

МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

А.А. Пендина¹, В.В. Гринкевич²,
Т.В. Кузнецова¹, В.С. Баранов¹

¹НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,

Санкт-Петербург;

²Санкт-Петербургский государ-
ственный университет

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК — УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ

✿ Метилирование ДНК — один из основных механизмов эпигенетической наследственности эукариот. В обзоре кратко рассмотрены пути метилирования цитозина, распределение 5-метилцитозина в геноме, механизм инактивации генов, опосредованный гиперметилированием, роль метилирования в геномном импринтинге, при инактивации X хромосомы, в эмбриогенезе млекопитающих, а также в процессах канцерогенеза и в этиологии некоторых распространенных наследственных заболеваний человека.

✿ **Ключевые слова:** метилирование ДНК, 5-метилцитозин, метилаза, импринтинг, онкогенез.

ВВЕДЕНИЕ

Полная расшифровка генома человека, к сожалению, мало прояснила одну из основных проблем современной биологии — проблему реализации наследственной информации на разных стадиях онтогенеза. Вместе с тем именно благодаря программе Геном человека, доказавшей удивительное качественное и количественное сходство геномов разных организмов, особенно в пределах одного класса (к примеру, млекопитающие), стало очевидным, что в основе видовой специфичности, равно как и в процессах реализации наследственной информации в онтогенезе, решающая роль принадлежит процессам молекулярной и надмолекулярной регуляции функции генома. Их расшифровка составляет важный раздел современной генетики — функциональной геномики (протеомики). Нет, однако, сомнения в том, что процессы регуляции генной активности осуществляются при тесном взаимодействии эндогенных (ДНК) и экзогенных (внешняя среда) факторов. Очевидно и то, что экзогенные, в том числе и экологические факторы могут не только направлять работу генома, но в экстремальных вариантах нарушать дифференциальную активность генов, лежащую в основе онтогенеза. Следовательно, данная проблема является не только генетической, но имеет непосредственное отношение к экологической генетике.

Изменения дифференциальной экспрессии генов, наследуемые в ряду митотических делений клетки без нарушения нуклеотидной последовательности ДНК, называются эпигенетическими. В настоящее время описаны два молекулярных эпигенетических механизма: модификация гистонов и метилирование ДНК. Метилирование — это обратимая ковалентная модификация ДНК, происходящая в результате присоединения метильной группы к углероду в 5-ом положении молекулы цитозина с образованием 5-метилцитозина. Метилирование ДНК широко представлено в геномах разных организмов, таких как бактерии, растения, насекомые и млекопитающие и имеет большое значение для их развития.

В начале 80-х годов была выявлена корреляция между характером экспрессии генов и степенью метилирования ДНК [17, 82]. Метилирование оказывает влияние на транскрипцию как через изменение эффективности связывания позитивных и негативных факторов транскрипции с регуляторными участками, так и непосредственно через формирование неактивных участков хроматина. Статус метилирования в клетке может изменяться под влиянием вредных экологических факторов, в частности, тяжелых металлов.

Так, внутриклеточное накопление никеля вызывает нарушение структуры гетерохроматина, что в свою очередь приводит к гиперметилированию ДНК и инактивации экспрессии близлежащих генов [24]. Малые дозы кадмия вызывают ингибирование метилтрансферазы и ведут к гипометилированию ДНК. Однако при длительном воздействии кадмия наблюдается обратный эффект: активация метилтрансферазы и гиперметилирование ДНК [94]. Таким образом, эпигенетические изменения на уровне ДНК могут быть индуцированы внешней средой и быть одним из вариантов ответа организма на постоянно изменяющиеся факторы окружающей среды.

1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА. CpG ОСТРОВКИ

Основная часть молекул 5-метилцитозина находится в составе динуклеотидов 5'-CG-3' (CpG динуклеотиды). Их небольшое число представлено в последовательностях 5'-CpNpGr-3' или асимметричных последовательностях 5'-CpA-3' и 5'-CpT-3' [79]. В процессе эволюции происходит постепенная элиминация CpG динуклеотидов, в результате чего их частота в геномах высших эукариот составляет 5–10% от теоретически ожидаемой [10]. Метилирование играет важную роль в этом процессе, так как потеря большинства CpG сайтов обусловлена превращением метилированного цитозина в тимин в результате спонтанного дезаминирования (рис. 1).

В геномах млекопитающих, в том числе у человека, 70–80% молекул цитозина в составе CpG динуклеотидов представлены 5-метилцитозином [10, 19]. Метилированные участки ДНК характерны для хроматина с соответствующим набором гистонов и нуклеосомной организацией, в состав которого входит поздно реплицирующаяся ДНК, труднодоступная для транскрипционных факторов. В таких участках CpG динуклеотиды расположены с час-

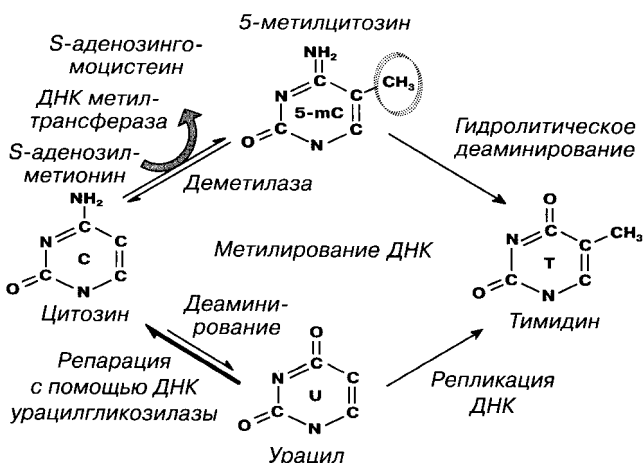


Рис. 1. Схема взаимного превращения цитозина и 5-метилцитозина и их мутационные изменения

тотой приблизительно 1:80. Для функционально активного хроматина более характерны участки ДНК (500–5000 н.п.), называемые CpG островками, плотность CpG динуклеотидов в которых в пять раз больше, чем в среднем по геному. Цитозин в таких участках в большинстве случаев находится в неметилированном состоянии. Хроматин CpG островков мало спирализован, отличается высокой степенью ацетилирования коровых гистонов, практически полным отсутствием гистона H1 и слабо выраженной нуклеосомной организацией. Все эти особенности строения ДНК эухроматина позволяют ему активно взаимодействовать с транскрипционными факторами [97]. Согласно последним данным, в геноме человека насчитывается около 29 000 CpG островков, которые в основном расположены в промоторных областях и/или экзонах всех генов «домашнего хозяйства» — *house keeping genes* и некоторых тканеспецифичных генов [22, 101].

2. ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Основными ферментами, обеспечивающими процесс метилирования в эукариотической клетке, являются метилтрансферазы. На сегодняшний день идентифицировано три метилтрансферазы: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. Ген метилтрансферазы-1 (*Dnmt1*), клонированный более 15 лет назад у лабораторной мыши, является высоко консервативным [13]. В дальнейшем ортологи гена *Dnmt1* были идентифицированы у различных видов, в том числе и у человека (DNMT1) [107]. Продукт гена *Dnmt1* поддерживает метилированное состояние ДНК в делящихся клетках. Метилируя вновь синтезированную ДНК, метилтрансфераза-1 обеспечивает воспроизведение родительского варианта метилирования в дочерних цепях ДНК после каждого раунда репликации (рис. 2). Отсутствие фермента приводит к снижению общего уров-

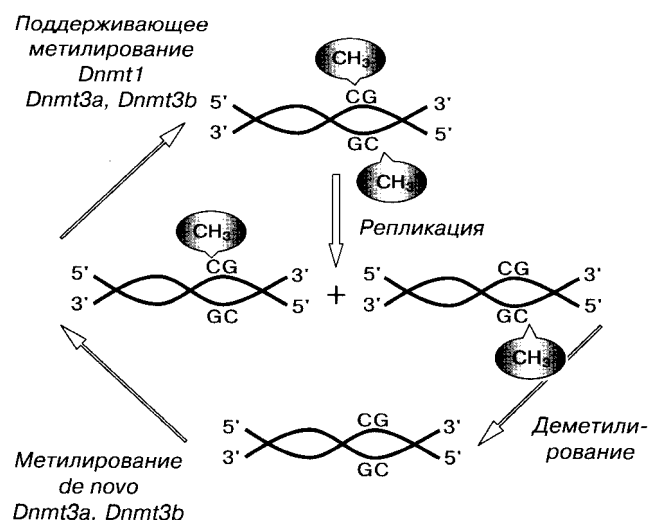


Рис. 2. Метилирование de novo и сохранение родительских схем метилирования в раундах репликации

ния метилирования в клетках и к гибели эмбрионов [58]. Однако эмбриональные стволовые клетки таких мышей жизнеспособны и сохраняют способность к метилированию *de novo* благодаря наличию других метилаз [56]. Именно к таким метилазам относятся ферменты Dnmt3a и Dnmt3b [73]. Совместное действие метилаз приводит к метилированию динуклеотидов CpG в не- и полуметилированной ДНК *in vitro* [72] (рис. 2).

Мутации в гене DNMT3B, приводящие к инактивации каталитического домена фермента, идентифицированы у пациентов с синдромом ICF — аутосомно-доминантным заболеванием, основным клиническим признаком которого являются лицевые аномалии, дефицит IgA и T клеток, сопутствующие инфекции и склонность к злокачественным новообразованиям. Цитогенетической особенностью синдрома является нестабильность центромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16 и реже 2 и 10, возникающая вследствие их гипометилированного состояния [105].

3. МЕХАНИЗМЫ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ МЕТИЛИРОВАНИЯ

В настоящее время считается, что метилирование ДНК является одним из основных способов регуляции экспрессии генов. При этом предполагается наличие двух основных механизмов транскрипционного блока (рис. 3) [18, 63].

Первый состоит в том, что 5-метилцитозин ингибирует связывание с ДНК некоторых факторов транскрипции (AP-26 с-Мус/Муп, цАМР-зависимый активатор CREB, E2F NF-kB), мишенями для которых являются последовательности, содержащие CpG нуклеотиды. Следует, однако, отметить, что ряд транскрипционных факторов (Sp1, CTF) не чувствителен к метилированию, поскольку они связываются с участками ДНК, не имеющими CpG динуклеотиды (рис. 3.1) [96].

В реализацию второго механизма вовлечены белки и белковые комплексы, которые специфично связываются с метилированными CpG динуклеотидами и ингибируют присоединение к ДНК факторов транскрипции (рис. 3.2) [40, 63]. Основная роль в этом процессе принадлежит метилцитозинсвязывающему комплексу (МЦСК), состоящему из 5 основных белков: MBD 1–4 и MeCP2. Все белки этого комплекса, за исключением MBD4, выполняют функцию репрессоров путем изменения структуры хроматина. Белок MBD4 участвует в репарации и предотвращает мутационные изменения метилцитозина [39].

MeCP2 является основным репрессирующим белком комплекса. Этот белок связывается с одиночными CpG динуклеотидами. При этом репрессорный эффект распространяется на несколько сот пар нуклеотидов. Белок состоит из двух доменов: метилцитозинсвязывающего (MBD), отвечающего за узнавание 5-метилци-

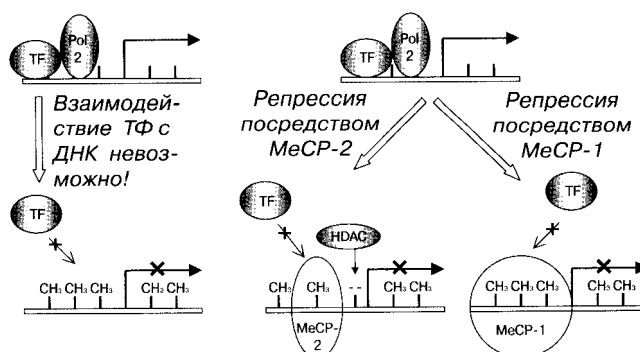
тозина, и репрессорного (TRD), имеющего сродство к гистондеацетилазе и обеспечивающего репрессию транскрипции [62]. Известно, что примерно 20% общего ацетилирования гистонов определяется взаимодействием ацетилаз с белком MeCP2. Многие регуляторы транскрипции осуществляют свои функции путем деацетилирования/ацетилирования гистонов. По всей видимости, именно деацетилирование гистонов лежит в основе инактивации гетерохроматина. При помощи специфических антител было установлено, что белок MeCP2 локализован преимущественно в G-сегментах гетерохроматина метафазных хромосом. Эмбрионы мыши, гомозиготные по делеции гена MeCP2, погибают до рождения, что указывает на важную роль белка MeCP2 в эмбриональном развитии [95].

У человека мутация в гене MECP2, локализованном на X-хромосоме, приводит к развитию прогрессирующего нейродегенеративного заболевания — синдрому Ретта. Характерные симптомы заболевания проявляются у девочек в возрасте от 6 до 18 месяцев в виде прогрессирующей умственной отсталости с утратой речевых способностей, аутизма и атаксии. Мальчики с мутацией этого гена нежизнеспособны и, как правило, умирают вскоре после рождения [9].

MBD2 является вторым метилцитозинсвязывающим белком. Этот белок, как и гистондеацетилазы HDAC1, HDAC2 и гистонсвязывающие белки RbAp46, RbAp48, входит в состав комплекса MeCP1, обладающий невысокой способностью к взаимодействию с метилированной ДНК. Для связывания с ДНК ферменту необходимо несколько CpG динуклеотидов. Учитывая слабое сродство этого комплекса к метилированной

1. Прямое взаимодействие с транскрипционным фактором

2. Специфические транскрипционные репрессоры



Примеры ТФ:
Чувствительные к метилированию
AP-2, E2F, NFkB, CREB, Мус/Муп
Нечувствительные к метилированию
SP-1, CTF

Рис. 3. Возможные механизмы репрессии транскрипции посредством изменения метилирования цитозина (цит. по Singal, Ginder, 1999)

ДНК, предполагается, что он выполняет вспомогательные функции в процессе генной репрессии [67].

