

СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1 ПРИ ХРОМОСОМНОМ МОЗАИЦИЗМЕ НА РАННИХ СТАДИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2015 г. С. А. Васильев^{1, 2*}, Е. Н. Толмачёва¹, А. А. Кашеварова^{1, 2},
Е. А. Саженова¹, И. Н. Лебедев^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск, 634050

²Лаборатория онтогенетики человека, Национальный исследовательский
Томский государственный университет, Томск, 634050

Поступила в редакцию 23.05.2014 г.

Принята к печати 30.06.2014 г.

Ранние этапы эмбрионального развития человека характеризуются пространственно-временным совпадением событий тотального эпигенетического репрограммирования генома с возрастанием частоты мозаичных форм числовых хромосомных нарушений. Можно предположить, что аномалии этого процесса в различных областях генома приводят к нарушениям локальной организации хроматина и экспрессии генов, что нарушает также правильную сегрегацию хромосом в митозе. Мы сравнивали индексы метилирования ретротранспозона LINE-1, характеризующие профиль метилирования генома, в плацентарных тканях спонтанных абортусов человека с чистыми и мозаичными формами анеуплоидий, с нормальным кариотипом, а также индуцированных абортусов первого триместра беременности в качестве контроля. Впервые показано, что, по сравнению с другими изученными группами, во внезародышевой мезодерме и цитотрофобласте хориона спонтанных абортусов с хромосомным мозаицизмом индекс метилирования LINE-1 максимален. В то же время у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом метилирование мобильного генетического элемента существенно понижено. Высказана гипотеза, что нарушения в процессе деметилирования родительских геномов при эпигенетическом репрограммировании на предимплантационных этапах развития могут быть связаны с повышением частоты ошибок митотической сегрегации хромосом, что приводит к формированию мозаичного кариотипа.

Ключевые слова: LINE-1, анеуплоидия, хромосомный мозаицизм, эпигенетическое репрограммирование генома.

METHYLATION STATUS OF LINE-1 RETROTRANSPOSON IN CHROMOSOMAL MOSAICISM DURING THE EARLY STAGES OF HUMAN EMBRYONIC DEVELOPMENT, by S. A. Vasilyev^{1,2*}, E. N. Tolmacheva¹, A. A. Kashevarova^{1,2}, E. A. Sazhenova¹, I. N. Lebedev^{1,2} (¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia; *e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru; ²Laboratory of Human Ontogenetics, National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia). Early stages of human embryonic development are characterized by spatio-temporal coincidence of events of total epigenetic genome reprogramming and elevated level of mosaic forms of numerical chromosome abnormalities. It is possible that the abnormal reprogramming of various regions of the genome can lead to violations of local epigenetic chromatin organization and gene expression, affecting the correct chromosome segregation during mitosis. In this study, a comparative analysis of the methylation index of LINE-1 retrotransposon, which is largely reflecting the methylation profile of the genome, is performed in placental tissues of spontaneous abortions with complete and mosaic forms of aneuploidy, and with a normal karyotype, as well as in the control group of induced abortions of the first trimester of pregnancy. It was shown that extraembryonic mesoderm and chorionic cytotrophoblast of spontaneous abortions with chromosomal mosaicism are characterized by the highest index of LINE-1 methylation among all groups studied. At the same time excessive hypomethylation of transposable genetic element recorded in spontaneous abortions with normal karyotype. It is suggested that violations of parental genomes demethylation during epigenetic reprogramming at preimplantation stages of development may be associated with an increased frequency of mitotic errors in chromosome segregation, leading to the formation of a mosaic karyotype.

Keywords: LINE-1, aneuploidy, chromosomal mosaicism, epigenetic genome reprogramming.

DOI: 10.7868/S0026898414060196

Принятые сокращения: ВМ – внезародышевая мезодерма; ЦТ – цитотрофобласт.

* Эл. почта: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Метилирование ДНК – крайне динамичный процесс в течение всего эмбриогенеза млекопитающих. Программа индивидуального развития запускается общим эпигенетическим репрограммированием генома зиготы, назначение которого – индукция плюрипотентности бластомеров, после чего устанавливаются тканеспецифичные профили генной экспрессии. Отцовский геном гиперметилирован в сперматозоидах, тогда как ооциты, по сравнению с ними, метилированы меньше. Особенно ярко эти различия между гаметами проявляются в уровне метилирования таких диспергированных повторов как LINE-1 [1]. На предимплантационной стадии отцовский геном активно теряет 5-метилцитозин, расположенный преимущественно в повторяющихся последовательностях, после чего происходит пассивное деметилирование обоих родительских геномов, которое достигает наиболее низкого уровня на стадии бластоцисты. После имплантации происходит реметилирование ДНК и устанавливается тканеспецифичный профиль метилирования генома [1]. Ошибки эпигенетического репрограммирования могут приводить к нарушениям программы индивидуального развития и внутриутробной гибели эмбриона.

Следует отметить, что в этот же временной период на этапе предимплантационного развития стремительно увеличивается частота хромосомного мозаицизма, являющегося следствием митотических ошибок при сегрегации хромосом. Около 80% ранних эмбрионов человека, полученных при оплодотворении *in vitro*, содержат анеуплоидные бластомеры, несмотря на то, что большинство (87.5%) зигот в этих же условиях имеют нормальный кариотип [2]. Примечательно, что возникновение мозаицизма совпадает по времени с тотальным деметилированием генома, которое может приводить к временной дестабилизации хроматина. Такое пространственно-временное совпадение цитогенетических и эпигенетических процессов поднимает вопрос об их взаимосвязи, два аспекта этой проблемы могут быть рассмотрены теоретически. С одной стороны, хромосомные мутации, возникающие в соматических клетках на самых первых делениях дробления, могут быть результатом ошибок эпигенетического репрограммирования генома, которые затрагивают, в том числе, и гены, ответственные за контроль сегрегации хромосом в митозе. С другой стороны, хромосомные аномалии мейотического происхождения, имеющиеся в зиготе, при активации эмбрионального генома могут вызывать масштабные нарушения его эпигенетического репрограммирования и приводить ко множественным изменениям экспрессии генов, что нарушает нормальное течение онтогенеза.

