

Роль метилирования ДНК в нарушении костного метаболизма

Б.И. Ялаев¹, А.В. Тюрин², Р.Я. Миргалиева³, Р.И. Хусаинова^{1, 3}

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, кафедра госпитальной терапии, Уфа, Россия

³ Республиканский медико-генетический центр, Уфа, Россия

e-mail: yalaev.bulat@yandex.ru

Остеопороз (ОП) является одним из многофакторных заболеваний и развивается на основе взаимодействия генетической компоненты с окружающей средой. Однако, несмотря на существенные достижения в понимании молекулярно-генетических аспектов этого заболевания и развитие методов диагностики, для остеопороза не регламентированы эпигенетические маркеры, прогнозирующие риск заболевания на доклинической стадии и позволяющие предсказать его течение и тяжесть с целью проведения профилактических мероприятий для снижения риска переломов. Расширение знаний в области биологии костной ткани, особенно в направлении генетики остеопороза и остеоиммунологии, позволило показать, что остеопороз возникает не только на основе гормональных или механических нарушений, а представляет собой сложный процесс деструкции костной ткани многофакториальной природы. Уменьшение костной массы, нарушение минерализации матрикса и изменение микроархитектуры кости могут иметь разные патогенетические схемы развития, и, кроме того, все еще остаются неизвестные звенья патогенеза ОП. Одним из таких звеньев, вероятно, является ДНК-метилирование, которое представляет собой механизм эпигенетической регуляции экспрессии генов. Ряд данных указывает на то, что этот механизм, наряду с регуляторными микроРНК и посттрансляционными модификациями, вносит существенный вклад в центральные процессы костного ремоделирования и роста костной ткани. Несмотря на это, результаты современных исследований значительно различаются, профиль метилирования ДНК у пациентов с остеопорозом не всегда воспроизводится в полногеномных исследованиях, до сих пор не определены биомаркеры первичного ОП на основе эпигенетических aberrаций, воспроизводимые в различных популяциях. Поэтому актуальной задачей является выяснение значимости накопленных данных. Цель данного обзора – обобщение и систематизация данных о роли ДНК-метилирования в костном метаболизме в норме и патологии, формировании остеопороза, оценка достижений и тенденций в этой области исследований и технологий изучения ДНК-метилирования.

Ключевые слова: остеопороз; эпигенетика; метилирование ДНК; минеральная плотность костной ткани; переломы.

Для цитирования: Ялаев Б.И., Тюрин А.В., Миргалиева Р.Я., Хусаинова Р.И. Роль метилирования ДНК в нарушении костного метаболизма. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):67-74. DOI 10.18699/VJ19.463

The role of DNA methylation in the disorders of bone metabolism

B.I. Yalaev¹, A.V. Tyurin², R.Y. Mirgalieva³, R.I. Khusainova^{1, 3}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, Ufa, Russia

² Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

³ Republican Medical-Genetic Center, Ufa, Russia

e-mail: yalaev.bulat@yandex.ru

Osteoporosis is one of multifactorial diseases, it develops from interactions between the genetic component and the environment. However, the universal epigenetic markers of osteoporosis are not yet defined. Finding the risk factors will predict the risk of osteoporosis at the preclinical stage, help define the course and severity of the disease, and develop preventive measures based on them to reduce the risk of fractures. Expanding knowledge in the field of bone biology, especially in the genetics of osteoporosis and osteoimmunology, showed that osteoporosis is a disease that occurs not only due to hormonal or mechanical disorders, but also as a clinically and genetically heterogeneous disease, and there are still unknown pathogenetic links in its structure. Decreases in bone mass and matrix mineralization as well as changes in bone microarchitecture can have different pathogenetic patterns of development and, moreover, there are unknown links of the pathogenesis of osteoporosis. It is possible that DNA methylation is one of these links and a mechanism for epigenetic regulation of gene expression. Evidence exists that this mechanism alongside regulatory miRNAs and post-translational modifications makes a significant contribution to the central processes of bone remodeling; however, the results of various studies vary greatly, and, therefore, there is a need to understand the significance of the accumulated data and to make them consistent.

The purpose of this review is to compile and systematize data on the role of DNA methylation in bone metabolism in normal and pathological conditions, in the formation of osteoporosis, and to assess achievements and trends in this field of research and technologies for studying DNA methylation.

Key words: osteoporosis; epigenetics; DNA methylation; bone mineral density; fractures.

For citation: Yalaev B.I., Tyurin A.V., Mirgalieva R.Y., Khusainova R.I. The role of DNA methylation in the disorders of bone metabolism. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1): 67-74. DOI 10.18699/VJ19.463 (in Russian)

Введение

Метилирование ДНК – один из ключевых механизмов регуляции транскрипционной активности генов, эмбрионального развития, структуры хроматина, инактивации X-хромосомы, хромосомной стабильности и геномного импринтинга. Представляет собой форму ковалентной модификации ДНК без изменения ее последовательности, при которой происходит перенос метильной группы (CH₃) с S-аденозилметионина в позицию 5 пиримидинового кольца цитозина. Метилирование промоторных регионов генов часто приводит к подавлению транскрипции, затрудняя связывание транскрипционных факторов, либо к их мобилизации на CpG-сайтах. Подавление процессов транскрипции и трансляции приводит к конденсации хроматина и вызывает затухание экспрессии гена в определенном участке генома (Филина и др., 2012). Помимо всего прочего, специфика метилирования ДНК тесным образом связана с процессами посттрансляционных модификаций гистонов, нуклеосомным позиционированием и неравномерным распределением генов. Ряд данных указывает на то, что конфигурация нуклеосом и их позиционирование частично регулируются через метилирование ДНК, которое способствует процессам компактизации хроматина (Reppe et al., 2015).

