

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Биологический институт
Кафедра физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
д-р биол. наук
Д.С. Воробьев
«02» июня 2023 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

**БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ В
ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ
РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СПИРАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ, ПРИ
РАННЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ГИБЕЛИ У ЧЕЛОВЕКА**

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки 06.03.01– Биология

Даркова Яна Андреевна

Руководитель работы
д-р биол. наук
С.А. Васильев

подпись

«02» июня 2023 г.

Автор работы
студент группы № 011902

подпись

Я.А. Даркова

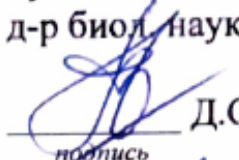
«02» июня 2023 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель ООП

д-р биол. наук

 Д.С. Воробьев

«15» февраля 2023 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы бакалавра обучающегося Дарковой Яне Андреевне по направлению подготовки 06.03.01 «Биология», направленность (профиль) «Биология»

1. Тема выпускной квалификационной работы: «Биоинформатический анализ профиля метилирования в промоторах генов, ассоциированных с нарушением ремоделирования спиральных артерий при презклатмсии, при ранней эмбриональной гибели у человека»

2. Срок сдачи работы:

а) в деканат – _____ б) в ГЭК – _____

3. Исходные данные к работе:

Объект исследования: *Homo sapiens*

Предмет исследования: Трисомия 16 хромосомы, моносомия хромосомы X и нормальный каритип с повышенным и низким уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1 спонтанных абортусов первого триместра беременности.

Цель исследования: Выявить профиль метилирования в промоторах генов, ассоциированных с нарушением ремоделирования спиральных артерий при презклатмсии, у спонтанных абортусов с трисомией 16 хромосомы, моносомией хромосомы X и нормальным каритипом.

Задачи:

1. Анализ профиля метилирования в промоторах генов *PSG2* и *NPR3* в хорионе спонтанных и медицинских абортусов первого триместра беременности с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования.
2. Биоинформатический анализ влияния каритипа спонтанного абортуса (трисомия 16, моносомия X, нормальный каритип) на профиль

метилирования генов *PSG2* и *NPR3* в хорионе спонтанных абортусов

3. С использованием биоинформатического анализа определить связь между уровнями метилирования промоторов генов *PSG2* и *NPR3* и степенью метилирования мобильного генетического элемента *LINE-1* в хорионе спонтанных абортусов
4. С помощью биоинформатического анализа изучить дифференциально-метилованные сайты генов *PSG2* и *NPR3* и их перекрытие с различными регуляторными элементами
5. Проанализировать корреляции между уровнями метилирования генов *PSG2* и *NPR3* и сроками невынашивания беременности

4. Методы исследования:

Выделение ДНК из ворсин хориона, бисульфитная конверсия ДНК, полимеразная цепная реакция, чистка ПЦР-продукта сефадексом, биоинформатический анализ с помощью Statistica 10.0

5. Организация или отрасль, по тематике которой выполняется работа:

Научно-исследовательский институт медицинской генетики
Федерального государственного научного учреждения «Томский
национальный исследовательский медицинский центр Российской
академии наук»

6. Краткое содержание работы

Преэклампсия является одной из ведущих причин материнской смертности, но её этиология до сих пор в значительной степени неизвестна. В данной работе рассматривается неудачное ремоделирование спиральных артерий как одна из возможных причин подобного заболевания. Проанализированы гены-кандидаты преэклампсии *NPR3* и *PSG2*, участвующие в эмбриональном ангиогенезе. Проведена статистическая обработка уровня метилирования генов как механизма, влияющего на активность генов. Также проработана взаимосвязь эпигенетической регуляции и анеуплоидного кариотипа абортусов, учтён вклад мобильного генетического элемента *LINE-1* в общую картину невынашивания беременности.

Руководитель выпускной квалификационной работы

Д.б.н., профессор кафедры физиологии
растений, битехнологий и
биоинформатики



Васильев
С.А.

должность, место работы

подпись

И.О. Фамилия

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Общие черты эмбрионального развития. Ремоделирование спиральных артерий.....	9
1.2. Преэклампсия.....	16
1.3. Гены-кандидаты преэклампсии.....	18
1.3.1. PSG2.....	18
1.3.2. NPR3.....	20
1.5. Мобильные генетические элементы. LINE-1.....	23
1.4. Эпигенетическое программирование. Метилирование ДНК.....	27
1.5. Метилирование ДНК как механизм-кандидат при преэклампсии.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1 МАТЕРИАЛ.....	36
2.2. МЕТОДЫ.....	36
2.2.1 Выделение ДНК из ворсин хориона.....	36
2.2.2 Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови.....	37
2.2.3 Бисульфитная конверсия ДНК.....	38
2.2.4. Получение библиотек.....	40
2.2.5 Чистка ПЦР продукта с помощью сефадекса.....	40
2.2.6 Секвенирование полученных библиотек и биоинформатическая обработка.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
ВЫВОДЫ.....	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

АННОТАЦИЯ

Преэклампсия является одной из ведущих причин материнской смертности и для того, чтобы преодолеть репродуктивные потери, необходимо изучать новые прогностические маркеры развития заболевания, чтобы уже на ранних сроках начать лечение. Одним из вариантов является анализ уровня метилирования ключевых генов эмбрионального развития, ведь степень метилирования генов отражает их функциональную активность. В данной работе исследованы гены *NPR3* и *PSG2* в ворсинах хориона групп спонтанных абортусов с трисомией 16, моносомией X и нормальным кариотипом. Изучение профиля метилирования проводилось с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. С использованием биоинформатической обработки в программе Statistica 10.0 были выявлены пересечения дифференциально-метилованных сайтов с различными регуляторными элементами. В контексте работы проведено исследование взаимосвязи уровня метилирования генов, анеуплоидного кариотипа абортусов, а также вклад в эмбриональные потери мобильного генетического элемента LINE-1. В работе содержится 1 таблица, 20 рисунков. Суммарный объём страниц 60. Структура дипломной работы включает: список сокращений, введение, литературный обзор, материалы и методы, результатами и обсуждением, заключением, выводами и списком использованной литературы. Информация в данной работе взята из 44 англоязычных и 3 отечественных источников.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

5mC – 5`-метилцитозин (также 5MeC)

CpG - островки (CGI) – CG-Island

LINE – длинные диспергированные повторы (long interspersed nuclear elements)

МГЭ – мобильные генетические элементы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СА – спонтанные абортусы

МА – медицинские абортусы

ТФ – транскрипционные факторы

ВВЕДЕНИЕ

Преэклампсия - это опасное осложнение, возникающее во время беременности. Среди симптомов рассматривают высокое кровяное давление, альбуминурию и другие системные нарушения у женщин без артериальной гипертензии в анамнезе.

Частота преэклампсии оценивается в 7-10% случаев невынашивания беременности, что приводит к высокой степени смертности и составляет 15% преждевременных родов. Более того, было также установлено, что преэклампсия является важной причиной отслойки плаценты, острой почечной недостаточности, кровоизлияния в мозг, диффузного внутрисосудистого свертывания крови и недостаточности кровообращения. Поэтому ранняя диагностика крайне важна для принятия соответствующих превентивных мер.

Несмотря на то, что преэклампсия является одной из ведущих причин материнской смертности, её этиология до сих пор в значительной степени неизвестна. Исследователи связывают патогенез преэклампсии как с генетическими, так и с эпигенетическими факторами, например, с метилированием ДНК. В отличие от генетических особенностей, многие эпигенетические изменения обратимы, что даёт оптимистичный прогноз в отношении лечения преэклампсии.

Гены *PSG2* и *NPR3* отличаются особо важными функциональными проявлениями во время беременности.

Нарушение регуляции *PSG2* было выявлено при скрининге на наличие новых прогностических сывороточных маркеров преэклампсии и подтверждено методом иммуноферментного анализа. Ген *NPR3* также принимает участие в формировании клинической картины данного идиопатического заболевания.

Таким образом, актуальность в исследовании уровней метилирования ДНК при различных заболеваниях связана с обнаружением эпигенетических маркеров патологического течения беременности и ассоциирована с возникновением новых терапевтических подходов к лечению многих заболеваний.

В данной работе проведён биоинформатический анализ уровня метилирования промоторов генов-кандидатов *PSG2* и *NPR3* у спонтанных, медицинских абортусов хориона человека при неправильном ремоделировании спиральных артерий и преэклампсии.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы является изучение уровня метилирования промоторов генов абортусов с разным кариотипом и его влияния на патологическое течение беременности.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Подобрать важные гены для анализа их вклада в нормальное и дисфункциональное эмбриональное развитие
2. С использованием таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования выявить и проанализировать профиль метилирования промоторов генов *PSG2* и *NPR3* в хорионе спонтанных и медицинских абортусов
3. С помощью биоинформатического анализа промоторов генов *PSG2* и *NPR3* спонтанных абортусов с трисомией, моносомией и нормальным кариотипом оценить влияние кариотипа на уровень метилирования в хорионе спонтанных абортусов
4. С использованием биоинформатического анализа определить связь между уровнями метилирования промоторов генов *PSG2* и *NPR3* и степенью метилирования мобильного генетического элемента LINE-1 в хорионе спонтанных абортусов

5. С помощью биоинформатического анализа изучить дифференциально-метилированные сайты генов *PSG2* и *NPR3* и их перекрытие с различными регуляторными элементами
6. Проанализировать корреляции между уровнями метилирования генов *PSG2* и *NPR3* и сроками невынашивания беременности

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие черты эмбрионального развития. Ремоделирование спиральных артерий.

После слияния мужской и женской гамет происходит ряд делений, через 3 дня приводящий к образованию 8-клеточного эмбриона, который впоследствии развивается в 16-клеточную морулу и при дальнейшем уплотнении и делении превращается в бластоцисту [31]. Однако хромосомно нормальными бластоцистами становятся далеко не все придимплантационные эмбрионы. Дело в том, что на стадии дробления обнаруживается крайне высокий уровень геномной нестабильности, например, анеуплоидия и мозаицизм выявляются в 90% эмбрионов пожилых женщин [41].

Далее клеточная спецификация в бластоцисте начинается с разделения тотипотентных клеток на трофэктодерму и внутреннюю клеточную массу (ВКМ) в зависимости от положения. Клетки ВКМ могут образовывать эмбриональные и внеэмбриональные структуры (плацента, экстраэмбриональная мезодерма для вторичных ворсинок хориона), тогда как трофэктодерма дифференцируется в специализированные клетки трофобласта: синцитиотрофобласты, цитотрофобласты или инвазивные цитотрофобласты (также вневорсинчатый трофобласт для человека)[29]. Фенотипически инвазивные линии клеток разделяются на интерстициальные и эндovasкулярные инвазивные клетки трофобласта. Первые перемещаются между клетками децидуальной стромы матки, а вторые – внутри спиральных артерий [30].

Поддержание клеток в пролиферативном стволовом состоянии или их дифференцировка в специализированные линии трофобластов реализуется с помощью различных сигнальных путей (фактор роста фибробластов, Notch), факторов транскрипции (FOSL1), посттрансляционных модификаторов гистонов, цитокинов и т.д. Более того, из проведённых генетических

скринингов появляется всё больше информации о полиморфизмах в различных генах (*Stox1*, *COMT*, *CORIN*, *KIR*, *HLA-C*), влияющих на уровень экспрессии генов, а также о мутациях, меняющих регуляцию дифференцировки трофобластов (ген *HELLP*)[29].

