

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  
gratu NCN nr 2014/13/B/NZ4/00157



Podziękowania:

Dziękuję profesor Monice Puzianowskiej-Kuźnickiej za wsparcie i cierpliwość, dziękuję kolegom z zespołu za pomoc i wspaniałą atmosferę pracy.

Rodzicom za bycie wspaniałymi rodzicami.

Mojemu Miśkowi za bycie cudownym partnerem i tatą.

## Spis treści

Spis tabel.....	6
Spis rycin .....	7
Spis skrótów.....	9
Streszczenie .....	14
Abstract.....	18
I. Wstęp.....	22
1. Starzenie .....	22
1.1. Mechanizmy procesu starzenia .....	22
1.2. Rola tkanki tłuszczowej w regulacji przebiegu procesu starzenia.....	23
1.3. Komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej i ich starzenie.....	24
2. Epigenetyczne modyfikacje DNA .....	26
2.1. Metylacja DNA.....	26
2.2. 5-hydroksymetylacja DNA .....	28
3. Enzymy TET .....	32
3.1. TET1 .....	33
3.2. TET2 .....	35
3.3. TET3 .....	37
3.4. Regulacja ekspresji i aktywności TET .....	37
3.5. TET a choroby .....	38
4. Związany z wiekiem dryft epigenetyczny dotyczący modyfikacji DNA.....	39
III. Hipoteza i cel pracy.....	42
IV. Materiały i metody .....	44
5. Materiały.....	44
5.1. Bufory .....	44
5.2. Odczynniki .....	45
5.3. Zestawy.....	47
5.4. Przeciwciała I-rzędowe .....	47
5.5. Przeciwciała II-rzędowe .....	48
5.6. Sprzęt.....	48
5.7. Programy, pakiety i bazy danych.....	49
5.8. Materiał biologiczny .....	50

6.	Metody.....	50
6.1.	Izolacja, hodowla i mrożenie komórek ASC .....	50
6.2.	Identyfikacja komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej.....	51
6.3.	Adipogeneza .....	51
6.4.	Barwienie pod kątem markerów różnicowania .....	52
6.5.	Potencjał do samoodnowy .....	52
6.6.	Izolacja DNA.....	52
6.7.	Analiza globalnego poziomu modyfikacji DNA (dot blot) .....	53
6.8.	Sekwencjonowanie pod kątem hydroksymetylacji hMeDIP-seq .....	54
6.9.	Analiza dystrybucji 5hmC w genomie ASC .....	55
6.10.	Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem (DHMR) .....	55
6.11.	Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych pomiędzy ASC a fibroblastami .....	57
6.12.	Identyfikacja funkcjonalna i ontologiczna zidentyfikowanych regionów .....	58
6.13.	Analiza statystyczna częstości występowania regionów różnicowo hydroksymetylowanych w obrębie poszczególnych elementów genomu .....	60
6.14.	Izolacja RNA .....	61
6.15.	Odwrotna transkrypcja i PCR czasu rzeczywistego .....	61
6.16.	Immunofluorescencja .....	63
6.17.	Izolacja białka i immunobloty .....	64
6.18.	Analiza statystyczna.....	65
V.	Wyniki.....	66
7.	Podskórna tkanka tłuszczowa.....	66
7.1.	Globalny poziom modyfikacji DNA .....	66
7.2.	Ekspresja enzymów TET.....	70
8.	Komórki macierzyste podskórnej tkanki tłuszczowej .....	71
8.1.	Identyfikacja ASC .....	71
8.2.	Globalny poziom 5hmC w komórkach ASC .....	72
8.3.	Lokalizacja subkomórkowa białek TET w ASC .....	74
8.4.	Związane z wiekiem zmiany w ekspresji TET w ASC.....	75
8.5.	Dystrybucja 5hmC w genomie ASC.....	76
8.6.	Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem w ASC .....	79

8.7. Porównanie profilu 5hmC pomiędzy ASC a fibroblastami oraz poszukiwanie związanych z wiekiem DHMR wspólnych dla ASC i fibroblastów.....	84
VI. Dyskusja .....	91
VII. Podsumowanie .....	108
VIII. Wnioski .....	110
IX. Bibliografia .....	112

## Spis tabel

Tabela 1. Lista buforów.....	44
Tabela 2. Przeciwciała I-rzędowe.....	47
Tabela 3. Przeciwciała II-rzędowe.....	48
Tabela 4. Podsumowanie wariantów analizy różnicowej.....	57
Tabela 5. Lista starterów użytych do reakcji PCR czasu rzeczywistego.....	62
Tabela 6. Analiza regresji dla modeli uwzględniających poszczególne czynniki potencjalnie wpływające na poziom 5hmC. ....	69

## Spis rycin

Rycina 1. Mechanizm biernej i aktywnej demetylacji DNA. ....	28
Rycina 2. Dystrybucja 5hmC w genomie i jej wpływ na aktywność transkrypcyjną genów. ....	32
Rycina 3. Budowa białek TET. ....	33
Rycina 4. Reprezentatywny immunoblot przedstawiający siłę sygnału luminescencji badanych modyfikacji DNA.....	54
Rycina 5. Schemat przedstawiający analizowane regiony genomu. ....	59
Rycina 6. Krzywe topnienia produktów powstałych podczas reakcji PCR czasu rzeczywistego dla wszystkich badanych genów TET. ....	63
Rycina 7. Analiza globalnego poziomu modyfikacji epigenetycznych DNA.....	67
Rycina 9. Rozkład płci oraz BMI w grupie badanej. ....	68
Rycina 10. Korelacja pomiędzy 5hmC a wiekiem po korekcie danych o płeć i BMI. ....	68
Rycina 11 . Związane z wiekiem zmiany w ekspresji TET1-3 w podskórnej tkance tłuszczowej osób w różnym wieku. ....	70
Rycina 12. Identyfikacja komórek macierzystych tkanki tłuszczowej na podstawie wzorca ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych. ...	72
Rycina 13. Globalny poziom 5hmC w DNA komórek ASC.....	73
Rycina 14. Barwienia immunofluorescencyjne przedstawiająca lokalizacje białek TET w komórkach ASC .....	74
Rycina 15. Analiza ekspresji TET w ASC od osób młodych i starszych.....	75
Rycina 16. Względny poziom 5hmC w obrębie wybranych elementów genomu. ....	77
Rycina 17. Względny poziom 5hmC w obrębie wybranych elementów genomu. ....	68
Rycina 18. Względny poziom 5hmC w obrębie wybranych elementów powtórzonych. ....	78
Rycina 19. Związane z wiekiem DHMR zidentyfikowane przy użyciu pakietu MEDIPS. ....	80
Rycina 20. DHMR wspólne dla analiz przy użyciu zoptymalizowanych parametrów dla szerokiego i wąskiego okna. ....	81
Rycina 21. Heatmapa obrazująca poziom 5hmC w DHMR uzyskanych przez połączenie regionów wytypowanych przez algorytmy dla wąskiego i szerokiego okna.....	82

Rycina 22. Występowanie związanych z wiekiem DHMR w obrębie konkretnych struktur genomu.....	83
Rycina 23. Heatmapa przedstawiająca regiony o różnicowo hydroksymetylowane w komórkach ASC i fibroblastach.....	85
Rycina 24. Analiza współwystępowania regionów różnicowo hydroksymetylowanych między ASC a fibroblastami w obrębie wysp CpG i elementów regulatorowych potencjalnie regulowanych przez 5hmC.....	86
Rycina 25. Związane z wiekiem DHMR wspólne dla ASC i fibroblastów.....	88
Rycina 26. Analiza ekspresji genów powiązanych ze związanymi z wiekiem DHMR. ....	89
Rycina 27. Poziom 5hmC u poszczególnych pacjentów w obrębie wybranego, wspólnego DHMR zidentyfikowanego przez analizę zoptymalizowaną dla wąskiego i szerokiego okna genomowego.....	98
Rycina 28. Przykładowe DHMR wytypowane w obrębie tylko jednego wariantu analizy. .	99



## Spis skrótów

Skrót	Objaśnienie
<b>2OG</b>	2-oksoglutaran
<b>3'UTR</b>	3' untranslated region, rejon 3' niepodlegający translacji
<b>5'UTR</b>	5' untranslated region, rejon 5' niepodlegający translacji
<b>5CaC</b>	5-carboxylcytosine, 5-karboksylocytozyna
<b>5fC</b>	5-formylcytosine, 5-formylocytozyna
<b>5hmC</b>	5-hydroxymethylcytosine, 5-hydroksymetylocytozyna
<b>5hmU</b>	5-hydroxymethyluracil, 5-hydroksymetylouracyl
<b>5mC</b>	5-methylcytosine, 5-metylocytozyna
<b>AID</b>	Activation-induced cytidine deaminase, deaminaza cytydyny
<b>AluY</b>	elementy powtórzone Alu, klasa Y
<b>AML</b>	acute myeloid leukemia, ostra białaczka szpikowa
<b>ANOVA</b>	analiza wariancji
<b>APOBEC</b>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide like, enzym edytujący mRNA apolipoproteiny B podobny do katalitycznego polipeptydu
<b>AR</b>	Androgen receptor, receptor androgenowy
<b>ASC</b>	adipose-derived stem cells, komórki macierzyste tkanki tłuszczowej
<b>BAM</b>	compressed binary version of a SAM file, format zapisu danych z sekwencjonowania
<b>BER</b>	base excision repair, naprawa DNA metodą wycinania nukleotydów
<b>BMI</b>	body mass index, indeks masy ciała
<b>BSA</b>	bovine serum albumin, bydlęca albumina płodowa
<b>C17orf97, LIAT1</b>	chromosome 17 open reading frame 97; arginyltransferase binding protein, otwarta ramka odczytu 97 chromosomu 17; białko wiążące arginylotransferazę
<b>C3H10T1</b>	mysie komórki mezenchymalne
<b>CD</b>	markery powierzchniowe
<b>CDS</b>	coding sequence, region kodujący w DNA
<b>CEBP<math>\alpha</math></b>	CCAAT enhancer binding protein $\alpha$ , białko wiążące CCAAT wzmacniacz $\alpha$

<b>c-Myc</b>	Myc proto-oncogene protein, proto-onkogen Myc
<b>Cp</b>	crossing point, punkt przecięcia oznaczający liczbę cykli, po których obserwowano fluorescencję w reakcji RT-PCR
<b>CTCF</b>	CCCTC-binding factor, czynnik wiążący sekwencję CCCTC
<b>CXXC</b>	domena CXXC wiążąca DNA
<b>ddH2O</b>	woda destylowana, dejonizowana
<b>DHMR</b>	differentially hydroxymethylated region, region różnicowo hydroksymetylowany
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium, pożywka hodowlana
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxide, dimetylosulfotlenek
<b>DNMT</b>	DNA methyltransferases, metylotransferaza DNA
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid, kwas edetynowy
<b>ERR<math>\alpha</math></b>	Estrogen-related receptor $\alpha$ , receptor pokrewny do receptora estrogenowego $\alpha$
<b>ES</b>	embryonic stem cells, embrionalne komórki macierzyste
<b>Esrrb</b>	Estrogen related receptor $\beta$ , receptor pokrewny do receptora estrogenowego $\beta$
<b>EYS</b>	Eyes shut homolog, homolog białka Eyes shut
<b>EZH2</b>	Enhancer of Zeste homolog 2, wzmacniacz białka homologicznego do Zeste 2
<b>FABP4</b>	Fatty acid-binding protein 4, białko wiążące kwasy tłuszczowe 4
<b>FBS</b>	fetal bovine serum, bydlęca surowica płodowa
<b>FDR</b>	false discovery rate, współczynnik fałszywych odkryć, oczekiwana proporcja błędów I rodzaju
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
<b>H3K4me1</b>	metylacja lizyny 4 histonu 3
<b>H3K4me2</b>	dimetylacja lizyny 4 histonu 3
<b>H3K4me3</b>	trimetylacja lizyny 4 histonu 3
<b>H3K27ac</b>	acetylacja lizyny 27 histonu 3
<b>H3K27me3</b>	trimetylacja lizyny 27 histonu 3

<b>H4K16Ac</b>	acetylacja lizyny 16 histonu 4
<b>H3K36</b>	trimetylacja lizyny 27 histonu 3
<b>H2BK5ac</b>	acetylacja lizyny 5 histonu H2B
<b>H3K23ac</b>	acetylacja lizyny 23 histonu H2B
<b>H3K9ac</b>	acetylacja lizyny 9 histonu 3
<b>HCF1</b>	Host cell factor 1, czynnik komórki gospodarza C1
<b>HERVH-int</b>	human endogenous retrovirus subfamily H, podrodzina H ludzkich endogennych retrowirusów
<b>hMeDIP-seq</b>	hydroxymethylated DNA immunoprecipitation sequencing, immunoprecypitacja hydroksymetylowanego DNA połączona z sekwencjonowaniem
<b>IDAX</b>	CXXC finger protein 4, białko zawierające domenę palca cynkowego 4
<b>IDH1</b>	Isocitrate dehydrogenase 1, dehydrogenaza izocytrynianowa 1
<b>IDH2</b>	Isocitrate dehydrogenase 2, dehydrogenaza izocytrynianowa 2
<b>IMBX</b>	3-isobutyl-1-methylxanthine, 3-izobutylo-1-metyloksantyna
<b>Klf4</b>	Krüppel-like factor 4, Krüppel-podobny czynnik transkrypcyjny 4
<b>KLHL13</b>	Kelch-like family member 13, Kelch-podobne białko 13
<b>MACS</b>	model-based analysis of ChIP-Seq, algorytm do typowania regionów pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji DNA połączonej z sekwencjonowaniem
<b>MBD</b>	methyl-CpG binding domain, domena wiążąca metylowany motyw CpG
<b>Mbd3</b>	Methyl-CpG-binding domain protein 3, białko wiążące metylowany motyw CpG 3
<b>MeDIP-seq</b>	methylated DNA immunoprecipitation sequencing, immunoprecypitacja metylowanego DNA połączona z sekwencjonowaniem
<b>MEF</b>	mouse embryonic fibroblasts, mysie fibroblasty zarodkowe
<b>miRNA</b>	mikroRNA
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cells, mezychemalne komórki macierzyste
<b>NANOG</b>	Homeobox transcription factor NANOG, czynnik transkrypcyjny NANOG

<b>NSD3</b>	Histone-lysine N-methyltransferase NSD3, N-metylotransferaza histonowo-lizynowa NSD3
<b>OCT</b>	Octamer-binding transcription factor, czynnik transkrypcyjny wiążący oktamer 4
<b>OGT</b>	O-linked $\beta$ -GlcNAc O-GlcNAc transferase, transferaza O-GlcNAc
<b>PBS-T</b>	phosphate buffered saline-Tween, buforowana fosforanem sól fizjologiczna z dodatkiem Tween 20
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>PFA</b>	paraformaldehyde
<b>PRC1</b>	Polycomb repressive complex 1, kompleks supresorowy polycomb 1
<b>PSC</b>	human pluripotent stem cells, ludzkie pluripotentne komórki macierzyste
<b>pz</b>	pary zasad
<b>RBFOX1</b>	RNA binding Fox-1 homolog 1, homolog Fox-1 wiążący RNA 1
<b>REST</b>	RE1-silencing transcription factor, hamujący czynnik transkrypcyjny RE1
<b>RHD</b>	Rh blood group D antigene, antygen D zgodności grupowej krwi w układzie Rh
<b>Rhms</b>	relative hydroxymethylation score, względny poziom hydroksymetylacji
<b>RIPA</b>	radioimmunoprecipitation assay buffer, bufor do izolacji białka
<b>RPKM</b>	reads per kilobase per million, liczba odczytów na tysiąc par zasad transkryptu na milion zmapowanych odczytów
<b>RSRP1</b>	Arginine and serine rich protein 1, białko bogate w argininy i seryny 1
<b>RT-PCR</b>	real-time PCR, PCR w czasie rzeczywistym
<b>SASP</b>	senescence-associated secretory phenotype, fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem
<b>SAT</b>	subcutaneous adipose tissue, podskórna tkanka tłuszczowa
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate, sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego
<b>SET1/COMPASS</b>	Complex proteins associated with Set1, kompleks białek związanych z białkiem SET1

<b>SIN3A</b>	Paired amphipathic helix protein, sparowane białko helisy amfipatycznej
<b>SINE</b>	short interspersed repetitive elements, krótkie rozproszone elementy powtórzone
<b>Sox2</b>	SRY-box transcription factor 2, czynnik transkrypcyjny 2 regionu Y determinującego płeć
<b>SVF</b>	stromal vascular fraction, frakcja podporowo-naczyniowa
<b>TAD</b>	topologically associating domains, domeny w obrębie chromatyny
<b>TBP</b>	TATA-box binding protein, białko wiążące sekwencję TATA
<b>TBS-T</b>	tris-buffered saline-Tween, buforowana tris sól fizjologiczna z dodatkiem Tween 20
<b>TDG</b>	thymine-DNA glycosylase, glikozylaza tymidyny
<b>TET</b>	Ten-eleven translocation, enzym translokacji dziesięć-jedenaście
<b>TGS</b>	tris glicyna SDS, bufor do elektroforezy
<b>TMM</b>	trimmed mean of M values, metoda normalizacji danych z sekwencjonowania pod kątem wielkości biblioteki
<b>TR<math>\alpha</math>1</b>	Thyroid hormone nuclear receptor $\alpha$ 1, receptor jądrowy hormonu tarczycy $\alpha$ 1
<b>TR<math>\beta</math>1</b>	Thyroid hormone nuclear receptor $\beta$ 1, receptor jądrowy hormonu tarczycy $\beta$ 1
<b>TSPAN7</b>	Tetraspanin 7, tetraspanina 7
<b>TSS</b>	transcription start site, miejsce startu transkrypcji

## 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  $\alpha$ -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, **dotychczasowym 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  $53 \pm 20$  lat), z BMI 17-35  $\text{kg/m}^2$  (średnio  $26,6 \pm 5$   $\text{kg/m}^2$ ) 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  $83 \pm 6$  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  $82 \pm 5$  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.

## Abstract

Slowing down the aging process, one of the most critical risk factors for age-related diseases, is of great importance, especially now, when we face the rapid aging of the human population. Subcutaneous adipose tissue (SAT) is an energy store and a very important endocrine organ. The age-related changes occurring in this tissue affect the rate and course of this process. One of the causes of age-related dysfunction of adipose tissue is a change in the functioning of adipose-derived stem cells (ASCs).

By modulating the chromatin structure, epigenetic modifications regulate gene expression and, therefore, are essential for maintaining the normal phenotype of cells. Notably, the epigenome undergoes significant aging-associated changes. The best-known element of epigenetic drift is a change in DNA methylation. The discovery of TET enzymes and the process of active DNA demethylation shed new light on the mechanisms of action of this epigenetic modification. TET enzymes belong to the family of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent oxygenases. They oxidize 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), which may further undergo active and passive demethylation. Thanks to their various properties, TET enzymes are involved in regulating DNA methylation, protecting CpG islands against abnormal methylation, and indirectly affect modifications of histone proteins. In turn, 5hmC, which not only is an intermediate product of DNA demethylation but is an active epigenetic modification, is involved in regulating gene expression by affecting the activity of the regulatory elements, among others. It also plays an essential role in regulating the process of differentiation of adipose tissue progenitor cells.

These and other data provided the basis for the **hypothesis** that age-related changes in TET expression or activity and changes in the level and distribution of 5hmC in SAT and ASCs are part of the epigenetic drift.

The project **aimed** to investigate the age-related changes in the expression of TET enzymes and the level of DNA 5-hydroxymethylation in human subcutaneous adipose tissue and ASCs, as well as to study the changes in the distribution of 5hmC (presence of regions differentially hydroxymethylated with age, DHMRs) in ASC DNA using next-generation sequencing. As the results of the differential analysis of large-scale data depend mainly on the algorithm used, this aim of the study also included determining whether and how the used algorithm affects the obtained results. Moreover, an **additional goal** was to select regions specifically 5-hydroxymethylated in ASCs by comparing the profile of this

modification in ASCs and fibroblasts originating from the same donors. A second additional goal was to check whether there are age-related DHMRs common for different cell types (universal aging-related changes in hydroxymethylation).

The research material was subcutaneous adipose tissue collected from 71 patients (39 women and 32 men) aged 18-96 years (mean  $53\pm 20$  years), with a BMI of 17-35 kg/m<sup>2</sup> (mean  $26,6\pm 5$  kg/m<sup>2</sup>) from areas with limited exposure to sunlight. The collection was performed with the consent of the Bioethics Committee of the Warsaw Medical University (KB/283/2013). All participants gave informed consent to participate in the study. The data was analyzed taking into account the principles of anonymization. ASCs were isolated from the youngest (n=8, 25-34 years, mean  $30\pm 3.5$  years) and the oldest individuals (n=10, 77-89 years, mean  $81\pm 4.6$  years). DNA, mRNA, and proteins were isolated from SAT and ASCs (passage 3). The global level of DNA modifications (5mC, 5hmC, 5fC, 5caC) was tested using immunoblots. Expression of TET at the mRNA level was investigated using real-time PCR and the amount of proteins – using immunoblots. 5-hydroxymethylated regions in ASC DNA originating from five young (28-34 years, mean  $30.6\pm 3$  years) and five older (77-94 years, mean  $83\pm 6$  years) individuals were obtained using immunoprecipitation of 5-hydroxymethylated DNA followed by a new generation sequencing (hMeDIP-seq). Differential analysis was performed using the MEDIPS package for the R environment to identify age-related DHMRs. The analysis was performed using the default settings suggested by the package creators and for the parameters optimized for the two genomic window sizes of 50 bp and 450 bp. The analysis of 5hmC distribution in the ASCs' genome was performed by determining the level of this modification in the elements of gene structure, regulatory elements, regions associated with modifications of histone proteins, CpG islands, and repeated elements. Identification of regions differentiating ASCs from fibroblasts was performed using the MEDIPS package for seven individuals: three young (27-33 years, mean  $29.6\pm 3$  years) and four age-advanced (77-94 years, mean  $82\pm 5$  years) from whom both ASCs and fibroblasts were obtained.

I observed a significant age-related increase in the global level of DNA hydroxymethylation ( $r=0.36$ ,  $p=0.026$ ) in SAT DNA but no changes in the level of other modifications tested. The 5hmC level was also higher in ASC DNA isolated from the elderly than the young ( $p=0.0003$ ). This result remained significant after adjusting for BMI and sex. Additionally, the 5hmC level in ASCs correlated with the population doubling time ( $r=0.62$ ,

$p=0.01$ ) and was higher in slowly dividing cells. Analysis of TET expression in SAT at the mRNA and protein levels showed that the level of TET1 did not change with age in my study group. However, I observed an age-related increase in TET2 mRNA ( $r=0.33$ ,  $p=0.006$ ) and an increase in the level of TET3 protein ( $r=0.32$ ,  $p=0.04$ ). In contrast, in ASCs, the levels of mRNA and TET proteins did not differ between cells of young and elderly donors. The levels of mRNA and TET proteins did not correlate with the level of 5hmC in either the SAT or the ASCs.

To identify age-related DHMRs in ASCs, I performed a differential analysis using three different algorithms. Each of the analyzes identified a different number of DHMRs. By combining the regions obtained from all variants of the analysis, I identified about 100 age-related DHMRs. These regions were located preferentially outside the CpG islands. Age-related DHMRs common to all analysis variants were associated with the *TSPAN7*, *LIAT1*, *KLHL13*, *EYS*, *RBFOX1* genes.

Differential analysis of 5-hydroxymethylated regions in ASC and fibroblasts performed as part of the secondary objective identified 2,520 regions differentiating ASCs from fibroblasts. Among the regions with higher hydroxymethylation in ASCs, there were more CpG island-containing promoters than in the DHMRs with higher hydroxymethylation in fibroblasts. The genes associated with these regions in ASCs were related, among others, to the process of cellular differentiation.

In addition, I showed that the genome region within the intron of the *RSRP1* gene was hyper-hydroxymethylated in both ASCs and fibroblasts of the elderly compared to cells of young people. RT-PCR analysis showed that the level of its mRNA is significantly lower in ASCs isolated from age-advanced study subjects. There was no such age-related relationship in fibroblasts.

The obtained results suggest that 5hmC may play an important role in the epigenetic regulation of ASC functioning and that changes in the level and distribution of 5hmC in SAT and ASCs are part of the age-related epigenetic drift in humans. Changes in the level/distribution of this modification most likely do not result from changes in the expression of *TET* genes but are a consequence of the changing microenvironment of the cell occurring with age, affecting the catalytic activity of these enzymes. Most probably, some age-related changes in the level/distribution of 5hmC affect gene expression in ASCs, which may be one of the reasons for the reduced regenerative potential of these cells

observed in age-advanced individuals. On the other hand, some age-related DHMRs were found in genes not expressed in this cell type, suggesting that they are only of marker significance.

On the other hand, a comparison of the 5hmC profile between ASCs and fibroblasts suggests that the changes in DNA hydroxymethylation associated with aging are mostly tissue-specific. Nevertheless, the DHMR in the intron of the *RSRP1* gene is a candidate for the universal marker of aging.

A comparison of the different parameters for the differential analysis of changes in DNA hydroxymethylation suggests that performing analysis for genomic windows of different sizes and combining the results is a reasonable approach, especially if the data are not analyzed for precisely defined genomic factors. Additionally, the application of the FDR correction is better than the Bonferroni correction, which can result in a large number of false negatives.

# I. Wstęp

## 1. Starzenie

### 1.1. Mechanizmy procesu starzenia

Starzenie jest procesem dotyczącym wszystkich żywych organizmów, prowadzącym do postępującego upośledzenia funkcji komórek, tkanek i narządów. Jest czynnikiem ryzyka występowania wielu związanych z wiekiem chorób. Dlatego, w czasach szybko postępującego starzenia się społeczeństw, poszukiwanie skutecznych terapii opóźniających starzenie i w związku z tym – opóźniających wystąpienie lub wręcz zapobiegających rozwojowi takich chorób jest niezwykle istotne. Aby takie działania były skuteczne, konieczne jest poznanie mechanizmów procesu starzenia. Badanie tego procesu jest jednak niezwykle trudne, ponieważ jest to proces wieloczynnikowy, na który składa się wiele mechanizmów, oddziałujących na siebie nawzajem.

Do przyczyn starzenia na poziomie molekularnym zalicza się między innymi uszkodzenia genomowego DNA (Moskalev i wsp., 2013) oraz mitochondrialnego DNA (Pinto i Moraes, 2015), skracanie telomerów (Shammas, 2011), aktywację retrotranspozonów (Dubnau, 2018), uszkodzenia (zwłaszcza oksydacyjne) białek i lipidów komórkowych (Goto i Radak, 2013), nagromadzenie błędów związanych procesami transkrypcji i translacji (Milholland i wsp., 2017) oraz dryft epigenetyczny, czyli nagromadzenie zmian w obrębie modyfikacji DNA i towarzyszących mu białek (Shah i wsp., 2014). Niekiedy do dryftu epigenetycznego zalicza się również zmiany w ilości miRNA. Zmiany w obrębie genomu i epigenomu prowadzą do ich destabilizacji. Wraz z wiekiem dochodzi także do akumulacji uszkodzonych cząsteczek białkowych (lipofuscyny) w lizosomach (Moreno-García i wsp., 2018), nadmiernej glikacji białek (Chaudhuri i wsp., 2018), agregacji białek o nieprawidłowej strukturze przestrzennej (Kikis i wsp., 2010). Na poziomie organelli, do przyczyn starzenia zaliczyć można utratę funkcji mitochondriów (Haas, 2019), peroksosomów (Titorenko i Terlecky, 2011) i lizosomów (Carmona-Gutierrez i wsp., 2016).

Opisane powyżej i inne zmiany prowadzą do zaburzeń w funkcjonowaniu komórek oraz starzenia komórkowego (senescencji) (DiLoreto i Murphy, 2015). Jest to zjawisko, które polega na nagromadzeniu się uszkodzeń w komórce oraz zahamowaniu cyklu komórkowego. Zahamowanie proliferacji komórek uszkodzonych jest mechanizmem

obronnym, chroniącym organizm przed ich potencjalnie szkodliwym wpływem, np. procesem nowotworzenia. Senescencja indukowana jest głównie poprzez wzrost ekspresji czynników p16 i p53, prowadzący do wzrostu p21, które to czynniki są uznane za ważne markery starzenia komórkowego (Van Deursen, 2014). Komórki senescentne rezydują w tkankach. Charakteryzują się zmienionym profilem wydzielniczym, nazywanym SASP. Czynniki humoralne wydzielane przez komórki senescentne mają szkodliwy wpływ na komórki zdrowe oraz przyczyniają się do pojawienia się towarzyszącego starzeniu stanu zapalnego o niewielkim stopniu nasilenia (inflammaging). Akumulacja komórek dysfunkcyjnych, przy jednoczesnym wyczerpywaniu się rezerwuaru komórek macierzystych, prowadzi do dysfunkcji całych tkanek i narządów, dlatego starzenie komórkowe jest istotnym czynnikiem przyczyniającym się do starzenia całego organizmu, a usuwanie komórek senescentnych jest aktualnie uważane za obiecującą terapię potencjalnie zapobiegającą rozwojowi chorób związanych z wiekiem (Baker i wsp., 2011).

## **1.2. Rola tkanki tłuszczowej w regulacji przebiegu procesu starzenia**

Tkanka tłuszczowa odpowiedzialna jest za odpowiedź organizmu na składniki odżywcze, magazynowanie energii, termoregulację oraz proces gojenia ran i regeneracji tkanek. Ponadto, tkanka tłuszczowa jest bardzo ważnym organem endokrynnym, który poprzez wydzielanie hormonów, adipokin i cytokin moduluje metabolizm, odpowiedź immunologiczną i stan zapalny całego organizmu (Fantuzzi, 2005) (Jonas i wsp., 2015).

Tkanka tłuszczowa stanowi też istotny komponent regulujący przebieg procesu starzenia (Palmer i Kirkland, 2016), czego dowodem jest to, że głównymi czynnikami ryzyka rozwoju patologii takich jak insulinooporność, miażdżyca i nadciśnienie są właśnie wiek oraz otyłość, które charakteryzują się podobnymi zmianami w funkcjonowaniu tej tkanki (Rössner, 2002) (Jura i Kozak, 2016). Ponadto, poznane do tej pory skuteczne interwencje prowadzące do spowolnienia procesu starzenia, takie jak restrykcja kaloryczna, powiązane są z zachowaniem lub przywróceniem prawidłowego funkcjonowania tkanki tłuszczowej (Huffman i Barzilai, 2010).

Wraz z wiekiem dochodzi do zmian w ilości i dystrybucji tkanki tłuszczowej, zmian w jej składzie komórkowym i właściwościach endokrynnych. W starzejącej się tkance tłuszczowej dochodzi do akumulacji adipocytów o zmniejszonej zdolności do magazynowania kwasów tłuszczowych. Istnieje kilka przyczyn tego zjawiska. Tkanka tłuszczowa rozrasta się poprzez przyrost nowych adipocytów (hiperplazję) oraz wzrost istniejących już komórek

tłuszczowych (hipertrofię). Hipertrofia jest zjawiskiem niekorzystnym, ponieważ nadmierny rozrost adipocytów prowadzi do ich dysfunkcji (Goossens, 2008), dlatego w zdrowej tkance tłuszczowej dochodzi do regularnej wymiany adipocytów (Spalding i wsp., 2008) (Arner i wsp., 2010). Rezerwuarem do produkcji nowych komórek tłuszczowych są komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (ASC), które w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne różnicują się w preadipocyty a następnie w adipocyty (Arner i wsp., 2010). Wraz z wiekiem potencjał regeneracyjny ASC spada, co uniemożliwia odnowę populacji prawidłowo funkcjonujących komórek (Caso i wsp., 2013). W następstwie, kwasy tłuszczowe magazynowane są w istniejących już adipocytach, co w sytuacji obniżonej zdolności do ich utylizacji prowadzi do ich dysfunkcji i zwiększonej insulinooporności. Dodatkowo, w starzejącej się tkance tłuszczowej dochodzi do akumulacji opisanych powyżej komórek senescentnych o zmienionym profilu wydzielniczym (Park i wsp., 2014). Komórki te zaburzają prawidłowe funkcjonowanie preadipocytów oraz adipocytów, zwiększając ich insulinooporność (Xu i wsp., 2015).

Zmiany na poziomie komórkowym przyczyniają się do powstania przewlekłego stanu zapalnego tkanki tłuszczowej i zaburzenia jej funkcji endokrynej. Zmniejsza się zdolność podskórnej tkanki tłuszczowej do magazynowania kwasów tłuszczowych, co prowadzi do odkładania się tłuszczu ektopowego w wątrobie, mięśniach oraz trzustce (Cartwright i wsp., 2007), rozwoju lipotoksyczności i zwiększenia stanu zapalnego w obrębie tych tkanek (Mancuso i Bouchard, 2019). Związane z wiekiem zmiany w tkance tłuszczowej oddziałują więc na cały organizm i zwiększają ryzyko rozwoju chorób związanych z wiekiem (Tchkonia i wsp., 2010).

### **1.3. Komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej i ich starzenie**

Jak wspomniano, bardzo istotną składową przyczyniającą się do związanych z wiekiem zaburzeń w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej jest dysfunkcja zasiedlających ją komórek progenitorowych. ASC są komórkami macierzystymi pochodzenia mezenchymalnego, które swoim fenotypem odpowiadają mezenchymalnym komórkom macierzystym (MSC) izolowanym ze szpiku kostnego oraz sznura pępowinowego. Komórki te charakteryzują się morfologią zbliżoną do fibroblastów. Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Stowarzyszenia Terapii Komórkowych, MSC powinny charakteryzować się zdolnością adhezji do plastiku, ekspresją markerów powierzchniowych takich jak CD105, CD73 i CD90 oraz brakiem ekspresji markerów CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79 $\alpha$  lub CD19 lub HLA-



DR (Dominici i wsp., 2006). Inni autorzy sugerują, że MSC powinny być pozytywne pod kątem markerów takich jak Stro-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD105 i CD106, a negatywne pod kątem CD11b, CD31, CD34 i CD45 (Kolf i wsp., 2007). Wielu badaczy poszukuje do tej pory markera specyficznego jedynie dla MSC. Na przestrzeni lat kandydatami do tej roli były między innymi białka SSEA4 (Gang i wsp., 2007), GD2 (Martinez i wsp. 2007), Frizzled-9 (Bühning i wsp. 2007), CD200 (Delorme i wsp. 2008) czy CD271 (Álvarez-Viejo i wsp., 2015). Żadne z tych białek nie zostało jednak ostatecznie potwierdzone jako jednoznaczny i uniwersalny marker dla tych komórek. Nie ma więc konkretnego markera, który definiuje MSC (lv i wsp., 2014). Dodatkowo, nie ma komórki MSC, która wyraża ekspresję wszystkich wymienionych wyżej markerów, a ekspresja niektórych różni się w zależności od miejsca pochodzenia tych komórek (Colter i wsp., 2001) (Li i wsp., 2011) (Yang, 2018). Ponadto, markery powierzchniowe uważane za charakterystyczne dla MSC ulegają również ekspresji w fibroblastach. Głównym sposobem na identyfikację MSC jest więc identyfikacja funkcjonalna. Najważniejszą cechą definiującą MSC jest ich zdolność do różnicowania w adipocyty, osteoblasty i chondroblasty (Dominici i wsp., 2006). Dodatkowo, komórki te mają zdolność do samoodnowy, czyli tworzenia kolonii.

Jak wspomniano, ASC to komórki o fenotypie MSC, ale izolowane z tkanki tłuszczowej (Mizuno, 2009). W związku z tym, wykazują również zdolność do różnicowania w adipocyty, osteoblasty i chondroblasty. Komórki te znajdują się w tak zwanej frakcji podporowocząsteczkowej tkanki tłuszczowej (SVF). We frakcji tej znaleźć można ASC oraz preadipocyty – oba typy komórek mające zdolność do adipogenezy. Preadipocyty to prawdopodobnie ASC zadeklarowane do adipogenezy, a przed odkryciem i zdefiniowaniem ASC wiele badań na preadipocytach prowadzonych było prawdopodobnie również na frakcji ASC. Możliwe, że ASC i preadipocyty to tak naprawdę te same komórki, których fenotyp zależy od kontekstu eksperymentalnego (Cawthorn i wsp., 2012). Część doniesień literaturowych dotyczy natomiast „frakcji SVF”, która zawiera zarówno ASC jak i preadipocyty.

ASC izolowane od pacjentów starszych mają obniżone zdolności regeneracyjne. Zmniejsza się ich zdolność do samoodnowy, tempo proliferacji oraz potencjał do różnicowania w osteoblasty i chondroblasty (Zhou i wsp., 2008). Badania sugerują, że potencjał ASC do adipogenezy *in vitro* jest podobny u osób młodych i starszych (Liu i wsp., 2017). Inne dane pokazują, że potencjał komórek frakcji SVF do adipogenezy spada wraz z wiekiem, co może być następstwem wzrostu odsetka komórek senescentnych

wyrażających zwiększoną ekspresję p53 (Gustafson i wsp., 2019). ASC izolowane od pacjentów starszych wykazują też zwiększoną ekspresję markerów starzenia komórkowego takich jak p16, p21 oraz aktywność związanej ze starzeniem  $\beta$ -galaktozydazy (Choudhery i wsp., 2014). Badania *in vivo* przy użyciu obrazowej spektrometrii mas wykazują natomiast negatywną korelację pomiędzy adipogenezą a wiekiem w ludzkiej tkance tłuszczowej (Guillermier i wsp., 2017).

## 2. Epigenetyczne modyfikacje DNA

Modyfikacje epigenetyczne nie zmieniają sekwencji DNA, ale mają kluczowy wpływ na aktywność genów. Zaliczamy do nich modyfikacje samego DNA oraz białek histonowych odpowiedzialnych za upakowanie DNA w chromatynę. Według rozszerzonej definicji epigenomu, do modyfikacji epigenetycznych zalicza się również miRNA, ponieważ ich rodzaj i ilość mają wpływ na ilość ostatecznego produktu aktywności genu – aktywnego biologicznie białka. Niniejszy rozdział poświęcony jest tylko epigenetycznym modyfikacjom DNA.

### 2.1. Metylacja DNA

Metylacja cytozyny jest główną i zarazem najlepiej poznaną epigenetyczną modyfikacją DNA. Prawidłowa metylacja pełni kluczową rolę w rozwoju zarodkowym, w procesie różnicowania się komórek i ich prawidłowym funkcjonowaniu. Modyfikacja ta zaangażowana jest w kształtowanie struktury chromatyny, regulację ekspresji genów i utrzymanie integralności genomu. Ponadto, metylacja DNA leży u podstaw procesów takich jak piętnowanie genomowe i dezaktywacja chromosomu X (Moore i wsp., 2013) (Bauer i wsp., 2015) (Meng i wsp., 2015).

Za metylację DNA odpowiedzialne są metylotransferazy DNA (DNMT). Enzymy te przenoszą grupę metylową na węgiel reszty cytozynowej w pozycji 5, przekształcając cytozynę w 5-metylocytozynę (5mC). Do tej pory poznano cztery metylotransferazy DNA: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B oraz DNMT3L (Jin i Robertson, 2013). DNMT1 odpowiedzialna jest za utrzymanie prawidłowego wzoru metylacji w komórkach dzielących się. Enzym ten wykazuje powinowactwo do DNA, w którym tylko jedna nić jest metylowana, czyli przede wszystkim do DNA po replikacji. DNMT1 kopiuje wzór metylacji z nici matrycowej na nowo zsyntetyzowaną nić potomną (Hermann i wsp., 2004). Dodatkowo, DNMT1 jest odpowiedzialna za utrzymanie wzoru metylacji w czasie naprawy DNA (Mortusewicz i wsp.,

2005). DNMT3A i DNMT3B mają zdolność dodawania grup metylowych do niemetylowanego DNA, są więc odpowiedzialne za metylację *de novo* (Uysal i wsp., 2015). DNMT3L nie posiada aktywności enzymatycznej. Białko to wchodzi jednak w interakcje z DNMT3A i DNMT3B, stymulując ich aktywność katalityczną (Jia i wsp., 2007).

Metylacja DNA występuje głównie w cytozynach, po których w sekwencji następuje guanina. Takie miejsca nazywane są motywem CpG. Ocenia się, że 70-80% cytozyn w motywach CpG jest metylowanych. Silnej metylacji ulegają zwłaszcza regiony satelitowe, elementy powtórzone i regiony wewnątrzgenowe (Li i Zhang, 2014). Metylacja DNA pełni ważną rolę w tak zwanych wyspach CpG, czyli regionach, w których motyw CpG występuje w zagęszczeniu większym niż w reszcie genomu. Około 70% genów zawiera w obrębie promotora wyspę CpG (Saxonov i wsp., 2006). Wyspy CpG są w większości pozbawione metylacji DNA, wyjątek stanowią geny ulegające trwałemu wyciszeniu, między innymi te podlegające piętnowaniu oraz niektóre geny tkankowo specyficzne (Jones, 2012). Metylacji w tkankach somatycznych ulegają często wyspy CpG w obrębie promotorów genów powiązanych z rozwojem zarodkowym (Weber i wsp., 2007) (Illingworth i wsp., 2008). Profil metylacji DNA zarówno w wyspach CpG, jak i poza nimi, jest tkankowo specyficzny i jest odpowiedzialny za warunkowanie prawidłowego fenotypu komórek (De Bustos i wsp., 2009) (Previti i wsp., 2009) (Suelves i wsp., 2016).