В пользу первого механизма свидетельствуют полученные нами ранее данные о том, что частота абберрантного метилирования некоторых генов

контроля клеточного цикла у эмбрионов с анеуплоидным кариотипом повышается [3, 4]. При этом у 4.7 % зародышей с хромосомным мозаицизмом эпимутации генов *P14ARF* и *RBI* предшествуют возникновению мозаичного кариотипа [5]. В пользу второго механизма свидетельствует тот факт, что во внезародышевых тканях спонтанных абортусов I-го триместра беременности с трисомией по хромосоме 16, которая в внутриутробно погибших эмбрионов практически всегда есть следствие ошибок мейоза I у матери, наблюдаются смещение времени равновероятной инактивации X-хромосомы и значительные отличия в профиле метилирования в CpG-сайтах, расположенных в промоторах генов [6, 7]. Сходные процессы протекают и в плацентарных тканях плодов с ограниченным плацентарным мозаицизмом по трисомии 16 [8]. Однако остается неясным, затрагивают ли эти отклонения – при нарушении нормального эпигенетического репрограммирования – только отдельные гены, или они маркируют более существенные изменения профиля метилирования генома, которые и являются причиной или следствием анеуплоидии. Такие системные нарушения эпигенетического профиля генома отражает индекс метилирования ретротранспозона LINE-1, часто используемый в качестве показателя глобального уровня метилирования генома [9, 10]. Кроме того, точность метилирования LINE-1 – условие реализации его регуляторных функций в эмбриональном развитии как на стадии дробления [11], так и при дифференцировке внезародышевых тканей [12-14].

Цель настоящей работы – изучение взаимосвязи между индексом метилирования ретротранспозона LINE-1 и числовыми хромосомными нарушениями во внезародышевых тканях у спонтанных абортусов I-го триместра беременности с полной или мозаичной формами анеуплоидии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал. Объект исследования – плацентарные ткани из 51 спонтанного абортуса и 18 индуцированных абортусов, составивших контрольную группу. Спонтанные абортусы получены от женщин с клиническим диагнозом неразвивающаяся беременность, или анэмбриония, поставленным по результатам динамического ультразвукового исследования. Индуцированные абортусы получены от здоровых женщин, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Продолжительность внутриутробного развития зародышей, определенная по дате последней менструации у спонтанных абортусов – 9.6 ± 2.5 недели, а у индуцированных – 9.0 ± 2.0 недели, что статистически неразлично в сравниваемых группах ($p = 0.24$). Данные о гестационном возрасте, определенном

```

1  gggggaggag ccaagatggc cgaataggaa cagctccggg ctacagctcc cagcgtgagg
61  gacgcagaag acgggtgatt tctgcatatt catctgaggt accgggttca tctcactagg
121 gagtgccaga cagtggggcg aggcactgt gtgcgcgcac cgtgcgcgag ccgaagcagg
181 gcgaggcatt gcctcacctg ggaagcgcaa ggggtcaggg agttcccttt ccgagtcaaa
241 gaaaggggtg acggacgcac ctggaaaatc gggtcactcc caccogaata ttgctctttt
301 cagaccggct taagaaaggg cgccaccaga gactatatcc cacacctggc tcagagggtc
361 ctacgcccac ggaatctcgc tgattgctag cacagcagtc tgagatcaaa ctgcaaggcg
421 gcaacgaggg tgggggaggg gcgcccggca ttgcccaggc ttgcttaggt aaacaaagca
481 gccgggaagc tcgaactggg tggagcccac cacagctcaa ggaggcctac ctgcctctgt
541 aggctccacc tctgggggca gggcacagac aaacaaaaag acagcagtaa cctctgcaga
601 cttaagtgtc cctgtctgac agctttgaag agagcagtggt ttctcccagc acgcagctgg
661 agatctgaga acgggcagac tgcctcctca agtgggtccc tgaccctga cccccgagca
721 gcctaactgg gaggcacccc ccagcagggc acaactgacac ctcacacggc agggatttcc
781 aacagacctg cagctgaggg tcctgtctgt tagaaggaaa actaacaacc agaaaggaca
841 tctacacgaa aacccactctg tacatcacca tcatcaaaaga ccaaaagtag ataaaaccc
901 aaagatgggg aaaaaacaga acagaaaaac tggaaactct aaaaacgcaga ggccctctcc
961 tcctccaaag gaacgcagtt cctcaccagc aacagaacaa agctggatgg agaattgatt
1021 tgacgagctg agagaagaag gcttcagacg atcaaatcac tctgagctac agggagacat
1081 tcaaaccaaa ggcaagaag ttgaaaactt tgaaaaaat ttagaagaat gtataactag
1141 aataacc

```

Рис. 1. Последовательность ДНК ретротранспозона LINE-1 (RefSeq X58075.1). Изучаемая последовательность в промоторном регионе отмечена рамкой, анализируемые CpG-сайты выделены серым цветом.

по данным ультразвукового исследования, имелись только для части спонтанных абортусов ($n = 29$, 7.4 ± 1.4 недели). Разность между гестационным и менструальным возрастом, отражающая задержку развития эмбриона и время, прошедшее с момента его гибели до момента получения биологического материала, составляет в группе спонтанных абортусов 2.8 ± 2.0 недели.

Анализировали две ткани — цитотрофобласт хориона (ЦТ) и внезародышевую (extraembryonic) мезодерму (ВМ), которые представляют собой производные трофэктодермы и эпибласта внутренней клеточной массы соответственно и имеют существенные отличия в характере метилирования генома [15]. Морфологически различающиеся ткани разделяли механически.

