

## PONDEREA UNOR PROFILURI ALE METILĂRII PROMOTORULUI GENEI P15 (LOCUS: CDKN2B) LA PACIENȚII CU CARDIOPATIE ISCHEMICĂ DE ORIGINE ATEROSCLEROTICĂ

Victor Popescu<sup>1</sup> – cercet. șt. superior, dr. șt. biol.,

Diana Manea<sup>2</sup> – conf. univ., dr. șt. med.,

Cristina Butovscaia<sup>1</sup> – cercet. șt.,

Anastasia Buza<sup>1</sup> – cercet. șt.,

<sup>1</sup>Laboratorul de genetică, USMF „Nicolae Testemițanu”,

<sup>2</sup>Spitalul Internațional Medpark

tel. 022 205374, e-mail: victor.popescu@usmf.md

### Rezumat

Studiul a avut ca scop stabilirea ponderii unor profiluri ale metilării promotorului genei p15 (*locus CDKN2B*) în celulele sanguine ale pacienților cu cardiopatie ischemică de origine aterosclerotică prin amplificarea porțiunilor genice cu ajutorul perechilor de praimer nonmetil-specifici și metil-specifici (tehnica MSP). Obiectul studiului l-au constituit 35 de pacienți și 35 persoane sănătoase. Concluziile: 1) A fost stabilită corespunderea fenotipului cardiopatie ischemică cu metilarea ADN, la nivelul promotorului genei p15 (profilul MM); 2) Celulele analizate UM, au reprezentat un amestec, în care, cele mai multe au conținut ambele molecule de ADN metilate (MM), iar un număr mai mic de celule au inclus fie ambele molecule de ADN nemetilate (UU), fie o moleculă ADN metilată, iar cealaltă – nemetilată (UM).

**Cuvinte-cheie:** cardiopatie ischemică, metilarea ADN, gene-candidat, markeri moleculari

**Summary. Frequency of some methylation profiles of p15 gene promoter (locus CDKN2B) in the blood cells of patients with ischemic cardiomyopathy of atherosclerotic origin**

The study has the purpose to assess the frequency of some methylation profiles of p15 gene promoter (*locus CDKN2B*) in blood cells of patients with ischemic cardiomyopathy of atherosclerotic origin by amplification of gene sectors with nonmethyl-specific and methyl-specific primer pairs (MSP technique). Study object: 35 patients and 35 healthy people. Conclusions: 1) It was established the correspondence of the phenotype of ischemic cardiomyopathy with DNA methylation in the p15 gene promoter (MM profile); 2) Investigated UM cells proved to be a mixture with the majority of cells contained both methylated DNA molecules (MM) and a smaller amount of cells included both unmethylated DNA molecules (UU) or one of the two DNA molecules was methylated and the second one was unmethylated (UM).

**Key words:** ischemic cardiomyopathy, DNA methylation, candidate genes, molecular markers

**Резюме. Частоты некоторых профилей метилирования промотора гена p15 (locus CDKN2B) в клетках крови у пациентов с ишемической болезнью сердца атеросклеротического происхождения**

Целью данного исследования было установление частоты некоторых профилей метилирования промотора гена p15 (*locus CDKN2B*) в клетках крови у пациентов с ишемической болезнью сердца атеросклеротического происхождения посредством амплификации генных участков с помощью нонметил-специфических и метил-специфических пар праймеров (MSP технология). Предметом исследования были 35 пациентов и 35 здоровых людей. Выводы: 1) Была установлена корреляция между фенотипом ишемии сердца и метилированием ДНК промотора гена p15 (профиль MM); 2) Исследованные UM клетки представляли собой смесь в которой большинство клеток содержали оба метилированных ДНК молекул (MM), а меньшее количество клеток – одну метилированную молекулу ДНК и вторую неметилированную (UM).

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, метилирование ДНК, гены кандидаты, молекулярные маркеры

**Introducere.** Deși, în domeniul descifrării mecanismelor patogenetice ale cardiopatiei ischemice și în tratamentul ei au fost obținute succese incontestabile, totuși incidența acestei maladii în țările cu un nivel înalt de dezvoltare continuă să dețină primul loc printre cauzele mortalității [1].

Printre factorii care condiționează instalarea și progresia cardiopatiei ischemice există, inclusiv, factori de risc nemodificabili (nu depind de schimbările

modului de viață a subiectului), de exemplu, constituția genetică [2]. Totodată, cercetările din ultimii ani în domeniul biologiei moleculare au adus argumente majore în favoarea implicării unor factori epigenetici, de exemplu a metilării ADN în patogeneza cardiopatiei ischemice [3].

