



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Epigeneettiset metylaatiokellot biomarkkereina ikäntymiseen liittyvissä sairauksissa

Sofia Westerlund

Biologia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

24.6.2024

Turku

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

LuK-tutkielma

Biologian laitos

Sofia Westerlund: Epigeneettiset metylaatiokellot biomarkkereina ikääntymiseen liittyvissä sairauksissa

Kesäkuu 2024

Väestön ikääntyessä vanhenemiseen liittyvät sairaudet muodostavat merkittävän haasteen terveydenhuoltojärjestelmille, minkä vuoksi uusien biomarkkerien löytäminen on entistä tärkeämpää. Pitkäikäisyys- ja ikääntymistutkimuksissa keskeiseksi tutkimuskohteeksi on viime vuosikymmenien aikana noussut DNA-metylaatio, epigeneettinen säätelymekanismi, joka vaikuttaa geeniekspressioon kajoamatta itse DNA:n emässekvenssiin. DNA-metylaatiokuvioihin perustuvat epigeneettiset kellot ovat matemaattisia malleja, jotka pystyvät arvioimaan kronologisen iän lisäksi niin sanottua biologista ikää sekä ikääntymisen kiihtymistä. Tunnetuimmat näistä kelloista ovat Horvathin ja Hannumin kronologiset kellot sekä biologista ikää mittaavat yhdistelmäbiomarkkerit PhenoAge ja GrimAge. Jotkut näistä kelloista soveltuvat myös sairausalttiuksien ja elinajanodotteen arvioimiseen paremmin kuin osa perinteisistä kliinisistä markkereista. Tämän lisäksi epigeneettiset kellot ovat paljastaneet selviä yhteyksiä DNA-metylaation ja lukuisten vanhenemiseen liittyvien sairauksien, kuten hermoston rappeutumissairauksien ja erilaisten syöpätautien välillä. Usein metylaatiomuutoksia on havaittavissa jo ennen taudin puhkeamista, ja tästä syystä metylaatiopohjaisen biomarkkerin kehittämiseksi on paljon odotuksia. Metylaatiokellojen käytössä on kuitenkin ongelmia, jotka liittyvät sekä teknisiin yksityiskohtiin että ikääntymisen biologisen taustan perimmäiseen syyhyn, joka on vielä toistaiseksi tuntematon. Näitä haasteita on tarpeen käsitellä, jotta epigeneettisten kellojen hyödyntäminen kliinisessä ja terapeuttisessa käytössä olisi tehokasta ja luotettavaa.

Avainsanat: biomarkkeri, DNA-metylaatio, epigenetiikka, ikääntyminen, ikääntymiseen liittyvät sairaudet, metylaatiokello

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	DNA-METYLAATION PERUSTEET	2
3	METYLAATIOKELLOT IKÄÄNTYMISEN BIOMARKKEREINA.....	4
3.1	Kronologinen vs. biologinen ikä.....	4
3.2	Metylaatiokellojen kehittäminen ja validointi	6
3.3	Epigeneettiset kellot.....	8
3.3.1	Ensimmäisen sukupolven metylaatiokellot.....	9
3.3.2	Seuraavan sukupolven metylaatiokellot	11
4	IKÄÄNTYMISEEN LIITTYVÄT SAIRAUDET.....	12
4.1	Hermoston rappeutumissairaudet.....	13
4.1.1	Alzheimerin tauti	13
4.1.2	Muut hermostotaudit.....	15
4.2	Syöpä.....	16
4.2.1	Paikallinen hypermetylaatio.....	17
4.2.2	Globaali hypometylaatio	17
5	HAASTEET JA SOVELLUKSET	18
5.1	Biologiset haasteet	18
5.2	Tekniset ja analyttiset haasteet.....	20
5.3	Terapeuttiset ja kliiniset sovellukset.....	22
6	YHTEENVETO.....	24
7	LÄHTEET.....	25

1 JOHDANTO

Ikääntyminen on biologisesti moniulotteinen prosessi, johon liittyy lukuisia fysiologisia ja solutason muutoksia. Vaikka ikääntymisen vaikutukset ulkoiseen ilmiösuureen ovat usein selkeät, ikääntymisen molekulaarinen syy-seuraussuhde on edelleen tieteelle arvoitus. Tämän selvittämiseksi on tutkittu useita eri ikääntymiseen liittyviä prosesseja, joita ovat esimerkiksi genomisen instabiliteetti, telomeerien lyheneminen, proteostasian menetys, häiriintynyt ravintoaineiden aistiminen, mitokondriaaliset toimintahäiriöt, solujen senesenssi eli vanheneminen, kantasolujen ehtyminen, muuttunut solujen välinen kommunikaatio sekä epigeneettiset muutokset (López-Otín ym. 2013). Näistä viimeisin on noussut pitkäikäisyys- ja ikääntymistutkimusten kuumaksi pisteeksi, eikä syyttä. Maailman väestö on kokemassa mittavan demografisen muutoksen, kun yli 60-vuotiaiden osuuden ennustetaan kohoavan 22 %:iin vuoteen 2050 mennessä (World Health Organization 2022). Vaikka tämä on rohkaiseva merkki edistyneestä terveydenhuollosta, pidempi elämä ei välttämättä tarkoita terveellisempää elämää. Pikemminkin se tuo mukanaan haasteita, kuten ikääntymiseen liittyvien sairauksien lisääntymistä ja työvoiman vähenemistä, mikä puolestaan saattaa johtaa monimutkaisiin konflikteihin (Fiorito ym. 2021).

Koska monen ikääntymiseen liittyvän sairauden ennuste paranee mitä varhaisemmin tauti havaitaan, on sairauden puhkeamista edeltävien biomarkkerien havainnointi ennakoivana strategiana ensisijaisen kriittistä. Tällä saralla epigeneettiset metylaatiokellot ovat nousseet lupaavaksi työkaluksi. Nämä kellot ovat yksilön biologista ja/tai kronologista ikää arvioivia matemaattisia malleja, jotka hyödyntävät genomisen DNA-tason metylaatiokuvausta (engl. methylation pattern). Biologinen ikä voi poiketa kronologisesta iästä, mikä kuvastaa elämäntapojen, ympäristön ja geneettisten tekijöiden kumulatiivista vaikutusta solujen terveyteen (Fraga ym. 2005). DNA-metylaatiolla, erityisesti metyyliiryhmän lisäämisellä CpG-dinukleotideihin, on keskeinen tehtävä geenien ilmenemisen säätelyssä. Siinä missä CpG-kohtat ovat genomissa tyypillisesti metyloituja, geenien promoottorialueiden CpG-saarekkeet pysyvät suurelta osin metyloitumattomina eli hypometyloituneina, jolloin ne ovat paremmin transkriptiotekijöiden saavutettavissa. Tämä geeni-ilmentymistä lisäävä hypometylaatio on ratkaisevan tärkeää geenien ilmentymiselle, koska metylaation on perinteisesti ajateltu toimivan geenien transkription vaimentimena (Eden & Cedar 1994). On havaittu, että tiettyjen CpG-kohtien metylaatioasteet kokevat tyypillisiä muutoksia ikääntymisen ja erilaisten

sairauksien myötä (Campisi & Vjig 2009), mikä tekee yrityksestä ennustaa sairauksia ja niiden riskitasoja metylaation avulla entistä realistisempaa.

Aiempi tutkimus on tuottanut useita vaihtoehtoisia metylaatiokelloihin perustuvia implementaatioita (Horvath 2013; Hannum ym. 2013; Levine ym. 2018; Lu ym. 2019). Tämän tutkielman tavoitteena on arvioida tunnetuimpien epigeneettisten metylaatiokellojen (HorvathAge, HannumAge, PhenoAge, GrimAge) potentiaalia biomarkkereina ikääntymiseen liittyvissä sairauksissa. Annan yleiskatsauksen alan nykytilasta esittelemällä näiden kellojen vahvuuksia, kehitystä ja validointia, mutta käsittelen myös niiden rajoituksia ja käyttöön liittyviä haasteita. Lisäksi tarkastelen erikseen syövän ja hermoston rappeutumissairauksien metylaatioidatan perusteella tehtyjä löydöksiä, jotka tukevat metylaatiokellojen hyödyntämistä näiden ikääntymiseen liittyvien sairauksien osalta.

2 DNA-METYLAATION PERUSTEET

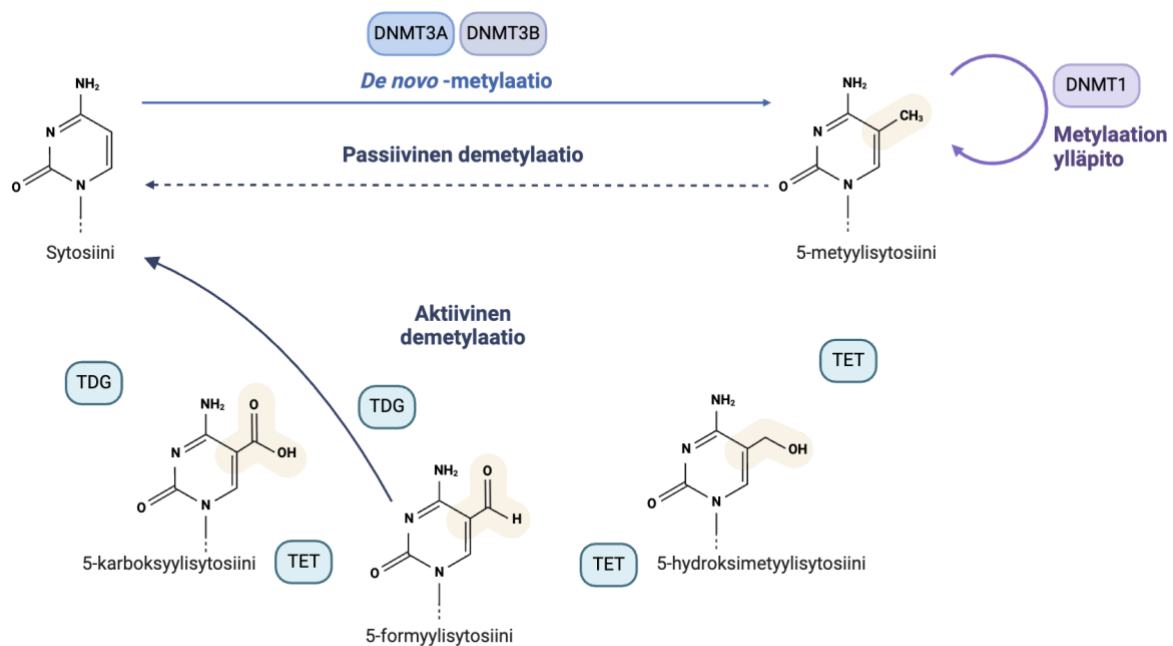
Epigenetiikka tutkii sellaisia periytyviä muutoksia geenien ilmenemisessä tai solujen fenotyypissä, jotka eivät muuta yksilön perimää eli DNA:n emässekvenssiä. Tällaisiin epigeneettisiin muunnoksiin kuuluvat muun muassa DNA- ja histonitason kemialliset muokkaukset mutta myös geeniekspressiota säätelevät ei-koodaavat RNA-molekyylit. Kenties kaikkein tutkituin epigeneettinen muunnos on DNA:n metylaatio eli S-adenosyylimetioniinista (SAM) irrotetun metyyliiryhmän entsyymaattinen lisäys sytosiinimäksen 5'-hiileen (K. Chen ym. 2016). Toisin kuin geneettiset mutaatiot, metylaatiomuutokset ovat palautuvia prosesseja, joihin vaikuttavat erilaiset ympäristön ärsykkeet läpi yksilön elämän, mikä tekee metylaatiosta dynaamisen rajapinnan genomien ja ympäristön välillä. Nisäkkäiden soluissa DNA-metylaation tiedetään olevan ratkaisevassa osassa muun muassa genomien eheyden ylläpidossa, yksilönkehityksessä, geneettisessä leimautumisessa, X-kromosomin inaktivaatiossa, ikääntymisessä sekä syövän kehityksessä.

DNA-metylaatio viittaa pääasiassa 5-metyylisytosiinin (5mC) muodostumiseen yhdessä tai useammassa genomien 28 miljoonassa CpG-dinukleotidissa. Tämä voi vaikuttaa geeniekspressioon esimerkiksi häiritsemällä transkriptiofaktoreiden sitoutumis- ja tunnustuskohdita tai värväämällä proteiineja, jotka säätelevät kromatiinin pakkautumisastetta (Reddington ym. 2013; Yin ym. 2017). Genomien metylaatioaste on yleensä runsas lähes

kaikilla alueilla paitsi geenien promoottori- ja vahvistaja-alueiden lähellä sijaitsevilla CpG-saarekkeilla (Nishiyama & Nakanishi 2021). Nämä saarekkeet ovat DNA-sekvenssejä, joissa on erityisen korkea sytosiini-guaaniinipitoisuus. Lisäksi normaaleissa soluissa esiintyy hypometylaatiota CpG-rannikoilla (engl. CpG island shores), jotka käsittävät noin kahden kiloemäksen pituisen alueen CpG-saarekkeen ympärillä. Hypometylaatiota esiintyy myös aktivoiviin tai inaktivoiviin histonimarkkereihin assosioituneissa DNA-metylaatiokanjoneissa, joita karakterisoi hyvin alhainen metylaatioaste (Jeong ym. 2014).

