 1084–1090.
38. Reddy R., Akoury E., Phuong Nguyen N.M., Abdul-Rahman O.A. Report of four new patients with protein-truncating mutations in *C6orf221/KHDC3L* and colocalization with *NLRP7* // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2013. — Vol. 21. — P. 957–964.
39. Robinson W.P., Bernasconi F., Basaran S. A somatic origin of homologous Robertsonian translocation and isochromosomes // *Am. J. Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 54. — P. 290–302.
40. Rogan P.K., Sabol D.W., Punnett H.H. Maternal uniparental disomy of chromosome 21 in normal child // *Am. J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 83. — P. 69–71.
41. Tiranti V., Lamantea E., Uziel G. Leigh syndrome transmitted by uniparental disomy of chromosome 9 // *J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 36. — P. 927–928.
42. Tsukishiro S., Li Q.Y., Tanemura M. et al. Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion // *J. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 50. — P. 112–117.
43. Valverde R., Edwards L., Regan L. Structure and function of KH domains // *FEBS J.* — 2008. — Vol. 275, №11. — P. 2712–2726.
44. Van den Veyver I.B., Al-Hussaini T.K. Biparental hydatidiform moles: a maternal effect mutation affecting in the offspring // *Hum. Reprod.* — 2006. — Vol. 21. — P. 233–242.
45. Wolf J.B., Brandvain Y. Gene interactions in the evolution of genomic imprinting // *Heredity.* — 2014. — Vol. 112, №10. — P. 1038–1047.
46. Yamazawa K., Ogata T., Ferguson-Smith A.C. Uniparental disomy and human disease: an overview // *Am. J. Med. Genet.* — 2010. — Vol. 154, №154. — P. 329–334.
47. Zechner U., Pliushch G., Schneider E. et al. Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception // *Mol. Hum. Reprod.* — 2010. — Vol. 16, №9. — P. 704–713.
48. Zheng H.Y., Tang Y., Niu J. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in human spontaneous abortions after assisted reproduction techniques and natural conception // *Hum. Reprod.* — 2013. — Vol. 28, №1. — P. 265–273.
49. <http://igc.otago.ac.nz> — Каталог импринтированных генов и родительских эффектов у человека и животных.
50. <http://www.geneontology.org> — База данных «Gene Ontology (GO)».

Multiple epimutations of imprintome in human reproductive pathology

Sazhenova E.A., Lepshin M.V., Lebedev I.N.

Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences,
Tomsk, Russia, 634050,
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Genomic imprinting is a key phenomenon involved in the regulation of fetal development. It is shown that rather multiple epimutations of imprinted genes than uniparental disomy can cause disruption of human embryonic development. Genes with maternal effect (*NLRP7* and *C6orf221/KHDC3L*) were determined to be responsible for the formation of epimutations at human imprinted genes. Paper reviews application of genome imprinting disturbance assessment in assisted reproductive technologies.

Key words: imprintome, multiple epimutations of imprinted genes, assisted reproductive technologies

Анализ мутаций у больных муковисцидозом методом полноэкзомного секвенирования гена *CFTR**

Иващенко Т.Э.¹, Насыхова Ю.А.¹, Гембицкая Т.Е.²,
Орлов А.В.³, Черменский А.Г.², Баранов В.С.¹

¹ — Институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН; e-mail: tivashchenko2011@mail.ru

² — НИИ пульмонологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

³ — Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова

С учётом сравнительно низкой (по сравнению с Западной Европой) частоты выявляемости мутаций при муковисцидозе (МВ) в России (около 70—75%) остаётся достаточно большое количество больных с неидентифицированными мутациями или с одной известной мутацией. Так, в Санкт-Петербурге одна мутация не идентифицируется в среднем у 38%, а две — у 14% пациентов. В настоящее время для идентификации неизвестных мутаций широко используют метод полноэкзомного секвенирования гена *CFTR*, который позволяет выявлять мутации в кодирующей части гена и в интронных районах, фланкирующих экзоны. Методом секвенирования экзона гена *CFTR* определена нуклеотидная последовательность кодирующей части гена у 40 пациентов с МВ, имеющих одну или две неидентифицированные мутации. В двух случаях выявлена сплайсинговая мутация 489+1G>T (621+1G->T) в экзоне 4, в двух других — мутация L1335P в экзоне 25, не входящие в стандартные тест-системы, используемые в РФ. Выявлены также три ранее не описанные мутации — c3816_3817 delTG (экзон 23), E92A (экзон 4), K1468R (экзон 27). Дальнейший поиск мутаций в гене *CFTR* является приоритетной задачей. Он позволяет уточнить диагноз и спектр мутаций, улучшить пренатальную диагностику, повысить качество медико-генетического консультирования и оптимизировать методы лечения.

Ключевые слова: муковисцидоз, мутации, ген *CFTR*, секвенирование

Введение

МВ (кистозный фиброз поджелудочной железы) — наиболее распространённое, тяжёлое моногенное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Впервые заболевание описано в 1936 г. Fanconi. В 1938 г. Anderson выделила его в самостоятельную нозологическую единицу под названием *кистозный фиброз поджелудочной железы*. Его другое наименование — *муковисцидоз*, предложенное Faber в 1945 г., — в настоящее время применяется, главным образом, в некоторых европейских странах и в России [3].

Вплоть до 60-х годов прошлого столетия МВ считался исключительно педиатрической проблемой, так как продолжительность жизни больных не превышал 10—12 лет. В дальнейшем благодаря генетическим исследованиям, позволившим уточнить патогенез заболевания, были разработаны эффективные методы лечения, в результате которых средняя выживаемость больных с МВ значительно выросла. В настоящее время больные МВ старше 25—30 и 40 лет уже не являются редкостью [1].

Молекулярно-генетическими методами ген МВ картирован длинном плече хромосомы 7 (7q31.1) в 1985 г. В конце 1989 г. он был идентифицирован и выявлена наиболее частая мутация — delF508, приводящая к МВ. Охарактеризован белковый продукт этого гена, получивший название *трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза (CFTR)* [10, 12, 13]. В гене *CFTR* обнару-

жено множество мутаций, которые, в отличие от delF508, представлены спорадическими случаями, т.е. встречаются достаточно редко. В настоящее время описано 1966 мутаций (Cystic Fibrosis Mutation Database — <http://www.genet.sickkids.on.ca>).

Частоты и спектр мутаций в гене *CFTR* в России отличаются от таковых в Западной Европе и в Северной Америке; диагностически значимыми (частота >2%) для пациентов с МВ в РФ являются delF508, 394delTT, G542X, 2143delT, 2184insA, W1282X, N1303K, 3732delA, CFTRdele2,3(21kb) [3]. Учитывая сравнительно низкую (по сравнению с Западной Европой) частоту выявляемости мутаций в России (около 70—75%) имеется достаточно большое количество больных с неидентифицированными мутациями или с одной известной мутацией. В настоящее время для поиска неизвестных мутаций широко используют метод полноэкзомного секвенирования гена *CFTR*, позволяющий выявить мутации в кодирующей части гена и во фланкирующих экзонах интронных последовательностей гена.