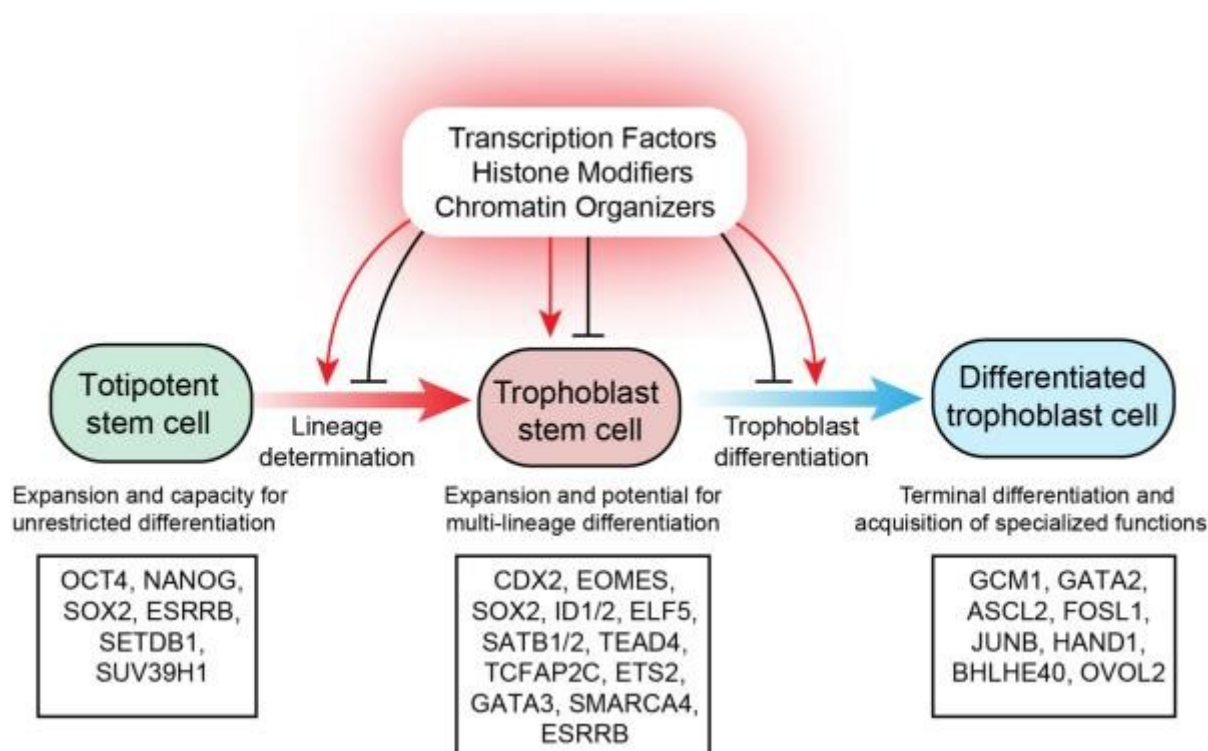


Рисунок 1. Развитие и специализация трофобластов, регулируемые факторами транскрипции и организаторами хроматина [32]

Процесс имплантации эмбриона в матку является пусковым для гемохориальной плацентации. Данная разновидность плацентации необходима для получения ресурсов материнского организма, направленных на рост эмбриона. Функциональные единицы плаценты представлены трофобластами[29].

Спиральные артерии матки – это каналы для доставки питательных веществ между матерью и плодом. Целенаправленная структурная модификация возникает в дистальных сегментах спирального артериального дерева матки (Рисунок 2). Изменения происходят как в клеточных (эндотелиальные и гладкомышечные клетки), так и внеклеточных компонентах, в частности осуществляется гиперплазия, гипертрофия,

апоптоз, дедифференцировка, миграция и ремоделирование внеклеточного матрикса. В результате меняется свойство вазорегуляции каналов, максимизирующее приток материнских ресурсов к плаценте[29].

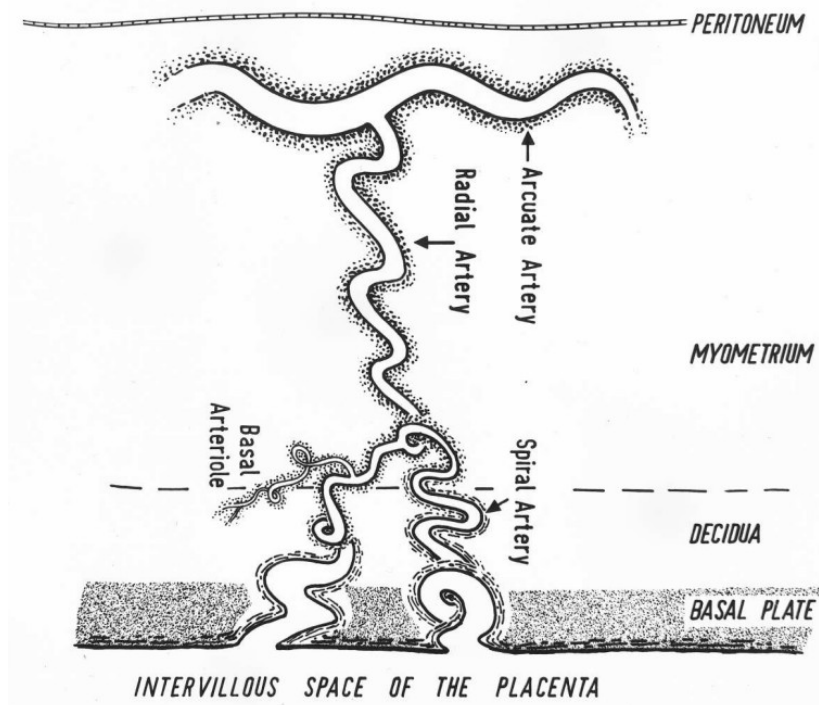


Рисунок 2. Кровоснабжение плацентарного ложа и межворсинчатого пространства иллюстрирующая изменения спиральных артерий в базальной пластинке, децидуальной оболочке и соединительной зоне миометрия[33].

Среди участников ремоделирования сосудов выделяют: инвазивные линии трофобласта внеэмбрионального происхождения, материнские НК-клетки (уникальные децидуальные dNK-клетки, накапливающиеся в месте имплантации), макрофагов и тромбоциты материнского происхождения[29]. Последние захватываются эндovasкулярными трофобластами, активируются, выделяют из гранул хемокины (CCL5), цитокины (CD40), факторы роста(EGF, VEGF, TGF), способствуя инвазии (Рисунок 3) [33].

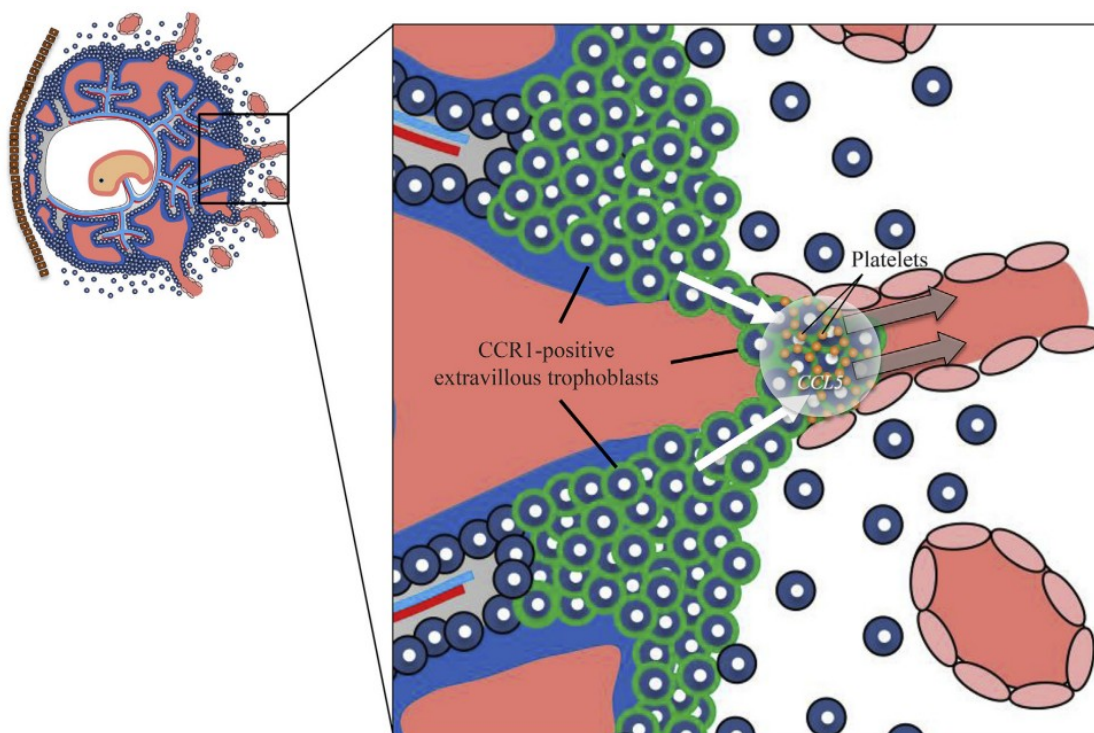


Рисунок 3. Система тромбоциты-хемокины-CCR1 при ремоделировании спиральной артерии [36]

В общем виде стадии плацентации можно представить следующим образом:

- 1) В период овуляции у женщины наблюдается секреторная фаза эндометрия, характеризующаяся повышенной проницаемостью сосудов, отеком, пролиферацией и дифференцировкой стромальных клеток в децидуальные, инвазией лейкоцитов и ангиогенезом. Процесс оплодотворения пролонгирует децидуализацию, вызывает приток новых иммунных клеток и клеток трофобласта [30]
- 2) Имплантация в свою очередь вызывает более сильное изменение вазорегуляции посредством NK-клеток, макрофагов и интерстициальных инвазивных трофобластов, которые проникают в слой гладкомышечных клеток под действием матриксных металлопротеиназ [29]. Сосуды вакуолизируются, расширяются, теряют эластичность, мышечные клетки дезорганизуются [30].

dNK-клетки способствуют потере целостности оболочки сосудов. Воздействие данных клеток врождённого иммунитета опосредовано: интерфероном γ , интерлейкином 11 и интерлейкином 15, оксидом азота, а также набором ангиогенных факторов роста и ферментов, модифицирующих внеклеточный матрикс. В различных экспериментах показано, что dNK-клетки могут стимулировать дифференцировку и инвазию трофобластов с помощью продукции цитокинов и хемокинов[30], однако также обладают функцией задержки и ограничения инвазивной программы внезародышевых клеток[29].

Ряд факторов микроокружения влияет на морфогенез плаценты. Например, гипоксия, специально создаваемая пробками трофобластов катализирует увеличение сосудистой сети мезометрия матки и способствует более глубокой инвазии трофобластов (пункт 2)[33]. Последние мигрируют к кислороду в плацентарном русле. Однако хроническая гипоксия приводит к повреждениям плаценты. Так, концентрация кислорода и продолжительность воздействия оказывают разное влияние на течение беременности[29].

Кроме того, в процессах трансформации сосудов играют роль: дисбаланс в уровнях антиангиогенных и ангиогенных белков, количество регуляторных Т-лимфоцитов, работа ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и так далее[32].

Перед заселением эндovasкулярными трофобластами материнские сосуды окружаются и разрушаются синцитиотрофобластом. Лакуны бывших сосудов, выстланные эндovasкулярными трофобластами, окруженные синцитиотрофобластом представляют собой ворсинки хориона (Рисунок 4) [33].

3) Псевдоваскуляризация во втором триместре беременности после изменения морфологии сосудов: вытеснение и замена эндovasкулярными трофобластами эндотелия децидуальных окончаний

спиральных артерий вплоть до лучевых артерий слоя миометрия [29]. Первоначальный гладкомышечный слой заменяется фибриноидным материалом, выделяемым интерстициальными трофобластами, слой интимы утолщается. Спиральные артерии превращаются в маточно-плацентарные артерии [30]. Пропускная способность сосудов повышается, сопротивление и способность реагировать на вазоактивные вещества снижаются, вследствие чего перфузия плаценты улучшается [32]. Маточные вены также видоизменяются вневорсинчатыми трофобластами для более эффективного оттока отходов жизнедеятельности и плазмы крови из межворсинчатого пространства [30].

