

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЕФИМОВА

Ольга Алексеевна

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
СЕКМЕНТОВ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА

Специальность: 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук и в Санкт-Петербургском государственном университете

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Кузнецова Татьяна Владимировна,
в.н.с. ФГБУ НИИ акушерства и гинекологии им.
Д.О.Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Родионов Александр Викентьевич,
заведующий лабораторией биосистематики и цитологии
ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,
Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор
Паткин Евгений Львович,
заведующий лабораторией молекулярной цитогенетики
развития млекопитающих ФГБУ НИИ
экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-
Петербург

Ведущая организация: ГНУ ВНИИ генетики и разведения
сельскохозяйственных животных Россельхозакадемии

Защита состоится « _____ » _____ 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.12 при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и селекции, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета

Автореферат разослан « _____ » _____ 2012 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.232.12

доктор биологических наук

Мамон Людмила Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вопрос о принципах и механизмах, лежащих в основе дифференциальной экспрессии генов в индивидуальном развитии человека, представляется крайне актуальным на сегодняшний день. Остается до конца неясным, как в условиях идентичности наследственного аппарата, при одинаковом наборе генов во всех клетках, возникает многообразие клеток и тканей.

Важнейшим условием корректной реализации наследственной информации на разных этапах онтогенеза является дифференциальная активность генов, которая определяется составом и структурой хроматина. Профили экспрессии генов устанавливаются и поддерживаются за счет наследуемых эпигенетических модификаций хроматина. К эпигенетическим модификациям хроматина относят метилирование цитозина ДНК и посттрансляционные модификации гистоновых белков. Под метилированием ДНК понимают обратимую ферментативную реакцию, в результате которой происходит присоединение метильной группы к 5' положению остатков цитозина в динуклеотиде 5'-CpG-3' (Ванюшин, 2006; Senner, 2011). Модификации аминокислотных остатков гистоновых белков, к числу которых относят ацетилирование, метилирование, убиквитинирование и фосфорилирование происходят, в основном, в N-терминальных участках, которые расположены за пределами компактного октамера и могут подвергаться действию различных клеточных сигналов. В результате метилирования ДНК и модификаций гистонов устанавливается специфичный структурно-функциональный статус хроматина и осуществляется эпигенетическая регуляция транскрипционной активности, специфичная для разных типов клеток и/или этапов онтогенеза (Dhall, Chatterjee, 2011). Таким образом, клетки с идентичным геномом и разными фенотипами характеризуются разными эпигеномами.

Актуальным представляется вопрос, когда устанавливаются, как изменяются и каким образом поддерживаются в хроматине схемы расположения эпигенетических маркеров, специфичные для различных тканей и разных стадий развития. Определенная информация на эту тему получена на модельных объектах (Miyanagi et al., 2010; Zhao et al., 2010; Smallwood et al., 2011). В период доимплантационного развития происходит интенсивная эпигенетическая реорганизация генома, изменяются профили метилирования ДНК, унаследованные из родительских гамет – высокоспециализированных клеток, – и устанавливается собственно эмбриональный рисунок метилирования ДНК, направляющий дифференцировку бластомеров во все многообразие типов клеток и тканей организма (Feng et al., 2010). Нарушения этого процесса могут приводить к сбою программы онтогенеза, формированию aberrантных профилей экспрессии генов, и, как следствие, тяжелым патологиям или остановке развития (Naaf, 2006). Таким образом, информация о динамике эпигенетических изменений родительских геномов имеет как фундаментальную, так и практическую значимость. Следует, однако, учитывать, что многие ключевые процессы эмбриогенеза, включая оплодотворение, первые деления дробления, время активации генома и эпигенетическое репрограммирование, являются видоспецифичными (Beaujean et al., 2004; Shi et al., 2004; Hou et al., 2005; Fulka et al., 2006), что не позволяет экстраполировать все данные, полученные на модельных объектах, на человека.

Уникальная возможность изучения доимплантационного развития человека, в том числе выявление причин его нарушений, появилась с разработкой и внедрением в медицинскую практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Однако, исследования динамики эпигенетических изменений в эмбриональном развитии человека остаются ограниченными по ряду причин, связанных, прежде всего, с труднодоступностью материала и этическими факторами, вплоть до полного запрета в некоторых странах проведения исследований на эмбрионах человека. Не освещенным остается вопрос о том, каким образом происходит репрограммирование родительских геномов при первых делениях дробления эмбрионов человека. Данные о динамических и тканеспецифических изменениях эпигенома при дифференцировке клеток в постимплантационном развитии человека также остаются неполными. Большинство исследований модификаций гистонов и метилирования ДНК сфокусированы на описании эпигенетических изменений отдельных локусов, и лишь небольшая часть работ посвящена оценке эпигенетического статуса всего генома. Следует подчеркнуть, что наиболее часто изучение модификаций гистонов и метилирования ДНК проводят на интерфазных ядрах (Fulka et al., 2004; Beaujean et al., 2004; Xu et

al., 2005; Skalníková et al., 2007). Ограничение таких исследований состоит в невозможности определения времени стирания/установления эпигенетических маркеров в отдельных локусах. Между тем, участки генома неоднородны по структуре и имеют разное функциональное значение. Оценить набор эпигенетических маркеров как всего генома в целом, так и его отдельных участков позволяет выявление метилированной ДНК и модифицированных гистонов на метафазных хромосомах.

Для изучения метилирования ДНК метафазных хромосом разработаны подходы, позволяющие прямо или косвенно определить характер распределения метилированных остатков цитозина. К таким подходам относятся обработка митотических хромосом метилчувствительными эндонуклеазами рестрикции, ник-трансляция *in situ* с предварительной обработкой метилспецифичными рестриктазами (Adolph, Hameister, 1990), PRINS и SPRINS (Andersen et al., 1998). Наиболее перспективным является метод иммуноцитохимической детекции 5-метилцитозина с помощью высокоспецифичных моноклональных антител. Метод иммуноцитохимического окрашивания применяют также для детекции модифицированных гистонов. Использование антител позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты. Отмечают, что использование иммуноцитохимического подхода для оценки эпигенетического статуса генома особенно целесообразно при работе с отдельными клетками, в том числе с бластомерами ранних зародышей (Santos, Dean, 2006).

Наибольший интерес для изучения эпигенома человека представляют бластомеры ранних зародышей, клетки из эмбриональных и экстраэмбриональных тканей на разных стадиях эмбриогенеза человека и мезенхимные стволовые клетки в сравнительном аспекте с клетками в терминальной стадии дифференцировки. На их примере можно проследить динамику изменений и установить вклад эпигенетических модификаций в репрограммирование генома в эмбриогенезе.

Целью настоящего исследования было:

Охарактеризовать распределение метилированной ДНК и ацетилизованного гистона H3 на метафазных хромосомах в клетках различных тканей человека в пре- и постнатальный период развития.

Задачи:

- 1) Локализовать участки, обогащенные 5-метилцитозином, на дифференциально окрашенных метафазных хромосомах из разных тканей на эмбриональной и постнатальной стадиях онтогенеза человека.
- 2) Сопоставить на метафазных хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов человека рисунок распределения ацетилизованного гистона H3 с QFN-исчерченностью и рисунком распределения 5-метилцитозинобогащенной ДНК
- 3) Изучить характер метилирования ДНК метафазных хромосом в бластомерах дробящихся зародышей человека.
- 4) Охарактеризовать тканеспецифические особенности метилирования ДНК метафазных хромосом из лимфоцитов, мезенхимных стволовых клеток, цитотрофобласта хориона, эмбриональных печени и легкого человека.
- 5) Провести анализ распределения 5-метилцитозина вдоль плеч хромосом X в лимфоцитах и цитотрофобласте хориона при нормальном и aberrантном кариотипе.
- 6) Оценить и провести сравнительный анализ статуса метилирования блоков прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в клетках из разных тканей на доимплантационной, эмбриональной и постнатальной стадиях онтогенеза человека.

Научная новизна. Впервые проведен иммуноцитохимический анализ метилирования ДНК метафазных хромосом из мезенхимных стволовых клеток, эмбриональных и экстраэмбриональных тканей в сравнительном аспекте с лимфоцитами взрослых индивидов человека. Выявлено сегментспецифичное распределение метилированных участков вдоль плеч хромосом, повторяющееся в клетках из разных тканей, определенное нами, как MeC-сегментация. Впервые описана динамика изменений характера метилирования ДНК метафазных хромосом доимплантационных зародышей человека. Впервые проведено сравнительное иммуноцитохимическое исследование особенностей распределения ацетилизованного гистона H3

на метафазных хромосомах лимфоцитов взрослых и плодов человека. Продемонстрированы ткане- и стадийноспецифические особенности метилирования ДНК и ацетилирования гистона H3 метафазных хромосом человека.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы вносят вклад в освещение принципов эпигенетической регуляции организации и работы генома в онтогенезе человека. Описанная в работе динамика изменений метилирования ДНК метафазных хромосом в доимплантационном, эмбриональном и постнатальном развитии человека позволяет приблизиться к пониманию вклада эпигенетических модификаций в репрограммирование как всего генома, так и его отдельных локусов.

