МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2023, том 57, № 4, с. 647–664

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ РЕГИОНОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ[1]

© 2023 г. Н. П. Бабушкина[a, *], А. А. Зарубин[a], Ю. А. Королёва[a], Д. Е. Гомбоева[a], Е. Ю. Брагина[a], И. А. Гончарова[a], М. В. Голубенко[a], Р. Р. Салахов[a], А. А. Слепцов[a], М. С. Кузнецов[b], Б. Н. Козлов[b], Э. Ф. Муслимова[b], С. А. Афанасьев[b], А. Н. Кучер[a], М. С. Назаренко[a]

[a] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия*

[b] *Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634034 Россия*

**e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru*

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.
После доработки 08.02.2023 г.
Принята к публикации 21.02.2023 г.

Статус метилирования ДНК в геноме человека изменяется в патогенезе распространенных заболеваний и выступает в качестве предиктора ожидаемой продолжительности жизни. В связи с этим представляет интерес исследование уровня метилирования регуляторных регионов генов, отвечающих за общебиологические процессы, потенциально значимые для развития возраст-ассоциированных заболеваний. Среди них гены белков различных систем репарации ДНК, продукты которых характеризуются плейотропными эффектами. В исследовании представлены результаты таргетного анализа метилирования двух регионов генома (промоторного участка гена *MLH1* и энхансерного – вблизи гена *ATM*) в разных тканях пациентов с атеросклерозом сонных артерий. В результате анализа профилей метилирования исследованных генов в различных тканях одних и тех же индивидов выявлено наличие выраженных различий между лейкоцитами и тканями сосудистой стенки. Различия по уровням метилирования в нормальных и пораженных атеросклерозом тканям сонных артерий обнаружены только для двух исследованных CpG-сайтов в гене *ATM* (chr11:108089866 и chr11:108090020, сборка GRCh37/hg19). На основании этих данных можно предполагать участие ATM в развитии атеросклероза. “Нагруженность” изученных регионов сайтами связывания транскрипционных факторов (по данным ReMapp2022) свидетельствует о том, что тканеспецифичный характер метилирования регуляторных участков генов *MLH1* и *ATM* может быть связан с уровнем их экспрессии в конкретной ткани. Показано, что межиндивидуальные различия в уровнях метилирования CpG-сайтов ассоциированы с достаточно удаленными нуклеотидными заменами.

Ключевые слова: метилирование ДНК, CpG-островки, высокопроизводительное секвенирование, атеросклероз, ген *ATM*, ген *MLH1*

DOI: 10.31857/S002689842304002X, **EDN:** QKQNQS

Метилирование ДНК в позиции C5 цитозинового кольца в CpG-динуклеотидах с образованием 5-метилцитозина – один из наиболее изученных механизмов эпигенетической регуляции генома. Функциональное значение метилирования ДНК заключается в транскрипционной инактивации хроматина, обусловленной надмолекулярными изменениями его компактизации. В соматических клетках метилирование ДНК ответственно за поддержание и реализацию таких фундаментальных биологических процессов, как инактивация Х-хромосомы, геномный импринтинг, регуляция тканеспецифичной экспрессии генов, репрессия ретротранспозонов [1].

Известно, что некоторые из локусов генома обладают свойством сохранять относительно стабильный уровень метилирования продолжительное время и статус их метилирования коррелирует с изменчивостью ряда клинических признаков, значимых для развития заболеваний различной природы [2–5]. Появляется все больше свидетельств тесной связи эпигенетического возраста ДНК в крови с заболеваниями, проявляющимися

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002689842304002X для авторизованных пользователей.

в течение жизни человека (сердечно-сосудистыми, неврологическими, онкологическими и др.) [6]. В связи с этим предполагают, что эпигенетический полиморфизм, наряду со структурным, может быть еще одним из значимых факторов риска многофакторных заболеваний [1, 7]. В частности, было высказано предположение, что в роли пускового механизма атеросклероза выступают аберрантные проатерогенные паттерны метилирования ДНК в тканях артерий [8]. Действительно, в ряде исследований показано, что профиль метилирования CpG-сайтов ряда генов пораженной атеросклерозом сосудистой стенки отличается от такового в интактной ткани [4, 9, 10].

Нами выполнен таргетный анализ метилирования двух регионов генома (промоторный участок гена *MLH1* и энхансерный – вблизи гена *ATM*). Оба гена кодируют компоненты систем репарации ДНК и задействованы во многих биологических процессах, в том числе и таких, как ответ на окислительный стресс, иммунный ответ, онкогенез [11]. Роль генов *MLH1* и *ATM* при атеросклерозе изучена недостаточно. Известно, что соматические мутации в гене *ATM* ассоциированы с клональным гемопоэзом с неопределенным потенциалом – фактором риска возрастзависимых заболеваний, включая атеросклероз [12].

Цель исследования заключалась в выявлении особенностей метилирования регуляторных регионов двух генов систем репарации ДНК: *MLH1* и *ATM* – в разных тканях пациентов с атеросклеротическим поражением сонных артерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Группа исследования. Выборка пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий была сформирована на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ. В выборку было включено 27 пациентов (21 мужчина и 6 женщин, средний возраст – 64.4 ± 7.1 лет), которым по показаниям была проведена операция каротидной эндартерэктомии. У всех пациентов стеноз оперируемой сонной артерии при ультразвуковом исследовании превышал 70% просвета сосуда. Для каждого пациента получены образцы цельной венозной крови, а также образцы тканей сосудов: удаленной атеросклеротической бляшки сонной артерии (на поздних стадиях патологического процесса), прилежащего морфологически неизмененного участка сонной артерии, фрагмента большой подкожной вены (используемой для пластики сонной артерии).

Выделение ДНК из образцов крови и тканей. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная как из лейкоцитов цельной венозной крови, собранной в пробирки с консервантом ЭДТА, так и из тканей сосудистой стенки.

Для выделения ДНК из образцов цельной венозной крови использовали метод фенол–хлороформной экстракции [13]. Ткани сосудов (площадью примерно 1 $см^2$) гомогенизировали в жидком азоте, обрабатывали протеиназой K (“СибЭнзим”, Россия) и проводили экстракцию ДНК фенол–хлороформом. Для дальнейшего анализа ДНК подвергали бисульфитной модификации с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (“Zymo Research”, США), согласно протоколу производителя.

Целевые регионы. Выбор целевых регионов для анализа метилирования ДНК исследуемых локусов выполнен согласно следующим критериям: локализация участка ДНК вблизи гена; регуляторная роль данного участка в отношении соответствующего гена; локализация в исследуемом участке генома энхансера или активного промотора, а также вариабельность статуса метилирования ДНК по данным консорциума ENCODE (https://www.encodeproject.org). Активные регуляторные регионы генома выбраны согласно определяемым по наличию соответствующих сигналов в данных DNase-seq (участки открытого хроматина) и ChIP-seq на гистоновые модификации: H3K27Ac (активный хроматин), H3K4me1 (энхансеры), H3K4me3 (промоторы) (http://www.genome.ucsc.edu/) – в разных клеточных культурах, использованных консорциумом ENCODE [14]. Дополнительно учтена информация по локализации предсказанных энхансерных элементов и точках начала транскрипции генов из базы данных GeneHancer [15].

При выборе целевых регионов также учитывали их расположение относительно CpG-островков. В первую очередь это CpG-берега (в пределах ±2000 п.н. от CpG-островка) и CpG-шельфы (в пределах ±4000 п.н. от CpG-островка), которые обогащены функциональными CpG-сайтами и для которых характерны более динамичные уровни метилирования [16, 17]. В силу особенностей первичной структуры анализируемых последовательностей ДНК уровень метилирования был изучен в промоторном регионе гена *MLH1* и в энхансерном – гена *ATM*.

Для гена *MLH1* был выбран фрагмент, содержащий 9 CpG-сайтов (табл. 1), расположенных в пределах 500–1000 п.н. в 5'-направлении от CpG-островка в промоторной области. Исследуемый участок промотора (GH03J036988 по базе данных GeneHancer) приходится на область умеренной гиперчувствительности к ДНКазе I и локализации гистоновых меток H3K27. Кроме того, по данным проекта ENCODE, в этой области выявлено вариабельное метилирование CpG-сайтов в разных клеточных линиях (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf).

Таблица 1. Изученные регионы генов *MLH1* и *ATM* и структура использованных праймеров

Рассматриваемые параметры	*MLH1*		*ATM*	
Регуляторный элемент	Промотор		Энхансер	
Локализация относительно гена	“Выше по течению”		“Выше по течению”	
Категория CpG-региона[a]	CpG-берег		CpG-шельф	
Геномные координаты[b]	start	chr3:37033249	start	chr11:108089569
	CpG_1	chr3:37033323	CpG_1	chr11:108089803
	CpG_2	chr3:37033373[c]	CpG_2	chr11:108089866
	CpG_3	chr3:37033394	CpG_3	chr11:108090015
	CpG_4	chr3:37033489	CpG_4	chr11:108090020
	CpG_5	chr3:37033562	CpG_5	chr11:108090130
	CpG_6	chr3:37033600	CpG_6	chr11:108090159[d]
	CpG_7	chr3:37033625[e]	end	chr11:108090311
	CpG_8	chr3:37033632[f]		
	CpG_9	chr3:37033662		
	end	chr3:37033762		
Структура праймеров[g] (5' → 3')	F: AATTTTTTTGAGGGTAGGAAAGTTTGTTAG		F: ATAATAGAAAAGATAAAATGGGTAAGGATT	
	R: CCCCAACTATTAAAATATCATTCATTATTC		R: AACAAACTTCAAAAATTCTAAAAATCCCC	
ПЦР-продукт (п.н.)	514		743	

[a] Категории в соответствии с плотностью расположения CpG-сайтов: CpG-берег (в пределах ±2000 п.н. от CpG-островка), CpG-шельф (в пределах ±4000 п.н. от CpG-островка).

[b] Координаты приведены согласно сборке генома человека GRCh37/hg19;

[c] cg02103401 (ID на метилочипах Illumina);

[d] cg09191173;

[e] cg24607398,

[f] cg10990993;

[g] праймеры подобраны с помощью программы MethPrimer (https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi; https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi); F – прямой праймер, R – обратный праймер (синтезированы “ДНК-Синтез”, Россия).

Предполагаемая регуляторная область гена *ATM* находится на расстоянии 3 т.п.н. в 5'-направлении от точки начала транскрипции гена и приходится на область открытого и активного хроматина (согласно данным проекта ENCODE) и энхансера (GH11J108220), согласно базе данных GeneHancer (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf). В этом регионе локализовано 6 CpG-сайтов (табл. 1).

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах *MLH1* и *ATM* проводили методами ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и ПЦР в режиме реального времени (табл. 2). Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с использованием набора БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (“БиоЛабМикс”, Россия) со специфическими парами праймеров (табл. 1).

