

УДК 577.21:575.224.234:591.3

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА *RB1* КАК ФАКТОР НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА: ВОЗМОЖНЫЙ ВКЛАД В ЭТИОЛОГИЮ ХРОМОСОМНОГО МОЗАИЦИЗМА В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2008 г. Е. Н. Толмачева, А. А. Кашеварова, Н. Н. Суханова, Е. А. Саженова, И. Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск 634050;

e-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 15.08.2007 г.

Изучен статус метилирования гена контроля клеточного цикла *RB1* в плацентарных тканях спонтанных абортусов человека первого триместра беременности с мозаичными вариантами числовых нарушений хромосом, верифицированными с помощью молекулярно-цитогенетического исследования. Впервые выявлено aberrантное метилирование промоторного региона гена у 20% внутриутробно погибших эмбрионов с хромосомным мозаицизмом. Максимальная частота эпимутаций зарегистрирована в группе зародышей с низким уровнем аномальных клеток, для которых наиболее вероятны митотические ошибки при возникновении мозаичной анеуплоидии в первично эуплоидных зиготах. Выдвинуто предположение, что aberrантные эпигенетические модификации генома в ходе ранних этапов эмбрионального развития человека могут являться одним из пусковых механизмов геномной нестабильности, реализуемой в форме мозаичных нарушений кариотипа, несовместимых с нормальным течением эмбриогенеза.

Интенсивное внедрение молекулярно-цитогенетических технологий в изучение проблем генетики эмбрионального развития человека, а также развитие преимплантационной генетической диагностики акцентируют внимание на существенной роли нестабильности эмбрионального генома в патологии внутриутробного периода развития и невынашивании беременности. Одной из форм геномной нестабильности является хромосомный мозаицизм, при котором в организме, возникшем из одной оплодотворенной яйцеклетки, имеются две или более клеточные линии с различной хромосомной конституцией. Исследования кариотипа отдельных бластомеров, проведенные в рамках процедур преимплантационной цитогенетической диагностики, показали, что от 15 до 85% эмбрионов, в зависимости от морфологических характеристик (нормальные бластоцисты или бластоцисты, остановившиеся в развитии), имеют числовые аномалии хромосом, причем существенная их часть находится в мозаичном состоянии [1, 2]. Частота хромосомного мозаицизма возрастает в период дробления бластомеров от 15% на стадии 2–4 клеток до 50–60% на стадии 5–8-клеточной морулы [3, 4], а от 8 до 17% бластоцист обладают хаотичным кариотипом, т.е. имеют клетки с различными комбинациями хромосомных нарушений [5, 6]. На более поздних этапах внутриутробного развития (первый триместр беременности) частота мозаичных вариантов ане-

уплоидий у спонтанных абортусов составляет 20–25% [7–9].

Механизмы, нарушающие сегрегацию хромосом в ходе клеточного деления и приводящие к анеуплоидии и полиплоидии, в последние годы активно обсуждаются в печати. Главным образом они исследуются в связи с развитием злокачественных новообразований, поскольку клетки многих солидных опухолей имеют анеуплоидный кариотип, а различные опухолевые клеточные линии характеризуются хромосомной нестабильностью [10]. Не исключено, что молекулярные механизмы, приводящие к нарушению стабильности генома как при онкологических процессах, так и в раннем эмбриогенезе, могут быть общими. Одним из таких механизмов могут являться эпигенетические реорганизации хроматина, включающие метилирование цитозинового основания ДНК и ковалентные модификации гистонов. Известно, что одним из важных факторов, приводящих к нарушениям регуляции клеточной пролиферации и стабильности генома в процессе злокачественного роста, является гиперметилирование промоторных регионов генов контроля клеточного цикла, обуславливающее их инактивацию [11]. Первые деления дробления бластомеров также характеризуются супрессией контрольных точек клеточного цикла [12]. Кроме того, в этот же период начинается эпигенетическое репрограммирование генома, при котором

