

Е. Л. Паткин

**ЭПИГЕНЕТИКА –  
ИНТЕГРИРУЮЩАЯ СИСТЕМА  
МЕЖДУ ГЕНАМИ, МЕТАБОЛИЗМОМ  
И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДОЙ,  
ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ ФЕНОТИП**



Санкт-Петербург  
2017

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ"

Паткин Евгений Львович

**ЭПИГЕНЕТИКА – ИНТЕГРИРУЮЩАЯ СИСТЕМА МЕЖДУ  
ГЕНАМИ, МЕТАБОЛИЗМОМ И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДОЙ,  
ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ ФЕНОТИП**

Актровая речь на заседании Ученого Совета  
ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины"

26 декабря 2017 г.

Санкт-Петербург  
2017

Гипотезы — это леса, которые возводят перед зданием и сносят, когда здание готово; они необходимы для работника; он не должен только принимать леса за здание.

И. Гёте

Глубокоуважаемые члены Ученого Совета, коллеги и гости Института!

Фундаментальной парадигмой генетики как науки, ее краеугольным камнем является выяснение взаимоотношений «генотип/фенотип». При этом исследователи лишь сравнительно недавно получили возможность изучать биологический феномен, лежащий в основе формирования всего огромного разнообразия живых организмов и клеток, их составляющих. Речь идет о дифференцировке клеток в эмбриогенезе. В последнее время этот малоизученный процесс стал необычайно привлекательным для исследования ввиду все большего количества данных, указывающих на его критическую роль в различных патологических процессах, возникающих во взрослом состоянии, и очевидного значения для культивирования эмбриональных стволовых клеток, которые предполагается использовать в терапевтических целях. Именно в раннем эмбриогенезе во взаимодействии между мужским и женским генотипами зиготы и зародыша и окружающей средой закладываются эпигенотипы различных бластомеров, а далее — органов и тканей. Более того, именно при исследовании эмбриогенеза были сформулированы основные понятия эпигенетики и развиты соответствующие методические подходы.

Название «эпигенетика» появилось в 1942 году, когда Конрад Уоддингтон, биолог из Англии, заложивший основы системной биологии, предложил этот термин как среднее между «генетикой» и аристотелевским «эпигенезом» — учением о последовательном эмбриональном развитии. Когда Уоддингтон ввёл этот термин, физическая природа генов не была до конца известна, поэтому он использовал его в качестве концептуальной модели того, как гены могут взаимодействовать со своим окружением при формировании фенотипа. Робин Холлидэй (Robin Holliday, 1990) определил эпигенетику как «изучение механизмов временного и пространственного контроля активности генов в процессе развития организмов». Таким образом, термин «эпигенетика» может быть использован, чтобы описать любые внутренние факторы, которые влияют на развитие организма, за исключением самой последовательности ДНК. Сегодня одним из определений понятия «эпигенетика» является: «Изучение изменений функции гена, которые наследуются в результате митоза и/или мейоза и не могут быть объяснены изменениями в нуклеотидной последовательности ДНК» (Russo et al., 1996).

Итак, эпигенетика – это стабильные изменения в геноме, наследуемые в ходе клеточных делений и, в ряде случаев, между поколениями, но не определяемые последовательностями нуклеотидов в ДНК. Расширение эпигенетики до эпигеномики, как и генетики до геномики, заключается в расширении центра внимания от конкретных локусов к большим или полным наборам эпигенетических признаков, влияющих на фенотип индивида. Эпигенетическое репрограммирование – это процесс, при помощи которого генотип организма взаимодействует с окружающей средой, образуя фенотип. Этим и объясняются индивидуальные колебания и возникновение уникальности клеток, тканей и органов, несмотря на идентичность генетической информации.

Главными эпигенетическим факторами принято считать модификации гистонов, метилирование ДНК и некодирующие РНК (Паткин, 2008; Mehler et al., 2008). К ним следует также отнести, как показал целый ряд недавних исследований, и такой важный фактор, как пространственная организация ядра (Паткин, Сучкова, 2006; Fraser, Bickmore, 2007). Эти механизмы участвуют в таких основных клеточных функциях как геномная стабильность, X-хромосомная инактивация, гетерохроматинизация, генный импринтинг, мозаичный эффект положения, парамутации, моноаллельная экспрессии, и, в более широком смысле, различия в экспрессии между аллелями. Эпигенетическое репрограммирование придает большую пластичность в развитии организма, благодаря чему в течение определенных критических периодов эндогенные или экзогенные факторы могут изменять функционирование определенных органных систем. Эпигенетические изменения обратимы, по крайней мере, в линии половых клеток, и они часто действуют на расстоянии. В многоклеточном организме именно эпигенетические эффекты обуславливают многообразие типов клеток, идентичных по своему генотипу (Patkin, 2002). Такое фенотипическое разнообразие вызвано различиями в картине генной экспрессии между различными группами клеток и даже между отдельными клетками, например, нейронами.

Эпигенетические модификации действуют подобно переключателям, контролирующим генную активность так, что только гены, действие которых необходимо в данной клетке, фактически включены. Эти модификации обеспечивают "память" о генной активности, передающуюся в ходе каждого клеточного деления, чтобы, например, клетки печени образовывали при делении именно себе подобные, а не нейроны или миоциты. Метилирование ДНК, за некоторыми исключениями, обычно связывают с подавлением генной

экспрессии, поскольку промоторы активно экспрессирующихся генов, как правило, не метилированы. Другим важным эпигенетическим механизмом является ремоделирование, т.е. изменение структуры хроматина, также связанное с регуляцией экспрессии генов (Shiota, 2004).

За последние годы наблюдается бурный рост эпигенетических исследований, связанный, как обычно, с развитием новых молекулярных и цитологических подходов. Но, основные фундаментальные наблюдения связаны с изучением процессов дифференцировки в развитии. Рассмотрим вкратце основные постулируемые сегодня эпигенетические механизмы, или, как часто говорят эпигенетические маркеры.

Эпигенетические маркеры включают модификации хроматина (например, триметилирование гистоновых хвостов), некодирующую РНК, и модификации ДНК (например, ДНК-метилирование) (Egger и др., 2004, Bernal and Jirtle, 2010). Метилирование ДНК представляет собой наиболее полно охарактеризованный эпигенетический механизм управления, и, как правило, заключается в добавлении метильной группы к 5'-углероду цитозина к цитозин-фосфо-гуанину (CpG) динуклеотиду, образуя 5-метилцитозин (5-МЦ). Метилирование ДНК, как правило, ведет к уменьшению связывания транскрипционных факторов с промоторами / энхансерами сайтов, ведя к уменьшению транскрипции генов (Medvedeva et al., 2014). Из-за высокого мутагенного потенциала 5mC спонтанно деаминируется в тимин, поэтому геном млекопитающих в значительной степени лишается CpG за исключением CpG островков (CGIs) (Bird et al., 1985). Эти богатые CpG островки (CGI) распределены по геному млекопитающих неслучайно, будучи преимущественно локализованными в регуляторных районах, таких как промоторы (Deaton & Bird 2011). Метилирование ДНК также

изменяет взаимодействие между ДНК и ДНК-связывающими белками, регулируя генную экспрессию. Метилирование CGI обычно ассоциировано с транскрипционной репрессией, хотя локальная плотность CpG в пределах конкретного промотора может фактически способствовать транскрипционному эффекту (Hackett, Surani. 2013; Messerschmidt, 2016). ДНК метилируется с участием семейства ДНК метилтрансфераз (DNMTs). DNMT1 преимущественно метилирует полуметилированную ДНК и, таким образом, поддерживает метилирование ДНК после репликации. Метилирование de novo устанавливается с помощью ДНК-метилтрансфераз 3А и 3В, которые преимущественно метилируют неметилированную ДНК. Третий член семьи DNMT3, DNMT3L не обладает какой-либо DNMT активностью, но помогает стимулировать активность, DNMT3А и 3В. Гораздо меньше известно о механизмах деметилирования ДНК. Уже давно было предположено, что 5mC может отщепляться как пассивно (из-за отсутствия поддержания во время репликации), так и активно с помощью специализированного(ых) фермента(ов), которые были обнаружены лишь недавно. Было обнаружено семейство ферментов (ТЕТ) способных окислять 5mC до 5-гидроксиметилцитозина (5hmC) и далее до 5-формилцитозина (5fC) и 5-карбокситозина (5caC) (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2011). Гистоны — это семейство высококонсервативных, небольших, основных (положительно заряженных) белков, вокруг которых закручена отрицательно заряженная ДНК, образуя нуклеосомы — основные структурные единицы хроматина (комплекс белок-ДНК), дающие возможность упаковывать ДНК в ядре (Kornberg & Lorch 1999). И хвосты и глобулярные домены гистонов могут подвергаться множественным пост-трансляционным модификациям, включая ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, рибозилирование АДФ, убиквитинирование и сумоилирование, образуя так

