

Статус метилирования гена *CDKN2A* (P16^{INK4A} и P14^{ARF}) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом*

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

¹ — Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ медицинской генетики СО РАМН, 634050, Томск, ул. Набережная р.Ушайки, 10, факс: (3822) 51-37-44; e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

² — Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

³ — ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России, 634050, Томск, Московский тракт, 2

Недавно была показана надёжная ассоциация однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNPs) региона 9p21.3 с риском развития заболеваний, входящих в круг синтропии сердечно-сосудистого континуума. Однако патофизиология данного локуса изучена недостаточно. SNPs, связь с которыми обнаружена в отношении болезней, расположены недалеко от генов клеточного цикла, в том числе ингибитора циклин-зависимой киназы (*CDKN2A*). В настоящем исследовании впервые был оценён статус метилирования ДНК в области промотора и первого экзона гена *CDKN2A* (p16^{INK4a} и p14^{ARF}) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом (n=108). Для тестирования образцов использовались методы метилспецифичной и метилчувствительной ПЦР. В результате не выявлено aberrантного метилирования данного участка гена в тканях из области атеросклеротических бляшек и подлежащей макроскопически неизменённой сосудистой стенки у тех же самых больных. **Ключевые слова:** метилирование ДНК, атеросклероз, *CDKN2A*

Введение

Сердечно-сосудистая патология занимает лидирующее место в структуре заболеваемости и смертности в мире. Известно, что у индивидов чаще встречаются не изолированные нозологии, а их сочетания, представляя собой континуум. Данное понятие предполагает существование общих факторов риска, патогенетических механизмов, в том числе и общих генов подверженности — «синтропных» генов в отношении развития различных, с клинической точки зрения форм сердечно-сосудистых заболеваний [4, 5].

В настоящее время, благодаря крупномасштабным и высокопроизводительным технологиям, достигнуты большие успехи в выявлении генов и сигнальных путей при патологии. Недавно была показана надёжная ассоциация локуса 9p21.3 с риском развития некоторых синтропных заболеваний сердечно-сосудистого континуума, в том числе тех, в основе развития которых лежит атеросклеротическое поражение сосудистой стенки [6]. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) данного региона тесно сцеплены между собой и расположены недалеко от генов клеточного цикла — ингибиторов циклинзависимых киназ, *CDKN2A* (кодирует p16^{INK4a} и p14^{ARF} у человека или p19^{ARF} у мыши) и *CDKN2B* (кодирует p15^{INK4b}). Их белковые продукты принадлежат к

супрессорам опухолей и являются ключевыми регуляторами процессов пролиферации и апоптоза.

Хорошо известно, что делеция и/или эпигенетическая инактивация данной категории генов является одной из причин злокачественной трансформации клеток при канцерогенезе [15]. Не исключено, что подобные механизмы могут вносить вклад в формирование предрасположенности к образованию атеросклеротической бляшки. Например, на мышинной модели заболевания было показано, что нокаут гена *CDKN2A* (p19^{ARF}) связан с уменьшением проапоптотического влияния макрофагов и гладкомышечных клеток и увеличением темпов формирования атеросклеротических бляшек в определённых регионах аорты [9].

Таким образом, *цель настоящей работы* заключалась в оценке статуса метилирования промотора и первого экзона гена *CDKN2A* (p16^{INK4a} и p14^{ARF}) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом.

Материалы и методы

Формирование и клиническая характеристика выборки больных атеросклерозом проходила на базе НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (г.Кемерово). Всего в группу обследования вошли 54 русских мужчины (средний возраст 62,6±6,3 года). В зависимости от степени сосудисто-моз-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №10-04-00674).

говой недостаточности (классификация А.В. Покровского, 1977 г.) больные распределились следующим образом: I степень — 20 чел. (37%), II степень — 3 чел. (5,6%), III степень — 16 чел. (29,6%), IV степень — 15 чел. (27,8%) [3]. Инсульт или транзиторные ишемические атаки в анамнезе регистрировались у 19 индивидов (35,2%). Гиперхолестеринемия в анамнезе была в 46 случаях, что составило 85,2%. Сахарный диабет 2-го типа выявлен у 14 больных (25,9%). Кроме этого, все 54 пациента имели ишемическую болезнь сердца и артериальную гипертензию, а у 24 чел. (44,4%) из них диагностирована хроническая ишемия нижних конечностей.