Процесс метилирования ДНК играет важную роль в возраст-ассоциированных заболеваниях, таких как остеопороз (ОП) – метаболическое заболевание костной ткани, возникающее в результате нарушения баланса метаболических процессов и ремоделирования костной ткани (Tarantino et al., 2017). Как показывает статистика, заболевание приводит к более чем 9 миллионам переломов в год, каждая третья женщина и каждый пятый мужчина старше 50 лет подвержены резкому увеличению риска переломов с высокой долей смертности и инвалидизации (Sozen et al., 2017). Как следствие, остеопороз считается одной из наиболее острых проблем в сфере здравоохранения и представляет серьезный социально-экономический вызов современному обществу.

В клинической практике для лечения ОП применяют фармакологические препараты, направленные либо на ингибирование процесса резорбции (антирезорбтивные препараты), либо на стимуляцию костноформирующих процессов (анаболические препараты), однако вместе с ними часто назначают витаминные комплексы с кальцием и витамином D для поддержания или увеличения прочности костей. В первом случае наиболее распространенными медикаментами являются бифосфанаты, а для стимуляции формирования костной ткани применяют препараты на основе производных фтора и др. (Tu et al., 2018). Однако, несмотря на наличие широкого спектра препаратов и методов современной диагностики, частота забо-

левания только увеличивается, и в большинстве случаев переломы наступают больных ОП до обращения в клинику, что ведет к высокой степени инвалидизации. По этой причине необходимы не только поиск универсальных биомаркеров высокого риска, но и разработка методов терапии и, если учитывать гетерогенную природу остеопороза и низкую прогностическую значимость отдельных генов, поиск и исследование взаимосвязи одновременно большого числа генов, вовлеченных в костный метаболизм в связке с их эпигенетическими регуляторами. Это позволило бы идентифицировать паттерн генетических локусов, на которые можно влиять через эпигенетические механизмы, и разработать алгоритм ранней диагностики первичного остеопороза и его таргетной терапии.

Роль эпигенетических факторов в гомеостазе костной ткани

Наиболее ранние исследования эпигенетических факторов касательно костной ткани начались с исследований ДНК-метилирования кандидатных генов, ацетилирования гистонов и изучения профилей микроРНК, для которых уже была показана высокая роль в регуляции костного ремоделирования и, частично, в патогенезе остеопороза (Гребенникова и др., 2015).

На данный момент науке известны несколько механизмов посттрансляционных модификаций: ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, сумоилирование, поли(ADP)(АДФ)-рибозилирование, нековалентная изомеризация пролина и дезаминирование. Результатом активности этих модификаторов является изменение структуры хроматина, при котором определенные участки либо деконденсируются, активизируя транскрипцию ДНК, либо конденсируются, значительно снижая транскрипционную активность или полностью блокируя ее. Паттерн этих модификаций образует так называемый гистоновый код, который формирует общую картину транскрипционной активности генома без изменения ее последовательности (Rojas et al., 2015).

Учитывая сложный состав костной ткани и разнообразие протекающих в ней процессов, начиная от опорной функции и заканчивая функцией резервирования ионов, таких как кальций и фосфат, очевидно, что эта ткань должна обеспечивать быстрые реакции на органические изменения и внешние стимулы, и эпигенетические факторы, вероятно, играют не последнюю роль в этой системе. Эпигенетические модификации, в свою очередь, обратимы и чувствительны к эндогенным и экзогенным стимулирующим сигналам, что оказывает влияние как на физиологические, так и на патофизиологические процессы в организме. По этой причине изменения одного или нескольких эпигенетических механизмов могут быть

связаны, в том числе, и с нарушением регуляции гомеостаза кости с последующим изменением регуляции формирования и резорбции костной ткани и процессами ее минерализации (Marini et al., 2016).

Несмотря на то что роль различных эпигенетических механизмов в патогенезе ОП обычно исследуют по отдельности, не исключен и разный уровень их синергизма. Учитывая причастность регуляторных микроРНК или посттрансляционных модификаций к большому количеству биологических процессов, очевидно, что взаимовлияния этих факторов и их изменения с ДНК-метилированием могут играть значительную роль в формировании остеопороза (Moskalev, Vaiserman, 2018).

К настоящему времени уже достоверно известно о существовании нескольких эпигенетических модификаторов, участвующих в регуляции костной ткани. Так, например, установили, что деацетилазы гистонов (HDACs), которые отвечают за регуляцию статуса ацетилирования гистонов, играют огромную роль в поддержании правильного развития скелета, пика его костной массы, накопления и поддержания костной массы в течение жизни и при старении (Marini et al., 2016).

Помимо роли ацетилирования гистонов в костном метаболизме, достаточно хорошо изучена система гистоновой метилирования – тонко настроенной антагонистической системы активности метилтрансферазы лизин гистонов и лизин-деметилазы гистонов. Речь идет о различиях модуляции дифференциации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в остеогенный или адипогенный путь, так как обнаружено, что метилтрансферазы SETDB1 и EZH2 ингибируют остеогенную дифференцировку МСК через подавление *RUNX2*, транскрипционных факторов TCF7 и Osterix (*OSX*) и способствуют тем самым адипогенезу МСК. И, напротив, метилтрансферазы KDM4B, KDM6A и KDM6B усиливают остеогенез, индуцируя транскрипцию *RUNX2*, *BMP*, *OCN*, *DLX5* и связанных HOX-генов. Однако, несмотря на важность этих процессов в формировании костной ткани, большее внимание исследователей привлекает метилирование ДНК (Ghayor, Weber, 2016).

