

Н.Ю. Абрамычева¹, Е.Ю. Федотова^{1*}, Е.П. Нужный¹, Н.С. Николаева¹,
С.А. Ключников¹, М.В. Ершова¹, А.С. Танас², С.Н. Иллариошкин¹

¹ Научный центр неврологии, Москва, Российская Федерация

² Медико-генетический научный центр, Москва, Российская Федерация

Эпигенетика болезни Фридрейха: метилирование области экспансии (GAA)_n-повторов гена *FXN*

Обоснование. Болезнь Фридрейха (БФ) — самая частая форма среди наследственных атаксий, в большинстве случаев связанная с гомозиготной экспансией GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN*. Метилирование данного гена может играть большую роль в патогенезе БФ. **Цель** — изучить паттерн метилирования CpG-сайтов, фланкирующих область GAA-повторов гена *FXN* у пациентов с БФ и их родственников с гетерозиготным носительством GAA-экспансии, а также его взаимосвязь с клиническими особенностями заболевания. **Методы.** Исследованы образцы ДНК пациентов с БФ (n=18), их родственников с гетерозиготным носительством GAA-экспансии (n=12) и здоровых добровольцев группы контроля (n=15). Паттерн метилирования определяли методом прямого секвенирования после бисульфитной обработки. **Результаты.** Всего проанализировано 18 CpG-сайтов в UP-GAA области гена (до GAA-повторов) и 12 сайтов в DOWN-GAA области (после GAA-повторов). В UP-GAA области наблюдался более высокий уровень метилирования CpG-сайтов для БФ по сравнению с контрольной группой (p<0,05), а в DOWN-GAA области — снижение среднего уровня метилирования для БФ по сравнению с контролем (p<0,05). Анализ степени метилирования UP-GAA области у пациентов с БФ по сравнению с контролем выявил гиперметилирование по 15 CpG-сайтам из 18 (p<0,05). Наибольшие различия в уровне метилирования в UP-GAA области наблюдались для CpG-сайтов 50–54, 57 и 58. Напротив, в DOWN-GAA области в контрольной группе практически все CpG-сайты были метилированы полностью, а в группе БФ уровень метилирования был статистически значимо меньше (p<0,05). Выявлена прямая корреляция усредненного процента метилирования для UP-GAA области с длиной более длинного экспандированного аллеля при БФ (r=0,63; p=0,03) и отсутствие корреляций для DOWN-GAA области. У гетерозиготных носителей выявлена аналогичная прямая корреляция в UP-GAA области для CpG-сайта 50 (r=0,77; p=0,04), тогда как в DOWN-GAA области наблюдалась обратная зависимость метилирования от числа GAA-повторов в экспандированном аллеле (r=-0,83, p=0,02). Выявлена отрицательная корреляционная связь между гиперметилированием отдельных CpG-сайтов в UP-GAA области и возрастом дебюта заболевания (p<0,05). **Заключение.** В работе выявлено гиперметилирование UP-GAA области и гипометилирование DOWN-GAA области у пациентов с БФ по сравнению с контрольной группой, что определяется длиной GAA-экспансии и оказывает непосредственное влияние на возраст дебюта заболевания.

Ключевые слова: болезнь Фридрейха, эпигенетика, метилирование.

(Для цитирования) Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Нужный Е.П., Николаева Н.С., Ключников С.А., Ершова М.В., Танас А.С., Иллариошкин С.Н. Эпигенетика болезни Фридрейха: метилирование области экспансии (GAA)_n-повторов гена *FXN*. Вестник РАМН. 2019;74(2):80–87. doi: 10.15690/vramn1099)

Обоснование

Болезнь Фридрейха (БФ) — самая частая форма наследственных атаксий, распространенность которой составляет 2–7 на 100 000 населения. Тип наследования — аутомно-рецессивный. Частота гетерозиготного носительства мутантного гена составляет 1:90–120 человек [1–3]. Ген БФ, *FXN* (*FRDA*), картирован в прицентроммерной области 9-й хромосомы в локусе 9q13-21.1 и кодирует митохондриальный белок фратаксин. Заболевание в большинстве случаев связано с гомозиготной экспансией tandemных GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN*: в норме число копий GAA не превышает 32, а у 96–98% пациентов с БФ число GAA-повторов в обоих аллелях гена увеличено от 70 до 1700 [4, 5]. Экспансия такой длины нарушает созревание первичного транскрипта, препятствуя вырезанию интрона из молекулы зрелой мРНК. Это приводит к снижению или даже почти полному блоку трансляции гена и, соответственно, к недостаточности синтеза или искажению структуры цитоплазматического белка фратаксина, отвечающего за митохондриальный транспорт железа. Недостаточность фратаксина приводит к аккумуляции железа цитозольного происхождения внутри митохондрий, нарушению синтеза АТФ, расстройству механизмов поддержания мембранного потенциала и индукции свободнорадикальных окислительных реакций

в митохондриях, что сопровождается гибелью клеток наиболее энергозависимых органов и тканей, среди которых в первую очередь страдают нейроны [6–10].

БФ характеризуется дегенеративными изменениями в проводящих путях задних и боковых канатиков спинного мозга, задних корешках, а также в клетках коры мозжечка, подкорковых ядер, коры большого мозга [11, 12]. Тяжесть клинических проявлений и возраст дебюта БФ, как и при других «болезнях экспансии», имеют определенную связь с размером патологически удлиненного GAA-тракта. Однако в ряде работ показано, что только в ~50% случаев наблюдается четкая обратная корреляция между возрастом манифестации заболевания и количеством GAA-повторов, что указывает на многофакторность регуляции фенотипических особенностей БФ [13–16].

