БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1240 – 1255

УДК 57.085.23

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК С СОХРАНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА: ПРЕИМУЩЕСТВО ИЛИ ОГРАНИЧЕНИЕ?

Обзор

© 2020 Е.М. Самойлова*, В.П. Баклаушев

Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682 Москва, Россия; электронная почта: samoyket@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2020
После доработки 28.07.2020
Принята к публикации 05.08.2020

С момента первого описания старения и возраста клеток Хейфликом и Мурхедом в 1961 году наше понимание этих процессов значительно расширилось. Помимо укорочения теломерных концов, колоссальное значение в процессе старения имеют эпигенетические изменения профиля метилирования ДНК. В аспекте создания технологии репрограммирования клеток вопросы эпигенетического возраста и процесса старения приобретают особую актуальность. Два принципиально различных подхода к репрограммированию: создание клеток с индуцированной плюрипотентностью (ИПСК) и прямая трансдифференцировка по-разному влияют на эпигенетический возраст клетки. Считается, что при получении ИПСК возраст клетки, в частности профиль метилирования ДНК, «обнуляется», а при прямой трансдифференцировке – сохраняется. Понимание биологической роли метилирования ДНК в развитии, поддержании функциональной активности, тканевом и клеточном разнообразии, модификациях нейронных сетей в процессе обучения и в инволюционных процессах, сопровождающих старение, крайне важно для создания адекватных моделей заболеваний нервной системы. Прямое репрограммирование является и альтернативой, и ценным дополнением к методике ИПСК как источник зрелых клеток для моделирования нейродегенеративных заболеваний, а также в качестве новой стратегии для *in vivo* заместительной терапии. Оптимизация технологии получения аутологичных клеток пациентов с использованием альтернативных методов прямого и непрямого репрограммирования с учётом состояния эпигенетических часов первичных клеток будет способствовать дальнейшему развитию регенеративной и персонифицированной медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регенеративная медицина, эпигенетические часы, прямое репрограммирование, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, теломеры, метилом.

DOI: 10.31857/S0320972520090055

ВВЕДЕНИЕ

Люди являются исключительно долгоживущими по сравнению с другими приматами, с предполагаемой максимальной продолжительностью жизни 115 лет [1]. Это чрезвычайное долголетие отражается на всех постмитотических клетках, создавая уникальные предпосылки для возрастных заболеваний, таких как опухоли, нейродегенерации, диабет и другие метаболические болезни. Исследованиям процесса старения и его взаимосвязи с заболеваниями посвящено немало работ [2–5], но эта проблема слишком сложна и многогранна для создания универсальной концепции [3]. Средний возраст населения планеты продолжает увеличиваться, и возрастные заболевания становятся основным бременем для системы здравоохранения. Это, в свою очередь, создаёт потребность в модельных системах гериатрической патологии, необходимых для изучения возрастных факторов клеточной дисфункции и болезней. Процессы развития возрастных заболеваний описываются теорией «множественных попаданий», суммар-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ТФ – транскрипционный фактор; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; Ascl1 – Achaete-scute homolog 1; BAM – Brn2/Ascl1/Myt1L; Brn2 – домен POU класс 3, транскрипционный фактор 2; CpG – 5′ цитозин-фосфат-гуанин-3′ динуклеотид; CH – динуклеотид цитозина и аденина (A) или тимина (T) или цитозина (C); mCH – метилированный динуклеотид, где H может быть аденин (A), цитозин (C) или тимин (T); hmC – гидроксиметилцитозин, hmCG – динуклеотид гидроксиметилцитозингуанина; H3K4me3 – триметилирование лизина 4 в гистоне H3; H3K27me3 – триметилирование лизина 27 в гистоне H3; 5mC – 5-метилцитозин; Myt1L – миелиновый транскрипционный фактор 1 типа; NeuroD1 – нейрогенная дифференцировка; REST – фактор транскрипционного репрессора нейрональных генов; TL – длина теломер.

* Адресат для корреспонденции.

но вызывающих дисфункцию; одним из этих «попаданий» является, безусловно, эпигенетическое старение, в то время как другие «попадания» представляют собой генетическую предрасположенность, факторы окружающей среды, особенности поведения, вредные привычки и пр. [6, 7]. Моделирование старения на животных сильно ограничено вследствие относительно короткого срока их жизни, в связи с чем создание эффективных *in vitro* моделей на клетках и органоидах человека для изучения процесса старения и патогенеза возрастных болезней является весьма актуальной задачей.

Для создания модельных систем заболеваний *in vitro* применяются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые получают из первичных клеток человека переводом в плюрипотентное (эмбриональное) состояние посредством временной экспрессии транскрипционных факторов Яманаки: (OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), KLF4 (Kruppel-like factor 4), SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2) и C-MYC (протоонкоген MYC) (OKSM)) [8]. Полученные ИПСК могут быть дифференцированы в различные типы целевых клеток, такие как нейроны, миоциты, гепатоциты и другие, что позволяет исследовать клеточные процессы в контексте интересующего заболевания [9]. Однако факторы плюрипотентности обнуляют эпигенетические характеристики исходных клеток, что делает их малоподходящими для моделирования возрастных заболеваний. В качестве альтернативы может применяться метод прямого репрограммирования (трансдифференцировки) одного соматического типа клеток в другой, что позволяет сохранить возрастные эпигенетические сигнатуры клеток и точнее смоделировать течение болезни [10–12].

Существует множество клеточных и системных маркеров, определяющих возрастные изменения. Изначально процесс репликативного старения объяснялся невосстанавливаемым укорочением теломерных участков хромосом [13], однако позже было показано, что процесс старения клетки и организма гораздо более разнообразен. Так, накопление повреждений ДНК и снижение функциональной активности митохондрий могут способствовать нарушению обмена веществ [14]. Дополнительный вклад в старение вносят изменение морфологии клеток, метаболические изменения, потеря потенциала дифференцировки, активация сигнальных путей p53/p21CIP1 и p16INK4A/pRb, повышение активности β-галактозидазы, связанной со старением (SA-β-gal), образование связанных со старением гетерохроматических очагов (SAHF) и ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP) [15–17]. Также для процесса старения клетки характерны нарушения механизмов усвоения питательных веществ, связанные с нарушениями пути передачи сигналов инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) (IIS) и его нисходящих факторов транскрипции FOXO (forkhead box protein O) и mTOR (мишень рампомицина млекопитающих), снижение активности сиртуинов и аденозинмонофосфат (АМФ)-киназ [16]. В целом, стареющие клетки демонстрируют характерный секреторный фенотип, который способствует низкоуровневому системному воспалению и, вероятно, создает эффект свидетеля для остальных клеток через паракринную передачу. К факторам, формирующим такой фенотип, относятся провоспалительные цитокины (IL-6, TNF-α и пр.), IGFBP3 (инсулиноподобный белок 3, связывающий фактор роста), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), трансформирующий фактор роста- β (TGFβ) и пр. [16]. Помимо общих молекулярных маркеров старения выделяют и целый ряд биохимических предикторов, таких как повышенные уровни С-реактивного белка, глюкозы, холестерина, липопротеинов низкой плотности, щелочной фосфатазы, сывороточного альбумина и пр. [6]. Однако очевидно, что эти общие молекулярные и биохимические маркеры не являются специфичными для процесса старения и встречаются при подавляющем большинстве заболеваний, что делает невозможным использование их в качестве самодостаточных биомаркеров старения. Не меньшую роль в старении играет метилирование ДНК. Показано, что в процессе старения происходит массивное гипометилирование ДНК, и лишь определенные сайты становятся гиперметилированными [18]. При этом часть паттернов возрастного метилирования тканеспецифична [19]. Поэтому выявление наиболее общего и точного маркера старения долгое время было Святым Граалем для специалистов в этой области. Американская федерация исследований старения (AFAR) сформулировала несколько критериев биомаркера старения [20, 21].

1) Биомаркер должен предсказывать скорость старения. Другими словами, он должен описывать положение человека в каждый хронологический момент его жизни и быть лучшим предиктором продолжительности жизни, чем биологический возраст.

2) Биомаркер должен описывать механизм, который лежит в основе процесса старения, а не последствия болезни.

3) Биомаркер должен быть доступен для исследований при минимальной инвазивности.

4) Биомаркер должен быть универсальным для людей и лабораторных животных (в идеале – мелких лабораторных, таких как мыши и крысы).

К сожалению, на данный момент не существует ни одного биомаркера старения, удовлетворяющего этим критериям. Имеется несколько основных кандидатов, из которых наиболее исследованными являются длина теломер и метилирование ДНК. Старение и возрастные заболевания затрагивают все ткани и системы организма по-разному, и объять необъятное невозможно, поэтому в нашем обзоре мы сосредоточимся на наиболее актуальном, с нашей точки зрения, аспекте: старении центральной нервной системы и моделировании нейродегенеративных заболеваний путём клеточного репрограммирования.

ТЕЛОМЕРНЫЕ КОНЦЫ: ЧАСЫ ЖИЗНИ КЛЕТКИ?

