

Анализ ДНК-метилирования дифференциально экспрессирующихся генов в линиях фибробластов монозиготных близнецов, дискордантных по болезни Паркинсона

Рыболовлев И.Н., Власов И.Н., Алиева А.Х., Сломинский П.А., Шадрина М.И.

ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН
123182, г. Москва, площадь Академика Курчатова, д. 2

Болезнь Паркинсона (БП) является многофакторным гетерогенным нейродегенеративным заболеванием. Поскольку этиопатогенез БП недостаточно изучен, кроме поиска и анализа изменений на уровне ДНК, необходимо распространить фокус исследований на другие уровни: транскриптом и метилом. Изменения на уровне эпигенома можно исследовать у лиц с идентичной генетической конституцией, такой «моделью» являются дискордантные по этому заболеванию монозиготные близнецы. В исследовании приняло участие 3 пары фенотипически и генотипически монозиготных близнецов русского происхождения; в исследовании приняло участие 3 пары фенотипически и генотипически монозиготных близнецов русского происхождения. БП была уточнена у одного из каждой пары близнецов; длительность течения болезни у близнеца с БП составило по меньшей мере 7 лет; длительность течения болезни у близнеца с БП составила по меньшей мере 7 лет. Были проанализированы метиломы крови и отобраны точки варьирующегося метилирования. Нами было найдено 8 дифференциально экспрессирующихся генов, которые могут быть дифференциально метилированы. Были выявлены различия между здоровым близнецом и близнецом с БП по уровню метилирования ДНК для ряда этих генов в клеточных линиях фибробластов. Полученные нами данные могут указывать на участие процесса ДНК-метилирования в регуляции транскрипции кандидатных генов-участников патогенеза БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, ДНК-метилирование, бисульфитное секвенирование, монозиготные близнецы.

Для цитирования: Рыболовлев И.Н., Власов И.Н., Алиева А.Х., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Анализ ДНК-метилирования дифференциально экспрессирующихся генов в линиях фибробластов монозиготных близнецов, дискордантных по болезни Паркинсона. *Медицинская генетика* 2020; 19(12): 73-74.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.12.73-74

Автор для корреспонденции: Рыболовлев И.Н.; **e-mail:** i.rybolovlev@img.ras.ru

Финансирование. РФФИ, проект №18-315-20009.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020.

DNA-methylation analysis of differentially expressed genes in fibroblast cell-lines, derived from monozygotic twins discordant for Parkinson's disease

Rybolovlev I.N., Vlasov I.N., Alieva A.Kh., Slominskiy P.A., Shadrina M.I.

Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
Kurchatov square 2, Moscow, 123182, Russia

In recent years it has been convincingly demonstrated that genetic factors play an important role in progression of Parkinson's disease (PD). Since the etiology of PD has not been elucidated completely yet, it is crucial to shift focus of the research to the broader areas — to dive into investigations of methylome and transcriptome. Epigenetic regulation of gene expression may take part in pathogenesis of PD. Changes in epigenome can be conveniently investigated in case of individuals with almost identical genetic makeup, and monozygotic twins discordant for PD may be such "model". 3 pairs phenotypically and genotypically monozygous twins of Russian ancestry were enrolled in the study. PD was diagnosed in one of each pair. The disease duration was at least 7 years. Data on blood methylomes was analyzed. Points of variable methylation in blood methylomes were selected. With this approach, 8 differentially expressed genes were found that also may be differentially methylated. Changes in methylation level for some of these genes were found in monozygotic twins discordant for PD fibroblasts cell-lines between healthy and afflicted siblings. Acquired data might suggest participation of DNA-methylation in transcription regulation of PD pathogenesis-related candidate genes.

Keywords: Parkinson's disease, DNA-methylation, bisulfite sequencing, monozygotic twins.

For citation: Rybolovlev I.N., Vlasov I.N., Alieva A.Kh., Slominskiy P.A., Shadrina M.I. DNA-methylation analysis of differentially expressed genes in fibroblast cell-lines, derived from monozygotic twins discordant for Parkinson's disease. *Medical genetics* 2020; 19(12): 73-74. (In Rus.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.12.73-74

Corresponding author: Ivan Rybolovlev; **e-mail:** i.rybolovlev@img.ras.ru

Funding. Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-315-20009).