Дальнейший анализ проведен методом бисульфитного секвенирования ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) с использованием технологии массового параллельного секвенирования в соответствии с методикой D. Masser с соавт. [18]. Ампликоны, полученные после ПЦР одного и того же образца ДНК, пулировали эквимолярно. Очистку пулированных ампликонов для подготовки библиотек проводили с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов GeneJET NGS Cleanup Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию очищенных ампликонов измеряли на флуориметре Qubit 3.0 (“Thermo Fisher Scientific”). Подготовку и индексацию ДНК-библиотек проводили с использованием наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit или Nextera DNA Flex Library Prep Kit (“Illumina”, США), согласно протоколу производителя. Секвенирование полученных ДНК-библиотек выполнено на приборе MiSeq (“Illumina”) с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) в режиме секвенирования по 150 п.н. с обоих концов фрагментов ДНК-библиотеки.

Анализ данных. Для автоматизации и стандартизации обработки результатов использован алгоритм methylseq, реализованый в Nextflow (https://doi.org/10.5281/zenodo.2555454) [19]. По-

Таблица 2. Условия анализа изученных полиморфных вариантов генов *MLH1* и *ATM*

Последовательности праймеров/TaqMan проб[a] (5' → 3')	T_{an}[b] (°C)	Метод детекции, использованные эндонуклеазы[c]
rs1799977, ген *MLH1*		
F: ATAGTTTGCTGGTGGAGATA R: ATGTGATGGAATGATAAACC	56	ПЦР-ПДРФ, Bcc I (“G” = 243; “A” = 161 + 82)
rs189037, ген *ATM*		
F: CTGCTTGGCGTTGCTTCTTC R: TGGAGTGAGGAGAGGGAGGA	60	ПЦР-ПДРФ, Mox20 I (“G” = 330, “A” = 220 + 110)
rs1801516, ген *ATM*		
F: TTTAGCAGTATGTTGAGTTTATGGC R: GGCAACTTTTATCTCCATTCCA FAM-TTTACTCCAAGATACAAATGAATCATGGA-BHQ1 HEX-TTTACTCCAAAATACAAATGAATCATGGA-BHQ1	56	ПЦР в реальном времени

[a] Праймеры и пробы подобраны с помощью программы Vector NTI (http://www.informaxinc.com; синтерзированы “ДНК-Синтез”); FAM (флуоресцеин) и HEX (гексахлорфлуоресцеин) – флуоресцентные красители, BHQ1(Black Hole Quenchers 1) – гаситель для ПЦР в реальном времени.

[b] Температура отжига праймера.

[c] ПДРФ-анализ проводили с использованием указанных эндонуклеаз в соответствии с протоколом фирмы-производителя (“СибЭнзим”, Россия). В скобках указаны длины фрагментов (в п.н.), соответствующих анализируемым аллелям.

лученные прочтения фрагментов ДНК автоматически рассортированы по образцам с удалением нуклеотидной последовательности адаптеров. Прочтения отфильтрованы по качеству (не менее Q20), длине (не менее 20 нуклеотидов) с использованием инструмента Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), выравнивание проведено на референсную сборку генома человека GRCh38/hg38 с помощью инструмента bwa-meth [20]. Информация о статусе метилирования CpG-сайтов из BAM-файлов экстрагирована с помощью инструмента Bismark [21]. Для контроля качества использованы инструменты FastQC, Qualimap, Preseq, MultiQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) [22–24].

Дальнейшая биоинформатическая обработка профилей метилирования ДНК в исследуемых локусах и статистический анализ данных выполнены в программной среде R с помощью специализированного пакета methylKit [25]. Для манипуляций с данными, вывода графиков и таблиц использованы дополнительные программные пакеты R (ggplot2, reshape, RColorBrewer, Rtsne, xlsx). Из анализа исключали CpG-сайты с менее чем 15-кратным покрытием. Уровень метилирования CpG-сайта определяли как долю прочтений, соответствующих метилированным остаткам цитозина по отношению ко всем прочтениям цитозина в данной позиции генома, и выражали в процентах.

Генотипирование SNP было проведено с использованием программы cgmaptools [26], с применением биномиальной модели (минимальное покрытие – 10×, максимальная ошибка – 0.05). Нормализация, фильтрация и объединение vcf-файлов проведены с использованием программы bcftools (http://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html) с последующей аннотацией в программе annovar [27].

Описание распределения уровня метилирования CpG-сайтов в исследуемых группах представлено в виде среднего значения со стандартным отклонением. Для анализа сходства профилей метилирования ДНК в исследуемых образцах использован алгоритм нелинейного снижения размерности данных tSNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) [28]. Для поиска дифференциально метилированных CpG-позиций применяли линейную регрессию, где зависимой переменной был уровень метилирования, а независимыми – порядковый номер эксперимента, биологический образец, заболевание и тип ткани. Такой подход позволил отделить внутрииндивидуальную дисперсию от групповой и технической. Показатели сцепления: нормированный коэффициент неравновесия по сцеплению D' (коэффициент Левонтина), квадрат коэффициента корреляции между локусами r^2, показатель максимального правдоподобия LOD – рассчитывали в Haploview 4.2 [29]. Корреляционный анализ проводили с применением критерия Спирмена; зависимость уровня метилирования от генотипов оценивали по критерию Манна–Уитни (в пакете программ Statistica v.6.0). Статистически значимыми считались различия с уровнем значимости $p < 0.05$.

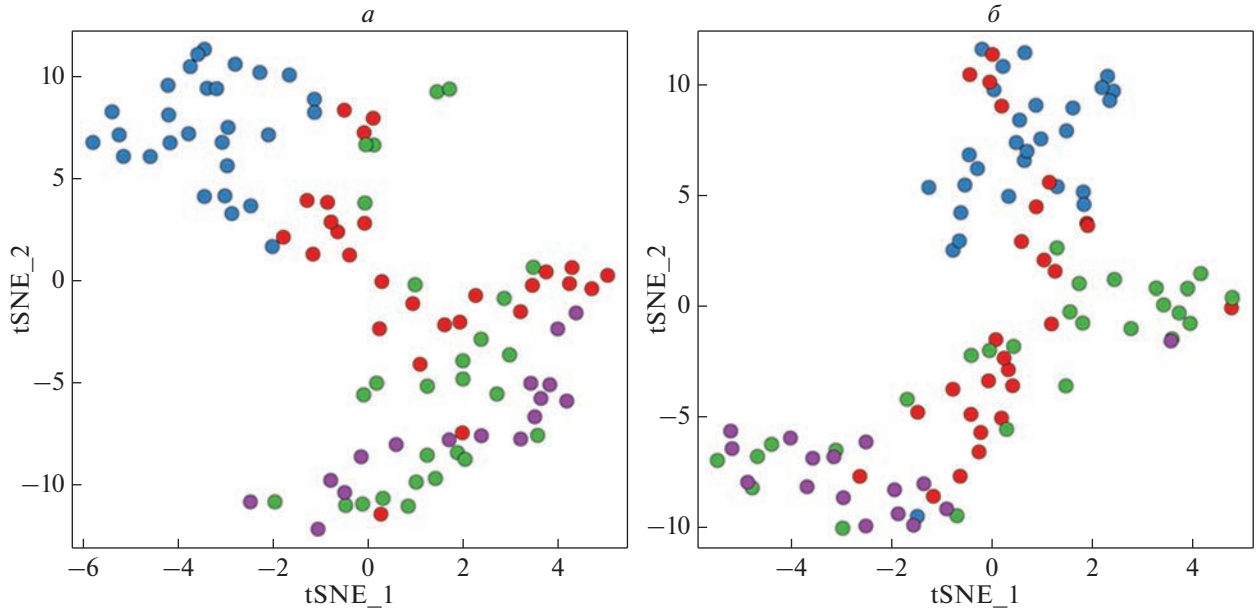

Рис. 1. Взаимное расположение и кластеризация исследуемых образцов (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов в регуляторных областях генов *MLH1* (*а*) и *ATM* (*б*). Данные, полученные для лейкоцитов, обозначены синим цветом, для атеросклеротической бляшки – красным, для нормальной ткани артерий – зеленым, для вен – фиолетовым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение метилирования регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* проведено в пределах мультиплексного эксперимента, включавшего большое число таргетных последовательностей. Всего произведено 3 отдельных запуска секвенатора. Для учета вариабельности данных, полученных в разных запусках, результаты каждого запуска и каждого образца обрабатывали независимо, а при дальнейшем анализе порядковый номер запуска выступал в качестве одной из ковариант регрессионного анализа.

Данные по уровню метилирования ДНК в крови, бляшке и артерии получены для 27 пациентов (у двух из обследованных по одной ткани исключено из дальнейшего анализа в связи с низким уровнем покрытия), а в вене – для 15 пациентов.

По данным tSNE-анализа в целом наблюдается выраженная тканеспецифичность метилирования изученных регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* – выявлена тенденция кластеризации образцов кровеносных сосудов (артерий и вен) отдельно от лейкоцитов (рис. 1).

Характеристика метилирования промотора гена MLH1

Наибольший уровень метилирования CpG-сайтов гена *MLH1* (в среднем >55%, размах вариабельности – от 15 до 87%) наблюдался в лейкоцитах крови (рис. 2).

Индивидуальные значения уровня метилирования ДНК в образцах кровеносных сосудов не превышали 73%, средний уровень составил порядка 30%. Образцы интактных и пораженных атеросклерозом артерий практически не отличались по профилю метилирования ДНК, а средний уровень метилирования CpG-сайтов в них составил 32% (от 4 до 73%) и 33% (от 2 до 63%) соответственно. Наименьший уровень метилирования ДНК зарегистрирован в сосудистой стенке вен: в среднем 23% (от 2 до 61%).

Паттерн метилирования CpG-сайтов в исследуемом участке промотора *MLH1* сходен во всех образцах: CpG_2 (chr3:37033373) и CpG_5 (chr3:37033562) со сниженным относительно других CpG-сайтов уровнем метилирования фланкируют участки с более высоким уровнем (рис. 2). Такой паттерн приблизительно повторяет форму плотности распределения сайтов локализации модифицированного гистона H3K27Ac в разных клеточных линиях (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf).