Ważną funkcją metylacji DNA jest hamowanie ekspresji wspomnianych powyżej potencjalnie szkodliwych elementów powtórzonych, transpozonów i wirusowych elementów genomowych stanowiących, jak się ocenia, około 45% genomu ludzkiego. Ekspresja tych elementów może prowadzić do ich replikacji, insercji wewnątrzgenowej i mutacji. Ich metylacja zapewnia więc integralność genomu (Yoder i wsp., 1997) (Zheng i wsp., 2017).

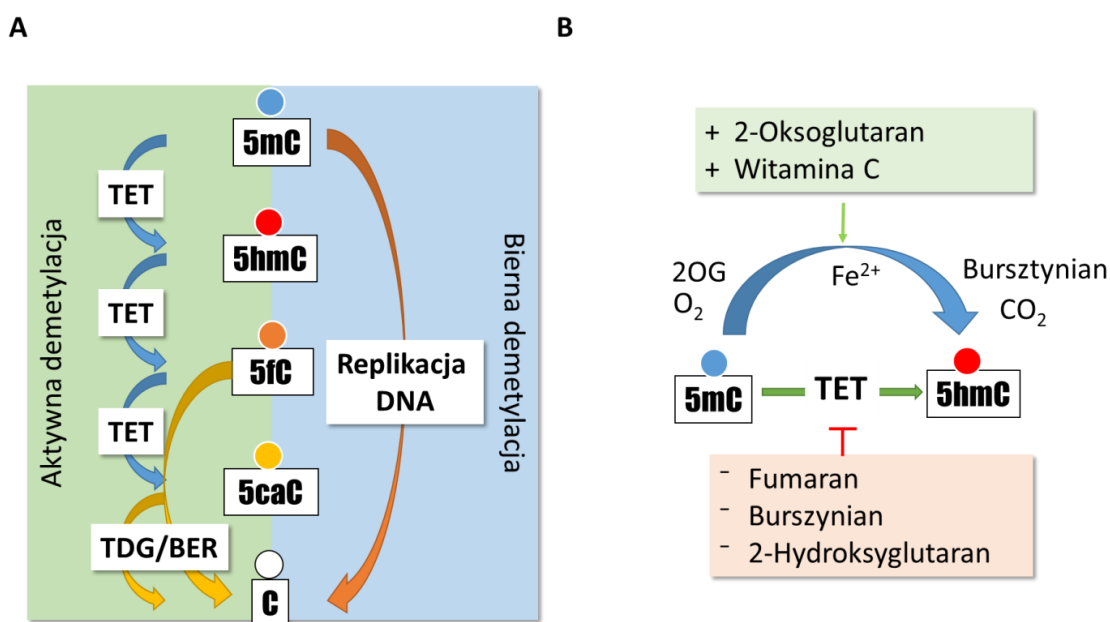
Jedną z podstawowych funkcji metylacji DNA jest regulacja ekspresji genów. Wpływ 5mC na ekspresję jest złożony i zależy od kontekstu genomowego. Metylacja ma inne oddziaływanie w miejscu startu transkrypcji (TSS), z wyspą CpG lub bez, w regionach wewnątrzgenowych, elementach regulatorowych i regionach powtórzonych (Jones, 2012). Jej wpływ na ekspresję zależy również od gęstości wyspy CpG. Generalnie, metylacja DNA związana jest raczej z hamowaniem ekspresji genów a nie z jej aktywacją. Niezależnie od sekwencji, duże zgrupowania metylowanego DNA są skorelowane z ciasno upakowaną, nieaktywną chromatyną (Meng i wsp., 2015). Metylacja wyspy CpG o dużej i średniej

gęstości w promotorze genu może prowadzić do stabilnego wyciszenia jego ekspresji (Deaton i Bird, 2011). Jednak nie oznacza to, że promotory zdemetylowane zawsze będą aktywne (Weber i wsp., 2007). Metylacja wewnątrz genów koreluje natomiast z ich zwiększoną ekspresją, jednak mechanizm tego zjawiska nie jest do końca poznany (Aran i wsp., 2011).

Sam mechanizm regulacji ekspresji genów poprzez metylację DNA jest złożony i związany z modelowaniem struktury chromatyny oraz regulacją wiązania innych białek, na przykład enzymów odpowiedzialnych za modyfikację białek histonowych (Siegfried i Simon, 2010) oraz białek wiążących metylowane CpG w DNA (MBD) (Hsieh, 1994) (Fujita i wsp., 2000) (Moore i wsp., 2013).

## 2.2. 5-hydroksymetylacja DNA

5-hydroksymetylocytozyna (5hmC) początkowo uważana była za uszkodzenie DNA (Valinluck i wsp., 2004). Opisany w 2009 roku wysoki poziom tej modyfikacji w komórkach Purkiniego rzucił jednak nowe światło na jej potencjalną rolę w genomie (Kriaucionis i Heintz, 2009). Funkcjonalne znaczenie 5hmC zostało ostatecznie potwierdzone przez odkrycie enzymu TET1 i katalizowanej przez niego reakcji przekształcenia 5mC do 5hmC (Tahiliani i wsp., 2009). Do tej pory odkryto 3 enzymy z tej grupy: TET1, TET2 i TET3. Enzymy te opisane zostaną w oddzielnym rozdziale.



**Rycina 1.** A) Mechanizm biernej i aktywnej demetylacji DNA. B) Reakcja oksydacji 5mC do 5hmC przeprowadzana przez enzymy TET oraz wybrane czynniki regulujące jej wydajność. Na podstawie (Kohli i Zhang, 2013).

Wiadomo, że 5hmC jest produktem pośrednim procesu aktywnej oraz biernej demetylacji DNA. W procesie aktywnej demetylacji, 5hmC ulega dalszej oksydacji przez TET do 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboksyocytozyny (5CaC) (Ito i wsp., 2011). 5fC i 5CaC są rozpoznawane i wycinane przez glikozylazę tymidyny (TDG). Następnie, tak powstałe uszkodzenie DNA jest naprawiane przez system naprawy DNA metodą wycinania nukleotydów (BER), który w miejsce uszkodzenia wstawia niemetylowaną cytozynę (Rycina 1A) (He i wsp., 2011). 5hmC może też podlegać deaminacji przez AID/APOBEC do 5-hydroksymetylourydyny (5hmU), która jest dalej usuwana przez BER (Guo i wsp., 2011). Ponadto, Chen i wsp. w swojej pracy wykazali, że metylotransferazy DNMT3A i DNMT3B również mogą działać jako dehydroksymetylaza 5hmC i tym samym prowadzić do demetylacji DNA (Chen i wsp., 2012).

Nie opisano do tej pory enzymów które, tak jak to jest w przypadku 5mC, odtwarzałyby wzór hydroksymetylacji na nici potomnej. Dlatego też oksydacja 5mC do 5hmC przyczynia się do procesu biernej demetylacji DNA w komórkach dzielących się, ponieważ podczas replikacji DNA na nici potomnej w miejscu 5hmC powstaje niemodyfikowana cytozyna (Kohli i Zhang, 2013).

Początkowo kwestią sporną było, czy 5hmC jest stabilną modyfikacją DNA, czy jedynie produktem przejściowym demetylacji. Badania preferencji substratowej TET wykazały, że 5hmC jest stosunkowo stabilna i mało podatna na dalszą oksydację przez te enzymy (Hu i wsp., 2015). Za rolę 5hmC w regulacji epigenetycznej przemawia też istnienie specyficznych białek wykazujących do niej powinowactwo, takich jak Mbd3 (Yildirim i wsp., 2011) (Hahn i wsp., 2014). Te dane sugerują, że w 5hmC jest modyfikacją o potencjalnym znaczeniu funkcjonalnym. Z drugiej strony, analiza współwystępowania TET z 5hmC wykazała, że regiony o dużym zagęszczeniu CpG powiązane z TET1 są prawie całkowicie pozbawione 5hmC. Może to oznaczać, że przynajmniej w tych regionach zachodzi szybka demetylacja (Xu i wsp., 2011).

Zarówno globalny poziom 5-hydroksymetylacji jak i dystrybucja 5hmC w genomie są tkankowo specyficzne (Nestor i wsp., 2012), a wysoki poziom 5hmC wewnątrz genów odzwierciedla profil ekspresji genów charakterystycznych dla danej tkanki, czyli koreluje z ich wysoką ekspresją (Lin i wsp., 2017). Szczególnie wysoki poziom tej modyfikacji

występuje w mózgu (Kriaucionis i Heintz, 2009), w zygotach (Wossidlo i wsp., 2011) oraz w embrionalnych komórkach macierzystych (ES) (Tahiliani i wsp., 2009).

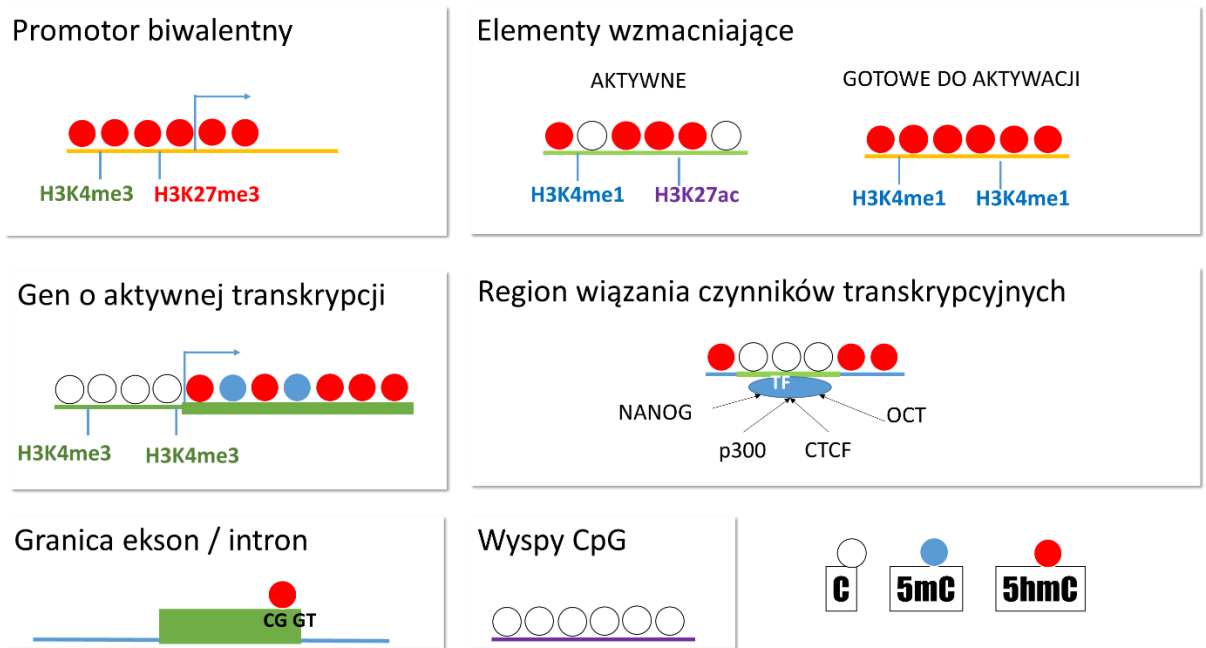
Dystrybucja 5hmC w genomie jest częściowo odmienna od dystrybucji 5mC. Badania dystrybucji tej modyfikacji w komórkach ES wykazały, że jest ona powiązana przede wszystkim z regionami euchromatyny bogatymi w geny (Ficz i wsp., 2011) (Pastor i wsp., 2011) (Xu i wsp., 2011) i obecna jest głównie w regionach o średnim zagęszczeniu motywu CpG (Ficz i wsp., 2011) (Xu i wsp., 2011). Poziom tej modyfikacji jest wysoki wewnątrz genów, przy czym jest wyższy w eksonach niż w intronach. Modyfikacja ta jest ponadto powiązana z elementami regulatorowymi, takimi jak elementy wzmacniające (enhancers) i regiony wiązania czynników transkrypcyjnych (Yu i wsp., 2012). 5hmC współwystępuje z H3K4me2/3, modyfikacją związaną z aktywnymi genami (Szulwach i wsp., 2011). Ponadto, poziom 5hmC jest wysoki w tak zwanych promotorach biwalentnych, oznaczonych jednocześnie przez aktywujący H3K4me3 i powiązany z hamowaniem transkrypcji H3K27me3 (Wu i wsp., 2011). Taki status dotyczy często tak zwanych genów metabolizmu podstawowego (housekeeping genes), które są gotowe do szybkiej aktywacji (poised).

Dokładny mechanizm regulacji ekspresji genów przez 5hmC nie jest znany. W ludzkich komórkach ES 5hmC powiązana jest zarówno z genami aktywnymi jak i wyciszonymi, jednak profil dystrybucji tej modyfikacji wokół TSS i wewnątrz genów jest zależny od poziomu ich ekspresji i nie jest to zależność liniowa. W genach o wysokiej i średniej ekspresji rozkład 5hmC wokół TSS jest bimodalny, czyli wyraźny sygnał hydroksymetylacji obserwuje się tuż przed i tuż po TSS, podczas gdy sam TSS jest tego sygnału pozbawiony. W genach o średnim poziomie ekspresji obserwuje się najwyższy poziom 5hmC wewnątrz genu, podczas gdy w genach o najniższej ekspresji modyfikacja ta akumuluje się głównie w promotorze, w regionie TSS (Szulwach i wsp., 2011). Dane z ES są odmienne od tych dotyczących tkanki mózgowej, gdzie regiony TSS były pozbawione 5hmC niezależnie od poziomu ekspresji, a wysoki poziom 5hmC wewnątrz genów korelował liniowo ze wzrostem ekspresji (Song i wsp., 2011). Analiza dystrybucji 5hmC i ekspresji genów w czterech regionach mysiego mózgu wykazała pozytywną korelację pomiędzy ilością 5hmC a poziomem ekspresji danego genu, jednak nie w genach metabolizmu podstawowego (Lin i wsp., 2017). Również analiza poziomu 5hmC i ekspresji genów w komórkach ludzkiego jelita wykazała, że poziom 5hmC koreluje pozytywnie z ekspresją większości genów, jednak w przypadku 10% genów obserwowano korelację ujemną (Uribe-Lewis i wsp., 2020). Dane te sugerują, że wpływ

5hmC na ekspresję genów jest złożony i zależy od tkanki i lokalizacji tej modyfikacji w genomie.

Dane jednoznacznie wskazują, że 5hmC pełni ważną rolę w regulacji statusu elementów regulatorowych. Analiza dystrybucji 5hmC w genomie komórek ES wykazała, że modyfikacja ta obecna jest w elementach wzmacniających oraz motywach wiążących czynnik p300 (Laird i wsp., 2013) i w regionach otaczających miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych takich jak NANOG, OCT, CTCF (Stroud i wsp., 2011) (Yu i wsp., 2012). Wpływ 5hmC na aktywność elementów regulatorowych również wydaje się być złożony i zależy od kontekstu. Wiele danych literaturowych pokazuje, że poziom 5hmC jest zwiększony w elementach wzmacniających, w szczególności tych powiązanych z modyfikacjami białek histonowych H3K4me1 i H3K27ac oraz powiązanych z transkrypcją genów charakterystycznych dla danego fenotypu komórek (Stroud i wsp., 2011) (Li i wsp., 2018). Dodatkowo, dane sugerują, że poziom 5hmC jest wyższy w elementach wzmacniających gotowych do aktywacji w porównaniu do tych już aktywnych (Yu i wsp., 2012) (Wen i wsp., 2014). Z drugiej strony, w komórkach ES zaobserwowano grupę regionów wiążących czynniki transkrypcyjne, w których wysoki poziom 5hmC powiązany był z zahamowaniem transkrypcji genów docelowych. Indukcja różnicowania prowadziła do spadku poziomu 5hmC w tych regionach i aktywacji transkrypcji. Autorzy sugerują, że 5hmC hamuje aktywność elementów regulatorowych powiązanych z genami kluczowymi dla różnicowania (Choi i wsp., 2014). Najnowsze dane sugerują, że czynniki transkrypcyjne mogą wiązać się do metylowanych regionów DNA i indukować ich demetylację poprzez rekrutowanie enzymów TET. Taki mechanizm wykazano dla CTCF oraz REST (Stadler i wsp., 2011) (Pastor i wsp., 2013).

Podsumowując, rola 5hmC w regulacji ekspresji genów jest złożona i powiązana z modelowaniem epigenomu poprzez kontrolowanie poziomu metylacji DNA, interakcje z białkami histonowymi a także z samodzielnym oddziaływaniem w elementach regulatorowych i miejscach wiązania czynników transkrypcyjnych z wiążącymi się z tymi miejscami białkami (Rycina 2). Generalnie, modyfikacja ta powiązana jest z aktywną chromatyną, jednak może być też zaangażowana w hamowanie ekspresji genów.



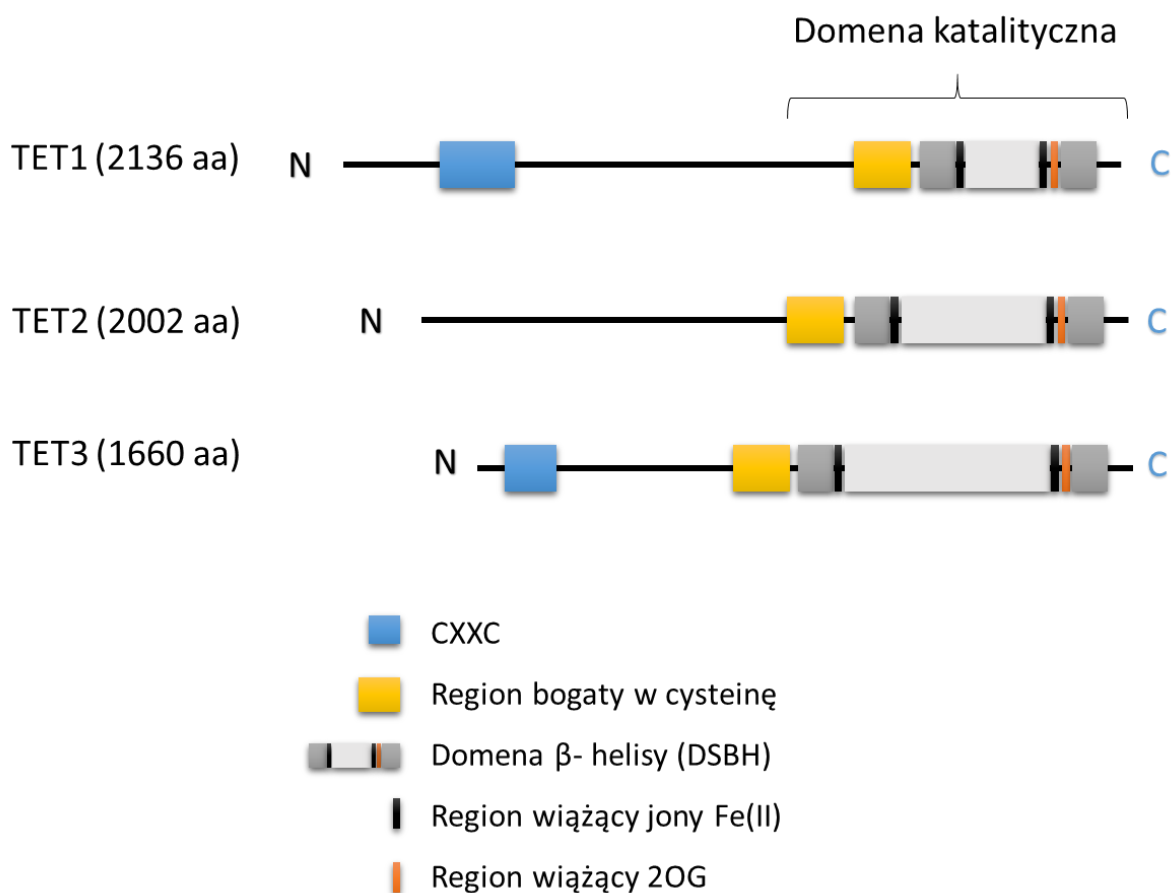
**Rycina 2.** Dystrybucja 5hmC w genomie i jej wpływ na aktywność transkrypcyjną genów.

### 3. Enzymy TET

Enzymy TET to dehydrogenazy zależne od  $\alpha$ -ketoglutaranu (2OG, 2-oksoglutaran) i jonów  $Fe^{2+}$ . Do tej pory opisano trzy enzymy z tej grupy: TET1, TET2 i TET3 (Rasmussen i Helin, 2016). Enzymy TET wykorzystują 2OG, tlen oraz jony żelaza do oksydacji 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny, prowadząc równocześnie do dekarboksylacji 2OG do bursztynianu oraz powstania cząsteczki dwutlenku węgla (Rycina 1B).

Wszystkie enzymy TET posiadają C-kończową domenę katalityczną, z regionem bogatym w cysteinę oraz podwójną  $\beta$ -helisę wiążącą jony  $Fe^{2+}$ . Pełne izoformy TET1 oraz TET3 posiadają N-kończową domenę CXXC o strukturze palca cynkowego, która wykazuje powinowactwo do motywu CpG i jest domeną wiążącą DNA (Xu i wsp., 2011) (Rycina 3). TET2 natomiast na drodze ewolucji utracił domenę wiążącą DNA, która kodowana jest przez osobny gen *CXXC4* (Ko i wsp., 2013).





**Rycina 3.** Budowa białek TET na podstawie (Rasmussen i Helin, 2016).

Wszystkie TET są odpowiedzialne za produkcję 5hmC w genomie. Ekspresja TET różni się pomiędzy tkankami (Nestor i wsp., 2012). Enzymy te regulują poziom 5hmC na różnych etapach życia, zaangażowane są w sieci interakcji z innymi białkami, okupują częściowo odmienne regiony w genomie i podlegają odmiennej regulacji. Ponadto, wydaje się, że funkcje TET są również częściowo odmienne i zależne od kontekstu komórkowego. Wszystko to sugeruje, że proces demetylacji przeprowadzany przez enzymy TET podlega bardzo precyzyjnej regulacji i jest kluczowy dla utrzymania prawidłowego fenotypu komórek.

### 3.1. TET1

TET1 jest pierwszy odkrytym enzymem z tej rodziny. Nazwa ten-eleven translocation 1 pochodzi od translokacji chromosomowej, która przyczyniła się do odkrycia tego białka. Niektóre przypadki ostrej białaczki szpikowej AML wywołane są przez translokację pomiędzy 10 a 11 chromosomem  $t(10;11)(q22;q23)$ , która prowadzi do powstania

fuzyjnego genu. Analiza regionu chromosomowego zaangażowanego w powstanie na tej matrycy fuzyjnego białka doprowadziła do identyfikacji białka o nieznanym do tej pory funkcji biologicznej, które nazwano właśnie TET1 (Lorsback i wsp., 2003). Jak wspomniano powyżej, aktywność katalityczną TET1 i jego rolę w procesie hydroksymetylacji DNA odkryto sześć lat później, w 2009 roku (Tahiliani i wsp., 2009).

Najwyższa ekspresja pełnej długości izoformy TET1 obserwowana jest w embrionalnych komórkach macierzystych. Jest ona 5 razy większa niż ekspresja TET2 i ulega znacznemu obniżeniu po rozpoczęciu procesu różnicowania (Koh i wsp., 2011). TET1 zaangażowany jest w utrzymanie prawidłowego fenotypu komórek ES poprzez regulację ekspresji genów pluripotencji oraz indukcję różnicowania i zmian w morfologii komórek (Ito i wsp., 2011) (Wu i wsp., 2011) (Freudenberg i wsp., 2012). Wskutek spadku ekspresji TET1 i spadku poziomu 5hmC w genomie (Koh i wsp., 2011), wiele genów hydroksymetylowanych w komórkach ES ulega hipermetylacji w komórkach zróżnicowanych (Williams i wsp., 2011). Co ciekawe, możliwe jest, że TET1 i TET2 działają antagonistycznie w regulacji niektórych genów i mogą być zaangażowane w regulację innych kierunków różnicowania komórek (Koh i wsp., 2011).

TET1 reguluje również procesy różnicowania w somatycznych komórkach macierzystych. Nokaut TET1/TET2 w mysich zarodkowych fibroblastach (MEF) prowadzi do zaburzenia procesu różnicowania w kierunku adipocytów (Wiehle i wsp., 2016). W procesie różnicowania mysich komórek mezenchymalnych C3H10T1/2 w kierunku chondrocytów dochodzi do wzrostu ekspresji TET1, natomiast wyciszenie ekspresji TET1 w tych komórkach prowadzi do spadku poziomu markerów chondrogenyzy takich jak kolagen typu II i X (Ito i wsp., 2016). Nokaut TET1 w komórkach mięszni zęba prowadzi do zahamowania proliferacji i zmniejszenia potencjału do różnicowania w tkankę zębową (Rao i wsp., 2016).

TET1 integruje ze sobą wiele czynników epigenetycznych i bierze udział w procesach modyfikacji białek histonowych. Dane literaturowe wskazują, że TET1 wchodzi w interakcję z białkami powiązаныmi z heterochromatyną takimi jak HDAC1, HDAC2, SIN3A, EZH2 (Cartron i wsp., 2013). Obecność TET1 w regionach promotorowych koreluje z obecnością modyfikacji H3K4me3, która powiązana jest z aktywną transkrypcją (Deplus i wsp., 2013). Dodatkowo, TET1 zaangażowany jest w depozycję represywnej modyfikacji H3K27me3 poprzez kierowanie czynnika Ezh2, będącego częścią kompleksu represorowego PRC1, do genów docelowych. Zwiększone wiązanie TET1 obserwuje się w promotorach biwalentnych

(Wu i wsp., 2011). Wykazano, że TET1 zaangażowany jest też w regulację acetylacji H4K16Ac. TET1 może działać hamująco na ekspresję genów niezależnie od swojej aktywności katalitycznej. TET1 wchodzi w interakcję z kompleksem represora SIN3A, który zaangażowany jest w hamowanie transkrypcji poprzez deacetylację białek histonowych za pośrednictwem HDAC1 i HDAC2 (Williams i wsp., 2011).

Bardzo ważną funkcją TET1 jest ochrona DNA przed stochastyczną metylacją (Jin i wsp., 2014) (Wiehle i wsp., 2016). Autorzy sugerują, że TET1 chroni genom przed nieprawidłową metylacją także poprzez blokowanie DNMTs (Xu i wsp., 2011). Wyciszenie TET1 w mysich ES prowadzi do wzrostu metylacji w promotorach, co również dowodzi, że TET1 bierze udział w utrzymaniu promotorów o wysokim zgęszczeniu CpG w stanie niezmetylowanym (Wu i wsp., 2011).

TET1 zaangażowany jest też w procesy naprawy DNA (Zhong i wsp., 2017) oraz ochronę komórek przed promieniowaniem UV (Lin i wsp., 2014). Dodatkowo, wydaje się, że TET1 wraz z białkiem CTCF zaangażowany jest również w proces składania mRNA (splicing). Wiązanie CTCF do DNA jest zależne od poziomu metylacji, a TET1 i TET2 regulują ten proces poprzez zamianę 5mC na 5hmC, co w następstwie prowadzi do włączenia do mRNA eksonów zależnych od CTCF (Marina i wsp., 2016).

### **3.2. TET2**

Jak wspomniano wcześniej, TET2 różni się od pozostałych białek z tej rodziny brakiem domeny wiążącej DNA. W procesie ewolucji doszło do oddzielenia się sekwencji kodującej domenę CXXC od genu *TET2* i powstania oddzielnego genu *CXXC4*, zwanego również *IDAX*. Badania dowodzą, że kodowane przez ten gen białko IDAX odpowiedzialne jest za kierowanie TET2 do jego genów docelowych. Wiązanie IDAX do DNA stymuluje również degradację TET2 przez kaspazy (Ko i wsp., 2013).

TET2 również jest zaangażowany w regulację funkcji komórek ES, chociaż jego ekspresja jest niższa niż ekspresja TET1. Dane sugerują, że TET1 i TET2 wspólnie regulują poziom 5hmC w tych komórkach, ponieważ dopiero nokaut genów kodujących oba te enzymy jednocześnie prowadzi do znacznego spadku poziomu tej modyfikacji (Koh i wsp., 2011). W warunkach niedoboru TET1 w komórkach ES, TET2 może prawdopodobnie przejmować jego funkcje (Freudenberg i wsp., 2012). Jak wspomniano powyżej, możliwe, że TET1 i TET2 działają antagonistycznie w regulacji ekspresji niektórych

genów i mogą być zaangażowane w regulację innych kierunków różnicowania komórek (Koh i wsp., 2011). W komórkach ES wyróżnia się różne stadia pluripotencji w zależności od warunków hodowli. Komórki naiwne (naïve) posiadają cechy mysich komórek macierzystych izolowanych z węzła zarodkowego blastocysty przed implantacją, natomiast komórki o fenotypie „primed” przypominają komórki epiblastu po implantacji. TET1 zaangażowany jest w proces przeprogramowania komórek do stanu „primed”, podczas gdy TET2 warunkuje utrzymanie komórek w stadium naiwnym (Fidalgo i wsp., 2016). TET2 jest również zaangażowany w proces indukcji cech macierzystości w komórkach somatycznych. Indukcja kluczowych w tym procesie genów *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc* w mysich fibroblastach prowadzi do wzrostu ekspresji TET2, co z kolei prowadzi do wzrostu hydroksymetylacji w obrębie genów kluczowych dla pluripotencji takich jak *Nanog* i *Esrrb* oraz ich aktywacji w następstwie remodelowania chromatyny w obrębie ich *loci*. Z drugiej strony, wyciszenie TET2 hamuje aktywację czynników pluripotencji w procesie indukcji komórek macierzystych (Doege i wsp., 2012). Dowodzi to, że zarówno TET2 jak i TET1 są ważnymi białkami zaangażowanymi w regulację funkcji komórek macierzystych.

TET2 pełni szczególnie istotną rolę w regulacji funkcji komórek hematopoetycznych (Moran-Crusio i wsp., 2011). Mutacje genu *TET2* obserwuje się w ludzkich nowotworach krwi (Nakajima i Kunimoto, 2014). Ponadto, nokaut *TET2* u myszy prowadzi do rozwoju różnego typu białaczek (Li i wsp., 2011). Mutacje w *TET2* towarzyszą też nowotworom takim jak czerniak oraz glejak. TET2 uważany jest więc za supresor nowotworzenia (Delhommeau i wsp., 2009) (Nakajima i Kunimoto, 2014).

Enzym ten zaangażowany jest w regulację funkcji komórek immunologicznych. Jego ekspresja jest wysoka w pomocniczych limfocytach T (Ichiyama i wsp., 2015). TET2 zaangażowany jest też w regulację funkcji MSC poprzez udział w hydroksymetylacji genów powiązanych z procesem różnicowania w adipocyty i osteoblasty (Li i wsp., 2018) (Cakouros i wsp., 2019).

TET2 reguluje ekspresję genów poprzez modyfikację DNA oraz towarzyszących mu białek histonowych. Rekrutuje OGT do regionów TSS genów i promuje GlcNAcylicację (kowalencyjne przyłączenie N-acetylogalaktozaminy) seryny 112 histonu H2B. Prowadzi to do zmian struktury chromatyny i aktywacji ekspresji genów (Chen i wsp., 2013). Po drugie, kompleks TET2/3 z OGT bierze udział w modyfikacji czynnika HCF1, metylotransferazy będącej częścią kompleksu SET1/COMPASS, który prowadzi to do wzrostu modyfikacji

H3K4me3 w genomie (Deplus i wsp., 2013). Dodatkowo, TET2 pełni istotną rolę w regulacji poziomu metylacji elementów regulatorowych, takich jak elementy wzmacniające (Hon i wsp., 2014) (Rasmussen i wsp., 2015) (Yamazaki i wsp., 2015) (Wang i wsp., 2018).

### **3.3. TET3**

TET3 ulega szczególnie wysokiej ekspresji w gametach oraz zygotach (Gu i wsp., 2011) (Rasmussen i Helin, 2016). TET3 zaangażowany jest w drugą falę demetylacji zachodzącą po zapłodnieniu oocyta przez plemnik. Wysoka wówczas ekspresja TET3 prowadzi do konwersji 5mC do 5hmC a następnie do 5fC i 5CaC, które są biernie tracone wraz z replikacją DNA (Wossidlo i wsp., 2011).

TET3 nie ulega ekspresji w komórkach ES (Koh i wsp., 2011). Białko to natomiast wydaje się pełnić istotną rolę w innych typach komórek, jest między innymi zaangażowane w proces neurogenezy (Zhang i wsp., 2016) (Montalbán-Loro i wsp., 2019), regulację funkcjonowania komórek wątroby (Li i wsp., 2020) oraz limfocytów B i T (Yue i wsp., 2019) (Tanaka i wsp., 2020).

Dane sugerują, że TET3 może regulować transkrypcję na drodze różnych mechanizmów niezależnych od jego aktywności katalitycznej w procesie demetylacji DNA. TET3, podobnie jak TET2, poprzez interakcję z OGT zaangażowany jest w depozycję modyfikacji białka histonowego H3K4me3 (Deplus i wsp., 2013). Dodatkowo, TET3 wchodzi w interakcję z NSD3 i zaangażowany jest w trimetylację H3K36 (Perera i wsp., 2015). TET3 zaangażowany jest w regulację ekspresji genów poprzez interakcję z regulatorem transkrypcji REST (Perera i wsp., 2015). Wchodzi też w interakcje z jądrowymi receptorami hormonów takimi, jak TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, AR i ERR $\alpha$  zwiększając ich stabilność w chromatynie, zapobiegając ich degradacji, a także zwiększając ich zdolność do aktywacji transkrypcji genów docelowych. Autorzy sugerują, że taka stabilizująca rola TET3 może odnosić się do różnych receptorów jądrowych (Guan i wsp., 2017).

### **3.4. Regulacja ekspresji i aktywności TET**

Enzymy TET podlegają wszechstronnej regulacji. Ich ekspresja regulowana jest poprzez różne elementy cis-regulatorowe, alternatywne promotory i różne czynniki transkrypcyjne (Lou i wsp., 2019). Ponadto, podlegają one regulacji potranskrypcyjnej przez miRNA (Zhang i wsp., 2018) i potranslacyjnej poprzez modyfikacje aminokwasów (Ciccarone i wsp., 2015) (Bauer i wsp., 2015). Jak wspomniano powyżej, enzymy TET należą

do rodziny oksygenaz zależnych od 2OG oraz Fe<sup>2+</sup>. Enzymy TET są więc ściśle zależne od dostępności 2OG w komórce. Ich aktywność jest natomiast hamowana przez bursztynian, fumaran (Xiao i wsp., 2012) oraz 2-hydroksyglutaran powstający w wyniku mutacji w obrębie IDH1 i IDH2, enzymów odpowiedzialnych za przekształcenie izocytrynianu do  $\alpha$ -ketoglutaranu (Losman i Kaelin, 2013). Dodatkowo, aktywność TET regulowana jest przez zmiany metabolizmu energetycznego wpływającego na poziom stresu oksydacyjnego, status redox komórki i dostępność Fe<sup>2+</sup> (Minor i wsp., 2013) (Salminen i wsp., 2015). Aktywność TET rośnie w obecności witaminy C. Mechanizm jej działania nie polega jednak na bezpośredniej interakcji z TET, ale na odnawianiu rezerwuaru Fe<sup>2+</sup> poprzez redukcję Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> (Yin i wsp., 2013).

### 3.5. TET a choroby

Enzymy TET odpowiedzialne są za utrzymanie prawidłowego wzoru 5hmC, zapobiegają hipermetylacji DNA i warunkują prawidłową ekspresję genów odpowiedzialnych za utrzymanie stabilności genomu i naprawę DNA (Cimmino i wsp., 2015). Deregulacja ich ekspresji lub aktywności towarzyszy wielu chorobom.

TET są uważane za supresory procesu nowotworzenia. W wielu nowotworach obserwuje się spadek globalnego poziomu 5hmC. Nowotworom piersi, czerniakom i białaczkom towarzyszą często mutacje w genie *TET2* (Tefferi i wsp., 2009) (Pardanani i wsp., 2009). Ekspresja *TET1* jest obniżona w nowotworach jelita grubego (Neri i wsp., 2015). Utrata *TET1* predysponuje komórki hematopoetyczne do transformacji nowotworowej, w szczególności do białaczek wywodzących się z limfocytów B (Cimmino i wsp., 2015). W liniach komórkowych przerzutujących nowotworów piersi obserwowano zwiększoną metylację promotora *TET1* i spadek ekspresji tego genu (Sang i wsp., 2015).

Coraz więcej badań wykazuje, że epigenetyczna deregulacja prowadząca do zmian ekspresji genów jest jednym z czynników rozwoju wielu chorób, nie tylko tych związanych z transformacją nowotworową. Chorobom tym często towarzyszą zmiany ekspresji genów *TET*. Dotyczy to w szczególności chorób neurodegeneracyjnych, co nie jest zaskoczeniem, bo to właśnie w mózgu obserwuje się najwyższy poziom 5hmC (Kriaucionis i Heintz, 2009). Zwiększoną ekspresję TET obserwowano w przypadku pacjentów z zaburzeniami psychiatrycznymi i chorobą alkoholową (Guidotti i wsp., 2013). Lokalne i globalne zmiany w poziomie 5hmC oraz wzrost ilości *TET1* obserwowano też u pacjentów ze schizofrenią, chorobą dwubiegunową i depresją (Dong i wsp., 2012). Globalny wzrost poziomu 5hmC

w hipokampie oraz spadek tej modyfikacji w korze skroniowej obserwuje się u chorych na chorobę Alzheimera (Chouliaras i wsp., 2013) (Coppieters i wsp., 2014). Dodatkowo, utrata metylacji w pojedynczych motywach CpG promotora *TET1* oraz globalny wzrost poziomu 5hmC obserwuje się w komórkach nabłonkowych osób chorych na astmę (Somineni i wsp., 2016). Ekspresja mRNA *TET1* jest podwyższona w fibroblastach osób chorych na twardzienną układową (Hattori i wsp., 2015).

#### **4. Związany z wiekiem dryft epigenetyczny dotyczący modyfikacji**

##### **DNA**

Ocenia się, że do 80 roku życia tempo procesu starzenia jest jedynie w 25% regulowane przez czynniki genetyczne, a aż w 75% przez czynniki niegenetyczne, w tym – środowiskowe (Herskind i wsp., 1996) (Skytthe i wsp., 2003). Jednym z mechanizmów oddziaływania środowiska na ekspresję genów oraz funkcjonowanie komórek są zmiany modyfikacji epigenetycznych, które podlegają wpływowi czynników takich jak dieta (Szarc Vel Szic i wsp., 2015), aktywność fizyczna (Ling i Rönn, 2014), używki oraz toksyny (Shah i wsp., 2014). To między innymi dlatego wraz z wiekiem dochodzi do akumulacji zmian w kodzie epigenetycznym, co nazywamy „dryftem epigenetycznym”. Ponieważ modyfikacje epigenetyczne podlegają wpływowi środowiska, stanowią one potencjalny cel dla strategii spowalniających proces starzenia.

Jak opisano w poprzednich rozdziałach, modyfikacje epigenetyczne poprzez modulację struktury chromatyny regulują ekspresję genów. Są one kluczowe w regulacji procesu różnicowania komórek macierzystych, w utrzymaniu prawidłowego fenotypu komórek, a także w utrzymaniu stabilności genomu (Putiri i Robertson, 2011) (Kim i Costello, 2017). Najlepiej poznanym komponentem zmian epigenetycznych związanych z procesem starzenia są zmiany metylacji DNA. Poziom metylacji DNA jest najwyższy w embrionach i stopniowo spada wraz z wiekiem (Goel i wsp., 2017), szczególnie w obrębie elementów powtórzonych (Jintaridh i Mutirangura, 2010). Zmiany metylacji DNA, między innymi poprzez aktywację ekspresji retrotranspozonów, prowadzą do destabilizacji genomu i powstania tzw. szumu transkrypcyjnego. Z drugiej strony, obserwuje się wzrost poziomu metylacji w wybranych regionach genomu, głównie w obrębie wysp CpG powiązanych z promotorami niektórych genów, prowadząc do ich niekorzystnego wyciszenia (Yeh i wsp., 2017). Dodatkowo, związaną z wiekiem hipermetylację obserwuje się w promotorach biwalentnych i genach docelowych dla kompleksu Polycomb

(Rakyan i wsp., 2010) (Dozmorov, 2015) (Mozhui i Pandey, 2017). Na podstawie statusu metylacji wybranych motywów CpG w genomie opracowano algorytmy umożliwiające obliczenie wieku chronologicznego tkanki, tzw. zegary epigenetyczne (Koch i Wagner, 2011) (Horvath, 2013) (Hannum i wsp., 2013).