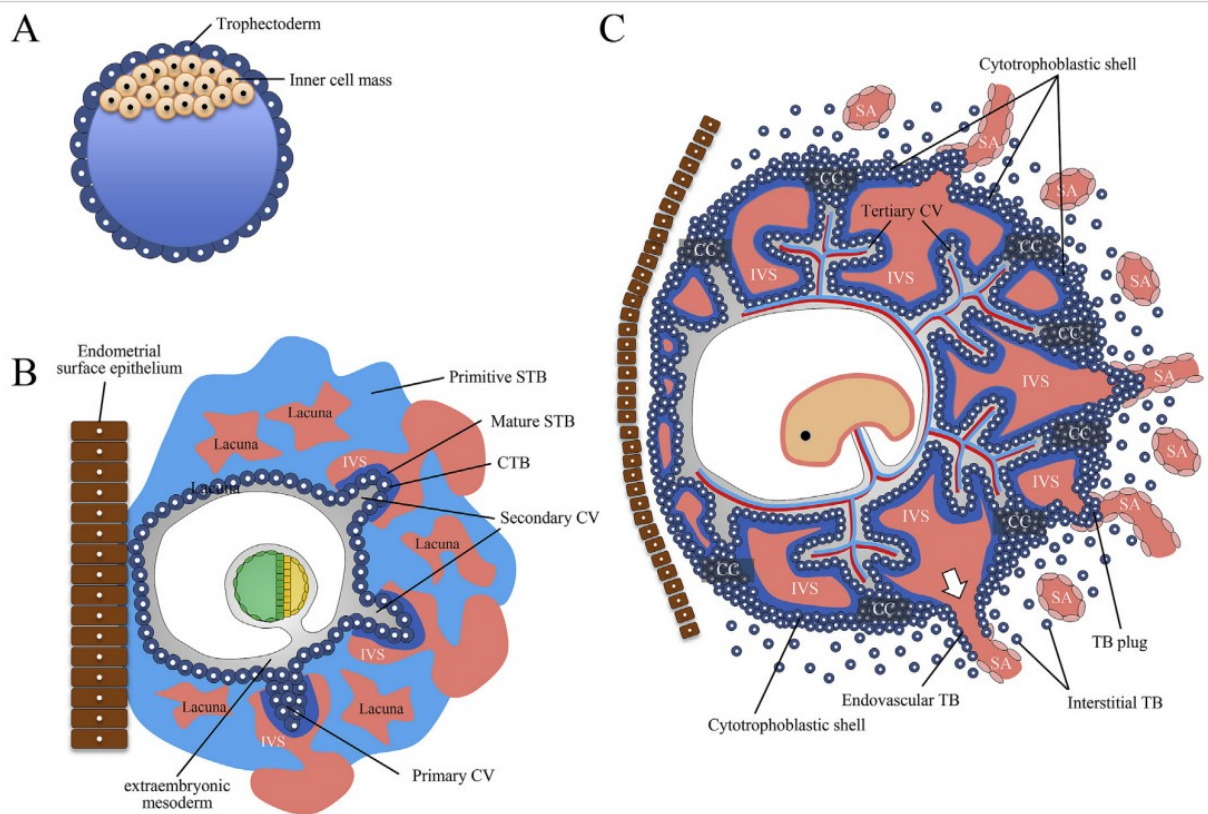


Рисунок 4. Ранние стадии плацентации у человека. CC, столбик клеток; СТБ, цитотрофобласт; CV, ворсинки хориона; IVS, межворсинчатое пространство; SA, спиральная артерия; STB, синцитиотрофобласт; TB, трофобласт[33]

Степень ремоделирования спиральных артерий матки, зависящего от беременности, различается у разных видов, а отклонения в изменениях сосудов матки связаны с заболеваниями, связанными с беременностью [29].

Неудачное ремоделирование спиральных артерий матки может привести к хронической гипоксии, воспалительным процессам, высвобождению антиангиогенных факторов, иммунному дисбалансу, мультисистемным нарушениям столь характерным для преэклампсии [29]. Таким образом, плацентарная дисфункция вследствие неуспешного ремоделирования спиральных артерий выступает первым этапом преэклампсии и предшествует нарушениям в продукции сосудорасширяющих веществ и повышению чувствительности к сосудосуживающим компонентам кровеносного русла (Рисунок 5)[32].

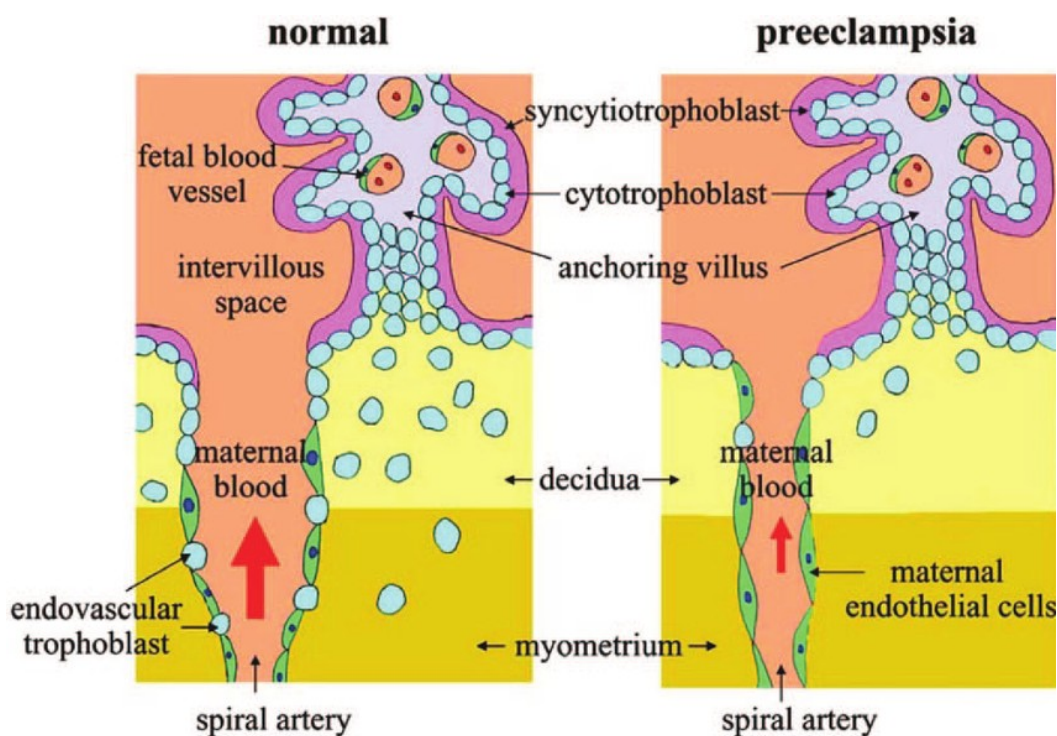


Рисунок 5. Разница в ремоделировании спиральных артерий при нормальном течении беременности и преэклампсии

1.2. Преэклампсия

Преэклампсия – распространённое мультисистемное осложнение беременности, пагубным образом влияющее на перинатальное здоровье матери и младенца[1]. Среди критериев диагностики заболевания выделяют, в первую очередь, артериальную гипертензию (систолическое давление ≥ 140 мм рт.ст. и/или диастолическое давление ≥ 90 мм рт.ст.) [2], повреждение печени и почек (протеинурия или альбуминурия более 300 мг/сут)[3].

По разным оценкам частота преэклампсии варьирует от 2 до 30%, в соответствии с этно-территориальными особенностями популяций [4], составляет 15% случаев преждевременных родов[1], а также приводит к 60 000 материнским смертям в год [3].

Выявлено, что преэклампсия является значимой причиной острой почечной недостаточности, отёков мозга и кровоизлияний, аномальной свёртываемости крови и недостаточности кровообращения, в конце концов, ограничивает рост плода, повышает риски неблагоприятных исходов беременности, таких как преждевременные роды, отслойка плаценты, трудные роды [1, 2, 3]. К долгосрочным последствиям для потомства можно отнести умственную отсталость, аутизм, шизофрению и эпилепсию[3], для женщины – повышенное артериальное давление и протеинурию (необходимость пересадки почки увеличивается в 5 раз), снижение продолжительности жизни в среднем на 7 лет [5].

Согласно общепризнанной модели преэклампсии плацентарного происхождения рассматривают две стадии развития заболевания[3]:

- 1) Аномальная плацентация на ранних сроках беременности, вследствие дефекта инвазии трофобластов и неполного сосудистого ремоделирования спиральных артерий матки[5], что ведёт к локальной гипоксии [7].

2) Дисфункциональная плацента продуцирует антиангиогенные молекулы (sFLT1 и sENG) и повышенное число остатков синцитиотрофобластов в материнское кровяное русло, приводя к гипертензии (как компенсации неудачной плацентации) и множественному повреждению органов [5, 7].

Но невзирая на тревожную статистику смертности и негативных последствий преэклампсии, о молекулярных основах заболевания до сих пор ведутся дискуссии.

Исследователи связывают патогенез преэклампсии с более чем 130 факторами риска[4], среди которых: слишком высокая или слишком низкая иммунная толерантность, окислительный стресс в виду митохондриальной дисфункции или отсутствия антиоксидантов, эндотелиальная аномалия, наконец генетическая и эпигенетическая регуляция [5]. В том числе нарушение метилома плаценты рассматривается как одна из причин преэклампсии [43].

Наследуемость заболевания составляет приблизительно 50% [3]. Общегеномные исследования родословных обнаружили локусы риска на следующих хромосомах: 2p13, 2q23, 11q23, 10q22, 22q12, 2p25, 9p13, 4q32 и 9p11 [3]. Работы с использованием микрочипов обнаруживают множество генов-мишеней, относящихся к возникновению преэклампсии [7].

1.3. Гены-кандидаты преэклампсии

1.3.1. *PSG*

PSG, карциноэмбриональный антиген (*CEA*) объединяют в семейство генов *CEA*, относящееся к суперсемейству иммуноглобулинов: они имеют характерный аминоконцевой домен, который гомологичен вариабельной области иммуноглобулина, а также обычно три Ig-константных домена (Ig C2-подобные домены типа A или B) и относительно гидрофильный хвост [10]. Полагают, что наследственный ген *CEA/PSG* является общим как для приматов, так и для грызунов, но последующие дупликации генов привели к значительному увеличению вариабельности структуры, экспрессии и функции белка [10]. Подгруппа *CEA* является повсеместно используемым опухолевым маркером. Подсемейство *PSG* содержит по меньшей мере 11 различных генов, расположенных в хромосоме 19q13 [10]. В геноме может встречаться более одной копии этих генов, также копии могут давать начало разным, альтернативно сплайсированным транскриптам [9]. По сравнению со средним значением по геному, внутри подсемейства *PSG* наблюдается высокий уровень вариаций числа копий, повышенная частота генных конверсий и быстрая дивергенция кодирующих последовательностей [10]. Большое количество близкородственных генов *PSG*, вероятно, развилось как следствие необходимости “тонкой настройки” взаимодействия клетка-клетка и клетка-матрица, что является актуальным, например, при проникновении трофобласта плаценты в слизистую оболочку матки [9].