Цитогенетический анализ. Кариотип спонтанных абортусов культур клеток ВМ устанавливали при помощи стандартного метафазного анализа. Дополнительно проводили FISH-анализ, используя специфичные к центромерам ДНК-зонды на хромосомы, вовлеченные в анеуплоидию, для определения степени мозаицизма и межтканевого распределения клеток с анеуплоидным хромосомным набором. Для приготовления этих зондов использовали бактериальные клоны, содержащие плазмидные вставки центромерных фрагментов хромосом (любезно предоставлены М. Роччи, Институт генетики, г. Бари, Италия). Способы получения суспензий интерфазных ядер некультивированных клеток внезародышевых тканей и проведения интерфазного FISH-анализа описаны ранее [16].

Анализ метилирования LINE-1. Геномную ДНК выделяли из нативных (некультивированных) клеток (после механического разделения тканей зародыша) и обрабатывали протеиназой К в течение 16 ч. при 37°C с последующей очисткой ДНК смесью фенола и хлороформа. Бисульфитную конвер-

сию ДНК проводили с помощью набора EZ DNA methylation Direct Kit (“Zymo Research”, США), согласно протоколу производителя.

Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 определяли путем пиросеквенирования с использованием набора PyroMark Q24 CpG LINE-1 (“Qiagen”, Германия) согласно протоколу производителя. Пробы для ПЦР содержали однократный буфер, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM каждого dNTP, 1 мкл прямого и обратного праймера (10 пикомоль каждого праймера), $2 \text{ ед. HotStart Taq-полимеразы}$ (“Qiagen”) и 1 мкл ДНК (после бисульфитной конверсии) в общем объеме 25 мкл . Условия ПЦР: начальная денатурация при 95°C в течение 15 мин ; следующие 45 циклов: $95^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$, $50^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$, $72^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$; конечная элонгация — 72°C в течение 5 мин . Размер ПЦР-продукта — 149 п.н. Биотинилированный ПЦР-продукт очищали и иммобилизовали одноцепочечную ДНК, как рекомендовано производителем. Затем в каждый образец добавляли 0.3 микромоль пиросеквенирующего праймера и проводили реакцию с помощью пиросеквенатора PyroMark Q24 (“Qiagen”). Индекс метилирования рассчитывали как отношение метилированного цитозина к сумме метилированных и неметилированных цитозинов, используя программное обеспечение PyroMark Q24, в трех CpG-сайтах промоторного региона LINE-1 (рис. 1).

Статистический анализ. Сравнивали индексы метилирования LINE-1 в группах эмбрионов при помощи рангового критерия Манна–Уитни. Зависимость между индексом метилирования LINE-1 и продолжительностью внутриутробного развития определяли, применяя непараметрический критерий Спирмена. Для оценки прогностической значимости проводили ROC-анализ. Статистические

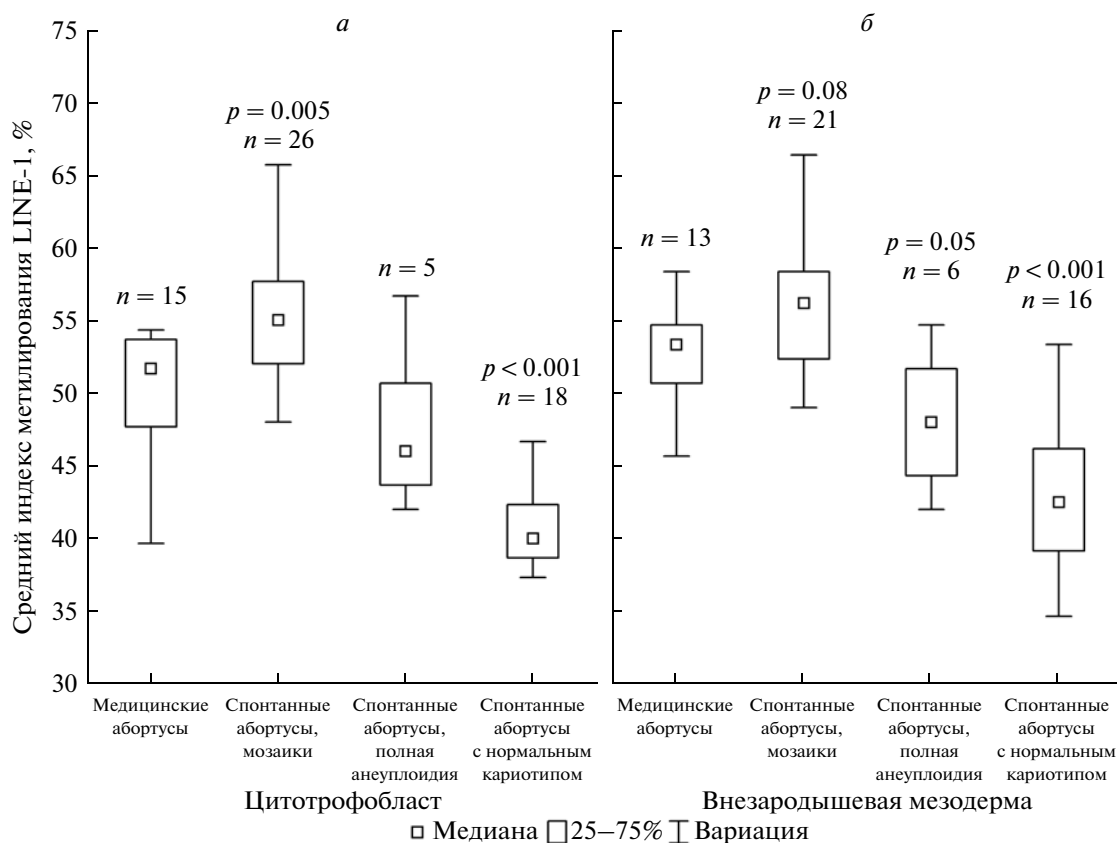


Рис. 2. Индекс метилирования LINE-1 в цитотрофобласте хориона (а) и внезародышевой мезодерме (б) индуцированных абортусов, спонтанных абортусов с мозаичной и полной формами анеуплоидии по различным хромосомам и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом.