Полученные результаты могут служить основой при разработке и совершенствовании методов оценки функционального состояния генома. Выявление отклонений в характере эпигенетического модифицирования генома может быть информативным при использовании ВРТ, проведении пренатальной диагностики, а также при оценке негативного влияния внешних факторов на работу генома.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Распределение 5-метилцитозинобогащенной ДНК в метафазных хромосомах человека, выявляемое иммуноцитохимическим методом, представляет собой особый тип рисунка линейной дифференцированности хромосом – MeC-сегментацию.
- 2) Степень обогащения отдельных сегментов метафазных хромосом человека метилированной ДНК и/или ацетилированным гистоном H3 тканеспецифична и зависит от срока развития.
- 3) Хромосомы обоих родительских геномов в доимплантационном развитии человека со стадии зиготы до стадии бластоцисты подвергаются градуальному деметилированию, проходя стадию гемиметилирования на стадии 2-х клеток.
- 4) Установление сегментной специфичности распределения 5-метилцитозинобогащенной ДНК на метафазных хромосомах происходит в доимплантационном развитии человека на стадиях 8-ми клеток – бластоцисты.

Апробация работы. Представленные в диссертации результаты были доложены на Европейской конференции по генетике человека (European Human Genetics Conference) в 2005, 2007, 2008 г., Международной конференции «Генетика в России и мире» в 2006 г., Британской конференции по генетике человека (British Human Genetics Conference) в 2006 г., Европейской конференции по эпигенетике (Epigenetics Europe) в 2010 г. и Европейской конференции по цитогенетике (European Cytogenetics Conference) в 2009 и 2011 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 38 работ (10 статей, 28 тезисов конференций), в том числе 7 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы (322 источника). Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 29 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили препараты метафазных хромосом, полученные из:

- лимфоцитов периферической крови 20 взрослых индивидов человека, направленных на кариотипирование в НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН;
- лимфоцитов пуповинной крови 15 плодов человека 20-24 недель развития, полученной путем кордоцентеза с целью проведения пренатальной диагностики в НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН;
- эмбриональных печени и легкого 4 эмбрионов человека, полученных в результате искусственного прерывания беременности по желанию пациенток на сроке 5-8 недель в НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН;
- 20 образцов хориона, полученных методами хорион- или плацентобиопсии на сроке беременности 9-20 недель с целью пренатального кариотипирования, при прерывании беременности по желанию пациенток на сроке 5-12 недель и при прерывании неразвивающейся беременности на сроке 5-8 недель в НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН;
- культур мезенхимных стволовых клеток 3-5 пассажа, любезно предоставленных ООО «Транстехнологии». МСК выделяли из эксплантов костного мозга грудины 5 взрослых индивидов

человека; фенотипирование и культивирование проводили по описанной ранее методике (Шальгина и др., 2009; Grigorian et al., 2010).

- бластомеров 78 доимплантационных триплоидных и морфологически аномальных диплоидных зародышей человека различных стадий развития – от зиготы до бластоцисты, полученных в результате экстракорпорального оплодотворения в Международном центре репродуктивной медицины и в отделении вспомогательных репродуктивных технологий НИИ АГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН.

Культивирование лимфоцитов периферической и пуповинной крови проводили по стандартной методике с собственными модификациями (Кузнецова и др., 1999). Препараты метафазных хромосом из хориона и эмбриональных органов готовили «прямым» методом без предварительного культивирования по стандартной методике с собственными модификациями (Чиряева и др., 2012). Препараты метафазных хромосом из бластомеров доимплантационных зародышей готовили, согласно описанной ранее методике (Dyban et al., 1993), с собственными модификациями (Баранов и др., 2005; Pendina et al., 2011). Детекцию 5-метилцитозина (5-MeC) и ацетилированного гистона H3 (AcH3K9) на препаратах проводили с помощью специфических антител и FITC/Су3-конъюгированных вторых антител при уровне разрешения ~400 и ~300 сегментов, соответственно (ISCN, 2009). Детекцию 5-MeC проводили на зафиксированных уксусно-спиртовым фиксатором (1:3) и QFН/АсD-окрашенных метафазных хромосомах. Детекцию AcH3K9 проводили на зафиксированных 2% спиртовым раствором уксусной кислоты фрагментах метафазных пластинок, содержащих 5-15 хорошо идентифицируемых хромосом, не налегающих друг на друга. Для идентификации хромосом применяли АТ-специфичный краситель DAPI.

Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа *LEICA DM LS*, оборудованного объективами FLUOTAR 20x/0,40 и 100x/1,30-0,60, автоматической фотонасадкой, цветной камерой Leica DFC 320, блоком светофильтров. Для получения фотоизображения использовали программное обеспечение Leica DFC Twain. Распределение и интенсивность флуоресцентного сигнала оценивали визуально и с помощью программного обеспечения Image J 1.34s.

Для визуальной оценки различий использована балльная система: АТ-5-МеС флуоресценцию оценивали визуально по пятибалльной шкале (0 – отсутствие сигнала; 1 – очень слабый сигнал; 2 – слабый сигнал; 3 – сигнал средней интенсивности; 4 – сильный сигнал); АТ-АсH3K9 флуоресценцию оценивали визуально по четырехбалльной шкале (0 – отсутствие сигнала; 1 – очень слабый сигнал; 2 – слабый сигнал; 3 – сигнал средней интенсивности). Проводили индивидуальный анализ каждой хромосомы кариотипа из разных метафазных пластинок. Каждому сегменту данной хромосомы присваивали определенное количество баллов на основе визуальной оценки уровня его флуоресценции в гомологичных хромосомах на 10 метафазных пластинках. Результирующий балл определяли по простому большинству присвоенных значений.

Измерение интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения Image J 1.34s проводили на цифровых фотоизображениях иммуноокрашенных хромосом. Каждому пикселю в выделенной области изображения автоматически присваивалось значение от 0 до 255, в зависимости от его оттенка серого в 8-ми битном режиме. Средняя интенсивность свечения выделенной области рассчитывалась автоматически при суммировании значений, присвоенных всем пикселям, и делении полученной суммы на количество пикселей. Построение кривой распределения сигнала производилось на основе абсолютных значений свечения пикселей, лежащих в проведенной по объекту линии, шириной в один пиксель.

Достоверность различий интенсивности флуоресценции сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни для малых выборок и с помощью критерия Крускала-Вэллеса при сравнении сегментов в гомологичных триадах и тетрадах хромосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Феномен сегментспецифичной локализации эпигенетических маркеров на метафазных хромосомах человека

При иммуноцитохимическом анализе метафазных пластинок из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови взрослых индивидов (72 метафазных пластинки 7 взрослых индивидов) выявлена гетерогенность распределения сайтов связывания антител к 5-метилцитозину

(AT-5-MeC) вдоль плеч всех хромосом набора (рис.1). Сегментная локализация флуоресцентных сигналов установлена при сопоставлении на совмещенных кариограммах фотоизображений хромосом после QFH/АсD и иммунофлуоресцентного окрашивания. Большинство сайтов связывания моноклональных антител к 5-метилцитозину были локализованы в QFH/АсD-негативных сегментах, соответствующих R-блокам. Высокая плотность сайтов связывания антител к 5-метилцитозину также была отмечена в районах прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16, гетерохроматиновом блоке хромосомы Y и в коротких плечах акроцентрических хромосом групп D (хромосомы 13, 14, 15) и G (хромосомы 21, 22). Различий между гомологичными хромосомами выявлено не было. Характер распределения 5-MeC сигналов повторялся на всех метафазных пластинках и не характеризовался индивидуальной специфичностью.

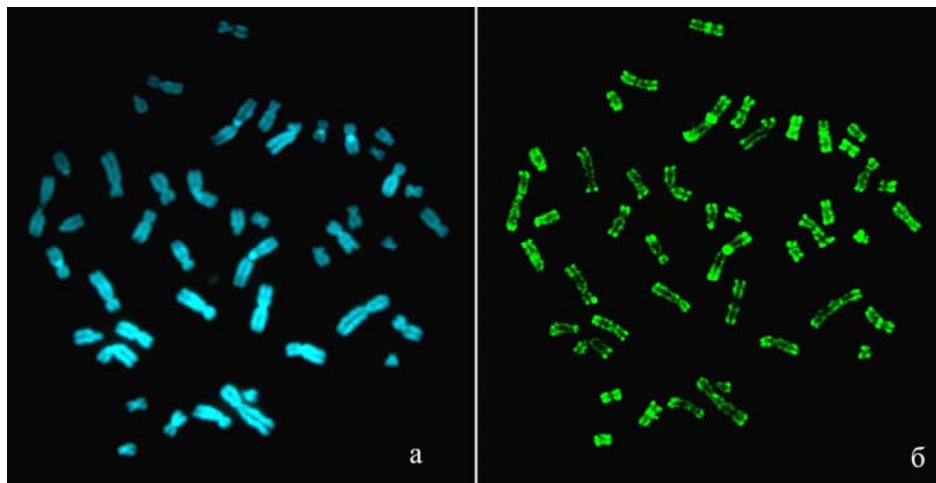


Рис.1. Метафазная пластинка из лимфоцита взрослого индивида после QFH окрашивания (а) и иммунофлуоресцентной детекции 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител (б).

