

УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ДЛИНА ТЕЛОМЕР КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧАСОВ СТАРЕНИЯ

© А. Л. Рунов,^{1, 2, *} М. С. Вонский,^{1, 2} В. М. Михельсон¹

¹Институт цитологии РАН и

²Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии

им. Д. И. Менделеева, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: tsinakan@gmail.com

Старение — процесс, зависящий от множества как внешних, так и внутренних факторов. Биологический возраст человека определяет износ организма и риск развития возрастных заболеваний. В качестве показателя биологического возраста в настоящее время рассматривают различные характеристики, в том числе среднюю длину теломер в клетках и уровень метилирования ДНК. Мы предлагаем совместить два подхода для создания модели, позволяющей оценивать биологический возраст человека. Использование ПЦР в реальном времени для определения длины теломер и MS-HRM для анализа метилирования ДНК позволит оперативно определять интересующие нас параметры при применении минимального набора оборудования.

Ключевые слова: биологический возраст, метилирование ДНК, старение, теломеры.

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени, HRM — плавление ДНК с высоким разрешением, MALDI-TOF MS — специфичная к метилированию времяпролетная масс-спектрометрия, MS-HRM — специфичное к метилированию плавление ДНК с высоким разрешением, NGS — высокопроизводительное секвенирование.

Старение — процесс, сопровождающийся многочисленными изменениями биологической активности в живых клетках. Старость представляется комплексной проблемой, связанной с истощением организма. С одной стороны, ее можно рассматривать как болезнь, т. е. потенциально предполагать возможность излечения. С другой стороны, старость есть функциональный период жизни организма, проявляющийся неизбежно. Классическими симптомами старения у млекопитающих считаются искривление позвоночника, уменьшение фертильности, снижение слуха и зрения, анемия, ухудшение иммунитета, потеря веса и снижение когнитивных функций. Эти видимые физиологические изменения являются следствием множества молекулярно-биологических отклонений, проявляющихся на клеточном уровне. Долгие годы исследования старения были направлены на создание унифицированной теории, способной объяснить всё разнообразие возрастных биологических изменений и найти возможность обратить их вспять или хотя бы замедлить (Newgard, Sharpless, 2013).

Продолжительность жизни человека существенно зависит как от генетических факторов, заложенных изначально, так и от влияния внешней среды. Так как старение начинается с изменений на молекулярном и клеточном уровнях, приводя к видимым последствиям в виде заболеваний и смерти, важной задачей при изучении данного процесса является выявление глубинных причин его развития. До сих пор остается открытым вопрос о взаи-

мосвязи хронологического и биологического возраста. Несомненно, риск развития заболеваний преклонного возраста связан именно с изменениями на молекулярном уровне, т. е. с биологическим возрастом организма (Fontana et al., 2010).

Современные теории старения предлагают множество молекулярных механизмов, выступающих в качестве основных причин развития процесса (Salmon et al., 2010). К ним относят накопление ошибок в ДНК, связанное с ухудшением работы систем репарации, накопление маркеров апоптоза, появление большого количества неправильно свернутых белков, накопление свободных радикалов, разрушающих работу клеточных систем, и т. д. Однако представляемые результаты зачастую противоречивы, что, возможно, связано с отсутствием референтных материалов для стандартизации выполняемых измерений.

В качестве маркеров биологического возраста должны быть выбраны характеристики клетки, которые достоверно изменяются при увеличении хронологического возраста организма. Мы предлагаем использовать для оценки биологического возраста систему, включающую в себя комбинацию двух маркеров — длины теломер в клетках как генетического маркера, ответственного за целостность хромосом (Blackburn, 2000), и уровня метилирования ДНК как эпигенетического маркера, отражающего состояние процессов транскрипции и репарации (Walsh, Xu, 2006).

Длина теломер как маркер биологического возраста

До настоящего времени одним из ключевых факторов, определяющих продолжительность жизни, считается длина концевых участков хромосом — теломер. Данные участки несут важную функцию поддержания целостности генома, позволяя решить проблему недорепликации концевых участков хромосом. Помимо этого, теломеры ответственны за прикрепление генетического материала к ядерной оболочке, сегрегацию и стабилизацию поврежденных хромосом. Есть данные о влиянии теломер на экспрессию генов (Stadler et al., 2013).