Для всех 9 CpG-сайтов в гене *MLH1* получены статистически значимые межтканевые различия ($p < 0.000000$ для критерия Уилкоксона). Согласно результатам множественной регрессии, уровень метилирования регуляторного региона гена *MLH1* в лейкоцитах отличался от такового в тканях артерий и подкожной вены по всем исследованным CpG-сайтам (во всех случаях $p < 0.01$); при этом между пораженной атеросклерозом и

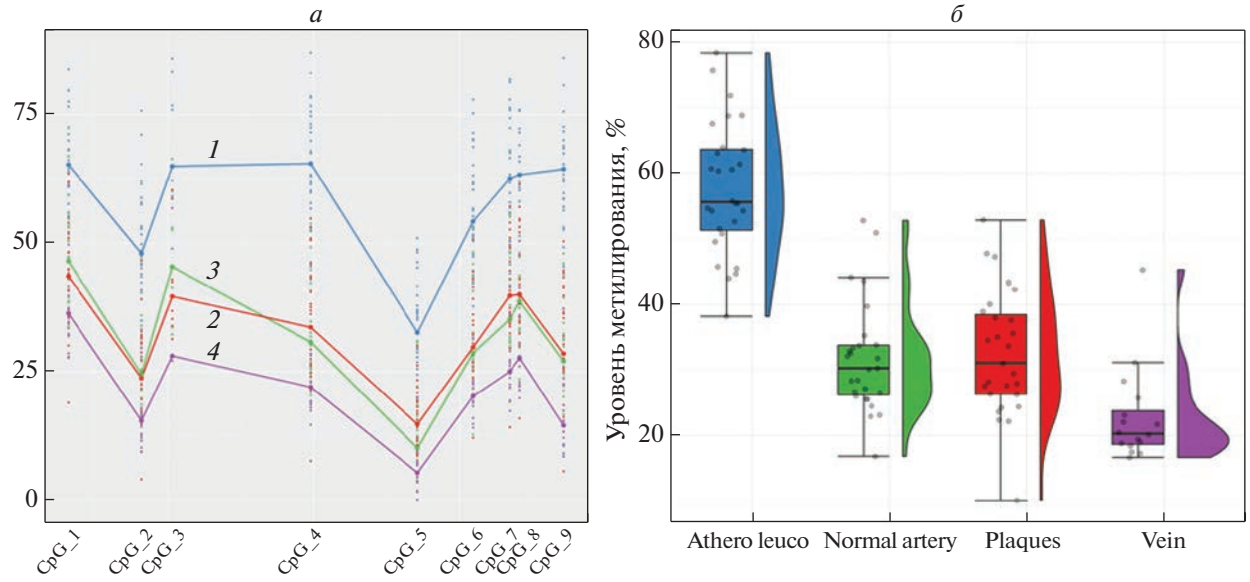

Рис. 2. Профиль метилирования промоторного региона гена *MLH1*. Данные, полученные для лейкоцитов (Athero leuco), обозначены синим цветом (*1*), для атеросклеротической бляшки (Plaques) – красным (*2*), для нормальной ткани артерий (Normal artery) – зеленым (*3*), для вен (Vein) – фиолетовым (*4*). *а* – Профиль метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе гена *MLH1*. Значения уровня метилирования каждого из исследуемых образцов отмечены небольшими точками, средние значения в каждой из групп исследования обозначены крупными точками и для наглядности соединены линиями между соседними CpG-сайтами (хромосомные позиции см. в табл. 1). *б* – Усредненный уровень метилирования ДНК исследованного регуляторного региона гена *MLH1* в различных тканях.

непораженной тканью артерий различия не выявлены ни по одному из исследованных сайтов (во всех случаях $p > 0.07$). В то же время сосудистая стенка вены по большинству сайтов значимо ($p < 0.05$) отличалась как от непораженной артериальной стенки (за исключением CpG_3, $p = 0.550$), так и от атеросклеротической бляшки – за исключением CpG_1 ($p = 0.160$) и CpG_3 ($p = 0.557$). Скорее всего, отсутствие различий по сайту chr3:37033394 (CpG_3) обусловлено невысоким уровнем прочтений в этой хромосомной позиции, что привело к исключению большого числа образцов из анализа для этого сайта.

Исследуемая область располагается в экзоне 1 гена *EPM2AIP1* и незначительно удалена от CpG-островка (567 п.н.) и одного из трех сайтов начала транскрипции гена *MLH1*. Данный регион полностью входит в состав промотора GH03J036988; внутри анализируемого фрагмента расположен проксимальный энхансероподобный элемент EH38E2192185 (http://www.genome.ucsc.edu/; https://www.genecards.org/). В эту область попадают также отдельные точки мультирегионов взаимодействий генов *MLH1* и *LRRFIP2* с регуляторными элементами (http://www.genome.ucsc.edu/) (рис. 3).

Характеристика метилирования энхансерной области гена ATM

Для уровня метилирования ДНК в изученном регуляторном регионе гена *ATM* характерна тканеспецифичность за исключением “крайних” CpG-сайтов, по которым уровни метилирования имеют тенденцию выравниваться между исследуемыми группами тканей (рис. 4*а*). В целом по региону более высокие уровни метилирования CpG-сайтов зарегистрированы для кровеносных сосудов (рис. 4*б*): выше в венах и примерно на 10% ниже в пораженных атеросклерозом сонных артериях, интактные артерии по уровню метилирования ДНК занимают промежуточное положение. В лейкоцитах отмечены более низкие, по сравнению с образцами кровеносных сосудов, уровни метилирования всех CpG-сайтов, за исключением CpG_1 (chr11:108089803), для которого выявлен повышенный уровень метилирования (>88%) во всех тканях. Уровень метилирования CpG-сайтов в изученном регионе во всех исследованных тканях в целом соответствовал следующей закономерности: CpG_1 > CpG2 > CpG3 < < CpG4 < CpG5 > CpG6 (рис. 4).

Суммарная оценка уровня метилирования для всех 6 сайтов в гене *ATM* тем не менее выявила значимые различия между тканями ($p < 0.000000$ для критерия Уилкоксона). Согласно результатам множественной регрессии, по уровню метилирования ДНК ткани сосудистой стенки статистически значимо отличаются от лейкоцитов периферической крови. Так, пораженная артериальная ткань отличается от лейкоцитов ($p < 0.05$) по уровням метилирования пяти CpG-сайтов, кроме CpG_1 ($p = 0.112$). Более выражены отличия по

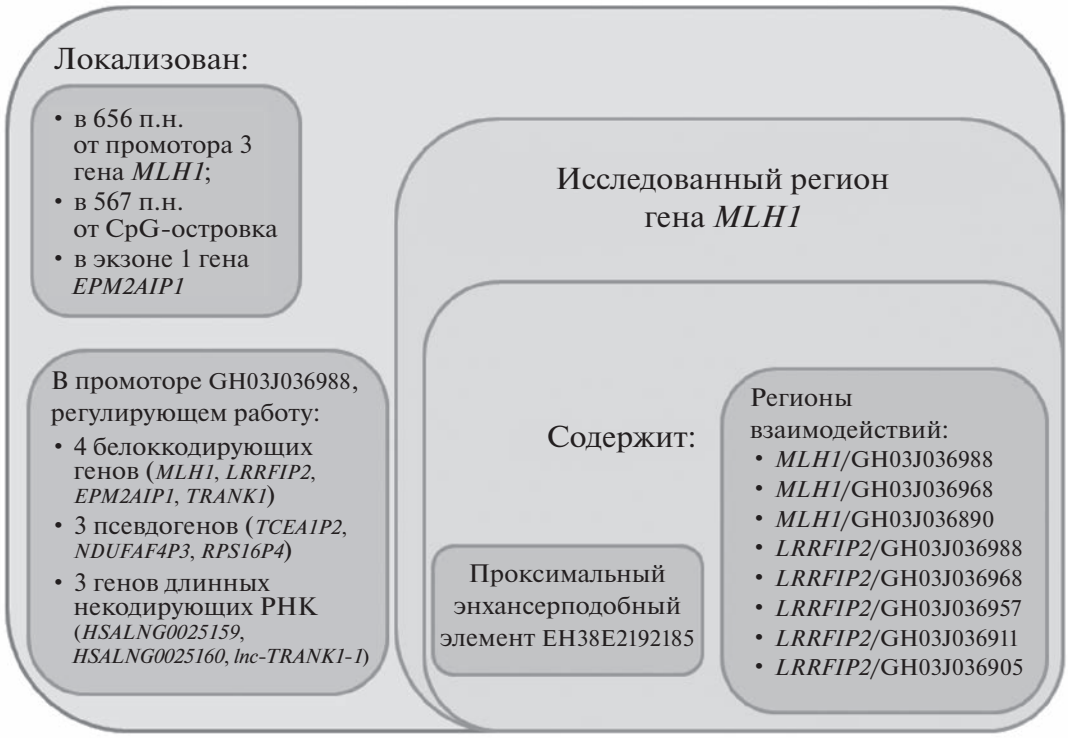

Рис. 3. Структурно-функциональная характеристика исследованного региона гена *MLH1*. Составлено с использованием ресурсов UCSC (http://www.genome.ucsc.edu/) и GeneCard (https://www.genecards.org/).

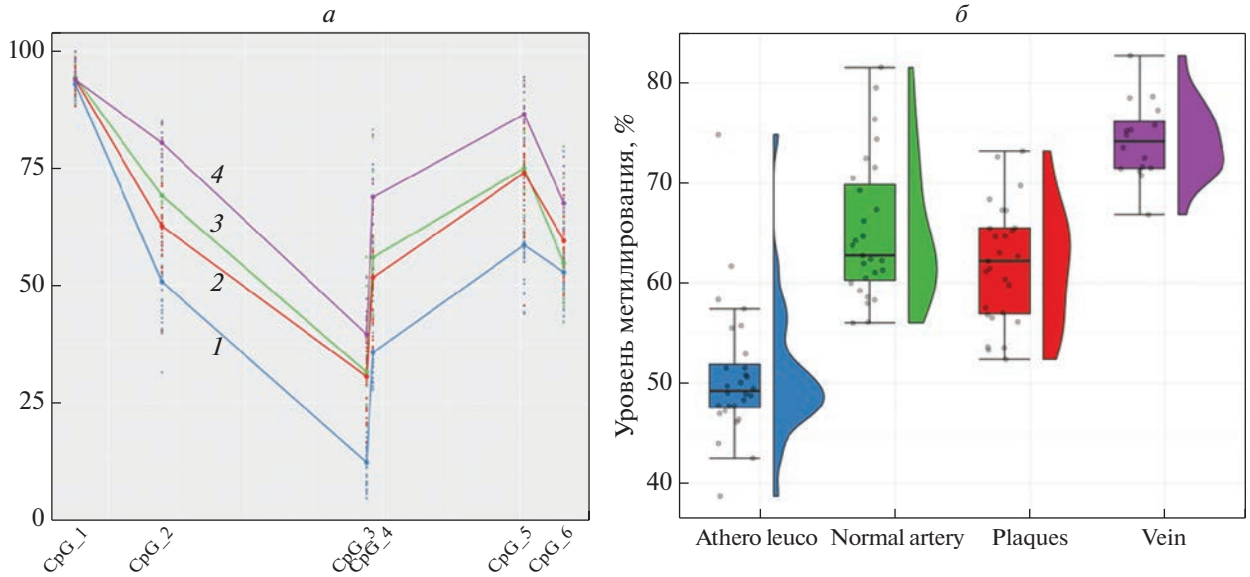

Рис. 4. Профиль метилирования энхансерного региона гена *ATM*. *а* – Паттерн метилирования отдельных CpG-сайтов в энхансере гена *ATM*. *б* – Усредненный уровень метилирования исследованного регуляторного региона гена *ATM* в разных тканях. Обозначения см. в подписи к рис. 2.

