

Анализ транскрипционной активности подсемейств AluYa5 и AluYb8 в геноме человека при старении и долголетию

Эрдман В.В., Каримов Д.Д., Туктарова И.А., Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р., Мустафина О.Е.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
450054, г. Уфа, Проспект Октября, д. 71

Согласно одной из современных концепций старения и долголетия человека, причиной деградации эндогенных процессов является повышение нестабильности генома с возрастом. К факторам генетической нестабильности относятся транспозоны, или мобильные генетические элементы. В геноме человека широко распространены Alu-ретротранспозоны. Среди членов данного семейства AluYa5 и AluYb8 являются единственными, сохранившими транспозиционную активность. С целью проверки гипотезы о роли активности транспозонов AluYa5 и AluYb8 в старении и долголетию человека проведен сравнительный анализ уровня их экспрессии среди лиц разного возраста. В исследовании приняли участие 75 здоровых жителей Республики Башкортостан в возрасте от 21 до 97 лет. Общая выборка дифференцирована на возрастные группы: среднюю (38 человек, 21–39 лет), старческую (23 человека, 82–89 лет) и группу долгожителей (14 человек, 90–97 лет). Образцы РНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови стандартным тризольным методом. Количественный анализ содержания AluYa5-РНК и AluYb8-РНК в лейкоцитах крови проводили методом ПЦР в реальном времени. Относительное количество мРНК определяли с помощью $\Delta\Delta C_t$ -метода. Сравнение возрастных групп проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса. В общей анализируемой выборке показатели относительного уровня экспрессии субсемейств AluYa5 и AluYb8 составили 0,84 и 0,80 отн. ед. соответственно. Согласно сравнительному анализу относительного уровня AluYa5-РНК и AluYb8-РНК в лейкоцитах крови людей, относящихся к трем возрастным группам, не наблюдается статистически значимых различий в экспрессии транспозонов семейств AluYa5 ($H=3,59$, $p=0,17$) и AluYb8 ($H=2,65$, $p=0,27$). После объединения групп лиц старческого возраста и долгожителей и сравнения их с лицами среднего возраста различия в показателях значений медианы также не достигли уровня статистической значимости ($p=0,1$). При этом у людей в возрасте 82 лет и старше наблюдается более низкий уровень экспрессии Alu-элементов субсемейства AluYa5 (0,75 против 2,69 отн. ед.) и AluYb8 (0,73 против 2,15 отн. ед.). Таким образом, в исследованной выборке не было обнаружено статистически значимых изменений относительного уровня экспрессии субсемейств AluYa5 и AluYb8 с возрастом.

Ключевые слова: старение, долголетие, генетическая нестабильность, транспозон, Alu-элемент

Для цитирования: Эрдман В.В., Каримов Д.Д., Туктарова И.А., Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р., Мустафина О.Е. Анализ транскрипционной активности подсемейств AluYa5 и AluYb8 в геноме человека при старении и долголетию. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 50-53.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.50-53

Автор для корреспонденции: Эрдман Вера Викторовна; e-mail: danivera@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и АНА в рамках научного проекта № 19-54-40007.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.07.2020.

Analysis of AluYa5 and AluYb8 subfamilies transcriptional activity in the human genome with aging and longevity

Erdman V.V., Karimov D.D., Tuktarova I.A., Timasheva Y.R., Nasibullin T.R., Mustafina O.E.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences
October prospect 71, Ufa, 450054, Russia

According to one of the modern concepts of human aging and longevity, the cause of the degradation of endogenous processes is the increased genome instability with age. Factors of genetic instability include transposons, or mobile genetic elements. Alu-retrotransposons are ubiquitous in the human genome. Among the members of this family, AluYa5 and AluYb8 are the only ones that retained transpositional activity. To test the hypothesis about the role of AluYa5 and AluYb8 transposons activity in human aging and longevity, we performed the comparative analysis of their expression level among individuals of different ages. The study group included 75 healthy residents of the Republic of Bashkortostan aged between 21 and 97 years. The total sample was divided into the following groups according to age: middle-aged (38 people, 21-39 years old), elderly (23 people, 82-89 years old) and a group of long-livers (14 people, 90-97 years old). RNA samples were isolated from leukocytes of peripheral venous blood by the standard method using Trizol reagent. Quantitative analysis of AluYa5-RNA and AluYb8-RNA in blood leukocytes was performed by real-time PCR. The relative amount