Metylaation vakaan mutta palautuvan luonteen vuoksi DNA:ssa tapahtuu sekä metyyliryhmien lisäystä että niiden poistoa eli demetylaatiota (kuva 1). Metylaation tapahtumisesta ja ylläpitämisestä vastaavat pääasiassa kolme erilaista DNA-metyylitransferaasia (DNMT), jotka nimensä mukaisesti siirtävät metyyliryhmän DNA:lle. Solunjakautumisessa DNA-juoste hemimetyloituu, minkä seurauksena uuden DNA-molekyylin tytärjuoste on hetken metyyliryhmätön. DNMT1 varmistaa näiden ryhmien samanlaisen kopioitumisen replikaation aikana, kun taas DNMT3A ja DNMT3B katalysoivat paljaan DNA:n *de novo* -metylaatiota (Nishiyama & Nakanishi 2021). Sen sijaan demetylaatiota tapahtuu kahden eri reitin välityksellä: passiivisesti replikaatiosta riippuvaisella tavalla tai aktiivisesti TET-perheen (engl. ten-eleven translocation) demetylaasien vaikutuksesta (Kagiwada ym. 2013; Yamaguchi ym. 2013). Nisäkkäät ekspressoivat TET1-, TET2- ja TET3-entsyymejä, jotka hapettavat metyloidun 5mC:n 5-formyylysytosiiniksi (5fC) ja edelleen 5-karboksyylisytosiiniksi (5caC) (Kudo ym. 2012). Tämän lisäksi demetylaatioon osallistuu tymiini-DNA-glykosylaasi eli TDG. Se tunnistaa ja leikkaa TET:n muokkaaman emäksen, kuten 5fC:n tai 5caC:n, minkä jälkeen DNA-polymeraasit viimeistelevät emäksettömän kohdan korvaamisen metyloitumattomalla sytosiinilla (Dalton & Bellacosa 2012; Onodera ym. 2021).

Klassisen mallin mukaan geenin promoottorin hypometylaatio tehostaa ja hypermetylaatio puolestaan hiljentää transkriptiota. Epigeneettisen markkerin kuten metyyliryhmän läsnäolo hypermetyloituneessa DNA:ssa tyypillisesti siis estää transkriptiofaktorin sitoutumisen, joskin enenevästi on näyttöä myös siitä, että tietyt transkriptiofaktorit kykenevät ohittamaan sitoutumiskohtiensa repressoivia epigeneettisiä tekijöitä. Kun jotkut transkriptiofaktorit indusoivat DNA:n aktiivisen demetylaation TET-entsyymien välityksellä, tiettyjen proteiinien, kuten SOX2:n, sitoutuminen johtaa passiiviseen demetylaatioon ja siten estää DNA:n metylaation ylläpidon (Vanzan ym. 2021). Tämä lisää uuden ja odottamattoman näkökulman metylaatiokuvioiden ja geeniekspression säätelyyn ja täten fysiologisten sekä patologisten prosessien ymmärtämiseen.



Kuva 1. DNA:n sytosiiniemästen metylaatiota ja demetylaatiota säädelään entsymaattisesti. DNA-metyylitransferaasit (DNMT3A ja DNMT3B) katalysoivat *de novo* -metylaation, minkä seurauksena DNA saa uusia metyyliryhmiä. DNMT1 osallistuu metylaatiokuvion ylläpitämiseen koptioimalla parentaalisen juosteen metyyliryhmät tytärjuosteelle. Sitä vastoin TET-entsyymit ja tyymiini-DNA-glykosylaasi (TDG) osallistuvat demetylaatioon: TET-entsyymit hapettavat 5-metyylisytyosiinin joko 5-formyyylimetyylisytyosiiniksi tai 5-karboksyylisytyosiiniksi, jonka TDG leikkaa pois. DNA-polymeraasit viimeistelevät metyloitumattoman sytosiinin lisäyksen. Replikaatiossa tapahtuu tämän lisäksi myös passiivista demetylaatiota, jolloin metyloituneiden sytosiinien osuus vähenee. Kuva muokattu mallista “DNA methylation”, lähde BioRender.com (2024). Haettu <https://app.biorender.com/biorender-templates>

3 METYLAATIOKELLOT IKÄÄNTYMISEN BIOMARKKEREINA

3.1 Kronologinen vs. biologinen ikä

Ikääntymistä koskevissa tutkimuksissa kronologisen ja biologisen iän erotus on välttämätöntä mutta haastavaa sekä laadullisesti että määrällisesti. Kronologinen ikä on suoraviivainen käsite, sillä se on universaalisti ymmärrettävissä oleva luku, joka kuvaa syntymästä kulunutta aikaa. Yksilöt eivät kuitenkaan vanhene samalla tavalla (Fransquet ym. 2019), ja tämä ero ikääntymisprosessissa on kiihdyttänyt vaihtoehtoisten ikääntymistä mittaavien tekijöiden

etsintää. Vaikka kiinnostus biologista ikää kohtaan on kasvanut viimeisten vuosikymmenien aikana, sen yhdenmukaisessa soveltamisessa on ongelmakohtia: biologiselle iälle ei ole yhtä sovittua määritelmää eikä standardoitua mittaria (Mitniski ym. 2015). Tutkijat ovat ehdottaneet lukuisia biologisia markkereita ja fysiologisia parametrejä, kuten telomeerien pituutta, immuunitoimintaa, sydämen terveyttä ja kognitiivisia kykyjä mahdollisina biologisen iän indikaattoreina, mutta helposti kvantifioitavan mittarin puuttuminen on merkittävä haaste.

Tällä hetkellä yksi lupaavimmista konsepteista on epigeneettinen ikä, sillä sen uskotaan heijastavan sellaista osaa biologisesta iästä, joka altistaa yksilön sairauksille ja kuolemalle (Lin ym. 2016; Christiansen ym. 2016). Tämän lisäksi yksilötasolla kronologinen ja epigeneettinen ikä voivat poiketa merkittävästi toisistaan (B. Chen ym. 2016). Kun kronologista ikää verrataan näennäiseen DNA-metylaatioikään (engl. DNA methylation age, DNAmAge), näiden erotus tuottaa arvion biologisesta iästä (Fransquet ym. 2019), minkä perusteella arvioidaan ikääntyvätkö kudokset odotettua nopeammin vai hitaammin. Positiivinen arvo viittaa epigeneettisen iän olevan korkeampi kuin kronologinen ikä ja negatiivinen taas nuorempi.

Ikääntymisnopeuden on osoitettu olevan perinnöllistä, ja fenotyypin muuntelun puhtaasti geneettistä komponenttia kuvaavat heritabiliteetti-arvot vaihtelevat vain hieman tutkimuksesta ja käytetystä mittaustavasta riippuen. Lu ym. (2019) raportoivat kapea-alaisen heritabiliteetin (h^2) olevan 30 %. Horvath (2013) samantapaisesti esitti laaja-alaisen heritabiliteetin (H^2) asettuvan noin 39 %:iin oltuaan ensin huomattavasti korkeampi vastasyntyneillä, mikä näyttäisi korostavan ympäristön vaikutuksen merkitystä yksilön ikääntyessä. Ikääntymisnopeuden geneettistä komponenttia puoltaa myös tutkimus, joka alustavasti osoitti 105–109-vuotiaiksi elävien jälkeläisillä olevan alhaisempi epigeneettinen ikä kuin samanikäisillä kontrolleilla (Horvath ym. 2015).

Ikääntymisnopeuteen liittyen B. Chen ym. (2016) ovat luoneet verisolujen koostumuksen perusteella kaksi mittaria epigeneettisen ikääntymisen kiihtymisestä: sisäisen epigeneettisen ikääntymisnopeuden (engl. intrinsic epigenetic age acceleration, IEAA) ja ulkoisen epigeneettisen ikääntymisnopeuden (engl. extrinsic epigenetic age acceleration, EEAA). Tiedetään, että veren solujen koostumus muuttuu vanhenemisen myötä (Pang ym. 2017), ja arvioidakseen solunsisäisiä muutoksia IEAA ottaa nämä verisolujen muutokset huomioon mutta antaa niistä riippumattoman sijaislukeman ikääntymisestä. Toisin sanoen IEAA mittaa ikääntymistä tavalla, joka ei korreloi kronologisen iän kanssa. EEAA päinvastoin sisältää edellä mainitut solukoostumuksen muutokset käyttämällä painotettua keskiarvoa

solulaskelmasta ikääntyvässä kudoksessa. Nämä kaksi ikääntymisnopeuden mittaria todennäköisesti siis mittaavat hieman eri näkökulmia ikääntymisprosessista (Horvath & Raj 2018); IEAA antaa alustavasti yhdenmukaisempia arvoja eri solutyypeissä sekä elimissä, kun taas EEAA näyttää assosioituvan paremmin DNA-metylaatioikään perustuvan kuolinajan ennusteen kanssa (Levine ym. 2018). Koska metylaation kaltaiset epigeneettiset muutokset eivät ole fiksoituja, niiden mahdollinen muokkaaminen tarjoaa tutkimuskohteen, millä voi olla merkittäviä yhteiskunnallisia ja terveydellisiä vaikutuksia.

3.2 Metylaatiokellojen kehittäminen ja validointi

AFAR (American Federation for Aging Research) on asettanut neljä kriteeriä tarkalle ja käytännölliselle ikääntymisen biomarkkerille. Biomarkkerin tulee (a) ennustaa ikääntymisnopeutta ja elinaikaa paremmin kuin kronologinen ikä, (b) aidosti valvoa ikääntymisprosessia sairauden oireiden sijaan, (c) olla toistuvasti ja helposti mitattavissa turvallisella tavalla ja (d) toimia sekä ihmisissä että laboratorioeläimissä, joilla alustavat testaukset aina validoidaan ennen ihmiskokeisiin siirtymistä. Käytännössä tällaista biomarkkeria ei kuitenkaan ole vielä löydetty, eikä sellaisen olemassaolo ole taattua. (Jylhävä 2017.) Tästä syystä tutkijat ovat tyytyneet Bakerin ja Sprottin (1988) määrittelyyn ikääntymisen biomarkkerista: sen tulisi pystyä nopeasti ennustamaan yksilön tai elimen toimintakykyä ja siinä tapahtuvia muutoksia kronologista ikää paremmin. CpG-dinukleotidien metylaatiotasoihin perustuvat biomarkkerit täyttävät nämä kriteerit, josta syystä ne ovat tulleet suosituiksi ikääntymis- ja pitkäikäisyystutkimuksissa; tarkkuutensa vuoksi niitä kutsutaankin epigeneettisiksi kelloiksi tai metylaatiokelloiksi (B. Chen ym. 2016; Horvath & Raj 2018). Niiden vahvuus perustuu siihen, että ne mittaavat metylaatiota joko solu- tai kudokskohtaisesti tai vaihtoehtoisesti useasta kudoksesta samanaikaisesti (Bergsma & Rogaeva 2020).

Huolimatta jokaisen kellon ainutlaatuisesta koulutusmallista metylaatiokellojen kehittäminen on pääpiirteittäin samankaltaista. Sekä Horvath ja Raj (2018), Bergsma ja Rogaeva (2020) että Mei ym. (2023) ovat kuvanneet yksityiskohtaisesti kellojen koostamista. Kehittäminen alkaa metylaatioaineiston hankintaan liittyvillä päätöksillä kudostyyppistä, testistä ja biologisen iän sijaismarkkerista. Tutkimukseen valitun kudoksen tulisi olla helposti saatavilla, kuten veri, sylki, suun limakalvon epiteelisolut tai rasvakudos, mutta myös hankalammin saatavia kudoksia on käytetty, kuten kuolemanjälkeisiä aivokudosnäytteitä. Aineiston on myös tärkeää kattaa tarpeeksi iso ikähaarukka, jotta kalibrointi myöhemmässä vaiheessa olisi

mahdollisimman tarkkaa. Metylaatiodataa tuotetaan lukuisilla eri menetelmillä, kuten pyrosekvensoinnilla ja endonukleasidigestiolla, mutta Illuminan BeadChip-teknologiaan perustuvat metylaatiotestit (27K, 450K ja 850K eli EPIC) ovat suosituimmat (Kurdyukov & Bullock 2016). Ensimmäisen sukupolven kronologisissa kelloissa biologisen iän sijaismarkkerina on tyypillisesti käytetty kronologista ikää (Horvath 2013). Sijaismarkkerina on mahdollista käyttää myös muita ikääntymiseen liittyviä mittauksia, kuten veren plasmaproteiineja, jolloin käytännössä puhutaan yhdistelmäbiomarkkerista, mikä on tyypillistä toisen sukupolven kelloille.

