

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21:616.13-004.6

**ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
В ОБЛАСТИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК ЧЕЛОВЕКА**

© 2011 г. М. С. Назаренко^{1, 2*}, В. П. Пузырев^{1, 2}, И. Н. Лебедев^{1, 2}, А. В. Фролов³,
О. Л. Барбараш³, Л. С. Барбараш³

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

²Сибирский государственный медицинский университет Росздрава, Томск, 634050

³Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, 650002

Поступила в редакцию 15.10.2010 г.

Принята к печати 22.11.2010 г.

Мутационная концепция атерогенеза, подтверждаемая “потерей гетерозиготности” и нестабильностью микросателлитов в области атеросклеротических бляшек, дополняется данными об эпигенетической вариабельности локусов, вовлеченных в патологический процесс. Однако только недавно появилась возможность крупномасштабного анализа эпигенетических модификаций генома. В представленной работе с использованием микрочипа на платформе GoldenGate Methylation Cancer Panel I (“Illumina”, США) впервые определен уровень метилирования 1505 CpG-сайтов в 807 генах в образцах атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии человека. Установлено дифференциальное метилирование 103 (7%) CpG-сайтов 90 (11%) генов. Наиболее существенные различия в уровне метилирования характерны для сайта, расположенного в CpG-островке импринтированного гена *H19*. В базе данных по генетической эпидемиологии человека (HuGENet) 10 из 90 генов, дифференциальное метилирование которых показано в нашей работе (*ICAM1*, *GSTM1*, *IGFBP1*, *POMC*, *APOA1*, *IL1RN*, *INS*, *LTA*, *MMP3*, *THBS2*), отнесены к генам, предположительно связанным с широким спектром патологий, составляющих сердечно-сосудистый континуум.

Ключевые слова: метилирование ДНК, атерогенез, микрочип “GoldenGate Methylation Cancer Panel I”.

METHYLATION PROFILING OF HUMAN ATHEROSCLEROTIC PLAQUES, by M. S. Nazarenko^{1, 2*}, V. P. Puzyrev^{1, 2}, I. N. Lebedev^{1, 2}, A. V. Frolov³, O. L. Barbarash³, L. S. Barbarash³ (¹Research Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia; *e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru; ²Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia; ³Research Institute for Complex Studying of Cardiovascular Diseases, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, 650002 Russia). Somatic mutation theory of atherogenesis proved by alterations at the DNA level such as “loss of heterozygosity” and microsatellite instability in atherosclerotic plaque is complemented by the data of epigenetic variability of genetic loci involved in the pathological process. However, only recently large-scale analysis of epigenetic modifications in the human genome became possible. For the first time quantitative microarray-based methylation profiling of 1505 CpG-sites across 807 genes was performed in atherosclerotic aorta and carotid artery wall lesions using the GoldenGate Methylation Cancer Panel I (“Illumina”, USA). One hundred and three (7%) CpG-sites in 90 (11%) genes were differentially methylated between tissue samples. The most pronounced differences in DNA methylation levels were registered for a site which is located in CpG-island of imprinted gene *H19*. By comparing 90 genes that were differentially methylated between tissue samples in our study, 10 genes (*ICAM1*, *GSTM1*, *IGFBP1*, *POMC*, *APOA1*, *IL1RN*, *INS*, *LTA*, *MMP3*, *THBS2*) were overlapped with data in Human Genome Epidemiology Network (HuGENet), in which they were identified as candidates for cardiovascular disease continuum.

Keywords: DNA methylation, atherogenesis, microarray “GoldenGate Methylation Cancer Panel I”.

Большое количество преимущественно экспериментальных исследований свидетельствует в пользу соматической мутационной концепции формирования атеросклеротических бляшек как морфологического субстрата атеросклероза [1]. Од-

нако изменение генетического материала, обусловленное единичными мутациями и геномной нестабильностью, при атеросклерозе изучено менее детально, чем при злокачественных новообразованиях [2]. В частности, стандартным цитогенетическим и молекулярно-цитогенетическим методами в клет-

* Эл. почта: maria.nazarenko@medgenetics.ru

ках атеросклеротических бляшек выявлены разнообразные аномалии кариотипа [3, 4]. Причем частоты некоторых хромосомных aberrаций были достаточно существенными, чтобы соответствовать цитогенетическому критерию клональности [3]. В области атеросклеротических бляшек обнаружены также микросателлитная нестабильность, “потеря гетерозиготности”, разрывы и модификации цепи ДНК [5–8].