называемый гистоновый код (Suganuma & Workman, 2011). Функциональные группы добавляются или удаляются целым рядом ферментов: ацетилазами, метилтрансферазами, киназами, АДФ-рибозилтрансферазами, убиквитин-лигазами, сумо-лигазами; деацетилазы, деметилазы, фосфатазы, АДФ-рибозилгидролазами, деубиквитиназами, сумо-деконъюгирующими ферментами (Khare et al. 2012). Эти модификации изменяют взаимодействие между ДНК и ДНК-связывающими белками (такими как транскрипционные факторы и РНК-полимеразы). Таким образом формируется общий комбинированный эффект гистонового кода, который определяет состояние активного или репрессивного хроматина и, следовательно, регулирует экспрессию гена. В целом, ацетилирование и деметилирование гистонов ассоциировано с активным хроматином (эухроматином), тогда как деацетилирование метилирование гистонов связаны с репрессированной структурой хроматина (гетерохроматин). Более того, как и следовало ожидать, показано, что работа ДНК метилаз связана с модификациями гистонов. В последнее время активно исследуется надсемейство некодирующих РНК (ncRNA), которое включает в себя ряд семейств обычно классифицируемых в зависимости от их длины (Mattick, 2007). В целом, miРНК подавляют экспрессию генов путем связывания с мРНК специфично по отношению к последовательности нуклеотидов, и либо вызывая их деградацию, или подавляя их трансляцию (Ivey, Srivastava, 2015). Таким образом, микроРНК участвуют в тонкой настройке экспрессии генов, в то время как рiРНК и esiRNAs играют основную роль в поддержании стабильности генома.

Все эти механизмы играют важную роль в нормальном развитии млекопитающих, в особенности, во время раннего эмбриогенеза и формирования половых клеток (Cook & Balleloch

2013; Luk et al., 2014; Grote, Herrmann, 2015). Какие же основные эпигенетические события происходят в раннем развитии?

### **Эпигенетические изменения в раннем развитии**

В ходе развития плода происходят процессы деметилирования и метилирования *de novo* (Reik et al., 2001; Smallwood, Kelsey, 2012), причем эти волны эпигенетического перепрограммирования регулируют начальную пролиферацию и дифференцировку клеток зародышей (Messerschmidt et al., 2014). Метилирование ДНК, как упомянуто выше, является ключевой ковалентной модификацией, наследуемой в ходе делений соматических клеток, а 5-метил-цитозин (5-MeC) представляет 2-5% всех цитозинов в геномах млекопитающих и встречается в основном в CpG динуклеотидах (Паткин, 2008; Millar et al., 2003). Метилирование ДНК участвует в регуляции многих клеточных процессов, в том числе, в структурировании хроматина и его ремоделинге, инактивации X-хромосомы, геномном импринтинге, стабильности хромосом и транскрипции генов (Reik et al., 2001). Паттерны метилирования детерминируются во время раннего эмбриогенеза (Hajkova et al., 2002) и продолжают модифицироваться весь неонатальный период (Weaver et al., 2005). Между оплодотворением и имплантацией происходит деметилирование большинства собственных генов, за исключением импринтированных и некоторых повторяющихся последовательностей. Отсутствие деметилирования импринтированных генов в предимплантационный период является существенным для нормального эмбрионального развития (Wu et al., 2004), тогда как деметилирование других генов является важным фактором создания "открытого" состояния генома в недифференцированном, развивающемся эмбрионе.

Наши исследования в области эпигенетики и эпигеномики были начаты в Отделе эмбриологии ИЭМ (зав. проф. А.П. Дыбан) еще в 70-х годах XX века, то есть фактически были

пионерскими в нашей стране и одними из немногих в мире. На первом этапе они были посвящены наиболее яркому примеру эпигенетической регуляции, а именно выключению одной из X хромосом в раннем эмбриогенезе, встречающемуся у самок млекопитающих и человека (Avner P. and Heard 2001) и динамике гетерохроматина. Инактивация X хромосомы у самок протекает в раннем эмбриогенезе, когда любая из двух X хромосом претерпевает цитологически выявляемую гетерохроматинизацию (то есть ведет себя подобно центральному гетерохроматину).

У самок млекопитающих одна из X хромосом выключается для компенсации различий в дозе генов между самцами (XY) и самками (XX). Такая инактивированная X хромосома (Xi) далее стабильно наследуется в ходе клеточных делений. Исторически наиболее ранний и простой метод цитологического выявления гетерохроматизированной X хромосомы млекопитающих берет свое начало от работы Barr, Bertram (1949), которые описали половой хроматин (X хроматин) — гетеропикнотическую структуру, найденную в интерфазных ядрах клеток ряда видов млекопитающих. В дальнейшем было доказано (Ohno, Cattanaach, 1962), что половой хроматин является цитологическим проявлением генетической инактивации одной из X хромосом. Однако, например, у мышей половой хроматин не выявляется. И это в значительной мере тормозило исследования гетерохроматизированной X хромосомы у млекопитающих. Но, тем не менее, инактивированная X хромосома, как оказалось, может быть выявлена в метафазе при помощи окрашивания флуорохромами акрихин-ипритом и/или Хехст после обработки ткани в горячем гипотоническом растворе при приготовлении препаратов (Kanda, 1973, Паткин, 1973, 1980). Мы показали, что инактивированная X хромосома может выявляться в ряде случаев уже на стадии двух бластомеров в одном из них, то есть это указывает на ранее

начало дифференцировки. Еще одним важным направлением первых эпигенетических исследований поиска взаимосвязи между генетической активностью хромосом и цитологическим проявлением этой активности можно отнести исследование гетерохроматина. Сам термин гетерохроматин был впервые предложен Heitz (1928) для обозначения хромосомального материала, который в отличие от эухроматина не деконденсируется в телофазе и остается более конденсированным в интерфазе и ранней профазе. В дальнейшем было сформулировано понятие гетерохроматинизации, суть которого в том, что участок эухроматического района, приближенный к гетерохроматину приобретает свойства последнего в течение значительной части клеточного цикла находиться в компактном состоянии, при этом активность генов данного района репрессируется (Прокофьева-Бельговская, 1964). Процесс гетерохроматинизации обратим, лабилен, находится под контролем генотипа, на него влияют условия развития, включая влияние экотоксикантов, и он проявляется не во всех клетках организма, вызывая мозаичное развитие признака (Прокофьева-Бельговская, 1977). Показано, что основную роль в эпигенетической регуляции моноаллельной экспрессии генов X хромосомы и импринтированных генов играют повторяющиеся последовательности ДНК (Cullen, 2004; Tupler и Gabellini, 2004). Причем, такие повторы могут быть локализованы как внутри генной последовательности (экзонах или интронах), так и вне генов. В последнем случае действие повторов на экспрессию соседних и, возможно, отдаленных генов может осуществляться при участии интерстициального гетерохроматина (Dillon, Festenstein, 2002). Одним из загадочных аспектов организации генома у эукариот является разделение хромосом на эухроматин и гетерохроматиновые области. Приблизительно 15% человеческого генома и 30%

от *Drosophila melanogaster* являются гетерохроматическими (John, 1988).

