

Jonna Alkula

EPIGENEETTISTEN KELLOJEN OMINAISUUDET

Tarkastelussa biologista ikää mallintavat DNAm PhenoAge
ja DNAm GrimAge

TIIVISTELMÄ

Jonna Alkula: Epigeneettisten kellojen ominaisuudet – Tarkastelussa biologista ikää mallintavat DNAm PhenoAge ja DNAm GrimAge
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2021

Ihmisten keskimääräinen elinikä ja elinajanodote on pidentynyt huomattavasti etenkin hyvinvointivaltioissa kehittyneen yhteiskunnan myötä. Vanheneminen aiheuttaa kuitenkin väistämättä solujen ja kudosten toiminnan heikkenemistä, mikä näkyy sairauksina, elimistön fyysisen kunnon heikkenemisenä ja kuolleisuuden kasvuna. Tarkkoja ja yksittäisiä genomitason syitä vanhenemiselle ei ole löydetty, mutta muun muassa epigeneettisten muutosten, telomeerien lyhenemisen ja mutaatioiden kertymisen oletetaan edistävän vanhenemisprosessia.

Kaikki vanhenemistä edistävät tekijät ovat osa biologista ikää. Biologisella iällä tarkoitetaan solujen ja kudosten todellista ikää, mikä yleensä eroaa ihmisen kronologisesta iästä. Biologisella iällä pyritäänkin kuvaamaan solujen ja kudosten toimintakykyä, koska se pyrkii kertomaan soluihin kertyneistä vaurioista. Tämän vuoksi biologinen ikä kuvastaa jokaisen yksilöllistä vanhenemistä paremmin kuin kronologinen ikä.

Koska epigeneettiset muutokset ovat yksi vanhenemisen tunnusmerkeistä, on niiden avulla pyritty kuvaamaan ihmisen ikääntymistä. Epigeneettisiä muutoksia ovat DNA:n metylaatio, histonien kovalenttinen muokkaus, nukleosomien muokkaus sekä ei-koodaavat RNA:t. Näistä nimenoman metylaatiotason muutoksia on pystytty tutkimaan viimeisen parinkymmenen vuoden aikana kehittyneiden tutkimusmenetelmien myötä. Vuonna 2013 julkaistiinkin ensimmäiset epigeneettiset kellot, jotka mallintavat ihmisen kronologista ikää tiettyjen DNA-kohtien metylaatiomuutosten avulla. Myöhemmin julkaistiin biologista ikää kuvaavia kelloja, joita tämä kandidaatintutkielma pääasiassa käsittelee. Tämän työn tarkoituksena on kuvata kahden epigeneettisen kellon, DNAm PhenoAgen ja DNAm GrimAgen avulla, mitä epigeneettiset kellot ovat ja mitä niillä voidaan biologisen iän lisäksi ennustaa.

Epigeneettiset kellot ovat matemaattisia algoritmeja, joihin syötetään tietoja tietyistä biomarkkereista ja DNA:n metylaatiotasojen muutoksista. Metylaatiotasojen muutoksia tutkitaan tietyistä CpG-kohdista, jotka ovat runsaasti vierekkäisiä sytosiini (C) ja guaniini (G) -nukleotidejä sisältäviä alueita DNA:ssa. Käytettävät biomarkerit ja mitattavien CpG-kohtien määrä ja paikka DNA:ssa vaihtelevat eri kellojen välillä. Tässä kandidaatintutkielmassa tarkastellut DNAm PhenoAge ja DNAm GrimAge kuvaavat populaatiotasolla biologista ikää ja ennustavat muun muassa jäljellä olevaa elinaikaa ja riskiä Alzheimerin taudin sekä erilaisten syöpien ilmentymiselle. Jos epigeneettisten kellojen kehitystyö jatkuu suotuisana, voitaisiin niitä tulevaisuudessa käyttää myös yksittäisten potilaiden diagnostisena keinona. Lisäksi epigeneettisellä tutkimuksella voitaisiin tunnistaa uusia vanhenemismekanismeja, joiden hillitseminen voisi pidentää tervettä elinaikaa.

Avainsanat: biologinen ikä, epigeneettiset kellot, DNAm PhenoAge, DNAm GrimAge

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on kirjoitettu Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnassa keväällä 2021. Haluan kiittää ohjaajaani Saara Marttilaa mielenkiintoisen, mutta haastavan aiheen tarjoamisesta, sekä kaikesta avusta ja neuvoista työtä tehdessä.

Tampereella, 26.04.2021

Jonna Alkula

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO	4
2.	EPIGENEETTISET MUUTOKSET – GEENIEN SÄÄTELY	5
2.1	Kromatiinin rakenne ja histonimuokkaukset.....	5
2.2	DNA:n metylaatio ja CpG-saarekkeet	7
3.	VANHENEMISEEN LIITTYVIÄ MÄÄRITELMIÄ.....	8
4.	EPIGENEETTISET KELLLOT	9
4.1	DNAm PhenoAge	10
4.1.1	Menetelmä.....	10
4.1.2	Tulokset.....	12
4.2	DNAm GrimAge.....	16
4.2.1	Menetelmä.....	16
4.2.2	Tulokset.....	19
4.3	DNAm PhenoAgen ja DNAm GrimAgen erot ja yhteneväisyydet	20
5.	YHTEENVETO	23
	LÄHTEET	24

1. JOHDANTO

Ikuisen elämän saavuttaminen on kiehtonut ihmisiä aina, ja se liittyykin tiiviisti erilaisiin uskointoihin ja mytologioihin. Kehittyneen lääketieteen ja yhteiskunnan myötä ihmisten keskimääräinen elinikä on pidentynyt huomattavasti viimeisten vuosikymmenien aikana. Esimerkiksi Suomessa vuonna 2019 syntyneiden tyttöjen elinajanodote (84,5 v.) oli reilut 10 vuotta pidempi kuin vuonna 1971 syntyneiden, ja vastaavasti vuonna 2019 syntyneiden poikien elinajanodote (79,2 v.) oli reilut 13 vuotta enemmän kuin vuonna 1971 syntyneillä pojilla (<https://findikaattori.fi/fi/table/46>, viitattu 6.2.2021). Koska elinajanodote lasketaan sillä periaatteella, että kuolleisuus pysyisi samana kuin arviointihetkellä, tulevat eliniät todellisuudessa olemaan vielä pidempiä, koska kuolleisuus pienee jatkuvasti terveydenhuollon kehityksen myötä.

Eliniän pitenemisen myötä tutkijat ovat alkaneet pohtia, kuinka vanhaksi voisimme todellisuudessa elää tai olisiko jopa ikuinen elämä mahdollista. Nämä kysymykset ovatkin herättäneet kiihvasta keskustelua tutkijoiden keskuudessa. Nelsonin ja Maselin (2017) tutkimuksen mukaan ikuinen elämä on mahdotonta monisoluisilla organismeilla, sillä ikääntyessä osa soluista heikkenee, mutta osa kasvaa hallitsemattomasti, jolloin täydellisestä luonnonvalinnasta huolimatta kuolemaksi koituisi joko syöpä tai solujen heikkenemisen aiheuttama elimistön toimintakyvyn rappeutuminen. Jotta ikuinen elämä olisi mahdollista, täytyisi ensin siis selvittää, mistä vanheneminen kaiken kaikkiaan aiheutuu. Tämän jälkeen näitä vanhenemistä aiheuttavia muutoksia voitaisiin pyrkiä estämään pitäen solut terveinä ja toimintakykyisinä.

López-Otín (2013) mukaan epigeneettiset muutokset ovat yksi yhdeksästä vanhenemisen tunnusmerkistä. Epigeneettinen tutkimus onkin lisääntynyt viime vuosikymmeninä kehittyneiden tutkimusmenetelmien ja laitteistojen myötä, ja se on tällä hetkellä yksi bioinformatiikan ja molekyylibiologian kiinnostavimmista tutkimuskohteista. 2010-luvulla kehitetyt epigeneettiset kellot ovatkin oiva esimerkki siitä, miten epigeneettistä tutkimusta voidaan hyödyntää monin eri tavoin vanhenemisen tutkimisessa ja erilaisten sairauksien ilmentymisen ennustamisessa.

Ensimmäiset epigeneettiset kellot, Hannumin (2013) ja Horvathin (2013) kellot, mallintavat DNA:n metylaatiotasojen avulla ihmisen kronologista ikää. Vaikka Hannumin kello julkaistiin aikaisemmin, on Horvathin kello näistä kahdesta kuitenkin siteerauksien perusteella tunnetumpi ja käytetympi. Myöhemmin epigeneettisiä kelloja kehitettiin mallintamaan myös ihmisen biologista ikää (Levine ym. 2018, Lu ym. 2019). Biologisella iällä kuvataan elimistön toimintakykyä ja solujen todellista ikää, sillä biologista ikää tutkittaessa tarkastellaan nimenomaan soluihin ja kudoksiin kertyneitä vaurioita (Chen ym. 2016, Hillary ym. 2020, Jazwinski ja Kim 2019, Li ym. 2020). Tässä kandidaatintutkielmassa tutustutaan tarkemmin biologista ikää ennustaviin epigeneettisiin kelloihin,

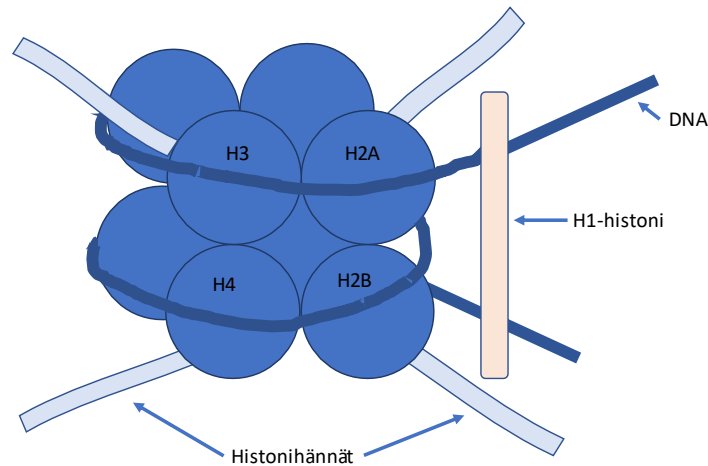
PhenoAgeen (Levine ym. 2018) sekä GrimAgeen (Lu ym. 2019), selvittämällä mitä ne ovat ja mitä niillä voidaan tutkia.

