

Вариабельность генома соматических клеток при многофакторных заболеваниях человека

Назаренко М.С.^{1,2,3}, Слепцов А.А.¹, Марков А.В.¹, Пузырев В.П.^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

В обзоре обсуждается одно из перспективных фундаментальных направлений исследований генетики многофакторных заболеваний (МФЗ), связанное с изучением variability генома соматических клеток в органах-мишенях. Приведены результаты собственного исследования относительно variability числа копий участков ДНК и уровня метилирования ДНК в лейкоцитах периферической крови и клетках артерий при их атеросклеротическом поражении у человека. С практической точки зрения, выявленные молекулярные мишени могут быть использованы в качестве биомаркеров для профилактики, диагностики и лечения МФЗ.

Ключевые слова: многофакторные заболевания, вариации по числу копий участков ДНК, метилирование ДНК.

Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда (проекты № 14-15-00305 и № 16-15-10150).

Genome variability of somatic cells in human complex diseases

Nazarenko M.S.^{1,2,3}, Sleptcov A.A.¹, Markov A.V.¹, Puzyrev V.P.^{1,3}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

² Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

One promising fundamental area of research of genetics of complex diseases, related to the study of the genome variability of somatic cells in target organs was underlined in the review. The results of own research on the copy number variations and DNA methylation level in peripheral blood leukocytes and arterial cells in human atherosclerosis were shown. From a practical point of view, the identified molecular targets can be used as biomarkers for the prevention, diagnosis, and treatment of complex diseases.

Key words: complex diseases, copy number variation, DNA methylation.

Введение

Развитие современных технологий позволило получить «непредвзятый» портрет молекулярно-генетических событий в различных тканях не только в сравнительном межиндивидуальном аспекте, но и на уровне отдельного организма, ткани и клеток. Действительно, применение высокоразрешающих методов исследований, таких, как микрочиповая технология и массовое параллельное секвенирование, обнаружило существенную меж- и внутриканевую генетическую гетерогенность [1, 2]. Несмотря на то, что variability генома соматических клеток является физиологичным отражением их дифференцировки и процесса развития, интенсивно накапливаются данные, о её существенном вкладе в патогенез как онкопатологии, так и некоторых многофакторных заболеваний (МФЗ) [3].

Вариабельность генома соматических клеток при МФЗ

В целом, исследования показывают, что variability генома соматических клеток детектируется на разных уровнях его организации. Так, точковые мутации в генах *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и *JAK2*, выявленные в клетках крови в виде клонального гематопоэза, ассоциированы с повышенным риском развития не только лейкозов, но и атеросклеротического поражения артерий и диабетической васкулопатии [4–6]. Вместе с тем, помимо точковых замен, в соматических клетках наблюдаются вариации числа копий участков ДНК (CNV, copy number variation) и анеуплоидии [3]. Показано, что накопленный груз и спектр CNV в клетках крови при достижении определенного «порога» вносит вклад в аутизм в виде «олигогенной гетерозиготности». Причем, большее количество редких и протяженных CNV,

включая варианты с неизвестной патогенетической значимостью, связаны с более тяжелой клинической картиной заболевания [7]. В то же время, потеря Y хромосомы в клетках крови является потенциальным предиктором риска развития как онкопатологии и повышенной смертности мужчин в пожилом возрасте, так и редких аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний [3].

Как правило, соматические мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) детектируются в опухолевых клетках злокачественных новообразований. Однако исследования показали, что в клетках миокарда и атеросклеротической бляшки у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), а также в клетках головного мозга у больных с болезнями Альцгеймера или Паркинсона также присутствует низкий уровень делеций мтДНК [8–10]. Остается неясным, являются ли данные мутации мтДНК в соматических клетках причиной или следствием патологического процесса. Вместе с тем, Ross и соавт. продемонстрировали на модельных мышах, что комбинация унаследованных точковых мутаций мтДНК, связанных с ранним старением, с *de novo* мутациями приводит к нарушению развития головного мозга [11]. Таким образом, учитывая, что изначально человек имеет низкий уровень гетероплазмичных мутаций, аналогичный механизм может лежать в основе патогенеза некоторых МФЗ, в том числе болезней Паркинсона и Альцгеймера [12]. Несомненно, сочетание унаследованных и *de novo* мутаций в соматических клетках имеет критическое значение для клинической манифестации МФЗ. Данное явление аналогично «двухударной» модели Кнудсена, описывающей подобные события при злокачественных новообразованиях [13].