Uważa się, że związane z wiekiem zmiany w profilu metylacji mogą przyczyniać się do rozwoju nowotworów (Putiri and Robertson, 2011) i innych chorób (Calvanese et al., 2009). Wpływ lokalnych, związanych z wiekiem zmian metylacji na ekspresję genów nie jest do końca jasny. Wiadomo, że hipermetylacja promotora genu może prowadzić do zahamowania jego ekspresji (King i wsp., 2012). Badania na dużych grupach ludzi wykazują, że tylko 2% CpG, których status metylacji zmienia się z wiekiem, koreluje ze zmianą ekspresji genów, a niektóre badania na myszach w ogóle nie wykazały istotnej korelacji pomiędzy zmianą metylacji a ekspresją (Unnikrishnan i wsp., 2019). Sugeruje to, że większość związanych z wiekiem zmian dotyczących tej modyfikacji w obrębie genów najprawdopodobniej nie ma następstw funkcjonalnych.

Osoby długowieczne oraz ich potomstwo charakteryzują się obniżonym wiekiem epigenetycznym w stosunku do wieku chronologicznego (Horvath i wsp., 2015), co koreluje z opóźnionym rozwojem chorób związanych z wiekiem (Xiao i wsp., 2015). Dane sugerują też, że wzrost wieku epigenetycznego o 5 lat związany jest z 8-15% wzrostem ryzyka śmierci (Fransquet i wsp., 2019).

Mechanizm tych związanych z wiekiem zmian metylacji DNA nie jest jednak do końca poznany. Spadek globalnego poziomu metylacji może być powiązany ze spadkiem ekspresji metylotransferaz (Ciccarone i wsp., 2016) lub niedoborem w diecie osób starszych kwasu foliowego, kofaktora cykli związanych z donacją grup metylowych (Rampersaud i wsp., 2000). Uważa się też, że do globalnego spadku metylacji przyczyniać się może narażenie na czynniki szkodliwe takie jak promieniowanie UV-B, zanieczyszczenia powietrza i dym papierosowy (Xiao i wsp., 2019). Odkrycie enzymów TET i procesu aktywnej demetylacji DNA rzuciło nowe światło na ten problem (Lorsback i wsp., 2003). Ponieważ enzymy TET zaangażowane są w regulację metylacji DNA, ochronę wysp CpG przed nieprawidłową metylacją a także, pośrednio, regulują modyfikacje białek histonowych i bezpośrednio oddziałują z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, zmiany w ich ekspresji lub aktywności mogą przyczynić się do związanych z wiekiem poważnych zmian w obrębie całego epigenomu oraz w funkcjonowaniu starzejących się komórek. TET mogą być też



zaangażowane w regulację procesu starzenia na drodze innych mechanizmów, na przykład poprzez utrzymanie integralności telomerów oraz warunkowanie stabilności chromosomów poprzez regulację poziomu metylacji w regionach subtelomerowych (Yang i wsp., 2016).

Ponadto, jak wspomniano, enzymy TET są kluczowe w warunkowaniu prawidłowego funkcjonowania komórek macierzystych. Możliwe więc, że związane z wiekiem zmiany w ekspresji TET oraz w poziomie i dystrybucji 5hmC w genomie komórek macierzystych mogą być jedną z przyczyn spadku potencjału regeneracyjnego tych komórek, który obserwuje się w procesie starzenia.

### III. Hipoteza i cel pracy

Podskórna tkanka tłuszczowa jest ważnym organem endokrynnym, a zmiany zachodzące w niej wraz z wiekiem stanowią istotny komponent regulujący proces starzenia. Związane z wiekiem zmiany modyfikacji epigenetycznych DNA komórek tkanki tłuszczowej stanowią istotny temat badań, ponieważ jest to tkanka podlegająca silnym wpływom czynników zewnętrznych, co potencjalnie czyni ją szczególnie narażoną na zmiany w obrębie epigenomu. Szczególnie istotny jest dryft epigenetyczny w komórkach macierzystych tkanki tłuszczowej, których różnicowanie w dojrzałe adipocyty podlega regulacji epigenetycznej i jest kluczowe dla utrzymania równowagi tej tkanki.

Dane literaturowe sugerują, że zmiany w ekspresji/aktywności enzymów TET mogą być jedną z przyczyn związanego z wiekiem dryftu epigenetycznego. Moja **hipoteza** zakłada, że wraz z wiekiem w komórkach SAT dochodzi do zmian w ekspresji/aktywności enzymów TET oraz zmian w poziomie/dystrybucji 5hmC, co stanowi jeden z elementów dryftu epigenetycznego w tej tkance.

Aby tę hipotezę zweryfikować, **celem** pracy stało się zbadanie zmian w ekspresji enzymów TET oraz poziomie 5hmC w procesie starzenia SAT i izolowanych z niej ASC, jak również określenie dystrybucji 5hmC i związanych z wiekiem zmian dystrybucji tej modyfikacji w komórkach ASC. W ramach tego celu oceniony będzie również wpływ algorytmu wykorzystanego do analizy danych z badań wielkoskalowych dotyczących dystrybucji 5hmC na uzyskane wyniki.

Fenotypy ASC i fibroblastów są bardzo zbliżone i brak jest aktualnie markerów pozwalających na jednoznaczne odróżnienie tych dwóch typów komórek, dlatego **dotychczasowym celem** pracy było wytypowanie regionów specyficznie 5-hydroksymetylowanych w ASC poprzez porównanie profilu tej modyfikacji epigenetycznej w tych dwóch typach komórek pochodzących od tych samych dawców. Drugim celem dodatkowym było sprawdzenie, czy istnieją regiony różnicowo hydroksymetylowane z wiekiem (DHMR) wspólne dla różnych typów komórek (uniwersalne zmiany hydroksymetylacji w toku starzenia).

*Cele szczegółowe*

1. Zbadanie związanych z wiekiem zmian w globalnym poziomie 5hmC oraz ekspresji TET w ludzkiej podskórnej tkance tłuszczowej izolowanej z regionów chronionych przed promieniowaniem słonecznym.
2. Zbadanie związanych z wiekiem różnic w globalnym poziomie 5hmC oraz ekspresji TET w ASC izolowanych od osób młodych i starszych.
3. Analiza dystrybucji 5hmC w DNA ASC osób młodych i starszych oraz identyfikacja związanych z wiekiem DHMR w tych komórkach.
4. Porównanie wpływu różnych parametrów na wyniki analizy różnicowej *in silico* w kontekście identyfikacji związanych z wiekiem DHMR.
5. Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych różnicujących komórki ASC od fibroblastów.
6. Identyfikacja związanych z wiekiem DHMR wspólnych dla ASC i fibroblastów.

## IV. Materiały i metody

### 5. Materiały

#### 5.1. Bufory

*Tabela 1. Lista buforów nie wchodzących w skład gotowych zestawów.*

<b>Bufory do analizy DNA</b>			
<b>Nazwa</b>	<b>Zastosowanie</b>	<b>Skrót</b>	<b>Skład</b>
<b>Bufor do denaturacji DNA 2x stężony</b>	Denaturacja DNA przed analizą modyfikacji DNA metodą dot-blot		0,8 mM NaOH; 20 Mm EDTA
<b>Bufor neutralizujący</b>	Neutralizacja DNA po denaturacji		2 M octan amonu, pH 7
<b>Buforowana fosforanem sól fizjologiczna z Tween 20</b>	Płukanie membran nitrocelulozowych dot-blot	PBS-T	Buforowana sól fizjologiczna; 0,1% Tween 20
<b>Bufory do immunofluorescencji</b>			
<b>Nazwa</b>	<b>Zastosowanie</b>	<b>Skrót</b>	<b>Skład</b>
<b>Roztwór paraformaldehydu</b>	Utrwalanie komórek przed bawieniem immunohistochemicznym	PFA	4% PFA w PBS
<b>Bufor blokująco-permeabilizujący 1</b>	Blokowanie i permeabilizacja komórek podczas barwienia immunofluorescencyjnego		3% BSA; 0,5% Triton w PBS
<b>Bufor blokująco-permeabilizujący 2</b>	Rozcieńczenie przeciwciał I-rzędowych do barwienia immunofluorescencyjnego		3% BSA; 0,1% Triton w PBS
<b>Bufory do analizy białek</b>			
<b>Nazwa</b>	<b>Zastosowanie</b>	<b>Skrót</b>	<b>Skład</b>
<b>Bufor do izolacji białka z tkanki tłuszczowej</b>	Do homogenizacji tkanki tłuszczowej w pierwszym etapie izolacji białka		50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,2 mM EDTA i 5x stężona mieszanina inhibitorów proteaz
<b>Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)</b>	Izolacja białka całkowitego z komórek	RIPA	150 nM NaCl; 1% NP40; 0,05% dezoksycholan sodu; 0,1% SDS, 50 Mm Tris pH 8, 5 mM EDTA
<b>Tris-Glicyna-SDS</b>	Elektroforeza białek	TGS	25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,1% SDS
<b>Bufor do transferu białek</b>	Transfer białek o masie 15-150 kDa		25 mM Tris; 192 mM glicyna; 20% metanol

<b>Bufor do transferu dużych białek</b>	Transfer białek >150 kDa		25 mM Tris; 192 mM glicyna; 10% metanol
<b>Bufor redukujący Laemmliego 5x stężony</b>	Denaturacja ekstraktów białkowych		5% 2-merkптоetanol; 10% SDS; 50% glicerol; 1M Tris pH 6,8; 0,012% błękit bromofenolowy
<b>Buforowana Tris sól fizjologiczna z Tween 20</b>	Płukanie membran nitrocelulozowych – immunoblot	TBS-T	20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20

#### Bufory do hodowli i analizy ASC

Nazwa	Zastosowanie	Skrót	Skład
<b>Pożywka hodowlana</b>	Hodowla komórek ASC		DMEM; 15% inaktywowany cieplnie FBS; 10 U/ml penicyliny i 10 µg/ml streptomycyny
<b>Pożywka do adipogenezy</b>	Różnicowanie komórek ASC w adipocyty		Pożywka hodowlana (patrz powyżej); 0,31 µM deksametazon; 60 µM indometacyna; 0,5 Mm IMBIX
<b>Pożywka izolacyjna</b>	Neutralizacja enzymów i zawieszanie komórek podczas izolacji		DMEM; 20% inaktywowany cieplnie FBS; 10 U/ml penicyliny i 10 µg/ml streptomycyny

## 5.2. Odczynniki

- 2-Merkптоetanol (Sigma)
- Albumina bydlęca (BSA, Bovine Serun Albumin) (Sigma)
- Błękit bromofenolowy (Sigma)
- Błękit toluidynowy (Sigma)
- Chlorek sodu (NaCl) (Sigma)
- Clarity™ Western ECL (Bio-Rad)
- cOplete, EDTA-free (Roche)
- Dexametazon (Sigma)
- Dezoksychofan sodu (Sigma)

- DMEM (Gibco)
- DMSO (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Etylowy alkohol (Linegal Chemicals)
- Fluorescent Mounting Medium (DAKO)
- Glicerol (Sigma)
- Glicyna (Sigma)
- Hoechst 33342 (Sigma)
- IMBX (Sigma)
- Indometacyna (Sigma)
- Izopropylowy alkohol (Sigma)
- Kolagenaza I (Sigma)
- Kwas borowy (H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>) (Sigma)
- Kwas solny (HCl) (Sigma)
- Laurylosiarczan (dodecylosiarczan) sodu (SDS) (Sigma)
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)
- Membrana nitrocelulozowa (Bio-Rad)
- Metylowy alkohol (Linegal Chemicals)
- Octan amonu, roztwór 2M (Sigma)
- Paraformaldehyd (Sigma)
- Penicylina/streptomycyna (Sigma)
- Płodowa surowica bydlęca (FBS) (Gibco)
- Proteinaza K (EurX)
- SDS (Sigma)
- Tris-EDTA (TE) 100x (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- Trypsyna (Gibco)
- Tween 20 (Sigma)
- Woda destylowana, dejonizowana (ddH<sub>2</sub>O)
- Wodorotlenek sodu (NaOH) (POCH)

### 5.3. Zestawy

- Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit” (RiD Systems)
- Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (RiD Systems)
- GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EurX)
- Sherlock AX (A&A Biotechnology)
- Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research)
- Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific)

### 5.4. Przeciwciała I-rzędowe

*Tabela 2. Przeciwciała I-rzędowe.*

Antygen	Technika	Producent	Klon/nr. kat.
5mC	DB	Abcam	33D3
5hmC	DB/IF	Active-Motif	AB_10013602
5fC	DB	Active-Motif	61223
5CaC	DB	Active-Motif	61225
ssDNA	DB	Merck Milipore	F7-26
TET1	WB/IF	Invitrogen	PA5-34906
TET2	IF	Invitrogen	PA5-19201
TET2	WB	Active-Motif	21F11
TET3	WB/IF	Abiocode	R1092-3
GAPDH	WB	Santa Cruz Biotechnology	FL-25778
HSP90	WB	Santa Cruz Biotechnology	H-114

WB: Western blot (immunoblot), DB: dot-blot, IF: immunofluorescencja

## 5.5. Przeciwciała II-rzędowe

**Tabela 3.** Przeciwciała II-rzędowe.

Przeciwciało	Producent	Gospodarz
HRP-anty-królicze IgG	Merck-Millipore	koza
HRP-anty-mysie IgG	Merck-Millipore	królik
HRP-anty-kozie IgG	Merck-Millipore	osioł
HRP-anty-mysie IgG1κ	Santa-Cruz Biotechnology	królik
HRP-anty-mysie IgM	Invitrogen	koza
Alexa Fluor-633 anty-królicze IgG H+L	Invitrogen	koza
Alexa Fluor-546 anty-królicze IgG H+L	Life Technologies	koza
Alexa Fluor-633 anty-mysie IgG H+L	Invitrogen	królik
Alexa Fluor-488 anty-kozie IgG H+L	Invitrogen	osioł

## 5.6. Sprzęt

- Blok grzewczy (Thermo Scientific)
- Cytometr przepływowy BD FACSCANTO II (BD Biosciences)
- Kolorymetryczny czytnik płytek (Epoch)
- nanoDROP2000 (Thermo Scientific)
- Mikroskop konfokalny System LSM 780 (Zeiss)
- Mini Protean II, zestaw do elektroforezy białek i mokrego transferu białek na membranę nitrocelulozową (Bio-Rad)
- Qubit 4 Fluorometer (Thermo Scientific)
- Stratalinker UV 1800 Crosslinker (Stratagene)
- System Bio-dot do dot-blot (Bio-Rad)
- System do odczytu chemiluminescencji GeneGnome XRQ (Syngene)
- Termocykler do PCR czasu rzeczywistego LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- TissueLyser II (QIAGEN)



## 5.7. Programy, pakiety i bazy danych

### Programy

- R (R Core Team, 2017)
- R Studio (Haque i wsp., 2017)
- GraphPad Prism (GraphPad Software)
- Image Studio Lite (Li-Cor)
- ZEN2012 (Zeiss)

### Pakiety do programu R Studio

- DiffBind (Stark i Brown, 2021)
- MEDIPS (Lienhard i wsp., 2014)
- Annotatr (Cavalcante i Sartor, 2017)
- ChIPPeakAnno (Zhu i wsp., 2010)
- ComplexHeatmap (Gu i wsp., 2016)
- ggplot2 (Wickham, 2016)
- Rgreat
- R commander

### Narzędzia internetowe

- Panther (Thomas i wsp., 2003)
- ReMap 2020 (Chèneby i wsp., 2020)

## 5.8. Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiła podskórna tkanka tłuszczowa pobrana z okolic o ograniczonym narażeniu na promieniowanie słoneczne (pachwiny i okolica nadłonowa) przy okazji planowych operacji (przepuklina, operacje powłok brzusznych). Tkanka pobrana była z okolic niezmienionych chorobowo, wzdłuż dolnej linii cięcia, od 71 pacjentów (39 kobiet oraz 32 mężczyzn) w wieku 18-96 lat (średnio  $53 \pm 20$  lat), z BMI 17-35  $\text{kg}/\text{m}^2$  (średnio  $26,6 \pm 5$   $\text{kg}/\text{m}^2$ ), wolnych od chorób ogólnoustrojowych mogących mieć wpływ na stan skóry i tkanki podskórnej takich, jak cukrzyca, nowotwór i choroby autoimmunologiczne. Tkanki pobierano za zgodą Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB/283/2013). Uczestnicy wyrazili zgodę na udział w badaniu. Dane analizowano po uwzględnieniu zasad anonimizacji.

Skóra o powierzchni ok. 2  $\text{cm}^2$  wraz z tkanką podskórną umieszczana była w soli fizjologicznej i przewożona na lodzie do laboratorium w czasie nie dłuższym niż 2 godziny od pobrania. Następnie tkankę podskórną oddzielano od skóry oraz naczyń krwionośnych. Część tkanki „na świeżo” poddawana była trawieniu enzymatycznemu w celu izolacji komórek (podrozdział „Izolacja komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej”). Resztę tkanki dzielono na porcje po około 100 mg i mrożono w  $-80^\circ\text{C}$  do dalszych analiz.

## 6. Metody

### 6.1. Izolacja, hodowla i mrożenie komórek ASC

Świeżo pobraną tkankę tłuszczową (ok. 2,5 ml) poddawano trawieniu 0,075% roztworem kolagenazy I w  $37^\circ\text{C}$  przez 45 minut w wytrząsarce. Po trawieniu do homogenatu dodawano dwukrotną objętość pożywki izolacyjnej, mocno wstrząsano i filtrowano przez sitko do hodowli komórkowych o porach 100  $\mu\text{m}$ . W tym etapie dojrzałe adipocyty ulegają zniszczeniu, co pozwala na ich oddzielenie od komórek frakcji SVF. Następnie komórki wirowano w 450 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Osad komórkowy oddzielano od tłuszczu powstałego w wyniku rozpadu adipocytów, zawieszano w 5 ml medium izolacyjnego, filtrowano przez sitko o porach 70  $\mu\text{m}$  i wysiewano do butelki hodowlanej 25  $\text{cm}^2$ . Protokół opracowano w oparciu o pracę Bunnell i wsp. (Bunnell i wsp., 2008). Dalszą hodowlę prowadzono w pożywce hodowlanej. Pożywkę zmieniano co 2-3 dni. Po osiągnięciu konfluencji na poziomie 80-90%, komórki poddawano trawieniu 0,05% roztworem trypsyny z dodatkiem EDTA w  $37^\circ\text{C}$  przez 1-5 minut. Następnie

komórki zalewano podwójną objętością medium hodowlanego, wirowano w 250 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Osad zawieszano w medium hodowlanym i wysiewano do nowych naczyń hodowlanych w zagęszczeniu  $3 \times 10^3/\text{cm}^2$  lub mrożono w medium hodowlanym z dodatkiem 10% DMSO do dalszych doświadczeń.

Komórki po trzecim pasażu zbierano po osiągnięciu przez nie konfluencji na poziomie 90%. Po odciągnięciu pożywki szalkę przepłukiwano PBS. Następnie komórki zalewano 5 ml PBS i zeszkrobywano przy użyciu skrobaczki. Komórki zbierano do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml i wirowano w 300 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu odlewano nadsącz, a osad płukano w 1 ml PBS i przenoszono do probówek 1 ml typu Eppendorf. Komórki wirowano w 400 x g przez 10 minut w 4°C. Po wirowaniu ściągano nadsącz, a osad komórkowy mrożono w -80°C do dalszych analiz.

## **6.2. Identyfikacja komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej**

### *Analiza markerów powierzchniowych komórek ASC w cytometrze przepływowym*

Pozyskane przez mnie pierwotne hodowle komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej scharakteryzowałam pod kątem obecności markerów charakterystycznych dla komórek macierzystych pochodzenia mezenchymalnego. Komórki macierzyste powinny posiadać markery powierzchniowe CD90 i CD146, natomiast nie posiadać markera komórek hematopoetycznych CD45. Do identyfikacji markerów powierzchniowych użyto zestawu Human Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit. Osad komórek płukano w 2 ml buforu do barwienia (dostarczonego przez producenta zestawu), wirowano w 300 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Osad komórkowy zawieszano w 100 µl mieszaniny blokującej zawierającej 3% BSA w PBS i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do komórek dodawano po 10 µl przeciwciał anti-CD90, anti-CD146, anti-CD45 (z zestawu, do końcowego rozcieńczenia 1:10) i inkubowano w ciemności przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Komórki płukano w 2 ml buforu do barwienia i wirowano w 300 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po zlaniu nadsączu, komórki zawieszano w 200 µl buforu do barwienia i analizowano w cytometrze przepływowym FACSCanto II.

## **6.3. Adipogeneza**

Komórki ASC wysiewano w zagęszczeniu  $10^4/\text{cm}^2$  na dołek szalki 12-dołkowej z umieszczonymi wewnątrz szklanymi szkiełkami nakrywkowymi o średnicy 14 mm.

Po osiągnięciu przez komórki konfluencji na poziomie 100%, zmieniano pożywkę na pożywkę różnicującą w adipocyty, którą następnie zmieniano co 2-3 dni. Różnicowanie prowadzono przez 3 tygodnie.

#### **6.4. Barwienie pod kątem markerów różnicowania**

Po zakończeniu procesu różnicowania, komórki utrwalano 4% PFA w PBS przez 12 minut i barwiono na obecność markera dojrzałych adipocytów FABP-4 oraz markera osteocytów – osteokalcyny. Do barwień użyto przeciwciał załączonych do zestawu Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit, stosując rozcieńczenia zgodnie z protokołem producenta. Barwienie immunocytochemiczne wykonano zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale „Immunocytochemia”.

#### **6.5. Potencjał do samoodnowy**

Komórki w liczbie 50 wysiewano do studzienki szalki 6-dołkowej w pożywkę hodowlaną. Komórki hodowano aż do uzyskania widocznych kolonii, około 14 dni, wymieniając pożywkę co 3 dni. Następnie komórki płukano PBS i zalewano 0,1% roztworem błękitu toluidynowego w PBS na 1 minutę, aż do uwidocznienia się kolonii na szalce.

#### **6.6. Izolacja DNA**

##### *Izolacja DNA z tkanki tłuszczowej*

Okolo 30 mg tkanki tłuszczowej zostało poddane homogenizacji przy użyciu homogenizatora kulkowego TissueLyser II. Homogenizację przeprowadzano z częstotliwością 20 Hz przez 2 minuty w 2 cyklach, w 4°C. Następnie tkankę trawiono proteinazą K przez 16 godzin w 55°C. DNA izolowano przy użyciu zestawu Tissue DNA Purification Kit zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. DNA z kolumny wypłukiwano przy użyciu 100 µl buforu elucyjnego dostarczonego przez producenta zestawu.

##### *Izolacja DNA z ASC*

DNA z ASC izolowano przy użyciu zestawu GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit zgodnie z protokołem producenta. Osady komórkowe poddawano trawieniu proteinazą K w celu degradacji białek, nanoszono na kolumny ze złożem selektywnie wiążącym DNA, które płukano buforami dostarczonymi przez producenta. Oczyszczone DNA z kolumny wypłukiwano przy użyciu 50 µl buforu TE.

Ze względu na to, że stężenie DNA potrzebne do sekwencjonowania pod kątem 5-hydroksymetylacji musiało być duże, do tej metody DNA izolowano zestawem Sherlock AX, który łączy ze sobą oczyszczanie na kolumnach i precypitację alkoholem. Stężenie DNA do sekwencjonowania mierzono przy użyciu testów opartych na fluorescencji Qubit dsDNA HS Assay i aparatury Qubit. Metoda ta opiera się na pomiarze fluorescencji pochodzącej od barwników łączących się z dwuniciowym DNA.

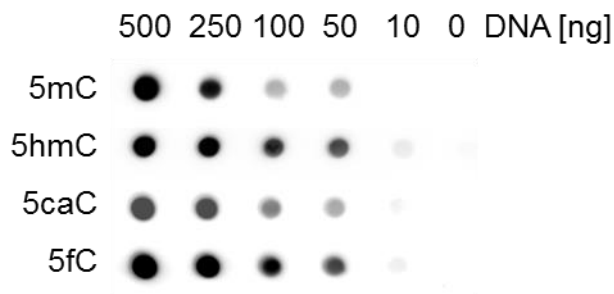
#### *Pomiar stężenia i analiza jakości DNA*

Po izolacji, stężenie DNA mierzono przy pomocy urządzenia NanoDROD 2000. W celu oceny stężenia oraz czystości wyizolowanego DNA, mierzono absorbancję 2  $\mu$ l próbki przy długości fali 280 i 260 nm. Stosunek absorbancji 260/280 około 1,8 charakteryzował czyste DNA. Niższa wartość oznacza zanieczyszczenie próbki białkami lub fenolami.

### **6.7. Analiza globalnego poziomu modyfikacji DNA (dot blot)**

Pierwszym etapem analizy było dobranie optymalnej ilości DNA oraz sprawdzenie specyficzności przeciwciał. W tym celu przygotowano serię rozcieńczeń (20, 10, 4, 2 i 0,4 ng/ $\mu$ l) DNA izolowanego z podskórnej tkanki tłuszczowej. Próbki rozcieńczano w buforze TE. Następnie 25  $\mu$ l DNA z każdego rozcieńczenia oraz 25  $\mu$ l samego buforu TE (kontrola negatywna) mieszano z 25  $\mu$ l 2x stężonego buforu denaturującego. Tak przygotowane próbki denaturowano w 100°C przez 10 minut, po czym neutralizowano równą objętością 2 M roztworu octanu amonu. Zdenaturowane DNA nanoszono na membranę nitrocelulozową umieszczoną w aparaturze Bio-dot podłączonym pod próżnię. Po transferze membranę suszono w temperaturze pokojowej, utrwalano UV w aparacie Stratalinker UV 1800 (1200 J, 5 minut), blokowano 10% roztworem odtłuszczonego mleka z dodatkiem 1% BSA w PBS-T i inkubowano przez 16 godzin w 4°C z przeciwciałem I-rzędowym (Tabela 2) anti-5mC w rozcieńczeniu 1:5000, anti-5hmC w rozcieńczeniu 1:10000, anti-5fC w rozcieńczeniu 1:10000, anti-5caC w rozcieńczeniu 1:10000, anti-ssDNA (kontrola, globalny poziom jednoniciowego DNA, co stanowiło kontrolę wewnętrzną ilości nałożonego DNA) w rozcieńczeniu 1:200 w 10% odtłuszczonego mleka z dodatkiem 1% BSA w PBS-T. Następnie membrany płukano 3-krotnie po 7 minut w buforze PBS-T i inkubowano przez godzinę z przeciwciałem II-rzędowym (Tabela 3): dla 5mC – anti-mysim IgG sprzężonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym 1:10000 w PBS-T, dla 5hmC, 5fC, 5caC – anti-króliczym IgG sprzężonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym 1:10000 w PBS-T lub przeciwciałem anti-mysim IgM sprzężonym z

peroksydazą chrzanową w PBS-T w rozcieńczeniu 1:2000. Detekcję sygnału przeprowadzono z użyciem substratu Clarity™ Western ECL w urządzeniu GeneGnome. Na podstawie tak pozyskanych wyników wybrano 100 ng DNA jako optymalną ilość do przeprowadzenia analiz ilościowych modyfikacji DNA (Rycina 4).



**Rycina 4.** Reprezentatywny immunoblot przedstawiający siłę sygnału luminescencji badanych modyfikacji DNA przy różnych ilościach DNA nałożonych na membranę oraz brak sygnału w kontroli negatywnej, co potwierdza specyficzność przeciwciał.

Dla przeprowadzenia analizy ilościowej, DNA izolowane z podskórnej tkanki tłuszczowej i komórek ASC rozcieńczono do 4 ng/μl. Dalszą analizę globalnego poziomu 5mC, 5hmC, 5fC i 5caC prowadzono zgodnie z powyżej opisanym protokołem. Detekcję sygnału przeprowadzono z użyciem substratu Clarity™ Western ECL w urządzeniu GeneGnome. Analiza densytometryczna wykonana była w programie Image Studio Lite. Globalna ilość badanych modyfikacji DNA została znormalizowana do ogólnej ilości jednoniciowego DNA.

## 6.8. Sekwencjonowanie pod kątem hydroksymetylacji hMeDIP-seq

DNA z komórek izolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej od 5 osób młodych (28-34 lata; średnio  $30,6 \pm 3$  lata) i 5 starszych (77-94 lata; średnio  $83 \pm 6$  lat) poddano fragmentacji a następnie immunoprecypitacji przy użyciu przeciwciała specyficznego dla 5hmC, a uzyskane fragmenty sekwencjonowano. Usługa została wykonana przez firmę zewnętrzną (NXT-DX, Gent Belgium). Odczyty zmapowano do genomu referencyjnego *Human reference genome Ensembl GRCh38* przy użyciu oprogramowania STAR (v. 2,5). Na podstawie zmapowanych odczytów wytypowano regiony 5-hydroksymetylowane przy użyciu oprogramowania MACS14 peak caller. Wstępna obróbka danych została przeprowadzona przez firmę NXT-DX. Dalsza analiza danych z sekwencjonowania została przeprowadzona przeze mnie przy użyciu programu R, pakietów opisanych w dziale „programy i pakiety” oraz metod opisanych w kolejnych podrozdziałach.

## 6.9. Analiza dystrybucji 5hmC w genomie ASC

Analizę dystrybucji 5hmC w genomie ASC wykonałam na danych pozyskanych jedynie od pacjentów młodych dlatego, by wyeliminować ewentualny wpływ wieku na uzyskane wyniki. Dystrybucja regionów hydroksymetylowanych wykazywała dużą zmienność międzyosobniczą. W celu wyeliminowania szumu i uzyskania reprezentatywnego profilu 5-hydroksymetylacji, do dalszej analizy wybrałam regiony 5-hydroksymetylowane występujące u przynajmniej 3 z 5 uczestników badania (wartość przyjęta arbitralnie). Regiony te wytypowano przy użyciu pakietu DiffBind.

Przeanalizowałam poziom 5-hydroksymetylacji w obrębie poszczególnych struktur genomu. W tym celu, przy użyciu pakietu MEDIPS, przypisałam do każdego regionu względny poziom 5-hydroksymetylacji, czyli liczbę odczytów dla danego regionu znormalizowaną o liczbę par CpG w jego obrębie. Następnie, przy pomocy pakietu Annotatr, wygenerowałam histogramy przedstawiające dystrybucję względnego poziomu 5hmC w obrębie poszczególnych anotacji w porównaniu do średniego poziomu 5hmC we wszystkich analizowanych regionach, w których w ogóle wykryto obecność 5-hydroksymetylacji. Ryciny obrazujące względny poziom 5hmC dla wybranych regionów genomu wygenerowałam przy użyciu pakietu ggplot2. Analizę statystyczną względnego poziomu 5hmC w obrębie poszczególnych struktur genomu przeprowadzono przy użyciu nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa.

## 6.10. Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem (DHMR)

### *Wybór pakietu i algorytmu do analizy różnicowej*

Na obecnym etapie wiedzy, wobec braku wystandaryzowanej i wiarygodnej metody analizy, wybór algorytmu do różnicowej analizy danych wielkoskalowych ma kluczowy wpływ na wyniki. Istnieje wiele narzędzi do różnicowej analizy danych z sekwencjonowania nowej generacji. Wybrałam pakiet MEDIPS, ponieważ jest on dedykowany do analizy danych z sekwencjonowania pod kątem metylacji DNA – MeDIP-seq, czyli metody analogicznej do użytej w niniejszych badaniach – hMeDIP-seq. Atutem MEDIPS jest funkcja wyliczania względnego poziomu metylacji, czyli poziomu metylacji znormalizowanego do liczby par CG w obrębie danego regionu.

Analiza została wykonana w kilku wariantach. W pierwszym etapie wykonałam ją przy użyciu parametrów domyślnych, sugerowanych przez twórców algorytmu. Następnie wykonałam analizy przy użyciu indywidualnie dobranych parametrów dla 2 różnych wielkości analizowanego okna genomowego.

#### *Etapy i parametry analizy różnicowej*

Do przeprowadzenia analizy różnicowej przez algorytm statystyczny, niezbędne jest pozyskanie listy regionów wraz z wartościami określającymi poziom 5hmC dla danego regionu u każdego pacjenta, zwanej dalej macierzą regionów. W przypadku pakietu MEDIPS macierz regionów tworzona jest na podstawie plików BAM, które zawierają informację o wszystkich odczytach pozyskanych podczas sekwencjonowania oraz mapowaniu ich do genomu referencyjnego. Regiony do dalszej analizy definiowane są na podstawie następujących parametrów:

- Przewidywana długość odczytów (extend) – długości fragmentów DNA poddanych immunoprecypitacji poprzedzającej sekwencjonowanie. Domyślnie zalecane jest użycie parametru „extend” = 300 pz.
- Wielkość regionów, na jakie dzielony jest genom podczas analizy (wielkość okna, ws, window size). Ten parametr zależy od wielkości docelowo badanych czynników genomowych (np. powinien być wąski dla analizy regionów wiązania czynników transkrypcyjnych, a szerszy dla wiązania białek histonowych). Domyślnie zalecane jest użycie wielkości okna 100 pz.
- Minimalna liczba odczytów definiuje, jaka powinna być minimalna sumaryczna liczba odczytów z danego regionu od wszystkich pacjentów, aby region został poddany analizie. Domyślnie = 10.

#### *Analiza statystyczna*

Normalizacja odczytów pod kątem wielkości biblioteki przeprowadzana jest metodą TMM (Robinson i Oshlack, 2010). Po utworzeniu macierzy regionów oraz normalizacji odczytów, regiony poddane są analizie statystycznej wraz z korektą dla porównań wielokrotnych. W przypadku MEDIPS, test statystyczny oparty jest na algorytmie statystycznym EdgeR. Korekta wartości p dla porównań wielokrotnych przeprowadzona jest domyślnie przy użyciu testu Bonferroniego. Próg istotności dla skorygowanej wartości p ustawiono na 0,05.



Analizy dla parametrów zoptymalizowanych (dobranych przeze mnie) przeprowadziłam następująco: przewidywana długość odczytów (extend): 450 pz; wielkość okna (ws): 450 pz oraz 50 pz; minimalna liczba odczytów: 5; poprawka pod kątem porównań wielokrotnych: FDR. Szczegółowe parametry wszystkich wykonanych analiz przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4.** Podsumowanie wariantów analizy różnicowej.

Parametr	Domyślne	Parametry zoptymalizowane
Normalizacja do wielkości biblioteki		TMM
Algorytm analizy statystycznej		EDGER
Długość regionów	300 pz	450 pz
Wielkość analizowanego okna	100 pz	450 oraz 50 pz
Poprawka p-value	Bonfferoni	FDR
Normalizacja do wielkości biblioteki		Pełna
Minimalna liczba odczytów	10	5

### 6.11. Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych pomiędzy ASC a fibroblastami

W celu sprawdzenia, czy dystrybucja 5hmC może być czynnikiem różnicującym ASC od fibroblastów, wykonałam analizę różnicową profilu tej modyfikacji wykorzystując dane pozyskane z hMeDIP-seq od 7 uczestników badania (od 3 osób młodych (27-33 lata; średnio  $29,6 \pm 3$  lata) i 4 starszych (77-94 lata; średnio  $82 \pm 5$  lat). Od każdego z nich pozyskano profil hydroksymetylacji dla ASC i fibroblastów ze skóry właściwej. Zdecydowałam się na uwzględnienie zarówno młodych jak i starszych pacjentów, aby zwiększyć grupę badaną, zakładając, że nawet jeśli profil hydroksymetylacji zmienia się z wiekiem, to poziom 5hmC w kluczowych regionach różnicujących te 2 typy komórek od siebie pozostaje bez zmian. Analizę przeprowadziłam dla wielkości regionu oraz okna genomowego 450 pz, co odpowiadało średniej długości regionów 5-hydroksymetylowanych wytypowanych przez algorytm MACS. Nie przeprowadziłam analizy dla okna 50 pz ponieważ analiza wykonana była pod kątem szerszych elementów genomu powiązanych ze strukturami genów.

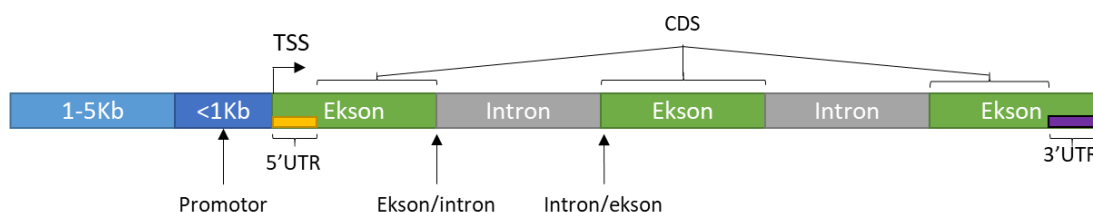
## 6.12. Identyfikacja funkcjonalna i ontologiczna zidentyfikowanych regionów

Regiony 5hmC z ASC, związane z wiekiem DHMR z ASC oraz regiony różnicujące ASC od fibroblastów identyfikowałam w odniesieniu do:

- a. poszczególnych struktur genu (pozyskane z bazy USCS KnownGene (James Kent i wsp., 2002) (Rycina 5A):
  - 5'UTR,
  - promotor,
  - granica ekson-intron/intron-ekson,
  - eksony,
  - introny,
  - 3'UTR,
  - CDS,
- b. Wysp CpG (Rycina 5B) (Morgan M, 2020):
  - wyspy CpG,
  - CpG shores, czyli regiony przylegające od wysp CpG w odległości do 2 kpz,
  - CpG shelves, czyli regiony znajdujące się w odległości 2-4 kpz od wyspy CpG,
- c. Elementów regulatorowych, pozyskanych z bazy Ensembl Regulatory Build (Zerbino i wsp., 2015):
  - miejsca wiązania CTCF,
  - regiony regulatorowe wzmacniające (enhancers),
  - miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych,
  - otwarta chromatyna,
  - promotory,
  - regiony przylegające do promotorów (flanka promotora),
- d. Aktywności elementów regulatorowych pobranych z bazy Ensembl zdefiniowanych uprzednio w komórkach MSC izolowanych ze szpiku oraz dla fibroblastów skórnych. Aktywność elementów regulatorowych przewidywana jest na podstawie profilu wiązania czynników transkrypcyjnych oraz miejsc cięcia DNazę-I (charakterystyczne dla otwartej chromatyny). Aktywność elementów podzielono na 4 kategorie:

- ACTIVE (aktywny), profil epigenetyczny charakterystyczny dla elementów aktywnych,
  - POISED (gotowy do aktywacji), profil epigenetyczny charakterystyczny dla elementów z potencjałem do aktywacji,
  - REPRESSED (zahamowany), profil epigenetyczny charakterystyczny dla elementów zahamowanych,
  - INACTIVE (nieaktywny), brak obecności analizowanych czynników transkrypcyjnych,
- e. Modyfikacji histonowych zdefiniowanych poprzednio dla MSC pozyskanych z komórek embrionalnych (Roadmap Epigenomics Consortium i wsp., 2015),
- f. Elementów powtórzonych pozyskanych z bazy RepeatMasker (Nishimura, 2000),
- g. Regionów wiązania czynników transkrypcyjnych identyfikowanych przy użyciu narzędzia Remap 2020 (Chèneby i wsp., 2020).

**A**



**B**



**Rycina 5.** Schemat przedstawiający analizowane regiony genomu. A) Elementy struktury genów. B) Regiony w odniesieniu do wysp CpG. Na podstawie <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/annotatr/inst/doc/annotatr-vignette.html>

Przypisanie cech do regionów oraz analiza dystrybucji regionów w obrębie poszczególnych elementów genomowych przeprowadzone zostały przy użyciu pakietu Annotatr.

Wykonałam również analizę ontologiczną genów powiązanych z analizowanymi regionami. Do przypisania genów do regionów użyłam pakietu ChipPeakAnno (geny leżące w obrębie regionów) lub narzędzia rGreat, które przeznaczone jest do wytypowania genów potencjalnie regulowanych przez (również odległe) elementy regulatorowe. Tak uzyskaną listę genów poddałam analizie pod kątem ich powiązania z procesami biologicznymi z bazy GO, w celu ustalenia potencjalnej funkcji tych genów oraz analizy statystycznej częstości występowania genów z poszczególnych szlaków. Analiza ontologiczna wykonana została przy użyciu narzędzia internetowego Panther.

