

УДК 575.16.591

ВЛИЯНИЕ 5-АЗАДЕЗОКСИЦИТИДИНА И РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА У ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ¹

© 2010 г. Л. И. Пенков, Т. К. Тасева, Я. М. Койчева, Е. С. Платонов*

Институт генетики им. академика Д. Костова Болгарской академии наук
1113 София, Болгария

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

E-mail: platonov@vigg.ru; lpenkov@abv.bg

Поступила в редакцию 23.04.09 г.

Окончательный вариант получен 10.08.09 г.

Изучали действие двух типов веществ — 5-азадезоксицитидина и ретиновой кислоты, оказывающих деметилирующее влияние на ДНК в процессе развития диплоидных партеногенетических эмбрионов мышей. Изучено влияние 5-азадезоксицитидина на гибридных мышей (СВАхС57ВL/6)F1, введенного в среду с одноклеточными партеногенетическими эмбрионами *in vitro* на 6 ч во время S-фазы клеточного цикла. После развития *in vitro* до стадии бластоцисты партеногенетические эмбрионы были трансплантированы в матку ложнобеременным самкам. Установлено, что в доимплантационном периоде 5-азадезоксицитидин в концентрации 0.1 мкМ активирует развитие зародышей до стадии бластоцисты (69% — в опыте, 61% — в контроле), а в постимплантационном — увеличивает число мест имплантации в матку (76% — в опыте, 63% — в контроле). Эффекты ретиновой кислоты изучали на партеногенетических эмбрионах, полученных от мышей инбредных линий С57ВL/6 или СВА, добавляя ее в среду к одноклеточным эмбрионам *in vitro* на 96 ч. Обработка партеногенетических эмбрионов С57ВL/6 кислотой в концентрациях 0.1 или 0.5 мкМ статистически значимо увеличивала число мест имплантации зародышей — 76 и 78% соответственно против 57% у необработанных эмбрионов. Добавление сходных доз ретиновой кислоты в питательную среду к партеногенетическим эмбрионам мышей линии СВА (в отличие от эмбрионов С57ВL/6) не улучшает процесс имплантации, причем ее концентрация 2.0 мкМ является токсической для зародышей. В течение постимплантационного периода партеногенетические эмбрионы мышей линии С57ВL/6, подвергнутые обработке ретиновой кислотой, так же как и контрольные, не развиваются до сомитных стадий. У мышей линии СВА 45% контрольных зародышей развиваются до продвинутых сомитных стадий, однако число обработанных ретиновой кислотой эмбрионов не увеличивается. Таким образом, обработка партеногенетических эмбрионов двух инбредных линий мышей и их гибридов деметилирующими ДНК соединениями (5-азадезоксицитидином и ретиновой кислотой) создает предпосылки для частичной модуляции геномного импринтинга и повышения выживаемости таких зародышей.

Ключевые слова: 5-азадезоксицитидин, ретиновая кислота, метилирование ДНК, геномный импринтинг, партеногенетические эмбрионы мыши.

Метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией генома, которая регулирует ключевые аспекты его функционирования. Паттерны метилирования генома в дифференцированных соматических клетках являются стабильными и наследуются в последующих клеточных поколениях. У млекопитающих существуют как минимум два периода развития, когда в геноме происходит об-

ширное репрограммирование паттернов метилирования и образуются клетки с тотипотентными свойствами, — в первичных половых клетках и в эмбрионах доимплантационных стадий развития. Метилирование ДНК играет основную роль в осуществлении механизма геномного импринтинга (Surani et al., 1990; Howlett, Reik, 1991; Li et al., 1993). Реализация этого процесса накладывает биологический запрет на осуществление партеногенеза и андрогенеза у млекопитающих (McGrath, Solter, 1984; Surani et al., 1984).

Метилирование ДНК в норме осуществляется с помощью ДНК метилтрансфераз, а тотальное деме-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 04-04-48612, 01-04-48760), Болгарским министерством образования и науки (проект № ВG051PO001/07/3.3-02/25) и Оперативной программой ЕС “Развитие человеческих ресурсов”.

