

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ЛОКУСЕ *MIR137HG*, АССОЦИИРОВАННОМ С ШИЗОФРЕНИЕЙ И ИНТЕЛЛЕКТОМ, МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНО С ЗАБОЛЕВАНИЕМ И КОГНИТИВНЫМИ ФУНКЦИЯМИ

© 2019 г. М. В. Алфимова^{1, #, *}, Н. В. Кондратьев^{1, #}, А. К. Голов¹, В. Е. Голимбет¹

¹Научный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия

*e-mail: m.alfimova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2018 г.

После доработки 18.04.2018 г.

Принята к публикации 03.05.2018 г.

В крупнейших полногеномных исследованиях шизофрении и когнитивных функций выявлены ассоциации этих фенотипов с полиморфными сайтами в локусе *MIR137HG*, содержащем гены микроРНК *MIR137* и *MIR2682*. В настоящей работе мы предприняли изучение особенностей метилирования CpG-островка, расположенного внутри *MIR137HG* и включающего полностью ген *MIR137* и область, прилегающую к 5'-концу *MIR2682*, в периферической крови 44 больных шизофренией и 50 здоровых. Была проведена оценка связи метилирования данного CpG-островка с шизофренией и когнитивным функционированием. С помощью метода бисульфитного секвенирования единичных молекул ДНК в реальном времени были установлены индивидуальные уровни метилирования каждого из 91 CpG, находящегося на выбранном участке. Все испытуемые заполнили батарею нейропсихологических тестов. Проведенное исследование показало, что изученный CpG-островок является гипометилированным в обеих группах, за исключением одного сайта – CpG (chr1: 98511049), со значительной межиндивидуальной вариативностью доли метилирования. Более высокий уровень метилирования этого CpG был характерен для больных мужчин и связан со снижением когнитивного индекса в общей группе больных и здоровых. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего изучения различных регуляторных механизмов работы генов *MIR137* и *MIR2682* для понимания молекулярной основы формирования когнитивного дефицита при шизофрении.

Ключевые слова: метилирование ДНК, микроРНК, шизофрения, когнитивный дефицит, SMRT-BS.

DOI: 10.1134/S0016675819020036

Шизофрения является тяжелым, инвалидизирующим психическим заболеванием. Многочисленные данные указывают, что ее возникновение и исход тесно связаны с нарушениями когнитивного функционирования пациентов [1]. Это позволяет предположить, что изучение генов, для которых в полногеномных исследованиях (GWAS) показана ассоциация как с шизофренией, так и с когнитивными, может пролить свет на биологические механизмы развития заболевания и сопутствующего ему когнитивного дефицита.

Одним из таких генов является *MIR137HG* на хромосомном участке 1p21.3, содержащий гены, кодирующие микроРНК 137 и 2682 (*hsa-mir-137* и *hsa-mir-2682*). В GWAS, проведенных Консорциумом по психиатрической геномике, выявлены высокозначимые ассоциации шизофрении с однонуклеотидными полиморфизмами (SNP), расположенными в интронной и 5'-области *MIR137HG*

[2–4]. Значение локуса *MIR137HG* для шизофрении подтверждено и крупнейшим GWAS китайской популяции [5]. Последующее секвенирование этого региона позволило обнаружить ряд редких SNP. Те из них, которые были расположены в участках с возможной энхансерной или промоторной, но не инсуляторной активностью, также показали ассоциацию с заболеванием [6]. Изучение роли найденных в GWAS полиморфных маркеров в вариативности когнитивного функционирования при шизофрении указывает на их связь с нарушением скорости обработки информации, вербальной памяти и регуляторно-исполнительных функций [7, 8], хотя данные не вполне однозначны [9, 10]. Недавний крупнейший метаанализ, объединивший данные GWAS образования и интеллекта, с совокупной выборкой численностью 248482 человека, показал, что *MIR137HG* является также одним из 187 локусов, ассоциированных с когнитивными способностями в общей популяции [11].

М.В. Алфимова и Н.В. Кондратьев внесли одинаковый вклад в эту работу.

