

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПОДСЕМЕЙСТВ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1 В ВОРСИНАХ ХОРИОНА ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

© 2023 г. С. А. Васильев^{1, *}, В. В. Деменова¹, Е. Н. Толмачева¹, С. А. Филатова^{1, 2},
А. С. Зувев¹, А. С. Ушакова^{1, 2}, О. Ю. Васильева¹, И. В. Лушников²,
Е. А. Саженова¹, Т. В. Никитина¹, И. Н. Лебедев¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 25.06.2023 г.

После доработки 21.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Невынашивание беременности потенциально связано с нарушениями эпигенетической регуляции генов, ответственных за развитие эмбриона и плаценты. Цель настоящей работы – анализ уровня метилирования различных подсемейств ретротранспозона LINE-1, составляющего около 17% всего генома, в ворсинах хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с различным кариотипом, включая наиболее распространенные анеуплоидии. Был проведен анализ профиля метилирования в промоторе ретротранспозона LINE-1 с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в ворсинах хориона медицинских абортусов ($n = 39$), спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ($n = 173$), трисомией 16 ($n = 62$) и моносомией X ($n = 46$), а также в лимфоцитах периферической крови здоровых добровольцев ($n = 17$). Уровень метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в контрольных группах лимфоцитов взрослых индивидов и в ворсинах хориона медицинских абортусов был наибольшим для эволюционно молодых подсемейств L1HS, меньшим – для более древних подсемейств L1PA2, L1PA3 и минимальным для еще более древнего подсемейства L1PA4. В группах спонтанных абортусов наблюдался повышенный уровень метилирования LINE-1, причем этот эффект был более выражен для более древних подсемейств LINE-1. Выявленные закономерности указывают на меньший контроль за более древними подсемействами ретротранспозона LINE-1 в геноме человека, которые потенциально могут использоваться в качестве регуляторных элементов для расположенных рядом генов, участвующих в эмбриональном развитии. Повышение уровня метилирования таких последовательностей может нарушать развитие плаценты и эмбриона и вносить определенный вклад в невынашивание беременности.

Ключевые слова: ретротранспозон LINE-1, метилирование ДНК, ворсины хориона, невынашивание беременности, анеуплоидия, бисульфитное секвенирование, спонтанные абортусы.

DOI: 10.31857/S0016675823120147, **EDN:** PQAIPV

Невынашивание беременности является распространенным явлением, затрагивающим около 15% всех беременностей [1]. Существует много известных причин выкидыша, главной из которых является анеуплоидия. Тем не менее, почти 50% случаев потери беременности на ранних сроках остаются необъясненными [2].

Плацента выполняет ведущую роль в раннем эмбриональном развитии, обеспечивая питание зародыша и взаимодействие между ним и матерью. К окончанию первого триместра беременности критичным для дальнейшего развития эмбриона становится нормальное протекание процесса ремоделирования спиральных артерий, так как до девятой недели беременности пробки из клеток вневорсинчатого трофобласта ограничивают поступление материнской крови в пространство

между ворсинками хориона. Закупорка помогает поддерживать состояние физиологической гипоксии на ранних стадиях процесса плацентации, способствуя пролиферации цитотрофобласта, а не дифференцировке и инвазии [3]. После распада этих пробок примерно на девятой неделе беременности маточно-плацентарные спиральные артерии начинают снабжать материнской кровью межворсинчатое пространство [4]. Эмбрионы, которые не могут обеспечить нормальное протекание этого процесса, по-видимому погибают из-за гипоксии и недостатка питательных веществ.

Фундаментальную роль в контроле развития плаценты играют эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов [5]. Плацента обладает специфическим метиломом, значительно отличающим ее от эмбриональных тканей и тканей

взрослого организма [6]. Ключевым его свойством является низкий уровень метилирования различных повторяющихся последовательностей, включая эндогенные ретровирусы и ретротранспозоны [7]. Известно, что гены, имеющие ретровирусное происхождение, играют важную роль в формировании и функционировании плаценты [8]. Ошибки регуляции таких последовательностей, в основном осуществляемой за счет метилирования ДНК, может потенциально объяснять нарушения функционирования плаценты на ранних сроках беременности и приводить к невынашиванию беременности.

Кроме того, важную роль на ранних стадиях развития эмбриона и плаценты играют различные мобильные генетические элементы, включая эндогенные ретровирусы человека и ретротранспозоны [9, 10]. Подсемейства LINE-1 различаются между собой отдельными заменами нуклеотидов, которые являются специфическими для всех членов отдельного подсемейства. В геномах гоминоидных приматов распространились пять подсемейств ретротранспозона LINE-1 (L1P1, L1PA2, L1PA3, L1PA4, L1PA5) [11, 12]. Еще одно подсемейство (L1HS) является специфичным только для человека [13]. Ранее нами были выявлены нарушения уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона у спонтанных абортусов первого триместра беременности с анеуплоидией по различным хромосомам [14].

