

**СОМАТИЧЕСКИЙ МОЗАИЦИЗМ
И СТРУКТУРНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНА *GBP3* ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**
**А.А. Слепцов¹, М.С. Назаренко^{1,2}, А.В. Зайцева², А.Н. Казанцев³, Н.Н. Бурков³,
О.Л. Барбараш³, В.П. Пузырев^{1,2}**

¹НИИ медицинской генетики ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

²ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе вариаций по числу копий участков ДНК (CNV) в гене *GBP3* в лейкоцитах и артериях пациентов с каротидным атеросклерозом. Материалом послужили парные образцы крови и атеросклеротические бляшки сонных артерий, полученные от пациентов с каротидным атеросклерозом ($n = 94$). Оценка CNV выполнялась с помощью цифровой капельной ПЦР. Показано, что у пациентов с каротидным атеросклерозом частота CNV в гене *GBP3* в лейкоцитах крови составляет 44 %. CNV-делеция в гомозиготном состоянии выявлена у 5 (5,3 %) пациентов, а в гетерозиготном — у 36 (38,3 %). CNV-амплификация в том же регионе идентифицирована у одного больного. Соматический мозаицизм при сравнении образцов ДНК тканей атеросклеротической бляшки и лейкоцитов периферической крови обнаружен у 12 (13 %) пациентов. Мозаичные CNV-делеции преобладали в лейкоцитах периферической крови, в то время как CNV-амплификации — напротив, в атеросклеротических бляшках. Соматический мозаицизм по гену *GBP3* при атеросклерозе широко представлен и имеет различное соотношение клонов, несущих тот или иной тип CNV по гену *GBP3*.

Ключевые слова: вариации числа копий участков ДНК, атеросклероз, *GBP3*, цифровая капельная ПЦР, соматический мозаицизм.

Сердечно-сосудистые заболевания представляют собой широкий спектр патологий, среди которых наибольшую медико-социальную значимость имеют ишемическая болезнь сердца

(ИБС) и острые сосудистые события (инфаркт миокарда и инсульт). В основе их развития главным образом лежит атеросклеротическое поражение артерий. Несмотря на значительные

Слепцов Алексей Анатольевич — канд. мед. наук, м.н.с. лаборатории популяционной генетики, e-mail: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Назаренко Мария Сергеевна — д-р мед. наук, рук. лаборатории популяционной генетики Научно-исследовательского института медицинской генетики ФГБНУ РАН; асс. кафедры медицинской генетики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Зайцева Анна Владимировна — студентка 5-го курса медико-биологического факультета, e-mail: zaitseval6101996@yandex.ru

Казанцев Антон Николаевич — врач-сердечно-сосудистый хирург нейрохирургического отделения, e-mail: dr.antonio.kazantsev@mail.ru

Бурков Николай Николаевич — канд. мед. наук, врач-сердечно-сосудистый хирург нейрохирургического отделения, e-mail: burkovn79@mail.ru

Барбараш Ольга Леонидовна — д-р мед. наук, проф., директор, e-mail: olb61@mail.ru

Пузырев Валерий Павлович — д-р мед. наук, проф., академик РАН, научный руководитель НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр академии наук», зав. кафедрой медицинской генетики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: p.valery@medgenetics.ru

успехи в проведении исследований ассоциаций между однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) и фенотипами (эндофенотипами) атеросклероза, в данной области по-прежнему наблюдается значительный пробел, связанный с *missing heritability*, т. е. одних SNP недостаточно для объяснения наследуемости данной патологии. Появление новых технологий расширило границы понимания структурной вариабельности генома, из которых наиболее перспективными, в плане раскрытия данного феномена, являются вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV).