of mRNA was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method. Comparison of age groups was carried out using one-way analysis of variance with the Kruskal-Wallis test. In the total analyzed sample, the expression levels of AluYa5 and AluYb8 were 0.84 and 0.80 rel. units respectively. According to the results of comparative analysis of AluYa5-RNA and AluYb8-RNA in blood leukocytes of people from three age groups, there were no statistically significant differences in the expression of AluYa5 ($H = 3.59$, $p = 0.17$) and AluYb8 ($H = 2.65$, $p = 0.27$). After combining the groups of elderly people and long-livers and comparing them with middle-aged people, the differences in the median values also did not reach the level of statistical significance ($p = 0.1$). At the same time, people aged 82 and older demonstrated lower level of expression of AluYa5 subfamily (0.75 versus 2.69 rel. units) and AluYb8 subfamily (0.73 versus 2.15 rel. units). There were no statistically significant changes in the relative expression level of the AluYa5 and AluYb8 subfamilies with age in the study group.

Keywords: aging, longevity, genetic instability, transposon, Alu-element.

For citation: Erdman V.V., Karimov D.D., Tuktarova I.A., Timasheva Y.R., Nasibullin T.R., Mustafina O.E. Analysis of AluYa5 and AluYb8 subfamilies transcriptional activity in the human genome with aging and longevity. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 50-53. (In Rus).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.50-53

Corresponding author: Erdman Vera Viktorovna, e-mail: danivera@mail.ru

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Abkhazian Academy of Sciences (project No. 19-54-40007).

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.07.2020.

Введение

Одна из разрабатываемых концепций старения и долголетия человека постулирует в качестве причины деградации эндогенных процессов нестабильность генома [1]. Источниками генетической нестабильности могут являться как внешние, так и внутренние факторы. К одним из важнейших эндогенных факторов нестабильности генома относятся транспозоны, или мобильные генетические элементы (МГЭ). Alu-повторы, занимающие около 11% генома, являются наиболее распространёнными транспозонами человека. Семейство Alu специфично для приматов, а линии Ya5 и Yb8 встречаются только у человека, они являются единственными членами семейства, сохранившими транспозиционную активность, при этом транспонируется только небольшая их часть, называемая мастер-генами [2].

Усиление активности транспозонов с возрастом рассматривается как один из основных факторов, вызывающих старение организма [3]. Было показано увеличение подвижности МГЭ в геноме дрозофилы в стрессовых условиях, причем повсеместно [4]. Alu-РНК содержат конститутивные сайты связывания факторов теплового шока [5] и подавляют транскрипцию мРНК в клетках человека при стрессе [6], участвуют в репрессии трансляции мРНК [8]. Активация МГЭ при старении присуща организмам разного уровня организации. Увеличение активности транспозонов с возрастом показано у мышей, термитов, плодовых мушек, нематод и дрожжей [7].

С целью проверки гипотезы о роли активности транспозонов AluYa5 и AluYb8 в старении и долголети человека проведен сравнительный анализ уровня их экспрессии среди лиц разного возраста.

Материалы и методы

В соответствии с требованиями биоэтики проведено анкетирование 75 мужчин и женщин в возрасте от 21 до 97 лет, жителей Республики Башкортостан. Вся выборка сформирована из лиц, физически сохранных по сердечно-сосудистой и нервной системе. Общая выборка дифференцирована на следующие группы согласно принятой классификации [8]: зрелый возраст (38 человек, возрастной диапазон – 21–39 лет), старческий возраст (23 человека, возрастной диапазон – 82–89 лет) и долгожители (14 человек, возрастной диапазон – 90–97 лет).

Образцы РНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови стандартным тризольным методом. Очистку РНК проводили с помощью фермента DNase I, RNase-free, получение кДНК осуществляли с использованием набора RevertAid™ (Thermo Scientific). Количественный анализ содержания AluYa5-РНК и AluYb8-РНК в лейкоцитах крови проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве референсного гена был выбран ген бета-2-миоглобулина (*B2M*). Относительное количество мРНК определяли $\Delta\Delta C_t$ -методом [9]. Сравнение возрастных групп проводили с использованием непараметрического метода – однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (SPSS v.21.0).

