

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ (*APEX1*, *XPD*) И КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА (*CHEK2*, *P53*) ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Куцын К.А., Коваленко К.А., Машкина Е.В., Шкурат Т.П.

ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия (344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1), e-mail: konst\_ak@mail.ru

Изменение экспрессии генов, участвующих в сверхочных точках клеточного цикла и запуске апоптоза, оказывает влияние на жизнеспособность эмбриона. Проведено исследование уровней экспрессии генов системы репарации и контроля клеточного цикла: *APEX1* (MIM\*107748), *XPD* (MIM\*126340), *CHEK2* (MIM\*604373), *P53* (MIM\*191170). Уровень экспрессии исследуемых генов в децидуальной и хорионической ткани при физиологически протекающей беременности и при невынашивании беременности первого триместра был проанализирован с помощью RT-qPCR метода. Уровень экспрессии всех исследованных нами генов в децидуальной ткани несколько выше по сравнению с хорионической, как в норме, так и при неразвивающейся беременности ( $p = 0,01$ ). В результате исследования выявлено повышение уровня экспрессии гена *XPD* в децидуальной ткани при невынашивании беременности по сравнению с нормально протекающей беременностью ( $p = 0,003$ ). При невынашивании беременности в клетках децидуальной ткани уровень экспрессии *CHEK2* ниже по сравнению с соответствующими образцами хорионической ткани ( $p = 0,039$ ).

Ключевые слова: невынашивание беременности, экспрессия гена, система репарации, контроль клеточного цикла.

## MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF REPAIR (*APEX1*, *XPD*) AND CELL CYCLE CONTROL SYSTEMS' (*CHEK2*, *P53*) GENE EXPRESSION FOR MISCARRIAGE

Kutsyn K.A., Kovalenko K.A., Mashkina E.V., Shkurat T.P.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia (344006, av. Stachki 194/1, Rostov-on-Don), e-mail: konst\_ak@mail.ru

The early stages of embryonic development are based on the mechanisms that underlie the functioning of several functional groups of proteins and genes encoding them. However, these mechanisms are not studied sufficiently, which significantly complicates the understanding of the laws of interaction of different cell types, individual body systems and the formation of his reactions. During the first trimester of pregnancy, there is an active cell division and fetal cytotrophoblast. Alterations in the expression of genes, involved in the checkpoints and apoptosis, effect on the embryo viability. In this study, we assessed the distribution of repair (*APEX1* (MIM\*107748), *XPD* (MIM\*126340) and cell cycle control system *CHEK2* (MIM\*604373), *P53* (MIM\*191170). Estimation of expression level of analyzed genes was performed by RT-qPCR method. In the issue of chorionic tissue analysis decreasing of *XPD* gene expression level was revealed in comparison to normal pregnancy course ( $p = 0,003$ ). In miscarriage decidual cells in tissue level expression *CHEK2* lower compared with corresponding samples of chorionic tissue ( $p = 0,039$ ). Expression level of analyzed genes is lower in the decidua then in the chorion both normal and pathological pregnancy ( $p = 0,01$ ).

Keywords: miscarriage, gene expression, repair system, cell cycle control.

### Введение

Синтез и репарация ДНК, так же как и метилирование ДНК, являются важнейшими процессами в ходе гаметогенеза, оплодотворения и беременности [3]. Ключевыми событиями в ходе раннего эмбриогенеза являются активация эмбрионального генома, т.е. переход с материнского паттерна экспрессии генов, установившегося в ооцитах, к профилю экспрессии генов собственно эмбриона, формирование бластоцисты и успешная имплантация [1]. Для последней необходимы как полноценная подготовка рецептивного эндометрия, так и поддержание жизнеспособности эмбриона. В период раннего

эмбриогенеза, уровень экспрессии генов различается в тканях матери и плода и зависит от конкретного этапа развития зародыша [2]. На ранних стадиях развития эмбриона наблюдается очень небольшой уровень синтеза мРНК. Эти ранние стадии развития контролируются продуктами оогенеза и материнским геномом, что говорит о преимущественной зависимости раннего эмбриогенеза от того, что экспрессируется материнским геномом.

