

Феномен парадоминантного наследования при атеросклерозе*

Пузырев В.П.^{1,3}, Назаренко М.С.^{1,3}, Лебедев И.Н.^{1,3}, Марков А.В.¹,
Слепцов А.А.¹, Кашеварова А.А.¹, Толмачёва Е.Н.¹, Фролов А.В.²,
Попов В.А.², Барбараш О.Л.², Барбараш Л.С.²

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» СО РАМН, 634050, Томск, ул. Набережная р.Ушайки, 10, факс: (3822) 51-72-72; e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

³ — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, Томск, пр.Ленина, 36

В настоящей работе методом микрочипового анализа на платформе Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina, США) охарактеризован уровень метилирования 27 578 CpG-сайтов, локализованных в 14 475 генах, в тканях сосудистого русла больных атеросклерозом, экстраэмбриональной мезодерме спонтанных и медицинских абортусов I триместра с нормальным кариотипом. В результате установлены различия в профиле метилирования ДНК тканей, выявлены дифференциально метилированные гены, в том числе и те, эпигенетический статус которых при развитии атеросклероза изменяется в соответствии с гипотезой парадоминантного наследования.

Ключевые слова: парадоминантное наследование, атеросклероз, микрочипы, метилирование ДНК

Введение

Определение вклада наследственной компоненты в этиологию многофакторных заболеваний является одним из актуальных направлений исследований в области медицинской генетики во всем мире. Основные ожидания от результатов работ в этом направлении, безусловно, связаны с получением индивидуальных оценок риска развития болезни, особенностей её течения, ответа на терапию. Огромный массив данных, накопленных в последние годы, в том числе и в ходе масштабных полногеномных ассоциативных исследований, позволил обозначить относительно небольшой список генов, наследственная изменчивость которых может быть фактором риска развития многофакторных заболеваний.

Одна из причин такого состояния дел в исследуемой предметной области может быть связана с вниманием исключительно к наследуемым полиморфным структурным вариантам генов, тогда как вне поля зрения остаются вполне ожидаемые изменения функциональной активности генов в ходе онтогенеза или, по крайней мере, на этапах, предшествующих развитию заболевания. Концепция соматического мутагенеза в настоящее время является фундаментом молекулярной онкологии, однако она до сих пор не получила должного внимания для объяснения закономерностей развития многофакторных заболеваний.

Один из механизмов, который может объяснить участие соматических мутаций в формировании сложно наследуемого фенотипа, выходит за рамки классических механизмов наследования и получил название «парадоминантное наследование» [13, 14]. Сущность данного феномена заключается в том, что развитие заболевания возможно при комбинировании унаследованных мутаций с соматическими мутациями неповреждённых аллелей тех же самых генов (рис. 1). Иными словами, такие фенотипы не наследуемы, поскольку вызваны мутациями не в половых, а в соматических клетках. В то же время, некоторые мозаичные фенотипы могут обнаруживаться у нескольких членов одной семьи, симулируя аутосомно-доминантный тип наследования. Отсюда и термин — *парадоминантность*.

Гетерозиготные по парадоминантной мутации индивидуумы имеют нормальный фенотип и передают мутантный аллель без проявления. Гомозиготы же являются летальными. Признак (или болезнь) появляется только в том случае, если соматическая мутация в нормальном аллеле возникнет на очень ранних стадиях эмбриогенеза, что приведёт к потере гетерозиготности и формированию гомозиготных или гемизиготных популяций клеток. В результате эмбрион становится мозаиком. Парадоминантное наследование напоминает, но не соответствует двухударной модели Кнудсена, согласно, которой вторая мутация происходит в любой момент времени в постнатальном онтогенезе. Таким образом, парадоминантность не является неологизмом для соматического «второго удара».

* Работа выполнена при финансовой поддержке грантов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. для проведения научных исследований коллективами НОЦ (соглашение №8062), Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (НШ-5096.2014.4), а также при финансовой поддержке на развитие материально-технической базы в рамках программы РАМН «Протеом человека».

Концепция парадоминантного наследования изначально была предложена для объяснения этиологии ряда наследственных синдромов, проявляющихся патологией кожных покровов — синдром МакКьюна—Олбрайта, пигментные невусы Беккера. Однако совсем недавно доказательства парадоминантного наследования неожиданно были приведены для локальных структурных нарушений, которые возникают в ходе васкулогенеза, ангиогенеза и лимфангиогенеза [25]. Можно предположить, что данный феномен свойственен многим патологическим процессам у человека, в том числе широко распространённым заболеваниям сердечно-сосудистой системы, в основе которых лежит атеросклероз сосудов соответствующих локализаций.

Формирование морфологического субстрата патологии — атеросклеротических бляшек происходит постепенно через ряд молекулярных событий и сопровождается разнообразными макро- и микроструктурными изменениями ядерного и митохондриального генома [2]. Не исключено, что некоторая доля соматических мутаций имеет эпигенетическую составляющую, которая представлена метилированием ДНК, ковалентными модификациями гистонов и РНК-опосредованными механизмами, вызывающими локальные изменения в структуре хроматина.

Наиболее изученной эпигенетической модификацией является метилирование ДНК — ферментативный процесс ковалентного присоединения метильных групп к пятому атому углерода остатков цитозина, входящих в состав CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов). Данная эпигенетическая модификация достаточно стабильна и относительно легко может быть зарегистрирована с помощью существующих молекулярно-генетических технологий. Метилирование ДНК обеспечивает процесс ремоделирования хроматина, стабильность генома, регуляцию функциональной активности генов и реализацию целого ряда феноменов в процессе онтогенеза: репрограммирование генома, тканеспецифичную экспрессию генов, репрессию ретропозонов, геномный импринтинг, инактивацию X-хромосомы и др. В то же время, аберрантный статус метилирования ДНК является частым событием, регистрируемым практически во всех злокачественных новообразованиях с высокой частотой [4]. В рамках активно разрабатываемой «эпигенетической концепции канцерогенеза» [11], именно аберрантным эпигенетическим модификациям генома, а не накапливаемым генным мутациям и хромосомным абберациям, отводится первостепенная роль в индукции злокачественной трансформации клеток.

