

УДК 577.21:616.1

## ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЛОКУСА *INK4B-ARF-INK4A* ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

© 2013 г. М. С. Назаренко<sup>1,3</sup>, А. В. Марков<sup>1</sup>, И. Н. Лебедев<sup>1,3</sup>, А. А. Слепцов<sup>1</sup>, Ю. А. Королева<sup>1</sup>, А. В. Фролов<sup>2</sup>, О. Л. Барбараш<sup>2</sup>, Л. С. Барбараш<sup>2</sup>, В. П. Пузырев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск 634050

e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово 650002

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск 634050

Поступила в редакцию 05.07.2012 г.

Недавно была показана надежная ассоциация однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNPs) региона 9p21.3 с риском развития заболеваний, в основе развития которых лежит атеросклеротическое поражение сосудистой стенки. Однако патофизиология данного локуса изучена недостаточно. В настоящем исследовании впервые оценен профиль метилирования ближайших картированных генов ингибиторов циклин-зависимых киназ *CDKN2A* (p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>) и *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом. В результате не выявлено aberrантного метилирования ДНК анализируемых участков генов в тканях из области атеросклеротических бляшек и подлежащей макроскопически неизменной сосудистой стенки у тех же самых больных.

DOI: 10.7868/S0016675813060076

Недавно в результате полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) была установлена связь однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNPs) локуса 9p21.3 с риском развития и прогрессии синтропных заболеваний “сердечно-сосудистого континуума”, в том числе тех, в основе развития которых лежит атеросклеротическое поражение сосудистой стенки [1–6]. Выявленная ассоциация была подтверждена в последующих работах дизайна “случай–контроль” в различных этнических группах и при мета-анализе данных.

Механизм, лежащий в ее основе, остается неизвестным. Одним из направлений исследований является детальная структурно-функциональная характеристика ближайших картированных генов, включая ингибиторы циклин-зависимых киназ *CDKN2A* (кодирует p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup> у человека или p19<sup>ARF</sup> у мыши) и *CDKN2B* (кодирует p15<sup>INK4b</sup>). Их белковые продукты играют важную роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза.

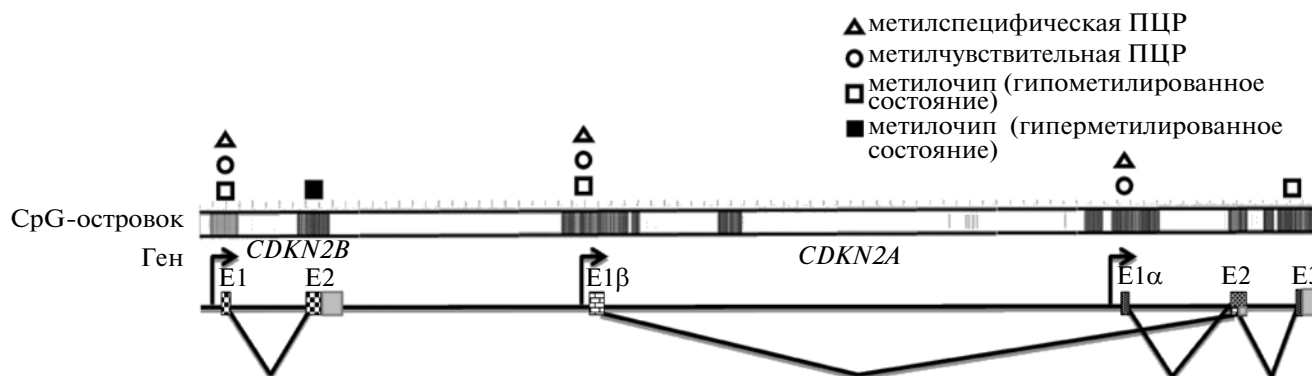
Потеря функции локуса *INK4b-ARF-INK4a*, связанная с делецией и/или aberrантным метилированием, является частым событием в тканях опухолей различной локализации. В то же время работы, посвященные установлению роли ингибиторов циклин-зависимых киназ при атеросклерозе, единичны [7]. Нокаут гена *Cdkn2a* (p19<sup>ARF</sup>) связан с увеличением темпов формирования атеросклеротических бляшек в определенных регионах аорты на модели заболевания у мыши [8]. Не

исключено, что вариабельность метилирования данной категории генов может вносить вклад в предрасположенность к развитию и прогрессии атеросклеротического поражения артерий у человека.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в оценке профиля метилирования локуса *INK4b-ARF-INK4a* в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом.