2. EPIGENEETTISET MUUTOKSET – GEENIEN SÄÄTELY

Termin ”epigenetiikka” määritteli ensimmäisen kerran Conrad Waddington vuonna 1942 (Waddington 2012). Alun perin määritelmä oli paljon laajempi kuin nykyään, sillä epigenetiikan ajateltiin olevan tutkimusala, joka tutkii niitä geenien ja geenituotteiden välisiä vuorovaikutuksia, jotka saavat aikaan yksilön ilmiänsun eli fenotyypin (Dupont ym. 2009, Waddington 2012). Nykyään epigenetiikalla tarkoitetaan geenin toimintaan ja säätelyyn liittyviä mekanismeja, jotka periytyvät vähintäänkin mitoottisesti solulta toiselle solunjakautumisessa ja mahdollisesti myös meioottisesti yksilöltä toiselle. Etuliite ”epi” on kreikkaa ja tarkoittaa ”päällä”. Epigeneettiset tekijät ovatkin nimensä mukaisesti DNA:n päällä eivätkä aiheuta muutoksia DNA-sekvenssissä. Epigeneettisiä mekanismeja ovat DNA:n metylaatio, histonien kovalenttinen muokkaus, nukleosomien muokkaus sekä määrittelijästä riippuen myös ei-koodaavat RNA:t (Dupont ym. 2009, Taipale 2006, Wei ym. 2017).

2.1 Kromatiinin rakenne ja histonimuokkaukset

Epigenetiikan merkitys geeninsäätelyssä jää usein vähemmälle huomiolle, koska usein perimä yhdistetään vain DNA:han ja geeneihin. Ihmisen 23 kromosomiparia muodostuu kromatiinista, jonka perusyksikkö nukleosomi on esitetty alla olevassa kuvassa (Kuva 1). Nukleosomi muodostuu, kun DNA:ta kietoutuu histoniproteiinien ympärille noin 1,7 kierroksen verran. DNA:ta, joka ei ole kietoutunut histonien ympärille, kutsutaan linkkeri-DNA:ksi. Sitä on siis kromatiinissa kaikkien nukleosomien välillä. Yhdessä nukleosomissa on H2A, H2B, H3 ja H4 -histoniproteiineja kutakin kaksi kappaletta. Näiden histoniproteiinien aminoterminaaliset hännät työntyvät nukleosomin ulkopuolelle. Lisäksi on olemassa H1-histoniproteiini, joka puolestaan kiinnittää nukleosomin DNA-linkkeihin vakauttaen kromatiinin rakennetta (Alberts ym. 2014, Dupont ym. 2009).



Kuva 1: Pelkistetty kuva nukleosomin rakenteesta. Kuvassa on näkyvissä kahdeksan histoniproteiinin muodostama oktameerirakenne, jonka ympärille on kietoutunut kaksijuosteista DNA:ta. Kuvassa näkyy myös nukleosomin ulkopuolelle tulevat histonihännät ja H1-histoniproteiini. Tekijä Jonna Alkula

Nukleosomin muodostuminen ja histonien kiinnittyminen DNA:han on tarkoin säädeltyä. Sitoutumista tapahtuu etenkin niillä alueilla, joissa on paljon AA-, TT- ja TA-dinukleotideja. Tämä johtuu siitä, että niiden säännöllinen esiintyminen kaventaa DNA-kaksoisjuosteen pientä syvennystä (minor groove), jolloin DNA:n sitoutuminen ja kietoutuminen histonien ympärille on helpompaa (Alberts ym. 2014).

Nukleosomit eivät kuitenkaan jää pysyvästi tiettyyn kohtaan DNA-sekvenssiä, vaan ne ovat jatkuvassa liikkeessä sen mukaan, mitä kohtaa DNA-sekvenssistä halutaan lukea ja täytyykö kromatiinin olla avointa (eukromatiini) vai suljettua (heterokromatiini). Ne DNA-sekvenssin alueet, joita halutaan lukea, täytyy siis olla helposti saatavilla, jolloin ne eivät voi olla kietoutuneena histonien ympärille. Nukleosomeja voidaan liikuttaa kromatiinia pitkin ATP-riippuvaisten kromaatiinin uudelleenmuodostuskompleksien avulla (ATP-dependent chromatin remodeling complexes). Ne sitoutuvat sekä DNA:han että histonikompleksiin ja hyödyntävät ATP:n hydrolyysistä saatavaa energiaa muuttaen nukleosomin rakennetta. Tällä tavoin DNA:n sitoutuminen histonien ympärille heikkenee, ja useiden sitoutumis-irtoutumistoisten jälkeen nukleosomi saadaan liikutettua uuteen kohtaan DNA-sekvenssiä (Alberts ym. 2014).

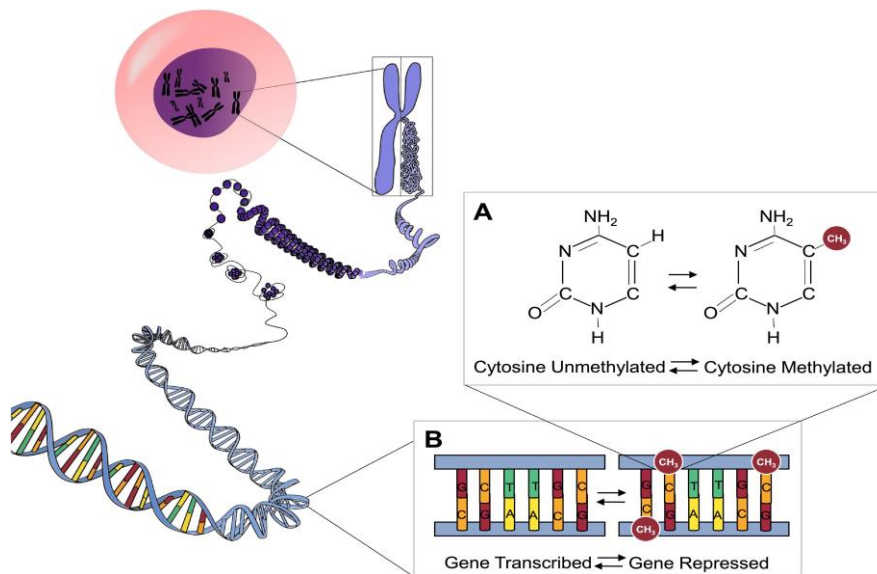
Nukleosomien rakennetta voidaan puolestaan muokata muuttamalla histonikompleksin rakennetta. Tällöin ATP-riippuvaiset kromatiinin uudelleenmuodostuskompleksit toimivat yhdessä erilaisten histoni-chaperoni proteiinien kanssa, ja vaihtavat joko osan tai kaikki nukleosomin histonit toisiksi.

Myös nämä rakenteen muutokset perustuvat ATP:n hydrolyysiin. Yksi yleinen nukleosomin rakenteen muokkausmenetelmä on poistaa histonikompleksista H2A-H2B-dimeerit ja vaihtaa ne erilaisiksi varianteiksi (Alberts ym. 2014).

Histonikompleksien lisäksi myös histonien aminoterminaalisia häntiä voidaan muokata. Kovalenttiset modifikaatiot eivät ole pysyviä, vaan häntiä muokataan etenkin translaation jälkeen (Taipale 2006). Aminohapoista etenkin lysiiniä, arginiiniä ja seriiniä modifioidaan asetylaatiolla, metylaatiolla ja fosforylaatiolla. Modifikaatiolla on vaikutusta sekä kromatiinin rakenteeseen, että geenien luentaan, riippuen siitä, mitä aminohappoa muokataan ja miten. Esimerkiksi lysiinin asetylaation H3- ja H4 -histonihännissä tiedetään aktivoivan transkriptiota, mutta metylaatio voi joko hiljentää tai aktivoita transkriptiota riippuen aminohaposta ja siitä, onko kyseessä mono-, di- vai trimetylaatio (Dupont ym. 2009, Taipale 2006). Histonihäntien kovalenttinen muokkaus vaikuttaa siis merkittävästi kromatiinin rakenteen säätelyyn ja toimintaan, mutta koska sitä on vielä vaikea tutkia laajalla mitakaavalla, sen yhteydestä vanhenemiseen tiedetään todella vähän verrattuna metylaatioon.

2.2 DNA:n metylaatio ja CpG-saarekkeet

Metylaatiolla (Kuva 2) tarkoitetaan yksinkertaisesti sitä, että metyyliryhmä (-CH₃) liittyy DNA:n sytosiiniemäkseen, jolloin muodostuu 5-metyylisytosiini (Dupont ym. 2009, Gillespie ym. 2019, Taipale 2006). Metyyliryhmän liittäminen sytosiiniin voi tapahtua neljän eri DNA-metyylitransferaasin avulla. DNMT1 on nisäkkäiden pääasiallinen metyylitransferaasi, kun taas DNMT3A, DNMT3B ja DNMT3L ovat *de novo* metyylitransferaaseja, eli ne osallistuvat metylaatioon pääasiassa alkionkehityksen aikana (Dupont ym. 2009, Marttila 2016).



Kuva 2: Kromosomin rakenne ja DNA:n metylaatio. Kuva A: Yksittäisen sytosiiniemäksen rakennekaava ja metylaatio. Kuva B: Kaksijuosteinen DNA pakataan histoniproteiinien avulla kromatiiniksi, jota edelleen pakkaamalla muodostuu kromosomit (Gillespie ym. 2019).

CpG-pareilla tarkoitetaan 5' → 3' suunnassa vierekkäin olevia C (sytosiini) ja G (guaniini) -nukleotidejä, jotka ovat kiinni toisissaan fosfodiesterisidoksella. Vierekkäisten C ja G nukleotidien metylaatio on soluissa yleistä, koska ne kopioituvat transkriptiossa syntyvälle tytärjuosteelle. CpG-saarekkeet ovat puolestaan DNA-alueita, joissa on runsaasti vierekkäisiä GC-nukleotidejä, ja joiden keskimääräinen pituus on 1000 nukleotidiparia (Alberts ym. 2014).

