

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Экспрессия генов *NUP153* и *YWHAB* с их канонических промоторов и альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1 в плаценте первого триместра беременности

В.В. Деменева¹✉, Е.Н. Толмачева¹, Т.В. Никитина¹, Е.А. Саженова¹, С.Ю. Юрьев², А.Ш. Махмутходжаев², А.С. Зуев¹, С.А. Филатова³, А.Е. Дмитриев³, Я.А. Даркова³, Л.П. Назаренко¹, И.Н. Лебедев^{1, 2}, С.А. Васильев^{1, 3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

✉ deviva2503@gmail.com

Аннотация. Для плаценты характерен уникальный гипометилированный геном. Благодаря этой особенности плаценты в первом триместре беременности наблюдается потенциальная возможность использования регуляторных элементов, полученных от ретровирусов и ретротранспозонов, которые во взрослом организме подавляются метилированием ДНК. Кроме того, у спонтанных абортусов и с нормальным кариотипом, и с анеуплоидиями отмечается аномальное повышение уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в трофобласте хориона, что может быть связано с нарушением транскрипции генов с использованием регуляторных элементов LINE-1. На сегодняшний день идентифицировано 988 генов, способных экспрессироваться с альтернативных промоторов LINE-1. Из них с помощью инструмента STRING были отобраны гены, продукты которых взаимодействуют с белками, экспрессирующимися на высоком уровне в плаценте и участвующими в дифференцировке трофобласта, *NUP153* и *YWHAB*. Целью настоящего исследования являлся анализ экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1 в зародышевой части плаценты спонтанных и медицинских абортусов первого триместра беременности. Определение уровня экспрессии генов проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени в лимфоцитах взрослых индивидов ($n = 10$), в ворсинах хориона и экстраэмбриональной мезодерме медицинских абортусов ($n = 10$) и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ($n = 10$) и с наиболее частыми анеуплоидиями в I триместре беременности (трисомия 16 ($n = 8$) и моносомия X ($n = 6$)). Индекс метилирования LINE-1 оценивали в ворсинах хориона спонтанных абортусов с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Уровень экспрессии обоих генов с канонических промоторов был выше в лимфоцитах крови, чем в тканях плаценты ($p < 0.05$). Однако уровень экспрессии гена *NUP153* с альтернативного промотора LINE-1 был выше в 17 раз в ворсинах хориона и в 23 раза – в экстраэмбриональной мезодерме по сравнению с лимфоцитами ($p < 0.05$). Между группами спонтанных абортусов с моносомией X и остальными группами были выявлены статистически значимые различия. Уровень экспрессии *NUP153* и *YWHAB* с канонических промоторов был выше в группе спонтанных абортусов с моносомией X по сравнению со всеми другими группами ($p < 0.05$). Индекс метилирования LINE-1 отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии генов как с канонических (*NUP153* – $R = -0.59$, *YWHAB* – $R = -0.52$, $p < 0.05$), так и с альтернативных промоторов LINE-1 (*NUP153* – $R = -0.46$, *YWHAB* – $R = -0.66$, $p < 0.05$). Таким образом, наблюдаемое нами повышение индекса метилирования LINE-1 в плаценте спонтанных абортусов связано с уровнем экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* не только с альтернативных, но и с канонических промоторов, что в дальнейшем может приводить к негативным последствиям для нормального эмбриогенеза.
Ключевые слова: невынашивание беременности; плацента; ретротранспозон LINE-1; метилирование ДНК; *NUP153*; *YWHAB*.

Для цитирования: Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Юрьев С.Ю., Махмутходжаев А.Ш., Зуев А.С., Филатова С.А., Дмитриев А.Е., Даркова Я.А., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Экспрессия генов *NUP153* и *YWHAB* с их канонических промоторов и альтернативных промоторов ретротранспозона LINE-1 в плаценте первого триместра беременности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(1):63-71. DOI 10.18699/VJGB-23-09

Expression of the *NUP153* and *YWHAB* genes from their canonical promoters and alternative promoters of the LINE-1 retrotransposon in the placenta of the first trimester of pregnancy

V.V. Demeneva¹✉, E.N. Tolmacheva¹, T.V. Nikitina¹, E.A. Sazhenova¹, S.Yu. Yuriev², A.Sh. Makhmutkhodzhaev², A.S. Zuev¹, S.A. Filatova³, A.E. Dmitriev³, Ya.A. Darkova³, L.P. Nazarenko¹, I.N. Lebedev^{1, 2}, S.A. Vasilyev^{1, 3}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

✉ deviva2503@gmail.com

© Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Юрьев С.Ю., Махмутходжаев А.Ш., Зуев А.С., Филатова С.А., Дмитриев А.Е., Даркова Я.А., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н., Васильев С.А., 2023

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. The placenta has a unique hypomethylated genome. Due to this feature of the placenta, there is a potential possibility of using regulatory elements derived from retroviruses and retrotransposons, which are suppressed by DNA methylation in the adult body. In addition, there is an abnormal increase in the level of methylation of the LINE-1 retrotransposon in the chorionic trophoblast in spontaneous abortions with both normal karyotype and aneuploidy on different chromosomes, which may be associated with impaired gene transcription using LINE-1 regulatory elements. To date, 988 genes that can be expressed from alternative LINE-1 promoters have been identified. Using the STRING tool, genes (*NUP153* and *YWHAB*) were selected, the products of which have significant functional relationships with proteins highly expressed in the placenta and involved in trophoblast differentiation. This study aimed to analyze the expression of the *NUP153* and *YWHAB* genes, highly active in the placenta, from canonical and alternative LINE-1 promoters in the germinal part of the placenta of spontaneous and induced abortions. Gene expression analysis was performed using real-time PCR in chorionic villi and extraembryonic mesoderm of induced abortions ($n = 10$), adult lymphocytes ($n = 10$), spontaneous abortions with normal karyotype ($n = 10$), and with the most frequent aneuploidies in the first trimester of pregnancy (trisomy 16 ($n = 8$) and monosomy X ($n = 6$)). The LINE-1 methylation index was assessed in the chorionic villi of spontaneous abortions using targeted bisulfite massive parallel sequencing. The level of expression of both genes from canonical promoters was higher in blood lymphocytes than in placental tissues ($p < 0.05$). However, the expression level of the *NUP153* gene from the alternative LINE-1 promoter was 17 times higher in chorionic villi and 23 times higher in extraembryonic mesoderm than in lymphocytes ($p < 0.05$). The expression level of *NUP153* and *YWHAB* from canonical promoters was higher in the group of spontaneous abortions with monosomy X compared to all other groups ($p < 0.05$). The LINE-1 methylation index negatively correlated with the level of gene expression from both canonical ($NUP153 - R = -0.59$, $YWHAB - R = -0.52$, $p < 0.05$) and alternative LINE-1 promoters ($NUP153 - R = -0.46$, $YWHAB - R = -0.66$, $p < 0.05$). Thus, the observed increase in the LINE-1 methylation index in the placenta of spontaneous abortions is associated with the level of expression of the *NUP153* and *YWHAB* genes not only from alternative but also from canonical promoters, which can subsequently lead to negative consequences for normal embryogenesis.

