

УДК 577.218

Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза

О. Г. Кулакова^{1,2*}, М. Р. Кабилов³, Л. В. Данилова^{4,5}, Е. В. Попова¹, О. А. Батурина³,
Е. Ю. Царева^{1,2}, Н. М. Баулина^{1,2}, И. С. Киселев^{1,2}, А. Н. Бойко¹, А. В. Фаворов^{4,5},
О. О. Фаворова^{1,2}, В. В. Власов³

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, Россия

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А, Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8, Россия

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, Россия

⁵Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

*E-mail: olga.koulakova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2016

Принята к печати 25.04.2016

РЕФЕРАТ Рассеянный склероз (РС) – это тяжелое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы с полигенным типом наследования. Помимо генетических факторов, важную роль в развитии и течении РС могут играть эпигенетические механизмы, в первую очередь метилирование ДНК, влияющее на экспрессию генов. В настоящей работе для поиска дифференциально метилированных CpG-сайтов, ассоциированных с развитием двух основных клинических форм заболевания – ремиттирующего РС (РРС) и первично-прогрессирующего РС (ППРС), впервые проведен полногеномный анализ профиля метилирования ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови больных РРС и ППРС в сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы. Проведено также прямое сравнение профилей метилирования ДНК у пациентов с РРС и ППРС. При всех попарных сравнениях выявлены существенные различия в профилях метилирования. При иерархической кластеризации по уровню метилирования обнаруженных дифференциально метилированных сайтов (ДМС) и при визуализации данных с помощью метода главных компонент наблюдается четкое объединение образцов ДНК каждой из сравниваемых групп в отдельный кластер. У больных ППРС в сравнении со здоровыми индивидами выявлено большее число ДМС, чем у больных РРС в сравнении со здоровыми индивидами (67 против 30). Более половины всех ДМС расположены в генах, что превышает число, ожидаемое при случайном распределении ДМС среди проб. В случае РРС большая часть ДМС гипометилирована, при ППРС – гиперметилирована. В CpG-островках и соседних областях расположено 60% ДМС, выявляемых при сравнении РРС с контролем, и 79% – при сравнении ППРС с контролем. Прямое сравнение двух форм РС выявило 51 ДМС, из которых большая часть (82%) гиперметилирована при ППРС. В целом, показано, что ППРС отличается от РРС большими изменениями в паттерне метилирования ДНК. Полученные результаты свидетельствуют об участии метилирования ДНК в развитии РС. Впервые показано, что эпигенетический механизм метилирования ДНК вовлечен в формирование клинически различных форм РС – РРС и ППРС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метилирование ДНК, мононуклеарные клетки крови, рассеянный склероз, эпигенетика.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМС – дифференциально метилированный сайт; МНК – мононуклеарные клетки периферической крови; РС – рассеянный склероз; РРС – ремиттирующий РС; ППРС – первично-прогрессирующий РС; ЦНС – центральная нервная система; EDSS (Expanded Disability Status Scale) – расширенная шкала оценки степени инвалидизации; HLA (human leukocyte antigen) – главный комплекс гистосовместимости.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – это тяжелое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС) со сложным комплексом патогенетических процессов, среди которых важнейшую роль играет хроническое аутоиммунное воспаление, направленное на миелиновую оболочку нейронов и приводящее к демиелинизации, гибели олигодендроцитов, разрушению аксонов, глиозу и нейродегенерации. Этиология РС остается не выявленной. Проведенные в последние годы полногеномные исследования ясно показали, что наблюдаемый тип наследования РС, характерный для полигенных заболеваний, действительно определяется совместным вкладом множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов [1–3]. Однако если исключить из рассмотрения гены главного комплекса гистосовместимости (HLA), то каждый из аллелей риска РС, взятый отдельно, дает относительно малый эффект: отношения шансов для отдельных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) находятся, за редкими исключениями, в диапазоне 1.1–1.3 [4]. Совокупный вклад всех генетических вариантов, идентифицированных при полногеномных исследованиях, может объяснить менее 27% наследуемости [5] – проблема, получившая название «недостающей», или «потерянной» наследуемости (missing heritability). Эти наблюдения, а также низкий уровень конкордантности РС у монозиготных близнецов [6], влияние некоторых факторов внешней среды [7] и большая распространенность РС среди женщин [8] привели к предположению о том, что, помимо генетических факторов, важную роль в развитии и течении РС могут играть эпигенетические механизмы.

Эпигенетические модификации представляют собой различные функциональные изменения в геноме организма, которые влияют на экспрессию генов в различных клетках или тканях, но не связаны с изменением нуклеотидной последовательности ДНК. Один из наиболее хорошо изученных эпигенетических механизмов – метилирование ДНК, самым распространенным вариантом которого является присоединение метильной группы к цитозиновым основаниям в составе CpG-динуклеотидов в позиции C5 цитозинового кольца. Этот процесс модулирует экспрессию близлежащих генов. Хотя глобальное метилирование ДНК довольно стабильная эпигенетическая модификация, передающаяся дочерним клеткам в ходе митоза, различные факторы внешней среды могут вызывать динамические изменения эпигенома в течение жизни. Полученные в последние годы результаты свидетельствуют о том, что эпигенетические модификации могут играть важную роль в формировании риска развития аутоиммунных

и нейродегенеративных заболеваний, в частности РС [9, 10].