Epigeneettisissä kelloissa tarkastellaan tietyissä CpG-kohdissa tapahtuvia DNA:n metylaatiotason muutoksia. DNA:n metyloituminen voi sekä aktivoida että hiljentää geenien luentaa riippuen metylyliryhmien sijainnista geenin suhteen. Metylaatiosta puhuttaessa käytetään termejä hypo- ja hypermetylaatio. Hypometylaatiolla tarkoitetaan metylaation vähentymistä ja hypermetylaatiolla lisääntymistä. Suurin osa CpG-saarekkeista sijaitsee yleensä geenien promoottorialueilla. Ne ovat useimmiten metyloimattomia, jotta transkriptiotekijät voivat sitoutua helpommin DNA:han ja geenien ilmentymistä voidaan säädellä. CpG-saarekkeiden metyloitumattomuus on tärkeää, koska metyloituminen estäisi geenien luentaa. DNA on vastaavasti metyloitunutta yleensä geenien välisissä toistojaksoissa ja heterokromatiinissa, jossa geenien luenta on muutenkin vähäisempää tiukan pakkaustiheyden vuoksi (Alberts ym. 2014, Taipale 2006, Tieva ja Peltomäki 2012). Syöpäsairauksissa tilanne on juuri päinvastainen, koska metylaatiotasäätely on häiriintynyt. Tällöin kasvunrajoitegeenien promoottorialueet voivat olla hypermetyloituneita ja geenien väliset alueet hypometyloituneita. Syöpäsairauksissa DNA:n metylaatio voikin sekä hiljentää kasvunrajoitegenejä, että edesauttaa onkogeneenien aktivoitumista (Tieva ja Peltomäki 2012).

3. VANHENEMISEEN LIITTYVIÄ MÄÄRITELMIÄ

Vanhenemisesta puhuttaessa tarkastellaan yleensä kronologista ikää, mikä tarkoittaa ikävuosien kertymistä syntymävuoden perusteella. Elinvuosien kuluessa solujen ja kudosten toiminta heikenee, mikä näkyy lopulta myös elimistön fyysisen kunnan heikkenemisenä ja kuolleisuuden kasvuna (Kananen ja Marttila 2019). Kronologinen ikä ei ole kuitenkaan tarpeeksi hyvä selittämään esimerkiksi sitä, miksi samana vuonna syntyneet henkilöt ovat fyysiseltä kunnoltaan erilaisia, tai miksi 80-vuotiaalla on vähemmän sairauksia ja hänen elimistönsä on paremmassa kunnossa kuin vaikka 65-vuotiaalla. Näitä eroja selittää ihmisen biologinen ikä (Fransquet ym. 2019, Levine ym. 2018, Li ym. 2020).

Biologinen ikä kertoo solujen ja kudosten vanhenemisprosessista ja solujen ja kudosten todellisesta iästä, sillä niiden vanhenemisprosessit eivät etene samaan tahtiin kronologisen iän kanssa.

Biologinen ikä on käsite, jolla kuvataan vanhenemisen ilmiötä. Biologisella iällä pyritäänkin kertomaan, kuinka paljon soluihin ja kudoksiin on kertynyt vaurioita. Nämä vauriot puolestaan johtavat elimistön toimintakyvyn heikkenemiseen (Li ym. 2020). Biologisen iän tutkimukset ovat osoittaneet, että jopa saman henkilön eri kudoksissa voi olla erilainen biologinen ikä. Tämä osoittaa sen, että samat vanhenemistä ajavat muutokset eivät tapahdu edes saman henkilön soluissa samanaikaisesti (Chen ym. 2016, Hillary ym. 2020, Levine ym. 2018, Lu ym. 2019).

Kun tutkitaan solujen ja kudosten biologista ikää, käytetään biomarkkereina kronologisen iän lisäksi tiettyjen DNA-kohtien metylaatiotasoa ja huomioidaan myös muut soluissa tapahtuvat vanhenemismekanismet (Chen ym. 2016, Fransquet ym. 2019, Levine ym. 2018, Lu ym. 2019). Biologinen ikä on siis yläkäsite, johon sisältyy sekä epigeneettiset tekijät, että myös muut solun vanhenemisprosessit. Näitä vanhenemisprosesseja on muun muassa telomeerien lyheneminen ja mutaatioiden sekä tuman rakennemuutosten aiheuttama genomien epästabiilisuus (López-Otín ym. 2013). Epigeneettinen ikä onkin yksi tapa mitata biologista ikää ja se huomioi solun tapahtumista vain epigenetiikkaan liittyvät ilmiöt. Näitä termejä, biologista ja epigeneettistä ikää, käytetään artikkeleissa kuitenkin usein tarkoittamaan samaa asiaa. Etenkin biologisesta iästä puhuttaessa on todellisuudessa tutkittu pelkästään DNA:n metylaatiotasoa eli epigeneettistä ikää.

Koska biologista ikää mitattaessa huomioidaan myös henkilön kronologinen ikä, on epigeneettisistä kelloista haluttu johtaa vielä yksi ikääntymistä arvioiva muuttuja AgeAccel. Esimerkiksi Lu ym. (2019) kehittivät omasta epigeneettisestä kellostaan AgeAccelGrimin, joka huomioi kronologisen iän vaikutuksen biologiseen ikään. Tällä tavoin voidaan verrata kaikenikäisiä henkilöitä keskenään, sillä oletettavaa on, että iäkkäämmän henkilön kronologinen ikä vaikuttaa hänen biologiseen ja epigeneettiseen ikäänsä enemmän kuin nuoremmalla henkilöllä. AgeAccelGrim kertoo siis niimensä mukaisesti ikääntymisen kiihtyvyydestä, joka saadaan, kun epigeneettistä ikää verrataan kronologiseen ikään regressioanalyysin avulla. Jos saatu arvo on korkeampi kuin alkuperäinen, solujen vanhenemisprosessi on kiihtynyt. AgeAccelGrimin lisäksi on olemassa muitakin ikääntymisen kiihtymistä mittaavia muuttujia, kuten AgeAccelHannum ja AgeAccelPheno, joissa biologinen ikä on määritelty toisistaan poikkeavista DNA:n metylaatiokohdista (Chen ym. 2016, Lu ym. 2019).

4. EPIGENEETTISET KELLOT

Epigeneettiset kellot ovat matemaattisia algoritmeja, joihin syötetään tietoja biomarkkereista ja CpG-kohtien metylaatiotason muutoksista. Näistä tiedoista pystytään matemaattisten kaavojen

avulla mallintamaan jokaisen biologinen ikä, jolla puolestaan ennustetaan erilaisten sairauksien ilmentymistä (Chen ym. 2016, Levine ym. 2018, Lu ym. 2019). Kuten aiemmin mainittiin, ensimmäiset epigeneettiset kellot, Hannumin (2013) ja Horvathin (2013) kellot, tutkivat kronologisen iän ja DNA:n metylaatiotasojen välistä yhteyttä. Tässä luvussa keskitytään kuitenkin tuoreempien biologista ikää mallintavien kellojen tutkimiseen ja esittelyyn. Aluksi esitellään tarkemmin PhenoAgen (Levine ym. 2018) ja GrimAgen (Lu ym. 2019) kehityksessä käytetyt menetelmät, tärkeimmät tulokset sekä vertaillaan näiden kahden kellon yhteneväisyyksiä ja eroavaisuuksia. Tämän lisäksi tuodaan esiin muutamia muita tutkimustuloksia, jotka on saatu käyttämällä edellä mainittuja kelloja. Työssä ei kuitenkaan analysoida tarkasti käytettyjä kaavoja tai tilastotieteellisiä menetelmiä, vaan keskitytään tarkastelemaan epigeneettisiä kelloja biologisesta näkökulmasta.

4.1 DNAm PhenoAge

4.1.1 Menetelmä

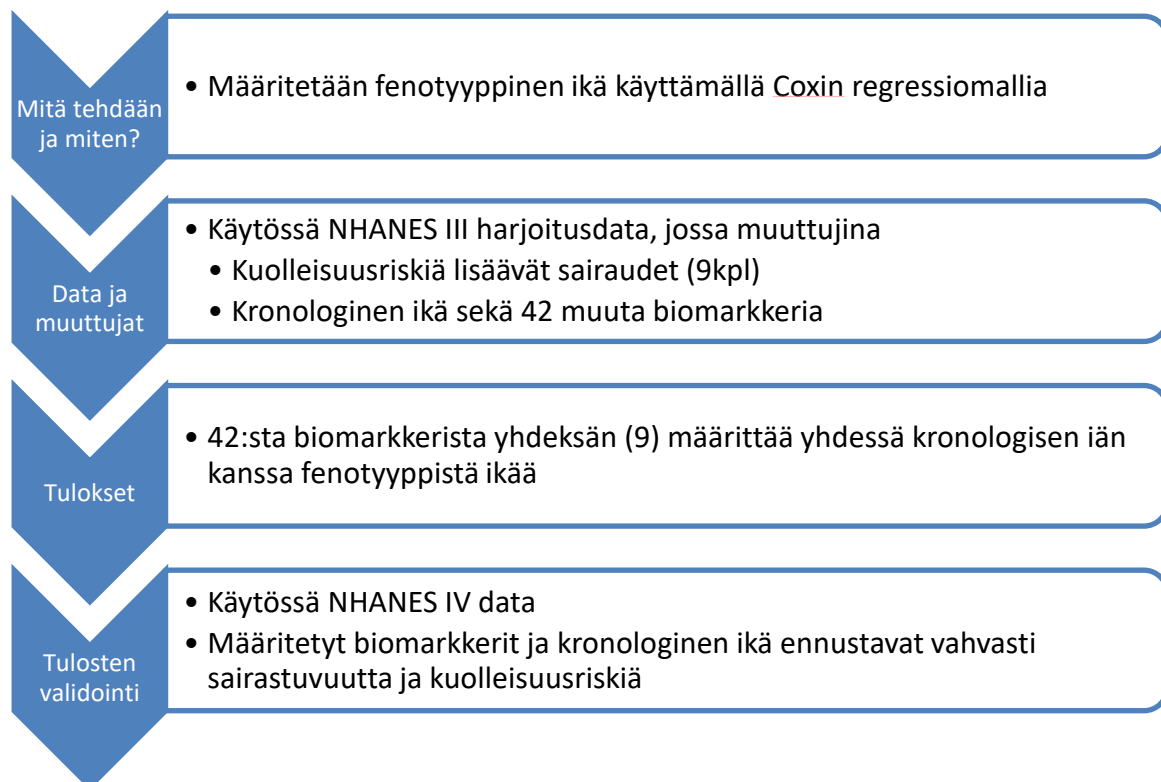
Ihmisen epigeneettistä ikää ennustava malli, DNAm PhenoAge (Levine ym. 2018), kehitettiin kaksovaiheisella menetelmällä. Ensimmäisen vaiheen tarkoitus oli kehittää veren plasmaproteiinipitoisuuksista ja kronologisesta iästä fenotyypinen ikä (phenotypic age), ja kun sitä toisessa vaiheessa mallinnettiin metylaation avulla, saatiin kehitettyä varsinainen biologista ikää mallintava DNAm PhenoAge (Levine ym. 2018).