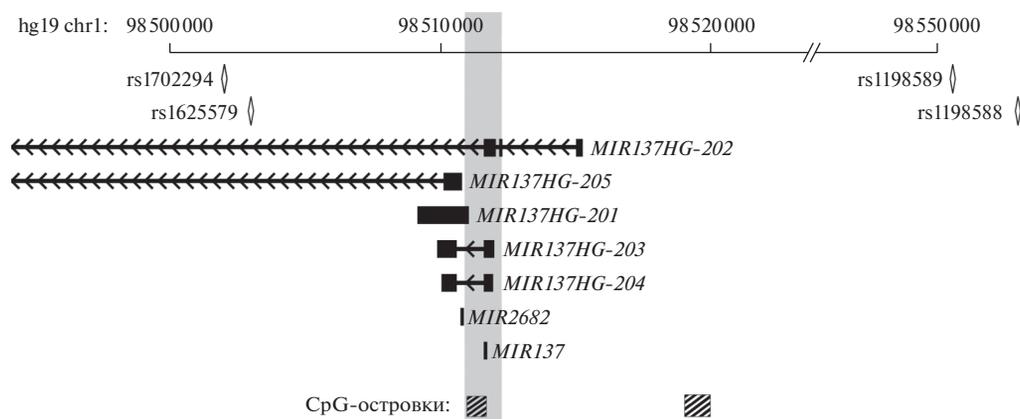


Рис. 1. Схема строения локуса *MIR137HG*. Вверху дана координатная сетка региона (сборка hg19). Альтернативные транскрипты гена *MIR137HG* обозначены так же, как в браузере Ensembl. Экзоны представлены черными прямоугольниками; интроны — линиями со стрелочками, указывающими направление транскрипции. Расположение микроРНК обозначено вертикальными полужирными линиями, CpG-островков — прямоугольниками со штриховкой. Серым фоном обозначен проанализированный ПЦР-продукт. Локализация полиморфных сайтов, выявленных в GWAS шизофрении, показана с помощью ромбов: rs1625579 SZ [2], rs1702294 [4], rs1198589 [5], rs1198588 [3].

МикроРНК-137 представляет собой регулятор экспрессии многих генов, вовлеченных в нейроразвитие, ряд которых рассматривается в качестве генов риска шизофрении [12, 13]. Функции микроРНК-2682 пока мало изучены, однако стоит отметить, что, согласно базе данных miRmine [14], она имеет сравнимый с микроРНК-137 уровень экспрессии в большинстве клеточных линий и тканей. Таким образом, изменение экспрессии микроРНК-137 или микроРНК-2682 может представлять собой узловую компонент в цепи событий, ведущих к нарушению когнитивных функций пациентов. Показано, что один из ассоциированных с шизофренией полиморфных сайтов в гене *MIR137HG* связан с экспрессией микроРНК-137 [15]. Более полному пониманию роли локуса *MIR137HG* в развитии заболевания может способствовать анализ эпигенетических модификаций ДНК в этом регионе GWAS.

В данной работе мы предприняли изучение особенностей метилирования в периферической крови больных шизофренией и здоровых CpG-островок, расположенного внутри *MIR137HG* и включающего полностью ген *MIR137* и область, прилегающую к 5'-концу *MIR2682* (рис. 1). Данный CpG-островок не затрагивает 5'-регуляторную область *MIR137HG*, однако содержит альтернативный промотор *MIR137* [16]. Кроме того, он включает регионы, которые, согласно ENCODE, могут являться промоторами и энхансерами [6]. Целью работы был анализ связи между метилированием данного CpG-островка, с одной стороны, и шизофренией и когнитивным функционированием — с другой. Для этого с помощью метода бисульфитного секвенирования единичных молекул ДНК в реальном времени (single-molecule real-time bisulfite sequencing, SMRT-BS) был определен

уровень метилирования каждого из 91 CpG, находящегося на выбранном участке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В выборку были отобраны лица из базы данных лаборатории клинической генетики НЦПЗ на основании следующих критериев: возраст от 18 до 45 лет, европейское происхождение, наличие полного среднего образования, отсутствие наркотической и алкогольной зависимости, а также соматических и неврологических заболеваний, влияющих на когнитивные функции. Все испытуемые подписали информированное согласие на участие в исследовании, сдали кровь для выделения ДНК, заполнили батарею нейропсихологических тестов и анкету для сбора социально-демографических данных. Проведение исследования одобрено Этическим комитетом НЦПЗ.