Механизм, который объясняет участие соматических мутаций в формировании сложно наследуемого фенотипа, выходящего за рамки классических механизмов наследования, и получил название «парадоминантное наследование» [14]. Сущность данного механизма заключается в манифестации заболевания при сочетании мутаций, унаследованных и возникших *de novo* в соматических клетках [15]. Мутации передаются из поколения в поколение в гетерозиготном состоянии, поскольку их носители не имеют фенотипических проявлений, а гомозиготное состояние является летальным на ранних стадиях эмбрионального развития. Патологический признак проявляется только в том в случае, если потеря гетерозиготности произойдет в некоторой части соматических клеток на более поздних этапах онтогенеза.

Концепция «парадоминантного наследования» изначально была предложена для объяснения этиологии ряда наследственных синдромов, проявляющихся патологией кожных покровов — синдрома МакКьюна—Олбрайта, пигментных невусов Беккера [15]. Доказательства данного типа наследования также приведены для нарушений васкулогенеза, ангиогенеза и лимфангиогенеза. В частности, в клетках вен при их аномалиях на коже и слизистых у одного и того же человека идентифицированы как

унаследованные мутации, так и мутации *de novo* в гене эндотелиальной тирозиновой киназы (*TEK*). Таким образом, можно предположить, что этот феномен свойственен многим патологическим процессам у человека, в том числе имеющим многофакторную природу [16].

Вариабельность генома клеток артерий и лейкоцитов периферической крови при атеросклерозе

Патогенез атеросклеротического поражения артерий представляет собой многофакторный процесс, существенный вклад в его развитие вносит генетическая компонента [17]. Несмотря на активные исследования в области генетики атеросклероза и его осложнений, локусов, изменчивость которых может быть фактором риска развития и прогрессии данных заболеваний, известно относительно немного [18]. Одной из возможных причин является смещенная оценка в сторону наследуемых полиморфных генетических вариантов, тогда как вне поля зрения остаются «ожидаемые» изменения структуры и механизмов регуляции активности генов в соматических клетках в ходе онтогенеза или, по крайней мере, на этапах, предшествующих развитию заболевания [16].

Нашим исследовательским коллективом был проведен сравнительный анализ CNV и уровня метилирования ДНК клеток сосудов и лейкоцитов крови при выраженном атеросклеротическом поражении артерий у человека. В результате установлено, что у одного больного атеросклерозом в лейкоцитах увеличение числа копий участков ДНК в хромосомном регионе 10q24.31 (*ERLIN1*) унаследовано, а у двух других пациентов увеличение копийности данного участка ДНК произошло в результате постзиготических событий [19]. Это может быть отражением увеличения возраста и старения человека. Действительно, структурные варианты генома в виде CNV в мозаичном состоянии идентифицированы в лейкоцитах периферической крови и различных тканях здоровых индивидов [3].

В тоже время, в образцах ДНК лейкоцитов крови у трех индивидов контрольной группы, напротив, установлено уменьшение числа копий в хромосомном регионе 10q24.31 (*ERLIN1*) [20]. Возможно, что CNV в анализируемом регионе генома может быть новым генетическим маркером подверженности атеросклерозу. Следует отметить, что SNP в области гена *ERLIN1* связаны с неалкогольной жировой болезнью печени и ее биомаркером — уровнем аланин-аминотрансферазы в плазме крови [21]. Механизм ассоциации полиморфизма в данном гене с патологией неизвестен. Продукт гена *ERLIN1* (ER lipid raft associated 1) является холестерол-связывающим белком, который взаимодействует с комплексом SREBP-Scap-Insig и ингибирует синтез холестерола при условии его достаточного содержания в клетке. Не исключено, что данная CNV может быть связана с риском атеросклеротического поражения артерий либо непосредственно, модулируя функциональную активность гена *ERLIN1* и вызывая на-

рушение гомеостаза липидов в клетках артерий, либо опосредованно, влияя на предрасположенность к его фактору риска — неалкогольной жировой болезни печени.