Гетерохроматин отличается от эухроматина малочисленностью генов, плотно упакованной структурой в течение клеточного цикла, репликацией в конце S-фазы, высоким содержанием повторяющихся последовательностей и типичным расположением вблизи центральных и теломерных областей (Hennig, 1999; Henikoff, 2000, Grewal, Elgin, 2002). Гетерохроматин относительно устойчив к расщеплению нуклеазами, будь то неспецифические (ДНКазы I) или специфические и менее доступен для других экзогенных зондов, таких как Dam метилтрансфераза (Eisenberg, 2001). Образование гетерохроматина и его изменения лежат в основе эпигенетических явлений, участвующих в процессах дифференциации (Patkin, 2002), и, как было показано, участвуют в некоторых заболеваниях человека (Hendrich, Vickmore, 2001) и при старении (Villeponteau, 1997). Действительно мы показали, закономерное изменение числа блоков структурного гетерохроматина при делениях дробления и в гоноцитах человека при их миграции и при дифференцировке в оогонии. Таким образом мы показали закономерные изменения в гетерохроматизации X хромосомы и поведении структурного гетерохроматина, сопряженные с процессом дифференцировки (рис. 1).

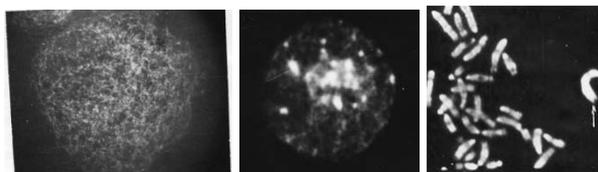


Рисунок 1. Выявление гетерохроматина в пронуклеусах, морулах и инактивированной X хромосомы.

То есть, полученные нами данные, а также описанные ниже, впервые, по крайней мере в нашей стране, продемонстрировали важнейшую роль эпигенетических феноменов в процессе дифференцировки. Для прояснения закономерностей формирования гетерохроматина, который рассматривается как один из основных эпигенетических феноменов, мы трансфецировали клетки эмбриональной тератокарциномы F9 фрагментом ДНК-сателлита IV (Sat) быка, который не гомологичен сателлитной ДНК мыши. DAPI-окрашивание продемонстрировало, что интегрированный сателлит индуцировал образование заметных эктопических блоков неогетерохроматина в областях, прилегающих к интегрированному сателлиту. Эти блоки были расположены исключительно между интегрированными Sat и центромерным гетерохроматином. Таким образом, мышьяная повторяющаяся центромерная ДНК (АТ-богатая, DAPI-положительная) «распространяется» вдоль хромосомы в ответ на интеграцию богатой GC-богатой ДНК (рис. 2).

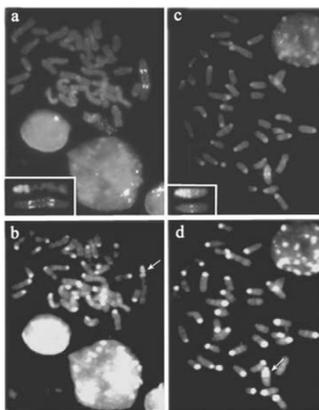


Рисунок 2. Выявление неогетерохроматина при помощи FISH.

Эти результаты указывают на возможный механизм такого эпигенетического феномена, как эффект положения.

Но описанные выше наши и зарубежные исследования в этом же направлении, относительно корреляции процесса начальной дифференцировки и гетерохроматизации одной из X хромосом и динамике структурного гетерохроматина не дают решения одной из фундаментальных проблем современной биологии — установления молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе клеточного коммитирования (детерминации) и дифференцировки в раннем эмбриогенезе, в ходе которого имеет место сочетание точных митотических делений и создание клеточного многообразия. В основе управления указанными процессами генной экспрессии, как все более становится ясным, лежат эпигенетические механизмы, которые скорее всего ответственны за то, что очевидно идентичные генетические последовательности прочитываются транскрипционными механизмами двумя различными, но наследуемыми путями: активным или репрессированным. В любом случае в ходе дифференцировки должны существовать механизмы, обеспечивающие асимметричность клеточных делений, приводящую к различиям между дочерними клетками. (Hall, Watt, 1989; Horvitz, Herskowitz, 1992; Patkin, 2002). Адекватным при этом является изучение структурно-функциональной организации хромосом и ядер в ходе раннего эмбриогенеза *in situ* на цитологических препаратах с использованием в первую очередь молекулярно-цитогенетических методов, дающих возможность использования современных молекулярных методов анализа на уровне отдельных хромосом и хромосомных доменов. Нами впервые показано, что мужской и женский наборы хромосом на стадии зиготы различаются по уровню метилирования ДНК в их составе, общий уровень метилирования ДНК хромосом падает в ходе делений дробления, а количество транскрипционно активных или потенциально активных сайтов хромосом растет в ходе делений дробления, достигая максимальной величины

на стадии бластоцисты. Впервые обнаружена спонтанная дифференциальная окраска хроматид на стадии бластоцисты, при этом впервые доказано существование спонтанных сестринских хроматидных обменов и показано, что их частота в 4-5 раз превышает таковую у постимплантационных зародышей и взрослых животных (Patkin et al., 1994, рис. 3). Впервые показано различие в уровне метилирования ДНК сестринских хроматид на стадии бластоцисты (Patkin et al., 1997, рис. 3), что было затем подтверждено в работе Rougier et al. (1998).

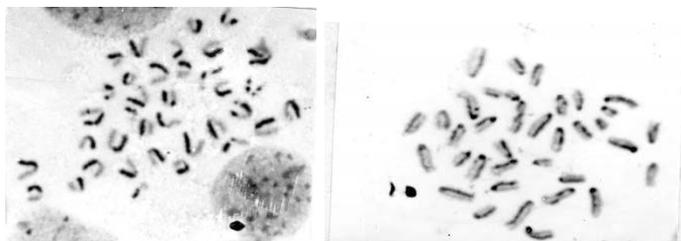


Рисунок 3. Дифференциальная организация и метилирование сестринских хроматид на стадии бластоцисты мышей.

На этой основе впервые сформулирована гипотеза, связывающая первичную цитодифференцировку бластомеров с асимметричностью организации сестринских хроматид и сестринскими хроматидными обменами, обусловленными в свою очередь асимметричностью метилирования хроматидной ДНК. В дальнейшем на основе разработанного нами иммуноцитохимического метода выявления метилирования *in situ* (Grudinina et al., 2015) нам удалось впервые показать, что феномен дифференциального метилирования сестринских хроматид встречается не только у доимплантационных зародышей, но и в других клетках, хотя с меньшей частотой (Patkin et al., 2015), причем мы обнаружили, что различия в метилировании сестринских хроматидах коррелируют со

степенью предполагаемой клеточной дифференцировки. В частности, эта асимметрия в маркировке сестринских хроматид была самой высокой в бластоцистах и близка к нулю в клетках HEK293 (рис. 4).

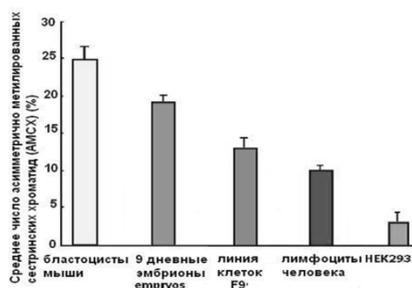


Рисунок 4. Асимметрия метилирования сестринских хроматид в зависимости от степени дифференцированности клеток.

Механизм, лежащий в основе такого дифференциального метилирования сестринских хроматид неясен, хотя мы предполагаем, что это обусловлено пассивным и / или активным деметилированием ДНК во время репликации ДНК. Что касается роли этого асимметричного метилирования сестринских хроматид, мы прогнозируем, что после деления клеток, дочерние клетки будут нести одну гомологичную хромосому с открытой конформацией хроматина, что типично для недифференцированных клеток, тогда как другая дочерняя клетка существует как более дифференцированная. Мы выдвинули гипотезу что асимметричное метилирование сестринских хроматид является специфической характеристикой потенциала или уже состоявшегося состояния дифференциации, и, следовательно, может быть использовано в качестве маркера эмбриона, прародителя, и взрослых стволовых клеток, а также в качестве маркера воздействия окружающей среды или маркера заболеваний, связанных с дифференцировкой и /или дедифференцировкой (см. ниже).

