Анализ уровня метилирования гена MIR21 в сосудах и лейкоцитах крови при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования

Королёва Ю.А.,[1] Марков А.В.,[1] Слепцов А.А.,[1] Зарубин А.А.,[1] Муслимова Э.Ф.,[2] Афанасьев С.А.,[2] Кузнецов М.С.,[2] Козлов Б.Н.,[2] Назаренко М.С.[1]

1 — Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10

2 — Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634012, г. Томск, ул. Киевская, 111А

Методом таргетного бисульфитного секвенирования проанализирован уровень метилирования предполагаемого промоторного региона, CpG-островка и «тела» гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерий, а также в лейкоцитах крови здоровых индивидов. Выявлено гипометилирование CpG-сайтов в гене *MIR21* в сосудах по сравнению с лейкоцитами (вне зависимости от наличия заболевания). В атеросклеротической бляшке 4 последовательных CpG-сайта «тела» гена *MIR21* оказались значимо гипометилированы относительно предлежащей макроскопически интактной части сонной артерии. Таким образом, установлена тканеспецифичность метилирования CpG-сайтов в гене *MIR21* в сосудах, а также его связь с атеросклерозом сонных артерий.

Ключевые слова: *MIR21*, атеросклероз, метилирование ДНК

Для цитирования: Королёва Ю.А., Марков А.В., Слепцов А.А., Зарубин А.А., Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования. *Медицинская генетика* 2020; 19(5): 41-43.
DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.41-43

Автор для корреспонденции: *Королёва Юлия Александровна*, **e-mail:** yuliya.koroleva@medgenetics.ru
Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10150).
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила: 20.05.2020

Analysis of MIR21 gene methylation level in blood vessels and leukocytes in carotid atherosclerosis by targeting bisulphite sequencing

Koroleva I.A.,[1] Markov A.V.,[1] Sleptcov A.A.,[1] Zarubin A.A.,[1] Muslimova E.F.,[2] Afanasiev S.A.,[2] Kuznetsov M.S.,[2] Kozlov B.N.,[2] Nazarenko M.S.[1]

1 — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
Nab. Ushaiki str. 10, Tomsk, 634050, Russian Federation

2 — Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science
Kievskaya str., 111a, 634012, Tomsk, Russian Federation

We analyzed the DNA methylation level of *MIR21* gene (proposed promoter, CpG island and gene body) by targeted bisulfite sequencing in blood vessels and leukocytes of patients with carotid artery atherosclerosis and in blood leukocytes of healthy individuals. We detected DNA hypomethylation at the CpG sites in the *MIR21* gene in the blood vessels compared to the leukocytes (regardless of the disease). At the same time, 4 consecutive CpG sites of the *MIR21* gene body were significantly hypomethylated in atherosclerotic carotid plaque compared to nearby macroscopically intact tissue. Thus, we have shown the tissue specificity at the CpG sites in the *MIR21* gene for vessels and its association with carotid artery atherosclerosis.

Keywords: *MIR21*, atherosclerosis, DNA methylation

For citation: Koroleva I.A., Markov A.V., Sleptcov A.A., Zarubin A.A. Muslimova E.F., Afanasiev S.A., Kuznetsov M.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. Analysis of *MIR21* gene methylation level in blood vessels and leukocytes in carotid atherosclerosis by targeting bisulphite sequencing. *Medical genetics*. 2020; 19(5): 41-43. (In Rus)
DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.41-43

Corresponding author: *Koroleva Iuliia*, **e-mail:** yuliya.koroleva@medgenetics.ru
Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant project № 14-15-00305).
Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interests.
Accepted: 20.05.2020

МикроРНК, как один из эпигенетических механизмов регуляции активности генов, выступают важным участником патогенеза различных заболеваний. Наиболее активно идёт изучение miR-21, для которой показано, в том числе, значительное усиление экспрессии в тканях артерий, поражённых атеросклерозом [1]. В свою очередь, экспрессию микроРНК регулирует такой эпигенетический механизм как метилирование CpG-сайтов, преимущественно в CpG-островках промоторных регионов генов, реже — вне CpG-островков в промоторах или «теле» гена микроРНК [2]. Расположение промотора *MIR21* окончательно не выяснено, однако предполагается в пределах региона chr17:57914850-57915900 (здесь и далее сборка генома GRCh37/hg19) [3,4]. Ген *MIR21* располагается в регионе chr17:57918627-57918698 [http://genome-euro.ucsc.edu]. Есть данные о CpG-островке в области chr17:57916300-57916700 [5]. Комплексное изучение состояния метилирования ДНК данных регионов генома в сосудах и лейкоцитах крови представляет интерес для понимания молекулярных механизмов атерогенеза.

