

doi 10.18699/vjgb-25-47

Индекс метилирования генов *DLK1* и *MKRN3* при преждевременном половом созревании

Е.А. Саженова , О.Ю. Васильева , Д.А. Федотов , М.Б. Канканам Патирананге , А.Д. Лобанов ,
А.Ю. Самбялова , Е.Е. Храмова , Л.В. Рычкова , С.А. Васильев , И.Н. Лебедев 

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

⁴ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

 elena.sazhenova@medgenetics.ru

Аннотация. Преждевременное половое созревание (ППС, OMIM 176400, 615346) – заболевание, которое вызвано преждевременной реактивацией гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. В определении сроков полового созревания ведущую роль играют генетические, эпигенетические и экологические факторы. В последние годы варианты в генах *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3* и *DLK1* были идентифицированы как генетические причины ППС. Гены *MKRN3* и *DLK1* являются импринтированными, в связи с чем эпигенетические модификации, такие как метилирование ДНК, изменяющее экспрессию данных генов, также могут рассматриваться в качестве причины ППС. Цель настоящего исследования – определение индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* у девочек с клинической картиной ППС. Анализ индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* проводили в группе из 45 девочек (возраст 7.2 ± 1.9 года) с клинической картиной ППС и нормальным кариотипом методом таргетного массового параллельного секвенирования после обработки ДНК бисульфитом натрия. Контрольная группа состояла из девочек без ППС ($n = 15$, возраст 7.9 ± 1.6 года). Различий по возрасту между группами не выявлено ($p > 0.8$). Анализ индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* не показал различий между пациентами с ППС и контрольной группой. Группа пациентов с изолированным адренархе имела повышенный индекс метилирования центра импринтинга гена *MKRN3* (72 ± 7.84 против 56.92 ± 9.44 %, $p = 0.005$). В группе пациентов с центральным ППС 3.8 % пациентов имели пониженный индекс метилирования центра импринтинга гена *DLK1* и 11.5 % – гена *MKRN3*. Таким образом, показано, что не только генетические варианты, но и нарушение индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* могут быть причиной ППС.

Ключевые слова: преждевременное половое созревание; гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ); гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось (ГПГ); геномный импринтинг; *DLK1*; *MKRN3*

Для цитирования: Саженова Е.А., Васильева О.Ю., Федотов Д.А., Канканам Патирананге М.Б., Лобанов А.Д., Самбялова А.Ю., Храмова Е.Е., Рычкова Л.В., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Индекс метилирования генов *DLK1* и *MKRN3* при преждевременном половом созревании. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(3):440-447. doi 10.18699/vjgb-25-47

Финансирование Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-25-00359.

Methylation index of the *DLK1* and *MKRN3* genes in precocious puberty

E.A. Sazhenova , O.Yu. Vasilyeva , D.A. Fedotov , M.B. Kankanam Pathiranaage , A.D. Lobanov ,
A.Yu. Sambyalova , E.E. Khramova , L.V. Rychkova , S.A. Vasilyev , I.N. Lebedev 

¹ Scientific Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

 elena.sazhenova@medgenetics.ru

Abstract. Precocious puberty (PP, OMIM 176400, 615346) is an autosomal dominant disorder caused by the premature reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Genetic, epigenetic, and environmental factors play a decisive role in determining the timing of puberty. In recent years, genetic variants in the *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*, and *DLK1* genes have been identified as genetic causes of PP. The *MKRN3* and *DLK1* genes are imprinted, and therefore epigenetic modi-

fications, such as DNA methylation, which alter the expression of these genes, can also contribute to the development of PP. The aim of this study is to determine the methylation index of the imprinting centers of the *DLK1* and *MKRN3* genes in girls with a clinical presentation of PP. The methylation index of the imprinting centers of the *DLK1* and *MKRN3* genes was analyzed in a group of 45 girls (age 7.2 ± 1.9 years) with a clinical presentation of PP and a normal karyotype using targeted massive parallel sequencing after sodium bisulfite treatment of DNA. The control group consisted of girls without PP ($n = 15$, age 7.9 ± 1.6 years). No significant age differences were observed between the groups ($p > 0.8$). Analysis of the methylation index of the imprinting centers of the *DLK1* and *MKRN3* genes revealed no significant differences between patients with PP and the control group. However, in the group of patients with isolated adrenarche, an increased methylation index of the imprinting center of the *MKRN3* gene was observed (72 ± 7.84 vs 56.92 ± 9.44 %, $p = 0.005$). In the group of patients with central PP, 3.8 % of patients showed a decreased methylation index of the imprinting center of the *DLK1* gene, and 11.5 % of probands had a decreased methylation index of the imprinting center of the *MKRN3* gene. Thus, this study demonstrates that not only genetic variants but also alterations in the methylation index of the imprinting centers of the *DLK1* and *MKRN3* genes can contribute to the development of PP.

Key words: precocious puberty; gonadotropin-releasing hormone (GnRH); hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG); genomic imprinting; *DLK1*; *MKRN3*

For citation: Sazhenova E.A., Vasilyeva O.Yu., Fedotov D.A., Kankanam Pathirana M.B., Lobanov A.D., Sambyalova A.Yu., Khramova E.E., Rychkova L.V., Vasilyev S.A., Lebedev I.N. Methylation index of the *DLK1* and *MKRN3* genes in precocious puberty. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(3):440-447. doi 10.18699/vjgb-25-47

Введение

Период подросткового возраста представляет собой один из ключевых этапов развития личности, во время которого происходят сложные изменения в нейроэндокринной системе и других биологических процессах, приводящих к физическому и половому созреванию. Появление вторичных половых признаков до 8 лет у девочек и 9 лет у мальчиков определяется как преждевременное половое созревание (ППС), частота которого составляет около 3.7 случаев на 10000 человек. В настоящее время данная патология становится все более распространенным явлением (Чеботарева и др., 2022; Alghamdi, 2023). По международной классификации болезней (МКБ-10) ППС делится на E22.8 – состояние гиперфункции гипофиза, преждевременная половая зрелость центрального происхождения и E30.9 – нарушение полового созревания неуточненное (изолированное телархе, изолированное адренархе).

