

УДК 577.24

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ CpG-САЙТОВ ГЕНА *CSFI* КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЕГО ЭКСПРЕССИИ И МАРКЕР БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. Д. Сергеева<sup>а, \*</sup>, А. Д. Перенков<sup>а</sup>, М. В. Ведунова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,

Нижний Новгород, 603022 Россия

\*e-mail: a.d.sergeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Ассоциированное с возрастом изменение характера метилирования считается важным предиктором биологического возраста человека. Изменение уровня метилирования CpG-динуклеотидов способствует сдвигу в работе ряда генов, в том числе ассоциированных с функционированием иммунной системы. В число этих генов входит ген *CSFI*, белковый продукт которого ассоциирован с воспалительным старением, что делает его важным биомаркером возрастзависимых заболеваний. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии определен профиль метилирования ассоциированного с промотором CpG-островка гена *CSFI*. Проведен поиск зависимостей между характером метилирования CpG-сайтов внутри исследуемых регионов и относительным уровнем мРНК гена *CSFI* и его белковым продуктом у лиц разных возрастных групп. Показан высокий уровень корреляции двух CpG-сайтов с исследуемыми параметрами и установлено, что эти CpG-динуклеотиды входят в состав сайтов связывания факторов транскрипции семейства NFI и фактора EGR1. Предполагается, что эти CpG-сайты играют важную роль в регуляции экспрессии гена *CSFI*.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, возрастные изменения, CpG-островок, ген *CSFI*

**DOI:** 10.31857/S00268998424050024, **EDN:** HUUTDV

### ВВЕДЕНИЕ

Старение – биологический процесс, характеризующийся возрастным снижением функций, которое захватывает все уровни организации организма [1]. При старении изменяется экспрессия генов, часть из которых, например генов, связанных с репарацией ДНК, активируется, а генов, ответственных за трансляцию, и генов, кодирующих белки цепи переноса электронов, напротив, подавляется [2]. Сдвиги в экспрессии генов связаны не только с накопленными в течение жизни мутациями, но и с генетической программой онтогенеза [3].

Важную роль в регуляции активности генов играют эпигенетические изменения. Метилирование ДНК считается наиболее точным из всех эпигенетических меток предиктором биологического возраста [4]. Известно, что с возрастом происходит глобальное гипометилирование генома с локальным гиперметилированием промоторных областей некоторых генов [5]. К генам, степень метилирования которых изме-

няется с возрастом, относятся гены, связанные с функционированием иммунной системы [6].

Важную роль в регуляции транскрипции генов играют промоторы, расположенные выше точки начала транскрипции [7, 8], подверженной различным модификациям. Метилирование промоторного региона, как правило, ингибирует экспрессию гена [9]. Считается, что степень модификации промоторной области гена негативно коррелирует с уровнем его транскрипции [10]. Гены, содержащие CpG-островки в промоторной области, характеризуются, как правило, относительно стабильным уровнем экспрессии во многих типах клеток. К таким генам относятся так называемые гены домашнего хозяйства и гены, связанные с регуляцией развития [11]. Еще одним участком, который может быть ассоциирован с транскрипционной активностью гена, считается первый интрон. Снижение уровня метилирования CpG-динуклеотидов внутри этого участка способно активировать внутренние сайты транскрипции,

приводя к образованию альтернативных вариантов мРНК [12–14].

Процесс старения характеризуется повышением синтеза провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины (IL)-6 и -12, фактор некроза опухолей- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и др. [15]. Наиболее заметно с возрастом ассоциированы макрофагальный колониестимулирующий фактор-1 (CSF1), CXCL1, CXCL9, IL-6, фактор роста сосудистого эндотелия А (VEGFA) [16, 17]. Согласно существующим представлениям CSF1, или M-CSF1 ассоциирован с возрастзависимыми патологиями, такими как болезнь Альцгеймера, сердечно-сосудистые заболевания, катаракта и хронические болезни почек [17, 18]. Повышение экспрессии гена *CSF1* в опухолях, в частности в таких, как рак молочной железы, предстательной железы и яичников, усиливает онкогенность опухоли, способствует ее ускоренному метастазированию и инвазивности [19]. Показано также, что возрастзависимое повышение содержания CSF1 в крови замедляет заживление ран у мышей [20].

В норме M-CSF отвечает за дифференцировку, пролиферацию и выживаемость макрофагов и их предшественников, участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки остеокластов, а также в резорбции костной ткани. M-CSF участвует в стимуляции высвобождения провоспалительных цитокинов при воспалительных процессах. Основными клетками, способными к синтезу M-CSF, являются остеобласты и остециты. Альтернативный сплайсинг мРНК гена *M-CSF* приводит к образованию трех вариантов биологически активных молекул: мембраносвязанного гликопротеина, секретлируемого гликопротеина и секретлируемого протеогликана [21, 22].

