

---

---

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ ERVWE1 И ERVFRDE1 В ПЛАЦЕНТАРНЫХ ТКАНЯХ НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

Е.Г. Деревянчук, N. Souren, K. Lepikhov, Т.П. Шкурат

Лаборатория биомедицины НИИ биологии  
Южный федеральный университет  
Saarland University, Saarbrucken, Germany  
*пр. Стачки 194/1, Ростов-на-Дону, Россия, 344104*

Поиск причин, лежащих в основе патологических процессов эмбрионального развития человека, занимает лидирующую позицию среди исследований в области репродукции человека. Поэтому нами был проведен анализ эпигенетических феноменов, регулирующих экспрессию генов, которые вовлечены в процессы формирования плаценты. Было установлено, что нарушенный уровень метилирования генов эндогенных вирусов человека ERVWE1 и ERVFRDE1 в хорионической ткани плодной части плаценты может быть ассоциирован с патологическим течением и неблагоприятным исходом беременности.

**Ключевые слова:** невынашивание беременности, метилирование, гены эндогенных вирусов человека, ERVWE1, ERVFRDE1, плацента.

Невынашивание беременности является одной из наиболее частых и распространенных проблем репродукции человека. Невынашивание беременности в сроки до 20 нед. является самопроизвольным выкидышем [2; 5]. Частота самопроизвольного прерывания беременности составляет около 17–22% от общего числа всех выявленных беременностей [3; 4; 19]. При этом в ранние сроки беременности (6–8 нед.) происходит 40–80% от всех самопроизвольных выкидышей [12]. Зачастую невынашивание беременности случается вследствие не одной, а нескольких причин. Безусловно лидирующее место среди всех известных причин невынашивания беременности и самопроизвольного ее прерывания принадлежит генетическим факторам, так как хромосомные аномалии плода наблюдаются в 50% ранних потерь беременности [19; 2]. Среди других причин невынашивания беременности различают экстрагенитальную патологию, анатомические аномалии и инфекционные заболевания половой системы матери, эндокринные нарушения, иммунные факторы и др. [5; 11]. Однако у 45–50% женщин все же не удастся установить истинную причину, в результате которой произошло самопроизвольное прерывание беременности. Очевидно, что исследование факторов, лежащих в основе данной патологии раннего онтогенеза человека, имеет высокую значимость.

Не сегодняшний день все большее внимание уделяется эпигенетическим процессам, нарушение которых может приводить к различной патологии эмбрионального развития человека на ранних сроках беременности [7; 8; 17; 18]. Под термином «эпигенетика» понимают митотически и мейотически наследуемые изменения экспрессии генов при отсутствии структурных изменений их нуклеотидной последовательности [14]. На молекулярном уровне эпигенетические процессы представлены метилированием CpG-динуклеотидов ДНК и модификациями гистонов хроматина (ацетилированием, фосфорилированием и др.). По данным многочисленных исследований известно, что метилирование CpG насыщенных промоторных областей (CpG-островков) большинства генов блокирует их транскрипцию и, следовательно, подавляет экспрессию [6]. Понимание эпигенетических механизмов регуляции активности генома в ходе эмбриогенеза человека и развития плаценты, как наиболее важного эмбрионального органа и главного компонента функциональной системы мать–плод, может внести неоценимый вклад в раскрытие этиологии патологических процессов, возникающих на ранних сроках беременности.

Плацента формируется из эмбриональных клеток и состоит из материнской (децидуальная ткань) и плодной частей (хорионическая ткань). Этот временный орган начинает формироваться из трофобластических клеток плода в момент имплантации бластоцисты на 7-е сутки эмбриогенеза человека [1]. В дальнейшем трофобласт трансформируется в цитотрофобласт, который дает начало многоядерному поверхностному клеточному слою – синцитиотрофобласту. Было показано, что гены эндогенных ретровирусов человека играют важную роль в слиянии клеточных стенок и образовании синцитиотрофобласта. В частности, гены ERVWE1 и ERVFRDE1 активно транскрибируются в плацентарных тканях и продуцируют синцитин-1 и синцитин-2 – белки, необходимые для синцитиализации цитотрофобласта [10; 15].

