

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА *MAPT* ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ИЗ ГРУППЫ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ

© 2022 г. Е. В. Яковенко¹, *, Н. Ю. Абрамычева¹, Е. Ю. Федотова¹, С. Н. Иллариошкин¹

¹Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

*e-mail: helenaabracham@gmail.com

Поступила в редакцию 21.10.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 27.12.2021 г.

К группе синуклеинопатий – нейродегенеративных заболеваний, связанных с накоплением в структурах центральной нервной системы патологических белковых агрегатов белка альфа-синуклеина – относятся такие заболевания как болезнь Паркинсона (БП) и мультисистемная атрофия (МСА). Точные причины развития этих заболеваний на настоящий момент еще не определены, при этом установлено взаимодействие генетических и средовых факторов. Полиморфные варианты гена *MAPT*, а также нарушение эпигенетических механизмов, в частности, метилирования транскрипционно значимых областей генов, являются факторами риска развития синуклеинопатий. В работе изучено влияние уровня метилирования гена *MAPT* на развитие БП и МСА, проведено клинико-эпигенетическое сопоставление данных. Определено гиперметилирование в трех CpG-сайтах промоторной области гена *MAPT* в группе МСА при сравнении с контролем. Также определена статистически значимая разница между гаплотипами *MAPT* в уровне метилирования четырех CpG-сайтов промотора в группе МСА, при этом протективный гаплотип *H2* имел более низкие уровни метилирования. Определено влияние возраста и противопаркинсонической терапии агонистами дофаминовых рецепторов на уровень метилирования гена *MAPT*. Наши данные сравнительного анализа метилирования при синуклеинопатиях свидетельствуют скорее о возможной протективной роли гипометилирования *MAPT*, на что указывают преимущественно гипометилированный статус CpG-сайтов в контрольной группе, гипометилирование протективного *H2*-гаплотипа *MAPT* и повышение уровня гиперметилирования с возрастом.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, мультисистемная атрофия, эпигенетика, метилирование ДНК, ген *MAPT*.

DOI: 10.31857/S0016675822050113

Синуклеинопатии представляют собой одну из групп церебральных протеинопатий – нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся накоплением в нейронах и глиальных клетках патологических белковых агрегатов [1]. При синуклеинопатиях таким патологическим субстратом являются агрегаты короткого синаптического белка альфа-синуклеина, принимающего аномальную конформацию, в структурах центральной и периферической нервной системы [2]. Различия в типах клеток и областях нервной системы, где локализуются агрегаты, обуславливают клинические проявления синуклеинопатий и манифестацию их различных нозологических форм, среди которых наиболее распространены являются болезнь Паркинсона (БП) и мультисистемная атрофия (МСА).

Согласно эпидемиологическим исследованиям последних лет БП является глобальным бременем для здравоохранения и общества в целом, поражая 1–2% населения старше 65 лет и 4–5%

людей старше 85 лет [3, 4]. Около 10% случаев заболевания затрагивает более молодую возрастную группу до 50 лет [5, 6]. Проявляется БП как моторными симптомами (гипокинезия, тремор, ригидность, постуральная неустойчивость), так и широким рядом немоторных нарушений [7]. Главным патоморфологическим признаком этого заболевания являются агрегаты белка альфа-синуклеина в цитоплазме нейронов – тельца Леви, которые определяются в комбинации с потерей дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга [8].

БП – комплексная патология, которая вызывается сочетанием генетических и средовых факторов, причем на долю спорадической формы приходится около 90%, а на долю наследственных форм – около 10% всех случаев заболевания. На данный момент известны 23 гена (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1*, *DJ-1*, *GBA* и др.), мутации в которых вызывают развитие наследственных форм

БП [9]. Также известно множество полиморфных вариантов в различных генах (включая *SNCA* и *MAPT*), ассоциированных с БП и установленных по результатам полногеномных ассоциативных исследований – GWAS (genome wide association study) [10–12].

МСА – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся вегетативной недостаточностью в комбинации с моторными нарушениями, преимущественно паркинсонического типа и/или мозжечкового типа [13]. При МСА агрегаты альфа-синуклеина встречаются главным образом в виде олигодендроглиальных цитоплазматических включений и, в меньшей степени, нейрональных цитоплазматических включений, что приводит к дегенерации клеток различных областей мозга [14]. МСА считается спорадическим заболеванием, при этом, по данным последних GWAS-исследований, обнаружено несколько локусов, ассоциированных с риском развития МСА – в их числе гены *SNCA*, *MAPT* и *COQ2* [15].

Поиск факторов предрасположенности к развитию синуклеинопатий ведется в различных направлениях, в том числе и в области эпигенетики. Эпигенетические изменения относятся к устойчивым и наследуемым изменениям в экспрессии генов, происходящих без нарушения последовательности ДНК [16, 17]. К основным эпигенетическим механизмам относят метилирование ДНК, модификации гистонов и контроль активности генов с помощью некодирующих РНК [18]. Эпигенетические изменения, влияющие на развитие БП, активно изучаются в течение последнего десятилетия и сконцентрированы на метилировании ДНК – процессе присоединения метильной группы к цитозину, состоящему в тандеме с гуанином (СрG-динуклеотид, или СрG-сайт). Считается, что высокий уровень метилирования СрG-сайтов в промоторных и регуляторных областях приводит к нарушению связывания с ДНК-полимеразами и транскрипционными факторами и, соответственно, к снижению транскрипции генов, а низкий – наоборот – к повышению транскрипции [19].