Теломеры представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности на конце хромосом, которые укорачиваются при репликации соматических клеток. Репликативные ДНК-полимеразы не обладают способностью полностью реплицировать концевые участки линейных молекул ДНК, так что этот процесс контролируется специализированной ДНК-полимеразой, известной как теломераза. Большинство соматических клеток млекопитающих не экспрессируют теломеразу, что приводит к прогрессирующему с каждым делением клетки укорочению теломерных концов. Истощение теломер объясняет ограниченную пролиферативную способность культивируемых *in vitro* клеток, так называемое репликативное старение или предел Хейфлика [22]. Таким образом, можно считать, что процесс укорочения теломер отсчитывает деления клетки. Еще одна проблема состоит в том, что даже в присутствии теломеразы разрывы в области теломерных концов не восстанавливаются общими механизмами репарации, так как у теломер эту функцию должны выполнять шелтерины – специфические белковые комплексы, защищающие теломеры от повреждений и регулирующие работу теломеразы. Поэтому повреждения компонентов шелтеринов приводит к нарушению репарации разрывов ДНК на концевых участках хромосом [23]. Так, мутации шелтеринов были обнаружены в некоторых случаях апластической анемии и врожденного дискератоза, характеризующихся феноменом ускоренного старения даже при нормальной длине теломер [2].

Изначально считалось, что именно процесс укорочения теломер является основным счетчиком старения клетки и организма. Von Zglinicki и Martin-Ruiz [24] показали, что длина теломер удовлетворяет нескольким критериям для биомаркера старения, так как она связана с базовой биологией клетки и коррелирует со старением и гериартрическими болезнями. Но впоследствии было показано, что укорочение теломерных концов подчас слабо коррелирует с хронологическим старением [25]. Lu et al. [26] исследовали метилирование ДНК теломерной и субтеломерной областей [формирование метки DNAmTL (метилирование ДНК в области теломерных концов)] лейкоцитов – наиболее частого источника данных о состоянии TL и показали, что метилирование в два раза точнее предсказывает возраст, чем длина теломерных участков. Также этот показатель гораздо точнее описывает влияние внешних негативных факторов (курение, инфекции и пр.) на скорость старения, чем TL. Более того, в ходе *in vitro* экспериментов на линиях клеток с теломеразной активностью [трансдуцированных лентивирусом с hTERT (обратная трансриптаза теломеразы человека)] они показали, что даже при восстановлении TL ферментом эпигенетический возраст клеток через метилирование продолжает отсчитываться, значения DNAmTL первичных фибробластов человека продолжали уменьшаться даже после того, как они стали иммортализованными. Ещё одной проблемой является использование теломер для оценки старения слабо делящихся или неделящихся клеток, например нейронов взрослого мозга.

Таким образом, несмотря на то что TL в некоторых случаях вполне адекватно позволяет судить о скорости старения организма [3], при оценке эпигенетического возраста более информативными могут быть паттерны метилирования ДНК.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ОНТОГЕНЕЗЕ

Метилирование ДНК с образованием 5-метилцитозина (5mC) является стабильной ковалентной модификацией, которая сохраняется в постмитотических клетках на протяжении всей их жизни, определяя их клеточную идентичность. Тем не менее статус метилирования у каждого из ~1 млрд цитозинов в геноме является динамическим, изменяемым в ходе роста и развития клеток, внешних воздействий и пр. В геноме млекопитающих динамические модификации 5mC преимущественно обнаруживаются в контексте цитозин-фосфат-гуанин-3′динуклеотида

(CpG). Всего в геноме человека насчитывается более 28 млн таких CpG динуклеотидов, и места их скопления формируют так называемые CpG-островки. Другие участки генома, которые также содержат CpG-динуклеотиды (но в меньшем количестве), называются «берега», «шельф» или «открытое море» – в зависимости от удаления от CpG-островка. В большинстве соматических клеток основная часть CpG (более 80%) метилирована, за исключением CpG-островков регуляторных последовательностей, которые в ходе развития могут показывать пониженный уровень метилирования [27]. То есть локальное гипометилирование может служить надежной сигнатурой промоторов и энхансеров, так как уровень метилирования для промоторов обычно не превышает 10%, а для энхансеров – 10–50% [28]. При этом сравнение профилей метилирования разных типов клеток показало, что у большинства нормальных клеток 15–21% CpG различаются по уровню метилирования [29]. CpG группируются в тканеспецифические дифференцированные метилированные области (DMR, Differentiated Metylation Regions), которые преимущественно обнаруживаются во внутригенных областях и в дистальных регуляторных регионах – энхансерах, сайтах связывания транскрипционных факторов (ТФ) [29, 30]. Наблюдения показывают, что большое количество DMR (20 000–100 000 в зависимости от типа ткани) отражает тканевое деметилирование, вызванное специфическим связыванием транскрипционных факторов. Это подтверждается экспериментами на эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) мыши с использованием инсуляторного белка CCCTC-связывающего фактора (CTCF) и транскрипционного репрессора нейрональных генов (REST, RE1-Silencing Transcription factor) [28]. Наличие интактного мотива CTCF является необходимым и достаточным для локального гипометилирования. Удаление REST приводило к увеличению 5mC в слабо метилированных областях, обычно связанных REST. Примечательно, что такое усиление 5mC может быть обращено вспять путем повторного введения REST. Интересно, что во время внутриутробного развития происходит массивное деметилирование 5mC и *de novo* метилирование происходит уже после рождения [31].

Динамическое метилирование ДНК характерно не только для CpG динуклеотидов, но было показано и для других пар динуклеотидов – mCH (метилированный динуклеотид), где H может быть A (аденин), C (цитозин) или T (тимин) [32]. Более того, для некоторых тканей и органов именно mCH является основным метилируемым динуклеотидом, например, в ЭСК и в нейронах [27, 33]. Примечательно, что в эмбриональных клетках и при получении ИПСК наиболее динамично менялось метилирование mCH, тогда как метилирование CpG оставалось практически неизменным [27]. Наличие интрагенного 5mCH (динуклеотид 5-метилцитозин-аденин (А)/тимин (Т)/цитозин (Ц)) положительно коррелирует с экспрессией генов в ЭСК человека, но отрицательно коррелирует с экспрессией генов в мозге [33].

Развитие и созревание мозга – сложноорганизованный процесс, который начинается в эмбриональном периоде и продолжается у людей вплоть до третьего десятилетия жизни [34]. Несмотря на многие исследования, посвященные изучению нейрогенеза и глиогенеза в эмбриональном и взрослом мозге, до сих пор нет полного понимания, какие молекулярные механизмы являются ключевыми в этих процессах. Особенно сложным для изучения оказался раздел эпигенетического контроля развития мозга. Динамические эпигенетические изменения наблюдаются во время развития мозга, созревания и обучения [33]. Исследование Lister et al. [33] показало, что основным динамическим паттерном метилирования в мозге является mCH. Метилирование динуклеотидов CH наиболее существенно происходит в нейронах в раннем детстве и в подростковом возрасте, становясь доминирующей формой метилирования ДНК в зрелых нейронах человека. Это показывает, что период синаптогенеза, в течение которого созревает нейронная цепь, сопровождается параллельным процессом крупномасштабной реконфигурации эпигенома нейрона. При этом имеет место двухфазное изменение паттернов метилирования в онтогенезе: в эмбриональном мозге происходит деметилирование и mCH исчезает по мере созревания нейронов (уровень mCH в генах обратно пропорционален уровню экспрессии контролируемого гена), и уже после рождения обновлённая сигнатура mCH во взрослых нейронах появляется *de novo*. mCH увеличивается наиболее быстро во время первичной фазы синаптогенеза в развивающемся постнатальном мозге, от 2 до 4 недель у мышей и в первые 2 года у людей с последующим более медленным накоплением mCH в позднем подростковом возрасте. Накопление mCH первоначально соответствует увеличению плотности синапсов в средней лобной извилине человека (синаптогенез длится от рождения до 5 лет), но впоследствии оно продолжает увеличиваться в течение периода подростковой синаптической корректировки, который у людей встречается в возрасте 5–16 лет [33]. Также в составе высоко экспрессируемых генов имеется достаточно

большое количество гидроксиметилцитозина (hmC) в контексте CG, который является промежуточным звеном в процессе деметилирования ДНК и наиболее динамичной формой метилированной метки, быстро переходящей при изменении условий как в полностью метилированную, так и полностью деметелированную формы [35]. При этом была показана прямая корреляция содержания hmC у плода и взрослой особи: высокий уровень внутригенного hmC на стадии внутриутробного развития сохранялся и во взрослых клетках [33]. Надо отметить, что hmC может быть достаточно стабильной модификацией, что потенциально указывает на её регуляторную роль. Разнообразие нейрональных и глиальных клеток в лобной коре может говорить об особенностях метилирования ДНК в различных типах клеток. Было показано, что нейроны содержат гораздо больше паттернов mCH по сравнению с глиальными клетками. При этом в глиальных клетках обогащение mCH происходит в генах, которые в нейронах CH гипометилированы, как, например, транскрипционный активатор Mef2c (миоцит-специфический фактор-энхансер 2C), играющий ключевую роль в процессах обучения и памяти, дифференцировке нейронов, синаптической пластичности и пр. [36, 37]. Это согласуется с концепцией о потенциальной роли mCH в репрессии транскрипции нейрональных генов в глиальном геноме [33]. И наоборот, гены, связанные с функцией глии, гиперметилированы в нейронах и гипометилированы в глиальных клетках [33]. Интересно, что ДНК-метилтрансфераза 3a (Dnmt3a), обеспечивающая процесс метилирования цитозина в пятой позиции, во взрослом мозге преимущественно работает с динуклеотидами CH, но не CG, что говорит о различии механизмов контроля этих двух процессов. Метилирование ДНК в промоторных областях и в телах генов участвует в регуляции экспрессии генов. Предполагается, что консервативные, специфичные для типа клеток паттерны метилирования ДНК могут быть связаны со специфическими нейрональными и глиальными клеточными процессами. Исследования показали, что в отличие от глиальных клеток в процессе развития мозга нейроны теряют внутригенное метилирование CG- и CH-пар и приобретают высокий уровень hmCG в нейрональных генах [33]. При этом экспрессия высоко конститутивных генов, не участвующих в нейрогенезе, не подвержена подобной регуляции, так же как и генов с низким уровнем экспрессии [33]. Все это демонстрирует, что динамическое метилирование ДНК в генах тесно связано с дифференциальной транскрипционной активностью в развитии мозга млекопитающих и специализации нервных клеток. Обратная зависимость, наблюдаемая между уровнем генного mCH и транскрипционной активностью, согласуется с концепцией, в которой внутригенное накопление mCH препятствует транскрипционной активности. Альтернативно процесс транскрипции может мешать метилированию mCH *de novo* или вызывать активное деметилирование mCH [27].

