

Метилирование генов в CD3⁺-клетках при псориазе

В.В. Соболев¹, Е.В. Денисова³, А.Г. Соболева¹, И.М. Корсунская^{2,4}, Е.В. Чекалин¹,
А.Д. Золотаренко¹, С.А. Брускин¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва; ²Городская клиническая больница № 14 им. В.Г. Короленко, Москва; ³ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва; ⁴кафедра кожных и венерических болезней (зав. — проф. О.Ю. Олисова) лечебного ф-та ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

С помощью микрочипов Illumina проанализирован уровень метилирования генов в CD3⁺-клетках у больных псориазом относительно такового у здоровых людей. Выявлены локусы, дифференциально метилированные в CD3⁺-клетках у больных псориазом и здоровых лиц. Среди наиболее метилированных локусов в CD3⁺-клетках у больных псориазом выделяются гены киназ FRK, JAK1, AKAP7, DYRK1A, PRKCA, RPS6KA2. Четкое разделение образцов на две группы позволяет предположить, что по уровню метилирования исследованных генов в CD3⁺-клетках можно определять предрасположенность к псориазу и, вероятно, проводить его раннюю диагностику.

Ключевые слова: псориаз, метилирование, FRK, JAK1, AKAP7, DYRK1A, PRKCA, RPS6KA2

GENE METHYLATION IN CD3⁺ CELLS IN PSORIASIS

V.V.Sobolev, E.V.Denisova, A.G.Soboleva, I.M.Korsunskaya, E.V.Chekalin, A.D.Zolotarev, S.A.Bruskin

Gene methylation level in CD3⁺ cells of psoriasis patients in comparison with that in normal subjects was analyzed using Illumina microchips. Differentially methylated locuses were detected in CD3⁺ cells of psoriasis patients and normal subjects. FRK, JAK1, AKAP7, DYRK1A, PRKCA, RPS6KA2 kinase genes were detected in the most methylated locuses in CD3⁺ cells of psoriasis patients. The clear-cut separation of the samples into two groups suggested that the level of the studied genes methylation in CD3⁺ cells can serve for predicting liability to psoriasis and presumably for diagnosis of its early stages.

Key words: psoriasis, methylation, FRK, JAK1, AKAP7, DYRK1A, PRKCA, RPS6KA2

Псориаз является комплексным воспалительным заболеванием кожи, в которое вовлечены такие процессы, как гиперпролиферация кератиноцитов и их аберрантная дифференцировка, ангиогенез дермы и др. [1].

При образовании псориазных бляшек обнаруживают утолщение эпидермиса (акантоз) вследствие ускоренной пролиферации кератиноцитов, уменьшение или полное отсутствие гранулярного слоя и сохранение ядер в корнеоцитах (паракератоз) в связи с аберрантной дифференцировкой кератицитов, заметное расширение капиллярной сети в сосочковом слое дермы, что приводит к визуально наблюдаемой эритеме, а также появление плотного воспалительного инфильтрата, состоящего из кластеров CD4⁺ Т-хелперов и антигенпрезентирующих дендритных клеток (DCs) в дерме и CD8⁺ Т-клеток и нейтрофилов в эпидермисе [2].

Как известно псориаз имеет сильный генетический компонент с предполагаемой наследуемостью 66% [3]. В проявлении патологии задействованы большие группы взаимодействующих генов с измененной экспрессией [4–6], изменение определенных участков хромосом (CNVs) [7–8], локусы, ассоциированные с псориазом [9]. Однако запуск патологического про-

цесса осуществляется не только совокупным эффектом перечисленных генетических факторов, но и внешними триггерами и эпигенетическим фактором.

Важным фактором эпигенетической регуляции является метилирование ДНК.

Метилирование ДНК — важный элемент контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. Это регулируемый процесс; предполагается его важная роль в регуляции экспрессии генов [10]. Нарушение механизма метилирования ДНК существенно влияет на развитие различных патологий.

Цель работы — анализ статуса метилирования генов Т-лимфоцитов у здоровых лиц и больных псориазом до лечения.

Материалы и методы

Забор крови производили у больных псориазом и здоровых лиц (контроль) (табл. 1).