Роль ДНК-метилирования в дифференцировке костных клеток и ремоделировании костной ткани

Известно, что паттерны ДНК-метилирования могут различаться как в специализированных клетках (остеобластах, остеокластах), так и в прогениторных (стволовых клетках, детерминированных на дифференцировку в определенный тип клеток). В то же время данных об изменении уровня метилирования в тех или иных генах, вовлеченных в формирование костной ткани или патогенез остеопороза, все еще недостаточно, чтобы сформировать полную картину о роли ДНК-метилирования в гомеостазе костной ткани (Moore et al., 2013).

Установлено, что в остеобластах метилирование ДНК параллельно регулирует экспрессию нескольких генов, участвующих в функциях костных клеток (Repre et al., 2015). В частности, обнаружено, что ген щелочной фосфатазы (*ALPL*) (Cho et al., 2014), склеростина (*SOST*), *OSX* (Osterix), *DLX5* (гомеобоксный ген) (Lee et al., 2006; Zhang D. et al., 2015), эстрогенового рецептора альфа

(*ESR1*), остеопонтина (*OPN*), лиганда RANK *RANKL*, остеопротегерина (*OPG*), секретированного ферментированного белка 1 (*SFRP1*) и лептина (*LEP*) регулируются ДНК-метилированием. Метилирование промотора *ALPL* связано обратной зависимостью с транскрипцией и экспрессией ряда генов и дифференциально регулируется в разных функциональных группах клеток костной ткани. Так, в остеобластах ген *ALPL* гипометилирован, у остеоцитов метилирование повышено, а у остеокластов выражено гиперметилирование этого гена (Repre et al., 2015). Склеростин, кодируемый геном *SOST*, преимущественно экспрессируется в остеоцитах (Li et al., 2005). Первоначально этот белок считался антагонистом неклассического костного морфогенетического белка (BMP). Позднее склеростин был идентифицирован как белок, взаимодействующий с рецепторами LRP5/6 и способствующий ингибированию сигнального пути Wnt, что приводит к уменьшению образования кости. Идентифицированные CpG-сайты в гене *SOST* расположены либо близко к кодирующей последовательности, либо в предполагаемых участках связывания с транскрипционными факторами. Выявлено, что метилирование ДНК может эффективно препятствовать связыванию транскрипционных факторов, приводя к ингибированию экспрессии гена *SOST*, что коррелировало с вариабельностью минеральной плотности костной ткани (МПКТ) (Li et al., 2005). Было обнаружено, что у женщин, вне зависимости от возраста, уровень мРНК гена *SOST* и содержание сывороточного склеростина ассоциированы с возрастом, индексом массы тела и МПКТ бедренной кости ($p < 0.0005$). Высказано предположение, что у женщин с остеопорозом, вероятно, включается гомеостатический механизм, уменьшающий потерю костной массы посредством усиления процессов формирования костной ткани через Wnt-сигнальную систему (Delgado-Calle et al., 2012).

Одним из малоизученных, но представляющих интерес с точки зрения ремоделирования костной ткани является тирозин-киназный рецептор ROR2. Это специфический рецептор или корецептор для WNT5A (член семейства структурно связанных генов, которые кодируют секретлируемые сигнальные липид-модифицированные гликопротеины). Промотор гена этого рецептора значительно деметилирован в ходе индукции дифференцировки прогениторных клеток костной ткани в остеобласты. Было показано, что в прогениторных клетках, которые дифференцируются в остеобласты, в отличие от зрелых остеоцитов, экспрессия гена *ROR2* увеличена в 300 раз. В настоящий момент роль и функции этого гена, а также aberrации его метилирования в костной ткани все еще остаются неизученными. Таким образом, ДНК-метилирование напрямую связано с работой данного гена, и необходимо оценить его вклад в различные звенья патогенеза костной ткани (Tarfiel et al., 2011).

В работе (Cho et al., 2014) показано, что один из членов семейства белков WNT – Wnt3a – способен активировать экспрессию двух генов: *BMP2* (морфогенетический белок 2-го типа) и *ALPL* (щелочная фосфатаза). Эти белки играют большую роль в дифференцировке остеобластов. Авторы установили, что в клетках неостеогенного пути промоторные регионы генов *BMP2* и *ALPL* высокомети-

лированы. Раскрытие механизмов этой системы может быть применено в терапии остеопороза, например, с использованием 5AzadC (азацитидин, представляет собой аналог пиримидинового нуклеозида цитидина, ключевого компонента РНК и ДНК) для деметилирования промоторных регионов генов, контролирующих или усиливающих остеогенез (Cho et al., 2014).

Похожие результаты были описаны при исследовании метилирования промоторных регионов гена транскрипционного фактора *DLX5* (гомеобокс-содержащий ген 5) и гена *OSX*, или Osterix (кодирует остеобласт-специфический транскрипционный фактор), которые были деметилированы в остеогенной линии клеток. Использование деметилирующего агента 5AzadC приводило к увеличению экспрессии этих генов. Такие же результаты получены при исследовании мультипотентных клеток пульпы зубов. После обработки культуры данных клеток 5AzadC в них повысилась активность щелочной фосфатазы и увеличилась экспрессия генов *DLX5*, *OSX* и *RUNX2*. Эксперимент с использованием мезенхимальных стволовых клеток и деметилирующих агентов, подобных 5-азацитидину, тоже приводил к усилению остеогенной дифференцировки (Zhang D. et al., 2015).

Таким образом, ДНК-метилирование имеет высокий уровень вовлеченности в процессы костного ремоделирования через систему регуляторных генов и тесно связано с генами-регуляторами роста и дифференцировки остеобластов и остеокластов, а также усилителями и ингибиторами сигнальных путей, координирующих процесс костного ремоделирования.