тирование – с участием неспецифических ДНК деметилаз (Carlson et al., 1992; Kafri et al., 1993; Yoder et al., 1997). С другой стороны, при сайтспецифическом метилировании или деметилировании в действие могут вовлекаться транскрипционные факторы, не кодирующие РНК, а также ядерные рецепторы гормонов (стероидных, тиреоидных), ретиноевой кислоты и др. (Brandeis et al., 1993; Mark et al., 2006). Обширное неспецифическое деметилирование ДНК экспериментальным путем может осуществляться с помощью аналогов цитидина – 5-азацитидина (5-азаЦ) и 5-азадезоксцитидина (5-азаДЦ) (Jones, Taylor, 1980; Razin, Cedar, 1991).

Существует выраженная корреляция между уровнем метилирования ДНК и экспрессией генов. Применение деметилирующих ДНК агентов (5-азаЦ и 5-азаДЦ) в нормальных и партеногенетических клетках может приводить к реактивации определенных генов, в частности импринтированных (Пенков, Платонов, 1992; Hu et al., 1996; Kharroubi et al., 2001). Обработка партеногенетических эмбрионов *in vitro* и *in vivo* 5-азаЦ предотвращает их программируемую гибель и приводит к последующему развитию вплоть до стадии 35–45 сомитов (Пенков, Платонов, 1997; Penkov et al., 1996).

Среди экзогенных факторов, включающихся в различные метаболические процессы и способных влиять на деметилирование ДНК, особое место занимает ретиноевая кислота, определяемая как неспецифическое деметилирующее соединение (Livingston et al., 2004). Однако ее влияние, в частности на партеногенетическое развитие млекопитающих, остается малоизученным. Действие ретиноевой кислоты, очевидно, осуществляется совместно с тотальным деметилированием ДНК и может оказывать влияние на реализацию геномного импринтинга у ранних эмбрионов. Под влиянием ретиноевой кислоты может происходить неспецифическое деметилирование ДНК, например, при индукции дифференцировки тератокарциномных клеток с ее помощью происходит обширное, около 30%, деметилирование ДНК (Razin et al., 1984). Подобное наблюдается также в клетках внезародышевых оболочек, в желточном мешке и плаценте мышей.

Деметилирование ДНК тератокарциномных клеток обладает кумулятивным эффектом и вызывается воздействием ретиноевой кислоты в концентрации 0.5 мкМ в течение 8–13 сут. Механизм такого обширного деметилирования ДНК в настоящее время остается неясным, но он, вероятно, осуществляется прямо или косвенно при помощи ядерных рецепторов для ретиноевой кислоты.

Ретиноевая кислота индуцирует экспрессию нескольких факторов, регулирующих транскрипцию, в частности гомеобоксные гены группы *Нох-2* и рецепторы β -ретиноевой кислоты при ее концентрации 0.01–10.0 мкМ (Glass et al., 1991). Было показано, что ретиноевая кислота в сходных дозах существенно увеличивает синтез рецепторов эпидер-

мального фактора роста (Jetten, 1980; Hudson et al., 1990). Партеногенетические эмбрионы представляют собой удобную модель для расшифровки связей между сигнальными путями ретиноевой кислоты, метилирования ДНК и геномного импринтинга.

Для выяснения начальных этапов осуществления этих процессов необходимо оценить влияние 5-азаДЦ на диплоидные партеногенетические эмбрионы гибридных мышей (СВА \times С57BL/6)F1, а также изучить действие ретиноевой кислоты на партеногенетические эмбрионы, которые получены от двух инбредных линий мышей – С57BL/6 и СВА, по многим параметрам развития отличающихся друг от друга (Пенков, Платонов, 1996; Penkov et al., 1996). Мы полагаем, что применение 5-азаДЦ или ретиноевой кислоты в доимплантационном периоде может улучшать развитие ранних партеногенетических эмбрионов и положительно влиять на зародыши продвинутых стадий сомитогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали 8–10-недельных мышей инбредных линий СВА и С57BL6, а также гибридных мышей (СВА \times С57BL/6)F1. День обнаружения у самок вагинальной пробки после спаривания с вазэктомизированными самцами считали 1-м днем беременности.