Глиальные паттерны mCG и mCH очень похожи на паттерны плода и раннего постнатального мозга [33]. Это указывает на то, что метилирование ДНК на ранних стадиях развития мозга млекопитающих может быть состоянием по умолчанию, которое в значительной степени сохраняется до зрелости в глиальных клетках, тогда как дифференцировка и созревание нейронов включают в себя обширную реконфигурацию ДНК-метилома, связанную со специализацией клеток. Также стоит отметить, что дискретные области, показывающие пониженный или повышенный уровень метилирования CG, связаны со специфическими локальными модификациями хроматина. Так, при гипометилировании наблюдаются модификации гистонов, характерные для активных энхансеров (H3K4me1 (метилирование лизина 4 в гистоне H3) и H3K27ac (ацетилирование лизина 27 в гистоне H3)), и повышенная гиперчувствительность к ДНКазе I (дизоксирибонуклеазе I), и гипометилирование CH [33].

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК: ХРОНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

Метилирование ДНК является динамической модификацией, и во многих сообщениях задокументированы возрастные изменения метилома [3, 7, 38]. Например, метилирование ДНК имеет тенденцию снижаться с возрастом на большей части ДНК, но повышаться на некоторых островках CpG, особенно в отношении генов-мишеней polycomb – белков, способных ремоделировать хроматин, генов-регуляторов транскрипции, развития и клеточной дифференцировки [39]. Основываясь на возрастных изменениях метилирования популяционно стабильных участков ДНК, несколько групп исследователей определили так называемые «часы» метилирования ДНК [18, 40]. Эпигенетические часы – это регрессионная модель, связывающая изменение уровня метилирования определенных CpG нуклеотидов с возрастом. Часы, построенные на метилировании ДНК, в настоящее время лучше оценивают фактический хроноло-

гический возраст, чем транскриптомные и протеомные данные или TL [3].

Первые эпигенетические часы были разработаны Hannum et al. [40] на основе оценки 71 CpG из ДНК мононуклеаров периферической крови. Следующие, более точные во многих аспектах, пан-тканевые эпигенетические часы были созданы Horvath S. [18] на основе оценки метилирования 353 CpG в ДНК, полученной из нескольких нормальных и опухолевых тканей. Комбинированный статус метилирования этих CpG показывает эпигенетический возраст, который коррелирует с хронологическим возрастом. Точность часов измеряется коэффициентом корреляции между фактическим хронологическим возрастом, измеренным возрастом и средней абсолютной разницей между фактическим и измеренным возрастом. Пан-тканевые эпигенетические часы с очень высокой точностью предсказывают хронологический возраст и скорость старения без учета внешних факторов воздействия и, как следует из названия, без особого уточнения по тканям. По определению, хронологические часы измеряют время, прошедшее с рождения. Следовательно, люди, родившиеся в один и тот же день, имеют одинаковый хронологический возраст на протяжении всей жизни независимо от образа жизни и наличия заболеваний и вредных привычек. Напротив, люди с одинаковым хронологическим возрастом могут иметь разный биологический возраст. Хотя биологический возраст и не является четко определенным, он определяет снижение функциональных возможностей тканей, органов и целого организма, связанных с наличием или отсутствием внешних факторов [41]. Несмотря на эти сложности, недавние исследования показали, что разница между кажущимся возрастом метилирования ДНК и истинным хронологическим возрастом отражает биологический возраст, по крайней мере до некоторой степени. Также биологический возраст часто строится с учетом специфики ткани и органа. Например, ткань молочной железы у женщин имеет больший биологический возраст по сравнению с другими тканями организма и другой ритм эпигенетических часов в подростковом периоде под влиянием гормонов [42, 43]. Поэтому для более точного определения биологического возраста клеток и скорости старения («PhenoAge», «GrimAge») большинство современных эпигенетических часов являются либо специализированными по тканям, либо комбинированными с другими показателями, кроме метилирования ДНК [44, 45]. Например, недавно построенные часы метилирования ДНК с предсказанием смертности, названные «GrimAge», включают изменения, связанные с курением, посредством оценки курения по количеству пачек в год. Эти часы также включают определенные уровни белка в плазме, оцененные по метилированию ДНК, и это приводит к еще более точному прогнозу как продолжительности, так и качества жизни [45].

Существует немало исследований, показавших массивные эпигенетические нарушения в процессе развития рака [41], логично предположить, что метилирование ДНК регулирует динамическое равновесие генома и нивелирует повреждения ДНК, неизбежно возникающие в процессе жизни клетки. Возрастные изменения метилирования ДНК также могут быть вторичными по сравнению с другими изменениями в модификаторах хроматина и/или хроматине [46]. Модификации гистонов влияют на метилирование ДНК. Например, метилирование ДНК исключается из генных промоторов с помощью H3K4me3 (гистон H3, триметилирование лизина 4), но рекрутируется на генные тела и гетерохроматин с помощью H3K36me3 (гистон H3, триметилирование лизина 36) и H3K9me3 (гистон H3, триметилирование лизина 9) [47]. И наоборот, гипометилирование ДНК вызывает перераспределение активности белков polycomb и H3K27me3 (гистон H3, триметилирование лизина 27) [48]. С этой точки зрения, часы метилирования ДНК могут быть представлены как «часы эпигенетической сети», а изменения метилирования могут быть вторичными по отношению к другим эпигенетическим или даже связанным метаболическим изменениям [49], которые составляют эту сеть. Также в некоторых случаях биологические часы приравнивают к «эпигенетическому дрейфу», так как они отражают межиндивидуальные вариации дисфункции тканей и риска болезней, то есть отражают эпигенетическое расхождение между людьми на фоне хронологического сходства.

Таким образом, понимание биологических основ метилирования ДНК, его роли в развитии, поддержании функциональной активности, тканевом и клеточном разнообразии эпигенетических модификациях нейронных сетей и в инволюционных процессах, сопровождающих старение, крайне важно для создания адекватных моделей нейродегенеративных заболеваний с учётом состояния эпигенетических часов модельных клеток.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ

Итак, для *in vitro* моделирования нейродегенеративных заболеваний и инволюционных

состояний, связанных со старением, необходим адекватный источник клеток [50]. Не менее актуальной задачей является поиск безопасного и экономически целесообразного источника аутологичных клеток для персонифицированной регенеративной терапии заболеваний и травм нервной системы, сопровождающихся гибелью нейронов и глиальных клеток и необратимым нарушением функции ЦНС [51].

Открытие технологии получения ИПСК около 15 лет назад привело к разработке многочисленных *in vitro* моделей заболеваний и потенциальных методов персонифицированной терапии [52]. Общая стратегия заключалась в том, чтобы перепрограммировать соматические клетки пациента, например фибробласты в ИПСК, а затем дифференцировать их в целевой тип клеток. Постоянно совершенствующиеся протоколы дифференцировки позволяют получить даже самые редкие и малочисленные типы терминально дифференцированных клеток, а в последние годы из ИПСК стали получать органоиды – сложные колонии клеток, отражающие особенности целых тканей и органов [53]. Однако у ИПСК есть существенный минус для моделирования возрастных заболеваний: процесс репрограммирования через стадию плюрипотентности (по сути – ЭСК) обнуляет возраст изначальной линии соматических клеток.

В качестве альтернативы перепрограммированию и дифференцировке ИПСК применяют стратегию так называемого прямого репрограммирования, также известного как трансдифференцировка, при которой сохраняются возрастные паттерны донорских клеток [9]. Транскрипционные факторы, микроРНК и малые молекулы используются, чтобы стимулировать терминально дифференцированные клетки напрямую трансформироваться в другой клеточный тип, минуя стадию плюрипотентности.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЧЕРЕЗ ИПСК И СТАРЕНИЕ НЕЙРОНОВ

Нейроны являются одними из самых долгоживущих клеток в организме, большинство из них генерируется в эмбриональном и раннем постнатальном периоде. Во взрослом мозге процесс нейрогенеза ограничен тремя зонами: субвентрикулярная зона, зубчатая извилина и обонятельные луковицы [54, 55]. Более того, если в эмбриональном мозге процесс нейрогенеза направлен на создание массива новых нейронов, то взрослый нейрогенез играет поддерживающую роль и сосредоточен в основном на генерации глиальных клеток [54]. В процессе жизни нейроны накапливают определенные возрастные изменения, способствующие развитию нейродегенерации, особенно при наличии врожденных генетических предпосылок. Ради восстановления ДНК на транскрипционно активных генах накапливаются некритичные повреждения ДНК и подавляются не жизненно важные транскрипционные пути [12]. Митохондрии с возрастом становятся все более уязвимыми, что приводит к увеличению продукции свободных активных форм кислорода (АФК), которые являются мощным ДНК-повреждающим фактором [14]. Таким образом, репарация ДНК может быть сильно снижена в процессе развития нейродегенерации [55]. Известно, что при боковом амиотрофическом склерозе и лобно-височной деменции мутации в белке FUS (Fused in Sarcoma) приводят к нарушениям целостности ДНК [12]. Интересно, что для нейронов характерен механизм индуцированного запуска транскрипции ранних генов нейронного ответа через двухцепочечные разрывы в целевых промоторах ранних генов [56]. Однако при болезни Альцгеймера этот процесс блокируется внеклеточным амилоидным белком β [56]. Кроме целостности и стабильности ДНК, в нейронах с возрастом изменяется проницаемость ядерных пор [57]. Со временем поры становятся все более проницаемыми, что ослабляет их регуляторную функцию относительно транскрипции и глобальной ядерной организации. Такие изменения не наблюдаются в молодых клетках и не моделируются искусственно, хотя известно, что при боковом амиотрофическом склерозе и лобно-височной деменции белки poly-PR, FUS и TDP-43 (TAR ДНК-связывающий белок 43) могут блокировать ядерные поры [12].

