



ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Сборник научных трудов
XVII Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

РОССИЯ, ТОМСК, 21 – 24 апреля 2020 г.

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Abstracts
XVII International Conference of Students
and Young Scientists

RUSSIA, TOMSK, April 21 – 24, 2020

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ИНДЕКСОМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ И
ТРИСОМИЕЙ 16 У СПОНТАННЫХ АБОРТУСОВ**Е.С. Сердюкова¹, О.Ю. Васильева², Д.И. Жигалина²Научный руководитель: д.б.н. С.А. Васильев²¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

² НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ,

Россия, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: katva.serdyukova.1997@mail.ru**CORRELATION BETWEEN METHYLATION INDEX OF GENES AND TRISOMY 16 IN
MISCARRIAGES**E.S. Serdyukova¹, O. Yu. Vasilyeva², D.I. Zhigalina²Scientific adviser: PhD, S.A. Vasiliev²¹ Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Av., 36, 634050² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Naberezhnaya r. Ushayki, 10, 634050

E-mail: katva.serdyukova.1997@mail.ru

Abstract. *In this study, the targeted bisulfite massive parallel sequencing was used to study the level of gene methylation (ANKRD53, GATA3, CALCB, TRPV6, SLC13A4) in miscarriages. Using bioinformatics approaches, we found a statistically significant increase in methylation in the promoter regions of analyzed genes. A relationship was observed between the level of methylation of the ANKRD53 gene, which is responsible for chromosome segregation in mitotic division and the fraction of cells with a trisomy karyotype of miscarriages with aneuploidy. Also, in this sample, aberrant methylation of the regulatory region of the transcription factor GATA3 was noted, which is the main component for the timely differentiation of cytotrophoblast cells in the prenatal period. The promoters of the remaining genes (CALCB, TRPV6 and SLC13A4) were also hypermethylated, which may affect the outcome of embryo development in the early stages of pregnancy.*

Введение. Нарушение эпигенетического статуса ДНК на ранних этапах развития эмбриона, вследствие воздействия неблагоприятных факторов, может стать одной из причин гибели для развивающегося организма [1]. В настоящее время особое внимание уделяется изучению эпигенетических процессов реализации наследственной информации в эмбриональном развитии [2, 3]. Метилирование может вносить существенный вклад в такие биологические процессы как: регуляцию экспрессии генов, подавление мобильных элементов генома [4], обеспечение стабильности хромосом, ремоделирование структуры хроматина [5]. Кроме того, метилирование в процессе эмбриогенеза динамически изменяется. Чаще всего гибель эмбрионов происходит в I триместре беременности, и в половине случаев причиной становятся геномные мутации, основную часть которых составляют анеуплоидии. Изменение числа хромосом может сказаться на изменении метилирования ДНК в промоторах отдельных генов, за счёт нарушения дозового баланса генов. Данное событие оказывает

негативное влияние на внутриутробное развитие эмбриона. По результатам ранее проведенного широкогеномного анализа на метилчипах “Infinium HumanMethylation27 Bead Chip” (Illumina, США) у спонтанных абортусов с анеуплоидией были выделены дифференциально-метилированные гены, которые легли в основу панели генов для детального исследования индекса метилирования с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования [6]. Цель данного исследования – оценить взаимосвязь статуса метилирования CpG-сайтов промоторной области генов с наличием трисомии по хромосоме 16 у спонтанных абортусов I триместра беременности.

Экспериментальная часть. В исследовании были использованы образцы цитотрофобласта хориона (n=22) спонтанных абортусов с анеуплоидией (трисомия 16) и 10 медицинских абортусов первого триместра беременности. Образцы предоставлены биобанком НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Выделение геномной ДНК из эмбриональных тканей проводилось путём их разделения на хорион и мезодерму с последующей инкубацией с протеиназой К в течение 16 ч при 37°C. Далее проводилась фенол-хлороформная экстракция ДНК. Качество ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), концентрацию устанавливали при помощи флуориметра Qubit® (ThermoFisher Scientific, США). После выделения ДНК подвергали бисульфитной модификации набором EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США), принцип действия которого заключается в конвертировании неметилированного цитозина в урацил с последующим образованием тимина в ходе ПЦР. Была проведена ПЦР-амплификация фрагментов бисульфит-конвертированной ДНК, соответствующих промоторам генов (*ANKRD53*, *GATA3*, *CALCB*, *SLC13A4*, *TRPV6*), в каждом из которых было несколько анализируемых CpG сайтов. Геномные координаты исследуемых фрагментов приведены в таблице (таблица 1). Праймеры подбирались с использованием инструмента Primer-BLAST NCBI.

