

УДК575.224.22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИЧИНЫ ОСТАНОВКИ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2025 г. Н. А. Аракелян¹, А. П. Григоренко², В. М. Петрова¹, Е. Василевская¹,
Д. В. Исламгулов³, А. В. Долгих³, А. Д. Манахов^{1, 2, *}

¹Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус»,
Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Клиника Фомина, Уфа, 450078 Россия

*e-mail: manakhov@rogaevlab.ru

Поступила в редакцию 05.12.2024 г.

После доработки 22.01.2025 г.

Принята к публикации 29.01.2025 г.

Женская фертильность зависит от успешного созревания ооцитов, сложного и точно регулируемого клеточного процесса, который готовит их к оплодотворению и последующему эмбриональному развитию. Однако с возрастом и наступлением репродуктивного старения вероятность возникновения ошибок в этом процессе значительно возрастает. Эти возрастные изменения сопровождаются накоплением генетических и эпигенетических нарушений, митохондриальной дисфункцией, а также изменениями в работе цитоскелета, что увеличивает риск дефектов созревания ооцитов, аномалий эмбрионального развития и бесплодия. В этом исследовании мы провели генетический анализ пациентки с женским бесплодием из-за остановки созревания ооцитов и выявили гетерозиготный вариант с.527C>T (p.Ser176Leu) в гене *TUBB8*, который нарушает образование микротрубочек и приводит к дефектам формирования мейотического веретена и аресту ооцитов. Сообщалось, что варианты гена *TUBB8*, кодирующего важный компонент микротрубочек, участвуют в патогенезе остановки созревания ооцитов, аномального оплодотворения и других нарушений. Эти изменения могут быть более выраженными у женщин с признаками репродуктивного старения.

Ключевые слова: бесплодие, арест ооцитов, репродуктивное старение, полногеномное секвенирование, *TUBB8*.

DOI: 10.31857/S0016675825060084 **EDN:** SWCKBN

Репродуктивное старение у женщин сопровождается изменениями, которые негативно влияют на процессы созревания ооцитов. Среди этих изменений выделяются нарушения в работе цитоскелета и митохондриальная дисфункция, что приводит к увеличению частоты хромосомных аномалий, включая анеуплоидии. Одной из причин таких изменений являются мутации в генах, участвующих в ключевых этапах мейоза и созревания ооцитов.

На сегодняшний день описано четыре типа нарушения созревания ооцитов: арест на стадии зародышевого пузыря, метафазы I (MI), метафазы II (MII) и смешанный арест с ооцитами на более чем одной стадии мейоза. Эти нарушения обусловлены как ферментативными и гормональными изменениями, так и генетическими мутациями.

Идентифицировано более десяти генов, связанных с остановкой созревания ооцитов, включая: *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *PATL2*, *WEE2*, *TRIP13*, *CDC20*, *TBPL2* и *TUBB8* [1–19].

Одним из наиболее частых генов, связанных с нарушением созревания ооцитов и эмбрионального развития, является *TUBB8*. Этот ген кодирует β -тубулин, специфичный для приматов, который экспрессируется исключительно в ооцитах на разных стадиях их созревания и раннего эмбрионального развития. Тубулин (α/β) является структурной единицей микротрубочек, которые играют критическую роль в сборке веретена деления во время мейоза. Функциональные исследования показали, что патогенные варианты гена *TUBB8* нарушают сворачивание и сборку гетеродимера

α/β -тубулина, что приводит к дефектам структуры микротрубочек, нарушению сборки веретена деления и остановке созревания ооцитов [1, 2]. Клинические фенотипы у женщин-носителей включают арест созревания ооцитов, неудачи оплодотворения, раннюю остановку эмбрионального развития и неудачи имплантации. Гетерозиготные патогенные варианты *TUBB8* в большинстве случаев приводят к аресту на стадии метафазы I из-за доминантного негативного эффекта, хотя описаны случаи ареста на более ранних стадиях эмбрионального развития [3].