В представленной работе определен уровень метилирования двух регуляторных участков гена *CSF1*, относительный уровень мРНК и количество белка CSF1 в периферической крови доноров разного возраста.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Из биобанка, содержащего 486 образцов периферической крови условно здоровых доноров, произвольным образом выбраны 26 (19 от доноров женского пола, 7 – мужского). Возраст доноров составил 48.1 (23.0; 58.3) лет. Согласно возрастной классификации Всемирной организации здравоохранения, исследуемая выборка была разделена на три группы: до 45 лет (13 человек), 45–59 лет (семь человек), 60–85 лет (шесть человек).

Геномную ДНК выделяли с помощью набора ДНК-Экстран-1 (“Синтол”, Россия)

по инструкции производителя. Концентрацию нуклеиновой кислоты определяли на флуориметре Qubit 4 с использованием набора Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (“ThermoFisher”, США). Геномную ДНК (1 мкг) подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора BisQuick (“Евроген”, Россия). Образец, полученный после конверсии, использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Праймеры для оценки метилирования подбирали с использованием сервиса EpiDesigner (“Agena Bioscience”, США).

Праймеры к промотору:

*prom\_f*: aggaagagagGTTAGTATTGAATTAGT TTGGAGAG;

*prom\_r*: cagtaatcagactcactatagggagaaggctAAAA ACCCAAACAACCTTTCACTT.

К интрону:

*int\_f*: aggaagagagGGGATTGTTAG-GTTTTTTTGGG;

*int\_r*: cagtaatcagactcactatagggagaaggctAATTA-ACCCCTAAACTTTCCCTAC.

К обратным праймерам добавлены последовательности промотора T7-полимеразы для последующих этапов синтеза РНК.

Исследуемый GC-богатый фрагмент гена *CSF1* амплифицировали с использованием 2 × Tersus буфера (“Евроген”), 1 U SynTaq ДНК-полимеразы (“Синтол”). Амплификацию проводили по следующей программе: предварительная денатурация – 5 мин при 95°C; 45 циклов: 95°C – 30 с, 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин, затем финальная элонгация при 72°C в течение 7 мин.

После ПЦР неприсоединенные dNTP дефосфорилировали при помощи щелочной фосфатазы креветки (SAP, “Agena Bioscience”, США). На следующем этапе проводили специфическую реакцию MassCLEAVE, в ходе которой происходят две совмещенные реакции: *in vitro* транскрипция РНК с последующим урацилспецифичным гидролизом. Результаты оценивали на MALDI-TOF масс-спектрометре MassARRAY (“Agena Bioscience”) с использованием программного обеспечения EpiTYPER.

Относительный уровень мРНК CSF1 оценивали методом ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена использовали ген *TBP*, кодирующий ТАТА-связывающий белок. мРНК выделяли с помощью набора РНК-Экстран (“Синтол”) по инструкции производителя. После этого проводили обратную транскрипцию, используя набор ОТ-1 (“Синтол”) и специфические обратные праймеры. ПЦР

в реальном времени проводили со следующими праймерами:

CSF\_fw 5'-gggctccctgctgtttgtt-3'

CSF\_rv 5'-gcacactggatctttcaact -3';

TBP\_fw 5'-cgaatataatccaagcggtt-3'

TBP\_rv 5'-ctggactgttcttctactctt-3'.

Аmplификацию проводили на амплификаторе CFX96 Touch ("Bio-Rad", США) по следующей программе: предварительная денатурация – 5 мин при 95°C; затем 45 циклов – 30 с при 95°C, 20 с при 58°C и 30 с при 72°C, с последующим считыванием интенсивности флуоресценции. ПЦР проводили с использованием готовой 2.5 × смеси SYBR Green I ("Синтол"). Данные обрабатывали методом  $\Delta\Delta C_t$ . Данные нормировали с использованием гена *TBP* в качестве референсного.

Количество CSF1 в плазме крови определяли по технологии xMAP ("LUMINEX", США) с использованием коммерческого набора Milliplex MAP ("Millipore", США) в соответствии с инструкцией производителя. Панель включала оценку 47 цитокинов, включая CSF1. Плазму крови с иммобилизованными антителами инкубировали при перемешивании в течение ночи (16–18 ч) при 2–8°C. Для регистрации и анализа данных использовали стандартный набор программ на приборе Luminex MAGPIX

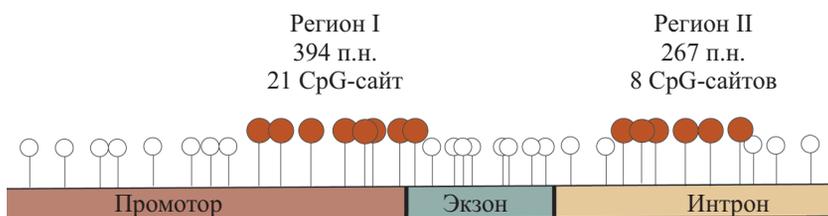
("LUMINEX"). Коэффициент детерминации каждого анализа был не ниже 0.95.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Statistica 10. Для оценки корреляции использовали коэффициент Спирмена. Сравнение групп проводили с использованием критериев Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Поиск мест посадки транскрипционных факторов проводили с использованием GenomeBrowser.