### **6.13. Analiza statystyczna częstości występowania regionów różnicowo hydroksymetylowanych w obrębie poszczególnych elementów genomu**

Sama liczba regionów różnicowo hydroksymetylowanych w obrębie danego elementu genomu nie świadczy o jego zwiększonej tendencji do zmian w poziomie 5hmC. Jeśli genom człowieka zawiera więcej intronów niż promotorów, to prawdopodobnie więcej takich regionów będzie znajdować się właśnie w intronach. W celu sprawdzenia, czy poszczególne elementy genomowe są faktycznie statystycznie bardziej podatne na wystąpienie 5-hydroksymetylacji lub jej związane z wiekiem zmiany, zestaw analizowanych regionów porównywano do losowo wygenerowanego zestawu regionów o analogicznej liczbie i długości fragmentów. W ten sposób można zweryfikować, czy konkretny element genomu pojawia się istotnie częściej niż wynika to z rachunku prawdopodobieństwa. Regiony losowe generowane są ze wskazanej puli regionów, której dobór zależy od rodzaju analizy i ma istotny wpływ na pozyskane wyniki. W przypadku analizy dystrybucji 5hmC w genomie ASC, regiony losowe zostały wygenerowane z całego ludzkiego genomu hg38. W przypadku analizy związanych z wiekiem DHMR, regiony losowe wygenerowano ze wszystkich 5-hydroksymetylowanych fragmentów w genomie ASC. W przypadku regionów różnicujących ASC od fibroblastów, regiony losowe zostały wygenerowane ze wszystkich fragmentów DNA 5-hydroksymetylowanych w ASC i fibroblastach. Analizę statystyczną wraz z wytypowaniem regionów losowych przeprowadzano przy pomocy pakietu LOLA i testu dokładnego Fishera.

## 6.14. Izolacja RNA

### *Izolacja RNA z tkanki tłuszczowej*

Okolo 30 mg tkanki tłuszczowej zanurzonej w 500 µl TRIzolu zostało poddane homogenizacji przy użyciu homogenizatora kulkowego TissueLyser II. Homogenizację przeprowadzano z częstotliwością 20 Hz przez 2 minuty w 2 cyklach, w 4°C. Następnie przeprowadzono izolację RNA przy użyciu zestawu Direct-zol RNA MiniPrep kit zgodnie z procedurą załączoną przez producenta. W skrócie, metoda opiera się na precypitacji RNA przy użyciu alkoholu etylowego o stężeniu 95-100% i związaniu go na kolumnie dołączonej do zestawu. Następnie RNA jest płukane na kolumnie przy użyciu buforów dołączonych przez producenta i wypłukiwane przy użyciu 100 µl ddH<sub>2</sub>O wolnej od RNAz. Ilość i jakość RNA oceniano przy użyciu urządzenia NanoDROP2000. Absorbancję 2 µl próbki mierzono przy długości fali 280 i 260 nm. Stosunek absorbancji 260/280 dla czystego RNA powinien wynosić okolo 2. Niższa wartość może oznaczać zanieczyszczenie białkami lub fenolami.

### *Izolacja RNA z ASC*

RNA z ASC izolowano przy użyciu zestawu Universal RNA/miRNA Purification Kit zgodnie z protokołem załączonym przez producenta zestawu. W skrócie, metoda ta polega na homogenizacji komórek poprzez ich mieszanie przy użyciu pipety automatycznej w buforach dołączonych przez producenta. Następnie homogenat jest wirowany, a nadsącz oczyszczany na kolumnie poprzez krótkie wirowanie. Przesącz z kolumny jest mieszany z alkoholem etylowym o stężeniu 95-100% w celu precypitacji RNA i nakładany na kolumnę wiązającą RNA. RNA związane na kolumnie jest płukane przy użyciu buforów dołączonych przez producenta zestawu, a następnie wypłukiwane przy użyciu 50 µl ddH<sub>2</sub>O wolnej od RNAz. Ilość i jakość RNA oceniano przy użyciu urządzenia NanoDROP2000, jak opisano powyżej.

## 6.15. Odwrotna transkrypcja i PCR czasu rzeczywistego

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem zestawu Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, zgodnie z instrukcją producenta, na matrycy 500 ng RNA izolowanego z podskórnej tkanki tłuszczowej lub ASC. Jako starterów użyto mieszaniny losowych heksamerów. Do sterylnych próbek dodawano 500 ng RNA, po 1 µl starterów o stężeniu 100 µM, 1 µl mieszaniny dNTP o stężeniu 10 mM (po 2,5 mM każdy) i uzupełniano ddH<sub>2</sub>O do 15 µl. Wstępną denaturację przeprowadzono w 65°C przez 5 minut.

Następnie próbki inkubowano na lodzie przez 5 minut, krótko wirowano i dodawano 4  $\mu$ l buforu reakcyjnego 5x stężonego i 1  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy, dostarczone przez producenta zestawu. Mieszaninę inkubowano w 25°C przez 10 minut, w 50°C przez 30 minut i w 85°C przez 5 minut. Analizę ekspresji genów przeprowadzano metodą ilościową.

Przygotowano mieszaninę cDNA od wszystkich uczestników badania i wykonano z niej serię rozcieńczeń. Przy ich wykorzystaniu, dla każdego genu wyznaczono krzywą standardową, przypisując logarytm arbitralnej liczby kopii do wartości  $C_p$  odczytanej dla każdego badanego rozcieńczenia.

Reakcja PCR czasu rzeczywistego przeprowadzona została na matrycy 2,5 ng cDNA (1  $\mu$ l) od każdego pacjenta. Do cDNA dodawano 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O wolnej of RNAz, 3  $\mu$ l SYBR Green I, po 0,5  $\mu$ l każdego ze starterów o stężeniu 10 mM. Wstępną denaturację w 95°C przeprowadzano przez 5 minut, a następnie wykonywano 45 cykli z denaturacją w 95°C przez 12 sekund, przyłączaniem starterów (Tabela 5) w temperaturze jak w tabeli i wydłużaniem w 72°C przez 12 sekund.

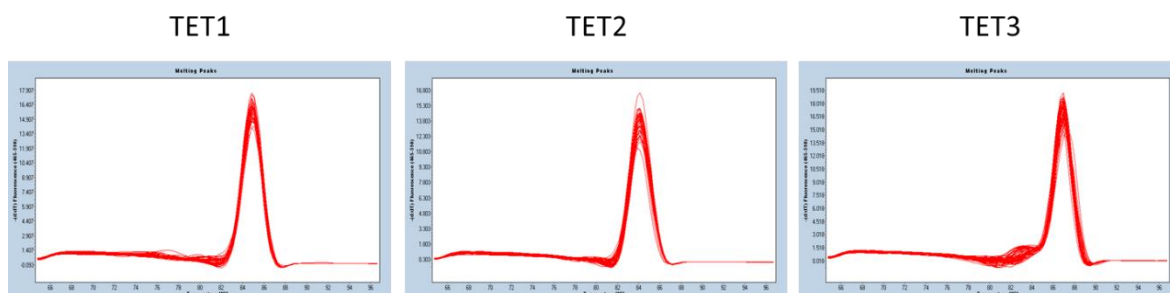
**Tabela 5.** Lista starterów użytych do reakcji PCR czasu rzeczywistego.

Gen	Starter sensowny	Starter antysensowny	Temp.
<b>TET1</b>	5'AAATGTTGCCCGAGAATGTC3'	5'TGTTGTGAATGTCCCTGTGG3'	60°C
<b>TET2</b>	5'AGCCAAGAAAGAAATCCAGGT3'	5'TTTTCCCCTCCTGCTCATT3'	60°C
<b>TET3</b>	5'CTGGAGCATGTACTTCAACG3'	5'ACGGCAGTCAATCGCTATTT3'	60°C
<b>GAPDH</b>	5'AATCCCATCACCATCTTCCA3'	5'TGGATCCCACGACGTACTCA3'	60°C
<b>TBP</b>	5'ACTCCACTGTATCCCTCCC3'	5'TATATTCGGCGTTTCGGGCA3'	60°C
<b>TMEM50A</b>	5'AGACCAGCACGGTCAACTAGA3'	5'TTCTGAAGAGGAAGAGACAACAAG3'	61°C
<b>RSRP1</b>	5'TTGACTTGCCAGCTAGTCTCAG3'	5'TTCTGTTACCTTTTCCGACAGTT3'	60°C

Jednocześnie z cDNA od pojedynczych pacjentów, analizowano 2,5 ng mieszaniny równych ilości cDNA od wszystkich pacjentów jako próbkę referencyjną, dzięki czemu możliwe było porównanie ekspresji pomiędzy doświadczeniami. Arbitralną liczbę kopii badanego genu liczono metodą bezwzględna w odniesieniu do krzywej standardowej oraz próbki referencyjnej. Dane literaturowe donoszą, że najlepszą metodą normalizacji jest średnia geometryczna z ekspresji kilku genów referencyjnych (Riedel i wsp., 2014), dlatego

ekspresję normalizowano do średniej geometrycznej liczby kopii dwóch genów referencyjnych *TBP* i *GAPDH*.

W celu sprawdzenia, czy w wyniku reakcji PCR powstał jeden produkt, przeprowadzono analizę krzywej topnienia. Analiza ta potwierdziła powstanie tego samego, pojedynczego produktu dla każdej badanej próbki (Rycina 6).



**Rycina 6.** Krzywe topnienia produktów powstałych podczas reakcji PCR czasu rzeczywistego dla genów TET.

## 6.16. Immunofluorescencja

ASC na szkiełkach nakrywkowych utrwalano w 4% PFA przez 12 minut, permeabilizowano w mieszaninie blokująco-permeabilizującej 1 przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałem I-rzędowym rozcieńczonym w mieszaninie blokująco-permeabilizującej 2. Do barwienia wykorzystano przeciwciała anty-TET1 w rozcieńczeniu 1:100, anty-TET2 w rozcieńczeniu 1:200, anty-TET3 w rozcieńczeniu 1:100 (Tabela 2). Następnie preparaty inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym rozcieńczonym w PBS odpowiednio: anty-króliczym IgG sprzężonym z Alexa-Fluor 633 w rozcieńczeniu 1:200, anty-kozimi IgG sprzężonym z Alexa-Fluor 488 w rozcieńczeniu 1:500, anty-króliczym IgG sprzężonym z Alexa-Fluor 633 w rozcieńczeniu 1:200 (Tabela 3) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342. Do zaklejenia preparatów użyto Immunofluorescence Mounting Medium. Analizę obrazów przeprowadzono w mikroskopie konfokalnym System LSM 780 z użyciem oprogramowania ZEN 2012.

## 6.17. Izolacja białka i immunobloty

### *Izolacja białka z podskórnej tkanki tłuszczowej*

Białko z tkanki tłuszczowej izolowano wg. protokołu Sajic i wsp. (Sajic i wsp., 2011), opartej na usuwaniu lipidów z homogenatów tkankowych przy użyciu rozpuszczalników organicznych. Około 0,5-1 ml tkanki tłuszczowej homogenizowano w homogenizatorze mechanicznym w 500  $\mu$ l buforu do izolacji białek z dodatkiem 1875  $\mu$ l mieszaniny chloroformu z metanolem zmieszanych w stosunku 1:2. Mieszanina umieszczana była w plastikowych, okrągłodennych probówkach o pojemności 11 ml. Homogenizację prowadzono przez 60 sekund. Homogenat inkubowano przez 15 minut na lodzie, mieszając go co kilka minut, a następnie dodawano 625  $\mu$ l chloroformu i 625  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Ekstrakty wirowano w 800 x g przez 5 minut w 4°C, a powstały po wirowaniu pierścień białkowy przenoszono do probówek Eppendorfa i ponownie wirowano w tych samych warunkach w celu usunięcia resztek rozpuszczalników. Otrzymany osad białkowy rozpuszczano w 100-300  $\mu$ l buforu zawierającego 0,1% SDS w 40 mM Tris z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz Complete stężonych 5x (roztwór roboczy skoncentrowany 25-krotnie rozcieńczano 5x). Próbkę wirowano w 16000 x g przez 15 minut w 4°C w celu usunięcia nierozpuszczalnej frakcji białek. Frakcję rozpuszczalnych białek w postaci nadsącza przenoszono do nowych probówek i mrożono w -80°C do dalszych analiz. Stężenie białka całkowitego mierzono metodą Bradforda przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu BCA, odnosząc wyniki do krzywej standardowej. Do pomiaru stężenia białka całkowitego próbki rozcieńczano 5-krotnie. Odczyt kolorymetryczny przeprowadzano w czytniku firmy Epoch. Stężenie białka wyznaczano przy użyciu programu dostarczonego przez producenta aparatury.

### *Izolacja białka z hodowli komórkowych*

Komórki płukano zimnym buforem PBS i mechanicznie odklejało od szalki przy użyciu skrobaczki. Komórki zawieszono w 1,5 ml PBS przenoszono do 2 ml probówki Eppendorfa i wirowano w 400 x g przez 10 minut w 4°C. Po zlaniu nadsącza, osad komórkowy zawieszano w zimnym buforze RIPA z dodatkiem 2x stężonego koktajlu inhibitorów proteaz Complete. Osad komórkowy homogenizowano poprzez pipetowanie oraz mieszanie na mieszadle laboratoryjnym. Następnie homogenat inkubowano przez 15 minut na lodzie, mieszając co 5 minut. Homogenat wirowano w 12000 x g przez 30 sekund



w 4°C, a pozyskany nadsącz zawierający frakcję rozpuszczalnych białek przenoszono do nowych probówek. Stężenie białka całkowitego mierzono przy pomocy zestawu BCA jak opisano powyżej.

### *Immunoblot*

Ekstrakty białkowe mieszano z 5x stężonym buforem redukującym Laemmliego i denaturowano w 100°C przez 5 minut w bloku grzewczym. Na gradientowy 4-15% żel poliakryloamidowy nakładano 20-30 µg ekstraktu białkowego. Elektroforezę prowadzono w aparaturze Mini Protean II w buforze TGS przy napięciu 70 V przez 20 minut, a następnie przy 110 V do całkowitego rozwinięcia próbek. Następnie przeprowadzano mokry transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową przy natężeniu prądu 30 mA przez noc w 4°C. Po transferze membranę blokowano w TBS-T z dodatkiem 3% odtłuszczonego mleka przez godzinę, a następnie inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym anti-TET1 w rozcieńczeniu 1:1000, anti-TET2 w rozcieńczeniu 1:500, anti-TET3 w rozcieńczeniu 1:500, anti-GAPDH w rozcieńczeniu 1:5000 (Tabela 2) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, płukano 3 x po 7 minut w PBS-T i inkubowano z odpowiednim przeciwciałem II-rzędowym: anty-króliczym IgG sprzężonym z HRP w rozcieńczeniu 1:10000 dla TET1, TET3 oraz GAPDH, anty-kozium IgG sprzężonym z HRP w rozcieńczeniu 1:10000 dla TET2 (Tabela 3), przez 40 minut. Po trzykrotnym płukaniu w TBS-T, membrany wywoływano przy użyciu odczynnika Clarity™ Western ECL. Detekcję sygnału przeprowadzono w urządzeniu GeneGnome. Analiza densytometryczna wykonana była w programie Image Studio Lite. Poziom białek TET normalizowano do poziomu białka referencyjnego GAPDH.

### **6.18. Analiza statystyczna**

Analiza normalności rozkładu przeprowadzona została przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Analiza korelacji przeprowadzona została przy użyciu testu korelacji Spearmana dla danych o rozkładzie skośnym. Porównanie poziomu analizowanych parametrów pomiędzy grupami przeprowadzone zostało przy pomocy testu *t*-Studenta dla danych o rozkładzie normalnym lub testu Manna-Whitneya dla danych o rozkładzie skośnym. Analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5. Analizę rozkładu reszt oraz wieloczynnikową analizę regresji przeprowadzono przy użyciu biblioteki R commander dla środowiska R.

Informacje dotyczące analizy statystycznej danych z sekwencjonowania pod kątem dystrybucji 5hmC umieszczono w poszczególnych podrozdziałach.

## V. Wyniki

### 7. Podskórna tkanka tłuszczowa

#### 7.1. Globalny poziom modyfikacji DNA

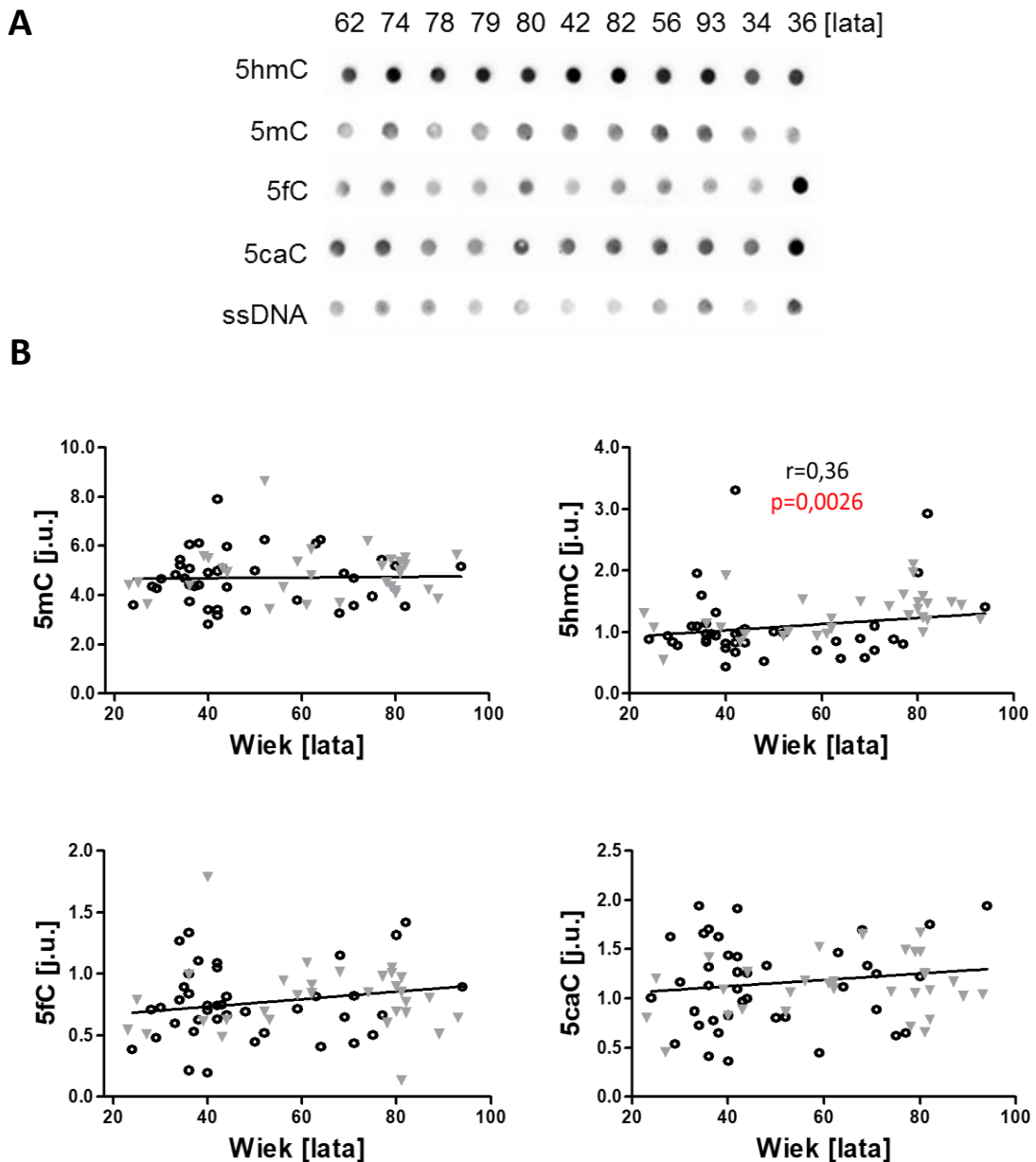
W celu sprawdzenia, czy globalny poziom epigenetycznych modyfikacji DNA związanych z katalityczną aktywnością enzymów TET podlega zmianom w procesie starzenia, przeprowadziłam analizę poziomu 5mC, 5hmC, 5fC oraz 5caC w DNA izolowanym z podskórnej tkanki tłuszczowej osób w różnym wieku. Z przyczyn technicznych (ograniczona ilość materiału pobieranego przy okazji operacji planowych i duża liczba przeprowadzanych analiz) liczebność i zakres wiekowy w grupach dla poszczególnych analiz może się różnić. Dokładne dane podano w tekście oraz pod rycinami odnoszącymi się do konkretnych wyników.

Na Rycinie 7A przedstawiono reprezentatywne immunobloty na obecność 5mC i jej pochodnych. Zaobserwowałam istotny, związany z wiekiem wzrost globalnego poziomu hydroksymetylacji DNA ( $r=0,36$ ;  $p=0,026$ ). Analiza nie wykazała natomiast związanych z wiekiem, istotnych zmian w poziomie 5mC, 5fC i 5caC w grupie badanej (Rycina 7B).

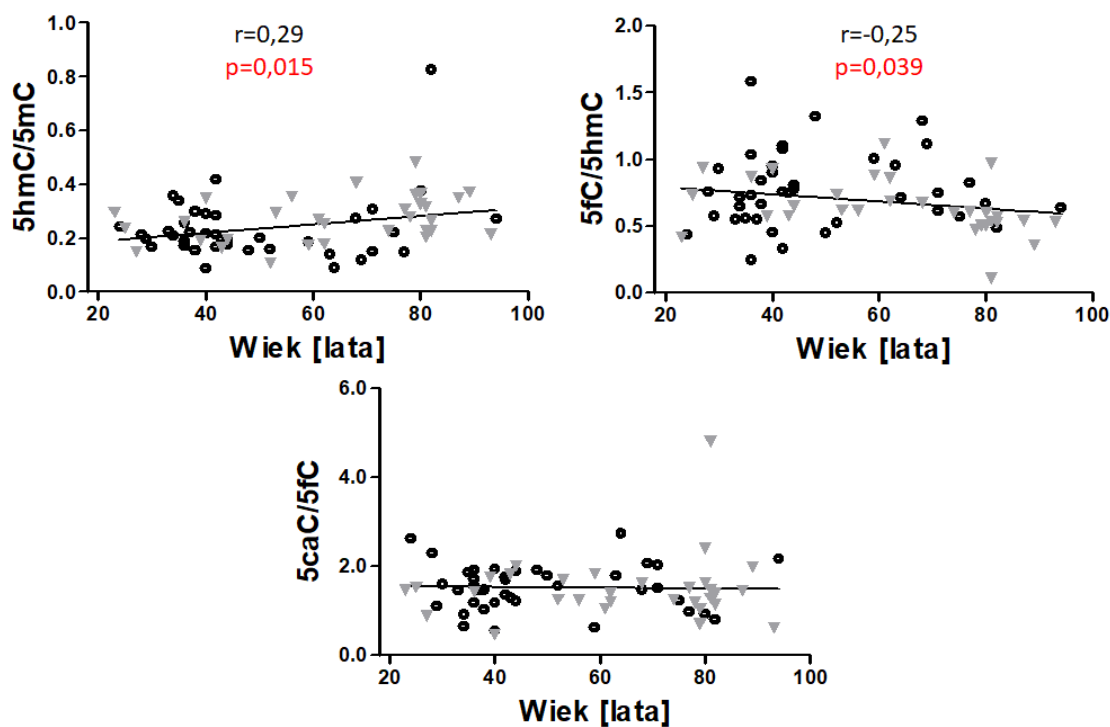
Zaobserwowałam również, że wraz z wiekiem w DNA podskórnej tkanki tłuszczowej dochodzi do znamienego wzrostu stosunku 5hmC do 5mC ( $r=0,29$ ;  $p=0,015$ ) i spadku stosunku 5fC do 5hmC ( $r=-0,25$ ;  $p=0,039$ ), aczkolwiek poziom tych korelacji był niski (Rycina 8).

Ponieważ grupa badana charakteryzowała się szerokim zakresem BMI (Rycina 9A), o rozkładzie odzwierciedlającym ten charakterystyczny dla populacji, w którym masa ciała rośnie wraz z wiekiem do 60-70 roku życia, po czym zaczyna spadać (Puzianowska-Kuźnicka i wsp., 2016), a funkcja i morfologia tkanki tłuszczowej jest różna u osób o różnej masie ciała, przeprowadziłam analizę korelacji pomiędzy BMI a globalnym poziomem badanych modyfikacji DNA. Analiza wykazała spadek globalnego poziomu 5hmC wraz ze wrastającym BMI ( $r=-0,4$ ,  $p=0,0028$ ) (Rycina 9B). Nie zaobserwowałam korelacji pomiędzy innymi modyfikacjami a BMI w mojej grupie badanej.

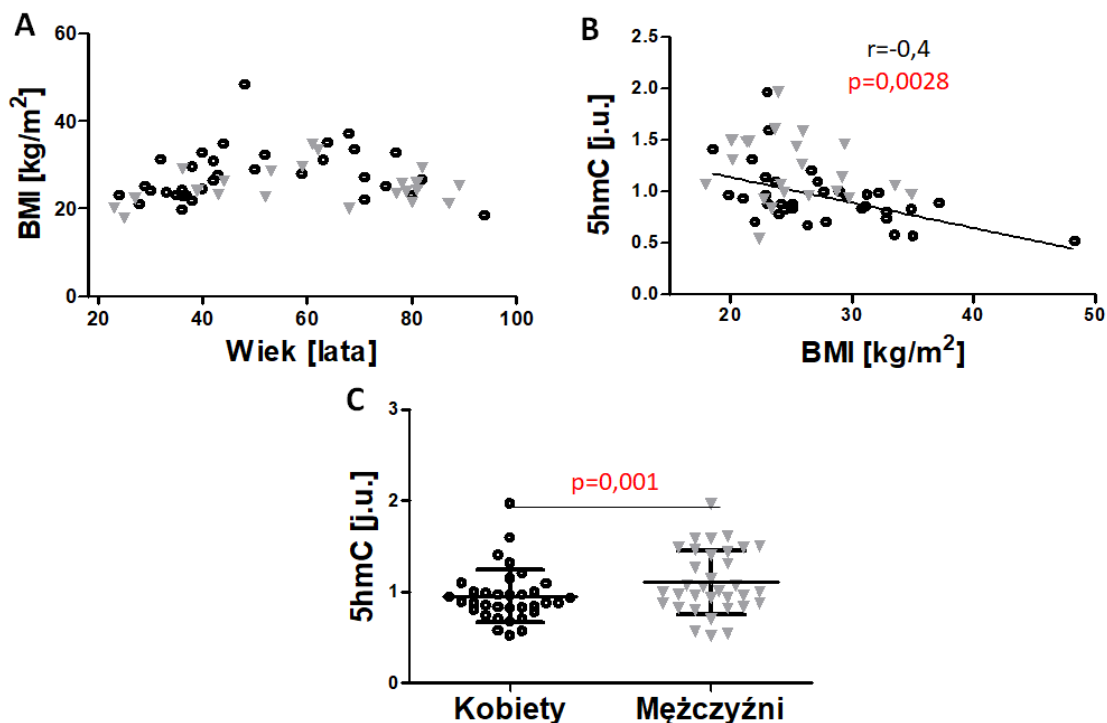
Wykazałam również, że globalny poziom 5hmC jest niższy w podskórnej tkance tłuszczowej kobiet w porównaniu do mężczyzn ( $p=0,001$ ) (Rycina 9C). Nie było związanych z płcią różnic w przypadku pozostałych modyfikacji DNA.



**Rycina 7.** Analiza globalnego poziomu modyfikacji epigenetycznych DNA. A) Reprezentatywny dot-blot na obecność 5hmC, 5mC, 5fC i 5caC w DNA izolowanym z podskórnej tkanki tłuszczowej. B) Związane z wiekiem zmiany w poziomie modyfikacji DNA w podskórnej tkance tłuszczowej osób w różnym wieku ( $n=67$ , 18-96 lat). Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu testu korelacji Spearmana. Czarne koło: kobiety, szary trójkąt: mężczyźni. j.u.: jednostki umowne.



**Rycina. 8.** Stosunek globalnych ilości modyfikacji DNA w podskórnej tkance tłuszczowej osób w różnym wieku ( $n=67$ , wiek 18-96 lat). Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu testu korelacji Spearmana. Czarne koło: kobiety, szary trójkąt: mężczyźni. j.u.: jednostki umowne.



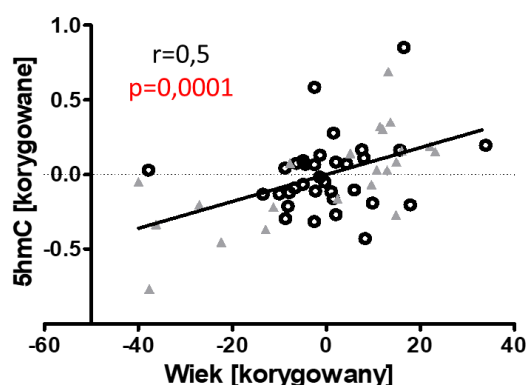
**Rycina 9.** Rozkład płci oraz BMI w grupie badanej. A) Rozkład BMI w stosunku do wieku. B) Korelacja pomiędzy BMI a poziomem 5hmC. Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu testu korelacji Spearmana. C) Poziom 5hmC u kobiet i mężczyzn. Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu testu t-studenta. j.u.: jednostki umowne.

Mając powyższe na uwadze, przeprowadziłam wieloczynnikową analizę regresji zależności poziomu 5hmC od wieku, uwzględniając dodatkowo czynniki takie jak płeć, BMI oraz miejsce pobrania tkanki podskórnej. Analiza wykazała, że poziom 5hmC wzrasta z wiekiem niezależnie od płci, regionu pobrania oraz BMI. Podsumowanie analizy regresji z użyciem różnych modeli przedstawiono w Tabeli 6.

**Tabela 6.** Analiza regresji dla modeli uwzględniających poszczególne czynniki potencjalnie wpływające na poziom 5hmC. Dla każdego modelu przedstawiono wyraz wolny B, współczynnik  $R^2$  będący miarą dopasowania modelu,  $\beta$  – poziom istotności modelu oraz współczynniki regresji i poziom istotności dla poszczególnych analizowanych czynników.

	Wiek i płeć		Wiek i region		Wiek i BMI		Wiek, BMI i płeć	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>Nachylenie (B)</b>	0,6459	***	0,6727	***	1,4643	***	1,4463	***
<b>R<sup>2</sup></b>	0,27		0,18		0,38		0,44	
<b>Wiek</b>	0,0061	**	0,0067	*	0,0082	***	<b>0,0071</b>	***
<b>Płeć</b>	0,21	*	-	-	-	-	0,1371	§
<b>Region pobrania</b>	-	-	0,0517	-	-	-	-	-
<b>BMI</b>	-	-	-	-	-0,0319	***	-0,0259	***

\*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05, § oznacza p na granicy istotności

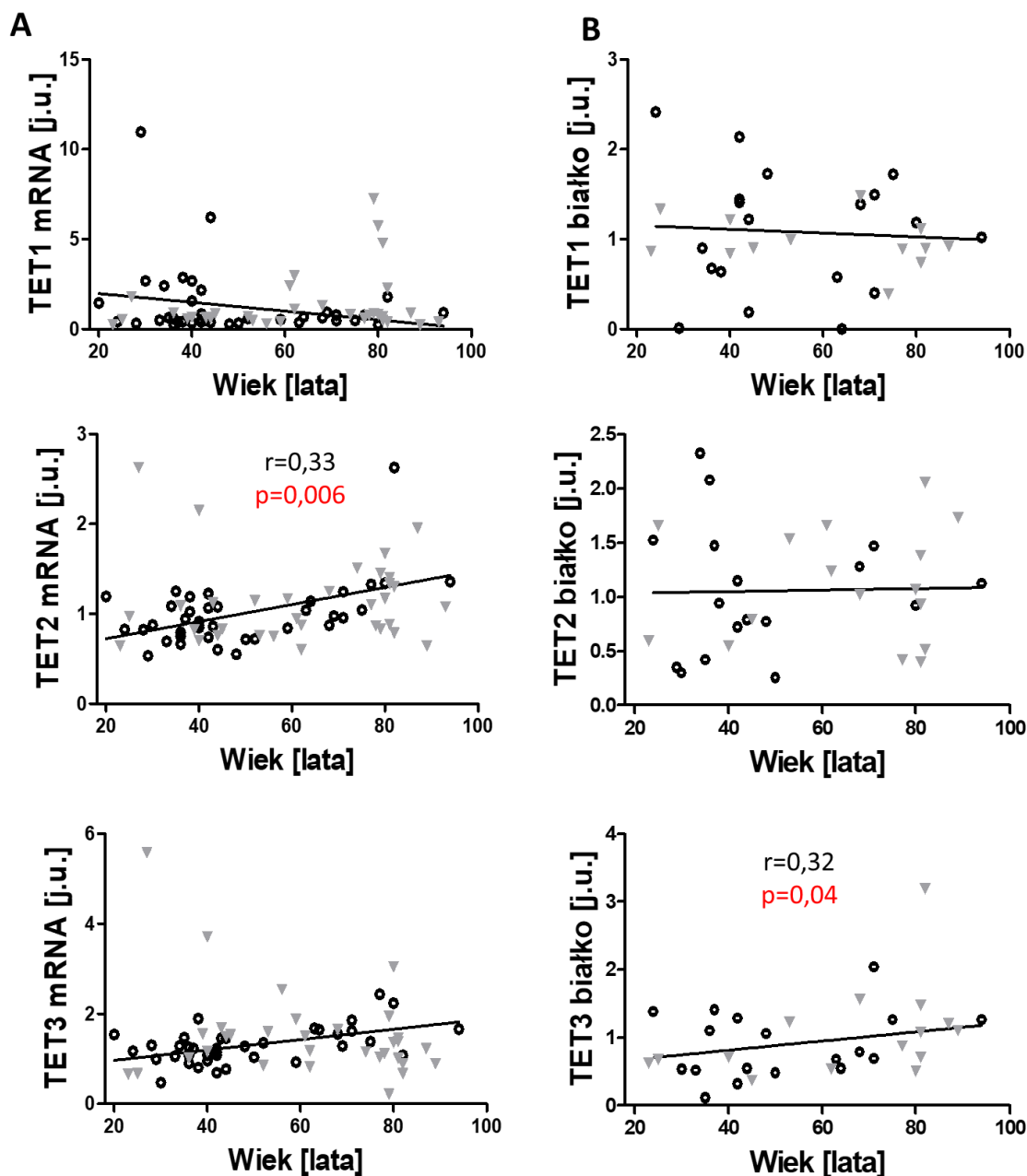


**Rycina 10.** Korelacja pomiędzy 5hmC a wiekiem po korekcie danych o płeć i BMI. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu korelacji Pearsona. Czarne koło: kobiety, szary trójkąt: mężczyźni.

Przeprowadziłam również analizę korelacji pomiędzy 5hmC oraz wiekiem skorygowanym o płeć i BMI. W tym celu pozyskałam reszty dla modelu regresji uwzględniającego wszystkie badane parametry i przeprowadziłam analizę korelacji

Pearsona danych skorygowanych. Analiza wykazała korelację na poziomie  $r=0,5$  i  $p=0,0001$  (Rycina 10). Nie było zależności pomiędzy poziomem innych badanych modyfikacji a wiekiem i BMI w tej analizie.

## 7.2. Ekspresja enzymów TET



**Rycina 11.** Związane z wiekiem zmiany w ekspresji TET1-3 w podskórnej tkance tłuszczowej osób w różnym wieku. A) Zmiany poziomu mRNA ( $n=71$ , 20-96 lat). Poziom mRNA TET normalizowano do średniej geometrycznej liczby kopii mRNA genów referencyjnych GAPDH i TBP. B) Zmiany poziomu białek TET ( $n=40$ , 20-96 lat). Poziom białka badano metodą immunoblotu. Poziom TET normalizowano do poziomu białka referencyjnego GAPDH. Czarne koło: kobiety, szary trójkąt: mężczyźni. j.u.: jednostki umowne.

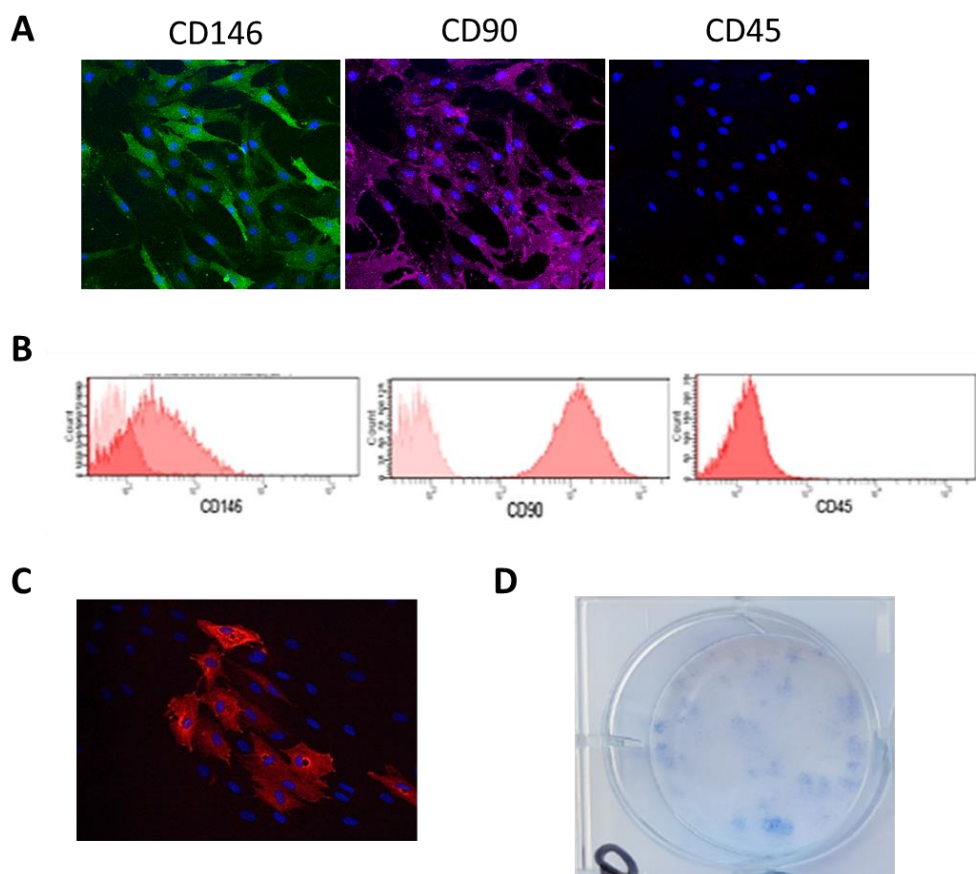
Przeprowadziłam analizę ekspresji wszystkich TET na poziomie mRNA oraz białka (Rycina 11). Zarówno poziom mRNA jak i białka nie różnił istotnie się między płciami. Poziom TET nie korelował też z BMI. W przypadku TET1 nie zaobserwowałam związanych z wiekiem zmian w ekspresji. Zaobserwowałam natomiast, że poziom mRNA TET2 rośnie wraz z wiekiem ( $r=0,33$ ,  $p=0,006$ ) bez jednoczesnego wzrostu ilości białka kodowanego przez gen *TET2*. W przypadku TET3 nie zaobserwowałam zmian w poziomie mRNA, ale uwidocznił się wzrost poziomu białka ( $r=0,32$ ,  $p=0,04$ ). Nie było korelacji pomiędzy poziomem mRNA i białka w przypadku żadnego z badanych TET.

W celu sprawdzenia, czy zaobserwowane przeze mnie zmiany w globalnym poziomie hydroksymetylacji DNA są następstwem zmian w ekspresji enzymów TET, przeprowadziłam analizę korelacji poziomu białek TET z globalnym poziomem 5hmC w tkance tłuszczowej. Nie zaobserwowałam takich korelacji.

## **8. Komórki macierzyste podskórnej tkanki tłuszczowej**

### **8.1. Identyfikacja ASC**

Pozyskane przez mnie pierwotne hodowle komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej wykazywały ekspresję markerów powierzchniowych CD90 i CD146. Nie zaobserwowałam natomiast ekspresji markera komórek hematopoetycznych. Tego typu układ odpowiada fenotypowi komórek macierzystych pochodzenia mezenchymalnego (Rycina 12A i B). Dodatkowo, komórki posiadały zdolność do różnicowania w adipocyty (Rycina 12C) oraz potencjał do samoodnowy (Rycina 12D).

