

Streszczenie

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

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

Celem niniejszej rozprawy była analiza zmian w poziomie, organizacji oraz wpływie na ekspresję genów wybranych modyfikacji histonu H3 oraz zbadanie jak to się przekłada na zmiany struktury chromatyny w komórkach poddanych różnym typom starzenia. Dodatkowo próbowano poznać udział HP1 α w procesie starzenia. Następnie porównano zmiany zachodzące w VSMC *in vitro* z tymi zachodzącymi *in vivo* w komórkach mięśni gładkich pochodzących z blaszek miażdżycowych oraz fibroblastach. Główny model badawczy stanowiły VSMC, które poddano starzeniu RS i PS. Czynnikiem indukującym PS była doksorubicyna oraz kurkumina. Ten sam model eksperymentalny zastosowano w przypadku fibroblastów. Ponadto, analizie poddano komórki mięśni gładkich pochodzące z blaszek miażdżycowych wyizolowane od 6 pacjentów.

W toku pracy szczegółowo scharakteryzowano zmiany architektury jądra i struktury chromatyny zachodzące w starzeniu komórek mięśni gładkich naczyń. Wykazano, że stopień rozluźnienia chromatyny jest zależny od typu starzenia i wiąże się ze

stopniowym spadkiem metylacji i acetylacji lizyn histonu H3 (H3K4me3, H3K9ac, H3K9me3, H3K27me3). Zaobserwowano również, że w starzeniu zanika oddziaływanie między H3K9me3 oraz HP1 α i dochodzi do akumulacji HP1 α w ciałkach PML, co może wpływać na destabilizację chromatyny. Ponadto, w VSMC wytypowano miejsca oddziaływań H3K9me3 z HP1 α w młodych komórkach oraz wykazano związane ze starzeniem zmiany w rozmieszczeniu H3K9me3 i H3K4me3 w genomie. Dodatkowo, na podstawie przeprowadzonych analiz zaproponowano przesiewową metodę oznaczania starych komórek w badanej populacji biorąc pod uwagę strukturę jądra i chromatyny. Dodatkowo, po raz pierwszy zaproponowano użycie dwóch białek, ANLN oraz CLDN1, w roli nowych znaczników starzenia, pozwalających odróżnić starzenie przyspieszone od replikacyjnego.

Słowa kluczowe: starzenie komórkowe; VSMC; miażdżyca; epigenetyka; jądro komórkowe; chromatyna

Summary

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

Cellular senescence is defined as an irreversible cell cycle arrest with preservation of full, albeit altered, metabolic functions. It can arise due to either exhaustion of replication potential (replicative senescence - RS) or exposure to various stressors (premature senescence - PS). Regardless of the trigger, both types of cellular senescence cause several morphological changes, particularly at the nuclear and gene expression level. These changes involve gradual loss of compact heterochromatin, and the formation of relaxed euchromatin. Several factors contribute to this transformation, including loss of histones, imbalances in the post-translational modifications of histones, disruptions in histone-remodeling enzymes, and alterations in proteins that stabilize chromatin structure. One such protein is HP1 α (Heterochromatin Protein 1 subunit α), which, by attaching to trimethylated lysine 9 of histone H3 (H3K9me₃), causes chromatin condensation, stabilization and gene silencing.

The main objective of this dissertation was to analyze changes in selected histone H3 modifications and their impact on chromatin structure and gene expression in senescent VSMC, fibroblasts and cells derived from atherosclerotic plaque. The second goal was to clarify the involvement of HP1 α in the process.

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

This study provides an extensive characterization of senescence-related changes occurring in cell nucleus. It was demonstrated that the degree of chromatin relaxation depends on the type of senescence and correlates with a gradual decrease in histone H3 methylation and acetylation (H3K4me₃, H3K9ac, H3K9me₃, H3K27me₃). Additionally, the study revealed the disruption of interactions between

H3K9me3 and HP1 α during senescence, leading to HP1 α accumulation in PML bodies, potentially contributing to chromatin destabilization. Based on CHIP-seq data, the characteristic sites of H3K9me3 and HP1 α interactions in young VSMC were selected. In addition, it was shown that VSMCs assume different distribution of H3K4me3 and H3K9me3 in the genome that depends on the type of senescence. Moreover, a screening method for identifying senescent cells in the examined population based on nuclear and chromatin structure has been proposed. Finally, ANLN and CLDN1 were introduced as novel senescence markers for distinguishing RS from PS.

Keywords: senescence; VSMC; atherosclerosis; epigenetics; nucleus; chromatin