процедуры выполняли, используя программное обеспечение Statistica 8.0 (Statsoft).

Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ “НИИ медицинской генетики” СО РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стандартный цитогенетический анализ 34 спонтанных абортусов выявляет трисомию хромосом 2, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 20, 21, 22, дисомию Y-хромосомы и моносомию хромосомы 13; во всех них далее определяли содержание (в процентах) анеуплоидного клона с помощью FISH-анализа для разделения чистых и мозаичных форм анеуплоидии (таблица). Согласно данным FISH-анализа, доля анеуплоидных клеток у абортусов варьирует от 3 до 98% в ЦТ и от 0 до 100% — в ВМ. Учитывая возможность перекрытия сигналов, специфичных к центромере ДНК-зондов при FISH-анализе, кариотип считали мозаичным, если доля анеуплоидного клона составляет менее 90%. В результате составлены подгруппы спонтанных абортусов с полной и мозаичной формами анеуплоидии (27 и 7 эмбрионов соответственно)

(таблица); 17 абортусов имеют нормальный кариотип.

Индексы метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе LINE-1 статистически значимо не отличаются в группах абортусов и хорошо коррелируют друг с другом. Поэтому далее мы использовали среднее значение индекса метилирования трех сайтов. Ни в одной из исследованных групп не выявлено различий в индексах метилирования между ЦТ и ВМ.

Индекс метилирования LINE-1 в ЦТ и ВМ не отличается также в группах спонтанных абортусов с полной формой анеуплоидии ($47.80 \pm 5.93\%$ и $48.11 \pm 4.67\%$ соответственно) и индуцированных абортусов ($51.84 \pm 6.92\%$ и $52.72 \pm 3.75\%$ соответственно) (рис. 2). В группе спонтанных абортусов с мозаичной формой анеуплоидии индекс метилирования LINE-1 несколько выше, чем у индуцированных — как в ЦТ ($56.54 \pm 5.70\%$), так и в ВМ ($56.56 \pm 5.81\%$), однако эти различия статистически значимы только в ЦТ ($p = 0.005$) (рис. 2). Наиболее неожиданно было то, что статистически значимым оказался и более низкий индекс метилирования LINE-1 в ЦТ и ВМ в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом

Кариотип и средний индекс метилирования LINE-1 (%) по трем CpG-сайтам в тканях спонтанных абортусов первого триместра с анеуплоидией по различным хромосомам

№	Цитотрофобласт		Внезародышевая мезодерма		Группа
	Кариотип	LINE-1	Кариотип	LINE-1	
1	47,XYY/46,XY (7:93)	н/о	46,XY (100)	65.67	СА М
2	47,+16/46 (75:25)	н/о	47,+16/46 (67:33)	65.33	СА М
3	н/о	76.00	45,XX,-13/46,XX (19:81)	н/о	СА М
4	47,XY,+16/46,XY (82:18)	71.00	47,XY,+16*	68.33	СА М
5	47,XX,+2/46,XX (87:13)	53.00	47,XX,+2*	54.67	СА М
6	47,XX,+15/46,XX (64:36)	54.33	47,XX,+15*	53.33	СА М
7	45,XX,-16/47,XX,+16/46,XX (10:8:82)	55.00	н/о	49.67	СА М
8	47,XY,+22/46,XY (57:43)	65.67	47,XY,+22*	50.33	СА М
9	47,XX,+13/46,XX (58:42)	56.67	47,XX,+13/46,XX (67:33)	54.67	СА М
10	47,XY,+2/46,XY (32:68)	67.00	47,XY,+2*	66.33	СА М
11	47,XY,+8/46,XY (87:13)	56.67	47,XY,+8*	58.00	СА М
12	47,XX,+16/46,XX (40:60)	51.67	47,XX,+16/46,XX (83:17)	58.33	СА М
13	47,XY,+16/46,XY (67:33)	54.33	47,XY,+16/46,XY (82:18)	49.00	СА М
14	47,XX,+7/46,XX (99:1)	н/о	47,XX,+7/46,XX [4:1]*	47.00	СА П
15	47,XX,+7/46,XX (98:2)	43.67	47,XX,+7 [4]*	н/о	СА П
16	47,XX,+2/46,XX (98:2)	н/о	47,XX,+2 [2]*	42.00	СА П
17	47,XX,+16/46,XX (52:48)	52.00	47,XX,+16/46,XX (65:35)	55.33	СА М
18	47,XX,+10/46,XX (18:82)	54.00	47,XX,+10/46,XX (30:70)	52.33	СА М
19	45,XY,-15/46,XY (18:82)	48.67	46,XY (100)	57.33	СА М
20	47,XX,+16/46,XX (98:2)	42.00	47,XX,+16/46,XX (98:2)	49.00	СА П
21	47,XX,+9/46,XX (72:28)	48.00	47,XX,+9/46,XX (60:40)	57.00	СА М
22	47,XY,+7/46,XY (3:97)	63.67	46,XY (100)	57.33	СА М
23	47,XX,+8/46,XX (3:97)	57.67	46,XX (100)	61.67	СА М
24	47,XYY/46,XY (68:32)	53.33	47,XYY (100)	57.00	СА М
25	47,+16/46 (87:13)	57.33	47,+16 [2]*	н/о	СА М
26	47,XY,+21/46,XY (74:26)	50.67	47,XY,+21/46,XY (80:20)	49.33	СА М
27	47,XY,+16/46,XY (24:76)	57.00	47,XY,+16/46,XY (5:95)	н/о	СА М
28	н/о	56.67	47,XY,+16/46,XY (92:8)	54.67	СА П
29	47,XX,+20/46,XX (85:15)	52.00	47,XX,+20 [12]*	н/о	СА М
30	47,XX,+16/46,XX (74:26)	57.67	47,XX,+16/46,XX (81:19)	55.67	СА М
31	47,XX,+16/46,XX (81:19)	51.00	47,XX,+16 [8]*	н/о	СА М
32	47,XY,+20/46,XY (92:18)	50.67	47,XY,+20/46,XY (92:18)	51.67	СА П
33	н/о	51.67	47,XY,+20/46,XY (80:20)	50.67	СА М
34	47,XX,+16/46,XX (92:8)	46.00	47,XX,+16 [7]*	44.33	СА П

В круглых скобках указаны доли клонов с различным кариотипом по результатам FISH-анализа; в квадратных скобках указано число метафазных клеток, на основе которых определен кариотип в стандартном цитогенетическом анализе; * – кариотип определен только по результатам стандартного цитогенетического анализа; н/о – анализ не проводили; СА М – спонтанные абортусы с мозаичной формой анеуплоидии; СА П – спонтанные абортусы с полной формой анеуплоидии. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 определяли в трех CpG-сайтах.