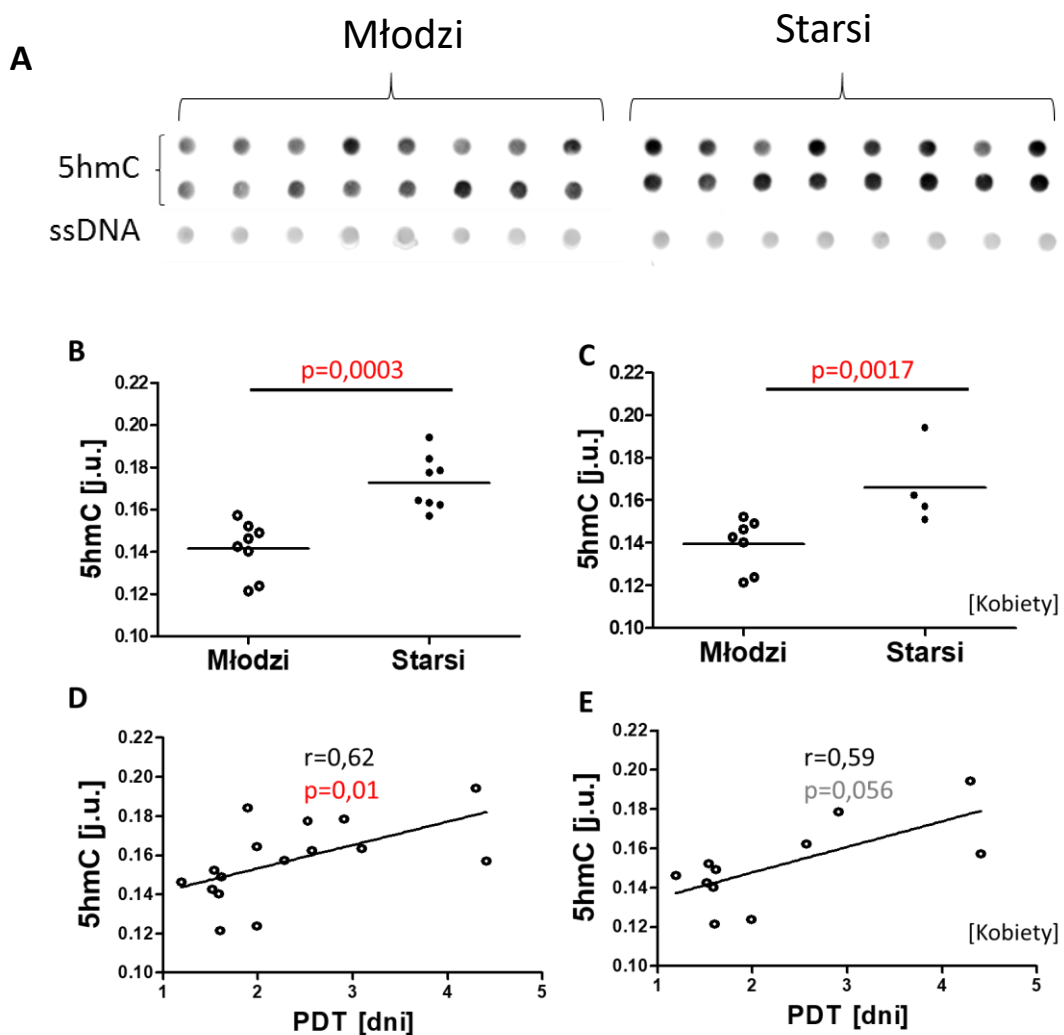


**Rycina 12.** Identyfikacja komórek macierzystych tkanki tłuszczowej na podstawie wzorca ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych. A) Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego: zielony: CD146, różowy: CD90, niebieski: Hoechst 33342 (jądra komórkowe). Brak barwienia na CD45. B) Histogramy przedstawiające rozkład ekspresji badanych markerów (histogram ciemniejszy) w porównaniu do niebarwionej kontroli (histogram jaśniejszy). C) Barwienie komórek ASC po 21 dniach indukcji adipogenezy na obecność markera adipocytów FABP4 (czerwony). D) Test tworzenia kolonii.

## 8.2. Globalny poziom 5hmC w komórkach ASC

Przeprowadziłam analizę globalnego poziomu 5hmC w DNA izolowanym z pierwotnych hodowli ASC wyizolowanych od 8 osób młodych (25-34 lat) i 8 osób starszych (71-94 lata). Rycina 13A przedstawia reprezentatywny immunoblot. Zaobserwowałam, że poziom tej modyfikacji jest istotnie wyższy w DNA komórek od osób starszych ( $p=0,0003$ ) (Rycina 13B). Moja grupa badana składała się zarówno z kobiet jak i z mężczyzn, przy czym w grupie młodych był tylko jeden mężczyzna. Z tego powodu przeprowadziłam dodatkową analizę poziomu 5hmC jedynie dla kobiet. Analiza statystyczna wykazała, że poziom 5hmC był wyższy u starszych kobiet w porównaniu do tego u kobiet młodych ( $p=0,0017$ ) (Rycina 13C).





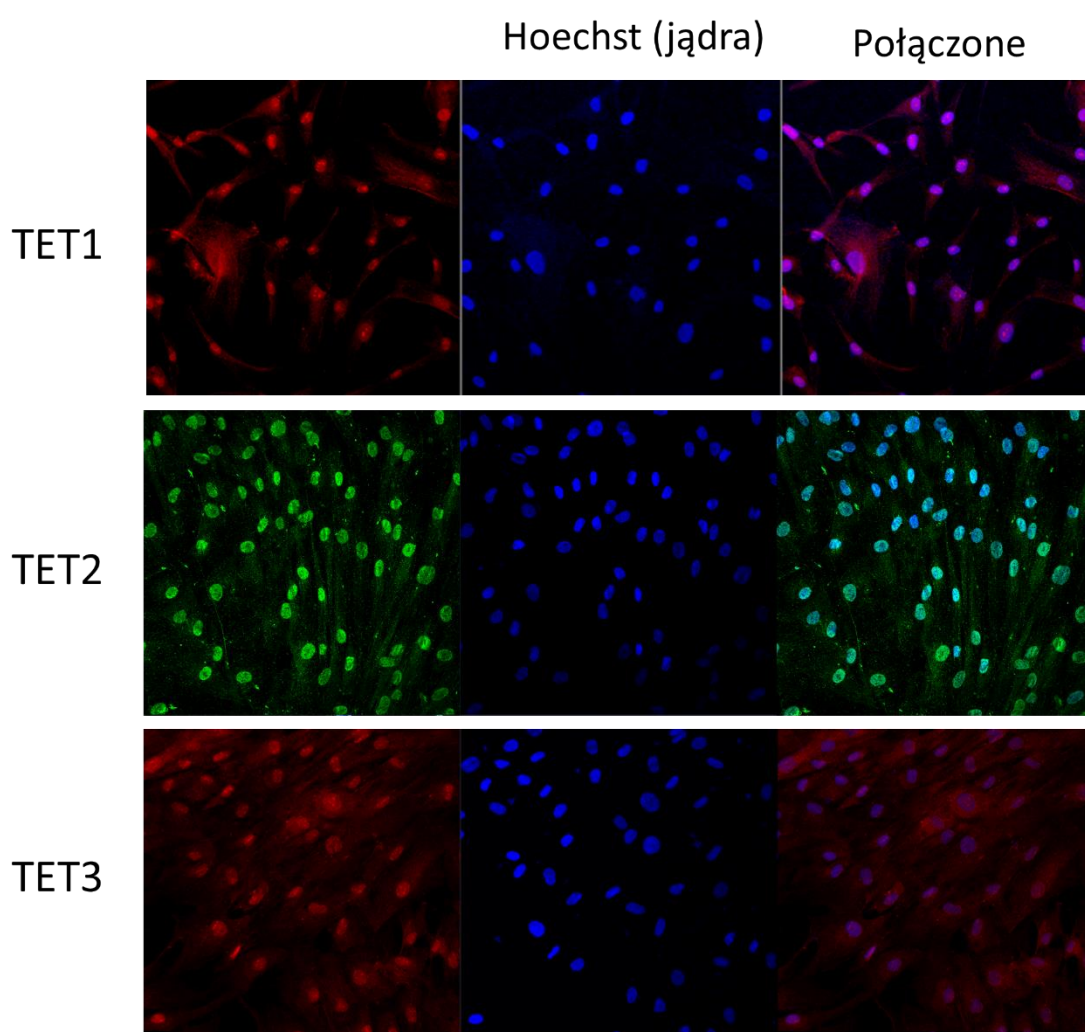
**Rycina 13.** Globalny poziom 5hmC w DNA ASC osób młodych i starszych. A) Reprezentatywny immunoblot. B) Poziom 5hmC w DNA izolowanym z ASC osób młodych ( $n=8$ , 25-34 lat) oraz starszych ( $n=8$ , 71-94 lata). C) Poziom 5hmC w DNA izolowanym z ASC od kobiet młodych ( $n=7$ , 27-34 lat) oraz starszych ( $n=4$ , 71-80 lat). D) Korelacja pomiędzy poziomem 5hmC w ASC a czasem podwojenia populacji. E) Korelacja pomiędzy poziomem 5hmC w ASC kobiet a czasem podwojenia populacji. Porównanie poziomu 5hmC pomiędzy grupami wiekowymi przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta. Analizę korelacji 5hmC z czasem podwojenia populacji przeprowadzono przy użyciu testu korelacji Spearmana. PDT: czas podwojenia populacji.

5-hydroksymetylacja podlega biernemu usuwaniu z genomu w następstwie replikacji DNA, ponieważ nie jest ona przepisywana na nić potomną po podziale komórki. Modyfikacji tej może więc być więcej w komórkach wolniej proliferujących w porównaniu z komórkami proliferującymi szybciej (Kagiwada i wsp., 2013). Z tego powodu, w celu scharakteryzowania tempa proliferacji, dla badanych hodowli pierwotnych wyznaczyłam czas podwojenia populacji. Przeprowadziłam analizę korelacji pomiędzy tempem proliferacji komórek a globalnym poziomem 5hmC. Analiza wykazała, że globalny

poziom 5hmC wzrasta wraz z malejącym tempem podziałów komórkowych ( $r=0,62$ ,  $p=0,01$ ) (Rycina 13D). Przeprowadziłam również dodatkową analizę uwzględniając jedynie kobiety. W tym wypadku korelacja pomiędzy poziomem 5hmC a tempem proliferacji była na granicy istotności ( $r=0,59$ ,  $p=0,056$ ) (Rycina 13E).

### 8.3. Lokalizacja subkomórkowa białek TET w ASC

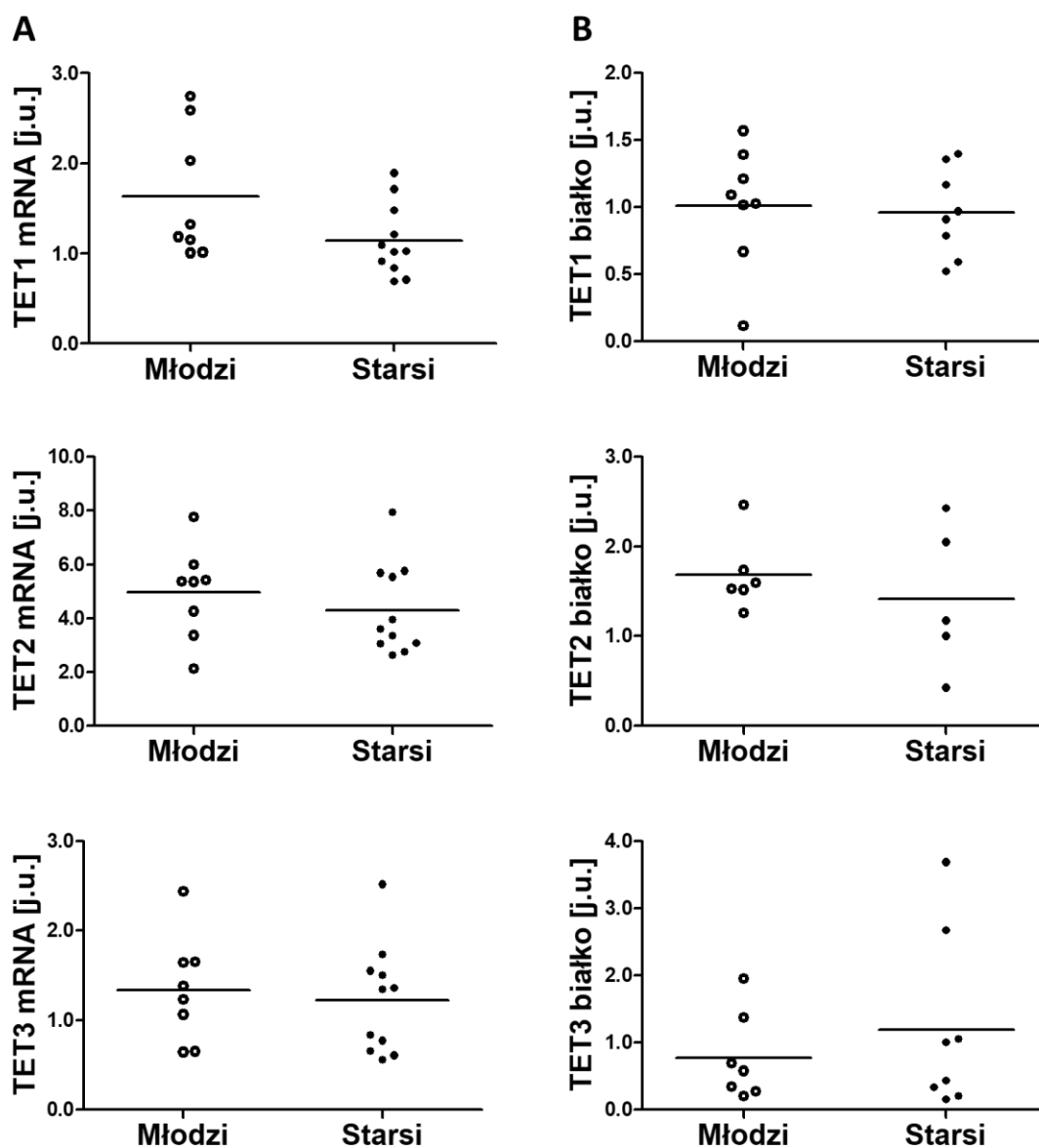
Wykonałam barwienie immunohistochemiczne utrwalonych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w celu sprawdzenia lokalizacji badanych białek. Barwienie wykazało, że białka TET lokalizują się głównie w jądrze komórkowym, co jest zgodne z ich funkcją (Rycina 14).



**Rycina 14.** Barwienia immunofluorescencyjne przedstawiające lokalizację białek TET w komórkach ASC. TET1: czerwony, TET2: zielony, TET3: czerwony.

Zaobserwowałam również słaby sygnał mogący świadczyć o lokalizacji cytoplazmatycznej. Dane literaturowe sugerują, że enzymy TET mogą wykazywać lokalizację cytoplazmatyczną w wyniku ich translokacji przez białko Aid (Arioka i wsp., 2012). W przypadku TET3 wykazano, że translokacja tego białka z jądra do cytoplazmy może nastąpić w wyniku jego modyfikacji potranslacyjnej przez OGT (Zhang i wsp., 2014).

#### 8.4. Związane z wiekiem zmiany w ekspresji TET w ASC



**Rycina 15.** Analiza ekspresji TET. A) Poziom mRNA genów TET w ASC osób młodych ( $n=8$ , 25-34 lata) oraz starszych ( $n=10$ , 77-89 lat). B) Poziom białka TET w ASC osób młodych ( $n=8$ , wiek 25-34 lata) oraz starszych ( $n=8$ , wiek 81-89 lat). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta. j.u.: jednostki umowne.

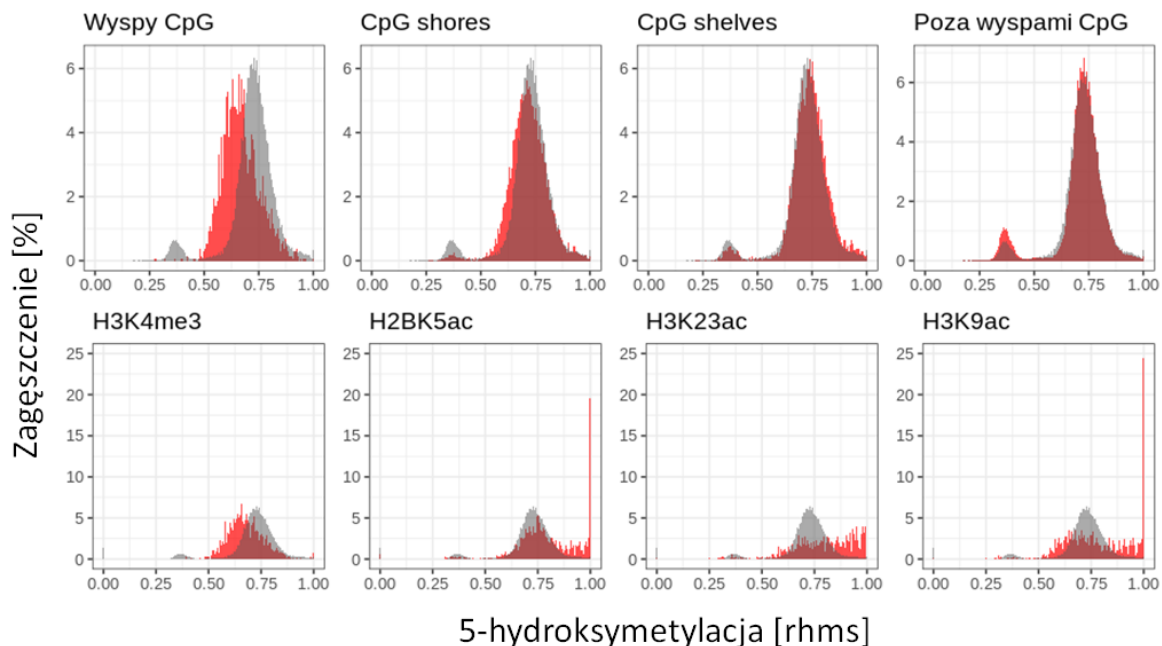
Przeprowadziłam analizę ekspresji TET1, TET2 oraz TET3 w ASC izolowanych z tkanki tłuszczowej osób młodych i starszych na poziomie mRNA (młodzi n=8, 27-35 lat; starsi n=10, 77-89 lat) oraz białka (młodzi n=8, 25-34 lata; starsi n=8, 81-89 lat). Z przyczyn technicznych analiza poziomu białka TET2 i TET3 nie została wykonana dla wszystkich pacjentów (zbyt mało białka na wszystkie analizy). Nie zaobserwowałam związanych z wiekiem różnic w ekspresji żadnego TET (Rycina 15). Poziom mRNA badanych genów nie korelował z poziomem kodowanych przez nie białek.

## **8.5. Dystrybucja 5hmC w genomie ASC**

*Elementy struktury genów, regiony regulatorowe, miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych*

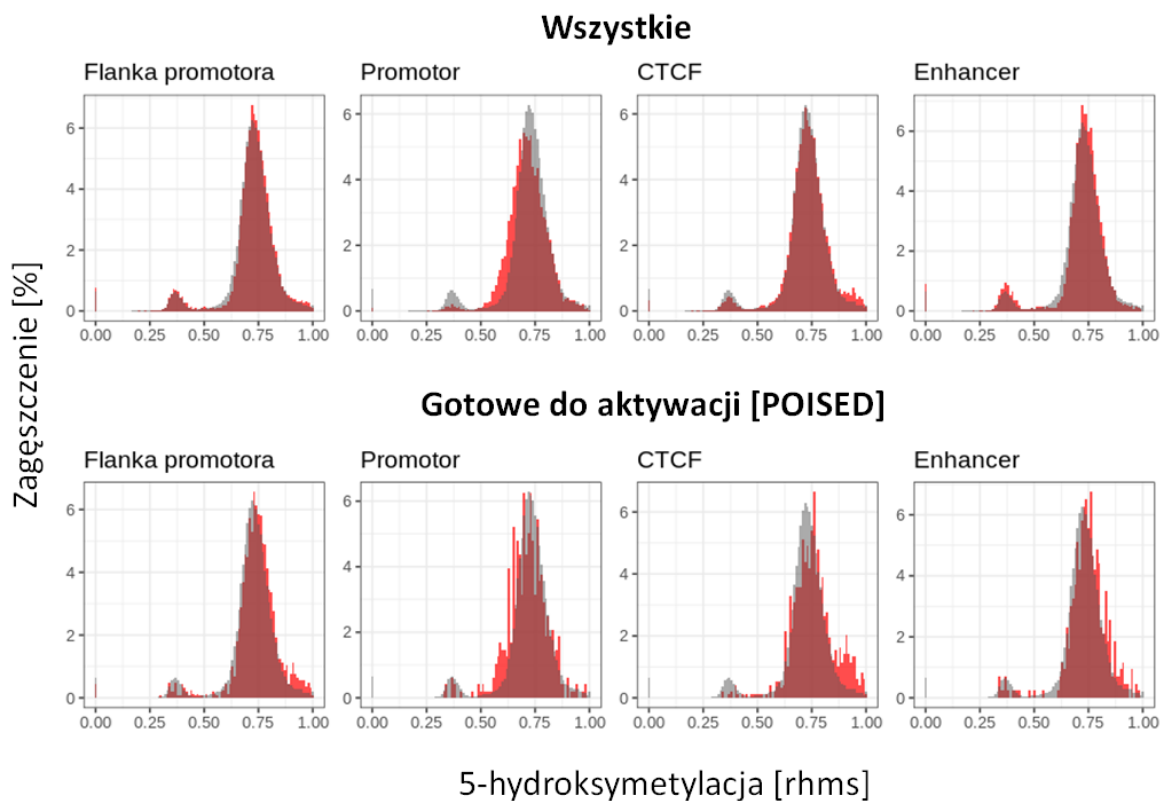
5-hydroksymetylacja DNA jest stosunkowo niedawno odkrytą modyfikacją epigenetyczną i jej rola w regulacji funkcji ASC nie jest jeszcze dobrze poznana. Analiza jej dystrybucji w obrębie genów, elementów regulatorowych, modyfikacji białek histonowych oraz wysp CpG może dostarczyć istotnych informacji na temat jej biologicznej roli. Te wyjściowe dane mogą być pomocne w przewidzeniu potencjalnych następstw zmian w poziomie i dystrybucji tej modyfikacji, w tym również zmian związanych ze starzeniem. Z tego powodu analizę dystrybucji 5hmC w genomie ASC wykonałam jedynie na danych pozyskanych od zdrowych, młodych pacjentów, z teoretycznie optymalnym genomowym układem 5hmC.

Analiza względnego, normalizowanego do zawartości motywu CpG poziomu hydroksymetylacji w obrębie poszczególnych struktur genomu wykazała, że wyspy CpG oraz regiony oddalone do 2 kbp od wysp (CpG shores) mają istotnie niższy poziom 5hmC w porównaniu do średniego poziomu tej modyfikacji we wszystkich analizowanych regionach. Poziom 5hmC był istotnie niższy w regionach powiązanych z H3K4me3, a istotnie wyższy w regionach powiązanych z H2BK5ac, H3K23ac, H3K9ac (Rycina 16).



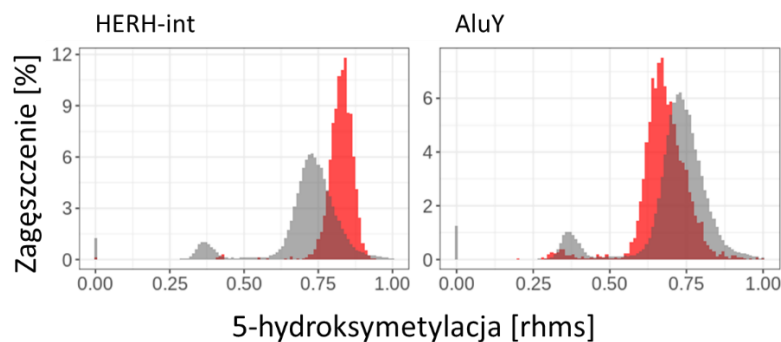
**Rycina 16.** Względny poziom 5hmC w obrębie wybranych elementów genomu (czerwony) w porównaniu do średniej względnej hydroksymetylacji w obrębie wszystkich analizowanych regionów (szary). rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

Analiza poziomu 5hmC w elementach regulatorowych wykazała, że poziom ten jest istotnie niższy w obrębie promotorów oraz istotnie wyższy w regionach wiązania CTCF w porównaniu do średniego poziomu tej modyfikacji we wszystkich analizowanych regionach. Ponadto, analiza poziomu 5hmC w elementach regulatorowych w zależności od ich aktywności wykazała, że poziom 5hmC jest istotnie wyższy w regionach wiązania CTCF oraz regionach wzmacniających gotowych do aktywacji (Rycina 17).



**Rycina 17.** Względny poziom 5hmC w obrębie wybranych elementów genomu (czerwony) w porównaniu do średniej względnej hydroksymetylacji w obrębie wszystkich analizowanych regionów (szary). rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

Metylacja DNA pełni istotną rolę w wyciszaniu elementów powtórzonych. W celu zweryfikowania potencjalnego udziału 5hmC w regulacji tych elementów przeprowadziłam analizę jej poziomu w obrębie elementów powtórzonych pobranych z bazy RepeatMasker. Względny poziom 5hmC w regionach HERVH-int był wyższy niż w innych elementach powtórzonych. Poziom 5hmC był natomiast niższy w obrębie elementów powtórzonych AluY w porównaniu do reszty analizowanych regionów powtórzonych (Rycina 18).

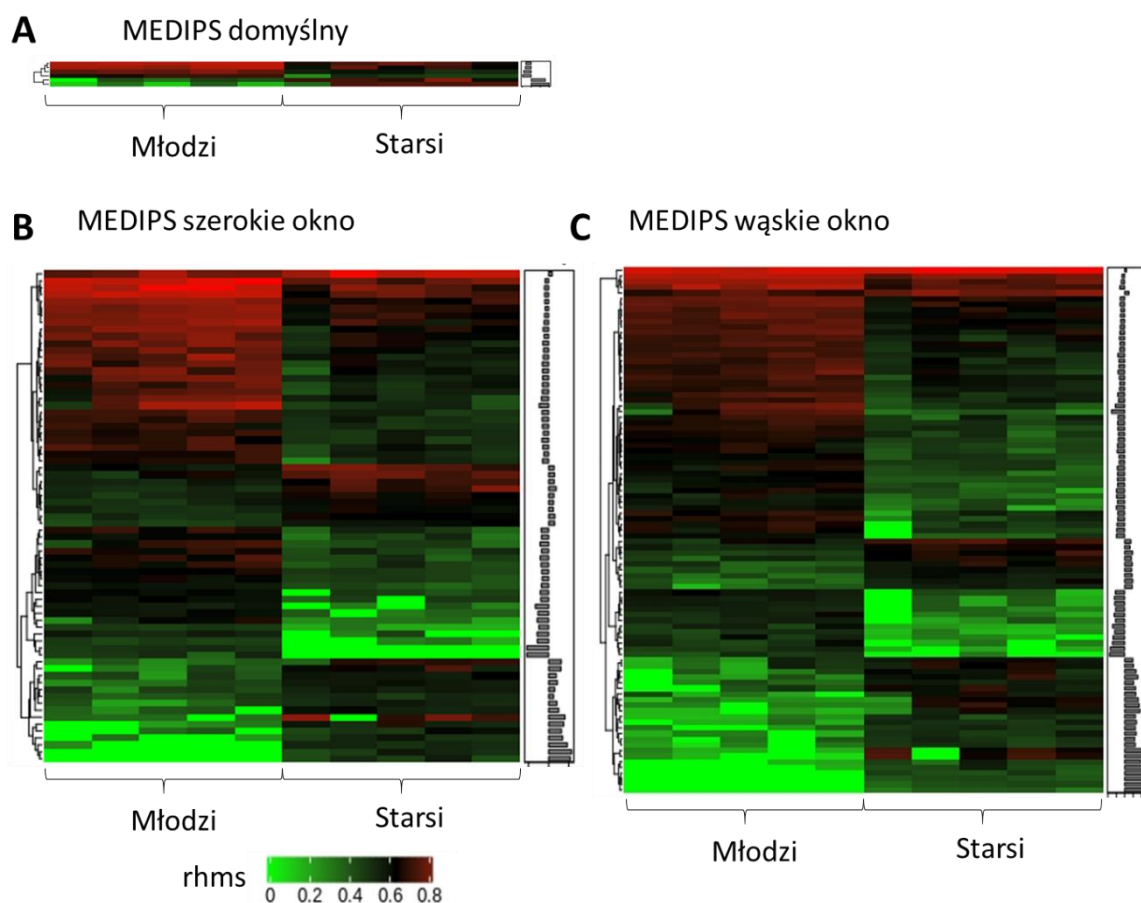


**Rycina 18.** Względny poziom 5hmC w obrębie elementów powtórzonych AluY (czerwony) oraz HERVH-int (czerwony) w porównaniu do średniej względnej hydroksymetylacji w obrębie wszystkich analizowanych regionów powtórzonych (szary). rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

## **8.6. Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem w ASC**

Dane pozyskane z sekwencjonowania DNA ASC pod kątem 5hmC poddałam analizie różnicowej w celu wytypowania regionów różnicowo hydroksymetylowanych z wiekiem.

Analiza przeprowadzona przy użyciu pakietu MEDIPS dla parametrów domyślnych zidentyfikowała jedynie 6 DHMR, w tym 4 z niższym i 2 wyższym poziomem hydroksymetylacji w komórkach od osób starszych (Rycina 19A). Ze względu na bardzo małą liczbę zidentyfikowanych DHMR przy ustawieniach domyślnych, zdecydowałam się na przeprowadzenie dodatkowych analiz, optymalizując parametry pod kątem analizowanych przeze mnie danych. Głównymi zmianami było zmniejszenie minimalnej dopuszczalnej liczby odczytów z 10 do 5 oraz zmiana rodzaju korekty pod kątem porównań wielokrotnych z Bonfferoniego na FDR. Analizy te przeprowadziłam dla dwóch skrajnych wielkości analizowanego okna genomowego: 450 pz odpowiadającego średniej długości fragmentów DNA poddanych immunoprecypitacji poprzedzającej sekwencjonowanie oraz wąskiego 50 pz, odpowiedniego do analizy zmian w obrębie wąskich regionów genomu takich jak ekson-intron, regiony wiązania czynników transkrypcyjnych, itp. Analiza przeprowadzona przy użyciu pakietu MEDIPS dla szerokiego okna 450 pz zidentyfikowała 71 DHMR, w tym 46 z niższą i 25 z wyższą hydroksymetylacją w komórkach od starszych uczestników badania (Rycina 19B). Analiza dla okna wąskiego zidentyfikowała natomiast 93 DHMR, 58 z niższą i 35 z wyższą hydroksymetylacją w komórkach od starszych uczestników badania (Rycina 19C).

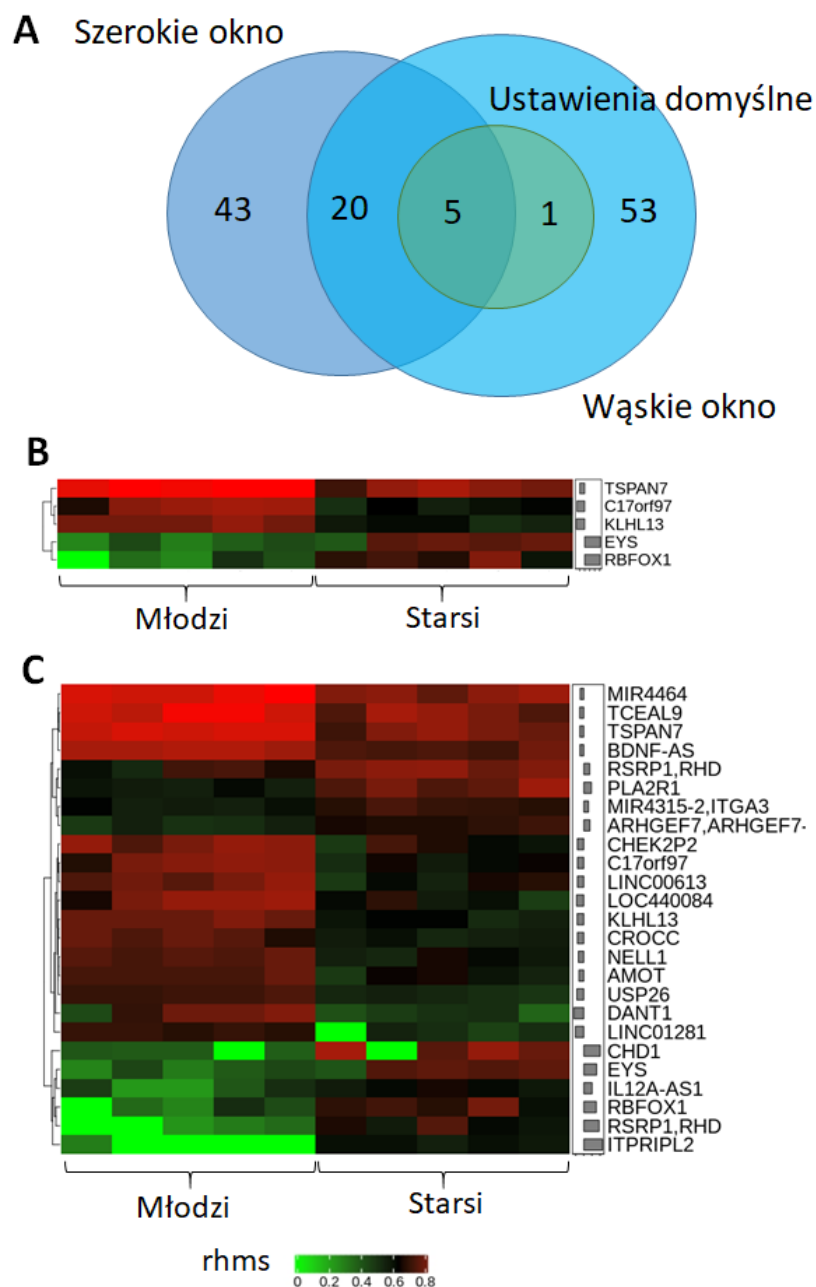


**Rycina 19.** Związane z wiekiem DHMR zidentyfikowane w ASC przy użyciu pakietu MEDIPS. A) Heatmapa obrazująca poziom 5hmC w DHMR zidentyfikowanych z użyciem parametrów domyślnych. B) Heatmapa obrazująca poziom 5hmC w DHMR zidentyfikowanych z użyciem parametrów zoptymalizowanych dla szerokiego okna 450 pz. C) Heatmapa obrazująca poziom 5hmC w DHMR zidentyfikowanych z użyciem parametrów zoptymalizowanych dla wąskiego okna 50 pz. rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

28 regionów z analizy dla okna szerokiego pokrywało się z 36 regionami z analizy dla okna wąskiego, dając w sumie 25 wspólnych połączonych regionów. Regiony łączono w przypadku, gdy wiele regionów z analizy dla wąskiego okna pokrywało się z jednym regionem dla okna szerokiego (Rycina 20A i C).

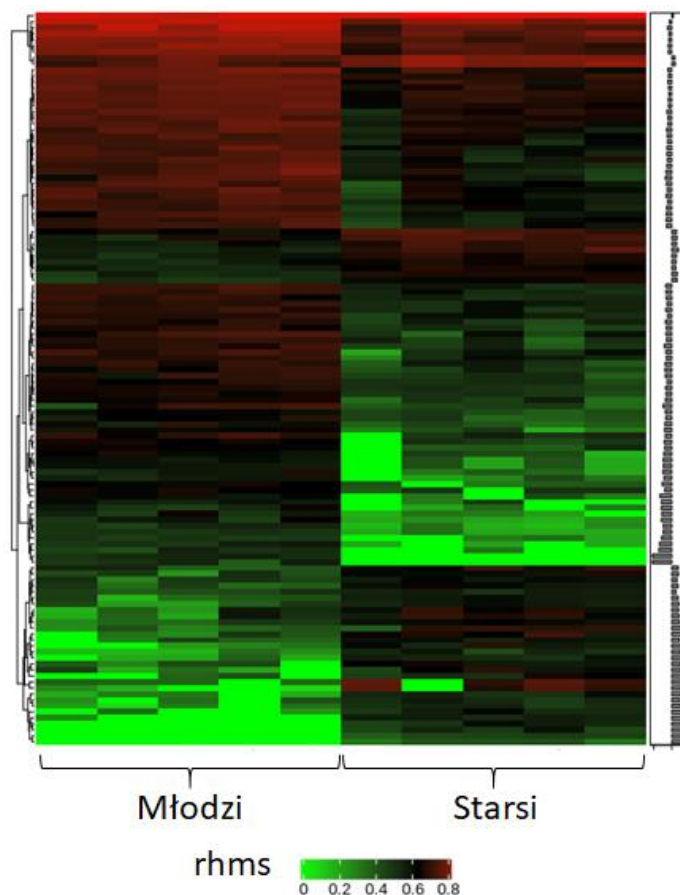
Pięć regionów było wspólnych dla wszystkich wariantów analizy. Były to regiony powiązane z genami *TSPAN7* (Tetraspanin 7), *C17orf97* (LIAT1), *KLHL13* (Kelch Like Family Member 13), *EYS* (Eyes Shut Homolog) oraz *RBFOX1* (RNA Binding Fox-1 Homolog 1) (Rycina 20A i B).





**Rycina 20.** Związane z wiekiem DHMR w ASC wspólne dla analiz przy użyciu różnych parametrów. A) Diagram Venn'a przedstawiający liczbę wspólnych regionów dla wszystkich analiz. B) Heatmapa obrazująca poziom 5mC w DHMR wspólnych dla wszystkich wariantów analizy. C) Heatmapa obrazująca poziom 5mC we wspólnych DHMR zidentyfikowanych przez analizy zoptymalizowane dla szerokiego i wąskiego okna. rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

Wygenerowałam również zestaw DHMR będący połączeniem DHMR pozyskanych dla wąskiego i szerokiego okna. Połączenie wyników tych dwóch analiz dało 122 DHMR, w tym 80 hipo-hydroksymetylowanych i 42 hiper-hydroksymetylowanych z wiekiem (Rycina 21).

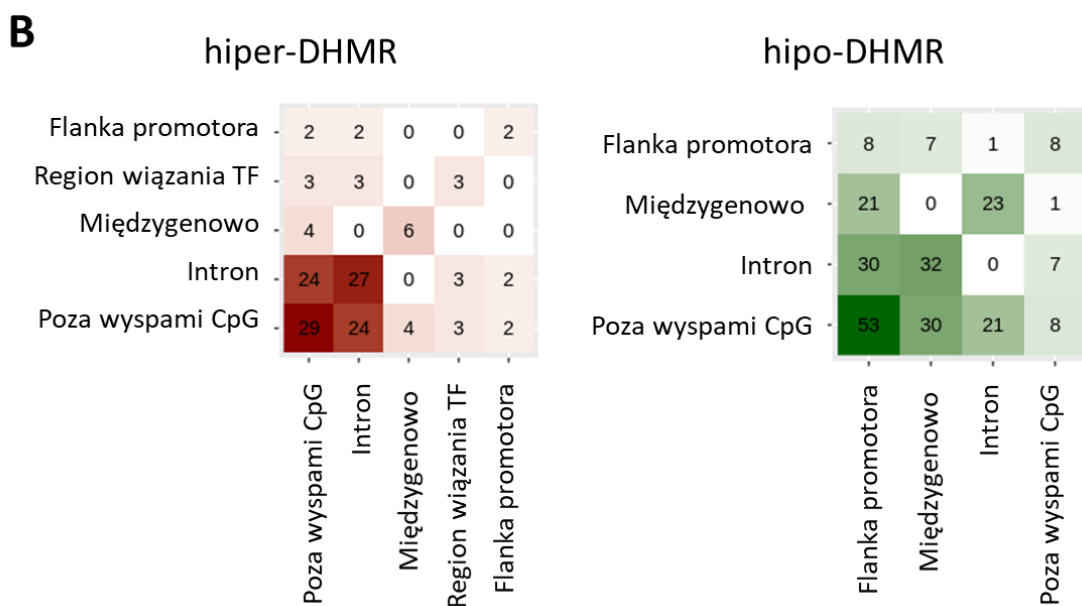
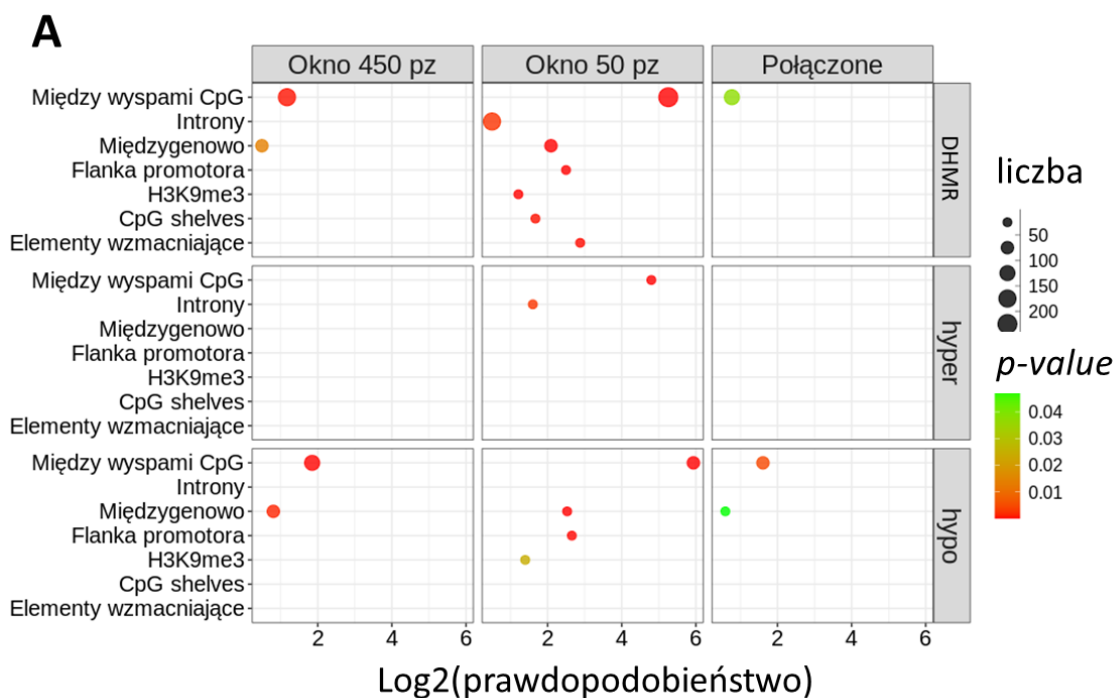


**Rycina 21.** Heatmapa obrazująca poziom 5hmC w DHMR uzyskanych przez połączenie regionów wytypowanych przez algorytmy dla wąskiego i szerokiego okna. rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

Ponieważ analiza przy ustawieniach domyślnych wykazała jedynie 6 DHMR, nie przeprowadzałam dalszej analizy tych danych. Natomiast DHMR zidentyfikowane przy użyciu parametrów zoptymalizowanych przeanalizowałam pod kątem ich obecności w poszczególnych elementach genów oraz w elementach regulatorowych. Analizę tę wykonałam dla DHMR zidentyfikowanych dla każdego okna osobno, a także dla zestawu DHMR otrzymanego z połączenia ze sobą DHMR z obu okien.