Современные достижения в изучении метилирования ДНК при остеопорозе

Технологии секвенирования нового поколения позволяют системно исследовать влияние эпигенетических механизмов на регуляцию экспрессии генов. В частности, они позволяют определять профиль метилирования ДНК и общий профиль РНК одних и тех же образцов, благодаря чему можно с большой точностью определить эффекты метилирования ДНК (или микроРНК) на экспрессию одновременно большого количества генов.

В исследовании (Zhang J.G. et al., 2015) для выявления эпигенетических изменений у пациентов с остеопорозом провели измерение уровня транскриптомы и микроРНК на микрочипах, а также исследование метилома в норме и патологии (с низким уровнем МПКТ или наличием остеопоротических переломов). Сопоставив данные, авторы отобрали наиболее значимые пути и взаимодействующие гены, которые были ассоциированы с остеопорозом или вариабельностью МПКТ, после чего была построена сеть из 12 взаимодействующих генов и 11 микроРНК. Как оказалось, некоторые гены из этого модуля, такие как *PIK3R5* (регуляторная субъединица 5 фосфанозитида 3-киназы), *STAT5A* (сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 5A) и *AKT1* (протеинкиназа B), ассоциированы с вариабельностью МПКТ и взаимосвязаны с локусами количественных признаков МПКТ. Интересно, что экспрессия этих генов закономерно снижалась с повышением уровня метилирования при переходе от группы с высоким

уровнем МПКТ к группе с низким уровнем (Zhang J.G. et al., 2015).

Командой J.A. Morris et al. (2017) было проведено крупномасштабное EWAS исследование (исследование ассоциаций эпигенома) с измерением уровня метилирования до 473 882 CpG-сайтов и его сравнением с уровнем МПКТ в нижней части шейки бедра и поясничного отдела позвоночника с выборкой объемом до 4614 человек из Европы и Северной Америки. Однако исследователи не обнаружили значимого изменения метилирования, достоверно связанного с уровнем МПКТ (Morris et al., 2017).

Примерно в это же время ассоциации были получены группой Cheishvili et al. (2018). Основной целью их исследования было найти такие участки в геноме, метилирование которых наиболее значительно ассоциировано с первичным остеопорозом у женщин и которые могли бы быть потенциальными биомаркерами раннего периода этого заболевания (Cheishvili et al., 2018). Первичный анализ генома у нормальных женщин и у женщин с ранним остеопорозом позволил выявить 4454 дифференциально метилированных CpG-сайта, а анализ метилирования ДНК двенадцати участников с прогрессирующим остеопорозом при сравнении с контрольной группой выявил 13 293 дифференциально метилированных CpG-сайта.

Вскоре после анализа данных исследователями были выделены 13 CpG-сайтов, уровень метилирования которых статистически наиболее надежно коррелировал с остеопорозом (Cheishvili et al., 2018). Некоторые из них оказались локализованы в следующих генах: *ZNF267* (белок цинкового пальца 267), *ABLIM2* (актин-связывающий белок 2-го типа), *RHOJ* (член семейства белков Ras, гомолог J), *CDKL5* (циклинзависимая киназа 5-го типа), *PDCD1* (белок запрограммированной клеточной смерти 1-го типа). *ZNF267* участвует в регуляции транскрипции многих генов и оказался гипометилирован у пациентов с остеопорозом, *ABLIM2* действует как скаффолд-белок, стимулирующий транскрипционную активность *ABRA* (кодирует актин-связывающий белок), *RHOJ* – член семейства белков RHO, участвует в процессе роста и выживания клеток PI3K/AKT/mTOR пути, его белок связан также с ангиогенезом. *CDKL5*, кодирующий циклинзависимую киназу, был гиперметилирован у всех исследуемых с остеопорозом. Другим гиперметилированным геном оказался *PDCD1*, участвующий в регуляции активности T- и B-клеток и действующий в роли индуктора клеточной смерти. Исследователи установили, что *CDKL5*, идентифицированный в данном EWAS-анализе, может вызывать посттрансляционные модификации MeCP2 – метил-CpG-связывающий белок 2, который играет одну из главных ролей при развитии синдрома Ретта. Кроме того, известно, что *RHOJ* имеет свойство понижать активность белков миозина IX класса Myo9a и Myo9b, и это представляется интересным, так как было показано, что Myo9b – ключевой регулятор поддержания функции остеокластов и отключение этого белка увеличивает активность белков Rho (Rho ГТФазы – семейство клеточных сигнальных белков, «малых» G-белков). Важно также и то, что опосредованный белками Rho путь сигналинга имеет значительное влияние на дифференциацию остеокластов. Что касается

гена *ZNF267*, который у женщин с остеопорозом гипометилирован, то предполагается, что он может блокировать активность матриксной металлопротеиназы 10 (MMP-10), участвующей в дифференцировке миобластов в остеобласты, и поскольку *ZNF267* негативно регулирует этот фермент, вероятно, он играет роль в снижении активности формирования костей. Было показано, что белок PDCD1 взаимодействует с различными компонентами иммунной системы и играет ключевую роль в периферической иммунной толерантности. Известно, что дефицит этого белка снижает остеокластогенез, препятствуя таким образом развитию остеопоротического фенотипа (Cheishvili et al., 2018).

