

УДК 577.29

<https://doi.org/10.17816/MAJ623679>

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ *DNMT1* КАК МАРКЕР НАРУШЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Е.А. Цымбалова¹, Е.А. Чернявская¹, Д.Е. Рыжкова¹, Г.Н. Бисага², И.Н. Абдурасулова¹, В.И. Людыно¹¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;² Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Цымбалова Е.А., Чернявская Е.А., Рыжкова Д.Е., Бисага Г.Н., Абдурасулова И.Н., Людыно В.И. Изменение экспрессии *DNMT1* как маркер нарушения эпигенетической регуляции у пациентов с рассеянным склерозом // Медицинский академический журнал. 2023. Т. 23. № 3. С. 41–53. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ623679>

Рукопись получена: 18.10.2023

Рукопись одобрена: 21.11.2023

Опубликована: 30.11.2023

Обоснование. Рассеянный склероз — хроническое нейродегенеративное аутоиммунное заболевание, характеризующееся наличием очагов воспаления и демиелинизации в центральной нервной системе. Запуск патологических процессов при рассеянном склерозе обусловлен сложным взаимодействием генетических факторов, неблагоприятных факторов среды и эпигенетическими влияниями. Прогрессирующая неврологическая симптоматика вследствие нарушений аксональной проводимости, гибели аксонов и нейродеструкции приводит к значительному ухудшению качества жизни пациентов и инвалидизации. Поиск новых маркеров для совершенствования методов диагностики и терапии, в том числе с учетом генетического профиля и эпигенетических взаимодействий, является актуальной задачей.

Цель — исследование изменений экспрессии мРНК *DNMT1* у пациентов с рассеянным склерозом с разной продолжительностью заболевания, анализ метилирования промоторной области гена *DNMT1* и сопоставление изменений в уровне экспрессии *DNMT1* с содержанием гомоцистеина в крови и наличием полиморфизмов генов, кодирующих синтез ключевых ферментов фолатного цикла.

Материалы и методы. Уровень экспрессии мРНК *DNMT1* в периферических мононуклеарных клетках крови оценивали методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией, для анализа метилирования промотора *DNMT1* использовали метод флуоресцентной полимеразной реакции с метилчувствительным анализом кривых плавления с высоким разрешением. Содержание гомоцистеина в крови определяли методом иммунохемилюминесцентного анализа. Для генотипирования по полиморфизмам генов фолатного цикла использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, для дискриминации аллелей применяли флуоресцентные зонды с LNA-модификациями.

Результаты. Показано, что у пациентов с рассеянным склерозом, в том числе в дебюте заболевания, уровень экспрессии мРНК *DNMT1* достоверно ниже, чем у добровольцев контрольной группы. Связи между снижением экспрессии *DNMT1* и уровнем метилирования промотора обнаружено не было. Выявленная сильная положительная взаимосвязь между уровнем экспрессии мРНК *DNMT1* и содержанием гомоцистеина у пациентов с рассеянным склерозом и наличием сочетанного влияния генотипов по полиморфизмам A2756G гена *MTR* и C677T гена *MTHFR* на экспрессию *DNMT1* позволяет предполагать, что генетически обусловленные особенности метаболизма фолатов могут способствовать нарушению эпигенетической регуляции при рассеянном склерозе.

Заключение. Полученные результаты указывают на перспективность исследований, направленных на выявление факторов, обуславливающих эпигенетические изменения при рассеянном склерозе. Изучение механизмов, определяющих вклад полиморфных вариантов генов фолатного цикла в патогенез рассеянного склероза, — один из возможных путей совершенствования диагностических и терапевтических подходов.

Ключевые слова: рассеянный склероз; эпигенетика; метилирование; *DNMT1*; полиморфизм генов; фолатный цикл.

CHANGES IN *DNMT1* EXPRESSION AS A MARKER OF EPIGENETIC REGULATION DISTURBANCES IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

Evgenia A. Tsymbalova¹, Ekaterina A. Chernyavskaya¹, Daria E. Ryzhkova¹, Gennady N. Bisaga², Irina N. Abdurasulova¹, Viktoria I. Liudyno¹¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;² Almazov National Medical Research Center, Saint Petersburg, Russia

For citation: Tsymbalova EA, Chernyavskaya EA, Ryzhkova DE, Bisaga GN, Abdurasulova IN, Liudyno VI. Changes in *DNMT1* expression as a marker of epigenetic regulation disturbances in multiple sclerosis patients. *Medical Academic Journal*. 2023;23(3):41–53. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ623679>

Received: 18.10.2023

Accepted: 21.11.2023

Published: 30.11.2023

Список сокращений

DNMTs — ДНК-метилтрансферазы; РС — рассеянный склероз; MTHFR — метилентетрагидрофолатредуктаза; MTR — метионин синтаза; MTRR — метионин синтаза-редуктаза; ПЦР — полимеразная цепная реакция; MS-HRM (Methyl-sensitive High-Resolution Melting) — метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением; EDSS (Expanded Disability Status Scale) — расширенная шкала оценки степени инвалидизации.

BACKGROUND: Multiple sclerosis is a chronic neurodegenerative autoimmune disease characterized by the presence of foci of inflammation and demyelination in the central nervous system. The initiation of pathological processes in multiple sclerosis is caused by a complex interaction of genetic factors, unfavorable environmental factors and epigenetic influences. Progressive neurological symptoms caused by axonal conduction disorders, axonal death and neurodestruction lead to a significant decreased patients' quality of life and disability. The search for a new markers to improve diagnostic and therapeutic methods, including taking into account the genetic background and epigenetic interactions, is an urgent task.

AIM: The work was aimed to study the changes in *DNMT1* mRNA expression in multiple sclerosis patients with different disease duration, to analyze methylation of *DNMT1* promoter, and compare the changes in the level of *DNMT1* expression with the homocysteine content in the blood, and the presence of polymorphic variants in genes coding the key folate cycle enzymes.

MATERIALS AND METHODS: The level of *DNMT1* mRNA expression in peripheral mononuclear blood cells was assessed by reversed transcription followed by polymerase chain reaction. Fluorescent polymerase chain reaction followed by methyl-sensitive analysis of high-resolution melting curves was used to analyze methylation of the *DNMT1* promoter. The content of homocysteine in the blood was determined by chemiluminescence immunoassay. The real-time polymerase chain reaction was used for genotyping by polymorphism of folate cycle genes; the fluorescent probes with the LNA modifications were used to discriminate alleles.

RESULTS: It has been shown that in multiple sclerosis patients, including those at the onset of the disease, the level of *DNMT1* mRNA expression is significantly lower than in the control group. No relationship was found between the decrease in *DNMT1* expression and the level of promoter methylation. Strong positive relationship between the level of *DNMT1* mRNA expression and homocysteine content in patients with multiple sclerosis and the combined effects of the genotypes of *MTR* A2756G and *MTHFR* C677T polymorphism on the expression of *DNMT1* have been shown. These findings suggest that genetically determined features of folate metabolism may contribute to the disruption of epigenetic regulation in multiple sclerosis.

CONCLUSIONS: The obtained results indicate the promise of research aimed to identifying the factors causing epigenetic changes in multiple sclerosis. Studying the mechanisms of the folate cycle genes polymorphic variants contribution to the pathogenesis of multiple sclerosis could be one of the possible ways to improve diagnostic and therapeutic approaches.

Keywords: multiple sclerosis; epigenetics; methylation; *DNMT1*; gene polymorphism; folate cycle.

Обоснование

Нарушение эпигенетической регуляции является важным звеном патогенеза мультифакториальных заболеваний, опосредуя взаимодействие факторов внешней среды и факторов генетической предрасположенности [1, 2]. Метилирование ДНК — процесс, осуществляемый посредством передачи метильной группы от универсального метильного донора S-аденозинметионина на цитозин, входящий в состав CpG-динуклеотидов, — первый из открытых и наиболее изученный механизм эпигенетического контроля [3]. Эта реакция осуществляется ферментами семейства ДНК-метилтрансфераз (DNMTs) [4, 5]. Продукт гена *DNMT1* обеспечивает стабильность паттернов метилирования в процессе клеточного деления, обладая сродством преимущественно к полуметилированной ДНК. Метилтрансферазы DNMT3a и DNMT3b осуществляют метилирование *de novo* и экспрессируются в основном в недифференцированных эмбриональных клетках [6].