Учитывая подтвержденную во многих исследованиях тесную взаимосвязь между уровнем экспрессии альфа-синуклеина и риском развития БП [20–23], метилирование альфа-синуклеина стало наиболее изучаемым аспектом при оценке роли эпигенетических механизмов у пациентов с БП. Известно, что в гене альфа-синуклеина (*SNCA*) существуют СрG-островки (области с высокой концентрацией СрG-динуклеотидов), находящиеся в промоторной области и в интроне 1, причем по данным ряда проведенных исследований СрG-сайты этой области *SNCA* гипометилированы в группе пациентов с БП, что приводит к по-

вышению синтеза мРНК *SNCA* и накоплению альфа-синуклеина в клетках [24–29].

Помимо гена *SNCA* многие другие гены также показали значимую роль в формировании предрасположенности к развитию БП и других синуклеинопатий. Ген *MAPT*, который кодирует тау-белок, ассоциированный с микротрубочками цитоскелета нейронов, согласно ряду GWAS-исследований является фактором риска развития как БП, так и МСА [30, 31]. Обнаружено, что гаплотип *H1* гена *MAPT* повышает риск развития БП, в то время как гаплотип *H2* является протективным фактором в отношении этого заболевания [32]. Исследований, посвященных изучению влияния метилирования гена *MAPT* на развитие БП и МСА, на настоящий момент крайне мало. В гене *MAPT* расположено несколько СрG-островков, причем самый большой из них, содержащий 302 СрG-сайта, располагается в промоторном регионе [33].

Целью нашего исследования стало изучение влияния уровня метилирования гена *MAPT* на развитие БП и МСА, проведение клинико-эпигенетических сопоставлений, а также изучение корреляций между гаплотипами *MAPT* и уровнем метилирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включены 61 пациент с диагнозом “болезнь Паркинсона”, поставленным по критериям Международного общества расстройств движений (32 мужчины, 29 женщин, средний возраст 60.4 лет, медиана 63 [53; 69] лет). В группу МСА вошли 22 пациента с паркинсоническим фенотипом данного заболевания, поставленным по критериям S. Gilman с соавт. [34]: 7 мужчин, 15 женщин, средний возраст 61.0 лет, медиана 59.5 [54.5; 69] лет. В группу контроля включены 43 неврологически здоровых добровольца: 16 мужчин, 27 женщин, средний возраст – 58.0 [53; 62.5] лет. Группы были сопоставимы по поло-возрастным характеристикам.

Всем пациентам с БП проводился подробный сбор анамнеза, общеклинический и неврологический осмотр, уточнялись возраст дебюта и длительность заболевания, семейный анамнез, определялись стадия заболевания по Hoehn-Yahr, форма заболевания (дрожательная/акинетико-ригидная/смешанная), а также проводилось тестирование пациентов по Унифицированной шкале оценки болезни Паркинсона Международного общества расстройств движений (MDS-UPDRS), Монреальской шкале оценки когнитивных функций (МОСА), Госпитальной шкале тревоги и депрессии (HADS).