Целью настоящей работы было определить методом полноэкзомного секвенирования гена *CFTR* мутации у пациентов с неизвестной мутацией в гене *CFTR* на одной или обеих хромосомах, но с установленным диагнозом МВ, подтверждённым клиническими данными и лабораторными исследованиями (рентгенологический и функциональные анализы, положительный «потовый тест»).

* Исследование проведено при финансовой поддержке Благотворительного фонда «Острова»

Материалы и методы

Работа выполнена на образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови пациентов с МВ. В ходе работы обследованы 40 пациентов с МВ в возрасте от 3 до 56 лет.

У всех больных диагноз МВ подтвержден клинической картиной и соответствующими данными лабораторных, рентгенологических и функциональных исследований, положительным «потовым тестом».

Все пациенты обследовались, наблюдались и проходили лечение в детском Центре МВ, ДГБ св. Ольги и Центре МВ взрослых НИИ пульмонологии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург). Выделение ДНК проводили в соответствии с методикой, приведённой в руководстве Сэмбука с соавторами [14], с некоторыми модификациями.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров опубликованы в работе Воупе с авторами [7].

Смесь для амплификации объемом 100 мкл включала 15 нМ каждого праймера, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 16,6 мМ сульфата аммония, 6,7 мМ MgCl₂, 6,7 мкМ ЭДТА, 10 мМ меркаптоэтанол, 0,17% BSA, 1,0 мМ каждого dNTP и 1 единицу *Taq*-ДНК-полимеразы («Бион», Москва).

Для амплификации фрагментов гена *CFTR* использовали следующие условия ПЦР: после денатурации (95°C, 5 мин) проводили 30 циклов амплификации в режиме 95°C — 50 с, 52—60°C — 50 с (в зависимости от последовательности праймеров), 72°C — 1 мин. Качество и количество продуктов ПЦР проверяли в 7,5%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Гель окрашивали в водном растворе бромистого этидия

Таблица

Мутации в гене *CFTR*, выявленные в анализируемой группе больных МВ

Количество пациентов	Генотип
3	+/- delF508
3	+/+
1	+/-c3816_3817 delTG
1	+/-del21kb
1	+/-S1196X
1	K1468R/1677delTA
1	1393-1G>A (1525-1G>A) / delF508
3	2184insA/ delF508
2	489+1G>T (621+1G->T)/ delF508
1	164+1G>T/ delF508
1	1679+2T>C/delF508
1	Leu1335Pro)/+
1	delF508/2789+3G>A
3	delF508/3849+10kbC>T
1	delF508/3691delT
1	delF508/L1335P
1	E217G /+
1	E92 A/ delF508
1	E92K/E92K
1	S945L/4021insT
1	G1249E/delF508
1	G542X/+
1	L138ins/ delF508
1	N1303K/ delF508
1	N1303K/L1335P
1	R1066C/delF508
1	R334W/1766+1G>C
1	R75X /delF508
1	W1282R/ D1152H
1	W1282R/R347P
1	W1310X/3849+10kb C > T

(0,5 мкг/мл) и регистрировали наличие продукта ПЦР в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм) на трансиллюминаторе Macrovue (LKB, Великобритания). После очистки продукта ПЦР проводили секвенирование с использованием Big Dye Terminator 1.1 kit (Applied Biosystems, США), с последующим капиллярным электрофорезом в анализаторе 3130 (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования проводили путём программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США), BioEdit, базы данных Cystic Fibrosis Mutation Database и CFTR2.

Результаты и обсуждение

Как уже отмечалось, частота выявляемости мутаций при МВ в России составляет в среднем 70–75%. Среди пациентов с МВ из Санкт-Петербурга в среднем у 38% больных идентифицируется одна мутация, а у 14% пациентов неизвестны обе мутации. Таким образом, генотип по гену *CFTR* остаётся неизвестным у 52% пациентов [2].

В исследуемой группе больных одна мутация идентифицирована у 26 пациентов (65%), а у 14 пациентов (35%) генетический дефект выявлен не был, при этом частота неизвестных мутаций составила 67%.

Нами проанализирована нуклеотидная последовательность 27 экзонов, а также промоторной области гена *CFTR* в 40 образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови пациентов с МВ. В 37 образцах ДНК (93%) выявлены различные мутации в гене *CFTR*. Таким образом, идентифицированы мутации в 85% *CF* хромосом, а частота неизвестных мутаций составила 15%.

Как следует из представленных в таблице данных, в двух случаях выявлена сплайсинговая мутация 489+1G>T (621+1G->T) в экзоне 4 (2,5%), в двух других — мутация L1335P в экзоне 25 (2,5%). Следует отметить, что данные мутации не входят в стандартные тест-системы, используемые в РФ. К относительно часто встречающимся мутациям исследуемой выборки можно отнести мутации W1282R (2,5%), 3849+10kb C>T (5%), N1303K (2,5%), E92K (2,5%), 2184insA (3,8%). Остальные идентифицированные мутации в гене *CFTR* выявлены в единичных случаях. Найдены три ранее не описанные мутации: c3816_3817 delTG (экзон 23), E92A (экзон 4), K1468R (экзон 27) (рисунок на 4-й странице обложки). Таким образом, для более точной молекулярной диагностики МВ в Северо-Западном регионе России необходимо пересмотреть спектр диагностически значимых мутаций и с учётом результатов наших предыдущих исследований таковыми являются: delF508, CFTRdele2,3(21kb), 334delTT, 3849+10kb, G542X, R334W, R347P, 2184insA, 2143delT, 1677delTA, 3737delA, W1282X, W1282R, N1303K, E92K, 489+1G>T (621+1G->T) и L1335P.

До недавнего времени считалось, что МВ — тяжёлое наследственное заболевание, приводящее к смерти в ранние годы жизни. Однако последние исследования показали, что диагноз МВ не всегда такой однозначный, как считали ранее. Существуют различные формы этого заболевания от лёгких, «стёртых» до тяжёлых, с летальным исходом. Очевидно, что *CFTR* отвечает за широкий спектр клинической патологии и клиническая картина проявления мутаций в гене *CFTR* может быть размытой и нечёткой. Последние годы все больше внимания привлекают фенотипические проявления «мягких» мутаций МВ, а также сочетания мутаций «мягкая—жесткая» [8, 11].

В этих случаях заболевание обычно протекает более легко, может манифестировать в подростковом или взрослом возрасте, прежде всего патологией лёгких, тогда как признаки недостаточности поджелудочной железы и гепатобилиарной системы появляются позже или вообще отсутствуют. Среди всех больных МВ преимущественно лёгочными формами с поздней манифестацией заболевания страдают от 10 до 30% [4–6].

В исследуемой выборке больных 16 пациентов (19%) имели течения заболевания с преимущественным поражением лёгких, поздней манифестацией и без панкреатической недостаточности. Несмотря на более лёгкое течение и позднюю манифестацию заболевания, у 47% больных была выявлена в гетерозиготном состоянии «жесткая» мутация delF508. В 27% случаев идентифицирована сплайсинговая мутация 3849+10kbC>T. В исследованной выборке по частоте мутаций на первом месте находилась мутация delF508 (23%), на втором — сплайсинговая мутация 3849+10kbC>T (13%), на третьем (7%) — мутации E92K и W1282R. Частота выявляемости мутантных аллелей составила 83%. В группе больных с классической формой МВ частота мутантных аллелей составила 82%.