Ensimmäisissä epigeneettisissä kelloissa, Hannumin (2013) ja Horvathin (2013) kelloissa mallinnettiin kronologista ikää. Fenotyypinen ikä eroaa kronologisesta iästä kuitenkin siten, että se pystyy erottamaan kuolleisuusriskin niiden henkilöiden välillä, joilla on sama kronologinen ikä. Fenotyypisestä iästä kehitetty DNAm PhenoAge mallintaa puolestaan biologista ikää, koska se sisältää fenotyypisen iän lisäksi tietoa myös epigeneettisistä muutoksista. Tämän vuoksi fenotyypinen ikä ja etenkin DNAm PhenoAge kuvastavat yksilöllistä vanhenemista paremmin kuin kronologinen ikä (Levine ym. 2018).

Fenotyypisen iän määrittämisessä käytettiin National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) dataa. NHANES on 1960-luvulla aloitettu tutkimusohjelma, jonka tarkoituksena on kerätä dataa sekä arvioida aikuisten ja lasten terveyttä ja ravitsemustilaa Yhdysvalloissa (<https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm>, viitattu 18.4.2021). Tässä tutkimuksessa käytetyt NHANES datat rajattiin siten, että näytteiden luovuttajat olivat iältään vähintään 20-vuotiaita. Harjoitusdatana (training data) käytetyssä NHANES III -tietokannassa oli näytteitä 9 926 ja kuolleisuutta pystyttiin seuraamaan jopa 23 vuoden ajan. Tulosten validoinnissa käytetyssä NHANES IV sisälsi puolestaan 6 209 näytettä ja kuolleisuutta pystyttiin seuraamaan 12 vuoden ajan (Levine ym. 2018).

DNAm PhenoAgen määrittämisessä käytetty data on puolestaan peräisin InCHIANTI -tietokannasta, jossa dataa on kerätty kahdessa aikapisteessä vuosina 1998 ja 2007. InCHIANTI -tietokannan näytteet on kerätty Italiassa Toscanan alueella asuivilta henkilöiltä, ja näytteitä hyödynnettiin alun perin iäkkäiden henkilöiden liikuntaongelmien selvittämiseen ja hoidon suunnitteluun (<http://in-chiantistudy.net/wp/>, viitattu 18.4.2021). DNAm PhenoAgen määrittämisessä oli käytössä 456 näytettä. Ensimmäisessä aikapisteessä tutkittavat olivat 21–91-vuotiaita ja seuraavassa aikapisteessä vastaavasti 30–100-vuotiaita (Levine ym. 2018).

Alla olevassa kuvassa (Kuva 3) on kuvattu, miten fenotyypistä ikää kuvaava malli, Phenotypic Age, kehitettiin. Tutkimuksessa käytettiin Coxin regressiomallia ja NHANES III dataa. Tarkoituksena oli valikoida spesifit biomarkkerit, joita voidaan hyödyntää fenotyypin iän määrittämisessä. Analyysissä ikääntymiseen liittyviä, kuolemanriskiä lisääviä sairauksia regressoitiin käyttäen muuttujina 42:ta erilaista kliinistä biomarkkeria sekä kronologista ikää. Kyseisiä sairauksia olivat sydän-sairaudet, pahanlaatuiset kasvaimet, krooniset alahengitystiesairaudet, aivoverisuonisairaudet, Alzheimerin tauti, diabetes, munuaistulehdus, nefrootinen oireyhtymä sekä nefroosi. Analyysin jälkeen jäljelle jäi yhdeksän biomarkkeria, jotka yhdessä kronologisen iän kanssa määrittävät fenotyypistä ikää. Nämä biomarkkerit on esitetty alempana olevassa taulukossa (Taulukko 1). Tulokset validoitiin vielä käyttäen NHANES IV dataa, mikä osoitti sen, että määritellyt biomarkkerit ja kronologinen ikä ovat vahvoja sairastavuuden ja kuolleisuusriskin ennustajia (Levine ym. 2018).



Kuva 3: Fenotyypin iän määrittämisen vaiheet. Tehty Levine ym. (2018) artikkelin perusteella.

Taulukko 1: Levine ym. (2018) artikkelissa mainitut fenotyypin iän määrittämisessä käytetyt biomarkerit.

Biomarkerit:
Albumiini
Kreatiniini
Seerumin glukoosipitoisuus
C-reaktiivinen proteiini (CRP)
Lymfosyyttien osuus
Keskimääräinen solutilavuus
Punasolujen jakautumisen leveys
Alkalinen fosfataasi
Valkosolujen määrä
Kronologinen ikä

Kun ensimmäisessä vaiheessa saatiin mallinnettua fenotyypin ikä, kehitettiin sen avulla seuraavassa vaiheessa varsinainen DNAm PhenoAge siten, että fenotyypistä ikää regressoitettiin verinäytteistä analysoidun DNA-metylaatiotietojen kanssa. DNA:n metylaatiotasoa mitattiin käyttäen Illuminan 27k, 450k ja EPIC siruja. Yhteensä näillä kaikilla kolmella sirulla tutkittiin 20 169 CpG-kohtaa, joista lopulta 513 huomioitiin epigeneettisen iän mallintamisessa. Suoritetun regressioanalyysin perusteella saatiin siis määritettyä DNAm PhenoAge, joka sisälsi tiedot 513 CpG-kohdan metylaatiosta, kronologisesta iästä ja yhdeksästä aiemmin määritetystä biomarkerista. DNAm PhenoAgen luotettavuutta validoitiin vielä käyttämällä viittä muuta tietokantaa (Levine ym. 2018).

4.1.2 Tulokset

Koska DNAm PhenoAge kehitettiin fenotyypin iän avulla, saatiin tuloksia erikseen sekä fenotyypistä iästä, että biologisesta iästä. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 2) on esitetty, miten fenotyypin ikä ennustaa kuolleisuutta. Prosenttiosuudet kertovat, kuinka paljon kuolleisuuden riski nousee, kun fenotyypin ikä kasvaa yhdellä vuodella. Näytteenantajien fenotyypin ikä korreloi hyvin kronologisen iän kanssa ($r=0,94$).

Taulukko 2: Kuolleisuuden ennustus fenotyyppisen iän avulla. Kuinka paljon kuolleisuuden riski nousee, kun fenotyyppinen ikä kasvaa yhdellä vuodella. Tiedot haettu Levine ym. (2018) artikkelista.

Kuolleisuuden syy	Kuolemantapauksia	Kuolleisuusriskin kasvu
Kokonaiskuolleisuus	1052	9 %
Ikääntymiseen liittyvien sairauksien aiheuttama kuolleisuus	661	9 %
Sydän- ja verisuonitaudit	272	10 %
Syöpä	265	7 %
Alzheimerin tauti	30	4 %
Diabetes	41	20 %
Krooniset alahengitystiesairaudet	53	9 %

Tutkijat selvittivät myös, liittyvätkö ajan kuluessa tapahtuvat DNAm PhenoAge -muutokset fenotyyppisen iän muutoksiin ja kuinka hyvin ne korreloivat kronologisen iän kanssa. Huomioitavaa on se, ettei DNAm PhenoAgen tai fenotyyppisen iän ja kronologisen iän välistä korrelaatiota ole tarkoitus saada täydelliseksi ($r=1$), koska oletettavaa on, että niissä on eroavaisuutta. Oletettavaa on kuitenkin se, että mitä parempi korrelaatio on, sitä paremmin ikäestimaattorit (DNAm PhenoAge tai fenotyyppinen ikä) toimivat. Saatujen tulosten mukaan fenotyyppinen ikä ja DNAm PhenoAge korreloivat kahdessa aikapisteessä (mittauspisteiden väli kymmenen vuotta) eri tavalla, kun niitä mukautettiin kronologisen iän kanssa: DNAm PhenoAgen korrelaatio oli $r=0,68$ ja fenotyyppisen iän $r=0,50$. Tutkijat havaitsivat myös, että näiden aikapisteiden välillä fenotyyppisen iän muutos korreloi hyvin ($r=0,74$) DNAm PhenoAgen muutosten kanssa (Levine ym. 2018), mikä on hyvin oletettavaa, koska DNAm PhenoAgen algoritmi sisältää aiemmin määritetyn fenotyyppisen iän.

Koska DNAm PhenoAge kehitettiin käyttäen vain yhtä tietokantaa, haluttiin sen luotettavuutta validoida käyttämällä vielä muita tietokantoja (Taulukko 3). Kaikki käytetyt sirut olivat Illuminan valmistamia, ja korrelaatio kronologisen iän kanssa oli $r=0,62-0,89$ (Levine ym. 2018).

Taulukko 3: DNAm PhenoAgen validointi eri tietokannoilla. Tiedot haettu Levine ym. (2018) artikkelista.

Käytetty tietokanta:	Näytteiden määrä:	Käytetty siru:	Korrelaatio kronologisen iän kanssa:
Women's Health Initiative 1 (WHI 1)	2 016	Illumina 450K	$r=0,66$
Women's Health Initiative 2 (WHI 2)	2 191	Illumina 450K	$r=0,69$
Framingham Heart Study (FHS)	2 553	Illumina 450K	$r=0,78$
Normative Aging Study (NAS)	657	Illumina 450K	$r=0,62$
Jackson Heart Study (JHS)	1 747	Illumina EPIC	$r=0,89$

Taulukossa 3 esiteltujen tietokantojen näytteitä käytettiin myös arvioimaan DNAm PhenoAgen yhteyttä kuolleisuuteen. Koska biologinen ikä kuvaa elimistön toimintakykyä ja soluihin kertyneitä

vaurioita, on oletettavaa, että mitä korkeampi biologinen ikä on, sitä korkeampi myös kuolleisuusriski on. Saadut tulokset tukivat tätä oletusta, sillä yhden vuoden kasvu DNAm PhenoAge:ssa lisäsi kokonaiskuolleisuuden riskiä 4,5 %. Lisäksi ennustettua elinajanodotetta ja kuolleisuusriskiä verrattiin eri tahtiin ikääntyvillä henkilöillä. Mukana otoksessa olivat 5 % nopeimmin ja hitaimmin vanhenevat henkilöt sekä keskiarvoa edustavat henkilöt. Kuten oletettua, nopeimmin vanhenevilla henkilöillä on suurin kuolemanriski: 1,62-kertainen keskimääräisellä nopeudella vanheneviin ihmisiin verrattuna ja 2,58-kertainen hitaimmin vanheneviin verrattuna. Nopeimmin vanhenevilla henkilöillä on myös lyhyempi elinajanodote ja suhteellinen elossaololuku muihin verrattuna (Levine ym. 2018).