Неоплодотворенные яйцеклетки после гормональной суперовуляции (Пенков, Платонов, 1997) выделяли из яйцеводов в фосфатном буфере; клетки кумулюса удаляли в растворе, содержащем 100 МЕ/мл гиалуронидазы (“Sigma”, США). Яйцеклетки активировали к партеногенетическому развитию 7%-ным этанолом (Дыбан, Хожай, 1980; Kaufman, 1982) в модифицированной среде Виттена (Abramczuk et al., 1977) в течение 5 мин при 27°C. Активированные яйцеклетки после многократного отмывания инкубировали 7 ч при 37°C в питательной среде, содержащей 5 мкг/мл цитохалазина В. Диплоидные партеногенетические эмбрионы культивировали в среде Виттена в герметично закрытых пузырьках в атмосфере 5%-ного CO₂, 5%-ного O₂ и 90%-ного N₂. В среду для культивирования *in vitro* партеногенетических эмбрионов, находящихся на одноклеточной стадии развития во время S-фазы клеточного цикла, добавляли на 6 ч 5-азаДЦ (“Sigma”, США), растворенный в фосфатном буфере. Ретиноевую кислоту (*транс*-форма) растворяли в ДМСО (“Sigma”, США) в условиях минимального освещения, хранили при температуре –20°C и растворяли непосредственно перед употреблением в модифицированной среде Виттена. Различные концентрации ретиноевой кислоты добавляли в питательную среду, где содержались партеногенетические эмбрионы на одноклеточной стадии развития, на 96 ч с заменой кислоты через 48 ч. Партеногенетические эмбрионы на стадии бластоцисты трансплантировали в правый рог матки гибридных самок

Таблица 1. Влияние 5-азадезоксицитидина на доимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мыши *in vitro*

Линия мышей	Концентрация, мкМ	Число	
		диплоидных яйцеклеток	бластоцист
(CBA × C57BL/6)F1	0.1	330	228 (69)*
	1.0	307	173 (56)
	2.5	578	185 (32)**
	—	580	354 (61)

Примечание: здесь и в табл. 2 в скобках — %; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(CBA × C57BL/6)F1 на 3-й день ложной беременности. В отдельной серии экспериментов ретиновую кислоту вводили внутривентриально беременным самкам с трансплантированными партеногенетическими эмбрионами на постимплантационных стадиях развития. Мышей забивали на 10–12-й дни беременности, зародыши выделяли вместе с плацентой и оценивали их развитие. Статистический анализ результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние 5-азаДЦ на партеногенетические эмбрионы доимплантационных стадий развития. Препарат добавляли *in vitro* в концентрациях 0.1, 1.0 и 2.5 мкМ в среду, где культивировали партеногенетические эмбрионы на стадии зиготы, полученные от гибридных мышей (CBA × C57BL/6)F1 (табл. 1). Установлено, что в доимплантационном периоде 5-азаДЦ в концентрации 0.1 мкМ статистически значимо ($p < 0.05$) улучшает развитие партеногенетических эмбрионов до стадии бластоцисты по сравнению с контролем (69 и 61% соответственно). При использовании 5-азаДЦ в дозе 1.0 мкМ положительных эффектов обнаружено не было, а в концентрации 2.5 мкМ количество бластоцист по сравнению с контролем снизилось (32 и 61% соответственно, $p < 0.01$).

