



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Bartosz, Górnikiewicz

Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Regulacja epigenetyczna a potencjał regeneracyjny ssaków. Badania globalnych profili metylacji w tkankach dorosłej myszy MRL/MpJ i w sercach noworodków myszy C57BL/6J.

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Epigenetic regulation and regenerative capacity in mammals. The analysis of genomic DNA methylation profiles in the tissues of adult MRL/MpJ mouse and murine neonatal hearts of the C57BL/6J strain.

Promotor

podpis

dr hab. inż. Paweł Sachadyn

Gdańsk, rok 2015

Spis treści

1.	Cel pracy	3
2.	Streszczenie	4
3.	Wstęp	6
3.1.	<i>Metylacja DNA, jako epigenetyczny mechanizm regulacji ekspresji genów....</i>	6
3.2.	<i>Mechanizmy epigenetyczne w regeneracji i gojeniu ran</i>	10
3.3.	<i>Modyfikacje histonów w procesie regeneracji i gojenia ran</i>	13
3.4.	<i>Metody badania metylacji DNA</i>	14
3.5.	<i>Zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ</i>	16
3.6.	<i>Regeneracja serca u noworodków myszy</i>	26
4.	Materiały i metody	30
4.1.	<i>Tkanki.....</i>	30
4.2.	<i>Izolacja kwasów nukleinowych</i>	30
4.3.	<i>Eksperymenty mikromacierzowe</i>	30
4.4.	<i>Narzędzia bioinformatyczne i bazy danych.....</i>	33
4.5.	<i>Techniki użyte do weryfikacji eksperymentów mikromacierzowych.....</i>	34
5.	Model I: dorosła mysz MRL/MpJ.....	36
5.1.	<i>Wyniki.....</i>	36
5.2.	<i>Dyskusja</i>	51
5.3.	<i>Podsumowanie.....</i>	63
6.	Model II: serca noworodków myszy C57BL/6J	65
6.1.	<i>Wyniki.....</i>	65
6.2.	<i>Dyskusja i podsumowanie</i>	79
7.	Uwagi końcowe	83
8.	Spis skrótów	86
9.	Literatura	87

1. Cel pracy

Celem tej pracy doktorskiej było zbadanie genomowych profili metylacji DNA, a w szczególności analiza związku pomiędzy różnicami w metylacji DNA i potencjałem regeneracyjnym w oparciu o znane modele regeneracji u ssaków: (i) myszy MRL/MpJ, która zamyka 2 mm otwory wycięte w małżowinie usznej bez wytworzenia blizny i wykazuje podwyższone zdolności regeneracyjne w innych tkankach, (ii) serca noworodków myszy, u których przed ukończeniem 7 dnia życia obserwuje się regenerację rozległych uszkodzeń lewej komory serca.

2. Streszczenie

W pracy tej otrzymano genomowe profile metylacji DNA dla dwóch modeli regeneracji u ssaków: (i) dorosłej myszy MRL/MpJ, która jest zdolna do zamykania otworów w małżowinie usznej oraz wykazuje podwyższone zdolności regeneracyjne w wielu innych narządach oraz (ii) sercach noworodków myszy, u których zachodzi regeneracja rozległych uszkodzeń lewej komory serca.

Zidentyfikowano szereg odmiennie metylowanych regionów DNA, regionów DMR, pomiędzy myszą MRL/MpJ oraz szczepami kontrolnymi C57BL/6J i BALB/c w różnych tkankach: szpiku kostnym, śledzionie, wątrobie, sercu i małżowinie usznej pochodzących od niezranionych zwierząt. W małżowinie usznej, geny znalezione w sąsiedztwie regionów DMR były związane z procesami wpływającymi na regenerację, takimi jak tworzenie przednio-tylnego wzorca ekspresji genów, stan zapalny i apoptoza. Regiony promotorowe tych genów posiadały miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego Smad1, należącego do szlaku sygnałowego Tgf β /Bmp. Ponadto wiele z tych genów było położone w sąsiedztwie *loci* cechy ilościowej zdolności do zamykania otworów w uszach.

W modelu serca noworodków myszy zidentyfikowano regiony DMR wyróżniające profile metylacji DNA w dniu 1, kiedy obserwowana jest zdolność do regeneracji, i późniejszymi stadiami: dniem 7, 2 oraz 8 tygodniem, kiedy zdolność ta zanika. Geny związane z regionami DMR odpowiedzialne były za rozwój serca oraz tworzenie przednio-tylnego wzorca ekspresji genów. W porównaniu z dniem 1, w dniu siódmym zaobserwowano przeważającą liczbę regionów DMR, w których nastąpił wzrost poziomu metylacji DNA. Analiza bioinformatyczna wyłoniła potencjalne czynniki transkrypcyjnej regulacji, którymi są, zaangażowane w morfogenezę serca Mef2c, Nr2f2, Tead4 oraz Mfsd6l, o funkcji bliżej nieznannej, mające miejsca wiązania w pobliżu odpowiednio około 25% i 50% z 929 regionów DMR.

Abstract

In this work a global DNA methylation analysis was performed in two mammalian models of regeneration: the adult MRL/MpJ mouse and neonatal murine hearts. The MRL/MpJ mouse is known to close through-and-through holes in the ear pinnae without scarring and to display enhanced regenerative responses in other tissues. Neonatal murine heart heals perfectly after partial resection.

A number of differentially methylated regions (DMRs) distinguishing between the MRL/MpJ mouse and the control C57BL/6J and BALB/c strains were identified in a selection of tissues: bone marrow, spleen, liver, heart and ear pinnae collected from uninjured animals. In the ear pinnae, the genes located in the vicinity of the DMRs were associated with key processes that contribute to regeneration such as anterior/posterior pattern specification, inflammation, and apoptosis. The regulatory regions of those genes were enriched in the target sequence motifs of Smad1 transcription factor which participates in Tgf β /Bmp signaling pathway. What is more, some of them were located within the intervals of the quantitative trait loci responsible for ear punch closure.

In the neonatal heart regeneration model a number of DMRs were identified in the heart between day 1, when the regenerative repair is observed, and later stages day 7, week 2, and week 8, when it declines. The genes associated with these DMRs are involved in heart development and anterior/posterior pattern specification. The critical transition from d1 to d7 is characterized by a considerable excess of genes increasing over those decreasing their methylation status. The transcription factors predicted to regulate the 929 genes increasing their methylation status from d1 to d7 include Mef2c, Nr2f2, Tead4, known to be involved in heart morphogenesis and together targeting over a forth part of differentially methylated genes, as well as Mfsd6l, which has no recognized function but targets over a half of differentially methylated genes.

3. Wstęp

3.1. Metylacja DNA, jako epigenetyczny mechanizm regulacji ekspresji genów

Metylacja DNA, obok kowalencyjnych modyfikacji histonów i działania niekodujących RNA, jest epigenetycznym mechanizmem regulacji ekspresji genów. U ssaków metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej w pozycji 5' pierścienia cytozyny w obrębie dinukleotydów CpG, w wyniku czego powstaje 5-metylocytozyna (5-meC) (Cheng 2011). Jednak warto pamiętać, że w embrionalnych komórkach macierzystych i mózgu metylacja DNA jest również odnajdywana poza tym kontekstem nukleotydowym (Ziller et al. 2011). Genom ssaków jest stosunkowo ubogi w dinukleotydy CpG, które występują średnio raz na 50-100 par zasad. Dodatkowo ich dystrybucja nie jest równomierna, a ich największe zagęszczenie obserwuje się w obrębie wysp CpG, CGI (ang. *CpG island*) (Smith and Meissner 2013). Metylacja DNA odgrywa ważną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak różnicowanie się komórek, rozwój organizmu, lionizacja, piętnowanie genomowe, represja regionów repetytywnych oraz utrzymanie stabilności genomu.

3.1.1. Metylotransferazy DNA

Przyłączanie grupy metylowej jest prowadzone przez metylotransferazy DNA, Dnmt (ang. *DNA methyltransferase*), których mechanizm działania oparty jest na wywijaniu cytozyny poza strukturę podwójnej helisy (ang. *base flipping*). Enzymy te wykorzystują S-adenozyl-L-metioninę jako donora grup metylowych. U ssaków występują trzy metylotransferazy DNA: metylazę DNA Dnmt1, która odtwarza wzór metylacji DNA na nowo syntetyzowanej nici po replikacji DNA, w miejscach hemimetylowanych, czyli na podstawie wzoru występującego na nici matrycowej, dzięki czemu jest on dziedziczony przez komórki potomne oraz prowadzące metylację *de novo*, Dnmt3a i Dnmt3b. Do rodziny białek Dnmt3 należy również pozbawione aktywności katalitycznej białko Dnmt3l. Tworzy ono tetrameryczne kompleksy wraz z metylazami Dnmt3a/b. Białko Dnmt3l jest zdolne do oddziaływania z N-terminalnymi częściami histonów, co umożliwia powiązanie mechanizmu metylacji DNA z modyfikacjami histonów (Cheng 2011). Mimo że główną funkcją Dnmt3a/b jest ustanawianie metylacji DNA *de novo*, ich aktywność jest również niezbędna w komórkach somatycznych (Spruijt and Vermeulen 2014).

3.1.2. Tlenowe pochodne metylocytozyny

Metylacja DNA nie jest jedyną modyfikacją zasad DNA u ssaków. 5-meC może ulegać dalszym przekształceniom w swoje tlenowe pochodne: 5-hydroksymetylocytozynę (5-hmC), formylocytozynę (5-fC) i karboksycytozynę

(5-caC), a proces ten prowadzony jest przez białka Tet1-3 (Kohli and Zhang 2013). Nie jest znany mechanizm enzymatyczny bezpośredniego odłączenia grupy metylowej od cytozyny w DNA w komórkach kręgowców. Usuwanie lub modyfikowanie wzoru metylacji DNA zachodzi za pośrednictwem wspomnianych pochodnych tlenowych i przebiega ono na dwa sposoby. W pierwszym 5-hmC nie jest rozpoznawana przez kompleks Dnmt1, co zapobiega odtworzeniu wzoru metylacji DNA po replikacji DNA. Mechanizm ten jest określany jako *aktywna modyfikacja - bierne rozcieńczenie*, ponieważ 5-hmC ulega rozcieńczeniu po każdej kolejnej replikacji DNA. Obok niego funkcjonuje mechanizm *aktywnej modyfikacji - aktywnego odtworzenia*, w którym pozostałe pochodne metylocytozyny, 5-fC i 5-caC, mogą być wycinane przez glikozylazę tymidynową Tdg, która jest elementem mechanizmu naprawy DNA typu BER (ang. *base excision repair*) (Kohli and Zhang 2013).

3.1.3. Białka wiążące dinukleotydy CpG

Sekwencje nukleotydowe zawierające dinukleotydy CpG są miejscem wiązania dla wielu białek wrażliwych na obecność metylacji DNA. Metylowane CpG są rozpoznawane przez białka rodziny MBP (ang. *methyl-binding proteins*), które posiadają charakterystyczną domenę wiążącą 5-mC MBD (ang. *methyl-CpG binding domain*), białka rodziny Kaiso, która rozpoznaje 5-mC przez domenę palców cynkowych oraz białka rodziny SRA (ang. *SET-and RING-associated domain*).