В 1971 г. А. М. Оловников выдвинул теломерную теорию старения, позже подтвержденную его американскими коллегами, которая предполагает постоянное укорочение теломер, что ограничивает количество возможных делений клетки в отсутствие теломеразной активности (Olovnikov, 1973; Allsop et al., 1992). Истощения пролиферативной способности клеток некоторых тканей оказывается достаточно для возникновения ассоциированных со старением заболеваний (Herbig et al., 2006; Mikhelson, Gamaley, 2008). Тем не менее данные о взаимосвязи длины теломер и возраста противоречивы. Так, в группе долгожителей Северо-Западного региона России достоверное уменьшение средней длины теломер с возрастом показано лишь у людей старше 90 лет (Смирнова и др., 2012). Влияние различных стрессов на длину теломер и связь этих изменений с биологическим возрастом организма в настоящее время активно обсуждается (Puterman et al., 2010).

Нет сомнений в том, что длина теломер каким-то образом ассоциирована с возрастом и влиянием внешних факторов на организм в течение жизни. Тем самым кажется перспективным выбор средней длины теломер в качестве маркера биологического возраста ткани. Остается необходимым выбор методического подхода для определения длины теломер.

Традиционным методом измерения длины теломер в образцах ДНК человека является определение средней длины концевого фрагмента рестрикции (Allshire et al., 1989). К сожалению, данный метод требует относительно большого количества ДНК (0.5—5 мкг) и длительного времени (3—5 сут). Кроме того, неизбежны ошибки определения длины теломер, связанные с использованием различных рестриктаз, с их активностью, наличием полиморфизмов в субтеломерной области и возможных индивидуальных различий длины субтеломерных фрагментов, которые будут оказывать влияние на результат. Необходимо использовать метод, позволяющий достаточно быстро и без особых затрат исследовать большое количество образцов. Подобный метод определения относительной длины теломер был предложен в 2002 г. (Cawthon, 2002) и позднее модифицирован для определения их абсолютной длины (O'Callaghan et al., 2008).

Метод определения абсолютной длины теломер основан на использовании ПЦР-РВ. Среднюю длину теломерных последовательностей на клетку определяют за счет нормирования их числа в образце на число копий гена, встречающегося в геноме 1 раз. Амплификацию теломерной последовательности проводят с использованием специальных праймеров, не образующих димеров (Cawthon, 2002). Для определения абсолютной длины теломер в клетке используют синтетические контрольные образцы,

содержащие заданное количество теломерных повторов с известной концентрацией (O'Callaghan et al., 2008). Этот подход с успехом использован в ряде работ в области геронтологии. Так, с применением этого метода нами была подтверждена корреляция между длиной теломер и возрастом в группе долгожителей Северо-Западного региона (Смирнова и др., 2012).

Метилирование ДНК — эпигенетический фактор старения

В последние годы все большее внимание уделяют эпигенетической природе старения. Одной из важнейших эпигенетических модификаций, статус которой в организме достоверно меняется с течением жизни, является метилирование ДНК (Weidner et al., 2014). Под метилированием ДНК в живой клетке обычно понимают добавление метильной группы по пятому положению к цитозину в составе CpG-динуклеотидов. Метилирование ДНК играет важную роль во многих биологических процессах. Оно влияет на регуляцию экспрессии, принимает участие в геномном импринтинге и т. п. Особую роль метилирование ДНК играет в онтогенезе млекопитающих: выключение генов, участвующих в пренатальном развитии организма, происходит именно за счет метилирования соответствующих участков генома (Johnson et al., 2012). В норме в организме человека метилировано до 70 % CpG-динуклеотидов или 3—6 % всех цитозинов.

Способные к метилированию CpG-динуклеотиды распределены по геному не случайным образом, а формируют так называемые CpG-островки, которые группируются на 5'-конце многих генов, включающих в себя промоторную область, 5'-нетранслируемый участок мРНК и первый экзон. Метилирование CpG-динуклеотидов, находящихся в этих позициях, блокирует транскрипцию соответствующих генов, изменяет транскриптом и соответственно протеом клетки (Yang et al., 2006). Нарушения регуляции метилирования ДНК приводят к изменениям функционирования не только на клеточном уровне, но и на уровне всего организма. Изменения в профиле метилирования ДНК являются важными маркерами канцерогенеза и развития иных патологий. Описан случай, когда химиотерапия с применением гипометилирующих агентов (азациитидина и децитабина) привела к развитию миокардита (Vibault et al., 2011). Таким образом, системные нарушения регуляции метилирования ДНК в процессе старения могут приводить к развитию заболеваний, ассоциированных с возрастом (Johnson et al., 2012).

