

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЕНОМА В РАЗВИТИИ ЧЕЛОВЕКА

И.Н. Лебедев, Т.В. Никитина, А.Г. Токарева, Н.Н. Суханова, С.А. Назаренко

ГУ Научно-исследовательский институт медицинской генетики
Томского научного центра СО РАМН, Томск, Россия, e-mail: igorl@img.tsu.ru

Для онтогенеза человека характерна чрезвычайно высокая частота репродуктивных потерь, в значительной степени обусловленная геномными мутациями. Несмотря на интенсивные исследования структуры хромосомного дисбаланса, ассоциированного с патологией эмбриогенеза, многие вопросы о механизмах формирования высокого уровня нарушений кариотипа на самых ранних этапах индивидуального развития до сих пор остаются неясными. С развитием методов полногеномного молекулярно-цитогенетического анализа и вспомогательных репродуктивных технологий накапливаются данные о значительной доле мозаичных форм хромосомных аномалий в структуре геномных мутаций у зародышей человека. Наличие в организме двух или более клеточных клонов с разными хромосомными наборами свидетельствует о митотической нестабильности эмбрионального генома. Другим маркером нестабильности выступают соматические мутации микросателлитных локусов ДНК, частота которых, в отличие от мутаций гаметического происхождения, заметно повышена у внутриутробно погибших зародышей человека. По-видимому, нестабильность генома на разных уровнях его организации является одним из основных факторов пренатального отбора у человека. В обзоре рассмотрены данные о некоторых патогенетических эффектах геномной нестабильности в эмбриональном развитии организма. Обсуждается гипотеза о взаимосвязи высокого уровня мутационной изменчивости с нарушениями фундаментальных механизмов эпигенетической регуляции ранних этапов онтогенеза.

Введение

Одним из наиболее значимых явлений в репродукции человека является высокая частота невынашивания беременности. Согласно некоторым оценкам, шансы наступления беременности, ее нормального протекания и рождения здорового ребенка у женщин в возрасте 20–30 лет составляют всего 21–28 % в течение одного менструального цикла (Bonde *et al.*, 1998). Около 60 % зигот элиминируется на пре- и ранних постимплантационных этапах развития, а 15–20 % клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерываются в течение первого триместра (Macklon *et al.*, 2002). Очевидно, что исследование факторов, лежащих в основе такого мощного действия отбора, имеет высокую значимость.

В настоящее время уже не вызывает сомнений, что доминирующим фактором пренатального отбора у человека являются геном-

ные мутации (Griffin *et al.*, 1997). Согласно классическим представлениям, большинство aberrаций кариотипа составляют числовые аномалии хромосом, анеуплоидии и полиплоидии, формирующиеся вследствие ошибок гаметогенеза в половых клетках родителей или в результате нарушений оплодотворения. Однако, несмотря на интенсивные исследования механизмов формирования числовых хромосомных нарушений в гаметогенезе у человека, многие вопросы в этой области цитогенетики до сих пор остаются дискуссионными (Hassold, Hunt, 2001). В последнее время со стремительным развитием комбинации новых методов молекулярно-цитогенетического анализа и процедур вспомогательных репродуктивных технологий стали накапливаться сведения о высокой частоте мозаичных форм хромосомных нарушений на преимплантационных этапах развития человека (Los *et al.*, 2004). Формирование мозаичных вариантов хромосомных нарушений,

при которых организм имеет как минимум два клеточных клона с различным кариотипом, является результатом ошибок митотической сегрегации хромосом в соматических клетках развивающегося зародыша. Безусловно, данный феномен может вносить весьма заметный вклад в формирование общего пула хромосомных аномалий в пренатальном периоде развития человека. Однако этот вклад остается пока еще малоизученным. Существенный интерес с позиций анализа нестабильности эмбрионального генома могут представлять данные и о соматических мутациях микросателлитных локусов ДНК, частота которых в отличие от мутаций гаметического происхождения заметно повышена у внутриутробно погибших зародышей человека. В настоящем обзоре рассмотрены некоторые данные о патогенетической роли геномной нестабильности в раннем периоде онтогенеза человека, в том числе полученные в результате наших собственных исследований. Кроме того, обсуждены регуляторные эпигенетические механизмы, нарушения которых потенциально могут быть ассоциированы с потерей контроля за структурно-функциональной целостностью генома.

