

Особенности метилирования CpG-сайтов в области гена микроРНК MIR10B и гена транскрипционного фактора TWIST1 при атеросклерозе

Марков А.В.¹, Бабушкина Н.П.¹, Голубенко М.В.¹, Салахов Р.Р.¹, Зарубин А.А.¹, Слепцов А.А.¹, Королёва Ю.А.¹, Шарыш Д.В.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, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

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

В работе проведен анализ профилей метилирования гена miR-10b и гена транскрипционного фактора *TWIST1*, регулирующего экспрессию данной микроРНК, в кровеносных сосудах и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом и у относительно здоровых лиц. Обнаружено гипометилирование *MIR10B* в поражённых атеросклерозом артериях относительно непораженных артерий и вен. Профиль метилирования гена *TWIST1* был тканеспецифичен и постоянен вне зависимости от наличия заболевания.

Ключевые слова: атеросклероз, метилирование ДНК, miR-10b, *TWIST1*.

Для цитирования: Марков А.В., Бабушкина Н.П., Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Зарубин А.А., Слепцов А.А., Королёва Ю.А., Шарыш Д.В., Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Особенности метилирования CpG-сайтов в области гена микроРНК *MIR10B* и гена транскрипционного фактора *TWIST1* при атеросклерозе. *Медицинская генетика* 2020; 19(5): 44-45.
DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.44-45

Автор для корреспонденции: Марков Антон Владимирович, e-mail: anton.markov@medgenetics.ru

Финансирование. Программа фундаментальных научных исследований РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Features of CpG site methylation within miRNA gene MIR10B and transcription factor gene TWIST1 in atherosclerosis

Markov A.V.¹, Babushkina N.P.¹, Golubenko M.V.¹, Salakhov R.R.¹, Zarubin A.A.¹, Sleptsov A.A.¹, Koroleva Yu.A.¹, Sharysh D.V.¹, Muslimova E.F.², Afanasyev 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 of the Russian Academy of Sciences
Ushaika Embankment, 10, Tomsk, 634050, Russian Federation

2 — Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
Kievskaya st., 111a, Tomsk, 634012, Russian Federation

We analyzed DNA methylation profiles within genes of miR-10b and *TWIST1* regulating the expression of this microRNA in blood vessels and blood leukocytes of patients with advanced atherosclerosis and in relatively healthy individuals. *MIR10B* hypomethylation was detected in arteries affected by atherosclerosis in comparison with unaffected arteries and veins. Methylation profile of *TWIST1* gene was tissue-specific and consistent regardless of atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis, DNA methylation, miR-10b, *TWIST1*.

For citation: Markov A.V., Babushkina N.P., Golubenko M.V., Salakhov R.R., Zarubin A.A., Sleptsov A.A., Koroleva Yu.A., Sharysh D.V., Muslimova E.F., Afanasyev S.A., Kuznetsov M.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. Features of CpG site methylation within miRNA gene *MIR10B* and transcription factor gene *TWIST1* in atherosclerosis. *Medical genetics*. 2020; 19(5): 44-45. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.44-45

Corresponding author: Anton V. Markov, e-mail: anton.markov@medgenetics.ru

Funding. Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, the Program for basic scientific research.

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 20.05.2020

МикроРНК miR-10b задействована в ключевых патологических процессах на разных этапах развития атеросклероза (дисфункции эндотелия, регуляции апоптоза и пролиферации гладкомышечных клеток, функциональной неспособности макрофагов). На мышиных моделях было показано, что нокаут гена данной микроРНК приводит к развитию атеросклероз-резистентного фенотипа, а её нокдаун — к стабилизации атеросклеротического поражения артерий [1,2], что свидетельствует о перспективности изучения miR-10b в качестве мишени для терапевтического воздействия. Ген *MIR10B* локализован в CpG-островке (плотном скоплении CpG-динуклеотидов), а ген транскрипционного фактора *TWIST1*, регулирующий экспрессию данной микроРНК, также имеет промоторный CpG-островок. В связи с этим, предполагается регуляторная роль метилирования данных генов в функционировании miR-10b при развитии атеросклероза у человека.