Недавние исследования метилирования ДНК в различных тканях показали, что изменения профилей метилирования связаны не только с развитием возрастных заболеваний, но и с хронологическим возрастом. Были предложены «эпигенетические часы» (Horvath, 2013), предназначенные для определения биологического возраста большинства типов тканей и органов человека. Предложенный подход позволяет сравнивать биологический возраст различных тканей одного организма, что существенно облегчает поиск взаимосвязи ускоренного старения и факторов, его вызывающих.

Данный метод определения биологического возраста основан на исследовании предложенных Хорватом (Horvath, 2013) 353 метилированных последовательностей

в составе геномной ДНК. При этом определяемый возраст довольно точно отражает состояние организма: он быстро увеличивается в процессе развития, после чего замедляется, и последующее старение происходит линейно. Определенный описываемым методом биологический возраст хорошо отражает хронологический возраст как для делящейся культуры клеток, так и для непродливающих клеток (например, при исследовании тканей мозга).

Существует достаточно много способов определения степени метилирования ДНК. Классическим методом анализа метилирования является высокоэффективная жидкостная хроматография (Ehrlich et al., 1982). В рамках этого подхода проводят полный гидролиз исследуемой ДНК для последующего ее разделения на фракции, соответствующие различным нуклеотидам, и определяют соотношение пиков метилированного и неметилированного цитозина. К сожалению, этот метод требует большого количества хорошо очищенной геномной ДНК и не подходит для рутинных анализов.

В большинстве подходов для определения уровня метилирования как этап используется бисульфитная конверсия. При обработке бисульфитом натрия (3.1 М) в присутствии гидрохинона (0.5 мМ) неметилированные цитозины конвертируются в урацилы, тогда как метилированные остаются неизменными, что приводит к различиям в последовательности метилированной и неметилированной форм ДНК (Clark et al., 1994). Это позволяет проводить дальнейшую амплификацию для обогащения препарата геномной ДНК копиями амплифицированной последовательности. Таким образом, анализ метилирования проводится не на уровне всего генома, а лишь для специфических фрагментов ДНК. При амплификации урацилы замещаются на тимины, внося изменения в последовательность нуклеотидов в ампликонах. При этом для проведения ПЦР в зависимости от последующего метода анализа используют как чувствительные к метилированию праймеры (MS-PCR), так и неселективные праймеры, обеспечивающие амплификацию после конверсии как метилированного, так и неметилированного вариантов последовательности.

Для анализа полученных ампликонов могут быть использованы такие методы, как высокопроизводительное секвенирование (NGS), времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) и др. При использовании NGS сравнивают непосредственно нуклеотидные последовательности в составе CpG-сайтов интересующих фрагментов ДНК. При проведении MALDI-TOF MS продукты амплификации *in vitro* транскрибируют, после чего полученные РНК полностью гидролизуют рибонуклеазой А и анализируют с помощью масс-спектрометра. К сожалению, эти методы достаточно дороги и требуют много времени (Shen, Waterland, 2007), а высокая стоимость оборудования делает его недоступным для многих лабораторий.

Для большинства практических приложений информация об уровне метилирования, т. е. о процентном соотношении метилированных CpG участков к общему их количеству на определенном участке ДНК, оказывается столь же полезной, как и знание конкретного профиля метилирования. Для определения соотношения метилированных и неметилированных цитозина в CpG-динуклеотидах в составе специфической последовательности может быть использован анализ профилей плавления продуктов ПЦР. Этот подход основан на плавлении

ДНК с высоким разрешением (HRM) после амплификации мишени, подвергнутой бисульфитной конверсии (MS-HRM). Кривая плавления ДНК меняется в зависимости от нуклеотидной последовательности ампликона, его GC-состава, что и лежит в основе метода MS-HRM (Wojdacz, Dobrovic, 2007).

При анализе ДНК методом HRM продукты ПЦР в комплексе с интеркалирующим флуоресцентным красителем (SYBR Green I, LCGreen, SYTO9, Eva-Green и др.) медленно нагревают (0.1—0.2 °C/c). При повышении температуры двухнитевая ДНК денатурирует (плавится), высвобождая краситель, что ведет к уменьшению флуоресцентного сигнала. Температура, при которой плавится двухнитевая ДНК, определяется нуклеотидной последовательностью фрагмента, его длиной и соотношением GC/AT.