на первом этапе происходит тотальное деметилирование генома, исключая импринтированные локусы, а затем в процессе обособления зародышевых и экстраэмбриональных листков запускается процесс установления тканеспецифичных профилей метилирования в дифференцирующихся клетках [13]. Нарушения эпигенетического репрограммирования – отсутствие деметилирования определенных локусов или aberrантное гиперметилирование промоторных регионов генов, которые в норме не должны подвергаться метилированию, могут повлечь за собой негативные последствия, особенно когда они касаются генов, обеспечивающих контроль клеточного цикла и репарации ДНК. Предполагается, что aberrантные эпигенетические модификации (или эпимутации) могут встречаться с частотой, на несколько порядков превышающей частоту генных мутаций [14]. Значимость повреждений генов контроля клеточного цикла в этиологии хромосомного нерасхождения начинает активно обсуждаться в современной литературе [15], однако частота и роль их эпигенетической инактивации на ранних этапах эмбрионального развития остаются практически неизученными. Цель настоящего исследования – определение связи между митотической нестабильностью эмбрионального генома, проявляющейся в форме мозаичных вариантов числовых нарушений хромосом, и aberrантным гиперметилированием промоторного региона гена *RBI*, продукт которого является одним из ключевых элементов регуляции “точки рестрикции” и вступления клетки в митоз [16].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Обследованы некультивированные плацентарные ткани – цитотрофобласт хориона (ЦХ) и экстраэмбриональная мезодерма (ЭМ) 45 спонтанных абортусов с мозаицизмом по анеуплоидиям различных хромосом. Срок беременности, до которого продолжалось развитие эмбрионов, установленный в ходе динамического ультразвукового обследования беременных женщин, варьировал от 5 до 12 нед. и составил в среднем 7.7 нед. Средний возраст матерей составил 29 лет. В качестве контрольной группы обследованы внезародышевые ткани 20 медицинских абортусов, полученных от здоровых женщин (средний возраст 26 лет) на 6–12 нед. беременности (средний срок 9 нед.), не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Кроме того, были изучены экстраэмбриональные ткани 20 спонтанных абортусов с нормальным кариотипом 5–11 нед. развития (средний срок 7.5 недель). Средний возраст матерей в этой

группе составил 27 лет. Эмбриональный материал был собран за период с 1997 по 2006 г. в ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН г. Томска и хранился в банке тканей при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

У 36 спонтанных абортусов, включенных в настоящее исследование, с помощью стандартного цитогенетического анализа культивированных эмбриональных фибробластов предварительно были выявлены трисомии по различным аутосомам. Протокол проведения цитогенетического исследования подробно был описан нами ранее [17]. В девяти случаях клетки спонтанных абортусов обладали низкой пролиферативной активностью, поэтому их кариотипирование было выполнено с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на интерфазных ядрах некультивированных клеток экстраэмбриональных тканей [9].

С целью изучения уровня и межтканевого распределения клеток с числовыми нарушениями хромосом с помощью интерфазного FISH-анализа были ретроспективно обследованы некультивированные плацентарные ткани спонтанных абортусов с цитогенетически установленной анеуплоидией. Суспензии интерфазных ядер были получены путем ферментативной дезагрегации ЭМ коллагеназой I типа (“Sigma”, США) и мацерации ворсин хориона в 60%-ной уксусной кислоте [9]. FISH-анализ был проведен с центромероспецифичными ДНК-зондами, мечеными репортерными молекулами: дигоксигенин-11-дезоксисуридинтрифосфатом либо биотин-11-дезоксисуридинтрифосфатом. Для синтеза ДНК-зондов использовали клоны *E. coli*, несущие плазмидную ДНК со вставками центромероспецифичных  $\alpha$ -сателлитных последовательностей хромосом человека 2, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 20, 21, 22 и Y. Данные клоны были любезно предоставлены профессором М. Роччи (Resources for Molecular Cytogenetics, Институт генетики г. Бари, Италия). Выделение плазмидной ДНК, синтез ДНК-зондов, а также интерфазный FISH-анализ были проведены по стандартной методике [18].