Существенное влияние на сроки начала полового созревания оказывают пол ребенка, расовая принадлежность, наследственная предрасположенность, факторы окружающей среды, характер питания, социально-экономическое положение (Саженова и др., 2023). Неблагоприятную роль могут играть, например, ожирение и экзогенное поступление гормонов (Петеркова и др., 2021; Micangeli et al., 2023). Тем не менее на протяжении последнего десятилетия были обнаружены гены, которые входят в сложную сеть тормозящих, активирующих и регулирующих нейроэндокринных факторов, имеющих решающее значение для контроля начала полового созревания, – *KISS1*(1q32.1) и его рецептор *KISS1R* (*GPR54*, 19p13.3), а также два импринтированных гена, экспрессирующихся в норме только с отцовского гомолога, *DLK1* (14q32) и *MKRN3* (15q11.2) (Roberts, Kaiser, 2020; Faienza et al., 2022). Основной механизм моноаллельной экспрессии импринтированных генов – это аллель-специфическое метилирование ДНК, устанавливающее дифференциальное метилирование на двух родительских хромосомах.

Ген *DLK1* (OMIM 176290) кодирует EGF-подобный мембраносвязанный белок, который относится к эпидермальному фактору роста, участвует в сигнальном пути Notch и регулирует дифференцировку преадипоцитов,

экспрессируется в нейроэндокринных тканях, особенно в корковом слое надпочечников (Gomes et al., 2019; Macedo, Kaiser, 2019). Ген *MKRN3* (OMIM 603856) относится к семейству макоринов и участвует в управлении началом полового созревания, блокируя высвобождение гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) из гипоталамуса, тем самым задерживая наступление половой зрелости (Abreu et al., 2020). Ген *MKRN3* кодирует белок с цинковым пальцем RING, который присутствует в большинстве убиквитинлигаз E3, участвующих в процессе деградации внутриклеточных белков (Ub-протеасомный путь). Белок *MKRN3* может взаимодействовать с белками, связанными с половым созреванием, передачей сигналов инсулина, метаболизмом РНК и межклеточной адгезией (Li C. et al., 2021).

Гены *DLK1* и *MKRN3*, как большинство импринтированных генов, находятся под контролем центров импринтинга. Ген *DLK1* имеет два центра импринтинга, герминативный *MEG3/DLK1:IG-DMR* и вторичный – *MEG3:TSS-DMR*, формирующийся после оплодотворения. Ген *MKRN3* находится под контролем герминативного центра импринтинга *SNURF:TSS-DMR* и непосредственным контролем соматического *MKRN3:TSS-DMR*. Эти центры импринтинга метилированы только на отцовском гомологе в соматических тканях, таких как лейкоциты и фибробласты кожи (Okae et al., 2014).

Известно, что импринтированные гены играют основополагающую роль в развитии как мозга, так и плаценты как питающего эмбрион органа, поскольку нарушения в гипоталамо-гипофизарной системе, регулирующей эндокринную активность мозга в период эмбрионального развития, могут негативно сказаться на формировании эндокринной системы плода (Tucci et al., 2019). Гипофиз плода производит такие гормоны, как соматотропный, фолликулостимулирующий, лютеинизирующий и тиреотропный, которые имеют жизненно важное значение для роста плода и его полового созревания. Сбой в выработке этих гормонов может привести к задержке внутриутробного роста или к ППС после рождения (Canton et al., 2021). Возможно, что некоторые случаи ППС связаны с нарушением импринтированного состояния генов *DLK1* и *MKRN3*.

Цель настоящего исследования – определение индекса метилирования импринтированных регионов центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* у девочек с клинической картиной преждевременного полового созревания.

Материалы и методы

В молекулярно-генетический анализ было включено 45 девочек с ППС и нормальным кариотипом в возрасте 7.2 ± 1.9 года. Данная группа была разделена на две подгруппы: девочки с гиперфункцией гипофиза (ППС центрального происхождения, МКБ-10: E22.8, $n = 26$, возраст 7.6 ± 1.4 года) и с неуточненным ППС (МКБ-10: E30.1, $n = 19$, возраст 6.9 ± 0.8 года). Последняя, в свою очередь, делилась на подгруппы с изолированным телархе ($n = 11$, возраст 7.4 ± 1.2 года) и изолированным адренархе ($n = 8$, возраст 6.8 ± 1.4 года). Контрольная группа состояла из девочек без ППС ($n = 15$, возраст 7.9 ± 1.6 года). Различий по возрасту между группами не обнаружено ($p > 0.8$). Выборка пациентов сформирована на базе Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (г. Иркутск). Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено биоэтическим комитетом Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 1.1 от 12.01.2023). От родителей пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании и проведение ДНК-диагностики.

Описание подгрупп пациентов:

- девочки с ППС и изосексуальной гонадотропин-зависимой формой (ППС центрального происхождения) – девочки до 8 лет, имеющие ускоренное физическое развитие (SDS роста +1 и более), с опережением полового развития по Таннеру 2–4-й стадии; с уровнем гонадотропных гормонов гипофиза, соответствующим пубертатным значениям, и положительной пробой с бусерелином; с доказанным по УЗИ увеличением молочных желез и матки; с биологическим возрастом, не соответствующим паспортному;
- девочки с изолированным увеличением молочных желез (телархе) – девочки до 8 лет, имеющие ускоренное/нормальное физическое развитие (SDS роста +1 и более), с опережением полового развития по Таннеру 2-й стадии; с уровнем гонадотропных гормонов гипофиза, соответствующим допубертатным значениям, и отрицательной пробой с бусерелином; с доказанным по УЗИ увеличением молочных желез и матки;
- девочки с изолированным адренархе – девочки до 8 лет, имеющие ускоренное/нормальное физическое развитие (SDS роста +1 и более), с опережением полового развития по Таннеру 2–3-й стадии; с уровнем гонадотропных гормонов гипофиза, соответствующим допубертатным значениям, и отрицательной пробой с бусерелином; с доказанным по УЗИ отсутствием увеличения молочных желез и матки.