Интересно отметить, что распределение частот мутаций гена *CFTR* при классической смешанной форме МВ и с преимущественно лёгочной формой достоверно различалось. Так, вторая по частоте после delF508 мутация CFTRdele2,3 (21kb) при классической смешанной форме МВ в группе с лёгочной формой заболевания вообще не обнаружена. Из этого следует, что для адекватного выбора диагностической панели при рутинном типировании МВ мутаций необходимо учитывать форму заболевания.

Вызывает некоторое удивление большое количество полиморфизмов, идентифицированных при секвенировании экзонов гена *CFTR*, в том числе и экзона 10. Как известно, данный экзон кодирует первый АТФ связывающий домен, играющий ключевую роль в транспорте ионов Cl⁻. Возможно, эти вариации экзона 10 не столь безобидны для функций гена *CFTR*, как первоначально казалось. Так, например, полиморфизм M470V, который долгое время считался вариантом нормы, в действительности, играет важную роль и от-

носится к так называемым полудоминантным мутациям с частичной пенетрантностью [9]. Хотелось бы отметить высокую частоту полиморфного варианта 4521G/A (Glnat 1463) в экзоне 27 гена *CFTR*, частота которого составила 24%. Аллель 4521A сцеплен с другим полиморфным вариантом 4700T8/9 в 3'-нетранслируемой области гена. Возможно, более пристальное внимание к подобным полиморфизмам (особенно в кодирующих областях гена) позволит прояснить их роль в патогенезе различных форм МВ.

Таким образом, дальнейший поиск мутаций в гене *CFTR* является приоритетной задачей, так как позволяет уточнить диагноз и спектр МВ мутаций, повысить качество пренатальной диагностики и медико-генетического консультирования, оптимизировать схему лечения.

Список литературы

1. Гембицкая Т.Е., Черменский А.Г., Бойцова Е.В. Муковисцидоз сегодня: достижения и проблемы, перспективы этиопатогенетической терапии // *Врач*. — 2012. — №2. — С. 5–8.
2. Иващенко Т.Э. Молекулярно-генетический анализ мутаций в гене *CFTR* // Сборник материалов региональной научно-практической конференции «Муковисцидоз. Что важно сегодня». — СПб., 2013. — С. 10–12.
3. Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза муковисцидоза. — СПб.: Интермедика, 2002. — 252 с.
4. Капранов Н.И., Гембицкая Т.Е., Черменский А.Г. Глава 30. Муковисцидоз // Рациональная фармакотерапия. Клиническое руководство / Под ред. акад. А.Г. Чучалина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — С. 43–72.
5. Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю. и др. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области // *Вопросы современной педиатрии*. — 2013. — Т. 12, №1.
6. Фейжельсон Ж., Пеко И. Возраст постановки диагноза и процент поздней диагностики при поздней манифестации муковисцидоза // Сборник материалов VIII Нац. конгресса «Муковисцидоз у детей и взрослых». — Ярославль, 2007. — С. 11–18.
7. Boyne J., Evans S., Pollitt R., Taylor C., Dalton A. Many delF508 heterozygote neonates with transient hypertrypsinaemia have a second, mild *CFTR* mutation // *J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 37. — P. 543–547.
8. Groman I.D., Karczeski B., Shridan M., Robinson T. Phenotypic and genetic characterization of patients with features of «nonclassic» forms of cystic fibrosis // *J. Pediatr.* — 2005. — №140. — P. 675–680.
9. Kerem B., Kerem E. The Molecular Basis for Disease Variability in Cystic Fibrosis // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 4. — P. 65–73.
10. Kerem B.S., Rommens J.M., Buchanan J.A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis // *Science*. — 1989. — Vol. 245. — P. 1073–1080.
11. McKone E.F., Goss C.H., Aitken M.L. *CFTR* genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis // *Chest*. — 2006. — Vol. 130. — P. 1441–1447.
12. Riordan J.M., Rommens J.M., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA // *Science*. — 1989. — Vol. 245. — P. 1066–1073.
13. Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Melmer G., Drumm N. et al. Identification of Cystic Fibrosis gene: Chromosome walking & jumping // *Science*. — 1989. — Vol. 245. — P. 1059–1065.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. — N.Y.: Cold Spring Harborab. Press, 2001. — 245 p.

Analysis of mutations in CF patients using method of whole-exome sequencing of *CFTR* gene

Ivashchenko T.E., Nasihova U.A., Gembitskaia T.E., Orlov A.B., Chermenskii A.G., Baranov B.S.

Russia, St.-Petersburg. E-mail: tivashchenko2011@mail.ru

In Russian Federation the frequency of identified mutations of gene *CFTR* in patients with cystic fibrosis (CF) reaches approximately 70–75% (that is lower than in Western Europe) and it remains a quite large number of patients with one or both unidentified mutations. In Saint-Petersburg in 38% of CF cases one mutation was not found, in 14% of CF cases — two. At present the method of whole-exome sequencing of *CFTR* gene and flanking intronic regions is widely used to identify the unknown mutations. The entire *CFTR* coding regions sequencing was performed in 40 CF patients with one or two unidentified mutations. In two cases the splicing mutation 489+1G>T (621+1G>T) was detected in 4 exon, in two others cases we found the mutation L1335P in 25 exon. These both mutations aren't included in standard test systems used in the Russian Federation. Also the three novel mutations were detected (c.3816_3817 delTG (exon 23), E92A (exon 4), K1468R (exon 27)). Further search for mutations in gene *CFTR* is a priority task. It allows to specify the diagnosis, to improve prenatal diagnostics, to increase quality of medico-genetic consultation and to optimize treatment methods.

Key words: cystic fibrosis, mutations, *CFTR* gene, sequencing

Геномный анализ метилирования ДНК с использованием секвенирования нового поколения*

Стрельников В.В.^{1,2,3}, Танас А.С.^{1,2}, Руденко В.В.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,2,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук,

Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, факс: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Москва, 119992, ул. Трубецкая, д. 8, факс: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1, факс: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

Анализ метилирования ДНК изначально являлся краеугольным камнем эпигенетических исследований. Появление геномных технологий, обеспечивающих доступность масштабных исследований метилирования ДНК, в значительной степени подогревает и без того неугасающий интерес к изучению этой эпигенетической модификации в норме и при патологии. В настоящее время исследования метиломов выполняются преимущественно с использованием гибридных микрочипов. В то же время, отмечаются недостатки такого технологического подхода: невозможность воспроизводимости результатов, связанная с различиями платформ и характерным для микрочипового гибридного анализа групповым эффектом, приводит к значительному снижению информативности получаемых массивов данных. Геномное секвенирование бисульфит-модифицированной ДНК может повысить информативность анализа метиломов, однако в полногеномном варианте оно неприменимо к скринингу больших выборок по целому ряду причин. В качестве альтернативы рассматривается метод бисульфитного секвенирования ограниченных выборок локусов с использованием геномных секвенаторов — RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing), который может успешно применяться в скрининговых исследованиях метиломов уже сегодня. Отличительной особенностью RRBS в сравнении с полногеномным бисульфитным секвенированием является возможность регулировать состав анализируемых библиотек, ограничивая представленность низкоинформативных нуклеотидных последовательностей и повышая относительную долю CpG-островков. Авторами разработан способ обоснованного сокращения библиотек секвенируемых геномных локусов RRBS, обеспечивающий максимальную селективность (долю последовательностей CpG-островков в общем массиве данных) анализа метиломов. Для анализа оптимизированных выборок локусов разработан способ скрининга метиломов на основе высокопроизводительного параллельного секвенирования, в том числе с использованием настольных геномных анализаторов, что позволяет внедрить геномный анализ метилирования в широкую практику биологических и медико-биологических исследований.

