

Метилирование генов некодирующих РНК при аневризме и атеросклерозе восходящей аорты

Гончарова И.А.^{1*}, Зарубин А.А.¹, Шипулина С.А.¹, Панфилов Д.С.², Козлов Б.Н.², Назаренко М.С.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский НИМЦ РАН, Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский НИМЦ РАН, Томск, Россия

* irina.goncharova@medgenetics.ru

Ключевые слова: аневризма и атеросклероз восходящей аорты; некодирующие РНК; метилирование ДНК

Мотивация и цель: Некодирующие РНК (нкРНК) регулируют множество физиологических и патологических процессов, приводящих к развитию различных, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваний [1]. Исследования, посвященные функционированию нкРНК при аневризме восходящей аорты, единичны [2]. В немногочисленных работах представлены результаты по метилированию ДНК при атеросклерозе, расслоении или аневризме восходящей аорты [3–6], а также экспрессии генов при сочетании аневризмы аорты и атеросклероза [7]. Однако в данных исследованиях гены нкРНК отдельно не рассматриваются. В связи с этим целью настоящего исследования является изучение особенностей метилирования нкРНК при аневризме восходящей аорты как «изолированной» формы, так и при сочетании с атеросклерозом.

Методы и алгоритмы: Оценка уровня метилирования ДНК выполнена у шести пациентов (мужчины в возрасте 48–64 лет) с аневризмой восходящей аорты (дилатированная часть, нерасширенная проксимальная часть дуги (макроскопически интактная ткань) и атеросклеротическая бляшка, локализованная в проксимальной части дуги аорты). Метилирование ДНК оценивалось с помощью RRBS на приборе Illumina HiSeq1500. Результаты секвенирования обработаны с помощью DRAGEN Bio-IT v.3.9.5 (Illumina) и сопоставлены с геномом человека (сборка GRCh38). Дифференциально метилированными (ДМС) считались CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $FDR < 0.05$ и $|\Delta\beta| \geq 0.2$.

Результаты: Из 2 322 700 проанализированных CpG-сайтов между дилатированной при аневризме и интактной тканями аорты различия в уровне метилирования выявлены только для сайтов (chr5:93573113 и chr5:93573147), расположенных в первом интроне гена *NR2F1-AS1*. В дилатированной части аорты наблюдается снижение уровня метилирования данных сайтов относительно интактной ткани ($\Delta\beta = -0.30$ и $\Delta\beta = -0.43$ соответственно).

Между образцами атеросклеротических бляшек и интактной ткани аорты выявлено 480 ДМС, из которых 28 относятся к генам нкРНК. Среди них 8 (28.6 %) локализованы внутри последовательности регуляторных элементов (промотор, энхансер, сайт связывания транскрипционного фактора CTCF) и 15 (51.7 %) гипометилированы в атеросклеротической бляшке аорты.

Для пяти генов нкРНК (*NR2F1-AS1*, *LINC01926*, *LINC01280*, *LINC01770*, *LOC100506691* (*LINC02985*)), дифференциально метилированных в атеросклеротических бляшках аорты, ранее показано изменение метилирования в тканях грудной аорты при атеросклерозе без аневризмы [4].

Для ДМС *LINC01926* (chr18:58821123), *LINC01770* (chr1:1433596) и *LINC01280* (chr2:216603507) при аневризме и атеросклерозе аорты показано однонаправленное изменение метилирования с дифференциально метилированными регионами этих генов (chr18:58785792–58786168, chr1:1431925–1432353 и chr2:216566016–216566274) при атеросклерозе аорты без аневризмы [4]: в атеросклеротической бляшке аорты независимо от наличия аневризмы гиперметилированы *LINC01926* и *LINC01280*; гипометилирован *LINC01770*.

