

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Национальный исследовательский Томский государственный университет
Томский государственный архитектурно-строительный университет
Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

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

24–27 апреля 2018 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and Fundamental Medicine

XV International Conference of students, graduate students
and young scientists

April 24–27, 2018

Томск 2018

**ИНДЕКС МЕТИЛИРОВАНИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ *GNAS* И *GRB10* ПРИ
НАРУШЕНИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА**А.А. Кадралиева¹Научный руководитель: к.б.н. Е.А. Саженова²¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 630090

E-mail: aly.kadralieva@gmail.com**METHYLATION INDEX OF IMPRINTED *GNAS* AND *GRB10* GENES IN ABNORMAL HUMAN
EMBRYO DEVELOPMENT**A.A. Kadralieva¹Scientific supervisor: E.A. Sazhenova, PhD²¹National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str. 36, 634050²Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of
Sciences, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki str. 10, 630090E-mail: aly.kadralieva@gmail.com

Abstract. *The present study analyzes the methylation index of the imprinted *GNAS* and *GRB10* genes in the group of the first trimester spontaneous abortions with normal karyotype. The DNA samples derived from extraembryonic mesoderm of 47 spontaneous abortions and 45 induced abortions were examined. A significant increase in the methylation index of the imprinted *GNAS* gene and a decrease in the *GRB10* in the spontaneous abortions were observed. Based on the function of this imprinted genes, it can be assumed that an increase in the methylation index of the *GNAS* gene and its decrease in the *GRB10* could enhance the suppression of embryo growth and lead to a possible disturbance of embryo development.*

Введение. Одной из актуальных проблем современного акушерства является невынашивание беременности, которая, по некоторым оценкам, охватывает примерно 25% супружеских пар репродуктивного возраста, при этом в структуре самопроизвольного прерывания неуклонно растет доля неразвивающейся беременности первого триместра [1].

«Размножение» человека контролируется как генетическими механизмами, так и эпигенетическими факторами регуляции генной экспрессии, одним из которых является геномный импринтинг – особый вид регуляции активности генов в зависимости от родителя, от которого данный ген получен. Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития и может оказывать влияние на степень экспрессии генов, контролирующих рост эмбриона, процессы пролиферации и дифференцировки клеток и другие процессы внутриутробного развития плода [2]. Механизмы импринтинга преимущественно связаны с дифференциальным метилированием промоторных регионов импринтированных генов и регуляторных последовательностей (центров

импринтинга), устанавливаемым строго специфичным образом в гаметогенезе и поддерживаемым в соматических клетках на протяжении всего онтогенеза [3].

Нарушение дифференциального метилирования импринтированных генов приводит к эпимутациям, которые могут быть представлены как aberrантным гиперметилированием экспрессируемого аллеля, так и, напротив, гипометилированием инактивированного аллеля. В первом случае происходит полная потеря продукта импринтированного гена в клетке, тогда как во втором – наблюдается увеличение дозы гена вследствие установления его биаллельной экспрессии [4].

Материалы и методы. Для проведения данной работы в качестве материала исследовали образцы внезародышевой (экстраэмбриональной) мезодермы 47 спонтанных абортусов (СА) I триместра с нормальным кариотипом. В качестве контроля была исследована внезародышевая мезодерма 45 медицинских абортусов (МА) I триместра беременности. Внезародышевая мезодерма является производной эпибласта, дающего начало наружному зародышевому листку, поэтому данная ткань ближе по происхождению к эмбриональным структурам, чем другие плацентарные ткани. Продолжительность внутриутробного периода развития определялась по дате последней менструации и составила для СА – $7,64 \pm 1,24$ недель и для МА – $7,69 \pm 1,27$ недель.

Геномную ДНК выделяли из некультивированных клеток внезародышевой мезодермы после стандартной обработки протеиназой К при 37°C и экстракцией фенол/хлороформом.

Для бисульфитной конверсии ДНК использовали набор EZ DNA methylation Direct Kit («Zymo Research», США) согласно протоколу производителя. Индекс метилирования определяли путем пиросеквенирования пяти CpG-динуклеотидов для гена *NESP55* и восьми для *GRB10*, расположенных в ДМР, на пиросеквенаторе PyroMark Q24 («Qiagen», Германия).