Изменения структуры генома в виде однократного или многократного удвоения (дупликации, амплификации) или, напротив, удаления (делеции) определенного участка ДНК, размеры которых могут варьировать в широких диапазонах — от нескольких нуклеотидов до нескольких миллионов пар оснований, классифицируются как вариации по числу копий участков ДНК (CNV). С точки зрения влияния на фенотип выделяют как патологические структурные вариации, так и нейтральные. В ряде работ показана ассоциация CNV с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, ИБС, инфарктом миокарда [1–4]. Однако результаты работ неоднозначны, так как исследования проведены в разных популяциях с использованием неединообразного дизайна и методических подходов для идентификации CNV.

В предыдущих работах нашего исследовательского коллектива показано, что у пациентов с ИБС и метаболическим синдромом идентифицирована CNV в области гена гуанилат-связывающего белка 3 (*GBP3*) [5]. Причем у одного пациента наблюдался соматический мозаицизм: CNV-делеция обнаружена только в образцах ДНК атеросклеротической бляшки (АТБ).

Белковый продукт гена *GBP3* принадлежит к семейству гуанилат-связывающих белков, функция которых заключается в защите от вирусных и бактериальных инфекций [6]. Экспрессия кодирующих их генов происходит в ответ на выделение интерферонов. Однонуклеотидный полиморфизм rs17433780:A > G (Cys > Arg) в гене *GBP3* ранее показал ассоциацию с увеличением толщины комплекса «интима–медиа» сонных артерий [7]. Гуанилат-связывающие белки, включая *GBP3*, могут участвовать в активации макрофагов при атеросклерозе. Увеличение экспрессии гена *Gbp3* выявлено в пенистых клетках АТБ синуса аорты на поздних стадиях патологического процесса у мышей с генотипом apoE^{-/-}, находящихся на «западной» диете в течение 14 недель [8].

Соматический мозаицизм CNV является распространенным феноменом и найден во многих тканях, включая сердечно-сосудистую систему [5, 9], однако его связь с атеросклерозом неясна. В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в оценке соматического мозаицизма вариаций числа копий участков ДНК гена *GBP3* в лейкоцитах и артериях у пациентов с каротидным атеросклерозом с помощью цифровой капельной ПЦР.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследуемую группу включено 94 пациента с выраженным атеросклерозом каротидных артерий (70 мужчин и 24 женщины) славянского происхождения. Средний возраст индивидов составил $65 \pm 3,6$ года. Все пациенты имели ИБС, абдоминальное ожирение, артериальную гипертензию и гиперхолестеринемию. У 38 (34 %) лиц был сахарный диабет 2-го типа. Формирование выборок и клиническая характеристика больных проходили на базе ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово). Всеми пациентами подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Данное исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово) и НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (г. Томск).

Биоптаты АТБ получены при проведении каротидной эндартерэктомии, выполненной по поводу стеноза сонных артерий >70 %. Ткани замораживались и хранились в жидком азоте. Лейкоциты периферической крови взяты от тех же пациентов до операции.

ДНК из образцов выделяли с использованием стандартной фенол-хлороформной экстракции [10]. Оценка качества и концентрации ДНК выполнена на спектрофотометре NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США), а также при электрофорезе в 1%-м агарозном геле. ДНК доводилась до рабочей концентрации 20 нг/мкл в IDTE-буфере с повторной перепроверкой качества ДНК в 1%-м агарозном геле. CNV в гене *GBP3* идентифицировали с помощью капельной цифровой ПЦР (ddPCR) на приборе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США), согласно протоколу производителя. До проведения ПЦР ДНК обрабатывалась ферментом рестрикции MboII (NEB) 1 е.а. на 1 мкг ДНК при 37 °С в течение одного часа. Для реакции использовался TaqMan-зонд Hs03382083_cn (Thermo Fisher Scientific) на 7 интрон гена (коорди-

наты Chr1:89012376, сборка генома GRCh38). В качестве внутреннего контроля использовался TaqMan-зонд RNase P Copy Number Reference Assay (Thermo Fisher Scientific).

