

## БОЛЕЗНЬ ФРИДРЕЙХА: ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *FXN* И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОСОБЕННОСТЯМИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Е. Ю. Федотова <sup>✉</sup>, Н. Ю. Абрамычева, Е. П. Нужный, М. В. Ершова, С. А. Ключников, С. Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Болезнь Фридрейха (БФ) — наиболее частая аутосомно-рецессивная атаксия, связанная с экспансией tandemных некодирующих GAA-повторов в гене *FXN*. Нарушение транскрипции и недостаточность белка фратаксина являются ключевыми звеньями патогенеза заболевания. Целью работы было исследовать экспрессию мРНК гена *FXN* и провести анализ клинических, генетических и эпигенетических корреляций в группе пациентов с гомозиготной экспансией повторов, в группе их родственников с гетерозиготной экспансией и в контрольной группе. Уровень мРНК гена *FXN* определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Паттерн метилирования CpG-сайтов оценивали методом прямого секвенирования после бисульфитной обработки. В результате работы получены разграничительные значения между группой пациентов БФ, группой гетерозиготных носителей и контрольной группой (15 и 79% соответственно). При проведении клинико-генетических сопоставлений с уровнем экспрессии *FXN* значимых корреляций выявлено не было. При сопоставлении экспрессии гена с эпигенетическим профилем было установлено, что экспрессия подавляется при гиперметилировании ряда CpG-сайтов выше области тринуклеотидных повторов и некоторых не-CpG-сайтов ниже области повторов. Таким образом, выявленные сайты могут быть рассмотрены в качестве точки приложения таргетного эпигенетического редактирования для увеличения транскрипции *FXN* и, следовательно, для таргетной терапии заболевания.

**Ключевые слова:** болезнь Фридрейха, экспрессия гена, эпигенетика, метилирование ДНК, не-CpG-метилирование, ДНК-диагностика, таргетная терапия

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта РФФ (номер проекта 17-75-20211).

**Информация о вкладе авторов:** все авторы внесли равнозначный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили ее финальную версию перед публикацией.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 11-3/17 от 18 октября 2017 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Юрьевна Федотова  
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва; ekfedotova@gmail.com

**Статья получена:** 22.08.2019 **Статья принята к печати:** 13.09.2019 **Опубликована онлайн:** 25.09.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.062

## FRIEDREICH ATAXIA: *FXN* GENE EXPRESSION AND ITS RELATIONSHIP WITH DNA METHYLATION PATTERN

Fedotova EYu <sup>✉</sup>, Abramychcheva NYu, Nuzhny EP, Ershova MV, Klyushnikov SA, Illarioshkin SN

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Friedreich ataxia (FRDA) is the most common autosomal recessive ataxia associated with the non-coding GAA tandem repeats expansion in the *FXN* gene. Transcription impairment and frataxin protein deficiency are the key features of the disease pathogenesis. Our research was aimed to study the *FXN* gene mRNA expression as well as to carry out the clinical, genetic and epigenetic correlation analysis in a group of patients with homozygous expansion, in a group of their relatives with heterozygous expansion and in a control group. The *FXN* mRNA level was determined using the real-time polymerase chain reaction. Methylation pattern of CpG sites was evaluated by direct bisulfite sequencing. As a result of the study, the threshold values were obtained between the FRDA patients group, the group of heterozygous carriers and the control group (15 and 79%, respectively). The clinical and genetic features comparison with the *FXN* expression level revealed no significant correlation. When comparing gene expression with an epigenetic profile, it was found that hypermethylation of a number of CpG sites upstream of the trinucleotide repeats and some non-CpG sites downstream of the region of repeats inhibited expression. Thus, the identified methylated sites may be considered as a target for epigenome editing to increase the *FXN* transcription and, consequently, for target therapy of the disease.

**Keywords:** Friedreich ataxia, gene expression, epigenetics, DNA methylation, non-CpG methylation, DNA diagnostics, target therapy

**Funding:** the study is supported by grant of the Russian Science Foundation (project № 17-75-20211).

**Author contribution:** all authors contributed to the study and preparation of the article equally, read and approved the final version before publishing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Research Center of Neurology (protocol № 11-3/17 dated October 18, 2017). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Yu. Fedotova  
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; ekfedotova@gmail.com

**Received:** 22.08.2019 **Accepted:** 13.09.2019 **Published online:** 25.09.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.062

Болезнь Фридрейха (БФ) — наиболее частая аутосомно-рецессивная атаксия, связанная с экспансией tandemных тринуклеотидных GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN* [1, 2]. Молекулярной основой заболевания является недостаточность продукта гена — митохондриального белка фратаксина [3]. Считается, что значительная экспансия в сотни нуклеотидов, имеющая место при БФ, препятствует транскрипции соответствующей мРНК *FXN* [2].