Все пациенты подписали добровольное согласие на участие в эксперименте. Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, а также НИИ медицинской генетики СО РАМН.

Биоптаты тканей получены в результате эндартерэктомии из сонных артерий. Причём, у каждого больного взяты образцы из двух областей сосудистой стенки: атеросклеротической бляшки и прилегающей макроскопически неизменённой ткани. Сразу после оперативного вмешательства каждый биоптат был осмотрен и тщательно очищен от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, отмыт в стерильном физиологическом растворе с целью удаления сгустков крови. В заключение проведена макродиссекция интимы от подлежащего медиального слоя артерии. Сформированный банк тканей представлен 108 образцами, которые были заморожены в жидком азоте и хранились при температуре 80°С вплоть до исследования.

Геномная ДНК выделена из тканей сосудистой стенки после стандартной обработки протеиназой K в течение ночи при 37°С экстракцией фенол/хлороформом.

Оценка статуса метилирования ДНК в области промотора и первого экзона гена *CDKN2A* (p16^{INK4a} и p14^{ARF}) проведена методом метилчувствительной ПЦР. Для этого геномную ДНК, предварительно обработанную рестриктазой HpaII («Fermentas», Литва), подвергли амплификации с использованием соответствующих праймеров [1, 8, 13].

Дополнительно статус метилирования первого экзона гена *CDKN2A* (p16^{INK4a} и p14^{ARF}) был проанализирован методом метилспецифичной ПЦР. Бисульфитная обработка ДНК производилась с использованием набора «EZ DNA Methylation™ Kit» («Zymo Research», США) по стандартному протоколу производителя. Структура праймеров, которая использовалась для амплификации модифицированной ДНК, была опубликована ранее [10]. Разделение продуктов реакции производилось в 3%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Детекция фрагментов ДНК осуществлялась в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью геледокументирующей установки Gel Doc 2000 («Bio-Rad», США).

Результаты и обсуждение

В результате настоящего исследования не выявлено aberrантного метилирования ДНК области промотора и первого экзона гена *CDKN2A* (p16^{INK4a} и p14^{ARF}) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом. Возможно, что статус метилирования ДНК данных областей гена не является важной детерминантой атеросклеротического поражения сосудов у человека. С другой стороны, полученный результат является предварительным и может быть обусловлен рядом причин.

Во-первых, требует решения вопрос методического плана — достаточно ли информативен использованный в настоящей работе качественный анализ метилирования CpG-сайтов ограниченного участка гена. Преимуществом проведённого исследования является одновременное применение методов метилспецифичной и метилчувствительной ПЦР. Метилчувствительным методом был протестирован статус метилирования промоторной области гена *CDKN2A/p16^{INK4a}* (амплификат включает 23 CpG-сайта, из них четыре входят в сайты узнавания рестриктазой Hpa II). Для определения статуса метилирования фрагментов альтернативных экзонов Ex1 α /p16^{INK4a} и Ex1 β /p14^{ARF} использовались оба метода. При этом праймеры метилспецифичной ПЦР, содержали в своём составе суммарно 7—8 CpG-сайтов, а в состав ампликонов, получаемых в ходе метилчувствительной ПЦР, входили 33—34 CpG-динуклеотида и до трёх сайтов узнавания ферментом Hpa II. Фрагменты, которые синтезировались в результате обеих реакций, перекрывались. Не исключено, что использование методов количественного анализа большего по протяжённости участка гена позволит получить более точную характеристику паттерна метилирования ДНК.

Во-вторых, в работе было проанализировано 108 образцов тканей из области атеросклеротических бляшек и прилегающей макроскопически неизменённой сосудистой стенки сонных артерий у тех же самых больных. Следует отметить, что артерии как в пределах одного, так и разных бассейнов сосудистого русла существенно различаются в подверженности к атеросклеротическому процессу. В связи с этим, необходимо расширить количество и спектр тестируемых образцов. Это могут быть ткани аорты и коронарных артерий.

