

Starzenie organizmu związane jest ze spadkiem funkcjonalności tkanek i narządów oraz ze zwiększoną zachorowalnością na choroby wieku podeszłego. Starzenie komórkowe jest nierozdzielnie związane ze starzeniem całego organizmu. W komórce pojawia się szereg zmian dotyczących metabolizmu, ekspresji genów oraz struktury organelli komórkowych i makrocząstek. Zmiany te w znacznym stopniu dotyczą jądra komórkowego i struktury chromatyny. Nie tylko zwiększa się liczba uszkodzeń DNA, które akumulują się w komórce w procesie starzenia, ale dochodzi również do zmian w składzie białek związanych z prawidłowym funkcjonowaniem otoczki jądrowej (zmiana proporcji laminy a na korzyść progeryny). Obserwuje się również zmniejszenie puli heterochromatyny na rzecz euchromatyny oraz utratę histonów tworzących strukturę nukleosomową, co powoduje rozluźnienie chromatyny i prowadzi do zmiany/zaburzenia jej struktury i funkcjonowania, sprzyja powstawaniu uszkodzeń DNA, ale i zmienia ekspresję genów. Zaobserwowano, że w procesie starzenia dochodzi do zmian epigenetycznych zarówno w DNA jak i histonach. Starzeniu towarzyszy spadek poziomu metylacji histonu H3 na lizynie 9 (H3K9me3) oraz poziomu białka HP1, które wiąże się z H3K9me3 i jest niezbędne do tworzenia heterochromatyny.

Mimo, że przyczyny starzenia mogą być różne (skracanie telomerów prowadzące do starzenia replikacyjnego lub stres, indukujący starzenie przyspieszone), to komórka wyraża pewien zasób cech uniwersalnych. Jednakże obserwowane są również pewne różnice w fenotypie zależne od typu starzenia. Wiadomo ponad to, że nawet tak uniwersalny proces jak starzenie komórkowe może przebiegać inaczej w komórkach pochodzących z różnych tkanek (tzw. markery komórkowo specyficzne). Szczególnie mało wiadomo o tego typu różnicach (przyczyna starzenia, typ komórki) na poziomie chromatyny. Poza tym, istniejące dane, dotyczące zmian chromatyny towarzyszących starzeniu komórkowemu, są niejednokrotnie sprzeczne. Z jednej strony w komórkach obserwuje się miejsca silnie skondensowanej chromatyny tzw. SAHF (senescence associated heterochromatin foci), a z drugiej strony obserwowany jest ubytek histonów i deheterochromatynizacja. Nasze wstępne wyniki pokazały, że w przypadku komórek mięśni gładkich naczyń zmiany w modyfikacji histonów różnią się w zależności od typu starzenia. W starzeniu replikacyjnym dochodzi do spadku poziomu H3K9me3 i HP1 alfa oraz zmian organizacji HP1 alfa. W przypadku starzenia przyspieszonego, indukowanego stresem, nie obserwowano spadku poziomu H3K9me3 ani HP1 alfa a jedynie zmiany w organizacji HP1 alfa. Dlatego **celem projektu jest analiza zmian struktury chromatyny podczas starzenia replikacyjnego i przyspieszonego komórek mięśni gładkich naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem roli HP1 alfa w tym procesie oraz modyfikacji histonu H3. Postulujemy, że inny jest zakres modyfikacji histonu H3 w starzeniu replikacyjnym i w przyspieszonym oraz że deheterochromatynizacja jest charakterystyczna tylko dla starzenia replikacyjnego. Zamierzamy zidentyfikować geny, których obszary chromosomowe różnią się pod względem modyfikacji histonu H3 w obydwu typach starzenia i ustalić czy zmiany te mają wpływ na różnice w poziomie ekspresji genów. Planujemy sprawdzić, czy podobne zmiany towarzyszą starzeniu *in vitro* i *in vivo***

Planowana jest analiza modyfikacji histonu H3 (H3K9ac, H3K9me3, H3K27me3 i H3K4me3) oraz poziomu białka HP1 alfa w różnych typach starzenia komórkowego (ChIP-seq, immunocytochemia, Western blotting) oraz analiza struktury chromatyny (cięcie nukleazą mikrokokalną, *in situ* nick translation, AFM). Zamierzamy zidentyfikować geny, których obszary chromatynowe wykazują różnice w poziomie modyfikacji H3K9me3 i H3K4me3 w różnych typach starzenia - na podstawie wyników uzyskanych z ChIP-seq oraz ustalić czy zmiany modyfikacji H3K9 mają wpływ na różnice w poziomie ekspresji genów w zależności od typu starzenia (qPCR). Zbadamy ponadto wybrane modyfikacje w komórkach mięśni gładkich pochodzących z płytek miażdżycowych w celu porównania starzenia *in vitro* i *in vivo*.

W organizmie zachodzi zarówno starzenie replikacyjne jak i przyspieszone. Jak dotychczas brak jest znaczników pozwalających jednoznacznie odróżnić starzenie replikacyjne od przyspieszonego (poza analizą długości telomerów), zwłaszcza w przypadku starzenia zachodzącego *in vivo*. Poznanie różnic w modyfikacjach histonu H3 w komórkach starych jest szczególnie interesujące i ważne w przypadku komórek budujących naczynia. Biorą one udział w rozwoju miażdżycy, procesu, w którym rola starzenia komórkowego jest niebagatelna. Komórki naczyń są narażone na stres i są w bliskim kontakcie ze związkami znajdującymi się we krwi (leki, szkodliwe elementy pochodzące z pożywienia). Wiedza o różnicach w poziomie i modyfikacjach heterochromatyny podczas starzenia replikacyjnego i przyspieszonego może okazać się przydatna w określeniu markerów charakterystycznych dla poszczególnych typów starzenia. Znalezienie takich znaczników mogłoby mieć w przyszłości znaczenie diagnostyczne i posłużyć w badaniu wpływu związków/leków na starzenie komórek. Poznanie różnic w modyfikacjach chromatyny i wytypowanie genów, na których ekspresję ma to wpływ może się przyczynić do zrozumienia roli starzenia komórkowego w procesie miażdżycy, umożliwić prognozowanie skutków i znalezienie nowych potencjalnych markerów pomagających wcześniej określić stopień ryzyka, bądź nowych celów terapeutycznych. Znaczenia badaniom nadaje fakt, że możliwości spowalniania starzenia replikacyjnego są bardzo ograniczone, natomiast modyfikowanie, bądź unikanie starzenia przyspieszonego jest możliwe.