

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

**ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК CD14+ МОНОЦИТОВ
ПРИ ПЕРВИЧНО-ПРОГРЕССИРУЮЩЕМ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ**

© 2023 г. И. С. Киселев^{а, *}, О. Г. Кулакова^а, О. А. Батурина^б, М. Р. Кабилов^б,
А. Н. Бойко^{а, с}, О. О. Фаворова^а

^аРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

^бИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^сФедеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства России,
Москва, 117997 Россия

*e-mail: kiselev.ivan.1991@gmail.com

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 02.05.2023 г.

Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунно-воспалительное, нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся значительной клинической гетерогенностью. У 10–15% пациентов развивается первично-прогрессирующий РС (ППРС), при котором, в отличие от наиболее частой ремиттирующей формы РС, происходит неуклонное развитие нейродегенерации и, как следствие, стойкое постепенное увеличение неврологической симптоматики. Одной из причин отличий в патогенезе двух форм РС могут быть особенности эпигенетической регуляции генной экспрессии. Метилирование ДНК – один из ключевых эпигенетических механизмов, обычно носит тканеспецифический характер и остается практически неизученным в различных клеточных популяциях больных ППРС. Целью настоящей работы стало выявление профилей дифференциального метилирования CpG-сайтов генома CD14+ моноцитов, характеризующих ППРС. При полногеномном анализе метилирования ДНК у больных ППРС и индивидов контрольной группы выявлено 169 дифференциально метилированных позиций, 90.5% которых гиперметилированы у больных ППРС. Более половины всех дифференциально метилированных позиций находятся в области известных генов и входят в состав CpG-островков и соседних с ними областей, что говорит об их высокой функциональной значимости. Нами идентифицированы шесть протяженных дифференциально метилированных регионов в области генов *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1*, связанных с воспалением и нейродегенерацией, что свидетельствует об активной эпигенетической регуляции экспрессии упомянутых генов.

Ключевые слова: первично-прогрессирующий рассеянный склероз, воспаление, нейродегенерация, метилирование ДНК, эпигенетическая регуляция

DOI: 10.31857/S002689842305004X, **EDN:** GVHYAT

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое хроническое аутоиммунно-воспалительное и нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), является основной причиной прогрессирующей инвалидизации молодых людей [1]. Развитие аутоиммунного процесса при

РС приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера, инфильтрации иммунных клеток в ЦНС и последующему развитию демиелинизирующих поражений как головного, так и спинного мозга [2]. РС относят к числу комплексных заболеваний, которые развиваются под воздействием факторов внешней среды у генетически предрасположенных лиц. И генетические, и внешние факторы порознь умеренно влияют на риск развития РС, однако их совместное воздействие может приводить к резкому возрастанию риска, что предполагает их взаимодействие на молекулярном уровне [3]. Показано, что влияние многих факторов внешней среды опосредовано различ-

Сокращения: ДМП – дифференциально метилированная позиция; ДМР – дифференциально метилированный регион; МНК – мононуклеарные клетки; ППРС – первично-прогрессирующий рассеянный склероз; РС – рассеянный склероз, РРС – ремиттирующий рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость; EDSS (Expanded Disability Status Scale) – расширенная шкала инвалидизации.

ными эпигенетическими механизмами [4], которые обеспечивают стабильное изменение экспрессии генов без изменения их нуклеотидной последовательности [5].

РС – гетерогенное заболевание. У большинства больных первоначально диагностируют ремиттирующую форму РС (РРС), при которой повторяющиеся эпизоды острой неврологической симптоматики (обострения) чередуются с полным или частичным восстановлением (ремиссией). Однако у 10–15% больных РС с самого начала развивается тяжелая первично-прогрессирующая форма РС (ППРС), при которой происходит стойкое постепенное накопление повреждений аксонов, гибель нейронов и, как следствие, увеличение неврологической симптоматики [6]. Кроме клинического течения, ППРС отличается от РРС и по механизмам развития патологического процесса [7]. Нейровоспаление выступает в качестве одного из основных факторов, связанных с развитием целого ряда нейродегенеративных заболеваний, включая РС, и характеризуется резкими изменениями эпигенетической регуляции [5]. К числу основных эпигенетических механизмов относится метилирование ДНК. В подавляющем большинстве случаев ДНК метилируется в положении С5 остатка цитозина в составе CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов).

Полногеномный анализ метилирования ДНК позволил выявить отличия в профилях метилирования ДНК при РРС и у здоровых индивидов, причем характер отличий зависел от типа сравниваемых клеток и тканей больных [8–10].

Ранее нами впервые были обнаружены различия в профилях метилирования ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК), которые позволяют отличить больных РРС, ППРС друг от друга и от здоровых индивидов [11]. Поскольку МНК представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, выявление различий в профилях метилирования ДНК в отдельных субпопуляциях клеток крови может способствовать лучшему пониманию механизмов патогенеза ППРС. Впервые значительные отличия профилей метилирования ДНК в CD4+ Т-лимфоцитах больных ППРС и здоровых доноров были обнаружены в работе [12].