Между тем, вариабельность генома соматических клеток включает не только изменение структуры нуклеотидной последовательности ДНК, но и механизмы регуляции активности генов. Нами установлены умеренные различия уровня метилирования ДНК между клетками атеросклеротически измененных коронарных и сонных артерий и интактных сосудов (внутренних грудных артерий и больших подкожных вен). В исследованных тканях выявлено 14—31,8% дифференциально метилированных генов от всех проанализированных на микрочипе, а тех генов, CpG-сайты которых различались по уровню метилирования более чем на 20%, было 1,0—2,4%. Это существенно меньше, чем при злокачественных новообразованиях [22]. Тем не менее, данное наблюдение сопоставимо с ранее выявленными изменениями уровня метилирования ДНК в некоторых тканях и органах больных с заболеваниями, которые известны в качестве факторов риска атеросклеротического поражения артерий. Это подкожно-жировая клетчатка у женщин с ожирением, скелетные мышцы и подкожно-жировая клетчатка у близнецов, больных сахарным диабетом 2 типа, а также висцеральная жировая ткань у больных с метаболическим синдромом и при сочетании ожирения с инсулинорезистентностью [23—27]. Умеренные изменения уровня метилирования ДНК могут быть обусловлены тем, что он представляет собой интегральный показатель изменений различных клеток анализируемого образца. Возможно, что в работах, где используется цельный биоптат органа регистрируются кумулятивные изменения, которые происходят во многих клетках. Не исключено, что применение технологии работы с отдельными клетками прольет свет на изменение уровня метилирования ДНК с более высокой точностью.

Нами также установлено, что изменение уровня метилирования ДНК в клетках коронарных и сонных артерий, пораженных атеросклерозом, по сравнению с интактными сосудами направлено в сторону гиперметилирования. Весьма вероятно, что гиперметилирование ДНК в атеросклеротически измененных артериях на поздних стадиях патологического процесса является характерной чертой данного заболевания. Преобладание относительно гиперметилированных CpG-сайтов характерно для некоторых областей головного мозга при болезни Альцгеймера [28], а также миокарда левого желудочка больных дилатационной кардиомиопатией [29]. Такое распространенное гиперметилирование отдельных CpG-сайтов может являться отражением потери «пластичности» клеток или их зрелости, что вполне ожидаемо происходит у человека с возрастом. С другой стороны, это может быть причиной «ухудшения» функционирования атеросклеротически пораженных артерий на поздних стадиях патологического процесса.

Кроме того, выявлено, что гомеобокс-содержащие гены (*HOXD3*, *HOXD4*, *HOXA7* и *ALX4*) гипометилированы в клетках атеросклеротически измененных коронарных и сонных артерий по сравнению с интактными сосудами, что может быть признаком их ремоделирования на поздних стадиях патологического процесса. Снижение уровня метилирования ДНК целого ряда генов, включая *HOXD3*, *HOXD4* и *ALX4*, регистрируется в скелетных мышцах пациентов с ювенильным дерматомиозитом по сравнению с контрольной группой [30]. Такое сходство профиля метилирования гомеобокс-содержащих генов при атеросклерозе и таком хроническом системном аутоиммунно-воспалительном заболевании скелетных мышц с васкулопатией, как ювенильный дерматомиозит, косвенно свидетельствует об общности патогенеза данных патологических состояний. Более того, изменение уровня метилирования гомеобокс-содержащих генов в столовых клетках, а также в мышечных клетках отражает способность ткани к самовосстановлению и дифференцировке, что в настоящее время является фокусом интереса регенеративной медицины [31]. Вероятно, что изучение механизмов функциональной активности гомеобокс-содержащих генов в клетках сосудов, а также возможность их регуляции ляжет в основу обратимости атеросклеротического поражения артерий.

Важным результатом нашего исследования стало выявление гипометилирования в области гена *MIR10B* в клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами [32]. Параллельно с нашим исследовательским коллективом работали финские исследователи [33]. Они обнаружили гипометилирование более 140 областей генов микроРНК, включая *MIR10B*, с использованием технологии полногеномного бисульфитного секвенирования в атеросклеротических бляшках бедренных артерий по сравнению с интактными внутренними грудными артериями [33]. Это говорит о том, что данное событие неслучайно и может являться важной детерминантой атеросклеротического поражения артерий вне зависимости от его локализации. Предполагается, что MiR-10b потенциально может послужить перспективной терапевтической мишенью и кандидатом для разрабатываемых схем таргетной фармакотерапии, направленных на ее ингибирование и увеличение обратного транспорта холестерина из клеток при дислипидемиях [34].

