Геномный импринтинг и его роль в этиологии наследственных болезней человека

Назаренко С.А.

Genomic imprinting and its role in ethiology of human hereditary diseases

Nazarenko S.A.

НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск

© Назаренко С.А.

Геномный импринтинг является формой неменделевского эпигенетического наследования, которое характеризуется дифференциальной экспрессией гена в зависимости от его родительского происхождения – матери или отца. Известно уже около 60 импринтированных генов, многие из которых оказывают существенное влияние на рост и развитие плода. Основным эпигенетическим модификатором генома является метилирование цитозиновых оснований ДНК, определяющее взаимодействие между ДНК и белками, распознающими модифицированные основания, и регулирующее экспрессию генов через механизм компактизации—декомпактизации хроматина. Нарушения моноаллельной экспрессии генов приводят к развитию особого класса наследственных заболеваний человека — болезней геномного импринтинга.

Ключевые слова: геномный импринтинг, метилирование ДНК, наследственные болезни.

Genomic imprinting is a form of non-Mendelian epigenetic inheritance that is defined by differential gene expression depending on its parental origin — maternal or paternal. It is known about 60 imprinted genes many of which effect significantly on the fetus growth and development. Methylation of DNA cytosine bases that defines the interaction of DNA and proteins identifying the modified bases and controls the gene expression through chromatin compacting-decompacting mechanism, is a main epigenetic genom modifier. Disturbances in monoallelic gene expression lead to the development of a special class of human hereditary diseases — genomic imprinting diseases.

Key words: genomic imptinting, DNA methylation, hereditary diseases.

УДК 575.16+591.3:599.3

Введение

В ходе изучения наследования многочисленных признаков и мутаций у различных организмов, в том числе у человека, был обнаружен ряд явлений, которые свидетельствовали о существовании нетрадиционного, неканонического, или неменделевского, наследования. К их числу по праву принадлежит феномен геномного импринтинга. Под геномным импринтингом (англ. *imprint* — отпечаток) понимают эпигенетический процесс, дифференциально маркирующий материнские и отцовские гомологичные хромосомы, приводящий к разному фенотипическому проявлению мутаций у потомства, унаследованных от матери или отца. Таким образом, геномный импринтинг является особой формой неменделевского эпигенетического наследования, которое характеризуется дифференциальной экспрессией гена в зависимости от его родительского происхождения. В участках генома, подверженных импринтингу, экспрессируется только один из двух аллелей — отцовский или материнский, т.е. наблюдается моноаллельная экспрессия генов. Второй аллель вследствие наличия на нем некоего отпечатка импринтирован (выключен или подавлен) и не

экспрессируется. Установлено, что в основе эпигенетической маркировки генома, определяющей геномный импринтинг, лежит специфическое для особей разного пола метилирование цитозиновых оснований ДНК, которое устанавливается во время гаметогенеза и выключает транскрипцию одного из родительских аллелей [32]. Естественно, что все события, изменяющие моноаллельный характер экспрессии генов, такие как структурные повреждения хромосом в участках локализации
этих генов, нарушение биродительского наследования
гомологичных хромосом с импринтированными генами или изменение статуса метилирования данных генов, будут сопровождаться определенными фенотипическими эффектами и, прежде всего, патологией внутриутробного развития организма и специфическими синдромами [1, 2]. Рассмотрение современного состояния данной проблемы и составляет предмет настоящей публикации.

Метилирование ДНК — основа геномного импринтинга

В настоящее время стал очевидным факт, что именно метилирование ДНК является основным эпигенетическим модификатором генома, регулирующим ключевые аспекты его функционирования. Известно, что у млекопитающих и других позвоночных в структуре ДНК кроме четырех азотистых оснований — аденина (A), тимина (T), гуанина (G) и цитозина (C) — имеется так называемая пятая буква — 5-метилцитозин (m5C). Цитозиновые основания ДНК метилируются в основном в симметричных CpG-динуклеотидах, они составляют около 1% всей геномной ДНК и около 80% всех CpG-динуклеотидов [13]. У позвоночных геномы соматических клеток в целом сильно метилированы, за исключением так называемых CpG-островков. Эти CpG-богатые области ДНК длиной около 1 kb, локализованные в промоторных районах генов и активно работающие в большинстве клеток организма, получили название генов «домашнего хозяйства». На их долю приходится около 60% всех активно транскрибируемых в клетках генов. Остальные же CpG-динуклеотиды генома, сосредоточенные прежде всего в районах конститутивного гетерохроматина, сильно метилированы, а хроматин в этих областях сильно компактизован и транскрипционно неактивен. То же справедливо в отношении и импринтированных аллелей генома.

В результате интенсивных исследований, преимущественно на таком модельном организме, как мышь, были получены ценные сведения об эпигенетическом программировании генома соматических и половых клеток на разных этапах индивидуального развития [32]. Эти результаты можно суммировать следующим образом:

1) рисунки метилирования ДНК в клетках организма обладают пространственной, временной и тканевой специфичностью;

2) специфика метилирования ДНК наследуется дочерними клетками;

3) специфические метки метилирования (отпечатки) стираются в примордиальных половых клетках;

4) в ходе созревания в половых клетках происходит восстановление рисунков метилирования в соответствии с половой принадлежностью организма;

5) после слияния половых клеток в доимплантационной стадии эмбрионального развития происходит деметилирование генома, а в ходе дальнейших этапов развития зародыша — *de novo* метилирование ДНК соматических клеток;

6) активные гены в клетках не метилированы;

7) в случае метилирования промоторов генов отмечается подавление их экспрессии.