Маркеры геномной нестабильности при патологии эмбриогенеза

Интенсивное развитие молекулярно-цитогенетических и эмбриологических технологий предоставило уникальную возможность получения новой информации о структуре геномных мутаций, ассоциированных с патологией эмбрионального развития человека. Наибольший прогресс в этом вопросе, безусловно, достигнут в области преимплантационной генетической диагностики. Исследования кариотипа отдельных бластомеров показали, что от 15 до 85 % зародышей имеют числовые аномалии хромосом (Munne *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1995; Magli *et al.*, 2000), причем существенная часть из них находится в мозаичном состоянии. По результатам флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с центромероспецифичными ДНК-зондами даже на ограниченном числе хромосом было показано, что частота хромосомного мозаицизма заметно возрастает в период дробления бластомеров от

15–18 % на стадии 2–4 клеток до 50–68 % на стадии 5–8-клеточной морулы (Xu *et al.*, 2000; Bielanska *et al.*, 2002). В некоторых работах мозаичная хромосомная конституция бластоцист регистрировалась даже у 90–100 % обследованных зародышей (Bielanska *et al.*, 2002; Malmgren *et al.*, 2002). По результатам нескольких недавних исследований, в которых с помощью сравнительной геномной гибридизации (CGH) удалось впервые осуществить полногеномный скрининг хромосомных нарушений на уровне отдельных бластомеров, было показано, что частота хромосомного мозаицизма варьирует от 33 до 60 % (Voullaire *et al.*, 2000; Wells, Delhanty, 2000; Wilton *et al.*, 2003; Trussler *et al.*, 2004). От 16 до 51 % бластоцист обладают хаотичным кариотипом, т. е. несут в своем составе бластомеры с различными комбинациями хромосомных нарушений. Шансы на успешную имплантацию таких бластоцист являются минимальными.

На постимплантационных этапах развития хромосомный мозаицизм также выступает заметным фактором внутриутробного отбора. Особую теоретическую значимость для цитогенетики онтогенеза, а также серьезную проблему для пренатальной диагностики представляет ограниченный плацентарный мозаицизм (confined placental mosaicism, CPM). При CPM наблюдается локализация клеточных клонов с хромосомными аномалиями исключительно в экстраэмбриональных тканях, кариотип клеток зародыша является при этом нормальным. Частота CPM у нормально развивающихся эмбрионов и плодов составляет в среднем 1–2 % (Kalousek, 2000), тогда как у спонтанных абортусов I триместра беременности данный показатель достигает уже 20–25 % (Griffin *et al.*, 1997; Lebedev *et al.*, 2004).

Распределение мозаичных клеточных линий в различных тканях зародыша определяется множеством факторов и зависит от механизма возникновения первичного хромосомного нарушения (мейотическая мутация в гаметогенезе родителей или митотическая ошибка в делящихся клетках эмбриона); от стадии дифференцировки ткани, в которой появляется новая клеточная линия; от ее пролиферативных и миграционных свойств (Wolstenholme, 1996). Комбинация отмеченных факторов опреде-

ленным образом сказывается и на характере эмбрионального развития. В качестве примера можно привести полученные нами данные об особенностях фенотипического проявления мозаичных вариантов аутосомных моносомий в I триместре беременности (Лебедев, Назаренко, 2004). С помощью интерфазного FISH-анализа клеток 60 спонтанных абортусов с низкой пролиферативной активностью, недоступных для стандартного цитогенетического исследования, была обнаружена неожиданно высокая частота мозаичных моносомий по аутосомам 7, 15, 21 и 22, составившая 19 % от всех выявленных хромосомных нарушений. Аутосомные моносомии являются летальным нарушением кариотипа, несовместимым, как правило, с нормальной имплантацией бластоцисты, поэтому данный тип хромосомных аномалий практически не регистрируется в выборках спонтанно абортированных эмбрионов в I триместре беременности. Для объяснения возможных механизмов формирования мозаичных моносомий у эмбрионов на постимплантационных этапах развития нами было изучено распределение анеуплоидных клеточных линий в производных различных эмбриональных и внезародышевых листков. Клетки с моносомиями по хромосомам 7 и 15, ранее не описанным у спонтанных абортусов I триместра, оказались ограниченными цитотрофобластом плацентарных тканей и отсутствовали в экстраэмбриональной мезодерме. Внезародышевая мезодерма является производной эпибласта, обособляющегося из клеток внутренней клеточной массы бластоцисты после имплантации. Наблюдаемый вариант межтканевого распределения анеуплоидных клеток мог сформироваться в результате митотического нерасхождения хромосом в части клеток цитотрофобласта уже после обособления эмбриональных и внезародышевых листков, т. е. после этапа имплантации. По всей видимости, клетки имплантирующейся бластоцисты имели нормальный кариотип.

Другой вариант распределения клеточных линий наблюдался для моносомий по хромосомам 21 и 22. Анеуплоидные клетки в мозаичном состоянии с нормальной клеточной линией обнаруживались как в цитотрофобласте, так и в экстраэмбриональной мезодерме. Такое распределение может свидетельствовать о достаточно

раннем возникновении хромосомного нарушения, вероятно, еще до имплантации. Возможно, что присутствие клеток с моносомиями 21 и 22 в бластоцисте не является существенным препятствием для прохождения имплантации. Более того, в единичных случаях моносомии 21 и 22 регистрировались у спонтанных абортусов (Hassold *et al.*, 1980; Dejmek *et al.*, 1992), а моносомия 21 была описана даже у новорожденных (Pellisier *et al.*, 1987, Garzicic *et al.*, 1988).