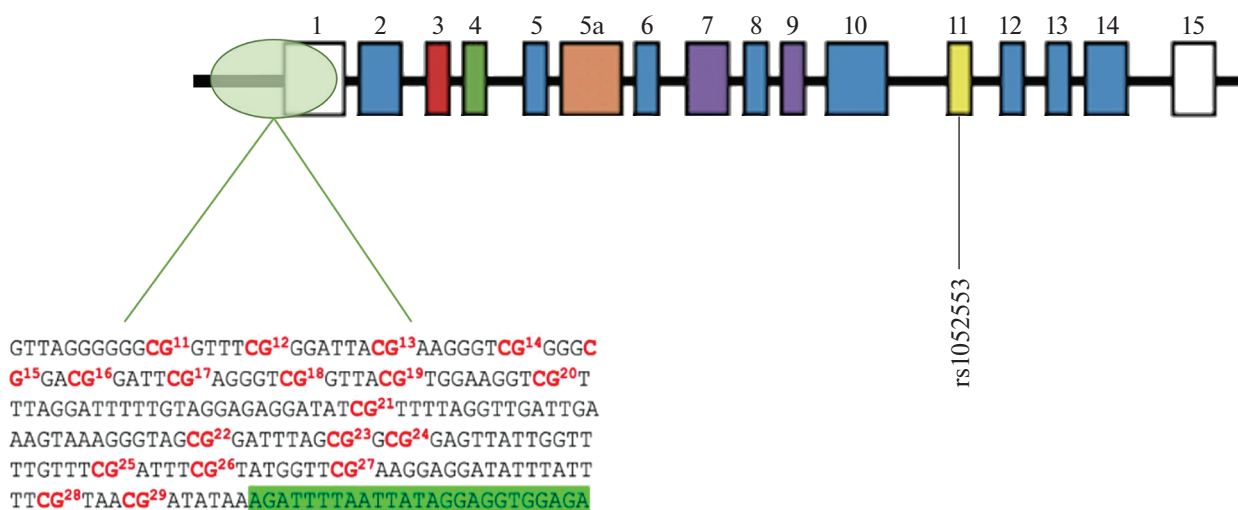


Рис. 1. Локализация исследуемой промоторной области с экзонем 1, и варианта rs1052553 в экзоне 11 гена *MAPT* (синие элементы – облигатно транскрируемые экзоны, красный, зеленый, желтый – экзоны с альтернативным сплайсингом в тканях головного мозга и других тканях, фиолетовые – экзоны, не транскрируемые в головном мозге, белые – нетранскрируемые области). Зеленый овал – промоторная область гена *MAPT*. Буквенная последовательность – изучаемые CpG-сайты гена *MAPT* (обратный праймер отмечен зеленым цветом).

Средний возраст дебюта заболевания в группе БП составлял 55 лет [48; 64] лет. Длительность заболевания составляла в среднем 4 [3; 7] года. В группе преобладали пациенты со смешанной (дрожательно-ригидной) формой БП – 49 (80.3%) больных, акинетико-ригидную форму определили у 11 (18.0%) пациентов, дрожательная форма была у одного пациента (1.6%). В состав основной группы БП вошли 13 пациентов (21.3%) с положительным семейным анамнезом по данному заболеванию.

Пациенты были подразделены на следующие стадии по функциональной шкале Hoehn-Yahr: 1-я стадия – 12 человек (19.9%), 2-я стадия – 18 человек (29.5%), 2.5-я стадия – 1 человек (1.6%), 3-я стадия – 28 человек (46.0%), 4-я стадия – 2 человека (3.3%). Средний суммарный балл по шкале UPDRS в периоде выключения был равен 55 [35; 78.75] баллов.

Противопаркинсоническую терапию получал 41 пациент (67.2%). При этом препараты леводопы принимал 31 (50.8%) пациент, средняя суточная доза составила 600 [300; 737.25] мг. Терапию агонистами дофаминовых рецепторов (прамипексол, ропинирол, пирибедил) получали 30 пациентов (49.2%), при этом средняя эквивалентная доза составила 200 [150; 300] мг. Амантадины получали 20 пациентов (32.79%), со средней эк-

вивалентной дозой 300 [150; 300] мг. Также рассчитывалась суммарная эквивалентная доза в подгруппе пациентов ($n = 41$), получающих терапию, которая составила 600 [300; 950] мг. При расчете в общей группе пациентов ($n = 61$) суммарная эквивалентная доза принимаемых препаратов составила 300 [0; 800] мг.

В группе МСА средний возраст начала болезни составил 55 [52.25; 64] года, длительность заболевания – 3.5 [2; 5] года.

Методы исследования

В гене *MAPT* уровень метилирования определялся в промоторной области (CpG 11–29, нумерация CpG-сайтов от начала исследуемого CpG-островка, охватывающего также нетранскрируемый 1-й экзон) (рис. 1). Нумерация экзонов проведена согласно референсному транскрипту NM_001123066.4. Расположение исследованной области относительно референсного генома (GRCh38): chr17: 45894045 (CpG-11) – chr17: 45894235 (CpG-29). CpG-сайты с 1-го по 10-й в экзоне 1 были полностью метилированы в обеих исследованных группах, поэтому в дальнейшем они не включались в анализ.

Подобранные праймеры для исследования уровня метилирования экзона 1 гена *MAPT*:

- прямой праймер 5'→3' TGTTAAGGAAAGGATTTATTTTGGTT,
- обратный праймер 5'→3' CTTTCTCCACCTCCTATAATTAATCT.

Таблица 1. Уровни метилирования (%) CpG-сайтов в промоторной области гена *MAPT* у пациентов с МСА, отличающиеся от контроля

Номер CpG-гена	МСА	Контроль	<i>p</i> (<i>U</i>)
12	29 [26; 31]	22.5 [17.25; 27.75]	0.000232
14	21 [18.25; 24.75]	17 [13.5; 20]	0.000477
20	17 [13; 20]	9 [0; 13.5]	0.001033

Паттерн метилирования определялся с помощью метода прямого секвенирования амплифицированных участков ДНК после выделения геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови и ее бисульфитной конверсии набором EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Амплификацию фрагментов ДНК для последующего секвенса проводили в 10 мкл реакционной среды: 50 mM KCl, 50 mM Трис-НСl (рН 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента анти-телами (“Синтол”, Москва), по 1 мкМ прямого и обратного праймеров, образец ДНК ~20 нг.