Выборку составили 44 больных шизофренией (средний возраст 27.02 ± 7.11 лет, 55% женщин) и 50 здоровых испытуемых без наследственной отягощенности психозами (средний возраст 27.48 ± 7.05 лет, 52% женщин). Группы значительно не различались по возрастному и половому составу. Пациенты находились на стационарном психиатрическом лечении. Согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра, 41 человек страдал основными формами шизофрении (F20), один испытуемый острым полиморфным психотическим расстройством (F23) и два испытуемых шизоаффективным расстройством (F25).

Нейропсихологическая батарея состояла из шести тестов (RAVLT, Семантическая вербальная беглость, Отсчитывание от 200 по 2 и 5, ТМТ-В, Цветобуквенный тест Струпа, Тест на распозна-

Таблица 1. Распределение показателя “доля метилирования” CpG_049 в выборках больных шизофренией и здоровых (контроль)

Выборка	Среднее (SD)	Медиана	Количество испытуемых (доля) в перцентильной группе*				
			25% (0.17)	50% (0.29)	75% (0.42)	>75% (0.80)	всего
Больные	0.32 (0.19)	0.32	10 (0.23)	10 (0.23)	10 (0.23)	14 (0.32)	44
Контроль	0.29 (0.21)	0.28	14 (0.28)	14 (0.28)	13 (0.26)	9 (0.18)	50

* Границы перцентилей рассчитаны для объединенной выборки больных и здоровых [21].

вание мимически выраженных эмоций), выявляющих типичные для шизофрении когнитивные нарушения. В данной работе для оценки когнитивного функционирования использовали композитный индекс (g), полученный путем усреднения показателей отдельных тестов, представленных в Т-баллах. Т-баллы вычисляли на основании нормативных данных. Тесты и методика получения Т-баллов более подробно описаны ранее [17].

Определение статуса метилирования осуществлено модифицированным методом SMRT-BS на основе бисульфитной конверсии и высокопроизводительного секвенирования третьего поколения PacBio [18] с использованием стратегии подавления ПЦР на коротких матрицах с помощью идентичных адаптеров на концах праймеров [19]. Для анализа была выбрана мишень длиной 1197 пн (chr1: 98510907–98512103; GRCh37/hg19), содержащая CpG-островок, расположенный в гене *MIR137HR* и включающий полностью ген *MIR137* (chr1: 98511626–98511727). Для создания библиотеки использовали праймеры на обратную цепь ДНК: mir137_for: GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACGTGTAGAGGAAAGTATTGGGAGAGTA; mir137_rev: GCAGTCGAACATGTAGC-TGACTCAGGTCACCTCCAAATCTATACCACACTACAACCA; U1p 5'-Pi-GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCAC. Секвенирование подготовленной библиотеки осуществляли в CCS-режиме на приборе PacBio RSII в Центре секвенирования Университета штата Вашингтон, США.

В анализ вошли образцы с количеством прочтений не менее 5: медиана 9, межквартильный размах 9 (от 6 до 15 прочтений). Группы больных и здоровых не различались по данному показателю (тест Манна–Уитни, $z = 0.30$, $p = 0.77$). Для каждого испытуемого вычисляли долю метилирования, определяемую для каждого CpG как отношение прочтений с неконвертированным цитозином к общему количеству прочтений для данного CpG.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сайт считали гипометилированным при доле метилирования <0.2 (20%), как это было сделано ранее [20]. Согласно этому критерию, изученные CpG были преимущественно гипометилированы. В 89 случаях не менее 88% общей выборки имели показатели меньше 0.2 и в одном – 71% общей выборки. Был обнаружен только один сайт с высокой межиндивидуальной вариативностью по метилированию – CpG_049 (chr1: 98511049). Далее мы провели анализ метилирования в этом сайте в поисках его связи с шизофренией и когнитивными функциями.

Распределения значений метилирования CpG_049 у больных и здоровых сравнивали методом перцентилей, что позволило сгладить влияние неодинакового числа прочтений у разных испытуемых [21]. Различия между группами не были значимы ($\chi^2 = 2.44$, $d.f. = 3$, $p = 0.49$) (табл. 1).

