

PCSK9 Associated Promoter Methylation Status in Patients with Hyperlipidemia

Samaneh Bahrami¹,
Maryam Tahmasebi-birgani²,
Mahdi Bijanzadeh³,
seyed Ali-Hossein Saberi⁴

¹ MSc Student in Human Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Associate Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received July 20, 2020 ; Accepted May 24, 2021)

Abstract

Background and purpose: Hyperlipidemia is one of the main risk factors for coronary artery disease and is defined as abnormal elevation of lipids or lipoproteins in the blood. Pcsk9 is the ninth member of the proprotein convertase family that binds to the LDLR on the surface of the hepatocyte, leading to degradation of LDLR in lysosomes which could cause hyperlipidemia. The present study aimed to analyze the methylation status of pcsk9 promoter in patients with hyperlipidemia.

Materials and methods: This case-control study was conducted in 50 patients with hyperlipidemia and 50 healthy controls. DNA isolation from whole blood was performed using salting out procedure. Promoter methylation of the Pcsk9 gene was analyzed by methylation-specific PCR (MSP). Ten MSP products were sequenced to confirm the data obtained.

Results: According to MSP results, methylation pattern of pcsk9 gene promoter displayed an unmethylated status among the patients and control individuals. In other words, no methylation was seen in case and control samples.

Conclusion: The current study showed no significant association between PCSK9 methylation pattern and blood lipid profile level in case group and control group.

Keywords: hyperlipidemia, methylation, pcsk9

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (199): 156-161 (Persian).

* Corresponding Author: Maryam Tahmasebi-birgani - School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (E-mail: Tahmasebi-ma@ajums.ac.ir)

بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 در بیماران مبتلا به هایپرلیپیدمی

سمانه بهرامی¹
مریم طهماسبی بیرگانی²
مهدی بیژن زاده³
سید علی حسین صابری⁴

چکیده

سابقه و هدف: هایپرلیپیدمی از مهم ترین عوامل خطر بروز بیماری های عروق کرونر محسوب می شود و به معنای افزایش غیرطبیعی لیپیدها یا لیپوپروتئین ها در خون می باشد. PCSK9 نهمین عضو شناسایی شده از خانواده پروپروتئین کانورتاز (PC) می باشد، به LDLR در سطح سلول های کبدی متصل می شود و منجر به تجزیه آن در لیزوزوم ها می شود که بدین صورت منجر به هایپرلیپیدمی می شود. هدف از این مطالعه، بررسی متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 در بیماران مبتلا به هایپرلیپیدمی می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق مورد شاهدهی، 50 بیمار مبتلا به هایپرلیپیدمی و 50 فرد کنترل سالم شرکت نمودند و استخراج DNA به روش حذف نمکی (Salting Out) انجام گردید. جهت بررسی متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9، واکنش زنجیره ای پلیمراز ویژه متیلاسیون (MSP) انجام گردید. همچنین جهت تایید نتایج به دست آمده، 10 محصول MSP توالی یابی شد.

یافته ها: نتایج حاصل از MSP وضعیت غیرمتیله را در تمامی نمونه های افراد بیمار و کنترل نشان داد، به عبارتی در هیچ یک از نمونه های بیمار و کنترل متیلاسیون مشاهده نشد.

استنتاج: یافته ها موید این مطلب می باشد که متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 در گروه بیمار و افراد کنترل با سطح پروفایل چربی خون ارتباط معنی داری وجود ندارد.

