

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21:616.1

ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ТКАНЯХ  
СОСУДИСТОГО РУСЛА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

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

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

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Томск, 634050

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, 650002

Поступила в редакцию 26.09.2012 г.

Принята к печати 11.10.2012 г.

В настоящее время вопрос эпигенетических механизмов регуляции функциональной активности генов при сердечно-сосудистых заболеваниях вызывает большой интерес. В данной работе впервые проведен анализ профиля метилирования ДНК в тканях сосудистого русла различной локализации у больных атеросклерозом с использованием микрочипа Infinium HumanMethylation27 BeadChip (“Illumina”, США). При сравнении образцов тканей из сонной (область атеросклеротических бляшек и подлежащей макроскопически неизменной стенки) и внутренней грудной артерий, а также большой подкожной вены нижней конечности установлено дифференциальное метилирование 314 CpG-сайтов 286 генов. Наиболее существенные изменения уровня метилирования зарегистрированы в отношении CpG-динуклеотидов гомеобоксных генов *HOXA2* и *HOXD4*, а также импринтированного гена *MEST*. В частности, в тканях из области атеросклеротических бляшек сонных артерий отмечалось гипометилирование этих генов по сравнению с паттерном их метилирования в неизмененных тканях внутренней грудной артерии, а также большой подкожной вены нижней конечности.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, атеросклероз, Infinium HumanMethylation27 BeadChip.

DNA METHYLATION PROFILING OF THE VASCULAR TISSUES IN THE SETTING OF ATHEROSCLEROSIS, by M. S. Nazarenko<sup>1,2\*</sup>, A. V. Markov<sup>1</sup>, I. N. Lebedev<sup>1,2</sup>, A. A. Sleptcov<sup>1</sup>, A. V. Frolov<sup>3</sup>, O. L. Barbarash<sup>3</sup>, L. S. Barbarash<sup>3</sup>, V. P. Puzyrev<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Research Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia, \*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru; <sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia; <sup>3</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, 650002 Russia). To date the question of epigenetic mechanisms of gene regulation in the context of cardiovascular diseases is of a considerable interest. Here, for the first time DNA methylation profiles of vascular tissues of atherosclerotic patients have been analyzed with using the microarray Infinium HumanMethylation27 BeadChip (“Illumina”, USA). As the result, within 286 genes 314 CpG-sites that varied significantly in the DNA methylation level between the tissue samples of carotid (in the area of atherosclerotic plaques and nearby macroscopically intact tissues of the vascular wall) and mammary arteries as well saphenous veins have been identified. The most pronounced differences in the methylation level were registered for CpG-sites of homeobox genes *HOXA2* and *HOXD4* as well as imprinted gene *MEST*. In particular, these genes were found to be hypomethylated in the carotid atherosclerotic plaques compared to their methylation patterns in intact tissues of internal mammary arteries and saphenous veins.

**Keywords:** DNA methylation, atherosclerosis, Infinium HumanMethylation27 BeadChip.

DOI: 10.7868/S0026898413030099

В настоящее время появляется все больше данных, свидетельствующих о важности эпигенетических модификаций генома — таких как метилирова-

ние ДНК, модификации гистоновых белков и РНК-опосредованные механизмы — в формировании многофакторных заболеваний. Хорошо известно, что aberrантный статус метилирования цитозиновых остатков ДНК присущ тканям злокачествен-

\* Эл. почта: maria.nazarenko@medgenetics.ru

ных новообразований различной локализации [1]. Выявлено, что некоторые из локусов генома обладают свойством сохранять относительно стабильный уровень метилирования ДНК на протяжении достаточно продолжительного времени и, более того, их статус метилирования коррелирует с наличием ряда клинических признаков, значимых для развития многофакторной патологии, в частности ожирения [2].

Однако экспериментальные исследования, связанные с изучением вариабельности метилирования ДНК при сердечно-сосудистых заболеваниях, единичны. В работах, проведенных на модельных животных и культурах клеток *in vitro*, показано, что в атеросклеротических бляшках есть как глобальное гипометилирование ДНК, так и гиперметилирование промоторных регионов нескольких генов одновременно, что коррелирует с изменением их транскрипционной активности [3]. Исследований, посвященных характеристике вариабельности метилирования ДНК при атеросклерозе у человека, относительно немного. Как правило, в этих случаях используется относительно легкодоступный биологический материал — лейкоциты периферической крови. Исследованию тканей сосудистой стенки посвящено несколько работ, в которых статус метилирования оценивали для небольшого числа генов-кандидатов [4–8].

