

МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1 ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

В.В. Серебрякова

Научный руководитель: к.м.н. А.В. Марков

НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: valerie2605@mail.ru

METHYLATION OF RETROTRANSPOSON LINE-1 IN ATHEROSCLEROSIS

V.V. Serebryakova

Scientific Supervisor: A.V. Markov

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, 634050

E-mail: valerie2605@mail.ru

Abstract. DNA methylation is one of the perspective but insufficiently studied epigenetic mechanisms which can be involved in atherosclerosis and related cardiovascular disease. Global DNA methylation estimated by the methylation level of retrotransposon LINE-1 in peripheral blood leukocytes (PBLs) was shown to be decreased in coronary heart disease and stroke. The aim of our study was to characterize LINE-1 methylation variability in PBLs of healthy persons (males, n=36), and, PBLs and cells of affected carotid arteries (CACs) of patients with atherosclerosis (males, n=63). LINE-1 methylation analysis was performed using bisulfite pyrosequencing. We showed significant hypomethylation ($p<0,05$) in both PBLs and CACs of patients in comparison with PBLs of healthy individuals. But there was no significant difference between LINE-1 methylation levels in matched PBLs and CACs of the same patients. Methylation level of LINE-1 in CACs but not in PBLs of patients with atherosclerosis was negatively associated with atherogenic index, which was partly in contrast with recent findings. Mild decrease in LINE-1 methylation with age was observed in PBLs of only healthy men. Absence of the same association in patients with atherosclerosis can be explained by stronger relation between LINE-1 methylation with the severity of the disease rather than age.

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из главных причин смертности и инвалидизации населения в мире. Эпигенетическая вариабельность – перспективный, но недостаточно изученный механизм в комплексном процессе развития сердечно-сосудистой патологии [1]. Один из эпигенетических механизмов – метилирование ДНК – чаще всего представлен ковалентной модификацией цитозина, путем присоединения метильной группы в CpG-сайтах. Общий уровень метилирования ДНК обычно оценивают с помощью ретротранспозона LINE-1, он широко представлен в геноме человека и в норме гиперметилован в разных тканях. Гипометилирование LINE-1 в лейкоцитах крови наблюдается при ишемической болезни сердца и инсульте [2, 4], однако не ясно, как данное явление соотносится с изменениями, наблюдаемыми в пораженных атеросклерозом артериях.

Целью данной работы являлась характеристика вариабельности метилирования ретротранспозона LINE-1 в лейкоцитах и клетках сонных артерий при атеросклерозе у человека.

Материалы и методы. В исследовании использовались образцы ДНК, полученные из лейкоцитов крови и атеросклеротических бляшек сонных артерий мужчин с атеросклерозом ($n=63$), а также лейкоцитов крови здоровых мужчин ($n=36$). ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным микрометодом. Бисульфитная модификация ДНК была проведена с помощью набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research). Анализ уровня метилирования (процента метилированных цитозинов по каждой CpG-позиции) производился на приборе PyroMark Q24 (Qiagen). Обработка результатов проведена в программе SPSS Statistics 17.0 (IBM) с использованием непараметрических методов статистики: медиана, 1 и 3 квартили ($M (Q_1 - Q_3)$) для описания данных, критериев Манна-Уитни и Вилкоксона для сравнительного анализа и коэффициента корреляции Спирмена (ρ).

Результаты. Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 оценивался по трем CpG-сайтам методом бисульфитного пиросеквенирования, описанным ранее [3]. По результатам анализа был вычислен усредненный уровень метилирования по анализируемому региону ДНК. Между уровнями метилирования трех CpG-сайтов и усредненным по региону значением во всех анализируемых тканях наблюдалась сильная положительная корреляция ($p < 0,05$), поэтому усредненный уровень был использован как основной показатель метилирования LINE-1.

Уровень метилирования LINE-1 в лейкоцитах здоровых мужчин составил 74,6% (69,8% - 76,7%). В клетках сонных артерий и лейкоцитах крови больных атеросклерозом наблюдалось статистически значимое гипометилирование LINE-1 по сравнению с образцами крови здоровых лиц (рис. 1). Вместе с тем, уровень метилирования в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий составил 68,9% (64,2% - 71,1%) и был ниже такового в лейкоцитах крови тех же пациентов (71,8% (62,4% - 73,6%)), но различия между данными показателями были не значимы. Более того, между ними наблюдалась положительная корреляция ($\rho = 0,29$; $p < 0,05$).