Białka te mogą wiązać DNA w sposób zależny lub niezależny od sekwencji DNA oraz mogą oddziaływać z deacetylazami histonów Hdac (ang. *histone deacetylase*), których działanie prowadzi do kondensacji chromatyny. Istnieje wiele białek rozpoznających tlenowe pochodne metylocytozyny, co sugeruje ich istotną funkcję w innych procesach niż demetylacja DNA, np. w regulacji transkrypcji (Spruijt and Vermeulen 2014). Niemetylowane dinukleotydy CpG są rozpoznawane przez białka posiadające domenę CXXC, które oddziałują z białkami Tet oraz metylazami histonów Kdm2a i Kdm2b, odpowiedzialnymi za ustanawianie znaczników aktywnej transkrypcji na powierzchni białek histonowych (Schubeler 2015).

3.1.4. Wpływ metylacji DNA na ekspresję genów

Jednym z dowodów na to, że metylacja DNA hamuje ekspresję genów jest obserwowany efekt inhibicji metylotransferaz DNA przez 5-azadeoksycytydynę, który skutkuje wzrostem poziomu ekspresji genów. Klasyczny model tłumaczący sposób regulacji ekspresji genów przez metylację DNA oparty jest na dwóch mechanizmach. Pierwszy z nich zakłada, że grupa metylowa stanowi zawadę steryczną dla czynników transkrypcyjnych, uniemożliwiając ich wiązanie się do elementów regulatorowych

promotora. Drugi mechanizm zakłada wiązanie białek rozpoznających 5-mC, które są składnikami kompleksów modelujących strukturę chromatyny oraz modyfikację białek histonowych. W obu przypadkach metylacja DNA skutkuje blokadą inicjacji transkrypcji, a tym samym wyciszeniem ekspresji genu (Spruijt and Vermeulen 2014). Rozwój technik umożliwiających badanie globalnych profili metylacji DNA umożliwił odkrycie bardziej złożonych mechanizmów regulacji, w których metylacja DNA w zależności od lokalizacji może mieć różny wpływ na ekspresję genu.

Regiony promotorowe zawierające CGI stosunkowo rzadko ulegają metylacji DNA. Ponadto, są one często pozbawione nukleosomów, które odgrywają istotną rolę w procesie metylacji DNA *de novo*. Metylacja DNA regionów promotorowych zawierających CGI jest obserwowana przede wszystkim w przypadku genów ulegających długoterminowej represji, np. genów wyciszonych w procesie piętnowania genowego lub lionizacji, czyli inaktywacji jednej z dwóch kopii chromosomu X u kobiet. Brak metylacji DNA w obrębie CGI jest cechą dotyczącą całego genomu, ponieważ ulega jej mniej niż 10% CGI (Jones 2012).

Duże zmiany w poziomie metylacji DNA, rzędu kilkudziesięciu procent, są obserwowane w przypadku genów o niskiej zawartości dinukleotydów CpG w regionach promotorowych. Jednocześnie poziom metylacji DNA jest odwrotnie skorelowany z poziomem ich ekspresji (Jones 2012). Promotory te najczęściej odpowiadają za ekspresję genów tkankospecyficznych lub genów eksprymowanych w komórkach macierzystych, np. *Nanog* (Hattori et al. 2007) i *Oct4* (Hattori et al. 2004).

Metylacja DNA może występować również w pozapromotorowych regionach DNA, np. wewnątrz genów lub wzmacniaczy (ang. *enhancer*) i izolatorów (ang. *insulator*) chromosomowych. Jednocześnie większość regionów, które ulegają tkankospecyficznej metylacji DNA znajduje się właśnie w regionach pozapromotorowych (Koh and Rao 2013). Chociaż regiony wewnątrzgenowe również są ubogie w dinukleotydy CpG, obecna w nich metylacja DNA może pełnić kilka istotnych funkcji. Przede wszystkim prowadzi ona do wyciszenia transkrypcji regionów repetytywnych i retrowirusów, jednocześnie umożliwiając transkrypcję genów gospodarza. Ponadto duże zmiany w poziomie metylacji DNA obserwowane są na granicy exon-intron, co może wpływać na kinetykę elongacji transkrypcji oraz alternatywne składanie transkryptów genów (Jones 2012). Trzeba również zaznaczyć, że większość genów posiada alternatywne miejsca startu transkrypcji, a tym samym, jeden promotor może znajdować się wewnątrz pierwotnego transkryptu, którego ekspresja jest kontrolowana przez inny promotor położony *powyżej*. Metylacja wewnętrznego promotora może regulować inicjację transkrypcji w jego obrębie, a jednocześnie nie wpływać na elongację transkryptu kontrolowaną przez promotor

położony *powyżej*. Ponadto metylacja DNA wewnątrz genu może wspomagać elongację transkrypcji (Jones 2012).

Wzmacniacze i izolatory chromosomowe stanowią kolejną grupę elementów genetycznych, które mogą ulegać metylacji DNA. Znajdują się one zazwyczaj w bardzo odległych od miejsc startu transkrypcji regionach DNA oraz są one ubogie w dinukleotydy CpG. Jednocześnie w regionach tych poziom metylacji DNA utrzymuje się na bardzo niskim poziomie oraz obserwuje się wiązanie w ich obrębie wielu enzymów zaangażowanych w procesy metylacji i demetylacji DNA (Jones 2012).

3.2. Mechanizmy epigenetyczne w regeneracji i gojeniu ran

Regeneracja polega na przywróceniu funkcjonalnych właściwości tkanek lub narządów po ich uszkodzeniu lub utracie. Dla prawidłowego przebiegu tego procesu kluczowe jest usunięcie uszkodzonych tkanek oraz zastąpienie ich przez proliferujące w miejscu zranienia komórki. Ponieważ większość narządów zbudowana jest z terminalnie zróżnicowanych komórek o bardzo ograniczonych zdolnościach do podziałów, konieczne jest ich odróżnicowanie oraz ponowne zróżnicowanie. Metylacja DNA odgrywa istotną rolę w zdolności komórek do podziałów i różnicowania. Przykładowo geny markerowe komórek macierzystych *Nanog* i *Oct4*, które wpływają na ich zdolność do samoodnowy i pluripotencji, są wyciszane przez metylację DNA ich regionów promotorowych (Hattori et al. 2004, Hattori et al. 2007). Ponadto przeprogramowaniu komórek somatycznych do indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych iPSC (ang. *induced pluripotent stem cells*) towarzyszy zmiana genomowych profili metylacji DNA, która dodatkowo zależy od użytych do procesu przeprogramowania czynników transkrypcyjnych (Planello et al. 2014).

Ponieważ metylacja DNA odgrywa istotną rolę w procesie różnicowania się komórek na etapie rozwoju embrionalnego, wydaje się, że musi ona mieć znaczenie również w procesie regeneracji. Metylacja DNA w procesie regeneracji może dotyczyć przeprogramowania regulatorowych regionów DNA związanych z genami biorącymi udział w procesie regeneracji (Powell et al. 2013), trwałym wyłączeniem szlaków sygnałowych związanych z rozwojem organizmu (Felician et al. 2014), metabolizmem kwasu foliowego (Iskandar et al. 2010), a nawet epigenetycznym dziedziczeniem międzypokoleniowym (Zeybel et al. 2012).

3.2.1. Metylacja DNA w regeneracji u danio pręgowanego

Regeneracja płetwy u Danio pręgowanego to klasyczne modele regeneracji. W 30 godzinie po amputacji płetwy u danio obserwowany jest spadek globalnego poziomu 5-mC oraz 5-hmC w miejscu amputacji. Poziom 5-mC odnawia się po 72 godzinach, podczas gdy 5-hmC utrzymuje się na niskim poziomie. Jednocześnie zmiany w globalnych poziomach 5-mC i 5-hmC wiążą się ze wzrostem poziomu ekspresji genów zaangażowanych w procesy naprawy DNA (*gadd45g*) oraz spadkiem ekspresji odpowiedzialnych za proces demetylacji DNA (*tet*, *apobec2b*) (Hirose, Shimoda and Kikuchi 2013). Podczas procesu odtwarzania amputowanej płetwy obserwuje się wzrost poziomu ekspresji metylotransferaz DNA (*dmnt3aa*, *dmnt3ab*, *dnmt4*) (Takayama et al. 2014).

Przeprogramowanie epigenetyczne u danio zostało dobrze opisane w przypadku regeneracji siatkówki. W procesie tym komórki Müllera (MG) ulegają przeobrażeniu



w komórki progenitorowe (MGPC, ang. *Müller glia progenitor cell*). Procesowi temu towarzyszy indukcja wielu genów związanych z procesami metylacji i demetylacji DNA. W badaniu tym 5-azadeoksytydyna nie wpływała na proces odróżnicowania MG, ale ograniczała proliferację, migrację i różnicowanie się komórek potomnych MGPC. Chociaż procesowi odróżnicowania MG towarzyszy zmiana poziomu metylacji DNA wielu dinukleotydów CpG oraz wzrost poziomu ekspresji związanych z nimi genów, regiony promotorowe genów pluripotencji nie ulegają demetylacji, a co więcej są trwale hipometylowane (Powell et al. 2013). Oznacza to, że regeneracja siatkówki u danio wynika z trwałej zdolności MG do przeprogramowania, a zmiany w metylacji DNA dotyczą genów regulowanych przez czynniki pluripotencji.

3.2.2. Metylacja genu *Shh* uniemożliwia regenerację u płatany szponiastej

Dorosłe osobniki płatany szponiastej (*Xenopus laevis*) są niezdolne do odtwarzania amputowanych kończyn. Odrastanie odnóży jest jednak obserwowane u jej kijanek przed ukończeniem procesu przeobrażenia. U dorosłych osobników wprawdzie powstaje blastema, ale proces regeneracji zatrzymuje się na etapie chrzęstnego kikutu. Utracie zdolności do odrastania kończyny u żaby, towarzyszy hipermetylacja wzmacniacza chromosomowego genu *Shh*, który odpowiada za różnicowanie się kończyn. Metylacja DNA obecna w tym regionie uniemożliwia ekspresję *Shh* oraz indukcję wielu genów regulowanych przez ten czynnik. U kijanek, ale również dorosłych traszek, region ten nie jest metylowany, przez co po amputacji możliwe jest odtworzenie funkcjonalnej kończyny (Yakushiji et al. 2007). Jednocześnie aktywacja *Shh* u młodych żab pozwala na odtworzenie funkcjonalnej kończyny (Yakushiji et al. 2009). W badaniu tym zanik zdolności regeneracyjnych związany jest z epigenetycznym wyłączeniem szlaków sygnałowych zaangażowanych w tworzenie wzorca ekspresji genów.

3.2.3. Szlak Notch w regeneracji serca u noworodków

Rola Notch1 w stymulacji proliferacji kardiomiocytów jest kolejnym przykładem, w którym metylacja DNA powoduje wyłączenie procesów rozwojowych, co wpływa na zdolność do regeneracji. Noworodki myszy są zdolne do regeneracji rozległych uszkodzeń serca (Porrello et al. 2011b). Jednak krótko po urodzeniu, w kardiomiocytach zostaje trwale zatrzymany postęp cyklu komórkowego (Walsh et al. 2010), co jest związane m.in. ze spadkiem ekspresji Notch1 (Felician et al. 2014). Chociaż wymuszona nadekspresja Notch1 wydłuża zdolność kardiomiocytów do proliferacji, podobne wymuszenie jej u dorosłych osobników nie wpływa na zdolności

regeneracyjne serca. Ma to związek z przeprogramowaniem epigenetycznym regionów promotorowych regulowanych przez *Notch1* genów *Hes1*, *Hey1* i *Hey2* oraz samego genu *Notch1* (Felician et al. 2014).