Эти результаты, в целом, согласуются с данными других авторов. Следует отметить, однако, что в первом исследовании, проведенном с помощью антител к 5-метилцитозину, была зарегистрирована высокая степень метилирования центромерных районов хромосом у мыши и блоков конститутивного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16, 15 и Y у человека, тогда как специфичности хромосом выявить не удалось (Miller et al., 1974). Аналогичные результаты были описаны в работах других авторов (Lubit et al., 1976; Montpellier et al., 1994). Сегментспецифичное распределение сайтов связывания антител к 5-метилцитозину вдоль плеч метафазных хромосом человека впервые было выявлено в работе Барбин с соавторами (Barbin et al., 1994). Подчеркнем, что в вышеупомянутых исследованиях биологические причины дифференциального метилирования хромосом практически не обсуждаются и иммуноцитохимическое окрашивание хромосом рассматривается в качестве способа диагностики предраковых состояний, сопровождающихся изменениями статуса метилирования ДНК (Barbin et al., 1994; Montpellier et al., 1994; Pfarr et al., 2005).

На наш взгляд, отдельного внимания заслуживает сам феномен сегментной специфичности локализации на хромосомах 5-метилцитозинобогатой ДНК. На основании полученных результатов нами предположено, что распределение обогащенных 5-метилцитозином участков ДНК вдоль плеч хромосом представляет собой особый тип дифференциальной исчерченности, объединяющий все T-, большинство R-сегментов, блоки прицентромерного гетерохроматина и районы коротких плеч акроцентрических хромосом. Идентифицированы характерные морфологические маркеры (табл.), по которым можно идентифицировать пары гомологов, а наблюдаемый рисунок поперечной исчерченности назван MeC-сегментацией (от англоязычного обозначения 5-метилцитозина – 5-MeC) (Пендина и др., 2005).

Для проверки наличия MeC-рисунка на хромосомах из клеток разных типов проведена иммуноцитохимическая детекция 5-метилцитозина на препаратах метафазных хромосом из мезенхимных стволовых клеток взрослых индивидов (30 метафазных пластинок 5 индивидов), лимфоцитов плодов (49 метафазных пластинок 5 плодов 20-24 недель развития), из клеток хориона (76 метафазных пластинок 9 эмбрионов), печени и легкого эмбрионов с нормальным кариотипом (32 метафазных пластинок из клеток печени и 29 – из клеток легкого от 4 эмбрионов 5-8 недель развития) (рис. 2). Во всех случаях наблюдали преимущественную локализацию AT-5-MeC

сигналов в R- и T-сегментах, в коротких плечах акроцентрических хромосом, в конститутивном гетерохроматине (Ефимова и др., 2009).

Таблица

Характерные морфологические маркеры, выявляемые на метафазных хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов человека с помощью антител к 5-метилцитозину

Хромосома №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Сегмент	p36 q12 q21 q42	p25 p23 q37	p25 p21 q21 q27 q29	p16 q35	p15 q31 q35	q23 p21 q25 q27	p22 q11.2 q22 q36	p23 p21 q24	p12 q34	p15 p13 q11.2 q26	P15 q13 q23
Хромосома №	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Сегмент	p13 q24	q12 q32 q34	q24 q32	p11.2 q24 q26	p13 q11.2 q24	p13 q21 q25	p11.2 q23	p13 q13	p13 q11.2 q13	p11.2 q22	p11.2 q11.2 q13

Характерное сегментспецифичное распределение 5-метилцитозинобогащенной ДНК также обнаружено в дополнительных и структурно-перестроенных хромосомах из клеток хориона при неразвивающейся беременности: при наличии в кариотипе дополнительных хромосом 7, 9, 13, 16, 17, при триплоидии и в случае кариотипа 47,XX,i(7)(q10),+i(7)(p10) (рис. 3). Отличия, специфичные для разных тканей, выявлены лишь в степени метилирования отдельных сегментов. Проведенный сравнительный анализ позволил сделать вывод об одинаковом *tune* распределения 5-метилцитозинобогащенной ДНК вдоль плеч хромосом в исследованных тканях в пренатальный и постнатальный период развития.

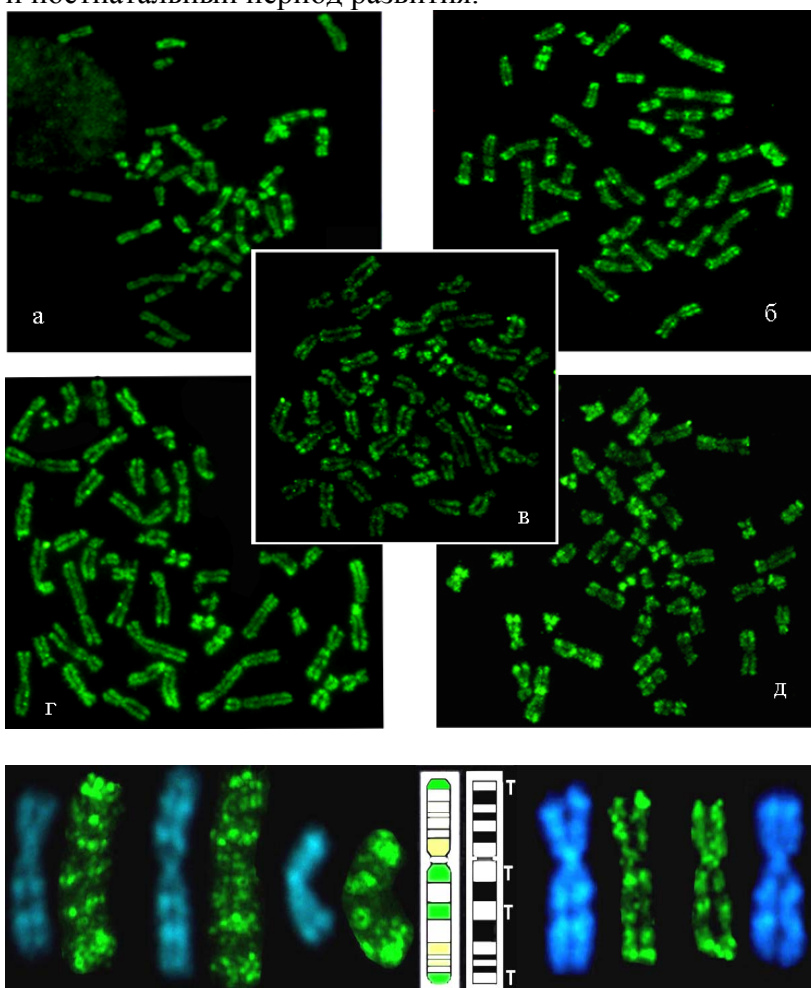


Рис.2. MeC-сегментация метафазных хромосом из мезенхимной стволовой клетки взрослого индивида человека (а), лимфоцита пуповинной крови плода 22 недель развития (б), цитотрофобласта хориона (в), печени (г) и легкого (д) эмбриона 5/6 недель развития после иммуноцитохимической детекции 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител.

Рис. 3. Распределение АТ 5-МеС флуоресцентного сигнала по длине нормально и структурно перестроенной хромосомы 7. Слева – гомологичные хромосомы 7 после QFN и иммуноокрашивания: триада из клеток цитотрофобласта с кариотипом 47,XX,i(7)(q10),+i(7)(p10); в центре – идиограммы 5-МеС и QFN исчерченности хромосомы 7; справа – гомологичные хромосомы 7 после QFN и иммуноокрашивания при нормальном кариотипе.

Таким образом, рисунок MeC-сегментации был выявлен на всех метафазных пластинках из ФГА-стимулированных лимфоцитов, мезенхимных стволовых клеток, клеток хориона и эмбриональных тканей. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что MeC-сегментация действительно является типом дифференциальной исчерченности хромосом человека.

На следующем этапе работы проведено иммуноцитохимическое исследование распределения на метафазных хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов человека другого эпигенетического маркера – ацетилизованного по лизину в 9-м положении гистона H3 (AcH3K9). Проанализировано 180 фрагментов метафазных пластинок из лимфоцитов 13 взрослых и 120 фрагментов – из лимфоцитов 10 плодов человека 20-22 недель развития. Установлено неравномерное распределение AT-AcH3K9-сигналов по длине метафазных хромосом взрослых индивидов и плодов человека с локализацией в DAPI-негативных сегментах хромосом, соответствующих R-сегментам (рис.4). Характер исчерченности индивидуальных хромосом повторялся на всех фрагментах метафазных пластинок.

Известно, что ацетилизация гистона H3 характерно для транскрипционно активного хроматина. Принимая во внимание более высокую плотность генов в R-сегментах по сравнению с G-сегментами (Родионов, 1985; Vicmore, Sumner, 1989), наблюдаемая в нашем исследовании специфика локализации AcH3K9 может быть объяснена высоким и низким уровнем транскрипционной активности хроматина этих сегментов.

В MeC⁺ и AcH3K9⁺-районах хромосом выявлена варьирующая в зависимости от сегмента интенсивность флуоресценции. На основе сравнения распределения AT-5-MeC и AT-AcH3K9 флуоресцентных сигналов с QFH/AcD и DAPI-исчерченностью, а также с учетом различий в интенсивности флуоресценции, были составлены идиограммы всех аутосом кариотипа (рис.5, 6).