W celu weryfikacji, czy poszczególne elementy genomu są istotnie bardziej podatne na związane z wiekiem zmiany w hydroksymetylacji niż reszta genomu, DHMR porównywano do regionów losowo wygenerowanych ze wszystkich hydroksymetylowanych fragmentów w DNA ASC. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu dokładnego Fisher'a. Analiza wykazała, że hiper-hydroksymetylowane z wiekiem DHMR zidentyfikowane przez algorytm dla wąskiego okna 50 pb są istotnie częściej niż regiony losowe powiązane z intronami oraz regionami leżącymi poza wyspami CpG, przy czym 82% hiper-hydroksymetylowanych

DHMR zlokalizowanych poza wyspami CpG (Rycina 22A i B) znajdowało się w obrębie intronów.



**Rycina 22.** Występowanie związanych z wiekiem DHMR w obrębie konkretnych struktur genomu. A) Analiza statystyczna częstości występowania związanych z wiekiem DHMR w ASC. Analizę wykonano przy użyciu testu dokładnego Fisher'a, porównując DHMR do regionów losowo wygenerowanych ze wszystkich regionów zawierających 5hmC poddawanych analizie. Na rycinie przedstawiono wyniki dla wartości  $p < 0,05$ . B) Kolokalizacja DHMR powiązanych z regionami genomu podlegającej istotnie częstszej zmianie 5hmC z wiekiem dla analizy wąskiego okna genomowego.

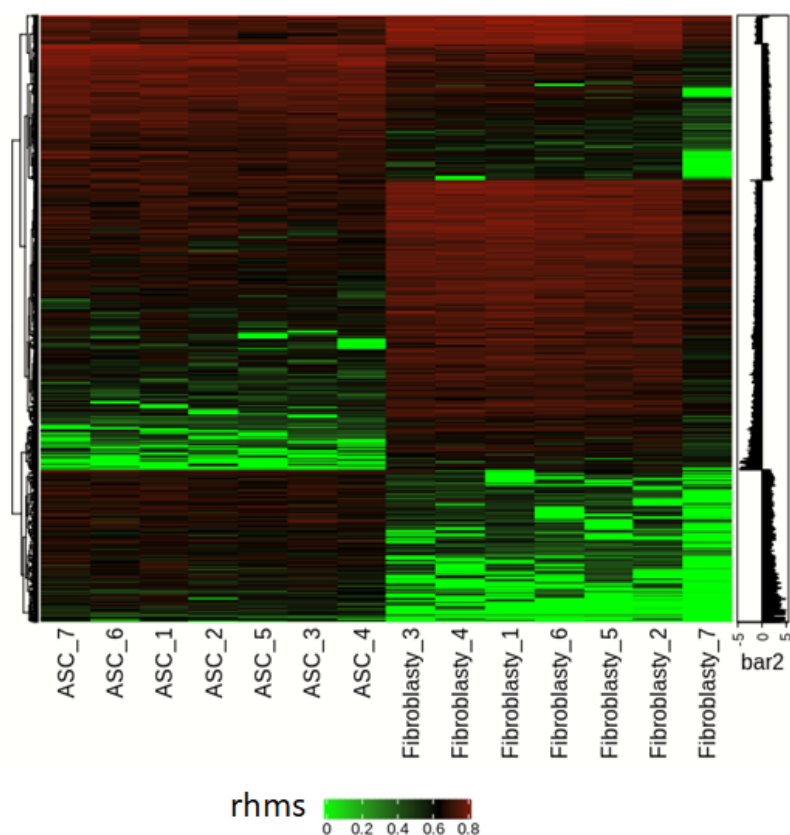
Hipo-hydroksymetylowane DHMR z tej analizy były natomiast istotnie częściej niż regiony losowe powiązane z modyfikacją białka histonowego H3K9me3, regionami leżącymi poza wyspami CpG, regionami międzygenowymi oraz flanką promotora, przy czym 91% hipo-hydroksymetylowanych regionów międzygenowych leżało poza wyspami CpG (Rycina 22A i B). W przypadku analizy szerokiego okna genomowego, jedynie regiony pomiędzy wyspami CpG oraz regiony międzygenowe występowały częściej w porównaniu do regionów losowych w analizie uwzględniającej wszystkie regiony; podobną obserwację poczyniłam dla regionów hipo-hydroksymetylowanych z wiekiem (Rycina 22A). Natomiast regiony hiper-hydroksymetylowane nie występowały istotnie częściej niż regiony losowe w obrębie żadnej z badanych struktur genomu. Wyniki dla DHMR połączonych z obu analiz pokrywały się z tymi pozyskanych dla okna szerokiego, z tą różnicą, że regiony międzygenowe nie występowały istotnie częściej niż regiony losowe. W przypadku tych analiz ponad 90% regionów międzygenowych była zlokalizowana poza wyspami CpG (Rycina 22A).

Podsumowując, analiza wykazała, że związane z wiekiem zmiany hydroksymetylacji występują preferencyjnie poza wyspami CpG, przy czym na wzrost hydroksymetylacji narażone być mogą introny leżące poza wyspami CpG, natomiast na związany z wiekiem spadek hydroksymetylacji – regiony międzygenowe znajdujące się poza wyspami CpG.

Analizę ontologiczną genów powiązanych z regionami przeprowadziłam wykorzystując narzędzie Panther dla listy regionów utworzonej przez połączenie DHMR ze wszystkich analiz. Do regionów przypisałam geny leżące w obrębie DHMR oraz geny leżące w ich pobliżu. DHMR powiązane były ze 111 genami. Klasyfikacja ontologiczna genów pod kątem procesów biologicznych z bazy GO wykazała, że najwięcej genów (minimum 10% analizowanych genów) powiązanych było z metabolizmem i modyfikacją białek, regulacją i transdukcją sygnału komórkowego, regulacją ekspresji genów, metabolizmem kwasów nukleinowych, rozwojem układu nerwowego. Geny z żadnego z analizowanych procesów biologicznych nie były statystycznie istotnie podatne na związane z wiekiem zmiany hydroksymetylacji przy uwzględnieniu poprawki dla porównań wielokrotnych.

### **8.7. Porównanie profilu 5hmC pomiędzy ASC a fibroblastami oraz poszukiwanie związanych z wiekiem DHMR wspólnych dla ASC i fibroblastów.**

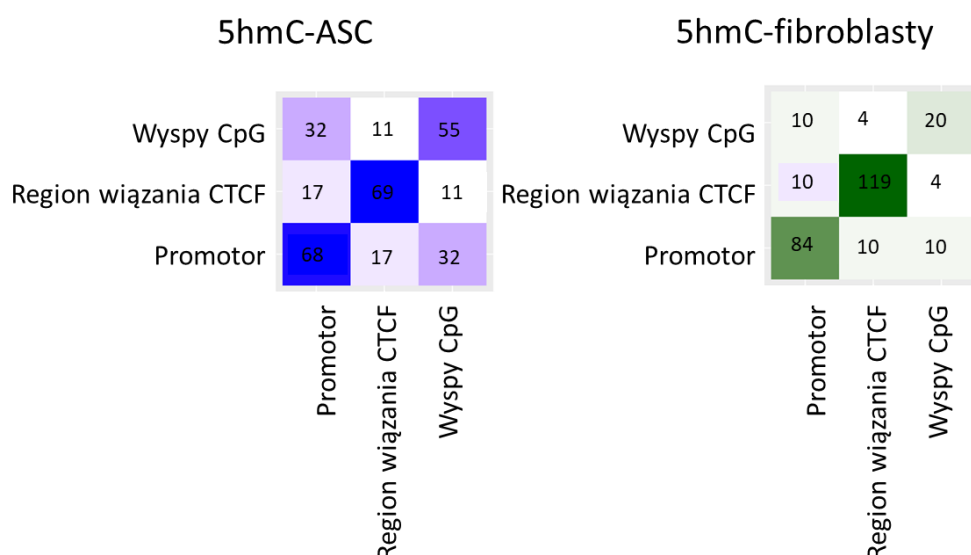
Komórki MSC i fibroblasty charakteryzują się bardzo podobnym fenotypem i wyrażają podobne markery powierzchniowe, natomiast różnią się od siebie potencjałem do różnicowania oraz samoodnowy. Również komórki MSC pozyskane z tłuszczu, czyli ASC, fenotypowo są prawie nierozróżnialne od fibroblastów (Brohem i wsp., 2013). Niektórzy badacze twierdzą, że fibroblasty to tak naprawdę zróżnicowane lub stare komórki MSC (Soundararajan i Kannan, 2018). Ponadto, uważa się, że rozróżnienie tych komórek jest istotne w kontekście medycyny regeneracyjnej i terapii komórkowych, ponieważ fibroblasty wykazują niższy potencjał regeneracyjny i immunomodulacyjny *in vivo* (Savvatis i wsp., 2012). Dostępne dane sugerują, że dystrybucja 5hmC w genomie jest komórkowo i tkankowo specyficzna. Dodatkowo, 5hmC wydaje się pełnić szczególną rolę w regulacji funkcjonowania komórek macierzystych, dlatego porównanie profilu hydroksymetylacji ASC i fibroblastów wydaje się być uzasadnione w kontekście późniejszego wykorzystania wyników dla scharakteryzowania różnic tych dwóch typów komórek.



**Rycina 23.** Heatmapa przedstawiająca regiony różnicowo hydroksymetylowane w komórkach ASC i fibroblastach. Pary typów komórek pochodzą od tych samych dawców. rhms: względny poziom hydroksymetylacji.

Analiza zidentyfikowała 2520 hydroksymetylowanych regionów odróżniających ASC od fibroblastów, 1205 o większym oraz 1315 o niższym poziomie 5hmC w komórkach ASC w porównaniu z fibroblastami (Rycina 23).

Regiony następnie analizowano w dwóch grupach: o większym poziomie 5hmC w ASC (5hmC-ASC) i o większym poziomie 5hmC w fibroblastach (5hmC-fibroblasty). Regiony następnie przypisano do struktur genomu oraz elementów regulatorowych. Pośród regionów 5hmC-fibroblasty było więcej regionów regulatorowych, natomiast wyspy CpG występowały częściej wśród regionów 5hmC-ASC. Wiadomo, że metylacja DNA w obrębie wysp CpG powiązanych z promotorami genów pełni istotną rolę w regulacji ich ekspresji (Deaton i Bird, 2011). Pośród regionów 5hmC-ASC było ponad dwa razy więcej wysp CpG niż pośród regionów 5hmC-fibroblasty, co może sugerować, że hydroksymetylacja wysp CpG może pełnić rolę w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za warunkowanie fenotypu badanych komórek. Przeprowadziłam więc analizę współwystępowania wysp CpG i elementów regulatorowych w regionach różnicowo hydroksymetylowanych pomiędzy fibroblastami a komórkami ASC. Na 68 promotorów pośród regionów 5hmC-ASC, 32 zawierało wyspę CpG (47%), a w fibroblastach w regionach o zwiększonej zawartości 5hmC tylko 11% promotorów zawierało wyspę CpG (Rycina 24).



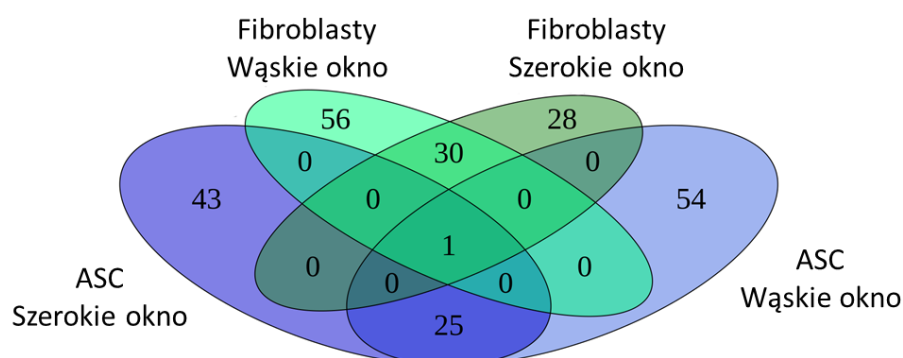
**Rycina 24.** Analiza współwystępowania regionów różnicowo hydroksymetylowanych między ASC a fibroblastami w obrębie wysp CpG i elementów regulatorowych potencjalnie regulowanych przez 5hmC. Heatmapy przedstawiają liczbę regionów znajdujących się jednocześnie w obrębie dwóch analizowanych anotacji. 5hmC-ASC: regiony o wyższym poziomie 5hmC w komórkach ASC w porównaniu do fibroblastów. 5hmC-fibroblasty: regiony o wyższym poziomie 5hmC w fibroblastach w porównaniu do ASC.

Kolejnym etapem była analiza genów powiązanych z rejonami różnie hydroksymetylowanymi w ASC i fibroblastach. Ponieważ dane sugerują, że poziom 5hmC jest wyższy wewnątrz genów ulegających ekspresji w danej tkance, przeprowadziłam taką analizę dla genów, których introny oraz eksony leżą w obrębie takich rejonów. Przy użyciu narzędzia Panther geny te poddałam analizie ontologicznej, przypisując do nich funkcję biologiczną. Dodatkowo, przy użyciu Panther wykonałam test statystyczny częstości występowania genów powiązanych z poszczególnymi procesami biologicznymi. Jako referencyjnej listy genów użyłam wszystkich genów powiązanych z 5-hydroksymetylowanymi regionami w ASC i fibroblastach. W tej analizie wytypowano procesy biologiczne, których korygowana wartość p poddana poprawce FDR była mniejsza niż 0,05. Analiza intronów i eksonów powiązanych z rejonami 5hmC-ASC wykazała, że są one istotnie, około 1,5x częściej niż wynika to z prawdopodobieństwa powiązane jedynie z trzema procesami biologicznymi: rozwojem układu nerwowego (GO:0007399), regulacją szlaków sygnałowych (GO:0023051) oraz regulacją komunikacji międzykomórkowej (GO:0010646). W przypadku wszystkich tych szlaków, powiązanych było z nimi ponad 100 z 640 analizowanych genów. W przypadku genów powiązanych z intronami i eksonami o zwiększonym poziomie 5hmC w fibroblastach w stosunku do ASC (5hmC-fibroblasty), były one istotnie częściej niż wynika to z prawdopodobieństwa powiązane z ponad 100 różnymi procesami biologicznymi. Trzy procesy, których częstość występowania była największa w stosunku do tej wynikającej z prawdopodobieństwa, około 1,7x i które były powiązane z minimum 100 genami spośród 640 analizowanych to neurogeneza (GO:0022008), rozwój układu nerwowego (GO:0007399), morfogeneza struktur anatomicznych (GO:0009653).

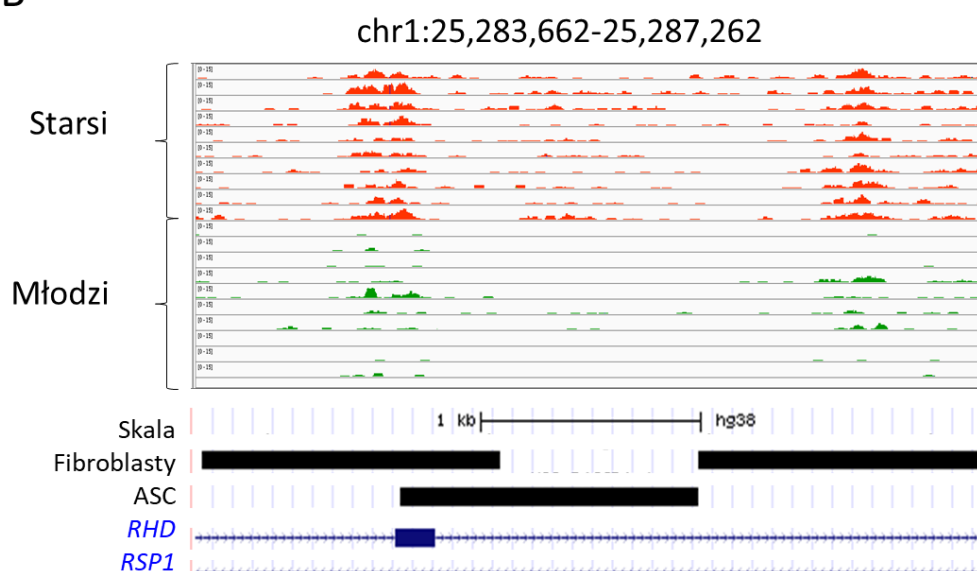
Można hipotetyzować, że zwiększona hydroksymetylacja wysp CpG w promotorach genów ma związek z regulacją ich aktywności. Z tego powodu przy pomocy algorytmu ChIPpeakAnno do promotorów hydroksymetylowanych w ASC, posiadających wyspy CpG, przypisałam potencjalnie regulowane przez nie geny. Analiza z poprawką FDR nie wykazała procesów biologicznych istotnie częściej powiązanych z analizowanymi genami, co może wynikać z ich małej liczby. Analiza bez korekty wartości p wskazała, że najbardziej nadreprezentowane były szlaki powiązane z cyklem komórkowym (GO:0022402, GO:0007049) oraz regulacją syntezy i metabolizmu RNA (GO:2001141, GO:1903506, GO:0051252). Dodatkowo, aż 9 z 23 analizowanych genów powiązanych było z procesami różnicowania komórkowego (GO:0030154). Geny te występowały dwukrotnie częściej niż wynika to z rachunku prawdopodobieństwa.

Następnie przeszłam do analiz dotyczących zmian hydroksymetylacji związanych z wiekiem. W celu sprawdzenia, czy zidentyfikowane przez mnie i opisane powyżej związane z wiekiem DHMR są specyficzne jedynie dla komórek ASC, czy mogą być DHMR-ami o charakterze uniwersalnym, porównałam je ze związanymi z wiekiem DHMR w fibroblastach izolowanych ze skóry, w których analiza danych z hMeDIP-seq została przeprowadzona analogicznym algorytmem jak dla komórek ASC (Pakiet MEDIPS, okno 450 pz i 50 pz, poprawka FDR, próg dla korygowanego  $p=0,05$ ). Wytypowałam jeden wspólny dla obu typów komórek związany z wiekiem DHMR (Rycina 25A i B). Region ten znajdował się w intronie genu *RSP1* i jednocześnie w intronie/eksonie genu *RHD*, blisko genu *TMEM50*. Gen *RHD* jest antygenem grupy krwi i nie ulega ekspresji w badanych komórkach.

A



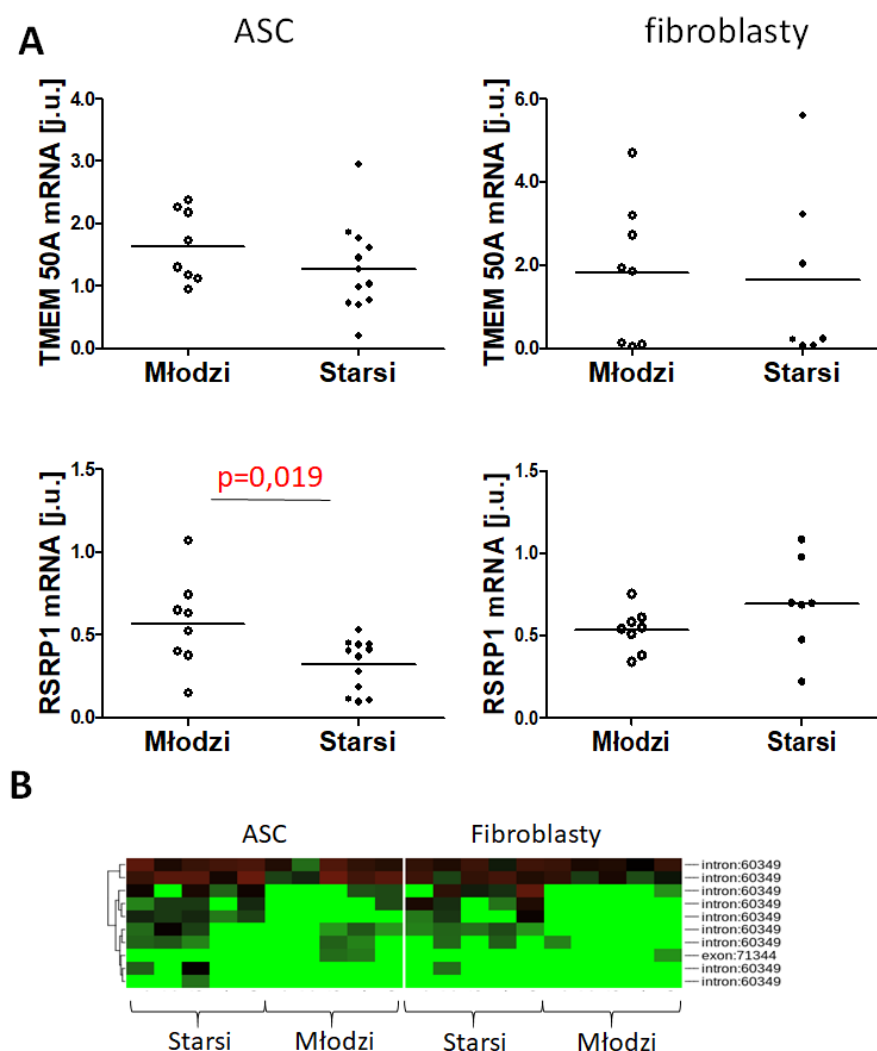
B



**Rycina 25.** Związany z wiekiem DHMR wspólny dla ASC i fibroblastów. A) Diagram Venn'a ilustrujący liczbę wspólnych regionów dla poszczególnych analiz. B) Szczegółowy widok DHMR wspólnego dla ASC i fibroblastów, obrazujący poziom 5hmC oraz umiejscowienie w genomie. Do przygotowania panelu użyto przeglądarki genomowej UCSC genome Browser.



W celu sprawdzenia, czy ta powiązana z wiekiem zmiana hydroksymetylacji może mieć efekt funkcjonalny w postaci zmiany ekspresji powiązanych genów, zdecydowałam się na zbadanie ekspresji *RSRP1* oraz *TMEM50* w fibroblastach oraz ASC izolowanych od osób młodych oraz starszych. Analiza ekspresji przy użyciu metody PCR czasu rzeczywistego nie wykazała różnic w ekspresji genu *TMEM50* pomiędzy młodymi i starszymi dawcami ani w fibroblastach ani w ASC. Wykazała natomiast, że ekspresja *RSRP1* jest niższa w ASC izolowanych od osób młodych w porównaniu do tych od osób starszych ( $p=0,019$ ). Nie zaobserwowałam jednak związanych z wiekiem różnic w ekspresji tego genu w fibroblastach (Rycina 26A).



**Rycina 26.** Analiza ekspresji genów powiązanych ze związanymi z wiekiem DHMR. A) Ekspresja genów powiązanych ze związanym z wiekiem DHMR wspólnym dla ASC i fibroblastów. B) Heatmapa obrazująca poziom 5hmC w obrębie wszystkich 5-hydroksymetylowanych regionów genu *RSRP1* w ASC i fibroblastach. j.u.- jednostki umowne.

Dodatkowo, zobrazowałam poziom 5hmC w obrębie genu *RSRP1* we wszystkich badanych próbkach. Analiza wykazała, że poziom tej modyfikacji jest wyższy w grupie osób starszych nie tylko w DHMR zidentyfikowanym przez analizę różnicową, ale również w innych regionach leżących w obrębie intronu tego genu (Rycina 26B).

## VI. Dyskusja

### *Związane z wiekiem, globalne zmiany w poziomie modyfikacji DNA oraz ekspresji genów TET*

Wykonane przeze mnie badania wykazały po raz pierwszy związany z wiekiem wzrost poziomu 5hmC w DNA izolowanym z podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka. Sugeruje to, że zmiany w obrębie 5hmC są elementem związanego z wiekiem dryftu epigenetycznego. Wiadomo, że wraz z wiekiem spada globalny poziom metylacji DNA (Ciccarone i wsp., 2018). Możliwe więc, że globalny spadek 5mC jest częściowo powiązany z jej przekształceniem w 5hmC. Jest to mechanizm tym bardziej prawdopodobny, że wykazano, że 5hmC na jednej nici DNA hamuje metylację okolicznych CpG (Ji i wsp., 2014). Z drugiej strony, w mojej grupie badanej nie zaobserwowałam spadku poziomu metylacji DNA. Należy jednak wziąć pod uwagę, że dot blot użyty do oceny globalnych ilości modyfikacji DNA jest metodą mało dokładną i subtelne zmiany ilości 5mC mogły nie być zauważone.

Badania przeprowadzone przez innych autorów sugerują, że poziom 5hmC koreluje pozytywnie z wiekiem w przypadku trzewnej tkanki tłuszczowej. Autorzy nie zaobserwowali takiej korelacji w przypadku SAT (Rohde i wsp., 2015). Badania te nie były jednak przeprowadzone pod kątem starzenia i średnia wieku oraz odchylenie standardowe grupy badanej ( $63 \pm 16$  lat) sugerują, że zakres wiekowy nie był tak szeroki, jak w moich badaniach, co mogło uniemożliwić tym autorom zaobserwowanie niewielkich zmian. Wzrost globalnego poziomu 5hmC obserwowano także w starzejącym się mysim hipokampie (Chen i wsp., 2012) (Chouliaras i wsp., 2014) oraz mózdzku (Szulwach i wsp., 2011). Z drugiej strony, spadek poziomu tej modyfikacji z wiekiem obserwowano w ludzkich komórkach krwi (Valentini i wsp., 2016). Dane te sugerują, że nie tylko poziom 5hmC jest tkankowo specyficzny ale również kierunek zmian, jakim podlega on w procesie starzenia, może zależeć od rodzaju tkanki.

Globalny poziom 5hmC w SAT nie korelował z poziomem mRNA ani białka żadnego z TET, pomimo iż zaobserwowałam związany z wiekiem wzrost mRNA TET2 oraz białka TET3. Nie jest to zaskakujące, ponieważ 5hmC jest dynamiczną modyfikacją epigenetyczną regulowaną wspólnie przez wszystkie trzy enzymy TET oraz inne mechanizmy. Ponadto, biologiczna funkcja enzymów TET nie zależy jedynie od ich ilości, ale przede wszystkim od ich aktywności. Aktywność TET natomiast regulowana jest przez wiele czynników endogennych takich jak poziom metabolitów cyklu Krebsa (Salminen i wsp., 2015),

obecność inhibitorów takich jak 2-hydroksyglutaran (Losman i Kaelin, 2013), dostępność  $\text{Fe}^{2+}$ . Aktywność TET rośnie w obecności witaminy C, która przyczynia się do odnowienia rezerwuaru  $\text{Fe}^{2+}$  (Minor i wsp., 2013). Z drugiej strony wydaje się, że stres oksydacyjny prowadzi do zahamowania aktywności TET i spadku poziomu 5hmC, prawdopodobnie w wyniku zmniejszania się dostępności  $\text{Fe}^{2+}$  w wyniku ich utlenienia (Delatte i wsp., 2014). Również dostępność tlenu molekularnego  $\text{O}_2$  jest kluczowa dla prawidłowego działania TET, ponieważ atom tlenu jest substratem w przeprowadzanej przez te enzymy reakcji (Salminen i wsp., 2015). Ponadto, aktywność TET wykazuje dużą zmienność międzyosobniczą, ponieważ jest zależna między innymi od diety, stylu życia, narażenia na czynniki środowiskowe. Może to być szczególnie widoczne w tkance tłuszczowej, której biologia w sposób szczególny regulowana jest przez styl życia. Problem istnienia potencjalnych związanych z wiekiem zmian w aktywności poszczególnych TET mógłby zostać rozwiązany, gdyby istniały odpowiednie testy. Jednakże testy obecnie dostępne analizują aktywność wszystkich TET łącznie oraz wymagają dodania egzogennych kofaktorów, przez co nie odzwierciedlają zmian aktywności poszczególnych TET oraz tych będących następstwem zmian mikrośrodowiska komórki i tkanki, które są kluczowe w regulacji aktywności tych białek. Dlatego też obecnie można jedynie stwierdzić, że wpływ związanych z wiekiem zmian ekspresji żadnego TET na zmiany ilości 5hmC nie był na tyle istotny, żeby można go było wykryć dostępnymi metodami analitycznymi.

Enzymy TET przekształcają 5mC do 5hmC a następnie do 5fC i 5caC. Nie zaobserwowałam związanych z wiekiem zmian w poziomie 5fC ani 5caC w mojej grupie badanej. Zaobserwowałam jednak związany z wiekiem spadek stosunku 5fC/5hmC. Może to pośrednio sugerować, że wraz z wiekiem dochodzi do spadku zdolności TET do dalszej konwersji 5hmC do 5fC i może to być jeden z mechanizmów akumulacji 5hmC w genomie starzejących się komórek.

Poziom i dystrybucja 5hmC jest tkankowo specyficzna, możliwe więc, że zaobserwowane przeze mnie zmiany poziomu tej modyfikacji w podskórnej tkance tłuszczowej wynikają ze zmian w składzie subpopulacji komórek ją zasiedlających. Wstępne badania poziomu białek markerowych charakterystycznych dla makrofagów (CD68), preadipocytów (CEBP $\alpha$ ) oraz limfocytów T (CD4) przeprowadzone przeze mnie nie wykazały jednak korelacji pomiędzy poziomem markerów poszczególnych typów komórek a 5hmC, co sugeruje, że obserwowany z wiekiem wzrost poziomu tej modyfikacji nie jest

następstwem związanej z wiekiem akumulacji poszczególnych typów komórek (dane nie pokazane). Z drugiej strony, poziom markerów poszczególnych subpopulacji komórek zbadałam na niewielkiej grupie pacjentów oraz badałam globalny poziom markerów w pełnych ekstraktach białkowych SAT, dlatego powyższa hipoteza wymaga dogłębnej analizy na znacznie większej grupie.

Dane literaturowe sugerują także, że adipocyty podskórnej tkanki tłuszczowej różnią się między sobą poziomem 5hmC (Yu i wsp., 2016), możliwe więc, że obserwowany wzrost poziomu 5hmC w SAT wynika ze związanych z wiekiem zmian w proporcji adipocytów różniących się od siebie profilem epigenetycznym. Weryfikacja takiego mechanizmu również wymaga dodatkowych badań.

Z drugiej strony, hipotezę o faktycznej akumulacji 5hmC w tkance tłuszczowej z wiekiem wspierają wyniki badań przeprowadzonych na stosunkowo homogennej frakcji komórek otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej, ASC, gdzie obserwowałam zwiększony poziom 5hmC w komórkach izolowanych od osób starszych w porównaniu do komórek od osób młodych. Co istotne, tempo proliferacji komórek ASC izolowanych od osób starszych było niższe niż tych izolowanych od młodych uczestników badania. Globalny poziom 5hmC korelował pozytywnie z czasem podwojenia populacji – był wyższy w komórkach wolniej się dzielących. Sugeruje to, że 5hmC może akumulować się w komórkach starych, wolno dzielących się, ponieważ nie jest w nich tracona tak efektywnie w procesie biernej demetylacji powiązanej z replikacją DNA, jak w komórkach szybciej proliferujących (Hahn i wsp., 2014).

Na podstawie danych pozyskanych z SAT oraz ASC można zaproponować dwa mechanizmy wpływające na zwiększenie ilości 5hmC w komórkach starych: akumulację w komórkach wolno dzielących się, gdzie nie jest usuwana w procesie biernej demetylacji, jak również obniżoną zdolność TET do dalszego przekształcenia 5hmC do 5fC.

#### *Dystrybucja 5hmC w ASC*

Dystrybucja oraz funkcja 5hmC w genomie są w znacznym stopniu tkankowo specyficzne, a modyfikacja ta wydaje się pełnić szczególną rolę w regulacji funkcji komórek ES (Szulwach i wsp., 2011). Badania wykazują również, że 5hmC oraz enzymy TET zaangażowane są w regulację procesu różnicowania somatycznych komórek macierzystych (Cakouros i wsp., 2019). Nie ma jednak aktualnie danych na temat dystrybucji tej

modyfikacji w obrębie poszczególnych struktur genomu w komórkach ASC, dlatego wykonałam taką analizę.

Badania poziomu 5hmC w kontekście elementów regulatorowych wykazały, że względny poziom tej modyfikacji jest istotnie niższy w obrębie promotorów genów w stosunku do innych elementów genomu. Dodatkowo, najniższy względny poziom 5hmC w porównaniu do wszystkich analizowanych struktur genomu zaobserwowano w przypadku wysp CpG. Obniżony poziom 5hmC w obrębie wysp CpG powiązanych z promotorami obserwowano również w mózgu (Wen i Tang, 2014). Prawdopodobnie jest on związany z szybką, aktywną demetylacją DNA w tych regionach genomu (Wu i wsp., 2011).

Istotnie wyższy względny poziom 5hmC w porównaniu do reszty genomu ASC zaobserwowałam w obrębie miejsc wiązania CTCF. Wynik ten jest zgodny z aktualną wiedzą na temat interakcji pomiędzy CTCF i TET1. Wiadomo, że CTCF wiąże się z TET1 i kieruje to białko do regionów docelowych, indukując ich hydrosymetylację/demetylację. Ponadto, poziom 5hmC był wyższy w regionach CTCF gotowych do aktywacji. Podobną zależność obserwowano w przypadku elementów wzmacniających, w których poziom 5hmC był istotnie zwiększony w regionach wzmacniających gotowych do aktywacji. Taki wynik jest spójny z literaturą dotyczącą komórek ES (Pastor i wsp., 2011). Regiony gotowe do aktywacji są charakterystyczne dla komórek macierzystych i często powiązane są z genami związanymi z różnicowaniem (Bernstein i wsp., 2006) (Musri i wsp., 2010). Sugeruje to, że 5hmC pełni w ASC istotną rolę poprzez utrzymywanie w gotowości genów, których aktywacja jest potrzebna w procesie różnicowania.

Poziom 5hmC był znamienne niższy w regionach powiązanych z H3K4me3 niż w reszcie elementów genomu. Ta modyfikacja epigenetyczna powiązana jest z aktywną transkrypcją. H3K4me3 może hamować wiązanie DNMT3L do histonu 3, a co za tym idzie – hamować metylację DNA, co może pośrednio prowadzić do niskiego poziomu 5hmC (Adams-Cioaba i Min, 2009). Ponadto, badania wykazują, że H3K4me3 może hamować wiązanie się kompleksu NuRD do nukleosomów (Zegerman i wsp., 2002). Białka z kompleksu NuRD są represorami transkrypcji i wykazują powinowactwo do 5hmC (Yildirim i wsp., 2011). Możliwe więc, że niski poziom 5hmC w obrębie H3K4me3 jest odzwierciedleniem mechanizmu mającego na celu utrzymanie aktywnej transkrypcji genów. Wyższy względny poziom 5hmC obserwowano natomiast w regionach powiązanych z H2BK5ac, H3K23ac,

H3K9ac. Wszystkie te modyfikacje białek histonowych powiązane są z aktywną transkrypcją powiązanych z nimi genów (Ma i wsp., 2016) (Mobley i Abell, 2017) (Li i wsp., 2018) (Ilgolkina i wsp., 2019). Są to jednak modyfikacje stosunkowo mało zbadane i niewiele wiadomo na temat dokładnych mechanizmów regulacji epigenetycznej z nimi współistniejących.

Badania dystrybucji 5hmC w mózgu wykazały, że poziom tej modyfikacji jest wyższy na granicy ekson-intron w stosunku do reszty genomu. Autorzy spekulują, że modyfikacja ta może znakować eksony do późniejszego procesu składania mRNA (Khare i wsp., 2012) i że taka rola 5hmC może być specyficzna dla tkanki mózgowej. Faktycznie, moje analizy nie wykazały, aby 5hmC występowała istotnie częściej na granicy ekson-intron w ASC. Jednakże, w cytowanej pracy 5hmC analizowana była metodą o wyższej rozdzielczości niż ta użyta w moich badaniach. Możliwe, że metoda hMeDip-seq jest zbyt mało czuła, by wykryć różnice w poziomie modyfikacji dla tak wąskich regionów jak granica ekson-intron.

Analiza względnego poziomu 5hmC w obrębie badanych regionów powtórzonych wykazała, że istotnie wyższy poziom tej modyfikacji występuje jedynie w przypadku regionów HERVH-int. HERVH-int są to endogenne transpozony specyficzne dla ssaków naczelnych. Co ciekawe, najnowsze badania dowodzą, że te regiony powtórzone zaangażowane są w tworzenie domen przestrzennych chromatyny TAD w ludzkich pluripotentnych komórkach macierzystych (PSC) i są zaangażowane w regulację ekspresji genów oraz w proces różnicowania. Wyciszenie HERVH-int prowadziło do zmniejszenia ekspresji powiązanych z nimi genów (Zhang i wsp., 2019). W tworzenie domen TAD zaangażowane jest białko CTCF. Najnowsze badania wykazują, że CTCF jest funkcjonalnie powiązane z białkami TET, kieruje je bowiem do regionów docelowych, gdzie indukuje hydroksymetylację/demetylację DNA (Dubois-Chevalier i wsp., 2014). Możliwe więc, że kolokalizacja 5hmC z HERVH-int jest właśnie pośrednim wynikiem ich powiązania z CTCF. Może to też sugerować, że 5hmC jest zaangażowana w tworzenie TAD w procesie różnicowania ASC. Badania ponadto wykazały, że HERV-H kodują długie niekodujące lncRNA, które ulegają szczególnie wysokiej ekspresji w ludzkich ES i są prawdopodobnie zaangażowane w regulację pluripotencji tych komórek (Lu i wsp., 2014).

Względny poziom 5hmC był z kolei niższy w obrębie elementów powtórzonych AluY, w porównaniu do reszty genomu. Elementy Alu stanowią część elementów powtórzonych SINE i stanowią około 13,7% ludzkiego genomu. Ponadto, 25% wszystkich

par CpG w ludzkim genomie leży w obrębie tych elementów powtórzonych (Luo i wsp., 2014). Metylacja elementów Alu jest dynamiczna i zmienia się na wczesnych etapach rozwoju oraz w procesie starzenia i stanowi ważny element zaangażowany w hamowanie ich aktywności. Dodatkowo, metylacja tych elementów jest regulowana przez wiele czynników środowiskowych. AluY stanowią jedną z podrodzin elementów Alu. Co ciekawe, AluY są elementami bardzo aktywnymi i wykazują wysoki poziom transpozycji w obrębie ludzkiego genomu (Bennett i wsp., 2008). Badania dotyczące statusu metylacji elementów Alu wykazały, że AluY mają najwyższy stopień metylacji spośród wszystkich typów elementów Alu (Rodriguez i wsp., 2008). Spadek metylacji AluY towarzyszy wczesnym etapom procesu nowotworzenia (Bakshi i wsp., 2016). Możliwe więc, że elementy AluY są w sposób szczególny chronione przed aktywną demetylacją, stąd ich niski poziom 5hmC w porównaniu do reszty genomu.