واژه های کلیدی: هایپرلیپیدمی، متیلاسیون، PCSK9

مقدمه

وراثتی که با نام هایپرکلسترولمی خانوادگی (FH) شناخته می شود، عمدتاً به علت جهش در ژن گیرنده LDL (LDLR) و ژن آپولیپوپروتئین (APOB B-100) ایجاد می شود (3)، اما جهش در ژن دیگری تحت عنوان PCSK9 به عنوان سومین ژن مسبب این اختلال

هایپرلیپیدمی از شایع ترین بیماری های مزمن می باشد که طی آن سطح لیپیدها یا لیپوپروتئین ها در خون به شکل غیرطبیعی افزایش می یابد (1)، برخی ارثی هستند و برخی دیگر متعاقب ابتلا به بیماری هایی نظیر دیابت، بیماری های کبدی و یا رژیم غذایی نادرست حادث می شود (2). فرم

E-mail: Tahmasebi-ma@ajums.ac.ir

مؤلف مسئول: مریم طهماسبی بیرگانی - اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

2. استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

3. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

4. استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: 1399/4/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/5/12 تاریخ تصویب: 1400/3/3

معرفی شده است (4). مکانیسم عمل PCSK9 توانایی اتصال آن به گیرنده سطح سلول‌های کبدی می‌باشد که بدین گونه گیرنده‌های LDL کبدی را کاهش می‌دهد و این رسپتورها شکسته و تجزیه می‌شوند (5) و هنگامی که غلظت LDL-C خون افزایش می‌یابد به آرامی در جدار داخلی سرخرگ‌هایی با قطر متوسط و بزرگ رسوب می‌کند و منجر به تشکیل پلاک‌های فیبری-چربی و تنگی رگ و تصلب شراین می‌شود که از علل اصلی بروز بیماری‌های ایسکمی دهنده رگ‌های قلب و مغز به شمار می‌رود (6). تغییرات اپی‌ژنتیک می‌تواند بروز برخی بیماری‌ها حتی انواع تک ژنی را دستخوش تغییر کند (7). اپی‌ژنتیک تغییرات در بیان ژن می‌باشد که توالی DNA دستخوش تغییر نمی‌شود (8). متیلاسیون DNA از شناخته شده‌ترین تغییرات اپی‌ژنتیکی در پستانداران بوده که در تشکیل نواحی هتروکروماتین ژنوم نقش دارد و اگر در نواحی پروموتور ژن رخ دهد منجر به مهار رونویسی از روی ژن می‌شود (9). متیلاسیون DNA به عنوان یک مارکر تشخیص به موقع و پیش‌آگهی در بسیاری از بیماری‌های مختلف ارائه شده است (10). هدف از این مطالعه، بررسی متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 در بیماران مبتلا به هایپرلیپیدمیایی بود که برای جهش‌های سه ژن LDLR، ApoB و PCSK9 منفی بودند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به تصویب رسیده است. در این مطالعه، 50 بیمار مبتلا به هایپرلیپیدمی و 50 کنترل سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. معیارهای ورود به مطالعه در بیماران افرادی بودند که دارای سطح کلسترول تام بیش از 290 میلی‌گرم بر دسی لیتر، سابقه خانوادگی بیماری‌های قلبی عروقی و سطح BMI کم‌تر از 23 بودند. شاخص‌های خروج شامل دیابت، فشارخون، بیماری‌های کلیوی و BMI بیش از 23 بود. گروه سالم افرادی بودند که فشارخون، دیابت، بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های

کلیوی، اختلالات لیپیدی و چاقی را نداشتند. در این تحقیق تمامی شرایط اخلاقی پزشکی رعایت گردید و قبل از انجام نمونه‌گیری فرم رضایت‌نامه از بیماران گرفته شد. DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی با روش پروتئیناز K و حذف با استفاده از غلظت بالای نمک استخراج شد (11). برای بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 از روش PCR مختص متیلاسیون (MSPCR) استفاده شد. ژنوم افراد مورد مطالعه با استفاده از کیت بی‌سولفیت ساخت شرکت QIAGEN آلمان Lot No:142339708 و با توجه به نحوه دستورالعمل کیت آماده‌سازی گردید. این روش نیازمند دو جفت پرایمر می‌باشد، توالی پرایمرهای مورد نظر در جدول شماره 1 آورده شده است.