## **Эпигенетика, эпигеномика, патологии человека**

В настоящее время традиционное представление о том, что восприимчивость к заболеваниям определяется взаимодействием между генами и окружающей средой, дополняется и расширяется новыми данными о ключевой роли эпигенетического репрограммирования (Tang, Ho, 2007). Этим и объясняются индивидуальные колебания и возникновение уникальности клеток, тканей и органов, несмотря на идентичность генетической информации. Эпигенетическое репрограммирование придает большую пластичность в развитии организма, благодаря чему в течение определенных критических периодов эндогенные или экзогенные факторы могут изменять функционирование определенных органных систем. Особая роль в связи с развитием различных патологий принадлежит процессу развития, так как эпигенетика развития, как представляется, устанавливает "адаптивные" фенотипы, позволяющие справляться с возникающими в более позднем периоде жизни влияниями со стороны окружения. Такие адаптивные фенотипы способствуют сохранению здоровья, в то время как возможные нарушения в этот период могут снизить адаптивность к вредным воздействиям в более поздние периоды жизни. Недавняя идентификация значительного числа эпигенетически регулируемых генов в различных модельных системах создает основу для описания определенных эпигеномов, связанных с различными заболеваниями. Вследствие этого, в глобальную проблему улучшения здоровья человека, связанную с совершенствованием лечебных мероприятий при заболевании, может быть включен новый аспект персонализированной, превентивной медицины, основанной, в частности, на эпигенетическом маркировании в пределах каждого генетического "портрета".

Более того, как показано недавно, отклонения от нормы в питании матери могут привести к аномальному паттерну

метилирования как у самой матери, так и у ее детей и внуков, что в дальнейшем развитии может сказаться в появлении заболевания во взрослом состоянии (Morgan, Whitelaw, 2008). Еще более разительным, является обнаружение у крыс того, что поведение матери может вести к изменению уровня метилирования у потомства, причем это отклонение от нормы поддерживается в дальнейшем онтогенезе (Champagne et al., 2006), что также может приводить к аномальной восприимчивости к патологии. Исследование паттерна метилирования ДНК в мозгу также показало, что этот показатель может быть крайне лабильным в зависимости от уровня экспрессии ряда генов, в частности, он меняется при синаптической передаче (Sweatt et al., 2008). Найдено также, что уровень метилирования геномной ДНК у монозиготных близнецов может значительно различаться (Kaminsky et al., 2009), что возможно, и обуславливает известную дискордантность монозиготных близнецов по встречаемости различных патологий, особенно ментальных (Weksberg et al., 2002; Javierre et al., 2010). Метилирование ДНК также претерпевает значительные изменения с возрастом, что связывают с развитием ряда возрастных заболеваний, особенно, рака и неврологических патологий (Maegawa et al., 2010). То есть метилирование ДНК, в отличие от общепринятых в течение многих лет взглядов, оказывается довольно лабильной эпигенетической характеристикой, как и модификации хроматина. Но молекулярные механизмы того, что определяет "закрепленность" и независимость от различных внешних и внутренних факторов, либо лабильность метилирования ДНК, остаются пока не понятными. Не исключено, что в такой дифференциации могут играть роль тандемные ДНК повторы. (см. ниже). Доказательством роли эпигенетических феноменов в развитии патологий является наличие ряда заболеваний, для которых твердо установлена

такая зависимость, так, например, близнецы конкордантные по синдрому Бэквита-Видемана являются конкордантными по отсутствию метилирования в гене KCNQ10T1, кодирующем не транслируемую РНК (Weksberg et al., 2002). То же имеет место в случае синдрома ICF, который является редким аутосомно-рецессивным заболеванием, для него характерны варьирующий иммунодефицит, небольшие лицевые аномалии и деконденсация центромерного гетерохроматина, сопровождающаяся нестабильностью хромосом 1, 9, 16. Молекулярные нарушения в этом случае – гипометилирование сателлита 2 и сателлита 3 этих хромосом. Хотя общий уровень метилирования представляется нормальным,  $\alpha$  сателлитный повтор и неактивная X хромосома могут быть гипометилированы. Показана мутация в germ-line гена DNMT3B, которая, как предполагают, ведет к гипометилированию (Jin et al., 2008). Еще одним примером является синдром Ретта (Liu, Francke, 2006). Синдром Ретта — это X-сцепленная первазивная патология развития, и она вызывается мутациями в гене, кодирующем метил-CpG-связывающим белке MECP2. MeCP2 это хроматин-связанный белок, который может как активировать, так и ингибировать транскрипцию. Он необходим для созревания нейронов и регулируется в развитии у человека и мышей. Имеются многочисленные данные относительно роли эпигенетических механизмов, а именно, метилирования ДНК и ацетилирования гистонов в формировании неоплазий (Fraga et al., 2005; Esteller, 2007; Seligson et al., 2005). Наследуемый характер эпигенетического механизма был показан в случае рака прямой кишки, при котором фермент репарации ДНК кодируемый геном MLH1 инактивируется метилированием ДНК. Для таких больных наблюдали поддержание такой эпимутации между поколениями (Hitchins et al., 2007). Показана также регуляторная роль метилирования ДНК для некоторых других заболеваний. Так при аутоиммунных и воспалительных

заболеваниях часто имеет место ассоциация с нарушением регуляции Т-клеточных ответов, связанных в свою очередь с нарушением метилирования гена FOXP3 — ключевого для развития регуляторных Т-клеток ( Huehn et al., 2009). Роль эпигенетических модификаций описана и для целого ряда других комплексных заболеваний (см. обзор Handel et al., 2009, Паткин, 2008). Скорее всего список таких патологий будет постоянно расти с развитием новых более чувствительных методов, а также благодаря все большему вниманию, уделяемому поиску роли эпигенетических механизмов в других распространённых заболеваниях (Godfrey et al., 2007; Jiang et al., 2004; Dolinoy et al., 2007). Предполагается, что эпигенетические модификации — изменения в генной экспрессии, протекающие без изменений в последовательности ДНК, могут наследоваться как митотически (см. выше), так и передаваться между поколениями (Rakyan et al., 2003; Anway et al., 2005; Сломинская и др., 2006; Whitelaw, Whitelaw, 2008), хотя факт передачи эпигенетических модификаций между поколениями пока ограничен лишь несколькими примерами (Whitelaw, Whitelaw, 2008).

В настоящее время считается установленным, что увеличение возраста, наличие сахарного диабета, высокое содержание холестерина в крови (атеросклероз), курение, высокое кровяное давление (гипертония), ожирение, гиподинамия, мужской пол и история семьи являются факторами риска, которые увеличивают предрасположенность к развитию сердечной недостаточности (Thom et al., 2006), и, как уже показано, отражаются в изменениях уровня метилирования ДНК (Bjornsson et al., 2008; Marín-García, Akhmedov, 2015). Результаты многочисленных опытов, определивших изменения уровня метилирования ДНК в лейкоцитах периферической крови в моделях атеросклероза на животных, подтверждаются исследованиями, выявившими

такие же изменения в крови больных людей. Важно, что такие эпигенетические изменения предшествуют каким-либо из перечисленных признаков атеросклероза, которые могут быть обнаружены с помощью биохимических, гистологических и цитологических методов, поэтому модификации метилирования ДНК могли бы служить биомаркером на ранних стадиях, как атеросклероза, так и сердечно-сосудистых заболеваний (Lund et al., 2004; Zaina et al., 2005; Lund, Zaina, 2009). Учитывая очевидный полигенный характер, как атеросклероза, так и различных типов сердечно-сосудистых и цереброваскулярных патологий, можно полагать, что уровень глобального метилирования ДНК отражает изменения уровня метилирования ДНК в генах различных типов клеток, участвующих в иммунных или воспалительных ответах при развитии указанных патологий (Zaina et al., 2005; Zaina, 2014). В то же время имеются данные, свидетельствующие о ключевой роли эпигенетических модификаций в регуляции экспрессии генов эндотелия, и, следовательно, в патогенезе сосудистых заболеваний, в том числе атеросклероза и сосудистого рестеноза (Pons et al. 2009). Важно отметить, что наибольшее число потенциально метилируемых/деметируемых сайтов CpG локализовано в ретротранспозонах и тандемных повторах ДНК, а именно они, склонны при изменении уровня метилирования ДНК становиться нестабильными и нарушать нормальную экспрессию генов. Все это вместе взятое указывает на необходимость оценки обшегономного уровня метилирования ДНК в понимании этиологии заболевания, а также в качестве потенциального биомаркера заболеваний. Так, в настоящее время уже ясно показано, что развитие артериальной гипертензии, которая относится к важным факторам риска сердечной недостаточности, тесно связано с нарушением метилирования/деметирирования промоторов ДНК ряда ключевых генов. В частности, было показано

увеличение метилирования ДНК в промоторе гена, экспрессирующего 11-бета-гидроксистероид-дегидрогеназу 2 (11beta-HSD2), сниженная активность которого, как правило, сопровождается развитием первичной артериальной гипертензии (Friso et al., 2008; 2015).

