

Agnieszka Gadecka

**Zmiany struktury chromatyny komórek mięśni gładkich naczyń
krwionośnych w zależności od typu starzenia z uwzględnieniem
modyfikacji histonu H3**

Praca doktorska wykonana
w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
dr hab. Anna Bielak-Żmijewska,
prof. Instytutu Nenckiego

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana dzięki finansowaniu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Opus kierowanego przez dr hab. Annę Bielak-Żmijewską pt. „Zmiany epigenetyczne odpowiedzialne za strukturę chromatyny i ekspresję genów w replikacyjnym i przyspieszonym starzeniu komórek mięśni gładkich naczyń; modyfikacje histonu H3 oraz udział białka HP1 alfa” (2016/21/B/NZ3/00370), w którym autorka pełniła rolę wykonawcy.

Pragnę serdecznie podziękować

dr hab. Annie Bielak-Żmijewskiej

za opiekę naukową, nieskończoną cierpliwość i wyrozumiałość oraz nieocenioną pomoc w powstawaniu niniejszej rozprawy doktorskiej. Dziękuję za codzienną życzliwą atmosferę w pracy, owocne dyskusje oraz wsparcie w chwilach zwątpienia

prof. dr hab. Ewie Sikorze

za zaufanie, wsparcie merytoryczne oraz cenne uwagi w trakcie przygotowywania tej pracy.

koleżankom i kolegom z Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia

za ogromną pomoc i nieustające wsparcie oraz niepowtarzalną atmosferę, dzięki której praca z Wami to sama przyjemność.

dr hab. Marcie Koblowskiej, dr Helenie Kossowskiej oraz dr Roksanie Iwanickiej-Nowickiej

z Zakładu Biologii Systemów, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

za owocną współpracę, pomoc w analizach ChIP-seq i mikromacierzy oraz okazaną wyrozumiałość i ciekawe dyskusje

mgr Natalii Nowak

z Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych

za owocną współpracę, nieustanną pomoc oraz cierpliwość do mnie i moich niekończących się pytań

dr hab. Adrianie Magalskiej

za interesujące dyskusje oraz użyczenie przeciwciał

dr Milenie Wiech oraz mgr Agacie Kominek

z Pracowni Cytometrii

za pomoc w pomiarach cytometrycznych oraz dalszych analizach

dr hab. Maciejowi Wnukowi oraz dr Renacie Wojnarowskiej-Nowak

z Zakładu Genetyki Uniwersytetu Rzeszowskiego

za dzielenie się cenną wiedzą, pomoc w pomiarach z wykorzystaniem AFM oraz owocną współpracę

dr hab. Michałowi Dąbrowskiemu, dr Agacie Charzyńskiej oraz dr Janowi Ludwiczakowi

za pomoc w analizach bioinformatycznych

Spis treści

Wykaz skrótów	11
Streszczenie	15
Summary	17
1. Wstęp	19
1.1. Ogólne zmiany zachodzące w starej komórce	19
1.2. Rodzaje starzenia komórkowego i związane z nimi ścieżki sygnałowe.....	21
1.3. Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu	24
1.4. Architektura jądra komórkowego	27
1.5. Modyfikacje epigenetyczne DNA i histonów	30
1.5.1. Metylacja DNA.....	31
1.5.2. Potranslacyjne modyfikacje histonów	33
1.5.2.1. Metylacja histonów.....	34
1.5.2.2. Acetylacja histonów	38
1.5.2.3. Przemodelowanie struktury chromatyny pod wpływem kompleksów przebudowujących zależnych od ATP	39
1.5.3. Regulacja ekspresji genów przez niekodujące RNA	40
1.6. Charakterystyka i funkcje białka HP1 α	41
1.7. Zmiany w strukturze jądra i chromatyny towarzyszące starzeniu komórkowemu.....	44
1.1. Zależne od wieku choroby układu krążenia oraz udział starzenia komórkowego w rozwoju miażdżycy	49
2. Hipoteza i cele pracy	55
3. Materiały i metody	57
3.1. Materiały	57
3.1.1. Komórki	57
3.1.1.1. Hodowla ludzkich komórek mięśni gładkich naczyń izolowanych z aorty	57
3.1.1.2. Hodowla ludzkich fibroblastów	57
3.1.1.3. Izolacja oraz hodowla ludzkich komórek mięśni gładkich pochodzących z blaszek miażdżycowych	57
3.1.1.4. Przeciwciała	58
3.1.2. Startery	59
3.2. Metody	61
3.2.1. Układ eksperymentalny	61

3.2.1.1.	Komórki kontrolne.....	61
3.2.1.2.	Starzenie przyspieszone indukowane doksorubicyną.....	61
3.2.1.3.	Starzenie przyspieszone indukowane kurkuminą.....	61
3.2.1.4.	Starzenie replikacyjne.....	62
3.2.2.	Oznaczanie aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem.....	62
3.2.3.	Analiza zdolności do replikacji DNA – test wbudowywania bromodeoksyurydyny (BrdU) do DNA.....	62
3.2.4.	Charakterystyka jąder komórkowych za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM)...	63
3.2.4.1.	Izolacja jąder komórkowych.....	63
3.2.4.2.	Przygotowanie próbek.....	63
3.2.4.3.	Pomiar i analiza danych.....	63
3.2.4.4.	Pomiar szorstkości powierzchni.....	64
3.2.5.	Analiza struktury chromatyny i jądra komórkowego VSMC za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz oprogramowania CellProfiler.....	64
3.2.5.1.	Przygotowanie komórek oraz barwienie F-aktyny falloidyną.....	64
3.2.5.2.	Rejestracja obrazu w mikroskopie fluorescencyjnym oraz analiza zdjęć w programie CellProfiler.....	64
3.2.6.	Barwienie immunocytochemiczne.....	66
3.2.7.	Detekcja białek metodą Western blotting.....	67
3.2.7.1.	Izolacja białek całokomórkowych oraz normalizacja próbek.....	67
3.2.7.2.	Western blotting.....	67
3.2.7.3.	Usuwanie przeciwciał związanych z błoną nitrocelulozową (ang. <i>Stripping</i>).....	68
3.2.8.	Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej.....	68
3.2.9.	Analiza aktywności enzymatycznej deacetylaz histonów.....	69
3.2.9.1.	Izolacja białek z użyciem buforu RIPA.....	69
3.2.9.2.	Oznaczanie stężenia białek metodą BCA.....	70
3.2.9.3.	Oznaczanie aktywności enzymatycznej.....	70
3.2.10.	Analiza profilu transkryptomycznego metodą mikromacierzy.....	71
3.2.10.1.	Utrwalanie komórek.....	71
3.2.10.2.	Izolacja RNA.....	71
3.2.10.3.	Kontrola poziomu zanieczyszczeń genomowym DNA.....	72
3.2.10.4.	Przygotowanie próbek oraz hybrydyzacja do płytek macierzy.....	72
3.2.10.5.	Dalsza obróbka danych oraz analiza funkcjonalna wyników.....	73
3.2.11.	Analiza poziomu mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym.....	74
3.2.11.1.	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR).....	74

3.2.11.2.	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR).....	75
3.2.12.	Analiza profilu wzbogacenia H3K4me3, H3K9me3 oraz HP1 α w genomie metodą immunoprecypitacji histonów i sekwencjonowania nowej generacji (ChIP-seq).....	76
3.2.12.1.	Przygotowanie komórek - utrwalanie kompleksów białko-DNA	76
3.2.12.2.	Izolacja i fragmentacja chromatyny	76
3.2.12.3.	Kontrola długości fragmentów chromatyny	77
3.2.12.4.	Immunoprecypitacja chromatyny	78
3.2.12.5.	Kontrola wydajności immunoprecypitacji metodą qPCR.....	79
3.2.12.6.	Sekwencjonowanie nowej generacji.....	82
3.2.12.7.	Bioinformatyczna analiza danych.....	83
3.2.12.7.1.	Przygotowanie odczytów	83
3.2.12.7.2.	Detekcja pików.....	84
3.2.12.7.3.	Wizualizacja danych oraz analiza funkcjonalna miejsc wzbogaconych w badane modyfikacje histonu H3 i białko HP1 α	84
3.2.12.8.	Analiza statystyczna wyników	84
4.	Wyniki	85
4.1.	Zmiany towarzyszące starzeniu <i>in vitro</i> komórek mięśni gładkich pochodzących z aorty ...	85
4.1.1.	Ogólna charakterystyka zmian zachodzących podczas starzenia	85
4.1.2.	Zmiany w strukturze jądra i chromatyny w zależności od typu starzenia.....	89
4.1.2.1.	Wzrost chropowatości powierzchni jąder starych komórek.....	89
4.1.2.2.	Analiza zmian w organizacji chromatyny za pomocą programu Cell Profiler	91
4.1.3.	Poziom oraz organizacja modyfikacji histonu H3.....	96
4.1.4.	Udział enzymów regulujących strukturę chromatyny.....	101
4.1.4.1.	Metylotransferazy i demetylazy histonu H3	102
4.1.4.2.	Acetylotransferazy i deacetylasy histonu H3	107
4.1.5.	Udział białka HP1 α w starzeniu	110
4.1.5.1.	Interakcja HP1 α z H3K9me3.....	113
4.1.5.2.	Interakcja HP1 α z γ H2AX.....	115
4.1.5.3.	Interakcja HP1 α z białkiem PML.....	116
4.1.6.	Zmiany w profilu rozmieszczenia H3K4me3 oraz H3K9me3 w genomie młodych i starych VSMC – analiza wzbogacenia badanych znaczników metodą ChIP-seq	118
4.1.6.1.	Analiza funkcjonalna miejsc wzbogaceń w znaczniki aktywnej i nieaktywnej chromatyny	120
4.1.6.2.	Miejsca wzbogacenia w HP1 α	124

4.1.7.	Różnice w profilu transkryptomycznym między komórkami starzejącymi się w sposób przyspieszony oraz replikacyjny	127
4.2.	Komórki mięśni gładkich izolowane z blaszki miażdżycowej.....	132
4.2.1.	Ogólna charakterystyka komórek mięśni gładkich pochodzących z blaszki miażdżycowej oraz wstępna analiza znaczników starzenia.....	132
4.2.2.	Zmiany w modyfikacjach histonów	134
4.2.3.	Analiza ekspresji wybranych genów kodujących białka odpowiedzialne za modyfikację chromatyny.....	138
4.2.4.	Analiza ekspresji białka HP1 α	139
4.3.	Analiza uniwersalności zmian w fibroblastach skóry	141
4.3.1.	Różnice w kinetyce podziału między VSMC a fibroblastami	141
4.3.2.	Ogólna charakterystyka starych fibroblastów oraz kontrola procesu starzenia	142
4.3.3.	Zmiany w poziomie oraz organizacji modyfikacji histonu H3.....	144
4.3.4.	Enzymy modelujące strukturę chromatyny.....	146
4.3.5.	Zmiany dotyczące białka HP1 α	148
4.4.	Nowe potencjalne znaczniki starzenia – białka anillina (ANLN) oraz kładyna-1 (CLDN1) .	150
4.4.1.	Analiza białek z zastosowaniem VSMC <i>in vitro</i>	150
4.4.2.	Analiza białek w komórkach blaszki <i>in vivo/ex vivo</i>	155
5.	Dyskusja	161
5.1.	Charakterystyka struktury jądra i chromatyny komórek ulegających różnym typom starzenia	162
5.2.	Odmienny profil transkryptomiczny VSMC zależny od typu starzenia.....	166
5.3.	Starzenie komórkowe wiąże się ze spadkiem poziomu znaczników heterochromatyny H3K9me3 oraz H3K27me3.....	169
5.4.	Starzenie komórkowe wiąże się ze spadkiem poziomu znaczników aktywnej chromatyny H3K4me3 oraz H3K9ac	171
5.5.	Starzenie przyspieszone oraz replikacyjne nie przyczynia się do powstawania SAHF	173
5.6.	Analiza zmian dotyczących HP1 α w starzeniu komórkowym.....	174
5.7.	Analiza białek CLDN1 oraz ANLN w kontekście nowych znaczników starzenia <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i>	176
6.	Podsumowanie i wnioski	187
	Bibliografia	189
	Spis publikacji autorki rozprawy	213

Wykaz skrótów

53BP1	(ang. <i>p53-binding protein 1</i>) – białko wiążące się do supresora nowotworu p53 rozpoznające uszkodzenie podwójnej nici DNA
AEBP2	(ang. <i>Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2</i>) – białko kompleksu PRC2
ANLN	(ang. <i>Anillin</i>) – anillina
AP	(ang. <i>Atherosclerotic plaque</i>) – komórki blaszki miażdżycowej
ATM	(ang. <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>) – kinaza białkowa biorąca udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA
ATR	(ang. <i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>) – kinaza białkowa biorąca udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA
AURKB	(ang. <i>Aurora kinase B</i>) – kinaza Aurora B
CAF-1	(ang. <i>Chromatin Assembly Factor-1</i>) – kompleks białkowy składający się z wielu podjednostek, odpowiedzialny za tworzenie nukleosomów poprzez umieszczanie nowosyntetyzowanych histonów na nici DNA
CD	(ang. <i>Chromo domain</i>) – domena chromo białka HP1 α
CDK	(ang. <i>Cyclin-dependent kinase</i>) – kinazy zależne od cyklin
ChIP-seq	(ang. <i>Chromatin immunoprecipitation coupled with Next-Generation Sequencing</i>) – immunoprecypitacja chromatyny sprzężona z sekwencjonowaniem następnej generacji
CHK	(ang. <i>Checkpoint kinase</i>) – kinaza punktu kontrolnego
CLDN1	(ang. <i>Claudin-1</i>) – kładyna-1
CpG	(ang. <i>Cytosine-guanine dinucleotide</i>) – dinukleotyd cytozyna-guanina
CSD	(ang. <i>Chromoshadow domain</i>) – domena chromoshadow białka HP1 α
CTCF	(ang. <i>CCCTC-binding factor</i>) – białko wiążące się do DNA, wyznaczające granice TAD; represor transkrypcji
CTRL	(ang. <i>Control</i>) – komórki kontrolne
CUR	(ang. <i>Curcumin</i>) – komórki traktowane kurkumina lub kurkumina
DDR	(ang. <i>DNA-damage response</i>) – odpowiedź na uszkodzenia DNA
DEG	(ang. <i>Differentially Expressed Genes</i>) – geny ulegające zróżnicowanej ekspresji
DNMT	(ang. <i>DNA methyltransferase</i>) – metylotransferaza DNA
DOX	(ang. <i>Doxorubicin</i>) – komórki traktowane doksorubicyną lub doksorubicyna

E2F	(ang. <i>E2 transcription factor</i>) – rodzina czynników transkrypcyjnych regulujących cykl komórkowy
EED	(ang. <i>Embryonic Ectoderm Development</i>) – białko kompleksu PRC2
EGF	(ang. <i>Epidermal growth factor</i>) – nabłonkowy czynnik wzrostu
EZH1/2	(ang. <i>Enhancer of Zeste 1/2</i>) – białko EZH1 lub EZH2 kompleksu PRC2
FC	(ang. <i>Fold Change</i>) – krotność zmian w poziomie ekspresji genu lub białka
FDR	(ang. <i>False Discovery Rate</i>) – poziom wykrycia wyników fałszywie pozytywnych
GO	(ang. <i>Gene Ontology</i>) – struktura hierarchiczna produktów genów opisująca ich funkcje molekularne, procesy biologiczne oraz składniki komórkowe
H2AX	(ang. <i>H2A histone family member X</i>) – wariant histonu H2A
H3K27me3	(ang. <i>Histone 3 lysine 27 trimethylation</i>) – trimetylacja lizyny 27 histonu H3
H3K4me3	(ang. <i>Histone 3 lysine 4 trimethylation</i>) – trimetylacja lizyny 4 histonu H3
H3K9Ac	(ang. <i>Histone 3 lysine 9 acetylation</i>) – acetylacja lizyny 9 histonu H3
H3K9me3	(ang. <i>Histone 3 lysine 9 trimethylation</i>) – trimetylacja lizyny 9 histonu H3
HAT	(ang. <i>Histone acetyltransferase</i>) – acetylotransferaza histonów
HBB	(ang. <i>Hemoglobin subunit beta</i>) – β -globina
HDAC	(ang. <i>Histone deacetylase</i>) – deacetylaza histonów
HDM	(ang. <i>Histone demethylase</i>) – demetylaza histonów
HGPS	(ang. <i>Hutchinson-Gilford progeria syndrome</i>) – zespół Hutchinsona-Gilforda
HMGB1	(ang. <i>High mobility group box-1</i>) – białko o wysokiej ruchliwości typu 1
HMT	(ang. <i>Histone methyltransferase</i>) – metylotransferaza histonów
HP1α	(ang. <i>Heterochromatin protein 1 subunit alpha</i>) – białko heterochromatyny podjednostka alfa
HR	(ang. <i>Hinge region</i>) – obszar łącznikowy między domeną CD i CSD białka HP1 α
IL	(ang. <i>Interleukin</i>) – interleukina
INCENP	(ang. <i>Inner centromere protein</i>) – wewnętrzne białko centromeru
JARID2	(ang. <i>Jumonji and AT-Rich Interaction Domain Containing 2</i>) – białko kompleksu PRC2.2
KDM	(ang. <i>Histone lysine demethylase</i>) – demetylaza lizyn w histonach
LAD	(ang. <i>Lamina-associated domains</i>) – domeny heterochromatyny związanej z lamina
LBR	(ang. <i>Lamin B receptor</i>) – białko wiążące laminy z heterochromatyną

LMNA/C	(ang. <i>Lamin A/C</i>) – laminy typu A/C
LMNB1	(ang. <i>Lamin B1</i>) – lamina B1
LLPS	(ang. <i>Liquid-liquid phase separation</i>) – separacja faz ciecz-ciecz
MMP	(ang. <i>Matrix metalloproteinase</i>) – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
NE	(ang. <i>Nuclear envelope</i>) – otoczka jądrowa
NES	(ang. <i>Nuclear export signal</i>) – sekwencja w budowie białka umożliwiająca jego eksport na zewnątrz jądra komórkowego
NLS	(ang. <i>Nuclear localization signal</i>) – sekwencja w budowie białka umożliwiająca jego import do wnętrza jądra komórkowego
NPC	(ang. <i>Nuclear pore complex</i>) – białka tworzące pory jądrowe
PBS	(ang. <i>Phosphate-buffered saline</i>) – roztwór buforowanej fosforanem soli fizjologicznej
PCA	(ang. <i>Principal component analysis</i>) – analiza głównych składowych
PCL	(ang. <i>Polycomb-like proteins</i>) – grupa białek wchodzących w skład kompleksu PRC2
PML	(ang. <i>Promyelocytic leukemia protein</i>) – białko białaczki promielocytowej
PRC1, PRC2	(ang. <i>Polycomb Repressive Complex 1, 2</i>) – represyjny kompleks PRC1 i PRC2
PS	(ang. <i>Premature senescence</i>) – starzenie przyspieszone
PTM	(ang. <i>Post-translational modification</i>) – potranslacyjne modyfikacje
Rb	(ang. <i>Retinoblastoma protein</i>) – białko retinoblastoma
RFC	(ang. <i>Replication factor</i>) – replikacyjny czynnik C
RFT	(ang. <i>Reactive oxygen species</i>) – reaktywne formy tlenu
RPA	(ang. <i>Replication protein A</i>) – białko replikacyjne A
RS	(ang. <i>Replicative senescence</i>) – starzenie replikacyjne
SA-β-gal	(ang. <i>Senescence-associated β-galactosidase</i>) – enzym β-galaktozydaza związana ze starzeniem
SASP	(ang. <i>Senescence-associated secretory phenotype</i>) – fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem
SETD1	(ang. <i>SET Domain Containing 1</i>) – białko kompleksu PRC2
SIPS	(ang. <i>Stress-induced premature senescence</i>) – starzenie przyspieszone indukowane stresem
SIRT	(ang. <i>Silent information regulator T</i>) - sirtuiny

SMYD3	(ang. <i>SET and MYND Domain Containing 3</i>) – metylotransferaza histonów zawierająca domeny SET i MYDN3
SUV39H1	(ang. <i>Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1</i>) – metylotransferaza supresora różnorodności 3-9 homolog 1,
SUZ12	(ang. <i>SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>) – białko kompleksu PRC2
TAD	(ang. <i>Topologically associated domains</i>) – domena topologiczna,
TET	(ang. <i>Ten-eleven translocation family enzymes</i>) – demetylaza DNA należąca do rodziny TET
TSS	(ang. <i>Transcription start site</i>) – miejsce startu transkrypcji
VEGF	(ang. <i>Vascular endothelial growth factor</i>) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
VSMC	(ang. <i>Vascular smooth muscle cells</i>) – komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych
WDR5	(ang. <i>WD Repeat Domain 5</i>) – gen kodujący metylotransferazę histonów
ZNF	(ang. <i>Zinc-finger protein</i>) – białko wiążące DNA zawierające motyw palca cynkowego
ZO-1	(ang. <i>Zona Occludens-1</i>) – białko strefy zamykającej obecne w połączeniach ścisłych między komórkami

Streszczenie

Spodziewana średnia długość życia człowieka nieustająco rośnie. Negatywnym skutkiem tego zjawiska jest coraz częstsze występowanie chorób związanych z wiekiem, zwłaszcza chorób układu krążenia, które według WHO nadal pozostają dominującą przyczyną zgonów na świecie. Do najczęstszych chorób zaliczają się nadciśnienie, niewydolność serca i zawał, tętniak aorty oraz udar mózgu. u podstaw tych schorzeń leży rozwój miażdżycy, czyli zapalnej choroby tętnic prowadzącej do zwężenia światła naczynia poprzez wytworzenie stabilnej lub niestabilnej (tworzącej największe zagrożenie dla zdrowia) blaszki miażdżycowej. Badania dowiodły, że jednym z głównych typów komórek odpowiedzialnych za kondycję naczyń oraz stabilność blaszki miażdżycowej są komórki mięśni gładkich naczyń (*vascular smooth muscle cells* – VSMC). VSMC izolowane z blaszki wykazują wiele cech starzenia komórkowego.

Starzenie komórkowe jest nieodwracalnym zatrzymaniem cyklu komórkowego z zachowaniem pełnych, aczkolwiek zmienionych, funkcji metabolicznych. Do starzenia może dojść zarówno na drodze wyczerpania zdolności komórki do podziałów (starzenie replikacyjne – RS), jak i w wyniku stresu (starzenie przyspieszone – PS). Oba typy starzenia powodują szereg zmian morfologicznych komórki, a w szczególności zmian na poziomie jądra komórkowego i ekspresji genów. Obserwuje się stopniowy spadek zawartości skondensowanej heterochromatyny na rzecz rozluźnionej euchromatyny. Jest to spowodowane między innymi utratą histonów, zaburzeniem równowagi między represyjnymi a aktywującymi modyfikacjami potranslacyjnymi histonów oraz upośledzeniem działania enzymów modelujących histony czy białek stabilizujących strukturę chromatyny. Jednym z takich białek jest HP1 α (ang. *Heterochromatin Protein 1 subunit α* – białko heterochromatyny 1 podjednostka α), które poprzez przyłączanie się do trimetylowanej lizyny 9 histonu 3 (H3K9me3) powoduje kondensację i stabilizację chromatyny oraz wyciszenie genów.

Wstępne badania prowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia wykazały, że podczas starzenia replikacyjnego znacząco spada poziom zarówno modyfikacji H3K9me3 jak i białka HP1 α oraz dochodzi do reorganizacji HP1 α w jądrze, czyli tworzenia się wielu wyraźnych skupisk. W związku z tym, celem niniejszej rozprawy była analiza zmian w poziomie, organizacji oraz wpływie na ekspresję genów wybranych modyfikacji histonu H3 oraz zbadanie jak to się przekłada na zmiany struktury chromatyny w komórkach poddanych różnym typom starzenia. Dodatkowo próbowano poznać udział HP1 α w procesie starzenia. Następnie porównano zmiany zachodzące w VSMC *in vitro* z tymi zachodzącymi *in vivo* w komórkach mięśni gładkich pochodzących z blaszek miażdżycowych. Ostatnim zadaniem była weryfikacja uniwersalności zmian w upakowaniu chromatyny towarzyszących starzeniu na przykładzie ludzkich fibroblastów.

Główny model badawczy stanowiły VSMC, które poddano starzeniu RS i PS. Czynnikiem indukującym PS była dokсорubicyna oraz kurkumina. Ten sam model eksperymentalny zastosowano w przypadku fibroblastów. Ponadto, analizie poddano komórki mięśni gładkich pochodzące z blaszek miażdżycowych wyizolowane od 6 pacjentów.

Szczegółowa analiza struktury jądra oraz chromatyny w VSMC wykazała znaczące różnice zależne od typu starzenia i pozwoliła wytypować parametry odróżniające starzenie przyspieszone od replikacyjnego. Zastosowanie jednego z tych parametrów – wielkości powierzchni jądra specyficznej dla VSMC – ułatwiło identyfikację starych komórek w populacji pochodzącej z blaszki miażdżycowej.

Wykazano również, że spadek H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 oraz H3K9Ac jest uniwersalnym zjawiskiem zachodzącym w starzeniu badanych typów komórek, a wielkość spadku modyfikacji w hodowlach *in vitro* jest zależna od rodzaju bodźca indukującego starzenie. W komórkach pochodzących z blaszki, *ex vivo*, poziom wybranych modyfikacji jest silnie zależny od dawcy. Wykazano, że spadek i reorganizacja białka HP1 α w starzeniu uniemożliwia oddziaływanie z H3K9me3 czego przyczyną może być akumulacja HP1 α w ciałkach PML. Ponadto, w VSMC wykazano związane ze starzeniem zmiany w rozmieszczeniu H3K9me3 i H3K4me3 w genomie oraz wytypowano miejsca oddziaływań H3K9me3 z HP1 α w młodych komórkach. Analiza transkryptomyczna wskazała geny charakterystyczne dla poszczególnych typów starzenia, a na podstawie uzyskanych wyników wytypowano białka ANLN i CLDN1, mogące pełnić rolę nowych markerów starzenia pozwalających na identyfikację jego typu.

Podsumowując, w niniejszej pracy szczegółowo scharakteryzowano zmiany architektury jądra i struktury chromatyny zachodzące w starzeniu komórek mięśni gładkich naczyń. Wykazano, że stopień rozluźnienia chromatyny jest zależny od typu starzenia i wiąże się ze stopniowym spadkiem metylacji i acetylacji lizyn histonu H3. Zaobserwowano również, że w starzeniu zanika oddziaływanie między H3K9me3 oraz HP1 α i dochodzi do akumulacji HP1 α w ciałkach PML, co może wpływać na destabilizację chromatyny. Na podstawie przeprowadzonych analiz zaproponowano przesiewową metodę oznaczania starych komórek w badanej populacji biorąc pod uwagę strukturę jądra i chromatyny. Dodatkowo, po raz pierwszy zaproponowano użycie dwóch białek, ANLN oraz CLDN1, w roli nowych znaczników starzenia, pozwalających odróżnić starzenie przyspieszone od replikacyjnego.

Summary

The average life expectancy of the human population continues to rise, resulting in aging societies. However, this demographic shift brings a concerning increase in the prevalence of age-related diseases, particularly cardiovascular diseases. According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases remain the primary cause of death globally. The most common include hypertension, heart attack, aortic aneurysm, and stroke. At the core of these conditions lies development of atherosclerosis – an inflammatory disease of the arteries that leads to the narrowing of vessel lumen through the formation of stable or unstable (posing greater health risk) atherosclerotic plaque (AP). Multiple studies have identified vascular smooth muscle cells (VSMCs) as one of the critical cell types essential for proper vascular function and AP stability. VSMCs derived from atherosclerotic plaques, exhibit numerous characteristics associated with cellular senescence.

Cellular senescence is defined as an irreversible cell cycle arrest with preservation of full, albeit altered, metabolic functions. It can arise due to either exhaustion of replication potential (replicative senescence - RS) or exposure to various stressors (premature senescence - PS). Regardless of the trigger, both types of cellular senescence cause several morphological changes, particularly at the nuclear and gene expression level. These changes involve gradual loss of compact heterochromatin, and the formation of relaxed euchromatin. Several factors contribute to this transformation, including loss of histones, imbalances in the post-translational modifications of histones, disruptions in histone-remodeling enzymes, and alterations in proteins that stabilize chromatin structure. One such protein is HP1 α (Heterochromatin Protein 1 subunit α), which, by attaching to trimethylated lysine 9 of histone 3 (H3K9me3), causes chromatin condensation, stabilization and gene silencing.

Preliminary studies conducted at the Laboratory of Molecular Basis of Aging revealed a significant decrease in both H3K9me3 and HP1 α protein levels during senescence and reorganization of HP1 α , which forms pronounced clusters. Therefore, the main objective of this dissertation was to analyze changes in selected histone H3 modifications and their impact on chromatin structure and gene expression in senescent VSMC, fibroblasts and cells derived from atherosclerotic plaque. The second goal was to clarify the involvement of HP1 α in the process.

VSMCs were subjected to both replicative and premature senescence, where premature senescence was induced by doxorubicin and curcumin. This experimental framework was extended to fibroblasts, while smooth muscle cells isolated from atherosclerotic plaques were analyzed from at least six patients.

The comprehensive analysis of nucleus and chromatin structure in senescent VSMCs revealed significant changes, differentiating RS from PS. One of the differentiating parameters, nuclear surface area size specific to VSMCs, helped to identify senescent cells in a population derived from atherosclerotic plaque. Furthermore, it has been demonstrated that the decline in H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, and H3K9Ac modifications is a universal hallmark of senescence across tested types of cells, although the level of decrease is different in PS and RS. The level of tested modifications in the *ex vivo* model was heavily dependent on the donor. The decrease and reorganization of HP1 α in senescence prevented interaction with H3K9me3, probably due to accumulation of HP1 α in PML bodies. Based on CHIP-seq data, the characteristic sites of H3K9me3 and HP1 α interactions in young

VSMC were selected. In addition, it was shown that VSMCs assume different distribution of H3K4me3 and H3K9me3 in the genome that depends on the type of senescence. Last but not least, transcriptomic analysis identified genes specific to each type of senescence, and based on the results, new markers of senescence, ANLN and CLDN1 were proposed.

In summary, this study provides an extensive characterization of senescence-related changes. It demonstrates that the chromatin relaxation degree depends on the type of senescence and correlates with a gradual decrease in histone H3 methylation and acetylation. Additionally, it reveals the disruption of interactions between H3K9me3 and HP1 α during senescence, leading to HP1 α accumulation in PML bodies, potentially contributing to chromatin destabilization. Moreover, a screening method for identifying senescent cells in the examined population based on nuclear and chromatin structure has been proposed. Finally, ANLN and CLDN1 were introduced as novel senescence markers for distinguishing RS from PS.

1. Wstęp

Starzenie się jest naturalnym procesem dotyczącym niemal wszystkich organizmów żywych. Wiąże się ono ze stopniowym pogorszeniem funkcji tkanek i narządów, ogólnego stanu zdrowia oraz z zwiększonym występowaniem chorób związanych z wiekiem. Do najczęściej występujących chorób dotyczących ludzi w podeszłym wieku należą: choroby neurodegeneracyjne tj. Alzheimera, Parkinsona, choroby układu krążenia tj. nadciśnienie, miażdżycy, zawał serca, udar oraz cukrzyca typu II i pewne typy nowotworów. Analiza tkanek zmienionych chorobowo wykazała duży odsetek komórek przejawiających cechy starzenia komórkowego [1]. Ponadto starzenie organizmu niewątpliwie wiąże się z akumulacją starych komórek [2], a ostatnie badania pokazały, że usunięcie starych komórek z organizmu jest w stanie złagodzić symptomy starzenia [3]. Dostępna wiedza pokazuje bezsprzecznie, że u podstaw starzenia się organizmu oraz chorób wieku podeszłego leży starzenie komórek. Dowiedziono również, że starzeniu mogą ulegać również komórki postmitotyczne (np. neurony), jednakże w niniejszej pracy skupiono się głównie na zmianach dotyczących komórek zdolnych do podziału.

1.1. Ogólne zmiany zachodzące w starej komórce

Najprostszą definicją starzenia komórkowego jest stałe zatrzymanie podziałów komórki z zachowaniem jej funkcji metabolicznych. Charakterystyczną cechą takich komórek jest ich zmieniająca się morfologia, relatywnie łatwa do zidentyfikowania w obrazie mikroskopowym, gdyż dochodzi do znacznego powiększenia powierzchni oraz rozpłaszczenia komórki [4]. Niemniej zmiany fenotypowe nie są wystarczającym wskaźnikiem zachodzącego procesu, który dotyczy wielu struktur i funkcji w komórce. W związku z tym, zarówno w hodowlach *in vitro* jak również *in vivo*, stosuje się szereg analiz pozwalających zidentyfikować komórki stare na podstawie zestawu znaczników [5]. W wyniku starzenia, komórki mogą być zatrzymane albo w fazie G1 albo G2 cyklu komórkowego, co jest efektem zwiększenia ekspresji białek odpowiedzialnych za regulację cyklu [6]. Są to inhibitory kinaz zależnych od cyklin, białko p16 oraz p21.

W cytoplazmie można zaobserwować wzrost ziarnistości wynikającej ze zwiększonej liczby lizosomów. Wzrost liczby prowadzi również do podwyższenia aktywności enzymów lizosomalnych, w tym β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (*senescence-associated β -galactosidase*, SA- β -gal). Detekcja tego białka w cytoplazmie starej komórki, ze względu na prostotę i krótki czas oznaczenia, stała się podstawowym znacznikiem używanym do identyfikacji większości typów starzenia komórkowego [7]. Komórki stare, w których jest podwyższona aktywność tego enzymu, stają się niebieskie, co łatwo

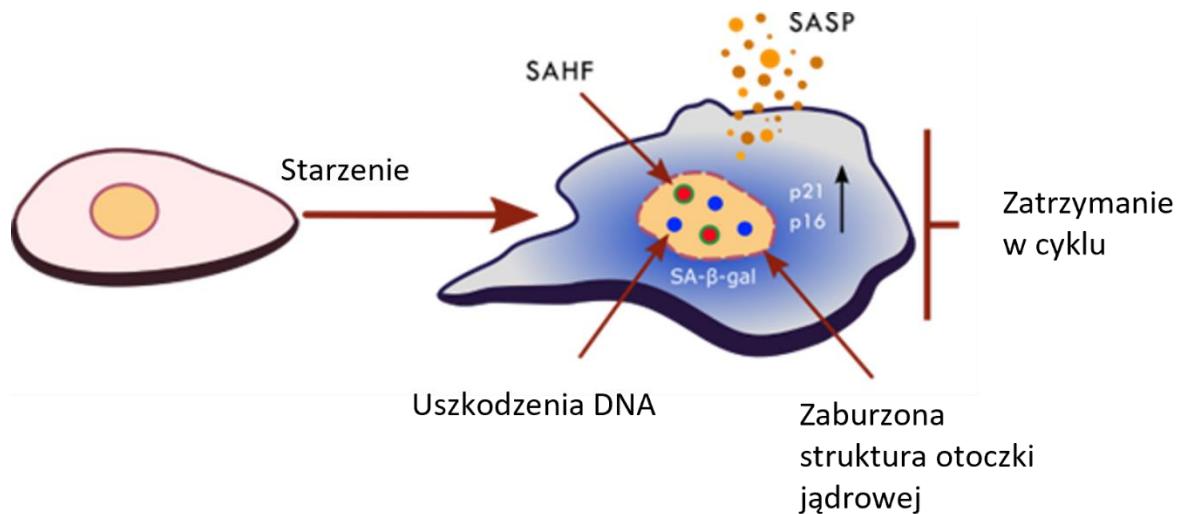
można zaobserwować w mikroskopie świetlnym. Jednakże należy używać tego znacznika w połączeniu z innymi, gdyż w warunkach przegęszczenia hodowli może dostarczać fałszywie pozytywne wyniki.

Wiele kluczowych zmian towarzyszących starzeniu zachodzi w jądrze komórkowym. Jego rozmiar powiększa się, dochodzi do zaburzeń w budowie otoczki oraz blaszki jądrowej, a zwykle ściśle upakowana chromatyna, nazywana heterochromatyną, ulega rozluźnieniu zmieniając się w euchromatynę [8]. Z drugiej strony może dochodzić do lokalnej kondensacji chromatyny i tworzenia skupisk heterochromatyny związanej ze starzeniem, czyli SAHF (*senescence associated heterochromatin foci*). Pod wpływem różnych czynników (endo- i egzogennych) dochodzi też do powstawania i akumulacji pęknięć podwójnej nici DNA. One z kolei aktywują kaskadę białek biorących udział w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (*DNA damage response*, DDR – opisana szczegółowo w podrozdziale 1.2.) [9]. Standardowymi markerami pozwalającymi wykryć powstałe uszkodzenia jest fosforylowana forma histonu H2AX (γ H2AX) oraz białko 53BP1, które w formie skupisk gromadzą się wokół powstałych pęknięć [10]. Ostatecznie sygnał jest przekazywany do białka efektorowego p53 i dochodzi do jego fosforylacji. Całkowity poziom tego białka, jak i fosforylowanej formy, znacząco wzrasta w starzeniu, czyniąc je kolejnymi, typowymi znacznikami starzenia komórkowego. Powyższe zmiany to tylko część z tych zachodzących w jądrze komórkowym podczas starzenia, a szczegółowy opis zmian zamieszczono w dalszych częściach tego rozdziału.

Należy podkreślić, że podczas starzenia, oprócz DNA jądrowego (*nuclear DNA*, nDNA), uszkodzeniom ulega również DNA mitochondrialne (mtDNA) [11]. Przyczynia się do tego wzrost poziomu i akumulacji reaktywnych form tlenu (RFT) w mitochondriach co skutkuje uszkodzeniami organelli komórkowych oraz zwiększa ryzyko dalszych uszkodzeń DNA (mtDNA a nawet nDNA) i mutacji. Dochodzi do upośledzenia funkcji mitochondriów, a wydajność degradacji (autofagii) wadliwych organelli w komórce ulega znaczącemu zmniejszeniu. Na skutek takich zmian dochodzi do indukcji i dalszej progresji starzenia komórkowego.

Zmiany zachodzące w jądrze komórkowym, mają swoje odzwierciedlenie w ekspresji genów. Jednym z ważnych elementów jest zwiększona synteza białek wydzielanych przez komórki, co skutkuje odmiennym profilem sekrecyjnym [12]. Zatem istotnym markerem staje się poziom i skład wydzielanych białek, które określa się kolektywnie jako SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) [13]. Do nich zaliczają się interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8), chemokiny (CXCL, CCL), czynniki wzrostu (VEGF, EGF), nierozpuszczalne białka macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, kolagen)

i inne. Wiele z nich wpływa na mikrośrodowisko tkanek i działa parakrynnie na otaczające komórki, przynosząc efekt zarówno pozytywny jak i negatywny. W niektórych przypadkach SASP może działać jako sygnał naprawczy stymulujący komórki układu immunologicznego do usuwania uszkodzonych lub starych komórek [14]. Z drugiej strony, nadmiar wydzielanych czynników prozapalnych wywołuje przewlekły stan zapalny, który może przyczyniać się do przyspieszonego starzenia komórkowego, pogorszenia funkcji tkanek, a w rezultacie ogólnego stanu zdrowia oraz rozwoju chorób wieku podeszłego [15].



Rycina 1.1. Podstawowe zmiany zachodzące podczas starzenia komórkowego. W wyniku uszkodzeń DNA, dochodzi do podwyższonej ekspresji białek p21 i p16 i zatrzymania komórek w cyklu oraz i wzrostu aktywności SA-β-gal. Ponadto obserwuje się lokalną kondensację chromatyny i tworzenie SAHF, znaczące zaburzenia w strukturze otoczki jądrowej oraz wzmożoną produkcję czynników zewnątrzkomórkowych, czyli SASP. Grafikę zaczerpnięto z [16] i przygotowano na podstawie [17].

1.2. Rodzaje starzenia komórkowego i związane z nimi ścieżki sygnałowe

Pierwsze doniesienie dotyczące starzenia komórkowego pojawiły się w 1961 roku, kiedy Leonard Hayflick i Paul Moorhead zauważyli zatrzymanie podziałów fibroblastów w hodowli, które nie wynikało z warunków mogących powodować stres. Okazało się, że doszło do wyczerpania zdolności komórek do podziałów, a zjawisko nazwano „limitem Hayflicka” [18]. Jest to maksymalna liczba podziałów jaką może przejść komórka, zanim ulegnie starzeniu. Limit ten jest silnie zależny od rodzaju komórki i organizmu, i dotyczy jedynie zdolnych do podziału komórek zróżnicowanych, gdyż uważa się, że komórki macierzyste, podobnie jak nowotworowe, są zdolne do nieograniczonej proliferacji. Nie znaczy to jednak, że komórki macierzyste i nowotworowe nie starzeją się. Może do tego dojść

spontanicznie w przypadku komórek macierzystych lub na skutek indukcji starzenia w komórkach nowotworowych.

Gdy komórki wyczerpią swój potencjał do podziału, dochodzi do tak zwanego starzenia replikacyjnego. Główną przyczyną i zarazem cechą charakterystyczną tego procesu jest krytyczne skrócenie telomerów znajdujących się na końcach chromosomów co tworzy swego rodzaju „replikometr” kontrolujący liczbę podziałów komórkowych [19]. Telomery zbudowane są z tysięcy powtórzeń krótkiej sekwencji TTAGGG i wraz z białkami zwanymi szelterydami tworzą dwie pętle D i T. Dzięki temu telomery zachowują swoją stabilną strukturę i chronią chromosomy przed łączeniem się ze sobą. Do skracania telomerów dochodzi podczas podziałów komórkowych na skutek tzw. problemu końca replikacji [20]. Synteza nowej nici za pomocą Polimerazy DNA zawsze odbywa się w kierunku od 3' do 5' końca. W związku z tym, replikacja nici wiodącej jest ciągła i zachodzi w całej nici, zaś nić opóźniona jest dobudowywana krótkimi odcinkami nukleotydów nazywanymi fragmentami Okazaki. Proces rozpoczyna się od dołączenia starterów RNA, a między nimi dochodzi do syntezy DNA. W kolejnym kroku startery są usuwane, a fragmenty łączone ze sobą, co prowadzi do skrócenia nici na jednym z końców. Niestety komórki somatyczne nie mają zdolności do odbudowy brakujących sekwencji, ponieważ poziom odpowiedzialnego za ten proces enzymu telomerazy, spada wraz z wiekiem [21]. Gdy dochodzi do krytycznego skrócenia telomerów, nie są one w stanie stworzyć pętli i tym samym zapewnić ochrony końcom chromosomów. W rezultacie jest to odczytywane jako uszkodzenie DNA i uruchamiana jest ścieżka DDR, a do tych miejsc rekrutowane są białka odpowiedzialne za wykrycie uszkodzeń i naprawę DNA. W starych komórkach mechanizm naprawy jest mniej wydajny i dochodzi do akumulacji nienaprawionych uszkodzeń [22].

Drugim rodzajem starzenia, jakiego mogą ulec komórki jest starzenie przyspieszone indukowane stresem (*stress-induced premature senescence*, SIPS, w skrócie w pracy nazywane PS). Uważa się, że jest ono niezależne od skracania telomerów, choć istnieją badania pokazujące, że pod wpływem stresu oksydacyjnego może dojść do ich skrócenia i uszkodzenia [23]. Niemniej w przeciwieństwie do starzenia replikacyjnego, SIPS zachodzi znacznie szybciej i gwałtowniej, nawet w ciągu kilku dni od zadziałania bodźca indukującego (w hodowli komórkowej). Do czynników przyczyniających się do starzenia przyspieszonego możemy zaliczyć reaktywne formy tlenu (RFT), promieniowanie gamma i UV oraz związki uszkadzające DNA, takie jak na przykład rutynowo stosowana w terapii przeciwnowotworowej doksorubicyna (*therapy-induced senescence*, TIS). Starzenie może też być wywołane zwiększoną ekspresją onkogenów w komórce (*oncogene-induced senescence*, OIS), a przykładowymi białkami związanymi z tym procesem są białko Ras, BRAF czy c-Myc [24, 25, 26]. Bez

względu na bodziec indukujący SIPS, w komórce dochodzi do akumulacji nienaprawionych uszkodzeń DNA, a co za tym idzie aktywacji ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA. W większości przypadków bezpośrednią przyczyną starzenia są uszkodzenia DNA, ale znane są również sytuacje, gdy komórka mimo braku uszkodzeń wykazuje symptomy starzenia [27, 28].

Oba typy starzenia aktywują tę samą ścieżkę sygnałową w odpowiedzi na przerwanie ciągłości nici DNA. W okolicy uszkodzenia jako pierwsze rekrutowane są białka rozpoznające i zabezpieczające miejsce pęknięcia DNA, do których należą białka kompleksu MRN (MRE11, RAD50, NBS), 911 (RAD9, HUS1, RAD1) oraz białka RPA i RFC [10]. Sygnał informujący o powstałym uszkodzeniu jest przekazywany do kinaz ATM i ATR, które fosforylują histon H2AX na serynie 139, nazywany γ H2AX, który tworzy skupiska w okolicy pęknięć DNA. Dzięki temu dochodzi do stabilizacji tworzącego się kompleksu naprawczego, a akumulacja tego wariantu histonu umożliwia rekrutację białek odpowiedzialnych za przemodelowanie chromatyny. W związku z tym w okolicach pęknięć może dochodzić do lokalnej kondensacji chromatyny, bogatej w trimetylowaną lizynę 9 histonu H3 (H3K9me3). Modyfikacja ta służy za miejsce przyłączenia acetylotransferazy Tip60, która poprzez przyłączenie grupy acetylowej do ATM, wpływa na aktywację tego białka [29]. Niemniej pojawienie się H3K9me3 jest krótkotrwałe, ponieważ zbyt długa kondensacja chromatyny w okolicy uszkodzeń, mogłaby zahamować dostęp maszynerii naprawczej szlaku DDR. W rezultacie, grupy metylowe są usuwane, a chromatyna rozluźnia się. Pozwala to na przyłączenie się 53BP1, które dalej przekazuje sygnał białkom odpowiedzialnym za naprawę powstałych uszkodzeń oraz kinazom punktu kontrolnego cyklu komórkowego (CHK1 i CHK2) [10]. Końcowym etapem ścieżki sygnalizacyjnej jest aktywacja i stabilizacja białka p53, m.in. przez jego acetylację na lizynie 382 i fosforylację na serynie 15, oraz synteza białka p21, co w efekcie prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego [30]. W tym momencie komórka może podjąć jedną z trzech decyzji, które zależą od stopnia akumulacji uszkodzeń. Jeśli jest ich niewiele dochodzi do ich naprawy. Natomiast w przypadku zbyt licznych pęknięć, gdy komórka nie jest w stanie się ich pozbyć, przechodzi w stan stałego zatrzymania podziałów, czyli starzenia komórkowego lub kierowana jest na ścieżkę apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki, zwłaszcza gdy uszkodzenia dotyczą miejsc kodujących kluczowe dla funkcjonowania komórki geny.

Obok szlaku DDR, istotną rolę w indukcji starzenia pełni ścieżka z udziałem białka Rb (*Retinoblastoma protein*) i aktywacja inhibitora kinaz zależnych od cyklin, p16. Do aktywacji ścieżki dochodzi w przypadku, gdy komórka nie jest w stanie naprawić powstałych uszkodzeń, ale zmiany nie są jeszcze krytyczne i nie prowadzą do apoptozy. W wyniku aktywacji białka Rb (defosforylacji) dochodzi do przemodelowania struktury chromatyny przy wykorzystaniu enzymów odpowiedzialnych za

modyfikacje epigenetyczne. W początkowej fazie wyższy poziom białka p16 blokuje kinazy (CDK4/6) odpowiadające za fosforylację białka Rb, które w hipofosforylowanej formie wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, odgrywającym ważną rolę w podziale komórkowym. W rezultacie dochodzi do zatrzymania komórek w fazie G1 i zahamowania proliferacji [31].

Uruchomienie powyższych ścieżek sygnałowych jest niezbędne do zainicjowania starzenia w wielu typach komórek. Wzrost poziomu białek zaangażowanych w ten proces (m.in. p53, p21, p16) jest obserwowany w hodowlach komórkowych *in vitro*, ale również *in vivo* w tkankach starzejących się organizmów, w tym ludzi [32]. Dzięki temu są istotnymi markerami używanymi do identyfikacji komórek starych. Niemniej jednak żaden z nich nie jest w stanie precyzyjnie wskazać typu starzenia i jak dotąd nie udało się wytypować takiego znacznika, który mógłby być zastosowany do odróżnienia starzenia replikacyjnego od przyspieszonego. O ile starzenie replikacyjne jest naturalnym zjawiskiem, to starzenie przyspieszone jest wynikiem działania szkodliwych czynników zewnętrznych lub wewnętrznych. W związku z tym prawidłowa identyfikacja przyczyny zachodzących zmian mogłaby pomóc w ocenie wpływu leków i środowiska na tempo starzenia komórkowego, co w konsekwencji pozwoliłoby uniknąć efektów ubocznych wynikających z przyspieszonego starzenia.

1.3. Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu

Starzenie komórkowe jest istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój chorób związanych z wiekiem, lecz nie znaczy to, że nie pełni pozytywnych funkcji w organizmie. Jest to podstawowy proces komórkowy pełniący ważną, a wręcz niezbędną funkcję już na etapie rozwoju zarodkowego. Stare komórki pojawiają się na określonych etapach i w ściśle określonych miejscach rozwijającego się zarodka kontrolując prawidłowy przebieg organogenezy [33] (analogicznie jak ma to miejsce w przypadku apoptozy, która na pewnych etapach rozwoju jest niezbędna do formowania narządów i układów). Komórki charakteryzują się podwyższoną aktywnością SA- β -gal oraz wyższym poziomem białka p21. Dowiedziono, że wyciszenie p21 powodowało pewne zaburzenia w rozwoju zarodkowym myszy wskazując, że wystąpienie starzenia komórkowego na tym etapie jest niezbędne w rozwoju organizmu. Co ciekawe, w takim starzeniu nie obserwuje się innych cech charakterystycznych dla tego procesu, czyli nie dochodzi do wzrostu poziomu białka p53 i p16, skracania telomerów ani do powstawania uszkodzeń DNA. Stare komórki zostają usunięte przez komórki układu odpornościowego – makrofagi, zapewniając prawidłowy rozwój zarodka [34].

Starzenie komórkowe może też występować na późniejszym etapie życia, gdzie m.in. sprzyja gojeniu się ran z wykorzystaniem lokalnego, przejściowego stanu zapalnego (ostry stan zapalny)

wytworzonego przez uszkodzone i sąsiadujące komórki, co wiąże się ze zmianą profilu sekrecyjnego [35, 36]. Jest to bodziec, który stymuluje np. fibroblasty do migracji w miejsce uszkodzenia, dalszej proliferacji oraz przebudowy tkanki dzięki wydzielanym czynnikom zewnątrzkomórkowym. Dzięki zwiększonej sekrecji enzymów metaloproteinaz, dochodzi do trawienia nadmiaru kolagenu, co zapobiega powstawaniu zwłóknień w tkankach (blizn) [37]. Ostatnim etapem jest usunięcie starej komórki przez komórki układu odpornościowego, co kończy się regeneracją tkanki. Z drugiej strony, przedłużony stan zapalny (przewlekły stan zapalny na niskim poziomie), który związany jest ze starzeniem ma wpływ destrukcyjny na organizm. W wyniku stałego działania SASP dochodzi do zmniejszenia proliferacji i indukcji starzenia fibroblastów, co w efekcie prowadzi do zahamowania odnowy tkanek w miejscu uszkodzenia, a upośledzony układ immunologiczny nie nadąża usuwać starych komórek, przedłużając tym samym czas regeneracji [38].

Równie dwojaki efekt starzenia można zaobserwować w przypadku rozwoju nowotworu. Mutacje w genach supresorowych (np. p53 lub Rb) oraz aktywacja onkogenów powoduje niekontrolowany wzrost proliferacji komórek. Może to skutkować powstawaniem większej liczby uszkodzeń DNA, a gdy dochodzi do ich nagromadzenia, komórka ulega starzeniu, co zapobiega namnażaniu się wadliwych komórek. Jak wspomniano, stare komórki charakteryzuje wydzielanie wielu białek zewnątrzkomórkowych, co wpływa na rozprzestrzenianie się starzenia na sąsiadujące komórki, hamując tym samym ich proliferację. W przypadku nowotworów efekt SASP może być czasem odwrotny i wręcz stymulować zmutowane komórki do dalszej proliferacji i metastazy, poprzez stwarzanie sprzyjającego mikrośrodowiska [39]. Wykazano, że wyciszenie białka PTBP1 u myszy powoduje zahamowanie wydzielania SASP, co powstrzymało dalszy rozwój raka wątroby [40]. Niemniej zjawisko starzenia zostało wykorzystane w terapii nowotworowej, gdzie za pomocą chemioterapeutyków (lub innych czynników) hamuje się proliferację komórek poprzez indukcję starzenia i tym samym zatrzymuje rozwój nowotworu.

Obecność starych komórek towarzyszy organizmowi na każdym etapie życia, jednak wydajność ich usuwania przez układ odpornościowy zmienia się wraz z wiekiem. Właśnie w wyniku upośledzenia funkcji komórek układu odpornościowego, u osób starszych dochodzi do nagromadzenia starych komórek w tkankach i narządach, co wywołuje przewlekły stan zapalny. Proces ten jest odpowiedzialny za progresję starzenia organizmu i jest nazywany inflammaging (od ang. „*inflammation*” i „*aging*”). Prowadzi on do zwiększenia zapadalności na różne choroby związane z wiekiem, jak np. choroby układu krążenia, w tym miażdżycy (której dokładny proces powstawania opisano w podrozdziale 1.8.), neurodegeneracyjne (Alzheimera i Parkinsona), przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, idiopatyczne

włóknienie płuc czy cukrzycę typu II i zaćmę. We wszystkich objętych chorobowo tkankach spotyka się komórki wykazujące cechy starzenia. W związku z tym, że usunięcie starych komórek z organizmu zwierząt niweluje negatywne skutki starzenia i poprawia ogólną kondycję fizyczną oraz funkcje poznawcze, komórki stare stały się celem terapeutycznym w przypadku starzenia organizmu oraz w chorobach wieku podeszłego [41]. Terapia polegająca na usunięciu starych komórek nazywana jest senoterapią, a związki użyte do osiągnięcia tego celu – senolitykami. Zauważono, że usunięcie starych komórek z podwyższoną ekspresją białka p16 z organizmu myszy (zarówno myszy z progerią, czyli zespołem przedwczesnego starzenia, jak i starych myszy typu dzikiego), oprócz korzystnych zmian w narządach wewnętrznych, powodowało zwiększenie warstwy tłuszczowej oraz grubości włókien mięśniowych, przyczyniając się do poprawy sprawności ruchowej [42]. Ponadto dowiedziono, że podawanie mieszaniny związków dasatynibu i kwercetyny, może poprawić zdolności kognitywne (pamięci, uczenia się czy orientacji w terenie) u starych szczurów [43]. W związku z tym, badania nad możliwością zastosowania senolityków u ludzi stały się intensywnie rozwijaną gałęzią biogerontologii [44]. Obecnie, prowadzonych jest już wiele badań klinicznych z udziałem senolityków, mających na celu terapię chorób związanych z wiekiem i przeciwstarzeniową [45].

Warto również dodać, że do starzenia organizmu dochodzi nie tylko na skutek upływu lat, ale może wystąpić przedwcześnie na drodze przyspieszonego starzenia komórek, wynikającego z zaburzenia funkcjonowania jądra lub nieprawidłowej replikacji i naprawy DNA, co dzieje się również na skutek wad genetycznych. Przykładem skrajnie przyspieszonego starzenia, nazywanego progerią są zespoły Hutchinsona-Gilforda (HGPS), Wernera czy Cockayne. Każde z tych schorzeń ujawnia się na różnym etapie życia człowieka i jest powodowane przez mutację bezpośrednio wpływającą na zmiany w funkcjonowaniu komórki. Pierwsze oznaki wystąpienia HGPS pojawiają się już około pierwszego roku życia i wynikają z mutacji genu kodującego białko otoczki jądrowej, laminę. Zespół Wernera ujawnia się pod koniec dojrzwania, a przyczyną jego wystąpienia jest mutacja w genie kodującym helikazę Wrn odpowiedzialną za rozplatanie DNA i naprawę uszkodzeń [46]. Natomiast zespół Cockayne jest dziedziczną chorobą wrodzoną, która charakteryzuje się upośledzonym mechanizmem naprawy DNA ze względu na mutacje w genach kodujących białka CSA i CSB. Białka te biorą udział w naprawie poprzez wycinanie nukleotydu z nici (*nucleotide-excision repair*, NER) [47].

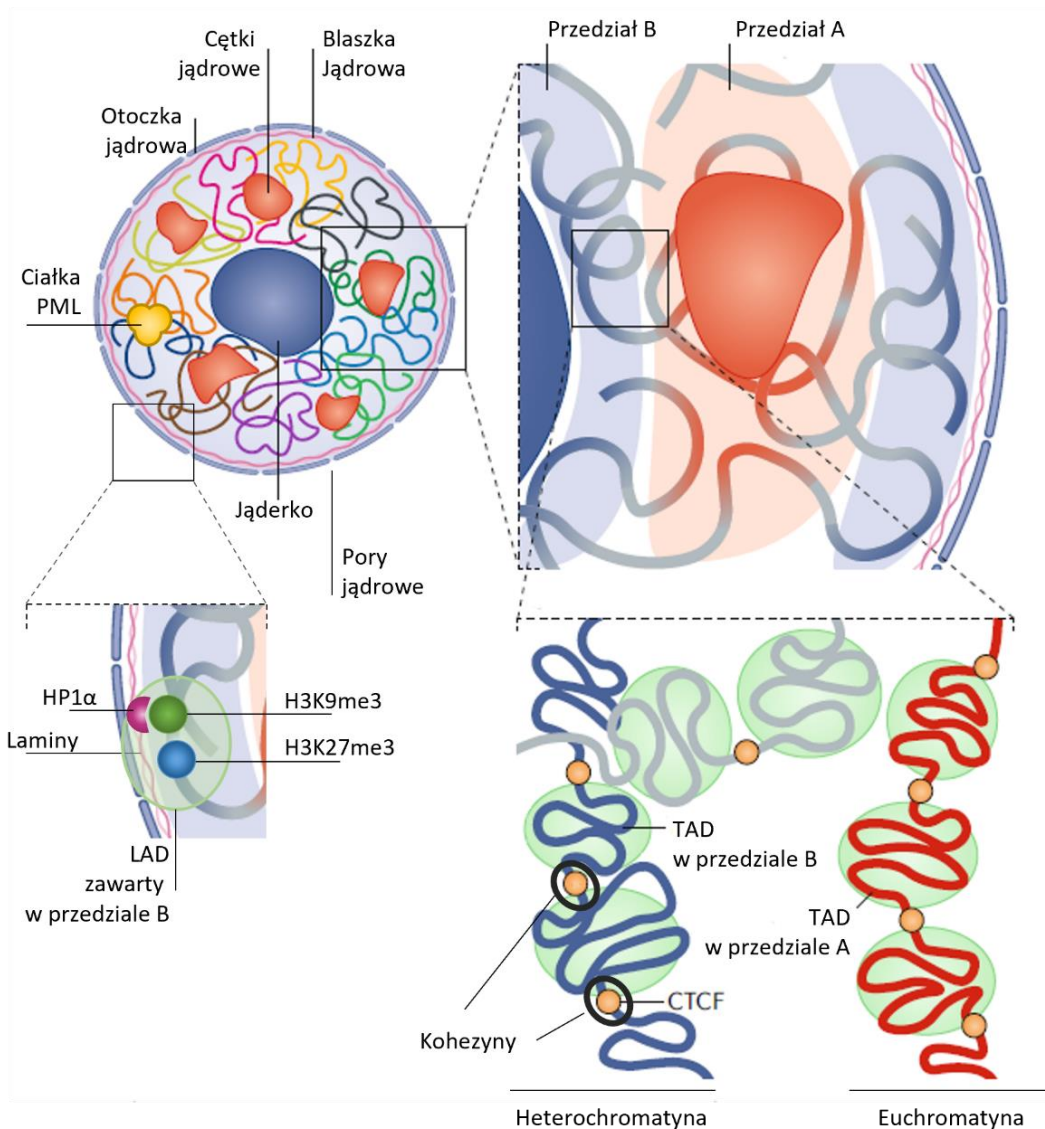
Wiele zmian, zarówno na skutek progerii jak i w starzeniu chronologicznym, zachodzi na poziomie jądra komórkowego, które szczegółowo opisano w dalszych rozdziałach niniejszej pracy.

1.4. Architektura jądra komórkowego

Aby umożliwić zrozumienie zmian towarzyszącym starzeniu, zachodzących na terenie jądra, omówiona zostanie budowa jądra komórki młodej. Jądro jest najważniejszą organelą znajdującą się w centralnej części komórki i to tutaj, zamknięty w podwójnej błonie lipidowej, znajduje się materiał genetyczny kontrolujący wszystkie zachodzące procesy. Jest to możliwe dzięki skoordynowanej współpracy różnych wyspecjalizowanych enzymów oraz białek strukturalnych odpowiedzialnych za organizację architektury jądra i regulację ekspresji genów.

Jądro komórkowe jest oddzielone od cytoplazmy podwójną błoną lipidową, nazywaną otoczką jądrową (*nuclear envelope*, NE). W otoczce znajdują się liczne białka międzybłonowe, w tym białka tworzące pory jądrowe (*nuclear pore complex*, NPC), czyli nukleoporyny [48]. Główną funkcją kanału zbudowanego z nukleoporyn jest umożliwienie transportu białek, jonów czy innych cząsteczek oraz zapewnienie sprawnej komunikacji między wnętrzem jądra a cytoplazmą komórki. Duże białka, czyli o masie powyżej 40 kDa wymagają transportu aktywnego. Jest to możliwe, dzięki krótkiej sekwencji sygnałowej obecnej w strukturze tych białek: jest to sygnał lokalizacji jądrowej NLS (*nuclear localization signal*) oraz NES (*nuclear export signal*). Fragmenty te są rozpoznawane przez białka importyny i eksportyny, które kontrolują sprawne przemieszczanie się białek przez błonę. Sama otoczka jądrowa składa się z błony zewnętrznej (*outer nuclear membrane*, ONM), połączonej z szorstką siateczką śródplazmatyczną, w której odbywa się synteza i fałdowanie białek oraz błony wewnętrznej (*inner nuclear membrane*, INM), będącej w stałym kontakcie z nukleoplazmą. Ponadto, INM pozostaje w bliskim kontakcie z blaszką jądrową, dzięki której jądro zachowuje swój kształt, a za pośrednictwem tworzących ją lamin uczestniczy w organizacji struktury chromatyny oraz prawidłowym utrzymaniu porów jądrowych w otoczce [49].

Laminy tworzą włókna białkowe należące do tak zwanych filamentów pośrednich, a w ich skład wchodzi trzy typy lamin: A, B oraz C. Lamin A i C (będące dwoma różnymi formami splicingowymi genu *LMNA*) wyrażane są głównie w zróżnicowanych komórkach [50], natomiast Lamina B jest obecna na wszystkich etapach rozwoju komórki [51]. Laminy są miejscem zakotwiczenia fragmentów skondensowanej chromatyny, tworząc tak zwane domeny związane z laminą (*lamin-associated domains*, LAD) (Ryc. 1.2.) [52]. Są to transkrypcyjnie nieaktywne obszary wzbogacone w H3K9me3 i związane z nim białko HP1 α oraz H3K27me3 (szczegółowo omówione w rozdziale 1.5.2.1. oraz 1.6.). Do interakcji z chromatyną dochodzi za pomocą białek zawierających w swojej strukturze domenę LEM (LAP2-emerin-MAN1) oraz poprzez interakcję z receptorem laminy B (LBR) [53].



Ryc. 1.2. Budowa jądra komórkowego oraz organizacja przestrzenna chromatyny (szczegółowo omówione w tekście). Zmodyfikowano na podstawie [54].

Struktura chromatyny jest wysoce zorganizowana i w interfazowym jądrze przybiera ściśle określoną konformację. Badania wykazały, że po zakończeniu podziału, każdy chromosom zajmuje „swoje miejsce” w przestrzeni jądrowej [54]. Małe chromosomy oraz obszary aktywne najczęściej lokują się w środkowej części, natomiast miejsca nieaktywnej transkrypcji oraz większe chromosomy gromadzą się na peryferiach jądra. Idąc dalej, chromatynę można umownie podzielić na dwa odrębne obszary, biorąc pod uwagę miejsca aktywnej i nieaktywnej transkrypcji. Dzięki najnowszym badaniom struktury przestrzennej chromatyny, można rozdzielić ją na przedział A, czyli wspomniany aktywny obszar

genomu zawierający euchromatynę oraz bardziej skondensowany i nieaktywny przedział B bogaty w heterochromatynę [55]. Wewnątrz przedziału a spotkamy miejsca bogate w grupy acetylowe oraz znaczniki promujące ekspresję genów. Tam też dochodzi do częstszych interakcji między DNA a białkami znajdującymi się w tym rejonie. Natomiast obszary skondensowanej chromatyny zwykle gromadzą się na peryferiach jądra, a miejsca przedziału B często pokrywają się z wcześniej opisanymi strukturami LAD [56]. Wchodząc na niższy, bardziej szczegółowy poziom rozłożenia przestrzennego chromatyny, można wyodrębnić topologicznie związane domeny, czyli tak zwane TAD (*topologically associating domains*). Są to fragmenty chromatyny tworzące obszary ograniczone kohezynami i białkami CTCF (Ryc. 1.2. dla poprawienia przejrzystości, nie zaznaczano kohezyn we wszystkich miejscach występowania białka) [57]. Białka te wyznaczają granicę TAD, a formowanie przez nie charakterystycznych pętli, umożliwia interakcję oddalonych od siebie regionów DNA i wpływając na regulację ekspresji genów.

Kolejną niezwykle ważną, najlepiej widoczną i największą strukturą znajdującą się w jądrze jest jąderko (jedno lub kilka), którego średnica może osiągać nawet 8 μm . Wewnątrz jąderka znajdują się kwasy nukleinowe i wybrane białka oraz zachodzi synteza rybosomalnego RNA oraz powstają rybosomy. Jąderko, obok ciałek jądrowych, czyli ciałek PML (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*), cętek jądrowych (*nuclear speckles*), ciałek PcG (*polycomb-group proteins*) i ciałek Cajala, należy do struktur bezbłonowych zawieszonych w nukleoplazmie [58].

Ciałka PML to dynamiczne struktury związane z regulacją różnorodnych procesów komórkowych, w tym ekspresji genów, odpowiedzi na stres, naprawy uszkodzeń DNA czy regulacji cyklu komórkowego. Tak wszechstronna funkcja możliwa jest dzięki obecności licznych białek wchodzących w ich skład. Oprócz białka rdzeniowego, czyli PML, można w nich spotkać np. białko Sp100, SUMO, DAXX, HP1 α i wiele innych [59]. W związku z tym, ciała PML stanowią pewnego rodzaju rezerwuar, w którym białka mogą przebywać czasowo, aż do momentu zapotrzebowania w danym procesie. Na przykład białka takie jak kinaza ATR, CHK2, BLM, RPA czy MRE11 (obecne w ciałkach niepobudzonych komórek) po wystąpieniu uszkodzeń DNA, dysocjują z ciałek, aby wziąć udział w naprawie. Ponadto skład ciałek PML oraz ich liczba zmienia się w zależności od cyklu komórkowego, a same skupiska ulegają zniekształceniu i rozszczepieniu w konkretnych fazach cyklu [60]. Podobny rozpad ciałek i związany z nim wzrost ich liczby zauważono podczas stresu komórkowego, jakim jest np. uszkodzenie DNA, szok cieplny czy promieniowanie UV i gamma.

Cętki jądrowe, nazywane też plamkami jądrowymi, to organelle zawieszane w przestrzeni międzychromatynowej, niezwiązanej DNA, do których należą czynniki uczestniczące w składaniu mRNA. Są to małe jądrowe nukleoproteiny (*small nuclear ribonucleoprotein*, snRNP) oraz białka SR, czyli białka bogate w serynę i argininę (*serine-arginine rich proteins*) [61]. Ciałka PcG to wielobiałkowe kompleksy, które mogą brać udział w przemodelowaniu struktury chromatyny oraz wyciszaniu genów [62], a ciałka Cajala uczestniczą w procesie wycinania intronów w trakcie dojrzewania RNA [63].

1.5. Modyfikacje epigenetyczne DNA i histonów

Typowe jądro komórki eukariotycznej mierzy między 5 a 20 μm średnicy [64], będąc tym samym największą organelą w komórce. W nim zawarty jest materiał genetyczny w postaci dwuniciowego DNA, który w rozwiniętej, liniowej postaci osiągnąłby ok. 2 metry długości. Aby całe DNA mogło pomieścić się w tak ograniczonej przestrzeni, musi zostać odpowiednio „upakowane”. Dzieje się to dzięki szeregowi mechanizmów modulujących kondensację i strukturę przestrzenną chromatyny. Ponadto, chromatyna musi podlegać dynamicznej regulacji umożliwiającej rozpoczęcie lub zahamowanie transkrypcji, a takimi skutecznymi regulatorami są modyfikacje epigenetyczne. Termin „epigenetyka” został po raz pierwszy użyty i zarazem stworzony przez embriologa Conrada Waddingtona na początku lat 40. XX wieku i opisywał badanie pozagenowych mechanizmów różnicowania komórek [65]. W trakcie swojej pracy nad zarodkami muszki *Drosophila melanogaster*, Waddington zauważył, że poprzez modulacje środowiskowe można wpływać na fenotyp rozwijających się owadów. Interpretacja uzyskanego wyniku sugerowała, że czynniki zewnętrzne działające na zarodek, wpływają jedynie na kierunek różnicowania komórek i przybieranie określonego fenotypu. Niemniej poczynione obserwacje były impulsem do zgłębiania fenomenu, chociaż prawdziwy i dokładny mechanizm epigenetycznej regulacji genów długo pozostawał zagadką. Wraz z postępowaniem badań w tej dziedzinie, definicja epigenetyki kilkakrotnie zmieniała się, aby ostatecznie przybrać formę „badania dziedzicznych i środowiskowych zmian w funkcji genu, które nie pociągają za sobą żadnych zmian w sekwencji DNA” [66]. Obecnie wiadomo, że do takich modyfikacji zalicza się między innymi metylację DNA oraz potranslacyjne modyfikacje histonów (*post-translational modifications*, PTMs). Charakterystyczną cechą obu sposobów regulacji jest ich wysoka specyficzność tkankowa oraz potencjalna odwracalność, co czyni je atrakcyjnym celem terapeutycznym w leczeniu wielu schorzeń, ale również w opóźnianiu procesu starzenia [67].

Regulacja struktury chromatyny i ekspresji genów zachodzi dzięki skoordynowanej współpracy białek, które ze względu na swoją funkcję można podzielić na enzymy wprowadzające (*writers*), usuwające (*erasers*) oraz białka rozpoznające (*readers*) konkretne modyfikacje na DNA lub histonach [68]. Do

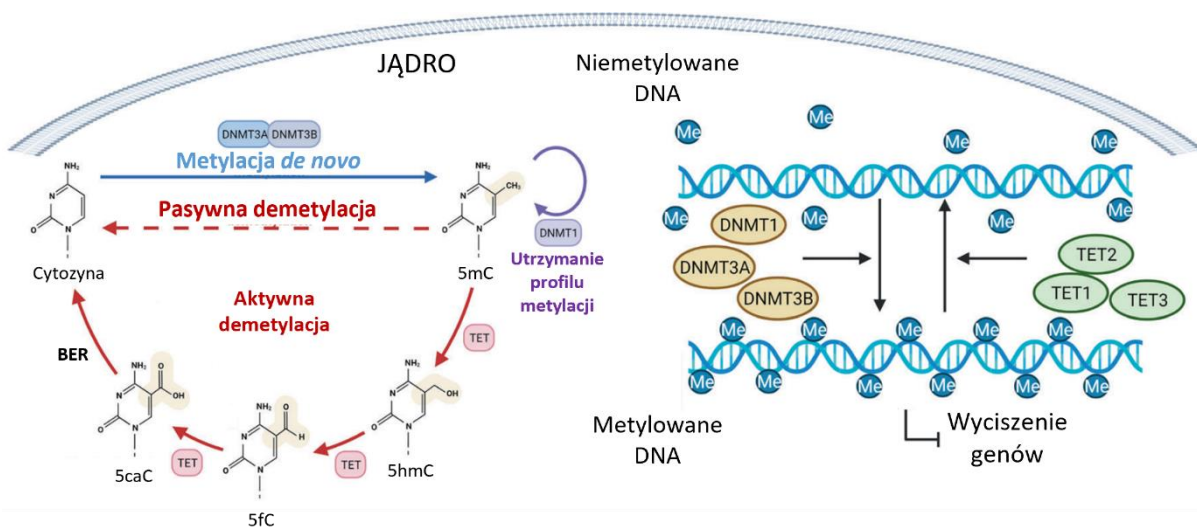
najważniejszych modyfikacji regulujących ekspresję genów należą metylacje i acetylacje, a do enzymów wprowadzających te grupy funkcyjne zalicza się m. in. metylotransferazy DNA (*DNA methyltransferases*, DNMTs), metylotransferazy histonów (*histone methyltransferases*, HMTs) i acetylotransferazy histonów (*histone acetyltransferases*, HATs). Odwrotną rolę pełnią demetylasy DNA (*DNA demethylases*), demetylasy histonów (*histone demethylases*, HDMs) oraz deacetylasy histonów (*histone deacetylases*, HDACs). Z kolei do białek odczytujących należą takie, które w swojej budowie posiadają domeny o wysokim powinowactwie do zmodyfikowanych miejsc i poprzez aktywne przyłączanie determinują wynik transkrypcji [69]. Domeny rozpoznające metylowane histony obejmują m.in. domeny chromo (CD), PHD, WD40, Tudor, MBT, BAH i inne, podczas gdy acetylacja histonów jest rozpoznawana przez domeny bromo i tandemowe domeny PHD. Co ciekawe, białka odczytujące mogą celować w wiele PTM w obrębie histonu, nukleosomu, a nawet wielu nukleosomów, a ich działanie może być kontrolowane przez niekodujące RNA. Co więcej, białka te mogą rekrutować czynniki zaangażowane w transkrypcję, replikację lub naprawę uszkodzeń DNA [70].

Dodatkowym, dość niedawno odkrytym sposobem regulacji ekspresji genów jest kontrola ich translacji przez niekodujące RNA, jak np. mikroRNA (miRNA).

1.5.1. Metylacja DNA

Jednym z głównych i zarazem najlepiej poznanych mechanizmów modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA, która związana jest z wyciszeniem ekspresji genów. Jest to modyfikacja bardzo trwała, a jej wzór jest dziedziczony przez komórki potomne. Metylacja zachodzi przy udziale metylotransferaz DNA, gdzie grupa metylowa z S-adenozylometioniny (SAM) jest przenoszona na piątą pozycję pierścienia cytozyny w obrębie dinukleotydu CpG. Do tej pory, zidentyfikowano trzy główne białka odpowiedzialne za metylację DNA. Są to DNMT1, DNMT3a oraz DNMT3b, a każdy z nich pełni konkretną rolę w procesie metylacji. Pierwszą, dość szeroko opisaną metylotransferazą jest DNMT1 [71]. To dzięki niej zachodzi dokładne odwzorowanie profilu metylacji na nowo syntetyzowanym DNA w oparciu o nić matrycową. Zatem DNMT1 pomaga utrzymać spójność i ciągłość wzoru metylacji w komórkach potomnych. Natomiast enzymy DNMT3a i DNMT3b przeprowadzają metylację *de novo*, czyli koordynują umiejscowienie grupy metylowej w nowych miejscach w genomie zawierających dinukleotyd CpG. Dinukleotyd ten może występować na długości całego genomu, lecz najczęściej spotyka się go w okolicach promotorów genów, gdzie grupuje się w tzw. wyspy CpG (*CpG islands*) [72]. W zależności od stopnia metylacji cytozyny w rejonach wysp, DNA może być hipo- lub hipermetylowane, co wpływa na ekspresję genów. Hipometylacja skutkuje aktywną transkrypcją, zaś hipermetylacja, wyciszeniem genów. W ludzkim genomie od 60 do 80% wszystkich miejsc

występowania CpG pozostaje silnie zmetylowanych, z wyjątkiem wysp CpG, które w prawidłowych komórkach pozostają aktywne transkrypcyjnie. Jednakże te zwykle niezmetylowane wyspy CpG, w warunkach patologicznych oraz w procesie starzenia się organizmu mogą ulegać znaczącym zmianom [73]. Wraz z upływem lat obserwuje się globalną utratę metylacji w genomie, z jednocześnie zwiększoną hipermetylacją promotorów genów specyficznych dla prawidłowej funkcji komórek lub kodujących wybrane czynniki transkrypcyjne. Prowadzi to do istotnych zmian w profilu ekspresji genów w porównaniu z młodym organizmem. Co ciekawe, zaobserwowane zmiany przyczyniły się do rozwoju metod opartych na ocenie profilu metylacji specyficznych komórek i tkanek, czyli tak zwanych zegarów epigenetycznych. Dzięki nim, można oszacować wiek biologiczny człowieka, który może być różny od wieku chronologicznego, określić tempo starzenia się organizmu i zidentyfikować podatność na pewne schorzenia [74].



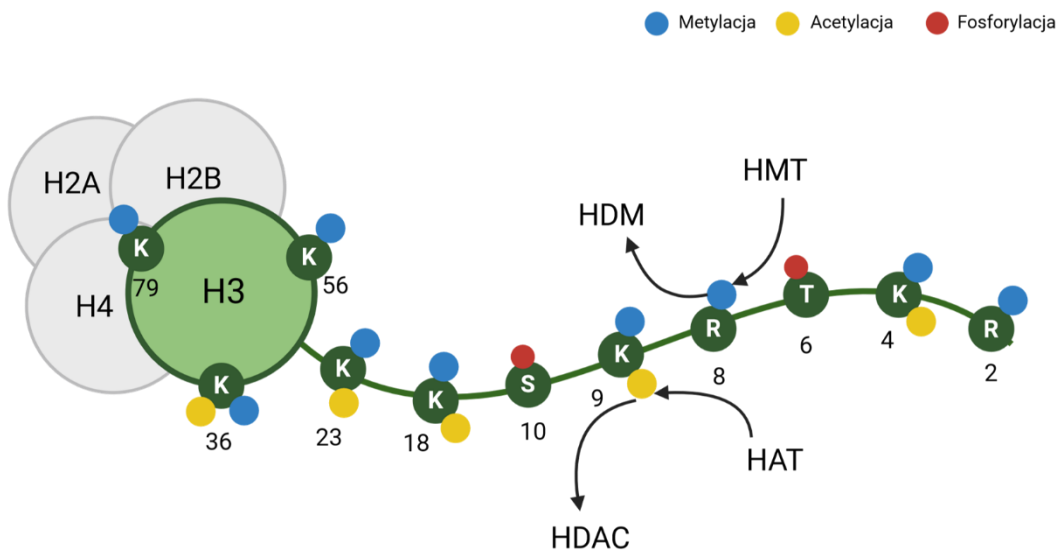
Ryc. 1.3. Schemat przedstawiający proces metylacji i demetylacji DNA. Po lewej zamieszczono etapy pasywnej i aktywnej demetylacji zachodzącej na cytozynie, a po prawej ogólną zasadę działania metylacji i jej efektu na ekspresję genów. Zmodyfikowano na podstawie [75].