Цель настоящего исследования – анализ уровня метилирования различных подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с нормальным кариотипом и с наиболее частыми анеуплоидиями – трисомией 16 и моносомией X.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования были отобраны образцы ворсин хориона медицинских абортусов (МА) ($n = 39$, гестационный возраст 8.3 ± 1.8 нед.), спонтанных абортусов (СА) с нормальным кариотипом ($n = 173$, гестационный возраст 7.6 ± 1.9 нед.), трисомией по хромосоме 16 ($n = 62$, гестационный возраст 6.9 ± 1.9 нед.) и моносомией X ($n = 46$, гестационный возраст 8.8 ± 1.2 нед.). Образцы, взятые из биобанка "Биобанк населения Северной Евразии" НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, были получены в период с 1993 по 2022 г. До начала исследования образцы хранили при температуре -80°C без размораживания. В качестве группы сравнения использовались лимфоциты периферической крови здоровых добровольцев ($n = 17$, возраст 30.8 ± 2.7 лет). Исследование проводилось с соблюдением этических норм в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Для всех образцов из биобанка было получено информированное согласие родителей на использование биоматериала для био-

банкирования и проведения исследований. Также были получены информированные согласия от здоровых добровольцев. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Для определения кариотипа был проведен стандартный цитогенетический анализ на прямых препаратах ворсин хориона и культурах фибробластов экстраэмбриональной мезодермы [15]. Результаты кариотипирования всех спонтанных абортусов с анеуплоидией были подтверждены методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Уровень мозаицизма по анеуплоидии оценивали с нижним порогом 10% и верхним порогом 90%. Для анализа моносомии по X-хромосоме были использованы центромеро-специфичные ДНК-зонды на хромосому X, а для анализа трисомии по 16-ой хромосоме были использованы субтеломерные ДНК-зонды (16q и 16p). Анализ проводился по описанной ранее методике [16]. Выделение геномной ДНК из ворсин хориона и лимфоцитов периферической крови проводили с помощью фенол-хлороформного метода.

Праймеры для таргетного обогащения части промотора ретротранспозона LINE-1 с помощью ПЦР были разработаны на основе референсной последовательности ретротранспозона LINE-1 подсемейства L1HS, взятой из базы данных GenBank (X58075.1). Анализ проводился в соответствии с разработанным ранее протоколом [17].

Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование было проведено на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Nano Kit (2×250). Оценка качества прочтений была выполнена с помощью FastQC v0.11.8, после чего был проведен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore. Затем прочтения были картированы на бисульфит-конвертированные таргетные последовательности с помощью инструмента bwa-meth v0.2.2 (<https://github.com/brentp/bwa-meth>) с параметрами по умолчанию. Данные по метилированию в контексте CpG были извлечены из полученных файлов BAM с помощью инструмента MethylDackel (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>). Уровень метилирования анализировался только в CpG-сайтах с покрытием более 10.

Сайты посадки использованных праймеров присутствуют в последовательностях нескольких подсемейств LINE-1. Для определения степени совпадения был проведен анализ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием бисульфит-конвертированной последовательности участка промотора LINE-1, получаемого с помощью разработанных в работе праймеров, и бисульфит-конвертированных консенсусных последовательностей повторов в геноме человека, полученных из UCSC Repeat Browser [18] (рис. 1). Результаты анализа показали, что в совпадающих с L1HS после-

довательностях L1P2, L1PA6, LTR65, HERVL18 и MER110-int отсутствует последовательность прямого праймера, а в последовательностях L1PA7 и L1PA10 – последовательность обратного праймера. Поэтому для этих подсемейств с использованием разработанных праймеров не могло быть получено продукта ПЦР. В результате полное перекрытие последовательностей обнаружено только для следующих подсемейств LINE-1: L1HS, L1P1, L1PA2, L1PA3, L1PA4, L1PA5. Были выделены три участка с повышенной вариабельностью без CpG-сайтов, SNP в которых могут быть использованы для последовательной классификации прочтений, относящихся к разным подсемействам LINE-1 (рис. 1). Первый участок позволяет провести фильтрацию подсемейств L1HS и L1PA2, второй участок – подсемейства L1PA5, третий участок – подсемейств L1PA3, L1PA4, L1P1. Для каждого нераспределенного прочтения был проведен анализ BLAST по сравнению с консенсусными последовательностями подсемейств LINE-1, по результатам которого прочтение было отнесено к подсемейству с максимальной степенью совпадения. При проведении сравнений позиции цитозинов были маскированы.