В последнее время уделяется большое внимание роли эпигенетики в развитии различных заболеваний, среди которых особенное место занимают патологии нервной системы, связанные с «динамическими мутациями», т.е. с экспансией tandemных повторов [17–19]. Основными вопросами при изучении эпигенетики являются закономерности и механизмы изменения экспрессии генов, не затрагивающие нуклеотидной последовательности ДНК. Наиболее хорошо изученным к настоящему времени эпигенетическим механизмом является метилирование

цитозинового основания ДНК: оно осуществляется путем присоединения метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца. Основной функцией метилирования является изменение активности гена за счет специфической регуляции экспрессии, при этом даже незначительные изменения в степени метилирования ДНК могут существенно изменить уровень экспрессии генов [20–24]. Изучение паттерна метилирования CpG-сайтов при различных заболеваниях открывает возможность для разработки принципиально новой молекулярной терапии, связанной с воздействием на эпигеном и коррекцией нарушений механизмов контроля экспрессии генов [25, 26].

Учитывая существующую обратную связь между уровнем экспрессии гена *FXN* и тяжестью состояния БФ, предполагается, что модификация ДНК-метиления может влиять на прогрессирование заболевания, а эпигенетический профиль может служить изменяемым и измеряемым маркером при проведении специфического лечения [27].

Активность многих генов зависит от регуляторных последовательностей, находящихся в 1-м интроне. Соответственно, область GAA-экспансии 1-го интрона гена *FXN* с наибольшей вероятностью влияет на уровень его экспрессии [28, 29]. Ряд исследований, направленных на изучение влияния эпигенетического статуса на развитие БФ, сфокусированы на оценке уровня метилирования CpG-сайтов области, фланкирующей (GAA)_n-повторы. Так, в ряде работ были выявлены различия степени метилирования этого региона в образцах пациентов с БФ по сравнению с контрольной группой, а именно наблюдалось гиперметилование области, расположенной выше GAA-экспансии, и гипометилование области,

расположенной ниже. Большинство исследований проводилось на аутопсийном материале, и оценка уровня метилирования проводилась по нескольким выборочным CpG-сайтам [30–32].

В нашей работе был проведен сравнительный анализ степени метилирования множества CpG-сайтов (суммарно 30 сайтов) области (GAA)_n-повторов гена *FXN* (771 п.н. до повторов в UP-GAA области и 255 п.н. после повторов в DOWN-GAA области) на репрезентативной выборке российских пациентов с БФ, здоровых родственников пациентов — гетерозиготных носителей экспансии (GAA)_n-повторов и контрольной группы.

Цель исследования — изучить паттерн метилирования гена *FXN* у пациентов с БФ и гетерозиготных носителей экспансии GAA-повторов.

Методы

Дизайн исследования

Нерандомизированное контролируемое исследование. Группы формировались ретроспективно на основании результатов генетической диагностики.

Критерии соответствия

В работе была использована коллекция образцов ДНК пациентов с БФ, наблюдавшихся в ФГБНУ «Научный центр неврологии», их здоровых родственников (гетерозиготных носителей GAA-экспансии в 1-м интроне гена *FXN*) и пациентов контрольной группы. Критериями включения в группу с БФ являлся клинический диагноз заболевания, поставленный согласно утвержденным диагностическим критериям с наличием по-

N.Yu. Abramychева¹, E.Yu. Fedotova^{1*}, E.P. Nuzhnyi¹, N.S. Nikolaeva¹,
S.A. Klyushnikov¹, M.V. Ershova¹, A.S. Tanas², S.N. Illarionov¹

¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation

² Research Center of Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Epigenetics of Friedreich's Disease: Methylation of the (GAA)_n-Repeats Region in *FXN* Gene

Background: Friedreich's disease (FD) is the most common hereditary ataxia. It is associated, most frequently, with homozygous GAA repeats expansion in intron 1 of the *FXN* gene. Methylation of the *FXN* gene can play an important role in the pathogenesis of FD. **Aims:** to study methylation pattern in CpG sites flanking GAA-expansion in intron 1 of the *FXN* gene in patients with FD and their heterozygous relatives as well as its relationship with clinical features. **Materials and methods:** We studied DNA samples from patients with FD (n=18), their relatives carrying heterozygous GAA expansion (n=12), and control group (n=15). Pattern of methylation was studied by direct sequencing of DNA regions after bisulphide processing. **Results:** We analyzed 18 CpG sites in the UP-GAA region of the gene (before GAA-repeats) and 12 CpG sites in the DOWN-GAA region (after GAA-repeats). In the UP-region, the mean methylation level of CpG sites in FD patients was higher compared to controls (n=15) (p<0.05), while in the DOWN-region there was a decrease of mean methylation level in FD compared to controls (p<0.05). Analysis of methylation level in different CpG sites in the UP-GAA region revealed hypermethylation for 15 of 18 CpG-sites as compared to controls (p<0.05). The most significant differences in methylation level in the UP-GAA region were seen for CpG sites 50–54, 57 and 58. In contrast, in the DOWN-GAA region almost all CpG sites were fully methylated in the control group, while in FD patients methylation was significantly lower (p<0.05). We revealed positive correlation of mean methylation level and more expanded allele length for the UP-GAA region in FD (r=0.63; p=0.03), and no correlations for the DOWN-GAA region. In heterozygous carriers we observed an analogous positive correlations in the UP-GAA region for CpG site 50 (r=0.77; p=0.04), while in the DOWN-GAA region there was inverse correlation of methylation with GAA repeat number in the expanded allele (r=-0.83, p=0.02). Negative correlation was found between the hypermethylation of some CpG-sites in the UP-GAA region and age of the disease onset (p<0.05). **Conclusion:** We revealed hypermethylation in the UP-GAA region and hypomethylation in the DOWN-GAA region in patients with FD compared to controls and correlations of methylation level with the GAA expansion length and age of disease onset.