Цель исследования: охарактеризовать метилирование генов *MIR10B* и *TWIST1* в клетках кровеносных сосудов и лейкоцитах крови при атеросклерозе.

Материал и методы

От пациентов с атеросклерозом сонных артерий (СА) ($n = 22$, возраст 65 ± 7 лет, стеноз СА $\geq 70\%$) получены парные образцы атеросклеротических бляшек СА (САБ), прилежащих тканей интактной СА (САН), больших подкожных вен (БПВ) и лейкоцитов крови (ЛКБ). От клинически здоровых лиц сравнимого возраста ($n = 14$, 66 ± 8 лет) получены лейкоциты крови (ЛКЗ). Оценку метилирования CpG-сайтов проводили методом бисульфитного секвенирования ампликонов. Вкратце, после бисульфитной конверсии и амплификации целевых участков *MIR10B* (промотор и тело гена, chr2:177014629-177015244 согласно сборке GRCh37, 23 CpG-сайта) и *TWIST1* (промотор и экзон 1, chr7:19158089-19158886, 29 CpG-сайтов) проводили пулирование ампликонов по образцам, приготовление ДНК-библиотек набором Nextera Flex (Illumina) и секвенирование на приборе MiSeq (Illumina). Обработку прочтений проводили с помощью инструментов: bwa-meth и MethylDackel. Статистический анализ сигналов метилирования выполнен в программном пакете methylKit в среде R.

Результаты и обсуждение

CpG-островок, в котором локализуется ген *MIR10B*, имел высокий уровень метилирования в образцах БПВ (средний уровень метилирования $65 \pm 8\%$), что было значительно выше ($p < 0,01$) его гипометилированного состояния в образцах САБ ($24 \pm 7\%$) и ЛКБ ($23 \pm 9\%$) пациентов и аналогичного показателя в группе ЛКЗ ($23 \pm 6\%$). Гипометилирование CpG-островка в САБ соотносится с данными о повышении экспрессии miR-10b в развитых атеросклеротических бляшках у человека [3]. Образцы САН имели промежуточный уровень метилирования ($40 \pm 17\%$) и подразделялись на 2 кластера — с «веноподобным» и «лейкоцитоподобным» профилями метилирования *MIR10B*. Такая картина может быть связана с разной степенью инфильтрации лейкоцитами стенки артерии при воспалении и постепенном развитии атеросклеротической бляшки. Транскрипционный фактор *TWIST1* является одним из механочувствительных регуляторов miR-10b, играющих важную роль в нормальном функционировании эндотелия. Для CpG-островка в области гена *TWIST1* была характерна выраженная тканеспецифичность: уровень метилирования варьировал только между тканями кровеносных сосудов (САБ, САН и БПВ, в среднем — $28-30\%$) и лейкоцитами крови (ЛКЗ и ЛКБ, в среднем — $9-10\%$; $p < 0,01$).

Выводы

Ген *MIR10B* гипометилирован в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови, вариабельно метилирован в интактных артериях и гиперметилирован в венах, что свидетельствует о дифференциальной доступности для транс-регуляторных факторов. Эпигенетическое состояние гена одного из его регуляторов *TWIST1* остается тканеспецифичным и относительно постоянным в кровеносных сосудах, независимо от их атеросклеротического поражения.

Литература/ References

1. Nakahara M., Kobayashi N., Oka M. et al. miR-10b deficiency affords atherosclerosis resistance. *bioRxiv* 2018; 248641.
2. Wang D., Wang W., Lin W. et al. Apoptotic cell induction of miR-10b in macrophages contributes to advanced atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovascular Research* 2018; 114(13): 1794–1805.
3. Bidzhikov K., Gan L., Denecke B. et al. MicroRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans. *Thrombosis and Haemostasis* 2012; 107(4): 619–625.