Koska vanheneminen on yksi monien kansantautien suuri riskitekijä, on myös DNAm PhenoAge ja sairauksien yhteys oletettavaa. Tulokset ovat kronologisesta iästä riippumattomia, mutta korkeampi DNAm PhenoAge lisää henkilön samanaikaisesti esiintyvien sairauksien määrää, fyysisen toimintakyvyn ongelmia sekä sepelvaltimotaudin riskiä. Vastaavasti todennäköisyys olla terve (disease-free) vähenee (Levine ym. 2018).

Sairastuvuus- ja kuolleisuusriskejä arvioitiin vielä uudestaan huomioiden näytteenantajien raportoima tupakointihistoria, koska tupakoivilla ihmisillä havaittiin olevan merkittävästi korkeampi epigeneettinen ikä aikaisemmin tai ei koskaan tupakoineisiin henkilöihin verrattuna. Tulokset eivät sinänsä muuttuneet aikaisemmista, sillä DNAm PhenoAge havaittiin liittyvän kuolleisuuteen, samanaikaisesti esiintyvien sairauksien määrään, fyysiseen toimintakykyyn, sepelvaltimotaudin riskiin ja todennäköisyyteen olla terve sekä tupakoivilla että tupakoimattomilla henkilöillä. Huomioitavaa on kuitenkin se, ettei sillä, kuinka monta vuotta on tupakoinut, ollut vahvaa yhteyttä DNAm PhenoAge kanssa (Levine ym. 2018). Zhaon ym. (2019) tutkimustulos tukee Levinen ym. (2018) tutkimusta, sillä hekin löysivät yhteyden raportoidun tupakointihistorian ja epigeneettisen iän kiihtymisen välillä käyttäessään PhenoAge ja GrimAge -kelloja. Yang ym. (2019) puolestaan havaitsivat, että muutokset 52 CpG-kohdassa ovat vahvemmin yhteydessä DNAm PhenoAge kiihtymiseen kuin itseraportoitu tupakointihistoria.

Levine ym. (2018) osoittivat myös, että kokoverinäytteen lisäksi DNAm PhenoAge määrittämisessä voitaisiin soveltaa myös kudosisäily- ja solunäytteitä, koska niistä määritetty DNAm PhenoAge korreloi hyvin kronologisen iän kanssa. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 4) on esitelty joitakin kudoksia, joista DNAm PhenoAge on onnistuneesti määritetty.

Taulukko 4: Esimerkkejä mistä kudoksista DNAm PhenoAge voidaan määrittää ja millainen korrelaatio on ollut kronologisen iän välillä. Tiedot haettu Levine ym. (2018) artikkelista.

Näyte:	Korrelaatio kronologisen iän kanssa:
Kaikki kudokset	r=0,71
Aivokudos	r=0,54–0,92
Rintakudos	r=0,47
Ihon fibroblasti	r=0,87
Epidermis	r=0,84
Sydän	r=0,66
Maksa	r=0,80
Sylki	r=0,81

Alzheimerin tauti liittyy voimakkaasti ikääntymiseen, sillä sen yleisyys kasvaa mitä iäkkäämmäksi ihmiset tulevat. Esimerkiksi yli 85-vuotiaista tautia sairastaa 15–20 % (https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00699, viitattu 14.3.2021). Koska DNAm PhenoAge pystyttiin onnistuneesti määrittämään veren lisäksi myös aivokudoksesta, tutkijat halusivat selvittää, onko DNAm PhenoAgella yhteyttä Alzheimerin tautiin. Religious Order Study (ROS) ja Memory and Aging Project (MAP) tutkimuksista saatiin näytteet noin 700 vainajalta. DNAm PhenoAge määritettiin dorsolateraaliseen prefrontaaliseen aivokuoresta, ja potilaiden mahdollinen Alzheimerin tauti oli diagnosoitu aikaisemmin ruumiinavauksessa. Tulokset osoittavat, että niillä henkilöillä, joilla diagnosoitiin Alzheimerin tauti, aivokuoresta määritetty DNAm PhenoAge oli yli vuoden vanhempi kuin samanikäisillä Alzheimeria sairastamattomilla henkilöillä (Levine ym. 2018). Sibbett ym. (2020) eivät puolestaan löytäneet omassa tutkimuksessaan yhteyttä dementiaan ja kiihtyneen ikääntymisen välillä yli 79-vuotiailla henkilöillä. Tutkimus erosi kuitenkin Levinen ym. (2018) tutkimuksesta siinä mielessä, että he määrittivät epigeneettisen iän verinäytteistä ensin Horvathin kelloilla (2013), jonka jälkeen he laskivat AgeAccel arvoja muun muassa PhenoAgelle ja GrimAgelle. Tulokset olivat yllättäviä, jonka vuoksi lisätutkimuksille on tarvetta. Tutkijoiden oletuksena on, että suuremmilla aineistoilla ja erilaisilla kohorteilla voitaisiinkin tukea heidän hypoteesiaansa siitä, että DNA-metylaatiotasojen muutosten avulla määritetty ikääntymisen kiihtyvyys on yhteydessä dementiaan (Sibbett ym. 2020). Tämä tukisi Levine ym. (2018) saamia tuloksia, joissa Alzheimeria sairastaneiden henkilöiden epigeneettinen ikä oli vanhempi kuin samanikäisillä sairastamattomilla.

DNAm PhenoAgen kyky ennustaa syövän ilmaantuvuutta on todettu monissa eri tutkimuksissa. Levine ym. (2018) havaitsivat, että yhden vuoden kasvu DNAm PhenoAgessa lisää keuhkosyövän riskiä 5 %, ja tupakoivilla henkilöillä riski on jopa kaksinkertainen tupakoimattomiin verrattuna. DNAm PhenoAgen sekä Hannumin (2013) ja Horvathin (2013) kelloilla määritetyn biologisen iän

kiihtymisen on todettu olevan yhteydessä myös naisten rintasyöpäriskiin. Esimerkiksi DNAm PhenoAgen kiihtyminen viidellä vuodella kasvattaa rintasyöpäriskiä 15 % (Kresovich ym. 2019).

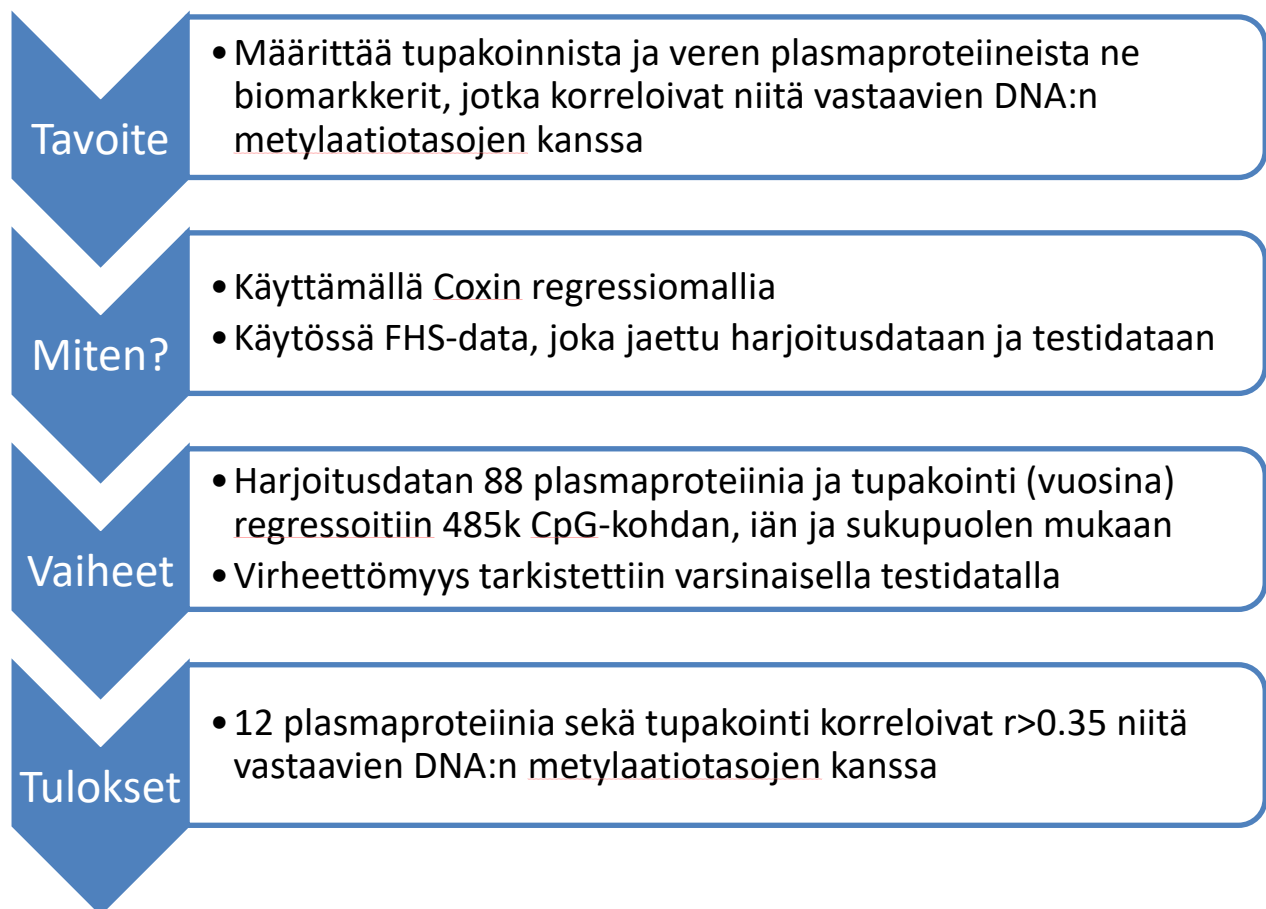
Gàon ym. (2020) mukaan verinäytteistä määritetyillä AgeAccelPhenolla ja AgeAccelGrimillä on tilastollisesti merkittävä yhteys paksusuolensyöpää sairastavien kuolleisuuteen. Eloonjääminen oli epätodennäköisintä potilailla, joilla oli suurimmat AgeAccel-arvot syövän alku- ja keskivaiheissa. Näin ollen epigeneettisistä kelloista voisi olla hyötyä paksusuolensyöpää sairastavien potilaiden hoitopäätöksiä tehdessä, kun jo diagnosointivaiheessa voitaisiin arvioida eloonjäämisen todennäköisyyttä (Gào ym. 2020). Wang ym. (2020) määrittivät DNA:n metylaatiotasojen muutoksia puolestaan normaaleista paksusuolen limakalvonäytteistä jakaen koehenkilöt tulosten ja taustatietojen perusteella kolmeen eri riskiryhmään. Tulokset olivat yllättäviä siihen nähden, että yleensä korkeampi epigeneettinen ikä lisää kuolleisuus- ja sairastuvuusriskiä. Wang ym. (2020) mukaan suurimman paksusuolen syövän riskin omaavilla henkilöillä DNAm PhenoAgella määritetty epigeneettinen ikä hidastui normaaleissa paksusuolen näytteissä. Heidän mukaansa epigeneettisen iän häiriintyminen saattaa olla merkki suuresta paksusuolensyövän riskistä (Wang ym. 2020). Edellä kuvatut tutkimustulokset kuitenkin osoittavat, että DNAm PhenoAgella voidaan ennustaa erilaisten syöpäsairauksien riskiä sekä kudospäätteistä että verestä. Tulevaisuudessa näitä tutkimuksia voitaisiinkin kenties hyödyntää syövän varhaisessa havaitsemisessa ja diagnosoinnissa.