На первом этапе осуществляли бисульфидную конвертацию, используя Zymo EZ DNA Methylation Kit согласно инструкции производителя. Смесь ДНК и реактива для конверсии инкубировали 16 циклов при следующих температурных режимах: при 95°C в течение 30 с; 50°C в течение 1 ч.

Далее проводили отмывку бисульфидно-конвертированной ДНК (БКД) с помощью колонок, а БКД смывали буфером для элюции.

Сведения об авторах:

Соболев Владимир Васильевич — канд. биол. наук (sobolew_vl@mail.ru); Соболева Анна Геннадьевна — канд. биол. наук; Денисова Елена Валерьевна — врач-дерматолог; Корсунская Ирина Марковна — д-р мед. наук, профессор; Чекалин Евгений Витальевич — студент; Золотаренко Алена Дмитриевна — аспирант; Брускин Сергей Александрович — канд. биол. наук.

Т а б л и ц а 1

Характеристика пациентов

Показатель	Здоровые люди (n = 11)	Больные псориазом (n = 10)
Возраст, годы	33,1 ± 9,9	53 ± 17,2
Мужчины	5 (45,5%)	10 (100%)
Женщины	6 (54,5%)	—
Индекс PASI	—	24,6 ± 5,7

П р и м е ч а н и е. PASI — Psoriatic Area and Severity Index (индекс распространенности и тяжести псориаза).

20 мкл буфера МА1 переносили на плашку MSA4 и добавляли 4 мкл БКД. После этого добавляли 4 мкл 0,1 М NaOH. Образцы встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали 15 с при ускорении 280g для осаждения раствора на дно плашки. К образцу последовательно добавляли 68 мкл буфера RPM и 75 мкл буфера MSM. Образцы еще раз встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали в режиме 280g для осаждения раствора на дно плашки. Образцы инкубировали в Illumina Hybridization Oven в течение 24 ч при температуре 37°C.

На следующем этапе осуществляли ферментативную фрагментацию образцов ДНК. Для этого к каждому образцу БКД добавляли 50 мкл буфера FMS и встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали в режиме 280g для осаждения раствора на дно плашки. После чего образцы инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C.

Т а б л и ц а 2

Наиболее метилированные гены киназ в CD3⁺-клетках больных псориазом и здоровых лиц

Ген	Достижаемый уровень значимости (P-Value)	Скорректированный достигаемый уровень значимости (Pval Adj)	Отклонение β	Средняя β у здоровых	Средняя β у больных	Локализация, хромосома	Функция
<i>FRK</i>	1.0E-06	6.8E-05	0,153	0,313	0,159	6	Fyn-related kinase Белок относится к группе киназ типа TYR. Играет роль в подавлении роста и во время фаз G ₁ S клеточного цикла
<i>JAK1</i>	1.5E-07	2.0E-05	-0,181	0,447	0,628	1	Janus kinase 1 (JAK1) Относится к группе protein-tyrosine kinases (PTK), характеризующиеся наличием второго фосфотрансферазосвязанного домена. JAK1 вовлечена в пути передачи сигнала интерферона IFN-α, IFN-β, IFN-γ
<i>AKAP7</i>	7.0E-06	2.1E-04	-0,163	0,406	0,569	6	A kinase (PRKA) anchor protein 7 Фермент группы A-kinase anchoring protein (AKAP) присоединяется к регуляторной субъединице (RII) cAMP-зависимой протеин киназе A (PKA)
<i>DYRK1A</i>	4.6E-08	9.5E-06	-0,147	0,419	0,565	21	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) катализирует автофосфорилирование сериновых/треониновых/тирозиновых остатков, играет роль в сигнальных путях регуляции клеточной пролиферации, развитию мозга
<i>PRKCA</i>	5.1E-11	1.6E-07	-0,144	0,568	0,712	17	Protein kinase C, alpha киназа C (PKC) серин-треонин специфичных белков, активируется кальцием и вторичным мессенджером диацилглицеролом. Продукт этого гена играет роль в клеточной трансформации, клеточной адгезии
<i>RPS6KA2</i>	1.1E-08	4.0E-06	-0,143	0,538	0,682	6	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2 Белок группы RSK (ribosomal S6 kinase) сериновых/треониновых киназ. Содержит два неидентичных катализирующих домена и фосфорилирует различные субстраты, включая mitogen-activated kinase (MAPK) сигнальный путь. Активность белка контролирует клеточный рост и клеточную дифференциацию