Проведенный нами анализ уровня метилирования ДНК по сайтам CCGG с помощью метил-чувствительных рестриктаз HpaII и MspI в ДНК из периферической крови выявляет более сложную закономерность изменений глобального метилирования ДНК при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Последовательности CCGG, наряду с CpG сайтами ДНК, служат удобной мишенью для полногеномного сканирования уровня метилирования ДНК из-за их более высокой плотности локализации в геноме в сравнении с отдельными CpG сайтами. С помощью данного метода была установлена связь глобального гиперметилирования ДНК с сосудистой воспалительной реакцией в результате эндотелиальной травмы, которая коррелировала со смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний (Stenvinkel et al., 2007). Подобные же результаты о гиперметилировании ДНК в периферической крови были получены у больных с заболеванием коронарных артерий (Sharma et al., 2008). Авторы также показали, что в возрастной группе (61-75 лет) у пациентов с подобным заболеванием наблюдается значительно более высокий уровень общегеномного гиперметилирования ДНК по сравнению с контрольной группой. Более того, по-видимому, уровень метилирования ДНК в значительной степени модифицируется с нарастанием симптомов кардиоваскулярных заболеваний, в том числе было показано, что на терминальных стадиях кардиомиопатии в кардиомиоцитах у больных было обнаружено снижение метилирования CpG последовательностей как в районе промоторов, так и на самих генах,

отвечающих за увеличение экспрессии, и не менялось на тех, которые отвечают за понижение экспрессии (Movassagh et al., 2011).

Очень важно, что сердечно-сосудистые заболевания часто развиваются после длительной бессимптомной фазы. Поэтому важно иметь максимальное число биомаркеров различной природы. С помощью эпигеномных биомаркеров, еще до проявления определенной симптоматики заболевания, можно будет иметь возможность предупредить больных с ИБС о нарастании риска развития инфаркта миокарда и оценить успех проводимой терапии.

Для решения указанных проблем необходима разработка персонифицированной диагностики и в дальнейшем терапии, что требует сочетанного исследования как на человеческом материале, включая индивидуализированные клеточные культуры, эпидемиологические исследования, так и на модельных системах, особенно для изучения наследования эпигенетических нарушений. На этой основе будут предложены способы возможной коррекции повышенной восприимчивости к заболеваниям с помощью так называемых "эпигенетических" лекарств. На основе полученных данных будет разработан ряд новых тест-систем и методических указаний, необходимых для скрининга повреждающих факторов; новые молекулярные методики персонифицированной предикативной диагностики сердечно-сосудистых (ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда), нейродегенеративных (болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, эпилепсия) и сопутствующих когнитивных расстройств, а также онкологических заболеваний. Эпигенетический подход, который позволяет произвести оценку патологических модификаций уровня полногеномного метилирования ДНК, как ожидается, способен значительно продвинуть наше современное понимание этиологии сосудистых заболеваний и может служить в качестве

предикативного при определении будущего риска развития таких заболеваний. Поскольку большинство сердечно-сосудистых заболеваний имеют мультифакторную этиологию, складывающуюся из сочетания генетических факторов с факторами окружающей среды, поведенческими особенностями и характером питания, в особенности в период развития. В силу этого, традиционные диагностические методы могут не указывать на патологию. Использование эпигенетического анализа может быть чрезвычайно полезно, давая интегральную картину состояния генома при патологии и возникающими эпигенетическими модификациями, в особенности метилированием ДНК. Важно отметить, что наибольшее число потенциально метилируемых/деметируемых сайтов CpG локализовано в ретро-транспозонах и тандемных повторах ДНК, а именно они, склонны при изменении уровня метилирования ДНК становиться нестабильными и нарушать нормальную экспрессию генов, но уровень их метилирования не находит отражения при общепринятых методах биохимического анализа. Указанная нестабильность генома особенно значима в пожилом возрасте в патогенезе сосудистых заболеваний, в том числе атеросклероза и сосудистого рестеноза. Исходя из вышесказанного мы оценивали обшегеномный уровень метилирования ДНК в качестве потенциального биомаркера заболеваний.

Проведенный нами эпигенетический анализ позволил выявить определенную связь у больных пожилого возраста с поражениями коронарных сосудов (ИБС) с изменениями уровня метилирования CpG сайтов ДНК. Было установлено, что у мужчин с диагнозом ИБС, которая сопровождается атеросклерозом аорты, церебральных, коронарных артерий, с очень высоким риском сердечно-сосудистых осложнений и поражениями вен нижних конечностей, а также имеющих

другие сопутствующие заболевания, уровень метилирования ДНК значительно превышает таковые значения у условно здоровых мужчин (рис. 5).

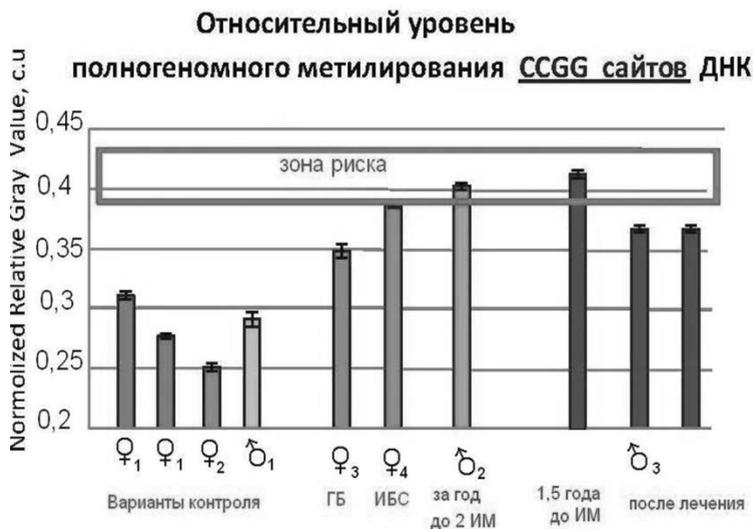


Рисунок 5. Анализ полногеномного метилирования ДНК у пациентов с с/с заболеваниями.

По предварительным данным, для женщин такого же возраста такая закономерность пока не была выявлена. Во-вторых, проведенное хирургическое лечение наряду со стандартной терапией приводит у них к снижению уровня метилирования ДНК по CCGG сайтам, хотя это снижение незначительно. По-видимому, этот показатель может служить маркером высокой степени атеросклеротического поражения коронарных артерий у пациентов пожилого возраста, по крайней мере, для мужчин. Причем это выявляется обоими методами определения уровня полногеномного метилирования ДНК в крови пациентов. Для более определенных выводов в отношении женщин с ИБС требуется пролонгированное исследование на большем количестве

пациентов со сходной клинической характеристикой и сходным соответствующим лечением. Можно сделать заключение, что оба методических подхода требуются для более точной диагностики.

