

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.01.43-46>

Анализ уровня метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования

Королёва Ю.А.¹, Зарубин А.А.¹, Бабушкина Н.П.¹, Гомбоева Д.Е.¹, Муслимова Э.Ф.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, д. 10.
- 2 – Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук 634012, г. Томск, ул. Киевская, д. 111 а

В нестабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий усиливается экспрессия микроРНК miR-100, что может быть связано с вариабельностью метилирования CpG-сайтов гена *MIR100* и его регуляторных регионов. Целью работы был анализ связи уровня метилирования ДНК предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box) с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования. В качестве материала использовались ткани сосудов и лейкоциты крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (n=19), а также лейкоциты периферической крови относительно здоровых индивидов (n=18). В результате выявлена тканеспецифичность паттерна метилирования региона chr11:122,024,891-122,025,506 (сборка генома GRCh37/hg19), включающего E-box — уровень метилирования в непоражённых сонных артериях снижен по сравнению как с венами (p<0,001), так и с лейкоцитами периферической крови (p<0,007). При этом в атеросклеротических бляшках наблюдается значимое гипометилирование относительно непоражённых артерий, однако уровень метилирования ДНК в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом не отличается от такового в лейкоцитах крови контрольной группы. Полученные результаты позволяют говорить о тканеспецифичности метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box) и о возможной его связи с атеросклеротическим поражением артерий, однако метилирование исследуемого региона нельзя применять в качестве диагностического биомаркера атеросклероза.

Ключевые слова. *MIR100*, атеросклероз, метилирование ДНК, микроРНК, сосуды, тканеспецифичность.

Для цитирования: Королёва Ю.А., Зарубин А.А., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е., Муслимова Э.Ф., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования. *Медицинская генетика* 2023; 22(1): 43-46.

Автор для корреспонденции: Королёва Ю.А.; e-mail: yuliya.koroleva@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования №122020300041-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 09.01.2023

Methylation level analysis of putative regulatory region of *MIR100* gene in carotid atherosclerosis by targeted bisulfite sequencing

Koroleva I.A.¹, Zarubin A.A.¹, Babushkina N.P.¹, Gomboeva D.E.¹, Muslimova E.F.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 10, Nab. r. Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation
- 2 – Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences 111 a, Kyevskaya str., Tomsk, 634012, Russian Federation

Expression of miR-100 is increased in unstable carotid atherosclerotic plaques. It can be associated with CpG sites methylation variability in the *MIR100* gene region and its adjacent regulatory regions. The aim of our work was to analyze the association of DNA methylation level in the putative regulatory region of *MIR100* gene with advanced carotid atherosclerosis using targeted bisulfite sequencing. We analyzed DNA samples of paired vessel tissues and blood leukocytes of patients with advanced atherosclerosis of the carotid arteries (n=19), as well as blood leukocytes of healthy individuals (n=18). As a result, we revealed tissue-specific methylation pattern of the chr11:122,024,891-122,025,506 region (GRCh37/hg19 genome assembly) including E-box (see Chen D. et al, 2014 for more information). The methylation level in unaffected carotid arteries was decreased compared to both veins (p<0.001) and peripheral blood leukocytes

($p < 0.007$). Significant hypomethylation was observed in atherosclerotic carotid plaques relative to unaffected carotid arteries, but the level of DNA methylation in blood leukocytes of patients with atherosclerosis did not differ from that in blood leukocytes of the control group. Our findings suggest tissue-specific methylation of the putative regulatory region of *MIR100* gene (E-box) and its possible association to atherosclerosis. Nevertheless, the methylation of the chr11:122,024,891-122,025,506 region cannot be used as a diagnostic biomarker of atherosclerosis.

Keywords. *MIR100*, atherosclerosis, DNA methylation, microRNA, blood vessel, tissue specificity.