3.2.4. Stymulacja regeneracji układu nerwowego za pomocą kwasu foliowego

Kwas foliowy jest wymagany do prawidłowego rozwoju układu nerwowego, ale również jest substratem do syntezy zasad DNA oraz źródłem grup metylowych dla metylacji DNA. Podawanie bardzo wysokich dawek kwasu foliowego stymuluje regenerację neuronów rdzeniowych, poprzez zatrzymanie globalnej demetylacji DNA w neuronach. Kwas foliowy indukuje ekspresję receptorów Folr1, które odpowiadają za jego transport do wnętrza komórek, w wyniku czego aktywność metylotransferaz DNA *de novo* ulega zwiększeniu. Skutkuje to wzrostem poziomu globalnej i lokalnej (w genie *Gadd45a*) metylacji DNA. Substancje działające agonistycznie i antagonistycznie na metabolizm kwasu foliowego, w sposób zależny od dawki, wpływają odpowiednio pozytywnie i negatywnie na proces regeneracji neuronów centralnego układu nerwowego (Iskandar et al. 2010).

3.2.5. Epigenetyczna adaptacja do gojenia wątroby u potomstwa szczurów poddanych uszkodzeniu wątroby

Bardzo ciekawy mechanizm epigenetyczny regulujący zdolność do regeneracji został wykryty podczas badań nad chronicznym uszkodzeniem wątroby przez czterochlorek węgla (CCl_4) (Zeybel et al. 2012). Zaobserwowano, że uszkodzenie wątroby u szczurów wywołuje adaptację do gojenia tego typu uszkodzeń u ich potomstwa. Dziedziczna adaptacja dotyczy właściwości komórek gwieździstych, które wpływają na proces włóknienia wątroby. U potomstwa szczurów, u których wywołano uszkodzenie wątroby, obserwuje się zmniejszoną zdolność komórek gwieździstych do różnicowania w miofibroblasty. W wątrobie potomstwa obserwuje się zmniejszoną metylację DNA w regionach promotorowych genów *Ppar γ* i *Ppar α* oraz zwiększoną metylację w promotorze genu *Tgfg1*. Przypuszcza się, że przekazanie zdolności do regeneracji następuje poprzez modyfikację struktury chromatyny i metylacji DNA w spermie zwierząt poddanych uszkodzeniu wątroby, która to modyfikacja może następować w wyniku uwolnienia do krwioobiegu niezidentyfikowanego dotąd czynnika stymulującego przeprogramowanie. Ponieważ zmiany te powinny dotyczyć całego organizmu, Zeybel et al. (Zeybel et al. 2012) sprawdzili jak wpływają one na proces zwłóknienia nerek, który wykazuje szereg podobieństw patomorfologicznych do procesu zwłóknienia wątroby. W tym wypadku zaobserwowana adaptacja nie wpłynęła

na regenerację nerek, a więc przekazywana zdolność do regeneracji dotyczyła przede wszystkim wątroby, chociaż bez dokładnego zbadania innych typów uszkodzeń trudno przesądzić, czy nie wpływa ona na zdolności innych narządów do regeneracji (Zeybel et al. 2012).

3.3. Modyfikacje histonów w procesie regeneracji i gojenia ran

Regulacja struktury chromatyny, wnikająca z modyfikacji białek histonowych lub obecności różnych wariantów histonów, jest obok metylacji DNA kolejnym mechanizmem kontrolującym ekspresję genów, a tym samym mającym wpływ na zdolność do regeneracji. Spośród różnych protein kontrolujących strukturę chromatyny do najlepiej poznanych należą białka z grupy *Polycomb* (PcG) i grupy *Trithorax* (TrxG). Kompleksy białek PcG, PRC1 i PRC2 (ang. *Polycomb Repressive Complex*) odpowiedzialne są za wprowadzanie modyfikacji histonów związanych z wyciszeniem ekspresji genów np. trimetylacji 27 lizyny histonu 3 (H3K27me3), podczas gdy białka grupy TrxG wprowadzają modyfikacje związane z aktywną transkrypcją, np. trimetylacja 4 lizyny histonu 3 (H3K2me3) (Katsuyama and Paro 2011).

W embrionalnych komórkach macierzystych obserwuje się tzw. biwalentne domeny chromatyny, które posiadają zarówno wyciszające, jak i aktywujące znaczniki chromatyny. Uważa się, że wspólne występowanie tych znaczników utrzymuje geny związane z rozwojem w stanie wyciszenia, ale jednocześnie gotowości w przypadku rozpoczęcia różnicowania. Z czasem domeny te ulegają trwałej represji i kondensacji w heterochromatynę, a w dojrzałych komórkach macierzystych poszczególnych tkanek obserwuje się występowanie tych domen jedynie w pobliżu genów charakterystycznych dla różnicowania danej tkanki (Barrero and Izpisua Belmonte 2011).

Podczas gojenia ran skóry u myszy zaobserwowano spadek poziomu ekspresji genów kodujących białka kompleksu PRC2: *Eed*, *Ezh2* i *Suz12*, a jednocześnie zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów *Utx* i *Jmjd3*, które kodują demetylazy H3K27 i są związane z kompleksami TrxG (Shaw and Martin 2009). Podobne zwiększenie poziomu ekspresji genu *Jmjd3* obserwowane jest w blastemie podczas odrastania płetwy u danio pręgowanego (Stewart, Tsun and Izpisua Belmonte 2009). Dodatkowo zaburzenie funkcji PcG u muszki owocowej zwiększa prawdopodobieństwo transdeterminacji dysków imaginalnych po ich uszkodzeniu, np. dysku odnóży w dysk skrzydeł (Katsuyama and Paro 2011).

3.4. Metody badania metylacji DNA

Zamiana C na 5-meC w DNA nie zmienia temperatury topnienia DNA, ani odczytu w sekwencjonowaniu kapilarnym DNA i jest stosunkowo trudna do wykrycia. Do identyfikacji 5-meC w genomowym DNA używane są najczęściej następujące podejścia: trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację CpG, precypitacja fragmentów DNA zawierających 5-meC za pomocą przeciwciał (MeDIP, ang. *methylated DNA immunoprecipitation*) lub innych białek wiążących 5-meC oraz chemiczna modyfikacja DNA przy użyciu wodorosiarczynu (IV) sodu (NaHSO_3), znana jako konwersja wodorosiarczynowa (ang. *bisulphite conversion*).

Tak przygotowane DNA może być analizowane za pomocą szeregu metod opartych na amplifikacji PCR, sekwencjonowaniu, spektrometrii masowej, hybrydyzacji oraz sekwencjonowaniu nowej generacji NGS. Ponieważ, każda z metod wstępnych może być użyta z każdą z tych metod analitycznych istnieje mnóstwo różnych procedur i ich odmian (Fazzari and Grealley 2010, Tang et al. 2015, Umer and Herceg 2013, Laird 2010). Do najczęściej wykorzystywanych metod umożliwiających badanie metylacji DNA w obrębie danego *locus* należą: amplifikacja DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowanie produktów PCR po chemicznej modyfikacji DNA. Do analizy genomowych profili metylacji DNA wykorzystywane są techniki oparte na hybrydyzacji jak mikromacierze DNA lub sekwencjonowanie nowej generacji.

Seqwencjonowanie wodorosiarczynowe (ang. *bisulphite sequencing*) jest techniką polegającą na sekwencjonowaniu metodą Sanger produktów PCR po reakcji konwersji matrycowego DNA. W wyniku konwersji niemetylowana C ulega deaminacji do uracylu i jest ona rozpoznawana przez polimerazę DNA w reakcji PCR jako tymina, podczas gdy 5-meC pozostaje niezmodyfikowana. Gdy uzyskane po konwersji matrycowego DNA produkty PCR zostaną wklonowane do plazmidu, technika ta umożliwia badanie wzorów metylacji DNA dla pojedynczej cząsteczki DNA.

Amplifikacja za pomocą reakcji PCR DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi jest kolejną techniką umożliwiającą badanie metylacji DNA w obrębie danego *locus*. Technika ta wykorzystuje enzymy restrykcyjne, które posiadają w swojej sekwencji rozpoznawania dinukleotydy CpG i jednocześnie ich aktywność jest wrażliwa na obecność grupy metylowej. Dlatego w zależności od wyniku trawienia takim enzymem można uzyskać informację o poziomie metylacji DNA dla dinukleotydów CpG znajdujących się w obrębie sekwencji rozpoznawania danego enzymu restrykcyjnego. Przykładem takiego enzymu jest *HpaII* rozpoznający sekwencję [CCGG] lub enzym trawiący cząsteczki DNA zawierający zmetylowane cytozyny *McrBC* rozpoznający sekwencję [R5-meC(N)₄₀₋₃₀₀R5-meC].

Wśród technik umożliwiających badanie metylacji DNA w obrębie całych genomów na uwagę zasługuje wykorzystana w tej pracy technika MeDIP-chip. W technice tej genomowe DNA jest poddawane fragmentacji, a następnie dzielone na dwie pule, z których jedna jest poddana immunoprecypitacji za pomocą przeciwciała specyficznego wobec 5-meC (MeDIP, ang. *methylated DNA immunoprecipitation*), podczas gdy druga służy jako próbka kontrola (INPUT). Obie pule są znakowane fluorescencyjnie innymi znacznikami i poddane hybrydyzacji na dwukolorowych mikromacierzach. Poprzez porównanie fluorescencji obu pul DNA można zaobserwować, które fragmenty DNA uległy immunoprecypitacji, a więc są związane ze zmetylowanymi regionami DNA. Inne metody oparte na hybrydyzacji DNA do mikromacierzy to CHARM (ang. *comprehensive high-throughput arrays for relative methylation*), która w reakcji wstępnej wykorzystuje trawienie DNA za pomocą enzymów restrykcyjnych oraz *Infinium* firmy Illumina, która wykorzystuje konwertowane genomowe DNA i umożliwia procentowe oznaczanie poziomu metylacji DNA dla pojedynczych CpG w badanych próbkach.

W związku z rozwojem technik sekwencjonowania nowej generacji obecnie jest możliwe wykonanie sekwencjonowania całego genomu, które połączone z reakcją konwersji DNA umożliwia zbadanie genomowych profili metylacji DNA. Główną trudnością w jej wykorzystaniu wynika z małej złożoności sekwencji DNA po reakcji konwersji DNA, która utrudnia identyfikację genomowych lokalizacji uzyskanych sekwencji. Popularną metodą badania metylacji DNA opartą na NGS jest RRBS (ang. *reduced representation bisulphite sequencing*), która w celu zmniejszenia złożoności uzyskanych sekwencji wykorzystuje do reakcji konwersji DNA fragmenty o długości ~50-200 pz, które powstają po trawieniu enzymami restrykcyjnymi zawierającymi dinukleotydy CpG w sekwencji rozpoznawania genomowego DNA, które umożliwiają wzbogacenie sekwencji bogatych w CpG.