Понимание эпигенетического влияния при патологии не может быть полным без связи с данными как транскрипционных профилей, так и полногеномных исследований ассоциаций (GWAS).

Поскольку существует зависимость между снижением плотности метилирования в CpG-островках промоторов и увеличением функциональной активности гена, полученные результаты согласуются с данными литературы в отношении экспрессии. В частности, L.M. Holdt с соавторами было показано, что ген *CDKN2A* (p16^{INK4a} и p14^{ARF}) активно экспрессируется в области атеросклеротических бляшек и морфологически не изменённой сосудистой стенки коронарных артерий [12].

В настоящей работе был исследован один из эпигенетических феноменов — метилирование ДНК. Известно, что локус 9p21.3 содержит последовательность длинной некодирующей РНК (ANRIL). В ряде работ были показаны различия в экспрессии ряда транскриптов ANRIL в тканях сосудистой стенки и клетках периферической крови в зависимости от генотипа больных. Не исключено, что ANRIL регулирует функциональную активность генов локуса 9p21.3 через взаимодействие с комплексами белков группы Polycomb [7].

Экспериментальные работы, посвящённые изучению эпигенетической вариабельности генетических локусов при атеросклерозе *in vivo* у человека, единичны. Как правило, внимание исследователей сосредоточено на оценке вклада в атерогенез наиболее хорошо изученного эпигенетического феномена — метилирования ДНК. В большинстве случаев при обследовании индивидов используется относительно легкодоступный биологический материал — лейкоциты периферической крови. Результаты данных работ противоречивы. Исследования тканей сосудистой стенки, как поражённых патологическим процессом, так и сохранённых, немногочисленны. У больных атеросклерозом в тканях сосудистой стенки оценивался статус метилирования лишь ограниченного количества генов-кандидатов. Это гены 15-липоксигеназы (*ALOX15*), рецепторов эстрогена (*ESR1* и *ESR2*), транспортёра 3 монокарбоксилата (*MCT3*) и ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI2*) [11, 14, 16, 18, 19]. В настоящем исследовании был осуществлён анализ статуса метилирования лишь одного гена — *CDKN2A*. Возможно, что увеличение спектра за счёт других генов, в том числе из категории супрессоров опухолей, позволит получить принципиально новую информацию о механизмах формирования подверженности атеросклеротическому процессу тканей сосудистой стенки.

Основываясь на опыте проведения полногеномных исследований ассоциаций (GWAS), одним из закономерных этапов в отношении широко распространённых заболеваний будет проведение эпигеномных исследований ассоциаций (EWAS) [17]. Решение такой задачи становится возможным с использованием методов микрочиповых технологий, обеспечивающих проведение скрининга одновременно большого числа сайтов. Предполагается, что данный подход позволит идентифицировать эпигенетически регулируемые регионы генома, которые в дальнейшем можно будет анализировать более детально. Результаты исследования в этом направлении были недавно нами опубликованы [2]. Анализ уровня метилирования 1505 CpG-сайтов 807 генов проведён в образцах атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии с использованием микрочипа на платформе GoldenGate Methylation Cancer Panel I («Illumina», США). Из 90 генов, показавших дифференциальное метилирование, 10 генов (*ICAM1*, *GSTM1*, *IGFBP1*, *POMC*, *APOA1*, *IL1RN*, *INS*, *LTA*, *MMP3*, *THBS2*), согласно базе данных по генетической эпидемиологии человека (Hu-

GENet), обозначены как кандидаты широкого спектра патологии, составляющей сердечно-сосудистый континуум. Логично полагать, что эпигенетическая вариабельность таких общих (синтропных) генов может быть важным фактором атеросклеротического процесса.