Toisessa vaiheessa valitaan koneoppimiseen perustuva tilastollinen malli, joka on yleensä lineaarinen regressioalgoritmi, kuten penalisoitu regressioanalyysi. Tähän lukeutuvat lasso- ja harjanneregressiot, sekä nämä kaksi yhdistävä elastinen verkko (engl. Elastic Net, EN). EN:n on todettu sekä teoriassa että käytännössä soveltuvan metylaatiokellojen luontiin, sillä se mukautuu erinomaisesti tilanteisiin, joissa ennustemuuttujia eli selittäjiä on huomattavasti enemmän kuin havaintoja. EN ja muut penalisoidut regressiomallit vähentävät regressiolle tyypillistä ylisovitusta, missä malli oppii koulutusdatansa liian hyvin ja sieppaakin kohinaa ja satunnaista vaihtelua. Tämä voi johtaa alentuneeseen suorituskykyyn, kun mallia sovelletaan otoksen ulkopuolisen, täysin uuden tiedon ennustamiseen. Algoritmi kuitenkin valitsee kovariaatit eli CpG-dinukleotidit automaattisesti, ja jokaiselle kelloon päätyvälle CpG:lle asetetaan β -kerroin. Tämä on negatiivinen tai positiivinen paino, joka kuvaa ko. metylaatiokohdan metylointitason muuttumista ikääntymisen myötä. CpG:t skaalataan, missä yhteydessä niistä vähiten informatiiviset saavat arvokseen 0. Kun CpG:t ja niiden kertoimet lopuksi summataan, saadaan arvio kudoksen epigeneettisestä iästä (yhtälö 1; Field ym. 2018).

$$Ikä \sim Vakiotermin + \beta_1 CpG_1 + \beta_2 CpG_2 + \dots + \beta_N CpG_N$$

(Yhtälö 1)

Ennen validaatiota metylaatiokelloa koulutetaan ensimmäisen vaiheen valituilla ja mitatuilla parametreilla. Aineisto jaetaan koulutus- ja testiosajoukoksi, mistä saadut korrelaatiokerroin (r) ja keskimääräinen absoluuttinen erotus todellisen kronologisen iän ja yhtälön antaman iän välillä (engl. median absolute error, MAE) määrittävät kellon luotettavuuden. Mitä pienempi MAE, sitä paremmin kello on kalibroitu. EN:llä koulutettua metylaatiokelloa voidaan pitää

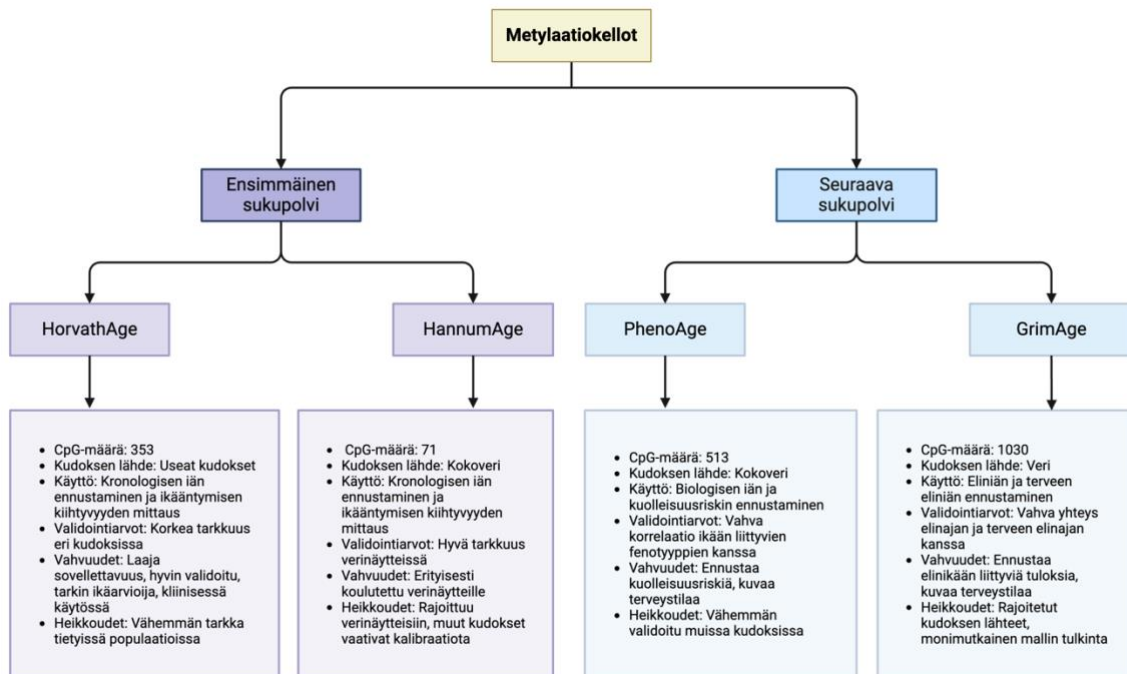
luotettavana, mikäli sen korrelaatiokerroin on vähintään 0,8, joskin on tavanomaista, että kellojen tarkkuus koulutusaineistossa on parempi kuin varsinaisessa käytössä (Horvath 2013). Vaikka kellot itsessään ovat hyödyllisiä, niiden pohjalta voidaan rakentaa myös ikääntymisnopeuteen liittyviä mittareita, jotka heijastavat erilaisiin tauteihin ja ikääntymiseen liittyviä tiloja (Horvath & Raj 2018).

3.3 Epigeneettiset kellot

Bocklandtin ym. (2011) luotua ensimmäisen metylaatioon perustuvan ikäarvioijan epigeneettiset kellot ovat kehittyneet huomattavasti. Kaikki kellot eivät kuitenkaan ole ominaisuuksiltaan ja käyttötarkoitukseltaan samanarvoisia, minkä vuoksi käyttöön on vakiintunut vain murto-osa nykyään olemassa olevista kelloista. Näistä käytetyimpiä ovat ensimmäisen sukupolven Horvathin ja Hannumin kellot, sekä seuraavan sukupolven PhenoAge ja GrimAge. Epigeneettisiä kelloja luokitellaan monin eri kriteerein, ja niiden luokittelu onkin tärkeä elementti, kun halutaan ymmärtää ikäarvioijan ominaisuuksia, käyttötarkoitusta ja soveltuvuutta (Kuva 2). Edellä mainittu jako ensimmäisen ja seuraavan sukupolven kelloihin on kenties kaikkein intuitiivisin. Merkittävimmät erot näiden kellojen välillä liittyvät lähinnä CpG-dinukleotidien kattavuuden laajenemiseen metylaatiodataa hankkivissa testeissä, ylimääräisten biomarkkerien hyödyntämiseen niin sanottuna yhdistelmäbiomarkkerina biologisen iän arvioinnissa (Jylhävä 2017), sekä parantuneeseen tarkkuuteen ja ennustusvoimaan.

Muitakin jakotapoja on, ja on oleellista ymmärtää, mitä niillä tarkoitetaan. Metylaatiokellojen kehitys pohjautuu joko yhdestä tai useasta kudoksesta saatuun metylaatioaineistoon, minkä takia voidaan puhua yhden kudoksen (engl. single tissue) tai useampia kudostyyppettä (engl. multi-tissue, pantissue) kattavista kelloista. Vain yhteen kudokseen perustuvat kellot vaativat kalibroitua muihin kudoksiin sovellettaessa (Bergsma & Rogaeva 2020). Tämän lisäksi julkaisuissa usein erotellaan kronologiset kellot biologisista kelloista sen mukaan, onko niiden kehityksessä käytetty kovariaattina pelkkää kronologista ikää vai jotain muuta mittaria (Bergsma & Rogaeva 2020). Siinä missä kronologiset kellot sopivat erinomaisesti juuri kronologisen iän mittaamiseen, biologiset kellot ovat suunnattu enemmän biologisen iän arvioimiseen. Vaikka eri kellojen suoriutuminen saattaa validointiarvojen perusteella olla

yhdenmukaista, on pidettävä mielessä, että ne perustuvat pääasiallisesti eri CpG-dinukleotideihin ja täten ne heijastanevat kudoksettaisia vaikutuksia (Field ym. 2018).



Kuva 2. Käyttöön vakiintuneiden metylaatiokellojen yleisimpiä ominaisuuksia. Taulukossa vertaillaan neljän metylaatiokellon ominaisuuksia: CpG-dinukleotidien määrää, kudoslähdettä, käyttötarkoitusta, validointiarvoja, vahvuuksia ja heikkouksia. Kuva muokattu mallista “Types of Agrochemicals”, lähde BioRender.com (2024). Haettu <https://app.biorender.com/biorender-templates>

3.3.1 Ensimmäisen sukupolven metylaatiokellot

Varhaisten metylaatiokellojen merkittävät puutteet, kuten huono tarkkuus ja vähäinen CpG:iden määrä rajoittivat merkittävästi niiden käyttöä, sillä DNAm-ikää ei voi luotettavasti arvioida monesta kudoksesta vain muutaman CpG:n mallilla (Horvath & Raj 2018). Tällä hetkellä käytetyimmät ensimmäisen sukupolven metylaatiokellot ovat Elastic Net -analyysillä luodut Horvathin ja Hannumin kronologiset ikääntymismallit, HorvathAge ja HannumAge. Horvathin 353 CpG:tä kattava kello (Horvath 2013) on ensimmäinen ikääntymismalli, joka loi vankan pohjan epigeneettisen ikääntymisen tutkimukselle. Se on myös tähän mennessä luoduista kelloista tarkin kronologisen iän arvioija (Horvath & Raj 2018). HorvathAge on kehitetty suuresta aineistosta (n = 7844) Illuminan 27K- ja 450K-testeillä, jotka mittaavat CpG-dinukleotidien metylaatiota. Aineisto kattaa koko aikuisiän sekä eri etnisiä populaatioita.

Validaatiotestin perusteella korrelaatio on erittäin korkea (0,96) ja MAE vain 3,6 vuotta. Koska Horvathin kello perustuu useasta kudoksesta saatuun metylaatiodataan, se on sovellettavissa laajaan kirjoon eri solutyyppejä sekä kudoksia (esim. kokoveri, paksusuoli, keuhkot, sylki). Muutamia poikkeuksia kuitenkin on; soveltuvuus esimerkiksi rintakudokseen, luurankolihas kudokseen ja sydänlihaskudokseen on heikko.

Horvathin kellon CpG:iden annotaatio paljastaa assosiaatioita solukuolemaan ja solujen selviytymiseen, kudoksen ja organismin kehitykseen, syöpään, sekä solujen kasvuun ja jakautumiseen liittyvien geenien kanssa. Sen lisäksi nämä kello-CpG:t voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden korrelaation perusteella iän kanssa; positiivinen korrelaatio käsittää 193 CpG:tä, jotka ovat yllidustettuja lähellä Polycomb-ryhmän kohdegeenejä, kun taas negatiivisen korrelaation ryhmässä on 160 CpG:tä, jotka esiintyvät pääasiassa CpG-rannikoilla. Kyseisen kellon pohjalta luotu keskimääräinen ikääntymiskiihtyvyys (engl. average age acceleration) kykenee määrittämään, onko tietyn kudoksen metylaatioikä odotettua vanhempi tai nuorempi.

Samoihin aikoihin luotu HannumAge (Hannum ym. 2013) perustuu 656 yksilön kokoverinäytteistä johdettuun epigeneettisen assosiaatiotutkimuksen (EWAS) dataan. Tutkijat hyödynsivät kahta kohorttia ($n_1 = 482$, $n_2 = 174$), jotka koostuivat sekä kaukasialaisista että latinalaisamerikkalaisista. Yksilöiden ikä vaihteli 19 ja 101 vuoden välillä, minkä vuoksi Hannumin kello ei ole ihanteellinen lapsista saatujen näytteiden analysoimiseen. Metylaatioprofiilien käsittely suoritettiin Illuminan Infinium HumanMethylation450 BeadChip -testillä, joka kattaa 485 577 CpG:tä. Elastic Net valikoi parhaimpaan ennustemalliin perustuen 71 CpG:tä, joskin analyysistä jätettiin pois sukupuolikromosomeihin kuuluvat markkerit tulosten tulkitsemisen yksinkertaistamiseksi. Samasta analyysimenetelmästä huolimatta vain kuusi kelloon päätyneistä CpG:istä ovat yhteisiä Horvathin kellon kanssa (Jylhävä 2017). Annotaatioissa lähes kaikki CpG:t sijoittuvat joko vanhenemiseen liittyvien fenotyyppien (esim. Alzheimerin tauti, oksidatiivinen stressi) geeneihin tai niiden lähelle. Onkin ehdotettu, että HannumAge on tarkempi myöhäisen iän terveydentilan ja kuolleisuusriskien arvioinnissa, kun taas HorvathAge kuvaa paremmin sisäsyntyisiä prosesseja (Levine ym. 2018). Kaksi CpG:tä löytyy endokriinisysteemin ja hermoston toiminnalle tärkeästä somatostatiinigeenistä (*STT*), mutta useat markkerit assosioituvat erityisesti ylipainoon ja aineenvaihduntaan. Hannumin kellon tarkkuus on huomattava, sillä todellisen ja ennustetun iän korrelaatio on 0,91 ja MAE 4,9 vuotta.

Hannumin ikääntymismallin pohjalta on kehitetty ilmeisen metylomisen ikääntymisnopeuden (engl. apparent methylomic aging rate, AMAR) mittari, jolla arvioidaan heijastavako poikkeavat arvot todellisia biologisia eroja vai esimerkiksi vain mittausvirhettä. AMAR määritellään metylaatioidatan perusteella ennustetun iän ja kronologisen iän suhteena. Tutkijat raportoivat, että miessukupuoli vaikuttaa ikääntymisnopeuteen kiihdyttävästi. Kiihtymisilmiö todettiin myös kudostyyppistä riippumatta kasvainkudoksissa, jotka näyttivät ikääntyneen noin 40 % enemmän kuin saman yksilön muut normaalit kudokset.

3.3.2 Seuraavan sukupolven metylaatiokellot

Seuraavan sukupolven metylaatiokellojen luomisen perusteena on oivallus siitä, että pelkän kronologisen iän varaan jääminen epigeneettisten ikääntymisbiomarkkerien kehittämisessä todennäköisesti jättää huomioimatta sellaisia oleellisia CpG:itä, joiden metylaatioaste ei muutukaan voimakkaasti ajan kuluessa (Levine ym. 2018). Tämän pohjalta Levine ym. (2018) ovat kehittäneet 513 CpG:tä käsittävän biologisen ikäarvioijan, DNAm PhenoAgen, jossa sijaismarkkerina on kronologisen iän sijaan kliinisiin biomarkkereihin perustuva fenotyypinen ikä. Kokonaisuudessaan PhenoAge on johdettu yhdeksästä kliinisestä biomarkkerista (albumiini, kreatiniini, seerumin glukoosi, CRP, lymfosyyttiprosentti, solujen keskitilavuus, punasolujen koon vaihtelu, alkalinen fosfataasi ja valkosolujen määrä) sekä kronologisesta iästä Elastic Net -regressioanalyysillä. Tähän saatu metylaatioaineisto on peräisin eri tietokantoihin tallennetuista Illuminan 27K-, 450K- ja EPIC-metylaatiotesteistä. PhenoAge ennustaa eroja kuolinsykohtaisessa ja yleisessä kuolleisuusriskissä, kognitiivisessa suoriutumisessa, sekä fyysisessä toiminnassa samanikäisissä yksilöissä; yhden vuoden lisääntynyt fenotyypinen ikä on yhdistetty 4,5 % korkeampaan yleiseen kuolleisuusriskiin. Joissakin tapauksissa PhenoAge myös ennustaa jäljellä olevan elämän määrää paremmin kuin kronologinen ikä. Vaikka se on alun perin kehitetty kokoveren perusteella niin kuin Hannumin kello, se on silti alustavasti osoittautunut soveltuvan erilaisiin soluihin ja kudoksiin, joskin vähemmän validoidusti. Validointitutkimuksessa PhenoAgen ja kronologisen iän väliseksi korrelaatioksi on saatu 0,71, mutta se vaihtelee eri kudosten välillä. Esimerkiksi aivokudoksen kanssa korrelaatio on korkeampi (0,92), kun taas keuhkojen kanssa se on alhaisempi (0,55).