### **Популяционная эпигенетика**

Эпигенетическое наследование предполагает передачу информации (эпигенетические метки), не кодируемой в последовательности ДНК, от родительских клеток к дочерним клеткам, и от поколения к поколению. Эпигенетическое маркирование, подобно книжным закладкам, маркирует состояние хроматина, как "включено" или "выключено", как "открытое" или "закрытое", так что оно может быть идентифицировано и может поддерживаться в дочерних клетках (Choudhuri, 2009). Популяционная генетика изучает генетическое разнообразие в популяциях и закономерности изменения этого разнообразия в цепи поколений (во времени) и в разных частях ареала (в пространстве). Аналогичным образом популяционная эпигенетика развивается как подраздел исследования взаимодействия между молекулярной генетикой, геномикой и популяционной биологией, задаваясь вопросами относительно распространенности и важности эпигенетических изменений в природном мире (Richards, 2008). Однако, значение изменчивости эпигенетических состояний на популяционном уровне во многом остается неизученным. В контексте популяционной эпигенетики необходимо рассмотрение различных аспектов эпигенетики, например, молекулярных мишеней эпигенетических механизмов, межгенерационного наследования эпигенетических модификаций, животных-моделей для исследования эпигенетики, эпигенетических последствий воздействия на млекопитающих неблагоприятных внешних факторов (Bollati, Vaccarelli, 2010; Choudhuri et al., 2010; Jablonka, Raz, 2009; LeBaron et al., 2010; Rosenfeld, 2010; Patkin,

Sofronov, 2013). Под действием таких факторов происходят соответствующие изменения в генной экспрессии, что часто ведет к измененному фенотипу. В некоторых случаях эпигенетические изменения могут быть переданы последующим поколениям, даже когда эти поколения уже не подвергаются воздействию внешними факторами, приведшими к исходным эпигенетическим изменениям (см. ниже). То есть, популяция может сталкиваться с последствиями от воздействия химических веществ на их предков (Румак и др., 2000), что важно, как для понимания эволюционных процессов, так и для оценки экологического риска (Vandegheuchte, Janssen, 2011). Уже первые исследования эпигеномной изменчивости в популяциях указывают на высокий уровень фенотипически важных различий, при которых паттерны эпигенетического регулирования различны между индивидами и участками генома, а также и в связи с различиями окружающей среды. Этот феномен имеет прямое отношение к патологическим процессам, так как этническая принадлежность может в значительной степени определять восприимчивость к распространенным патологиям (Паткин, Софронов, 2012; Smith, 2011; Viennas et al., 2012). Действительно, мы показали, что частота индивидуумов с метилированными аллелями минисателлитов гена транспортера серотонина, гена рецептора B2 брадикинина и гена центаурина  $\beta 5$  значительно различается в контрольных выборках русских и казахов (рис. 6).

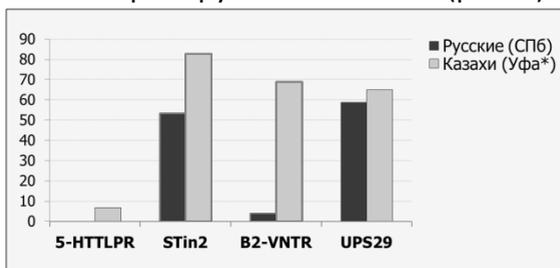


Рисунок 6. Различия в метилировании минисателлитов генов Stin2, B2-VNTR, UPS29 у русских и казахов.

## **Эпигенетическая токсикология и перспективы ее развития**

В последнее время наши исследования совместно с акад. Г.А. Софроновым направлены на изучение эпигенетических механизмов влияния экотоксикантов на эмбриогенез и гаметогенез млекопитающих, как наиболее критические периоды в отношении к внешним влияниям различной природы.

Все большее число данных свидетельствует в пользу парадигмы об определяющей роли воздействия факторов окружающей среды (например, диеты, химических веществ, стресса и т.д.) во время критических периодов жизни (например, до зачатия, во время беременности, младенчестве, отрочестве) в восприимчивости к болезням, возникающей в более позднем периоде жизни (Bateson et al., 2004; Heindel et al., 2015). При этом показано, что воздействия факторов среды в ходе развития могут изменять регуляцию генов и формирующегося фенотипа путем изменений эпигенома (Waterland, Jirtle, 2004; Waterland, Michels, 2007). Этот феномен (Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis (DOHaD) позднее получил свое развитие в постулировании того, что различные стимулы окружающей среды (в том числе ксенобиотики) на раннем этапе жизни нарушают нормальное развитие и увеличивают риск развития хронических заболеваний в дальнейшей жизни. При этом ключевыми медиаторами этого явления были признаны эпигенетические механизмы (Godfrey et al., 2007). Условия окружающей среды у прародителей F0 приводили к увеличенному риску заболевания у потомства F1 или даже внуков F2. Важно, что передача риска заболевания к F1/F2 происходит в отсутствие первоначального экологического триггера (Zambrano et al., 2005). Несколько авторов предположили, что передача фенотипов может быть опосредована эпигенетическим перепрограммированием зародышевых клеток и / или зрелых

гамет (Daxinger, Whitelaw , 2012), а само явление получило название трансгенерационного эпигенетического наследования. Данных по трансгенерационным эффектам эпигенетической токсичности ксенобиотиков пока очень мало. Одна из проблем в этой связи заключается в том, что стабильность эпигенетических изменений часто является очень динамичной, и именно этим объясняется, почему в контексте эпигенетических изменений, индуцируемых ксенобиотиками, чаще всего исследуются изменения в метилировании ДНК. Опубликованы данные по таким факторам окружающей среды как табак, загрязнители воздуха, эндокринные разрушители, а также различные токсичные металлы (Perera, Herbstman, 2011). Эту развивающуюся в настоящее время область исследований предлагается рассматривать как "токсикоэпигенетику" (Софронов, Паткин, в печати).

Итак, считается, что основными механизмами влияния окружающей среды и различных внутренних факторов на измененную в сравнении с нормой экспрессию генов выступают эпигенетические модификации. Важно, что такая модифицированная экспрессия гена может поддерживаться у взрослых и передаваться следующим поколениям. Но механизмы этого остаются неясными. Наши исследования в основном базируются на уже полученных и описанных выше наших результатах и методических подходах как *in situ*, так и *in vitro* на таких моделях, как до- и постимплантационные зародыши мышей и клеточные культуры различного происхождения. В качестве экотоксикантов в основном были изучены бисфенолА и хлористый кадмий.

Ранее было показано, что действие бисфенола А (БФА) ассоциировано с эпигенетическими изменениями после воздействия во время развития (Dolinoy et al., 2007; Kundakovic, Champagne 2011, а пренатальное воздействие БФА изменяет постнатальное развитие на экологически значимом уровне

воздействия (Takai et al., 2001; Xiao et al., 2011). Биохимические механизмы, с помощью которых ВРА изменяет эпигенетическое программирование, остаются неясными, хотя существует множество доказательств того, что ВРА изменяет эпигенетическое программирование (Bernal, Jirtle, 2010). В отношении модулирования раннего развития ВРА важно, что доимплантационное развитие характеризуется, как показали мы и другие авторы, критическими изменениями в структуре метилирования ДНК, демонстрируя как деметилирование, так и метилирование de novo (Patkin , 2002).

ВРА, как и другие негенотоксические агенты может влиять на функцию гена через эпигенетические механизмы стабильным и продолжительным образом, что может быть неотличимым от эффектов физического повреждения ДНК (Szyf, 2007). Как было показано в клинических, так и в доклинических исследованиях воздействие ВРА связано с различными заболеваниями (см. обзор Lang et al., 2008). Установлено, что БФА даже в низких, экологически релевантных дозах влияет на репродуктивные органы млекопитающих и оказывает воздействие на раннее развитие организма, а также на постнатальное развитие.

Многочисленными исследованиями показано, что БФА, влияет на мейоз в яичниках, снижает качество ооцитов на животных моделях и у женщин, подвергающихся экстракорпоральному оплодотворению, ослабляет пролиферацию эндометрия матки, снижает восприимчивость к матке и увеличивает невозможность имплантации (Caserta et al., 2014). Как показали исследования на животных, воздействуя на зародыши в матке в ранний период развития, БФА вызывает во взрослом организме широкий спектр вредных эффектов, включая ожирение, ухудшение половой дифференциации, нарушение развития мозга, измененное поведение и иммунные реакции, которые могут быть трансгенерационно

переданы будущим поколениям. Имеются данные, что у человека воздействие БФА может провоцировать развитие сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, ожирения, а также повышает риск выкидышей. Очевидно, что любые эпигенетические изменения во время раннего эмбриогенеза должны сохраняться в хромосомах, чтобы функционировать во взрослом и / или следующем поколении и модулировать ответ на болезни. Поэтому нас интересует — изменяется ли эпигенетическая маркировка метафазных хромосом, в частности метилирование ДНК, когда эмбрионы и различные клеточные линии подвергаются воздействию ВРА. Различия в уровне метилирования сестринских хроматид и потенциальные биологические последствия этого являются активными областями исследований в связи с дифференцировкой во время эмбриогенеза (Patkin, 2002; Patkin et al., 2015), дифференциации тканеспецифических стволовых клеток (Lansdorp, 2012) и, более широко, в контексте асимметрии клеточных делений (Tajbakhsh et al., 2009; Moore et al., 2017). Асимметричное наследование при делении клеток млекопитающих может быть особенно важным для обеспечения клеточной приспособленности и передачи клеточных потенциалов в их потомстве, например, в контексте деления соматических стволовых клеток (Bernal, Jirtle, 2010; Moore, Jessberger, 2016). Например, несмотря на неопределенность механизма, частота хромосом с асимметрией в сестринских хроматидах и различия между хроматидами в уровне метилирования могут служить дополнительным критерием, лежащим в основе патогенеза опухолей и роли факторов окружающей среды. Статус метилирования хромосом и хроматид может указывать на активное или потенциально неактивное (репрессированное) состояние кластеров генов — например, генов, импринтированных в дочерней клетке после деления. Мы

предположили, как описано выше, что различие метилирования в сестринских хроматидах метафазных хромосом может служить чувствительным маркером для измерения эффективности воздействия экотоксикантов. Чтобы исследовать это, мы сравнили влияние ВРА на количество хромосом с различным метилированием сестринских хроматид в доимплантационных и постимплантационных зародышах мышей, недифференцированных клетках линии эмбриональной карциномы мыши F9 и человеческих дифференцированных клетках HEK293.

