

Метилирование гена липазы *PNPLA2* при атеросклерозе

Марков А.В.^{1,3*}, Назаренко М.С.^{1,3,4}, Чуркин Е.О.⁴, Барбараш О.Л.², Пузырев В.П.^{1,3,4}

¹ — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск; * anton.markov@medgenetics.ru

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

³ — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

⁴ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Актуальность. Одним из ключевых компонентов в развитии атеросклероза является нарушение липидного обмена. Однако роль эпигенетических механизмов в данном процессе изучена недостаточно. **Цель.** Характеристика variability метилирования гена липазы *PNPLA2* в клетках артерий различной локализации и лейкоцитах периферической крови при атеросклерозе. **Материалы и методы.** Оценка уровня метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий, а также стенке непораженных внутренних грудных артерий и лейкоцитах периферической крови выполнена методом бисульфитного пиросеквенирования. Статистический анализ полученных данных выполнен в программной среде R. **Результаты и выводы.** Для клеток артериальной стенки из области атеросклеротических бляшек коронарных артерий характерны более высокие уровни метилирования в промоторном регионе гена *PNPLA2* по сравнению с непораженной стенкой внутренних грудных артерий. Уровень метилирования анализируемой области гена в лейкоцитах больных атеросклерозом ассоциирован с курением и приемом статинов.

Ключевые слова: метилирование ДНК, липаза, атеросклероз

Methylation of *PNPLA2* lipase gene in atherosclerosis

Markov A.V.^{1,3*}, Nazarenko M.S.^{1,3,4}, Churkin E.O.⁴, Barbarash O.L.², Puzyrev V.P.^{1,3,4}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRCM, Tomsk, Russia; * anton.markov@medgenetics.ru

² — Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases

³ — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁴ — Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

One of the key components in the development of atherosclerosis is the metabolic imbalance of lipids. However, the role of epigenetic mechanisms in this process is studied insufficiently. The aim of our study was to characterize variability of the *PNPLA2* lipase gene methylation in the cells of differently localized arteries and peripheral blood leukocytes in atherosclerosis. **Materials and methods.** Using bisulfite pyrosequencing, we performed the assessment of DNA methylation level in atherosclerotic plaques of coronary and carotid arteries, and in the wall of unaffected internal thoracic arteries, and in peripheral blood leukocytes of patients with atherosclerosis. Statistical data analysis was performed in R software environment. **Results and conclusions.** Cells of coronary atherosclerotic plaques were found to have higher levels of methylation in the promoter of *PNPLA2* gene compared to unaffected wall of internal thoracic arteries. Methylation level of analyzed gene region in leukocytes of patients with atherosclerosis was associated with smoking and statins.

Keywords: DNA methylation, lipase, atherosclerosis

Актуальность

Нарушение метаболизма липидов является одним из ключевых процессов в развитии атеросклероза. Оно проявляется в повышении уровня холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), гипертриглицеридемии или недостаточной концентрации в крови антиатерогенного холестерина липопротеидов высокой плотности, сопровождающих постепенную инфильтрацию интимы артерий. Согласно современным представлениям, повреждение эндотелиальных клеток инициирует макрофагальный захват липопротеидов крови и перемещение их в субэндотелиальное пространство. В стенке со-

суда липопротеиды изолированы от антиоксидантных факторов плазмы крови, поэтому подвержены изменениям продуктами перекисного окисления липидов. Макрофаги фагоцитируют преимущественно модифицированные ЛПНП и превращаются в пенистые клетки [1, 2]. В последнее время обсуждается роль эпигенетических механизмов в регуляции этих процессов и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с атеросклеротическим поражением артерий [3]. Несмотря на успехи в изучении метилирования некоторых генов метаболизма липидов, вопрос об их эпигенетиче-

ской вариабельности при атеросклерозе остается открытым [4].

Одним из ключевых ферментов внутриклеточного липолиза является триглицеридгидролаза (липаза PNPLA2). Этот фермент участвует в начальных этапах деградации триглицеридов с выделением жирных кислот, необходимых для синтеза клеточных мембран, сигнальных медиаторов или энергетического субстрата для митохондрий [5]. У человека мутации в гене *PNPLA2* связаны с массивной аккумуляцией нейтральных липидов в коронарных артериях и миокарде, что приводит к развитию хронической сердечной недостаточности [6]. В недавней работе было показано изменение в уровне метилирования промотора данного гена в атеросклеротических бляшках по сравнению с непораженными артериями [7].

Цель настоящего исследования заключалась в характеристике вариабельности метилирования гена *PNPLA2* в клетках артерий различной локализации и лейкоцитах периферической крови при атеросклерозе.