Нами установлено, что изменение уровня метилирования в локусе 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) в лейкоцитах пациентов ассоциировано с курением и ишемическим инсультом. В лейкоцитах пациентов уровень метилирования одного из CpG-сайтов выше у курящих ($18 \pm 5\%$), чем у некурящих ($14 \pm 6\%$; $p < 0,05$), а уровень метилирования другого CpG-сайта анализируемого региона ниже у тех, кто перенес ишемический инсульт ($18 \pm 8\%$) по сравнению с индивидами без инсульта в анамнезе ($20 \pm 7\%$; $p < 0,05$). Хотя изменение уровня метилирования ДНК между группами составляло 3%, даже такие значения могут быть связаны с изменением экспрессии генов и нарушать функцию клеток и органов [35].

Нами выявлено, что в клетках пораженных атеросклерозом артерий белковые продукты генов с гипометилированными CpG-сайтами, как и при злокачественных новообразованиях, связаны с иммуновоспалительным ответом, что объединяет патогенез данных патологических состояний. Активация иммуновоспалительного ответа через гипометилирование ДНК может быть связана с миграцией лимфоцитов (моноцитов) в патологический очаг или обусловлена различиями в метилировании ДНК резидентных клеток сосудов. Неудивительно, что при аутоиммунных заболеваниях показана тесная связь белковых продуктов дифференциально метилированных генов с иммуновоспалительным ответом, что также объединяет данные патологии с атеросклерозом.

Еще одним доказательством важности иммуновоспалительного компонента при атеросклерозе является то, что показаны существенные различия в уровне метилирования (на 20% и более) отдельных CpG-сайтов, локализованных в области генов иммуновоспалительного ответа (*S100A10*, *TLR4*, *TRAF1*, *BATF*, *PLA2G3*, *ALOX12*, *C10orf82*, *C11orf52/HSPB2*, *HRH2*, *C1QTNF3* и *CCL28*) между пораженными атеросклерозом артериями и интактными сосудами. Согласно данным литературы, эти гены экспрессируются в клетках крови и сосудов модельных животных или человека. Гены иммуновоспалительного ответа также картированы в области CNV в лейкоцитах и клетках артерий у больных атеросклерозом. Это хромосомные субсегменты 1p22.2 (*GBP3*), 1p13.1 (*IGSF3*), 2q31.2 (*PRKRA*), 5q35.3 (*BTNL3*), 22q13.1 (*APOBEC3B*, *APOBEC3A*), 12q24.11 (*UNG*, *ACACB*), 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*), а также семейство генов *DEFB*.

Следует отметить, что меньшая доля картированных CNV в лейкоцитах и клетках сосудов, а также идентифицированных дифференциально метилированных генов в клетках артерий, пораженных атеросклерозом, и интактных сосудов связана с атеросклерозом и его факторами риска в результате исследований генетических ассоциаций. Среди всех идентифицированных CNV 10 содержат гены, связанные с факторами риска атеросклероза. Это артериальная гипертензия — 1q31.3 (*CFHR3*, *CFHR1*), 3p21.1 (*SFMBT1*), 22q11.23 (*GSTT1*); индекс массы тела — 9p21.1 (*LINGO2*); неалкогольная жировая болезнь печени — 10q24.31 (*ERLIN1*); сахарный диабет 2 типа — 1p21.1 (*AMY2B*); метаболический синдром — 7q33 (*EXOC4*, *LRGUK*); 12q24.11 (*UNG*, *ACACB*); 16q13.12-q13.11 (*PDXDC1*); аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка — 10q21.3 (*CTNNA3*). С фенотипом заболевания в виде кальцификации коронарных артерий и утолщения комплекса интима-медиа сонных артерий связаны CNV в хромосомных субсегментах 1p22.2 (*GBP3*) и 10q21.1 (*PCDH15*), а с ишемической болезнью сердца — 16q22.1 (*PDPR*) и 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*).