В настоящем исследовании мы сосредоточились на другой популяции МНК – CD14+ моноцитах, патогенный вклад которых в развитие РС реализуется через дифференцировку в макрофаги или дендритные клетки в ЦНС и выполнение эффекторных функций, связанных с модуляцией воспалительных реакций [13]. Профили метилирования ДНК CD14+ моноцитов в выборках больных ППРС и здоровых индивидов анализировали с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Участники исследования. В состав исследуемых групп вошли восемь больных ППРС в возрасте 43 ± 9 лет (из них шесть женщин) и восемь здоровых добровольцев в возрасте 34 ± 9 лет (из них шесть женщин). До начала исследования больные не получали иммуномодулирующей терапии. Критерием исключения пациентов из исследования было наличие системного воспаления, других аутоиммунных или инфекционных заболеваний. Диагноз ППРС ставили в соответствии с критериями МакДональда [14]; средний балл пациентов по расширенной шкале инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS) составил 4.29 ± 0.39 . Все участники исследования были, по данным анкетирования, этническими русскими. Проведение исследования одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Выделение ДНК и анализ метилирования. Периферическую кровь индивидов собирали в пробирки с EDTA в качестве антикоагулянта; МНК получали центрифугированием на градиенте Фиколл-1077 Диаколл (“Диаэм”, Россия). CD14+ моноциты выделяли из МНК методом положительной селекции на иммуномагнитных микробусах, конъюгированных с анти-CD14-антителами (“Miltenyi Biotec”, Германия). Геномную ДНК из CD14+ моноцитов выделяли с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (“QIAGEN”, Германия), а затем подвергали бисульфитной конверсии с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (“Zymo Research”, США). Уровни метилирования ДНК анализировали с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности Infinium HumanMethylation450 BeadChip на сканере iScan (“Illumina”, США).

Анализ данных. Данные об уровнях метилирования анализировали с помощью пакета ChAMP v. 3.14 [15] и стандартных средств среды R. Из анализа исключали пробы, значение *p* обнаружения сигнала (detection *p*-value) в которых превышало 0.01; пробы, комплементарные нескольким участкам генома (multi-hit); SNP-содержащие пробы и пробы, расположенные в хромосомах X и Y. Данные метилирования нормализовали с использованием метода квантильной нормализации (beta-mixture quantile normalization method, BMIQ) [16], интегрированного в пакет ChAMP в виде функции champ.norm(). Наличие ковариат (пол и возраст) и пакетного эффекта (batch-эффекта) от разных “слайдов” проверяли путем анализа результатов сингулярного разложения (singular value decomposition analysis, SVD), реализованного в функции champ.SVD(). Для оценки уровня метилирования конкретного CpG-сайта вычисляли значение β , которое представляет собой отношение интенсивности сигнала метилирования от соответствующей пробы к сумме ин-