Результаты. Индекс метилирования был определен в пяти CpG-сайтах гена *GNAS* и в восьми CpG-сайтах гена *GRB10* внутри групп медицинских и спонтанных абортусов (табл. 1, 2).

Для гена *GNAS* в контрольной выборке минимальный и максимальный индекс метилирования составил 26,6% и 70,9%, и был обнаружен в пятом CpG. Среди спонтанных абортусов данные показатели составили 32,7% в пятом CpG и 84,4% в четвертом CpG, соответственно (табл. 1). Увеличение индекса метилирования может приводить к снижению экспрессии гена, а значит к уменьшению количества продуцируемого белка.

Таблица 1

Значение индекса метилирования гена *GNAS* в группе индуцированных и спонтанных абортусов

CpG-сайты	Индекс метилирования (МА)			Индекс метилирования (СА)			p
	значение			Значение			
	мин.	макс.	среднее	мин.	макс.	среднее	
CpG1	29,6	66,5	43,5±8,3	36,2	75,3	49,9±7,1	<0,01
CpG2	29,5	65,5	43,2±8,6	35,8	79,8	50,0±8,1	<0,01
CpG3	29,9	62,1	41,7±7,7	39,9	76,4	49,7±7,6	<0,01
CpG4	29,4	64,6	43,0±8,3	35,7	84,4	49,5±8,0	<0,01
CpG5	26,6	70,9	42,3±11,3	32,7	73,5	47,7±9,8	<0,05
CpGcp	29,3	65,1	42,7±9,6	37,7	77,9	49,4±7,8	<0,01

Примечание: мин. – минимальное значение индекса метилирования, макс. – максимальное значение индекса метилирования, CpGcp – среднее значение индекса метилирования по пяти CpG.

Индекс метилирования гена *GRB10* в контрольной группе варьировал в пределах от 29,5% в четвертом CpG до 71,0% в пятом CpG. В выборке СА минимальное значение этого показателя соответствовало 20,0% в четвертом, максимальное 59,5% в восьмом CpG (табл. 2). Снижение индекса метилирования гена *GRB10* могло привести к увеличению экспрессии данного гена, а значит к увеличению количества белка.

Таблица 2

Значение индекса метилирования гена GRB10 в группе индуцированных и спонтанных эмбрионов

CpG-сайты	Индекс метилирования (МА)			Индекс метилирования (СА)			p
	значение			Значение			
	мин.	макс.	среднее	мин.	макс.	среднее	
CpG1	42,0	64,5	51,3±6,1	21,9	49,3	37,9±7,7	<0,01
CpG2	42,7	64,9	49,8±5,2	29,2	55,0	41,8±7,6	<0,01
CpG3	42,1	60,6	49,3±9,2	27,2	54,3	41,7±8,1	<0,01
CpG4	29,5	65,4	49,5±6,9	20,0	55,5	41,1±9,1	<0,01
CpG5	38,9	71,0	50,5±6,5	25,8	58,4	39,9±9,4	<0,01
CpG6	41,3	63,1	50,4±5,0	24,3	57,2	41,3±8,4	<0,01
CpG7	36,0	67,0	50,4±6,2	23,9	57,5	40,7±7,8	<0,01
CpG8	34,4	60,4	50,3±5,8	20,4	59,5	41,0±8,5	<0,01
CpGcp	49,3	51,3	50,2±4,4	36,9	41,9	40,6±6,5	<0,01

Примечание: мин. – минимальное значение индекса метилирования, макс. – максимальное значение индекса метилирования, CpGcp – среднее значение индекса метилирования по восьми CpG.

Вывод. В настоящем исследовании обнаружены статистически значимые отличия по индексу метилирования импринтированных генов между спонтанными и медицинскими абортусами, которые свидетельствует о том, что в пренатальном периоде происходит отбор против эмбрионов с подобными нарушениями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радзинский В.Е. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС. – М.: Редакция журнала Status Praesens, 2015. – 48 с.
2. Elhamamsy A.R. (2017). Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. J Assist Reprod Genet, Vol. 34, no. 5, pp. 549-562.
3. Adalsteinsson B.T., Ferguson-Smith A.C. (2014). Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. Genes, Vol. 5, no. 3, pp. 635-655.
4. Лебедев И.Н., Саженова Е.А. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 10. – С. 1356–1373.