Procesem przeciwnym do metylacji, jest demetylacja. Może ona zachodzić pasywnie podczas mitozy, gdy wskutek zaburzonej pracy DNMT1 nie dochodzi do nałożenia grupy metylowej na nowopowstałą nić DNA. Drugim sposobem jest aktywna demetylacja przeprowadzana przez enzymy TET (*ten-eleven translocation*) i często zachodzi niezależnie od podziałów komórkowych. Do rodziny enzymów TET należą trzy izoformy: TET1, TET2 i TET3 [76]. W wyniku ich działania metylowana cytozyna zostaje stopniowo utleniana do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboksylocytozyny (5caC), co ostatecznie kończy się usunięciem zmodyfikowanej zasady poprzez

mechanizm BER (*base excision repair*) lub dekarboksylację [77]. Sposób, w jaki proces demetylacji DNA przebiega *in vivo*, jest jednak nadal przedmiotem szeroko zakrojonych badań. Do tej pory pokazano, że komórki budujące różne tkanki wydają się gromadzić 5hmC, a wzbogacenie jest zwykle obserwowane w okolicy promotorów określonych genów [78]. Wskazuje to, że 5hmC służy nie tylko jako półprodukt w aktywnej demetylacji DNA, ale może również stanowić odrębny epigenetyczny znak regulacyjny kontrolujący ekspresję genów.

1.5.2. Potranslacyjne modyfikacje histonów

Kolejny poziom regulacji upakowania chromatyny ma miejsce przy udziale białek histonowych oraz ich potranslacyjnych modyfikacji (PTM). Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, składający się z łańcucha DNA zbudowanego z 147 par zasad, nawiniętego na osiem cząsteczek histonów. DNA upakowane w formie nukleosomów tworzy struktury wyższego rzędu, które są stabilizowane przez dodatkowy histon łącznikowy H1 [79]. Oktamer histonowy zbudowany jest z dwóch kopii kanonicznych histonów H2A, H2B, H3 oraz H4, a każdy z nich (z wyjątkiem H4) występuje również w postaci wariantów. Warianty różnią się sekwencją aminokwasów i mogą być syntetyzowane niezależnie od replikacji DNA, zarówno w komórkach mitotycznych jak i postmitotycznych [80]. W ciągu życia komórki może dochodzić do wymiany histonów w nukleosomie, a proces ten dotyczy głównie histonów kanonicznych. Mogą być one wymieniane na nowe białka tego samego typu lub na wspomniane warianty. Ważną cechą wszystkich histonów jest ich podatność na modyfikacje, które umiejscawiane są na tzw. ogonach (*histone tails*), czyli N-końcach białek, wystających ponad rdzeniową część histonów. Tym sposobem tworzą łatwo dostępne miejsce dla enzymów dodających bądź usuwających dane modyfikacje z reszt aminokwasowych (np. lizyny, argininy lub seryny) (Ryc. 1.4.). Do najczęściej przyłączanych cząsteczek należą grupy metylowe, acetylowe, fosforanowe lub niskocząsteczkowe białko jakim jest ubikwityna. Niemniej w niniejszej pracy, skupiono się głównie na badaniu roli metylacji i acetylacji lizyn.



Ryc. 1.4. Potranslacyjne modyfikacje histonu H3 oraz enzymy odpowiedzialne za dodanie lub usunięcie grupy acetylowej i metylowej z danej reszty aminokwasowej. Rycina przygotowana za pomocą oprogramowania Biorender.

W wyniku działania enzymów odpowiedzialnych za PTM dochodzi do przekształcenia struktury przestrzennej chromatyny. Jak wspomniano, chromatyna może przybierać dwie główne formy: skondensowaną i niedostępną dla procesu transkrypcji, hipermetylowaną heterochromatynę lub rozluźnioną i aktywną transkrypcyjnie euchromatynę, przeważnie bogatą w grupy acetylowe. Ponadto heterochromatynę można podzielić na dwa rodzaje, różniące się występowaniem w genomie oraz podatnością na działanie enzymów modulujących, czyli heterochromatynę konstytutywną oraz fakultatywną. Heterochromatyna konstytutywna pełni kluczową rolę w utrzymaniu stabilności i integralności genomu i jest stale obecna w komórce niezależnie od cyklu komórkowego. Najczęściej spotyka się ją w obszarach centromerów i telomerów, jak również w rejonach niezawierających genów. Dla odmiany, heterochromatyna fakultatywna jest dynamiczna i ulega aktywnej regulacji przez specjalistyczne enzymy. Może pojawiać się w jądrze komórkowym okresowo, zwłaszcza w rejonach genów ulegających tymczasowemu wyciszeniu. Każdy rodzaj chromatyny charakteryzuje się specyficznymi modyfikacjami. Szczegółowy opis potranslacyjnych zmian zachodzących na lizynie histonu H3 oraz ich roli w komórce zawarto w kolejnych rozdziałach.

1.5.2.1. Metylacja histonów

Spośród wszystkich poznanych modyfikacji histonów, metylacja wydaje się pełnić jedną z najważniejszych ról w regulacji ekspresji genów. Tak jak w przypadku metylacji DNA, grupa metylowa

jest przenoszona z cząsteczki SAM na łańcuch boczny lizyny, za pomocą enzymów HMT. W wyniku ich działania, łańcuch boczny aminokwasu ulega mono-, di- lub trimetylacji [81], a za każdy etap odpowiedzialne są specyficzne białka (Tabela 1.1.) [82].

Ogólnie uważa się, że metylacja jest związana z represją genów, jednakże w przypadku histonów, zależnie od lokalizacji lizyny na ogonie histonu, może ona wpływać zarówno na wyciszenie jak i aktywację transkrypcji. Przykładem aktywnego znacznika jest monometylowana lizyna 4 (H3K4me1) znajdująca się w enhancerach (czyli regionach dystalnych) genów, trimetylowana lizyna 4 (H3K4me3), której wzbogacenie występuje głównie w miejscach promotorowych, trimetylowana lizyna 36 (H3K36me3), która znajduje się w egzonach oraz di- i trimetylowana lizyna 79 (H3K79me2/3), która może występować w całym obszarze kodujących genów [83]. Za powstanie skondensowanej chromatyny, a tym samym wyciszenie wybranych genów odpowiedzialna jest głównie trimetylacja lizyny 9 (H3K9) oraz 27 (H3K27). Trimetylacja H3K9 najczęściej spotykana jest w promotorach oraz ciałach nieaktywnych genów, tworząc heterochromatynę fakultatywną. Ponadto jest niezbędną modyfikacją tworzącą heterochromatynę konstytutywną stabilizującą strukturę chromatyny w rejonach centromerów oraz telomerów. Z kolei H3K27me3 jest związana głównie z powstawaniem heterochromatyny fakultatywnej oraz częściową inaktywacją dodatkowego chromosomu X w żeńskich komórkach, tworząc tak zwane ciała Barra. Co ciekawe, w zarodkowych komórkach macierzystych dochodzi do akumulacji H3K27me3 w miejscach promotorowych niektórych genów, które wraz z H3K4me3 tworzą domeny biwalentne. To unikalne miejsce tworzy pewnego rodzaju stan „niezdecydowania” komórkowego. Równoczesna obecność sygnału aktywacji (H3K4me3) i represji genów (H3K27me3) wskazuje na obszary będące na granicy ekspresji i wyciszenia. Miejsca biwalentne pełnią znaczącą rolę w procesie różnicowania komórek i rozwoju zarodkowego [84].

Niemal za każdy rodzaj metylacji lizyny odpowiedzialny jest specjalnie przeznaczony ku temu enzym. W tabeli 1.1. zamieszczono listę enzymów odpowiedzialnych za metylację konkretnej lizyny (K4, K9 i K27), a w nawiasie zaznaczono, ile grup funkcyjnych może dołączyć każdy z nich. Metylacja H3K4 może zachodzić dzięki wielu różnym białkom, a wiele z nich jest w stanie sukcesywnie dołączyć kilka grup metylowych do jednej lizyny. Podobnie to wygląda w przypadku H3K9. Nałożenie pierwszej grupy metylowej zwykle inicjowane jest przez białko G9a lub EHMT1 (inaczej GLP), które w kolejnym etapie mogą dołączyć drugą cząsteczkę CH₃. Często jednak, druga grupa nakładana jest przez PRDM2 lub SETDB1. Natomiast trimetylacja może zachodzić również dzięki aktywności SETDB1 lub bardziej typowo, w wyniku działania metylotransferazy SUV39H1. Jest to enzym najczęściej biorący udział w trimetylacji lizyny 9 czym wpływa na kondensację chromatyny. Poprzez dodatkowe oddziaływanie

z białkiem HP1 α oraz metylovanym DNA, stabilizuje upakowaną strukturę chromatyny i wpływa na wyciszenie genów.

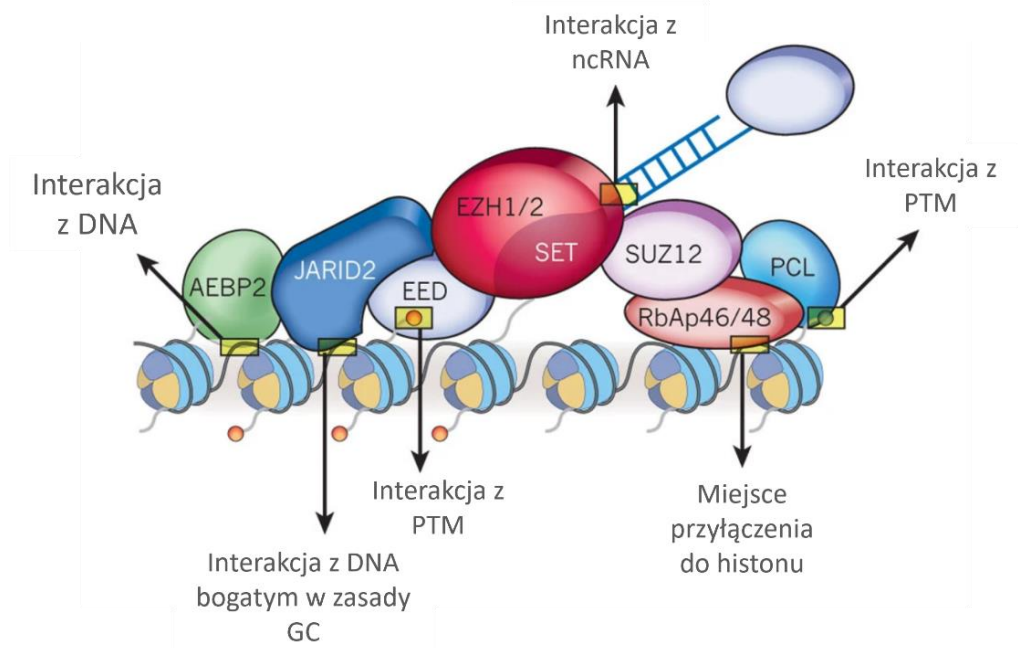
Tabela 1.1. Enzymy zaangażowane w metylację i demetylację lizyny 4, 9 i 27 histonu H3.

Miejsce metylacji	Metylotransferaza	Demetylaza
H3K4	SETD1A (me1-3), SETD1B, SETD7 (me1), MLL (me1-3), MLL2, MLL3 (me1-3), MLL4, ASH1L (me1/3), SMYD3 (me2/3), WDR5	LSD1, LSD2, KDM5A-D (JARID1A-D), NO66
H3K9	SUV39H1 (me3), SUV39H2, SETDB1 (me2/3), SETDB2, G9a (me1/me2), EHMT1/GLP (me1/ me2), PRDM2 (me2), MECOM, JMJD2A	Rodzina białka JHDM3 KDM9
H3K27	EZH1/2 (kompleks PRC2)	UTX, UTY, JMJD3

Wyjątkowy sposób metylacji dotyczy H3K27 i o ile w poprzednich przypadkach znane są enzymy inicjujące dołączenie pierwszej cząsteczki grupy metylowej, to mechanizm monometylacji lizyny 27 nadal pozostaje zagadką. Natomiast dalsze etapy, czyli di- i trimetylacja są już w pewnym stopniu poznane. W przeciwieństwie do K4 i K9, metylacja przeprowadzana jest dzięki katalitycznej aktywności jednego enzymu, EZH2 (*enhancer of zeste 2*), wchodzącego w skład kompleksu PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) (Ryc. 1.5.). Niekiedy w kompleksie, w zamian EZH2, może występować jego homolog EZH1. Podejrzewa się, że jego obecność może wpływać na mniejszą wydajność metylacji, gdyż posiada znacznie niższą aktywność enzymatyczną w porównaniu do EZH2. Z drugiej strony, EZH1 posiada większą zdolność do wiązania nukleosomów niż EZH2, przez co może wpływać na silniejszą kondensację chromatyny [85]. Kolejną różnicą między tymi białkami, jest ich różny poziom ekspresji w komórkach. Białko EZH2 jest charakterystyczne dla silnie proliferujących komórek (zwłaszcza komórek macierzystych), a jego ekspresja jest kontrolowana przez zależny od cyklu czynnik transkrypcyjny E2F [86]. Dzięki temu, EZH2 odwzorowuje profil metylacji H3K27 w nowopowstałych komórkach. Z drugiej strony, poziom EZH1 wydaje się być stały i relatywnie niski w komórkach, niezależnie od etapu rozwoju. Uważa się, że dzięki temu EZH1 może służyć podtrzymaniu poziomu metylacji H3K27 w komórkach [87]. Z racji, że EZH1 i EZH2 pełnią kluczową rolę w procesie i są niezbędne w tworzeniu PRC2, często traktuje się je kolektywnie jako EZH1/2.

Białko EZH1/2 swoją aktywność enzymatyczną zawdzięcza obecności domeny SET, katalizującej przyłączanie grupy metylowej. Jednakże, aby białko mogło prawidłowo wypełniać swoją funkcję, musi

współpracować z trzema dodatkowymi, niezbędnymi białkami, tworząc rdzeń kompleksu [88]. Są to białka SUZ12, EED (*embryonic ectoderm development*) oraz RbAp46/48 (retinoblastoma-associated protein 46/48, znane również jako RBBP4 i RBBP7). Każde z tych białek pełni odrębną rolę w procesie metylacji. Białko EED rozpoznaje i przyłącza się do modyfikacji histonu (głównie H3K27me3), a poprzez zmianę konformacji EZH1/2 stymuluje jego aktywność enzymatyczną przyczyniając się do propagacji metylacji na histonach [89]. Z kolei SUZ12 w połączeniu z białkiem opiekuńczym (chaperonem) histonów RbAp46/48, pełnią funkcję stabilizującą cały kompleks, dzięki interakcji z N-końcem ogona histonu H3 [90].



Ryc. 1.5. Schemat przedstawiający skład kompleksu PRC2 oraz funkcje tworzących go białek. Zmodyfikowany na podstawie [88].

Jak zaznaczono na rycinie 1.5. do kompleksu mogą przyłączać się inne białka, tworząc dwa podtypy: PRC2.1 i PRC2.2. W pierwszym znajdują się dodatkowe białka PCL (*polycomb-like*), natomiast w drugim typie można spotkać białka AEBP2 i JARID2 [88]. Każde z nich może wpływać nieco odmiennie na funkcję kompleksu, lecz nadal nie jest jasna ich dokładna rola. Uważa się, że białka grupy PCL (czyli PCL1, PCL2 i PCL3 znane również jako PHF1, MTF2 i PHF19), mogą wchodzić w interakcję z białkiem SUZ12 i wpływać na aktywację EZH2, a ich ekspresja jest tkankowo specyficzna [91]. Dzięki obecnej w tych białkach domenie tudor, może dochodzić do rozpoznawania H3K36me3, dołączenia kompleksu PRC2 i tym samym regulacji znajdujących się w pobliżu genów. W przypadku białka AEBP2, będącego

częścią kompleksu PRC2.2, nie udało się jeszcze jednoznacznie określić pełnionej przez niego funkcji. Uważa się, że poprzez interakcję z nicią DNA, może w to miejsce rekrutować PRC2 i wzmacniać aktywność enzymatyczną kompleksu [92]. Drugie białko kompleksu PRC2.2, JARID2, może odgrywać znaczącą rolę w rozwoju zarodkowym, a jego wyciszenie w zarodkach myszy prowadzi do groźnych defektów w tworzącym się układzie krwionośnym [93]. JARID2 łączy się z nicią DNA w miejscach bogatych w guaninę i cytozynę, aby w tę okolicę rekrutować kompleks PRC2 i podobnie jak AEBP2, wpływać na aktywność enzymatyczną. Brak białka (lub jego inaktywacja) może zaburzać przyłączenie się kompleksu do chromatyny, lecz wykazano, że nie wpływało to znacząco na ogólny poziom metylacji H3K27 [94]. Dzięki działaniu kompleksu PRC2, modyfikacja H3K27me3 pozwala na przyłączenie się kompleksu PRC1, wpływając na ekspresję genów oraz kondensację i stabilizację chromatyny [95].

Odłączenie grup metylowych z reszt lizyn zachodzi dzięki przeciwstawnie działającym enzymom, czyli demetylazom histonów (HDM) i tak jak w przypadku HMT, każda lizyna posiada swój własny zestaw enzymów odpowiedzialnych za usunięcie grupy z łańcucha. Demetylacja często jest związana z rozluźnieniem chromatyny, a w miejsce usuniętych grup, mogą być zdeponowane inne modyfikacje wpływające na ekspresję genów, jak na przykład grupy acetylowe.

1.5.2.2. Acetylacja histonów

Zmiany w acetylacji chromatyny są kluczowym elementem regulacji transkrypcji genów i acetylacja często spotykana jest w miejscach rozluźnionej euchromatyny. Za jej aktywną i otwartą formę odpowiadają acetylotransferazy histonów (HAT), które przenoszą grupę acetylową z acetylo-CoA na określone reszty lizyny w ogonie histonu [96]. Jednak w przeciwieństwie do HMT, enzymy te nie są przypisane do jednej konkretnej lizyny na histonie. Przez to, że mogą brać czynny udział w acetylacji różnych białek obecnych w komórce, a lista ich jest wyjątkowo długa i należą tu również białka niehistonowe, nadzorują precyzyjną regulację aktywności genów i funkcji komórkowych. Wiele enzymów HAT można przypisać do większych grup i kompleksów, takich jak rodziny białek GNAT, MYST, p300/CBP, Rtt109, HAT1 czy kompleksu TFIID [97].

Przeciwstawną funkcję do HAT pełnią deacetylazy histonów (HDAC). Usuwając grupę acetylową z histonów, kontrolują upakowanie chromatyny, przez co mogą wpływać na wyciszenie genów. u ludzi rozpoznano 18 enzymów, które podzielono na cztery klasy bazując na ich strukturze, lokalizacji w komórce oraz różnic w pełnionej funkcji, jak również ze względu na kofaktor użyty w reakcji deacetylacji [98].

Na tej podstawie rozróżniamy następujące klasy:

- Klasa pierwsza (I) składa się z białek najbardziej do siebie podobnych pod względem strukturalnym. Do nich zalicza się HDAC1, HDAC2, HDAC3 oraz HDAC8. Przeważnie znajdują się w jądrze, choć pojawiają się doniesienia o przemieszczaniu się, w wyjątkowych sytuacjach, HDAC1 do cytoplazmy [99].
- Klasa druga (II) podzielona jest na dwie podklasy, czyli IIa oraz IIb. Do pierwszej z nich zaliczamy białka zdolne do wędrówki między jądrem a cytoplazmą w odpowiedzi na różne sygnały. Są to HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9. W drugiej grupie znajdziemy HDAC6 i HDAC10, które znajdują się głównie w cytoplazmie komórki.
- Klasa trzecia (III) zawiera specyficzną grupę białek – sirtuiny. W przeciwieństwie do reszty deacetylaz, sirtuiny charakteryzują się wykorzystywaniem cząsteczek NAD⁺ jako substratu reakcji (klasy I, II i IV wymagają Zn²⁺ jako kofaktora). Dotąd poznano siedem sirtuin (SIRT1-7). Lokalizacją jądrową cechują się SIRT1, SIRT6 i SIRT7. Zależnie od sytuacji, SIRT2 może lokalizować się w jądrze, gdzie bierze udział w regulacji cyklu komórkowego lub w cytoplazmie. Pozostałe trzy białka, SIRT3, SIRT4 oraz SIRT5 spotykane są jedynie w mitochondriach. Efektem działania sirtuin jądrowych jest tworzenie się heterochromatyny konstytutywnej i fakultatywnej, a najlepiej poznanym białkiem jest SIRT1. Wpływa ona na kondensację chromatyny, m.in. poprzez stymulację metylacji H3K9me3. Najpierw powoduje usunięcie grupy acetylowej z H3K9, a następnie aktywuje oraz kieruje w to miejsce SUV39H1. Do aktywacji metylotransferazy dochodzi na skutek deacetylacji lizyny 266 w obrębie domeny SET, przez co SUV39H1 zmienia swoją konformację [100].
- Klasa czwarta (IV) składa się z jednego białka HDAC11. Jest ostatnim odkrytym białkiem z rodziny HDAC w związku z czym nie do końca poznano jeszcze funkcję czy mechanizm działania tego białka w regulacji genów. Dotychczasowe badania HDAC11 prowadzone były w kontekście immunologicznym i nowotworowym [101]. HDAC11 najprawdopodobniej powoduje deacetylację czynników E2Fa/E2F4 i hamuje ekspresję genu supresorowego ARHI w komórkach raka piersi.

1.5.2.3. Przemodelowanie struktury chromatyny pod wpływem kompleksów przebudowujących zależnych od ATP

Nieco odmiennym sposobem regulacji struktury chromatyny (poza modyfikacjami epigenetycznymi) jest reorganizacja nukleosomów za pomocą kompleksów remodelujących (*chromatin remodeling complexes*, CRC) [102]. Ich działanie polega na wykorzystaniu energii pochodzącej z hydrolizy ATP do

zmiany oddziaływać między histonami a DNA. Dzięki temu nukleosomy mogą być przesuwane i precyzyjnie pozycjonowane w miejscach genomu, a ich gęstość jest kontrolowana poprzez dodanie bądź usunięcie całych grup nukleosomów z danego obszaru. Do takich kompleksów zalicza się kompleks typu ISWI (*Imitation Switch*), CHD (*Chromodomain Helicase DNA-binding*) lub inaczej nazywany NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*), INO80 oraz SWI/SNF (*Switch/Sucrose Non-Fermenting*), a każdy z nich, poza rdzeniową ATPazą, składa się z kilku dodatkowych podjednostek wpływających na ich aktywność i specyficzność. Za pośrednictwem odpowiednich domen znajdujących się w białkach, kompleksy te biorą udział w naprawie DNA, mogą oddziaływać z modyfikowanymi (jak to ma miejsce w przypadku NuRD), jak i niemodyfikowanymi (np. ISWI) histonami, doprowadzając do podmiany pojedynczych histonów lub usunięcia całych nukleosomów. Kompleksy mogą brać czynny udział w deacetylacji histonów ze względu na obecność takich białek jak HDAC1 i HDAC2 (NuRD) [103]. Często kontrolują kondensację chromatyny i ekspresję genów poprzez oddziaływanie z kompleksem PRC2 (NuRD, SWI/SNF). Chociaż w przypadku SWI/SNF, kompleks ten może działać zarówno synergistycznie jak i antagonistycznie do kompleksu PRC2, a sposób działania zależy od miejsca w genomie [104]. Ponadto działanie SWI/SNF skutkuje tworzeniem się heterochromatyny, blokując tym samym dostęp czynników transkrypcyjnych. Co ciekawe, kompleks ten może również hamować ekspresję niekodującego RNA (ncRNA) poprzez rekrutację i stabilizację nukleosomów w promotorach ncRNA. Podsumowując, na skutek przebudowy chromatyny dochodzi do zmienionej ekspresji genów.

1.5.3. Regulacja ekspresji genów przez niekodujące RNA

Trzecim sposobem kontroli ekspresji genów jest potranskrypcyjna regulacja mRNA przez krótkie, niekodujące RNA, czyli mikroRNA (miRNA). miRNA są najkrótszymi jednoniciowymi cząsteczkami RNA, składającymi się z 20-25 nukleotydów. Po kilkietapowym procesie dojrzewania miRNA, którego część zachodzi w jądrze, a część w cytoplazmie, dochodzi do utworzenia dojrzałej nici miRNA, która następnie przyłącza się do końca 3' UTR cząsteczki informacyjnego RNA. Poprzez swoją komplementarność, miRNA może hamować ekspresję genu lub kierować go do degradacji. Ścieżka jaką obierze kompleks miRNA-mRNA, zależy od stopnia dopasowania tych dwóch cząsteczek. W przypadku całkowitego pokrycia, nić mRNA transkrybowanego genu ulega pęknięciu i dalszej degradacji, a w przypadku mniejszej zgodności ekspresja genu jest jedynie wyciszana [105].

Pierwsze miRNA, *lin-4* i *let-7*, odkryto dokładnie trzydzieści lat temu (1993) w trakcie badań nad nicieniem *Caenorhabditis elegans* [106], a do tej pory odkryto już ponad 1000 miRNA (wg bazy danych miRBase.org jest ich prawie 2000) zdolnych regulować ekspresję nawet 30% ludzkich genów [107]. Ponadto dowiedziono, że jedno miRNA jest w stanie jednocześnie wpływać na kilka różnych mRNA

[108]. Do białek, których poziom jest regulowany przez miRNA zaliczają się enzymy modyfikujące chromatynę takie jak DNMT, HDAC i HMT [109, 110]. Oprócz tego, że miRNA funkcjonuje jako regulator ekspresji genów, jego ekspresja również jest kontrolowana przez te same mechanizmy epigenetyczne tworząc pewnego rodzaju regulacyjne sprzężenie zwrotne [111].

Badania przeprowadzone w ciągu kilku ostatnich lat dowiodły, że miRNA bierze udział w regulacji niemal wszystkich poznanych dotychczas procesów zachodzących w komórkach [112]. Ponadto, ze względu na niską podatność na działanie RNaz w komórce, miRNA pozostaje stabilne w tkankach i płynach ustrojowych [113, 114], dzięki czemu może stać się potencjalnym markerem zaburzeń i stanów patologicznych zachodzących w organizmie [115].

1.6. Charakterystyka i funkcje białka HP1 α

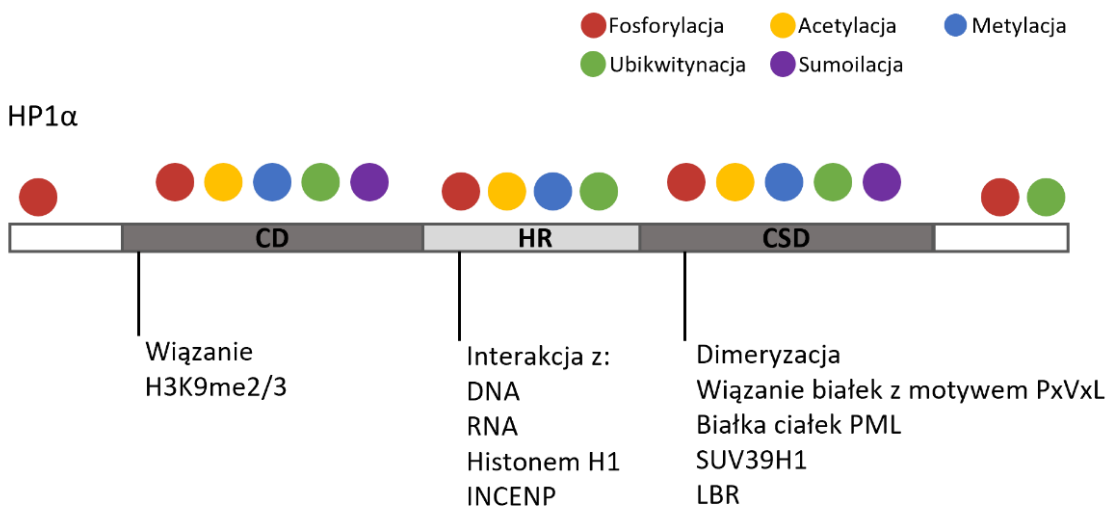
Jak opisano powyżej, regulacja ekspresji genów zachodzi na drodze złożonych procesów aktywnie regulujących strukturę chromatyny. Najbardziej plastycznym wydaje się być potranslacyjna modyfikacja histonów, w których zmiany mogą zachodzić na wiele różnych sposobów w wyznaczonych miejscach, dzięki działaniu dedykowanej maszynerii epigenetycznej składającej się z enzymów wprowadzających i usuwających daną modyfikację. Kolejnym, ważnym elementem związanym z potranslacyjną regulacją genów są białka odczytujące dane znaczniki histonów i do nich zalicza się m.in. białko HP1 α , należące do rodziny białek heterochromatyny 1 (*heterochromatin protein 1*, HP1) [116]. Jest to rodzina zachowanych ewolucyjnie białek obecnych u eukariontów (z wyjątkiem *S. cerevisiae*). Biorą udział m.in. w regulacji ekspresji genów, naprawie uszkodzeń DNA oraz stabilizacji struktury chromatyny.

Do rodziny ludzkich HP1 zalicza się 3 izoformy: HP1 α (kodowane przez gen *CBX5*), HP1 β (*CBX1*) oraz HP1 γ (*CBX3*). Pomimo wysokich podobieństw w strukturze, każde z nich wykazuje inną lokalizację w jądrze i co za tym idzie, spełnia nieco odmienną funkcję. HP1 α można spotkać wyłącznie w rejonach skondensowanej chromatyny, zwłaszcza w okolicach centromerów, telomerów oraz w sekwencjach powtarzalnych. HP1 β obserwuje się zarówno w hetero- jak i euchromatynie. Natomiast HP1 γ występuje przeważnie w rejonach aktywnych genów regulując ich transkrypcję. W niniejszej pracy badano udział izoformy alfa ze względu na oddziaływanie z H3K9me3 oraz udział w tworzeniu SAHF, co może mieć wpływ na zmianę ekspresji genów podczas starzenia.

W swojej budowie białko HP1 zawiera dwie funkcjonalne domeny przedzielone obszarem łącznikowym (*unstructured hinge region*, HR) (Ryc. 1.6.). Na N-końcu znajduje się domena chromo (CD), która rozpoznaje metylowany histon i umożliwia przyłączenie się HP1 α do H3K9me2/3. Następujący

po tym obszar HR jest najbardziej plastyczny, o różnej długości charakterystycznej dla danej izoformy. W swojej strukturze HR posiada domenę NLS, kierującą białka do jądra. W wyjątkowych sytuacjach, dotyczy to jedynie izoformy HP1 γ , białko może być również obecne w cytoplazmie. Wykazano ponadto, że HR może oddziaływać z DNA i RNA [117, 118] oraz histonem łącznikowym H1, co dodatkowo ułatwia interakcję i przyłączanie się białka do H3K9me2/3. Zarówno domena CD jak i obszar HR, są podatne na potranslacyjne modyfikacje, w tym fosforylację i sumoilację, co wpływa na funkcję białka i jego lokalizację w jądrze [119]. Pokazano, że fosforylacja N-końca powoduje tworzenie się specyficznych, płynnych struktur powstających na drodze separacji faz ciecz-ciecz (*liquid-liquid phase separation*, LLPS). Dzięki temu, HP1 α może łączyć ze sobą długie odcinki DNA zawierające wiele nukleosomów tworząc duże kompleksy skondensowanej chromatyny [120]. Ponadto fosforylacja domeny chromo zwiększa powinowactwo wiązania HP1 α do H3K9me3 [121]. Z drugiej strony, fosforylacja odcinka łącznikowego może zmniejszać stopień oddziaływania między HP1 α a DNA.

Na końcu C cząsteczki HP1 α , znajduje się domena CSD (*chromoshadow domain*) odpowiedzialna za homo- i heterodimeryzację (z resztą białek HP1) oraz dalsze oddziaływanie z innymi białkami i czynnikami transkrypcyjnymi. Interakcję z innymi białkami umożliwia specjalna sekwencja PxVxL („P” oznacza prolinę, „V” walinę, „L” leucynę, a „x” dowolny aminokwas) znajdująca się w partnerach białkowych, rozpoznawana przez domenę CSD. Do nich należą m.in. białka wchodzące w skład ciałek PML (np. SP100), proteaza SENP7 i receptor laminy B – LBR (*lamin B receptor*) [122]. Do wyjątków należy białko SUV39H1, które nie posiada w swojej strukturze wymaganej sekwencji, a współpraca obu białek jest niezbędna do tworzenia się heterochromatyny i postępującej kondensacji w dalszych częściach genomu [123, 124]. Ponadto, istnieją doniesienia, że HP1 α (HP1a u *Drosophila melanogaster*) może przyłączać się do chromatyny z pominięciem H3K9me3 [125].



Ryc. 1.6. Schemat budowy białka HP1 α z wyszczególnieniem jakim modyfikacjom mogą ulegać dane domeny oraz opis ich funkcji. Zmodyfikowano na podstawie [126].

Tworzenie stabilnej heterochromatyny rozpoczyna się od deacetylacji lizyny 9 histonu H3 przy udziale sirtuiny 6 i 1, a aktywność SIRT1 wpływa na rekrutację metylotransferazy SUV39H1 (jak opisano w podrozdziale 1.5.2.2.). Przeniesienie grupy metylowej na H3K9 przyczynia się do rozpoznania modyfikacji przez domenę CD białka HP1 α i utworzenie homodimeru. Dimer ten przyjmuje charakterystyczną konformację w kształcie litery „Y”, co dodatkowo ułatwia pozycjonowanie cząsteczki na metylowanej lizynie. Następnie HP1 α poprzez domenę CSD rekrutuje SUV39H1, prowadząc do metylacji kolejnych histonów i umożliwiając tworzenie heterochromatyny w dalszych częściach genomu [123]. Ponadto, dzięki interakcji obszaru łącznikowego HP1 α z DNA oraz współpracy z DNMT1, dochodzi do wzrostu metylacji DNA i tym samym wyciszenia genów. Na stabilizację heterochromatyny wpływa również interakcja białka HP1 α z zakotwiczonym w otoczce jądrowej receptorem LBR, tworząc zwarte i transkrypcyjnie nieaktywne domeny LAD [127]. Niedawne badania wykazały, że HP1 α może dodatkowo rekrutować białko CTCF w miejscach okołocentromerowych, wpływając na organizację i utrzymanie stabilnej struktury chromatyny w komórce [128]

Utworzona heterochromatyna ulega dynamicznym zmianom w trakcie podziału komórkowego, a rola HP1 α w mitozie jest niejednoznaczna. Z jednej strony dochodzi do częściowej akumulacji HP1 α w okolicy centromerów poprzez interakcję z H3K9me3 oraz INCENP (*inner centromere protein*), z drugiej natomiast dochodzi do usunięcia białka z tych miejsc ze względu na fosforylację seryny 10 histonu H3 (p-H3S10) [129]. W czasie mitozy p-H3S10, odgrywa kluczową rolę w prawidłowej kondensacji i segregacji chromosomów, a dzieje się to dzięki aktywności kinazy Aurora B (*Aurora B kinase*, AURKB). Kinaza ta może oddziaływać z białkiem centromerowym INCENP (*inner centromere protein*) oraz obecnym tam HP1 α , a jej zaburzona aktywność zwykle prowadzi do nieprawidłowości w rozdziale chromosomów. Do akumulacji fosforylowanej seryny histonu H3 dochodzi w rejonach centromerowych i dzieje się to w późnej fazie G2. Tym sposobem dochodzi do zmiany konformacji chromatyny i usunięcia HP1 α z kompleksu HP1 α -H3K9me3 oraz zablokowania dalszego oddziaływania domeny CD z tą modyfikacją. Ostatnie badania sugerują, że do odłączenia HP1 α od centromerów dodatkowo przyczynia się hiperfosforylacja odcinka łącznikowego tego białka, za pomocą AURKB. W rezultacie HP1 α wykazuje mniejszą zdolność do interakcji z DNA i odłącza się od chromatyny [130]. Dowiedziono również, że w trakcie mitozy to właśnie HP1 α pierwsze ulega fosforylacji i w wyniku tego część białka zostaje usunięta, natomiast dopiero zachodząca w dalszym etapie fosforylacja H3S10

wpływa na dalsze zmniejszenie połączeń HP1 α z H3K9me3. Jednakże część HP1 α nadal jest związana z centromerami.

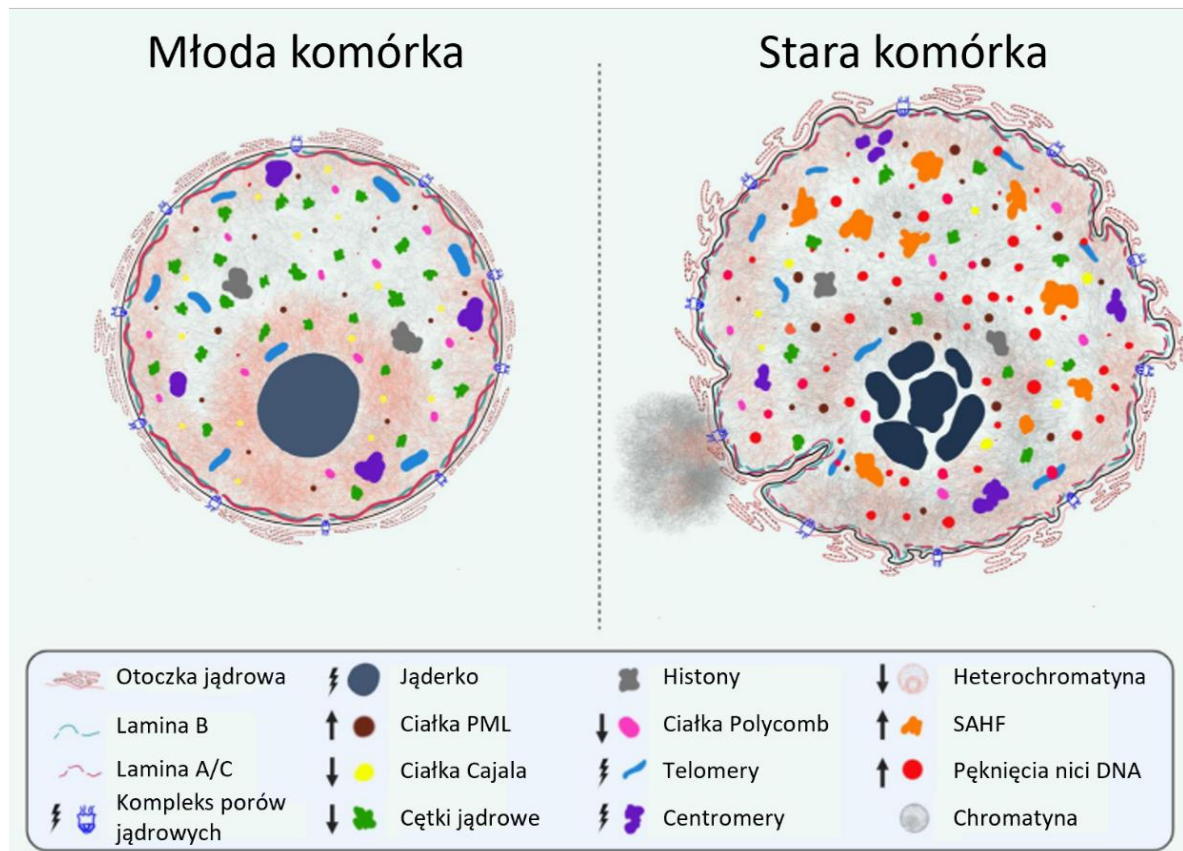
Oprócz kontroli stabilności heterochromatyny, HP1 α bierze czynny udział w szlaku DDR oraz naprawie powstałych uszkodzeń [131]. Jak wspomniano w podrozdziale 1.2., w wyniku pęknięcia podwójnej nici DNA dochodzi do lokalnej i krótkotrwałej kondensacji chromatyny. Najczęściej rolę HP1 α w procesie wiąże się z obecnością H3K9me3, czyli stabilizacją heterochromatyny w okolicach uszkodzeń, lecz niektóre badania sugerują, iż HP1 α może działać niezależnie od tej modyfikacji [132]. Gdy wywołano uszkodzenia DNA laserem dochodziło do rekrutacji HP1 α do miejsc pęknięcia nici za pomocą kompleksu CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*). Wyciszenie HP1 α skutkowało upośledzeniem rekrutacji białka 53BP1 oraz RAD51 w miejsca uszkodzeń i zahamowaniem naprawy uszkodzeń oraz zmniejszeniem przeżywalności komórek. Nie zauważono natomiast efektu na formowanie się skupisk γ H2AX [133].

Rola HP1 α nie jest jednoznaczna i ograniczona jedynie do tworzenia skondensowanej, stabilnej struktury heterochromatyny w jądrze. Badania dowodzą, że może brać udział w podziale komórki oraz naprawie DNA niezależnie od H3K9me3, przez co może pełnić inne funkcje w komórce, które nadal pozostają nie do końca poznane.

1.7. Zmiany w strukturze jądra i chromatyny towarzyszące starzeniu komórkowemu

Starzenie to proces wpływający na funkcjonowanie całej komórki. Choć zmiany dotyczą wielu struktur komórki, to najważniejsze z nich, mające wpływ na funkcje innych organelli, zachodzą w jądrze (Ryc. 1.7.). Zwiększająca się powierzchnia jądra i globalne rozluźnienie chromatyny stały się typowymi markerami starzenia. Zmiany pojawiają się w blaszce i otoczce jądrowej. Blaszka jądrowa jest zbudowana z lamin i w miarę starzenia, obserwuje się znaczący spadek ekspresji białka laminy B1, natomiast poziom laminy A/C może spadać, a w niektórych przypadkach pozostawać bez zmian [134]. Zaburzony poziom laminy A/C jest często związany z gromadzeniem się prekursora tego białka, czyli prelaminy A. Ponadto, mutacja w genie LMNA powodująca brak dojrzewania i tworzenie niefunkcjonalnej formy nazywanej progeryną jest przyczyną opisanego powyżej zespołu HGPS. Akumulacja progeryny oraz spadek poziomu laminy B1 w starych komórkach prowadzi do zmian w morfologii jądra oraz defektów w jego strukturze co skutkuje zwiększoną podatnością na odkształcenia i sprzyja tworzeniu się charakterystycznych wybrzuszeń (*nuclear blebbing*) [135]. Zaburzenia w strukturze otoczki niosą za sobą zmiany w liczbie oraz rozmieszczeniu porów jądrowych,

co prowadzi do utrudnień w transporcie cząsteczek między jądrem a cytoplazmą. Zauważono, że w VSMC podwyższony poziom prelamininy a wpływa na przemieszczenie białka Nup153 (wchodzące w skład porów jądrowych) w otoczkę, blokując tym samym import 53BP1 w miejsce pęknięć nici DNA [136]. W związku z tym dochodzi do nagromadzenia nienaprawionych uszkodzeń i dalszej progresji starzenia. Spadek laminy B1 pociąga za sobą spadek białka LBR będącego miejscem zakotwiczenia HP1 α i związanej z nią heterochromatyny [137]. To z kolei przyczynia się do zerwania połączenia i destabilizacji LAD, a heterochromatyna przemieszcza się do wnętrza jądra.



Ryc. 1.7. Schemat podsumowujący zmiany zachodzące w jądrze komórkowym podczas starzenia. Strzałka skierowana w górę oznacza wzrost poziomu, strzałka skierowana w dół spadek poziomu danej a symbol błyskawicy oznacza uszkodzenia danej struktury jądrowej. Zmodyfikowano na podstawie [138].

Wraz ze starzeniem dochodzi do rozluźnienia chromatyny i tym samym destabilizacji jej struktury i zmian w profilu ekspresji genów. Proces ten jest związany m.in. z globalnym spadkiem poziomu histonów i liczby nukleosomów [139]. Szacuje się, że w starzeniu dochodzi do zmniejszenia się puli histonów H3 i H4 o około 30%, a w starzeniu replikacyjnym drożdży nawet o 50% [140]. Może to być wynikiem działania kompleksów przebudowujących chromatynę lub zaburzenia w produkcji histonów.

W starej komórce synteza nowych histonów kanonicznych jest zredukowana, gdyż ich ekspresja najczęściej zachodzi w następstwie podziałów komórkowych (które w starych komórkach są wstrzymane). Prowadzi to do utraty nawet całych kompleksów nukleosomów, co ma odzwierciedlenie w destabilizacji struktury chromatyny, jej rozluźnieniu i zwiększeniu podatności na uszkodzenia DNA. Z drugiej strony obserwuje się wzrost wariantów histonów, które gromadzą się w nukleosomach zamiast histonów kanonicznych, ponieważ ich synteza jest niezależna od cyklu komórkowego. Wysoki poziom wariantu H3.3 znaleziono *post mortem* w mózgu osób w podeszłym wieku oraz mysich neuronach [141]. Wraz ze starzeniem obserwuje się wzrost wariantu H3.3 oraz zastąpienie nim histonu H3 w wątrobie, sercu oraz nerkach myszy. To z kolei prowadziło do zmian w poziomie metylacji H3 [142]. W mysich fibroblastach poddanych starzeniu (replikacyjnemu i przyspieszonemu indukowanemu uszkodzeniami DNA) oprócz występowania γ H2AX zaobserwowano znacznie większą akumulację H2A.J, w porównaniu do kontroli. Jest to wariant, który niedawno przykuł uwagę badaczy ze względu na występowanie w starzeniu indukowanym promieniowaniem jonizującym. H2A.J zastępuje kanoniczny histon H2A w miejscach znajdujących się na pograniczu heterochromatyny i euchromatyny [143]. Gromadzenie się tego wariantu wpływa na reorganizację struktury chromatyny, co może prowadzić do indukcji SASP i rozprzestrzeniania stanu zapalnego na sąsiednie komórki, a nawet indukcji uszkodzeń DNA [144]. Zbyt długo aktywowana ścieżka DDR w komórce przyczynia się do degradacji metylotransferazy G9a i GLP skutkując spadkiem poziomu H3K9me2 i tym samym deheterochromatynizacji [145].

Kolejnym czynnikiem wpływającym na związane z wiekiem rozluźnienie chromatyny są zmiany epigenetyczne, w tym wspomniany spadek poziomu metylacji histonów. Jest to m.in. cecha charakterystyczna progerii (przyspieszonego starzenia), czyli zespołu Wernera i HGPS. W progerii dochodzi do globalnego spadku H3K9me3 i związanego z nią białka HP1 α , co dzieje się na skutek obniżonego poziomu SUV39H1 [146]. Wykazano, że niski poziom metylacji H3K9 negatywnie wpływa na utrzymanie prawidłowej struktury heterochromatyny konstytutywnej. Ta z kolei powoli przechodzi w formę euchromatyny i staje się podatna na uszkodzenia, zwłaszcza w rejonach telomerowych. Ponadto wykazano, że obniżenie poziomu H3K9me3 i towarzyszący mu wzrost acetylacji H3K9 i H4K16 w promotorach genów IL-6 i IL-8, przyczynia się do ich wzmożonej ekspresji prowadząc do SASP [147]. Obserwowany wzrost acetylacji wspomnianych miejsc koreluje z obniżonym poziomem deacetylaz (w tym sirtuin) w starych komórkach. Niższy poziom SIRT1 zmniejsza aktywność SUV39H1, co z kolei wiąże się ze znacznie niższym poziomem H3K9me3 [100]. Z drugiej strony w niektórych przypadkach może dochodzić do spadku acetylacji, jak na przykład dzieje się w przypadku lizyny 56 histonu H3

podczas starzenia replikacyjnego wynikającego z wyższej aktywności SIRT6 [148]. Sirtuina ta jest też odpowiedzialna za deacetylację H3K9 w telomerach stabilizując ich strukturę.

Poziom acetylacji histonów, podobnie jak metylacji, zależy od typu starzenia oraz jest tkankowo specyficzny. W starych ludzkich fibroblastach zauważono wzrost poziomu acetylacji H4K16 w promotorach genów, co skutkowało rozluźnioną chromatyną i ułatwioną wymianą nukleosomów [149]. Z drugiej strony istnieją doniesienia o spadku acetylacji H4K16 w starych komórkach [150]. W modelu progerii u myszy pozbawionych ekspresji białka Zmpste24 (metaloproteiny tnącej prelaminę A), dochodzi do akumulacji prelaminy A, która zakłóca działanie acetylotransferazy MOF wywołując hipoacetylację H4K16 [151]. W kontroli poziomu acetylacji biorą udział enzymy HAT i HDAC, a najczęściej opisywanymi są sirtuiny. Uważa się, że sirtuiny są „strażnikami długowieczności” i mogą wpływać na wydłużenie życia [152]. W młodych komórkach wysoki poziom tych enzymów pozwala utrzymać homeostazę komórki dzięki kontroli wielu procesów, w tym regulacji ekspresji genów i cyklu komórkowego, naprawy DNA, apoptozy oraz metabolizmu. Jednak wraz ze starzeniem dochodzi do znacznego spadku poziomu oraz aktywności sirtuin. Wykazano, że zahamowanie aktywności SIRT6 u myszy przyczynia się do przyspieszonego starzenia i znacznie skraca życie zwierząt [153]. Z drugiej strony, nadekspresja SIRT6 poprzez deacetylację H3K9 blokuje szlak sygnalizacyjny NF- κ -B, co prowadzi do zmniejszenia syntezy przekaźników stanu zapalnego a tym samym do wydłużenia życia myszy. Ponadto badania wykazały, że nadekspresja SIRT6 może zahamować starzenie szczurzych i ludzkich komórek krążka międzykręgowego (*Human Nucleus Pulposus Cells*, HNPC) właśnie przez deacetylację H3K9 [154].

Pomimo globalnego rozluźnienia chromatyny będącego charakterystyczną cechą starzenia, lokalnie obserwuje się jej kondensację i tworzenie SAHF. Są to struktury, które często składają się ze skupisk H3K9me3 otoczonych chromatyną bogatą w H3K27me3, tworzących typowy rdzeń wyciszonej chromatyny. Wokół niego może akumulować się aktywna forma chromatyny wzbogacona w H3K36me3 [155]. Chociaż obecność H3K9me3 i H3K27me3 wydaje się być charakterystyczną cechą SAHF, ostatnie badania wykazały, że usunięcie tych znaczników nie wpływało na tworzenie się tych skupisk [155]. Podobnie brak białka HP1 nie zaburzał powstawania SAHF [156]. Wydaje się więc, że do ich tworzenia potrzebne są inne białka, takie jak histon mH2A (makro H2A), HMGA1, HIRA ASF1a i inne [157]. Poprzez wytworzenie się skupisk miejscowej kondensacji chromatyny dochodzi do reorganizacji jej struktury, co ma przełożenie na zmienioną ekspresję genów. Wyciszeniu ulegają geny kodujące białka odpowiedzialne za proliferację komórki lub czynniki transkrypcyjne E2F. Jednak pojawienie się SAHF wydaje się być jedynie cechą charakterystyczną starzenia indukowanego onkogenami (OIS), gdyż

tylko w takim modelu zaobserwowano ich obecność w zdecydowanej większości komórek. Skupiska takie występują niekiedy w starych replikacyjnie fibroblastach, lecz zwykle dotyczy do tylko kilku procent komórek w populacji [157]. Postuluje się więc, że tworzenie SAHF nie jest uniwersalną cechą starzenia, a służy raczej jako wskaźnik zachodzącego OIS [158].

Kontrola ekspresji genów w starzeniu jest też zależna od zmian zachodzących na poziomie DNA. Dowiedziono, że wraz z wiekiem dochodzi do globalnego spadku metylacji CpG w genomie, a jest to najprawdopodobniej związane ze spadkiem poziomu DNMT1 oraz DNMT3a podczas starzenia [159]. Z drugiej strony w starzeniu relikacyjnym często można zauważyć hipermetylację w promotorach specyficznych genów. Są to geny odpowiedzialne za procesy metaboliczne w komórce lub białka supresorowe [160].

Starzenie komórkowe dotyczy również innych struktur jądrowych w tym jąderek, ciałek jądrowych czy ciałek PML [161]. Morfologia jąderek jest z reguły bardzo zróżnicowana, nawet w młodych komórkach. Jednak wraz z wiekiem najczęściej dochodzi do ich powiększenia oraz zwiększenia ich liczebności w jądrze [162]. Badania wskazują, że wzrost powierzchni i liczby jąderek w komórkach nicienia *C. elegans* negatywnie wpływa na długość życia zwierząt [163]. Podobny trend zauważono u drożdży, myszy, a nawet ludzi. W komórkach mięśni osób starszych poddanych restrykcji kalorycznej oraz systematycznemu wysiłkowi fizycznemu (są to sposoby interwencji przeciwstarzeniowych), zanotowano znacznie mniejsze i mniej liczne jąderka w porównaniu z grupą kontrolną [164]. Zmiany w morfologii jąderka towarzyszące starzeniu często korelują ze wzrostem ekspresji rRNA i białek rybosomalnych i jest to często obserwowane w komórkach pacjentów z zespołem HGPS [165]. Zahamowanie ekspresji tych białek skutkuje zmniejszeniem się powierzchni jąderek oraz przedłużeniem życia.

Ciałka PML obecne w komórce, obserwowane głównie w miejscach wolnych od chromatyny, biorą czynny udział w wielu procesach komórkowych, w tym w starzeniu [166]. W wyniku stresu oksydacyjnego białko PML (czyli białko rdzeniowe ciała PML) ulega utlenieniu, czego skutkiem jest oligomeryzacja i tworzenie ciałek PML. W kolejnym kroku, PML ulega sumoilacji i silnemu upakowaniu wraz z tworzeniem się struktury bezbłonowej. Do tworzących się ciałek dołączają białka zawierające motyw rozpoznający sumoilację (*SUMO Interacting Motif*). Do tej pory poznano ich około 60, a stanowczą większość z nich związana jest z odpowiedzią na stres komórkowy [167]. Przykładem takiej odpowiedzi jest wzrost liczby ciałek PML w ludzkich jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) w wyniku promieniowania jonizującego [168].

Wykazano, że wzrost liczby ciałek jest ogólną cechą starzenia, niezależnie od bodźca indukującego ten proces [169]. Jak wspomniano, ciałka PML odgrywają znaczącą rolę w procesie naprawy uszkodzeń DNA. Oprócz opisanego w podrozdziale 1.4. udziału białek skupiających się w obrębie ciałek PML w rozpoznaniu pęknięć nici DNA, ciałka PML są również miejscem acetylacji białka p53, które zatrzymuje komórki w cyklu, celem umożliwienia dalszej odpowiedzi na uszkodzenia. Zatem w ciałkach PML występują białka, które biorą udział w rozpoznaniu i naprawie uszkodzeń DNA oraz białka kontrolujące cykl komórkowy.

Podsumowując, starzenie komórkowe jest złożonym procesem, który wpływa na wiele struktur wewnątrz jądra komórkowego. Ma to istotny wpływ na funkcje innych organelli w komórce poprzez m.in. zaburzony transport między jądrem a cytoplazmą. Opisane zmiany niosą za sobą znaczące konsekwencje dla procesu starzenia się komórek oraz organizmu jako całości i wpływają na rozwój chorób związanych z wiekiem.

1.1. Zależne od wieku choroby układu krążenia oraz udział starzenia komórkowego w rozwoju miażdżycy

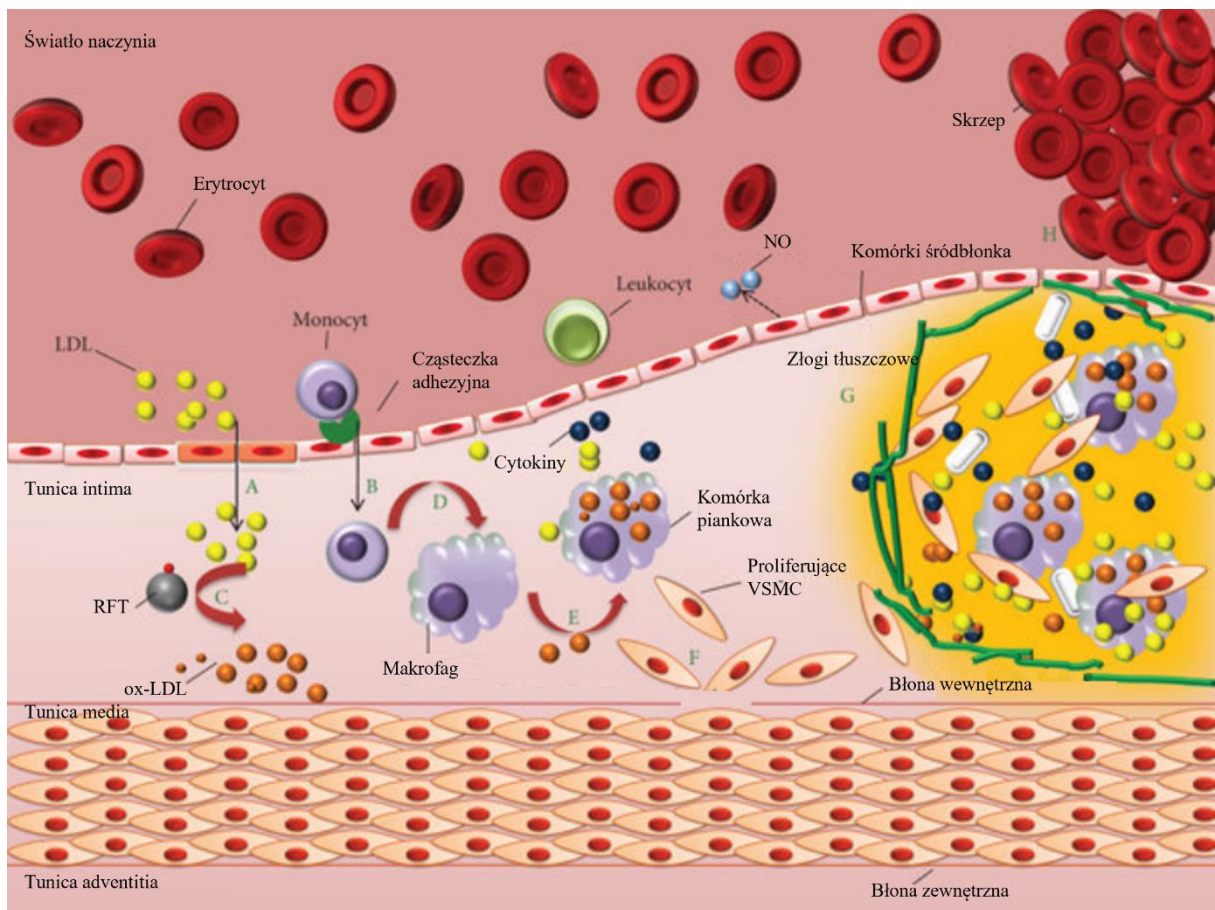
Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) główną przyczyną zgonów na świecie od wielu lat pozostają choroby układu sercowo-naczyniowego (cardiovascular diseases, CVD). W Polsce stanowią one 35% wszystkich zgonów [170]. u podstaw tych schorzeń najczęściej leży rozwijająca się miażdżycza mająca swoje źródło w nadciśnieniu tętniczym, hiperlipidemii, hiperhomocysteinemii, cukrzycy czy narażeniu na substancje toksyczne pochodzące np. z dymu tytoniowego. Miażdżycę definiuje się jako ogólnoustrojowe, przewlekłe zapalenie tętnic i żył, które najczęściej prowadzi do wytworzenia charakterystycznej struktury, czyli blaszki miażdżycowej, uwypuklającej się do wnętrza naczynia i znacząco zmniejszającej jego wewnętrzną średnicę. Blaszka powstaje na skutek gromadzenia się tuż pod warstwą śródbłonna złogów tłuszczowych i makrofagów przekształconych w komórki piankowe. Tak utworzony rdzeń oddzielony jest od światła naczynia włóknistą czapeczką zbudowaną z komórek mięśni gładkich (VSMC), śródbłonna i kolagenu. Ze względu na swoją strukturę, blaszki dzieli się na stabilne i niestabilne. Te pierwsze charakteryzują się mniejszą zawartością lipidów w rdzeniu, a ich czapeczka zawiera relatywnie grubą i ścisłą warstwę komórek mięśni gładkich tworząc zwartą barierę zabezpieczającą przed pęknięciem. Powstawanie takiej blaszki jest zwykle długotrwałym i powolnym procesem, często zajmującym kilka lat. Z kolei blaszka niestabilna może być następstwem przekształcenia blaszki stabilnej, choć najczęściej do jej wytworzenia dochodzi gwałtownie. Posiada znacznie większy rdzeń martwiczy i zmniejsza się grubość otaczającego go kapturka (grubość zwykle nie przekracza 65 μm). Dodatkowo, w jej wnętrzu często zachodzi proces neowaskularyzacji, co

proceeds to the intima of the artery. Research has shown that this rupture of the unstable plaque and the formation of a thrombus associated with it, is a cause of the acute coronary syndrome (acute coronary syndrome, ACS).

Arteries and veins are built from endothelial cells (endothelial cells, EC), that is a single layer of highly specialized cells lining the inside of the vessel. One of the key roles, which the endothelial cell plays, is the production of factors controlling the contraction and relaxation of blood vessels, and also the ability to maintain the appropriate elasticity of the vessel wall. Tension and elasticity of the vessel, depend above all on the correct secretion of nitric oxide (*nitric oxide*, NO), which acts in opposition to angiotensin II and endothelin-1 (ET-1). The two latter substances constrict the vessels and promote the development of atherosclerosis [171]. EC rest on the basement membrane forming a semi-permeable internal lining (tunica intima) separating the vessel from the smooth muscle cells (tunica media). Permeability and integrity of the internal lining are controlled by a complex of proteins found in the EC lining forming so-called tight junctions (also called adherens junctions). In their composition enter claudins, occludins, junctional adhesion molecules (zona occludens, ZO) and adhesive proteins JAM. The whole vessel is surrounded by an outer layer, consisting of endothelial cells and connective tissue (tunica adventitia) [172].

Despite the extensive research, it has not yet been possible to determine the cause of atherosclerosis. It is accepted that the action of stress factors leads to the damage of the endothelial cells of the arteries, which initiates the changes in the organism. Many researchers postulate that the damage of the endothelial cells occurs as a result of disturbed blood flow caused by high blood pressure. This happens most often in the places of branching of the vessels, where the endothelial cells are exposed to the direct action of constant, oscillatory shear stress (oscillatory shear stress, OS) [173], [174]. OS is a stimulus for the endothelial cells to change their phenotype to secretory. As a result, the release of adhesive molecules (ICAM-1, VCAM-1), which are recognized by monocytes and lymphocytes. In addition, endothelial cells acquire a pro-inflammatory phenotype (as a result of the action of many transcription factors, such as NF- κ B or AP-1), which leads to the loosening of tight junctions between cells forming a permeable layer (Fig. 1.8.). In consequence, lipoproteins, especially those of low density (low density lipoprotein, LDL), penetrate the vessel wall, where they undergo oxidation (ox-LDL) as a result of exposure to high cholesterol and the action of enzymes such as lipoxygenase (LOX). Along with LDL, into the intima migrate monocytes, which differentiate into macrophages, absorb ox-LDL and transform into foamy cells. As time passes, they may undergo apoptosis, which leads

uwolnieniem treści komórkowej do przestrzeni międzybłonowej i dalszą akumulacją lipidów, prowadząc do ich przesylenia, a nawet krystalizacji. To z kolei napędza dalszą migrację makrofagów, stopniowo przyczyniając się do powstawania rdzenia martwiczego. Ponadto, limfocyty T, po przedostaniu się do formującej się blaszki, wydzielają wiele cytokin (np. czynnik martwicy nowotworów – TNF- α , interleukina 1 – IL-1) i czynników wzrostu (PDGF, VEGF) stymulujących podział i migrację VSMC do warstwy wewnętrznej naczynia i tworzenie czapeczki blaszki miażdżycowej.



Ryc. 1.8. Etapy powstawania miażdżycy. A) Przenikanie cząstek LDL do wnętrza naczynia poprzez uszkodzoną warstwę śródbłonka. B) Migracja monocytów do wnętrza naczynia dzięki rozpoznaniu cząstek adhezyjnych wydzielanych przez EC. C) Utlenienie LDL na skutek działania RFT i wytworzenie utlenionej formy ox-LDL. D) Różnicowanie monocytów do makrofagów. E) Powstawanie komórek piankowych na drodze wchłaniania ox-LDL przez makrofagi. F) Wzmoczona proliferacja i migracja VSMC do wnętrza naczynia oraz wytworzenie blaszki miażdżycowej. G) Kumulacja złogów tłuszczowych i powstawanie rdzenia martwiczego. H) Przerwanie ściany naczynia i wytworzenie skrzepu. Zmodyfikowano na podstawie [172].

Po przedostaniu się do błony wewnętrznej, VSMC ulegają dalszym wzmocnionym podziałom. W wyniku zmiany fenotypu z kurczliwego na proliferująco-wydzielniczy, dochodzi do produkcji macierzy

zewnątrzkomórkowej, która przyczynia się do naprawy powstających uszkodzeń oraz stabilizacji formującej się czapeczki włóknistej. Z drugiej strony, proliferacja VSMC może skutkować wyczerpaniem limitu podziałów i starzenia komórkowego, czego skutkiem jest zmniejszenie stabilności blaszki. Na powolną degradację i rozerwanie blaszki może mieć też wpływ podwyższony poziom proteaz wydzielany przez stare VSMC, co negatywnie wpływa na macierz zewnątrzkomórkową. Liczne badania pokazały, że starzenie VSMC ma miejsce *in vivo* i stare VSMC zidentyfikowano zarówno w blaszkach miażdżycowych, jak i ścianach naczyń osób starszych [175]. Komórki wyizolowane z blaszek wykazywały się krótszymi telomerami i mniejszą zdolnością do proliferacji, co było wynikiem podwyższonej ekspresji białek kontrolujących cykl komórkowy (p16 i p21). Zauważono też większą aktywność SA- β -gal oraz wzrost poziomu RFT, które mogą przyczyniać się do powstawania i gromadzenia uszkodzeń DNA.

Według wolnorodnikowej teorii starzenia to właśnie nadmiar reaktywnych form tlenu, w tworzącej się blaszce, jest przyczyną starzenia VSMC i większości towarzyszących mu zmian [176]. Głównym źródłem endogenego poziomu RFT są mitochondria oraz oksydazy NADPH (NOX) występujące w błonie komórkowej. Powstające zburzenia w ich funkcjonowaniu prowadzą do gromadzenia się wolnych rodników, które w połączeniu z podwyższonym poziomem egzogennej puli uszkadzają nDNA. Uważa się też, że wzrost poziomu RFT może potencjalnie powodować uszkodzenia mtDNA, prowadząc do dysfunkcji mitochondriów i napędzając dalszą produkcję reaktywnych form tlenu, choć zdania na ten temat są podzielone. Niemniej, stres oksydacyjny może być również przyczyną powstawania uszkodzeń w miejscach telomerowych, prowadząc do ich przyspieszonego skrócenia i tym samym indukcji starzenia. Na drodze podwyższonej aktywności RFT dochodzi do stymulacji VSMC i wydzielania czynników SASP, a to z kolei indukuje przewlekły stan zapalny w komórce. Tak jak wspomniano, komórki wydzielają wtedy białka degradujące macierz zewnątrzkomórkową, wpływając na destabilizację blaszki miażdżycowej.

Ponadto dowiedziono, że starzejące się VSMC ulegają stopniowej mineralizacji, przez co dochodzi do zmniejszenia elastyczności naczyń. Dzieje się to na skutek zmian w poziomie białek odpowiedzialnych za ten wapnienie. Z jednej strony dochodzi do spadku poziomu białka MGP (*matrix Gla protein*), które jest inhibitorem mineralizacji, a z drugiej do wzrostu ekspresji stymulującego ten proces białka BMP-2. Obserwuje się również zmiany w ekspresji Runx-2, ALP (*alkaline phosphatase*), osteopontyny (OPN) i osteoprotegeryny (OPG), czyli białek wpływających na przybieranie przez VSMC fenotypu charakterystycznego dla osteoblastów [177]. Niedawne badania dowiodły, że miostatyna ma działanie

łagodzące mineralizację VSMC. Miostatyna hamuje ekspresję Runx-2 oraz BMP-2 w szczurzych komórkach [178].

Powstawanie blaszki miażdżycowej jest wysoce skomplikowanym procesem, ściśle związanym ze starzeniem komórek mięśni gładkich. W związku z tym poznanie zachodzących zmian w starzeniu mogłoby przyczynić się do lepszego zrozumienia procesu i tym samym rozwinięcia nowych terapii łagodzących negatywne skutki starzenia. Wiele takich zmian zachodzi na poziomie jądra, zatem ważne zgłębienie epigenetycznych mechanizmów zaangażowanych w proces starzenia.

2. Hipoteza i cele pracy

Starzenie organizmu jest nieuniknionym procesem dotyczącym każdego człowieka i jest nierozdzielnie związane ze starzeniem komórek budujących tkanki i narządy. W komórce dochodzi do szeregu zmian morfologicznych i biochemicznych, z których szczególnie istotne są te związane z jądrem i strukturą chromatyny, czego konsekwencją jest zmiana ekspresji genów. Modyfikacje epigenetyczne chromatyny, dotyczą zarówno DNA jak i histonów, jednakże uważa się, że to histony są bardziej podatne na regulację przez czynniki zewnętrzne. Fakt ten czyni je atrakcyjnym celem terapeutycznym w wielu chorobach wieku podeszłego, w tym miażdżycy. Zatem istotnym jest, aby poznać i scharakteryzować zmiany potranslacyjne histonów zachodzące w starzeniu komórek budujących naczynia i odpowiedzialnych za utrzymanie ich prawidłowego funkcjonowania.

Dane literaturowe niejednokrotnie dostarczają sprzecznych informacji dotyczących zmian chromatyny towarzyszących różnym typom starzenia. Z jednej strony dochodzi do lokalnej silnej heterochromatynizacji i tworzenia skupisk SAHF (*senescence-associated heterochromatin foci*), z drugiej zaś dochodzi do globalnego spadku histonów i rozluźnienia chromatyny. Udowodniono, że zmiany te są często tkankowo specyficzne. Wstępne badania przeprowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia wykazały, że podczas starzenia replikacyjnego komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) obserwowany jest spadek metylacji histonu H3 na lizynie 9 (H3K9me3). W wyniku tego dochodzi do rozluźnienia chromatyny i zmiany jej struktury. Temu typowi starzenia towarzyszy również spadek poziomu oraz reorganizacja białka HP1 α , którego rolą jest między innymi stabilizacja heterochromatyny poprzez przyłączanie się do H3K9me3. Zmiany te były słabiej wyrażone w starzeniu przyspieszonym. W związku z tym, nasza hipoteza zakłada, że w starzeniu replikacyjnym i przyspieszonym zachodzą różne zmiany modyfikacji histonu H3. Postulujemy również, że deheterochromatynizacja jest charakterystyczna dla starzenia replikacyjnego i w związku z tym, głównym celem niniejszej pracy było szczegółowe poznanie różnic w strukturze chromatyny zależnych od typu starzenia. Aby to zweryfikować analizowano zmiany struktury chromatyny oraz ekspresji genów podczas starzenia przyspieszonego i replikacyjnego VSMC, z uwzględnieniem wybranych modyfikacji histonu H3.

W pracy zdefiniowano szczegółowe cele badawcze:

- 1. Charakterystyka zmian struktury chromatyny w starzeniu replikacyjnym oraz przyspieszonym komórek mięśni gładkich naczyń.**

2. Identyfikacja genów, których obszary chromosomowe różnią się pod względem wzbogacenia wybranych modyfikacji histonu H3; analiza zmian globalnego wzoru trimetylacji lizyny 9 i 4 w zależności od typu starzenia.
3. Analiza profilu transkryptomicznego komórek ulegających starzeniu w sposób replikacyjny i przyspieszony.
4. Zbadanie udziału białka HP1 α w procesie starzenia replikacyjnego i przyspieszonego.
5. Porównanie zmian zachodzących w komórkach mięśni gładkich naczyń hodowanych *in vitro* ze zmianami *ex vivo* komórek izolowanych z blaszki miażdżycowej.
6. Analiza wybranych modyfikacji histonów w fibroblastach w celu zweryfikowania uniwersalności zmian towarzyszących różnym typom starzenia.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Komórki

3.1.1.1. Hodowla ludzkich komórek mięśni gładkich naczyń izolowanych z aorty

Komórki pozyskane z aorty młodych dawców płci męskiej zakupiono w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC) oraz Gibco. Ich hodowlę prowadzono w dedykowanej pożywce (ATCC) wzbogaconej w 5% bydlęcą surowicę płodową (FBS), 5 ng/ml EGF, 5 ng/ml FGF-B, 5 µg/ml insuliny, 10 mM L-glutaminę oraz 50 µg/ml kwas askorbinowy (zestaw suplementów ATCC), w inkubatorze o temperaturze 37°C i atmosferze nasyconej parą wodną oraz zawierającej 5% dwutlenku węgla. Komórki pasażowano co 3 lub 4 dni i wysiewano w gęstości 4 tys. komórek/cm² powierzchni naczynia hodowlanego. Przy pasażowaniu stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (Sigma).

3.1.1.2. Hodowla ludzkich fibroblastów

Fibroblasty pozyskane od różnych dawców zakupiono w banku komórkowym (ATCC, Gibco oraz ScienCell). Komórki hodowano w pożywce DMEM (Sigma) uzupełnionej o 10% FBS, 1000 mg/L glukozę, 2 mM L-glutaminę z dodatkiem antybiotyków: 100 U/ml penicyliną, 100 µg/ml streptomycyną oraz 250 ng/ml amfoterycyną B. Hodowlę oraz pasażę prowadzono w takich samych warunkach jak dla VSMC.

3.1.1.3. Izolacja oraz hodowla ludzkich komórek mięśni gładkich pochodzących z blaszek miażdżycowych

Komórki mięśni gładkich izolowano z blaszek miażdżycowych pobranych z tętnicy szyjnej pacjentów. Materiał uzyskano dzięki współpracy z prof. dr. hab. n. med. Krzysztofem Bojakowskim po otrzymaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej działającej przy szpitalu MSWiA w Warszawie. Wyciętą blaszkę miażdżycową przewożono w pełnej pożywce DMEM, w temperaturze pokojowej. Blaszkę czyszczono z krwi i zwapniałych części tkanki i cięto na fragmenty wielkości 1-2 mm². Otrzymane eksplanty umieszczano w pożywce DMEM na podłożu selekcyjnym pokrytym żelatyną (Biocoat Gelatin Cellware, Corning) umożliwiającą adhezję komórkom mięśni gładkich. Komórki pozostawały w hodowli do czasu osiągnięcia konfluencji lub przez maksymalnie 30 dni. Następnie komórki odklejano i hodowano w gęstości 4 tys. komórek/cm² w pożywce do mięśni gładkich (ATCC) w warunkach opisanych powyżej. Komórki zbierano 24 godziny po wysianiu i analizowano. Izolację wykonała mgr Dorota Janiszewska.

3.1.1.4. Przeciwciała

Listę przeciwciał stosowanych w barwieniach immunofluorescencyjnych (IF), Western blot (WB) oraz ChIP-seq zamieszczono w tabeli 3.1. poniżej.

Tabela 3.1. Wykaz przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych w badaniach.

Antygen	Masa białka [kDa]	Pochodzenie	Zastosowanie oraz rozcieńczenie (ilość)	Producent, numer katalogowy
ANLN	124	mysie monoklonalne	WB 1:1000	Abcam, ab211872
		królicze poliklonalne	IF 1:250	Sigma, HPA050556
CLDN1	20	królicze poliklonalne	IF 1:100 WB 1:50	Abcam, ab15098
EED	50	mysie monoklonalne	WB 1:1000	GeneTex, GTX634650
GAPDH	35	mysie monoklonalne	WB 1:150000	Millipore, MAB374
H3	17	królicze poliklonalne	IF 1:500 WB 1:10000	Abcam, ab1791
H3.3	17	królicze monoklonalne	WB 1:1000	Abcam, ab176840
H3K4me3	17	królicze poliklonalne	IF 1:200 WB 1:1000 ChIP-seq 1 µg	Diagenode, C15410003
H3K9me3	17	królicze poliklonalne	IF 1:500 WB 1:1000 ChIP-seq 1,5 µg	Diagenode, C15410193
		mysie monoklonalne	IF 1:500	Diagenode, C15200146
H3K9Ac	17	królicze monoklonalne	IF 1:400 WB 1:1000	Cell Signaling, 9649
H3K27me3	17	królicze poliklonalne	IF 1:500 WB 1:1000	Diagenode, C15410195
HDAC1	55	królicze poliklonalne	IF 1:1000 WB 1:1000	Abcam, ab19845
HMGB1	25	królicze monoklonalne	WB 1:500	Abcam, ab79823
HP1α	21	królicze poliklonalne	IF 1:200 WB 1:1000 ChIP-seq 2,5 µg	Cell Signaling, 2616
		mysie monoklonalne	IF 1:500	Abcam, ab234085
LMNA/C	74 (Lamina A) 63 (Lamina C)	mysie monoklonalne	WB 1:1000	Cell Signaling, 4777P
LMNB1	72	mysie monoklonalne	IF 1:100 WB 1:500	Santa Cruz, sc-365962
p21	21	królicze poliklonalne	WB 1:500	Santa Cruz, sc-397

p53	53	mysie monoklonalne	WB 1:500	Santa Cruz, sc-126
PML	80-100	królicze poliklonalne	IF 1:500	Santa Cruz, sc-5621
SUV39H1		królicze poliklonalne	IF 1:500	Abcam, ab155164
	48	królicze monoklonalne	WB 1:500	Cell Signaling, 8729
γH2AX (S139)		mysie monoklonalne	IF 1:200	Abcam, ab26350

Tabela 3.2. Wykaz przeciwciał drugorzędowych.