A PREGNANCY-SPECIFIC GLYCOPROTEIN

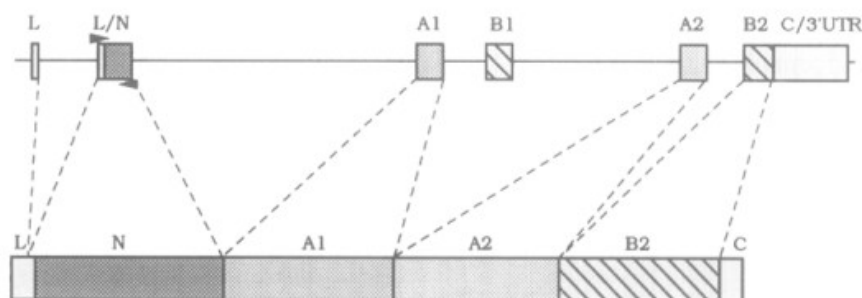


Рисунок 6. Карта типичного гена *PSG* с экзон-интронной организацией [10]

B IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY

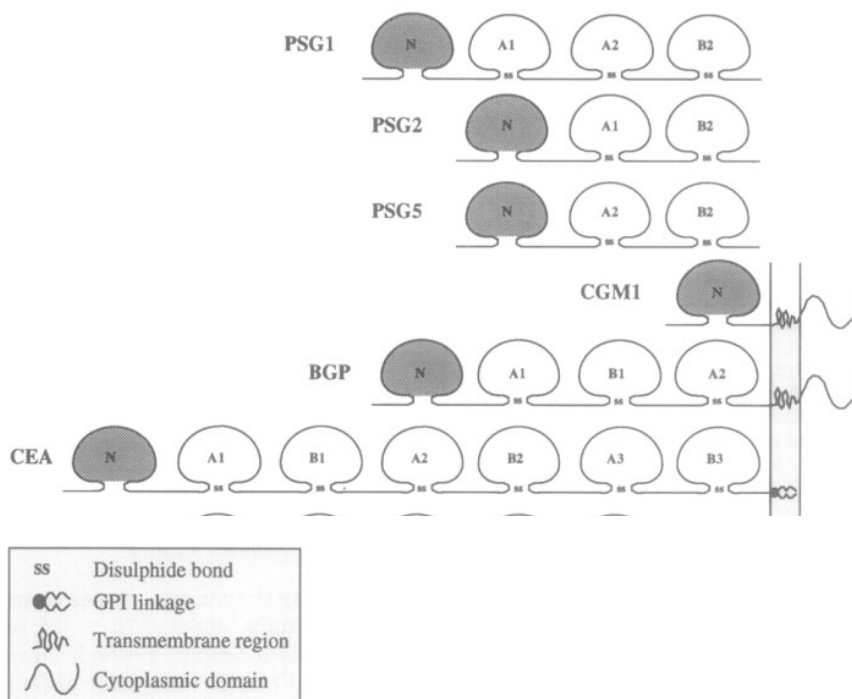


Рисунок 7. Изображение некоторых членов суперсемейства иммуноглобулинов с гомологичными N-доменами [10].

Семейство *PSGs* обладает функциями иммунной регуляции, способствующими ангиогенезу и антитромбоцитарному эффекту. Уровень *PSG* тесно связан с физиологией беременности, что делает его возможным маркером функциональной активности плаценты [10].

PSG2 секретируется трофобластом в материнский кровоток. Однако некоторыми исследователями ставится под сомнение плацентарная специфичность *PSG*-белков, ввиду их экспрессии неплацентарными тканями: печенью плода, слюнной железой, толстой кишкой, семенниками и гранулоцитами [9].

Нарушение регуляции *PSG2* при преэклампсии было подтверждено методом иммуноферментного анализа. При нормотензивной беременности уровень *PSG2* с увеличением срока гестации снижается, тогда как в гипертензивном случае увеличивается [8].

Данных о регуляции транскрипции у *PSGs* немного. На примере охарактеризованной области выше по течению от сайта начала транскрипции гена *PSG5* можно рассуждать об общих принципах регуляции для всего подсемейства *PSGs*. Так, у промоторов *PSGs* отсутствует ТАТА-бокс, некоторые типичные элементы инициатора, а также CG-богатые регионы[10].

1.3.2. *NPR3*

Ген *NPR3* кодирует рецептор С натрийуретического пептида/гуанилатциклазу С для клиренса натрийуретического пептида [13]. Так, основная роль *NPR3* состоит в регуляции тонуса и объёма сосудов, посредством выведения из организма соответствующих гормонов [15]. Ряд работ указывает на участие *NPR3* в модуляции артериального давления. [13, 14, 15].

NPR3, также известный как рецептор NPR-C, является одним из трех трансмембранных рецепторов семейства натрийуретических пептидов, широко распространен в клетках гладкой мускулатуры сосудов и тромбоцитах [14].

NPR3 вовлечён в ремоделирование спиральных артерий и сосудистую дисфункцию, например, в качестве конечного звена биохимической цепочки Corin – pro-ANP – ANP – NPR-C. Сердечный фермент Corin ответственен за преобразование предсердного натрийуретического пептида (ANP) из предшественника в зрелую форму. ANP как гормон регулирует водно-солевой баланс крови и как следствие тонус сосудов, тем самым способствуя адаптации сердечно-сосудистой системы в ответ на перегрузки в организме женщины при беременности [16].

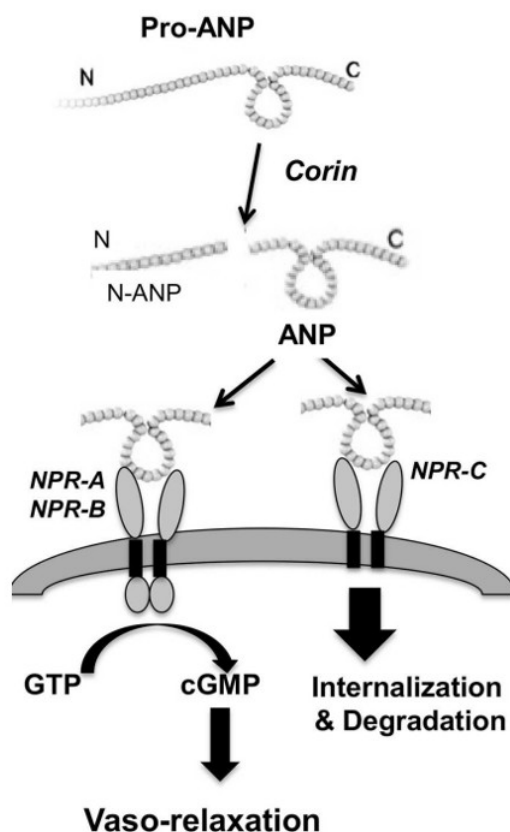


Рисунок 8. Сигнальный путь ANP и Corin [13]

Работа предсердного натрийуретического пептида регулируется связыванием гормона с его рецептором NPR3. Согласно исследованию на мышах инвазия трофобласта ослабевает при дефиците ANP и корина, а преэклампсия наоборот связана с аномально повышенными значениями данных белков. В исследовании наблюдалась повышенная экспрессия NPR-C в эндотелии сосудов матери с гипертензивным течением беременности, в отличие от нормотензивных случаев [14]. В норме повышенное содержание ANP при беременности позволяет эффективно кровоснабжать плодно-плацентарную единицу за счёт расширения сосудов [16]. Можно предположить, что при преэклампсии из-за гипер-экспрессии *NPR3* клиренс ANP достаточно высок, что снижает содержание ANP в крови и вызывает гипертензию. Также в некоторых исследованиях отмечалось увеличение экспрессии NPR-C в ответ на гипертрофию сердца у крыс [23].

В некоторых исследованиях *NPR3* фигурирует в качестве гена межклеточной коммуникации, принимающего участие в мейотическом контроле [17].

Кроме того, натрийуретические пептиды и их рецепторы имеют иммуномодулирующие свойства, что объясняется влиянием этих паракринных факторов на пролиферацию и дифференцировку тимоцитов и возможностью экспрессии *NPR3* макрофагами. Уменьшение экспрессии *NPR3* может повлиять на баланс иммунотолерантности матери и плода. В статье приведена взаимосвязь между цитокином-супрессором MNSFb и *NPR3*. Супрессор облегчает имплантацию эмбриона в матку, что коррелирует с повышенной экспрессией *NPR3* в месте имплантации и наоборот, анти-супрессор снижал продукцию *NPR3* и затруднял инвазию трофобласта плода [18].

В регуляции транскрипции *NPRC* принимает участие множество факторов: лиганды и вторичные мессенджеры (цГМФ) этого белка, гормоны, факторы роста, соль как пищевая добавка, адrenoблокаторы, физиологические и патофизиологические состояния – подавление экспрессии. Усиленная продукция *NPRC* происходит при действии витамином D3 и TGF-1, а также при хронической сердечной недостаточности [19].

Генетическая вариабельность *NPR3* может влиять на индивидуальные особенности человека, например, на риск развития артериальной гипертензии, в частности полиморфизм в промоторе гена ассоциирован с высоким кровяным давлением и высокой вероятностью ишемического инсульта [18, 20].

Одна из сложностей изучения человеческого гена *NPR3* заключается в наличии большого количества повторов (GT, CA и другие)[21].

1.5. Мобильные генетические элементы. LINE-1.

Мобильные генетические элементы (МГЭ, транспозоны, «прыгающие гены») - фрагменты ДНК, инсерционные мутагены со способностью менять свою локализацию в геноме [34].

LINE-1 относится к non-LTR ретротранспозонам, имеющим размер от 3 до 8 тыс. п.о. [34].

В полноразмерных копиях non-LTR ретротранспозонов выделяют основные структурные компоненты: 5'-нетранслируемая область (5' UTR), центральная часть и 3'-нетранслируемая область (3' UTR)[34].

5'-нетранслируемая область включает внутренний промотор РНК полимеразы II. В 5' UTR могут содержаться делеции, влияющие на активность и полноразмерность МГЭ. Так, из 500000 копий элементов L1 в геноме человека приблизительно 7000 являются полноразмерными, и только около 90 из них проявляют активность[34].

В строении центральной части LINE-1 выделяют:

1) Первую рамку считывания(ORF1), а также включает в себя мотивы, определяющие РНК - связывающую активность («цинковые пальцы») и шаперонную активность

2) Вторую рамку считывания(ORF2), кодирующую два фермента: обратную транскриптазу и эндонуклеазу. Эндонуклеаза наиболее близка к апуриновой/апиридиновой эндонуклеазе (apurinic/apyrimidin endonuclease - APE) и помимо эндонуклеазной активности обладает способностью к репарации ДНК

REL-домен обеспечивает наличие рестрикционной эндонуклеазы и сайт-специфическую встройку новых копий данных элементов

3'-конец вариативен по длине и нуклеотидной последовательности. Полагают, что этот участок содержит специфические последовательности,

узнаваемые обратной транскриптазой. В этой области расположены: 3'-нетранслируемый участок и поли(А)-последовательность, нужная для транспорта мРНК и трансляции. Как правило, поли(А)-последовательность к мРНК клетки хозяина пристраивается после транскрипции, но у LINE она закодирована прямо в геноме ретротранспозона[34].

Полный цикл ретротранспозиции non-LTR ретротранспозонов содержит стадии: транскрипция, трансляция, сборка рибонуклеопротеидных комплексов, транспорт в ядро клетки-хозяина, обратная транскрипция, интеграция в геном хозяина[34].