Для 8 генов (*ALOX12*, *ALX4*, *TLR4*, *TRAF1*, *FABP1*, *TMEM182*, *ABCB11* и *NPR2*), дифференциально метилированных между артериями пораженных атеросклерозом

и интактными сосудами, ранее была показана связь с атеросклерозом и его факторами риска у человека путём анализа генетических ассоциаций. А именно, с атеросклерозом и его осложнениями в виде острых сосудистых событий ассоциирован полиморфизм генов *TLR4* и *TRAF1*, а для гена *ALOX12* установлена связь его полиморфизма с атеросклерозом, сахарным диабетом 2 типа и артериальной гипертензией. Следует отметить, что полиморфизм других генов связан не с атеросклерозом, а с его факторами риска. Гены *FABP1* и *ABCB11* — с метаболическими нарушениями (ожирение, метаболический синдром, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени), *TMEM182* и *NPR2* — с сосудистыми нарушениями в виде артериальной гипертензии, а *ALX4* — с сосудисто-метаболическими нарушениями в виде сахарного диабета 2 типа.

Заключение

Таким образом, все более очевидными становятся данные о том, что некоторые болезни, имеющие генетическую компоненту, не обязательно являются унаследованными и могут быть ассоциированы с постзиготической вариабельностью генома соматических клеток. Структурные варианты генома соматических клеток, которые приводят к внутри- и межтканевой генетической гетерогенности, а также тканеспецифичные эпигенетические модификации генома играют важную роль в реализации сложно наследуемого фенотипа.

Регионарная подверженность и пенетрантность МФЗ может быть объяснена с позиций накопленного груза и спектра мутаций в соматических клетках их органов-мишеней. Возможно, что одни унаследованные и частые варианты, которые обычно выявляются с использованием анализа ассоциаций, играют важную роль на ранних стадиях формирования предрасположенности МФЗ, а другие варианты (в том числе структурные и эпигенетические), «каналзируют» заболевание, определяя его специфичность и клиническую манифестацию в органе-мишени.

Согласно результатам проведенных исследований, у больных с выраженным атеросклеротическим поражением артерий меньшая доля картированных CNV в лейкоцитах и клетках сосудов, а также идентифицированных дифференциально метилированных генов между клетками артерий, пораженных атеросклерозом, и интактными сосудами связана с атеросклерозом и его факторами риска в результате исследований генетических ассоциаций. Это подчеркивает большой потенциал вариабельности генома соматических клеток в понимании молекулярных механизмов МФЗ. В результате работ, проведенных в данном направлении, могут быть идентифицированы новые патофизиологические пути и специфические мишени для профилактики, диагностики и лечения патологии.