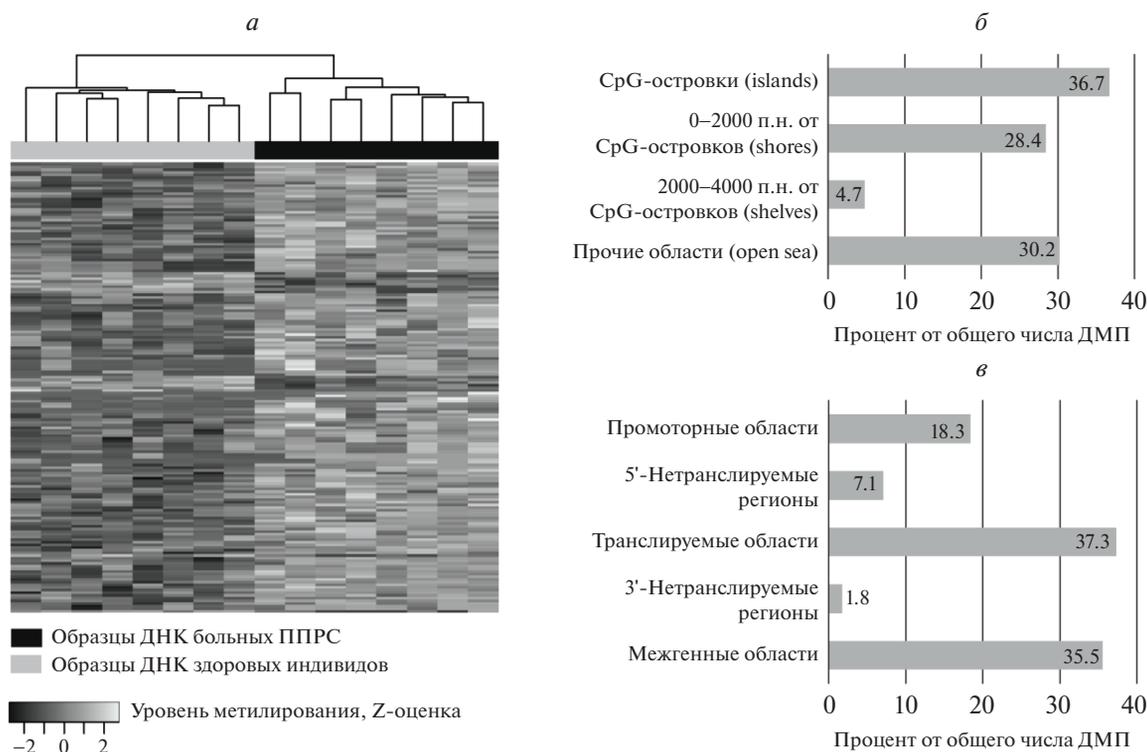


Рис. 1. Характеристика ДМП, идентифицированных в CD14+ моноцитах больных ППРС. *а* – Карта интенсивности сигналов ДМП у больных ППРС и здоровых индивидов. Градиент от черного к светло-серому отражает повышение уровня метилирования ДНК в исследуемых образцах. Дендрограмма сверху показывает иерархическую кластеризацию образцов: черным обозначены больные ППРС, светло-серым – здоровые индивиды. *б* – Локализация ДМП по отношению к функционально значимым скоплениям CpG-сайтов. *в* – Локализация ДМП по отношению к структурным элементам генов.

тенсивностей двух сигналов (метилированного и неметилированного) этой же пробы. Значения β варьировали в пределах от 0 (неметилированные пробы) до 1 (полностью метилированные пробы).

CpG-сайт рассматривали как дифференциально метилированную позицию (ДМП), если значение $|\Delta\beta|$ для него в сравниваемых группах было больше 0.1 (т.е. уровень метилирования отличался более чем на 10%) и определенная с помощью *t*-теста Стьюдента величина *p* была <0.01 . Локализацию CpG-сайтов по отношению к функционально значимым скоплениям CpG-сайтов и структурным элементам генов определяли с помощью стандартной аннотации UCSC genes в hg19.

Поиск дифференциально метилированных регионов (ДМР) осуществляли с использованием пакета Vumphunter v. 3.16 [17], интегрированного в алгоритм ChAMP в виде функции champ.DMR(). Регион считали ДМР, если он содержал не менее семи CpG-сайтов с уровнями метилирования, одинаково измененными у больных ППРС, а соответствующая величина *p* в пермутационном тесте была меньше 0.01.

Данные визуализировали, используя пакеты gplots v. 3.1.1, ggplot2 v. 3.3.5 и стандартные средства среды R. Для построения карт интенсивно-

сти сигналов ДМП применяли стандартизованную Z-оценку уровней метилирования – безразмерный статистический показатель, удобный для сравнения значений разной размерности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полногеномное профилирование метилирования ДНК выполнено в CD14+ моноцитах восьми больных ППРС и восьми здоровых индивидов контрольной группы. Первичную фильтрацию и контроль качества прошли 408875 CpG-сайтов. SVD-анализ показал, что batch-эффект, а также пол и возраст включенных в исследование индивидов не являются значимыми ковариантами, поэтому мы не включали их в дальнейший анализ.

При сравнении уровней метилирования ДНК в исследуемых группах идентифицировано 169 ДМП; их характеристика представлена на рис. 1. Как видно из рис. 1а, выявленный набор ДМП хорошо отличает больных ППРС от здоровых добровольцев, при этом у больных гиперметилировано подавляющее большинство ДМП (153, 90.5%).

Большинство ДМП расположено в CpG-островках или в пределах 2000 п.н. от них (36.7 и 28.4% соответственно). Вне известных скоплений

Таблица 1. Характеристика ДМП-содержащих генов, выявленных при анализе метилирования ДНК CD14+ моноцитов больных ППРС и здоровых индивидов

Уровень метилирования ДМП у больных ППРС	Категория генов		
	гены, кодирующие белки	РНК-гены	псевдогены
Повышен	<i>ABI2, AGAP2</i> (2), <i>ANKMY1</i> (2), <i>AP2S1, BANP, C19orf77, C6orf27, C8orf73</i> (2), <i>CACNB2, CARS, CAT, CCDC81, CHL1</i> (2), <i>CLDN12, CLIP2, CPXM1, CRTAC1</i> (3), <i>CYP2D6, DDO</i> (2), <i>DYRK1B, EDN3, ENOSF1, ERICH1</i> (3), <i>GALNT9</i> (3), <i>GGA2, GPR124, HHLA2, HKR1</i> (2), <i>IGF2BP1</i> (5), <i>IGSF9B</i> (2), <i>IMMT, KDM4B, KIAA1161</i> (2), <i>KIAA1274, KLHL8</i> (2), <i>LCLAT1</i> (3), <i>LSP1, MATN4, NCKAP5, NPAS3, NR4A2, OR2L13</i> (8), <i>PCDH12, PRKCZ, PRKD3, QDPR, RAB17, RAPGEF4, RCCD1, RHOJ</i> (2), <i>SLC12A7, SLC25A2, SLC46A2, SPAG1, SRGAP1, STK32C</i> (2), <i>TACR1, TAGLN, TBX21, TECR, TGFBI, TLE2, TNR</i> (2), <i>TULP1, WRNIP1, ZDNHC4, ZNF83, ZP2</i>	<i>HCG4P6</i>	<i>HLA-H</i>
Снижен	<i>BARX2, DTX1, HOPX, LPCAT1, PPP5C, PTPRN2, RGS6, SEC14L1</i>	—	—