Для анализа статуса метилирования гена *RBI* геномная ДНК была выделена из нативных (некультивированных) тканей спонтанных и медицинских абортусов после стандартной обработки протеиназой K в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  и экстракции фенол/хлороформом. Бисульфитную модификацию ДНК проводили в течение одного часа при  $95^{\circ}\text{C}$  [19]. Модифицированную ДНК очищали с помощью набора Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up System (“Promega”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Метилспецифическую ПЦР проводили с использованием праймеров на промоторный регион гена *RBI* [20]. Начальную денатурацию выполняли при  $96^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин, с последующими 30 циклами:  $94^{\circ}\text{C}$  –

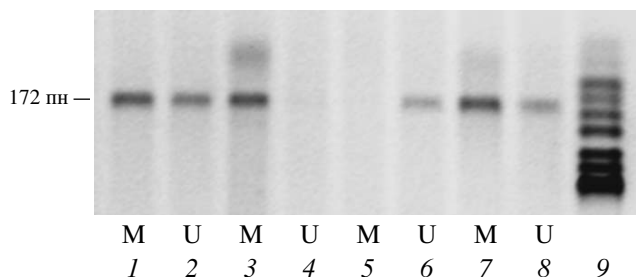
1 мин, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с, конечная элонгация 72°C – 5 мин. Фрагменты ДНК фракционировали с помощью гель-электрофореза в 2.5%-ном агарозном геле и визуализировали в проходящем свете на установке GelDoc (“Bio-Rad”, США). Частоту эпимутаций рассчитывали как отношение числа метилированных аллелей к общему числу проанализированных аллелей локуса *RB1*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее исследование были включены 45 спонтанных абортусов первого триместра беременности с мозаичными вариантами анеуплоидий по хромосомам 2, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 20, 21, 22 и Y (табл. 1). В большинстве случаев после интерфазного FISH-анализа в обследованных экстраэмбриональных тканях были выявлены два клеточных клона: с нормальной хромосомной конституцией и с аутосомной трисомией. У одного зародыша (№ 7) был зарегистрирован мозаичный вариант моносомии по хромосоме 15, ограниченной исключительно тканями цитотрофобласта. Еще у одного спонтанного абортуса (№ 5) в клетках ЭМ был выявлен кариотип 47,XYU, тогда как в ЦХ присутствовал дополнительный клеточный клон с нормальным кариотипом.

В результате анализа статуса метилирования промоторного региона гена *RB1* aberrантное метилирование было выявлено у девяти из 45 спонтанных абортусов (20%). Метилированные аллели обнаруживались либо в обеих обследованных экстраэмбриональных тканях (эмбрионы № 1, 3, 4, 8 в табл. 1), либо в одной из них, причем в двух случаях (№ 3, 8) в ЭМ оба аллеля гена *RB1* были метилированы (табл. 1, рисунок). Из девяти выявленных спонтанных абортусов с метилированным промотором гена *RB1* семь эмбрионов имели мозаичный трисомный кариотип, один был мозаиком по кариотипу 47,XYU, еще у одного зародыша была зарегистрирована мозаичная моносомия хромосомы 15, ограниченная клетками цитотрофобласта. При анализе локуса *RB1* у медицинских абортусов и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ни одного случая aberrантного метилирования выявлено не было.

Исследование статуса метилирования проводили в двух разных плацентарных тканях – цитотрофобласте хориона и экстраэмбриональной мезодерме, различающихся по характеру эпигенетического репрограммирования генома. Цитотрофобласт является производным трофэктодермы и представляет собой стволовую линию плаценты, существуя на протяжении всего периода внутриутробного развития. Экстраэмбриональная мезодерма формируется на 13–15-й дни развития и является одной из производных эпибласта, дифференцирующегося как в собственно эмбриональные структуры, так и в некоторые внезаро-



Электрофореграмма после метилспецифической ПЦР промоторного района гена *RB1*. Дорожки 1–6 – спонтанные абортусы; 7, 8 – положительный контроль (М – метилированный аллель, U – неметилированный аллель); 9 – маркер молекулярной массы pUC19/Msp I.