*In vivo*, profilul metilic al ADN-ului, în unele situații, este modificabil pe parcursul vieții, iar în altele – nemodificabil. În afară de aceasta, în dependență de

țesut, unul și același situs în ADN poate fi metilat sau nemetilat, la un moment dat [4].

Situsul cromozomial 9p21 este considerat un "hot spot" al diverselor maladii umane, fiind asociat cu riscul înalt al insuficienței cardiace, infarct miocardic, anevrisme ale aortei abdominale, ictusul cerebral, diabetul zaharat de tip 2, dar și alte patologii de etiologie distantă: glaucom, melanom, leucemie, periodontită, boala Alzheimer, endometrioză ș.a. [1, 3].

Genele *p16* și *p15* localizate în situsul cromozomial 9p21, codifică proteine-inhibitoare ale kinazelor ciclin-dependente care, la rândul lor, servesc drept reglatori ai fosforilării proteinei *pRb* [5, 6].

Rezultatele cercetărilor confirmă faptul că în stare nemetilată, la nivelul promotorului, gena *p15* este activă, determinând sinteza intracelulară a CDKN2B. Prin intermediul acestei molecule, gena dată poate contribui la susținerea proliferării celulelor musculare netede ale peretelui vascular și, prin urmare, a formării plăcilor ateromatoase [3]. Unele din aceste celule musculare ale peretelui mediu vascular, în timpul proceselor aterogenetice, pot migra în stratul *intima* al peretelui vascular [7], iar de aici, pot pătrunde în fluxul sanguin [8] și, astfel, pot fi recuperate în timpul recoltării sângelui venos.

În vederea stabilirii markerilor metil-ADN candidați ai evenimentelor acute ale cardiopatiei ischemice, în cercetarea prezentă, am analizat statutul metilic al genei *p15*, în sânge venos, la 35 pacienți cu cardiopatie ischemică. Se poate presupune că variațiile în rata formării sau nivelul proteinelor-inhibitoare ale kinazelor ciclin-dependente, drept rezultat al modificărilor metilării secvenței ADN, corespunzătoare genei *p15*, vor duce la modificări ale funcției de proliferare a elementelor peretelui vascular. Astfel, am putea include sau exclude gena *p15* în/din lista de gene-candidat ale inițierii sau progresiei cardiopatiei ischemice.

**Scopul lucrării** a fost stabilirea ponderii unor profiluri ale metilării promotorului genei *p15* (locus CDKN2B) în celulele sanguine ale pacienților cu cardiopatie ischemică de origine aterosclerotică.

**Material și metode.** Obiectul studiului l-au constituit 35 de pacienți (lot de studiu), vârsta medie 57 ani, cu diagnosticul clinic de cardiopatie ischemică, confirmată prin testele specifice instrumentale (ECG, EcoCG și coronarografie), care s-au aflat sub observație în următoarele instituții medicale: Clinica Cardiologică Republicană, Spitalul Clinic Republican, Clinica Spitalului Militar.

Lotul de control, la fel, a fost constituit din 35 de persoane cu vârsta medie 57 ani, fără maladii cardiovasculare, fapt care s-a verificat prin culegerea anamnezei, examinarea clinică și efectuarea ECG.

Metoda de laborator, utilizată în cercetarea dată, a fost evidențierea metilării ADN la nivelul promotorului genei *p15* prin tratarea ADN cu bisulfite de sodiu (conversia citozinei nemetilate în uracil) și amplificarea porțiunilor genice cu ajutorul perechilor de praimer nonmetil-specifici și metil-specifici prin tehnica MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*).

Componentele mixturii pentru reacția de amplificare în lanț a ADN-ului, conținând uracil:

- apă deionizată sterilă - volum variabil;
- tampon PCR 1× (*Fermentas*) – 5 μl soluție 10×;
- dNTPs câte 0.2 mM/L din fiecare tip – 5 μl soluție 2mM;
- praimer: *p15 U(s)*, *p15 U(as)* - 300 ng fiecare / praimer: *p15 M(s)*, *p15 M(as)*;
- Taq ADN-polimeraza – 1,25 U/50 μl, volum variabil;
- MgCl<sub>2</sub> - 3 mM/L – 6 μl soluție 25 mM;
- Volumul amestecului de mai sus: 40 μl
- ADN modificat prin conversie ≈50 ng, 10 μl ADN soluție 5 ng/μl

Volumul total al amestecului: 50 μl.