Материалы и методы

Материал для исследования был получен от 76 русских мужчин в возрасте 61 ± 7 лет, проходивших плановое хирургическое лечение. Выборка больных была охарактеризована в отношении клинико-анамнестических данных (курение, стенокардия, ХСН, диабет, острая сосудистая недостаточность, прием лекарств) и результатов лабораторно-диагностического исследования (глюкоза, липидный профиль). Банк тканей, полученных от пациентов, включал образцы атеросклеротических бляшек из области правых коронарных ($n = 22$) и сонных артерий ($n = 54$), а также биоптаты не пораженных атеросклерозом внутренних грудных артерий ($n = 22$) и образцы лейкоцитов периферической крови ($n = 76$).

Ткани артериальной стенки были отмыты в изотоническом растворе и обработаны протеиназой К в течение ночи при 37°C . Из образцов была выделена геномная ДНК стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Оценка метилирования ДНК была проведена методом бисульфитного пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 System (Qiagen, США). Для этого ДНК подвергалась бисульфитной модификации с использованием набора EZ

DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) и амплификации с помощью ПЦП (структура праймеров: прямой — $5'$ -GAAAAGGGGTGAAAGGGTGATA- $3'$ и обратный — биотин- $5'$ -TTCTTACCTAAATCTAACCCCTACC- $3'$). Пиросеквенирование было проведено по протоколу производителя прибора с использованием праймера $5'$ -GGATTGTTTTATTTTTGGGGTA- $3'$, в двух повторах для каждого образца. Уровень метилирования отдельных CpG-сайтов был рассчитан с помощью программы PyroMark Q24 Software 2.0.6 (Qiagen, США).

Статистическая обработка результатов проведена в программной среде R [8]. Сравнение уровней метилирования в группах исследования проводилось с использованием критериев Вилкоксона—Манна—Уитни и Вилкоксона для связанных выборок, корреляционный анализ — с помощью коэффициента корреляции Пирсона [9].

Результаты и обсуждение

В клетках атеросклеротически измененных правых коронарных артерий, но не сонных артерий, выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторном регионе гена *PNPLA2* по сравнению с неизменными внутренними грудными артериями ($p < 0,05$; таблица). В среднем по анализируемому региону уровень метилирования составил $57,1 \pm 4,1\%$ и $48,8 \pm 4,2\%$ в клетках коронарных и сонных артерий, соответственно, и $48,6 \pm 4,2\%$ во внутренних грудных артериях. В лейкоцитах обнаружен низкий уровень метилирования как отдельных CpG-сайтов, так и в целом по региону в пределах $29,8 \pm 6,7\%$, что было значимо ниже уровня метилирования в клетках артерий ($p < 0,01$). Таким образом, для исследованного региона гена *PNPLA2* была характерна тканевая специфичность уровня метилирования в клетках артерий и лейкоцитах.

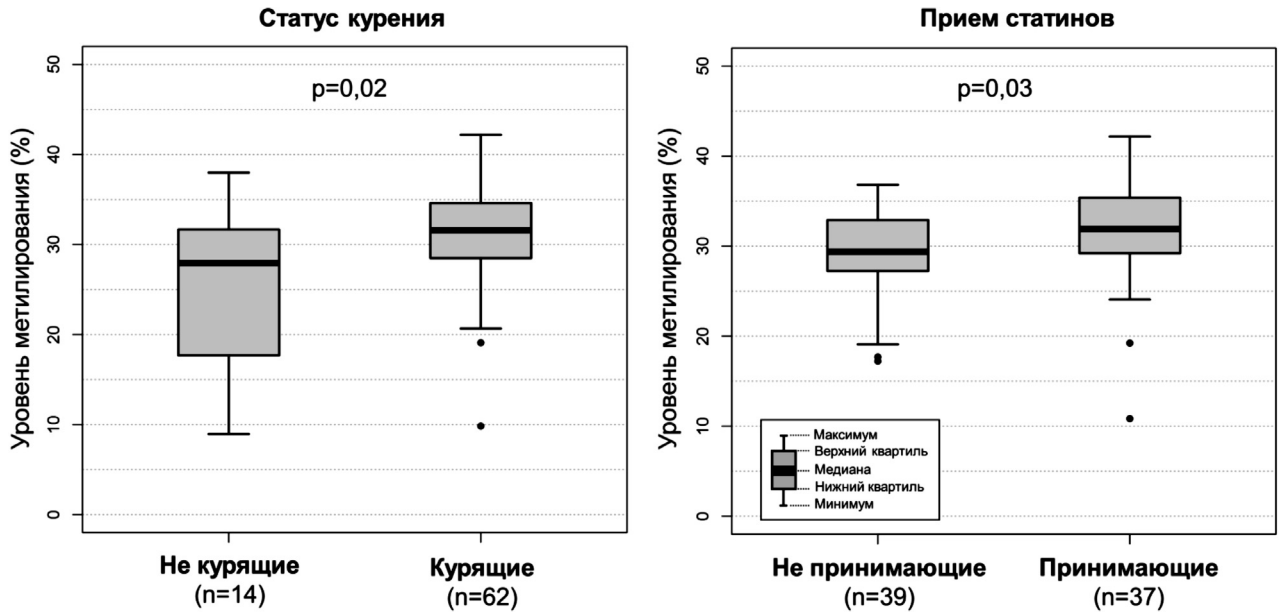
Уровни метилирования отдельных CpG-сайтов коррелировали между собой в пределах одного типа ткани, достигая максимальных значений в группе лейкоцитов (коэффициент корреляции $r = 0,96-0,99$; $p < 0,01$). Однако при сопоставлении уровня метилирования отдельных CpG-сайтов гена *PNPLA2* в клетках атеросклеротически измененных артерий с лейкоцитами статистиче-