дышевые ткани. В период имплантации, когда запускается процесс тканеспецифичного метилирования генома, уровень метилирования ДНК в клетках трофобласта возрастает незначительно, в то время как геном клеток, дающих начало эмбриональным структурам, подвергается существенному метилированию [13]. Поэтому можно предположить, что эпимутации будут более характерны для клеток ЭМ, где процессы метилирования идут более интенсивно и соответственно вероятность ошибок выше. Однако в настоящем исследовании не было выявлено статистически значимых отличий по частоте aberrантного метилирования аллелей *RB1* в ЦХ ( $7.14 \times 10^{-2}$ ) и ЭМ ( $12.16 \times 10^{-2}$ ) спонтанных абортусов с хромосомным мозаицизмом ( $p = 0.21$ ). Вероятно, что у эмбрионов с aberrантным метилированием *RB1* в обеих тканях (№ 1, 3, 4, 8) эпимутации возникали на ранних преимплантационных этапах развития еще до обособления трофэктодермы и внутренней клеточной массы и возможно были связаны с нарушениями процесса деметилирования родительских геномов.

Анеуплоидия в эмбриональных клетках может быть следствием нерасхождения гомологичных хромосом в гаметогенезе у родителей либо возникнуть при митотическом делении соматических эмбриональных клеток. Однако появление мозаичного варианта кариотипа всегда результат митотических ошибок, происходящих на ранних этапах эмбриогенеза. При этом если зигота эуплоидна, то митотическое нерасхождение гомологичных хромосом будет продуцировать два клона клеток – с трисомией и моносомией хромосом. Поскольку клетки с моносомией аутосом обычно нежизнеспособны, в дальнейшем в развивающемся организме будут присутствовать только два типа клеток – с нормальным хромосомным набором и с трисомией. Маркером митотического нерасхождения в этом случае будет являться невысокая частота анеуплоидного клеточного клона, особенно ограниченного каким-нибудь одним типом ткани. Альтер-

**Таблица 1.** Статус метилирования промоторного региона гена *Rb1* в экстраэмбриональных тканях спонтанных абортусов с хромосомным мозаицизмом