В целом эти свойства свидетельствуют о том, что метилирование ДНК в геноме является специфичной формой клеточной памяти. Появляется все больше доказательств того, что эта клеточная память играет ключевую роль в развитии благодаря специфическому пространственно-временному кодированию генной экспрессии в разных клетках организма (эпигенетическая память). Таким образом, разные клетки организма, несмотря на единый геном, имеют разные эпигеномы, обеспечивающие дифференциальную экспрессию генов, разные клеточные фенотипы и функции.

Перепрограммирование статуса метилирования генома имеет место как в половых клетках, так и в ходе раннего эмбрионального развития (рис. 1). Геномы зрелых половых клеток — сперматозоидов и яйцеклеток — так же, как и геномы соматических клеток, в целом сильно метилированы, хотя и не исключены некоторые различия в специфике рисунка метилирования [5]. Деметилирование генома возникает в примордиальных половых клетках, которые затем вступают в митотический (у представителей мужского пола) или мейотический (у представителей женского пола) период покоя. Реметилирование ДНК в мужских половых клетках возникает на стадии просперматогонии, а в женских – в растущих ооцитах. Однако каким образом устанавливаются специфические рисунки метилирования генома, остается неизвестным. Предполагается, что перепрограммирование статуса метилирования генома половых клеток необходимо для записи новой программы развития. Другая цель может заключаться в удалении приобретенных родителями эпигенетических модификаций генома, вызванных генетическими и средовыми факторами [31], хотя стираются ли они полностью, неизвестно.

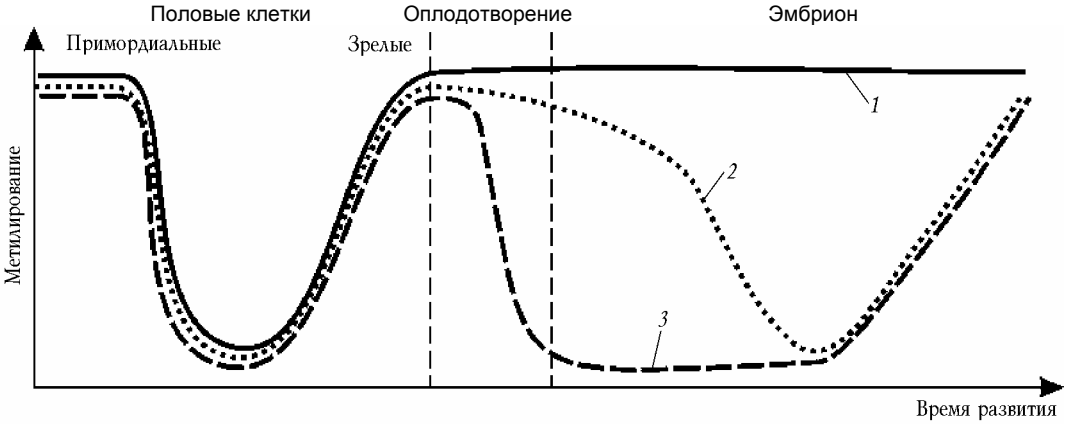

Рис. 1. Динамика метилирования ДНК половых и соматических клеток в ходе раннего развития эмбриона: *1* — импринтированные гены;
2 — неимпринтированные материнские гены; *3* — неимпринтированные отцовские гены

Тканеспецифичное метилирование цитозиновых остатков ДНК у млекопитающих осуществляется с помощью нескольких вариантов ферментов — ДНК-метилтрансфераз (*Dnmts*) — *Dnmt1*, *Dnmt2*, *Dnmt3A*, *Dnmt3B* и *Dnmt3L*, — отличающихся по своим функциям. Две ДНК-метилтрансферазы — *Dnmt3A* и *3B* — необходимы для метилирования ДНК *de novo* в эмбриональных стволовых клетках и в ходе эмбриогенеза, а *Dnmt1* поддерживает специфический рисунок метилирования в митотически размножающихся клетках [5]. После репликации две полуметилированные дочерние молекулы ДНК распознаются этим ферментом и конвертируются в полностью метилированные. Эмбрионы мышей с направленными гомозиготными мутациями гена *Dnmt1* плохо развивались и погибали в середине беременности [24]. *Dnmt3L* при взаимодействии с *Dnmt3A* способствует специфическому метилированию материнских генов в женских половых клетках, а разрушение с помощью направленных мутаций генов *Dnmt3A* или *Dnmt3L* отменяет метилирование генов в ооцитах и нарушает сперматогенез. Что касается ДНК-метилтрансферазы второго типа — *Dnmt2*, то она обладает крайне незначительной энзиматической активностью, и ее функция еще окончательно не выяснена.