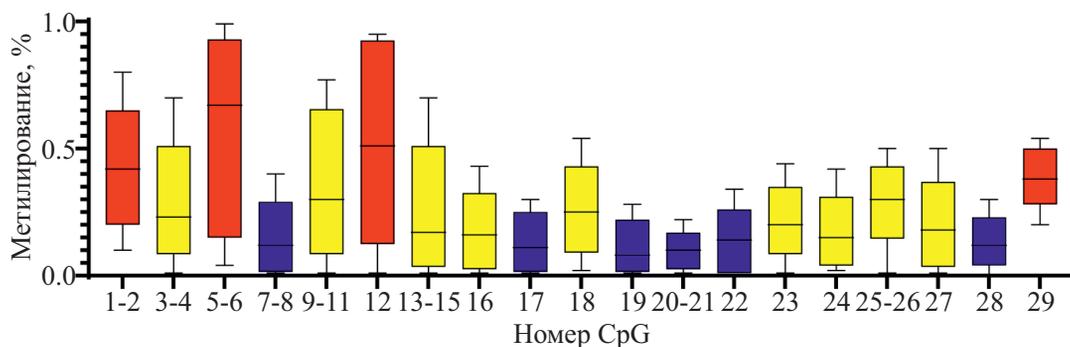
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ген *CSF1* картирован в области chr1:110,453,233–110,473,616 (GRCh37/hg19). На первом этапе исследования для анализа метилирования были выбраны два фрагмента CpG-островков в регуляторной области гена, локализованные в промоторе (chr1: 110453116–110453510) и в первом интроне (chr1: 110453889–110454155) гена *CSF1*. Схема целевых регионов представлена на рис. 1.

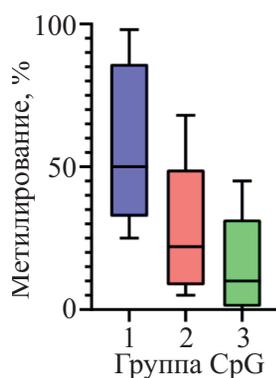
Всего проанализированы 29 CpG-сайтов (последовательно названных CpG1–29), некоторые CpG-динуклеотиды, расположенные в этих регионах, не были эпителированы из-за ограничения технологии MassARRAY. Определены средние уровни метилирования CpG-сайтов в обоих регионах (рис. 2). Уровень метилирования составил 42% (26%; 50%).



**Рис. 1.** Схема участков гена *CSF1*, выбранных для анализа метилирования. Регион I находится в промоторе и частично в первом экзоне гена *CSF1*, он содержит 21 анализируемый CpG-динуклеотид. Регион II расположен в первом интроне гена и содержит восемь анализируемых CpG-сайтов.



**Рис. 2.** Диаграмма разброса уровня метилирования CpG-сайтов в исследуемых регионах гена *CSF1*. Красным обозначены CpG-сайты с высоким уровнем метилирования; желтым – со средним; синим – с низким.



**Рис. 3.** CpG-сайты гена *CSF1* с разным уровнем метилирования. 1 – Группа с высоким уровнем метилирования; 2 – группа со средним уровнем метилирования; 3 – группа с низким уровнем метилирования.

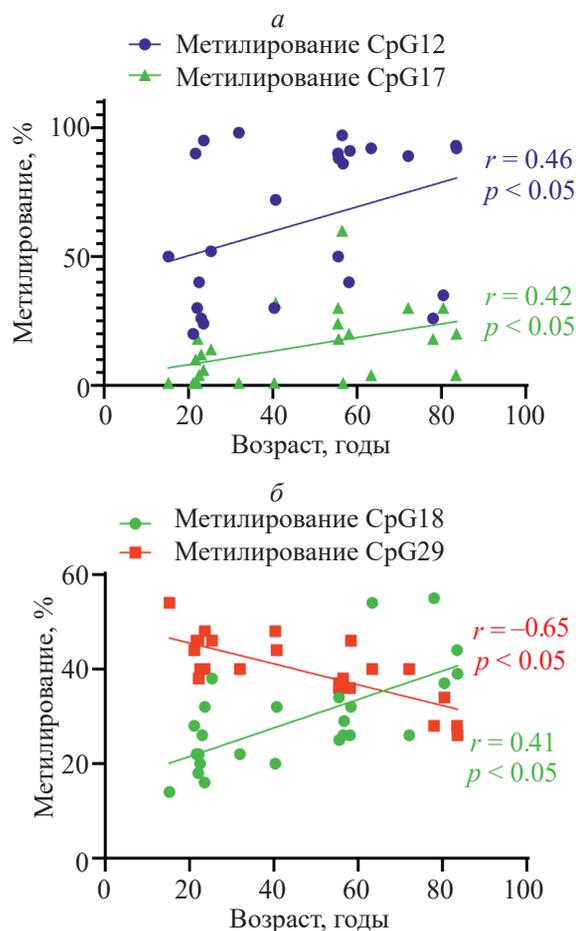
Уровень метилирования CpG-сайтов, расположенных в регионе I, составил 20% (8%; 40%), причем ближе к точке начала транскрипции уровень метилирования был ниже. В регионе II уровень метилирования CpG-сайтов составил 18% (8%; 40%). Внутри регионов все CpG-сайты были разделены на три группы, достоверно различающиеся ( $p < 0.05$ ) по уровню метилирования. Для CpG-динуклеотидов с высоким уровнем метилирования медиана составила 50% (40%; 74%), со средним уровнем – 22% (12%; 30%), с низким – 10% (2%; 18%) (рис. 3).

