

УДК 391.31

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ МАЖОРНОГО САТЕЛЛИТА В ЯДРАХ ДВУХКЛЕТОЧНЫХ МЫШИНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ РАЗВИТИЯ¹

© 2009 г. И. С. Кузнецова, Е. М. Нониашвили*, Е. В. Гаврилова, А. П. Дыбан*

Институт цитологии РАН

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

**Институт экспериментальной медицины РАМН*

197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12

E-mail: kis@mail.cytspb.rssi.ru

Поступила в редакцию 02.12.08 г.

Окончательный вариант получен 09.04.09 г.

Проведено исследование степени метилирования ядерной ДНК и, в частности, мажорного сателлита в ядрах двухклеточных зародышей мышей, которые развивались: в материнском организме; в стандартной культуральной среде M16, применяемой для культивирования зародышей мыши; и в среде M2, используемой для манипуляций с зародышами на воздухе. Исследовали ядра двухклеточных зародышей в возрасте 44–46 ч после введения хорионического гормона. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень метилирования мажорного сателлита зависит от условий, в которых развиваются зародыши.

Уровень метилирования ядерной ДНК увеличивается с ухудшением условий среды. В среде M2, не предназначенной для длительного культивирования зародышей, уровень метилирования ДНК, и в частности мажорного сателлита, выше, чем в остальных группах зародышей. Таким образом, под эпигенетическим контролем находится не только значительное число генов, а также и повторяющиеся последовательности сателлитной ДНК.

Ключевые слова: эмбрион, эпигеномное программирование, мажорный сателлит, метилирование.

Под эпигенетическими изменениями принято понимать наследуемые изменения функции генов и других последовательностей ДНК, не связанных с изменениями их первичной нуклеотидной последовательности (Baylin et al., 1998; Bird, 2002). Основу эпигенетической регуляции составляют обратимые ковалентные модификации ДНК (метилирование цитозинового оснований) и гистонов (ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинирование).

На протяжении гаметогенеза и при образовании тотипотентной зиготы осуществляются эпигенетические изменения ядерного аппарата клеток (Reik et al., 2001; Fulka et al., 2004). Первый цикл изменения уровня метилирования генов осуществляется в гаметогенезе (Saltou et al., 2002; Pangas, Rajkovich, 2006), а второй начинается сразу же после пенетрации яйцеклетки спермием. Во время оплодотворения в отцовском геноме происходит активное деметилирование ДНК и замена протаминов на гипометилированные гистоны. ДНК материнского пронуклеуса сильнее метилирована и содержит ацетилю-

ванные гистоны (Arney et al., 2002). В отцовском пронуклеусе зиготические гены начинают активироваться после первой фазы синтеза ДНК (Aoki et al., 1997; Schultz, 2002). При этом уровень транскрипции генома выше в четыре–пять раз, чем в материнском пронуклеусе (Aoki et al., 1997). От двухклеточной стадии до стадии бластоцисты происходит пассивное деметилирование ДНК. Это, по-видимому, обусловлено исключением из ядер фермента ДНК – метилтрансферазы 1 (Dnmt1) (Walsh et al., 1998). На стадии бластоцисты заново метилируется ДНК ядер внутренней клеточной массы, тогда как ДНК ядер трофобластической оболочки остается гипометилированной (Santos, Dean, 2004).

Незначительная экспрессия зиготических генов мышинных зародышей начинается в фазе G_2 первого митотического цикла, тогда как большая часть этих генов начинает транскрибироваться в фазе G_2 двухклеточного зародыша. Различные агенты внешней среды, действие которых влияет на эпигенетическое репрограммирование, могут воздействовать на экспрессию генов у зародышей, развивающихся в материнском организме (Дыбан А., Дыбан П., 2006).

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 08-04-01069-а, 07-04-01216-а).

В нормально развивающемся зародыше на доимплантационных стадиях развития одиночные и низкокопийные гены *MUP* (murine urinary protein), диспергированные повторы (LINE), высокоповторяющиеся последовательности сателлитной ДНК (сатДНК) гипометилированы (Sanford et al., 1987; Howlett, Reik, 1991; Razin, Cedar, 1993; Razin, Shemer, 1995; Kim et al., 2004; Yamazaki et al., 2007). СатДНК организует районы конститутивного гетерохроматина. На хромосомах сатДНК в основном локализуется в перичентромерном и центральномерном районах хромосом, а в ядрах соматических клеток вовлечена в состав хромоцентров (Alcobia et al., 2000; Kuznetsova et al., 2005). В ранних зародышах перичентромерный район совместно локализуется с прехромоцентрами и проядрышками (Гаврилова и др., 2009; Martin et al., 2006).

Метилирование ДНК зависит не только от функционального состояния клетки, но и от факторов внешней среды. Различие в характере метилирования может накапливаться в клетках и тканях с течением времени (Лихтенштейн, Киселева, 2001), что может служить базой для дифференциальной экспрессии генов и возникновения мутаций как в генах, так и в районах конститутивного гетерохроматина. Существует мнение, что нарушение процесса оплодотворения ооцитов, а также различные нарушения раннего эмбриогенеза – увеличение частоты анеуплоидии у ранних зародышей, мозаицизм, характер импринтирования генома, нарушение структуры и распределения органелл в эмбрионах – могут быть связаны с условиями культивирования (Trussler et al., 2004), следствием чего является изменение эпигенетического статуса клеток.

Предполагается, что под эпигенетическим контролем находятся и повторяющиеся последовательности сатДНК, которым отводят значительное место в морфофункциональной организации ядра. С перестройками в последовательностях ДНК перичентромерного района, основным компонентом которого в геноме мыши является мажорный сателлит (MaCat), связывают механизмы возникновения анеуплоидий.