Уровни метилирования ($m \pm SD$ %) отдельных CpG-сайтов гена *PNPLA2* в клетках артерий и лейкоцитах пациентов с атеросклерозом

Таблица

CpG-сайт*	Атеросклеротические бляшки		Внутренние грудные артерии	Лейкоциты периферической крови
	коронарной артерии	сонной артерии		
chr11:818892-818893	$60,9 \pm 4,8$	$51,3 \pm 5,4$	$48,2 \pm 4,3$	$33,3 \pm 7,63$
chr11:818903-818904	$76,9 \pm 5,1$	$68,3 \pm 6,0$	$72,9 \pm 6,1$	$35,7 \pm 7,8$
chr11:818917-818918	$33,5 \pm 3,1$	$26,8 \pm 4,5$	$24,7 \pm 3,4$	$20,3 \pm 5,0$

Примечание. * — локализация сайтов указана по сборке генома GRCh/hg 38



Уровень метилирования в области промотора гена *PNPLA2* у пациентов с атеросклерозом в зависимости от статуса курения и приема статинов.

ски значимой корреляции не выявлено. Кроме того, средний уровень метилирования гена *PNPLA2* в лейкоцитах был статистически значимо выше у пациентов с атеросклерозом, которые курят, а также принимают статины (рисунок), что стоит учитывать при планировании дальнейших исследований.

Ген *PNPLA2* картирован в локусе 11p15.5 и содержит 9 экзонов [5]. Функциональные последствия изменения уровня метилирования в исследованном участке гена *PNPLA2* могут быть связаны с его экспрессией в макрофагах и пенных клетках. Учитывая данные литературы, можно предположить, что на поздних стадиях атеросклеротического поражения гиперметилирование промотора гена триглицерид гидролазы в клетках артерий приводит к уменьшению продукции данного фермента, вследствие чего происходит накопление триглицеридов в цитоплазме, возникает дисфункция митохондрий, уменьшается фагоцитоз липопротеинов, и увеличивается количество клеток, вступивших в апоптоз [10].

Заключение

В результате выполненного исследования выявлена тканевая специфичность уровня метилирования промоторной области гена *PNPLA2* в клетках артериальной стенки и лейкоцитах у пациентов с атеросклерозом. Установлено, что данный показатель в лейкоцитах больных атеросклерозом связан с курением и приемом статинов.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование было проведено при поддержке гранта Российского научного фонда №16-15-10150.

Список литературы

1. Аронов ДМ, Лупанов ВП. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза. Атеросклероз и дислипидемии. 2011;1:48-56.
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 2011 May 19;473(7347):317-25.
3. Napoli C, Crudele V, Soricelli A et al. Primary prevention of atherosclerosis: a clinical challenge for the reversal of epigenetic mechanisms? Circulation. 2012 15;125(19):2363-2373.
4. Grimaldi V, Vietri MT, Schiano C et al. Epigenetic reprogramming in atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2015;17(2):476.
5. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. Genes Dev. 2013 Mar 1;27(5):459-484.
6. Hirano K, Ikeda Y, Zaima N et al. Triglyceride deposit cardiomyopathy. N Engl J Med. 2008;359(22):2396-2398.
7. Пузырев ВП, Назаренко МС, Лебедев ИН и др. Феномен парадоминантного наследования при атеросклерозе. Медицинская генетика. 2014;10:41-48.
8. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
9. Холлендер М, Вульф ДА. Непараметрические методы статистики. М.: Финансы и статистика. 1983;86-92.
10. Radovic B, Aflaki E, Kratky D. Adipose triglyceride lipase in immune response, inflammation, and atherosclerosis. Biol Chem. 2012;393(9):1005-11.