Гены *LOC100506691* (*LINC02985*) и *NR2F1-AS1* при атеросклерозе аорты без аневризмы (данные Lacey M. с соавторами [4]) и при сочетании атеросклероза и аневризмы аорты (данные настоящего исследования) показывают разнонаправленное изменение метилирования. Регион chr12:122065085–122065517 гена *LOC100506691* (*LINC02985*) гипометилирован в бляшке аорты без аневризмы ($\Delta\beta = -0.26$) [4], тогда как ДМС chr12:122063660, локализованный в промоторе этого гена, гиперметилирован ($\Delta\beta = 0.55$) при сочетанной патологии. Разнонаправленность метилирования ДНК в данном случае, возможно, объясняется тем, что область промотора и тела гена метилируются по-разному, независимо от наличия изолированной или сочетанной патологии аорты.

В настоящем исследовании при аневризме и атеросклерозе аорты в последовательности гена *NR2F1-AS1* выявлен протяженный гипометилированный регион в 39 024 пары оснований (chr5:93544844–93583868), куда входит 81 CpG-сайт. Среди них два (chr5:93573147 и chr5:93563824) являются ДМС ($\Delta\beta = -0.28$ и $\Delta\beta = -0.37$ соответственно). Вместе с тем при атеросклерозе аорты, не сопровождающемся аневризмой, в гене *NR2F1-AS1* выявлено пять гиперметилированных регионов, в том числе chr5:93571579–93571913 и chr5:93572011–93573146 ($\Delta\beta = 0.25$ и $\Delta\beta = 0.32$ соответственно [4]), в последовательности которых в настоящем исследовании обнаружены гипометилированные сайты.

Кроме этого, выявлены ДМС псевдогенов *YBX3P1* и *SMG1P2*, относящиеся к нкРНК. В последовательности *YBX3P1* находится гиперметилированный в бляшке регион chr16:31569429–chr16:31569442, содержащий четыре CpG-сайта, один из которых является ДМС (chr16:31569442 ($\Delta\beta = 0.29$)). В гене *SMG1P2* выявлен единственный ДМС (chr16:29608442), гипометилированный в бляшке аорты ($\Delta\beta = -0.36$).

Как показывает реанализ результатов экспрессии генов в гладкомышечных клетках восходящей аорты (GSE140947), псевдогены *YBX3P1* и *SMG1P2* являются дифференциально экспрессирующимися при аневризме аорты и атеросклерозе [7]. Наблюдается снижение экспрессии обоих генов в пораженной аорте относительно интактных тканей ($\log_2\text{FoldChange} = -0.67$ и $\log_2\text{FC} = -0.56$ соответственно) [7].

CpG-сайт chr16:31569442 гена *YBX3P1* локализован в промоторе, и, вероятно, повышение его метилирования приводит к снижению функциональной активности гена. Для гена же *SMG1P2* изменения метилирования сайта chr16:29608442 и экспрессии гена не согласуются: снижение метилирования данного сайта сопровождается и снижением экспрессии гена. CpG-сайт

chr16:29608442 локализован в интроне *SMG1P2* и, вероятно, не влияет на экспрессию данного гена.

Выводы: Некодирующие РНК играют роль в развитии аневризмы восходящей аорты независимо от наличия атеросклеротического поражения сосуда. Маркером развития аневризмы аорты может выступать ген *NR2F1-AS1*, характер метилирования которого различается при сочетанной и изолированных формах атеросклероза и аневризмы восходящей аорты: при изолированной аневризме и в сочетании с атеросклеротическим поражением сосуда ген гипометилирован, а при атеросклерозе без аневризмы аорты – гиперметилирован.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ (№ 22-25-00701).