Примечание. Если ген содержит более одного ДМП, то их число указано в скобках при названии гена. Жирным шрифтом отмечены гены, содержащие ДМП, уровни метилирования которых различаются между сравниваемыми группами более чем на 20%.

СрG-сайтов локализовано только 30.2% ДМП (рис. 1б). Сто девять ДМП (64.5% от общего числа) располагаются в области 78 известных генов, преимущественно в их транскрибируемых регионах (37.3%); в промоторных областях генов лежат 18.3% ДМП, в 5'- и 3'-нетранскрибируемых областях — 7.1 и 1.8% ДМП соотв. (рис. 1в). Абсолютное большинство выявленных генов (97.4%) относятся к белкокодирующим (табл. 1). Повышение уровня метилирования при ППРС более чем на 20% наблюдали в 13 ДМП в семи генах: *ERICH1* (cg01053087 и cg05875700), *HCG4P6* (cg18786623), *IGF2BP1* (cg18128536), *LCLAT1* (cg12454169, cg17749961 и cg15652532), *NPAS3* (cg11787167), *OR2L13* (cg20433858, cg08260406, cg08944170 и cg20507276), *RHOJ* (cg07157030).

Нами проведен поиск ДМП, располагающихся в непосредственной близости от известных генов, с целью идентификации генов, подвергающихся выраженной регуляции экспрессии путем метилирования ДНК. В результате были идентифицированы шесть кандидатных ДМП в области генов *OR2L13, CAT, LCLAT1, HOXA5, RNF39* и *CRTAC1* (табл. 2). Дифференциальное метилирование четырех из этих генов: *OR2L13, CAT, LCLAT1* и *CRTAC1* выявлено и на уровне отдельных ДМС (см. табл. 1).

Анализ карт выявленных ДМП (рис. 2) показывает, что все они, как и можно ожидать, гиперметилированы у больных ППРС и в большинстве случаев располагаются в СрG-островках и соседних с ними областях. ДМП *OR2L13, CAT, LCLAT1* и *HOXA5* затрагивают промоторные регионы генов, а ДМП *RNF39* располагается в транскрибируемой области. ДМП *CRTAC1* не только находится в

теле гена, но и лежит за пределами известных скоплений СрG-сайтов. ДМП *LCLAT1* — самый короткий, он характеризуется наибольшими различиями уровней метилирования между сравниваемыми группами. К сожалению, технические ограничения HumanMethylation450 BeadChip не позволяют расширить его анализ дальше в 5'-область для более подробного изучения ландшафта метилирования промотора гена *LCLAT1* (ближайший детектируемый СрG-сайт лежит на расстоянии около 20 т.п.н.). ДМП в области генов *HOXA5* и *RNF39*, достаточно протяженные по сравнению с другими, но характеризуются большой дисперсией индивидуальных значений и невыраженными различиями уровней метилирования между группами, не превышающими 10%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования нами впервые выявлены значительные изменения профилей метилирования ДНК в CD14+ клетках больных ППРС при сравнении со здоровыми индивидами, позволяющие уверенно дискриминировать эти две группы (см. рис. 1). Показано, что у пациентов с ППРС гиперметилировано 90.5% ДМП. Эти данные хорошо согласуются с полученными нами ранее результатами анализа ДНК из CD4+ лимфоцитов и МНК больных ППРС, где гиперметилированными оказались 81 и 86% выявленных ДМП соответственно [11, 12].

Настоящее исследование является единственным, выполненным на CD14+ моноцитах больных ППРС, поэтому сопоставлять данные о глобальных уровнях метилирования ДНК в этой популяции