Antygen	Koniugat	Pochodzenie	Rozcieńczenie i zastosowanie	Producent, numer katalogowy
królicze IgG	Fluorochrom Alexa 488	koza	IF 1:500 FC 1:500	ThermoFisher Scientific, A-11008
mysie IgG	Fluorochrom Alexa 488	koza	IF 1:500	ThermoFisher Scientific, A-11029
królicze IgG	Fluorochrom Alexa 555	koza	IF 1:500	ThermoFisher Scientific, A-21428
mysie IgG	Fluorochrom Alexa 555	koza	IF 1:500	ThermoFisher Scientific, A-21422
królicze IgG	Peroksydaza chrzanowa	koza	WB 1:2000	Agilent Dako, P0448
mysie IgG	Peroksydaza chrzanowa	koza	WB 1:2000	Agilent Dako, P0447

3.1.2. Startery

Sekwencje starterów przednich (ang. Forward – F) i wstecznych (ang. Reverse – R) wykorzystanych w reakcji qPCR umieszczono w tabeli 3.3. W reakcji użyto starterów wybranych dla dwóch typów matryc: cDNA (oznaczone qPCR) oraz immunoprecypitowanego DNA (oznaczone ChIP-seq). Geny referencyjne oznaczono szarym kolorem. Komercyjnie dostępne startery zamówiono przez Prospecta (polski dystrybutor amerykańskiej firmy Real Time Primers), a syntezę zaprojektowanych starterów przeprowadzono w Instytucie Biochemii i Biofizyki, PAN.

Tabela 3.3. Lista starterów stosowanych w analizie qPCR oraz ChIP-seq.

Symbol genu	Nazwa genu	Sekwencja startera	
qPCR			
GAPDH	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)	F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
		R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
EIF2B1	Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa	F	CACTGCCCTTCCTTAATCA
		R	AGCTACTCACCTGCCTCAA
DAD1	Defender Against Cell Death 1,	F	CAGTTCGGTTACTGTCTCCTCG
		R	GGAGATGCCTTGAAATCCGCT
ANLN	Anillina (<i>Anillin</i>)	F	TCAAGCTAGCCAGGCTCTTA
		R	CTGAGGTCTTCGTTCTTCA
CBX5 (HP1 α)	Białko heterochromatyny 1 izoforma alfa (<i>Chromobox homolog 5, HP1α</i>)	F	AACAGGTGAGTTGGGATTGA
		R	ATTCCTCCAAAAGGGATGAG
CLDN1	Klaudyna-1 (<i>Claudin-1</i>)	F	GCGCGATATTTCTTCTTGCAGG
		R	TTCGTACCTGGCATTGACTGG
EZH1	Białko kompleksu PRC2	F	AAGCGACATGCTATTGAAGG
		R	TGGGGTCTGACATCTCTGTT
EZH2	Białko kompleksu PRC2	F	TGAAGCAAATTCTCGGTGTC
		R	CACCACTCCACTCCACATTC
HBB	1 i 2 egzon β -globiny	F	GTACGGCTGTCATCACTTAG
		R	CCTGAGACTTCCACTGAT
HDAC1	Deacetylaza histonu 1 (<i>histone deacetylase 1</i>)	F	ATCGGTTAGGTTGCTTCA
		R	TCATTCGTGTTCTGGTTAGTC
HDAC3	Deacetylaza histonu 3 (<i>histone deacetylase 3</i>)	F	ACGTGGGCAACTTCCACTAC
		R	GACTCTTGGTGAAGCCTTGC
HDAC9	Deacetylaza histonu 3 (<i>histone deacetylase 9</i>)	F	TTCACAGCAACGCATTCTAA
		R	CAGAGGAACACCTTGCCTAA

KDM4D	Demetylaza lizyny (<i>lysine demethylase 4D</i>)	F	CGCCTACAGTTCTCAAGGAA
		R	TAGGGAAAGGTCACCATGAA
SUV39H1	Metylotransferaza histonów (<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>)	F	CGTGCTTACAGTGCTGGGTA
		R	ATGCAGCCCTGAAGAAGAGA
ChIP-seq			
ZNF554	Czynnik transkrypcyjny zawierający motyw palca cynkowego	F	CGGGGAAAAGCCCTATAAAT
		R	TCCACATTCACCTGCATTCTGT

3.2. Metody

3.2.1. Układ eksperymentalny

3.2.1.1. Komórki kontrolne

Młode, dzielące się komórki, nie przekraczające 10 pasażu (VSMC) lub 25 pasażu (fibroblasty) wysiewano w gęstości 4 tys. komórek/cm² i analizowano po 24 godzinach. W przypadku fibroblastów przygotowano dodatkową kontrolę, analizowaną po 48 godzinach od wysiania.

3.2.1.2. Starzenie przyspieszone indukowane doksorubicyną

Komórki na wczesnym pasażu wysiewano w gęstości 4 tys. komórek/cm² i po 24 godzinach dodawano do pożywki roztwór doksorubicyny (Sigma-Aldrich), o końcowym stężeniu 100 nM lub 150 nM (odpowiednio dla VSMC lub fibroblastów). Komórki hodowano przez kolejne 7 dni bez wymiany pożywki. Wszystkie analizy przeprowadzono po 7 dniach inkubacji, chyba że w tekście zaznaczono inaczej.

3.2.1.3. Starzenie przyspieszone indukowane kurkumina

Młode komórki wysiewano w gęstości 4 tys. komórek/cm² i po 24 godzinach do pożywki dodawano roztwór kurkuminy o końcowym stężeniu 7,5 μM lub 10 μM (odpowiednio dla VSMC lub fibroblastów). Hodowlę prowadzono przez kolejne 7 dni bez zmiany pożywki. Wszystkie analizy przeprowadzono po 7 dniach inkubacji, chyba że w tekście zaznaczono inaczej.

Roztwór wyjściowy o stężeniu 10 mM przygotowywano poprzez zawieszenie 3,68 mg kurkuminy (Cayman) w 1 ml DMSO. Tak przygotowany roztwór przechowywano w -20°C bez dostępu światła przez miesiąc. Rozmrożony roztwór używano raz.

3.2.1.4. Starzenie replikacyjne

Komórki wysiewano w gęstości 4 tys. komórek/cm² i pasażowano do osiągnięcia 70% konfluencji (co 3 lub 4 dni) aż do momentu zaprzestania podziałów. Proces starzenia kontrolowano poprzez liczenie komórek, obserwację ich morfologii w mikroskopie świetlnym oraz badanie zdolności do replikacji DNA (poziom inkorporacji bromodeoksyurydyny – BrdU – do DNA) i aktywności β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-gal). Po ostatnim pasażu, komórki zbierano po 24 godzinach od wysiania i analizowano.

3.2.2. Oznaczanie aktywności β-galaktozydazy związanej ze starzeniem

W celu zbadania aktywności enzymu SA-β-gal, komórki wysiewano w liczbie 14 tys./dołek na szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w 12-dołkowej szalce. Komórki kontrolne oraz stare replikacyjnie utrwalano i barwiono po 24 godzinach od wysiania, a komórki stare w sposób przyspieszony po 7 dniach od dodania związków. W celu utrwalenia komórek, z naczynia hodowlanego usunięto pożywkę, a szkiełka przepłukiwano roztworem PBS. Utrwalanie przeprowadzano przez 5 minut w roztworze 2% formaldehydu i 0,2% glutaraldehydu (Sigma) w PBS. Następnie, po kolejnym płukaniu w PBS, komórki inkubowano przez 18 godzin w 37°C, w roztworze barwiącym zawierającym: 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl D-galaktopiranozyd (X-gal, Sigma.), 5mM żelazo (II) cyjanek potasu (C₆FeK₄N₆ × 3 H₂O), 5 mM żelazo (III) cyjanek potasu (C₆FeK₃N₆), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ (Merck) oraz bufor fosforanowy o pH 6,0. DNA barwiono roztworem DAPI (1 µg/ml w PBS) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz programu ImageJ. Wyniki przedstawiono jako procent komórek z podwyższoną aktywnością SA-β-gal w stosunku do całkowitej liczby komórek.

3.2.3. Analiza zdolności do replikacji DNA – test wbudowywania bromodeoksyurydyny (BrdU) do DNA

Komórki w liczbie 14 tys. wysiewano na szkiełka nakrywkowe o wymiarach 15 × 15 mm umieszczone w 12-dołkowej szalce. Do pożywki dodawano bromodeoksyurydynę (BD Biosciences) o końcowym stężeniu 10 µM i hodowano w standardowych warunkach przez kolejne 24 godziny lub dodatkowe 48 godzin w przypadku młodych fibroblastów. Do komórek kontrolnych oraz starych replikacyjnie BrdU dodawano po 2 godzinach od wysiania, natomiast do komórek poddawanych starzeniu przyspieszonemu w 6 dniu po wysianiu (czyli 24 godziny przed utrwaleniem).

Po inkubacji, odlaniu pożywki oraz przepłukaniu roztworem PBS, komórki utrwalano w zimnym (-20°C) 70% etanolu i przechowywano w -20°C. Utrwalone komórki płukano PBS z dodatkiem 0,5% Tritonu X-

100 (Sigma), a następnie przez 30 minut inkubowano w 4N HCl w PBS. Po płukaniu PBS, kwas solny neutralizowano 0,1 M roztworem boraksu (tetraboran sodu, Sigma) przez 1 minutę. Po kolejnym płukaniu w PBS, komórki inkubowano przez godzinę z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciw BrdU, rozcieńczonym 1:100 w PBS z dodatkiem 0,5% Tween 20 i 1% BSA. Następnie komórki płukano w roztworze 0,5% Tween 20 w PBS i inkubowano przez kolejną godzinę z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym połączonym z fluorochromem, zawieszonym w 0,5% Tween 20 i 1% BSA w PBS, bez dostępu światła. Po dwukrotnym płukaniu w PBS z 0,5% Tween 20, DNA barwiono DAPI w stężeniu 1 µg/ml przez 15 minut. Komórki ponownie płukano i szkiełko nakrywkowe, na którym znajdowały się komórki, przytwierdzano do szkiełka podstawowego przy pomocy kropli zatapiacza (Fluoromount G, Invitrogen). Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz programu ImageJ. Wyniki przedstawiono jako procent komórek włączających BrdU w stosunku do całkowitej liczby komórek.

3.2.4. Charakterystyka jąder komórkowych za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM)

3.2.4.1. Izolacja jąder komórkowych

Odklejone i odwirowane komórki mięśni gładkich w liczbie od 0,5 do 1 miliona umieszczano w 75 mM roztworze KCl w celu lizy komórek i otrzymania jąder komórkowych. Po zawieszeniu komórek w buforze prowadzono inkubację w 37°C przez 20-25 minut, a proces izolacji kontrolowano poprzez obserwację komórek pod mikroskopem świetlnym. W tym celu, do zawiesiny jąder komórkowych dodawano równą objętość 0,06% błękitu trypanu i umieszczano w komorze Neubauera. Następnie, wyizolowane jądra wirowano w 1100 rpm przez 5 min i zawieszano w roztworze etanolu i lodowatego kwasu octowego (w proporcji 3:1 – roztwór Carnoya). Jądra utrwalano przez 15 min w temperaturze -20°C, dwukrotnie płukano w PBS i ostatecznie zawieszano w świeżej porcji roztworu Carnoya i przechowywano w -20°C.

3.2.4.2. Przygotowanie próbek

Na powierzchnię świeżo ściętej miki naniesiono 10 µl zawiesiny badanych jąder komórkowych i pozostawiono do całkowitego wyschnięcia w temperaturze pokojowej.

3.2.4.3. Pomiar i analiza danych

Pomiary wykonano przy pomocy mikroskopu sił atomowych Innova AFM (Bruker), wykorzystując tryb pomiarowy przerywanego kontaktu (Tapping Mode). Ze względu na znaczne rozmiary badanych obiektów, skanowano obszar 100 × 100 µm z zastosowaniem częstotliwości 0,2 Hz. Skanowanie

proszono w różnych miejscach próbki (od trzech do ośmiu w zależności od próbki), wybierając miejsca pozbawione zanieczyszczeń. Do pomiarów wykorzystano sondy skanujące TESP-SS (Bruker) typu Super Sharp (2-5 nm), o częstotliwości drgań około 300 kHz oraz sztywności 42 N/m. Analizy przeprowadzono za pomocą programu NanoScope Analysis oraz Gwyddion. Pomiaru oraz analizę (określenie rozmiarów, wykonanie przekrojów wysokościowych, wyznaczenie szorstkości powierzchni jąder) wykonano we współpracy z dr Renatą Wojnarowską-Nowak oraz dr. hab. Maciejem Wnukiem z Uniwersytetu Rzeszowskiego.

3.2.4.4. Pomiar szorstkości powierzchni

Uzyskane obrazy poddano wstępnej minimalnej obróbce w programie Gwyddion. Zastosowano korekcję pochylenia podłoża oraz średnie odejmowanie płaszczyzn (mean plane subtraction) [179]. Następnie, na powierzchnię jądra nałożono maskę, z której dokonano automatycznego pomiaru chropowatości, czyli RMS roughness (R_q , wartość podano w nm). Analizę prowadzono z pomiarów trzech powtórzeń biologicznych, a wynik przedstawiono jako poziom zmian względem kontroli.

3.2.5. Analiza struktury chromatyny i jądra komórkowego VSMC za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz oprogramowania CellProfiler

3.2.5.1. Przygotowanie komórek oraz barwienie F-aktyny falloidyną

W celu globalnej analizy tekstury chromatyny, VSMC wysiewano na szkiełkach nakrywkowych i po odpowiednim czasie inkubacji utrwalano w 4% roztworze PFA w PBS przez 15 minut. Utrwalone komórki przechowywano w roztworze azydku (8 mg/50 ml) w PBS w temperaturze 4°C. Komórki permeabilizowano 0,5% roztworem Triton X-100 w PBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym płukaniu w PBS, komórki inkubowano przez kolejne 30 minut z falloidyną (w celu wybarwienia cytoszkieletu aktynowego i uwidocznienia zarysu komórki) rozcieńczoną PBS w proporcji 1:40. Następnie płukano w PBS, a DNA barwiono roztworem DAPI w stężeniu 1 µg/ml, przez 15 minut. Komórki płukano i umieszczano w kropli zatapiacza (Fluoromount G, Invitrogen) na szkiełku podstawowym.

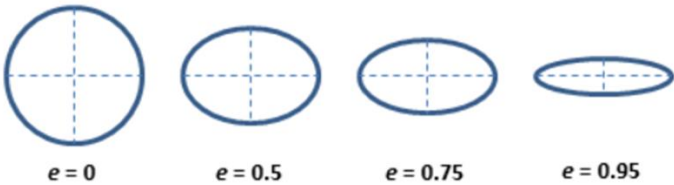
3.2.5.2. Rejestracja obrazu w mikroskopie fluorescencyjnym oraz analiza zdjęć w programie CellProfiler

Obrazowanie próbek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego DMI6000 (Leica Microsystems) wyposażonego w obiektyw 40x NA 0.5 i kamerę DCF 35DFXR2. Obraz rejestrowano poprzez skanowanie całego obszaru szkiełka w jednej płaszczyźnie za pomocą oprogramowania LAS AF (Leica Microsystems), z funkcją złożenia wielu pól widzenia. Zdjęcia zapisywano w 8-bitowym formacie

TIFF. Po wstępnej kontroli jakości za pomocą wtyczki Microscope Focus Quality w programie FijiJ [180], dalszej analizie poddano jedynie wyraźne jądra w liczbie: 1920 komórek kontrolnych, 832 komórek traktowanych kurkumina, 1844 komórek traktowanych doksorubicyną oraz 1004 komórek starych replikacyjnie.

Analizę obrazu przeprowadzono za pomocą programu CellProfiler [181] i Cell Profiler Analyst [182], dzięki którym mierzono parametry opisujące powierzchnię i kształt jądra oraz teksturę chromatyny. Szczegółowy opis parametrów zamieszczono w tabeli 3.3. poniżej. Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem dwustronnego testu Mann-Whitney-Willcoxon oraz testu Dunna, w związku z brakiem rozkładu normalnego próbek. Analizy przeprowadzono we współpracy z mgr Natalią Nowak oraz dr Janem Ludwiczakiem.

Tabela 3.3. Szczegółowy opis parametrów (wraz z polską i angielską nazwą) opisujących strukturę jądra i chromatyny. Przetłumaczone na podstawie instrukcji oprogramowania Cell Profiler.

Parametr	Polska nazwa	Definicja
Nuclear Area	Powierzchnia jądra	Powierzchnia jądra wyrażona jako liczba pikseli (pix2) lub μm^2 (um2).
Nuclear Eccentricity	Mimośród (ekscentryczność)	Stosunek odległości między ogniskami (foci) elipsy do długości jej osi głównej. Elipsa, której mimośród wynosi 0 jest kołem, natomiast wartość 1 jest odcinkiem linii. Parametr ten opisuje kształt jądra-elipsy. Im wartość jest bliższa 0, tym jądro przybiera kształt bardziej kulisty. Natomiast jeśli wartość jest bliższa 1, jądro ma bardziej wydłużony kształt elipsy. 
Nuclear Perimeter	Obwód jądra	Całkowita długość obwodu jądra. Im większa wartość tym większe jądro lub bardziej nieregularna jego krawędź.
Nuclear Solidity	Masywność	Parametr opisujący strukturę jądra/chromatyny. Im mniejsza wartość tym więcej „dziur” w badanym obiekcie.
Nuclear Compactness	Zwartość (kompaktowość)	Średnia kwadratowa odległość pikseli mierzonego obiektu od centroidu podzielona przez badany obszar. Wypełnione koło będzie miało zwartość 1, a obiekty nieregularne lub z otworami będą miały wartość większą niż 1.
DNA Integrated Intensity	Scałkowana intensywność DNA	Suma intensywności pikseli w obrębie obiektu. Parametr opisuje ilość DNA w komórce lub stopień skondensowania chromatyny.
DNA Mean Intensity	Średnia intensywność DNA	Średnia intensywność pikseli w obrębie obiektu. Niska wartość wskazuje na rozluźnienie chromatyny

DNA Median Intensity	Mediana intensywności DNA	Mediana intensywność pikseli w obrębie obiektu. Kolejny parametr opisujący poziom skondensowania chromatyny.
DNA Intensity STD	Odch. stand. intensywności DNA	Odchylenie standardowe intensywności pikseli w obrębie obiektu. Duże odchylenia wskazują na nieregularną strukturę chromatyny w jądrze
DNA Texture Angular Second Moment	Drugi moment kątowy tekstury DNA	Miara jednorodności obrazu. Wyższa wartość tej cechy wskazuje na mniejsze zróżnicowanie intensywności w obrazie. Wartość 1 wskazuje na jednolity obraz. Oznacza to na rozluźnienie chromatyny bez zauważalnych skupisk (wartość bliższa 1) bądź nieregularne skondensowanie (wartość bliższa 0).
DNA Texture Contrast	Kontrast tekstury DNA	Miara lokalnego zróżnicowania w obrazie. Wartość 0 oznacza jednolity obraz, a wysoka wartość wskazuje na wysoki stopień lokalnego zróżnicowania i sugeruje bardziej skondensowaną chromatynę lub obecność skupisk wewnątrz badanego obszaru.
DNA Texture Correlation	Korelacja tekstury DNA	Miara liniowej zależności intensywności w obrazie. Dla obrazu z dużymi obszarami o podobnej intensywności, korelacja jest znacznie wyższa niż dla obrazu z dużymi różnicami w poziomie intensywności. Otrzymana wartość mieści się w przedziale -1 i 1 i świadczy to o skondensowaniu chromatyny (niska korelacja) lub rozluźnieniu (wysoka korelacja).
DNA Texture Entropy	Entropia tekstury DNA	Wskaźnik złożoności w obrębie obrazu. Złożony obraz daje wysoką wartość entropii. Świadczy to o różnym rozłożeniu chromatyny w jądrze.
DNA Texture Inverse Difference Moment	Odwrotny moment różnicy tekstury DNA	Kolejna cecha reprezentująca kontrast obrazu. Przybiera niską wartość dla obrazów niejednorodnych, a stosunkowo wyższą dla obrazów jednorodnych.
DNA Texture Variance	Wariancja tekstury DNA	Miara zróżnicowania wartości intensywności obrazu. Dla obrazu o jednolitej intensywności wariancja tekstury wynosi zero.

3.2.6. Barwienie immunocytochemiczne

Lokalizację wybranych białek badano metodą immunodetekcji. Komórki były wysiewane w liczbie 14 tys. na szkiełka nakrywkowe o wymiarach 15 × 15 mm umieszczone w 12-dołkowej szalce. Po odpowiednim czasie hodowli komórki utrwalano 4% roztworem PFA w PBS przez 15 minut, a następnie przechowywano w 70% etanolu w -20°C. Utrwalone komórki permeabilizowano w 0,5% roztworze Triton X-100 w PBS i blokowano przez 10 min w roztworze blokującym, czyli zawierającym 11,5% surowicy koziej (Sigma), 2% albuminy surowicy bydlęcej (Sigma) i 0,5% Triton X-100 zawieszonych w PBS. Przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczano w buforze blokującym i inkubowano z komórkami przez dwie godziny w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu komórek w PBS, szkiełka inkubowano przez godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromem, rozcieńczonymi w PBS. Po kolejnym płukaniu jądra barwiono DAPI w stężeniu 1 µg/ml przez 15 minut.

Komórki ponownie płukano i umieszczano na szkiełku podstawowym w kropli zatapiacza (Fluoromount G, Invitrogen). Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego i konfokalnego oraz programów ImageJ i Las X (Leica). Wykaz przeciwciał zamieszczono w Tabeli 3.1. i 3.2.

3.2.7. Detekcja białek metodą Western blotting

3.2.7.1. Izolacja białek całokomórkowych oraz normalizacja próbek

W celu analizy poziomu białek, odklejone komórki płukano w PBS i wirowano przez 5 minut w 1000 rpm (Eppendorf 5702). Roztwór PBS odsączono, a otrzymany pelet przechowywano w -20°C. Aby wyekstrahować białka, osad komórek zawieszano w odpowiedniej objętości PBS oraz dodawano taką samą objętość 2× stężonego buforu Laemmliego (2% SDS, 10% glicerol, 5% DTT, 0,002% błękitu bromofenolowego, 0,0625 M Tris-HCl o pH 6,8). Komórki homogenizowano za pomocą strzykawki insulinowej o średnicy igły 0,3 mm i inkubowano w 95°C przez 10 min. Następnie wirowano 12 500 rpm (Eppendorf MiniSpin®) przez 5 min, supernatant przenoszono do nowej probówki i przechowywano w -20°C. Próbkę normalizowano poprzez elektroforetyczne rozdzielanie białek w 12% żelu poliakrylamidowym, który przez 10 minut barwiono błękitem brylantowym Coomassie Blue (40% metanol, 10% kwas octowy, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250), a następnie odbarwiano 8% kwasem octowym w celu pozbycia się niespecyficznego tła. Procedurę (rozdzielanie elektroforetyczne) powtarzano do uzyskania równej intensywności barwienia ścieżek lizatów białkowych.

3.2.7.2. Western blotting

Elektroforetyczny rozdział białek, w zależności od ich wielkości, przeprowadzano na 12% lub 15% żelu poliakrylamidowym. Elektroforeza była prowadzona pod stałym napięciem 120 V w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem buforu do elektroforezy (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM glicyna, 0,1% SDS). Białka przenoszono na membranę nitrocelulozową w buforze do transferu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicyna, 0,5% SDS, 20% metanol) w procesie transferu mokrego prowadzonego przy stałym natężeniu 400 mA przez 1 lub 2 godziny w 4°C. Wydajność transferu kontrolowano barwieniem membrany 1% roztworem barwnika Ponceau w 3% kwasie octowym który następnie opłukano w utraczystej wodzie MilliQ. Następnie, przez godzinę blokowano niespecyficzne wiązania w 5% roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (w przypadku białka HP1α) w TBST (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween). Inkubację membrany z pierwszorzędowym przeciwciałem prowadzono w 5% roztworze mleka lub BSA w TBST w 4°C przez noc lub w temperaturze pokojowej przez godzinę. Szczegółową listę użytych przeciwciał zamieszczono w tabeli 3.1. Kolejnym krokiem było płukanie membrany w roztworze TBST i inkubowanie z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym

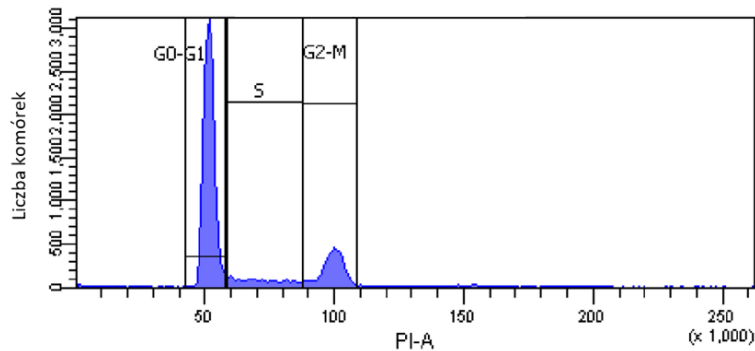
połączonym z peroksydazą chrzanową (HRP), rozcieńczonym 1:2000 w 5% roztworze mleka w TBST, przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po płukaniu w roztworze TBST, sygnał uwidaczniano substratem ECL (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific lub Amersham ECL™, Cytvia) i rejestrowano z użyciem kliszy fotograficznej. Analizę densytometryczną przeprowadzono za pomocą programu ImageJ, gdzie próbki normalizowano do GAPDH lub w przypadku modyfikacji histonów dodatkowo do całkowitego poziomu histonu H3 (po uprzednim usunięciu przeciwciał z membrany, patrz punkt 3.2.7.3.).

3.2.7.3. Usuwanie przeciwciał związanych z błoną nitrocelulozową (ang. *Stripping*)

W celu ponownego wykorzystania membrany, usunięto z niej drugo- i pierwszorzędowe przeciwciała z zastosowaniem specjalnego buforu o niskim pH (1.5% glicyny, 0,1% SDS, 1% Tween, 1% HCl, pH 2,2). Błone dwukrotnie traktowano powyższym buforem przez 10 minut. Następnie dwukrotnie płukano w PBS oraz TBST. Ostatecznie błony ponownie blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka i dalej traktowano według powyższego opisu inkubacji z przeciwciałami.

3.2.8. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej

VSMC oraz fibroblasty wysiewano w gęstości 4 tys./cm², traktowano (doksorubicyną lub kurkumina) i inkubowano przez ustalony czas, zależny od wariantu eksperymentalnego. Komórki odklejano, liczono i dwukrotnie płukano w PBS. Następnie komórki w liczbie ok 100 tys. zawieszono w 500 µl świeżego PBS i wstrzykiwano do 4,5 ml zimnego (-20°C) etanolu. Tak przygotowane komórki przechowywano w -20°C przez co najmniej 24 godziny. Utrwalone komórki dwukrotnie wirowano w roztworze 0,05% Tween w PBS przy 1200 rpm (Eppendorf 5702) przez 5 min. Otrzymany osad zawieszono w 0,5 ml PBS i dodano 0,5 ml buforu cytrynianowego (4 mM kwas cytrynowy i 0,2 M Na₂HPO₄). Komórki inkubowano 5 min i następnie dodano 3ml PBS. Po zwirowaniu (1200 rpm 5 min) osad zawieszono w 0,5 ml buforu barwiącego (3,8 mM cytrynian sodu, 0,5 mg/ml RNaza A, 50 µg/ml jodku propidyny w PBS) i inkubowano przez 30 min w ciemności. Komórki w liczbie 10 000 analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSRFortessa (BD Biosciences). Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono po nałożeniu bramek w odpowiednich obszarach histogramu, a schemat bramkowania przedstawiono na rycinie 3.2.



Ryc. 3.2. Rozkład zawartości DNA w komórce mierzony metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem jodku propidyny (PI), który wiąże się stochiometrycznie do DNA. Oś y przedstawia liczbę komórek, a oś x zawartość DNA w komórce, mierzona poziomem fluorescencji jodku propidyny. Na podstawie otrzymanych szczytów histogramu można wyodrębnić fazę G0-G1, której poziom fluorescencji PI odpowiada liczbie komórek z zawartością DNA 2N, fazę S oraz fazę G2/M, w której poziom fluorescencji odpowiada liczbie komórek z podwojoną zawartością DNA, 4N.

3.2.9. Analiza aktywności enzymatycznej deacetylaz histonów

Aktywność enzymatyczną deacetylaz histonów klasy I, IIb oraz IV oznaczano kolorymetrycznie za pomocą zestawu Colorimetric Histone Deacetylase Activity Assay (ScienCell). Podczas pierwszego etapu reakcji dochodzi do deacetylacji lizyn na załączonym do zestawu substracie przez potencjalnie obecne w lizacie białkowym enzymy HDAC. W efekcie powstaje produkt, który po inkubacji w dedykowanym buforze wywołującym, uwalnia chromofor mierzony przy absorpcji 405 nm. Aktywność deacetylaz histonów podano w pmolach deacetylowanego produktu/czas reakcji (min)/mg lizatu stosując wzory podane przez producenta. W zestaw badanych deacetylaz wchodzi białka HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8, HDAC10 i HDAC11.

3.2.9.1. Izolacja białek z użyciem buforu RIPA

Białkowe ekstrakty całokomórkowe uzyskiwano z użyciem buforu lizującego RIPA (Sigma) wzbogaconego w inhibitory proteaz (Roche). Komórki w naczyniu hodowlanym umieszczano na lodzie i przepłukiwano zimnym PBS. Po usunięciu buforu dodawano bufor RIPA w objętości 10 μ l/cm². Następnie, komórki odrywano skrobakiem, przenoszono do probówek oraz inkubowano przez 20 minut na lodzie. W trakcie inkubacji próbki homogenizowano za pomocą strzykawki insulinowej. Zawiesinę komórek wirowano przez 15 minut w 13000 rpm (Eppendorf 5702/R) w temperaturze 4°C. Supernatant z nad osadu przenoszono do nowej probówki i przechowywano w -20°C. Stężenie białka oznaczano metodą BCA.

3.2.9.2. Oznaczanie stężenia białek metodą BCA

Stężenie białek oszacowano stosując metodę kolorymetryczną, która opiera się na zdolności tworzenia kompleksu jonów miedzi z kwasem bincinoninowym oraz białkami w warunkach alkalicznych. W tym celu przygotowano roztwór zawierający siarczan (VI) miedzi (II) oraz kwas bincinoninowy (Sigma) i do objętości 100 µl dodawano do 5 µl zawiesiny badanego białka i białka o znanym stężeniu, niezbędnego do wyznaczenia krzywej wzorcowej. Krzywą wzorcową przygotowano poprzez rozpuszczenie BSA w ultraczystej wodzie MilliQ. Próbki inkubowano przez 30 minut w 37°C, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 562 nm (Tecan). Wynik odnoszono do wartości krzywej wzorcowej.

3.2.9.3. Oznaczanie aktywności enzymatycznej

Eksperyment przeprowadzono według instrukcji producenta w 96-dołkowej szalce. W skrócie, 15 µg białka rozcieńczono w ddH₂O, dodano odpowiednie objętości buforów załączonych do zestawu (w tym bufor do oznaczania oraz substrat reakcji deacetylacji) i inkubowano przez 4 godziny w 37°C. Reakcję zahamowano poprzez dodanie określonej objętości buforu wywołującego i inkubację próbek w 37°C prowadzono przez kolejne 30 minut. Absorbancję ostatecznego produktu reakcji oznaczono przy długości fali 405 nm. Równolegle prowadzono reakcję pozytywnej i negatywnej kontroli oraz krzywej standardowej, do stworzenia której zastosowano deacetylowane standardy załączone do zestawu. Kontrolę pozytywną stanowił lizat komórkowy dostarczony przez producenta, natomiast negatywną kontrolę uzyskano poprzez dodanie inhibitorów deacetylaz, również dołączonych do zestawu, do kontroli pozytywnej.

Aby obliczyć gęstość optyczną każdej deacetylowanej próbki wzorcowej zastosowano poniższy wzór:

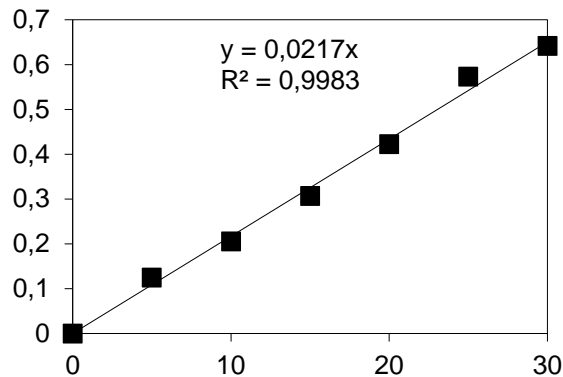
$$\Delta OD_{405\text{ nm},n} = OD_{405\text{ nm},\text{dołek } n} - OD_{405\text{ nm},\text{dołek } 1}$$

Gdzie:

$OD_{405\text{ nm},\text{dołek } n}$ – zmierzona absorbancja odpowiedniego dołka krzywej standardowej

$OD_{405\text{ nm},\text{dołek } 1}$ – zmierzona absorbancja pierwszego dołka krzywej standardowej (o stężeniu 0 nmoli)

Następnie przygotowano wykres krzywej standardowej umieszczając na osi y wyliczone wartości $\Delta OD_{405\text{ nm},n}$, a na osi x stężenia deacetylowanych standardów.



Ryc. 3.3. Krzywa standardowa z dopasowaniem liniowym $y = ax$.

Ostateczną aktywność enzymów HDAC obliczono stosując kolejno poniższe równania:

$$\Delta OD_{405 \text{ nm, próbki}} = OD_{405 \text{ nm, próbki}} - OD_{405 \text{ nm, negatywna kontrola}}$$

$$\text{Deacetylowany produkt (nmol)} = \frac{\Delta OD_{405 \text{ nm, próbki}}}{a}$$

$$\text{Aktywność HDAC (pmol/min/mg)} = \frac{\text{Deacetylowany produkt (nmol)} \times 1000}{\text{Czas inkubacji (min)} \times \text{ilość lizatu (mg)}}$$

3.2.10. Analiza profilu transkryptomycznego metodą mikromacierzy

3.2.10.1. Utrwalanie komórek

Trypsynizowane VSMC liczone w rozwiniętej komorze Neubauera i w liczbie 1×10^6 lub 1×10^5 komórek (VSMC lub blaszek miażdżycowych odpowiednio) wirowano w 1000 rpm (Eppendorf 5702) przez 5 min. Osad komórkowy zawieszano w 100 μl PBS i wstrzykiwano do 900 μl RNALater (Thermo Fisher Scientific). Komórki inkubowano w 4°C przez 24 godziny, a następnie przechowywano w -80°C .

3.2.10.2. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano w sposób zautomatyzowany z użyciem zestawu odczynników MagNA Pure Total RNA Isolation kit (Roche) w aparacie MagNA Pure Compact (Roche). Stężenie oraz jakość RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Integralność określano przy użyciu elektroforezy kapilarnej za pomocą Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) oraz

zestawu dedykowanych odczynników RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies). Wyizolowane RNA przechowywano w -20°C (krótkoterminowo) lub -80°C (długoterminowo).

3.2.10.3. Kontrola poziomu zanieczyszczeń genomowym DNA

W celu skontrolowania, czy w wyizolowanych próbkach nie pozostały ślady genomowego DNA przeprowadzono reakcję PCR amplifikacji 1 i 2 egzonu ludzkiej β -globiny (HBB). Do reakcji użyto buforu do reakcji PCR (A&A Biotechnology), odpowiedniej pary primerów HBB (sekwencja w tabeli 3.3.) oraz badanej próbki. Reakcję przeprowadzono w aparacie Mastercycler® nexus (Eppendorf) w warunkach opisanych w tabeli 3.4. Otrzymany produkt sprawdzano przy wykorzystaniu elektroforezy w 1% żelu agarozowym.

Tabela 3.4. Warunki reakcji PCR sprawdzającej obecność genomowego DNA w próbce.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	
Preinkubacja	94	04:00	
Amplifikacja	94	00:45	35 cykli
	57	00:45	
	72	00:60	
Koniec reakcji	4	∞	

3.2.10.4. Przygotowanie próbek oraz hybrydyzacja do płytek macierzy

Profil ekspresji genów VSMC poddanych różnym typom starzenia (w trzech powtórzeniach biologicznych), badano za pomocą analizy mikromacierzy z wykorzystaniem zestawu odczynników GeneChip™ WT PLUS (ThermoFisher Scientific) oraz platformy Affymetrix Gene Atlas System, zgodnie z instrukcjami producenta. Po wstępnej analizie jakości, do 250 ng całkowitego RNA dodano odpowiednio rozcieńczone, modyfikowane nukleotydy poli-A (poly-A spike controls) oraz bufor reakcyjny zawierający zestaw starterów z sekwencją promotorową polimerazy T7 i dedykowany enzym (first-strand enzyme) dołączający powyższe sekwencje do 5' końca nici cDNA. Jednocześnie przygotowano próbę kontrolną, którą stanowiło załączone do zestawu RNA izolowane z komórek HeLa. Przygotowane mieszaniny RNA poddano reakcji syntezy pierwszej nici cDNA z użyciem termocyklera Mastercycler® nexus (Eppendorf). Próbkę inkubowano kolejno przez godzinę w 25°C, godzinę w 42°C oraz 2 minuty w 4°C. Bezpośrednio po zakończeniu reakcji przystąpiono do syntezy drugiej nici cDNA, z zastosowaniem dedykowanych odczynników i następujących warunków: inkubacja przez godzinę w 16°C, przez 10 minut w 65°C oraz przez 2 minuty w 4°C. Po uzyskaniu drugiej nici cDNA od razu przeprowadzono transkrypcję *in vitro*, czyli syntezę komplementarnego RNA (cRNA) z wykorzystaniem

polimerazy RNA T7. Reakcję prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 40°C. Gotowe cRNA oczyszczano za pomocą kulek magnetycznych poprzez trzykrotne płukanie 80% etanolem. Oczyszczone cRNA eluowano w wodzie wolnej od nukleaz o temperaturze 65°C przez 3 minuty, a następnie poddano kontroli jakości oraz oszacowaniu stężenia z użyciem spektrofotometru NanoDrop. W kolejnym etapie przygotowano reakcję odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania sscDNA (*sense-strand cDNA*). Do 15 µg cRNA dodano dedykowany zestaw starterów i inkubowano przez 5 minut w 70°C, 5 minut w 25°C oraz 2 minuty w 4°C. Tak przygotowany materiał posłużył do końcowej syntezy pojedynczej nici ss-cDNA (*single-stranded cDNA*), którą przeprowadzono poprzez 10 minutową inkubację w 25°C, następnie 90 minut w 42°C, 10 minut w 70°C oraz 2 minuty w 4°C. Otrzymane pojedyncze nici ss-cDNA poddano hydrolizie cRNA z użyciem RNazy H, a potem czyszczono za pomocą kulek magnetycznych. Po jednokrotnym płukaniu 100% etanolem i kolejnym, trzykrotnym płukaniu 80% etanolem, ss-cDNA eluowano w wodzie wolnej od nukleaz o temperaturze 65°C przez 1 minutę. Stężenie otrzymanego materiału oznaczano z użyciem spektrofotometru NanoDrop, a ocenę jakości i rozkładu otrzymanych fragmentów przeprowadzono przy użyciu elektroforezy kapilarnej za pomocą Bioanalyzer 2100 oraz zestawu dedykowanych odczynników RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies). Na podstawie pomiarów zdecydowano się poddać fragmentacji 5,5 µg ss-cDNA z użyciem glikozylazy DNA uracylu (UDG) oraz endonukleazy APE 1 (*apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*). Reakcję przeprowadzono przez godzinę w 37°C, następnie przez 2 minuty w 97°C i 2 minuty w 4°C. Ponownie skontrolowano rozkład fragmentów ss-cDNA z użyciem bioanalizatora Bioanalyzer 2100, aby przystąpić do ostatecznego znakowania próbek biotyną, przed hybrydyzacją do macierzy. Do 5,5 µg gotowych fragmentów ss-cDNA dodawano terminalną transferazę deoksynukleotydową TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) oraz dołączony do zestawu bufor zawierający odczynnik znakujący biotyną. Mieszaninę inkubowano przez godzinę w 37°C, 10 minut w 70°C oraz 2 minuty w 4°C.

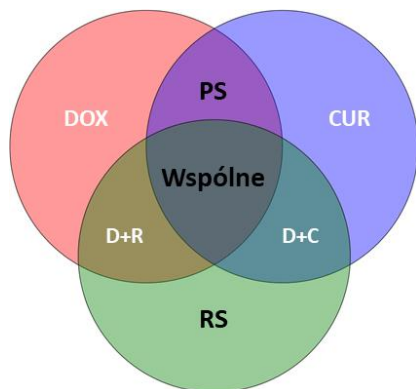
Wyznakowane próbki hybrydyzowano do pasków Affymetrix HuGene 2.1 ST Array Strips, kompatybilnych z systemem GeneAtlas™. Reakcję przeprowadzono przez 16 godzin w 48°C. Przepłukane paski mikromacierzy skanowano w aparacie Gene Atlas Imaging Station (Affymetrix), a sczytane dane intensywności sygnału zapisano w plikach CEL.

3.2.10.5. Dalsza obróbka danych oraz analiza funkcjonalna wyników

Otrzymane pliki CEL importowano do programu Transcriptome Analysis Console (TAC, Thermo Fisher Scientific) i normalizowano metodą RMA (Robust Multi-array Average). Po przeprowadzeniu kontroli jakości (według instrukcji producenta oprogramowania), zastosowano jednokierunkową analizę ANOVA w celu określenia zmian w ekspresji genów (DEG) zachodzących w badanych warunkach

eksperymentalnych. Ponadto, aby zminimalizować zmienność wynikającą z zastosowania komórek od różnych dawców oraz czasu przeprowadzonych eksperymentów na ekspresję genów, nałożono poprawkę „batch effect”. Punktem odcięcia, za który uznano ekspresję za znaczącą, była krotność zmian $\leq -1,3$ i $\geq 1,3$ oraz $p \leq 0,05$.

Analizę ekspresji genów w wariantach CUR, DOX i RS przeprowadzono w odniesieniu do komórek kontrolnych. Po otrzymaniu listy znacząco zmienionych genów, sprawdzono jaka część z nich się pokrywa. Wynik zobrazowano za pomocą diagramu Venna, który przedstawiono na rycinie 3.4. poniżej. Geny wspólne dla wszystkich wariantów, znajdujące się w środku przecięcia trzech zbiorów, nazywano dalej „Wspólne”. Punkt przecięcia dwóch zbiorów genów ekspresjonowanych przez komórki traktowane doksorubicyną i kurkuminą (bez genów wspólnych) nazwano PS, a listę genów charakterystyczną tylko dla starzenia replikacyjnego – RS. Te trzy osobne zbiory (czyli Wspólne, PS i RS) poddano analizie funkcjonalnej za pomocą bazy danych Gene Ontology (GO) [183, 184] z użyciem narzędzia g:Profiler. Zastosowano poprawkę sugerowaną przez twórców (g:SCS threshold), a za istotne statystycznie wyniki uznano te nieprzekraczające wartości p-value 0,05.



Ryc. 3.4. Schemat oznaczeń na diagramie Venna. Do dalszej analizy funkcjonalnej wybrano geny charakterystyczne dla starzenia przyspieszonego (PS), ekprimowane wyłącznie w starzeniu replikacyjnym (RS) oraz wspólne dla obu typów starzenia, zaznaczone na środku przecinających się zbiorów genów (Wspólne). Czarnym kolorem czcionki zaznaczono wybrane analizowane zbiory, a kolorem białym zbiór genów, które nie zostały uwzględnione w analizach funkcjonalnych.

3.2.11. Analiza poziomu mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym

3.2.11.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR)

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcjami producenta. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler® nexus (Eppendorf) z użyciem 1 μg RNA wyizolowanego metodą opisaną w podrozdziale 3.2.10.2. Stężenie otrzymanego cDNA mierzono spektrofotometrem NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 3.5. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej		Warunki reakcji PCR	
Odczynnik	Objętość [μ l]	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas inkubacji [min]
Roztwór reakcyjny 5X (Reaction Mix)	4		
Mieszanina enzymów Maxima	2	25	10
Matryca RNA	1 μ g	50	15
Woda wolna od nukleaz	do 20	85	5
Całkowita objętość	20	4	∞

3.2.11.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Ekspresję wybranych genów zmieniających się podczas starzenia oszacowano przeprowadzając reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). W tym celu użyto odczynnika LightCycler[®] 480 SYBR Green i Master (Roche), zestawu uprzednio zwalidowanych primerów (tabela 3.3.) oraz 20 ng matrycy cDNA (VSMC oraz komórek blaszek miażdżycowych). Reakcję przeprowadzono w 2 powtórzeniach technicznych w objętości 10 μ l używając aparatu LightCycler[®]96 (Roche). Skład mieszaniny oraz warunki reakcji umieszczono w tabeli 3.6 oraz 3.7.

Wstępną analizę danych przeprowadzono za pomocą programu kompatybilnego z termocyklerem (LightCycler[®]96 System, Roche), aby następnie wyznaczyć względny poziom ekspresji genów. W tym celu posłużono się metodą Pfaffla [185]. Kontrolę endogenną stanowił gen GAPDH (powszechnie stosowany gen referencyjny), DAD1 oraz EIF2B1 (geny o relatywnie stałej ekspresji mRNA we wszystkich warunkach eksperymentalnych, wybrane na podstawie mikromacierzy), a uzyskane wyniki przedstawiano jako krotność zmian FC (Fold Change) względem komórek kontrolnych z zaznaczonym kierunkiem zmian.

Tabela 3.6. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR.

Odczynnik	Objętość [μ l]
SYBR Green i Master	5
Primery (F+R), 500 nM	2,5
cDNA, 20 ng	2,5
Całkowita objętość	10 μ l

Tabela 3.7. Warunki reakcji qPCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]
Preinkubacja	95	10:00
Amplifikacja	95	00:10
	59	00:10
	72	00:30
		40 cykli
Krzywa topnienia	95	00:10
	65	01:00
	97	00:01
Koniec reakcji	4	∞

3.2.12. Analiza profilu wzbogacenia H3K4me3, H3K9me3 oraz HP1 α w genomie metodą immunoprecypitacji histonów i sekwencjonowania nowej generacji (ChIP-seq)

Procedurę immunoprecypitacji histonów przeprowadzano za pomocą zestawu iDeal kit for histones (Diagenode) i postępowano według instrukcji producenta. Podstawowe kroki opisano w skrócie poniżej.

3.2.12.1. Przygotowanie komórek - utrwalanie kompleksów białko-DNA

Komórki odklejano trypsyną i dwukrotnie płukano PBS. Następnie, w liczbie 3 milionów zawieszono w 500 μ l PBS i poddano procesowi sieciowania (cross-link) świeżym, 1% roztworem formaldehydu wolnego od metanolu (Carl Roth). Komórki poddano inkubacji w temperaturze pokojowej, której czas zależny był od wariantu eksperymentalnego. Warunki reakcji sieciowania oraz późniejszej fragmentacji dobrano na drodze przeprowadzonej uprzednio optymalizacji procesu. Komórki kontrolne inkubowano przez 1 minutę, komórki traktowane doksorubicyną i kurkuminą przez 2 minuty, a komórki stare replikacyjnie przez 3 minuty. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 0,125 M glicyny i dalszą inkubację w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie komórki dwukrotnie płukano zimnym PBS i wirowano przy 1800 rpm (Eppendorf 5424 R) przez 5 min w 4°C. Od tego momentu cała procedura immunoprecypitacji była wykonywana w 4°C oraz przy użyciu zimnych odczynników.

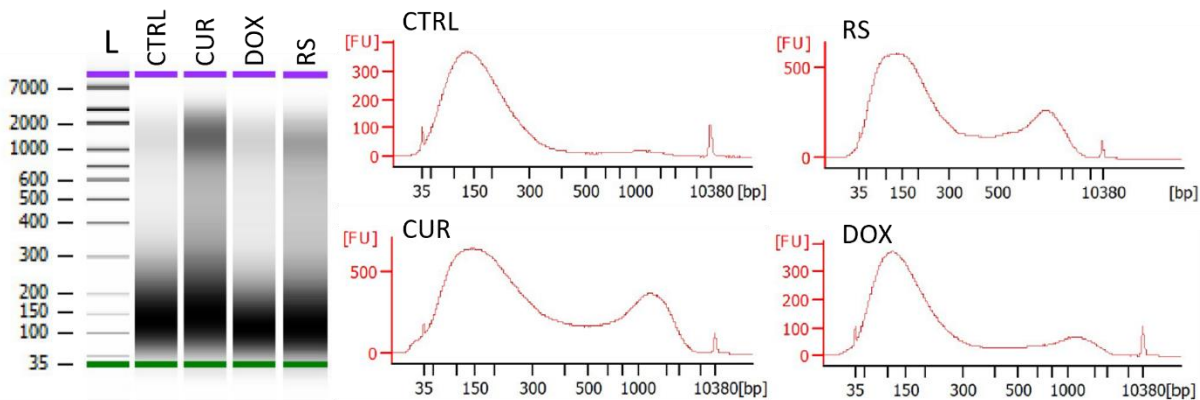
3.2.12.2. Izolacja i fragmentacja chromatyny

Osad otrzymany z utrwalonych komórek zawieszano w 3 ml buforu lizującego iL1 (proporcja 1 ml/1 mln komórek) i inkubowano w 4°C przez 10 min na kołyszce laboratoryjnej w celu mieszania roztworu. Zawiesinę komórek wirowano przy 2200 rpm (Eppendorf 5804 R) przez 5 minut w 4°C i usuwano supernatant. Osad komórkowy zawieszano w 3 ml kolejnego buforu lizującego (iL2) oraz inkubowano

i wirowano w tych samych warunkach. Uzyskany pelet zawieszano w buforze do sonikowania (iS1) wzbogaconym w inhibitory proteaz załączone do zestawu w proporcji 100 μ l na 1 milion komórek. Fragmentację chromatyny ultradźwiękami przeprowadzono za pomocą sonikatora Bioruptor Plus (Diagenode), stosując odpowiednie cykle sonikacji, zależne od wariantu eksperymentalnego. Jeden cykl sonikacji na ustawieniach HIGH oznacza 30 sekundową emisję fal z 30 sekundową przerwą. Podczas fragmentacji komórek młodych zastosowano 40 cykli, natomiast komórek traktowanych doksorubicyną i kurkuminą oraz RS 30 cykli. Warunki sonikacji wybrano na podstawie wcześniej wykonanej optymalizacji eksperymentu. Cały proces przeprowadzano w recyrkulacyjnej łaźni wodnej o stałej temperaturze 4°C.

3.2.12.3. Kontrola długości fragmentów chromatyny

Długość fragmentów sonikowanej chromatyny kontrolowano poprzez pobranie 10 μ l zawiesiny chromatyny i dodanie do niej 40 μ l wody ChIP-seq grade oraz 2 μ l rozcieńczonej mieszaniny RNaz (Thermo Fisher Scientific) w proporcji 1:150 (w wodzie ChIP-seq grade). Roztwór inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Następnie dodawano 50 μ l buforu eluującego iE1, 4 μ l buforu iE2 i inkubowano w 65°C przez noc z wytrząsaniem w celu odwrócenia procesu sieciowania. DNA oczyszczano metodą ekstrakcji z użyciem mieszaniny fenol-chloroform. Do 106 μ l zawiesiny dodano taką samą objętość roztworu fenol-chloroform-alkohol izoamylowy. Po zwirowaniu (13000 rpm przez 2 min w temperaturze pokojowej, Eppendorf 5804R), do oczyszczonej frakcji wodnej dodano równą objętość mieszaniny chloroform-alkohol izoamylowy i wirowano w tych samych warunkach. Oczyszczone DNA strącano etanolem. W pierwszym etapie dodawano 10 μ l 3M octanu sodu pH 5,3, 3 μ l glikogenu oraz 500 μ l 100% zimnego etanolu i inkubowano przez 1h w -20°C. Próbki zwirowano (13000 rpm, 25 min, 4°C) i do osadu DNA dodano 500 μ l 70% zimnego (-20°C) etanolu i ponownie zwirowano (13000 rpm, 10 min, 4°C). Osuszony precypitat DNA zawieszono w 10 μ l buforu TE. Długość fragmentów DNA kontrolowano za pomocą aparatu Bioanalyzer 2100 oraz zestawu dedykowanych odczynników High Sensitivity DNA Analysis kit (Agilent Technologies). Na Ryc. 3.5. przedstawiono przykładowy rozkład fragmentów dla każdego wariantu eksperymentalnego.



Ryc. 3.5. Elektroforetyczny rozdział fragmentów sonikowanej chromatyny. Lewy panel przedstawia przykładowy rozkład fragmentów w żelu, a prawy elektroforegram przedstawiony jako funkcja poziomej fluorescencji (FU – jednostka umowna fluorescencji) do długości fragmentów (bp – pary zasad). Obraz wygenerowano za pomocą oprogramowania Bioanalyzer 2100. We wszystkich wariantach, większość otrzymanych fragmentów mieściła się w przedziale 100-300 par zasad (pokazany jako pierwszy pik). Komórki traktowane kurkumina oraz stare replikacyjnie wykazywały obecność fragmentów o długości ok. 1000 par zasad, widocznych jako drugi pik z prawej strony wykresu.

Mimo wielu prób ustalenia odpowiednich warunków usieciowienia i fragmentacji chromatyny, nie we wszystkich wariantach udało się uzyskać idealny rozkład fragmentów, zalecany przez producenta (czyli mieszczący się w przedziale 150-300 pz). Taki rozkład ma kluczowe znaczenie dla uzyskania dokładnych i reprezentatywnych wyników dalszej analizy. Zbyt długie fragmenty mogą zawierać wiele miejsc interakcji chromatyny z białkiem, co może zakłócać jednoznaczne przypisanie miejsc wzbogacenia do regionów w genomie. Z drugiej strony, uzyskanie fragmentów krótszych niż 150 pz niesie ze sobą utratę niezbędnych informacji w sekwencji pozwalających je dokładnie zmapować. Najbardziej zbliżony rozkład uzyskano dla komórek kontrolnych (1 minuta sieciowania, 40 cykli sonikacji) oraz DOX (2 minuty sieciowania, 30 cykli). Pojawienie się długich fragmentów mogło mieć wpływ na dalsze etapy, w tym na immunoprecypitację z przeciwciałem oraz przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania.

3.2.12.4. Immunoprecypitacja chromatyny

Immunoprecypitację chromatyny prowadzono używając przeciwciał skierowanych przeciwko H3K9me3, H3K4me3 oraz HP1 α , z wykorzystaniem około 750 tysięcy komórek. Równocześnie w celu zbadania specyficzności wiązania przeciwciał, przeprowadzono reakcję w wykorzystaniem IgG (dołączonego do zestawu) jako kontroli negatywnej. Ponadto z każdego wariantu eksperymentalnego odłożono 1 μ l zawiesiny chromatyny jako „input” (próbka kontrolna) sprawdzający wydajność immunoprecypitacji. Po poprzedniej optymalizacji stężeń przeciwciał, ostatecznie zdecydowano się użyć

1 µg przeciwciała H3K4me3 i IgG, 1,5 µg H3K9me3 oraz 2,5 µg HP1α. Całonocną reakcję immunoprecypitacji prowadzono w 4°C na rotorze laboratoryjnym, w przygotowanym buforze zawierającym BSA, inhibitory proteaz, bufor iC1 (dostarczony przez producenta), badane przeciwciała oraz kulki magnetyczne opłaszczane białkiem A. Kulki z utworzonymi kompleksami z chromatyną płukano kolejno czterema buforami wchodzącymi w skład zestawu, po czym wraz z próbką kontrolną eluowano buforem elucyjnym iE1 w temperaturze pokojowej przez 30 minut na wytrząsarce obrotowej. Po zwirowaniu i przeniesieniu otrzymanej zawiesiny DNA do nowej probówki, przeprowadzono reakcję odwrócenia sieciowania chromatyny formaldehydem poprzez całonocną inkubację próbek w 65°C z wytrząsaniem. Następnie otrzymane DNA oczyszczano za pomocą kulek magnetycznych zawieszonych w odpowiednim buforze. Kulki poddano kolejnym płukaniom buforami dostarczonymi przez producenta i ostatecznie oczyszczone DNA zawieszono w gotowym buforze C, również dołączonym do zestawu. Ilość immunoprecypitowanego DNA badano z użyciem odczynników Qubit dsDNA HS (Invitrogen), a pozostałe próbki przechowywano w -20°C.

3.2.12.5. Kontrola wydajności immunoprecypitacji metodą qPCR

Przed przystąpieniem do sekwencjonowania próbek, sprawdzono wydajność immunoprecypitacji chromatyny za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Reakcję przeprowadzono z użyciem odczynnika LightCycler® 480 SYBR Green i Master (Roche), a skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 3.8., natomiast warunki reakcji w tabeli 3.9.

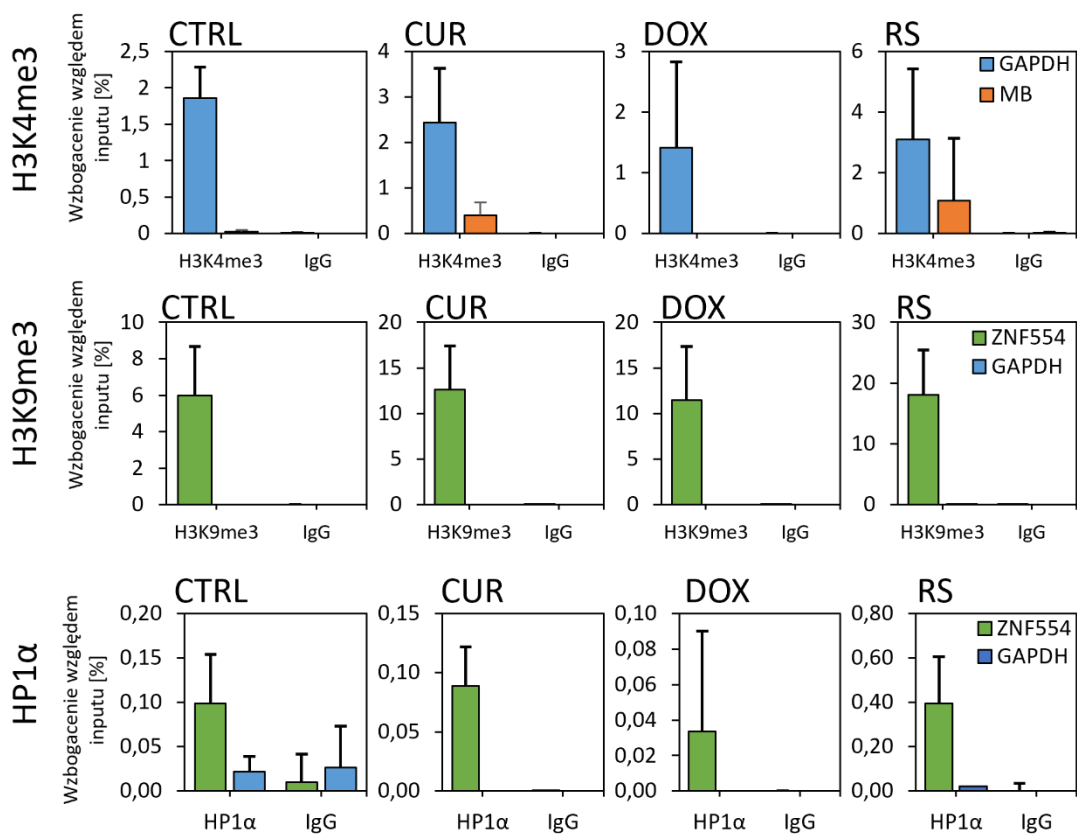
Dla każdego kompleksu białko-DNA (lub modyfikacja histonu-DNA) amplifikowano typowe rejony bogate w dane białko lub modyfikację histonu, stanowiące kontrolę pozytywną potwierdzającą powodzenie immunoprecypitacji oraz rejony zwykle pozbawione danych białek, stanowiące kontrolę negatywną. W przypadku znacznika H3K4me3 dokonano amplifikacji miejsc promotorowych genu *GAPDH*, służących za kontrolę pozytywną, natomiast kontrolę negatywną stanowił egzon drugi mioglobiny *MB*. Powyższe startery zostały dołączone do zestawu, a ich sekwencja została zastrzeżona przez producenta. Dla znacznika H3K9me3 oraz białka HP1α kontrolę stanowił gen *ZNF554* (sekwencję starterów podano w tabeli 3.3.), a negatywną to samo miejsce promotorowe genu *GAPDH* wymienionego powyżej. Równolegle prowadzono amplifikację wszystkich wymienionych miejsc dla chromatyny immunoprecypitowanej z IgG (stanowiącą kontrolę negatywną reakcji). Otrzymane wyniki przedstawiono jako procent wzbogacenia względem inputu, a wykresy obrazujące zmiany umieszczono na rycinie 3.6.

Tabela 3.8. Skład mieszaniny reakcyjnej ChIP-qPCR.

Odczynnik	Objętość [μ l]
SYBR Green i Master	4
Primery (F+R)	2
DNA	2
Całkowita objętość	8 μ l

Tabela 3.9. Warunki reakcji qPCR zastosowanej w celu kontroli reakcji immunoprecypitacji.

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	
Denaturacja	95	10:00	
Amplifikacja	95	00:30	40 cykli
	60	00:30	
	72	00:30	
Koniec reakcji	4	∞	

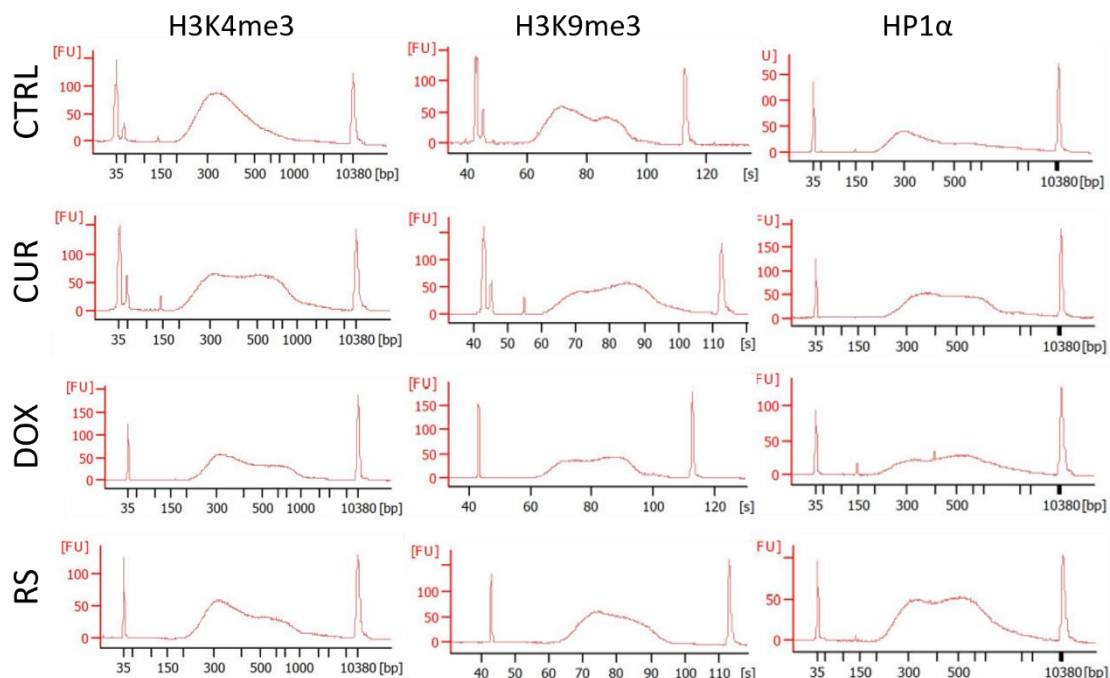


Ryc. 3.6. Kontrola powodzenia procesu immunoprecypitacji metodą qPCR. Procentowy poziom wzbogacenia badanej modyfikacji i białka HP1a w wyznaczonych miejscach w genomie podano względem inputu. Dla każdej analizy wzbogacenia dla danej modyfikacji przeprowadzono równolegle kontrolę negatywną immunoprecypitacji z wykorzystaniem neutralnego IgG. Wyniki podano jako średnią z odchyleniem standardowym.

Przedstawione na powyższej rycinie wyniki, a zwłaszcza relatywnie wysokie słupki w pozytywnych kontrolach przeprowadzonych dla H3K4me3 i H3K9me3 (są to odpowiednio miejsca kodujące gen *GAPDH* i *ZNF554*) wskazują na udane przeprowadzenie immunoprecypitacji z danymi przeciwciałami oraz ich specyficzność. Dodatkowym potwierdzeniem jest brak sygnału wzbogacenia w negatywnych kontrolach, czyli odpowiednich rejonach genu *MB* dla H3K4me3 oraz *GAPDH* dla H3K9me3. Jedynie w przypadku wariantu CUR i RS można zauważyć wzrost wzbogacenia H3K4me3 w negatywnej kontroli (*MB*), jednak jest on niewielki i może być wyjątkowo specyficzny dla tych typów starzenia. Brak sygnału w próbkach immunoprecypitowanych z przeciwciałem IgG dodatkowo wskazuje na specyficzność wiązania H3K4me3 oraz H3K9me3 do chromatyny. Mimo niskiego wzbogacenia białkiem HP1α (są to wyniki wzbogacenia poniżej 1% względem inputu) zdecydowano się przekazać wszystkie próbki do sekwencjonowania.

3.2.12.6. Sekwencjonowanie nowej generacji

Sekwencjonowanie zostało wykonane w Laboratorium Specjalistycznym Genomiki, Centrum Nowych Technologii, Uniwersytetu Warszawskiego. Po immunoprecypitacji skonstruowano biblioteki z użyciem zestawu KAPA HyperPrep Kit (KAPA Biosystems) oraz dedykowanych adapterów KAPA Unique Dual-Indexed Adapter Kit (KAPA Biosystems). Biblioteki skonstruowano według zalecenia producenta, czyli z 3 ng materiału lub 7 ul tam, gdzie stężenie próbki nie było wystarczające. Liczbę cykli dobrano do każdej próbki osobno na podstawie analizy bibliotek po wstępnej amplifikacji. Następnie, otrzymane biblioteki poddano kontroli długości fragmentów z użyciem aparatu Bioanalyzer 2100 oraz zestawu odczynników High Sensitivity DNA Analysis kit (Agilent). Stężenie bibliotek zmierzono metodą qPCR za pomocą zestawu KAPA Library Quantification kit (Kapa Biosciences) przy zastosowaniu protokołu producenta. Pomimo otrzymania nietypowego rozkładu fragmentów w części próbek (typowy rozkład charakteryzuje się krzywą w kształcie dzwonu mieszczącą się w zakresie od 150 do 500 par zasad – tak jak w przypadku H3K4me3 w komórkach kontrolnych na rycinie 3.7 poniżej) zdecydowano się na wykorzystanie bibliotek do dalszej analizy. Sekwencjonowanie przeprowadzono na instrumencie Illumina NovaSeq 6000 w trybie odczytu pair-end 2×51 cykli z użyciem standardowej procedury zalecanej przez producenta z 0,5% dodatkiem biblioteki kontrolnej Phix (Illumina). Ostatecznie uzyskano średnio ok. 80% liczby planowanych odczytów. W wyniku sekwencjonowania otrzymano wysokiej jakości dane (ponad 97% danych o jakościach przekraczających Phred Score Q37) co stanowiło 66-115% planowanej ilości danych. Z analizy wykluczono dwie próbki, tj. po jednym powtórzeniu wariantu DOX i CTRL immunoprecypitowanych z przeciwciałem H3K9me3, dla których otrzymano odpowiednio 21% i 33% ilości danych. Pozostałe próbki przekazano do dalszej analizy.



Ryc. 3.7. Przykładowy rozkład fragmentów bibliotek otrzymany za pomocą aparatu Bioanalyzer 2100. Elektroforegramy przedstawiają funkcję poziomu fluorescencji do długości fragmentów. Zaobserwowana w drugiej kolumnie (przedstawiająca obraz biblioteki przygotowanej dla fragmentów bogatych w modyfikację H3K9me3) zmiana jednostki na osi x z „bp” na „s” wynika z błędu w rejestracji sygnału fluorescencji markera wielkości przez instrument i nie wpływa na ostateczną interpretację wyników. Typowy rozkład uzyskanych fragmentów powinien mieścić się w przedziale od 150 do 500 pz, a krzywa powinna przyjmować kształt prawoskośnego dzwonu ze szczytem w okolicach 300 pz. Taki rozkład uzyskano dla komórek kontrolnych immunoprecypitowanych z H3K4me3.

3.2.12.7. Bioinformatyczna analiza danych

Analiza sekwencjonowania została wykonana przez dr Krzysztofa Gorycę we współpracy z Laboratorium Specjalistycznego Genomiki Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

3.2.12.7.1. Przygotowanie odczytów

Ocenę jakości surowych plików fastq wykonano z zastosowaniem narzędzia FastQC, po czym odczyty zostały przycięte za pomocą oprogramowania Trimmomatic [186]. Przycinano wszystkie odczyty o jakości mniejszej niż 12 (phred+33) w oknie czteronukleotydowym. Odczyty krótsze niż 20 nukleotydów (po przycięciu) były odrzucane z dalszej analizy. Przycięte sekwencje mapowano do genomu referencyjnego człowieka grch38 (ENSEMBL) przy użyciu Bowtie2 [187] z domyślnymi

parametrami. Duplikaty odczytów były identyfikowane i usuwane z użyciem narzędzia MarkDuplicates z pakietu GATK (wersja 4.2.3.0) z domyślnymi parametrami [188].

3.2.12.7.2. Detekcja pików

Kolejnym krokiem było dwuetapowe wykrywanie pików, czyli regionów ze statystycznie wyższym pokryciem w odczyty wzbogaceń w stosunku do otoczenia genomowego. Zastosowano standardowo używane narzędzie MACS2 [189] po uprzednim złączeniu powtórzeń w jedno, za pomocą narzędzia „merge” z pakietu samtools. Następnie za pomocą narzędzia summarizeOverlaps z biblioteki GenomicAlignments zliczono pokrywające się odczyty regionów wzbogacenia (pików) dla każdego powtórzenia biologicznego, aby oszacować występującą zmienność. Uzyskane zliczenia zostały wykorzystane w kolejnej analizie statystycznej z użyciem narzędzia edgeR [190].

Ostatecznie, zidentyfikowane piki przypisywano do zajmowanych miejsc w genomie za pomocą narzędzia annotatePeak na bazie danych Ensembl [191].

3.2.12.7.3. Wizualizacja danych oraz analiza funkcjonalna miejsc wzbogaconych w badane modyfikacje histonu H3 i białko HP1 α

Do zobrazowania stopnia pokrycia miejsc wybranymi białkami w genomie zastosowano przeglądarkę genomową Integrative Genomics Viewer (IGV) [192]. Każdy wariant eksperymentalny zaznaczono odpowiednim kolorem: komórki kontrolne – czarnym, komórki traktowane kurkuminą – żółtym, komórki traktowane doksorubicyną – czerwonym, a komórki stare replikacyjnie – niebieskim.

Analizę funkcjonalną przeprowadzono z wykorzystaniem bazy danych GO oraz narzędzia g:Profiler (z tymi samymi ustawieniami jak w przypadku analizy mikromacierzy).

3.2.12.8. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną przeprowadzono co najmniej z trzech odrębnych powtórzeń biologicznych. Za pomocą programu GraphPad Prism wyznaczono odchylenia standardowe, a w celu wyznaczenia istotności statystycznej zmian zachodzących między komórkami starymi a młodymi, w większości przypadków zastosowano test t studenta. W przypadku zastosowania innego testu statystycznego, jego szczegóły uwzględniono przy opisie danej metody, zamieszczonej w niniejszym rozdziale. Uzyskane wartości notowano następująco: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

4. Wyniki

Główny model badawczy stanowiły komórki mięśni gładkich naczyń izolowane z aorty. W badaniach, oprócz starzenia replikacyjnego (w skrócie nazywane RS), zastosowano dwa modele starzenia przyspieszonego, gdzie czynnikami indukującymi starzenie była dokсорubicyna lub kurkumina (łącznie określane jako PS). Dokсорubicyna jest to powszechnie stosowany chemioterapeutyk silnie oddziałujący z chromatyną. Poprzez wbudowywanie się do DNA upośledza działanie enzymu Topoizomeraza II, zaburzając proces replikacji. W rezultacie prowadzi to do pęknięć podwójnej nici DNA m.in. W promotorach aktywnych genów [193] oraz do zmiany architektury chromatyny i ekspresji genów poprzez czasowe usunięcie nukleosomów z miejsc promotorowych i otwartej chromatyny [194, 195]. Dokсорubicyna ponadto wzmacnia produkcję wolnych rodników oraz zakłóca aktywność helikazy, co również skutkuje powstawaniem uszkodzeń DNA [196]. Drugi związek, kurkumina, to polifenol o plejotropowym działaniu, który w pewnym zakresie stężeń wywołuje efekt cytostatyczny. Bierze ona udział w modelowaniu chromatyny poprzez hamowanie działania metylotransferaz DNA oraz acetylotransferaz i deacetylaz histonów [197]. Związek ten został szczegółowo opisany w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia jako czynnik indukujący starzenie z pominięciem szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA [28]. Kontrolę stanowiły młode, dzielące się komórki na wczesnych pasażach.

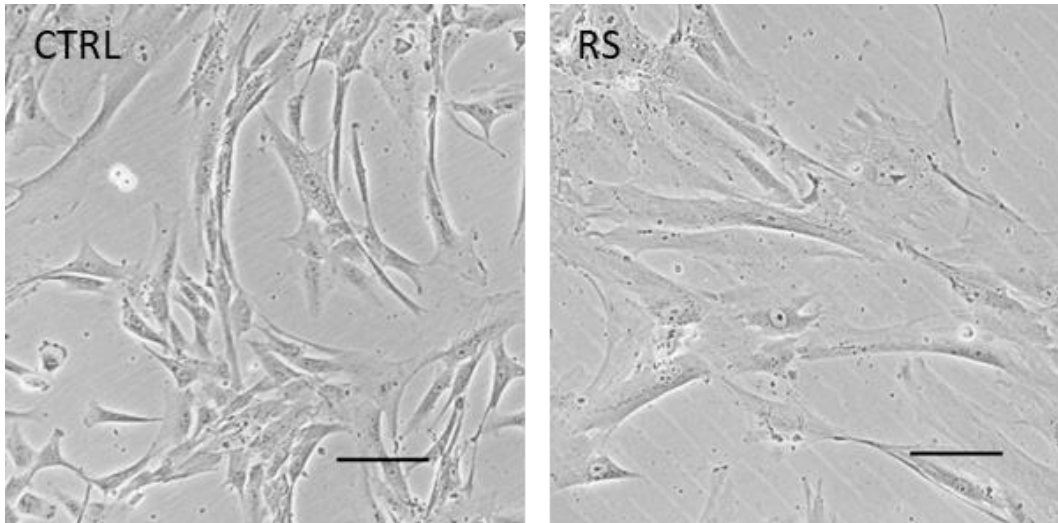
Uniwersalność zmian zachodzących podczas starzenia sprawdzono wykonując wybrane analizy z wykorzystaniem ludzkich fibroblastów stosując ten sam układ eksperymentalny. Dodatkowo, porównano zmiany zachodzące *in vitro* ze zmianami występującymi *ex vivo* w komórkach mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych pacjentów. Wyniki omówiono w dalszej części rozdziału.

4.1. Zmiany towarzyszące starzeniu *in vitro* komórek mięśni gładkich pochodzących z aorty

4.1.1. Ogólna charakterystyka zmian zachodzących podczas starzenia

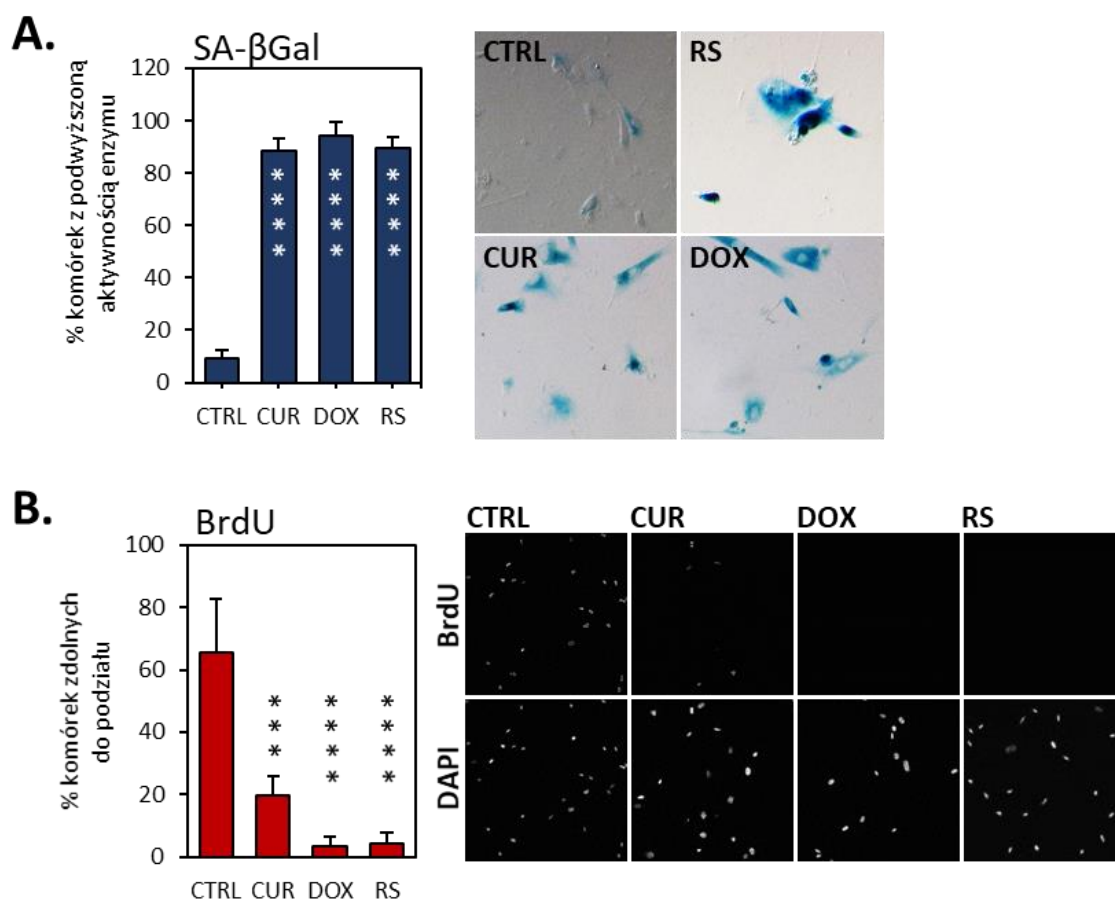
Przed przystąpieniem do głównych analiz zmian struktury chromatyny starych komórek, proces starzenia regularnie kontrolowano za pomocą podstawowych oznaczeń, jakimi są badanie aktywności SA-β-galaktozydazy związanej ze starzeniem i testu wbudowywania BrdU do DNA. Badano również poziom ekspresji białek związanych ze starzeniem (p53, p21), określano liczbę uszkodzeń podwójnej nici DNA oraz dokonano ogólnej charakterystyki morfologii komórek.