Данные, полученные при исследовании статуса метилирования сатДНК на ранних этапах эмбриогенеза клонированных млекопитающих и при развитии *in vitro*, противоречивы (Chen et al., 2004; Kim et al., 2004; Fulka et al., 2004; Yamagata et al., 2007). Влияние сред культивирования на статус метилирования сатДНК при развитии ранних зародышей остается практически не изученным (Barton et al., 2001; Shi, Haaf, 2002). Как было отмечено ранее, одной из моделей для изучения эпигенетического репрограммирования в раннем развитии млекопитающих являются зародыши, культивируемые в различных искусственных средах (Дыбан А., Дыбан П., 2006).

В нашей работе проведено исследование метилирования ДНК и, в частности MaCat, в ядрах двухклеточных зародышей мыши, развивающихся в материнском организме; в стандартной культуральной среде M16 и в среде M2, используемой при манипуляциях с зародышами (Whitten, Biggers, 1968).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Зародыши. Опыт проводили на зародышах гибридных мышей F1 (C57BL/СВА), полученных из питомника “Рапполово” РАМН, СПб. В работе использовали половозрелых мышей весом 18–20 г, содержащихся при естественном световом режиме. Для точного датирования возраста зародышей применяли гормональную стимуляцию самок (Самошкина и др., 1988). Для этой цели самкам вводили 7 ед. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (“Folligon, Intervet”, Голландия) и через 46–48 ч 10 ед. хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, “Chorulon, Intervet”, Голландия). Самок подсаживали на ночь в клетку к самцам, через 18 ч отбирали самок с копуляционными пробками. Животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков. Возраст зародышей исчисляли в часах от времени введения ХГЧ. Одна группа зародышей развивалась в материнском организме до двухклеточной стадии. Другую группу зародышей на одноклеточной стадии (20–22 ч после введения ХГЧ) вымывали из яйцеводов, освобождали от клеток кумулюса в каплях среды M2 (“Sigma”, США), содержащей 300 ед/мл гиалуронидазы, и культивировали в течение 24 ч в каплях сред M2 и M16 (“Sigma”, США) под слоем парафинового масла в атмосфере воздуха с 5%-ным содержанием CO₂. В каждой группе проанализировано по 50 зародышей.

Получение препаратов. Препараты зародышей получали по методу, описанному ранее (Дыбан, 1983), с небольшими модификациями. Под контролем стереомикроскопа МБС-12 при помощи микропипетки зародыши 1–2 мин промывали в гипотоническом растворе, содержащем 1.93%-ный раствор цитрата натрия и 0.56%-ный раствор хлорида калия (в соотношении 3 : 1), при комнатной температуре. Затем переносили их в солонку с охлажденным до +4°C стандартным фиксатором (метанол: ледяная уксусная кислота, 3 : 1) на 1–2 мин и вместе с каплей фиксатора помещали на предметное стекло. Зародыши расправляли, капая на них смесь метанола и ледяной уксусной кислоты (1 : 1). После этого на стекло наносили несколько капель стандартного фиксатора и высушивали препараты при комнатной температуре.

В качестве гибридных зондов использовали клонированный в векторе pBluescript II KS+ фрагмент MaCat (471 п.н.) (Radic et al., 1987). Плазмида была любезно предоставлена докт. Б.А. Хамкало, Отдел молекулярной биологии и биохимии Калифорнийского университета США (University of

California, USA). Для гибридизации *in situ* вставку MaCat метили с использованием прямого и обратного нуклеотидных праймеров фага M13 методом ПЦР в присутствии биотин-16-dUTP.

Иммунофлуоресцентная гибридизация in situ. В работе использованы мышинные моноклональные антитела (АТ) против метилированного цитозина (5-MeC, 1 : 200, "Eurogenetec", Бельгия). Для окрашивания препараты эмбрионов обрабатывали 100 мг/мл РНКазы А в 2 х SSC при 37°C в течение 60 мин, затем 0.01%-ным раствором пепсина в 10 мМ HCl в течение 10 мин и проводили через серию спиртов восходящей концентрации (70, 80, 100%). На высушенные препараты наносили гибридизационный буфер (2 х SSC, 70%-ный формамид, 1 х декстран), содержащий меченый фрагмент MaCat (2 мкг/мл). Денатурацию проб и препаратов проводили одновременно в течение 3 мин при 80°C. Гибридизацию проводили во влажной камере при 37°C в течение ночи, после чего препараты отмывали по 5 мин при той же температуре в растворе 50%-ного формамида на буфере 4 х SSC, а затем по 5 мин в сменах 4 х SSC, 2 х SSC и 1 х SSC при температуре гибридизации и трех сменах буфера КСМ при комнатной температуре, мМ: 135 KCl, 20 NaCl, 0.5 ЭДТА, 0.1%-ный Тритон X-100, 10 трис-HCl, pH 7.5. Далее препараты инкубировали в блокирующем 5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина ("Sigma", США) на буфере КСМ в течение 30 мин. Затем инкубировали с первыми антителами против 5-MeC во влажной камере в течение 1 ч при 37°C. После этого отмывали в КСМ (три раза по 15 мин), наносили вторые антитела против мыши (Alexa 488, "Invitrogen", США), инкубировали 1 ч при 37°C и отмывали в КСМ три раза по 15 мин. Для выявления участков гибридизации зонда MaCat, меченного биотином, наносили антитела против авидина, конъюгированного с Су-3 ("Roche", Германия). Для визуализации ядер препараты дополнительно окрашивали красителем 4,6-диамидофенилиндолом (DAPI, "Polysciences, Inc", США) в концентрации 0.5 мкг/мл и заключали в среду VectaShield ("Dabco", США).