#### *Identyfikacja związanych z wiekiem DHMR w ASC i porównanie algorytmów analizy różnicowej*

Kluczowym elementem badań była identyfikacja związanych z wiekiem zmian w poziomie i dystrybucji 5hmC w obrębie specyficznych *loci*. W tym celu metodą hMeDIP-seq zbadano profil 5hmC w komórkach ASC izolowanych od osób młodych oraz starszych, a następnie przeprowadzono analizę różnicową mającą na celu wytypowanie związanych z wiekiem DHMR. Metoda hMeDIP-seq opiera się na immunoprecypitacji DNA specyficznym przeciwciałem wiążącym 5hmC, a następnie sekwencjonowaniu nowej generacji. Pozyskane odczyty mapuje się do genomu referencyjnego, dzięki czemu otrzymujemy listę regionów 5-hydroksymetylowanych wraz z poziomem tej modyfikacji w ich obrębie. Dalsza analiza danych przeprowadzona może zostać na wiele sposobów i nie ma jednego złotego standardu określającego algorytm postępowania. Ponadto, wybór parametrów analizy często zależy od kontekstu biologicznego, na przykład od tego, jak dużych różnic między grupami się spodziewamy. 5-hydroksymetylacja jest stosunkowo nową modyfikacją epigenetyczną i niewiele jeszcze wiadomo na temat zmian, jakie zachodzą w jej dystrybucji wraz z wiekiem. Aktualnie jest tylko kilka badań opisujących związane z wiekiem zmiany w dystrybucji tej modyfikacji i przeprowadzane były one na różnych organizmach, tkankach i przy użyciu różnych metod profilowania 5hmC. Z tych powodów wybranie odpowiednich parametrów do analizy danych było utrudnione. Wynik analizy różnicowej w bardzo dużym stopniu może zależeć od wybranego algorytmu matematycznego oraz zadanych



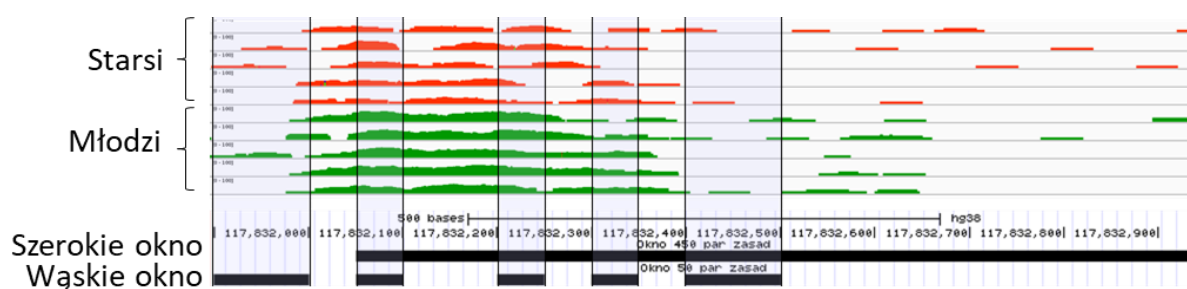
parametrów (Wu i wsp., 2015) (Steinhauser i wsp., 2016). Wobec braku algorytmu dedykowanego konkretnie do analizy hydroksymetylacji DNA, jak wspominałam wcześniej, wybrałam pakiet MEDIPS dlatego, że jest on dedykowany do analizy analogicznych danych pochodzących z sekwencjonowania pod kątem metylacji DNA metodą MeDiP-seq. Ponadto, zdecydowałam się na przeprowadzenie analizy różnicowej przy różnych parametrach, gdyż jednym z celów pracy była weryfikacja wpływu parametrów analizy na pozyskane wyniki. W pierwszym etapie przeprowadziłam analizę przy użyciu parametrów domyślnie wbudowanych w pakiet MEDIPS, sugerowanych przez jego twórców. W drugim etapie przeprowadziłam analizę z indywidualnie dobranymi parametrami.

Ważnym parametrem analizy wpływającym na wynik końcowy jest wybór wielkości analizowanego okna genomowego, czyli wielkość regionu, na który dzielony jest genom do porównawczej analizy różnicowej. 5hmC powiązana jest zarówno z elementami regulatorowymi związanymi z wąskimi fragmentami DNA, na przykład miejscami wiązania czynników transkrypcyjnych, jak i z szerszymi fragmentami genomu, na przykład intronami i eksonami. Z tego powodu analizę przeprowadziłam dla dwóch skrajnych wielkości okna genomowego – 450 par zasad, co odpowiada średniej długości fragmentów 5-hydroksymetylowanych w ASC wytypowanych przez algorytm MACS oraz wąskiego okna 50 pz, optymalnego dla analizy regionów powiązanych z elementami genomowymi takimi jak miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, elementy regulatorowe, itd. Szerokość okna domyślnie sugerowana przez twórców pakietu MEDIPS to 100 pz.

Analiza MEDIPS dla ustawień domyślnych wytypowała w ASC jedynie 6 związanych z wiekiem DHMR, natomiast analizy dla parametrów zoptymalizowanych zidentyfikowały odpowiednio 71 DHMR przy analizie okna szerokiego oraz 93 DHMR dla okna wąskiego. Główną przyczyną tak niskiej zidentyfikowanej liczby DHMR w przypadku analizy dla ustawień domyślnych jest sugerowana w pakiecie korekta Bonferroniego dla porównań wielokrotnych. Test Bonferroniego jest testem bardzo restrykcyjnym i może dawać dużą frakcję wyników fałszywie negatywnych. Uważa się, że test FDR jest bardziej odpowiedni niż test Bonferroniego w przypadku analiz wielkoskalowych, w których mamy do czynienia z bardzo dużą liczbą porównań. W przypadku testu FDR istnieje bowiem mniejsze ryzyko pozyskania wyników fałszywie negatywnych przy jednoczesnej kontroli ryzyka wykrycia wyników fałszywie pozytywnych. W przypadku danych wielkoskalowych, gdzie identyfikuje się dużą liczbę zjawisk, korzystniejsze jest wykrycie większej liczby wyników pozytywnych,

nawet kosztem niewielkiej frakcji wyników fałszywie pozytywnych (Chen i wsp., 2010) (Korthauer i wsp., 2019). Pięć na sześć regionów wytypowanych przez analizę przy parametrach domyślnych pokrywało się z obydwoma analizami z ustawieniami zoptymalizowanymi. Sugeruje to, że takie restrykcyjne warunki analizy dają pewność wytypowania wyników najbardziej istotnych, jednak prawdopodobnie kosztem odrzucenia wielu wyników prawdziwie pozytywnych.

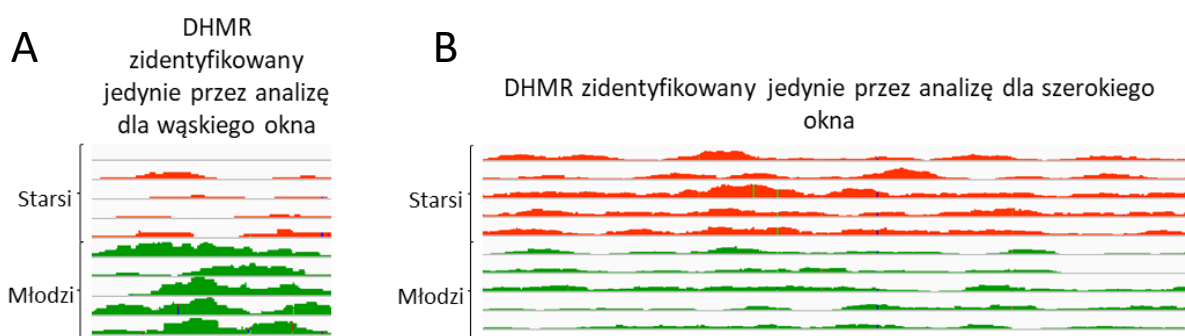
Analiza przy użyciu parametrów zoptymalizowanych dla wąskiego i szerokiego okna dała tylko częściowo pokrywające się wyniki. 28 regionów z analizy dla okna szerokiego pokrywało się z 36 regionami z analizy dla okna wąskiego, dając w sumie 25 wspólnych połączonych regionów (Rycina 20A i C). Pokazuje to, że szerokość okna ma duży wpływ na wyniki, jednak ustawienie zbyt wąskiego okna może generować większą liczbę regionów nie odzwierciedlających sytuacji biologicznej. Pokazuje to przykład regionu z Ryciny 27, który został zidentyfikowany jako jeden region dla szerokiego okna 450 pz, natomiast w przypadku analizy dla wąskiego okna 50 pz zostały zidentyfikowane 4 takie krótsze regiony leżące w jego obrębie. Ponadto, jak widać na rycinie, w przypadku DHMR dla okna szerokiego poziom 5hmC ewidentnie różni się pomiędzy pacjentami starszymi i młodymi. Natomiast w przypadku okna wąskiego, ostatni w kierunku 5'→3' region wydaje się nie różnić lub minimalnie różnić pomiędzy grupami wiekowymi, możliwe jest więc, że został wytypowany fałszywie pozytywnie.



**Rycina 27.** Poziom 5hmC u poszczególnych pacjentów w obrębie wybranego DHMR zidentyfikowanego przez analizę zoptymalizowaną dla szerokiego okna genomowego oraz pokrywające się z tym oknem cztery DHMR wytypowane w analizie dla okna wąskiego.

Analiza statystyczna częstości występowania DHMR w obrębie poszczególnych struktur genomu dla szerokiego okna wykazała, że regiony wytypowane przez tę analizę występują istotnie częściej w porównaniu do regionów losowych jedynie w obszarach między

wypami CpG. W przypadku analizy dla wąskiego okna, DHMR również występowały istotnie częściej pomiędzy wypami CpG, ale także w obrębie intronów, regionów wiązania czynników transkrypcyjnych (hipo-DHMR), oraz międzygenowo i w obrębie flanki promotora (hiper-DHMR). Ta analiza statystyczna dla wąskiego okna może nie mieć jednak odzwierciedlenia biologicznego, ponieważ w przypadku ustawienia wąskiego okna genomowego często dochodzi do identyfikacji jako osobnych kilku krótkich regionów leżących bardzo blisko siebie. Regiony te są przypisane do tej samej struktury genomu, przez co dochodzi do sztucznego powielenia liczby regionów w obrębie danej anotacji. Wyniki te sugerują, że ustawienie zbyt wąskiego okna analizy nie jest podejściem optymalnym. Z drugiej strony, w przypadku analizy dla okna szerokiego, ze względu na zbyt duże uśrednienie poziomu 5hmC w obrębie okna można pominąć krótsze, istotne DHMR. Ponieważ każdy z wariantów analizy wytypował unikalne dla siebie, istotne statystycznie DHMR, wydaje się, że dobrym podejściem może być połączenie regionów pozyskanych w przypadku analiz dla dwóch różnych wielkości okna. Przy takim podejściu, wytypowane zostają istotne DHMR powiązane z krótkimi (reprezentatywne DHMR, Rycina 28A) i szerokimi regionami genomu (reprezentatywne DHMR, Rycina 28B), a jednocześnie krótkie regiony leżące blisko siebie, będące tak naprawdę fragmentami regionów dłuższych, zostają ze sobą połączone (Rycina 27).



**Rycina 28.** Przykładowe DHMR wytypowane w obrębie tylko jednego wariantu analizy. A) dla wąskiego okna, B) dla szerokiego okna.

#### *Związane z wiekiem DHMR – potencjalna rola*

Badania u myszy wykazały obecność 1967 hiper-hydroksymetylowanych z wiekiem DHMR w mózdzku i 107 w hipokampie oraz 1206 hipo-hydroksymetylowanych z wiekiem DHMR w mózdzku i 271 w hipokampie (Szulwach i wsp., 2011). Analiza różnicowa w

dystrybucji 5hmC w mysich komórkach krwi wykazała natomiast obecność 8613 DHMR, przy czym 98,1% tych regionów było hipo-hydroksymetylowanych z wiekiem (Kochmanski i wsp., 2018). W moich badaniach liczba związanych z wiekiem DHMR była znacznie mniejsza. Taka różnica wynika najprawdopodobniej z tego, że badania na zwierzętach przeprowadzono na szczepach wsobnych o bardzo niskiej zmienności międzyosobniczej (w tym – genetycznej), żyjących w jednakowym środowisku, co może być powodem, dla którego związane z wiekiem zmiany epigenomu są u takich osobników do siebie podobne i w związku z tym łatwiej wykrywalne. Moje wyniki dotyczą natomiast niespokrewnionych ludzi, różniących się zarówno podłożem genetycznym jak i środowiskiem życia. Badania dowodzą, że środowisko jest niezwykle istotne w regulacji dystrybucji 5hmC, a profil tej modyfikacji może odzwierciedlać narażenie na dane czynniki środowiskowe (Laird i wsp., 2013). Dlatego też najprawdopodobniej cechy dryftu epigenetycznego u uczestników mojego badania istotnie się od siebie różniły i z tego powodu zidentyfikowałam stosunkowo niewielką liczbę związanych z wiekiem DHMR. Najprawdopodobniej zaobserwowałam jedynie DHMR które są najsilniej powiązane z procesem starzenia.

Badania profilu 5hmC na poziomie pojedynczych par CpG w MSC izolowanych ze szpiku osób w wieku 2-89 lat zidentyfikowały 785 hipo- oraz 846 hiper-hydroksymetylowanych z wiekiem CpG (Toraño i wsp., 2016). Różnicowo hydroksymetylowane CpG wytypowane w tych badaniach nie pokrywają się z wytypowanymi przeze mnie związanymi z wiekiem DHMR w ASC. W moich badaniach identyfikowałam całe regiony, a nie pojedyncze pary CpG i prawdopodobnie dlatego liczba zidentyfikowanych przeze mnie regionów była niższa. Ponadto, różnice w zidentyfikowanych DHMR pomiędzy badaniami mogą wynikać także z tego, że mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku różnią się od tych izolowanych z tłuszczu pod względem ich profilu epigenetycznego (Reinisch i wsp., 2015).

Analiza częstości występowania DHMR w obrębie konkretnych struktur genomu wykazała, że na związane z wiekiem zmiany narażone są regiony leżące poza wyspami CpG, przy czym na wzrost hydroksymetylacji narażone mogą być introny leżące poza wyspami CpG, natomiast na związane z wiekiem spadek hydroksymetylacji – regiony międzygenowe znajdujące się poza wyspami CpG. Inna interpretacja tego wyniku może być taka, że wyspy CpG są mniej narażone na związane z wiekiem zmiany w poziomie 5hmC. Analiza dystrybucji 5hmC w ASC wykazała, że wyspy CpG mają najniższy poziom 5hmC ze wszystkich

analizowanych przeze mnie struktur genomu, a dane literaturowe sugerują, że regiony o wysokim zagęszczeniu par CpG ulegają szybkiej, aktywnej demetylacji. Jak wspomniano powyżej, dane pozyskane przez mnie z analizy związanych z wiekiem zmian w globalnym poziomie 5hmC w ASC sugerują, że związane z wiekiem wzrost tej modyfikacji w dużym stopniu może wynikać z jej akumulacji w komórkach wolno dzielących się, ponieważ nie jest ona usuwana w procesie biernej demetylacji. Jeśli wyspy CpG podlegają aktywnej demetylacji nie tylko do 5hmC, ale i do dalszych pochodnych tego procesu oraz procesowi naprawy polegającej na wstawieniu niezmodyfikowanej cytozyny nawet w komórkach wolno dzielących się, to 5hmC będzie się akumulować preferencyjnie poza wyspami CpG. Z drugiej strony, brak związanej z wiekiem hipo-hydroksymetylacji wysp CpG może wynikać z i tak bardzo niskiego poziomu tej modyfikacji w ich obrębie.

Nie wiadomo, czy zaobserwowane przeze mnie zmiany dystrybucji 5hmC mają następstwa funkcjonalne. Przeprowadziłam analizę ekspresji dwóch genów powiązanych ze związanymi z wiekiem DHMR zidentyfikowanymi zarówno w ASC jak i w fibroblastach. Ponieważ występują w dwóch typach komórek, DHMR te są kandydatami na uniwersalną cechę dryftu epigenetycznego, co wymaga, oczywiście, sprawdzenia w jeszcze innych komórkach. Gen *TMEM50* nie znajdował się w obrębie DHMR, a leżał około 6000 pb dalej i został wytypowany przez algorytm GREAT jako powiązany z największą liczbą DHMR. Analiza ekspresji *TMEM50* nie wykazała jednak związanych z wiekiem zmian w jego ekspresji ani w przypadku ASC, ani w przypadku fibroblastów. Najprawdopodobniej gen ten nie jest regulowany przez regiony genomu, w których znajdowały się DHMR wytypowane przez algorytm GREAT. Drugim analizowanym genem był *RSRP1*, którego intron znajdował się w obrębie hiper-hydroksymetylowanego z wiekiem DHMR. W przypadku tego genu zaobserwowałam związane z wiekiem spadek jego ekspresji jedynie w ASC, ale nie w fibroblastach. Badania przeprowadzone na tkankach somatycznych sugerują, że wzrost poziomu 5hmC w obrębie genu koreluje raczej ze wzrostem jego ekspresji. Ponadto, w mysich komórkach krwi obserwowano spadek ekspresji genu *Nifc* towarzyszący związanemu z wiekiem spadkowi 5hmC oraz 5mC (Kochmanski i wsp., 2018). Z drugiej strony, badania sugerują, że korelacja pomiędzy poziomem 5hmC a ekspresją genu jest odmienna w komórkach ES, w których nie jest ona liniowa. Poziom 5hmC w przypadku tych komórek był wyższy wewnątrz genów o średniej ekspresji w porównaniu do tych o ekspresji najwyższej (Szulwach i wsp., 2011). Możliwe więc, że w komórkach ASC, które są komórkami pluripotentymi, zależność pomiędzy hydroksymetylacją genu a jego

aktywnością jest zbliżona do tej obserwowanej w komórkach ES. Wówczas związany z wiekiem wzrost poziomu 5hmC w obrębie genu *RSRP1* może być powiązany ze zmianą jego ekspresji z poziomu wysokiego na średni. Zastanawiające jest, że związane z wiekiem zmiany w ekspresji *RSRP1* zaobserwowałam jedynie w przypadku ASC, ale nie w przypadku fibroblastów. Może to być następstwem wspomnianych wyżej różnic funkcjonalnych pomiędzy komórkami macierzystymi a zróżnicowanymi, jakimi są fibroblasty.

Wcześniej wykazano, że poziom 5hmC jest wyższy w regionach regulatorowych takich jak elementy wzmacniające oraz w regionach wiązania czynników transkrypcyjnych (Stroud i wsp., 2011). Dane dowodzą, że 5hmC w regionach wzmacniających jest kluczowa do aktywacji transkrypcji genów docelowych (Hon i wsp., 2014). Najczęściej, jednak nieznamienne, występującym elementem regulatorowym w obrębie zidentyfikowanych przeze mnie DHMR wytypowanych dla obu wielkości okien łącznie był region otaczający promotor (około 11% DHMR) oraz region wiązania CTCF (około 7% DHMR). Może to sugerować, że obserwowane przeze mnie, związane z wiekiem zmiany w poziomie 5hmC oddziałują na ekspresję genów. Wyniki dotyczące *RSRP1* również sugerują, że zmianie 5hmC w obrębie intronu może towarzyszyć zmiana ekspresji genu, a około 50% wytypowanych DHMR było powiązane właśnie z intronami. Nie wiadomo jednak, czy w tym przypadku zmiana poziomu 5hmC jest przyczyną, czy następstwem zmiany ekspresji. Badania wykazują, że wysoki poziom metylacji DNA wewnątrz genów koreluje z wysoką ekspresją (Ball i wsp., 2009) (To i wsp., 2015). Możliwe więc, że zmiany w poziomie 5hmC wewnątrz genów są następstwem zmian poziomu 5mC, która stanowi substrat dla enzymów TET. Ponadto, regiony chromatyny aktywnie transkrybowane są łatwiej dostępne dla różnych czynników modyfikujących. Zarówno wzrost 5mC jak i 5hmC w genach o wysokiej ekspresji może więc przynajmniej częściowo następstwem ekspresji genu a nie jej przyczyną.

Najprawdopodobniej jednak większość wytypowanych przez mnie DHMR ma jedynie znaczenie markerowe i nie wpływa znacząco na transkryptom, tak jak to ma miejsce w przypadku związanych z wiekiem zmian metylacji DNA. Weryfikacja wpływu związanych z wiekiem zmian w dystrybucji 5hmC na ekspresję genów wymaga dodatkowych badań integrujących ze sobą badanie profilu tej modyfikacji i analizę transkryptomu.

*Porównanie profilu 5hmC ASC do profilu 5hmC fibroblastów i poszukiwanie związanych z wiekiem DHMR wspólnych dla różnych typów komórek*

MSC i fibroblasty to komórki o bardzo zbliżonym fenotypie i nie ma specyficznych markerów powierzchniowych umożliwiających ich jednoznaczne rozróżnienie (Haniffa i wsp., 2009) (Soundararajan i Kannan, 2018). Główną cechą różnicującą je od siebie jest zdolność komórek MSC do różnicowania w adipocyty, chondroblasty i chondrocyty. Niektóre badania wykazują jednak, że fibroblasty izolowane ze skóry również mogą wykazywać potencjał do różnicowania w te trzy typy komórek. To podobieństwo do fibroblastów dotyczy również ASC (Denu i wsp., 2016). Autorzy sugerują, że ASC fibroblasty mogą być tak naprawdę tym samym typem komórek ale pozyskanym z innych źródeł lub fibroblasty mogą być starymi komórkami ASC (Soundararajan i Kannan, 2018).

Badania wykazują, że różnice w profilu epigenetycznym mogą być obiecującym markerem pozwalającym na zdefiniowanie różnic pomiędzy fibroblastami a MSC, co pokazano w przypadku metylacji DNA (Koch i wsp., 2011). Również profil 5hmC jest tkankowo specyficzny. Dane sugerują, że 5hmC jest zaangażowana w regulację elementów regulatorowych charakterystycznych dla danej tkanki (Sérandour i wsp., 2012) (Taylor i wsp., 2016), a także jest wyższa w genach ulegających tkankowo specyficznej ekspresji (Lin i wsp., 2017). Można spodziewać się więc, że fibroblasty i komórki MSC/ASC różnią się od siebie pod kątem dystrybucji tej modyfikacji. Wytypowanie różnicowo hydroksymetylowanych elementów genomu pomiędzy MSC/ASC a fibroblastami może też pomóc ustalić, jaką rolę pełni ta modyfikacja w regulacji funkcji somatycznych komórek macierzystych.

Do porównania profilu 5hmC w moich badaniach wykorzystałam komórki ASC oraz fibroblasty izolowane ze skóry 7 pacjentów, przy czym od każdego pacjenta pozyskano oba typy komórek. Analizę przeprowadziłam przy użyciu pakietu MEDIPS. Ponieważ dane literaturowe dowodzą, że poziom 5hmC jest wyższy w genach aktywnych, specyficznych dla danej tkanki, analiza nastawiona była na poszukiwanie szerszych regionów wewnątrzgenowych i została wykonana dla szerokiego okna genomowego 450 pb, co stanowiło uśrednioną długość regionów hydroksymetylowanych w ASC i fibroblastach wytypowanych przez algorytm MACS.

Analiza zidentyfikowała 2520 różnicowo 5-hydroksymetylowanych regionów odróżniających ASC od fibroblastów; 1205 o większym oraz 1315 o niższym poziomie 5hmC

w komórkach ASC w porównaniu z fibroblastami. Dla porównania, badania porównujące profil metylacji pomiędzy MSC a fibroblastami wykazały 346 CpG o zwiększonej metylacji w MSC oraz 152 CpG o zwiększonej metylacji w fibroblastach. Badacze zaproponowali dwa miejsca CpG: w loci powiązanych z genem *C3orf35* oraz *CIDEA*, których różnicowa metylacja potencjalnie pozwala na rozróżnienie tych dwóch typów komórek (De Almeida i wsp., 2016). W innych badaniach wykazano, że 766 CpG było hiper-metylowanych w fibroblastach i 752 CpG było hiper-metylowanych w MSC (Koch i wsp., 2011). Badania te sugerują, że MSC faktycznie różnią się profilem epigenetycznym od fibroblastów. Liczba zidentyfikowanych regionów może sugerować, że profil 5hmC bardziej niż profil metylacji różnicuje mezynchymalne komórki macierzyste od fibroblastów. Z drugiej strony, różnice w liczebności regionów na korzyść hydroksymetylacji mogą wynikać z różnic metodologicznych. W wyżej wymienionych badaniach profil metylacji pozyskano przy użyciu techniki HumanMethylation27 BeadChip, która bada status metylacji jedynie konkretnych 27578 par CpG, a użyta w naszych badaniach technika hMeDIP-seq bada profil hydroksymetylacji w całym genomie.

Badania sugerują, że wysoki poziom 5hmC wewnątrz genów koreluje z ich wysoką ekspresją i jest charakterystyczny dla danej tkanki. Analiza procesów biologicznych powiązanych z genami leżącymi w obrębie intronów i eksonów powiązanych z DHMR różnicującymi ASC od fibroblastów nie wykazała jednak nadreprezentacji procesów biologicznych jednoznacznie powiązanych z badanymi typami komórek. Co ciekawe, w przypadku regionów 5hmC-ASC (540 genów), jedynie geny powiązane z trzema procesami biologicznymi były istotnie nadreprezentowane, a w przypadku regionów 5hmC-fibroblasty (640 genów) było tych procesów ponad sto. W przypadku obu analizowanych typów komórek, geny hiper-hydroksymetylowane były istotnie częściej niż wynika to z rachunku prawdopodobieństwa powiązane z rozwojem układu nerwowego. Dane te sugerują, że wytypowane przez mnie rejony różnie hydroksymetylowane w ASC i fibroblastach nie mają znaczenia funkcjonalnego. Analiza wytypowanych rejonów pod kątem ich występowania w poszczególnych strukturach genomu wykazała, że wśród regionów o większej hydroksymetylacji w ASC było ponad dwa razy więcej wysp CpG niż w fibroblastach. Co ciekawe, na 68 promotorów wśród regionów 5hmC-ASC, 32 zawierało wyspę CpG (47%), a w fibroblastach w regionach o zwiększonej zawartości 5hmC tylko 11% promotorów zawierało wyspę CpG (Rycina 24). Analiza ontologiczna genów powiązanych z hiper-hydroksymetylowanymi w ASC wyspami CpG leżącymi w obrębie promotorów genów



wykazała, że są one istotnie nadreprezentowane przez geny powiązane z różnicowaniem komórek, rozwojem struktur anatomicznych oraz cyklem komórkowym i morfogenezą. Może to sugerować, że 5hmC w wyspach CpG w obrębie promotorów genów warunkuje pluripotencję tych komórek. Analiza dystrybucji 5hmC w ASC wykazała, że poziom 5hmC jest wyższy w elementach regulatorowych gotowych do aktywacji. Możliwe więc, że wysoki poziom 5hmC w promotorach genów związanych z różnicowaniem znakuje je jako gotowe do aktywacji, a co za tym idzie warunkuje zdolność komórek ASC do różnicowania. Brak 5hmC w tych genach w przypadku fibroblastów może oznaczać, że są one już nieaktywne, dlatego fibroblasty wykazują zmniejszony potencjał do różnicowania.

Z drugiej strony, analiza profilu 5hmC w genomie ASC wykazała, że poziom 5hmC był wyższy w gotowych do aktywacji regionach CTCF oraz elementach wzmacniających, ale nie promotorach. Na potrzeby dyskusji przeprowadziłam dodatkową analizę poziomu 5hmC w promotorach zawierających wyspę CpG. Analiza ta nie wykazała znamienych różnic pomiędzy promotorami o różnej aktywności zgodnie z klasyfikacją z bazy Ensembl Regulatory Built. Należy jednak pamiętać, że dane na temat aktywności elementów regulatorowych pochodzą z zewnętrznej bazy danych stworzonej dla MSC pozyskanych w wyniku różnicowania komórek embrionalnych i dają one tylko orientacyjny pogląd na dystrybucję oraz aktywność elementów regulatorowych w analizowanych przez mnie ASC. Możliwe więc, że w obrębie wytypowanych przeze mnie hiper-hydroksymetylowanych wysp CpG w ASC znajdują się inne elementy regulatorowe charakterystyczne dla ASC. Weryfikacja tej hipotezy wymaga oczywiście dodatkowych badań.

Dodatkowym celem pracy było zidentyfikowanie regionów, które mogą podlegać identycznej, związanej z wiekiem różnicowej 5-hydroksymetylacji DNA niezależnie od tkanki. W tym celu porównałam związane z wiekiem DHMR wytypowane dla ASC z tymi wytypowanymi dla fibroblastów. Udało się zidentyfikować jeden wspólny region leżący w intronie genu *RSRP1*, mogący być uniwersalnym, tkankowo niezależnym związanym z wiekiem DHMR. Szerzej region ten został omówiony w sekcji „Związane z wiekiem DHMR – potencjalna rola” na stronie 103.

#### *Ograniczenia i zalety pracy*

Do ograniczeń pracy należy to, że w mojej grupie badanej obserwowałam duży zakres BMI. Wiadomo, że status otyłości może znacząco wpływać na biologię tkanki tłuszczowej, a także na proces starzenia i optymalnym byłoby przeprowadzenie analiz na materiale

pobranym od osób nieotyłych. Ponieważ nie było to jednak możliwe, w mojej analizie uwzględniłam potencjalny wpływ BMI na związane z wiekiem zmiany w poziomie badanych modyfikacji epigenetycznych, przeprowadzając analizę regresji. W analizie tej potwierdziłam, że zaobserwowane przeze mnie związane z procesem starzenia zmiany są niezależne od BMI.

Wiadomo, że proces hodowli komórkowej może wpływać na epigenom i biologię komórek, a model hodowli komórkowej nie odzwierciedla całkowicie biologii komórek w warunkach *in vivo* (Shen i wsp., 2006) (Meissner i wsp., 2008). Niestety, nie mieliśmy możliwości uzyskania odpowiednio dużej ilości tkanek do izolacji, aby wszystkie zaplanowane badania przeprowadzić na świeżo izolowanych ASC i niezbędne było założenie hodowli pierwotnych. Badania wykazują jednak, że młode hodowle komórkowe odznaczające się małą liczbą podwojeń populacji zachowują w dużej części cechy komórek świeżo izolowanych z tkanki (Boraldi i wsp., 2010) (Garitaonandia i wsp., 2015). Aby zminimalizować potencjalny wpływ hodowli na komórki i nie doprowadzić do starzenia się komórek *in vitro*, analizy przeprowadzone w ramach moich badań wykonane zostały na komórkach, które przeszły maksymalnie 5-6 podwojeń populacji.

Z kolei mocną stroną pracy jest jej innowacyjność. Związane z wiekiem zmiany w obrębie modyfikacji epigenetycznych w podskórnej tkance tłuszczowej i ASC nie zostały wcześniej zbadane ani opublikowane. Dodatkowo, badania poziomu modyfikacji DNA i ekspresji enzymów TET przeprowadzono kompleksowo. Zbadałam zarówno ekspresję mRNA jak i poziom białek TET. Jest to istotne, ponieważ zmiana poziomu mRNA nie zawsze koresponduje ze zmianą poziomu białka, a co za tym idzie – może nie mieć następstw biologicznych. Publikowane wyniki badań zmian ekspresji jedynie na poziomie mRNA mogą w związku z tym prowadzić do wyciągania fałszywych wniosków.

Tkanka tłuszczowa jest bardzo heterogenna pod względem składu komórkowego. Co więcej, jej skład komórkowy może różnić się pomiędzy pacjentami. Między innymi dlatego moje badania rozszerzone były o hodowle pierwotne ASC, co pozwoliło odnieść pozyskane wyniki do bardziej homogennej frakcji komórek. Zmiany w obrębie 5-hydroksymetylacji DNA zostały zbadane zarówno na poziomie globalnym jak i lokalnym przy użyciu nowoczesnych technik wielkoskalowych. Dodatkowo, analizę danych wielkoskalowych przeprowadziłam przy użyciu różnych algorytmów, aby uzyskać możliwie jak najwiarygodniejsze wyniki.

Przeprowadziłam też analizę dystrybucji 5hmC w genomie ASC, co uzupełnia znacznie wiedzę na temat potencjalnych następstw biologicznych jakie mogą nieść za sobą związane z wiekiem zmiany w obrębie tej modyfikacji.

#### *Innowacyjność pracy*

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania są **w całości innowacyjne**. Do tej pory nie przeprowadzono bowiem analiz związanych z wiekiem zmian w ilości enzymów TET ani zmian w hydroksymetylacji DNA jako elementu dryftu epigenetycznego w podskórnej tkance tłuszczowej oraz izolowanych z niej ASC. Ponadto, o znaczeniu i innowacyjności tych badań świadczy fakt przeprowadzenia ich na tkankach pochodzących od człowieka, a nie w modelach zwierzęcych czy w ustalonych hodowlach komórkowych poddanych procesowi starzenia replikacyjnego *in vitro*.

## VII. Podsumowanie

*Ad. celu 1 i 2. Zbadanie związanych z wiekiem różnic w globalnym poziomie 5hmC oraz ekspresji TET w ludzkiej podskórnej tkance tłuszczowej izolowanej z regionów chronionych przed promieniowaniem słonecznym oraz ASC izolowanych od osób młodych i starszych.*

Moje badania wykazały, że poziom 5hmC rośnie wraz z wiekiem w podskórnej tkance tłuszczowej człowieka. Analogicznie, poziom tej modyfikacji jest wyższy w ASC izolowanych od osób starszych w porównaniu do tych izolowanych od osób młodych. Zmiana poziomu 5hmC nie koreluje jednak ze zmianą poziomu białek TET ani w przypadku pełnej tkanki tłuszczowej ani izolowanych z niej ASC. Zaobserwowałam spadek stosunku 5fC do 5hmC. Zaobserwowałam również korelację pomiędzy wzrostem zawartości 5hmC a dłuższym czasem podwojenia populacji komórek w hodowli.

*Ad. celu 3. Analiza dystrybucji 5hmC w DNA ASC osób młodych i starszych oraz identyfikacja związanych z wiekiem DHMR w tych komórkach.*

Analiza dystrybucji 5hmC w ASC osób młodych wykazała podwyższony poziom tej modyfikacji w elementach regulatorowych takich jak regiony wiązania CTCF oraz regiony wzmacniające, a także w regionach powiązanych z modyfikacjami białek histonowych H2BK5ac, H3K23ac, H3K9ac. Poziom 5hmC był natomiast istotnie niższy w stosunku do reszty genomu w obrębie wysp CpG oraz regionach powiązanych z H3K4me3. Dodatkowo, poziom 5hmC był istotnie obniżony w obrębie elementów powtórzonych AluY i podwyższony w obrębie elementów HERVH-int.

Wytypowałam około 100 związanych z wiekiem DHMR w ASC. Regiony te lokalizowały się preferencyjnie poza wyspami CpG, a regiony hipo-hydroksymetylowane z wiekiem występowały częściej niż regiony losowe międzygenowo. Związane z wiekiem DHMR wspólne dla wszystkich wariantów analizy powiązane były z genami *TSPAN7*, *LIAT1*, *KLHL13*, *EYS*, *RBFOX1*.

*Ad. celu 4. Porównanie wpływu różnych parametrów na wyniki analizy różnicowej in silico w kontekście identyfikacji związanych z wiekiem DHMR.*

Wykonałam analizę różnicową przy użyciu trzech różnych algorytmów. Każda z analiz zidentyfikowała odmienną liczbę DHMR, przy czym najmniej regionów, 6 DHMR, było w przypadku analizy dla parametrów domyślnych. Najwięcej, 93 DHMR uzyskano w analizie

zoptymalizowanej dla wąskiego okna, zaś analiza zoptymalizowana dla szerokiego okna zidentyfikowała 71 DHMR. Większość regionów wytypowana przez algorytm dla ustawień domyślnych (5 na 6 regionów) pokrywała się z tymi zidentyfikowanymi przez oba algorytmy zoptymalizowane, natomiast 25 regionów pokrywało się pomiędzy analizami zoptymalizowanymi dla wąskiego i szerokiego okna.

*Ad. celu 5. Identyfikacja regionów różnicowo hydroksymetylowanych różnicujących komórki ASC od fibroblastów.*

Zidentyfikowałam 2520 5-hydroksymetylowanych regionów różnicujących ASC od fibroblastów. Wytypowane regiony nie były istotnie częściej niż wynika to z rachunku prawdopodobieństwa powiązane z procesami biologicznymi charakterystycznymi dla analizowanych typów komórek. Wśród regionów o zwiększonej hydroksymetylacji w ASC było więcej promotorów zawierających wyspę CpG niż w obrębie DHMR hiperhydroksymetylowanych w fibroblastach.

*Ad. celu 6. Identyfikacja związanych z wiekiem DHMR wspólnych dla ASC i fibroblastów.*

Region genomu leżący w obrębie intronu genu *RSRP1* był hiperhydroksymetylowany zarówno w ASC jak i fibroblastach osób starszych w porównaniu z komórkami osób młodych. Analiza ekspresji tego genu wykazała, że była ona niższa w ASC izolowanych od osób starszych w porównaniu do ASC izolowanych od osób młodych. Nie było różnic w ekspresji tego genu pomiędzy grupami wiekowymi w przypadku fibroblastów.

## VIII. Wnioski

Wyniki mojej pracy wskazują, że zmiany w poziomie oraz dystrybucji 5hmC w podskórnej tkance tłuszczowej człowieka oraz izolowanych z niej ASC stanowią element związanego z wiekiem dryftu epigenetycznego. Ponieważ znaczna część związanych z wiekiem DHMR znajdowała się w obrębie genów nie ulegających ekspresji w ASC, sugeruje to, że powstające w procesie starzenia zmiany w dystrybucji 5hmC mają w dużej części charakter jedynie markerowy. Z drugiej strony, zmiany poziomu 5hmC mogą wpływać na ekspresję genów, za czym przemawia zwiększony poziom 5hmC w elementach regulatorowych, a także zaobserwowana przeze mnie obniżona ekspresja *RSRP1* towarzysząca zwiększonemu poziomowi 5hmC w obrębie intronu tego genu u osób starszych. Również różnice w profilu hydroksymetylacji pomiędzy ASC i fibroblastami sugerują, że 5hmC może pełnić ważną rolę w epigenetycznej regulacji funkcjonowania ASC. Przynajmniej niektóre związane z wiekiem zmiany w poziomie i dystrybucji tej modyfikacji mogą więc być jedną z przyczyn obniżonego potencjału regeneracyjnego tych komórek, jakie obserwuje się u starszych osób. Zachowanie prawidłowego wzoru 5-hydroksymetylacji może być ważną strategią mającą na celu utrzymanie potencjału tych komórek do różnicowania oraz samoodnowy. Ponadto, związane z wiekiem zmiany w obrębie tej modyfikacji w przyszłości mogą posłużyć do udoskonalenia tzw. zegarów epigenetycznych i biologicznych służących do oceny wieku chronologicznego oraz biologicznego, jak również ryzyka występowania chorób związanych z wiekiem.

Zmiany w poziomie/dystrybucji 5hmC nie wynikają najprawdopodobniej ze zmian w ekspresji genów TET, a są prawdopodobnie następstwem zmieniającego się wraz z wiekiem mikrośrodowiska komórki, które oddziałuje na aktywność katalityczną tych enzymów. Dobrą strategią dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania enzymów TET, a co za tym idzie – ochrony epigenomu przed związanymi z wiekiem zmianami, może być stosowanie związków zwiększających aktywność tych białek takich jak  $\alpha$ -ketoglutaran lub witamina C.

Wreszcie, porównanie profilu 5hmC pomiędzy ASC a fibroblastami sugeruje, że związane z upływem czasu zmiany hydroksymetylacji DNA są w większości tkankowo specyficzne.

Porównanie różnych parametrów analizy różnicowej zmian w hydroksymetylacji DNA wskazuje, że zastosowanie poprawki FDR jest lepsze niż poprawki Bonferroniego, która może prowadzić do dużej liczby wyników fałszywie negatywnych. Dodatkowo, 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.

## IX. Bibliografia

- Adams-Cioaba MA, Min J. (2009). Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochem Cell Biol*, 87(1), 93–105.
- Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. (2015). CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells*, 7(2), 470-476.
- Aran D, Toperoff G, Rosenberg M, Hellman A. (2011). Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum Mol Genet*, 20(4), 670–680.
- Arioka Y, Watanabe A, Saito K, Yamada Y. (2012). Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. *PLoS One*, 7(9), e45031.
- Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, Arner P. (2010). Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*, 59(1), 105–109.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, Lebrasseur NK, Childs BG, Van De Sluis B, Kirkland JL, Van Deursen JM. (2011). Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–236.
- Bakshi A, Herke SW, Batzer MA, Kim J. (2016). DNA methylation variation of human-specific Alu repeats. *Epigenetics*, 11(2), 163–173.
- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee J-H, Leproust E, Park I-H, Xie B, Daley GQ, Church GM, Author NB. (2009). Targeted and genome-scale methylomics reveals gene body signatures in human cell lines. *Nat Biotechnol*, 27(4), 361–368.
- Bauer C, Göbel K, Nagaraj N, Colantuoni C, Wang M, Müller U, Kremmer E, Rottach A, Leonhardt H. (2015). Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-Linked N-Acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem*, 290(8), 4801–4812.
- Bennett EA, Keller H, Mills RE, Schmidt S, Moran JV, Weichenrieder O, Devine SE. (2008). Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Res*, 18(12), 1875–1883.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315–326.
- Boraldi F, Annovi G, Tiozzo R, Sommer P, Quagliano D. (2010). Comparison of *ex vivo* and *in vitro* human fibroblast ageing models. *Mech Ageing Dev*, 131(10), 625–635.
- Brohem CA, De Carvalho CM, Radoski CL, Santi FC, Baptista MC, Swinka BB, De C, De Araujo LRR, Graf RM, Feferman IHS, Lorencini M. (2013). Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *Int J Cosmet Sci*, 35(5), 448–457.
- Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. (2008). Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2), 115–120.