В настоящее время установлено, что для репрессии транскрипции необходимы как метилирование ДНК, так и деацетилирование гистонов. Остается, однако, неясным, что является первичным: определяет ли метилирование ДНК изменения в компактизации хроматина, либо изменения в упаковке хроматина маркируют участки ДНК, где должно происходить метилирование *de novo* (рис. 4). Нет сомнения в том, что специфические последовательности ДНК могут взаимодействовать с метилтрансферазами, обеспечивающими метилирование *de novo*. Следствием этого является связывание с ДНК метилцитозинсвязывающих белков и гистонацетилазного комплекса, что приводит к стабилизации хроматина и невозможности присоединения к ДНК транскрипционного комплекса (рис. 4а). С другой стороны, сама структура хроматина может определять последовательности ДНК, которые должны подвергаться метилированию *de novo* (рис. 4б). Большинство авторов считает, что вначале осуществляется метилирование определенных последовательностей ДНК, а затем изменяется структура хроматина, в состав которого они входят [66, 81]. Вполне вероятно, что обе программы дополняют друг друга, обеспечивая в процессе клеточной дифференцировки как длительное (перманентное) выключение крупных информационных блоков активного хроматина (конформацион-

ные изменения), так и более лабильное (транзиторное) выключение отдельных генов (метилирование).

4. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Метилирование ДНК, влияя на функциональную активность генов и на конформацию хроматина, вовлечено во множество процессов, происходящих в клетке. Так, показана важная роль метилирования в регуляции экспрессии тканеспецифичных генов, в клеточной дифференцировке, репликации ДНК, в процессах репарации ДНК и поддержания геномной стабильности [8]. Предполагается, что метилирование играет важную роль в защите генома от мобильных генетических элементов [14, 70], а также в инактивации «чужеродных» генов, доставленных в клетки в целях коррекции наследственных дефектов. Метилирование в районах с малой плотностью генов, в частности, в участках прицентромерного гетерохроматина, по всей видимости, важно для стабилизации структуры, поддержания конформации и целостности хромосом [26]. В то же время метилирование цитозина в составе CpG динуклеотидов в промоторных участках генов в большинстве случаев подавляет экспрессию. Наиболее подробно механизмы репрессии генов, обусловленные метилированием, изучены в отношении такого феномена, как геномный импринтинг — одного из вариантов эпигенетической

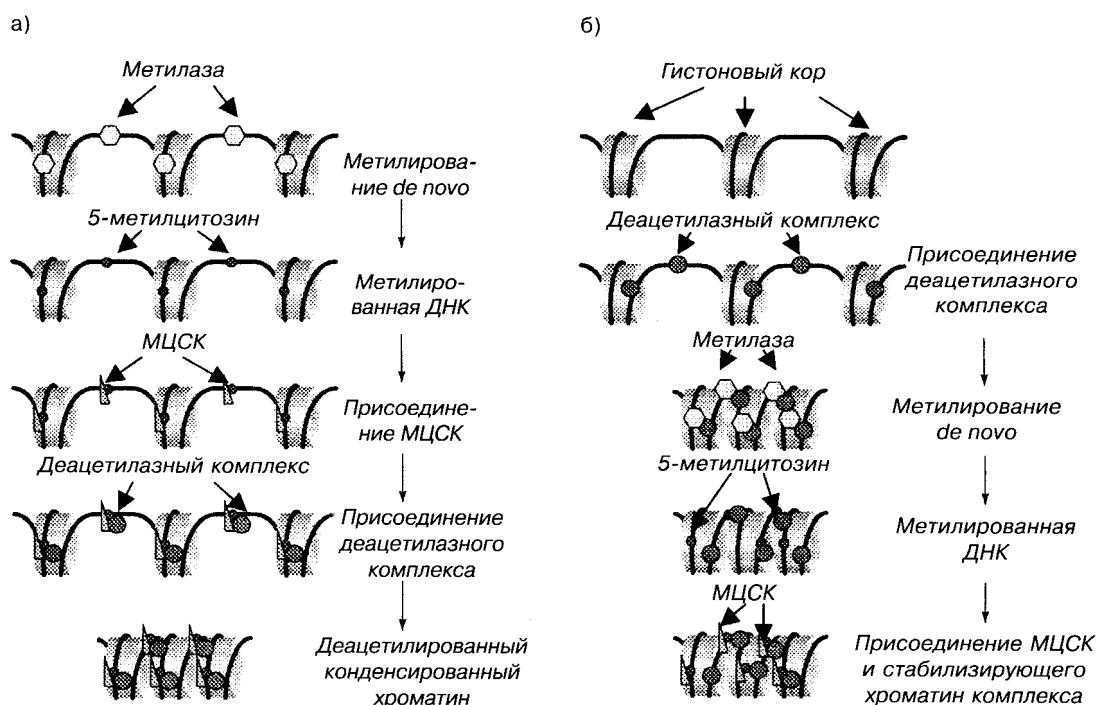


Рис. 4. Взаимосвязь между метилированием цитозина в молекуле ДНК и ацетилированием гистонов: а — метилированные участки ДНК определяют локализацию сайтов связывания деацетилазного комплекса; б — присоединение деацетилазного комплекса детерминирует участки, в которых должно происходить метилирование ДНК (Newell-Price et al., 2000)

наследственности, при котором специфический характер дифференциальной активности генов определяется полом организма, от которого эти гены унаследованы [1, 2].

5. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ

У млекопитающих, насекомых и цветковых растений отцовские и материнские гены могут обнаруживать дифференциальную активность уже на ранних стадиях онтогенеза. При этом наблюдается видимое искажение менделевских правил наследования отдельных признаков. В участках генома, подверженных импринтингу, экспрессируется только одна аллель — отцовская или материнская. Иными словами, экспрессия импринтированного гена в организме-потомке определяется его родительским происхождением, то есть зависит от того, передается ли он геномом спермия или яйцеклетки. Данные по геномному импринтингу у человека были суммированы на конференции National Institute of Child Health (USA) [102]. Они подробно рассмотрены в ряде отечественных обзоров и сборников [4, 6, 7].

Природа этого явления в настоящий момент остается неясной. Однако доказано, что в механизме импринтинга основная роль принадлежит модификации белков хроматина и ДНК определенных генов, в частности, процессам ацетилирования гистонов и метилирования ДНК. Механизм импринтинга в родительских половых клетках, его сохранение в клетках эмбриона и роль в дифференциальной активности генов долгое время оставались неясными. В последние годы в изучении геномного импринтинга достигнут ряд серьезных успехов: 1) определены *cis*-последовательности, играющие важную роль в контроле импринтинга; 2) установлено время появления и элиминации импринтов в половых клетках; 3) описана динамика метилирования импринтированных генов в пре- и постнатальном периодах онтогенеза; 4) обнаружена кластерная локализация импринтированных генов в геноме; 5) показана асинхронность их репликации.

Важнейшие события, связанные с геномным импринтингом, происходят еще в гаметогенезе. При этом как в мужских, так и в женских гаметах вначале происходит стирание (удаление) предсуществующих импринтов, унаследованных от родителей, а затем в их геномах устанавливаются новые импринты в соответствии с полом особи.

Для развивающихся половых клеток характерна последовательная смена двух событий: глобальное деметилирование ДНК и ее реметилирование. К 12–13 дням эмбрионального развития мыши ДНК первичных половых клеток находится в неметилированном состоянии независимо от пола зародыша. К 15–16 дням развития происходит реметилирование большинства нуклеотидных последовательностей генов (за исключением CpG островков). При этом различия в характере метилирования отцовских

и материнских хромосом сохраняются только в нуклеотидных последовательностях некоторых генов [47, 86].