Данные ddPCR проанализированы с использованием программного обеспечения QuantaSoft версии 1.7.4: измерена доля положительных капель и вычислено количество копий ДНК на каплю на основе распределения Пуассона, который с точностью оценивает 95%-й доверительный интервал (ДИ) для каждой капли. В норме регистрируются две копии CNV (1,75–2,25). Гомозиготы по CNV-делеции определялись при отсутствии сигналов с TaqMan-зонда на CNV в гене *GBP3*, но при наличии сигналов с RNase P. Гетерозиготная CNV-делеция принималась при наличии 1 копии (в диапазоне 1,75–2,25), CNV-амплификация – при наличии более 2,35 копии. Среднее число капель на образец составило 18000 ± 2000 , среднее число положительных капель – 7000 ± 3000 . Все полученные сигналы не имели эффекта «дождя».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании обнаружена высокая вариабельность CNV в гене *GBP3* (табл. 1). Так, частота CNV-делеции в образцах ДНК лейкоцитов периферической крови (ЛПК) у больных составила 44 % ($n = 41$), из них в гомозиготном состоянии с 0 копиями – 5,3 % ($n = 5$), в гетерозиготном состоянии с одной копией – 38,3 % ($n = 36$). Кроме того, у одного больного в ЛПК обнаружена CNV-амплификация с тремя копиями гена *GBP3*. С другой стороны, у данного пациента не было сходной CNV-амплификации в образцах ДНК атеросклеротических бляшек. В целом частота CNV в образцах ДНК АТБ и ЛПК не различается. Так, частота CNV-делеции в гомозиготном состоянии в АТБ и ЛПК составляет 36,2 и 38,2 % соответственно ($n = 34$; $p > 0,05$).

Оценка количества копий является приближенной, т. е. с установкой пороговых значений для округления до целого числа копий, однако, принимая во внимание абсолютную квантифика-

цию цифровой ПЦР, данным методом можно оценить и мозаичные формы CNV [11, 12]. Соматический мозаицизм по образцам ДНК между ЛПК и АТБ, обнаруженный у 12 (13 %) пациентов, можно разделить на 7 групп (рис. 1, 2). В группе А обозначен пациент с CNV-амплификацией в гене *GBP3* только в ЛПК, уровень мозаицизма составляет 72 %, т. е. в 18 % клеток крови отсутствует 3-я копия анализируемого региона CNV гена *GBP3* либо гена в целом. Не исключено, что высокий показатель копий на клетку ЛПК указывает на клональный гематопоез. В группе Б два пациента с CNV-делецией в гене *GBP3* в 34–35 % клеток АТБ. В группе В три пациента, у которых, напротив, наблюдалась CNV-амплификация в АТБ, доля мозаичных клонов составила 59, 28 и 39 % соответственно.

В группе Г обозначен пациент с неопределенным уровнем CNV в пределах двух и более копий предположительно с низкой числом мозаичных клонов (26 и 19 % соответственно) в обеих тканях, преимущественно в ЛПК. Больше количество мозаичных клонов с CNV-амплификацией у пациента в группе Д (34 % для ЛПК и 50 % для АТБ). Кроме того, выявлены случаи с разнополярным соотношением CNV, т. е. CNV-делеция в части клонов ЛПК и CNV-амплификация в части клеток АТБ. Так, в группе Е два пациента с CNV-делецией в 29 и 26 % клонов ЛПК, в то время как в АТБ выявлены, напротив, как норма, так и CNV-амплификация в 38 % клеток АТБ. В ином случае, как в группе Ж, два пациента имеют очевидную CNV-делецию, однако лишь в 65 и 69 % клеток ЛПК, тогда как в АТБ наблюдается как CNV-амплификация в 25 % клеток АТБ, так и норма.

Сравнительный анализ частоты и структуры CNV по гену *GBP3* со структурными вариантами, представленными в базе данных DGV, показал отличие как по частоте, так и по структуре (рис. 3). Однако в ряде работ продемонстрированы сходные частоты CNV-делеции у индивидов в некоторых азиатских и европейских популяциях [13, 14].