Интересно отметить, что степень тяжести нарушения эмбрионального развития также оказалась связанной с особенностями межтканевого распределения клеточных линий с аутосомными моносомиями. Если анеуплоидные клетки оказывались ограниченными цитотрофобластом (моносомии 7 и 15) или преобладали в нем по сравнению с экстраэмбриональной мезодермой (один из случаев моносомии 22), то такие ситуации приводили к остановке эмбриогенеза на 7–8-й неделях развития и заканчивались неразвивающимися беременностями. В тех же случаях, когда клетки с моносомиями преобладали в экстраэмбриональной мезодерме (моносомия 22) или обнаруживались с одинаковой частотой в цитотрофобласте и в мезодерме, эмбриональное развитие останавливалось достаточно рано, вероятно, еще на этапе дифференцировки внутренней клеточной массы, поскольку все абортированные зародыши были представлены пустыми плодными мешками. Возможно, что преобладание мозаичной аутосомной моносомии, по крайней мере, по хромосомам 21 и 22 в производных эпибласта может являться критическим фактором, несовместимым с нормальным морфогенезом эмбриональных структур. Таким образом, эти данные указывают на то, что тканеспецифичная локализация анеуплоидных клеток, определяемая стадиейспецифичными аномалиями митоза в онтогенезе, может оказывать определенное влияние на характер нарушений развития зародыша.

Дополнительным подтверждением этого тезиса являются результаты исследования, в котором было проанализировано влияние хромосомного мозаицизма в плацентарных тканях на развитие плодов с трисомиями по хромосомам 13 и 18 (Kalousek *et al.*, 1989). Цитогенетический анализ плацент 14 новорожденных и мертворожденных с чистой формой

трисомии 13 или 18 в тканях плода показал наличие диплоидно-анеуплоидного мозаицизма в цитотрофобласте (с частотой нормальных клеток 12–100 %), но не в строме ворсин хориона (экстраэмбриональная мезодерма) или амнионе. Вероятно, что присутствие в цитотрофобласте клеток с нормальным кариотипом, возникших вследствие механизма «коррекции трисомии», может поддерживать относительно нормальное внутриутробное развитие таких зародышей в течение III триместра.

Интересно отметить, что хромосомный мозаицизм является не единственным маркером нестабильности эмбрионального генома на ранних этапах онтогенеза. Особый интерес в этом отношении могут представлять мутации микросателлитных локусов ДНК. Микросателлиты (МС) – короткие tandemно повторяющиеся последовательности ДНК с длиной повторяющегося мотива от 2 до 6 нуклеотидов, формирующие более или менее однородные тракты протяженностью до сотен нуклеотидов. Особенностью данного класса повторов ДНК является высокая частота спонтанных мутаций (Brinkmann *et al.*, 1998), которая значительно возрастает при некоторых патологических состояниях. Повышенная частота мутаций МС локусов, так называемая микросателлитная нестабильность, выявляется при онкологических заболеваниях и является индикатором дефектов генов системы mismatch-репарации ДНК (Thibodeau *et al.*, 1993).

В 1998 г. появилось первое сообщение о повышенной частоте гаметических мутаций МС у спонтанных абортусов, а также о статистически значимой связи между наличием гаметических мутаций и невынашиванием беременности (Spandidos *et al.*, 1998). В этом исследовании 23 % спонтанных абортусов продемонстрировали наличие мутаций МС локусов, возникших в половых клетках родителей. Учитывая тот факт, что генетические причины гибели около половины зародышей, имеющих нормальный кариотип, как правило, остаются не выявленными, предположение о существовании связи между повышенной частотой МС мутаций и невынашиванием беременности требовало дополнительного экспериментального подтверждения.