Результаты представлялись в виде уровня метилирования, равного отношению числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тимина в отдельном CpG-сайте. Кроме того был вычислен средний уровень метилирования вдоль всей области интереса. Статистический анализ был выполнен с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Ранговый критерий Манна–Уитни был использован для сравнения уровня метилирования между группами образцов. Для определения границ выбросов в группе медицинских абортусов использовались формулы $Q_1 - 1.5IQR$ и $Q_3 + 1.5IQR$, где Q_1 и Q_3 – первый и третий квартиль соответственно, IQR – межквартильное расстояние. Отличия считались значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После фильтрации всех прочтений по подсемействам LINE-1 было обнаружено, что наиболее представленным подсемейством оказалось подсемейство L1PA3 (21%), а большая часть прочтений относилась к подсемействам L1HS, L1PA2 и L1PA3 (суммарно 55 и 54% в группах СА и МА соответственно) (рис. 2, а, б). На оставшиеся подсемейства приходилось в сумме менее 1% всех прочтений. В подсемейство L1PA5 попало менее 0.1% прочтений, в связи с чем в дальнейшем анализе оно не использовалось. Около 44% прочтений не удалось классифицировать как относящиеся к одному из подсемейств LINE-1 (рис. 2, а, б). Возможно, это связано с генетическими вариантами, возникшими в отдельных сайтах в регионах, по которым проводилась классификация подсемейств. Поэтому для нераспределенных прочтений была опреде-

лена степень близости их последовательности к консенсусным последовательностям различных подсемейств LINE-1. Было обнаружено, что большая часть всех нераспределенных последовательностей (77.6%) была наиболее близка к подсемейству L1HS (рис. 2, в). Таким образом, около 48% всех прочтений относилось к подсемейству L1HS.

Уровень метилирования в лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов и ворсинках хориона медицинских и спонтанных абортусов отличался между разными подсемействами LINE-1, будучи самым высоким для эволюционно наиболее молодого подсемейства L1HS, специфичного для человека и сохранившего способность к ретротранспозиции копии LINE-1 (рис. 3, 4). Уровень метилирования был ниже для более эволюционно древних подсемейств L1PA2 и L1PA3, и минимальным – для самого древнего подсемейства L1PA4. Исключением стало эволюционно молодое подсемейство L1P1, для которого уровень метилирования был на уровне более древних подсемейств (рис. 3, 4). Выявленный тренд к снижению уровня метилирования различных подсемейств LINE-1 от эволюционно молодых к более древним (за исключением L1P1) в лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов и ворсинках хориона соответствовал таковому в образцах опухолей различной локализации [19]. Это указывает на общую тенденцию в тканях разной локализации, включая опухолевые клетки.

Ранее нами был обнаружен повышенный уровень метилирования LINE-1 в спонтанных абортусах с анеуплоидным кариотипом [14]. При анализе отдельно в каждом подсемействе индекс метилирования LINE-1 значимо не отличался между медицинскими абортусами и объединенной выборкой всех спонтанных абортусов для более молодых подсемейств L1HS (МА – $51.1 \pm 3.1\%$; СА – $52.6 \pm 5.0\%$, $p = 0.12$) и L1PA2 (МА – $36.6 \pm 2.8\%$; СА – $37.9 \pm 5.4\%$, $p = 0.3$). Индекс метилирования более древних подсемейств LINE-1 был выше в объединенной выборке спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами: L1PA3 (МА – $37.4 \pm 2.3\%$; СА – $39.4 \pm 5.0\%$, $p = 0.02$), L1PA4 (МА – $23.5 \pm 7.1\%$; СА – $30.8 \pm 9.9\%$, $p < 0.001$). Индекс метилирования в недифференцированных подсемействах был также выше у спонтанных абортусов (МА – $40.7 \pm 2.0\%$; СА – $43 \pm 4.5\%$, $p = 0.001$). Исключением стало эволюционно молодое подсемейство L1P1 (МА – $20.8 \pm 8.4\%$; СА – $23.5 \pm 8.0\%$, $p = 0.004$), для которого уровень метилирования был также повышен в группе спонтанных абортусов.