Alte metode și accesorii au fost specifice fiecărei etape de lucru, după cum urmează: recoltarea sângelui venos în eprubete cu anticoagulant K3EDTA; extracția ADN genomic uman din sânge cu protocol *Qiagen Blood Mini* [9]; modificarea ADN-ului prin conversia citozinei în uracil cu protocol *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit* [10]; amplificarea prin tehnica MSP a ADN-ului conținând uracil, a fost îndeplinită cu *termocycler Crocodile III Appligene*, protocol PCR *Fermentas* și praimer descriși anterior de Herman J. și echipa sa [11] (Tabelul 1).

Tabelul 1

**Secvențele praimerilor corespunzători promotorului genei *p15***

Praimer	Secvență
p15U(s)	5'- TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT- 3'
p15U(as)	5'- CCATACAATAACCAACAACCAA- 3'
p15M(s)	5'- GCGTTCGTATTTGCGGTT -3'
p15M(as)	5'- CGTACAATAACCGAACGACCGA -3'

Analiza produșilor de amplificare a fost efectuată în gel de agaroză *Amresco*, tip I (2,0%) în soluție TBE (1×), marker ADN pentru greutatea moleculară 98 pb și 95 pb; vizualizarea produșilor de amplificare - prin transiluminare (312 nm) și documentarea - prin fotografiere.

**Rezultate și discuții.** Analiza electroforetică a porțiunilor ADN amplificate, după conversia EpiTect a ADN-ului genomic, din sânge venos, a permis evidențierea epigenotipurilor UU, UM, MM corespunzătoare promotorului genei *p15* (statutul U/M).

Astfel, în lotul martor a lipsit profilul MM-p15 (tabelul 1, figura 1), sugerând faptul că, nefiind inactivată prin metilare, gena p15 a blocat proliferarea celulelor analizate, la toate persoanele sănătoase investigate.

În lotul pacienților cu cardiopatie ischemică, profilul MM dat s-a înregistrat în 14,3% din cazuri (tabelul 1, figura 2), gena p15 susținând proliferarea celulelor peretelui vascular. La cei 5 pacienți (14,3%), toate moleculele de ADN (din specimenul de sânge analizat) s-au dovedit a fi metilate la nivelul promotorului genei p15.

Teoretic, profilul p15-UU, cuprinde cazurile în care gena p15 este activă în toate celulele analizate, blocând proliferarea acestora. În cadrul studiului dat, am regăsit o corespundere fenotipică în loturile analizate. Spre deosebire de rezultatele obținute la persoanele sănătoase, la care profilul p15-UU a fost înregistrat în 17 (48,6%) cazuri, în rândul pacienților cu cardiopatie ischemică, profilul p15-UU a fost identificat în 11 (31,4%) cazuri, adică mai puțin cu 17,2%.

Dacă considerăm faptul că nu doar profilul p15-UU, dar și p15-UM cuprinde subiecții la care gena p15 este activă (cel puțin în unele molecule de ADN din speciemenele analizate, în cazul profilului UM), atunci și această abordare susține ipoteza că gena p15 blochează sau diminuează proliferarea elementelor pereților vaselor sangvine, preponderent la persoanele sănătoase (35/65 versus 30/65, tabelul 2).

Tabelul 2

**Distribuția statutului metil-ADN în lotul martor și în lotul de studiu**

Profil metil-ADN	Lotul martor (n=35)	Lotul de studiu (n=35)
UU	17 (48,6%)	11 (31,4%)
UM	18 (51,4%)	19 (54,3%)
UU+UM	35	30
	65	
MM	0	5 (14,3%)

Doar în cazul profilului p15-UM, examinat separat de alte profile, nu se regăsește corespunderea directă a principiului: gena activă reprezintă preponderent status-ul fenotipic sănătos. Ponderea profilului p15-UM în lotul martor a constituit 51,4%, iar la pacienții cu cardiopatie ischemică – 54,3%. Aici, o explicație ar fi aceea că profilul electroforetic UM obținut de noi, nu reprezintă statutul unei celule în care o moleculă ADN ar fi metilată, iar cealaltă – nu, ci, mai probabil, celulele analizate, au reprezentat un amestec, în care, cele mai multe au conținut ambele molecule de ADN metilate (profilul MM, exercitând

aceleși efect de supresie a activității genei p15), iar un număr mai mic de celule au inclus fie ambele molecule de ADN nemetilate (UU), fie o moleculă ADN metilată, iar cealaltă – nemetilată (UM). Acest număr, relativ mic, de celule (UU și UM), deși cu activitate a genei p15, nu au realizat efectul fenotipic final de a menține proprietățile permissive pentru fluxul sanguin ale arterelor coronariene, la același nivel ca și la persoanele cu statut UU în majoritatea celulelor pereților vaselor sanguine.