4.2 DNAm GrimAge

4.2.1 Menetelmä

Myös Lu ym. (2019) kehittivät oman epigeneettistä ikää arvioivan kellon, DNAm GrimAgen, kaksivaiheisella menetelmällä. Ensimmäisessä vaiheessa määritettiin DNA:n metylaatiotasoihin pohjautuvat biomarkerit plasmaproteiineista ja tupakoinnista, joita hyödynnettiin seuraavassa vaiheessa varsinaisen DNAm GrimAgen kehittämiseen. Ensimmäisessä vaiheessa käytetty data on peräisin Framingham heart study (FHS) tietokannasta. Tietokannan alkuperäiset näytteenantajat ovat kohtaisin Yhdysvalloista Framinghamin kaupungista. Pitkäaikaisen seurantatutkimuksen alkuperäisenä tarkoituksena oli löytää yhteisiä selittäviä tekijöitä sydän- ja verisuonitautien kehittymiselle. Sitten tutkimus on laajentunut koskemaan alkuperäisten näytteenantajien lisäksi myös heidän lapsiaan ja lastenlapsiaan antaen tietoa kolmesta sukupolvesta (<https://framingham-heartstudy.org/>, viitattu 18.4.2021). Lu ym. (2019) käyttivät 2 356 näytteen kokoista FHS-datajoukkoa, joka jaettiin harjoitusdataan ja varsinaiseen testidataan. Harjoitusdata sisälsi 70 % ja testidata 30 % näytteistä. Näytteiden luovuttajien taustat kuten keski-ikä ja tupakointihistoria olivat hyvin samanlaiset molemmissa ryhmissä. Harjoitusdatassa keski-ikä oli 66 vuotta ja heistä 59 % on tupakoinut aikaisemmin tai tällä hetkellä. Testidatan vastaavat lukemat olivat 67 vuotta ja 62 % (Lu ym. 2019).

Alla olevassa kuvassa (Kuva 4) on kuvattuna ensimmäinen vaihe DNAm GrimAgen kehittämisessä. Ensin harjoitusdatasta verrattiin DNA:n metylaatiotasoa tupakointihistorian sekä immunomäärityksellä mitatun 88 plasmaproteiinin pitoisuuden kanssa. Analyysissä tarkasteltiin niitä CpG-kohtia, jotka ovat sekä Illuminan Infinium 450k ja EPIC siruilla. Jokainen plasmaproteiini regressioitiin Coxin regressiomallilla kronologisen iän, sukupuolen ja CpG-kohtien metylaatiotasojen mukaan. Mitatuista plasmaproteiinitasoista 12 korreloi kohtalaisen hyvin ($r > 0.35$) niitä vastaavien DNA:n metylaatiotasojen kanssa sekä harjoitusdatassa että varsinaisessa testidatassa (Taulukko 5). Lisäksi 172 CpG-kohdan metylaatiotasojen analysoitiin korreloivan raportoidun tupakointihistorian kanssa.



Kuva 4: Ensimmäinen vaihe DNAm GrimAgen määrittämisessä. Tehty Lu ym. (2019) artikkelin perusteella.

Taulukko 5: Immunomäärityksellä analysoitujen plasmaproteiinien (12kpl) ja tupakoinnin korrelaatio niitä vastaavien DNA-metylaatiotasojen välillä. Seitsemää ensimmäistä plasmaproteiinia käytettiin myöhemmässä vaiheessa myös kuolleisuuden ennustamisessa ja siten DNAm GrimAgen algoritmissa. Tiedot haettu Lu ym. (2019) artikkelista.

Biomarkkerit	Harjoitusdata (n=1731)	Testidata (n=625)
	Korrelaatio biomarkkerin ja metylaatiotasojen välillä	Korrelaatio biomarkkerin ja metylaatiotasojen välillä
adrenomedulliini	0,65	0,38
beeta-2-mikroglobuliini	0,62	0,43
kystatiini C	0,58	0,39
kasvun erilaistumistekijä 15 (GDF15)	0,74	0,53
leptiini	0,68	0,35
plasminogeenin aktivaattorin inhibiittori (PAI-1)	0,69	0,36
metalloproteiinaasien kudoshäiriö- torin-1 (TIMP-1)	0,43	0,35
CD56	0,86	0,36
keruloplasmiini	0,56	0,49
solunulkoinen matriisiproteeini 1 (EFEMP1)	0,59	0,41
myoglobiini	0,50	0,38
Seerumin paraoksonaasi/aryleste- raasi 1 (PON-aryyli 1)	0,57	0,51
tupakointi (vuosina)	0,79	0,66

Seuraavan vaiheen tarkoituksena oli kehittää varsinainen biologista ikää mallintava DNAm GrimAge ikään kuin käänteisesti kuolleisuusriskiä arvioimalla. Tutkimuksessa käytetystä datasta saatiin seurantatietoa siitä, kuinka kauan näytteenantajat olivat eläneet näytteenoton jälkeen. Tätä tietoa regressoitiin näytteenantajan sukupuoleen, kronologiseen ikään, sekä DNA:n metylaatiotietojen perusteella arvoituun tupakointiin (DNAm PACKYRS) ja 12 plasmaproteiinia vastaaviin biomarkkereihin. Analyysi tehtiin jälleen Coxin regressiomallilla, jolloin plasmaproteiineja rajautui mukaan vain seitsemän. Nämä seitsemän plasmaproteiinia on esitetty edellä olevassa taulukossa (Taulukko 5) ylimmäisenä. Tupakointiin käytettyä aikaa ja näitä seitsemää plasmaproteiinia kuvaavat DNA:n metylaatioprofiilit sisältävät kukin alle 200 CpG-kohtaa, ja kaiken kaikkiaan erillisiä CpG-kohtia on 1030, kun kaikki metylaatioprofiilit otetaan huomioon. Coxin regressiomallilla saadaan tulos, joka voidaan kuvata kuolleisuuden riskisuhteen logaritmina. Tämä parametri muutettiin matemaattisesti lineaarisesti biologista ikää mallintavaksi DNAm GrimAgeksi, jonka luotettavuutta testattiin vielä useilla tuhansilla näytteillä eri tietokannoista (Lu ym. 2019).

DNAm GrimAgen algoritmi sisältää siis kohdehenkilön iän, sukupuolen ja kahdeksan DNA:n metylaatiotasoihin perustuvaa biomarkkeria (tupakointi ja seitsemän plasmaproteiinia). Lisäksi tutkijat kehittivät epigeneettisen iän kiihtyvyyttä arvioivan mallin, AgeAccelGrimin. Sen tarkoituksena on

huomioida kuinka paljon yksilön kronologinen ikä vaikuttaa hänen epigeneettiseen ikäänsä, jotta kronologiselta iältä erilaisia henkilöitä ja heidän biologista vanhenemisnopeuttaan voidaan vertailla keskenään. Epigeneettisen iän kiihtyvyys saadaan laskettua, kun epigeneettistä ikää verrataan kronologiseen ikään lineaarisen regressioanalyysin avulla. Jos saatu arvo on alkuperäistä korkeampi, on solujen vanhenemisprosessi kiihtynyttä (Chen ym. 2016, Lu ym. 2019).

4.2.2 Tulokset

Biologista ikää mallintava DNAm GrimAge korreloi voimakkaasti ($r=0.82$) kronologisen iän kanssa FHS-datassa, jota käytettiin DNAm GrimAgen luomisessa. Tämän lisäksi DNAm GrimAgen ennustuskäkyä ja toimivuutta testattiin useiden eri tietokantojen näytteillä. Käytössä oli kaiken kaikkiaan viisi kohorttia, jotka sisälsivät yhteensä 6 935 näytettä. Näytteistä tehtiin meta-analyysi, josta selvisi, että AgeAccelGrim sekä jokainen DNAm GrimAgen kahdeksasta biomarkkerista ennusti hyvin jäljellä olevaa elinaikaa (time-to-death). AgeAccelGrim oli myös merkittävä jäljellä olevan elinajan ennustaja, kun analyysi rajattiin tupakoimattomiin tai aikaisemmin tai nykyisin tupakoiviin henkilöihin (Lu ym. 2019).

Selvää on, että pelkkien plasmaproteiinipitoisuuksien määrittäminen on monissa laboratorioissa helpompaa ja edullisempaa kuin metylaatiotasojen mittaaminen, jonka vuoksi tutkittiin, antavatko metylaatiotasot selvästi luotettavampaa ja parempaa tietoa niin, että sitä olisi hyödyllistä käyttää jatkossakin. Tutkijat testasivat, onko jäljellä olevan elinajan ennustekyvyyssä eroavaisuuksia, jos analyysi tehdäänkin mitattavissa olevilla biomarkkereilla, jolloin analyysissä käytetään veren plasmaproteiinipitoisuuksia ja raportoitua tupakointihistoriaa eikä niitä vastaavia metylaatiotasoja. DNA:n metylaatiotasoihin pohjautuva DNAm PACKYRS sekä ikäsopeutetut biomarkkerit DNAm PAI-1, DNAm TIMP-1, DNAm Cystatin C ennustivat paremmin jäljellä olevaa elinaikaa kuin vastaavat, ei-metylaatiotasoihin perustuvat biomarkkerit. Toisaalta nimenomaan plasmaproteiinipitoisuuksista ja raportoidusta tupakointihistoriasta tehty ikäalgoritmi ei eronnut merkittävästi metylaatiopohjaisesta AgeAccelGrimista, sillä DNAm AgeAccelGrimin hasardisuhde (HR) oli 1,12 ja p-arvo oli $8,6 \times 10^{-5}$, ja vastaavasti ei-metylaatioihin perustuvien biomarkkereiden pohjalta tehdyn AgeAccelGrimin HR oli 1,10 ja p-arvo oli $3,2 \times 10^{-7}$. Tulokset osoittivat myös sen, että AgeAccelGrimilla sekä muutamalla DNA:n metylaatiotasoihin pohjautuvalla biomarkkerilla ja plasmaproteiinipitoisuudella on merkittävä perinnöllisyys (Lu ym. 2019).