Ключевые слова: геномный анализ метилирования ДНК, биологические микрочипы, секвенирование нового поколения

Современные высокопроизводительные методы геномного анализа метилирования ДНК

Существует два принципиальных подхода к анализу метилирования ДНК. Первый подразумевает изучение уже известных генов/локусов, статус метилирования которых представляет интерес в связи с ранее обнаруженными ассоциациями с заболеваниями или нормальными вариантами функционирования геномов. Подобные исследования абсолютно необходимы для эпигенетической характеристики того или иного признака и обычно охватывают ограниченный круг хорошо охарактеризованных генов, что позволяет унифицировать результаты исследований метилотипов. Подобный стандартизированный подход имеет определённые преимущества, поскольку

позволяет сравнивать результаты десятков исследований, что значительно повышает их статистическую достоверность. В то же время, ограниченность круга генов, включённых в такие панели по изучению метилирования, не позволяет идентифицировать новые гены и локусы, дифференциальный характер метилирования которых имеет своё отражение в формировании нормальных и патологических фенотипов. Поэтому основными критериями эффективности изучения метиломов в настоящее время становится второй подход: широта и непредвзятый характер скрининга метилирования ДНК.

Начало XXI века ознаменовалось разработкой и внедрением в практику научных исследований целого спектра методов изучения метилирования ДНК на уровне генома, каждый из которых, тем не менее, включает в себя

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов №14-04-01606 а, №14-04-32295 мол_а. Танас А.С. является получателем стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

использование одной из двух современных технологических платформ высокопроизводительного анализа нуклеотидных последовательностей — гибридизацию ДНК на микромассивах (биологические микрочипы) и параллельное клональное секвенирование ДНК (секвенирование нового поколения). Различные методы, использующие аффинное обогащение геномных локусов — *MethylCap*, *MBD-seq*, *MeDIP* [15, 20], — представляют собой не более чем подходы к подготовке геномных библиотек к анализу методами геномного секвенирования или гибридизации на микрочипах.

Вследствие причин скорее исторического характера гибридизационные микрочипы остаются наиболее популярной платформой геномного анализа метилирования ДНК. Знакомые пользователям протоколы гибридизации на микрочипах, простая система анализа данных, а также сравнительно низкие затраты по сравнению с секвенированием позиционировали микрочипы как инструмент, весьма удобный для анализа дифференциально метилированных регионов (DMRs) на основе анализа статуса метилирования известных CpG-сайтов генома человека.

Тем не менее, гибридизационной платформе присущи некоторые внутренние проблемы и ограничения. Массивы формируются на основе заранее разработанных зондов, которые соответствуют конкретным позициям CpG-динуклеотидов геномов определённых видов живых организмов. Таким образом, отсутствует возможность параллельного получения дополнительной генетической информации, в частности об аллельном состоянии однонуклеотидных полиморфизмов (SNP); ограничивается потенциал обнаружения новых дифференциально метилированных локусов; а исследования эпигеномов других биологических видов требуют проведения полного цикла разработки и производства соответствующих зондов. Кроме того, характерные для гибридизационных микрочипов проявления группового эффекта и кросс-гибридизации с нецелевыми фрагментами ДНК снижают достоверность результатов и требуют подтверждения данных с использованием альтернативных методов.

Недостатки гибридизационного подхода к геномному анализу метилирования подробно раскрыты в нескольких недавних публикациях, посвящённых оценке надёжности анализа с использованием популярной платформы *Infinium Human Methylation450 BeadChip* (далее — *HM450*).

Исследования, проведённые в лаборатории Розанны Вексберг [7], показали, что значительное количество зондов в массиве *HM450* подвержено кросс-гибридизации с нецелевыми областями генома либо содержит известные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). Оба фактора подрывают достоверность анализа метилирования ДНК. Авторы выявили в общей сложности 29 233 зонда, которые имеют высокую вероятность гибридизации в нецелевых областях генома. Кроме того,

исследователи обнаружили, что почти половина (49,3%) зондов перекрывает, по крайней мере, один SNP, причём 13,8% зондов содержат SNP непосредственно в анализируемых CpG-парах (замены в позициях цитозина или гуанина). Авторы пришли к выводу, что участки дифференциального метилирования ДНК, идентифицированные с помощью микрочипов *HM450*, должны проходить валидацию независимым методом анализа, например секвенированием нового поколения.

Другое исследование, проведённое Колумбийским университетом [9], показало возможность получения при использовании чипов *HM450* ложных результатов, связанных с групповым эффектом и использованием общепринятого программного обеспечения для анализа нарушений в путях регуляции биологических процессов. Были проанализированы образцы крови, полученные от лиц, подвергающихся воздействию высоких и низких доз мышьяка в питьевой воде. Образцы ДНК наносили на чипы *HM450* случайным образом либо группами, содержащими образцы лишь одной из двух выборок, для создания потенциального группового эффекта, который чреват артефактами анализа. Авторы показали, что в последнем случае между выборками выявляется в сотни и тысячи раз больше дифференциально метилированных CpG-динуклеотидов, чем при дизайне эксперимента со случайным порядком нанесения образцов из разных выборок. Параллельно показано, что применение к результатам *HM450* программного обеспечения для анализа путей регуляции биологических процессов, предназначенного для данных по экспрессии генов, получаемых на гибридизационных микрочипах, способно внести дополнительный диссонанс в интерпретацию выявляемых паттернов дифференциального метилирования. Авторы провели симуляционное исследование на 100 случайных CpG-сайтах, представленных на чипе *HM450*, с использованием популярного программного обеспечения *Ingenuity IPA*. Несмотря на то, что для анализа были выбраны случайные сайты, программа выявила между ними значимые взаимосвязи в отношении различных заболеваний и путей регуляции, в частности неоплазии и клеточной дифференцировки. Авторы объяснили это тем, что при дизайне зондов для *HM450* предпочтение отдавалось локусам, представляющим особый интерес, с точки зрения ассоциации с распространёнными заболеваниями, т.е. эти чипы не являются инструментом непредвзятого скрининга CpG-метилирования генома человека.