- Bühring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. (2007). *Ann N Y Acad Sci*, 1106(1), 262-71.
- Cakouros D, Hemming S, Gronthos K, Liu R, Zannettino A, Shi S, Gronthos S. (2019). Specific functions of TET1 and TET2 in regulating mesenchymal cell lineage determination, *Epigenetics Chromatin*, 12(1), 3.
- Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. (2009). The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*, 8(4), 268–276.
- Carmona-Gutierrez D, Hughes AL, Madeo F, Ruckenstein C. (2016). The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Res Rev*, 32, 2–12.
- Cartron PF, Nadaradjane A, LePape F, Lalier L, Gardie B, Vallette FM. (2013). Identification of TET1 partners that control its DNA-demethylating function. *Genes Canc*, 4(5–6), 235–241.
- Cartwright MJ, Tchkonja T, Kirkland JL. (2007). Aging in adipocytes: Potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol*, 42(6), 463–471.
- Caso G, McNurlan MA, Mileva I, Zemlyak A, Mynarcik DC, Gelato MC. (2013). Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. *Metabolism*, 62(3), 337–340.
- Cavalcante RG, Sartor MA. (2017). Annotatr: Genomic regions in context. *Bioinformatics*, 33(15), 2381–2383.
- Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: Going back to the future. *J Lipid Res*, 53(2), 227–246.
- Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, Gugliucci A, Kapahi P. (2018). The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: Bridging association and causality. *Cell Metab*, 28(3), 337–352.
- Chen CC, Wang KY, Shen CKJ. (2012). The mammalian *de novo* DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J Biol Chem*, 287(40), 33116–33121.
- Chen H, Dzitoyeva S, Manev H. (2012). Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in the mouse hippocampus. *Restor Neurol Neurosci*, 30(3), 237–245.
- Chen JJ, Roberson PK, Schell MJ. (2010). The false discovery rate: A key concept in large-scale genetic studies. *Cancer Control*, 17(1), 58–62.
- Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. (2013). TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, 493(7433), 561–564.
- Chèneby J, Ménétrier Z, Mestdagh M, Rosnet T, Douda A, Rhalloussi W, Bergon A, Lopez F, Ballester B. (2020). ReMap 2020: A database of regulatory regions from an integrative analysis of Human and Arabidopsis DNA-binding sequencing experiments. *Nucleic Acids Res*, 48(D1), D180–D188.
- Choi I, Kim R, Lim HW, Kaestner KH, Won KJ. (2014). 5-hydroxymethylcytosine represses the activity of enhancers in embryonic stem cells: A new epigenetic signature for gene regulation. *BMC Genomics*, 15(1), 670.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. (2014). Donor age negatively

- impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*, 12(1), 8.
- Chouliaras L, van den Hove D, Kenis G, Keitel S, Hof PR, van Os J, Steinbusch HW, Schmitz C, Rutten BP. (2014). Age-related increase in levels of 5-hydroxymethylcytosine in mouse hippocampus is prevented by caloric restriction. *Curr Alzheimer Res*, 9(5), 536–544.
- Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HWM, Coleman PD, Rutten BPF, van den Hove DLA. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*, 34(9), 2091–2099.
- Ciccarone F, Malavolta M, Calabrese R, Guastafierro T, Bacalini MG, Reale A, Franceschi C, Capri M, Hervonen A, Hurme M, Grubeck-Loebenstien B, Koller B, Bernhardt J, Schön C, Slagboom PE, Toussaint O, Sikora E, Gonos ES, Breusing N, Grune T, Jansen E, Dolle M, Moreno-Villanueva M, Sindlinger T, Burkle A, Zampieri M, Caiafa P. (2016). Age-dependent expression of DNMT1 and DNMT3B in PBMCs from a large European population enrolled in the MARK-AGE study. *Aging Cell*, 15(4), 755–765.
- Ciccarone F, Tagliatesta S, Caiafa P, Zampieri M. (2018). DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? *Mech Ageing Dev*, 174(1), 3–17.
- Cimmino L, Dawlaty MM, Ndiaye-Lobry D, Yap YS, Bakogianni S, Yu Y, Bhattacharyya S, Shaknovich R, Geng H, Lobry C, Mullenders J, King B, Trimarchi T, Aranda-Orgilles B, Liu C, Shen S, Verma AK, Jaenisch R, Aifantis I. (2015). TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nat Immunol*, 16(6), 653–662.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(14), 7841–7845.
- Coppieters N, Dieriks BV, Lill C, Faull RLM, Curtis MA, Dragunow M. (2014). Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol Aging*, 35(6), 1334–1344.
- Da Li, Cao T, Sun X, Jin S, Di Xie, Huang X, Yang X, Carmichael GG, Taylor HS, Diano S, Huang Y. (2020). Hepatic TET3 contributes to type-2 diabetes by inducing the HNF4 $\alpha$  fetal isoform. *Nat Commun*, 11(1), 342.
- De Almeida DC, Ferreira MRP, Franzen J, Weidner CI, Frobel J, Zenke M, Costa IG, Wagner W. (2016). Epigenetic classification of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Reports*, 6(2), 168–175.
- De Bustos C, Ramos E, Young JM, Tran RK, Menzel U, Langford CF, Eichler EE, Hsu L, Henikoff S, Dumanski JP, Trask BJ. (2009). Tissue-specific variation in DNA methylation levels along human chromosome 1. *Epigenetics Chromatin*, 2(1), 7.
- Deaton AM, Bird A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25(10), 1010–1022.
- Delatte B, Deplus R, Fuks F. (2014). Playing TETRIS with DNA modifications. *EMBO J*, 33(11), 1198–1211.

- Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic J-P, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguie F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, 360(22), 2289–2301.
- Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, Hematti P. (2016). Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol*, 136(2), 85–97.
- Deplus R, Delatte B, Schwinn MK, Defrance M, Méndez J, Murphy N, Dawson MA, Volkmar M, Putmans P, Calonne E, Shih AH, Levine RL, Bernard O, Mercher T, Solary E, Urh M, Daniels DL, Fuks F. (2013). TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J*, 32(5), 645–655.
- DiLoreto R, Murphy CT. (2015). The cell biology of aging. *Mol Biol Cell*, 26(25), 4524–4531.
- Doerge CA, Inoue K, Yamashita T, Rhee DB, Travis S, Fujita R, Guarnieri P, Bhagat G, Vanti WB, Shih A, Levine RL, Nik S, Chen EI, Abeliovich A. (2012). Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature*, 488(7413), 652–655.
- Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebé L, Layrolle P, Häupl T, Charbord P. (2008) Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*, 111(5), 2631-2635.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Dong E, Gavin DP, Chen Y, Davis J. (2012). Upregulation of TET1 and downregulation of APOBEC3A and APOBEC3C in the parietal cortex of psychotic patients. *Transl Psychiatry*, 2(9), e159.
- Dozmorov MG. (2015). Polycomb repressive complex 2 epigenomic signature defines age-associated hypermethylation and gene expression changes. *Epigenetics*, 10(6), 484–495.
- Dubnau J. (2018). The retrotransposon storm and the dangers of a Collyer's genome. *Curr Opin Genet Dev*, 49, 95–105.
- Dubois-Chevalier J, Oger F, Dehondt H, Firmin FF, Gheeraert C, Staels B, Lefebvre P, Eeckhoutte J. (2014). A dynamic CTCF chromatin binding landscape promotes DNA hydroxymethylation and transcriptional induction of adipocyte differentiation. *Nucleic Acids Res*, 42(17), 10943–10959.
- Fantuzzi G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 115(5), 911–919.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 473(7347), 398–404.

- Fidalgo M, Huang X, Guallar D, Sanchez-Priego C, Valdes VJ, Saunders A, Ding J, Wu WS, Clavel C, Wang J. (2016). Zfp281 coordinates opposing functions of Tet1 and Tet2 in pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 19(3), 355–369.
- Fransquet PD, Wrigglesworth J, Woods RL, Ernst ME, Ryan J. (2019). The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: A systematic review and meta-analysis. *Clin Epigenetics*, 11(1), 62.
- Freudenberg JM, Ghosh S, Lackford BL, Yellaboina S, Zheng X, Li R, Cuddapah S, Wade PA, Hu G, Jothi R. (2012). Acute depletion of Tet1-dependent 5-hydroxymethylcytosine levels impairs LIF/Stat3 signaling and results in loss of embryonic stem cell identity. *Nucleic Acids Res*, 40(8), 3364–3377.
- Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M. Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. (2000). *Mol Cell Biol*, 20(14), 5107-5118.
- Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. (2007). *Blood*, 109(4), 1743-1751.
- Garitaonandia I, Amir H, Boscolo FS, Wambua GK, Schultheisz HL, Sabatini K, Morey R, Waltz S, Wang YC, Tran H, Leonardo TR, Nazor K, Slavin I, Lynch C, Li Y, Coleman R, Gallego Romero I, Altun G, Reynolds D, Dalton S, Parast M, Loring JF, Laurent LC. (2015). Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS One*, 10(2), e0118307.
- Goel N, Karir P, Garg VK. (2017). Role of DNA methylation in human age prediction. *Mech Ageing Dev*, 166, 33–41.
- Goossens GH. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*, 94(2), 206–218.
- Goto S, Radak Z. (2013). Implications of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *J Sport Health Sci*, 2(2), 75–80.
- Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabó PE, Pfeifer GP, Li J, Xu GL. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), 606–612.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847–2849.
- Guan W, Guyot R, Samarut J, Flamant F, Wong J, Gauthier KC. (2017). Methylcytosine dioxygenase TET3 interacts with thyroid hormone nuclear receptors and stabilizes their association to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(31), 8229–8234.
- Guidotti A, Dong E, Gavin DP, Veldic M, Zhao W, Bhaumik DK, Pandey SC, Grayson DR. (2013). DNA methylation/demethylation network expression in psychotic patients with a history of alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res*, 37(3), 417–424.
- Guillermier C, Fazeli PK, Kim S, Lun M, Zuflacht JP, Milian J, Lee H, Francois-Saint-Cyr H, Horreard F, Larson D, Rosen ED, Lee RT, Lechene CP, Steinhauser ML. (2017). Imaging mass spectrometry demonstrates age-related decline in human adipose plasticity. *JCI Insight*, 2(5), e90349.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1

- promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), 423–434.
- Gustafson B, Nerstedt A, Smith U. (2019). Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat Commun*, 10(1), 2757.
- Haas RH. (2019). Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology (Basel)*, 8(2), 48.
- Hahn MA, Szabó PE, Pfeifer GP. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine: A stable or transient DNA modification? *Genomics*, 104(5), 314–323.
- Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. (2009). Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, 94(2):258–263.
- Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*, 49(2), 359–367.
- Haque A, Wang Z, Chandra S, Dong B, Khan L, Hamlen KW. (2017). FUSION - An online method for multistream classification. *International Conference on Information and Knowledge Management, Proceedings*, 919–928.
- Hattori M, Yokoyama Y, Hattori T, Motegi S ichiro, Amano H, Hatada I, Ishikawa O. (2015). Global DNA hypomethylation and hypoxia-induced expression of the ten eleven translocation (TET) family, TET1, in scleroderma fibroblasts. *Exp Dermatol*, 24(11), 841–846.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li N, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303–1307.
- Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*, 279(46), 48350–48359.
- Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sørensen TIA, Harvald B, Vaupel JW. (1996). The heritability of human longevity: A population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870–1900. *Hum Genet*, 97(3), 319–323.
- Hon GC, Song CX, Du T, Jin F, Selvaraj S, Lee AY, Yen CA, Ye Z, Mao SQ, Wang BA, Kuan S, Edsall LE, Zhao BS, Xu GL, He C, Ren B. (2014). 5mC oxidation by Tet2 modulates enhancer activity and timing of transcriptome reprogramming during differentiation. *Mol Cell*, 56(2), 286–297.
- Horvath S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14(10), R115.
- Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, Gentilini D, Di Blasio AM, Delledonne M, Mari D, Arosio B, Monti D, Passarino G, De Rango F, D'Aquila P, Giuliani C, Marasco E, Collino S, Descombes P, Garagnani P, Franceschi C. (2015). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany, NY)*, 7(12), 1159–1170.
- Hsieh CL. (1994). Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol*, 14(8), 5487–5494.

- Hu L, Lu J, Cheng J, Rao Q, Li Z, Hou H, Lou Z, Zhang L, Li W, Gong W, Liu M, Sun C, Yin X, Li J, Tan X, Wang P, Wang Y, Fang D, Cui Q, Yang P, He C, Jiang H, Luo C, Xu Y. (2015). Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature*, 527(7576), 118–122.
- Huffman DM, Barzilai N. (2010). Contribution of adipose tissue to health span and longevity. *Interdiscip Top Gerontol*, 37(1), 1–19.
- Ichihama K, Chen T, Wang X, Yan X, Kim BS, Tanaka S, Ndiaye-Lobry D, Deng Y, Zou Y, Zheng P, Tian Q, Aifantis I, Wei L, Dong C. (2015). The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells. *Immunity*, 42(4), 613–626.
- Igolkina AA, Zinkevich A, Karandasheva KO, Popov AA, Selifanova M V, Nikolaeva D, Tkachev V, Penzar D, Nikitin DM, Buzdin A. (2019). H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3 and H3K9me3 histone tags suggest distinct regulatory evolution of open and condensed chromatin landmarks. *Cells*, 8(9), 1034.
- Illingworth R, Kerr A, DeSousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A. (2008). A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol*, 6(1), 0037–0051.
- Ito R, Shimada H, Yazawa K, Sato I, Imai Y, Sugawara A, Yokoyama A. (2016). Hydroxylation of methylated DNA by TET1 in chondrocyte differentiation of C3H10T1/2 cells. *Biochem Biophys Reports*, 5(1), 134–140.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300–1303.
- James Kent W, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, 12(6), 996–1006.
- Ji D, Lin K, Song J, Wang Y. (2014). Effects of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine on Dnmt1 and DNMT3a-mediated cytosine methylation. *Mol Biosyst*, 10(7), 1749–1752.
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, 449(7159), 248–251.
- Jin B, Robertson KD. (2013). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol*, 754(1), 3–29.
- Jin C, Lu Y, Jelinek J, Liang S, Estecio MRH, Barton MC, Issa JPJ. (2014). TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells. *Nucleic Acids Res*, 42(11), 6956–6971.
- Jintaridith P, Mutirangura A. (2010). Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiol Genomics*, 41(2), 194–200.
- Jonas MI, Kurylowicz A, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Wierzbicki Z, Chmura A, Pruszczyk P, Puzianowska-Kuznicka M. (2015). Interleukins 6 and 15 levels are higher in subcutaneous adipose tissue, but obesity is associated with their increased content in

- visceral fat depots. *Int J Mol Sci*, 16(10), 25817–25830.
- Jones PA. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7), 484–492.
- Jura M, Kozak LP. (2016). Obesity and related consequences to ageing. *Age (Omaha)*, 38(1), 23.
- Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, Yamaji M, Saitou M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J*, 32(3), 340–353.
- Khare T, Pai S, Koncevicus K, Pal M, Kriukiene E, Liutkeviciute Z, Irimia M, Jia P, Ptak C, Xia M, Tice R, Tochigi M, Moréra S, Nazarians A, Belsham D, Wong AH, Blencowe BJ, Wang SC, Kapranov P, Kustra R, Labrie V, Klimasauskas S, Petronis A. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat Struct Mol Biol*, 19(10), 1037–1044.
- Kikis EA, Gidalevitz T, Morimoto RI. (2010). Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Adv Exp Med Biol*, 694(1), 138–159.
- Kim M, Costello J. (2017). DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med*, 49(4), e322.
- King GD, Rosene DL, Abraham CR. (2012). Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Omaha)*, 34(6), 1405–1419.
- Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Äijö T, Pastor WA, Segal MF, Li H, Koh KP, Lähdesmäki H, Hogan PG, Aravind L, Rao A. (2013). Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 497(7447), 122–126.
- Koch CM, Suschek C V, Lin Q, Bork S, Goergens M, Jousen S, Pallua N, Ho AD, Zenke M, Wagner W. (2011). Specific age-associated DNA methylation changes in human dermal fibroblasts. *PLoS One*, 6(2), e16679.
- Koch CM, Wagner W. (2011). Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany NY)*, 3(10), 1018-1027.
- Kochmanski J, Marchlewicz EH, Cavalcante RG, Sartor MA, Dolinoy DC. (2018). Age-related epigenome-wide DNA methylation and hydroxymethylation in longitudinal mouse blood. *Epigenetics*, 13(7), 779–792.
- Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A. (2011). Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 8(2), 200–213.
- Kohli RM, Zhang Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472–479.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9(1), 204.
- Korthauer K, Kimes PK, Duvallet C, Reyes A, Subramanian A, Teng M, Shukla C, Alm EJ, Hicks

- SC. (2019). A practical guide to methods controlling false discoveries in computational biology. *Genome Biol*, 20(1), 118.
- Kriaucionis S, Heintz N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science*, 324(5929), 929–930.
- Laird A, Thomson JP, Harrison DJ, Meehan RR. (2013). 5-hydroxymethylcytosine profiling as an indicator of cellular state. *Epigenomics*, 5(6), 655–669.
- Li E, Zhang Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(5), a019133.
- Li J, Wu X, Zhou Y, Lee M, Guo L, Han W, Mo W, Cao WM, Sun D, Xie R, Huang Y. (2018). Decoding the dynamic DNA methylation and hydroxymethylation landscapes in endodermal lineage intermediates during pancreatic differentiation of hESC. *Nucleic Acids Res*, 46(6), 2883–2900.
- Li K Le, Zhang L, Yang XM, Fang Q, Yin XF, Wei HM, Zhou T, Li Y Bin, Chen XL, Tang F, Li YH, Chang JF, Li W, Sun F. (2018). Histone acetyltransferase CBP-related H3K23 acetylation contributes to courtship learning in *Drosophila*. *BMC Dev Biol*, 18(1), 20.
- Li R, Zhou Y, Cao Z, Liu L, Wang J, Chen Z, Xing W, Chen S, Bai J, Yuan W, Cheng T, Xu M, Yang FC, Zhao Z. (2018). TET2 loss dysregulates the behavior of bone marrow mesenchymal stromal cells and accelerates Tet2<sup>-/-</sup> driven myeloid malignancy progression. *Stem Cell Reports*, 10(1), 166–179.
- Li Zhe, Cai X, Cai CL, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang FC, Xu M. (2011). Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 118(17), 4509–4518.
- Li Zhilong, Liu C, Xie Z, Song P, Zhao RCH, Guo L, Liu Z, Wu Y. (2011). Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLoS One*, 6(6), e20526.
- Lienhard M, Grimm C, Morkel M, Herwig R, Chavez L. (2014). MEDIPS: Genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments. *Bioinformatics*, 30(2), 284–286.
- Lin IH, Chen YF, Hsu MT. (2017). Correlated 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and gene expression profiles underpin gene and organ-specific epigenetic regulation in adult mouse brain and liver. *PLoS One*, 12(1), e0170779.
- Lin JR, Qin HH, Wu WY, He SJ, Xu JH. (2014). Vitamin C protects against UV irradiation-induced apoptosis through reactivating silenced tumor suppressor genes p21 and p16 in a Tet-dependent DNA demethylation manner in human skin cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 29(6), 257–264.
- Ling C, Rönn T. (2014). Epigenetic adaptation to regular exercise in humans. *Drug discovery today*, 19(7), 1015–1018.
- Liu M, Lei H, Dong P, Fu X, Yang Z, Yang Y, Ma J, Liu X, Cao Y, Xiao R. (2017). Adipose-derived mesenchymal stem cells from the elderly exhibit decreased migration and differentiation abilities with senescent properties. *Cell Transplant*, 26(9), 1505–1519.
- Lorsback RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. (2003). TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia



- containing the t(10;11)(q22;23). *Leukemia*, 17(3), 637–641.
- Losman JA, Kaelin WG. (2013). What a difference a hydroxyl makes: Mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev*, 27(8), 836–852.
- Lou H, Li H, Ho KJ, Cai LL, Huang AS, Shank TR, Verneris MR, Nickerson ML, Dean M, Anderson SK. (2019). The Human TET2 gene contains three distinct promoter regions with differing tissue and developmental specificities. *Front Cell Dev Biol*, 7(1), 99.
- Lu X, Sachs F, Ramsay LA, Jacques PÉ, Göke J, Bourque G, Ng HH. (2014). The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat Struct Mol Biol*, 21(4), 423.
- Luo Y, Lu X, Xie H. (2014). Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. *Biomed Res Int*, 2014(1), 784706.
- Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. (2014). *Stem Cells*, 32(6), 1408-1419.
- Ma L, Yuan L, An J, Barton MC, Zhang Q, Liu Z. (2016). Histone H3 lysine 23 acetylation is associated with oncogene TRIM24 expression and a poor prognosis in breast cancer. *Tumor Biol*, 37(11), 14803–14812.
- Mancuso P, Bouchard B. (2019). The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11(10), 137.
- Marina RJ, Sturgill D, Bailly MA, Thenoz M, Varma G, Prigge MF, Nanan KK, Shukla S, Haque N, Oberdoerffer S. (2016). TET-catalyzed oxidation of intragenic 5-methylcytosine regulates CTCF-dependent alternative splicing. *EMBO J*, 35(3), 335–355.
- Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. (2007). Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*, 109(10), 4245–4248.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), 766–770.
- Meng H, Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, Cao L. (2015). DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci*, 11(5), 604–617.
- Milholland B, Suh Y, Vijg J. (2017). Mutation and catastrophe in the aging genome. *Exp Gerontol*, 94(1), 34–40.
- Minor EA, Court BL, Young JI, Wang G. (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem*, 288(19), 13669–13674.
- Mizuno H. (2009). Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*, 76(2), 56–66.
- Mobley RJ, Abell AN. (2017). Controlling epithelial to mesenchymal transition through acetylation of histone H2BK5. *J Nat Sci*, 3(9), 432.
- Montalbán-Loro R, Lozano-Ureña A, Ito M, Krueger C, Reik W, Ferguson-Smith AC, Ferrón SR. (2019). TET3 prevents terminal differentiation of adult NSCs by a non-catalytic action at Snrpn. *Nat Commun*, 10(1), 1726.

- Moore LD, Le T, Fan G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38.
- Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Patel J, Zhao X, Perna F, Pandey S, Madzo J, Song C, Dai Q, He C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Nimer SD, Melnick A, Godley LA, Aifantis I, Levine RL. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 20(1), 11–24.
- Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M. (2018). An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. *Front Neurosci*, 12(1), 464.
- Morgan M SL. (2020). AnnotationHub: Client to access AnnotationHub resources. *R Packag. Version 2.22.0*.
- Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(25), 8905–8909.
- Moskalev AA, Shaposhnikov M V, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*, 12(2), 661–684.
- Mozhui K, Pandey AK. (2017). Conserved effect of aging on DNA methylation and association with EZH2 polycomb protein in mice and humans. *Mech Ageing Dev*, 162(1), 27–37.
- Musri MM, Carmona MC, Hanzu FA, Kaliman P, Gomis R, Párrizas M. (2010). Histone demethylase LSD1 regulates adipogenesis. *J Biol Chem*, 285(39), 30034–30041.
- Nakajima H, Kunimoto H. (2014). TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci*, 105(9), 1093–1099.
- Neri F, Dettori D, Incarnato D, Krepelova A, Rapelli S, Maldotti M, Parlato C, Paliogiannis P, Oliviero S. (2015). TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene*, 34(32), 4168–4176.
- Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, Katz E, Dixon JM, Harrison DJ, Meehan RR. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res*, 22(3), 467–477.
- Nishimura D. (2000). RepeatMasker. *Biotech Softw Internet Rep*, 1(1–2), 36–39.
- Palmer AK, Kirkland JL. (2016). Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. *Exp Gerontol*, 86(1), 97–105.
- Pardanani D, Lasho T, Lim K, Abdel-Wahab O, Patel J, Gangat N, Finke C, Schwager S, Mullally A, Li C, Hanson C, Mesa R, Pardanani A, Gilliland G, Levine R, Tefferi A. (2009). TET2 mutation prevalence and clinical correlates in a spectrum of myeloid neoplasms: A single institution study of 337 patients. *Haematol 14th Congr Eur Hematol Assoc*, 94(1), 420–421.
- Park MH, Kim DH, Lee EK, Kim ND, Im DS, Lee J, Yu BP, Chung HY. (2014). Age-related inflammation and insulin resistance: A review of their intricate interdependency. *Arch Pharm Res*, 37(12), 1507–1514.

- Pastor WA, Aravind L, Rao A. (2013). TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(6), 341–356.
- Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, Henderson HR, Lister R, Ko M, McLoughlin EM, Brudno Y, Mahapatra S, Kapranov P, Tahiliani M, Daley GQ, Liu XS, Ecker JR, Milos PM, Agarwal S, Rao A. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 473(7347), 394–397.
- Perera A, Eisen D, Wagner M, Laube SK, Künzel AF, Koch S, Steinbacher J, Schulze E, Splith V, Mittermeier N, Müller M, Biel M, Carell T, Michalakis S. (2015). TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression. *Cell Rep*, 11(2), 283–294.
- Pinto M, Moraes CT. (2015). Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med*, 85(1), 250–258.
- Previti C, Harari O, Zwir I, del Val C. (2009). Profile analysis and prediction of tissue-specific CpG island methylation classes. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 116.
- Putiri EL, Robertson KD. (2011). Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin Epigenetics*, 2(2), 299–314.
- Puzianowska-Kuźnicka M, Owczarz M, Wieczorowska-Tobis K, Nadrowski P, Chudek J, Slusarczyk P, Skalska A, Jonas M, Franek E, Mossakowska M. (2016). Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: The PolSenior study. *Immun Ageing*, 13(1), 21.
- R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, Whittaker P, McCann OT, Finer S, Valdes AM, Leslie RD, Deloukas P, Spector TD. (2010). Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res*, 20(4), 434–439.
- Rampersaud GC, Kauwell GPA, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. (2000). Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr*, 72(4), 998–1003.
- Rao LJ, Yi BC, Li QM, Xu Q. (2016). TET1 knockdown inhibits the odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells. *Int J Oral Sci*, 8(2), 110–116.
- Rasmussen Kasper D, Helin. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*, 30(7), 733–750.
- Rasmussen KD, Jia G, Johansen JV, Pedersen MT, Rapin N, Bagger FO, Porse BT, Bernard OA, Christensen J, Helin K. (2015). Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. *Genes Dev*, 29(9), 910–922.
- Reinisch A, Etchart N, Thomas D, Hofmann NA, Fruehwirth M, Sinha S, Chan CK, Senarath-Yapa K, Seo EY, Wearda T, Hartwig UF, Beham-Schmid C, Trajanoski S, Lin Q, Wagner W, Dullin C, Alves F, Andreeff M, Weissman IL, Longaker MT, Schallmoser K, Majeti R, Strunk D. (2015). Epigenetic and *in vivo* comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood*, 125(2),

- Riedel G, Rüdrieh U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FWR, Bock M. (2014). An extended  $\Delta$ CT-method facilitating normalisation with multiple reference genes suited for quantitative RT-PCR analyses of human hepatocyte-like cells. *PLoS One*, *9*(3), e93031.
- Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, Kheradpour P, Zhang Z, Wang J, Ziller MJ, et al. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, *518*(7539), 317–329.
- Robinson MD, Oshlack A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*, *11*(3), R25.
- Rodriguez J, Vives L, Jordà M, Morales C, Muñoz M, Vendrell E, Peinado MA. (2008). Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells. *Nucleic Acids Res*, *36*(3), 770–784.
- Rohde K, Keller M, Stumvoll M, Dietrich A, Blüher M, Böttcher Y. (2015). DNA 5-hydroxymethylation in human adipose tissue differs between subcutaneous and visceral adipose tissue depots. *Epigenomics*, *7*(6), 911–920.
- Rössner S. (2002). Obesity: The disease of the twenty-first century. *Int J Obes*, *26*, S2–S4.
- Sajic T, Hopfgartner G, Szanto I, Varesio E. (2011). Comparison of three detergent-free protein extraction protocols for white adipose tissue. *Anal Biochem*, *415*(2), 215–217.
- Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. (2015). 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: Potential role in the regulation of aging process. *Cell Mol Life Sci*, *72*(20), 3897–3914.
- Sang Y, Cheng C, Tang XF, Zhang MF, Lv X Bin. (2015). Hypermethylation of TET1 promoter is a new diagnostic marker for breast cancer metastasis. *Asian Pacific J Cancer Prev*, *16*(3), 1197–1200.
- Savvatis K, van Linthout S, Miteva K, Pappritz K, Westermann D, Schefold JC, Fusch G, Weithäuser A, Rauch U, Becher PM, Klingel K, Ringe J, Kurtz A, Schultheiss HP, Tschöpe C. (2012). Mesenchymal stromal cells but not cardiac fibroblasts exert beneficial systemic immunomodulatory effects in experimental myocarditis. *PLoS One*, *7*(7), e41047.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103*(5), 1412–1417.
- Sérandour AA, Avner S, Oger F, Bizot M, Percevault F, Lucchetti-Miganeh C, Palierne G, Gheeraert C, Barloy-Hubler F, Péron C Le, Madigou T, Durand E, Froguel P, Staels B, Lefebvre P, Métivier R, Eeckhoutte J, Salbert G. (2012). Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res*, *40*(17), 8255–8265.
- Shah S, McRae AF, Marioni RE, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Murphy L, Martin NG, Montgomery GW, Starr JM, Wray NR, Deary IJ, Visscher PM. (2014). Genetic and environmental exposures constrain epigenetic drift over the human life course. *Genome Res*, *24*(11), 1725–1733.

- Shammas MA. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14(1), 28–34.
- Shen Y, Chow J, Wang Z, Fan G. (2006). Abnormal CpG island methylation occurs during in vitro differentiation of human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet*, 15(17), 2623–2635.
- Siegfried Z, Simon I. (2010). DNA methylation and gene expression. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 55(3), 451–458.
- Skytthe A, Pedersen NL, Kaprio J, Stazi MA, Hjelmborg JVB, Iachine I, Vaupel JW, Christensen K. (2003). Longevity studies in GenomeEUtwin. *Twin Res*, 6(5), 448–454.
- Somineni HK, Zhang X, Biagini Myers JM, Kovacic MB, Ulm A, Jurcak N, Ryan PH, Khurana Hershey GK, Ji H. (2016). Ten-eleven translocation 1 (TET1) methylation is associated with childhood asthma and traffic-related air pollution. *J Allergy Clin Immunol*, 137(3), 797–805.
- Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, Li Y, Chen CH, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang B, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*, 29(1), 68–75.
- Soundararajan M, Kannan S. (2018). Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *J Cell Physiol*, 233(12), 9099–9109.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783–787.
- Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, Schöler A, Wirbelauer C, Oakeley EJ, Gaidatzis D, Tiwari VK, Schübeler D. (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature*, 480(7378), 490–495.
- Stark, R and Brown G. (2021). DiffBind: differential binding analysis of ChIP-Seq peak data. *Bioconductor*, 1–73.
- Steinhauser S, Kurzawa N, Eils R, Herrmann C. (2016). A comprehensive comparison of tools for differential ChIP-seq analysis. *Brief Bioinform*, 17(6), 953–966.
- Stroud H, Feng S, Morey Kinney S, Pradhan S, Jacobsen SE. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol*, 12(6), R54.
- Suelves M, Carrió E, Núñez-Álvarez Y, Peinado MA. (2016). DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation. *Brief Funct Genomics*, 15(6), 443–453.
- Szarc Vel Szic K, Declerck K, Vidaković M, Vanden Berghe W. (2015). From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: Is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin Epigenetics*. 7(1), 33.
- Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Han JW, Kim SS, Namburi S, Hermetz K, Kim JJ, Rudd MK, Yoon YS, Ren B, He C, Jin P. (2011). Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genet*, 7(6), e1002154.
- Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI,

- Vasanthakumar A, Godley LA, Chang Q, Cheng X, He C, Jin P. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, *14*(12), 1607–1616.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, *324*(5929), 930–935.
- Tanaka S, Ise W, Inoue T, Ito A, Ono C, Shima Y, Sakakibara S, Nakayama M, Fujii K, Miura I, Sharif J, Koseki H, Koni PA, Raman I, Li QZ, Kubo M, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Araki H, Miura F, Ito T, Kawakami E, Baba Y, Kurosaki T. (2020). Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity. *Nat Immunol*, *21*(8), 950–961.
- Taylor SE, Li YH, Smeriglio P, Rath M, Wong WH, Bhutani N. (2016). Stable 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) acquisition marks gene activation during chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, *31*(3), 524–534.
- Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* *9*(5), 667–684.
- Team R Development Core. (2018). A Language and Environment for Statistical Computing. In *R. Foundation for Statistical Computing*, <https://www.R-project.org>.
- Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Finke CM, Mullally A, Li CY, Pardanani A, Gilliland DG. (2009). Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: Clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR $\alpha$  correlates. *Leukemia*, *23*(5), 900–904.
- Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A. (2003). PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*, *13*(9), 2129–2141.
- Titorenko VI, Terlecky SR. (2011). Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic*, *12*(3), 252–259.
- To TK, Saze H, Kakutani T. (2015). DNA methylation within transcribed regions. *Plant Physiol*, *168*(4), 1219–1225.
- Toraño EG, Bayón GF, del Real Á, Sierra MI, García MG, Carella A, Belmonte T, Urduñigo RG, Cubillo I, García-Castro J, Delgado-Calle J, Pérez-Campo FM, Riancho JA, Fraga MF, Fernández AF. (2016). Age-associated hydroxymethylation in human bone-marrow mesenchymal stem cells. *J Transl Med*, *14*(1), 207.
- Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. (2019). The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther*, *195*(1), 172–185.
- Uribe-Lewis S, Carroll T, Menon S, Nicholson A, Manasterski PJ, Winton DJ, Buczacki SJA, Murrell A. (2020). 5-Hydroxymethylcytosine and gene activity in mouse intestinal differentiation. *Sci Rep*, *10*(1), 546.
- Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. (2015). Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie*, *116*, 103–113.
- Valentini E, Zampieri M, Malavolta M, Bacalini MG, Calabrese R, Guastafierro T, Reale A,

- Franceschi C, Hervonen A, Koller B, Bernhardt J, Eline Slagboom P, Toussaint O, Sikora E, Gonos ES, Breusing N, Grune T, Jansen E, Dollé MET, Caiafa P. (2016). Analysis of the machinery and intermediates of the 5hmC-mediated DNA demethylation pathway in aging on samples from the MARKAGE Study. *Aging (Albany NY)*, 8(9), 1896–1922.
- Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*, 32(14), 4100–4108.
- Van Deursen JM. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446.
- Wang L, Ozark PA, Smith ER, Zhao Z, Marshall SA, Rendleman EJ, Piunti A, Ryan C, Whelan AL, Helmin KA, Morgan MA, Zou L, Singer BD, Shilatifard A. (2018). TET2 coactivates gene expression through demethylation of enhancers. *Sci Adv*, 4(11), eaau6986.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet*, 39(4), 457–466.
- Wen L, Li X, Yan L, Tan Y, Li R, Zhao Y, Wang Y, Xie J, Zhang Y, Song C, Yu M, Liu X, Zhu P, Li X, Hou Y, Guo H, Wu X, He C, Li R, Qiao J. (2014). Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biol*, 15(3), R49.
- Wen L, Tang F. (2014). Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain. *Genomics*, 104(5), 341–346.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. *Springer-Verlag New York*. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wiehle L, Raddatz G, Musch T, Dawlaty MM, Jaenisch R, Lyko F, Breiling A. (2016). Tet1 and Tet2 protect DNA methylation canyons against hypermethylation. *Mol Cell Biol*, 36(3), 452–461.
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen J V, Cloos PAC, Rappsilber J, Helin K. (2011). TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 473(7347), 343–349.
- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun*, 2(1), 241.
- Wu DY, Bittencourt D, Stallcup MR, Siegmund KD. (2015). Identifying differential transcription factor binding in ChIP-seq. *Front Genet*, 6(1), 169.
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*, 25(7), 679–684.
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun Y, Zhang Y. (2011). Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 473(7347), 389–394.
- Xiao FH, He YH, Li QG, Wu H, Luo LH, Kong QP. (2015). A genome-wide scan reveals important roles of DNA methylation in human longevity by regulating age-related disease genes. *PLoS One*, 10(3), e0120388.

- Xiao FH, Wang HT, Kong QP. (2019). Dynamic DNA methylation during aging: A “prophet” of age-related outcomes. *Front Genet*, 18(10), 107.
- Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, Liu L, Liu Y, Yang C, Xu Y, Zhao S, Ye D, Xiong Y, Guan KL. (2012). Inhibition of  $\alpha$ -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev*, 26(12), 1326–1338.
- Xu C, Bian C, Lam R, Dong A, Min J. (2011). The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain. *Nat Commun*, 2(1), 227.
- Xu M, Palmer AK, Ding H, Weivoda MM, Pirtskhalava T, White TA, Sepe A, Johnson KO, Stout MB, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Tchkonian T, Kirkland JL. (2015). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife*, 19(4), e12997
- Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, Barbera AJ, Zheng L, Zhang H, Huang S, Min J, Nicholson T, Chen T, Xu G, Shi Y, Zhang K, Shi YG. (2011). Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*, 42(4), 451–464.
- Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, He R, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Kantarjian HM, Liang S, Estecio MR, Godley LA, Issa JPJ. (2015). TET2 mutations affect Non-CpG island DNA methylation at enhancers and transcription factor-binding sites in chronic myelomonocytic Leukemia. *Cancer Res*, 75(14), 2833–2843.
- Yang J, Guo R, Wang H, Ye X, Zhou Z, Dan J, Wang H, Gong P, Deng W, Yin Y, Mao SQ, Wang L, Ding J, Li J, Keefe DL, Dawlaty MM, Wang J, Xu GL, Liu L. (2016). Tet enzymes regulate telomere maintenance and chromosomal stability of mouse ESCs. *Cell Rep*, 15(8), 1809–1821.
- Yang YHK. (2018). Aging of mesenchymal stem cells: Implication in regenerative medicine. *Regen Ther*, 3(9), 120–122.
- Yeh SH, Liu CL, Chang RC, Wu CC, Lin CH, Yang KD. (2017). Aging-dependent DNA hypermethylation and gene expression of GSTM1 involved in T cell differentiation. *Oncotarget*, 8(30), 48591–48602.
- Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, Weng Z, Rando OJ, Fazio TG. (2011). Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*, 147(7), 1498–1510.
- Yin R, Mao SQ, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, Zhang D, Huang H, Gao J, Li Z, Jiao Y, Li C, Liu S, Wu D, Gu W, Yang YG, Xu GL, Wang H. (2013). Ascorbic acid enhances tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc*, 135(28), 10396–10403.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13(8), 335–340.
- Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song CX, Zhang L, Kim A, Li X, Dai Q, Shen Y, Park B, Min JH, Jin P, Ren B, He C. (2012). Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*, 149(6), 1368–1380.



- Yu P, Ji L, Lee KJ, Yu M, He C, Ambati S, McKinney EC, Jackson C, Baile CA, Schmitz RJ, Meagher RB. (2016). Subsets of visceral adipose tissue nuclei with distinct levels of 5-hydroxymethylcytosine. *PLoS One*, *11*(5), e0154949.
- Yue X, Lio CWJ, Samaniego-Castruita D, Li X, Rao A. (2019). Loss of TET2 and TET3 in regulatory T cells unleashes effector function. *Nat. Commun*, *10*(1), 2011.
- Zegerman P, Canas B, Pappin D, Kouzarides T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem*, *277*(14), 11621–11624.
- Zerbino DR, Wilder SP, Johnson N, Juettemann T, Flicek PR. (2015). The Ensembl Regulatory Build. *Genome Biol*, *16*(1), 56.
- Zhang J, Chen S, Zhang D, Shi Z, Li H, Zhao T, Hu B, Zhou Q, Jiao J. (2016). Tet3-mediated dna demethylation contributes to the direct conversion of fibroblast to functional neuron. *Cell Rep*, *17*(9), 2326–2339.
- Zhang Q, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J, Wong J. (2014). Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem*, *289*(9), 5986–5996.
- Zhang Y, Li T, Preissl S, Amaral ML, Grinstein JD, Farah EN, Destici E, Qiu Y, Hu R, Lee AY, Chee S, Ma K, Ye Z, Zhu Q, Huang H, Fang R, Yu L, Izpisua Belmonte JC, Wu J, Ren B. (2019). Transcriptionally active HERV-H retrotransposons demarcate topologically associating domains in human pluripotent stem cells. *Nat Genet*, *51*(9), 1380–1388.
- Zhang Z, Cao Y, Zhai Y, Ma X, An X, Zhang S, Li Z. (2018). MicroRNA-29b regulates DNA methylation by targeting Dnmt3a/3b and Tet1/2/3 in porcine early embryo development. *Dev Growth Differ*, *60*(4), 197–204.
- Zheng Y, Joyce BT, Liu L, Zhang Z, Kibbe WA, Zhang W, Hou L. (2017). Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements. *Nucleic Acids Res*, *45*(15), 8697–8711.
- Zhong J, Li X, Cai W, Wang Y, Dong S, Yang J, Zhang J, Wu N, Li Y, Mao F, Zeng C, Wu J, Xu X, Sun ZS. (2017). TET1 modulates H4K16 acetylation by controlling auto-acetylation of hMOF to affect gene regulation and DNA repair function. *Nucleic Acids Res*, *45*(2), 672–684.
- Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, *7*(3), 335–343.
- Zhu LJ, Gazin C, Lawson ND, Pagès H, Lin SM, Lapointe DS, Green MR. (2010). ChIPpeakAnno: A Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 237.