

УДК 577.21

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК, МИТОХОНДРИИ И ПРОГРАММИРУЕМОЕ СТАРЕНИЕ

Мини-обзор

© 2015 Л.А. Зиновкина¹, Р.А. Зиновкин^{2*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,
электронная почта: roman.zinovkin@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.15
После доработки 28.08.15

Метилирование ДНК является одним из основных путей эпигенетической регуляции экспрессии генов ядерной ДНК. Прогресс в изучении метилирования геномной ДНК привел к определению в ней точных сайтов метилирования, отражающих биологический возраст клеток и тканей организма. Однако функциональное значение метилирования митохондриальной ДНК (мтДНК) до настоящего времени остается неизвестным. Появляется все больше данных о связи метилирования мтДНК со старением и окислительным стрессом. В данном мини-обзоре обобщена информация о метилировании ядерной и мтДНК у млекопитающих, указывающая на связь этих процессов с программируемым старением.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эпигенетика, метилирование ДНК, митохондрии, старение.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ЯДЕРНОЙ ДНК

Метилирование ДНК – важнейшая эпигенетическая модификация, регулирующая экспрессию генов. При метилировании ДНК происходит перенос метильной группы на атом углерода в пятом положении цитозина с использованием в качестве донора метильной группы S-аденозил-L-метионина (SAM), в результате образуются 5-метилцитозин (5mC) и S-аденозил-L-гомоцистеин. В клетках человека имеется несколько цитозиновых ДНК метилтрансфераз: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b и DNMT3L. Все эти ферменты содержат высококонсервативный C-концевой каталитический домен и N-концевые регуляторные варибельные участки, которые взаимодействуют с другими белками и хроматином [1]. Под воздействием ферментов семейства TET (ten eleven translocation) происходит окис-

ление 5mC с образованием 5-гидроксиметилцитозина (5hmC) [2].

Метилирование ДНК преимущественно происходит в последовательностях CpG, которые образуют т.н. CpG-островки, расположенные перед транскрипционно активными генами. Недавно обнаружено, что метилирование цитозинов может происходить и вне динуклеотидов CpG [3, 4]. Изначальные паттерны метилирования создаются ДНК метилтрансферазами DNMT3a и -3b, активно работающими в эмбриогенезе. DNMT3L, видимо, функционирует в качестве адаптерного белка в процессе метилирования ДНК в гаметогенезе [5]. DNMT3a и -3b (в меньшей степени DNMT1) обладают *de novo* метилирующей активностью. В процессе репликации образуются полуметилированные молекулы ДНК, а за восстановление и поддержание паттернов метилирования у млекопитающих отвечает DNMT1. В настоящее время становится популярной стохастическая модель метилирования, которая рассматривает метилирование в каждом сайте как результат двух противоположных процессов – метилирования и деметилирования, зависящих, в свою очередь, от активности ДНК метилтрансфераз и ферментов семейства TET, а также состояния хроматина [6].

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК, мтАФК – митохондриальные активные формы кислорода; яДНК – ядерная ДНК, 5mC – 5-метилцитозин, 5hmC – 5-гидроксиметилцитозин, DNMT – ДНК-метилтрансфераза, TET – ten-eleven-translocation оксигеназа.

* Адресат для корреспонденции.

МЕТИЛИРОВАНИЕ мтДНК

Метилирование цитозинов в мтДНК было обнаружено еще в 1970-х гг. [7–9]. Важно отметить, что выделенная из митохондрий животных цитозиновая ДНК-метилтрансфераза обладала иной специфичностью по сравнению с ядерной ДНК-метилтрансферазой [10]. Метилирование мтДНК было подтверждено и в последующих работах [11, 12], однако его функциональное значение так и не было определено.

В последнее десятилетие исследований в этой области стало заметно больше. В мтДНК был обнаружен 5hmC [13], а также частично определены паттерны метилирования, которые оказались постоянными почти по всему митохондриальному геному в разных тканях и типах клеток, за исключением нескольких участков, метилирование в которых различалось в зависимости от тканеспецифичности [14]. Больше всего метилированных остатков цитозина наблюдалось в регуляторных областях мтДНК – в промоторных участках, особенно в консервативных блоках CSB II и CSB III [15]. Эти участки играют важнейшую роль в связывании с белком TEFM, ответственным за переключение с синтеза коротких РНК-праймеров для репликации на полноценную транскрипцию обеих цепей мтДНК [16].