Следует отметить, что общее деметилирование, характерное для ранних стадий развития половых клеток, касается также и всех импринтированных генов [20]. Так, на 12,5 день развития гены, для которых характерен эффект импринтинга (*Igf2r*, *p57Kip2*, *Peg1*, *Peg3*, *Snrpn*, *U2afsr1*), в первичных половых клетках находятся в неметилированном состоянии [20, 93]. При слиянии первичных половых клеток с лимфоцитами процесс деметилирования распространяется как на импринтированные, так и на неимпринтированные гены дифференцированных клеток [92]. Единственная последовательность, которая, по-видимому, может избегать общего деметилирования в раннем развитии половых клеток, — это 5' район гена *Xist*, ответственный за инактивацию одной из X-хромосом у зародышей женского пола, необходимой для компенсации дозы генов [80].

В процессе оогенеза метилирование геномной ДНК *de novo* происходит на стадии роста ооцитов вскоре после рождения. Это было показано для некоторых повторяющихся последовательностей и для гена *Igf2r* [20], а также трансгенов — чужеродной ДНК, включенной в геном ооцита [21].

Время установления импринтинга генов в мужских половых клетках точно не выяснено. По всей видимости, метилирование генов *H19* и *Igf2* устанавливается вскоре после рождения, о чем косвенно свидетельствует высокий уровень метилтрансферазы *Dnmt1* в ядрах сперматогоний.

После оплодотворения и вплоть до стадии бластоцисты происходит глобальное деметилирование генома зародыша, то есть импринты мужских и женских геномов стираются. У мыши однокопийные гены деметилируются в течение первых делений дробления и остаются гипометилированными до стадии поздней гастролы. Импринтированные сайты мужского генома деметилируются к 8-клеточной стадии. Гаметический импринтинг полностью стирается уже на стадии морулы (8–16 бластомеров) [61]. Тотальное деметилирование на начальных стадиях дробления, по-видимому, отражает процесс дедифференцировки геномов мужского и женского пронуклеусов и приобретение бластомерами дробящегося зародыша плюрипотентного состояния. Происходящая на стадии морулы компактизация зародыша ведет к первичной дифференцировке на внутреннюю клеточную массу и трофэктодерму и сопровождается быстрой утратой тотипотентности клеток трофобласта. Дальнейшая дифференцировка клеток внутренней клеточной массы с образованием трех зародышевых листков сопровождается установлением определенного для каждого из них характера метилирования. Таким образом, путем изменения метилирования происходит активация одних и инактивация других комплексов генов, в результате чего формируется импринт, необходимый для обеспечения нормального развития целого зародыша и его отдельных зачатков [34, 61, 83].

Стадия бластоцисты характеризуется началом тотального метилирования ДНК *de novo*. Предположительно, метилирование происходит в период с 5,5 по 6,5 день развития, то есть вскоре после имплантации. К 6,5 дню все однокопийные гены, не содержащие CpG островки, уже метилированы. В то же время гены, содержащие CpG островки, гомеобоксные гены и активные аллели импринтированных генов на этой стадии избегают метилирования *de novo*. Дефинитивный характер метилирования для этих генов устанавливается на более поздних стадиях развития.

Первичные половые клетки, то есть клетки будущих дефинитивных гамет, избегают метилирования *de novo* вплоть до момента заселения гонад (у мышей — 11,5 день развития). Метилирование в этих клетках происходит только после 14-го дня развития [83].

Аллель-специфический паттерн метилирования, установленный еще в эмбриональный период, сохраняется в соматических клетках взрослых индивидов. Так, в культивируемых фибробластах функционирует только отцовская аллель гена *Igf2*, тогда как материнская аллель экспрессируется, если только в культуру клеток добавляют ингибитор метилтрансферазы — 5-азадеоксцитидин [29].

Изменения эпигенотипа, приводящие к ослаблению или нарушению установившегося импринтинга, способствуют развитию патологических состояний клетки, в частности, ее злокачественному перерождению. В этой связи особый интерес представляет изучение молекулярных механизмов установления и поддержания аллель-специфичного метилирования.

В настоящее время предполагается существование, по крайней мере, двух возможных механизмов узнавания мест геномного импринтинга. Согласно одному из них, прямые tandemные повторы, находящиеся в CG обогащенных последовательностях и ассоциированные с районами дифференциального метилирования, могут являться молекулярными маркерами импринтированных генов. Действительно, при изучении первичной структуры импринтированных генов было установлено, что большинство из них содержат в своих регуляторных областях прямые tandemные повторы. Сравнительный анализ таких повторов не позволил выявить существенной гомологии их последовательностей. Однако высокое содержание гуанина, сходная протяженность и характерная локализации по отношению к кодирующей части гена позволили предположить, что эти последовательности могут исполнять роль молекулярных маркеров импринтированных генов. По всей видимости, такие повторы могут формировать альтернативные вторичные шпильчатые структуры ДНК или специфичные хроматиновые домены, которые, в свою очередь, могут маркировать участки, в которых будет происходить метилирование *de novo* в гаметах или в клетках зародыша [23].

Согласно второму механизму, важная роль в экспрессии импринтированных генов принадлежит транскриптам

импринтированных аллелей. Рассмотрим этот механизм на примере одного из трех генов, для которых доказано существование антисмысловых транскриптов. Так, для материнской аллели гена *Igf2r* у мыши показан синтез антисмыслового транскрипта, функция которого заключается в подавлении в *cis*-положении экспрессии отцовской аллели *Igf2r*, что приводит к моноаллельной экспрессии гена [104]. Мутации, нарушающие синтез такого антисмыслового транскрипта, приводят к экспрессии отцовского гена *Igf2r* [57]. Предполагается, что антисмысловой РНК-транскрипт может подавлять экспрессию отцовской аллели *Igf2r* в *cis*-положении несколькими способами: путем прямого присоединения к отцовской аллели (такой механизм «окутывания» доказан при инактивации X-хромосомы) (1), блокированием промотора *Igf2r* при транскрипции в обратном направлении (2) или в результате конкурентного связывания транскрипционных факторов (3).

6. ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ

Ярким примером регуляции активности генов, ключевым звеном которого является нетранслируемый транскрипт, может служить инактивация X-хромосомы в соматических клетках самок млекопитающих. Процесс инактивации начинается на определенном участке, получившем название «центра инактивации X-хромосомы», в котором картирован ген *Xist* (X-инактивирующий специфический транскрипт), кодирующий транскрипт размером 15-17 т.п.о. Ген *Xist* имеет три промотора: P1, P2 и P0. Если транскрипция осуществляется с промоторов P1 и P2, то образуется стабильный транскрипт размером 15 тыс. п.о., если же с промотора P0 — возникает нестабильный продукт. Переключение транскрипции с промотора P0 на P1/P2 коррелирует с началом процесса инактивации X-хромосомы. Накопление специфических стабильных РНК-транскриптов по длине X-хромосомы ведет к образованию так называемой «РНКовой шубы», которая постепенно покрывает X-хромосому и детерминирует ее инактивацию. В функционально активной X-хромосоме ген *Xist* инактивирован, что детерминировано метилированием CpG динуклеотидов в последовательности 5'-GCGCCGCGG-3' (от -44 до -36), расположенной в его промоторной области [34]. Наличие или отсутствие метилирования этого участка определяет активность гена *Xist* на доимплантационной стадии развития. Показано, что после обработки культивируемых клеток 5-азацитидином, нарушающим процесс метилирования, происходит частичная реактивация генов X-хромосомы, что свидетельствует о значимой роли метилирования в создании и поддержании инактивированного состояния X-хромосомы [61]. У эмбрионов мыши в доимплантационный период (3,5-4 день развития) в трофэктодерме и в первичной энтодерме наблюдается импринтированная экспрессия гена *Xist*, причем инактивируется преимущественно

отцовская аллель. Для клеток самого зародыша характерна случайная инактивация X-хромосомы как отцовской, так и материнской.