№	Цитотрофобласт		Экстраэмбриональная мезодерма		Возможное происхождение анеуплоидии
	Кариотип	Статус метилирования	Кариотип	Статус метилирования	
1	47,XX,+16/46,XX (52:48)	+/-	47,XX,+16/46,XX (65:35)	+/-	мейотическое
2	47,XX,+9/46,XX (72:28)	-/-	47,XX,+9/46,XX (60:40)	+/-	мейотическое
3	47,XY,+7/46,XY (3:97)	+/-	46,XY	+/+	митотическое
4	47,XX,+8/46,XX (3:97)	+/-	46,XX	+/-	митотическое
5	47,XY/46,XY (68:32)	+/-	47,XY	-/-	мейотическое
6	47,XY,+16/46,XY (24:76)	-/-	47,XY,+16/46,XY (5:95)	+/-	мейот/мит
7	45,XY,-15/46,XY (18:82)	+/-	46,XY	н/о	митотическое
8	47,XX,+10/46,XX (18:82)	+/-	47,XX,+10/46,XX (30:70)	+/+	мейот/мит
9	47,XX,+16/46,XX (74:26)	н/о	47,XX,+16/46,XX (81:19)	+/-	мейотическое
10	47,XY,+16/46,XY (67:33)	-/-	47,XY,+16/46,XY (82:18)	н/о	мейотическое
11	47,XY,+21/46,XY (74:26)	-/-	47,XY,+21/46,XY (80:20)	-/-	мейотическое
12	47,XY,+16/46,XY (66:34)	-/-	47,XY,+16/46,XY (65:35)	-/-	мейотическое
13	47,XY,+16/46,XY (61:39)	-/-	47,XY,+16*	-/-	мейотическое
14	47,XX,+16/46,XX (81:19)	-/-	47,XX,+16*	-/-	мейотическое
15	н/о	-/-	47,XY,+16/46,XY (92:8)	-/-	мейотическое
16	47,XX,+21/46,XX (36:64)	-/-	47,XX,+21/46,XX (49:51)	-/-	мейотическое
17	47,XX,+16/46,XX (90:10)	-/-	47,XX,+16/46,XX*	-/-	мейотическое
18	47,XX,+16/46,XX (62:38)	-/-	47,XX,+16*	-/-	мейотическое
19	47,XY,+16/46,XY (22:78)	н/о	47,XY,+16/46,XY*	-/-	мейотическое
20	н/о	-/-	47,XY,+9/46,XY (90:10)	-/-	мейотическое
21	47,XY,+21/46,XY (55:45)	-/-	47,XY,+21/46,XY (30:70)	-/-	мейотическое
22	47,XY,+16/46,XY (82:18)	-/-	47,XY,+16*	н/о	мейотическое
23	47,XY,+21/46,XY (27:73)	-/-	47,XY,+21*	н/о	мейотическое
24	47,XY,+16/46,XY (92:8)	-/-	47,XY,+16*	н/о	мейотическое
25	47,XY,+16/46,XY (55:45)	-/-	47,XY,+16/46,XY (84:16)	н/о	мейотическое
26	47,XY,+22/47,XY (58:42)	-/-	47,XY,+22*	-/-	мейотическое
27	47,XX,+9/46,XX (90:10)	-/-	47,XX,+9/46,XX (92:8)	-/-	мейотическое
28	47,XX,+2/46,XX (87:13)	-/-	47,XX,+2*	-/-	мейотическое
29	47,XY,+8/46,XY (87:13)	-/-	47,XY,+8*	н/о	мейотическое
30	н/о	-/-	47,XX,+13/46,XX (4:96)	н/о	мейот/мит
31	47,XY,+2/46,XY (32:68)	-/-	47,XY,+2*	-/-	мейотическое
32	47,XY,+16/46,XY (14:86)	н/о	47,XY,+16/46,XY(66:34)	-/-	мейотическое
33	47,XY,+20/46,XY (92:8)	-/-	47,XY,+20/46,XY (92:8)	-/-	мейотическое
34	47,XX,+20/46,XX (85:15)	-/-	47,XY,+20*	-/-	мейотическое
35	47,XX,+11/46,XX (89:11)	-/-	47,XX,+11/46,XX (93:7)	-/-	мейотическое
36	н/о	-/-	47,XY,+20/46,XY (80:20)	-/-	мейотическое
37	47,XX,+15/46,XX (64:36)	-/-	47,XX,+15*	-/-	мейотическое
38	47,XX,+15/46,XX (22:78)	-/-	47,XX,+15/46,XX*	-/-	мейот/мит
39	47,XY,+7/46,XY (98:2)	-/-	47,XY,+7*	-/-	мейотическое
40	47,XY,+21/46,XY (38:62)	-/-	47,XY,+21*	-/-	мейотическое
41	47,XX,+7/46,XX (99:1)	-/-	47,XX,+7/46,XX*	-/-	мейотическое
42	47,XY,+7/46,XY (96:4)	-/-	47,XX,+7*	-/-	мейотическое
43	47,XX,+2/46,XX (98:2)	-/-	47,XX,+2/46,XX (96:4)	-/-	мейотическое
44	47,XX,+16/46,XX (93:7)	-/-	47,XX,+16*	-/-	мейотическое
45	47,XX,+2/46,XX (84:16)	-/-	47,XX,+2*	-/-	мейотическое

Примечание. \* – результат цитогенетического анализа; “+/+” – наличие только метилированного аллеля; “+/-” – наличие метилированного и неметилированного аллеля; “-/-” – наличие только неметилированных аллелей; н/о – не обследовано.

нативным механизмом возникновения мозаицизма в эуплоидной зиготе может быть анафазное отставание хромосом, которое приведет к появлению моносомных клеток, что и было обнаружено в одном из обследованных нами случаев (№ 7).