Нарушение функции импринтированных генов и болезни человека

Эффекты импринтинга наиболее четко прослеживаются при исследовании случаев однородительских дисомий (ОРД). Под ОРД понимают ошибочное происхождение двух гомологичных хромосом от одного родителя — материнского

(мат) или отцовского (отц) происхождения, в результате которого зародыш или организм приобретает псевдонормальный кариотип. Всего у человека возможно существование 47 типов однородительского наследования целых хромосом и большое число сегментарных форм ОРД по отдельным хромосомным участкам, однако не все они проявляются клинически [22]. Фенотипический эффект ОРД по какой-либо хромосоме набора выявляется лишь в том случае, если эта хромосома несет импринтированные локусы. Отцовские или материнские ОРД по этим хромосомам приводят либо к полному отсутствию экспрессии этих генов (функциональной нуллисомии), либо к их сверхэкспрессии, в результате чего возникают аномалии развития организма. У человека ОРД по ряду хромосом, несущих импринтированные гены, совместимы с относительно нормальным протеканием пренатального этапа развития и приводят к развитию болезней, выявляемых после рождения (см. таблицу).

Заболевания человека, этиологически связанные с однородительскими дисомиями

Хромосома	Родительское происхождение ОРД	Заболевание или синдром
6	Отцовское	Транзиторный неонатальный сахарный диабет
7	Материнское	Синдром Рассела—Сильвера
11	Отцовское	Синдром Видемана—Беквита
14	Материнское	Синдром ОРД14мат
	Отцовское	Синдром ОРД14отц
15	Материнское	Синдром Прадера—Вилли
	Отцовское	Синдром Энгельмана

К настоящему времени накоплен большой объем фактического материала по конкретным хромосомам, вовлеченным в ОРД у человека, фенотипическим эффектам отцовской и материнской ОРД по данным хромосомам, эффектам импринтинга, обнаруживаемым через феномен ОРД и стратегии определения ОРД в практике клинической генетики. У человека и мыши идентифицировано уже около 60 импринтированных генов, значительная часть которых играет важную роль не только в обеспечении нормального эмбрионального и постнатального развития, но также контролирует интеллектуальные, психические и поведенческие функции. Одной из интригующих особенностей генома млекопитающих стало обнаружение кластерной организации многих из идентифицированных генов, подверженных импринтингу. У человека найдены четыре кластера импринтированных генов на хромосомах 7, 11, 14 и 15. Два достаточно больших кластера таких локусов расположены в хромосомах 11 и 15, нарушение функции которых приводит к сидрому Видемана—Беквита (СВБ), а также к синдрому Прадера—Вилли (СПВ) и синдрому Энгельмана (СЭ) соответственно [21]. Эти заболевания послужили основой для детального изучения характера согласованной регуляции экспрессии импринтированных генов, расположенных в кластерах.

Рассмотрим более подробно несколько наиболее типичных болезней геномного импринтинга, в основе этиологии которых лежит нарушение моноаллельной экспрессии импринтированных генов.

Транзиторный неонатальный сахарный диабет (ТНСД) является редкой формой патологии, выявляемой на первых месяцах жизни новорожденного. Это заболевание может сочетаться с задержкой внутриутробного развития, низким ростом, макроглоссией и гипергликемией, требующей инсулинотерапии. У 20% таких больных были обнаружены случаи наследования пробандом двух гомологов хромосомы 6 отцовского происхождения — ОРД6отц, а также дупликации области 6q22-q24, наследуемой от отца [27]. Отсутствие неонатального сахарного диабета при ОРД хромосомы 6 материнского происхождения позволило сделать заключение о наличии импринтированного гена, локализованного в области 6q22-q24. Описан пациент с неонатальным диабетом, макроглоссией и черепно-лицевыми аномалиями, у которого имелась частичная изодисомия по сегменту 6q24-qter отцовского происхождения, что свидетельствовало о митотической рекомбинации в дистальном участке длинного плеча хромосомы 6 и наличии импринтированного локуса в пределах данного участка [10]. Выявлен ген *ZAC/PLAGL1*, который локализуется в

области 6q24 и считывается только с отцовской хромосомы [19]. Этот ген, вовлеченный в контроль клеточного цикла, может быть хорошим кандидатным геном ТНСД, поскольку его белковый продукт принимает участие в аутокринном контроле секреции инсулина в поджелудочной железе. Идентифицирован также другой импринтированный ген в области 6q24, который был назван «импринтированным транскриптом, ассоциированным с пузырным заносом» — *HYMAI* [3]. На отцовской хромосоме с этого гена считывается нетранслируемая РНК. Не исключено, что этот локус, как и ген *ZAC/PLAGL1*, расположенный в 70 kb дистальнее гена *HYMAI*, также может быть кандидатным геном ТНСД.

Синдром Рассела—Сильвера (СРС) характеризуется выраженным пре- и постнатальным отставанием в росте и дисморфическими признаками, включающими латеральную асимметрию и/или гемигипертрофию лица, туловища и конечностей, треугольное лицо с широким выступающим лбом, маленькую нижнюю челюсть, опущенные уголки рта и клинадактилию V пальца. Большинство случаев СРС являются спорадическими, однако предполагается рецессивный, доминантный и Х-сцепленный типы наследования. При исследовании 35 пациентов с СРС или примордиальной задержкой роста D. Kotzot и соавт. [20] обнаружили четверых больных с ОРД7мат, что позволило предположить наличие, по крайней мере, одного импринтированного локуса на хромосоме 7. В настоящее время имеются сообщения о более чем 30 случаях ОРД7мат, и все они связаны с задержкой роста, а, по крайней мере, у 25 пациентов выявлен СРС. Предположительная функция гена, мутация которого приводит к СРС, заключается в регуляции роста, поскольку именно серьезная задержка роста является главным признаком данного заболевания. Фенотип больных с ОРД7мат может быть обусловлен либо потерей стимулирующего рост гена, считываемого с хромосомы отца, либо двойной дозой подавляющего рост гена, экспрессируемого с хромосомы матери.

