УДК 577.21:616.132-007.64

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ CpG-САЙТОВ В 5' РЕГИОНЕ ГЕНА *TBX20* В ВОСХОДЯЩЕЙ АОРТЕ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И АНЕВРИЗМЕ

© 2024 г. Ю. А. Королёва¹*, И. А. Гончарова¹, А. А. Зарубин¹, С. А. Шипулина¹,
А. А. Слепцов¹, Д. С. Панфилов², Б. Н. Козлов², М. С. Назаренко¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

²Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
Томск, 634012 Россия

*e-mail: yuliya.koroleva@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Выявлено гипометилирование пяти CpG-сайтов в 5'-регионе гена *TBX20* (локус 7p14.2) в тканях атеросклеротической бляшки аорты по сравнению с ее дилатированным участком у больных с аневризмой восходящей аорты. С привлечением внешних данных мы установили, что при диссекции аорты и атеросклерозе аорты уровень метилирования ДНК региона chr7:35253926-35262250 изменяется разнонаправленно. Полученные результаты свидетельствуют об изменении эпигенетической регуляции как при атеросклеротическом поражении аорты, так и при ее аневризме.

Ключевые слова: *TBX20*, аневризма аорты, атеросклероз аорты, метилирование.

DOI: 10.31857/S0016675824070091 **EDN:** BH1OTN

Метилирование ДНК тесно связано с развитием и прогрессией сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе обусловленных атеросклеротическим поражением артерий. Опубликованные клинические и экспериментальные наблюдения показывают, что метилирование ДНК может быть вовлечено в патогенез такой жизнеугрожающей патологии как аневризма аорты (АА) [1, 2].

Между АА и атеросклеротическим поражением сердечно-сосудистой системы наблюдаются сложные взаимоотношения. С одной стороны, оба состояния имеют общие факторы риска, такие как гипертензия и курение, а наличие атеросклеротических бляшек аорты (АБА) в ее восходящем отделе считается фактором риска развития аневризмы [3, 4]. Однако, с другой стороны, в некоторых исследованиях высказано предположение о протективном эффекте аневризмы восходящего отдела грудной аорты в отношении риска развития и осложненного течения атеросклероза артерий различной локализации [5, 6]. Этот эффект может быть обусловлен не только генетическими особенностями, но и эпигенетическими модификациями, в том числе и

разнонаправленным изменением метилирования каких-либо генов или их регуляторных элементов. В связи с этим интересным представлялся анализ уровня метилирования ДНК в тканях восходящей аорты и выявление его паттернов при аневризме и атеросклеротическом поражении сосуда.

Уровень метилирования ДНК был проанализирован у шести мужчин с несиндромальными спорадическими формами аневризмы восходящей аорты без сочетанного поражения аортального клапана. Возраст обследованных составил 48–64 г. У всех пациентов наблюдалась артериальная гипертензия, у четырех — ожирение, у трех — стенокардия и у одного пациента — сахарный диабет второго типа. Атеросклероз коронарных или сонных артерий (степень стеноза больше 60%) по результатам ультразвукового исследования выявлен у трех пациентов, в доклинической стадии (30%) — у двух пациентов. У трех пациентов отмечены фиброзные атеросклеротические бляшки восходящей аорты, еще у одного пациента обнаружено атеросклеротическое поражение восходящей аорты на стадии липидных полос.

Всем пациентам проведено открытое хирургическое лечение в НИИ кардиологии г. Томска в период 2020–2023 гг. У четырех пациентов взяты три фрагмента ткани аорты: атеросклеротическая бляшка дилатированной части аорты (АБА); дилатированная часть, не пораженная атеросклерозом (АА) и нерасширенная проксимальная часть дуги аорты (относительно интактная – НА). У двух пациентов не наблюдалось атеросклеротического поражения аорты, поэтому взяты только два фрагмента сосуда – АА и НА.

От всех участников было получено информированное письменное согласие на обследование. Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (регистрационный номер 191, протокол № 13 от 15.11.2021 г.).