Изменения активности метилтрансфераз обнаруживаются при различных патологических процессах — при опухолевом росте, нейродегенеративных заболеваниях, аутоиммунной патологии. Для многих типов злокачественных новообразований показана связь между подавлением продукции генов — онкосупрессоров и гиперэкспрессией DNMTs на транскрипционном и трансляционном уровнях [7–9]. Изменение

активности ДНК-метилтрансфераз, а также изменения уровня общегеномного метилирования в сочетании с активацией/инактивацией специфических генов, участвующих в патогенезе, показаны и для ряда заболеваний ЦНС. В частности, снижение экспрессии *DNMT1* у пациентов с болезнью Альцгеймера коррелирует с повышением продукции пресенилина, при болезни Паркинсона выявлена связь дисрегуляции экспрессии α -синуклеина, транслокации *DNMT1* и гиперпродукции генов, вовлеченных в ее патогенез [10–12]. Продемонстрирована связь между формированием патологических белковых агрегатов, сниженной экспрессией гена *FUS* и гиперэкспрессией *DNMT1* у пациентов с одним из вариантов семейной формы бокового амиотрофического склероза [13].

Рассеянный склероз (РС) — прогрессирующее демиелинизирующее заболевание аутоиммунной природы, для которого характерно хроническое течение с нарастанием неврологического дефицита [14]. Согласно опубликованным данным, при РС обнаруживаются значительные изменения профилей метилирования ДНК, в том числе гипометилирование промоторов генов, связанных с контролем миелинизации, дифференцировки Т-лимфоцитов, воспалительных реакций (PAD2, FOXP3, IL-17A) [15–18]. Поскольку у больных рассеянным склерозом наблюдается значительное снижение экспрессии мРНК *DNMT1* [19], логично предположить, что именно подавление

активности *DNMT1* способствует формированию aberrантных паттернов метилирования и дисрегуляции экспрессии генов. В этой связи вызывает интерес сопоставление уровней экспрессии гена *DNMT1* у пациентов в стадии дебюта РС и при продолжительном течении заболевания. Представлялось целесообразным также определить, коррелирует ли подавление экспрессии *DNMT1* с изменением степени метилирования промоторной области гена, или же это снижение обусловлено другими механизмами. Известно, в частности, что регуляция процессов метилирования тесно связана с функционированием фолатного цикла и активностью ферментов, контролирующих обмен гомоцистеина и метионина и образование метильных доноров [20, 21]. Избыточному накоплению гомоцистеина вследствие его замедленного превращения в метионин сопутствует снижение продукции S-аденозинметионина, возникновение дефицита метильных групп и снижение соотношения S-аденозинметионин/S-аденозингомоцистеин [22]. S-Аденозингомоцистеин, образующийся как побочный продукт в реакции метилирования, является конкурентным ингибитором DNMTs [23]. В свою очередь, на особенности обмена фолатов и, соответственно, на метаболизм гомоцистеина могут оказывать влияние как недостаточное поступление микронутриентов, в особенности витаминов группы В, являющихся коферментами цикла фолиевой кислоты, так и генетически обусловленное снижение активности ключевых генов фолатного цикла — метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), метионин синтазы (*MTR*) и метионин синтазы-редуктазы (*MTRR*).

Целью представленного исследования была оценка уровня экспрессии мРНК *DNMT1*, степени метилирования промотора *DNMT1* у пациентов с РС с разной продолжительностью заболевания и выявление взаимосвязи между активностью гена *DNMT1* и наличием полиморфизмов генов фолатного цикла.

Материалы и методы

Для выполнения исследования была создана выборка из 98 пациентов с подтвержденным согласно критериям Макдональда [24] диагнозом РС, а также сформирована контрольная группа, в которую вошли 32 здоровых добровольца без неврологической патологии (табл. 1). Пациенты, включенные в исследование, находились на амбулаторном наблюдении в клинике ФГБНУ «ИЭМ» и ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». Образцы венозной крови для проведения молекулярно-биологических исследований получали от пациентов и здоровых добровольцев после подписания добровольного информированного согласия.

Генетическое тестирование для выявления полиморфизмов генов фолатного цикла — *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* было выполнено для всех участников. Исследование экспрессии *DNMT1* выполнено на 30 образцах, отобранных из общей выборки.

Генотипирование по полиморфизмам С677Т и А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR* и А66G гена *MTRR*

Для проведения молекулярно-биологических и генетических исследований использовали образцы венозной крови, взятой в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Тотальную ядерную ДНК для генотипирования выделяли из цельной крови по стандартной методике с применением набора реагентов ДНК-сорб Б (ООО «Некст-Био», Санкт-Петербург). Генотипы по полиморфизмам С677Т и А1298С гена *MTHFR* (SNP rs1801133 и rs1801131), А2756G гена *MTR* (SNP rs1805087) и А66G гена *MTRR* (SNP rs1801394) определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и аллель-специфических LNA-модифицированных флуоресцентных зондов. Использовали праймеры и зонды, синтезированные ООО «ДНК-Синтез».

Таблица 1 / Table 1

Демографические характеристики контрольной группы и пациентов с рассеянным склерозом.

Данные представлены в виде: медиана [1-й квартиль; 3-й квартиль]

Demographic characteristics of controls subjects and multiple sclerosis patients.

Data are presented as: median [1rd quartile; 3rd quartile]

Показатель	Контрольная группа, n = 32	Пациенты с рассеянным склерозом, n = 99
Пол (Ж : М)	24 : 8	71 : 28
Возраст, лет	37,0 [31,5; 47,0]	40,0 [32,0; 48,0]
Возраст дебюта рассеянного склероза, лет	—	31,0 [24,0; 37,0]
Балл по шкале EDSS	—	3,8 [2,0; 5,1]

Примечание: EDSS (Expanded Disability Status Scale) — расширенная шкала оценки степени инвалидизации.

Анализ уровня экспрессии и оценка метилирования промотора гена *DNMT1*

Для анализа экспрессии *DNMT1* была сформирована группа из числа общей выборки, состоящая из 10 пациентов с диагнозом РС и длительностью заболевания более 1 года, 10 пациентов в стадии дебюта РС (длительность заболевания не более полугода) и 10 здоровых добровольцев соответствующего возраста.

Оценку уровней экспрессии мРНК и степени метилирования промоторной области гена *DNMT1* проводили с использованием мононуклеарных клеток периферической крови, которые выделяли методом градиентного центрифугирования с использованием набора реагентов Проба-Фиколл (ООО «ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя.

Экстракция мРНК и оценка уровня экспрессии гена *DNMT1*

Тотальную мРНК выделяли из периферических мононуклеарных клеток крови с использованием реагента Extract-RNA (ЗАО «Евроген», Россия). Уровень экспрессии мРНК гена *DNMT1* оценивали методом обратной транскрипции с последующей ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов Taqman и регистрацией результатов в режиме реального времени. Относительный уровень экспрессии *DNMT1* рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$ относительно уровня экспрессии гена β -глюкуронидазы (Glucuronidase beta, GUSB), стабильность уровня экспрессии которого и валидность использования в качестве внутреннего контроля при исследовании экспрессии генов в периферических мононуклеарных клетках крови человека показана ранее [25].

Экстракция геномной ДНК и определение степени метилирования промоторной области гена *DNMT1*

Для экстракции геномной ДНК из образцов периферических мононуклеарных клеток использовали комплект реагентов Проба ГС-генетика (ООО «ДНК-Технология») в соответствии с инструкцией производителя. Количественную и качественную оценку получаемых образцов геномной ДНК осуществляли с помощью спектрофотометрического измерения концентрации на длине волны 260 нм на приборе NanoDrop LITE (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}) использовали для оценки чистоты препарата.