Препараты анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа DMRXA ("Leica Wetzlar GmbH", Германия), об. х 100/1.30, ок. 1.6. Для получения видеоизображения использовали программное обеспечение QFISH ("Leica Cambridge Ltd.", Германия). Для трехмерного анализа препаратов использовали лазерный конфокальный сканирующий инвертированный микроскоп Carl Zeiss LSM 5 Pascal (Германия). Дистанция между оптическими срезами варьировала от 0.5 до 0.9 мкм. Получение и обработку изображений производили с помощью программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser Version 3.0 и KS 100 ("Carl Zeiss", Германия). Для последующей компьютерной обработки изображений использовали пакет программ Adobe Photoshop™ 6.0 и ImageJ.

Степень метилирования MaCat в ядрах зародышей оценивали в процентном соотношении, исходя из площади перекрывания сигналов метилирования с гибридизационным сигналом MaCat, где за 100% была взята средняя площадь сигнала MaCat в каждой из групп зародышей. Подсчет площади сигнала проводили из следующих допущений: площадь каждого сигнала рассматривалась как количество пикселей на сигнал; интенсивность пикселей оценивали от 50 до 255 оттенков серого; наблюдаемые сигналы внутри ядра рассматривали как эллипс. Площадь эллипса рассчитывали по формуле $S = \pi a \cdot b$ (нм²), где a и b – радиусы эллипса. Два соседних сигнала рассматривали как отдельные, если их радиусы были 150–220 нм, а дистанция между сигналами – не менее 168 нм. Статистический анализ результатов проведен с использованием t -коэффициента Стьюдента при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние культивирования в средах M16 и M2 на изменение морфологии ядер двухклеточного зародыша. Стандартное культивирование зародышей гибридов мыши F1 происходит на поддерживающей среде M16 в микрокапельной культуре в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5%-ном содержании диоксида углерода. Все другие манипуляции с яйцеклетками и эмбрионами вне инкубатора проводят в забуференной среде M2 (4.969 г/л NEPES, pH 7.4). Компонентный состав сред (кроме NEPES) тождествен, различие касается лишь натрия бикарбоната, содержание которого в среде M16 больше, чем в среде M2. Остальные ингредиенты представлены KCl, NaCl, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂ · 2H₂O, лактатом натрия, пируватом натрия, бычьим сывороточным альбумином, глюкозой и феноловым красным (Whitten, Biggers, 1968).

Мы исследовали ядра двухклеточных зародышей мышей в возрасте 44–46 ч после введения ХГЧ. Одна группа зародышей развивалась в материнском организме, две другие в возрасте 20–22 ч после введения ХГЧ вымывали из яйцеводов и помещали в культуральные среды M16 и M2 на 24 ч. На рис. 1 представлены ядра зародышей, развивающихся *in vivo* и *in vitro*. При окрашивании ядер DAPI выявлены следующие различия: 1) окраска ядер зародышей, развивающихся в искусственных средах M2 и M16, более интенсивна, чем у таковых, развивающихся в материнском организме; 2) в ядрах зародышей, развивающихся *in vitro*, гетерохроматин вокруг ядрышек прокрашивается сильнее. При культивировании в среде M2 идентификация ядрышек затруднена.

Размер ядер двухклеточного зародыша при развитии в материнском организме и в искусственных средах M2 и M16. Средний размер ядер зародышей, развивающихся *in vivo*, по осям X : Y : Z составляет 45 : 40 : 17 мкм, а *in vitro* – 27 : 20 : 13 мкм (рис. 2).