Определение кариотипа проводили с помощью стандартного цитогенетического анализа лимфоцитов периферической крови. Кариотипирование осуществляли на базе люминесцентного микроскопа исследовательского класса AxioImager (Carl Zeiss, Германия).

Выделение ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом. Бисульфитную модификацию ДНК выполняли с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. В ходе бисульфитной конверсии неметилированный цитозин модифицируется в урацил, который при дальнейшей ПЦР заменяется на тимин, а метилированный цитозин не подвергается модификации. Анализ индекса метилирования выполняли с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования.

Для создания библиотек использовали специально разработанные олигонуклеотидные праймеры, позволяющие амплифицировать с бисульфит-конвертированной ДНК целевые участки генома. Подбор праймеров осуществляли на импринтированные регионы, содержащие CpG-динуклеотиды центров импринтинга *MEG3/DLK1*:IG-DMR и *MKRN3*:TSS-DMR, контролирующих экспрессию генов *DLK1* и *MKRN3* соответственно. Для получения последовательности нуклеотидов использовали геномный браузер UCSC (University of California, Santa Cruz), который содержит информацию о последовательностях геномов (GRCh38, UCSC). В дальнейшем полученную последовательность нуклеотидов задействовали для подбора праймеров с помощью биоинформатической программы MethPrimer (Li L.C., Dahiya, 2002). Проверку термодинамических свойств праймеров осуществляли с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.

Импринтированный ген *DLK1* расположен на хромосоме 14, в локусе 14q32.2. Экспрессия этого гена регулируется центром импринтинга *MEG3/DLK1*:IG-DMR, позиция chr100809090–100811721 (GRCh38). Эта область генома содержит 52 CpG-динуклеотида, изменение индекса метилирования которых может влиять на экспрессию данного гена. Экспрессия импринтированного гена *MKRN3*, расположенного на хромосоме 15, в локусе 15q11.2, регулируется центром импринтинга *MKRN3*:TSS-DMR, позиция chr23561939–23567348 (сборка GRCh38). Эта область генома содержит 26 CpG-динуклеотидов, изменение индекса метилирования которых влияет на экспрессию *MKRN3* (см. таблицу).

Амплификацию целевых фрагментов проводили с использованием набора БиоМастер HS-Тaq ПЦР (2x) («Биолабмикс», Россия) по протоколу производителя со следующими условиями ПЦР: 95 °C 5 мин; 36 циклов: 95 °C 20 с, 66 °C 30 с, 72 °C 40 с. Концентрацию целевых фрагментов определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Продукты реакции очищали от примесей с применением раствора сефадекса G50 (Sigma, США). Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование осуществляли на приборе MiSeq с применением набора MicroKit (2x150) (Illumina, США).

Оценка качества прочтений выполнена с помощью FastQC v0.11.8, после чего был проведен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore. Затем прочтения картировали на бисульфит-конвертированные таргетные последовательности с использованием инструмента bwa-meth v0.2.2 с параметрами по умолчанию. Данные по метилированию в контексте CpG были извлечены из полученных файлов BAM с помощью инструмента

Список праймеров и расположение анализируемых регионов в центрах импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3*

Праймер	Последовательность праймера, 5' – 3'	Положение (GRCh38, UCSC)	Размер продукта ПЦР, п. н.	Количество CpG-динуклеотидов
<i>MEG3/DLK1:IG-DMR</i>				
D1R1	GTTGTTTTGATTTGTTAGGTT	chr100809428–100810087	659	11
D1F1	ACCTTATCCCACATAAAATA			
D1F2	ATTTTTGATTTGTAGTTGGG	chr100809940–100810497	557	13
D1R2	CCTATCTTACTTCTTAAAAAAC			
D1F3	GATAAGGTAGGATAAGAAAAGTA	chr100810080–100810720	640	14
D1R3	CCAAAATCAATAACTCAAATC			
D1F4	AGGTTTGAGTTTGAGTTATT	chr100810692–100811466	655	22
D1R4	ACAATTTAACAACAACCTTCCTC			
D1F5	GTAGTTTTTAGTAGTGTAGT	chr100811196–100811815	619	13
D1R5	CTACACCTTTAATCCAAAAA			
Итого		2387 п. н.		52*
<i>MKRN3:TSS-DMR</i>				
M3F1	TAGATGGGATAAAAGAAGGTAAT	chr23561945–23562513	568	22
M3R1	CCTCAAAAACATAAACCTAA			
M3F2	TTTTTTTGTGTTAGGAGATGAGA	chr23562966–23563522	556	2
M3R2	CTTCTCCTTTTCATAATTACCA			
M3F3	TTAGAAAAGAAGGTATAGTTGAG	chr23562528–23563130	602	2
M3R3	ACCCATAAAATTCTTAAAC			
Итого		1577 п. н.		25*

* С учетом перекрытия анализируемых регионов.

MethylDackel. Результаты представлены в виде индекса метилирования (ИМ), являющегося отношением числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тиминов в отдельном CpG-сайте. Кроме того, вычислен средний индекс метилирования вдоль всех целевых участков.

Ограничением используемого в данном исследовании метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования является невозможность дифференцировать гипометилирование обнаруженных центров импринтинга от однородительского наследования хромосом 14 и 15, а также от микроделеций этих регионов. Поэтому в случае выявления снижения индекса метилирования в центрах импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* для исключения делеционных вариантов в этих регионах проводили ПЦР в реальном времени на межгенный локус 14q32.3 и ген *NIPAI* (15q11.2) соответственно.