Полученные образцы ДНК подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора реагентов BisQuick (ЗАО «Евроген», Москва) для превращения неметилированных цитозинов

в урацил. Из каждого образца на бисульфитную конверсию было взято не менее 100 нг ДНК. Все образцы (включая образцы метилированной и неметилированной контрольной ДНК, алгоритм изготовления которых описан ниже) обрабатывали одновременно, чтобы избежать возможных эффектов партии.

Эффективность бисульфитной конверсии оценивали с использованием искусственного образца полностью неметилированной ДНК человека. В качестве образца полностью неметилированной ДНК был использован амплифицированный ПЦР-продукт, включающий исследуемый участок в промоторной области гена *DNMT1*, протяженностью 638 пн. Для амплификации использовали праймеры: прямой (638_F): 5'-GGGAATCCACGGTCCATTT-3', и обратный (638_R): 5'-GGGCTTCTCGTCTTTAT-3'.

Оценка метилирования промоторной области гена *DNMT1*

Для определения степени метилирования промотора *DNMT1* использовали метод флуоресцентной ПЦР с последующим метил-чувствительным анализом кривых плавления с высоким разрешением (Methyl-sensitive High-Resolution Melting, MS-HRM). Технология анализа кривых плавления с высоким разрешением, первоначально разработанная для генотипирования, впоследствии была адаптирована для оценки сайт-специфического метилирования. Данные, получаемые при количественной оценке метилирования с использованием MS-HRM анализа, сопоставимы с результатами пиросеквенирования, что доказывает валидность метода [26].

Для выбора участков промоторной области гена *DNMT1* с высоким содержанием CpG-динуклеотидов и подбора специфических праймеров использовали ресурс https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/. При подборе праймеров для оценки степени метилирования с использованием метода HRM-анализа учитывали рекомендации, позволяющие избежать ошибок, связанных с преимущественной амплификацией неметилированной и/или не полностью конвертированной ДНК [27, 28]. Также учитывали изменения, происходящие при бисульфитной конверсии в соответствии с критериями, описанными в руководстве, доступном по ссылке: <https://zymoresearch.eu/pages/bisulfite-beginner-guide>. Были подобраны два варианта независимых от метилирования праймеров, а также использованы праймеры, предложенные F. Corpedè и соавт. [29] для анализа уровня метилирования промоторной области гена *DNMT1*. Последовательности праймеров приведены в табл. 2, положение праймеров на последовательности схематически изображено на рис. 1.

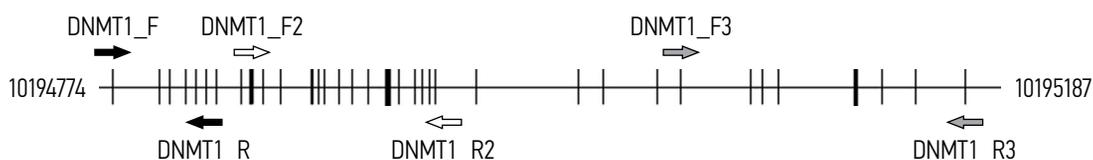


Рис. 1. Схематическое изображение промоторной области *DNMT1* и положение праймеров, использованных для амплификации участков промотора. Поперечные линии показывают положение CpG-динуклеотидов (двойные линии соответствуют участкам CGCG). Цифрами обозначены позиции на хромосоме для размещенной в банке данных NCBI последовательности NC_000019.10

Fig. 1. Schematic representation of the *DNMT1* promoter region and the positions of the primers used to amplify the promoter region. Cross lines indicate the position of CpG dinucleotides (double lines correspond to CGCG regions). The numbers indicate positions on the chromosome for the sequence NC_000019.10 located in the NCBI

Амплификацию участков промоторной области *DNMT1* проводили с использованием платформы Roche LightCycler 96 (Roche AppliedScience, Laval, PQ, Канада). Для ПЦР и последующего анализа кривых плавления использовали ранее описанный протокол [30]. Параметры протокола для всех постановок были следующие: 1 цикл 95 °C в течение 12 мин, 60 циклов 95 °C в течение 30 с, 63 °C в течение 30 с и 72 °C в течение 45 с; с последующим шагом HRM 95 °C в течение 10 с и 50 °C в течение 1 мин, 65 °C в течение 15 с и непрерывным измерением до 95 °C с одним измерением на 0,2 °C. ПЦР проводили в конечном объеме 50 мкл с использованием hot-start TaqM полимеразы (ООО «АлкорБио»), 20 пмоль каждого праймера и 10 нг модифицированной бисульфитом матрицы ДНК. Все реакции проводили в трехкратной повторности.

В качестве калибраторов использовали образцы с заданным процентом метилирования, изготовленные из 100 % метилированной и неметилированной контрольной ДНК человека в соответствующих соотношениях. Полностью метилированную ДНК получали в реакции с использованием фермента CpG-метилазы M.SSI (ООО «СибЭнзим») из геномной ДНК клеточной

линии человека Raji (ЗАО «Евроген»). В качестве образца полностью неметилированной ДНК использовали амплифицированный ПЦР-продукт, соответствующий исследуемому участку промотора *DNMT1*.

Контрольные образцы ДНК подвергали бисульфитной конверсии (одновременно с исследуемыми образцами) и проводили процедуру нормализации эффективной концентрации ДНК с помощью предварительной ПЦР таким образом, чтобы разница пороговых циклов *Ct* для метилированной и неметилированной ДНК не превышала двух циклов. После этой процедуры готовили стандартные образцы (калибраторы) с заданным процентом метилирования — от 0 до 100 %. Калибраторы включали в каждую постановку и использовали полученные для них значения для построения стандартных кривых и определения уровня метилирования для каждого из исследуемых образцов.

Постобработка данных MS-HRM

Выбор метода постобработки данных MS-HRM осуществляли на основании анализа литературных источников. Метод расчета, основанный на вычислении величины AUC (Area Under

Таблица 2 / Table 2

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для конвертированной бисульфитом ДНК, использованные для анализа уровня метилирования промоторной области гена *DNMT1* методом MS-HRM
The sequences of oligonucleotide primers for bisulfite-converted DNA used to analyze the level of methylation of the *DNMT1* promoter region using the MS-HRM method

Последовательность 5'–3'	Длина фрагмента	CpG сайты (n)	Регион относительно TSS	Позиции на хромосоме
DNMT1_F GCGTTTTGTTTGTTTTTT	106	9	47–151	10194773– 10194878 NC_000019.10
DNMT1_R CCCAATACCCACACTAA				
DNMT1_F2 ACGGTTAGTGTGGGTATT	155	21	–87–67	10194857– 10195012 NC_000019.10
DNMT1_R2 CCAAATAAAATAATAAA				
DNMT1_F3 GGTATCGTGTTTATTTTTTAGTAA	114	9	–263÷–149	10195084– 10195187 NC_000019.10
DNMT1_R3 ACGAAACCAACCATACCCAA				

Curve — площадь под кривой), являющейся производной кривой HRM, и на сравнении показателей AUC для калибраторов с известным уровнем метилирования и уровнем метилирования исследуемых образцов, был выбран как соответствующий задачам исследования [31].

Нормализацию кривых плавления проводили с использованием программного обеспечения Roche LightCycler 96. Графики различий (Difference Plot) строили для каждой нормализованной кривой плавления относительно кривой плавления, выбранной в качестве базовой линии (Baseline sample) и соответствующей графику для 100 % метилированного контрольного образца. При выборе более одного образца для базовой линии данные этих кривых были усреднены, и полученные показатели использовали в качестве опорных значений для вычитания. После нормализации на графике различий каждая кривая отображалась в том виде, в котором она появляется при вычитании значения AUC для базовой линии.