При сравнении уровня метилирования LINE-1 каждой отдельной подгруппы спонтанных абортусов с медицинскими абортусами результаты различались. Спонтанные абортусы с трисомией 16 имели значимо более высокий средний уровень метилирования LINE-1 и уровни метилирования всех подсемейств LINE-1 по сравнению с меди-

X58075	1	TATTAGGGAGTG-TTAGATAGTGGGCGTAGGTTATTGTGTGC-GCGTATCGTGCGGAGTCG	60
L1HS	113-.....G.....T-.....	172
L1PA2	112-.....G.G.....-.....	171
L1PA3	112-.....A.G.G...TA.....	172
L1PA4	113	...G.....-.....T...A.G.G...TA.....T.....	173
L1P1	110	...G.....-.....T...A.G.G...TA.....A..T.....	170
L1PA5	108	...G...TT...-CG.....T...A.G.G...TA.TT...A.T.T.....	168
L1P2	147	152
L1PA6	149T.....	154
L1PA10	105-...T..G.....T...T...-----G.----G.N...A.	151
L1PA7	110-...T..G.....T...T...-----G.----G.....	156
X58075	61	AAGTAGGGCGAGGTATTGTTTTATTGGGAAGCGTAAGGGGTTA-GGGAGnnnnnnnnnCGA	121
L1HS	173-.....	234
L1PA2	172T.....-.....	233
L1PA3	173C.....-.....TT.	234
L1PA4	174C.....-.....A.....TT.	235
L1P1	171C.....C.....TA.....-.....A.....TT.	232
L1PA5	169C.....C.....N.....-.....A.....TT.	230
L1P2	153G...C.....C.....T.....CG-..GA.....TT.	214
L1PA6	155G...C.....-.....G...T.....TT.	216
L1PA10	152T.G.....C.....N.....-.....A.....TT.	213
L1PA7	157T.G..CG.C.....C.....CG-...A.....TT.	218
X58075	122	GTTAAGAAAGGGGTGACGGA-C-GTATTTGAAAATCGGGTTATTTTTATTTCG--AATATT	179
L1HS	235-.....-.....	292
L1PA2	234-G.....-.....	291
L1PA3	235TA..-G.....TT--.....	292
L1PA4	236TA..TG-.....TT--.....	293
L1P1	233TA..TG-.....TT--.....	290
L1PA5	231	...G.G...C...TA..-G.....TT--.....	288
L1P2	215	...G.G...TC...TA..-TT.....A.....TA--.....	272
L1PA6	217	...G.G...TC...TA..TT-.....AT...A.....CG..TA--.....	274
L1PA10	214	...G.G...	223
L1PA7	219	...G.G...TTN...G...TT-..G..AT..GG.A...TG...CGG..TA--G....	276
HERVL18	1915TT.....-.....	1938
X58075	180	GCGTTTTTTAGATCGGTTTAAGAAACGGCGTATTACGAGATTATATTTATATTTGGTTTAGAGG	244
L1HS	293	356
L1PA2	292C..CG.....A.....CG.....CG.....	356
L1PA3	293C..CG.....A.....G.....CG.....CG.....	357
L1PA4	294TA..G.....T.....TA.....G.....CG.....CG.....	358
L1P1	291TA..G..T...GT...TA.....G.....CG.....CG.....	355
L1PA5	289TA..G.T...GT...TA.....G.....CGCG.....CG.....	353
L1P2	273TA..G.T...GT...T..TA.....G.....CG.G.....	331
L1PA6	275TT..G.T...GT...TT..TAG...G...T.T...CG.G.....T..	340
L1PA7	277	AT.....TT.....	294
LTR65	317T...T.A..G..T..TG..T..A.....AT....	362
HERVL18	1939	-.....	1943
MER110	4329	4346

Рис. 1. Результаты анализа BLAST бисульфит-конвертированной последовательности участка промотора LINE-1, получаемого с помощью разработанных в работе праймеров, и бисульфит-конвертированных консенсусных последовательностей повторов в геноме человека, полученных из UCSC Repeat Browser. В верхней строке текста приведена референсная последовательность, взятая из базы данных GenBank (X58075.1), ниже – последовательности повторов в геноме человека, полученные из UCSC Repeat Browser. Точками отмечены сайты, совпадающие с референсной последовательностью, буквами – несовпадающие позиции. Желтым цветом выделены сайты гибридизации праймеров; зеленым цветом выделены варибельные регионы, по присутствию которых проводилась фильтрация прочтений, специфичных для различных подсемейств LINE-1.

цинскими абортусами (рис. 4). Для спонтанных абортусов с моносомией X значимо более высокий уровень метилирования LINE-1 по сравнению с медицинскими абортусами отмечался для подсемейств L1PA4, L1P1, нераспределенных прочтений и среднего уровня метилирования LINE-1. Спонтанные абортусы с нормальным кариотипом име-

ли повышенный уровень метилирования лишь для подсемейств L1PA4, L1P1 и нераспределенных прочтений (рис. 4).