Статистический анализ выполнен с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для сравнения уровня метилирования между группами использовали *t*-критерий Стьюдента, ранговый критерий Манна–Уитни, метод попарных сравнений. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Результаты

Индекс метилирования 52 CpG-динуклеотидов центра импринтинга гена *DLK1* (*MEG3/DLK1:IG-DMR*) в контрольной группе показал, что три локуса, *DLK1_3_520*, *DLK1_4_422* и *DLK1_5_509*, гиперметилированы в норме, что не соответствует импринтированным генам (рис. 1, а). При наложении индекса метилирования контрольной группы и группы пробандов с ППС по этим CpG-динуклеотидам также видно, что эти локусы имеют повышенный уровень метилирования и не отличаются от контрольной группы (см. рис. 1, а). Поэтому в настоящее исследование эти локусы не были включены. В противоположность центру импринтинга *DLK1*, только один из 25 CpG-динуклеотидов (*MKRN3_3_296*) центра импринтинга гена *MKRN3* (*MKRN3:TSS-DMR*) в контрольной группе был гиперметилирован и не соответствовал характеристике импринтированных генов в норме (см. рис. 1, б). При сравнении метилирования контрольной группы и пробандов с ППС по этому локусу также наблюдался повышенный уровень метилирования (см. рис. 1, б). В связи с чем в дальнейший анализ этот локус также не был включен.

Средний индекс метилирования центра импринтинга гена *DLK1* пробандов с ППС не отличался от контрольной группы (51.46 ± 9.59 против 58.44 ± 7.15 % соответственно, $p = 0.058$), хотя отмечалось некоторое снижение этого

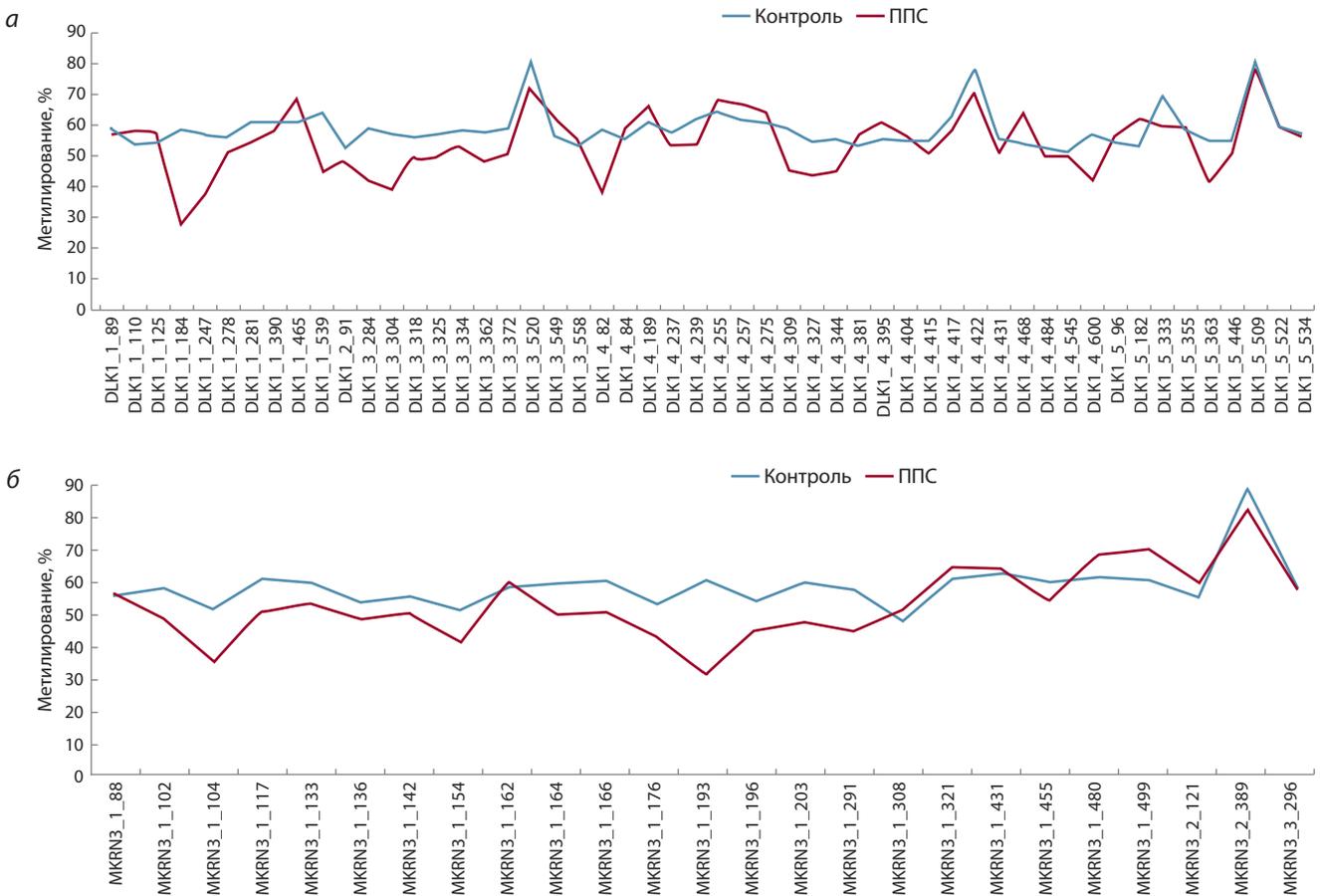


Рис. 1. Индекс метилирования CpG-динуклеотидов центров импринтинга генов *DLK1* (а) и *MKRN3* (б).