Эпигенетическая вариабельность генома при атеросклерозе, как впрочем, и при других многофакторных заболеваниях, остаётся относительно малоизученным вопросом. Однако роль эпигенетических механизмов в этиологии данного класса патологии человека, представляется весьма заметной [26—30]. Основанием для такого утверждения может служить тот факт, что частота

аберрантных эпигенетических модификаций генов (эпимутаций), по некоторым оценкам, на два-три порядка превышает частоту структурных генных мутаций [17]. Очевидно, что при таких отличиях вклад эпигенетических механизмов в формирование сложно наследуемого фенотипа может быть достаточно высоким, и он будет заметно превышать вклад наследственного структурного полиморфизма генов, обычно фиксируемого на уровне однонуклеотидных замен (SNP).

Исследования эпигенетических особенностей тканей сосудистой стенки, как поражённых патологическим процессом, так и сохранных, пока остаются единичными [1, 8, 16, 24, 30, 33, 34]. Основываясь на опыте проведения полногеномных исследований ассоциаций (GWAS), одним из закономерных этапов в отношении широко распространённых заболеваний будет являться проведение эпигеномных ассоциативных исследований (EWAS) [31]. Решение такой задачи становится возможным с использованием современных микрочиповых технологий, обеспечивающих проведение скрининга одновременно большого числа сайтов метилирования. Данный подход позволяет идентифицировать определённые эпигенетически регулируемые регионы генома, которые, в дальнейшем, можно будет анализировать более детально, в том числе и на предмет участия в патогенезе многофакторного заболевания.

Таким образом, *цель настоящего исследования* заключалась в выявлении эпигенетически регулируемых регионов генома в рамках концепции парадоминантного наследования многофакторных заболеваний.

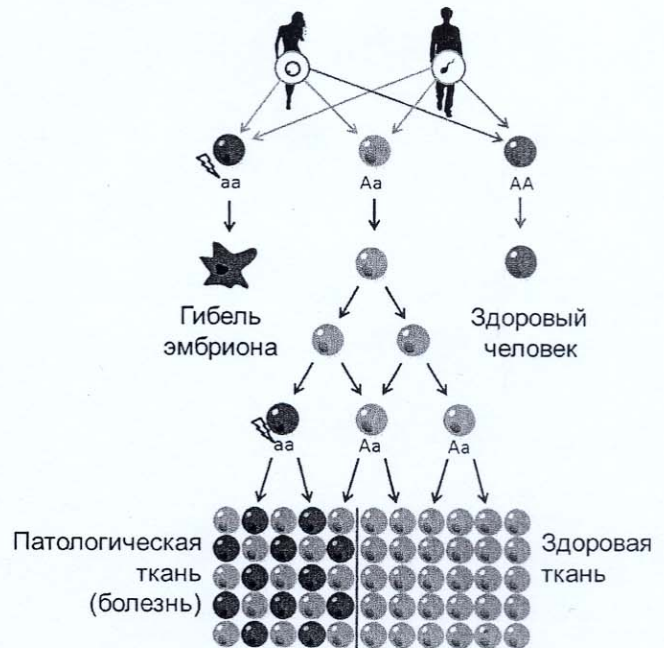


Рис. 1. Гипотеза парадоминантного наследования: аллель «А» — норма; аллель «а» — мутация.

Материалы и методы

Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИМГ» СО РАМН. В группу больных с ишемической болезнью сердца, добровольно согласившихся принять участие в обследовании, входило шесть мужчин (средний возраст $55 \pm 6,5$ года). У всех добровольцев была артериальная гипертензия. Инфаркт миокарда в анамнезе диагностирован у четырёх человек, гиперхолестеринемия — у трёх, сахарный диабет 2 типа — у двух. Два больных курили.

Банк тканей включал образцы сосудистой стенки (правые коронарные артерии с атеросклеротическими бляшками и неизменённые внутренние грудные артерии), полученные в результате коронарного шунтирования у тех же самых больных. Атеросклеротические бляшки представляли собой поздние стадии патологического процесса, что обусловило показания к оперативному лечению. Каждый образец был осмотрен, тщательно очищен от масс кальцификации, отложений липидов и тромбов, а также хорошо промыт в стерильном физиологическом растворе.

Группа медицинских абортусов состояла из шести зародышей (3 — женского пола и 3 — мужского), а спонтанных абортусов — из 5 (3 — женского пола и 2 — мужского). Все зародыши были I триместра с нормальным кариотипом. Для анализа взята экстраэмбриональная мезодерма.

Весь биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре -80°C вплоть до исследования.

Для выделения ДНК использована стандартная фенол-хлороформная экстракция с предварительной гомогенизацией цельных твердых тканей на приборе Minilys (Bertin Tech, США), согласно протоколу производителя. Оценка качества и концентрации выделенной ДНК проведена с помощью спектрофотометра NanoDor (Thermo, США).

Для анализа профиля метилирования ДНК всех тканей использован микрочип Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina, США). Данная платформа позволяет проводить тестирование 27 578 отдельных CpG-сайтов в составе 14 475 генов при относительно небольшом количестве обработанной бисульфитом ДНК. В среднем на ген приходится приблизительно 1,9 CpG-сайтов. Панель включает различные классы генов, в том числе связанные со злокачественными новообразованиями, а также промоторы микроРНК; при этом у 60% генов CpG-сайты, исследуемые в промоторной области, входят в CpG-островки.