Очевидно, что при столь долгом сроке жизни нейроны должны обладать совершенными механизмами динамического контроля стабильности генома и транскрипционной активности, одним из которых является метилирование ДНК. В предыдущем разделе подробно описано, какие паттерны метилирования характеризуют возрастные изменения. Соотношение паттернов mC и hmC формирует уникальное динамическое равновесие, определяющее возраст клеток и скорость старения. Очевидно, что эти же механизмы оказывают значительное влияние на патогенез нейродегенеративных заболеваний.

Использование ИПСК и усовершенствованных стратегий дифференцировки позволило получить определенные типы нервных клеток, генетически принадлежащие пациентам, включая различные типы нейральных стволовых клеток (НСК), дофаминергические, глутаматергичес-

кие, ГАМКергические нейроны, двигательные нейроны, астроциты, олигодендроциты и многие другие типы клеток для моделирования возрастных заболеваний [58]. Для моделирования ряда заболеваний, в частности наследственных нейродегенераций, возраст моделируемых клеток не имеет значения [59, 60]. Однако в большинстве спорадических и обусловленных старением нейродегенеративных заболеваний эпигенетический возраст может быть одним из ключевых факторов патогенеза.

Технология репрограммирования через плюрипотентную стадию сопряжена с массивной эпигенетической перестройкой, в ходе которой не только меняется фенотип клетки, но и обнуляется возраст до эмбрионального [61, 62]. Olova et al. [63] показали, что даже при частичном непрямом репрограммировании, при котором нет устойчивой плюрипотентной стадии, обнуление возрастных эпигенетических сигнатур происходит в первые 10 дней репрограммирования – в период повышенной активности генов плюрипотентности, ранней экспрессии *NANOG* (ген гомеобоксного белка NANOG), *SALL4* (ген Sal-подобного белка 4), *ZFP42* (ген белка цинкового пальца 42), *TRA-1-60* (ген альфа-локуса рецептора Т-клеток), *UTF1* (ген недифференцированного транскрипционного фактора эмбриональных клеток 1), *DPPA4* (ген фактора развития плюрипотентности 4) и *LEFTY2* (ген фактора определения лево-право 2). Схожие результаты были продемонстрированы в работе Ocampo et al. [64], в которой авторы с помощью циклической индукции OKSM провели неполное репрограммирование клетки. При этом гены, кодирующие эти факторы, активировались на два дня, после чего следовал период покоя продолжительностью пять дней. Затем цикл активации повторялся снова и снова. В результате они показали обнуление эпигенетического возраста до раннего постнатального состояния без полной потери специализации клетки.

Даже использование всего двух трансформирующих факторов из коктейля Яманаки (SOX2 и c-MYC) без постоянной индукции оказалось достаточно, чтобы полученная в результате популяция клеток была по возрастным сигнатурам сходна с аналогичной популяцией, дифференцированной из ЭСК [65]. Такое омоложение ИПСК было также продемонстрировано на уровне изменения теломер [66, 67], изменения работы митохондрий и пр. [68, 69].

Вследствие такого «омоложения» репрограммированных клеток модели нейродегенеративных заболеваний, основанные на ИПСК, нуждаются в дополнительных стрессорах, имитирующих возрастные изменения. Например, в исследованиях с использованием ИПСК-производных дофаминергических нейронов для моделирования болезни Паркинсона последовательно использовались АФК или митохондриальные нейротоксины, такие как H_2O_2, 6-гидроксидофамин (OHDA), валиномицин или CCCP (карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон), для имитации возрастных нейрон-специфических нарушений [12]. Точно так же ингибирование протеасом с использованием таких соединений, как MG132, было необходимо для получения агрегатов белка в ИПСК-производных нейронах в модели болезни Гентингтона [70], а воздействие эксайтотоксического глутамата было необходимо для образования агатин-3 микроагрегатов в ИПСК-производных нейронах в модели болезни Мачадо–Джозефа [71]. Интересно, что генетические нарушения в генах *PS1* (photosystem 1) или *APP* (amyloid precursor protein), приводящие к ранней манифестации болезни Альцгеймера, изменяют транскрипцию амилоидного белка β без дополнительного влияния, но не вызывают гибели клеток, происходящей только после дополнительного эксайтотоксического действия глутамата [72]. Это свидетельствует о том, что при данной патологии аберрантный амилоидный белок уже присутствует в молодых нейронах, но серьезные нарушения в этих нейронах начинаются только в процессе старения клетки [73]. В отдельных исследованиях для моделирования возрастных изменений в ИПСК-производных нейронах использовали гиперэкспрессию белка прогерина, что приводило к индукции ряда маркеров старения, включая формирование фокусов γH2AX (член семейства гистонов H2AX) и H2K9me (метилирование лизина 9 в гистоне H2) [12, 74].

Очевидно, что различные подходы по искусственному «состариванию» ИПСК-производных клеток воспроизводят лишь отдельные феномены старения и не позволяют говорить о решении проблемы обнуления биологического возраста у нейронов, полученных из ИПСК.

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ С СОХРАНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ СИГНАТУР

В аспекте сохранения эпигенетического возраста хорошей альтернативой ИПСК является прямое репрограммирование клетки. Поскольку прямое репрограммирование минует стадию плюрипотентности, эпигенетические паттерны донорских клеток сохраняются и у конечной культуры. Первым исследованием, продемонстрировавшим эффективность такого

подхода, было превращение фибробластов в миобласты путем избыточной экспрессии MYOD1 (белок определения миобластов 1) [75]. В дальнейшем протоколы прямой трансдифференцировки одного типа соматических клеток в другой позволили получить клетки крови, нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты, клетки поджелудочной железы, макрофаги и пр. [76–80]. Репрограммирование мышиных фибробластов в функциональные индуцированные нейроны было впервые достигнуто путем сверхэкспрессии набора пронейральных факторов транскрипции, Bbn2, Ascl1 и Myt1L, также известных как BAM [79]. Через год те же авторы усовершенствовали протокол, добавив к BAM NeuroD1 [81]. С тех пор ученые далеко продвинулись в изучении механизмов, вовлеченных в прямое репрограммирование, и разработали немало протоколов на основе транскрипционных факторов, микроРНК и малых молекул для генерации нейронов, которые по паттерну экспрессии и электрофизиологической активности идентичны нейронам, полученным из ЭСК или ИПСК [51, 82, 83].

Надо понимать, что любое репрограммирование, в том числе прямое, провоцирует массивные эпигенетические изменения, обусловленные взаимодействием ТФ с ДНК. При этом некоторые ТФ взаимодействуют только с открытыми и гипометилированными областями хроматина, некоторые, наоборот, рекрутируются в своих целевых областях только при наличии метильных меток [33]. На основании этого сформировалась система иерархии ТФ по способности взаимодействовать с ДНК [83]. Первичные ТФ способны взаимодействовать с транскрипционно неактивными областями хроматина и рекрутировать туда вторичные ТФ. Было высказано предположение, что первичные ТФ могут вызывать локальное эпигенетическое ремоделирование [83].

В отличие от факторов Яманаки, которые также являются первичными ТФ, факторы прямого репрограммирования связывают конкретные области хроматина, не меняющиеся в процессе репрограммирования. Факторы Яманаки первоначально также связываются с сайтами-мишенями в исходном типе клетки, но в процессе репрограммирования меняют их и в конечном итоге связывают разные сайты в репрограммированных клетках [84, 85]. Одним из примеров данного феномена является Ascl1, чья принудительная экспрессия напрямую превращает фибробласты в постмитотические нейроны и приводит к снижению содержания 5mC в большинстве своих сайтов связывания [83]. Нейрогенин 2 (Ngn2) и NeuroD1 – еще два хорошо изученных пронейральных транскрипционных фактора, которые действуют как первичные ТФ при прямом репрограммировании фибробластов в индуцированные нейроны [86–88]. NeuroD1 связывает неметилированные CpG-богатые области и переводит H3K4me3/H3K27me3 из двухвалентного состояния в моновалентное H3K4me3 во время репрограммирования [87]. Данные о доступности хроматина позволяют предположить, что Brn2, Zfp238 (белок цинкового пальца 238), Sox8 (SRY-Box Transcription Factor 8) и Dlx3 (дистальный гомеобокс 3) являются одними из наиболее важных эндогенных вторичных ТФ, задействованных в пронейрональном репрограммировании [83, 89].

