

Л. М. Морозова

## МЕТИЛИРОВАНИЕ И ИМПРИНТИНГ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Обсуждается участие метилирования ДНК в процессах импринтинга и дифференцировки зародышей ранних стадий онтогенеза.*

Функциональная активность генов, специфичных для определенных этапов эмбрионального развития, проявляется в результате целого комплекса регуляторных процессов, которые осуществляются на разных уровнях, таких как структура хроматина, инициация транскрипции, сплайсинг мРНК, инициация трансляции и стабильность ее продуктов. Из них существенное значение для процессов дифференцировки и развития имеет регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции и структуры хроматина.

Исследования последнего десятилетия демонстрируют важную роль в регуляции функциональной активности генов и целых хромосом метилирования геномной ДНК — фактора, определяющего и феномен хромосомного импринтинга. Многие процессы, происходящие в клетках и целом организме, связывают с энзиматическим метилированием цитозина в составе ДНК.

Отмечают наличие корреляционных связей между уровнями метилирования генов и их экспрессией [1], а также такими процессами, как связывание белковых факторов с регуляторными участками генов [2], модификацией структуры ДНК [3], конденсацией хроматина и инактивацией X-хромосом [4], становлением тканевой специфичности [5], дифференцировкой клеток и раком [6], старением клеточных культур и организмов [7], мутационным процессом и темпами дивергенции генов [8], импринтингом [9] и т. д. Метилирование ДНК происходит в 5'-положении цитидина в основном в динуклеотиде 5'-CpG-3' [10], при этом наличие метилированного цитидина варьирует у разных объектов в широких пределах (от 40 мол % у растений, 2—8 у млекопитающих до почти полного отсутствия у дрозофилы — 0,008) [11].

Метилирование цитозина в клетках осуществляется с помощью метилтрансфераз, которые переносят метильную группу 5-аденозил-L-метионина в пятое положение цитозина [1].

Пути реализации генетической информации от оплодотворенной яйцеклетки до взрослой особи, становление тканевой специфичности, сохранение стволовых клеток в популяции дифференцированных до сих пор во многом остаются невыясненными. А поскольку метилирование ДНК является супрессором экспрессии генов, то с его помощью пытаются объяснить и процессы дифференцировки.

Уже ранние исследования одноклеточных зародышей млекопитающих выявили несхожесть родительских геномов по степени спирализации хромосом и замене у них протаминов на гистоны, чего не наблюдали при изучении гино- и партеногенетических зародышей [13].

Данные о неоднозначности родительских геномов в дальнейшем подтвердили Сурани с сотр. [14] и Мак Грас и Солтер [15] опытами по пересадке ядер в зиготах мышей, сооставив развитие гино-, пар-

тено-, андрогенетических и нормальных зародышей. Ни один из первых трех перечисленных типов зародышей не был способен к полному развитию до взрослой особи. Партено- и гиногенетические зародыши обычно гибли на 10—12-й день эмбрионального развития, имея хорошо развитую внутреннюю клеточную массу (ВКМ) и слабовыраженную трофэктодерму [16]. Андрогенетические особи, наоборот, характеризуются развитой трофэктодермой при почти полном отсутствии ВКМ. До стадии бластулы доходит всего 19 % андрогенетических зародышей, которые обычно останавливаются в дроблении на стадии четырех клеток. Введение в андрогенетические зародыши мРНК или суспензии нормальных бластоцист способствовало их более успешному развитию (47 % вместо 19) [17]. Триплоидные зародыши с двойным отцовским набором хромосом также имели более развитую плаценту. Это послужило основанием для утверждения того, что отцовский набор хромосом отвечает за развитие плаценты. Несмотря на раннюю гибель андро- и гиногенетических особей, их бластомеры обладают плюрипотентностью: в химерах с 2—8-клеточными нормальными морулами их производные в дальнейшем обнаруживали в разных тканях, но начиная с 12-го дня развития отмечали селективную гибель таких клеток [18]. Химеры из андро- и гиногенетических морул также не способны к развитию до взрослой особи, несмотря на то, что у них представлены оба родительских генома, хотя и в разных клетках. В то же время особи, полученные из активированных яйцеклеток, которым вводили ядра гаплоидных андрогенетических 2—16-клеточных морул, развиваются так же, как и нормальные зародыши [19]. Все эти данные свидетельствуют о том, что для нормального развития зародышей необходимо наличие обоих родительских геномов в каждой клетке. Чем же обусловлены различия родительских геномов, особенно в том случае, когда отцовский геном тоже имеет X-хромосому? Выяснилось, что родительские геномы отличаются как количественно, так и качественно по уровням метилирования: ДНК сперматозоидов метилирована сильнее ДНК ооцитов и морул, в то время как ДНК бластоцист не обнаруживает метилирования. Однако эмбриональное развитие 7-го дня сопровождается реметилированием ДНК, которое заканчивается к 18-му дню и соответствует в дальнейшем таковому соматических клеток. При этом ДНК первичных половых клеток 12—13 дней развития мышей остается деметилированной как у самок, так и самцов [20]. Эти данные свидетельствуют о том, что метилирование, несомненно, участвует в процессах дифференцировки, однако остается неясным, является оно причиной или следствием дифференцировки.