В настоящем исследовании представлены клинические характеристики 45-летней женщины с длительным 23-летним анамнезом первичного бесплодия. У пробанда наблюдалось снижение овариального резерва и сохранение нормальных уровней половых гормонов, на что указывали базальные уровни фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) 10.21 мМЕ/мл, лютеинизирующего гормона (ЛГ) 8.91 мМЕ/мл и антимюллерова гормона (АМГ) 1.6 нг/мл. Ее кариотип оказался нормальным (46, XX). Кроме того, семенные параметры ее мужа показали 72.1 миллиона сперматозоидов на миллилитр концентрации спермы, 43% прогрессивной подвижности и 7% нормальной морфологии сперматозоидов на эякулят.

Пациентка прошла диагностику и лечение в Клинике Фомина в Уфе. В ходе цикла интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) было получено в общей сложности шесть ооцитов, все из которых остановились на стадии мейоза I.

Геномную ДНК выделяли из образцов периферической крови с использованием колонок QIAGEN Mini Spin Columns в соответствии с протоколом производителя (QIAGEN, Германия). Подготовку библиотеки проводили с помощью набора DNA PCR Free Kit (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. Количественную оценку библиотеки проводили с помощью qPCR с использованием протокола набора KAPA Library Quantification Illumina Kit (KAPA Biosystems, США). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов Illumina NovaSeq S4 v1.5 (Illumina) в режиме парно-концевых прочтений 2×151 на приборе NovaSeq 6000 в Университете «Сириус» (Сочи, Россия).

Полученные FASTQ файлы были выровнены на референсный геном человека (GRCh38) с использованием алгоритма BWA-MEM [4]. Генетические варианты были предсказаны с использованием пакета Genome Analysis Toolkit (GATK) HaplotypeCaller версии 4.0 [5]. Аннотацию и прогнозирование эффектов выбранных вариантов выполняли в VEP с использованием аннотации генома человека [20].

В качестве вариантов кандидатов отбирали варианты в кодирующей области генома с частотой менее 0.01 по базе данных GnomAD [21]. Для вариантов, потенциально приводящих к аминокислотным заменам, оценивали степень их патогенности с помощью программ SIFT [22] и PolyPhen2 [23].

Для валидации выбранных мутаций было проведено секвенирование по Сэнгеру. Праймеры для ПЦР-амплификации были разработаны с использованием программного обеспечения Primer3: TUBB8-F – GCCAAGGGACACTACACC, TUBB8-R – ACAGAGCTTCGTTATCTATGCAA. ПЦР была проведена с использованием GenPack PCR Core (Изоген, Россия). Полученные ампликоны были очищены с помощью набора Cleanup Standard Kit (Евроген, Россия). Секвенсную реакцию проводили с помощью набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в объеме 10 мкл. Полученные продукты реакции очищали на колонках DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) и секвенировали на приборе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Средняя глубина покрытия полногеномного секвенирования составила 19.78. В результате проведенного анализа в качестве вариантов-кандидатов были отобраны семь миссенс-вариантов в семи генах (табл. 1), которые были проанализированы (по литературным данным) для определения возможности их прямой или косвенной связи с остановкой созревания ооцитов. В результате анализа был выявлен редкий вариант с.527C>T (rs869025609) в гене *TUBB8*, приводящий к аминокислотной замене р.Ser176Leu (табл. 1). Данная аминокислотная замена была описана и затрагивает консервативный GTPase-домен семейства Tubulin/FtsZ, что нарушает сборку α/β -тубулинового гетеродимера. Это нарушение приводит к аномальному поведению микротрубочек и дефектам формирования мейотического веретена, что в конечном итоге вызывает женское бесплодие [1].

Для подтверждения варианта rs869025609 в гене *TUBB8* было проведено секвенирование по Сэнгеру образцов ДНК пациентки, ее родителей и сестры. Согласно анализу, для пациентки и ее отца было установлено гетерозиготное состояние локуса *TUBB8* с.527C>T (рис. 1).