Микрочиповые технологии позволяют проводить скрининг уровня метилирования отдельных CpG-сайтов широкого спектра генов одновременно в нескольких образцах. Использование этого подхода в отношении тканей сосудистого русла, в том числе пораженных атеросклеротическим процессом, нашло свое отражение в ранее проведенных исследованиях [9, 10]. Однако такие работы единичны.

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении спектра дифференциально метилированных CpG-динуклеотидов в тканях сосудистого русла, различающихся по степени подверженности к развитию атеросклеротического процесса (сонная и внутренняя грудная артерия, а также большая подкожная вена нижней конечности). Уровни метилирования оценивали с помощью микрочипа Infinium HumanMethylation27 BeadChip. Данная платформа позволяет проводить тестирование отдельных 27578 CpG-сайтов в составе 14475 генов одновременно в 12 образцах при относительно небольшом количестве обработанной бисульфитом ДНК. В среднем на ген приходится приблизительно 1.9 CpG-сайтов. Панель включает различные классы генов, в том числе связанные со злокачественными новообразованиями, а также промоторы микроРНК; при этом у 60% генов CpG-сайты, исследуемые в промоторной области, входят в CpG-островки [11].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В группу пациентов, добровольно согласившихся принять участие в эксперименте, входило девять мужчин (средний возраст  $58.5 \pm 2.7$  лет). У всех больных диагностировано мультифокальное атеросклеротическое поражение сосудов, в связи с чем они прошли хирургическое лечение: трем больным выполнено аорто-коронарное шунтирование, шестерым — каротидная эндартерэктомия. До этого двум пациентам уже проводили каротидную эндартерэктомию, еще одному — аорто-коронарное шунтирование, другому — чрескожное коронарное вмешательство со стентированием; один из больных перенес несколько реваскуляризирующих операций на сосудах нижних конечностей.

Сосудисто-мозговая недостаточность наблюдалась у семи пациентов. По классификации А.В. Покровского (1977) больные распределились следующим образом: I степень — 2, II степень — 0, III степень — 3, IV степень — 2 человека. Инсульт в анамнезе перенесли два пациента. У всех добровольцев была ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия, а в двух случаях — хроническая ишемия нижних конечностей ПА и ПБ степени. Инфаркт миокарда в анамнезе диагностирован у пяти больных, гиперхолестеринемия в анамнезе — у семи, сахарный диабет типа II — у одного. Семь пациентов курили.

**Банк тканей** включал образцы сонных и внутренних грудных артерий, а также больших подкожных вен нижних конечностей. Ткань сонных артерий получена в результате каротидной эндартерэктомии у больных из двух областей сосудистой стенки: атеросклеротическая бляшка ( $n = 6$ ) и предлежащая макроскопически неизменная ткань ( $n = 2$ ). Атеросклеротические бляшки представляли собой поздние стадии патологического процесса, что обусловило показания к оперативному лечению. Биоптаты внутренних грудных артерий ( $n = 2$ ) и больших подкожных вен нижних конечностей ( $n = 2$ ) собраны в результате аорто-коронарного шунтирования. Каждый образец осмотрен, тщательно очищен от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, а также хорошо промыт в стерильном физиологическом растворе. Биологический материал замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$ .

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

**Профиль метилирования ДНК** анализировали на микрочипе Infinium HumanMethylation27 BeadChip (“Illumina”, США). Бисульфитная модификация геномной ДНК проведена с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (“Zymo Research”, США). Дальнейшие этапы полногеномной амплификации, ферментативного расщепления ДНК на фраг-

менты, очистки и гибридизации проведены согласно стандартному протоколу производителя [11]. Во время гибридизации фрагменты ДНК отжигали на локус-специфичных ДНК-праймерах, соответствующих метилированному или неметилированному состоянию цитозина. Дальнейшую процедуру – удлинение праймеров на одно основание – проводили с использованием DNP- и биотин-меченых ddNTP. Интенсивность сигналов с матрицы регистрировали с помощью сканера Illumina BeadArray Reader (“Illumina”). Первичную обработку полученных данных проводили в пакете программ GenomeStudio Methylation Module (“Illumina”). Параметром уровня метилирования служит величина  $\beta$ , которая соответствует отношению флуоресцентных сигналов метилированных аллелей к сумме флуоресцентных сигналов метилированных и неметилированных аллелей. Индекс метилирования  $\beta$  варьирует от 0 (неметилированное состояние) до 1 (полное метилирование всех CpG-сайтов в данном положении).