Если зигота трисомна, то мозаицизм может быть результатом анафазного отставания дополнительной хромосомы на этапах постзиготического развития. Этот механизм, получивший название “коррекция трисомной зиготы” [21], так-

**Таблица 2.** Частота эпимутаций гена *RB1* в группах спонтанных абортусов с разным уровнем анеуплоидных клеток в экстраэмбриональных тканях

Группа	Частота анеуплоидных клеток	Число спонтанных абортусов в группе	Число спонтанных абортусов с метилированным <i>RB1</i>	Частота эпимутаций <i>RB1</i>
I	Низкая (3–35%)	10	5	$31.25 \times 10^{-2}$
II	Средняя (36–68%)	11	2	$7.14 \times 10^{-2}$
III	Высокая (69–99%)	24	2	$2.38 \times 10^{-2}$

же приводит к формированию двух клеточных клонов – трисомного и с нормальной хромосомной конституцией. Нерасхождение в этом случае даст нормальный клеточный клон и тетрасомию, которая встречается достаточно редко. Распределение клеток с хромосомной аномалией в различных тканях эмбриона при коррекции трисомии определяется множеством факторов и зависит, в том числе, от этапа развития, на котором происходит восстановление дисомного кариотипа, от соотношения пролиферативной и миграционной активности клеток с нормальным и анеуплоидным хромосомным набором, а также является в некоторых случаях хромосомоспецифичным [22, 23]. Чаще всего маркером коррекции трисомии выступает небольшой процент эуплоидных клеток, присутствующих в одном или в нескольких типах тканей. Таким образом, частота и межтканевое распределение клеток с числовыми нарушениями хромосом в плацентарных тканях эмбрионов человека могут быть индикаторами различных механизмов формирования хромосомного мозаицизма в эуплоидных и анеуплоидных зиготах [23].

В обследованных в настоящей работе экстраэмбриональных тканях спонтанных абортусов частота анеуплоидных клеток варьировала от 3 до 99%. Для анализа возможных механизмов возникновения мозаичной анеуплоидии исследованная выборка была дифференцирована на три группы в зависимости от частоты анеуплоидного клеточного клона (табл. 2). Как было отмечено выше, у эмбрионов с мозаицизмом низкого уровня (группа I) наиболее вероятным механизмом формирования мозаицизма является митотическое нерасхождение в части клеток первично эуплоидной зиготы. Именно эта группа представляет наибольший интерес в плане изучения роли эпимутаций генов клеточного цикла в этиологии хромосомного нерасхождения у эмбрионов, развивающихся из эуплоидных зигот. Во второй группе спонтанных абортусов возможно как митотическое, так и мейотическое происхождение анеуплоидии. И, наконец, третья группа эмбрионов была представлена спонтанными абортусами с высоким уровнем мозаичной анеуплоидии, возникающей преимущественно вследствие коррекции трисомии. Следует отметить, что в послед-

нюю группу было отнесено почти 50% всех обследованных спонтанных абортусов.

Частота эпимутаций гена *RB1* в трех группах спонтанных абортусов заметно различалась (табл. 2). Так, наиболее высокая частота aberrантного метилирования была зарегистрирована у эмбрионов с низким уровнем аномального клона, для которых наиболее вероятны митотические ошибки при возникновении анеуплоидии. Доля эмбрионов с метилированным промотором *RB1* в этой группе достоверно отличалась от соответствующего показателя в группе зародышей с высоким уровнем анеуплоидных клеток ( $p = 0.01$ ). Между группами I и II, II и III достоверных различий по частоте эпимутаций выявлено не было ( $p = 0.14$  и  $p = 0.37$ , соответственно). Таким образом, aberrантное метилирование гена *RB1* чаще наблюдается у спонтанных абортусов с мозаицизмом низкого уровня, формирующимся вследствие митотических ошибок в эмбриональных клетках изначально эуплоидной зиготы. Мы предполагаем, что инактивация экспрессии гена *RB1*, в том числе и вследствие эпигенетических нарушений, или недостаточное количество белкового продукта в клетке может инициировать возрастание митотической нестабильности и возникновение хромосомного мозаицизма. Каким образом могут быть реализованы эти процессы?