Мы продолжили анализ, разбив группы по медиане на лиц с “низким” (≤ 0.29) и “высоким” (>0.29) уровнем метилирования. Чтобы учесть влияние факторов, которые могут нивелировать различия по метилированию между больными и здоровыми, провели логистическую регрессию. В модель для прогноза принадлежности к группам с низким (0) и высоким (1) уровнем метилирования CpG_049 в качестве независимых переменных, помимо диагноза, включили возраст, пол, курение и парные взаимодействия категориальных переменных. Курение учитывали в связи с его известным влиянием на метилирование, хотя роль курения в метилировании промотора *MIR137* в слизистой оболочке рта не обнаружена [22]. Следует отметить, что больные и здоровые значимо не различались по этому показателю: в группе больных 21% были курильщиками, в группе здоровых – 23%.

Методом поиска лучших подмножеств выявили две значимые модели. В одной из них единственным предиктором уровня метилирования был пол ($p = 0.026$), в другую в качестве предикторов вошли пол и эффект взаимодействия “пол \times диагноз” ($p = 0.049$) с низким уровнем классификации испытуемых для обеих моделей (~60%). Дальнейший анализ эффектов пола и его взаимо-

Таблица 2. Распределение испытуемых по группам с низким и высоким уровнем метилирования CpG_049 и когнитивный показатель в каждой подгруппе (Т-баллы)

Выборка	Подгруппа с уровнем метилирования		Общая группа
	низким	высоким	
Больные	41.64 (5.09), <i>n</i> = 20	37.45 (7.09), <i>n</i> = 24	39.35 (6.54), <i>n</i> = 44
женщины	39.89 (3.93), <i>n</i> = 5	36.31 (8.32), <i>n</i> = 15	37.20 (7.54), <i>n</i> = 20
мужчины	42.22 (5.41), <i>n</i> = 15	39.36 (4.08), <i>n</i> = 9	41.15 (5.06), <i>n</i> = 24
Здоровые	51.03 (3.23), <i>n</i> = 28	49.61 (5.71), <i>n</i> = 22	50.41 (4.53), <i>n</i> = 50*
женщины	51.93 (2.21), <i>n</i> = 13	49.35 (6.94), <i>n</i> = 11	50.75 (5.02), <i>n</i> = 24
мужчины	50.25 (3.05), <i>n</i> = 15	49.88 (4.49), <i>n</i> = 11	50.10 (4.11), <i>n</i> = 26
Все	47.12 (6.22), <i>n</i> = 48	43.27 (8.87), <i>n</i> = 46	445.23 (7.83), <i>n</i> = 94**

* Главный эффект диагноза значим, $F = 83.39$, $p < 0.001$.

** Главный эффект уровня метилирования значим, $F = 3.99$, $p = 0.049$.

действия с диагнозом показал, что различия между мужчинами и женщинами не достигают уровня статистической значимости (точный тест Фишера, двусторонний, $p = 0.098$). Вместе с тем среди мужчин больные чаще имели высокий уровень метилирования, чем здоровые ($p = 0.017$). В подгруппе женщин различия между больными и здоровыми отсутствовали (распределение испытуемых по группам см. в табл. 2).

Далее мы провели оценку связи метилирования CpG_049 с уровнем когнитивного функционирования (g). Применяли метод построения общих линейных моделей. Помимо показателя метилирования (низкий/высокий), в качестве предикторов g вводили диагноз и пол. Использовали полный факториальный анализ с возрастом в качестве ковариаты. Главные эффекты диагноза и метилирования оказались значимыми (табл. 2). У больных наблюдалось выраженное снижение g относительно здоровых. Когнитивный показатель был выше у лиц из группы с более низким уровнем метилирования. При этом самые низкие значения g обнаружены у больных мужчин с высоким уровнем метилирования. Однако эффект трехфакторного взаимодействия “диагноз × пол × уровень метилирования” на интеллект не был значим, и *post hoc* попарное сравнение с поправкой Бонферрони не выявило достоверных отличий больных мужчин с высоким уровнем метилирования от других подгрупп больных по когнитивному показателю.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что изученный CpG-островок является гипометилированным в клетках крови больных шизофренией и здоровых, за исключением одного сайта – CpG_049 (chr1: 98511049), для которого мы выявили значительную межиндивидуальную вари-