Затем образцы фрагментированной ДНК подвергали переосаждению, для чего добавляли 100 мкл буфера РМ1, встряхивали в течение 1 мин, центрифугировали при ускорении 280g для осаждения раствора на дно плашки. Для осаждения ДНК к раствору добавляли 300 мкл 100% изопропанола, пробы перемешивали и инкубировали при температуре 4°C в течение 30 мин, после чего образцы центрифугировали при температуре 4°C в режиме 3000g в течение 30 мин. ДНК растворяли в 46 мкл буфера RA1. Образцы инкубировали в Illumina Hybridization Oven в течение 1 ч при температуре 48°C.

На следующем этапе образцы ДНК гибридизовали с BeadChips. Для этого образцы ДНК денатурировали при температуре 95°C в течение 20 мин, после этого охлаждали при комнатной температуре в течение 30 мин. 400 мкл буфера РВ2 добавляли в BeadChip Hyb Chamber, затем, используя многоканальную пипетку, добавляли 15 мкл ДНК к BeadChip.

BeadChip Hyb Chamber с образцом ДНК помещали в Illumina Hybridization Oven и инкубировали при температуре 48°C в течение 16 ч (но не более 24 ч). После гибридизации чип промывали в реагенте ХС4 (предварительно смешивали 330 мл этанола и 20 мл буфера ХС4) и высушивали при комнатной температуре.

После гибридизации проводили окрашивание микрочипов. Для этого чипы погружали в 200 мл буфера РВ1 в течение 1 мин. После этого нагревали Chamber Rack до температуры 44°C и помещали в него чип, затем последовательно добавляли 150 мкл буфера РА1 — выдерживали в течение 30 с и повторяли 5 раз, добавляли 450 мкл буфера ХС1 и инкубировали в течение 10 мин, 450 мкл буфера ХС2 и инкубировали в течение 10 мин, 200 мкл буфера ТЕМ и инкубировали в течение 15 мин, 450 мкл 95% формамида/1 мМ ЭДТА и инкубировали в течение 1 мин, 450 мкл буфера ХС3 и инкубировали в течение 1 мин. Для завершения окрашивания в резервуар с чипом последовательно добавляли 250 мкл буфера STM и инкубировали в течение 10 мин, 450 мкл буфера ХС3 и инкубировали в течение 1 мин, 250 мкл буфера АТМ и инкубировали в течение 10 мин, 450 мкл буфера ХС3 и инкубировали в течение 1 мин, 250 мкл буфера АТМ и инкубировали в течение 10 мин, 450 мкл буфера ХС3 и инкубировали в течение 1 мин, 250 мкл буфера STM и инкубировали в течение 10 мин, 450 мкл буфера ХС3 и инкубировали в течение 1 мин. После завершения окрашивания чипы промывали в 310 мл буфера РВ1 и 310 мл раствора ХС4. Чип высушивали при пониженном давлении 675 мм рт. ст. в течение 50—55 мин.

На заключительном этапе чипы сканировали при помощи HiScanSQ System («Illumina Inc.», США). Полученные изображения анализировали с помощью биоинформатических методов.

Для выделения сигналов метилирования ДНК из сканированных чипов использовали программное обеспечение GenomeStudio® (версия 2011.1; модель метилирования версия 1.9.0, «Illumina Inc.»).

Данные метилирования были получены из сырых сигналов без выделения фона или нормализации данных. Наблюдаемые значения β — это уровень метилирования для каждого CpG, которые варьируют от 0 (неметилированные, U) до 1 (полное метилирование, M) на непрерывной шкале; рассчитывали интенсивность аллелей со значениями M и U как показатель сигнала флуоресценции по формуле:

$$\beta = \frac{\text{Max}(M, 0)}{\text{Max}(M, 0) + \text{Max}(U, 0) + 100}$$

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и R методами вариационной статистики и коррекции пиков.

Результаты и обсуждение

С помощью микрочипов Illumina провели анализ статуса метилирования в геномах Т-клеток, полученных от 10 больных псориазом и 11 здоровых лиц.