جدول شماره 1: توالی پرایمر

پرایمر	5'>3' توالی	سایز محصول
Me-F	GTA GTG AGA TTG GTT CGG GC	149
Me-R	ACG ACG CCT TAA ACC TTA CG	149
UMe-F	AGG TAG TGA GAT TGG TTT GGG T	156
UMe-R	CAC CAA CAA CAC CTT AAA CCT TAC	156

Me: Methylated; Ume: Unmethylated;
F: Forward; R: Reverse

روش کار به طور خلاصه به این صورت بود که محتویات هر تیوپ شامل 2 میکرولیتر DNA تیمار شده به وسیله بیسولفیت، 0/5 میکرولیتر پرایمر مستقیم، 0/5 میکرولیتر پرایمر معکوس، 8 میکرولیتر Master Mix و با آب مقطر استریل به حجم نهایی 25 میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب‌های بالا در شرایط دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل به صورت 95 درجه به مدت 1 دقیقه، annealing پرایمرهای متیله و غیرمتیله در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و مرحله طویل شدن در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و در نهایت 7 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد و در دستگاه ترموسایکلر مدل PeQLab, 96 universal gradient, UK قرار داده شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد، مشاهده باند 149 bp نشان‌دهنده وجود متیلاسیون در پروموتور ژن PCSK9 و باند 156 bp

عدم متیلاسیون را نشان می‌دهد. همچنین جهت تایید باندهای مورد مشاهده، 10 محصول PCR مورد توالی‌یابی قرار گرفت.

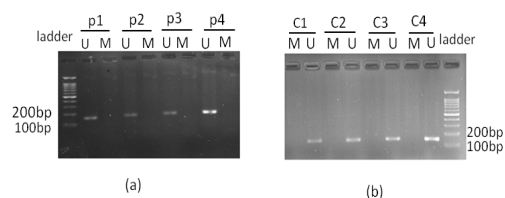
یافته‌ها و بحث

خصوصیات بالینی افراد مورد مطالعه در جدول شماره 2 ذکر شده است.

جدول شماره 2: خصوصیات کلینیکی افراد بیمار و کنترل

کنترل	بیمار	خصوصیات
انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	
24/26	20/30	مردان
72/12 $\pm$ 10/44	03/8 $\pm$ 12/47	سن (سال)
49/16 $\pm$ 2/152	73/21 $\pm$ 96/303	TC (mg/dl)
74/43 $\pm$ 70/106	30/106 $\pm$ 34/250	TG (mg/dl)
02/7 $\pm$ 50/43	75/7 $\pm$ 66/40	HDL-C (mg/dl)
80/18 $\pm$ 38/90	19/29 $\pm$ 32/205	LDL-C (mg/dl)

نتایج حاصل از آزمایش MSP پروموتور ژن PCSK9 و با شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روش‌های آزمایش، منجر به تولید محصولی به طول 156 جفت باز به عنوان قطعه مورد آزمایش در مورد عدم متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 در نمونه‌های افراد بیمار و کنترل شد، نتایج موید این مطلب است که پروموتور ژن مذکور در افراد بیمار و کنترل در وضعیت غیر متیله قرار دارند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: الکتروفورز محصول PCR در تعدادی از نمونه‌های بیمار و کنترل. تصویر (a) نشان‌دهنده وضعیت متیلاسیون در چند بیمار مبتلا به هایپرلیپیدمی و تصویر (b) وضعیت متیلاسیون را در افراد کنترل نشان می‌دهد. (بیمار - P، کنترل - C، متیله - M، غیر متیله - U)

لازم به ذکر است که نمونه‌هایی که با پرایمرهای غیر متیله تکثیر یافته‌اند، قادر به تکثیر با پرایمرهای متیله نیستند و بالعکس. همچنین در توالی‌یابی سنگر مشاهده گردید که تمامی بازهای C غیر CpG و همچنین بازهای C

