

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk



mgr inż. Joanna Borkowska

**Zmiany epigenetycznych modyfikacji DNA i ekspresji
regulujących je enzymów TET w procesie starzenia
podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka
i izolowanych z niej komórek macierzystych (ASC)**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Monika Puzianowska-Kuźnicka
Promotor pomocniczy: dr Anna Domaszewska-Szostek

Warszawa, 2021

Badania współfinansowane w ramach programu KNOW (krajowy naukowy ośrodek wiodący) oraz
grantu NCN nr 2014/13/B/NZ4/00157



Streszczenie

Spowalnianie procesu starzenia, będącego jednym z najważniejszych czynników ryzyka występowania chorób związanych z wiekiem, jest niezwykle istotne zwłaszcza obecnie, w obliczu szybkiego starzenia się społeczeństw. Podskórna tkanka tłuszczowa (subcutaneous adipose tissue, SAT) jest nie tylko magazynem energii, ale i bardzo ważnym organem endokrynnym, a zmiany zachodzące w tej tkance wraz z wiekiem wpływają na tempo i przebieg procesu starzenia. Jedną z przyczyn związanej z wiekiem dysfunkcji tkanki tłuszczowej są zmiany w funkcjonowaniu zasiedlających ją komórek macierzystych (adipose-derived stem cells, ASC).

Modyfikacje epigenetyczne poprzez modulację struktury chromatyny regulują ekspresję genów i są niezbędne do utrzymania prawidłowego fenotypu komórek. Wiadomo, że wraz z wiekiem dochodzi do istotnych zmian w obrębie epigenomu. Zjawisko to nazywane jest dryftem epigenetycznym. Najlepiej poznanym elementem dryftu epigenetycznego są zmiany metylacji DNA. Odkrycie enzymów TET (ten-eleven translocation) i procesu aktywnej demetylacji DNA rzuciło nowe światło na mechanizmy działania tej modyfikacji epigenetycznej. Enzymy TET należą do rodziny oksygenaz zależnych od α -ketoglutaranu. Przeprowadzają reakcję oksydacji 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), która może dalej podlegać procesowi aktywnej oraz biernej demetylacji. Enzymy TET dzięki swoim właściwościom zaangażowane są nie tylko w regulację metylacji DNA, ochronę wysp CpG przed nieprawidłową metylacją, ale także, pośrednio, regulują modyfikacje białek histonowych. Z kolei 5hmC, która nie jest tylko produktem pośrednim w procesie demetylacji DNA, ale jest aktywną modyfikacją epigenetyczną, zaangażowana jest w regulację ekspresji genów, między innymi poprzez wpływ na aktywność elementów regulatorowych. Pełni też ważną rolę w regulacji procesu różnicowania komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej.

Te i inne dane stały się podstawą **hipotezy**, że związane z wiekiem zmiany w ekspresji lub aktywności TET oraz zmiany w poziomie i dystrybucji 5hmC w SAT oraz izolowanych z niej ASC są elementem dryftu epigenetycznego.

Celem projektu było zbadanie związanych z wiekiem zmian w ekspresji enzymów TET oraz w poziomie 5-hydroksymetylacji DNA w podskórnej tkance tłuszczowej człowieka oraz w izolowanych z niej komórkach macierzystych, jak również zbadanie zmian w dystrybucji 5hmC (obecność regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem, DHMR) w

genomie komórek ASC przy użyciu sekwencjonowania nowej generacji. Ponieważ wyniki analizy różnicowej danych wielkoskalowych zależą w dużym stopniu od zastosowanego algorytmu, w ramach tego celu pracy zaplanowano również określenie, czy faktycznie i jaki wpływ na uzyskane wyniki ma rodzaj algorytmu. Ponadto, **dodatkowym celem** było wytypowanie regionów specyficznie 5-hydroksymetylowanych w ASC poprzez porównanie profilu tej modyfikacji w ASC i fibroblastach pochodzących od tych samych dawców. Drugim celem dodatkowym było sprawdzenie, czy istnieją związane z wiekiem DHMR wspólne dla różnych typów komórek (uniwersalne zmiany hydroksymetylacji w toku starzenia).

Materiał do badań stanowiła podskórna tkanka tłuszczowa pobrana od 71 pacjentów (39 kobiet oraz 32 mężczyzn) w wieku 18-96 lat (średnio 53 ± 20 lat), z BMI 17-35 kg/m² (średnio $26,6 \pm 5$ kg/m²) z okolic o ograniczonym narażeniu na promieniowanie słoneczne. Pobranie wykonano za zgodą Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB/283/2013). Uczestnicy wyrazili zgodę na udział w badaniu. Dane analizowano po uwzględnieniu zasad anonimizacji. Od młodych (n=8, 25-34 lat, średnio $30 \pm 3,5$ lat) i najstarszych osób (n=10, 77-89 lat, średnio $81 \pm 4,6$ lat) izolowano dodatkowo ASC. Z SAT oraz ASC w 3 pasażu izolowano mRNA, DNA oraz białko. Globalny poziom modyfikacji DNA (5mC, 5hmC, 5fC, 5caC) badano przy użyciu immunoblotów. Ekspresję TET na poziomie mRNA badano przy użyciu PCR czasu rzeczywistego, a ilość białka przy użyciu immunoblotów. Regiony 5-hydroksymetylowane w DNA ASC od 5 osób młodych (28-34 lata; średnio $30,6 \pm 3$ lata) i 5 starszych (77-94 lata; średnio 83 ± 6 lat) pozyskano przy użyciu immunoprecypitacji 5-hydroksymetylowanego DNA i sekwencjonowania nowej generacji (hMeDIP-seq). Analiza różnicowa w celu wytypowania związanych z wiekiem DHMR wykonana została przy użyciu pakietu MEDIPS dla środowiska R. Analizę wykonano przy użyciu ustawień domyślnych sugerowanych przez twórców pakietu oraz dla parametrów zoptymalizowanych dla dwóch skrajnych szerokości okna genomowego 50 pz i 450 pz. Analizę dystrybucji 5hmC w genomie ASC wykonano określając poziom tej modyfikacji w elementach struktury genów, elementach regulatorowych, regionach powiązanych z modyfikacjami białek histonowych, wyspach CpG oraz elementach powtórzonych. Identyfikację regionów różnicujących ASC od fibroblastów wykonano przy użyciu pakietu MEDIPS dla 7 osób: 3 osób młodych (27-33 lata; średnio $29,6 \pm 3$ lata) i 4 starszych (77-94 lata; średnio 82 ± 5 lat) od których izolowano zarówno ASC jak i fibroblasty.

