

Suvi Tuulia Talasterä

EPIGENEETTISEN IÄN VAIHTOEHTOISET MÄÄRITYSMETODIT

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintyö
Joulukuu 2021

TIIVISTELMÄ

Suvi Tuulia Talasterä: Epigeneettisen iän vaihtoehtoiset määrittämiset
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Biolääketieteen tekniikan kandidaattiohjelma
Joulukuu 2021

Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitettiin kirjallisuuteen pohjaten, onko epigeneettiselle iälle olemassa muita mahdollisia määrittämisetodeja kuin DNA-metylaatiomikrosiru. Tämän lisäksi tuli suorittaa laboratoriomäärittämisetodien välillä hintavertailua.

Kirjallisuuden pohjalta voitiin löytää seuraavat vaihtoehtoiset laboratoriomäärittämisetodit DNA-metylaatiomikrosirulle: Whole genome bisulfite sequencing, Reduced representation bisulfite sequencing ja TIME-seq. Tämän lisäksi tuli huomioida, että epigeneettisen iän määrittäminen kattaa kaksi muutakin päävaihetta laboratoriomäärittämisetodien lisäksi. Nämä toiset vaiheet ovat: datan tuotto eli tässä tapauksessa DNA:n eristäminen ja sille suoritettavat toimenpiteet ennen laboratoriomäärittämisetodia. Kolmas päävaihe on laboratoriomäärittämisetodista saadun datan analysointi. Analysointivaiheessa hyödynnetään tilasto- ja todennäköisyyslaskentaan pohjautuvia ohjelmistoja. Tässä kirjallisuuskatsauksessa kuitenkin pääpaino on laboratoriomäärittämisetodeissa ja niiden välisessä hintavertailussa.

Alan kirjallisuuteen pohjaten voitiin tulla johtopäätökseen, että epigeneettiselle iälle löytyi ainakin neljä erilaista mahdollista laboratoriomäärittämisetodia mukaan lukien DNA-metylaatiomikrosiru. Hintavertailussa tultiin loppupäätelmään, missä todettiin TIME-seq menetelmän olevan huomattavasti muita menetelmiä edullisempi mutta saatavuudessaan kuitenkin häviää toisiksi halvimmalle menetelmälle.

Loppupäätelmäksi saatiin, että vaikka TIME-seq on menetelmänä edullisin, sen haittapuolena kuitenkin sen saatavuus sillä metodi on hyvin uusi. Toisiksi edullisin hinta oli "Reduced representation bisulfite sequencing"-menetelmällä. Lyhyesti voidaan sanoa, että tulostarkkuudeltaan kyseiset metodit ovat samaa tasoa. Vaikka TIME-seq on edullisempi, päihittää RRBS-menetelmä sen saatavuudellaan.

Avainsanat: Biologinen ikä, epigeneettinen kello, DNA-metylaatio.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	EPIGENETIIKKA.....	7
	2.1 DNA-metylaatio.....	8
	2.2 DNA:n metylaatio epigeneettisenä säätelytekijänä.....	9
3	BIOLOGINEN IKÄ.....	11
	3.1 Biologinen vanheneminen ja biologinen ikä.....	11
	3.2 Biologinen ikä ja DNA-metylaatio.....	12
4	EPIGENEETTISEN IÄN MÄÄRISTYSMETODIT.....	13
	4.1 DNA-metylaatiomikrosiru.....	14
	4.2 Koko genomin bisulfiittisekvensointi (WGBS).....	15
	4.3 Restriktioentsyymillä kohdistettu bisulfiittisekvensointi (RRBS).....	16
	4.4 TIME-seq.....	17
5	MÄÄRITYSMETODIEN KESKINÄINEN HINTAVERTAILU.....	19
6	YHTEENVETO.....	22
	LÄHTEET.....	24

1 JOHDANTO

Epigenetiikka on nostanut arvoaan tiedemaailmassa valtavasti viime aikoina. Epigenetiikka voidaan lyhyesti kiteyttää siihen, miten ulkoinen ympäristö vaikuttaa perimäämme sammuttaen ja aktivoiden geenien toimintaa kuitenkin DNA:n emäsjärjestykseen kajoamatta. DNA:n metylaatio on yksi tärkeä epigeneettisen säätelyn solutason mekanismi.

On saatu näyttöä siitä, että kronologisen iän ja yksilön DNA:n metyloitumisasteen välillä on yhteys. Tämä tarkoittaa sitä, että iästä riippuvaisten metylaatiomuutosten avulla voidaan laskea yksilön epigeneettinen ikä. Tämän epigeneettisen iän ajatellaan heijastelevan yksilön biologista ikää. Biologinen ikä kuvaa sitä, kuinka nopeasti vanhenemisproessi on edennyt ja antaa hyvää yksilökohtaista informaatiota mahdollisista riskeistä sairastua erilaisiin ikääntymiseen liittyviin sairauksiin. [1]

Tämän työn tarkoituksena on selvittää kirjallisuuteen pohjaten, onko epigeneettiselle iälle olemassa muita mahdollisia laboratoriomääritysmetodeja kuin DNA-metylaatiomikrosiru. Tämän kirjallisuuskatsauksen alussa kerron lyhyesti pohjateoriaa epigenetiikasta, jonka tieteenhaaran tutkimustuloksiin tämä kirjallisuuskatsaus perustuu. Työ käsittelee myös DNA:n rakennetta ja sen metyloitumista, jotta ymmärrettävyys biologisen iän määritelmästä syvenisi erilaisten epigeneettisen iän vaihtoehtoisia määritysmetodeja varten. Työn tavoitteen kannalta on myös tärkeää vertailla keskenään vaihtoehtoisia määritysmetodeja laatuun ja hintaan painottaen.

Luvussa kaksi taustoitetaan epigenetiikkaa. Luvussa kolme käsitellään biologista ikää sekä biologista vanhenemista ja kerrotaan yleisesti niiden taustateoriaa epigeneettisen iän määritysmetodeja varten. Luvussa neljä käsitellään epigeneettisen iän vaihtoehtoiset laboratoriomääritysmetodit ja luvussa viisi

vertaillaan vaihtoehtoisia määrittäsmetodeja keskenään hintaan ja laatuun painottaen. Luvussa kuusi on yhteenveto.