3.5. Zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ

Biologiczną odpowiedź na zranienie można podzielić na dwie kategorie: *regenerację* i *naprawę*. *Regeneracja* polega na zastąpieniu i odnowieniu tkanek o normalnej architekturze i funkcji, w ekstremalnym znaczeniu, całych organów lub narządów. *Naprawa* natomiast polega na szybkim zamykaniu rany poprzez wytworzenie ziarniny, a następnie blizny. W porównaniu do płazów, u których może nastąpić odtworzenie całej kończyny po amputacji, zdolność do regeneracji u ssaków jest bardzo ograniczona. Istnieje jednak szereg wyjątków jak odtwarzanie wątroby po resekcji znaczącej jej części (Kwon, Lee and Choi 2015), żebra pod warunkiem zachowania okostnej (Srouf et al. 2015), odrastania końcówek palców pod warunkiem zachowania nasady paznokcia (Borgens 1982). Ponadto wymienić można kilka innych fenomenów regeneracji u ssaków, które mogą być inspirujące, ale wydaje się, że nie dotyczą problemów medycyny regeneracyjnej, czyli zamykanie otworów o średnicy 1 cm wyciętych w małżowinie usznej królika (Goss and Grimes 1975) lub odrastanie poroża u jeleni (Nieto-Diaz et al. 2012). Znacznie wyższy potencjał regeneracyjny niż organizmy dorosłe prezentują embriony lub noworodki ssaków. Wymienić należy tu bezbliznowe gojenie skóry płodowej obserwowane do początku trzeciego trymestru (Helmo et al. 2013), pełną i funkcjonalną regenerację rdzenia kręgowego po transekcji u oposa krótkoogonowego (Fry et al. 2003), regenerację serca po resekcji koniuszka serca u noworodków myszy, która jest szerzej omówiona w dalszej części tej pracy (Porrello et al. 2011b). Interesujący jest też jedyny znaleziony dotąd u ssaków przypadek autotomii i bezbliznowego gojenia skóry u afrykańskiej myszy kolczastej (Seifert et al. 2012), Wymienione fenomeny podwyższonej zdolności do regeneracji wskazują, że być może dorosłe ssaki posiadają pewien zablokowany potencjał regeneracyjny.

Myszy MRL/MpJ jest godnym uwagi modelem regeneracji, który pozwala na prowadzenie badań nad molekularnym, komórkowym i genetycznym podłożem tego zjawiska. Mysz MRL/MpJ jest szczepem wsobny otrzymanym przez krzyżowanie myszy C57BL/6J (0,3%), C3H/HeDi (12,1%), AKR/J (12,6%) i LG/J (75%). Szczególnie cenne w wypadku tego modelu cechy to podwyższona odpowiedź regeneracyjna obserwowana w różnych tkankach i zachowanie tych właściwości u myszy dorosłych.

3.5.1. Regeneracyjne gojenie otworów wyciętych w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ

Zdolność do całkowitego zamykania 2 mm otworów w małżowinie usznej, stosowanych do znakowania zwierząt, bez tworzenia wyraźnej blizny, była pierwszą obserwacją wskazującą na zwiększone zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ

(Clark, Clark and Heber-Katz 1998). Cecha ta odróżnia mysz MRL/MpJ od większości innych szczepów myszy laboratoryjnych (Li et al. 2001). U MRL/MpJ następuje odtworzenie mięśni, chrząstek, mieszków włosowych, gruczołów, naczyń krwionośnych, a nawet nerwów obwodowych (Buckley, Metcalfe and Ferguson 2011). Histologiczna analiza pozwoliła na identyfikację czterech podstawowych różnic pomiędzy myszą MRL/MpJ, a szczepem kontrolnym C57BL/6 (Clark et al. 1998, Heber-Katz 1999):

- (1) *Szybkie zamykanie powierzchni całej rany przez warstwę nabłonka* (reepitelizacja) następująca już w drugim dniu po zranieniu u myszy MRL/MpJ, podczas gdy u C57BL/6 proces ten trwał do 8 dni.
- (2) *Zmiany występujące w błonie podstawnej naskórka*. Podczas gdy u myszy C57BL/6 błona podstawna jest wyraźna, u myszy MRL/MpJ szybko zanika ona pomiędzy 4-5 dniem po zranieniu, a granica pomiędzy nabłonkiem i naskórkiem zaciera się.
- (3) *Wytworzenie blastemy*. Proces zamykania otworów w uszach zapoczątkowuje blastema, czyli grupa niezróżnicowanych komórek, które proliferują w miejscu zranienia.
- (4) *Chondrogeneza*. Pod koniec zamykania otworu w uszach (około 30 dnia po zranieniu) u myszy MRL/MpJ następuje odtwarzanie chrząstki, które trwa około 3 miesięcy, co nie jest obserwowane nawet na granicach zranienia u myszy C57BL/6.

Warto zwrócić uwagę, że podobny jak u myszy MRL/MpJ efekt zamykania otworów w małżowinie usznej obserwowany jest również u innych szczepów myszy: LG/J (prodka myszy MRL/MpJ) i CBA/J (Li et al. 2000), linii myszy wyprowadzonej pod kątem wysokiej odpowiedzi zapalanej AIRmax (Canhamero, Garcia and De Franco 2014), mysz nagiej FoxNI (Gawronska-Kozak 2004), myszy z punktową mutacją w genie *Tgfb1* (Liu et al. 2011) oraz myszy pozbawionej genu *p21* (Bedelbaeva et al. 2010). Należy też podkreślić, że fenomen regeneracyjnego zamykania otworów w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ został potwierdzony w szeregu niezależnych badań wykonanych w różnych laboratoriach (Li et al. 2001, Rajnoch et al. 2003).

3.5.2. Loci cechy ilościowej zamykania otworów w uszach (QTL)

Zdolność do zamykania otworów w uszach jest cechą wielogenową. Mapowanie *loci* za nią odpowiadających zostało przeprowadzone w serii krzyżówek myszy o wysokich i zwykłych zdolnościach regeneracyjnych oraz o różnym stopniu pokrewieństwa: MRL/MpJ-*Fas*^{L^{pr}} x C57BL6 (McBrearty et al. 1998, Blankenhorn et al.

2003); MRL/MpJ x C57BL6 (Blankenhorn et al. 2003); MRL/MpJ x SJL/J (Masinde et al. 2001); MRL/MpJ x CAST/Ei (Heber-Katz et al. 2004a, Yu et al. 2005); LG/J x SM/J (Blankenhorn et al. 2009), które pozwoliły na identyfikację około 20 *loci* cechy ilościowej (ang. *quantitative trait loci*, QTL) (Tabela 1).

W badaniach tych zaobserwowano, że część ze zidentyfikowanych *loci* odpowiadających za zdolność do zamykania otworów w uszach może pochodzić od słabych regeneratorów. *Loci* mają charakter addytywny (obecność wielu pośrednich fenotypów pomiędzy dobrze i słabo regenerującym się szczepem wyjściowym) (Masinde et al. 2001). Część z nich ma charakter dominujący (regeneracja u pokolenia F1 nieznacznie różna od dobrze regenerującego się szczepu rodzicielskiego) (Masinde et al. 2001, Yu et al. 2005), a część recesywny (słaba regeneracja u pokolenia F1, zbliżona do słabo regenerującego się szczepu rodzicielskiego) (Masinde et al. 2006). W szeregu badań zaobserwowano również, że samce regenerują się gorzej niż samice (Blankenhorn et al. 2009, Blankenhorn et al. 2003, Masinde et al. 2006, Heber-Katz et al. 2004a), a kastracja samców polepsza proces zamykania otworów w uszach (Blankenhorn et al. 2003). Co więcej, niektóre *loci* wpływają w różnym stopniu na proces regeneracji w zależności od płci oraz tego czy w krzyżówce wyjściowej jako samicy użyto dobrze, czy słabo regenerującego się szczepu, co sugeruje rolę piętnowania genomowego w tym procesie (Blankenhorn et al. 2003). Oprócz tego wykazano rolę relacji epistatycznych pomiędzy różnymi *loci* (Masinde et al. 2001). Warto również zwrócić uwagę na to, że w szeregu badań nie zauważono zachodzenia na siebie *loci* odpowiadających za zdolność do zamykania otworów w uszach i efekty autoimmunologiczne u myszy MLR/MpJ-*Fas*^{Lpr} (McBrearty et al. 1998).

Tabela 1 Zestawienie loci cechy ilościowej (QTL) zamykania otworów w uszach. Położenie markera genetycznego związanego z QTL lub interwałów QTL podano w centymorganach (cM).

Chr	QTL	(McBrearty et al. 1998)	(Masinde et al. 2001)	(Blankenhorn et al. 2003)	(Heber-Katz et al. 2004a)	(Yu et al. 2005)	(Blankenhorn et al. 2009)	(Cheverud et al. 2012)
1	Sth1		38-68					
2	Heal15							0-40
3	Sth2		43-74					
4	Sth3		4-35					
4	Sth4		35-66					
4	Heal8			66-71		60-66,6		62-95
6	Sth5		28-67					28-87
7	Sth6		38-52	26-52				
7	Sth7		73-82			53,3		
8	Heal1	49		49-68				34-73
9	Sth8		31,7			26		24-66
9	Sth9		41,5			49		48-74
9	Chr9a						60	
9	Chr9b						85-98	
9	Sth8-9							39-64
10	Heal16						48	23-37
10	Chr10b						86	41-53
11	Heal10			55-61			83-92	45-72
12	Heal5	52		52				
13	Heal2	11		9-19	10			
13	Heal3	60	45,9	48-60				
13	Heal7			30-35	35			7-40
14	Heal12				12			10-24
15	Heal4	56,8		48-56			68-69	
16	Heal11			4-20				3-22
17	Heal13				44	22,9-45,3		
18	Heal9			30-44				0-47

3.5.3. Inne modelu uszkodzeń badane u myszy MRL/MpJ

3.5.3.1. Uszkodzenia serca

Serce było kolejnym narządem myszy MRL/MpJ, dla którego opisano podwyższoną odpowiedź regeneracyjną po kriou uszkodzeniu prawej komory (Leferovich et al. 2001, Bedelbaeva et al. 2004). W przeciwieństwie do szczepu kontrolnego C57BL/6, u MRL/MpJ odzyskiwało ono swoją sprawność i normalną budowę po około 60 dniach od uszkodzenia (Leferovich et al. 2001). U MRL/MpJ kardiomiocyty penetrowały miejsce uszkodzenia przy jednoczesnym wytwarzaniem luźnej sieciującej struktury przez fibroblasty. Około 15 dnia u MRL/MpJ następowało roztwarzanie ziarniny i odtwarzanie naturalnej architektury serca, które w 60 dniu po uszkodzeniu posiadało bardzo małe ślady bliznowacenia. U myszy C57BL/6 proces ten nie był obserwowany, a po upływie tego samego czasu można było zauważyć wyraźną bliznę w miejscu zranienia (Leferovich et al. 2001). Trzeba zaznaczyć, że to bezbliznowe gojenie serca nie zostało jednak zaobserwowane przez Grisela et al. (Grisel et al. 2008) po kriou uszkodzeniu wykonanym według protokołu stosowanego przez Leferovicha et al. (Leferovich et al. 2001). Zwiększona zdolność do regeneracji serca u myszy MRL/MpJ zależy od stopnia uszkodzenia (Naseem et al. 2007), a ponadto nie była obserwowana w przypadku innych niż kriou uszkodzenie typów urazów: niedokrwienie i reperfuzja

(Abdullah et al. 2005), trwała niedrożność tętnic wieńcowych (Robey and Murry 2008, Moseley et al. 2011, Cimini et al. 2008, Grisel et al. 2008, Smiley et al. 2014, Oh et al. 2004).