Наиболее яркий AT-5-MeC флуоресцентный сигнал (4 балла) установлен в 54 из 157 R-сегментов у взрослых и 46 из 157 R-сегментов у плодов, блоках прицентромерного гетерохроматина хромосом 1 и 16 и коротких плечах больших и малых акроцентриков. Флуоресценция средней интенсивности (3 балла) зарегистрирована в 53 R-сегментах у взрослых и в 64 у плодов, а также в блоке прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9. Слабый флуоресцентный сигнал (2 балла) характерен для 33 R-сегментов у взрослых индивидов и 35 у плодов. Во всех QFH-позитивных блоках, соответствующих G-сегментам, флуоресцентный сигнал был очень слабым (1 балл), а в центромерных участках отсутствовал (0 баллов). Следует отметить, что в 17 R-сегментах у взрослых и в 12 у плодов интенсивность флуоресценции сопоставима с таковой в G-сегментах, т.е. очень слабая (1 балл) (рис.5, отмечено красным). Выявленные в нашем исследовании различия в интенсивности AT-5-MeC флуоресценции сегментов хорошо согласуются с особенностями их нуклеотидного состава. Известно, что для R- и G-сегментов характерен разный нуклеотидный состав: R-диски являются более GC-богатыми, по сравнению с G-, и, следовательно, содержат больше потенциальных сайтов связывания AT-5-MeC. Наблюдаемые отличия в степени обогащения 5-метилцитозином R-сегментов объясняются более ярко выраженной неоднородностью их нуклеотидного состава по сравнению с G-сегментами (Saccone, Bernardi, 2001).

Хроматин, имеющий AT-AcH3K9 сигнал средней интенсивности (3 балла) зарегистрирован в 33 R-сегментах у взрослых и у плодов. Сигнал слабой интенсивности (2 балла) выявлен в 62 R-сегментах хромосом у взрослых и в 59 R-сегментах хромосом у плодов человека. Участки, имеющие очень слабый флуоресцентный сигнал (1 балл) – наименее обогащенные ацетилизированным гистоном H3, – во всех G-сегментах и в 38 R-сегментах хромосом у взрослых и в 42 R-сегментах хромосом у плодов. Флуоресцентного сигнала не выявлено (0 баллов) в прицентромерном гетерохроматине хромосом 1, 9 и 16 у взрослых индивидов и плодов человека. Варьирующая степень ацетилирования R-блоков может отражать разную транскрипционную активность локализованного в них хроматина.

Обратило на себя внимание гипометилизованное состояние двух сегментов хромосомы 9 (9p13, 9q22) и одного хромосомы 15 (15q24), характеризующихся высоким содержанием изохора H3 и CpG островков. В сегменте 9p13 нами было зарегистрировано высокое содержание AcH3K9 (рис.6). Нуклеотидный состав сегмента в совокупности с его эпигенетическим статусом,

выявленном в нашем исследовании, могут указывать на потенциальную активность локализованного в нем хроматина.

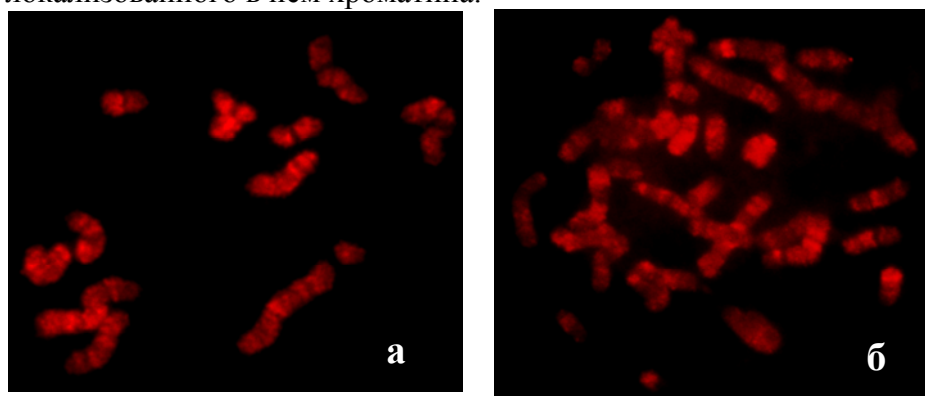


Рис.4. Фрагмент метафазной пластинки из лимфоцита взрослого индивида человека (а) и из лимфоцита плода человека 20 нед. развития (б) после иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью моноклональных антител к AcH3K9.

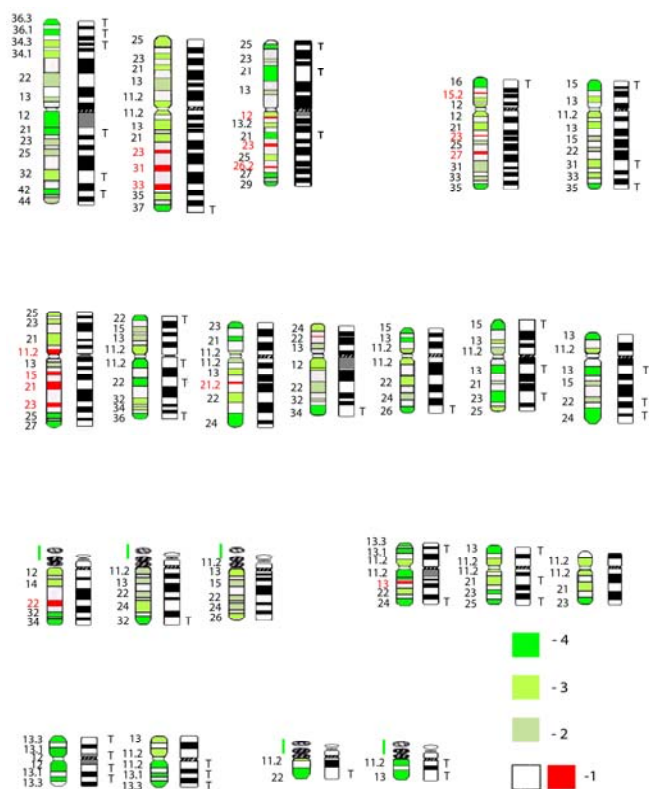


Рис. 5. Сопоставление сегментной локализации 5-метилцитозинобогатенной ДНК на хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов человека (идиограмма слева) и G-исчерченности (идиограмма справа). Различные оттенки зеленого отражают интенсивность AT 5-MeC флуоресценции, оцененную в 2-4 балла в R-сегментах, блоках прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 и коротких плечах акроцентрических хромосом. Белым показан низкий уровень свечения (1 балл), характерный для всех G-сегментов. Красным отмечены R-сегменты, интенсивность AT 5-MeC сигнала в которых оценена в 1 балл. Уровень разрешения ~400 сегментов (ISCN, 2009).

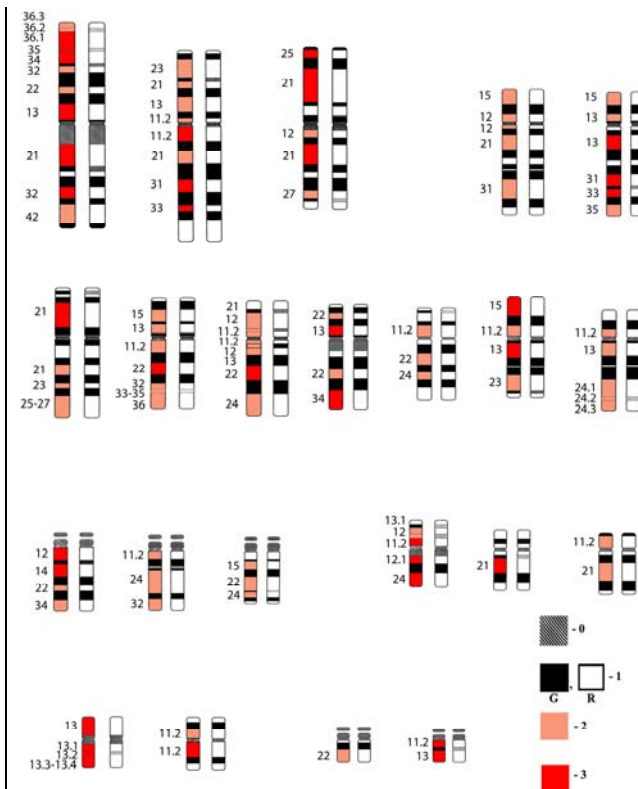


Рис. 6. Сопоставление сегментной локализации AcH3K9 на хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов человека (идиограмма слева) и G-исчерченности (идиограмма справа). Различные оттенки красного отражают интенсивность AT AcH3K9 флуоресценции, оцененную в 2-3 балла в R-сегментах. Черным показан низкий уровень свечения (1 балл), характерный для всех G, белым – свечение, оцененное в 1 балл в R сегментах. Серый цвет маркирует сегменты, в которых сигнал отсутствовал (0 баллов). Уровень разрешения ~300 сегментов (ISCN, 2009).

Полученные в нашем исследовании результаты привлекают внимание к интересному факту: блочной структуре хромосомы на уровне организации ее эпигенома. Это проявляется в сегментспецифичном расположении сайтов, обогащенных 5-метилцитозином и ацетилированным гистоном H3. По всей видимости, дифференциальное эпигенетическое модифицирование является одним из факторов, определяющих разделение хромосомы на функционально активные и инертные участки.