2 EPIGENETIIKKA

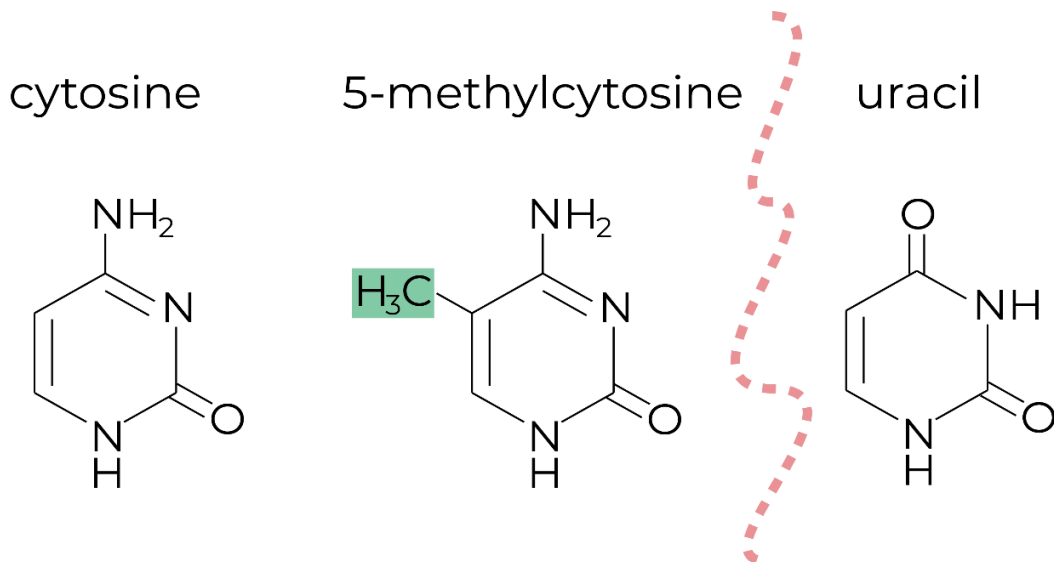
Epigenetiikan käsitettä tiedemaailmassa ehdotti ensimmäisenä vuosina 1905–1975 elänyt britannialainen embryologi ja geeniteknikko Conrad Hal Waddington. Alkuperäinen määritelmä epigenetiikalle oli laajempi kuin nykyinen. Nykyisin epigenetiikka määritellään tieteenalana, joka tutkii mm. ulkoisen ympäristön vaikutuksia geenien ilmenemiseen. Tämä tarkoittaa sitä, että ympäristötekijät voivat lisätä tai vaimentaa geenien aktiivisuutta, joka taas vaikuttaa geenien toiminnan ilmenemiseen. Kun geeni on aktiivinen, sen emäsjärjestyksen mukaisen ohjeen perusteella tuotetaan proteiineja solun proteiinisynteesissä. Jos geenin toiminta on hiljennetty, sen sisältämää ohjetta proteiiniin ei voida lukea ja solussa ei synny tätä kyseistä proteiinia. Perimä sisältää kaikki geenit mutta ne eivät ole kaikki aktiivisia samaan aikaan, vaan niiden aktiivisuutta säädellään hallitusti. Aktiivisuuden tulee olla hallittua, jotta kantasoluista on mahdollista erilaistaa useita eri solutyyppejä ja sitä kautta erilaisia kudoksia. Esimerkiksi ihmisen yksilökehitys on tästä hyvä esimerkki, hallittu geenien aktiivisuuden säätely on siinä avainasemassa. Geenien aktiivista säätelyä ohjataan erilaisten säätelytekijöiden avulla, josta esimerkkinä DNA:n metyloituminen. Vain ilmenevien geenien perimän informaatio luetaan transkriptiossa, jossa DNA:n sisältämien geenien informaatio muutetaan proteiinisynteesikoneiston ymmärrettävään muotoon eli RNA:ksi, joka taas luetaan solun ribosomeilla. Kuitenkaan syventyminen proteiinisynteesiin ei ole tämän työn kannalta oleellista mutta on kuitenkin hyvä ymmärtää, että muutokset DNA:ssa voivat vaikuttaa solun proteiinisynteesikoneiston tuottamiin proteiineihin ja tämä onkin epigeneettisen säätelyn perusta. [2]

Tässä työssä keskitytään kertomaan juuri epigeneettisen iän vaihtoehtoisista määrittämismetodeista. Epigeneettistä ikää voidaan selvittää DNA-metyloitumisasteen perusteella erilaisilla laboratoriomäärittämismetodeilla ja tarkastelun painopiste onkin DNA:n metyloitumisen mittaumenetelmissä. Tässä

luvussa kerrotaan DNA-metylaatiosta perustavalla tasolla sekä sen merkityksestä juuri epigeneettisessä säätelyssä.

2.1 DNA-metylaatio

DNA:n metylaatio on jokaisen solun ja kudoksen toiminnalle tärkeä solutason säätelyprosessi. DNA:n metylaatio on erilaista saman lajin yksilöiden ja eri lajien välillä, sekä yksilössä jopa solutyypin välillä. Teorioita ja syitä, jotka vaikuttavat DNA-metylaation heterogeenisuuteen yksilöiden välillä ovat esimerkiksi ikä, yleinen terveydentila, sukupuoli ja erilaiset yksilökohtaiset erot elintavoissa. DNA:n metylaation avulla voidaan selvittää solujen erilaistumista ja niiden epigeneettistä ikää. DNA-metylaatiossa sytosiiniemäksen pyrimidiinirenkaaseen liittyy metyyliryhmä, tämä estää kyseisen kohdan lukemisen DNA-juosteesta eli transkriptio estyy. [3]



Kuva 1 Vasemmalla DNA-juosteen sytosiiniemäs, keskellä metyloitunut sytosiiniemäs ja oikealla urasiiniemäs.