Несмотря на данные глобальных исследований, все еще не обнаруживается четкой взаимосвязи между определенными паттернами метилирования и остеопорозом. Поэтому все чаще возникают проекты, направленные на исследование паттернов ДНК-метилирования непосредственно в костном биопсийном материале. Попытка охарактеризовать паттерны метилирования генов, которые значительно ассоциированы с вариабельностью уровня МПКТ у 84 постменопаузальных женщин, была предпринята в работе (Reppe et al., 2017). Проанализировано более 480 тыс. метилированных CpG-сайтов, для исследования отобрано 100 генов, которые непосредственно вовлечены в метаболизм МПКТ. Выяснилось, что активность генов *MEPE*, *SOST*, *WIF1* и *DKK1* – метаболических ингибиторов костной ткани, сильно коррелировала с метилированием в большом количестве CpG-сайтов в различных генах. Авторы идентифицировали 64 метилированных CpG-сайта, уровень которых достоверно различался у остеопоротических пациентов и у контрольной группы. Наиболее высокий уровень значимости был обнаружен для гена *RAD23* – гомолога В (cg14919562), пероксисомального фактора биогенеза 14 (cg14170597), тенаскина ХВ (cg03822479, *TNXB*), переносчика растворенных веществ 25 (митохондриальный переносчик железа), члена типа 37 (cg26617611, *SLC25A37*) и кислотного кластерного сортирующего белка 2 фосфофурина (cg08105005, *PACS2*). Отмечена редукция уровня метилирования в гене *RAD23* у женщин с остеопорозом, хотя у четырех женщин уровень метилирования был повышен. Для оценки влияния метилирования CpG-сайтов на уровень МПКТ в шейке бедра был применен метод линейной регрессии; обнаружено, что метилирование объясняет около 19 % вариации уровня МПКТ (Reppe et al., 2017).

Помимо измерения и ассоциации паттернов ДНК-метилирования с наличием переломов и уровнем МПКТ, предпринимаются попытки соотнести данные профиля метилирования во взаимосвязи с регуляторными последовательностями ДНК. Так, Del Real et al. (2017) решили провести подобную работу, изучив роль мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в патогенезе остеопороза. Результаты показали, что наиболее дифференциально метилированные локусы расположены в областях с энхансерной активностью, удаленных от генов и их промоторов. Эти области были связаны с ростом МСК и дифференциацией остеобластов. МСК у пациентов с переломами показали повышенную пролиферацию и повышение активности остеогенеза через активность генов *RUNX2/OSX*.

Авторы утверждают, что связь между метилированием и экспрессией переменна (Del Real et al., 2017).

Эпидемиологические исследования доказали, что возникновение и развитие ОП связано с условиями жизни в пренатальном и раннем постнатальном периоде развития ребенка. Как установлено, вес при рождении связан прямой зависимостью с костной массой в молодом и взрослом возрасте, а нарушение роста в начале постнатального развития является маркером повышенного риска перелома бедер у взрослых. Вероятно, здесь не последнюю роль играет ДНК-метилирование, однако этому не существует прямых доказательств (Harvey et al., 2014). Увеличение числа случаев переломов из-за остеопороза вызвано характерной для развитых и развивающихся стран тенденцией к увеличению продолжительности жизни и возрастанию доли людей пожилого возраста в популяции. По этой причине медицина нуждается в дальнейшем совершенствовании профилактики первичного и вторичного ОП с обязательным включением в клинику новых открытых диагностических маркеров, среди которых большое значение могут иметь эпигенетические модификаторы, в том числе ДНК-метилирование.

Технологии изучения ДНК-метилирования

В 1969 г. Б.Ф. Ванюшиным была предложена одна из первых эпигенетических гипотез, согласно которой метилирование определенных участков гена влияет на уровень его экспрессии. Эта гипотеза легла в основу теории эпигенетики (Ванюшин, 2013). А в 1978 г. Э. Берд и его группа показали, что метилирование участков ДНК можно выявить с использованием чувствительных к метилированию ферментов, что предвосхитило начало интенсификации эпигенетических исследований (Эллис и др., 2010). С тех пор технологии исследования метилирования ДНК были значительно улучшены, и их можно разделить на три категории (Vaccarelli, 2018):

- 1) геноспецифический анализ (изучение локального метилирования). Направлен на качественное и количественное определение уровня метилирования отдельных генов;
- 2) анализ уровня глобального метилирования. Позволяет проводить количественный и качественный анализ эпигенетических маркеров одновременно в разных участках генома независимо от их локализации;
- 3) полногеномный анализ. Базирующийся на полногеномных методах исследования и технологиях микроматричного анализа (micro array), этот метод позволяет изучать одновременно большое количество известных CpG-сайтов по всему геному.

Надо отметить, что диапазон методов определения статуса ДНК-метилирования достаточно разнообразен, и в настоящее время существует большое количество подходов, включая такие технологии, как высокоэффективная жидкостная хроматография через УФ-детектор, полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ), иммуноферментный анализ, люминесцентный анализ и др. (Kurdyukov, Bullock, 2016). Существенным недостатком этих методов, с точки зрения поиска молекулярно-генетических маркеров заболеваний, является измерение общего статуса метилирования ДНК, при котором невоз-

можно оценить статус или профиль метилирования в отдельных CpG-сайтах или CpG-островках. Для того чтобы увеличить чувствительность, точность и производительность в этой области, со временем были разработаны технологии, позволяющие измерять и идентифицировать уровень метилирования ДНК с высокой точностью как в одном, так и в большом количестве CpG-сайтов (или CpG-островков). Благодаря этому можно оценить общий вклад изменения паттернов метилирования в проявление определенных фенотипических признаков одновременно в сотнях тысяч CpG-сайтов либо осуществить сравнительный анализ с профилем транскриптомы, протеомы и пр. (Kurdyukov, Bullock, 2016).

