

Оценка общего уровня метилирования ДНК по метилированию ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе у человека

Марков А.В.^{1*}, Серебрякова В.В.², Назаренко М.С.^{1,2,3},
Голубенко М.В.^{1,3}, Барбараш О.Л.³, Пузырев В.П.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

* e-mail: anton.markov@medgenetics.ru

Атеросклероз — многофакторное возрастзависимое заболевание с определенным вкладом эпигенетических факторов. Снижение общего уровня метилирования ДНК, оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1, в лейкоцитах крови ассоциировано с риском осложнений атеросклероза, но недостаточно изучен эпигенетический статус LINE-1 в очаге поражения — стенке артерии. Цель — анализ вариабельности общего уровня метилирования ДНК (оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1) в клетках крови и сонных артерий при атеросклерозе у человека. Оценка метилирования LINE-1 в клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, и лейкоцитах крови тех же пациентов (n = 92), а также лейкоцитах крови здоровых индивидов сопоставимого возраста (n = 60) выполнена методом бисульфитного пиросеквенирования. Общий уровень метилирования ДНК по элементу LINE-1 в лейкоцитах крови был ниже у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (66,2%) по сравнению со здоровыми индивидами (68,2%; p<0,05). В клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, наблюдалось более выраженное снижение уровня метилирования LINE-1 относительно того же показателя в лейкоцитах крови (64,8% против 66,2% соответственно, p<0,05). Уровень метилирования LINE-1 обратно коррелировал с хронологическим возрастом в группе здоровых индивидов, а также с индексом массы тела и коэффициентом атерогенности у здоровых лиц и пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий. Снижение общего уровня метилирования ДНК, оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1, в лейкоцитах крови и клетках артерий связано с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его факторами риска.

Ключевые слова: атеросклероз, метилирование ДНК, мобильный генетический элемент, ретротранспозон, LINE-1.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 16-04-01481 А); биологический материал для исследования взят из коллекции НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России (проект № 0550-2017-0019).

Assessment of global DNA methylation in human atherosclerosis using methylation of retrotransposable element LINE-1

Markov A.V.^{1*}, Serebryakova V.V.², Nazarenko M.S.^{1,2,3},
Golubenko M.V.^{1,3}, Barbarash O.L.³, Puzyrev V.P.^{1,2}

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

² Siberian State Medical University, Tomsk

³ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular diseases, Kemerovo

* e-mail: anton.markov@medgenetics.ru

Rationale. Atherosclerosis is a complex age-dependent disease developed under contribution of epigenetic factors. Decreasing of global DNA methylation, estimated by methylation level of retrotransposon LINE-1 in blood leukocytes is associated with a risk of complications of atherosclerosis, but epigenetic status of LINE-1 in the lesion of artery wall is under-investigated. **Aim.** Analysis of the global DNA methylation variability (using methylation level of LINE-1) in human blood cells and carotid arteries in atherosclerosis. **Materials and methods.** Quantification of LINE-1 methylation level in match pairs of carotid arteries affected by atherosclerosis and blood leukocytes collected from patients (n = 92), as well as in white blood cells of the same-aged healthy individuals (n = 60) was performed using bisulfite pyrosequencing. **Results.** Global DNA methylation estimated as LINE-1 methylation level was lower in blood leukocytes of patients with advanced carotid atherosclerosis (66.2%) in comparison with healthy individuals (68.2%; p<0.05). Further decrease of LINE-1 methylation level was observed in cells of carotid atherosclerotic lesions compared to matched samples of blood leukocytes (64.8% vs. 66.2%, respectively, p<0.05). LINE-1 methylation level was negatively correlated with the chronological age of healthy individuals, as well as with the body mass index and the atherogenic index of both healthy individuals and patients with advanced carotid atherosclerosis. **Conclusion.** The decrease of global DNA methylation estimated as hypomethylation of LINE-1 in blood leukocytes and arterial cells was associated with advanced carotid atherosclerosis and its risk factors.

Key words: atherosclerosis, DNA methylation, transposable element, retrotransposon, LINE-1.