Kuten PhenoAgen kohdalla, myös tässä tutkijat olettivat, että biologista ikää mallintava GrimAge ennustaa aikaa erilaisten sairauksien puhkeamiseen. Coxin regressioanalyysillä saadut tulokset osoittavat, että AgeAccelGrim ennustaa erittäin hyvin sepelvaltimotaudin ja kongestiivisen sydämen vajaatoiminnan ilmaantumista. Myös yksittäinen ikäsopeutettu DNAm PAI-1 biomarkkeri ennusti hyvin näiden molempien sairauksien ilmaantuvuutta. Poikkileikkaustutkimukset osoittivat

myös, että korkeammat AgeAccelGrim-arvot liittyvät fyysisen toimintakyvyn alenemiseen, korkeampaan verenpaineeseen, 2-tyyppin diabetekseen ja naisten varhaisiin vaihdevuosiin (Lu ym. 2019). Vaihdevuosien ja epigeneettisen iän kiihtymisen välistä yhteyttä on tutkinut myös Thurston ym. (2020). Heidän tuloksensa tuki Lu ym. (2019) tuloksia, sillä he totesivat tutkimuksessaan, että varhaisista vaihdevuosista kärsivillä naisilla vakavat ja myöhään ilmaantuvat vasomotoriset oireet, kuten kuumat aallot, liittyivät korkeampiin DNAm PhenoAgen ja DNAm GrimAgen arvoihin.

Tärkeää on tietysti myös tietää, miten hyvin kehitetty malli toimii muihin kelloihin verrattuna. AgeAccelGrim ennusti parhaiten jäljellä olevaa elinaikaa sekä aikaa minkä tahansa syövän kehittymiselle ja naisten varhaiselle menopaussille, kun sitä verrattiin aiemmin kehitettyihin DNAm PhenoAgeen (Levine ym. 2018) sekä Horvathin (2013) ja Hannumin (2013) kelloihin. AgeAccelGrimia vastaavat, epigeneettisen iän kiihtymistä kuvaavat mittarit, nimettiin AgeAccelPhenoksi, AgeAccelksi (Horvathin kello) ja AgeAccelHannumiksi. AgeAccelGrim korreloi parhaiten ($r=0,45$) AgeAccelPhenon kanssa (Levine ym. 2018), mikä on hyvin oletettavaa, koska ne molemmat mallintavat biologista ikää toisin kuin Hannumin ja Horvathin kellot. Meta-analyysin p-arvot osoittavatkin, että näistä neljästä kellosta juuri biologista ikää mallintavat kellot, ja erityisesti AgeAccelGrim, ennustavat parhaiten jäljellä olevaa elinaikaa. Tulos on hyvin looginen sen takia, että biologinen ikä huomioi yksilölliset vanhenemismuutokset toisin kuin kronologinen ikä. Järjestys p-arvojen mukaan parhaimmasta huonoimpaan oli AgeAccelGrim ($p=2,0 \times 10^{-75}$; HR=1,10), AgeAccelPheno ($p=3,5 \times 10^{-36}$; HR=1,05), AgeAccelHannum ($p=6,8 \times 10^{-16}$; HR=1,04) ja AgeAccel ($p=8,9 \times 10^{-5}$; HR=1,02). Järjestys ei muuttunut, vaikka analyysia rajoitettiin tupakoinnin perusteella tai tutkittiin vain 20 % nopeimmin ja hitaimmin vanhenevia ihmisiä. Coxin regressiomallilla tehtyjä analyysejä pystyttiin myös mukauttamaan tietokannoista saatujen tietojen perusteella. Kovariaatteina käytettiin muun muassa painoindeksiä, sekä aikaisemmin sairastettua syöpää, diabetesta tai korkeaa verenpainetta, koska näillä uskotaan olevan vaikutusta solujen toimintakykyyn ja siten biologiseen ikään. Erilaisista kovariaateista huolimatta AgeAccelGrimilla oli jälleen korkein ja merkittävin ennustekyky jäljellä olevalle elinajalle (Lu ym. 2019).

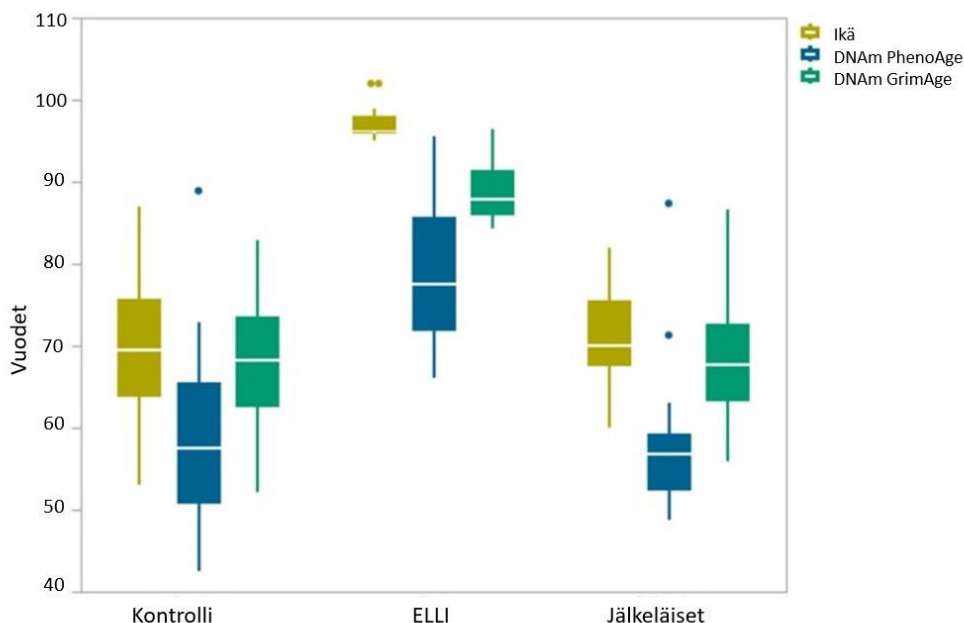
4.3 DNAm PhenoAgen ja DNAm GrimAgen erot ja yhteneväisyydet

Vaikka DNAm PhenoAge ja DNAm GrimAge arvioivat molemmat biologista ikää, on niissä paljon eroavaisuuksia. Alla olevaan taulukkoon (Taulukko 6) on koottu tietoja kyseisten kellojen biomarkkereista, CpG-kohtien määrästä ja muutamia esimerkkejä kellojen käyttökohteista. Yhtäläisyyksiä löytyy lähinnä kellojen käyttökohteista, sillä epigeneettisen iän kiihtymisellä on todettu olevan yhteyttä muun muassa monien syöpäsairauksien riskin lisääntymiseen ja fyysisen toimintakyvyn heikkenemiseen (Gào ym. 2020, Kresovich ym. 2019, Levine ym. 2018, Lu ym. 2019). PhenoAgen ja GrimAgen käyttökohteita on löydetty myös muista tutkimuksista, kuten kappaleissa 4.1.2 ja 4.2.2 tuotiin esiin.

Taulukko 6: Yhteenvetotaulukko DNAm PhenoAge ja DNAm GrimAge. Tiedot haettu Levine ym. (2018) ja Lu ym. (2019) artikkeleista.

Epigeneettiset kellot	DNAm PhenoAge	DNAm GrimAge
Mistä biomarkkerit määritetty?	Veren plasmaproteiinipitoisuuksista	Veren plasmaproteiineja vastavista DNA:n metylaatiotasosta
Biomarkkerit	Albumiini	Adrenomedulliini
	Kreatiniini	Beeta-2-mikroglobuliini
	Seerumin glukoosipitoisuus	Kystatiini C
	C-reaktiivinen proteiini (CRP)	Kasvun erilaistumistekijä 15 (GDF15)
	Lymfosyyttien osuus	Leptiini
	Keskimääräinen solutilavuus	Plasminogeenin aktivaattorin inhibiittori (PAI-1)
	Punasolujen jakautumisen leveys	Metalloproteiinaasien kudosinhibiittori-1 (TIMP-1)
	Alkalinen fosfataasi	Raportoitu tupakointi (vuosina)
	Valkosolujen määrä	Sukupuoli
	Kronologinen ikä	Kronologinen ikä
Tutkittavien CpG-kohtien määrä	513	1030
Esimerkkejä mitä epigeneettisillä kelloilla voidaan arvioida tai ennustaa	Yleistä kuolleisuusriskiä	Jäljellä olevaa elinaikaa
	Syöpäsairauksien riskiä	Syöpäsairauksien riskiä
	Samanaikaisesti esiintyvien sairauksien määrää	Kongestiivista sydämen vajaatoiminnan riskiä
	Fyysistä toimintakykyä	Fyysistä toimintakykyä
	Alzheimerin taudin riskiä	Varhaisia vaihdevuosia
Todennäköisyyttä olla terve	Sepelvaltimotaudin riskiä	

Monissa tutkimuksissa on käytetty useita erilaisia epigeneettisiä kelloja yhden sijaan, jotta saatuja tuloksia on voitu verrata keskenään. Gutman ym. (2020) ovat hyödyntäneet DNAm GrimAgea ja DNAm PhenoAgea tutkiessaan poikkeuksellisen pitkäikäisten henkilöiden (exceptionally long-lived individuals, ELLI) metylaatiotasoja. Alla olevassa kuvassa (Kuva 5) on kuvattuna jokaisen ryhmän kronologinen ikä sekä DNAm GrimAgea ja DNAm PhenoAgea määritetyt epigeneettiset iät. Kuvasta voidaan päätellä, että DNAm GrimAge korreloi paremmin kronologisen iän kanssa kuin DNAm PhenoAge. Lisäksi epigeneettinen ikä oli kaikissa ryhmissä alhaisempi kuin kronologinen ikä ja ero oli suurin nimenomaan poikkeuksellisen pitkäikäisillä henkilöillä. Tutkijoiden mukaan tämä viittaisi siihen, että poikkeuksellisen pitkäikäisillä yksilöillä on suotuisa DNA-metylaatioprofiili, mikä mahdollistaa hitaamman ikääntymisen muihin verrattuna. Hitaampi ikääntyminen lisää puolestaan tervettä elinaikaa. Huomioitavaa on kuitenkin se, että aineisto oli todella pieni, mikä voi antaa virheellisiä tuloksia (Gutman ym. 2020).