«Золотым стандартом» современных методов оценки статуса или профиля ДНК-метилирования считается бисульфитная конверсия ДНК. Этот метод предполагает предварительную процедуру денатурации ДНК, которая затем инкубируется в присутствии бисульфита, в результате чего происходит реакция сульфирования цитозина в 6-м положении. После этого проводится гидролитическое дезаминирование цитозин-сульфата, который при последующей реакции с щелочью превращается в урацил. Конвертации подвергается только неметилированный цитозин, а 5-метилцитозин не вступает в реакцию с бисульфитом, что в итоге позволяет идентифицировать и количественно определять метилированные участки генома. Служа отправной точкой, эта процедура позволила адаптировать ряд молекулярно-генетических методов для исследования ДНК-метилирования, которые часто объединяют под названием методов «бисульфитной конверсии» (Li et al., 2013). На сегодняшний день наиболее популярными среди них считаются следующие методы.

Пиросеквенирование. Основано на предварительной бисульфитной конверсии ДНК. В основе метода лежит амплификация интересующей последовательности, которая затем клонируется для процедуры секвенирования. Эта технология позволяет определить аллель-специфическое метилирование одновременно в большом количестве фрагментов ДНК. Как и прямое секвенирование, пиросеквенирование может быть применено для изучения глобального статуса метилирования и считается одним из наиболее эффективных методов с высокой разрешающей способностью. Его активно применяют также для анализа метилирования мобильных генетических элементов ДНК (Wong et al., 2006). Как правило, оценивают уровень метилирования LINE-элементов, так как они позволяют оценить глобальный статус метилирования из-за высокой частоты повторов и длины фрагментов. Особенно часто пиросеквеницию применяют для высокопроизводительного анализа образцов ДНК опухолевых клеток. Кроме того, ее используют для исследования метилирования импринтированных генов (Colin et al., 2016).

Метил-специфическая ПЦР. Один из наиболее доступных и эффективных методов исследования метилирования ДНК, позволяющий оценивать статус метилирования на любых CpG-сайтах или CpG-островках. Вначале проводится бисульфитная конверсия ДНК, затем исследователи идентифицируют изменения в исходной последовательности с использованием традиционной ПЦР с применением специфического набора праймеров

как для метилированной, так и для неметилированной ДНК. Метод был внедрен в 1996 г. Германом и его коллегами. Он удобен для анализа небольшого количества генов, содержащих CpG-динуклеотиды (Ku et al., 2011; Скрябин и др., 2013).

Иммунопреципитация метилированной ДНК. Этот метод позволяет оценить статус ДНК-метилирования благодаря свойству некоторых белков высокоспецифично связывать метилированный цитозин. Их разделяют на два типа: антитела, которые распознают 5-метилцитозин, и метил-CpG-связывающие белки. В случае, когда применяют первый тип белка, говорят об иммунопреципитации метилированной ДНК, а при использовании второго – об иммунопреципитации хроматина. Принципиальная схема метода такова: ДНК расщепляется физическим или рестрикционным методом, затем она осаждается с использованием белков, которые распознают 5-метилцитозин. После очистки от неспецифических фрагментов метилированная ДНК элюируется из комплексов с белками. Данный метод позволяет определить общий статус метилирования ДНК, но не позволяет установить статус метилирования CpG-динуклеотида (Gupta et al., 2010).

HRM-анализ. Анализ метилирования ДНК может быть проведен чувствительной к метилированию ПЦР с анализом кривой плавления высокого разрешения (Methylation-Sensitive High Resolution Melting – MS-HRM). Этот метод особенно актуален с точки зрения малого количества требуемой ДНК. В основе принципа лежит приобретение различной последовательности исследуемых участков ДНК после бисульфитной конверсии, которое позволяет выявить разный профиль кривых плавления и на основе этого идентифицировать наличие или отсутствие метилирования на определенном CpG-сайте (или CpG-островке) (Wojdacz, Dobrovic, 2007; Hussman, Hansen, 2018).

Реал-тайм ПЦР. Еще одним методом количественного определения метилирования является ПЦР в реальном времени MethyLight, основанная на чувствительном, количественном и специфичном определении метилированных сайтов. При этом могут использоваться Taq-Man-зонды, специфичные для метилированных или неметилированных последовательностей. ДНК также предварительно подвергают бисульфитной конверсии. MethyLight широко применяется для анализа большого количества образцов. Несмотря на высокую чувствительность к детектированию сигнала метилирования, обычный анализ MethyLight может анализировать только один ген за раз, что потенциально ограничивает анализ множественных маркеров (Susan et al., 2004; Olkhov-Mitsel et al., 2014).

Метилочипы. Высокопроизводительным методом является использование чиповых технологий. С их помощью возможно осуществить одновременный анализ большого количества метилированных участков. Так, компания Illumina разработала систему 450K Infinium Methylation BeadChip, содержащую более 450000 потенциально метилируемых CpG-сайтов. В данном методе ДНК на начальном этапе также подвергается бисульфитной конверсии, после чего проводится стандартная процедура гибридизации на чипах фрагментов амплифицированной ДНК (Li et al., 2013; Yi-an et al., 2013).

Технологии исследований ассоциации эпигенома (EWAS) на основе микроматричного анализа, а также технологии секвенирования следующего поколения (пиросеквенирование и пр.) считаются наиболее востребованными в области изучения эпигенетических факторов многофакторных заболеваний. В то же время для исследования небольшого числа кандидатных генов наиболее оптимальными решениями могут считаться методы HRM-анализа и метил-специфической ПЦР.