В наших исследованиях на семейном материале (55 супружеских пар с невынашиванием

беременности) также была обнаружена высокая частота мутаций тетра-нуклеотидных локусов в целом как гаметического, так и соматического происхождения (Никитина, Назаренко, 2000). У 8 из 55 обследованных эмбрионов (14,5 %) были зарегистрированы мутации МС. В среднем частота мутаций исследованной панели 21 тетра-нуклеотидного маркера ($9,8 \times 10^{-3}$ на locus на гамету на поколение) практически в 5 раз превысила спонтанный уровень мутирования МС данного типа. Однако наиболее интересные данные были получены в результате дифференциального анализа частоты гаметических и соматических мутаций МС в семьях со здоровыми детьми и в супружеских парах с невынашиванием беременности. В семьях, имевших спонтанный аборт с нормальным кариотипом, частота гаметических мутаций МС оказалась более высокой, чем в семьях с нормальной репродуктивной функцией: $4,36 \times 10^{-3}$ и $2,32 \times 10^{-3}$ на locus на гамету на поколение соответственно, однако это различие оказалось статистически недостоверным ($P = 0,25$). В то же время при исследовании сегрегации 10 МС локусов ДНК у 4 из 95 спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (4,2 %) было обнаружено наличие дополнительных аллелей, отсутствующих у обоих родителей. Такая ситуация свидетельствует о мутационном событии в соматических клетках зародыша. В контрольной выборке из 51 медицинского абортуса не было выявлено ни одной мутации по исследованным локусам, что позволило исключить гипермутабильность МС маркеров как причину повышенной частоты мутаций некоторых из них в группе спонтанных абортусов. В среднем частота мутаций всего комплекса МС маркеров в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом составила $8,8 \times 10^{-3}$ и статистически значимо ($P = 0,01$) превысила скорость спонтанного мутирования исследованных тетра-нуклеотидных МС. Полученные данные дают основание предполагать, что нестабильность генома, выявляемая на уровне повторяющихся последовательностей ДНК, может затрагивать не только генетически нейтральные локусы, но, возможно, и участки генома, играющие важную регуляторную роль в раннем развитии и жизнеспособности зародыша. Принципиально отметить, что, как и в случае хромосомного мозаицизма, гибель

части зародышей человека на ранних этапах онтогенеза оказывается ассоциированной с нестабильностью эмбрионального генома, проявляющейся в форме соматических мутаций МС локусов ДНК.

Эпигенетические факторы нестабильности генома в эмбриогенезе

Какие факторы могут определять высокий уровень наблюдаемой нестабильности генома в раннем периоде эмбриогенеза? В целом этот вопрос лежит в области фундаментальной проблемы современной биологии развития, связанной с познанием закономерностей функционирования генома и реализации наследственной информации в онтогенезе. Представляется очевидным, что нестабильность генома может определяться дисбалансом особых регуляторных систем, контролирующих его структурно-функциональную целостность в течение индивидуального развития организма. С одной стороны, это могут быть контрольные системы клеточного цикла (cell cycle checkpoints) или механизмы репарации ДНК. С другой стороны, целостность генома может находиться под контролем эпигенетических систем регуляции генной экспрессии.

Под «эпигенетикой» принято понимать наследуемые изменения функции гена, не связанные с изменениями его первичной нуклеотидной последовательности (Bird, 2002). Материальную основу эпигенетической регуляции составляют обратимые ковалентные модификации ДНК (метилирование цитозиновых оснований) и гистонов (ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинилирование). С позиций возможности наследуемости эпигенетического статуса клетки в ряду поколений только метилирование ДНК в настоящее время рассматривается как истинная эпигенетическая модификация генома. Функциональное значение метилирования ДНК заключается в транскрипционной инактивации хроматина, обусловленной надмолекулярными изменениями его компактизации. В нормальных соматических клетках метилирование ДНК ответственно за поддержание и реализацию таких фундаментальных биологических процессов, как инактивация X-хромосомы, геномный

импринтинг, регуляция тканеспецифичной экспрессии генов, репрессия ретротранспозонов в геноме и, что представляет существенный интерес в рамках настоящего обзора, контроль геномной стабильности (Costello, Plass, 2001). По-видимому, закономерно, что вслед за завершением проекта «Геном человека» начинаются исследования «метилома» – совокупности метилированных последовательностей ДНК в клетке (Feinberg, 2001) и уже объявлено о формировании консорциума «Эпигеном человека» (HEP – Human Epigenome Project) (Novik *et al.*, 2002).

Изменение статуса метилирования отдельных локусов или всего генома в целом драматическим образом сказывается на судьбе клеток. Наиболее отчетливо это проявляется при канцерогенезе, где на фоне чрезвычайно высокой нестабильности генома регистрируются его глобальное гипометилирование и гиперметилирование CpG-островков промоторных областей регуляторных генов. Прогрессивно растущий список генов с установленными формами эпигенетической инактивации при онкологических процессах включает в себя гены, ответственные за реализацию ключевых процессов клеточной физиологии, таких, как клеточный цикл, апоптоз, дифференцировка, репарация ДНК, передача внутри- и межклеточных сигналов, регуляция факторов транскрипции (Plass, Soloway, 2002; Strathdee, Brown, 2002). Очевидно, что нарушение этих процессов несовместимо с нормальным функционированием как отдельной клетки, так и всего организма в целом.