Kuva 5: Kronologinen ikä sekä DNAm PhenoAge ja DNAm GrimAge määritetyt epigeneettiset iät kolmessa eri tutkimusryhmässä. Ryhmät ovat kontrolli (N=28), ELLI eli poikkeuksellisen pitkäikäiset yksilöt (N=24) ja ELLI-jälkeläiset (N=18). Muokattu lähteestä Gutman ym. 2020.

Vaikka epigeneettisten kellojen kohdalla on puhuttu paljon vanhenemisesta ja sen merkityksestä fyysisen toimintakyvyn heikkenemiseen ja sairauksien ilmenemiseen, täytyy muistaa, että epigeneettiset tekijät ovat vain yksi vanhenemisen tunnusmerkeistä (López-Otín ym. 2013). Viime vuonna julkaistussa tutkimuksessa verrattiinkin ensimmäistä kertaa yhdeksää erilaista tapaa mallintaa biologista ikää (Li ym. 2020). Tutkimuksessa ei siis käytetty pelkästään epigeneettisiä kelloja vaan 20 vuoden seuranta-ajan aikana tutkittiin muun muassa telomeerien pituutta, fysiologista ikää ja kognitiivista toimintakykyä. Ruotsalaisessa populaatioaineistossa oli mukana 845 henkilöä, jotka olivat iältään 50–90-vuotiaita. Kaikilla mittaustavoilla mitattuna niillä saman ikäryhmän henkilöillä, joilla oli korkeampi biologinen ikä, oli suurempi todennäköisyys kuolla aikaisemmin. Käytetyistä tutkimusmenetelmistä erityisesti DNA:n metylaatiotasoihin perustuvat ikäestimaattorit, joita olivat Hannumin kello (2013), Horvathin kello (2013), DNAm PhenoAge (Levine ym. 2018) sekä DNAm GrimAge (Lu ym. 2019), ennustivat parhaiten yksilön kuolemanriskiä (Li ym. 2020). Tulevaisuudessa biologista ikää ja vanhenemisen vaikutuksia tutkittaessa onkin tarvetta juuri tämän kaltaisille tutkimuksille, joissa pyrittäisiin huomioimaan mahdollisimman monipuolisesti erilaiset vanhenemisen tunnusmerkit ja tavat mallintaa biologista ikää.

5. YHTEENVETO

Epigeneettisten tekijöiden eli DNA:n metylaation, histonien kovalenttisen muokkauksen, nukleosomien muokkauksen sekä ei-koodaavan RNA:n (Dupont ym. 2009, Taipale 2006, Wei ym. 2017) tiedetään olevan yksiä vanhenemisen tunnusmerkeistä (López-Otín ym. 2013). Niillä pystytään vaikuttamaan geenien toimintaan ja säätelyyn muuttamatta DNA-sekvenssiä, ja niiden on todettu periytyvän vähintäänkin mitoottisesti solulta toiselle (Dupont ym. 2009, Taipale 2006, Wei ym. 2017). Tämänhetkiset tutkimusmenetelmät ja -laitteet mahdollistavat lähinnä vain DNA:n metylaatiotasojen tutkimisen laajoilla aineistoilla, jonka vuoksi sen merkityksestä geeninsäätelyssä tiedetään eniten.

Metylaatiolla eli metyyliiryhmän (-CH₃) liittymisellä DNA:n sytosiiniemäkseen voidaan sekä aktiivoida että inaktiivoida geenien luentaa (Dupont ym. 2009, Gillespie ym. 2019, Taipale 2006). Epigeneettisissä kelloissa tarkastellaan nimenomaan metylaatiotasolla tapahtuvia muutoksia, joiden avulla voidaan mallintaa sekä kronologista (Hannum ym. 2013, Horvath 2013) että biologista ikää (Levine ym. 2018, Lu ym. 2019). Koska biologisella iällä pyritään kuvaamaan solujen ja kudosten toimintakykyä ja niihin kertyneitä vaurioita, voidaan sen avulla ennustaa myös riskejä erilaisille sairauksille (Li ym. 2020).

Tarkastelussa olleet DNAm PhenoAge (Levine ym. 2018) ja DNAm GrimAge (Lu ym. 2019) mallintavat biologista ikää ja ennustavat melko luotettavasti muun muassa yleistä kuolleisuusriskiä, jäljellä olevaa elinaikaa ja riskejä erilaisille sairauksille, kuten Alzheimerin taudille ja sepelvaltimotaudille. Yleisesti voidaankin sanoa, että mitä korkeampi biologinen ikä on eli mitä enemmän soluihin on kertynyt vaurioita, sitä suurempi kuolleisuus- ja sairastuvuusriski on (Levine ym. 2018, Lu ym. 2019). DNAm PhenoAgea ja DNAm GrimAgea on käytetty myös monissa muissa tutkimuksissa erilaisilla populaatio- ja potilasaineistoilla. Korkeampien DNAm PhenoAge ja DNAm GrimAge -arvojen on todettu lisäävän esimerkiksi rintasyövän riskiä (Kresovich ym. 2019) ja olevan yhteydessä paksusuolensyöpää sairastavien kuolleisuuteen (Gào ym. 2020). Vaikka useat tähän mennessä tehdyt tutkimukset tukevat Levinen ym. (2018) ja Lu ym. (2019) tuloksia, ja epigeneettiset kellot näyttävät toimivan hyvin käytetyissä aineistoissa (Gào ym. 2020, Gutman ym. 2020, Kresovich ym. 2019, Thurston ym. 2020), täytyy kehityksen vielä jatkua ennen kuin niitä voidaan hyödyntää yksittäisten potilaiden kliinisissä tutkimuksissa. Edellytyksenä olisi vielä laajempien, monipuolisempien ja pidempää seuranta-aikaa sisältävien tutkimusaineistojen käyttö. Lisäksi epigeneettistä tutkimusta hyödyntämällä voitaisiin tunnistaa uusia vanhenemismekanismia. Niiden hillitseminen voisi hidastaa vanhenemisprosessin etenemistä, jolloin voitaisiin pidentää tervettä elinaikaa.

LÄHTEET

Alberts B, Johnson A, Lewis J, ym. *Molecular Biology of the Cell*. Oxford: Taylor & Francis Group; 2014, s. 187–207, 404–407.

Chen B, Marioni R, Colicino E, ym. DNA methylation-based measures of biological age: Meta-analysis predicting time to death. *Aging (Albany, NY)*. 2016;8(9):1844–1865.

Dupont C, Armant DR, Brenner CA. *Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective*. *Seminars in reproductive medicine*. 2009;27(5):351–7.

Fransquet PD, Wrigglesworth J, Woods RL, ym. The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: a systematic review and meta-analysis. *Clinical epigenetics*. 2019;11(1):62.

Gào X, Zhang Y, Boakye D, ym. Whole blood DNA methylation aging markers predict colorectal cancer survival: a prospective cohort study. *Clinical epigenetics*. 2020;12(1):184.

Gillespie SL, Hardy LR, Anderson CM. Patterns of DNA methylation as an indicator of biological aging: State of the science and future directions in precision health promotion. *Nursing outlook*. 2019;67(4):337–344.

Gutman D, Rivkin E, Fadida A, ym. Exceptionally Long-Lived Individuals (ELLI) Demonstrate Slower Aging Rate Calculated by DNA Methylation Clocks as Possible Modulators for Healthy Longevity. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(2):615.

Hannum G, Guinney J, Zhao L, ym. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular cell*. 2013;49(2):359–367.

Hillary RF, Stevenson AJ, McCartney DL, ym. Epigenetic measures of ageing predict the prevalence and incidence of leading causes of death and disease burden. *Clinical epigenetics*. 2020;12(1):115.

Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*. 2013;14(10):R115.

Jazwinski SM ja Kim S. Examination of the Dimensions of Biological Age. *Frontiers in genetics*. 2019;26(10):263.

Kananen L ja Marttila S. Vanhenemisen biologiset mekanismit ja miten niihin voi vaikuttaa. *Duodecim (Helsinki, Finland: 1961)*. 2019;135(11):1098-106.

Kresovich JK, Xu Z, O'Brien KM, ym. Methylation-Based Biological Age and Breast Cancer Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2019;111(10):1051–1058.

Levine ME, Lu AT, Quach A, ym. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany, NY)*. 2018;10(4):573–591.

Li X, Ploner A, Wang Y, ym. Longitudinal trajectories, correlations and mortality associations of nine biological ages across 20-years follow-up. *eLife*. 2020;9(11):e51507.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, ym. The Hallmarks of Aging. *Cell (Cambridge)*. 2013;153(6):1194–1217.

Lu AT, Quach A, Wilson JG, ym. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and health-span. *Aging (Albany, NY)*. 2019;11(2):303–327.

Marttila S. Ageing-associated changes in gene expression and DNA methylation with implications for intergenerational epigenetic inheritance. Tampere University Press; 2016, s. 34–37.

Nelson P ja Masel J. Intercellular competition and the inevitability of multicellular aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*. 2017;114(49):12982–12987.

Sibbett RA, Altschul DM, Marioni RE, ym. DNA methylation-based measures of accelerated biological ageing and the risk of dementia in the oldest-old: a study of the Lothian Birth Cohort 1921. *BMC psychiatry*. 2020;20(1):91.

Taipale M. Epigenetiikka, geeninsäätely ja syöpä. *Duodecim (Helsinki, Finland: 1961)*. 2006;122(21):2611-8.

Thurston RC, Carroll JE, Levine M, ym. Vasomotor Symptoms and Accelerated Epigenetic Aging in the Women's Health Initiative (WHI). *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2020;105(4):1221–1227.

Tieva A, Peltomäki P. Epigenetic modifications in cancer. *Duodecim (Helsinki, Finland: 1961)*. 2012;128(1):62–71.

Waddington CH. The Epigenotype. *International journal of epidemiology*. 2012;41(1):10–13.

Wang T, Maden SK, Luebeck GE, ym. Dysfunctional epigenetic aging of the normal colon and colorectal cancer risk. *Clinical epigenetics*. 2020;12(1):5.

Wei JW, Huang K, Yang C, ym. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology reports*. 2017;37(1):3–9.

Yang Y, Gao X, Just AC, ym. Smoking-Related DNA Methylation is Associated with DNA Methylation Phenotypic Age Acceleration: The Veterans Affairs Normative Aging Study. *International journal of environmental research and public health*. 2019;16(13):2356.

Zhao W, Ammous F, Ratliff S, ym. Education and Lifestyle Factors Are Associated with DNA Methylation Clocks in Older African Americans. *International journal of environmental research and public health*. 2019;16(17):3141.