Исследование уровней экспрессии генов системы репарации и контроля клеточного цикла в ооцитах и предимплантационных эмбрионах на всех стадиях развития выявило их ключевую роль в нормальном эмбриональном развитии. На настоящий момент аллельный полиморфизм генов системы репарации и контроля клеточного цикла подробно рассмотрен при изучении этиологии и патогенеза различных раковых заболеваний. В то же время вовлеченность аллельных вариантов данных генов в развитие патологии беременности практически не исследована. Однако в течение первого триместра беременности происходит активное деление как фетальных, так и материнских клеток, при этом неизбежно возникновение ошибок, которые в норме исправляются системой контроля повреждений ДНК (DDR – dna damage response). Очевидно, что наличие аллельных вариантов генов системы репарации и контроля клеточного цикла посредством снижения функциональной активности BER/NER-репарационных белков и специфических протеинкиназ может внести немалый вклад в развитие патологии беременности вследствие несрабатывания механизма корректировки повреждений ДНК, появления геномной нестабильности и запуска апоптоза в материнских и фетальных клетках. В результате происходит недостаточная децидуализация стромы эндометрия, способствующая неполной или слабой инвазии цитотрофобласта, что подавляет нормальные гестационные изменения в маточно-плацентарных артериях и приводит к снижению кровотока в них. Любые изменения интенсивности экспрессии генов и выполняемых ими функций приведут к нарушению процессов эмбриогенеза и возникновению патологии беременности [5]. Целью данной работы было исследовать уровень экспрессии генов системы репарации и контроля клеточного цикла при невынашивании беременности.

### **Материал и методы исследования**

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы децидуальной и хорионической тканей, полученные при медицинском аборте у женщин с физиологическим течением беременности на сроке 6-10 недель (12 образцов), а также при невынашивании беременности (10 образцов) раннего срока. У женщин, включенных в исследуемые группы, были исключены анатомические и гормональные аномалии. Все женщины подписали информированное согласие об участии в исследовании.

Выделение тотальной РНК из образцов тканей материнского и зародышевого происхождения проводили экстракцией смесью гуанидинтиоционат-фенол-хлороформ. Реакцию обратной транскрипции проводили при температуре 45° С в течение 50 минут. Затем следовала инактивация MMLV-RT при 92° С в течение 8 минут. Уровень экспрессии генов *APEX1* (MIM\*107748), *XPD* (MIM\*126340), *CHEK2* (MIM\*604373), *P53* (MIM\*191170) в децидуальной и хорионической тканях при физиологически протекающей беременности и при невынашивании беременности первого триместра определяли с помощью real-time PCR с использованием флуоресцентных ген-специфичных зондов. Подбор праймеров и зондов к мРНК исследуемых генов проводили с помощью программы Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), которые в дальнейшем были синтезированы фирмой Синтол (Москва) (табл. 1). Реакцию амплификации проводили в двух повторах для каждого образца по следующей программе: 94° С – 10 минут, 60° С – 50 секунд, 94° С – 15 секунд. Последние два шага повторяли 40 раз.

Таблица 1 – Характеристика праймеров и зондов, используемых для определения уровня экспрессии генов цитокинов

Ген	5-3` последовательность праймеров и зонда
<i>DH</i> <i>GAP</i>	AGGTCGGAGTCAACGGATTT ATCGCCCACTTGATTTTGG Fam-GGCGCCTGGTCACCAGGGCT-BHQ1
<i>XI</i> <i>APE</i>	AAAGTTTCTTACGGCATAGGCGAT CTGTTACCAGCACAAACGAGTCA Fam-ATCACCCGGCCTTCCTGATCATGCTCC- BHQ1
<i>P53</i>	GCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACT CAACCTCCGTCATGTGCTGTGACTG Fam-TTGATTCCACACCCCGCCCGGCACC- BHQ1
<i>XPD</i>	CGAGGCCACACAACATTGACAAC TCTTTGATCCTGAGCACCGTCT Fam-AACCTCACCCGCGGACCCTTGACC-BHQ1
<i>EK2</i> <i>CH</i>	AGCCCAGCCTTCTACTAGTCGAAA GTTCAAACCACGGAGTTCACAACACA Fam-TCGGCACCCCTCGGCTTCCCTTCACGG- BHQ1

Статистический анализ результатов исследования уровня экспрессии генов, проводили методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Для сравнения уровня экспрессии генов использовали все значения экспрессии гена ( $\Delta Ct$ ) и сравнивали их между собой как две выборки. Для подтверждения достоверности отличий экспрессии гена в совокупности одной из выборок образцов по сравнению с другой выборкой использовали критерий Стьюдента.