Таким образом, целью нашего исследования было оценить роль уровня метилирования генов ERVWE1 и ERVFRDE1 в развитии патологических процессов эмбриогенеза человека на ранних сроках беременности.

**Материалы и методы.** Образцы плацентарных тканей были получены на кафедре акушерства и гинекологии Ростовского медицинского университета. Децидуальная и хорионическая ткани были получены от беременных женщин в результате самопроизвольного аборта, в ходе неразвивающейся или физиологической беременности, терминированным по медицинским показаниям. Исследование проводилось с информированного согласия обследуемых женщин. Все образцы тканей были заморожены и хранились при температуре 80 °С до выделения ДНК.

Геномная ДНК была выделена из децидуальной и хорионической тканей с использованием стандартного протокола. Для проведения анализа уровней метилирования генов ДНК была обработана бисульфитом натрия,

при этом все неметилированные цитозины были конвертированы в урацил, тогда как метилированный цитозин остался неизменным. Далее была произведена ПЦР с применением праймеров для генов ERVWE1 и ERVFRDE1 собственного дизайна. Продукты ПЦР были идентифицированы с помощью электрофореза. Уровень метилирования генов оценивался с использованием SNUPE метода (single-nucleotide primer extension) в сочетании с ион-парной обратнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией после очистки ПЦР продуктов от неизрасходованных реагентов ПЦР реакции и димеров праймеров ExonucleaseI/SAP-ферментом. Индекс метилирования был рассчитан по формуле  $AC/(AC + AT)$ , где AC и AT – площадь пика соответствующего праймеру, элонгированному на дидезоксицитозин или дидезокситимин. Были проанализированы только два CpG-сайта в ампликоне, так как известно, что в коротких последовательностях (менее 1000 п.о.) большинство соседних CpG-сайтов также метилированы или деметилированы [9].

**Результаты.** Для исключения генетической патологии, которая могла явиться причиной неблагоприятного исхода беременности, нами был проанализирован уровень метилирования LINE1 элементов как индикаторов геномной стабильности в обеих тканях (децидуальной и хорионической) беременных женщин всех трех исследуемых групп [16]. В итоге нами было установлено, что уровень метилирования LINE1 элементов не отличался во всех обследуемых группах беременных с небольшой разницей в зависимости от типа ткани и составил приблизительно 36% для первого CpG-сайта (CpG1) и 30% – для второго (CpG2) в хорионической ткани и 45% для CpG1 и 38% для CpG2 в децидуальной ткани (рис. 1).

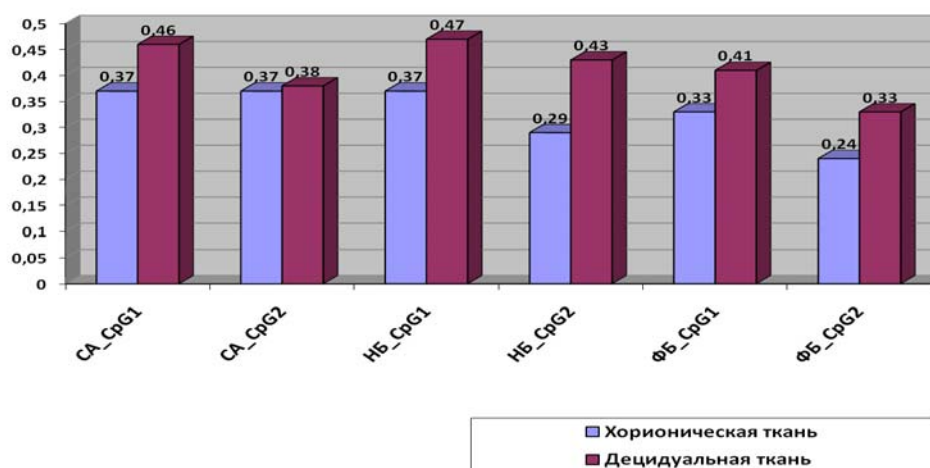


Рис. 1. Уровень метилирования LINE1 элементов в плацентарных тканях при различном течении беременности:

СА – самопроизвольный аборт, НБ – неразвивающаяся беременность,  
ФБ – физиологическая беременность

Согласно литературным данным, промоторные регионы генов ERVWE1 и ERVFRDE1 гипометилированы в хорионической ткани и имеют высокий уровень метилирования в децидуальной ткани материнской части плаценты [10]. Эти результаты соответствуют данным о функции синцитинов в плодной части плаценты, принимая во внимание тот факт, что гены экспрессируются в случае отсутствия метилирования в их промоторной области. Кроме того, для гена синцитина-2 описано дифференциальное метилирование, при котором второй CpG-сайт (CpG2) имеет более низкий уровень метилирования чем первый (CpG1) [10]. Результаты нашего исследования уровней метилирования генов ERVWE1 и ERVFRDE1 в плацентарных тканях не противоречат литературным данным, так как нами также было обнаружено тканеспецифическое метилирование обоих генов: гиперметилирование промоторных областей в децидуальной ткани и низкий уровень метилирования в хорионической ткани плаценты (рис. 2 и 3). Однако нами было выяснено, что между группами с патологическим течением беременности и контрольной группой беременных женщин наблюдалась статистически значимая разница в уровне метилирования генов ERVWE1 и ERVFRDE1, но только в хорионической ткани. Причем группах с нарушением гестации уровень метилирования обоих генов в этой ткани был в 2 раза выше в по сравнению с контролем.

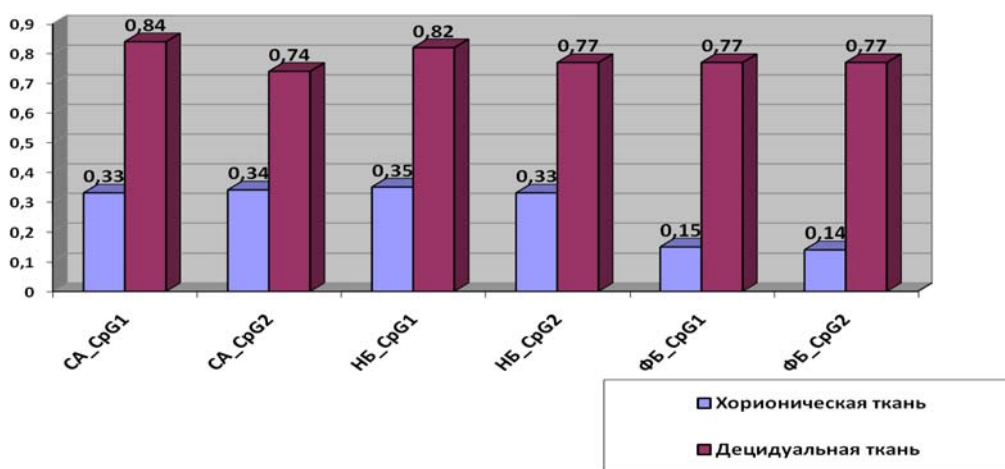


Рис. 2. Уровень метилирования ERVWE1 в плацентарных тканях при различном течении беременности:

СА – самопроизвольный аборт, НБ – неразвивающаяся беременность, ФБ – физиологическая беременность

При измерении уровня метилирования генов синцитинов в других соматических тканях (сыворотке крови беременных женщин, слюне и ткани эмбриона) было выявлено гиперметилирование обоих CpG-сайтов гена ERVWE1 и CpG1 ERVFRDE1, и отмечался повышенный уровень метилирования второго CpG-сайта гена ERVFRDE1 (рис. 4).