Мутационный процесс не ограничен герминативными изменениями. Изучение гена ингибитора G-белка (*GNAI2B*) при идиопатической желудочковой тахикардии [9], гена коннексина 40 (*GJA5*) при идиопатической фибрилляции предсердий [10] и гена BCL2-антагониста киллера 1 (*BAK1*) при анаэризм абдоминальной части аорты [11, 12] показывает, что соматический мозаицизм в органах сердечно-сосудистой системы распространен более широко, чем предполагали ранее.

Однако соматические мутации не могут, по всей видимости, ограничиваться исключительно структурными нарушениями генома. Вполне вероятно, что некоторая доля соматических изменений имеет эпигенетическую составляющую, представленную метилированием ДНК и ковалентными модификациями гистонов. Метилирование цитозинового основания в CpG-богатых районах генома приводит к подавлению экспрессии генов. Нуклеотидная последовательность генов при этом не изменяется, однако эпигенетическое состояние наследуется дочерними клетками.

Наиболее существенные эпигенетические события происходят во время репрограммирования генома в ходе гаметогенеза и раннего эмбриогенеза. В процессе эмбрионального развития существует короткий период, когда в определенных тканях временно инактивированы механизмы репарации ДНК, что может приводить к накоплению нескольких генетических вариантов, включая мутации и полиморфизмы. Гипотеза о связи мутационной изменчивости с нарушениями фундаментальных механизмов эпигенетической регуляции ранних этапов онтогенеза обсуждалась ранее [13].

Кроме детерминированного и точно управляемого репрограммирования генома в процессе развития организма, возможно появление случайных эпигенетических изменений при старении или в ответ на влияние факторов внешней среды. Эпигенетическая вариабельность вносит вклад в фенотипические различия, а также играет важную роль в формировании подверженности к широко распространенным заболеваниям. Это наиболее очевидно в случае злокачественных новообразований, когда наблюдается гиперметилирование CpG-богатых участков генов-супрессоров опухолевого роста, генов, участвующих в репарации ДНК, контроле клеточного цикла, апоптоза и т.п. При канцерогенезе выключение гена-супрессора происходит не только посредством ге-

нетических механизмов, как при “потере гетерозиготности”, но и эпигенетических — метилирования промотора и репрессии транскрипции.

Изучение эпигенетических изменений, лежащих в основе широко распространенных заболеваний человека, в том числе сердечно-сосудистых, — одно из наиболее активно развиваемых направлений современной генетики [14]. Однако изучению роли метилирования ДНК отдельных генов в тканях сосудистой стенки при развитии атеросклероза посвящено относительно небольшое число экспериментальных работ *in vivo* [15–18]. Не исключено, что определенная степень вариабельности эпигенетических модификаций в тканях сосудистой стенки может вносить вклад в формирование предрасположенности к атеросклерозу.

Использование технологий микрочипов позволяет одновременно проанализировать статус метилирования отдельных CpG-сайтов большого числа генов. Цель настоящей работы — сравнительный анализ уровня метилирования 1505 CpG-сайтов 807 генов в образцах атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии. Выбор микрочипа на платформе GoldenGate Methylation Cancer Panel I (“Illumina”, США) был обусловлен рядом причин. Панель включает основные классы генов, которые вовлечены в канцерогенез, в том числе гены-супрессоры опухолей, онкогены, гены репарации ДНК, контроля клеточного цикла, дифференцировки, апоптоза, а также X-сцепленные и импринтированные гены. Кроме того, существенная доля тестируемых CpG-динуклеотидов располагается в регуляторных участках генов и является функционально значимой [19].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проведение представленной работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН. Обследовано двое больных. Больной А., мужчина 54 лет, русский. Основной диагноз: атеросклероз с окклюзией подвздошных артерий слева, стеноз справа, окклюзия бедренных и большеберцовых артерий с обеих сторон, хроническая ишемия ПА. Больной Ч., мужчина 78 лет, русский. Основной диагноз: атеросклероз со стенозом правой внутренней сонной артерии 80%, окклюзия левой внутренней сонной артерии, резидуальный период острого нарушения мозгового кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии, легкий правосторонний гемипарез. Фоновая патология у обоих больных представлена гипертонической болезнью.