Во всех группах спонтанных абортусов был в два раза выше коэффициент вариации (CV) среднего уровня метилирования LINE-1 (CA НК – 11.6%, Моно X – 11.4%, Три 16 – 10.55%) по срав-

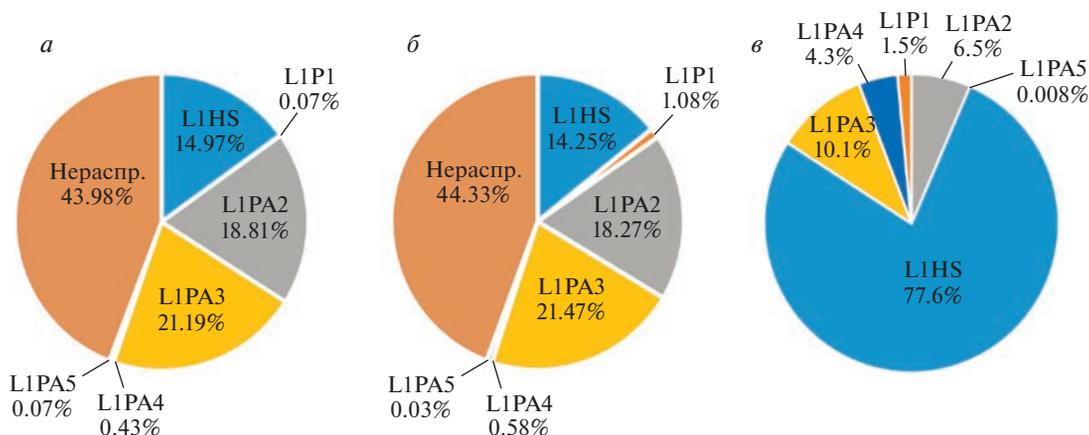


Рис. 2. Распределение прочтений между подсемействами LINE-1. *a* – в группе спонтанных абортусов (СА), *б* – в группе медицинских абортусов (МА), *в* – представленность подсемейств LINE-1 в группе нераспределенных прочтений.

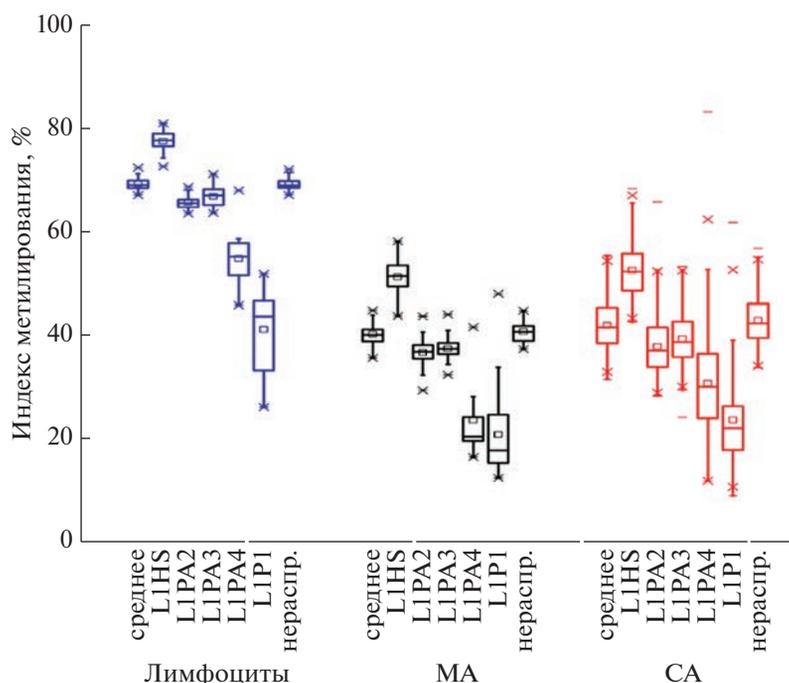


Рис. 3. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 и индекс метилирования отдельных подсемейств LINE-1 в лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов и в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА), и объединенной группы спонтанных абортусов с различным кариотипом (СА). Бокс – 25–75% процентиля, усы – границы выбросов; полосой в боксе отмечена медиана, квадратом – среднее значение, крестами отмечены значения 1 и 99%, горизонтальными чертами – минимальное и максимальное значения.