3.5.3.2. Amputacja koniuszków palców i uszkodzenia chrząstek stawowych

Odrastanie koniuszków palców jest jednym z modeli badań nad procesem regeneracji u ssaków. Zregenerowane w ten sposób palce są najczęściej krótsze i mają zdeformowaną płytkę paznokcia. Porównanie zdolności do odrastania amputowanych palców zbadano u nowonarodzonych (Chadwick et al. 2007) i dorosłych myszy (Gourevitch et al. 2009, Turner, Johnson and Badylak 2010).

U noworodków myszy odrastanie koniuszków palców zostało porównane u myszy MRL/MpJ, C57BL/6 i DBA/2. U myszy MRL/MpJ odrastanie palców przebiega szybciej i bardziej kompletnie niż u myszy kontrolnych. Ponadto płytkę paznokcia odtwarza się u 90% badanych myszy MRL/MpJ w porównaniu do 72,9% dla myszy DBA/2 i 66,7% dla C57BL/6 (Chadwick et al. 2007). W przypadku dorosłych myszy porównano proces gojenia po amputacji palców w połowie drugiego paliczka. Mimo, że u myszy MRL/MpJ zaobserwowano szybszą reepitalizację i dużą liczbę proliferujących komórek, to podobnie jak u szczepów kontrolnych C57BL/6 (Gourevitch et al. 2009, Turner et al. 2010) i Swiss Webster (Gourevitch et al. 2009) nie nastąpiło znaczące odrastanie palców. Co ciekawe, u myszy MRL/MpJ odpowiedź zapalna była pośrednia pomiędzy myszą C57BL/6 i Swiss Webster.

Mysz MRL/MpJ jest zdolna do gojenia uszkodzeń chrząstek stawowych (Fitzgerald et al. 2008, Ward et al. 2008). W badaniach tych zauważono, że samce myszy MRL/MpJ lepiej goją ten typ uszkodzenia, jednak występuje słaba korelacja pomiędzy zamykaniem otworów w uszach, a regeneracją chrząstki. Ponadto u myszy MRL/MpJ nie jest obserwowana silna odpowiedź zapalna w stawach w przypadku uszkodzeń chrząstek (Ward et al. 2008), która w dużej mierze wpływa na naprawę tego typu uszkodzenia oraz jest obserwowane lepsze gojenie ścięgien (Lalley et al. 2015).

3.5.3.3. Uszkodzenia skóry

Zwiększone zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ nie są obserwowane w przypadku ran skóry grzbietowej polegających na wycięciu skrawka skóry (Colwell et al. 2006, Beare, Metcalfe and Ferguson 2006), ani oparzeń (Davis et al. 2007). U myszy MRL/MpJ obserwowane jest jednak lepsze przyjmowanie przeszczepów skóry w porównaniu do myszy B10.BR (Tolba et al. 2010). W przypadku transplantacji skóry myszy B10.BR do myszy MRL/MpJ obserwowana jest słabsza odpowiedź

zapalna wynikająca z mniejszej infiltracji komórek układu odpornościowego oraz obniżona apoptoza przy jednoczesnej zwiększonej rewaskularyzacji.

3.5.3.4. Uszkodzenia układu nerwowego i narządów zmysłów

Regeneracja centralnego układu nerwowego jest blokowana przez wytwarzanie fizycznej bariery w postaci gliozy (blizny glejowej) uniemożliwiającej odtwarzanie połączeń nerwowych. Głównymi elementami tworzącymi bliznę są astrocyty, które wytwarzają cząsteczki macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak kwaśne białko włóknkowe (GFAP, ang. *glial fibrillary acidic protein*) oraz proteoglikany siarczanu chondroityny (CSPG, ang. *chondroitin sulfate proteoglycans*), będącymi inhibitorami wzrostu. Ponadto w obrębie takiej blizny występują komórki mikroglejowe, kontrolujące homeostazę układu nerwowego i biorące udział w odpowiedzi immunologicznej (Thuret et al. 2012).

Zarówno w mózgu, uszkodzenie kory i szlaku przewodzenia pomiędzy substancją czarną i prążkowiec (Hampton et al. 2004), jak i w obrębie rdzenia kręgowego, uszkodzenie na poziomie piersiowym (Kostyk et al. 2008, Thuret et al. 2012), u myszy MRL/MpJ obserwuje się zmniejszoną reakcję astrocytów i zwiększoną mikrogleju. Ponadto w przypadku rdzenia kręgowego zaobserwowano zmniejszoną ilość CSPG (Kostyk et al. 2008, Thuret et al. 2012) oraz inne zmiany w obrębie zranienia, takie jak luźniejsza struktura blizny i słabiej zaznaczona granica między tkanką normalną, a blizną (Kostyk et al. 2008). We wszystkich tych doniesieniach badacze byli zgodni, że u myszy MRL/MpJ po zranieniu tworzą się warunki sprzyjające regeneracji aksonów, ale w przypadku mózgu czas ten jest za krótki na odtworzenie struktury. W obu eksperymentach, w których uszkodzono rdzeń kręgowy, obserwowano wzrost aksonów u myszy MRL/MpJ, ale tylko w jednym z nich (Thuret et al. 2012), w którym wykonywano częściowe przecięcie, czyli hemisekcję rdzenia kręgowego, zaobserwowano szybsze i lepsze przywrócenie funkcji motorycznych. W przypadku całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego, mysz MRL/MpJ wykazywała wprawdzie większy wzrost aksonów w miejscu zranienia, jednak jej funkcje motoryczne były bardziej osłabione niż u zwierząt należących do szczepu kontrolnego (Kostyk et al. 2008).

Ponadto zaobserwowano bardziej intensywny wzrost nerwów obwodowych podczas regeneracyjnego zamykania otworów w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ w porównaniu ze szczepem kontrolnym C57BL/6J (Buckley et al. 2011). Wprawdzie regeneracja nerwów obwodowych jest u ssaków normalnym procesem, ale jej intensywność u myszy MRL/MpJ wydaje się cechą znaną, zwłaszcza że

regeneracja jest zależna od obecności nerwów obwodowych i nie jest możliwa po przeprowadzeniu denerwacji (Buckley et al. 2012).

Obniżenie zawartości CSPG zauważono także w przypadku regeneracji siatkówki, co zostało powiązane ze zwiększoną zdolnością do regeneracji u myszy MRL/MpJ (Tucker et al. 2008). W modelu uszkodzenia siatkówki symulującego powiązane z wiekiem zwyrodnienie plamki żółtej u myszy MRL/MpJ następuje przywrócenie jej funkcji, co nie jest obserwowane u szczepu kontrolnego AKR/J (Xia et al. 2011). Ponadto u MRL/MpJ występuje przyspieszone gojenie rogówki, któremu nie towarzyszy zmniejszenie jej przejrzystości (Ueno et al. 2005).

3.5.4. Cechy myszy MRL/MpJ mogące wpływać na jej zdolności regeneracyjne

3.5.4.1. Przemodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej

Ważnym aspektem związanym ze zwiększoną zdolnością regeneracyjną myszy MRL/MpJ jest przemodelowanie miejsca uszkodzenia, a w szczególności rozpad macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces ten prowadzony jest przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinase*). MMP-2 i MMP-9 są wydzielane przez migrujące fibroblasty, neutrofile i makrofagi w postaci nieaktywnego zymogenu, który jest aktywowany przez trawienie przez protezę MT1-MMP. Aktywność MMP jest regulowana przez rodzinę tkankowych inhibitorów MMP (TIMP, ang. *tissue inhibitors of MMP*) (Gourevitch et al. 2003).

Po uszkodzeniu małżowiny usznej zarówno u myszy MRL/MpJ, jak i szczepu kontrolnego C57BL/6, występuje odpowiedź zapalna. Część z napływających do miejsca zranienia komórek jest MMP-2 i MMP-9 pozytywna. Jednocześnie komórki te wytwarzają TIMP-2 i TIMP-3. U myszy MRL/MpJ infiltracja miejsca zranienia przez komórki układu odpornościowego jest większa i w porównaniu do C57BL/6 mniejsza ich część wytwarza TIMP, przez co wypadkowa aktywność MMP jest większa u MRL (Gourevitch et al. 2003). Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku odpowiedzi na uszkodzenie w sercu (Heber-Katz et al. 2004b), mózgu (Hampton et al. 2004) i w siatkówce oka (Tucker et al. 2008). Zwiększona aktywność MMP odpowiada za rozpad błony podstawnej oraz usuwania fizycznych barier dla migrujących komórek w miejscu zranienia, co jest kluczowe dla procesu regeneracji.

3.5.4.2. Zaburzenie cyklu komórkowego

Ważnym aspektem związanym ze zwiększonymi zdolnościami regeneracyjnymi myszy MRL/MpJ jest obserwowane u niej zaburzenie cyklu komórkowego, wynikające z niedoboru białka p21 zaobserwowane w fibroblastach (Bedelbaeva et al. 2010).

Białko p21 jest inhibitorem cyklin zależnych od kinaz i odgrywa istotną rolę w regulacji punktu kontrolnego cyklu komórkowego pomiędzy fazami G₁/S. Ponieważ u MRL/MpJ zaobserwowano deficyt p21, nie następuje zatrzymanie cyklu komórkowego w tym punkcie, co prowadzi do zależności cyklu komórkowego od punktu kontrolnego w fazie G₂. Jest to obserwowane w postaci nietypowego profilu cyklu komórkowego, w którym fibroblasty myszy MRL/MpJ i blisko spokrewnionego szczepu LG/J, który również ma zdolność do zamykania otworów w uszach, wykazują akumulację komórek w fazie G₂, a nie G₁ jak szczepy nieposiadające podwyższonej zdolności do go regeneracji (C57BL/6, SM/J). Niekontrolowane wejście w fazę S skutkuje zwiększoną proliferacją oraz stresem replikacyjnym, obserwowanym w postaci endogennych uszkodzeń DNA. Delecja genu *Cdkn1a*, kodującego p21, skutkuje pojawieniem się zdolności do regeneracyjnej naprawy otworów w małżowinie usznej w innym szczepie myszy B6129F2/J, który wykazuje wówczas szereg podobieństw do myszy MRL/MpJ (Bedelbaeva et al. 2010). Akumulacja komórek w fazie G₂ obserwowana jest również w wielu klasycznych modelach regeneracji, takich jak płazy ogoniaste.

Warto zwrócić uwagę, że delecja genu p53, głównego pozytywnego regulatora p21, nie wpływa, ani pozytywnie u szczepów kontrolnych, ani negatywnie u MRL/MpJ, na zdolność do zamykania otworów w uszach, chociaż zwiększa ona ilość komórek różnicujących się w chondrocyty i adipocyty (Arthur et al. 2010). Ponadto w sercu, na różnych etapach rozwoju i normalnym stanie fizjologicznym, nie są obserwowane różnice w poziomie wielu innych regulatorów cyklu komórkowego (kinaz zależnych od cyklin: Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6; cyklinami A, E, D1, B1; p27; E2F5) pomiędzy MRL/MpJ, a C57BL/6 (Moseley et al. 2011).