Известно, что в регуляторных областях мтДНК есть несколько сайтов CpG, которые *in vitro* защищены от метилирования экзогенными бактериальными ферментами [17]. Наличие таких сайтов было показано в точке начала репликации легкой цепи O_L и последовательности TERM, в которой происходит терминация транскрипции с промоторов LSP и HSP1. Предполагается, что метилирование этих областей может влиять на процессы репликации и транскрипции в митохондриях [18].

Кроме того, многочисленные метилированные цитозины находятся в последовательности TAS, где происходит терминация синтеза 7S ДНК, при наличии которой в мтДНК формируется D-петля. D-петля присутствует не всегда и не во всех молекулах мтДНК, ее функции остаются неизвестными. Предполагается, что она может участвовать в регуляции репликации и рекомбинации мтДНК, обеспечивать открытую конформацию мтДНК для доступа ферментов, а также связь нуклеоида с внутренней мембраной. Механизм регуляции синтеза D-петли не изучен, но, вероятно, что эта регуляция может осуществляться в области TAS [19].

Метилирование цитозинов в митохондриях, по-видимому, осуществляет митохондриальная изоформа DNMT1 – mtDNMT1. Она образуется

при транскрипции того же гена, что и ядерная изоформа, ее удлиненный транскрипт кодирует митохондриальную адресную последовательность [13]. Кроме DNMT1, как показано в ряде работ, в митохондриях присутствуют и DNMT3a/3b [15, 20].

Интересно, что в митохондриях метилирование активно происходит не только в CpG-сайтах. В области D-петли также метилированы динуклеотиды CpA, CpC и CpT [15]. Функциональный смысл и ферменты, осуществляющие такое метилирование пока не определены.

Лишь в последние годы появились данные об изменениях в характере метилирования мтДНК, вызванных различными воздействиями [18, 21, 22].

Гиперметилирование генов 12S рРНК, Phe-тРНК и области D-петли наблюдалось у рабочих, профессиональная деятельность которых связана с длительной работой на загрязненном воздухе [23]. Количество 12S рРНК лимитирует митохондриальную трансляцию, в гене Phe-тРНК расположен один из промоторов, в D-петле сосредоточены многие регуляторные элементы мтДНК. Вероятно, условия окружающей среды могут влиять на метилирование мтДНК, изменяя экспрессию митохондриальных генов.

Различные онкологические заболевания могут сопровождаться гиперметилированием мтДНК [24]. Возможно, этот процесс приводит к изменениям в экспрессии митохондриальных генов, что ведет к снижению активности дыхательной цепи митохондрий и возникновению эффекта Варбурга. Это, в свою очередь, может привести к изменению профиля экспрессии ядерных генов, тем самым стимулируя онкогенез.

В клетках, гиперэкспрессирующих митохондриальную изоформу фермента DNMT1 (mtDNMT1), изменялась экспрессия некоторых митохондриальных генов – количество ND6, кодируемого L-цепью уменьшалось, в то время как количество ND1, кодируемого H-цепью, возрастало [13]. Интересно, что экспрессия mtDNMT1 возрастала и при действии транскрипционных факторов NRF1 и PGC1- α , активация которых происходит при окислительном стрессе [13]. Это может указывать на принципиальную возможность изменения экспрессии митохондриальных генов за счет изменения их метилирования под действием окислительного стресса.

Участие DNMT1 в обеспечении нормального функционирования митохондрий косвенно подтверждает тот факт, что некоторые наследственные заболевания, связанные с мутациями в этом гене, фенотипически проявляются как митохондриальные [1].

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И СТАРЕНИЕ

Более 40 лет назад была установлена связь между старением и уменьшением уровня метилирования ДНК млекопитающих [25]. Затем было обнаружено, что уменьшение метилирования ДНК в культуре фибробластов млекопитающих положительно коррелирует с количеством делений этих клеток, тогда как в immortalized клетках уровень метилирования остался неизменным [26]. На основе этих данных была выдвинута гипотеза, объясняющая возрастные дисфункции в клетках и тканях нарушениями в метилировании ДНК [27]. С развитием современных методов анализа эпигенетических маркеров генома были получены новые уточненные данные. Оказалось, что с возрастом уровень метилирования геномной ДНК меняется разнонаправленно в различных CpG участках (см. обзор [28]). Такое разнонаправленное изменение сложно объяснить лишь стохастическими процессами, сопровождающими метилирование и деметилирование ДНК, что хорошо согласуется с программируемым характером старения, которое может вызываться изменением метилирования ДНК [29].