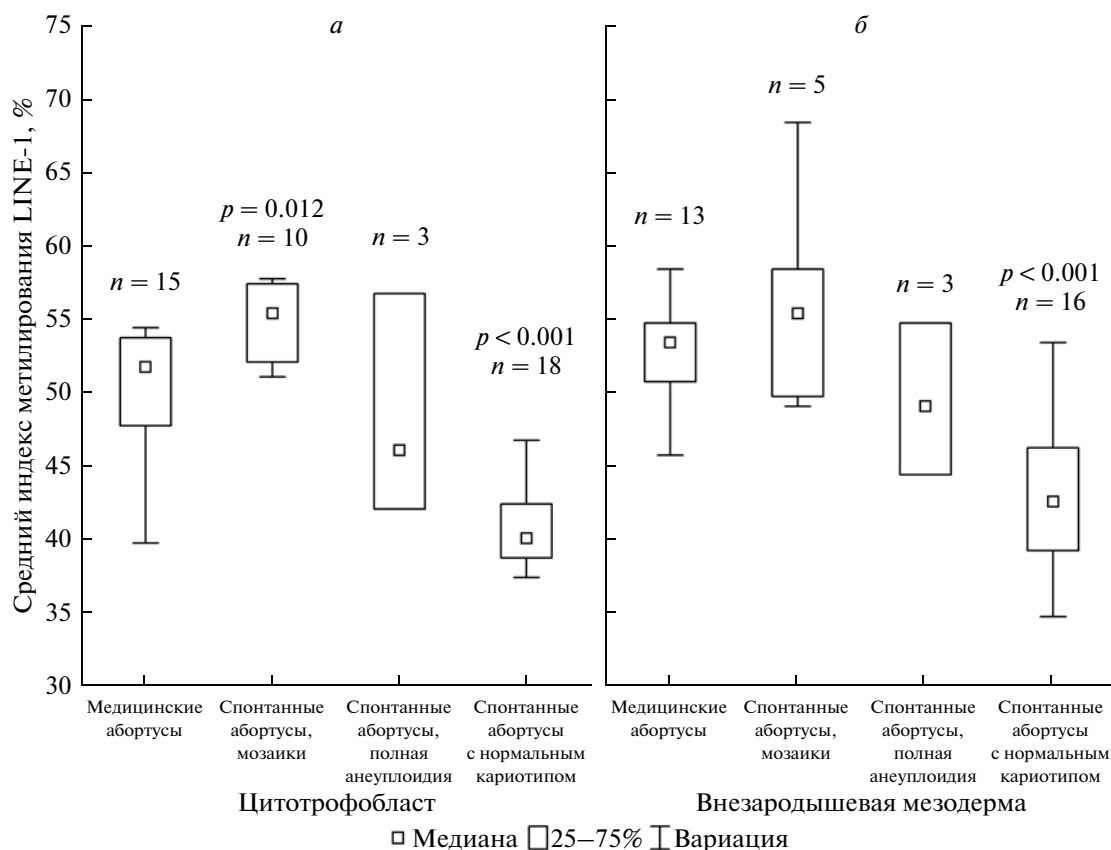


Рис. 3. Индекс метилирования LINE-1 в цитотрофобласте хориона (а) и внезародышевой мезодерме (б) индуцированных абортусов, спонтанных абортусов с мозаичной и полной формами трисомии 16 и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом.

($40.91 \pm 3.38\%$ и $43.38 \pm 6.17\%$ соответственно), чем в группе индуцированных абортусов ($p < 0.001$).

Следует отметить, что спонтанные абортусы с чистыми и мозаичными формами числовых хромосомных нарушений имеют анеуплоидии по разным хромосомам, и соответственно обнаруженные различия могли быть обусловлены дисбалансом по числу копий разных хромосом в сравниваемых подгруппах. Чтобы исключить влияние этого фактора, сравнили индекс метилирования LINE-1 в обеих внезародышевых тканях только эмбрионов, обладающих самой частой анеуплоидией в I-ом триместре беременности – трисомией хромосомы 16 (рис. 3). В этом случае индекс метилирования LINE-1 оказался также статистически значимо выше в ЦТ эмбрионов с мозаичной формой трисомии 16 ($56.27 \pm 5.71\%$), чем в индуцированных абортусах ($51.84 \pm 6.92\%$) ($p = 0.012$). Кроме того, более высокий индекс метилирования LINE-1 (по сравнению с индуцированными абортусами) статистически значимо сохраняется и в группе спонтанных абортусов с мозаичной формой любой другой анеуплоидии, за исключением трисомии 16 ($p = 0.038$, данные не представ-

лены). Таким образом, обнаруженные нами различия не связаны с неравномерностью распределения анеуплоидии по разным хромосомам в подгруппах эмбрионов с мозаичными и полными формами числовых хромосомных нарушений, а также и с тем, что для спонтанных абортусов исходно характерна преимущественно трисомия 16.