Визуализация осуществлялась с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis Software (v5.2 Applied Biosystems). Степень метилирования рассчитывали путем анализа первичных результатов секвенирования по Сэнгеру. Процент метилирования для каждого конкретного CpG-сайта для каждого ДНК-образца рассчитывали по отношению высоты синего пика С

(пик электрофореграммы, местоположение которого соответствует анализируемому CpG-сайту и указывающий на наличие метилированного цитозина) относительно суммарной высоты пиков С + Т данного положения (метилированный синий и неметилированный красный цитозин).

Гаплотип гена *MAPT* определялся с помощью сцепленного полиморфного варианта rs1052553 (A>G) (где нуклеотид А соответствует гаплотипу *H1*, а нуклеотид G – гаплотипу *H2*) в экзоне 11 (рис. 1). Амплификацию фрагментов двухщепочечной ДНК для последующего секвенса проводили в 10 мкл специально подобранной реакционной среды: 50 mM KCl, 50 mM Трис-НСl (рН 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента анти-телами (“Синтол”, Москва), по 1 мкМ прямого и обратного праймера, образец ДНК ~20 нг.

Подобранные праймеры для экзона 11 гена *MAPT*:

- прямой праймер 5'→3' AAGACTGTGGAGCCGAGTTG,
- обратный праймер 5'→3' TGCCCTGACTATGAGAGCCT.

Статистический анализ проводился на программе Statistica 13 (Tibco Russia). В работе использовались: *U*-критерий Манна–Уитни для оценки различий между двумя независимыми выборками, ANCOVA, метод ранговой корреляции Спирмена и множественная линейная регрессия. Статистический уровень значимости принимался равным 0.05. Также проводилась поправка на множественную проверку гипотез по методу Бонферрони, для 19 CpG-сайтов, *p* составило 0.0026.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилирование *MAPT* у пациентов с БП и МСА

При сравнении групп БП и контроля не было обнаружено статистически значимых различий в уровнях метилирования изучаемых сайтов в гене *MAPT*.

При сравнении групп МСА и контроля были обнаружены статистически значимые различия в уровнях метилирования ряда CpG-сайтов, представленных в табл. 1. Уровень метилирования *MAPT* в группе БП, МСА и в контрольной

группе отражен на рис. 2. Как видно из рисунка, уровень метилирования при БП занимает промежуточное положение между пациентами с МСА и контрольной группой.

При сравнении уровня метилирования гена *MAPT* в группах БП и МСА статистически значимой разницы в исследуемых CpG выявить не удалось.

Взаимосвязь метилирования *MAPT* и гаплотипов *H1* и *H2*

Процент встречаемости аллелей и диплотипов *H1/H2* гена *MAPT* по группам приведен в табл. 2.

Поочередное сравнение контрольной группы с группой БП и с группой МСА по распределению аллелей и генотипов отличий не выявило. Учитывая низкую частоту встречаемости диплотипов *H1/H2* и *H2/H2*, анализ подгрупп диплотипов и их связи с метилированием не проводился.

Исследован уровень метилирования у пациентов с БП, МСА и в контрольной группе в зависимости от гаплотипа *MAPT* (*H1* или *H2*).