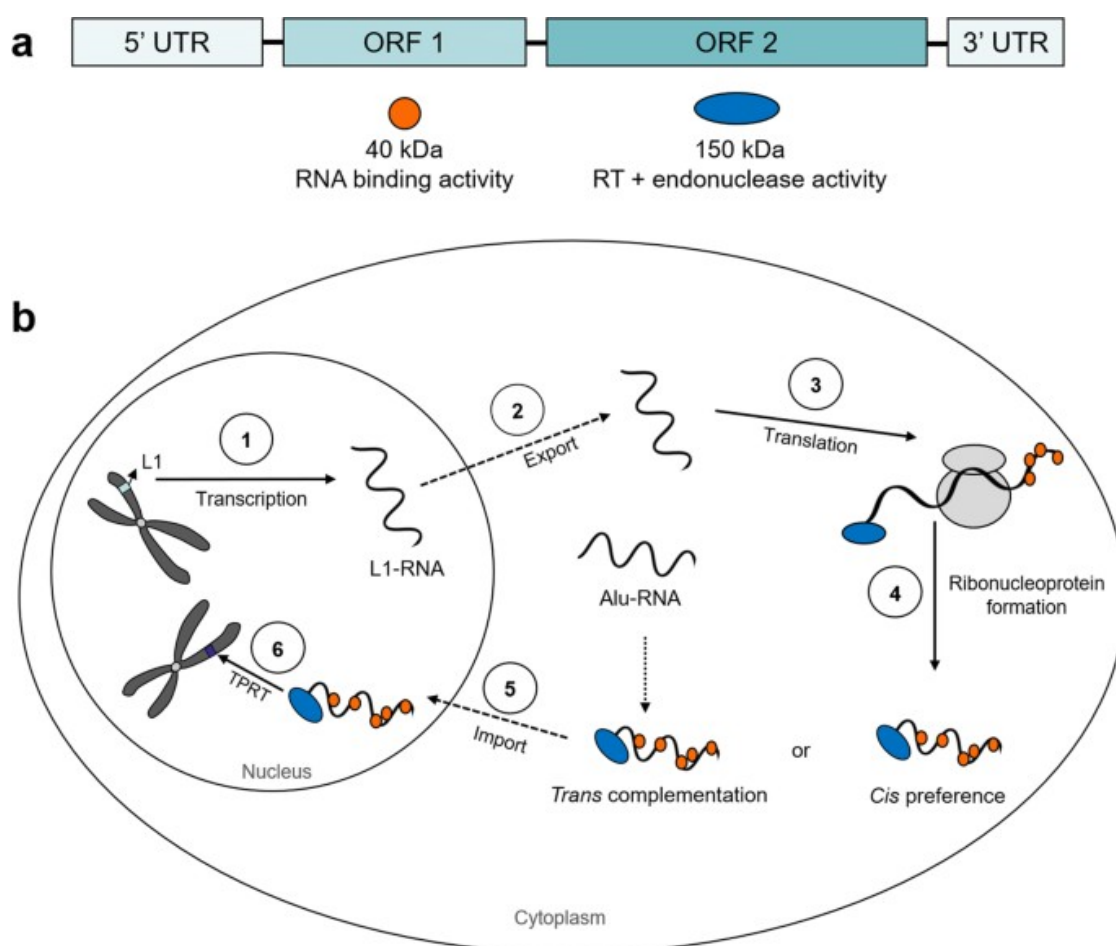


Рисунок 9. Структура LINE-1 и механизм ретротранспозиции. а - Строение L1: 5'-UTR, две ORF (открытые рамки считывания), 3'-UTR. б Механизм ретротранспозиции L1. Транскрипция (1), экспорт (2) и трансляция (3) элемента L1. РНК транслируется в белки ORF1 и ORF2, связываясь с L1-РНК с образованием частиц RNP (рибонуклеопротеинов) (4)

(цис-предпочтение). ORF1p и ORF2p также могут связываться с другими РНК (такими как клеточная мРНК, Alu-РНК или SINE-РНК) (транскомплементация). Комплексы RNP импортируются в ядро (5), где РНК может быть интегрирована в новом месте генома в процессе обратной транскрипции, инициируемой сайтом-мишенью (TPRT) [41]

Транскрипция и трансляция осуществляются с использованием ферментативного аппарата хозяйской клетки. Причём транскрипция РНК-полимеразой может происходить как с собственного внутреннего промотора LINE-1, так и с соседнего гена-хозяина [34].

Перемещение и воспроизводство МГЭ может приводить к нарушению функций генов, изменению регуляции генов, хромосомным перестройкам, миссенс- или нонсенс-мутациям, приобретению новых функций, изменению размера геномов, обмену генетической информацией между репродуктивно изолированными видами [35].

LINE-1 экспрессируется в ооцитах *Homo sapiens*, а также во время сперматогенеза. Поэтому часто ретротранспозиция происходит в зародышевых клетках и во время раннего эмбрионального развития по сравнению с соматическими клетками. Инсерции LINE-1 *de novo* в зародышевых клетках играют важную роль в наследственной генетической изменчивости [41]. Вставки LINE-1 накапливаются в половых клетках и эмбриональных стволовых клетках именно для обеспечения эволюционного успеха МГЭ [42]. В то же время ненаследуемая транспозиция составляет примерно один случай на 100-200 новорождённых. Экспрессия LINE-1 необходима для предимплантационного развития, поскольку данный МГЭ является источником эндогенной обратной транскриптазы, нужной для процессов дробления. Элементы LINE-1 модулируют транскрипционную активность генов хозяина [41].

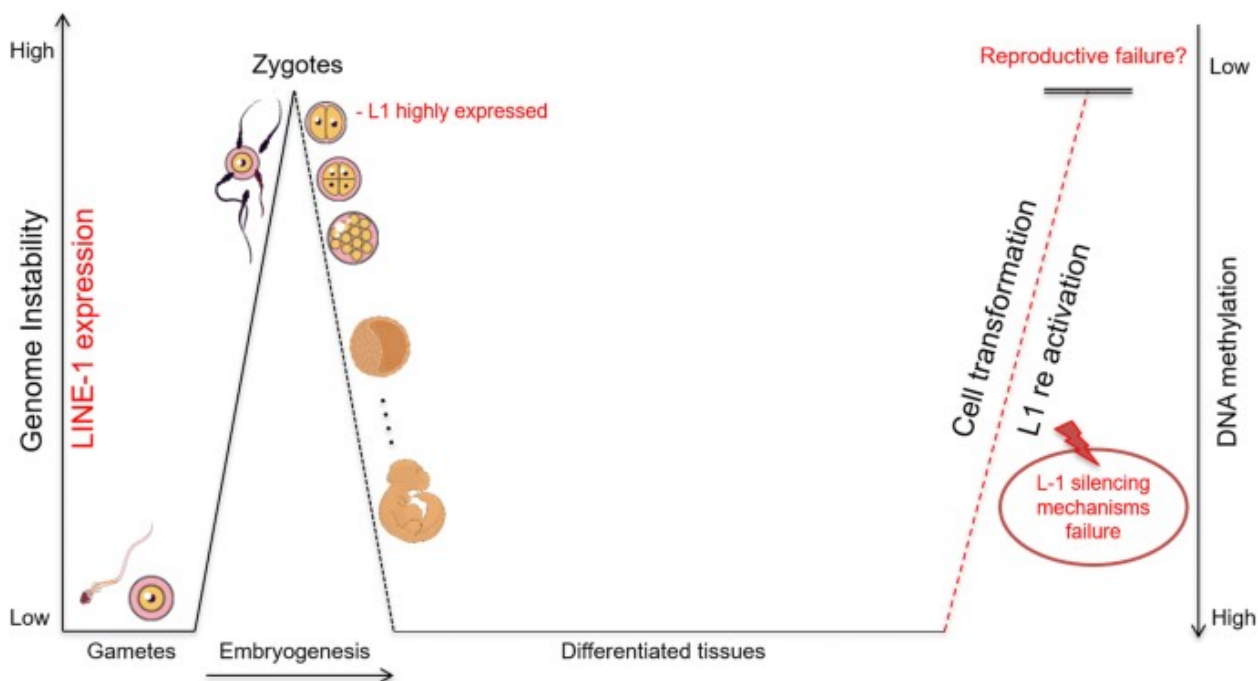


Рисунок 10. Взаимосвязь LINE-1, геномной нестабильности и уровней метилирования

С другой стороны, МГЭ участвуют в патогенезе ряда заболеваний: шизофрения[36], многочисленные виды рака [37, 38], нейродегенеративные и иммунные проблемы [39], а также непредсказуемые последствия как, например, увеличение количества двуцепочечных разрывов в зародышевой линии и соматических тканях[40].

Организм выработал систему защиты против МГЭ, механизмы которой очень разнообразны: связывание цинковыми пальцами, РНК-интерференция малыми РНК, репарация разрывов после инсерций и метилирование ДНК [40, 39]. Метилирование ДНК является основным механизмом защиты, действие которого рассмотрено в следующей главе.

1.4. Эпигенетическое программирование. Метилирование ДНК.

Американский биолог, доктор Алан Вулфф, определил термин эпигенетика как «наследуемые изменения в экспрессии генов, которые происходят без изменения последовательности ДНК» [25].

Эпигенетические метки необходимы для регуляции работы генов. Среди таких меток выделяют модификации гистонов и метилирование ДНК [27]. Метилирование цитозина ДНК с образованием 5mC широко распространено у эукариот, начиная от грибов и заканчивая позвоночными. Этот процесс важен как для эмбрионального развития, так и для поддержания гомеостаза в тканях взрослых особей[28].

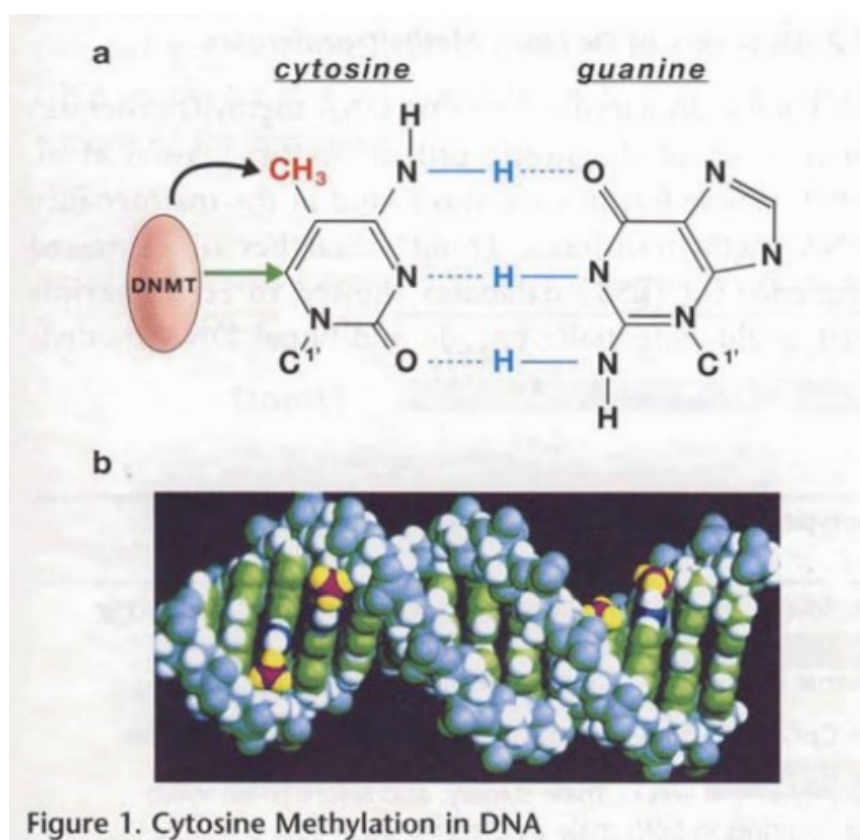


Рисунок 11. Метилирование цитозина в составе CpG динуклеотида ДНК.

Парные метильные фрагменты (пурпурный и желтый) расположены в главной бороздке двойной спирали[27].

Метилирование, не ассоциированное с симметричным CpG-контекстом (цитозин и гуанин, связанные вместе фосфатом), встречается крайне редко

[28]. Ковалентная модификация цитозина (метилование) в динуклеотидной последовательности 5' CpG 3' происходит в главной бороздке спирали ДНК посредством переноса CH₃ из S-аденозил-L-метионина в пятое положение остатков цитозина. В месте активного взаимодействия ДНК с белками происходит либо блокировка связывания транскрипционных факторов, либо рекрутирование других комплексов, например, белков из семейства метил-CpG-связывающих доменов (MBD), белка Kaiso и т.д. Все описанные интеракции носят характер негативной регуляции (репрессии), так как изменяют доступность ДНК физически или за счёт рекрутированных белков. Также привлекаемые белки могут быть ассоциированы с корепрессорами [26]. Однако не всегда гиперметилованное состояние ведёт к сайленсингу генов. Например, промоторы с низкой плотностью CpG демонстрируют активную транскрипцию вне зависимости от уровня метилирования [28].