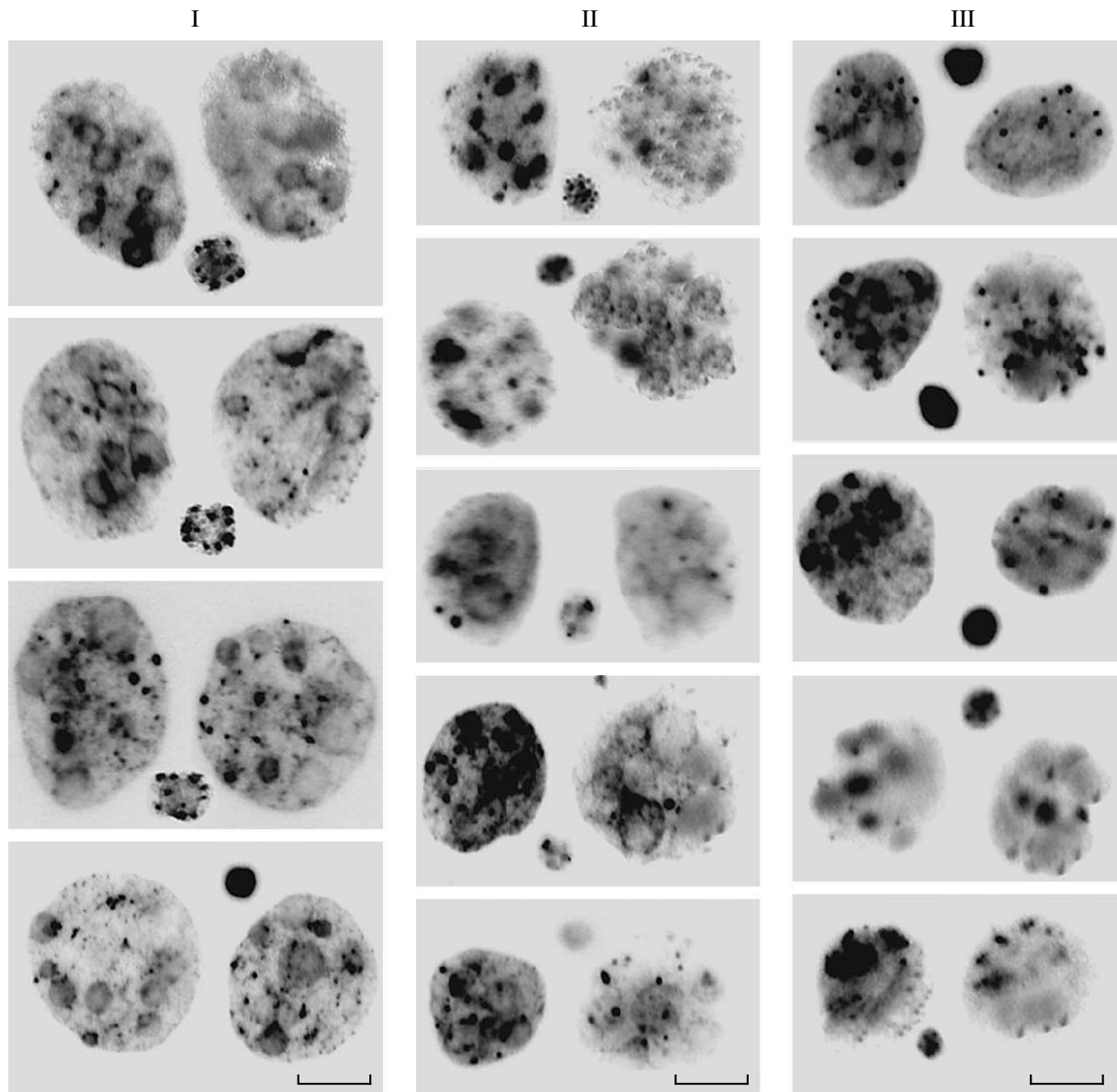


Рис. 1. Ядра двухклеточных зародышей, развивающихся *in vivo* (I), а также *in vitro* в средах культивирования M16 (II) и M2 (III). Окраска DAPI. Масштаб: 15 мкм.

При фиксации зародышей метанол/уксусной кислотой (3 : 1) происходит уплощение зародышей по оси Z в два раза. Ядра зародышей, развивающихся *in vitro*, в два раза меньше, чем таковые, развивающихся *in vivo*; 20% проанализированных ядер зародышей, развивающихся *in vivo*, по размерам и окраске DAPI соответствуют таковым, развивающимся в среде M16. Анализ ядер двухклеточных зародышей, развивающихся в среде M16, показал, что основную группу составляют ядра, имеющие меньший размер и более интенсивную окраску DAPI, чем у зародышей, развивающихся *in vivo*. По рассматриваемым характеристикам 20% ядер соответствуют таковым, развивающимся *in vivo* (рис. 3). В ядрах зародышей, развивающихся *in vitro*, число

ядрышек меньше (три–четыре), чем в зародышах, развивающихся *in vivo* (семь–десять). При развитии зародышей в среде M16 5% ядер двухклеточных зародышей по своим размерам и окраске DAPI сопоставимы с пронуклеусами зигот (рис. 4).

Распределение гибридационного сигнала MaCat и окраски против метилированного цитозина (5-MeC) в ядрах зародышей, развивающихся в материнском организме и в искусственных средах M2 и M16. При сравнении локализации гибридационных сигналов MaCat в ядрах двухклеточных зародышей при развитии *in vivo* и *in vitro* отличий выявлено не было (рис. 5, вклейка). Гибридационный сигнал MaCat совпадает с участками, ярко

окрашенными DAPI, однако не все DAPI-позитивные районы содержат сигнал MaCat. Основной сигнал MaCat локализуется на одном полюсе каждого ядра и в основном прилежит к ядрышкам. Вместе с тем можно наблюдать ядрышки без гибридационного сигнала.

В зародышах, развивающихся *in vivo* (рис. 5, а; вклейка), распределение гибридационного сигнала MaCat по сравнению с зародышами, развивающимися в средах M2 и M16, полярно (рис. 5, б, в). MaCat в ядрах зародышей, развивающихся *in vivo*, гипометилирован (рис. 6, а; вклейка). Во всех проанализированных ядрах зародышей, развивающихся *in vitro*, сигнал метилированного цитозина распределяется по всему объему ядра более равномерно, хотя полярность в распределении сохраняется (рис. 6, б, в). Интенсивность метилированного сигнала MaCat в ядрах зародышей, развивающихся *in vitro*, по сравнению с таковым *in vivo* увеличивается (рис. 7).

Таким образом, несмотря на то, что среда M16 является стандартной для культивирования зародышей мышей, всего лишь 20% зародышей по размерам соответствуют норме и практически у всех изменен уровень метилирования.

Необходимо также отметить, что около 20% ядер зародышей, развивающихся *in vivo*, по интенсивности окраски DAPI, распределению сигнала метилирования и размерам соответствуют ядрам зародышей, развивающихся *in vitro* в культуральной среде M16. Полярные тельца всех исследованных двухклеточных эмбрионов сильно метилированы (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранние этапы эмбрионального развития млекопитающих характеризуются динамичными процессами эпигенетического репрограммирования генома, в основе которых лежат последовательные события глобального деметилирования и реметилирования ДНК (Дыбан А., Дыбан П., 2006). Биологическая значимость этих процессов заключается в детерминации онтогенетических и тканеспецифичных профилей экспрессии генов.