Продолжительность внутриутробного развития эмбрионов, в принципе, могла бы влиять на профиль метилирования ДНК внезародышевых тканей на стадии формирования плаценты. С другой стороны, метилирование ДНК является динамичным маркером и, теоретически, может изменяться после остановки развития самого зародыша, отражая адаптационные способности плацентарных тканей, относительно автономное развитие которых продолжается в этих условиях (неразвивающаяся беременность или анэмбриония). Поэтому мы исследовали, имеется ли корреляция между индексом метилирования LINE-1 и возрастом эмбрионов, определенным по дате последней менструации, а также возрастом, определенным по данным ультразвукового исследования. Оказалось, что в обоих случаях никакого (статистически значимого) взаимовлияния не на-

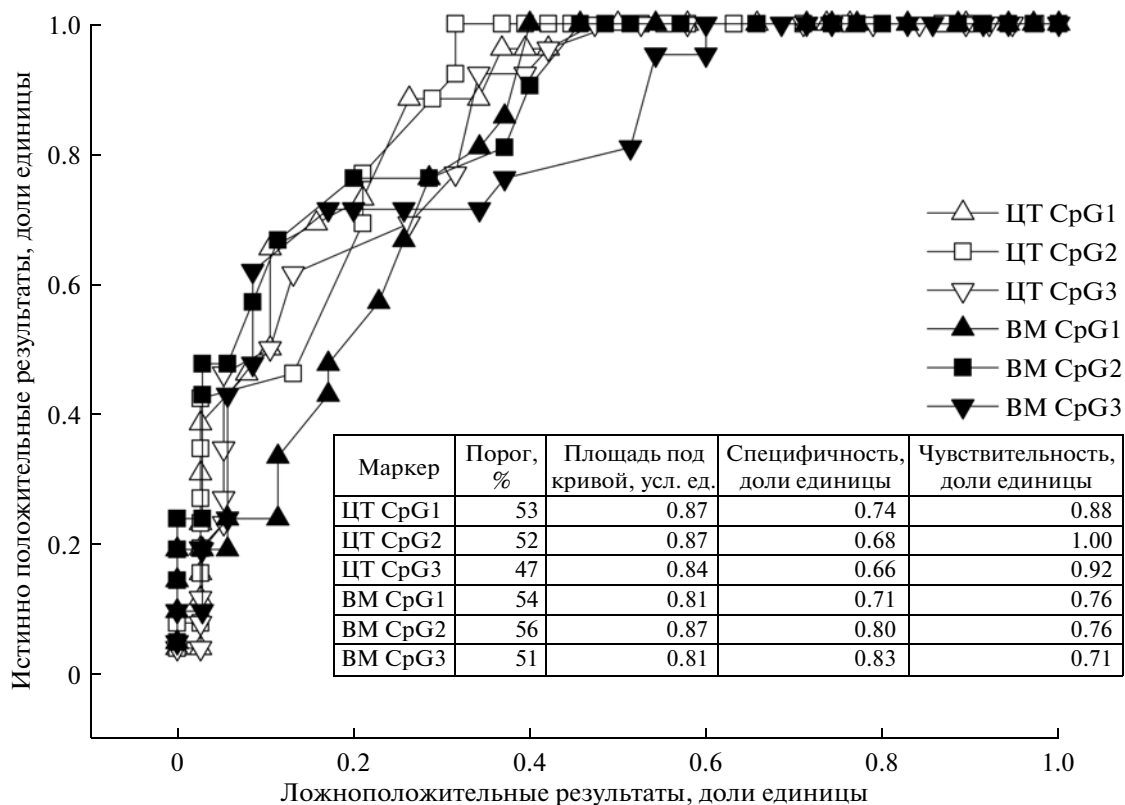


Рис. 4. Результаты ROC-анализа по оценке возможности использования индекса метилирования LINE-1 для определения эмбрионов с мозаичной формой анеуплоидии. На рисунке представлена зависимость истинно положительных результатов от ложноположительных при использовании пороговых значений индексов метилирования трех CpG-сайтов в промоторе LINE-1 (CpG1-3) в цитотрофобласте хориона (ЦТ) и внезародышевой мезодерме (BM) для выявления спонтанных абортусов с мозаичной формой анеуплоидии. Приведены чувствительность и специфичность отдельных маркеров, а также площадь под кривой, характеризующая прогностическую эффективность маркера.

блюдается. Кроме того, не наблюдается и значимой корреляции между индексом метилирования LINE-1 и разностью между возрастом эмбрионов, определенным по дате последней менструации, и возрастом, определенным по данным ультразвукового исследования. Этот показатель отражает задержку развития эмбриона и время, прошедшее с момента его гибели до момента получения биологического материала для исследования. Иными словами, задержка эмбриона в полости матки после остановки развития не оказывает заметного влияния на регистрируемый уровень метилирования генома (по крайней мере, по результатам оценки индекса метилирования LINE-1). Это характерно как для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, так и для внутриутробно погибших эмбрионов с чистыми и мозаичными формами анеуплоидий.

ROC-анализ всех спонтанных и индуцированных абортусов показывает, что индекс метилирования трех CpG-динуклеотидов во BM и ЦТ обладает высокой прогностической значимостью для выявления эмбрионов с мозаичным анеуплоидным кариотипом (площадь под кри-

вой (AUC) = 0.81–0.88, рис. 4). При этом наиболее чувствительным маркером оказался индекс метилирования второго CpG-динуклеотида в промоторе LINE-1 в ЦТ, позволяющий выявлять абсолютно все эмбрионы с мозаичной формой анеуплоидии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ошибки эпигенетического репрограммирования на самых начальных этапах индивидуального развития могут возникать в различных регионах генома, в том числе и в повторяющихся последовательностях. Из них мобильные элементы семейства LINE-1 являются наиболее распространенным автономным семейством, составляя около 17% генома человека [17]. Они способны размножаться в геноме при помощи механизма обратной транскрипции и оказывают существенное влияние на геном, главным образом за счет обратного встраивания в новые участки генома, для чего необходима экспрессия РНК LINE-1 и кодируемых ими белков. Повышение уровня экспрессии элементов LINE-1 сопровождается частичным демем-

тированием их промоторов [18]. В то же время активация этих мобильных элементов необходима для предимплантационного развития эмбриона. На это указывает, в частности, тот факт, что промоторные регионы ретротранспозона частично деметилированы как на стадии бластоцисты, так и во внезародышевых тканях мыши и человека [19]. Микроинъекции комплементарных к LINE-1 антисмысловых олигонуклеотидов в бластоцисты мыши тормозят транскрипцию ретротранспозона и приводят к необратимой остановке эмбрионального развития на стадии 2–4 бластомеров [11]. Эмбрионы остаются жизнеспособными, но прекращают деление, и в таких бластоцистах значительно меняется профиль экспрессии генов. Кроме того, подавление экспрессии LINE-1 приводит к нарушению хронологического порядка работы генов, участвующих в реализации программы развития на ранних этапах дробления [11].