Установлению связи метилирования ДНК с дифференцировкой зародышей способствовало изучение метилирования как трансгенов, так и собственных генов зародышей разных стадий онтогенеза. Создание векторов с де- и метилированными генами и введение их в проооциты яйцеклеток позволили выявить время включения этих генов, проследить за изменением участков их метилирования в онтогенезе и исследовать их экспрессию в зависимости от степени метилирования. В соматических тканях паттерны метилирования генов сохраняются в ряду поколений, меняясь лишь при их экспрессии. Однако в процессе дифференцировки зародышей отмечают эффекты де- и реметилирования ДНК на разных стадиях онтогенеза, при этом метилирование не только сайтспецифично, но и нитеспцифично. Трансгены, метилированные *in vitro*, при дифференцировке также подвергаются модификациям [21]. Анализ сайтов метилирования ApoA1 (apolipoprotein A1), P<sub>gk</sub>2 (phosphoglycerate kinase 2), Aprt (adenosinphosphoribosyl transferase) и большого β-глобинового генов на разных стадиях онтогенеза обнаружил различия в родительских образцах метилирования. Деметилирование отцовского генома зародышей идет быстрее и заканчивается к 8-клеточной стадии, а материнских — на 16-клеточной моруле. На стадии бластулы исследуемые гены были тоже деметилированы. Возможно, снижение метилирования ДНК этой стадии способствует

установлению плюрипотентности клеток эпибласта. В этот момент деметилирования отмечают и первую дифференцировку — выделение трофэктодермы. В дальнейшем наступало постепенное реметилирование этих генов, которое заканчивалось в период органогенеза. В течение оогенеза некоторые участки генов *ApoA1* и *Pgk2* деметилировались, что, по мнению авторов, связано с экспрессией названных генов в это время [22]. Изучение 3'- и 5'-участков генов *ApoA1*, *Pgk2*, *Ost3/4* в сперматогенезе также выявило деметилирование, связанное с дифференцировкой, — переходом из одной стадии сперматогенеза в другую с последующим метилированием *de novo*. При этом метилирование 3'-участков наступало на 15—18-й день развития и сохранялось затем на протяжении всего сперматогенеза. Все изменения метилирования в дальнейшем происходили только в 5'-участке. Интересно, что окончательное метилирование ДНК в сперматогенезе происходит у сперматозоидов в каудальной части эпидидимиса без репликации ДНК и является, вероятно, подготовкой генома спермы к вкладу в развитие зародышей после оплодотворения [23].

Применение ингибиторов метилирования, в частности 5-азоцитидина (5-АЦ), позволило установить связь между изменением метилирования ДНК и дифференцировкой зародышей и клеток. Обработка 5-АЦ доимплантационных зародышей мышей приводила к более ранней экспрессии у них гена *Gri-1* (глюкозофосфатизомеразы) [24], однако дальнейшего анализа развития таких животных проведено не было. Снижение уровня метилирования ДНК фибробластов мышей *in vitro* при воздействии 5-АЦ вызывало их дифференцировку в различных направлениях: развивались миобласты, адипоциты, хондрициты [25]. Следовательно, пути дифференцировки определяются не только деметилированием, но и другими факторами, которые должны узнавать, когда и какие гены необходимо деметилировать. Такие факторы, изменяющие транскрипционную активность генов и связывающиеся с ДНК в зависимости от метилирования CpG-сайтов, в настоящее время активно исследуются. Обнаружены белки, которым для связи с промоторами генов необходимо метилирование CpG-сайтов; которые «безразличны» к метилированию CpG-участков связи, и такие, которые связываются только в отсутствие их метилирования; белки, которым для связи достаточно одного метилированного CpG-сайта и которым необходимо не менее 12 симметрично метилированных участков. Сводка таких белков приведена в работах Эрлих и Эрлих [2] и Бойса и Берда [26].