Key words: epigenetics, methylation, Friedreich's disease.

(For citation: Abramychева NYu, Fedotova EYu, Nuzhnyi EP, Nikolaeva NS, Klyushnikov SA, Ershova MV, Tanas AS, Illarionov SN. Epigenetics of Friedreich's Disease: Methylation of the (GAA)_n-Repeats Region in *FXN* Gene. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2019;74(2):80–87. doi: 10.15690/vramn1099)

ложительной молекулярно-генетической диагностики (гомозиготная экспансия tandemных GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN*). Для гетерозиготных носителей, группа которых формировалась из родственников больных, критерием включения было наличие гетерозиготной GAA-экспансии. В группу контроля включались здоровые добровольцы, не имевшие клинических проявлений и экспансии GAA-повторов в гене *FXN*. Все образцы крови для получения образцов ДНК были взяты с информированного согласия исследуемых лиц.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе ДНК-лаборатории V неврологического (нейрогенетического) отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии» (далее ФГБНУ «НЦН»).

Продолжительность исследования

Исследование проводилось в 2017–2018 гг. на образцах ДНК, собранных за время работы ДНК-лаборатории ФГБНУ «НЦН» с 2011 г.

Описание медицинского вмешательства

Всем больным после заполнения информированного согласия осуществлялся забор крови из кубитальной вены для молекулярно-генетического исследования в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) с 3,8% цитратом натрия.

Исходы исследования

Основной исход исследования

Изучалась степень метилирования CpG-сайтов в области GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN* (UP- и DOWN-области).

Методы регистрации исходов

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США). Наличие экспансии GAA-повторов оценивали методом полимеразной цепной реакции соответствующей области с последующим разделением в агарозном геле.

Паттерн метилирования определяли методом прямого секвенирования соответствующих участков ДНК после бисульфитной обработки, в результате которой 5-метилцитозин остается неизменным и амплифицируется как цитозин, тогда как неметилированный цитозин в результате сульфонирующего и последующего гидролитического дезаминирования преобразуется в урацил, который амплифицируется как тимин. Бисульфитную конверсию проводили с помощью набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) согласно методике производителя.

Для секвенирования интересующая область 1-го интрона гена *FXN* была разбита на три короткие последовательности, которые амплифицировались со специфических праймеров, лежащих вне CpG-сайтов.

Степень метилирования рассчитывали путем анализа первичных результатов секвенирования по Сэнгеру (хроматограмм капиллярного электрофореза), полученных на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) и обработанных с помощью компьютерной программы SeqBase; программа позволяет учитывать неэквивалентность нуклеотидного состава секвенированных матриц, модифицированных бисульфитом натрия. Процент метилирования для каждого конкретного CpG-сайта в образцах ДНК рассчитывали по отноше-

нию высоты синего пика (метилированный цитозин, C) к суммарной высоте синего и красного пиков (метилированный и неметилированный цитозин, C+T).

Этическая экспертиза

Работа одобрена Локальным этическим комитетом ФГБНУ «НЦН» (протокол № 11-3/17 от 18.10.17). Все участники исследования получили необходимую информацию и добровольно подписали информированное согласие.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США) и IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM, США). Для проверки гипотез использовали критерии непараметрической статистики. Сравнение групп осуществляли критерием Краскала–Уоллиса, корреляционный анализ проводили с помощью метода ранговой корреляции Спирмена (r). Уровень значимости (p) при проверке гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследовании была проанализирована геномная ДНК следующих лиц: пациентов с БФ ($n=18$); их здоровых родственников — гетерозиготных носителей GAA-экспансии в гене *FXN* ($n=12$); неврологически здоровых людей с отсутствием экспансии в обоих аллелях *FXN* ($n=15$). Средний возраст пациентов с БФ составил $28,2 \pm 7,9$ (от 14 до 43) года, возраст дебюта симптомов — $13,4 \pm 7,4$ (от 4 до 41) года. Возраст начала заболевания определялся согласно появлению первых симптомов атаксии. Средний возраст гетерозиготных носителей составил $43,5 \pm 9,1$ (от 29 до 56) года. Группа контроля была сопоставима по возрасту, полу и этническому составу с группой БФ.

Основные результаты исследования

Число tandemных GAA-повторов в меньшем аллеле гена у пациентов с БФ составило 595 ± 186 , в большем аллеле — 795 ± 145 . Число tandemных повторов в экспандированном аллеле у гетерозигот *FXN* составило 600 ± 237 .