### Результаты исследования и их обсуждение

В целом, в норме в клетках децидуальной ткани уровень экспрессии *APEX1* выше по сравнению с соответствующими образцами хорионической ткани ( $P = 0,013$ ) (рис. 1А). При

нарушении ранних этапов эмбриогенеза активность транскрипции гена *APEX1* в клетках хорионической ткани приблизительно на одном уровне с децидуальной. В целом, уровень экспрессии данного гена в тканях материнского и зародышевого происхождения при патологии беременности не отличается от такового для физиологически протекающей беременности (рис. 1Б).

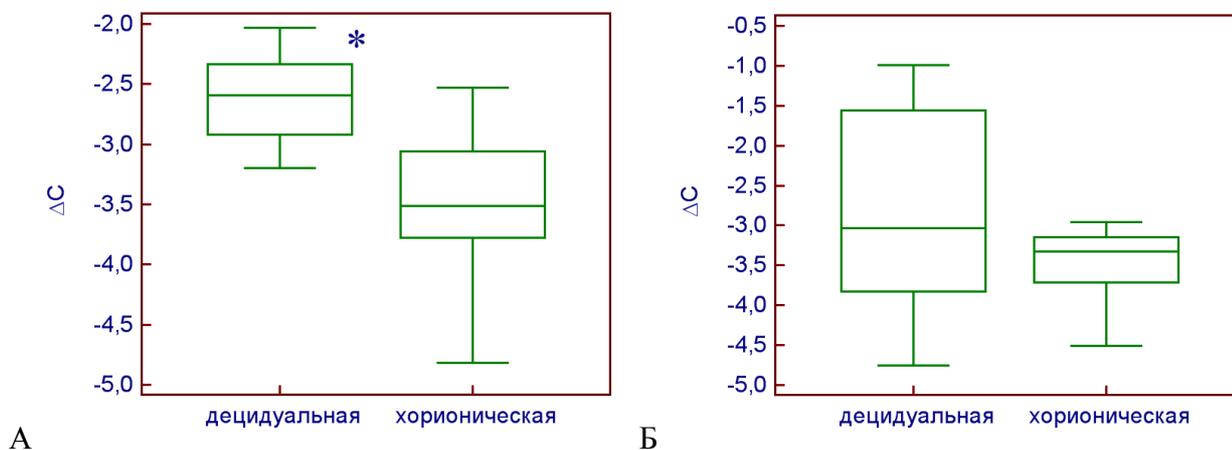


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *APEX1* в клетках хорионической и децидуальной тканей относительно экспрессии гена *GAPDH* при физиологически протекающей беременности (А) и невынашивании беременности (Б).

Уровень экспрессии гена *XPD* в децидуальной ткани при физиологически протекающей беременности в среднем в 2,5 раза ( $P = 0,0001$ ) превосходит данный показатель в хорионической ткани (рис. 2А). При невынашивании беременности – в 1,5 раза ( $P = 0,003$ ) (рис. 2Б). Экспрессия данного гена в децидуальной ткани при невынашивании беременности выше по сравнению с физиологически протекающей беременностью ( $P = 0,003$ ). В хорионической ткани уровень мРНК *XPD* одинаков при обоих вариантах течения беременности.