тивность доли метилирования. Данный CpG расположен в интроне гена *MIR137HG*, между 3'-областью *MIR137* и 5'-областью *MIR2682*, на участке с потенциальной промоторной активностью [6]. Основными факторами метилирования ДНК являются плотность CpG и связывание факторов транскрипции [23]. Соответственно CpG-островки преимущественно неметилированы, хотя во внутригенных CpG-островках метилирование встречается чаще, чем в промоторных [24, 25]. Ввиду этого гипометилированное состояние всего изученного CpG-островка было ожидаемым. В то же время вариативно метилированный CpG-сайт в этом регионе может представлять интерес для изучения шизофрении и когнитивного дефицита больных. Полученные нами данные позволяют предположить, что для больных шизофренией мужчин характерен более высокий уровень метилирования CpG_049. Кроме того, более высокий уровень метилирования этого CpG связан со снижением когнитивного индекса в общей группе больных и здоровых. Интересно отметить, что соседний цитозин (chr1: 98511050), находящийся в CpH-контексте (CpC_050), также имел более высокий уровень метилирования по сравнению с остальными 215 CpH изученного региона. Согласно WGBS-исследованиям метилирования в клетках периферической крови, CpC с заметным уровнем метилирования представляют доли процента от всех CpC [26, 27]. В настоящей работе медианное значение доли метилирования CpC_050 составило 0.11 у больных и 0.13 у здоровых. Прочие 215 CpH были практически неметилированы – медианное значение для каждого из них было равно нулю. Поскольку метилирование CpH у человека, по-видимому, не передается при делении клеток [28], можно предположить, что цитозины в составе динуклеотидов CpG_049 и CpC_050 могут, по какой-то причине, приобретать метилирование *de novo*. Для проверки данной гипотезы требуются

дальнейшие исследования с применением других методов.

Функциональное значение метилирования именно данного CpG, расположенного в низкометилованном CpG-островке, неизвестно. Метилирование ДНК в промоторах преимущественно ведет к подавлению транскрипции, а внутри генов может быть связано с транскрипцией положительно, вовлечено в альтернативный сплайсинг, являться маркером альтернативного внутригенового промотора или присутствия тканеспецифичного регуляторного элемента. На уровень метилирования могут влиять транскрипционные факторы, связывающиеся с энхансерами. Кроме того, само метилирование ДНК важно для связывания ряда транскрипционных факторов [29–31]. Проведенный нами поиск с помощью сервиса PROMO 3.0 [32] по базе регуляторных последовательностей TRANSFAC и сервиса molotool (<http://molotool.autosome.ru>) [33] показал, что нуклеотидная последовательность, содержащая CpG_049, является сайтом узнавания транскрипционных факторов WT1, KLF3 и TFAP2B. Из них TFAP2B может представлять интерес для изучения когнитивного дефицита, так как он вовлечен в регуляцию метаболизма катехоламинов в ЦНС и, в частности, играет важную роль в развитии норадренергических нейронов [34]. Кроме того, полиморфизм гена *TFAP2B* ассоциирован с когнитивными функциями у женщин из общей популяции [35].

Относительно транскрипционных факторов, требующих для связывания с ДНК наличия метилированного цитозина в сайте узнавания, следует отметить, что при выборе данного CpG-островка в качестве объекта исследования мы провели биоинформатический поиск сайтов узнавания одного из таких транскрипционных факторов – ZFP57 – в регионах сцепления с индексными SNP в GWAS шизофрении [4]. ZFP57 асимметрично связывает метилированные цитозины в CpG-сайте внутри последовательности 5'-TGCCGC-3', причем большее значение имеет метилирование цитозина на обратной цепи [36, 37]. Оказалось, что ген *MIR137* содержит шесть сайтов узнавания ZFP57, хотя при предположении об их случайном распределении в геноме человека вероятность случайного попадания не менее 6 сайтов связывания в регион протяженностью в 1 тпн составляет $1.83e-10^*$. Наличие кластера сайтов связывания ZFP57 увеличивает вероятность взаимодействия

* Вероятность рассчитана по формуле $p = 1 - P\left(5, \frac{N}{0.001 \times L}\right)$, где P – распределение Пуассона с ожидаемым количеством сайтов (λ), рассчитанным как число N найденных сайтов ZFP57 в геноме человека ($N = 223802$ в референтном геноме hg19), деленное на количество участков размером в 1 тпн в геноме человека длиной $L = 3104071695$ пн.