ДНК соматических тканей млекопитающих метилирована в 70% всех CpG-сайтов, общее количество которых оценивается в 28 миллионов [27]. Исключением являются CpG-островки – области длиной от 500 до 2000 пар оснований с высокой плотностью CpG, в которых отсутствует метилирование [26]. Гипометилованное состояние поддерживается за счёт связывания с фактором транскрипции, а с помощью триметилирования гистона (H3K4me3), тяжёлого состояния хроматина. CpG-островки маркируют промоторы и 5'-домены генов, особенно часто они ассоциированы с генами развития и генами домашнего хозяйства [28]. Около 60% генов *Homo sapiens* содержат промоторы CpG-островков. Ввиду отсутствия метилирования CGI-участки более стабильны, ведь в них не происходит мутации 5-метилцитозина до тимидина вследствие спонтанного дезаминирования [26]. Некоторые CpG-островки метилируются во время ранней клеточной дифференцировки для запрограммированной репрессии специфичных для разных тканей генов. Менее насыщенные CG нуклеотидами края островков называются “островковыми берегами”.

Метилирование ДНК в этих областях также может быть снижено во время активной транскрипции из-за физического присутствия факторов транскрипции или ослабления структуры хроматина [27].

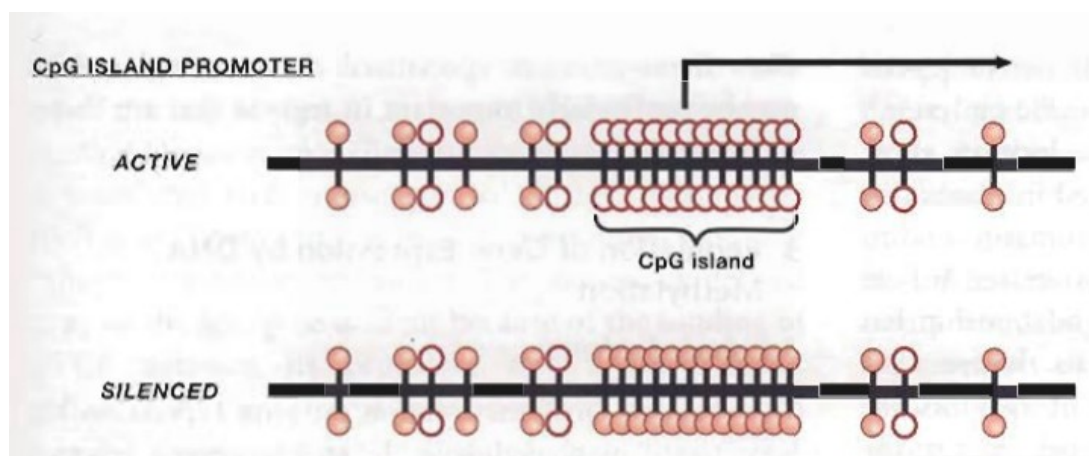


Рисунок 12. CpG-островки [27]

Паттерны метилирования у млекопитающих устанавливаются во время эмбрионального развития и поддерживаются в последующих циклах деления, тем самым образуя форму клеточной памяти. «Метилом» реплицируется полуконсервативно благодаря «поддерживающей ДНК-метилтрансферазе» Dnmt1. Данный фермент предпочитает в качестве субстрата гемиметилированную ДНК (метилцитозин только на одной нити)[26]. Экспрессия ДНК-метилтрансферазы1 активируется факторами транскрипции в S-фазе и продуцируется в большинстве митотических клеток. Белок NP95 является посредником между ДНК и ферментом, который задаёт положение для Dnmt1[28]. Однако также существует метилирование *de novo*, реализуемое с помощью Dnmt3a и Dnmt3b. Этот вид метилирования характерен для тотипотентных стадий эмбриогенеза, при инактивации соответствующих метилтрансфераз наступает летальный исход. Мутации в гене Dnmt3b приводят к ICF-синдрому, редкому состоянию, характеризующемуся иммунодефицитом, нестабильностью центромер и т.д. [26]. Dnmt2 на самом деле обладает активностью РНК-метилтрансферазы *in vitro* и не сильно влияет на изменение фенотипа [28].

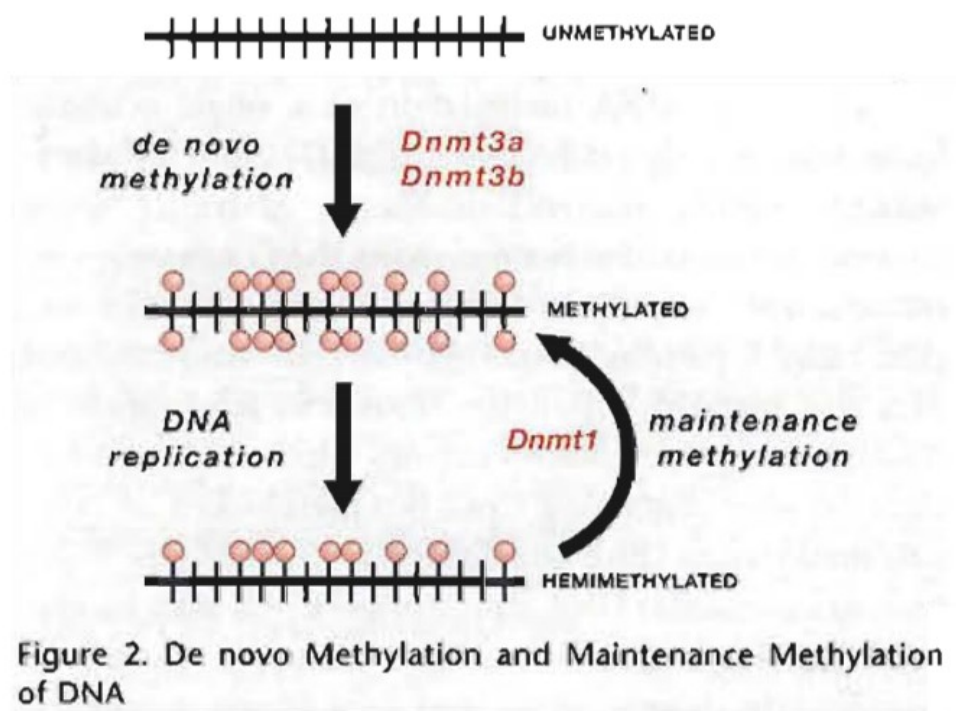


Рисунок 13. Механизмы метилирования *de novo* с помощью Dnmt3a и Dnmt3b и поддерживающего метилирования Dnmt1[27].

Механизмы деметилирования осуществляются как активно, так и пассивно. В последнем случае Dnmt1 или фактор рекрутирования NP95 исключаются из ядра, что вызывает глобальную потерю метилирования. Что касается активного деметилирования, то дезаминирование 5mC до тимидина осуществляется с помощью дезаминазы AID. В результате создаётся несоответствие Т:G, ведущее к удалению тимина и последующей эксцизионной репарации пары оснований с восстановлением неметилированного цитозина. Также возможен иной путь активного деметилирования при участии диоксигеназ TET, окисляющих 5-метилцитозин до 5-гидроксиметилцитозина и далее до 5-карбоксицитозина, которые после восстанавливаются до цитозина без метильных меток [28].

Во время подготовки к половому размножению и эмбрионального развития возникают волны эпигенетического перепрограммирования [26].

- 1) В первичных половых клетках(PGCs) происходит стирание соматических сигнатур, установление аллель-специфических для пола

и половых клеток эпигенетических меток в гаметах, которые обеспечивают эффективное мейотическое созревание, оплодотворение, после чего удаляются [28].

2) Через несколько часов после оплодотворения, на стадии ранней бластоцисты (32-64 клетки), удаляется больше половины глобального уровня метилирования, снимаются эпигенетические метки сперматозоида и яйцеклетки и эмбриональный геном возвращается к базовому, тотипотентному состоянию. В отцовском геноме наблюдается активное деметилирование из-за ферментов дезаминирования семейства Aid/Aprobес, в материнском – пассивное, связанное с отсутствием поддерживающего метилирования [26]. Благодаря белку STELLA в материнском пронуклеусе активная потеря 5mC наблюдается именно в отцовском пронуклеусе [28]. Таким образом, экспрессия отцовских и материнских копий генов сохраняется на разном уровне в предимплантационном эмбрионе (поздняя морула/ранняя бластоциста)[27]. Однако из-за глобального стирания эпигенетических меток может происходить реактивация ретротранспозонов, в том числе LINE-1. МГЭ влияют на экспрессию соседних генов, нарушают кодирующие области других генов, вызывают хромосомные делеции и перестройки [41].

3) При имплантации во внутриклеточной массе (ICM) происходит быстрая волна метилирования *de novo*, тогда как трофэктодерма остаётся гипометелированной. Так, ворсинки хориона в постимплантационном эмбрионе демонстрируют на 10-25% меньшее метилирование цитозина, чем ткани плода. Кроме того, ген DNMT1 специфически реперссируется моноаллельным метилированием в ворсинках хориона и клетках трофобласта [27].

Уровень метилирования клеток плаценты понижен, так как недолгоживущие клетки не нуждаются в длительном поддержании

стабильности [26]. Более того, в экстраэмбриональных тканях встречаются области пониженного метилирования ДНК, чередующиеся с областями более высокого метилирования ДНК – «частично метилированные домены». Подобные регионы (>100 кбайт) кроме плаценты встречаются в фибробластах лёгких плода, адипоцитах и раковых клетках. Плацентарные PMD занимают около 40% генома и относительно бедны генами. Гены внутри PMD показывают более высокое метилирование промоторов и, соответственно, пониженную экспрессию в сравнении с соматическими тканями. Нарушение этой своеобразной структуры плаценты ведёт к плацентарной дисфункции, неудаче имплантации и возможному выкидышу [27].

Метилирование ДНК играет важную роль в процессах геномного импринтинга и в X-инактивации [26].

Геномный импринтинг – это экспрессия генов, специфичных для родителей, в диплоидных клетках, в процессе которой одна родительская копия генов активна, а другая заглушается. Неимпринтированные гены же воспроизводятся обеими родительскими копиями генов. Как правило, гены, включённые в процесс геномного импринтинга, кодируют факторы, регулирующие эмбриональный и неонатальный рост. Именно метилирование «импринтирует» набор генов от одного из родителей и обеспечивает скоординированную экспрессию разнородного генетического материала по материнским или отцовским аллелям [26]. Метилирование контрольных областей импринтинга создаёт кластеры генов с разной активностью, регулирует связывание с инсуляторными белками, экспрессию антисмысловой некодирующей РНК. Специфическое для родительского происхождения метилирование ДНК устанавливается в процессе дифференцировки гамет и поддерживается на протяжении всей жизни [28].

Метилирование CpG-островков *de novo* стабилизирует сайленсинг на инактивированной X-хромосоме в процессе дозовой компенсации половых

хромосом [26]. Депрессия второй X-хромосомы у женщин является результатом каскада событий: активация некодирующей РНК (Xist), которая покрывает X-хромосому, запускает смещение транскрипционных факторов, изменение структуры хроматина и, в конце концов, метилирование промоторов CpG-островков [28].

Гипометилирование ДНК может затрудняет точную сегментацию хромосом, увеличивая вероятность нерасхождения хромосом. Так, в исследованиях приводится пример с мышами со сниженным уровнем метилирования, который был ассоциирован с лимфомами и трисомией по 15 хромосоме. Также известно, что мутации *Dnmt3b* ведут ко всевозможным хромосомным aberrациям: слияние и разрыв хромосом, анеуплоидия и т.д. [26]. Важно отметить, что метилированием подавляется, например, транскрипционная активность перичентромерных повторов. Транскрипция данных элементов приводит к перестройкам вблизи центромер, хромосомы не выравниваются во время митоза и их сегрегация не происходит должным образом [28].