уровням метилирования лейкоцитов от тканей венозной стенки ($p < 0.00005$ для всех сайтов, кроме CpG_1, $p = 0.354$). Уровень метилирования интактной артериальной ткани отличается от лейкоцитов по четырем сайтам: ($p < 0.000000005$ для всех сайтов, кроме CpG_1, $p = 0.330$, и CpG_6, $p = 0.182$). В свою очередь венозная сосудистая стенка также отличается по пяти сайтам (кроме CpG_1) от артериальной – как пораженной атеросклерозом ($p < 0.001$ для всех сайтов), так и интактной ($p < 0.05$ для всех сайтов). Ранее также был выявлен более низкий уровень метилирова-

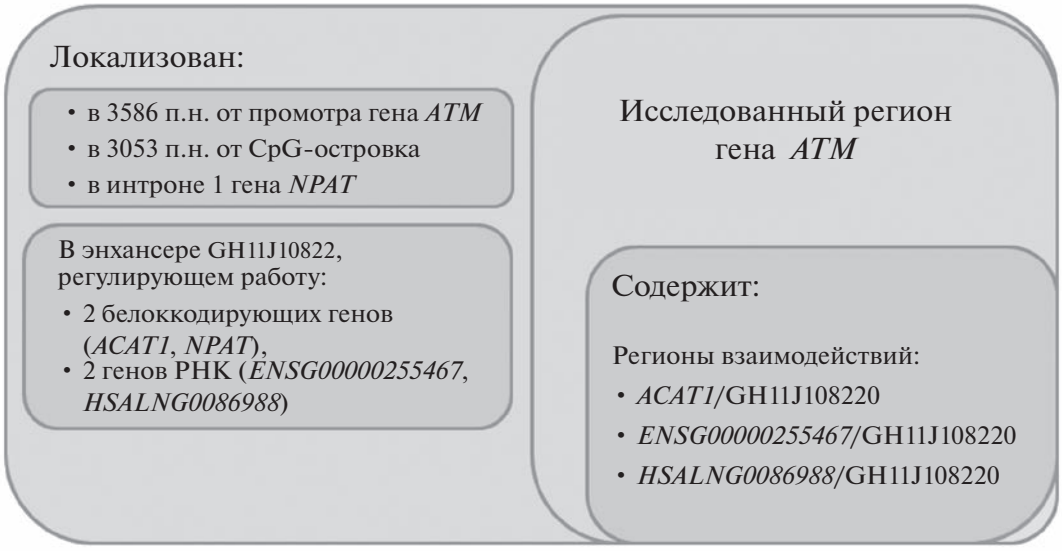

Рис. 5. Структурно-функциональная характеристика исследованного региона гена *ATM*. Составлено с использованием ресурсов UCSC (http://www.genome.ucsc.edu/) и GeneCard (https://www.genecards.org/).

ния CpG-сайтов в энхансерной последовательности генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в лейкоцитах крови по сравнению с образцами сосудистой стенки [10]. Различия в уровнях метилирования между непораженной стенкой артерии и атеросклеротической бляшкой зарегистрированы по двум сайтам: CpG_2 (chr11:108089866, $p = 0.0003$) и CpG_4 (chr11:108090020, $p = 0.0026$). По обоим сайтам в пораженной ткани уровень метилирования ниже примерно на 10%. Полученные данные в некоторой степени согласуются с литературными: гипометилирование CpG-сайтов преимущественно именно в "шельфовой" области CpG-островков показано для неопластических тканей [17], а в патогенезе онкологических заболеваний и атеросклероза отмечается общность некоторых биологических процессов (таких как адаптивные иммунные реакции, задействованный в изменении морфологии сигналинг, пролиферация и миграция гладкомышечных клеток сосудов) [30, 31]. На основании полученных результатов можно предполагать усиление экспрессии гена *ATM* и активизацию процессов, регулируемых кодируемой им киназой, в пораженной атеросклерозом стенке артерий.

В целом, паттерн метилирования в регуляторной области гена *ATM* сохранен во всех исследуемых группах и имеет общий характер: высокий уровень метилирования chr11:108089803 (CpG_1) в 5'-регуляторной области, далее следует пониженный уровень метилирования в CpG_3 (chr11:108090015), затем наблюдается повышение уровня метилирования более чем на 20% в CpG_4 (chr11:108090020) (рис. 4). Следует отметить, что такой характер метилирования CpG-сайтов соответствует локализации повторяющихся элементов: сайты с локально повышенным уровнем их метилирования располагаются в 5'-регионах длинных концевых повторов (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf).

Исследуемый регион гена *ATM* локализован в последовательности энхансера GH11J108220 в интроне 1 гена *NPAT* (рис. 5) (http://www.genome.ucsc.edu/; https://www.genecards.org/). Энхансер GH11J108220 регулирует экспрессию гена *NPAT*, относительно гена *ATM* нет четкой информации. Тем не менее известно, что гены *ATM* и *NPAT* относятся к корегулируемым и коэкспрессирующимся и имеют общий двунаправленный промотор (https://www.genecards.org/; https://gtexportal.org/home/). Таким образом, можно предположить влияние данного регуляторного элемента на экспрессию обоих генов. Кроме того, продукт гена *NPAT* позитивно регулирует экспрессию *ATM* [32, 33].

Роль метилирования изученных регионов генов MLH1 и ATM в регуляции их экспрессии

По данным проекта ORegAnno (http://www.oreganno.org/), изученные нами регуляторные области генов *MLH1* и *ATM* находятся в регионах связывания транскрипционного фактора (ТФ) SMARCA4 (http://www.genome.ucsc.edu/) [34]. SMARCA4 обладает геликазной и АТФазной активностью, будучи частью большого АТФ-зависимого комплекса ремоделирования хроматина SNF/SWI, который необходим для активации транскрипции генов, обычно репрессируемых хроматином.

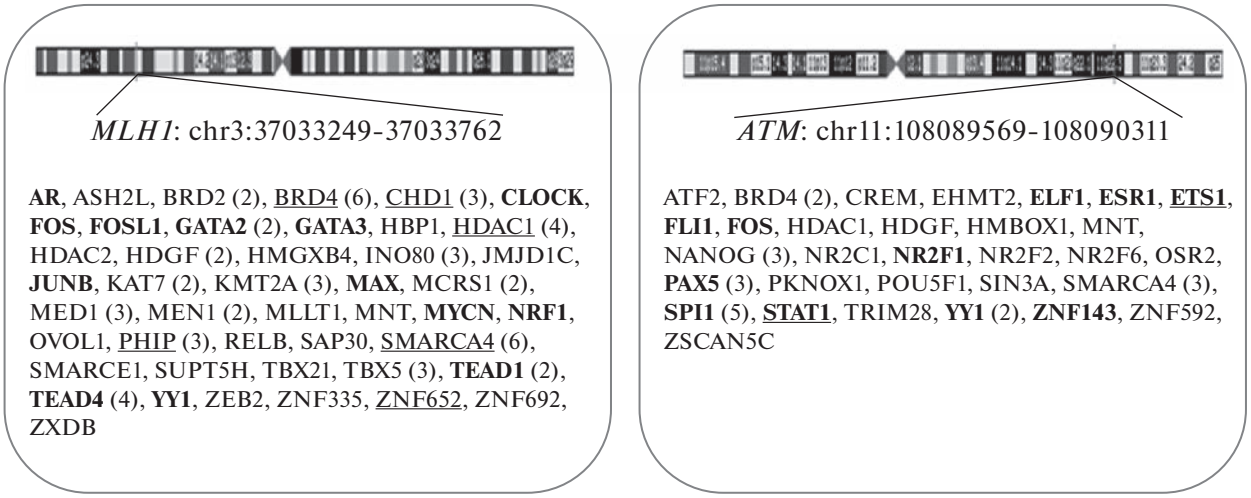

Рис. 6. Факторы транскрипции, для которых зарегистрировано наличие сайтов связывания в исследованных регионах генов *MLH1* и *ATM*. В скобках указано число сайтов связывания данного ТФ в изученном регионе (если оно больше 1); жирным шрифтом выделены ТФ, функционирование которых доказано в клетках крови; подчеркнуты ТФ, сайты связывания которых включают всю анализируемую последовательность целиком.

Полагают, что транскрипция в этом случае регулируется через изменение структуры хроматина (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Согласно ReMapp2022 (https://remap2022.univamu.fr) с ДНК в промоторном регионе гена *MLH1* связываются 45 ТФ (рис. 6). Семь сайтов связывания ТФ полностью включают в себя проанализированную нами последовательность: это 2 сайта для BRD4 (изолятор хроматина, который может модулировать сигнальный ответ на повреждение ДНК [35], коактиватор РНК-зависимой полимеразы II [36]), а также по одному сайту для HDAC1 (деацетилаза гистонов, регулятор структурной динамики хроматина; https://www.ncbi.nlm.nih.gov), SMARCA4 (см. выше), ZNF652 (репрессор транскрипции [37]), CHD1 (белок эухроматина, фактор ремоделирования хроматина [38]), PHIP (модулирует передачу сигналов инсулина; https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Таким образом, изученный регион *MLH1* несет существенную регуляторную нагрузку. “Плотность” связывания ТФ возрастает в направлении от CpG_1 к CpG_9 – то есть, чем ближе к CpG-островку, тем больше сайтов связывания различных ТФ.

С регуляторным регионом гена *ATM,* по данным ReMap2022, в разной степени перекрываются 43 сайта связывания ТФ (рис. 6), из них для 6 ТФ выявлено более одного сайта (https://remap2022.univamu.fr). Сайты связывания двух ТФ полностью перекрывают анализируемый фрагмент ДНК (STAT1 и ETS1). Активатор транскрипции STAT1 опосредует экспрессию множества генов, важных для жизнеспособности клеток в ответ на различные клеточные стимулы и патогены; играет важную роль в иммунных реакциях на вирусные, грибковые и микобактериальные патогены (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). ТФ ETS1 может функционировать либо как активатор, либо как репрессор транскрипции большого числа генов; участвует в развитии стволовых клеток, их старении и гибели, а также в онкогенезе (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Остальные ТФ связываются с последовательностями, лишь частично перекрывающимися с анализируемым фрагментом, поэтому на их аффинность оказывают влияние не все из исследованных CpG-сайтов. Максимальное число сайтов связывания с ТФ приходится на CpG_3 и CpG_4 (https://remap2022.univ-amu.fr; http://www.genome.ucsc.edu/).

Следует заметить, что в ReMapp2022 представлены экспериментальные данные по иммунопреципитации хроматина в различных клеточных линиях; среди них нет клеточных линий сосудистой стенки и клеток цельной крови. Однако все ТФ, связывающиеся с изученными регионами, экспрессируются в широком спектре тканей и в большинстве своем, по-видимому, не относятся к тканеспецифическим. Согласно базе данных NAIK Genome Database (http://summit.med.unideb.hu/summitdb/experiment_preview.php), в мононуклеарных клетках периферической крови зарегистрировано связывание с ДНК для 13 из 45 ТФ, связывающихся с анализируемым регионом гена *MLH1*, и 11 из 31 ТФ, связывающихся с анализируемым регионом гена *ATM* (рис. 6). Таким образом, выявленный нами тканеспецифичный характер метилирования регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* может влиять на уровень экспрессии этих генов в различных тканях.