Результаты и обсуждение

Проведена оценка относительного уровня экспрессии (мРНК) молодых субсемейств Alu-повторов AluYa5 и AluYb8 в лейкоцитах крови в общей анализируемой

Относительный уровень экспрессии молодых субсемейств Alu-повторов AluYa5 и AluYb8 в лейкоцитах крови в разных возрастных группах и в общей выборке жителей Республики Башкортостан

Возрастная группа (диапазон, лет)	AluYa5		AluYb8	
	Me (отн. ед.)	H (p)	Me (отн. ед.)	H (p)
Средний возраст (21-39)	2,69	3,59 (0,17)	2,15	2,65 (0,27)
Старческий возраст (82-89)	0,42		0,59	
Долгожители (90-97)	0,81		0,78	
Общая группа (21-97)	0,84		0,80	

Примечание. Me – медиана, H – критерий Краскела-Уоллиса, p – уровень значимости.

выборке и в выделенных возрастных группах (таблица). В общей группе показатели медианного теста составили 0,84 и 0,80 отн. ед. соответственно. Согласно сравнительному анализу относительного уровня AluYa5-РНК и AluYb8-РНК в лейкоцитах крови людей, относящихся к трем возрастным группам – среднего, старческого возраста и долгожителей, не наблюдается статистически значимых различий в экспрессии транспозонов семейств AluYa5 (H=3,59, p=0,17) и AluYb8 (H=2,65, p=0,27). Наблюдаемые значения медианы экспрессии в группах лиц старческого возраста и долгожителей оказались достаточно схожи. Поэтому с целью усиления статистической мощности мы объединили эти группы для проведения дальнейшего анализа. В результате установлено, что в объединенной группе лиц старческого возраста и долгожителей (82–97 лет) экспрессия AluYa5 снижена относительно таковой в группе лиц зрелого возраста (0,75 против 2,69 отн. ед., H=2,54, p=0,11). В группе лиц в возрасте 82 лет и старше экспрессия AluYb8 также несколько ниже, чем в группе лиц зрелого возраста (0,73 против 2,15 отн. ед., H=2,63, p=0,10). Однако различия в показателях значений медианы между возрастными группами не достигают статистической значимости, при этом у людей в возрасте 82 лет и старше наблюдается более низкий уровень экспрессии (мРНК) Alu-элементов субсемейства AluYa5 и AluYb8.

Изменение активности Alu-элементов под влиянием экзо- и эндогенных средовых факторов может быть одним из пусковых механизмов, опосредующих нестабильность генома [7]. В частности, метилирование МГЭ считается наиболее распространённым механизмом подавления их активности [10], 90% транспозонов AluYa5 и AluYb8 метилированы более чем на 75%. Снижение уровня метилированных Alu кДНК в плазме

крови считается маркером опухолеобразования, уровень метилирования коррелирует с выживаемостью раковых больных [11]. Было показано, что у человека снижение уровня метилирования Alu-элементов, а, следовательно, их активация, наблюдается в возрасте 34–68 лет [12]. Сопоставляя данные литературы с полученными нами результатами, необходимо отметить, что средняя продолжительность жизни населения нашей страны составляет 72 года, а нижний порог периода старческого возраста, согласно классификации, основанной на физиологических, антропометрических и биохимических показателях, находится на уровне 75 лет [8]. В данной работе исследовались лица с продолжительностью жизни, превышающей средний популяционный уровень (82–97 лет). Можно предположить, что наблюдаемый нами более низкий уровень экспрессии Alu-ретроэлементов среди лиц старческого возраста и долгожителей имеет значение для дожития до преклонного возраста. Это согласуется с одной из гипотез, связывающей усиление контроля над МГЭ с увеличением продолжительности жизни [13].

Таким образом, в исследованной нами выборке жителей Республики Башкортостан не было обнаружено статистически значимых изменений относительного уровня экспрессии субсемейств AluYa5 и AluYb8 с возрастом.