Мы обнаружили, что воздействие ВРА на доимплантационные эмбрионы мыши вызывало значительное снижение уровня асимметричного метилирования хроматид (АМХ) в хромосомах и метилирования ядер. Воздействие ВРА на потенциально дифференцирующие клетки F9 не оказывало никакого влияния на метилирование ДНК в ядрах, но значительно уменьшало количество. Уровень метилирования ДНК и АМХ в клетках HEK293 также не изменялся.

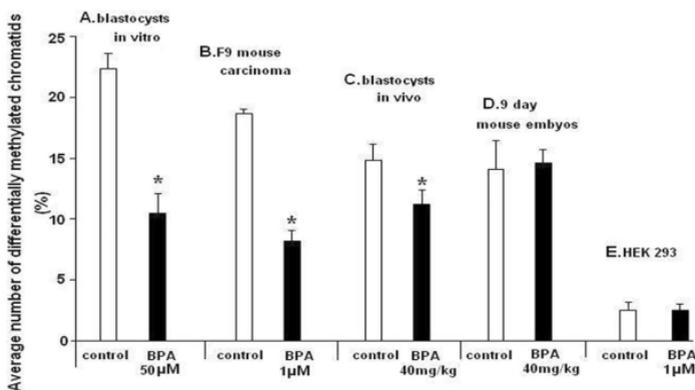


Рисунок 7. Среднее число асимметрично метилированных хроматид при воздействии БФА у зародышей и в клетках различного типа.

Эти данные показывают, что ВРА оказывает значительное влияние на дифференцирующиеся и потенциально дифференцируемые клетки. То есть, критическим окном для воздействия БФА является время раннего развития эмбриона, особенно в период активации эмбрионального генома при развитии до стадии бластоцисты. Поэтому особенно важно понять, как модифицируется метилирование ДНК в эмбрионах самого раннего срока развития под влиянием БФА. Для изучения влияния бисфенола А (БФА на эпигенетический статус эмбрионов мыши раннего срока развития было исследовано изменение уровня метилирования ДНК *in situ* ( Нониашвили и др., 2017). Был *in vivo* исследован эффект воздействия БФА на выживание и рост зародышей мышей (до стадии бластоцисты), матери которых получали однократно при внутрибрюшинном введении дозу этого токсиканта. Одновременно, по уровню флуоресценции антител к 5-MeC *in situ* была произведена оценка статуса метилирования ДНК на препаратах ядер клеток зародышей. Был исследован также уровень метилирования ДНК и параметров развития зародышей до стадии бластоцисты при культивировании в среде, содержащей БФА и этанола, начиная со стадий зиготы и 2-х клеток (рис. 8, 9).

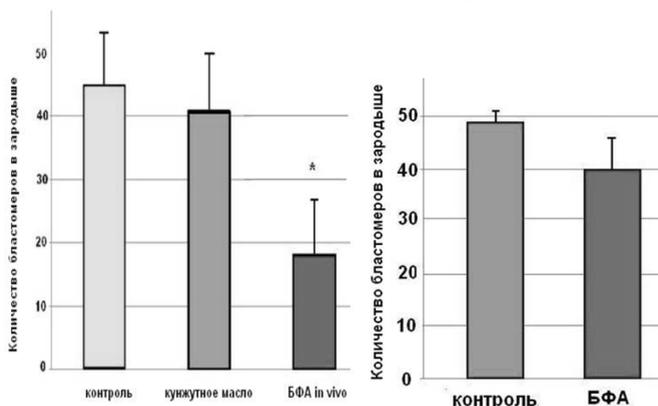


Рисунок 8. Среднее количество бластомеров в зародышах мышей при воздействии БФА в F1 и F2.

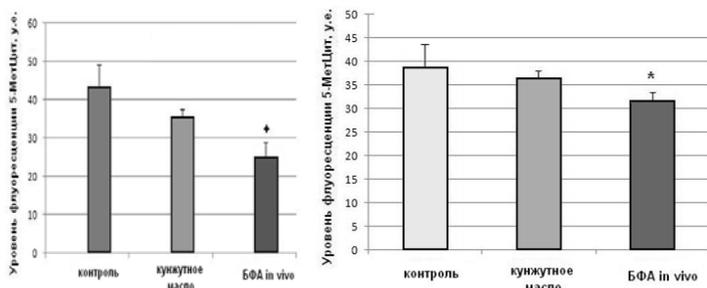


Рисунок 9. Относительный уровень метилирования 5-МетЦит в хромосомах бластоцист 4-х дневных зародышей мышей под воздействием БФА в F1 и F2.

Надо отметить, что метилирование, регистрируемое на уровне хромосом и ядер, отражает метилирование всего генома, причем большую часть составляют различные типы повторяющихся последовательностей, включая транспозоны, ретротранспозоны и различные типы сателлитных ДНК. То есть в исследовании *in situ*, использованном в данной работе, мы наблюдаем, вероятнее всего, в основном изменения в уровне метилирования именно в последовательностях такого типа, что свидетельствует об их роли в качестве мишеней для воздействия токсикантами в раннем развитии. Учитывая, что структура повторов, в частности их длина, может меняться вследствие процесса активного деметилирования, сопряженного с процессами репарации с участием системы ТЕТ-ферментов (что было показано в ряде работ (Dion et al., 2008; Mahfoudhi et al., 2016) и происходящего в первую очередь в раннем эмбриогенезе (Schuermann et al., 2016), можно предположить, что такие изменения, поддерживаясь в онтогенезе, могут вести к заболеваниям.

Воздействие БФА в ходе эмбриогенеза может вызывать эпигенетические изменения как всего генома, так и некоторых генов, которые связаны с изменениями в экспрессии генов, уже

обнаруживаемыми у зародышей при воздействии *in utero* (Manfo et al., 2014). Другие гены могут проявлять замедленный ответ в виде гормональных событий, начинающихся в период полового созревания. Эти эффекты могут не проявляться после пренатального воздействия, но сохраняются длительное время после прекращения воздействия. Такие изменения паттерна метилирования ДНК в эмбриогенезе, как предполагается, в значительной мере могут обуславливать развитие патологий уже во взрослом состоянии, особенно при старении.