Интересно, что вторичные ТФ Prdm8 (PR/SET домен 8), Bhlhe22 (базовый член семейства Helix-Loop-Helix E22) и Brn2, которые являются прямыми генами-мишенями NeuroD1 в микроглии, могут также способствовать превращению микроглии в нейроны путем индукции экспрессии генов нейронов (*Brn2*) или репрессии генов микроглии (*Bhlhe22*, *Prdm8*) [87]. Несколько исследовательских групп использовали стратегию двойного первичного ТФ (Ascl1 и Ngn2), которая обеспечивает высокую эффективность репрограммирования даже старых фибробластов человека [90, 91]. Однако не все первичные ТФ одинаково хорошо взаимодействуют с хроматином разных типов клеток. Например, Ascl1 способен индуцировать превращение фибробластов, но не кератиноцитов в индуцированные нейроны. Это объясняется тем фактом, что первичные ТФ требуют более специфической эпигенетической сигнатуры для связывания с закрытым хроматином и существовавшими ранее модификациями гистонов, такими как трехвалентное состояние хроматина H3K4me1/H3K27ac/H3K9me3 в фибробластах, что является одной из причин, по которым Ascl1 индуцируют прямое преобразование только в фибробластах [83].

Теоретически иерархическую роль первичных ТФ могут сыграть малые молекулы, повышающие доступность ДНК трансформируемых клеток (VPA (вальпроевая кислота), RG108) [92], но на практике становится очевидно, что малые молекулы работают неадресно, так что с равной вероятностью могут повысить доступность областей как нейральных генов, так и любых других [93]. Интересно отметить, что были обнаружены различия в выборе ТФ между видами, так, например, NeuroD1 и Ngn2 использовались преимущественно в протоколах репрограммирования клеток человека, но не в протоколах для мышиных клеток [79, 81]. Однако,

учитывая небольшое количество ТФ, исследованных с этой точки зрения, неизвестно, действительно ли способность к ремоделированию 5mC ограничена первичными ТФ. Кроме того, механизм ТФ-индуцированной локальной потери 5mC не понятен. Возможно, ТФ могут напрямую задействовать механизм деметилирования цитозина, опосредованный Ten Eleven Translocation метилцитозиндиоксигеназой (TET), или в качестве альтернативы активируют промежуточные этапы ремоделирования хроматина или модификации гистонов [94].

В исследовании Luo et al. [95] авторы попытались показать, какие эпигенетические изменения определяют процесс прямого репрограммирования фибробластов мыши в нейроны. Анализируя репрограммирование ТФ Brn2, Ascl1 и Myt1L вместе и по отдельности, они показали, что Ascl1 или BAM индуцировали значительное глобальное накопление метилирования mCH, которое отсутствовало у фибробластов и на промежуточных стадиях репрограммирования. Причем, видимо, основную роль в накоплении метилирования mCH играл именно ТФ Ascl1, однако остальные два фактора (Brn2 и Myt1L) формировали сигнатуры метилирования зрелых нейронов. При этом Ascl1 также вызывал локальное деметилирование CG в своих сайтах связывания. Сравнив паттерны метилирования в зрелых нейронах коры мыши с паттернами в репрограммированных клетках, они показали, что mCH и там сильно обогащены в контексте mCAC, что показывает формирование возрастных сигнатур метилирования у полученных нейронов по сравнению с изначальными эмбриональными фибробластами. Также они показали, что раннее накопление mCH коррелирует с генами, демонстрирующими динамическую экспрессию во время перепрограммирования, и подтвердили, что высоко экспрессируемые гены накапливают меньше mCH, чем низко экспрессируемые гены, снижающие свою активность в процессе репрограммирования, например гены фибробластов. При этом в процессе развития нативного мозга мыши активация генов с положительной регуляцией развития связана с накоплением hmCG, что может косвенно задействовать DNMT3A и TET для производства hmCG [33].

Прямое превращение из фибробластов в нейроны связано с выраженным промоторным гиперметилированием, которое является уникальным для индуцированных нейронов и дифференцированных из нейральных прогениторных клеток, но не наблюдается во время дифференцировки нейронов *in vivo* [95]. Авторы показали, что индуцированные нейроны проявляют как согласованные (например, mCH), так и различные (например, метилирование промоторов) эпигеномные изменения по сравнению со зрелыми корковыми нейронами. Таким образом, метилирование *de novo* необходимо для прямого репрограммирования. Сохранение возрастной потери нуклеоцитоплазматической компартментализации (NCC) в индуцированных нейронах показали Mertens et al. [96] при прямом репрограммировании фибробластов человека с помощью ТФ Ngn2 и Ascl1, а также малых молекул-ингибиторов передачи сигналов TGFβ /SMAD [аббревиатура состоит из гомологий генов семейства Caenorhabditis elegans SMA («small» worm phenotype) and Drosophila MAD («Mothers Against Decapentaplegic»)], GSK3β (киназа гликоген-синтазы 3 бета) и энхансеров внутриклеточного циклического АМФ.

Кроме ТФ, в прямом репрограммировании используют микроРНК, shRNA (короткая/малая шпилечная РНК) и малые молекулы. Самым успешным, на данный момент, протоколом с РНК можно считать протокол Yoo et al. [97], основанный на трансдукции вектора с микроРНК-9/9* и микроРНК-124. Синергическое воздействие этих микроРНК позволило получить функциональные индуцированные нейроны из фибробластов взрослого человека. При этом исследование Huh et al. [98] показало, что прямое репрограммирование с помощью микроРНК-9/9* и микроРНК-124 никак не меняет возрастные сигнатуры метилирования ДНК. Авторы проверили возможность получения функциональных индуцированных нейронов из фибробластов доноров разного возраста: от 3 дней до 96 лет. На основании эпигенетических часов Horvath они показали, что фактический хронологический возраст доноров сильно коррелировал с предполагаемым возрастом ДНК фибробластов (корреляция = 0,75) и репрограммированных нейронов (корреляция = 0,82). Более того, при сравнении паттернов метилирования ДНК каждого перепрограммированного нейрона с паттернов метилирования ДНК соответствующего фибробласта наблюдалась почти идеальная корреляция (R = 0,91), что свидетельствует о том, что эпигенетические часы не нарушаются во время прямого репрограммирования нейронов на основе микроРНК. Помимо паттернов метилирования, авторы показали, что при прямом репрограммировании сохраняются и все остальные клеточные маркеры старения, такие как повышенный уровень АФК, повреждения ДНК и уменьшающаяся TL. Примечательно, что специфические паттерны метилирования нейронов являются дополнительным фактором идентификации нейронного подтипа.

Более того, эти паттерны способны дать информацию о функциональности полученных нейронов [99, 100].

Таким образом, прямое репрограммирование, сохраняющее эпигенетический статус первичных клеток, гораздо предпочтительнее для моделирования возрастных нейродегенеративных заболеваний.

НЕДОСТАТКИ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ С СОХРАНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Из всего описанного выше выбор прямо репрограммированных клеток для создания моделей нейродегенерации кажется очевидным. Однако есть и минусы в этой методике. Во-первых, протоколы дифференцировки из ИПСК более воспроизводимы [92]. Во-вторых, требования к источникам первичных клеток для прямого репрограммирования более высоки, поскольку не все соматические клетки подходят для успешного нейронального репрограммирования. Проще всего прямое репрограммирование проходит с глиальными клетками, которые довольно сложно получить у взрослого человека. ИПСК возможно получить из любого первичного типа клеток, а из них соответственно – любой конечный тип. В-третьих, недостатком первично репрограммированных клеток является ограниченное количество пассажей. С одной стороны, процесс получения ИПСК и из них – конечного типа клеток дорог и продолжителен. Время генерации стабильных ИПСК-клонов составляет 2–3 месяца, а дальнейшая дифференцировка – 6–15 недель [101]. При прямом репрограммировании желаемую культуру можно получить уже через 2–4 недели, а полностью функциональную нейронную сеть, еще через 5–6 недель, что значительно быстрее, чем при работе с ИПСК [96]. Однако, несмотря на это, стабильные клоны ИПСК пассируются практически без ограничений, так что однажды выведенные, они могут быть использованы множество раз для самых разных задач. Прямо репрограммированные клетки без дополнительных модификаций будут ограничены пределом Хейфлика для своей первоначальной культуры клеток. Тем не менее если стоит задача получения аутологичной культуры клеток для персонализированной терапии или персонализированного моделирования возрастного заболевания, то неограниченность пассажей ИПСК значения не имеет. Предел Хейфлика в прямо репрограммированных клетках для задач *in vitro* можно преодолеть искусственно с помощью вставки экзогенной теломеразы (hTERT), которая не повлияет на эпигенетические паттерны возраста, хотя и таит в себе опасность появления генетических артефактов.