Белок ретинобластома (pRB) – ядерный фосфопротеин, являющийся негативным регулятором клеточной пролиферации. Активация белка зависит от степени его фосфорилирования и носит в клетке циклический характер. Основная функция pRB заключается в связывании в гипофосфорилированном состоянии E2F-семейства факторов транскрипции, которые являются центральным регулятором экспрессии генов контроля клеточного цикла и прямо модулируют экспрессию генов, вовлеченных в репликацию и репарацию ДНК, а также в прохождении G1/S и G2/M-сверочных точек клеточного цикла. При фосфорилировании pRB происходит высвобождение связанных с ним факторов транскрипции E2F, что обеспечивает проходимость клеткой так называемой “точки рестрикции” и необратимое вступление в митоз. Потеря белкового продукта pRB может инициировать проходимость незапланированных циклов репликации без репарации

повреждений ДНК и, как следствие, накопление геномной нестабильности. В дополнение к нарушениям в G1/S-фазе потеря rRB ведет к изменениям в экспрессии циклина E и связанному с этим возникновению анеу- и полиплоидии [24].

В сверхочной точке G2/M эффекты инактивации *RB1* могут проявиться через изменение уровня таких критических для этой стадии клеточного цикла регуляторных факторов, как циклин-зависимая киназа CDK1, циклин B, CDC20 и MAD2, контролируемых rRB/E2F-комплексом [16]. Так, инактивация гена *RB1* приводит к повышению уровня E2F, что в свою очередь вызывает возрастание экспрессии MAD2 [25]. Белок MAD2 является одним из регуляторов сверхочной точки веретена деления, блокирует активацию сепаразы и является мишенью для комплекса активации анафазы – APC. Сверхэкспрессия MAD2 приводит к задержке митоза, увеличению частоты разрывов в хромосомах, появлению анафазных мостов, анеу- и полиплоидии. Более того, для инициации этих процессов достаточно лишь кратковременного повышения уровня MAD2 в клетке [26]. По всей видимости, вклад нарушений экспрессии других rRB-зависимых генов в индукцию анеуплоидии также может быть реализован через разрыв тесной координации между завершением митоза и инициацией репликации ДНК.

Следующий возможный механизм – нарушение взаимодействий между ретинобластомным белком и хроматин-ремоделирующими факторами. Структура хроматина играет ключевую роль в контроле транскрипции генов, при этом метилирование цитозинового основания ДНК и ковалентные модификации гистонов являются основными факторами эпигенетической регуляции. Ретинобластомный белок способен взаимодействовать с рядом ферментов, которые контролируют структуру хроматина через гистоновые модификации, обеспечивают поддержание длины теломер или регулируют функции центромерных регионов хромосом [27]. Среди таких ферментов можно отметить гистоновые деацетилазы (HDAC1, HDAC2, HDAC3) и метилтрансферазы (H3-K9 и H4-K20). Кроме того, rRB взаимодействует с хроматин-ремоделирующими АТФ-зависимыми геликазами BRG1 и BRM, а также с ДНК-метилтрансферазами. Показано, что дефицит ретинобластомного белка в клетке может вызывать дефекты в структуре центромерного гетерохроматина, приводить к слиянию центромер, хромосомному нерасхождению и возрастанию геномной нестабильности [28]. Следовательно, нарушения регуляции структуры гетерохроматина в связи с потерей rRB могут затрагивать и такие процессы, которые непосредственно независимы от изменений в G1/S-фазе клеточного цикла.

Таким образом, в ходе настоящего исследования впервые описано aberrантное метилирование промоторного региона гена *RB1* у спонтанных абортусов с хромосомным мозаицизмом. Показано, что эпимутации *RB1* ассоциированы с низким уровнем анеуплоидных клеток у мозаичных зародышей, и выдвинуто предположение, что aberrантное метилирование промоторной области гена контроля клеточного цикла может являться одним из пусковых механизмов возникновения анеуплоидии в соматических клетках развивающегося зародыша. Вопрос о том, на каком этапе эмбриогенеза могут произойти подобные эпимутации, остается открытым и требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 05-04-48129).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Munne S., Weier H.U., Grifo J., Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 373–379.
2. 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.
3. Bielanska M., Tan S.L., Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type and relevance to embryo outcome // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. № 2. P. 413–419.
4. Los F.J., van Opstal D., van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model // *Hum. Reprod. Upd.* 2004. V. 10. P. 79–94.
5. 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.* 2000. V. 6. № 11. P. 1055–1062.
6. 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.
7. Kalousek D.K., Barrett I.J., Gartner A.B. Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism // *Hum. Genet.* 1992. V. 88. № 6. P. 642–646.
8. 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. Med. Genet.* 1997. V. 72. P. 297–301.
9. 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.
10. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetics instability in colorectal cancer // *Nature.* 1997. V. 386. P. 623–627.