For citation: Koroleva I.A., Zarubin A.A., Babushkina N.P., Gomboeva D.E., Muslimova E.F., Kuznetsov M.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. Methylation level analysis of putative regulatory region of *MIR100* gene in carotid atherosclerosis by targeted bisulfite sequencing. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2023; 22(1): 43-46 (In Russ.)

Corresponding author: Koroleva I.A.; e-mail: yuliya.koroleva@medgenetics.ru

Funding. The work was carried out according to the State Order of the Ministry of Science and Higher Education No. 122020300041-7.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 09.01.2023

Введение

Одной из основных причин инвалидизации и смертности в мире являются ишемические инсульты, нередко возникающие вследствие нарушения стабильного течения атеросклеротического процесса. Согласно литературным данным, в нестабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий по сравнению со стабильными бляшками наблюдается усиление экспрессии микроРНК miR-100 [1,2]. Экспрессия микроРНК контролируется, в том числе, посредством метилирования CG-динуклеотидов (CpG-сайтов), локализованных на расстоянии до 2,5 т.п.н. от сайта начала транскрипции микроРНК [3]. Согласно литературным данным, на экспрессию miR-100 влияет транскрипционный фактор ZEB1, который связывается с расположенным на расстоянии 2,2 т.п.н. от гена *MIR100* ZEB1-связывающим сайтом (E-box, CAGCTG) [4]. ZEB1 значительно повышает активность предполагаемого промотора miR-100 [4].

Ген *MIR100*, согласно браузеру UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), располагается в регионе chr11:122,022,937-122,023,016, в то время как сайт E-box (CAGCTG) занимает участок chr11:122,025,183-122,025,188 [4].

Согласно базе данных PubMed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov), метилирование гена *MIR100* и близлежащих регионов в основном изучается в отношении онкологических заболеваний. Подобный анализ при атеросклеротическом поражении артерий представляет исследовательский интерес.

Цель исследования: проанализировать уровень метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box) в тканях сосудов и лейкоцитах крови у пациентов при атеросклеротическом поражении сонных артерий и оценить его тканеспецифичность и связь с заболеванием.

Методы

Формирование выборок и обследование пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий проводили на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Все участники исследования подписали информированное согласие. В группу пациентов с атеросклерозом сонных артерий вошли 19 человек в возрасте от 46 до 78 лет, из них 13 мужчин и 6 женщин. У 9 пациентов при ультразвуковом исследовании (УЗИ) был обнаружен стеноз $>70\%$ сонной артерии, что является показанием к каротидной эндартерэктомии; у 10 пациентов в анамнезе наблюдались клинические проявления стеноза — острые нарушения мозгового кровообращения, включая ишемический инсульт. У всех пациентов в ходе оперативного вмешательства были получены образцы атеросклеротических бляшек (СAB), макроскопически неизмененных предлежащих участков сонных артерий (САН) и больших подкожных вен, используемых в качестве «заплаты» (БПВ). Образцы лейкоцитов периферической крови (ЛКБ) получены от тех же пациентов до оперативного вмешательства.

Контрольную группу составили 18 человек в возрасте от 53 до 78 лет без клинических признаков поражения сердечно-сосудистой системы; из них 12 мужчин и 6 женщин. Проведённое УЗИ сонных артерий не выявило гемодинамически значимых изменений (толщина комплекса интима-медиа $0,8 \pm 0,2$ мм). От индивидов данной группы получены образцы периферической крови (ЛКЗ).