Полученные графики различий для калибраторов и исследуемых образцов импортировали в Excel (Microsoft Office 2021) в виде текстового файла, содержащего данные измерений флуоресцентного сигнала от каждой точки по градиенту температуры. Дальнейший расчет проводили с использованием протокола, предложенного в работе [31] и доступного по ссылке <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n2bvj6yx1k5/v1>.

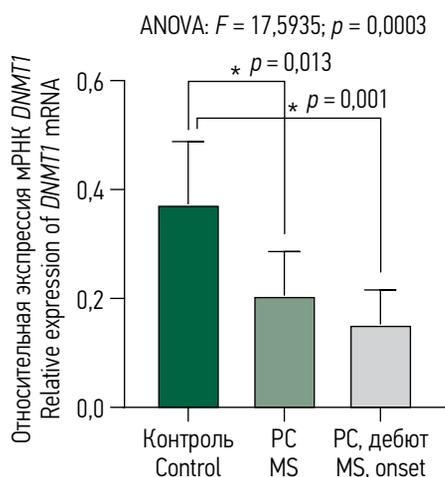


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии мРНК *DNMT1* в периферических мононуклеарных клетках крови у пациентов с рассеянным склерозом (РС). Данные представлены в виде средних и ошибки среднего; * достоверные различия между группами по результатам апостериорного анализа, $p < 0,05$ (критерий Тьюки для неравных выборок)

Fig. 2. The changes in the DNMT1 mRNA expression level in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis (MS). Data are presented as means and the error of the mean; * significant differences between groups according to the results of post-hoc analysis, $p < 0.05$ (Tukey's test for unequal samples)

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Частоты аллелей и генотипов по исследуемым полиморфным вариантам определяли прямым подсчетом и проводили сравнение между группами с использованием метода χ^2 и точного критерия Фишера (для групп численностью менее 5). Коэффициент корреляции Пирсона рассчитывали для анализа взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК *DNMT1* и содержанием гомоцистеина в крови. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) применяли для обнаружения различий в уровне мРНК *DNMT1* между исследованными группами и определения влияния генотипов по исследованным полиморфизмам на экспрессию *DNMT1*. Для выявления сочетанного влияния нескольких независимых факторов применяли многофакторный дисперсионный анализ. Для оценки адекватности применения статистических критериев данные проверяли на соответствие закону нормального распределения с использованием критерия Колмогорова – Смирнова.

Результаты

Анализ уровня экспрессии мРНК *DNMT1* выявил достоверные различия между экспериментальными группами (ANOVA, $F = 17,5935$, $p = 0,0003$) (рис. 2). По данным апостериорного анализа достоверное снижение уровня мРНК *DNMT1* по сравнению с группой контроля было выявлено как у пациентов в дебюте РС ($p = 0,001$), так и у пациентов с продолжительным течением заболевания ($p = 0,013$).

Полученные данные согласуются с данными ранее опубликованного исследования, в котором продемонстрировано 2-кратное снижение уровня экспрессии мРНК *DNMT1* в периферических мононуклеарных клетках крови пациентов с РС [19]. Кроме того, в проведенном нами исследовании выявлено, что значимое подавление экспрессии *DNMT1* отмечается уже на стадии дебюта заболевания.

Оценка степени метилирования промоторной области гена *DNMT1* не выявила достоверных различий между образцами, полученными от здоровых участников исследования (контроль), и образцами от пациентов с РС. При количественном расчете процента метилирования для образцов из группы контроля были получены значения от 0 до 2 %, для образцов пациентов с РС — от 0 до 3,5 %. Однако наблюдалась тенденция к увеличению процента метилирования у пациентов с РС по сравнению со здоровыми участниками (медиана 1,94 против 1,20). На рис. 3 изображены кривые плавления для калибровочных образцов в диапазоне

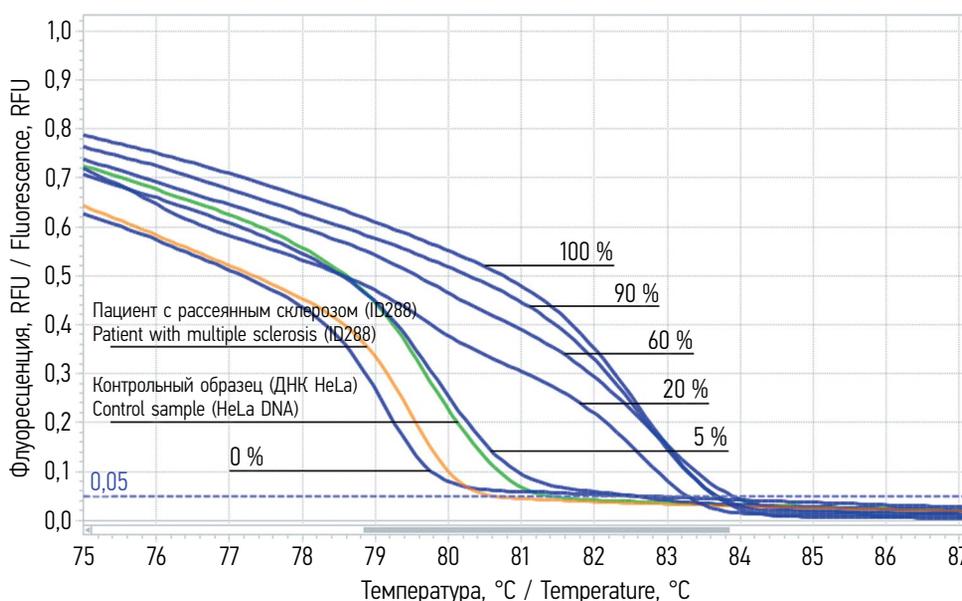


Рис. 3. Нормализованные кривые плавления для амплифицированных фрагментов промотора *DNMT1*. Синие линии соответствуют кривым плавления для калибровочных образцов с известным процентом метилирования; зеленая линия — кривая плавления для образца, полученного из опухолевой клеточной линии HeLa (рассчитанный процент метилирования 5,5 %); оранжевая линия — кривая плавления образца, полученного из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с рассеянным склерозом (рассчитанный процент метилирования 1,15 %)

Fig. 3. Normalized melting curves for amplified *DNMT1* promoter fragments. Blue lines correspond to melting curves for calibration samples with known percentage of methylation; green line — melting curve for a sample obtained from the HeLa tumor cell line (calculated percentage of methylation 5.5%); orange line — sample obtained from peripheral blood mononuclear cells of a patient with multiple sclerosis (calculated percentage of methylation 1.15%)

от 0 до 100 %, образца из клеток опухолевой линии HeLa с метилированием около 5 % (использованного в качестве стандарта с неизвестным процентом метилирования) и одного из исследуемых образцов.

При проведении корреляционного анализа выявлено наличие достоверной сильной положительной взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК *DNMT1* и содержанием гомоцистеина в сыворотке крови у пациентов с длительностью заболевания более 1 года (табл. 3). У пациентов в стадии дебюта РС и у здоровых добровольцев контрольной группы корреляции между этими показателями обнаружено не было. В группе пациентов с длительностью заболевания более 1 года продолжительность заболевания соста-

вила от 4 до 15 лет (медиана и межквартильный размах 9 [7; 12]). Необходимо отметить, что корреляции уровня экспрессии мРНК *DNMT1* с длительностью заболевания у пациентов этой группы не зафиксировано ($r = -0,034$; $p = 0,931$). Обнаруженные закономерности могут отражать взаимосвязь нарушений регуляции процессов метилирования и изменений в функционировании метаболизма фолиевой кислоты и цикла метионин — гомоцистеин при развитии заболевания.