Сравнительный анализ метилирования отдельных генов у больных РС и у здоровых доноров выявил гипометилирование в промоторной области гена *PAD2*, кодирующего пептидиларгининдезаминазу типа II, в белом веществе мозга [11] и в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК) [12]. Гиперметилирование гена протеинтирозинфосфатазы *SHP-1* обнаружено в МНК больных РС [13]. В последние пять лет проведено несколько сравнительных исследований полногеномного профиля метилирования ДНК больных РС и здоровых индивидов. Анализ метилома проводили как в клетках крови (МНК, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитах) [6, 14–16], так и в ткани белого вещества мозга [17]. Хотя все исследования проводили на небольшом количестве образцов, в CD4+ Т-лимфоцитах наблюдали дифференциальное метилирование генов HLA класса II и некоторых других генов иммунной системы, ассоциация которых с заболеванием была показана ранее [15], а в тканях белого вещества выявлено дифференциальное метилирование генов, связанных с выживаемостью олигодендроцитов [16].

РС характеризуется выраженной клинической гетерогенностью [8]. В цитированных работах объектом эпигенетических исследований были больные с наиболее распространенной формой РС – ремиттирующим РС (РРС), для которого характерно чередование периодов обострения и ремиссии. Примерно у 10–15% больных наблюдается первично-прогрессирующий РС (ППРС), проявляющийся непрерывным нарастанием неврологического дефицита с начала заболевания. Протекает ППРС значительно тяжелее, чем РРС; уже на ранних стадиях ППРС отчетливо выражены признаки атрофии мозга. Пока не предложено какого-либо специфического лечения больных ППРС, а все известные в настоящее время иммуномодулирующие препараты и кортикостероиды, применяемые при РРС, в этом случае малоэффективны.

В настоящей работе впервые проведен полногеномный анализ профиля метилирования ДНК в МНК больных РРС и ППРС в сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы для поиска дифференциально метилированных CpG-сайтов, ассоциированных с развитием двух основных клинических форм заболевания, а также сравнили профили метилирования ДНК у пациентов с РРС и ППРС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Характеристика больных РС и контролей**

В работу включены 14 больных РРС (девять женщин и пять мужчин) и восемь больных ППРС (шесть

женщин и два мужчины) в возрасте от 29 до 58 лет. Диагноз поставлен согласно критериям МакДональда в последней версии 2010 года [18]. Средний балл по шкале инвалидизации (EDSS) у больных РС составлял 2.32 ± 0.82 , у больных ППРС – 4.29 ± 0.39 . Включенные в исследование больные никогда не принимали иммуномодулирующих препаратов. В контрольную группу вошли шесть женщин и двое мужчин в возрасте от 28 до 50 лет без острых или хронических неврологических заболеваний. Все они проживали в Московском регионе; оба их родителя были этническими русскими (по данным анкетирования). От всех участников получено информированное согласие на проведение генетических исследований.

Выделение ДНК и анализ полногеномного метилирования

Образцы периферической крови больных РС (8 мл) собирали в пробирки с EDTA (Vacuette® EDTA Tubes, Greiner Bio-One). Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) выделяли с помощью центрифугирования на градиенте фиколл-гипака. Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNA Midi Kit (Qiagen, Santa Clara, CA, США) по методике производителя. Бисульфитную конверсию геномной ДНК проводили при помощи набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research). Уровень метилирования ДНК анализировали на сканере iScan (Illumina) с использованием чипов Infinium HumanMethylation450 BeadChip [19] в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН).

Биоинформатический анализ

Первичная обработка данных и их нормализация были выполнены с помощью специально разработанных скриптов на языке программирования R [20].

Оценку уровня метилирования каждого CpG-сайта в образце проводили с помощью вычисления показателя бета (beta-value), который представляет собой отношение интенсивности сигнала метилирования данной пробы к общей интенсивности этой пробы (суммы интенсивностей метилированного и неметилированного сигнала). Значение бета варьирует от 0 (неметилированная проба) до 1 (полностью метилированная проба). Вычисление значений показателя бета для каждой пробы в каждом образце проводили с помощью пакета methylumi [21].

Из последующего анализа были исключены пробы, содержащие однонуклеотидный полиморфизм на расстоянии до 10 п.н. от исследуемого CpG-сайта, и пробы, перекрывание которых с повторяющимися последовательностями ДНК обнаружено на расстоянии до 15 п.н. от исследуемого CpG-сайта. Исключены

также пробы, у которых величина p значимости обнаружения сигнала (detection p -value) была больше 0.05 более чем в 5% образцов, а также пробы, расположенные в X и Y хромосомах. В итоге, из исходных примерно 485 000 CpG-сайтов анализировали 384 138.