Młode komórki mięśni gładkich na wczesnym etapie hodowli charakteryzują się niewielkim wrzecionowatym kształtem i małym jądrem komórkowym w centralnej części. Często obserwuje się drobne, kuliste i opalizujące w mikroskopie świetlnym komórki będące w trakcie podziału. Natomiast podczas starzenia, zarówno replikacyjnego jak i indukowanego stresem, dochodzi do drastycznego powiększenia powierzchni komórki. Komórki są bardziej spłaszczone, mają nieregularne, poszarpane krawędzie oraz wydłużone „wypustki” cytoplazmy, a ich jądra są znacznie powiększone i posiadają wiele jąderek. W hodowli nie obserwuje się opalizujących, dzielących się komórek (Ryc. 4.1.).



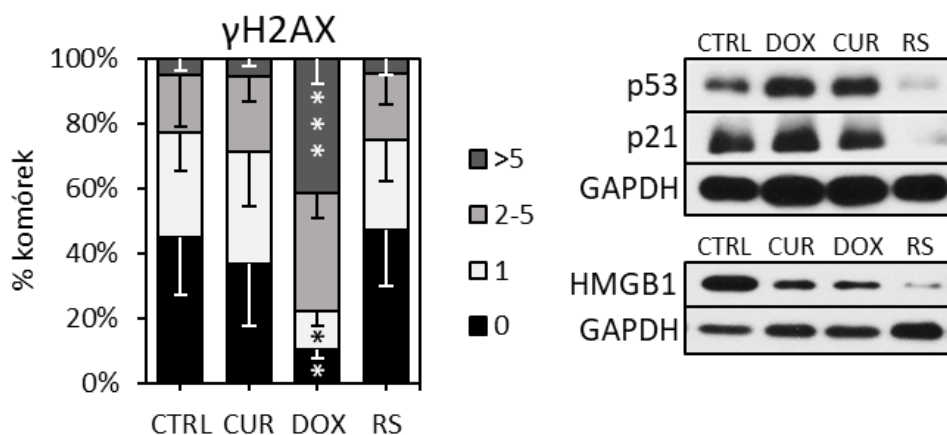
Ryc. 4.1. Poglądowe zdjęcie porównujące morfologię komórek mięśni gładkich naczyń młodych (CTRL) i starych replikacyjnie (RS) z zastosowaniem mikroskopii świetlnej. Skala 100 μm .

Komórki stare wykazują znacząco podwyższony poziom aktywności enzymu SA- β -gal, który po zastosowaniu odpowiedniego testu kolorymetrycznego, uwidacznia się w starych komórkach w postaci ciemnoniebieskiego zabarwienia (Ryc. 4.2. A, prawy panel). Ponad 80% komórek starych, zarówno PS jak i RS, posiada podwyższoną aktywność tego enzymu. Wzrost aktywności SA- β -gal negatywnie koreluje z poziomem inkorporacji BrdU, który odzwierciedla zdolność komórek do replikacji DNA. W komórkach traktowanych dokсорubicyną oraz RS odsetek dzielących się komórek spada ponad dziesięciokrotnie w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.2. B). Komórki traktowane kurkuminą, pomimo znaczącego spadku podziałów, nadal w ok. 20% są zdolne do proliferacji.



Ryc. 4.2. Analiza podstawowych znaczników starzenia w komórkach kontrolnych (CTRL) oraz komórkach indukowanych do starzenia doksorubicyną (DOX) lub kurkuminą (CUR) oraz starych replikacyjnie (RS): A) Aktywność SA-β-gal (n = 5), B) Odsetek dzielących się komórek (n = 5). Lewy panel przedstawia wykresy podsumowujące ilościowo zachodzące zmiany, prawy panel ukazuje przykładowe zdjęcia. Zdjęcia SA-β-gal zrobione w powiększeniu 100x, BrdU 200x. Analiza statystyczna przeprowadzona testem t-studenta wobec komórek kontrolnych (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Kolejnym ważnym markerem, zwłaszcza w kontekście starzenia indukowanego stresem, jest wzrost liczby uszkodzeń DNA. Ich poziom badano za pomocą barwienia immunocytochemicznego używając przeciwciała rozpoznającego fosforylowaną na serynie 139 formę białka H2AX (γ H2AX), czyli białka, które jako jedno z pierwszych jest zaangażowane w szlak prowadzący do naprawy DNA. Największą akumulację uszkodzeń wykazują komórki traktowane doksorubicyną i niemal połowa posiada w jądrze więcej niż 5 skupisk nienaprawionych uszkodzeń (Ryc. 4.3.). Komórki CUR i RS nie wykazywały znaczącego wzrostu liczby uszkodzeń, czym nie różniły się od kontroli.



Ryc. 4.3. Analiza liczby uszkodzeń DNA w komórkach młodych, PS (DOX, CUR) i RS na podstawie skupisk γ H2AX w jądrze komórkowym (lewy wykres) ($n = 3$). Na wykresie przedstawiono procent komórek przynależących do danej grupy. Populację podzielono na komórki nieposiadające uszkodzeń (kolor czarny) oraz takie, w których występuje jedno (biały), dwa do pięciu (jasnoszary) i powyżej pięciu (ciemnoszary) skupisk na jądro. Analiza statystyczna przeprowadzona testem t-studenta wobec komórek kontrolnych, (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$. Po prawej stronie pokazano przykładowy obraz zmian ekspresji białka p53, p21 oraz HMGB1 w starzeniu ($n = 3$).

Poziom ekspresji białek odpowiedzialnych za zatrzymanie komórek w cyklu komórkowym, tj. p53 i p21, był znacząco wyższy w komórkach DOX i CUR w porównaniu zarówno do kontroli jak i RS (Ryc. 4.3.). Z drugiej strony komórki RS wykazywały znaczny spadek wyżej wymienionych białek w porównaniu do komórek młodych.

HMGB1 jest obecnym w większości komórek niehistonowym białkiem, którego poziom jest bardzo wysoki, a do jego funkcji należy między innymi regulacja ekspresji genów. Poprzez przyłączanie się do nici DNA powoduje zmianę struktury przestrzennej miejsc promotorowych w celu ułatwienia dostępu maszynerii transkrypcyjnej [198, 199]. Niekiedy może wchodzić w interakcje z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi i zwiększać ich aktywność [200]. Dotychczasowe badania dowiodły, że synteza tego białka spada w starzeniu [201]. Badane komórki mięśni gładkich charakteryzują się spadkiem poziomu HMGB1 w obu typach starzenia, jednak spadek w RS był bardziej spektakularny (Ryc. 4.3.).

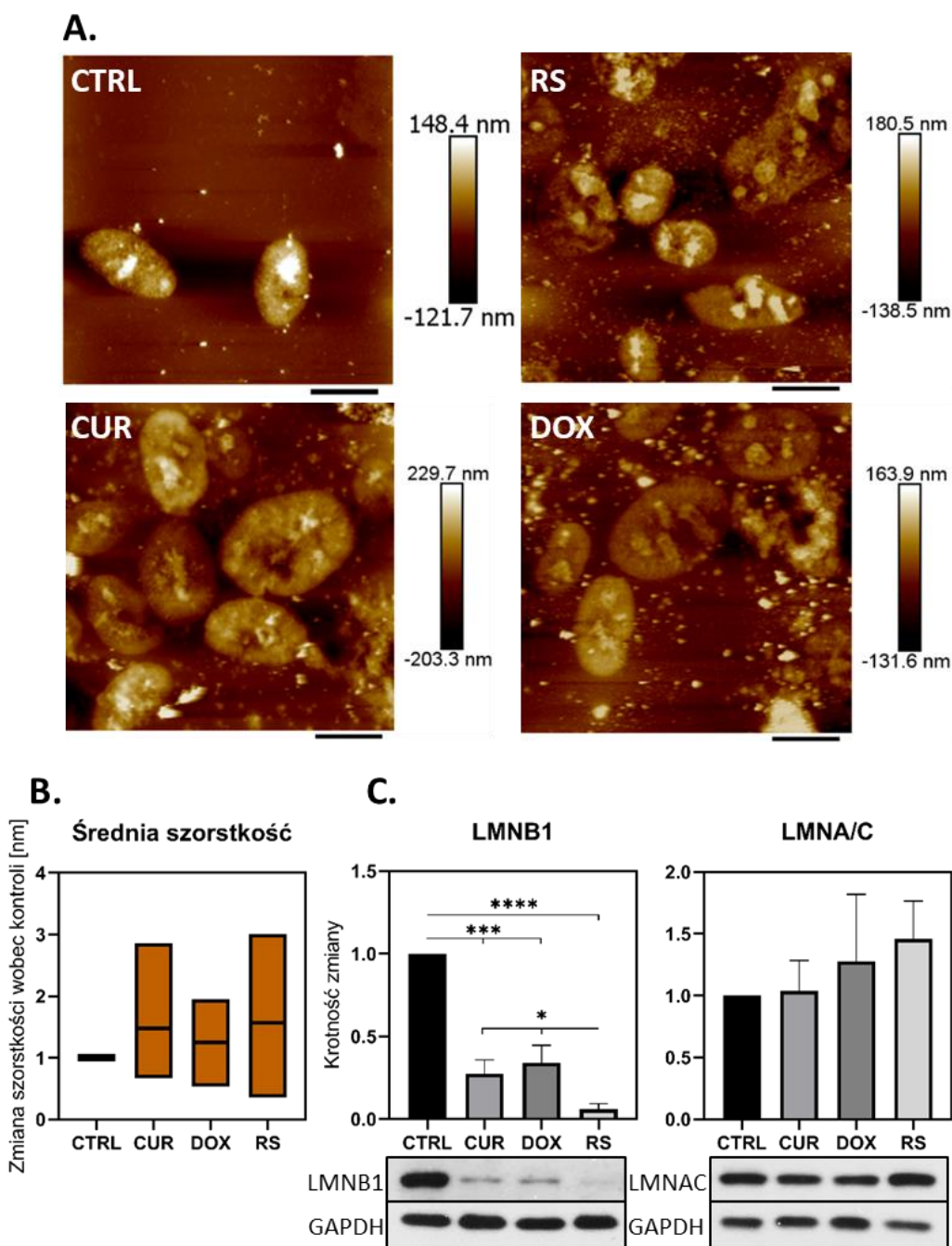
Powyzsza analiza rutynowo stosowanych markerów wskazuje na pewnego stopnia podobieństwo między starzeniem przyspieszonym a replikacyjnym i służyła głównie jako kontrola procesu starzenia, gdyż starzenie VSMC na powyższych modelach zostało już przez nas scharakteryzowane wcześniej [6, 28]. W kolejnym kroku, przystąpiono do szczegółowej analizy różnic pod kątem zmian w strukturze jądra i chromatyny.

4.1.2. Zmiany w strukturze jądra i chromatyny w zależności od typu starzenia

4.1.2.1. Wzrost chropowatości powierzchni jąder starych komórek

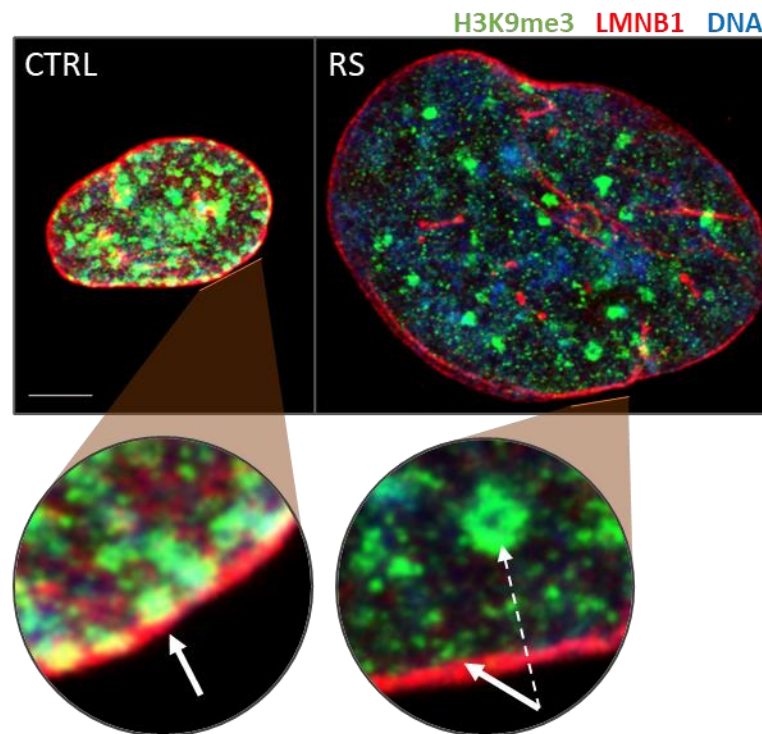
Analizę prowadzono przy wykorzystaniu mikroskopii sił atomowych (AFM). Jądra komórek młodych mają owalny kształt o regularnych brzegach. W większości są małych rozmiarów i posiadają wyraźnie zarysowane, małe jąderka, które wydają się wystawać wysoko ponad powierzchnię jądra (obserwowane jako jaśniejsze miejsca na skanie) (Ryc. 4.4. A). Dla odmiany, jądra komórek RS są stosunkowo heterogenne pod względem wielkości i kształtu, co wynika z niesynchronicznego starzenia w hodowli i obecności komórek na różnym etapie starzenia. Większość jąder jest dużych rozmiarów (średnio $31 \mu\text{m} \times 49 \mu\text{m}$, 4.4 ± 9.0), o nieregularnym kształcie i brzegu. Jąderka tych komórek są przeważnie większe i mniej wznoszące się ponad powierzchnię otoczki jądrowej. Wzrasta też ich liczba. Pośrednią morfologię wykazują jądra komórek PS, gdyż pod względem wielkości zbliżone są do RS, natomiast biorąc pod uwagę regularność brzegu, przypominają bardziej komórki kontrolne. Morfologia jąder jest wysoce zróżnicowana i zależy od czynnika indukującego starzenie. Jąderka komórek traktowanych DOX są liczne i relatywnie płaskie, o dość regularnej krawędzi, natomiast traktowanie kurkumina wpływa na ich wysoką nieregularność i niewielkie wzniesienie ponad powierzchnię.

Uzyskane wyniki sugerują, że wraz ze starzeniem może dochodzić do stopniowego zwiększenia szorstkości powierzchni jądra. Jednak ze względu na ograniczenia techniczne metody (długi czas potrzebny na skanowanie wyznaczonego obszaru i ograniczona dostępność do sprzętu), analizę przeprowadzono łącznie tylko na 20-30 jądrach danego wariantu eksperymentalnego, co nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Następnie sprawdzono, czy chropowatość powierzchni jądra koreluje ze zmianami ekspresji lamin (Ryc. 4.4. C). Wyniki pokazały, że przypuszczalny wzrost szorstkości koreluje ze spadkiem poziomu laminy B1 (LMNB1) w obu typach starzenia. Znaczące różnice w poziomie ekspresji LMNB1 widać również między PS a RS. Zauważono natomiast nieistotny wzrost w poziomie laminy A/C podczas starzenia replikacyjnego i indukowanego doksorubicyną (Ryc. 4.4. C).



Ryc. 4.4. Analiza morfologii i chropowatości jądra oraz białek tworzących blaszkę jądrową w komórkach kontrolnych oraz starych (PS i RS). A) Reprezentatywne skany obrazujące zmiany topografii jądra komórkowego w zależności od typu starzenia. Skala 20 μm , skala ciepła (heatmap scale) ilustruje wysokość w osi z. B) Wykres pudełkowy podsumowujący szorstkość powierzchni jądra obliczoną z 3 powtórzeń (liczba jąder: CTRL = 21, CUR = 22, DOX = 25, RS = 32). Środkowa linia przedstawia średnią, górne i dolne krawędzie zaznaczają odchylenie. C) Poziom białek laminy B1 i laminy A/C mierzony metodą Western blot. Wykresy przedstawiają wyniki densytometrii ($n = 3$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-studenta: $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (****). Pod wykresami znajdują się przykładowe zdjęcia obrazujące ilość białka w poszczególnych wariantach doświadczalnych.

Potencjalny wzrost chropowatości może pośrednio wskazywać na reorganizację struktury chromatyny w starych komórkach, ponieważ wg literatury i dotychczasowych obserwacji, wraz ze spadkiem laminy B1 dochodzi do zmiany w strukturze blaszki jądrowej oraz reorganizacji domen LAD, a tym samym oderwania się heterochromatyny bogatej w trimetylację lizyny 9 histonu 3 (H3K9me3) od wewnętrznej błony otoczki jądrowej [202, 203]. Na poniższej rycinie pokazano przykładowe zdjęcie komórek młodych i starych replikacyjnie, obrazujące spadek miejsc kontaktu heterochromatyny z laminą B1 i przemieszczenie się regionów występujących pod otoczką jądrową do wnętrza jądra (Ryc. 4.5).



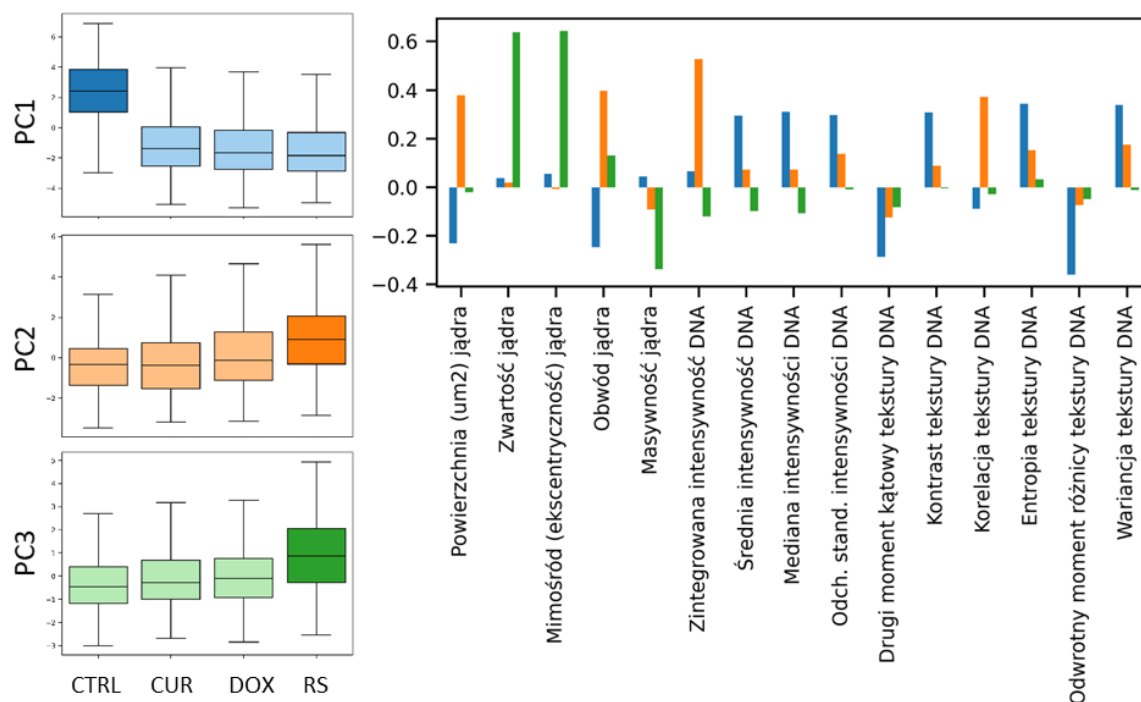
Ryc. 4.5. Reorganizacja domen LAD w jądrach komórek kontrolnych i starych replikacyjnie. Dużymi strzałkami zaznaczono różnice w miejscach przyłączenia heterochromatyny do laminy B1; przerywana strzałka wskazuje na przemieszczenie się oderwanej chromatyny w głąb jądra. Przykładowe zdjęcie z mikroskopu konfokalnego. Skala 5 μm .

4.1.2.2. Analiza zmian w organizacji chromatyny za pomocą programu Cell Profiler

W kolejnym etapie dokonano ogólnej charakterystyki zmian kondensacji chromatyny w zależności od typu starzenia. Jądra wybarwione barwnikiem DAPI analizowano z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Na podstawie otrzymanego obrazu mikroskopowego dokonano szeregu pomiarów z użyciem oprogramowania Cell Profiler opisujących wielkość i kształt jądra oraz strukturę chromatyny, których dokładny opis można znaleźć w rozdziale Metodyka (3.2.5.2.).

Ze względu na mnogość parametrów i ich wariantów, do dalszej analizy wybrano najważniejsze i najbardziej adekwatne do badanych komórek, czyli opisujące zmiany w promieniu od 3 do 12 pikseli (co równa się odpowiednio 0,85 i 3,5 μm) od punktu pomiarowego wewnątrz jądra (promień jądra młodych komórek wynosi właśnie ok. 3,5 μm). Dla wyselekcjonowanych parametrów zastosowano analizę głównych składowych (PCA), w celu sprawdzenia występowania różnic między wariantami eksperymentalnymi. W wyniku analiz wyodrębniono 3 główne składowe. Pierwsza, PC1, wyjaśnia 50% wariacji i wskazuje na istotne różnice pomiędzy komórkami kontrolnymi a starymi replikacyjnie i w sposób przyspieszony (Ryc. 4.6. górny wykres lewego panelu). Ponadto zawiera w sobie najwięcej cech różniących. Do nich zaliczają się między innymi powierzchnia i obwód jądra oraz parametry intensywności i tekstury DNA (np. średnia, mediana, odchylenie czy kontrast). Kolejne dwie, czyli PC2 i PC3, wyjaśniają ok 25% wariacji i ujawniają cechy odróżniające RS zarówno od kontroli jak i PS (są to np. mimośród i zwartość jądra, zintegrowana intensywność DNA oraz korelacja tekstury DNA). Szczegółową listę parametrów wchodzących w skład PC1, PC2 i PC3 oznaczono odpowiednio kolorem niebieskim, pomarańczowym i zielonym na prawym wykresie ryciny 4.6. Na kolejnej rycinie (Ryc. 4.7.) zamieszczono wykresy zmian przykładowych parametrów zachodzących w starzeniu oraz pozwalających odróżnić starzenie przyspieszone od replikacyjnego.

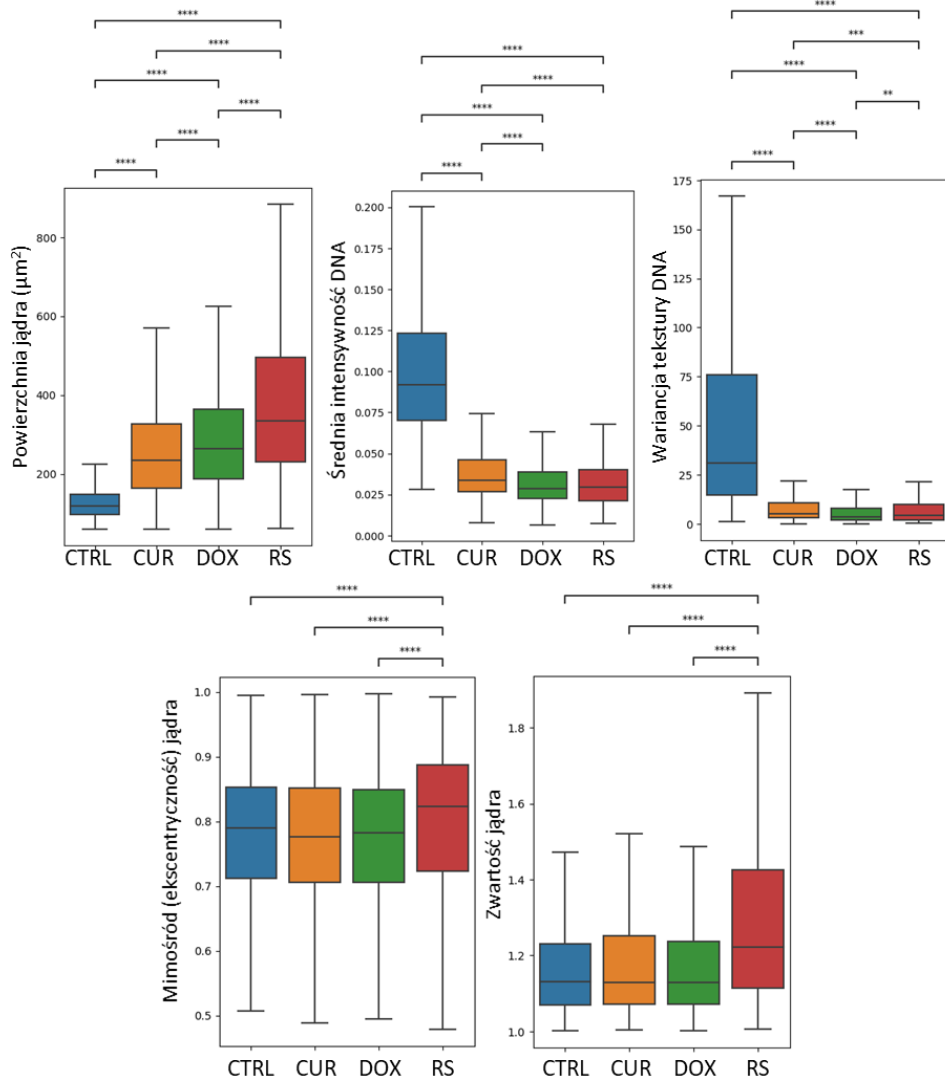
Przeprowadzona analiza parametrów kształtu wykazała istotne zwiększenie powierzchni jądra komórkowego we wszystkich badanych typach starzenia, przy czym komórki RS wykazywały największy wzrost. Ponadto, porównując zwartość oraz ekscentryczność jąder, najbardziej wydłużone i nieregularne były jądra komórek RS. Natomiast jądra komórek poddanych działaniu doksorubicyny i kurkuminy nie różniły się istotnie od komórek kontrolnych. Zmiany, zwłaszcza tak wyraźnie jak te w RS, mogą być między innymi wynikiem spadku laminy B1 (podobnie jak w przypadku wzrostu chropowatości jądra badanego mikroskopią sił atomowych).



Ryc. 4.6. Analiza głównych składowych oraz lista parametrów wchodzących w skład wyznaczonych składowych PC1, PC2 i PC3. Na wszystkich wykresach zastosowano ten sam schemat kolorystyczny: niebieski – PC1, pomarańczowy – PC2, zielony – PC3. Na wykresie po prawej zamieszczono szczegółową listę parametrów, które mogą wpływać pozytywnie (dodatnie wartości) lub negatywnie (ujemne wartości) na główne składowe. Parametry wchodzące w skład PC1 pozwalają na odróżnienie młodych komórek od starych, natomiast składowa PC2 i PC3 pozwalają na odróżnienie starzenia replikacyjnego od reszty wariantów.

O ile parametry opisujące kształt jąder można analizować osobno i każdy z nich dostarcza jednoznacznej odpowiedzi, o tyle parametry opisujące teksturę chromatyny należy analizować całościowo, aby móc uzyskać pełny obraz zmian. a więc analizowane parametry intensywności barwienia DAPI (średnia intensywność) oraz tekstury, tj. entropia, moment drugi kątowy, kontrast, korelacja, odwrotny moment różnicy i wariacja wykazały, że wszystkie warianty starzenia w większości charakteryzowały się mniej skomplikowaną teksturą chromatyny i bardziej jednolitym zabarwieniem niż kontrola, co sugeruje większe rozluźnienie chromatyny. Jednakże komórki traktowane dokсорubicyną wydają się mieć najbardziej widoczne zmiany, a efekt w komórkach traktowanych kurkuminą oraz RS jest bardziej subtelny. Dodatkowo, w komórkach kontrolnych zauważa się obecność wyraźnych i intensywnych „bloków” chromatyny w zakresie analizowanych odległości (czyli 0,85 i 3,5 μm). Sugeruje to większą kondensację chromatyny w młodych komórkach być może wynikającą z innego etapu cyklu komórkowego. Co ciekawe, parametry korelacji oraz kontrastu sugerują, że w komórkach RS może niekiedy dochodzić do tworzenia podobnych bloków jak

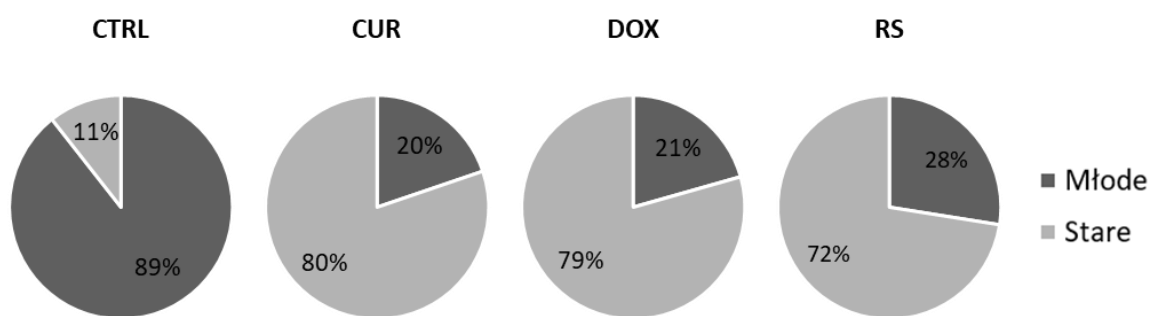
w kontroli, lecz w tym przypadku najprawdopodobniej nie są one powiązane z wchodzeniem komórek w cykl, jak to ma miejsce w komórkach młodych. Można przypuszczać, że takie miejsca skondensowanej chromatyny w pojedynczych komórkach RS, są czasami obserwowanymi skupiskami SAHF. W dalszej części pracy próbowano zbadać tę hipotezę.



Ryc. 4.7. Wybrane parametry obrazujące różnice w strukturze jądra i chromatyny, pozwalające odróżnić komórki stare od młodych oraz typ starzenia. Zmiany przedstawiono w postaci wykresów pudełkowych, gdzie długość ramek reprezentuje zakres międzykwartylowy (IQR), linia ciągła wewnątrz ramki oznacza medianę, a wąsy zaznaczają maksymalną obserwację poniżej górnego odcięcia (kwartył 3 + $(1,5 \times \text{IQR})$) i minimalną obserwację poniżej dolnego odcięcia (kwartył 1 - $(1,5 \times \text{IQR})$). Na wykresie pominięto wartości odstające od górnego i dolnego odcięcia w celu poprawy przejrzystości. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwustronnego testu Mann-Whitney-Willcoxona z poprawką Dunna: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Górny panel obrazuje parametry odróżniające komórki stare niezależnie od typu starzenia od komórek młodych, a dolny komórki RS od PS i komórek kontrolnych.

Powyższa metoda analizy chromatyny, pozwala nie tylko odróżnić komórki młode od starych, ale również badane typy starzenia przyspieszonego od replikacyjnego. Dodatkowo, może być stosowana jako przesiewowa metoda identyfikacji starych komórek w badanej populacji, co też uczyniono w dalszych analizach, przede wszystkim tych dotyczących barwień immunocytochemicznych. W tych badaniach, wstępną selekcję komórek przeprowadzono na podstawie wielkości powierzchni jądra. Przyjęto, że komórki młode to te, których powierzchnia jądra wynosiła mniej niż $200 \mu\text{m}^2$, natomiast gdy powierzchnia jądra przekraczała ten próg, komórki klasyfikowano jako stare. Tę graniczną wartość wybrano na podstawie wyników uzyskanych podczas powyższej analizy (przedstawionych na rycinie 4.7., wykresie podsumowującym powierzchnię jądra). Zauważono, że w przypadku komórek kontrolnych, większość jąder nie przekracza powierzchni $200 \mu\text{m}^2$ (górna krawędź przedziału międzykwartylowego wyznacza powierzchnię ok. $160 \mu\text{m}^2$), a mediana wynosi ok. $120 \mu\text{m}^2$. Dodatkowo, na przykładzie komórek traktowanych doksorubicyną stwierdzono, że powierzchnia jądra komórki starzejącej się zaczyna się od ok. $200 \mu\text{m}^2$ (dolna krawędź przedziału międzykwartylowego). Posłużono się komórkami traktowanymi doksorubicyną, ponieważ w wyniku działania tego związku, komórki najbardziej spójnie reagują na bodziec (wykres przedstawiający procent komórek wbudowujących BrdU, Ryc. 4.2. B).

Po zastosowaniu powyższych wytycznych, ostateczna analiza wybarwionych jąder VSMC (które zostały omówione w dalszych częściach rozdziału) obejmowała 89% populacji komórek kontrolnych, 80% komórek traktowanych kurkuminą, 79% komórek traktowanych doksorubicyną i 72% komórek starych replikacyjnie. Podsumowanie przedstawiono na rycinie poniżej.



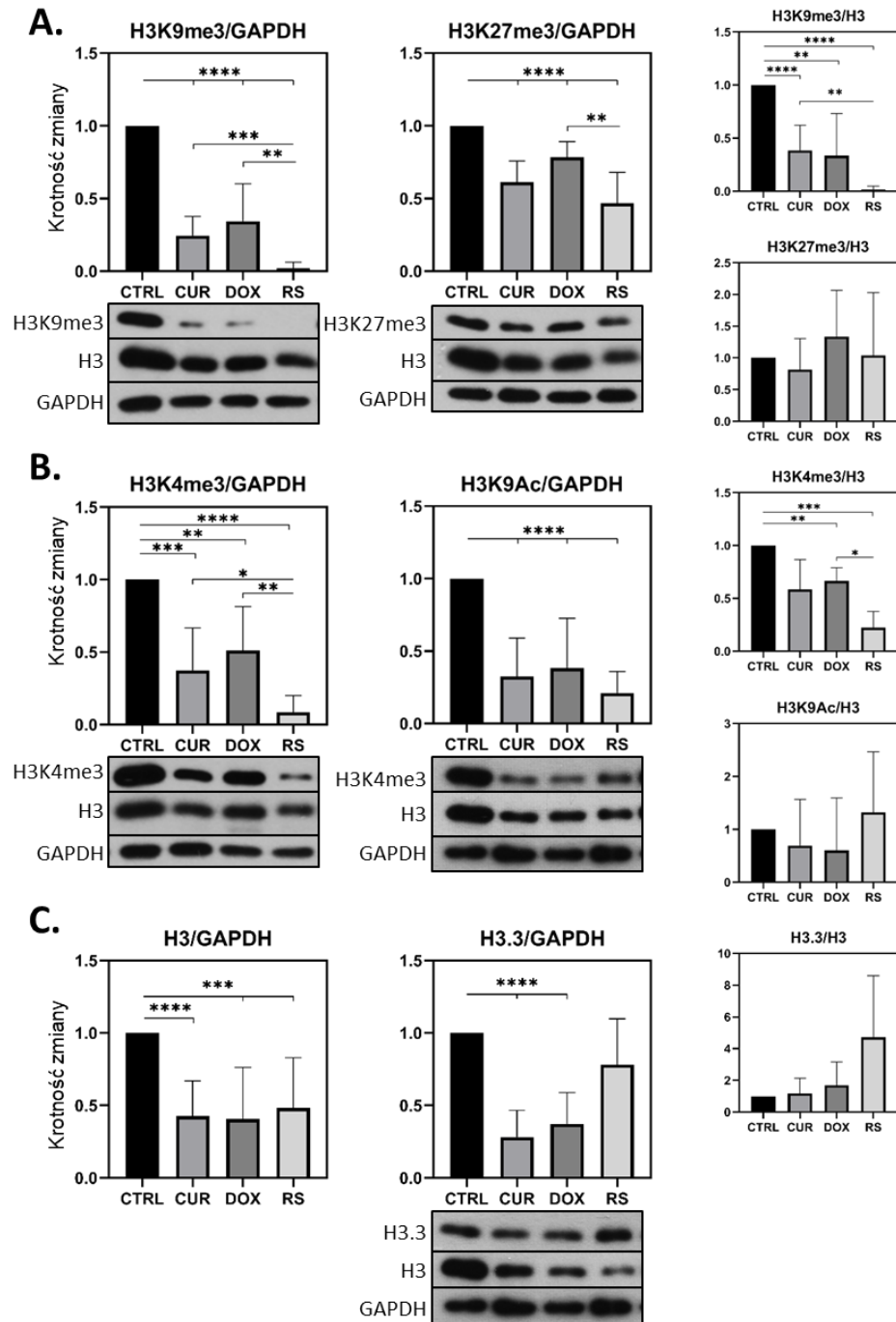
Ryc. 4.8. Odsetek komórek młodych i starych w badanych wariantach doświadczalnych po zastosowaniu wstępnej selekcji na podstawie analizy powierzchni jądra (nieprzekraczającej $200 \mu\text{m}^2$ dla CTRL i przekraczającej $200 \mu\text{m}^2$ dla komórek starych) wyznaczonej z użyciem oprogramowania Cell Profiler. Taka klasyfikacja posłużyła do wyłączenia z dalszych analiz immunocytochemicznych komórek nietypowych dla danego wariantu doświadczalnego (czyli starych w kontroli oraz młodych w RS i PS).

4.1.3. Poziom oraz organizacja modyfikacji histonu H3

Na podstawie dotychczas zaobserwowanej stopniowej deheterochromatyzacji oraz wzmożonej aktywności metabolicznej komórek starych, w tym specyficznego dla starzenia fenotypu sekrecyjnego (SASP) jak i zmian dotyczących ekspresji wielu genów, postanowiono zbadać zmiany w poziomie potranslacyjnych modyfikacji histonów. Wybrano H3, ponieważ modyfikacje tego histonu, a zwłaszcza metylacja, odpowiada za kondensację chromatyny i związaną z tym zahamowaną ekspresją genów oraz tworzenie SAHF. Do analiz wybrano modyfikacje charakterystyczne dla skondensowanej chromatyny, czyli H3K9me3 i H3K27me3, oraz znaczniki typowe dla aktywnej euchromatyny, takie jak H3K4me3

i H3K9Ac. Poziom białek normalizowano zarówno do GAPDH jak i do H3.

Uzyskane wyniki pokazują, że w przypadku znaczników heterochromatyny, największy spadek zaobserwowano w H3K9me3, gdzie poziom obniża się o ponad połowę w PS, aż do niemal całkowitego zaniku w RS (Ryc. 4.9.). Mniejszy spadek zanotowano dla modyfikacji H3K27me3 i jest on zbliżony w obu typach starzenia. O ile rozluźnienie chromatyny spowodowane jest m.in. spadkiem powyższych modyfikacji typowych dla heterochromatyny, o tyle nie jest to tożsame ze wzrostem modyfikacji typowych dla aktywnej euchromatyny. Wbrew oczekiwaniom, poziom H3K4me3 oraz H3K9Ac spada w obu typach starzenia. Trimetylowana lizyna 4 wykazuje identyczny profil do H3K9me3 i tak samo widać znaczące różnice między PS i RS. Z kolei spadek acetylacji na lizynie 9 był niezależny od typu starzenia. Tak samo niezależny od typu starzenia był obserwowany spadek totalnego histonu H3. W obu typach starzenia ekspresja białka jest o połowę mniejsza niż w młodych komórkach.

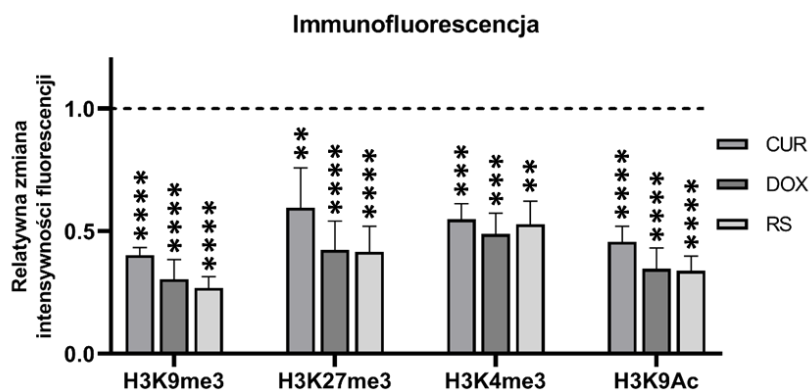


Ryc. 4.9. Zmiany w poziomie modyfikowanego histonu H3, jego wariantu H3.3 oraz samego histonu H3 analizowane metodą Western blot. Przygotowano przykładowy obraz zmian znaczników heterochromatyny (A) i euchromatyny (B) oraz samego histonu H3 i jego wariantu H3.3 (C). Obliczenia densytometryczne przygotowano na podstawie min. trzech osobnych powtórzeń. Dwie pierwsze kolumny przedstawiają poziom białka w odniesieniu do kontroli, uprzednio normalizowany do GAPDH. Trzecia kolumna zaznacza zmiany ekspresji w odniesieniu do całkowitego histonu H3. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą niesparowanego testu t-studenta: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Gdy poziom modyfikacji normalizowano do całkowitego histonu H3 profile ekspresji H3K9me3 i H3K4me3 pokrywały się z ogólnym spadkiem znaczników, z wyjątkiem H3K9Ac oraz H3K27me3. W przypadku H3K9Ac, komórki RS wykazywały wzrost acetylacji (ale przy braku istotności statystycznej), natomiast w przypadku H3K27me3 wydaje się, że nie dochodzi do zmian w poziomie ten modyfikacji w starzeniu.

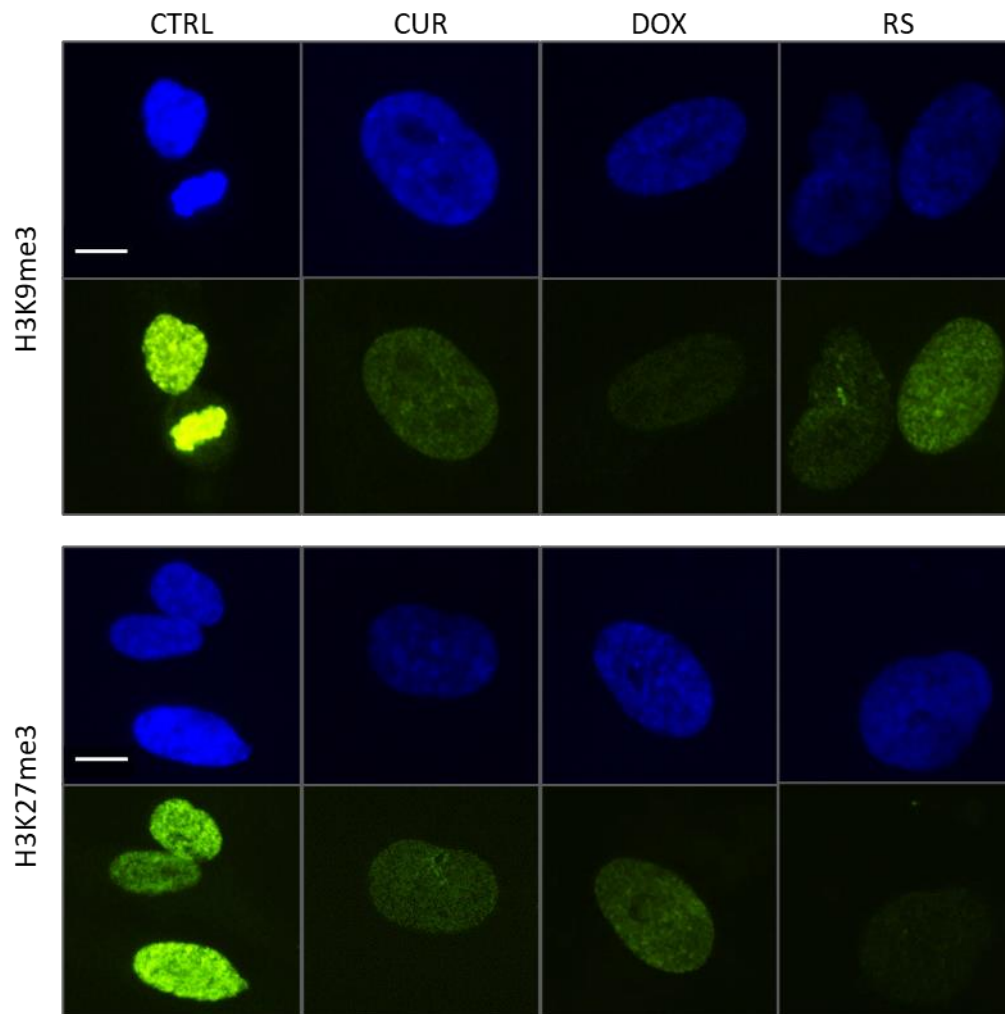
Wiedząc, że podczas starzenia dochodzi do zatrzymania komórek w cyklu, postanowiono dodatkowo sprawdzić poziom histonu H3.3 (wariant histonu H3), którego ekspresja jest niezależna od podziałów [204][205]. Rola tego wariantu histonu jest dwójaka. Gdy histon ten wchodzi w skład nukleosomów, może kierować ich depozycję w miejsca aktywnej transkrypcji (zarówno do promotorów jak i enhancerów) powodując miejscową reorganizację chromatyny [206]. Z drugiej strony może powodować kondensację w regionach telomerowych czy pericentromerowych. W naszym układzie eksperymentalnym zauważono spadek wariantu H3.3 we wszystkich badanych wariantach eksperymentalnych, jednak istotną zmianę zanotowano jedynie dla komórek traktowanych CUR i DOX. Normalizacja do histonu kanonicznego H3 sugeruje potencjalny wzrost H3.3 (zwłaszcza w RS), co może być związane z procesem „wymiany” histonów (histone turnover) (Ryc. 4.9.).

Rozluźnienie chromatyny związane ze starzeniem zostało również potwierdzone barwieniem immunocytochemicznym. Poziom intensywności fluorescencji mierzono jedynie w jądrach, które spełniały kryteria opisane w podrozdziale 4.1.2.2., czyli mieszczące się w odpowiednich przedziałach wielkości powierzchni. Wyniki pokazały, że poziom średniej intensywności fluorescencji wszystkich modyfikacji sukcesywnie spada (Ryc. 4.10.).

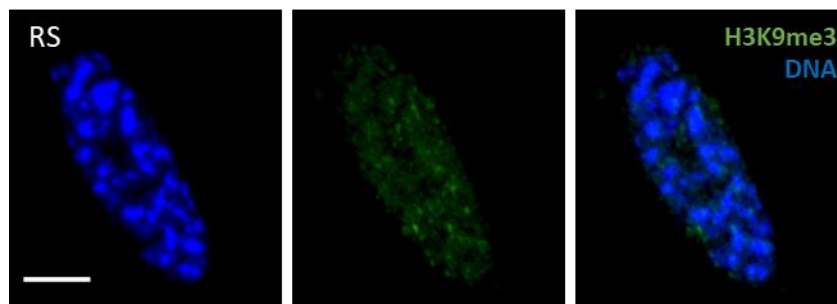


Ryc. 4.10. Wykres podsumowujący zmiany w intensywności fluorescencji H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3, H3K9Ac w badanych typach starzenia po zastosowaniu selekcji jąder na podstawie ich powierzchni (większej niż 200 μm^2 dla starych i mniejszej niż 200 μm^2 w przypadku młodych). Poziom zmian obliczano względem komórek kontrolnych, które zaznaczono jako przerywana linia na wykresie. Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA): $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

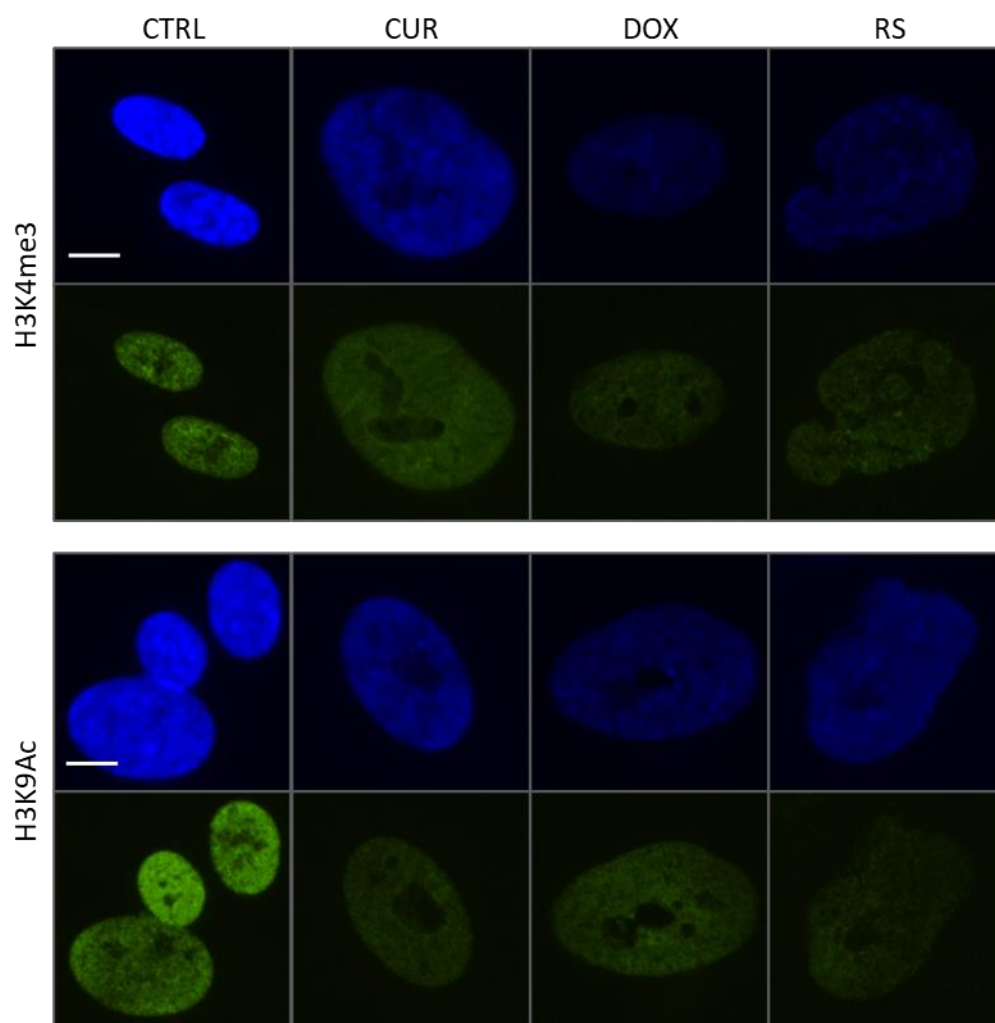
Dokładna analiza rozmieszczenia poszczególnych znaczników w jądrze badanych wariantów eksperymentalnych pokazała, że komórki kontrolne wykazują najwyższe zróżnicowanie intensywności fluorescencji, bez względu na badaną modyfikację. Jest to najprawdopodobniej związane z heterogenną populacją komórek, a co za tym idzie inną fazą cyklu komórkowego. Przyglądając się bliżej rozmieszczeniu konkretnych modyfikacji w jądrze zauważono, że w młodych komórkach, H3K9me3 tworzy wiele zwartych, intensywnie świecących skupisk wskazujących na upakowaną heterochromatynę (Ryc. 4.11.). Ponadto, najsilniejszy sygnał zarejestrowano w jądrach będących w trakcie podziału. Podczas starzenia natomiast, dochodzi do zmniejszenia i ujednoczenia intensywności sygnału wskazującego na rozluźnienie chromatyny. Nie obserwuje się też zbyt wielu charakterystycznych skupisk heterochromatyny, nazywanych SAHF (z wyjątkiem pojedynczych komórek). Podobnie nie zaobserwowano dużych i wyraźnych skupisk bogatych w trimetylację lizyny 27 (H3K27me3) ani w większości komórek kontrolnych, ani starych (Ryc. 4.12.). To sugeruje, że w tym typie komórek nie dochodzi do tworzenia typowych SAHF w badanych typach starzenia. Mimo że niekiedy obserwuje się miejsca silnej kondensacji występujące głównie w RS i komórkach traktowanych doksorubicyną, to skupiska te nie wydają się być wtedy wzbogacone w powyższe znaczniki. Zatem możliwe, że w komórkach mięśni gładkich naczyń mogą sporadycznie powstawać SAHF, w których nie występują H3K9me3 ani H3K27me3. Znaczniki euchromatyny, czyli H3K4me3 i H3K9Ac, rozkładają się relatywnie równomiernie w jądrze, z wyjątkiem obszarów jąderka, które są wyraźnie oddzielone do reszty chromatyny (Ryc. 4.13.). W nich nie obserwuje się obecności powyższych modyfikacji. Przykładowy obraz wszystkich badanych znaczników oraz potencjalne skupiska SAHF zamieszczono na rycinach poniżej.



Ryc. 4.11. Analiza rozmieszczenia znaczników heterochromatyny H3K9me3 i H3K27me3 w jądrze. Przykładowy obraz przygotowany metodą immunofluorescencji. Kolor niebieski pokazuje jądro komórki wybarwione DAPI, a zielony H3K9me3 oraz H3K27me3. Skala 10 μm .



Ryc. 4.12. Analiza potencjalnych miejsc SAHF. Przykładowe zdjęcia jądra komórkowego wybarwionego DAPI (niebieski) i z uwidocznionym H3K9me3 (zielony) w komórkach starych replikacyjnie. Skala 10 μm .



Ryc. 4.13. Analiza rozmieszczenia znaczników euchromatyny H3K4me3 oraz H3K9Ac w jądrze. Przykładowy obraz przygotowany metodą immunofluorescencji. Kolorem niebieskim pokazano jądra wybarwione DAPI, a zielonym H3K4me3 oraz H3K9Ac. Skala 10 μm .

Zaobserwowane zmiany w rozmieszczeniu H3K9me3 i poziomie H3K4me3 skłoniły nas do dokładniejszego przeanalizowania miejsc ich zdeponowania w genomie za pomocą immunoprecypitacji histonów oraz sekwencjonowania nowej generacji (ChIP-seq). Uzyskane wyniki opisano w dalszej części niniejszej pracy.

4.1.4. Udział enzymów regulujących strukturę chromatyny

Po zaobserwowaniu zależnego od starzenia spadku wszystkich badanych modyfikacji histonu H3 przystąpiono do wyjaśnienia przyczyn zachodzących zmian. Pierwszym krokiem było zbadanie roli

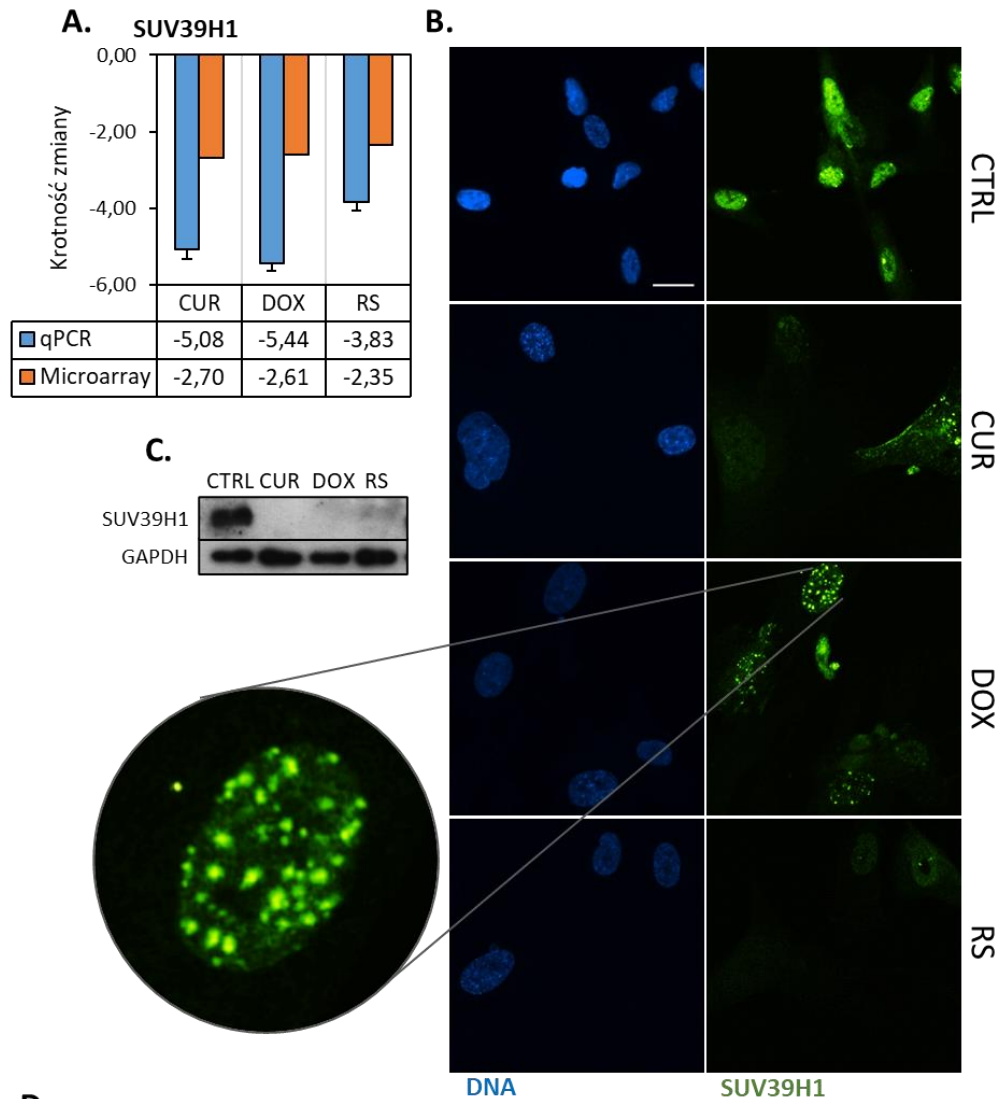
wybranych enzymów odpowiedzialnych za depozycję znaczników (grup metylowych i acetylowych), a kolejnym analiza białek usuwających daną modyfikację z lizyn obecnych na ogonach histonów.

4.1.4.1. Metylotransferazy i demetylasy histonu H3

Badanie roli metylotransferaz uczestniczących w procesie starzenia ograniczono tylko do tych, które są odpowiedzialne za metylację lizyny 4, 9 oraz 27 histonu H3. Listę pobrano z bazy danych Gene Ontology i skorzystano z terminu (ontology term) o numerze GO:0042800 dla H3K4me3, GO:0046974 dla H3K9me3 i GO:0046976 dla H3K27 oraz dostępnej literatury. Przygotowane listy białek porównano ze zmianami w ekspresji genów uzyskanych metodą mikromacierzy.

Większość enzymów biorących udział w metylacji lizyny 9 histonu H3 wykazują zbliżony poziom ekspresji mRNA w komórkach kontrolnych i starych (PS i RS). Wyjątkiem są geny *SUV39H1* oraz *SUV39H2*, których ekspresja spada we wszystkich typach starzenia (Ryc. 4.14.). Co ciekawe, komórki traktowane kurkuminą dodatkowo wykazują niewielki spadek w poziomie genu *MECOM* (inaczej *PRDM3*, białko to odpowiedzialne jest za monometylację lizyny 9) i *SETDB2* (odpowiedzialne za trimetylację lizyny 9) oraz 1,3-krotny wzrost *PRDM16* (również odpowiedzialne za monometylację lizyny 9) (Ryc. 4.14. D).

Szczególą metylotransferazą jest *SUV39H1*, która poprzez trimetylowanie lizyny 9 histonu 3 i interakcję z białkiem HP1 α prowadzi do kondensacji i stabilizacji chromatyny. Wyniki mikromacierzy sugerują ok. 2,5-krotny spadek transkryptu genu w obu typach starzenia. Z kolei produkt reakcji qPCR uwidacznia największy, ok. 5-6-krotny, spadek ekspresji *SUV39H1* w komórkach starych w sposób przyspieszony. Natomiast komórki RS wykazują 4 razy niższą ekspresję genu w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 4.14. A). Rozbieżności w uzyskanych danych mogą wynikać z większej czułości metody qPCR. Niemniej zaobserwowany spadek transkryptu ma odzwierciedlenie w spadku poziomu białka (Ryc. 4.14. C). Ponadto, barwienie immunocytochemiczne wykazało zmianę w rozmieszczeniu tego enzymu w jądrze (Ryc. 4.14. B). Komórki dzielące się mają równomiernie i intensywnie wybarwione jądra ze sporadycznymi, pojedynczymi skupiskami, w przeciwieństwie do komórek starych replikacyjnie i traktowanych kurkuminą, w których obserwuje się spadek intensywności fluorescencji, a występowanie skupisk jest znikome. Wyjątkiem okazały się komórki traktowane doksorubicyną, które oprócz ogólnego spadku intensywności sygnału, charakteryzują się powstawaniem największej liczby skupisk *SUV39H1* w jądrze. Jednakże nie we wszystkich komórkach ta liczba jest równie wysoka.



D.

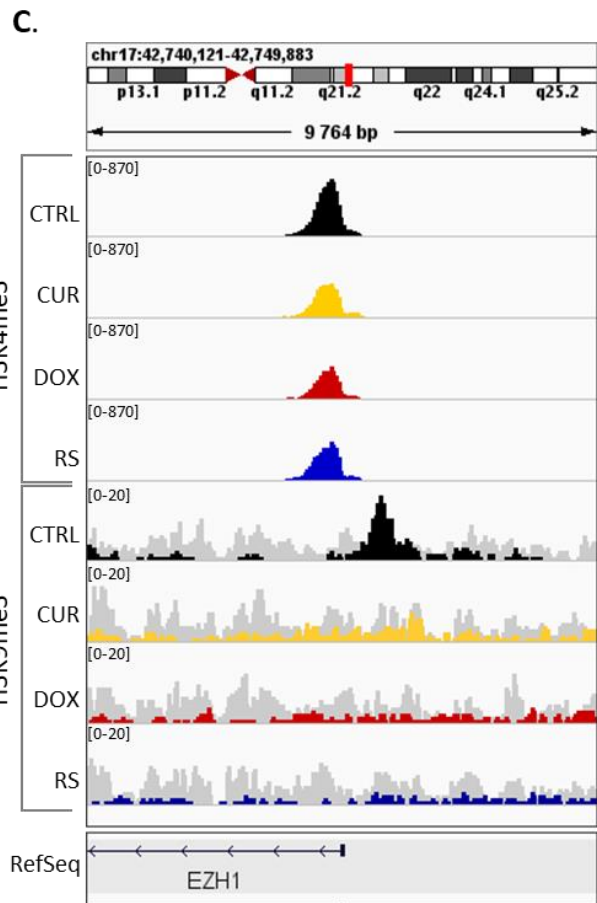
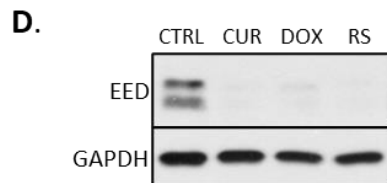
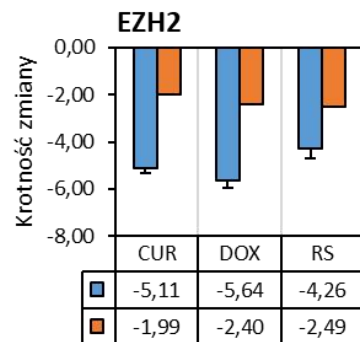
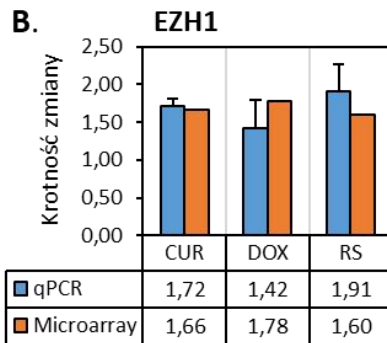
Modyfikacja	Gen	CUR		DOX		RS	
		FC	p-val	FC	p-val	FC	p-val
H3K9me3	SUV39H1	-2,7	$3,9 \times 10^{-5}$	-2,61	$1,6 \times 10^{-5}$	-2,35	$4,6 \times 10^{-5}$
	SUV39H2	-2,04	$9,4 \times 10^{-6}$	-2,16	$1,6 \times 10^{-6}$	-2,06	$2,9 \times 10^{-6}$
	MECOM	-1,35	0,025				
	SETDB2	-1,38	0,002				
	PRDM16	1,3	0,045				

Ryc. 4.14. Zmiany w poziomie i organizacji białka SUV39H1 oraz poziomie mRNA innych metylotransferaz histonu H3 na lizynie 9. A) Spadek poziomu mRNA dla SUV39H1 (na podstawie mikromacierzy i qPCR) ($n = 3$); B) Reorganizacja białka SUV39H1 w jądrze zobrażowana barwieniem immunocytochemicznym. Skala 10 μm ; C) Przykładowy obraz spadku ekspresji białka SUV39H1 badany metodą Western blot ($n=3$); D) Tabela podsumowująca zmieniającą się ekspresję genów kodujących metylotransferazy lizyny 9 histonu H3. Dane uzyskano metodą mikromacierzy. Poziom mRNA zaznaczono jako relatywna krotność zmiany ekspresji z zaznaczonym kierunkiem zmian (FC). Kolor niebieski oznacza spadek, a czerwony wzrost ekspresji genu.

Analizę enzymów odpowiedzialnych za metylację lizyny 27 histonu H3, czyli wchodzących w skład kompleksu PRC2 oraz wariantów PRC2.1 i PRC2.2, przeprowadzono na poziomie genów, białka oraz możliwej regulacji przez modulację chromatyny w rejonie genu znacznikami aktywnej (H3K4me3), bądź wyciszonej heterochromatyny (H3K9me3). Białka wchodzące w skład kompleksu oraz jego wariantów przedstawiono na rycinie 1.4. we Wstępie. Otrzymane wyniki pokazują, że podczas starzenia może dochodzić do deregulacji całego kompleksu, gdyż poziom ekspresji genów kodujących większość białek, a zwłaszcza wchodzących w skład rdzenia, spada. Transkrypt genu *EZH2*, który pełni kluczową rolę w procesie metylacji (tak jak *EZH1*), spada średnio dwukrotnie w obu typach starzenia (5 krotnie według oznaczenia metodą qPCR) (Ryc. 4.15. B). Podobnie, bez względu na bodziec indukujący starzenie, spada poziom *RBBP4*. Z drugiej strony, niższy poziom *RBBP7* zauważono tylko w komórkach DOX i RS. Biorąc pod uwagę geny kodujące dwa kolejne białka wchodzące w skład rdzenia PRC2, można zauważyć spadek *SUZ12* w komórkach RS, natomiast spadek *EED* zanotowano jedynie w wariancie CUR. Ekspresję ostatniego genu sprawdzono na poziomie białka i otrzymany wynik wykazał, że znaczący spadek *EED* dotyczy wszystkich typów starzenia, a nie tylko komórek traktowanych kurkumina, jak wskazywały wyniki mikromacierzy. Co ciekawe, we wszystkich typach starzenia dochodzi do wzrostu ekspresji *EZH1*. Białko to jest często spotykane w nieproliferujących komórkach, w przeciwieństwie do *EZH2*, które jest charakterystyczne dla komórek proliferujących [207]. Tak jak wspomniano we wstępie pracy, białko *EZH1* wykazuje mniejszą aktywność katalityczną niż *EZH2* [208], ale z drugiej strony pozwala utrzymać skondensowaną formę chromatyny. Nie można wykluczyć, że w starych komórkach wzrost *EZH1* służy do utrzymania niskiego, ale stałego poziomu H3K27me3. Wzrost poziomu *EZH1* może być związany z epigenetyczną regulacją ekspresji tego genu. Metodą CHIP-seq zbadano wzbogacenie H3K4me3 w rejonie TSS genu *EZH1* i najwyższe pokrycie zanotowano dla komórek kontrolnych, natomiast reszta wariantów wykazuje się o połowę niższym pikiem (Ryc. 4.15. C). Wyjątkowo, w bliskim sąsiedztwie miejsca promotorowego genu wyłącznie komórek kontrolnych, zauważono wzbogacenie modyfikacją H3K9me3. Być może do zahamowania czy zmniejszonej ekspresji *EZH1* w CTRL, w porównaniu do reszty wariantów, dochodzi właśnie poprzez obecność tego znacznika tuż przy TSS. Możliwe, że skutkuje to miejscową kondensacją chromatyny i tym samym wyciszeniem genu.

A.

Modyfikacja	Gen	CUR		DOX		RS		
		FC	p-val	FC	p-val	FC	p-val	
H3K27me3	PRC2 PRC2.1 PRC2.2	EZH1	1,66	0,0005	1,78	$9,57 \times 10^{-5}$	1,6	0,0001
		EZH2	-1,99	0,0007	-2,4	$6,53 \times 10^{-5}$	-2,49	$7,14 \times 10^{-5}$
		RBBP4	-1,4	0,0017	-1,4	0,0058	-1,47	0,0005
		RBBP7			-1,56	0,0013	-1,8	$9,2 \times 10^{-5}$
		EED	-1,45	0,0081				
		SUZ12					-1,71	0,0034
		MTF2			-1,39	0,0026		
		PHF19	-1,41	0,0128			-1,48	0,005
		JARID2			-1,87	0,005	-1,83	0,015



Ryc. 4.15. Zmiany w poziomie ekspresji genów, których białkowe produkty biorą udział w tworzeniu kompleksu PRC2 metylującego lizynę 27 histonu H3. A) Tabela podsumowująca zmiany w poziomie transkryptu genów związanych z tworzeniem kompleksu PRC2 oraz jego odmian PRC2.1 i PRC2.2 przygotowana na podstawie mikromacierzy. Poziom mRNA zaznaczono jako względną krotność zmiany ekspresji (FC) z zaznaczonym kolorem kierunkiem zmian istotnych statystycznie ($p\text{-val} < 0,05$). Czerwonym kolorem zaznaczono wzrost, a niebieskim

spadek ekspresji. B) Ekspresja genów EZH1 i EZH2 potwierdzona metodą qPCR (n = 3). Wynik normalizowano względem kontroli (krotność zmian). C) Poziom wzbogacenia znacznikiem aktywnej (H3K4me3) i nieaktywnej (H3K9me3) chromatyny w rejonie TSS genu EZH1. Kolorem czarnym zaznaczono komórki kontrolne, żółtym wariant CUR, czerwonym wariant DOX, a niebieskim wariant RS. Szary kolor pików reprezentuje input. Obraz uzyskano za pomocą programu IGV. D) Przykładowy obraz poziomu białka EED metodą Western blot (n = 3).

Ekspresja genów kodujących metylotransferazy lizyny 4, nieznacznie spada tylko w przypadku *SETD1A* (RS), *SETD1B* (DOX i RS) i *WDR5* (RS). Wyjątkowo, do niewielkiego wzrostu ekspresji dochodzi w genie *SMYD3* w komórkach traktowanych kurkuminą (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących metylotransferazy lizyny 4 histonu H3 na podstawie wyników z mikromacierzy. Poziom mRNA zaznaczono jako relatywną krotność zmiany ekspresji (FC) z zaznaczonymi kolorami kierunkiem zmian (niebieski - spadek, czerwony - wzrost).

Modyfikacja	Gen	CUR		DOX		RS	
		FC	p-val	FC	p-val	FC	p-val
H3K4me3	SETD1A					-1,32	0,001
	SETD1B			-1,4	0,0008	-1,35	0,003
	SMYD3	1,39	0,045				
	WDR5					-1,62	0,01

Analiza profilu transkryptomowego demetylaz histonów nie wykazała istotnych zmian w poziomie ekspresji genów, które w większości zachowują poziom porównywalny z komórkami kontrolnymi. Jedynie w przypadku pojedynczych enzymów zanotowano nieprzekraczający dwukrotności zmian wzrost lub spadek ekspresji. Biorąc pod uwagę różny kierunek zmian, wydaje się, że demetylacja nie jest zaburzona i enzymy te nie odgrywają kluczowej roli w procesie starzenia komórkowego. Szczegółowa lista przyporządkowanych do modyfikacji demetylaz, wraz z krotnością i kierunkiem zmian ekspresji genów zamieszczono w tabeli 4.2. poniżej.

Tabela 4.2. Zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących demetylaza lizyny 4, 9 i 27 histonu H3 na podstawie wyników z mikromacierzy. Poziom mRNA zaznaczono jako relatywna krotność zmiany ekspresji (FC) z zaznaczonym kolorami kierunkiem zmian (niebieski - spadek, czerwony - wzrost).

Modyfikacja	Gen	CUR		DOX		RS	
		FC	p-val	FC	p-val	FC	p-val
H3K9me3	KDM1A					-1,79	0,001
	KDM4B	1,3	0,013	1,55	0,001	1,31	0,012
	PHF2					-1,39	0,002
H3K27me3	KDM6B					-1,42	0,005
H3K4me3	KDM5D					1,38	0,004
	KDM5B	1,48	0,016	1,49	0,007		

Podsumowując tę część badań, wydaje się, że spadek trimetylacji lizyn w starzeniu może być związany ze spadkiem ekspresji genów kodujących wybrane metylotransferazy, jak i spadkiem syntezy białek (np. SUV39H1 i EED). W efekcie, może to prowadzić do deregulacji funkcji enzymów oraz całych kompleksów remodelujących chromatynę. Mniej istotną rolę mogą odgrywać demetylaza histonów, gdyż poziom mRNA tych genów w większości nie różni się istotnie od komórek młodych. Natomiast geny wymienione w tabeli 4.2, mimo zaznaczonych zmian w ekspresji, wydają się mieć niewielki wpływ na profil zmian metylacji histonów zachodzących w starzeniu, lecz aby potwierdzić tę hipotezę należy przeprowadzić dodatkowe badania.

4.1.4.2. Acetylotransferazy i deacetylaza histonu H3

Po zbadaniu roli metylotransferaz w procesie starzenia, przystąpiono do wyjaśnienia spadku acetylacji na histonie H3. W tym celu, z bazy danych Gene Ontology pobrano listę białek zaangażowanych w acetylację lizyn histonu H3 (GO: 0043966) i porównano z profilem transkryptomycznym uzyskanym metodą mikromacierzy. Zaobserwowano, że w trakcie starzenia dochodzi do spadku poziomu transkryptu większości genów kodujących acetylotransferazy, z wyjątkiem trzech, których wzrost ekspresji nie przekraczał dwukrotności poziomu kontroli i zależał od typu starzenia. Poziom oraz kierunek zmian 17 białek zaangażowanych w acetylację histonu H3 zamieszczono w tabeli 4.3. poniżej.

Tabela 4.3. Zmiany w profilu ekspresji genów kodujących acetylotransferazy histonu H3. Poziom mRNA zaznaczono jako relatywna krotność zmiany ekspresji (FC). Kolorem czerwonym zaznaczono wzrost, a niebieskim spadek ekspresji genu.

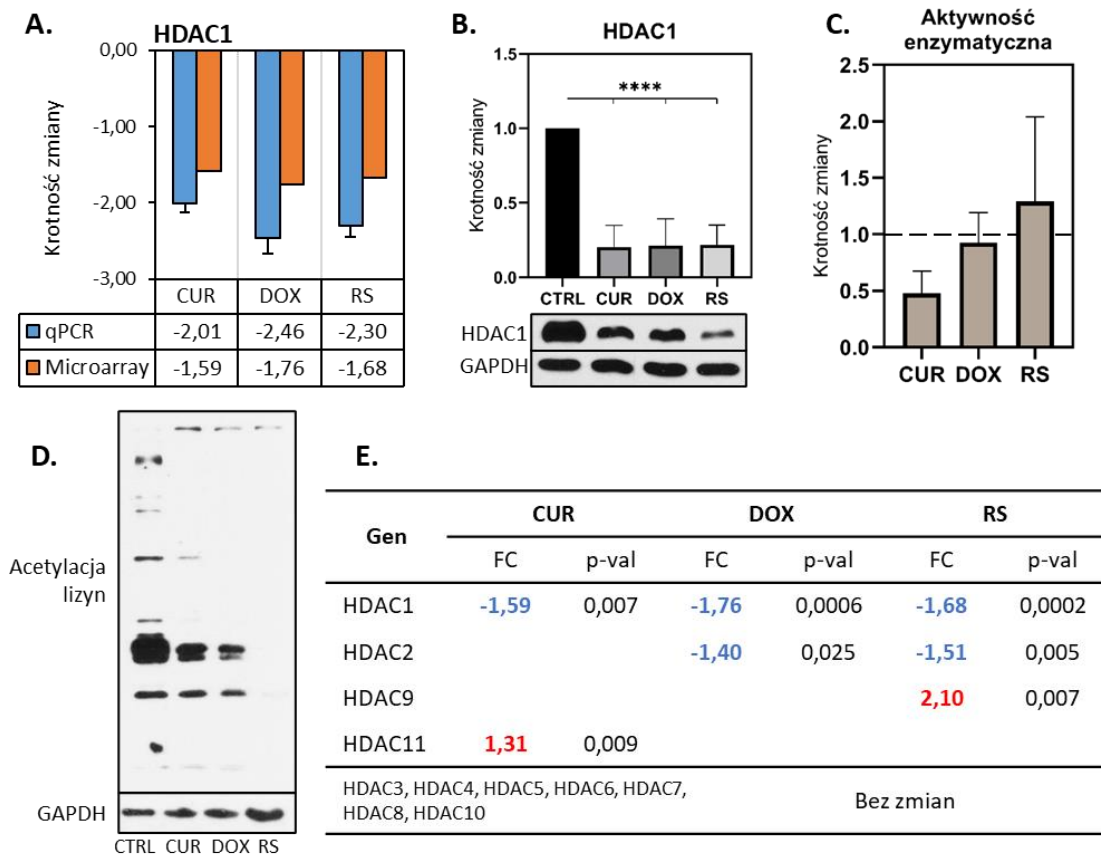
Gen	CUR		DOX		RS	
	FC	p-val	FC	p-val	FC	p-val
ESCO2	-3,1	$9,9 \times 10^{-8}$	-3,45	$9,5 \times 10^{-9}$	-3,29	$1,8 \times 10^{-8}$
TAF6L	-1,75	0,0037	-1,52	0,0068	-1,44	0,0115
SF3B3	-1,64	0,0147	-1,54	0,0053	-1,95	0,0014
TAF5	-1,62	0,0005	-1,55	0,0003	-1,62	$6,03 \times 10^{-5}$
TADA2A	-1,59	0,0034	-1,68	0,0005	-1,78	0,0003
POLE3	-1,54	0,0231	-1,54	0,0118	-1,39	0,0204
SGF29	-1,38	0,0296	-1,44	0,0099	-1,48	0,0042
ENY2	-1,37	0,0017	-1,39	0,0005	-1,46	0,0002
KAT6A	-1,35	0,0075			-1,69	0,0001
MAP3K7	1,39	0,0015	1,48	0,0004		
YEATS2	1,61	0,0243	1,8	0,0039	1,59	0,0032
ATXN7L3					-1,42	0,0174
LDB1					1,44	0,0071
MBIP					-1,49	0,0001
TAF6					-1,51	0,0036
TRRAP			-1,3	0,0101	-1,43	0,0017
WDR5					-1,62	0,014

W trakcie prowadzonych badań podjęto próbę zmierzenia aktywności acetylotransferaz histonów (za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu ScienCell), jednak wyniki nie pozwoliły na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Następnie sprawdzono, czy spadek acetylacji może mieć związek z aktywnością deacetylaz histonów (HDAC). Jednym z dość dobrze poznanych białek jest HDAC1, usuwający grupę acetylową z lizyny 9 histonu H3 [209]. Enzym ten jednak nie posiada domeny rozpoznającej i wiążącej DNA, dlatego, aby poprawnie pełnić swoją funkcję musi stworzyć kompleks na przykład z czynnikiem transkrypcyjnym lub innymi białkami modyfikującymi chromatynę [210]. Jednym z takich białek wchodzących w skład kompleksu remodelującego jest SUV39H1 (którego poziom spada w starzeniu, patrz Ryc. 4.14.) i poprzez wspólne działanie z HDAC1 doprowadzają do kondensacji chromatyny i wyciszenia genów [211, 212]. Podczas starzenia dochodzi do średnio dwukrotnego spadku ekspresji genu HDAC1 (mierzony metodą qPCR), co ma przełożenie na spadek ekspresji białka (Ryc. 4.16. a i B). Spadek ten jest niezależny od typu starzenia. Ponadto sprawdzono aktywność zestawu deacetylaz, w skład

którego, oprócz sześciu innych enzymów, wchodzi też HDAC1 (Ryc. 4.16. C). Subtelny wzrost aktywności odnotowano jedynie w komórkach starych replikacyjnie (brak istotności statystycznej). Z drugiej strony, niemal o połowę spadła aktywność w komórkach poddanych działaniu kurkuminy, co wynika z faktu, że kurkumina jest inhibitorem deacetylaz [197]. Natomiast poziom aktywności badanych deacetylaz w komórkach traktowanych doksorubicyną pozostał bez zmian. Jednakże badanie ogólnej acetylacji lizyn pokazało, że podczas starzenia dochodzi do spadku acetylacji białek, co było zwłaszcza widoczne w komórkach RS (Ryc. 4.16. D). Może to mieć związek ze zwiększoną aktywnością enzymów w tym wariantcie eksperymentalnym.