3.5.4.3. Embrionalne cechy metabolizmu

Dorośla mysz MRL/MpJ zachowuje pewne cechy metabolizmu embrionalnego, które zanikają u innych szczepów (Naviaux et al. 2009). Wśród nich można wyróżnić między innymi zwiększony anaerobowy metabolizm glikolityczny, zwiększoną oksydację kwasu glutaminowego oraz zmniejszony metabolizm kwasów tłuszczowych. Mitochondria myszy MRL/MpJ w hodowlach fibroblastów wykazują zmniejszony potencjał międzybłonowy, zmniejszoną produkcję reaktywnych form tlenu i zmniejszoną aktywność fosforylacji oksydacyjnej (Naviaux et al. 2009). Do innych nietypowych właściwości mitochondriów myszy MRL/MpJ zaliczyć można heteroplazmię związaną z charakterystycznymi dla tego szczepu wariantami sekwencji nukleotydowej w mitochondrialnych genach kodujących tRNA metioniny i argininy, które mogą wpływać na biosyntezę białek mitochondrialnych (Sachadyn et al. 2008).

Obecność embrionalnych cech metabolizmu najwyraźniej objawia się w sercu dorosłej MRL/MpJ, w którym w stanie nieuszkodzonym obserwowana jest ekspresja embrionalnych czynników transkrypcyjnych *Nanog*, *Sox2* i *Islet-2* (Naviaux et al. 2009). Dodatkowo ekspresja czynników *Nanog* i *Oct4* obserwowana jest w hodowlach fibroblastów myszy MRL/MpJ, podczas gdy u myszy C57BL/6J nie są one wykrywane (Zhang et al. 2015). Ponadto zauważono, że mezenchymalne komórki macierzyste myszy MRL/MpJ nadprodukują białka sFrp (ang. *secreted Frizzled-Related Proteins*) oraz występuje w nich wyciszenie kanonicznego szlaku Wnt (Alfaro et al. 2008). Wywołanie nadekspresji genów sFrp w mezenchymalnych komórkach macierzystych skutkuje zwiększeniem zdolności regeneracyjnych serca (Alfaro et al. 2008).

3.5.4.4. Rezerwuar komórek odpowiedzialnych za regenerację

W celu sprawdzenia czy zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ są zależne od udziału lokalnych tkanek czy komórek napływających do miejsca zranienia przeprowadzono szereg eksperymentów opartych na przeszczepach różnych rodzajów komórek. Zdolność do regeneracji serca w odpowiedzi na kriou uszkodzenie udało się stymulować u myszy C57BL/6 przez przeniesienie płodowych komórek wątroby myszy MRL/MpJ. Zabieg ten nie wpływał jednak na zdolność do zamykania otworów w uszach (Bedelbaeva et al. 2004).

Wcześniejsze uszkodzenie wpływa na szybkość zamykania otworów w uszach u myszy MRL/MpJ, co sugeruje rolę czynników obecnych w krwioobieg w tym procesie (Davis et al. 2005). Zdolność do regeneracji próbowano przenieść poprzez przeszczep szpiku kostnego do zwierząt poddanych ablacji szpiku. Przeszczep szpiku nie wpływa na zdolność do zamykania otworów w uszach (Kench et al. 1999). Brak efektu zaobserwowano również w przypadku przeniesienia oczyszczonych makrofagów z myszy MRL/MpJ do myszy C57BL/6-SCID (Davis et al. 2005). Ponadto zauważono, że większość komórek proliferujących w miejscu zranienia nie pochodzi ze szpiku kostnego (Heber-Katz et al. 2004b).

Efekt bezbliznowego gojenia ran grzbietu udało się uzyskać u myszy C57BL/6J przez zastosowanie bezkomórkowego ekstraktu macierzy zewnątrzkomórkowej otrzymanego z hodowli *in vitro* blastemy wyprowadzonej z małżowiny usznej myszy MRL/MpJ. Ekstrakt ten bogaty jest w takie czynniki wzrostu jak bFgf, Vegf, Hgf, Kgf (Vorotnikova et al. 2010).

3.5.4.5. Rola stanu zapalnego w regeneracyjnym procesie zamykania otworów w uszach

Zdolność do zamykania otworów w uszach przez mysz AIRmax (Canhamero et al. 2014) oraz mysz nagą (Gawronska-Kozak 2004) wskazuje na istotną rolę układu immunologicznego w procesie regeneracji. Zarówno w stanie nieuszkodzonym, jak i w momencie uszkodzenia u myszy MRL/MpJ obserwowana jest różna ekspresja wielu genów związanych ze stanem zapalnym (Gourevitch et al. 2014). Ma to związek z większą ilością prozapalnych komórek tucznych, neutrofilów i makrofagów w małżowinie usznej. U myszy MRL/MpJ obserwowana jest zmniejszona ekspresja receptora dojrziałych komórek tucznych *Fcεr1g*, który jest odpowiedzialny za ich interakcję z innymi komórkami (Gourevitch et al. 2014). Jednocześnie farmakologiczna inhibicja cyklooksygenazy, enzymu odpowiedzialnego za produkcję prostanglandyny H₂, hormonu stymulującego stan zapalny, spowalnia proces zamykania otworów w uszach i niekorzystnie wpływa na jego efekt końcowy (Gourevitch et al. 2014).

3.6. Regeneracja serca u noworodków myszy

Serce u dorosłych ssaków posiada bardzo nikłe zdolności do regeneracji, dlatego jego uszkodzenia prowadzą do trwałego pogorszenia jego funkcji, a nawet śmierci organizmu. Powszechnie uważa się, że komórki serca są ostatecznie zróżnicowane i nie mają nawet znikomych zdolności do podziałów. Ostatnie badania jednak temu zaprzeczają i wskazują, że małe populacje kardiomiocytów dzielą się przez całe życie organizmu (Senyo et al. 2013) oraz przez krótki okres po urodzeniu są zdolne do regeneracji dużych uszkodzeń serca (Porrello et al. 2011b). Jednakże z czasem następuje ograniczenie zdolności kardiomiocytów do proliferacji. Podobnie serca embrionów są zdolne do regeneracji uszkodzeń powstałych w wyniku genetycznej ablacji 50-60% kardiomiocytów lub sercowych komórek progenitorowych (Drenckhahn et al. 2008, Sturzu et al. 2015). Poznanie mechanizmów regulujących rozwój serca oraz odpowiedzialnych za spadek tempa podziałów kardiomiocytów, który następuje wraz z wiekiem, jest kluczowe dla rozwoju skutecznych terapii stymulujących procesy regeneracji tego narządu oraz może stanowić uzupełnienie dotychczasowych terapii opartych na zastosowaniu komórek macierzystych (Patel, Silva and Winters 2015).

3.6.1. Regeneracja serca u noworodków myszy

Zdolność do regeneracji serca noworodków myszy wykazano na modelu chirurgicznej resekcji serca za pomocą eksperymentu, w którym wycinano część wierzchołka lewej komory serca odpowiadającą około 15% jego masy (Porrello et al. 2011b). W ciągu 21 dni obserwowane jest stopniowe odtworzenie wyciętego fragmentu tkanką mięśniową o normalnej architekturze, a jak pokazuje badanie echokardiograficzne, funkcje narządu nie wykazują żadnych zaburzeń. Ten wysoki potencjał regeneracyjny zanika jednak w pierwszym tygodniu życia. U siedmiodniowych myszy ten typ uszkodzenia goi się z wytworzeniem blizny (Porrello et al. 2011b). Co istotne, proces regeneracji prowadzony jest przede wszystkim przez istniejące kardiomiocyty, których podziały następują w obrębie całego narządu, a nie jedynie w sąsiedztwie uszkodzenia (Porrello et al. 2011b). Zdolność do regeneracji serca u noworodków myszy została potwierdzona w modelu kriouszkodzenia (Jesty et al. 2012) oraz klinicznie istotnym modelu zamknięcia tętnicy wieńcowej (Porrello et al. 2013).

Komórki macierzyste serca (c-kit⁺) również uczestniczą w procesie regeneracji serca, jednak ich udział jest odmienny niż kardiomiocytów oraz zmienia się wraz z wiekiem (Jesty et al. 2012). Zaobserwowano, że chociaż większość komórek c-kit⁺ w obrębie zranienia różnicuje się w kardiomiocyty, to w pozostałych regionach serca komórki c-kit⁺ utrzymują swój charakter endotelialny. Ponadto populacja komórek c-kit⁺



występująca u dorosłych myszy, nie posiada zdolności do różnicowania się w komórki mięśniowe serca, a jedynie w naczynia krwionośne (Jesty et al. 2012).

Warto zwrócić uwagę, że w odróżnieniu od modelu regeneracji obserwowanej u myszy MRL/MpJ, zdolność do regeneracji serca, chociaż opisana po raz pierwszy dla myszy ICR/CD-1 (Porrello et al. 2011b), nie wydaje się być cechą wyjątkową dla tego szczepu myszy. W badaniach dotyczących mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za spadek zdolności regeneracyjnych były wykorzystane również myszy C57BL/6 lub myszy transgeniczne o złożonym pochodzeniu genetycznym (Walsh et al. 2010, Porrello et al. 2011a, Porrello et al. 2013, Xin et al. 2013a, Mahmoud et al. 2013, Puente et al. 2014).

3.6.2. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za zanik zdolności regeneracyjnych serca u noworodków myszy

Spadek zdolności kardiomiocytów do podziałów wiąże się z trwałym zatrzymaniem postępu ich cyklu komórkowego krótko po urodzeniu (Walsh et al. 2010). Początkowo serca noworodków myszy składają się z jednojądrzastych małych kardiomiocytów, które w pierwszym tygodniu życia przechodzą jeszcze jedną rundę replikacji DNA oraz kariokinezy po urodzeniu, ale ze względu na brak odpowiednich cytokin komórka nie dzieli się, co skutkuje jej binukleacją. Dalszy wzrost rozmiarów serca następuje poprzez hipertrofię, tj. zwiększenie wielkości przez istniejące kardiomiocyty (Walsh et al. 2010). Zatrzymanie postępu cyklu komórkowego przez kardiomiocyty oraz wzrost serca po urodzeniu zostały powiązane z szeregiem mechanizmów molekularnych.

3.6.2.1. Zmiana metabolizmu po urodzeniu

Zwiększenie metabolizmu tlenowego w pierwszym tygodniu życia jest nadrzędnym sygnałem powodującym zatrzymanie cyklu komórkowego kardiomiocytów (Puente et al. 2014). Kardiomiocyty noworodków myszy posiadają stosunkowo małą ilość mitochondriów, jednak w wyniku wzrostu roli metabolizmu tlenowego po urodzenie ich masa, pofałdowanie wewnętrznej błony oraz aktywność wzrasta. Zwiększenie metabolizmu tlenowego skutkuje powstawaniem reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) oraz aktywacją szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA damage response*). Ekspozycja noworodków myszy na warunki hipertlenowe (100% O₂) oraz hipotlenowe (15%) począwszy od e18,5 dnia rozwoju płodowego, odpowiednio skraca lub wydłuża okres proliferacji kardiomiocytów. Podobny efekt ma podawanie substancji generujących lub neutralizujących ROS (Puente et al. 2014).

3.6.2.2. Szlaki sygnałowe biorące udział w rozwoju serca

Przykładami szlaków sygnałowych wpływających na zdolności regeneracyjne serca u noworodków, a które ulegają zahamowaniu po urodzeniu są szlak sygnałowy Hippo, Nrg1 i Notch1 (punkt 1.2.3).