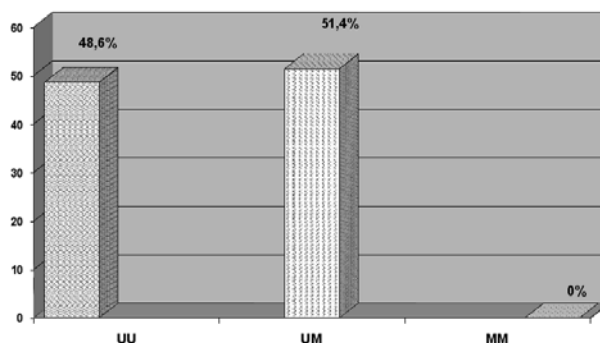


Figura 1. Distribuția profilurilor metil-ADN în lotul martor

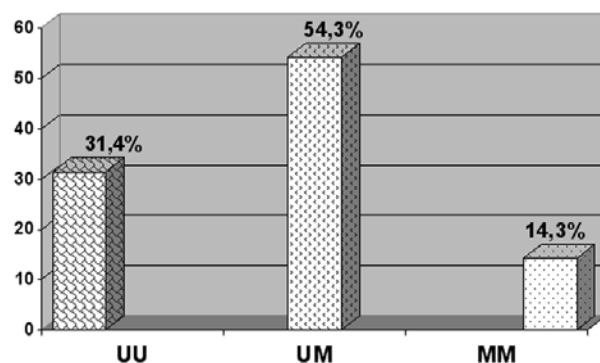


Figura 2. Distribuția profilurilor metil-ADN în lotul pacienților cu cardiopatie ischemică

Pentru a elucida cu exactitate care elemente ale pereților vaselor sangvine, dar și care este numărul celulelor în fiecare subtip UU, UM, MM din pereții arterelor coronariene, atât la persoanele fără cardiopatie ischemică, cât și la pacienții cu această maladie, este necesar de a aplica metode performante de laborator, inclusiv: coronarangiografia, analiza citogenetică, microdisecția țesuturilor și analiza profilului metilic al ADN-ului unei celule, pentru a stabili statutul metilic al fiecărei molecule de ADN ale celulei date, dar și metode alternative de evidențiere a metilării ADN, pe lângă tehnica MSP.

**Concluzii:**

1. A fost stabilită corespunderea fenotipului cardiopatie ischemică cu metilarea ADN, la nivelul promotorului genei p15 (profilul MM).

2. Celulele analizate UM, au reprezentat un amestec, în care, cele mai multe au conținut ambele

molecule de ADN metilate (MM), iar un număr mai mic de celule au inclus fie ambele molecule de ADN nemetilate (UU), fie o moleculă ADN metilată, iar cealaltă – nemetilată (UM).

#### Bibliografie

1. Caproș N. Coronary artery disease. Environmental and genetic factors. – Ch.: SC Profesional Service SRL, 2012. – 244p.
2. Istrati V., Manea D. et al. Corelația unor markeri polimorfi ai genelor enzimei de conversie a angiotensinei I și a receptorilor tip 1 ai angiotensinei 2 cu extinderea procesului aterosclerotic în arterele coronariene. *Bulet. Acad. Șt. a Moldovei. Șt. Med.* 2006, 1:64-69.
3. Congrains A., Kamide K. et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis*. 2012; 220(2): 449-55.
4. Rakyan V.K., Down T.A. et al. An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Research* 2008; 18:1518-1529.
5. Hangaishi A., Ogawa S. et al. Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4A/CDKN2, MTS2/p15INK4B, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies. *Blood* 87: 4949-4958, 1996.
6. Marx S. O., Totary-Jain H. et al. Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Restenosis *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4:104-111.
7. Lacolley P., Regnault V. et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular Research*. 2012, 95, 194–204.
8. Hillebrands J-L., Klatter F.A. et al. Blood-Borne Origin of Neointimal Smooth Muscle Cells in Transplant Arteriosclerosis. *Graft* 2002; 5; 161-163.
9. DNA Blood Mini Kit – Protocol *QIAGEN* (02/2003).
10. EpiTect Bisulfite Kit – Protocol *QIAGEN* (04/2006).
11. Herman J.G., Graff J.R. et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93(18): 9821-9826.