Установлено влияние возраста на метилирование CpG-сайтов региона II в группах CpG с высоким ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.05$ ) и низким ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.05$ ) уровнями метилирования в группе 45–59 лет. Обнаружена положительная корреляция уровней метилирования CpG12 ( $r = 0.46$ ,  $p < 0.05$ ), CpG17 ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.05$ ), CpG18 ( $r = 0.39$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = -0.65$ ,  $p < 0.05$ ) с возрастом доноров (рис. 4).

Затем в соответствии с новой классификацией ВОЗ сформировали возрастные группы доноров. Выявили корреляции между уровнями метилирования CpG-сайтов и возрастом. В группе 15–44 года установлена корреляция уровней метилирования сайтов CpG7, CpG8 ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ), CpG12 ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ) с возрастом.

В группе 45–59 лет выявлена зависимость уровня метилирования сайтов CpG22 ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ) от возраста доноров. В группе 60–85 лет установлена корреляция между уровнем метилирования CpG29 ( $r = -0.84$ ,  $p < 0.05$ ) и возрастом.

Обнаружено, что уровни метилирования CpG18 ( $H = 6.35$ ,  $p < 0.05$ ), CpG19 ( $H = 6.04$ ,



**Рис. 4.** Уровень метилирования CpG12 и CpG17 (а), CpG18 и CpG29 (б) у доноров разных возрастных групп.

$p < 0.05$ ) и CpG29 ( $H = 12.16$ ,  $p < 0.05$ ) различались в зависимости от возраста доноров (рис. 5).

Относительный уровень мРНК гена *CSF1* составил 0.85 (0.37; 1.38). Не найдено корреляции между уровнем мРНК и возрастом доноров как во всей выборке, так и в выделенных возрастных группах.

Установлены корреляции между метилированием некоторых CpG-сайтов и относительным уровнем мРНК *CSF1*. В группе доноров 45–59 лет выявлено влияние метилирования CpG22 ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG24 ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.05$ ) на относительный уровень мРНК *CSF1*. В группе 60–85 лет такая зависимость обнаружена для CpG18 ( $r = -0.9$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 6).

Проведенный на следующем этапе анализ выявил положительную зависимость между количеством М-CSF (*CSF1*) в плазме и возрастом доноров ( $r = 0.63$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 7).

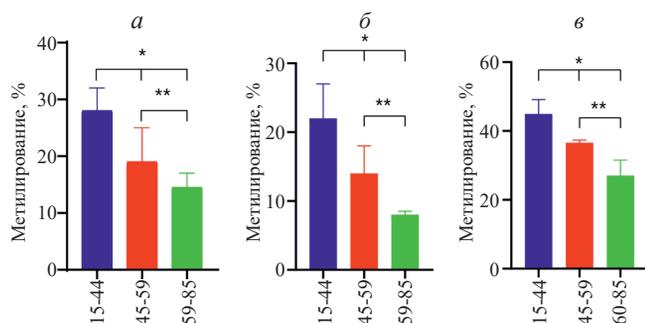


Рис. 5. Уровни метилирования CpG18 (а), CpG19 (б) и CpG29 (в) в разных возрастных группах.