7. БОЛЕЗНИ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ НАРУШЕНИЯМИ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Выше (см. раздел 2) уже упоминалось о двух сравнительно частых моногенных заболеваниях (синдром ICF и синдром Ретта), которые обусловлены мутациями в генах метилтрансфераз. На сегодняшний день имеются сведения о более 30 заболеваниях, в основе которых лежат нарушения метилирования ДНК, приводящие к аномалиям процесса импринтинга и, как следствие, к «болезням импринтинга» [3, 5, 8]. В основу классификации болезней импринтинга может быть положен уровень организации генетического материала (геном, хромосомы, гены), на котором проявляется эффект геномного импринтинга [6]. Нарушения на уровне целого генома приводят к развитию хорионэпителиомы — злокачественной опухоли, возникающей при беременности из клеток трофобласта, несущих только отцовский геном, т. е. являющихся продуктом диспермного оплодотворения (андрогенеза). На хромосомном уровне — это случаи патологии развития до (плацентарная недостаточность) и после рождения (хромосомные болезни), обусловленные полной или частичной однородительской дисомией хромосом или их сегментов, содержащих импринтированные гены. Импринтированные гены обнаружены на многих хромосомах человека — 1, 5, 6, 11, 14, 15, 19, 20, X. Два больших кластера импринтированных генов обнаружены на хромосомах 1 и 15. Патологический эффект импринтин-

га, связанный с однородительской дисомией, описан для хромосом 1, 2, 4–11, 13–16, 19, 20, 22, X. На геномном уровне наиболее яркими примерами являются синдром Прадера–Вилли и синдром Ангельмана, обусловленные мутациями, либо нарушениями функций в кластере импринтированных генов в проксимальной части длинного плеча хромосомы 15. Предположительно с феноменом геномного импринтинга связывают особенности наследования таких сравнительно частых заболеваний, как маниакально-депрессивный психоз, хорея Гентингтона, шизофрения, аутизм, миотоническая дистрофия.

8. РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ОНКОГЕНЕЗЕ

Роли метилирования (импринтинга) в процессах канцерогенеза посвящена обширная литература [31, 33, 49; 54, 71, 76, 78, 100]. Сохранение статуса метилирования ДНК, характерного для каждого типа клеток, важно для обеспечения их нормальной жизнедеятельности и функции. Вместе с тем в настоящее время накапливается все больше фактов, показывающих, что нарушение характера метилирования может играть существенную роль в процессах трансформации нормальных клеток в опухолевые. Изменения статуса метилирования цитозина широко распространены при спорадических раковых заболеваниях человека, характеризующихся гипометилированием на уровне генома и локальным aberrантным гиперметилированием CpG островков [99]. При этом оба эти процесса, одновременно происходящие в разных районах генома, могут предшествовать озлокачествлению. Важная роль в онкогенезе принадлежит спонтанному деаминированию 5-метилцитозина в определенных райо-

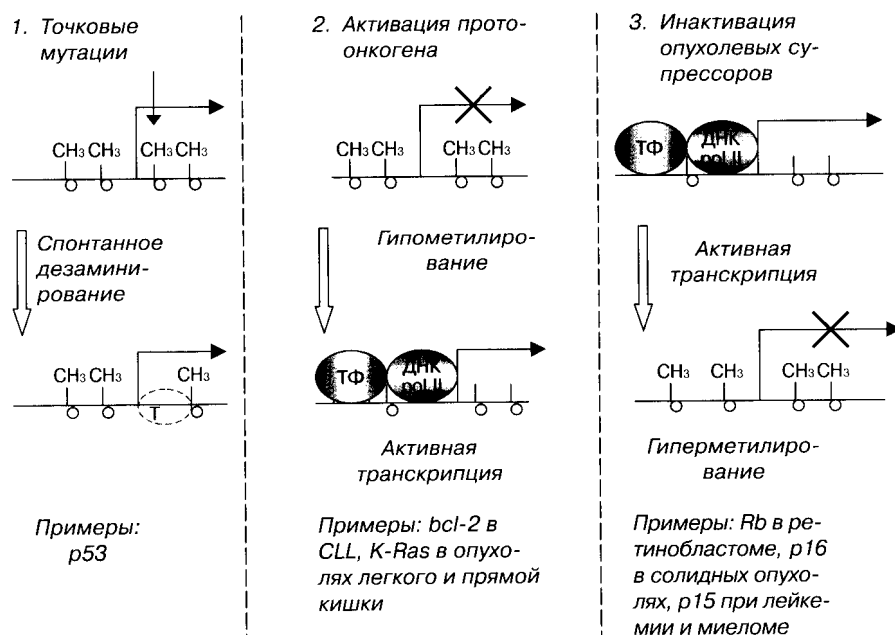


Рис. 5. Предполагаемое значение спонтанного деаминирования 5-метилцитозина, гипометилирования и гиперметилирования в онкогенезе (цит. по Singal, Ginder, 1999)

нах генов, который приводит к точковым мутациям — заменам С на Т (рис. 5.1). 24% мутаций в гене опухолевого супрессора белка p53 составляют замены С на Т в динуклеотидах CpG, что является одной из причин, детерминирующих образование солидных опухолей [33, 36]. Известно, что в гене p53 содержится около 290 CpG динуклеотидов. При этом точковые замены в 23 CpG динуклеотидах, расположенных в районе, кодирующем ДНК-связывающий домен, составляют треть от общего числа мутаций в этом гене [55]. Установлена определенная зависимость между расположением «горячих точек» мутаций и локализацией опухоли. Так, мутационные изменения в кодонах 175, 248, 273 гена p53 характерны только для опухолей молочной железы, яичника и для лейкемии [43], а в кодоне 157 они встречаются лишь в клетках опухолей легкого курящих пациентов [75].

Существует три гипотезы, объясняющие роль в индукции злокачественных образований, — активация протоонкогенов (1), хромосомная нестабильность (2) и активация латентных ретротранспозонов (3) [33]. При этом уровень злокачественности в определенной мере коррелирует со степенью метилирования геномной ДНК [77, 91].

1. Гипометилирование приводит к изменению транскрипционной активности многих онкогенов, таких как протоонкоген K-ras в опухолях легкого и толстой кишки [30], опухолевый супрессор 14-3-3 $\{\sigma\}$ [15], p21CIP1/WAF1/SD11 [84] (рис. 5.2). Взаимосвязь между гипометилированием и изменением генной экспрессии показана для антиапоптотического гена bcl-2 при хронической лимфоцитарной лейкемии В-клеток [38].