Key words: miscarriage; placenta; retrotransposon LINE-1; DNA methylation; *NUP153*; *YWHAB*.

For citation: Demeneva V.V., Tolmacheva E.N., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Yuriev S.Yu., Makhmutkhodzhaev A.Sh., Zuev A.S., Filatova S.A., Dmitriev A.E., Darkova Ya.A., Nazarenko L.P., Lebedev I.N., Vasilyev S.A. Expression of the *NUP153* and *YWHAB* genes from their canonical promoters and alternative promoters of the LINE-1 retrotransposon in the placenta of the first trimester of pregnancy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(1):63-71. DOI 10.18699/VJGB-23-09

Введение

У человека репродуктивные потери наблюдаются чаще в первом триместре беременности, чем в другие периоды эмбриогенеза. Одной из наиболее частых причин ранней эмбриональной гибели являются нарушения числа хромосом (анеуплоидии), которые приводят к тяжелым аномалиям развития. Формирование мейотической и митотической форм анеуплоидий соответствует волнам эпигенетического репрограммирования, в частности этапу деметилирования генома в зиготе и на стадии дробления. На данном этапе ранняя бластоциста демонстрирует меньшее метилирование ДНК, чем клетки организма в любой другой момент онтогенеза (Smith et al., 2012). Для внутренней клеточной массы затем следует быстрая волна метилирования ДНК *de novo*, в то время как трофобластическая оболочка остается гипометилированной (Santos et al., 2010).

На протяжении всей беременности плацента обладает уникальным гипометилированным эпигенетическим ландшафтом по сравнению с другими экстраэмбриональными и эмбриональными тканями, что может говорить о ее особых функциях (Robinson, Price, 2015). Гипометилирование в плацентарной ДНК происходит в основном в «частично метилированных доменах» и по всему геному распределяется неравномерно. «Частично метилированными доменами» называют большие (> 100 т. п. н.) участки с пониженным метилированием ДНК, чередующиеся с областями с более высоким метилированием ДНК (Schroeder et al., 2013).

В плаценте также наблюдается пониженное метилирование ДНК некоторых типов повторяющихся элементов генома (Price et al., 2012). Известно, что ретротранспозон

LINE-1 (long interspersed nuclear element-1) представляет собой самый большой, занимающий приблизительно до 20 % генома, и наиболее эволюционно молодой класс ретротранспозонов у человека, сохраняющий способность к транспозиции (Ostertag et al., 2001). Транскрипционная активность LINE-1 подавляется метилированием ДНК в течение большинства периодов онтогенеза.

Важной особенностью LINE-1, требующей внимания, является высокий уровень его метилирования в лейкоцитах крови, независимо от возраста и пола, при этом в других тканях уровень метилирования LINE-1 имеет свои тканеспецифические различия (Chalitchagorn et al., 2004). Так, показано, что для плаценты как самостоятельного органа уровень метилирования ретротранспозонов не всегда совпадает с глобальным уровнем метилирования всего генома. В одном из исследований было показано значительное снижение уровня метилирования LINE-1 в тканях плаценты третьего триместра беременности по сравнению с первым. При этом не было обнаружено изменений уровня метилирования ДНК всего генома между первым и третьим триместрами (He et al., 2014).

Можно предположить о временной регуляции метилирования и активации LINE-1 в ходе нормального развития плаценты. Это поднимает вопрос о возможной функциональной роли последовательностей ретротранспозона LINE-1 в развитии плаценты. Ранее нами было обнаружено, что часть спонтанных абортусов с нормальным кариотипом характеризуются эпигенетическими нарушениями, сходными со спонтанными абортусами с анеуплоидией. Кроме того, для спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был отмечен повышенный индекс метили-