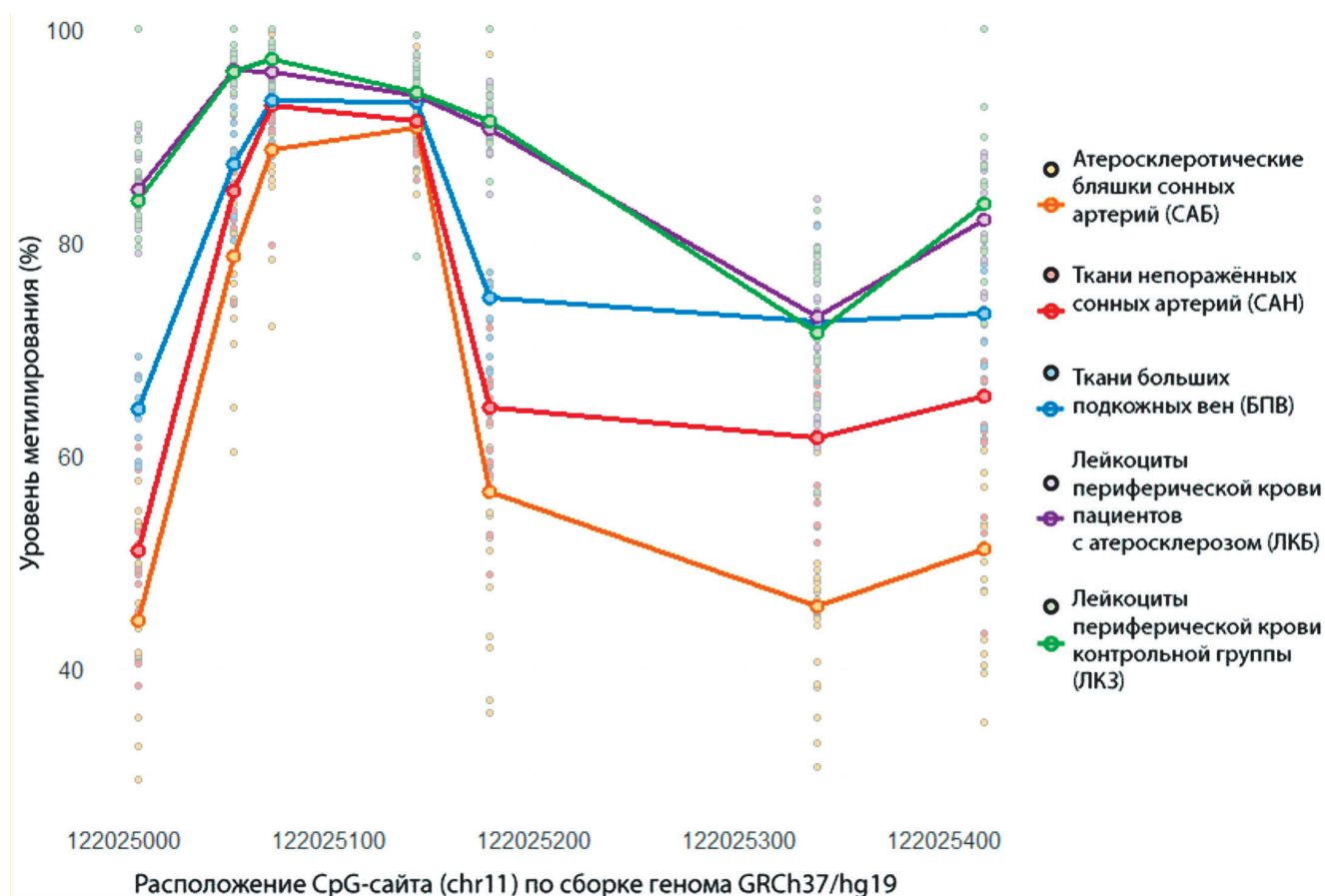
ДНК была выделена из образцов с использованием стандартного фенол-хлороформного метода и обработана бисульфитом натрия. Последовательность праймеров для секвенирования исследуемого региона была по-