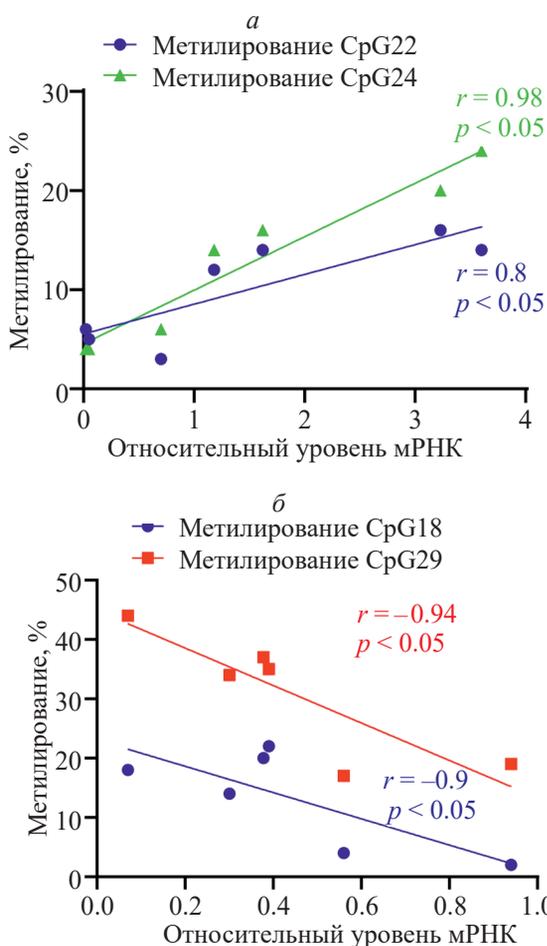


Рис. 6. Зависимость уровня метилирования CpG22 и CpG24 (а), CpG18 и CpG29 (б) от относительного уровня мРНК CSF1 у доноров.

Нами не обнаружено зависимости между уровнем мРНК CSF1 и количеством белка как во всей выборке, так и внутри разных возрастных групп. В регионе I показана корреляция между уровнем белка и степенью метилирования группы CpG с низким уровнем метилирования ( $r = -0.82$ ,  $p < 0.05$ ). В регионе II обнаружена зависимость между уровнем метилирования

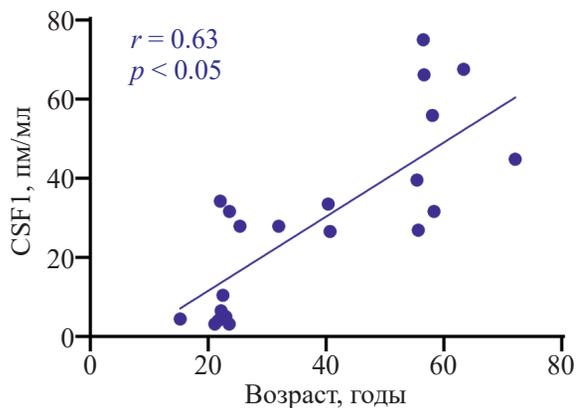


Рис. 7. Уровень CSF1 в плазме доноров разного возраста.

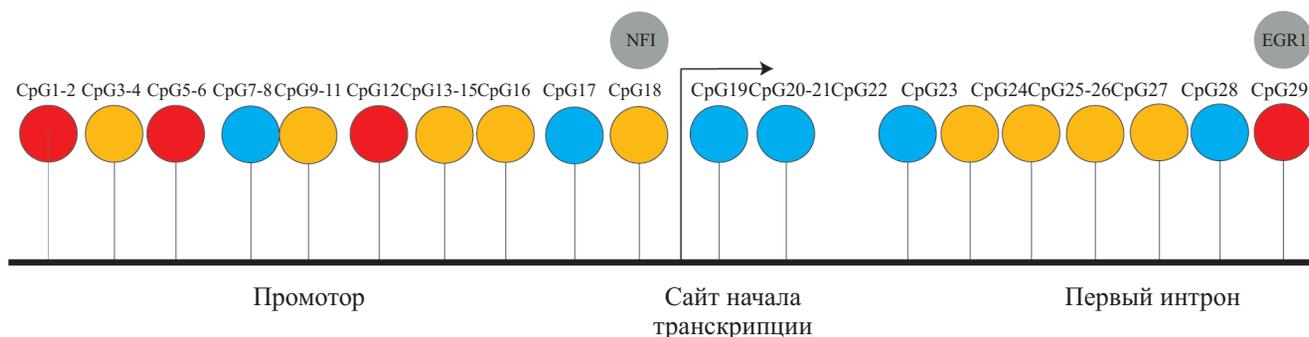
CpG в группе с высоким уровнем и количеством белка M-CSF в плазме ( $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ).

Также внутри возрастных групп установлены корреляции между метилированием отдельных CpG-сайтов и количеством белка M-CSF в плазме. В группе 15–44 лет выявлена зависимость как метилирования CpG27 ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.05$ ), так и медианного уровня метилирования региона II ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.05$ ) от уровня белка. В группе 45–59 лет обнаружена корреляция между метилированием CpG7, CpG8 ( $r = -0.82$ ,  $p < 0.05$ ), медианным уровнем метилирования региона I ( $r = -0.85$ ,  $p < 0.05$ ) и уровнем CSF1 в плазме. В группе 60–85 лет установлена зависимость между уровнем метилирования CpG29 ( $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ) и количеством CSF1.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе проведен поиск CpG-сайтов – маркеров активации гена *CSF1*, имеющего принципиальное значение для идентификации возрастзависимых изменений в организме человека и развития ряда патологий.