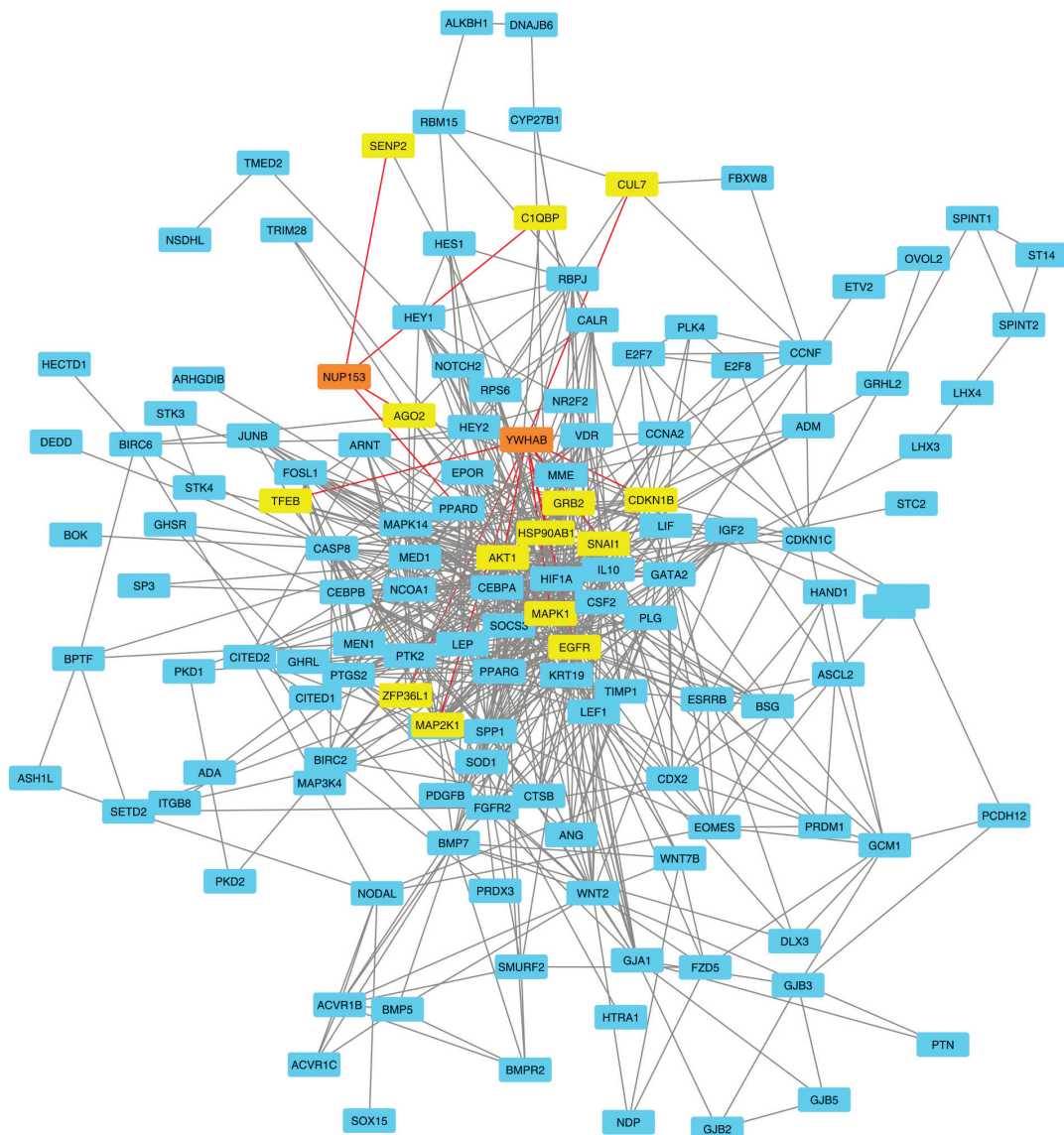


Рис. 1. Функционально значимые связи белков, участвующих в развитии плаценты (GO:0061450, GO:0097360, GO:0001890), с продуктами генов *NUP153* и *YWHA8* по данным STRING.

Желтым цветом показаны белки, имеющие функциональные связи (выделено красным) с продуктами генов *NUP153* и *YWHA8* (отмечены оранжевым цветом) (STRING score > 0.4).

рования в промоторе ретротранспозона LINE-1, наблюдаемый в группах спонтанных абортусов с трисомией по хромосоме 16 и моносомией X (Vasilyev et al., 2021b).

Одна из возможных ролей LINE-1 может состоять в использовании его регуляторных последовательностей для влияния на транскрипцию расположенных рядом генов. Такое влияние становится возможным благодаря тому, что LINE-1 включает в себя смысловой промотор, управляющий транскрипцией белков ORF1 и ORF2p, необходимых для ретротранспозиции, и антисмысловой промотор, управляющий транскрипцией химерных транскриптов – 5'-антисмысловых последовательностей LINE-1, сплайсированных с экзонами соседних генов (Denli et al., 2015). Антисмысловые транскрипты LINE-1 затрагивают до 4% всех генов человека, а антисмысловые промоторы LINE-1 активно транскрибируются в различных типах клеток человека, в том числе и в эмбриональных тканях. Всего на

данный момент идентифицировано 988 генов, способных экспрессироваться с альтернативных промоторов LINE-1 (Criscione et al., 2016b). С учетом гипометилирования промоторов LINE-1 в плаценте возможно, что экспрессия множества генов в экстраэмбриональных тканях может происходить преимущественно с альтернативных промоторов LINE-1.

Среди генов, потенциально способных к экспрессии с альтернативных промоторов LINE-1, с помощью инструмента STRING было отобрано два, *NUP153* и *YWHA8*, продукты которых показали высокий уровень экспрессии в плаценте и функционально связаны с белками, участвующими в дифференцировке трофобласта (по данным Gene Ontology: GO:0061450, trophoblast cell migration; GO:0097360, chorionic trophoblast cell proliferation; GO:0001890, placenta development) (рис. 1). Ген *NUP153* функционирует как каркасный элемент в ядерной фазе

комплекса ядерных пор и необходим для нормального ядерно-цитоплазматического транспорта белков и мРНК как во время митоза соматических клеток (Bilig et al., 2019), так и в эмбриональных стволовых клетках мыши (Souquet et al., 2018). Ген *YWHAB* относится к группе генов, отвечающих за передачу сигнала путем связывания с фосфосерин-содержащими белками.

Белок, кодируемый геном, взаимодействует с фосфатазами *RAF1* и *CDC25* и может играть роль в митогенной передаче сигналов и механизмах клеточного цикла. В клеточной линии фибробластов, выделенной из эмбрионов мышей, было показано, что сверхэкспрессия *YWHAB* стимулирует и поддерживает независимый от прикрепления рост клеток (Sasaki et al., 2014).

Таким образом, целью настоящего исследования был анализ экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 в зародышевой части плаценты спонтанных и медицинских абортусов.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования были отобраны образцы ворсин хориона и экстраэмбриональной мезодермы медицинских абортусов (МА) ($n = 10$, гестационный возраст 8.2 ± 2.3 нед), спонтанных абортусов (СА) с нормальным кариотипом ($n = 10$, гестационный возраст 7.2 ± 1.4 нед), трисомией по хромосоме 16 ($n = 8$, гестационный возраст 6.5 ± 0.8 нед) и моносомией X ($n = 6$, гестационный возраст 8.6 ± 0.7 нед). Образцы, взятые из биобанка «Биобанк населения Северной Азии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, получены в период с 2004 по 2021 г. и хранились в жидком азоте.

Исследование проводили с соблюдением этических норм в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Для всех образцов из биобанка получено информированное согласие родителей на участие в эксперименте. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Для определения кариотипа проведен стандартный цитогенетический анализ на прямых препаратах ворсин хориона и культурах фибробластов экстраэмбриональной мезодермы (Lebedev et al., 2004). Результаты кариотипирования для 14 образцов СА с трисомией и моносомией были подтверждены методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Уровень мозаицизма по анеуплоидии оценивали с нижним порогом 10 % и верхним порогом 90 %.

Для анализа моносомии X были использованы центромеро-специфичные ДНК-зонды на хромосомы X, а для анализа трисомии 16 – субтеломерные ДНК-зонды (16q и 16p). Анализ выполняли по описанной ранее методике (Vasilyev et al., 2010). Четыре образца имели мозаичный кариотип с уровнем трисомии от 10 до 90 %. Остальные 10 спонтанных абортусов с более высокой долей трисомии или моносомии были классифицированы как имеющие чистую анеуплоидию. В качестве группы сравнения использовали лимфоциты периферической крови родителей МА (5 семейных пар, возраст 30.8 ± 2.7), содержащиеся до начала эксперимента в реагенте «Лира» (Биолабмикс, Россия).