Средний уровень метилирования регуляторных регионов изученных генов в лейкоцитах периферической крови, порядка 50%, может отра-

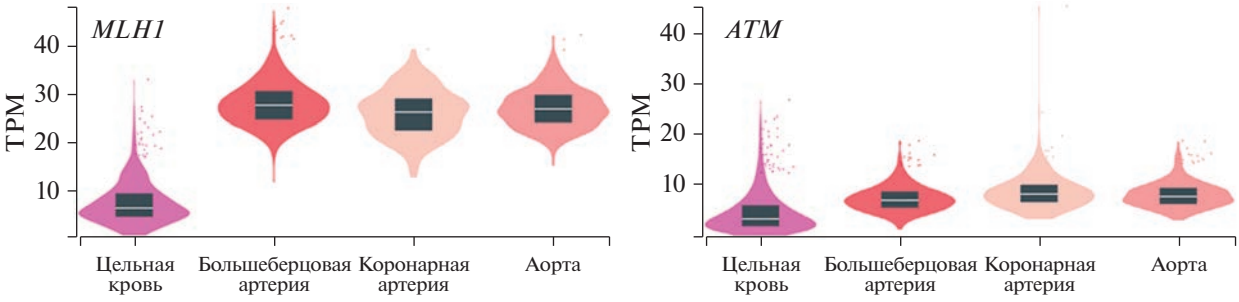

Рис. 7. Экспрессия генов *MLH1* и *ATM* в цельной крови и тканях сосудов (по данным GTEx Portal, https://gtexportal.org/home/). Результаты представлены как число транскриптов на миллион (TPM).

жать "активную готовность" к экспрессии (рис. 2, рис. 4). Данный факт вполне объясним при учете функциональных особенностей изученных генов, так как основной биологический процесс, в котором участвуют продукты генов *MLH1* и *ATM* – репарация ДНК, а значит они экспрессируются во всех типах тканей и на всех стадиях онтогенеза. Кроме того, продукты изученных генов участвуют в процессах воспаления, онкосупрессии, а также вовлечены во множество других биологических процессов (особенно это касается ATM) [11].

Более интересным результатом представляется гипометилирование промоторного региона гена *MLH1* в тканях сосудистой стенки и в то же время гиперметилирование энхансерного региона гена *ATM*. На основании этих данных можно предположить усиление экспрессии *MLH1* и снижение экспрессии *ATM* в тех же тканях. Полученные по гену *MLH1* результаты в отношении статуса метилирования промоторного региона хорошо согласуются с данными GTExPortal (https://gtexportal.org/home/) по экспрессии этого гена (рис. 7): в цельной крови уровень экспрессии *MLH1* невысокий (медианное значение – 6.6 транскриптов на миллион, TPM), а в тканях сосудов (в аорте, большеберцовой и коронарной артериях) он почти одинаков и приблизительно в 4 раза выше. В то же время приведенный в базе данных GTEx-Portal фактический уровень экспрессии гена *ATM* отличается от ожидаемого (исходя из полученных нами данных по метилированию ДНК): экспрессия *ATM* в тканях сосудов (7–8 TPM) также несколько выше, чем в цельной крови (3.3 TPM). Возможно, это связано с тем, что изученный нами регион гена *ATM* представляет собой энхансер, а не промотор гена, его действие на экспрессию более опосредованное. Однако следует отметить, что в нашем исследовании оценка метилирования ДНК в тканях сосудистой стенки проведена у больных атеросклерозом, поэтому уровень метилирования данного региона может быть связан именно с патологическим процессом, но это предположение требует дальнейшего изучения.

Межиндивидуальная вариабельность метилирования изученных регионов генов MLH1 и ATM

Для изученных регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* характерна межиндивидуальная вариабельность уровня метилирования ДНК. Причем гипо- или гиперметилирование у отдельных индивидов выявляли в разных тканях (по сравнению с уровнем метилирования ДНК у других индивидов в этой ткани). Известно, что метилом клеток человека претерпевает запрограммированные изменения не только во время онтогенеза, но и под воздействием внешних стимулов, таких как диета, прием лекарственных препаратов, уровень физической активности и различные факторы окружающей среды [4, 39–45]. Оценить влияние всех факторов не представляется возможным, мы рассмотрели некоторые из них. Так, из 27 пациентов только один на момент взятия крови для исследования не принимал лекарственных препаратов из групп гипотензивных, сахароснижающих средств, антикоагулянтов/дезагрегантов, статинов. Большое разнообразие принимаемых препаратов и их сочетаний не позволяет провести корреляционный анализ для оценки влияния отдельных лекарственных средств на уровень метилирования исследованных регионов, но их разнообразие может быть одной из причин высокой межиндивидуальной вариабельности изученного уровня метилирования ДНК.

В некоторых исследованиях (например, см. [46]) отмечали зависимость уровней метилирования отдельных CpG-сайтов от пола и возраста, в том числе и регионов, изученных в проведенном нами исследовании. Согласно данным метилочипов, на которых присутствовали три пробы из анализируемого региона гена *MLH1* и одна проба из региона *ATM*, в клетках цельной крови уровни метилирования cg02103401 и cg24607398 (CpG_2 и CpG_7 *MLH1*) коррелировали с полом,

cg10990993 (CpG_8 *MLH1*) – с полом и возрастом [46], cg09191173 (CpG_6 *ATM*) – с возрастом [46]. Нами зарегистрирована слабая отрицательная корреляция с возрастом ($r = -0.411$) уровня метилирования CpG_3 (chr11:108090015) в регуляторном регионе гена *ATM* в лейкоцитах (но не в тканях сосудистой стенки) пациентов с атеросклерозом. Корреляций уровня метилирования исследованных CpG-сайтов гена *MLH1* с полом и возрастом не выявлено ни в одной из исследованных тканей.

Идентификация SNP, влияющих на уровень метилирования CpG-сайтов (meQTL) в изученных регионах генов MLH1 и ATM

Известно, что помимо средовых воздействий на уровень метилирования оказывают влияние и структурные вариации генома [47–49]. В исследованных регионах локализовано большое число редких (<5%) SNP (108 в регионе *MLH1* и 62 в регионе *ATM*) (https://gnomad.broadinstitute.org/).

Анализ "сырых" данных бисульфитного массового параллельного секвенирования, как и стандартный анализ данных высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяет выявлять нуклеотидные замены в анализируемой последовательности. Однако есть некоторые особенности в интерпретации этих данных, поскольку в результате бисульфитной обработки неметилированные остатки цитозина конвертируются в урацил, что приводит после проведения ПЦР к появлению "замен" C/T. В регионе гена *MLH1* была определена 101 такая замена: 92 в гомозиготном состоянии и 9 в гетерозиготном, – что соответствует числу и локализации цитозинов в данном фрагменте: 92 неметилированных и 9 в составе анализируемых CpG-сайтов. Анализ замен C/T можно рассматривать как своеобразный "контроль качества" бисульфитной обработки, так как неполная конверсия приводит к массовому появлению "гетерозигот" вне CpG-сайтов (один образец был нами исключен из анализа на основании таких наблюдений). Кроме того, зарегистрированы две замены A/G – каждая только в одной ткани одного из образцов, что указывает на высокую вероятность случайного события при ПЦР; их присутствие в образцах требует дальнейшего подтверждения.

Кроме того, между CpG_3 и CpG_4 выявлена замена T/G в позиции chr3:37033461 (rs4647200), идентифицированная во всех исследованных тканях у 7 индивидов, один из которых был гомозиготным по этому варианту. Эта замена приводит к появлению нового CpG-сайта, уровень метилирования которого имеет те же межтканевые особенности, что и весь регион (наиболее высокий уровень – в клетках крови, наиболее низкий – в венах). Известно, что порядка 20% распространенных вариантов в геноме человека приводят к появлению либо исчезновению CpG-сайтов, их функциональные последствия изучены плохо. Однако показано, что потеря CpG-сайтов вследствие таких замен приводит к общему снижению уровня метилирования региона [50].

Мы изучили связь rs4647200 с уровнем метилирования CpG-сайтов в регуляторном регионе гена *MLH1*. CpG_3 был исключен из анализа ввиду малого числа образцов, для которых было возможно провести анализ данных по метилированию этого сайта. Статистически значимые различия по уровню метилирования зарегистрированы лишь для отдельных CpG-сайтов (табл. 3), что

Таблица 3. Ассоциации уровней метилирования изученных CpG-сайтов с rs4647200 и rs1799977 гена *MLH1*

Ткань	Уровень значимости[a]							
	CpG_1	CpG_2	CpG_4	CpG_5	CpG_6	CpG_7	CpG_8	CpG_9
rs4647200								
Кровь		0.013	0.031	0.013		0.041	0.010	
Атеросклеротическая бляшка			0.034	0.047		0.041		
Интактная артерия								
Вена	0.013			0.003		0.040		
rs1799977								
Кровь				0.047			0.045	
Атеросклеротическая бляшка								
Интактная артерия	0.013	0.013	0.001	0.005	0.002	0.025		
Вена	0.008							

[a] Ассоциации выявлены методом Манна–Уитни, приведены только статистически значимые различия в уровнях метилирования. Для rs4647200 сравнения уровней метилирования проведены между генотипами TT и (TG + GG); для rs1799977 – между AA и (AG + GG).

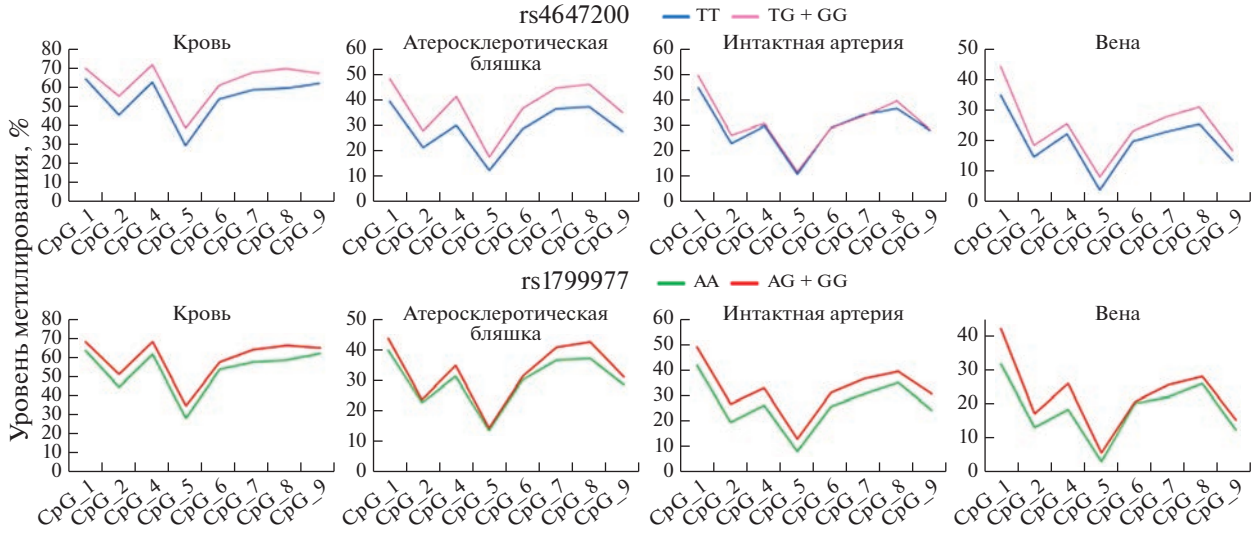

Рис. 8. Средние уровни метилирования CpG-сайтов в исследованных тканях в зависимости от генотипов rs4647200 и rs1799977 гена *MLH1*.