Связь импринтированных генов хромосомы 7 с этиологией СРС получила подтверждение в результате обнаружения двух случаев СРС, обусловленных тандемной дупликацией участка 7p11.2-p13 материнского происхождения, включающего локус *GRB10* [18, 28]. Было высказано предположение, что ген *GRB10* (белка 10, связывающегося с рецептором ростового фактора) моноаллельно экспрессируется с материнского аллеля в некоторых тканях и является строгим кандидатным локусом СРС. Белок *GRB10* соединяется как с инсулином, так и с рецептором инсулиноподобного фактора роста, ингибируя их тирозин-киназную активность. Оказывая супрессирующее влияние на рост, увеличенная доза этого гена может способствовать подавлению роста организма. Это позволяет предполагать, что сверхэкспрессия гена, отвечающего за подавление роста и экспрессирующегося с хромосомы матери, лежит в основе развития СРС не только в случаях дупликации участка 7p11.2-p13 материнского происхождения, но и при ОРД7мат. В недавно выполненном исследовании у двух из 58 пациентов с СРС были обнаружены мутации в локусе *GRB10*, что говорит в пользу данного предположения [36]. Следует, однако, отметить, что ген *GRB10* противоположно импринтирован в разных тканях одного и того же индивида — он экспрессируется с отцовской хромосомы в тканях мозга плода и с хромосомы матери — в скелетных мышцах. В других тканях отмечается его биаллельная экспрессия.

На хромосоме 7 человека помимо гена *GRB10*, расположенного в коротком плече, идентифицированы два других импринтированных локуса, которые располагаются в длинном плече в сегменте 7q32 – *PEG1/MEST* [33] и *γ2-COP* [6]. Они также рассматриваются в качестве кандидатных генов СРС. Большинство обследованных пациентов с ОРД7мат имели однородительскую дисомию по целой хромосоме 7, что не позволяло оценить вклад генов, расположенных в разных плечах данной хромосомы, в этиологию заболевания. Значительный интерес в этом отношении представляют пациенты с сегментной ОРД хромосомы 7, поскольку анализ таких случаев позволяет существенно сузить границы хромосомы, в пределах которых локализуется кандидатный импринтированный локус рассматриваемого заболевания. К настоящему времени описаны только

2 больных с сегментной ОРД хромосомы 7 и наличием данного синдрома. Первый пациент имел отцовскую изодисомию 7p и материнскую изодисомию 7q, что свидетельствовало о причастности импринтированного гена 7q к развитию СРС [12], а второй пациент имел ОРД материнского происхождения по сегменту 7q31-qter и биродительское наследование оставшегося участка хромосомы 7, что ограничивает поиск кандидатного локуса данного синдрома в дистальном участке 7q [15]. Таким образом, два последних случая говорят в пользу импринтированных генов *PEG1/MEST* или *γ2-COP* как кандидатных локусов СРС. В целом наличие значительного количества спорадических случаев заболевания и его ассоциация с аномалиями других хромосом, в частности 8, 15, 17 и 18, свидетельствует о высокой генетической гетерогенности синдрома Рассела—Сильвера и о различных механизмах генетического контроля такого интегрального признака, как рост. В связи с этим необходимо дальнейшее накопление материала для выяснения молекулярных механизмов развития данного заболевания.

Синдром Видемана—Беквита (СВБ) характеризуется макроглоссией, пупочной грыжей (омфалоцеле) и большим весом при рождении. Отмечаются также аномалии черепа и лица с развитием гемангиом и пигментных невусов, вертикальные бороздки на мочках и кожные вдавления на задней поверхности ушных раковин, висцеромегалия, цитомегалия коры надпочечников и гипогликемия. Больные имеют предрасположенность к развитию эмбриональных опухолей, включая нефробластому (опухоль Вильмса), рабдомиосаркому, карциному коры надпочечников и гепатобластому. Чаще всего синдром возникает спорадически, но в 15% случаев заболевание имеет семейный характер. В таких случаях СВБ наследуется аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью, и передача мутации идет через мать. Часть случаев СВБ ассоциируется со структурными хромосомными аберрациями, затрагивающими дистальный участок короткого плеча хромосомы 11. Наиболее частой формой хромосомного дисбаланса при СВБ является частичная трисомия сегмента 11p15.5 с дупликацией отцовского происхождения. В то же время транслокации и инверсии, затрагивающие участок 11p15, наследуются больными преимущественно от матери [14, 15].