нению с медицинскими абортусами (5.5%) (рис. 4). В результате значительная часть спонтанных абортусов имела уровень метилирования LINE-1 выше границы выбросов в группе медицинских абортусов (табл. 1). Доля спонтанных абортусов с уровнем метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов, возрастала с увеличением эволюционного возраста подсемейства LINE-1 в ряду L1HS, L1PA2, L1PA3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ уровня метилирования различных подсемейств ретротранспозона LINE-1 подтвердил наши более ранние результаты [14] и показал, что в ворсинах хориона спонтанных абортусов повышен как средний уровень метилирования ретротранспозона LINE-1, так и уровень метилирования отдельных подсемейств ретротранспозона LINE-1. При этом для эволюционно более древних подсемейств повышение уровня метили-

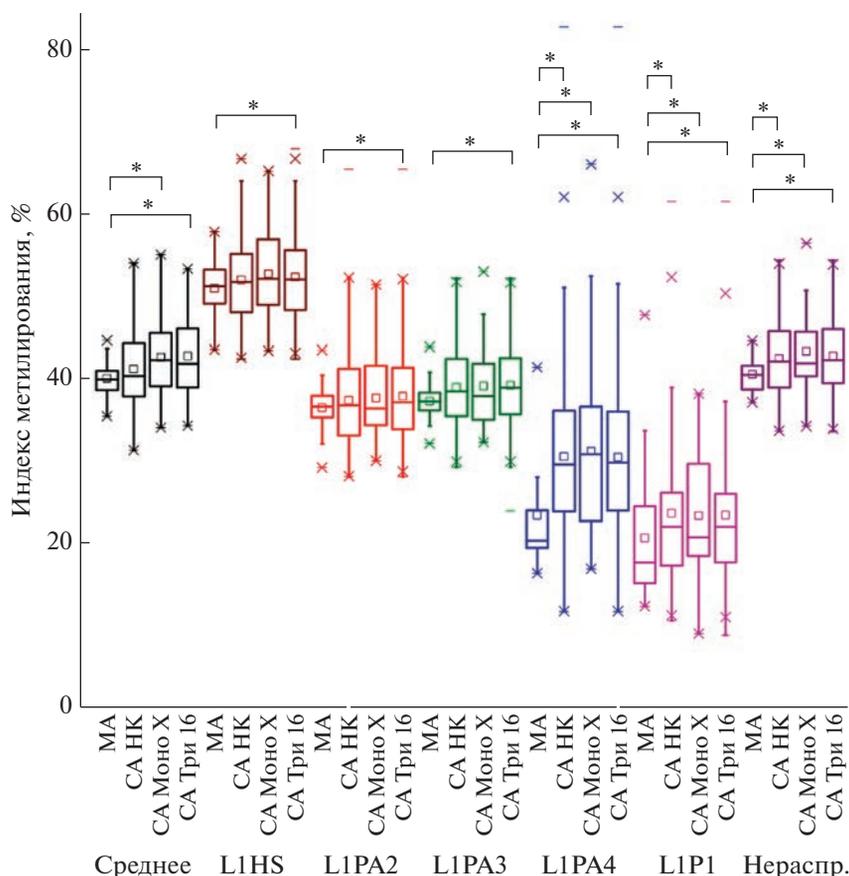


Рис. 4. Средний индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 и индекс метилирования отдельных подсемейств LINE-1 в ворсинах хориона медицинских абортусов (МА), и спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (СА НК), с моносомией X (СА Моно X), с трисомией 16 (СА Три 16). Бокс – 25–75% процентиля, усы – границы выбросов, полосой в боксе отмечена медиана, квадратом – среднее значение, крестами отмечены значения 1 и 99%, горизонтальными чертами – минимальное и максимальное значения, нераспр. – прочтения, нераспределенные на группы по результатам анализа; * – $p < 0.05$.

рования LINE-1 относительно уровня, характерного для контрольной группы медицинских абортусов, было более выраженным по сравнению с эволюционно молодыми семействами. Это может быть связано с тем, что наиболее эволюционно молодое подсемейство LINE-1 (L1HS) еще способно к ретротранспозиции и находится под более жестким контролем за счет метилирования ДНК в промоторе [19], что подтверждается и результатами настоящего исследования.

Роль ретротранспозона LINE-1 в плаценте не ясна. Несмотря на обнаруженный в настоящем исследовании повышенный уровень метилирования у сравнительно молодых подсемейств LINE-1 (L1HS, L1PA2 и L1PA3), они являются наиболее транскрипционно активными в плаценте [20]. Показано, что среди генов, способных к использованию промоторов LINE-1, обогащены гены, экспрессирующиеся в мозге и плаценте [21]. Кроме того, ретротранспозоны из подсемейства L1PA2 могут предоставлять свои антисмысловые промоторы в качестве альтернативных промоторов длинных некодирующих РНК в плаценте [22]. Возможно,

что неспособные к ретротранспозиции элементы LINE-1 постепенно начинают использоваться геномом в качестве отдельных функциональных элементов (в первую очередь, промоторов) для рядом расположенных генов [23]. В этом случае повышение уровня метилирования LINE-1 может приводить к нарушению экспрессии рядом расположенных генов, как было показано нами недавно [24], и нарушать развитие плаценты.