Analiza poziomu pozostałych transkryptów genów kodujących deacetylazę wykazały, że jedynie trzy, oprócz HDAC1, ulegają zmianie. Jest to HDAC2 notujący około 1,5-krotny spadek oraz HDAC11 (CUR) i HDAC9 (RS), których ekspresja wzrasta. Wyniki należy jeszcze potwierdzić na poziomie białka.



Ryc. 4.16. Analiza poziomu i aktywności deacetylaz histonów w procesie starzenia. A) Zmiany w poziomie mRNA deacetylaz HDAC1 mierzone za pomocą mikromacierzy i qPCR (podano krotność zmian). B) Poziom białka HDAC1 oznaczany metodą Western blot. Densytometria przygotowana z trzech powtórzeń oraz przykładowy obraz zmian. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą niesparowanego testu t-studenta: $p < 0,0001$ (****). C) Zmiany w aktywności enzymatycznej zestawu deacetylaz (w tym: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8, HDAC10 i HDAC11). D) Analiza globalnego poziomu acetylacji lizyn wchodzących w skład różnych białek

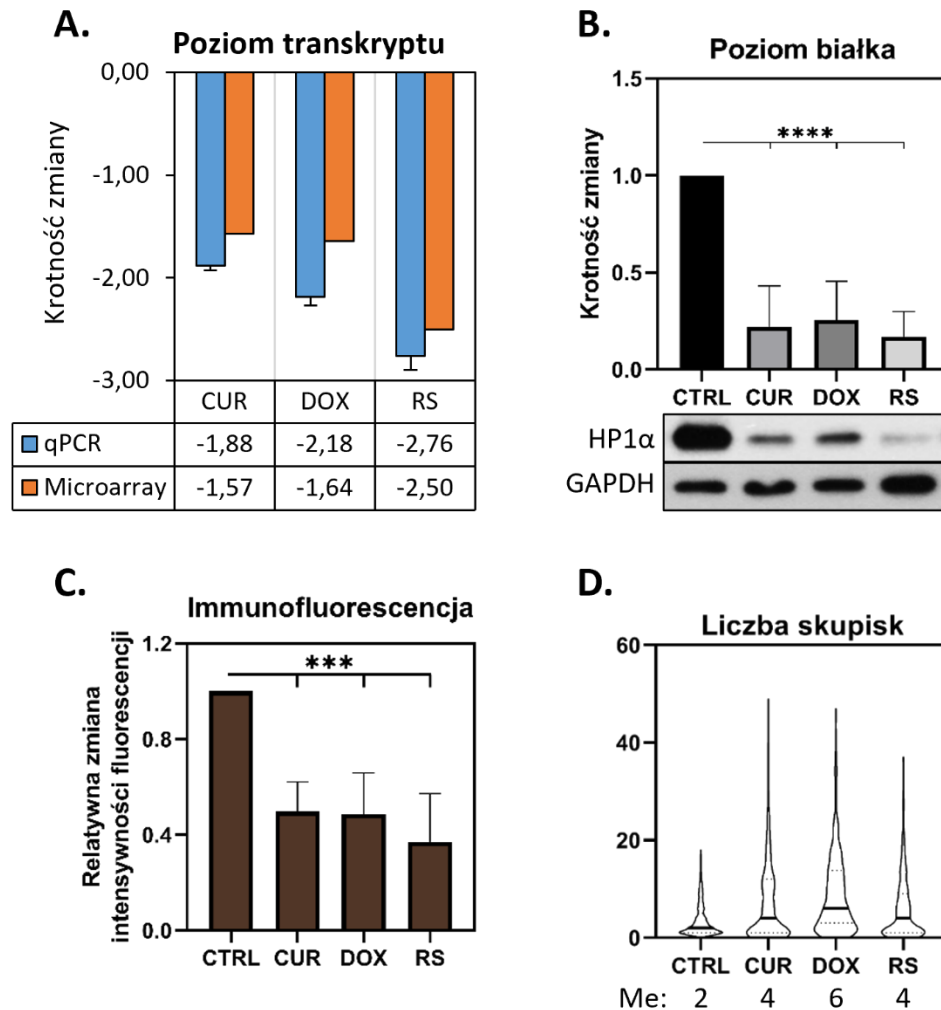
badanego metodą Western blot; (E) Lista genów kodujących deacetylazy histonów oraz kierunek zmian obserwowany podczas starzenia (na podstawie mikromacierzy). Poziom mRNA zaznaczono jako relatywna krotność zmiany ekspresji (FC) z zaznaczonym kolorem kierunkiem zmian. Kolorem czerwonym zaznaczono wzrost, a niebieskim spadek.

Dodatkowo, wyniki mikromacierzy wykazały, że mRNA wszystkich sirtuin, kodujących enzymy odpowiedzialne za deacetylację białek, pozostaje na takim samym poziomie jak w komórkach kontrolnych. Jest to dość zaskakujący wynik, gdyż dotychczasowe badania prowadzone w Pracowni wykazały znaczące zmiany wybranych sirtuin na poziomie białka [213].

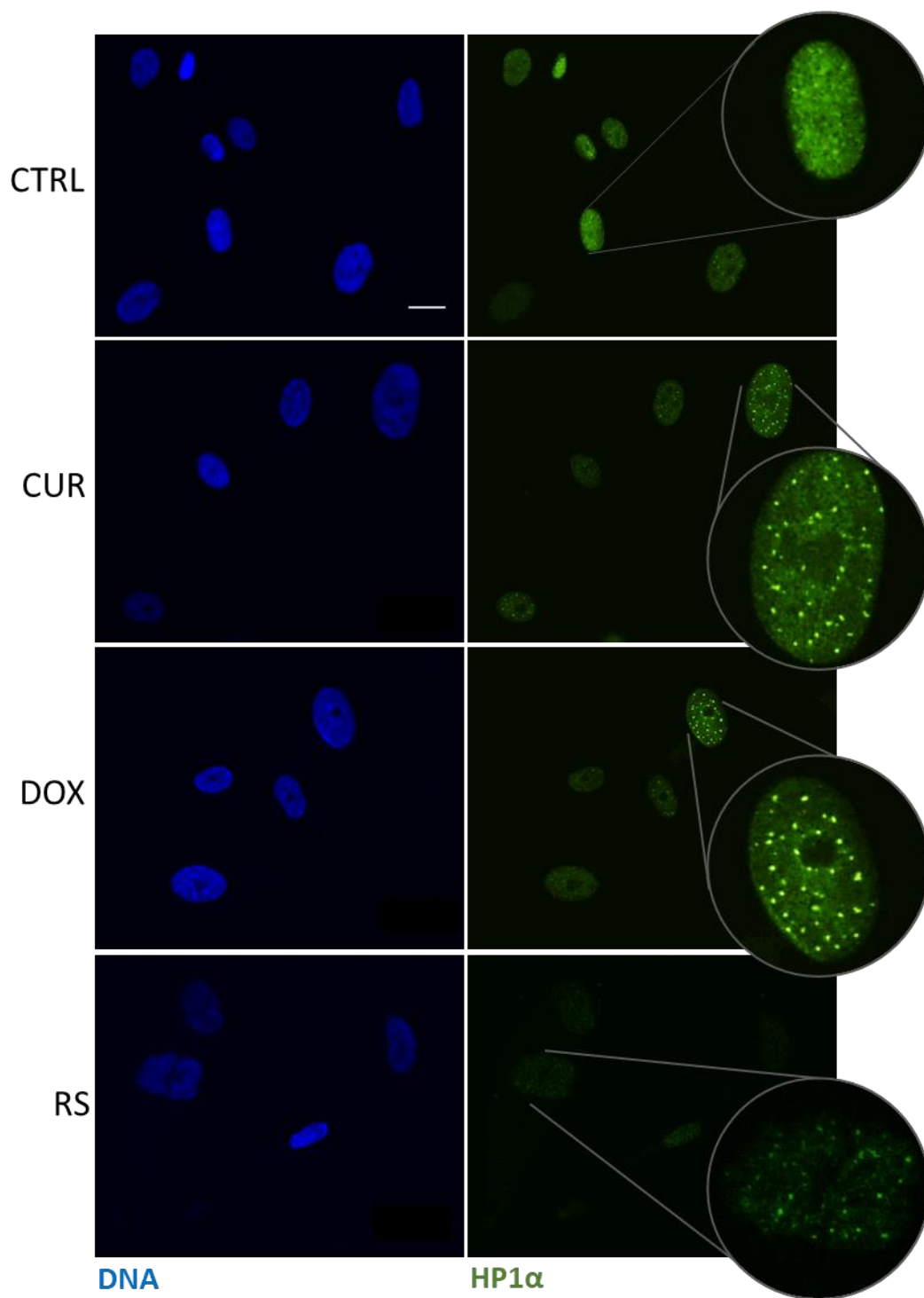
Zmniejszony poziom acetylacji lizyn, zwłaszcza w starzeniu replikacyjnym może być spowodowany zarówno spadkiem poziomu acetylotransferaz (a więc brakiem dodawania grup acetylowych) oraz wzrostem aktywności innych deacetylaz, pomimo spadku ekspresji wybranych HDAC.

4.1.5. Udział białka HP1 α w starzeniu

Jak wspomniano, białko HP1 α przyłączając się do trimetylowanej lizyny 9 histonu H3 bierze udział w tworzeniu stabilnej formy nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny. Badania dowiodły, że poziom ekspresji HP1 α spada we wszystkich analizowanych typach starzenia. Dzieje się to zarówno na poziomie transkryptu (średnio 2-krotny spadek mRNA w PS oraz 2,7-krotny w RS) jak i białka (spadek o ponad połowę) (Ryc.4.17. a i B). Analiza wyselekcjonowanych na podstawie wielkości powierzchni jąder komórkowych (tak jak opisano w podrozdziale 4.1.2.2.), poddanych barwieniu immunocytochemicznemu wykazała spadek średniej intensywności fluorescencji HP1 α w jądrze komórkowym (zmierzona intensywność podzielona przez powierzchnię jądra), jednocześnie wskazując na zmianę organizacji tego białka w PS (Ryc. 4.18.). W jądrach młodych komórek kontrolnych pojawiają się nieliczne skupiska wybarwionego białka (mediana wynosi 2), a relatywnie intensywny sygnał fluorescencji rozkłada się przeważnie równomiernie na powierzchni jądra. Wraz ze starzeniem dochodzi do spadku intensywności fluorescencji oraz wzrostu liczby skupisk w jądrze, gdzie największą ich liczbę zanotowano w komórkach traktowanych doksorubicyną.



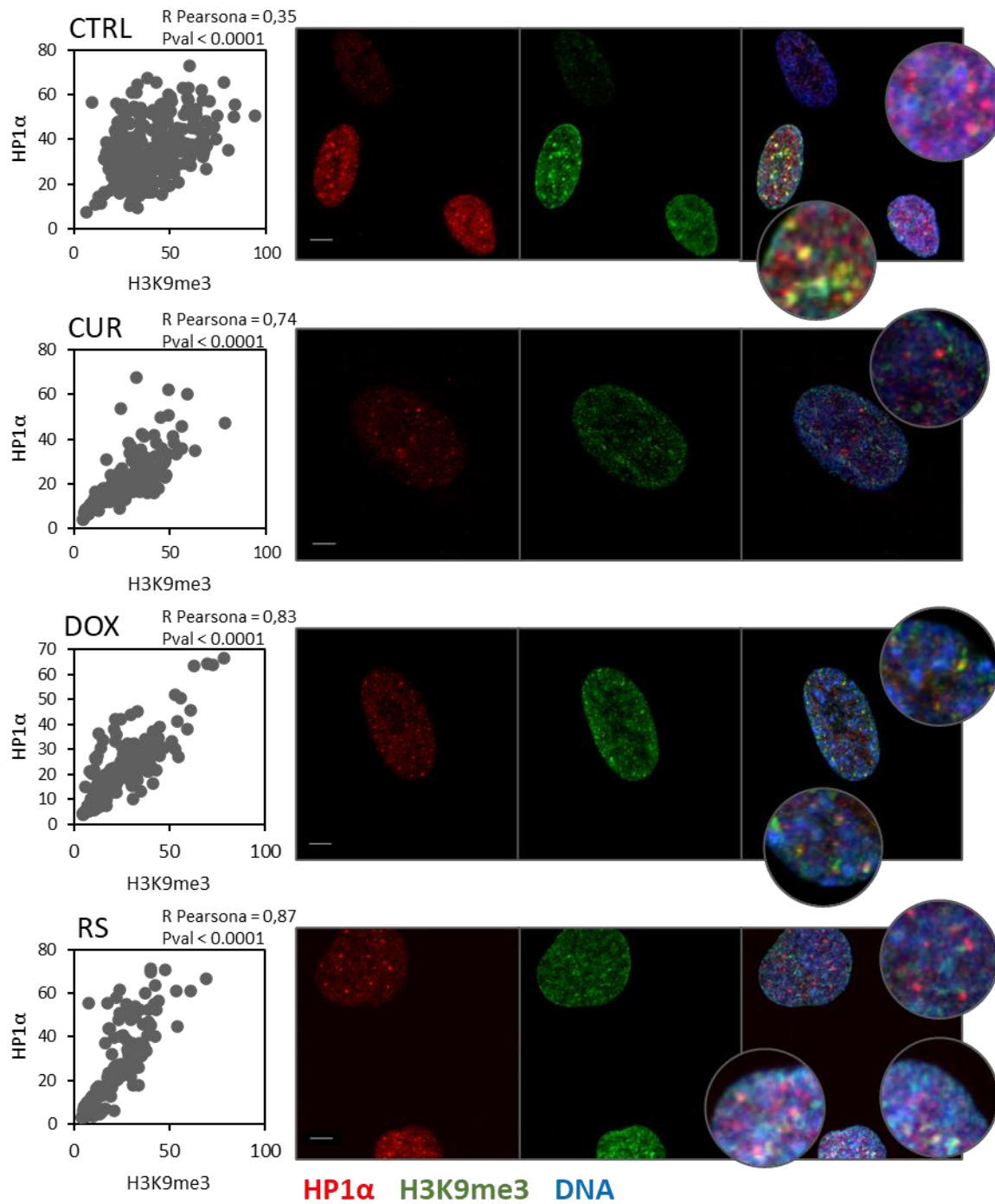
Ryc. 4.17. Zmiany w ekspresji genu i poziomie białka HP1 α towarzyszące starzeniu. A) Spadek na poziomie mRNA oznaczano metodą mikromacierzy i qPCR (krotność zmian). B) Densytometria oraz przykładowe obrazy uzyskane metodą Western blot (n = 3). C) Zmiany w średniej intensywności barwienia immunofluorescencyjnego HP1 α w jądrze komórkowym (n = 3). D) Wykres przedstawiający rozkład skupisk białka w zależności od typu starzenia (n = 4). Linia środkowa zaznacza medianę, której dokładną wartość zaznaczono pod wykresem (Me). Linia przerywana wyznacza przedział międzykwartylowy.



Ryc. 4.18. Reorganizacja białka HP1 α w jądrze w zależności od typu starzenia. Przykładowe zdjęcia z n = 3. Skala 10 μ m.

4.1.5.1. Interakcja HP1 α z H3K9me3

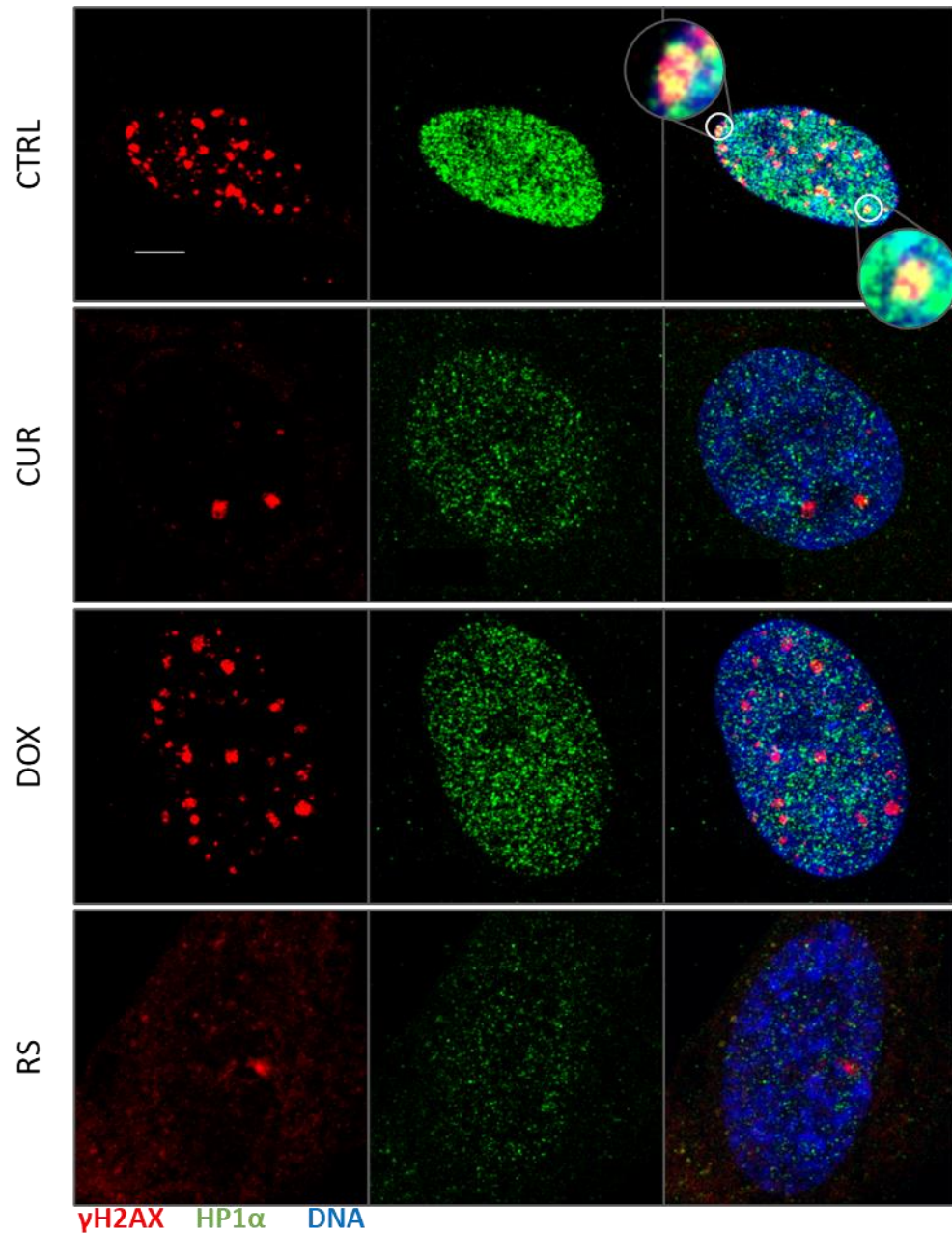
Obserwowany spadek i reorganizacja HP1 α skłoniła nas do zbadania interakcji z H3K9me3. Jak wspomniano, HP1 α niekiedy występuje w formie skupisk (zwłaszcza w starzeniu), w związku z tym sprawdzono wzajemną zależność poziomu tych białek oraz potencjalne współwystępowanie. Barwienie immunocytochemiczne wykazało wysoką korelację między średnią intensywnością H3K9me3 a HP1 α , w komórkach starych PS i RS (R Pearsona powyżej 0,74) (Ryc. 4.19.). Wskazuje to na wysoką zależność między poziomem tych dwóch białek. Niższą korelacją wykazują się komórki młode, ale jest ona również istotna statystycznie. W komórkach młodych pojawiające się skupiska obu białek dużo częściej kolokalizują ze sobą niż w komórkach starych, niezależnie od typu starzenia, gdzie tylko niewielka część pojawiających się sporadycznie skupisk H3K9me3 pokrywa się ze skupiskami HP1 α . To sugeruje, że HP1 α może wspomagać kondensację i utrzymanie heterochromatyny głównie w komórkach młodych. Możliwe też, że występują słabsze oddziaływania białka HP1 α i H3K9me3 w jądrze komórek starych (może to być m.in. efektem spadku poziomu białek), co może odgrywać rolę w regulacji struktury chromatyny, a tym samym w starzeniu.



Ryc. 4.19. Interakcja białka HP1 α z H3K9me3 w zależności od czynnika indukującego starzenie. Lewy panel przedstawia zależność (korelacja Pearsona) średniej intensywności immunofluorescencji między HP1 α a H3K9me3. Prawy panel obrazuje kolokalizację skupisk obu białek. Przykładowe zdjęcia z $n = 3$. Skala 5 μm .

4.1.5.2. Interakcja HP1 α z γ H2AX

Na podstawie wyników otrzymanych dla komórek HeLa pokazano, że wokół znacznika uszkodzeń DNA, czyli γ H2AX, dochodzi do miejscowej kondensacji chromatyny bogatej w H3K9me3 [214]. W związku z tym, postanowiono sprawdzić czy białko HP1 α uczestniczy w kondensacji chromatyny związanej z uszkodzeniami DNA.

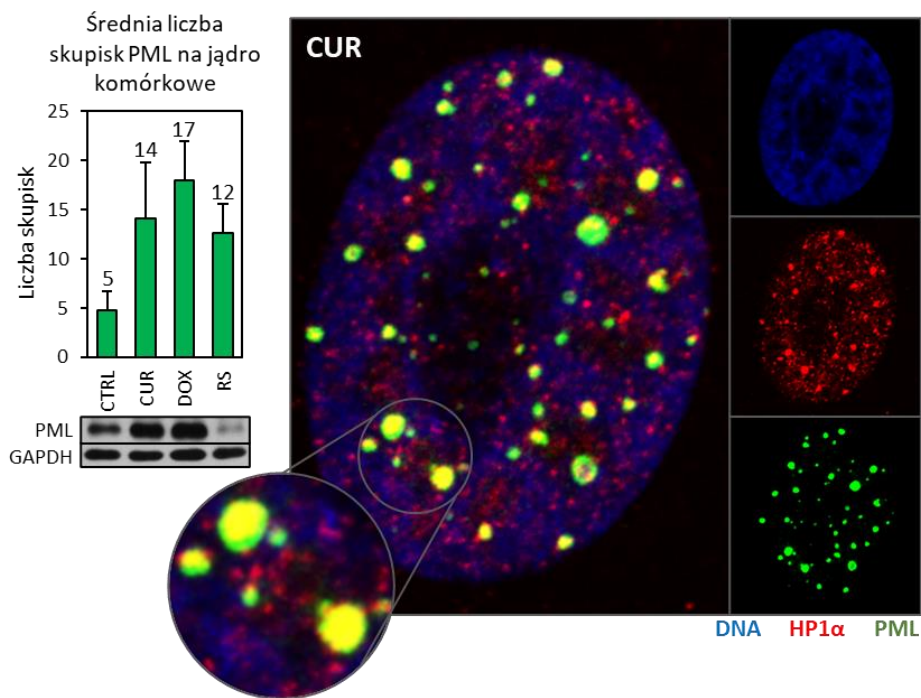
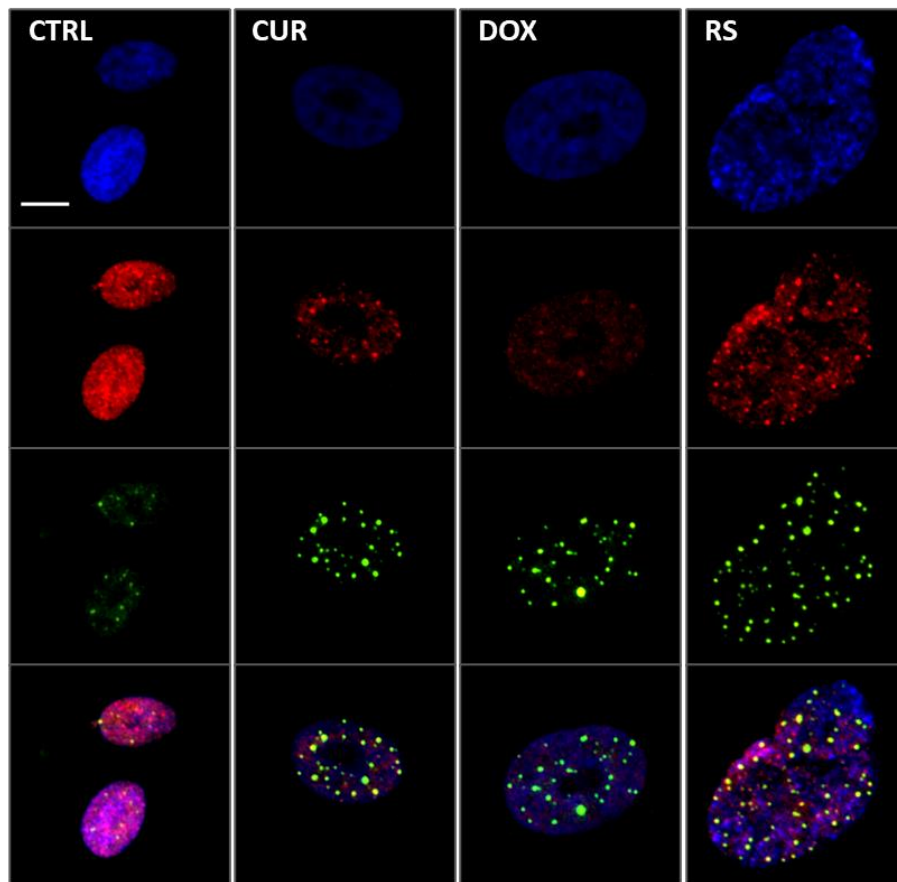


Ryc. 4.20. Analiza występowania białka HP1 α w okolicach podwójnych pęknięć nici DNA, rozpoznawanych za pomocą znacznika γ H2AX. Przykładowe zdjęcia z mikroskopu konfokalnego n = 3. Skala 5 μ m.

W żadnym z analizowanych typów starzenia nie dochodzi do kolokalizacji badanych białek. Jednakże w komórkach kontrolnych, w których doszło do powstawania wielu podwójnych pęknięć nici DNA, białko HP1 α wydaje się częściej (ale nie zawsze) wnikać do wnętrza skupiska γ H2AX. Należy jednak mieć na uwadze, że procent komórek młodych z wieloma uszkodzeniami DNA jest niewielki (Ryc. 4.3.) i obraz przedstawiony na rycinie 4.20. pokazuje jedynie sporadycznie występujące zjawisko. Uszkodzenia w młodych komórkach mogą występować w wyniku stresu związanego np. z pasażowaniem, ale większość z nich ulega naprawie. Zatem możliwym jest, że białko HP1 α lokalizuje się jedynie wokół naprawialnych miejsc uszkodzeń lub jest deponowane na wczesnych etapach procesu naprawy [215]. Jednakże hipoteza ta wymaga dokładniejszej analizy.

4.1.5.3. Interakcja HP1 α z białkiem PML

Nieco więcej światła na zjawisko tworzenia skupisk HP1 α rzuciła jego jednoczesna detekcja z białkiem PML. Białko PML jest rdzeniem ciała jądrowego PML, które pełni funkcję pewnego rodzaju „rezerwuaru” innych białek, uczestniczących m.in. w regulacji ekspresji genów czy naprawie podwójnych uszkodzeń nici DNA [216]. Podczas starzenia przyspieszonego dochodzi do wzrostu zarówno ekspresji PML jak i zwiększenia liczby skupisk w porównaniu do kontroli. Z drugiej strony, w starzeniu replikacyjnym dochodzi do spadku ekspresji białka z jednoczesnym wzrostem liczby skupisk w jądrze. Podwójne barwienie wykazało częstą kolokalizację PML i HP1 α w obu typach starzenia, natomiast wydaje się, że w komórkach kontrolnych liczba takich wspólnych miejsc jest znacznie mniejsza. Przykładowy obraz pokrywających się miejsc HP1 α i PML przedstawiono na rycinie 4.21. Tam też zamieszczono dokładniejszy obraz pokrywających się skupisk (kolor żółty) na przykładzie komórek traktowanych kurkuminą.



Ryc. 4.21. Analiza kolokalizacji skupisk HP1 α z białkiem PML. Górny panel przedstawia przykładowy obraz rozmieszczenia białka we wszystkich wariantach eksperymentalnych. Kolorem niebieskim zaznaczono DNA (DAPI), zielonym H3K9me3, czerwonym HP1 α . Na dolne pokazano wykres przedstawiający średnią liczbę skupisk

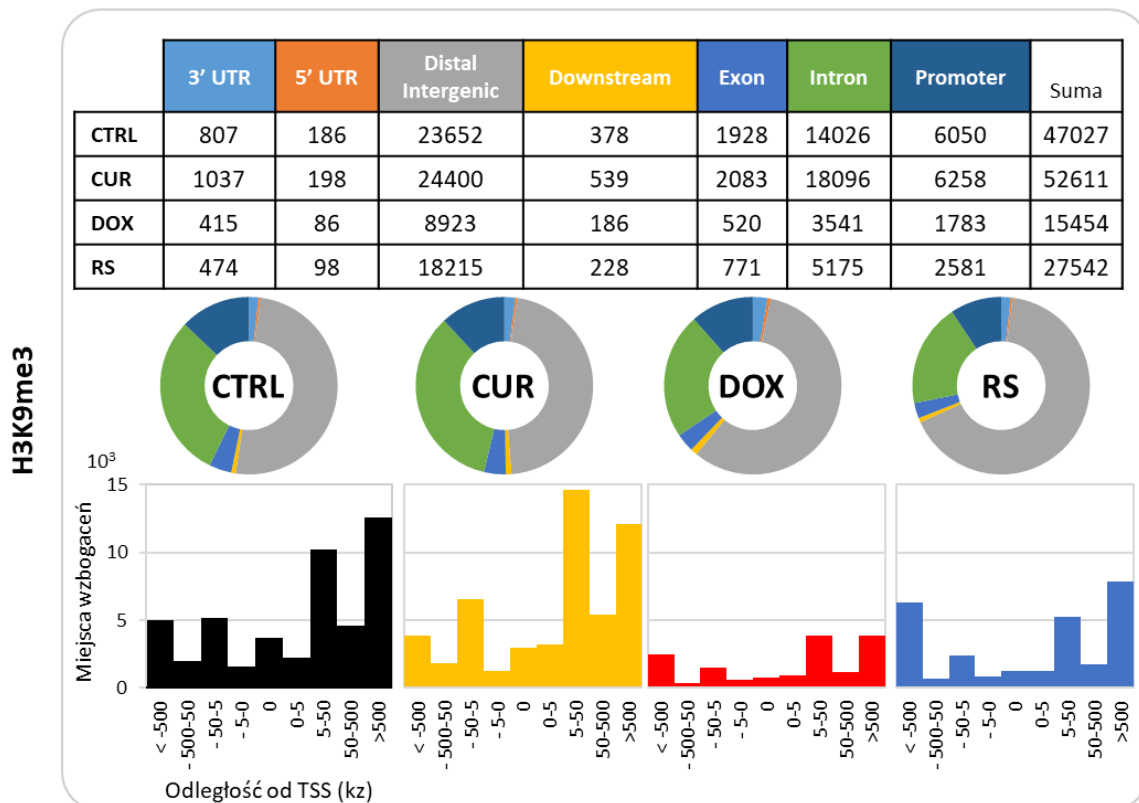
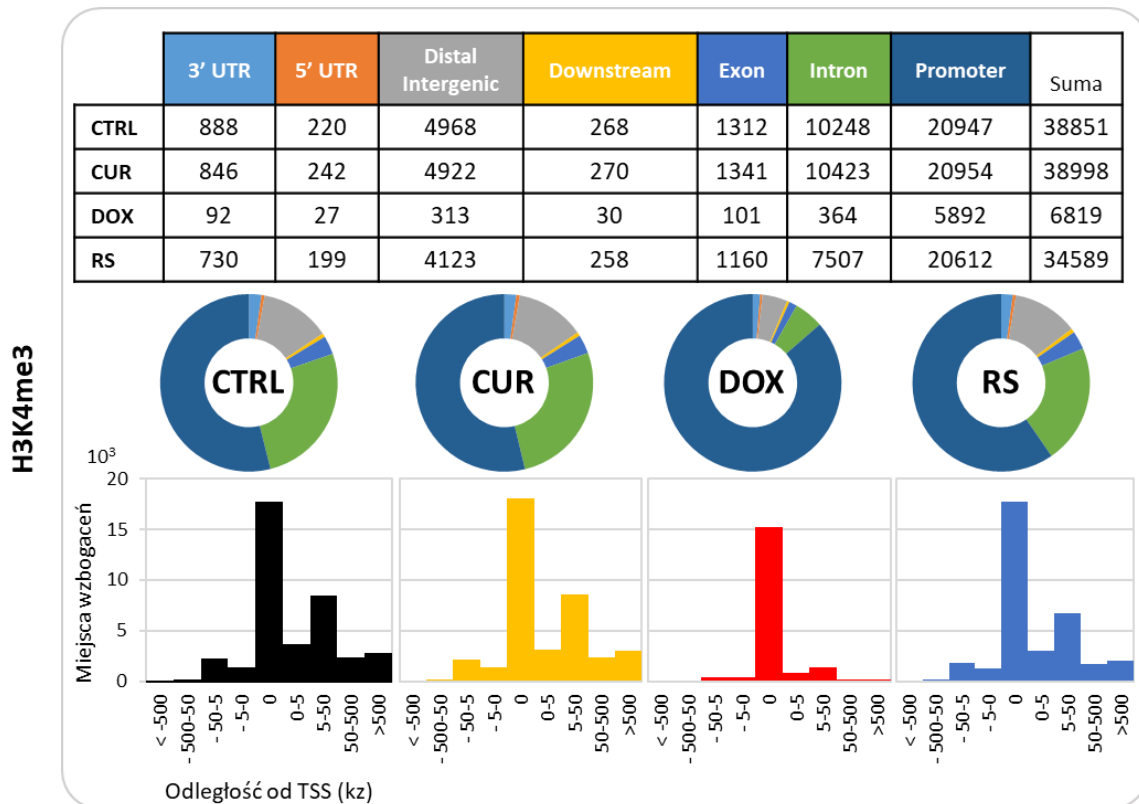
na jądro komórkowe (n = 3), a pod nim przykładowy obraz zmian w ekspresji białka oznaczony metodą Western blot. Obok pokazano zbliżenie na pokrywające się skupiska uzyskane przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Skala 10 μ m.

4.1.6. Zmiany w profilu rozmieszczenia H3K4me3 oraz H3K9me3 w genomie młodych i starych VSMC – analiza wzbogacenia badanych znaczników metodą CHIP-seq

Ze względu na stopniowy spadek H3K4me3 oraz H3K9me3 w badanych typach starzenia (Ryc. 4.9.) postanowiono sprawdzić, w których miejscach w genomie dochodzi do akumulacji tych znaczników i jaki może mieć to wpływ na ekspresję genów. Aby poznać regiony wzbogacone w badane modyfikacje zastosowano immunoprecypitację histonów sprzężoną z sekwencjonowaniem nowej generacji (CHIP-seq). Wstępną ocenę materiału wyjściowego zamieszczono w rozdziale 3. Materiały i metody.

Zauważono, że komórki traktowane DOX wykazują się najniższą liczbą odczytów H3K4me3 i w tym wypadku całkowita liczba regionów wzbogacenia jest 5-krotnie niższa niż w pozostałych wariantach. W CTRL, CUR i RS, liczba odczytów jest zbliżona i wynosi powyżej 30000. Możliwe, że wpływa to na reorganizację znacznika w starzeniu i związaną z tym ekspresję genów, w związku z tym sprawdzono miejsca występowania H3K4me3 w genomie. Zgodnie z literaturą, większość wzbogacenia zarejestrowano w miejscach promotorowych genów w miejscu startu transkrypcji. Drugim miejscem częstego występowania tej modyfikacji są introny. Najprawdopodobniej są to te z nich, które występują tuż po pierwszym egzonie, ponieważ sporo odczytów znajduje się dalej za TSS (Ryc. 4.22.). Wyjątkowo, w przypadku wariantu DOX, ponad 80% wszystkich odczytów lokuje się głównie w promotorach, a mała rozpiętość wokół TSS może sugerować pojawianie się bardzo wąskiego pików wzbogacenia w tę modyfikację. Uważa się, że cechą charakterystyczną H3K4me3 jest jego występowanie właśnie w formie wąskich pików (*narrow peaks*) rozpościerających się na ograniczonej długości 0,5 - 1,5 kb w miejscach startu transkryptu. Ostatnie badania dowodzą jednak, że znacznik ten może też występować na większej przestrzeni tworząc szerokie piki (*broad peaks*), zajmując dłuższy fragment genomu niż umowna granica, co może mieć odzwierciedlenie w poziomie ekspresji genów. W otrzymanych przeze mnie wynikach szerokość pików jest zależna od wariantu eksperymentalnego. Niektóre geny charakteryzują się węższym pikiem w komórkach kontrolnych w porównaniu do komórek starych, a niektóre wykazują tendencję odwrotną (np. ANLN i CLDN1 opisane w rozdziale 4.4.). Rola występowania wąskiego oraz szerokiego pików oraz ich wpływu na komórkę pozostaje tematem postępujących badań. Ponadto w starzeniu dochodzi do spadku odczytów w danych genach

i pik jest zwykle niższy w komórkach starych w porównaniu z młodymi, chociaż też jest to zależne od genu.



Ryc. 4.22. Profil wzbogacenia H3K4me3 oraz H3K9me3 w genomie komórek młodych i starych. Tabela podsumowująca liczebność wzbogacenia w danych obszarach genomu dla każdego wariantu eksperymentalnego. Środkowe wykresy obrazują odsetek zmian poszczególnych obszarach, a panel poniżej rozłożenie miejsc wzbogaceń wokół miejsca startu transkrypcji. Zastosowano następujące oznaczenia: kolor czarny – CTRL, żółty – CUR, czerwony – DOX, niebieski – RS.

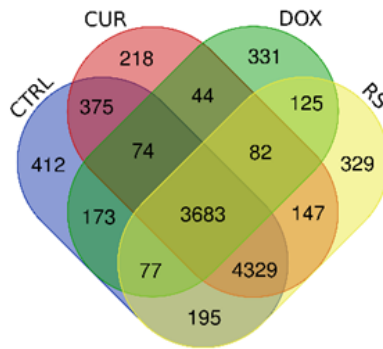
W przypadku H3K9me3, najniższą liczbę odczytów również zanotowano dla wariantu DOX (15454). Nieco więcej uzyskano dla komórek RS (27542) oraz CTRL (47027), natomiast wbrew założeniom najwięcej wzbogaceń/odczytów otrzymano dla komórek traktowanych kurkuminą (52611). Ponadto H3K9me3 głównie lokuje się w rejonach międzygenowych dystalnych (*distal intergenic*) i jest to typowe dla wszystkich badanych wariantów. Niekiedy dochodzi do akumulacji tej modyfikacji w miejscach promotorowych, ale jest to jedynie 10% wszystkich odczytów, a miejsca TSS są w większości pozbawione H3K9me3. Ponadto analiza obrazu wzbogaceń w przeglądarce genomowej wykazała wysokie zagęszczenie tej modyfikacji w regionach okołocentrometowych.

W związku z obserwowanymi zmianami w całkowitej liczbie odczytów oraz różnicami w rozkładzie danych znaczników w genomie, postanowiono przeprowadzić analizę funkcjonalną miejsc wspólnych jak i różniących dane warianty eksperymentalne.

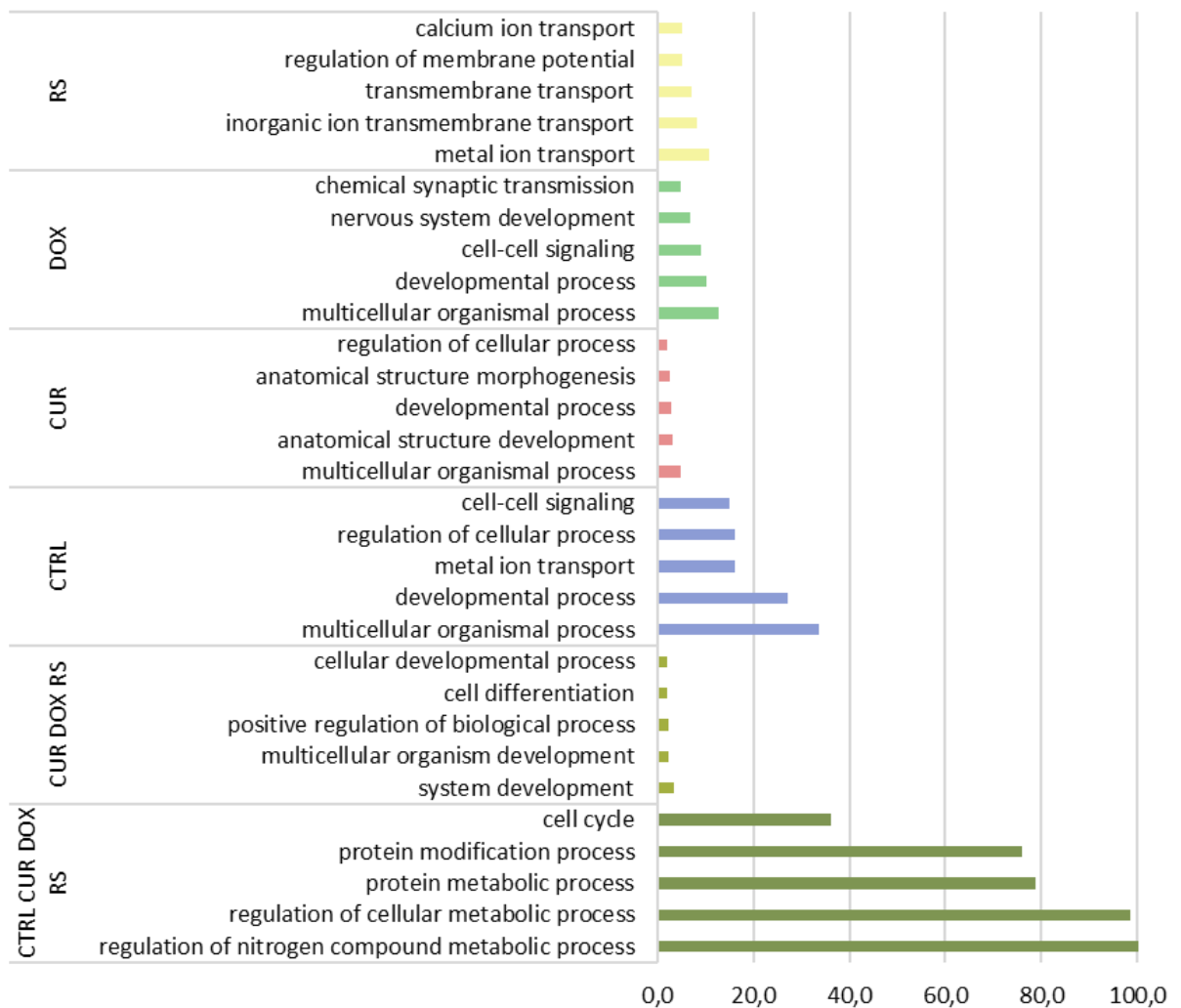
4.1.6.1. Analiza funkcjonalna miejsc wzbogaceń w znaczniki aktywnej i nieaktywnej chromatyny

Do analizy funkcjonalnej regionów bogatych w H3K4me3 wybrano istotne odczyty wskazane przez edgeR ($\text{edgeR} < 0,05$) znajdujące się w promotorach genów kodujących białka ze wszystkich wariantów eksperymentalnych. Na rycinie 4.23. diagram Venna przedstawia przecinające się zbiory znaczących odczytów, a do dalszej analizy wzięto geny znajdujące się w środkowej części, czyli takie, których ekspresja może być kontrolowana przez H3K4me3 stale, czyli zarówno w komórkach młodych jak i poddanych starzeniu obu typów. Do takich zaliczają się geny biorące udział w procesach metabolicznych komórki, modyfikacji białek czy kontroli cyklu komórkowego. Zbiór genów wspólnych dla starzenia, czyli miejsce przecięcia się zbiorów CUR, DOX i RS zawierał jedynie 82 geny, które odpowiedzialne są za rozwój i różnicowanie komórek. Należy jednak pamiętać, że ze względu na małą liczbę genów poddanych analizie (a do analizy funkcjonalnej warto przekazać odpowiednio duży zbiór genów wyjściowych, czyli powyżej 100) może ona być jedynie szacunkowa. Jeszcze mniej charakterystycznych genów znaleziono w PS (44 geny) i w związku z tym, nie udało się przeprowadzić pełnej analizy funkcjonalnej. Zauważono natomiast pewną reorganizację znacznika w genomie, czyli pojawienie się wzbogacenia w nowych miejscach charakterystycznych tylko dla danego wariantu

eksperymentalnego, CTRL, CUR, DOX i RS, a wyniki wybranych najważniejszych procesów przedstawiono na wykresie ryciny 4.23. poniżej.



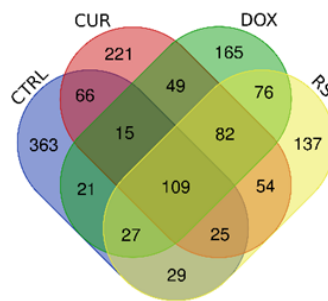
biological processes



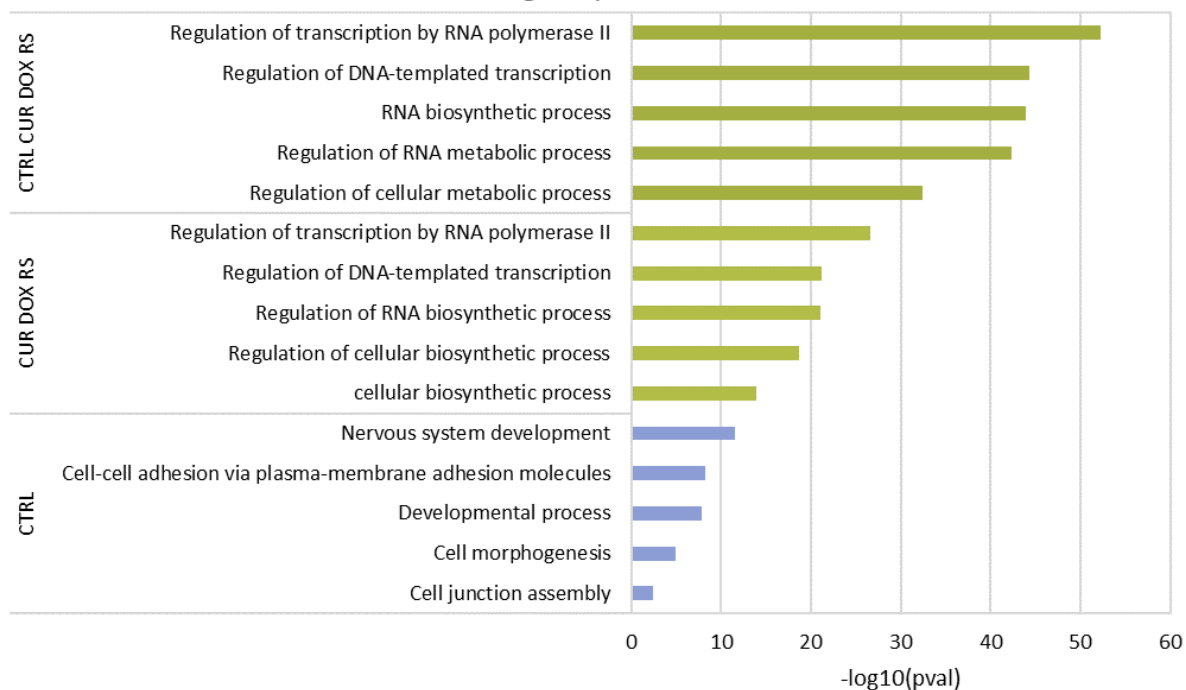
Ryc. 4.23. Analiza funkcjonalna obszarów promotorowych genów bogatych w H3K4me3. Diagram Venna przedstawia zbiory przecięcia wszystkich wariantów eksperymentalnych, a poniższy wykres procesy biologiczne aktywowane przez geny należące do wybranych zbiorów.

Analizę funkcjonalną miejsc wzbogaconych w H3K9me3 również przeprowadzono z wykorzystaniem istotnych odczytów ($\text{edgeR} < 0,05$) genów kodujących białka, lecz znajdujących się w całym genomie (czyli regiony promotorów, intronów, miejsc międzygenowych i inne). Tak jak w przypadku H3K4m3, do dalszej analizy starano się wziąć ten same zbiory genów wyznaczone przez diagram Venna, jednak ze względu na niewystarczającą liczbę elementów nie wszędzie otrzymano pełną analizę. Ponadto, mimo obszernego zbioru charakterystycznych miejsc wzbogacenia dla CUR (221), DOX (165) i RS (137) nie uzyskano informacji na temat procesów biologicznych, w które mogłyby być zaangażowane dane regiony.

Jednakże, niezależnie od badanego wariantu (czyli w przecinającym się zbiorze genów ze wszystkich badanych wariantów), w VSMC dochodzi do wzbogacenia H3K9me3 w rejonach genów kodujących białka z rodziny ZNF (*zinc finger protein*), co może sugerować wycieszenie ekspresji tych genów i jest ich aż 78. Białka ZNF są zaangażowane w regulację transkrypcji DNA, procesów związanych z regulacją RNA oraz niektórych funkcji metabolicznych. Podobnie w przypadku komórek starych, niezależnie od typu (czyli zbiór 82 obszarów charakterystycznych wspólnie dla CUR, DOX i RS) również dochodzi do wzbogacenia tą modyfikacją w regionach genów kodujących ZNF i związane są z podobnymi procesami jak obszary charakterystyczne dla wszystkich wariantów. Natomiast wyłącznie w komórkach młodych (363 obszarów wyjątkowych tylko dla CTRL), dochodzi do akumulacji H3K9me3 w genach kodujących różne białka np. biorące udział w tworzeniu połączeń międzykomórkowych (cell junction) i adhezji (cell-cell adhesion), procesach rozwoju komórki czy neurogenezy. Szczegółową analizę obszarów i ich roli w procesach biologicznych zamieszczono na rycinie 4.24.



biological processes



Ryc. 4.24. Analiza funkcjonalna obszarów bogatych w H3K9me3. Diagram Venna przedstawia zbiory przecięcia wszystkich wariantów eksperymentalnych, natomiast poniższy wykres procesy biologiczne aktywowane przez geny należące do wybranych zbiorów.

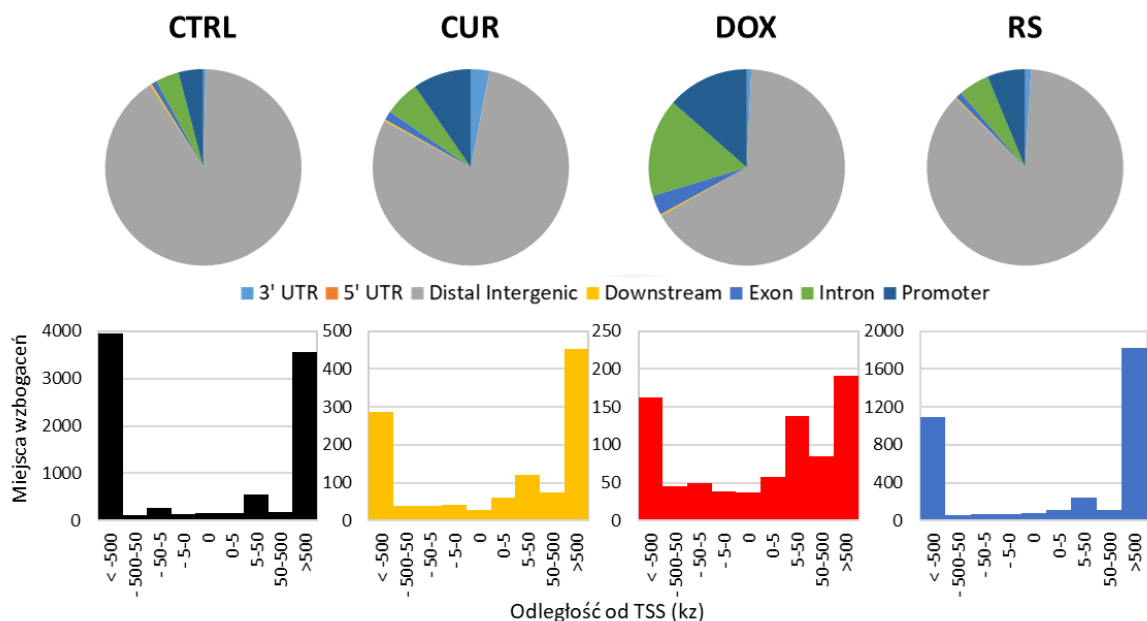
Ponadto analiza miejsc typowych dla genów, których produkty białkowe są zaangażowane w tworzenie SAHF, nie wykazała znaczącego wzrostu H3K9me3 w regionach tych genów. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje, zwłaszcza barwienia, że w VSMC w badanych typach starzenia nie dochodzi do lokalnej kondensacji chromatyny. Co więcej, typowe dla SAHF miejsca kodujące czynniki transkrypcyjne z rodziny E2F posiadają zwiększoną obecność znacznika aktywnej chromatyny, czyli H3K4me3. Zauważono, że w młodych komórkach dochodzi do znacznej akumulacji tej modyfikacji w miejscach promotorowych E2F1 oraz E2F2, które związane są z aktywacją transkrypcji. Wyniki te zostały poniekąd potwierdzone analizą transkryptomoczną mikromacierzy, ponieważ E2F1

w komórkach młodych ulega ekspresji, a jego poziom w komórkach starych zmniejsza się w porównaniu do kontroli (E2F2 pozostaje bez zmian – nie pokazano). Ponadto, we wszystkich wariantach (CTRL, CUR, DOX i RS) dochodzi do wzbogacenia H3K4me3 w genach E2F3, E2F4, E2F5 oraz E2F7, czyli czynników hamujących ekspresję i progresję cyklu komórkowego. Z kolei, analiza mikromacierzy wykazała spadek ekspresji tych białek, mimo obecności znacznika aktywującego. Najprawdopodobniej do regulacji ekspresji tych genów w starzeniu dochodzi w wyniku działania innych procesów. Jednak aby zrozumieć te obserwacje, potrzebne są dalsze badania.

4.1.6.2. Miejsca wzbogacenia w HP1 α

Jak pokazano wcześniej, wraz ze starzeniem dochodzi do spadku ekspresji HP1 α w VSMC. Zaobserwowano również formowanie się charakterystycznych skupisk, zwłaszcza w komórkach o starzeniu przyspieszonym. Przeprowadzone barwienia w celu analizy współwystępowania z różnymi białkami rzuciły nieco światła na zachodzące zmiany, natomiast nadal nie poznano dokładnych miejsc występowania skupisk HP1 α w genomie. Jak pokazano we wcześniejszych rozdziałach, HP1 α silnie oddziałuje z H3K9me3 w komórkach kontrolnych (wysoka kolokalizacja), natomiast nie dochodzi do współwystępowania tych białek w starzeniu. W świetle dotychczasowych doniesień, HP1 α może oddziaływać z chromatyną niezależnie od H3K9me3. Z tego względu, oprócz charakterystyki miejsc współwystępowania HP1 α łącznie z H3K9me3, próbowano zbadać potencjalne regiony wiązania HP1 α do chromatyny z pominięciem H3K9me3, a w tym celu użyto opisanej wcześniej metody ChIP-seq.

	3' UTR	5' UTR	Distal Intergenic	Downstream	Exon	Intron	Promoter	Suma
CTRL	37	1	8239	28	83	348	373	9109
CUR	35	1	911	3	17	66	110	1143
DOX	6	0	532	2	26	130	109	805
RS	36	0	3163	6	38	186	228	3657

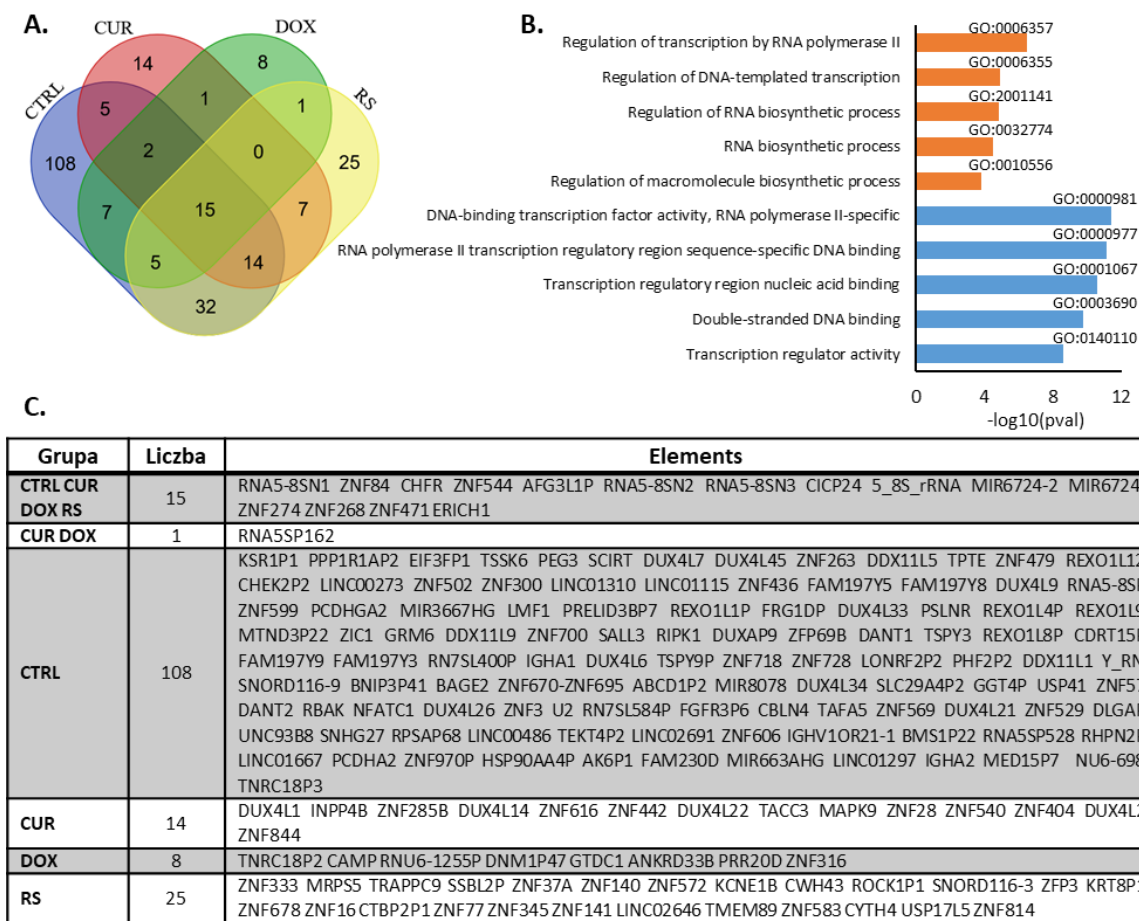


Ryc. 4.25. Analiza wzbogaceń HP1 α w genomie komórek kontrolnych (czarny), traktowanych kurkuminią (żółty) lub doksorubicyną (czerwony) oraz starych replikacyjnie (niebieski). Tabela zestawiająca całkowitą liczbę regionów wzbogacenia HP1 α w genomie w zależności od wariantu eksperymentalnego. Środkowy panel wskazuje odsetek odczytów znajdujących się w wyznaczonych obszarach genomu. Na dolnym panelu podsumowano miejsca wzbogaceń wokół TSS dla wszystkich wariantów eksperymentalnych.

Wstępna analiza wzbogaceń wykazała, że całkowita liczba odczytów jest znacznie niższa niż w przypadku H3K9me3, a najmniej uzyskano ich dla komórek traktowanych DOX (tabela zamieszczona na rycinie 4.25.). Podobnie jak w przypadku H3K9me3, najwięcej odczytów HP1 α zanotowano w obszarach dystalnych międzygenowych (distal intergenic), a odsetek różni się między wariantami (wykresy kołowe ryciny 3.25.). Wydaje się, że w wariantcie DOX dochodzi do najsilniejszego przeorganizowania profilu wzbogacenia HP1 α w genomie, ponieważ odsetek odczytów w tych miejscach zmniejsza się. Na najniższym panelu można zaobserwować profil rozkładu HP1 α wokół TSS. W każdym wariantcie poziom odczytów w miejscach startu transkrypcji jest niewielki, a znaczna część lokuje się w dalszych częściach genomu.

Widząc podobieństwa w rozkładzie odczytów w genomie między HP1 α a H3K9me3, przeprowadzono analizę potencjalnych miejsc współwystępowania obu znaczników. Na diagramie Venna (Ryc. 4.26.)

zaznaczono przecinające się zbiory miejsc współwystępowania obu białek i zauważono, że najwięcej takich miejsc interakcji zachodzi w komórkach kontrolnych. W związku z tym, do analizy funkcjonalnej przekazano wyłącznie te geny. Miejsca podwójnego występowania powyższych znaczników związane są z regulacją transkrypcji i biosyntezy RNA, a geny zaangażowane w te procesy należą do rodziny białek ZNF.



Ryc. 4.26. Analiza miejsc współwystępowania HP1α z H3K9me3 w młodych i starych VSMC. A) Diagram Venna wyznaczający przecinające się zbiory zawierające wspólne obszary wzbogaceń. B) Analiza funkcjonalna wskazanych miejsc współwystępowania charakterystycznych wyłącznie dla młodych komórek. Na wykresie zestawiono terminy dotyczące procesów biologicznych (pomarańczowy) oraz funkcji molekularnych (niebieski). C) Tabela z listą miejsc współwystępowania HP1α z H3K9me3 w wybranych zbiorach, tj. wspólnych dla młodych oraz obu typów starzenia (CTRL CUR DOX RS), charakterystycznych dla PS (CUR DOX) oraz występujących wyłącznie w komórkach młodych (CTRL), traktowanych kurkuminą (CUR), doksorubicyną (DOX) oraz starych replikacyjnie (RS).

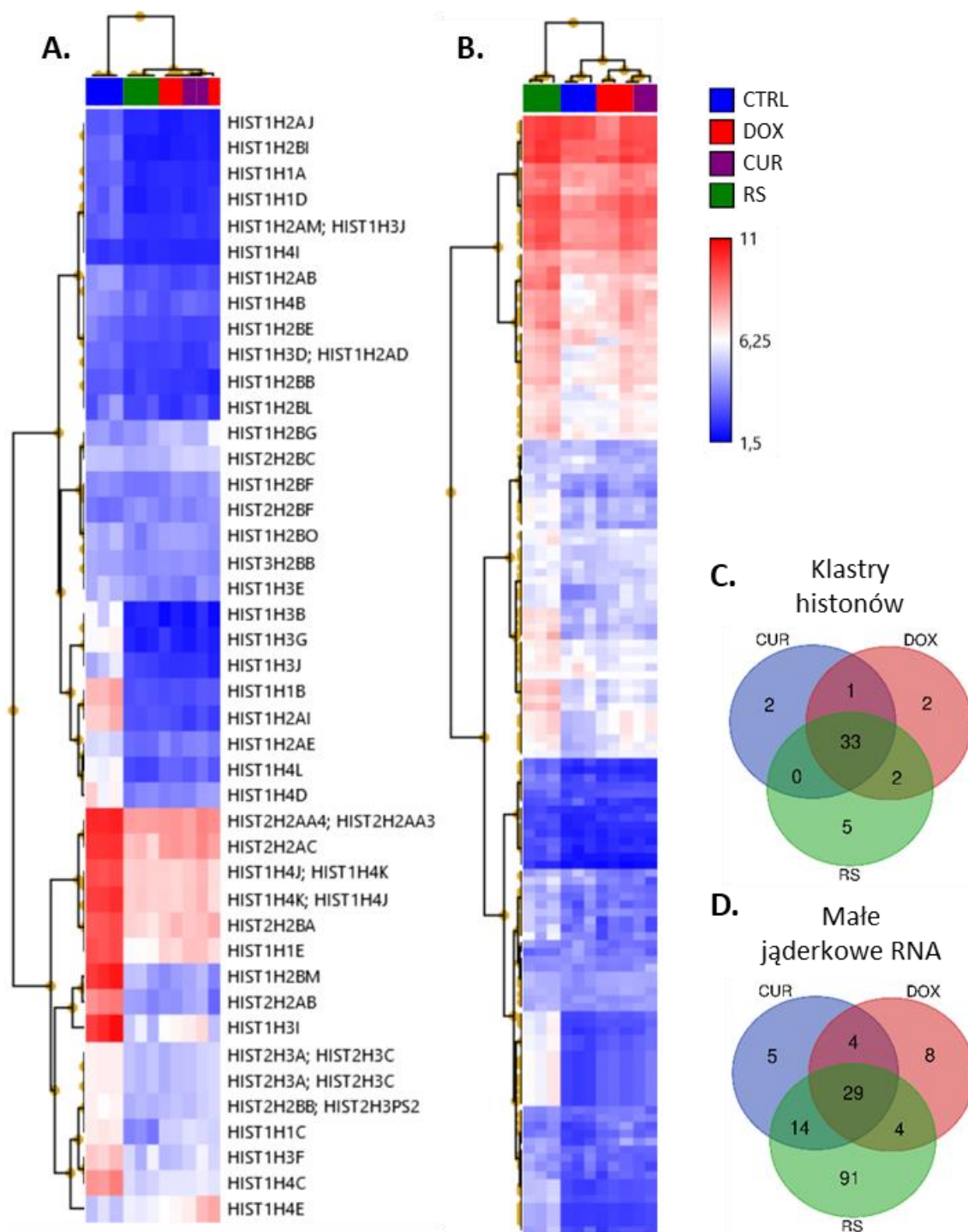
Jak wspomniano, próbowano znaleźć miejsca interakcji HP1 α z chromatyną bez udziału H3K9me3. Przeprowadzona analiza nie wykazała wielu miejsc, a tym bardziej nie znaleziono żadnych genów wspólnych dla któregośkolwiek typu starzenia.

4.1.7. Różnice w profilu transkryptomycznym między komórkami starzejącymi się w sposób przyspieszony oraz replikacyjny

Aby dopełnić obrazu zmian zachodzących podczas starzenia VSMC, bazując na wynikach otrzymanych z mikromacierzy, dokonano analizy funkcjonalnej genów charakterystycznych dla RS i PS. Na rycinie 4.27. a zamieszczono wynik analizy głównych składowych (PCA), która wykazała znaczące różnice w transkryptomie między komórkami młodymi (kolor niebieski) a starymi replikacyjnie (kolor zielony), młodymi a starymi w sposób przyspieszony (kolor czerwony – DOX, fioletowy – CUR) oraz między dwoma typami starzenia (PS i RS). Jest to kolejny dowód potwierdzający występowania różnic między starzeniem indukowanym stresem a replikacyjnym. Geny ulegające zróżnicowanej ekspresji (*differentially expressed genes*, DEG), charakterystyczne dla każdego wariantu przedstawiono również w formie heatmapy i klastrowania hierarchicznego zarówno genów, jak i wariantów. Kolory na heatmapie reprezentują zarejestrowany sygnał (log₂), gdzie niebieski oznacza najniższy, a czerwony najwyższy sygnał. Klastrowanie ze względu na warianty eksperymentalne dostarczyło tych samych wniosków, co analiza PCA, czyli widać znaczące różnice w ekspresji genów między komórkami młodymi a starymi oraz między RS a PS (Ryc. 4.27. B). W związku z tym postanowiono przeanalizować ogólne zmiany zachodzące w starzeniu, a geny te nazwano „Wspólne”, zmiany typowe dla starzenia replikacyjnego, które w tej analizie transkryptomicznej oznaczono dalej jako „RS”, oraz geny charakterystyczne dla starzenia przyspieszonego, czyli „PS”. Na diagramie Venna (Ryc. 4.27. C) odpowiednio zaznaczono przecinające się zbiory genów o zróżnicowanej ekspresji a ich poziom (wzrost lub spadek) odnoszono do komórek kontrolnych. Schemat oznaczeń na diagramie wyjaśniono w podpunkcie 3.2.10.5. rozdziału Materiały i metody (Ryc. 3.4.), czyli geny „Wspólne” znajdują się w środku przecięcia trzech zbiorów genów, geny „PS” w miejscu przecięcia dwóch zbiorów (DOX i CUR), a geny charakterystyczne tylko dla starzenia replikacyjnego „RS” znajdują się w zbiorze nieprzecinającym się z żadnym innym (dół diagramu). Ponadto podano liczbę DEG, a kierunek zmian zaznaczono odpowiednim kolorem (czerwony – wzrost, niebieski – spadek ekspresji). Dla każdego zbioru pokazano 7 genów ulegającym najwyższej i najniższej ekspresji oraz zaznaczono krotność zmian dla każdego wariantu eksperymentalnego, wchodzącego w skład danego zbioru.

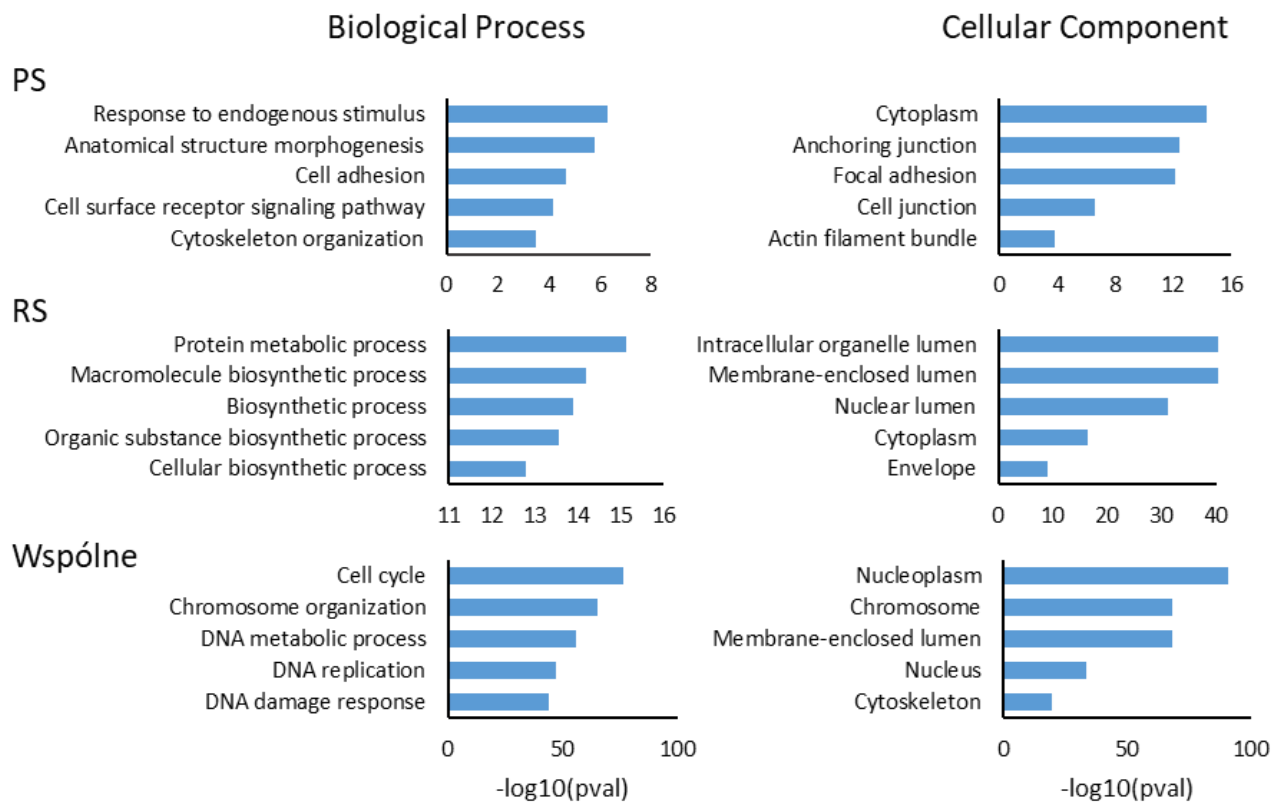
trzech zbiorów genów, których ekspresja zmieniała się w poszczególnych wariantach eksperymentalnych względem komórek kontrolnych, z uwzględnieniem liczby genów wchodzących w skład poszczególnych podzbiorów. Ponadto w zbiorach „PS”, „Wspólne” oraz „RS” (wyjaśnienie oznaczeń można znaleźć w rozdziale Metody) zaznaczono liczbę genów, których ekspresja rośnie (czerwony trójkąt) i maleje (niebieski trójkąt). D) Lista pierwszych 7 genów podlegających wzmożonej ekspresji oraz 7 genów hamowanych w poszczególnych zbiorach (PS, Wspólne i RS). Z prawej strony zamieszczono mapę ciepłą obrazującą krotkość zmian (Fold Change).

W obu typach starzenia (wspólne) oraz w starzeniu replikacyjnym przeważnie dochodzi do spadku poziomu mRNA, natomiast w starzeniu przyspieszonym zanotowano niemal 3-krotnie więcej genów ulegających ekspresji (454) niż zahamowaniu (166). Ponadto, największe zmiany zanotowano dla klastrów histonów, których ekspresja spadała nawet 70-krotnie we wszystkich typach starzenia, w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.28. A). Ciekawych obserwacji dokonano dla małych jąderkowych RNA (snoRNA), których wzrost ekspresji był charakterystyczny głównie dla RS oraz w niewielkim stopniu w PS, a klastrowanie wyraźnie pokazało różnicę między komórkami RS a CTRL i PS (Ryc. 4.28. B). Obserwowany spadek ekspresji genów kodujących klastry histonów, może sugerować jedną z przyczyn rozluźniania się chromatyny w trakcie starzenia, natomiast wysoka ekspresja snoRNA może tłumaczyć towarzyszące starzeniu powiększanie się jąder.



Ryc. 4.28. Analiza porównawcza zmian w poziomie ekspresji klastrów histonów i małych jąderkowych RNA (SNORD). Mapa ciepła oraz klastrowanie hierarchiczne uwzględniające zmiany sygnału (\log_2) zarejestrowanego dla każdego genu we wszystkich badanych wariantach (CTRL, CUR, DOX, RS). A) Geny kodujące klastry histonów B) Geny kodujące małe jąderkowe RNA (SNORD). C) Diagram Venna przedstawiający przecinające się zbiory genów klastrów histonów, zmieniających się względem CTRL. D) Diagram Venna przedstawiający przecinające się zbiory genów kodujących SNORD, zmieniających się względem CTRL.

Następnie dla każdego badanego zbioru genów przeprowadzono analizę funkcjonalną z wykorzystaniem bazy danych Gene Ontology, a wyniki przedstawiono w ramach terminów opisujących procesy biologiczne (biological proces) oraz lokalizację w komórce (cellular component). Wyniki wykazały, że geny ulegające zmianom w starzeniu (wspólne), zgodnie z założeniami i dotychczasową wiedzą, kodują białka znajdujące się przeważnie w jądrze, gdzie biorą udział w kontroli cyklu komórkowego, organizacji chromosomów, replikacji czy naprawie DNA (Ryc. 4.29. Wspólne). Natomiast znaczące różnice w funkcjach genów można zauważyć w starzeniu replikacyjnym i przyspieszonym. W przypadku RS, produkty genów związane są z utrzymaniem procesów metabolicznych oraz syntezy białek i najczęściej spotykane są wewnątrz różnych organelli komórkowych, w tym w jądrze, oraz cytoplazmie. Komórki poddane działaniu doksorubicyny i kurkuminy (PS) wykazują zmiany w ekspresji genów dotyczących odpowiedzi na bodziec zewnętrzny. Co ciekawe, biorą też udział w adhezji komórkowej oraz reorganizacji cytoszkieletu. Białka kodowane przez te geny lokalizują się w cytoplazmie i są związane z włóknami aktyny oraz w miejscach adhezji komórek. Może to wpływać na zdolność komórek poddanych starzeniu przyspieszonemu do migracji, co pokazano wcześniej w Pracowni (wyniki nieopublikowane).



Ryc. 4.29. Analiza funkcjonalna genów charakterystycznych dla badanych przedziałów (PS, RS i wspólne). Na wykresach przedstawiono procesy biologiczne oraz uwzględniono lokalizację w komórce, gdzie produkt genu

pełni określoną funkcję (cellular component). Analizę wykonano za pomocą narzędzia g:Profiler polegając na bazie danych Gene Ontology.