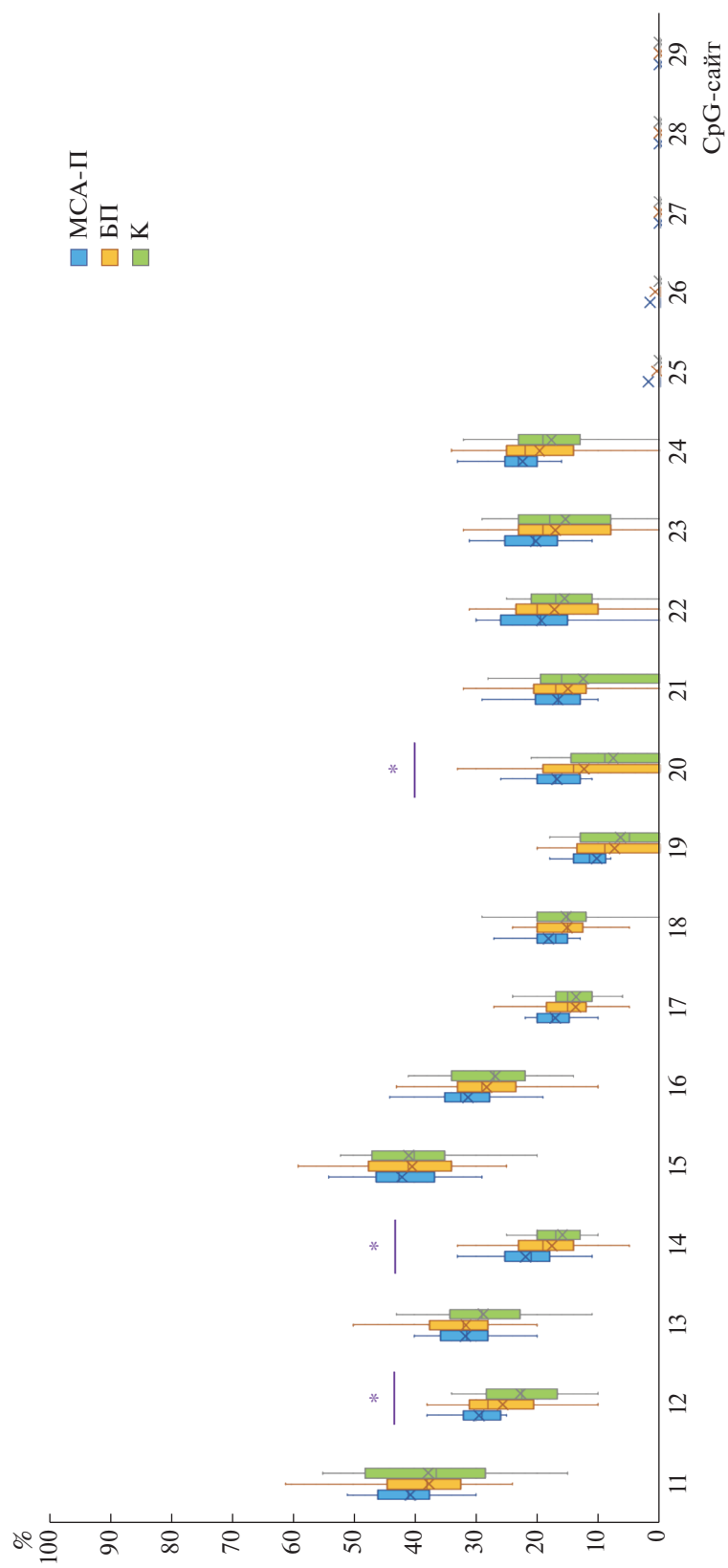


Рис. 2. Метилирование CpG-сайтов промоторной области гена *MART*. * – статистически значимые различия между контрольной группой и пациентами с МСА. По оси абсцисс – номера CpG-сайтов, по оси ординат – процент метилирования. БП – болезнь Паркинсона, МСА-П – мультисистемная атрофия – паркинсонический фенотип, К – группа контроля.

Таблица 2. Распределение аллельных вариантов *H1* и *H2* по группам

Группа	Гаплотип		Генотип		
	<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H1/H1</i>	<i>H1/H2</i>	<i>H2/H2</i>
БП	67 (88%)	9 (12%)	32 (84%)	3 (8%)	3 (8%)
МСА	38 (82.6%)	8 (17.4%)	16 (69.5%)	6 (26%)	1 (4.5%)
Контроль	36 (90%)	4 (10%)	17 (85%)	2 (10%)	1 (5%)

Таблица 3. Метилирование сайтов (%) промоторной области гена *MAPT* в зависимости от носительства аллелей *H1* и *H2* у пациентов с МСА

Номер CpG-гена	Гаплотип		<i>p(U)</i>
	<i>H1</i>	<i>H2</i>	
12	30 [27.5; 33]	26 [25; 26.25]	0.001605
13	33 [29; 38]	23.5 [22.25; 29]	0.000773
14	24 [19; 26]	17 [16; 18]	0.000350
16	32.5 [28; 35]	25.5 [22; 28.75]	0.002465

При сравнении метилирования у пациентов с БП, являющихся носителями разных гаплотипов, был обнаружен один дифференциально метилированный CpG-сайт – CpG-15: в группе пациентов с аллелем *H1* – метилирование составило 40 [34; 45]%, в группе с аллелем *H2* – 34 [30; 34]% ($p(U) = 0.001819$), т.е. носители *H1* имели более высокий уровень метилирования.

В группе пациентов с МСА также выявлены значимые различия в метилировании гена *MAPT* при носительстве гаплотипов *H1* и *H2*. Результаты приведены в табл. 3. Во всех четырех дифференциально метилированных сайтах носительство гаплотипа *H1* было ассоциировано с более высоким уровнем метилирования.

В контрольной группе различий между носителями гаплотипов выявлено не было.

Анализ метилирования MAPT в зависимости от демографических и клинических характеристик

Различий в метилировании *MAPT* между мужчинами и женщинами выявлено не было.

Изучена взаимосвязь между уровнем метилирования *MAPT* и возрастом пациентов на момент исследования. В группе БП были выявлены прямые корреляции указанных показателей в трех CpG-сайтах: CpG-19 ($r = 0.52$ – средняя корреляция, $p = 0.000001$); CpG-22 ($r = 0.47$ – слабая корреляция, $p = 0.00013$); CpG-23 ($r = 0.4$ – слабая корреляция, $p = 0.00173$). Таким образом, с возрастом наблюдалось гиперметилирование исследованных сайтов. При этом в группе пациентов с

МСА и в контрольной группе подобных корреляций обнаружить не удалось.

Корреляций между возрастом начала заболеваний (с поправкой на возраст на момент обследования) и уровнем метилирования в *MAPT* в работе не обнаружено.

При изучении корреляций уровня метилирования *MAPT* с длительностью заболевания в группе БП выявлена слабая обратная корреляция по сайту CpG-15 ($r = -0.38$, $p = 0.00259$). В группе МСА корреляций с длительностью заболевания не выявлено.