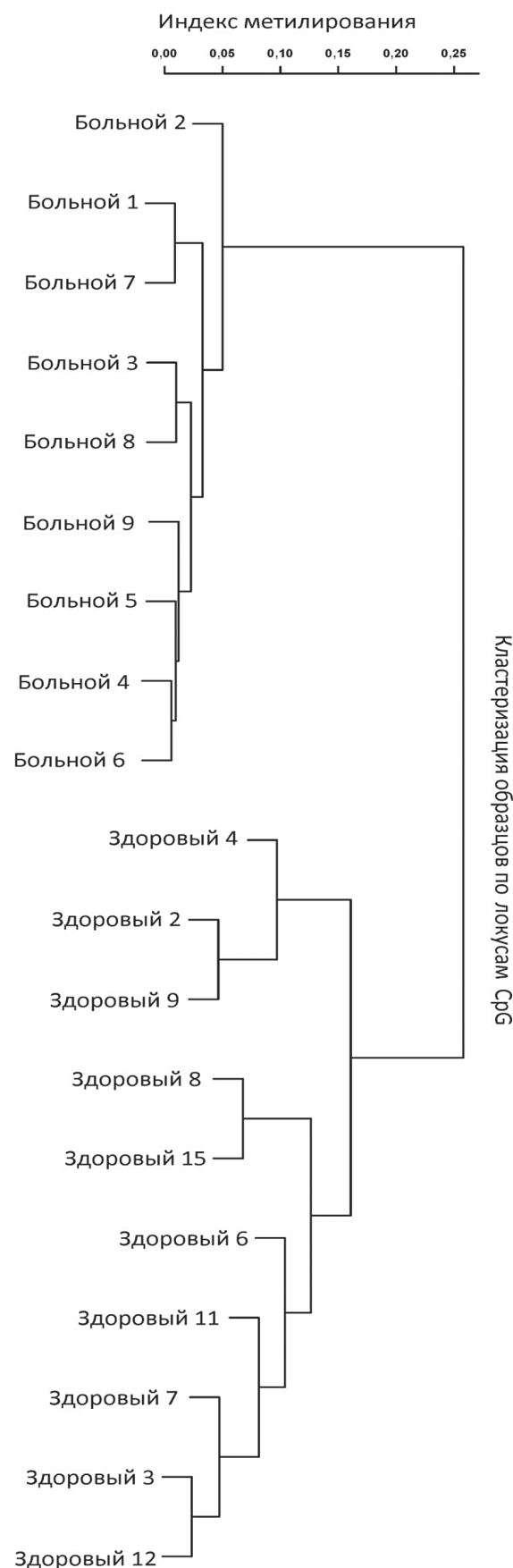


Рис. 1. Кластерный анализ образцов, полученных от больных и здоровых лиц, по уровню метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в CD3⁺-клетках.

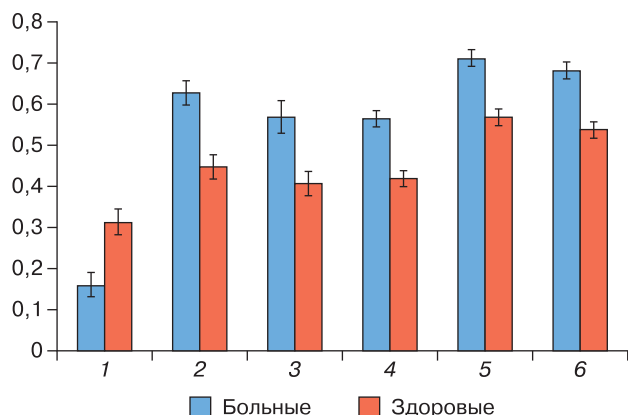


Рис. 2. Уровень (в усл. ед.) метилирования генов *FRK*(1), *JAK1*(2), *AKAP7*(3), *DYRK1A*(4), *PRKCA*(5), *RPS6KA2*(6) в $CD3^+$ -клетках у больных псориазом и у здоровых людей.

В результате выявили локусы, дифференциально метилированные в $CD3^+$ -клетках у больных псориазом и здоровых лиц. Среди наиболее метилированных локусов в $CD3^+$ -клетках у больных псориазом выделяются гены киназ *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* (табл. 2).