Всего в группу обследования вошло 60 русских мужчин (средний возраст 62.3 ± 6.7 лет). В зависимости от степени сосудисто-мозговой недостаточности [9] больные распределились следующим образом: I степень – 21 (35%), II степень – 3 (5%), III степень – 19 (31.7%), IV степень – 17 (28.3%) человек. Инсульт или транзиторные ишемические атаки головного мозга в анамнезе регистрировались у 21 (35%) индивида. Кроме этого, все пациенты имели ишемическую болезнь сердца и артериальную гипертензию, а у 26 (43.3%) из них диагностирована хроническая ишемия нижних конечностей. Гиперхолестеринемия в анамнезе была у 53 индивидов, что составило 88.3%. Сахарный диабет 2-го типа выявлен у 15 (25%) больных.

Биоптаты тканей получены в результате эн-дартерэктомии из сонных артерий. У каждого больного взяты образцы из двух областей сосудистой стенки: атеросклеротическая бляшка и пред-



Структура локуса *INK4b-ARF-INK4a*. Визуализация CpG-островков проводилась с помощью программы “CpG Island Finder” [http://dbcat.cgm.ntu.edu.tw/]. Критерии идентификации CpG-островков: наблюдаемое/ожидаемое отношение CpG больше 60%, минимальная протяженность 200 пн.

лежащая макроскопически неизменная ткань. Биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  вплоть до исследования.

Геномная ДНК выделена из тканей сосудистой стенки после стандартной обработки протеиназой К в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  и экстракцией фенол/хлороформом.

Анализ профиля метилирования широкого спектра генов, включая локус *INK4b-ARF-INK4a*, осуществлялся с помощью метилочипа “Infinium HumanMethylation27 BeadChip” (“Illumina”, США). Для тестирования были выбраны образцы ДНК, выделенные из области атеросклеротических бляшек ( $n = 6$ ) и предлежащей макроскопически неизменной стенки сонных артерий ( $n = 2$ ). При проведении исследования с использованием метилочипа получены средние значения индекса метилирования ( $\beta$ ) широкого спектра генов, в том числе 19 CpG-сайтов, входящих в четыре CpG-островка локуса *INK4b-ARF-INK4a*. Анализ выполнен согласно протоколу производителя [10].

Подтверждающее тестирование статуса метилирования в области промоторов и первых экзонов анализируемых генов проводилось с помощью методов метилспецифической и метилчувствительной ПЦР. Объем выборки составил 120 образцов ДНК, выделенных из тканей атеросклеротической бляшки и предлежащей макроскопически неизменной стенки сонной артерии. В ходе метилчувствительной ПЦР оценивался статус метилирования ДНК в области промоторов и первых экзонов генов *CDKN2A* ( $p16^{\text{INK4a}}$  и  $p14^{\text{ARF}}$ ) и *CDKN2B* ( $p15^{\text{INK4b}}$ ). Для этого геномную ДНК, предварительно обработанную рестриктазой *HpaII* (“Fermentas”, Литва), подвергали амплификации с использованием соответствующих праймеров [11–14]. Кроме того, CpG-сайты в области первых экзонов генов *CDKN2A*

( $p16^{\text{INK4a}}$  и  $p14^{\text{ARF}}$ ) и *CDKN2B* ( $p15^{\text{INK4b}}$ ) проанализированы с помощью метилспецифической ПЦР. Бисульфитная обработка ДНК проводилась с использованием набора “EZ DNA Methylation™ Kit” (“Zymo Research”, США) по протоколу производителя. Структура праймеров, которые применялись для амплификации модифицированной ДНК, заимствована из данных литературы [15, 16].

Таким образом, в настоящем исследовании в тканях сонных артерий больных атеросклерозом была проведена оценка профиля метилирования локуса *INK4b-ARF-INK4a* с помощью трех различных методик: метилочип, метилспецифическая и метилчувствительная ПЦР (рисунок).

Согласно данным метилочипа, в тканях сонных артерий выявлено гипометилирование девяти CpG-сайтов двух CpG-островков (9:21958106-21958899 и 9:21983444-21986348) гена *CDKN2A* ( $p16^{\text{INK4a}}$  и  $p14^{\text{ARF}}$ ) и четырех CpG-сайтов одного CpG-островка (9:21998555-21999615) гена *CDKN2B* ( $p15^{\text{INK4b}}$ ). В то же время относительно высокие значения среднего индекса метилирования регистрировались для шести CpG-сайтов одного CpG-островка (9:21995095-21996291) гена *CDKN2B* ( $p15^{\text{INK4b}}$ ) как в образцах тканей из области атеросклеротических бляшек, так и в предлежащей макроскопически неизменной стенке (таблица).