Список литературы

1. Бабенко О.В., Землякова В.В., Саакян С.В. и др. Функциональная патология RB1 и p16 в ретинобластомах // Молекулярная биология. — 2002. — №36. — С. 777—783.
2. Назаренко М.С., Пузырев В.П., Лебедев И.Н. и др. Профиль метилирования ДНК в области атеросклеротических бляшек человека // Молекулярная биология. — 2011. — Т. 45, №4. — С. 610—616.
3. Покровский А.В., Кованева Р.А., Зингерман Л.С. и др. Показания к хирургическому лечению сосудисто-мозговой недостаточности у больных с окклюзирующими поражениями брахиоцефальных сосудов // Невропатол. и психиатр. — 1977. — №12. — С. 1789—1797.
4. Пузырев В.П., Макеева О.А., Голубенко М.В. Гены синтропий и сердечно-сосудистый континуум // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, №3. — С. 479—480.
5. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б. Генетический взгляд на феномен сочетанных заболеваний человека // Acta Naturae. — 2009. — №3. — С. 57—63.
6. Broadbent H.M., Peden J.F., Lorkowski S. et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p // Hum. Mol. Genet. — 2008. — Vol. 17, №6. — P. 806—814.
7. Cunnington M.S., Keavney B. Genetic mechanisms mediating atherosclerosis susceptibility at the chromosome 9p21 locus // Curr. Atheroscler. Rep. — 2011. — Vol. 13, №3. — P. 193—201.
8. Furlong R.A., Lyall J.E., Lush M.J. Four dinucleotide repeat polymorphisms on chromosome 9 (D9S143-D9S146) // Hum. Mol. Genet. — 1992. — Vol. 1, №6. — P. 447.
9. Gonzalez-Navarro H., Abu Nabah Y.N., Vinue A. et al. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis // J. Am. Coll. Cardiol. — 2010. — Vol. 55, №20. — P. 2258—2268.
10. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93, №18. — P. 9821—9826.
11. Hiltunen M.O., Turunen M.P., Hakkinen T.P. et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions // Vasc. Med. — 2002. — Vol. 7, №1. — P. 5—11.
12. Holdt L.M., Sass K., Gabel G. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p16INK4a, p14ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque // Atherosclerosis. — 2011. — Vol. 214, №2. — P. 264—270.
13. Kamb A., Shattuck-Eidens D., Eeles R. et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus // Nat. Genet. — 1994. — Vol. 8, №1. — P. 22—26.
14. Kim J., Kim J.Y., Song K.S. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — Vol. 1771, №1. — P. 72—80.
15. Kim W.Y., Sharpless N.E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging // Cell. — 2006. — Vol. 127, №2. — P. 265—275.
16. Post W.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Wilhide C.C. et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system // Cardiovasc. Res. — 1999. — Vol. 43, №4. — P. 985—991.

17. Rakyan V.K., Down T.A., Balding D.J., Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases // *Nat. Rev. Genet.* — 2011. — Vol. 12, №8. — P. 529–541.

18. Zawadzki C., Chatelain N., Delestre M. et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expres-

sion in carotid atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* — 2009. — Vol. 204, №2. — P. 4–14.

19. Zhu S., Goldschmidt-Clermont P.J., Dong C. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis // *Circulation.* — 2005. — Vol. 112, №9. — P. 1353–1361.

Methylation status of *CDKN2A* gene (P16^{INK4A} and P14^{ARF}) in carotid artery tissue of atherosclerotic patients

Nazarenko M.S.^{1,3}, Markov A.V.¹, Sleptsov A.A.¹, Frolov A.V.², Barbarash O.L.², Barbarash L.S.², Puzyrev V.P.^{1,3}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, 634050, Tomsk, Ushaika Embankment, 10, fax: (3822) 51-37-44; e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

² — Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, 650002, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6

³ — Siberian State Medical University, 634050, Tomsk, Moscovski Trakt, 2

Recent studies have demonstrated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a region of chromosome 9p21.3 confer risk of group of syntropic diseases — cardiovascular disease continuum. However, the pathophysiology underlying this locus is still not well understood. The disease-related SNPs are located in the proximity of the cell cycle genes, including cyclin-dependent kinase inhibitor (*CDKN2A*). In the current study the DNA methylation state of promoter region and first exon of *CDKN2A* gene (p16^{INK4a} and p14^{ARF}) was for first time evaluated in the carotid artery samples of atherosclerotic patients (n=108). We used methylation-specific and methyl sensitive PCR technique for testing of the specimens. Consequently, these regions were not aberrantly methylated in the area of atherosclerotic plaques and nearby macroscopically intact tissues of the vascular wall from the same patients examined.

Key words: DNA methylation, atherosclerosis, *CDKN2A*