Для выявления возможного вклада полиморфных вариантов генов фолатного цикла в механизмы эпигенетических нарушений при РС был проведен анализ влияния генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*

Таблица 3 / Table 3

Данные корреляционного анализа для оценки взаимосвязи между уровнем относительной экспрессии мРНК *DNMT1* и содержанием гомоцистеина в крови

The data of correlation analysis to assess the relationship between the level of relative expression of *DNMT1* mRNA and the content of homocysteine in the blood

Группа	Гомоцистеин / мРНК <i>DNMT1</i>
Контрольная группа ($n = 10$)	$r = 0,294$; $p = 0,442$
Рассеянный склероз, дебют ($n = 10$)	$r = 0,388$; $p = 0,268$
Рассеянный склероз ($n = 10$)	$r = 0,733$; $p = 0,025$

Примечание: r — коэффициент корреляции Пирсона; p — значение для 95 % уровня значимости.

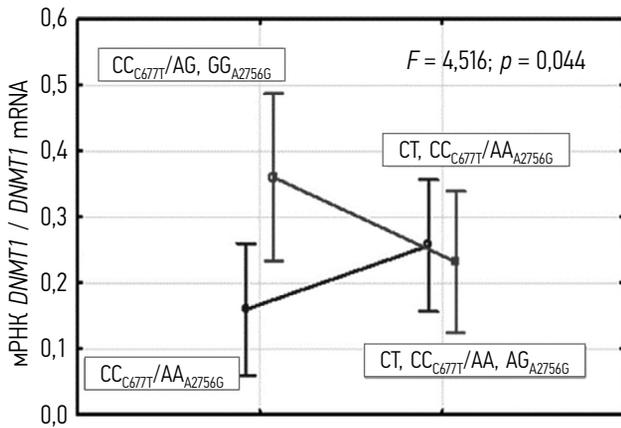


Рис. 4. Сочетанное влияние генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* на уровень экспрессии *DNMT1* у участников контрольной группы и пациентов с рассеянным склерозом

Fig. 4. The combined effect of genotypes for polymorphisms C677T of the *MTHFR* gene and A2756G of the *MTR* gene on the level of *DNMT1* expression in control group subjects and patients with multiple sclerosis

на уровень экспрессии *DNMT1*. Ни для одного из 4 исследованных полиморфных вариантов (C677T, A1298C, A2756G, A66G) не было установлено изолированного влияния генотипа на экспрессию *DNMT1*. Однако было обнаружено сочетанное влияние генотипов по полиморфизмам A2756G гена *MTR* и C677T гена *MTHFR* на уровень экспрессии мРНК *DNMT1* (ANOVA, $F = 4,516$; $p = 0,044$) (рис. 4). Парные сравнения при проведении апостериорного анализа продемонстрировали наличие достоверных различий в уровне экспрессии мРНК *DNMT1* между участниками с генотипами CC_{C677T}/AA_{A2756G} и CC_{C677T}/AG,GG_{A2756G} ($p = 0,017$, критерий Фишера), при этом для сочетания генотипов CC_{C677T}/AA_{A2756G} были характерны наиболее низкие значения экспрессии *DNMT1*.

При сравнении распределения генотипов по этим полиморфным вариантам в контрольной группе и в группе пациентов с РС (независимо от длительности заболевания) также были выявлены достоверные различия ($\chi^2 = 10,73$; $p = 0,014$). Оказалось, что среди пациентов с РС комбинация генотипов CC_{C677T}/AG,GG_{A2756G} встречается достоверно реже, чем в группе контроля (15 и 35 % соответственно). То есть доля сочетаний полиморфных вариантов, при которых отмечались наиболее высокие значения относительной экспрессии *DNMT1*, была снижена у пациентов с РС. Кроме того, в группе пациентов с РС частота аллеля А по полиморфизму A2756G гена *MTR* была достоверно выше, чем в контрольной группе ($\chi^2 = 4,655$; $p = 0,031$).

Выявленные закономерности указывают на то, что риск развития нарушений, связанных со

снижением экспрессии *DNMT1*, может определяться, по крайней мере частично, генотипом по полиморфизмам A2756G гена *MTR* и C677T гена *MTHFR*.

Обсуждение

РС — наиболее распространенное из группы демиелинизирующих заболеваний. При полногеномном анализе у пациентов с РС выявлены значительные отличия профилей метилирования ДНК по сравнению со здоровыми людьми [32]. Эти отличия затрагивают большой спектр генов, участвующих в регуляции активности иммунных клеток, в процессах созревания и дифференцировки олигодендроцитов, в формировании структуры миелина [33–35]. Важным для понимания механизмов эпигенетических нарушений при РС является обнаружение сниженной экспрессии (как на уровне мРНК, так и на уровне белков) *DNMT1* и *TET2*, ферментов, контролирующих метилирование и деметилирование ДНК. Двукратное снижение экспрессии мРНК *DNMT1* в периферических мононуклеарных клетках пациентов с РС продемонстрировано в одном опубликованном исследовании [19]. Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее и кроме того демонстрируют, что изменения экспрессии *DNMT1* характерны в том числе для пациентов в стадии дебюта РС.

Направленное влияние на активность метилтрансфераз с применением деметилирующих препаратов обсуждается в литературе как один из возможных новых подходов к терапии РС и других нейродегенеративных заболеваний [36, 37]. В связи с обнаружением эпигенетических изменений, специфических для патогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний, исследуются и возможности точечного редактирования паттернов метилирования [38]. В качестве альтернативного и, возможно, более безопасного способа может рассматриваться модификация фолатного обмена, непосредственно связанного с регуляцией процессов метилирования. Фолатный цикл и цикл метионин – гомоцистеин — сопряженные метаболические пути, обеспечивающие образование одноуглеродных фрагментов (метильных групп), необходимых для синтеза ДНК, аминокислот, реакций метилирования [21]. Данные экспериментальных исследований демонстрируют, что искусственно создаваемый дефицит нутриентов, прежде всего, витаминов группы В, приводит к накоплению гомоцистеина, снижению скорости его трансформации в метионин, дефициту S-аденозинметионина и изменению активности ДНК-метилтрансфераз [39, 40]. Показано также,

что наличие полиморфизмов в генах, кодирующих метионинсинтазу (*MTR*) и метилентетрагидрофолатредуктазу (*MTHFR*), связано с глобальными, либо с ген-специфическими изменениями метилирования ДНК [41, 42]. Согласно данным выполненного на группе здоровых людей исследования, наличие полиморфизмов в ключевых генах фолатного цикла может влиять на степень метилирования промоторной области гена *DNMT1* в периферических мононуклеарных клетках крови [29]. В частности, в этой работе было показано увеличение уровня метилирования промотора *DNMT1* у носителей минорной аллели G по полиморфизму A2756G гена *MTR* (rs1805087).

В представленном нами исследовании не выявлено изолированного влияния полиморфных вариантов генов фолатного цикла на уровень экспрессии *DNMT1*, однако показано наличие сочетанного действия генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR*. При сочетании генотипов CC_{C677T}/AG, GG_{A2756G} значения экспрессии *DNMT1* были наиболее высокими. Эти данные согласуются с данными литературы, показывающими, что аллель T полиморфизма C677T сопряжена с гипометилированием ДНК, а аллель G варианта A2756G гена *MTR* — с гиперметилированием [41]. Интересно отметить также, что наличие кумулятивного действия полиморфных вариантов генов фолатного цикла ранее уже было показано [43]. Для дальнейших исследований представляет интерес проверка предположения о том, что сочетание генотипов CC_{C677T}/AA_{A2756G}, при котором наблюдается наибольшее снижение уровня экспрессии *DNMT1*, будет сопряжено с большим риском развития и/или прогрессирования заболевания.