У 20% больных с СВБ выявляется мозаичная отцовская изодисомия хромосомы 11, причем чаще всего в ОРД вовлекается не целая хромосома, а только дистальный участок ее короткого плеча — 11p15.5 [16]. Причиной этого события является постзиготический соматический кроссинговер, приводящий к сегментной ОРД хромосомы 11 отцовского происхождения. При исследовании большой группы больных с СВБ, имеющих мозаичный вариант ОРД11отц, было показано, что пропорция клеток с ОРД коррелирует со степенью увеличения органов [17]. По-видимому, вариабельность фенотипических признаков при СВБ может быть связана с уровнем мозаицизма аномальных клеток в организме.

В качестве одного из главных кандидатных локусов СВБ рассматривается ген инсулиноподобного фактора роста II типа — *IGF2* (соматомедин А), — экспрессирующийся с отцовской хромосомы в большинстве тканей плода, включая печень. В результате дупликации или ОРД хромосомы 11 отцовского происхождения возникает сверхэкспрессия этого гена во время эмбрионального периода, поэтому избыточная продукция фактора роста может объяснить развитие клинических признаков гигантизма у новорожденных детей с данным синдромом. У больных с СВБ без цитогенетических нарушений и ОРД обнаружено нарушение статуса импринтинга гена *IGF2* — вместо моноаллельной была обнаружена биаллельная его экспрессия (потеря импринтинга), что также объясняет фенотипические особенности синдрома с позиций увеличения дозы гена рассматриваемого фактора роста [35].

В сегменте 11p15.5 находится большой кластер локусов как с отцовской экспрессией, способствующих росту — *IGF2*, *INS* и *KCNQ1OT1 (LIT1*), так и с материнской экспрессией, препятствующих росту, — *H19*, *CDKN1C (p57^{kip2})* и *KCNQ1 (KVLQT1*). В настоящее время ведется интенсивное изучение достаточно сложных механизмов регуляции работы импринтированных генов, расположенных не только в этом, но и в других кластерах генома человека и млекопи-

тающих. Так, установлено, что противоположно импринтированные гены *H19* и *IGF2* регулируются координированно благодаря конкуренции их промоторов за доступ к общему энхансеру [34]. Энхансер — последовательность ДНК, расположенная в отдалении от гена *IGF2*, но близко сцепленная с геном *H19*, — играет важную роль в регуляции активности обоих локусов. На хромосоме матери энхансер активирует транскрипцию гена *H19*, с которого считывается нетранслируемая РНК, а ген *IGF2* находится в неактивном состоянии. На хромосоме отца в результате метилирования локуса *H19* ген *IGF2* становится доступным для энхансера и активируется. ОРД по сегменту 11p15.5 отцовского происхождения приводит к двойной дозе гена *IGF2,* что и определяет развитие клинических признаков СВБ. При ОРД11отц у больных нарушается статус метилирования генов в области 11p15.5, и поэтому анализ метилирования является первым диагностическим тестом для выявления случаев ОРД, ассоциированных с данным заболеванием.

Регион-специфическое метилирование участка хромосомы 11, расположенного выше гена *H19*, является областью эпигенетической маркировки, необходимой для установления импринтинга генов *H19* и *IGF2* в цис-положении. Делеция ДНК внутри этой области приводит к потере импринтинга обоих генов [34]. Показано, что данный дифференциально метилирующийся район содержит элемент, обладающий способностью блокировать активность энхансера с помощью энхансер-блокирующего белка CTCF [4]. Метилирование CpG-динуклеотидов внутри этого элемента не позволяет CTCF присоединиться к нему, а делеция данного элемента приводит к потере энхансер-блокирующей активности и активации экспрессии гена *IGF2*. Таким образом, элемент с CTCF-зависимой энхансер-блокирующей активностью действует как специфический изолятор, контролирующий импринтинг гена *IGF2*. Активность этого изолятора ограничена материнским аллелем, поскольку ДНК отцовского аллеля заметилирована. Неметилированная импринтинг-контролируемая область на материнской хромосоме действует в данном случае как хроматиновая граница, блокирующая взаимодействие гена *IGF2* с энхансером, лежащим в 3'-конце локуса *H19*.

Помимо мутаций, затрагивающих локусы *H19* и *IGF2*, у больных с СВБ выявляются мутации и других импринтированных генов, расположенных в пределах сегмента 11p15.5. Так, при СВБ были выявлены герминативные мутации гена *CDKN1C (p57^{kip2})*, причем у этих больных имелась более высокая частота пупочной грыжи и низкий риск эмбриональных опухолей, по сравнению со случаями СВБ с другой молекулярной патологией [14]. У больных с мозаичной отцовской изодисомией области 11p15.5 отмечается сниженная экспрессия гена *CDKN1C* в клетках печени и почек, что свидетельствует о том, что гаплонедостаточность по этому гену также вносит свой вклад в формирование фенотипических нарушений, характерных для СВБ. Практически все признаки СВБ, за исключением опухолей и гипогликемии, можно объяснить сверхэкспрессией гена *IGF2* и недостаточной экспрессией гена *CDKN1C*. Поскольку локусы *IGF2* и *CDKN1C* лежат в одном импринтированном домене, было высказано предположение, что связь между функциями генных продуктов этих локусов может свидетельствовать о функциональном взаимодействии между генами с координированной регуляцией импринтинга в пределах кластера импринтированных генов и локальными механизмами регуляции внутри отдельных регионов домена [26].