Таким образом, можно считать, что метилирование является вторичной сигнальной системой, эпигенетическим фактором, участвующим в реализации генетической информации зародышей. В настоящее время представлен ряд гипотез для объяснения механизмов дифференцировки, которые объединяют состояние клеток, строение ДНК, ее метилирование и участие белковых факторов [27—29]. Суть гипотез сводится к тому, что а) транскрипционные факторы в участках связывания с ДНК воспринимают 5mC как мутацию и не связываются с ней; б) метилированные участки ДНК связываются с ядерными белками, которые не позволяют транскрипционным факторам связываться с промоторами генов.

Дифференцировка зародышей сопровождается инактивацией X-хромосом у самок, которая у различных производных зародышей происходит неодновременно (трофэктодерма — 3,5 сут, примитивная энтодерма — 4,5 сут, эмбриональная эктодерма — 6 сут), что позволило предположить наличие связи между дифференцировкой эмбрионов и инактивацией. До 3,5 дней эмбрионального развития у самок активны обе X-хромосомы, затем происходит инактивация одной из них, причем в трофэктодерме и ее производных у мышей наблюдается избирательная инактивация отцовских X-хромосом [30]. Следовательно, на протяжении нескольких циклов репликации отцовская X-хромосома как бы помнит о своем происхождении. Инактивация X-хромосом во ВКМ

заканчивается к 5,5 сут и там она случайна. Инактивация X-хромосом сопровождается их усиленным метилированием. CpG-участки генов на инактивированных X-хромосомах полностью метилированы и не метилированы — на активных. У человека инактивация X-хромосом случайна, а у сумчатых инактивируются только отцовские X-хромосомы [4]. Механизмы различной инактивации родительских X-хромосом в эмбриогенезе неясны. Сейчас предложено более десятка теорий, объясняющих инактивацию X-хромосом, и среди них теория различного метилирования X-хромосом, а вследствие этого — различной степени их конденсации [31]. Инактивация наступает независимо от того, что в клетках присутствуют все транскрипционные факторы. По-видимому, сигнал для инактивации X-хромосом должен поступать с аутосом, поскольку у зародышевой X<sup>0</sup> X-хромосома остается активной, а у зародышевой X<sup>m</sup>X<sup>mO</sup> одна из материнских X-хромосом инактивируется [32]. Предполагают, что геном, воспринимающим такой сигнал с аутосом, является ген XIST, который активен только на инактивированной X-хромосоме. Однако начало экспрессии этого гена обнаруживают только на восьмой день эмбриогенеза, в то время как инактивация наступает на четвертый [33]. Кроме того, потеря района XIC (центра инактивации) вместе с геном XIST инактивированной X-хромосомы человека в гибридных соматических клетках человек — мышь не привела к активации X-хромосом даже после воздействия 5-Az. Очевидно, по крайней мере, в соматических клетках для поддержания инактивации X-хромосом не требуется центра инактивации XIC вместе с геном XIST [34]. Однако для подтверждения этого мнения необходимо проследить за становлением инактивации X-хромосом с делецией в гене XIST в онтогенезе. Неслучайная инактивация X-хромосом в эмбриогенезе, ее связь с метилированием дали уникальную возможность изучить экспрессию генов на активной и инактивированной X-хромосомах. CpG-сайты 5'-промоторных районов генов инактивированных X-хромосом оказались более метилированными по сравнению с таковыми активных X-хромосом. Но на инактивированных X-хромосомах имеется ряд генов, остающихся активными, — STS, ZFX, ZFY, UBE1, RPS4X, MIC2, XIST, исследование которых позволило понять, почему особи XO человека (синдром Шерешевского — Тернера) обладают пониженной жизнеспособностью, в то время как самки XO мышей жизнеспособны и плодовиты. У человека гены ZFX, ZFY транскрибируются с обеих хромосом, и отсутствие одной из них приводит к снижению нормы дозы генов. У мышей ген Zfv экспрессируется только с отцовской хромосомы, и если она инактивирована, то особи X<sup>mO</sup>, X<sup>m</sup>X<sup>Y</sup> имеют одинаковое количество продукта [35]. Исследование метилирования промоторной части гена Pgf1 обнаружило, что из 61 CpG-сайтов 60 метилированы на обеих нитях инактивированных X-хромосом и ни один из них не метилирован на активных X-хромосомах. Кроме того, промотор гена Pgf1 инактивированных X-хромосом «упакован» вокруг нуклеосом, а на активных оставался свободным и доступным для транскрипционных факторов [36]. Воздействие 5-Az приводит к различному деметилированию CpG-сайтов промоторных районов Pgf1-генов. Это свидетельствует о том, что CpG-участки являются автономными по отношению к метилированию [37]. Для активной экспрессии гена Pgf1 необходимо деметилирование не только промоторного участка, но и района, лежащего перед промотором. Деметилирование только промоторного района не приводило к экспрессии гена, и у таких клонов вскоре наблюдали метилирование *de novo*. Отмечено, что метилирование X-хромосом появляется после их инактивации, а индукция инактивации X-хромосом в культуре эмбриональных стволовых клеток не всегда сопровождается метилированием [38, 39]. Все эти данные свидетельствуют о том, что метилирование, по-видимому, является вторичным механизмом, необходимым для быстрого и точного включения и выключения генов и фиксации процессов, которые уже произошли. Таким образом, X-хромосомы в эмбрио-