DNA:n metyloitumista katalysoivat metyleaasi ja DNA-transferaasienstyymit. DNA-metylaatiolla on tärkeä rooli genomistabiliteettien säätelyssä. Genomistabiliteetti on välttämätön solun normaalille kehitykselle ja niiden perustoiminnoille. Genomistabiliteetillä tarkoitetaan, että solun sisältämä genomi

vakautetaan tarkoituksenmukaisesti, jolloin sitä voidaan hyödyntää juuri kyseisen solutyypin tarvitsemalla tavalla. DNA:n metyloitumista muokkaa kaksi vastakkaista prosessia, joissa DNA:n sytosiiniemäkseen joko lisätään tai poistetaan metyyliiryhmä. DNA:n metyloituminen on siis palautumiskykyinen prosessi, toisin kuin esimerkiksi muutokset DNA:n emäsjärjetyksessä. Ihmisen somaattisten solujen perimän sytosiineista noin prosentti on metyloituneita. [3] [4] [5]

2.2 DNA:n metylaatio epigeneettisenä säätelytekijänä

Nykytiedon valossa DNA-metylaatioita pidetään yhtenä tärkeänä epigeneettisenä säätelytekijänä. DNA-metylaatioista on tiedetty jo kauan mutta niiden merkitys ja tärkeys epigenetiikassa on valottunut vasta viime vuosina. Yksilöiden välinen heterogeenisuus DNA-metylaatioiden suhteen tekee niistä mielenkiintoisen kohteen tarkastella. Voidaan esimerkiksi miettiä sitä, miten ne voivat kertoa yksilön sen hetkisestä terveydentilasta ja miten niiden avulla voi olla mahdollista jopa ennustaa yksilön lähitulevaisuuden terveydentilaa. Tällä tarkoitetaan sitä, että DNA:n metyloitumisaste olisi voimakkaasti sidoksissa yksilön terveydentilaan ja mahdollisesti voisi ennustaa yksilön riskiä sairastua tulevaisuudessa erilaisiin sairauksiin. On voitu jo huomata, että yksilöidenväliset erot DNA-metylaatioissa voivat toimia mahdollisina biomarkkereina erilaisissa sairauksissa. Eli siis tietyt DNA-metylaatiomuutokset heijastelevat riskiä tai kertovat jo mahdollisesta sairastumisesta tietyissä sairauksissa. [3] [6]

Selkärankaisilla epigeneettistä muuntelua eli metylaatiasteen muutoksia havaitaan runsaasti DNA:n CpG-saarekkeissa. Nämä ovat alueita, joissa on runsaasti dinukleotideja, joissa sytosiiniemästä seuraa guaniiniemäs. Jos metyloitunut CpG-saareke sijaitsee geenin promoottorissa, se voi estää kyseisen geenin transkription. Ihmisen perimän promoottoreissa noin 72 %:ssa esiintyy CpG-paikkoja, jotka muodostavat yleensä CpG-saaria. CpG-saarissa on siis runsaasti samalla alueella dinukleotideja, joissa sytosiiniemästä seuraa guaniiniemäs. Pituutta CpG-saarilla yleensä on noin 200–2000 emäsparin verran. Se miten DNA:n metylaatiot säätelevät transkriptiota on monimutkainen prosessi mutta yksinkertaistetusti esitettynä geenin ilmeneminen hiljenee, kun

promoottorialue on metyloitu. Toisena esimerkkinä tästä säätelytavasta käytetään X-kromosomin inaktivointia, joka aikaansaadaan CpG-kohtien metyloitumisesta, tämä taas estää transkriptiota voimakkaasti. X-kromosomin inaktivoituminen nisäkäsnaaraissa aiheuttaa sen, että osassa yksilön soluissa on toiminnassa vain isältä peritty X-kromosomi ja toisissa vain äidiltä peritty X-kromosomi. [3] [6]

3 BIOLOGINEN IKÄ

3.1 *Biologinen vanheneminen ja biologinen ikä*

Biologinen vanhenemisprosessi on määritelty ajasta riippuvaiseksi hitaaksi prosessiksi, johon olennaisesti liittyy useiden biologisten toimintojen heikkeneminen ikääntymisen myötä. Biologisen vanhenemisprosessin edetessä sairauksien ja kuoleman riski kasvaa. Prosessin etenemisnopeus vaihtelee saman lajin sisällä yksilöiden välillä. Biologinen ikä mittaa vanhenemisprosessin vaihetta ja etenemisnopeutta, vanheneminen voi olla esimerkiksi hidastunutta tai kiihtynyttä. Biologinen ikä voi olla yksilön kalenteri-ikää suurempi tai pienempi. Biologisen iän ollessa suurempi suhteessa yksilön kalenteri-ikään, on voitu havaita, että sairastumis- sekä kuolemanriski ovat tällöin suuremmat. [7]

Somaattisten solujen perimän epigeneettisillä muutoksilla ajatellaan olevan yhteys ikääntymisprosessin tapahtumiin. Muita ikääntymismekanismia ovat kantasolujen ehtyminen, vaurioiden kertyminen perimään, mitokondrioiden toiminnan häiriöt, solujen energiatuotannon väheneminen, solujen välistä signalointia häiritsevät prosessit ja virheellisten proteiinien kertyminen soluihin proteaasientsyymien toimintahäiriöiden vuoksi. Muilla ikääntymismekanismilla ja epigeneettisillä muutoksilla ajatellaan olevan yhteys niin sanottuihin ikääntymiseen liittyviin sairauksiin, joita ovat erilaiset hermoston rappeutumisesta seuraavat sairaudet, syövät, ateroskleroosi ja yhteys matala-asteisen tulehduksen syntyyn. Epigeneettiset muutokset perimässämme ovat säätelymekanismeja, jotka voivat vaikuttaa muihin ikääntymiseen liittyviin mekanismeihin. Jos epigeneettiset muutokset vaikuttavat perimässä esim. tulehdusta inhiboiviin geeneihin tai DNA-vaurioiden korjaamisesta vastaaviin geeneihin. Voi mahdollisena seurauksena olla esimerkiksi tulehdus tai syöpä.[5]

3.2 Biologinen ikä ja DNA-metylaatio

Kronologisen iän arviointi vuosina pelkän verinäytteen perusteella on hyödyllistä ainakin kahdella eri tapaa. DNA:n metyloitumisaste veressä on yksi tekniikka arvioida tätä kronologista ikää. Kun DNA:sta voidaan todistaa ikä luotettavasti, on sitä mahdollista hyödyntää esimerkiksi oikeuslääketieteessä. Näin ei välttämättä tarvittaisi silminnäkijää vaan olisi mahdollista käyttää niin sanottua DNA-todistajaa epäiltyjen henkilöiden karsimiseen tai syyllisen todistamiseen. Tämä on toki vai yksi sovellutuskohde, johon biologisen iän määrittämistä voidaan lähitulevaisuudessa hyödyntää. [3]