11. Costello J.F., Plass C. Methylation matters // *J. Med. Genet.* 2001. V. 38. P. 285–303.
12. 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.
13. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. P. 662–673.
14. Horsthemke B., Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective // *Hum. Reprod. Upd.* 2005. V. 11. P. 473–482.
15. Poss K.D., Nechiporuk A., Stringer K. F. et al. Germ cell aneuploidy in zebrafish with mutations in the mitotic checkpoint gene *mps1* // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 13. P. 1527–1532.
16. Knudsen E. S., Knudsen K. E. Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle // *Exp. Biol. Med.* 2006. V. 231. P. 1271–1281.
17. Nikitina T.V., Lebedev I.N., Sukhanova N.N. et al. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors // *Fert. Ster.* 2005. V. 83. № 4. P. 964–972.
18. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. *Human Cytogenetics. A Practical Approach.* N.Y.: Oxford Univ. Press, 1992. V. 1. 274 p.
19. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 13. P. 65.
20. Gonzalez-Gomez P., Bello M.J., Alonso M.E. et al. CpG island methylation status and mutation analysis of the *RBI* gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumour // *Brit. J. Cancer.* 2003. V. 88. P. 109–114.
21. Kalousek D.K. Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 91. P. 39–45.
22. 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 // *Prenat. Diagn.* 1996. V. 16. P. 511–524.
23. 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. (Lebedev I.N., Nazarenko S.A. Tissue-specific placental mosaicism for autosomal trisomies in human spontaneous abortuses: mechanisms of formation and phenotypical effects // *Rus. J. Genetics.* 2001. V. 37. № 11. P. 1224–1237.)
24. Niculescu A.B. 3rd, Chen X., Smeets M. et al. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 629–643.
25. Hernando E., Nahle Z., Juan G. et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control // *Nature.* 2004. V. 430. № 12. P. 797–802.
26. Sotillo R., Hernando E., Diaz-Rodriguez E. et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice // *Cancer Cell.* 2007. V. 11. P. 9–23.
27. Isaac C.E., Francis S.M., Martens A.L. et al. The retinoblastoma protein regulates pericentric heterochromatin // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 26. № 9. P. 3659–3671.
28. Gonzalo S., Garcia-Gao M., Fraga M.F. et al. Role of the *RBI* family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. P. 420–428.

## Epigenetic Inactivation of the *RBI* Gene as a Factor of Genomic Instability: A Possible Contribution to Etiology of Chromosomal Mosaicism during Human Embryo Development

E. N. Tolmacheva, A. A. Kashevarova, N. N. Sukhanova,  
E. A. Sazhenova, and I. N. Lebedev

*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,  
Tomsk, 634050 Russia;*

*e-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru*

The methylation status of the cell cycle control gene *RBI* has been studied in placental tissues of spontaneous abortions of the first trimester of pregnancy with mosaic variants of numerical chromosomal abnormalities verified by a molecular genetic examination. Aberrant methylation of the gene promoter region has been revealed for the first time in 20% of embryos with chromosomal mosaicism that died in utero. A maximum frequency of epimutations was recorded in a group of embryos with a low level of abnormal cells for which mitotic errors are most likely to determine the formation of mosaic aneuploidy in primary euploid zygotes. It has been suggested that aberrant epigenetic genomic modifications at early stages of human embryonic development can be one of the mechanisms promoting genomic instability realized in the form of mosaic abnormalities of the karyotype that are incompatible with the normal course of embryogenesis.