Результаты количественного анализа были подтверждены при тестировании статуса метилирования генов *CDKN2A* ( $p14^{\text{ARF}}$ ) и *CDKN2B* ( $p15^{\text{INK4b}}$ ) в большей по размеру выборке больных с использованием метилспецифической и метилчувствительной ПЦР. Во всех образцах показано отсутствие aberrантного метилирования CpG-сайтов промоторов и первых экзонов генов.

Поскольку существует зависимость между плотностью метилирования CpG-островков промоторных регионов генов и их функциональной

Средний индекс метилирования отдельных CpG-сайтов генов *CDKN2A* (p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>) и *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом

Ген	CpG-островок*/локализация в гене	CpG'-сайт*	Средний индекс метилирования (β)	
			макроскопически неизменная сосудистая стенка	область атеросклеротических бляшек
<i>CDKN2B</i> (p15 <sup>INK4b</sup> )	9:21998555-21999615/промотор, экзон E1	cg01716061	0.07	0.04
		cg02400248	0.01	0.04
		cg19133618	0.04	0.01
		cg19764407	0.04	0.07
	9:21995095-21996291/экзон E2	cg06421800	0.58	0.62
		cg10210238	0.50	0.57
		cg18979223	0.65	0.71
		cg08390209	0.57	0.66
		cg04675937	0.61	0.69
		cg19481686	0.57	0.66
<i>CDKN2A</i> (p14 <sup>ARF</sup> )	9:21983444-21986348/промотор, экзон E1β	cg00718440	0.03	0.02
		cg26673943	0.07	0.05
		cg03079681	0.05	0.04
		cg13479669	0.16	0.14
<i>CDKN2A</i> (p16 <sup>INK4a</sup> )	9:21958106-21958899/экзон E3	cg10895543	0.08	0.12
		cg07752420	0.12	0.18
		cg09099744	0.07	0.11
		cg12840719	0.14	0.14
		cg11653709	0.18	0.21

\* Локализация CpG-островка и CpG-сайта указана согласно аннотации производителя метилолипа.

активностью, полученные результаты согласуются с данными литературы в отношении экспрессии. В частности, Holdt et al. [17] показали, что гены *CDKN2A* (p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>) и *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>) активно экспрессируются в области атеросклеротических бляшек и морфологически неизменной стенке коронарных артерий.

Образцы тканей, полученные в результате эндартерэктомии из сонных артерий, имеют определенное преимущество для исследования. Данное оперативное вмешательство предполагает удаление интимы и внутренней части медиального слоя сосуда, т.е. всех основных клеток, которые вовлекаются в патологический процесс. С другой

стороны, следует отметить, что артерии как в пределах одного, так и разных бассейнов сосудистого русла существенно различаются в подверженности к атеросклеротическому процессу. В связи с этим для дальнейших исследований необходимо расширить спектр тестируемых тканей. Например, это могут быть образцы коронарных артерий, аорты. Актуальным для решения в рамках продолжения работ представляется вопрос, связанный с высокой межклеточной гетерогенностью тканей сосудистой стенки.

В настоящей работе исследован один из эпигенетических феноменов — метилирование ДНК. Известно, что локус 9p21.3 содержит последователь-

ность длинной некодирующей РНК (ANRIL). В ряде работ были установлены различия в экспрессии некоторых транскриптов ANRIL в тканях сосудистой стенки и клетках периферической крови в зависимости от генотипа больных. Не исключено, что ANRIL регулирует функциональную активность генов локуса 9p21.3 через взаимодействие с комплексами белков группы Polycomb [5].