2. Следствием гипометилирования, по-видимому, может быть и нестабильность хромосом. Так, в нормальных соматических клетках прицентромерные районы гетерохроматина на хромосомах 1 и 16 гиперметилированы, в то время как в клетках аденокарциномы молочной железы и опухоли эпителия яичников эти районы хромосом гипометилированы и обнаруживают повышенную ломкость [64, 77].

3. В некоторых случаях локальное гипометилирование ДНК приводит к транскрипционной активации ретротранспозонов [32, 90]. Для генома человека наиболее характерны ретротранспозоны LINE's. Их насчитывается около 100 тыс., причем активны из них только 30–60 [87]. В клетках опухолей происходит активация промоторов LINE's в результате их деметилирования и, как следствие, активация транскрипции [32, 90] с последующим перемещением LINE's в кодирующую часть генов, регулирующих процессы пролиферации или репарации [60].

Важную роль в опухолевой трансформации нормальных клеток может играть и процесс гиперметилирования, особенно если он затрагивает промоторные области генов онкосупрессоров (рис. 5.3). Ген ретинобластомы pRb был первым из множества генов, для которых была дока-

зана взаимосвязь между гиперметилированием их промоторов и инактивацией транскрипции [37]. Такой же механизм регуляции характерен и для генов, контролирующих клеточный цикл (RB [88], p14ARF [108], CDKN2A [45], CDKN2B [68], p27/KIP1 [103]), дифференцировку (MYOD [46], WT1 [59], PAX6 [85]), апоптоз (DAP kinase [50], CASP8 [98]), репарацию ДНК (hMLH1 [25, 106]), устойчивость к наркотическим веществам и детоксикацию (GSTP1 [27], MDR1 [48]), метастазирование (E-cadherin [35, 65]) и т. д. Нередко гиперметилирование промоторной области генов коррелирует с увеличением уровня активности ДНК-метилтрансфераз, что ведет к стабильному выключению функций онкосупрессоров, а также генов, контролирующих клеточную пролиферацию или апоптоз [51].

Изучение статуса метилирования в ряде случаев рассматривается как вспомогательный метод в диагностике и лечении раковых заболеваний человека. Например, гиперметилирование главного промотора онкосупрессора BRCA1 обнаружено исключительно в клетках опухоли молочной железы и яичника, но не в промоторе соответствующего гена при раке прямой кишки или лейкемии [16]. Обширная информация на эту тему накоплена в отношении генов p15, p16, VHL [41, 42].

Сегодня не вызывает сомнения, что изменение статуса метилирования может предшествовать началу опухолевой трансформации нормальных клеток при многих раковых заболеваниях. Считается, что дефекты метилирования, обусловленные действием различных эндогенных и экзогенных факторов в сочетании с предсуществующими мутациями онкогенов и онкосупрессоров, создают согласно известной «двухударной гипотезе» Кнудсенна [53] необходимый толчок к бласттрансформации и злокачественному росту [4]. Установление этого факта послужило толчком для разработки многочисленных генетических тестов в целях ранней диагностики и выяснения прогноза онкологических заболеваний [8]. Например, метилирование промотора онкосупрессорного гена p16 рассматривается как биомаркер ранних стадий рака легкого [12, 69, 74]. Установление статуса метилирования генов WIT1, DAP, MGMT используется для предсказания возможного ответа клеток опухоли на химиотерапию или для прогнозирования течения заболевания [28, 52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накоплено много фактов, свидетельствующих о важной роли метилирования в таких сложных процессах, как функциональная активность генов, геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы, клеточная пролиферация, репарация ДНК и онкогенез. Убедительно доказана роль метилирования в детерминации моноаллельной экспрессии импринтированных ге-

нов. В экспериментах на мышцах подробно изучена динамика деметилирования – реметилирования генома в половых клетках и на ранних стадиях развития зародышей; предложены гипотезы, объясняющие сохранение импринтов в онтогенезе и важную роль геномного импринтинга в процессах дифференцировки эмбриональных зачатков и органов. Не вызывает сомнения большой вклад дефектов процесса метилирования в возникновение многих хромосомных и генных болезней человека, особенно болезней с необычным, менделевским типом наследования.

В исследованиях последних лет особенно большое значение придается изучению процесса метилирования в происхождении онкологических заболеваний, их ранней диагностики и лечения. Активация протоонкогенов в сочетании с инактивацией онкосупрессоров, абберации хромосом и дефекты их сегрегации, связанные с ошибками метилирования ДНК *de novo*, в настоящее время рассматриваются как предраковые состояния, следствием которых может быть злокачественное перерождение и прогрессия опухолей. Анализ изменений характера метилирования ДНК имеет важное прогностическое значение для ранней диагностики и лечения рака. Направленное изменение метилирования ДНК в опухолевых клетках могло бы явиться одним из способов коррекции их дисфункции. Для реализации этого направления необходимо дальнейшее изучение факторов, регулирующих специфичность процессов метилирования и деметилирования.

Литература

1. Баранов В.С. Хромосомный импринтинг и хромосомные взаимодействия в раннем развитии млекопитающих // Успехи современной биологии. — 1988. — Т. 105, № 3. — С. 393–405.
2. Баранов В.С. Хромосомный импринтинг и наследственные болезни // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7. — С. 73–79.
3. Гинтер Е.К. Медицинская генетика. — М.: Медицина, 2003. — 447 с.
4. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бочков Н.П. // Метилирование ДНК как этиологический фактор канцерогенеза // Вестник РАМН. — 2002. — № 4. — С. 6–11.
5. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е., Блиникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. — М.: Практика, 1996. — 410 с.
6. Назаренко С.А. Нарушение эпигенетической регуляции активности генов и болезней человека // Вестн. РАМН. — 2001. — № 10. — С. 43–48.
7. Немцова М.В. Геномный импринтинг и наследственная патология // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 554–560.
8. Немцова М.В. Нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов как новый класс молекулярной патологии. Автореф. ... канд. биол. наук // М., 2002. — 48 с.
9. Amir R.E., Van der Veyver I.B., Wan M. et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 // Nat Genet. — 1999. — Vol. 23. — P. 185–188.
10. Antequera F., Bird A. CpG islands // EXS. — 1993. — Vol. 64. — P. 169.
11. Antequera F., Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse // Proc Natl Acad Sci USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 11995.
12. Belinsky S.A., Nikula K.J., Palmisano W.A. et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis // Proc Natl Acad Sci USA. — 1998. — Vol. 95, N 20. — P. 11891–11896.
13. Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases // J. Mol. Biol. — 1988. — Vol. 203. — P. 971.
14. Bestor T.H. The host defence function of genomic methylation patterns // Novartis Found Symp. — 1998. — Vol. 214. — P. 187–95, discussion 195–199.
15. Bhatia K., Siraj A. K., Hussain A. et al. The tumor suppressor gene 14-3-3 σ is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2003. — Vol. 12, N 2. — P. 165–169.
16. Bianco T., Chenevix-Trench G., Walsh D.C. et al. Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer // Carcinogenesis. — 2000. — Vol. 21, N 2. — P. 147–151.
17. Bird A. The essentials of DNA methylation // Cell. — 1992. — Vol. 70 — P. 5–8.
18. Bird A.P., Wolffe A.P. Methylation-induced repression — belts, braces, and chromatin // Cell. — 1999. — Vol. 99. — P. 451–454.
19. Bird A.P. Gene number, noise reduction and biological complexity // Trends Genet. — 1995. — Vol. 11, N 3. — P. 94–100.
20. Brandeis M., Kafri T., Ariel M., et al. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse // EMBO J. — 1993. — Vol. 12. — P. 3669–3677.
21. Chaillet J.R., Vogt T.F., Beier D.R. and Leder P. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis // Cell. — 1991. — Vol. 66. — P. 77–83.
22. Consortium Ihgs. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. — 2001. — Vol. 860. — P. 860–921.
23. Constancia M., Pickard B., Kelsey G., Reik W. Imprinting mechanisms // Genome Res. — 1998. — Vol. 8. — P. 881–900.
24. Costa M., Yan Y., Zhao D., Salnikow K. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis: gene silencing by nickel delivery to the nucleus and gene activation/inactivation by nickel-induced cell signaling // J. Environ Monit. — 2003. — Vol. 5, N 2. — P. 222–223.
25. Deng G.R., Chen A.D., Hong J. et al. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 2029–2033.
26. Ehrlich M. DNA methylation: normal development, inherited diseases and cancer // J. Clin Ligand Assay. — 2000. — Vol. 23. — P. 144–146.
27. Esteller M., Corn P.G., Urena J.M., et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia // Cancer Res. — 1998. — Vol. 58, N 20. — Vol. 4515–4518.
28. Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E. et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents // N. Engl. J. Med. — 2000. — Vol. 343, N 19. — P. 1350–1354.
29. Eversole-Cire P., Ferguson-Smith A.C., Sasaki H. et al. Activation of an imprinted Igf2 gene in mouse somatic cell cultures // Mol. Cell. Biol. — 1993. — Vol. 13. — P. 4928–4938.
30. Feinberg A.P., Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts // Nature. — 1983. — Vol. 301, N 5895. — P. 89–92.
31. Fleisher A.S., Esteller M., Wang S. et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 1090–1095.
32. Florl A.R., Lower R., Schmitz-Drager B.J. et al. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas // Br J. Cancer. — 1999. — Vol. 80. — № 9. — P. 1312–1321.
33. Gama-Sosa M.A., Slagel V.A., Trewyn R.W. et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors // Nucleic Acids Res. — 1983. — Vol. 11, N 19. — P. 6883–6894.