Изучена взаимосвязь между уровнями метилирования двух регионов, расположенных внутри CpG-островка гена *CSF1*, относительным уровнем мРНК данного гена, количеством белка в плазме и возрастом доноров. Целевая область региона I включает 21 CpG-сайт, доступный для эпителирования, регион II содержит восемь таких сайтов. Общий профиль метилирования обоих регионов в выборке характеризуется средней степенью метилирования (рис. 8). Ближе к точке начала транскрипции уровень метилирования региона I заметно ниже, что, по-видимому, может быть связано с необходимостью посадки транскрипционных факторов. В регионе II такой зависимости не наблюдается. Регион II локализован внутри интрона, по-



**Рис. 8.** Схема исследуемого региона CpG-островка гена *CSF1*. Красным цветом обозначены CpG с высоким уровнем метилирования, желтым — со средним, синим — с низким. Стрелка показывает направление транскрипции. Серыми кругами указаны транскрипционные факторы, в сайты посадки которых входят указанные CpG-динуклеотиды. CpG1–21 относятся к промотору, CpG22–29 — к интрону. Транскрипционные факторы семейства NFI и фактор EGR1 ассоциированы с регуляцией гена *CSF1*.

этому относительно невысокий уровень его метилирования может указывать на его использование в качестве альтернативного сайта начала транскрипции, или, напротив, приводить к раннему прерыванию транскрипции. Еще одной возможной функцией этого региона может быть помощь *цис*-регуляторным элементам в регуляции транскрипции [23]. В интроне 1 гена *CSF1* расположен энхансер, который, предположительно, может быть усилен внутренним CGI.

В профиле метилирования исследуемых регионов CpG-островка гена *CSF1* выделены три группы CpG-сайтов с разным уровнем метилирования. Отсутствие различий в общем уровне метилирования этих групп между возрастными группами доноров может говорить о том, что, возможно, метилирование отдельных CpG-сайтов играет более важную роль в регуляции *CSF1*. Обнаружено изменение уровня модификации некоторых CpG-сайтов в зависимости от возраста доноров. Однако метилирование большей части CpG-сайтов не изменялось с возрастом. Возможно, что модификация конкретных сайтов в данном случае более важна для транскрипции, чем профиль метилирования в целом. Так, например, согласно данным S. Ogushi и соавт., уровень метилирования CpG-сайтов, локализующихся рядом с сайтами посадки транскрипционных факторов, влияет на активность гена металлопротеиназы-1 [24].

Деление выборки на возрастные группы позволило обнаружить некоторые зависимости между уровнями метилирования и другими параметрами. Наиболее заметные изменения наблюдали в группе 45–59 лет. Возможно, в этот период происходят активные изменения гомеостатического профиля, которые приведут в дальнейшем к состоянию, называемому воспалительным старением [25].

Отсутствие корреляции между относительным уровнем мРНК и степенью метилирования, а также уровнем белка в плазме может говорить о более существенном влиянии на транскрипцию гена *CSF1* других эпигенетических факторов, например, микроРНК, кольцевых РНК, длинных некодирующих РНК или модификации гистонов [26–29].

Наиболее выражена корреляция уровней метилирования CpG18 и CpG29 с другими показателями. В старшей возрастной группе показана зависимость между метилированием этих сайтов и уровнем мРНК. Выявлена также зависимость между степенью метилирования сайта CpG29 и белковым продуктом гена *CSF1* у лиц 60–85 лет. Методом поиска сайтов посадки установлено, что CpG18 входит в сайт связывания факторов семейства NFI, а CpG29 ассоциирован с транскрипционным фактором EGR1.

Транскрипционные факторы NFI необходимы для привлечения VAF-комплекса к промотору с его последующей активацией [30]. Установлено, что члены семейства NFI активно экспрессируются в разных видах опухолей, а также при возрастных изменениях [31]. L.M. Reynolds и соавт. показали, что экспрессия NFIA в моноцитах зависит от ассоциированной с возрастом степени метилирования ряда CpG-сайтов [32].

EGR1 участвует в регуляции факторов роста, генов репарации ДНК, а также при повреждениях тканей и фиброзе [33]. Показано, что фосфорилирование EGR1 приводит к блокированию транскрипции SP1-зависимых генов [34]. Известна связь воспаления с EGR1. Данный транскрипционный фактор способен подавлять активацию макрофагов путем блокировки активности усилителей воспаления [35]. Сайты связывания EGR1 локализованы как в промоторах (41.6% всех сайтов), так и в интронах (26.4%). Часто (31%) сайт связы-

вания данного фактора находится в пределах CpG-островков [36].

В гене *CSFI*, сайт связывания EGR1 находится в пределах первого интрона и входит в состав CpG-островка

Показано, что экспрессия факторов EGR1 и NFI увеличивается с возрастом [37]. Это позволяет предположить, что эти белки играют важную роль в регуляции транскрипции гена *CSFI*. CpG-18 и CpG-29, локализованные в гене *CSFI*, ассоциированы с данными транскрипционными факторами. Возрастзависимое изменение уровня метилирования CpG-сайтов, входящих в состав сайтов связывания EGR1 и NFI, может изменять активность транскрипции гена. Таким образом, высокоточным методом MALDI-TOF показана потенциальная возможность использования уровня метилирования CpG18 и CpG29 в промоторной и интронной областях гена *CSFI* в качестве маркера возрастзависимых изменений.