Важнейшим событием для геронтологии и эпигенетики явилось открытие биомаркеров старения – эпигенетических часов, которые позволяют определять биологический возраст клеток и тканей [30]. Проведено точное картирование нескольких сотен CpG участков, уровень метилирования которых достоверно коррелировал с биологическим возрастом. Важно отметить, что в этой же работе было установлено, что «манипуляции, используемые для получения плюрипотентных клеток, переводят эпигенетические часы к нулю» [30].

Одним из наиболее изученных факторов, вызывающих изменение уровня метилирования, является хроническое воспаление [31, 32], однако причины этого изменения до сих пор неизвестны. Согласно теории «воспалительного старения» (англ. «inflammaging»), длительное воспаление приводит к дисбалансу иммунной системы и появлению старческого фенотипа [33]. Роль митохондрий в этом процессе была впервые описана в 2006 г. [34]: при замене клеточной мтДНК на другой гаплотип происходило изменение экспрессии цитокинов как на базовом уровне, так и при стимуляции ИЛ-6. Это свидетельствует о наличии ретроградного сигнального пути между митохондриальным и ядерным геномами, который может определять воспалительные процессы, сопутствующие старению.

В процессе функционирования дыхательной цепи митохондрий образуются токсичные

мтАФК, вызывающие окислительный стресс в клетках, тканях и органах. МтАФК играют важную роль в качестве мессенджеров воспалительного ответа [35], а также сопровождают практически любой окислительный стресс, вызванный экзо- или эндогенными факторами [36]. Показано, что окислительный стресс, вызванный перекисью водорода, приводит к связыванию DNMT1 с хроматином и изменению уровня метилирования яДНК [37]. Важнейшая роль мтАФК в процессе старения была подробно рассмотрена в работах проф. В.П. Скулачева [38, 39], но не является целью настоящего обзора.

Ранее была популярна гипотеза, утверждающая, что старение млекопитающих вызывают мутации, накапливающиеся в мтДНК. Предлагалась схема т.н. «порочного круга»: мутации в мтДНК → нарушение работы дыхательной цепи → повышение уровня мтАФК → мутации в мтДНК [40, 41]. Данную гипотезу подтверждали следующие факты: 1) уровень соматических мутаций в мтДНК выше, чем у яДНК [42]; 2) репаративные процессы в мтДНК организованы проще, чем в ядерной [43]. Под действием АФК образуется 8-оксо-dG, что приводит к трансверсиям G:C → T:A после репликации мтДНК [44, 45]; 3) трансгенные «мутаторные» мыши с нарушенной репаративной функцией полимеразы γ , осуществляющей репликацию мтДНК, быстро накапливали большое количество мутаций в мтДНК, преждевременно старели и умирали [46].

Вместе с тем общий уровень мутационной нагрузки по мтДНК в большинстве тканей является невысоким, а накопление мутаций в мтДНК приводит к клональному распространению вариантов мтДНК и дисфункции органов и тканей [47]. При этом репаративные процессы в митохондриях оказались недооцененными. В митохондриях показана эффективная работа репарационной системы base excision repair (BER), присутствуют компоненты системы mismatch repair (MMR) [48]. Считается, что в митохондриях отсутствует система nucleotide excision repair (NER), хотя ядерные компоненты этой системы – белки CSA и CSB импортировались в митохондрию при окислительном стрессе. Предполагается, что в митохондриях CSB участвует в регуляции транскрипции и BER [49]. Наличие репарации двуцепочечных повреждений мтДНК не изучено, но ключевой фермент репарации, основанной на гомологичной рекомбинации Rad 51, импортировался в митохондрии в условиях окислительного стресса и участвовал в репликации [50].

Ведущая роль 8-оксо-dG при мутагенезе мтДНК также была опровергнута. В митохондриях частота трансверсий, в том числе и G:C → T:A,

с возрастом не менялась, в то время как увеличивалась частота транзиций. Вероятно, митохондриальные системы репарации эффективно ликвидируют повреждения, вызванные 8-оксо-dG [51].

Гетерозиготные мутаторные мыши имели нормальную продолжительность жизни, хотя они и накапливали в сотни раз больше мутаций в мтДНК, чем стареющие мыши дикого типа [52]. Таким образом, митохондриальная стохастическая теория старения оказалась опровергнута.