34. Goto T., Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 1998. — Vol. 62, N 2. — P. 362–378.
35. Graff J.R., Gabrielson E., Fujii H. et al. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275, N 4. — P. 2727–2732.
36. Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis // *Cancer Res.* — 1994. — Vol. 54, N 18. — P. 4855–4878.
37. Greger V., Debus N., Lohmann D., et al. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma // *Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 94, N 5. — P. 491–496.
38. Hanada M., Delia D., Aiello A. et al. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia // *Blood*. — 1993. — Vol. 82, N 6. — P. 1820–1828.
39. Hendrich B., Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG-binding proteins // *Mol. Cell Biol.* — 1998. — Vol. 18. — P. 6538–6547.
40. Hendrich B., Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2000. — Vol. 249. — P. 55–74.
41. Herman J.G., Civin C.I., Issa J.P. et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies // *Cancer Res.* — 1997. — Vol. 57, N 5. — P. 837–841.
42. Herman J.G., Latif F., Weng Y. et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — Vol. 91. — P. 9700–9704.
43. Hollstein M., Shomer B., Greenblatt M. et al. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — Vol. 24, N 1. — P. 141–146.
44. Itano O., Ueda M., Kikuchi K. et al. A new predictive factor for hepatocellular carcinoma based on two-dimensional electrophoresis of genomic DNA // *Oncogene*. — 2000. — Vol. 19, N 13. — P. 1676–1683.
45. Jarrard D.F., Bova G.S., Ewing C.M. et al. Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (p16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer // *Genes Chrom. Cancer*. — 1997. — Vol. 19, N 2. — P. 90–96.
46. Jones P.A., Wolkowicz M.J., Rideout W.M. et al. De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1990. — Vol. 87. — P. 6117–6121.
47. Kafri T., Ariel M., Brandeis M. et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line // *Genes & Dev.* — 1992. — Vol. 6. — P. 705–714.
48. Kantharidis P., Elost A., deSilva M. et al. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance // *Clin. Cancer Res.* — 1997. — Vol. 311. — P. 2025–2032.
49. Katz F., Webb D., Gibbons B. et al. Possible evidence for genomic imprinting in childhood acute myeloblastic leukaemia associated with monosomy for chromosome 7 // *Br. J. Haematol.* — 1992. — Vol. 80, N 3. — P. 332–336.
50. Katzenellenbogen R.A., Baylin S.B., Herman J.G. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies // *Blood*. — 1999. — Vol. 93, N 12. — P. 4347–4353.
51. Kautiainen T.L., Jones P.A. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture // *J. Biol. Chem.* — 1986. — Vol. 261, N 4. — P. 1594–1598.
52. Kawakami K., Brabender J., Lord R.V. et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2000. — Vol. 92, N 22. — P. 1805–1811.
53. Knudson A.G. mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1971. — Vol. 68. — P. 820–823.
54. Kondo M., Matsuo S., Uchida K. et al. Selective maternal-allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57KIP2 gene at 11p15.5 // *Oncogene*. — 1996. — Vol. 12, N 6. — P. 1365–1368.
55. Laird P.W., Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics // *Annu. Rev. Genet.* — 1996. — N 30. — P. 441–464.
56. Lei H., Oh S.P., Okano M. et al. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells // *Development*. — 1996. — Vol. 122. — P. 3195.
57. Lerchner W. and Barlow D.P. (1997) Paternal repression of the imprinted mouse Igf2r locus occurs during implantation and is stable in all tissues of the post implantation mouse embryo // *Mech. Dev.* — Vol. 61. — P. 141–149.
58. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality // *Cell*. — 1992. — Vol. 69. — P. 915.
59. Malik K., Salpekar A., Hancock A. et al. Identification of differential methylation of the WT1 antisense regulatory region and relaxation of imprinting in Wilms' tumor // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 2356–2360.
60. Miki Y., Nishisho I., Horii A. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. // *Can. Res.* — 1992. — Vol. 52, N 3. — P. 643–645.
61. Monk M., Boubelik M., Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development // *Development*. — 1987. — Vol. 99. — P. 371–382.
62. Nan X., Campoy F.J., Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin // *Cell*. — 1997. — Vol. 88. — P. 471.
63. Nan X., Cross S., Bird A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins // *Novartis Found. Symp.* — 1998. — Vol. 214. — P. 6–16, discussion 16–21. — P. 46–50.
64. Narayan A., Ji W., Zhang X.Y. et al. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas // *Int. J. Cancer*. — 1998. — Vol. 77, N 6. — P. 833–838.
65. Nass S.J., Herman J.G., Gabrielson E. et al. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 4346–4348.
66. Newell-Price J., Adrian J.L., King C., King P. DNA methylation and silencing of gene expression // *TEM*. — 2000. — Vol. 11, N 4. — P. 142–148.
67. Ng H.H., Zhang Y., Hendrich B., Johnson C.A. et al. MBD2 is a transcriptional repressor, belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23. — P. 58–61.
68. Nguyen T.T., Mohrbacher A.F., Tsai Y.C., Groffen J., Heisterkamp N., Nichols P.W., Yu M.C., Lubbert M., Jones P.A. Quantitative measure of c-abl and p15 methylation in chronic myelogenous leukemia: biological implications // *Blood*. — 2000. — Vol. 95, N 9. — P. 2990–2992.
69. Nuovo G.J., Plaia T.W., Belinsky S.A. et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96, N 22. — P. 12754–12759.
70. O'Neill R.J.W., O'Neill M.J., Graves J.A.M. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid // *Nature*. — 1998. — Vol. 393. — P. 68–72.
71. Ogawa O., Eccles M.R., Szeto J. et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour // *Nature*. — 1993. — Vol. 362, N 6422. — P. 749–751.
72. Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development // *Cell*. — 1999. — Vol. 99. — P. 247–257.
73. Okano M., Xie S., Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells // *Nucleic Acids Res.* — 1998. — Vol. 26. — P. 2536.
74. Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G. et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 5954–5958.