Одним из наиболее значимых в последние годы открытий в области регуляции генной экспрессии в раннем периоде онтогенеза млекопитающих явилось установление феномена эпигенетического перепрограммирования генома (Li, 2002). На стадии дробления от зиготы до бластоцисты отмечается практически тотальное деметилирование генома (за исключением импринтированных локусов). В период имплантации, когда происходит обособление зародышевых и экстраэмбриональных листков, запускается процесс установления тканеспецифичного метилирования. При этом уровень метилирования ДНК в стволовой линии экстраэмбриональных тканей – трофобласте – возрастает незначительно, в то время как геном

клеток – производных внутренней клеточной массы, дающих начало эмбриональным структурам, подвергается существенному метилированию. Предполагается, что подобные эпигенетические преобразования генома существенны для обеспечения тотипотентности зиготы с последующим сужением морфогенетического статуса клеток по мере установления тканеспецифичного характера генной экспрессии в процессе клеточной дифференцировки (Dean *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003).

Возвращаясь к феномену хромосомного мозаицизма на преимплантационных этапах развития, можно заметить, что накопление частоты мозаичных нарушений хромосом при дроблении бластомеров протекает на фоне глобального гипометилирования генома, так же, как и при онкологических процессах. Кроме того, дополнительным фактором может выступать инактивация контрольных точек клеточного цикла на этапах дробления (Harrison *et al.*, 2000). Активация экспрессии эмбрионального генома запускается только лишь со стадии 4–8 бластомеров (Braude *et al.*, 1988). Прямые экспериментальные доказательства взаимосвязи эпигенетического статуса преимплантационных зародышей человека с хромосомными аномалиями и нарушениями эмбрионального развития пока еще не получены. Вместе с тем возрастающий уровень хромосомного дисбаланса на фоне гипометилирования генома недавно был отмечен при исследовании преимплантационных зародышей различных видов млекопитающих (Shi *et al.*, 2004), а также при клонировании (Slimane-Bureau *et al.*, 2003). Отмечается, что корректное эпигенетическое перепрограммирование генома дифференцированной соматической клетки с целью восстановления ее тотипотентности и сохранения при этом нормального кариотипа остается главным лимитирующим фактором успешного клонирования.

Вполне вероятно, что нарушение тонких механизмов индукции экспрессии эмбрионального генома при накоплении в нем к моменту активации высокого уровня хромосомных aberrаций может отразиться на эпигенетическом статусе дифференцирующихся клеток и в дальнейшем негативным образом сказаться на ходе всего эмбриогенеза. Особого внимания в этом отношении заслуживает информация об

особенностях межтканевой локализации хромосомных нарушений у спонтанных абортусов. Обобщение результатов цитогенетических исследований внутриутробно погибших зародышей с этих позиций указывает на значительное преобладание мозаичных хромосомных аномалий в клетках цитотрофобласта хориона (Лебедев, Назаренко, 2001). Эта ткань является производным трофобласта, который избегает основной волны метилирования *de novo* при перепрограммировании эмбрионального генома. То есть и в данном случае возникновение мозаичного хромосомного нарушения протекает на фоне гипометилированного состояния ДНК.

Влияние гипометилирования ДНК на индукцию нестабильности генома прослеживается во многих модельных системах (Ehrlich, 2000). Так, например, показано, что в дифференцированных соматических клетках перичентромерные гетерохроматиновые районы хромосом 1 и 16, содержащие фракцию сателлитной ДНК *sat2*, гиперметилированы. При аденокарциноме груди, опухолях яичников и спорадических опухолях Вильмса эти районы гипометилированы и нестабильны. Нестабильность проявляется в различных типах хромосомных aberrаций, таких, как изохромосомы, транслокации с разрывами в околоцентромерных областях, делеции целых хромосомных плеч (Costello, Plass, 2001). Подобные изменения наблюдаются и при искусственном ингибировании ДНК-метилтрансферазы I типа (DNMT1), ответственной за поддержание статуса метилирования при репликации ДНК (Hernandez *et al.*, 1997). Мутации другого гена – *DNMT3B*, кодирующего синтез ДНК-метилтрансферазы 3В, вовлеченной в метилирование ДНК *de novo*, определяют развитие синдрома ICF, сопровождающегося центромерной нестабильностью, иммунодефицитом и лицевыми аномалиями (Robertson, Wolffe, 2000). Интересно отметить, что ранее в нашей лаборатории было описано существенное увеличение размеров С-гетерохроматиновых районов хромосом 1 и 16, содержащих сателлит II, в экстраэмбриональных тканях спонтанных абортусов по сравнению с эмбриональными тканями (Назаренко, Карагеоргий, 1995). По хромосоме 9, содержащей сателлит III, и по хромосоме Y, содержащей 4 разных типа сателлитной ДНК, отличия оказались недостоверными.