Аналізу на степень метилирования были подвергнуты две области 1-го интрона гена *FXN*: 5'-область выше (GAA)_n-повторов протяженностью 771 п.н. (UP-GAA), содержащая 18 CpG-сайтов, и область после повторов протяженностью 255 п.н. (DOWN-GAA), содержащая 12 CpG-сайтов. Для удобства представления данных все CpG-сайты были обозначены порядковыми номерами (50–67 в UP-области и 1–12 в DOWN-области) (рис. 1). В обеих областях наблюдалось различие в степени метилирования образцов ДНК пациентов с БФ и контрольной группы. В UP-GAA области усредненный уровень метилирования CpG-сайтов для образцов БФ был выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В DOWN-GAA области наблюдалось статистически значимое снижение усредненного уровня метилирования для образцов БФ по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При этом образцы с одним экспандированным аллелем (гетерозиготные

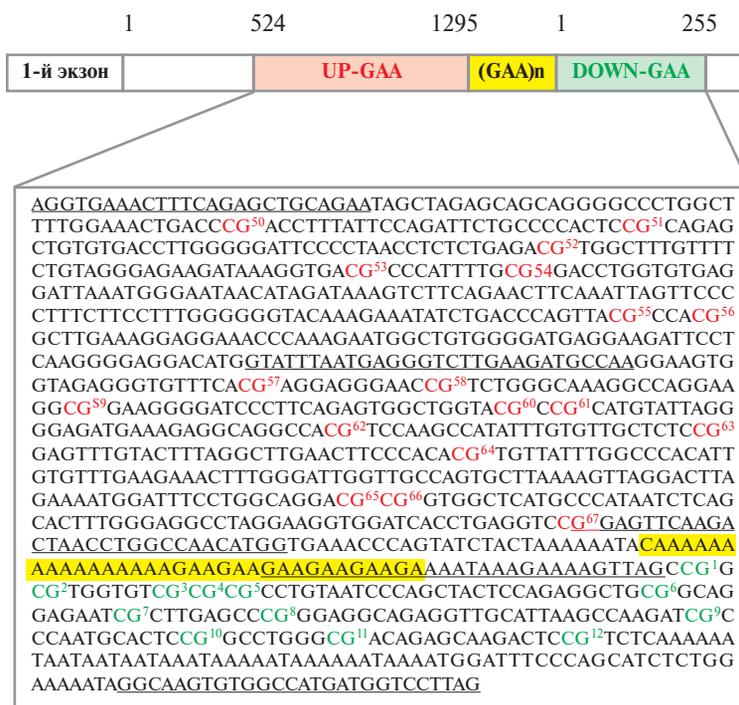


Рис. 1. Схема проанализированной области 1-го интрона гена FXN

Примечание. Красным цветом выделены CpG-сайты UP-GAA области (нумерация CpG-сайтов от начала интрона), зеленым — CpG-сайты DOWN-GAA области (нумерация с конца области (GAA)_n-повторов), желтым — область поли(А)-тракта и (GAA)_n-повторов. Подчеркнуты нуклеотидные последовательности праймеров.

носители) занимали промежуточное положение по статусу метилирования между БФ и контрольной группой (рис. 2). Следует отметить, что более существенные различия наблюдались в UP-GAA области. Так, усредненный уровень метилирования этого региона в образцах БФ превышал таковой для контрольных образцов в некоторых случаях более чем в 2 раза, а для гетерозиготных носителей — в 1,5 раза.

Сравнительный анализ степени метилирования отдельных CpG-сайтов UP-GAA области у пациентов с БФ по сравнению с группой контроля выявил значимое

($p < 0,05$) гиперметилирование для 15 CpG-сайтов из 18 (рис. 3). Наибольшие различия в уровне метилирования в UP-GAA области наблюдались для CpG-сайтов 50, 51, 52, 53, 54, 57 и 58. Степень метилирования этих CpG-сайтов в образцах БФ варьировала от 40–60 (сайты 50 и 52) до 80–100% (сайты 51, 53, 54, 57 и 58) по сравнению с образцами контрольной группы — от 0 (сайты 50, 51 и 52) до 5–20% (сайты 53, 54, 57 и 58). Наоборот, в DOWN-GAA области в контрольной группе практически все CpG-сайты были метилированы полностью, тогда как в группе БФ метилирование было статистиче-

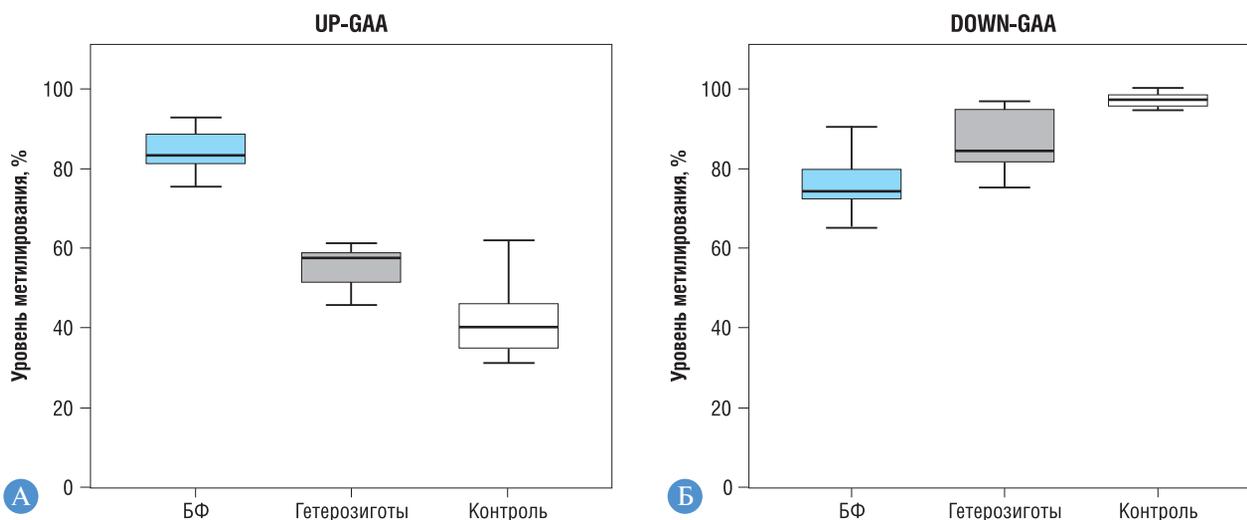


Рис. 2. Усредненная степень метилирования CpG-сайтов у пациентов с болезнью Фридрейха, гетерозиготных носителей GAA-экспансии и лиц контрольной группы

Примечание. Обнаружены статистически значимые различия усредненного уровня метилирования у пациентов с болезнью Фридрейха (БФ) в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$). А — UP-GAA область, Б — DOWN-GAA область.