Выделение РНК проводили из ворсин хориона и экстраэмбриональной мезодермы фенол-хлороформным методом. С момента получения материала изучаемых образцов до начала выделения РНК все ткани хранились в жидком азоте. Разделение тканей предварительно осуществляли в RNAlater (Invitrogen, США) для стабилизации РНК в образцах. Каждый образец гомогенизировали в ступке с жидким азотом, предварительно добавив 500 мкл реагента «Лира» (Биолабмикс). Лизат инкубировали сначала 5 мин при 55 °С, далее – 5 мин при комнатной температуре. Затем лизат центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин для удаления нерастворенных фрагментов и отбирали супернатант в новую пробирку. На каждый 1 мл реагента «Лира» был добавлен 0.2 мл хлороформа, с последующим встряхиванием (вручную) в течение 15 с, инкубированием смеси в течение 10 мин при комнатной температуре и центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин при 4 °С. Затем к водной фазе, содержащей РНК, добавляли 0.5 мл 100 % охлажденного изопропанола на каждый 1 мл реагента «Лира», инкубировали смесь при –20 °С в течение 10 мин и центрифугировали образец при 12000 g в течение 10 мин при 4 °С.

Осадок промывали дважды 80 % охлажденным этанолом при 10000 g в течение 5 мин при 4 °С. Сушили осадок 2 мин в концентраторе (Eppendorf, США) (параметры: 45 °С, V-AL). Для растворения осадка добавляли 40 мкл ДЭПК-воды и 1 мкл RiboLock (Thermo, США) и ожидали 10 мин при комнатной температуре до полного растворения. Все образцы во время выделения на этапах инкубации при комнатной температуре находились на холодной подложке во избежание деградации РНК. После выделения все образцы хранились при –80 °С.

Перед проведением обратной транскрипции с получением кДНК осуществляли обработку РНК ДНКазой. Далее для обратной транскрипции использовали набор ОТ-М-MuLV-RH (Биолабмикс) со случайным гексапраймером. Смесь для проведения реакции обратной транскрипции включала 1.5 мкг РНК, 3 мкл гексапраймера, 4 мкл реакционного буфера KCl, 2 мкл 0.1 М ДДТ, 1 мкл 10 мМ смеси dNTP и 1 мкл ревертазы. Анализ экспрессии генов выполняли с помощью метода ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена был использован ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Для генов *NUP153* и *YWHAB* были подобраны два вида праймеров: первый для длинных продуктов, которые экспрессируются только с канонических промоторов, а второй – для коротких продуктов, экспрессирующихся с альтернативных анти-смысловых промоторов LINE-1 (см. таблицу).

Ген *NUP153* включает 22 экзона, а короткий транскрипт с альтернативного промотора LINE-1 – только экзоны 21–22. Для детекции транскриптов гена *NUP153* с канонического промотора были подобраны праймеры на экзоны 16–17, а для детекции транскриптов с альтернативного промотора – на экзоны 21–22. С обычного промотора гена *YWHAB* транскрибируются два нормальных длинных транскрипта с экзонами 7 или 6, в связи с этим было решено использовать праймеры на каждый отдельный продукт. Для первого транскрипта с семью экзонами праймеры были подобраны в экзонах 1–2. Для второго транскрипта с шестью экзонами праймеры были

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для оценки уровня экспрессии генов *NUP153*, *YWHAB* и *GAPDH* с помощью ПЦР в реальном времени

Ген	Транскрипт	Последовательность нуклеотидов
<i>NUP153</i>	Транскрипт с канонического промотора (NM_001278209.2, 22 экзона)	F 5'-TGTATGCTGAGAAACCAGGAAGTT-3' R 5'-GTAGAGTCTGCCTTATTCTGCACTA-3'
	Укороченный транскрипт с альтернативного промотора LINE-1 (2 экзона)	F 5'-CAGCATTACAGTGGGGTCAAAT-3' R 5'-CAACACCAATGTGACCTTTATTTCC-3'
<i>YWHAB</i>	Транскрипт с канонического промотора (NM_003404, 7 экзонов)	F 5'-GCTCGGAAGGGTCTTTGTTC-3' R 5'-TCTATCCACAGCCGAATGGG-3'
	Транскрипт с канонического промотора (NM_139323, 6 экзонов)	F 5'-GAGTAGTGGGCTTAGGAAGGAAGAG-3' R 5'-CTTTTATCCATTGTCATTCCCGTGG-3'
	Укороченный транскрипт с альтернативного промотора LINE-1 (4 экзона)	F 5'-CTGTAGCCTGGCAAAAACGG-3' R 5'-TCCGATGTCCACAGAGTGAGA-3'
<i>GAPDH</i>	Транскрипт с канонического промотора (NM_002046.7, 10 экзонов)	F 5'-GCCAGCCGAGCCACATC-3' R 5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер.

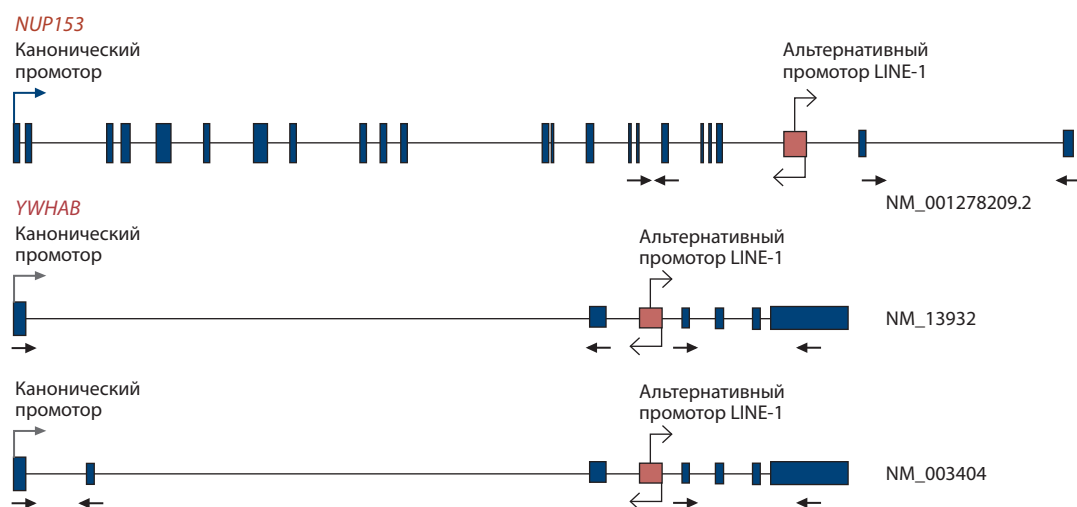


Рис. 2. Схема расположения альтернативных промоторов LINE-1 для генов *NUP153* и *YWHAB*.

Стрелками схематично показаны сайты гибридизации олигонуклеотидных праймеров. Стрелкой, начинающейся в начале элемента LINE-1, отмечено направление считывания с прямого промотора LINE-1, являющегося для него основным. Второй стрелкой, направленной в другую сторону, показано направление экспрессии с альтернативного промотора LINE-1, альтернативного и для изучаемых генов.