Авторы благодарят Кондакову Е.В. за помощь в проведении экспериментов по оценке уровня белка M-CSF.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSWR-2023\_0032).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследования проведены в соответствии с правилами локального этического комитета Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (протокол № 1 от 02.12.2020). Все испытуемые получили описание исследования и дали письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang S., Guo Y. (2020) Epigenetic clock: DNA methylation in aging. *Stem Cells Int.* **2020**, 1047896.
- Perez-Gomez A., Buxbaum J.N., Petrascheck M. (2020) The aging transcriptome: read between the lines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **63**, 170–175.
- Takasugi M., Yoshida, Y., Nonaka Y., Ohtani N. (2023) Gene expressions associated with longer lifespan and aging exhibit similarity in mammals. *Nucl. Acids Res.* **51**(14), 7205–7219.
- Chen L., Ganz P.A., Sehl M.E. (2022) DNA methylation, aging, and cancer risk: a mini-review. *Front. Bioinform.* **2**, 847629.
- Johnson A.A., Akman K., Calimport S.R., Wuttke D., Stolzing A., de Magalhães J.P. (2012) The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res.* **15**(5), 483–494.
- Keenan C.R., Allan R.S. (2019) Epigenomic drivers of immune dysfunction in aging. *Aging Cell.* **18**(1), e12878.
- Einarsson H., Salvatore M., Vaagenso C., Alcaraz N., Bornholdt J., Rennie S., Andersson R. (2022) Promoter sequence and architecture determine expression variability and confer robustness to genetic variants. *eLife.* **11**, e80943.
- Kreamer N.N., Phillips R., Newman D.K., Bodedicker J.Q. (2015) Predicting the impact of promoter variability on regulatory outputs. *Sci. Rep.* **5**, 18238.
- Nojima S., Fuchikamia M., Kataoka T., Arakia M., Omuraa J., Miyagia T., Okamoto Y., Hishimoto A., Morinobu S. (2021) Alterations in DNA methylation rates of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia. *Eur. J. Psychiatry.* **35**(2), 67–74.
- de Mendoza A., Nguyen T.V., Ford E., Poppe D., Buckberry S., Pflueger J., Grimmer M.R., Stolzenburg S., Bogdanovic O., Oshlack A., Farnham P.J., Blancafort P., Lister R. (2022) Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biol.* **23**(1), 163.
- Vavouri T., Lehner B. (2012) Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol.* **13**(11), R110.
- Nam A.R., Lee K.H., Hwang H.J., Schabert J.J., An J.H., Won S.H., Cho J.Y. (2020) Alternative methylation of intron motifs is associated with cancer-related gene expression in both canine mammary tumor and human breast cancer. *Clin. Epigenetics.* **12**(1), 110.
- Zhang X., Wu M., Xiao H., Lee M.T., Levin L., Leung Y. K., Ho S.M. (2010) Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the *PMP24* gene in prostate cancer. *Prostate.* **70**(7), 765–776.
- Hong J., Je-Keun R. (2022) Genomic effect of DNA methylation on gene expression in colorectal cancer. *Biology.* **11**(10), 1388.
- Walker K.A., Basisty N., Wilson D.M., 3rd, Ferrucci L. (2022) Connecting aging biology and inflammation in the omics era. *J. Clin. Invest.* **132**(14), e158448.
- Li X., Li C., Zhang W., Wang Y., Qian P., Huang H. (2023) Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**(1), 239.
- Yusipov I., Kondakova E., Kalyakulina A., Kriwonosov M., Lobanova N., Bacalini M.G., Franceschi C., Vedunova M., Ivanchenko M. (2022) Accelerated epigenetic aging and inflammatory/

- immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease. *GeroSci.* **44**(2), 817–834.
18. Wing M.R., Devaney J.M., Joffe M.M., Xie D., Feldman H.I., Dominic E.A., Guzman N.J., Ramezani A., Susztak K., Herman J.G., Cope L., Harmon B., Kwabi-Addo B., Gordish-Dressman H., Go A.S., He J., Lash J.P., Kusek J.W., Raj D.S., Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study (2014) DNA methylation profile associated with rapid decline in kidney function: findings from the CRIC study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**(4), 864–872.
19. Maldonado M.D.M., Schlom J., Hamilton D.H. (2023) Blockade of tumor-derived colony-stimulating factor 1 (CSF1) promotes an immune-permissive tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* **72**(10), 3349–3362.
20. Ambrosi T.H., Marecic O., McArdle A., Sinha R., Gulati G.S., Tong X., Wang Y., Steininger H.M., Hoover M.Y., Koepke L.S., Murphy M.P., Sokol J., Seo E.Y., Tevlin R., Lopez M., Brewer R.E., Mascharak S., Lu L., Ajanaku O., Conley S.D., Seita J., Morri M., Neff N.F., Sahoo D., Yang F., Weissman I.L., Longaker M.T., Chan C.K.F. (2021) Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature.* **597**(7875), 256–262. doi: 10.1038/s41586-021-03795-7
21. Plotkin L.I., Bivi N. (2014) Chapter 3: Local regulation of bone cell function. In: *Basic and Applied Bone Biology*. Eds Burr D.B., Allen M.R. San Diego: Acad. Press, pp. 47–73.
22. Menke J., Iwata Y., Rabacal W.A., Basu R., Stanley E.R., Kelley V.R. (2011) Distinct roles of CSF-1 isoforms in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**(10), 1821–1833.
23. Cain J.A., Montibus B., Oakey R.J. (2022) Intragenic CpG Islands and their impact on gene regulation. *Front. Cell Develop. Biol.* **10**, 832348.
24. Ogushi S., Yoshida Y., Nakanishi T., Kimura T. (2020) CpG site-specific regulation of metallothionein-1 gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(17), 5946.
25. Piber D., Olmstead R., Cho J.H., Witarama T., Perez C., Dietz N., Seeman T.E., Breen E.C., Cole S.W., Irwin M.R. (2019) Inflammaging: age and systemic, cellular, and nuclear inflammatory biology in older adults. *J. Gerontol. Ser. A, Biol. Sci. Med. Sci.* **74**(11), 1716–1724.
26. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, 402.
27. Zhou, W.Y., Cai Z.R., Liu J., Wang D.S., Ju H. Q., Xu R.H. (2020) Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Mol. Cancer.* **19**(1), 172.
28. Dong X., Weng Z. (2013) The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics.* **5**(2), 113–116.
29. Kaikkonen M.U., Lam M.T., Glass C.K. (2011) Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Res.* **90**(3), 430–440.
30. Liu R., Liu H., Chen X., Kirby M., Brown P.O., Zhao K. (2001) Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell.* **106**(3), 309–318.
31. Fane M., Harris L., Smith A.G., Piper M. (2017) Nuclear factor one transcription factors as epigenetic regulators in cancer. *Int. J. Cancer.* **140**(12), 2634–2641.
32. Reynolds L.M., Taylor J.R., Ding J., Lohman K., Johnson C., Siscovick D., Burke G., Post W., Shea S., Jacobs D.R., Jr, Stunnenberg H., Kritchinsky S.B., Hoeschele I., McCall C.E., Herrington D., Tracy R.P., Liu Y. (2014) Age-related variations in the methylome associated with gene expression in human monocytes and T cells. *Nat. Commun.* **5**, 5366.
33. Wang B., Guo H., Yu H., Chen Y., Xu H., Zhao G. (2021) The role of the transcription factor EGR1 in cancer. *Front. Oncol.* **11**, 642547.
34. Havis E., Duprez D. (2020) EGR1 transcription factor is a multifaceted regulator of matrix production in tendons and other connective tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(5), 1664.
35. Trizzino M., Zucco A., Deliard S., Wang F., Barberi E., Veglia F., Gabrilovich D., Gardini A. (2021). EGR1 is a gatekeeper of inflammatory enhancers in human macrophages. *Sci. Adv.* **7**(3), eaaz8836.
36. Duclot F., Kabbaj M. (2017) The role of Early Growth Response 1 (EGR1) in brain plasticity and neuropsychiatric disorders. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, 35.
37. Senapati P., Miyano M., Sayaman R.W., Basam M., Trac C., Leung A., LaBarge M.A., Schones D.E. (2022) Normal mammary epithelia accumulate DNA methylation changes with age that are consistent with breast cancer methylomes. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.06.26.170043

## Methylation of Selected CpG-Sites of the Gene *CSF1* as a Factor of Regulation of its Expression and a Marker of Human Biological Aging

A. D. Sergeeva<sup>1, \*</sup>, A. D. Perenkov<sup>1</sup>, M. V. Vedunova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,  
Nizhny Novgorod, 603022 Russia*

*\*e-mail: a.d.sergeeva@yandex.ru*

Age-associated transformation of the methylation pattern is considered to be an important predictor of human biological age. Changes in the level of CpG-dinucleotide methylation contribute to a shift in the function of a number of genes, including those associated with the functioning of the immune system. One of such gene is *CSF1*. The protein product of this gene is associated with inflammatory aging, making it an important biomarker of age-related diseases. We studied the methylation profile of the promoter-associated CpG island of the *CSF1* gene by MALDI-TOF mass spectrometry. The dependences between the character of CpG-site methylation within the investigated regions and the relative level of the gene mRNA and its protein product in people of different age groups were searched. For two CpG sites, a high level of correlation with the studied parameters is shown. A search for the landing sites of transcription factor binding sites associated with gene transcription showed that these CpG dinucleotides are part of motifs for the NFI family transcription factors and the EGR1 factor. We hypothesize that these CpG sites play an important role in the regulation of *CSF1* gene expression.

**Keywords:** DNA methylation, age-depend changes, CpG-island, *CSF1* gene