генезе подвержены импринтингу, т. е. модификации, приводящей к инактивации одного из родительских аллелей, или, как в случае X-хромосом, целой хромосомы. Импринтинг в онтогенезе млекопитающих характерен и для аутосом, их сегментов и отдельных генов.

Понятие импринтинг, введенное Лоренцем в 1930 г. для объяснения поведенческих реакций животных, затем использованное Краузе в 1960 г. для обоснования избирательной элиминации отцовских хромосом у *Sciara*, а также Купером в 1971 и Лайон и Рэстэном в 1984 г. — для феномена избирательной инактивации отцовских X-хромосом, претерпело серьезные изменения. Под хромосомным импринтингом понимают различные структурно-молекулярные изменения хромосом, происходящие во время онтогенеза и приводящие к различиям в экспрессии гомологичных генов в зависимости от того, с каким родительским аллелем они передаются [40]. Изменение дозы генетического материала одного из родителей может вызвать серьезные нарушения в развитии потомков в одних случаях и не отразиться на развитии — в других. Так, нормальное развитие мышей отмечают при наличии двойной дозы от отца 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 15-й хромосом. В то же время удвоенная дистальная часть 7-й хромосомы или проксимальной части 11-й в мужских гаметах ведет к нарушениям в развитии особей. В первом случае отмечают гибель зародышей в перинатальном периоде, тогда как во втором — поворожденные значительно крупнее нормальных [41]. Иначе влияет удвоение дозы генетического материала, получаемого потомком с ооцитом. Полноценное развитие потомства происходит при удвоенной дозе материнских 1, 4, 5, 9, 13, 14, 15-й хромосом и нарушается, если они получают с яйцеклеткой двойную дозу хромосом 2, 6, 7, 8, 11, 17-й. Дупликация проксимальной части 11-й хромосомы приводила к двукратному уменьшению размеров потомков. Следовательно, хромосомы 2, 6, 7, 8, 11, 17-я, так же как и X-хромосомы, подвержены импринтингу, причем моносомия по 2, 7, 17-й хромосомам сказывается на развитии особей раньше, чем даже их гаплоидия, при этом утрата материнской 17-й хромосомы проявляется быстрее отцовской. Таким образом, влияние дозы гена и, по-видимому, трансдействующих сигналов с хромосом различного родительского происхождения очень важны в развитии потомков. Различают четыре типа генов, отличающихся по их способности активации в зиготе:

группа С — гены домашнего обеспечения, не зависящие от родительского происхождения: гены хромосом 1, 4, 5, 9, 13, 14, 15-й;

группа G — гены регуляторного типа, способные нормально включаться и функционировать, если унаследованы через ооцит: гены 2, 6, 7, 8, 11, 17-й хромосом;

группа W — гены регуляторного типа, контролирующие развитие при передаче их через отцовский аллель и ответственные за развитие плаценты, гены 7-й хромосомы;

группа Z — активация возможна при наличии обоих родительских гомологов: хромосомы 2, 5, 17-я [40].

Создание трансгенных животных и исследование экспрессии трансгенов в онтогенезе животных обнаружили связь между родительской принадлежностью трансгена, материнским генотипом и метилированием. Так, передача трансгена *Adp* сопровождалась четким импринтингом. Потомки самок, несущих этот трансген, были нормальными в развитии, а потомки, получившие трансген от отца, имели нарушения в развитии конечностей, причем только у потомков с нарушениями наблюдалась экспрессия трансгена [42]. Трансген тропонина 1 379, передаваясь через отца, обуславливал два разных фенотипа при развитии потомков у самок линий C57Bl и DBA. ДНК трансгена зародышей при передаче через отца самками мышей линии C57Bl была всегда высокометилированной, а у самок DBA — слабометилированной. Эффект проявлялся уже на 11-й день развития. Очевидно, что метилирование трансгена вызвано модифицирующим влиянием материнских факторов. Передача трансгена от матери не зависела от модифицирующего влия-