В ряде исследований показано, что в критическом локусе ДНК, содержащем ген *FXN*, в случае экспансии образуется гетерохроматин (неактивный хроматин) с подавлением процессов транскрипции [4]. Ему соответствуют определенные модификации гистонов — уменьшение ацетилирования и повышение триметилирования, что показано у пациентов с БФ [5–7]. Наряду с модификацией гистонов наблюдают и другие эпигенетические феномены — усиление ДНК-метилирования в промоторе и в области 1-го

интрона, расположенной выше участка GAA-экспансии (UP-GAA), и снижение ДНК-метилирования в области 1-го интрона ниже GAA-экспансии (DOWN-GAA). Известно, что метилирование цитозина в динуклеотидной паре цитозин-гуанин (CpG) в промоторе приводит к уменьшению экспрессии гена, т. е. метилирование ДНК в UP-GAA-области предположительно ингибирует транскрипцию FXN и приводит к снижению уровня фратаксина [8].

ДНК-метилирование и модификации гистонов — это взаимосвязанные эпигенетические процессы. В частности, уровень ДНК-метилирования может быть прогностически важным маркером для ингибиторов гистоновых деацетилазы, клинические испытания которых проводят с целью эпигенетической терапии БФ. При этом есть мнение, что при БФ ДНК-метилирование первично по отношению к модификации гистонов [9].

В последние годы стали появляться работы, исследующие значение так называемого не-CpG-метилирования (*non-CpG methylation*). При этом типе происходит метилирование цитозина в паре с другими, отличными от гуанина, нуклеотидами — аденином, тиминном, цитозином. Наибольший уровень не-CpG-метилирования был найден в стволовых клетках и клетках нервной системы [10, 11], что позволяет предполагать особую роль данного варианта эпигенетической модификации в реализации функций нервной системы в норме и при патологии. До настоящего времени не-CpG-метилирование при БФ не исследовали.

Целью работы было исследовать уровень экспрессии мРНК гена *FXN* и провести анализ клинических, генетических и эпигенетических корреляций у пациентов с БФ и гетерозиготных носителей мутации *FXN*.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе 5-го неврологического отделения Научного центра неврологии с 2017 по 2019 г. Была изучена группа пациентов с БФ и подтвержденной гомозиготной экспансией GAA-повторов в гене *FXN* ( $n = 8$ ; 3 женщины и 5 мужчин). Средний возраст больных составил  $29,9 \pm 9,5$  лет, возраст дебюта заболевания —  $13,8 \pm 6,7$  лет, длительность заболевания —  $16,0 \pm 9,3$  лет. Критерии включения пациентов в группу с БФ: наличие клинического диагноза заболевания с положительными результатами молекулярно-генетической диагностики (гомозиготная экспансия tandemных GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN*). Среднее число GAA-повторов в коротком аллеле гена в группе составило  $506,0 \pm 232,0$  (GAA1), в длинном —  $718,8 \pm 143,8$  (GAA2). Пациентов клинически обследовали по шкале оценки атаксии SARA (средний балл в группе —  $23,1 \pm 11,4$ ) и по шкале Монреальской когнитивной оценки MoCA (средний балл —  $24,6 \pm 2,7$ ); определяли также наличие кардиомиопатии (5/8), нарушений углеводного обмена (3/8), сколиоза и деформации стоп (6/8). Критерии исключения: отсутствие верифицированного диагноза заболевания.

Основную группу пациентов сравнивали с группой гетерозиготных носителей мутации в гене *FXN*, обозначаемой далее как GAA-гетерозиготы ( $n = 6$ ; 5 женщин и 1 мужчина); в эту группу вошли родственники больных БФ первой степени родства. Группа сравнения была старше по возрасту ( $53,7 \pm 19,6$  лет) по сравнению с больными БФ (за счет родителей пациентов). Для гетерозиготных носителей критерием включения было наличие гетерозиготной GAA-экспансии. Длина экспандированного аллеля *FXN* в группе

составила  $664,0 \pm 283,7$  повторов (GAA2). Контрольная группа ( $n = 10$ ) без экспансии GAA-повторов в гене *FXN* была сопоставима по полу и возрасту с основной группой.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega; США). Наличие экспансии GAA-повторов в гене *FXN* оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) соответствующей области с последующим разделением ампликонов в агарозном геле.