Бисульфитная модификация геномной ДНК проведена с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Дальнейшие этапы полногеномной амплификации, ферментативного расщепления ДНК на фрагменты, очистки и гибридизации были проведены согласно стандартному протоколу производителем

[7]. Во время гибридизации фрагменты ДНК отжигались на локуспецифичных ДНК-праймерах, соответствующих метелированному или неметелированному состоянию цитозина. Далее происходило удлинение праймеров на одно основание с использованием DNP- и Biotin-меченных ddNTP. Интенсивность сигналов с матрицы измерялась с помощью сканера Illumina BeadArray Reader (Illumina, США). Первичная обработка полученных данных была проведена в пакете программ GenomeStudio Methylation Module (Illumina, США). Оценкой уровня метилирования служит величина β , которая соответствует отношению флюоресцентных сигналов метелированных аллелей к сумме флюоресцентных сигналов метелированных и неметелированных аллелей. Уровень (индекс) метилирования β варьирует от 0 (неметелированное состояние) до 1 (полное метелирование всех CpG-сайтов в данном положении).

Контроль качества данных проводили с помощью многомерного шкалирования и иерархического кластерного анализа. Сравнительный анализ уровня метилирования отдельных CpG-сайтов между группами тканей выполнен с использованием статистических пакетов, реализованных в статистической среде R (lumi, limma) [18], с учётом следующих критериев: $\text{adjPBH} < 0,05$ и $\Delta\beta \geq |0,2|$. Возникновение ложноположительных результатов (FDR) при множественном сравнении данных скорректировано по методу Benjamini-Hochberg (adjPBH). Связь дифференциально-метелированных генов с заболеваниями оценивали с помощью пакета DOSE, реализованного в статистической среде R [18]. Функциональная аннотация генов с изменёнными уровнями метилирования была выполнена с помощью интернет-ресурса «WEB-based GENE Set AnaLysis Toolkit» [19]. Категории описываемых генов соответствуют классификатору базы данных Gene Ontology (GO) [20].

Стратегия поиска эпигенетически регулируемых регионов генома в рамках концепции парадоминантного наследования многофакторных заболеваний была построена следующим образом. На первом этапе проводился анализ уровня метилирования широкого спектра генов в контрольных образцах (ткани сосудов, не поражённые атеросклерозом) и выбирались CpG-сайты, имеющие уровень метилирования, в пределах 0,4–0,6. Иными словами один аллель какого-то выбранного гена находился в неметелированном состоянии, а второй был метелирован. Такая ситуация в норме характерна для импринтированных локусов генома, демонстрирующих моноаллельную экспрессию в зависимости от родительского происхождения активного аллеля [3]. Молекулярную основу импринтинга как раз и составляет дифференциальное метилирование импринтированных генов, устанавливаемое строго специфичным образом в оогенезе и сперматогенезе. Однако моноаллельная экспрессия в геноме человека не ограничена исключительно импринтированными генами, и известна для некоторых генов зрительных и обонятельных рецепторов,

а также ряда генов иммунной системы [22]. В отличие от импринтинга, моноаллельная экспрессия этих генов не зависит от пола родителя, а определяется случайными факторами, формируя быстрый и эффективный ответ на тот или иной фактор среды (в случае генов иммунной системы). Поэтому «гетерозиготный» статус метилирования какого-то спектра генов, несмотря на период глобального эпигенетического репрограммирования генома на ранних стадиях онтогенеза, всё же, с определённой вероятностью, может быть выявлен в контрольных образцах. Подобный эпигенетический статус делает более вероятным, по сравнению с неметилированным состоянием обоих аллелей, метилирование второго активного аллеля с полной инактивацией экспрессии локуса. То есть в данном случае мы будем наблюдать «потерю гетерозиготности» на эпигенетическом уровне.

Соответственно, вторым этапом в проведении исследования, становился поиск регионов генома с «потерей гетерозиготности», в которых уровень метилирования отобранных на предыдущем этапе CpG-сайтов, отклонялся от 0,4—0,6 (приближаясь к 1 при гиперметилировании или к 0 в случае гипометилирования). Этот анализ был проведен с использованием микрочиповых технологий на образцах ДНК, выделенной из тканей сосудов, поражённых атеросклерозом.

На следующем этапе статус метилирования таких сайтов проверен в тканях спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, поскольку, согласно, концепции парадоминантного наследования, ранняя инактивация нормального «парадоминантного» аллеля должна являться летальным событием. Анализ эпигенетического статуса отобранных генов на предмет их aberrантного гипер- (больше 0,6) или гипометилирования (меньше 0,4) выполнен сначала в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. После этого уровень метилирования выявленных генов-кандидатов атеросклероза был оценен в контрольной группе медицинских абортусов с нормальным кариотипом, выделив те гены, которые имеют «гетерозиготный» характер метилирования.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования проведен анализ профиля метилирования 27 578 CpG-сайтов 14 475 генов в тканях правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками (ПКА) и неизменённых внутренних грудных артерий (ВГА) больных атеросклерозом, а также экстраэмбриональной мезодермы медицинских (МА) и спонтанных абортусов (СА) (рис. 2). Анализируемые ткани отличались по профилю метилирования ДНК. Ткани сосудистой стенки больных атеросклерозом группировались отдельно от экстраэмбриональной мезодермы абортусов. Менее дифференцированные ткани медицинских и спонтанных абортусов оказались ближе друг к другу по профилю метилирования ДНК, чем высокодифференцирован-