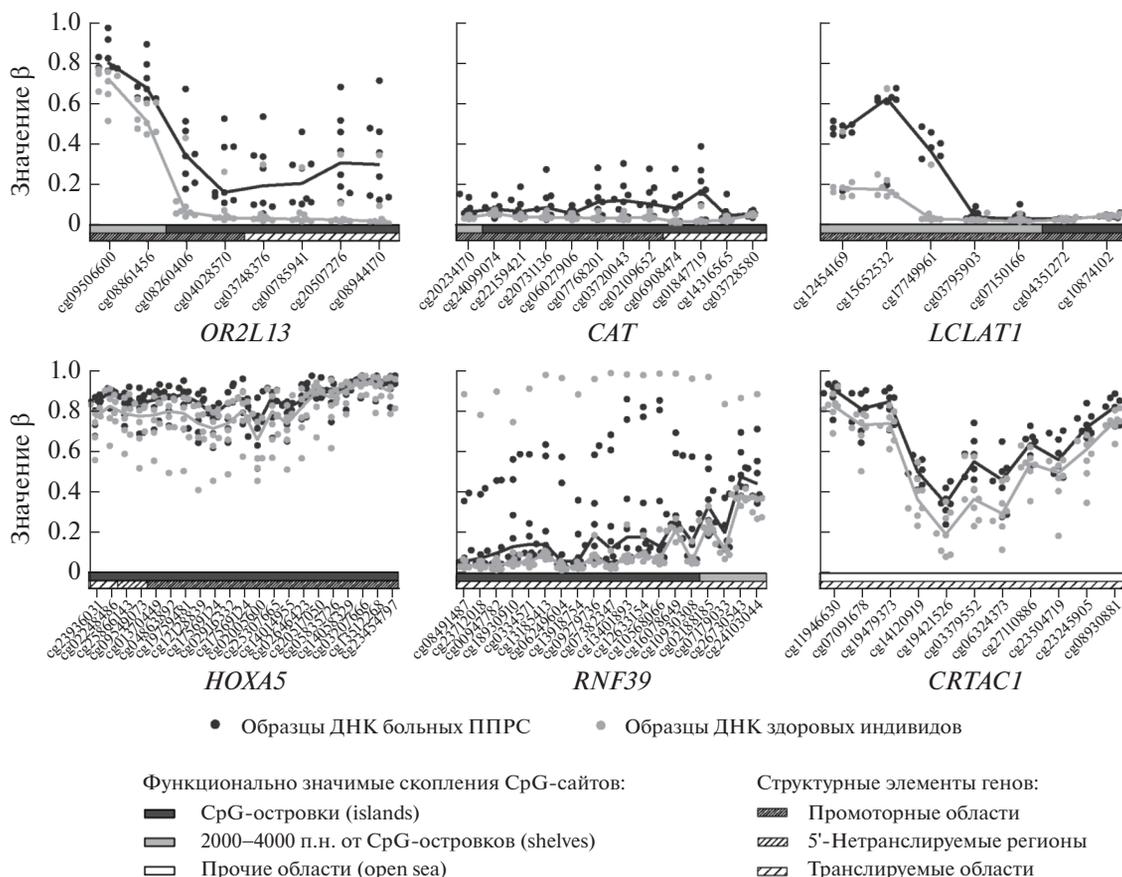


Рис. 2. Карты ДМР, выявленных при анализе метилирования ДНК CD14+ моноцитов больных ППРС и здоровых индивидов. Идентификаторы CpG-сайтов, образующих ДМР, даны согласно стандартной аннотации Illumina в подписи к оси абсцисс; их локализация на оси схематически представлена по отношению к функционально значимым скоплениям CpG-сайтов и к структурным элементам генов (изображены на верхней и нижней полосках соответственно). Точками показаны уровни метилирования CpG-сайтов, образующих ДМР, у каждого отдельного больного ППРС (черный цвет) или здорового индивида (светло-серый цвет). Результирующие кривые тех же цветов проведены через медианные значения уровней метилирования CpG-сайтов внутри каждой группы.

лейкоцитов мы можем только с результатами, полученными для РРС. У больных РРС также выявлено гиперметилирование ДНК, однако его уровень существенно ниже (61.1%), чем при ППРС [18]. Эти данные подтверждают высказанное нами ранее предположение [12], что более высокие уровни метилирования ДНК иммунных клеток позволяют отличить ППРС от РРС.

Общепризнанно, что воспаление, наряду с нейродегенерацией, является одним из основных патогенетических механизмов РС. Причем эти процессы вносят разный вклад при разных формах РС: так, при РРС лидирующую роль играет аутоиммунное воспаление, а при ППРС – нейродегенерация. Полученные нами результаты согласуются с этими представлениями. Сравнение

Таблица 2. Характеристика ДМР в области известных генов, идентифицированных в CD14+ моноцитах больных ППРС

Ген, содержащий ДМР	Координаты ДМР	Длина ДМР, п.н.	Количество CpG-сайтов, образующих ДМР	Значение <i>p</i>
<i>OR2L13</i>	chr1: 248100228–248100614	386	8	9.7×10^{-6}
<i>CAT</i>	chr11: 34460107–34460856	749	12	0.0010
<i>LCLAT1</i>	chr2: 30669597–30670025	428	7	0.0029
<i>HOXA5</i>	chr7: 27183133–27183990	857	21	0.0020
<i>RNF39</i>	chr6: 30039130–30039801	671	19	0.0037
<i>CRTAC1</i>	chr10: 99734081–99735202	1121	11	0.0051

профилей метилирования, выявленных в настоящей работе, при ППРС и в контрольной группе, показывают существенные отличия от результатов аналогичного сравнения, проведенного нами ранее для РРС [18]. Действительно, только восемь из 169 ДМП, обнаруженных в настоящей работе, оказались общими в двух формах РС. Это гиперметилированные cg07400503 (ген *STK32C*), cg08754268 (*RAPGEF4*), cg14809332 и cg19878482 (*C8orf73*), cg07581775, cg16039660 и cg27462975 (межгенные области), а также гипометилированный cg11575295 (*PTPRN2*). Эти данные дают основание предполагать, что большинство выявленных ДМП специфичны для ППРС, а не обусловлены системным воспалением.