Это позволило высказать предположение, что причина наблюдаемых отличий по величине С-сегментов хромосом заключается в изменении их надмолекулярной компактизации, обусловленной тканеспецифичным характером метилирования ДНК гетерохроматина. При этом сателлит II является, по-видимому, наиболее чувствительной мишенью, отвечающей большей степенью декомпактизации при гипометилировании цитозиновых оснований ДНК. Позднее данное предположение нашло экспериментальное подтверждение в других исследованиях. Так, гипометилирование прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16 обнаружено в экстраэмбриональных тканях на ранних этапах (5–8 недель) нормального развития зародышей человека, но не в клетках эмбрионального происхождения (Пендина и др., 2001). Очевидно, что эти наблюдения отражают общую закономерность установления дифференциального характера метилирования ДНК в производных разных зародышевых и экстраэмбриональных листков в раннем эмбриогенезе млекопитающих (Li, 2002).

Как уже отмечалось выше, наряду с глобальным гипометилированием генома, гиперметилирование промоторных областей генов также может вносить определенный вклад в формирование геномной нестабильности. В ряду генов с известными формами такой эпигенетической инактивации особого внимания в связи с митотической нестабильностью генома, безусловно, заслуживают гены контроля клеточного цикла: *p14^{ARF}*, *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}*, *p27^{KIP1}*, *p57^{KIP2}*, *14-3-3σ*, *RB1* (Costello, Plass, 2001; Strathdee, Brown, 2002). Так, продукты генов *p14^{ARF}*, *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}*, *RB1* вовлечены в Rb- и p53-метаболические пути регуляции клеточного цикла на этапе G1/S и определяют возможность прохождения клеткой «точки рестрикции» и вступления в митоз (Roncalli *et al.*, 2002). Инактивация этих генов, в том числе и через эпигенетические механизмы, обеспечивает возможность пролиферации клеток с нестабильным хромосомным набором, приводит к возрастанию уровня и спектра хромосомных аномалий, автокаталитической клональной эволюции кариотипа и, как следствие, к прогрессии злокачественного процесса (Xing *et al.*, 1999). Гены *p27^{KIP1}* и *p57^{KIP2}* – ингибиторы циклин-за-

висимых киназ – вовлечены в контроль завершения S-фазы клеточного цикла и ответственны за невозможность повторных раундов репликации ДНК без полного окончания клеточного деления. Инактивация этих генов рассматривается в качестве одного из возможных молекулярных механизмов эндомитоза (Edgar, Orr-Weaver, 2001), что представляет особый интерес для исследования закономерностей формирования полиплоидных клеток. Продукт гена стратифина (*SFN*) 14-3-3σ принадлежит к семейству белков, ответственных за контроль вступления клетки в митоз на этапе G₂/M, и ингибирует клеточное деление при повреждениях ДНК через p53-зависимую деградацию цитоплазматического комплекса «CDC2 – циклин B1», участвующего в инициации митоза (Hermeking *et al.*, 1997). При воздействии γ-облучения было отмечено более высокое накопление хромосомных aberrаций в клеточных линиях рака груди, не экспрессирующих 14-3-3σ (Ferguson *et al.*, 2000). Таким образом, индукция хромосомной нестабильности в клетках вполне может быть обусловлена инактивацией контрольных точек клеточного цикла вследствие гиперметилирования промоторных регионов некоторых регуляторных генов.

Гиперметилирование промоторов генов *hMLH1*, *BRCA1*, *MGMT*, продукты которых вовлечены в процессы репарации ДНК, также может драматическим образом сказываться на стабильности генома. В частности, потеря функции *hMLH1* при колоректальном раке приводит практически к 100-кратному повышению частоты мутаций MC локусов (Ionov *et al.*, 1993). Эпигенетическая инактивация гена *hMLH1* описана при спорадических формах рака эндометрия, а также при наследственном колоректальном раке и раке желудка (Costello, Plass, 2001). Эксперименты по реактивации экспрессии *hMLH1* с использованием ингибиторов ДНК-метилтрансфераз показали возможность восстановления нормального фенотипа клеток, способных к мисматч репарации ДНК. Можно предположить, что aberrантная эпигенетическая инактивация генов мисматч репарации ДНК в раннем эмбриогенезе также может лежать в основе нестабильности эмбрионального генома, выявляемой на уровне микросателлитных локусов.

Таким образом, в настоящее время сформирована совокупность фактов, позволяющая рассматривать глобальные или локальные нарушения эпигенетической системы регуляции целостности генома в качестве одного из потенциальных индуцирующих факторов его нестабильности на разных структурно-функциональных уровнях организации. Аберрантные эпигенетические изменения в ходе раннего эмбриогенеза человека, являясь, по всей видимости, неспецифичными по отношению к тем или иным локусам генома, могут в конечном итоге выступать существенным фактором пренатального отбора. Однако важно подчеркнуть, что причинно-следственные отношения между нарушениями эпигенетических систем регуляции целостности генома и его нестабильностью, проявляющейся в форме мозаичных нарушений кариотипа и соматических мутаций микросателлитных локусов ДНК, во многом еще не ясны (Matzke *et al.*, 2003). Скорее всего, в основе нарушений генетических механизмов, приводящих к патологии эмбриогенеза, лежат еще неизученные феномены эпигенетического контроля индивидуального развития.