2. Становление дифференциального метилирования ДНК хромосом в доимплантационном развитии человека

Для установления времени появления MeC-сегментации в онтогенезе было проведено изучение специфичности метилирования ДНК в доимплантационном развитии человека. В связи с недоступностью нормальных зародышей, в исследовании использовали триплоидные зародыши или диплоидные зародыши с аномальной морфологией (содержащие вакуоли и фрагментированные бластомеры). Способность таких зародышей к имплантации, дальнейшему развитию и рождению свидетельствуют о том, что эпигенетическое репрограммирование их генома, играющее ключевую роль в установлении программы эмбриогенеза, может не отличаться от такового у нормальных. Характер распределения сайтов связывания моноклональных антител к 5-метилцитозину анализировали после каждого деления дробления, со стадии зиготы до стадии бластоцисты. Проанализировано 78 зародышей: 15 зигот, 12 двухклеточных зародышей, 14 четырехклеточных зародышей, 12 зародышей на стадии 5-8 клеток, 13 зародышей на стадии морулы и 12 бластоцист. Общее число проанализированных метафазных пластинок и их фрагментов составило 143 (Баранов и др., 2005; Pendina et al., 2011).

На стадии метафазы в 15 зиготах выявлено практически равномерное распределение AT 5-MeC флуоресцентных сигналов вдоль плеч хромосом. Гомологичные хромосомы различались по степени метилирования. У диплоидных эмбрионов в одном из гомологов всегда наблюдали более интенсивную AT-5-MeC флуоресценцию, чем во втором. У триплоидных эмбрионов два гомолога из триады всегда характеризовались одинаковой интенсивностью AT-5-MeC сигнала, которая была больше или меньше по сравнению с таковой третьего гомолога (рис.7а). Вероятнее всего, более низкий уровень метилирования характерен для отцовских хромосом, что связано с деметилированием мужского генома (Beaujean et al., 2004; Fulka et al., 2004; Xu et al., 2005; Ефимова и др., 2012). Визуализация сигнала на обоих гомологах свидетельствует о том, что деметилированию подвергаются не все последовательности ДНК, и некоторые участки сохраняют метилированный статус, в результате чего образуются так называемые «недометилированные» хромосомы.

На стадии двух бластомеров обнаружено равномерное распределение AT-5-MeC флуоресцентного сигнала вдоль плеч хромосом на 13 метафазных пластинках. Во всех хромосомах выявлена асимметрия AT-5-MeC между сестринскими хроматидами: в одной хроматиде интенсивность флуоресценции была больше, чем в другой. Показаны различия в интенсивности AT-5-MeC сигнала в хроматидах с сильной флуоресценцией между гомологичными хромосомами (рис.7б). Иными словами, каждая пара гомологов была представлена асимметрично окрашенными хромосомами, при этом флуоресценция одной из хроматид была одинаково слабой в обоих гомологах, а оставшиеся хроматиды характеризовались более сильной флуоресценцией, различающейся по интенсивности в гомологичных хромосомах. Таким образом, разный эпигенетический статус отцовских и материнских хромосом сохраняется после первого деления дробления. Описанный тип распределения сайтов связывания AT-5-MeC наблюдали в большинстве хромосом из бластомеров диплоидных и триплоидных двухклеточных эмбрионов. В отдельных хромосомах выявлена сегментспецифическая локализация сигнала, напоминающая MeC-сегментацию хромосом из ФГА-стимулированных лимфоцитов, клеток эмбриональных органов и цитотрофобласта хориона человека.

Асимметричное метилирование хромосом было описано у ранних эмбрионов мышей и определено как гемиметилирование (Rouquier et al., 1998). Гемиметилированное состояние может достигаться за счет пассивного (зависимого от репликации) деметилирования ДНК зародыша, при котором новосинтезированная цепь ДНК не метилируется в соответствии с характером метилирования старой цепи (Howlett, Reik, 1991). В результате, каждая асимметрично метилированная хромосома состоит из двух хроматид, одна из которых содержит неметилированную, а другая – гемиметилированную ДНК. Слабый равномерный сигнал, выявленный в нашем исследовании на одной из хроматид каждой хромосомы, свидетельствует о том, что не все последовательности ДНК находятся в деметилированном состоянии.

На стадии четырех клеток в 21 метафазной пластинке, наряду с двумя типами асимметричных хромосом, наблюдавшимися на стадии двух клеток, показано наличие хромосом с одинаково слабой интенсивностью флуоресценции в обеих хроматидах (рис.7в). Появление

хромосом, у которых гипометилированы обе хроматиды, по всей видимости, связано с дальнейшим пассивным деметилированием генома зародыша. Наличие одинаково слабых флуоресцентных сигналов, тем не менее, свидетельствует о сохранении низкого уровня метилирования ДНК в обеих хроматидах. В диадах и триадах гомологов наблюдали различные комбинации асимметричных и слабоокрашенных хромосом, т.е. одни диады или триады состояли только из асимметричных хромосом, в то время как в составе других были обнаружены также и слабоокрашенные хромосомы. Не было выявлено хромосомной специфичности для слабого или асимметричного сигнала. Соотношение асимметричных и слабоокрашенных хромосом было неодинаковым на разных метафазных пластинках. Это позволяет предположить, что при делении бластомеров двухклеточного зародыша человека сегрегация по-разному метилированных хроматид происходит случайным образом. В результате комбинации хроматид с разным статусом метилирования различаются в дочерних клетках. В нашем исследовании было выявлено три типа хроматид, согласно степени их метилирования – метилированные, гипометилированные и характеризующиеся промежуточной степенью метилирования (недометилированные). Теоретически возможное число комбинаций таких хроматид для одной диады гомологов составляет 4, а для одной триады – 8 (рис. 8). Следует отметить, что если рассматривать весь хромосомный набор, то число сочетаний диад с различными комбинациями гомологов составит 4^{23} в случае диплоидного зародыша и 8^{23} в случае триплоидного.

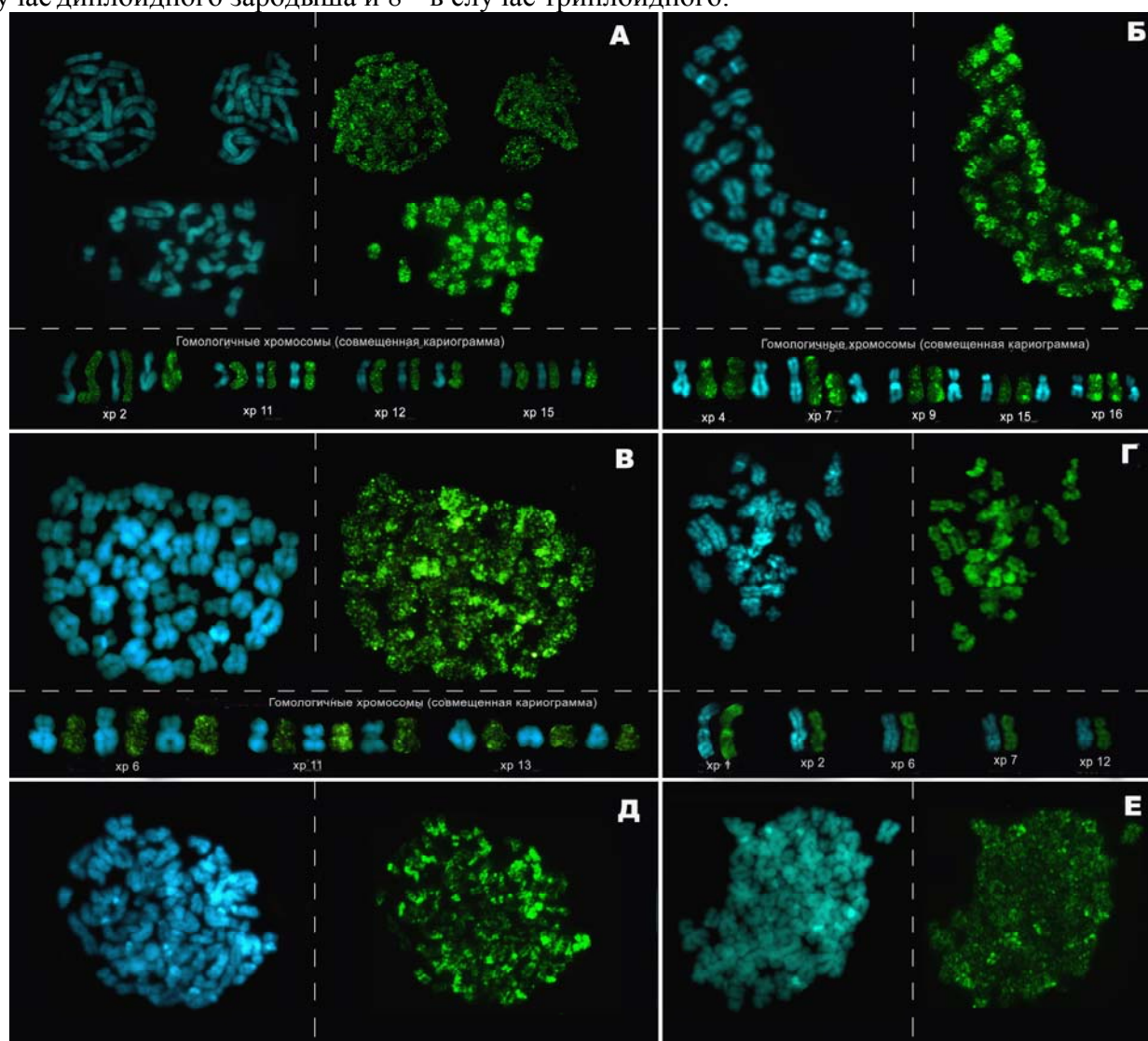


Рис.7. Метафазные хромосомы дробящихся зародышей человека после QFН/АсD окрашивания (голубой) и иммуноцитохимической детекции 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител/FITC (зеленый). А - Метафазные хромосомы из 3-х отдельно лежащих пронуклеусов зиготы человека и фрагмент совмещенной кариограммы. Б - Фрагмент метафазной пластинки из бластомера 2-клеточного зародыша человека и фрагмент совмещенной кариограммы. В - Метафазные хромосомы из бластомера 4-клеточного зародыша и фрагмент совмещенной кариограммы. Г - Фрагмент метафазной пластинки из бластомера 8-клеточного зародыша и фрагмент совмещенной кариограммы. Д,Е- Метафазные хромосомы из бластоцисты.