Метилирование ДНК подавляет транскрипцию ретротранспозонов, различных вирусных геномов, повторяющихся элементов, сателлитных ДНК, защищая хромосомы от нежелательной рекомбинации [26].

Ретротранспозоны (такие как LINE-1, Alu, эндогенный ретровирус человека HERV) составляют около 50% генома *Homo sapiens*. Интересно, что уровни метилирования мобильных генетических элементов LINE-1 различны для плода и окружающих его тканей. Пониженное метилирование многих транспозонов может вести к более обширному использованию повторно полученных промоторов для плацентарно-специфической экспрессии генов. Так, среди плацентарно-специфичных генов, использующих промоторы из HERV, выделяют гены синцитин 1 и синцитин 2, которые участвуют в слиянии клеток трофобласта с образованием многоядерного синцития [27]. В

ооцитах и двухклеточных эмбрионах подобная непрямая регуляция генов может играть важную роль для успешного развития [28].

В конце концов, для клеток с идентичным геномным базисом в многоклеточном организме важно иметь функциональное разделение и тканеспецифичную экспрессию. Подобный эффект достигается при избирательном подавлении или активации определённых генов. В качестве интересного примера можно привести запрограммированную потерю метилирования ДНК гена IL-2 во время дифференцировки Т-клеток [26]. Также метилирование ДНК может влиять на использование альтернативных промоторов генов или регуляторных областей, таких как супрессоры, энхансеры, изоляторы и т.д. Во внутригенных областях паттерны метилирования могут обозначать границы экзон-интрон при процессинге РНК или во время альтернативного сплайсинга [28]. Получается своеобразный «код метилирования ДНК», включающий в себя информацию о множестве функциональных областей генома с различающимися по интенсивности процессами транскрипции [27].

В тотипотентных и плюрипотентных клетках эпигенетические метки более пластичны и менее стабильны [26]. И именно метилирование ДНК препятствует регрессу клеток в недифференцированное состояние [28].

На метилирование ДНК оказывают влияние окружающая среда и внутренние факторы, такие как клеточное старение и онкогенная трансформация. Среди внешнего воздействия можно выделить опыты Уивера, демонстрирующие различия в метилировании промотора гена глюкокортикоидного рецептора в зависимости от материнского поведения. Другой пример показывает взаимосвязь между рационом матери во время беременности и уровнем метилирования ДНК у потомства, фенотипически проявляемым в изменении окраски агути. Таким образом, внешние факторы могут индуцировать изменения эпигенетических состояний, давать долгосрочные биологические эффекты [26].

Роль механизмов метилирования в этиологии многих заболеваний [26]. Примечательно, но в раковых клетках метилирование энхансера более тесно связано с изменением экспрессии, чем метилирование промотора [28].

1.5. Метилирование ДНК как механизм-кандидат при преэклампсии

В ряде исследований выявлена связь между преэклампсией и экспрессией генов в ткани плаценты и уровнем метилирования ДНК [1, 6, 7].

Аберрантное метилирование ДНК коррелирует со степенью тяжести течения преэклампсии в целом. Более того, известно, что эпигенетические модификации в первом триместре беременности влияют на функциональную активность трофобластов [7]. Кроме того, в некоторых публикациях развитие преэклампсии ассоциировано с гипометилированием промоторов генов плаценты и кровеносных сосудов матери [1, 5]. Например, деметилирование промотора синцитина, важного для формирования синцитиотрофобласта, критично для тканеспецифичной экспрессии этого гликопротеина [7].

Изменение метилирования генов является перспективным прогностическим маркером для раннего выявления и лечения преэклампсии [7]. Выбор правильной промоторной последовательности ДНК во многом имеет решающее значение, поэтому в данной научной работе была приведена литературная справка о генах-кандидатах при преэклампсии.

Уровень метилирования рецептора натрийуретических пептидов может влиять на биохимический состав крови и развитие болезни. Так, гиперметилирование в промоторной области натрийуретических пептидов В (NPPB) коррелирует с низким содержанием данного гормона в организме и с положительным функциональным исходом ишемического инсульта [24].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 МАТЕРИАЛ

Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН.

В качестве материала для исследования была использована ДНК абортусов I триместра, выделенная из эмбриональных тканей (хориона) и ДНК их родителей, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови.

Были взяты образцы спонтанных абортусов со следующими кариотипами: Трисомия по 16 хромосоме (47XY+16, 47XX+16), моносомия по X-хромосоме (45X), нормальный кариотип (46 XY и 46 XX).

Также были использованы группы медицинских абортусов и лимфоцитов крови взрослого человека.

2.2. МЕТОДЫ

2.2.1 Выделение ДНК из ворсин хориона

- 1) Отобрать образцы тканей из холодильника на 80°C.
- 2) Прозеинфицировать инструменты в ПЦР-боксе ультрафиолетом в течение одного часа.
- 3) При помощи стерильных ножниц и пинцета разделить ткани плодного мешка: рыхлые ворсины хориона отделить от плотной прозрачной мезодермы.
- 4) Поместить выделенные образцы в маркированные эппендорфы, обработать инструменты.
- 5) Добавить в эппендорф с хорионом 475 мкл буфера для протеиназы К (состав для 100 мл: 2 мл 0,5 М ЭДТА, 1 мл 1 М трис-HCl (pH 7,4), 200 мкл 5M NaCl), 50 мкл 10 % SDS, 7,5 мкл протеиназы К (10мг/мл)) (хранили при -20°C).

- 6) Инкубировать ночь при температуре 37°C.
- 7) Добавить равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1) и перемешать с помощью вортекса в течение 10 минут.
- 8) Центрифугировать в центрифуге 10 мин. со скоростью 12000 об./мин, после чего отобрать супернатант в новый эппендорф.
- 9) Добавить равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешать с помощью вортекса в течение 10 минут.
- 10) Добавить 7 мкл 3М CH_3COONa и 750 мкл 96 % ледяного $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Вручную накрутить ДНК саму на себя до появления визуально различимой нити ДНК в пробирке.
- 11) Центрифугировать при температуре 4°C в течение 30 мин. Со скоростью 12000 об/мин. Аккуратно слить спирт, промокнув края эппендорфа фильтровальной бумагой.
- 12) Добавить 200 мкл 70 % этанола, перемешать. Центрифугировать при температуре 20°C в течение 30 мин. со скоростью 12000 об/мин. Аккуратно слить спирт, промокнув края эппендорфа фильтровальной бумагой.
- 13) Высушить в выпаривателе в течение 5 мин. при температуре 45°C. (важно стараться не пересушить осадок).

2.2.2 Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови

- 1) Охладить центрифугу до +4 °C.
- 2) Произвести отмывку крови в течение 2 часов после ее забора и после хранить при -80 °C.
- 3) К 0,7 мл крови добавить 0,8 мл 1×SSC и перемешать. Центрифугировать в течение 2 мин. со скоростью 12000 об/мин. Осторожно слить надосадочную жидкость.
- 4) Добавить 1,4 мл 1×SSC и сильно потрясти, чтобы разбить осадок. Повторно центрифугировать на 12000 об./мин в течение 2 мин. Аккуратно слить супернатант, промокнув края эппендорфа фильтровальной бумагой.

- 5) Добавить 270 мкл 0,2М CH_3COONa ($\text{pH}=5,4$), встряхнуть на шейкере в течение 10 мин. до полной гомогенизации.
- 6) Добавить 30 мкл 10% SDS и перемешать. Затем оставить на час в термостате при температуре 37°C .
- 7) Добавить 300 мкл раствора фенол-хлороформа (1:1) и перемешивать в течение 10 мин.
- 8) Центрифугировать со скоростью 13000 об./мин в течение 8 мин. Осторожно перенести водную фазу, стараясь не захватить мутную интерфазу, в чистый эппендорф.
- 9) Добавить 300 мкл хлороформа и перемешать в течение 10 минут. Центрифугировали при 13000 об./мин в течение 8 мин.
- 10) Снова аккуратно перенести водную фазу, не захватывая интерфазу, в чистый эппендорф.
- 11) Добавить 1 мл охлаждённого 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и потрясти эппендорф.
- 12) Вручную прокрутить эппендорф для накручивания ДНК самой на себя.
- 13) Центрифугировать при 12000 об./мин в течение 30 сек.. После аккуратно слить спирт.
- 14) Добавить 1 мл 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, перемешать и потрясти. Затем центрифугировать при 12000 об./мин в течение 30 сек.
- 15) Осторожно слить спирт, промокнув края эппендорфа фильтровальной бумагой. Просушить осадок в пробирке в течение 10 мин.
- 16) Добавить 50 мкл H_2O и оставить на ночь для полного растворения ДНК в термостате при 37°C .

2.2.3 Бисульфитная конверсия ДНК

Бисульфитная модификация ДНК проводилась с использованием набора —EZ DNA Methylation-Direct Kit¹ (Zymo Research, США), согласно протоколу производителя.

- 1) Развести 1 мкг выделенной ДНК в 20 мкл деионизованной воды.

- 2) Добавить 130 мкл CT Conversion Reagent и инкубировать 8 мин при 98°C, затем 3,5 часа при 64°C.
- 3) Перенести 150 мкл модифицированной ДНК в колонки (можно сделать самим из обрезанного носика с фильтром и эппендорфа на 1,5 мл), добавить 600 мкл M-Binding Buffer. Центрифугировать в течение 30 сек. на скорости 13000 об/мин. Аккуратно слить осадок.
- 4) Добавить в колонку для промывки 100 мкл M-Wash Buffer, центрифугировать в аналогичных условиях.
- 5) Добавить 200 мкл M-Desulphonation Buffer в колонку, инкубировать 15-20 мин при комнатной температуре.
- 6) Центрифугировать 30 сек. на скорости 13000 об/мин.
- 7) Добавить 200 мкл M-Wash Buffer, центрифугировали ещё 30 сек. на скорости 13000 об/мин. Повторить данный этап.
- 8) Перенести колонку в новый маркированный эппендорф и добавить 20 мкл M-Elution Buffer.
- 9) Центрифугировать 30 сек. на скорости 13000 об/мин.
- 10) Добавить ещё 30 мкл M-Elution Buffer, центрифугировать 30 сек. на скорости 13000 об/мин

Полученную ДНК хранить при температуре -20°C. В процессе бисульфитной конверсии неметилированный цитозин подвергается метилированию в 5'-положении и модифицируется в урацил. При дальнейшей ПЦР урацил считывается как тимин, в то время как метилированный цитозин не подвергается какой-либо модификации.

2.2.4. Получение библиотек

Для проведения ПЦР с градиентом температур необходимо смешать реагенты в следующем соотношении: деионизированная вода (8 мкл), микс SYBR green (10 мкл), праймер forward (1 мкл), праймер reverse (1 мкл), ДНК (3 мкл). Суммарный объем полученной смеси 20 мкл.

ПЦР проходит в следующих условиях:

- 1) Денатурация при 95° в течение 5 мин.
- 2) 40 циклов: при 95° по 30 сек. (отжиг) и при 60° по 45 сек. (элонгация)
- 3) Денатурация при 95° в течение 30 сек.
- 4) Отжиг при 60° в течение 45 сек.
- 5) Элонгация при 70° в течение 45 сек.

Таблица 1 – последовательности олигонуклеотидных праймеров для генов

Ген	Транскрипт	Последовательность нуклеотидов
<i>PSG2</i>	Транскрипт с канонического промотора	F 5'-GTTGTTGTGTGTAGAGGAGGAATAG-3'
		R 5'-ATCCCAAACCAACCTAAACCTAAC-3'
<i>NPR3</i>	Транскрипт с канонического промотора	F 5'-TAGGGAGGAGTTTTGATGTAAGAAT-3'
		R 5'-TCCTTCTCTACAATATCACTAATTT-3'

Примечание: F – прямой праймер, R – обратный праймер

Амплификация состоит в увеличении количества дублей образцов и, соответственно, повышении концентрации. Концентрацию измеряли флуориметром Qubit 4.0 (Thermo, США).