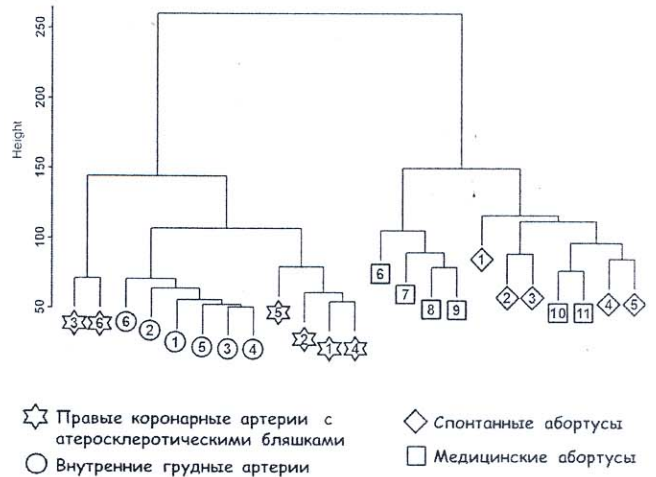
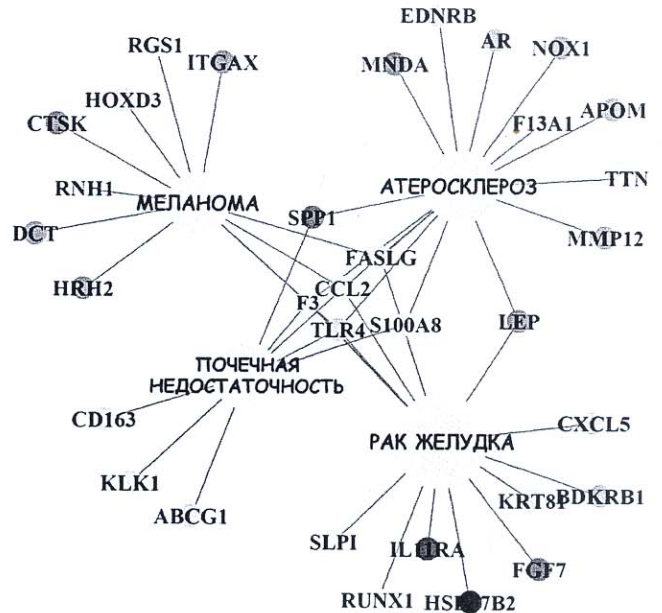


Рис. 2. Профиль метилирования ДНК в тканях больных атеросклерозом, спонтанных и медицинских абортусов.



Заболевание	Кол-во генов	adjPBH
Рак желудка	13	0,01
Атеросклероз	15	0,04
Почечная недостаточность	8	0,04
Меланома	11	0,04

Рис. 3. Связь дифференциально-метилированных генов в тканях сосудистой стенки с заболеваниями.

а также ряда генов иммунной системы [22]. В отличие от импринтинга, моноаллельная экспрессия этих генов не зависит от пола родителя, а определяется случайными факторами, формируя быстрый и эффективный ответ на тот или иной фактор среды (в случае генов иммунной системы). Поэтому «гетерозиготный» статус метилирования какого-то спектра генов, несмотря на период глобального эпигенетического репрограммирования генома на ранних стадиях онтогенеза, всё же, с определённой вероятностью, может быть выявлен в контрольных образцах. Подобный эпигенетический статус делает более вероятным, по сравнению с неметилированным состоянием обоих аллелей, метилирование второго активного аллеля с полной инактивацией экспрессии локуса. То есть в данном случае мы будем наблюдать «потерю гетерозиготности» на эпигенетическом уровне.

Соответственно, вторым этапом в проведении исследования, становился поиск регионов генома с «потерей гетерозиготности», в которых уровень метилирования отобранных на предыдущем этапе CpG-сайтов, отклонялся от 0,4—0,6 (приближаясь к 1 при гиперметилировании или к 0 в случае гипометилирования). Этот анализ был проведен с использованием микрочиповых технологий на образцах ДНК, выделенной из тканей сосудов, поражённых атеросклерозом.

На следующем этапе статус метилирования таких сайтов проверен в тканях спонтанных абортусов с нормальным кариотипом, поскольку, согласно, концепции парадоминантного наследования, ранняя инактивация нормального «парадоминантного» аллеля должна являться летальным событием. Анализ эпигенетического статуса отобранных генов на предмет их aberrантного гипер- (больше 0,6) или гипометилирования (меньше 0,4) выполнен сначала в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. После этого уровень метилирования выявленных генов-кандидатов атеросклероза был оценен в контрольной группе медицинских абортусов с нормальным кариотипом, выделив те гены, которые имеют «гетерозиготный» характер метилирования.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования проведен анализ профиля метилирования 27 578 CpG-сайтов 14 475 генов в тканях правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками (ПКА) и неизменённых внутренних грудных артерий (ВГА) больных атеросклерозом, а также экстраэмбриональной мезодермы медицинских (МА) и спонтанных абортусов (СА) (рис. 2). Анализируемые ткани отличались по профилю метилирования ДНК. Ткани сосудистой стенки больных атеросклерозом группировались отдельно от экстраэмбриональной мезодермы абортусов. Менее дифференцированные ткани медицинских и спонтанных абортусов оказались ближе друг к другу по профилю метилирования ДНК, чем высокодифференцирован-

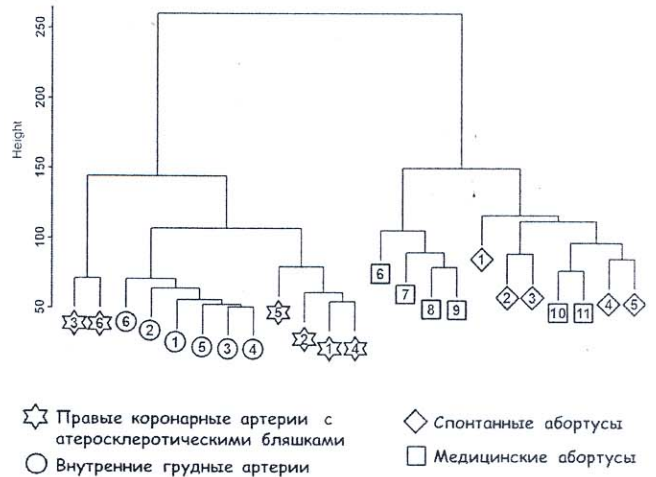
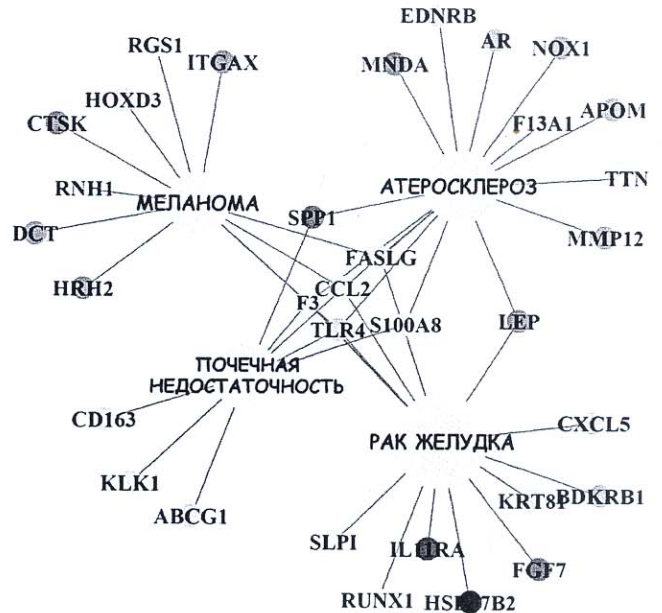