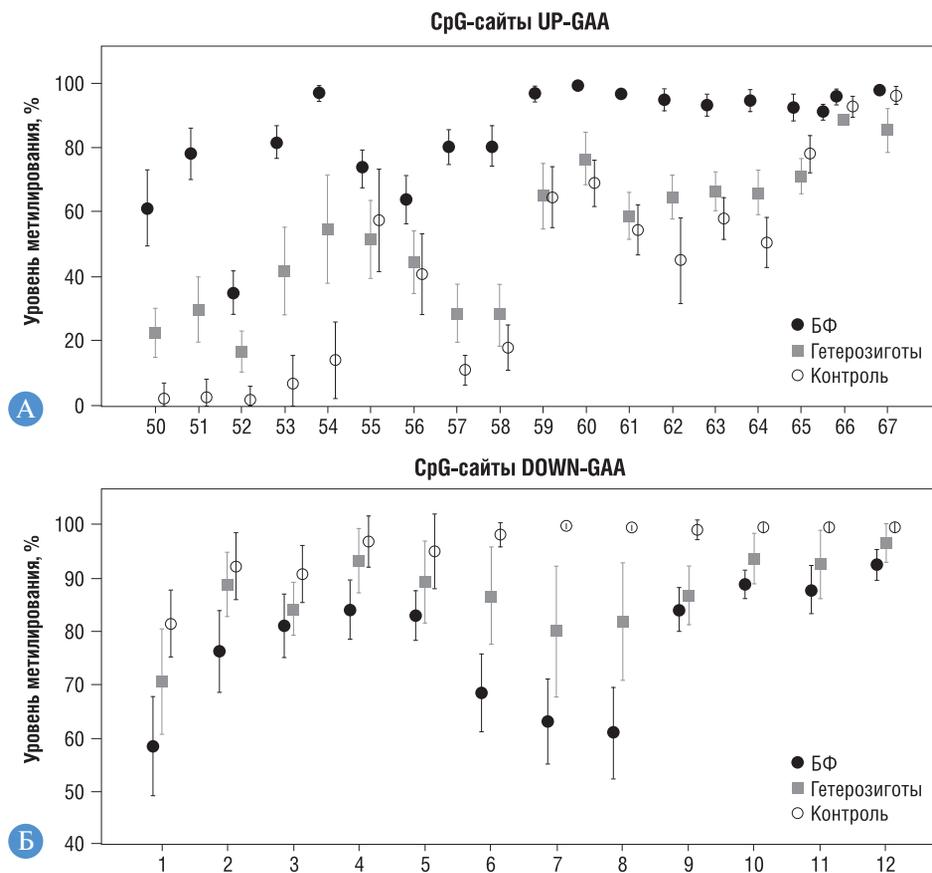


Рис. 3. Степень метилирования CpG-сайтов области, фланкирующей (GAA)_n-повторы гена *FXN*, в образцах ДНК пациентов с болезнью Фридрейха, гетерозиготных носителей экспансии и контрольной группы

Примечание. А — 18 CpG-сайтов UP-GAA-области (с 50-го по 67-й), Б — 12 CpG-сайтов DOWN-GAA-области. БФ — болезнь Фридрейха.

ски значительно снижено ($p < 0,05$). Наибольшие различия в уровне метилирования в DOWN-GAA области наблюдались для CpG-сайтов 6, 7 и 8, при этом все сайты в образцах контрольной группы, начиная с сайта CpG-4, были полностью метилированы (98–100%). В образцах БФ полного метилирования не наблюдалось ни для одного из исследованных сайтов.

Оценка корреляции метилирования исследуемых областей гена *FXN* с числом GAA-повторов более экспандированного аллеля в группе БФ выявила значимую прямую взаимосвязь этих показателей при анализе UP-GAA области ($r = 0,63$; $p = 0,03$) (рис. 4А) и отсутствие корреляции для DOWN-GAA области. Аналогичный анализ полученных результатов для группы гетерозиготных носителей