CpG-сайт считали дифференциально метилированным (ДМС), если различия между уровнями его метилирования в двух группах удовлетворяли двум условиям: абсолютные величины разности средних по группам значений показателя бета должны быть > 0.1 , а соответствующая величина $p < 0.01$. Локализацию индивидуального CpG-сайта в CpG-островке определяли с использованием аннотации UCSC в hg19; соседние области (shore) локализованы в 2 т.п.н. от CpG-островков, отдаленные области (shelf) – в 2 т.п.н. от соседних областей (shore) [19]. Для оценки величины p использовали t -тест Стьюдента, модифицированный по эмпирическому методу Байеса и предоставляемый пакетом limma [22] в программном обеспечении R. Малый размер выборки не позволял вводить поправки на число гипотез (проб).

Визуализацию сигналов ДМС с помощью метода главных компонент (principal component analysis, PCA) и построение карт интенсивности сигналов (heatmap) осуществляли с использованием стандартных методов среды R и специально разработанных скриптов на языке программирования R [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

С целью изучения возможности вовлечения эпигенетического механизма метилирования ДНК в развитие разных форм РС мы провели полногеномное профилирование сайтов метилирования ДНК из МНК периферической крови в репрезентативных группах больных РС, больных ППРС и здоровых доноров (контроль) и сравнили образцы больных РС с контрольными образцами, образцы больных ППРС с контрольными образцами, а также образцы больных РС и ППРС между собой.

Карты интенсивности сигналов ДМС, выявленных при этих трех типах сравнения, представлены на рис. 1А–В. Всего обнаружено 136 ДМС, наблюдавшихся при одном или более попарном сравнении. Сравнительный анализ метилирования ДНК при всех трех попарных сравнениях выявил существенные различия в профилях метилирования. При иерархической кластеризации по уровню метилирования 136 ДМС наблюдается четкое объединение образцов ДНК больных каждой из сравниваемых групп в отдельный кластер. Визуальное сравнение интенсивности сигналов ДМС (соотношение синего и желтого цветов) указывает на более высокий уровень метилирования ДНК больных ППРС, чем в контроле и у больных РС.