Влияние 5-азаДЦ на имплантацию и на постимплантационное развитие партеногенетических эмбрионов. Было установлено, что 5-азаДЦ в концентрации 0.1 мкМ в постимплантационном периоде развития статистически значимо ($p < 0.01$) увеличивает число мест имплантации по сравнению с контролем (76 и 63% соответственно; табл. 2). Применение 5-азаДЦ в концентрации 0.1 мкМ не приводило к увеличению (16%) числа партеногенетических эмбрионов на стадиях сомитов, а к 11-му дню беременности живых эмбрионов, имеющих более 25 сомитов, обнаружено не было. При использовании 5-азаДЦ в концентрациях 1.0 и 2.5 мкМ наблюдали снижение числа мест имплантации до 52 и 46% соответственно при 63% в контроле ($p < 0.05$). Влияние 5-азаДЦ в концентрации 1.0 мкМ выразалось в торможении развития эмбрионов до стадии сомитов (5% — в опыте, 22% — в контроле, $p < 0.01$), причем партеногенетических эмбрионов, имеющих больше 25 сомитов, обнаружено не было. После обработки зародышей 5-азаДЦ в концентрации 2.5 мкМ ни один партеногенетический эмбрион не достигал стадии сомитов.

Влияние ретиновой кислоты на партеногенетические эмбрионы доимплантационных стадий развития. Анализировали влияние ретиновой кислоты в диапазоне доз от 0.01 до 5.0 мкМ на доимплантационное развитие *in vitro* партеногенетических мышей инбредной линии C57BL/6. Кислоту добавляли в питательную среду к партеногенетическим эмбрионам на стадии зиготы на 96 ч (табл. 3). У контрольных эмбрионов число бластоцист, развившихся *in vitro*, составляло 90%, а после добавления 0.01 мкМ ретиновой кислоты — 93%. С применением более высоких доз ретиновой кислоты (0.1–2.0 мкМ) наблюдали уменьшение, а при использовании в концентрации 5.0 мкМ — значительное снижение числа бластоцист (46%, $p < 0.01$). У партеногенетических эмбрионов инбредной линии CBA изучали влияние ретиновой кислоты в диапазоне доз от 0.1 до 5.0 мкМ. Ретиновая кислота в концентрации 0.1–2.0 мкМ, так же как у мышей инбредной линии C57BL/6, не вызывает существенного уменьшения числа бластоцист, однако в дозе 5.0 мкМ снижает их количество до 32% (в контроле — 59%, $p < 0.01$).

Таблица 2. Влияние 5-азадезоксицитидина на имплантацию и постимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мыши

Линия мышей	Концентрация, мкМ	Число		
		трансплантированных эмбрионов	имплантаций	эмбрионов на стадиях сомитов
(CBA × C57BL/6)F1	0.1	216	165 (76)**	26 (16)
	1.0	142	74 (52)*	4 (5)**
	2.5	178	82 (46)**	—
	—	340	214 (63)	47 (22)

Таблица 3. Действие ретиноевой кислоты на доимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мыши *in vitro*

Линия мышей	Концентрация, мкМ	Число	
		диплоидных яйцеклеток	бластоцист
C57BL/6	0.01	112	104 (93)
	0.1	128	100 (86)
	0.5	55	46 (84)
	1.0	145	117 (81)
	2.0	89	76 (85)
	5.0	111	51 (46)*
CBA	—	564	506 (90)
	0.1	42	23 (55)
	1.0	272	157 (58)
	2.0	147	86 (59)
	5.0	76	24 (32)*
	—	350	178 (59)

Примечание: здесь и в табл. 4 в скобках — %; * $p < 0.01$.

Таблица 4. Влияние ретиноевой кислоты на имплантацию и постимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мышей

Линия мышей	Концентрация, мкМ	Число		
		трансплантированных эмбрионов	имплантаций	эмбрионов на стадиях сомитов
C57BL/6	0.01	48	35 (73)	—
	0.1	71	54 (76)*	—
	0.5	46	36 (78)*	—
	1.0	42	25 (60)	—
	—	157	89 (57)	—
	CBA	0.1	23	17 (74)
1.0		65	41 (64)	12 (29)
2.0		69	32 (46)*	6 (19)
—		153	105 (69)	47 (45)