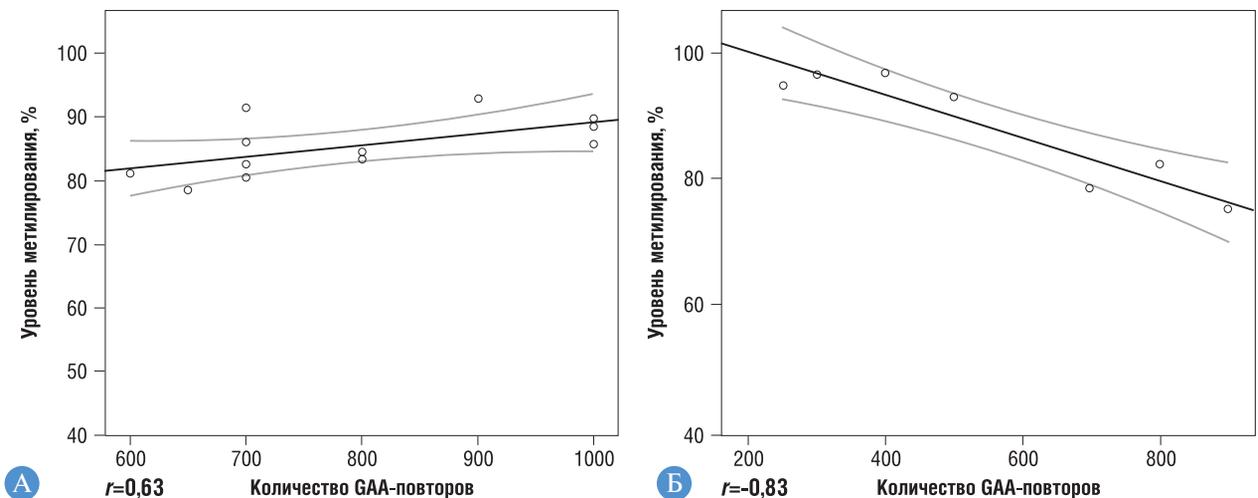


Рис. 4. Корреляции между усредненной степенью метилирования CpG-сайтов и числом GAA-повторов более длинного экспандированного аллеля

Примечание. А — в группе с болезнью Фридрейха в UP-GAA-области ($p = 0,03$), Б — в группе гетерозиготных носителей мутации в DOWN-GAA области ($p = 0,02$).

мутации выявил прямую корреляцию в UP-GAA области только для CpG-сайта 50: увеличение GAA-повторов в экспандированном аллеле у гетерозигот приводило к увеличению степени метилирования ($r=0,77$; $p=0,04$); в DOWN-GAA области наблюдалась значимая обратная зависимость паттерна метилирования от числа GAA-повторов в экспандированном аллеле ($r=-0,83$; $p=0,02$) (рис. 4Б).

При проведении клинико-эпигенетических сопоставлений была выявлена отрицательная корреляционная связь между степенью метилирования отдельных CpG-сайтов (50, 51 и 52) в UP-GAA области и возрастом дебюта заболевания ($p<0,05$). Таким образом, гиперметилирование данных участков связано с более ранним появлением симптомов болезни.

Дополнительные результаты исследования

Дополнительных результатов получено не было.

Нежелательные явления

Нежелательных явлений не зарегистрировано.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

В работе изучена степень метилирования 30 CpG-сайтов области (GAA)_n-повторов в 1-м интроне гена *FXN* на выборке российских пациентов с БФ, гетерозиготных носителей экспансии и лиц контрольной группы. Выявлено гиперметилирование UP-GAA области и гипометилирование DOWN-GAA области у пациентов с БФ по сравнению с контрольной группой, а также показана прямая корреляция уровня метилирования UP-GAA области с длиной GAA-экспансии. Для группы гетерозиготных носителей GAA-экспансии выявлена прямая корреляция уровня метилирования UP-GAA с числом GAA-повторов только для CpG-сайта 50; в DOWN-GAA области выявлена обратная корреляция среднего уровня метилирования с числом GAA-повторов. Также было показано, что гиперметилирование нескольких CpG-сайтов в UP-GAA области связано с более ранним возрастом начала заболевания.

Обсуждение основного результата исследования

Отсутствие в ряде случаев прямой зависимости фенотипических проявлений БФ от числа GAA-повторов в гене *FXN* указывает на то, что эпигенетический профиль *FXN* может быть полезным дополнительным инструментом для определения прогноза, мониторинга течения заболевания и выбора тактики лечения. За последние 10 лет описаны единичные специфические факторы, контролирующие транскрипцию гена *FXN* [33–36]. Ряд работ посвящен влиянию модификации гистонов (метилирования, ацетиления) на экспрессию фратаксина и влиянию соответствующих ингибиторов гистоновых деацетилаз на клиническую картину заболевания [37].

Метилирование ДНК является одним из наиболее важных и изученных эпигенетических механизмов, влияющих на экспрессию генов и участвующих в патогенезе многих наследственных заболеваний. При изучении эпигенетических процессов, влияющих на экспрессию генов, в первую очередь изучают статус метилирования CpG-островков в промоторных областях генов. Однако в литературе нет достоверных сведений, указывающих на

значимое метилирование именно промоторной области гена *FXN* при БФ.

Напротив, для других областей гена такие данные есть: так, в ряде работ было показано, что экспансия GAA-повторов приводит к изменениям в степени метилирования области, фланкирующей GAA-повторы в 1-м интроне гена *FXN*. В одном из первых исследований [30] на образцах ДНК из тканей мозга и сердца (по 4 образца) было показано гиперметилирование CpG-сайтов 5'-области GAA-повторов (UP-GAA). В работе другой группы исследователей [32] на аутопсийном материале от двух пациентов с БФ и двух контрольных образцах тканей мозга и сердца также было выявлено гиперметилирование UP-GAA области и гипометилирование DOWN-GAA области повторов. Однако степень метилирования индивидуальных CpG-сайтов в этих двух исследованиях была различной, что объясняется, по-видимому, малым размером исследованных выборок.