در ناحیه CpG که متیله نمی‌باشند، به باز t تبدیل شده‌اند که تاییدکننده‌ی وضعیت غیر متیله می‌باشد. نتایج حاصله نشانگر این مطلب می‌باشد که ارتباط معناداری میان متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 با پارامترهای بالینی بیمار شامل جنس، سن و سطح پروفایل چربی خون دیده نمی‌شود. هایپرکلسترولمی خانوادگی یک بیماری ژنتیکی با الگوی وراثتی اتوزومی غالب می‌باشد که میزان شیوع آن متأسفانه در جوامع انسانی نسبتاً بالا است. تشخیص زودرس و درمان این بیماری می‌تواند ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی زودرس را کاهش دهد. طی پروژه‌ی پیشین که به بررسی تغییرات نوکلئوتیدی شایع در ژن‌های LDLR، ApoB و PCSK9 بر روی همین بیماران شرکت‌کننده در پژوهش صورت گرفته بود، جهش شایعی در این ژن‌ها مشاهده نشد و از آنجایی که جهش مسببی در این بیماران یافت نشد، می‌توان یک احتمال را در نظر گرفت که علت اپی ژنتیک برای هایپرلیپیدمی وجود دارد. شواهدی وجود دارد که مکانسیم اپی ژنتیک ممکن است در تنظیم سطح چربی بین افراد نقش داشته باشد در نتیجه ممکن است همراه با ریسک بیماری‌های قلبی عروقی باشد (12). ژن PCSK9 در بازوی کوتاه کروموزوم 1 واقع شده است و به میزان بالایی در کبد بیان می‌شود (13). هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات بالقوه متیلاسیون DNA بر تنوع پروفایل چربی خون در افراد هایپرلیپیدمی و کنترل بود که نتایج به‌دست آمده، ارتباط معنی‌داری میان متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 با سطح لیپیدهای پلاسما نشان نداد. نتایج این مطالعه مشابه با نتایج به‌دست آمده از مطالعه Peng و همکارانش می‌باشد که ارتباط معنی‌داری میان متیلاسیون پروموتور ژن ABCG1 با سطح پروفایل چربی در بیماران مبتلا به عروق کرونری یافت نکردند (14). علاوه بر این، غزنوی و همکارانش با بررسی متیلاسیون پروموتور ژن ABCA1 در بیماران مبتلا به عروق کرونری ارتباط معنی‌داری میان متیلاسیون با سطح لیپید پلاسما در بیماران مبتلا به عروق کرونری مشاهده نکردند (15).

وجود دارد (18). یافته های مطالعه حاضر، حاکی از آن است که متیلاسیون پروموتور ژن PCSK9 نقشی در تنوع سطح چربی در جمعیت مورد مطالعه ندارد و متیلاسیون این ژن فاکتور مرتبط با بیماری نیست بلکه حوادث مولکولی دیگری نیز در شروع و ایجاد بیماری می تواند دخیل باشد که تایید این موضوع مستلزم بررسی های بیش تر در جامعه آماری بزرگ تر می باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که تامین مالی پروژه را به عهده گرفتند و همچنین از اساتید محترم گروه ژنتیک پزشکی، سپاسگزاری می گردد. این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی خانم سمانه بهرامی دانشجوی ارشد ژنتیک پزشکی (طرح تحقیقاتی شماره CMRC-9632 و کد اخلاق IRAJUMS.REC.1396.599) می باشد.