Известно, что оба полиморфных варианта — C677T и A2756G — связаны с увеличением риска развития гипергомоцистеинемии. Замена C-T (C677T гена *MTHFR*) приводит к образованию термолабильной формы фермента, к снижению его активности до 70 % у носителей генотипа CT и до 30 % от исходного уровня у носителей генотипа TT, что снижает эффективность образования активной формы фолиевой кислоты — 5-метилтетрагидрофолата — кофермента в реакции реметилирования гомоцистеина [44]. Полиморфизм A2756G нарушает функции и стабильность кодируемой геном *MTR* метионинсинтазы — фермента, катализирующего реметилирование Hcy в метионин [45]. Выявленная в представленном исследовании и обнаруживаемая только у пациентов с РС с большой длительностью заболевания корреляционная взаимосвязь между экспрессией *DNMT1* и содержанием маркера фолатного обмена — гомоцистеина — подтверждает,

что нарушения обмена фолиевой кислоты внесут вклад в дизрегуляцию эпигенетических процессов при РС. Интересно отметить, что ранее на когорте здоровых добровольцев была показана слабая достоверная обратная корреляционная зависимость между уровнем метилирования промотора *DNMT1* и содержанием гомоцистеина [29]. Поскольку нарушения обмена фолатов потенциально обратимы, изучение взаимосвязи эпигенетических перестроек и особенностей метаболизма фолиевой кислоты — очевидно, перспективное направление поиска новых маркеров и новых мишеней для терапии РС.

Заключение

В представленном исследовании впервые показано, что снижение уровня экспрессии *DNMT1* при рассеянном склерозе наблюдается уже на стадии дебюта заболевания. Наличие взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК *DNMT1*, содержанием гомоцистеина в крови и генотипом по полиморфизмам генов *MTHFR* и *MTR* согласуется с гипотезой о том, что изменения метаболизма одноуглеродных фрагментов, обусловленные наличием полиморфных вариантов генов фолатного цикла, вовлечены в патогенез РС и могут способствовать нарушению эпигенетической регуляции.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00312).

Соблюдение этических норм. Выполнение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/23 от 20.09.2023). От всех участников эксперимента, данные которых приведены в публикации, до проведения исследования было получено добровольное информированное согласие.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Е.А. Цымбалова* — проведение экспериментов, обработка результатов; *Е.А. Чернявская* — проведение экспериментов, подбор литературы, обработка результатов; *Д.Е. Рыжкова* — проведение экспериментов, описание, обработка результатов; *Г.Н. Бисага*, *И.Н. Абдурасулова* — обсуждение результатов; *В.И. Людино* — концепция и руководство работой, обработка результатов, написание текста.

Additional information

Funding source. The study was carried out with financial support from the Russian Science Foundation (grant No. 23–25–00312).

Compliance with ethical standards. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Federal State Budgetary Institution “IEM” (protocol No. 3/23 of September 20, 2023). Before the study, voluntary informed consent was obtained from all subjects whose data are presented in the publication.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Authors' contribution. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, and read and approved the final version before publication. The largest contribution is distributed as follows: *E.A. Tsymbalova* — conducting experiments, processing results; *E.A. Chernyavskaya* — conducting experiments, selecting literature, processing results; *D.E. Ryzhkova* — conducting experiments, describing, processing results; *G.N. Bisaga, I.N. Abdurasulova* — discussion of the results; *V.I. Lyudyno* — concept and management of the work, processing of results, writing the text.

Список литературы

- Liu L., Li Y., Tollefsbol T.O. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2008. Vol. 10, No. 1–2. P. 25–36.
- Pogribny I.P., Beland F.A. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. Vol. 66, No. 14. P. 2249–2261. DOI: 10.1007/s00018-009-0015-5
- Riggs A.D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation // *Cytogenet. Cell Genet.* 1975. Vol. 14, No. 1. P. 9–25. DOI: 10.1159/000130315
- Goll M.G., Bestor T.H. Eukaryotic cytosine methyltransferases // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. Vol. 74. P. 481–514. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
- Mattei A.L., Bailly N., Meissner A. DNA methylation: a historical perspective // *Trends Genet.* 2022. Vol. 38, No. 7. P. 676–707. DOI: 10.1016/j.tig.2022.03.010
- Hervouet E., Peixoto P., Delage-Mourroux R. et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma // *Clin. Epigenetics.* 2018. Vol. 10. P. 17. DOI: 10.1186/s13148-018-0450-y
- Mizuno S., Chijiwa T., Okamura T. et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia // *Blood.* 2001. Vol. 97, No. 5. P. 1172–1179. DOI: 10.1182/blood.v97.5.1172
- Wong K.K., Lawrie C.H., Green T.M. Oncogenic roles and inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in acute myeloid leukaemia // *Biomark. Insights.* 2019. Vol. 14. P. 117721919846454. DOI: 10.1177/117721919846454
- Zhang T.J., Zhang L.C., Xu Z.J., Zhou J.D. Expression and prognosis analysis of *DNMT* family in acute myeloid leukemia // *Aging (Albany NY).* 2020. Vol. 12, No. 14. P. 14677–14690. DOI: 10.18632/aging.103520
- Grossi E., Stoccoro A., Tannorella P. et al. Artificial neural networks link one-carbon metabolism to gene-promoter methylation in Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2016. Vol. 53, No. 4. P. 1517–1522. DOI: 10.3233/JAD-160210
- Mohd Murshid N., Aminullah Lubis F., Makpol S. Epigenetic changes and its intervention in age-related neurodegenerative diseases // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022. Vol. 42, No. 3. P. 577–595. DOI: 10.1007/s10571-020-00979-z
- Younesian S., Yousefi A.M., Momeny M. et al. The DNA methylation in neurological diseases // *Cells.* 2022. Vol. 11, No. 21. P. 3439. DOI: 10.3390/cells11213439
- Hartung T., Rhein M., Kalmbach N. et al. Methylation and expression of mutant *FUS* in motor neurons differentiated from induced pluripotent stem cells from ALS patients // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. P. 774751. DOI: 10.3389/fcell.2021.774751
- Compston A., Coles A. Multiple sclerosis // *Lancet.* 2008. Vol. 372, No. 9648. P. 1502–1517. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
- Calabrese R., Zampieri M., Mechelli R. et al. Methylation-dependent *PAD2* upregulation in multiple sclerosis peripheral blood // *Mult. Scler.* 2012. Vol. 18, No. 3. P. 299–304. DOI: 10.1177/1352458511421055
- Zheleznyakova G.Y., Piket E., Marabita F. et al. Epigenetic research in multiple sclerosis: progress, challenges, and opportunities // *Physiol. Genomics.* 2017. Vol. 49, No. 9. P. 447–461. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00060.2017
- Ruhrmann S., Ewing E., Piket E. et al. Hypermethylation of *MIR21* in *CD4+* T cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis associates with lower *miRNA-21* levels and concomitant up-regulation of its target genes // *Mult. Scler.* 2018. Vol. 24, No. 10. P. 1288–1300. DOI: 10.1177/1352458517721356
- Garcia-Manteiga J.M., Clarelli F., Bonfiglio S. et al. Identification of differential DNA methylation associated with multiple sclerosis: A family-based study // *J. Neuroimmunol.* 2021. Vol. 356. P. 577600. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2021.577600
- Calabrese R., Valentini E., Ciccarone F. et al. *TET2* gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1842, No. 7. P. 1130–1136. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.04.010
- Friso S., Choi S.W. Gene-nutrient interactions and DNA methylation // *J. Nutr.* 2002. Vol. 132, No. 8 Suppl. P. 2382S–2387S. DOI: 10.1093/jn/132.8.2382S
- Clare C.E., Brassington A.H., Kwong W.Y., Sinclair K.D. One-carbon metabolism: Linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2019. Vol. 7. P. 263–287. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115206
- Mentch S.J., Locasale J.W. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016. Vol. 1363, No. 1. P. 91–98. DOI: 10.1111/nyas.12956
- Ponnaluri V.K.C., Estève P.O., Ruse C.I., Pradhan S. S-adenosylhomocysteine hydrolase participates in DNA methylation inheritance // *J. Mol. Biol.* 2018. Vol. 430, No. 14. P. 2051–2065. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.05.014
- Polman C.H., Reingold S.C., Edan G. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria” // *Ann. Neurol.* 2005. Vol. 58, No. 6. P. 840–846. DOI: 10.1002/ana.20703