Влияние ретиноевой кислоты на имплантацию и постимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мышей C57BL/6 и CBA. Кислоту добавляли в питательную среду к одноклеточным зародышам на 96 ч (табл. 4). У мышей C57BL/6 после культивирования *in vitro* анализировали влияние ретиноевой кислоты в концентрациях 0.01–1.0 мкМ. В контроле число имплантаций составило 57%, причем эмбрионы, развившиеся до сомитных стадий, отсутствовали. Было установлено статистически значимое увеличение числа мест им-

плантации зародышей, обработанных ретиноевой кислотой в разной концентрации ($p < 0.01$): 0.01 мкМ — 73, 0.1 мкМ — 76, 0.5 мкМ — 78 и 1.0 мкМ — 60%. При этом эмбрионы не развивались до сомитных стадий ни при одной из изученных концентраций ретиноевой кислоты.

У мышей линии CBA изучали действие кислоты в диапазоне концентраций 0.1–2.0 мкМ. Зародыши также культивировали *in vitro* 96 ч и трансплантировали в матку ложнобеременных самок, а затем анализировали их развитие на 12-й день беременности. В контроле число имплантаций составило 69%, а развитие до стадий сомитов наблюдали у 45% эмбрионов. Обработка 0.1 мкМ ретиноевой кислоты приводила к значительному увеличению количества имплантаций — 74%, при этом число сомитных эмбрионов составило 47%. В то же время действие ретиноевой кислоты в дозах 1.0 и 2.0 мкМ приводило к снижению числа имплантаций до 64 и 46% соответственно, сходным образом уменьшалось и количество сомитных эмбрионов — 29 и 19% соответственно. Не было отмечено случаев развития эмбрионов дальше стадии 25 сомитов.

Влияние ретиноевой кислоты на постимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мышей линии CBA также было изучено после ее внутрибрюшинной инъекции самкам на разных сроках беременности (табл. 5). Дозы ее были выбраны таким образом, чтобы избежать нарушений развития эмбрионов (Glass et al., 1991). Ретиноевую кислоту в концентрации 0.1 мкМ ежедневно инъецировали самкам на 7.5, 8.5 и 9.5-й дни беременности. Показано, что количество сомитных эмбрионов составляло 44% по сравнению с 45% — в контроле. После ежедневного введения 0.5 мкМ ретиноевой кислоты в те же сроки беременности количество сомитных эмбрионов составляло 41%. После одноразовой инъекции ретиноевой кислоты в концентрации 1.0 мкМ на 8.5-й день от начала беременности число сомитных эмбрионов сохранялось на том же уровне — 42%. Развития эмбрионов более чем до 25 сомитов не наблюдали при действии всех изученных концентраций ретиноевой кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Аналог цитозина 5-азаДЦ в отличие от 5-азаЦ содержит дезоксирибозу вместо рибозы и после фосфорилирования включается преимущественно в ДНК. Будучи однажды включенным в ДНК, азануклеозидовое кольцо не может метилироваться, чем и объясняется способность аналогов цитидина (5-азаЦ и 5-азаДЦ) ингибировать метилирование ДНК. При одинаковых концентрациях 5-азаДЦ в 10 раз более эффективен, чем 5-азаЦ, как в отношении деметилирования ДНК, так и в возможности индукции неактивных генов и фенотипической трансформации клеток (Jones, Taylor, 1980; Hu et al., 1996).

Ранее мы показали, что добавление 5-азаЦ (1.0 мкМ) в среду для культивирования партеногенетических эмбрионов на одноклеточной стадии развития *in vitro* не увеличивает число мест имплантации эмбрионов гибридных мышей (СВА × С57BL/6)F1. Применение 5-азаЦ в дозе 1.0 мкМ и выше достоверно уменьшало число развившихся партеногенетических бластоцист как мышей линии С57BL/6, так и гибридных мышей (СВА × С57BL/6)F1 (Penkov et al., 1992, 1996).