2.2.5 Чистка ПЦР продукта с помощью сефадекса

- 1) Настоять сефадекс G-50 (почь при 4°C). Развести 1 г. Сефадекс на 20 мл деионизированной воды.

- 2) Приготовить колонки из пробирки 0,5 мл, носика с фильтром и приёмника.
- 3) Добавить 750 мкл сефадекса на колонку.
- 4) Центрифугировать 5 мин. при 900 об./мин. Отбросить содержимое приёмника.
- 5) Повторить с 500 мкл сефадекса. Отбросить содержимое приёмника.
- 6) Добавить 200 мкл деионизованной воды на слой сефадекса. Подождать 1 мин. Центрифугировать 5 мин. при 900 об./мин. Отбросить содержимое приёмника.
- 7) Перенести колонки в новые 1,5 мл пробирки. Добавили ПЦР-продукт на слой сефадекса. Центрифугировать 5 мин. при 900 об./мин.
- 8) Полученную концентрацию измерить флуориметром Qubit 4.0 (Thermo, США).

2.2.6 Секвенирование полученных библиотек и биоинформатическая обработка

- 1) Провести таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Micro Kit (2x150).
- 2) Оценить качество прочтений с помощью FastQC v0.11.8, затем провести тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore.
- 3) Картировать прочтения на бисульфит-конвертированный таргетные последовательности с помощью инструмента bwa-meth v0.2.2 с параметрами по умолчанию.
- 4) Извлечь данные по метилированию в контексте CpG из полученных файлов BAM с помощью инструмента MethylDackel.
- 5) Репрезентировать результаты в виде уровня метилирования, представляющего собой отношение числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тиминов в каждом отдельном CpG сайте.

- 6) Вычислить средний уровень метилирования вдоль всей области интереса.

Статистический анализ был выполнен с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Ранговый критерий Манна-Уитни был использован для сравнения уровня метилирования между группами образцов. Отличия считались значимыми при $p < 0.05$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ye W. Preeclampsia is Associated with Decreased Methylation of the GNA12 Promoter / W. Ye [et al.] // *Ann Hum Genet.* – 2016. – №1. – P. 7-10.
2. Ling Y. Screening of serum biomarkers of preeclampsia by proteomics combination with bioinformatics / Y. Ling [et al.] // *Hypertens Pregnancy.* – 2019. – №38. – P. 184-192.
3. Ren Z. Distinct placental molecular processes associated with early-onset and late-onset preeclampsia / Z. Ren [et al.] // *Theranostics.* – 2021. – №11. – P. 5028-5044.
4. Абрамова М.Ю. Генетические маркеры тяжелого течения преэклампсии. Научные результаты биомедицинских исследований / М.Ю. Абрамова [и др.] // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2022. – №6. – С. 27-34.
5. Méhats C. Nouveaux regards sur la prééclampsie / C. Méhats [et al.] // *Med Sci (Paris).* – 2017. – № 33. – P. 1079-1088.
6. Blair J.D. Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset pre-eclampsia / J.D. Blair [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2013. – Vol. 19. – P. 697-708.
7. Anton L. Differential methylation of genes associated with cell adhesion in preeclamptic placentas / L. Anton // *PLoS One.* – 2014. – № 9. – P. e100148.
8. Ling Y. Screening of serum biomarkers of preeclampsia by proteomics combination with bioinformatics / Y. Ling [et al.] // *Hypertens Pregnancy.* – 2019. – № 38. – P. 184-192.
9. Khan W.N. The pregnancy-specific glycoprotein family of the immunoglobulin superfamily: identification of new members and estimation of family size / W.N. Khan [et al.] // *Genomics.* – 1992. – № 12. – P. 780-787.

10. Moore T. Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions / T. Moore [et al.] // *Int J Dev Biol.* – 2014. – № 58. – P. 273-80.
11. Sheen J. M. Prenatal dexamethasone-induced programmed hypertension and renal programming / J. M. Sheen [et al.] // *Life Sci.* – 2015. – № 132. – P. 41-48.
12. Natekar A. Elevated blood pressure: Our family's fault? The genetics of essential hypertension / A. Natekar [et al.] // *World J Cardiol.* – 2014. – № 6. – P. 327-337.
13. Gu Y. Aberrant pro-atrial natriuretic peptide/corin/natriuretic peptide receptor signaling is present in maternal vascular endothelium in preeclampsia / Y. Gu [et al.] // *Pregnancy Hypertens.* – 2018. – № 11. – P. 1-6.
14. Tain Y.L. Melatonin prevents maternal fructose intake-induced programmed hypertension in the offspring: roles of nitric oxide and arachidonic acid metabolites / Y.L. Tain [et al.] // *J Pineal Res.* – 2014. – № 57. – P. 80-89.
15. Nicole M. V. Onset and Regression of Pregnancy-Induced Cardiac Alterations in Gestationally Hypertensive Mice: The Role of the Natriuretic Peptide System / M. V. Nicole [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 2015. Vol. 93. – P. 1–8.
16. de Lima Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count / de Lima [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – № 10. – P. 19557.
17. Wang J. Immunoneutralization of endometrial monoclonal nonspecific suppressor factor beta (MNSFbeta) inhibits mouse embryo implantation in vivo / J. Wang [et al.] // *Mol Reprod Dev.* – 2007. – № 74. – P. 1419-1427.

18. Garg R. Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression / R. Garg [et al.] // *Peptides*. – 2005. – № 26. – P. 1009-1023.
19. Pereira N.L. Natriuretic peptide receptor-3 gene (NPR3): nonsynonymous polymorphism results in significant reduction in protein expression because of accelerated degradation / N.L. Pereira [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet*. – 2013. – № 6. – P. 201-210.
20. Gilmore R. C. Using PAC nested deletions to order contigs and microsatellite markers at the high repetitive sequence containing Npr3 gene locus / R. C. Gilmore [et al.] // *Gene*. – 2001. – № 275. – P. 65-72.
21. Rubattu S. Association of a single nucleotide polymorphism of the NPR3 gene promoter with early onset ischemic stroke in an Italian cohort / S. Rubattu [et al.] // *Eur J Intern Med*. – 2013. – № 24. – P. 80-2.
22. Venkatesan B. Transient silencing of Npr3 gene expression improved the circulatory levels of atrial natriuretic peptides and attenuated β -adrenoceptor activation- induced cardiac hypertrophic growth in experimental rats / B. Venkatesan [et al.] // *Eur J Pharmacol*. – 2016. – № 782. – P. 44-58.
23. Wang A. Associations of B-Type Natriuretic Peptide and Its Coding Gene Promoter Methylation With Functional Outcome of Acute Ischemic Stroke: A Mediation Analysis / A. Wang [et al.] // *J Am Heart Assoc*. – 2020. – № 9. – P. e017499.
24. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin / M. Nakao // *Gene*. – 2001. – № 278. – P. 25-31.
25. Allis C.D. Epigenetics / C.D. Allis [et al.] // – 2007. – P. 342-353.
26. Robinson W.P. The human placental methylome / W.P. Robinson [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2015. – №5. – P. a023044.

27. Messerschmidt D.M. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos / D.M. Messerschmidt [et al.] // *Genes Dev.* – 2014. – № 28. – P. 812-828.
28. Zhu P. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos / P. Zhu [et al.] // *Nat Genet.* – 2018. – № 50. – P. 12–19.
29. Soares M.J. Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling during the establishment of pregnancy / M.J. Soares [et al.] // *Int J Dev Biol.* – 2014. – № 58. – P. 247-259.
30. Brosens I. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes / I. Brosens [et al.] // *Am J Obstet Gynecol.* – 2019. – № 221. – P. 437-456.
31. Bai Q. Dissecting the first transcriptional divergence during human embryonic development / Q. Bai [et al.] // *Stem Cell Rev Rep.* – 2012. – № 1. – P.150-162.
32. Albrecht E.D. Regulation of Uterine Spiral Artery Remodeling: a Review / E.D. Albrecht // *Reprod Sci.* – 2020. – №10. – P. 1932-1942.
33. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling / Y. Sato // *Mol Cell Endocrinol.* – 2020. – № 503. – P.110699.
34. Сормачева И.Д. Эволюция и распространение мобильных генетических элементов в геномах представителей отряда *Lepidoptera* / И.Д. Сормачева [и др.] // Диссертация. – 2014. – С.8-10.
35. Lander E.S. Initial sequencing and analysis of the human genome / E.S. Lander [et al.] // *Nature.* – 2001. – № 409. – P. 860–921.
36. Sekar A. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4 / A. Sekar [et al.] // *Nature.* – 2016. – № 530. – P.177–183.
37. Rodić N. Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers / N. Rodić [et al.] // *Am J Pathol.* – 2014. – № 184. – P.1280–1286.

38. Kassiotis G. Endogenous retroviruses and the development of cancer / G. Kassiotis [et al.] // J Immunol. – 2014. – №192. – P. 1343–1349.
39. Chuong E.B. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits / E.B. Chuong [et al.] // Nat Rev Genet. – 2017. – №18. – P. 71-86.
40. Gasior S.L. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks / S.L. Gasior [et al.] // J Mol Biol. – 2006. – №357. – P. 1383-1393.
41. Kohlrausch F.B. Control of LINE-1 Expression Maintains Genome Integrity in Germline and Early Embryo Development / Kohlrausch F.B. [et al.] // Reprod. Sci. – 2022. – № 29. – P. 328–340.
42. Lou C. A potential new mechanism for pregnancy loss: considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage / C. A. Lou [et al.] // Reprod Biol Endocrinol. – 2020. – №18. – P.6.
43. Vlahos A. Human placental methylome in the interplay of adverse placental health, environmental exposure, and pregnancy outcome / A. Vlahos [et al.] // PLoS Genet. – 2019. – №15. – e1008236.
44. Kerkel K. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21 / K. Kerkel [et al.] // PLoS Genet. 2010, – №11. – e1001212.
45. Tolmacheva E.N. Epigenetic effects of trisomy 16 in human placenta / E.N. Tolmacheva [et al.] // Molecular Biology. – 2013. – №47. – P. 373-381
46. Васильев С.А. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека / С.А. Васильев [и др.] // Молекулярная биология. – 2015. - №1. - С. 165-174.
47. Hassold T. Trisomy in humans: incidence, origin and etiology / T. Hassold, P.A. Hunt, S. Sherman / T. Hassold [et al.] // Curr Opin Genet Dev. – 1993. – № 3. – P. 398-403.

СПРАВКА

Томский Государственный Университет

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Даркова Яна Андреевна
Самоцитирование
рассчитано для: Даркова Яна Андреевна
Название работы: ВКР Даркова ЯА 011902 Г
Тип работы: Не указано
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	6.55%	СОВПАДЕНИЯ	6.55%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	93.45%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	93.45%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 12.06.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 12.06.2023 09:37

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.4-49
Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Переводные заимствования издательства Wiley ; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразирования по коллекции

Работу проверил: Большакова Наталия Павловна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.

Директору Биологического института,
д-ру биол. наук Д.С. Воробьеву,
от рук. лаб. инструментальной геномики
НИИ медицинской генетики
Томского НИМЦ, д.б.н.
Васильева С.А.

Выпускная квалификационная работа «Биоинформатический анализ профиля метилирования в промоторах генов, ассоциированных с нарушением ремоделирования спиральных артерий при преэклампсии, при ранней эмбриональной гибели у человека» студентки 4 курса БИ кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Дарковой Я.А., выполненная на базе НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН в лаборатории инструментальной геномики, содержит в себе сведения, представляющие интеллектуальную собственность НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН, в связи с чем текст ВКР не может быть опубликован в репозитории целиком. Прошу разрешить размещение текста ВКР в репозитории с изъятием раздела «Результаты и обсуждение».

«02» июня 2023 года


Подпись _____ Васильев С.А.

Директор института


Подпись _____ Воробьев Д.С.