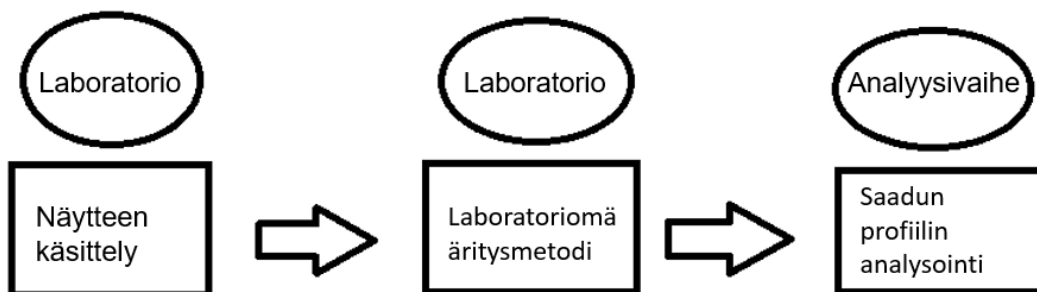
Ihmisen perimässä on olemassa metylaatiokohtia, joissa metylaatiotaso muuttuu kellomaisesti, juuri tätä mekanismia on hyödynnetty epigeneettisissä kelloissa. Vaikka tällä tavoin voidaankin mitata hyvin luotettavasti epigeneettinen ikä on edelleen epäselvää juontavatko metylaatiotasojen muutokset ikääntymiseen liittyvistä molekyyli- ja soluprosesseista vai onko metylaatio itsessään sidoksissa vanhenemisprosessiin. [8]

Se, että kronologinen ikä vaikuttaa koko genomia laajuisesti DNA:n metyloitumistasoihin on tiedetty jo 1960-luvulta lähtien. DNA:n metyloityminen onkin ollut ensimmäinen monikudoksen ikääntymisen biomarkkeri, tämä on näytetty toteen ihmis- ja hiirikokeissa, joissa metylaatio toimi biomarkkerina. Ikää arvoidaan CpG-ryhmien perusteella, joita epigeneettiset kellot sisältävät. Nämä yhdistettynä matemaattiseen algoritmiin voidaan laskea CpG-kohtien perusteella epigeneettinen ikä vuosina. [21] Esimerkiksi tutkimuksissa, joissa on seurattu monotsygoottisten eli identtisten kaksosten DNA:n metylaatiotasoa koko genomia laajuisesti aina ensimmäisestä elinvuodesta lähtien on voitu havaita metylaatiotasojen iästä riippuvainen muutos. Monotsygoottiset kaksokset ovat hyvä tutkimuskohde, koska heillä on syntyessään sama DNA-sekvenssi ja lähes identtiset DNA:n metylaatioprofiilit genomissaan. [3]

4 EPIGENEETTISEN IÄN MÄÄRITYSMETODIT

Tässä luvussa käsitellään kirjallisuuteen pohjaten neljä erilaista laboratoriomääritysmetodia DNA:n metylaatioprofiilin analysointiin. Ensimmäisenä käsitellään DNA-metylaatiomikrosiru ja sen jälkeen muut sille vaihtoehtoiset laboratoriomääritysmenetelmät. Kappaleissa laboratoriomääritysmetodi esitellään lyhyesti ja kerrotaan myös suppeasti itse analysointiprosessin kulusta.

Määritysmetodi käsittää epigeneettisen iän määrittämisen tapauksessa DNA:n eristämisen, laboratoriomääritysmetodin, sekä laboratoriomääritysmetodista saadun datan käsittely. Datat käsittely tapahtuu todennäköisyys- ja tilastolaskentaa perustuvien erilaisten ohjelmistojen avulla eli niillä saadaan luotua analyysi metylaatioprofiilista. Analyysin avulla voidaan selvittää näytteestä epigeneettinen ikä. Alla olevassa kaaviossa on kuvattuna epigeneettisen iän tutkimuksen kulku pääpiirteittäin.



Kuva 2 Epigeneettisen iän määrittämisen kulku.

Näyte epigeneettisen iän määrittämisessä voi olla peräisin monista eri kudoksista. Näytteen käsittelyllä yllä olevassa kaaviossa tarkoitetaan DNA:n eristämistä näytteestä ja mahdollisia muita sille tehtäviä toimenpiteitä ennen laboratoriomääritysmenetelmää. Analyysivaiheella eli saadun metylaatioprofiilin käsittely, perustuu epigeneettisiin kelloihin. Epigeneettiset kellot perustuvat ikääntymisen kannalta informatiivisten CpG-kohtien havaitsemiseen. Nämä kyseiset kohdat on poimittu koneoppimismenetelmällä. Menetelmä poimii informatiivisimmat CpG-paikat ja luo niiden avulla iän ennustemallin. Validoitua ennustemallia hyödyntäen voidaan laskea toisessa tutkimusaineistossa DNA:n metylaatiotasoihin perustuva epigeneettinen ikäarvio. Huomioitavan arvoinen asia on se, että yksittäinen CpG-kohta ei välttämättä korreloi ikäarviossa yksinään epigeneettisen iän kanssa. Mutta sillä voi olla suurempi merkitys arviossa, kun se katsotaan osaksi CpG-kohtien kokonaisuutta eli ne muodostavat niin sanottuja yhdistelmäbiomarkkereita. Eri epigeneettisten kellojen välillä voivaivat vaihdella esimerkiksi tulostarkkuus ja tutkittavat CpG-sarjat. Laboratoriomääritysmenetelmiä avataan lisää alla olevissa kappaleissa. [9]