До сих пор проведено очень немного исследований по изучению связей между старением и метилированием мтДНК. Исследование количества 5mC в гене *12S* мтДНК людей различных возрастов показало, что с возрастом уровень метилирования этого гена снижается [22]. С возрастом в мтДНК коры больших полушарий у мышей увеличивалось количество 5hmC, но не 5mC [53]. При этом количество транскриптов митохондриальных генов *ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* и *ND6* с возрастом увеличивалось в коре, но не в мозжечке. Связаны ли между собой увеличение 5hmC и возрастание уровня транскрипции генов, кодирующих компоненты I комплекса неясно.

Возрастные изменения также были показаны в экспрессии ферментов, ответственных за метилирование и гидроксиметилирование ДНК в митохондриях. В коре мозга мышей уровень мРНК mtDNMT1 уменьшался, а уровень мРНК TET1–TET3 не изменялся. В мозжечке с возрастом увеличивался уровень мРНК TET2 и TET3 и не менялся уровень мРНК mtDNMT1 [53]. Метилирование участков, расположенных перед митохондриальными генами *ND6*, *ATP6* и *COX1* уменьшалось в процессе эмбрионального развития мозга человека [14].

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА РАБОТЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ СТАРЕНИИ

В rho0 клетках без мтДНК наблюдалось измененное метилирование CpG островков в ядерном геноме по сравнению с исходными линиями клеток. При введении мтДНК в rho0 клетки профиль метилирования частично восстанавливался [21]. Показано, что степень метилирования ядерных генов, продукты которых являются митохондриальными белками, была тканеспецифична и коррелировала со степенью экспрессии генов и активностью митохондрий [54].

Наиболее ярким доказательством функционирования эпигенетических механизмов в процессе старения служат данные, полученные в

группе проф. Хаяши [55]. Дыхательная цепь пожилых людей работает не так эффективно, как в молодости, что приводит к падению скорости потребления кислорода и формированию «старческого» фенотипа клеток. Авторам удалось восстановить нормальное функционирование дыхательной цепи в клетках со «старческим» фенотипом путем репрограммирования клеток. Анализ экспрессии генов показал, что причиной изменений в функционировании дыхательной цепи было эпигенетическое снижение экспрессии ядерного гена *GCAT*, кодирующего глицин С-ацетилтрансферазу, которая участвует в биосинтезе глицина в митохондриях. Добавление глицина в среду фибробластам со «старческим» фенотипом частично восстанавливало работу дыхательной цепи. Поскольку в образовании глицина в митохондриях участвует также продукт гена *SHMT2* – сериновая гидроксиметилтрансфераза, было проведено сравнение количеств мРНК SHMT2 в фибробластах молодых и пожилых людей. В последнем случае наблюдалось значимое снижение уровня мРНК.

В случае экспериментального снижения экспрессии *GCAT* и/или *SHMT2* в фибробластах молодых пациентов с помощью shRNA и siRNA соответственно, возникали нарушения в работе дыхательной цепи, характерные для «старческого фенотипа». Таким образом, эпигенетические процессы приводили к возрастным нарушениям в функционировании митохондрий путем изменения экспрессии генов, продукты которых вовлечены в митохондриальный метаболизм, в частности, в образование глицина из серина (*SHMT2*) и L-треонина (*GCAT*). Недостаток глицина в митохондриях приводит к нарушениям митохондриальной трансляции, что могло служить причиной формирования дефектов дыхательной цепи, из-за которых возникал «старческий фенотип» [55]. Кроме того, митохондриальный и цитоплазматический фолатные циклы, в которых работает SHMT, сопряжены с метиониновым циклом, в котором из метионина синтезируется SAM – донор метильных групп в реакциях метилирования как митохондриальной, так и цитоплазматической ДНК. Поэтому снижение активности ферментов, участвующих в синтезе глицина, может сильно влиять не только на трансляцию, но и на метилирование, обеспечивая эпигенетические изменения в экспрессии генов, приводящие к метаболическим «старческим» изменениям.