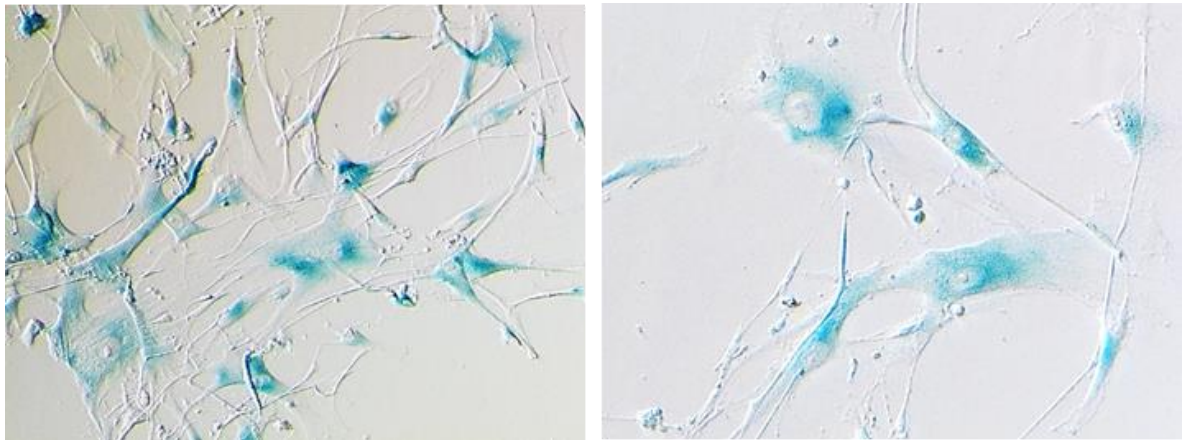
Powyższa analiza transkryptomyczna pozwoliła nam na zrozumienie różnic między typami starzenia i pozwoliła na wstępne wytypowanie potencjalnych markerów starzenia, w tym starzenia przyspieszonego. Wyniki opisujące wybranych kandydatów zamieszczono w rozdziale 4.4.

4.2. Komórki mięśni gładkich izolowane z blaszki miażdżycowej

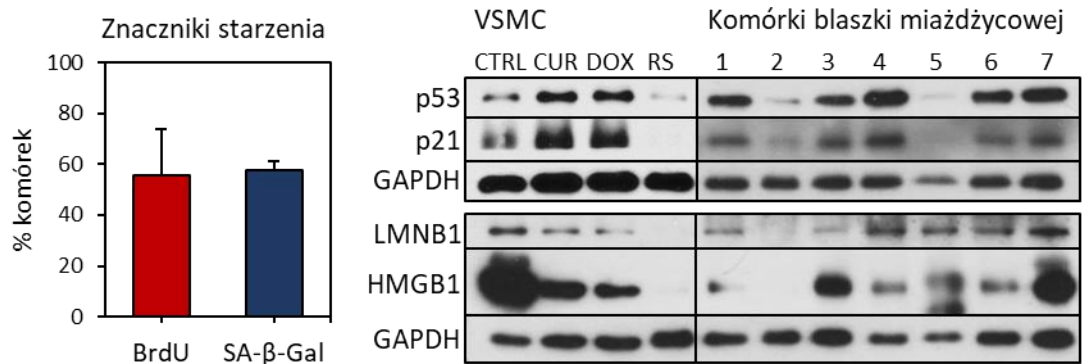
W celu porównania zmian modyfikacji histonów między starzeniem komórkowym zachodzącym *in vitro* a *in vivo*, wykorzystano komórki mięśni gładkich naczyń pochodzące z blaszki miażdżycowej (AP z ang. Atherosclerotic plaque), model *ex vivo*. Materiał pobierano śródoperacyjnie od pacjentów będących w różnym wieku. Należy zaznaczyć, iż ze względów technicznych (ograniczona ilość wyizolowanego materiału) nie wszystkie przedstawione analizy były wykonywane na tym samym materiale. Detekcję białek metodą Western blot przygotowano z materiału pochodzącego od przynajmniej 7 pacjentów (chyba, że w tekście zaznaczono inaczej), natomiast barwienia immunocytochemiczne oraz analizę qPCR wykonano na komórkach od trzech dawców. W dalszej części rozdziału, zamiennie stosowano nazwy takie jak „komórki blaszki”, „blaszki” i „AP” opisujące komórki mięśni gładkich izolowane z blaszki miażdżycowej. Dodatkowo przymiotnikiem „stary” skrótowo opisywano komórki wykazujące fenotyp komórek starych (zwiększona powierzchnia jądra komórkowego, rozluźniona chromatyna), a przymiotnikiem „młode” komórki o cechach komórek młodych (małe jądra o skondensowanej chromatynie). W analizach porównawczych (np. qPCR) wynik odnoszono do młodych VSMC hodowanych *in vitro*.

4.2.1. Ogólna charakterystyka komórek mięśni gładkich pochodzących z blaszki miażdżycowej oraz wstępna analiza znaczników starzenia

Wyizolowane komórki stanowią heterogenną populację, za czym przemawia mieszana morfologia komórek młodych i starych z przeważającymi cechami tych drugich. Znaczna część komórek w populacji jest płaska i ma powiększoną powierzchnię o nieregularnych krawędziach z licznymi, wydłużonymi wypustkami (Ryc. 4.30.). Wraz z powiększeniem się komórki dochodzi do zwiększenia powierzchni jądra, wokół którego gromadzi się SA- β -gal (Ryc. 4.31.). Około 60% komórek wykazało zwiększoną aktywność tego enzymu, ale jednocześnie 60% komórek było zdolnych do replikacji DNA (Ryc. 4.31.).



Ryc. 4.30. Morfologia komórek pochodzących z blaszki miażdżycowej i aktywność SA-β-gal (lewe zdjęcie powiększenie 100x, prawe zdjęcie powiększenie 200x).



Ryc. 4.31. Analiza wybranych markerów starzenia w komórkach pochodzących z blaszki miażdżycowej. Wykres przedstawia procent komórek ze zwiększoną aktywnością SA-β-gal (n = 7) oraz zdolnych do podziału (BrdU, n = 5). Poziom białek oznaczano metodą Western blot na przykładzie 7 blaszek miażdżycowych. Zachodzące zmiany w AP (prawa strona blotów) skonfrontowano z wynikami uzyskanymi dla VSMC ulegających starzeniu *in vitro* z uwzględnieniem obu typów starzenia (lewa strona blotów).

Poziom ekspresji białek związanych z zatrzymaniem cyklu komórkowego był silnie zależny od dawcy. W większości komórek izolowanych z blaszek białko p53 wykazywało wysoki poziom ekspresji, który pokrywał się z białkiem p21. Kolejne białka będące markerami starzenia, czyli lamina B1 i HMGB1, również wykazywały wysoką zmienność w ekspresji zależną od dawcy i w niektórych przypadkach przypominały starzenie przyspieszone, w niektórych replikacyjne, a w niektórych poziom ekspresji obu białek był równie wysoki jak w młodych komórkach VSMC.

Powyższa analiza podstawowych markerów wykazała, że blaszki miażdżycowe składają się z heterogennej populacji komórek młodych i starych, a ekspresja wybranych znaczników jest silnie zależna od dawcy.

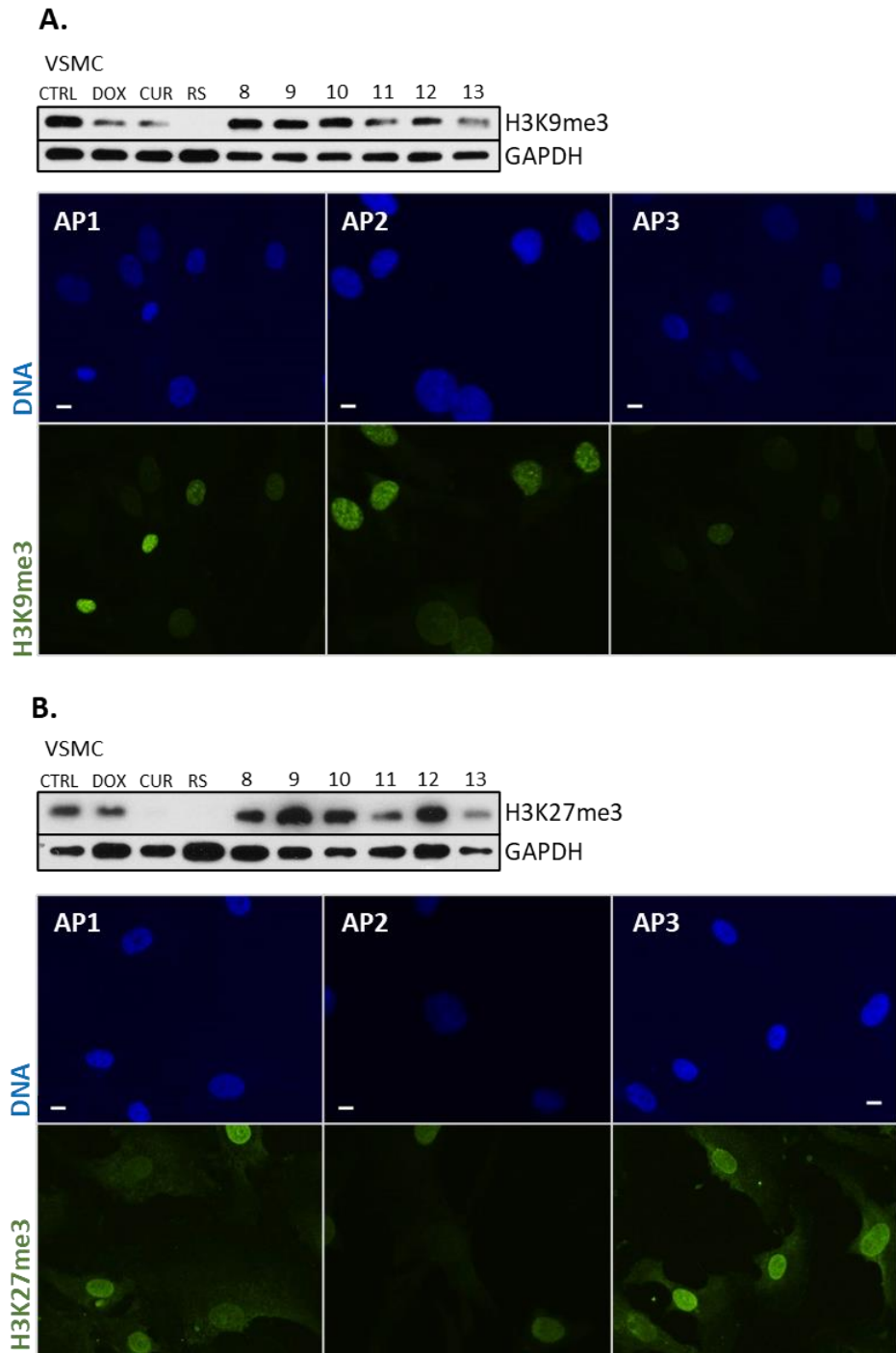
4.2.2. Zmiany w modyfikacjach histonów

Jak opisano powyżej, komórki blaszki charakteryzują się wysoce zróżnicowaną ekspresją znaczników starzenia, silnie zależną od dawcy. W związku z tym sprawdzono, czy podobna heterogenność jest utrzymana w poziomie znaczników hetero- i euchromatyny zbadanych metodą Western blot i barwienia immunofluorescencyjnego.

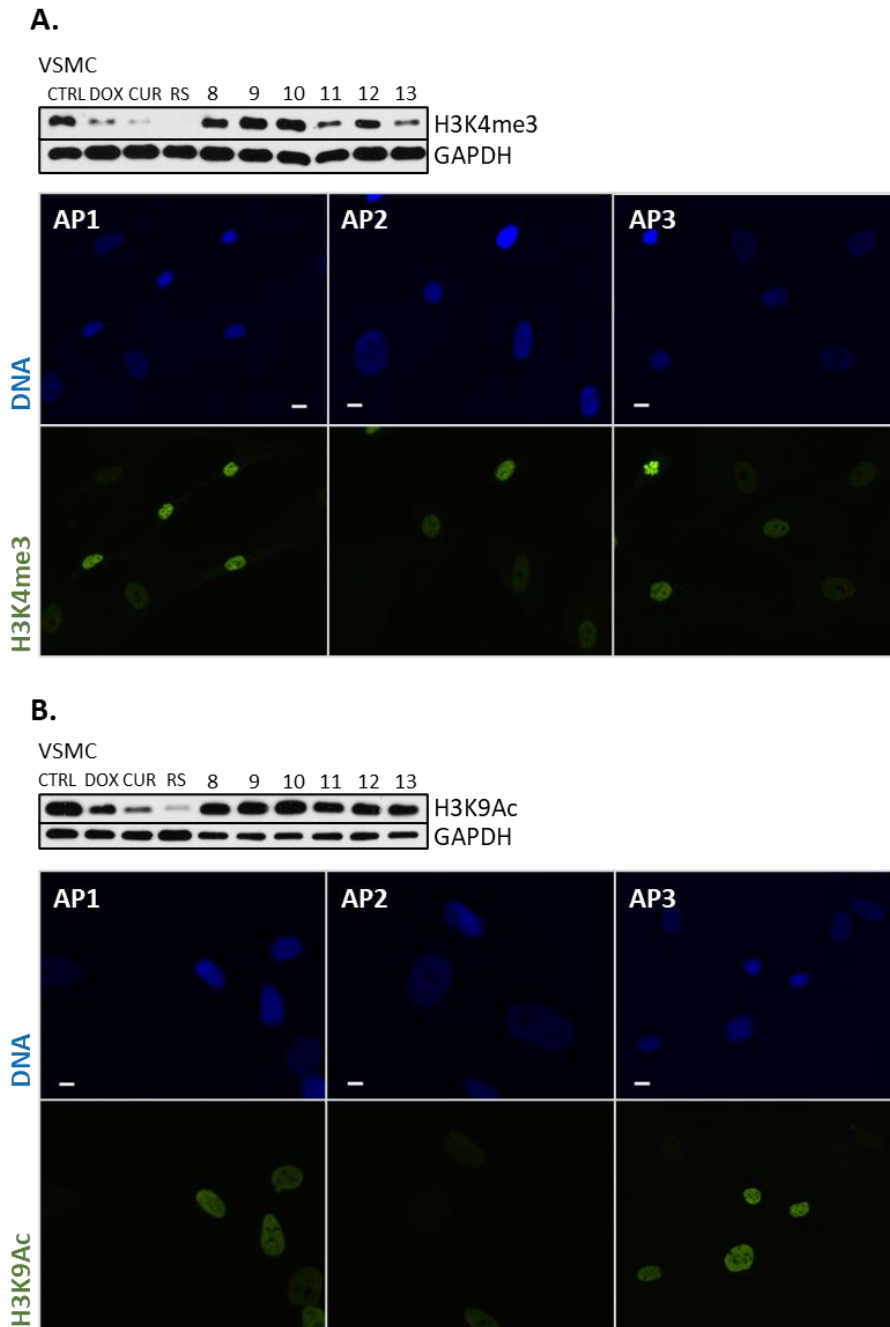
Analiza ilości białka metodą Western blot wykazała, że przypadku niektórych modyfikacji histonu profil zmian przypominał komórki stare w sposób przyspieszony, czasem stare replikacyjnie, a niekiedy poziom ekspresji był równy lub nawet wyższy niż w młodych komórkach VSMC (jak na przykład H3K27me3 w komórkach pochodzących od dawcy 9 i 12). Poziom H3K9me3 wydawał się być stały oraz relatywnie wysoki w komórkach od większości dawców (8-10 oraz 12), natomiast komórki dawcy 11 i 13 wykazywały zmniejszoną ekspresję i przypominały starzenie przyspieszone. Inaczej wyglądał rozkład znacznika H3K27me3, gdzie zróżnicowanie w poziomie białka było największe pośród blaszek pochodzących od różnych dawców. Największą ekspresję zanotowano w komórkach pochodzących od dawcy 9 oraz 12, mniejszą od 8 i 10, a najmniejszą od 11 i 13. Profil zmian modyfikacji H3K4me3 przypominał H3K9me3, gdzie największe różnice w poziomie białka (czyli jego spadek) były widoczne również tylko w komórkach od dawcy 11 i 13. Najciekawszy rozkład zaobserwowano w acetylacji lizyny 9 (H3K9Ac), gdyż poziom ekspresji był równie wysoki jak w młodych VSMC. Notowany wcześniej duży spadek w poziomie wyżej wymienionych znaczników w komórkach dawcy 11 i 13, w tym wypadku był znacznie mniej nasilony. Analizując powyższe wyniki zauważono, że jeśli dochodziło do spadku modyfikowanego histonu, to dotyczyło to wszystkich badanych modyfikacjach, jak w przypadku komórek dawcy 11 i 13. Z kolei w pozostałych przypadkach poziom wszystkich modyfikowanych histonów był na wysokim poziomie, z wyjątkiem H3K27me3.

Barwienie immunocytochemiczne pokazało, że tak jak w przypadku poziomu białek, intensywność sygnału fluorescencji badanych znaczników oraz barwnika DAPI była wysoce zróżnicowana w komórkach ze wszystkich badanych blaszek i zależna od dawcy. W populacji zauważono wiele komórek przejawiających cechy komórek starych. Biorąc pod uwagę powierzchnię jądra uznano, że około 40% z nich może być komórkami starymi. Liczbę tę oszacowano bazując na danych uzyskanych z pomiarów jąder VSMC poddanych dwóm typom starzenia oraz stosując ten sam sposób kategoryzacji

na komórki młode i stare (podrozdział 1.1.2.2. Cell Profiler). Jądra starych komórek pochodzących z blaszek, miały znacząco zmniejszony i równomierny sygnał DAPI sugerujący bardziej rozluźnioną chromatynę. Ich kształt wydaje się być bardziej zbliżony do kulistego, a krawędź relatywnie regularna, czym przypominają VSMC poddane starzeniu przyspieszonemu. Dodatkowo, w populacji tej nie zauważono charakterystycznych skupisk heterochromatyny (wybarwionych barwnikiem DAPI), które sugerowałyby pojawianie się SAHF. Nie obserwuje się również skupisk H3K9me3 ani H3K27me3 typowych dla SAHF. Analizując osobno każdy badany znacznik, zauważono, że intensywność H3K9me3 jest większa w mniejszych jądrach (komórki młode). W nich też dochodzi do powstawania skupisk i większego upakowania heterochromatyny, co różni je od starych komórek. Wraz ze zwiększaniem się powierzchni jądra dochodzi do zmniejszenia intensywności sygnału H3K9me3. Podobny trend zauważono dla H3K27me3, gdzie jądra o mniejszej powierzchni charakteryzują się wyższą intensywnością fluorescencji, w odróżnieniu od większych jąder, w których sygnał spada. Z drugiej strony w mniejszych jądrach nie dochodzi do powstawania dużych i wyraźnych skupisk i rozkład sygnału jest w większości równomierny. Znaczniki euchromatyny (H3K4me3 oraz H3K9Ac) wykazują podobny profil rozmieszczenia jak w młodych komórkach VSMC, czyli intensywny sygnał barwienia obserwuje się z małych jądrach, a o wiele słabszy w starych. Rozmieszczenie modyfikacji jest równomierne wewnątrz jądra, z pominięciem jąderek, w których nie rejestrowano żadnego sygnału. Ekspresję białek oraz ich rozmieszczenie w jądrze podsumowano na rycinach 4.32. oraz 4.33.



Ryc. 4.32. Zmiany w poziomie oraz lokalizacji znaczników heterochromatyny H3K9me3 i H3K27me3 w jądrze komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych. A) Przykładowy obraz zmian w poziomie modyfikacji H3K9me3 przygotowany na podstawie metody Western blot z białek pochodzących z komórek od 6 dawców (8-13), w porównaniu do VSMC oraz obraz barwienia immunofluorescencyjnego komórek pochodzących od trzech dawców (AP1-3). B) Ten sam jak wyżej zestaw analiz tylko dla modyfikacji H3K27me3, przygotowany na tym samym zestawie lizatów białkowych oraz preparatów. Skala 10 μ m.



Ryc. 4.33. Zmiany w poziomie oraz lokalizacji znaczników euchromatyny H3K3me3 i H3K9Ac w jądrze komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych. (A) Przykładowy obraz zmian w poziomie modyfikacji H3K4me3 przygotowany na podstawie metody Western blot z białek pochodzących z komórek od 6 dawców (8-13), w porównaniu do VSMC oraz barwienie immunofluorescencyjne komórek pochodzących od trzech dawców (AP1-3). (B) Ten sam zestaw analiz dla modyfikacji H3K9Ac, przygotowany na tym samym zestawie lizatów białkowych oraz preparatów. Skala 10 μ m.

4.2.3. Analiza ekspresji wybranych genów kodujących białka odpowiedzialne za modyfikację chromatyny

Analizę zmian ekspresji genów metodą qPCR przeprowadzono w komórkach pochodzących od trzech dawców, a profil zmian przedstawiono jako krotność zmian (FC) względem młodych komórek VSMC. Uzyskane wyniki porównano z tymi otrzymanymi dla VSMC i zebrano w Tabeli 4.4. Kolorem niebieskim zaznaczono spadek ekspresji, kolorem czerwonym wzrost, a brak zmian (czyli gdy poziom ekspresji nie przekraczał 1,3 lub nie był mniejszy niż -1,3) kolorem czarnym. W tabeli umieszczono geny kodujące metylotransferazy (*SUV39H1*, *EZH1*, *EZH2*), demetylazę *KDM4D*, odpowiedzialną głównie za usunięcie grupy metylowej z lizyny 9 oraz trzy deacetylazy histonów (*HDAC1*, *HDAC3*, *HDAC9*).

Tabela 4.4 Porównanie poziomu ekspresji genów kodujących wybrane enzymy remodelujące chromatynę między komórkami AP a VSMC. Krotność zmian (FC) analizowano metodą qPCR.

Gen	AP	VSMC		
		CUR	DOX	RS
EZH1	-1,16	1,72	1,42	1,91
EZH2	-4,87	-5,11	-5,54	-4,26
HDAC1	-3,52	-2,01	-2,46	-2,30
HDAC3	-0,65	0,13	-0,03	-0,64
HDAC9	-3,25	0,77	-0,54	3,00
KDM4D	-2,83	-2,13	-2,1	0,16
SUV39H1	-4,29	-5,08	-5,44	-3,83

Wszystkie wymienione geny wykazały istotnie mniejszą ekspresję w AP, oprócz genu *EZH1* i *HDAC3*, których poziom pozostawał bez zmian. Niższy poziom ekspresji metylotransferaz *SUV39H1* i *EZH2* oraz deacetylazy *HDAC1* był podobny do tego jaki obserwowano w obu typach starzenia VSMC. Natomiast różnice zanotowano w poziomie *EZH1*, *KDM4D* oraz *HDAC9*. Gen *EZH1* w VSMC ulega zwiększonej ekspresji w porównaniu do AP. Jak wspomniano, obecność *EZH1* w kompleksie PRC2 jest charakterystyczna dla komórek nieproliferujących, więc obserwowany niższy poziom w komórkach blaszek może być związany z obecnością zdolnych do podziału komórek (ok. 60%, wykres na rycinie 4.31). Profil ekspresji demetylasy *KDM4D* wydaje się przypominać ten obserwowany w starzeniu przyspieszonym VSMC i dochodzi do spadku ekspresji genu w tych przypadkach. W VSMC starzejących się w sposób replikacyjny poziom pozostaje bez zmian. Ekspresja *HDAC9* wykazała się odwrotnym kierunkiem zmian w AP w porównaniu do VSMC. W komórkach AP poziom *HDAC9* spada trzykrotnie,

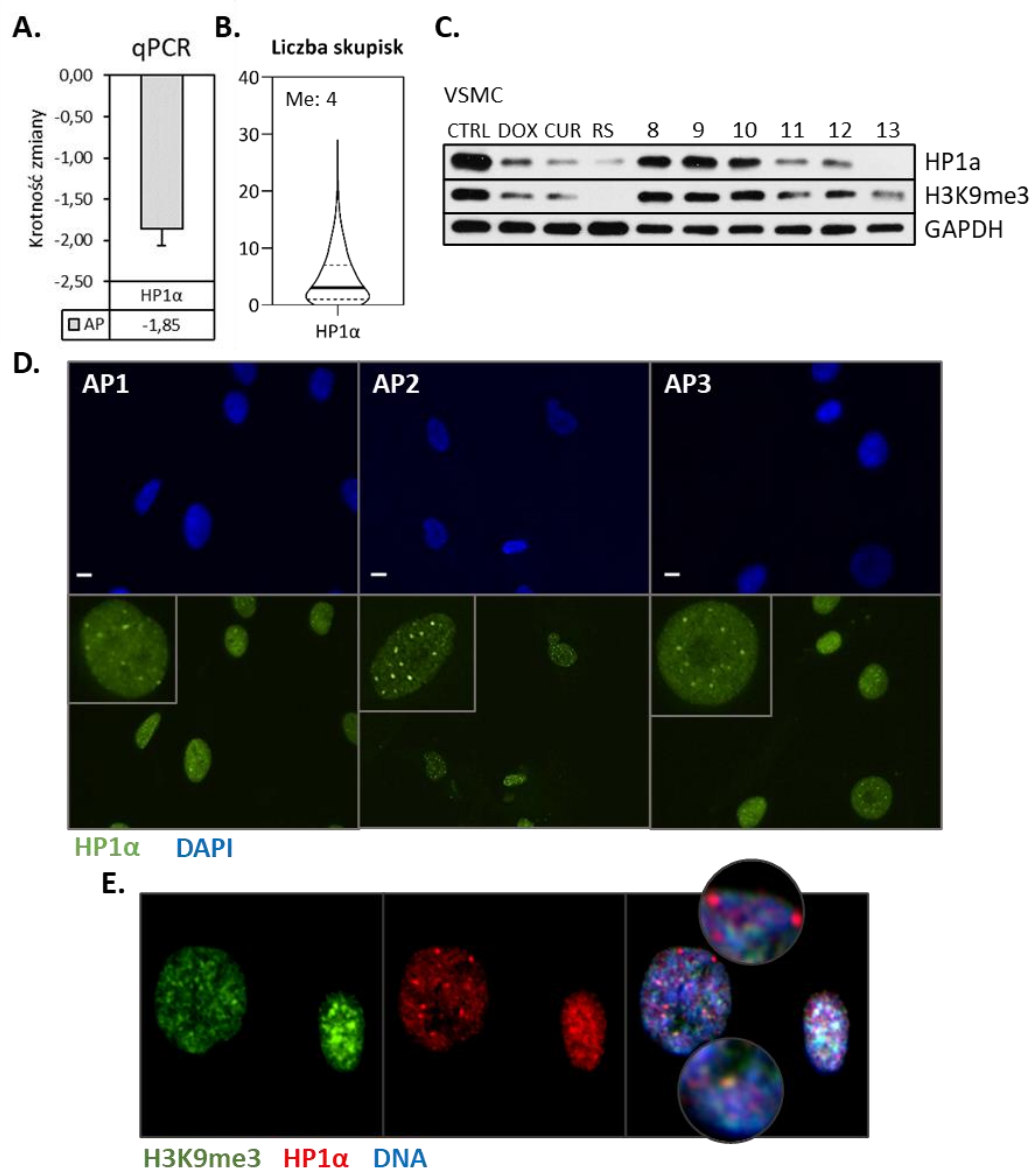
natomiast w VSMC ten sam gen rośnie trzykrotnie wyłącznie w wariacie RS. W starzeniu przyspieszonym VSMC nie zauważono istotnych zmian w ekspresji tego genu. Podobnie w przypadku *HDAC3* nie zauważono znaczących zmian w poziomie ekspresji genu ani w AP ani w VSMC. Zmniejszona ekspresja genów w komórkach AP może skutkować dalszą, zmniejszoną translacją białek i związanego z tym zaburzenia funkcjonowania badanych enzymów.

4.2.4. Analiza ekspresji białka HP1 α

Aby zbadać kierunek zmian białka HP1 α w komórkach pochodzących z blaszki miażdżycowej, przeprowadzono część oznaczeń jakie zastosowano w przypadku VSMC. Sprawdzano poziom ekspresji genu i białka, jego rozmieszczenie w jądrze oraz relację z H3K9me3. Każda z wymienionych analiz była przeprowadzona na oddzielnych zestawach komórek pochodzących od różnych dawców, a uzyskane wyniki zebrano na rycinie 4.35. Niestety ze względów technicznych dotychczasowa analiza kolokalizacji z białkiem PML oraz γ H2AX nie pozwoliła na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Badania są kontynuowane przy wykorzystaniu metody PLA (*proximity ligation assay*).

Komórki blaszki wykazują około dwukrotny niższy poziom ekspresji genu *HP1 α* , lecz należy mieć na uwadze, że wynik obrazuje zmiany jedynie dla trzech dawców, innych niż w analizach poziomu białka (Ryc. 4.34. a i C). Biorąc pod uwagę ekspresję białek, którą mierzono już dla 6 dawców, zauważono znaczący spadek jedynie w połowie badanych próbek. Druga połowa wykazuje relatywnie wysoki poziom ekspresji, czym przypominają młode VSMC. Kierunek zmian HP1 α korelował ze znacznikiem heterochromatyny, czyli H3K9me3.

Analiza wykazała, że średnia intensywność fluorescencji białka HP1 α maleje wraz ze zwiększającą się powierzchnią jąder. Podobnie jak w przypadku starzenia VSMC, dochodzi do zwiększenia liczby skupisk w dużych jądrach starych komórek w porównaniu do komórek młodych. W nich pojawiają się intensywne skupiska, lecz w mniejszej liczbie. Łączone barwienie białka HP1 α ze znacznikiem heterochromatyny H3K9me3, tak jak w przypadku starych VSMC, wskazało na wysoką zależność średniej intensywności fluorescencji między dwoma białkami (R Pearsona = 0,81). Ponadto wyniki sugerują, że skupiska HP1 α pokrywają się w niewielkim stopniu ze skupiskami H3K9me3. Może to świadczyć o tym, że w tym typie komórek z jakiegoś powodu dochodzi do zmniejszenia zdolności do oddziaływania tych białek, tak jak zauważono w VSMC w PS i RS, co może być skutkiem starzenia.



Ryc. 4.34. Analiza zmian białka HP1α w komórkach blaszki miażdżycowej. A) Spadek ekspresji genu ($n = 3$) w odniesieniu do młodych VSMC, mierzony techniką qPCR. B) Liczba skupisk białka HP1a w jądrze komórek blaszek. Mediana wynosi 4 skupiska na jądro. C) Poziom białek HP1α i H3K9me3 w komórkach pochodzących od 6 dawców (8-13) badany metodą Western blot w porównaniu do VSMC. D) Rozmieszczenie białka w jądrze komórek wyizolowanych od trzech dawców (AP1-3). E) Barwienie immunocytochemiczne kolokalizacji białka HP1α z H3K9me3. Skala 10 μm .

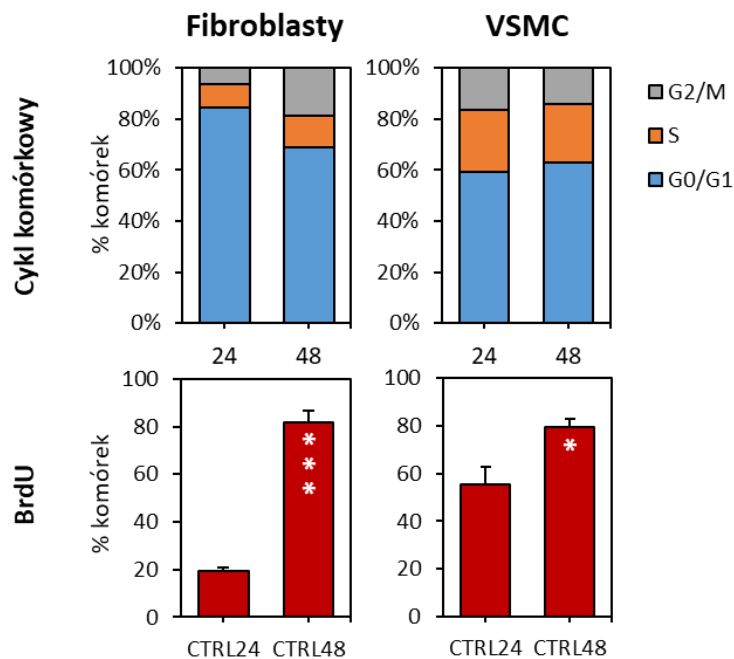
Ekspresja białka HP1α jest silnie zależna od dawcy. Zauważono, że jego poziom zwykle koreluje z poziomem ekspresji H3K9me3, choć przeważnie nie dochodzi do współwystępowania pojawiających się skupisk tych białek w jądrze starych komórek.

4.3. Analiza uniwersalności zmian w fibroblastach skóry

W celu sprawdzenia, czy zmiany obserwowane w VSMC są uniwersalne czy komórkowo specyficzne, przeprowadzono wybrane analizy na fibroblastach, które są klasycznym modelem do badania starzenia. Przed przystąpieniem do dalszego opisu badań, należy wyjaśnić zastosowanie w niektórych przypadkach dodatkowej 48-godzinnej kontroli. W Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia, podczas równoległe prowadzonych badań z wykorzystaniem ludzkich fibroblastów, zaobserwowano wpływ użycia kontroli po 24 lub 48 godzinach od wysiania na ostateczną interpretację wyników. W związku z tym, zdecydowano się wykonać wybrane oznaczenia z zastosowaniem obu punktów czasowych. W dalszym oznaczeniu wariantów nazwę kontroli 24-godzinnej skrócono do „kontrola 24” lub „24”, a 48-godzinnej do „kontrola 48” lub „48”.

4.3.1. Różnice w kinetyce podziału między VSMC a fibroblastami

Aby zrozumieć zaobserwowane różnice, koniecznym było skontrolowanie cyklu komórkowego z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej w dwóch punktach czasowych. VSMC i fibroblasty analizowano po 24 oraz 48 godzinach od wysiania.



Ryc. 4.35. Analiza kontrolnych fibroblastów i VSMC zebranych po 24 i 48h od wysiania. Ocena odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu w zależności od analizowanego punktu czasowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego (górny panel) oraz porównanie odsetka komórek zdolnych do syntezy DNA (włączenie BrdU - dolny panel) w fibroblastach i VSMC (n = 3). Istotność statystyczną wyznaczono za pomocą testu t-studenta, (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$.

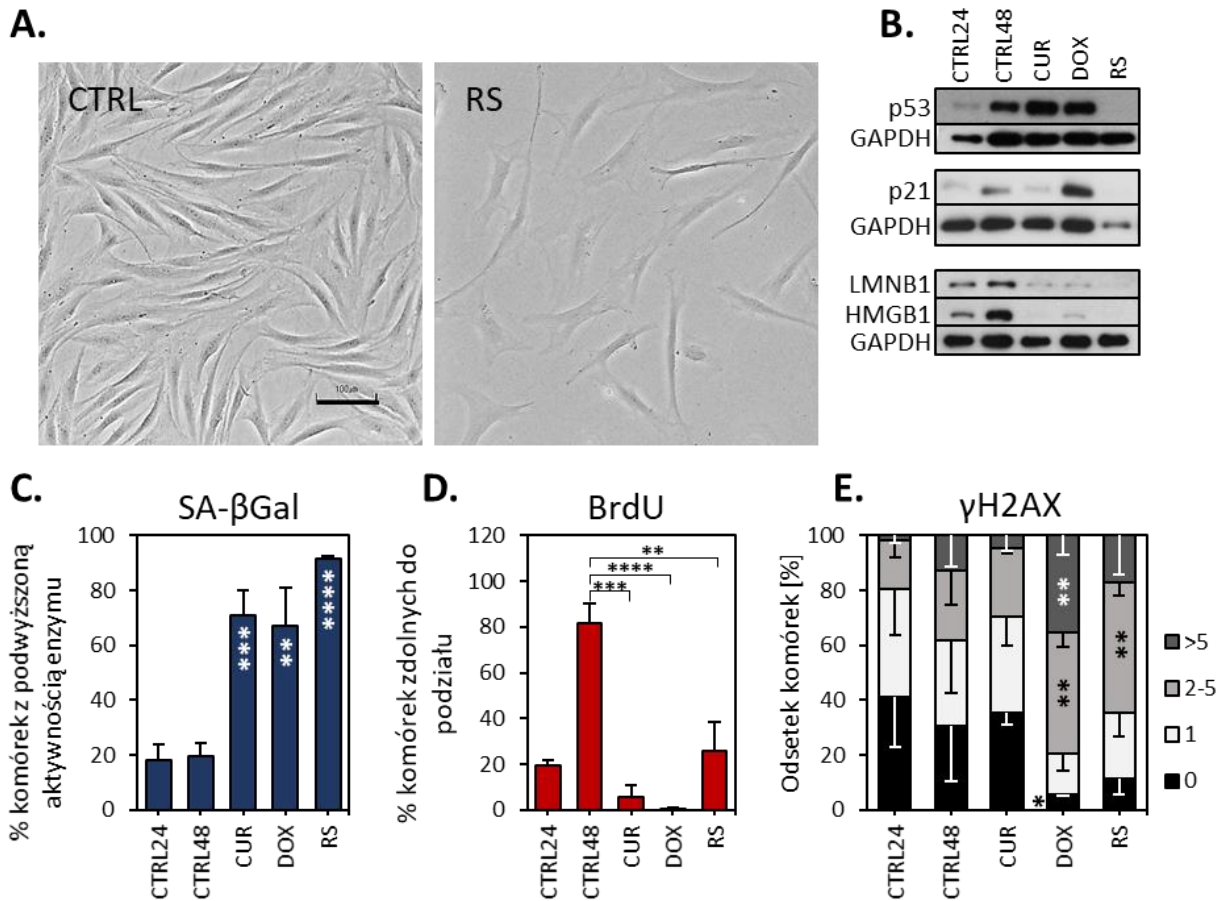
Fibroblasty po 24 godzinach od wysiania w większości znajdują się w fazie G₀/G₁ cyklu komórkowego. Dopiero po 48-godzinnej hodowli widać wzrost odsetka komórek wchodzących w fazę S oraz G₂/M (30%) (Ryc. 4.35.). Jest to czas, gdy komórki wykazują największy potencjał do podziałów (wg literatury, na wczesnych pasażach, pomiędzy 1 a 20, czas podziału komórek wynosi 30-40 h [217, 218]. Porównując, VSMC wykazują zbliżone proporcje między fazą G₀/G₁, S i G₂/M po 24 i 48 godzinach. Dodatkowo, wynik testu na proliferację (zdolność do wbudowywania BrdU do DNA) potwierdził zwiększenie odsetka dzielących się fibroblastów w kontroli 48-godzinnej. Podsumowując, użyta w badaniach VSMC kontrola 24-godzinna dobrze odzwierciedla komórki dzielące się. Natomiast w przypadku fibroblastów, należy stosować kontrolę 48-godzinną.

4.3.2. Ogólna charakterystyka starych fibroblastów oraz kontrola procesu starzenia

Podobnie jak w przypadku VSMC hodowanych *in vitro* oraz komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych, dokonano charakterystyki procesu starzenia fibroblastów, jednak w tym wypadku włączając komórki kontrolne po 48-godzinnej hodowli.

Młode fibroblasty są wydłużonego, wrzecionowatego kształtu i posiadają relatywnie małe, owalne jądro ulokowane na środku komórki. Stare komórki są bardziej płaskie i mają dość nieregularny kształt z postrzępionymi brzegami oraz wykazują się dużym wzrostem aktywności SA- β -gal w PS i RS (Ryc. 4.36.). Test na proliferację wykazał znaczący spadek odsetka komórek dzielących się jako efekt indukcji starzenia przyspieszonego. Komórki traktowane doksorubicyną niemal całkowicie zatrzymują się w cyklu (pozostaje ok. 2% dzielących się komórek), natomiast po dodaniu kurkuminy, 20% komórek nadal jest zdolnych do podziału. Komórki stare w sposób replikacyjny, z racji heterogenności populacji wynikającej z braku synchronizacji procesu, wykazują ok 25% poziom proliferacji. Białko p53 wykazuje najniższą ekspresję w kontroli 24-godzinnej oraz starzeniu replikacyjnym, a jego zwiększony poziom obserwowany był w komórkach PS. Jego poziom wzrasta również w kontroli 48-godzinnej, co związane jest z intensywnym podziałem komórkowym niosącym za sobą powstawanie naprawialnych uszkodzeń DNA (patrz wykres Ryc. 4.36. E). Z kolei drugie białko związane z zatrzymaniem w cyklu, czyli p21, wykazuje najwyższy poziom w komórkach traktowanych doksorubicyną, nieco niższy w młodej hodowli 48-godzinnej, a najniższy w trzech pozostałych wariantach (CTRL24, CUR, RS). Kolejne typowe markery starzenia, LMNB1 oraz HMGB1, wykazują znaczący spadek poziomu we wszystkich typach starzenia. Za to w komórkach kontrolnych 48-godzinnych dochodzi do wzrostu ich poziomu.

Wraz ze starzeniem indukowanym doksorubicyną, dochodzi do zwiększenia odsetka komórek z wieloma, nienaprawionymi uszkodzeniami DNA. Podobny wzrost uszkodzeń, zanotowano w komórkach starych replikacyjnie.



Ryc. 4.36. Analiza znaczników starzenia przyspieszonego i replikacyjnego fibroblastów. (A) Poglądowe zdjęcie porównujące morfologię młodych (CTRL) i starych replikacyjnie (RS) fibroblastów z zastosowaniem mikroskopii świetlnej. Skala 100 μm; (B) przykładowy obraz zmian w ekspresji znaczników starzenia takich jak p53, p21 oraz lamina B1 (LMNB1) i HMGB1; (C) ocena aktywności SA-β-gal (n = 4) i (D) poziom wbudowywania BrdU do DNA (n = 4); (E) analiza liczby uszkodzeń DNA rozpoznawanych barwieniem immunocytochemicznym z użyciem przeciwciała przeciw γH2AX (n = 3). Na wykresie przedstawiono procent komórek przynależących do danej grupy. Populację podzielono na komórki nie posiadające uszkodzeń (kolor czarny) oraz takie, w których występuje jedno (biały), dwa do pięciu (jasnoszary) i powyżej pięciu (ciemnoszary) skupisk na jądro. Do oszacowania istotności statystycznej użyto testu t-studenta względem kontroli 48-godzinnej. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01, (***) p < 0,001, (****) p < 0,0001.

Dzięki powyższym analizom, identyfikowano komórki stare w hodowli, a profil zaobserwowanych zmian zastosowanych markerów, przypominał ten widoczny w VSMC. W związku z tym, przystąpiono do dalszych analiz, w celu charakterystyki wpływu starzenia na strukturę chromatyny starych fibroblastów.

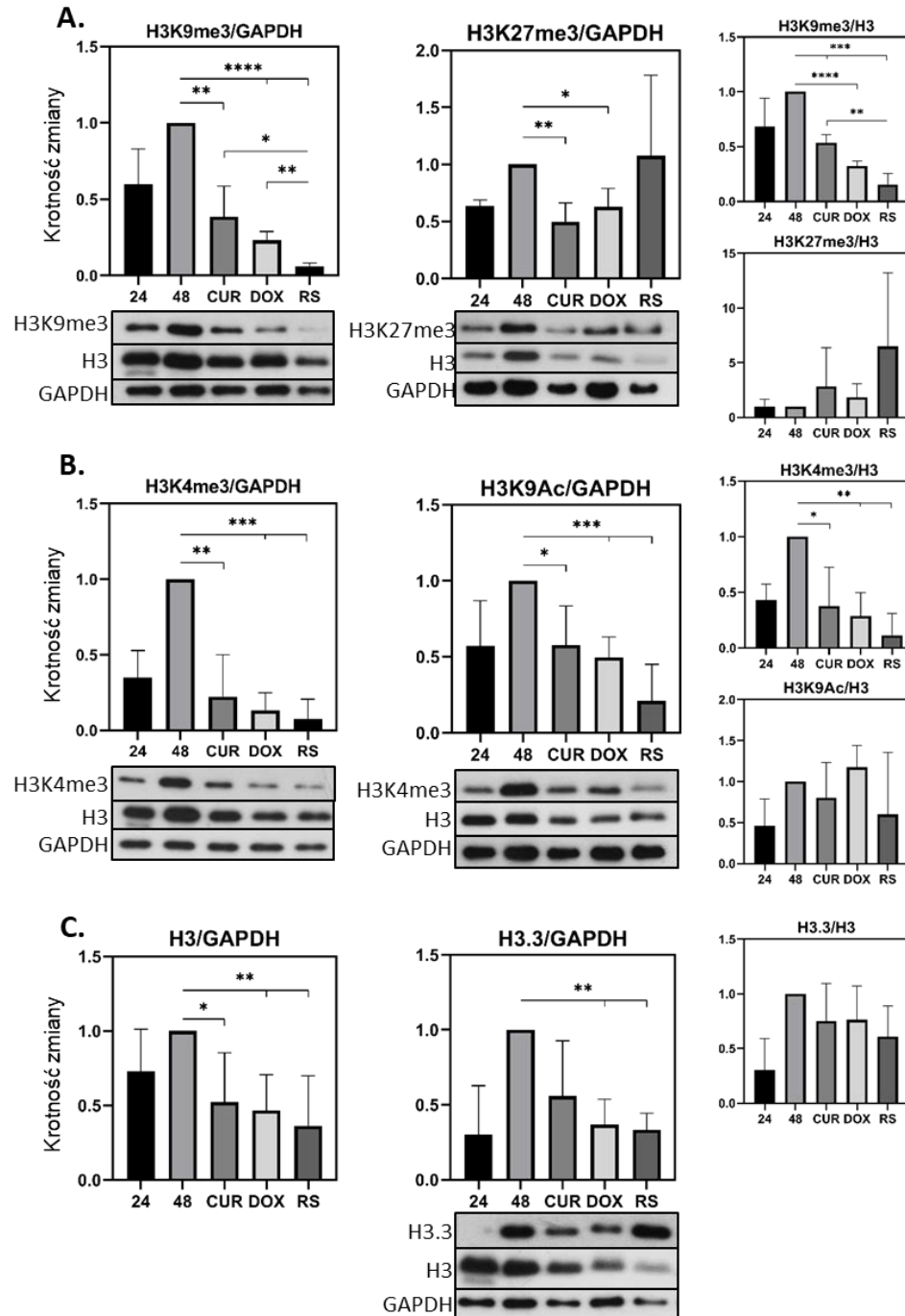
4.3.3. Zmiany w poziomie oraz organizacji modyfikacji histonu H3

Obserwowany w VSMC związany ze starzeniem spadek badanych znaczników hetero- i euchromatyny, skłonił nas do sprawdzenia uniwersalności zachodzących zmian. W tym celu zbadano ludzkie fibroblasty poddane tym samym typom starzenia. Tak jak opisano wyżej, do analiz poziomu białek metodą Western blot dołączono kontrolę 48-godzinną, która reprezentowała komórki intensywnie proliferujące, odpowiadające 24-godzinnej kontroli VSMC (Ryc. 4.37.). W związku z tym analizy kierunku zmian w poziomie białek oraz obliczenia istotności statystycznej wykonano względem kontroli 48-godzinnej, a otrzymane wykresy zamieszczono na rycinie 4.38. Dla uwidocznienia różnicy między dwoma punktami czasowymi w komórkach kontrolnych i pokazania jak istotne jest to dla prawidłowej interpretacji wyników, postanowiono zachować wyniki dla kontroli 24-godzinnej.

We wszystkich badanych białkach, ich poziom w kontroli 24 jest o wiele niższy niż w kontroli 48, choć nie zawsze zmiana jest istotna statystycznie (nawet jeśli zmiana była istotna to nie pokazano jej na wykresach). Ponadto, gdy porównano kontrolę 24 z poziomem białek w komórkach poddanych starzeniu, wydaje się, że nie dochodzi do znaczących zmian w ich poziomie, co błędnie sugeruje brak wpływu starzenia na badane markery.

Natomiast przeprowadzona analiza porównawcza z kontrolą 48-godzinną, wykazuje zauważalny spadek badanych znaczników. Tak jak w przypadku VSMC, dochodzi do znacznego spadku trimetylacji lizyny 9 w obu typach starzenia. Obserwowano również znaczące różnice między starzeniem przyspieszonym a replikacyjnym. W starzeniu przyspieszonym można zauważyć znaczący spadek trimetylacji lizyny 27, natomiast w starzeniu replikacyjnym, nie dochodzi do istotnych zmian. Wydaje się więc, że poziom tego znacznika jest równie wysoki jak w komórkach silnie proliferujących. Znaczniki euchromatyny wykazują podobny trend jak te analizowane w VSMC, czyli zauważalny spadek w obu typach starzenia. Niemniej ani w przypadku H3K4me3, ani H3K9Ac nie widać różnic między starzeniem przyspieszonym a replikacyjnym (w przeciwieństwie do obserwacji w komórkach VSMC).

Oprócz zauważalnego spadku badanych modyfikacji w obu typach starzenia, dochodzi również do spadku samego histonu H3, jak i jego wariantu H3.3.



Ryc. 4.37. Zmiany w poziomie modyfikowanego histonu H3, jego wariantu H3.3 oraz samego histonu H3 analizowane metodą Western blot w fibroblastach. (A) Przykładowy obraz zmian znaczników heterochromatyny, (B) euchromatyny oraz (C) samego histonu H3 i jego wariantu H3.3. Obliczenia densytometryczne przygotowano na podstawie min. trzech powtórzeń. Dwie pierwsze kolumny przedstawiają spadek poziomu białka w odniesieniu do kontroli 48-godzinnej, uprzednio normalizowanego do GAPDH. Trzecia kolumna obrazuje zmiany poziomu w odniesieniu do całkowitego histonu H3, również w odniesieniu do kontroli 48-godzinnej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą niesparowanego testu t-studenta: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Poziom badanych znaczników normalizowano również względem całkowitego histonu H3. Tak samo jak w przypadku VSMC (również normalizowanych do H3), profil zmian H3K9me3 oraz H3K4me3 pokrywał się z ogólnym spadkiem modyfikacji. Fibroblasty w przeciwieństwie do VSMC, wykazują się wzrostem H3K27me3 w starzeniu replikacyjnym oraz niemal niezmiennym profilem acetylacji lizyny 9. Podobnie niewielkie zmiany zaobserwowano w przypadku wariantu H3.3.

Podsumowując, gdy porównywano poziom modyfikacji histonów (normalizowanych do GAPDH) w starych komórkach do komórek proliferujących (kontrola 48), profil ekspresji H3K9me3, H3K4me3 oraz H3K9Ac przypominał ten obserwowany w komórkach VSMC. Wydaje się więc, że spadek tych modyfikacji jest uniwersalnym znacznikiem starzenia komórkowego. Wyjątkiem okazała się trimetylacja lizyny 27. W ulegających starzeniu replikacyjnemu fibroblastach, w przeciwieństwie do VSMC, nie obserwowano znaczących zmian w porównaniu do komórek proliferujących. Ponadto dochodzi do związanego ze starzeniem ogólnego spadku histonu H3, co może skutkować ubytkiem nukleosomów i rozluźnieniem chromatyny. Analiza poziomu modyfikacji z uwzględnieniem czasu hodowli użytej kontroli wykazała, że komórki po 24 godzinach od wysiania charakteryzują się niskim poziomem wszystkich badanych modyfikacji. Jest to związane z opóźnionym wejściem komórek w cykl.

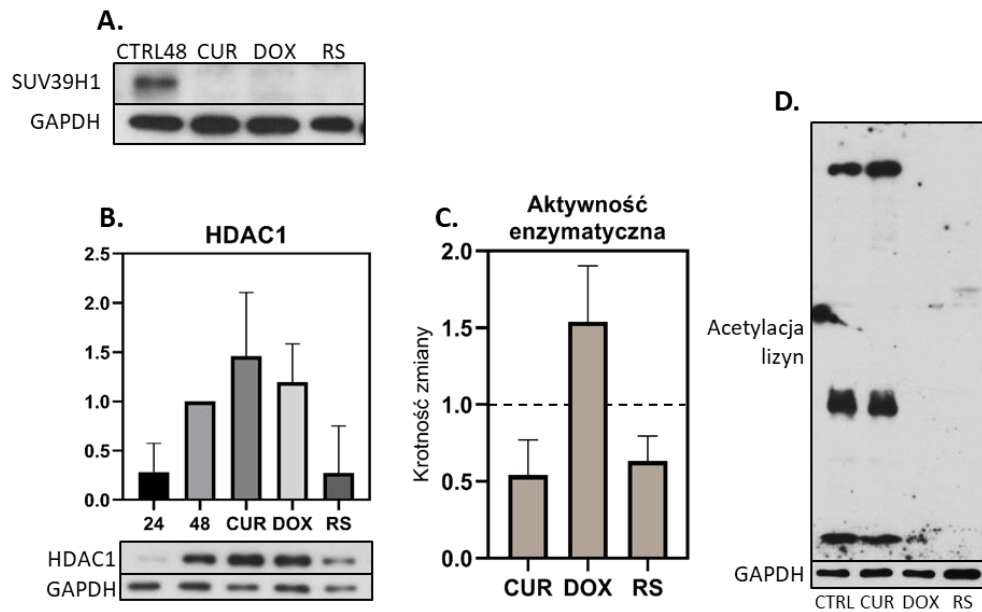
Analiza białek obrazowanych podczas barwienia immunocytochemicznego wykazała istotne podobieństwa w rozmieszczeniu wszystkich znaczników oraz ich intensywności barwienia fibroblastów do VSMC. Starzeniu towarzyszył spadek wszystkich znaczników. Komórki młode charakteryzowały się najintensywniejszą i najbardziej zróżnicowaną intensywnością barwienia wszystkich badanych modyfikacji. Podobnie trimetylacja lizyny 9 wykazywała wyższy sygnał fluorescencji niż trimetylacja lizyny 27, a znaczniki euchromatyny, tak samo jak w VSMC lokalizowały się w całym jądrze z wyjątkiem jąderka. W przeciwieństwie do VSMC, nie zauważono charakterystycznych skupisk chromatyny obrazowanej DAPI, czyli SAHF w żadnym z badanych typów starzenia. Wydaje się więc, że nie dochodzi do ich powstawania ani pod wpływem doksorubicyny lub kurkuminy, ani w wyniku wyczerpania podziałów.

4.3.4. Enzymy modelujące strukturę chromatyny

Przeprowadzono analizę wybranych enzymów zaangażowanych w regulację poziomu znaczników chromatyny tj. metylotransferazy SUV39H1 oraz deacetylaz histonów, w tym białka HDAC1. Podobnie jak w VSMC dochodzi do zahamowania ekspresji białka SUV39H1 niezależnie od typu starzenia.

Niestety, z przyczyn technicznych nie udało się uzyskać jednoznacznych danych dotyczących lokalizacji tego białka w komórce.

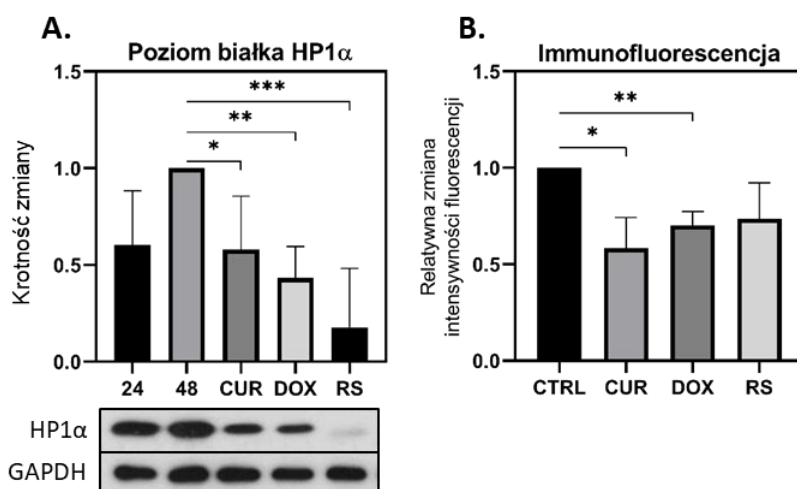
W przeciwieństwie do VSMC, poziom ekspresji białka HDAC1 rośnie w starzeniu przyspieszonym, a maleje w starzeniu replikacyjnym (w porównaniu do kontroli 48-godzinnej) (Ryc. 4.38.). Zmiany te są jednak nieistotne statystycznie. Jednakże najwyższy wzrost poziomu zanotowany w komórkach traktowanych kurkuminą nie miał odzwierciedlenia w aktywności deacetylaz. Ich poziom spada około dwukrotnie w porównaniu do młodych komórek. Podobna sytuacja ma miejsce w komórkach starych replikacyjnie. Natomiast najwyższy poziom aktywności deacetylaz zaobserwowano w komórkach poddanych działaniu doksorubicyny. Sprawdzenie poziomu acetylacji lizyn w białkach wykazało spadek ilości tylko w przypadku komórek traktowanych doksorubicyną oraz poddanych starzeniu replikacyjnemu. Być może jest to efektem wzrostu aktywności deacetylaz po traktowaniu doksorubicyną. Spadek acetylacji białek obserwowany w RS sugerują bardziej złożony mechanizm i niewykluczone, że dochodzi do zmian w ilości lub aktywności innych enzymów związanych z regulacją acetylacji białek.



Ryc. 4.38. Zmiany w poziomie białka SUV39H1 oraz aktywności enzymatycznej deacetylaz histonów i ekspresji białka HDAC1 podczas obu typów starzenia PS i RS. A) Poziom metylotransferazy SUV39H1. B) Poziom białka HDAC1 w zależności od wariantu eksperymentalnego. Wykres przedstawia analizę densytometryczną w odniesieniu do kontroli 48-godzinnej, a pod nim zamieszczono przykładowy wynik Western blot (n = 3). C) Aktywność enzymatyczna deacetylaz histonów (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8, HDAC10 i HDAC11) w odniesieniu do kontroli 48-godzinnej. D) Poziom globalnej acetylacji lizyn obecnych w białkach badany metodą Western blot. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach biologicznych.

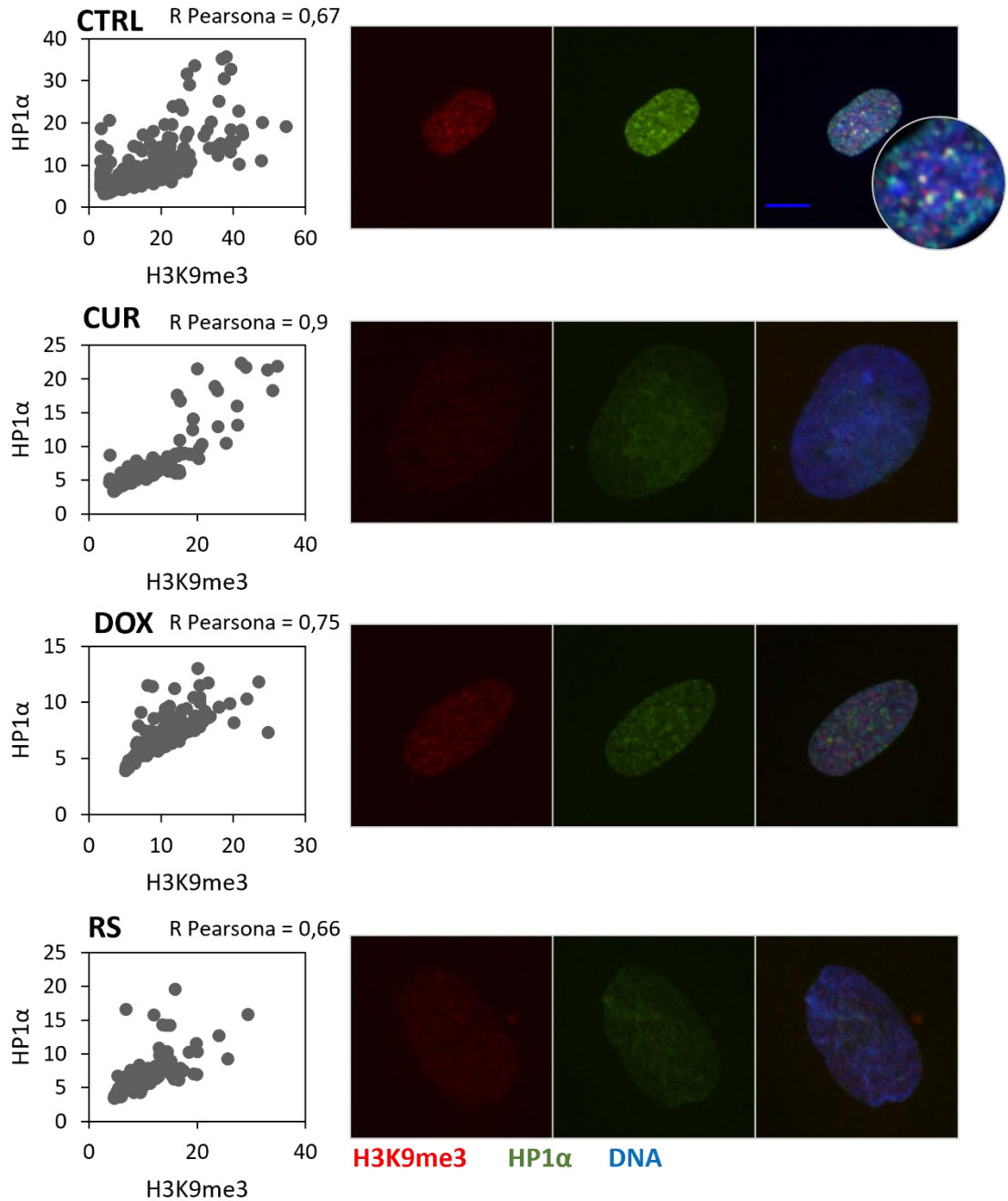
4.3.5. Zmiany dotyczące białka HP1 α

Ekspresja białka HP1 α ulegała zmniejszeniu we wszystkich typach starzenia, ale największy zanotowano w komórkach starych replikacyjnie (Ryc. 4.39.). Ponadto, podczas starzenia dochodzi również do spadku intensywności barwienia immunocytochemicznego. Podobnie jak VSMC, młode fibroblasty wykazują się zarówno wysoką, jak i zróżnicowaną intensywnością fluorescencji, a w młodych fibroblastach obserwowano największą liczbę skupisk skondensowanej chromatyny. Jednakże w przeciwieństwie do komórek mięśni gładkich naczyń, podczas starzenia fibroblastów nie obserwowano akumulacji skupisk HP1 α w jądrze (Ryc. 4.40.).



Ryc. 4.39. Analiza ekspresji białka HP1 α w fibroblastach. A) Poziom ekspresji białka w zależności od typu starzenia w odniesieniu do kontroli 48-godzinnej, mierzone metodą Western blot. Wykres przedstawia wynik z densytometrii, a pod nim znajduje się przykładowe zdjęcie. B) Pomiar intensywności fluorescencji w zależności od typu starzenia w odniesieniu do młodych komórek (oznaczone jako CTRL). Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Tak jak w VSMC, analizowano wzajemną zależność oraz współwystępowanie białka z H3K9me3. Zauważono, że do współwystępowania obu białek dochodzi najczęściej w młodych komórkach kontrolnych, co może przyczyniać się do kondensacji i stabilizacji chromatyny (Ryc. 4.40.). Jak wspomniano, w odróżnieniu od VSMC, w starzejących się fibroblastach (niezależnie od typu starzenia) nie dochodzi do tworzenia wielu skupisk HP1 α , przez co nie pojawiają się miejsca wspólnej lokalizacji z H3K9me3. Aczkolwiek wysoki wskaźnik korelacji w starzeniu przyspieszonym wskazuje na wysoką zależność w poziomie między tymi dwoma białkami. Niestety z przyczyn technicznych nie udało się zbadać zależności między HP1 α a białkiem PML i γ H2AX. Badania będą kontynuowane przy wykorzystaniu techniki PLA.



Ryc. 4.40. Interakcja białka HP1 α ze znacznikiem heterochromatyny H3K9me3 w zależności od czynnika indukującego starzenie fibroblastów. Lewy panel przedstawia zależność (korelacja Pearsona) średniej intensywności fluorescencji między HP1 α a H3K9me3. Prawy panel obrazuje współwystępowanie skupisk obu białek. Skala 10 μ m.

4.4. Nowe potencjalne znaczniki starzenia – białka anilina (ANLN) oraz kładyna-1 (CLDN1)

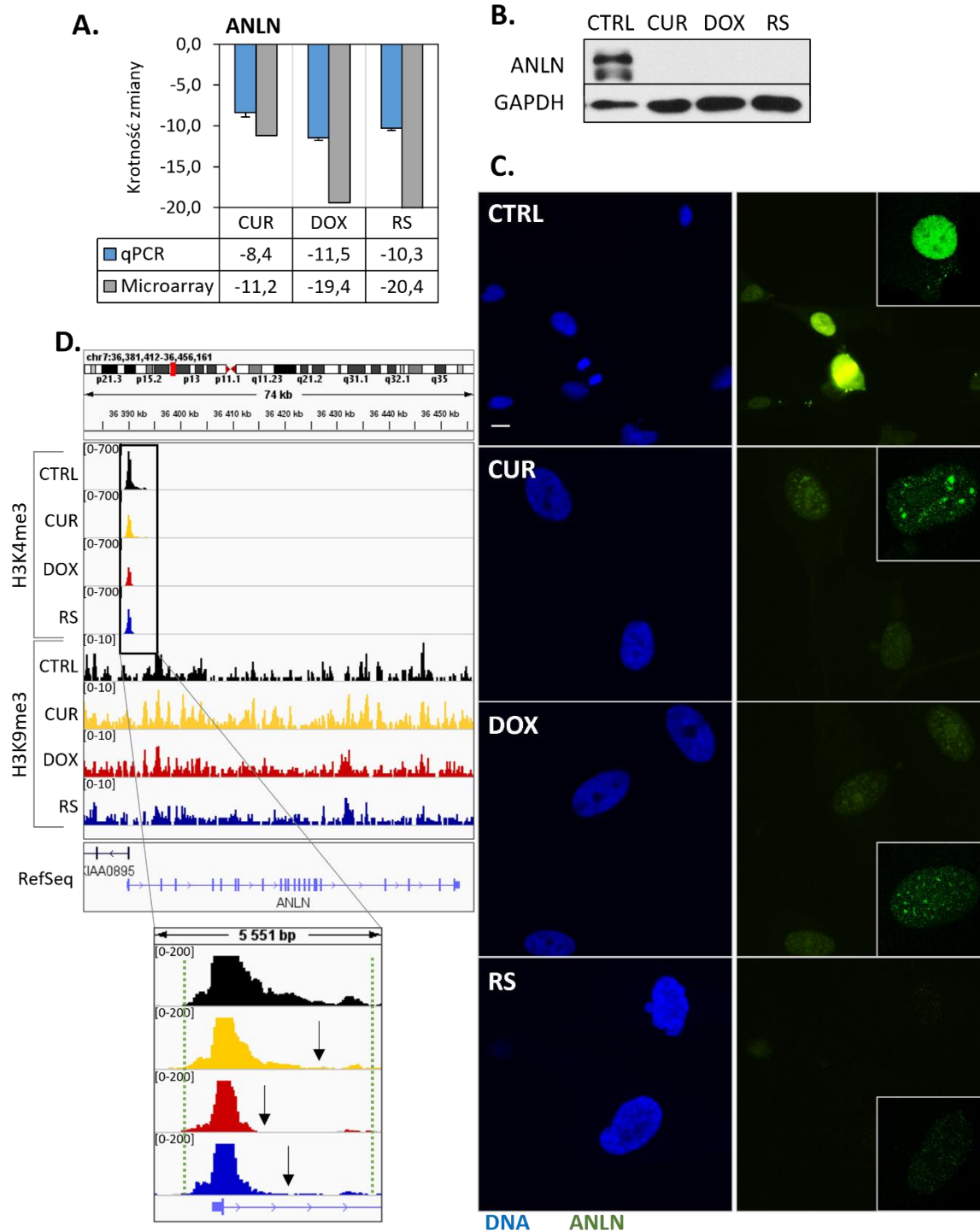
4.4.1. Analiza białek z zastosowaniem VSMC *in vitro*

Jak już wspomniano, opisane w niniejszym rozdziale wyniki transkryptomyczne stanowiły punkt wyjścia do poszukiwań nowych, potencjalnych markerów starzenia. Do dalszych badań zdecydowano się wybrać jeden gen ulegający zmianom w obu typach starzenia oraz taki, który jest charakterystyczny tylko dla starzenia przyspieszonego. Ostatecznie wybrano anilinę (ANLN) oraz kładynę-1 (CLDN1).

Anilina jest kluczowym białkiem biorącym udział w procesie cytokinezy. Pełni jedną z głównych ról w formowaniu pierścienia kurczliwego i wraz z aktyną, pomaga w rozdzieleniu dwóch nowopowstałych komórek. Ponadto, ANLN jest obserwowana w jądrze komórek, sugerując jej dodatkową, nie do końca poznaną jeszcze rolę.

Anilina należy do czołówki białek o największym spadku poziomemu transkryptu obserwowanym w obu typach starzenia. Uzyskany wynik potwierdzono dodatkowo reakcją łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym oraz na poziomie białka metodą Western blot (Ryc. 4.41.). Podwójny prążek, który jest zauważalny poniżej głównego (o masie molekularnej 124 kDa) może sugerować istnienie izoformy tego białka. Następnie sprawdzono lokalizację aniliny w komórce. Barwienie pokazało, że w młodych komórkach anilina znajdowała się w pierścieniu kurczliwym dzielących się komórek oraz intensywny i równomierny sygnał pojawiał się w jądrze interfazowym, co było zgodnie z dotychczasowymi doniesieniami. Jednakże w jądrze komórek poddanych obu typom starzenia, sygnał odzwierciedlający ilość białka był zdecydowanie niższy. Ponadto w odróżnieniu od młodych komórek, w tych traktowanych doksorubicyną lub kurkuminą dochodzi do tworzenia nieregularnych skupisk lokalizujących się w miejscach luźnej chromatyny, a niekiedy nawet w jąderku (Ryc. 4.41. C, prawy róg prawego panelu). Poczynione obserwacje sugerują, iż jest to cecha komórek starych w sposób przyspieszony, gdyż taki wzór barwienia w komórkach starych replikacyjnie występuje sporadycznie. Po wstępnych analizach dotyczących ekspresji i lokalizacji aniliny, postanowiono przyjrzeć się mechanizmom regulacji ekspresji genu i przestudiować profil wzbogacenia regionu we wspomniane wcześniej modyfikacje histonów, czyli aktywującą H3K4me3 oraz represyjną H3K9me3. W miejscu promotorowym (startu transkrypcji) można zauważyć wysokie pokrycie modyfikacją H3K4me3 we wszystkich badanych wariantach eksperymentalnych, lecz największe zanotowano dla kontroli (około dwa razy większe niż w przypadku starzenia przyspieszonego czy replikacyjnego). Jak widać na dolnym panelu ryciny. 4.41. D, w komórkach kontrolnych wzbogacenie w H3K4me3 obejmuje znacznie więcej

zasad obszaru TSS niż w pozostałych wariantach, tworząc tak zwany szeroki pik (*broad peak*). Jest to odpowiednio CTRL – 4242, CUR – 2786, DOX – 1497 i RS – 1704 zasad. Może to wpływać na większą otwartość chromatyny i łatwiejszy dostęp maszynerii transkrypcyjnej do miejsc startu transkrypcji [219], co skutkuje wysoką ekspresją genu w młodych komórkach. W przypadku wzbogacenia H3K9me3 nie zauważono znaczącego wzrostu sygnału w żadnym z wariantów starzenia, który mógłby wytłumaczyć zahamowaną ekspresję *ANLN*. Najprawdopodobniej nie dochodzi do kondensacji chromatyny w rejonie genu, która byłaby odpowiedzialna za spadek transkrypcji. Zatem zaobserwowane zahamowanie ekspresji w starzeniu musi być regulowane na drodze innych mechanizmów.

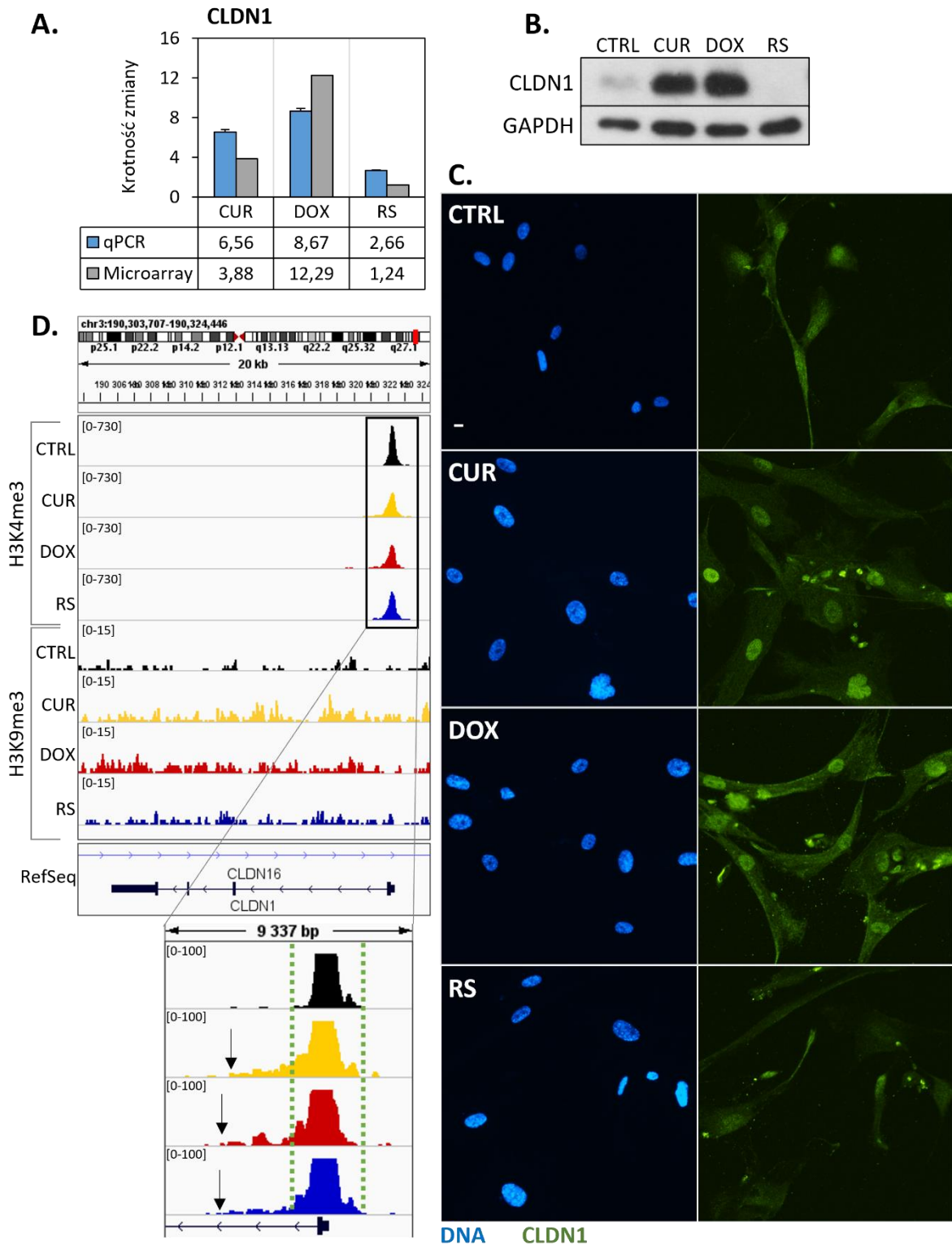


Ryc. 4.41. Analiza poziomu mRNA i białka oraz reorganizacji aniliny jądrowej podczas starzenia przyspieszonego i replikacyjnego. A) Ekspresja genu obserwowana w obu typach starzenia, oznaczana za pomocą mikromacierzy oraz qPCR i wyrażana jako krotność zmian (FC) względem komórek kontrolnych. B) Przykładowy obraz poziomu białka oznaczony za pomocą metody Western blot ($n = 5$). C) Lokalizacja białka zależna od typu starzenia. W mniejszym kwadracie przedstawiono szczegółowy obraz skupisk obecnych w starzeniu przyspieszonym uzyskany dzięki mikroskopii konfokalnej ($n = 3$). Skala $10 \mu\text{m}$. D) Widok fragmentu genomu z przeglądarki genomowej

Integrative Genomics Viewer (IGV) kodującego białko ANLN przedstawiający wzbogacenia w modyfikacje H3K4me3 oraz H3K9me3 uzyskane metodą CHIP-seq. Kolorem czarnym oznaczono komórki młode, żółtym komórki traktowane kurkuminą, czerwonym komórki traktowane doksorubicyną a niebieskim komórki stare replikacyjne. Po lewej stronie ścieżek w nawiasach kwadratowych zaznaczono skalę wzbogacenia w odczyty. W panelu poniżej przybliżony obszar pierwszego egzonu/TSS ANLN oraz rozkład H3K4me3 na długości 5551 pz w genomie. Przerywaną zieloną linią zaznaczono granicę wzbogacenia w komórkach kontrolnych, a czarnymi strzałkami zaznaczono granice występowania H3K4me3 w starych komórkach.

Drugie wybrane białko, kładyna-1, wraz z innymi 19 kładynami, okładynami, białkami JAM oraz białkami strefy zamykającej (zonula occludens-1, ZO-1), tworzy połączenia ściste między komórkami, a do jej funkcji należy kontrola przepuszczalności nabłonka. Poprzez interakcję z białkami zaangażowanymi w tworzenie połączeń ścisłych z aktyną i cytoszkieletem, mogą wpływać na strukturę komórki i jej zdolność do migracji. Ponadto kładyny odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej polaryzacji błony komórkowej oraz w rozwoju organizmów i różnicowaniu komórek. Wyciszenie genu *Cldn1* u myszy i prowadzi do zaburzeń przepuszczalności nabłonka i w efekcie śmierci tuż po urodzeniu w wyniku odwodnienia [220]. Kładyna 1 jest najczęściej spotykana w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych (zwłaszcza tych tworzących barierę krew-mózg), komórkach warstwy podskórnej lub między komórkami nabłonka wyściełającego wewnątrz jelit.

Podczas starzenia przyspieszonego dochodzi do znaczącego wzrostu ekspresji genu *CLDN1*, co ma przełożenie na zwiększony poziom białka w komórce (Ryc. 4.42.). W starzeniu replikacyjnym dochodzi do około 2,5-krotnego wzrostu poziomu mRNA, jednakże nie obserwowano wzrostu ilości białka, którego poziom jest podobny jak w komórkach młodych. Ciekawej obserwacji dostarczyło barwienie immunofluorescencyjne. W komórkach młodych, białko znajdowało się w cytoplazmie, a tylko w nielicznych przypadkach można było zaobserwować słaby sygnał w jądrze. W komórkach poddanych starzeniu replikacyjnemu dochodzi do spadku sygnału w cytoplazmie, a sygnał w jądrze jest rzadko spotykany. Natomiast komórki traktowane zarówno doksorubicyną jak i kurkuminą, wykazują silniejszy sygnał fluorescencji w jądrze komórkowym. Przejście białka CLDN1 z cytoplazmy do wnętrza jądra jest charakterystyczną cechą jedynie komórek ulegających starzeniu w sposób przyspieszony.