Таблица 1

Частота CNV в хромосомном сегменте 1p22.2 (*GBP3*) в лейкоцитах и артериях у пациентов с каротидным атеросклерозом, n (%)

Тип ткани	Количество копий (диапазон) CNV (%)				Всего
	0 (0–0,5) копий	1 (0,51–1,5) копия	2 (1,51–2,5) копии	3 (2,51–3,5) копии	
ЛПК	5 (5,3)	36 (38,3)	52 (55,3)	1 (1,1)	94 (100)
АТБ сонных артерий	5 (5,3)	34 (36,2)	55 (58,5)	0 (0)	94 (100)

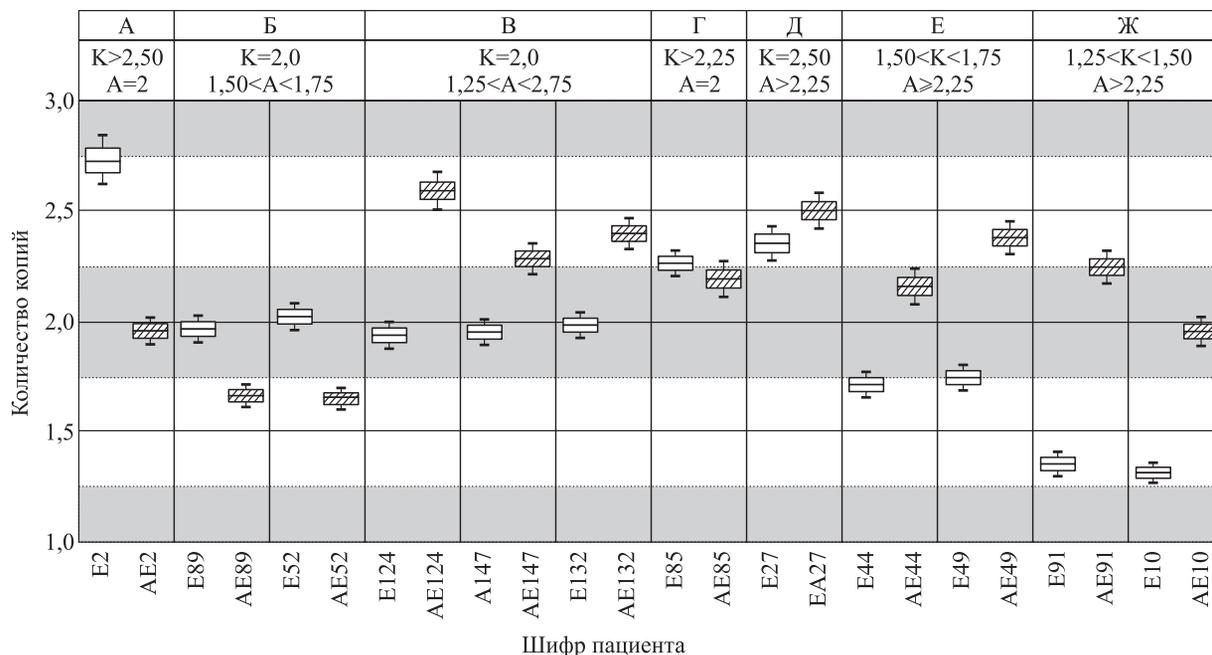


Рис. 1. Попарное сравнение CNV в хромосомном субсегменте 1p22.2 (*GBP3*) в ЛПК и АТБ каротидных артерий у пациентов. Белый «ящик с усами» – количество копий в образцах ЛПК, закрашенный – в образцах АТБ того же пациента. Закрашенное поле – интервал детекции копий CNV ($\pm 0,25$). Описание групп (А–Ж) в тексте

Оценка распространенности CNV в гене *GBP3* в различных популяциях представляется перспективной задачей, однако не менее актуальным является и анализ функциональной значимости данного варианта в различных тканях организма в норме и при патологии, поскольку белковый продукт гена *GBP3* экспрессируется повсеместно [6].