Биоптаты тканей аорты и сонной артерии получены в результате бифуркационного аорто-бедренного шунтирования и эндартерэктомии из сонных артерий справа соответственно. Каждый образец был осмотрен и тщательно очищен от масс кальциатов,

Дифференциально метилированные CpG-сайты ($\Delta\beta > 0.34$ и $p < 0.00001$) в атеросклеротических бляшках аорты и сонной артерии

Ген	CpG-сайт*	β , сонная артерия	β , аорта	Сонная артерия vs. аорта		Продукт гена
				Diff Score	$\Delta\beta$	
<i>H19</i>	cg15886040	0.66	0.02	374.34	0.64	H19, некодирующая РНК на хромосоме 11
<i>TBX1</i>	cg03402455	0.54	0.14	102.21	0.40	Белок TBX1, изоформа А
<i>HOXA11</i>	cg17466857	0.06	0.71	-371.33	-0.65	Гомеобоксный белок A11
	cg08479590	0.13	0.53	-102.16	-0.40	
<i>HOXA5</i>	cg05640017	0.13	0.66	-206.87	-0.53	Гомеобоксный белок A5
<i>KRAS</i>	cg26129757	0.03	0.51	-181.51	-0.48	Белок c-K-ras2
<i>MAP3K1</i>	cg00468724	0.01	0.38	-116.91	-0.37	Киназа 1 киназы митоген-активированной протеинкиназы
<i>AXIN1</i>	cg24498552	0.31	0.84	-206.98	-0.53	Аксин 1
<i>AATK</i>	cg02979355	0.99	0.57	374.34	0.42	Апоптоз-ассоциированная тирозинкиназа
<i>GSTM1</i>	cg17452244	0.83	0.42	109.49	0.41	Глутатион-S-трансфераза M1, изоформа 2
<i>STK23</i>	cg02910024	0.63	0.28	72.45	0.35	Серин/треонин-киназа 23

* Локализация CpG-сайта, согласно аннотации производителя микрочипа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL9183>.

Примечание: β – уровень метилирования CpG-сайта; Diff Score – достоверность различий в уровне метилирования CpG-сайта; $\Delta\beta$ – разность в уровнях метилирования между CpG-сайтом сонной артерии и аорты.

отложений липидов и тромбов, отмыт в стерильном физиологическом растворе с целью удаления сгустков крови. Сразу после оперативного вмешательства проведена макродиссекция интимы от подлежащего медиального слоя атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии. Образцы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C вплоть до исследования.

Геномную ДНК выделяли из тканей сосудистой стенки после стандартной обработки протеиназой К в течение ночи при 37°C и экстракции смесью фенол–хлороформ. Бисульфитная конверсия ДНК выполнена при помощи набора “EZ DNA Methylation Kit” (“Zymo Research”, США). Метилирование ДНК анализировали с использованием реагентов “Illumina” и в соответствии с протоколом производителя [19]. Для каждого CpG-сайта использовали четыре пробы: два аллель-специфичных и два локус-специфичных праймера, соответствующих метилированному или неметилированному состоянию цитозина. После проведения гибридизации интенсивность флуоресценции сигналов измеряли с помощью сканера BeadArray Reader (“Illumina”, США).

Полученные данные анализировали с помощью пакета программ BeadStudio (“Illumina”). Оценивали уровень метилирования (β) каждого CpG-сайта, который может варьировать от 0 (образец содержит только неметилированные аллели) до 1 (все аллели метилированные). Параметр вычисляли по отношению флуоресцентного сигнала от метилированного CpG-динуклеотида (M) к сумме флуоресцентных сигналов от неметилированного (U) и метилирован-

ного CpG-динуклеотидов. При анализе дифференциального метилирования вычисляли параметры Diff Score (достоверность различий в уровне метилирования CpG-сайта) и $\Delta\beta$ (разность в уровнях метилирования CpG-сайтов). Для функциональной аннотации генов использовали программу WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit [20]. Классификация категорий генов соответствует классификации, предлагаемой в базе данных Gene Ontology (GO) [<http://www.geneontology.org>]. В расчетах использовали поправку на множественность сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение образцов ДНК, выделенных из тканей атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии, показало, что из 1505 CpG-сайтов 807 генов микрочипа дифференциально метилированными оказались 103 (7%) CpG-сайта в 90 (11%) генах ($\text{DiffScore} > |20|$; $p < 0.01$), из них три гена (*PLS3*, *STK23*, *TIMP1*) расположены на X-хромосоме, а остальные – на аутосомах.