На стадии пяти – восьми бластомеров характер распределения АТ-5-МеС сигнала на проанализированных 32 метафазных пластинках оказался схож с таковым у четырехклеточных эмбрионов, но диады и триады гомологов состояли преимущественно из слабоокрашенных хромосом. На стадии восьми клеток метафазные хромосомы из некоторых бластомеров характеризовались сегментспецифичным распределением сигнала, соответствующим МеС-сегментации (рис.7г). Неравномерное распределение 5-метилцитозинобогащенной ДНК вдоль плеч хромосом свидетельствует о том, что на стадии восьми бластомеров происходит метилирование ДНК *de novo*. Это предположение подтверждается исследованием характера метилирования ДНК в интерфазных ядрах доимплантационных зародышей человека, выявившим высокий уровень содержания 5-метилцитозина в некоторых бластомерах (Fulka et al., 2004).

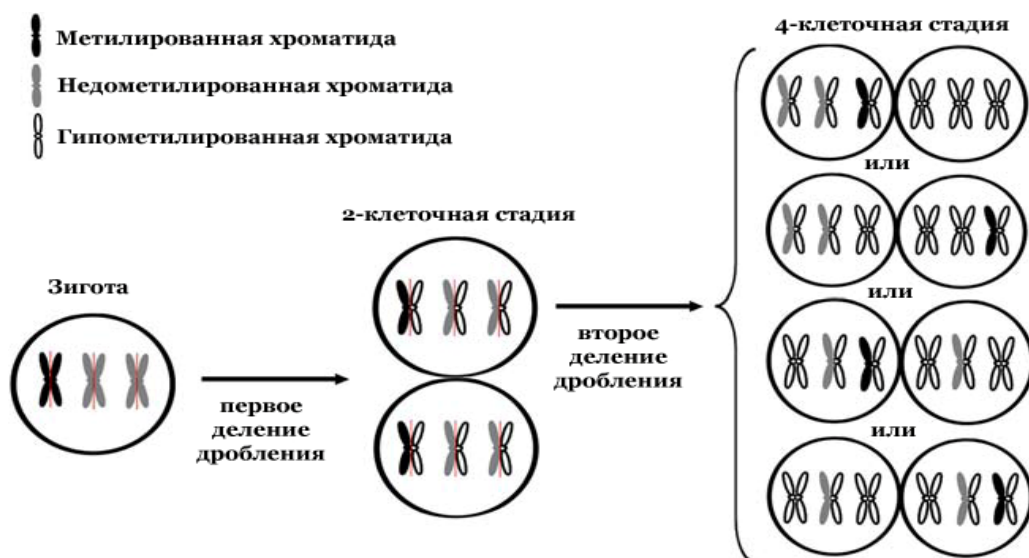


Рис.8. Схема возможных комбинаций по-разному метилированных хроматид гомологичных хромосом после 1-го и 2-го деления триплоидного эмбриона человека. После 1-го деления каждая хромосома состоит из одной метилированной/неметилированной и одной гипометилированной хроматиды. Случайное расхождение хроматид на стадии 2-го деления приводит к одной из восьми комбинаций гомологичных гами- и гипометилированных метафазных хромосом в каждом бластомере 4-х клеточного эмбриона.

На стадии морулы в 30 проанализированных метафазных пластинках также встречались асимметричные и слабоокрашенные хромосомы. На стадии бластоцисты асимметрично окрашенных хромосом выявлено не было (рис. 7д,е). В 27 метафазных пластинках наблюдали сегментспецифичный тип распределения сигнала (рис. 7д), соответствующий МеС-сегментации в лимфоцитах и клетках эмбриональных и экстраэмбриональных тканей. Появление рисунка МеС-сегментации, вероятнее всего, указывает на завершение репрограммирования генома зародыша. Для метафазных хромосом из некоторых бластомеров – 5 из 32 проанализированных – показана практически равномерная флуоресценция плеч хромосом (рис.7е). Такие различия характера метилирования ДНК могут быть связаны с дифференциацией бластомеров на трофэктодерму и внутреннюю клеточную массу. При изучении метилирования ДНК интерфазных ядер другими авторами было показано гипометилирование ДНК из клеток внутренней клеточной массы по сравнению с клетками трофэктодермы (Fulka et al., 2004).

Можно заключить, что в доимплантационном развитии человека каждое деление дробления сопровождается глобальными изменениями характера метилирования ДНК. Деметилирование происходит градуально и затрагивает все хромосомы и все сегменты хромосом обоих родительских геномов. К стадии бластоцисты в результате реметилирования хромосомы приобретают характерное для соматических клеток сегментспецифическое распределение 5-метилцитозина.

3. Тканевая специфичность метилирования ДНК сегментов хромосом в пре- и постнатальном развитии человека

Проведенный анализ позволил установить одинаковый характер локализации 5-метилцитозина на метафазных хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов, из

клеток хориона и эмбриональных печени и легкого, а также из мезенхимных стволовых клеток человека. Однако, несмотря на общий тип распределения метилированных сайтов, выявлены как ткане-, так и стадиоспецифичные особенности.

При сопоставлении интенсивности AT 5-MeC флуоресцентного сигнала на хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов человека с таковой у плодов 20-22 недель развития, выявлены отличия в 22 сегментах: 1q42 (T), 2q23, 2q31, 2q33, 3q21, 3q25, 5q13, 6p11.2, 7p13, 7p15, 12p13, 12q13 (T), 13q22, 14q13, 15q11.2-13, 15q15, 16q22, 17q21 (T), 18q11.2, 20q11.2 (T), 21q11.2, 22q11.2 (T) (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$).

Интенсивность AT-5-MeC-флуоресценции R-сегментов хромосом плодов была изменена как в сторону увеличения, так и уменьшения по сравнению с таковой у взрослых индивидов. При этом в 9 R-сегментах интенсивность флуоресценции была выше, а в 13 R-сегментах - ниже у плодов, чем у взрослых. Возможно, разный уровень метилирования этих сегментов у взрослых и плодов связан с динамическими изменениями их структурно-функционального статуса, необходимыми для реализации программы развития (Ефимова и др., 2012).

Наибольшее внимание привлекал сегмент 2q31, по которому, помимо различий в степени метилирования ДНК, были обнаружены различия в содержании AcH3K9. Согласно полученным нами результатам, сегмент 2q31 в лимфоцитах взрослых характеризуется высоким уровнем ацетилирования гистона H3 и низким уровнем метилирования ДНК, а в лимфоцитах плодов – низким уровнем ацетилирования гистона H3 и высоким уровнем метилирования ДНК. Полученные результаты указывают на потенциально более низкую функциональную активность хроматина в сегменте 2q31 у плодов человека 20-22 недель развития по сравнению с таковой у взрослых индивидов. В сегменте 2q31 локализованы тканеспецифичные гены молекул иммуноглобулинового суперсемейства CD51 (ген *ITGA1*) и CD49D (ген *ITGA4*). Выявленные нами особенности метилирования и ацетилирования сегмента 2q31 могут быть связаны с активной работой иммунной системы у взрослых индивидов, но не у плодов человека (Cicala et al., 2009). Наши данные свидетельствуют о зависимости характера метилирования ДНК и ацетилирования гистона H3 в лимфоцитах человека от стадии развития.

Анализ метилирования ДНК в других тканях человека в пренатальный период развития также позволил выявить ряд особенностей. Для метафазных хромосом из клеток цитотрофобласта хориона показана более низкая по сравнению с лимфоцитами степень метилирования ДНК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,001$). Несмотря на общее снижение степени метилирования в метафазных пластинках, характер распределения 5-метилцитозинобогащенной ДНК вдоль плеч хромосом не отличался от такового в других тканях. Таким образом, степень метилирования всех сегментов хромосом из клеток цитотрофобласта хориона оказалась ниже, чем в лимфоцитах. Известно, что клетки хориона активно дифференцируются и пролиферируют. Механизмы, обеспечивающие интенсивную пролиферацию нормальных клеток хориона до 13-й недели развития, схожи с таковыми в малигнизированных клетках (Raabe, 1990), характеризующихся гипометилированием на уровне генома и локальным aberrантным гиперметилированием CpG островков (Туско, 2000). В связи с этим, сниженный по сравнению с лимфоцитами уровень метилирования ДНК в хорионе, выявленный в нашей работе, может быть связан с его высоким пролиферативным статусом.