ВМ и ЦТ хориона являются производными различных зародышевых листков (эпибласта, дифференцирующегося из внутренней клеточной массы, и трофэктодермы соответственно). Ранее нами обнаружено, что клетки ВМ эмбрионов I-го триместра беременности содержат больше гиперметилированных CpG-сайтов, расположенных в промоторах генов, чем клетки ЦТ [15]. Однако, напротив, как показано в этой работе, индекс метилирования LINE-1 в клетках ВМ и ЦТ во всех изученных группах эмбрионов, включая медицинских абортусов, не отличается. Это свидетельствует о том, что индекс метилирования LINE-1, по-видимому, или не изменяется, начиная от стадии дробления, на которой происходит разделение внутренней клеточной массы и трофэктодермы, или эти изменения носят равномерный и однонаправленный характер в обоих внезародышевых листках. Таким образом, полученные в настоящем и предыдущих наших исследованиях данные свидетельствуют о том, что тканеспецифичный рисунок метилирования ДНК определяется, в основном, характером метилирования промоторных регионов генов, а не особенностями эпигенетических модификаций высококопийных мобильных генетических элементов LINE-1.

Мы показали, что в плацентарных тканях спонтанных абортусов I-го триместра беременности с мозаичной формой анеуплоидии по различным хромосомам статистически значимо повышается индекс метилирования LINE-1, тогда как этот показатель в группе абортусов с полной формой анеуплоидии и в группе медицинских абортусов не отличается. Анеуплоидия в эмбриональных клетках может иметь как мейотическое, так и митотическое происхождение, но — независимо от происхождения геномной мутации — появление мозаичного варианта кариотипа всегда есть результат митотических ошибок, происходящих

на ранних этапах эмбриогенеза. Очевидно, что избыток/недостаток дозы генов, расположенных на одной из хромосом набора, в зиготе или хромосомный дисбаланс, возникающий на первых этапах дробления бластомеров, сами по себе могут изменять эпигенетический профиль генома и приводить к нарушению динамики процессов эпигенетического репрограммирования в раннем эмбриогенезе [20]. Известно, что на этот период предимплантационного развития приходится одна из волн эпигенетического репрограммирования генома, во время которой происходит “снятие” метилирования с родительских пронуклеусов. При этом отцовский геном подвергается активному деметилированию, затрагивающему, в основном, повторяющиеся последовательности, в том числе и LINE-1, тогда как в материнском геноме происходит пассивное деметилирование, которое касается последовательностей генов, кодирующих белки [1, 21].

Наблюдаемое нами повышение индекса метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов I-го триместра беременности с мозаичной формой анеуплоидии может являться как следствием, так и причиной возникновения мозаицизма на первых стадиях дробления. В первом случае анеуплоидия может приводить к нарушению формирования тканеспецифичного рисунка метилирования ДНК, в том числе и к повышению индекса метилирования LINE-1. Однако эта гипотеза не объясняет отсутствия различий в индексах метилирования LINE-1 разных внезародышевых тканей спонтанных абортусов. С другой стороны, нарушение пассивного и активного деметилирования родительских геномов в зиготе, что наблюдается у части эмбрионов с нормальным или анеуплоидным кариотипом зиготы, может быть связано с возникновением мозаицизма в ходе первых клеточных делений из-за недостаточной активности LINE-1, которая необходима для стадии дробления [11]. В пользу такого механизма свидетельствует тот факт, что максимальные значения индекса метилирования LINE-1 характерны для обеих изученных внезародышевых тканей спонтанных абортусов с хромосомным мозаицизмом. Кроме того, ошибки деметилирования в зиготе могут приводить и к нарушениям в эпигенетической регуляции генов, ответственных за сегрегацию хромосом и контроль клеточного цикла. Действительно, ранее мы показали, что во внезародышевых тканях у эмбрионов с мозаичными вариантами анеуплоидного кариотипа имеются эпимутации в некоторых генах контроля клеточного цикла, наиболее частые из которых — эпимутации гена *RB1* [22].

Таким образом, зафиксированное нами повышение индекса метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов I-го триместра беременности с мозаичной формой анеуплоидии является, по-

видимому, следствием нарушения деметилирования родительских геномов в зиготе, что приводит к подавлению активности LINE-1. В свою очередь, это может быть связано с возникновением хромосомного мозаицизма в ходе первых митотических делений. В то же время у эмбрионов с анеуплоидией мейотического происхождения — без нарушения деметилирования генома в зиготе — мозаицизм в ходе первых митотических делений, по-видимому, не возникает, и анеуплоидный кариотип сохраняется во всех клетках организма.

Наиболее неожиданный результат настоящего исследования — это то, что в обеих внезародышевых тканях группы спонтанных абортусов с нормальным кариотипом индекс метилирования LINE-1 понижается в равной степени. Эти факты указывают либо на раннее постзиготическое происхождение нарушения метилирования LINE-1 (до разделения трофэктодермы и внутренней клеточной массы), либо на отсутствие реметилирования повтора во ВМ и ЦТ хориона после имплантации. Понижение уровня метилирования LINE-1 может приводить к повышению не только уровня экспрессии РНК, но и частоты транспозиции мобильного генетического элемента, что увеличивает геномную нестабильность, которую можно наблюдать на других, не цитогенетических, уровнях организации генома, и которая приводит, по-видимому, к внутриутробной гибели эмбриона. Более того, увеличение копийности LINE-1 может, в свою очередь, обуславливать еще большее снижение индекса метилирования.