**Статистический анализ данных** проводили с помощью программного пакета Partek Genomics Suite 6.6 (“Partek Inc.”, США). Качество данных контролировали анализом главных компонент (PCA) и гистограмм распределения уровней сигнала. Выявление статистически значимой разницы ( $p < 0.05$ ) индекса метилирования в исследуемых группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Корректировка ложноположительных результатов (FDR) при анализе данных с поправкой на множественные сравнения производилась по методу Бенджамини-Хохберга.

**Функциональная аннотация генов** выполнена с помощью интернет-ресурса DAVID [12]. Категории описываемых генов соответствуют классификатору базы данных Gene Ontology (GO) [13]. Избыточность категорий отфильтрована с помощью онлайн-инструмента REVIGO [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведен сравнительный анализ профиля метилирования 27578 CpG-сайтов в составе 14 475 генов в тканях сонной (атеросклеротическая бляшка и прилежащая макроскопически неизменная область) и внутренней грудной артерий, а также большой подкожной вены нижних конечностей у больных атеросклерозом с помощью микрочипа Infinium HumanMethylation27 BeadChip.

Во всех четырех группах тканей сосудистой стенки 17689 CpG-сайтов (64.1%) оказались гипометилированы ( $\beta \leq 0.2$ ), а 5655 (20.5%) – гиперметилированы ( $\beta \geq 0.6$ ). Из 27578 CpG-сайтов, входящих в состав микрочипа, 20006 (72.5%) расположены в CpG-островках [11]. Средний индекс метилирования ( $\beta$ ) для CpG-сайтов, локализованных вне CpG-

островков, был выше по сравнению с таковым в CpG-островках (0.21 и 0.14 соответственно).

В результате дисперсионного анализа дифференциальное метилирование показано для 314 (1%) CpG-сайтов в составе 286 (2%) генов ( $p < 0.05$ ). Согласно аннотации производителя микрочипа, из 314 CpG-динуклеотидов – 150 (48%) расположено в CpG-островках. Четыре дифференциально метилированных гена картированы на X-хромосоме (*CXorf6*, *GUCY2F*, *MIDI1* и *RAB9B*), а остальные – на аутосомах. Наиболее представленными оказались гены, продукты которых связаны с формированием и спецификацией паттернов клеточной дифференцировки (GO:0009952; GO:0007389), реализацией и регуляцией процессов развития (GO:0032502; GO:0001501; GO:0050793), а также позитивной регуляцией биологических процессов на клеточном уровне (GO:0048522).

При анализе данных биологически обоснованным считается использование параметра разности индекса метилирования между CpG-сайтами ( $\Delta\beta$ ). Эта величина определяет, может ли данный метод достоверно различать индексы метилирования  $\beta$ , отличающиеся друг от друга хотя бы на 20% [11]. При сравнении групп образцов атеросклеротических бляшек и прилежащих макроскопически неизменных тканей сонных артерий не обнаружено CpG-сайтов, для которых разность среднего индекса метилирования превышает по абсолютной величине 0.2 ( $\Delta\beta \geq |0.2|$ ). При сравнении тканей из области атеросклеротической бляшки сонных артерий с неизменными тканями внутренней грудной артерии и большой подкожной вены нижней конечности выявлено 47 дифференциально метилированных CpG-сайтов, из них 16 локализованы в CpG-островках (таблица). Следует отметить, что наиболее значительные изменения индекса метилирования ( $\beta \leq 0.2$  и  $\beta \geq 0.6$ ) зарегистрированы для CpG-сайтов гомеобоксных генов *HOXA2* и *HOXD4*, а также импринтированного гена *MEST*. В тканях из области атеросклеротических бляшек для этих генов характерно гипометилирование CpG-динуклеотидов по сравнению с их метилированием во внутренних грудных артериях и больших подкожных венах нижних конечностей.