Происходящие в раннем эмбриогенезе изменения в динамике метилирования генома, индивидуальных хромосом (Eggan et al., 2000) и специфических генов (Kafri et al., 1992; Neumann, Barlow, 1996) обязательны для нормального развития эмбриона. Показано, что деметилирование ДНК “отцовского генома” происходит вскоре после оплодотворения, через 4–8 ч после этого “отцовский геном” практически полностью деметилирован (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2005). В течение этого времени наблюдаются не только гипометилирование, но и изменения в локализации паттернов метилирования (Yamazaki et al., 2007). В то же время “материнский геном” остается метилированным или в нем проис-

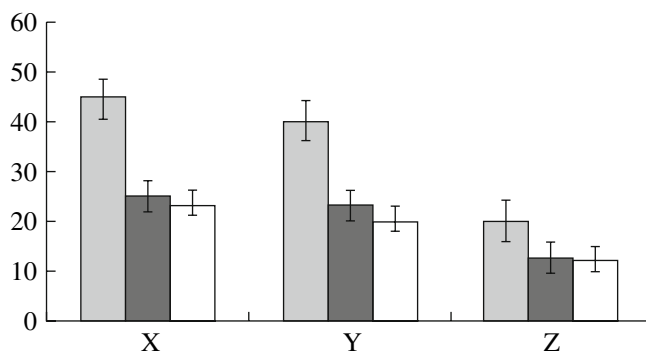


Рис. 2. Размер ядер двухклеточных зародышей при развитии *in vivo* (■) и *in vitro* в средах M16 (■) и M2 (□). По оси абсцисс- трехмерная система координат (X, Y, Z); по оси ординат – размер ядер, мкм.

ходит метилирование *de novo* (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2005).

В двухклеточном эмбрионе метилированная ДНК отцовского (гипометилированного) и материнского (метилированного) генетического материала располагается в различных районах ядра (рис. 6, а; Mayer et al., 2000; Barton et al., 2001, Yamazaki et al., 2007).

При переходе зародыша от двух- к четырехклеточной стадии происходит перераспределение метилированного хроматина. В ядрах эмбрионов на стадиях четырех-восьми клеток и морулы выявляется много сигналов метилирования, соответствующих периферическому хроматину, подобно распределению паттернов метилирования в ядрах соматических клеток (Coffigny et al., 1999; Martin et al., 2006). Деметилированное состояние хроматина, не

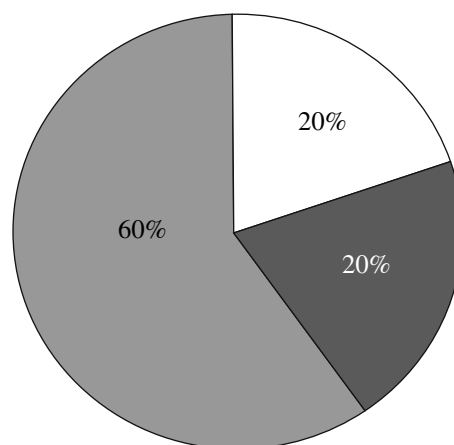


Рис. 3. Доля ядер зародышей, развивающихся в среде M16, которые по окраске DAPI и размерам соответствуют таковым, развивающимся *in vivo* (□); имеющих меньший размер и более интенсивную окраску DAPI по сравнению с зародышами, развивающимися *in vivo* (■); сопоставимых по окраске DAPI и размерам с пронуклеусами зигот (■).

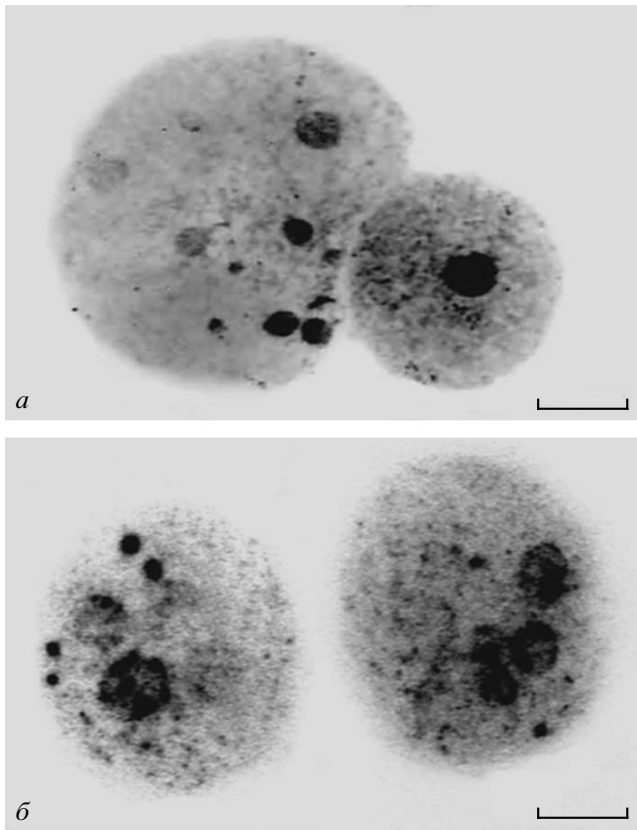


Рис. 4. Пронуклеусы зигот через 21 ч (а) и ядра двухклеточных зародышей через 46 ч (б) после введения ХГЧ, развивающихся в культуральной среде М16. Окраска DAPI. Масштаб: 20 мкм.

вовлеченного в формирование перичентромерного района хромосом, сохраняется до стадии имплантации бластоцисты (Razin, Shemer, 1995), а затем начинается процесс метилирования *de novo*.

Измененный паттерн метилирования наблюдается у 10–13% двухклеточных эмбрионов при естественном оплодотворении (Barton et al., 2001; Shi, Naaf, 2002). Ранее полученные данные (Shi, Naaf, 2002) показывают, что процедура суперстимуляции самок приводит к изменению паттернов метилирования у 20% эмбрионов, что коррелирует с данными нашей работы для группы зародышей, развивающихся в материнском организме. При культивировании зародышей в среде М16 только 20% зародышей соответствуют контрольной группе. Необходимо отметить, что, несмотря на различные условия культивирования, полярные тельца всех зародышей остаются всегда сильно метилированными (рис. 6; Barton et al., 2001; Shi, Naaf, 2002).