Рис. 2. Профиль метилирования ДНК в тканях больных атеросклерозом, спонтанных и медицинских абортусов.



Заболевание	Кол-во генов	adjPBH
Рак желудка	13	0,01
Атеросклероз	15	0,04
Почечная недостаточность	8	0,04
Меланома	11	0,04

Рис. 3. Связь дифференциально-метилированных генов в тканях сосудистой стенки с заболеваниями.

ные ткани правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками и внутренних грудных артерий. Наиболее однородный профиль метилирования ДНК был характерен для образцов в группе внутренних грудных артерий.

На втором этапе сравнительный анализ уровня метилирования отдельных CpG-сайтов между группами тканей ПКА и ВГА выявил 357 дифференциально метилированных CpG-сайтов, входящих в состав 326 генов ($\text{adjPВН} < 0,05$ и $\Delta\beta \geq |0,2|$). Из них 15 генов были связаны с атеросклерозом (*APOM*, *AR*, *CCL2*, *EDNRB*, *F13A1*, *F3*, *FASLG*, *LEP*, *MMP12*, *MNDA*, *NOX1*, *S100A8*, *SPP1*, *TLR4* и *TTN*; $\text{adjPВН} = 0,04$; рис. 3). Уровень метилирования 165 (46,2%) CpG-сайтов 144 генов был ниже в образцах правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками по сравнению с внутренними грудными артериями. Функциональная аннотация белковых продуктов данных генов, согласно онтологии биологических процессов, выявила, что они преимущественно участвуют в иммунно-воспалительных процессах (GO:0006954 , $\text{adjP} = 0,0018$; GO:0006955 , $\text{adjP} = 0,0045$; GO:0002376 , $\text{adjPВН} = 0,005$; GO:0006952 , $\text{adjP} = 0,005$; GO:0009607 , $\text{adjP} = 0,0086$).

Поиск генов, имеющих отношение к развитию атеросклероза и демонстрирующих эффект парадоминантного наследования на эпигенетическом уровне, проводился, согласно алгоритму, представленному на рис. 4. Учитывая феномен тканеспецифичности эпигенетических профилей, эксперименты на разных этапах онтогенеза проведены на производных мезодермы.

На первом этапе в контрольных образцах (ткани внутренних грудных артерий, не поражённых атеросклерозом) отбирались CpG-сайты, имеющие уровень метилирования, в пределах 0,4–0,6. После фильтрации данных осталось 715 CpG-сайтов. Вторым этапом был поиск регионов генома с «потерей гетерозиготности», в которых уровень метилирования отобранных на предыдущем этапе CpG-сайтов отклонялся от 0,4–0,6. Этот анализ проведён на образцах ДНК, выделенной из тканей правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками. В результате выбрано 507 CpG-сайтов. На третьем этапе в группе спонтанных абортусов проанализирован уровень метилирования этих 507 CpG-сайтов на предмет их aberrантного гипер- (>0,6) или гипометилирования (<0,4). После данного этапа осталось 426 CpG-сайтов. Среди них на заключительном этапе в контрольной группе медицинских абортусов выявлялись CpG-сайты с уровнем метилирования «гетерозиготного» характера (0,4–0,6).

В итоге было выявлено 6 CpG-сайтов, входящих в состав шести генов аполипопротеина М (*APOM*), белка 2 семейства В с доменом, гомологичным плекстрину (*PHLDB2*), миозина 1А (*MYO1A*), триглицерид гидролазы (*PNPLA2*), рецептора 3 галанина (*GALR3*) и мальтазы-глюкоамилазы (*MGAM*). Они были гиперметилированы в тканях правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками и экстраэмбриональной мезодерме спонтанных абортусов I триместра с нормальным кариотипом, но сохраняли «гетерозиготный статус» в не-