Yksilön DNAm PhenoAge on periytyvä ($h^2 = 0,33$ tai $0,51$ aineistosta riippuen) ja liittyy muun muassa tulehdusta aiheuttaviin tekijöihin ja transkriptionaaliseen signalointiin. Vain viisi CpG:tä, jotka assosioituvat geeneihin *P2RX1*, *SCGN*, *EDARADD*, *IPO8*, *NHLRC1*, esiintyvät kaikissa kolmessa edellä mainitussa kellossa. Nämä geenit myös korreloivat iän kanssa. DNAm PhenoAge korreloi positiivisesti monien tulehdukseen ja aineenvaihduntaan liittyvien

tekijöiden kuten CRP:n ja insuliinin kanssa, kun taas negatiivinen korrelaatio havaitaan HDL-kolesterolin kanssa. Lisäksi merkittävä osa kello-CpG:istä, joilla on korkea korrelaatio iän kanssa, sijaitsevat CpG-saarekkeilla, jotka liittyvät Polycomb-ryhmän kohdeproteiineihin.

Samalla periaatteella kehitetty DNAm GrimAge (Lu ym. 2019) on yhdistelmäbiomarkkeri, joka on luotu analysoimalla yli 6000 yksilön verinäytteitä kolmesta eri etnisestä ryhmästä. Käytetty metylaatiodata on peräisin Illuminan 450K- ja EPIC-testeistä. Tässä kellossa on 1030 CpG:tä, ja se perustuu seitsemän plasmaproteiinin (ADM, B2M, GDF-15, kystatiini C, leptiini, PAI-1, TIMP-1) lisäksi sekä sukupuoleen että tupakointiaskeleisiin. Näistä markkereista PAI-1 ja askivuodet osoittautuvat erityisen merkitseviksi. Regressioanalyysin perusteella GrimAgesta on luotu kolme biomarkkeria: epigeneettistä ikää mittaava DNAm GrimAge, ikääntymisen kiihtymistä arvioiva AgeAccelGrim ja iän huomioiva DNAm PAI-1. Ensimmäinen näistä arvioi aikaa kuolemaan, syöpään, koronaarisydäntautiin sekä menopaussin alkamisikään, kun taas AgeAccelGrim assosioituu lisäsairastavuuteen (engl. comorbidity), ja viimeisin elinaikaan sekä tyypin II diabetekseen. Annotaation perusteella GrimAge liittyy geeneihin, jotka yhdistetään esimerkiksi rasvahappojen solukalvojen väliseen kuljetukseen, sytokiinivälitteiseen signalointireittiin, sekä luokan II MHC-molekyylien reseptoriaktiivisuuteen. DNAm GrimAge on osoittautunut paremmaksi ennustamaan aikaa kuolemaan ja mihin tahansa syöpään kuin HorvathAge, HannumAge ja PhenoAge.

4 IKÄÄNTYMISEEN LIITTYVÄT SAIRAUDET

Ikääntyminen on yksi merkittävimmistä riskitekijöistä monille kroonisille sairauksille, minkä vuoksi useat tutkimukset ovat pyrkineet selvittämään DNA-metylaatioiän ja erilaisten ikääntymiseen liittyvien sairauksien välistä suhdetta (Jylhävä 2017; Fransquet ym. 2019). Tämän pohjalta on ehdotettu, että luotettava biologisen iän mittari voisi auttaa ennustamaan sairauden alkamista ja antaa tietoa ehkäisevistä strategioista. Toistaiseksi DNAmAgen ja sairauksien välinen yhteys on kuitenkin pysynyt paikoittain epäselvänä vaihtelevien tulosten vuoksi. Esimerkiksi multipeliskleroositutkimuksessa DNAm PhenoAge paljasti fenotyyppisen iän kiihtymistä, kun taas Horvathin ja Hannumin kellot eivät poikenneet kronologisesta iästä (Theodoropoulou ym. 2019). Tämä todennäköisesti korostaa sopivan epigeneettisen kellon valinnan tärkeyttä tautikohtaisia yhteyksiä käsittelevissä tutkimuksissa. (Bergsma & Rogaeva 2020.)

Tästä huolimatta DNA-metylaatioikä vaikuttaa lupaavalta biologisen iän ja sairauden riskin biomarkkerilta. Levine ym. (2015) osoittivat Horvathin kellon kiihtymistä Alzheimerin tautia sairastavien prefrontaalikorteksissa, mikä korreloi kognitiivisen heikkenemisen ja neuropatologisten markkereiden kanssa. Samoin Marioni ym. (2015) ja Belsky ym. (2016) havaitsivat assosiaatioita DNAmAgen ja kognitiivisen toiminnan välillä, kun analyysissä huomioitiin myös psykometriset mittarit. DNAmAge on yhdistetty tämän lisäksi syövän kehittymiseen ja siitä johtuvaan kuolleisuuteen; Hannum ym. (2013) ja Horvath (2013) havaitsivat yhteyden kasvainkudoksen epigeneettisen iän lisääntymisen tiettyjen syöpätyyppien osalta. Viimeaikaiset tutkimukset korostavatkin DNA-metylaation kriittistä osuutta monien biologisten toimintojen säätelyssä ja sen osallisuutta sairauksiin.

4.1 Hermoston rappeutumissairaudet

4.1.1 Alzheimerin tauti

Alzheimerin tauti (engl. Alzheimer's disease, AD) on länsimaissa yleinen muistisairaus, joka aiheuttaa aivotoimintojen asteittaista heikentymistä hermosolujen vaurioitumisen ja kuoleman seurauksena. Taudin patogeneesi on edelleen jokseenkin epäselvä, mutta se perustuu ainakin amyloidi-beeta-plakkien (A β) kertymiseen hermosolujen pinnalle sekä hyperfosforyloituneen tau-proteiinin neurofibrillivyyhtien kasautumiseen intrasellulaaritulassa (van den Hove ym. 2020). Oireet, kuten muistinmenetykset, kognitiiviset vaikeudet ja persoonallisuuden muutokset, tyypillisesti pahenevat taudin edetessä. AD:sta on sekä varhain puhkeava (engl. early-onset Alzheimer's disease, EOAD) että myöhään puhkeava (engl. late-onset Alzheimer's disease, LOAD) taudinkuva, joiden taustalla on eri mekanismit. LOAD muodostaa selvästi enemmistön tapauksista ja kehittyy yleensä 65 ikävuoden jälkeen, kun taas EOAD aiheuttaa kognitiivisia ongelmia ennen tätä ikärajaa ja muodostaa vain noin 5 % diagnooseista (Diniz ym. 2017). Taudin esiintyvyyden odotetaan kasvavan väestön ikääntyessä (Ao ym. 2022), mikä tulee asettamaan merkittäviä haasteita terveydenhuoltojärjestelmille, sillä taudille ei ole tällä hetkellä parantavaa hoitoa, ainoastaan taudinkuvaa jarruttavia lääkeinterventioita. Olemassa olevien lääkkeiden riittämätön teho ja huomattavat sivuvaikutukset ovat suuri kannustin uusien diagnosointi- ja hoitomenetelmien kehittämiseksi (Gao ym. 2022).

Vaikka epigeneettisten muutosten syy-seuraussuhde Alzheimerin taudissa ei ole selvillä, on kuitenkin osoitettu, että erilaiset DNA-metylaatiomuutokset vaikuttavat osaltaan taudin kehittymiseen (Ao ym. 2022). 5-metyylisytyosiini (5mC) on kenties tutkituin aivojen

epigeneettinen muutos, ja sillä on merkittävä osuus aivojen kehityksessä (Jeong ym. 2021). Coppieters ym. (2014) raportoivat 5mC:n tasojen kasvavan huomattavasti AD-potilailla esimerkiksi keskimmaisessa ylemmässä ja frontaaliosassa ohimopuolissa, mikä korreloi positiivisesti A β :n ja neurofibrillivyyhtien kanssa. Toisaalta Chouliaras ym. (2013) päätyivät samojen kudosten osalta juuri päinvastaiseen tulokseen tutkimuksessa, jossa otoskoko oli hieman suurempi. Keskeinen AD:n runtelema aivojen alue on myös entorinaalinen aivokuori, jonka geenien kuten *ANKK1*:n hypermetylaatiota havaitaan etuoslohkossa (Wood 2014). Lisäksi metylaatiomuutoksia on havaittu geneissä *ABCA7* ja *BINI*, jotka osallistuvat AD:n kehitykseen; nämä hypermetylaatiotapahtumat sattuvat usein samaan aikaan amyloidiproteiinien kertymisen kanssa. On mahdollista, että tällaiset DNA-metylaatiomuutokset viittaavat varhaisiin patologisiin muutoksiin. (Jager ym. 2014.)

Sytosiiniemäksen hydroksymetyylivariantti (5hmC) puolestaan vaikuttaa olevan yhteydessä geeniekspression aktivoitumiseen aivoissa, ja se liittyy erilaisiin fysiologisiin prosesseihin, kuten solujen erilaistumiseen, hermoston kehittymiseen ja ikääntymiseen (Wang ym. 2012). AD:ssa 5hmC:n pitoisuus aivoissa korreloi positiivisesti geenien kuten *TREM2*:n transkription kanssa, mikä on yhdistetty A β 42-peptidin fagosytoosiin (Celarain ym. 2016). Tämä on keskeinen prosessi A β :n aggregaation ja sitä seuraavien neurotoksisten vaikutusten estämisessä erityisesti hippokampuksessa (Jiang ym. 2014). Tätä myötäillen tutkimukset ovatkin osoittaneet 5hmC:n selektiivistä vähenemistä sekä AD-potilaiden että mallihiirten hippokampaalisissa ja neokortikaalisissa hermosoluissa, mikä pahenee iän myötä ja voimistuu A β -käsittelyn jälkeen (Zhang ym. 2020). Lisäksi TET-entsyymien väheneminen assosioituu alentuneisiin 5hmC-tasoihin, A β -plakin kertymiseen ja neuropatologisten piirteiden ilmenemiseen AD-aivoissa. Varhaisessa vaiheessa AD:n patologia liittyy TET-tasojen laskuun ja sitä seuraavaan 5hmC:n menetykseen hippokampuksessa, mikä edistää taudin etenemistä (Li ym. 2020). 5hmC:n dynamiikan spesifi osuus AD:n patogeneesissä on kuitenkin edelleen tuntematon, ja tutkimustuloksissa on ollut ristiriitaisia löydöksiä (Coppieters ym. 2014).

Amyloidiprekursoriproteiinin (APP), preseniliini1:n (PSEN1) ja Alzheimerin taudin välistä yhteyttä tutkittaessa on kyetty tunnistamaan tiettyjä mahdollisia riskitekijöitä. Coupland ym. (2015) raportoivat *PSEN1*:n liiallisen ekspresion johtavan *MAPT*-promootorin lisääntyneeseen metylaatioon. Toisaalta myös DNA:n hypometylaatiolla on laajamittaiset seuraukset SAM-tasojen ollessa alhaiset: se alentaa foolihappotasoa, lisää homokysteiniä perifeerisissä verinäytteissä sekä edistää A β -reitien geenien ekspressiota (Coppedè ym. 2012; Carmo ym. 2016). Fusio ym. (2011) havaitsivat CpG-metylaation alenevan B-

vitamiinipuutostilassa. B-vitamiinin puutos vaikuttaa pääasiassa CpG-metylaatioon säätelemällä sytosiinin metylaatiota tietyissä kohdissa, mikä puolestaan vaikuttaa *PSEN1*:n ekspressioon (Lucarelli ym. 2001). Hypometylaatio *TMEM59*-geenin promoottorialueella puolestaan estää APP-proteiinia lähtemästä Golgin laitteesta (Bakulski ym. 2012). DNA-metylaatio interaktoi myös neurodegeneratiivisten geenien hiljentämiseen vaikuttavan PRC2-kompleksin kanssa (Zhang ym. 2021). Monet tutkimukset viittaavat siihen, että Alzheimerin tauti ei yksinomaan heijasta normaalia ikääntymistä vaan pikemminkin osoittaa tyypillisen ikääntymisprosessin häiriöitä, mikä korostaa DNA-metylaatiokuvioinnin monimutkaista suhdetta geenien ilmenemisen säätelyssä ja Alzheimerin taudin patogeneesissä (Gao ym. 2022).

4.1.2 Muut hermostotaudit

DNA-metylaatiomuutokset ovat olleet myös muiden neurodegeneratiivisiin tauteihin keskittyvien tutkimusten fokuksena. Younesian ym. (2022) ovat tarkastelleet Alzheimerin taudin lisäksi DNA-metylaatiota muun muassa Huntingtonin ja Parkinsonin taudeissa. Parkinsonin tauti (PD) on toiseksi yleisin neurodegeneratiivinen häiriö, jolle on ominaista laaja α -synukleiiniproteiinin kertyminen ja siitä johtuva dopamiinisolujen menetys pääasiassa keskiaivoissa. α -synukleiinin (*SNCA*) asianmukainen säätely on ratkaisevan tärkeää hermosolujen terveydelle, koska sen kohonneet tasot voivat johtaa myrkyllisten Lewyn kappale -proteiinikertymien muodostumiseen hermosolujen sytoplasmassa, mikä lopulta käynnistää apoptoottisen solukuoleman (Poewe ym. 2017). PD:n varhainen diagnoosi on haasteellista, sillä tauti oireilee vasta merkittävän hermosoluvaurion seurauksena.