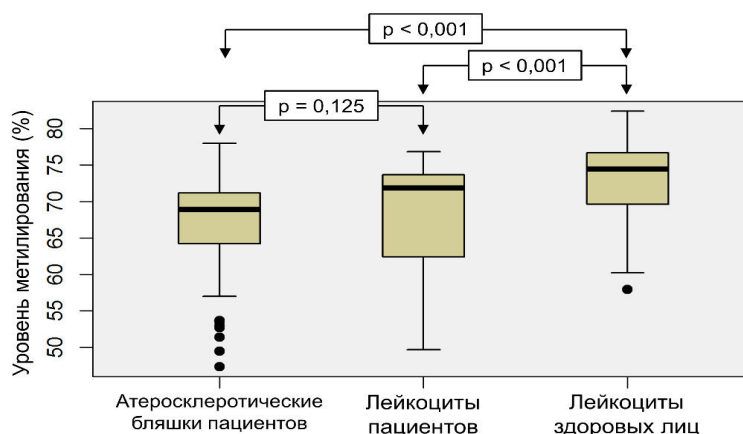


Рис. 1. Усредненный уровень метилирования по трем CpG-сайтам LINE-1 у больных и здоровых индивидов

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые также показали гипометилирование ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе и связали с риском развития его осложнений, причем значимая ассоциация была показана только для мужчин [2, 4, 5].

Поиск ассоциаций метилирования LINE-1 с клинико-лабораторными показателями пациентов с атеросклерозом выявил отрицательную корреляцию между индексом атерогенности и уровнем

метилирования LINE-1 в атеросклеротических бляшках ($\rho = -0,35$; $p < 0,05$). Связь между метилированием LINE-1 в клетках крови и липидным профилем, включая индекс атерогенности, была показана другими исследователями [6, 7], однако по результатам настоящей работы не выявлена.

В выборке здоровых лиц наблюдалась слабая отрицательная корреляция общего уровня метилирования LINE-1 в лейкоцитах с возрастом ($\rho = -0,46$; $p < 0,05$), хотя для больных такая зависимость не показана. Связь гипометилирования LINE-1 с возрастом была найдена ранее в работе Bollati V. с соавторами [8]. Отсутствие зависимости от возраста в группе больных можно объяснить более сильной зависимостью уровня метилирования от тяжести заболевания, чем от возраста.

Заключение. Таким образом, в исследовании показано гипометилирование ретротранспозона LINE-1 у пациентов с атеросклерозом как в клетках пораженных сонных артерий, так и лейкоцитах периферической крови в сравнении с лейкоцитами здоровых индивидов. Обнаружена связь уровня метилирования LINE-1 с возрастом в группе здоровых индивидов, а также уровня метилирования в атеросклеротических бляшках сонных артерий больных с индексом атерогенности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01481А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhong, J., Agha, G., Baccarelli, A. A. (2016). The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease. *Circulation research*, V. 118, no. 1, pp. 119-131.
2. Baccarelli, A., Wright, R., Bollati, V., Litonjua, A., Zanobetti, A., Tarantini, L. (2010). Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology*, V. 21, no. 6, pp. 819.
3. Aoki, Y., Nojima, M., Suzuki, H., Yasui, H., Maruyama, R., Yamamoto, E. (2012). Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. *Genome medicine*, V. 4, no. 12, pp. 101.
4. Lin, R. T., Hsi, E., Lin, H. F., Liao, Y. C., Wang, Y. S., H Juo, (2014). LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men. *Current neurovascular research*, V. 11, no. 1, pp. 4-9.
5. Guarrera, S., Fiorito, G., Onland-Moret, N. C., Russo, A., Agnoli, C., Allione, A. (2015). Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. *Clinical epigenetics*, V. 7, no. 1, pp. 133.
6. Cash, H. L., McGarvey, S. T., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Hawley, N. L., Lambert-Messerlian. (2011). Cardiovascular disease risk factors and DNA methylation at the LINE-1 repeat region in peripheral blood from Samoan Islanders. *Epigenetics*, V. 6, no. 10, pp. 1257-1264.
7. Pearce, M. S., McConnell, J. C., Potter, C., Barrett, L. M., Parker, L., Mathers, J. C., Relton, C. L. (2012). Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. *International journal of epidemiology*, V. 41, no. 1, pp. 210-217.
8. Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mechanisms of ageing and development*, V. 130, no. 4, pp. 234-239.