

**Предлагаемая тема практики в Лаборатории функциональной геномики ИОГен
РАН:**

Поиск потенциально информативных эпигенетических маркеров возраста и определение их статуса метилирования на образцах ДНК человека.

Одним из этапов идентификации личности в криминалистике является определение возраста индивидуума. Старение человека можно представить как постепенный процесс накопления изменений в биомолекулах, как на уровне ДНК, так и на уровне белков. Применение анализа таких изменений в криминалистике позволяет определять возраст как живых людей, так и их останков. Оценка возраста может использоваться для получения информации, актуальной для уголовных дел, юридических и антропологических исследований. Оценка возраста индивидуума может использоваться для предсказания связанных с возрастом физических признаков, таких, как цвет волос или облысение у мужчин. Кроме того, это важный фактор для идентификации неопознанных останков (пропавших без вести, жертв массовых беспорядков или жертв стихийных бедствий) – распространенной и сложной задачи, особенно при отсутствии живых родственников.

Традиционно для оценки возраста в судебно-медицинской экспертизе применяются морфологические методы исследования останков (например, оценка морфологических особенностей зубов или частей скелета), а также биохимические методы (определение возраста радиоуглеродным методом, определение возраста с использованием рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине). Ошибка при определении возраста морфологическими методами составляет около 10 лет, а при применении биохимических методов – около 3х лет для рацемизации и около 1-2 лет при радиоуглеродном анализе.

Однако перечисленные методы являются неприменимыми при отсутствии достаточного количества материала (например, на месте преступления), при высокой степени деградации материала, кроме того, для проведения анализа подходят не все типы тканей. В таких случаях применяются молекулярно-генетические методы анализа, которые позволяют использовать для оценки возраста фрагменты тканей, не содержащие морфологических признаков возраста, или образцы, содержащие очень малое количество биологического материала: кровь, сперму, слюну и другие биологические выделения, в том числе в форме высушенных мазков и пятен; мягкие ткани (фрагменты кожи, эпителиальные клетки слизистой оболочки, другие фрагменты мягких тканей); твердые ткани (кости, зубы); волосы с волосяными фолликулами; ДНК на сигаретных окурках и личных вещах, например, на зубной щетке. Основным материалом в молекулярно-генетических исследованиях является ДНК, поскольку она является чрезвычайно стабильной и долгоживущей молекулой, и сохраняется

даже в переработанном биологическом материале (высушенные пятна биологических жидкостей, переработанные пищевые продукты, копролиты, мумифицированные ткани и т. д.). Кроме того, она присутствует во всех биологических жидкостях, что позволяет проводить анализ из почти всех видов биологических субстратов (слюна, фекалии, молоко и т. д.). Наконец, из-за вырожденности генетического кода и существования длинных некодирующих участков, анализ ДНК может быть более информативен, чем анализ белков.

Основными молекулярно-генетическими методами определения возраста индивидуума являются: 1) оценка накопления мутаций в митохондриальной ДНК, 2) оценка длины теломер, 3) оценка количества повторов в ДНК, 4) оценка экспрессии генов, 5) оценка уровней метилирования ДНК. Все они на сегодняшний день применяются в исследованиях, и каждый из методов имеет свои преимущества и ограничения. Например, оценка накопления мутаций в мтДНК может применяться на деградированных образцах, поскольку митохондриальная ДНК в силу своей кольцевой формы более стабильна, чем геномная ДНК, и меньше деградирует, однако, в целом этот показатель является достаточно грубым маркером при определении возраста, и позволяет лишь разделить образцы по возрастным группам, но не оценить возраст индивидуума с уровнем точности, достаточным для задач криминалистики. Что касается оценки длины теломер, данный показатель может изменяться не только в зависимости от возраста, но и в зависимости от уровня окислительного стресса, при сердечно-сосудистых заболеваниях, ожирении, при различных формах рака. Также показана связь укорочения теломер с психологическим стрессом, хотя разные исследования по-разному оценивают значимость этой взаимосвязи.

В данной работе планируется в качестве маркера возраста планируется использовать оценку уровней метилирования ДНК. Метилирование ДНК является процессом модификации молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК. Среди факторов, которые приводят к изменениям уровней метилирования ДНК, можно отметить дифференцировку клеток, старение, генетическую вариабельность, воздействие окружающей среды – например, воздействие солнечного света и ультрафиолетового излучения, инфекции, физические упражнения, питание, употребление алкоголя, стрессы и т.д. Некоторые исследования показали, что ограничения калорийности рациона и физические упражнения позволяют изменить профили метилирования в скелетной мускулатуре и в тканях сердца таким образом, что они становятся сходны с более «молодыми» образцами. Впервые изменения уровня метилирования ДНК в онтогенезе и при старении были идентифицированы при анализе различных органов и жизненных стадий лосося. Позже было показано, что возрастное глобальное снижение уровней метилирования ДНК наблюдается у самых разных видов, включая крыс, мышей и человека.

Появление микрочипов, развитие технологий масштабного параллельного секвенирования и расширение их применения в эпигенетике позволило выявить более специфические возрастные изменения профилей метилирования определенных генов или геномных областей. Были выявлены маркеры, уровни метилирования которых могут быть использованы для определения возраста индивидуума. В последние годы количество публикаций, описывающих взаимосвязь профилей метилирования с возрастом, растет лавинообразно. Большинство исследователей используют в анализе образцы крови индивидуумов, однако, встречаются и публикации с результатами анализа других биологических жидкостей, а также различных типов клеток. Точность некоторых моделей для предсказания возраста индивидуумов по профилям метилирования уже достигла высокого уровня и достигает ошибки предсказания в ± 4 года.

Важную роль в разработке эффективного протокола определения возраста по уровням метилирования ДНК играет биоинформатический анализ данных и построение математических моделей, описывающих корреляции профилей метилирования с возрастом. Как правило, для поиска ассоциаций применяют регрессионный анализ. С развитием применения методов машинного обучения и нейросетей в биологии появилась возможность применить эти методы для получения моделей предсказания возраста.

За последние 10 лет появилось большое количество исследований, посвященных поиску универсальных маркеров старения. На сегодняшний день наиболее точными и робастными в условиях ограниченного количества исходного материала являются методы, основанные на оценке профилей метилирования в различных тканях, в то время, как методы транскриптомики и метаболомики являются менее точными, а оценка длины теломер сильно варьирует между индивидуумами и отдельными тканями.

В ходе прохождения практики студент будет непосредственно участвовать в выполнении проекта по поиску потенциально информативных эпигенетических маркеров возраста и определению их статуса метилирования на образцах ДНК человека. После теоретического введения мы вместе проведем пробоподготовку: выделим ДНК из биологического материала, оценим качество полученных образцов, проведем бисульфитную конверсию ДНК, подберем праймеры и проведем амплификацию целевых участков при помощи ПЦР, затем проведем электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле. Полученные ПЦР-ампликоны будут проанализированы путем секвенирования, и затем наш специалист по биоинформатике расскажет Ксении, как проводится биоинформатический анализ и каким образом полученные ею результаты будут использованы при разработке и верификации математических моделей для определения возраста индивидуумов.