Viimeaikaiset tutkimukset ovat joka tapauksessa korostaneet epigeneettisten mekanismien, erityisesti DNA-metylaation merkitystä PD:n patologiassa. CpG-saarekkeiden hypometylaatio PD-potilaiden *SNCA*-geenin intronissa 1 on havaittu lisäävän α -synukleiiniproteiinin ilmentymistä (Ai ym. 2014). Lisäksi on huomattu, että *CYP2E1*-geenin promoottorin hypometylaatio ja lisääntynyt aktiivisuus liittyvät dopamiinisolujen rappeutumiseen myrkyllisten aineenvaihduntatuotteiden muodostumisen kautta (Kaut ym. 2013). On myös esitetty, että levodopa, joka on keskeinen lääke PD:n hoidossa, saattaa vaikuttaa terapeuttisesti vaikuttamalla DNA-metylaatioprosesseihin (Schmitt ym. 2015).

PD:n tavoin Huntingtonin tauti (HD) on tuhoisa neurodegeneratiivinen tila, ja sitä karakterisoi diagnoosia hankaloittava kliinisten oireiden vaihtelu. Tyypillisesti potilailla ilmenee ongelmia

tai poikkeavuuksia motoriikassa, mielialassa, sekä kognitiivisissa kyvyissä. Pitkälle edenneenä tauti voi johtaa dementiaan. Huntingtonin taudista on olemassa kaksi erilaista muotoa, joista molemmilla on omat ominaispiirteensä. Varhaisiän taudissa oirekuva voi painottua kognitiivisiin ja käytösoireisiin, kun taas myöhäisessä taudinkuvassa motoriset oireet voivat esimerkiksi muistuttaa parkinsonismia (Sipilä ym. 2019). HD johtuu pääasiassa kromosomissa 4 sijaitsevan huntingtiinigeenin (*HTT*) mutaatiosta, joka koostuu yli 40 sytosiini-adeniini-guaaniini (CAG) -trinukleotidin toistosta. Seurauksena syntyy viallinen HTT-proteiini, joka on haitallinen erityisesti aivojuovion hermosoluille (Caron ym. 2018). Mutatoitunut *HTT* (*mHTT*) -geeni tuottaa kahta lähetti-RNA:ta, jotka transloidaan täyspitkäksi mHTT-proteiiniksi ja mHTT-eksoni 1-proteiiniksi. Näistä jälkimmäisellä on merkittävä osuus HD:n patologiassa; siirtyessään tumaan se oligomerisoituu ja muodostaa kasaumia, jotka johtavat suurempien jyvästen muodostumiseen hermosolujen sytoplasmassa ja tumassa. Näillä sytoplasmisilla jyväsillä on tuhoisia vaikutuksia muun muassa aksonaaliseen kuljetukseen, mitokondrioiden toimintaan sekä proteiinien hajotukseen.

Tutkimukset ovat osoittaneet, että DNA:n metylaatiokuviot muuttuvat HD:n yhteydessä. Nämä muutokset liittyvät 5mC:n lisääntymiseen, mikä vähentää hermosolujen toimintaan ja selviytymiseen olennaisesti liittyvien geenien kuten *SOX2*, *PAX6*, *NES* ja *BDNF* ilmentymistä (Ng ym. 2013; Pan ym. 2016). On myös näyttöä 5hmC:n globaalista alenemisestä sekä aivokuoressa että aivojuoviossa. Tämä menetys voi johtua TET1:n ilmentymisen vähenemisestä sekä TET-demetylaasien vaimennussäätelystä ja MECP2:n voimistavasta säätelystä (Wang ym. 2013).

4.2 Syöpä

Syövällä tarkoitetaan joukkoa eri kudoksista lähtöisin olevia sairauksia, joille on yhteistä solujen hallitsematon kasvu ja levittäytyminen muualle elimistöön. Seulonnasta ja hoitoyrityksistä huolimatta kuolleisuus syöpätauteihin on edelleen korkeaa, ja se jää toiseksi vain sydän- ja verisuonitaudeille (WHO 2020). Mahdollisimman varhainen diagnoosi parantaa hoitovastetta ja siten potilaan selviytymismahdollisuuksia, minkä vuoksi kyseessä on erittäin ongelmallinen sairaus, sillä yleensä oireita ilmenee vasta primaarisen tuumorin etäpesäkkeistyttyä (Roy & Tiirikainen 2021). Vaikka syöpä on ennen kaikkea mutaatioista johtuva geneettinen tauti, sille ominainen piirre on myös metylaatioepätasapaino eli poikkeava

DNA-metylaatio. Tämä epätasapaino on usein havaittavissa ennen varsinaisen kasvaimen muodostumista, mikä viittaa siihen, että DNA-metylaatio voi toimia pääasiallisena yhteytenä ympäristötekijöiden ja syövän alkamisen välillä (Brait ym. 2009).

4.2.1 Paikallinen hypermetylaatio

Paro ym. (2021, 152–154) korostavat DNA-metylaation ja syövän välisen suhteen olevan monimutkainen ja monitekijäinen, sekä esittelevät laajalti siihen liittyviä ilmiöitä. Syövässä havaitut muutokset ilmenevät usein paikallisena geenien hypermetylaationa eli metyyliiryhmien epätyypillisenä lisääntymisenä promoottorialueen CpG-saarekkeissa. Tämä voi johtaa sellaisten geenien hiljentymiseen, jotka tyypillisesti ovat aktiivisia terveissä kudoksissa, missä ne säätelevät esimerkiksi apoptoosia, solusykliä, sekä DNA-vaurioiden korjausta. Erityisesti kasvunrajoitegeenien promoottoreihin mutta muihinkin säätelyalueisiin keskittynyt hypermetylaatio liittyy vahvasti syövän kehittymiseen (Saito ym. 2003). On myös ehdotettu, että Polycomb-ryhmän proteiinien toimesta jo valmiiksi transkriptionaalisesti vaimennettujen geenien *de novo* -metylaatio edesauttaisi syöpäsolujen kantasolumaisen tilan syntymistä.

Hypermetylaatio on erittäin kontekstisidonnaista, sillä syöpien alatyypeilläkin on omanlaisensa metylaatioprofiilit. Esimerkiksi *OPCML*-geenin promoottorin metylaatio voi johtaa sen ekspression vähenemiseen, ja mitä alhaisempi kyseisen geenin ekspressio on, sitä vakavampi munasarjasyöpä potilaalla havaitaan (Chen ym. 2007). Samaan tautiin on yhdistetty kasvunrajoitegeenien *BRCA1* ja *RASSF1A* metyloituminen (Hentze ym. 2019). Kohdunkaulasyövässä *PAX1*:n ja *SETP9*:n metylaatioaste vaikuttaa taudin vakavuuteen (He ym. 2023) kun taas suusyövässä solun kasvu häiriintyy monien kasvunrajoitegeenien CpG-saarekkeiden metylaation seurauksena (Shridhar ym. 2016). Myös mahasyövässä tiettyjen geenien metylaatioaste on huomattavasti suurempi kuin terveessä kudoksessa (Ooki ym. 2010). Eturauhassyövässä on havaittu vastaavaa syövältä suojaavan *GSTP1*-geenin promoottorin metylaatiota (Li ym. 2004).

4.2.2 Globaali hypometylaatio

Toinen syövän tunnusmerkeistä on globaali hypometylaatio eli 5mC:n menetys (Paro ym. 2021, 154–155). Laajamittaisena tämän tiedetään johtavan kromosomi-instabiliteettiin esimerkiksi uudelleenaktivoimalla transposoneja, mutta osuessaan spesifisesti onkogeenien promoottorialueeseen se lisää näiden geenien ekspressiota (Hentze ym. 2019; Ao ym. 2021).

Hypometylaatio on lisäksi yhdistetty tuumorien asteittaiseen malignisoitumiseen invasiiviseksi tyyppiä.

Hypometylaatio on yleinen taustamekanismi useissa eri syöpätaudeissa, ja se on yksi ensimmäisistä syövässä tunnistetuista epigeneettisistä poikkeavuuksista (Paro ym. 2021, 154). Esimerkiksi keuhkosyövässä esiintyy usein laajamittaista DNA-hypometylaatiota yhdessä promoottorialueiden CpG-saarekkeiden hypermetylaation kanssa. Tämä johtaa proto-onkogeenin aktivaatioon ja kromosomistabiliteetin heikkenemiseen (Balgkouranidou ym. 2013). Sen sijaan mahasyövälle ominaista on transferrinigeenin alentunut metylaatioaste, mikä aiheuttaa proto-onkogeenin *TRF2* ekspression lisääntymistä ja edistää kasvaimen syntymistä (Dong ym. 2010). Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että naisten syöpätaudeissa, erityisesti munasarjasyövässä, tiettyjen CpG-saarekkeiden hypometylaatio assosioituu kudokseen tunkeutumiseen ja etäpesäkkeiden muodostumiseen (Zhuang ym. 2012). Dettleux ym. (2022) ovat osaltaan selvittäneet transkriptiofaktoreiden FOXA1 ja GATA3 osuutta DNA:n hypometylaation säätelyssä rintasyövässä; molemmat näistä näyttävät edistävän kromosomi-instabiliteettia ja rintasyöpäsolujen epänormaalia geeniekspressiota, mikä myötävaikuttaa taudin puhkeamiseen. Sama ryhmä korostaa, että epänormaalien metylaatiomuutosten kertymisen mekanismit ovat vielä huonosti ymmärrettyjä. Perinteisten mutaatioiden lisäksi vaihtoehtoina on harkittu TET-entsyymien säätelyn häiriöitä sekä akkumuloituvia genomien epimutaatioita (Nishiyama & Nakanishi 2021). Yksi suurimmista haasteista diagnostiikan näkökulmasta on tällä hetkellä tarpeeksi herkän ja tarkan syöpäkohtaisen biomarkkerin löytäminen, mikä aikaistaisi hoitoa ja yksilöllistäisi hoitosuunnitelmaa (Roy & Tiirikainen 2021).

5 HAASTEET JA SOVELLUKSET

5.1 Biologiset haasteet

Koska metylaatiomuutosten osuus ikääntymisessä ja ikääntymiseen liittyvissä sairauksissa on kiistatonta, metylaatiokellojen soveltaminen alan tutkimuksissa vaikuttaa suhteellisen lupaavalta. Kellojen maksimaalinen hyödyntäminen on todennäköisesti kuitenkin vielä kaukana, sillä tutkimusasetelmien suunnitteluun ja toteuttamiseen liittyy biologisia ongelmia, joista osa nostaa esiin meille vielä tuntemattomia tekijöitä. Bergsma ja Rogaeva (2020)

korostavat tarvetta erottaa ikääntymisen aiheuttamat DNA-metylaatiomuutokset niistä, jotka ovat peräisin ympäristö- ja elämäntapatekijöistä. Yksilöiden ikääntyessä ulkoisten tekijöiden merkitys kasvaa, mikä johtaa suurempaan yksilöiden väliseen vaihteluun metylaatiokuvioissa. Tämä Horvathin ja Hannumin kellojen sekä PhenoAgen vahvistama vaihtelu painottaa ympäristöaltistusten huomioimisen tärkeyttä. Sama ryhmä tuo esiin myös, että metylaatiokellojen tarkka kalibrointi edellyttää solu- ja kudosspesifisten DNA-metylaatiokuvioiden huomioimista. Vaikka tällainen korjaus parantaa kellon tarkkuutta, se voi toisaalta tahattomasti hämärtää biologisesti informatiivisia signaaleja. Siinä missä yhden kudoksen kattavien kellojen sytosiinit sijaitsevat yleensä CpG-rannikoilla, monen kudoksen kelloissa sytosiinit paikallistuvat yleensä evolutiivisesti konservoituneille CpG-saarekkeille.

Tällä hetkellä suurin haaste on kuitenkin ymmärtää ikääntymisen biologisia juurisyitä ja niiden liittymistä metylaatioon. Toistaiseksi ei ole vielä kyetty todistamaan, ajavatko DNA-metylaatiomuutokset ikääntymistä vai ovatko ne yksinkertaisesti passiivista seurausta ikääntymisen taustalla olevista prosesseista. Yksi ikääntymisen teorioista on epigeneettinen drift, joka viittaa ilmiöön, jossa nuorilla yksilöillä on samankaltaisia epigeneettisiä muutoksia, mutta nämä muutokset alkavat divergoitua voimakkaasti yksilöiden ikääntyessä (Fraga ym. 2005). Tämä tarkoittaa sitä, että aluksi samankaltaiset epigeneettiset profiilit alkavat muuttua ja eriytyä, mikä voi vaikuttaa solujen toimintaan ja siten ikääntymisprosessiin sekä sairauksien riskiin.

Käyttökelpoisuudestaan huolimatta emme osaa varmuudella myöskään sanoa, mitä DNAm-ikä varsinaisesti kuvastaa ja mikä sen biologinen merkitys on. Kehittäessään metylaatiokelloaan Horvath (2013) ja sittemmin Horvath ja Raj (2018) ovat havainnollistaneet muutamia seikkoja, jotka näyttäisivät viittaavan siihen, mitä DNA-metylaatiokellot eivät ainakaan mittaa: solujen vanhenemista, mitoottista proliferaatiota ja telomeerien pituutta. Huolimatta siitä, että vanhenevissa soluissa tapahtuu metylaatiomuutoksia, DNAm-ikään assosioituvat muutokset kohdistuvat tyypillisesti eri sytosiineihin. Tämän lisäksi DNAm-ikä on mielenkiintoisia ominaisuuksia: se mittaa kronologista ikää kuolemattomissa mutta silti jakaantuvissa soluissa sekä on yhteydessä alkion kantasolujen passage-lukuun, joka kuvaa viljeltyjen solujen siirtokertoja uuteen kasvatusliuokseen. Tästä jälkimmäisestä korrelaatiosta huolimatta DNAm ei mittaa mitoottista jakautumistakaan, sillä se kykenee antamaan tarkan ja yhdenmukaisen kronologisen iän sekä jakautumattomalle kudokselle että lyhyt- ja pitkäikäisille verisoluille. Vaikka telomeerien pituus assosioituu DNAm-ikään heikon negatiivisesti, kyseessä on todennäköisesti kaksi eri ilmiötä, sillä telomeraasin ekspressio ei alenna DNAm-ikää.