При исследовании уровня метилирования пациентов с БП в зависимости формы заболевания (акинетико-ригидная/дрожательная/смешанная) и семейного анамнеза (отягощен/не отягощен) статистически значимых различий выявлено не было. При оценке корреляций между уровнем метилирования и стадией заболевания по шкале Hoehn-Yahr, суммой баллов по шкале UPDRS и ее подразделам, а также суммой баллов по шкалам HADS и MOCA (с поправкой на возраст) значимых корреляций выявлено не было.

Согласно полученным данным, терапия леводопой или амантадинами не влияла на профиль метилирования *MAPT*. В то же время обнаружена разница между группами пациентов с БП, принимающими и непринимающими агонисты дофаминовых рецепторов. При поправке на возраст (которая была сделана с учетом того, что агонисты дофаминовых рецепторов обычно назначаются более молодым пациентам) выявлены различия по следующим сайтам *MAPT*: CpG-22 (без

терапии – 22 [19; 26]%, с терапией – 11 [8; 20.25]%, $p = 0.000178$) и CpG-23 (без терапии – 21 [18; 25]%, с терапией – 10.5 [6; 21.25]%, $p = 0.001689$), то есть назначение агонистов снижает уровень метилирования.

Корреляций между уровнем метилирования и дозой леводопы, дозой агонистов дофаминовых рецепторов (с поправкой на сумму баллов по шкале МОСА и возраст), эквивалентной дозой всех препаратов не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами был исследован ген *MART*, роль которого в риске развития нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий и таупатий была установлена в предыдущих работах. CpG-островок промоторной области с экзоном 1 был выбран в связи с тем, что именно этот участок гена *MART* определяет его экспрессию.

Нами при анализе эпигенетических модификаций *MART* определено гиперметилирование в трех промоторных CpG-сайтах в группе МСА при сравнении с контролем. При этом различий между пациентами с БП и контрольной группой, а также между группами БП и МСА выявлено не было.

Одно из небольшого числа исследований по метилированию промотора *MART* при БП, проведенное К. Coupland с соавт. [35], показало разницу между БП и контролем: у пациентов с БП ген *MART* был гиперметилирован в мозжечке (регионе, обычно не вовлеченном в патологический процесс при БП) и гипометилирован в скорлупе (регионе, в котором наиболее выражены патологические изменения при БП). Авторы предположили, что гиперметилирование промотора *MART* может выполнять протективную функцию, понижая экспрессию *MART*. Такое предположение частично подтверждается и данными исследования, проведенного при болезни Альцгеймера: у пациентов определялось гипометилирование CpG-островка промоторной области гена *MART*. При этом предполагается, что гипометилирование *MART* у пациентов с болезнью Альцгеймера ассоциировано с повышенной экспрессией тау-протеина и его патологической агрегацией, что наблюдается в мозге при данном заболевании [36].

Наши данные сравнительного анализа метилирования при синуклеинопатиях свидетельствуют скорее о возможной протективной роли гипометилирования *MART*. На это указывают преимущественно гипометилированный статус CpG-сайтов в контрольной группе, гипометилирование протективного *H2*-гаплотипа *MART* и повышение уровня

гиперметилирования с возрастом (возраст – один из основных факторов риска развития синуклеинопатий). Возможно, что характер метилирования *MART* достаточно специфичен для разных видов нейродегенеративной патологии [37].

Ассоциация между БП и вариантами в гене *MART* активно изучается в различных популяциях, и наиболее значимыми считаются полиморфизмы, связанные с гаплотипом *MART* (*H1* или *H2*). Известно, что гаплотип *H1* и некоторые SNP в гене *MART* повышают риск развития БП, а гаплотип *H2*, напротив, имеет протективные свойства. Такая зависимость позволила предположить, что эпигенетические модификации *MART* могут влиять на развитие БП. В настоящей работе определялась зависимость уровня метилирования CpG-сайтов гена *MART* от гаплотипа – *H1* или *H2*. Следует отметить, что гаплотип *H2* достаточно редко встречается в российской популяции, поэтому носительство генотипов *H1/H2* и, тем более, *H2/H2*, было слабо представлено среди нашей выборки пациентов и лиц контрольной группы. Тем не менее, нами была определена статистически значимая разница между гаплотипами в уровне метилирования четырех CpG-сайтов промоторной области гена *MART* в группе МСА, при этом протективный гаплотип *H2* имел более низкие уровни метилирования.

К. Coupland с соавт. в группе пациентов с БП показали более высокий уровень метилирования CpG-сайтов в гене *MART* у носителей гаплотипа *H1* в сравнении с гаплотипом *H2* [35]. Группой Y. Li с соавт. проведено исследование метилирования гена *MART* при таупатиях и выявлено повышение уровня метилирования в клетках крови и в регионах головного мозга при гаплотипе *H1* в сравнении с гаплотипом *H2* [38]. Данные работы согласуются с нашими результатами.