яния ее собственного генотипа. Если материнский трансген в следующем поколении передавался снова через отца, то вновь наблюдалось его метилирование [43]. По-видимому, геномный импринтинг является формой регуляции, позволяющей осуществлять контроль экспрессии генов на другом уровне, отличающемся от такового самого гена. Проявление импринтинга некоторыми трансгенами может быть связано со встройкой их в районы хромосом, подверженных импринтингу. Рейк с соавт. [44] показали, что встройка трансгена OXI-5, подверженного импринтингу, произошла в 7-ю хромосому, относящуюся к группе W. Авторы показали, что метилирование самого трансгена при встройке не изменилось, однако произошло изменение метилирования в области, прилегающей к трансгену. На проявление экспрессии OXI-5 помимо аллельного импринта накладывался линейный импринт матери. Чтобы выяснить, чем обусловлен импринтинг, связанный с линейной принадлежностью матери, был исследован SPARC — эндогенный локус 11-й хромосомы самок линий BALB и DBA. Оказалось, что участки *MspI* двух экзонов SPARC отличались по метилированию, кроме того, аллель этого локуса у линии BALB был короче, чем у линии DBA, из-за делеции в 9-м интроне. Отличия в метилировании локуса SPARC были в скрещиваниях BALB×DBA и DBA×BALB, но отсутствовали у исходных линий [44]. Следовательно, имеется модифицирующий(е) фактор(ы), действующий на гетерозиготный организм, который может быть следствием кроссинговера, поскольку известно, что хромосомы самок и самцов значительно отличаются по величине областей, подверженных кроссинговеру [45].

Итак, импринтинг — это процесс, позволяющий организмам изменять фенотип от одного поколения к следующему, не прибегая к мутационным изменениям ДНК, являясь временным изменением функции части ДНК и имеющий молекулярную основу. Механизм импринтинга, по Холлу, должен удовлетворять следующим условиям:

- а) уничтожению или стиранию предыдущего импринта;
- б) новой модификации хромосом материнского и отцовского геномов;
- в) различиям в тканеспецифической экспрессии новых родительских импринтов у потомков [46].

Метилирование ДНК отвечает всем этим требованиям, поскольку CpG-участки могут сохранять сайты метилирования в течение ряда репликаций ДНК, деметилироваться и метилироваться *de novo*.

Новые модификации могут возникать во время мейоза, созревания гамет, а также после оплодотворения. Импринтинг, по мнению Холла, является эволюционно приобретенным признаком в результате перехода к внутриутробному развитию и плацентации, где роль родительских геномов в воспроизводстве должна быть разной. Если отцовский геном необходим для плацентации и активного развития плаценты, о чем свидетельствуют данные по развитию андрогенетических особей, а также зародышей  $2n^{p1n^m}$ , имеющих более сильно развитую плаценту, то материнский геном должен обеспечивать толерантность по отношению к отцовскому геному, подавление (ограничение) роста плаценты и оптимизацию темпов роста потомков, способствующие их выживанию. Вероятно, именно поэтому передача трансгенов матерью часто приводит к их инактивации через метилирование.

Импринтинг, осуществляя дозовую регуляцию экспрессии генов, особенно важен в критические моменты развития организмов, когда необходимо, например, вызвать быстрый рост или его подавление. Предполагают, что он способствует также репродуктивной изоляции генов, предотвращая их переход в близкородственные виды [47]. Кроме млекопитающих, импринтинг и сопутствующее ему метилирование отмечены у цветковых растений.

Молекулярные основы импринтинга генов изучены очень мало, поскольку исследование генов, подверженных импринтингу, только началось. В настоящее время у млекопитающих обнаружены восемь имприн-

тирующих генов, три из которых экспрессируются в раннем онтогенезе и активно исследуются [48].

Два близкосвязанных гена *Igf2* и *H19* расположены на 7-й хромосоме и экспрессируются с противоположных аллелей: *Igf2* — с отцовского, а *H19* — с материнского. Третий ген *Igf2r* — рецептор инсулиноподобного фактора роста — находится на 17-й хромосоме и функционально инактивирован при наследовании от отца. Недавно дистальный этот ген обнаружен еще один ген *Mas*, проявляющий материнский импринтинг. Гены *Igf2* и *Igf2r* начинают транскрибироваться до имплантации, а гены *H19* и *Mas* — после нее.