Koska Horvathin kello tosiaan antaa samankaltaiset kronologiset ikäarviot jakautumattomille ja jakautuville kudoksille, Horvath (2013) on tämän pohjalta esittänyt hypoteesin DNAm-ian biologisesta taustasta. Kyseinen malli ehdottaa, että DNAm-ikä edustaa niin sanotun epigeneettisen ylläpitojärjestelmän (engl. epigenetic maintenance system, EMS) tekemää kertyvää työtä. EMS ylläpitää epigeneettistä vakautta ja aktivoituu, mikäli se aistii tätä vakautta uhkaavia tekijöitä. Mitä enemmän EMS joutuu kuluttamaan energiaa, sitä nopeampi epigeneettisen kellon tikitystahti on; toisin sanoen DNAm-ikä on reaktio vaurioiden korjaamiseen tai niiden estämiseen. Tämä kävisi yksiin metylaatiokellon tikitystahdin logaritmiseen käyrään; yksilönkehityksen alussa organismi vaatii suuren energiapanoksen epigeneettisen vakauden ylläpitämiseksi, kunnes organismin vanhetessa energian kulutus lopulta tasaantuu.

5.2 Tekniset ja analyttiset haasteet

Edellä mainittujen biologisten haasteiden lisäksi epigeneettisten metylaatiokellojen ymmärtämiseen ja hyödyntämiseen liittyy joukko teknisiä ja analyttisiä ongelmakohtia, joiden tiedostaminen auttaa sekä hahmottamaan metylaatiokellojen heikkouksia että tulkitsemaan julkaisuja kriittisesti. Erityisen tärkeää on ymmärtää, että monet tauteja koskevat metylaatiokellotutkimukset hyödyntävät poikittaistutkimuksista saatua dataa, ja pitkittäistutkimusten puuttuessa kausaalisuutta ei ole voitu osoittaa (Jylhävä ym. 2017). On siis mahdotonta sanoa, missä määrin kellojen taustalla olevat prosessit säätelevät ikääntymistä ja niihin liittyviä sairauksia tai *vice versa* ilman tutkimuksia, joissa yksilöitä seurataan pitkällä aikavälillä.

Alan tutkimuksia on kritisoitu myös muilla tavoin. Vaikka yleisimmin käytössä olevat metylaatiokellot osoittavat tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä erilaisiin tautitiloihin, metylaatiokellotutkimusten ryhmien välisiä eroja kuvaavat efektikoot (engl. effect size) sen sijaan ovat olleet melko vaatimattomia (Marioni ym. 2015; Levine ym. 2018). Tämä viittaa siihen, että löydösten käytännön merkitys on ehkä ollut liioiteltua. Tätä sivuten Mei ym. (2023) ovat kritisoineet biologisten rinnakkaisnäytteiden puuttumista ja toisinaan pieniä otoskokoja. Systemaattisessa vikatestissään he demonstroivat PhenoAgen putoavan tilastollisen merkitsevyyden alapuolelle, kun otoskoko kasvatettiin kuuteen käyttäen yhdeksää itsenäistä tietokantaa. Myös Fransquet ym. (2019) raportoivat meta-analyysissään epäilynsä mahdollisesta julkaisuharhasta ja vääristä positiivisista tuloksista. Edellä mainittu ryhmä

kritisoi lisäksi useita tutkimuksia puutteellisista tiedoista koskien populaation koostumusta, tapausten ja verrokkien valintakriteerejä tai mahdollisia sekoittavia tekijöitä.

Sekoittavien tekijöiden vaikutusta korostavat myös Bergsma ja Rogaeva (2020) erityisesti DNA-metylaatiodataa tuottavien testien sekä ikähaarukkaedustavuuden osalta. Koska testejä ei ole normalisoitu yhdenmukaisella tavalla, uudet tai poikkeavat metodit voivat johtaa virheelliseen DNA-metylaatioikään. Yhtä lailla tiettyjen ikäryhmien aliedustus joko kelloja hyödyntävissä tutkimuksissa tai kellojen kehityksessä puolestaan voi vaikuttaa metylaatiokellojen ennustetarkkuuteen eri elämänvaiheissa, koska lapsuusajan DNA-metylaation dynamiikka eroaa merkittävästi aikuisiän dynamiikasta. Esimerkiksi Horvathin ja Hannumin kellojen mukaan DNA-metylaatioiän muutokset hidastuvat iän myötä, kun taas nopeimmat muutokset tapahtuvat varhaisessa kehitysvaiheessa. Tarpeeksi suuri korrelaatio kronologisen iän kanssa on keskeistä myös kiihtyneen ikääntymisen tunnistamiseksi (Fransquet ym. 2019).

Field ym. (2018) ovat täsmentäneet rajoituksia, jotka liittyvät erityisesti Horvathin ja Hannumin kelloihin. Lineaarinen regressio, jota näissä metylaatiokelloissa käytetään, olettaa, että jokaisen kello-CpG:n vaikutus ikään on additiivinen ja että metylaatiomuutosten nopeus pysyy vakiona koko eliniän ajan, mikä ei välttämättä pidä paikkaansa. Tätä voidaan kuitenkin yrittää kiertää matemaattisesti erilaisilla ei-lineaarilla funktioilla ennen kellon rakentamista. Ikäarvioiden tarkkuus puolestaan riippuu kaikkien käytettyjen CpG-kohtien asianmukaisesta kattavuudesta, mikä aiheuttaa haasteita sekvensointipohjaisille tutkimuksille, joiden menetelmiä ei välttämättä ole standardoitu Illuminan testien tapaan mittaamaan aina samoja CpG-kohtia. Osittain tämän takia nykyiset metylaatiokellot eivät välttämättä sisällä biologisesti kaikkein informatiivisimpia CpG-kohtia, mutta toki tähän vaikuttaa se, että kattavinkin metylaatiotesti mittaa vain noin 3 % kaikista ihmisgenomin CpG-kohdista. Vaikka näillä kelloilla voidaan onnistuneesti ennustaa otoksen ulkopuolisia aineistoja, Mei ym. (2023) tähdensivät, että ElasticNet-analyysi ja CpG:iden valinta perustuvat numeeriseen korrelaatioon ilmiön kanssa, eikä mahdollisille biologisille merkityksille. Siihen ei täten välttämättä edes valikoidu sytosiineja, joiden metylaatio muuttuu tai korreloi vahvasti iän kanssa. Sytosiinivalintaa tarkemmin tutkiessaan sama tiimi selvitti, että EN:n automaattisesti hylkäämien sytosiinien poisto koulutusdatasta itse asiassa muutti valittuja CpG:itä. Voidaankin perustellusti todeta, että kello-CpG:iden merkitys on vielä toistaiseksi epäselvä.

5.3 *Terapeuttiset ja kliiniset sovellukset*

Varteenotettavista haasteista huolimatta metylaatiokellot on todettu tehokkaiksi työkaluiksi, joilla voidaan sekä ennustaa kronologista ikää että ymmärtää solujen ja kudosten fysiologista tilaa, mikä teoriassa tekee niistä erinomaisia välineitä tautien seulonnassa, diagnostiikassa ja interventioissa. Yleinen konsensus kuitenkin on, että metylaatiokellojen ei ole tarkoitus korvata jo olemassa olevia kliinisiä biomarkkereita, kuten verensokeria, vaan pikemminkin täydentää ja tukea niitä kokonaisvaltaisemman terveydentilan ymmärtämisessä (Levine ym. 2018; Lu ym. 2019). Esimerkiksi Suomen ulkopuolella Horvathin kello on tarkkuutensa ansiosta käytössä lukuisissa laboratorioissa, joissa sitä käytetään muun muassa apuvälineenä havaitsemaan epäjohdonmukaisuuksia DNA-metylaatioidatan ja kliinisten muuttujien välillä (Horvath & Raj 2018).

Metylaatiokellojen kliininen hyöty perustuu ennen kaikkea niiden ennustavaan voimaan. B. Chen ym. (2016) tarkastelevat ulkoisen epigeneettisen ikääntymiskiihtyvyyden (EEAA) merkitystä kuolinajan (engl. time to death) ennustamisessa. Heidän löydöksensä viittaa verisolujen koostumuksen sisältävien epigeneettisten ikäarvioiden, kuten EEAA:n, olevan merkittävästi yhteydessä kaikkiin kuolinsyihin liittyviin tekijöihin, ja ne ylittävät aiemmat ikääntymisen kiihtymisen mittarit. Nämä yhteydet pysyvät johdonmukaisina eri demografisten ja terveyteen liittyvien alaryhmien välillä, mukaan lukien etnisyys, sukupuoli, BMI, tupakointi, fyysinen aktiivisuus sekä merkittävät krooniset sairaudet. Tämä tutkimus vahvistaa käsitystä siitä, että epigeneettiset metylaatiokellot ennustavat yleistä kuolleisuusriskiä joitakin perinteisiä riskitekijöitä paremmin. DNA-tason metylaatiomittauksilla on etunsa myös nimenomaan ikääntymisen mekanismeja tutkivissa tutkimuksissa. Levine ym. (2018) selventävät, että tämä perustuu muun muassa kykyyn kvantifioida ikääntymistä erityisesti sellaisissa tapauksissa, missä yksilö on joko erittäin nuori tai terve, jolloin perinteiset mittauskohteet, kuten CRP, glukoosi ja kreatiniini, eivät vielä vaihtelee merkittävästi.

DNA:n metylaatioprofiilit voivat tarjota tehokkaita biomarkkereita erityisesti varhaisen vaiheen syöpäpotilaiden tunnistamiseen jo ennen varsinaisen syöpäkasvaimen tai -solujen havaitsemista (Hentze ym. 2019). Esimerkkinä tästä on kohdunkaulan syövän seulontatutkimuksessa esiin tullut Polycomb-ryhmän kohdegeenien hypermetylaatio, joka havaittiin kolme vuotta ennen taudin puhkeamista (Zhuang ym. 2012). Lisäksi munasarjasyöpätutkimuksessa on havaittu kolmen geenin (*OPCML*, *RUNX3*, *TFPI2*) kattavan metylaatioanalyysin tunnistavan varhaisen munasarjasyövän herkemmin kuin seerumin

syöpävasta-aineen CA125 tasot (Wang ym. 2015). Ihanteellista biomarkkeria seulontatarkoituksiin ei ole kuitenkaan löydetty, joskin DNA-metylaatio vaikuttaa lupaavalta (Hentze ym. 2019). Nishiyama & Nakanishi (2021) ovat puolestaan tarkastelleet DNMT-entsyymien estämistä syövässä ja korostavat DNA-hypometylaation tarkempaa ymmärtämistä mahdollisten sivuvaikutusten välttämiseksi. Sama ryhmä esittää myös UHRF1:n toiminnallisia domeeneja inhiboivien, pienimolekyylisten yhdisteiden olevan mahdollisesti tehokkaita vaihtoehtoja syövän hoidossa. Tämä pitänee paikkansa erityisesti niiden syöpien kohdalla, joissa esiintyy UHRF1:n yliekspressiota ja p53:n inaktivaatiota.

Younesian ym. (2022) sen sijaan painottavat, että neurodegeneratiivisiin tauteihin liittyvät DNA-metylaatiomuutokset ovat suurella todennäköisyydellä arvokkaita kohteita terapeuttisille interventioille, mutta tutkimuksista saadun tiedon siirtäminen kliiniseen käytäntöön on vielä alkuvaiheissa. Tämä johtuu osittain ainakin siitä, että kohdekudokseen pääsy on haastavaa, ja useimmissa tapauksissa biomarkkereita voidaan mitata vasta kuoleman jälkeen. Pitää kuitenkin paikkansa, että jotkut epigeneettiset muutokset ilmenevät ennen patologisia muutoksia. Koska suurin osa Alzheimerin taudin epigeneettisistä ilmiöistä liittyy nimenomaan taudin patologiaan, epigeneettiset interventiot voivat mahdollisesti estää taudin etenemistä tai parantaa potilaiden kognitiivisia kykyjä (Gao ym. 2022).

DNA-metylaation epävakaaseen luonteeseen pohjautuvat terapeuttiset sovellukset avaavat kenties kaikkein puoleensavetävimpien mahdollisuuksien kehityksen tulevaisuudessa. *In vitro*-tutkimukset ovat osoittaneet, että tehokkain interventio epigeneettistä ikääntymistä vastaan saavutetaan tällä hetkellä solun Yamanaka-tekijöiden ilmentämisellä. Nämä tekijät – OCT4, KLF4, SOX2 ja c-Myc – uudelleenohjaavat somaattiset solut monipotentteiksi kantasoluiksi, mikä käytännössä nollaa epigeneettisen kellon (Horvath 2013). Mielenkiintoisia tuloksia on saatu myös *in vivo* -toimenpiteillä: esimerkiksi hematopoieettista kantasoluterapiaa saavan henkilön veren epigeneettinen ikä muuttuu lyhytkestoisesti donorin ikää vastaavaksi (Weidner ym. 2015). Lisäksi poikittaistutkimukset ovat alustavasti paljastaneet mahdollisen väylän ruokavalion sekä elämäntapojen ja veren EEAA:n välillä. Hitaampi ikääntymisnopeus liitetään esimerkiksi runsaasti kasviksia ja kalaa sisältävään ruokavalioon, ylipainon välttämiseen ja fyysiseen liikuntaan (Quach ym. 2017). Tätä löydöstä myötäilee myös ensimmäinen pitkäikäistutkimus, jossa tarkastellaan fyysisen liikunnan ja ruokavalion kausaalisia vaikutuksia naisten ikääntymiseen GrimAgella mitattuna (Fiorito ym. 2021). Vaikka tutkimuksessa on edistytty merkittävästi, on edelleen epävarmaa, voiko DNA-metylaatiotasojen suoralla manipulaatiolla hidastaa tai kääntää biologista ikääntymistä (Horvath & Raj 2018).