Другое вероятное объяснение — это нарушение поступления питательных веществ к эмбриону, в том числе фолиевой кислоты, которая служит основным источником метильных групп. Это нарушение также может приводить к глобальному снижению уровня метилирования всего генома, что мы наблюдаем в настоящей работе. Кроме того, потеря метилирования ДНК теоретически могла бы являться следствием реакции внезародышевых тканей на гибель эмбриона. Однако нами не обнаружено статистически значимой взаимосвязи между индексом метилирования LINE-1 и периодом времени, прошедшим с момента гибели эмбриона, что указывает на начало процесса гипометилирования LINE-1 еще до остановки внутриутробного развития.

Таким образом, нами впервые обнаружено, что низкий уровень деметилирования ретро-транспозона LINE-1 в зиготе, в принципе, может быть связан с возникновением хромосомного мозаицизма на ранних этапах эмбрионального развития человека. С другой стороны, спонтанные абортусы I-го триместра беременности с нормальным кариотипом также имеют аномалии в процессе метилирования LINE-1, что сопровождается, по-видимому, их внутриутробной гибелью.

Работа получила финансовую поддержку Российского Фонда Фундаментальных исследований (14-04-01003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith Z.D., Chan M.M., Mikkelsen T.S., Gu H., Gnirke A., Regev A., Meissner A. 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*. **484**, 339–344.
2. Vanneste E., Voet T., Le Caignec C., Ampe M., Konings P., Melotte C., Debrock S., Amyere M., Vikkula M., Schuit F., Fryns J.P., Verbeke G., D'Hooghe T., Moreau Y., Vermeesch J.R. 2009. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat. Med.* **15**, 577–583.
3. Кашеварова А.А., Толмачева Е.Н., Суханова Н.Н., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. 2009. Оценка статуса метилирования промоторного региона гена контроля клеточного цикла P14ARF в плацентарных тканях спонтанных абортусов с хромосомным мозаицизмом. *Генетика*. **45(6)**, 849–856.
4. Кашеварова А.А., Толмачёва Е.Н., Саженова Е.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. 2011. Эпигенетический статус генов регуляции клеточного цикла в плаценте эмбрионов человека с хромосомным мозаицизмом. *Молекуляр. биология*. **45**, 316–324.
5. Кашеварова А.А. 2010. Цитогенетическая характеристика и эпигенетические механизмы формирования хромосомного мозаицизма при нарушении эмбрионального развития человека. *Автореф. дисс. ... канд. биол. наук*. Томск.
6. Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Суханова Н.Н., Харьков В.Н., Лебедев И.Н. 2011. Асимметричная инактивация X-хромосомы у эмбрионов человека с мозаичной трисомией хромосомы 16. *Генетика*. **47**, 401–405.
7. Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Лебедев И.Н. 2013. Эпигенетические эффекты трисомии 16 в плацентарных тканях человека. *Молекуляр. биология*. **47**, 423–432.
8. Blair J.D., Langlois S., McFadden D.E., Robinson W.P. 2014. Overlapping DNA methylation profile between placentas with trisomy 16 and early-onset preeclampsia. *Placenta*. **35**, 216–222.
9. Bollati V., Baccarelli A., Hou L., Bonzini M., Fustinoni S., Cavallo D., Byun H.M., Jiang J., Marinelli B., Pesatori A.C., Bertazzi P.A., Yang A.S. 2007. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res.* **67**, 876–880.
10. Rusiecki J.A., Baccarelli A., Bollati V., Tarantini L., Moore L.E., Bonfeld-Jorgensen E.C. 2008. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ. Health Perspect.* **116**, 1547–1552.
11. Beraldi R., Pittoggi C., Sciamanna I., Mattei E., Spadafora C. 2006. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 279–287.
12. Tabano S., Colapietro P., Cetin I., Grati F.R., Zanutto S., Mandò C., Antonazzo P., Pileri P., Rossella F., Larizza L., Sirchia S.M., Miozzo M. 2010. Epigenetic modulation

- of the IGF2/H19 imprinted domain in human embryonic and extra-embryonic compartments and its possible role in fetal growth restriction. *Epigenetics*. **5**, 313–324.
13. Price E.M., Cotton A.M., Peñaherrera M.S., McFadden D.E., Kobor M.S., Robinson W. 2012. Different measures of “genome-wide” DNA methylation exhibit unique properties in placental and somatic tissues. *Epigenetics*. **7**, 652–663.
 14. Oda M., Oxley D., Dean W., Reik W. 2013. Regulation of lineage specific DNA hypomethylation in mouse trophoblast. *PLoS One*. **8**, e68846.
 15. Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Лебедев И.Н. 2011. Профиль метилирования ДНК в плацентарных тканях человека. *Молекуляр. биология*. **45**, 538–545.
 16. Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V., Sukhanova N.N., Nazarenko S.A. 2004. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 513–520.
 17. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Showkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordtsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglu S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrino A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y.J.; International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**, 860–921.
 18. Федоров А.В. 2008. Регуляция транскрипции ретротранспозонов LINE1 млекопитающих. *Цитология*. **50**, 1011–1022.
 19. Lane N., Dean W., Erhardt S., Hajkova P., Surani A., Walter J., Reik W. 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*. **35**, 88–93.
 20. Pendina A.A., Efimova O. A., Fedorova I.D., Leont'eva O.A., Shilnikova E.M., Lezhnina J.G., Kuznetzova T.V., Baranov V.S. 2010. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. *Cytogenetic Genome Res.* **132**, 1–7.
 21. Li E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 662–673.
 22. Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Суханова Н.Н., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. 2008. Эпигенетическая инактивация гена *Rb1* как фактор нестабильности генома: возможный вклад в этиологию хромосомного мозаицизма в эмбриональном периоде. *Генетика*. **44**, 1461–1467.