4.1 DNA-metylaatiomikrosiru

Tämä menetelmä on niin sanottu "golden standard"-menetelmä. Menetelmän DNA-metylaatiomikrosirut ovat hyviä laadullisesti monella osa-alueella mutta niiden suurena haittapuolena on korkeat kustannukset. Lisäksi tällä metodilla epigeneettisen iän selvittämiseen tarvitaan paljon DNA:ta näytteessä, joten menetelmä ei siis sovi kaikkiin tilanteisiin vaadittavan suuren DNA-näytteen määrän vuoksi. Tällaisia ongelmatilanteita ovat esimerkiksi sellaiset tilanteet, joissa näyte sisältää vain vähäisen solumäärän. DNA-metylaatiomikrosiru millä voidaan selvittää DNA:n metyloitumisastetta perustuu DNA:n bisulfiittikäsittelyyn, joka saa kaikki metyloitumattomat sytosiiniemäket muuttumaan urasiiliemäksiksi. [10] Käsitelty DNA monistetaan polymeerasiketjureaktio-menetelmällä, jonka aikana DNA:n urasiiliemäket muuttuvat tymiiniemäksiksi. Tätä seuraa leimaus fluoresoivalla väriaineella ja näyte hybridisoidaan koettimille, jotka ovat kiinnitetty lasilevyille. [11] Koettimet sitoutuvat DNA-näytteessä olevien tymiini- ja sytosiiniemästen kanssa. Pariutumisen

mahdollistaa erottelun metyloitumattomien ja metyloituneiden CpG-saarien välillä. [10]

Suosituimpia mikrosiruista, jotka ovat suunniteltu DNA:n metylaatioprofiilin selvittämiseen ovat Illuminan mikrosirusarjat. Illuminan mikrosiru epigeneettisen metylaatioprofiilin selvittämiseen on aiemmin ollut aiemmin Illuminan 270K ja sen seuraajana saman yrityksen 450K Infinium Array-siru. Uudemmallalla 450K-sirulla oli jo nimensäkin mukaan kyky kattaa noin 486 000 CpG-kohtaa DNA:ssa. Käytännössä CpG-kohdat ilmenevät kahden fluoressinäytteen avulla. Testinäytteiden metyloituneiden CpG-kohtien määrä voidaan lukea fluoresssisignaalista. Illumina 450K Infinium Array-sirun tilalle on kuitenkin tullut samalta yritykseltä kattavampi uusi versio: Infinium MethylationEPIC BeadChip, joka on syrjäyttänyt edeltäjänsä. Uusi siru kattaa noin 850 000 CpG-kohtaa. Uusi siru on kattavampi mutta toimii pääperiaattein samalla mekanismilla kuin edeltäjänsä. Siruissa on mahdollista valita eri kokoja, sen mukaan kuinka montaa näytettä haluaa ajaa siruun saman aikaisesti. Sirun heikkous on kuitenkin se, että se vaatii suuren määrän DNA:ta verrattuna joihinkin muihin DNA:n metylaatioprofiilin laboratoriomääritysmetodeihin sekä kyseiset mikrosirut ovat hyvin kalliita, kun halutaan esimerkiksi määrittää epigeneettinen ikä sadoilta tai tuhansilta tutkittavilta. [12] [13]

4.2 Koko genomin bisulfiittisekvensointi (WGBS)

Lyhenne WGBS tulee sanoista ” Whole genome bisulfite sequencing”. Tekniikan pääideana on muuttaa metyloituneet sytosiinit urasiiliksi natriumbisulfiitin avulla. Uraasiilit muuttuvat tyymiiniksi polymeerasiketjureaktion vahvistamisen aikana. Metyloitu sytosiini säilyvät ehjänä bisulfiitti käsittelystä. Tämä strategia tuottaa kokonaista perimää, kun bisulfiittien sekvensointi yhdistetään koko genomin sekvensointiin ja näin saatiin WGBS-menetelmä. WGBS oli aikoinaan metylaatioprofiloinnin ykkösmenetelmä, koska se tarjoaa yhden nukleotidin tarkkuudella koko genomin laajuisen metylaatioprofiloinnin. Se vaatii suuren määrän DNA:ta ja on hyvin kallista juuri suuren sekvensointi määrän vuoksi. Kuitenkin koska WGBS-menetelmässä käydään läpi koko genomi, osoittautuu se myös tehokkuudeltaan huonoksi, sillä metylaatioprofiloinnin kannalta tärkeät

CpG-saarekkeet muodostavat vain pienen osuuden prosentuaalisesti koko genomista. [6]

Lyhyesti WGBS-menetelmä etenee seuraavassa järjestyksessä: Näyte DNA:n eristäminen, bisulfiittikonversio, kirjaston monistaminen ja data-analyysivaihe. [14] DNA- näyte tulee fragmentoida eli jakaa DNA pienempiin eripituisiin osiin, noin 0–1200 emäsparin mittaisiin. [15] Fragmenttien päät korjaavat erilaiset entsyymit ja fragmentit pariutuvat sekvenssisovittimien kanssa komplementaarisuusperiaatteen avulla. Koko DNA-näytteelle tehdään bisulfaattikäsittely, jossa DNA:n metyloitumattomat sytosiiniemäkset muutetaan urasiiliemäksiksi, metyyliiryhmä suojelee jo metyloituneita sytosiineja tältä reaktiolta, joten ne säilyvät ennallaan. Ennen bisulfiittikonversiota valitaan haluttu DNA:n näyte koko. Näyte koot vaihtelevat paljon ja ovat noin 10-1000ng. [16]

4.3 Restriktioentsyymillä kohdistettu bisulfiittisekvensointi (RRBS)

RRBS-lyhenne tulee sanoista "Reduced representation bisulfite sequencing". Käytännössä tekniikka yhdistää bisulfiittisekvensoinnin ja restriktioentsyymien, joiden avulla saadaan rikastettua CpG-alueita genomista. Tällä menetelmällä keskitytään n. 1 % koko genomien määräästä. [9] Idea RRBS-menetelmään syntyi, kun WGBS-menetelmää haluttiin muokata halvemmaksi ja tehokkaammaksi. WGBS-menetelmää lähdettiin kehittämään tehokkaammaksi siten, että bisulfiittisekvensointi kohdistettiin vain tiettyihin genomien osiin, tässä tapauksessa genomien CpG-rikkaille alueille ja näin syntyi RRBS-menetelmä. Kun sekvensointi kohdistetaan pieniin fragmentteihin, jotka kattavat koko genomista vain yhden prosentin, tarkoittaa tämä sitä, että sekvensoitaessa on vähemmän luettavaa ja kohde alueet voidaan silti kattaa riittävästi. Tällä menetelmällä on mahdollista saada katettua noin 85 % CpG-saarista ja 70 % geenien promoottoreista. [6]

Lyhyesti kerrottuna RRBS-menetelmän kulku on kuvattu tässä kappaleessa. Menetelmä alitetaan pilkkomalla genomi restriktioentsyymillä (epäherkkä genomien metylaatiokohdille). Pilkkomisen seurauksena syntyy erikokoisia DNA-fragmentteja. Saadut DNA-fragmentit liitetään metyloituihin sekvenssisovittimiin.