Цель исследования: выявить особенности уровня метилирования ДНК в области регуляторных элементов гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови при атеросклерозе.

Задачи исследования: аннотировать регуляторные элементы гена *MIR21* и провести сравнительный анализ уровня метилирования CpG-сайтов данных элементов в сосудах и лейкоцитах крови пациентов, лейкоцитах крови здоровых индивидов методом таргетного бисульфитного секвенирования; оценить тканеспецифичность и связь с атеросклерозом уровня метилирования ДНК анализируемых регионов генома.

Материал и методы

Пациентов с атеросклеротическим стенозом сонной артерии >70% было 22 человека (64,6 ± 6,5 лет). У пациентов в ходе операции получены образцы атеросклеротических бляшек (САБ), предлежащей макроскопически интактной части сонной артерии (САН) и больших подкожных вен нижних конечностей (БПВ). Лейкоциты периферической крови (ЛКБ) получены от тех же пациентов до операции. Контрольную группу составили 14 индивидов (65,6±7,7 лет), у которых толщина комплекса интима-медия была 0,9±0,3 мм при ультразвуковом исследовании сонных артерий; от них получены образцы лейкоцитов периферической крови (ЛКЗ).

Выделение ДНК проведено с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США), бисульфитная конверсия ДНК осуществлялась с помощью набора EZ DNA Methylation Kit, (Zymo Research, США). Таргетное бисульфитное секвенирование выполнено с использованием набора для приготовления ДНК-библиотек Nextera Flex на приборе MiSeq (Illumina). Проанализировано 3 региона гена *MIR21*: предполагаемый промоторный регион гена (chr17:57915138-57916025; 9 CpG-сайтов); CpG-островок (chr17:57915960-57916717; 17 CpG-сайтов); «тело» гена *MIR21* (chr17:57918142-57918840 6 CpG-сайтов). Статистический анализ данных проводили в свободно распространяемой среде R [The R Foundation]. Для сравнения уровней метилирования CpG-сайтов в различных тканях использовали критерий Уилкоксона. Контроль ложноположительных результатов (FDR) при множественном тестировании статистических гипотез проведен по методу Бенджамини-Хохберга с использованием поправки к полученным значениям p на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Установлено, что практически все проанализированные CpG-сайты гена *MIR21* значимо ($p<0,001$) гипометилированы в клетках сосудов (медианный уровень метилирования по всем исследованным регионам в САБ 5,3%, в САН 7,7%, в БПВ 3,2%) по сравнению с лейкоцитами (медианный уровень метилирования по всем исследованным регионам в ЛКБ – 44,4%, а в ЛКЗ – 42,3%). Такая картина наблюдается для 31 из 32 исследованных CpG-сайтов при сравнении САБ с лейкоцитами (ЛКЗ или ЛКБ) и для 28 из 32 исследованных CpG-сайтов при сравнении САН или БПВ с лейкоцитами (ЛКЗ или ЛКБ). При этом уровень метилирования всех изученных CpG-сайтов не различался как между САН и БПВ, так и между ЛКБ и ЛКЗ. Четыре последовательно расположенных CpG-сайта в области «тела» гена *MIR21* значимо ($p<0,006$) гипометилированы в САБ (медианный уровень метилирования 10,2%) относительно САН (медианный уровень метилирования 20,9%).

Выводы

Уровень метилирования CpG-сайтов в области предполагаемого промотора, CpG-островка и «тела» гена *MIR21* тканеспецифичен в сосудах, а в области «тела» гена *MIR21* ассоциирован с атеросклерозом сонных артерий.

Литература/ References

1. Raitoharju E., Lyytikäinen L.P., Levula M. et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 2011; 219(1): 211–217.
2. Huan T., Mendelson M., Joehanes R. et al. Epigenome-wide association study of DNA methylation and microRNA expression highlights novel pathways for human complex traits. *Epigenetics* 2019; 17: 1–16.
3. Fujita S., Ito T., Mizutani T. et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *Journal of molecular biology* 2008; 378(3): 492–504.
4. Adams A.T., Kennedy N.A., Hansen R. et al. Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's Disease implicates epigenetic alterations at the VMP1/MIR21 and HLA loci. *Inflammatory bowel diseases* 2014; 20(10): 1784–1793.
5. Iorio M.V., Visone R., Di Leva G. et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer research* 2007; 67(18): 8699–8707.