Szlak sygnałowy Hippo oddziałuje w procesie wzrostu organów poprzez regulację proliferacji komórek i apoptozy. Głównymi jego czynnikami są kinazy Mst1/2, należące do rodziny białek podobnych do Ste20, białko rusztowania Sav1, kinazy Lats1/2 oraz białka efektorowe Yap i Taz. W efekcie aktywacji szlaku Hippo koaktywatory transkrypcyjne, białka Yap i Taz ulegają fosforylacji, w wyniku czego lokalizują się one w cytoplazmie, co hamuje ekspresję regulowanych przez nie genów (Xin, Olson and Bassel-Duby 2013b).

Białko Yap jest kluczowe dla prawidłowego rozwoju serca na etapie embrionalnym, a delecja kodującego go genu po urodzeniu w kardiomiocytach skutkuje postępującą kardiomiopatią mięśnia sercowego. Serca noworodków myszy po delecji genu *Yap* tracą zdolność do regeneracji, a nadekspresja białka Yap skutkuje zwiększoną liczbą kardiomiocytów w sercu oraz wzrostem jego wielkości (Xin et al. 2013a). Regulatorami białka Yap są α -kateniny *Ctnna1* i *Ctnna3*, których delecja w sercu skutkuje zwiększeniem proliferacji kardiomiocytów (Li et al. 2015).

Białko Nrg1 oddziałując z kompleksem receptorów Erbb4/Erbb2 stymuluje proliferację kardiomiocytów *ex vivo*, a podanie Nrg1 poprawia funkcje serca po jego uszkodzeniu u myszy oraz po zawale u ludzi (Polizzotti et al. 2015). Ekspresja *Erbb2* w sercu spada w pierwszym tygodniu życia. Jednocześnie delecja *Erbb2* powoduje kardiomiopatię u noworodków, a jego nadekspresja skutkuje kardiomegalią, hipertrofią kardiomiocytów, ich częściowym odróżnicowaniem oraz proliferacją. Stymulacja Erbb4/Erbb2 skutkuje aktywacją szlaków sygnałowych Erk i Akt, oraz inhibicją Gsk3 β . Co najważniejsze, przejściowa indukcja produkcji Erbb2 zwiększa zdolności regeneracyjne serca po jego uszkodzeniu zarówno u młodych, jak i dorosłych myszy (D'Uva et al. 2015).

3.6.2.3. MikroRNA w regeneracji serca u noworodków

Zatrzymanie postępu cyklu komórkowego kardiomiocytów jest również związane z ekspresją określonych mikroRNA. Zaobserwowano, że około siódmego dnia po urodzeniu następuje silna indukcja mikroRNA z rodziny miR-15 (Porrello et al. 2011a). Nadekspresja tych mikroRNA w sercu podczas rozwoju embrionalnego powoduje powstanie wielu wad rozwojowych, np. ubytku przegrody międzykomorowej serca. Największy wzrost poziomu ekspresji po urodzeniu obserwuje się dla należącego do rodziny miR-15 mikroRNA mir-195, które reguluje ekspresję wielu genów związanych

z regulacją cyklu komórkowego, m.in. *Chek1*, *Cdc2a*, *Birc5*, *Nusap1* i *Spag5* (Porrello et al. 2011a). Inhibicja rodziny miR-15 u noworodków myszy wydłużyła okres zdolności regeneracyjnej serca poprzez zwiększenie zdolności proliferacyjnej kardiomiocytów (Porrello et al. 2013). Podobne działanie obserwowane jest również w przypadku miR-34a, który reguluje geny *Bcl2*, *Ccnd1* i *Sirt1* (Yang et al. 2015).

3.6.2.4. *Meis1* reguluje ekspresję genów związanych z cyklem komórkowym

Kolejny mechanizm wpływający na zatrzymanie cyklu komórkowego został powiązany z czynnikiem transkrypcyjnym *Meis1* (Mahmoud et al. 2013). Białka *Meis*, czyli należące do rodziny TALE (ang. *three amino acid loop extensions*) homeotyczne czynniki transkrypcyjne, pełnią ważne funkcje w procesie różnicowania się serca na etapie rozwoju embrionalnego. *Meis1* jest białkiem, którego produkcja zostaje zapoczątkowana około czwartego dnia po urodzeniu. Delecja genu *Meis1* w kardiomiocytach skutkuje ich zwiększoną proliferacją u noworodków i dorosłych myszy. Mimo, że u myszy po delecji tego genu w kardiomiocytach nie obserwuje się zmiany wielkości serca, ani zaburzenia jego funkcji, to zauważono zwiększenie zawartości jednojądrzastych kardiomiocytów (Mahmoud et al. 2013). *Meis1* indukuje ekspresję wielu inhibitorów cyklin zależnych od kinaz (p16, p15, p19, p21 i p57), a jego nadprodukcja obniża zdolność do regeneracji serca u noworodków myszy (Mahmoud et al. 2013).

3.6.2.5. Zamiany w układzie odpornościowym

Na spadek zdolności regeneracyjnych serca u noworodków myszy ma również wpływ dojrzewanie układu odpornościowego. Porównanie odpowiedzi immunologicznej po zabiegu zamknięcia tętnicy wieńcowej u jednodniowych i dwutygodniowych myszy pozwoliło na zidentyfikowanie różnic w odpowiedzi monocytów i makrofagów (Aurora et al. 2014). W odróżnieniu od makrofagów u dorosłych, makrofagi jednodniowych myszy eksprymowały wiele cytokin stymulujących angiogenezę, a ich specyficzna deplecja, chociaż nie wpływała na zdolność kardiomiocytów do podziałów, skutkuje gojeniem się uszkodzenia serca z wytworzeniem blizny (Aurora et al. 2014).

4. Materiały i metody

4.1. Tkanki

Tkanki myszy C57BL/6J i MRL/MpJ w wieku 8 tygodni zostały zakupione w kolekcji „The Jackson Laboratory” (Stany Zjednoczone). Tkanki myszy BALB/c w wieku 8 tygodni oraz serca noworodków myszy w wieku 1, 7 i 14 dni oraz serca embrionów myszy w embrionalnym dniu 15, 16, 18 i 19 zostały zakupione w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Polska). Tkanki po pobraniu zostały zabezpieczone odczynnikami RNALater (Qiagen, nr kat. 76104) i przechowywane w -80°C do czasu izolacji kwasów nukleinowych.

4.2. Izolacja kwasów nukleinowych

Izolację DNA połączoną z trawieniem RNA na kolumnie przeprowadzono za pomocą zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, nr kat. 69504) i RNaseA (Qiagen, nr kat. 19101), natomiast RNA połączoną z trawieniem genomowego DNA za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, nr kat. 74104) i RNase-Free DNase Set (Qiagen, nr kat. 79254).

4.3. Eksperymenty mikromacierzowe

4.3.1. Otrzymanie i analiza globalnych profili metylacji DNA

4.3.1.1. Immunoprecypitacja metylovanego DNA

Immunoprecypitację metylovanego DNA, znakowanie i hybrydyzację DNA oraz skanowanie mikromacierzy wykonała mgr Anna Ronowicz Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Immunoprecypitację DNA przeprowadzono w oparciu o protokół Webera (Weber et al. 2005). Do immunoprecypitacji użyto mieszanin powstałych z połączenia równych ilości DNA pochodzącego od trzech osobników tego samego szczepu lub na tym samym etapie rozwoju. Próbkę 7 µg DNA zostały poddane fragmentacji przy użyciu sonikatora BANDELIN model SONOPLUSmini20 do uzyskania fragmentów o długości 300-1000 pz. Część pofragmentowanego DNA (3 µg) zachowano jako próbkę wejściową (INPUT).

Pozostałą część pofragmentowanego DNA (4 µg) poddano denaturacji w 98°C przez 10 min i szybko schłodzone na lodzie (0-4°C) przez 10 min. Immunoprecypitację metylovanego DNA przeprowadzono za pomocą 10 µg mysiego przeciwciała monoklonalnego przeciwko 5-metylocytozynie (Eurogentec, nr kat. BI-MECY-1000) w buforze do immunoprecypitacji (bufor IP: 10 mM bufor fosforanowy, pH 7,0; 140 mM NaCl, 0,05% Triton X-100) na mieszadle obrotowym przez 2 h w temperaturze 4°C.

Kompleksy przeciwciało-DNA zostały wychwycone za pomocą DynaBeads M-280 (Invitrogen, nr kat. 11205D). Wychwytywanie kompleksów było prowadzone przez 2 h w temperaturze 4°C. Po trzykrotnym przepłukaniu DynaBeads 700 µl buforu IP zostały one zawieszone w 250 µl buforu lizującego (60 mM TRIS, 50 mM EDTA, 70 µg proteiny K) i inkubowane w 50°C przez 24 h w celu strawienia przeciwciał. DNA zostało kolejno poddane ekstrakcji fenolem i ekstrakcji chloroformem oraz poddane precypitacji etanolowej przy użyciu NaCl oraz zawieszono w 60 µl 10 mM buforu Tris pH 8,0.

4.3.1.2. Znakowanie i hybrydyzacja DNA

Znakowanie DNA zostało przeprowadzone za pomocą NimbleGen Dual-Color Labeling Kit (Roche-Nimblegen, nr kat. 06370250001). Próbkę badaną została wyznakowana za pomocą Cy3, natomiast próbki wejściowe (INPUT) za pomocą Cy5. Po reakcji znakowania w jednej próbce zmieszano po 15 µg DNA wyznakowanego Cy3 i Cy5, a następnie zatężono za pomocą koncentratora próżniowego.

Hybrydyzację wyznakowanego DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu NimbleGen Hybridization Kit (Roche-NimbleGen, nr kat. 05583683001) wykorzystując mikromacierze Mouse DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter (Roche-NimbleGen) przy użyciu systemu NimbleGen Hybridization System 4 (Roche-NimbleGen). Mikroplątki odpłukano z niezwiązanych fragmentów DNA za pomocą NimbleGen Wash Buffer Kit (Roche-NimbleGen, nr kat. 05584507001).

4.3.1.3. Otrzymanie i przetwarzanie danych

Skanowanie mikroplątek zostało wykonane za pomocą skanera MS200 (Roche-NimbleGen) przy rozdzielczości 2 µm. Dane z uzyskanych obrazów zostały przeanalizowane za pomocą programu NimbleScan v.2.6.0.0 (Roche-NimbleGen). Przetwarzanie danych polegało na normalizacji międzyplątkowej surowych danych za pomocą normalizacji kwantylowej każdego z kanałów osobno (Adriaens et al. 2012), otrzymaniu $\log_2(\text{Cy3/Cy5})$ oraz obliczeniu wzbogacenia (ang. enrichment) regionów DNA w oparciu o algorytm ACME (ang. *Algorithms for Calculating Microarray Enrichment*) (Scacheri, Crawford and Davis 2006) wykonanego dla odcinków (ang. *sliding window*) 750 pz. Uzyskane wyniki wzbogacenia dla każdej z sond w postaci ujemnej wartości z logarytmu dziesiętnego z wyniku testu Kołmogorowa-Smirnowa (ang. *KS Scores*) zostały wyeksportowane do arkusza kalkulacyjnego MS Excel 2010 (Microsoft). Wizualizacja wzbogacenia regionów DNA została wykonana za pomocą programu Deva v1.2.1 (Roche-NimbleGen).

Koordynaty genomowe regionów DMR podano zgodnie z bazą danych dla genomu myszy C57BL/6J zawierającą informacje o pozycjach genów, miejsc startu transkrypcji itp. przygotowaną w kwietniu 2007 roku i znaną jako „Build MM9”.