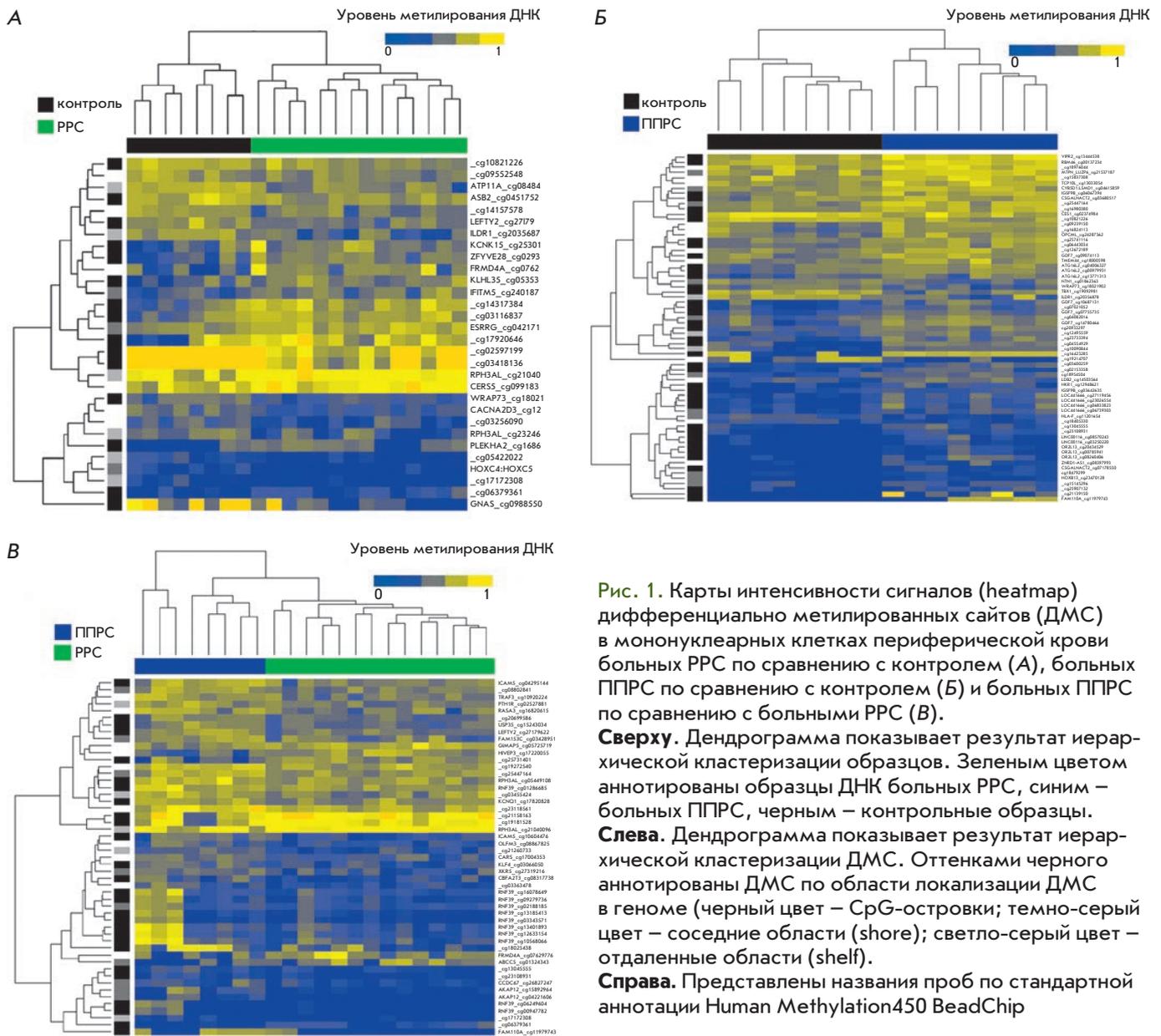


Рис. 1. Карты интенсивности сигналов (heatmap) дифференциально метилированных сайтов (ДМС) в мононуклеарных клетках периферической крови больных РРС по сравнению с контролем (А), больных ППРС по сравнению с контролем (Б) и больных ППРС по сравнению с больными РРС (В).

Сверху. Дендрограмма показывает результат иерархической кластеризации образцов. Зеленым цветом аннотированы образцы ДНК больных РРС, синим – больных ППРС, черным – контрольные образцы. **Слева.** Дендрограмма показывает результат иерархической кластеризации ДМС. Оттенками черного аннотированы ДМС по области локализации ДМС в геноме (черный цвет – CpG-островки; темно-серый цвет – соседние области (shore); светло-серый цвет – отдаленные области (shelf)). **Справа.** Представлены названия проб по стандартной аннотации Human Methylation450 BeadChip

Проведена визуализация данных для этих ДМС с помощью метода главных компонент (рис. 2). Видно, что включенные в исследование образцы хорошо дискриминируются в трехмерном пространстве первых трех главных компонент в три группы, и эти группы соответствуют трем фенотипам: РРС, ППРС и отсутствие этих заболеваний.

Характеристика найденных ДМС представлена в табл. 1. При сравнении больных РРС со здоровыми донорами (контроль) выявлены различия в уровнях метилирования 30 ДМС, больных ППРС с контрольной группой – 67 ДМС, а при сравнении двух форм РС обнаружено различие в уровне метилирования

51 сайта. В случае РРС большая часть проб гипометилирована в сравнении с контролем (из 30 ДМС гиперметилированы только 43%). Напротив, у больных ППРС число гиперметилированных проб повышено как по сравнению с контролем (86% проб гиперметилированы), так и по сравнению с больными РРС (82% проб гиперметилированы).

Более половины ДМС расположены в генах: 18 из 30 при сравнении РРС vs контроль, 38 из 67 – при ППРС vs контроль, 35 из 51 при сравнении ППРС vs РРС (табл. 1). Поскольку в платформе HumanMethylation450 генные пробы составляют примерно треть всех проб [19], можно констатировать