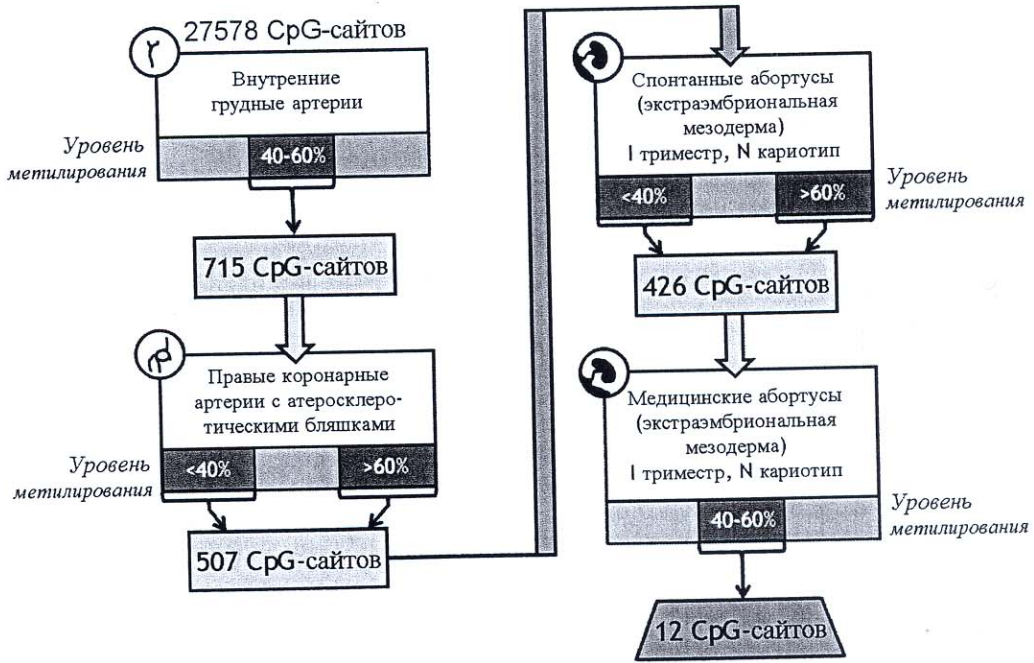


Рис. 4. Алгоритм поиска генов, имеющих отношение к развитию атеросклероза и демонстрирующих эффект парадоминантного наследования на эпигенетическом уровне.

поражённых тканях сосудистой стенки и экстраэмбриональной мезодерме медицинских абортусов (таблица).

С другой стороны, в тканях правых коронарных артерий с атеросклеротическими бляшками и экстраэмбриональной мезодерме спонтанных абортусов I триместра с нормальным кариотипом обнаружено гипометилирование в шести CpG-сайтах, входящих в состав шести генов α-субъединицы стимулирующего G-белка (*GNAS*), белка 1 семейства протеинов с Ras-связывающим доменом (*RASSF1*), NADH-дегидрогеназы (*NDUFS5*), disco-взаимодействующего белка 2, гомолога C (*DIP2C*), инсулиноподобного фактора роста 2 (*IGF2*) и миелопероксидазы (*MPO*) (таблица). Причём, CpG-сайты с изменёнными уровнями метилирования генов *APOM*, *PHLDB2*, *GNAS* и *MPO* регистрировались в двух и более образцах.

Лишь некоторые из идентифицированных в настоящем исследовании генов (*APOM*, *PNPLA2* и *MPO*) рассматривались ранее в отношении риска развития атеросклероза. Продукт гена *APOM* играет важную роль в метаболизме липопротеидов высокой плотности и предотвращении атеросклероза [21]. Ген *PNPLA2* кодирует фермент триглицерид гидролазу. Мутации в данном гене связаны с массивной аккумуляцией триглицеридов в коронарных артериях и миокарде, что приводит к развитию хронической сердечной недостаточности. С другой стороны, редкие полиморфные варианты гена *PNPLA2* обнаружены у здоровых индивидов, однако они связаны с незначительным снижением свободных жир-

ных кислот в плазме [9]. Экспрессия гена *MPO* обнаружена в атеросклеротических бляшках на поздних стадиях патологического процесса, связана с нестабильностью бляшки и увеличением риска неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов [15]. Возможно, что миелопероксидаза играет роль в атеросклеротическом поражении артерий через окислительный стресс, модифицируя липопротеиды низкой и высокой плотности [10].

Необходимо отметить, что ряд генов, обозначенных в таблице, ассоциирован со злокачественными новообразованиями. Соматические мутации в генах *GNAS*, *RASSF1*, *DIP2C* и *IGF2* выявлены при злокачественных опухолях различной локализации [23, 32]. Эпигенетическая инактивация гена «супрессора опухоли» *RASSF1*, связанная с гиперметилированием ДНК, обнаружена при развитии и прогрессии злокачественных новообразований. Продукт данного гена участвует в регуляции клеточного цикла, стабильности микротрубочек, апоптозе и т.д. [32]. Гипотеза о том, что в основе атеросклероза и злокачественных новообразований лежат сходные молекулярные механизмы была сформулирована достаточно давно [5]. Открытие моноклональности гладкомышечных клеток, послужило причиной рассмотрения формирования атеросклеротических бляшек с позиций неопластического процесса, когда серия соматических мутаций обуславливает селективную и неконтролируемую пролиферацию клеток. Образование моноклональных очагов может быть объяснено несколькими механизмами: экспансией

Таблица

Гиперметилированные и гипометилированные CpG-сайты в тканях сосудистой стенки больных атеросклерозом и экстраэмбриональной мезодерме спонтанных абортусов