Заключение

Идентификация ранних предикторов многофакторных заболеваний – одна из наиболее приоритетных задач современной молекулярной медицины. Как видно из описанных исследований, в метаболизм и ремоделирование костной ткани вовлечено большое количество регуляторных систем. Значимость и высокая роль метилирования ДНК в регуляторных процессах неоднократно были подтверждены многими исследованиями. Однако данный эпигенетический механизм все еще остается малоизученным в структуре ряда многофакторных заболеваний, в том числе остеопороза. Предпринято немалое количество попыток охарактеризовать aberrации ДНК-метилирования не только в исследованиях кандидатных генов, но и в глобальных исследованиях ассоциаций эпигенома человека. Прежде всего из них следует, что ДНК-метилирование – это крайне чувствительный и тканеспецифичный процесс, который может сильно варьировать в зависимости от возраста, пола, микроокружения травмированных участков и условий окружающей среды. Несмотря на полномасштабные исследования, результаты довольно сильно различаются, но из них следует, что более объективны исследования, направленные на изучение ДНК-метилирования непосредственно в самой костной ткани. При этом важно учитывать как можно большее количество микропараметров отбираемого материала, начиная от его клеточной гомогенности и заканчивая системным подходом одновременного исследования уровня экспрессии генов и их связи с другими эпигенетическими модификаторами, включая микроРНК и посттрансляционные модификации.

Список литературы / References

Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(4/2):805-832. [Vanyushin B.F. Epigenetics today and tomorrow. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4/2):805-832. (in Russian)]

Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Эпигенетические аспекты остеопороза. Вестн. РАМН. 2015;70(5):541-548. DOI 10.15690/vramn.v70.i5.1440. [Grebennikova T.A., Belaya Z.E., Rozhinskaya L.Y., Mel'nichenko G.A., Dedov I.I. Epigenetic aspects of osteoporosis. Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015;70(5):541-548. DOI 10.15690/vramn.v70.i5.1440. (in Russian)]

Скрябин Н.А., Кашеварова А.А., Денисов Е.В., Лебедев И.Н. Методы исследования метилирования ДНК: возможности и перспективы использования в онкологии. Сиб. онкол. журн. 2013; 6:64-60. [Skryabin N.A., Kashevarova A.A., Denisov E.V., Lebedev I.N. Methods of DNA methylation analysis: potential and limitations of their application in oncology. Sibirskii Onkologicheskii Zhurnal = Siberian Journal of Oncology. 2013;6:64-60. (in Russian)]

Филина Ю.В., Габдулхакова А.Г., Арлеевская М.И. Методы анализа метилирования ДНК. Биохимия. 2012;8:15-18. [Filina Yu.V., Gabdulhakova A.G., Arleyevskaya M.I. The methods of analysis of DNA methylation. Biokhimiya = Biochemistry. 2012; 8:15-18. (in Russian)]

Эллис С.Д., Дженуейн Т., Рейнберг Д. (ред.) Эпигенетика. М.: Техносфера, 2010. [Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D. (Eds.) Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. (Russ. ed.: Ellis S.D., Dzhenuyevn T., Reynberg D. (red.) Epigenetika. Moscow: Tekhnosfera Publ., 2010. (in Russian))]

Baccarelli A. Techniques for epigenetic analysis. How to apply them to human and epidemiology studies. 2018. Available at <https://cdn1.sph.harvard.edu/wp-content/uploads/sites/1291/2012/11/JacksonTutorial.pdf>

Cheishvili D., Parashar S., Mahmood N., Arakelian A., Kremer R., Goltzman D., Szyf M., Rabbani S.A. Identification of an epigenetic signature of osteoporosis in blood DNA of postmenopausal women. J. Bone Miner. Res. 2018;1-34. DOI 10.1002/jbmr.3527.

Cho Y.D., Yoon W.J., Kim W.J., Woo K.M., Baek J.H., Lee G., Ku Y., van Wijnen A.J., Ryoo H.M. Epigenetic modifications and canonical wntless/int-1 class (WNT) signaling enable transdifferentiation of nonosteogenic cells into osteoblasts. J. Biol. Chem. 2014;289(29): 20120-20128. DOI 10.1074/jbc.M114.558064.

Colin D., Sanjay K.G., Raymond Y. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. Methods Mol. Biol. 2016;1343:249-264. DOI 10.1007/978-1-4939-2963-4_19.

Del Real A., Perez-Campo F.M., Fernandez A.F., Sanudo C., Ibarbia C.G., Perez-Nunez M.I., Criekinge W.V., Braspenning M., Alonso M.A., Fraga M.F., Riancho J.A. Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. Epigenetics. 2017; 12(2):113-122. DOI 10.1080/15592294.2016.1271854.

Delgado-Calle J., Sanudo C., Bolado A., Fernandez A.F., Arozamena J., Pascual-Carra M.A., Rodriguez-Rey J.C., Fraga M.F., Bonewald L., Riancho J.A. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. J. Bone Miner. Res. 2012;27(4):926-937. DOI 10.1002/jbmr.1491.

Ghayer C., Weber F.E. Epigenetic regulation of bone remodeling and its impacts in osteoporosis. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(8):E1446. DOI 10.3390/ijms17091446.

Gupta R., Nagarajan A., Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. BioTechniques. 2010;49(4):3-11. DOI 10.2144/000113493.

Harvey N., Dennison E., Cooper C. Osteoporosis: a lifecourse approach. J. Bone Miner. Res. 2014;29(9):1917-1925. DOI 10.1002/jbmr.2286.

Hussmann D., Hansen L.L. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM). Methods Mol. Biol. 2018;1708:551-571. DOI 10.1007/978-1-4939-7481-8_28.

Ku J.L., Jeon Y.K., Park J.G. Methylation-specific PCR. Methods Mol. Biol. 2011;791:23-32. DOI 10.1007/978-1-61779-316-5_3.

Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. Biology. 2016;5(1):3. DOI 10.3390/biology5010003.