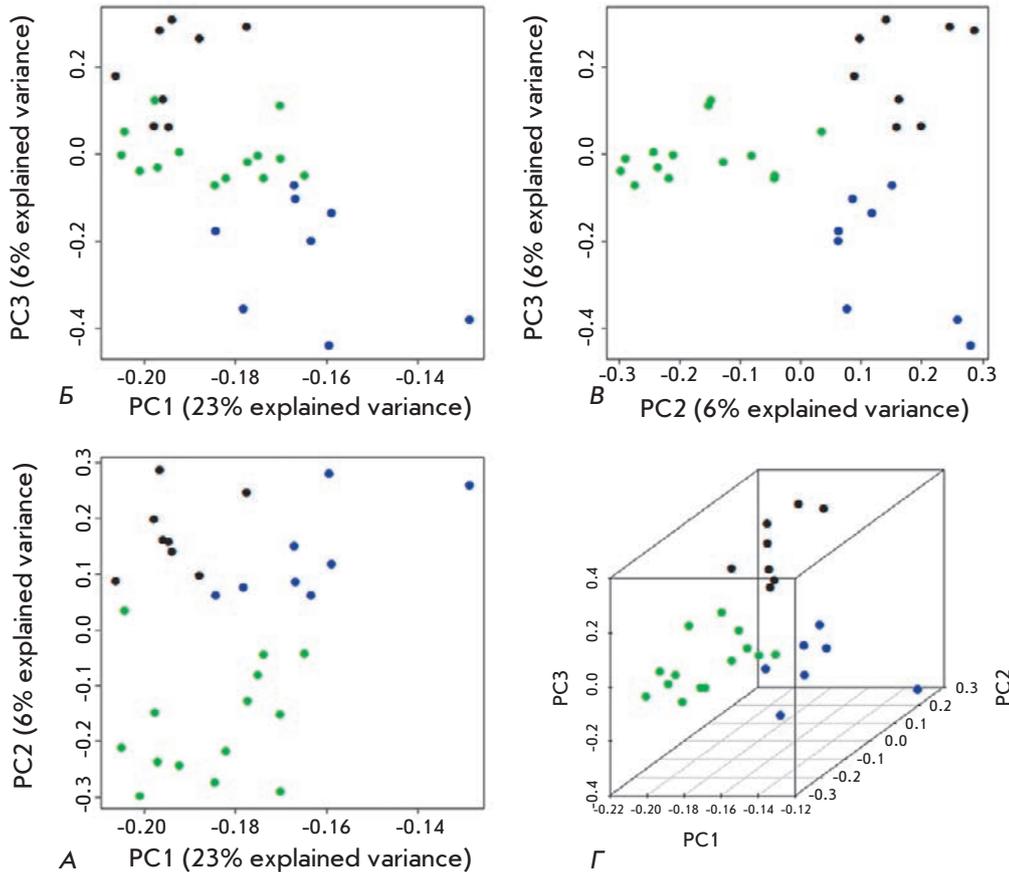


Рис. 2. Двумерная (2D) (А–В) и трехмерная (3D) (Г) кластеризация образцов в пространстве главных компонент (principal component analysis, PCA) дифференциально метилированных сайтов. Зеленые точки – образцы больных РРС, синие – образцы больных ППРС, черные – образцы контрольных индивидов. По осям: главные компоненты PC1, PC2, PC3, в скобках для каждой главной компоненты указана объясняемая ею доля варируемости данных

определенное превышение числа наблюдаемых внутригенных ДМС над ожидаемым при случайном распределении ДМС среди проб. Некоторые гены содержат по несколько ДМС; поэтому число генов с ДМС меньше – 17, 25 и 22 соответственно. Список этих генов (отдельно белоккодирующих, которых большинство, и белокнекодирующих) также представлен в табл. 1. 53% генов содержат ДМС с более высоким уровнем метилирования в первой группе при сравнении РРС vs контроль, 76% – при сравнении ППРС vs контроль и 86% – при сравнении ППРС vs РРС. В гене *RPH3AL* обнаружены два ДМС, из которых один характеризуется повышенным, а второй – пониженным уровнем метилирования при сравнении больных РРС со здоровыми индивидами и при сравнении больных ППРС с РРС.

Согласно принятому в работе критерию, CpG-сайт считается ДМС при 10% разнице в средних уровнях его метилирования в сравниваемых группах (абсолютные величины разности средних по группам значений показателя бета должны быть > 0.1). Некоторые ДМС характеризовались более суще-

ственными различиями в уровне метилирования. При сравнении групп больных РРС и здоровых индивидов абсолютное значение разности средних значений показателя бета для пяти сайтов изменялось более чем на 20%. Из этих сайтов три находятся в генах: средний уровень метилирования сайтов *cg07629776 (FRMD4A)* и *cg16866567 (PLEKHA2)* в группе больных РРС повышен на 21.5 и 25.1% соответственно, а сайта *cg09885502 (GNAS)* – понижен на 43.5% в группе больных РРС по сравнению с контролем. При сравнении больных ППРС со здоровыми индивидами для шести сайтов из 67 абсолютное значение разности средних значений показателя бета отличалось между группами более чем на 20%. При этом наибольшая разница в уровне метилирования, а именно, его повышение на 41%, наблюдалась для сайта *cg11979743* в гене *FAM110A*, и это единственный из шести сайтов, расположенный в гене. При прямом сравнении ППРС и РРС обнаружено семь ДМС, уровень метилирования которых изменялся более чем на 20% (диапазон 20.1–31.9%). Из них пять ДМС находятся в трех генах: средний

Таблица 1. Характеристика дифференциально метилированных сайтов (ДМС), выявленных при сравнительном анализе метилирования ДНК из МНК больных разными формами РС и здоровых индивидов (контроль)

Сравниваемые группы	PPC vs контроль	ПППС vs контроль	ПППС vs PPC
Количество ДМС	30	67	51
Из них ДМС с более высоким уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп	13 (43%)	58 (86%)	42 (82%)
Количество ДМС в генах	18	38	35
Количество генов, содержащих ДМС	17	25	22
Из них генов, содержащих ДМС с более высоким уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп	9 (53%)	19 (76%)	19 (86%)
Белоккодирующие гены, содержащие ДМС (число ДМС в гене) [#]	ASB2 ATP11A CACNA2D3 CERS5 ESRRG FRMD4A GNAS HOXC4-HOXC6 IFITM5 ILDR1 KCNK15 KLHL35 LEFTY2 PLEKHA2 RPH3AL (2)* WRAP73 ZFYVE28	ATG16L2 (3) CES1 CSGALNACT2 (2) CYB5D1;LSMD1 FAM110A GDF7 (4) HKR1 HLA-F HOXB13 IGSF9B (2) ILDR1 LDB2 MTPN;LUZP6 NTN1 OPCML OR2L13 (3) RBM46 TBX1 TCP10L TMEM44 VIPR2 WRAP73	ABCC5 AKAP12 (2) CARS CBFA2T3 CCDC67 FAM110A FRMD4A GIMAP5 HIVEP3 ICAM5 (2) KCNQ1 KLF4 LEFTY2 OLFM3 PTH1R RASA3 RNF39 (11) RPH3AL (2)* TRAF3 USP35 XKR5
Белокнекодирующие гены, содержащие ДМС (число ДМС в гене) [#]	-	LINC00116 (2) ZNRD1-AS1 LOC441666 (4)	FAM153C

Примечание. Жирным шрифтом отмечены гены, в которых обнаружены ДМС с повышенным уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп.