На модельных животных показано, что у мышей с генотипом *apoE^{-/-}*, получавших «западную» диету с высоким содержанием жиров, наблюдается повышенная экспрессия генов *Gbp2*, *Gbp3*, *Gbp5*, *Gbp6* и *Gbp7* в пенных клетках [8], а под действием окисленных липопротеинов низкой плотности в их макрофагах возрастает экспрессия белков *Gbp3* и *Gbp6*. Предполагается, что подобный метаболический стимул может инициировать индукцию гуанилат-связывающих белков в организме. Однако механизм связи данных белков с атерогенезом остается невыясненным.

Для установления происхождения соматического мозаицизма недостаточно идентифицировать CNV в исследуемых тканях. Так, например, оно может происходить и непосредственно в клетках крови, тогда можно говорить о клональном гематопоезе [15]. С другой стороны, CNV-делеция только в одной из тканей может свидетельствовать и о потере гетерозиготности (loss of

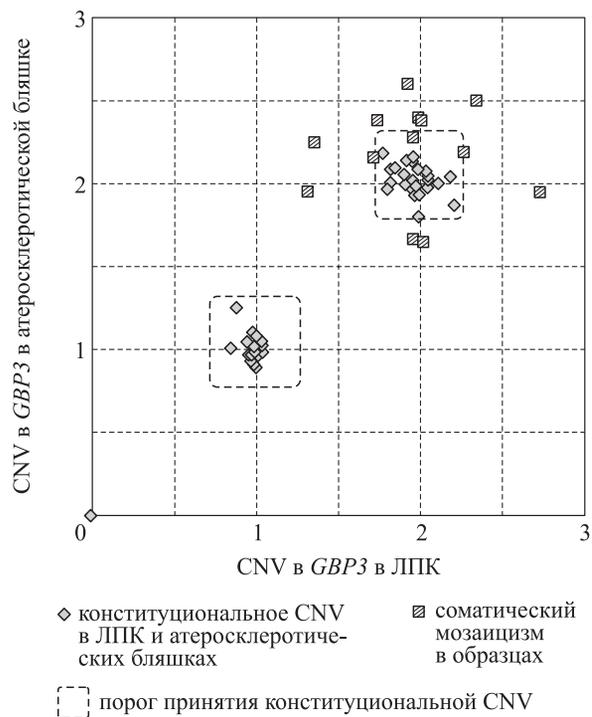


Рис. 2. Соотношение результатов ddPCR CNV гена *GBP3* в ЛПК и АТБ. В закрашенном квадрате соматические CNV

№	CNV ID ^(a)	Координаты CNV ^(b)		Размер CNV ^(b)	Частота CNV (%)			PubMed ID ^(g)
		Начало	Конец		Всего ^(г)	CNV-амп. ^(a)	CNV-дел. ^(e)	
1	^(з)	89009027	89013384	4,36	94	1 (1)	36 (38)	^(з)
2	dgv55n67	89010510	89012942	2,43	31	0 (0)	11 (35)	20364138
3	esv3586751	89010247	89012930	2,68	2504	0 (0)	865 (35)	21293372
4	esv2667765	89010225	89012941	2,72	1151	0 (0)	324 (28)	23128226
5	esv2714551	89010106	89012914	2,81	96	0 (0)	21 (22)	23290073
6	dgv62e212	89009426	89012283	2,86	873	0 (0)	16 (2)	25503493
7	dgv362n54	89011229	89012749	1,52	17421	0 (0)	137 (1)	21841781
8	dgv361n54	89011229	89012655	1,43	17421	2 (0)	0 (0)	21841781
9	dgv363n54	89011781	89012749	0,97	17421	0 (0)	78 (0)	21841781
10	esv22437	89010756	89012843	2,11	40	37 (93)	0 (0)	19812545
11	esv3565560	89009956	89013002	3,07	767	0 (0)	1 (0)	23714750
12	nsv10361	89010060	89013363	3,30	51	26 (84)	0 (0)	18304495
13	nsv546785	88994245	89010744	16,50	17421	0 (0)	1 (0)	21841781
14	nsv546786	89010744	89012749	2,01	17421	0 (0)	19 (0)	21841781
15	nsv546793	89011781	89013290	1,51	17421	0 (0)	1 (0)	21841781
16	nsv546794	89011781	89014075	2,30	17421	0 (0)	1 (0)	21841781
17	nsv946055	89010812	89014409	3,60	97	10 (10)	0 (0)	23825009
18	nsv819062	89010401	89013391	2,99	2	1 (50)	0 (0)	19587683
19	nsv1071104	89010116	89013117	3,00	1	0 (0)	1 (100)	25765185
20	nsv820541	89010510	89012942	2,43	1	0 (0)	1 (100)	20802225