Картирование этих генов, знание их структуры и функций, времени включения их в онтогенезе и участков метилирования дали надежду на возможность локализации структурных элементов, ответственных за импринтинг. Участки метилирования родительских аллелей этих генов менялись в онтогенезе. Это свидетельствует о том, что для разных стадий развития имеется свой характерный импринт. Для гена *Igf2r* выявлены два участка, отличающихся по метилированию родительских аллелей. Один сайт находится в районе начала транскрипции и метилирован только на отцовском (неактивном) аллеле, другой, расположенный в интроне, метилирован только на активном материнском аллеле. Метилирование первого участка наступает после оплодотворения, в то время как метилирование второго передается ооцитом. Именно второй участок, как предполагают, является ответственным за импринтинг, вызывая либо усиление экспрессии, либо предотвращение инактивации этого аллеля, тогда как отцовский аллель приводит к инактивации. Родительские аллели генов *Igf2* и *H19* не отличались по метилированию, однако районы перед этими генами имели разное метилирование у родительских хромосом [49]. Установлено, что импринтинг указанных генов влияет не только на их экспрессию, но и репликацию. Отцовские аллели генов, подверженных импринтингу, реплицируются раньше материнских [50].

Важность метилирования в импринтинге этих генов была доказана экспериментами Ли с сотр., которые обнаружили изменения импринтов при нарушении гена метилтрансферазы [51]. Возникшее при этом деметилирование генов *Igf2*, *Igf2r* и *H19* приводило к активации ранее «молчащего» на этой стадии гена *H19* и репрессии двух других генов. Выяснилось, что ген *H19* является супрессором гена *Igf2*, и активация первого вызывала репрессию второго. В отношении репрессии гена *Igf2r* авторы предположили, что, возможно, белок-репрессор связывается с этим геном, когда тот находится в неметилированном состоянии. Выключение материнского аллеля гена *Igf2r* требовало более сильного повреждения гена метилтрансферазы, свидетельствуя о том, что разные уровни метилирования необходимы для подавления экспрессии разных генов. У андро- и гиногенетических зародышей наблюдают экспрессию обоих генов *Igf2* и *H19*, т. е. отсутствие импринтинга. По-видимому, импринтинг и экспрессия генов осуществляются независимо друг от друга и первый необходим для регуляции экспрессии генов на разных стадиях онтогенеза [52]. Весьма возможно, что имеются стадие- и тканеспецифические факторы, узнающие импринт. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что импринтинг гена *Igf2* отсутствует в двух оболочках головного мозга (*leptomengus* и *choroid plexus*) [53], а протоонкоген *Mas*, обнаруживающий материнский импринтинг во всех исследованных тканях 11—12 дней эмбрионального развития, уже после 13,5 дней развития ограничивает свою импринтированную экспрессию сердцем и висцеральным желточным мешком. На первый день после рождения экспрессия с отцовского аллеля *Mas* наблюдается в клетках языка, скелетной мускулатуры и сердца, тогда как в клетках мозга, почек, селезенки экспрессия идет с обоих аллелей. Интересно, что в случае экспрессии с обоих аллелей отмечают различные уровни родительской мРНК. Это служит доказательством того, что некоторые элементы импринтинга все-таки оста-

ются [54]. Следовательно, метилирование является только одним из механизмов становления импринтинга.

Изучение метилирования в онтогенезе, установление сайтов, ответственных за импринтинг, важны для понимания определяющих его молекулярных механизмов, однако становление импринтинга, несомненно, является сложным процессом, в котором участвует несколько контролирующих механизмов. Поэтому необходимы комплексные подходы к изучению дифференцировки и импринтинга и, по-видимому, следует обратить внимание на модификаторы, изменяющие уровни экспрессии генов. Во всяком случае, сохранение после раунда репликации ДНК первоначально установленного паттерна метилирования реметилированных CpG-динуклеотидов обеспечивает его наследование. Так, инактивация или активация сайта связывания транскрипционного фактора в результате изменений в уровне метилирования могут привести к изменению степени связывания фактора и, следовательно, к транскрипционной активности генов.

*Л. М. Морозова*

## МЕТИЛЮВАННЯ І ІМПРИНТИНГ В ЕМБРІОГЕНЕЗІ ССАВЦІВ

### Резюме

Обговорюється участь метилування ДНК у процесах імпринтингу і диференціювання зародків ранніх стадій онтогенезу.