Sekvenssisovittimet hydratoituvat virtauskennon sovittimien kanssa. Erikokoiset DNA-fragmentit erotellaan elektroforeesilla ja tämän jälkeen puhdistetaan geelileikkauksella. [17] Seuraavaksi DNA-fragmentit bisulfiitti muunnetaan, tämä tarkoittaa sitä, että metyloitumattomat sytosiinit muutetaan urasiiliksi. Jo aiemmin metyloituneet sytosiinit pysyvät muuttumattomina, koska metyyliiryhmä suojaa niitä. Nämä käsitellyt DNA-fragmentit monistetaan polymeerasiketjureaktiossa tunnettujen alukkeiden (komplementaarisuus) avulla. Näytteen sekvensoinnissa käytettiin alkuperäisesti Sangerin sekvensointia mutta nykyään uudempia menetelmiä kuten esimerkiksi Illumina-sekvensointi. Itse tulosten analyysiin tarvitaan juuri tähän menetelmään suunniteltuja erikoisohjelmia. Näitä ohjelmistoja ovat esimerkiksi BSMAP, Bismark ja BS Seeker. [6][17][18]

4.4 TIME-seq

Lyhenne TIME-seq tulee englannin kielen lauseesta ” Tagmentation-based Indexing for Methylation Sequencing”, suomeksi tämä tarkoittaa: tagmentointiin perustuvaa metylaatiosekvenssin indeksointia. TIME-seq on suunniteltu edullisemmaksi ja nopeammaksi vaihtoehdoksi mitata DNA:n metyloitumisastetta, kun sitä verrataan aiempiin menetelmiin kuten DNA-metylaatiomikrosiru, WGBS tai RRBS. Tekniikkaa voidaan hyödyntää epigeneettisen iän määrittämiseen sekä yleisesti DNA:n metyloitumisprofiilin tutkimiseen. Tekniikan tavoitteena on lukea biomarkkereita, jotka kertovat DNA:n metyloitumisesta. Kyseisten biomarkkereiden antaman informaation avulla voidaan suorittaa metyloitumisasteen mittausta. TIME-seq-laboratiomääritysmenetelmällä saaduista metylaatiotasomittaustuloksista voidaan johtaa laskennallisesti epigeneettinen ikä mm. sc-Age-laskentatyökalulla. TIME-seq:llä tehdyissä tutkimuksissa on tähän mennessä käytetty hiirestä ja ihmisestä peräisin olevia DNA-näytteitä. [19]

Lyhyesti kuvattuna TIME-seq-metodissa hyödynnetään näytteiden indeksointia eli viivakoodausta sekä bisulfiittikäsittelyä. Bisulfiitille reagoimattomat Tn5-transposomit eli lyhyet sekvenssipätkät indeksoivat yksittäisen DNA-näytteen. Indeksointi tehdään näytteelle, jotta DNA-kirjasto voi olla poolattu eli useita näytteitä yhdistetään yhdeksi analysoitavaksi näytteeksi, jolloin menetelmän





kustannukset ovat alhaisemmat, kun laboratoriomenetelmän kallein vaihe eli sekvensointi tehdään poolatulle kirjastolle. Indeksoinnin ja poolauksen jälkeen, metyloituneet päät korjataan niin, että metyyliiryhmä poistetaan metyloituneista sytosiineista. Näytepoolien käsittelyssä hyödynnetään RNA-syöttejä, jotta liuos saadaan hybridisaatorikastettua. Kyseiset RNA-syötit tuotetaan oligonukleotidikirjaston avulla. Sovittimet ovat lyhyitä, koska ne toimivat tarkemmin rikastuksessa. Kun DNA-näyte on bisulfiittimuunnettu ja poolien indeksoitu polymeerasiketjureaktio monistus suoritettu, suoritetaan Illuminan lyhytsekvensointi. Saadut sekvensointitulokset demultipleksoidaan poolin Tn5-sovittimien indeksien avulla ja rinnastetaan referenssigenomiin soveltuvalla tietokoneohjelmistolla. Rinnastetuista tuloksista saadaan jokaiselle näytteelle tieto eri CpG-kohtien metylaatiosta. Lähdekoodi sekvensointidatan käsittelyyn sekä epigeneettisen iän arviointiin tullaan jakamaan avoimeen käyttöön tulevaisuudessa. [19]

5 METODIEN KESKINÄINEN HINTAVERTAILU

Viime vuosina tiedemaailman kiinnostus biologiseen ikään ja sitä mittaaviin epigeneettisiin kelloihin on kasvanut. Koska tiedemaailman kysyntä epigeneettisen iän määrittämenetelmiä kohtaan on kasvanut, on tullut tarve luoda erilaisia tekniikoita DNA:n metyloituksen selvittämiseen. Kun DNA-metyloituksen yhteys epigeneettiseen ikään todistettiin, oli DNA:n metyloitusastetta mittaava tekniikka hyvin kallista ja tietyillä samoilla menetelmillä se on sitä vieläkin. Kysynnän kasvamisen vuoksi rinnalle on noussut useampikin edullisempi vaihtoehto. Tässä kappaleessa vertaillaan työssä käsiteltyjen määrittämenetodien hintoja keskenään.