Важная роль тандемных повторов и их метилирования/деметиличирования подтверждается не только описанными нами изменениями эпигенома на уровне хромосом и ядер под влиянием экотоксикантов, но и обнаруженными нами закономерностями при изучении динамики метилирования минисателлитных повторов и топологии хроматина, локализованных в интронах ряда генов, связанных с сердечно-сосудистыми, неврологическими и нейродегенеративными патологиями. Анализ метилирования ДНК и степени компактизации хроматина был проведен на культурах клеток человека различного происхождения и морфологии: эпителиоподобная HepG2 (карцинома печени), фибробласто- и нейробластоподобная IMR-32 (нейробластома), фибробластоподобная FetMSC (мезенхимальные стволовые клетки костного мозга 5-6-недельного эмбриона). При анализе клеточных культур человека мы показали, что БФА и CdCl<sub>2</sub> через 72 часа воздействия приводит к эпигеномным изменениям в клеточных линиях человека HepG2, IMR32, FetMSC. Эти изменения проявлялись как на уровне метилирования ДНК, так и компактизации хроматина. Степень выраженности выявленных эпигеномных изменений зависела как от дозы экотоксиканта, так и типа клеток, что во многом может объясняться исходными генетическими, эпигенетическими и биохимическими особенностями этих клеток, в том числе

степенью их дифференцированности. Изменение уровня полногеномного метилирования ДНК и компактизации хроматина зависит не только от концентрации токсиканта (БФА или CdCl<sub>2</sub>), но и от типа клеточной культуры человека. При этом исследованные низкие дозы бисфенола А и хлорида кадмия, не вызывающие мутаций, влияют на относительный уровень полногеномного метилирования ДНК и степень компактизации хроматина, а влияние экотоксикантов (БФА или CdCl<sub>2</sub>) на эпигеном HepG2, IMR32 и FetMSC характеризуется немонотонной, нелинейной (полимодальной, бимодальной и мономодальной) зависимостью «доза-эффект» (рис. 10). То есть, при изучении токсикоэпигенетических эффектов на моделях крайне важно использовать максимально возможно различные типы клеток.

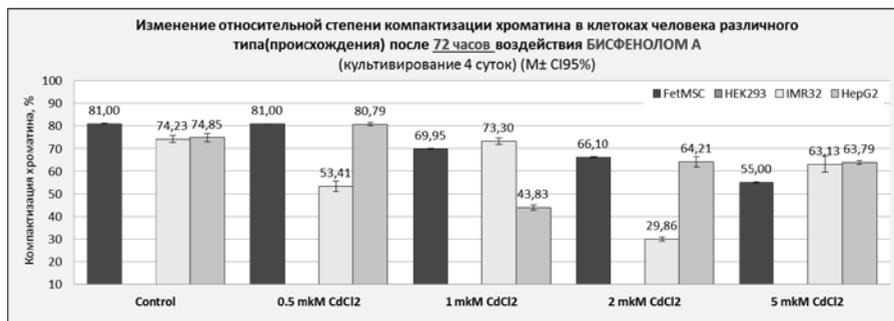


Рисунок 10. Компактизация хроматина в различных типах клеток при воздействии БФА.

В контексте популяционной эпигенетики и токсико-эпигенетики особый интерес представляет рассмотрение молекулярных мишеней межгенерационного наследования эпигенетических модификаций и эпигенетических последствий воздействия на млекопитающих неблагоприятных внешних факторов (Bollati, Vaccarelli, 2010; Choudhuri et al., 2010;

Jablonka, Raz, 2009; LeBaron et al., 2010; Rosenfeld, 2010). Под действием таких факторов происходят соответствующие изменения в генной экспрессии, что часто ведет к измененному фенотипу. В некоторых случаях эпигенетические изменения могут быть переданы последующим поколениям, даже когда эти поколения уже не подвергаются воздействию внешними факторами, приведшими к исходным эпигенетическим изменениям (см. ниже). То есть, популяция может сталкиваться с последствиями от воздействия химических веществ на их предков (Румак и др., 2000), что важно, как для понимания эволюционных процессов, так и для оценки экологического риска (Vandeghechuchte, Janssen, 2011). Популяционно-эпигенетический аспект влияния токсикантов на экспрессию генов может существовать только, если механизмы контроля, рассматриваемые эпигенетикой, функционируют в пределах не одного поколения организмов. Как стало ясно в последние годы, эпигенетические модификации, особенно метилирование ДНК, не только важны для определения идентичности клеток, но и могут в ходе мейотических и митотических делений быть переданы последующим поколениям, то есть в определенных случаях представлять собой эпигенетический код. Это феномен межгенерационного наследования эпигенетических модификаций объясняет ранее загадочную увеличенную восприимчивость к заболеваниям людей, которые сами уже не сталкиваются с повреждающими факторами внешней среды, но являются потомками таких индивидов. Оказалось, что потомки людей, переживших во время 2-й мировой войны голод, проявляют повышенную частоту сердечно-сосудистых патологий. Эпигенетическая регуляция в способности миокарда адаптироваться к изменениям окружающей среды играет особенно важную роль из-за довольно ограниченной способности миокардиоцитов человека к пролиферации. Становится все более ясным, что

эпигеном может модулироваться различными факторами окружающей среды, в том числе химическими веществами, питанием, а также при старении (Anway et al., 2005, 2006; Roth et al., 2009; Waterland et al., 2006; Weaver et al., 2004, 2005). Эпигеном обеспечивает важную взаимосвязь между генами и окружающей средой, и может рассматриваться как потенциальный механизм для быстрой, направляемой внешней средой адаптации (Franklin, Mnsuy, 2010). В контексте экотоксикологии требуются специальные исследования химических веществ, потенциально вызывающих эпигенетические изменения, способные стабильно передаваться в ряду поколений.

Так, мы провели анализ трансгенерационного эффекта от воздействия БФА на доимплантационное развитие эмбрионов мышей второго поколения F2, прямо не подвергавшихся воздействию токсикантом, а полученных в результате скрещивания потомков с неэспонированными мышами. Оказалось, что в поколениях F2 наблюдались значимые отклонения в развитии и изменение уровня общегеномного метилирования ДНК (Рис. 8, 9). Таким образом, действительно наблюдается межпоколенческая передача эпигенетических модификаций, влияющая на фенотип. Более того, нами обнаружено, что в поколении мышей F2 – потомков мышей экспонированных в F0 бисфенолом А наблюдаются особи с алопецией (рис. 11).

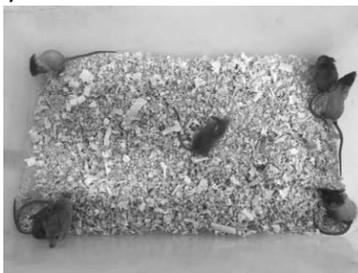


Рисунок 11. Безволосые мыши – F2 потомки мышей, экспонированных БФА в F0.

Такой характер наследования указывает, что БФА не вызывал генетических мутаций в системе генов, ответственных за формирование волосяного покрова, так как в этом случае наблюдалась алопеция уже в F1 поколении. Как уже отмечалось механизм межпоколенческого эпигенетического наследования далек от понимания. Можно предположить, что активное деметилирование ведет к изменениям в структуре, в первую очередь, повторяющихся некодирующих последовательностей, которые наследуются и оказывают модулирующее влияние на экспрессию генов и, как следствие, на фенотип поколений.

### **Заключение**

Заключая, нельзя не вспомнить о таком современном направлении науки, как системная биология — междисциплинарное научное направление, образовавшееся на стыке биологии и теории сложных систем, которое направлено на изучение сложных взаимодействий в живых системах, заложенном, впрочем еще давно Р. Уоддингтоном. Широкое распространение термин «системная биология» получил после 2000 года. Формируется новый подход к интерпретации результатов в биологии 21-го века вместо традиционного для биологии прошлых столетий редукционизма, и получил определение как интеграционизм (Peter Kohl et al., 2000). Основное внимание в системной биологии уделяется свойствам биологических систем, которые невозможно объяснить только с точки зрения свойств её компонентов. Понимание биологии на системном уровне даёт возможность для более верного осмысления структуры, динамики и функций как отдельной клетки, так и организма в целом, чем при рассмотрении по отдельности частей клетки или организма (Hiroaki, Kitano, 2003). Для верификации создаваемых моделей системная биология работает с самыми различными типами экспериментальных данных, используются данные, полученные в других областях

биологии: биохимии, биофизики, молекулярной биологии. Представляется, что результаты, полученные нами на протяжении многих лет в области эпигенетики и эпигеномики на уровне молекул, клеточных органелл, клеток, организмов и популяций в норме, при патологиях и при воздействии экотоксикантов иллюстрируют, что действительно эпигенетика и эпигеномика представляют собой фундаментальную основу для интегрального системного подхода в биологии, медицине, экологии и токсикологии. Но ведь именно такой подход исторически был основой медицины и физиологии. Очевидно, что мы находимся на начальном этапе, и необходимы дальнейшие междисциплинарные исследования на основе эпигенетики и эпигеномики, для чего Институт экспериментальной медицины предоставляет уникальные возможности.