*Ludmila Morozova*

## METHYLATION AND IMPRINTING IN MAMMALIAN EMBRYOGENESIS

### Summary

The author discusses the role of DNA methylation in the processes of imprinting and differentiation in embryos of early ontogenesis stages.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Doerfler W. DNA methylation and gene activity // *Annu. Rev. Biochem.*— 1983.— 52, N 1.— P. 93—124.
2. Ehrlich M., Ehrlich K. C. Effect of DNA methylation on the binding of vertebrate and plant proteins to DNA // *DNA methylation: Mol. biol. and biol. significanes.*— Basel: Birkhauser, 1993.— 572 p.
3. Doerfler W. Patterns of DNA methylation in the mammalian genome // *Biol. Chem. Hoppe.*— 1990.— 371, N 6.— P. 455—463.
4. Lyon M. F. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation // *Annu. Rev. Genet.*— 1992.— 26, N 1.— P. 17—28.
5. Shemer R., Walsh A., Eisenberg Sh. et al. Tissue-specific methylation patterns and expression of the human apolipoprotein A 1 gene // *J. Biol. Chem.*— 1990.— 265, N 2.— P. 1010—1015.
6. Ходосова И. А. О роли ферментативного метилирования ДНК в дифференцировке клеток и канцерогенезе // *Цитология.*— 1985.— 27, № 3.— С. 259—268.
7. Мазин А. А. Геном теряет весь 5-метилцитозин в течение жизни. Как это связано с накоплением мутаций при старении? // *Молекуляр. биология.*— 1993.— 27, № 1.— С. 160—173.
8. Мазин А. А., Ванюшин Б. Ф. Потери динуклеотидов CpG из ДНК. IV. Метилирование и дивергенция генов и псевдогенов низкомолекулярных ядерных РНК // *Там же.*— 1987.— 21, № 4.— С. 1099—1109.
9. Surrani M. A., Allen N. D., Barton S. C. et al. Development consequences of imprinting of parental chromosomes by DNA methylation // *Phil. Trans. R. Soc.*— 1990.— 326, N 1235.— P. 313—327.
10. Doerfler W. DNA methylation — a regulatory signal in eukaryotic gene expression // *J. Gen. Virol.*— 1981.— 57, pt. 1.— P. 1—20.
11. Washwal Ch., Janguly P., Chandra H. S. Estimation of the amount of 5'-methylcytosine in *Drosophila melanogaster* DNA amplified ELISA and photoacoustic spectroscopy // *EMBO J.*— 1984.— 3, N 2.— P. 263—266.
12. Taylor S. M., Jones P. A. Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. Use of 5'-azacytosine-containing DNA // *J. Mol. Biol.*— 1982.— 162, N 3.— P. 679—692.



13. Дыбан А. П., Сорокин А. В. Сопоставление отцовских и материнских гомологичных хромосом во время первых двух делений дроблений // *Онтогенез*.—1983.—14, № 3.— С. 238—241.
14. Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggest imprinting of the genome during gametogenesis // *Nature*.—1984.—308, N 5959.—P. 548—550.
15. McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes // *Cell*.—1984.—33, N 2.—P. 179—183.
16. Kaufman M. H. Early mammalian development partenogenetic studies.—London: Cambridge Univ. press., 1983.—259 p.
17. Hagemann J. J., Ferst N. L. Embryonic cytoplasmic extracts rescue murine androgenones to the blastocyst stage // *Development*.—1992.—114, N 4.—P. 997—1001.
18. Fundele R. H., Norris M. L., Barton S. C. et al. Temporal and spatial selection against partenogenetic cells during development of fetal chimeras // *Ibid*.—1990.—108, N 1.—P. 203—211.
19. Surani M. A. H., Barton S. C., Norris M. L. Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos: an analysis of mammalian development // *Biol. Reprod*.—1987.—36, N 1.—P. 1—16.
20. Monk M., Boubelic M., Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development // *Development*.—1987.—99, N 1.—P. 371—382.
21. Ward C., Bolden A., Nalin C. M., Weissbach A. In vitro methylation of the 5'-flanking region of the mouse  $\beta$ -globin gene // *J. Biol. Chem*.—1987.—262, N 11.—P. 11057—11063.
22. Kafri T., Ariel M., Brandeis M. et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line // *Genes and Develop*.—1992.—6, N 5.—P. 705—715.
23. Ariel M., Ceder H., McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis specific genes include reprogramming to the epididymis // *Nature Genetics*.—1994.—7, N 1.—P. 59—63.
24. Пенков Л. И., Платонов Е. С. Влияние 5-азациитидина на экспрессию гена глюкозофосфатизомеразы у зародышей мышей доимплантационных стадий развития // *Всесоюз. совещ. «Генетика развития»*: Тез. докл.—Ташкент, 1990.—Т. 1, ч. 2.—С. 250—262.
25. Holliday R. DNA methylation and epigenetic mechanisms // *Cell Biophys*.—1989.—15, N 1—2.—P. 15—20.
26. Boyes J., Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein // *Cell*.—1991.—64, N 6.—P. 1123—1134.
27. Aranda-Anzaldo A. On the regulation of DNA methylation by higher-order structure in the cell nucleus // *Medical Hypotheses*.—1991.—34, N 1.—P. 81—87.
28. Szyf M. DNA methylation patterns: an additional level of information? // *Biochem. Cell Biol*.—1991.—69, N 8.—P. 764—767.
29. Riggs A. D. DNA methylation and cell memory // *Cell. Biophys*.—1989.—15, N 1—2.—P. 1—13.
30. Grant S. G., Chapman V. H. Mechanisms of X-chromosome regulation // *Annu. Rev. Genet*.—1988.—22, N 2.—P. 199—233.
31. Нестерова Т. Б., Закиян С. М. Инактивация X-хромосомы у млекопитающих // *Генетика*.—1994.—30, № 3.—С. 293—317.
32. Lyon M. F. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression // *Progr. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol*.—1989.—36, N 2.—P. 119—130.
33. Kay G. F., Penny G. D., Patei D. et al. Expression of *Xist* during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation // *Cell*.—1993.—72, N 2.—P. 171—182.
34. Brown C. J., Willard H. F. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation // *Nature*.—1994.—368, N 6467.—P. 154—156.
35. Ashworth A., Rastan S., Lovel-Badge R., Kay G. X-chromosome inactivation may explain the difference in viability of XO humans and mice // *Ibid*.—1991.—356, N 6325.—P. 406—408.
36. Riggs A. D., Pfeifer G. P. X-chromosome inactivation and cell memory // *TIG*.—1988.—8, N 5.—P. 169—174.
37. Hansen R. S., Gartler S. M. 5-azacytidine-induced reactivation of the human X-chromosome-linked PGK-1 gene is associated with a large region of cytosine demethylation in the 5' CpG island // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1990.—87, N 11.—P. 4174—4178.
38. Lock L. F., Takagi N., Martin G. R. Methylation of the *Hprt* gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation // *Cell*.—1987.—48, N 1.—P. 39—46.
39. Bartlett M. H., Adra C. D. N., Park J. et al. DNA methylation of two X chromosome genes in female somatic and embryonal carcinoma cells // *Somat. Cell. Mol. Genet*.—1991.—17, N 1.—P. 35—47.
40. Баранов В. С. Хромосомный импринтинг и хромосомные взаимодействия в раннем развитии млекопитающих // *Успехи соврем. биологии*.—1988.—105, № 3.—P. 393—405.
41. Cattanach B. M. Parental origin effects in mice // *J. Embryol. Exp. Morph*.—1985.—97, Suppl.—P. 137—150.