подобраны в экзонах 1–3. Праймеры короткого продукта с альтернативного промотора LINE-1 гена *YWHAB* были подобраны в экзонах 4–7 (рис. 2). За экспрессию с альтернативных промоторов генов принимали разность между уровнем экспрессии гена, оцененной с помощью праймеров, лежащих после альтернативного промотора, и уровнем экспрессии гена, оцененной с помощью праймеров, лежащих до него. И уже этот показатель был использован для анализа данных и отображен на графиках. Для гена *YWHAB* вычитали уровень экспрессии обоих транскриптов с канонического промотора.

Индекс метилирования оценивали в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1 для ворсин хориона спонтанных абортусов с использованием таргетного бисульфитного

массового параллельного секвенирования. Приготовление библиотек и оценку проводили по ранее опубликованному протоколу (Vasilyev et al., 2021a). Статистический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0.

Результаты

Уровень экспрессии гена *NUP153* с канонического промотора был выше в лимфоцитах в 12.5 раза по сравнению с тканями плаценты ($p = 0.000001$). Уровень экспрессии гена *YWHAB* с канонического промотора был также в среднем выше в лимфоцитах крови, чем в тканях плаценты (в 4.6 раза) (транскрипт NM_13932 ($p = 0.00003$)). Уровень экспрессии транскрипта NM_003404 гена *YWHAB* имел

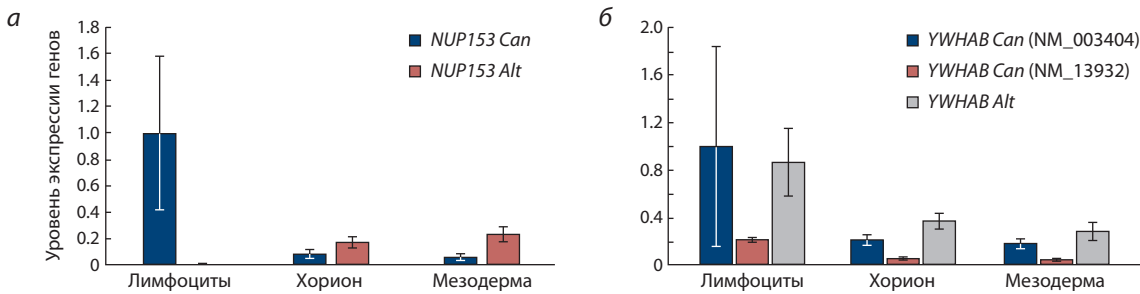


Рис. 3. Сравнение уровня экспрессии гена *NUP153* (а) и *YWHAB* (б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 в лимфоцитах крови, хорионе и мезодерме плаценты.

Значения приведены в виде кратности различий относительно уровня экспрессии генов с канонического промотора в лимфоцитах взрослых индивидов. Для гена *YWHAB* представлены уровни экспрессии двух различных транскриптов с канонического промотора (NM_003404, NM_139323). *GAPDH* – референсный ген; *Can* – канонический промотор; *Alt* – альтернативный промотор LINE-1.

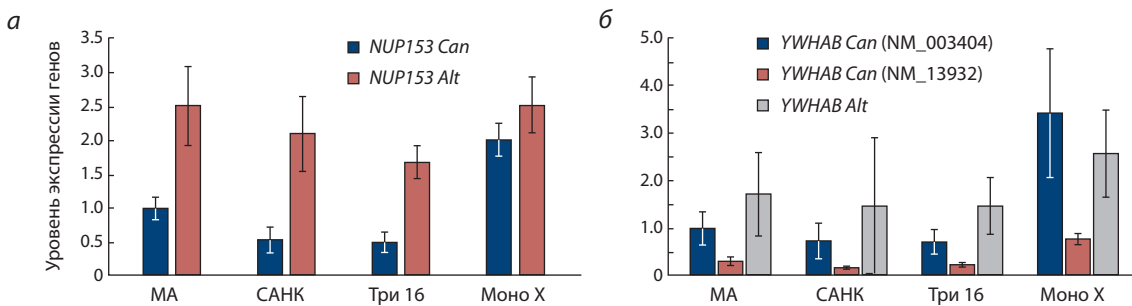


Рис. 4. Сравнение уровня экспрессии гена *NUP153* (а) и *YWHAB* (б) с канонических промоторов и альтернативных промоторов LINE-1 между группами спонтанных и медицинских абортусов.

Значения приведены как кратные различия относительно уровня экспрессии генов канонического промотора медицинских абортусов. SANК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом; Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией по хромосоме 16; Mono X – спонтанные абортусы с моносомией X.

высокую вариабельность в лимфоцитах. Однако уровень экспрессии гена *NUP153* с альтернативных промоторов LINE-1 был статистически значимо выше в экстраэмбриональных тканях по сравнению с лимфоцитами взрослых индивидов (в ворсинах хориона – в 17 раз, в экстраэмбриональной мезодерме – в 23 раза, $p < 0.05$) (рис. 3). При сравнении групп спонтанных и медицинских абортусов между собой (ворсины хориона и экстраэмбриональная мезодерма) уровень экспрессии обоих генов с канонических промоторов был выше в группе СА с моносомией X, чем в группах СА с нормальным кариотипом (для гена *NUP153* – в 3.7 раза, для гена *YWHAB* – в 4.5 раза, $p < 0.05$), СА с трисомией 16 (для гена *NUP153* – в 3.9 раза, для гена *YWHAB* – в 4.3 раза, $p < 0.05$) и МА (для гена *YWHAB* – в 3.1 раза, $p < 0.05$) (рис. 4).

В ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом был оценен уровень метилирования в промоторе ретротранспозона LINE-1. Средний уровень метилирования LINE-1 в ворсинах хориона СА составил: с трисомией 16 – $41.9 \pm 5.8\%$, с моносомией X – $39.7 \pm 3.6\%$, с нормальным кариотипом – $38.4 \pm 3.9\%$. Индекс метилирования LINE-1 отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии генов как с канонических (*NUP153* – $R = -0.59$, $p < 0.003$; *YWHAB* – $R = -0.52$, $p < 0.01$), так и с альтернативных промоторов LINE-1 (*NUP153* – $R = -0.46$, $p = 0.03$; *YWHAB* – $R = -0.66$, $p = 0.001$) (рис. 5).

Обсуждение

В настоящей работе обнаружено, что уровень экспрессии для генов *NUP153* и *YWHAB* в плаценте был ниже с канонических промоторов по сравнению с лимфоцитами крови взрослых индивидов, однако экспрессия гена *NUP153* с альтернативного промотора LINE-1 была выше в плаценте. Полученный результат свидетельствует в пользу гипотезы о том, что в плаценте вследствие гипометилированного эпигенетического ландшафта может активироваться экспрессия генов с альтернативных промоторов, приобретенных от ретровирусов и ретротранспозонов. Данное предположение поддерживается также и обогащением генов, тканеспецифично экспрессирующихся в плаценте, среди всех генов, способных к транскрипции с альтернативных промоторов LINE-1 (Criscione et al., 2016a).