Таким образом, наши результаты показывают, что нарушение созревания ооцитов было обусловлено гетерозиготным вариантом с.527C>T в гене *TUBB8*. Этот вариант был унаследован от отца, однако у него отсутствуют какие-либо негативные проявления, так как *TUBB8* не экспрессируется в мужских половых клетках. Согласно литературным данным, экспрессия *TUBB8* ограничивается исключительно ооцитами и эмбрионами, где он составляет значительную часть экспрессируемого

Таблица 1. Обзор генетического варианта

Ген	Позиция на геноме	Вариант	Замена кДНК	Эффект на белок	Тип варианта	GnomAD*	RUSeq*	SIFT†	PolyPhen2‡	Генотип
<i>TUBB8</i>	10:47865	rs869025609	c.527C>T	p.Ser176Leu	Missense	0.000(T)	–	Deleterious_low_confidence	Probably damaging	0/1
<i>VPS13D</i>	1:12277831	rs79282181	c.4243G>A	p.Asp1415Asn	Missense	0.002795(A)	0.004598(A)	Deleterious	Possibly damaging	1/1
<i>CASP10</i>	2:201209444	rs200540853	c.1297G>A	p.Glu433Lys	Missense	0.0002051(A)	0.0002964(A)	Deleterious	Probably damaging	0/1
<i>C10TNF3-AMACR</i>	5:34004615	rs773780945	c.511C>T	p.Arg171Cys	Missense	0.00004957(T)	0.0005206(T)	Deleterious	Probably damaging	0/1
<i>TMEM231</i>	16:75541371	rs369010440	c.749G>A	p.Arg250Gln	Missense	0.00009313(A)	0.0009152(A)	Tolerated	Possibly damaging	0/1
<i>FSCN2</i>	17:81529222	rs150620080	c.691C>T	p.Pro231Ser	Missense	0.0006604(T)	0.001511(T)	Deleterious	Probably damaging	0/1
<i>FAAH2</i>	X:57448667	rs147173444	c.1372G>T	p.Ala458Ser	Missense	0.0002712(T)	0.0003153(T)	Deleterious	Probably damaging	0/1

Примечание. * – частота соответствующей мутации в GnomAD, RUSeq, † – оценка патогенности мутации с помощью SIFT, PolyPhen2.