*В гене *RPH3AL* выявлены два ДМС, один с повышенным уровнем метилирования, другой – с пониженным.

[#] Указано число ДМС, расположенных в каждом гене, если их более одного.

Таблица 2. Локализация дифференциально метилированных сайтов (ДМС), выявленных при сравнительном анализе метилирования ДНК из МНК больных разными формами РС и здоровых индивидов (контроль), относительно CpG-островков генома человека

Локализация ДМС	Число ДМС при различных сравнениях групп индивидов		
	PPC vs контроль	ПППС vs контроль	ПППС vs PPC
Любая (общее число ДМС)	30 (100%)	67 (100%)	51 (100%)
В CpG-островках (island)	15 (50%)	42 (63%)	27 (53%)
В соседних областях («берег», shore)	3 (10%)	11 (16%)	9 (18%)
В отдаленных областях («шельф», shelf)	6 (20%)	2 (3%)	5 (10%)
В прочих областях («море», sea)	6 (20%)	12 (18%)	10 (19%)

Примечание. Локализацию индивидуального CpG-сайта в CpG-островке (island) определяли с использованием UCSC-аннотации в hg19; соседние области (shore) локализованы в 2 т.п.н. от CpG-островков; отдаленные области (shelf) – в 2 т.п.н. от соседних областей (shore); области, не относящиеся к упомянутым трем категориям, обозначены как «sea».

уровень метилирования сайта cg11979743 (*FAM110A*) повышен на 31.9%, а cg01324343 (*ABCC5*) – понижен на 21.8% в группе больных ППРС по сравнению с больными РРС. В третьем гене, *RNF39*, найдено 11 ДМС, средний уровень метилирования трех из них (cg13401893, cg12633154, cg10568066) повышен на 20.1–21.0% в группе больных ППРС.

Анализ локализации выявленных ДМС показал, что более половины из них находятся в CpG-островках и близлежащих зонах (табл. 2; см. также рис. 1). Это распределение примерно соответствует доле таких проб среди всех проб платформы [19]. Сравнение больных РРС с контролем показывает, что 50% ДМС расположено в CpG-островках и 10% – в соседних с ними областях, в случае больных ППРС доля таких ДМС возрастает до 63 и 16% соответственно, а при сравнении ППРС с РРС – 53 и 18% (табл. 2). Таким образом, метилирование ДНК при ППРС затрагивает функционально более значимые области генома.

Совокупность полученных данных складывается в целостную картину: ППРС отличается от РРС большими изменениями в паттерне метилирования ДНК. Действительно, при ППРС большее число ДМС выявляется в геноме и его (известной) кодирующей части, причем значительно больше половины ДМС и в геноме, и в генах гиперметилированы. Кроме того, при ППРС большее число ДМС, выявляемых при сравнении с контролем, локализовано в CpG-островках и соседних областях (79%), тогда как при РРС их доля составляет 60%.

ОБСУЖДЕНИЕ

С целью установить, участвуют ли эпигенетические механизмы в формировании клинически различных форм РС, мы впервые провели полногеномный анализ метилирования ДНК в МНК больных двумя формами РС – РРС и ППРС – и сравнили профили их метилирования со здоровыми индивидами и между собой. Выявлены существенные различия в профилях метилирования ДНК: при попарном сравнении этих трех групп (14 больных РРС, восемь больных ППРС, восемь индивидов контрольной группы) обнаружено 136 ДМС, характеризующихся различием средних показателей бета > 0.1 и величиной $p < 0.01$ по *t*-тесту Стьюдента. При трехмерной визуализации этих ДМС с помощью метода главных компонент образцы ДНК больных каждой из сравниваемых групп объединяются в отдельный кластер, что свидетельствует об устойчивом вовлечении дифференциального спектра метилирования ДНК в развитие разных форм РС.

Анализ спектра ДМС показал, что ППРС, более агрессивная, чем РРС, клиническая форма РС, от-

личается от РРС большими изменениями в спектре метилирования ДНК при сравнении с нормой. При этом среди ДМС количество сайтов с более высоким уровнем метилирования ДНК у больных ППРС выше, чем в контрольной группе и при РРС. В то же время сравнение РРС с группой контроля выявляет гипометилирование более половины ДМС. Сравнить полученные результаты с опубликованными данными мы можем только в случае РРС. Выявлено значимое гиперметилирование ДНК CD8+ Т-лимфоцитов у больных РРС [14], в то время как в CD4+ Т-лимфоцитах и в цельной крови не наблюдали изменений общего уровня метилирования ДНК [14] либо отмечали его небольшое уменьшение [15].

Анализ локализации дифференциально метилированных при РС сайтов показал, что более половины из них расположены или в CpG-островках, или во фланкирующих зонах (в диапазоне 2 т.п.н. от CpG-островка, так называемый «берег») (см. табл. 2), что с высокой вероятностью указывает на функциональное значение наблюдаемого метилирования ДНК, которое, как известно, заключается в блокировании экспрессии ряда генов.