Таким образом, результаты исследований, опубликованные в 2013 г. [7, 9], чётко указывают на необходимость осторожной интерпретации результатов анализа дифференциального метилирования ДНК, полученных с использованием гибридизационных чипов, в частности *Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip*. В то же время, растёт технологическая и ценовая доступность методов секвенирования нового поколения, которые открывают новые возможности в области эпи-

геномного анализа. В отличие от гибридизации на микрочипах, секвенирование позволяет исследовать метилирование ДНК любых организмов, для которых известны референсные геномные последовательности, способно одновременно выявлять как генетические мутации, так и эпигенетические модификации и не сковано рамками заранее определённых геномных локусов, что в совокупности может превратить его в метод выбора, несмотря на всё ещё более низкую стоимость гибридных подходов.

Методы геномного анализа метилирования ДНК путём секвенирования нового поколения

Подходы к анализу метилирования ДНК с использованием секвенирования нового поколения различаются, главным образом, способами подготовки геномных библиотек и особенностями анализа результатов секвенирования. Подготовка библиотек фрагментов нативной ДНК может осуществляться путём обработки ДНК изошизомерами рестриктаз с различной чувствительностью к метилированию либо аффинного обогащения образца метилированными нуклеотидными последовательностями. Подготовка библиотек ДНК, модифицированной бисульфитом, может осуществляться относительно неспецифичной ферментативной или ультразвуковой фрагментацией либо более специфичной обработкой эндонуклеазами рестрикции, направленной на формирование пулов фрагментов, обогащённых участками CpG-островков.

Внедрение секвенирования нового поколения фактически решило основную проблему классических методов скрининга дифференциального метилирования геномов, основанных на применении чувствительных и нечувствительных к метилированию ДНК изошизомеров рестриктаз (методы метилчувствительного фингерпринтинга, амплификации интерметилированных сайтов, рестрикционно-ориентированного геномного сканирования, дифференциального анализа репрезентаций [2, 4]), — проблему геномного картирования выявляемых дифференциально метилированных участков ДНК [3]. Использование секвенирования нового поколения в таких методах, как HELP-seq, Methyl-seq, MSCC, MRE-seq [5, 6, 17], позволило получать информацию о статусе метилирования до 1 млн локусов генома [11]. Тем не менее, все эти методы, так же как и методы, основанные на аффинном обогащении геномных библиотек, отличаются низкой разрешающей способностью, предоставляя информацию о метилировании геномных участков протяжённостью в десятки и сотни пар нуклеотидов [10].

Информация о статусе метилирования с однонуклеотидным разрешением может быть получена лишь путём секвенирования ДНК, предварительно обработанной бисульфитом натрия. Для проведения полногеномного бисульфитного секвенирования интактную ге-

номную ДНК подвергают неспецифической фрагментации и лигируют с адаптерами, остатки цитозина в составе которых заменены на остатки метилцитозина во избежание их дезаминирования в процессе последующей бисульфитной обработки. В дальнейшем бисульфит-конвертированные фрагменты геномной библиотеки клонально амплифицируют с универсальными праймерами и проводят их параллельное секвенирование. Впервые такой подход, получивший название Methyl-C-seq или BS-seq, был применен в 2008 г. для полногеномного секвенирования метилома *Arabidopsis thaliana* [8, 16]. Для исследования одного образца было задействовано 200 дорожек геномного секвенатора Illumina Genome Analyzer, при этом стоимость расходных материалов составила 200 000 долл. Несмотря на постоянно снижающуюся стоимость секвенирования нового поколения, полногеномное бисульфитное секвенирование и сегодня остаётся сложным и дорогостоящим подходом к изучению метиломов. Так, база данных NGSmethDB v2, по состоянию на март 2014 г., содержит результаты лишь 38 экспериментов полногеномного бисульфитного секвенирования ДНК человека [12].

Помимо высокой стоимости бисульфитного секвенирования методами нового поколения существуют объективные технические сложности, которые ставят под вопрос целесообразность полногеномного анализа метиломов. Выравнивание результатов бисульфитного секвенирования осложнено сниженной информативностью последовательностей бисульфит-модифицированной ДНК [21], поскольку неметилированные участки ДНК после бисульфитной конверсии представляют собой последовательности из трех нуклеотидов; кроме того, прямые и обратные прочтения конвертированной ДНК не являются комплементарными [14], что увеличивает объём референсного генома и усугубляет сложности анализа данных. Полные библиотеки геномной ДНК избивают последовательностями с низкой информативностью, что осложняет их геномное картирование и чревато бесполезным расходом ресурсов при секвенировании и даже ошибками определения статуса метилирования. В результате полногеномного бисульфитного секвенирования генерируется огромный массив данных, наибольшая часть которых отражает статус метилирования локусов, не являющихся маркерными с точки зрения дифференциального анализа биологических образцов по признаку статуса метилирования ДНК. Такими локусами со слабым дискриминирующим потенциалом являются протяжённые участки ДНК, содержащие редкие рассеянные CpG-динуклеотиды, и рассеянные короткие и длинные повторяющиеся элементы генома (SINE и LINE в геноме человека).

Для повышения информативности и надёжности анализа метилирования ДНК параллельным секвенированием разработан метод бисульфитного секвенирования ограниченных выборок локусов (Reduced Representation Bisulfite Sequencing — RRBS; [18]. В отличие от

полногеномного подхода, для подготовки геномных библиотек RRBS используются специфические эндонуклеазы рестрикции, формирующие пул CpG-богатых фрагментов ДНК, что позволяет значительно сократить секвенируемую фракцию генома и обогатить её наиболее информативными последовательностями ДНК.

Метод RRBS несколько расширил возможности использования геномного секвенирования метилирования ДНК для характеристики метиломов. В частности, в рамках проекта ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) за последние 3 года этим методом было проанализировано около 100 образцов ДНК человека. Опубликованные данные RRBS ENCODE характеризуют метиломы 17 нормальных тканей и порядка 80 клеточных линий, в том числе клеточных линий злокачественных новообразований [13]. В то же время, несмотря на то, что метод RRBS был опубликован 5 лет назад и взят на вооружение крупным международным консорциумом ENCODE, накопление знаний, получаемых с его использованием, до сих пор происходит крайне медленно. Кроме того, в научной литературе отсутствуют свидетельства применения RRBS в клинических исследованиях. Это говорит о том, что RRBS не решил основных проблем геномного секвенирования метилирования ДНК и требуется разработка нового подхода, который обеспечит возможность масштабного изучения метиломов в биологических и медицинских исследованиях.

Разработка способа геномного бисульфитного секвенирования для скрининга выборок образцов ДНК в биологических и медицинских исследованиях

Ключевым моментом разработки прикладной модификации метода RRBS является эффективное ограничение секвенируемой выборки локусов при максимальном сохранении её информативности с точки зрения анализа дифференциального метилирования ДНК. В методе RRBS на состав целевой выборки накладывает определённые ограничения способ формирования геномных библиотек (гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции). В классическом протоколе RRBS используется эндонуклеаза MspI, исходя из общепринятого положения о том, что сайты узнавания этого фермента маркируют CpG-островки. В то же время, нами показано, что существуют эндонуклеазы, сайты узнавания которых более специфично маркируют CpG-островки. В частности, при формировании библиотеки из генома человека с длинами фрагментов от 40 до 220 п.н. с использованием эндонуклеазы рестрикции MspI к CpG-островкам относится 21% фрагментов, в то время как при использовании рестриктазы XmaI — 50% [3].