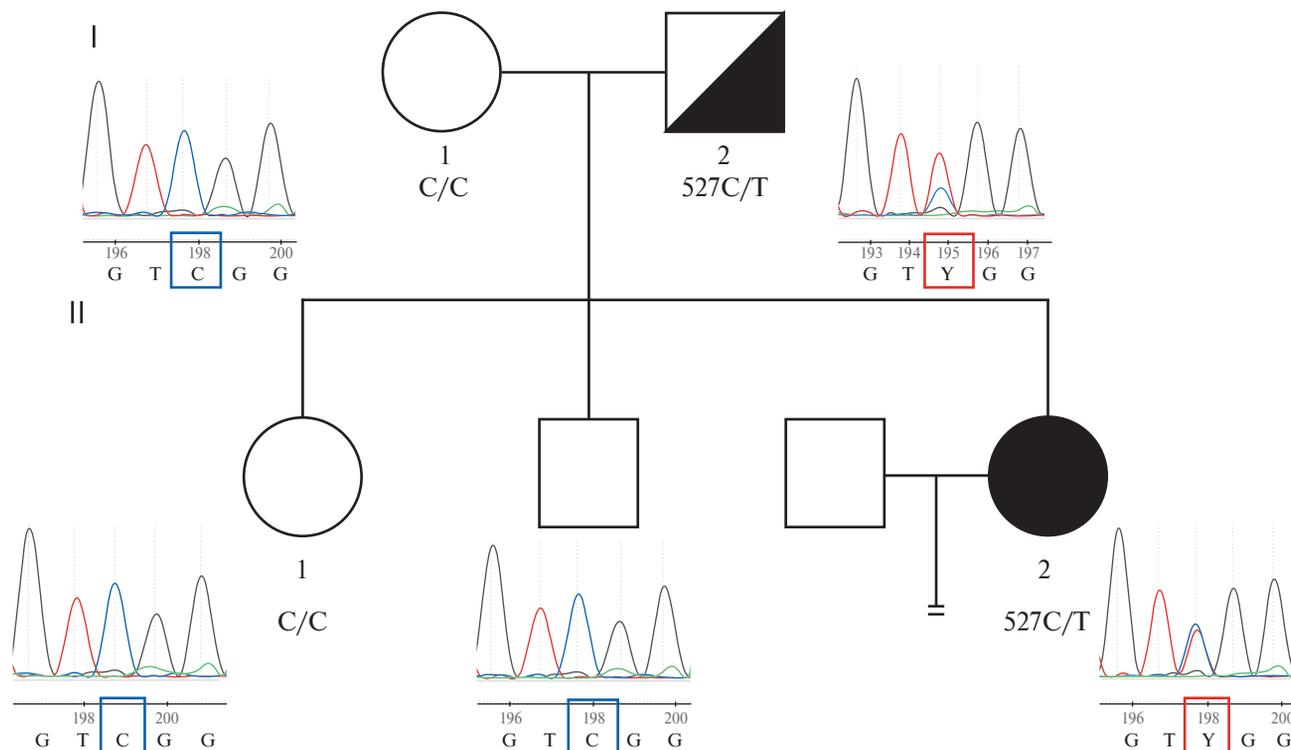


Рис. 1. Результаты секвенирования методом Сэнгера пробанда и членов ее семьи (*TUBB8* с.527C>T, р.Ser176Leu).

β -тубулина, ключевого компонента микротрубочек [6].

Несмотря на то что данный вариант был унаследован, важно отметить, что возрастные изменения в цитоплазме ооцитов могут усиливать эффект мутаций. В литературе описано, что с возрастом нарушаются ключевые процессы, такие как сборка веретена деления, работа цитоскелета и митохондриальная функция, что увеличивает риск хромосомных аномалий и снижает качество ооцитов. У пациенток старшего репродуктивного возраста возрастные изменения в цитоплазме могут создавать синергетический эффект с мутацией *TUBB8*, ухудшая процесс созревания ооцитов.

Таким образом, изучение таких генетических вариантов, как *TUBB8*, в контексте репродуктивного старения позволяет более полно понять механизмы нарушения фертильности и найти новые подходы к диагностике и лечению бесплодия, особенно у женщин старшего возраста. Это подчеркивает необходимость дальнейших исследований, направленных на изучение взаимодействия генетических мутаций и возрастных изменений в репродуктивной системе.

Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093).

Авторы выражают благодарность за научное консультирование Е.И. Рогаеву.

Исследование одобрено Этическим комитетом Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (протокол № 6, дата утверждения 7 апреля 2009 г.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников или их законных представителей было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feng R., Sang Q., Kuang Y. et al. Mutations in *TUBB8* and human oocyte meiotic arrest // N. Engl. J. Med. 2016. V. 374. № 3. P. 223–232. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510791>
2. Lin T., Liu W., Han W. et al. Genetic screening and analysis of *TUBB8* variants in females seeking ART // Reproductive Biomedicine Online. 2023. V. 46. № 2. P. 244–254.