6 YHTEENVETO

Epigeneettiset metylaatiokellot ovat saavuttaneet vakiintuneen aseman ikääntymistutkimuksissa erityisesti biologisen iän käsitteen kannustamana. Metylaatiomuutosten tutkiminen erilaisten sairauksien biomarkkereina on ensinnäkin valaissut metylaation ja patologioiden monimutkaista vuorovaikutusta, mutta myös antanut arvokasta tietoa epigeneettisen ikääntymisen prosesseista. Koska useita sairauksia, kuten hermoston rappeutumissairauksia ja syöpää, karakterisoi tietynlainen metylaatiokuva joko genomien laajuusena hypometylaationa tai geenispesifisenä hypermetylaationa, motivaatio luoda biomarkkeri sairauksien seulontaan on korkea ja todennäköisesti vain ajan kysymys. Pohjimmiltaan metylaatiokellojen potentiaali biomarkkerina perustuu metylaation entsyymaattisesti dynaamiseen luonteeseen; Genomin metylaatioastetta säätelevät metyyliiryhmiä lisäävät DNMT:t ja niitä poistavat TET-entsyymit, minkä seurauksena geenin transkriptio joko aktivoituu tai repressoituu. Genomin metylaatiotasot vaihtelevatkin runsaasti: pääasiassa metyyliiryhmiä lisätään CpG-dinukleotideihin promoottorialueilla, kun taas esimerkiksi CpG-kanjoneissa metylaatio on vähäistä.

Pelkän kronologisen iän seuraamisen sijaan metylaatiokellot mahdollistavat myös ikääntymisen poikkeavan kiihtymisen mittaamisen sekä erilaisten terveystilojen ennustamisen. Toistaiseksi suosituimmat kellot ovat Horvathin ja Hannumin kronologiset ikämallit sekä PhenoAge ja GrimAge, joilla kaikilla on lineaariseen regressioon perustuva ainutlaatuinen koulutusmalli. Perustavanlaatuisen erojensa takia tutkijoiden on kuitenkin osattava valita tutkimusasetelmaansa sopiva kello. Siinä missä Horvathin kello soveltuu erinomaisesti monenlaisiin kudoksiin, Hannumin kello rajoittuu verinäytteisiin. Sekä PhenoAge että GrimAge kuvaavat terveystilaa, mutta ensimmäinen soveltuu paremmin esimerkiksi ikääntymiseen liittyvien fenotyyppien ennustamiseen, kun taas jälkimmäinen kuvaa näistä kelloista parhaiten jäljellä olevaa aikaa kuolemaan.

Käyttökelpoisuudestaan huolimatta epigeneettisissä kelloissa piilee haasteita, jotka vaativat tarkkaa harkintaa. Biologiset monimutkaisuudet, kuten kudosspesifiset erot metylaatioasteissa ja ympäristötekijöiden vaikutus, korostavat tämänhetkisiä tietoaukkoja sekä tiedon tulkinnan varovaisuutta. Samoin teknisten haasteiden käsitteleminen edellyttää monipuolista lähestymistapaa. Sekoittavien tekijöiden ja eri alustojen välinen standardoimattomuuden huomioiminen ovat välttämättömiä näiden biomarkkerien täyden potentiaalin hyödyntämiseksi

ikäntymiseen liittyvissä sairauksissa. Mikäli kellojen pohjalta tehtävien analyysien luotettavuus todistetaan ja kyetään toistamaan, epigeneettisten biomarkkereiden integrointi kliiniseen käyttöön tulee tarjoamaan mahdollisuuksia varhaisempaan sairauksien havaitsemiseen ja kohdennettuihin hoitoihin. Erityisesti se tulee avaamaan ovia personoidulle lääketieteelle. Tulevaisuudessa tutkimukset voivat keskittyä kehittämään uusia sairauskontekstiin räätälöityjä kellomalleja sekä innovatiivisia menetelmiä, jotka mahdollistavat DNA-metylaatiomuutosten seurannan pitkällä aikavälillä. Näin voimme paremmin varautua sairauksien kasvavaan taakkaan ja tarjota ennaltaehkäisystrategioita, jotka ovat olennaisia väestön terveyden ja hyvinvoinnin ylläpitämisessä erityisesti nyt, kun populaation ikärakenne on muuttumassa suuresti lähivuosisikymmenien aikana.

7 LÄHTEET

- Ai, S. X., Xu, Q., Hu, Y. C., Song, C. Y., Guo, J. F., Shen, L., Wang, C. R., Yu, R. L., Yan, X. X., & Tang, B. S. (2014). Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 337(1-2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.11.033>
- Ao, C., Gao, L., Yu, L. (2022). Research Progress in Predicting DNA Methylation Modifications and the Relation with Human Diseases. *Current medicinal chemistry*, 29(5), 822–836. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210917115733>
- Baker, G.T., 3rd, Sprott, R.L. (1988). Biomarkers of aging. *Experimental gerontology*, 23(4-5), 223–239. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(88\)90025-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(88)90025-3)
- Bakulski, K.M., Dolinoy, D.C., Sartor, M.A., Paulson, H.L., Konen, J.R., Lieberman, A.P., Albin, R.L., Hu, H., Rozek, L.S. (2012). Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29(3), 571–588. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2012-111223>
- Balgkouranidou, I., Liloglou, T., Lianidou, E.S. (2013). Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. *Biomarkers in medicine*, 7(1), 49–58. <https://doi.org/10.2217/bmm.12.111>
- Belsky, D.W., Moffitt, T.E., Cohen, A.A., Corcoran, D.L., Levine, M.E., Prinz, J., Schaefer, J., Sugden, K., Williams, B., Poulton, R., Caspi, A., 2016. Telomere, epigenetic clock, and biomarker-composite quantifications of biological aging: Do they measure the same thing? bioRxiv. <http://dx.doi.org/10.1101/071373>.
- Bergsma, T., Rogaeva, E. (2020). DNA Methylation Clocks and Their Predictive Capacity for Aging Phenotypes and Healthspan. *Neuroscience insights*, 15, 2633105520942221. <https://doi.org/10.1177/2633105520942221>
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J.S., Horvath, S., Vilain, E. (2011). Epigenetic predictor of age. *PloS one*, 6(6), e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821>
- Brait, M., Ford, J.G., Papaiahgari, S., Garza, M.A., Lee, J.I., Loyo, M., Maldonado, L., Begum, S., McCaffrey, L., Howerton, M., Sidransky, D., Emerson, M.R., Ahmed, S., Williams, C.D., Hoque, M.O. (2009). Association between lifestyle factors and CpG island methylation in a cancer-free population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the*

- American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 18(11), 2984–2991. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-1245>
- Campisi, J., Vijg, J. (2009). Does damage to DNA and other macromolecules play a role in aging? If so, how? *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences & Medical Sciences*, 64A:175–178. doi: 10.1093/gerona/gln065
- Caron, N.S., Dorsey, E.R., Hayden, M.R. (2018). Therapeutic approaches to Huntington disease: from the bench to the clinic. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(10), 729–750. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.133>
- Celarain, N., Sánchez-Ruiz de Gordo, J., Zelaya, M.V., Roldán, M., Larumbe, R., Pulido, L., Echavarri, C., Mendioroz, M. (2016). TREM2 upregulation correlates with 5-hydroxymethylcytosine enrichment in Alzheimer's disease hippocampus. *Clinical epigenetics*, 8, 37. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0202-9>
- Chen, H., Ye, F., Zhang, J., Lu, W., Cheng, Q., Xie, X. (2007). Loss of OPCML expression and the correlation with CpG island methylation and LOH in ovarian serous carcinoma. *European journal of gynaecological oncology*, 28(6), 464–467. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179137/>
- Chen, B.H., Marioni, R.E., Colicino, E., Peters, M.J., Ward-Caviness, C.K., Tsai, P.-C., Roetker, N.S., Just, A.C., Demerath, E.W., Guan, W., Bressler, J., Fornage, M., Studenski, S., Vandiver, A.R., Moore, A.Z., Tanaka, T., Kiel, D.P., Liang, L., Vokonas, P., Schwartz, J., Lunetta, K.L., Murabito, J.M., Bandinelli, S., Hernandez, D.G., Melzer, D., Nalls, M., Pilling, L.C., Price, T.R., Singleton, A.B., Gieger, C., Holle, R., Kretschmer, A., Kronenberg, F., Kunze, S., Linseisen, J., Meisinger, C., Rathmann, W., Waldenberger, M., Visscher, P.M., Shah, S., Wray, N.R., McRae, A.F., Franco, O.H., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Absher, D., Assimes, T., Levine, M.E., Lu, A.T., Tsao, P.S., Hou, L., Manson, J.E., Carty, C.L., LaCroix, A.Z., Reiner, A.P., Spector, T.D., Feinberg, A.P., Levy, D., Baccarelli, A., van Meurs, J., Bell, J.T., Peters, A., Deary, I.J., Pankow, J.S., Ferrucci, L., Horvath, S. (2016). DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging*, 8(9), 1844–1865. <https://doi.org/10.18632/aging.101020>
- Chen, K., Zhao, B.S., He, C. (2016). Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression. *Cell Chemical Biology*, 23(1):74-85. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.11.007.
- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W., Coleman, P.D., Rutten, B.P., van den Hove, D.L. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of aging*, 34(9), 2091–2099. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021>
- Christiansen, L., Lenart, A., Tan, Q., Vaupel, J.W., Aviv, A., McGue, M., Christensen, K. 2016. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell*, 15:149–54. <https://doi.org/10.1111/accel.12421>
- Coppedè, F., Tannorella, P., Pezzini, I., Migheli, F., Ricci, G., Caldarazzo lenco, E., Piaceri, I., Polini, A., Nacmias, B., Monzani, F., Sorbi, S., Siciliano, G., Migliore, L. (2012). Folate, homocysteine, vitamin B12, and polymorphisms of genes participating in one-carbon metabolism in late-onset Alzheimer's disease patients and healthy controls. *Antioxidants & redox signaling*, 17(2), 195–204. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4368>
- Coppieters, N., Dieriks, B.V., Lill, C., Faull, R.L., Curtis, M. A., Dragunow, M. (2014). Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiology of aging*, 35(6), 1334–1344. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031>
- Coupland, K.G., Kim, W.S., Halliday, G.M., Hallupp, M., Dobson-Stone, C., Kwok, J.B. (2015). Effect of PSEN1 mutations on MAPT methylation in early-onset Alzheimer's disease.

- Current Alzheimer research*, 12(8), 745–751.
<https://doi.org/10.2174/1567205012666150710110756>
- Dalton, S.R., Bellacosa, A. (2012). DNA demethylation by TDG. *Epigenomics*, 4(4), 459–467.
<https://doi.org/10.2217/epi.12.36>
- De Jager, P.L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L.C., Yu, L., Eaton, M.L., Keenan, B.T., Ernst, J., McCabe, C., Tang, A., Raj, T., Replogle, J., Brodeur, W., Gabriel, S., Chai, H.S., Younkin, C., Younkin, S.G., Zou, F., Szyf, M., Epstein, C.B., Schneider, J.A., Bernstein, B.E., Meissner, A., Ertekin-Taner, N., Chibnik, L.B., Kellis, M., Mill, J., Bennett, D.A. (2014). Alzheimer’s disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nature neuroscience*. 17, 1156–1163. doi: 10.1038/nn.3786
- Detilleux, D., Spill, Y.G., Balaramane, D., Weber, M., Bardet, A.F. (2022). Pan-cancer predictions of transcription factors mediating aberrant DNA methylation. *Epigenetics & chromatin*, 15(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00443-w>
- Diniz, L.P., Tortelli, V., Matias, I., Morgado, J., Bérnago Araujo, A.P., Melo, H.M., Seixas da Silva, G.S., Alves-Leon, S.V., de Souza, J.M., Ferreira, S.T., De Felice, F.G., Gomes, F.C.A. (2017). Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against A β Oligomers in Alzheimer’s Disease Model. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(28), 6797–6809.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3351-16.2017>
- Do Carmo, S., Hanzel, C.E., Jacobs, M.L., Machnes, Z., Iulita, M.F., Yang, J., Yu, L., Ducatenzeiler, A., Danik, M., Breuillaud, L.S., Bennett, D.A., Szyf, M., Cuello, A.C. (2016). Rescue of Early bace-1 and Global DNA Demethylation by S-Adenosylmethionine Reduces Amyloid Pathology and Improves Cognition in an Alzheimer’s Model. *Scientific reports* 6, 34051.
<https://doi.org/10.1038/srep34051>
- Dong, W., Wang, L., Chen, X., Sun, P., Wu, Y. (2010). Upregulation and CpG island hypomethylation of the TRF2 gene in human gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*, 55(4), 997–1003.
<https://doi.org/10.1007/s10620-009-0810-8>
- Eden, S., Cedar, H. (1994). Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4(2), 255-259. doi: 10.1016/s0959-437x(05)80052-8
- Field, A.E., Robertson, N.A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., Adams, P.D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular cell*, 71(6), 882–895.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008>
- Fiorito, G., Caini, S., Palli, D., Bendinelli, B., Saieva, C., Ermini, I., Valentini, V., Assedi, M., Rizzolo, P., Ambrogetti, D., Ottini, L., Masala, G. (2021). DNA methylation-based biomarkers of aging were slowed down in a two-year diet and physical activity intervention trial: the DAMA study. *Aging cell*, 20(10), e13439. <https://doi.org/10.1111/accel.13439>
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.-Z., Plass, C., Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10604–10609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>
- Fransquet, P.D., Wrigglesworth, J., Woods, R.L., Ernst, M.E., Ryan, J. (2019). The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Epigenetics*, 11:62. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0656-7>
- Fuso, A., Nicolia, V., Pasqualato, A., Fiorenza, M.T., Cavallaro, R.A., Scarpa, S. (2011). Changes in Presenilin 1 gene methylation pattern in diet-induced B vitamin deficiency. *Neurobiology of aging*, 32(2), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.013>