25. Usarek E., Barańczyk-Kuźma A., Kaźmierczak B. et al. Validation of qPCR reference genes in lymphocytes from patients with amyotrophic lateral sclerosis // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, No. 3. P. e0174317. DOI: 10.1371/journal.pone.0174317
26. Migheli F., Stoccoro A., Coppedè F. et al. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, No. 1. P. e52501. DOI: 10.1371/journal.pone.0052501
27. Wojdacz T.K., Dobrovic A., Hansen L.L. Methylation-sensitive high-resolution melting // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3, No. 12. P. 1903–1908. DOI: 10.1038/nprot.2008.191
28. Wojdacz T.K., Hansen L.L., Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies // *BMC Res. Notes*. 2008. Vol. 1. P. 54. DOI: 10.1186/1756-0500-1-54
29. Coppedè F., Stoccoro A., Tannorella P., Migliore L. Plasma homocysteine and polymorphisms of genes involved in folate metabolism correlate with *DNMT1* gene methylation levels // *Metabolites*. 2019. Vol. 9, No. 12. P. 298. DOI: 10.3390/metabo9120298
30. Tannorella P., Stoccoro A., Tognoni G. et al. Methylation analysis of multiple genes in blood DNA of Alzheimer's disease and healthy individuals // *Neurosci. Lett.* 2015. Vol. 600. P. 143–147. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.06.009
31. Samsø Mathiasen S., Bińkowski J., Kjeldsen T. et al. Methylation levels assessment with Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM) // *PLoS One*. 2022. Vol. 17, No. 9. P. e0273058. DOI: 10.1371/journal.pone.0273058
32. Kiselev I.S., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorova O.O. DNA Methylation as an epigenetic mechanism in the development of multiple sclerosis // *Acta Naturae*. 2021. Vol. 13, No. 2. P. 45–57. DOI: 10.32607/actanaturae.11043
33. Mastronardi F.G., Noor A., Wood D.D. et al. Peptidyl arginine-deiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated // *J. Neurosci. Res.* 2007. Vol. 85, No. 9. P. 2006–2016. DOI: 10.1002/jnr.21329
34. Castro K., Casaccia P. Epigenetic modifications in brain and immune cells of multiple sclerosis patients // *Mult. Scler.* 2018. Vol. 24, No. 1. P. 69–74. DOI: 10.1177/1352458517737389
35. Kular L., Ewing E., Needhamsen M. et al. DNA methylation changes in glial cells of the normal-appearing white matter in multiple sclerosis patients // *Epigenetics*. 2022. Vol. 17, No. 11. P. 1311–1330. DOI: 10.1080/15592294.2021.2020436
36. Wang X., Wang J., Yu Y. et al. Decitabine inhibits T cell proliferation via a novel TET2-dependent mechanism and exerts potent protective effect in mouse auto- and allo-immunity models // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, No. 34. P. 56802–56815. DOI: 10.18632/oncotarget.18063
37. Rasmi Y., Shokati A., Hassan A. et al. The role of DNA methylation in progression of neurological disorders and neurodegenerative diseases as well as the prospect of using DNA methylation inhibitors as therapeutic agents for such disorders // *IBRO Neurosci. Rep.* 2022. Vol. 14. P. 28–37. DOI: 10.1016/j.ibneur.2022.12.002
38. Kantor B., Tagliafierro L., Gu J. et al. Downregulation of SNCA expression by targeted editing of DNA methylation: a potential strategy for precision therapy in PD // *Mol. Ther.* 2018. Vol. 26, No. 11. P. 2638–2649. DOI: 10.1016/j.jymthe.2018.08.019
39. Fuso A., Nicolìa V., Cavallaro R.A. et al. B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid-beta deposition in mice // *Mol. Cell. Neurosci.* 2008. Vol. 37, No. 4. P. 731–746. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.12.018
40. Fuso A., Nicolìa V., Cavallaro R.A., Scarpa S. DNA methylase and demethylase activities are modulated by one-carbon metabolism in Alzheimer's disease models // *J. Nutr. Biochem.* 2011. Vol. 22, No. 3. P. 242–251. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.01.010
41. Weiner A.S., Boyarskikh U.A., Voronina E.N. et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level // *Gene*. 2014. Vol. 533, No. 1. P. 168–172. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.098
42. Ni G., Qin J., Chen Z. et al. Associations between genetic variation in one-carbon metabolism and leukocyte DNA methylation in valproate-treated patients with epilepsy // *Clin. Nutr.* 2018. Vol. 37, No. 1. P. 308–312. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.01.004
43. Li W.X., Dai S.X., Zheng J.J. et al. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency // *Nutrients*. 2015. Vol. 7. P. 6670–6687. DOI: 10.3390/nu7085303
44. Raghubeer S., Matsha T.E. Methylene-tetrahydrofolate (MTHFR), the one-carbon cycle, and cardiovascular risks // *Nutrients*. 2021. Vol. 13. P. 4562. DOI: 10.3390/nu13124562
45. Tsai M.Y., Bignell M., Yang F. et al. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels // *Atherosclerosis*. 2000. Vol. 149. P. 131–137. DOI: 10.1016/s0021-9150(99)00297-x

References

1. Liu L, Li Y, Tollefsbol TO. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol.* 2008;10(1-2):25–36.
2. Pogribny IP, Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(14):2249–2261. DOI: 10.1007/s00018-009-0015-5
3. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 1975;14(1):9–25. DOI: 10.1159/000130315
4. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:481–514. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
5. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet.* 2022;38(7):676–707. DOI: 10.1016/j.tig.2022.03.010
6. Hervouet E, Peixoto P, Delage-Mourroux R, et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clin Epigenetics.* 2018;10:17. DOI: 10.1186/s13148-018-0450-y
7. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2001;97(5):1172–1179. DOI: 10.1182/blood.v97.5.1172
8. Wong KK, Lawrie CH, Green TM. Oncogenic roles and inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in acute myeloid leukaemia. *Biomark Insights.* 2019;14:1177271919846454. DOI: 10.1177/1177271919846454