Чипы Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip анализируют с помощью модуля Methylation 1.9.0 Illumina GenomeStudio. Illumina Infinium HumanMethylation 450 BeadChip — новые чипы, позволяющие проанализировать более 450 000 метилированных CpG сайтов внутри человеческого генома.

Для анализа данных, полученных из модуля Methylation 1.9.0. Illumina GenomeStudio, использовали пакет IMA версии 2.13.2. IMA (Illumina Methylation Analyzer) — это пакет R/bioconductor, разработанный для автоматизации процесса анализа изменений уровня метилирования в эпигенетических исследованиях, которые используют Illumina Infinium HumanMethylation 450 BeadChip.

С помощью функции IMA.methy450R мы провели кластерный анализ образцов, полученных от здоровых и больных пациентов, в ходе которого получили разделение на две большие группы: больных и здоровых (рис. 1).

Четкое разделение образцов на две группы — больных псориазом и здоровых людей, позволяет предположить, что по уровню метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в $CD3^+$ -клетках можно определять предрасположенность к псориазу и, вероятно, проводить его раннюю диагностику.

Проведя сравнительный анализ изучаемых генов по уровню их метилирования, можно отметить, что большинство из них наиболее метилированы в $CD3^+$ -клетках у больных псориазом людей, чем у здоровых лиц (рис. 2). Однако у гена *FRK* уровень метилирования в $CD3^+$ -клетках у здоровых лиц почти в 2 раза выше, чем у больных псориазом до лечения, т.е. у больных он наиболее деметилирован и, возможно, наиболее активно транскрибируется.

Ген *FRK* относится к группе киназ типа TYR. Играет роль в подавлении роста и во время фаз G_1S

клеточного цикла, и его активная транскрипция во время псориазического процесса вполне логична, так как при псориазе происходит гиперпролиферация кератиноцитов.

Скорее всего, наблюдаемое при псориазе массовое метилирование островков CpG (неметилированных в норме) обусловлено не собственно реакцией *de novo*, а механизмом спрединга, результаты активности которого закрепляются поддерживающим метилированием в ряду поколений гиперпролиферирующих кератиноцитов. Тем не менее полученные результаты свидетельствуют о явной роли метилирования генов *FRK*, *JAK1*, *AKAP7*, *DYRK1A*, *PRKCA*, *RPS6KA2* в $CD3^+$ -клетках в развитии псориазического процесса.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» ГК 16.512.11.2246.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gudjonsson J.E., Ding J., Johnston A., Tejasvi T., Guzman A.M., Nair R.P., et al. Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *J. Invest. Dermatol.* 2010; 130(7): 1829—40. doi: 10.1038/jid.2010.36.
2. Lowes M.A., Bowcock A.M., Krueger J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature.* 2007; 445(7130): 866—73.
3. Grjibovski A.M., Olsen A.O., Magnus P., Harris J.R. Psoriasis in Norwegian twins: contribution of genetic and environmental effects. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2007; 21(10): 1337—43.
4. Stuart P.E., Nair R.P., Ellinghaus E., Ding J., Tejasvi T., Gudjonsson J.E., et al. Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2010; 42(11): 1000—4. doi: 10.1038/ng.693.
5. Huffmeier U., Uebe S., Ekici A.B., Bowes J., Giardina E., Korendowych E., et al. Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nat. Genet.* 2010; 42(11): 996—9. doi: 10.1038/ng.688.
6. Strange A., Capon F., Spencer C.C., Knight J., Weale M.E., Allen M.H., et al.; Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat. Genet.* 2010; 42(11): 985—90. doi: 10.1038/ng.694.
7. Zhang X.J., Huang W., Yang S., Sun L.D., Zhang F.Y., Zhu Q.X., et al. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat. Genet.* 2009; 41(2): 205—10. doi: 10.1038/ng.310.
8. de Cid R., Riveira-Munoz E., Zeeuwen P.L., Robarge J., Liao W., Dannhauser E.N., et al. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat. Genet.* 2009; 41(2): 211—5. doi: 10.1038/ng.313.
9. Bowcock A.M., Krueger J.G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5(9): 699—711.
10. Antequera F., Boyes J., Bird A. High levels of *de novo* methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell.* 1990; 62(3): 503—14.

Поступила 15.11.12