Метилирование ДНК оценивали методом бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS). Для выполнения анализа ДНК в количестве 100 мкг на образец фрагментировали расщеплением рестриктазой Msp I (Сибэнзим). Репарацию концов и А-хвостов фрагментов ДНК осуществляли с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra для Illumina с последующим лигированием метилированных адаптеров (IDT) и очисткой продукта. Далее проводили отбор фрагментов размером 150–500 п.н. при помощи магнитных шариков (Agencourt AM Pure XP, Beckman Coulter). Лигированную с адаптером и очищенную ДНК обрабатывали бисульфитом натрия с помощью набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) и амплифицировали в течение 14 циклов ПЦР (NEBNext Q5U Master Mix, New England Biolabs, Inc) с использованием универсальных и индексных праймеров (NEBNext Multiplex Oligos для Illumina). Полученный ПЦР-продукт очищали на магнитных шариках (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter). После контроля качества методом капиллярного электрофореза (Bioanalyzer 2100, Agilent) библиотеку RRBS секвенировали на приборе Illumina HiSeq1500 (2 × 150 п.н.).

Результаты RRBS секвенирования были обработаны с помощью платформы DRAGEN Bio-IT v.3.9.5 (Illumina) и сопоставлены с геномом человека (сборка GRCh38). Для оценки качества использовали программу MultiQC v.1.11. На один образец приходилось 51.9 [47.4; 63.6] млн прочтений. Анализ дифференциального метилирования ДНК проводился в программной среде R с использованием пакетов methylKit и limma. Минимальное покрытие составило 10x. Дифференциально метилированными сайтами (ДМС) считались CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $|\Delta\beta| \geq 20\%$ и уровнем

значимости с поправкой на множественные сравнения $p_{FDR} < 0.05$.

В результате исследования было установлено гипометилирование 5 CpG-сайтов локуса 7p14.2 в тканях атеросклеротической бляшки по сравнению с участком дилатированной аорты (табл. 1). Уровень метилирования в АБА по сравнению с АА снижен на 44.1–58.4% ($p_{FDR} < 0.05$). Данные CpG-сайты расположены в 2558 п.н. друг от друга и на расстоянии 5179–7757 п.н. от 5'UTR гена *TBX20* (рис. 1).

Согласно геномному браузеру UCSC [7], четыре из выявленных нами дифференциально метилированных CpG-сайтов приходятся на сайты связывания транскрипционных факторов (ТФ) (табл. 1). При этом число ТФ, способных связываться с областью, включающей конкретный CpG-сайт, варьирует от 2 (для chr7:35259293) до 24 (для chr7:35261291). Кроме этого, два CpG-сайта локализованы непосредственно в последовательности энхансера EN38E2547742 и три в области гена нкРНК *ENSG00000226063* (табл. 1, рис. 1). Один из ДМС (chr7:35259405) представляет собой однонуклеотидный полиморфизм с высокой частотой миногомного аллеля среди представителей европейской популяции (rs78661208, MAF C = 0.3876).

Учитывая то, что между группами АА и НА, а также АБА и НА различия в уровне метилирования отдельных CpG-сайтов превышали 20% (однако группы сравнения были малы по размеру), мы рассмотрели внешние данные по анализу метилирования ДНК с помощью метилочипов Illumina в тканях восходящей аорты при ее диссекции (n = 12) по сравнению с нормальной тканью аорты (n = 6) (датасет GSE84274, загружен из базы данных GEO [8]), а также атеросклерозе аорты (n = 15) по сравнению с непораженной тканью (n = 15) (датасет GSE46394), загружен из базы данных GEO [8]).

При диссекции аорты в отдельных CpG-сайтах региона chr7:35253926–35262250 выявлено статистически значимое гиперметилирование (разница уровня метилирования по сравнению с непораженной тканью составляла от 1.39 до 17.70%), при этом гиперметилированные сайты группировались в три региона (рис. 1) (GSE84274 [8]). При атеросклерозе аорты, напротив, выявлены три региона, в которых CpG-сайты были гипометилированы (с разницей уровня метилирования от –3.16 до –15.50%) по сравнению с непораженной тканью аорты (GSE46394 [8]) (рис. 1). Таким образом, при диссекции аорты и атеросклерозе аорты уровень метилирования ДНК региона chr7:35253926–35262250 (в области генов нкРНК *ENSG00000289335* и *ENSG00000226063*) изменяется разнонаправленно.