On selvää, että hintavertailun voittaa uusin menetelmä eli TIME-seq, sillä se on kehitetty juuri sillä ajatuksella, että se voisi korvata vanhat kalliimmat menetelmät. Suoraviivainen eteneminen vähentää tarvikekustannuksia, kun TIME-seq: a verrataan vanhempiin tässä kirjallisuuskatsauksessa käsiteltyihin metodeihin. Time-seq maksaa 0,65 \$ yhtä näytettä kohden, kun taas RRBS-menetelmä hinta on noin 30–50 \$ yhtä näytettä kohden. [19] Pitää kuitenkin muistaa arvioida tässä myös sitä, että TIME-seq on niin uusi menetelmä, että siitä on tehty vielä vain vähän tutkimuksia ja lisäksi sen saatavuudesta ei löytynyt varmaa tietoa. Lisäksi esitetty hinta-arvio perustuu vain yhteen artikkeliin, johtuen juuri menetelmän tuoreudesta. WGBS-menetelmän hinta oli löydettävissä Diagenode A Hologic Companyn verkkosivuilla, siellä WGBS-menetelmän hinnaksi annettiin 775 € kahdeksaa näytettä kohden. [20] Tästä hinnasta voidaan laskea, että yhden näytteen hinnaksi tulisi noin 97 €. DNA-metylaatiomikrosiruista suosituimman eli Illuminan Infinium MethylationEPIC BeadChip hinta on riippuvainen siitä, kuinka monta näytettä kyseiseen mikrosiruun ajetaan samaan aikaan. Illumina, joka valmistaa kyseistä mikrosirua tarjoaa tiedon Infinium Methylation EPIC BeadChip

Kitin hinnasta omilla verkkosivuillaan. Hintojen näkyminen tuotteen yhteydessä edellyttää kuitenkin rekisteröitymistä kyseiselle verkkosivulle. Alla olevassa kuvassa on esitelty Illuminan verkkosivujen tarjoama hinnasto kyseiselle tuotteelle.

		Price
<input type="text" value="0"/>	 Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (8 samples) ⓘ 20042130	€2,245.00
<input type="text" value="0"/>	 Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (16 samples) ⓘ WG-317-1001	€4,294.00
<input type="text" value="0"/>	 Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (32 samples) ⓘ WG-317-1002	€7,808.00
<input type="text" value="0"/>	 Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (96 samples) ⓘ WG-317-1003	€23,422.00

Kuva 3 Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit:n hinnasto Illuminan verkkosivuilta

Ylemmän kuvan hinnastosta voidaan siis laskea, että yksittäisen näytteen hinnaksi saadaan noin 244–280 \$, hinta riippuu myös siitä, montako näytettä halutaan tutkia kerralla. Yleisesti voidaan olettaa, että mitä enemmän näytteitä tutkitaan kerralla, sen halvemmaksi hinta yksittäistä näytettä kohden tulee. Vaikka DNA-metylaatiomikrosiru on menetelmänä tunnettu ja laadullisesti hyvä on sen suurena haittapuolena kuitenkin hyvin korkeat kustannukset. Mutta on huomioitava, että muissa menetelmissä kustannuksia myös nostaa vaadittava laboratorion henkilökunta. Tässä kirjallisuuskatsauksessa laboratorion henkilöstöstä aiheutuvia kustannuksia ei käsitellä kuin mainitsemalla, mutta on hyvä muistaa, että tämä seikka vaikuttaa tutkimuksissa lopulliseen kustannuskokonaisuuteen.

Koska hintavertailun voittavat RRBS-menetelmä ja TIME-seq, suoritetaan niiden välillä vielä vertailua. Tutkimuksessa on voitu näyttää miten TIME-seq osoittautui tulostarkkuudeltaan yhtä hyväksi kuin RRBS-menetelmä, kun kyseinen tutkimus toteutettiin hiiren verestä sekä maksasta saaduista DNA-näytteistä. TIME-seq on ajallisesti RRBS-menetelmää nopeampi, sillä se kestää vain noin reilun vuorokauden. [19]

Taulukko 1. Taulukossa lyhyesti perustietoja kirjallisuuskatsauksessa esitellyistä laboratoriomääritysmenetelmistä. Taulukon lähdeviitteet: [19] [21] [22]

	DNA-metylaatiomikrosir u	WGBS	RRBS	TIME-seq
Hinta (\$) (yksi näyte)	244–280 \$	97 \$	30–50 \$	0,65 \$
Tarvittava DNA-näytteen määrä	500 ng	200 ng	10–300 ng	100 ng
Saatavuus/käytettävyys	Saatavuus hyvä, käytettävyttä rajoittaa DNA-näytteen vaadittava suuri määrä.	Hyvä saatavuus. Metodina tämä on hyvin aikaa vievä ja työläs.	Hyvä saatavuus. Edullisempi kuin DNA-metylaatiomikrosir u tai WGBS.	Saatavuudesta ei tietoa.

Taulukosta voidaan nähdä, että syötettävän DNA:n tarve on kaikista pienin RRBS- ja TIME-seq-menetelmässä. TIME-seq:in ja RRBS-menetelmän erottaa kuitenkin tällä hetkellä se, että RRBS on laajalti käytössä oleva menetelmä ja hyvin kaupallisesti saatavilla, kun taas TIME-seq:in saatavuudesta ei ole tietoa. Esimerkiksi yritys Diagenode tarjoaa RRBS-menetelmää ostopalveluna, jossa näytteen koko on kaikille selkärankaisille oltava 100 nanogrammaa. [23]

6 YHTEENVETO

Vaikka kronologisen iän määrittäminen pelkästään DNA:n metyloitumisasteen perusteella on hyvin uusi innovaatio, on se jo vakiinnuttanut paikkansa tiedemaailman silmissä, uutena hyödyllisenä menetelmänä. Menetelmän mahdolliset käyttökohteet ovat oikeuslääketieteessä, lääketieteellisissä tutkimuksissa sekä sairauksien hoitomuotojen ja niiden tunnistamismekanismien kehityksessä. Epigeneettisen iän määrittämisen suurimpana haasteena on tähän asti olleet rajalliset laboratoriomääritysmetodit sekä niistä aiheutuvat kustannukset. Kuitenkin tässä kirjallisuuskatsauksessa on voitu tulla päätelmään, että vanhojen kalliimpien määritysmetodien tilalle on noussut uusia halvempia menetelmiä. Laboratoriomääritysmetodien kustannusten laskiessa on mahdollista toteuttaa tutkimuksia pienemmällä budjetilla tai vaihtoehtoisesti samoilla kustannuksilla laajemmassa mittakaavassa. On kuitenkin muistettava, että vanhoilla menetelmillä on tuotettu monta hyvää ja luotettavaa tutkimusta ja uusien menetelmien heikkous on juuri uutuus eli usein menetelmän hyödyntäjillä eli esimerkiksi tutkijoilla on vähän kokemusta menetelmästä ja myös menetelmän saatavuus saattaa olla heikko. Tosin on oletettavaa, että uusi hyödyllinen menetelmä eli TIME-seq yleistyy alan tutkimuksissa metodina nopeasti, sillä sen kustannukset ja tehokkuus näyttää tutkimuksen valossa olevan parempi verrattuna aiempiin vanhempiin metodeihin, kuten esimerkiksi WGBS ja RRBS. Kuitenkaan TIME-seq-menetelmän saatavuudesta ei ole tietoa tarjolla. RRBS-menetelmä voittaa laadussaan TIME-seq-menetelmän, sillä sen saatavuus on hyvä ja sitä on käytetty paljon useammin kuin TIME-seq-menetelmää.