Другой ген, обнаруженный в пределах кластера импринтированных генов сегмента 11p15.5 и этиологически связанный с СВБ, называется «первый транскрипт, перекрывающий локус *KCNQ1»* (*KCNQ1OT1*). Этот локус имеет также другое название и обозначается как ген *LIT1* (первый интронный транскрипт гена длинного интервала QT). В норме он экспрессируется с отцовского аллеля в большинстве тканей с образованием антисмыслового транскрипта в пределах локуса *KCNQ1* (гена калиевого канала, мутации которого связаны с синдромом длинного интервала QT). Установлено, что не менее чем у половины пациентов с СВБ в метилированном материнском CpG-островке гена *LIT1* происходит потеря импринтинга [23]. Авторы предположили, что сегмент 11p15.5 имеет два импринтирован-

ных домена — более центромерный, включающий гены *KCNQ1* и *CDKN1C*, нарушения в котором при СВБ являются достаточно частыми, и более теломерный домен, включающий локус *IGF2*, нарушения в котором чаще ассоциированы с развитием опухолей.

Молекулярное исследование большой серии пациентов с СВБ показало наличие четырех разных классов молекулярной патологии, характерных для данного заболевания [7]. Первая группа больных (20%) имела ОРД11отц и аберрантное метилирование генов *H19* и *KCNQ1OT1*. Вторая группа (7%) имела дефект первого центра импринтинга СВБ, вызванный аберрантным метилированием только гена *H19*. Третья группа больных (55%) имела дефект второго центра импринтинга СВБ, вызванный аберрантным метилированием только гена *KCNQ1OT1*. И, наконец, четвертая группа пациентов (18%) имела нормальный статус метилирования обоих генов *H19* и *KCNQ1OT1*. У пациентов с деметилированием только гена *KCNQ1OT1* (группа III) опухоли вообще не развивались. Однако опухоли были обнаружены у 33% пациентов с гиперметилированием гена *H19* (группы I и II) и у 20% пациентов с невыявленным генетическим дефектом (группа IV). Авторы обнаружили 4 семейных случая СВБ с заметным снижением метилирования гена *KCNQ1OT1*, что свидетельствовало о наличии в этих семьях мутаций, нарушающих переключение импринтинга при передаче генов от одного поколения к другому.

Поскольку наиболее частыми конституциональными аномалиями при СВБ являются эпигенетические мутации, связанные с нарушением метилирования генов *H19* или *KCNQ1OT1 (LIT1)*, кодирующих нетранслируемую РНК, представляет интерес вопрос о связи разных эпигенетических мутаций со специфическим фенотипом данного заболевания. Специальное исследование этого вопроса было проведено у 92 человек с СВБ [11]. Авторы установили, что у больных с СВБ, сочетающимся с раком, частота аномалий метилирования ДНК гена *H19* была существенно выше, чем у больных, не имеющих опухолей. Кроме того, рак не был связан с нарушением статуса метилирования гена *LIT1*. Частота нарушений метилирования гена *LIT1* у пациентов со срединными дефектами стенки живота и макросомией была значительно более высокой, чем у больных без таких дефектов. Авторы также показали, что ОРД11отц чаще ассоциирует с гемигипертрофией, раком и гипогликемией. Таким образом, эти результаты показывают наличие связи между эпигенотипом и фенотипом при СВБ как по риску развития рака, так и по риску возникновения специфических врожденных пороков развития.

Синдромы Прадера—Вилли (СПВ) и Энгельмана (СЭ) связаны с нарушением функции кластера импринтированных генов, расположенных в участке q11-q13 хромосомы 15. Эти заболевания имеют разные клинические признаки (гипотония, ожирение, умственная отсталость, акромикрия, гипогонадизм при СПВ и атаксия, гиперкинезы, пароксизмальный смех, отсутствие речи при СЭ), но при цитогенетическом исследовании в обоих случаях у большинства больных выявляется делеция общего участка q11-q13 хромосомы 15. При анализе родительского происхождения хромосом обнаружено, что у 70% больных с СПВ заболевание возникает в результате делеции отцовской хромосомы 15, а у 70% больных с СЭ делеция затрагивает материнскую хромосому 15 [9, 25]. Этот факт подтверждает моноаллельный характер экспрессии отцовского гена при СПВ и материнского — при СЭ, делеция единственно активных копий которых приводит к функциональной нуллисомии соответствующих критических генов и развитию заболеваний. У 25% больных с СПВ и 5% больных с СЭ выявляется ОРД хромосомы 15 материнского и отцовского происхождения соответственно, т.е. при каждом синдроме имеет место реципрокная связь между родительским происхождением делеции и ОРД [30].

До недавнего времени не было описано ни одного случая сегментной ОРД по хромосоме 15 ни при СПВ, ни при СЭ, и поэтому предполагалось, что эти заболевания могут возникать лишь в результате ОРД по целой хромосоме. Мы описали первый в мировой литературе случай СПВ с сегментной однородительской гетеродисомией хромосомы 15 материнского происхождения [29]. Ана-

лиз наследования полиморфных ДНК-маркеров хромосомы 15 в семье с пробандом, имеющим типичные признаки СПВ, показал, что сегмент, вовлеченный в ОРД у данного больного, ограничен локусами *D15S172* и *GABRB3*, в то время как ДНК-маркеры, расположенные вне критического участка, четко демонстрировали биродительское наследование. Таким образом, этот случай ясно показывает, что не только ошибки мейоза, но и митотический кроссинговер через формирование сегментной ОРД также может детерминировать развитие заболеваний геномного импринтинга, ассоциированных с хромосомой 15.