Литература

- Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Тканеспецифичный плацентарный мозаицизм по аутосомным трисомиям у спонтанных абортусов человека: механизмы формирования и фенотипические эффекты // Генетика. 2001. Т. 37. № 11. С. 1459–1474.
- Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Особенности фенотипической экспрессии аутосомных моносомий при патологии постимплантационного развития человека // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 1. С. 53–60.
- Назаренко С.А., Карагеоргий Н.М. Межтканевые различия С-полиморфных районов хромосом и эмбрионов человека: возможная роль метилирования ДНК // Генетика. 1995. Т. 31. № 11. С. 1578–1581.
- Никитина Т.В., Назаренко С.А. Мутации в микросателлитных повторах ДНК и эмбриональная гибель человека // Генетика. 2000. Т. 36. № 7. С. 965–971.
- Пендина А.А., Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Баранов В.С. Особенности метилирования прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16 у эмбрионов человека // Цитология. 2001. Т. 43. № 8. С. 772–776.
- Bielanska M., Tan S.L., Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type and relevance to embryo outcome // Human Reproduction. 2002. V. 17. № 2. P. 413–419.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // Genes and Development. 2002. V. 16. P. 6–21.
- Bonde J.P.E., Ernst E., Jenson T.K. *et al.* Relation between semen quality and fertility: a population based study of 430 first-pregnancy planners // Lancet. 1998. V. 352. P. 1172–1177.
- Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development // Nature. 1988. V. 332. P. 459–461.
- Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F. *et al.* Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 62. P. 1408–1415.
- Costello J.F., Plass C. Methylation matters // J. Med. Genet. 2001. V. 38. P. 285–303.
- Dean W., Santos F., Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer // Seminars in Cell and Developmental Biol. 2003. V. 14. P. 93–100.
- Dejmek J., Vojtassak J., Malova J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia // Eur. J. Obstetrics Gynecol. Reprod. Biol. 1992. V. 46. P. 129–136.
- Edgar B.A., Orr-Weaver T.L. Endoreplication cell cycles: more for less // Cell. 2001. V. 105. P. 297–306.
- Ehrlich M. DNA methylation: normal development, inherited diseases and cancer // J. Clin. Ligand Assay. 2000. V. 23. P. 144–146.
- Feinberg A. Methylation meets genomics // Nature Genet. 2001. V. 27. P. 9–10.
- Ferguson A.T., Evron E., Umbricht C.B. *et al.* High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6049–6054.
- Garzicic B., Guc-Scekic M., Pilic-Radivojevic G. *et al.* A case of monosomy 21 // Annales de Genetique. 1988. V. 31. № 4. P. 247–249.
- Griffin D.K., Millie E.A., Redline R.W. *et al.* Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: Comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism // Am. J. of Med. Genet. 1997. V. 72. P. 297–301.
- Harper J.C., Coonen E., Handyside A.H. *et al.* Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos // Prenatal Diagnosis. 1995. V. 15. № 1. P. 41–49.
- Harrison R.H., Kuo H.C., Scriven P.N. *et al.* Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal

- mosaicism analysed by sequential multicolour FISH // *Zygote*. 2000. V. 8. P. 217–224.
- Hassold T., Chen N., Funkhouser J. *et al.* A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions // *Ann. Hum. Genet.* 1980. V. 44. № 2. P. 151–178.
- Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. P. 280–291.
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K. *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression // *Mol. Cell*. 1997. V. 1. P. 3–11.
- Hernandez R., Frady A., Zhang X.Y. *et al.* Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine // *Cytogenet. Cell Genet.* 1997. V. 76. P. 196–201.
- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S. *et al.* Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis // *Nature*. 1993. V. 363. P. 558–561.
- Kalousek D.K., Barrett I.J., McGillivray B.C. Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18 // *Am. J. Hum. Genet.* 1989. V. 44. № 3. P. 338–343.
- Kalousek D.K. Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development // *Am. J. Med. Genet.* 2000. V. 91. P. 39–45.
- Kang Y.K., Lee K.K., Han Y.M. Reprogramming DNA methylation in the preimplantation stage: peeping with Dolly's eyes // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. № 3. P. 290–295.
- Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V. *et al.* Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis // *Eur. J. Hum. Genet.* 2004. V. 12. № 7. P. 513–520.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. P. 662–673.
- Los F.J., van Opstal D., van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model // *Hum. Reprod. Update*. 2004. V. 10. № 1. P. 79–94.
- Macklon N.S., Geraedts J.P., Fauser B.C. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss // *Hum. Reprod. Update*. 2002. V. 8. P. 333–343.
- Magli M.C., Jones G.M., Gras L. *et al.* Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts *in vitro* // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 8. P. 1781–1786.
- Malmgren H., Sahlen S., Inzunza J. *et al.* Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations // *Mol. Hum. Reprod.* 2002. V. 8. № 5. P. 502–510.
- Matzke M.A., Mette M.F., Kanno T., Matzke A.J. Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer? // *Trends Genet.* 2003. V. 19. P. 253–256.
- Munne S., Weier H.U., Grifo J., Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 373–379.
- Novik K.L., Nimmrich I., Genç B. *et al.* Epigenomics: Genome-wide study of methylation phenomena // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2002. V. 4. P. 111–128.
- Pellisier M.C., Philip N., Voelckel-Baeteman M.A. *et al.* Monosomy 21: a new case confirmed by *in situ* hybridization // *Hum. Genet.* 1987. V. 75. № 1. P. 95–96.
- Plass C., Soloway P.D. DNA methylation, imprinting and cancer // *Eur. J. Hum. Genet.* 2002. V. 10. P. 6–16.
- Robertson K.D., Wolffe A.P. DNA methylation in health and disease // *Nat. Rev. Genet.* 2000. V. 1. P. 11–19.
- Roncalli M., Bianchi P., Bruni B. *et al.* Methylation framework of cell cycle inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma // *Hepatology*. 2002. V. 36. P. 427–432.
- Shi W., Dirim F., Wolf E. *et al.* Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. P. 340–347.
- Slimane-Bureau W., Bordignon V., Leveille C. *et al.* Assessment of chromosomal abnormalities in bovine nuclear transfer embryos and in their donor cells // *Cloning Stem Cells*. 2003. V. 5. P. 123–132.
- Spandidos D.A., Koumantakis E., Sifakis S., Sourvinos G. Microsatellite mutations in spontaneous aborted embryos // *Fertility Sterility*. 1998. V. 70. № 5. P. 892–895.
- Strathdee G., Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions // *Expert Rev. Mol. Med.* 2002. 4 March. Available at <http://www-errmm.cbccu.cam.ac.uk/02004222h.htm>.
- Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon // *Lancet*. 1993. V. 260. P. 816–819.
- Trussler J.S., Pickering S.J., Ogilvie C.M. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization // *Reprod. Biomed. Online*. 2004. V. 8. № 6. P. 701–711.
- Voullaire L., Slater H., Williamson R., Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization // *Hum. Genet.* 2000. V. 106. P. 210–217.
- Wells D., Delhanty J.D.A. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization // *Mol. Hum. Reprod.* 2002. V. 8. № 5. P. 502–510.

- Reprod. 2000. V. 6. № 11. P. 1055–1062.
- Wilton L., Voullaire L., Sargeant P. *et al.* Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence *in situ* hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure // *Fertility Sterility*. 2003. V. 80. № 4. P. 860–868.
- Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16 and 22: their incidence, likely origins and mechanisms for cell lineage compartmentalization // *Prenatal Diagnosis*. 1996. V. 16. P. 511–524.
- Xing E.P., Nie Y., Song Y. *et al.* Mechanisms of inactivation of *p14^{ARF}*, *p15^{INK4b}*, and *p16^{INK4a}* genes in human esophageal squamous cell carcinoma // *Clin. Cancer Res*. 1999. V. 5. P. 2704–2713.
- Xu Y., Zhuang G., Shu Y. Preliminary analysis of chromosome mosaicism in preimplantation embryos // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2000. V. 35. P. 456–458.

PATHOGENESIS OF EMBRYONIC GENOME INSTABILITY IN HUMAN DEVELOPMENT

I.N. Lebedev, T.V. Nikitina, A.G. Tokareva, N.N. Sukhanova, S.A. Nazarenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk Scientific Center, RAMS, Tomsk, Russia,
e-mail: igorl@img.tsu.ru

Summary

Human reproduction is associated with extremely high rate of pregnancy wastages owing to chromosomal abnormalities. Numerous cytogenetic studies of spontaneous abortions have been performed; however, there are still many questions about origin of chromosomal aberrations in early stage of human ontogenesis. Recently new data about high frequency of mosaic aneuploidies has come from assisted reproductive technologies and new molecular cytogenetic techniques. Mosaic chromosomal constitution with two or more cell lines with different karyotypes is the result of mitotic instability of embryo genome. Somatic mutations of microsatellites DNA repeats are another marker of genome instability. A high frequency of somatic mutations of tetranucleotide microsatellites in spontaneous abortions was found also. It seems that instability of embryonic genome may be considered as a substantial factor of prenatal selection in human. Data about pathogenesis of genomic instability during early stages of human development are presented in this review. The hypothesis that loss of genome integrity may be caused by disturbances of epigenetic control of embryo development is discussed.