Ryc. 4.42. Analiza poziomu mRNA i białka oraz reorganizacji kładuny-1 podczas starzenia przyspieszonego i replikacyjnego. A) Wykres przedstawiający poziom ekspresji genu, który oznaczano za pomocą mikromacierzy oraz qPCR, a zmianę przedstawiono jako krotność zmian (FC) względem kontroli. B) Przykładowy obraz poziomu

białka analizowany za pomocą metody Western blot (n = 3). C) Barwienie immunocytochemiczne ukazujące lokalizację białka w zależności od typu starzenia. Skala 10 μm . D) Widok fragmentu genomu z przeglądarki genomowej Integrative Genomics Viewer (IGV) kodującego białko CLDN1, przedstawiający wzbogacenia w modyfikacje H3K4me3 oraz H3K9me3. Wyniki uzyskano przy wykorzystaniu metody ChIP-seq. Kolorem czarnym oznaczono komórki młode, żółtym komórki traktowane kurkuminą, czerwonym komórki traktowane doksorubicyną a niebieskim komórki stare replikacyjne. Po lewej stronie ścieżek w nawiasach kwadratowych zaznaczono skalę wzbogacenia w odczyty. W panelu poniżej pokazano przybliżenie obszaru pierwszego egzonu CLDN1 oraz rozkład H3K4me3 na długości 9337 pz w genomie. Przerwaną zieloną linią zaznaczono granice wzbogacenia w komórkach kontrolnych, a czarnymi strzałkami zaznaczono granicę występowania H3K4me3 w starych komórkach.

Biorąc pod uwagę otrzymane metodą ChIP-seq wyniki zauważono, że w komórkach kontrolnych dochodzi do największego pokrycia rejonu TSS genu znacznikiem H3K4me3, tworząc tym samym charakterystyczny wąski i wysoki pik. Znaczenie szerszym pikiem (wzbogaceniem) charakteryzują się komórki stare PS i RS. Możliwe, że większy obszar zajmowany przez H3K4me3 wpływa na zwiększony poziom zarówno genu jak i białka w komórkach CUR i DOX poprzez stworzenie łatwiejszego dostępu czynników transkrypcyjnych oraz polimeraz do nici DNA w tych miejscach. Z drugiej strony, podobny profil wzbogacenia zanotowano w RS, jednakże tam ekspresja genu i synteza białka pozostają niezmienione i są na podobnym poziomie co w CTRL. Najprawdopodobniej w kontrolę ekspresji CLDN1 zaangażowane są inne mechanizmy, które na ten moment pozostają niewyjaśnione.

Powyższe białka mogą posłużyć jako nowe markery starzenia oraz być pomocne w odróżnieniu jego typu, PS vs RS. Oczywiście są to dopiero wstępne wyniki, wymagające dalszych, szczegółowych badań. Niemniej oba markery zostały zastosowane w próbie identyfikacji typu starzenia zachodzącego w komórkach z blaszek miażdżycowych, a uzyskane wyniki opisano w kolejnym podrozdziale.

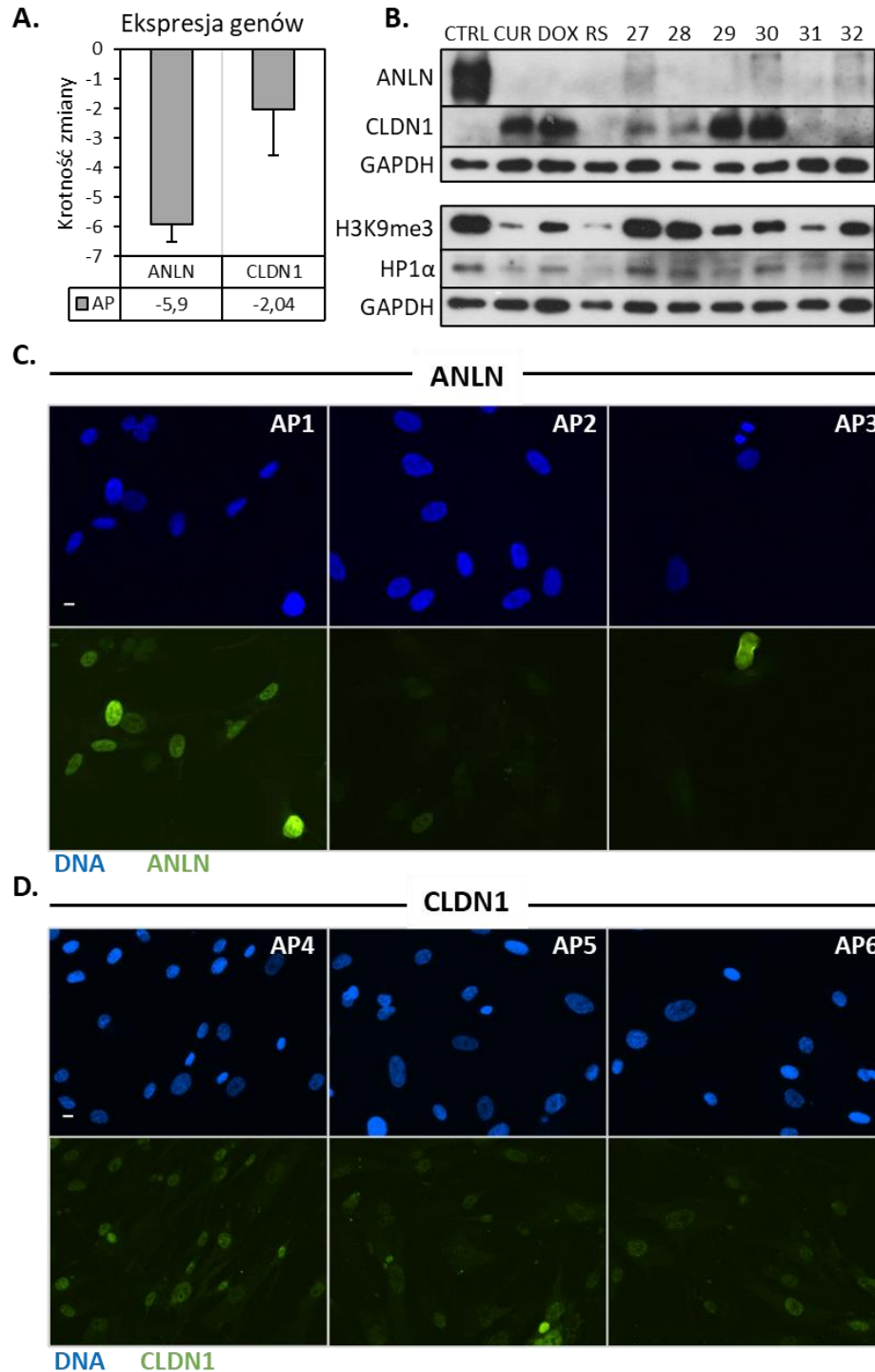
4.4.2. Analiza białek w komórkach blaszki *in vivo/ex vivo*

Ze względu na obiecujące wyniki wstępne uzyskane dla komórek mięśni gładkich naczyń, postanowiono sprawdzić ekspresję genu i syntezę wytypowanych białek, w komórkach izolowanych z blaszek. Na rycinie 4.43. pokazano zbiorcze wyniki dotyczące zarówno ANLN jak i CLDN1. Dodatkowo, na tym samym zestawie lizatów białkowych z komórek z blaszek miażdżycowych, przeprowadzono analizę Western blot białka HP1 α oraz modyfikacji H3K9me3 w celu znalezienia potencjalnych zależności w poziomie. Uzyskane wyniki skonfrontowano z komórkami VSMC.

W komórkach blaszek miażdżycowych dochodzi do około 6-krotnego spadku ekspresji genu *ANLN*. Ponadto, we wszystkich badanych próbkach (numery 27-32) obserwowano obniżony poziom białka, co może sugerować zatrzymanie podziałów komórkowych. Jedynie w próbkach 27, 30 i 32 można

wykryć obecność śladowych ilości białka. Intensywność barwienia immunocytochemicznego oraz lokalizacja białka w komórce jest silnie zależna od dawcy. W większości, sygnał fluorescencji rejestrowano w jądrze komórkowym i rozkładał się on równomiernie. W żadnym badanym preparacie nie zauważono powstawania charakterystycznych skupisk ANLN, jakie obserwowano w VSMC ulegających starzeniu w sposób przyspieszony. Nie dochodziło również do akumulacji w jąderku. Niekiedy można było zauważyć lokalizację białka w bruzdzie podziałowej, ale było to bardzo rzadkie.

W przypadku genu *CLDN1*, również dochodzi do spadku jego ekspresji, jednakże na poziomie białka zaobserwowano duże zróżnicowanie. Największy wzrost zanotowano w komórkach dawcy 29 oraz 30, w czym przypominały VSMC traktowane dokсорubicyną oraz kurkuminą. Biorąc pod uwagę towarzyszący im spadek ekspresji anilliny, można przypuszczać, że w tych komórkach doszło do starzenia przyspieszonego. Obserwowany niewielki wzrost ekspresji białka w komórkach od dawcy 27 i 28, może również sugerować obecność komórek ulegających starzeniu przyspieszonemu, lecz ich odsetek w populacji może być niewielki. Natomiast, starzenie replikacyjne mogło zajść w komórkach od dwóch ostatnich dawców, gdyż brak jest zarówno *CLDN1* jak i ANLN. Taki sam wzór ekspresji obu białek widoczny jest w komórkach VSMC w wariacie RS. Analiza barwienia immunocytochemicznego pokazała, że tak jak w przypadku ANLN (i wszystkich badanych wcześniej białek), intensywność barwienia oraz lokalizacja *CLDN1* jest wysoce zróżnicowana i zależna od dawcy. Należy jednak pamiętać, że barwienie obu białek przeprowadzono na komórkach od różnych pacjentów i porównanie ich ze sobą nie jest w pełni uprawnione. W komórkach od niektórych dawców obserwowano większy odsetek komórek z zauważalnym sygnałem fluorescencji w jądrze, a w niektórych są to tylko pojedyncze komórki. W takich przypadkach najczęściej dochodzi do ogólnego spadku intensywności fluorescencji w całej komórce, tak jak w starych replikacyjnie VSMC. Być może dochodzi tutaj do występowania obu typów starzenia.



Ryc. 4.43. Poziom ekspresji genów i białek ANLN i CLDN1 w komórkach pochodzących z blaszek miażdżycowych. A) Ekspresja genów zmierzona techniką qPCR (n = 3). B) Poziom białek zobrazowany metodą Western blot (n = 6) (27-32) w zestawieniu z VSMC. Dodatkowo zamieszczono obraz zmian modyfikacji H3K9me3 oraz białka HP1α w celu porównania poziomu białka. C) i D) Barwienie immunofluorescencyjne obrazujące lokalizację białka ANLN i CLDN1 w komórce. Skala 10 μm.

Porównując powyższe wyniki z poziomem białek HP1 α oraz H3K9me3 w tych samych blaszkach, można zauważyć, że w próbkach 29 i 30 obserwowana jest mniejsza ilość obu tych białek, przy równoczesnym spadku ANLN i wzroście CLDN1. Taki sam wzór zmian dotyczących tych czterech białek jest charakterystyczny dla starzenia przyspieszonego w VSMC. Najwyższy poziom H3K9me3 i HP1 α zanotowano dla próbek 27 i 28, czym przypominają młode VSMC. Poniękad potwierdza to przypuszczenie, że w komórkach od tych dawców, pomimo niewielkiego wzrostu CLDN1, mogą być obecne komórki o „młodym” fenotypie. W próbce o numerze 31 dochodzi do największego spadku poziomu H3K9me3 oraz HP1 α , a towarzyszący im spadek CLDN1 i ANLN przypomina wariant RS w VSMC. Najprawdopodobniej w populacji tych komórek przeważają komórki stare replikacyjnie. Ostatnia próbka (nr 32) wykazuje najmniej spójny profil poziomu czterech badanych białek, ponieważ dochodzi do znacznego spadku ekspresji ANLN i CLDN1, co sugeruje zajście starzenia replikacyjnego w komórkach, natomiast obserwowany poziom H3K9me3 i HP1 α przypomina ten zanotowany w próbce 29 i 30, czyli wskazujący na starzenie przyspieszone. Możliwe również, że w tej próbce obecna była pewna liczba komórek młodych, które wpłynęły na większy poziom H3K9me3 oraz HP1 α .

Podsumowując, w celu oznaczenia typu starzenia zachodzącego w komórkach izolowanych z blaszki miażdżycowej warto zastosować oba białka jako markery. Anillina może zostać użyta w celu zidentyfikowania procesu starzenia, ponieważ jej spadek zanotowano we wszystkich badanych typach (PS i RS), natomiast zastosowanie kładyny-1 może pomóc oznaczyć komórki stare w sposób przyspieszony (Tabela 4.5). Wysoka ekspresja CLDN1 koreluje z niższą ekspresją białka HP1 α i H3K9me3, co jest charakterystyczne dla starzenia przyspieszonego. Natomiast w przypadku braku lub niskiej ekspresji kładyny-1 warto dodatkowo sprawdzić profil HP1 α i H3K9me3, gdyż ich poziom może dać odpowiedź czy doszło do starzenia replikacyjnego czy w populacji obecne są komórki młode. Zatem brak ekspresji kładyny-1 połączony z niską ekspresją HP1 α i H3K9me3 wskazuje na starzenie replikacyjne, a wysoka ekspresja kładyny-1 połączona z niską ekspresją HP1 α i H3K9me3 wskazuje na przyspieszone. Wysoki poziom H3K9me3 i HP1 α , może sugerować obecność komórek o młodym fenotypie.

Tabela 4.5 Zmiany w poziomie białek ANLN, CLDN1, H3K9me3 oraz HP1 α w komórkach izolowanych z blaszki miażdżycowej, pozwalające scharakteryzować typ starzenia komórkowego.

Wariant	ANLN	CLDN1	H3K9me3	HP1α
Populacja z przewagą młodych komórek	+++	+/-	+++	+++
Populacja z przewagą komórek PS	-	+++	++	++
Populacja z przewagą komórek RS	-	-	+/-	+/-
Mieszana populacja komórek młodych i starych	+/-	+/-	+	+

Oznaczenia poziomu białka: „+++” - wysoki; „++” - niski, „+” - bardzo niski; „+/-” - bardzo niski lub brak; „-” – brak

5. Dyskusja

Wiele dotychczasowych badań dowiodło, że obecność i akumulacja starych komórek w tkankach ma znaczący wpływ na pogorszenie ich funkcji i jest ściśle związana z wiekiem. Stare komórki stanowią również istotny składnik zmienionych chorobowo narządów, w tym ścian naczyń krwionośnych objętych zmianami miażdżycowymi. Bardzo istotną rolę w tworzeniu się i stabilizacji blaszki miażdżycowej pełnią komórki mięśni gładkich naczyń, które stanowią jeden z modeli badawczych stosowanych w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia. Do tej pory opisaliśmy wiele zmian zachodzących podczas starzenia replikacyjnego oraz przyspieszonego indukowanego doksorubicyną i kurkumina [6, 213]. Jak wspomniano, doksorubicyna powoduje powstawanie uszkodzeń podwójnej nici DNA, co ma odzwierciedlenie w zmienionej strukturze chromatyny i ekspresji genów. Ponadto wykazano, że zastosowanie doksorubicyny w terapii nowotworowej ma działanie kardiotoksyczne [221] i może przyczyniać się do starzenia komórek progenitorowych serca oraz kardiomiocytów [222], [223]. Z kolei drugi związek, kurkumina, indukuje starzenie z uruchomieniem ścieżki DDR, mimo braku uszkodzeń DNA, co stanowiło doskonały odrębny model starzenia w stosunku do związków uszkadzających DNA. W Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia jako pierwsi zaczęliśmy badać działanie cytostatycznych dawek kurkuminy na VSMC. W mojej pracy doktorskiej skupiliśmy się na scharakteryzowaniu zmian strukturalnych chromatyny zachodzących w przyspieszonym starzeniu komórkowym obu typów (DOX vs CUR), gdyż zależało nam na identyfikacji cech różniących starzenie replikacyjne od przyspieszonego, również w przypadku indukcji starzenia niezależnego od uszkodzeń DNA. Poznanie tych różnic może przyczynić się do wytypowania nowych markerów pozwalających odróżnić oba typy starzenia, co też uczyniono w toku niniejszej pracy. Jest to o tyle ważne, iż w organizmie starzenie może zachodzić zarówno na drodze przyspieszonego jak i replikacyjnego starzenia. W związku z tym, nowe markery mogą pozwolić zidentyfikować warunki odpowiedzialne za indukcję starzenia przyspieszonego i zapobiec jego występowaniu oraz wybrać potencjalny cel terapeutyczny, który pozwoliłoby złagodzić negatywne skutki starzenia. Pod uwagę wzięto zmiany dotyczące histonu H3, gdyż biorą one udział w kontroli struktury chromatyny i ekspresji genów. Ponadto próbowaliśmy wyjaśnić rolę białka HP1 α w tym procesie. Uzyskane dane *in vitro* pozwoliły na przeprowadzenie charakterystyki zmian zachodzących *in vivo* oraz sprawdzenie ich uniwersalności w fibroblastach.

5.1. Charakterystyka struktury jądra i chromatyny komórek ulegających różnym typom starzenia

Jądro ma niezwykle dynamiczną i plastyczną strukturę, która podlega ciągłym zmianom zarówno w kształcie jak i sprężystości w trakcie cyklu komórkowego [224], migracji [225] czy pod wpływem czynników stresowych. Odpowiedzią na te czynniki może być starzenie komórkowe. Podczas starzenia dochodzi do znacznego powiększenia powierzchni jądra, w związku z czym cecha ta stanowi ogólny znacznik starzenia. Do tej pory ukazało się wiele prac podejmujących tematykę zmian jądrowych starych komórek, w tym VSMC. Niewiele jednak wzięło pod uwagę całościową charakterystykę zmian zachodzących podczas starzenia replikacyjnego i indukowanego stresem w porównaniu do komórek młodych.

Odkąd poznano i ulepszono technikę AFM, to obok mikroskopii elektronowej stanowi ona nieocenione narzędzie do poznania morfologii struktur komórkowych w skali nanometrów [226]. Tę metodę wykorzystano już w kilku badaniach mających na celu poznanie struktury komórek mięśni gładkich naczyń, w tym powierzchnię i wysokość komórek oraz zmiany w ich właściwościach mechanicznych pod wpływem wybranych czynników [227, 228]. Jednakże w niewielu badaniach podjęto się opisanie zmian zachodzących w strukturze jądra podczas starzenia. Jeśli takie prace są, to dotyczą np. starzenia przyspieszonego w mysim modelu progerii, a z wybranych parametrów uwzględniono pomiar powierzchni jądra i komórki lub sztywności najczęściej całej powierzchni komórki [229], rzadziej jądra [230]. Jeśli pomiary dotyczyły jądra, to były one przeprowadzane w nienaruszonej komórce, a więc sztywność mierzono z uwzględnieniem cech cytoszkieletu. Pokazano, że w starych VSMC dochodzi do wzrostu sztywności komórek i jest to jedna z ich charakterystycznych cech. Takie obserwacje poczyniliśmy również w naszych badaniach w komórkach RS, ale nie PS, gdzie takich zmian nie zaobserwowano (dane nieopublikowane). Natomiast w niniejszej pracy postanowiliśmy poszerzyć charakterystykę zmian zachodzących w starzeniu, tym razem opisując bezpośrednią szorstkość powierzchni wyizolowanych jąder, do tej pory nieopisywanej w tym modelu badawczym.

Uzyskane obrazy za pomocą mikroskopii sił atomowych pozwoliły nam zaobserwować znaczące zmiany w morfologii jądra. Oprócz zwiększonej powierzchni, stare komórki charakteryzowały się odmiennym kształtem, umożliwiającym wstępnie odróżnić komórki PS od RS. Jądra komórek starych w sposób przyspieszony były bardziej owalne o regularnej krawędzi w przeciwieństwie do komórek RS, które przybierały wysoce zróżnicowany kształt (Ryc. 4.4. A). Kolejną ważną zaobserwowaną różnicą była inna morfologia jąder, zależna od wariantu eksperymentalnego. W młodych komórkach jąderka są

nieliczne i bardzo skondensowane, wystające wysoko ponad powierzchnię jądra, zdecydowanie wyżej niż jąderka komórek starych. W starzeniu natomiast dochodziło do wzrostu powierzchni oraz liczby jąderek na jądro. Taka morfologia koreluje z wynikami mikromacierzy, które wykazały znaczący wzrost w ekspresji małych jąderkowych RNA (*small nucleolar RNA*, snoRNA) (Ryc. 4.28.). Małe jąderkowe RNA to cząsteczki o długości od 60 do 300 nukleotydów, które należą do długich niekodujących RNA (lncRNA). Lokalizują się w jąderkach i biorą udział w dojrzewaniu rybosomalnego i splicingowego RNA oraz potranskrypcyjnej regulacji genów, a swoją funkcję pełnią dopiero po utworzeniu kompleksu białkowego, czyli małych jąderkowych rybonukleoprotein – snoRNP (*small nucleolar ribonucleoproteins*) [231]. Ze względu na znajdujące się w ich strukturze specyficzne motywy, snoRNA można podzielić na SNORA oraz SNORD. SNORA charakteryzują się obecnością motywu pudełkowego H/ACA (H/ACA box snoRNAs) i zaangażowane są w pseudourydylację nukleotydów, natomiast SNORD posiadają motyw C/D i odpowiadają za metylację nukleotydów [232]. W naszych wynikach, to właśnie SNORD wykazuje się największym wzrostem ekspresji (SNORA nie zanotowano), a 91 z nich było ekspresjonowanych wyłącznie w RS. Trzy razy mniej (29) cząsteczek SNORD obserwowano we wszystkich typach starzenia, a ich ekspresja również była wyższa w porównaniu do kontroli. Wśród tych wspólnych genów znajduje się SNORD116-9, którego ekspresja, według naszych wyników, może być kontrolowana przez H3K9me3 i HP1 α . Wyniki ChIP-seq wskazują, że miejsce wspólnego występowania tych znaczników w okolicach genu kodującego SNORD116-9 jest charakterystyczne wyłącznie dla komórek młodych. W związku z tym dochodzi do zahamowania ekspresji SNORD116-9 w młodych komórkach, natomiast brak tych represyjnych znaczników (H3K9me3 i HP1 α) w komórkach starych może tłumaczyć wyższą ekspresję tego genu. Niestety nie zauważono więcej takich miejsc regulatorowych, więc nie można jednoznacznie określić mechanizmu regulacji SNORD. Reasumując, największe jąderka zanotowano w komórkach RS, co koreluje z najwyższą liczbą ekspresjonowanych cząsteczek SNORD w tym wariantcie. Znacznie mniej SNORD obserwowano w komórkach PS i najprawdopodobniej ma to wpływ na mniejszy rozmiar i liczbę jąderek w tym typie starzenia w porównaniu do RS. Poczynione obserwacje są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami, gdyż większa powierzchnia jąderek i wzrost ekspresji jąderkowych RNA jest proponowaną cechą starzenia [233], a nasze badania sugerują, że ich rozmiar i morfologia mogą być zależne od czynnika indukującego ten proces. Na obrazach AFM zaobserwowano również zmienną strukturę powierzchni jądra charakteryzującą się bardzo zróżnicowaną topografią (oszacowanej na podstawie skali ciepła), zależną od typu starzenia. W związku z tym spróbowano zmierzyć szorstkość powierzchni jąder. Taką metodę pomiaru szorstkości z sukcesem zastosowano w celu poznania dynamiki wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek neuroblastomy poddanych działaniu H₂O₂ [234].

Otrzymane przez nas wyniki sugerują wzrost szorstkości powierzchni jądra w starych komórkach, jednakże jest on nieistotny statystycznie ze względu na zbyt duże rozrzuty w pomiarach.

Przyczyny wzrostu powierzchni jądra w starych komórkach upatruje się m.in. w zmianach ekspresji lamin. W badanych typach starzenia zauważono spadek laminy B1, natomiast nie dochodzi do znaczących zmian w poziomie laminy A/C. O ile spadek LMNB1 jest cechą charakterystyczną starzenia [235], to spadek laminy A/C już nie i w VSMC białko to pozostaje na podobnym poziomie niezależnie od typu starzenia. Obok zmian w strukturze lamin, na powiększającą się powierzchnię wpływają również zaburzenia w cytoskiecie oraz stopień kondensacji chromatyny. Dowiedziono, że poziom upakowania chromatyny może kontrolować rozmiar jądra [236, 237]. W przypadku badanych przez nas komórek, rozluźniająca się struktura chromatyny w połączeniu z mniejszą ekspresją LMNB1 najprawdopodobniej wpływa na zwiększającą się szorstkość powierzchni, rozmiar oraz kształt jądra. Ponadto, w starzeniu zaobserwowano zmniejszone oddziaływanie H3K9me3 z LMNB1, co wskazuje na deregulację w strukturach LAD i tym samym może przyczyniać się do zwiększenia szorstkości powierzchni jądra oraz zmian w jego kształcie.

W związku z obserwowanymi zmianami, postanowiono dokonać dodatkowej charakterystyki struktury jądra i chromatyny w starzeniu, używając w tym celu stosownego barwienia oraz mikroskopii fluorescencyjnej. Dotychczas kilka zespołów podjęło się zadania scharakteryzowania zmian w starzeniu podobną metodą [238], ale znów niewiele z nich dotyczyło VSMC starzejących się w sposób przyspieszony lub replikacyjny. Aby tego dokonać zastosowano powszechnie używany w tym celu związek DAPI, który interkaluje do DNA i z racji posiadanych właściwości fluorescencyjnych obrazuje upakowanie chromatyny w jądrze [239]. Do dalszych analiz wykorzystano szereg parametrów, które były dostępne w pakiecie oprogramowania CellProfiler. Dzięki temu, udało nam się wskazać charakterystyczne zmienne wpływające na różnice między komórkami młodymi a starymi oraz pozwalające odróżnić starzenie przyspieszone od replikacyjnego. Pokazano, że jądra komórek ulegających starzeniu w sposób replikacyjny są znacząco większe niż CTRL czy PS i ich mediana powierzchni mierzy nieco ponad $300 \mu\text{m}^2$. Podobnych obserwacji dokonał zespół Stevana Stojanowica [240], który pokazał, że VSMC poddane starzeniu replikacyjnemu wykazywały się większą powierzchnią i mediana ich rozmiaru wynosiła powyżej $400 \mu\text{m}^2$. Niestety, mimo zastosowania w badaniach wariantu starzenia przyspieszonego (indukowanego bleomycyną) nie zmierzono powierzchni jądra tych komórek. W związku z tym nie jesteśmy w stanie skonfrontować naszych wyników z wariantu starzenia przyspieszonego. Ponadto na podstawie naszych pomiarów pokazano, że komórki RS przybierają bardziej wydłużony i nieregularny kształt oraz mają mało skomplikowaną strukturę DNA,

wskazującą na wysoce rozluźnioną chromatynę. Z drugiej strony komórki starzejące się w sposób przyspieszony wykazują fenotyp „pośredni” między komórkami młodymi a starymi (dokładniej opisane w podrozdziale 4.1.2.2.).

Podobną metodę charakterystyki starzejących się komórek zaproponował niedawno zespół R. Wallisa (2022 rok) [241], opisuje ona tak zwany profil morfologiczny związany ze starzeniem SAMP (*senescence-associated morphological profile*). Choć naukowcy zastosowali bardziej złożony i rozszerzony wachlarz cech morfologicznych i przestrzennych, gdyż pod uwagę brano również parametry opisujące całą komórkę w tym jej rozmieszczenie względem całej populacji (łącznie tych parametrów było ok. 60, które ostatecznie zredukowano do ok. 30), otrzymano podobne wnioski do moich i niektóre analizy dotyczące jądra komórkowego były zbliżone. Pokazano, podobnie jak uzyskanych przeze mnie wynikach, że w trakcie starzenia dochodzi do wzrostu powierzchni jądra oraz zmian w jego kształcie czy intensywności barwienia DNA, a zmiany te, mogą stanowić podstawę do identyfikacji starych komórek w populacji.

Również w zeszłym roku opublikowano algorytm pozwalający wykryć stare komórki w hodowli [242]. W tym projekcie uwzględniono zdecydowanie więcej parametrów, ponieważ analizy obejmowały dodatkowo zmiany typowych markerów starzenia jak poziom SA- β -gal, białka p21 czy p53, które połączono w jeden predyktor wykorzystujący głębokie uczenie maszynowe. Za jego pomocą, zespołowi z sukcesem udało się zidentyfikować komórki stare w próbkach pochodzących od pacjentów z progerią HGPS, zespołem ataksja-teleangiektazja (AT) i syndromem Cockayne oraz starych replikacyjnie fibroblastach. Predyktor ten sprawdził się również w starych astrocytach i neuronach.

Powyższe metody charakterystyki jąder [241, 242] stanowią obiecujący sposób na identyfikację starzejących się komórek w badanej populacji. Jednakże należy zaznaczyć, że żadna z nich nie pozwala na identyfikację typu starzenia, a wszystkie skupiają się jedynie na wykryciu zachodzącego procesu w hodowli *in vitro* lub *ex vivo*. W opisanych metodach zastosowano szeroki wachlarz parametrów charakteryzujących strukturę jądra, co niewątpliwie przemawia za ich atrakcyjnością, jednakże my pokazaliśmy, że do wykrycia starzejących się komórek w hodowli wystarczy kilka z nich. Ponadto, na ich podstawie można wstępnie podzielić VSMC na PS i RS. Z pewnością dalsze badania z wykorzystaniem innych typów starzenia oraz innych komórek zarówno *in vivo* jak i *ex vivo*, pozwolą nam zweryfikować skuteczność naszej metody. Niewątpliwie całościowa analiza komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych przyczyniłaby się do dokładnego i jednoznacznego wyznaczenia komórek starych w populacji. Na ten moment, by tego dokonać, wykorzystaliśmy tylko jeden parametr, czyli

wielkość powierzchni jądra, a punktem granicznym była wartość 200 μm^2 (wyjaśnienie zamieszczono w podrozdziale 4.1.2.2.).

Na tej podstawie wykazano obecność ok. 40% starych komórek pochodzących z blaszki, chociaż odsetek różnił się pomiędzy pacjentami. Wynik ten uzupełnia się (sumuje do 100%) z odsetkiem komórek zdolnych do podziału (identyfikowanych za pomocą poziomu wbudowywania BrdU), które nadal dzielą się w ok. 60%. Zastosowanie pomiaru aktywności SA- β -gal w tym przypadku okazało się nieprecyzyjnym znacznikiem, ponieważ otrzymany wynik wskazuje na obecność w populacji ok. 60% starych komórek. Jest to o 20% wyższy poziom niż wskazał pomiar powierzchni jądra. Jednak analizując hodowle komórek AP, w niektórych przypadkach (zależnych od pacjentów) obserwowano intensywniejszą proliferację komórek, w związku z tym, w niektórych miejscach dochodziło do przegęszczenia hodowli, co było przyczyną stresu komórkowego. To w takich komórkach obserwowano wysoki poziom SA- β -gal, czyli fałszywie pozytywny wynik. Potwierdza to niedoskonałość metody jakim jest oznaczanie aktywności SA- β -gal.

5.2. Odmienne profile transkryptomyczne VSMC zależny od typu starzenia

Przed przystąpieniem do zasadniczych analiz zmian transkryptomicznych towarzyszących starzeniu VSMC, dokonałam charakterystyki zachodzącego procesu, stosując wiele powszechnie używanych metod i znaczników. Do nich należy oznaczanie poziomu proliferacji komórek poprzez wbudowywanie BrdU do DNA komórki, poziom aktywności SA- β -gal, poziom białek związanych z zatrzymaniem cyklu czy uruchomieniem odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Z racji, że użyty w niniejszej pracy model starzenia VSMC został już przez nas szeroko opisany pod kątem tych znaczników, uzyskane wyniki nie będą tutaj szczegółowo dyskutowane. Tak jak wspomniano, ich zastosowanie w pracy miało na celu wyłącznie potwierdzenie wystąpienia procesu starzenia. Podobnie starzenie, zarówno przyspieszone jak i replikacyjne fibroblastów, które są standardowym modelem, jest opisane w wielu dostępnych pracach. Również w przypadku komórek blaszki miażdżycowej, wiele prac dowiodło obecności starych komórek w tkankach *ex vivo* [243]. Komórki te charakteryzują się wyższą aktywnością SA- β -gal, wyższym poziomem białek p21 i p16 oraz zwiększoną liczbą uszkodzeń DNA, rozpoznawanych pojawieniem się skupisk γ H2AX. W naszych analizach potwierdzono powyższe obserwacje oraz zauważono, że cechą charakterystyczną tych komórek jest ich niesynchroniczne starzenie się, silnie zależne od dawcy (tak jak opisano w rozdziale 4.2.).

Przechodząc do analizy uzyskanych wyników mikromacierzy, możemy zauważyć znaczne różnice w profilu ekspresji genów między starzeniem przyspieszonym a replikacyjnym VSMC. Pierwszego

dowodu dostarczyła nam przeprowadzona analiza głównych składowych, która dodatkowo wskazała wysokie podobieństwo między komórkami traktowanymi doksorubicyną i kurkuminą (Ryc. 4.27). W związku z tym przeprowadzono analizę funkcjonalną trzech grup genów, czyli wspólnych dla wszystkich typów starzenia, zmieniających się wyłącznie w starzeniu przyspieszonym (bez względu na bodziec indukujący starzenie) oraz charakterystyczne tylko dla starzenia replikacyjnego. Należy zaznaczyć, że do analiz zostały wzięte wszystkie znacząco zmieniające się geny, czyli takie, których ekspresja w danej grupie ulega zwiększeniu lub zahamowaniu, w związku z tym nie można jednoznacznie określić, które podane procesy biologiczne zostają aktywowane bądź wyciszane (jak to zwykle podaje się w publikacjach). Take podejście jest o tyle interesujące, że pozwala nam całościowo spojrzeć na zmiany zachodzące w danym procesie, a zwłaszcza poznać wspólne zależności oraz interakcje między genami o zróżnicowanej ekspresji. Według bazy danych Gene Ontology, geny zmieniające się we wszystkich typach starzenia zaangażowane są m.in. W regulację cyklu komórkowego, replikację DNA czy odpowiedź na uszkodzenia DNA, co jest zgodne z dotychczasowymi doniesieniami badającymi molekularny aspekt starzenia. Natomiast interesujące różnice można zaobserwować w starzeniu przyspieszonym oraz replikacyjnym. Geny zmieniające się w komórkach PS biorą udział w odpowiedzi na bodziec zewnętrzny, w adhezji komórek czy organizacji cytoszkieletu, a białka kodowane przez te geny, w większości znajdują się w cytoplazmie, miejscach połączeń międzykomórkowych (anchoring junctions), złączach komórkowych czy w wiązkach aktyny. Sugeruje to, że komórki poddane starzeniu przyspieszonemu mogą wykazywać zdolność do migracji. Hipoteza ta została już potwierdzona i dowiedziono, że jest to cecha wyłącznie komórek PS (wyniki nieopublikowane). Jednakże dane literaturowe dostarczają sprzecznych informacji na ten temat. Z jednej strony, wraz z wiekiem dochodzi do spadku zdolności VSMC do migracji [244], natomiast z drugiej, obserwuje się wzrost w starych komórkach aorty pozyskanych od starszych pacjentów w porównaniu do młodszych [245]. Co ciekawe, nieco inny profil transkryptomyczny, lecz nadal w pewnym stopniu podobny do tego otrzymanego przeze mnie, towarzyszący starzeniu przyspieszonemu uzyskał zespół Anny K. Urygi, gdzie badano wyłącznie komórki indukowane doksorubicyną, więc nie odzwierciedlały idealnie naszego układu eksperymentalnego. Nie porównano również tych wyników do starzenia replikacyjnego [246]. Ponadto, przedstawiono wyniki analizy z użyciem bazy danych REACTOME. Według ich doniesień, w tym typie starzenia, geny ulegające aktywacji zaangażowane są w proces starzenia komórkowego, wydzielania SASP i naprawę DNA. Natomiast geny, które ulegają wyciszeniu związane są z cyklem i podziałem komórkowym oraz utrzymaniem struktury telomerów. Należy zaznaczyć, że analiza ta dotyczyła wyłącznie jednego typu starzenia, a zmieniające się geny podzielono na te aktywowane i hamowane. Gdy jeszcze raz, w podobny sposób przeprowadzono analizę

funkcjonalną uzyskanych przeze mnie wyników, wyłącznie dla komórek traktowanych doksorubicyną oraz z zastosowaniem bazy danych REACTOME, zauważono zahamowanie podobnych ścieżek, natomiast aktywowane były głównie procesy związane z SASP (nie pokazano).

Przeprowadzona przeze mnie analiza komórek RS wskazała, że geny charakterystyczne dla tego typu starzenia odpowiadają głównie za regulację procesów metabolicznych w komórce oraz biosyntezę różnych cząsteczek komórkowych. Białka kodowane przez te geny najczęściej spotyka się w większości organelli komórkowych (cytoplazmie, jądrze oraz innych organellach i ich błonach). Niestety w literaturze brak jest jasnych danych dotyczących zmian w transkryptomie VSMC poddanych starzeniu replikacyjnemu. Spróbowano zatem skonfrontować nasze wyniki z danymi proteomicznymi, niedawno opublikowanymi przez zespół Stevana D. Stojanovica [247]. Analiza funkcjonalna białek sugeruje, że w starzeniu replikacyjnym dochodzi do deregulacji procesów związanych z metabolizmem RNA (geny wyciszane) oraz wzrostu sekrecji cząsteczek – SASP (geny aktywowane). Według naszych danych owszem, dochodzi do zmian w metabolizmie komórki, jednak procesy dotyczące RNA czy mRNA należą do zmieniających się najmniej istotnie (nie pokazano).

Jak widać, danych dotyczących profilu ekspresji genów charakterystycznych dla starzenia przyspieszonego i replikacyjnego w VSMC oraz ich porównania, jest niewiele. Ponadto, do tej pory nie opublikowano takich danych w kontekście starzenia indukowanego kurkuminą. Niniejsza praca jako pierwsza podsumowuje zmiany w poziomie ekspresji genów, zachodzących w starzeniu przyspieszonym (bez względu na występowanie bądź brak uszkodzeń DNA) i replikacyjnym VSMC. Jest to znaczący krok ku poznaniu różnic między tymi typami starzenia i być może wyznaczeniu nowych znaczników, identyfikujących proces w komórkach. W niniejszej pracy podjęto się tego zadania, a w dalszej części tego rozdziału przedyskutowano zaproponowane przez nas potencjalne białka.

Dodatkowo, na podstawie wyników mikromacierzy zauważono, że w starzeniu dochodzi do znacznego, gdyż nawet 70-krotnego, spadku ekspresji genów kodujących klastry histonów i ich wariantów. Jest to odwrotny wynik do tego raportowanego przez zespół Anny K. Urygi, ponieważ ich dane wskazują na znaczny wzrost ekspresji klastrów histonów w starzeniu przyspieszonym [246]. W wykonanej przeze mnie analizie komórek ulegających starzeniu na skutek kontaktu z doksorubicyną, ekspresja tych klastrów pozostaje bez zmian, podobnie jak i w pozostałych typach starzenia. Na podstawie otrzymanych przeze mnie danych, niestety nie jestem w stanie podać zmian w poziomie transkryptu kanonicznych histonów ze względu na ograniczenia techniczne metody. Histony kanoniczne, są jedynymi białkami, których mRNA nie posiada ogonka poliA [248], a metoda mikromacierzy jest

w stanie wykryć tylko takie mRNA, które ten fragment posiadają. W związku z tym sprawdziłam, jak zmienia się poziom histonu H3 na poziomie białka. Zgodnie z dotychczasowymi doniesieniami, we wszystkich badanych wariantach, zarówno VSMC i fibroblastów, dochodzi do spadku poziomu H3, co jest charakterystyczną cechą starzenia [249]. W związku z tym, że komórki zatrzymują się w cyklu, dodatkowo sprawdziliśmy, czy w starzeniu tych komórek dochodzi do akumulacji wariantu H3.3. Podobnie jak w przypadku histonu H3, dochodzi do ogólnego (czyli w porównaniu do referencyjnego białka GAPDH) spadku poziomu jego wariantu (jedynie w starych replikacyjnie VSMC spadek ten jest nieistotny). Takie obserwacje stoją w sprzeczności z danymi literaturowymi, ponieważ wiele badań potwierdza wzrost H3.3. W starzeniu [250]. Jednak, gdy porównano poziom H3.3 względem jego kanonicznego odpowiednika, stosunek H3.3 do H3 rośnie w starzeniu replikacyjnym VSMC lub pozostaje bez zmian w starzeniu przyspieszonym. Wydaje się więc, że w starzeniu VSMC może dochodzić do procesu wymiany histonów (*histone turnover*). W fibroblastach wydaje się, że tego znacznika jest tylko nieznacznie mniej w porównaniu do H3.

5.3. Starzenie komórkowe wiąże się ze spadkiem poziomu znaczników heterochromatyny H3K9me3 oraz H3K27me3

W starzeniu obserwuje się również znaczący spadek znaczników heterochromatyny H3K9me3 oraz H3K27me3, który jest zależny od typu starzenia i rodzaju komórek. W VSMC obserwowano stopniowy spadek H3K9me3, gdzie największy zanotowano dla komórek RS. Za spadek trimetylacji w obu typach starzenia najprawdopodobniej odpowiada metylotransferaza SUV39H1, której ekspresja genu jak i poziom białka spada wraz ze starzeniem. W związku z tym niemożliwe jest dołączenie nowych grup metylowych do lizyny 9 i 27. Ze spadkiem poziomu białka SUV39H1 związany jest też spadek sygnału fluorescencji w komórce, z wyjątkiem komórek traktowanych doksorubicyną. W tym wariacie zaobserwowano tworzenie się wielu skupisk tego białka. Być może powstawanie skupisk SUV39H1 związane jest z uszkodzeniami podwójnej nici DNA, występującymi głównie w komórkach traktowanych doksorubicyną (analiza skupisk γ H2AX, ryc. 4.3.). W mysim modelu progerii zauważono, że gromadząca się prelamina a wiąże się z SUV39H1, chroniąc białko przed degradacją. Dzięki temu, SUV39H1 jest w stanie aktywnie dołączać grupę metylową do lizyny 9 histonu H3 czym wpływa na wzrost poziomu upakowania chromatyny. Taka długotrwała kondensacja chromatyny bogatej w H3K9me3, powoduje opóźnienie uruchomienia ścieżki naprawy DNA. Wyciszenie SUV39H1 skutkowało wznowieniem naprawy DNA, co wydłużało życie myszy [251]. Jak wspomniano, w naszym modelu starzenia indukowanego doksorubicyną dochodzi do akumulacji nienaprawionych uszkodzeń DNA oraz powstawania wielu skupisk białka SUV39H1. Być może, mimo spadku poziomu, zmieniona

lokalizacja SUV39H1 wpływa na proces naprawy powstałych pęknięć. Aby potwierdzić tę hipotezę, przeprowadzono barwienie SUV39H1 z γ H2AX, lecz niestety do tej pory nie uzyskano jednoznacznych wyników.

Za spadek trimetylacji H3K9 w VSMC może być również odpowiedzialny wzrost ekspresji genu kodującego demetylazę KDM4B, która wykazuje najwyższe powinowactwo do H3K9me3 [252], zwłaszcza w okolicach centromerów [253]. Analiza rozkładu H3K9me3 (ChIP-seq) wskazuje na spadek tej modyfikacji właśnie w bliskich okolicach centromerów oraz telomerów, czyli tam, gdzie spotykana jest heterochromatyna konstytutywna (analiza za pomocą IGV). Są to jedynie bliskie okolice centromerów, ponieważ sekwencja i struktura samych centromerów, telomerów oraz ich bezpośrednich okolic długo pozostawała nieodkryta. Dopiero w drugim kwartale zeszłego roku opublikowano najnowszą sekwencję, całkowitego ludzkiego genomu, wliczając w to centromery [254], telomery [255] i wszystkie niepoznane dotąd fragmenty chromosomów. Być może ponowna analiza bioinformatyczna przypisywania pików do nowej sekwencji genomu poszerzyłaby nam obraz zmian rozłożenia tego znacznika na chromosomach.

Obserwując spadek enzymów odpowiedzialnych za trimetylację H3K9, przy jednoczesnym braku zmian enzymów odpowiedzialnych za mono- i dimetylację, można przypuszczać, że w starzeniu dochodzi jedynie do spadku poziomu H3K9me3 i rozluźnienia konstytutywnej chromatyny. Takich obserwacji dokonano np. w fibroblastach przyspieszonego modelu starzenia (zespół Cockayne).

Wraz ze starzeniem dochodzi do spadku poziomu drugiego znacznika heterochromatyny (tym razem fakultatywnej), czyli H3K27me3, ale o ile spadek jest znaczący, o tyle nie jest on tak samo spektakularny jak w H3K9me3. Taki spadek obu znaczników jest często obserwowany w zaawansowanych stadiach blaszki miażdżycowej, przy jednoczesnym wzroście acetylacji K9 i K27, co ostatecznie negatywnie wpływało na stabilność blaszki pacjentów [256]. Co ciekawe, spadek H3K27me3 nie był związany ani z metylotransferazą EZH2, ani demetylazą JMJD3, gdyż nie zanotowano znaczących zmian w poziomie tych białek w miażdżycy [257]. W pewnym stopniu jest to sprzeczne z naszymi wynikami, ponieważ poziom ekspresji *EZH2* oraz innych białek wchodzących w skład kompleksu PRC2, spada w starzeniu (niezależnie od typu). Wyjątkiem okazał się gen kodujący homolog EZH2, czyli białko EZH1. Jaką rolę pełni ono w starzeniu VSMC nadal jest niejasne. W komórkach krwiotwórczych, wyższy poziom EZH1 związany jest z ze zmniejszeniem poziomu trimetylacji H3K27 z jednoczesnym zwiększeniem monometylacji H3K27 i trimetylacji H3K4. Ponadto pokazano, że EZH1 może pełnić swoje funkcje niezależnie od EED [258, 259], którego poziom, zarówno genu jak i białka,

spada w naszym układzie eksperymentalnym. Wydaje się zatem, że w przypadku VSMC poddanych przyspieszonemu i replikacyjnemu starzeniu, za spadek trimetylacji H3K27 może odpowiadać nieprawidłowo działający kompleks PRC2. Być może do tego procesu przyczynia się również brak zmian w poziomie ekspresji większości genów kodujących demetylasy, które są dedykowane tej lizynie (z wyjątkiem KDM6B w starzeniu replikacyjnym). W celu potwierdzenia tych przypuszczeń niezbędne są dalsze badania.

Analiza zmian wybranych markerów heterochromatyny w fibroblastach potwierdziła uniwersalność zachodzących zmian w starzeniu, podczas którego obserwuje się stopniowy spadek trimetylacji H3K9 i H3K27. Wyjątkiem okazały się komórki poddane starzeniu replikacyjnemu, ponieważ poziom H3K27me3 wydaje się pozostawać tam bez zmian. Jednak należy mieć na uwadze fakt, że zanotowano bardzo rozbieżne pomiary. Niemniej obserwując zmiany w poziomie znaczników skondensowanej chromatyny w obu typach komórek, wydaje się, że niemal całkowita deheterochromatynizacja dotyczy głównie starzenia replikacyjnego, a komórki stare w sposób przyspieszony wykazują pośredni stopień upakowania między CTRL a RS.

Ponadto, przeprowadzona analiza znaczników heterochromatyny w blaszkach miażdżycowych jedynie potwierdziła poprzednie obserwacje. Poziom (wyższy lub niższy) trimetylacji H3K9 oraz H3K27 był zależny od dawcy. Zauważono natomiast, że poziom tych dwóch znaczników w pewnym stopniu korelował ze sobą. Barwienie immunocytochemiczne wykazało zależność intensywności sygnału fluorescencji od rozmiaru jądra; w małych jądrach (młodych) obserwowano wysoki sygnał świecenia, który malał wraz z powiększającym się jądrem (czyli starzeniem).

5.4. Starzenie komórkowe wiąże się ze spadkiem poziomu znaczników aktywnej chromatyny H3K4me3 oraz H3K9ac

Nieco zaskakujących wyników dostarczyła nam analiza białek charakterystycznych dla aktywnej chromatyny. Wbrew założeniom, poziom tych modyfikacji w badanym modelu starzenia VSMC spada. Jest to niezgodne z dotychczas publikowanymi badaniami, w których dowiedziono wzrost H3K4me3 oraz H3K9Ac w zaawansowanym stadium miażdżycy [260], co jak wspomniano powyżej powiązane jest ze zwiększoną liczbą starych komórek w blaszce. Ponadto pokazano, że w starzeniu replikacyjnym może dochodzić do podwyższonej acetylacji H3K9 [261]. W związku z tym, że nasze badania dostarczyły odwrotnych obserwacji, postanowiliśmy sprawdzić, co może być powodem tego zjawiska.

Analizując enzymy odpowiedzialne za metylację H3K4me3, wydaje się, że za spadek poziomu mogą być odpowiedzialne demetylasy histonów, ponieważ ekspresja genów KDM5D oraz KDM5B rośnie

w starzeniu (zależenie od jego typu). Nie można wykluczyć, że w starzeniu replikacyjnym, do niższego poziomu H3K4me3 przyczyniają się również metylotransferazy, ponieważ ekspresja genów trzech z nich również spada. Z racji, iż poziom ww. enzymów został sprawdzony wyłącznie na poziomie ekspresji genów, ich rola w regulacji metylacji H3K4 jest wyłącznie spekulacyjna.

Pomimo ogólnego spadku poziomu H3K4me3 w starzeniu, wydaje się, że zmiany w profilu wzbogacenia tą modyfikacją w genomie są nieznaczne. Przeprowadzone analizy ChIP-seq wykazały, że wraz ze starzeniem dochodzi do reorganizacji tego znacznika i zależnie od typu starzenia (oraz czynnika indukującego), dochodzi do pojawienia się nowych miejsc występowania H3K4me3. Ponadto dowiedziono, że wiele miejsc promotorów genów pozostaje stale wzbogacona w H3K4me3 (wszystkie cztery warianty eksperymentalne) i są to geny kodujące białka zaangażowane w cykl komórkowy czy procesy metaboliczne komórki. Jednak według wstępnej analizy porównawczej biorącej pod uwagę wyniki transkryptomiczne, obecność tej aktywującej modyfikacji nie jest tożsama ze wzmożoną ekspresją genów. Niektóre geny pozostawały wyciszone w starzeniu, mimo obecności H3K4me3 w promotorach (np. geny białek z rodziny E2F). Możliwe, że za kontrolę ekspresji tych genów odpowiadają inne mechanizmy. Jednym z nich może być występowanie w promotorach modyfikacji H3K27me3, tworząc miejsca biwalentne. W celu potwierdzenia tej hipotezy należałoby ponownie analizy ChIP-seq z użyciem przeciwciała rozpoznającego H3K27me3. Innym mechanizmem regulacji ekspresji genów może być przyłączanie się różnych czynników transkrypcyjnych, co może być związane z występowaniem szerokich bądź wąskich pików w promotorach. Ponadto, najczęściej (choć nie zawsze) dochodzi do zmniejszenia wysokości pików odczytów H3K4me3 w starzeniu. Niedawne badania sugerują, że obserwowany wysoki pik H3K4me3 może być związany z fenotypem kurczliwym VSMC, kontrolowanym przez metylotransferazę SMYD3 [262]. Poziom tego białka najprawdopodobniej nie ulega zmianom w stosowanym przez mnie modelu badawczym, gdyż jego poziom w starzeniu przypomina ten obserwowany w młodych komórkach.

Biorąc pod uwagę zmiany w poziomie acetylowanej lizyny 9 histonu H3 oraz na podstawie dotychczasowej wiedzy, można spekulować, iż za obserwowany spadek acetylacji w starzeniu VSMC, mogą być odpowiedzialne deacetylazy histonów. Sprawdzone zatem poziom ekspresji genów kodujących deacetylazy histonów, białka HDAC1 oraz aktywności wybranych deacetylaz. W starzeniu dochodzi do spadku poziomu HDAC1, enzymu odpowiedzialnego za deacetylację lizyny 9. Co ciekawe, w starzeniu replikacyjnym dochodzi do wzrostu aktywności licznych HDAC, a w skład badanego zestawu wchodził również HDAC1. Być może spadek HDAC1 na poziomie białka nie ogranicza jego aktywności albo inne deacetylazy przejmują jego funkcje. Co ciekawe w fibroblastach dochodzi do

wzrostu poziomu białka HDAC1 w starzeniu, a największą aktywność deacetylaz obserwowano w komórkach traktowanych dokсорubicyną. W tym wariacie obserwowaliśmy również najniższy poziom acetylowanych lizyn z białkami. Najprawdopodobniej regulacja poziomu acetylacji H3K9 zachodzi inaczej w różnych typach komórek.

Do regulacji poziomu acetylacji H3K9 w VSMC mogą się też przyczyniać acetylotransferazy, ponieważ ekspresja wielu z nich jest zahamowana w starzeniu. Niemniej podobnie jak w przypadku H3K4me3, potrzebne są dodatkowe analizy. Za deacetylację odpowiedzialne są również sirtuiny, które są najszerzej opisywanymi deacetylazami histonów w miążdżycy. W toku badań prowadzonych w naszej Pracowni opisano ich działanie w starzeniu PS i RS [263], w związku z tym nie będą dyskutowane w niniejszej pracy

W przypadku blaszek miążdżycowych obserwowano zróżnicowany poziom H3K4me3 w komórkach, zależny od dawcy. Zauważono, że profil zmian w przypadku tej modyfikacji, pokrywa się z tym zanotowanym dla H3K9me3. Natomiast wysoki poziom H3K9ac wydaje się być zgodny z dotychczasowymi doniesieniami.

5.5. Starzenie przyspieszone oraz replikacyjne nie przyczynia się do powstawania SAHF

Niekiedy, w VSMC starzejących się w sposób przyspieszony i replikacyjny, obserwowano jądra ze zwiększoną liczbą intensywniej wybarwionych DAPI skupisk DNA, przypominających z wyglądu SAHF. Mimo że w niniejszej pracy nie skupiano się na szczegółowej charakterystyce tych miejsc, postanowiono przeanalizować ich strukturę w kontekście znaczników H3K9me3 oraz H3K27me3. W literaturze można znaleźć liczne przykłady, że są to typowe białka uczestniczące w tworzeniu SAHF [264], chociaż ich obecność nie jest kluczowa w powstawaniu i stabilizacji tych skupisk [155]. W badanych komórkach, zarówno VSMC, AP jak i fibroblastach, nie dochodziło do akumulacji ani H3K9me3 ani H3K27me3 w miejscach skondensowanej chromatyny identyfikowanych na podstawie barwienia DAPI. Ponadto, analiza rozmieszczenia H3K9me3 w genomie VSMC nie wykazała wzrostu tej modyfikacji w promotorach czy okolicach genów kodujących białka E2F, czyli związanych z cyklem komórkowym. Promotory tych genów są często wyciszane na drodze powstawania SAHF, lecz w naszym układzie eksperymentalnym pozostają potencjalnie „otwarte”, ze względu na obecność znacznika aktywnej chromatyny H3K4me3 (szczegóły opisano w podrozdziale 4.1.6.1.). Zatem można wywnioskować, że w tych komórkach i tych typach starzenia nie dochodzi do powstawania charakterystycznych SAHF. Podobne wyniki uzyskano dla starzejących się replikacyjnie fibroblastów

skóry naczelnych (pawianów) [265]. Z drugiej strony, niedawno ukazała się praca metodyczna, która sugeruje, że w VSMC może dojść do powstawania SAHF, zwłaszcza w wyniku działania doksorubicyny [266]. Skupiska te oznaczano barwieniem immunofluorescencyjnym i okazało się, że miejsca te rozpoznawały białko γ H2AX, co mylnie zostało nazwane przez autorów SAHF. Fosforylowany wariant histonu, γ H2AX, wchodzi w skład specjalnych struktur związanych ze starzeniem, czyli DNA-SCARS (*DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*). Wraz z innymi białkami zaangażowanymi w sygnalizację oraz naprawę DNA, po zastosowaniu odpowiedniego barwienia, przybiera formę skupisk. DNA-SCARS jest zupełnie odmienną strukturą od SAHF i nie należy ich stosować zamiennie. Mimo braku w VSMC skupisk H3K9me3 oraz H3K27me3 związanych z SAHF, nie można jednoznacznie wykluczyć, że nie dochodzi do akumulacji innych białek mogących tworzyć SAHF, jak np. macroH2A, HMGA1, HIRA czy ASF1a. W naszych badaniach, do tej pory nie analizowano tych białek. Należy jednak podkreślić, że formowanie się takich struktur jest zjawiskiem bardzo rzadkim.

5.6. Analiza zmian dotyczących HP1 α w starzeniu komórkowym

Wiążące chromatynę białko HP1 α , pełni znaczącą rolę w utrzymaniu struktury wyciszonej chromatyny oraz prawidłowym tworzeniu się otoczki jądrowej i utrzymaniu kształtu jądra [267]. Sprawdziliśmy zatem jego zmiany w starzejących się VSMC, komórkach blaszki miażdżycowej oraz fibroblastach. Dostępne badania potwierdzają, że spadek HP1 α jest charakterystyczną cechą starzenia komórek osób cierpiących na progerie (HGPS, syndrom Wernera) [268, 269], natomiast nie jest wystarczająco jasne, jak HP1 α zachowuje się w starzeniu replikacyjnym oraz w starzeniu niezwiązanym z uszkodzeniami DNA.

Nasze badania dowiodły, że w VSMC znacząco spada ekspresja genu jak i poziom białka HP1 α niezależnie od typu starzenia. W zamian dochodzi do tworzenia się charakterystycznych skupisk, najprawdopodobniej na drodze separacji faz ciecz-ciecz [120]. Największą liczbę skupisk HP1 α obserwowano w komórkach traktowanych doksorubicyną (jest to średnio 6 skupisk na jądro), a nieco mniej w komórkach traktowanych kurkuminą i poddanych starzeniu replikacyjnemu (4 skupiska).

Po tych wstępnych obserwacjach, postanowiono sprawdzić oddziaływanie białka HP1 α z H3K9me3, z racji, iż jest to główny partner HP1 α . Zauważono, że w młodych komórkach dochodzi do częstszego współwystępowania tych białek niż w komórkach poddanych starzeniu, lecz nie zawsze lokalizacja skupisk H3K9me3 pokrywała się ze skupiskami HP1 α . Informacji na temat liczby oddziaływań między tymi dwoma białkami może nam dostarczyć trwająca analiza PLA. W komórkach starych, dochodzi do niemal całkowitego zaniknięcia oddziaływań między HP1 α i H3K9me3, a obserwowany zanik

wspólnego sygnału badanych białek w starzeniu może wpływać na strukturę i mechaniczne właściwości jądra. Według niedawnych doniesień, wyciszenie tego białka powoduje spadek elastyczności jądra oraz jego zmieniony kształt [270]. Co ciekawe, w tych samych badaniach dowiedziono, że czasowe wyciszenie HP1 α (poniżej 24 godzin) nie wpływało na poziom H3K9me3 ani upakowanie chromatyny i transkrypcję genów. Nie podano natomiast, jakie skutki w strukturze jądra i chromatyny może mieć stały zanik interakcji tych białek.

Obserwując oddziaływanie HP1 α z H3K9me3 w komórkach kontrolnych, postanowiono sprawdzić rozkład wzbogacenia tego białka w genomie. Najwięcej wspólnych odczytów dla HP1 α i H3K9me3, jak i samego HP1 α , obserwowano w rejonach międzygenowych, co przemawia za możliwym wpływem tych białek na kondensację chromatyny oraz regulację ekspresji genów. Podobne obserwacje występowania HP1 α w rejonach intergenowych zanotowano w komórkach embrionalnych nerki HEK293, gdzie odczyty w tym miejscu stanowiły 73% wszystkich odczytów (u nas stanowiły 90%) [271]. Nieco mniej liczne odczyty (w porównaniu do wszystkich odczytów) obserwowano w HP1 α , homologu obecnym w *Drosophila melanogaster* [272]. Tak jak w komórkach HEK293, w badanych przeze mnie komórkach VSMC również najczęściej obserwowano wzrost pokrycia HP1 α w genach kodujących białka z rodziny ZNF, czyli potencjalnych czynników transkrypcyjnych. Geny kodujące białka ZNF były również bogate w H3K9me3, stając się miejscem najczęstszego współwystępowania HP1 α z H3K9me3. Białka te związane są z regulacją transkrypcji genów oraz biosyntezą RNA. Najprawdopodobniej w młodych komórkach ekspresja tych czynników transkrypcyjnych może być hamowana poprzez współdziałanie HP1 α i H3K9me3, wpływających na kondensację chromatyny. Analiza CHIP-seq nie dostarczyła nam natomiast informacji na temat występowania HP1 α w genomie niezależnie od H3K9me3, mimo przesłanek, które wynikały z braku współwystępowania skupisk tych białek w jądrze. Być może takie miejsca samotnego przyłączania HP1 α w genomie nie występują. Ponadto ani w komórkach kontrolnych, ani podanych starzeniu, nie zauważono znacznego pokrycia HP1 α w regionach okołocentromerowych. Może to wynikać z tego, że HP1 α występuje w rejonach centromerów i telomerów, czego ze względu na ówczesny brak sekwencji referencyjnej tych obszarów [254, 255], nie można było jednoznacznie potwierdzić. Niemniej jest to pierwsza próba scharakteryzowania zmian wzbogacenia HP1 α w genomie starzejących się VSMC i do tej pory brak było takich danych.

Wykazałam, że do interakcji między HP1 α i H3K9me3 dochodzi głównie w komórkach młodych. Wiedząc, że H3K9me3 jest rekrutowane w miejsca pęknięcia nici DNA, a HP1 α jest partnerem tej modyfikacji, sprawdzono, czy HP1 α również umiejscawia się w okolicach podwójnych pęknięć DNA.

Łączone barwienie HP1 α z znacznikiem uszkodzeń, γ H2AX, wskazało jedynie nieliczne miejsca interakcji białek, wyłącznie w młodych komórkach. Tak jak zasugerowano w rozdziale 4.1.5.2., biorąc pod uwagę brak lokalizacji HP1 α w okolicach uszkodzeń w komórkach poddanych starzeniu, możliwym jest, że białko to może brać udział m.in. we wczesnych etapach procesu naprawy. Z drugiej strony w fibroblastach myszy z progerią obserwowano wysoki poziom HP1 α , który korelował z wysokim poziomem progeryny. Ponadto zaobserwowano, że ufosforylowana forma HP1 α znacząco opóźniała uruchomienie ścieżki DDR, a wyciszenie białka poprawiało funkcję maszynery naprawczej.

Powstałe podczas starzenia charakterystyczne skupiska HP1 α przypominają te, tworzone przez ciała PML. Potwierdziliśmy, że w starzeniu zarówno PS jak i RS dochodzi do wzrostu liczby skupisk PML (choć nie zawsze korelował on z poziomem białka), w związku z tym sprawdziliśmy potencjalne oddziaływanie tych białek ze sobą. W starzeniu dochodziło do wysokiego pokrycia obu białek w skupiskach. Wiemy, że rolą ciałek PML jest przejściowe bądź stałe „magazynowanie” białek, które biorą udział w wielu procesach komórkowych. Jednym z nich jest białko HIRA (*histone cel cycle regulator*), które w starzeniu (zwłaszcza OIS), wraz z towarzyszącym białkiem ASF1a (*Anti-Silencing Function 1A Histone Chaperone*), przejściowo łączą się z PML. Tam oddziałując z HP1 α i wariantem histonu macroH2A tworzą kompleks, przenosząc HP1 α do tworzących się SAHF [273]. Według moich wyników mikromacierzy, w starzeniu spada poziom ekspresji genów kodujących zarówno białko HIRA jak i ASF1a. W związku tym, najprawdopodobniej nie dochodzi do tworzenia się SAHF na drodze współpracy z HIRA i ASF1a, a białko HP1 α stale przebywa w ciałkach PML.

Jaką funkcję pełni HP1 α w ciałkach PML? Niewykluczone, że HP1 α oddziałuje tam z innymi białkami obecnymi w tych ciałkach. Jeśli tak, to z jakimi i w jakim celu? Na te i inne pytania odpowiedzi mogą nam dostarczyć jedynie dalsze przeprowadzone badania, które mogą umożliwić poznanie roli tego białka w starzeniu.

5.7. Analiza białek CLDN1 oraz ANLN w kontekście nowych znaczników starzenia *in vivo* i *ex vivo*

Starzenie komórkowe jest powszechnym procesem, który prowadzi do licznych zmian w organizmie o charakterze zarówno korzystnym, jak i niekorzystnym. Jak wspomniano, w niniejszej pracy głównie skupiliśmy się na charakterystyce negatywnych aspektów starzenia komórkowego, czyli udziale w rozwoju blaszki miażdżycowej. Istniejące badania dostarczają wielu informacji na temat obecności starych komórek mięśni gładkich naczyń w blaszce, lecz nie jest jeszcze w pełni jasne, jaki typ starzenia przeważa w przypadku tych komórek. Standardowo stosowane znaczniki (wzrost aktywności SA- β -gal,

zatrzymanie podziałów komórkowych, wzrost uszkodzeń DNA i skupisk γ H2AX, czy wzrost ekspresji białka p53) umożliwiają jedynie potwierdzenie procesu starzenia i oszacowanie stopnia zaawansowania procesu w tkankach, bez wskazania czynnika indukującego starzenie. Jak wiadomo, do starzenia może dojść w wyniku osiągnięcia przez komórki limitu Hayflicka lub w sposób przyspieszony. Podczas gdy analiza długości telomerów może stanowić potencjalny wskaźnik starzenia replikacyjnego (choć jak wspomniano, skrócenie telomerów spotyka się również w niektórych typach starzenia indukowanego stresem), obecnie brakuje jednoznacznych markerów identyfikujących proces starzenia przyspieszonego VSMC.

Analiza danych mikromacierzy pozwoliła nam wstępnie zidentyfikować kładynę-1 jako białko potencjalnie pełniące rolę znacznika starzenia przyspieszonego, gdyż poziom *CLDN1* znacząco rośnie jedynie w komórkach CUR i DOX. Odpowiednio, w komórkach traktowanych kurkuminą jest to niemal 4-krotny wzrost, a w komórkach traktowanych doksorubicyną aż 12-krotny w porównaniu do kontroli. Przeprowadzone analizy, metodą qPCR oraz Western blot, potwierdziły zachodzącą tendencję wzrostową ekspresji genu i poziomu białka w komórkach PS. Z drugiej strony, wynik qPCR ukazał znaczący wzrost w komórkach starych replikacyjnie (ekspresja genu rośnie 2,6 razy), lecz analiza poziomu białka metodą Western blot tego nie potwierdziła.

Wraz ze starzeniem dochodzi do powiększenia się powierzchni komórki, co może wpływać na pojawienie się miejsc kontaktu między komórkami i potencjalnego wytworzenia połączeń ścisłych (w których znajduje się kładyna-1). Podczas prowadzenia badań zauważyłam, że w starzeniu przyspieszonym, komórki w hodowli mogą przylegać do siebie i tworzyć niewielkie skupiska. Czasem podobne obserwacje poczyniono dla komórek starych replikacyjnie, lecz było to zależne od dawcy oraz stopnia zaawansowania starzenia. W związku z powyższym rodzi się pytanie, czy wzrost poziomu *CLDN1* w PS może być wynikiem występowania miejsc kontaktu między komórkami. W celu weryfikacji hipotezy przeprowadzono wstępne badania (nie pokazane w niniejszej rozprawie), w których prowadzono hodowlę komórek do osiągnięcia 100% konfluencji. Ponadto zbadano, czy wyższy poziom białka jest związany tylko z nieodwracalnym zatrzymaniem komórek w cyklu. Aby to sprawdzić, komórki hodowano w pożywce pozbawionej FBS przez 7 dni, co skutkowało przejściem komórek w stan spoczynku (*quiescent cells*). Takie komórki są zatrzymane w cyklu przejściowo, a po ponownym dodaniu surowicy do pożywki, wznawiają podziały. Po izolacji białka z powyższych wariantów eksperymentalnych przeprowadzono analizę jego poziomu metodą Western blot i w obu przypadkach nie zaobserwowano wzrostu *CLDN1*. Otrzymany wynik sugeruje, że wyższy poziom *CLDN1* nie jest związany ze wzrostem kontaktu międzykomórkowego ani wyjściem komórek z cyklu. Co więcej,

wzmoczona synteza białka wydaje się być cechą charakterystyczną wyłącznie komórek starzejących się w sposób przyspieszony.

Klaudyna-1 jest pierwszym poznanym i najszerzej badanym białkiem z tej rodziny. Znaczna część dotychczas opublikowanych badań dotyczy jej ekspresji w komórkach nowotworowych, a wiele zespołów badawczych postuluje, iż może pełnić rolę markera diagnostycznego [274, 275]. Jednakże wzrost czy spadek ekspresji CLDN1 jest silnie zależny od typu nowotworu [276]. Nadekspresja dotyczy większości z nich, w tym raka tarczycy, jelita grubego, czy komórek niektórych typów nowotworów głowy i szyi. Dowiedziono, że wysoka ekspresja CLDN1 w komórkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej jest związana z niską ogólną przeżywalnością pacjentów. Z drugiej strony, istnieją badania, gdzie podobną prognozę stawiano pacjentom z obniżoną ekspresją tego białka [276]. Niski poziom CLDN1 jest charakterystyczny dla nowotworu wątroby, płuc, prostaty oraz niektórych typów nowotworu piersi. W komórkach potrójnie ujemnego raka piersi (triple negative breast cancer, TNBC) spadek CLDN1 silnie koreluje ze wzrostem inwazyjności i migracji komórek, w wyniku czego dochodzi do zmniejszonej ogólnej przeżywalności pacjentów [277]. Gdy w komórkach nowotworu piersi MDA-MB-231 oraz Hs578T (zwykle wykazującymi niski poziom CLDN1) wywołano nadekspresję klaudyny-1, dochodziło do zatrzymania migracji oraz wzrostu akumulacji komórek poprzez wytworzenie szczelnych połączeń, bogatych w β -kateniny oraz okludyny. Zatem wyższa ekspresja CLDN1 może odgrywać kluczową rolę w hamowaniu migracji i przemieszczaniu się komórek nowotworowych i stanowić cel terapeutyczny dla niektórych typów raka. Jak wspomniano, nasze dotychczasowe, lecz jeszcze nieopublikowane badania wykazały odwrotną prawidłowość w VSMC. Komórki ze wzmożoną ekspresją CLDN1 (czyli traktowane doksorubicyną lub kurkuminą) zachowują swój potencjał do migracji czym przypominają młode VSMC.

Oprócz szeroko opisywanej roli w rozwoju nowotworów, białka należące do klaudyn pełnią ważną funkcję w utrzymywaniu bariery krew-mózg (*blood-brain barrier*, BBB) kontrolując przepływ cząsteczek między warstwami komórek i tym samym utrzymują homeostazę centralnego układu nerwowego [278]. W tych połączeniach obecna jest też klaudyna-1, chociaż jej poziom wydaje się być zależny od etapu rozwoju organizmu. Opublikowane wyniki wstępne sugerują, że Cldn1 w EC naczyń włosowatych myszy spada wraz z kolejnymi etapami rozwoju zarodkowego, a relatywnie stały i niski poziom białka utrzymuje się u dorosłych osobników [279, 280]. Niski poziom CLDN1 obserwowano też w komórkach śródbłonna mikronaczyniowego mózgu pochodzących od pacjentów z chorobą Alzheimera, przy jednoczesnym wzroście metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 [281]. Możliwe, że za zmniejszoną ekspresją CLDN1 odpowiedzialne są metaloproteinazy, których poziom w AD rośnie [282], przyczyniając się do

zwiększonej przepuszczalności śródbłonna bariery krew-mózg. Gdy zahamowano ekspresję metaloproteinaz przepuszczalność BBB znacząco malała, jednakże nie potwierdzono bezpośredniego związku przyczynowo-skutkowego działania MMP na CLDN1 [283] i jest to jedynie spekulacja. Niemniej stanowi to przesłankę, że metaloproteinazy mogą kontrolować ekspresję CLDN1 w starych replikacyjnie VSMC. Dowiedziono, że stare komórki charakteryzują się wzmożoną ekspresją czynników zewnątrzkomórkowych, w tym MMP, a nasze dotychczasowe badania (nieopublikowane) wykazały znaczny wzrost MMP wyłącznie w komórkach RS. Nie zauważono natomiast wzrostu w komórkach DOX i CUR. W związku z tym, możliwe, że przyczyną braku ekspresji białka CLDN1 w komórkach RS jest wzrost poziomu metaloproteinaz.

Według dotychczasowych doniesień, wydaje się, że do wzrostu ekspresji CLDN1 dochodzi najczęściej w stanach patologicznych [280]. Znacznie wyższy poziom zauważono np. u pacjentów po przebytych udarach niedokrwiennym mózgu. W swoich badaniach Sladojevic zauważył, że u pacjentów po przebytych udarach, dochodzi do przeorganizowania struktury połączeń ścisłych między komórkami EC naczyń włosowatych tworzących barierę krew-mózg, a wzrost kładyny-1 wpływał na przepuszczalność BBB zarówno u ludzi, jak i myszy. Aby zniwelować negatywne skutki przebytego udaru, badacze podali zwierzętom peptyd C1C2, który poprzez zmniejszenie poziomu CLDN1 w komórce wpływał na uszczelnienie naczyń włosowatych oraz przyczyniał się do poprawy stanu zdrowia i szybszego powrotu pacjentów do sprawności [280]. Badania wykazują, że CLDN1 może być obiecującym celem terapeutycznym, potencjalnie nawet w miażdżycy. Działanie peptydu C1C2 polega na przyłączeniu się do CLDN1 w błonie i przekierowanie białka do cytoplazmy, co prowadzi do rozluźnienia połączeń między komórkami [284]. Jednakże barwienie immunocytochemiczne w badanym przez nas modelu starzenia przyspieszonego wykazało, że CLDN1 w komórkach starych w sposób przyspieszony lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym. Taka lokalizacja nie jest częstym zjawiskiem, a dane na temat skutków przemieszczania się tego białka do jądra są sprzeczne i dotyczą głównie komórek nowotworowych. Badania dowiodły, że przemieszczenie się CLDN1 do jądra komórek raka tarczycy oraz wzrost poziomu białka przyczynia się do zwiększenia proliferacji oraz migracji komórek [285]. Z drugiej strony w komórkach czerniaka, to wzrost cytoplazmatycznej frakcji CLDN1 wpływał na metastazę i negatywną prognozę przeżywalności, a lokalizacja jądrowa nie miała większego wpływu na migrację komórek [286]. Natomiast w komórkach raka okrężnicy na migrację wpływał wzrost CLDN1 zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórki [287]. W świetle tych doniesień, kluczowym jest, aby dokładniej poznać rolę jaką odgrywa CLDN1 w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, aby móc uznać ją za potencjalny cel terapeutyczny.

W toku naszych badań, starano się również wyjaśnić przyczynę różnic w ekspresji CLDN1 między PS i RS, i poznać stojący za tym mechanizm regulacji na poziomie epigenetycznym. Przeprowadzona analiza ChIP-seq sugeruje, że ekspresja genu może być regulowana przez przyłączanie się H3K4me3 w miejscu startu transkrypcji genu *CLDN1*. Dowiedziono, że ogólny poziom H3K4me3 spada w starzeniu (wyniki Western blot oraz immunofluorescencji), a poziom wzbogacenia tą modyfikacją w rejonach TSS genu *CLDN1* zmniejsza się we wszystkich typach starzenia, w porównaniu do kontroli. Z drugiej strony, tylko w starzeniu pojawia się tzw. szeroki pik, który może ułatwiać transkrypcję, np. poprzez łatwiejsze przyłączanie się czynników transkrypcyjnych do TSS. Jednym z takich czynników jest białko p63, a dokładniej izoforma $\Delta Np63\alpha$, które reguluje ekspresję kładyny-1 w mysich keratynocytach [288]. Na podstawie danych z mikromacierzy nie stwierdzono zmian w poziomie ekspresji genu kodującego to białko, więc najprawdopodobniej nie bierze ono udziału w regulacji ekspresji CLDN1 w VSMC. W związku z tym, postanowiono wytypować inne białko mogące potencjalnie pełnić taką rolę. W tym celu poszukano czynników transkrypcyjnych za pomocą narzędzia MAGIC [289], który swoją bazę danych opiera na opublikowanych wynikach ChIP-seq oraz danych ENCODE. Spośród ok. 200 wytypowanych białek, wybrano pierwsze kilkanaście z nich, ponieważ kolejność wygenerowanych kandydatów zależy od ich istotności i pewności (*confidence*) występowania w okolicach genu *CLDN1*. Wybrane białka porównano z otrzymanymi przez nas wynikami transkryptomycznymi i wybrano jeden, potencjalny regulator ekspresji CLDN1 w VSMC. Jest to białko JUND, którego ekspresja genu w komórkach DOX i CUR rośnie, a w RS maleje. Wynik sugeruje, że JUND może regulować wyższą ekspresję CLDN1 w starzeniu przyspieszonym, natomiast brak tego czynnika hamuje ekspresję CLDN1 w starzeniu replikacyjnym. Niemniej to wstępna hipoteza, która wymaga dalszych badań.

Ostatnie badania dowiodły, że ekspresja CLDN1 może być kontrolowane przez miRNA. VMSC pochodzące z aorty szczurów z nadciśnieniem (*spontaneously hypersensitive rats, SHR*) wykazywały się znacznie zmniejszonym poziomem miR-3571 w porównaniu do grupy kontrolnej (szczury Wistar Kyoto). Skutkowało to podwyższoną ekspresją białka CLDN1 i większą zdolnością komórek do migracji. Natomiast nadekspresja miR-3571 wpływała na niższy poziom ekspresji CLDN1, co prowadziło do zahamowania proliferacji i migracji [290]. Podobnych obserwacji dokonano w naszym modelu eksperymentalnym, ponieważ tak jak już wspomniano, komórki CUR i DOX wykazywały się większą zdolnością do migracji w porównaniu do komórek RS. Korelowało to z ekspresją CLDN1 w komórkach. Nie wiadomo jednak, czy za regulację ekspresji w badanych przez nas VSMC odpowiada powyższe miRNA.

Ponadto według literatury ekspresja CLDN1 może być regulowana na drodze epigenetycznego przemodelowania chromatyny za pomocą deacetylaz histonów. Zaobserwowano, że wzrost SIRT1 i jej aktywności powoduje spadek H3K9ac w mysich podocytach, co w dalszej kolejności prowadziło do metylacji H3K9 w rejonie genu *CLDN1* oraz metylacji CpG za pośrednictwem DNMT1. Ostatecznie prowadziło to do zahamowania syntezy białka CLDN1 [291]. W naszych dotychczasowych badaniach, spadek SIRT1 obserwowany był w obu typach starzenia, tak jak i spadek acetylowanej i metylowanej formy H3K9. Zauważono również, że dochodziło do spadku DNMT1, co skutkuje hipometylacją genomu w komórkach starych relikacyjnie (w komórkach DOX nie zanotowano znaczących zmian) [6]. Natomiast wzrost ekspresji CLDN1 obserwuje się jedynie w komórkach przechodzących starzenie w sposób przyspieszony. Wydaje się zatem, że ten mechanizm regulacji ekspresji kładyny-1 nie dotyczy żadnego badanego typu starzenia. Możliwym jest jednak, że na tej drodze dochodzi do kontroli ekspresji CLDN1 w młodych komórkach. To w nich obserwujemy wysoki poziom SIRT1 i H3K9me3, a nawet H3K9Ac. Jednakże biorąc pod uwagę wyniki CHIP-seq, nie zauważono wzrostu wzbogacenia H3K9me3 w rejonie genu *CLDN1*, które mogłoby tłumaczyć niską ekspresję białka. Zatem pozostaje jeszcze możliwość kontroli przez metylację DNA w promotorach genu *CLDN1*, ale niestety nie mamy danych potwierdzających przypuszczenia.