Актуальность

Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с атеросклеротическим поражением артерий, остаются ведущей причиной смертности и заболеваемости населения во всем мире последние 50 лет [1]. В настоящее время сложилось представление об атеросклерозе как многофакторном заболевании, в основе которого лежит непрерывная череда молекулярных и клеточных событий в течение всей жизни человека. Несмотря на большие успехи в изучении атеросклероза, общепринятые теории (дисфункции эндотелия, липидной инфильтрации, аутоиммунной реактивности и др.) не могут в полной мере описать сложную картину развития атеросклеротической бляшки, а также её осложнений. Исследование эпигенетических модификаций генома клеток, составляющих пораженную стенку артерии, является одним из перспективных, но недостаточно изученных механизмов в развитии атеросклероза [2].

Одним из механизмов эпигенетической регуляции активности генов является метилирование ДНК, которое в соматических клетках взрослого человека представлено, в основном, ковалентной модификацией остатков цитозина в CpG-сайтах [3]. Метилирование ДНК у млекопитающих обнаруживается в области перичентромерных и гетерохроматиновых районов хромосом, и, особенно, в повторяющихся генетических элементах, таких, как транспозоны и ретровирусы [4]. Транспозоны представлены длинными и короткими диспергированными повторами (LINE и SINE), занимающими почти половину (до 45%) генома человека. Поэтому высококопийные элементы генома обычно используются для оценки так называемого общего уровня метилирования ДНК. Одними из наиболее часто используемых с данной целью последовательностей являются представители семейства ретротранспозонов LINE-1, которые равномерно распределены по геному человека (составляя около 17% от него) и в норме гиперметилированы в разных тканях организма [5]. До недавнего времени было принято рассматривать ретротранспозоны как бесполезные или вредные паразитные последовательности, однако в последние годы накапливаются сведения о роли данных элементов генома в регуляции экспрессии генов, особенно на ранних этапах онтогенеза человека [6]. Дисрегуляция на эпигенетическом уровне элементов LINE-1 может приводить к геномной нестабильности, внося вклад в развитие различных заболеваний человека, связанных с изменениями клеточного фенотипа, в том числе, и при атеросклеротическом поражении артерий. Гипометилирование LINE-1 в лейкоцитах крови связано с риском развития и ранним неблагоприятным исходом ишемической болезни сердца (ИБС) и ишемического инсульта [7–9]. Однако неясно, как данное явление соотносится с изменениями, наблюдаемыми в пораженных атеросклерозом артериях.

Поэтому целью настоящей работы являлся анализ вариабельности общего уровня метилирования ДНК (по метилированию ретротранспозона LINE-1) в клетках крови и сонных артерий при атеросклерозе у человека. В задачи исследования входило сопоставление уровней метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках крови и пораженных сонных артерий пациентов с атеросклерозом, а также лейкоцитов относительно здоровых индивидов; оценка связи уровня метилирования LINE-1 с факторами риска и клиническими проявлениями атеросклероза.

Материалы и методы

Выборка пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий была сформирована на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и состояла из 92 мужчин (возраст 63 ± 8 лет). Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике института. Все индивиды подписали добровольное согласие на участие в исследовании. У всех пациентов в анамнезе имелась артериальная гипертензия, эпизоды острого нарушения мозгового кровообращения — у 37 (40%) обследованных, причем 89 (97%) пациентов дополнительно страдали ИБС, а 39 (42%) перенесли инфаркт миокарда. Избыточную массу тела или ожирение имели 79 (85%), сахарный диабет 2 типа — 26 (29%) пациентов. Факт курения отмечался у 78 (85%) обследованных. В результате каротидной эндактерэктомии от пациентов с атеросклерозом сонных артерий получены атеросклеротические бляшки, представляющие собой область неоинтимы с подлежащим слоем меди и вплоть до наружной эластической мембраны. Образцы атеросклеротических бляшек тщательно очищены от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, отмыты в стерильном физиологическом растворе и, вместе с образцами периферической венозной крови, полученной от тех же пациентов, заморожены в жидком азоте для транспортировки.

Набор образцов лейкоцитарной ДНК относительно здоровых лиц, служащих контролем, а также основные этапы исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Контрольная выборка состояла из 60 мужчин (возраст 58 ± 13 лет) и была сформирована на основании отсутствия клинической симптоматики заболевания, а также результатов ультразвукового исследования сонных артерий (комплекс интима-медиа в пределах нормальных значений). При этом 21 индивид (35%) имел избыточную массу тела, факт курения отмечался у 53 (88%) человек. Весь биологический материал хранился при температуре -80°C до момента проведения молекулярно-генетического исследования.