Ткань	Внутренние грудные артерии						Правые коронарные артерии с атеросклеротическими бляшками						Медицинские абортусы						Спонтанные абортусы					Ген	Продукт		
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5				
№	CpG-сайт																										
	Гиперметилированные																										
eg06241300	0,49	0,45	0,49	0,53	0,51	0,53	0,66	0,62	0,79	0,60	0,74	0,84	0,47	0,43	0,46	0,44	0,51	0,48	0,71	0,49	0,53	0,62	0,67	<i>APOM</i>	Аполипопротеин М		
eg16396948	0,48	0,44	0,52	0,54	0,49	0,48	0,42	0,49	0,67	0,42	0,60	0,66	0,50	0,48	0,46	0,58	0,57	0,55	0,63	0,57	0,53	0,64	0,65	<i>PHLDB2</i>	Белок 2 семейства В с доменом, гомологичным плекстрину		
eg01514487	0,49	0,48	0,49	0,52	0,50	0,54	0,53	0,53	0,69	0,54	0,61	0,63	0,54	0,49	0,41	0,50	0,56	0,56	0,51	0,64	0,47	0,52	0,58	<i>MYO1A</i>	Миозин IА		
eg24427660	0,56	0,54	0,58	0,58	0,52	0,54	0,61	0,60	0,66	0,71	0,58	0,57	0,53	0,50	0,55	0,47	0,58	0,46	0,41	0,47	0,64	0,50	0,43	<i>PNPLA2</i>	Триглицерид гидролаза		
eg21402035	0,53	0,52	0,52	0,54	0,55	0,56	0,56	0,58	0,64	0,56	0,61	0,61	0,54	0,56	0,55	0,57	0,60	0,57	0,61	0,55	0,54	0,56	0,55	<i>GALR3</i>	Рецептор 3 галактина		
eg01476044	0,49	0,55	0,53	0,50	0,58	0,49	0,52	0,47	0,49	0,46	0,44	0,67	0,47	0,47	0,51	0,54	0,58	0,41	0,46	0,45	0,49	0,60	0,43	<i>MGAM</i>	Мальтаза-гликоамилаза (α-гликозилаза)		
№	CpG-сайт																										
	Гипометилированные																										
eg05558390	0,44	0,44	0,42	0,43	0,47	0,44	0,44	0,38	0,44	0,44	0,43	0,39	0,41	0,50	0,54	0,57	0,48	0,46	0,36	0,30	0,30	0,28	0,34	<i>GNAS</i>	?-субъединица стимулирующего G-белка		
eg06980053	0,48	0,46	0,49	0,44	0,50	0,41	0,50	0,44	0,37	0,53	0,45	0,36	0,47	0,58	0,50	0,52	0,47	0,49	0,46	0,40	0,46	0,42	0,37	<i>RASSF1</i>	Белок 1 семейства протеинов с Ras-связывающим доменом (RalGDS/AF-6)		
eg07388493	0,47	0,48	0,53	0,54	0,53	0,52	0,44	0,48	0,38	0,55	0,47	0,35	0,49	0,56	0,52	0,48	0,59	0,54	0,46	0,39	0,54	0,56	0,50	<i>NDUFS5</i>	NADH-дегидрогеназа (НАДН-кофизим Q редуктаза)		
eg00025991	0,49	0,52	0,52	0,48	0,51	0,51	0,45	0,48	0,41	0,48	0,41	0,39	0,48	0,52	0,51	0,49	0,52	0,52	0,51	0,38	0,47	0,50	0,46	<i>DIP2C</i>	disco-взаимодействующий белок 2, гомолог C (D. melanogaster)		
eg22956483	0,43	0,47	0,45	0,42	0,44	0,47	0,46	0,50	0,43	0,46	0,51	0,39	0,48	0,44	0,45	0,49	0,50	0,50	0,37	0,48	0,47	0,47	0,41	<i>IGF2</i>	Инсулиноподобный фактор роста 2 (соматомедин А)		
eg04988978	0,50	0,54	0,50	0,59	0,53	0,57	0,44	0,39	0,30	0,49	0,42	0,40	0,44	0,55	0,45	0,45	0,45	0,44	0,45	0,37	0,37	0,44	0,40	<i>MPO</i>	Миелопероксидаза		

Примечание. Гиперметилированные CpG-сайты — уровень метилирования >0,6; гипометилированные CpG-сайты — уровень метилирования <0,4

Список литературы

предсуществующего клона клеток, отбором специфической субпопуляции клеток (пролиферация, миграция и преимущество в выживании) или возникновение новых линий клеток через структурные и/или эпигенетические изменения генома.

Интересно, что в списке оказалось два импринтированных гена (*GNAS* и *IGF2*), моноаллельная экспрессия которых регулируется дифференциальным метилированием родительских аллелей. С локуса *GNAS* образуются несколько транскриптов, антисмысловых транскриптов, некодирующих РНК, в том числе α -субъединица G-белка, что обеспечивает плейотропное влияние гена. Любопытно вспомнить, что именно мутации в гене *GNAS* лежат в основе синдрома МакКьюна—Олбрайта, послужившего прототипом для формулировки принципов парадоминантного наследования. Гиперметилование в регионе NESP гена *GNAS* выявлено в лейкоцитах у двух больных с ранним инсультом и легкими признаками остеоидистрофии Олбрайта [12]. Не исключено, что «потеря импринтинга» в данном локусе вносит вклад в патогенез ишемического инсульта в раннем возрасте. Кроме того, недавно в результате GWAS установлена ассоциация SNP, расположенных около локуса *GNAS*, с уровнем артериального давления и сердечно-сосудистыми заболеваниями [12]. Ген *IGF2* также связан с широким спектром заболеваний, включая широко распространённые: метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа и атеросклероз коронарных артерий. Продукт гена стимулировал рост атеросклеротических бляшек у мыши, а локальная гиперэкспрессия *Igf2* индуцировала образование атероматозных масс в аорте [6].

Таким образом, в результате проведённого исследования с использованием микрочипа Infinium HumanMethylation27 BeadChip, Illumina установлены отличия по профилю метилирования ДНК тканей сосудистой стенки больных атеросклерозом, экстраэмбриональной мезодермы спонтанных и медицинских абортусов первого триместра с нормальных кариотипом. Правые коронарные артерии с атеросклеротическими бляшками и внутренние грудные артерии существенно отличаются по уровню метилирования 357 CpG-сайтов, входящих в состав 326 генов, в том числе и тех, которые имеют отношение к атеросклерозу (*APOM*, *AR*, *CCL2*, *ENDRB*, *F13A1*, *F3*, *FASLG*, *LEP*, *MMP12*, *MNDA*, *NOX1*, *S100A8*, *SPPI*, *TLR4*, *TTN*). Белковые продукты генов, гипометилированных в правых коронарных артериях с атеросклеротическими бляшками по сравнению с внутренними грудными артериями, преимущественно вовлечены в иммунно-воспалительные процессы. Сравнительный анализ уровней метилирования отдельных CpG-сайтов в тканях сосудистой стенки и экстраэмбриональной мезодерме, позволил идентифицировать гены (*APOM*, *PHLDB2*, *MYO1A*, *PNPLA2*, *GALR3*, *MGAM*, *GNAS*, *RASSF1*, *NDUFS5*, *DIP2C*, *IGF2*, *MPO*), эпигенетический статус которых при развитии атеросклероза изменяется в соответствии с гипотезой парадоминантного наследования.