Ген *TBX20* является членом подсемейства Tbx1 Т-бокс-содержащих генов, контролирующих различные факторы транскрипции, необходимые для

Таблица 1. Дифференциально метилированные CpG-сайты, локализованные в 5' регионе гена *TBX20* в тканях из различных отделов восходящей аорты

CpG-сайты	Локализация CpG-сайтов	Предсказанные сайты связывания TF (UCSC/ HarporegV4.2)	SNP/MAF (GnomAD v. 4.0.0)	Уровень метилирования			Разница уровня метилирования		
				АБА (n = 6)	АА (n = 4)	НА (n = 4)	АБА/АА (p _{FDR})	АБА/НА (p _{FDR})	АА/НА (p _{FDR})
chr7:35258799	Интрон гена нкРНК <i>AC009531.2</i> (<i>ENSG00000226063.1</i>)	EBF1, Ebf2, EBF3	rs78696287/ T = 0.0001	39.4 ± 17.9	83.5 ± 4.6	46.1 ± 13.9	-44.1 (0.025)	-6.7 (-)	37.4 (0.384)
chr7:35259293	Интрон гена нкРНК <i>AC009531.2</i> (<i>ENSG00000226063.1</i>)	ZNF528, ZNF343	Нет	20.7 ± 10.2	78.5 ± 7.4	54.5 ± 17.1	-57.8 (0.001)	-33.8 (0.241)	24.0 (0.936)
chr7:35259405	Экзон 1-го гена нкРНК <i>AC009531.2</i> (<i>ENSG00000226063.1</i>)	IRF7, IRF8/ AP-1, SETDB1, Znf143	rs78661208/ C = 0.3876	22.4 ± 11.4	70.7 ± 12.0	54.7 ± 14.9	-48.3 (0.024)	-32.3 (0.415)	16.0 (0.936)
chr7:35261291	энхансер EN38E2547742	KLF1, KLF2, KLF4, KLF5, KLF7, KLF10, KLF12, KLF14, KLF15, MAZ, PATZ1, PRDM9, SPI, SP2, SP3, SP4, SP9, FA-P2A, TFAP2B, TFAP2C, Wt1, ZNF148, ZNF263, ZNF281	нет	4.8 ± 6.7	63.2 ± 5.9	32.7 ± 23.3	-58.4 (0.017)	-27.9 (0.688)	30.5 (0.936)
chr7:35261357	энхансер EN38E2547742	нет	нет	14.3 ± 5.8	69.3 ± 10.3	33.7 ± 20.0	-55.0 (0.010)	-19.4 (-)	35.6 (0.299)

Примечание. TF – транскрипционные факторы, SNP – однонуклеотидные полиморфизмы, MAF – частота минорного аллеля (для европеоидных популяций), GnomAD – база данных генетических вариантов (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), UCSC – геномный браузер University of California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>), Harporeg – программа по функциональному анализу генетических вариантов и их расположению в галоглилах (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/harporeg.php>), p_{FDR} – уровень значимости р с поправкой на множественные сравнения (False Discovery Rate), АБА – атеросклеротическая бляшка дилатированной части аорты, АА – дилатированная часть аорты, не пораженная атеросклерозом, НА – нерасширенная проксимальная (относительно интактная) часть дуги аорты, нкРНК – некодирующая РНК.

эмбрионального развития и органогенеза. *Tbx20* важен для развития сердечно-сосудистой системы и участвует в ремоделировании сердца в ответ на патофизиологические стрессы [9]. Редкие патогенные варианты *TBX20* у человека ассоциированы со сложным спектром врожденных пороков сердца, включающим дефекты формирования перегородок и клапанов, коарктацию аорты, а также с аневризмой грудной аорты в сочетании с двустворчатым аортальным клапаном [10–12]. В исследованиях GWAS в области гена *TBX20* выявлены 16 частых SNP, ассоциированных с диаметром восходящей аорты, аневризмой аорты и атеросклерозом сонных и коронарных артерий [13].

Как генетические варианты, так и изменение эпигенетической регуляции, включая метилирование генов, связанных с развитием сосудистой системы и сердца (в том числе таких, как T-бокс-содержащие гены), могут способствовать нарушению целостности аорты и патогенезу аневризмы [2]. Высокая функциональная активность гена *TBX20* выявлена в фибробластах и гладкомышечных клетках аорты у пациентов с аневризмой восходящей аорты и контрольной группы [14, 15]. В то же время данные по изменению метилирования в области гена *TBX20* в клетках и тканях восходящей аорты при ее аневризме отсутствуют.