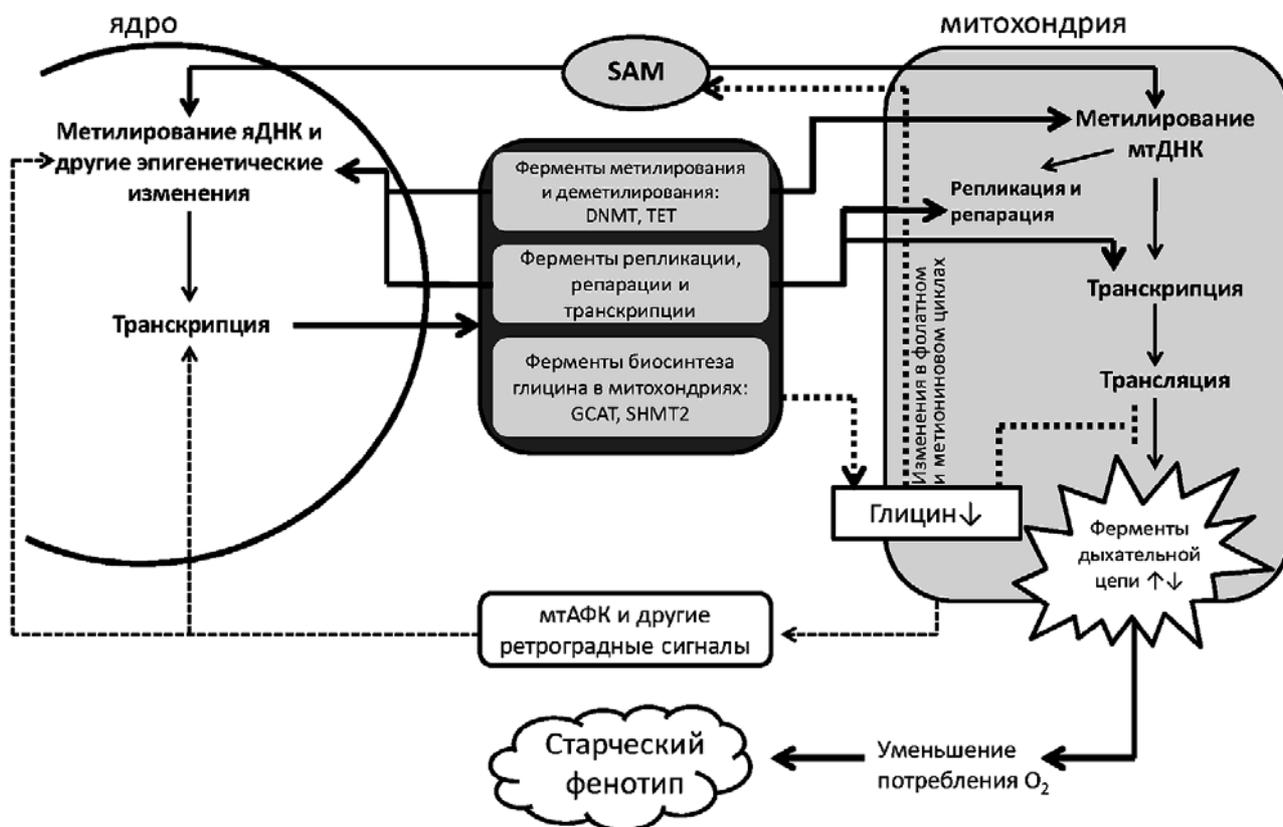
Логично предположить, что подобная схема: «Возрастные эпигенетические изменения в митохондриях и ядре → изменение экспрессии ядерных и/или митохондриальных генов → изменение метаболизма митохондрий → форми-

рование старческого фенотипа» может лежать в основе реализации общей «программы старения», охватывающей многие метаболические пути и гены (рисунок). Ключевую роль в реализации такой программы могут играть: 1) митохондриальные ферменты, закодированные в ядре (прежде всего ДНК-полимераза γ , РНК-полимераза POLRMT, вспомогательные ферменты репликации и транскрипционные факторы). Эпигенетическое изменение активности их генов может радикально повлиять на митохондриальный метаболизм; 2) ферменты, работающие как в ядре, так и в митохондриях. Разнообразие способов образования их митохондриальных изоформ подразумевает широкие возможности как для эпигенетической, так и многих других видов регуляции. Митохондриальные изоформы образуются альтернативным сплайсингом (гликозилаза OGG1) [56]; при транскрипции с разных промоторов одного гена (DNMT1 и урацилгликозилаза UNG) [13, 56]; при альтернативной инициации трансляции общего с ядерной формой транскрипта (топоизомераза TOP3Amt) [57]; с помощью ограниченного протеолиза ядерной изоформы (топоизомераза TOP2Bmt)

[58]; один фермент имеет и митохондриальный, и ядерный адрес (тимингликоль-гликозилаза hNTHL1) [56].