Выделение ДНК из лейкоцитов крови было проведено стандартным фенол-хлороформным микрометодом. Для выделения ДНК из клеток артериальной стенки замороженные образцы были гомогенизированы на приборе Minilys (Bertin Tech, США). Гомогенат инкубировали 2 часа при 55°C в 350 мкл буфера (100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА pH 8,0, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) с добавлением 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и 40 мкл 10% SDS. После инкубации охлаждали микропробирку до комнатной температуры, далее действовали по протоколу выделения ДНК из лейкоцитов крови.

Анализ метилирования LINE-1 методом бисульфитного пироквенирования выполнен на приборе PyroMark Q24 System (Qiagen, США). После бисульфитной модификации ДНК с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) проводилась амплификация одной из цепей ДНК с применением специфических для LINE-1 праймеров (прямого 5'-TTTGGAGTTAGGTGTGGGATATA-3' и обратного 5'-[Биотин]-CAAAAAATCAAAAAATTCCTTTCC-3') [10]. Для этого в 25 мкл смеси, содержащей 40–50 нг модифицированной ДНК, 0,2 мкМ каждого праймера и 12,5 мкл мастер-микса «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color» (Биолабмикс, Россия), была проведена ПЦР по программе: 95°C — 7 мин, 45 циклов (94°C, 56,3°C и 72°C — по 30 с), 72°C — 5 мин. Пироквенирование со специфическим праймером (5'-AGTTAGGTGTGGGATATAGT-3') было выполнено по протоколу производителя прибора [11]. Уровень метилирования отдельных CpG-сайтов, представляющий собой долю метилированных остатков цитозина в данных позициях генома, определен с использованием программы PyroMark Q24 Software 2.0.7 (Qiagen, США).

Статистическая обработка результатов проведена в программном пакете SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Сравнение уровней метилирования в группах исследований проводилось с использованием критериев Вилкоксона для связанных выборок и Вилкоксона—Манна—Уитни на уровне значимости 0,05. Результаты, полученные при множественных сравнениях данных, были скорректированы по методу Бонферрони. Для оцен-

ки корреляционных отношений между количественными показателями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования был оценен уровень метилирования трёх CpG-сайтов в 5'-нетранслируемой области ретротранспозона LINE-1 (L1Hs), соответствующих позициям 318 (CpG₁), 321 (CpG₂) и 328 (CpG₃) в последовательности X58075 базы данных GenBank. Кроме того, был рассчитан усреднённый уровень метилирования по анализируемому региону ДНК (табл. 1).

Между уровнями метилирования трех CpG-сайтов и усреднённым по региону значением во всех анализируемых тканях наблюдалась сильная положительная корреляция (коэффициент корреляции ρ варьировал от 0,85 до 0,97; $p < 0,05$). При сравнении метилирования отдельных CpG-сайтов между собой и со средним уровнем метилирования по анализируемому региону LINE-1 значимые различия в метилировании были получены только для крайних CpG-сайтов. В частности, уровень метилирования CpG₃ был ниже по сравнению с CpG₁ в атеросклеротических бляшках сонных артерий ($p = 0,006$) и лейкоцитах ($p = 0,036$) больных, а также клетках крови относительно здоровых индивидов ($p = 0,012$). Учитывая гетерогенность метилирования ДНК по отдельным CpG-сайтам и сильную корреляцию между ними в ряду биологических образцов, усредненный уровень метилирования LINE-1 можно использовать в качестве показателя вариабельности между разными тканями и состояниями, но не для ориентира при оценке абсолютной величины общего уровня метилирования ДНК.