75. Pfeifer G.P., Denissenko M.F. Formation and repair of DNA lesions in the p53 gene: relation to cancer mutations // *Environ Mol Mutagen.* — 1998. — Vol. 31, N 3. — P. 197–205.
76. Pulford D.J., Falls J.G., Killian J.K., Jirtle R.L. Polymorphisms, genomic imprinting and cancer susceptibility // *Mutat Res.* — 1999. — Vol. 436. — № 1. — P. 59–67.
77. Qu G.Z., Dubeau L., Narayan A. et al. Satellite DNA hypomethylation vs overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential // *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagens.* — 1999. — Vol. 423, N 1–2. — P. 91–101.
78. Rainer S., Johnson L.A., Dobry C.J. et al. Relaxation of imprinted genes in human cancer // *Nature.* — 1993. — Vol. 362, N 6422. — P. 747–749.
79. Ramsahoye B.H., Biniszkievicz D., Lyko F. et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 5237–5242.
80. Razin A. and Shemer R. DNA methylation in early development // *Hum. Mol. Genet.* — 1995. — Vol. 4. — P. 1751–1755.
81. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three-way connection // *The EMBO Journal.* — 1998. — Vol. 17, N 17. — P. 4905–4908.
82. Razin A., Cegar H. DNA methylation and gene expression // *Microbiol Rev.* — 1991. — Vol. 55. — P. 451–458.
83. Razin A., Kafri T. DNA methylation from embryo to adult // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* — 1994. — Vol. 48. — P. 53–81.
84. Roman-Gomez J., Castillejo J. A., Jimenez A. et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21CIP1/WAF1/SDI1 gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* — 2002. — Vol. 99, N 7. — P. 2291–2296.
85. Salem C.E., Markl I.D.C., Bender C.M. et al. PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells // *Int. J. Cancer.* — 2000. — Vol. 87. — P. 179–185.
86. Sanford J.P., Clark H.J., Chapman V.M. and Rossant J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse // *Genes & Dev.* — 1987. — Vol. 1. — P. 1039–1046.
87. Sassaman D.M., Dombroski B.A., Moran J.V. et al. Many human L1 elements are capable of retrotransposition // *Nat Genet.* — 1997. — Vol. 16, N 1. — P. 37–43.
88. Simpson D.J., Hibberts N.A., McNicol A.M. et al. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 1211–1216.
89. Singal R., Ginder G.D. DNA Methylation // *Blood.* — 1999. — Vol. 93, N 12. — P. 4059–4070.
90. Singer M.F., Krek V., McMillan J.P. et al. Linc-1 — a human transposable element // *Gene.* — 1993. — Vol. 135, N 1–2. — P. 183–188.
91. Soares J., Pinto A.E., Cunha C.V. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma — correlation with prognostic factors and tumor progression // *Cancer.* — 1999. — Vol. 85, N 1. — P. 112–118.
92. Tada M., Tada T., Lefebvre L. et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells // *EMBO J.* — 1997. — Vol. 16. — P. 6510–6520.
93. Tada T., Tada M., Hilton K., Barton S.C. et al. Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells // *Dev. Genes Evol.* — 1998.
94. Takiguchi M., Achanzar W.E., Qu W., Li G., Waalkes M.P. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation // *Exp Cell Res.* — 2003. — Vol. 286, N 2. — P. 355–365.
95. Tate P., Skarnes W., Bird A. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 is essential development in the mouse // *Nat Genet.* — 1996. — Vol. 12. — P. 205.
96. Tate P.H., Bird A.P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression // *Curr Opin Genet Dev.* — 1993. — Vol. 3. — P. 226.
97. Tazi J., Bird A. Alternative chromatin structure of CpG islands // *Cell.* — 1990. — Vol. 60. — P. 909.
98. Teitz T., Wei T., Valentine M.B., Vanin E.F., Grenet J., Valentine V.A., Behm F.G., Look A.T., Lahti J.M., Kidd V.J. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN // *Nat Med.* — 2000. — Vol. 6, N 5. — P. 529–535.
99. Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer // *J Clin Invest.* — 2000, N 105. — P. 401–407.
100. Tycko B. Genomic imprinting in Wilms' tumor // *Med Ped Oncol.* — 1996.
101. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. The sequence of the human genome // *Science.* — 2001. — Vol. 291. — P. 1304–1350.
102. Wilson G. N., Hall J.G., de la Cruz F. // Genomic imprinting: summary of an NICHD Conference // *Am. J. Med. Genet.* — 1993. — Vol. 46. — P. 675–680.
103. Worm J., Bartkova J., Kirkin A.F., Straten P.T. et al. Aberrant p27(Kip1) promoter methylation in malignant melanoma // *Oncogene.* — 2000. — Vol. 19, N 44. — P. 5111–5115.
104. Wutz A. et al. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island // *Nature.* — 1997. — Vol. 389. — P. 745–749.
105. Xu G.L., Bestor T.H., Bourc'his D. et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene // *Nature.* — 1999. — Vol. 402. — P. 187–191.
106. Yanagisawa Y., Akiyama Y., Iida S. et al. Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability // *Int J. Cancer.* — 2000. — Vol. 85, N 1. — P. 50–53.
107. Yen R.W., Vertino P.M., Nelkin B.D. et al. Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase // *Nucleic Acids Res.* — 1992. — Vol. 20. — P. 2287.
108. Zheng S.C., Chen P.C., McMillan A. et al. Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors // *Carcinogenesis.* — 2000. — Vol. 21, N 11. — P. 2057–2064.

DNA methylation as one of the main mechanisms of gene activity regulation

A.A. Pendina¹, V.V. Grinkevich², T.V. Kuznetsova¹, V.S. Baranov¹

¹ Ott's Institut of Gynecology et Obstetrics, Saint-Petersburg;

² Saint-Petersburg State university

✿ THE SUMMARY: DNA methylation is one of the main mechanisms of epigenetic inheritance in eukaryotes. In this review we looked through the ways of 5-methylcytosine origin, its distribution in genome, the mechanism of gene repression via hypermethylation, the role of methylation in genomic imprinting and in X-chromosome inactivation, in embryogenesis of mammals, in the processes of oncogenesis and in etiology of some common human inherited diseases.

✿ KEY WORDS: DNA methylation, 5-methylcytosine, methylase, imprinting, oncogenesis.