Нами не выявлено значимых отличий по уровню экспрессии генов *YWHAB* и *NUP153* с альтернативных промоторов между группами спонтанных абортусов с различным кариотипом и контрольной группой медицинских абортусов. При этом уровень экспрессии обоих генов с канонических промоторов был выше в группе спонтанных абортусов с моносомией X. Но обнаружено, что уровень экспрессии изученных генов изменяется у отдельных спонтанных абортусов в зависимости от изменения уровня метилирования в геноме. Полученные данные наглядно демонстрируют, что уровень экспрессии генов *NUP153*

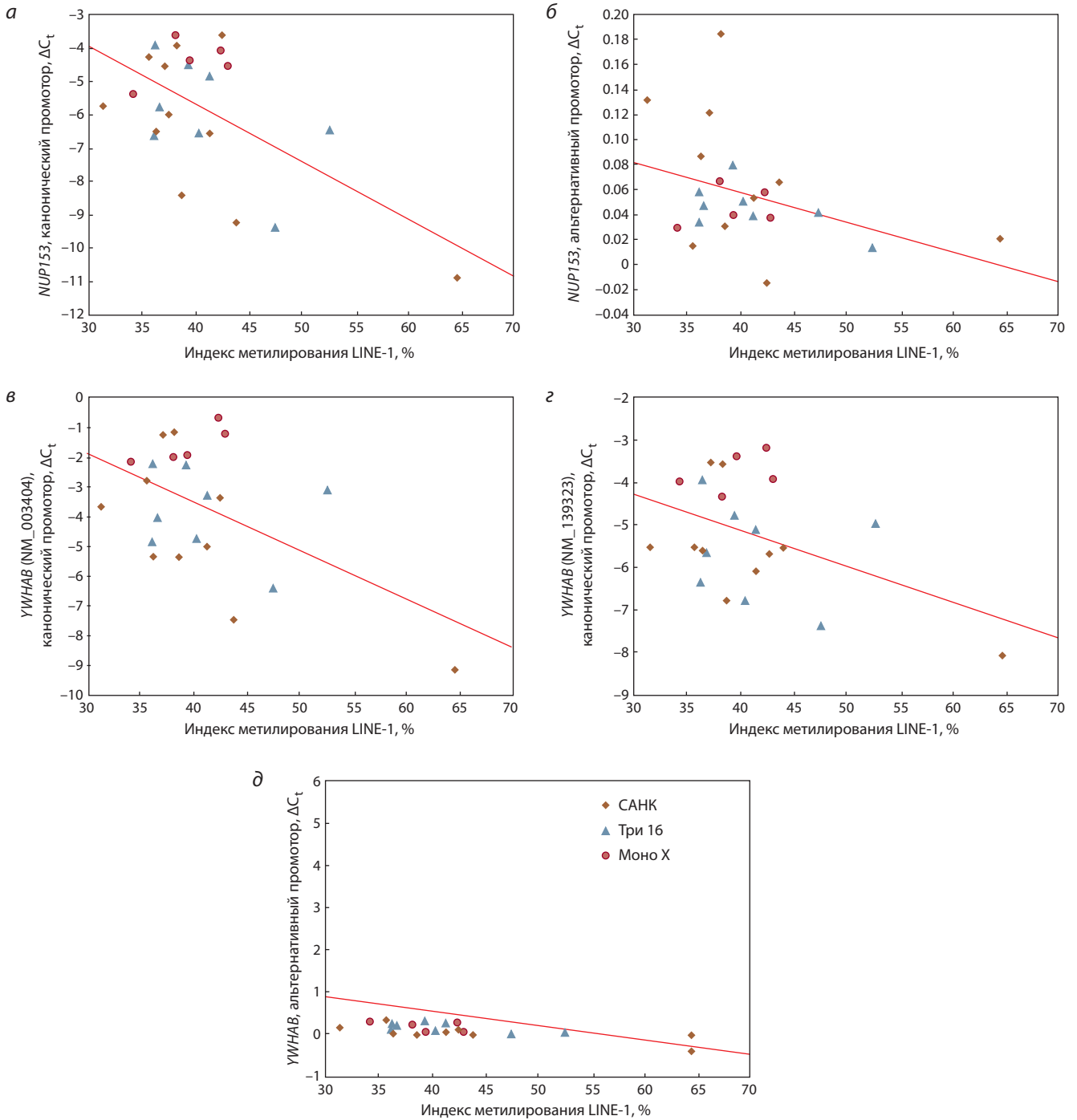


Рис. 5. Корреляция экспрессии генов *NUP153* и *YWHAВ* с индексом метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, трисомией 16 и моносомией X.

a – корреляция экспрессии гена *NUP153* с канонического промотора и индекса метилирования LINE-1; *б* – корреляция экспрессии гена *NUP153* с альтернативного промотора и индекса метилирования LINE-1; *в* – корреляция экспрессии гена *YWHAВ* (NM_003404) с канонического промотора и индекса метилирования LINE-1; *г* – корреляция экспрессии гена *YWHAВ* (NM_139323) с канонического промотора и индекса метилирования LINE-1; *д* – корреляция экспрессии гена *YWHAВ* с альтернативного промотора и индекса метилирования LINE-1. SANК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом; Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией по хромосоме 16; Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X.

и *YWHAВ* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 коррелирует с уровнем метилирования LINE-1: чем выше уровень метилирования LINE-1, тем ниже экспрессия.

Причин связи уровня метилирования LINE-1 с экспрессией исследуемых генов с обоих промоторов может быть

несколько. Во-первых, короткий транскрипт с альтернативного промотора может быть связан с активацией транскрипции гена с канонического промотора. Однако такой вариант представляется маловероятным, так как уровень экспрессии исследуемых генов с канонических промоторов на фоне гипометилирования генома в плаценте

был ниже, чем в лимфоцитах, для которых характерен уровень метилирования LINE-1 более 70 % (Rosser, An, 2012), хотя при верности высказанной гипотезы должно было быть наоборот. Во-вторых, уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 может отражать глобальный уровень метилирования генома и уровень метилирования в каноническом промоторе исследуемых генов. Этот вариант представляется более вероятным, но также не снимает вопрос о сниженной экспрессии исследованных генов в плаценте на фоне гипометилированного эпигенетического ландшафта по сравнению с лимфоцитами взрослых индивидов. Очевидно, экспрессия исследуемых генов регулируется не только с помощью метилирования, но и тканеспецифичными факторами транскрипции.