Бисульфитная обработка приводит к конверсии неметилированных цитозина в тимин в продуктах ПЦР, вследствие чего содержание цитозина в ампликоне снижается в обратной зависимости от уровня метилирования CpG-сайтов. Кривая плавления изменяется даже при одонуклеотидной замене, что позволяет определить минимальные изменения в профиле метилирования (Liew et al., 2004).

Аналитические возможности методов количественного определения уровня метилирования были исследованы в межлабораторных сличениях, проводимых международной рабочей группой по биоанализу Консультативного комитета по количествам вещества (аналитическая химия) Международного комитета по мерам и весам (BAWG CCQM CIPM). Использованный нами при проведении сличений CCQM P94.1 и CCQM P94.2 метод MS-HRM показал хорошие аналитические параметры, сопоставимые с более дорогостоящими и времязатратными методами анализа метилирования ДНК.

Взаимосвязь между метилированием ДНК и длиной теломер

Взаимосвязь между общим метилированием различных областей генома, длиной теломер и биологическим возрастом до настоящего времени мало изучена. На частном примере показано, что метилирование некоторых участков генома связано с длиной теломер в клетках (Buxton et al., 2014). В этой работе были исследованы препараты лейкоцитарной ДНК, полученной от пациентов различного возраста. Была показана взаимосвязь между длиной теломерных последовательностей и метилированием 65 промоторных участков генома. При этом была обнаружена как прямая взаимосвязь (гипометилирование соответствует более коротким теломерам), так и обратная. Четыре области генома, метилирование которых оказалось связано с длиной теломер, входят в список маркерных последовательностей, используемых Хорватом (Horvath, 2013) при построении своей модели биологических часов старения.

Необходимо выяснить, что является предпосылкой для старения организма в целом, а что — лишь следствием накопления «клеточной усталости» со временем. Корреляция между длиной теломер и степенью метилирования может быть не показательной: оба эти фактора однозначно связаны со старением, но вопрос о наличии между ними взаимосвязи в той или иной форме открыт.

Биологические часы

Модель определения биологического возраста, построенная с использованием двух количественных показателей — длины теломер и уровня метилирования ДНК — представляется более перспективной, чем модели, основанные на использовании только одного из параметров. Так как укорочение теломер и изменение уровня метилирования ДНК в клетке связаны с различными процессами, комбинация двух параметров позволит получить более полную картину, характеризующую биологический возраст. Двухпараметрическая модель биологического старения может быть использована для создания количественного критерия, позволяющего оценивать риски развития заболеваний старшего возраста.

Предлагаемая комбинация методических подходов для определения длины теломер и уровня метилирования маркерных участков генома упрощает проведение измерений: исследование метилирования методом MS-HRM позволяет использовать ту же приборную базу, что необходима для определения длины теломер методом ПЦР-РВ. Таким образом, открывается возможность для проведения популяционных исследований с применением обоих методов анализа, результаты которых позволят оценить изменения длины теломер и уровня метилирования ДНК в зависимости от биологического возраста и рассчитать вклад каждого из этих показателей в двухпараметрическую модель биологических часов старения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00943).