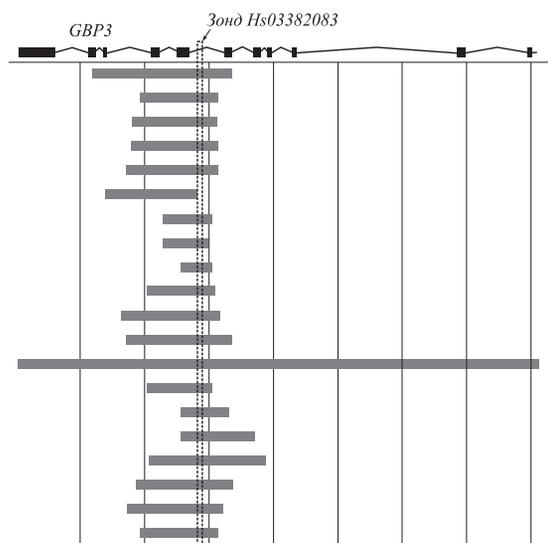


Рис. 3. Частоты CNV в области 7-го интрона гена *GBP3* в работах, представленных в базе данных по геномным вариациям (DGV, поиск выполнен 19 ноября 2019 г.), по сравнению с полученными в ходе настоящего исследования. а – координаты согласно сборке генома hg37; б – CNV ID – идентификационный номер CNV; в – размер CNV, тыс. п.о.; г – всего исследованных человек; д – CNV-амплификация; е – CNV-делеции; ж – идентификационный номер источника в базе данных PubMed; з – CNV, идентифицированная в настоящем исследовании

heterozygosity). В настоящем исследовании мы идентифицировали различные варианты соматического мозаицизма при атеросклерозе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Соматический мозаицизм по гену *GBP3* при атеросклерозе широко представлен и имеет различное соотношение клонов, несущих тот или иной тип CNV по гену *GBP3*. Мозаичные CNV-делеции преимущественно преобладают в ЛПК, в то время как CNV-амплификации – напротив, в АТБ. Не исключено, что в контексте соматического мозаицизма различные CNV в гене *GBP3* могут быть связаны с атерогенезом и/или с особенностями его течения. В перспективе определение структуры CNV и механизмов связи модифицированных тем самым изоформ *GBP3* с течением атеросклероза является актуальным.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Shia W.-C., Ku T.H., Tsao Y.M. et al. Genetic copy number variants in myocardial infarction patients with hyperlipidemia // BMC Genomics. 2011. Vol. 12, Suppl 3. P. S23.
- Marques F.Z., Prestes P.R., Pinheiro L.B. et al. Measurement of absolute copy number variation reveals association with essential hypertension // BMC Med. Genomics. 2014. Vol. 7. P. 44.
- Boon-Peng H., Mat Jusoh J.A., Marshall C.R. et al. Rare copy number variants identified suggest the regulating pathways in hypertension-related left ventricular hypertrophy // PLoS One. 2016. Vol. 11, N 3. P. e0148755.
- Glessner J.T. et al. CNV association of diverse clinical phenotypes from eMERGE reveals novel disease biology underlying cardiovascular disease // Int. J. Cardiol. 2019. doi: DOI10.1016/j.ijcard.2019.07.058
- Nazarenko M.S., Sleptcov A.A., Lebedev I.N. et al. Genomic structural variations for cardiovascular and metabolic comorbidity // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 41268.
- Tretina K., Park E.S., Maminska A., MacMicking J.D. Interferon-induced guanylate-binding proteins: Guardians of host defense in health and disease // J. Exp. Med. 2019. Vol. 216, N 3. P. 482–500.
- Xie G., Myint P.K., Voora D. et al. Genome-wide association study on progression of carotid artery intima media thickness over 10 years in a Chinese cohort // Atherosclerosis. 2015. Vol. 243, N 1. P. 30–37.
- Goo Y.-H., Son S.H., Yechoor V.K., Paul A. Transcriptional profiling of foam cells reveals induction of guanylate-binding proteins following Western diet acceleration of atherosclerosis in the absence of global changes in inflammation // J. Am. Heart Assoc. Vol. 5, N 4. P. e002663.
- Forsberg L.A., Gisselsson D., Dumanski J.P. Mosaicism in health and disease - clones picking up speed // Nat. Rev. Genet. 2017. Vol. 18, N 2. P. 128–142.
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3 vol. N.Y.: Cold Spring Harbor, 2001.
- Zhou B., Haney M.S., Zhu X. et al. Detection and quantification of mosaic genomic DNA variation in