В настоящей работе проводился анализ связи метилирования с возрастом пациентов на момент исследования, который продемонстрировал прямые корреляции с метилированием 3 CpG-сайтов промотора *MART* в группе БП – по мере старения уровень метилирования повышался. При этом метилирование не было связано с возрастом начала заболевания при поправке на возраст. Статистически значимых различий в уровне метилирования CpG-сайтов между женщинами и мужчинами в группах БП, МСА и контроля обнаружено не было. Полученные результаты не согласуются с работой [35], в которой было выявлено, что у женщин уровень метилирования был значимо выше, а возраст начала заболевания прямо коррелировал с метилированием *MART*.

В представленном исследовании были изучены корреляции между уровнями метилирования и различными клиническими проявлениями при БП и МСА. Нам не удалось выявить корреляций уровня метилирования ни с формой заболевания, ни с тяжестью моторных или немоторных клинических проявлений.

Также мы не обнаружили связи между дозой леводопы, эквивалентной дозой всех принимаемых противопаркинсонических препаратов, наличием терапии леводопой и амантадинами и профилем метилирования гена *MAPT*. В то же время нами обнаружено различие в профиле метилирования между пациентами, принимающими и не принимающими агонисты дофаминовых рецепторов: пациенты без терапии этой группой препаратов имели значимо более высокий уровень метилирования в трех промоторных CpG-сайтах гена *MAPT*. Эти данные показывают, что терапия агонистами дофаминовых рецепторов может приводить к гипометилированию, что в свою очередь говорит о возможном модифицирующем воздействии дофаминовых агонистов на течение нейродегенеративного процесса посредством эпигенетических механизмов.

Выявленные изменения в паттернах метилирования *MAPT* у пациентов с БП и МСА могут рассматриваться в качестве звеньев молекулярного патогенеза синуклеинопатий. Оценка уровня метилирования также может стать частью комплекса биомаркеров, которые исследуются в клинике для уточнения диагноза и прогноза болезни; согласно полученным нами данным, оценка метилирования *MAPT* может играть такую биомаркерную роль в первую очередь для МСА. Полученные данные свидетельствуют о возможном модифицирующем влиянии противопаркинсонической терапии на профиль метилирования и, следовательно, на течение заболевания, что требует дальнейших исследований.

Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kovacs G.G. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: Turning towards precision medicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 2. P. 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>
2. McCann H., Stevens C.H., Cartwright H., Halliday G.M. α -Synucleinopathy phenotypes // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20. Suppl 1. P. 62–67. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70017-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70017-8)
3. Bertram L., Tanzi R.E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. № 6. P. 1449–1457. <https://doi.org/10.1172/JCI24761>
4. Hirsch L., Jette N., Frolkis A. et al. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis // *Neuroepidemiology.* 2016. V. 46. № 4. P. 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>
5. Karimi-Moghadam A., Charsouei S., Bell B., Jabalameli M.R. Parkinson disease from mendelian forms to genetic susceptibility: New molecular insights into the neurodegeneration process // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. № 6. P. 1153–1178. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0587-4>
6. Schrag A., Ben-Shlomo Y., Quinn N.P. Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and Parkinsonism in London // *BMJ.* 2000. V. 321. № 7252. P. 21–22. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7252.21>
7. Jankovic J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2008. V. 79. № 4. P. 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
8. Dickson D.W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. V. 2. № 8. P. a009258. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>
9. Jankovic J., Tan E.K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2020. V. 91. № 8. P. 795–808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
10. Simón-Sánchez J., Schulte C., Bras J.M. et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 12. P. 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>
11. Nalls M.A., Pankratz N., Lill C.M. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 9. P. 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>
12. Chang D., Nalls M.A., Hallgrímsson I.B. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 10. P. 1511–1516. <https://doi.org/10.1038/ng.3955>
13. Ozawa T., Paviour D., Quinn N.P. et al. The spectrum of pathological involvement of the striatonigral and olivo-