DNA methylation of non-coding RNA genes in aneurysm and atherosclerosis of the ascending aorta

Goncharova I.A.^{1*}, Zarubin A.A.¹, Shipulina S.A.¹, Panfilov D.S.², Kozlov B.N.², Nazarenko M.S.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Tomsk, Russia

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Tomsk, Russia

* irina.goncharova@medgenetics.ru

Key words: aneurysm and atherosclerosis of ascending aorta; non-coding RNA; DNA methylation

Motivation and Aim: Non-coding RNAs (ncRNAs) control many physiological and pathological processes leading to the development of various medical conditions, including cardiovascular diseases [1]. Research on ncRNAs in ascending aortic aneurysm are scarce [2]. A few studies describe DNA methylation in atherosclerosis, dissection or aneurysm of the ascending aorta [3–6], as well as gene expression in aneurysm in a presence of atherosclerosis [7]. However, these studies do not focus on ncRNA genes. In this regard, the purpose of this study is to characterize DNA methylation of ncRNAs in the ascending aortic aneurysm individually and in combination with atherosclerosis.

Methods and Algorithms: DNA methylation was measured in six patients (men aged 48–64 years) with an aneurysm of the ascending aorta (dilated part, non-dilated proximal part of the arch (intact tissue) and an atherosclerotic plaque localized in the proximal part of the aortic arch. DNA methylation was determined using RRBS on an Illumina HiSeq1500. Sequencing results were processed using DRAGEN Bio-IT v.3.9.5 (Illumina) and compared to the human genome (GRCh38 assembly). CpG sites with $FDR < 0.05$ and $|\Delta\beta| \geq 0.2$ were considered differentially methylated (DMS).

Results: Of the 2,322,700 CpG sites analyzed between dilated and intact aorta, only two sites (chr5:93573113 and chr5:93573147) were differentially methylated. Both CpG sites are located in the first intron of the *NR2F1-AS1* gene. We observe the decrease in the level of DNA methylation of these CpG sites in the dilated aorta compared to intact tissue ($\Delta\beta = -0.30$ and $\Delta\beta = -0.43$, respectively).

In atherosclerotic plaques and intact aortic tissue, we identified 480 DMS, and 28 of them were related to ncRNA genes. Among them, 8 (28.6 %) are localized within regulatory elements (promoter, enhancer, CTCF transcription factor binding site) and 15 (51.7 %) are hypomethylated in the atherosclerotic aortic plaque.

For five ncRNA genes (*NR2F1-AS1*, *LINC01926*, *LINC01280*, *LINC01770*, *LOC100506691* (*LINC02985*)) differentially methylated in our study, a change in DNA methylation in atherosclerotic thoracic aortic tissue without aneurysm was previously shown [4].

CpG sites of *LINC01926* (chr18:58821123), *LINC01770* (chr1:1433596) and *LINC01280* (chr2:216603507) in aortic aneurysm with atherosclerosis have a unidirectional change of DNA methylation in aortic atherosclerosis without aneurysm (chr18:58785792-587861 68, chr1:1431925-1432353 and chr2:216566016-216566274) [4]: in the aortic atherosclerotic plaque, regardless of the presence of an aneurysm, *LINC01926* and *LINC01280* are hypermethylated and *LINC01770* is hypomethylated.

The *LOC100506691* (*LINC02985*) and *NR2F1-AS1* genes in aortic atherosclerosis without aneurysm (data from Lacey M. et al. [4]) and in a combination of atherosclerosis and aortic aneurysm (present study), show multidirectional changes in DNA methylation. The chr12:122065085-122065517 region of the *LOC100506691* gene (*LINC02985*) is hypomethylated ($\Delta\beta = -0.26$) in the aortic atherosclerotic plaque without aneurysm [4], while in case of comorbidity the DMS chr12:122063660 in the promoter of this gene is hypermethylated ($\Delta\beta = 0.55$). The multidirectionality of DNA methylation, in this case, may be explained by the fact that the promoter region and the gene body are methylated differently, regardless of the presence of isolated or combined aortic pathology.

In the present study, we identified an extended hypomethylated region of 39,024 base pairs (chr5:93544844-93583868) in aortic aneurysm compared to aortic atherosclerosis. This region includes 81 CpG sites and is located in the *NR2F1-AS1* gene. Among them, two CpG sites (chr5:93573147 and chr5:93563824) are DMS ($\Delta\beta = -0.28$ and $\Delta\beta = -0.37$, respectively). At the same time, in atherosclerotic aorta without aneurysm, the *NR2F1-AS1* gene contained five hypermethylated regions including chr5:93571579-93571913 and chr5:93572011-93573146 ($\Delta\beta = 0.25$ and $\Delta\beta = 0.32$, respectively [4]). On the contrary, we found hypomethylated CpG sites in these regions.