Выявлена разная интенсивность AT-5-MeC сигнала в гомологичных локусах хромосом из цитотрофобласта хориона, свидетельствующая о неодинаковой степени их метилирования. Число дифференциально метилированных гомологичных сегментов было неодинаковым на разных сроках развития: в хорионе 5-9 недель развития отличия были выявлены в 3-х сегментах (1q32, 4p12-14 и 6p21; t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$); в хорионе 10-14 недель развития – по 2 сегментам (1q32 и 4p12-14; t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$); в хорионе 15-20 недель развития – по 4 сегментам (1q32, 4p12-14, 13q32-34, 16q11.2; t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$). Природа выявленного феномена остается до конца неясной. Известно, что дифференциальное метилирование ДНК характерно для гомологичных локусов, подверженных геномному импринтингу – эпигенетическому маркированию, обеспечивающему дифференциальную экспрессию генов в зависимости от их родительского происхождения (Назаренко, 2004; Пендина и др., 2007). Характерным свойством большинства импринтированных генов в трофобласте является инактивация материнской аллели. Согласно базе данных импринтированных генов GeneImprint, в ряде сегментов, по которым мы выявили отличия в степени метилирования в гомологичных хромосомах, локализованы гены,

для которых предсказан эффект материнского импринтинга: в сегменте 1q32 локализован ген *PTPN14*, в сегменте 6p21 – *BTNL2*, в сегменте 13q34 – *FAM70B*. Таким образом, не исключено, что выявленные различия в статусе метилирования ДНК гомологичных хромосом в хорионе могут быть связаны с импринтированным состоянием хроматина. Изменения статуса метилирования ДНК в зависимости от срока могут быть связаны с запрограммированными активацией и репрессией хроматина в разные периоды развития, необходимыми для корректной реализации программы эмбриогенеза.

Анализ характера метилирования метафазных хромосом из мезенхимных стволовых клеток человека также позволил выявить ряд тканеспецифических особенностей. Мезенхимные стволовые клетки человека обладают основными свойствами мультипотентных стволовых клеток – способностью к ограниченному самообновлению и дифференцировке в нескольких направлениях (Шальгина и др., 2009; Grigorian et al., 2010). При сопоставлении характера метилирования ДНК метафазных хромосом МСК и лимфоцитов человека, выявлены сегменты, отличающиеся по обогащенности 5-метилцитозином. В сегментах 1q42, 4p18, 5q35, 8p24, 9q34, 11p15, 12p15, 13q34, 16p13.1-13.3, 20p13.3 показано увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с таковой в лимфоцитах человека (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$). В сегментах же 5p11.2-13, 6q21-23, 12q13, 16q13 наблюдали уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с таковой в лимфоцитах человека (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$). С использованием базы данных www.ncbi.nih.gov проведен анализ, в результате которого показано, что в гиперметилированных сегментах хромосом из МСК локализованы тканеспецифичные гены, активация транскрипции которых происходит только после дифференцировки стволовой клетки. В гипометилированных сегментах локализованы гены рецепторов ингибиторного фактора лейкемии и онкостатина М (5p11.2-13), гены субъединиц белков теплового шока и ген бета-тубулина (6q21-23), активное состояние которых может быть необходимо для правильного функционирования и деления стволовой клетки.

Таким образом, интересным наблюдением в нашем исследовании являются различия в степени метилирования ДНК и ацетилирования гистона H3 одних и тех же сегментов хромосом в клетках разных тканей. Дифференциальное эпигенетическое модифицирование указывает на функциональную неравнозначность таких локусов, связанную, по всей видимости, со спецификой организации и работы генетического аппарата в клетках разных типов. Полученные нами результаты указывают на то, что MeC-исчерченность является функциональным типом сегментации хромосом.

4. Профили метилирования ДНК гомологичных хромосом X при нормальном и aberrантном кариотипе

Представляло интерес изучить статус метилирования гомологичных хромосом X, для которых характерна функциональная инактивация всех гомологов, кроме одного. Анализ проведен на метафазных хромосомах из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов и из клеток хориона. Выявлены различия в характере метилирования гомологичных хромосом X в лимфоцитах взрослых индивидов по сегментам Xp22, Xq24 и Xq12-q13 и в лимфоцитах плодов по сегментам Xp22 и Xq24 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$) (рис.9). Объяснением выявленных различий, вероятнее всего, является разное функциональное состояние, вызванное инактивацией одного из гомологов. Вызывает удивление различный статус метилирования содержащих псевдоаутосомный район гомологичных сегментов Xp22, выявленный как в лимфоцитах, так и в клетках хориона на сроке 19-20 недель. Возможным объяснением является локализация в сегменте Xp22 участвующего в регуляции экспрессии *HOX*-генов гена *SCML1* (sex comb on midleg-like 1 (*Drosophila*)), активность которого зависит как от метилирования его регуляторной области, так и окружающего хроматина (Bernardino et al., 2000).

Различия в статусе метилирования сегмента Xq24 на гомологичных хромосомах X из лимфоцитов не противоречат данным, полученным другими исследователями. В сегменте Xq24 располагается гипервариабельный тандемный повтор, имеющий более высокую степень метилирования на активной хромосоме X по сравнению с инактивированной (Giacalone et al., 1992). Различия в степени метилирования сегмента Xq12-q13 на гомологичных хромосомах X из

лимфоцитов взрослых индивидов, но не плодов человека могут объясняться стадиоспецифичной регуляцией хроматина содержащего центр инактивации хромосомы X.

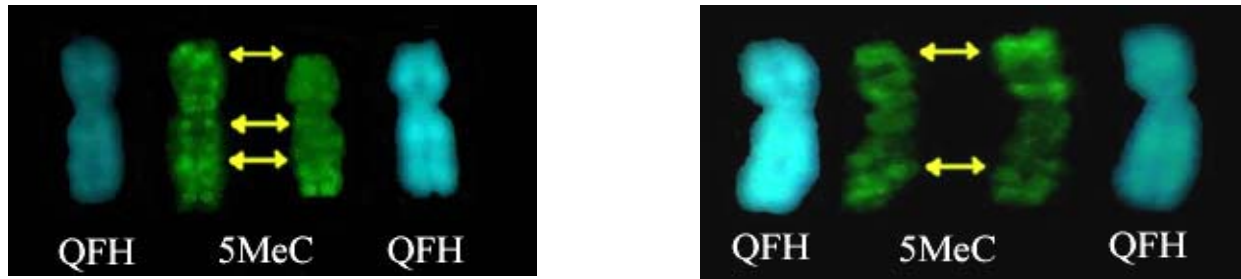


Рис. 9. Совмещенные кариограммы хромосом X из лимфоцита взрослого индивида (слева) и плода человека (справа) после QFH окрашивания и после иммунофлуоресцентной детекции антител к 5-метилцитозину. Стрелками указаны гомологичные сегменты, отличающиеся по интенсивности флуоресценции после иммунофлуоресцентной детекции АТ-5-МеС: Xp22, Xq24 и Xq12-q13 в лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов и Xp22 и Xq24 в лимфоцитах пуповинной крови плодов.

Отличия в степени метилирования сегментов гомологичных хромосом X из клеток хориона зависели от срока развития: на сроке развития 6-7 недель показаны различия в интенсивности метилирования гомологичных сегментов Xp11 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$), а на 19-20 недель – Xp22 и Xp11 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$). Отличия по статусу метилирования сегмента Xp11 на гомологичных хромосомах X из клеток цитотрофобласта хориона могут отражать тканеспецифичные и стадиоспецифичные особенности эпигенетического статуса хроматина в этом сегменте. Интересно отметить, что при триплоидии (69,XXX) нами выявлены различия по 3-м гомологичным сегментам хромосом X: Xp22, Xp11 и Xq12-q13. При этом по сегменту Xq12-q13 различия оказались достоверными между 3-мя гомологичными хромосомами X (t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$), тогда как для сегментов Xp22 и Xp11 показан одинаковый уровень метилирования в двух гомологах, отличающийся от такового в третьем (t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$). Возможно, это обусловлено aberrантным метилированием, связанным с нарушением реализации эпигенетической программы развития из-за наличия дополнительного генома.

5. Динамические изменения статуса метилирования ДНК блоков прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16

Изучены особенности метилирования ДНК блоков прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16 из клеток разных типов.

В гетерохроматиновых блоках хромосом из бластомеров доимплантационных зародышей человека наблюдали низкий уровень метилирования или даже его полное отсутствие до стадии бластоцисты включительно (рис.10). Низкий уровень содержания 5-метилцитозина в гетерохроматиновых участках, возможно, необходим для репрограммирования генома зародыша.