42. DeLoia J., Solter D. A transgene insertional mutation at an imprinted locus in the mouse genome // *Development*.—1990.—Suppl.—P. 73—79.
43. Sapienza C., Paquette J., Tran T. H., Peterson A. Epigenetic and genetic factors affect transgene methylation imprinting // *Ibid.*—1989.—107, N 2.—P. 165—168.
44. Reik W., Howlett S. K., Surani A. Imprinting by DNA methylation: from transgenes to endogenous gene sequences // *Ibid.*—1990.—Suppl.—P. 99—106.
45. Tomas B. J., Rothstein R. Sex, maps and imprinting // *Cell*.—1991.—61, N 1.—P. 1—3.
46. Hall J. G. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases // *Amer. J. Hum. Genet.*—1990.—46, N 5.—P. 857—873.
47. Forejt J., Gregorova S. Genetic analysis of genomic imprinting: an imprintor-1 gene controls inactivation of the paternal copy of the mouse *Tme* locus // *Cell*.—1992.—70, N 3.—P. 443—450.
48. Bartolomei M. S. The search for imprinted genes // *Nature genet.*—1994.—6, N 3.—P. 220—221.
49. Stoger R., Kubicka P., Liu C. G. et al. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf 2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal // *Cell*.—1993.—73, N 1.—P. 61—71.
50. Kitzberg D., Selig S., Brandeis M. et al. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions // *Nature*.—1993.—364, N 6436.—P. 459—463.
51. Li E., Beard C., Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting // *Ibid.*—1993.—360, N 6453.—P. 362—365.
52. Latham K. E., Doherty A. S., Scott C. D., Schultz R. M. *Igf 2r* and *Igf 2* gene expression in androgenetic, gynogenetic, and partenogenetic preimplantation mouse embryos: absence of regulation by genomic imprinting // *Genes and Develop.*—1994.—8, N 3.—P. 290—299.
53. DeChiara T. M., Robertson E. J., Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor 2 gene // *Cell*.—1991.—64, N 3.—P. 844—859.
54. Villar A. J., Pedersen R. A. Parental imprinting of the *Mas* protooncogene in mouse // *Nature Genet.*—1994.—8, N 4.—P. 373—379.

Ин-т молекуляр, биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

Получено 21.03.95