Мы установили, что применение 5-азаДЦ (0.1 мкМ) к партеногенетическим эмбрионам мышей (СВА × С57BL/6)F1 при тех же условиях приводит к существенному увеличению числа мест имплантации и формирующихся бластоцист. Столь различающееся действие 5-азаЦ и 5-азаДЦ на доимплантационное развитие и на имплантацию эмбрионов, очевидно, связано с высокой токсичностью 5-азаЦ, которая перекрывает возможную реактивацию импринтированных генов, контролирующих доимплантационное развитие и имплантацию в матку у партеногенетических зародышей.

С другой стороны, после обработки партеногенетических эмбрионов (СВА × С57BL/6)F1 5-азаЦ (1.0 мкМ) на одноклеточной стадии развития в постимплантационном периоде наблюдалось увеличение числа зародышей, достигших стадии 16–25 сомитов (Penkov et al., 1996). В нашей работе после обработки партеногенетических эмбрионов мышей (СВА × С57BL/6)F1 0.1 мкМ 5-азаДЦ увеличение числа зародышей, достигших различных стадий сомитов, было менее выражено. Можно предположить, что в этих случаях разный уровень эффектов указанных соединений, очевидно, связан с тем, что 5-азаЦ включается в РНК, в частности в некодирующую РНК, которая является составной частью процесса РНК-интерференции и участвует в инактивации некоторых импринтированных генов. Недавние исследования показали, что процесс РНК-интерференции является одним из важных механизмов геномного импринтинга (Mancini-DiNardo et al., 2006; Pauler, Barlow, 2006). Инактивация материнского импринтированного аллеля *Igf2* происходит при участии некодирующей РНК, транскрибируемой на отцовском аллеле импринтированного гена *H19*. Косвенно на это указывают исследования Коно с соавторами (Kono et al., 2004), которые показали, что небольшое число гиногенетических зародышей с нокаутом гена *H19* выживают до рождения.

При действии на партеногенетические эмбрионы в доимплантационном периоде развития ретиновой кислоты в концентрациях, вызывающих деметилирование ДНК, число бластоцист существенно не увеличивается, но статистически достоверно увеличивается число мест имплантации партеногенетических эмбрионов мышей С57BL/6. Это, очевидно, может быть связано с тем, что ретиновая кислота активирует экспрессию гена, кодирующего ламинин, и стимулирует формирование бластоцеля у

Таблица 5. Влияние ретиновой кислоты на постимплантационное развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мыши линии СВА

Концентрация, мкМ	Введение ретиновой кислоты (дни от начала беременности)	Число	
		имплантаций	эмбрионов на стадиях сомитов
0.1	7.5; 8.5; 9.5	32	14 (44)
0.5	7.5; 8.5; 9.5	44	18 (41)
1.0	8.5	41	17 (42)
—	—	105	47 (45)

Примечание: в скобках – %.

мышей на стадии бластоцисты (Kang et al., 1990; Taranger et al., 2005). Обработка партеногенетических эмбрионов ретиновой кислотой в течение доимплантационного периода концентрациями, вызывающими деметилирование ДНК, не приводит к развитию сомитных стадий мышей линии С57BL/6. У мышей СВА число партеногенетических эмбрионов на стадиях сомитов исходно значительно снижено, очевидно поэтому применение кислоты *in vitro* или *in vivo* не приводит к увеличению жизнеспособности эмбрионов дольше 10.5 дней. Эти данные согласуются с результатами ряда авторов, которые показали, в частности, что ретиновая кислота приводит к репрессии гена *Oct4* и активирует *de novo* гены для А-формы ламининов и нестина (Taranger et al., 2005). Установлено, что у эмбрионов позвоночных ретиновая кислота индуцирует появление значительных тератогенных эффектов (Glass et al., 1991). Вероятно, вследствие этих причин влияние ретиновой кислоты на развитие партеногенетических эмбрионов является столь неоднозначным. Кроме того, разные эффекты кислоты на партеногенетические эмбрионы инбредных линий мышей С57BL/6 и СВА, которые мы наблюдали, можно объяснить различиями в уровнях метилирования ДНК у этих инбредных линий и их гибридов.