Список литературы

- Смирнова Т. Ю., Рунов А. Л., Вонский М. С., Спивак Д. Л., Захарчук А. Г., Михельсон В. М., Спивак И. М. 2012. Длина теломер в группе долгожителей северо-западного региона России. Цитология. 54 (5) : 439—445. (Smirnova T. Yu., Runov A. L., Vonsky M. S., Spivak D. L., Zakharchuk A. G., Mikhelson V. M., Spivak I. M. 2012. Telomere length in a population of long-lived people of the northwestern region of Russia. Tsitologiya. 54 (5) : 439—445.)
- Allshire R. C., Dempster M., Hastie N. D. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. Nucleic Acids Res. 17 : 4611—4627.
- Allsop R. C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglay E. V., Futcher A. B., Greider C. W., Harley C. B. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89 : 10 114—10 118.
- Bibault J., Cambier N., Lemahieu J.-M., Quesnel B., Auffret M., Rose C. 2011. Acute myocarditis induced by hypomethylating agents. J. Clin. Oncol. 33 : 4656—4657.
- Blackburn E. H. 2000. Telomere states and cell fates. Nature. 408 : 53—56.
- Buxton J. L., Suderman M., Pappas J. J., Borghol N., McArdle W., Blakemore A. I., Hertzman C., Power C., Szyf M., Pembrey M. 2014. Human leukocyte telomere length is associated with DNA methylation levels in multiple subtelomeric and imprinted loci. Sci. Rep. 4 : 4954. DOI : 10.1038/srep04954.
- Cawthon R. M. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic. Acids Res. 30 : e47. DOI : 10.1093/nar/30.10.e47
- Clark S. J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res. 22 : 2990—2997.
- Ehrlich M., Gama-Sosa M. A., Huang L. H., Midgett R. M., Kuo K. C., McCune R. A., Gehrke C. 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res. 10 : 2709—2721.
- Fontana L., Partridge L., Longo V. D. 2010. Extending healthy life span — from yeast to humans. Science. 328 : 321—326.
- Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J. M. 2006. Cellular senescence in aging primates. Science. 311 : 1257.
- Horvath S. 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol. 14 : R115. DOI : 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
- Johnson A. A., Akman K., Calimport S. R. G., Wuttke D., Stolzinger A., de Magalhaes J. P. 2012. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-Related disease. Rejuvenation Res. 15 : 483—494.
- Liew M., Pryor R., Palais R., Meadows C., Erali M., Lyon E., Wittwer C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin. Chem. 50 : 1156—1164.
- Mikhelson V. M., Gamaley I. A. 2008. Telomere shortening is a sole mechanism of aging. Open Longevity J. 2 : 23—28.
- Newgard C. B., Sharpless N. E. 2013. Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. J. Clin. Invest. 123 : 946—950.
- O'Callaghan N. J., Dhillon V. S., Thomas P., Fenech M. 2008. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. Biotechniques. 44 : 807—809.
- Olovnikov A. M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J. Theor. Biol. 4 : 181—190.
- Puterman E., Lin J., Blackburn E., O'Donovan A., Adler N., Epel E. 2010. The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length. Public Library Sci. 5 : e10837. DOI : 10.1371/journal.pone.0010837.
- Salmon A. B., Richardson A., Pérez V. I. 2010. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? Free Rad. Biol. Med. 48 : 642—655.
- Shen L., Waterland R. A. 2007. Methods of DNA methylation analysis. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 10 : 576—581.
- Stadler G., Rahimov F., King O. D., Chen J. C. J., Robin J. D., Wagner K. R., Shay J. W., Emerson C. P. Jr., Wright W. E. 2013. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulo-humeral muscular dystrophy. Nature Struct. Mol. Biol. 20 : 671—678.
- Walsh C. P., Xu G. L. 2006. Cytosine methylation and DNA repair. Curr. Top Microbiol. Immunol. 301 : 283—315.
- Weidner C. I., Lin Q., Koch C. M., Eisele L., Beier F., Ziegler P., Bauerschlag D. O., Jockel K. H., Erbel R., Muhleisen T. W., Zenke M., Brummendorf T. H., Wagner W. 2014. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. Gen. Biol. 15 : R24. DOI : 10.1186/gb-2014-15-2-r24.
- Wojdacz T. K., Dobrovic A. 2007. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. Nucleic Acids Res. 35 : e41. DOI : 10.1093/nar/gkm013.
- Yang A. S., Doshi K. D., Choi S. W., Mason J. B., Mannari R. K., Gharybian V., Luna R., Rashid A., Shen L., Estecio M. R., Kantarjian H. M., Garcia-Manero G., Issa J. P. 2006. DNA methylation changes after 5-aza-20-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. Cancer Res. 66 : 5495—5503.

DNA METHYLATION LEVEL AND TELOMERE LENGTH AS A BASIS
FOR THE BIOLOGICAL AGING CLOCK MODEL CONSTRUCTION*A. L. Runov*^{1,2}, * *M. S. Vonsky*^{1,2}, *V. M. Mikhelson*¹¹ Institute of Cytology RAS and² D. I. Mendeleev Institute of Metrology, St. Petersburg;* e-mail: tsinakan@gmail.com

Aging is a process that depends on a variety of both external and internal factors. The biological age of a person determines body deterioration and the risk of age-related diseases. Currently, as indicators of biological age are considered different characteristics including average length of telomeres in cells and the level DNA methylation. We propose to combine the two approaches to create a model to assess the biological age of the person. Application of qPCR to determine the length of telomeres and MS-HRM for analysis of DNA methylation will help us to determine the parameters of interest quickly when using a minimum set of equipment.

Key words: aging, biological clock, DNA methylation, telomere.