показателя (см. рис. 1, а). На следующем этапе девочки с ППС были разделены на три подгруппы: с центральным ППС, изолированными телархе и адренархе. Метод парных сравнений между подгруппами также не показал значимых различий по данному гену (58.44 ± 7.15 % в контрольной группе против 53.32 ± 8.56 % с центральным ППС, 57.40 ± 9.31 % с изолированным телархе и 59.74 ± 2.05 % с изолированным адренархе, во всех случаях $p > 0.05$) (рис. 2, а). Сравнение индекса метилирования по этому региону каждого пробанда с ППС и контрольной группой показало, что только один пациент с центральным ППС имел снижение индекса метилирования (31.16 % против 58.44 ± 7.15 %, $p < 0.01$). Следовательно, в группе ППС в центре импринтинга гена *DLK1* снижение уровня метилирования происходит у 2.22 % (1/45) пациентов, а в группе девочек с центральным ППС – 3.84 % (1/26) случаев.

Анализ индекса метилирования центра импринтинга гена *MKRN3* не показал значимых различий между пробандами с ППС по сравнению с контрольной группой (53.71 ± 10.30 против 56.92 ± 9.26 %, $p = 0.71$). В то же время при разделении группы с ППС на три подгруппы (центральное ППС, изолированное телархе и изолированное адренархе) обнаружено значимое повышение индекса метилирования в группе с адренархе по сравнению с контрольной группой (72.00 ± 7.84 % против 56.92 ± 9.44 %, $p < 0.005$) (см. рис. 2, б). Сравнение индекса

метилирования центра импринтинга гена *MKRN3* каждого пробанда с группой контроля показало, что три пробанда с центральным ППС имели сниженный уровень метилирования (34.09, 29.01 и 32.08 % против 56.92 ± 9.44 %, во всех случаях $p < 0.01$). В результате в группе ППС снижение уровня метилирования центра импринтинга гена *MKRN3* имеют 6.66 % (3/45) пациентов, а непосредственно в группе девочек с центральным ППС – 11.53 % (3/26) пациентов.

Снижение индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* может свидетельствовать как об однородительском наследовании хромосом 14 и 15 материнского происхождения, так и о делециях этих регионов на хромосомах отцовского происхождения. Методом ПЦР в реальном времени были исключены делеционные варианты, включающие центры импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3*. Однородительское наследование не было исключено. В то же время однородительское наследование как хромосомы 14, так и хромосомы 15 – очень редкое событие (1:50000 человек для хромосомы 15) (Butler, 2020).

Таким образом, в настоящем исследовании анализ индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* между пациентами с ППС по сравнению с контрольной группой не показал различий между группами. Группа пациентов с изолированным адренархе имела повышенный индекс метилирования центра импринтинга гена *MKRN3* (72 ± 7.84 против 56.92 ± 9.44 %, $p = 0.005$).

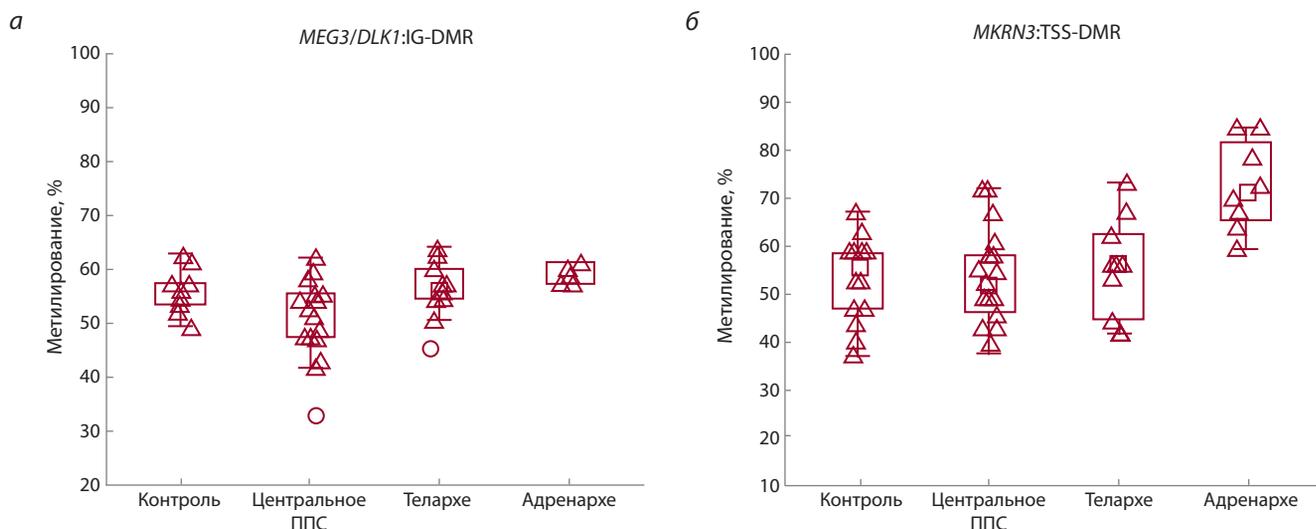


Рис. 2. Анализ попарных сравнений среднего индекса метилирования импринтированных центров *DLK1* и *MKRN3* между группами.

В группе пациентов с центральным ППС пониженный индекс метилирования гена *DLK1* имели 3.84 % пациентов и гена *MKRN3* – 11.53 % пациентов. Наличие эпимутаций одновременно в двух локусах не обнаружено ни у одного пробанда.

Обсуждение

В последние годы становится все более очевидным, что эпигенетические механизмы вносят определенный вклад в регуляцию сроков полового созревания. В нашем исследовании показано статистически значимое снижение индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* в группе девочек с центральным ППС (3.84 и 11.53 % пациентов соответственно). Следует отметить, что снижение индекса метилирования (гипометилирование) центра импринтинга *DLK1* выявляется в 8.8 % случаев при синдроме Темпла (OMIM 616222) (Narusawa et al., 2024). Данное заболевание характеризуется пре- и постнатальной задержкой роста, гипотонией, трудностями кормления, задержкой моторного развития, слабостью суставов, ожирением нижней части туловища, признаками дисморфогенеза (широкий лоб, короткий нос с широким кончиком, микроакрия) и в некоторых случаях ранним началом полового созревания (Kagami et al., 2019).