Анализ локализации ДМП, выявленных нами при ППРС, показал, что более 60% из них расположены в CpG-островках или в соседних с ними областях (в пределах 2000 п.н. от CpG-островка), и около 70% ДМП расположены в области генов, включая промоторную область и 5'- и 3'-районы (см. рис. 1). Эти данные указывают на функциональное значение выявленного профиля метилирования.

К сожалению, отдельные ДМП, если они не подтверждены на обширных независимых выборках больных, сложно рассматривать в качестве надежных маркеров нарушений эпигенетической регуляции экспрессии близлежащих генов, так как изменения метилирования этих ДМП могут быть связаны не только с патологическим состоянием, но и, например, с генетическими особенностями пациентов [19]. Поэтому далее мы сосредоточились на поиске протяженных дифференциально метилированных регионов (ДМР), каждый из которых включает несколько CpG-сайтов с однонаправленными изменениями метилирования.

Нами идентифицированы ДМР в области шести генов: *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1* (см. табл. 2 и рис. 2). Присутствие этих регионов с протяженными изменениями уровней метилирования свидетельствует с высокой вероятностью об активной эпигенетической регуляции экспрессии упомянутых генов. Здесь следует отметить, что, хотя все выявленные ДМР характеризуются повышенным уровнем метилирования при ППРС, опрометчиво предполагать, что во всех случаях происходит подавление экспрессии содержащих их генов. В соответствии с современными представлениями, даже гиперметилирование промоторов генов, которое традиционно связывают с репрессорными эффектами, может приводить не только к снижению, но и к повышению экспрессии, а в некоторых случаях и вовсе не влиять на нее [20]. К сожалению, пока мы не можем дать ответ на вопрос, к каким изменениям в профиле экспрессии приводит дифференциальное метилирование выявленных ДМР-содержащих

генов в моноцитах. Мы надеемся, что этот вопрос станет темой наших будущих исследований.

Наши результаты говорят в пользу нарушения эпигенетической регуляции экспрессии ДМР-содержащего гена *CAT* у больных с ППРС. Его экспрессия обнаруживается во многих клетках и тканях организма, в том числе в различных популяциях лейкоцитов. Каталаза, кодируемая геном *CAT*, является важнейшим антиоксидантным ферментом пероксисом, расщепляющим пероксид водорода до воды и молекулярного кислорода, и потому играет ключевую роль в функционировании клеток врожденного иммунитета, к которым относятся и CD14+ моноциты. Гиперметилирование этого гена у больных ППРС обнаружено нами только в CD14+ моноцитах, но не в CD4+ лимфоцитах [12]. Можно представить, что сниженная антиоксидантная модальность моноцитов может иметь некоторую патологическую значимость при ППРС. Также показано, что активность каталазы в плазме и ЦСЖ больных РС повышена по сравнению со здоровыми индивидами [21], а ее сверхэкспрессия уменьшает повреждение зрительного нерва в мышинной модели РС [22]. Оба этих явления могут быть связаны с активацией механизмов защиты клеток от окислительного стресса при развитии заболевания.

Еще два ДМР-содержащих гена, *HOXA5* и *RNF39*, в норме экспрессируются в лейкоцитах на низких уровнях. *HOXA5* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и инвазии опухолей [23]; его возможная роль в патогенезе ППРС остается неясной, но может быть связана с регуляцией p53-опосредованного апоптоза.

Пока малоизученный ген *RNF39*, кодирующий убиквитин-лигазу, успел привлечь внимание исследователей в связи с его возможной ролью в процессах, связанных с регуляцией экспрессии интерферонов первого типа в клетках врожденного иммунитета [24]. Дифференциальное метилирование *RNF39* выявлено при различных аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, таких как болезнь Бехчета, системная красная волчанка, аллергический ринит [25–27], что указывает на важную роль этого гена в патогенезе заболеваний, связанных с нарушениями функций иммунной системы. Важно отметить повышенный уровень метилирования *RNF39* также при другой, ремиттирующей, форме РС [9]. Более того, все 11 дифференциально метилированных CpG-сайтов, выявленных при РРС [9], обнаружены и нами в составе ДМР, причем все они были гиперметилированы при обеих формах РС.