Lee J.Y., Lee Y.M., Kim M.J., Choi J.Y., Park E.K., Kim S.Y., Lee S.P., Yang J.S., Kim D.S. Methylation of the mouse Dlx5 and Osx gene promoters regulates cell type-specific gene expression. Mol. Cell. 2006;22(2):182-188.

Li P., Demirci F., Mahalingam G., Demirci C., Nakano M., Meyers B.C. An integrated workflow for DNA methylation analysis. J. Genet. Genomics. 2013;40(5):249-260. DOI 10.1016/j.jgg.2013.03.010.

Li X., Zhang Y., Kang H., Liu W., Liu P., Zhang J., Harris S.E., Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. J. Biol. Chem. 2005;280(20):19883-19887. DOI 10.1074/jbc.M413274200.

Marini F., Cianferotti L., Brandi M.L. Epigenetic mechanisms in bone biology and osteoporosis: Can they drive therapeutic choices? Int. J. Mol. Sci. 2016;17(8):1329. DOI 10.3390/ijms17081329.

- Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-28. DOI 10.1038/npp.2012.112.
- Morris J.A., Tsai P.C., Joehanes R., Zheng J., Trajanoska K., Soerensen M., Forgetta V., Castillo-Fernandez J., Frost M., Spector T.D., Christensen K., Christiansen L., Rivadeneira F., Tobias J., Evans D., Kiel D.P., Hsu Y.H., Richards J.B., Bell J.T. Epigenome-wide association of DNA methylation in whole blood with bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.* 2017;32(8):1644-1650. DOI 10.1002/jbmr.3148.
- Moskalev A.A., Vaiserman A. (Eds.). *Epigenetics of Aging and Longevity*. London: Acad. Press, 2018.
- Olkhov-Mitsel E., Zdravic D., Kron K. Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Sci. Rep.* 2014;4:4432. DOI 10.1038/srep04432.
- Reppe S., Datta H., Gautvik K.M. The Influence of DNA methylation on bone cells. *Curr. Genomics*. 2015;16(6):384-392. DOI 10.2174/13892029166666150817202913.
- Reppe S., Lien T.G., Hsu Y.H., Gautvik V.T., Olstad O.K., Yu R., Bakke H.G., Lyle R., Kringen M.K., Glad I.K., Gautvik K.M. Distinct DNA methylation profiles in bone and blood of osteoporotic and healthy postmenopausal women. *Epigenetics*. 2017;12(8):674-687. DOI 10.1080/15592294.2017.1345832.
- Rojas A., Aguilar R., Henriquez B., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., van Wijnen A.J., van Zundert B., Allende M.L., Montecino M. Epigenetic control of the bone-master Runx2 gene during osteoblast-lineage commitment by the histone demethylase JARID1B/KDM5B. *J. Biol. Chem.* 2015;290(47):28329-28342. DOI 10.1074/jbc.M115.657825.
- Sozen T., Ozışık L., Başaran N.C. An overview and management of osteoporosis. *Eur. J. Rheumatol.* 2017;4(1):46-56. DOI 10.5152/eurjrheum.2016.048. Epub 2016 Dec 30.
- Susan E.C., Jurgen D., Nancy S.G. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(1):e10. DOI 10.1093/nar/gnh008.
- Tarantino U., Iolascon G., Cianferotti L., Masi L., Marcucci G., Giusti F., Marini F., Parri S., Feola M., Rao C., Piccirilli E., Zanetti E.B., Cittadini N., Alvaro R., Moretti A., Calafiore D., Toro G., Gimigliano F., Resmini G., Brandi M.L. Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. *J. Orthop. Traumatol.* 2017;18(Suppl.1):3-36. DOI 10.1007/s10195-017-0474-7.
- Tarfiei G., Noruzinia M., Soleimani M., Kaviani S., Mahmoodinia M.M., Farshdousti Hagh M., Pujol P. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J.* 2011;13(1):11-15.
- Tu K.N., Lie J.D., Wan C.K.V., Cameron M., Austel A.G., Nguyen J.K., Van K., Hyun D. Osteoporosis: A review of treatment options. *Phys. Ther.* 2018;43(2):92-104.
- Wojdacz T.K., Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e41. DOI 10.1093/nar/gkm013.
- Wong H.L., Byun H.M., Kwan J.M., Campan M., Ingles S.A., Laird P.W., Yang A.S. Rapid and quantitative method of allele-specific DNA methylation analysis. *BioTechniques*. 2006;41(6):734-739. DOI 10.2144/000112305.
- Yi-an C., Mathieu L., Sanaa C., Darci T.B., Daria G., Brent W.Z., Steven G., Thomas J.H., Rosanna W. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium Human-Methylation450 microarray. *Epigenetic.* 2013;8(2):203-209. DOI 10.4161/epi.23470.
- Zhang D., Li Q., Rao L., Yi B., Xu Q. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J. Endod.* 2015;41(5):640-645. DOI 10.1016/j.joen.2014.12.006.
- Zhang J.G., Tan L.J., Xu C., Hao H., Qing T., Yu Z., Chuan Q., Xiang-Ding C., Hong-Wen D. Integrative analysis of transcriptomic and epigenomic data to reveal regulation patterns for BMD variation. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138524. DOI 10.1371/journal.pone.0138524.

ORCID ID

B.I. YalaeV orcid.org/0000-0003-4337-1736
A.V. Tyurin orcid.org/0000-0002-0841-3024
R.Y. Mirgalieva orcid.org/0000-0003-2582-5028
R.I. Khusainova orcid.org/0000-0002-8643-850X

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

Received October 17, 2018. Revised November 6, 2018. Accepted November 6, 2018.