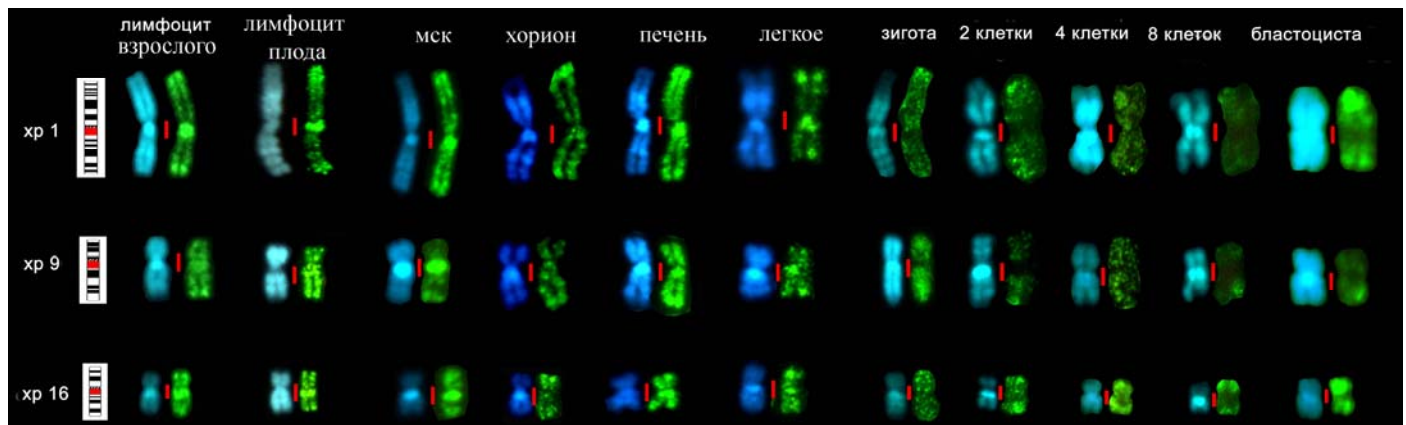


Рис. 10. Статус метилирования прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16 в лимфоцитах взрослых индивидов и плодов, мезенхимных стволовых клетках, клетках хориона, клетках эмбриональной печени и легкого и бластомерах доимплантационных зародышей человека.

Уровень метилирования ДНК прицентромерного гетерохроматина в лимфоцитах и клетках эмбриональных и экстраэмбриональных тканей обнаруживал как хромосом- так и стадиоспецифичность (рис. 10). Интенсивность АТ-5-МеС флуоресценции гетерохроматина хромосом 1 и 16 на всех проанализированных метафазах из ФГА-стимулированных лимфоцитов взрослых и плодов и эмбриональных тканей была высокой и не зависела от размеров блока. Для района 9q12 был характерен сигнал меньшей интенсивности. Известно, что в геноме человека гетерохроматин большей частью образован сателлитной ДНК I, II, III классов, распределение которых характеризуется определенной хромосомной специфичностью (Andersen et al., 1998). В состав гетерохроматина хромосомы 9 преимущественно входят сателлиты III и β , более богатые CpG динуклеотидами, по сравнению с сателлитной ДНК других классов, образующих прицентромерные гетерохроматиновые районы хромосом 1 и 16. Можно предполагать, что слабая интенсивность флуоресцентного сигнала гетерохроматина хромосомы 9 обусловлена его гипометилированным состоянием. Не исключено, что такое состояние важно для поддержания особой конформационной структуры этого района, необходимой для сохранения функциональной активности прилежащих генов (Пендина и др., 2005).

Выявлен более низкий по сравнению с лимфоцитами уровень содержания 5-метилцитозина в прицентромерном гетерохроматине хромосом из клеток цитотрофобласта хориона. На гипометилированное состояние гетерохроматиновых блоков хромосом 1, 9 и 16 из клеток цитотрофобласта хориона указывают также результаты исследования характера метилирования ДНК с помощью метода ник-трансляции *in situ* с предварительной обработкой хромосом метилчувствительными эндонуклеазами рестрикции (Пендина и др., 2001). Интересно отметить, что в нашем исследовании выявлены отличия в степени метилирования гетерохроматинового блока 9q12 в клетках хориона на разных сроках развития: на сроке развития 15-20 недель интенсивность флуоресценции сегмента 9q12 в обеих гомологичных хромосомах была достоверно ниже по сравнению с таковой на сроке 5-9 и 10-14 недель (t-критерий Стьюдента, $p < 0,01$). При трисомии 9 или 16, а также при триплоидии нами отмечены различия в степени метилирования гетерохроматиновых блоков в гомологичных хромосомах (критерий Крускала-Вэллеса, $p \leq 0,05$). Обнаруженные изменения статуса метилирования ДНК гетерохроматина свидетельствуют о его значимости для эмбрионального развития.

Таким образом, характер метилирования прицентромерного гетерохроматина, по всей видимости, также важен, как и уровень содержания 5-метилцитозина в эухроматине.

ВЫВОДЫ

1. Распределение 5-метилцитозинобогатой ДНК в метафазных хромосомах из лимфоцитов человека является сегментспецифичным. МеС-позитивные сегменты соответствуют всем T-сегментам и большинству R-сегментов аутосом, а также коротким плечам акроцентрических хромосом групп D и G и блокам прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16.
2. Наличие постоянных МеС⁺-сегментов – морфологических маркеров, – идентифицируемых на каждой паре гомологичных аутосом из клеток различного происхождения (лимфоцитов периферической и пуповинной крови, мезенхимных стволовых клеток, эмбриональных печени и легкого, цитотрофобласта хориона), позволяет охарактеризовать *МеС-сегментацию*, как новый тип рисунка линейной дифференцированности хромосом.
3. Гиперацетилирование сегментов метафазных хромосом из лимфоцитов взрослых индивидов и плодов человека может сочетаться с высоким, средним и низким уровнем метилирования ДНК.
4. В доимплантационном развитии человека со стадии зиготы до стадии бластоцисты происходят динамические изменения статуса метилирования хромосом в результате деметилирования родительских геномов. Сегментная специфичность локализации 5-метилцитозинобогатой ДНК на хромосомах появляется на стадии 8 клеток.
5. Уровень метилирования ДНК как эухроматиновых, так и гетерохроматиновых районов метафазных хромосом тканеспецифичен и изменяется в зависимости от срока развития.
6. Гомологичные хромосомы X отличаются по статусу метилирования сегментов Xp11, Xp22, Xq12-q13 и Xq24 в зависимости от типа клеток и стадии развития.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в журналах, рекомендованных ВАК

1. Пендина А.А., **Ефимова О.А.**, Каминская А.Н., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Иммуноцитохимический анализ статуса метилирования метафазных хромосом человека. // Цитология. 2005. Т.47, №8, с.731-737.
2. Баранов В.С., Пендина А.А., Кузнецова Т.В., **Ефимова О.А.**, Федорова И.Д., Леонтьева О.А., Корсак В.С., Никольский Н.Н. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития. // Цитология. 2005. Т.47, №8, с.723-730.
3. Пендина А.А., **Ефимова О.А.**, Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Болезни геномного импринтинга. // Журнал акушерства и женских болезней. 2007. Т. LVI, выпуск 1/2007, с.76-83.
4. Grigorian AS, Kruglyakov PV, Taminkina UA, **Efimova OA**, Pendina AA, Voskresenskaya AV, Kuznetsova TV, Polyntsev DG Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. // Bull Exp Biol Med. 2010. V.150 (1), P.125-130. (Григорян А.С., Кругляков П.В., Таминкина Ю.А., **Ефимова О.А.**, Пендина А.А., Воскресенская А.В., Кузнецова Т.В., Полынцев Д.Г. Изменения цитологических и кариологических характеристик мезенхимальных стволовых клеток человека при культивировании in vitro. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2010. №3, с.141-149).
5. Pendina A.A., **Efimova O.A.**, Fedorova I.D., Leont'eva O.A., Shilnikova E.M., Lezhnina J.G., Kuznetsova T.V., Baranov V.S. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos.// Cytogenet Genome Res. 2011. V.132 (1-2), P.1-7.
6. Чиряева О.Г., Пендина А.А., Тихонов А.В., **Ефимова О.А.**, Петрова Л.И., Дудкина В.С., Садик Н.А., Галембо И.А., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Сравнительный анализ аномалий кариотипа при неразвивающейся беременности, наступившей естественным путем и с применением вспомогательных репродуктивных технологий. // Журнал акушерства и женских болезней. 2012. Т. LXI, выпуск 3/2012, с.132-140.
7. **Ефимова О.А.**, Пендина А.А., Тихонов А.В., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Метилирование ДНК – основной механизм репрограммирования и регуляции генома человека. // Медицинская генетика. 2012. Т.11, №4 (118), с.10-18.

Статьи в научных журналах и изданиях, не входящих в перечень ВАК:

1. **Ефимова О.А.**, Пендина А.А., Чиряева О.Г., Петрова Л.И., Садик Н.А., Дудкина В.С., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Дифференциальное метилирование ДНК метафазных хромосом – основа нового способа окраски хромосом человека в пре- и постнатальный периоды онтогенеза. С. 143-149. // В «Современные технологии профилактики наследственных болезней и детской инвалидности» (к 40-летию медико-генетического центра), под ред. Романенко О.П., – СПб. ГУЗ МГЦ: «Феникс», 2009 г. – 368 с.
2. Шалыгина Ю.А., **Ефимова О.А.**, Кругляков П.В., Пендина А.А., Григорян А.С., Кузнецова Т.В., Полынцев Д.Г., Баранов В.С. Сравнительный цитогенетический анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ранних пассажей и лимфоцитов человека. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009. Т. IV, №2, с.63-69.
3. **Ефимова О.А.**, Пендина А.А., Тихонов А.В., Крапивин М.И., Копать В.В., Лежнина Ю.Г., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Распределение метилированной ДНК и модифицированных гистонов на метафазных хромосомах человека в пре- и постнатальные периоды онтогенеза. С.132-149. // В «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике», под ред. Баранова В.С., Масленникова А.Б., – Вып.17. – Новосибирск: «НСК Регион», 2012 г. – 152 с.