Паттерн метилирования определяли методом прямого секвенирования соответствующих участков ДНК после бисульфитной обработки с помощью набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research; США) согласно методике производителя. У каждого обследуемого определяли уровень метилирования CpG-сайтов в трех основных значимых областях гена *FXN*: в промоторной области, UP-GAA-области и DOWN-GAA-области. В промоторной области *FXN* были исследованы 16 CpG-сайтов, в UP-GAA-области — 67 CpG-сайтов, в DOWN-GAA-области — 21 CpG-сайт (с нумерацией от 5'-конца соответствующей области). Степень метилирования сайта рассчитывали по отношению высоты синего пика (метилированный цитозин, C) к суммарной высоте синего и красного пиков (метилированный и неметилированный цитозин, C + T).

Кроме исследования CpG-сайтов в работе проводили поиск и анализ метилирования не-CpG-сайтов. Не-CpG-сайты выявляли при анализе сиквенса по метилированному цитозину (mC), предшествующему аденину, тимину или цитозину (соответственно, mCA, mCT, mCC).

Оценку уровня экспрессии гена *FXN* проводили путем измерения количества мРНК гена *FXN* методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в исследуемых образцах по следующей схеме. Забор периферической крови осуществляли в пробирки с ЭДТА, образцы крови предварительно обрабатывали специальным буфером для лизиса эритроцитов Buffer EL (QIAGEN; Германия), аликвотировали и хранили при  $-80$  °C. Для выделения геномной РНК использовали набор RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN; Германия) по соответствующему протоколу производителя. Тотальную кДНК из полученных образцов РНК получали с помощью набора для обратной транскрипции и амплификации кДНК (Евроген; Россия) с добавлением олиго dT праймера, аликвотировали и хранили при  $-20$  °C. Содержание мРНК гена *FXN* в исследуемых образцах определяли по пороговому циклу методом ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем SYBR Green, с нормированием на референсный ген *GAPDH*. В качестве метода подсчета уровня экспрессии использовали формулу  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ .

Статистический анализ осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 (IBM; США) с использованием непараметрических методов статистики: критерия Манна-Уитни, критерия Спирмена. Для ROC-анализа применяли программу MedCalc 18 (MedCalc Software; Бельгия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Экспрессия гена *FXN* у носителей гомозиготной и гетерозиготной экспансии

В группе БФ у пациентов с гомозиготной экспансией GAA-повторов уровень экспрессии составил 0,05 [0,00; 0,127]; в группе их родственников с гетерозиготной экспансией —

0,57 [0,54; 0,66]; в референсной группе контроля — 1,016 [0,847; 1,214]. Группы статистически значимо различались между собой ( $p < 0,05$ ).

Учитывая перекрывающиеся значения уровней экспрессии между контрольной группой и группой GAA-гетерозигот, был проведен ROC-анализ. Площадь под кривой для анализируемого показателя составила 0,986; при разграничительном значении, равном 0,79, специфичность составила 95% и чувствительность — 93%. При ROC-анализе результатов оценки экспрессии гена в группах GAA-гетерозигот и GAA-гомозигот площадь под кривой составила 0,934; при разграничительном значении, равном 0,15, специфичность составила 93% и чувствительность — 87%.

### Клинические сопоставления

Проводили сопоставления экспрессии *FXN* с клиническими данными в группе больных БФ. При корреляционном анализе между уровнем экспрессии и возрастом пациентов, возрастом начала и длительностью заболевания, баллом по шкале оценки тяжести атаксии SARA, когнитивными изменениями по MoCA взаимосвязей выявлено не было ( $p > 0,05$ ). По полученным данным, уровень экспрессии не был связан с наличием кардиомиопатии, нарушением углеводного обмена или костными деформациями ( $p > 0,05$ ).

В группе сравнения среди родственников с гетерозиготной мутацией наименьший уровень экспрессии *FXN* был у носительницы гетерозиготной GAA-экспансии (750 GAA-повторов) 72 лет (матери пациента). В анамнезе у обследуемой — многолетняя эндокринопатия (тяжелый сахарный диабет 2-го типа). У других обследованных из группы GAA-гетерозигот сахарного диабета не было.

### Генетические сопоставления

Исследовали корреляцию между уровнем экспрессии мРНК *FXN* и длиной экспандированных аллелей. В группе БФ экспрессия не была ассоциирована ни с длиной меньшего аллеля GAA1 (статистической значимости не достигала), ни с длиной большего аллеля GAA2. В группе GAA-гетерозигот также не выявлено связи между уровнем экспрессии и длиной экспандированного аллеля GAA2.

### Эпигенетические сопоставления

В работе проведен поиск не-CpG-сайтов во всех исследуемых областях. В промоторной области было обнаружено 2 не-CpG-сайта, в UP-GAA-области не-CpG-

сайтов выявлено не было, в DOWN-GAA-области найдено 15 не-CpG-сайтов.