References

- Li B, Hui F, Yuan Z, Shang Q, Shuai G, Bao Y, et al. Untargeted fecal metabolomics revealed biochemical mechanisms of the blood lipid-lowering effect of koumiss treatment in patients with hyperlipidemia. *Journal of Functional Foods* 2021; 78: 104355.
- Nobukuni Y, Higashikawa F, Miyagawa K, Eboshida A. Hyperlipidemia: Complex Pathophysiology Caused by Multiple Genetic and Environmental Factors. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 2005; 60(4): 426-441.
- Nomura A, Tada H, Okada H, Nohara A, Ishikawa H, Yoshimura K, et al. Impact of genetic testing on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia (GenTLe-FH): a randomised waiting list controlled open-label study protocol. *BMJ Open* 2018; 8(12): e023636.
- Raal F, Panz V, Immelman A, Pilcher G. Elevated PCSK9 levels in untreated patients with heterozygous or homozygous familial hypercholesterolemia and the response to high-dose statin therapy. *J Am Heart Assoc* 2013; 2(2): e000028.
- on JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(2): 71-77.
- Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care* 2013; 40(1): 195-211.
- Zadel M, Maver A, Kovanda A, Peterlin B. DNA methylation profiles in whole blood of Huntington's disease patients. *Front Neurol* 2018; 9: 655.
- Braun KV, Voortman T, Dhana K, Troup J, Bramer WM, Troup J, et al. The role of DNA

Alonso و همکارانش با اندازه گیری غلظت پلاسمایی PCSK9 به روش الیزا و تعیین میزان کلسیفیکاسیون عروق کرونری در بیماران مبتلا به هایپرکلسترولمی خانوادگی مشاهده کردند در افرادی که سطح غلظت پلاسمایی بالای از PCSK9 را دارند، میزان کلسیفیکاسیون عروق کرونری بیش تر می باشد و سطح پلاسمایی PCSK9 مرتبط با شدت ابتلا به بیماری عروق کرونری می باشد (16). Fang و همکارانش با بررسی متیلاسیون پروموتور ژن ABCA1 در بیماران مبتلا به عروق کرونری زودرس ارتباط معنی داری با کاهش سطح HDL-C سرم، سطح بالای متیلاسیون پروموتور ژن ABCA1 و افزایش ریسک ابتلا به عروق کرونری زودرس را مشاهده کردند (17). در مطالعه ای که توسط Guay و همکارانش انجام شد به این نتیجه رسیدند که ارتباط معناداری میان متیلاسیون پروموتور ژن های LPL و CETP و تنوع پروفایل چربی خون در بیماران مبتلا به کلسترول بالای خانوادگی

- methylation in dyslipidaemia: A systematic review. *Prog Lipid Res* 2016; 64: 178-191.
9. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-463.
 10. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J, Gomez-Cabrero D, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics* 2013; 29(2): 189-196.
 11. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
 12. Gomez-Alonso MdC, Kretschmer A, Wilson R, Pfeiffer L, Karhunen V, Seppälä I, et al. DNA methylation and lipid metabolism: an EWAS of 226 metabolic measures. *Clinical Epigenetics* 2021; 13(1): 1-19.
 13. van Asch B, da Costa LFT. Patterns and tempo of PCSK9 pseudogenizations suggest an ancient divergence in mammalian cholesterol homeostasis mechanisms. *Genetica* 2021; 149(1): 1-19.
 14. Peng P, Wang L, Yang X, Huang X, Ba Y, Chen X, et al. A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the ABCG1, GALNT2 and HMGCR genes and coronary heart disease. *PloS One* 2014; 9(8): e102265.
 15. Ghaznavi H, Mahmoodi K, Soltanpour MS. A preliminary study of the association between the ABCA1 gene promoter DNA methylation and coronary artery disease risk. *Mol Biol Res Commun* 2018; 7(2): 59-65 (Persian).
 16. Alonso R, Mata P, Muñoz O, Fuentes-Jimenez F, Díaz JL, Zambón D, et al. PCSK9 and lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 254: 249-253.
 17. An F, Liu C, Wang X, Li T, Fu H, Bao B, et al. Effect of ABCA1 promoter methylation on premature coronary artery disease and its relationship with inflammation. *BMC Cardiovasc Disord* 2021; 21(1): 78.
 18. Guay S, Brisson D, Lamarche B, Marceau P, Vohl M, Gaudet D, et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis* 2013; 228(2): 413-420.