транскрипционного фактора с данной последовательностью [38]. Это позволяет предположить, что ген *MIR137* является одной из мишеней для ZFP57. Однако все сайты связывания оказались расположены на отрезке с координатами chr1: 98511630–98511784, т.е. далеко от метилированного CpG_049.

В целом данные изучения метилирования CpG-островка в гене *MIR137HG* согласуются с представлениями о важной роли локуса *MIR137HG* в модификации риска шизофрении и когнитивных функций. Значение полученных результатов ограничено сравнительно небольшим объемом выборки и особенностями клеток крови как модели для анализа метилирования, связанного с психическими расстройствами. Кроме того, антипсихотические препараты могут оказывать как глобальное, так и локальное влияние на уровни метилирования ДНК [39, 40] и когнитивные функции больных [41]. Мы не могли учесть этот фактор, так как пациенты получали комплексную антипсихотическую терапию, различную на разных этапах заболевания. Тем не менее выявленные особенности метилирования ДНК в локусе *MIR137HG* указывают на перспективность изучения различных регуляторных механизмов работы генов *MIR137* и *MIR2682* для понимания молекулярной основы формирования когнитивного дефицита при шизофрении.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00056).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Seidman L.J., Mirsky A.F.* Evolving notions of schizophrenia as a developmental neurocognitive disorder // *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2017. V. 23. № 9–10. P. 881–892. doi 10.1017/S1355617717001114
2. *Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium.* Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 10. P. 969–976. doi 10.1038/ng.940
3. *Ripke S., O'Dushlaine C., Chambert K. et al.* Genome-wide association analysis identifies 14 new risk loci for schizophrenia // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 10. P. 1150–1159. doi 10.1038/ng.2742
4. *Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium.* Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // *Nature.* 2014. V. 511. P. 421–427. doi 10.1038/nature13595
5. *Li Z., Chen J., Yu H. et al.* Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 11. P. 1576–1583. doi 10.1038/ng.3973 10.1038/ng.3973
6. *Duan J., Shi J., Fiorentino A. et al.* A Rare functional noncoding variant at the GWAS-Implicated *MIR137/MIR2682* locus might confer risk to schizophrenia and bipolar disorder // *Am. J. Hum. Genet.* 2014. V. 95. № 6. P. 744–753. doi 10.1016/j.ajhg.2014.11.001