При корреляционном анализе у пациентов с БФ выявлена прямая связь между уровнем экспрессии мРНК гена *FXN* и уровнем метилирования сайта CpG-54 в UP-GAA-области ( $r = 0,782$ ;  $p = 0,037$ ). В области DOWN-GAA выявлена обратная корреляция между уровнем экспрессии *FXN* и уровнем метилирования трех не-CpG-сайтов: не-CpG-7a ( $r = -0,788$ ;  $p = 0,035$ ), не-CpG-7b ( $r = -0,795$ ;  $p = 0,032$ ) и не-CpG-8a ( $r = -0,875$ ;  $p = 0,009$ ). Связи уровня метилирования указанных не-CpG-сайтов с длиной GAA1 либо GAA2 выявлено не было. В то же время для рядом расположенных CpG-сайтов метилирование не коррелировало с экспрессией, но зависело от длины экспандированного аллеля (табл. 1).

В группе сравнения у GAA-гетерозигот выявлена корреляция между уровнем экспрессии и уровнем метилирования CpG-13 в промоторной области ( $r = -0,947$ ;  $p = 0,017$ ), а также между уровнем экспрессии и уровнем метилирования CpG-3 в DOWN-GAA-области ( $r = -0,894$ ;  $p = 0,041$ ).

С учетом небольшого числа обследуемых в группах нами был проведен расчет корреляций в совмещенной группе, составленной из пациентов, родственников и здоровых добровольцев, с поправкой на группу. Выявленные корреляции между уровнем экспрессии *FXN* и уровнем метилирования отдельных сайтов представлены в табл. 2. Суммируя полученные результаты, можно отметить, что для CpG-сайтов выявлены обратные корреляции между экспрессией гена и метилированием в промоторе и UP-GAA-области и прямые корреляции между экспрессией гена и метилированием в DOWN-GAA-области, тогда как для не-CpG-сайтов в DOWN-GAA-области выявлены обратные корреляции.

Метилированный цитозин в не-CpG-сайтах предшествовал следующим нуклеотидам: сайт 5a — mCCC, сайт 7a — mCTT, сайт 7b — mCCC, сайт 8a — mCAG, сайт 8b — mCAT, сайт 10b — mCTG.

В совмещенной выборке степень метилирования не-CpG-сайтов DOWN-GAA-области не коррелировала с длиной экспансии (GAA1, GAA2) — как и в группе пациентов с БФ.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Недостаточность белка фратаксина при БФ имеет системный эффект и приводит к различным неврологическим и экстраневральным проявлениям заболевания [1, 9]. Тяжесть генетических изменений при

**Таблица 1.** Корреляции уровня экспрессии гена *FXN* и длины экспансии повторов в меньшем аллеле гена с уровнем метилирования не-CpG-сайтов DOWN-GAA области и рядом расположенных с ними CpG-сайтов у пациентов с БФ

Условные обозначения сайтов	Корреляция* уровня метилирования с экспрессией	Корреляция* уровня метилирования с длиной GAA1	Последующие за метилированным цитозином нуклеотиды	Место расположения цитозина (GRCh38)
CpG-7	–	–0,901*	mCG	chr9:69,037,380
не-CpG-7a	–0,788*	–	mCTT	chr9:69,037,382
не-CpG-7b	–0,795*	–	mCCC	chr9:69,037,388
CpG-8	–	–0,836*	mCG	chr9:69,037,390
не-CpG-8a	–0,875*	–	mCAG	chr9:69,037,397
CpG-9	–	–0,772*	mCG	chr9:69,037,420
CpG-10	–	–0,791*	mCG	chr9:69,037,434

**Примечание:** # — коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ); \* —  $p < 0,05$ ; «–» — нет корреляционной связи; mC — метилированный цитозин.

**Таблица 2.** Корреляции уровня экспрессии гена *FXN* и длины экспансии повторов в меньшем аллеле гена с уровнем метилирования не-CpG-сайтов DOWN-GAA области и рядом расположенных с ними CpG-сайтов у пациентов с БФ

Промотор: обратные корреляции	DOWN-GAA: прямые корреляции
– CpG-5 ( $r = -0,511$ )* – CpG-13 ( $r = -0,542$ )* – CpG-16 ( $r = -0,511$ )*	– CpG-2 ( $r = 0,567$ )* – CpG-12 ( $r = 0,520$ )*
UP-GAA: обратные корреляции	DOWN-GAA: обратные корреляции
– CpG-43 ( $r = -0,615$ )* – CpG-44 ( $r = -0,508$ )* – CpG-45 ( $r = -0,533$ )*	– не-CpG-5a ( $r = -0,514$ )* – не-CpG-7a ( $r = -0,571$ )* – не-CpG-7b ( $r = -0,506$ )* – не-CpG-8a ( $r = -0,625$ )* – не-CpG-8b ( $r = -0,644$ )* – не-CpG-10b ( $r = -0,540$ )*

Примечание: \* —  $p < 0,05$ .