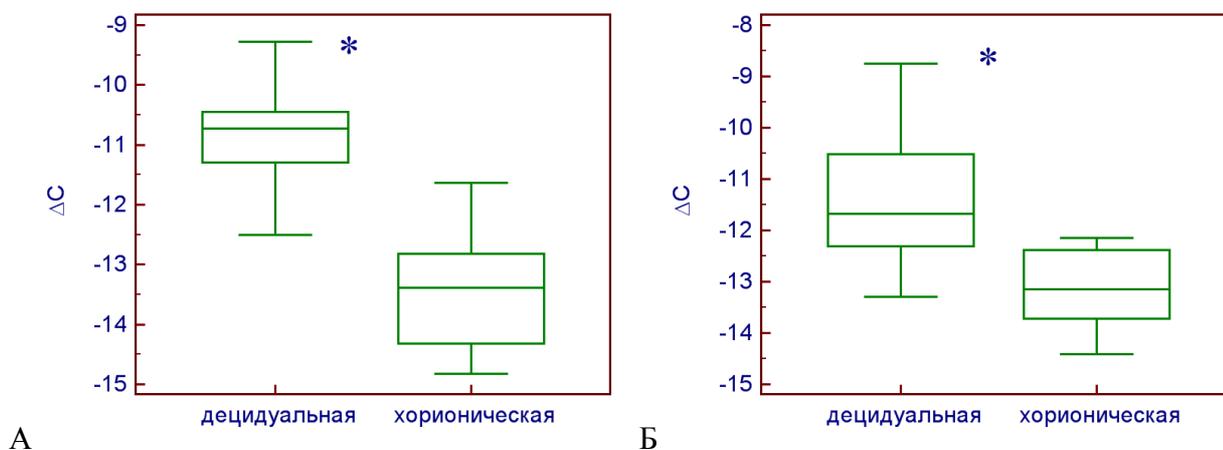


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *XPD* в клетках хорионической и децидуальной тканей относительно экспрессии гена *GAPDH* при физиологически протекающей беременности (А) и невынашивании беременности (Б).

В целом, в норме в клетках децидуальной ткани уровень экспрессии *CHEK2* выше, по сравнению с соответствующими образцами хорионической ткани ( $P = 0,0001$ ) (рис. 3А). При невынашивании беременности в клетках децидуальной ткани уровень экспрессии *CHEK2* выше по сравнению с соответствующими образцами хорионической ткани ( $P = 0,039$ ) (рис. 3Б).

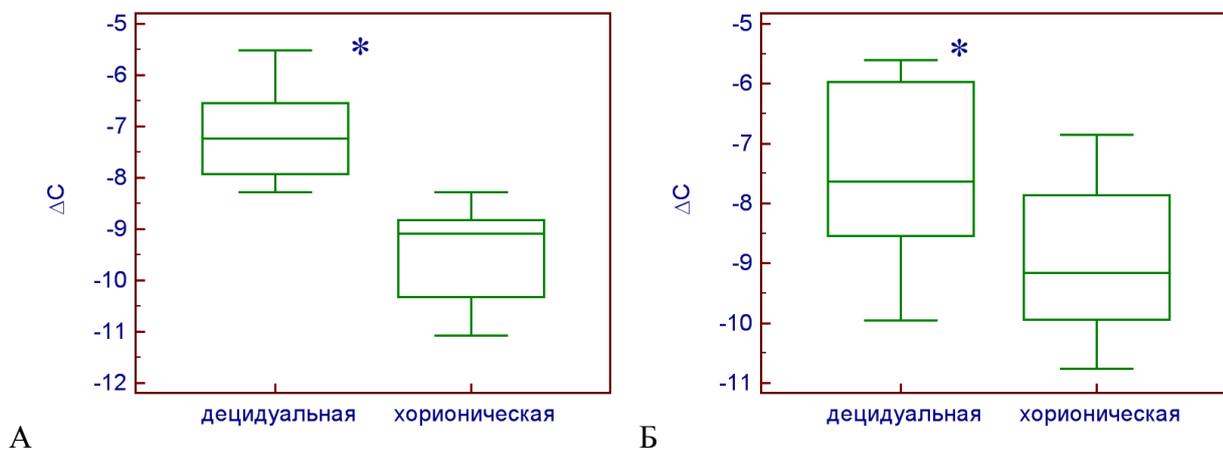


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *CHEK2* в клетках хорионической и децидуальной тканей относительно экспрессии гена *GAPDH* при физиологически протекающей беременности (А) и невынашивании беременности (Б).