Экспериментальные работы, посвященные изучению эпигенетической вариабельности при атеросклерозе у человека *in vivo*, единичны [18]. В тканях сосудистой стенки больных оценивался статус метилирования лишь ограниченного спектра генов-кандидатов. Это гены 15-липоксигеназы (*ALOX15*), рецепторов эстрогена (*ESR1* и *ESR2*), транспортера 3 монокарбоксилата (*MCT3*) и ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI2*). В рамках настоящего исследования осуществлен анализ профиля метилирования генов *CDKN2A* (p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>) и *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>). Однако предположение о роли нарушения метилирования ДНК в данном локусе при атеросклеротическом поражении сонных артерий у человека не нашло подтверждения. Возможно, что увеличение спектра генов, в том числе кодирующих белки клеточного цикла, позволит получить принципиально новую информацию о механизмах формирования подверженности к атеросклерозу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00674) и гранта ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы для проведения научных исследований коллективами НОЦ по теме “Феномен парадоминантного наследования в этиологии многофакторных заболеваний человека” (соглашение № 8062).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls // *Nature*. 2007. V. 447. № 7145. P. 661–678.
- Helgadottir A., Thorleifsson G., Manolescu A. et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction // *Science*. 2007. V. 316. № 5830. P. 1491–1493.
- McPherson R., Pertsemlidis A., Kavaslar N. et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease // *Science*. 2007. V. 316. № 5830. P. 1488–1491.
- Samani N.J., Erdmann J., Hall A.S. et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* 2007. V. 357. № 5. P. 443–453.
- Cunnington M.S., Keavney B. Genetic mechanisms mediating atherosclerosis susceptibility at the chromosome 9p21 locus // *Curr. Atheroscler. Rep.* 2011. V. 13. № 3. P. 193–201.
- Popov N., Gil J. Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health // *Epigenetics*. 2010. V. 5. № 8. P. 685–690.
- Fuster J.J., Fernandez P., Gonzalez-Navarro H. et al. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies // *Cardiovasc. Res.* 2010. V. 86. № 2. P. 254–264.
- Gonzalez-Navarro H., Abu Nabah Y.N., Vinue A. et al. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010. V. 55. № 20. P. 2258–2268.
- Покровский А.В., Кованева Р.А., Зингерман Л.С. и др. Показания к хирургическому лечению сосудисто-мозговой недостаточности у больных с окклюзирующими поражениями брахиоцефальных сосудов // *Невропатол. и психиатр.* 1977. № 12. С. 1789–1797.
- Bibikova M., Le J., Barnes B. et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay // *Epigenomics*. 2009. V. 1. № 1. P. 177–200.
- Furlong R.A., Lyall J.E., Lush M.J. Four dinucleotide repeat polymorphisms on chromosome 9 (D9S143-D9S146) // *Hum. Mol. Genet.* 1992. V. 1. № 6. P. 447.
- Kamb A., Shattuck-Eidens D., Eeles R. et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus // *Nat. Genet.* 1994. V. 8. № 1. P. 22–26.
- Землякова В.В., Стрельников В.В., Зборовская И.Б. и др. Сравнительный анализ аномального метилирования CpG-островков, расположенных в промоторных областях генов P16/CDKN2A и P14ARF, при немелкоклеточном раке легкого и остром лимфобластном лейкозе // *Мол. биол.* 2004. Т. 38. № 6. С. 966–972.
- Baur A.S., Shaw P., Burri N. et al. Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas // *Blood*. 1999. V. 94. № 5. P. 1773–1781.
- Amatya V.J., Takeshima Y., Inai K. Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation // *Mod. Pathol.* 2004. V. 17. № 6. P. 705–10.
- Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 18. P. 9821–9826.
- Holdt L.M., Sass K., Gabel G. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p16INK4a, p14ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis*. 2011. V. 214. № 2. P. 264–270.
- Назаренко М.С., Лебедев И.Н., Пузырев В.П. Эпигенетические модификации генома и сердечно-сосудистые заболевания // Сб. научных трудов “Генетика человека и патология: актуальные проблемы современной цитогенетики”. Томск: Печатная мануфактура, 2011. Вып. 9. С. 64–71.

**Methylation Profile of *INK4B-ARF-INK4A* Locus in Atherosclerosis**

**M. S. Nazarenko<sup>a, c</sup>, A. V. Markov<sup>a</sup>, I. N. Lebedev<sup>a, c</sup>, A. A. Sleptsov<sup>a</sup>, Yu. A. Koroleva<sup>a</sup>, A. V. Frolov<sup>b</sup>,  
O. L. Barbarash<sup>b</sup>, L. S. Barbarash<sup>b</sup>, and V. P. Puzirev<sup>a, c</sup>**

<sup>a</sup> *Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia*  
*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru*

<sup>b</sup> *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Siberian Branch,  
Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, 650002 Russia*

<sup>c</sup> *Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 9p21.3 locus have recently been demonstrated to be strongly associated with the risk of developing human atherosclerotic lesions. However, the pathophysiology of this locus is insufficiently studied. Here, the methylation profile of the nearest mapped genes for cyclin-dependent kinase inhibitors *CDKN2A* (p16<sup>INK4a</sup>, p14<sup>ARF</sup>) and *CDKN2B* (p15<sup>INK4b</sup>) in the tissues of the carotid artery in patients with atherosclerosis was evaluated for the first time. Aberrant DNA methylation of the analyzed loci was not established in either the atherosclerotic plaques and in the tissues from the macroscopically unchanged previa vascular wall in the same patients.