БФ — длина экспансии GAA-повторов — лишь отчасти может объяснить то многообразие клинической картины, которую наблюдают при данной патологии (вариабельный возраст начала и темп прогрессирования, особенности клинических проявлений, характер полиневропатии и вовлечения кортикоспинальных трактов, тяжесть и характер кардиомиопатии, нарушения углеводного обмена и др.). Закономерно, что поиск объяснения такого широкого фенотипического полиморфизма ведут путем изучения факторов и процессов, регулирующих реализацию генетической информации: метилирования ДНК, модификации гистонов, пространственной организации ДНК, антисмысловых транскриптов и некодирующих РНК. Из-за комплексности и многоплановости процессов, вызванных интронной GAA-экспансией, пока не удастся выделить главенствующие мишени, воздействие на которые помогло бы решить проблему недостаточности фратаксина и нарушенной транскрипции *FXN*, и, следовательно, предложить эффективную терапевтическую стратегию. В работе был сделан акцент на одном из эпигенетических аспектов — метилировании ДНК. Данный аспект представляется перспективным в свете появившихся работ по таргетному эпигенетическому редактированию, которое может позволить восстановить нарушенную транскрипцию, как было показано для умственной отсталости на примере экспансии тринуклеотидных повторов в гене *FMR1* [12–14].

Результаты по изучению степени экспрессии *FXN* представлены в ряде зарубежных работ. Так, в одной из них уровень мРНК *FXN* у пациентов с БФ были снижен до 19%, у гетерозиготных носителей — до 53% от уровня контроля, при этом уровень мРНК коррелировал с уровнем фратаксина, возрастом начала заболевания и длиной экспансии [15]. В другой работе были получены сопоставимые результаты, а также показано, что уровень мРНК и уровень белка фратаксина относительно стабильны во времени и меняются на фоне действия эпигенетической терапии — ингибитора гистоновых деацетилаз. Иными словами, уровень мРНК — измеряемый и изменяемый показатель, который можно использовать в клинических исследованиях [16].

Проведенный нами анализ экспрессии гена *FXN* выявил также существенное снижение уровня мРНК у пациентов — носителей гомозиготной GAA-экспансии (ниже 15%) относительно контрольной группы, и в группе родственников с гетерозиготной экспансией повторов (ниже 79%). Однако в нашем исследовании статистически значимых корреляций ни с клиническими, ни с генетическими характеристиками выявлено не было, вероятнее всего, из-за небольшого размера выборки. При

этом обращает на себя внимание тот факт, что в группе гетерозигот у пациентки с сахарным диабетом 2-го типа был выявлен наименьший уровень мРНК *FXN*. Возможно, у гетерозигот низкий уровень экспрессии мРНК и белка фратаксина может быть предиктором нарушений углеводного обмена, которые наблюдают у пациентов с БФ и могут также быть выявлены у их родственников — гетерозиготных носителей мутации [17, 18].

Работы по исследованию ДНК-метилирования при БФ немногочисленны [8, 19–23]. При этом БФ рассматривают как модельное заболевание с особым типом экспансии тринуклеотидных повторов — на обоих аллелях в некодирующей, регуляторной области гена [20]. В двух работах было обнаружено гиперметилирование нескольких сайтов в UP-GAA-области при БФ [21, 22]. Другие исследователи также показали гиперметилирование UP-GAA и выявили гипометилирование DOWN-GAA в клетках периферической крови пациентов, в головном мозге и миокарде [23], что подтверждает системный эффект экспансии GAA-повторов и информативность данных, получаемых на лейкоцитах периферической крови. Еще в одной работе на большой выборке пациентов с БФ кроме гиперметилирования UP-GAA и гипометилирования DOWN-GAA показана обратная корреляционная связь между уровнем метилирования одного UP-CpG-сайта с уровнем мРНК *FXN* [8]. Уровень мРНК коррелировал также с количеством GAA-повторов, возрастом начала заболевания, тяжестью симптомов. В нашей ранее опубликованной работе [19] было подтверждено гиперметилирование UP-GAA-области и гипометилирование DOWN-GAA-области при БФ, выявлены прямая связь степени метилирования сайтов UP-GAA-области с длиной экспансии у гомозиготных носителей мутации и обратная связь степени метилирования сайтов DOWN-GAA-области с длиной экспансии у гетерозиготных носителей мутации.