В состав микрочипа входили пробы для тестирования индекса метилирования отдельных CpG-сайтов генов липоксигеназы 15 (*ALOX15*), рецепторов эстрогена (*ESR1* и *ESR2*), транспортера 3 монокарбоксилата (*MCT3* или *SLC16A8*) и ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI2*). Профили метилирования определенных регионов этих генов в тканях сосудистой стенки человека оценивали и ранее [4–8], однако в результате проведенного нами исследования впервые выявлено гипометилирование большинства CpG-динуклеотидов генов *ALOX15*, *ESR1*, *ESR2* и *TFPI2* и гиперметилирование cg14014225 гена *SLC16A8* (рисунок). Индекс метилирования cg20253551 и cg02720618 гена *ESR1* оказался ниже в тканях

СрG-сайты, локализованные в СрG-островках, для которых разность среднего индекса метилирования  $\Delta\beta > |0.2|$

Ген	СрG-сайт*	Средний индекс метилирования ( $\beta$ ) в тканях сосудов			Продукт гена
		АБ	ВГА	БПВ	
<i>AATK</i>	cg13781408	0.95	0.60	0.38	Апоптоз-ассоциированная тирозинкиназа
<i>ALOX12</i>	cg08946332	0.79	0.50	0.43	12-липоксигеназа
<i>CPA5</i>	cg11063110	0.74	0.49	0.38	Карбоксипептидаза А5
<i>DAB2IP</i>	cg13060154	0.05	0.28	0.38	Белок, взаимодействующий с DAB2
<i>HOXA2</i>	cg09871315	<b>0.20</b>	0.40	<b>0.78</b>	Белок НохА2
<i>HOXA4</i>	cg24169822	0.51	0.20	0.16	Белок НохА4
<i>HOXD4</i>	cg01152019	<b>0.15</b>	0.58	<b>0.66</b>	Белок НохD4
	cg18750960	0.09	0.37	0.49	
<i>MEST</i>	cg01888566	<b>0.17</b>	0.50	0.54	Белок, гомологичный мезодермоспецифичному транскрипту (мышь)
	cg08077673	<b>0.18</b>	0.42	0.54	
	cg09059945	<b>0.16</b>	0.42	0.54	
<i>MTSS1</i>	cg18939260	0.92	0.71	0.58	Супрессор метастазов 1
<i>PAX8</i>	cg07403255	0.66	0.45	0.31	Белок семейства транскрипционных факторов с парным доменом 8
<i>RASIP1</i>	cg26750002	0.65	0.38	0.39	Взаимодействующий с Ras белок 1
<i>SLC5A10</i>	cg21495715	0.75	0.51	0.44	Растворимый переносчик семейства 5 (котранспортер натрия/глюкозы), изоформа 10
<i>THRB</i>	cg08319404	0.21	0.41	0.68	$\beta$ -рецептор тиреоидного гормона (трийодтиронина)

\* Локализация СрG-сайта указана согласно аннотации производителя микрочипа. АБ – атеросклеротическая бляшка сонной артерии; ВГА – внутренняя грудная артерия; БПВ – большая подкожная вена нижних конечностей. Жирным шрифтом выделены СрG-сайты с индексами метилирования  $\beta \leq 0.2$  и  $\beta \geq 0.6$ .

сонных артерий, как пораженных атеросклерозом, так и макроскопически неизменных, по сравнению с внутренней грудной артерией и большой подкожной веной нижних конечностей (рисунок).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