В ряде работ, выполненных с использованием микрочипов Illumina GoldenGate Methylation, для отбора дифференциально метилированных локусов генома использовали более строгие критерии [19]: CpG-сайты с параметром $\Delta\beta > 0.34$ (различие в уровне метилирования более 34%) и $p < 0.00001$ (двусторонний t -тест, включая фактор коррекции False Discovery Rate). С учетом этих критериев можно говорить о дифференциальном метилировании 11 CpG-сайтов в 10 генах (таблица). Например, в тканях аорты в отличие от сонной артерии отмечено

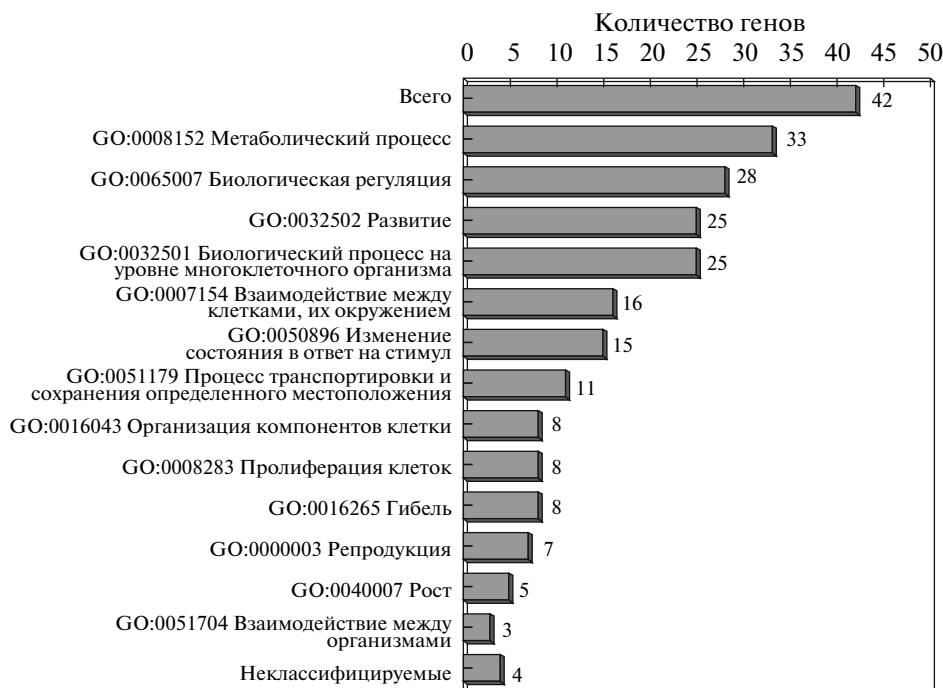


Рис. 1. Функциональная аннотация дифференциально метилированных генов в атеросклеротических бляшках аорты и сонной артерии: категории биологических процессов.

гипометилирование CpG-сайтов генов *H19* и белка *TBX1* (*TBX1*), но гиперметилирование генов гомеобоксных белков (*HOXA11* и *HOXA5*), белка с-K-ras2 (*KRAS*) и киназы 1 киназы митоген-активированной протеинкиназы (*MAP3K1*). Наиболее существенные различия в уровне метилирования выявлены в CpG-сайте, расположенном на расстоянии -541 п.н. от старта транскрипции импринтированного гена *H19*: в тканях аорты — 0.02, в сонной артерии — 0.66.

Из 103 дифференциально метилированных сайтов только 50 (49%) локализованы в CpG-островках 42 генов белков, связанных с различными биологическими процессами (рис. 1). Основные категории молекулярных функций белковых продуктов генов включают связывание белков, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, а также активность трансфераз и регуляторов транскрипции (рис. 2).

Сравнение списков генов, дифференциально метилированных в отдельных CpG-сайтах, локализованных в CpG-островках, со всеми генами, входящими в состав микрочипа, показало, что среди них наиболее представлены гены, продукты которых вовлечены в биологические процессы следующих категорий: GO:0032446 — модификация белков через конъюгацию малых белков; GO:0070647 — модификация белков через конъюгацию или удаление малых белков; GO:0016567 — убиквитинирование белков (*TSG101*, *DDB2*, *AXIN1*, *MAP3K1*; $p = 0.034$), а также GO:0048706 — эмбриональное развитие скелета (*TBX1*, *HOXA9*, *COL1A1*, *HOXB2*, *HOXA5*; $p = 0.034$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эпигенетическая вариабельность локусов, вовлеченных в атерогенез, остается относительно малоизученной. В тканях сосудистой стенки *in vivo* оценивали статус метилирования лишь отдельных генов, таких как гены рецептора эстрогена (*ER α* и *ER β*), транспортера 3 монокарбоксилата (*MCT3*) и ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI2*) [15–18].