В нашей работе мы также выявили гиперметилирование UP-GAA области и гипометилирование DOWN-GAA области повторов в образцах ДНК пациентов с БФ по сравнению с контрольной группой. Результаты оценки изменений степени метилирования индивидуальных CpG-сайтов частично совпали с данными, полученными в исследовании I. Castaldo и соавт. [38]. Этими авторами на большой выборке, включавшей 67 образцов ДНК из периферической крови от пациентов с БФ, было продемонстрировано гиперметилирование пяти CpG-сайтов UP-GAA области. В нашем исследовании они соответствуют CpG-сайтам 57, 58, 59, 60 и 61 и практически полностью совпадают по изменениям метилирования в процентном соотношении; однако, по нашим данным, большая значимость и больший интерес представляют CpG-сайты 50, 51, 53 и 54.

Полиморфная область GAA-повторов гена *FXN* находится внутри генетического элемента *Alu*, из которого, как считается, она и возникла [2, 4, 27, 32]. Одним из основных механизмов подавления мобильности *Alu*-элементов в клетке является метилирование этих участков ДНК, которое препятствует их транскрипции. Анализ паттерна метилирования CpG-сайтов области GAA-повторов в контрольной группе нашего исследования (нормальные аллели) подтвердил этот феномен: три последних CpG-сайта UP-GAA области (65, 66 и 67) метилированы, также метилированы все 12 CpG-сайтов DOWN-GAA области. Напротив, в группах БФ и гетерозиготных носителей мутации CpG-сайты DOWN-GAA области метилированы неполностью, и наблюдается достоверная обратная корреляция с размером GAA-экспансии. Другими словами, увеличение расстояния между центральной областью *Alu*-элемента и его 3'-концом за счет увеличения числа копий GAA-повторов приводит к блокированию метилирования, и чем больше это расстояние — тем выше эффект.

Известно, что на фенотип заболевания влияет длина экспансии GAA-тракта, однако клиническую вариабельность лишь частично можно объяснить генетическими детерминантами [39]. Например, наблюдается определенная вариабельность возраста начала заболевания, которая до настоящего времени не нашла конкретного объяснения. В данной работе было показано модифицирующее влияние метилирования определенных CpG-сайтов на фенотип заболевания: гиперметилирование нескольких CpG-сайтов в UP-GAA области гена *FXN* коррелировали с более ранним возрастом начала заболевания. Таким образом, установленные

корреляции подтверждают значимость эпигенетической регуляции в реализации фенотипической гетерогенности.

Заключение

Полученные результаты дают основание для дальнейшего изучения паттерна метилирования отдельных CpG-сайтов гена *FHN* в качестве потенциального биомаркера БФ, а также раскрывают механизмы патогенеза заболевания, что может быть использовано для разработки таргетной терапии в будущем.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Научно-исследовательская работа и публикация статьи осуществлены при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 17-75-20211).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов: все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА

- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*. 1996;271(5254):1423–1427. doi: 10.1126/science.271.5254.1423.
- Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet*. 2000;37(1):1–8. doi: 10.1136/jmg.37.1.1.
- Иллариошкин С.Н., Ершова М.В. Атаксия Фридрейха. В кн.: *Наследственные атаксии и параличи*. / Под ред. Иллариошкина С.Н., Руденской Г.Е., Ивановой-Смоленской И.А., и др. — М.: МЕДпресс-информ; 2006. — С. 49–113. [Illarioshkin SN, Ershova MV. *Ataksiya Fridreykha*. In: *Nasledstvennye ataksii i paraplegii*. Ed by Illarioshkin SN, Rudenskaya GE, Ivanova-Smolenskaya IA, et al. Moscow: MEDpress-inform; 2006. pp. 49–113. (In Russ).]
- Pandolfo M. The molecular basis of Friedreich ataxia. *Adv Exp Med Biol*. 2002;516:99–118. doi: 10.1007/978-1-4615-0117-6_5.
- Burk K. Friedreich ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias*. 2017;(4):4. doi: 10.1186/s40673-017-0062-x.
- Hanauer A, Chery M, Fujita R, et al. The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet*. 1990;46(1):133–137.
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, et al. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*. 1997;6(11):1771–1780. doi: 10.1093/hmg/6.11.1771.
- Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. The GAA triplet repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet*. 1998;62(1):111–121. doi: 10.1086/301680.
- Rouault TA, Tong WH. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):345–351. doi: 10.1038/nrm1620.
- Li K, Besse EK, Ha D, et al. Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*. 2008;17(15):2265–2273. doi: 10.1093/hmg/ddn127.
- Hughes JT, Brownell B, Hewer RL. The peripheral sensory pathway Friedreich's ataxia. An examination by light and electron microscopy of the posterior nerve roots, posterior root ganglia, and peripheral sensory nerves in cases of Friedreich's ataxia. *Brain*. 1968;91(4):803–818. doi: 10.1093/brain/91.4.803.
- Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K. Pathological study of corticospinal-tract degeneration in Friedreich's ataxia. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1992;18(1):81–86. doi: 10.1111/j.1365-2990.1992.tb00766.x.
- Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, et al. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*. 1996;59(3):554–560.
- Santoro L, De Michele G, Perretti A, et al. Relation between trinucleotide GAA repeat length and sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66(1):93–96. doi: 10.1136/jnnp.66.1.93.
- Иллариошкин С.Н., Ершова М.В., Ключников С.А., и др. Спастическая атаксия как редкий клинический вариант болезни Фридрейха // *Неврологический журнал*. — 2000. — Т.5. — №1 — С. 40–43. [Illarioshkin SN, Ershova MV, Klyushnikov SA, et al. Spastic ataxia as a rare clinical variant of Friedreich's disease. *Journal of neurology*. 2000;5(1):40–43 (In Russ).]
- Иллариошкин С.Н., Ершова М.В., Багыева Г.Х., и др. Атипичные фенотипы болезни Фридрейха: ДНК-анализ и клинико-генетические сопоставления // *Медицинская генетика*. — 2004. — Т.3. — №1 — С. 36–42. [Illarioshkin SN, Ershova MV, Bagyeva GK, et al. Atypical phenotypes of Friedreich's disease: DNA analysis and clinical-genetic correlations. *Medical genetics*. 2004;3(1):36–42. (In Russ).]
- Ozanne SE, Constancia M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(7):539–546. doi: 10.1038/ncpendmet0531.
- Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet*. 2010;11(4):285–296. doi: 10.1038/nrg2752.
- Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*. 2009;8(11):1056–1072. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70262-5.
- Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975;187(4173):226–232. doi: 10.1126/science.1111098.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915–926. doi: 10.1016/0092-8674(92)90611-f.
- Dhasarathy A, Wade PA. The MBD protein family—reading an epigenetic mark? *Mutat Res*. 2008;647(1–2):39–43. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.007.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, et al. Genomewide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*. 2007;3(10):2023–2036. doi: 10.1371/journal.pgen.0030181.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):597–610. doi: 10.1038/nrg1655.
- Herman D, Janssen K, Burnett R, et al. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*. 2006;2(10):551–558. doi: 10.1038/nchembio815.
- Libri V, Yandim C, Athanasopoulos S, et al. Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study. *Lancet*. 2014;384(9942):504–513. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60382-2.