Список литературы

1. O’Huallachain M, Karczewski KJ, Weissman SM, Urban AE, Snyder MP. Extensive genetic variation in somatic human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(44):18018-18023. doi:10.1073/pnas.1213736109.
2. Gottlieb B, Beitel LK, Trifiro M. Changing genetic paradigms: creating next-generation genetic databases as tools to understand the emerging complexities of genotype/phenotype relationships. *Hum Genomics.* 2014;8:9. doi:10.1186/1479-7364-8-9.
3. Forsberg LA, Gisselsson D, Dumanski JP. Mosaicism in health and disease — clones picking up speed. *Nat Rev Genet.* 2016;18(2):128-142. doi:10.1038/nrg.2016.145.
4. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
5. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017. doi:10.1056/NEJMoa1701719.
6. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017;355(6327):842-847. doi:10.1126/science.aag1381.
7. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367(14):1321-1331. doi:10.1056/NEJMoa1200395.
8. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res DNAging.* 1992;275(3-6):169-180. doi:10.1016/0921-8734(92)90021-G.
9. Phillips NR, Simpkins JW, Roby RK. Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer’s brains: A review. *Alzheimer’s Dement.* 2014;10(3):393-400. doi:10.1016/j.jalz.2013.04.508.
10. Botto N, Berti S, Manfredi S, et al. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res — Fundam Mol Mech Mutagen.* 2005;570(1):81-88. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.10.003.
11. Ross JM, Stewart JB, Hagstrom E, et al. Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature.* 2013;501(7467):412-415. doi:10.1038/nature12474.
12. Keogh M, Chinnery PF. Hereditary mtDNA heteroplasmy: A baseline for aging? *Cell Metab.* 2013;18(4):463-464. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.015.
13. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-823. doi:10.1073/pnas.68.4.820.
14. Happle R. The McCune-Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin Genet.* 1986;29(4):321-324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3720010>. Accessed October 13, 2016.
15. Happle R. What is paradigm inheritance? *J Med Genet.* 2009;46(9):648. doi:10.1136/jmg.2009.069336.
16. Пузырев ВП, Назаренко МС, Лебедев ИН, и др. Феномен парадоминантного наследования при атеросклерозе. *Медицинская генетика.* 2014;10:41-48.
17. Дзизинский АА, Пузырев ВП. *Наследственность и атеросклероз.* Наука. Новосибирск; 1977.
18. Khera A V., Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet.* 2017;18:331-344. doi:10.1038/nrg.2016.160.
19. Nazarenko MS, Sleptcov AA, Lebedev IN, et al. Genomic structural variations for cardiovascular and metabolic comorbidity. *Sci Rep.* 2017;7:41268. doi:10.1038/srep41268.
20. Слепцов АА, Назаренко МС, Барбараш ОЛ, Пузырев ВП. Вариации числа копий гена *ERLIN1* у больных с ишемической болезнью сердца. *Медицинская генетика.* 2016;15(5):42-44.
21. Feitosa MF, Wojczynski MK, North KE, et al. The *ERLIN1-CHUK-CWF19L1* gene cluster influences liver fat deposition and hepatic inflammation in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis.* 2013;228(1):175-180. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.038.
22. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 2012;22(2):407-419. doi:10.1101/gr.119867.110.
23. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, et al. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Differences in Muscle and Fat from Monozygotic Twins Discordant for Type 2 Diabetes. *PLoS One.* 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0051302.
24. Lokk K, Modhukur V, Rajashekar B, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol.* 2014;15(4):r54. doi:10.1186/gb-2014-15-4-r54.
25. Guenard F, Tchernof A, Deshaies Y, et al. Differential methylation in visceral adipose tissue of obese men discordant for metabolic disturbances. *Physiol Genomics.* 2014;46(6):216-222. doi:10.1152/physiolgenomics.00160.2013.
26. Amer P, Sinha I, Thorell A, Ryden M, Dahlman-Wright K, Dahlman I. The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. *Clin Epigenetics.* 2015;7(1):93. doi:10.1186/s13148-015-0126-9.
27. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep.* 2017;7:41903. doi:10.1038/srep41903.
28. Watson CT, Roussos P, Garg P, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer’s disease. *Genome Med.* 2016;8(1):5. doi:10.1186/s13073-015-0258-8.
29. Jo BS, Koh IU, Bae JB, et al. Methylome analysis reveals alterations in DNA methylation in the regulatory regions of left ventricle development genes in human dilated cardiomyopathy. *Genomics.* 2016;108(2):84-92. doi:10.1016/j.ygeno.2016.07.001.
30. Wang M., Xie H., Shrestha S., et al. Methylation alterations of WT1 and homeobox genes in inflamed muscle biopsy samples from patients with untreated juvenile dermatomyositis suggest self-renewal capacity. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(10):3478-3485. doi: 10.1002/art.34573.
31. Seifert A, Werheid DF, Knapp SM, Tobiasch E. Role of Hox genes in stem cell differentiation. *World J Stem Cells.* 2015;7(3):583-595. doi:10.4252/wjsc.v7.i3.583.
32. Nazarenko MS, Markov A V., Lebedev IN, et al. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122601. doi:10.1371/journal.pone.0122601.
33. Aavik E, Lumivuori H, Leppanen O, et al. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster. *Eur Heart J.* 2015;36(16):993-1000. doi:10.1093/eurheartj/ehu437.
34. Davalos A, Fernandez-Hernando C. From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Pharmacol Res.* 2013;75:60-72. doi:10.1016/j.phrs.2013.02.005.
35. Leenen FAD, Muller CP, Turner JD. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin Epigenetics.* 2016;8(1):92. doi:10.1186/s13148-016-0256-8.