Данная работа является продолжением предыдущей и исследует влияние эпигенетического профиля *FXN* на экспрессию соответствующей мРНК. Сопоставляя результаты предыдущей и настоящей работ, можно отметить, что гиперметилирование отдельных CpG-сайтов, располагающихся до области повторов (промотор и UP-GAA), связано с меньшим уровнем мРНК и с большим числом tandemных GAA-повторов в гене *FXN*. В DOWN-GAA гипометилирование отдельных CpG-сайтов связано с меньшим уровнем мРНК и с большим числом tandemных GAA-повторов.

Как было отмечено выше, не-CpG-метилирование при БФ до настоящего времени не исследовали. Функциональное значение не-CpG-сайтов обсуждают,

однако уже сейчас понятно, что оно имеет большое значение в регуляции экспрессии [24]. Не-CpG-сайты преимущественно располагаются там, где меньше плотность CpG-сайтов, т. е. обычно внутри гена. Метилирование не-CpG внутри гена ассоциировано с уменьшением его экспрессии. Считается, что по сравнению с CpG оно более подвержено изменениям, которые могут происходить в процессе развития организма и под воздействием различных факторов окружающей среды [25]. Так, в нейронах на стадии эмбриона не-CpG-сайты практически не метилированы и метилируются в процессе развития. Именно на нейроны приходится наибольшая часть не-CpG-метилирования взрослого организма, меньше — на глию, стволовые клетки, гаметы; оно практически отсутствует в других клетках. Ориентировочное соотношение в нейронах не-CpG-метилирования к CpG-метилированию — 1 : 3. Чаще всего первое встречается в динуклеотиде CpA, в меньшей степени — в динуклеотиде CpT и еще меньше — в CpC. Считается, что функция не-CpG-метилирования зависит от молекулярного контекста: так, метилирование цитозина в последовательности mCAC может приводить к снижению экспрессии гена, тогда как метилирование в mCAG — к ее повышению [10, 11].

В нашей работе были найдены 2 не-CpG-сайта в промоторной области, в области UP-GAA не-CpG найдены не были, и в DOWN-GAA области выявлены 15 не-CpG. Для сравнения, встречаемость CpG в этих же секвенированных областях следующая: 16 CpG — в промоторе, 67 CpG — в UP-GAA и 21 CpG — в DOWN-GAA. Из приведенных данных видно, что чем больше плотность CpG, тем меньше встречаемость не-CpG, и наоборот. Примерное, условное соотношение не-CpG к CpG — 1 : 6; напомним, что исследование проводили на лейкоцитах крови, а не на нейронах, с меньшей долей не-CpG.

В работе корреляций уровня метилирования двух не-CpG-сайтов в области промотора *FXN* с уровнем мПНК выявлено не было. В DOWN-GAA-области был выявлен кластер связанных друг с другом, расположенных рядом не-CpG-сайтов, метилирование которых обратно коррелирует с уровнем мПНК, при этом отсутствует связь уровня метилирования с длиной GAA-экспансии. Однонаправленный эффект всех 6 выявленных не-CpG-сайтов на экспрессию не зависел от контекста, указанная

выше обратная связь отмечена и при конфигурации CpA (mCAC, mCAG), и при CpT (mCTT, mCTG), и при CpC (2 mCCC).

На совмещенной выборке, в отличие от не-CpG-метилирования, уровень CpG-метилирования в DOWN-GAA показал прямые ассоциативные связи с уровнем мПНК, что говорит о возможном разнонаправленном эффекте этих двух типов метилирования. Еще одним различием между ними может быть зависимость от длины GAA-экспансии: при CpG-метилировании она присутствует, тогда как в случае не-CpG не выявляется. Следовательно, не-CpG-метилирование независимо от генетического дефекта может модифицировать экспрессию *FXN*.

Выявленный кластер близкорасположенных не-CpG-сайтов, метилирование которых связано с уменьшением транскрипции гена *FXN*, отстоит от известных и изучаемых при БФ регуляторных последовательностей и мест связывания факторов транскрипции — CTCF, SRF, TFAP2, EGR3, E-box (все они лежат в промоторе и UP-GAA-области) [26, 27]. Область выявленного не-CpG-кластера, находясь в DOWN-GAA-области, входит в состав Alu (SINE)-элемента. Функциональная значимость последнего до конца не ясна, однако удаление его приводит к существенному нарушению транскрипции *FXN* [4, 21]. Это еще раз косвенно подтверждает возможную значимость для транскрипции не-CpG-метилирования данной области.