Определенную часть генома млекопитающих составляют повторяющиеся элементы ДНК, участки которых подвергаются интенсивному метилированию (Selker, 1999). К числу последовательностей, обогащенных метилированными динуклеотидами CpG, относятся и последовательности сатДНК

(более 10% генома млекопитающих). У мыши последовательности MaCat, вовлеченные в формирование перичентромерного района, и минорного сателлита (MiCat), формирующие центромерный район хромосом, более деметилированы в ядрах мужских и женских гамет по сравнению с ядрами бластомеров доимплантационных зародышей (рис. 6, а; Sanford et al., 1984; Hajkova et al., 2002; Yamagata et al., 2007); начиная со стадии бластоцисты оба сателлита метилируются *de novo* (Yamagata et al., 2007).

В клонированных эмбрионах (при переносе соматического ядра в энуклеированный ооцит) и в эмбрионах после оплодотворения *in vitro* по сравнению с нормально развивающимися зародышами не наблюдается изменений в метилировании сатДНК (Yamagata et al., 2007). С другой стороны, ранее сообщалось, что в подобных эмбрионах последовательности сатДНК являются гиперметилированными (Fulka et al., 2004; Dindot et al., 2004).

Результаты нашей работы свидетельствуют, что метилирование MaCat зависит от условий, в которых развиваются зародыши: уровень метилирования ядерной ДНК увеличивается по мере ухудшения условий среды. Так в среде М2, не предназначенной для культивирования зародышей мыши, уровень метилирования ДНК, и в частности MaCat, выше, чем в остальных группах зародышей (рис. 6, 7).

Таким образом, помимо импринтированных локусов под эпигенетическим контролем находятся не только значительное число генов, вовлеченных в регуляцию стабильности генома на уровне репарации ДНК, но и повторяющиеся последовательности сатДНК. Считается, что изменение уровня метилирования связано с транскрипционным статусом клеток. В эмбриональных стволовых клетках линий Suv39h, E14 и IOUD2, где сатДНК гипометилирована, показано наличие стабильных двухцепочечных транскриптов, комплементарных MaCat и MiCat (Martens et al., 2005; Erukashvily et al., 2009). В базе данных кДНК двухклеточных зародышей также обнаруживаются транскрипты сатДНК (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Однако функциональная роль этих транскриптов еще не установлена. Предполагается, что транскрипты сатДНК могут модулировать программу генной экспрессии, опосредованно влияя на активность ДНК и организацию ядра в раннем эмбриогенезе (Martens et al., 2005).

В клетках, имеющих высокий уровень синтеза РНК с ДНК перичентромерного района, не детектируется белок HP1-γ и гистон H3, триметилированный по 9-му лизиновому остатку (Bouzinba-Segard et al., 2006). Эти клетки становятся поли- или анеуплоидными. Анализ паттернов метилирования сатДНК в нормальных и клонированных эмбрионах различных видов животных показывает изменение уровня метилирования ДНК (Chen et al., 2004; Kim et al., 2004; Kang et al., 2005). Эти наблюдения

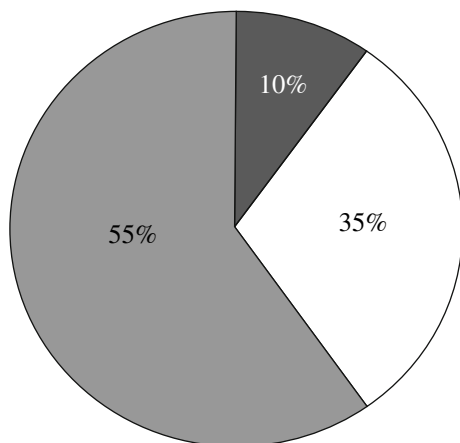


Рис. 7. Соотношение интенсивности метилированного сигнала MaSat в ядрах зародышей, развивающихся *in vivo* (■) и *in vitro* в средах M16 (□) и M2 (■).

подтверждают то, что частые плацентарные аномалии клонированных эмбрионов происходят из-за ошибок эпигенетического репрограммирования на доимплантационных стадиях развития (Дыбан А., Дыбан П., 2006).

Вспомогательные репродуктивные технологии по времени пересекаются с событиями эпигенетического репрограммирования и потенциально могут оказывать на них негативное влияние. Ряд сообщений свидетельствуют о рождении детей с синдромами Видеманна–Беквита (DeBaun et al., 2003; Gicquel et al., 2003; Halliday et al., 2004) и Энгельмана (Cox et al., 2002; Orstavik et al., 2003) после осуществления процедур искусственного оплодотворения или оплодотворения *in vitro*. Во всех случаях причиной развития заболеваний явилось нарушение статуса метилирования на этапах дробления. Не исключено, что этот эффект обусловлен неспособностью искусственных сред для культивирования зародышей *in vitro* поддерживать процессы эпигенетической регуляции экспрессии генов, важных для роста и дифференцировки клеток.

Данные нашей работы подтверждают различия в развитии зародышей гибридных мышей F1 (C57BL/6BA) *in vivo* и культивируемых в среде M16. Анализ изменений метилирования сателлитных последовательностей ДНК при сравнении зародышей, развивающихся в материнском организме, с зародышами, развивающимися в искусственных средах, может дать возможность отслеживать незначительные изменения, происходящие на ранних этапах эмбриогенеза, что в перспективе может стать надежным индикатором нормального развития зародышей.

Авторы благодарны О.И. Подгорной за ценные рекомендации при подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гаврилова Е.В., Кузнецова И.С., Енукашвили Н.И. и др. Локализация сателлитной ДНК и ассоциированных с ней белков относительно проядрышек у одно- и двухклеточных зародышей мыши // Цитология. 2009. Т. 51. № 5. С. 455–463.

Дыбан А.П., Дыбан П.А. Теоретические и прикладные аспекты эпигенетического репрограммирования развития млекопитающих // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1615–1620.

Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П. Метилирование ДНК и канцерогенез // Биохимия. 2001. Т. 66. Вып. 3. С. 293–317.

Самошкина Н. А., Голинский Г. Ф., Дыбан А. П. Исследование первого цикла репликации ДНК в эмбриогенезе мышей при помощи микроинъекции H^3 -тимидина в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток // Онтогенез. 1988. Т. 19. С. 583–589.

Alcobia I., Dilao R., Parreira L. Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns // Blood. 2000. V. 95. P. 1608–1615.

Aoki F., Worrall D.M., Schultz R.M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo // Devel. Biol. 1997. V. 181. № 2. P. 296–307.

Arney K.L., Bao S., Bannister A. et al. Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote // Int. J. Devel. Biol. 2002. V. 46. P. 317–320.

Barton S.C., Arney K.L., Shi W. et al. Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos // Hum. Mol. Genet. 2001. V. 10. № 26. P. 2983–2987.

Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R. et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia // Adv. Cancer Res. 1998. V. 72. P. 141–196.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // Genes Devel. 2002. V. 16. № 1. P. 6–21.

Bouzinba-Segard H., Guais A., Francastel C. Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 23. P. 8709–8714.

Chen T., Zhang Y.L., Jiang Y. et al. The DNA methylation events in normal and cloned rabbit embryos // FEBS Lett. 2004. V. 578. № 1–2. P. 69–72.

Coffigny H., Bourgeois C., Ricoul M. et al. Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis // Cytogenet. Cell Genet. 1999. V. 87. № 3–4. P. 175–181.

Cox G.F., Burger J., Lip V. et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects // Am. J. Hum. Genet. 2002. V. 71. № 1. P. 162–164.

DeBaun M.R., Niemitz E.L., Feinberg A.P. Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19 // Ibid. 2003. V. 72. № 1. P. 156–160.

Dindot S.V., Farin P.W., Farin C.E. et al. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos*

- gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses // Biol. Reprod. 2004. V. 71. № 2. P. 470–478.
- Dyban A.P. An improved method for chromosome preparations from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres // Stain. Technol. 1983. V. 58. № 2. P. 69–72.
- Eggan K., Akutsu H., Hochedlinger K. et al. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos // Science. 2000. V. 290. № 5496. P. 1578–1581.
- Enukashvily N.I., Malashicheva A.B., Waisertreiger I.S.-R. Satellite DNA spatial localization and transcriptional activity in mouse embryonic E-4 and ПОUD2 stem cells // Cytogen. Genome. Res. 2009. In press.
- Fulka H., Mrazek M., Tepla O. et al. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos // Reproduction. 2004. V. 128. № 6. P. 703–708.
- Gicquel C., Gaston V., Mandelbaum J. et al. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the *KCN1OT* gene // Am. J. Hum. Genet. 2003. V. 72. № 5. P. 1338–1341.
- Hajkova P., Erhardt S., Lane N. et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells // Mech. Devel. 2002. V. 117. № 1–2. P. 15–23.
- Halliday J., Oke K., Breheny S. et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study // Am. J. Hum. Genet. 2004. V. 75. № 3. P. 526–528.
- Howlett S.K., Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development // Development. 1991. V. 113. № 1. P. 119–127.
- Kafri T., Ariel M., Brandeis M. et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line // Genes Devel. 1992. V. 6. № 5. P. 705–714.
- Kang Y.K., Lee H.J., Shim J.J. et al. Varied patterns of DNA methylation change between different satellite regions in bovine preimplantation development // Mol. Reprod. Devel. 2005. V. 71. № 1. P. 29–35.
- Kim S.H., Kang Y.K., Koo D.B. et al. Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004. V. 324. № 1. P. 58–63.
- Kuznetsova I.S., Prusov A.N., Enukashvily N.I. et al. New types of mouse centromeric satellite DNAs // Chromosome Res. 2005. V. 13. P. 9–25.
- Martens J.H., O'Sullivan R.J., Braunschweig U. et al. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome // EMBO J. 2005. V. 24. № 4. P. 800–812.
- Martin C., Beaujean N., Brochard V. et al. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development // Devel. Biol. 2006. V. 292. № 2. P. 317–332.
- Mayer W., Smith A., Fundele R. et al. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos // J. Cell Biol. 2000. V. 148. № 4. P. 629–634.
- Neumann B., Barlow D.P. Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting // Curr. Opin. Genet. Devel. 1996. V. 6. № 2. P. 159–163.
- Orstavik K.H., Eiklid K., van der Hagen C.B. et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection // Am. J. Hum. Genet. 2003. V. 72. № 1. P. 218–219.
- Pangas S.A., Rajkovich A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters // Hum. Reprod. 2006. V. 12. № 3. P. 65–76.
- Radic M. Z., Lundgren K., Hamkalo B.A. Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin // Cell. 1987. V. 50. № 7. P. 1101–1108.
- Razin A., Cedar H. DNA methylation and embryogenesis // EXS. 1993. V. 64. P. 343–357.
- Razin A., Shemer R. DNA methylation in early development // Hum. Mol. Genet. 1995. V. 4. (Spec. №). P. 1751–1755.
- Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development // Science. 2001. V. 293. № 5532. P. 1089–1093.
- Saltou M., Barton S., Surani M.A. A molecular program for the specification of germ cell fate in mice // Nature. 2002. V. 418. P. 263–300.
- Sanford J., Forrester L., Chapman V. et al. Methylation patterns of repetitive DNA sequences in germ cells of *Mus musculus* // Nucl. Acids. Res. 1984. V. 12. № 6. P. 2823–2836.
- Sanford J.P., Clark H.J., Chapman V.M. et al. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse // Genes. Devel. 1987. V. 1. № 10. P. 1039–1046.
- Santos F., Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammalia // Reproduction. 2004. V. 127. № 6. P. 643–651.
- Santos F., Peters A.H., Otte A.P. et al. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos // Devel. Biol. 2005. V. 280. № 1. P. 225–236.
- Schultz R.M. The molecular foundation of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo // Hum. Reprod. Update. 2002. V. 8. № 4. P. 323–331.
- Selker E.U. Gene silencing: repeats that count // Cell. 1999. V. 97. № 2. P. 157–160.
- Shi W., Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure // Mol. Reprod. Devel. 2002. V. 63. № 3. P. 329–334.
- Trussler J.L., Pickering S.J., Ogilvie C.M. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization // Reprod. Biomed. Online. 2004. V. 8. № 6. P. 701–711.
- Walsh C.P., Chaillet J.R., Bestor T.H. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation // Nat. Genet. 1998. V. 20. № 2. P. 116–117.
- Whitten W.K., Biggers J.D. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium // J. Reprod. Fertil. 1968. V. 17. № 2. P. 399–401.
- Yamagata K., Yamazaki T., Miki H. et al. Centromeric DNA hypomethylation as an epigenetic signature discriminates between germ and somatic cell lineages // Devel. Biol. 2007. V. 312. № 1. P. 419–426.
- Yamazaki T., Yamagata K., Baba T. Time-lapse and retrospective analysis of DNA methylation in mouse preimplantation embryos by live cell imaging // Ibid. 2007. V. 304. № 1. P. 409–419.