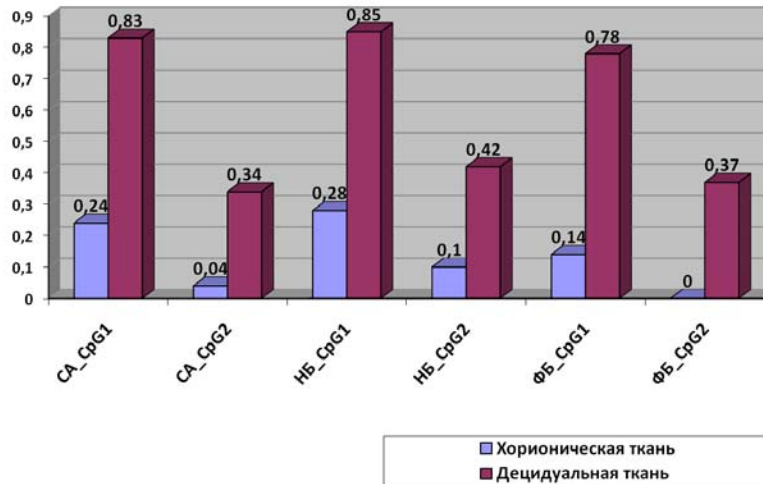


Рис. 3. Уровень метилирования ERVFRDE1 в плацентарных тканях при различном течении беременности:

СА – самопроизвольный аборт, HB – неразвивающаяся беременность, ФБ – физиологическая беременность

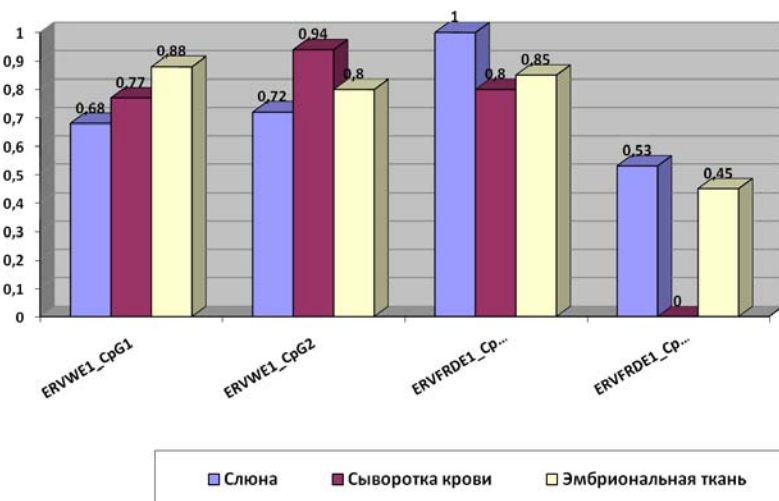


Рис. 4. Уровень метилирования генов ERVWE1 и ERVFRDE1 в соматических тканях при физиологически протекающей беременности

**Выводы.** В результате нашего исследования было обнаружено тканеспецифическое метилирование генов синцитинов, при котором наблюдалось их дифференциальное метилирование в разных типах плацентарных и соматических тканей. Такое явление тканеспецифического метилирования характерно для большинства генов, экспрессируемых в человеческом организме на различных этапах онтогенеза [13]. Полученные нами данные позволяют выдвинуть предположение, что уровни метилирования генов эндогенных