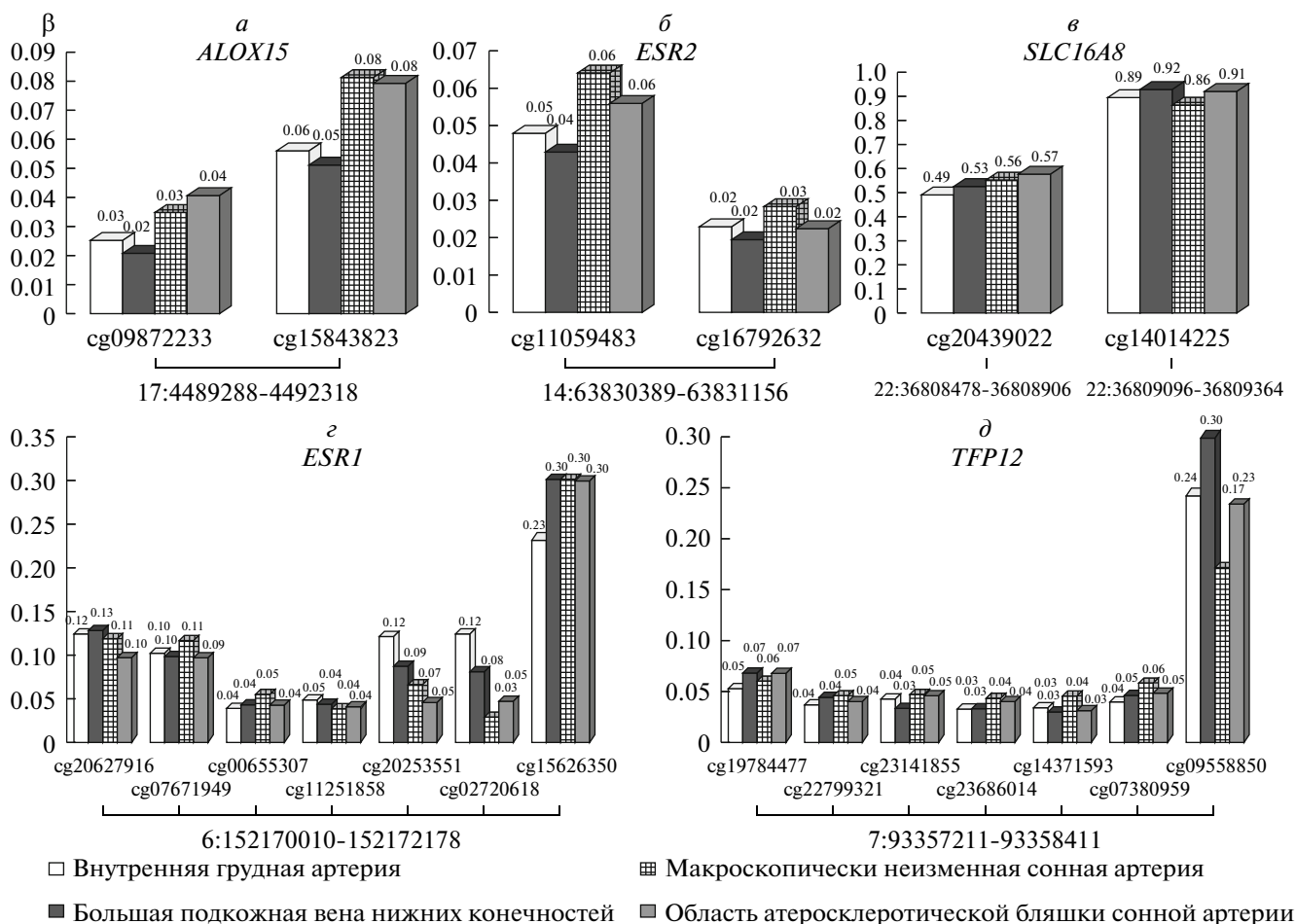
Необходимость расшифровки эпигенома для понимания механизмов развития и прогрессии сердечно-сосудистых заболеваний четко обоснована. Полагают, что эпигенетика представляет собой важное связующее звено между хранящейся в геноме информацией и влиянием факторов среды при формировании промежуточных и конечных патологических фенотипов. Помимо этого, факторы риска и биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний тесно взаимосвязаны с эпигенетическими паттернами [15].

Следует отметить, что одно из ключевых свойств эпигенетических феноменов, – тканеспецифичность. В связи с этим для идентификации информативных локусов генома необходимо проводить скрининг одновременно большого числа сайтов в тканях, подверженных патологическому

процессу. Решение такой задачи становится возможным при использовании современной технологии микрочипов, обеспечивающей высокопроизводительный анализ широкого спектра генов одновременно в нескольких образцах.