- Gao, X., Chen, Q., Yao, H., Tan, J., Liu, Z., Zhou, Y., Zou, Z. (2022). Epigenetics in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.911635>
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular cell*, 49(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
- He, L., Luo, X., Bu, Q., Jin, J., Zhou, S., He, S., Zhang, L., Lin, Y., Hong, X. (2023). PAX1 and SEPT9 methylation analyses in cervical exfoliated cells are highly efficient for detecting cervical (pre)cancer in hrHPV-positive women. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 43(1), 2179916. <https://doi.org/10.1080/01443615.2023.2179916>
- Hentze, J.L., Høgdall, C.K., Høgdall, E.V. (2019). Methylation and ovarian cancer: Can DNA methylation be of diagnostic use? *Molecular and clinical oncology*, 10(3), 323–330. <https://doi.org/10.3892/mco.2019.1800>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14, 3156. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M.G., Gentilini, D., Di Blasio, A.M., Delledonne, M., Mari, D., Arosio, B., Monti, D., Passarino, G., De Rango, F., D'Aquila, P., Giuliani, C., Marasco, E., Collino, S., Descombes, P., Garagnani, P., Franceschi, C. (2015). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*, 7:1159–70. <https://doi.org/10.18632/aging.100861>
- Horvath, S., Raj, K. (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Review Genetics* 19, 371–384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Jeong, H., Mendizabal, I., Berto, S., Chatterjee, P., Layman, T., Usui, N., Toriumi, K., Douglas, C., Singh, D., Huh, I., Preuss, T. M., Konopka, G., Yi, S. V. (2021). Evolution of DNA methylation in the human brain. *Nature communications*, 12(1), 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21917-7>
- Jeong, M., Sun, D., Luo, M., Huang, Y., Challen, G. A., Rodriguez, B., Zhang, X., Chavez, L., Wang, H., Hannah, R., Kim, S.-B., Yang, L., Ko, M., Chen, R., Göttgens, B., Lee, J.-S., Gunaratne, P., Godley, L.A., Darlington, G.J., Rao, A., Li, W., Goodell, M. A. (2014). Large conserved domains of low DNA methylation maintained by Dnmt3a. *Nature genetics*, 46, 17–23. <https://doi.org/10.1038/ng.2836>
- Jiang, T., Tan, L., Zhu, X.C., Zhang, Q.Q., Cao, L., Tan, M. S., Gu, L.Z., Wang, H. F., Ding, Z.Z., Zhang, Y.D., Yu, J.T. (2014). Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(13), 2949–2962. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.164>
- Jylhävä, J., Pedersen, N.L., Hägg, S. (2017). Biological Age Predictors. *EBioMedicine*, 21, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.046>
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., Saitou, M. (2013) Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO journal*, 32, 340–353. doi: 10.1038/emboj.2012.331
- Kaut, O., Schmitt, I., Wüllner, U. (2012). Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics*, 13(1), 87–91. <https://doi.org/10.1007/s10048-011-0308-3>
- Kudo, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Asaoka, Y., Ijichi, H., Nagae, G., Yoshida, H., Aburatani, H., Koike, K. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with

- malignant cellular transformation. *Cancer science*, 103(4):670-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02213.x
- Kurduykov, S., Bullock, M. (2016). DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology (Basel)* 5(1):3. doi: 10.3390/biology5010003
- Levine, M.E., Lu, A.T., Bennett, D.A., Horvath, S. (2015). Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging*, 7(12), 1198–1211. <https://doi.org/10.18632/aging.100864>
- Levine, M.E., Lu, A.T., Quach, A., Chen, B.H., Assimes, T.L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A.A., Stewart, J.D., Li, Y., Whitsel, E.A., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10(4), 573–591. <https://doi.org/10.18632/aging.101414>
- Li, L.C., Okino, S.T., Dahiya, R. (2004). DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1704(2), 87–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.06.001>
- Li, L., Qiu, Y., Miao, M., Liu, Z., Li, W., Zhu, Y., Wang, Q. (2020). Reduction of Tet2 exacerbates early stage Alzheimer's pathology and cognitive impairments in 2×Tg-AD mice. *Human molecular genetics*, 29(11), 1833–1852. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz282>
- Lin, Q., Weidner, C.I., Costa, I.G., Marioni, R.E., Ferreira, M.R., Deary, I.J., Wagner, W. (2016) DNA methylation levels at individual age-associated CpG sites can be indicative for life expectancy. *Aging (Albany NY)*, 8:394–401. <https://doi.org/10.18632/aging.100908>
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, A.T., Quach, A., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A.A., Li, Y., Stewart, J.D., Whitsel, E.A., Assimes, T.L., Ferrucci, L., Horvath, S. (2019). DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*, 11(2), 303–327. <https://doi.org/10.18632/aging.101684>
- Lucarelli, M., Fuso, A., Strom, R., Scarpa, S. (2001). The dynamics of myogenin site-specific demethylation is strongly correlated with its expression and with muscle differentiation. *Journal of biological chemistry*, 276, 7500–7506. doi: 10.1074/jbc. M008234200
- Marioni, R.E., Shah, S., McRae, A.F., Ritchie, S.J., Muniz-Terrera, G., Harris, S.E., Gibson, J., Redmond, P., Cox, S.R., Pattie, A., Corley, J., Taylor, A., Murphy, L., Starr, J.M., Horvath, S., Visscher, P.M., Wray, N.R., Deary, I.J. (2015). The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *International journal of epidemiology*, 44(4), 1388–1396. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277>
- Mei, X., Blanchard, J., Luellen, C., Conboy, M.J., Conboy, I.M. (2023). Fail-tests of DNA methylation clocks, and development of a noise barometer for measuring epigenetic pressure of aging and disease. *Aging*, 15(17), 8552–8575. <https://doi.org/10.18632/aging.205046>
- Mitnitski, A., Collerton, J., Martin-Ruiz, C., Jagger, C., von Zglinicki, T., Rockwood, K., Kirkwood, T.B. (2015). Age-related frailty and its association with biological markers of ageing. *BMC Medicine*, 13, 161. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0400-x>
- Ng, C.W., Yildirim, F., Yap, Y.S., Dalin, S., Matthews, B.J., Velez, P.J., Labadorf, A., Housman, D.E., Fraenkel, E. (2013). Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 2354–2359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221292110>
- Nishiyama, A., Nakanishi, M. (2021). Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends in Genetics*, 37(11):1012-1027. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.05.002>
- Onodera, A., González-Avalos, E., Lio, C.-W.J., Georges, R.O., Bellacosa, A., Nakayama, T., Rao, A. (2021). Roles of TET and TDG in DNA demethylation in proliferating and non-proliferating immune cells. *Genome biology*, 22, 186. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02384-1>

- Ooki, A., Yamashita, K., Kikuchi, S., Sakuramoto, S., Katada, N., Kokubo, K., Kobayashi, H., Kim, M.S., Sidransky, D., Watanabe, M. (2010). Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer. *Oncogene*, 29(22), 3263–3275. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.76>
- Pan, Y., Daito, T., Sasaki, Y., Chung, Y.H., Xing, X., Pondugula, S., Swamidass, S.J., Wang, T., Kim, A.H., Yano, H. (2016). Inhibition of DNA Methyltransferases Blocks Mutant Huntingtin-Induced Neurotoxicity. *Scientific reports*, 6, 31022. <https://doi.org/10.1038/srep31022>
- Pang, W.W., Schrier, S.L., Weissman, I.L. (2017). Age-associated changes in human hematopoietic stem cells. *Seminars in hematology*, 54(1), 39–42. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.10.004>
- Paro, R., Grossniklaus, U., Santoro, R., Wutz, A. (2021). Epigenetics and Cancer. In: Introduction to Epigenetics. *Learning Materials in Biosciences*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68670-3_8
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.E., Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Quach, A., Levine, M.E., Tanaka, T., Lu, A.T., Chen, B.H., Ferrucci, L., Ritz, B., Bandinelli, S., Neuhauser, M.L., Beasley, J.M., Snetselaar, L., Wallace, R.B., Tsao, P.S., Absher, D., Assimes, T.L., Stewart, J.D., Li, Y., Hou, L., Baccarelli, A.A., Whitsel, E.A., Horvath, S. (2017). Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging*, 9(2), 419–446. <https://doi.org/10.18632/aging.101168>
- Reddington, J.P., Perricone, S.M., Nestor, C.E., Reichmann, J., Youngson, N.A., Suzuki, M., Reinhardt, D., Dunican, D.S., Prendergast, J.G., Mjoseng, H., et al. (2013). Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes. *Genome biology*, 14, R25. doi: 10.1186/gb-2013-14-3-r25
- Roy, D., Tiirikainen, M. (2020). Diagnostic Power of DNA Methylation Classifiers for Early Detection of Cancer. *Trends in cancer*, 6(2), 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.12.006>
- Saito, Y., Kanai, Y., Nakagawa, T., Sakamoto, M., Saito, H., Ishii, H., Hirohashi, S. (2003). Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *International journal of cancer*, 105(4), 527–532. <https://doi.org/10.1002/ijc.11127>
- Schmitt, I., Kaut, O., Khazneh, H., deBoni, L., Ahmad, A., Berg, D., Klein, C., Fröhlich, H., Wüllner, U. (2015). L-dopa increases α -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 30(13), 1794–1801. <https://doi.org/10.1002/mds.26319>
- Shridhar, K., Walia, G.K., Aggarwal, A., Gulati, S., Geetha, A.V., Prabhakaran, D., Dhillon, P.K., Rajaramand, P. (2016). DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. *Oral oncology.*, 53:1–9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.012
- Sipilä, J.O.T., Kaasinen, V., Hietala, M., Päivärinta, M., Majamaa, K. (2019). Huntingtinonin tauti. *Aikakausikirja Duodecim*, 135(3):249 –256. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo14763>> [Luettu 17.3.2024]
- Theodoropoulou, E., Alfredsson, L., Piehl, F., Marabita, F., Jagodic, M. (2019). Different epigenetic clocks reflect distinct pathophysiological features of multiple sclerosis. *Epigenomics*, 11(12), 1429–1439. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0102>
- van den Hove, D.L.A., Riemens, R.J.M., Koulousakis, P., Pishva, E. (2020). Epigenome-wide association studies in Alzheimer's disease; achievements and challenges. *Brain Pathology*, 30(5), 978–983. <https://doi.org/10.1111/bpa.12880>

- Vanzan, L., Soldati, H., Ythier, V., Anand, S., Braun, S.M.G., Francis, N., Murr, R. (2021). High throughput screening identifies SOX2 as a super pioneer factor that inhibits DNA methylation maintenance at its binding sites. *Nature communications*, 2021;12(1):3337–418. doi: 10.1038/s41467-021-23630-x.
- Wang, T., Pan, Q., Lin, L., Szulwach, K.E., Song, C.X., He, C., Wu, H., Warren, S.T., Jin, P., Duan, R., Li, X. (2012). Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum. *Human molecular genetics*, 21(26), 5500–5510. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc394>
- Wang, F., Yang, Y., Lin, X., Wang, J.Q., Wu, Y.S., Xie, W., Wang, D., Zhu, S., Liao, Y.Q., Sun, Q., Yang, Y.G., Luo, H.R., Guo, C., Han, C., Tang, T. S. (2013). Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 22(18), 3641–3653. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt214>
- Wang, B., Yu, L., Yang, G.Z., Luo, X., Huang, L. (2015). Application of multiplex nested methylated specific PCR in early diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 16(7), 3003–3007. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.7.3003>
- Weidner, C.I., Ziegler, P., Hahn, M., Brümmendorf, T.H., Ho, A.D., Dreger, P., Wagner, W. (2015). Epigenetic aging upon allogeneic transplantation: the hematopoietic niche does not affect age-associated DNA methylation. *Leukemia*, 29(4), 985–988. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.323>
- Wood, H. (2014) AD-susceptible brain regions exhibit altered DNA methylation. *Nature Reviews Neurology*, 10, 548. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.164>
- World Health Organization (2022) *Ageing and health*. <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health#:~:text=By%202030%2C%201%20in%206,will%20double%20\(2.1%20billion\)>](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health#:~:text=By%202030%2C%201%20in%206,will%20double%20(2.1%20billion)>)> [Luettu 18.3.2024]
- World Health Organization (2020) *WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019*. <<https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>> [Luettu 15.4.2024]
- Yamaguchi, S., Shen, L., Liu, Y., Sandler, D., Zhang, Y. (2013) Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. *Nature* 504, 460–464. <https://doi.org/10.1038/nature12805>
- Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., Das, P. K., Kivioja, T., Dave, K., Zhong, F., Nitta, K. R., Taipale, M., Popov, A., Ginno, P. A., Domcke, S., Yan, J., Schübeler, D., Vinson, C., Taipale, J. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6337), eaaj2239. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>
- Younesian, S., Yousefi, A.M., Momeny, M., Ghaffari, S.H., Bashash, D. (2022). The DNA Methylation in Neurological Diseases. *Cells*, 11(21), 3439. <https://doi.org/10.3390/cells11213439>
- Zhang, Y., Zhang, Z., Li, L., Xu, K., Ma, Z., Chow, H.M., Herrup, K., Li, J. (2020). Selective loss of 5hmC promotes neurodegeneration in the mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(12), 16364–16382. <https://doi.org/10.1096/fj.202001271R>
- Zhang, L., Young, J.I., Gomez, L., Silva, T.C., Schmidt, M.A., Cai, J., Chen, X., Martin, E. R., & Wang, L. (2021). Sex-specific DNA methylation differences in Alzheimer's disease pathology. *Acta neuropathologica communications*, 9(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01177-8>
- Zhuang, J., Jones, A., Lee, S.-H., Ng, E., Fiegl, H., Zikan, M., Cibula, D., Sargent, A., Salvesen, H.B., Jacobs, I.J., Kitchener, H.C., Teschendorff, A.E., & Widschwendter, M. (2012). The dynamics and prognostic potential of DNA methylation changes at stem cell gene loci in

women's cancer. *PLoS Genetics* 8: e1002517. <https://doi.org/10.1371/annotation/35f168f3-c509-4b4f-b245-f6682325838e>