Zastosowanie CLDN1 jako uniwersalnego znacznika starzenia próbowano potwierdzić z wykorzystaniem fibroblastów poddanych tym samym typom starzenia, lecz niestety nie uzyskano jednoznacznych wyników. O ile kierunek zmian i poziom ekspresji białka w komórkach kontrolnych i poddanych starzeniu przyspieszonemu pokrywa się z profilem obserwowanym w VSMC, o tyle w przypadku starzenia replikacyjnego fibroblastów nie zaobserwowano spodziewanego spadku ekspresji CLDN1. W komórkach RS zaobserwowano intensywny prążek odpowiadający kładynie-1, który może wynikać z nieplanowanego stresu hodowlanego, przez co w większości populacji mogło dojść do starzenia przyspieszonego. Z drugiej strony, są to jedynie wstępne wyniki, a badania na poziomie białka przeprowadzono wyłącznie na jednym powtórzeniu, co uniemożliwia wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Ponadto, ze względów technicznych, nie udało się precyzyjnie określić lokalizacji białka w komórce. Badania są w toku.

Przeprowadzenie analizy CLDN1 w komórkach blaszki miażdżycowej dostarczyło ciekawych wyników. Poziom białka wykazywał się wysokim zróżnicowaniem, zależnym od dawcy. Podobnie od dawcy zależała lokalizacja białka w komórce. Zauważono, że w niektórych przypadkach dochodzi do akumulacji CLDN1 w większości analizowanych jąder, charakteryzujących się wyższą intensywnością fluorescencji, a niekiedy sygnał był bardzo słaby lub w ogóle nie zauważalny. Biorąc pod uwagę tak

zróżnicowane wyniki poziomu białka, istotnym jest, aby stosować tę analizę jednocześnie z analizą innych białek, które pomogą zidentyfikować młode, dzielące się komórki w populacji.

Białkiem, które zostało przez nas wstępnie zakwalifikowana jako ogólny znacznik starzenia komórkowego, wspólny dla wszystkich typów, jest anillina. Została wybrana, ponieważ do spadku jej poziomu dochodzi bez względu na bodziec indukujący starzenie. Jest to białko, które do tej pory było szeroko opisywane jako znacznik proliferujących komórek, z racji jego uczestnictwa w tworzeniu się bruzdy podziałowej [292]. Jest to możliwe, dzięki obecności w strukturze ANLN domen wiążących m.in. aktynę, miozynę i septyny, czyli białek tworzących pierścienie kurczliwy. Zatem ekspresja anilliny wzrasta w komórkach intensywnie dzielących się i obecność białka jest niezbędna do zakończenia cytokinezy. Gdy wyciszono ekspresję anilliny w komórkach U2OS dochodziło do zaburzenia cytokinezy z zachowaniem prawidłowej kariokinezy, co prowadziło do poliploidii. W jądrach takich poliploidalnych komórek, w fazie G1, dochodziło do stopniowej akumulacji skupisk 53BP1, co może ponadto sugerować udział anilliny w stabilizacji genomu [293]. Z drugiej strony w komórkach zarodka nicienia *Caenorhabditis elegans* pokazano, że wyciszenie ANLN nie zatrzymywało podziałów komórek, a jedynie zaburzało asymetryczne tworzenie się bruzdy podziałowej oraz nieznacznie spowolniło tempo podziału komórek [294].

Mimo że anillina jest charakterystycznym białkiem obecnym w dzielących się komórkach, najwyższy poziom ekspresji genu *ANLN* zanotowano w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Jej obecność jest niezbędna w tworzeniu się osłonki mielinowej neuronów, potrzebnej do sprawnego przekazywania impulsu nerwowego. Osłonka mielinowa jest wytwarzana przez komórki gleju – oligodendrocyty, które w wyniku kontaktu z aksonem otulają go zwojami warstw błony komórkowej, tworząc włókno rdzenne. Warstwy te są złączone ze sobą za pomocą różnych białek, w tym septyn oraz związanej z nimi anilliny [295]. Proces mielinizacji zaczyna się już w życiu płodowym i trwa do zakończenia okresu dorastania. Niestety wraz z wiekiem oraz w wyniku niektórych chorób, dochodzi do demielinizacji, czyli rozpadu osłonek mielinowych, a za procesem „rozwarstwiania” się osłonki mielinowej i tym samym utraty jej zwartej struktury stoi obniżona ekspresja ANLN w oligodendocytach. Z drugiej strony, inne badania przeprowadzone na komórkach nerwowych wykazały, że anillina jest też odpowiedzialna za migrację neuroblastów, ponieważ często lokalizuje się w krawędzi wiodącej tych komórek. ANLN wiąże się z białkiem adhezyjnym MIG-2, czym przyczynia się do stabilizacji kompleksu z F-aktyną umożliwiając komórce aktywne przemieszczanie się [296].

Podobnie jak w przypadku kładyny-1, anilina również jest omawiana w kontekście komórek nowotworowych i na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań, także zaproponowano użycie jej jako markera diagnostycznego różnych typów nowotworów [297]. Wyższa ekspresja ANLN w komórkach raka płuc przeważnie wiąże się z niską przeżywalnością pacjentów [298]. Chociaż nie udowodniono tego bezpośrednio w ramach przytoczonej powyżej pracy, ponieważ była to analiza bioinformatyczna opierająca się na publicznie dostępnych danych RNA-seq, przyczyną złej prognozy może być ponadnormatywna proliferacja komórek oraz wzmożona ich migracja. Przesłanką ku temu są badania przeprowadzone na zarodkach, w których obserwowano wysoki poziom białka oraz jego lokalizację w błonie komórkowej w okolicach połączeń ścisłych między komórkami nabłonkowymi [299]. Gdy wyciszono ANLN w komórkach dochodziło do zmniejszenia akumulacji białek ZO-1 oraz kładyn w błonie komórkowej. Niestety nie podano, która dokładnie kładyna została poddana analizie, w związku z tym nie możemy odnieść tych badań do naszych. Niemniej w naszej hodowli nie zauważono innej lokalizacji ANLN niż w cytoplazmie, bruzdzie podziałowej i jądrze komórkowym.

Obecność aniliny w jądrze była raportowana przez wielu badaczy. Pierwsze wzmianki o przemieszczaniu się aniliny do wnętrza interfazowego jądra pochodzą sprzed niemal trzydziestu lat i do tej pory nie wyjaśniono, jaką funkcję może tam pełnić. Uważa się, że w tym przypadku, jądro pełni rolę rezerwuaru białka, które w trakcie podziału przemieszcza się do wrzeciona podziałowego i bierze udział w podziale komórkowym. Co ciekawe, anilina jest też znajdowana w jądrze komórek postmitotycznych, do jakich należą neurony. Wskazuje to na dodatkową, niezwiązaną z podziałami, rolę białka w komórkach [300]. Dowiedziono natomiast, że wzrost poziomu białka w jądrze komórek nowotworowych, podobnie jak w przypadku raka płuc, skutkuje niską przeżywalnością pacjentów. Przemieszczanie się białka do jądra jest możliwe dzięki fragmentowi NLS obecnemu w strukturze białka. Jak wspomniano, oprócz innych domen niezbędnych do zakończenia procesu podziału komórki, ANLN posiada w swojej budowie domenę wiążącą aktynę. W związku z tym można przypuszczać, że anilina może oddziaływać z frakcją jądrową aktyny, jednakże rola ani mechanizm potencjalnego oddziaływania nadal nie jest poznany. Niektóre badania sugerują, że obecność ANLN w jądrze może również mieć znaczenie w procesie naprawy DNA, ponieważ dowiedziono, że ANLN oddziałuje z białkiem BRCA1 (obecnym w maszynerii naprawczej uszkodzonej nici DNA). W naszych badaniach, niezależnie od badanego typu komórki, obserwuje się obecność ANLN w jądrze, gdzie najwyższy sygnał rejestrowano w komórkach młodych. Ponadto w VSMC traktowanych doksorubicyną oraz kurkumina, pomimo znacznego spadku poziomu białka, dochodzi do lokalnego zagęszczenia ANLN i tworzą się liczne skupiska (choć liczba jest heterogenna i obserwowana jedynie w części populacji). W komórkach

poddanym starzeniu niekiedy obserwowano anilinę w jąderku. Podobnie było w przypadku komórek raka piersi linii MCF7, w których starzenie indukowano dokсорubicyną (wyniki nieopublikowane). Takich zmian nie zauważono jednak ani w fibroblastach, ani w komórkach blaszki miazdżycowej. Jest to pierwsza taka obserwacja, nigdzie wcześniej nie raportowana.

Dotychczas brak jest informacji o roli ANLN w starzeniu komórek prawidłowych. Przeprowadzone przez nas badania są pierwszymi, które wskazują na udział aniliny w tym procesie. Jedyną wzmianką łączącą starzenie i anilinę jest praca opisująca skutki wyciszenia aniliny w komórkach raka piersi, którego efektem było starzenie. Przejściowe wyciszenie ekspresji ANLN prowadziło do zahamowania podziału komórkowego i zatrzymania komórek w fazie G2/M cyklu. W wyniku tego działania zaobserwowano wiele innych cech starzenia komórkowego: dochodziło do zwiększenia rozmiaru i rozplaszczenia komórek, rosła aktywność SA- β -gal oraz spadał poziom cyklin B1 i A2 odpowiedzialnych za progresję cyklu komórkowego [301]. Pokazano więc, że spadek aniliny powoduje starzenie, a moje badania pokazały, że spadek aniliny towarzyszy starzeniu, co wspólnie dowodzi udziału w tym procesie. Są to obiecujące wyniki, które potwierdzają słuszność zastosowania ANLN jako znacznika starzenia. W naszych badaniach pokazaliśmy, że spadek poziomu ANLN jest uniwersalny i niezależny od typu starzenia czy komórek, i jako pierwsi proponujemy to białko jako nowy znacznik starzenia.

W toku pracy, podobnie jak w przypadku CLDN1, starano się poznać mechanizm epigenetycznej regulacji genu ANLN. W rejonie TSS komórek kontrolnych dochodzi do wysokich odczytów modyfikacji H3K4me3 tworząc otwartą chromatynę, gotową do rozpoczęcia transkrypcji. Ponadto, obszar wzbogaceń w młodych komórkach jest znacznie szerszy niż w przypadku pozostałych wariantów i obserwowany był szeroki pik (odwrotnie niż w CLDN1 – tam szerokie piki obserwowano właśnie w PS i RS). Możliwe, że ekspresja ANLN jest regulowana przez białko p53. Niedawne badania dowiodły, że przyłączenie się p53 w miejscu promotora genu prowadzi do wyciszenia ekspresji aniliny w komórkach raka okrężnicy [302]. Natomiast mutacja lub wyciszenie p53, prowadziło do wznowienia ekspresji ANLN. Cechą charakterystyczną procesu starzenia jest właśnie wysoka ekspresja p53, w związku z tym, wzrost ekspresji p53 w PS i RS może przyczyniać się do zmniejszenia poziomu ANLN w komórce i tym sposobem regulować ekspresję tego białka. Niemniej, aby potwierdzić tezę należy wykonać dodatkowe badania, które są w trakcie realizacji w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia.

W niniejszej pracy, po raz pierwszy badano białka CLDN1 i ANLN w kontekście starzenia i jako pierwsi proponujemy zastosowanie ich jako nowych znaczników starzenia. Jest to szczególnie istotne

zwłaszcza w identyfikacji starzenia przyspieszonego, gdyż do tej pory nie istnieją markery pozwalające odróżnić PS od RS. Zanim jednak białka te zaczną funkcjonować jako znaczniki, należy przeprowadzić szereg kompleksowych analiz z uwzględnieniem innych typów starzenia oraz różnych rodzajów komórek zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Takie dane niewątpliwie przyczynią się do lepszego poznania procesu starzenia oraz zmian zależnych od czynników go indukujących.

6. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, w niniejszej pracy:

1. Scharakteryzowano zmiany w strukturze jądra i chromatyny zachodzących w starych komórkach, co pozwoliło zaproponować wstępną przesiewową metodę identyfikacji starych komórek w populacji za pomocą wybranych parametrów oraz odróżnić starzenie przyspieszone od replikacyjnego.
2. Stworzono epigenetyczną mapę wzbogacenia w znaczniki H3K4me3, H3K9me3 oraz HP1 α dla VSMC poddanych starzeniu przyspieszonemu i replikacyjnemu.
3. Wykazano istotny spadek w modyfikacjach histonu we wszystkich badanych typach starzenia VSMC i fibroblastów, a poziom w komórkach blaszek miażdżycowych wykazał duże zróżnicowanie zależne od dawcy.
4. Zaobserwowano, że w wyniku starzenia dochodzi do zmian w oddziaływaniu białka HP1 α z H3K9me3. W zamian następuje częstsze współwystępowanie z białkiem PML.
5. Wykazano różnice w profilu transkryptomycznym między komórkami starzejącymi się w sposób przyspieszony i replikacyjny.
6. Zaproponowano dwa nowe znaczniki starzenia komórkowego, jakimi są anilina (ANLN) i kładyna-1 (CLDN1), pozwalające na identyfikację starych VSMC *in vitro* i *ex vivo* oraz rozróżnienie między starzeniem przyspieszonym a replikacyjnym.
7. Wykazano, że w populacji komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych, komórki stare stanowią ok 40%.

Otrzymane wyniki pozwoliły nam na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Zarówno w starzeniu przyspieszonym jak i replikacyjnym dochodzi do istotnych zmian w strukturze jądra komórkowego, co wiąże się ze stopniowym rozluźnieniem chromatyny.
2. Najbardziej rozluźniona chromatyna występuje w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu, w których obserwuje się niemal całkowitą deheterochromatyzację.
3. Na powiększenie powierzchni jądra VSMC oraz wzrost jego szorstkości może mieć wpływ zarówno zmniejszony poziom białka LMNB1 jak i stopniowe rozluźnienie chromatyny.
4. Rozluźnienie chromatyny ma związek ze spadkiem poziomu modyfikacji histonu H3 charakterystycznych dla heterochromatyny oraz aktywnej transkrypcyjnie chromatyny.

Spadek jest uniwersalnym zjawiskiem towarzyszącym starzeniu niezależnie od typu komórki i bodźca indukującego starzenie.

5. Spadek acetytacji w VSMC może być, między innymi, wynikiem wzrostu aktywności deacetylaz histonów.
6. HP1 α pomaga utrzymać stabilną heterochromatynę w młodych komórkach poprzez interakcję z H3K9me3, natomiast w trakcie starzenia akumuluje się w ciałkach PML, co może uniemożliwiać oddziaływania HP1 α z H3K9me3.
7. HP1 α może odgrywać rolę we wczesnym etapie naprawy uszkodzeń DNA lub w uszkodzeniach nadających się do naprawy poprzez współwystępowanie ze znacznikiem podwójnych uszkodzeń DNA, γ H2AX.
8. Wykazano, że w związku z różną dynamiką proliferacji między fibroblastami a VSMC, w fibroblastach należy stosować kontrolę po 48 godzinach od wysiania.

Bibliografia

- [1] C. S. L. Tuttle, S. W. M. Luesken, M. E. C. Waaijer, and A. B. Maier, "Senescence in tissue samples of humans with age-related diseases: a systematic review," *Ageing Res Rev*, vol. 68, p. 101334, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.arr.2021.101334.
- [2] J. M. van Deursen, "The role of senescent cells in ageing," *Nature*, vol. 509, no. 7501, pp. 439–446, May 2014, doi: 10.1038/nature13193.
- [3] J. Chang *et al.*, "Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice," *Nat Med*, vol. 22, no. 1, pp. 78–83, Jan. 2016, doi: 10.1038/nm.4010.
- [4] F. Rodier and J. Campisi, "Four faces of cellular senescence," *Journal of Cell Biology*, vol. 192, no. 4, pp. 547–556, Feb. 2011, doi: 10.1083/jcb.201009094.
- [5] D. Zhou, M. Borsa, and A. K. Simon, "Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells," *Aging Cell*, vol. 20, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1111/accel.13316.
- [6] A. Bielak-Zmijewska *et al.*, "A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta," *Biogerontology*, vol. 15, no. 1, pp. 47–64, Feb. 2014, doi: 10.1007/s10522-013-9477-9.
- [7] G. P. Dimri *et al.*, "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, no. 20, pp. 9363–9367, Sep. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
- [8] S. W. Criscione, Y. V. Teo, and N. Neretti, "The Chromatin Landscape of Cellular Senescence," *Trends in Genetics*, vol. 32, no. 11, pp. 751–761, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.tig.2016.09.005.
- [9] M. Fumagalli, F. Rossiello, C. Mondello, and F. d'Adda di Fagagna, "Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e110969, Oct. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0110969.
- [10] F. d'Adda di Fagagna *et al.*, "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence," *Nature*, vol. 426, no. 6963, pp. 194–198, Nov. 2003, doi: 10.1038/nature02118.
- [11] S. Miwa, S. Kashyap, E. Chini, and T. von Zglinicki, "Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 132, no. 13, Jul. 2022, doi: 10.1172/JCI158447.
- [12] M. J. Schafer *et al.*, "The senescence-associated secretome as an indicator of age and medical risk," *JCI Insight*, vol. 5, no. 12, Jun. 2020, doi: 10.1172/jci.insight.133668.
- [13] S. Watanabe, S. Kawamoto, N. Ohtani, and E. Hara, "Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases," *Cancer Sci*, vol. 108, no. 4, pp. 563–569, Apr. 2017, doi: 10.1111/cas.13184.

- [14] L. Cuollo, F. Antonangeli, A. Santoni, and A. Soriani, "The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases," *Biology (Basel)*, vol. 9, no. 12, p. 485, Dec. 2020, doi: 10.3390/biology9120485.
- [15] R. Di Micco, V. Krizhanovsky, D. Baker, and F. d'Adda di Fagagna, "Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 22, no. 2, pp. 75–95, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41580-020-00314-w.
- [16] A. Gadecka and A. Bielak-Zmijewska, "Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome," *Nutrients*, vol. 11, no. 6, p. 1251, Jun. 2019, doi: 10.3390/nu11061251.
- [17] F. Rodier and J. Campisi, "Four faces of cellular senescence," *Journal of Cell Biology*, vol. 192, no. 4, pp. 547–556, Feb. 2011, doi: 10.1083/jcb.201009094.
- [18] L. Hayflick, "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains," *Exp Cell Res*, vol. 37, no. 3, pp. 614–636, Mar. 1965, doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- [19] E. H. Blackburn, C. W. Greider, and J. W. Szostak, "Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging," *Nat Med*, vol. 12, no. 10, pp. 1133–1138, Oct. 2006, doi: 10.1038/nm1006-1133.
- [20] K. Muraki, K. Nyhan, L. Han, and J. P. Murnane, "Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability," *Front Oncol*, vol. 2, 2012, doi: 10.3389/fonc.2012.00135.
- [21] A. Pańcyszyn, E. Boniewska-Bernacka, and A. Goc, "The role of telomeres and telomerase in the senescence of postmitotic cells," *DNA Repair (Amst)*, vol. 95, p. 102956, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102956.
- [22] F. d'Adda di Fagagna, "Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response," *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 7, pp. 512–522, Jul. 2008, doi: 10.1038/nrc2440.
- [23] T. von Zglinicki, "Oxidative stress shortens telomeres," *Trends Biochem Sci*, vol. 27, no. 7, pp. 339–344, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0968-0004(02)02110-2.
- [24] M. Serrano, A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe, "Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a," *Cell*, vol. 88, no. 5, pp. 593–602, Mar. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- [25] N. Wajapeyee, R. W. Serra, X. Zhu, M. Mahalingam, and M. R. Green, "Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7," *Cell*, vol. 132, no. 3, pp. 363–374, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2007.12.032.
- [26] A. Ko *et al.*, "Oncogene-induced senescence mediated by c-Myc requires USP10 dependent deubiquitination and stabilization of p14ARF," *Cell Death Differ*, vol. 25, no. 6, pp. 1050–1062, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41418-018-0072-0.
- [27] D. Przybylska *et al.*, "NOX4 downregulation leads to senescence of human vascular smooth muscle cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 41, pp. 66429–66443, Oct. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12079.

- [28] W. Grabowska *et al.*, “Curcumin induces senescence of primary human cells building the vasculature in a DNA damage and ATM-independent manner,” *Age (Omaha)*, vol. 37, no. 1, p. 7, Feb. 2015, doi: 10.1007/s11357-014-9744-y.
- [29] M. K. Ayrapetov, O. Gursoy-Yuzugullu, C. Xu, Y. Xu, and B. D. Price, “DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 25, pp. 9169–9174, Jun. 2014, doi: 10.1073/pnas.1403565111.
- [30] M. Fischer, “Census and evaluation of p53 target genes,” *Oncogene*, vol. 36, no. 28, pp. 3943–3956, Jul. 2017, doi: 10.1038/onc.2016.502.
- [31] H. Rayess, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, “Cellular senescence and tumor suppressor gene p16,” *Int J Cancer*, vol. 130, no. 8, pp. 1715–1725, Apr. 2012, doi: 10.1002/ijc.27316.
- [32] S. Ressler *et al.*, “p16^{INK4A} is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin,” *Aging Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 379–389, Oct. 2006, doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x.
- [33] D. Muñoz-Espín *et al.*, “Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development,” *Cell*, vol. 155, no. 5, pp. 1104–1118, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019.
- [34] D. Muñoz-Espín *et al.*, “Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development,” *Cell*, vol. 155, no. 5, pp. 1104–1118, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019.
- [35] H. N. Wilkinson and M. J. Hardman, “Senescence in Wound Repair: Emerging Strategies to Target Chronic Healing Wounds,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, Aug. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00773.
- [36] M. Demaria *et al.*, “An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA,” *Dev Cell*, vol. 31, no. 6, pp. 722–733, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- [37] J.-I. Jun and L. F. Lau, “The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing,” *Nat Cell Biol*, vol. 12, no. 7, pp. 676–685, Jul. 2010, doi: 10.1038/ncb2070.
- [38] L. Gould *et al.*, “Chronic Wound Repair and Healing in Older Adults: Current Status and Future Research,” *J Am Geriatr Soc*, vol. 63, no. 3, pp. 427–438, Mar. 2015, doi: 10.1111/jgs.13332.
- [39] J. Yang, M. Liu, D. Hong, M. Zeng, and X. Zhang, “The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, Aug. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.722205.
- [40] A. Georgilis *et al.*, “PTBP1-Mediated Alternative Splicing Regulates the Inflammatory Secretome and the Pro-tumorigenic Effects of Senescent Cells,” *Cancer Cell*, vol. 34, no. 1, pp. 85–102.e9, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.06.007.
- [41] M. Raffaele and M. Vinciguerra, “The costs and benefits of senotherapeutics for human health,” *Lancet Healthy Longev*, vol. 3, no. 1, pp. e67–e77, Jan. 2022, doi: 10.1016/S2666-7568(21)00300-7.

- [42] D. J. Baker *et al.*, "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders," *Nature*, vol. 479, no. 7372, pp. 232–236, Nov. 2011, doi: 10.1038/nature10600.
- [43] A. Krzystyniak *et al.*, "Combination of dasatinib and quercetin improves cognitive abilities in aged male Wistar rats, alleviates inflammation and changes hippocampal synaptic plasticity and histone H3 methylation profile," *Aging*, vol. 14, no. 2, pp. 572–595, Jan. 2022, doi: 10.18632/aging.203835.
- [44] L. J. Hickson *et al.*, "Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease," *EBioMedicine*, vol. 47, pp. 446–456, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.069.
- [45] S. Chaib, T. Tchkonja, and J. L. Kirkland, "Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic," *Nat Med*, vol. 28, no. 8, pp. 1556–1568, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41591-022-01923-y.
- [46] B. A. Kudlow, B. K. Kennedy, and R. J. Monnat, "Werner and Hutchinson–Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 5, pp. 394–404, May 2007, doi: 10.1038/nrm2161.
- [47] V. Laugel, "Cockayne syndrome: The expanding clinical and mutational spectrum," *Mech Ageing Dev*, vol. 134, no. 5–6, pp. 161–170, May 2013, doi: 10.1016/j.mad.2013.02.006.
- [48] L. A. Hawryluk-Gara, M. Platani, R. Santarella, R. W. Wozniak, and I. W. Mattaj, "Nup53 Is Required for Nuclear Envelope and Nuclear Pore Complex Assembly," *Mol Biol Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 1753–1762, Apr. 2008, doi: 10.1091/mbc.e07-08-0820.
- [49] J. Lammerding, "Mechanics of the Nucleus," in *Comprehensive Physiology*, Wiley, 2011, pp. 783–807. doi: 10.1002/cphy.c100038.
- [50] R.-A. Röber, K. Weber, and M. Osborn, "Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study," *Development*, vol. 105, no. 2, pp. 365–378, Feb. 1989, doi: 10.1242/dev.105.2.365.
- [51] L. Vergnes, M. Péterfy, M. O. Bergo, S. G. Young, and K. Reue, "Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 28, pp. 10428–10433, Jul. 2004, doi: 10.1073/pnas.0401424101.
- [52] I. Solovei *et al.*, "LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation," *Cell*, vol. 152, no. 3, pp. 584–598, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.01.009.
- [53] Y. Hirano, K. Hizume, H. Kimura, K. Takeyasu, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka, "Lamin B Receptor Recognizes Specific Modifications of Histone H4 in Heterochromatin Formation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 51, pp. 42654–42663, Dec. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.397950.
- [54] H. Zheng and W. Xie, "The role of 3D genome organization in development and cell differentiation," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, no. 9, pp. 535–550, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0132-4.

- [55] L. Sun, R. Yu, and W. Dang, "Chromatin Architectural Changes during Cellular Senescence and Aging," *Genes (Basel)*, vol. 9, no. 4, p. 211, Apr. 2018, doi: 10.3390/genes9040211.
- [56] B. van Steensel and A. S. Belmont, "Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression," *Cell*, vol. 169, no. 5, pp. 780–791, May 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.022.
- [57] O. Symmons *et al.*, "Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains," *Genome Res*, vol. 24, no. 3, pp. 390–400, Mar. 2014, doi: 10.1101/gr.163519.113.
- [58] F. Orti, A. M. Navarro, A. Rabinovich, S. J. Wodak, and C. Marino-Buslje, "Insight into membraneless organelles and their associated proteins: Drivers, Clients and Regulators," *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 19, pp. 3964–3977, 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2021.06.042.
- [59] A. Corpet *et al.*, "PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can!," *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 21, pp. 11890–11912, Dec. 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa828.
- [60] G. Dellaire, R. W. Ching, H. Dehghani, Y. Ren, and D. P. Bazett-Jones, "The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism," *J Cell Sci*, vol. 119, no. 6, pp. 1026–1033, Mar. 2006, doi: 10.1242/jcs.02816.
- [61] D. L. Spector and A. I. Lamond, "Nuclear Speckles," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 2, pp. a000646–a000646, Feb. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a000646.
- [62] A. J. Saurin *et al.*, "The Human Polycomb Group Complex Associates with Pericentromeric Heterochromatin to Form a Novel Nuclear Domain," *J Cell Biol*, vol. 142, no. 4, pp. 887–898, Aug. 1998, doi: 10.1083/jcb.142.4.887.
- [63] I. A. Sawyer, D. Sturgill, M.-H. Sung, G. L. Hager, and M. Dunder, "Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity," *BioEssays*, vol. 38, no. 12, pp. 1197–1208, Dec. 2016, doi: 10.1002/bies.201600144.
- [64] J. Lammerding, "Mechanics of the Nucleus," in *Comprehensive Physiology*, Wiley, 2011, pp. 783–807. doi: 10.1002/cphy.c100038.
- [65] D. Noble, "Conrad Waddington and the origin of epigenetics," *Journal of Experimental Biology*, vol. 218, no. 6, pp. 816–818, Mar. 2015, doi: 10.1242/jeb.120071.
- [66] S. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhattar, and A. Shilatifard, "An operational definition of epigenetics: Figure 1.," *Genes Dev*, vol. 23, no. 7, pp. 781–783, Apr. 2009, doi: 10.1101/gad.1787609.
- [67] Q. Zhong *et al.*, "Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications," *MedComm (Beijing)*, vol. 4, no. 3, Jun. 2023, doi: 10.1002/mco2.261.
- [68] S. Biswas and C. M. Rao, "Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy," *Eur J Pharmacol*, vol. 837, pp. 8–24, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.021.
- [69] T. G. Gillette and J. A. Hill, "Readers, Writers, and Erasers," *Circ Res*, vol. 116, no. 7, pp. 1245–1253, Mar. 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303630.

- [70] M. Yun, J. Wu, J. L. Workman, and B. Li, "Readers of histone modifications," *Cell Res*, vol. 21, no. 4, pp. 564–578, Apr. 2011, doi: 10.1038/cr.2011.42.
- [71] L. D. Moore, T. Le, and G. Fan, "DNA Methylation and Its Basic Function," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 23–38, Jan. 2013, doi: 10.1038/npp.2012.112.
- [72] D. H. K. Lim and E. R. Maher, "DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression," *The Obstetrician & Gynaecologist*, vol. 12, no. 1, pp. 37–42, Jan. 2010, doi: 10.1576/toag.12.1.037.27556.
- [73] S. Hänzelmann *et al.*, "Replicative senescence is associated with nuclear reorganization and with DNA methylation at specific transcription factor binding sites," *Clin Epigenetics*, vol. 7, no. 1, p. 19, Dec. 2015, doi: 10.1186/s13148-015-0057-5.
- [74] C. G. Bell *et al.*, "DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations," *Genome Biol*, vol. 20, no. 1, p. 249, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13059-019-1824-y.
- [75] Y. Shi *et al.*, "Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 7, no. 1, p. 200, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01055-2.
- [76] M. Tahiliani *et al.*, "Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1," *Science (1979)*, vol. 324, no. 5929, pp. 930–935, May 2009, doi: 10.1126/science.1170116.
- [77] Y.-F. He *et al.*, "Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA," *Science (1979)*, vol. 333, no. 6047, pp. 1303–1307, Sep. 2011, doi: 10.1126/science.1210944.
- [78] S.-G. Jin, X. Wu, A. X. Li, and G. P. Pfeifer, "Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain," *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no. 12, pp. 5015–5024, Jul. 2011, doi: 10.1093/nar/gkr120.
- [79] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution," *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251–260, Sep. 1997, doi: 10.1038/38444.
- [80] S. Henikoff and M. M. Smith, "Histone Variants and Epigenetics," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 1, p. a019364, Jan. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a019364.
- [81] J. C. Black, C. Van Rechem, and J. R. Whetstone, "Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact," *Mol Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 491–507, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.006.
- [82] K. Hyun, J. Jeon, K. Park, and J. Kim, "Writing, erasing and reading histone lysine methylations," *Exp Mol Med*, vol. 49, no. 4, pp. e324–e324, Apr. 2017, doi: 10.1038/emmm.2017.11.
- [83] L. Godfrey *et al.*, "DOT1L inhibition reveals a distinct subset of enhancers dependent on H3K79 methylation," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 2803, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10844-3.

- [84] P. Voigt, W.-W. Tee, and D. Reinberg, "A double take on bivalent promoters," *Genes Dev*, vol. 27, no. 12, pp. 1318–1338, Jun. 2013, doi: 10.1101/gad.219626.113.
- [85] R. Margueron *et al.*, "Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms," *Mol Cell*, vol. 32, no. 4, pp. 503–518, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.004.
- [86] A. P. Bracken, "EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer," *EMBO J*, vol. 22, no. 20, pp. 5323–5335, Oct. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg542.
- [87] X. Shen *et al.*, "EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency," *Mol Cell*, vol. 32, no. 4, pp. 491–502, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.016.
- [88] R. Margueron and D. Reinberg, "The Polycomb complex PRC2 and its mark in life," *Nature*, vol. 469, no. 7330, pp. 343–349, Jan. 2011, doi: 10.1038/nature09784.
- [89] R. Margueron *et al.*, "Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks," *Nature*, vol. 461, no. 7265, pp. 762–767, Oct. 2009, doi: 10.1038/nature08398.
- [90] S. Chen, L. Jiao, M. Shubbar, X. Yang, and X. Liu, "Unique Structural Platforms of Suz12 Dictate Distinct Classes of PRC2 for Chromatin Binding," *Mol Cell*, vol. 69, no. 5, pp. 840–852.e5, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.039.
- [91] E. Walker *et al.*, "Polycomb-like 2 Associates with PRC2 and Regulates Transcriptional Networks during Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation," *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 153–166, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2009.12.014.
- [92] R. Cao and Y. Zhang, "SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex," *Mol Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 57–67, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.020.
- [93] E. Cho, M. R. Mysliwiec, C. D. Carlson, A. Ansari, R. J. Schwartz, and Y. Lee, "Cardiac-specific developmental and epigenetic functions of Jarid2 during embryonic development," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, no. 30, pp. 11659–11673, Jul. 2018, doi: 10.1074/jbc.RA118.002482.
- [94] D. Landeira *et al.*, "Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators," *Nat Cell Biol*, vol. 12, no. 6, pp. 618–624, Jun. 2010, doi: 10.1038/ncb2065.
- [95] Z. Geng and Z. Gao, "Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 22, p. 8594, Nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21228594.
- [96] D. E. Sterner and S. L. Berger, "Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 2, pp. 435–459, Jun. 2000, doi: 10.1128/MMBR.64.2.435-459.2000.

- [97] K. K. Lee and J. L. Workman, "Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 4, pp. 284–295, Apr. 2007, doi: 10.1038/nrm2145.
- [98] S.-Y. Park and J.-S. Kim, "A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes," *Exp Mol Med*, vol. 52, no. 2, pp. 204–212, Feb. 2020, doi: 10.1038/s12276-020-0382-4.
- [99] J. Y. Kim *et al.*, "HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage," *Nat Neurosci*, vol. 13, no. 2, pp. 180–189, Feb. 2010, doi: 10.1038/nn.2471.
- [100] A. Vaquero, M. Scher, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, L. Serrano, and D. Reinberg, "SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation," *Nature*, vol. 450, no. 7168, pp. 440–444, Nov. 2007, doi: 10.1038/nature06268.
- [101] S.-S. Liu, F. Wu, Y.-M. Jin, W.-Q. Chang, and T.-M. Xu, "HDAC11: a rising star in epigenetics," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 131, p. 110607, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110607.
- [102] C. R. Clapier, J. Iwasa, B. R. Cairns, and C. L. Peterson, "Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 18, no. 7, pp. 407–422, Jul. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.26.
- [103] Y. Zhang, H.-H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg, "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation," *Genes Dev*, vol. 13, no. 15, pp. 1924–1935, Aug. 1999, doi: 10.1101/gad.13.15.1924.
- [104] M. R. Wilson *et al.*, "SWI/SNF Antagonism of PRC2 Mediates Estrogen-Induced Progesterone Receptor Expression," *Cells*, vol. 11, no. 6, p. 1000, Mar. 2022, doi: 10.3390/cells11061000.
- [105] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, and C. Peng, "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, Aug. 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
- [106] B. Wightman, I. Ha, and G. Ruvkun, "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 855–862, Dec. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.
- [107] Q. Yao, Y. Chen, and X. Zhou, "The roles of microRNAs in epigenetic regulation," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 51, pp. 11–17, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cbpa.2019.01.024.
- [108] J. Satoh and H. Tabunoki, "Comprehensive analysis of human microRNA target networks," *BioData Min*, vol. 4, no. 1, p. 17, Dec. 2011, doi: 10.1186/1756-0381-4-17.
- [109] Y.-S. Wang, W.-W. Chou, K.-C. Chen, H.-Y. Cheng, R.-T. Lin, and S.-H. H. Juo, "microRNA-152 Mediates DNMT1-Regulated DNA Methylation in the Estrogen Receptor α Gene," *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e30635, Jan. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0030635.

- [110] J. Song, E.-H. Jin, D. Kim, K. Y. Kim, C.-H. Chun, and E.-J. Jin, "MicroRNA-222 regulates MMP-13 via targeting HDAC-4 during osteoarthritis pathogenesis," *BBA Clin*, vol. 3, pp. 79–89, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.bbacli.2014.11.009.
- [111] S. Morales, M. Monzo, and A. Navarro, "Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression," *Biomol Concepts*, vol. 8, no. 5–6, pp. 203–212, Dec. 2017, doi: 10.1515/bmc-2017-0024.
- [112] A. Valinezhad Orang, R. Safaralizadeh, and M. Kazemzadeh-Bavili, "Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation," *Int J Genomics*, vol. 2014, pp. 1–15, 2014, doi: 10.1155/2014/970607.
- [113] T. Kupec *et al.*, "Stability of circulating microRNAs in serum," *PLoS One*, vol. 17, no. 8, p. e0268958, Aug. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0268958.
- [114] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, and C. Peng, "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, Aug. 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
- [115] C. E. Condrat *et al.*, "miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis," *Cells*, vol. 9, no. 2, p. 276, Jan. 2020, doi: 10.3390/cells9020276.
- [116] J. M. Schoelz and N. C. Riddle, "Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation," *Epigenetics Chromatin*, vol. 15, no. 1, p. 14, Dec. 2022, doi: 10.1186/s13072-022-00453-8.
- [117] M. M. Keenen *et al.*, "HP1 proteins compact DNA into mechanically and positionally stable phase separated domains," *Elife*, vol. 10, Mar. 2021, doi: 10.7554/eLife.64563.
- [118] C. Muchardt, M. Guillemé, J. Seeler, D. Trouche, A. Dejean, and M. Yaniv, "Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α ," *EMBO Rep*, vol. 3, no. 10, pp. 975–981, Oct. 2002, doi: 10.1093/embo-reports/kvf194.
- [119] C. Maison *et al.*, "SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 α to pericentric heterochromatin," *Nat Genet*, vol. 43, no. 3, pp. 220–227, Mar. 2011, doi: 10.1038/ng.765.
- [120] A. G. Larson *et al.*, "Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin," *Nature*, vol. 547, no. 7662, pp. 236–240, Jul. 2017, doi: 10.1038/nature22822.
- [121] K. Hiragami-Hamada *et al.*, "N-Terminal Phosphorylation of HP1 α Promotes Its Chromatin Binding," *Mol Cell Biol*, vol. 31, no. 6, pp. 1186–1200, Mar. 2011, doi: 10.1128/MCB.01012-10.
- [122] K. Romeo, Y. Louault, S. Cantaloube, I. Liodice, G. Almouzni, and J.-P. Quivy, "The SENP7 SUMO-Protease Presents a Module of Two HP1 Interaction Motifs that Locks HP1 Protein at Pericentric Heterochromatin," *Cell Rep*, vol. 10, no. 5, pp. 771–782, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.004.
- [123] H. Raurell-Vila *et al.*, "An HP1 isoform-specific feedback mechanism regulates Suv39h1 activity under stress conditions," *Epigenetics*, vol. 12, no. 2, pp. 166–175, Feb. 2017, doi: 10.1080/15592294.2016.1278096.

- [124] B. Al-Sady, H. D. Madhani, and G. J. Narlikar, "Division of Labor between the Chromodomains of HP1 and Suv39 Methylase Enables Coordination of Heterochromatin Spread," *Mol Cell*, vol. 51, no. 1, pp. 80–91, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.013.
- [125] M. L. A. Figueiredo, P. Philip, P. Stenberg, and J. Larsson, "HP1a Recruitment to Promoters Is Independent of H3K9 Methylation in *Drosophila melanogaster*," *PLoS Genet*, vol. 8, no. 11, p. e1003061, Nov. 2012, doi: 10.1371/journal.pgen.1003061.
- [126] R. Sales-Gil and P. Vagnarelli, "How HP1 Post-Translational Modifications Regulate Heterochromatin Formation and Maintenance," *Cells*, vol. 9, no. 6, p. 1460, Jun. 2020, doi: 10.3390/cells9061460.
- [127] A. Poleshko, K. M. Mansfield, C. C. Burlingame, M. D. Andrade, N. R. Shah, and R. A. Katz, "The Human Protein PRR14 Tethers Heterochromatin to the Nuclear Lamina during Interphase and Mitotic Exit," *Cell Rep*, vol. 5, no. 2, pp. 292–301, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.024.
- [128] L. Bosch-Presegué *et al.*, "Mammalian HP1 Isoforms Have Specific Roles in Heterochromatin Structure and Organization," *Cell Rep*, vol. 21, no. 8, pp. 2048–2057, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.092.
- [129] G. Nishibuchi *et al.*, "Mitotic phosphorylation of HP1 α regulates its cell cycle-dependent chromatin binding," *The Journal of Biochemistry*, vol. 165, no. 5, pp. 433–446, May 2019, doi: 10.1093/jb/mvy117.
- [130] G. Nishibuchi *et al.*, "Mitotic phosphorylation of HP1 α regulates its cell cycle-dependent chromatin binding," *The Journal of Biochemistry*, vol. 165, no. 5, pp. 433–446, May 2019, doi: 10.1093/jb/mvy117.
- [131] M. S. Luijsterburg *et al.*, "Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage," *Journal of Cell Biology*, vol. 185, no. 4, pp. 577–586, May 2009, doi: 10.1083/jcb.200810035.
- [132] C. Baldeyron, G. Soria, D. Roche, A. J. L. Cook, and G. Almouzni, "HP1 α recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair," *Journal of Cell Biology*, vol. 193, no. 1, pp. 81–95, Apr. 2011, doi: 10.1083/jcb.201101030.
- [133] C. Baldeyron, G. Soria, D. Roche, A. J. L. Cook, and G. Almouzni, "HP1 α recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair," *Journal of Cell Biology*, vol. 193, no. 1, pp. 81–95, Apr. 2011, doi: 10.1083/jcb.201101030.
- [134] M.-H. Yoon *et al.*, "p53 induces senescence through Lamin A/C stabilization-mediated nuclear deformation," *Cell Death Dis*, vol. 10, no. 2, p. 107, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1378-7.
- [135] R. D. Goldman *et al.*, "Accumulation of mutant lamin a causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson–Gilford progeria syndrome," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 24, pp. 8963–8968, Jun. 2004, doi: 10.1073/pnas.0402943101.

- [136] A. M. Cobb *et al.*, "Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient," *Aging Cell*, vol. 15, no. 6, pp. 1039–1050, Dec. 2016, doi: 10.1111/accel.12506.
- [137] T. Shimi *et al.*, "The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence," *Genes Dev*, vol. 25, no. 24, pp. 2579–2593, Dec. 2011, doi: 10.1101/gad.179515.111.
- [138] R. U. Pathak, M. Soujanya, and R. K. Mishra, "Deterioration of nuclear morphology and architecture: a hallmark of senescence and aging," *Ageing Res Rev*, vol. 67, p. 101264, May 2021, doi: 10.1016/j.arr.2021.101264.
- [139] Z. Hu *et al.*, "Nucleosome loss leads to global transcriptional up-regulation and genomic instability during yeast aging," *Genes Dev*, vol. 28, no. 4, pp. 396–408, Feb. 2014, doi: 10.1101/gad.233221.113.
- [140] Z. Hu *et al.*, "Nucleosome loss leads to global transcriptional up-regulation and genomic instability during yeast aging," *Genes Dev*, vol. 28, no. 4, pp. 396–408, Feb. 2014, doi: 10.1101/gad.233221.113.
- [141] I. Maze *et al.*, "Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity," *Neuron*, vol. 87, no. 1, pp. 77–94, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.014.
- [142] A. Tvardovskiy, V. Schwämmle, S. J. Kempf, A. Rogowska-Wrzesinska, and O. N. Jensen, "Accumulation of histone variant H3.3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape," *Nucleic Acids Res*, vol. 45, no. 16, pp. 9272–9289, Sep. 2017, doi: 10.1093/nar/gkx696.
- [143] M. A. Abd Al-razaq *et al.*, "Role of Histone Variant H2A.J in Fine-Tuning Chromatin Organization for the Establishment of Ionizing Radiation-Induced Senescence," *Cells*, vol. 12, no. 6, p. 916, Mar. 2023, doi: 10.3390/cells12060916.
- [144] A. Isermann, C. Mann, and C. E. Rube, "Histone Variant H2A.J Marks Persistent DNA Damage and Triggers the Secretory Phenotype in Radiation-Induced Senescence," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 23, p. 9130, Nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21239130.
- [145] A. Takahashi *et al.*, "DNA Damage Signaling Triggers Degradation of Histone Methyltransferases through APC/CCdh1 in Senescent Cells," *Mol Cell*, vol. 45, no. 1, pp. 123–131, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018.
- [146] V. V. Ashapkin, L. I. Kutueva, S. Y. Kurchashova, and I. I. Kireev, "Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging?," *Front Genet*, vol. 10, May 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00455.
- [147] T. Hayakawa *et al.*, "SIRT1 Suppresses the Senescence-Associated Secretory Phenotype through Epigenetic Gene Regulation," *PLoS One*, vol. 10, no. 1, p. e0116480, Jan. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116480.
- [148] X.-Y. Zhai *et al.*, "Knockdown of SIRT6 Enables Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Senescence," *Rejuvenation Res*, vol. 19, no. 5, pp. 373–384, Oct. 2016, doi: 10.1089/rej.2015.1770.

- [149] T. S. Rai *et al.*, “HIRA orchestrates a dynamic chromatin landscape in senescence and is required for suppression of neoplasia,” *Genes Dev*, vol. 28, no. 24, pp. 2712–2725, Dec. 2014, doi: 10.1101/gad.247528.114.
- [150] K. Contrepois, J.-Y. Thuret, R. Courbeyrette, F. Fenaille, and C. Mann, “Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence,” *Epigenetics Chromatin*, vol. 5, no. 1, p. 15, Dec. 2012, doi: 10.1186/1756-8935-5-15.
- [151] V. Krishnan *et al.*, “Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 30, pp. 12325–12330, Jul. 2011, doi: 10.1073/pnas.1102789108.
- [152] W. Grabowska, E. Sikora, and A. Bielak-Zmijewska, “Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process,” *Biogerontology*, vol. 18, no. 4, pp. 447–476, Aug. 2017, doi: 10.1007/s10522-017-9685-9.
- [153] H. Zhou *et al.*, “Downregulation of Sirt6 by CD38 promotes cell senescence and aging,” *Aging*, Dec. 2022, doi: 10.18632/aging.204425.
- [154] E. Michishita *et al.*, “SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin,” *Nature*, vol. 452, no. 7186, pp. 492–496, Mar. 2008, doi: 10.1038/nature06736.
- [155] T. Chandra *et al.*, “Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation,” *Mol Cell*, vol. 47, no. 2, pp. 203–214, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.010.
- [156] R. Zhang, W. Chen, and P. D. Adams, “Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci,” *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 6, pp. 2343–2358, Mar. 2007, doi: 10.1128/MCB.02019-06.
- [157] T. Chandra *et al.*, “Global Reorganization of the Nuclear Landscape in Senescent Cells,” *Cell Rep*, vol. 10, no. 4, pp. 471–483, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.055.
- [158] I. Olan, T. Handa, and M. Narita, “Beyond SAHF: An integrative view of chromatin compartmentalization during senescence,” *Curr Opin Cell Biol*, vol. 83, p. 102206, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.ceb.2023.102206.
- [159] F. Ciccarone *et al.*, “Age-dependent expression of DNMT1 and DNMT3B in PBMCs from a large European population enrolled in the MARK-AGE study,” *Aging Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 755–765, Aug. 2016, doi: 10.1111/accel.12485.
- [160] S. Hänzelmann *et al.*, “Replicative senescence is associated with nuclear reorganization and with DNA methylation at specific transcription factor binding sites,” *Clin Epigenetics*, vol. 7, no. 1, p. 19, Dec. 2015, doi: 10.1186/s13148-015-0057-5.
- [161] R. U. Pathak, M. Soujanya, and R. K. Mishra, “Deterioration of nuclear morphology and architecture: a hallmark of senescence and aging,” *Ageing Res Rev*, vol. 67, p. 101264, May 2021, doi: 10.1016/j.arr.2021.101264.

- [162] V. Tiku and A. Antebi, "Nucleolar Function in Lifespan Regulation," *Trends Cell Biol*, vol. 28, no. 8, pp. 662–672, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.tcb.2018.03.007.
- [163] V. Tiku *et al.*, "Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 16083, Aug. 2017, doi: 10.1038/ncomms16083.
- [164] V. Tiku *et al.*, "Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 16083, Aug. 2017, doi: 10.1038/ncomms16083.
- [165] A. Buchwalter and M. W. Hetzer, "Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 328, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00322-z.
- [166] G. Ferbeyre, E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S. W. Lowe, "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence," *Genes Dev*, vol. 14, no. 16, pp. 2015–27, Aug. 2000.
- [167] V. Lallemand-Breitenbach and H. de Thé, "PML nuclear bodies: from architecture to function," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 52, pp. 154–161, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.ceb.2018.03.011.
- [168] B. Wenger *et al.*, "PML-nuclear bodies decrease with age and their stress response is impaired in aged individuals," *BMC Geriatr*, vol. 14, no. 1, p. 42, Dec. 2014, doi: 10.1186/1471-2318-14-42.
- [169] V. Bourdeau, "PML links aberrant cytokine signaling and oncogenic stress to cellular senescence," *Frontiers in Bioscience*, vol. Volume, no. 14, p. 475, 2009, doi: 10.2741/3256.
- [170] "Umieralność w 2021 roku Zgony według przyczyn-dane wstępne," 2022.
- [171] R. M. Gupta, P. Libby, and M. Barton, "Linking regulation of nitric oxide to endothelin-1: The Yin and Yang of vascular tone in the atherosclerotic plaque," *Atherosclerosis*, vol. 292, pp. 201–203, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.001.
- [172] C. Khatana *et al.*, "Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2020, pp. 1–14, Sep. 2020, doi: 10.1155/2020/5245308.
- [173] J.-J. Chiu and S. Chien, "Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives," *Physiol Rev*, vol. 91, no. 1, pp. 327–387, Jan. 2011, doi: 10.1152/physrev.00047.2009.
- [174] J. Zhou, Y.-S. Li, and S. Chien, "Shear Stress–Initiated Signaling and Its Regulation of Endothelial Function," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 34, no. 10, pp. 2191–2198, Oct. 2014, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303422.
- [175] B. A. Monk and S. J. George, "The Effect of Ageing on Vascular Smooth Muscle Cell Behaviour - a Mini-Review," *Gerontology*, vol. 61, no. 5, pp. 416–426, 2015, doi: 10.1159/000368576.
- [176] M. M. Mehdi, P. Solanki, and P. Singh, "Oxidative stress, antioxidants, hormesis and calorie restriction: The current perspective in the biology of aging," *Arch Gerontol Geriatr*, vol. 95, p. 104413, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.archger.2021.104413.

- [177] J. Tyson *et al.*, “Mechanisms of the Osteogenic Switch of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: WNT Signaling, BMPs, Mechanotransduction, and EndMT,” *Bioengineering*, vol. 7, no. 3, p. 88, Aug. 2020, doi: 10.3390/bioengineering7030088.
- [178] R. Nakano-Kurimoto *et al.*, “Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 297, no. 5, pp. H1673–H1684, Nov. 2009, doi: 10.1152/ajpheart.00455.2009.
- [179] C. Sbarigia, S. Tacconi, F. Mura, M. Rossi, S. Dinarelli, and L. Dini, “High-resolution atomic force microscopy as a tool for topographical mapping of surface budding,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, Oct. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.975919.
- [180] S. J. Yang *et al.*, “Assessing microscope image focus quality with deep learning,” *BMC Bioinformatics*, vol. 19, no. 1, p. 77, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12859-018-2087-4.
- [181] C. McQuin *et al.*, “CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology,” *PLoS Biol*, vol. 16, no. 7, p. e2005970, Jul. 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2005970.
- [182] T. R. Jones *et al.*, “CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens,” *BMC Bioinformatics*, vol. 9, no. 1, p. 482, Dec. 2008, doi: 10.1186/1471-2105-9-482.
- [183] S. A. Aleksander *et al.*, “The Gene Ontology knowledgebase in 2023,” *Genetics*, vol. 224, no. 1, May 2023, doi: 10.1093/genetics/iyad031.
- [184] M. Ashburner *et al.*, “Gene Ontology: tool for the unification of biology,” *Nat Genet*, vol. 25, no. 1, pp. 25–29, May 2000, doi: 10.1038/75556.
- [185] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res*, vol. 29, no. 9, pp. 45e–445, May 2001, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- [186] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120, Aug. 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- [187] B. Langmead, C. Wilks, V. Antonescu, and R. Charles, “Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors,” *Bioinformatics*, vol. 35, no. 3, pp. 421–432, Feb. 2019, doi: 10.1093/bioinformatics/bty648.
- [188] A. McKenna *et al.*, “The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data,” *Genome Res*, vol. 20, no. 9, pp. 1297–1303, Sep. 2010, doi: 10.1101/gr.107524.110.
- [189] Y. Zhang *et al.*, “Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS),” *Genome Biol*, vol. 9, no. 9, p. R137, Nov. 2008, doi: 10.1186/gb-2008-9-9-r137.
- [190] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth, “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 1, pp. 139–140, Jan. 2010, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.

- [191] K. L. Howe *et al.*, “Ensembl 2021,” *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. D1, pp. D884–D891, Jan. 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa942.
- [192] J. T. Robinson *et al.*, “Integrative genomics viewer,” *Nat Biotechnol*, vol. 29, no. 1, pp. 24–26, Jan. 2011, doi: 10.1038/nbt.1754.
- [193] F. Yang, C. J. Kemp, and S. Henikoff, “Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters,” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 773, pp. 9–15, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.01.007.
- [194] B. Pang *et al.*, “Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin,” *Nat Commun*, vol. 4, no. 1, p. 1908, May 2013, doi: 10.1038/ncomms2921.
- [195] F. Yang, C. J. Kemp, and S. Henikoff, “Doxorubicin Enhances Nucleosome Turnover around Promoters,” *Current Biology*, vol. 23, no. 9, pp. 782–787, May 2013, doi: 10.1016/j.cub.2013.03.043.
- [196] D. Gewirtz, “A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin,” *Biochem Pharmacol*, vol. 57, no. 7, pp. 727–741, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
- [197] S. Reuter, S. C. Gupta, B. Park, A. Goel, and B. B. Aggarwal, “Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds,” *Genes Nutr*, vol. 6, no. 2, pp. 93–108, May 2011, doi: 10.1007/s12263-011-0222-1.
- [198] R. Grosschedl, K. Giese, and J. Pagel, “HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures,” *Trends in Genetics*, vol. 10, no. 3, pp. 94–100, Mar. 1994, doi: 10.1016/0168-9525(94)90232-1.
- [199] S. S. Lange and K. M. Vasquez, “HMGB1: The jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic,” *Mol Carcinog*, vol. 48, no. 7, pp. 571–580, Jul. 2009, doi: 10.1002/mc.20544.
- [200] L. Jayaraman, N. C. Moorthy, K. G. K. Murthy, J. L. Manley, M. Bustin, and C. Prives, “High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53,” *Genes Dev*, vol. 12, no. 4, pp. 462–472, Feb. 1998, doi: 10.1101/gad.12.4.462.
- [201] R. Kang *et al.*, “HMGB1 in health and disease,” *Mol Aspects Med*, vol. 40, pp. 1–116, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.mam.2014.05.001.
- [202] J. Camps *et al.*, “Loss of lamin B1 results in prolongation of S phase and decondensation of chromosome territories,” *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 8, pp. 3423–3434, Aug. 2014, doi: 10.1096/fj.14-250456.
- [203] E. Lukášová, A. Kovařík, and S. Kozubek, “Consequences of Lamin B1 and Lamin B Receptor Downregulation in Senescence,” *Cells*, vol. 7, no. 2, p. 11, Feb. 2018, doi: 10.3390/cells7020011.
- [204] L. Shi, H. Wen, and X. Shi, “The Histone Variant H3.3 in Transcriptional Regulation and Human Disease,” *J Mol Biol*, vol. 429, no. 13, pp. 1934–1945, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.019.

- [205] R. S. Wu, S. Tsai, and W. M. Bonner, "Patterns of histone variant synthesis can distinguish G1 cells," *Cell*, vol. 31, no. 2, pp. 367–374, Dec. 1982, doi: 10.1016/0092-8674(82)90130-1.
- [206] P. Chen *et al.*, "H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin," *Genes Dev*, vol. 27, no. 19, pp. 2109–2124, Oct. 2013, doi: 10.1101/gad.222174.113.
- [207] R. Margueron *et al.*, "Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms," *Mol Cell*, vol. 32, no. 4, pp. 503–518, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.004.
- [208] S. H. Lee, Y. Li, H. Kim, S. Eum, K. Park, and C.-H. Lee, "The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer," *BMB Rep*, vol. 55, no. 12, pp. 595–601, Dec. 2022, doi: 10.5483/BMBRep.2022.55.12.174.
- [209] C. Moreno-Yruela *et al.*, "Class I histone deacetylases (HDAC1–3) are histone lysine deacetylases," *Sci Adv*, vol. 8, no. 3, Jan. 2022, doi: 10.1126/sciadv.abi6696.
- [210] M. A. Glozak, N. Sengupta, X. Zhang, and E. Seto, "Acetylation and deacetylation of non-histone proteins," *Gene*, vol. 363, pp. 15–23, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.gene.2005.09.010.
- [211] C. Giacinti and A. Giordano, "RB and cell cycle progression," *Oncogene*, vol. 25, no. 38, pp. 5220–5227, Aug. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209615.
- [212] D. Willis-Martinez, H. W. Richards, N. A. Timchenko, and E. E. Medrano, "Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer," *Exp Gerontol*, vol. 45, no. 4, pp. 279–285, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.exger.2009.10.001.
- [213] W. Grabowska *et al.*, "Curcumin induces multiple signaling pathways leading to vascular smooth muscle cell senescence," *Biogerontology*, vol. 20, no. 6, pp. 783–798, Dec. 2019, doi: 10.1007/s10522-019-09825-2.
- [214] M. Hausmann *et al.*, "Super-resolution localization microscopy of radiation-induced histone H2AX-phosphorylation in relation to H3K9-trimethylation in HeLa cells," *Nanoscale*, vol. 10, no. 9, pp. 4320–4331, 2018, doi: 10.1039/C7NR08145F.
- [215] M. Zarebski, E. Wiernasz, and J. W. Dobrucki, "Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites," *Cytometry Part A*, vol. 75A, no. 7, pp. 619–625, Jul. 2009, doi: 10.1002/cyto.a.20734.
- [216] M. Vancurova *et al.*, "PML nuclear bodies are recruited to persistent DNA damage lesions in an RNF168-53BP1 dependent manner and contribute to DNA repair," *DNA Repair (Amst)*, vol. 78, pp. 114–127, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.04.001.
- [217] H. Endt, C. N. Sprung, U. Keller, U. Gaipl, R. Fietkau, and L. V. Distel, "Detailed Analysis of DNA Repair and Senescence Marker Kinetics Over the Life Span of a Human Fibroblast Cell Line," *J Gerontol a Biol Sci Med Sci*, vol. 66A, no. 4, pp. 367–375, Apr. 2011, doi: 10.1093/gerona/glq197.

- [218] M. VJ, M. D, L.-L. A, L. S, and G. H, "In Vitro Culture Methods of Skin Cells for Optimal Skin Reconstruction by Tissue Engineering," in *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, InTech, 2011. doi: 10.5772/20341.
- [219] S. Park, G. W. Kim, S. H. Kwon, and J. Lee, "Broad domains of histone H3 lysine 4 trimethylation in transcriptional regulation and disease," *FEBS J*, vol. 287, no. 14, pp. 2891–2902, Jul. 2020, doi: 10.1111/febs.15219.
- [220] M. Furuse *et al.*, "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier," *J Cell Biol*, vol. 156, no. 6, pp. 1099–1111, Mar. 2002, doi: 10.1083/jcb.200110122.
- [221] P. S. Rawat, A. Jaiswal, A. Khurana, J. S. Bhatti, and U. Navik, "Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 139, p. 111708, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111708.
- [222] Y. Maejima, S. Adachi, H. Ito, K. Hirao, and M. Isobe, "Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage," *Aging Cell*, vol. 7, no. 2, pp. 125–136, Apr. 2008, doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00358.x.
- [223] E. Piegari *et al.*, "Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells," *Basic Res Cardiol*, vol. 108, no. 2, p. 334, Mar. 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0334-4.
- [224] J. Fidorra, Th. Mielke, J. Booz, and L. E. Feinendegen, "Cellular and nuclear volume of human cells during the cell cycle," *Radiat Environ Biophys*, vol. 19, no. 3, pp. 205–214, Sep. 1981, doi: 10.1007/BF01324188.
- [225] A. Katiyar *et al.*, "Nuclear size changes caused by local motion of cell boundaries unfold the nuclear lamina and dilate chromatin and intranuclear bodies," *Soft Matter*, vol. 15, no. 45, pp. 9310–9317, 2019, doi: 10.1039/C9SM01666J.
- [226] C. Sbarigia, S. Tacconi, F. Mura, M. Rossi, S. Dinarelli, and L. Dini, "High-resolution atomic force microscopy as a tool for topographical mapping of surface budding," *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, Oct. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.975919.
- [227] H. Lee *et al.*, "Cytoskeletal prestress regulates nuclear shape and stiffness in cardiac myocytes," *Exp Biol Med*, vol. 240, no. 11, pp. 1543–1554, Nov. 2015, doi: 10.1177/1535370215583799.
- [228] Y. Zhu, "Atomic Force Microscopy Reveals the Role of Vascular Smooth Muscle Cell Elasticity in Hypertension," in *Recent Developments in Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy for Materials Characterization*, IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.95761.
- [229] X. Mu *et al.*, "Cytoskeleton stiffness regulates cellular senescence and innate immune response in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome.," *Aging Cell*, vol. 19, no. 8, p. e13152, Aug. 2020, doi: 10.1111/acel.13152.

- [230] X. Yue *et al.*, “Nuclear softening mediated by Sun2 suppression delays mechanical stress-induced cellular senescence,” *Cell Death Discov*, vol. 9, no. 1, p. 167, May 2023, doi: 10.1038/s41420-023-01467-1.
- [231] T. Kiss, “Small Nucleolar RNAs,” *Cell*, vol. 109, no. 2, pp. 145–148, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00718-3.
- [232] D. Ronchetti *et al.*, “The expression pattern of small nucleolar and small Cajal body-specific RNAs characterizes distinct molecular subtypes of multiple myeloma,” *Blood Cancer J*, vol. 2, no. 11, pp. e96–e96, Nov. 2012, doi: 10.1038/bcj.2012.41.
- [233] R. U. Pathak, M. Soujanya, and R. K. Mishra, “Deterioration of nuclear morphology and architecture: a hallmark of senescence and aging,” *Ageing Res Rev*, vol. 67, p. 101264, May 2021, doi: 10.1016/j.arr.2021.101264.
- [234] C. Sbarigia, S. Tacconi, F. Mura, M. Rossi, S. Dinarelli, and L. Dini, “High-resolution atomic force microscopy as a tool for topographical mapping of surface budding,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, Oct. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.975919.
- [235] A. Freund, R.-M. Laberge, M. Demaria, and J. Campisi, “Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker,” *Mol Biol Cell*, vol. 23, no. 11, pp. 2066–2075, Jun. 2012, doi: 10.1091/mbc.e11-10-0884.
- [236] A. K. Efremov, L. Hovan, and J. Yan, “Nucleus size and its effect on nucleosome stability in living cells,” *Biophys J*, vol. 121, no. 21, pp. 4189–4204, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.bpj.2022.09.019.
- [237] A. D. Stephens, E. J. Banigan, and J. F. Marko, “Chromatin’s physical properties shape the nucleus and its functions,” *Curr Opin Cell Biol*, vol. 58, pp. 76–84, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.ceb.2019.02.006.
- [238] E. C. Filippi-Chiela, M. M. Oliveira, B. Jurkovski, S. M. Callegari-Jacques, V. D. da Silva, and G. Lenz, “Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42522, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042522.
- [239] A. K. Estandarte, S. Botchway, C. Lynch, M. Yusuf, and I. Robinson, “The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 31417, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep31417.
- [240] S. D. Stojanović *et al.*, “Inflammatory Drivers of Cardiovascular Disease: Molecular Characterization of Senescent Coronary Vascular Smooth Muscle Cells,” *Front Physiol*, vol. 11, May 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00520.
- [241] R. Wallis *et al.*, “Senescence-associated morphological profiles (SAMPs): an image-based phenotypic profiling method for evaluating the inter and intra model heterogeneity of senescence,” *Ageing*, vol. 14, no. 10, pp. 4220–4246, May 2022, doi: 10.18632/aging.204072.
- [242] I. Heckenbach *et al.*, “Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence,” *Nat Aging*, vol. 2, no. 8, pp. 742–755, Aug. 2022, doi: 10.1038/s43587-022-00263-3.

- [243] K. Gray *et al.*, “Effects of DNA Damage in Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis,” *Circ Res*, vol. 116, no. 5, pp. 816–826, Feb. 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304921.
- [244] A. Ruiz-Torres, R. Lozano, J. Melon, and R. Carraro, “Age-Dependent Decline of In Vitro Migration (Basal and Stimulated by IGF-1 or Insulin) of Human Vascular Smooth Muscle Cells,” *J Gerontol a Biol Sci Med Sci*, vol. 58, no. 12, pp. B1074–B1077, Dec. 2003, doi: 10.1093/gerona/58.12.B1074.
- [245] M. Wang *et al.*, “Proinflammatory Profile Within the Grossly Normal Aged Human Aortic Wall,” *Hypertension*, vol. 50, no. 1, pp. 219–227, Jul. 2007, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089409.
- [246] A. K. Uryga *et al.*, “Telomere damage promotes vascular smooth muscle cell senescence and immune cell recruitment after vessel injury,” *Commun Biol*, vol. 4, no. 1, p. 611, May 2021, doi: 10.1038/s42003-021-02123-z.
- [247] S. D. Stojanović *et al.*, “Inflammatory Drivers of Cardiovascular Disease: Molecular Characterization of Senescent Coronary Vascular Smooth Muscle Cells,” *Front Physiol*, vol. 11, May 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00520.
- [248] W. F. Marzluff, E. J. Wagner, and R. J. Duronio, “Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail,” *Nat Rev Genet*, vol. 9, no. 11, pp. 843–854, Nov. 2008, doi: 10.1038/nrg2438.
- [249] R. J. O’Sullivan, S. Kubicek, S. L. Schreiber, and J. Karlseder, “Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 17, no. 10, pp. 1218–1225, Oct. 2010, doi: 10.1038/nsmb.1897.
- [250] A. Tvardovskiy, V. Schwämmle, S. J. Kempf, A. Rogowska-Wrzesinska, and O. N. Jensen, “Accumulation of histone variant H3.3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape,” *Nucleic Acids Res*, vol. 45, no. 16, pp. 9272–9289, Sep. 2017, doi: 10.1093/nar/gkx696.
- [251] B. Liu, Z. Wang, L. Zhang, S. Ghosh, H. Zheng, and Z. Zhou, “Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model,” *Nat Commun*, vol. 4, no. 1, p. 1868, May 2013, doi: 10.1038/ncomms2885.
- [252] J. Antony, F. Oback, L. W. Chamley, B. Oback, and G. Laible, “Transient JMJD2B-Mediated Reduction of H3K9me3 Levels Improves Reprogramming of Embryonic Stem Cells into Cloned Embryos,” *Mol Cell Biol*, vol. 33, no. 5, pp. 974–983, Mar. 2013, doi: 10.1128/MCB.01014-12.
- [253] B. D. Fodor *et al.*, “Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells,” *Genes Dev*, vol. 20, no. 12, pp. 1557–1562, Jun. 2006, doi: 10.1101/gad.388206.
- [254] N. Altemose *et al.*, “Complete genomic and epigenetic maps of human centromeres,” *Science (1979)*, vol. 376, no. 6588, Apr. 2022, doi: 10.1126/science.abl4178.
- [255] S. Nurk *et al.*, “The complete sequence of a human genome,” *Science (1979)*, vol. 376, no. 6588, pp. 44–53, Apr. 2022, doi: 10.1126/science.abj6987.

- [256] A. Greiβel *et al.*, “Histone acetylation and methylation significantly change with severity of atherosclerosis in human carotid plaques,” *Cardiovascular Pathology*, vol. 25, no. 2, pp. 79–86, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.carpath.2015.11.001.
- [257] R. J. Wierda *et al.*, “Global histone H3 lysine 27 triple methylation levels are reduced in vessels with advanced atherosclerotic plaques,” *Life Sci*, vol. 129, pp. 3–9, May 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2014.10.010.
- [258] J. Xu *et al.*, “Developmental Control of Polycomb Subunit Composition by GATA Factors Mediates a Switch to Non-Canonical Functions,” *Mol Cell*, vol. 57, no. 2, pp. 304–316, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.009.
- [259] H. Kook, S.-B. Seo, and R. Jain, “EZ Switch From EZH2 to EZH1,” *Circ Res*, vol. 121, no. 2, pp. 91–94, Jul. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311351.
- [260] A. Greiβel *et al.*, “Histone acetylation and methylation significantly change with severity of atherosclerosis in human carotid plaques,” *Cardiovascular Pathology*, vol. 25, no. 2, pp. 79–86, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.carpath.2015.11.001.
- [261] X. Zhu *et al.*, “Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention,” *Signal Transduct Target Ther*, vol. 6, no. 1, p. 245, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00646-9.
- [262] D. Yang *et al.*, “H3K4 Methyltransferase Smyd3 Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration, and Neointima Formation,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 41, no. 6, pp. 1901–1914, Jun. 2021, doi: 10.1161/ATVBAHA.121.314689.
- [263] W. Grabowska *et al.*, “Curcumin elevates sirtuin level but does not postpone in vitro senescence of human cells building the vasculature,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 15, pp. 19201–19213, Apr. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8450.
- [264] T. Chandra and M. Narita, “High-order chromatin structure and the epigenome in SAHF,” *Nucleus*, vol. 4, no. 1, pp. 23–28, Jan. 2013, doi: 10.4161/nucl.23189.
- [265] U. Herbig, M. Ferreira, L. Condel, D. Carey, and J. M. Sedivy, “Cellular Senescence in Aging Primates,” *Science (1979)*, vol. 311, no. 5765, pp. 1257–1257, Mar. 2006, doi: 10.1126/science.1122446.
- [266] J. Herrmann, M. Babic, M. Tölle, K.-U. Eckardt, M. van der Giet, and M. Schuchardt, “A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 10, p. 3475, May 2020, doi: 10.3390/ijms21103475.
- [267] N. Kourmouli, “Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope,” *EMBO J*, vol. 19, no. 23, pp. 6558–6568, Dec. 2000, doi: 10.1093/emboj/19.23.6558.
- [268] B. A. Benayoun, E. A. Pollina, and A. Brunet, “Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 16, no. 10, pp. 593–610, Oct. 2015, doi: 10.1038/nrm4048.

- [269] P. Scaffidi and T. Misteli, "Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging," *Science (1979)*, vol. 312, no. 5776, pp. 1059–1063, May 2006, doi: 10.1126/science.1127168.
- [270] A. R. Strom *et al.*, "HP1 α is a chromatin crosslinker that controls nuclear and mitotic chromosome mechanics," *Elife*, vol. 10, Jun. 2021, doi: 10.7554/eLife.63972.
- [271] G. LeRoy *et al.*, "Proteogenomic characterization and mapping of nucleosomes decoded by Brd and HP1 proteins," *Genome Biol*, vol. 13, no. 8, p. R68, 2012, doi: 10.1186/gb-2012-13-8-r68.
- [272] H. Yin, S. Sweeney, D. Raha, M. Snyder, and H. Lin, "A High-Resolution Whole-Genome Map of Key Chromatin Modifications in the Adult *Drosophila melanogaster*," *PLoS Genet*, vol. 7, no. 12, p. e1002380, Dec. 2011, doi: 10.1371/journal.pgen.1002380.
- [273] R. Zhang *et al.*, "Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA," *Dev Cell*, vol. 8, no. 1, pp. 19–30, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.devcel.2004.10.019.
- [274] M. Benczik *et al.*, "Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology," *Pathology & Oncology Research*, vol. 22, no. 1, pp. 179–188, Jan. 2016, doi: 10.1007/s12253-015-9990-z.
- [275] B. Zhou, A. Moodie, A. Blanchard, E. Leygue, and Y. Myal, "Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights," *J Clin Med*, vol. 4, no. 12, pp. 1960–1976, Nov. 2015, doi: 10.3390/jcm4121952.
- [276] A. A. Bhat *et al.*, "Claudin-1, a Double-Edged Sword in Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 2, p. 569, Jan. 2020, doi: 10.3390/ijms21020569.
- [277] F. Ma *et al.*, "A CLDN1-Negative Phenotype Predicts Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e112765, Nov. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0112765.
- [278] R. F. Haseloff, S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg, and I. E. Blasig, "Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 38, pp. 16–25, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.004.
- [279] R. F. Haseloff, S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg, and I. E. Blasig, "Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 38, pp. 16–25, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.004.
- [280] N. Sladojevic *et al.*, "Claudin-1-Dependent Destabilization of the Blood–Brain Barrier in Chronic Stroke," *The Journal of Neuroscience*, vol. 39, no. 4, pp. 743–757, Jan. 2019, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1432-18.2018.
- [281] A. M. S. Hartz *et al.*, "Amyloid- β Contributes to Blood–Brain Barrier Leakage in Transgenic Human Amyloid Precursor Protein Mice and in Humans With Cerebral Amyloid Angiopathy," *Stroke*, vol. 43, no. 2, pp. 514–523, Feb. 2012, doi: 10.1161/STROKEAHA.111.627562.
- [282] M. Asahina, Y. Yoshiyama, and T. Hattori, "Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain.," *Clin Neuropathol*, vol. 20, no. 2, pp. 60–3, 2001.

- [283] Q. Hu *et al.*, “Therapeutic application of gene silencing MMP-9 in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model,” *Exp Neurol*, vol. 216, no. 1, pp. 35–46, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.007.
- [284] C. Staat *et al.*, “Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers,” *Biomaterials*, vol. 54, pp. 9–20, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.007.
- [285] D. Zwanziger *et al.*, “The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness,” *Endocr Relat Cancer*, vol. 22, no. 5, pp. 819–830, Oct. 2015, doi: 10.1530/ERC-14-0502.
- [286] A. D. French *et al.*, “PKC and PKA Phosphorylation Affect the Subcellular Localization of Claudin-1 in Melanoma Cells,” *Int J Med Sci*, pp. 93–101, 2009, doi: 10.7150/ijms.6.93.
- [287] P. Dhawan, “Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 7, pp. 1765–1776, Jul. 2005, doi: 10.1172/JCI24543.
- [288] T. Lopardo *et al.*, “Claudin-1 Is a p63 Target Gene with a Crucial Role in Epithelial Development,” *PLoS One*, vol. 3, no. 7, p. e2715, Jul. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002715.
- [289] A. Roopra, “MAGIC: a tool for predicting transcription factors and cofactors driving gene sets using ENCODE data,” *PLoS Comput Biol*, vol. 16, no. 4, p. e1007800, Apr. 2020, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007800.
- [290] Y. Xie *et al.*, “MiR-3571 modulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by targeting claudin 1,” *Int J Med Sci*, vol. 19, no. 3, pp. 511–524, 2022, doi: 10.7150/ijms.64639.
- [291] K. Hasegawa *et al.*, “Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes,” *Nat Med*, vol. 19, no. 11, pp. 1496–1504, Nov. 2013, doi: 10.1038/nm.3363.
- [292] G. R. X. Hickson and P. H. O’Farrell, “Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis,” *J Cell Biol*, vol. 180, no. 2, pp. 285–294, Jan. 2008, doi: 10.1083/jcb.200709005.
- [293] R. S. Pedersen *et al.*, “Profiling DNA damage response following mitotic perturbations,” *Nat Commun*, vol. 7, no. 1, p. 13887, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13887.
- [294] A. S. Maddox, L. Lewellyn, A. Desai, and K. Oegema, “Anillin and the Septins Promote Asymmetric Ingression of the Cytokinetic Furrow,” *Dev Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 827–835, May 2007, doi: 10.1016/j.devcel.2007.02.018.
- [295] J. Patzig *et al.*, “Septin/anillin filaments scaffold central nervous system myelin to accelerate nerve conduction,” *Elife*, vol. 5, Aug. 2016, doi: 10.7554/eLife.17119.
- [296] K. Rehan and A. S. Maddox, “Neuron Migration: Anillin Protects Leading Edge Actin,” *Current Biology*, vol. 25, no. 10, pp. R423–R425, May 2015, doi: 10.1016/j.cub.2015.03.030.

- [297] M. Ahmad *et al.*, "Expression Characteristics and Significant Diagnostic and Prognostic Values of ANLN in Human Cancers," *Int J Gen Med*, vol. Volume 15, pp. 1957–1972, Feb. 2022, doi: 10.2147/IJGM.S343975.
- [298] X. Long, W. Zhou, Y. Wang, and S. Liu, "Prognostic significance of ANLN in lung adenocarcinoma," *Oncol Lett*, May 2018, doi: 10.3892/ol.2018.8858.
- [299] C. C. Reyes *et al.*, "Anillin Regulates Cell-Cell Junction Integrity by Organizing Junctional Accumulation of Rho-GTP and Actomyosin," *Current Biology*, vol. 24, no. 11, pp. 1263–1270, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.04.021.
- [300] P. A. Hall *et al.*, "The Septin-Binding Protein Anillin Is Overexpressed in Diverse Human Tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 19, pp. 6780–6786, Oct. 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0997.
- [301] K. Magnusson *et al.*, "ANLN is a prognostic biomarker independent of Ki-67 and essential for cell cycle progression in primary breast cancer," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 904, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2923-8.
- [302] J. Ma *et al.*, "Identification of a new p53 responsive element in the promoter region of anillin," *Int J Mol Med*, Mar. 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4527.

Spis publikacji autorki rozprawy

1. Krzystyniak A, Wesierska M, Petrazzo G, **Gadecka A**, Dudkowska M, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Figiel I, Włodarczyk J, Sikora E. Combination of dasatinib and quercetin improves cognitive abilities in aged male Wistar rats, alleviates inflammation and changes hippocampal synaptic plasticity and histone H3 methylation profile. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jan 18;14(2):572-595. doi: 10.18632/aging.203835. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35042834; PMCID: PMC8833137.
2. **Gadecka A**, Bielak-Zmijewska A. Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome. *Nutrients*. 2019 Jun 1;11(6):1251. doi: 10.3390/nu11061251. PMID: 31159371; PMCID: PMC6628342.