В настоящей работе впервые установлено дифференциальное метилирование 103 CpG-сайтов в образцах атеросклеротических бляшек аорты и сонной артерии. Из этих 103 CpG-сайтов 50 локализованы в CpG-островках 42 генов. В ряде работ показано, что профиль транскрипции генов в отдельных клетках и тканях артерий, вен, а также в области атеросклеротических бляшек, расположенных в различных районах сосудистого русла, не одинаков [21–24]. Возможно, что регион-специфичный статус метилирования ДНК может объяснить данные функциональные различия.

Наиболее существенно различался уровень метилирования сайта, расположенного в CpG-островке гена *H19*. Локус *H19* входит в кластер импринтированных генов, локализованных в 11p15.5. В 5'-районе гена находятся дифференциально метилированные CTCF-связывающие сайты (DMR), которые контролируют импринтинг и экспрессию генов *IGF2* и *H19*. Нарушение статуса метилирования DMR *H19* регистрируется в злокачественных



Рис. 2. Функциональная аннотация дифференциально метилированных генов в атеросклеротических бляшках аорты и сонной артерии: категории молекулярных функций.

новообразованиях различного типа [25]. В гладкомышечных клетках из области атеросклеротических бляшек человека выявлена реэкспрессия *H19* [26]. Обработка культуры гладкомышечных клеток пупочной вены гомоцистеином в высоких концентрациях приводила к гипометилированию шести CTCF-связывающих сайтов в DMR *H19*. При повышении концентрации гомоцистеина наблюдалось увеличение экспрессии *H19* и *CTCF*, но снижение уровня мРНК и белка IGF2 [27].

Особый интерес представляет тот факт, что *H19* относится к группе импринтированных генов. По сравнению с другими локусами эти гены чаще подвержены нарушениям, что приводит к существенным последствиям, поскольку они экспрессируются только с одного из родительских аллелей. Данные гены считаются наиболее вероятными кандидатами на роль генов широко распространенных заболеваний, “программируемых” на ранних этапах онтогенеза, включая сердечно-сосудистую патологию [28].

Сравнение генов, дифференциально метилированных в двух образцах атеросклеротических бляшек, и генов, представленных в Базе данных по генетической эпидемиологии человека (HuGENet), показало, что 10 генов (*ICAM1*, *GSTM1*, *IGFBP1*, *POMC*, *APOA1*, *IL1RN*, *INS*, *LTA*, *MMP3*, *THBS2*) вовлечены в патогенез нескольких заболеваний одновременно (коронарная болезнь, артериальная гипертензия, ожирение), ассоциированы с аномальным уровнем липидов в крови и снижением

чувствительности тканей к инсулину [29]. Эта группа заболеваний и факторов их риска обозначена как “континуум сердечно-сосудистых болезней” [30] и отнесена к синтропиям (сочетаниям нескольких патологий у одного индивида). Набор локализованных во всем пространстве генома человека генов, белковые продукты которых взаимодействуют друг с другом, корегулируемых и вовлеченных в общий для данной синтропии метаболический путь, получил название синтропных генов [31, 32]. Логично полагать, что варибельность эпигенетических модификаций таких общих (синтропных) генов может быть важным фактором атеросклеротического процесса и его клинических проявлений. С другой стороны, не исключено, что интеграция генетической и эпигенетической информации существенно поможет в интерпретации результатов полногеномных исследований ассоциаций, когда полиморфные сайты расположены в межгенных районах, на значительном расстоянии от транскрибируемой последовательности и не имеют явного функционального значения [33].