Modifications in Major Satellite Methylation in the Nucleus of a Two-cell Mouse Embryo with Respect to Developmental Conditions

I. S. Kuznetsova, E.M. Noniashvili*, E.V. Gavrilova, and A.P. Dyban*

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Tihoretskiy Prospekt 4, Russia, 194064

** Institute of Experimental Medicine RAMS, Saint-Petersburg, Acad. Pavlov St. 12, Russia, 197376*

e-mail: kis@mail.cytsbp.rssi.ru

Abstract—The study of the degree of DNA methylation in the nucleus, in particular of the major satellite in two-cell mouse embryos developing in the maternal organism, in standard cultural media M16 used for cultivation of mouse embryos and M2 media used for manipulations with embryos in the air was conducted. Two-cell embryos nucleus aged 44–46 hours after chorionic hormone injection were investigated. The revealed results are evidence for the dependence of the major satelliteTs methylation level of the developmental conditions of embryos. The methylation level of the nucleus DNA was shown to increase with a deterioration of environmental conditions. It was reported, that in the case of cultivation in M2 media not suitable for long cultivation, the DNATs methylation level, MaSat in particular, was higher compared to other embryo groups. Accordingly, not only a significant number of genes but also repeats of satellite DNA are involved in epigenetic regulation.

Key words: embryo, epigenomic programming, major satellite, methylation.

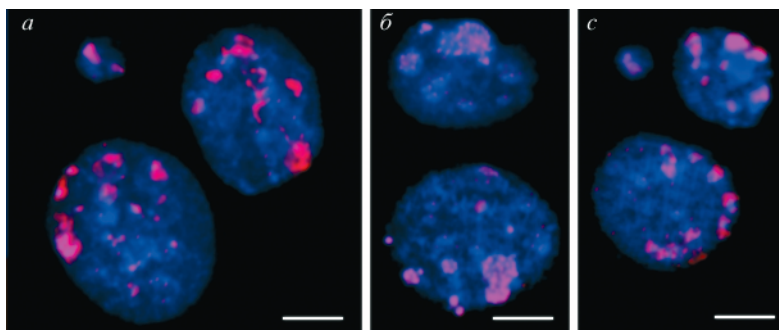


Рис. 5. Локализация гибридационного сигнала МаСат (красный цвет) в ядрах двухклеточных зародышей, развивающихся *in vivo* (а) и в культуральных средах М16 (б) и М2 (в). Здесь и на рис. 6: ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет); масштаб – 15 мкм.

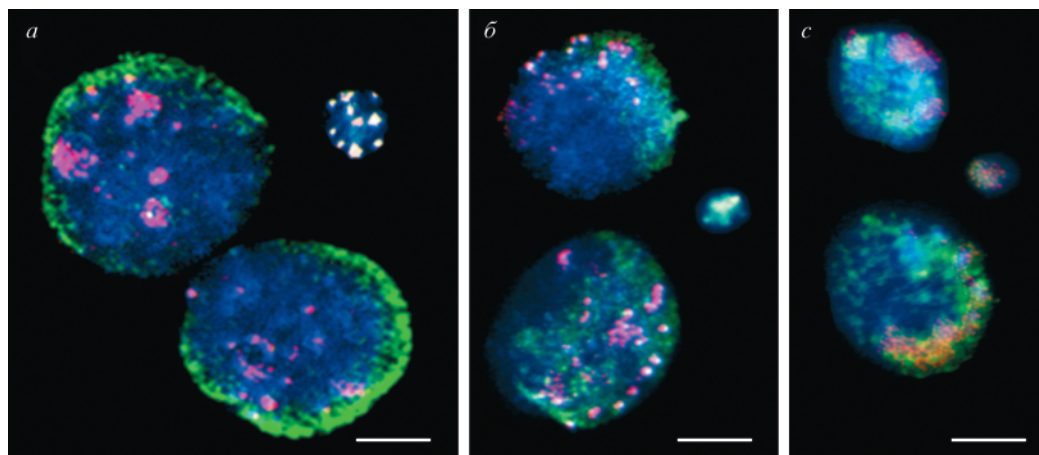


Рис. 6. Локализация гибридационного сигнала МаСат (красный цвет) и сигнала метилированного цитозина (зеленый цвет) в ядрах двухклеточных зародышей, развивающихся *in vivo* (а) и в культуральных средах М16 (б) и М2 (в).