Также мало изучена роль *TBX20* в развитии атеросклероза артерий различной локализации. Однако недавно с помощью технологии секвенирования транскриптома отдельных клеток была выявлена преимущественная экспрессия *TBX20* в гладкомышечных клетках и фибробластах пораженных атеросклерозом коронарных артерий человека. Более того, показано, что в гладкомышечных клетках и фибробластах область данного гена “насыщена” участками открытого хроматина [16]. Ранее в тканях грудной аорты, пораженных атеросклерозом, относительно непораженной ткани были выявлены несколько протяженных гипометилированных областей, затрагивающих 5'-UTR гена *TBX20* [17].

Результаты настоящего исследования согласуются с представленными выше, поскольку гипометилированные в атеросклеротической бляшке аорты CpG-сайты локализируются в том же регионе или непосредственной близости от него (рис. 1). Показано, что и промоторная область гена *TBX20*, находящаяся в 5000–8000 п.н. от изученного в данном исследовании региона, гипометилирована в тканях миокарда при тетраде Фалло [18, 19]. Выявленные в настоящем исследовании гипометилированные в атеросклеротической бляшке аорты CpG-сайты локализованы в регионе концентрации регуляторных элементов, в частности энхансеров, и являются сайтами связывания различных TF. В частности, среди TF, предположительно способных связываться с областью CpG-сайта chr7:35261291, отмечен SP1, который способствует активации гена

TBX20. Можно предположить, что снижение метилирования данного сайта при атеросклерозе аорты приведет к повышению активности гена *TBX20* в клетках атеросклеротической бляшки (преимущественно в гладкомышечных клетках и фибробластах). Это предположение косвенно подтверждается данными о повышении экспрессии гена *TBX20* при снижении уровня метилирования другого сайта связывания TF SP1 в области промотора *TBX20* в тканях миокарда при тетраде Фалло [19].

В настоящем исследовании показано, что ДМС chr7:35259405 является полиморфным сайтом с достаточно высокой частотой (36%) в европеоидных популяциях (табл. 1). Поскольку метилированию в ДНК подвергается цитозин, в случае однонуклеотидных полиморфизмов замена нуклеотида может приводить к утрате существующего или формированию нового сайта метилирования. Для установления роли однонуклеотидных полиморфизмов, а также участков связывания с транскрипционными факторами в данном локусе генома требуется проведение дополнительных исследований.

Таким образом, в данном исследовании выявлено гипометилирование пяти CpG-сайтов, расположенных на расстоянии примерно 5000 п.н. от гена *TBX20* (в области гена нкРНК *ENSG00000226063*), в тканях атеросклеротической бляшки аорты по сравнению с ее дилатированным участком у больных с аневризмой восходящей аорты. В то же время показано, что при диссекции аорты и атеросклерозе аорты уровень метилирования ДНК региона chr7:35253926–35262250 (в области генов нкРНК *ENSG00000289335* и *ENSG00000226063*) изменяется разнонаправленно. Полученные результаты свидетельствуют об изменении эпигенетической регуляции как при атеросклеротическом поражении аорты, так и при ее аневризме и выступают подтверждением возможной роли гена *TBX20* и генов нкРНК в процессах атерогенеза у лиц с аневризмой восходящей аорты и аортальным клапаном нормального строения.

Исследование выполнено за счет гранта РФ № 22-25-00701.

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук – протокол № 13 от 15 ноября 2021 г., а также Этическим комитетом Научно-исследовательского института кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук – протокол № 213 от 12 мая 2021 г.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской

декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Portelli S.S., Robertson E.N., Malecki C. et al.* Epigenetic influences on genetically triggered thoracic aortic aneurysm // *Biophys. Rev.* 2018. V. 10. № 5. P. 1241–1256. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0460-1>
2. *Liu P., Zhang J., Du D. et al.* Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of Hox genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis // *Clin. Epigenetics.* 2021. V. 13. № 1. P. 124. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01110-9>
3. *Leone O., Corsini A., Pacini D. et al.* The complex interplay among atherosclerosis, inflammation, and degeneration in ascending thoracic aortic aneurysms // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2020. V. 160. № 62. P. 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.08.108>
4. *Isselbacher E.M., Preventza O., H. Black J. 3rd. et al.* ACC/AHA guideline for the diagnosis and management of aortic disease: A report of the American Heart Association // *Circulation.* 2022. V. 146. № 24. P. e334–e482. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001106>
5. *Chau K.H., Bender J.R., Eleftheriades J.A.* Silver lining in the dark cloud of aneurysm disease // *Cardiology.* 2014. V. 128. № 4. P. 327–332. <https://doi.org/10.1159/000358123>
6. *Weininger G., Ostberg N., Shang M. et al.* Lipid profiles help to explain protection from systemic atherosclerosis in patients with ascending aortic aneurysm // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2022. V. 163. № 2. P. e129–e132. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2021.09.031>
7. *Nassar L.R., Barber G.P., Benet-Pagès A. et al.* The UCSC Genome Browser database: 2023 update // *Nucl. Ac. Res.* 2023. V. 51. № D1. P. D1188–D1195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072>
8. *Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P. et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update // *Nucl. Ac. Res.* 2013. V. 41. P. D991–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072>
9. *Chen Y., Xiao D., Zhang L. et al.* The role of Tbx20 in cardiovascular development and function // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.638542>
10. *Kirk E.P., Sunde M., Costa M.W. et al.* Mutations in cardiac T-box factor gene *TBX20* are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 2. P. 280–291. <https://doi.org/10.1086/519530>
11. *Luyckx I., Kumar A.A., Reyniers E. et al.* Copy number variation analysis in bicuspid aortic valve-related aortopathy identifies *TBX20* as a contributing gene // *Eur. J. Hum. Genet.* 2019. V. 27. № 7. P. 1033–1043. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0364-y>
12. *Tcheandjieu C., Xiao K., Tejada H. et al.* High heritability of ascending aortic diameter and trans-ancestry prediction of thoracic aortic disease // *Nat. Genet.* 2022. V. 54. № 6. P. 772–782. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01070-7>
13. *Sollis E., Mosaku A., Abid A. et al.* The NHGRI-EBI GWAS Catalog: Knowledgebase and deposition resource // *Nucl. Ac. Res.* 2023. V. 51. № D1. P. D977–D985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1010>
14. *Li Y., Ren P., Dawson A. et al.* Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic cell populations and differential gene expression patterns in control and aneurysmal human aortic tissue // *Circulation.* 2020. V. 142. № 14. P. 1374–1388. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046528>
15. *Ma W.F., Hodonsky C.J., Turner A.W. et al.* Enhanced single-cell RNA-seq work-flow reveals coronary artery disease cellular cross-talk and candidate drug targets // *Atherosclerosis.* 2022. V. 340. P. 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.11.025>
16. *Hodonsky C.J., Turner A.W., Khan M.D. et al.* Integrative multi-ancestry genetic analysis of gene regulation in coronary arteries prioritizes disease risk loci // *medRxiv.* 2023. V. 2. <https://doi.org/10.1101/2023.02.09.23285622>
17. *Lacey M., Baribault C., Ehrlich K.C., Ehrlich M.* Atherosclerosis-associated differentially methylated regions can reflect the disease phenotype and are often at enhancers // *Atherosclerosis.* 2019. V. 280. P. 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.11.031>
18. *Yang X., Kong Q., Li Z. et al.* Association between the promoter methylation of the *TBX20* gene and tetralogy of fallot // *Scand. Cardiovascular J.* 2018. V. 52. № 5. P. 287–291. <https://doi.org/10.1080/14017431.2018.1499955>
19. *Gong J., Sheng W., Ma D. et al.* DNA methylation status of *TBX20* in patients with tetralogy of Fallot // *BMC Med. Genomics.* 2019. V. 12. № 1. P. 75. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0534-3>

Methylation Levels In The 5' Region Of The *TBX20* Gene In The Ascending Aorta Change In Opposite Direction In Atherosclerosis And Aneurysm

Yu. A. Koroleva^{a, *}, I. A. Goncharova^a, A. A. Zarubin^a, S. A. Shipulina^a,
A. A. Sleptsov^a, D. S. Panfilov^b, B. N. Kozlov^b, M. S. Nazarenko^a

^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

^bResearch Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634012 Russia

*e-mail: yuliya.koroleva@medgenetics.ru

We found hypomethylation of 5 CpG sites in the 5' region of *TBX20* gene (7p14.2) in the tissues of atherosclerotic aortic plaque compared to dilated part of aorta in patients with ascending aortic aneurysm. Using GEO database, we found that the DNA methylation level in the chr7:35253926-35262250 region changes in opposite direction in aortic dissection and aortic atherosclerosis. The results suggest an alteration in epigenetic regulation both in aortic atherosclerosis and aortic aneurysm.

Keywords: *TBX20*, aortic aneurysm, atherosclerosis, DNA methylation.

Funding: The research was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No. 22-25-00701).