В изучении атерогенеза существует несколько методических проблем. Во-первых, необходимо определить эпигеном клеток каждого типа, участвующих в патологическом процессе (по крайней мере, эндотелиальных и гладкомышечных клеток, макрофагов и клеток иммунной системы), на разных стадиях заболевания. Поскольку уровень метилирования CpG-сайтов измеряют одновременно во всех клетках образца, макродиссекция тканей сосу-

дистой стенки способствует уменьшению клеточной гетерогенности. Однако в идеале необходимо анализировать клетки одного типа, выделенные с помощью лазерной микродиссекции. В то же время, этот подход связан с небольшим количеством получаемых клеток и, соответственно, с низким выходом ДНК, что ограничивает набор методов выявления собственно эпигенетических различий. Еще большие трудности возникнут при экспериментальной проверке предположения о значительной доле эпигенетического мозаицизма в клетках сосудистой стенки, как и в других тканях [34].

Во-вторых, метилирование ДНК влияет на активность гена. Согласно пороговым моделям, репрессия транскрипции достигается при определенной плотности метилирования в CpG-островках [35]. Хотя использование микрочипа GoldenGate Methylation Cancer Panel I позволяет определить уровень метилирования нескольких отдельных сайтов в гене, эти сайты преимущественно (69%) отобраны по локализации в CpG-островках и, следовательно, по влиянию на экспрессию.

Механизм, объясняющий наследственную передачу соматического мозаичного фенотипа, который чаще возникает спорадически, хотя возможны и семейные случаи, предложен в 1991 г. Harple [36]. В отношении этого феномена используется термин “парадоминантное наследование”, под которым понимают комбинацию унаследованных генетических изменений с соматическим повреждением тех же генов [36]. Иными словами, в гетерозиготном состоянии мутации передаются через поколения, поскольку у их носителей отсутствуют фенотипические проявления, а гомозиготные мутации летальны. Признак проявляется только при “потере гетерозиготности” в некоторой части соматических клеток. Основное отличие между этой формой “потери гетерозиготности” и другими, ассоциированными, в частности, со злокачественными новообразованиями, состоит в том, что “потеря гетерозиготности” происходит на ранних этапах онтогенеза, в результате возникает новый клон клеток, который, в свою очередь, дает начало мозаичному участку ткани. Недавно получены доказательства парадоминантного наследования локальных структурных нарушений, которые возникают в ходе васкулогенеза, ангиогенеза и лимфангиогенеза [37]. Можно предположить, что данный феномен присущ многим патологическим процессам, в том числе и таким широко распространенным заболеваниям сердечно-сосудистой системы, как ишемическая болезнь сердца, нарушение мозгового и периферического кровообращения, в основе которых лежит атеросклероз сосудов соответствующих локализаций.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам компании ЗАО “Геноаналитика” за проведение анализа на микрочипах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00674) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (Госконтракт 02.740.11.0284).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Flora S., Izzotti A. 2007. Mutagenesis and cardiovascular diseases. Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutat. Res.* **621(1–2)**, 5–17.
2. Andreassi M.G., Botto N. 2003. Genetic instability, DNA damage and atherosclerosis. *Cell Cycle.* **2(3)**, 224–227.
3. Casalone R., Granata P., Minelli E., et al. 1991. Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. *Hum. Genet.* **87(2)**, 139–143.
4. Maturri L., Cazzullo A., Turconi P., et al. 2001. Chromosomal alterations in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* **154(3)**, 755–761.
5. Hatzistamou J., Kiaris H., Ergazaki M., Spandidos D.A. 1996. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225(1)**, 186–190.
6. McCaffrey T.A., Du B., Consigli S., et al. 1997. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J. Clin. Invest.* **100(9)**, 2182–2188.
7. Flouris G.A., Arvanitis D.A., Parissis J.T., et al. 2000. Loss of heterozygosity in DNA mismatch repair genes in human atherosclerotic plaques. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **4(1)**, 62–65.
8. Arvanitis D.A., Flouris G.A., Spandidos D.A. 2005. Genomic rearrangements on *VCAM1*, *SELE*, *APEG1* and *AIF1* loci in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **9(1)**, 153–159.
9. Lerman B.B., Dong B., Stein K.M., et al. 1998. Right ventricular outflow tract tachycardia due to a somatic cell mutation in G protein subunit alpha2. *J. Clin. Invest.* **101(12)**, 2862–2868.
10. Gollob M.H., Jones D.L., Krahn A.D., et al. 2006. Somatic mutations in the connexin 40 gene (*GJA5*) in atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.* **354(25)**, 2677–2688.
11. Gottlieb B., Chalifour L.E., Mitmaker B., et al. 2009. *BAK1* gene variation and abdominal aortic aneurysms. *Hum. Mutat.* **30(7)**, 1043–1047.
12. Hatchwell E. 2010. *BAK1* gene variation and abdominal aortic aneurysms-variants are likely due to sequencing of a processed gene on chromosome 20. *Hum. Mutat.* **31(1)**, 108–109; author reply 110–111.
13. Лебедев И.Н., Никитина Т.В., Токарева А.Г. и др. 2006. Патогенетические эффекты нестабильности эмбрионального генома в развитии человека. *Информационный вестник ВОГиС.* **10(3)**, 520–530.
14. Turunen M.P., Aavik E., Yla-Herttuala S. 2009. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790(9)**, 886–891.
15. Post W.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Wilhide C.C., et al. 1999. Methylation of the estrogen receptor gene is

- associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **43(4)**, 985–991.
16. Zhu S., Goldschmidt-Clermont P.J., Dong C. 2005. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis. *Circulation.* **112(9)**, 1353–1361.
 17. Kim J., Kim J.Y., Song K.S., et al. 2007. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and *in vitro* vascular senescence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772(1)**, 72–80.
 18. Zawadzki C., Chatelain N., Delestre M., et al. 2009. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* **204(2)**, e4–14.
 19. Bibikova M., Lin Z., Zhou L., et al. 2006. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* **16(3)**, 383–393.
 20. Duncan D.T., Prodduturi N., Zhang B. 2010. WebGestalt2: an updated and expanded version of the Web-based Gene Set Analysis Toolkit. *BMC Bioinformatics.* **11(Suppl 4)**, P10.
 21. Chi J.T., Chang H.Y., Haraldsen G., et al. 2003. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100(19)**, 10623–10628.
 22. Orbe J., Fernandez L., Rodriguez J.A., et al. 2003. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis.* **170(2)**, 269–276.
 23. Deng D.X., Tsalenko A., Vailaya A., et al. 2006. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ. Res.* **98(2)**, 200–208.
 24. Zhang J., Burrigge K.A., Friedman M.H. 2008. *In vivo* differences between endothelial transcriptional profiles of coronary and iliac arteries revealed by microarray analysis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295(4)**, H1556–1561.
 25. Ideraabdullah F.Y., Vigneau S., Bartolomei M.S. 2008. Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat. Res.* **647(1–2)**, 77–85.
 26. Han D.K., Khaing Z.Z., Pollock R.A., et al. 1996. H19, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **97(5)**, 1276–1285.
 27. Li L., Xie J., Zhang M., Wang S. 2009. Homocysteine harasses the imprinting expression of *IGF2* and *H19* by demethylation of differentially methylated region between *IGF2/H19* genes. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **41(6)**, 464–471.
 28. Young L.E. 2001. Imprinting of genes and the Barker hypothesis. *Twin Res.* **4(5)**, 307–317.
 29. Yu W., Clyne M., Khoury M.J., Gwinn M. 2010. Phenopedia and Genopedia: disease-centered and gene-centered views of the evolving knowledge of human genetic associations. *Bioinformatics.* **26(1)**, 145–146.
 30. Dzau V.J., Antman E.M., Black H.R., et al. 2006. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation.* **114(25)**, 2850–2870.
 31. Пузырев В.П. 2008. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека. *Мед. генетика.* **7(9)**, 3–9.
 32. Пузырев В.П., Makeeva O.A., Freidin M.B. 2010. Syntropy, genetic testing and personalized medicine. *Personalized Medicine.* **7(4)**, 399–405.
 33. Pastinen T. 2010. Genome-wide allele-specific analysis: insights into regulatory variation. *Nat. Rev. Genet.* **11(8)**, 533–538.
 34. Schneider E., Pliushch G., El Hajj N., et al. 2010. Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucl. Acids Res.* **38(12)**, 3880–3890.
 35. Bock C., Walter J., Paulsen M., Lengauer T. 2008. Inter-individual variation of DNA methylation and its implications for large-scale epigenome mapping. *Nucleic Acids Res.* **36(10)**, e55.
 36. Happle R. 2009. What is paradominant inheritance? *J. Med. Genet.* **46(9)**, 648.
 37. Limaye N., Boon L.M., Vikkula M. 2009. From germline towards somatic mutations in the pathophysiology of vascular anomalies. *Hum. Mol. Genet.* **18(R1)**, R65–74.
 38. bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt
 39. www.geneontology.org
 40. www.hugenavigator.net