можно объяснить небольшим размером выборки. Однако во всех тканях прослеживается тенденция (наименее выраженная в интактных артериях) по увеличению уровня метилирования у носителей редкого аллеля rs4647200 (генотипы GT и GG) (рис. 8); при этом наиболее высокий уровень метилирования ДНК в подавляющем большинстве случаев зарегистрирован у носителя гомозиготного генотипа GG (1 человек, данные не показаны). Метилирование CpG-сайта, возникающего *de novo*, также контекстзависимо: у гомозиготы оно выше, чем у гетерозигот в 2.5 раза в клетках крови и в 3 раза во всех трех тканях сосудистой стенки. Интересно, что сходные результаты получены и при изучении зависимости уровня метилирования исследованных CpG-сайтов от генотипов по rs1799977 (миссенс-замене в экзоне 8 гена *MLH1*) (рис. 8). Между этими маркерами расстояние порядка 20 т.п.н., тем не менее при разных частотах редких аллелей (14.8 и 31.5% для rs4647200 и rs1799977 соответственно) в исследованной группе они полностью сцеплены: замена в промоторном регионе присутствует только на фоне замены в экзоне 8 гена *MLH1* ($D' = 1.0$, $r^2 = 0.379$, $LOD = 3.23$).

Таблица 4. Ассоциации уровней метилирования изученных сайтов с rs1801516 в гене *ATM*

Ткань	Уровень значимости[a]					
	CpG_1	CpG_2	CpG_3	CpG_4	CpG_5	CpG_6
Кровь						
Атеросклеротическая бляшка	0.043					0.009
Интактная артерия		0.024				
Вена						

[a] Ассоциации выявлены методом Манна–Уитни, приведены только статистически значимые различия в уровнях метилирования. Сравнения уровней метилирования проведены между генотипами GG и AG.

В регионе гена *ATM* зарегистрировано 158 "замен" C/T, которые соответствуют количеству и локализации цитозинов в данном фрагменте; из них 7 идентифицированы как метилцитозины; уровень метилирования изучен нами в шести из них. Кроме того, в отдельных тканях различных образцов зарегистрировано 15 замен A/G и по одной – A/T и T/A. Это могут быть соматические мутации, но наиболее вероятны случайные технические ошибки. Не выявлено замен, наличие которых подтверждено хотя бы в двух тканях одного образца.

Нами проанализирована возможная связь с уровнем метилирования CpG-сайтов изученного региона двух маркеров в гене *ATM*: rs189037 в промоторной области и rs1801516 в экзоне 37 (миссенс-замена). Эти SNP расположены довольно далеко как от анализируемой последовательности (более 3.5 т.п.н. и 85 т.п.н. для rs189037 и rs1801516 соответственно), так и относительно друг друга. Несмотря на удаленность, в изученной выборке маркеры сцеплены ($D' = 1.0$, $r^2 = 0.123$, $LOD = 1.06$). Замена rs189037 (частота редкого аллеля – 42.6%) не оказывает существенного влияния на уровни метилирования изученных CpG-сайтов в регуляторном регионе (рис. 9); при этом для значительно более удаленного rs1801516 (частота редкого аллеля – 13.5%) в некоторых случаях различия были статистически значимы (табл. 4).

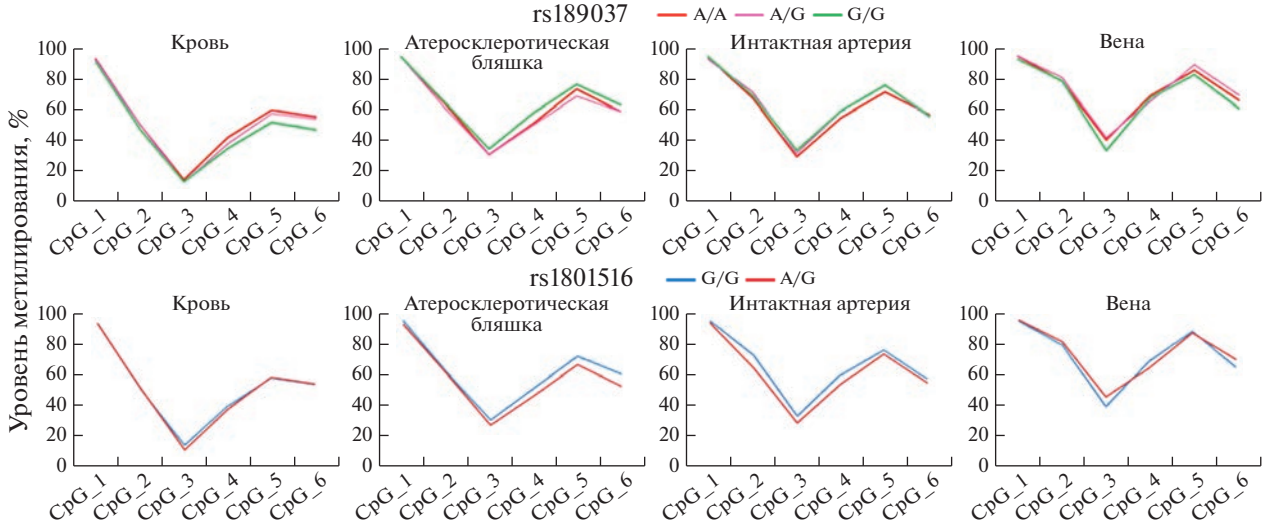

Рис. 9. Средние уровни метилирования CpG-сайтов в исследованных тканях в зависимости от генотипов rs189037 и rs1801516 гена *ATM*.

Изученные нами маркеры ранее не описаны в качестве *цис*- или *транс*-meQTL-вариантов для исследованных CpG-сайтов, хотя замена rs189037 в промоторе гена *ATM* (rs189037) относится к meQTL для четырех других CpG-сайтов при двух видах рака: cg01991180 при колоректальном раке и аденокарциноме простаты и cg12106634, cg14761454 и cg27453365 при аденокарциноме простаты (http://gong_lab.hzau.edu.cn/Pancan-meQTL/search) [51]. Все эти сайты расположены в одном регионе – в пределах "берега" CpG-островка (https://genome.ucsc.edu/). Замена в экзоне 37 гена *ATM*, rs1801516, при раке щитовидной железы является *cis*-meQTL для CpG-сайта в интроне 1 гена *ACAT1* (http://gong_lab.hzau.edu.cn/Pancan-meQTL/search), удаленного более чем на 182 т.п.н. от данного SNP (https://genome.ucsc.edu/), что косвенно согласуется с полученными нами результатами. Для двух изученных SNP (rs4647200 и rs1799977) в гене *MLH1* в доступной литературе не найдено информации по их роли в качестве meQTL, причем остается непонятным: эти маркеры не изучали в данном контексте, или же они не обладают meQTL-эффектом. Например, rs4647200 не представлен даже на высокоплотных чипах Infinium Multi-Ethnic Global BeadChip ("Illumina"). Для исследованных нами четырех CpG-сайтов (cg02103401, cg24607398, cg10990993 в гене *MLH1* и cg09191173 в гене *ATM*), представленных на метилочипах, согласно доступным данным, не было выявлено meQTL-SNP (http://gong_lab.hzau.edu.cn/Pancan-meQTL/search).

Таким образом, зависимость метилирования ДНК от контекста нуклеотидной последовательности гена более ярко выражена в отношении исследованного региона гена *MLH1*; причем данное явление показано как относительно SNP, расположенного внутри изученного региона, так и относительно более удаленного маркера. Для гена *ATM* этот эффект выражен существенно слабее. Интересно, что в этом случае значимые различия в уровнях метилирования ДНК выявляли в зависимости от генотипов маркера, существенно более удаленного, но эволюционно более консервативного [52]. Вероятно, это связано с более поздним происхождением замены в промоторном регионе в уже сформировавшемся ранее обширном блоке сцепления. Таким образом, межиндивидуальные различия в уровнях метилирования CpG-сайтов генов *MLH1* и *ATM* связаны с достаточно удаленными структурными вариациями последовательности ДНК. Скорее всего, этот феномен – следствие "блочной" структуры ДНК.

Сопоставление полученных результатов с данными из открытых источников

Четыре из изученных нами CpG-сайтов присутствуют на метилочипах Illumina. Три из них находятся в регуляторном регионе гена *MLH1*: CpG_2 (chr3:37033373, ID на чипе – cg02103401), CpG_7 (chr3:37033625, cg24607398), CpG_8 (chr3:37033632, cg10990993); – и один в гене *ATM* – CpG_6 (chr11:108090159, cg09191173). Это позволило провести сравнение полученных результатов с данными из общедоступного репозитория функциональных геномных данных – Gene Expression Omnibus (GEO, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), который содержит стандартизованные данные секвенирования или данные, полученные на микрочипах (табл. 5). Из обобщенных данных видно, что существует значительная вариабель-

Таблица 5. Уровень метилирования CpG-сайтов генов *MLH1* и *ATM* при атеросклерозе

Образцы	Уровень метилирования[a], %				Источник данных
	MLH1, CpG_2	*MLH1*, CpG_7	*MLH1*, CpG_8	*ATM*, CpG_6	
	chr3:37033373	chr3:37033625	chr3:37033632	chr11:108090159	
	cg02103401	cg24607398	cg10990993	cg09191173	
Сосуды					
Аорта (норма) (n = 15)	11.19 ± 4.32	25.51 ± 3.97	21.55 ± 4.72	75.70 ± 2.35	GSE46401[b] [53]
Атеросклеротические бляшки аорты (n = 15)	22.60 ± 7.34	40.09 ± 6.37	34.74 ± 5.25	72.89 ± 2.44	
Внутренняя грудная артерия (норма) (n = 4)	21.35 ± 5.97	41.68 ± 9.57	37.24 ± 4.98	73.83 ± 1.89	GSE149759[b] [54]
Атеросклеротические бляшки сонных артерий (n = 14)	30.85 ± 9.23	52.13 ± 7.56	47.79 ± 8.66	68.99 ± 4.62	
Сонные артерии (норма) (n = 26)	25.65 ± 9.38	35.74 ± 8.92	37.67 ± 5.83	57.21 ± 9.70	Эта работа
Атеросклеротические бляшки сонных артерий (n = 26)	24.31 ± 9.45	39.78 ± 9.15	41.96 ± 11.16	59.39 ± 6.60	Эта работа
Большие подкожные вены (n = 15)	17.50 ± 8.36	26.14 ± 7.72	29.25 ± 8.52	67.73 ± 6.45	Эта работа
Лейкоциты крови					
Здоровые доноры (n = 8)	68.53 ± 5.87	79.35 ± 8.54	76.82 ± 4.58	63.48 ± 5.89	GSE107143[b] [55]
Атеросклероз коронарных артерий (n = 8)	67.16 ± 5.28	80.95 ± 7.51	75.82 ± 3.78	61.11 ± 8.01	
Атеросклероз коронарных артерий (лейкоциты) (n = 27)	49.21 ± 11.76	61.74 ± 11.78	63.20 ± 8.38	53.96 ± 8.29	Эта работа

[a] Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.
[b] Идентификационные номера наборов данных из GEO.