1. Назаренко М.С., Марков А.В., Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Профиль метилирования ДНК в тканях сосудистого русла при атеросклерозе // Молекулярная биология. — 2013. — Т. 47, №3. — С. 398—404.
2. Andreassi M.G., Botto N. DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis // Trends Cardiovasc. Med. — 2003. — Vol. 13, №7. — P. 270—275.
3. Azzi S., Rossignol S., Le Bouc Y. et al. Lessons from imprinted multilocus loss of methylation in human syndromes: A step toward understanding the mechanisms underlying these complex diseases // Epigenetics. — 2010. — Vol. 5, №. 5. — P. 373—377.
4. Ballestar E., Esteller M. Epigenetic gene regulation in cancer // Adv. Genet. — 2008. — Vol. 61. — P. 247—267.
5. Benditt E.P., Benditt J.M. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1973. — Vol. 70, №6. — P. 1753—1756.
6. Bergman D., Halje M., Nordin M. et al. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review // Gerontology. — 2013. — Vol. 59, №3. — P. 240—249.
7. Bibikova M., Le J., Barnes B. et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay // Epigenomics. — 2009. — Vol. 1. — P. 177—200.
8. Castillo-Diaz S.A., Garay-Sevilla M.E., Hernandez-Gonzalez M.A. et al. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries // Int. J. Mol. Med. — 2010. — Vol. 26, №5. — P. 691—700.
9. Coassin S., Schweiger M., Kloss-Brandstatter A. et al. Investigation and functional characterization of rare genetic variants in the adipose triglyceride lipase in a large healthy working population // PLoS Genet. — 2010. — Vol. 6, №12. — P. e1001239.
10. Delporte C., Van Antwerpen P., Vanhamme L. et al. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies // Mediators Inflamm. — 2013. — Vol. 2013. — P. 971579.
11. Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer // Nat. Rev. Genet. — 2006. — Vol. 7, №1. — P. 21—33.
12. Freson K., Izzi B., Van Geet C. From genetics to epigenetics in platelet research // Thromb. Res. — 2012. — Vol. 129, №3. — P. 325—329.
13. Happle R. Cutaneous manifestation of lethal genes // Hum. Genet. — 1986. — Vol. 72, №3. — P. 280.
14. Happle R. How many epidermal nevus syndromes exist? A clinicogenetic classification // J. Am. Acad. Dermatol. — 1991. — Vol. 25, №3. — P. 550—556.
15. Hazen S.L. Myeloperoxidase and plaque vulnerability // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2004. — Vol. 24, №7. — P. 1143—1146.
16. 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.
17. Horsthemke B. Epimutations in human disease // Curr. Top. Microbiol. Immunol. — 2006. — Vol. 310. — P. 45—59.
18. <http://www.R-project.org>
19. <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>
20. <http://www.geneontology.org>
21. Hu Y.W., Zheng L., Wang Q. Characteristics of apolipoprotein M and its relation to atherosclerosis and diabetes // Biochim. Biophys. Acta. — 2010. — Vol. 1801, №2. — P. 100—105.
22. Jiang Y.H., Bressler J., Beaudet A.L. Epigenetics and human disease // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. — 2004. — Vol. 5. — P. 479—510.
23. Jiao X., Wood L.D., Lindman M. et al. Somatic mutations in the Notch, NF-KB, PIK3CA, and Hedgehog pathways in human

breast cancers // *Genes Chromosomes Cancer*. — 2012. — Vol. 51, №5. — P. 480–489.

24. Kim J., Kim J.Y., Song K.S. et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2007. — Vol. 1772, №1. — P. 72–80.

25. Limaye N., Boon L.M., Vikkula M. From germline towards somatic mutations in the pathophysiology of vascular anomalies // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — Vol. 18, №R1. — P. R65–74.

26. Pembrey M.E. Time to take epigenetic inheritance seriously // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 10, №11. — P. 669–671.

27. Pembrey M.E., Bygren L.O., Kaati G. et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 14, №2. — P. 159–166.

28. Petronis A. Epigenetics and twins: three variations on the theme // *Trends Genet.* — 2006. — Vol. 22, №7. — P. 347–350.

29. Petronis A. Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics // *Trends Genet.* — 2001. — Vol. 17, №3. — P. 142–146.

30. 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.

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

32. Richter A.M., Pfeifer G.P., Dammann R.H. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2009. — Vol. 1796, №2. — P. 114–128.

33. Zawadzki C., Chatelain N., Delestre M. et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis*. — 2009. — Vol. 204, №2. — P. e4–14.

34. 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.

Phenomenon of paradominant inheritance in atherosclerosis

Puzyrev V.P.^{1,3}, Nazarenko M.S.^{1,3}, Lebedev I.N.^{1,3}, Markov A.V.¹, Sleptsov A.A.¹, Kashevarova A.A.¹, Tolmacheva E.N.¹, Frolov A.V.², Popov V.A.², Barbarash O.L.², Barbarash L.S.²

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 — Tomsk State University, 634050, Tomsk, Lenin Prospekt, 36

In the current study the DNA methylation level of 27 578 CpG-sites located in 14 475 genes of vascular tissues of patients with atherosclerosis, extraembryonic mesoderm of first trimester spontaneous and medical abortions with normal karyotype was evaluated by the microarray Infinium HumanMethylation27 BeadChip («Illumina», USA). As a result we identified significant differences in DNA methylation profile between the tissues and differentially methylated genes, including those which epigenetic state changes during the development of atherosclerosis in accordance with the hypothesis of paradominant inheritance.

Key words: paradominant inheritance, atherosclerosis, microarray, DNA methylation