В результате проведенного исследования (с использованием микрочипа Infinium HumanMethylation27 BeadChip) тканей сонной (атеросклеротическая бляшка и прилегающая макроскопически неизменная область) и внутренней грудной артерий, а также большой подкожной вены нижних конечностей у больных атеросклерозом установлено дифференциальное метилирование 314 (1%) СрG-сайтов в составе 286 (2%) генов.

Известны две работы, в которых использован тот же методический подход при исследовании тканей сосудистой стенки больных атеросклерозом. Так, С.А. Кастильо-Диаз (Castillo-Diaz) с соавт. [9] проанализировали статус метилирования 10367 СрG-островков в тканях коронарных артерий больных с выраженным атеросклерозом ( $n = 45$ ) и контрольных образцах аорты, взятых у здоровых людей ( $n = 16$ ). Возраст индивидов составлял 22–79 лет, соотношение полов 1 : 1. Исследование проводили с помощью микрочипа, содержащего 14923 клон СрG-



Средний индекс метилирования ( $\beta$ ) отдельных CpG-сайтов генов *ALOX15* (а), *ESR2* (б), *SLC16A8* (в), *ESR1* (г) и *TFP12* (д) в тканях сосудистого русла. Примечание: под диаграммами указаны номер хромосомы и координаты CpG-островка, согласно аннотации производителя микрочипа.

островков с наборами HCG18.1K и 6.8K (“UHN Microarray Centre”, Канада). В контрольных образцах выявлено гиперметилирование 151 (1.4%) CpG-островка, из них в пораженных артериях 142 (94%) были деметилированы. В то же время 17 CpG-островков, которые находились в неметилированном состоянии в неизмененных образцах, оказались гиперметилированными в тканях коронарных артерий больных с выраженным атеросклерозом. Основные функциональные категории продуктов генов, связанных с дифференциально метилированными CpG-островками, представлены транскрипционными (23%) и сигнальными (16%) факторами, в том числе генами семейства *HOX*, *PROX1*, *NOTCH1* и *FOXPI* [9].

В исследовании, проведенном нами ранее [10], проанализированы уровни метилирования 1505 CpG-сайтов 807 генов в тканях из области атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии с использованием микрочипа на платформе GoldenGate Methylation Cancer Panel I (“Illumina”). Биоптаты тканей получены от двух муж-

чин, оперированных по поводу атеросклеротического поражения сосудов. В результате установлено дифференциальное метилирование 103 (7%) CpG-сайтов в составе 90 (11%) генов, белковые продукты которых участвуют в различных биологических процессах [10].

При сравнении списков дифференциально метилированных генов, полученных в данном исследовании и в работах Кастильо-Диас с соавт. [9] и Назаренко с соавт. [10], выявлено совпадение результатов соответственно по пяти генам (*CENTB5*, *DNAJB13*, *HOXC10*, *HOXD4* и *SMAD2*) и по семи генам (*AATK*, *EMR3*, *H19*, *HOXA9*, *MEST*, *PDGFRA* и *S100A4*). Ранее [9] показано гиперметилирование CpG-островка, локализованного ниже гена *HOXD4*, в тканях из области атеросклеротических бляшек коронарных артерий по сравнению с непораженной аортой, в то время как CpG-островки генов *CENTB5*, *DNAJB13*, *HOXC10* и *SMAD2* были неметилированы. Нами выявлено, что сайт cg01152019 гена *HOXD4* гипометилирован в тканях атеросклеротических бляшек сонных артерий по

сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей (таблица).

В тканях из области атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии при использовании микрочипа GoldenGate Methylation Cancer Panel I наиболее существенные различия в уровне метилирования ( $\Delta\beta \geq 0.34$ ) CpG-сайтов, локализованных в CpG-островках, установлены для cg02979355 гена *AATK* и cg15886040 гена *H19* [10]. Теперь нами выявлено гиперметиличивание cg13781408 гена *AATK* и гипометиличивание cg01888566, cg09059945 и cg08077673 гена *MEST* в тканях атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей (таблица). Для сайта cg15552238 гена *EMR3*, который представлен на обоих микрочипах фирмы “Illumina” и расположен вне CpG-островка, показано гипометиличивание в тканях из области атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с пораженной аортой [10], а также внутренними грудными артериями и большими подкожными венами нижних конечностей (данное исследование).