Основные клинические признаки синдрома Темпла перекрываются с синдромами Рассела–Сильвера (OMIM 180860) и Прадера–Вилли (OMIM 176270) (Kagami et al., 2015; Abi Nabib et al., 2019). В настоящем исследовании снижение индекса метилирования центра импринтинга гена *DLK1* обнаружено у одного пробанда с ППС, который также имел ожирение, перикаллезную липому и гипогенезию мозолистого тела. Помимо ППС и ожирения, клиническая картина у пациента не соответствовала фенотипу синдрома Темпла. По данным литературы, А.Р.М. Canton с коллегами (2020) показали снижение индекса метилирования центра импринтинга гена *DLK1* у 2.5 % (3/120) пациентов с ППС, пренатальной и постнатальной задержкой роста, гипотонией, трудностями кормления. Дальнейшее изучение этих случаев выявило

наличие у двух из них однородительского наследования хромосомы 14 материнского происхождения.

Гипометилирование центра импринтинга гена *MKRN3* может сопровождаться нарушением других импринтированных генов, экспрессирующихся в норме только с отцовского гомолога и расположенных, как и ген *MKRN3*, в регионе 15q11-q13. Это гены, кодирующие белки (*MAGEL2*, *NECDIN*, *NPAP1/C15orf2* и *SNURF-SNRPN*), не-транслируемые РНК (*MKRN3-AS/ZNF127-AS*, *UBE3A-AS* и *IPW*) и малые ядерные РНК (*SNORD116*, *SNORD115*, *SNORD64*, *SNORD107*, *SNORD108*, *SNORD109A* и *SNORD109B*).

Однородительское наследование данного региона материнского происхождения или делеция на отцовском гомологе может стать причиной синдрома Прадера–Вилли. Клиническая картина этого синдрома включает мышечную гипотонию, ожирение, гиперфагию, низкий рост, гипогонадизм и умственную отсталость различной степени выраженности. В редких случаях синдром сопровождается ППС (Nicoara et al., 2023). Выявленные в настоящем исследовании пациенты с гипометилированием центра импринтинга гена *MKRN3* имели центральное ППС без клинического фенотипа, характерного для синдрома Прадера–Вилли. Делеция региона 15q11-q13 у этих пациентов была исключена. Если бы они имели однородительское наследование этого региона материнского происхождения, то, несомненно, оно сопровождалось бы клинической картиной синдрома Прадера–Вилли. Поэтому, по-видимому, эти пациенты с большой вероятностью имели только гипометилирование центра импринтинга гена *MKRN3*.

Показано также повышение индекса метилирования центра импринтинга гена *MKRN3* в группе пробандов с изолированным адренархе. Преждевременное адренархе у детей не является следствием преждевременной активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, а связано с избыточной активацией сетчатой зоны надпочечников, источника дегидроэпиандростерона (ДГЭА), из которого формируются тестостерон и дигидротестостерон в

периферических тканях. Надпочечники на этапе внутриутробного развития начинают производить ДГЭА, который служит основой для выработки эстриола плаценты. Своевременное увеличение концентрации андрогенов необходимо для пубертатного скачка роста, укрепления костной ткани и стимуляции процесса эритропоэза. Умеренное превышение уровня ДГЭА активизирует развитие префронтальной коры головного мозга, оказывая нейротрофическое и нейротрофическое воздействие, а также регулирует функцию рецептора ГАМК – главного тормозного медиатора центральной нервной системы.

Гиперметилирование центра импринтинга гена *MKRN3* должно приводить к повышению экспрессии этого гена и, как следствие, к увеличению количества белка. *MKRN3* убиквитинирует различные факторы с целью подавления экспрессии гонадотропин-рилизинг-гормона. Убиквитинирование транскрипционного репрессора MBD3 ингибирует его связывание как с промотором *GNRH1*, так и с ДНК-ТЕТ2-деметиلاзой, что приводит к эпигенетическому подавлению транскрипции *GNRH1*. Более того, *MKRN3* опосредует убиквитинирование поли(А)-связывающих белков PABPC1, PABPC3 и PABPC4, снижает их связывание с поли(А)-хвостом мРНК-мишеней, включая мРНК *GNRH1*, влияя на их стабильность и трансляцию (Li C. et al., 2020; Fanis et al., 2022). *MKRN3* экспрессируется также в надпочечниках, но какую функцию, связанную с активацией адренархе, он выполняет, неизвестно.

Полногеномные, экзомные и метиломные ассоциативные исследования патогенетической гетерогенности ППС показывают, что генетические варианты в генах *KISS1R*, *KISS1*, *MKRN3* и *DLK1* обнаруживают примерно в 10 % спорадических и 27 % семейных случаев; у 4 % пациентов выявляют CNV (делецию 7q11.23 (синдром Вильямса–Бойрена), делецию Xp22.33, дупликацию 1p31.3); в редких случаях находят эпигенетические аномалии центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* (Canton et al., 2020). С использованием полного экзомного секвенирования также идентифицируют редкие *de novo* варианты потери функции генов в доминантном состоянии – это гены *TNRC6B* (22q13.1), *AREL1* (14q24.3), *PROKR2* (20p12.3), *LIN28B* (6q16.3), хотя их роль в этом процессе не столь однозначна (Shim et al., 2022).

Анализ метилома при данной патологии показал наличие гипометилирования промоторной области гена *ZFP57* (6p22.1) (Bessa et al., 2018). Ген *ZFP57* содержит домен KRAB – репрессор транскрипции. Кроме того, различные генетические варианты данного гена выявляются при мультилокусных нарушениях импринтинга, таких как транзитный неонатальный сахарный диабет (OMIM 601410), сопровождающийся гипометилированием нескольких импринтированных генов (*PLAGL1*, *GRB10* и *PEG3*) (Monteagudo-Sánchez et al., 2020; Mackay et al., 2024). Показано, что экспрессия *ZFP57* в гипоталамусе самок макак резуса увеличивалась во время перипубертатного развития, что свидетельствовало об усиленной репрессии нижестоящих генов-мишеней *ZFP57* (Bessa et al., 2018). Увеличение экспрессии *ZFP57*, наблюдаемое в гипоталамусе половозрелых самок обезьян, позволяет предположить, что функцией данного гена в нейроэндокринном мозге может быть подавление активности транс-

крипционных репрессоров полового созревания, таких как комплекс Polycomb (Lomniczi et al., 2015). Таким образом, показано, что не только генетические варианты, но и нарушение индекса метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3*, могут быть причиной ППС.