7. *Cummings E., Donohoe G., Hargreaves A. et al.* Mood congruent psychotic symptoms and specific cognitive deficits in carriers of the novel schizophrenia risk variant at MIR-137 // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 532. P. 33–38. doi 10.1016/j.neulet.2012.08.065
8. *Kuswanto C.N., Sum M.Y., Qiu A. et al.* The impact of genome wide supported microRNA-137 (MIR137) risk variants on frontal and striatal white matter integrity, neurocognitive functioning, and negative symptoms in schizophrenia // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr.* 2015. V. 168B. P. 317–326. doi 10.1002/ajmg.b.32314
9. *Van Erp T.G.M., Guella I., Vawter M.P. et al.* Schizophrenia miR-137 locus risk genotype is associated with DLPFC hyperactivation // *Biol. Psychiatry.* 2014. V. 75. № 5. P. 398–405. doi 10.1016/j.biopsych.2013.06.016
10. *Green M.J., Cairns M.J., Wu J. et al.* Genome-wide supported variant MIR137 and severe negative symptoms predict membership of an impaired cognitive subtype of schizophrenia // *Mol. Psychiatry.* 2013. V. 18. № 7. P. 774–780. doi 10.1038/mp.2012.84
11. *Hill W.D., Marioni R.E., Maghziyan O. et al.* A combined analysis of genetically correlated traits identifies 187 loci and a role for neurogenesis and myelination in intelligence // *Mol. Psychiatry.* 2018. doi 10.1038/s41380-017-0001-5
12. *Hauberg M.E., Roussos P., Grove J. et al.* Analyzing the role of microRNAs in schizophrenia in the context of common genetic risk variants // *JAMA Psychiatry.* 2016. V. 73. № 4. P. 369–377. doi 10.1001/jamapsychiatry.2015.3018
13. *Olde Loohuis N.F., Nadif Kasri N., Glennon J.C. et al.* The schizophrenia risk gene MIR137 acts as a hippocampal gene network node orchestrating the expression of genes relevant to nervous system development and function // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017. V. 73. P. 109–118. doi 10.1016/j.pnpbp.2016.02.009
14. *Panwar B., Omenn G.C., Guan Y.* miRmine: A database of human miRNA expression profiles // *Bioinformatics.* 2017. V. 33. № 10. P. 1554–1560. doi 10.1093/bioinformatics/btx019
15. *Guella I., Sequeira A., Rollins B. et al.* Analysis of miR-137 expression and rs1625579 in dorsolateral prefrontal cortex // *J. Psychiatr. Res.* 2013. V. 47. № 9. P. 1215–1221. doi 10.1016/j.jpsychires.2013.05.021
16. *Warburton A., Breen G., Rujescu D. et al.* Characterization of a REST-regulated internal promoter in the schizophrenia genome-wide associated gene *MIR137* // *Schizophr. Bull.* 2015. V. 41. № 3. P. 698–707. doi 10.1093/schbul/sbu117
17. *Лежейко Т.В., Алфимова М.В.* Эпигенетические исследования когнитивного дефицита при шизофрении: некоторые методологические проблемы // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2017. Т. 117. № 10. P. 76–80. doi 10.17116/jnevro201711710176-80
18. *Yang Y., Sebra R., Pullman B.S. et al.* Quantitative and multiplexed DNA methylation analysis using long-read Single-Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing (SMRT-BS) // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. P. 350. doi 10.1186/s12864-015-1572-7
19. *Brownie J., Shawcross S., Theaker J. et al.* The elimination of primer-dimer accumulation in PCR // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 16. P. 3235–3241.
20. *Mendizabal I., Zeng J., Keller T.E., Yi S.V.* Body-hypomethylated human genes harbor extensive intragenic transcriptional activity and are prone to cancer-associated dysregulation // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. 4390–4400. doi 10.1093/nar/gkx020
21. *Johnson W., Bey R., Burton J. et al.* Use of Pearson's Chi-square for testing equality of percentile profiles across multiple populations // *Open J. Stat.* 2015. V. 5. P. 412–420. doi 10.4236/ojs.2015.55043
22. *Costa L.A., da Silva I.C.B., Mariz B. et al.* Influence of smoking on methylation and hydroxymethylation levels in global DNA and specific sites of *KRT14*, *KRT19*, *MIR-9-3* and *MIR-137* genes of oral mucosa // *Arch. Oral Biol.* 2016. V. 72. P. 56–65. doi 10.1016/j.archoralbio.2016.08.013
23. *Long H.K., King H.W., Patient R.K. et al.* Protection of CpG islands from DNA methylation is DNA-encoded and evolutionarily conserved // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 14. P. 6693–706. doi 10.1093/nar/gkw258
24. *Illingworth R., Kerr A., DeSousa D. et al.* A Novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. e22. doi 10.1371/journal.pbio.0060022
25. *Jeziorska D.M., Murray R.J.S., De Gobbi M. et al.* DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 36. P. E7526–E7535. doi 10.1073/pnas.1703087114
26. *Busche S., Shao X., Caron M. et al.* Population whole-genome bisulfite sequencing across two tissues highlights the environment as the principal source of human methylome variation // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 290. doi 10.1186/s13059-015-0856-1
27. *Ziller M.J., Müller F., Liao J. et al.* Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 12. e1002389. doi 10.1371/journal.pgen.1002389
28. *Patil V., Ward R.L., Hesson L.B.* The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells // *Epigenetics.* 2014. V. 9. № 6. P. 823–828. doi 10.4161/epi.28741
29. *Singer M., Kostl I., Pachter L., Mandel-Gutfreund Y.* A diverse epigenetic landscape at human exons with implication for expression // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 7. P. 3498–3508. doi 10.1093/nar/gkv153
30. *Gutierrez-Arcelus M., Ongen H., Lappalainen T. et al.* Tissue-specific effects of genetic and epigenetic variation on gene regulation and splicing // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 1. e1004958. doi 10.1371/journal.pgen.1004958
31. *Blattler A., Farnham P.J.* Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 48. P. 34287–34294. doi 10.1074/jbc.R113.512517
32. *Messeguer X., Escudero R., Farré D. et al.* PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches // *Bioinformatics.* 2002. V. 18. № 2. P. 333–334.
33. *Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S. et al.* HOCOMOCO: expansion and enhancement of the col-