Литература

1. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153(6): 1194-217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
2. Дадашев С.Я., Гришаева Т.М. Последовательность заселения генома человека мобильными элементами. [Электронный ресурс]. *Режим доступа:* http://www.ivtn.ru/2008/pdf/t08_09.pdf.
3. Mustafina O.E. The possible roles of human Alu elements in aging. *Front Genet* 2013; (4): 96. doi:10.3389/fgene.2013.00096

4. Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К. Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila Melanogaster*. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2011; 15(2): 225-260
5. Pandey R., Mandal A.K., Jha V., Mukerji M. Heat shock factor binding in Alu repeats expands its involvement in stress through an anti-sense mechanism. *Genome Biol* 2011; 12(11): R117. doi:10.1186/gb-2011-12-11-r117
6. Mariner P.D., Walters R.D., Espinoza C.A. et al. Human Alu RNA Is a Modular Transacting Repressor of mRNA Transcription during Heat Shock. *Mol Cell* 2008; 29(4): 499-509. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.013
7. Sturm A., Ivics Z., Vellai T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(10): 1839-47. doi:10.1007/s00018-015-1896-0
8. Хрисанфова Е.Н. «Основы геронтологии (Антропологические аспекты)». М.: Изд-во Владос. 1999. 151 с.
9. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
10. Liu W.M., Maraia R.J., Rubin C.M., Schmid C.W. Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(6): 1087-95. doi:10.1093/nar/22.6.1087
11. Bakshi A., Herke S.W., Batzer M.A., Kim J. DNA methylation variation of human-specific Alu repeats. *Epigenetics* 2016; 11(2): 163-73. doi:10.1080/15592294.2015.1130518
12. Jintaridith P., Mutirangura A. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiological genomics* 2010; 41(2): 194-200. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00146.2009>
13. Longo M.S., Brown J.D., Zhang C. et al. Identification of a recently active mammalian SINE derived from ribosomal RNA. *Genome biology and evolution* 2015; 7(3): 775-788. doi:10.1093/gbe/evv015
3. Mustafina O.E. The possible roles of human Alu elements in aging. *Front Genet* 2013; (4): 96. doi:10.3389/fgene.2013.00096
4. Vasil'eva LA, Antonenko OV, Zaharov IK. Rol' mobil'nyh geneticheskikh elementov v genome *Drosophila Melanogaster*. [The role of mobile genetic elements in the genome of *Drosophila melanogaster*.] *Vavilovskij zhurnal genetikii i selekcii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding.] 2011; 15 (2): 225-260. (In Russ.).
5. Pandey R., Mandal A.K., Jha V., Mukerji M. Heat shock factor binding in Alu repeats expands its involvement in stress through an anti-sense mechanism. *Genome Biol* 2011; 12(11): R117. doi:10.1186/gb-2011-12-11-r117
6. Mariner P.D., Walters R.D., Espinoza C.A. et al. Human Alu RNA Is a Modular Transacting Repressor of mRNA Transcription during Heat Shock. *Mol Cell* 2008; 29(4): 499-509. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.013
7. Sturm A., Ivics Z., Vellai T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(10): 1839-47. doi:10.1007/s00018-015-1896-0
8. Khrisanfova E.N. Osnovy gerontologii (Antropologicheskiye aspekty). [The basics of gerontology (Anthropological aspects)]. M.: Izd-vo Vlados. 1999. 151 s. (In Russ.).
9. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-8. doi:10.1038/nprot.2008.73
10. Liu W.M., Maraia R.J., Rubin C.M., Schmid C.W. Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(6): 1087-95. doi:10.1093/nar/22.6.1087
11. Bakshi A., Herke S.W., Batzer M.A., Kim J. DNA methylation variation of human-specific Alu repeats. *Epigenetics* 2016; 11(2): 163-73. doi:10.1080/15592294.2015.1130518
12. Jintaridith P., Mutirangura A. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiological genomics* 2010; 41(2): 194-200. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00146.2009>
13. Longo M.S., Brown J.D., Zhang C. et al. Identification of a recently active mammalian SINE derived from ribosomal RNA. *Genome biology and evolution* 2015; 7(3): 775-788. doi:10.1093/gbe/evv015

References

1. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153(6): 1194-217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
2. Dadashev S.Ya., Grishaeva T.M. Posledovatel'nost' zaseleniya genoma cheloveka mobil'nymi elementami. [The sequence of popula-