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest

Accepted: 20.05.2020.

Блезнь Паркинсона (БП) является многофакторным гетерогенным нейродегенеративным заболеванием. БП характеризуется преимущественной дегенерацией дофаминергических (ДА) нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга [1]. Манифестация симптомов БП поздняя, обусловлена гибелью более 50% ДА-нейронов и падением уровня дофамина в стриатуме на 70-80% [2]. В последние годы была убедительно показана важность роли генетических факторов в развитии БП. Частота семейных форм БП находится в пределах 10–20%, тогда как спорадические формы заболевания составляют большинство случаев [3]. Поскольку этиопатогенез БП недостаточно изучен, кроме поиска и анализа изменений на уровне ДНК, необходимо распространить фокус исследований на другие уровни: транскриптом и метилом.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов способна принимать участие в патогенезе БП, и с этих позиций были изучены некоторые гены [4]. Изменения на уровне эпигенома можно исследовать у лиц с идентичной генетической конституцией, такой «моделью» являются дискордантные по этому заболеванию монозиготные близнецы. Ранее были получены клеточные линии фибробластов кожи от 3 пар монозиготных близнецов, дискордантных по БП, и был проведен полнотранскриптомный анализ. В результате был получен набор генов с значимо различающимся ($\geq 1,5$ раза) уровнем экспрессии («дифференциально экспрессирующиеся гены» — ДЭГи). Изучение дифференциально метилирования ДЭГов крови в фибробластах дискордантных по БП близнецов может позволить уточнить, насколько соответствуют профили экспрессии в данных тканях, а также насколько они подвергаются эпигенетической регуляции через механизм ДНК-метилирования.

Материалы и методы

Для получения сведений о дифференциально метилированных генах использовалась база данных ENCODE, для обработки данных использовалась программная среда R. В исследовании приняло участие 3 пары фенотипически и генотипически монозиготных близнецов русского происхождения; БП была уточнена у одного из каждой пары близнецов в соответствии с Унифицированной шкалой оценки болезни Паркинсона Международного общества расстройств движений, а также со шкалой Хен и Яра; длительность течения болезни у близнеца с БП составила, по меньшей мере, 7 лет. От всех участников было получено письменное информированное согласие об использовании их биологического материала. Исследование было проведено в соответствии с Этическими принци-

пами медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта (Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации).

Экстракция ДНК производилась из суспендированных в TRI Reagent (Molecular Research Center, США) культур фибробластов по протоколу TRIzol Reagent (Invitrogen, США). Бисульфитная конверсия ДНК производилась с помощью набора Zymo Research EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, США). Были подобраны нечувствительные к метилированию системы праймеров. ПЦР-амплификация проводилась в 2 раунда согласно подходу т.н. полуложенной («semi-nested») ПЦР. Очистка ПЦР-продуктов из геля производилась набором CleanUp Standart Kit (Евроген, Россия). Очищенные ПЦР-продукты секвенировались по Сэнгеру. На полученных флюорограммах в программном обеспечении SnapGene (GLC Biotech LLC, США) анализировалась амплитуда пиков, соответствующих цитозину и тимину, в отдельных CpG-сайтах. Расчеты производились в программном обеспечении MS Excel 2016 (Microsoft, США).

Результаты

Были проанализированы метиломы крови. В метиломах были отобраны точки варьирующегося метилирования (уровень метилирования различается между разными образцами крови). Среди точек варьирующегося метилирования были отобраны группы точек так, чтобы 3 и более точки варьирующегося метилирования находились в области ≤ 500 п.н. Далее были отобраны те, которые лежат внутри или в менее чем 1000 п.н. от ДЭГов. Таким образом, нами было найдено 8 ДЭГов, которые могут быть дифференциально метилированы. Были выявлены изменения на уровне метилирования ДНК для ряда этих генов в клеточных линиях фибробластов 3 пар монозиготных близнецов, дискордантных по БП между здоровым близнецом и близнецом с БП. Полученные нами данные могут указывать на участие процесса ДНК-метилирования в регуляции транскрипции кандидатных генов-участников патогенеза БП.

Литература/References

1. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(R1): R48-59.
2. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015; 386(9996): 896-912.
3. Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord*. 2013; 28(1): 14-23.
4. Soldner F. et al. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression. *Nature*. 2016; 533(7601): 95-9.