Для выявления эндонуклеаз, сайты узнавания которых маркируют CpG-островки наиболее специфично, мы проанализировали принадлежность сайтов узнавания каждой из известных на сегодняшний день эндо-

нуклеаз рестрикции последовательностям CpG-островов генома человека. Для осуществления такого анализа нами разработана программа ReMark [1]. Показано существование 36 уникальных сайтов узнавания рестриктаз из базы REBASE, принадлежащих последовательностям CpG-островов в большей степени, чем сайт узнавания MspI (CCGG). В то же время, подавляющее число таких рестриктаз чувствительно к CpG-метилированию, что препятствует их использованию в подготовке библиотек RRBS. Единственной известной на сегодняшний день нечувствительной к CpG-метилированию рестриктазой, обладающей большей селективностью по отношению к CpG-островкам, чем MspI, является XmaI (сайт узнавания — CCCGGG), которая и была выбрана нами для разработки оптимизированного протокола RRBS. Расчёты показали, что секвенирование библиотеки XmaI-RRBS, ограниченной длинами фрагментов 100 — 200 п.н., должно предоставлять информацию о состоянии метилирования свыше 110 000 CpG-динуклеотидов, более половины из которых принадлежат CpG-островкам.

Для валидации протокола XmaI-RRBS проведено секвенирование ДНК клеточной линии рака молочной железы MCF7 и образца нормальной молочной железы на полупроводниковом геномном секвенаторе Ion Tor-

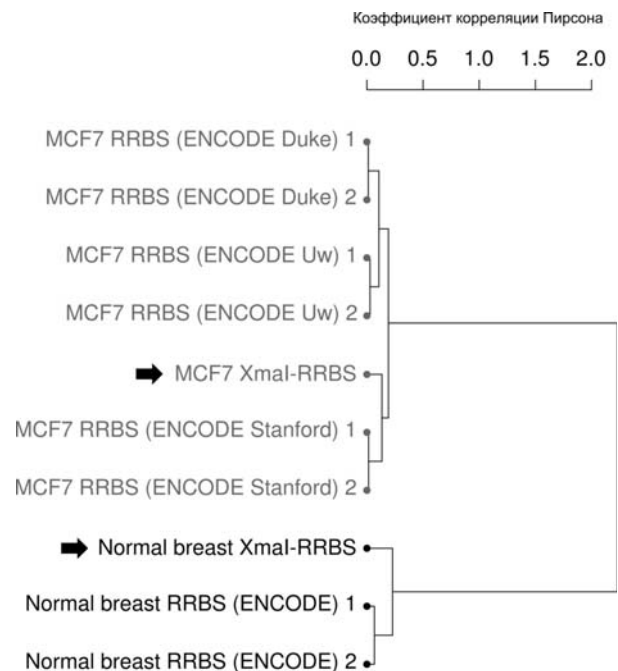


Рис. 1. Диаграмма иерархической кластеризации метиломов (расстояние корреляцией Пирсона) образцов клеточной линии MCF7 и нормальной молочной железы (Normal breast), полученных в проекте ENCODE (Uw — University of Washington, Duke — Duke University, Stanford — Stanford University, BC — BioChain) классическим методом RRBS и авторами настоящего исследования методом XmaI-RRBS. Полученные нами метиломы MCF7 и нормальной молочной железы (образцы указаны стрелками) кластеризуются совместно с метиломами, полученными в проекте ENCODE.

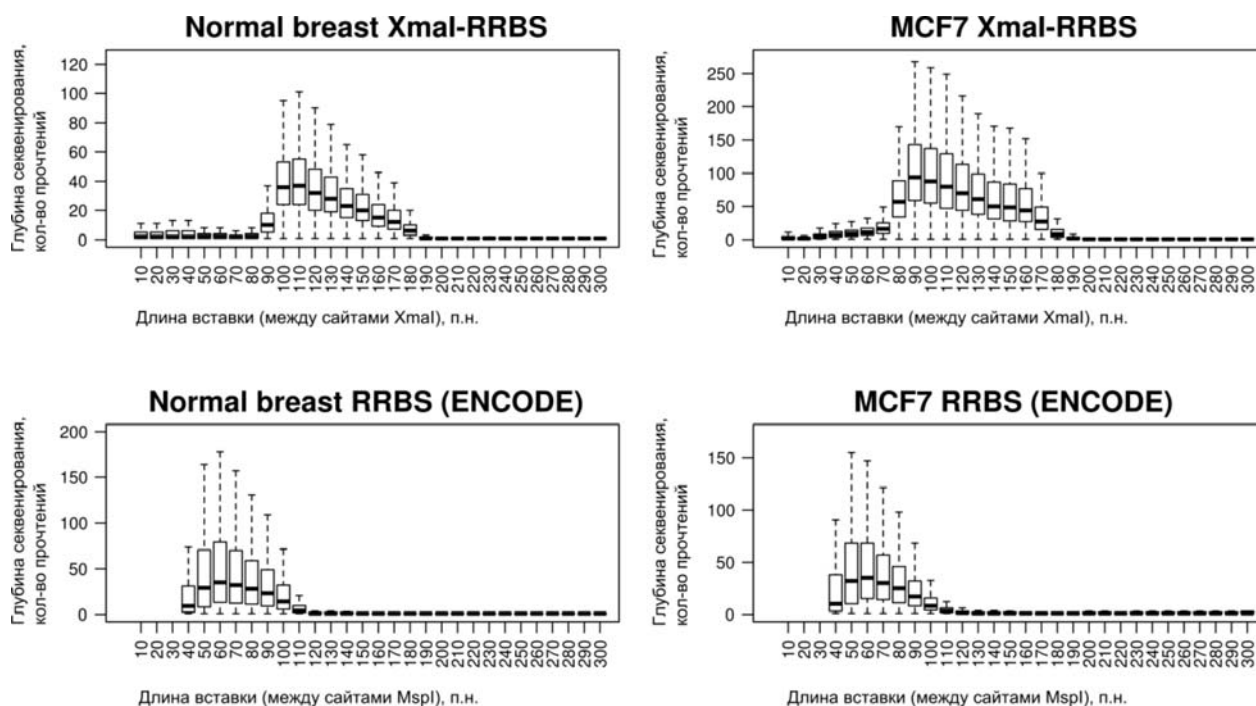


Рис. 2. Диаграммы глубины покрытия локусов библиотек MspI и XmaI различных длин для данных скрининга метилирования образцов клеточной линии MCF7 и нормальной молочной железы, полученных в настоящем исследовании (верхняя панель) и в проекте ENCODE (нижняя панель).

rent PGM. Полученные экспериментальные данные согласуются с данными других авторов, использовавших классический протокол RRBS (рис. 1), причём в нашем случае глубина секвенирования фрагментов библиотеки выше, а секвенируемые фрагменты длиннее, чем в результатах проекта ENCODE (рис. 2).