9. Zhang TJ, Zhang LC, Xu ZJ, Zhou JD. Expression and prognosis analysis of *DNMT* family in acute myeloid leukemia. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(14):14677–14690. DOI: 10.18632/aging.103520
10. Grossi E, Stocco A, Tannorella P, et al. Artificial neural networks link one-carbon metabolism to gene-promoter methylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;53(4):1517–1522. DOI: 10.3233/JAD-160210
11. Mohd Murshid N, Aminullah Lubis F, Makpol S. Epigenetic changes and its intervention in age-related neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 2022;42(3):577–595. DOI: 10.1007/s10571-020-00979-z
12. Younesian S, Yousefi AM, Momeny M, et al. The DNA methylation in neurological diseases. *Cells*. 2022;11(21):3439. DOI: 10.3390/cells11213439
13. Hartung T, Rhein M, Kalmbach N, et al. Methylation and expression of mutant *FUS* in motor neurons differentiated from induced pluripotent stem cells from ALS patients. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:774751. DOI: 10.3389/fcell.2021.774751
14. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502–1517. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
15. Calabrese R, Zampieri M, Mechelli R, et al. Methylation-dependent *PAD2* upregulation in multiple sclerosis peripheral blood. *Mult Scler*. 2012;18(3):299–304. DOI: 10.1177/1352458511421055
16. ZheleznyakovaGY, Picket E, MarabitaF, et al. Epigenetic research in multiple sclerosis: progress, challenges, and opportunities. *Physiol Genomics*. 2017;49(9):447–461. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00060.2017
17. Ruhmann S, Ewing E, Picket E, et al. Hypermethylation of *MIR21* in CD4+ T cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis associates with lower miRNA-21 levels and concomitant up-regulation of its target genes. *Mult Scler*. 2018;24(10):1288–1300. DOI: 10.1177/1352458517721356
18. Garcia-Manteiga JM, Clarelli F, Bonfiglio S, et al. Identification of differential DNA methylation associated with multiple sclerosis: A family-based study. *J Neuroimmunol*. 2021;356:577600. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2021.577600
19. Calabrese R, Valentini E, Ciccarone F, et al. *TET2* gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(7):1130–1136. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.04.010
20. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr*. 2002;132(8 Suppl):2382S–2387S. DOI: 10.1093/jn/132.8.2382S
21. Clare CE, Brassington AH, Kwong WY, Sinclair KD. One-carbon metabolism: Linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. *Annu Rev Anim Biosci*. 2019;7:263–287. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115206
22. Mentch SJ, Locasale JW. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1363(1):91–98. DOI: 10.1111/nyas.12956
23. Ponnaluri VKC, Estève PO, Ruse CI, Pradhan S. S-adenosylhomocysteine hydrolase participates in DNA methylation inheritance. *J Mol Biol*. 2018;430(14):2051–2065. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.05.014
24. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005;58(6):840–846. DOI: 10.1002/ana.20703
25. Usarek E, Barańczyk-Kuźma A, Kaźmierczak B, et al. Validation of qPCR reference genes in lymphocytes from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174317. DOI: 10.1371/journal.pone.0174317
26. Migheli F, Stocco A, Coppedè F, et al. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of *APC* and *CDKN2A* gene methylation. *PLoS One*. 2013;8(1):e52501. DOI: 10.1371/journal.pone.0052501
27. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc*. 2008;3(12):1903–1908. DOI: 10.1038/nprot.2008.191
28. Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Res Notes*. 2008;1:54. DOI: 10.1186/1756-0500-1-54
29. Coppedè F, Stocco A, Tannorella P, Migliore L. Plasma homocysteine and polymorphisms of genes involved in folate metabolism correlate with *DNMT1* Gene methylation levels. *Metabolites*. 2019;9(12):298. DOI: 10.3390/metabo9120298
30. Tannorella P, Stocco A, Tognoni G, et al. Methylation analysis of multiple genes in blood DNA of Alzheimer's disease and healthy individuals. *Neurosci Lett*. 2015;600:143–147. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.06.009
31. Samsø Mathiasen S, Bińkowski J, Kjeldsen T, et al. Methylation levels assessment with Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM). *PLoS One*. 2022;17(9):e0273058. DOI: 10.1371/journal.pone.0273058
32. Kiselev IS, Kulakova OG, Boyko AN, Favorova OO. DNA Methylation as an epigenetic mechanism in the development of multiple sclerosis. *Acta Naturae*. 2021;13(2):45–57. DOI: 10.32607/actanaturae.11043
33. Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, et al. Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res*. 2007;85(9):2006–2016. DOI: 10.1002/jnr.21329
34. Castro K, Casaccia P. Epigenetic modifications in brain and immune cells of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2018;24(1):69–74. DOI: 10.1177/1352458517737389
35. Kular L, Ewing E, Needham M, et al. DNA methylation changes in glial cells of the normal-appearing white matter in multiple sclerosis patients. *Epigenetics*. 2022;17(11):1311–1330. DOI: 10.1080/15592294.2021.2020436
36. Wang X, Wang J, Yu Y, et al. Decitabine inhibits T cell proliferation via a novel *TET2*-dependent mechanism and exerts potent protective effect in mouse auto- and allo-immunity models. *Oncotarget*. 2017;8(34):56802–56815. DOI: 10.18632/oncotarget.18063
37. Rasmi Y, Shokati A, Hassan A, et al. The role of DNA methylation in progression of neurological disorders and neurodegenerative diseases as well as the prospect of using DNA methylation inhibitors as therapeutic agents for such disorders. *IBRO Neurosci Rep*. 2022;14:28–37. DOI: 10.1016/j.ibneur.2022.12.002
38. Kantor B, Tagliafierro L, Gu J, et al. Downregulation of *SNCA* expression by targeted editing of DNA methylation: a potential strategy for precision therapy in PD. *Mol Ther*. 2018;26(11):2638–2649. DOI: 10.1016/j.jmthe.2018.08.019
39. Fuso A, Nicolai V, Cavallaro RA, et al. B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances *PS1* and *BACE* expression and amyloid-beta deposition in mice. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(4):731–746. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.12.018
40. Fuso A, Nicolai V, Cavallaro RA, Scarpa S. DNA methylase and demethylase activities are modulated by one-carbon metabolism in Alzheimer's disease models. *J Nutr Biochem*. 2011;22(3):242–251. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.01.010

41. Weiner AS, Boyarskikh UA, Voronina EN, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level. *Gene*. 2014;533(1):168–172. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.098
42. Ni G, Qin J, Chen Z, et al. Associations between genetic variation in one-carbon metabolism and leukocyte DNA methylation in valproate-treated patients with epilepsy. *Clin Nutr*. 2018;37(1):308–312. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.01.004
43. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, et al. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. *Nutrients*. 2015;7:6670–6687. DOI: 10.3390/nu7085303
44. Raghubeer S, Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the one-carbon cycle, and cardiovascular risks. *Nutrients*. 2021;13:4562. DOI: 10.3390/nu13124562
45. Tsai MY, Bignell M, Yang F, et al. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis*. 2000;149:131–137. DOI: 10.1016/s0021-9150(99)00297-x

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
 Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Евгения Антоновна Цымбалова — лаборант-исследователь Физиологического отдела им. И.П. Павлова.
 e-mail: evgesha.tsymbalova@mail.ru

Evgenia A. Tsymbalova — research assistant of I.P. Pavlov Department of Physiology.
 e-mail: evgesha.tsymbalova@mail.ru

Екатерина Александровна Чернявская — лаборант-исследователь Физиологического отдела им. И.П. Павлова.
 ORCID: 0009-0003-0421-9819;
 e-mail: kate-chernjavskaja@yandex.ru

Ekaterina A. Chernyavskaya — research assistant of I.P. Pavlov Department of Physiology.
 ORCID: 0009-0003-0421-9819;
 e-mail: kate-chernjavskaja@yandex.ru

Дарья Евгеньевна Рыжкова — специалист Физиологического отдела им. И.П. Павлова.
 ORCID: 0009-0004-3745-3203;
 e-mail: dashstepanova@gmail.com

Daria E. Ryzhkova — specialist of I.P. Pavlov Department of Physiology.
 ORCID: 0009-0004-3745-3203;
 e-mail: dashstepanova@gmail.com

Ирина Николаевна Абдурасулова — канд. биол. наук, руководитель Физиологического отдела им. И.П. Павлова.
 ORCID: 0000-0003-1010-6768;
 eLibrary SPIN: 5019-3940;
 e-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Irina N. Abdurasulova — Cand. Sci. (Biol.), Head of I.P. Pavlov Department of Physiology.
 ORCID: 0000-0003-1010-6768;
 eLibrary SPIN: 5019-3940;
 e-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Виктория Иосифовна Людино — канд. биол. наук, старший научный сотрудник Физиологического отдела им. И.П. Павлова.
 ORCID: 0000-0002-1449-7754;
 eLibrary SPIN: 8980-8497;
 e-mail: vliudyno@mail.ru

Victoria I. Liudyno — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate of I.P. Pavlov Department of Physiology.
 ORCID: 0000-0002-1449-7754;
 eLibrary SPIN: 8980-8497;
 e-mail: vliudyno@mail.ru

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
 Almazov National Medical Research Center, Saint Petersburg, Russia

Геннадий Николаевич Бисага — д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии с клиникой.
 ORCID: 0000-0002-1848-8775;
 eLibrary SPIN: 9121-7071;
 e-mail: bisaga@yandex.ru

Gennady N. Bisaga — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Neurology with the Clinic.
 ORCID: 0000-0002-1848-8775;
 eLibrary SPIN: 9121-7071;
 e-mail: bisaga@yandex.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Виктория Иосифовна Людино / Victoria I. Liudyno
 Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
 Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia
 E-mail: vliudyno@mail.ru