Таблица 1

Геномные координаты фрагментов промоторов генов (согласно сборке GRCh38)

Ген	Хромосома	Начало	Конец
ANKRD53	2	70978926	70979475
CALCB	11	15072481	15073849
GATA3	10	8049354	8053485
SLC13A4	7	135727815	135728662
TRPV6	7	142885085	142886120

Пробоподготовка библиотек для секвенирования была выполнена с использованием набора Illumina Nextera®XT. ДНК подверглась тагментации и последующим двум раундам ПЦР, направленным на лигирование адаптеров, а затем специфических индексов. Массовое параллельное секвенирование проводилось на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Micro Kit v2 в режиме 2x150 bp согласно протоколу производителя. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью ресурса Bioconductor в среде R.

Результаты. После проведения статистического анализа был определён уровень метилирования в промоторной области всех исследованных генов, его процент у спонтанных абортусов с трисомией 16 был значительно выше по сравнению с контрольной группой, представленной медицинскими абортусами. Обнаружены дифференциально-метилированные CpG-сайты, вероятно определяющие

регуляцию экспрессии этих генов. Исходя из полученных данных, можно говорить о том, что у спонтанных абортусов анеуплоидии сопровождаются некоторыми нарушениями эпигенетической регуляции генома. Во внутриутробном развитии наличие таких нарушений может быть ассоциирована с развитием патологического механизма, приводящего к гибели эмбриона. У спонтанных абортусов с трисомией 16 обнаружено повышение уровня метилирования гена *ANKRD53*, важная функция которого заключается в регуляции расхождения хромосом в процессе митоза. Возможно, это приводит к снижению уровня доли клеток с трисомией у спонтанных абортусов с анеуплоидией и формирования мозаицизма. Помимо этого, в выборке спонтанных абортусов с трисомией 16 наблюдалось аномальное метилирование регуляторной области транскрипционного фактора *GATA3*. Он является важным элементом в процессе дифференцировки клеток цитотрофобласта во внутриутробном развитии. Предполагается, что нарушение его функционирования может повлиять на имплантацию зародыша в стенку матки, что впоследствии приведёт к гибели плода [7]. Промоторы генов *CALCB*, *TRPV6* и *SLC13A4*, были также с повышенным уровнем метилирования, относительно выборки медицинских абортусов, что может негативно влиять на дальнейшее развитие эмбриона на начальных этапах беременности. В качестве порога гиперметилирования принимались отличия минимум в 10% в большую сторону по сравнению с группой сравнения.

Заключение. Данное исследование при помощи метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования позволило выявить повышение уровня метилирования в промоторной области исследуемых генов у спонтанных абортусов с анеуплоидией. Такое явление может нарушать сигнальное взаимодействие между эмбрионом и матерью, а впоследствии стать причиной гибели эмбриона на раннем этапе онтогенеза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-10026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов, В. С., Кузнецова, Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. Научно-практические аспекты. – СПб.: Издательство Н–Л., 2007. – 640 с.
2. Ко, М. Chromatin remodeling, development and disease / М. Ко, DH. Sohn, H. Chung, RH. Seong // *Mutat Res.* – 2008. – Vol. 647(1-2). – P.59-67.
3. Shi, L. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development / L. Shi, J. Wu // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2009. – Vol.5. – P.1-11.
4. Goll, MG. Eucaryotic cytosine methyltransferases / MG. Goll, TH. Bestor // *Annu Rev Biochem.* – 2005. – Vol.74. – P.481-514.
5. Reik, W. Epigenetic reprogramming in mammalian development / W. Reik, W. Dean, J. Walter // *Science.* – 2001. – Vol.293. – P.1089–1093.
6. Эпигенетические эффекты трисомии 16 в плацентарных тканях человека / Е.Н. Толмачёва [и др.]. – М.: Российская академия наук. – 2013. – Т. 47, № 3. – С. 423–432.
7. Yauk, C. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location / A. Polyzos, A. Rowan-Carroll, CM. Somers, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105(2). – P.605-610.