## ВЫВОДЫ

В работе представлено сопоставление клинических параметров, степени экспансии GAA-повторов и эпигенетических характеристик гена *FXN* с уровнем мПНК в группах пациентов с БФ, их гетерозиготных родственников и лиц контрольной группы. Выявлены значимые для экспрессии сайты метилирования *FXN*. В промоторной области и в области UP-GAA для ряда CpG-сайтов определена отрицательная корреляционная связь метилирования с уровнем экспрессии гена, так же как и для ряда не-CpG-сайтов в области DOWN-GAA. Представляется, что выявленный гиперметилированный кластер не-CpG-сайтов можно рассматривать в качестве точки приложения таргетного эпигенетического редактирования с целью увеличения транскрипции *FXN* и, следовательно, для таргетной терапии БФ.

## Литература

- Иллариошкин С. Н., Ершова М. В. Атаксия Фридрейха. В книге: Иллариошкин С. Н., Руденская Г. Е., Иванова-Смоленская И. А., Маркова Е. Д., Ключников С. А. Наследственные атаксии и параличи. М., 2006; с. 49–113.
- Burk K. Friedreich ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias*. 2017; (4): 4.
- Deutsch EC, Oglesbee D, Greeley NR, Lynch DR. Usefulness of frataxin immunoassays for the diagnosis of Friedreich ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85 (9): 994–1002.
- Yandim C, Nativivili T, Festenstein R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *Journal of neurochemistry*. 2013; 126 (Suppl. 1): 21–42.
- Herman D, Jenissen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*. 2006; 2 (10): 551–8.
- Sandi C, Sandi M, Virmouni SA, Al-Mahdawi S, Pook MA. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Frontiers in Genetics*. 2014; (5): 165.
- Soragni E, Miao W, Iudicello M, Jacoby D, De Mercanti S, Clerico M, et al. Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2014; 76 (4): 489–508.
- Evans-Galea MV, Carroddus N, Rowley SM, Corben LA, Tai G, Saffery R et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2012; 71 (4): 487–97.
- Blair IA, Farmer J, Hersch S, Larkindale J, Lynch DR, Napierala J et al. The current state of biomarker research for Friedreich's ataxia: a report from the 2018 FARA biomarker meeting. *Future Sci OA*. 2019; 5 (6): FSO398.
- He Y, Ecker JR. Non-CG methylation in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2015; (16): 55–77.
- Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes*. 2017; (8): e148.
- Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu X, Graef J, Muffat J, et al. Rescue of Fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene. *Cell*. 2018; (172): 979–92.
- Lau C-H, Suh Y. In vivo epigenome editing and transcriptional

- modulation using CRISPR technology. *Transgenic Res.* 2018; 27 (6): 489–509.
14. Gomez JA, Beitner U, Segal DJ. Live-animal epigenome editing: Convergence of novel techniques. *Trends Genet.* 2019; 35 (7): 527–41.
  15. Sacca F, Puoro G, Antenora A, Marsili A, Denaro A, Piro R, et al. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: Implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS ONE.* 2011; 6 (3): e17627.
  16. Plasterer HL, Deutsch EC, Belmonte M, Egan E, Lynch DR, Rusche JR. Development of frataxin gene expression measures for the evaluation of experimental treatment in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE.* 2013; 8 (5): e63958.
  17. Hebinck J, Hardt C, Schols L, Vorgerd M, Briedigkeit L, Kahn CR, Ristow M. Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes.* 2000; 49 (9): 1604–7.
  18. McCormick A, Farmer J, Perlman S, Delatycki M, Wilmot G, Matthews K, et al. Impact of diabetes in the Friedreich ataxia clinical outcome measures study. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2017; 4 (9): 622–31.
  19. Абрамычева Н. Ю., Федотова Е. Ю., Нужный Е. П., Николаева Н. С., Ключников С. А., Ершова М. В. и др. Эпигенетика болезни Фридрейха: метилирование области экспансии (GAA)n-повторов гена FXN. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2019; 74 (2): 80–7.
  20. Essebier A, Wolf PV, Cao MD, Carroll BJ, Balasubramanian S, Boden M. Statistical enrichment of epigenetic states around triplet repeats that can undergo expansions. *Front Neurosci.* 2016; (10): 92.
  21. Greene E, Mahishi L, Entezam L, Kumari D, Usdin K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35 (10): 3383–90.
  22. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, Acquaviva F, Giacchetti M, Filla 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): 808–12.
  23. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lymperi S, Sandi C 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): 735–46.
  24. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics.* 2014; 9 (6): 823–28.
  25. Fuso A, Lucarelli M. CpG and non-CpG methylation in the diet-epigenetics-neurodegeneration connection. *Curr Nutr Rep.* 2019; 8 (2): 74–82.
  26. Li K, Singh A, Crooks DR, Dai X, Cong Z, Pan L, et al. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS ONE.* 2010; 5 (8): e12286.
  27. Al-Mahdawi S, Sandi C, Pinto RM, Pook MA. Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus. *PLoS ONE.* 2013; 8 (9): e74956.