Along with that, we identified DMSs related to ncRNAs in the sequence of two pseudogenes *YBX3P1* and *SMG1P2*. The region chr16:31569429-chr16:31569442 of *YBX3P1* is hypermethylated in the aortic atherosclerotic plaque. This region contains four CpG sites, one of them is DMS (chr16:31569442 ($\Delta\beta = 0.29$)). A single DMS (chr16:29608442) located in *SMG1P2* gene is hypomethylated in the aortic atherosclerotic plaque ($\Delta\beta = -0.36$).

Reanalysis of gene expression in ascending aorta smooth muscle cells (GSE140947) shows that *YBX3P1* and *SMG1P2* pseudogenes are differentially expressed in aortic aneurysm and atherosclerosis [7]. The expression of both genes is decreased in aneurysm compared to intact tissue ($\log_2\text{FoldChange} = -0.67$ and $\log_2\text{FC} = -0.56$, respectively) [7]. The CpG site chr16:31569442 of the *YBX3P1* gene is localized in the promoter. It is possible that an increase in its DNA methylation leads to a decrease in the functional activity of the gene. For the *SMG1P2* gene, changes in DNA methylation of the chr16:29608442 site and gene expression are not consistent: a decrease in DNA methylation of this site is accompanied by a decrease in gene expression. The CpG site chr16:29608442 is localized in the intron of *SMG1P2* and probably does not affect the expression of this gene.

Conclusion: Non-coding RNAs play a role in the development of ascending aortic aneurysm regardless of the presence of aortic atherosclerotic lesions. *NR2F1-AS1* gene could be a marker for the development of ascending aortic aneurysms as its DNA

methylation pattern differs in combined and isolated forms of atherosclerosis and ascending aortic aneurysm. In both isolated aortic aneurysm and in combination with atherosclerotic lesion the *NR2F1-AS1* gene is hypomethylated, while in aortic atherosclerosis without aneurysm it is hypermethylated.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (No. 22-25-00701).

Список литературы/References

1. Jiang W., Agrawal D.K., Boosani C.S. Non-coding RNAs as epigenetic gene regulators in cardiovascular diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1229:133-148. doi 10.1007/978-981-15-1671-9_7
2. Li Y., Yang N. Microarray expression profile analysis of long non-coding RNAs in thoracic aortic aneurysm. *Kaohsiung J Med Sci.* 2018;34(1):34-42. doi 10.1016/j.kjms.2017.09.005
3. Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7(5):692-700. doi 10.1161/CIRCGENETICS.113.000441
4. 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;280:183-191. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2018.11.031
5. Pan S., Lai H., Shen Y., Breeze C., Beck S., Hong T., Wang C., Teschendorff A.E. DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):692-704. doi 10.1093/cvr/cvx050
6. Chen Y., Xu X., Chen Z., Huang B., Wang X., Fan X. DNA methylation alternation in Stanford- A acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc Disord.* 2022;22(1):455. doi 10.1186/s12872-022-02882-5
7. Chen P.Y., Qin L., Li G., Malagon-Lopez J., Wang Z., Bergaya S., Gujja S., Caulk A.W., Murtada S.I., Zhang X., Zhuang Z.W., Rao D.A., Wang G., Tobiasova Z., Jiang B., Montgomery R.R., Sun L., Sun H., Fisher E.A., Gulcher J.R., Fernandez-Hernando C., Humphrey J.D., Tellides G., Chittenden T.W., Simons M. Smooth muscle cell reprogramming in aortic aneurysms. *Cell Stem Cell.* 2020;26(4):542-557.e11. doi 10.1016/j.stem.2020.02.013