Мы провели поиск информации о функциях обнаруженных нами ДМС-содержащих генов, используя базу данных генов человека GeneCards [23], ресурс Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) Gene [24] и ряд других источников. Сравнение групп больных РРС и здоровых индивидов выявляет различия в метилировании генов, которые кодируют белки, участвующие в развитии иммунного ответа (*ASB2*, *LEFTY2*, *PLEKHA2*), в метаболизме липидов (*ILDR1*, *CERS5*), везикулярном транспорте (*RPH3AL*, *ZFYVE28*) и работе ионных каналов (*ATP11A*, *CACNA2D3*, *KCNK15*), а также в регуляции экспрессии многих генов (*ESRRG*, *HOXC4–HOXC6*). Среди них заслуживает отдельного внимания ген *ESRRG*, кодирующий эстроген-подобный рецептор гамма. Этот орфанный рецептор относится к семейству ядерных рецепторов и работает как активатор транскрипции ряда генов, в том числе гена основной ДНК-метилтрансферазы соматических клеток млекопитающих – ДНК-метилтрансферазы 1 (*DNMT1*), за счет прямого связывания с промотором [25] и тем самым регулирует уровень метилирования ДНК в клетке.

Данные о генах, дифференциально метилированных в МНК больных РРС по сравнению со здоровыми индивидами, полученные в нашей работе, не совпадают с результатами других исследований [6, 14–17]. Это не вызывает особого удивления, поскольку к настоящему времени сравнительный анализ метилирования ДНК больных РРС и здоровых

индивидов проводили только в клетках цельной крови, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитах [6, 14–16] и в тканях белого вещества мозга [17] и также не наблюдали совпадения результатов для клеток и тканей разного типа. Несовпадение результатов может быть связано не только с использованием разных популяций клеток, но и с разными критериями выбора ДМС.

Анализ функций генов, дифференциально метилированных у больных ПППС по сравнению со здоровыми индивидами, показал, что среди них есть группа генов, продукты которых в той или иной степени участвуют в развитии и дифференцировке нервной системы (*GDF7*, *MTPN*, *VIPR2*, *NTN1*, *TBX1*), в функционировании опиоидных рецепторов (*OPCML*) и в метаболизме различных ксенобиотиков, включая кокаин и героин (*CES1*). Метилирование генов этой функциональной направленности не было выявлено при сравнении больных РС и здоровых индивидов. При ПППС дифференциальное метилирование затронуло также гены, участвующие в развитии иммунного ответа (*HLA-F*, *MTPN*, *VIPR2*), в регуляции экспрессии многих генов (*HKR1*, *HOXB13*, *LDB2*, *TCP10L*, *TBX1*), в процессах аутофагии (*ATG16L2*), гемостаза (*FAM110A*) и в функционировании внеклеточного матрикса (*CSGALNACT2*).

Среди дифференциально метилированных генов, выявленных при сравнении каждой из форм РС с контролем, обнаружено совпадение всего двух генов – *ILDR1* и *WRAP73(WDR8)*, причем и у больных РС, и у больных ПППС уровень метилирования ДНК был ниже, чем у здоровых индивидов. Точное функциональное значение продуктов каждого из этих генов до конца не выяснено, однако активность рецептора *ILDR1*, по крайней мере частично, связывают с метаболизмом липидов [26], а содержащий консервативные WD-повторы белок *WRAP73* может формировать мультимерные комплексы с другими белками, участвуя в митозе, передаче сигнала в клетке [27] и в формировании ресничек [28].

В нашей работе впервые выявлены гены, метилирование которых отличается у больных двумя основ-

ными формами РС. Продукты этих генов участвуют в развитии и функционировании клеток иммунной системы (*HIVEP3*, *GIMAP5*, *TRAF3*), в регуляции экспрессии многих генов (*AKAP12*, *RASA3*, *CBFA2T3*), в процессах деградации (*USP35*), в работе эндокринной системы (*PTH1R*). Среди них заслуживают отдельного внимания два гена. Так, ген *ICAM5* кодирует дендрит-специфичную молекулу адгезии суперсемейства иммуноглобулинов, которая в ЦНС участвует во взаимодействии нервных клеток друг с другом и с клетками иммунной системы [29]. Из 35 ДМС, обнаруженных при сравнении ПППС vs РС и расположенных в генах, 11 были локализованы в гене *RNF39* и характеризовались более высоким уровнем метилирования ДНК при ПППС. У трех из этих ДМС разница в уровнях метилирования превышала 20%. Ген *RNF39* расположен в области генов HLA класса I. Функция *RNF39* пока не выяснена, однако показана ассоциация полиморфных вариантов этого гена с РС [30] и некоторыми другими аутоиммунными заболеваниями [31]. Гиперметилирование этого гена в CD4+ Т-лимфоцитах выявлено также у больных системной красной волчанкой [32].