Заключение

Важнейшим преимуществом методов секвенирования нового поколения является возможность получения информации о характере метилирования геномов с однонуклеотидным разрешением. Однако существующие подходы к геномному бисульфитному секвенированию ДНК — полногеномное бисульфитное секвенирование и секвенирование ограниченных выборок локусов — в настоящее время неприменимы в масштабных биологических и медицинских исследованиях вследствие высокой стоимости экспериментов и перегруженности результатов низкоинформативными нуклеотидными последовательностями, создающими сложности анализа и интерпретации результатов. Нами показано на примере метода RRBS, что обоснованный теоретическими расчётами выбор альтернативных способов формирования геномных библиотек для высокопроизводительного параллельного бисульфитного секвенирования ДНК может привести к формированию новых, более практичных лабораторных протоколов использования секвенирования нового поколения для эпигеномных исследований.

Список литературы

1. Борисова М.Э., Танас А.С., Стрельников В.В. Программа для ЭВМ «ReMark». Рекламно-техническое описание, описание применения. Регистрационный номер ВНИИЦ 50201350020, Москва, 2013. Интернет-ресурс: <http://tools.epigenetic.ru/ReMark>.
2. Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Танас А.А. Методы анализа метилирования ДНК // Введение в молекулярную диагностику: Учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. М.А. Пальцева и Д.В. Залетаева. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2011. Т. 2. — С. 80–99.
3. Танас А.С., Руденко В.В., Стрельников В.В. Дифференциальное метилирование геномов // LAP Lambert Academic Publishing, Германия. — 2013. — 151 с.
4. Танас А.С., Шкарупо В.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Дизайн эксперимента и анализ результатов амплификации интерметилированных сайтов с использованием компьютерной программы AIMS in silico // Молекулярная биология. — 2010. — Т. 44, №2. — С. 355–365.
5. Ball M.P., Li J.B., Gao Y. et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells // Nat. Biotechnol. — 2009. — №27. — P. 361–368.
6. Brunner A.L., Johnson D.S., Kim S.W. et al. Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver // Genome Res. — 2009. — №19. — P. 1044–1056.
7. Chen Y.A., Lemire M., Choufani S., Butcher D.T., Grafodatskaya D., Zanke B.W., Gallinger S., Hudson T.J., Weksberg R. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray // Epigenetics. — 2013. — Vol. 8, №2. — P. 203–209.
8. Cokus S.J., Feng S., Zhang X. et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning // Nature. — 2008. — №452. — P. 215–219.

9. Harper K.N., Peters B., Gamble M.V. Batch Effects and Pathway Analysis: Two Potential Perils in Cancer Studies Involving DNA Methylation Array Analysis // *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. — 2013. — Vol. 22, №6. — P. 1052–1060.
10. Harris R.A., Ting W., Cristian C. et al. Sequence-based profiling of DNA methylation: comparisons of methods and catalogue of allelic epigenetic modifications // *NBiotechnol.* — 2010. — №28. — P. 1097–1105.
11. Hirst M., Marra M.A. Next generation sequencing based approaches to epigenomics // *Briefings in Functional Genomics*. — 2010. — №9. — P. 455–465.
12. <http://bioinfo2.ugr.es/NGSmethDB/statistics.php?#hg19>
13. <http://www.genome.ucsc.edu>
14. Huss M. Introduction into the analysis of high-throughput-sequencing based epigenome data // *Brief Bioinform.* — 2010. — Vol. 11. — P. 512–523.
15. Jacinto F.V., Ballestar E., Esteller M. Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome // *Biotechniques*. — 2008. — №44. — P. 35–43.
16. Lister R., O'Malley R.C., Tonti-Filippini J. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis // *Cell*. — 2008. — №133. — P. 523–536.
17. Maunakea A.K., Nagarajan R.P., Bilenky M. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters // *Nature*. — 2010. — №466. — P. 253–257.
18. Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H., et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells // *Nature*. — 2008. — №454. — P. 766–770.
19. Oda M., Glass J.L., Thompson R.F. et al. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — №37. — P. 3829–3839.
20. Serre D., Lee B.H., Ting A.H. MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — №38. — P. 391–399.
21. Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. The cancer genome // *Nature*. — 2009. — Vol. 458. — P. 719–724.

Genomic DNA methylation analysis with next-generation sequencing

Strelnikov V.V.^{1,2,3}, Tanas A.S.^{1,2}, Rudenko V.V.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Zaletaev D.V.^{1,2,3}

¹ — Research Centre for Medical Genetics,

1, Moskvorechie St., Moscow, 115478, fax: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Russian Health Ministry,

8, Trubetskaya St., Moscow, 119991, fax: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

³ — N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Russian Health Ministry,

1, Ostrovityanova St., Moscow, 117997, fax: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

DNA methylation analysis had originally been a cornerstone of epigenetic research. The emergence of genome-scale technologies for DNA methylation studies is largely fueling the ever active interest towards the role of this epigenetic modification in health and disease. Currently, methylome research is mainly carried out by microarray hybridization. At the same time, some pitfalls of this technological approach, namely, non-reproducibility of results associated with differences platforms and typical for the microarray analysis group effect, significantly reduce the information content of the datasets derived. Genomic sequencing of bisulfite modified DNA can enhance methylome analysis, although genome-wide version is not applicable to screening large samples for a variety of reasons. Alternatively, an RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) method is intended to be successfully used in the methylome screening studies right away. Opposite to genome-wide bisulfite sequencing, RRBS allows to select the composition of the genomic libraries and to confine the fraction of low complexity nucleotide sequences simultaneously increasing the relative proportion of CpG islands. We have developed a method of sophisticated RRBS library reduction that provides maximum selectivity (proportion of CpG islands sequences) for the methylome analysis. Optimized RRBS representations can be analyzed by high performance parallel sequencing using desktop genome analyzers allowing implementation of genome-wide DNA methylation analysis in a broad variety of biological and biomedical research.

Key words: genome-wide DNA methylation analysis, DNA microarrays, next-generation sequencing

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика»

Настоящие правила являются приложением к договору публичной оферты, размещённому на сайте www.med-gen.ru, в разделе «Журнал «Медицинская генетика».

«Медицинская генетика» — ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал, публикующий результаты исследований отечественных и зарубежных учёных по современным проблемам генетики человека и медицинской генетики. К публикации принимаются ранее не опубликованные работы по профилю журнала: теоретические и обзорные статьи, результаты завершённых оригинальных исследований, краткие сообщения, описания клинических случаев, рецензии на книги, комментарии читателей к ранее опубликованным статьям и письма к редактору, информация о научных мероприятиях. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершённых исследований, а также статьи, посвящённые исследованиям, выполненным с нарушением этических норм и правил и норм гуманного обращения с биообъектами. Решение о публикации принимается редколлегией журнала после рецензирования рукописи с учётом научной значимости и актуальности представленных материалов. При рассмотрении полученных авторских материалов редакционная коллегия руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (www.ICMJE.org). Статьи, отклонённые редакционной коллегией, повторно не принимаются и не рассматриваются.