вирусов человека ERVWE1 и ERVFRDE1 могут быть использованы в качестве потенциальных диагностических маркеров, прогнозируемых отсутствие или наличие патологического течения эмбриогенеза человека уже на ранних сроках беременности. Вероятно, выявленное повышение уровней метилирования в промоторной области генов ERVWE1 и ERVFRDE1 в ткани плодной части плаценты в группах с неблагоприятным исходом беременности указывает на подавление экспрессии этих генов и как следствие нарушение синцитиализации цитотрофобласта и аномальное развитие плаценты. Однако для подтверждения нашего заключения необходим дополнительный сравнительный анализ метилирования генов синцитинов и экспрессии этих генов в плацентарных тканях, а также гистохимический и морфологический анализ плаценты при различном течении беременности.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.», госконтракт № 14.740.11.0006.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии: Учеб. для вузов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., 2005.
2. Дуда В.И., Дрожжина О.Г. Акушерство: Учеб. пособ.И. Дуда. – 3-е изд. – М., 2007.
3. Радзинский В.Е., Оразмурадов А.А. Ранние сроки беременности // Status praesens. – М., 2009.
4. Акушерство: Национальное руководство / Под ред. Э.К. Айламазяна и др. – М., 2007.
5. Радзинский В.Е., Ордяниц И.М., Оразмурадов А.А. Женская консультация. 2-е изд. – Петрозаводск, 2007.
6. Vaissiere T., Sawan C., Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing // Mutat Res. – 2008. – V. 659. – P. 40–48.
7. Bourque D.K., Avila L., Penaherrera M. et al. Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia // Placenta. – 2010. – V. 31. – P. 197–202.
8. Chelbi S.T., Vaiman D. Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia // Mol Cell Endocrinol. – 2008. – V. 282. – P. 120–129.
9. Eckhardt F., Lewin J., Cortese R. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22 // Nat Genet. – 2006. – V. 38. – P. 1378–1385.
10. Gimenez J., Montgiraud C., Oriol G. et al. Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues // DNA Res. – 2009. – V. 16. – P. 195–211.
11. Griebel C.P., Halvorsen J., Golemon T.B. et al. Management of spontaneous abortion // Am Fam Physician. – 2005. – V. 72. – P. 1243–1250.
12. Hourrier S., Salomon L.J., Dreux S. et al. Screening for adverse pregnancy outcome at early gestational age // Clin Chim Acta. – 2010. – V. 411. – P. 1547–1552.
13. Papageorgiou E.A., Fiegler H., Rakyan V. et al. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies // Am J Pathol. – 2009. – V. 174. – P. 1609–1618.

14. Russo V.E.A, Martienssen R.A., Riggs A.D. Epigenetic mechanisms of gene regulation // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – N. Y. – 1996.
15. Vargas A., Moreau J., Landry S. et al. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells // J. Mol. Biol. – 2009. – V. 392. – P. 301–318.
16. Konkel M.K., Batzer M.A. A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome // Semin Cancer Biol. – 2010. – V. 20. – P. 211–221.
17. Yuen R.K., Penaherrera M.S., Dodelszien P. von et al. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia // Eur/ J/ Hum/ Genet. – 2010. – V. 18. – P. 1006–1012.
18. Zhang H.J., Siu M.K., Wong E.S. et al. Oct4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease // Placenta. – 2008. – V. 29. – P. 549–554.
19. Zhang Y.X., Zhang Y.P., Gu Y. et al. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and arrayCGH // Clin/ Genet. – 2009. – V. 75. – P. 133–140.

## **COMPARATIVE ANALYSIS OF ERVWE1 AND ERVFRDE1 GENES METHYLATION LEVELS IN PLACENTAL TISSUES IN EARLY PREGNANCY**

**E.G. Derevyanchuk, N. Souren, K. Lepikhov, T.P. Shkurat**

Laboratory of Biomedicine  
Research institute of Biology, South Federal University  
Saarland University, Saarbrücken, Germany  
*Stachki Str., 194/1, Rostov-on-Don, Russia, 344104*

The search of the causes, underlying pathological processes of the human embryogenesis, has the leading position among studies in the field of Human Reproduction. Therefore we conducted analysis of the epigenetic phenomenon, which regulates expression of the genes, involved in the placenta formation processes. It was suggested, that abnormal methylation levels of human endogenous retroviruses ERVWE1 и ERVFRDE1 genes in chorionic tissue of the placenta fetal part can be associated with pathological course and adverse outcome of the pregnancy.

**Keywords:** noncarrying of pregnancy, methylation, genes of human endogenous retroviruses (HERV), ERVWE1, ERVFRDE1, placenta.