Заключение

Половое развитие – мультифакторный процесс с триггерной ролью генетических и эпигенетических факторов. В настоящем исследовании не показано значимых изменений метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* между пациентами с клинической картиной ППС по сравнению с контрольной группой. Тем не менее обнаружено, что у группы пациентов с изолированным адренархе был повышенный индекс метилирования центра импринтинга гена *MKRN3*. В группе девочек с центральным ППС 3.8 % пациентов имели пониженный индекс метилирования гена *DLK1* и 11.5 % – гена *MKRN3*, общий вклад нарушения метилирования этих генов составил 15.3 %. Наличие эпимутаций одновременно в двух исследуемых локусах не обнаружено ни у одного пробанда.

Таким образом, показано, что не только генетические, но и эпигенетические изменения через нарушения метилирования центров импринтинга генов *DLK1* и *MKRN3* могут быть причиной ППС. Однако существуют некоторые ограничения сделанным выводам, и, возможно, имеются другие эпигенетические причины, которые также способны влиять на формирование ППС – эпимутации в других импринтированных генах и мутации в центрах импринтинга, под непосредственным контролем которых находятся импринтированные гены. Тем не менее эпигенетическая роль импринтированных генов *DLK1* и *MKRN3* в формировании ППС показана в настоящем исследовании.

Список литературы / References

- Петеркова В.А., Алимova И.Л., Башнина Е.Б., Безлепкина О.Б., Болотова Н.В., Зубкова Н.А., Калинин Н.Ю., ... Малиевский О.А., Орлова Е.М., Петрайкина Е.Е., Самсонова Л.Н., Таранушенко Т.Е. Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие». *Проблемы эндокринологии*. 2021;67(5): 84-103. doi 10.14341/probl12821
- [Peterkova V.A., Alimova I.L., Bashnina E.B., Bezlepkin O.B., Bolotova N.V., Zubkova N.A., Kalinchenko N.Yu., ... Malievskiy O.A., Orlova E.M., Petraykina E.E., Samsonova L.N., Taranushenko T.E. Clinical guidelines “Precocious puberty”. *Problemy Endocrinologii = Problems of Endocrinology*. 2021;67(5):84-103. doi 10.14341/probl12821 (in Russian)]
- Саженова Е.А., Васильев С.А., Рычкова Л.В., Храмова Е.Е., Лебедев И.Н. Генетика и эпигенетика преждевременного полового созревания. *Генетика*. 2023;59(12):1360-1371. doi 10.31857/S001667582312010X
- [Sazhenova E.A., Vasilyev S.A., Rychkova L.V., Khramova E.E., Lebedev I.N. Genetics and epigenetics of precocious puberty. *Russ J Genet*. 2023;59(12):1277-1287. doi 10.1134/S1022795423120104]
- Чеботарева Ю.Ю., Петров Ю.А., Родина М.А. Некоторые аспекты преждевременного полового развития у девочек дошкольного возраста. *РМЖ. Мать и дитя*. 2022;5(3):215-222. doi 10.32364/2618-8430-2022-5-3-215-222
- [Chebotareva Yu.Yu., Petrov Yu.A., Rodina M.A. Some aspects of precocious puberty in preschool-age girls. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2022;5(3):215-222. doi 10.32364/2618-8430-2022-5-3-215-222 (in Russian)]