- lection of transcription factor binding sites models // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44(D1). P. D116–D125. doi 10.1093/nar/gkv1249
34. Hong S.J., Lardaro T., Oh M.S. et al. Regulation of the noradrenaline neurotransmitter phenotype by the transcription factor AP-2 β // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 24. P. 16860–16867. doi 10.1074/jbc.M709106200
35. Schabram I., Eggermann T., Siegel S.J. et al. Neuropsychological correlates of transcription factor AP-2Beta, and its interaction with COMT and MAOA in healthy females // Neuropsychobiology. 2013. V. 68. № 2. P. 79–90. doi 10.1159/000350997
36. Liu Y., Toh H., Sasaki H. et al. An atomic model of Zfp57 recognition of CpG methylation within a specific DNA sequence // Genes Dev. 2012. V. 26. № 21. P. 2374–2379. doi 10.1101/gad.202200.112
37. Zuo Zh., Roy B., Chang Y.K. et al. Measuring quantitative effects of methylation on transcription factor-DNA binding affinity // Sci. Adv. 2017. V. 3. № 11. eaao1799. doi 10.1126/sciadv.aao1799
38. Anvar Z., Cammisa M., Riso V. et al. ZFP57 recognizes multiple and closely spaced sequence motif variants to maintain repressive epigenetic marks in mouse embryonic stem cells // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 3. P. 1118–1132. doi 10.1093/nar/gkv1059
39. Swathy B., Banerjee M. Understanding epigenetics of schizophrenia in the backdrop of its antipsychotic drug therapy // Epigenomics. 2017. V. 9. № 5. P. 721–736. doi 10.2217/epi-2016-0106
40. Swathy B., Saradalekshmi K.R., Nair I.V. et al. Understanding the influence of antipsychotic drugs on global methylation events and its relevance in treatment response // Epigenomics. 2018. V. 10. № 3. P. 233–247. doi 10.2217/epi-2017-0086
41. Ferreira C.D., de Souza M.G.D., Fernández-Calvo B. et al. Neurocognitive functions in schizophrenia: A systematic review of the effects of typical and atypical antipsychotic drugs // Psychol. Neurosci. 2016. V. 9. № 1. P. 12–31. doi 10.1037/pne0000045

DNA Methylation at the Schizophrenia and Intelligence GWAS-Implicated *MIR137HG* Locus Might Be Associated with the Disease and Cognitive Functions

M. V. Alfimova^{a,*}, N. V. Kondratyev^a, A. K. Golov^a, and V. E. Golimbet^a

^aMental Health Research Center, Moscow Russia

*e-mail: m.alfimova@gmail.com

The largest genome-wide association studies have identified schizophrenia and intelligence associated variants in the *MIR137HG*-locus containing genes encoding microRNA-137 and microRNA-2682. In the present study, we investigated DNA methylation of the *MIR137HG* intragenic CpG island (CGI) in the peripheral blood of 44 patients with schizophrenia and 50 healthy controls. The CGI included the entire *MIR137* gene and the region adjacent to the 5'-end of *MIR2682*. The aim of the study was to examine the relationship of the CGI methylation with schizophrenia and cognitive functioning. A methylation level of 91 CpGs located in the selected region was established for each participant by means of single-molecule real-time bisulfite sequencing. All subjects completed the battery of neuropsychological tests. We found that the CGI was hypomethylated in both groups, except for one site – CpG (chr1: 98,511,049) with significant interindividual variability of methylation. A higher level of methylation of this CpG was seen in male patients and was associated with a decrease in the cognitive index in the entire sample of patients and controls. Our data suggest that further investigation of mechanisms that regulate the *MIR137* and *MIR2682* genes expression might help to understand the molecular basis of cognitive deficits in schizophrenia.

Keywords: DNA methylation, microRNA, schizophrenia, cognitive deficit, SMRT-BS.