Нельзя не отметить, что в случае изучения врожденных нейродегенеративных заболеваний, ИПСК могут быть не менее или даже более полезны, чем прямо репрограммированные клетки. Ведь они могут смоделировать особенности развития болезни на ранних этапах жизни. А комбинирование обеих методик даст уникальную картину эпигенетического развития болезни в процессе жизни пациента [11]. Например, при исследовании наследственной болезни Гентингтона такой подход позволил показать, что мутантный белок хантингтин самопроизвольно агрегируется в возрастных индуцированных нейронах, но не в молодых нейронах, полученных из ИПСК того же донора [102]. Также использование ИПСК является более предпочтительным для моделирования болезней раннего развития, например заболеваний аутистического спектра. Так, Schafer et al. [103] сравнили дифференцированные нейроны, полученные из ИПСК и напрямую, и только первые показали измененный болезнью фенотип. В противоположность наиболее широко распространенному предположению, что первые патологические фенотипические изменения появляются в незрелых нейронах, они обнаружили гетерохронные изменения генной сети уже на стадии нервных стволовых клеток. Также прямо репрограммированные клетки – культура крайне гетерогенная как по генетическим и фенотипическим показателям, так и по эпигенетическим. И это может быть как преимуществом при моделировании сложного заболевания, где клеточный мозаицизм может играть решающую роль, так и недостатком, например при создании изогенной контрольной линии клеток.

Таким образом, решение при выборе той или иной методики сильно зависит от условий, задачи и желаемого результата. Но, в целом, есть смысл комбинировать их для решения сложных задач.

Прямое репрограммирование является и альтернативой, и ценным дополнением к методике ИПСК для изучения основ клеточной идентичности и функциональности, исследования развития и старения человека и моделирования неврологических заболеваний, а также в качестве новой стратегии для *in vivo* заместительной терапии. В отличие от репрограммирования через стадию плюрипотентности, индуцированные нейроны сохраняют эпигенетический возраст (профиль метилирования ДНК,

размер теломерных концов) первоначальной культуры. Это позволяет создавать более адекватные модели возрастных нейродегенеративных заболеваний, а также изучать влияния старения на развитие других врожденных и приобретенных заболеваний. Основным недостатком прямого репрограммирования является то, что получаемые клетки имеют ограниченные возможности по количеству пассажей, так же как первичные клетки. Оптимизация технологии получения аутологичных клеток пациентов с использованием альтернативных методов прямого и непрямого репрограммирования будет способствовать дальнейшему развитию направлений регенеративной и персонифицированной медицины.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-115-50396).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dong, X., Milholland, B., and Vijg, J. (2016) Evidence for a limit to human lifespan, *Nature*, **538**, 257-259, doi: 10.1038/nature19793.
2. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**,1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
3. 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., and Horvath, S. (2018) An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan, *Aging (Albany NY)*, **10**, 573-591, doi: 10.18632/aging.101414.
4. Levine, M. E., Hosgood, H. D., Chen, B., Absher, D., Assimes, T., and Horvath, S. (2015) DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative, *Aging (Albany NY)*, **7**, 690-700, doi: 10.18632/aging.100809.
5. Horvath, S., and Levine, A. J. (2015) HIV-1 infection iccelerates ige iccording to the epigenetic clock, *J. Infect. Dis.*, **212**, 1563-1573, doi: 10.1093/infdis/jiv277.
6. Jylhävä, J., Pedersen, N. L., and Hägg, S. (2017) Biological age predictors, *EBioMedicine*, **21**, 29-36, doi: 10.1016/ j.ebiom.2017.03.046.
7. Gladyshev, T. V., and Gladyshev, V. N. (2016) A disease or not a disease? Aging as a pathology, *Trends Mol. Med.*, **22**, 995-996, doi: 10.1016/j.molmed.2016.09.009.
8. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861-72, doi: 10.1016/ j.cell.2007.11.019.
9. Mertens, J., Marchetto, M. C., Bardy, C., and Gage, F. H. (2016) Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 424-37, doi: 10.1038/nrn.2016.46.
10. Böhnke, L., Traxler, L., Herdy, J. R., and Mertens, J. (2018) Human neurons to model aging: a dish best served old, *Drug Discov. Today Dis. Models*, **27**, 43-49, doi: 10.1016/j.ddmod.2019.01.001.
11. Traxler, L., Edenhofer, F., and Mertens, J. (2019) Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons, *FEBS Lett.*, **593**, 3316-3337, doi: 10.1002/1873-3468.13678.
12. Mertens, J., Reid, D., Lau, S., Kim, Y., and Gage, F. H. (2018) Aging in a dish: iPSC-derived and directly induced neurons for studying brain aging and age-related neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 271-293, doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031534.
13. Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **37**, 614-636, doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
14. Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Chua, K. F., Mattson, M. P., Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (2016) Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 308-321, doi: 10.1038/nrm.2016.14.
15. Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P., and Leeuwenburgh, C. (2009) Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases, *Ageing Res. Rev.*, **8**, 18-30, doi: 10.1016/j.arr.2008.07.002.
16. Khan, S. S., Singer, B. D., and Vaughan, D. E. (2017) Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans, *Aging cell*, **16**, 624-633, doi: 10.1111/acel.12601.
17. Malaquin, N., Martinez, A., and Rodier, F. (2016) Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype, *Exp. Gerontol.*, **82**, 39-49, doi: 10.1016/j.exger.2016.05.010.
18. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, R115, doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
19. Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., Christensen, B. C., Gladyshev, V. N., Heijmans, B. T., Horvath, S., Ideker, T., Issa, J. J., Kelsey, K. T., Marioni, R. E., Reik, W., Relton, C. L., Schalkwyk, L. C., Teschendorff, A. E., Wagner, W., Zhang, K., and Rakyan, V. K. (2019) DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations, *Genome Biol.*, **20**, 249, doi: 10.1186/s13059-019-1824-y.
20. Johnson, T. E. (2006) Recent results: biomarkers of aging, *Exp. Gerontol.*, **41**, 1243-1246, doi: 10.1016/j.exger.2006.09.006.
21. Butler, R. N., Sprott, R., Warner, H., Bland, J., Feuers, R., Forster, M., Fillit, H., Harman, S. M., Hewitt, M., Hyman, M., Johnson, K., Kligman, E., McClearn, G., Nelson, J., Richardson, A., Sonntag, W., Weindruch, R., and Wolf, N. (2004) Biomarkers of aging: from primitive organisms to humans, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, B560-B567, doi: 10.1093/gerona/59.6.b560.
22. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
23. Palm, W., and de Lange, T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu. Rev. Genet.*, **42**, 301-334, doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.

24. Von Zglinicki, T., and Martin-Ruiz, C. M. (2005) Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases, *Curr. Mol. Med.*, **5**, 197-203, doi: 10.2174/1566524053586545.
25. Mather, K. A., Jorm, A. F., Parslow, R. A., and Christensen, H. (2011) Is telomere length a biomarker of aging? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 202-213, doi: 10.1093/gerona/glq180.
26. Lu, A. T., Seeboth, A., Tsai, P. C., Sun, D., Quach, A., et al. (2019) DNA methylation-based estimator of telomere length, *Aging (Albany NY)*, **11**, 5895-5923, doi: 10.18632/aging.102173.
27. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippin, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., and Ecker, J. R. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature*, **462**, 315-322, doi: 10.1038/nature08514.
28. Stadler, M. B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E. J., Gaidatzis, D., Tiwari, V. K., and Schübeler, D. (2011) DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions, *Nature*, **480**, 490-495, doi: 10.1038/nature10716.
29. Schultz, M. D., He, Y., Whitaker, J. W., Hariharan, M., Mukamel, E. A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J. R., Urich, M. A., Chen, H., Lin, S., Lin, Y., Jung, I., Schmitt, A. D., Selvaraj, S., Ren, B., Sejnowski, T. J., Wang, W., and Ecker, J. R. (2015) Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation, *Nature*, **523**, 212-216, doi: 10.1038/nature14465.
30. Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., and Young, R. A. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes, *Cell*, **153**, 307-319, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.035.
31. He, Y., Hariharan, M., Gorkin, D. U., Dickel, D. E., Luo, C., Castanon, R. G., Nery, J. R., Lee, A. Y., Williams, B. A., Trout, D., Amrhein, H., Fang, R., Chen, H., Li, B., Visel, A., Pennacchio, L. A., Ren, B., and Ecker, J. R. (2017) Spatiotemporal DNA methylome dynamics of the developing mammalian fetus, *bioRxiv*, doi: 10.1101/166744.
32. Woodcock, D. M., Crowther, P. J., and Diver, W. P. (1987) The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 888-894, doi: 10.1016/0006-291x(87)91048-5.
33. Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghighi, F. G., Sejnowski, T. J., Behrens, M. M., and Ecker, J. R. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development, *Science*, **341**, 1237905, doi: 10.1126/science.1237905.
34. Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D. O., and Gibb, R. (2012) Experience and the developing prefrontal cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109 Suppl. 2**, 17186-17193, doi: 10.1073/pnas.1121251109.
35. Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2012) MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system, *Cell*, **151**, 1417-1430, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.022.
36. Li, H., Radford, J. C., Ragusa, M. J., Shea, K. L., McKercher, S. R., Zaremba, J. D., Soussou, W., Nie, Z., Kang, Y. J., Nakanishi, N., Okamoto, S., Roberts, A. J., Schwarz, J. J., and Lipton, S. A. (2008) Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9397-9402, doi: 10.1073/pnas.0802876105.
37. Akhtar, M. W., Kim, M. S., Adachi, M., Morris, M. J., Qi, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., Kavalali, E. T., and Monteggia, L. M. (2012) *In vivo* analysis of MEF2 transcription factors in synapse regulation and neuronal survival, *PLoS One*, **7**, e34863, doi: 10.1371/journal.pone.0034863.
38. Fraga, M. F., and Esteller, M. (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks, *Trends Genet.*, **23**, 413-418, doi: 10.1016/j.tig.2007.05.008.
39. Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., Shen, H., Campan, M., Noushmehr, H., Bell, C. G., Maxwell, A. P., Savage, D. A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Kocjan, G., Gayther, S. A., Jones, A., Beck, S., Wagner, W., Laird, P. W., Jacobs, I. J., and Widschwendter, M. (2010) Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer, *Genome Res.*, **20**, 440-446, doi: 10.1101/gr.103606.109.
40. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sadda, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., and Zhang, K. (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates, *Mol. Cell*, **49**, 359-367, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016.
41. Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., and Adams, P. D. (2018) DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences, *Mol. Cell*, **71**, 882-895, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.008.
42. Sehl, M. E., Henry, J. E., Storniolo, A. M., Ganz, P. A., and Horvath, S. (2017) DNA methylation age is elevated in breast tissue of healthy women, *Breast Cancer Res. Treat.*, **164**, 209-219, doi: 10.1007/s10549-017-4218-4.
43. Binder, A. M., Corvalan, C., Mericq, V., Pereira, A., Santos, J. L., Horvath, S., Shepherd, J., and Michels, K. B. (2018) Faster ticking rate of the epigenetic clock is associated with faster pubertal development in girls, *Epigenetics*, **13**, 85-94, doi: 10.1080/15592294.2017.1414127.
44. Horvath, S., and Raj, K. (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 371-384, doi: 10.1038/s41576-018-0004-3.
45. 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., and Horvath, S. (2019) DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan, *Aging (Albany NY)*, **11**, 303-327, doi: 10.18632/aging.101684.
46. Booth, L. N., and Brunet, A. (2016) The aging epigenome, *Mol. Cell*, **62**, 728-744, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.013.
47. Rose, N. R., and Klose, R. J. (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 1362-1372, doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.02.007.
48. 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., Ramsahoye, B. H., Whitelaw, E., Greally, J. M., Adams, I. R., Bickmore, W. A., and Meehan, R. R. (2013) Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in derepression of Polycomb target genes, *Genome Biol.*, **14**, R25, doi: 10.1186/gb-2013-14-3-r25.
49. Berger, S. L., and Sassone-Corsi, P. (2016) Metabolic signaling to chromatin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a019463, doi: 10.1101/cshperspect.a019463.
50. Niccoli, T., and Partridge, L. (2012) Ageing as a risk factor for disease, *Curr. Biol.*, **22**, R741-52, doi: 10.1016/j.cub.2012.07.024.