ность уровня метилирования изученных сайтов в одних и тех же тканях даже при одной и той же патологии, но по данным разных исследований [53–55]. Это может быть связано с различиями в использованных методах пробоподготовки и анализа. В связи с этим напрямую проводить сравнения результатов различных исследований некорректно. Тем не менее обращают на себя внимание существенные различия в уровнях метилирования изученных CpG-сайтов в тканях стенки различных сосудов (с учетом наших данных): наименьший в аорте, средний в вене и максимальный в сонных артериях. Показано, что уровень метилирования всех изученных CpG-сайтов в атеросклеротической бляшке выше, чем в интактных артериальных тканях [53]. С этими результатами в некоторой степени согласуются полученные нами данные: по трем CpG-сайтам в гене *MLH1* и одному в гене *ATM* тенденция сохраняется, однако различия несущественны (не более 4%). По двум сайтам, для которых нами выявлены статистически значимые различия между пораженным и интактным участками артерий, ситуация противоположна (в пораженной ткани ДНК гипометилирована).

Таким образом, проведенный анализ профилей метилирования промоторной области гена *MLH1* и энхансерного региона гена *ATM* в различных тканях одних и тех же индивидов продемонстрировал наличие выраженных межтканевых различий, не позволяющих, однако, уверенно дифференцировать нормальные и пораженные ткани сосудистой стенки сонных артерий. Тем не менее на основании полученных результатов можно предполагать участие киназы ATM в развитии атеросклероза. Исходя из “нагруженности” изученных регионов сайтами связывания транскрипционных факторов (по данным ReMapp2022), тканеспецифичный характер метилирования регуляторных областей генов *MLH1* и *ATM* может быть связан с тканеспецифичным

уровнем их экспрессии. Межиндивидуальные различия в уровнях метилирования CpG-сайтов связаны с достаточно удаленными нуклеотидными заменами.

Авторский коллектив выражает искреннюю благодарность за помощь в подготовке и планировании эксперимента научному сотруднику, к.м.н. Маркову А.В.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП “Медицинская геномика” Томского НИМЦ и ресурсов биоколлекции “Биобанк населения Северной Евразии” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Работа выполнена при финансировании Госзадания Министерства науки и высшего образования (№ 122020300041-7).

Проведение работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (№ 10 от 15.02.2021 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feinberg A.P. (2008) Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*. **299**, 1345–1350. https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1345
2. Paul D.S., Beck S. (2014) Advances in epigenome-wide association studies for common diseases. *Trends Mol. Med*. **20**(10), 541–543. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.07.002
3. Neidhart M. (2015) *DNA Methylation and Complex Human Disease*. Elsevier Inc. 529 p. https://doi.org/10.1016/C2013-0-13028-0
4. Кучер А.Н., Назаренко М.С., Марков А.В., Королёва Ю.А., Барбараш О.Л. (2017) Вариабельность профилей метилирования CpG-сайтов генов микроРНК в лейкоцитах и тканях сосудов при атеросклерозе у человека. *Биохимия*. **82**(6), 923–933.
5. Levy M.A., McConkey H., Kerkhof J., Barat-Houari M., Bargiacchi S., Biamino E., Bralo M.P., Cappuccio G., Ciolfi A., Clarke A., DuPont B.R., Elting M.W., Faivre L., Fee T., Fletcher R.S., Cherik F., Foroutan A., Friez M.J., Gervasini C., Haghshenas S., Hilton B.A., Jenkins Z., Kaur S., Lewis S., Louie R.J., Maitz S., Milani D., Morgan A.T., Oegema R., Ostergaard E., Pallares N.R., Piccione M., Pizzi S., Plomp A.S., Poulton C., Reilly J., Relator R., Rius R., Robertson S., Rooney K., Rousseau J., Santen G.W.E., Santos-Simarro F., Schijns J., Squeo G.M., St John M., Thauvin-Robinet C., Traficante G., van der Sluijs P.J., Vergano S.A., Vos N., Walden K.K., Azmanov D., Balci T., Banka S., Gecz J., Henneman P., Lee J.A., Mannens M.M.A.M., Roscioli T., Siu V., Amor D.J., Baynam G., Bend E.G., Boycott K., Brunetti-Pierri N., Campeau P.M., Christodoulou J., Dyment D., Esber N., Fahrner J.A., Fleming M.D., Genevieve D., Kerrnohan K.D., McNeill A., Menke L.A., Merla G., Prontera P., Rockman-Greenberg C., Schwartz C., Skinner S.A., Stevenson R.E., Vitobello A., Tartaglia M., Alders M., Tedder M.L., Sadikovic B. (2021) Novel diagnostic DNA methylation episignatures expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. *HGG Adv*. **3**(1), 100075. https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2021.100075
6. Salameh Y., Bejaoui Y., El Hajj N. (2020) DNA Methylation biomarkers in aging and age-related diseases. *Front. Genet*. **11**, 171. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00171
7. Yuen R.K., Robinson W.P. (2011) A high capacity of the human placenta for genetic and epigenetic variation: implications for assessing pregnancy outcome. *Placenta*. **32**, S136–S141. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.003
8. Aavik E., Babu M., Yla-Herttuala S. (2019) DNA methylation processes in atheosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. **281**, 168–179. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.006
9. Назаренко М.С., Марков А.В., Королева Ю.А., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. (2017) Идентификация дифференциально метилированных генов, потенциально связанных с атеросклерозом у человека. *Российский кардиологический журнал*. **22**(10), 42–48. https://doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-42-48
10. Королёва Ю.А., Марков А.В., Гончарова И.А., Слепцов А.А., Бабушкина Н.П., Валиахметов Н.Р., Шарыш Д.В., Зарубин А.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. (2020) Метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в сосудах и клетках крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерий. *Российский кардиологический журн*. **25**(10), 32–40. https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4060)
11. Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Кучер А.Н. (2021) Вовлеченность генов белков BRCA1-ассоциированного комплекса наблюдения за геномом (BASC) в развитие многофакторной патологии. *Молекуляр. биология*. **55**(2), 318–337. https://doi.org/10.31857/S0026898421020038
12. Kar S.P., Quiros P.M., Gu M., Jiang T., Mitchell J., Langdon R., Iyer V., Barcena C., Vijayabaskar M.S., Fabre M.A., Carter P., Petrovski S., Burgess S., Vassiliou G.S. (2022) Genome-wide analyses of 200,453 individuals yield new insights into the causes and consequences of clonal hematopoiesis. *Nat. Genet*. **54**(8), 1155–1166. https://doi.org/10.1038/s41588-022-01121-z
13. Sambrook J., Russel D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 344 p.
14. Hoffman M.M., Ernst J., Wilder S.P., Kundaje A., Harris R.S., Libbrecht M., Giardine B., Ellenbogen P.M., Bilmes J.A., Birney E., Hardison R.C., Dunham I., Kellis M., Noble W.S. (2013) Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data. *Nucleic Acids Res*. **41**(2), 827–841. https://doi.org/10.1093/nar/gks1284
15. Fishilevich S., Nudel R., Rappaport N., Hadar R., Plaschkes I., Iny Stein T., Rosen N., Kohn A., Twik M., Safran M., Lancet D., Cohen D. (2017) GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes

in GeneCards. *Database* (Oxford). **2017**, bax028. https://doi.org/10.1093/database/bax028

16. Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z., Montano C., Onyango P., Cui H., Gabo K., Rongione M., Webster M., Ji H., Potash J., Sabunciyan S., Feinberg A.P. (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* **41**(2), 178–186. https://doi.org/10.1038/ng.298
17. Sandoval J., Heyn H., Moran S., Serra-Musach J., Pujana M.A., Bibikova M., Esteller M. (2011) Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. **6**(6), 692–702. https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16196
18. Masser D.R., Stanford D.R., Freeman W.M. (2015) Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing. *J. Vis. Exp*. **96**, 52488. https://doi.org/10.3791/52488
19. Ewels P.A., Peltzer A., Fillinger S., Patel H., Alneberg J., Wilm A., Garcia M.U., Di Tommaso P., Nahnsen S. (2020) The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat. Biotechnol.* **38**(3), 276–278. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0439-x
20. Pedersen B.S., Eyring K., De S., Yang I.V., Schwartz D.A. (2005) Fast and accurate alignment of long bisulfite-seq reads. *arXiv.* 1401.1129v2. https://doi.org/arxiv.org/abs/1401.1129
21. Krueger F., Andrews S.R. (2011) Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*. **27**(11), 1571–1572. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167
22. Okonechnikov K., Conesa A., Garcia-Alcalde F. (2016) Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. **2**(2), 292–294. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv566
23. Daley T., Smith A.D. (2013) Predicting the molecular complexity of sequencing libraries. *Nat. Methods*. **10**(4), 325–327. https://doi.org/10.1038/nmeth.2375
24. Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Käller M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. **32**(19), 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354
25. Akalin A., Kormaksson M., Li S., Garrett-Bakelman F.E., Figueroa M.E., Melnick A., Mason C.E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol*. **13**(10), R87. https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r87
26. Guo W., Zhu P., Pellegrini M., Zhang M.Q., Wang X., Ni Z. (2018) CGmapTools improves the precision of heterozygous SNV calls and supports allele-specific methylation detection and visualization in bisulfite-sequencing data. *Bioinformatics*. **34**(3), 381–387. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx595
27. Wang K., Li M., Hakonarson H. (2010) ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. **38**(16), e164. https://doi.org/10.1093/nar/gkq603
28. van der Maaten L.J.P., Hinton G.E. (2008) Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res*. **9**, 2579–2605.
29. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. **21**(2), 263–265. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457
30. Nettersheim F.S., Picard F.S.R., Hoyer F.F., Winkels H. (2022) Immunotherapeutic strategies in cancer and atherosclerosis-two sides of the same coin. *Front. Cardiovasc. Med*. **8**, 812702. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.812702
31. Fasehee H., Fakhraee M., Davoudi S., Vali H., Faghihi S. (2019) Cancer biomarkers in atherosclerotic plaque: evidenced from structural and proteomic analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **509**(3), 687–693. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.160
32. Byrd P.J., Cooper P.R., Stankovic T., Kullar H.S., Watts G.D., Robinson P.J., Taylor M.R. (1996) A gene transcribed from the bidirectional *ATM* promoter coding for a serine rich protein: amino acid sequence, structure and expression studies. *Hum. Mol. Genet*. **5**(11), 1785–1791. https://doi.org/10.1093/hmg/5.11.1785
33. Medina R., van der Deen M., Miele-Chamberland A., Xie R.L., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S. (2007) The HiNF-P/p220NPAT cell cycle signaling pathway controls nonhistone target genes. *Cancer Res*. **67**(21), 10334–10342. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1560
34. Lesurf R., Cotto K.C., Wang G., Griffith M., Kasaian K., Jones S.J., Montgomery S.B., Griffith O.L.; Open Regulatory Annotation Consortium. (2016) ORegAnno 3.0: a community-driven resource for curated regulatory annotation. *Nucleic Acids Res*. **44**(D1), D126–D132. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1203
35. Floyd S.R., Pacold M.E., Huang Q., Clarke S.M., Lam F.C., Cannell I.G., Bryson B.D., Rameseder J., Lee M.J., Blake E.J., Fydrych A., Ho R., Greenberger B.A., Chen G.C., Maffa A., Del Rosario A.M., Root D.E., Carpenter A.E., Hahn W.C., Sabatini D.M., Chen C.C., White F.M., Bradner J.E., Yaffe M.B. (2013) The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature*. **498**(7453), 246–250. https://doi.org/10.1038/nature12147
36. Muhar M., Ebert A., Neumann T., Umkehrer C., Jude J., Wieshofer C., Rescheneder P., Lipp J.J., Herzog V.A., Reichholf B., Cisneros D.A., Hoffmann T., Schlapansky M.F., Bhat P., von Haeseler A., Köcher T., Obenauf A.C., Popow J., Ameres S.L., Zuber J. (2018) SLAM-seq defines direct gene-regulatory functions of the BRD4-MYC axis. *Science*. **360**(6390), 800–805. https://doi.org/10.1126/science.aao2793
37. Kumar R., Manning J., Spendlove H.E., Kremmidiotis G., McKirdy R., Lee J., Millband D.N., Cheney K.M., Stampfer M.R., Dwivedi P.P., Morris H.A., Callen D.F. (2006) ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBFA2T3 to repress transcription. *Mol. Cancer Res*. **4**(9), 655–665. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0249
38. Pilarowski G.O., Vernon H.J., Applegate C.D., Boukas L., Cho M.T., Gurnett C.A., Benke P.J., Beaver E., Heeley J.M., Medne L., Krantz I.D., Azage M., Niyazov D., Henderson L.B., Wentzensen I.M., Baskin B., Sacoto M.J.G.,

Bowman G.D., Bjornsson HT. (2018) Missense variants in the chromatin remodeler *CHD1* are associated with neurodevelopmental disability. *J. Med. Genet.* **55**(8), 561–566. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104759

39. Hossain M.B., Vahter M., Concha G., Broberg K. (2012) Environmental arsenic exposure and DNA methylation of the tumor suppressor gene p16 and the DNA repair gene *MLH1*: effect of arsenic metabolism and genotype. *Metallomics*. **4**(11), 1167–1175. https://doi.org/10.1039/c2mt20120h
40. Ghosh M., Oner D., Poels K., Tabish A.M., Vlaanderen J., Pronk A., Kuijpers E., Lan Q., Vermeulen R., Bekaert B., Hoet P.H., Godderis L. (2017) Changes in DNA methylation induced by multi-walled carbon nanotube exposure in the workplace. *Nanotoxicology*. **11**(9–10), 1195–1210. https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1406169
41. Sanchez H., Hossain M.B., Lera L., Hirsch S., Albala C., Uauy R., Broberg K., Ronco A.M. (2017) High levels of circulating folate concentrations are associated with DNA methylation of tumor suppressor and repair genes *p16, MLH1*, and *MGMT* in elderly Chileans. *Clin. Epigenetics*. **9**, 74. https://doi.org/10.1186/s13148-017-0374-y
42. Remely M., Ferk F., Sterneder Sюю, Setayesh T., Kepcija T., Roth S., Noorizadeh R., Greunz M., Rebhan I., Wagner K.H., Knasmüller S., Haslberger A. (2017) Vitamin E modifies high-fat diet-induced increase of DNA strand breaks, and changes in expression and DNA methylation of *Dnmt1* and *MLH1* in C57BL/6J male mice. *Nutrients*. **9**(6), 607. https://doi.org/10.3390/nu9060607
43. Bhattacharjee P., Sanyal T., Bhattacharjee S., Bhattacharjee P. (2018) Epigenetic alteration of mismatch repair genes in the population chronically exposed to arsenic in West Bengal, India. *Environ. Res.* **163**, 289–296. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.002
44. Zappe K., Pointner A., Switzeny O.J., Magnet U., Tomeva E., Heller J., Mare G., Wagner K.H., Knasmueller S., Haslberger A.G. (2018) Counteraction of oxidative stress by vitamin E affects epigenetic regulation by increasing global methylation and gene expression of *MLH1* and *DNMT1* dose dependently in Caco-2 cells. *Oxid. Med. Cell Longev*. **3734250**. https://doi.org/10.1155/2018/3734250
45. Mohammad G., Radhakrishnan R., Kowluru R.A. (2019) Epigenetic modifications compromise mitochondrial DNA quality control in the development of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **60**(12), 3943–3951. https://doi.org/10.1167/iovs.19-27602
46. Mulder R.H., Neumann A., Cecil C.A.M., Walton E., Houtepen L.C., Simpkin A.J., Rijlaarsdam J., Heijmans B.T., Gaunt T.R., Felix J.F., Jaddoe V.W.V., Bakermans-Kranenburg M.J., Tiemeier H., Relton C.L., van IJzendoorn M.H., Suderman M. (2021) Epigenome-wide change and variation in DNA methylation in childhood: trajectories from birth to late adolescence. *Hum. Mol. Genet.* **30**(1), 119–134. https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa280
47. Feinberg A.P., Irizarry R.A. (2010) Evolution in health and medicine Sackler colloquium: stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**(1), 1757–1764. https://doi.org/10.1073/pnas.0906183107
48. Grundberg E., Meduri E., Sandling J.K., Hedman A.K., Keildson S., Buil A., Busche S., Yuan W., Nisbet J., Sekowska M., Wilk A., Barrett A., Small K.S., Ge B., Caron M., Shin S.Y.; Multiple Tissue Human Expression Resource Consortium; Lathrop M., Dermitzakis E.T., McCarthy M.I., Spector T.D., Bell J.T., Deloukas P. (2013) Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *Am. J. Hum. Genet.* **93**(5), 876–890. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.004
49. Ahsan M., Ek W.E., Rask-Andersen M., Karlsson T., Lind-Thomsen A., Enroth S., Gyllensten U., Johansson A. (2017) The relative contribution of DNA methylation and genetic variants on protein biomarkers for human diseases. *PLoS Genet.* **13**(9), 1007005. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007005
50. Zhou D., Li Z., Yu D., Wan L., Zhu Y., Lai M., Zhang D. (2015) Polymorphisms involving gain or loss of CpG sites are significantly enriched in trait-associated SNPs. *Oncotarget.* **6**(37), 39995–40004. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5650
51. Gong J., Wan H., Mei S., Ruan H., Zhang Z., Liu C., Guo A.Y., Diao L., Miao X., Han L. (2019) PancanmeQTL: a database to systematically evaluate the effects of genetic variants on methylation in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1), D1066–D1072. https://doi.org/10.1093/nar/gky814
52. Бабушкина Н.П., Кучер А.Н. (2023) Регуляторный потенциал SNP-маркеров в генах, кодирующих белки систем репарации ДНК. *Молекуляр. биология*. **57**(1), 24–46.
53. Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. (2014) DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**(5), 692–700. https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000441
54. Li J., Zhang X., Yang M., Yang H., Xu N., Fan X., Liu G., Jiang X., Fan J., Zhang L., Zhang H., Zhou Y., Li R., Gao S., Jin J., Jin Z., Zheng J., Tu Q., Ren J. (2021) DNA methylome profiling reveals epigenetic regulation of lipoprotein-associated phospholipase A2 in human vulnerable atherosclerotic plaque. *Clin. Epigenetics*. **13**(1), 161. https://doi.org/10.1186/s13148-021-01152-z
55. Istas G., Declerck K., Pudenz M., Szic K.S.V., Lendinez-Tortajada V., Leon-Latre M., Heyninck K., Haegeman G., Casasnovas J.A., Tellez-Plaza M., Gerhauser C., Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Berghe W.V. (2017) Identification of differentially methylated *BRCA1* and *CRISP2* DNA regions as blood surrogate markers for cardiovascular disease. *Sci. Rep.* **7**(1), 5120. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03434-0

Methylation of Regulatory Regions of DNA Repair System Genes in Carotid Atherosclerosis

N. P. Babushkina[1, *], A. A. Zarubin[1], Iu. A. Koroleva[1], D. E. Gomboeva[1], E. Yu. Bragina[1], I. A. Goncharova[1], M. V. Golubenko[1], R. R. Salakhov[1], A. A. Sleptcsov[1], M. S. Kuznetsov[2], B. N. Kozlov[2], E. F. Muslimova[2], S. A. Afanasiev[2], A. N. Kucher[1], and M. S. Nazarenko[1]

[1]Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

[2]Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634034 Russia

**e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru*

The status of DNA methylation in the human genome changes during the pathogenesis of common diseases and acts as a predictor of life expectancy. Therefore, it is of interest to investigate the methylation level of regulatory regions of genes responsible for general biological processes that are potentially significant for the development of age-associated diseases. Among them there are genes encoding proteins of DNA repair system, which are characterized by pleiotropic effects. Here, results of the targeted methylation analysis of two regions of the human genome (the promoter of the *MLH1* gene and the enhancer near the *ATM* gene) in different tissues of patients with carotid atherosclerosis are present. Analysis of the methylation profiles of studied genes in various tissues of the same individuals demonstrated marked differences between leukocytes and tissues of the vascular wall. Differences in methylation levels between normal and atherosclerotic tissues of the carotid arteries were revealed only for two studied CpG sites (chr11:108089866 and chr11:108090020, GRCh37/hg19 assembly) in the *ATM* gene. Based on this, we can assume the involvement of *ATM* in the development of atherosclerosis. "Overload" of the studied regions with transcription factor binding sites (according to ReMapp2022 data) indicate that the tissue-specific nature of methylation of the regulatory regions of the *MLH1* and *ATM* may be associated with expression levels of these genes in a particular tissue. It has been shown that inter-individual differences in the methylation levels of CpG sites are associated with sufficiently distant nucleotide substitutions.

Keywords: DNA methylation, CpG islands, NGS, atherosclerosis, *ATM*, *MLH1*