Кроме того, некоторые ферменты системы ядерной репарации направляются в митохондрию в условиях окислительного стресса. Интересно, что эти ферменты в митохондриях, вероятнее всего, выполняют несколько других функций, чем в ядре. Так, только в условиях окислительного стресса в митохондриях обнаруживается ключевой фактор репарации, основанной на гомологичной рекомбинации Rad51, участвующий в митохондриях в репликации [50]. При окислительном стрессе в митохондриях резко возрастают количества AP-эндонуклеазы APEX1 и компонентов NER CSA и CSB. Оказалось, что CSB в митохондриях, вероятно, участвует не столько в репарации, сколько в транскрипции, увеличивая процессивность POLRMT [49]. Представляется возможным, что при окислительном стрессе в митохондриях происходят изменения в репликации и транскрипции.

Все эти факты указывают на существование тесных и разнообразных связей между регуляцией генной экспрессии в ядре и митохондриях.



Гипотетическая схема реализации программы старения с помощью ядерных и митохондриальных эпигенетических механизмов. Пояснения приведены в тексте

Одним из способов такой регуляции, в том числе и при старении, может быть метилирование. Как SAM, так и ферменты метилирования-деметилирования DNMT и TET работают и в ядре, и в митохондриях. Возрастные изменения уровня DNMT и TET в митохондриях [53] указывают на участие системы метилирования в митохондриях в процессах старения. При окислительном стрессе, который зачастую сопровождает старение, происходит активация транскрипционных факторов NRF1 и PGC1- α , что приводит к увеличению экспрессии митохондриальной DNMT1 [13]. И если известно, что метилирование в ядре может менять экспрессию генов, в том числе и митохондриальных белков, то влияние изменений в метилировании и экспрессии митохондриального генома на экспрессию ядерных генов остается неизученным. Тем не менее возможны и такие ретроградные влияния — как эпигенетические, так и на уровне регуляции транскрипции.

Недавние исследования по определению сайтов метилирования яДНК, которые могут использоваться как «биологические часы» [30], а также по определению ключевой роли эпигенетических модификаций при старении клеток [55], подтверждают высказанную ранее гипотезу проф. Б.Ф. Ванюшина [29] о метилировании яДНК как способа реализации механизма запрограммированного старения (феноптоза), предложенного проф. В.П. Скулачевым [59]. Можно также предполагать важную роль метилирования мтДНК и ретроградного сигналинга в реализации этой программы.

Авторы выражают глубокую признательность профессору, академику РАН Владимиру Петровичу Скулачеву.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-24-00107).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maresca, A., Zaffagnini, M., Caporali, L., Carelli, V., and Zanna, C. (2015) DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front. Genet.*, **6**, 90.
- Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation, *Nature*, **502**, 472–479.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., and Walter, J. (2012) *In vivo* control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases, *PLoS Genet.*, **8**, e1002750.
- Guo, J.U., Su, Y., Shin, J.H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., Ming, G.L., and Song, H. (2014) Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain, *Nat. Neurosci.*, **17**, 215–222.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., and Bestor, T.H. (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints, *Science*, **294**, 2536–2539.
- Jeltsch, A., and Jurkowska, R.Z. (2014) New concepts in DNA methylation, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 310–318.
- Vanyushin, B.F., Kiryanov, G.I., Kudryashova, I.B., and Belozersky, A.N. (1971) DNA-methylase in loach embryos (*Misgurnus fossilis*), *FEBS Lett.*, **15**, 313–316.
- Vanyushin, B.F., and Kirnos, M.D. (1974) The nucleotide composition and pyrimidine clusters in DNA from beef heart mitochondria, *FEBS Lett.*, **39**, 195–199.
- Vanyushin, B.F., and Kirnos, M.D. (1977) The structure of animal mitochondrial DNA (base composition, pyrimidine clusters, character of methylation), *Mol. Cell. Biochem.*, **14**, 31–36.
- Kudryashova, I.B., Kirnos, M.D., and Vaniushin, B.F. (1976) DNA-methylase activities from animal mitochondria and nuclei: different specificity of DNA methylation, *Biokhimiia*, **41**, 1968–1977.
- Shmookler Reis, R.J., and Goldstein, S. (1983) Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. Genome number, integrity, and methylation, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9078–9085.
- Pollack, Y., Kasir, J., Shemer, R., Metzger, S., and Szyf, M. (1984) Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4811–4824.
- Shock, L.S., Thakkar, P.V., Peterson, E.J., Moran, R.G., and Taylor, S.M. (2011) DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3630–3635.
- Ghosh, S., Sengupta, S., and Scaria, V. (2014) Comparative analysis of human mitochondrial methylomes shows distinct patterns of epigenetic regulation in mitochondria, *Mitochondrion*, **18**, 58–62.
- Bellizzi, D., D'Aquila, P., Scafone, T., Giordano, M., Riso, V., Riccio, A., and Passarino, G. (2013) The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern, *DNA Res.*, **20**, 537–547.
- Agaronyan, K., Morozov, Y.I., Anikin, M., and Temiakov, D. (2015) Mitochondrial biology. Replication-transcription switch in human mitochondria, *Science*, **347**, 548–551.
- Rebelo, A.P., Williams, S.L., and Moraes, C.T. (2009) *In vivo* methylation of mtDNA reveals the dynamics of protein-mtDNA interactions, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6701–6715.
- Ferreira, A., Serafim, T.L., Sardao, V.A., and Cunha-Oliveira, T. (2015) Role of mtDNA-related mitoepigenetic phenomena in cancer, *Eur. J. Clin. Invest.*, **45** Suppl. 1, 44–49.
- Nicholls, T.J., and Minczuk, M. (2014) In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA, *Exp. Gerontol.*, **56**, 175–181.
- Chestnut, B.A., Chang, Q., Price, A., Lesuisse, C., Wong, M., and Martin, L.J. (2011) Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation, *J. Neurosci.*, **31**, 16619–16636.