Yhteenvedon pääpäättelmänä on helppo tehdä oletus, että kun jokin menetelmä on hyvin kallis mutta kysytty, alkaa tiedemaailma hyvin nopeasti työstää ongelmaan ratkaisua ja yhä parempi ja kustannustehokkaampi menetelmä kehittyvät aina toinen toisensa pohjalle. Tässäkin kirjallisuuskatsauksessa saatiin huomata, että jopa yhdessä vuosikymmenessä tutkimukset DNA:n metylaation ja

epigeneettisen iän laboratoriomääritysmetodeista tuottivat tarvittavia innovaatiota, jotta tutkimuksen kustannukset saataisiin laskettua hyvälle tasolle. Tieteellisten löydösten uutuuden vuoksi on vaikea edes kuvitella, kuinka laajoja sovellutuskohteita esimerkiksi lääketieteessä tullaan löytämään epigeneettiselle iälle ja sen laboratoriomääritysmetodeille tulevaisuudessa.

LÄHTEET

1. Kananen, Laura. Aging-Associated Changes in the DNA Methylome and Characteristics of the Epigenetic Clock. Tampere: Tampere University Press, 2018. Print.
2. Stary, Creed M. M.D., Ph.D. Patel, Hemal H. Ph.D. Roth, David M. M.D., Ph.D. (2015). Epigenetics: The Epicenter for future anesthesia research? the American Society of Anesthesiologists.
3. Personalized Epigenetics, edited by Trygve Tollefsbol, Elsevier Science & Technology, 2015. ProQuest Ebook Central
4. Lim SJ, Tan TW, Tong JC. Computational epigenetics: the new scientific paradigm. Bioinformatics 2010
5. Jung, Marc, and Gerd P Pfeifer. "Aging and DNA Methylation." BMC biology 13.1 (2015): 7–7. Web.
6. Chen, Yunshun et al. "Differential Methylation Analysis of Reduced Representation Bisulfite Sequencing Experiments Using edgeR [version 2; Peer Review: 2 Approved, 1 Approved with Reservations]." F1000 research 6 (2018): 2055–2055. Web.
7. Jylhävä, Juulia, Nancy L Pedersen, and Sara Hägg. "Biological Age Predictors." EBioMedicine 21.C (2017): 29–36. Web.
8. Simpson, Daniel J, and Tamir Chandra. "Epigenetic Age Prediction." Aging cell 20.9 (2021): e13452–n/a. Web.

9. Horvath, Steve, and Kenneth Raj. "DNA Methylation-Based Biomarkers and the Epigenetic Clock Theory of Ageing." *Nature reviews. Genetics* 19.6 (2018): 371–384. Web.
10. Gitan, Raad S et al. "Methylation-Specific Oligonucleotide Microarray: a New Potential for High-Throughput Methylation Analysis." *Genome research* 12.1 (2002): 158–164. Web.
11. Yan, Pearly S, Susan H Wei, and Tim Hui-Ming Huang. "Methylation-Specific Oligonucleotide Microarray." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 287 (2004): 251–260. Print.
12. [Infinium HumanMethylation450 BeadChip \(illumina.com\)](https://www.illumina.com/products/bytype/infinium-human-methylation450-beadchip.html)
13. [Infinium MethylationEPIC Kit | Methylation profiling array for EWAS \(illumina.com\)](https://www.illumina.com/products/bytype/infinium-methylation-epic-kit.html)
14. "Principles and Workflow of Whole Genome Bisulfite Sequencing – CD Genomics". www.cd-genomics.com. Retrieved 2021-11-03.
15. Turner, Daniel J et al. "A Large Genome Center's Improvements to the Illumina Sequencing System." *Nature methods* 5.12 (2008): 1005–1010. Web.
16. Wang, Qi et al. "Tagmentation-Based Whole-Genome Bisulfite Sequencing." *Nature protocols* 8.10 (2013): 2022–2032. Web.
17. Meissner, Alexander et al. "Reduced Representation Bisulfite Sequencing for Comparative High-Resolution DNA Methylation Analysis." *Nucleic acids research* 33.18 (2005): 5868–5877. Web.
18. Chatterjee, Aniruddha et al. "Technical Considerations for Reduced Representation Bisulfite Sequencing with Multiplexed Libraries." *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012 (2012): 741542–8. Web.

19. Ultra-Cheap and Scalable Epigenetic Age Predictions with TIME-Seq.
NewsRX LLC, 2021. Print.
20. [Premium Whole Genome Bisulfite Sequencing \(WGBS\) kit | Diagenode](#)
21. Meissner, Alexander et al. "Preparation of Reduced Representation Bisulfite Sequencing Libraries for Genome-Scale DNA Methylation Profiling."
Nature protocols 6.4 (2011): 468–481. Web.
22. [Microsoft Word - 190429_low input WGBS_EASI Genomics_DKFZ Seq \(easi-genomics.eu\)](#)
23. [RRBS Service \(Reduced Representation Bisulfite Sequencing\) | Diagenode](#)

Kuva 1.

https://www.google.fi/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.zymoresearch.com%2Fpages%2Fwhat-is-dna-methylation&psig=AOvVaw1Sb49vqcAzlexqLfQYzzKP&ust=1639994862589000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCNj5vlzP7_QCFQAAAAAdAAAAABAD

Kuva 3.

[Infinium MethylationEPIC Kit | Methylation profiling array for EWAS \(illumina.com\)](#)