27. Evans-Galea MV, Carrodus N, Rowley SM, et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol.* 2012;71(4):487–497. doi: 10.1002/ana.22671.
28. De Jaco A, Camp S, Taylor P. Influence of the 5' intron in the control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Chem Biol Interact.* 2005;157–158:372–373. doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.058.
29. Lee JG, Dahi S, Mahimkar R, et al. Intronic regulation of matrix metalloproteinase-2 revealed by in vivo transcriptional analysis in ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(45):16345–16350. doi: 10.1073/pnas.0508085102.
30. Greene E, Mahishi L, Entezam L, et al. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research.* 2007;35(10):3383–3390. doi: 10.1093/nar/gkm271.
31. Baralle M, Pastor T, Bussani E, et al. Influence of Friedreich ataxia GAA noncoding repeat expansions on pre-mRNA processing. *Am J Hum Genet.* 2008;83(1):77–88. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.06.018.
32. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet.* 2008;17(5):735–746. doi: 10.1093/hmg/ddm34.
33. Evans-Galea MV, Lockhart PJ, Galea CA, et al. Beyond loss of frataxin: the complex molecular pathology of Friedreich ataxia. *Discov Med.* 2014;17(91):25–35.
34. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Arch Neurol.* 2008;65(10):1296–1303. doi: 10.1001/archneur.65.10.1296.
35. Yandim C, Natisvili T, Festenstein R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *J Neurochem.* 2013;126(Suppl 1):21–42. doi: 10.1111/jnc.12254.
36. Li K, Singh A, Crooks DR, et al. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS One.* 2010;5(8):e12286. doi: 10.1371/journal.pone.0012286.
37. Serrano M. Epigenetic cerebellar disease. *Hand Clin Neurol.* 2018;155:227–244. doi: 10.1016/B978-0-444-64189-2.00015-9.
38. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, et al. DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J Med Genet.* 2008;45(12):808–812. doi: 10.1136/jmg.2008.058594.
39. Illarioshkin SN, Bagieva GK, Klyushnikov SA, et al. Different phenotypes of Friedreich's ataxia within one "pseudo-dominant" genealogy: relationships between trinucleotide (GAA) repeat lengths and clinical features. *Eur J Neurol.* 2000;7:535–540. doi: 10.1046/j.1468-1331.2000.t01-1-00113.x.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Федотова Екатерина Юрьевна**, к.м.н., [Ekaterina Yu. Fedotova, MD, PhD]

Адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80, тел.: +7 (495) 490-21-03, e-mail: ekfedotova@gmail.com, SPIN-код: 3466-2212, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8070-7644>

Абрамычева Наталья Юрьевна, к.б.н., [Nataliya Yu. Abramycheva, PhD]; e-mail: nataabr@rambler.ru,

SPIN-код: 6888-6008, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9419-1159>

Нужный Евгений Петрович [Evgenii P. Nuzhnyi, MD], e-mail: enuzhny@mail.ru, SPIN-код: 5571-3386,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3179-7668>

Николаева Наталья Сергеевна [Natalia S. Nikolaeva], e-mail: nikolaeva.n0211@yandex.ru, SPIN-код: 1604-1680,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9912>

Клюшников Сергей Анатольевич, к.м.н., [Sergey A. Klyushnikov, MD], e-mail: sergeklyush@gmail.com,

SPIN-код: 1769-2262, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8752-7045>

Ершова Маргарита Владимировна, к.м.н., [Margarita V. Ershova, MD, PhD], e-mail: mvedoc@mail.ru,

SPIN-код: 9922-0883, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8188-5140>

Танас Александр Сергеевич, к.б.н., [Alexander S. Tanas, PhD], e-mail: tanas80@gmail.com, SPIN-код: 2947-7067,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2177-6743>

Иллариошкин Сергей Николаевич, д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, [Sergey N. Illarioshkin, MD, PhD,

professor], e-mail: snillario@gmail.com, SPIN-код: 8646-9426, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2704-6282>