В заключение следует подчеркнуть, что деметилирование ДНК в доимплантационном или постимплантационном периодах развития партеногенетических эмбрионов, очевидно, является одним из этапов сложного и малоизученного процесса реактивирования импринтированных генов и его недостаточно для существенного улучшения жизнеспособности партеногенетических эмбрионов. Для решения этой проблемы важно не только реактивировать некоторые импринтированные гены, но и репрессировать другие, в частности, те, которые вовлечены в инактивацию X-хромосомы. В качестве долгосрочной стратегии можно предположить применение комбинированного воздействия веществ, оказывающих влияние на метилирование ДНК, модификацию гистонов, РНК-интерференцию, а так-

же ряд ростовых факторов и гормонов, вызывающих специфическое ремоделирование хроматина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дыбан А.П., Хожай Л.И. Партеногенетическое развитие овулировавших мышинных яйцеклеток под влиянием этилового спирта // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1980. Т. 139. С. 487–489.
- Пенков Л.И., Платонов Е.С. 5-Азациитидин ускоряет депрессию генов локуса *Gpi-1* в эмбриогенезе мыши // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 2. С. 140–145.
- Пенков Л.И., Платонов Е.С. Изучение развития диплоидных партеногенетических зародышей мышей инбредных линий C57BL/6 и CBA // Там же. 1996. Т. 27. № 5. С. 364–369.
- Пенков Л.И., Платонов Е.С. Ультросер-Г и 5-азациитидин пролонгируют развитие партеногенетических зародышей мышей // Там же. 1997. Т. 28. № 2. С. 138–144.
- Abramczuk J., Solter D., Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium // *Devel. Biol.* 1977. V. 61. P. 378–383.
- Brandeis M., Kafri T., Ariel M. et al. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 3669–3677.
- Carlson L.L., Page A.W., Bestor T.H. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: Implications for genomic imprinting // *Genes Devel.* 1992. V. 6. P. 2536–254.
- Glass C.K., DiRenzo J., Kurokawa R., Han Z. Regulation of gene expression by retinoic acid receptors // *DNA Cell Biol.* 1991. V. 10. P. 623–638.
- Howlett S.K., Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development // *Development.* 1991. V. 113. P. 119–127.
- Hu J.-F., Vu T.H., Hoffman A.R. Promoter-specific modulation of insulin-like growth factor II genomic imprinting by inhibitors of DNA methylation // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 18253–18262.
- Hudson L.G., Santon J.B., Glass C.K., Gill G.N. Ligand-activated thyroid hormone and retinoic acid receptors inhibit growth factor receptor promoter expression // *Cell.* 1990. V. 62. P. 1165–1175.
- Jetten A.M. Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor receptors // *Nature.* 1980. V. 284. P. 626–629.
- Jones P.A., Taylor S.M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation // *Cell.* 1980. V. 20. P. 85–93.
- Kafri T., Gao X., Razin A. Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the preimplantation mouse embryos // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. V. 90. P. 10558–10562.
- Kang H.M., Kim K., Kwon H.B., Cho W.K. Regulation of laminin gene expression in the expansion of mouse blastocysts // *Mol. Reprod. Devel.* 1990. V. 27. P. 191–199.
- Kaufman M.H. The chromosome complement of single pronuclear treatment haploide mouse embryos, following activation by ethanol // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1982. V. 71. P. 139–154.
- Kharroubi A.E., Piras G., Stewart C.L. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 8674–8680.
- Kono T., Obata Y., Wu Q. et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood // *Nature.* 2004. V. 428. P. 860–864.
- Li E., Beard C., Jaenisch R. Role of DNA methylation in genomic imprinting // *Ibid.* 1993. V. 366. P. 362–365.
- Livingston T., Eberhardt D., Edwards L., Godkin J. Retinol improves embryonic development *in vitro* // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004. V. 2. P. 83.
- Mancini-DiNardo D., Steele S.J.S., Levors J.M. et al. Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes // *Genes Devel.* 2006. V. 15. P. 1268–1282.
- Mark M., Ghyselinck N.B., Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006. V. 46. P. 451–480.
- McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes // *Cell.* 1984. V. 37. P. 179–183.
- Pauler F.M., Barlow D.P. Imprinting mechanisms-it only takes two // *Genes Devel.* 2006. V. 20. P. 1203–1206.
- Penkov L.I., Platonov E.S., Dryanovska O.A. Linear differences in the development of diploidised parthenogenetic embryos in mouse: Effect of 5-azacytidin on them // *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 1992. V. 45. P. 95–98.
- Penkov L.I., Platonov E.S., Mironova O.V., Konyukhov B.V. Effects of 5-azacytidine on the development of parthenogenetic mouse embryos // *Devel. Growth Differ.* 1996. V. 38. P. 263–270.
- Razin A., Cedar H. DNA methylation and gene expression // *Microbiol. Rev.* 1991. V. 55. P. 451–458.
- Razin A., Webb C., Szyf M. et al. Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation *in vivo* and *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 2275–2279.
- Surani M.A.H., Barton S.C., Norris M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis // *Nature.* 1984. V. 308. P. 548–550.
- Surani M.A., Allen N.D., Barton S.C. et al. Developmental consequences of imprinting of parental chromosomes by DNA methylation // *Phil. Trans. R. Soc. L. Biol.* 1990. V. 326. P. 313–327.
- Taranger C.K., Noer A., Sorensen A.L. et al. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. P. 5719–5735.
- Yoder J.A., Soman N.S., Verdine G.L., Bestor T.H. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 270. P. 385–395.