При сопоставлении уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в исследуемых тканях пациентов с клинически выраженным атеросклерозом выявлено снижение уровня метилирования CpG₁ и CpG₃ по сравнению с образцами периферической крови ($p < 0,001$ в обоих случаях; табл. 1). Средний по региону уровень метилирования ДНК был также достоверно ниже в клетках ате-

Таблица 1

Уровень метилирования LINE-1 (%) в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом и здоровых индивидов

Материал исследования	n	CpG ₁	CpG ₂	CpG ₃	Усредненный уровень
Лейкоциты здоровых индивидов	60	72,3 (65,8–75,6)	64,3 (53,7–76,6)	68,6 (61,1–73,5)	68,2 (60,7–75,7)
Лейкоциты пациентов с атеросклерозом	92	68,6 (62,3–73,2)	67,5 (54,7–74,7)	65,9 (57,7–70,7)	66,2 (59,1–72,9)
Атеросклеротические бляшки сонных артерий	92	63,9 (59,4–69,8)	68,2 (48,5–73,4)	61,9 (51,7–66,8)	64,8 (53,5–70,1)
Примечание. Результаты представлены в формате «Me(Q1-Q3)», где Me — медиана, Q1-Q3 — первый и третий квартили; n — число образцов в группе исследования.					

росклеротических бляшек по сравнению с клетками крови ($p < 0,001$). Вместе с тем, была выявлена статистически значимая корреляционная зависимость между уровнем метилирования LINE-1 в атеросклеротических бляшках сонных артерий и клетках крови (r варьировал от 0,41 до 0,66 для разных CpG-сайтов; $p < 0,01$). Следовательно, уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий изменяется наряду с изменением уровня метилирования в патологическом очаге — атеросклеротической бляшке. Данный результат не удивителен, если учитывать ведущую роль хронического воспаления в развитии атеросклеротической бляшки, включая инфильтрацию интимы артерии мононуклеарными лейкоцитами.

Метилирование LINE-1 в клетках крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий отличалось от того же показателя у здоровых индивидов. Статистически значимое снижение уровня метилирования было обнаружено по CpG-сайту CpG₁ ($p = 0,002$), тогда как CpG₃ и усредненный по региону уровень метилирования имели тенденцию к гипометилированию в клетках крови при атеросклерозе сонных артерий ($p = 0,060$ и $0,068$ соответственно; табл. 1). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые также показали снижение уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе и связали с риском развития его осложнений, причем значимые ассоциации с такими осложнениями атеросклероза, как инфаркт миокарда и инсульт, были найдены только у мужчин [7, 8, 12].

Для оценки связи клинической картины атеросклероза с общим уровнем метилирования ДНК был проведен корреляционный анализ статуса метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках пациентов и здоровых индивидов с клинико-анамнестическими (возраст, индекс массы тела, курение, инфаркт миокарда, эпизоды острого нарушения мозгового кровообращения в анамнезе) и биохимическими показателями (уровень глюкозы, липидный профиль). Обнаружена статистиче-

ски значимая слабая отрицательная корреляция уровня метилирования LINE-1 в клетках крови и атеросклеротических бляшек с индексом массы тела пациентов ($p < 0,05$; табл. 2). Кроме того, у пациентов обнаружена связь метилирования CpG₁, а также усредненного по региону уровня метилирования LINE-1 в клетках пораженных сонных артерий с коэффициентом атерогенности. Связь между метилированием LINE-1 в клетках крови и липидным профилем, включающим коэффициент атерогенности, была показана ранее в нескольких работах, однако не выявлена по результатам настоящего исследования [13, 14]. Интересно, что устойчивые корреляционные отношения уровня метилирования LINE-1 с индексом массы тела и коэффициентом атерогенности были установлены также у фенотипически здоровых индивидов (табл. 2). В другой работе уже была обнаружена отрицательная зависимость между метилированием LINE-1 и массой подкожного жира (который в немалой степени вносит вклад в значения ИМТ) у мужчин и женщин молодого возраста [15]. Таким образом, по результатам настоящего исследования не выявлено уникальных ассоциаций общего уровня метилирования ДНК с эндофенотипами, которые были бы характерны только для пациентов с атеросклерозом сонных артерий, но следует учитывать существующую ковариацию между метилированием LINE-1 и клиническими показателями, приведенными в табл. 2.