- pontocerebellar systems in multiple system atrophy: Clinicopathological correlations // *Brain J. Neurol.* 2004. V. 127. Pt. 12. P. 2657–2671.
<https://doi.org/10.1093/brain/awh303>
14. *Yoshida M.* Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration // *Neuropathology.* 2007. V. 27. № 5. P. 484–493.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00841.x>
15. *Sailer A., Scholz S.W., Nalls M.A. et al.* A genome-wide association study in multiple system atrophy // *Neurology.* 2016. V. 87. № 15. P. 1591–1598.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003221>
16. *Portela A., Esteller M.* Epigenetic modifications and human disease // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 10. P. 1057–1068.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
17. *Waddington C.H.* The epigenotype. 1942 // *Int. J. Epidemiol.* 2012. V. 41. № 1. P. 10–13.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
18. *Marques S., Oliveira C., Pereira C., Outeiro T.* Epigenetics in neurodegeneration: A new layer of complexity // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. V. 35. № 2. P. 348–355.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.008>
19. *Wüllner U., Kaut O., deBoni L. et al.* DNA methylation in Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. Suppl 1. P. 108–120.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13646>
20. *Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C. et al.* Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease // *Lancet.* 2004. V. 364. № 9440. P. 1167–1169.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
21. *Miller D.W., Hague S.M., Clarimon J. et al.* Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication // *Neurology.* 2004. V. 62. № 10. P. 1835–1838.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000127517.33208.f4>
22. *Nemani V.M., Lu W., Berge V. et al.* Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis // *Neuron.* 2010. V. 65. № 1. P. 66–79.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>
23. *Scott D.A., Tabarean I., Tang Y. et al.* A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 24. P. 8083–8095.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1091-10.2010>
24. *Jowaed A., Schmitt I., Kaut O., Wüllner U.* Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 18. P. 6355–6359.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>
25. *Matsumoto L., Takuma H., Tamaoka A. et al.* CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 11. P. e15522.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015522>
26. *Ai S.X., Xu Q., Hu Y.C. et al.* Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 337. № 1–2. P. 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.11.033>
27. *Tan Y.Y., Wu L., Zhao Z.B. et al.* Methylation of alpha-synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20. № 3. P. 308–313.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.12.002>
28. *Pihlström L., Berge V., Rengmark A., Toft M.* Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the alpha-synuclein gene // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. № 4. P. 577–580.
<https://doi.org/10.1002/mds.26073>
29. *Schmitt I., Kaut O., Khazneh H. et al.* L-dopa increases alpha-synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro* // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. № 13. P. 1794–1801.
<https://doi.org/10.1002/mds.26319>
30. *Kwok J.B., Teber E.T., Loy C. et al.* Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2004. V. 55. № 3. P. 329–334.
<https://doi.org/10.1002/ana.1082614991810>
31. *Vilarino-Güell C., Soto-Ortolaza A.I., Rajput A. et al.* *MAPT H1* haplotype is a risk factor for essential tremor and multiple system atrophy // *Neurology.* 2011. V. 76. № 7. P. 670–672.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820c30c1>
32. *Ezquerro M., Pastor P., Gaig C. et al.* Different *MAPT* haplotypes are associated with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 3. P. e11–6.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.011>
33. *Caillet-Boudin M.L., Buée L., Sergeant N., Lefebvre B.* Regulation of human *MAPT* gene expression // *Mol. Neurodegener.* 2015. V. 10. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s13024-015-0025-8>
34. *Gilman S., Wenning G.K., Low P.A. et al.* Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy // *Neurology.* 2008. V. 71. № 9. P. 670–676.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15>
35. *Coupland K.G., Mellick G.D., Silburn P.A. et al.* DNA methylation of the *MAPT* gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E *in vitro* // *Mov. Disord.* 2014. V. 29. P. 1606–1614.
<https://doi.org/10.1002/mds.25784>
36. *Iwata A., Nagata K., Hatsuta H. et al.* Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 3. P. 648–656.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt451>
37. *Hoffmann A., Sportelli V., Ziller M., Spengler D.* Driver or passenger: Epigenomes in Alzheimer's disease // *Epigenomes.* 2017. V. 1. № 1. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3390/epigenomes1010005>
38. *Li Y., Chen J.A., Sears R.L. et al.* An epigenetic signature in peripheral blood associated with the haplotype on 17q21.31, a risk factor for neurodegenerative tauopathy // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 3. P. e1004211.

Methylation of *MAPT* Gene in Neurodegenerative Synucleinopathies

E. V. Iakovenko^{a, *}, N. Yu. Abramychева^a, E. Yu. Fedotova^a, and S. N. Illarioshkin^a

^aResearch Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

*e-mail: helenaabracham@gmail.com

Synucleinopathies are neurodegenerative disorders, characterized by the accumulation of pathological aggregates of alpha-synuclein protein in central nervous system cells. Parkinson's disease (PD) and multiple system atrophy (MSA) are the most common variants of synucleinopathies. The exact causes of these disorders are still unknown, but it is well established that both genetic and environmental factors are involved. Both polymorphisms in *MAPT* gene and dysregulation of epigenetic mechanisms, particularly, methylation of transcription regulation regions of genes, are risk factors of synucleinopathy development. We examined the influence of methylation level of *MAPT* gene on the development of PD and MSA and performed clinical and epigenetical comparison. We identified hypermethylation of 3 CpG-sites in promotor region of *MAPT* gene in group of MSA patients in comparison with controls. We also identified significant differences in methylation level of 4 CpG-sites in promotor region between *MAPT* haplotypes in MSA group, and protective *H2*-haplotype was hypomethylated. The modifying role of age and antiparkinsonian therapy with dopamine agonists on methylation level of *MAPT* gene was established. Our data in analysis of methylation in group of synucleinopathies show potential protective role of *MAPT* hypomethylation, as we found predominantly hypomethylated status of CpG-sites in control group, hypomethylation of protective *H2*-allele of *MAPT* gene and age-dependent increase of hypermethylation.

Keywords: Parkinson's disease, multiple system atrophy, epigenetics, DNA methylation, *MAPT* gene.