51. Ahlfors, J. E., Azimi, A., El-Ayoubi, R., Velumian, A., Vonderwalde, I., Boscher, C., Mihai, O., Mani, S., Samoilova, M., Khazaei, M., Fehlings, M. G., and Morshead, C. M. (2019) Examining the fundamental biology of a novel population of directly reprogrammed human neural precursor cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 166, doi: 10.1186/s13287-019-1255-4.
52. Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., and Mummery, C. L. (2012) Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 713-726, doi: 10.1038/nrm3448.
53. Lancaster, M. A., and Knoblich, J. A. (2014) Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies, *Science*, **345**, 1247125, doi: 10.1126/science.1247125.
54. Götz, M., Nakafuku, M., and Petrik, D. (2016) Neurogenesis in the developing and adult brain – similarities and key differences, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a018853, doi: 10.1101/cshperspect.a018853.
55. Scheffler, B., Walton, N. M., Lin, D. D., Goetz, A. K., Enikolopov, G., Roper, S. N., and Steindler, D. A. (2005) Phenotypic and functional characterization of adult brain neuropoiesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9353-9358, doi: 10.1073/pnas.0503965102.
56. Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C., Stott, R. T., Gjoneska, E., Nott, A., Cho, S., Kellis, M., and Tsai, L. H. (2015) Activity-induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes, *Cell*, **161**, 1592-1605, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.032.
57. D'Angelo, M. A., Raices, M., Panowski, S. H., and Hetzer, M. W. (2009) Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells, *Cell*, **13**, 284-295, doi: 10.1016/j.cell.2008.11.037.
58. Marchetto, M. C., Brennand, K. J., Boyer, L. F., and Gage, F. H. (2011) Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, R109-R115, doi: 10.1093/hmg/ddr336.
59. Lafaille, F. G., Pessach, I. M., Zhang, S. Y., Ciancanelli, M. J., Herman, M., Abhyankar, A., Ying, S. W., Keros, S., Goldstein, P. A., Mostoslavsky, G., Ordovas-Montanes, J., Jouanguy, E., Plancoulaine, S., Tu, E., Elkabetz, Y., Al-Muhsen, S., Tardieu, M., Schlaeger, T. M., Daley, G. Q., Abel, L., Casanova, J. L., Studer, L., and Notarangelo, L. D. (2012) Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells, *Nature*, **491**, 769-773, doi: 10.1038/nature11583.
60. Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., and Studer, L. (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs, *Nature*, **461**, 402-406, doi: 10.1038/nature08320.
61. De Boni, L., Gasparoni, G., Haubenreich, C., Tierling, S., Schmitt, I., Peitz, M., Koch, P., Walter, J., Wüllner, U., and Brüstle, O. (2018) DNA methylation alterations in iPSC- and hESC-derived neurons: potential implications for neurological disease modeling, *Clin. Epigenetics*, **10**, 13, doi: 10.1186/s13148-018-0440-0.
62. Rando, T. A., and Chang, H. Y. (2012) Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock, *Cell*, **148**, 46-57, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.003.
63. Olova, N., Simpson, D. J., Marioni, R. E., and Chandra, T. (2019) Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity, *Aging Cell*, **18**, e12877, doi: 10.1111/acel.12877.
64. Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J. L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nuñez, G., Delicado, E. N., Campistol, J. M., Guillen, I., and Belmonte, J. C. I. (2016) *In vivo* amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming, *Cell*, **167**, 1719-1733.e12, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.052.
65. Sheng, C., Jungverdorben, J., Wiethoff, H., Lin, Q., Flitsch, L. J., Eckert, D., Hebisch, M., Fischer, J., Kesavan, J., Weykopf, B., Schneider, L., Holtkamp, D., Beck, H., Till, A., Wüllner, U., Ziller, M. J., Wagner, W., Peitz, M., and Brüstle, O. (2018) A stably self-renewing adult blood-derived induced neural stem cell exhibiting patternability and epigenetic rejuvenation, *Nat. Commun.*, **9**, 4047, doi: 10.1038/s41467-018-06398-5.
66. Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M. A. (2009) Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **4**, 141-154, doi: 10.1016/j.stem.2008.12.010.
67. Suhr, S. T., Chang, E. A., Rodriguez, R. M., Wang, K., Ross, P. J., Beyhan, Z., Murthy, S., and Cibelli, J. B. (2009) Telomere dynamics in human cells reprogrammed to pluripotency, *PLoS One*, **4**, e8124, doi: 10.1371/journal.pone.0008124.
68. Suhr, S. T., Chang, E. A., Tjong, J., Alcasid, N., Perkins, G. A., Goissis, M. D., Ellisman, M. H., Perez, G. I., and Cibelli, J. B. (2010) Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency, *PLoS One*, **5**, e14095, doi: 10.1371/journal.pone.0014095.
69. Prigione, A., Hossini, A. M., Lichtner, B., Serin, A., Fauler, B., Megges, M., Lurz, R., Lehrach, H., Makrantonaki, E., Zouboulis, C. C., and Adjaye, J. (2011) Mitochondrial-associated cell death mechanisms are reset to an embryonic-like state in aged donor-derived iPS cells harboring chromosomal aberrations, *PLoS One*, **6**, e27352, doi: 10.1371/journal.pone.0027352.
70. Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., Chestkov, I. V., Semashko, T. A., Kiseleva, E., Suldina, L. A., Bobrovsky, P. A., Zimina, O. A., Ryazantseva, M. A., Skopin, A. Y., Illarioshkin, S. N., Kaznacheyeva, E. V., Lagarkova, M. A., and Kiselev, S. L. (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Mol. Neurodegener.*, **11**, 27, doi: 10.1186/s13024-016-0092-5.
71. Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T., Hoffmann, P., Klockgether, T., Evert, B. O., Wüllner, U., and Brüstle, O. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado–Joseph disease, *Nature*, **480**, 543-546, doi: 10.1038/nature10671.
72. Duan, L., Bhattacharyya, B. J., Belmadani, A., Pan, L., Miller, R. J., and Kessler, J. A. (2014) Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death, *Mol. Neurodegener.*, **9**, 3, doi: 10.1186/1750-1326-9-3.
73. Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., and Suzuki, N. (2011) Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4530-4539, doi: 10.1093/hmg/ddr394.
74. Miller, J. D., Ganat, Y. M., Kishinevsky, S., Bowman, R. L., Liu, B., Tu, E. Y., Mandal, P. K., Vera, E., Shim, J. W., Kriks, S., Taldone, T., Fusaki, N., Tomishima, M. J., Krainc, D., Milner, T. A., Rossi, D. J., and Studer, L. (2013) Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging, *Cell Stem Cell*, **13**, 691-705, doi: 10.1016/j.stem.2013.11.006.

75. Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts, *Cell*, **51**, 987-1000, doi: 10.1016/0092-8674(87)90585-x.
76. Huang, P., Zhang, L., Gao, Y., He, Z., Yao, D., Wu, Z., Cen, J., Chen, X., Liu, C., Hu, Y., Lai, D., Hu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Cheng, X., Ma, X., Pan, G., Wang, X., and Hui, L. (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes, *Cell Stem Cell*, **14**, 370-384, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.003.
77. Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., and Srivastava, D. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors, *Cell*, **142**, 375-386, doi: 10.1016/j.cell.2010.07.002.
78. Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006) Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors, *Immunity*, **25**, 731-744, doi: 10.1016/j.immuni.2006.09.011.
79. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors, *Nature*, **463**, 1035-1041, doi: 10.1038/nature08797.
80. Zhu, S., Russ, H. A., Wang, X., Zhang, M., Ma, T., Xu, T., Tang, S., Hebrok, M., and Ding, S. (2016) Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts, *Nat. Commun.*, **7**, 10080, doi: 10.1038/ncomms10080.
81. Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhofm, T. C., and Wernig, M. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors, *Nature*, **476**, 220-223, doi: 10.1038/nature10202.
82. Mollinari, C., Zhao, J., Lupacchini, L., Garaci, E., Merlo, D., and Pei, G. (2018) Transdifferentiation: a new promise for neurodegenerative diseases, *Cell Death Dis.*, **9**, 830, doi: 10.1038/s41419-018-0891-4.
83. Wapinski, O. L., Vierbuchen, T., Qu, K., Lee, Q. Y., Chanda, S., Fuentes, D. R., Giresi, P. G., Ng, Y. H., Marro, S., Neff, N. F., Drechsel, D., Martynoga, B., Castro, D. S., Webb, A. E., Südhof, T. C., Brunet, A., Guillemot, F., Chang, H. Y., and Wernig, M. (2013) Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons, *Cell*, **155**, 621-635, doi: 10.1016/j.cell.2013.09.028.
84. Chronis, C., Fiziev, P., Papp, B., Butz, S., Bonora, G., Sabri, S., Ernst, J., and Plath, K. (2017) Cooperative binding of transcription factors orchestrates reprogramming, *Cell*, **168**, 442-459.e20, doi: 10.1016/j.cell.2016.12.016.
85. Fu, K., Chronis, C., Soufi, A., Bonora, G., Edwards, M., Smale, S. T., Zaret, K. S., Plath, K., and Pellegrini, M. (2018) Comparison of reprogramming factor targets reveals both species-specific and conserved mechanisms in early iPSC reprogramming, *BMC Genomics*, **19**, 956, doi: 10.1186/s12864-018-5326-1.
86. Liu, M. L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J. C., Gibson, J. R., Huber, K. M., and Zhang, C. L. (2013) Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons, *Nat. Commun.*, **4**, 2183, doi: 10.1038/ncomms3183.
87. Matsuda, T., Irie, T., Katsurabayashi, S., Hayashi, Y., Nagai, T., Hamazaki, N., Adefuin, A. M. D., Miura, F., Ito, T., Kimura, H., Shirahige, K., Takeda, T., Iwasaki, K., Imamura, T., and Nakashima, K. (2019) Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia–neuron conversion, *Neuron*, **101**, 472-485.e7, doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.010.
88. Iwafuchi-Doi, M., and Zaret, K. S. (2014) Pioneer transcription factors in cell reprogramming, *Genes Dev.*, **28**, 2679-2692, doi: 10.1101/gad.253443.114.
89. Wapinski, O. L., Lee, Q. Y., Chen, A. C., Li, R., Corces, M. R., Ang, C. E., Treutlein, B., Xiang, C., Baubet, V., Suchy, F. P., Sankar, V., Sim, S., Quake, S. R., Dahmane, N., Wernig, M., and Chang, H. Y. (2017) Rapid chromatin switch in the direct reprogramming of fibroblasts to neurons, *Cell Rep.*, **20**, 3236-3247, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.011.
90. Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F.-J., Koch, P., and Brüstle, O. (2012) Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts, *Nat. Methods*, **9**, 575-78, doi: 10.1038/nmeth.1972.
91. Zhao, J., He, H., Zhou, K., Ren, Y., Shi, Z., Wu, Z., Wang, Y., Lu, Y., and Jiao, J. (2012) Neuronal transcription factors induce conversion of human glioma cells to neurons and inhibit tumorigenesis, *PLoS One*, **7**, e41506, doi: 10.1371/journal.pone.0041506.
92. Samoilova, E. M., Kalsin, V. A., Kushnir, N. M., Chistyakov, D. A., Troitskiy, A. V., and Baklaushev, V. P. (2018) Adult neural stem cells: basic research and production strategies for neurorestorative therapy, *Stem Cells Int.*, **2018**, 4835491, doi: 10.1155/2018/4835491.
93. Samoilova, E. M., Revkova, V. A., Brovkina, O. I., Kalsin, V. A., Melnikov, P. A., Konoplyannikov, M. A., Galimov, K. R., Nikitin, A. G., Troitskiy, A. V., and Baklaushev, V. P. (2019) Chemical reprogramming of somatic cells in neural direction: myth or reality? *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 546-555, doi: 10.1007/s10517-019-04570-5.
94. Wu, H., and Zhang, Y. (2014) Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions, *Cell*, **156**, 45-68, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.019.
95. Luo, C., Lee, Q. Y., Wapinski, O., Castanon, R., Nery, J. R., Mall, M., Kareta, M. S., Cullen, S. M., Goodell, M. A., Chang, H. Y., Wernig, M., and Ecker, J. R. (2019) Global DNA methylation remodeling during direct reprogramming of fibroblasts to neurons, *eLife*, **8**, e40197, doi: 10.7554/eLife.40197.
96. Mertens, J., Paquola, A., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J. R., Gonçalves, J. T., Toda, T., Kim, Y., Winkler, J., Yao, J., Hetzer, M. W., and Gage, F. H. (2015) Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects, *Cell Stem Cell*, **17**, 705-718, doi: 10.1016/j.stem.2015.09.001.
97. Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R. E., Tsien, R. W., and Crabtree, G. R. (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons, *Nature*, **476**, 228-231, doi: 10.1038/nature10323.
98. Huh, C. J., Zhang, B., Victor, M. B., Dahiya, S., Batista, L. F., Horvath, S., and Yoo, A. S. (2016) Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts, *eLife*, ***5***, e18648, doi: 10.7554/eLife.18648.
99. Stroud, H., Su, S. C., Hrvatin, S., Greben, A. W., Renthal, W., Boxer, L. D., Nagy, M. A., Hochbaum, D. R., Kinde, B., Gabel, H. W., and Greenberg, M. E. (2017) Early-life gene expression in neurons modulates lasting epigenetic states, *Cell*, **171**, 1151-1164.e16, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.047.
100. Iwamoto, K., Bundo, M., Ueda, J., Oldham, M. C., Ukai, W., Hashimoto, E., Saito, T., Geschwind, D. H., and Kato, T. (2011) Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons, *Genome Res.*, **21**, 688-696, doi: 10.1101/gr.112755.110.

101. Nicholas, C. R., Chen, J., Tang, Y., Southwell, D. G., Chalmers, N., Vogt, D., Arnold, C. M., Chen, Y. J., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Sasai, Y., Alvarez-Buylla, A., Rubenstein, J. L., and Kriegstein, A. R. (2013) Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development, *Cell Stem Cell*, **12**, 573-586, doi: 10.1016/j.stem.2013.04.005.
102. Victor, M. B., Richner, M., Olsen, H. E., Lee, S. W., Monteys, A. M., Ma, C., Huh, C. J., Zhang, B., Davidson, B. L., Yang, X. W., and Yoo, A. S. (2018) Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes, *Nat. Neurosci.*, **21**, 341-352, doi: 10.1038/s41593-018-0075-7.
103. Schafer, S. T., Paquola, A., Stern, S., Gosselin, D., Ku, M., Pena, M., Kuret, T., Liyanage, M., Mansour, A. A., Jaeger, B. N., Marchetto, M. C., Glass, C. K., Mertens, J., and Gage, F. H. (2019) Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons, *Nat. Neurosci.*, **22**, 243-255, doi: 10.1038/s41593-018-0295-x.

CELL REPROGRAMMING WITH CONSERVATION OF EPIGENETIC AGE: ADVANTAGE OR LIMITATION?

Review

E. M. Samoilova* and V. P. Baklaushev

Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, FMBA of Russia, 115682 Moscow, Russia; E-mail: samoyket@gmail.com

Received July 28, 2020
Revised July 28, 2020
Accepted August 5, 2020

Our understanding of cell aging advanced significantly since the discovery of this phenomenon by Hayflick and Moorhead in 1961. In addition to the well-known shortening of telomeric regions of chromosomes, cell aging is closely associated with changes of the DNA methylation profile. Establishing, maintaining, or reversing epigenetic age of a cell is central to the technology of cell reprogramming. Two distinct approaches – iPSC- and transdifferentiation-based cell reprogramming – affect differently epigenetic age of the cells. The iPSC-based reprogramming protocols are generally believed to result in the reversion of DNA methylation profiles towards less differentiated states, while the original methylation profiles are preserved in the direct trans-differentiation protocols. Clearly, in order to develop adequate model of CNS pathologies, one has to have thorough understanding of the biological roles of DNA methylation in the development, maintenance of functional activity, tissue and cell diversity, restructuring of neural networks during learning, as well as in aging-associated neuronal decline. Direct cell reprogramming is an excellent alternative and a valuable supplement to the iPSC-based technologies both as a source of mature cells for modeling of neurodegenerative diseases, and as a novel powerful strategy for *in vivo* cell replacement therapy. Further advancement of the regenerative and personalized medicine will strongly depend on optimization of the production of patient-specific autologous cells involving alternative approaches of direct and indirect cell reprogramming that take into account epigenetic age of the starting cell material.

Keywords: regenerative medicine, epigenetic clock, direct cell reprogramming, induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, telomeres, methylome