3. *Chen B., Wang W., Peng X. et al.* The comprehensive mutational and phenotypic spectrum of *TUBB8* in female infertility // *Eur. J. Hum. Genet.* 2019. V. 27. № 2. P. 300–307.
<https://doi.org/10.1038/s41431-018-0283-3>
4. *Li H., Durbin R.* Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. № 14. P. 1754–1760.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
5. *McKenna A., Hanna M., Banks E. et al.* The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Research.* 2010. V. 20. № 9. P. 1297–1303.
6. *Janke C.* The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions // *J. Cell Biol.* 2014. V. 206. № 4. P. 461–472.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201406055>
7. *Cao T., Guo J., Xu Y. et al.* Two mutations in *TUBB8* cause developmental arrest in human oocytes and early embryos // *Reprod. Biomed. Online.* 2021. V. 43. № 5. P. 891–898.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.07.020>
8. *Chen B., Li B., Li D. et al.* Novel mutations and structural deletions in *TUBB8*: Expanding mutational and phenotypic spectrum of patients with arrest in oocyte maturation, fertilization or early embryonic development // *Hum. Reprod.* 2017. V. 32. № 2. P. 457–464.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dew322>
9. *Chen T., Bian Y., Liu X. et al.* A recurrent missense mutation in *ZP3* causes empty follicle syndrome and female infertility // *Am. J. Hum. Genet.* 2017. V. 101. P. 459–465.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.001>
10. *Dai C., Hu L., Gong F. et al.* *ZP2* pathogenic variants cause *in vitro* fertilization failure and female infertility // *Genet. Med.* 2019. V. 21. P. 431–440.
<https://doi.org/10.1038/s41436-018-0064-y>
11. *Huang L., Tong X., Luo L. et al.* Mutation analysis of the *TUBB8* gene in nine infertile women with oocyte maturation arrest // *Reprod. Biomed. Online.* 2017. V. 35. P. 305–310.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.05.017>
12. *Maddirevula S., Coskun S., Alhassan S. et al.* Female infertility caused by mutations in the oocyte-specific translational repressor *PATL2* // *Am. J. Hum. Genet.* 2017. V. 101. № 4. P. 603–608.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.009>
13. *Sang Q., Li B., Kuang Y. et al.* Homozygous mutations in *WEE2* cause fertilization failure and female infertility // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 102. P. 649–657.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.015>
14. *Wang A.C., Zhang Y.S., Wang B.S. et al.* Mutation analysis of the *TUBB8* gene in primary infertile women with arrest in oocyte maturation // *Gynecol. Endocrinol.* 2018. V. 34. № 10. P. 900–904.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1464138>
15. *Xing Q., Wang R., Chen B. et al.* Rare homozygous mutation in *TUBB8* associated with oocyte maturation defect-2 in a consanguineous mating family // *J. Ovarian Res.* 2020. V. 13. № 1. P. 42.
<https://doi.org/10.1186/s13048-020-00637-4>
16. *Yang P., Yin C., Li M. et al.* Mutation analysis of tubulin beta 8 class VIII in infertile females with oocyte or embryonic defects // *Clin. Genet.* 2021. V. 99. № 1. P. 208–214.
<https://doi.org/10.1111/cge.13855>
17. *Zhang Z., Li B., Fu J. et al.* Bi-allelic missense pathogenic variants in *TIRP13* cause female infertility characterized by oocyte maturation arrest // *Am. J. Hum. Genet.* 2020. V. 107. № 1. P. 15–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.05.001>
18. *Zhao L., Guan Y., Wang W. et al.* Identification novel mutations in *TUBB8* in female infertility and a novel phenotype of large polar body in oocytes with *TUBB8* mutations // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020. V. 37. № 8. P. 1837–1847.
<https://doi.org/10.1007/s10815-020-01830-6>
19. *Zhao L., Xue S., Yao Z. et al.* Biallelic mutations in *CDC20* cause female infertility characterized by abnormalities in oocyte maturation and early embryonic development // *Protein Cell.* 2020. V. 11. P. 921–927.
doi: 10.1007/s13238-020-00756-0
20. *McLaren W., Gil L., Hunt S.E. et al.* The ensembl variant effect predictor // *Genome Biol.* 2016. V. 17. P. 122.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
21. *Karczewski K.J., Francioli L.C., Tiao G. et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans // *Nature.* 2020. V. 581. № 7809. P. 434–443.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
22. *Vaser R., Adusumalli S., Leng S.N. et al.* SIFT missense predictions for genomes // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. № 1. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.123>
23. *Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>

The Identification of Genetic Factors Contributing to Human Oocytes Maturation Arrest Using Whole-Genome Sequencing

N. A. Arakelyan¹, A. P. Grigorenko², V. M. Petrova¹, E. Vasilevskaya¹,
D. V. Islamgulov³, A. V. Dolgikh³, A. D. Manakhov^{1, 2, *}

¹Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sirius, 354340 Russia

²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³Fomin Clinic, Ufa, 450078 Russia

*e-mail: manakhov@rogaevlab.ru

Female fertility is dependent on the successful maturation of oocytes, a complex and meticulously regulated cellular process that prepares oocytes for fertilization and subsequent embryonic development. However, with advancing age and the onset of reproductive senescence, the probability of errors in this process increases significantly. These age-related alterations are associated with the accumulation of genetic and epigenetic abnormalities, mitochondrial dysfunction, and modifications in cytoskeletal function, all of which elevate the risk of oocyte maturation defects, embryonic developmental anomalies, and infertility. In this study, we conducted a genetic analysis of a patient experiencing female infertility due to oocyte maturation arrest and identified a heterozygous variant, c.527C>T (p.Ser176Leu), in the *TUBB8* gene. This variant disrupts microtubule formation, leading to defects in meiotic spindle formation and subsequent oocyte arrest. Variants in the *TUBB8* gene, which encodes a crucial component of microtubules, have been implicated in the pathogenesis of oocyte maturation arrest, abnormal fertilization, and other related disorders. Such changes may be particularly pronounced in women exhibiting characteristics of reproductive senescence.

Keywords: infertility, oocyte arrest, reproductive aging, whole genome sequencing, *TUBB8*.