Результаты полногеномного анализа профилей метилирования ДНК в МНК больных РС, полученные в нашей работе, свидетельствуют об участии метилирования ДНК – одного из основных способов передачи эпигенетической информации у млекопитающих – в развитии РС. Впервые показано, что эпигенетический механизм метилирования ДНК вовлечен в формирование клинически различных форм РС – РС и ПППС, причем в случае ПППС метилирование, судя по всему, приводит к подавлению экспрессии большего числа генов. ●

*Работа поддержана грантами РФФИ
№ 13-04-40279-Н (ЛД, АФ), 13-04-40280-Н
(МК, ОБ, ВВ) и 13-04-40281-Н (ЕП, НБ, АБ) в рамках
комплексного проекта 13-00-40277-К и грантом
РНФ № 14-14-00605 (ОК, ЕЦ, ИК).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gourraud P.A., Harbo H.F., Hauser S.L., Baranzini S.E. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 248. P. 87–103.
- Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н. // *Генетика.* 2010. Т. 46. С. 302–313.
- Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 3. С. 62–75.
- Bashinskaya V.V., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorov A.V., Favorova O.O. // *Hum. Genet.* 2015. V. 134. P. 1143–1162.
- Lill C.M. // *Front. Neurol.* 2014. V. 5. P. 130.
- Baranzini S.E., Mudge J., van Velkinburgh J.C., Khankhanian P., Khrebtukova I., Miller N.A., Zhang L., Farmer A.D., Bell C.J., Kim R.W., et al. // *Nature.* 2010. V. 464. P. 1351–1356.
- O’Gorman C., Lucas R., Taylor B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 11718–11752.
- Бойко А.Н., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Гусев Е.И. // *Рас-сеянный склероз / Под ред. Гусева Е.И. и др. М.: Реал Тайм, 2011. С. 7–43.*
- Landgrave-Gomez J., Mercado-Gomez O., Guevara-Guzman R. // *Front. Cell Neurosci.* 2015. V. 9. P. 58.
- Meda F., Folci M., Baccarelli A., Selmi C. // *Cell Mol. Immunol.* 2011. V. 8. P. 226–236.
- Mastronardi F.G., Noor A., Wood D.D., Paton T., Moscarello M.A. // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. P. 2006–2016.
- Calabrese R., Zampieri M., Mechelli R., Annibali V., Guastafierro T., Ciccarone F., Coarelli G., Umeton R., Salvetti M., Caiafa P. // *Mult. Scler.* 2012. V. 18. P. 299–304.

13. Kumagai C., Kalman B., Middleton F.A., Vyshkina T., Massa P.T. // *J. Neuroimmunol.* 2012. V. 246. P. 51–57.
14. Bos S.D., Page C.M., Andreassen B.K., Elboudwarej E., Gustavsen M.W., Briggs F., Quach H., Leikfoss I.S., Bjolgerud A., Berge T., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0117403.
15. Graves M., Benton M., Lea R., Boyle M., Tajouri L., Macartney-Coxson D., Scott R., Lechner-Scott J. // *Mult. Scler.* 2013. V. 20. P. 1033–1041.
16. Maltby V.E., Graves M.C., Lea R.A., Benton M.C., Sanders K.A., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Clin. Epigenetics.* 2015. V. 7. P. 118.
17. Huynh J.L., Garg P., Thin T.H., Yoo S., Dutta R., Trapp B.D., Haroutunian V., Zhu J., Donovan M.J., Sharp A.J., et al. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. P. 121–130.
18. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., et al. // *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. P. 292–302.
19. Bibikova M., Barnes B., Tsan C., Ho V., Klotzle B., Le J.M., Delano D., Zhang L., Schroth G.P., Gunderson K.L., et al. // *Genomics.* 2011. V. 98. P. 288–295.
20. <http://www.R-project.org>
21. <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylumi.html>
22. Smyth G.K. // *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* / Ed. R. Gentleman V.C., etc. New York: Springer, 2005. P. 397–420.
23. <http://www.genecards.org>
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
25. Zhang Y., Wang L. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 1269–1275.
26. Chandra R., Wang Y., Shahid R.A., Vigna S.R., Freedman N.J., Liddle R.A. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. P. 3343–3352.
27. Shen K.F., Osmani S.A. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. P. 3842–3856.
28. Kurtulmus B., Wang W., Ruppert T., Neuner A., Cerikan B., Viol L., Sanchez R.D., Gruss O.J., Pereira G. // *J. Cell Sci.* 2015. V. 129. P. 621–636.
29. Tian L., Rauvala H., Gahmberg C.G. // *Trends Immunol.* 2009. V. 30. P. 91–99.
30. Cree B.A., Rioux J.D., McCauley J.L., Gourraud P.A., Goyette P., McElroy J., De Jager P., Santaniello A., Vyse T.J., Gregersen P.K., et al. // *PLoS One* 2010. V. 5. P. e11296.
31. Kurata R., Nakaoka H., Tajima A., Hosomichi K., Shiina T., Meguro A., Mizuki N., Ohono S., Inoue I., Inoko H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 401. P. 533–537.
32. Renauer P., Coit P., Jeffries M.A., Merrill J.T., McCune W.J., Maksimowicz-McKinnon K., Sawalha A.H. // *Lupus Sci. Med.* 2015. V. 2. P. e000101.