Повышенный уровень метилирования был сильнее выражен для спонтанных абортусов с анеупloidией (трисомия 16, моносомия X), однако также отмечался и у пятой части спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. Это указывает на возможную роль нарушений метилирования генома как самостоятельного и независимого от наличия анеупloidии фактора, ассоциированного с гибелью эмбриона на ранних сроках беременности.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-00341.

Таблица 1. Доля спонтанных абортусов с уровнем метилирования LINE-1, выходящим за границы нормальной вариации в группе медицинских абортусов

		Среднее	L1HS	L1PA2	L1PA3	Нераспр.	Всего
Границы индекса метилирования у МА (non-outlier range)		33.37–45.73%	39.82–61.32%	29.96–42.52%	32.88–42.73%	35.62–46.76%	
МА	гипер	0	0	1 (2.6%)	1 (2.6%)	0	39
	гипо	0	0	1 (2.6%)	1 (2.6%)	0	
СА НК	гипер	34 (19.7)	6 (3.5)	27 (15.6)	41 (23.7)	28 (16.2)	173
	гипо	4 (2.3)	0	7 (4.0)	19 (11.0)	9 (5.2)	
СА Моно X	гипер	11 (23.9)	5 (10.9)	10 (21.7)	10 (21.7)	11 (23.9)	46
	гипо	0	0	0	4 (8.7)	1 (2.2)	
СА Три 16	гипер	18 (29.0)	2 (3.2)	17 (27.4)	16 (25.8)	15 (24.2)	62
	гипо	0	0	1 (1.6)	2 (3.2)	0	
Итого		67 (20.9)	13 (4.1)	64 (20.0)	94 (29.4)	64 (20.0)	320

Примечание. Представлены количество и доля (%) абортусов с уровнем метилирования выше, чем верхняя граница (гипер) и ниже, чем нижняя граница (гипо) диапазона вариации в группе медицинских абортусов. МА – медицинские абортусы, СА НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом, СА Моно X – спонтанные абортусы с моносомией X (СА Моно X), СА Три 16 – спонтанные абортусы с трисомией 16.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Quenby S., Gallos I.D., Dhillon-Smith R.K. et al.* Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss // *Lancet*. 2021. V. 397. № 10285. P. 1658–1667. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00682-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00682-6)
2. *Li T.C., Makris M., Tomsu M. et al.* Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis // *Hum. Reprod. Update*. 2002. V. 8. № 5. P. 463–481. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.5.463>
3. *Red-Horse K., Zhou Y., Genbacev O. et al.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 114. № 6. P. 744–754. <https://doi.org/10.1172/JCI22991>
4. *Jauniaux E., Poston L., Burton G.J.* Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution // *Hum. Reprod.* Update. 2006. V. 12. № 6. P. 747–755. <https://doi.org/dml016>
5. *Shridhar V., Chu T., Simhan H. et al.* High-resolution analysis of the human placental DNA methylome in early gestation // *Prenat. Diagn.* 2020. V. 40. № 4. P. 481–491. <https://doi.org/10.1002/pd.5618>
6. *Robinson W.P., Price E.M.* The human placental methylome // *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2015. V. 5. № 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023044>
7. *Vlahos A., Mansell T., Saffery R. et al.* Human placental methylome in the interplay of adverse placental health, environmental exposure, and pregnancy outcome // *PLoS Genet.* 2019. V. 15. № 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008236>
8. *Etchegaray E., Naville M., Volff J.N. et al.* Transposable element-derived sequences in vertebrate development // *Mob. DNA*. 2021. V. 12. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00229-5>
9. *Grow E.J., Flynn R.A., Chavez S.L. et al.* Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells // *Nature*. 2015. V. 522. № 7555. P. 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature14308>
10. *Reiss D., Zhang Y., Mager D.L.* Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta // *Nucl. Ac. Res.* 2007. V. 35. № 14. P. 4743–4754. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm455>
11. *Lee J., Cordaux R., Han K. et al.* Different evolutionary fates of recently integrated human and chimpanzee LINE-1 retrotransposons // *Gene*. 2007. V. 390. № 1–