- Abi Habib W., Brioude F., Azzi S., Rossignol S., Linglart A., Sobrier M.-L., Giabicani É., Steunou V., Harbison M.D., Le Bouc Y., Netchine I. Transcriptional profiling at the *DLK1/MEG3* domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci Adv.* 2019;5:e9425. doi 10.1126/sciadv.aau9425
- Abreu A.P., Toro C.A., Song Y.B., Navarro V.M., Bosch M.A., Eren A., Liang J.N., Carroll R.S., Latronico A.C., Ronnekleiv O.K. *MKRN3* inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons. *J Clin Invest.* 2020;130(8):4486-4500. doi 10.1172/JCI136564
- Alghamdi A. Precocious puberty: types, pathogenesis and updated management. *Cures.* 2023;15(10):e47485. doi 10.7759/cureus.47485
- Bessa D.S., Maschietto M., Aylwin C.F., Canton A.P.-M., Brito V.N., Macedo D.B., Cunha-Silva M., ... Netchine I., Krepischi A.C.V., Lomniczi A., Ojeda S.R., Latronico A.C. Methylome profiling of healthy and central precocious puberty girls. *Clin Epigenetics.* 2018;10:e146. doi 10.1186/s13148-018-0581-1
- Butler M.G. Imprinting disorders in humans: a review. *Curr Opin Pediatr.* 2020;32(6):719-729. doi 10.1097/MOP.0000000000000965
- Canton A.P.M., Steunou V., Sobrier M.-L., Montenegro L.R., Bessa D.S., Gomes L.G., Jorge A.A.L., Mendonca B.B., Brito V.N., Netchine I., Latronico A.C. Investigation of imprinting defects in *MKRN3* and *DLK1* in children with idiopathic central precocious puberty through specific DNA methylation analysis. *J Endocr Soc.* 2020;4(1):SUN-090.A426. doi 10.1210/jendso/bvaa046.847
- Canton A.P.M., Krepischi A.C.V., Montenegro L.R., Costa S., Rosenberg C., Steunou V., Sobrier M.L., ... Jorge A.A.L., Mendonca B.B., Netchine I., Brito V.N., Latronico A.C. Insights from the genetic characterization of central precocious puberty associated with multiple anomalies. *Hum Reprod.* 2021;36(2):506-518. doi 10.1093/humrep/deaa306
- Faenza M.F., Urbano F., Moscogiuri L.A., Chiarito M., De Santis S., Giordano P. Genetic, epigenetic and environmental influencing factors on the regulation of precocious and delayed puberty. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:e1019468. doi 10.3389/fendo.2022.1019468
- Fanis P., Morrou M., Tomazou M., Michailidou K., Spyrou G.M., Toumba M., Skordis N., Neocleous V., Phylactou L.A. Methylation status of hypothalamic *Mkx3* promoter across puberty. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:e1075341. doi 10.3389/fendo.2022.1075341
- Gomes L.G., Cunha-Silva M., Crespo R.P., Ramos C.O., Montenegro L.R., Canton A., Lees M., ... Baracat E.C., Jorge A.A.L., Mendonca B.B., Brito V.N., Latronico A.C. *DLK1* is a novel link between reproduction and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(6):2112-2120. doi 10.1210/je.2018-02010
- Kagami M., Mizuno S., Matsubara K., Nakabayashi K., Sano S., Fuke T., Fukami M., Ogata T. Epimutations of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(8):1062-1067. doi 10.1038/ejhg.2014.234
- Kagami M., Yanagisawa A., Ota M., Matsuoka K., Nakamura A., Matsubara K., Nakabayashi K., Takada S., Fukami M., Ogata T. Temple syndrome in a patient with variably methylated CpGs at the primary *MEG3/DLK1*-IG-DMR and severely hypomethylated CpGs at the secondary *MEG3*:TSS-DMR. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):e42. doi 10.1186/s13148-019-0640-2
- Li C., Lu W., Yang L., Li Z., Zhou X., Guo R., Wang J., ... Wang W., Huang X., Li Y., Gao S., Hu R. *MKRN3* regulates the epigenetic switch of mammalian puberty via ubiquitination of *MBD3*. *Natl Sci Rev.* 2020;7(3):671-685. doi 10.1093/nsr/nwaa023
- Li C., Han T., Li Q., Zhang M., Guo R., Yang Y., Lu W., ... Zhou V., Han Z., Li H., Wang F., Hu R. *MKRN3*-mediated ubiquitination of Poly(A)-binding proteins modulates the stability and translation of *GNRHI* mRNA in mammalian puberty. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(7):3796-3813. doi 10.1093/nar/gkab155
- Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002;18(11):1427-1431. doi 10.1093/bioinformatics/18.11.1427
- Lomniczi A., Wright H., Castellano J.M., Matagne V., Toro C.A., Ramaswamy S., Plant T.M., Ojeda S.R. Epigenetic regulation of puberty via zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Nat Commun.* 2015;6:e10195. doi 10.1038/ncomms10195
- Macedo D.B., Kaiser U.B. *DLK1*, Notch signaling and the timing of puberty. *Semin Reprod Med.* 2019;37(4):174-181. doi 10.1055/s-0039-3400963
- Mackay D.J.G., Gazdag G., Monk D., Brioude F., Giabicani E., Krzyzewska I.M., Kalish J.M., ... Russo S., Tannorella P., Temple K.I., Öunap K., Tümer Z. Multi-locus imprinting disturbance (MLID): interim joint statement for clinical and molecular diagnosis. *Clin Epigenetics.* 2024;16:99. doi 10.1186/s13148-024-01713-y
- Micangeli G., Paparella R., Tarani F., Menghi M., Ferraguti G., Carlomagno F., Spaziani M., Pucarelli I., Greco A., Fiore M. Clinical management and therapy of precocious puberty in the Sapienza university pediatrics hospital of Rome, Italy. *Children (Basel).* 2023;10(10):e1672. doi 10.3390/children10101672
- Monteagudo-Sánchez A., Hernandez M.J.R., Simon C., Burton A., Tenorio J., Lapunzina P., Clark S., ... Kelsey G., López-Siguero J.P., de Nanclares G.P., Torres-Padilla M.E., Monk D. The role of *ZFP57* and additional KRAB-zinc finger proteins in the maintenance of human imprinted methylation and multi-locus imprinting disturbances. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(20):11394-11407. doi 10.1093/nar/gkaa837
- Narusawa H., Ogawa T., Yagasaki H., Nagasaki K., Urakawa T., Saito T., Soneda S., ... Naiki Y., Horikawa R., Ogata T., Fukami M., Kagami M. Comprehensive study on central precocious puberty: molecular and clinical analyses in 90 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2024;26:e666. doi 10.1210/clinem/dgae666
- Nicoara D.M., Scutca A.C., Mang N., Juganaru I., Munteanu A.I., Vitlan L., Mărginean O. Central precocious puberty in Prader-Willi syndrome: a narrative review. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:e1150323. doi 10.3389/fendo.2023.1150323
- Okae H., Chiba H., Hiura H., Hamada H., Sato A., Utsunomiya T., Kikuchi H., Yoshida H., Tanaka A., Suyama M., Arima T. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004868. doi 10.1371/journal.pgen.1004868
- Roberts S.A., Kaiser U.B. Genetic etiologies of central precocious puberty and the role of imprinted genes. *Eur J Endocrinol.* 2020;183(4):107-117. doi 10.1530/EJE-20-0103
- Shim Y.S., Lee H.S., Hwang J.S. Genetic factors in precocious puberty. *Clin Exp Pediatr.* 2022;65(4):172-181. doi 10.3345/cep.2021.00521
- Tucci V., Isles A.R., Kelsey G., Ferguson-Smith A.C. Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell.* 2019;176(5):952-965. doi 10.1016/j.cell.2019.01.043

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.10.2024. После доработки 18.12.2024. Принята к публикации 28.12.2024.