Различные результаты, полученные в настоящей работе, Кастильо-Диаз и др. [9], Назаренко с соавт. [10], могут быть обусловлены несколькими причинами. Во-первых, тестируемые образцы взяты из различных областей сосудистого русла: коронарные, сонные и внутренние грудные артерии, аорта, большая подкожная вена нижних конечностей. В качестве контрольных образцов Кастильо-Диаз и др. [9] использовали образцы аорты здоровых индивидов обоих полов, а в работах с микрочипами фирмы “Illumina” анализировали образцы сосудистого русла мужчин, больных атеросклерозом с различной степенью выраженности патологического процесса. Во-вторых, исследование статуса метилирования ДНК проводили с использованием различных технологий и платформ, в частности микрочипа “HCGI15K, HCGI8.1K и 6.8K”; “GoldenGate Methylation Cancer Panel I” и “Infinium HumanMethylation27 BeadChip”. Генов, тестируемых в формате обоих метилочипов фирмы “Illumina”, было 783, однако количество общих CpG-сайтов составило всего 112. С другой стороны, с помощью Infinium HumanMethylation27 BeadChip проведен анализ единичных CpG-сайтов, входящих в состав 20006 CpG-островков, что в два раза больше проанализированных в работе [9] (а именно 10024), причем с другой локализацией. Кроме того, в трех работах использованы различные подходы к статистической обработке данных, в том числе при функциональной аннотации продуктов дифференциально метилированных генов.

Ранее проводили оценку статуса метилирования определенных регионов ряда генов-кандидатов в тканях сосудистой стенки при атеросклерозе у человека [4–8]. Так, выявлено гипометиличивание четырех CpG-динуклеотидов в 5'-фланкирующем ре-

гионе гена *ALOX15* в выраженных атеросклеротических бляшках [4]. Высокий уровень метилирования регистрировали в промоторах и первых экзонах генов *ESR1* и *ESR2* в атеросклеротических бляшках коронарных артерий по сравнению с таковым в тканях аорты и внутренней грудной артерии [5, 6]. Гиперметиличивание CpG-района в экзоне 2 гена *SLC16A8* установлено в атеросклеротических бляшках аорты [7]. Эпигенетическая инактивация гена *TFPI2*, связанная с метилированием CpG-богатых регионов промотора, обнаружена в атеросклеротических бляшках сонных артерий [8].

В ходе проведенного нами исследования не подтвержден дифференциальный статус метилирования генов *ALOX15*, *ESR2*, *SLC16A8* и *TFPI2* в тканях сосудистой стенки у больных атеросклерозом. Однако индекс метилирования двух сайтов cg20253551 и cg02720618 гена *ESR1* оказался ниже в тканях сонных артерий по сравнению с внутренней грудной артерией и большой подкожной веной (рисунок). По-видимому, это связано с тем, что из всех CpG-сайтов, для которых ранее выявлено дифференциальное метилирование [4–8], только cg20439022 гена *SLC16A8* представлен на микрочипе Infinium Human Methylation27 BeadChip. С другой стороны, нельзя исключить вариабельности уровня метилирования ДНК тканей сердечно-сосудистой системы, исходно различающихся по своим анатомо-физиологическим свойствам и степени подверженности атеросклеротическому процессу. В вышеупомянутых работах проанализированы ткани ушка правого предсердия, неизменной аорты, внутренней грудной артерии, подкожной вены, атеросклеротических бляшек коронарных артерий [5, 6]; неизменные ткани и атеросклеротические бляшки аорты, варьирующие по степени тяжести, атеросклеротические бляшки коронарных артерий [7], а также ткани внутренней грудной артерии и атеросклеротические бляшки сонной артерии [8]. Кроме того, в этих работах использованы разные методические подходы: гибридизация Саузерн-блот, метилспецифическая ПЦР, комбинированный бисульфит-рестрикционный анализ, бисульфитное секвенирование, пиросеквенирование и технологии микрочипов. Наконец, во всех представленных исследованиях ДНК выделяли из цельных образцов тканей сосудистой стенки. Будем надеяться, что в дальнейшем использование современных технологий лазерной микродиссекции и клеточной сортировки поможет преодолеть проблему высокой клеточной гетерогенности тканей сердечно-сосудистой системы.