добрана с помощью онлайн-инструмента MethPrimer2 (urowgene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi). Таргетное бисульфитное секвенирование было проведено на приборе MiSeq (Illumina, США). Проанализированный регион приходится на участок chr11:122,024,891-122,025,506, включает предполагаемый регуляторный регион гена *MIR100* (E-box) и охватывает 8 CpG-сайтов. Для каждого образца были получены данные об уровне метилирования изучаемых CpG-сайтов в процентах. Статистический анализ данных был выполнен в свободно распространяемой программной среде R (версия 4.1.2). Для оценки уровней метилирования CpG-сайтов были использованы непараметрические оценки распределения в виде $M [Q1; Q3]$, где M – медиана, $Q1$ – 1-й квартиль (25-й перцентиль), $Q3$ – 3-й квартиль (75-й перцентиль). Сравнение уровней метилирования в группах исследования также проводилось с использованием непараметрических критериев: критерия Уилкоксона

при сравнении связанных выборок разных тканей, полученных от одних и тех же пациентов, а также U-критерия Манна-Уитни при сравнении независимых групп исследования (образцов лейкоцитов крови, полученных от пациентов и относительно здоровых индивидов). 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

В результате таргетного бисульфитного секвенирования получены данные о метилировании 7 из 8 CpG-сайтов исследуемого региона, кроме chr11:122,025,042, что связано с его недостаточным покрытием при секвенировании.



Уровень метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box), в сосудах и лейкоцитах крови.

The level of methylation of the putative regulatory region of the *MIR100* gene (E-box) in blood vessels and leukocytes.

За исключением сайта chr11:122,025,143 (для которого уровень метилирования во всех тканях превышает 90%, а различия между тканями не превышают 3%), исследованный регион демонстрирует характерный паттерн метилирования (**рисунок**).

Уровень метилирования в непоражённых артериях снижен по сравнению как с венами ($p < 0,001$; но не значимо для chr11:122,025,054 и chr11:122,025,072), так и с лейкоцитами периферической крови ($p < 0,007$). Медианный уровень метилирования по исследованному региону в САН 67,0%, в БПВ 77,2%, в ЛКБ 90,9%. При этом в атеросклеротических бляшках наблюдается значимое гипометилирование (медианный уровень в САБ 57,3%, $p < 0,003$) относительно непоражённых артерий. Такие различия позволяют говорить не только о тканеспецифичности метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box), но и о возможной его связи с атеросклеротическим поражением артерий.

В то же время уровень метилирования ДНК в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом по всем исследованным CpG-сайтам не отличался от такового в лейкоцитах крови контрольной группы (медианный уровень в ЛКЗ 91,0%, $p > 0,5$). Таким образом, метилирование предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box) нельзя применять в качестве диагностического биомаркера атеросклероза.

Интересно, что вышеописанный паттерн тканеспецифичности наиболее нагляден для CpG-сайта chr11:122,025,178, располагающегося в непосредственной близости от E-box (chr11:122,025,183-122,025,188).

Снижение уровня метилирования в данном регионе в поражённых атеросклерозом сонных артериях хорошо согласуется как с литературными данными об усилении экспрессии miR-100 в атеросклеротических бляшках [1, 2], так и с ролью E-box как регуляторного региона гена *MIR100*.

Выводы

Метилирование региона chr11:122,022,937-122,023,016 гена *MIR100*, включающего предполагаемый регуляторный регион E-box (chr11:122,025,183-122,025,188) тканеспецифично и предположительно ассоциировано с атеросклерозом сонных артерий. Тем не менее, определение уровня метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* (E-box) в лейкоцитах периферической крови нельзя применять в качестве диагностического биомаркера атеросклероза.

Литература/References

1. Cipollone F., Felicioni L., Sarzani R. et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*. 2011;42(9):2556-2563.
2. Maitrias P., Metzinger-Le Meuth V., Massy Z.A. et al. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque. *Journal of vascular surgery*. 2015;62(5):1245-1250.e1.
3. Morales S., Monzo M., Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomolecular concepts*. 2017;8(5-6):203-212.
4. Chen D., Sun Y., Yuan Y. et al. miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion. *PLoS genetics*. 2014;10(2):e1004177.