Функции трех остальных ДМР-содержащих генов – *OR2L13*, *LCLAT1* и *CRTAC1* – активно изучаются в клетках ЦНС, и причины изменения их метилирования в моноцитах крови пока оста-

ются неясными. Гиперметилирование этих же генов выявлено нами и в CD4⁺ лимфоцитах больных ППРС при сравнении со здоровыми индивидами [12]. Изменения в метилировании генов, вовлеченных в функционирование нервной системы, наблюдали в клетках крови и при вторично прогрессирующем РС [28, 29]. В совокупности объем накапливающихся данных может указывать на перспективность оценки уровней метилирования подобных генов в легкодоступном биоматериале — клетках крови — как маркеров изменений, происходящих в ЦНС больных РС.

Проведенный нами анализ впервые позволил идентифицировать профиль метилирования ДНК в CD14⁺ моноцитах, характерный для ППРС и согласующийся с результатами предыдущих исследований, что свидетельствует об универсальности некоторых эпигенетических механизмов при разных формах РС. Новые данные, полученные в ходе настоящего исследования, указывают на значительные изменения метилирования генов *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1*. Мы надеемся, что эти результаты (после их подтверждения на независимых выборах) будут способствовать выявлению новых мишеней для терапии ППРС и углублению знаний об особенностях патогенеза этой формы РС.

Анализ уровней метилирования ДНК проводили в Центре коллективного пользования “Геномика” (ИХБФМ СО РАН)

Исследование выполнено в рамках Государственного задания РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России № 121040600400-8.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Filippi M., Bar-Or A., Piehl F., Preziosa P., Solari A., Vukusic S., Rocca M.A. (2018) Multiple sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. **4**, 43.
- Dendrou C.A., Fugger L., Friese M.A. (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 545–558.
- Olsson T., Barcellos L.F., Alfredsson L. (2017) Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 25–36.
- Waubant E., Lucas R., Mowry E., Graves J., Olsson T., Alfredsson L., Langer-Gould A. (2019) Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **6**, 1905–1922.
- Giallongo S., Longhitano L., Denaro S., D’Aprile S., Torrisi F., La Spina E., Giallongo C., Mannino G., Lo Furno D., Zappalà A., Giuffrida R., Parenti R., Li Volti G., Tibullo D., Vicario N. (2022) The role of epigenetics in neuroinflammatory-driven diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15218.
- Koch M., Kingwell E., Rieckmann P., Tremlett H. (2009) The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. **73**, 1996–2002.
- Correale J., Gaitán M.I., Ysraaelit M.C., Fiol M.P. (2017) Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*. **140**, 527–546.
- 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., Casaccia P. (2014) Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nat. Neurosci.* **17**, 121–130.
- Maltby V.E., Lea R.A., Sanders K.A., White N., Benton M.C., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2017) Differential methylation at MHC in CD4⁺ T cells is associated with multiple sclerosis independently of HLA-DRB1. *Clin. Epigenetics*. **9**, 71.
- Maltby V.E., Graves M.C., Lea R.A., Benton M.C., Sanders K.A., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2015) Genome-wide DNA methylation profiling of CD8⁺ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4⁺ T cells in multiple sclerosis patients. *Clin. Epigenetics*. **7**, 118.
- Кулакова О.Г., Кабилов М.Р., Данилова Л.В., Попова Е.В., Батурина О.А., Царева Е.Ю., Баулина Н.М., Киселев И.С., Бойко А.Н., Фаворов А.В., Фаворова О.О., Власов В.В. (2016) Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза. *Acta Naturae*. **8**, 39–47.
- Киселев И.С., Кулакова О.Г., Данилова Л.В., Батурина О.А., Кабилов М.Р., Попова Е.В., Бойко А.Н., Фаворова О.О. (2022) Полногеномный анализ метилирования ДНК CD4⁺ Т-лимфоцитов больных первично-прогрессирующим рассеянным склерозом свидетельствует о вовлеченности этого эпигенетического процесса в иммунопатогенез заболевания. *Молекуляр. биология*. **56**, 468–475.
- Ashhurst T.M., van Vreden C., Niewold P., King N.J.C. (2014) The plasticity of inflammatory monocyte responses to the inflamed central nervous system. *Cell. Immunol.* **291**, 49–57.
- Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., Fujihara K., Galetta S.L., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Marrie R.A., Miller A.E., Miller D.H., Montalban X., Mowry E.M., Sorensen P.S., Tintoré M., Traboulsee A.L., Trojano M., Uitdehaag B.M.J., Vukusic S., Waubant E., Weinshenker B.G., Reingold S.C., Cohen J.A. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **17**, 162–173.
- Tian Y., Morris T.J., Webster A.P., Yang Z., Beck S., Feber A., Teschendorff A.E. (2017) ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. *Bioinformatics*. **33**, 3982–3984.
- Teschendorff A.E., Marabita F., Lechner M., Bartlett T., Tegner J., Gomez-Cabrero D., Beck S. (2013) A beta-

- mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. **29**, 189–196.
17. Jaffe A.E., Murakami P., Lee H., Leek J.T., Fallin M.D., Feinberg A.P., Irizarry R.A. (2012) Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int. J. Epidemiol.* **41**, 200–209.
 18. Kiselev I., Danilova L., Baulina N., Baturina O., Kabilov M., Boyko A., Kulakova O., Favorova O. (2022) Genome-wide DNA methylation profiling identifies epigenetic changes in CD4+ and CD14+ cells of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **60**, 103714.
 19. Philibert R.A., Terry N., Erwin C., Philibert W.J., Beach S.R., Brody G.H. (2014) Methylation array data can simultaneously identify individuals and convey protected health information: an unrecognized ethical concern. *Clin. Epigenetics*. **6**, 28.
 20. de Mendoza A., Nguyen T.V., Ford E., Poppe D., Buckberry S., Pflueger J., Grimmer M.R., Stolzenburg S., Bogdanovic O., Oshlack A., Farnham P.J., Blancafort P., Lister R. (2022) Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biol.* **23**, 163.
 21. Ibitoye R., Kemp K., Rice C., Hares K., Scolding N., Wilkins A. (2016) Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: a review. *Biomark. Med.* **10**, 889–902.
 22. Guy J., Qi X., Hauswirth W.W. (1998) Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 13847–13852.
 23. Fan F., Mo H., Zhang H., Dai Z., Wang Z., Qu C., Liu F., Zhang L., Luo P., Zhang J., Liu Z., Cheng Q., Ding F. (2022) HOXA5: A crucial transcriptional factor in cancer and a potential therapeutic target. *Biomed. Pharmacother.* **155**, 113800.
 24. Jia X., Zhao C., Zhao W. (2021) Emerging roles of MHC class I region-encoded E3 ubiquitin ligases in innate immunity. *Front. Immunol.* **12**, 687102.
 25. Kurata R., Nakaoka H., Tajima A., Hosomichi K., Shiina T., Meguro A., Mizuki N., Ohono S., Inoue I., Inoko H. (2010) TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B*51 and -A*26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 533–537.
 26. Renauer P., Coit P., Jeffries M.A., Merrill J.T., McCune W.J., Maksimowicz-McKinnon K., Sawalha A.H. (2015) DNA methylation patterns in naïve CD4+ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci. Med.* **2**, e000101.
 27. Morin A., Laviolette M., Pastinen T., Boulet L.-P., Laprise C. (2017) Combining omics data to identify genes associated with allergic rhinitis. *Clin. Epigenetics*. **9**, 3.
 28. Campagna M.P., Xavier A., Lea R.A., Stankovich J., Maltby V.E., Butzkueven H., Lechner-Scott J., Scott R.J., Jokubaitis V.G. (2022) Whole-blood methylation signatures are associated with and accurately classify multiple sclerosis disease severity. *Clin. Epigenetics*. **14**, 194.
 29. Ewing E., Kular L., Fernandes S.J., Karathanasis N., Lagani V., Ruhmann S., Tsamardinos I., Tegner J., Piehl F., Gomez-Cabrero D., Jagodic M. (2019) Combining evidence from four immune cell types identifies DNA methylation patterns that implicate functionally distinct pathways during multiple sclerosis progression. *EBioMedicine*. **43**, 411–423.

DNA Methylation Profile of CD14+ Monocytes Changes in Primary Progressive Multiple Sclerosis

I. S. Kiselev^{1, *}, O. G. Kulakova¹, O. A. Baturina², M. R. Kabilov²,
A. N. Boyko^{1, 3}, and O. O. Favorova¹

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

³Federal Center for Brain and Neurotechnology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: kiselev.ivan.1991@gmail.com

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune inflammatory and neurodegenerative disease of the central nervous system, characterized by significant clinical heterogeneity. In 10–15% of patients, primary progressive MS (PPMS) develops, in which, unlike the most common relapsing-remitting form of MS, neurodegeneration steadily progresses and, as a consequence, neurological symptoms continuously increase. Peculiarities of epigenetic regulation of gene expression may be one of the reasons for the differences in the pathogenesis of two MS forms. DNA methylation is one of the key epigenetic mechanisms that remains almost unexplored in different cell populations of PPMS patients. The aim of this work was to identify differential methylation profiles of CpG sites in the CD14+ monocyte DNA that characterize PPMS. Genome-wide analysis of DNA methylation in PRMS patients and healthy individuals identified 169 differentially methylated positions (DMPs), 90.5% of which were hypermethylated in PRMS patients. More than half of all DMPs are located in/near known genes and within CpG islands and their neighboring regions, which indicates their high functional significance. We found six differentially methylated regions (DMRs) in genes *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39*, and *CRTAC1* involved in inflammation and neurodegeneration, which indicates active epigenetic regulation of their expression.

Keywords: primary progressive multiple sclerosis, inflammation, neurodegeneration, DNA methylation, epigenetic regulation