## References

1. Illarioshkin SN., Ershova MV. Ataksiya Fridreykha. V knige: Illarioshkin SN, Rudenskaya GE, Ivanova-Smolenskaya IA., Markova ED, Klyushnikov SA. *Nasledstvennye ataksii i paraplegii.* M., 2006; s.49–113. Russian.
2. Burk K. Friedreich ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias.* 2017; (4): 4.
3. Deutsch EC, Oglesbee D, Greeley NR, Lynch DR. Usefulness of frataxin immunoassays for the diagnosis of Friedreich ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014; 85 (9): 994–1002.
4. Yandim C, Natisvili T, Festenstein R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *Journal of neurochemistry.* 2013; 126 (Suppl. 1): 21–42.
5. Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol.* 2006; 2 (10): 551–8.
6. Sandi C, Sandi M, Virmouni SA, Al-Mahdawi S, Pook MA. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Frontiers in Genetics.* 2014; (5): 165.
7. Soragni E, Miao W, Iudicello M, Jacoby D, De Mercanti S, Clerico M, et al. Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol.* 2014; 76 (4): 489–508.
8. Evans-Galea MV, Carrodus N, Rowley SM, Corben LA, Tai G, Saffery R, et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol.* 2012; 71 (4): 487–97.
9. Blair IA, Farmer J, Hersch S, Larkindale J, Lynch DR, Napierala J, et al. The current state of biomarker research for Friedreich's ataxia: a report from the 2018 FARA biomarker meeting. *Future Sci OA.* 2019; 5 (6): FSO398.
10. He Y, Ecker JR. Non-CG methylation in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015; (16): 55–77.
11. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes.* 2017; (8): e148.
12. Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu X, Graef J, Muffat J, et al. Rescue of Fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene. *Cell.* 2018; (172): 979–92.
13. Lau C-H, Suh Y. In vivo epigenome editing and transcriptional modulation using CRISPR technology. *Transgenic Res.* 2018; 27 (6): 489–509.
14. Gomez JA, Beitner U, Segal DJ. Live-animal epigenome editing: Convergence of novel techniques. *Trends Genet.* 2019; 35 (7): 527–41.
15. Sacca F, Puoro G, Antenora A, Marsili A, Denaro A, Piro R, et al. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: Implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS ONE.* 2011; 6 (3): e17627.
16. Plasterer HL, Deutsch EC, Belmonte M, Egan E, Lynch DR, Rusche JR. Development of frataxin gene expression measures for the evaluation of experimental treatment in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE.* 2013; 8 (5): e63958.
17. Hebinck J, Hardt C, Schols L, Vorgerd M, Briedigkeit L, Kahn CR, Ristow M. Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes.* 2000; 49 (9): 1604–7.
18. McCormick A, Farmer J, Perlman S, Delatycki M, Wilmot G, Matthews K, et al. Impact of diabetes in the Friedreich ataxia clinical outcome measures study. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2017; 4 (9): 622–31.
19. Abramycheva NYu, Fedotova EYu, Nuzhniy EP, Nikolaeva NS, Klyushnikov SA, Ershova MV, i dr. Эпигенетика болезни Фридрейкха: метилирование области экспансии (GAA)n-повторов гена FXN. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2019; 74 (2): 80–7.
20. Essebier A, Wolf PV, Cao MD, Carroll BJ, Balasubramanian S, Boden M. Statistical enrichment of epigenetic states around triplet repeats that can undergo expansions. *Front Neurosci.* 2016; (10): 92.
21. Greene E, Mahishi L, Entezam L, Kumari D, Usdin K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35 (10): 3383–90.
22. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, Acquaviva F, Giacchetti M, Filla 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): 808–12.
23. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lymperi S, Sandi C, 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): 735–46.
24. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics.* 2014; 9 (6): 823–28.

25. Fuso A, Lucarelli M. CpG and non-CpG methylation in the diet-epigenetics-neurodegeneration connection. *Curr Nutr Rep.* 2019; 8 (2): 74–82.
26. Li K, Singh A, Crooks DR, Dai X, Cong Z, Pan L, et al. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS ONE.* 2010; 5 (8): e12286.
27. Al-Mahdawi S, Sandi C, Pinto RM, Pook MA. Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus. *PLoS ONE.* 2013; 8 (9): e74956.