21. Minocherhomji, S., Tollefsbol, T.O., and Singh, K.K. (2012) Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases, *Epigenetics*, **7**, 326–334.
22. Iacobazzi, V., Castegna, A., Infantino, V., and Andria, G. (2013) Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool, *Mol. Genet. Metab.*, **110**, 25–34.
23. Byun, H.-M., Panni, T., Motta, V., Hou, L., Nordio, F., Apostoli, P., Bertazzi, P.A., and Baccarelli, A.A. (2013) Effects of airborne pollutants on mitochondrial DNA methylation, *Part. Fibre Toxicol.*, **10**, 18.
24. Sun, C., Reimers, L.L., and Burk, R.D. (2011) Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer, *Gynecol. Oncol.*, **121**, 59–63.
25. Vanyushin, B.F., Nemirovsky, L.E., Klimenko, V.V., Vasiliev, V.K., and Belozersky, A.N. (1973) The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents, *Gerontologia*, **19**, 138–152.
26. Wilson, V.L., and Jones, P.A. (1983) DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells, *Science*, **220**, 1055–1057.
27. Holliday, R. (1985) The significance of DNA methylation in cellular aging, *Basic Life Sci.*, **35**, 269–283.
28. Richardson, B. (2003) Impact of aging on DNA methylation, *Ageing Res. Rev.*, **2**, 245–261.
29. Ванюшин Б.Ф. (2013) Эпигенетика сегодня и завтра, *Вавиловский журн. генет. селекции*, **17**, 805–831.
30. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, 115.
31. Issa, J.-P.J., Ahuja, N., Toyota, M., Bronner, M.P., and Brentnall, T.A. (2001) Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis, *Cancer Res.*, **61**, 3573–3577.
32. Kang, G.H., Lee, H.J., Hwang, K.S., Lee, S., Kim, J.-H., and Kim, J.-S. (2003) Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation, *Am. J. Pathol.*, **163**, 1551–1556.
33. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., and De Benedictis, G. (2000) Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **908**, 244–254.
34. Bellizzi, D., Cavalcante, P., Taverna, D., Rose, G., Passarino, G., Salvioli, S., Franceschi, C., and De Benedictis, G. (2006) Gene expression of cytokines and cytokine receptors is modulated by the common variability of the mitochondrial DNA in cybrid cell lines, *Genes Cells*, **11**, 883–891.
35. Zinovkin, R.A., Romaschenko, V.P., Galkin, I.I., Zakharova, V.V., Pletjushkina, O.Y., Chernyak, B.V., and Popova, E.N. (2014) Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium, *Ageing (Albany N.Y.)*, **6**, 661.
36. Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.-O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000) Reactive oxygen species (Ros-Induced) Ros release a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes, *J. Exp. Med.*, **192**, 1001–1014.
37. O'Hagan, H.M., Wang, W., Sen, S., Shields, C.D., Lee, S.S., Zhang, Y.W., Clements, E.G., Cai, Y., Van Neste, L., and Easwaran, H. (2011) Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands, *Cancer Cell*, **20**, 606–619.
38. Skulachev, V.P., and Longo, V.D. (2005) Aging as a mitochondria-mediated atavistic program: can aging be switched off? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1057**, 145–164.
39. Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I., and Kolosova, N.G., Kopnin, B.P., Korshunova, G.A., Lichinitser, M.R., Obukhova, L.A., Pasyukova, E.G., Pisarenko, O.I., Roginsky, V.A., Ruuge, E.K., Senin, I.I., Severina, I.I., Skulachev, M.V., Spivak, I.M., Tashlitsky, V.N., Tkachuk, V.A., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
40. Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.*, **20**, 145–147.
41. Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine, *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 359–407.
42. Khrapko, K., Coller, H.A., Andre, P.C., Li, X.C., Hanekamp, J.S., and Thilly, W.G. (1997) Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13798–13803.
43. Brierley, E.J., Johnson, M.A., Lightowers, R.N., James, O.F., and Turnbull, D.M. (1998) Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle, *Ann. Neurol.*, **43**, 217–223.
44. Richter, C., Park, J.W., and Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6465–6467.
45. De Bont, R., and Van Larebeke, N. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data, *Mutagenesis*, **19**, 169–185.
46. Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgenuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., Morrow, J.D., Van Remmen, H., Sedivy, J.M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., and Prolla, T.A. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging, *Science*, **309**, 481–484.
47. Khrapko, K., and Turnbull, D. (2014) Mitochondrial DNA mutations in aging, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **127**, 29–62.
48. Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 659–671.
49. Kamenisch, Y., and Berneburg, M. (2013) Mitochondrial CSA and CSB: protein interactions and protection from ageing associated DNA mutations, *Mech. Ageing Dev.*, **134**, 270–274.
50. Sage, J.M., and Knight, K.L. (2013) Human Rad51 promotes mitochondrial DNA synthesis under conditions of increased replication stress, *Mitochondrion*, **13**, 350–356.
51. Kennedy, S.R., Salk, J.J., Schmitt, M.W., and Loeb, L.A. (2013) Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage, *PLoS Genet.*, **9**, e1003794.
52. Vermulst, M., Bielas, J.H., Kujoth, G.C., Ladiges, W.C., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., and Loeb, L.A. (2007) Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice, *Nat. Genet.*, **39**, 540–543.
53. Dzitoyeva, S., Chen, H., and Manev, H. (2012) Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria, *Neurobiol. Aging*, **33**, 2881–2891.
54. Takasugi, M., Yagi, S., Hirabayashi, K., and Shiota, K. (2010) DNA methylation status of nuclear-encoded mitochondrial genes underlies the tissue-dependent mitochondrial functions, *BMC Genomics*, **11**, 481.
55. Hashizume, O., Ohnishi, S., Mito, T., Shimizu, A., Iashikawa, K., Nakada, K., Soda, M., Mano, H., Togayachi, S., Miyoshi, H., Okita, K., and Hayashi, J. (2015) Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT

- and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects, *Sci. Rep.*, **5**, 10434.
56. Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowers, R.N., and Dietrich, A. (2011) DNA repair in organelles: pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging, *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 186–200.
57. Wang, Y., Lyu, Y.L., and Wang, J.C. (2002) Dual localization of human DNA topoisomerase 3alpha to mitochondria and nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12114–12119.
58. Low, R.L., Orton, S., and Friedman, D.B. (2003) A truncated form of DNA topoisomerase 2beta associates with the mtDNA genome in mammalian mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4173–4186.
59. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418–1426.

DNA METHYLATION, MITOCHONDRIA, AND PROGRAMMED AGING

L. A. Zinovkina¹, R. A. Zinovkin^{2*}

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia

² A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-0338, E-mail: roman.zinovkin@gmail.com

Received July 22, 2015

Revision received August 28, 2015

DNA methylation is a key epigenetic process involved in the regulation of nuclear gene expression. Progress in the study of genomic DNA methylation has led to the precise identification of methylation sites reflecting biological age of cells and tissues. However, the functional significance of mitochondrial DNA methylation (mtDNA) remains unknown. There is growing evidence that mtDNA methylation is linked to aging and oxidative stress. This mini-review summarizes information about the methylation of nuclear and mtDNA in mammals, indicating the connection of these processes to programmed aging.

Key words: epigenetics, DNA methylation, mitochondria, aging