Zaobserwowałam istotny, związany z wiekiem wzrost globalnego poziomu hydroksymetylacji DNA ($r=0,36$; $p=0,026$) w DNA SAT bez zmian w poziomie innych badanych modyfikacji. Poziom 5hmC był również wyższy w DNA ASC izolowanych od osób starszych w porównaniu do osób młodych ($p=0,0003$). Wynik pozostał istotny statystycznie po wieloczynnikowej analizie regresji uwzględniającej BMI i płeć. Dodatkowo, poziom 5hmC w ASC korelował z czasem podwojenia populacji ($r=0,62$; $p=0,01$) i był wyższy w komórkach wolno dzielących się. Analiza ekspresji TET w SAT na poziomie mRNA oraz białka wykazała, że poziom TET1 nie zmienia się z wiekiem w mojej grupie badanej. Zaobserwowałam natomiast związany z wiekiem wzrost mRNA TET2 ($r=0,33$, $p=0,006$) oraz wzrost poziomu białka TET3 ($r=0,32$, $p=0,04$). Natomiast w ASC poziomy mRNA i białek TET nie różniły się pomiędzy komórkami młodych i starszych dawców. Poziomy mRNA i białek TET nie korelowały z poziomem 5hmC ani w SAT, ani w ASC.

W celu wytypowania związanych z wiekiem DHMR w ASC, wykonałam analizę różnicową przy użyciu trzech różnych algorytmów. Każda z analiz zidentyfikowała odmienną liczbę DHMR. W wyniku połączenia regionów pozyskanych ze wszystkich wariantów analizy wytypowałam około 100 związanych z wiekiem DHMR. Regiony te lokalizowały się preferencyjnie poza wyspami CpG. Związane z wiekiem DHMR wspólne dla wszystkich wariantów analizy powiązane były z genami *TSPAN7*, *LIAT1*, *KLHL13*, *EYS*, *RBFOX1*.

Analiza różnicowa regionów 5-hydroksymetylowanych w ASC i fibroblastach wykonana w ramach realizacji celu dodatkowego zidentyfikowała 2520 regionów różnicujących ASC od fibroblastów. Wśród regionów o zwiększonej hydroksymetylacji w ASC było więcej promotorów zawierających wyspę CpG niż w obrębie DHMR hiper-hydroksymetylowanych w fibroblastach. Geny powiązane z tymi regionami powiązane były między innymi z procesem różnicowania komórkowego.

Ponadto wykazałam, że region genomu leżący w obrębie intronu genu *RSRP1* był hiper-hydroksymetylowany zarówno w ASC jak i fibroblastach osób starszych w porównaniu z komórkami osób młodych. Analiza ekspresji tego genu metodą RT-PCR wykazała, że poziom jego mRNA jest istotnie niższy w ASC izolowanych od osób starszych. W fibroblastach nie było takiej związanej z wiekiem zależności.

Pozyskane przeze mnie wyniki sugerują, że 5hmC może pełnić ważną rolę w epigenetycznej regulacji funkcjonowania ASC, a zmiany w poziomie oraz dystrybucji 5hmC

w SAT oraz ASC stanowią element związanego z wiekiem dryftu epigenetycznego u człowieka. Zmiany w poziomie/dystrybucji tej modyfikacji nie wynikają najprawdopodobniej ze zmian w ekspresji genów TET, a są następstwem zmieniającego się wraz z wiekiem mikrośrodowiska komórki, które oddziałuje na aktywność katalityczną tych enzymów. Wydaje się, że część związanych z wiekiem zmian w poziomie/dystrybucji 5hmC wpływa na zmiany ekspresji genów w ASC, co może być jedną z przyczyn obniżonego potencjału regeneracyjnego tych komórek, jakie obserwuje się u starszych osób. Z drugiej strony, część powiązanych wiekiem DHMR znajdowała się w obrębie genów nie ulegających ekspresji w tym typie komórek, co sugeruje, że takie powstające w procesie starzenia zmiany mają charakter markerowy.

Z kolei porównanie profilu 5hmC pomiędzy ASC a fibroblastami sugeruje, że związane z upływem czasu zmiany hydroksymetylacji DNA są w większości tkankowo specyficzne. Niemniej jednak DHMR w intronie genu *RSRP1* jest kandydatem na uniwersalny marker starzenia.

Porównanie różnych parametrów analizy różnicowej zmian w hydroksymetylacji DNA sugeruje, że dobrym podejściem wydaje się być wykonanie analizy dla okien genomowych o różnej wielkości i połączenie wyników, szczególnie jeśli dane nie są analizowane pod kątem dokładnie sprecyzowanych czynników genomowych. Dodatkowo, zastosowanie poprawki FDR jest lepsze niż poprawki Bonferroniego, która może prowadzić do uzyskania dużej liczby wyników fałszywie negatywnych.