- primary somatic tissues using ddPCR: Analysis of mosaic transposable-element insertions, copy-number variants, and single-nucleotide variants // *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1768. P. 173–190.
12. **Fujiki K., Shirahige K., Kaur M. et al.** Mosaic ratio quantification of isochromosome 12p in Pallister-Killian syndrome using droplet digital PCR // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2016. Vol. 4, N 3. P. 257–261.
 13. **Mills R.E., Walter K., Stewart C. et al.** Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing // *Nature.* 2011. Vol. 470, N 7332. P. 59–65.
 14. **Park H., Kim J.I., Ju Y.S. et al.** Discovery of common Asian copy number variants using integrated high-resolution array CGH and massively parallel DNA sequencing // *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42, N 5. P. 400–405.
 15. **Steensma D.P., Bejar R., Jaiswal S. et al.** Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes // *Blood.* 2015. Vol. 126, N 1. P. 9–16.

SOMATIC MOSAICISM AND STRUCTURAL VARIABILITY OF GBP3 GENE IN ATHEROSCLEROSIS

**A.A. Sleptsov¹, M.S. Nazarenko^{1,2}, A.V. Zaitseva², A.N. Kazantsev³, N.N. Burkov³,
O.L. Barbarash³, V.P. Puzyrev^{1,2}**

¹*Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center of RAS
634050, Tomsk, Naberezhnaya reki Ushayky, 10*

²*Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia
634050, Tomsk, Moskovsky path, 2*

³*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Kemerovo, Sosnovy blvd., 6*

The goal of the study was to analyze copy number variation (CNV) in the GBP3 gene between white blood cells and atherosclerotic plaques of patients with carotid atherosclerosis. The material was both blood samples and atherosclerotic plaques obtained from the same patients with carotid atherosclerosis ($n = 94$). Assessment of CNV was performed using digital droplet PCR. As a result, it was shown that among 94 patients with carotid atherosclerosis, the CNV frequency was 44 % in the GBP3 gene in leukocytes. Deletion was detected in 5 (5.3 %) patients, and loss in 36 (38.3 %) patients. The gain was identified in one patient. Somatic mosaicism was found in 12 (13 %) of patients, comparing DNA samples of atherosclerotic plaque tissue and white blood cells from the same patients. Mosaic copy number losses predominantly were detected in white blood cells, in contrast mosaic copy number gains were identified in atherosclerotic plaques. Somatic mosaicism of the GBP3 gene is widespread in atherosclerosis. Different ratio of mosaic clones carrying certain type of CNV in GBP3 gene is presented.

Keywords: copy number variation, atherosclerosis, GBP3, ddPCR, somatic mosaicism.

*Статья поступила 21 октября 2019 г.
Принята к печати 15 декабря 2019 г.*