Статья должна быть написана на русском языке, представлена в одном печатном экземпляре в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows и прислана в электронном виде на e-mail редакции. Статья должна сопровождаться направлением (сопроводительным письмом) от учреждения, где была выполнена научная работа, в котором должны быть отражены:

- информация о предшествовавших или повторных публикациях или о представлении в другой журнал любой части этой работы;
- заявление о финансовых или других взаимоотношениях, которые могут привести к «конфликту интересов»;
- заявление о том, что статья прочитана и одобрена всеми авторами, все требования к авторству соблюдены и все авторы уверены, что рукопись отражает действительно проделанную работу;
- заявление, что рукопись не содержит сведений, не подлежащих к опубликованию в открытой печати;
- указание на наличие письменных информированных согласий от пациентов на участие в исследовании и/или на публикацию информации о них, включая фотографии;
- указание на одобрение исследования локальным или центральным этическим комитетом.

В конце статьи должны быть подписи всех авторов и полностью указаны фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, номер телефона, адрес электронной почты автора, осуществляющего связь с редакцией. Материалы, не отвечающие этим требованиям, не принимаются.

Печатать следует на одной стороне листа формата А4 через 2 интервала, шрифтом Times Roman, 12 пунктов без переносов и выравнивания по правому краю. Все поля страницы должны быть не менее 25 мм. Нумерация страниц, включая первую, приводится внизу по центру. Общий объём рукописи, включая аннотации на русском и английском языках, список литературы, таблицы, рисунки и подписи под рисунками, не должен превышать для оригинальных статей 16 страниц, для обзорных и теоретических — 32 страницы, для кратких сообщений — 8 страниц. Число таблиц и число рисунков не должно быть более пяти, за исключением особых случаев, одобренных редколлекцией журнала. Размеры рисунков и таблиц не должны превышать одной страницы формата А4. Статьи большего объёма могут быть опубликованы в исключительных случаях по решению редакционной коллегии.

Структура статьи:

1. Название статьи, напечатанное строчными буквами без разрядки и выделения;
2. Фамилия(и) и инициалы автора(ов);
3. Место работы автора(ов): полное название учреждения (аббревиатуры недопустимы), город, почтовый адрес с индексом, адрес электронной почты (отметить арабскими цифрами соответствие авторов учреждениям, в которых они работают);
4. Аннотация (объёмом не более 0,5 стр.);
5. Ключевые слова (не более 5);
6. Экспериментальные оригинальные статьи должны иметь разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение. Два последних раздела могут быть объединены;
7. Теоретические и обзорные статьи могут иметь иные подразделы.
8. Краткие сообщения печатаются без подразделения на части.
9. В завершении рукописи в обязательном порядке должны быть упомянуты все лица и организации, оказавшие финансовую поддержку исследованию (в виде грантов, дарения или предоставления оборудования, реактивов, расходных материалов, лекарств или всего этого вместе), а также принявшие другое финансовое или личное участие, которое может привести к конфликту интересов, или декларировано отсутствие у авторов конфликта интересов.
10. В конце текста статьи могут быть выражены признательность отдельным лицам и (или) научным или иным фондам и организациям, оказавшим помощь в выполнении работы;
11. После текста статьи приводится список литературы;
12. Каждая таблица печатается на отдельной странице;
13. На отдельной странице приводятся подписи к рисункам, с указанием названия статьи и авторов;
14. По-английски на отдельной странице печатаются название статьи, фамилия (фамилии) и инициалы автора (авторов), название учреждения, его адрес, включая адрес электронной почты, перевод аннотации статьи (не более 0,5 стр.), ключевые слова (не более 5).

Названия разделов печатаются заглавными буквами на отдельной строке. Подзаголовки внутри разделов также печатаются на отдельной строке. На левом поле по тексту статьи указываются места расположения рисунков и таблиц. Сложные математические формулы печатаются на отдельной строке (следует использовать редактор формул, встроенный в текстовый редактор Word). Формулы нумеруются справа в круглых скобках в случае ссылок на них по ходу текста статьи

Данные рисунков не должны повторять материалы таблиц. Рисунки должны быть чёткими с минимальным количеством обозначений. Детали на рисунках обозначаются арабскими цифрами, либо русскими буквами, которые расшифровываются в подрисуночных подписях. В подписях к микрофотографиям необходимо указать метод окраски, если препарат окрашен, и увеличение.

Электронная версия рисунков, схем, фотографий должна быть представлена в точечных форматах tiff, jpeg или gif (300—600 dpi) или в векторных форматах Adobe Illustrator (ai, eps), Corel Draw (cdr). Файлы с иллюстрациями должны быть названы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат, и каким по порядку является рисунок.

Цитируемая литература (не более 25 для оригинальных работ и не более 50 для обзорных статей) приводится в алфавитном порядке (вначале на русском языке). **Не допускаются ссылки на неопубликованные работы, материалы конференций, диссертации (можно указывать в качестве источника автореферат диссертации).** В тексте номер ссылки заключён в квадратные скобки и соответствует нумерации в списке литературы.

Ссылка на публикацию в периодическом издании должна содержать фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер и страницы.

Примеры оформления ссылок:

Сурин В.Л. Лабораторная диагностика острой перемежающейся порфирии // *Генетика*. — 2001. — Т. 2, №5. — С. 690—697.

Gu X.K. *The porphyrias: recent advances* // *Clin. Chem.* — 1986. — Vol. 32, №3. — P. 1255—1265.

В случае цитирования книг, монографий ссылка содержит фамилию и инициалы автора, название, место издания, название издательства, год издания, число страниц. Пример оформления ссылки:

Кадурина Т.И. *Наследственные коллагенопатии (клиника, диагностика, лечение и диспансеризация)*. — СПб.: Невский Диалект, 2000. — 271 с.

Ссылка на материалы авторефератов диссертаций:

Котлукова Н.П. Кардиоваскулярная патология у новорожденных и детей раннего возраста: Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.м.н. — М., 2001. — 57 с.

Рецензирование статьи осуществляется в соответствии с утверждёнными правилами, с которыми можно ознакомиться на сайте www.med-gen.ru.

Редакция оставляет за собой право редактировать текст при обнаружении технических или смысловых дефектов, либо возвращать статью автору для исправления.

Датой поступления статьи считается день получения редакцией окончательного текста.

Отклонённые статьи не возвращаются.

Авторский гонорар не выплачивается.

Все статьи, в том числе статьи аспирантов и докторантов, публикуются бесплатно.

В случае обнаружения ошибок или описок в ранее опубликованных статьях журнал публикует в одном из последующих номеров на отдельной странице перечень ошибок и описок с цитированием оригинального текста статьи и со ссылкой на статью. При этом в оглавление номера включается раздел «Исправления». В случае выявления недостоверных данных в уже опубликованной статье редакция журнала публикует опровержение. Опровержение (как и редакторское мнение) помещается в журнале на отдельной странице и включается в оглавление. В тексте опровержения редактор приводит доказательства недостоверности данных, опубликованных в статье, и приводит все необходимые цитаты.

Статьи следует направлять по адресу:

115478, Москва, ул.Москворечье, 1,
Медико-генетический научный центр РАМН,
редакция журнала «Медицинская генетика».

Электронный вариант статьи следует направлять на электронный адрес редакции L_Tarlycheva@med-gen.ru.