2. P. 18–27.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.08.029>
12. Khan H., Smit A., Boissinot S. Molecular evolution and tempo of amplification of human LINE-1 retrotransposons since the origin of primates // *Genome Res.* 2006. V. 16. № 1. P. 78–87.
<https://doi.org/10.1101/gr.4001406>
 13. Boissinot S., Sookdeo A. The Evolution of LINE-1 in Vertebrates // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. № 12. P. 3485–3507.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw247>
 14. Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Y. et al. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021. V. 38. № 1. P. 139–149.
<https://doi.org/10.1007/s10815-020-02003-1>
 15. Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V. et al. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis // *Eur. J. Hum. Genet.* 2004. V. 12. № 7. P. 513–520.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201178>
 16. 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. Genetics.* 2010. V. 46. № 11. P. 1381–1385.
<https://doi.org/10.1134/s1022795410110141>
 17. Vasilyev S.A., Markov A.V., Vasilyeva O.Y. et al. Method of targeted bisulfite massive parallel sequencing of the human LINE-1 retrotransposon promoter // *MethodsX.* 2021. V. 8.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101445>
 18. Fernandes J.D., Zamudio-Hurtado A., Clawson H. et al. The UCSC repeat browser allows discovery and visualization of evolutionary conflict across repeat families // *Mob. DNA.* 2020. V. 11. P. 13.
<https://doi.org/10.1186/s13100-020-00208-w>
 19. Zheng Y., Joyce B.T., Liu L. et al. Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements // *Nucl. Ac. Res.* 2017. V. 45. № 15. P. 8697–8711.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx587>
 20. Zadora J., Singh M., Herse F. et al. Disturbed placental imprinting in preeclampsia leads to altered expression of DLX5, a human-specific early trophoblast marker // *Circulation.* 2017. V. 136. № 19. P. 1824–1839.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028110>
 21. Criscione S.W., Theodosakis N., Micevic G. et al. Genome-wide characterization of human L1 antisense promoter-driven transcripts // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. P. 463.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2800-5>
 22. Chishima T., Iwakiri J., Hamada M. Identification of transposable elements contributing to tissue-specific expression of long non-coding RNAs // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 1.
<https://doi.org/10.3390/genes9010023>
 23. Pourrajab F., Hekmatimoghaddam S. Transposable elements, contributors in the evolution of organisms (from an arms race to a source of raw materials) // *Heliyon.* 2021. V. 7. № 1.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06029>
 24. Demeneva V.V., Tolmacheva E.N., Nikitina T.V. et al. 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 // *Vavil. Zh. Genet. Selektsii.* 2023. V. 27. № 1. P. 63–71.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-23-09>

Methylation of the Retrotransposon LINE-1 Subfamilies in Chorionic Villi of Miscarriages

S. A. Vasilyev^{a, *}, V. V. Demeneva^a, E. N. Tolmacheva^a, S. A. Filatova^{a, b}, A. S. Zuev^a, A. S. Ushakova^{a, b},
O. Yu. Vasilyeva^a, I. V. Lushnikov^b, E. A. Sazhenova^a, T. V. Nikitina^a, and I. N. Lebedev^a

^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

^bNational Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Miscarriage is potentially associated with abnormal epigenetic regulation of genes responsible for the development of the embryo and placenta. The aim of this work was to analyze the methylation level of various subfamilies of the LINE-1 retrotransposon, which makes up about 17% of the entire genome, in chorionic villi of spontaneous abortions of the first trimester of pregnancy with different karyotypes, including the most common aneuploidies. The methylation profile in the LINE-1 retrotransposon promoter was analyzed using targeted bisulfite massive parallel sequencing in chorionic villi of induced abortions ($n = 39$), spontaneous abortions with normal karyotype ($n = 173$), trisomy 16 ($n = 62$) and monosomy X ($n = 46$), and peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers ($n = 17$). The level of methylation of the LINE-1 retrotransposon subfamilies in the control groups of adult lymphocytes and chorionic villi of induced abortions was the highest for evolutionarily young L1HS subfamilies, lower for the more ancient L1PA2 and L1PA3 subfamilies, and the lowest for the even more ancient L1PA4 subfamily. In the groups of spontaneous abortions, an increased level of LINE-1 methylation was observed, and this effect was more pronounced for the older LINE-1 subfamilies. The revealed patterns indicate less control over the older subfamilies of the LINE-1 retrotransposon in the human genome, which can potentially be used as regulatory elements for nearby genes involved in embryonic development. An increase in the level of methylation of such sequences can disrupt the development of the placenta and embryo and make a certain contribution to miscarriage.

Keywords: LINE-1 retrotransposon, DNA methylation, chorionic villi, miscarriage, aneuploidy, bisulfite sequencing, spontaneous abortions.