Уровень экспрессии гена *p53* выше в децидуальной ткани по сравнению с хорионической при физиологическом ( $P = 0,0001$ ) течении беременности (рис. 4А). При невынашивании беременности различий в уровне экспрессии гена *p53* между двумя типами тканей не выявлено ( $P = 0,19$ ) (рис. 4Б).

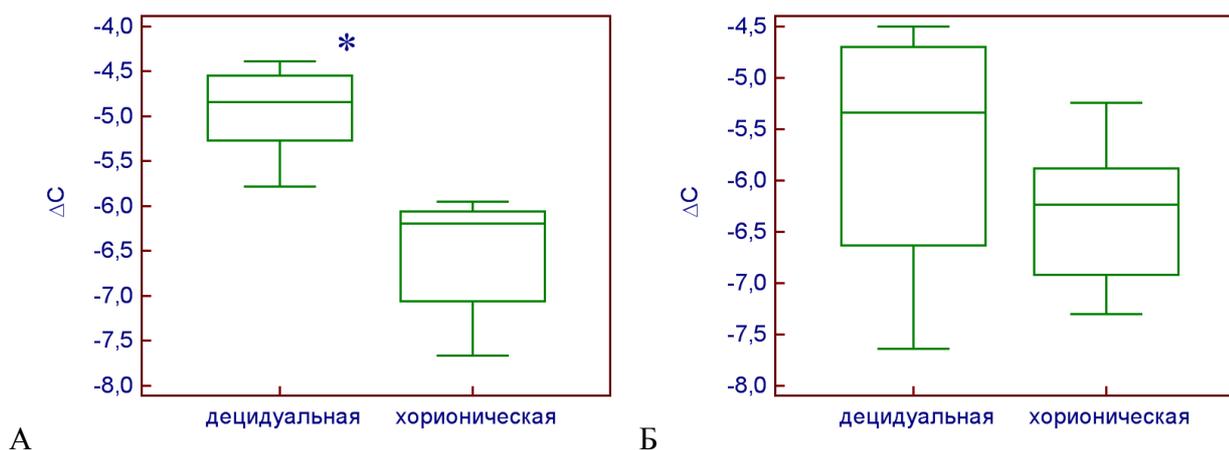


Рис. 4. Уровень экспрессии гена *p53* в клетках хорионической и децидуальной тканей относительно экспрессии гена *GAPDH* при физиологически протекающей беременности (А) и невынашивании беременности (Б).

В целом, уровень экспрессии всех исследованных нами генов репарации (эндонуклеазы и хеликазы) в тканях материнского происхождения выше ( $P = 0,01$ ), чем в хорионической. Возможно, это связано с тем, что при децидуализации эндометрия

запускается эндоредупликация, во время которой подавляются механизмы *ATM-CHEK2-P53* опосредованного апоптоза за счет сайленсинга промоторов проапоптотических генов. Показано, что гиперэкспрессия *p53* не индуцирует запуск апоптоза в эндоредуплицирующихся клетках, в отличие от клеток с обычным митотическим циклом. Кроме того, клетки в состоянии эндоциклического деления не вступают в апоптоз за счет измененного чекпоинт ответа на генотоксический стресс [7].

По данным литературы известно, что в ответ на повреждения ДНК *CHEK2* фосфорилирует *p53*, который в свою очередь активирует *p21*, который запускает *p53* – опосредованную остановку клеточного цикла в G1-фазе. Кроме того, было показано, что *p53* подавляет экспрессию *APEX1*, обеспечивая тем самым дополнительный *p53* – опосредованный путь индукции апоптоза в ответ на повреждения ДНК [8]. *APEX1* в свою очередь может выполнять роль как ко-активатора, так и ко-репрессора гена *p21*, в зависимости от *p53* статуса. Вероятно, что репрессия *APEX1* и гиперэкспрессия *p53* способны стимулировать эндоредупликацию клеток трофобласта и децидуа за счет активации ингибитора циклин-зависимых киназ *p21* [8].