Остается неясным, играет ли изменение экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* как с канонических, так и с альтернативных промоторов функциональную роль в жизнедеятельности плаценты или эти транскрипты – побочный продукт гипометилирования генома. Потенциально, нарушение работы гена *NUP153* может оказывать негативное влияние на ядерно-цитоплазматический транспорт белков и мРНК, а нарушение работы гена *YWHAB* может влиять на передачу клеточных сигналов.

Продукты генов *NUP153* и *YWHAB* имеют значимые функциональные связи с белками, участвующими в дифференцировке трофобласта (см. рис. 1). Для гена *NUP153* такими генами являются: *AGO2*, *SENP2*, *CIQBP*, *PPARD*. Для *YWHAB* список значимых связей шире – он взаимодействует с генами *TFEB*, *CUL7*, *ZFP36L*, *MAP2K1*, *AKT1*, *CDKN1B*, *SNAP1*, *MAPK1*, *EGFR*.

Нарушение работы каждого из этих генов оказывает негативное влияние на нормальное течение эмбриогенеза. Например, нормальная экспрессия *MAPK1* необходима для развития внеэмбриональной эктодермы во время плацентогенеза, а его отсутствие может приводить к гибели эмбриона из-за аномального развития и гиповаскуляризации плаценты (Bissonauth et al., 2006). Ген *CUL7* активно экспрессируется в клеточных линиях трофобласта. Дефицит белка Cul7 связан с задержкой внутриутробного развития из-за аномального развития плаценты, что может вызывать плохое снабжение плода кислородом (Fahlbusch et al., 2012). На более поздних сроках гестации дефицит может приводить к возникновению кожных или гиподермальных кровоизлияний, а также к развитию трофобласта с аномальной сосудистой структурой (Arai et al., 2003). Мутации *CUL7* в зародышевой линии связаны с синдромом 3-М и синдромом низкорослости якутов, оба из которых характеризуются пре- и постнатальной задержкой роста (Maksimova et al., 2007; Fu et al., 2010).

Ген *SENP2* принадлежит к семейству белков убиквитин-подобных и локализован в клетке в ядерных порах и цитоплазме (Talamillo et al., 2020). Мутации *SENP2* вызывают нарушение прогрессирования клеточного цикла во время развития трофобласта у мышей: удаление *SENP2* нарушает путь p53/Mdm2, влияя на клетки-предшественники трофобласта и на их созревание (Chiu et al., 2008). Во время дальнейшей дифференцировки *SENP2* оказывает влияние на нормальное развитие кардиомиоцитов. Сверхэкспрессия приводит к аномальной пролиферации кардиомиоцитов с нарушенной регуляцией циклина и

ингибиторов циклин-зависимой киназы, что приводит к врожденным аномалиям развития сердца (Kim et al., 2012). С другой стороны, делеции также вызывают дефекты развития миокарда из-за снижения пролиферации (Kang et al., 2010).

Логично предположить, что существующие функциональные связи генов *NUP153* и *YWHAB* с генами, участвующими в том числе и в дифференцировке трофобласта, могут идти как в негативном, так и в протективном направлении. Патологическое изменение экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* может потенциально приводить к нарушению работы других генов, формированию патологического фенотипа у пациентов или даже закончиться эмбриональной гибелью.

Заключение

Нами выявлено, что в тканях плаценты гены *NUP153* и *YWHAB* преимущественно экспрессируются с альтернативных промоторов LINE-1, находящихся в интронах. Несмотря на то что для всех групп (спонтанные и медицинские абортусы) экспрессия с альтернативных промоторов LINE-1 выше, чем с канонических, и не обнаружено значимых отличий по уровню экспрессии генов *YWHAB* и *NUP153* с альтернативных промоторов между группами, показана тенденция к общему снижению экспрессии для спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами. Однако установлено, что уровень экспрессии изученных генов изменяется у отдельных спонтанных абортусов в зависимости от уровня метилирования в геноме. Полученные данные наглядно демонстрируют связь уровня экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 с уровнем метилирования LINE-1 в экстраэмбриональных тканях спонтанных абортусов: чем выше уровень метилирования LINE-1, тем ниже экспрессия генов.

Таким образом, повышение индекса метилирования LINE-1 в плаценте спонтанных абортусов может быть связано со снижением экспрессии генов не только с альтернативных, но и с канонических промоторов. Установленные особенности взаимосвязи уровня метилирования LINE-1 с экспрессией генов *NUP153* и *YWHAB* указывают на существующий механизм саморегуляции нормального эмбриогенеза, при нарушении которого последствием является эмбриональная гибель плода.

Список литературы / References

- Arai T., Kasper J.S., Skaar J.R., Ali S.H., Takahashi C., DeCaprio J.A. Targeted disruption of *p185/Cul7* gene results in abnormal vascular morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(17):9855-9860. DOI 10.1073/pnas.1733908100.
- Bilir Ş., Kojidani T., Mori C., Osakada H., Kobayashi S., Koujin T., Hiraoka Y., Haraguchi T. Roles of Nup133, Nup153 and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis. *Genes Cells*. 2019;24(5):338-353. DOI 10.1111/gtc.12677.
- Bissonauth V., Roy S., Gravel M., Guillemette S., Charron J. Requirement for *Map2k1 (Mek1)* in extra-embryonic ectoderm during placental development. *Development*. 2006;133(17):3429-3440. DOI 10.1242/dev.02526.
- Chalitchagorn K., Shuangshoti S., Hourpai N., Kongruttanachok N., Tangkijvanich P., Thong-ngam D., Voravud N., Sriuranpong V., Mutirangura A. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in

- normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene*. 2004;23(54):8841-8846. DOI 10.1038/sj.onc.1208137.
- Chiu S.Y., Asai N., Costantini F., Hsu W. SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS Biol*. 2008;6(12):e310. DOI 10.1371/journal.pbio.0060310.
- Criscione S.W., Teo Y.V., Neretti N. The chromatin landscape of cellular senescence. *Trends Genet*. 2016a;32(11):751-761. DOI 10.1016/j.tig.2016.09.005.
- Criscione S.W., Theodosakis N., Micevic G., Cornish T.B., Burns K.H., Neretti N., Rodić N. Genome-wide characterization of human L1 antisense promoter-driven transcripts. *BMC Genomics*. 2016b;17:463. DOI 10.1186/s12864-016-2800-5.
- Denli A.M., Narvaiza I., Kerman B.E., Pena M., Benner C., Marchetto M.C., Diedrich J.K., Aslanian A., Ma J., Moresco J.J., Moore L., Hunter T., Saghatelian A., Gage F.H. Primate-specific ORF0 contributes to retrotransposon-mediated diversity. *Cell*. 2015;163(3):583-593. DOI 10.1016/j.cell.2015.09.025.
- Fahlbusch F.B., Dawood Y., Hartner A., Menendez-Castro C., Nögel S.C., Tzschoppe A., Schneider H., Strissel P., Beckmann M.W., Schleussner E., Ruebner M., Dörr H.G., Schild R.L., Rascher W., Dötsch J. Cullin 7 and Fbxw 8 expression in trophoblastic cells is regulated via oxygen tension: implications for intrauterine growth restriction? *J. Matern. Fetal Neonatal Med*. 2012;25(11):2209-2215. DOI 10.3109/14767058.2012.684166.
- Fu J., Lv X., Lin H., Wu L., Wang R., Zhou Z., Zhang B., Wang Y.L., Tsang B.K., Zhu C., Wang H. Ubiquitin ligase cullin 7 induces epithelial-mesenchymal transition in human choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem*. 2010;285(14):10870-10879. DOI 10.1074/jbc.M109.004200.
- He Z.M., Li J., Hwa Y.L., Brost B., Fang Q., Jiang S.W. Transition of LINE-1 DNA methylation status and altered expression in first and third trimester placentas. *PLoS One*. 2014;9(5):96994. DOI 10.1371/journal.pone.0096994.
- Kang X., Qi Y., Zuo Y., Wang Q., Zou Y., Schwartz R.J., Cheng J., Yeh E.T.H. SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Mol. Cell*. 2010;38(2):191-201. DOI 10.1016/j.molcel.2010.03.005.
- Kim E.Y., Chen L., Ma Y., Yu W., Chang J., Moskowitz I.P., Wang J. Enhanced desumoylation in murine hearts by overexpressed SENP2 leads to congenital heart defects and cardiac dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2012;52(3):638-649. DOI 10.1016/j.yjmcc.2011.11.011.
- Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V., Sukhanova N.N., Nazarenko S.A. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur. J. Hum. Genet*. 2004;12(7):513-520. DOI 10.1038/sj.ejhg.5201178.
- Maksimova N., Hara K., Miyashia A., Nikolaeva I., Shiga A., Nogovicina A., Sukhomyasova A., Argunov V., Shvedova A., Ikeuchi T., Nishizawa M., Kuwano R., Onodera O. Clinical, molecular and histopathological features of short stature syndrome with novel CUL7 mutation in Yakuts: new population isolate in Asia. *J. Med. Genet*. 2007;44(12):772-778. DOI 10.1136/jmg.2007.051979.
- Ostertag E.M., Kazazian H.H. Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet*. 2001;35:501-538. DOI 10.1146/annurev.genet.35.102401.091032.
- Price E.M., Cotton A.M., Peñaherrera M.S., McFadden D.E., Kober M.S., Robinson W. Different measures of "genome-wide" DNA methylation exhibit unique properties in placental and somatic tissues. *Epigenetics*. 2012;7(6):652-663. DOI 10.4161/epi.20221.
- Robinson W.P., Price E.M. The human placental methylome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2015;5(5):a023044. DOI 10.1101/cshperspect.a023044.
- Rosser J.M., An W. L1 expression and regulation in humans and rodents. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 2012;4(6):2203-2225. DOI 10.2741/537.
- Santos F., Hyslop L., Stojkovic P., Leary C., Murdoch A., Reik W., Stojkovic M., Herbert M., Dean W. Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI. *Hum. Reprod*. 2010;25(9):2387-2395. DOI 10.1093/humrep/deq151.
- Sasaki Y., Taya Y., Saito K., Fujita K., Aoba T., Fujiwara T. Molecular contribution to cleft palate production in cleft lip mice. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 2014;54(2):94-99. DOI 10.1111/cga.12038.
- Schroeder D.I., Blair J.D., Lott P., Yu H.O., Hong D., Cray F., Ashwood P., Walker C., Korf I., Robinson W.P., LaSalle J.M. The human placenta methylome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(15):6037-6042. DOI 10.1073/pnas.1215145110.
- Smith Z.D., Chan M.M., Mikkelsen T.S., Gu H., Gnirke A., Regev A., Meissner A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*. 2012;484(7394):339-344. DOI 10.1038/nature10960.
- Souquet B., Freed E., Berto A., Andric V., Audugé N., Reina-San-Martin B., Lacy E., Doye V. Nup133 is required for proper nuclear pore basket assembly and dynamics in embryonic stem cells. *Cell Rep*. 2018;23(8):2443-2454. DOI 10.1016/j.celrep.2018.04.070.
- Talamilla O., Barroso-Gomila O., Giordano I., Ajuria L., Grillo M., Mayor U., Barrio R. The role of SUMOylation during development. *Biochem. Soc. Trans*. 2020;48(2):463-478. DOI 10.1042/BST20190390.
- Vasilyev S.A., Markov A.V., Vasilyeva O.Yu., Tolmacheva E.N., Zatulina L.A., Sharysh D.V., Zhigalina D.I., Demeneva V.V., Lebedev I.N. Method of targeted bisulfite massive parallel sequencing of the human LINE-1 retrotransposon promoter. *MethodsX*. 2021a;8:101445. DOI 10.1016/j.mex.2021.101445.
- Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Lebedev I.N. Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239. *Russ. J. Genet*. 2010;46(11):1381-1385. DOI 10.1134/S1022795410110141.
- Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Y., Markov A.V., Zhigalina D.I., Zatulina L.A., Lee V.A., Serdyukova E.S., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2021b;38(1):139-149. DOI 10.1007/s10815-020-02003-1.

ORCID ID

V.V. Demeneva orcid.org/0000-0002-5315-4914
E.N. Tolmacheva orcid.org/0000-0002-0716-4302
T.V. Nikitina orcid.org/0000-0002-4230-6855
E.A. Sazhenova orcid.org/0000-0003-3875-3932
S.Yu. Yuriev orcid.org/0000-0002-1343-5471
A.Sh. Makhmutkhodzhaev orcid.org/0000-0002-7541-0317

A.S. Zuev orcid.org/0000-0001-9474-9335
S.A. Filatova orcid.org/0000-0002-9344-0253
A.E. Dmitriev orcid.org/0000-0002-0070-4863
Ya.A. Darkova orcid.org/0000-0002-7117-9250
L.P. Nazarenko orcid.org/0000-0002-1861-433X
I.N. Lebedev orcid.org/0000-0002-0482-8046
S.A. Vasilyev orcid.org/0000-0002-5301-070X

Благодарности. Исследование проведено в рамках реализации темы государственного задания № 1022072600037-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.10.2022. После доработки 26.12.2022. Принята к публикации 30.12.2022.