В тканях атеросклеротических бляшек сонных артерий нами выявлено гипометиличивание CpG-динуклеотидов гомеобокс-содержащих генов *HOXA2* и *HOXD4*, а также импринтированного гена *MEST* по сравнению с внутренними грудными артериями и большими подкожными венами. Возможно, что эпигенетическая изменчивость генов, вовлеченных в процессы развития, не только обес-

печивает наилучшую адаптацию организмов к изменяющимся условиям среды [2], но и обуславливает подверженность к многофакторным заболеваниям. Особый интерес представляет тот факт, что *MEST* относится к группе импринтированных генов, которые чаще, по сравнению с другими локусами генома, подвержены нарушениям, что приводит к “ощутимым” последствиям, поскольку они экспрессируются только с одного из родительских аллелей. Более детальное исследование статуса метилирования группы гомеобокс-содержащих и импринтированных генов при атеросклерозе позволит получить ценную информацию о механизмах формирования патологического процесса.

Таким образом, результаты проведенного исследования дополняют наше представление о молекулярно-генетической картине атеросклероза. Нами проанализированы CpG-динуклеотиды, локализованные в CpG-островках сайта старта транскрипции (TSS), поскольку большинство проведенных ранее исследований было сфокусировано именно на этих регионах генома и получена информация относительно связи метилирования ДНК этих областей и функциональной активности генов. Согласно современным представлениям, роль метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в сайтах старта транскрипции, экзонах и интронах генов, межгенных областях, повторяющихся и мобильных регионах генома, энхансерах и инсуляторах менее ясна [16]. Так, показано [17], что ткане- и опухолеспецифичное нарушение метилирования ДНК возникает в так называемых CpG-берегах (сайты, расположенные с меньшей плотностью на удалении 2 т.н. от CpG-островков). К сожалению, аннотация метилочипа Infinium Human Methylation27 BeadChip, используемого в данной работе, не позволяет выделить CpG-сайты в вышеуказанных регионах генома, но это реализовано на новой платформе Infinium HumanMethylation 450K BeadChip. В дальнейших исследованиях представляет интерес установление корреляций “эпигенотип–фенотип”, а также сопоставление уровня метилирования ДНК с данными транскрипционных профилей генов в тканях сердечно-сосудистой системы с целью определения биологической и клинической значимости эпигенетических модификаций генома в патогенезе атеросклероза.

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 науч-

ных исследований коллективами НОЦ (соглашение № 8062).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ballestar E., Esteller M. 2008. Epigenetic gene regulation in cancer. *Adv. Genet.* **61**, 247–267.
2. Feinberg A.P., Irizarry R.A., Fradin D. et al. 2010. Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index. *Sci. Transl. Med.* **2**, 49–67.
3. Turunen M.P., Aavik E., Yla-Herttuala S. 2009. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**, 886–891.
4. Hiltunen M.O., Turunen M.P., Hakkinen T.P. et al. 2002. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc. Med.* **7**, 5–11.
5. Post W.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Wilhide C.C., et al. 1999. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **43**, 985–991.
6. Kim J., Kim J.Y., Song K.S., et al. 2007. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**, 72–80.
7. Zhu S., Goldschmidt-Clermont P.J., Dong C. 2005. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis. *Circulation.* **112**, 1353–1361.
8. Zawadzki C., Chatelain N., Delestre M., et al. 2009. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* **204**, e4–14.
9. Castillo-Diaz S.A., Garay-Sevilla M.E., Hernandez-Gonzalez M.A., et al. 2010. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries. *Int. J. Mol. Med.* **26**, 691–700.
10. Назаренко М.С., Пузырев В.П., Лебедев И. Н., и др. 2011. Профиль метилирования ДНК в области атеросклеротических бляшек человека. *Молекулярная биология.* **45**, 610–616.
11. Bibikova M., Le J., Barnes B., et al. 2009. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay. *Epigenomics.* **1**, 177–200.
12. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>
13. <http://www.geneontology.org/>
14. <http://revigo.irb.hr/>
15. Baccarelli A., Rienstra M., Benjamin E.J. 2010. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3**, 567–573.
16. Jones P.A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–492.
17. Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., et al. 2009. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* **41**, 178–186.