Effect of 5-Azadeoxycytidine and Retinoic Acid on Expression of Genomic Imprinting in Parthenogenetic Mouse Embryos

L. I. Penkov^a, T. K. Taseva^a, Ya. M. Koicheva^a, and E. S. Platonov^b

^a Kostova Institute of Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Sophia, 1113 Bulgaria

^b Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia
e-mail: platonov@vigg.ru; lpenkov@abv.bg

Abstract—The action of two types of substances has been studied: 5-azadeoxycytidine and retinoic acid, which have a demethylation effect on DNA in the development process of diploid parthenogenetic mouse embryos. The effect of 5-azadeoxycytidine on hybrid mice (CBAx C57BL/6)F1 *in vitro* for 6 h, in the presence of single cell parthenogenetic embryos during the S-phase of the cell cycle has been studied. After developing to the blastocyst stage *in vitro*, parthenogenetic embryos were transplanted into the uterus of false pregnant females. It has been determined that a concentration of 0.1 μM 5-azadeoxycytidine activates embryonic development in the preimplantation period until the blastocyst stage (69% in experiment; 61% in the control) and during postimplantation, it increases the number of available space in the uterus for implantation (76% in experiment; 63% in the control).

The effect of retinoic acid on parthenogenetic embryos from inbred C57BL/6 or CBA mice lines was studied by adding it to single cell embryos in a medium *in vitro* for 96 h. Treating parthenogenetic embryos C57BL/6 with retinoic acid concentrations 0.1 μM or 0.5 μM significantly increased the number of spaces for embryo implantation, 76% and 78% respectively, as against 57% for untreated embryos. Addition of similar doses of retinoic acid to the nutrient medium containing CBA parthenogenetic mouse embryos does not improve implantation (as with embryos C57BL/6), and a concentration of 2.0 μM is toxic to the embryos. During the period of postimplantation, parthenogenetic embryos of mouse lines C57BL/6 treated with retinoic acid just as the controls, did not develop to the somite stage. Mouse lines CBA had 45% of their embryos which were used as controls, developing to the advanced somite stages. However, the number of embryos treated with retinoic acid does not increase. Thus the treatment of two parthenogenetic embryos from inbred mice lines and their hybrids with compounds which demethylate DNA (5-azadeoxycytidine and retinoic acid) creates an opportunity for partial modulation of genomic imprinting and an increase in the survival rate of such embryos.

Key words: 5-azadeoxycytidine, retinoic acid, DNA methylation, genomic imprinting, parthenogenetic mouse embryos