Процесс образования специализированных клеток децидуа – ключевой для развития беременности. В начале децидуализации стромальные клетки, непосредственно окружающие имплантируемую бластоцисту, активно делятся. Клеточный цикл осуществляется за счет работы циклин-зависимых киназ. Во время деления клеток эндометрия белок *p21* подавляет работу комплекса циклина D и киназы *cdk4*, что приводит к образованию эндоцикла (удвоению хромосом без деления). В результате эндоредупликации получают гигантские полиплоидные клетки децидуа (до 64n) [5].

Изменение уровня экспрессии генов *ATM – CHEK2* сигнального пути (*CHEK2*) приводит к изменению функциональной активности генов системы репарации (*APEX1, XPD*), контроля клеточного цикла и апоптоза (*p53*). *P53* в свою очередь индуцирует экспрессию генов, регулирующих имплантацию и плацентацию регулятор *LIF* и белок *p21*, запускающий процесс эндоредупликации в эндометрии, а также ХГЧ, участвующий в плацентации посредством стимуляции роста сосудов [6].

Полученные результаты можно объяснить тем, что в процессе эндоредупликации децидуальных клеток подавляется *p53*– опосредованный путь апоптоза. Кроме того, в клетках трофобласта, дифференцирующихся в эндоредуплицирующиеся клетки, индукция *p21* приводит к подавлению *Cdk1* и к подавлению работы чекпоинт пунктов и возникновению толерантности к повреждениям ДНК [5]. Исследование уровней экспрессии генов системы репарации и контроля клеточного цикла в ооцитах и предимплантационных эмбрионах на всех стадиях развития выявило их ключевую роль в нормальном

эмбриональном развитии. Изменение экспрессии генов, участвующих в чекпоинтах и запуске апоптоза, оказывает влияние на жизнеспособность эмбриона.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 12-04-31408.*

### Список литературы

1. Altmeae S. et al. Research Resource: Interactome of Human Embryo Implantation: Identification of Gene Expression Pathways, Regulation, and Integrated Regulatory Networks / Altmeae S., Reimand J.E., Hovatta O., Pu Zhang, et al. // *Mol Endocrinol.* 2012. – 26(1). – P. 203–217.
2. Assou S. et al. Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications / Assou S., Boumela I., Haouzi D., Anahory T., Dechaud H., Vos J., and Hamamah S. // *Human Reproduction Update.* 2011. – Vol.17. - No.2. – P. 272–290.
3. Assou S. et al. Transcriptome Analysis during Human Trophectoderm Specification Suggests New Roles of Metabolic and Epigenetic Genes / Assou S, Boumela I, Haouzi D, Monzo C, Dechaud H, et al. // *Plos ONE.* 2012. – 7(6): e39306.
4. Dey S.K. Molecular Cues to Implantation / Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J., Paria B.C., Daikoku T., Wang H. // *Endocr. Rev.* 2004. – 25. – P. 341–373.
5. Fox D.T. and Duronio R. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease / Fox D. T., Duronio R. // *Development.* 2013. – 140. – P. 3-12.
6. Hu W. et al. Regulation of Fertility by the p53 Family Members /Hu W., Zheng T., Wang J. // *Genes Cancer.* 2011. – 2. – P. 420–430.
7. Mehrotra S. et al. Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplicationgenotoxic stress / Mehrotra S., Maqbool S., Kolpakas A., Murnen K., Calvi B. // *Genes & development.* 2008. – 22. – P. 3158–3171.
8. Sengupta S. et al. Dual Regulatory Roles of Human AP-Endonuclease (APE1/Ref-1) in CDKN1A/p21 Expression / Sengupta S., Mitra S., Bhakat K. // *PLoS ONE* 8(7):e68467.
9. Zaky A. et al. Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage / Zaky A., Busso C., Izumi T., Chattopadhyay R., Bassiouny A., Mitra S., Bhakat K. // *Nucleic Acids Research.* 2008. – Vol. 36. - No. 5. – P. 1555–1566.

**Рецензенты:**

Амелина С.С., д.м.н., заведующая отделом биомедицины НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.

Усатов А.В., д.б.н., профессор, заведующий отделом изменчивости генома НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.