В выборке здоровых лиц наблюдалась слабая отрицательная корреляция уровня метилирования LINE-1 в лейкоцитах с возрастом (табл. 2), но среди пациентов с клинически выраженным атеросклерозом подобной зависимости не обнаружено. Ассоциация снижения уровня метилирования LINE-1 с возрастом была обнаружена ранее [9, 16]. Отсутствие связи общего уровня метилирования с хронологическим возрастом в выборке больных по результатам настоящего исследования отчасти можно объяснить меньшим разбросом по возрасту в данной группе. Кроме того, в изменчивость уровня метилирования LINE-1 при развитии клинически выраженного атеросклероза больший вклад могут вносить

Таблица 2

Корреляционные отношения между уровнем метилирования LINE-1 и количественными клиническими признаками

Материал исследования	Клинический показатель	CpG ₁	CpG ₂	CpG ₃	Усредненный уровень
Лейкоциты здоровых индивидов	Возраст	-0,324*	-0,445**	-0,369**	-0,391**
	ИМТ	-0,393**	-0,431**	-0,356*	-0,421**
	КА	-0,293*	-0,274*	-0,266	-0,299*
Лейкоциты пациентов с атеросклерозом	ИМТ	-0,289**	-0,272**	-0,263*	-0,259*
Атеросклеротические бляшки сонных артерий	ИМТ	-0,166	-0,255*	-0,209*	-0,209*
	КА	-0,355**	-0,259	-0,195	-0,297*
Примечание. ИМТ — индекс массы тела, КА — коэффициент атерогенности. Звездочками отмечен уровень значимости неравенства коэффициента корреляции нулю: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.					

другие факторы риска данного заболевания и его осложнений (генетические, средовые, рацион питания и образ жизни пациента), определяющие индивидуальные фенотипы пациентов [16].

Выводы

В настоящем исследовании установлена тенденция к снижению общего уровня метилирования ДНК, оцененного по метилированию ретротранспозона LINE-1, в лейкоцитах крови при наличии клинически выраженного атеросклероза сонных артерий. Получены новые сведения в отношении общего уровня метилирования в клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, который оказался ниже по сравнению с лейкоцитами крови тех же пациентов, но коррелировал с ним при оценке межиндивидуальной вариабельности данных показателей. Обнаружена обратная корреляция уровня метилирования LINE-1 с возрастом в группе здоровых индивидов, а с индексом массы тела и коэффициентом атерогенности — у здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом сонных артерий.

Список литературы

1. Hai Z, Zuo W. Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2016 May 1;456:69-74.
2. Feinberg AP. Epigenomics reveals a functional genome anatomy and a new approach to common disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1049-52.
3. Ванюшин БФ. Эпигенетика сегодня и завтра. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):805-32.
4. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;310:211-50.
5. Zhong J, Agha G, Baccarelli AA. The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease: Methodological Aspects, Study Design, and Data Analysis for Epidemiological Studies. *Circ Res*. 2016 Jan 8;118(1):119-31.
6. Васильев СА, Толмачёва ЕН, Кашеварова АА и др. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека. *Молекулярная биология*. 2015;49(1):165-74.
7. Baccarelli A, Wright R, Bollati V et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology*. 2010 Nov;21(6):819-28.
8. Lin RT, Hsi E, Lin HF et al. LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men. *Curr Neurovasc Res*. 2014 Feb;11(1):4-9.
9. Wei L, Liu S, Su Z et al. LINE-1 hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease in Chinese population. *Arq Bras Cardiol*. 2014 May;102(5):481-8.
10. Aoki Y, Nojima M, Suzuki H et al. Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. *Genome Med*. 2012 Dec 22;4(12):101.
11. Tabish AM, Baccarelli AA, Godderis L et al. Assessment of Changes in Global DNA Methylation Levels by Pyrosequencing® of Repetitive Elements. *Methods Mol Biol*. 2015;1315:201-7.
12. Guarrera S, Fiorito G, Onland-Moret NC et al. Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. *Clin Epigenetics*. 2015 Dec 24;7:133.
13. Cash HL, McGarvey ST, Houseman EA et al. Cardiovascular disease risk factors and DNA methylation at the LINE-1 repeat region in peripheral blood from Samoan Islanders. *Epigenetics*. 2011 Oct 1;6(10):1257-64.
14. Pearce MS, McConnell JC, Potter C, Barrett LM, Parker L, Mathers JC, Relton CL. Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):210-7.
15. Marques-Rocha JL, Milagro FI, Mansego ML, Mourro DM, Martinez JA, Bressan J. LINE-1 methylation is positively associated with healthier lifestyle but inversely related to body fat mass in healthy young individuals. *Epigenetics*. 2016;11(1):49-60.
16. Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev*. 2009 Apr;130(4):234-9.