Помимо микроделеции и ОРД хромосомы 15 в основе этиологии СПВ и СЭ могут лежать и другие молекулярные дефекты. В критической области хромосомы 15 были обнаружены противоположно импринтированные кандидатные локусы СПВ и СЭ — *SNRPN* и *UBE3A* соответственно. Ген *SNRPN* кодирует полипептид N малого ядерного рибонуклеопротеина, мутации которого обнаружены при СПВ. Центромернее от этого гена обнаружен центр импринтинга, включающий альтернативно сплайсирующиеся 5'-экзоны гена *SNRPN.* Эпигенетические мутации (эпимутации) в этих экзонах вызывают СЭ через потерю способности стирать отпечаток предшествующего поколения, т.е. в ходе оогенеза теряется способность переписывать отпечаток импринтинга в направлении от мужчины к женщине, а в ходе сперматогенеза – от женщины к мужчине [8]. Дистальнее гена *SNRPN* расположены несколько генов, кодирующих нетранслируемую РНК, которая может быть вовлечена в контроль импринтинга. Ген *UBE3A,* кодирующий убиквитин-лигазный белок, экспрессируется с хромосомы матери в мозге, но биаллельно — в других тканях. Мутации в этом локусе-мишени импринтинга были выявлены при семейных случаях заболеваний. В случае спорадической мутации в центре импринтинга у пораженных индивидов риск возникновения заболевания в семье составляет менее 1%. Однако в случае наличия мутации в центре импринтинга у матери пробанда на ее хромосоме 15, унаследованной от отца, риск рождения у нее ребенка с СЭ возрастает до 50%. Поскольку разные молекулярные формы заболевания у пробанда предполагают разный семейный прогноз, то возникает необходимость их четкой дифференцировки с помощью комплекса молекулярно-генетических методов.

Заключение

Успехи медицинской генетики последних лет позволили выявить новый класс наследственных заболеваний человека, которые можно определить как болезни геномного импринтинга. В основе их этиологии лежит нарушение моноаллельной экспрессии, характерной для импринтированных локусов. В настоящее время ведется активный поиск новых импринтированных участков в геноме человека, исследуются механизмы импринтинга, обнаруживаются новые факты о связи феномена геномного импринтинга с наследственной патологией. Однако многие вопросы тонкого регулирования работы импринтированных генов остаются неясными. Изучение этих актуальных проблем современной функциональной геномики позволит глубже понять механизмы дифференциальной экспрессии генов в ходе развития и использовать полученные знания для нужд практической медицины.

Литература

1. *Назаренко С.А.* Нарушение эпигенетической регуляции активности генов и болезни человека // Вестник РАМН. 2001. ‹ 10. С. 43—48.
2. *Пузырев В.П., Назаренко С.А.* Болезни генетического импринтинга у человека // Вопросы мед. химии. 1997. Т. 43. С. 356—365.
3. *Arima T., Drewell R.A., Arney K.L. et al.* A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus // Hum. Molec. Genet. 2001. V. 10. ‹ 14. P. 1475—1483.
4. *Bell A.C., Felsenfeld G.* Methylation of a *CTCF*-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene // Nature. 2000. V. 405. ‹ 6785. P. 482—485.
5. *Bestor T.H.* The DNA methyltransferases of mammals // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9. ‹ 16. P. 2395—2402.
6. *Blagitko N., Schulz U., Schinzel A. et al. Gamma-2-COP*, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome // Hum. Molec. Genet. 1999. V. 8. ‹ 13. P. 2387—2396.
7. *Bliek J., Maas S.M., Ruijter J.M. et al.* Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant *H19* and not *KCNQ1OT1* methylation: occurrence of *KCNQ1OT1* hypomethylation in familial cases of BWS // Hum. Mol. Genet. 2001. V. 10. ‹ 5. P. 467—476.
8. *Buiting K., Dittrich B., Gross S. et al.* Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman

syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 63. ‹ 1. P. 170—180.
9. *Butler M.G., Meaney F.J., Palmer C.G.* Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader—Labhart—Willi syndrome // Am. J. Med. Genet. 1986. V. 23. ‹ 3. P. 793—809.
10. *Das S., Lese C.M., Song M. et al.* Partial paternal uniparental disomy of chromosome 6 in an infant with neonatal diabetes, macroglossia, and craniofacial abnormalities // Am. J. Hum. Genet. 2000. V. 67. ‹ 6. P. 1586—1591.
11. *DeBaun M.R., Niemitz E.L., McNeil D.E. et al.* Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith—Wiedemann syndrome with cancer and birth defects // Am. J. Hum. Genet. 2002. V. 70. ‹ 3. P. 604—611.
12. *Eggerding F.A., Schonberg S.A., Chehab F.F. et al.* Uniparental isodisomy for paternal 7p and maternal 7q in a child with growth retardation // *Am. J. Hum. Genet.* 1994. V. 55. ‹ 2. P. 253—265.
13. *Ehrlich M.* Amount and distribution of 5-methycytosine in human DNA from different types of tissues or cells // Nucleic Acids Res. 1982. V. 10. ‹ 8. P. 2709–2721.
14. *Engel J.R., Smallwood A., Harper A. et al.* Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith—Wiedemann syndrome // J. Med. Genet. 2000. V. 37. ‹ 12. P. 921—926.
15. *Hannula K., Lipsanen-Nyman M., Kontiokari T., Kere J.* A narrow segment of maternal uniparental disomy of chromosome 7q31-qter in Silver-Russell syndrome delimits a candidate gene region // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 68. ‹ 1. P. 247—253.
16. *Henry I., Bonaiti-Pellie C., Chehensse V. et al.* Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome // Nature. 1991. V. 351. ‹ 6328. P. 665—667.
17. *Itoh N., Becroft D.M.O., Reeve A.E., Morison I.M.* Proportion of cells with paternal 11p15 uniparental disomy correlates with organ enlargement in Wiedemann—Beckwith syndrome // Am. J. Med. Genet. 2000. V. 92. ‹ 2. P. 111—116.
18. *Joyce C.A., Sharp A., Walker J.M. et al.* Duplication of 7p12.1-p13, including *GRB10* and *IGFBP1*, in a mother and daughter with features of Silver–Russell syndrome // Hum. Genet. 1999. V. 105. ‹ 3. P. 273—280.
19. *Kamiya M., Judson H., Okazaki M. et al.* The cell cycle control gene *ZAC/PLAGL1* is imprinted – a strong candidate gene for transient neonatal diabetes // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9. ‹ 3. P. 453—460.
20. *Kotzot D., Schmitt S., Bernasconi F. et al.* Uniparental disomy 7 in Silver—Russell syndrome and primordial growth retardation // Hum. Mol. Genet. 1995. V. 4. ‹ 4. P. 583–587.
21. *Kotzot D.* Abnormal phenotypes in uniparental disomy: Fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15 // Am. J. Med. Genet. 1999. V. 82. ‹ 3. P. 265—274.
22. *Ledbetter D.H., Engel E.* Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis // Hum. Mol. Genet. 1995. V. 4. Review. P. 1757—1764.
23. *Lee M.P., DeBaun M.R., Mitsuya K. et al.* Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to *KvLQT1*, occurs frequently in Beckwith–Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting // Proc. Nat. Acad. Sci. 1999. V. 96. ‹ 9. P. 5203—5208.
24. *Li E., Bestor T.H., Jaenisch R.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality // Cell. 1992. V. 69. ‹ 6. P. 915—926.
25. *Magenis R.E., Toth-Fejel S., Allen L.J. et al.* Comparison of the 15q deletions in Prader—Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences // Am. J. Med. Genet. 1990. V. 35. ‹ 3. P. 333—349.
26. *Maher E.R., Reik W.* Imprinting in clusters: lessons from Beckwith—Wiedemann syndrome // Trends Genet. 1997. V. 13. ‹ 8. P. 330—334.
27. *Marquis E., Robert J.J., Benezech C., Junien C., Diatloff-Zito C.* Variable features of transient neonatal diabetes mellitus with paternal isodisomy of chromosome 6 // Eur. J. Hum. Genet. 2000. V. 8. ‹ 2. P. 137—140.
28. *Monk D., Wakeling E.L., Proud V. et al.* Duplication of 7p11.2-p13, including *GRB10*, in Silver—Russell syndrome // Am. J. Hum. Genet. 2000. V. 66. ‹ 1. P. 36—46.
29. *Nazarenko S.A. Sazhenova E.A., Baumer A., Schinzel A.* Segmental maternal heterodisomy of the proximal part of chromosome 15 in an infant with Prader—Willi syndrome // Eur. J. Hum. Genet. 2004. V. 12. ‹ 5. P. 411—414.
30. *Nicholls R.D., Knoll J.H.M., Butler M.G. et al.* Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader—Willi syndrome // Nature. 1989. V. 342. ‹ 6247. P. 281—285.
31. *Pickard B., Dean W., Engemann S. et al.* Epigenetic targeting in the mouse zygote marks DNA for later methylation: a mechanism for maternal effects in development // Mech. Dev. 2001. V. 103. ‹ 1—2. P. 35—47.
32. *Reik W., Walter J.* Genomic imprinting: parental influence on the genome // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. ‹ 1. P. 21—32.
33. *Riesewijk A.M., Hu L., Schulz U.* Monoallelic expression of human *PEG1/MEST* is paralleled by parent-specific methylation in fetuses // Genomics. 1997. V. 42. ‹ 2. P. 236—244.
34. *Thorvaldsen J.L., Duran K.L., Bartolomei M.S.* Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of *H19* and *Igf2* // Genes Dev. 1998. V. 12. ‹ 23. P. 3693—3702.
35. *Weksberg R., Shen D.R., Fei Y.-L. et al.* Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith–Wiedemann syndrome // Nature Genet. 1993. V. 5. ‹ 2. P. 143–150.
36. *Yoshihashi H., Maeyama K., Kosaki R. et al.* Imprinting of human *GRB10* and its mutations in two patients with Russell–Silver syndrome // Am. J. Hum. Genet. 2000. V. 67. ‹ 2. P. 476—482.

Поступила в редакцию 19.06.2004 г.