Strategia normalizacji danych została ustalona we współpracy z mgr Michałem Krzemińskim z Katedry Rachunku Prawdopodobieństwa i Biomatematyki Politechniki Gdańskiej.

4.3.1.4. Identyfikacja regionów DMR – kryteria określające region DMR

Sposób identyfikacji regionów DMR został opracowany na potrzeby tej pracy. Nie istnieje jeden rekomendowany przez producenta macierzy algorytm analizy. Głównym zamierzeniem była identyfikacja stosunkowo dużych różnic w poziomie metylacji DNA. Zgodnie z dostępną literaturą wartość $KS = 2,0$, odpowiadająca istotności statystycznej $0,01$, oznacza znaczący poziom wzbogacenia DNA w reakcji immunoprecypitacji, gdy wartość KS około $1,3$ odpowiadająca istotności statystycznej $0,05$, znikomy poziom wzbogacenia DNA. Przykładowo, przyjęte kryteria powinny pozwolić na identyfikację regionów DNA, których wzbogacenie w reakcji immunoprecypitacji zmienia się między badanymi próbkami z zerowej na niską, ale wykrywalną (np. $0,0$ na $1,3$), z wartości niskiej na znaczącą (np. z $1,0$ na $2,0$), ale też takich regionów gdzie następuje zmiana wzbogacenia DNA z znaczącej na bardzo wysoką (np. z $2,0$ na $4,0$). W tym ujęciu region hipometylowany lub hipermetetylowany jest pojęciem względnym i oznacza znaczne różnice w poziomie wzbogacenia DNA. Na podstawie znaczącego wzbogacenia danego regionu DNA można wyciągnąć wniosek o poziomie metylacji DNA w danym regionie, jednak nie jest to informacja, którą można bezpośrednio przełożyć na zawartość procentową zmetylowanych nukleotydów CpG w danym regionie DNA. Należy też podkreślić, że metoda analizy profili metylacji DNA MeDIP-chip nie jest przeznaczona do wyznaczenia bezwzględnych poziomów metylacji DNA określonych dinukleotydów CpG, ale identyfikacji regionów DNA wykazujących wysoki poziom metylacji DNA. Atutami tej metody są stosunkowo szeroki zakres badanych regionów DNA oraz brak ryzyka artefaktów związanych z konwersją wodorosiarczynową DNA.

4.3.2. Otrzymanie i analiza profili ekspresji genów

Znakowanie i hybrydyzację DNA oraz skanowanie mikromacierzy wykonała mgr Anna Ronowicz Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Synteza dscDNA została wykonana we współpracy z mgr

Justyną Podolak-Popinigis z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej.

4.3.2.1. Synteza dwuniciowego komplementarnego DNA

Do syntezy dwuniciowego komplementarnego DNA (dscDNA) wykorzystano matrycą uzyskaną z połączenia równych ilości RNA wyizolowanego od trzech osobników myszy. Pierwsza nić cDNA została zsyntetyzowana przy użyciu odwrotnej transkryptazy (Maxima Reverse Transcriptase, ThermoScientificBio, nr kat. EP0742) przy wykorzystaniu 3 µg RNA matrycowego oraz oligonukleotydów dT₁₅. Syntezę nici komplementarnej przeprowadzono przy użyciu cDNA Synthesis System (Roche, nr kat. 11117831001). Dwuniciowe DNA oczyszczono po reakcji przy użyciu zestawu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, nr kat. 11732668001).

4.3.2.2. Znakowanie DNA i hybrydyzacja DNA do mikromacierzy

Znakowanie sond zostało wykonane przy użyciu NimbleGen One-Color DNA labeling kit (Roche-NimbleGen, nr kat. 06370411001). Do hybrydyzacji użyto zestawu NimbleGen Hybridization Kit (Roche-NimbleGen, nr kat. 05583683001) oraz systemu NimbleGen Hybridization System 4 (Roche-NimbleGen). W analizie profili ekspresji wykorzystano mikromacierze NimbleGen mouse gene expression 12x135K array (Roche-NimbleGen, nr kat. 05543797001). Mikromacierze te umożliwiały analizę 44 170 transkryptów genów 24 203 genów

4.3.2.3. Otrzymanie i przetwarzanie danych

Skanowanie mikroplamki zostało wykonane za pomocą skanera MS200 (Roche-NimbleGen) przy rozdzielczości 2 µm. Dane z uzyskanych obrazów zostały przeanalizowane za pomocą programu NimbleScan v.2.6.0.0 (Roche-NimbleGen). Surowe dane znormalizowano za pomocą algorytmu RMA (ang. *Robust Multi-array Average*) oraz wyeksportowano do arkusza kalkulacyjnego MS Excel 2010 (Microsoft).

4.4. Narzędzia bioinformatyczne i bazy danych

4.4.1. Analiza ontologiczna

Analiza ontologiczna ma na celu odnalezienie wspólnego kontekstu biologicznego dla grup genów, które zostały wyodrębnione ze względu na określone kryteria czyli np. różnice w poziomie ekspresji genów lub metylacji DNA. Analizy ontologiczne zostały wykonane za pomocą programu *ClueGO* (Bindea et al. 2009), który jest jedną z aplikacji platformy Cytoscape (Shannon et al. 2003). W analizie wykorzystano ontologie „*Biological Process*” i „*Molecular Function*” oraz prawostronny test hipergeometryczny z korekcją Benjaminiego-Hochberga lub Bonferroniego. Wyniki



przedstawiono jako ujemny logarytm dziesiętny z wyznaczonej wartości istotności statystycznej p . Test hipergeometryczny określa istotność statystyczną nadreprezentacji (zagęszczenia) genów związanych z daną kategorią funkcjonalną w obrębie analizowanej grupy genów. W obliczeniach tych uwzględniana jest liczba wszystkich genów należących do danej kategorii funkcjonalnej, wszystkich znanych genów danego organizmu, liczby genów w analizowanej grupie genów i liczby genów związanych z daną kategorią funkcjonalną. Korekcje statystyczne uwzględniają wielokrotność powtórzeń wykonywanych testów dla każdej kategorii funkcjonalnej i mają na celu zmniejszenie liczby wyników fałszywie pozytywnych.

4.4.2. Analiza nadrzędnych czynników regulatorowych

Wyszukiwanie potencjalnych genów regulatorowych przeprowadzono za pomocą narzędzia *iRegulon* (Janky et al. 2014), jednej z aplikacji platformy Cytoscape (Shannon et al. 2003). Narzędzie to określa poziom wzbogacenia dla poszczególnych motywów sekwencyjnych związanych z badanymi genami i przewiduje najbardziej prawdopodobne czynniki transkrypcyjne, które odpowiadają za ich regulację. W wykonanej analizie wykorzystano kolekcję „10K Sequence Motifs” i uwzględniono obszary do 500 pb powyżej miejsc startu transkrypcji badanych genów.

4.5. Techniki użyte do weryfikacji eksperymentów mikromacierzowych

4.5.1. Konwersja wodorosiarczynowa DNA

Konwersja wodorosiarczynowa została przeprowadzona za pomocą zestawu EZ DNA Methylation Kit Gold (Zymo Research, nr kat. D5005). Do konwersji użyto 1 μ g genomowego DNA. Reakcja polega na chemicznej modyfikacji cytozyny, która ulega deaminacji do uracylu, przez co podczas reakcji PCR i sekwencjonowania produktów PCR odczytywana jest jako tymina. 5-meC nie ulega deaminacji. Około dziesiątej części DNA oczyszczonego po konwersji użyto jako matrycy w reakcji PCR, która została przeprowadzona przy użyciu polimerazy DNA „Maxima Hot Start Taq” (ThermoscientificBio, nr kat. EP0601). Produkty PCR zostały oczyszczone z prążków żelu agarozowego. Sekwencjonowanie tak przygotowanych fragmentów DNA metodą Sangera przeprowadzono w ramach usługi komercyjnej (Genomed, Polska). Chromatogramy analizowano za pomocą programu ContigExpress (VectorNTI Advance 11.0, Invitrogen).

4.5.2. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację CpG

Analizę metylacji przeprowadzono przy użyciu enzymu *McrBC* (New England Biolabs, nr kat. M0272S) lub EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (MspI/HpaII)

(Thermoscientificbio, nr kat. K1441) wykorzystując 100 ng DNA w reakcji trawienia oraz reakcji kontrolnej pozbawionej enzymu (INPUT). Enzym *McrBC* rozpoznaje sekwencję RmeC(N)₄₀₋₃₀₀RmeC (gdzie R oznacza purynę) i trawi specyficznie zmetylowane DNA. Natomiast enzym *HpaII* trawi sekwencje CCGG, a jego aktywność jest hamowana przez metylację DNA. Oznaczając ilość DNA, która nie uległa strawieniu, możemy oszacować poziom metylacji DNA. Relatywne oznaczenie ilości niestrawionego, czyli zmetylowanego DNA, w porównaniu do ilości wyjściowego DNA zostało wykonana metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) przy użyciu Fast Start Essential DNA Master Green (Roche, nr kat. 06402712001) za pomocą systemu Light Cycler 96 (Roche), przy użyciu 4 ng DNA trawionego i 4 ng DNA kontrolnego DNA na reakcję. Wyniki zostały zaprezentowane jako stosunek ilości DNA po reakcji trawienia do ilości DNA w próbce wejściowej, po obliczeniu zgodnie ze wzorem 2^{-dCt} , gdzie dCt oznacza różnicę pomiędzy cyklem w którym amplifikacja wchodzi w fazę ekspotencjalną.

4.5.3. Sekwencje starterów

Sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystanych do amplifikacji wybranych regionów DNA w celu weryfikacji wyników mikromacierzowych oznaczeń poziomu metylacji DNA przedstawiono w poniższej tabeli (Tabela 2).

Tabela 2 Sekwencje nukleotydowe starterów użytych w niniejszej pracy.

McrBC/HpaII – zastosowanie wrażliwej na metylację CpG endonukleazy w celu przygotowania matryc do oznaczeń qPCR.

NaHSO₃ – konwersja wodorosiarczynowa matrycy do amplifikacji produktów PCR użytych do sekwencjonowania DNA.

Metoda	Gen	Długość [pz]	Starter „forward” (<i>nic sensowna</i>)	Starter „reverse” (<i>nić antysensowna</i>)
McrBC	<i>Ski</i>	150	CAACATCTGTCTACTGGACC	CAGCCTGAGAATCACAGAG
McrBC	<i>Ghrhr</i>	161	TGCCCTGTCTGTGTTCTC	ACCCAGCTGAATATTGAACG
McrBC	<i>Bcl2l11</i>	161	GGATTCACCTTGAGAAGCTAGAC	AGGCTGGCAGTAAGTAGGA
McrBC	<i>Ankrd</i>	180	CTTGCTGTCCTCGCTGA	GAAACCGAGACAGAGGTGTA
McrBC	<i>Gas2l2</i>	217	CCTGTAATATAAAGGTCTGAGATCG	ATGCCAACACTGTCACG
McrBC	<i>Ticam2</i>	155	GGAGGCACTGTTCTGATG	TCAGTGCGAGAGGAAGAT
McrBC	<i>Gjb4</i>	173	TCCCTTTGGGAAGCTAAGT	TAAGTGAGGAACAAAAGCTGC
HpaII	<i>Rfx8</i>	189	CCAAAGGGTTCAGTATAACGG	CAGGCTTGAGGGGATCG
NaHSO ₃	<i>Rfx8</i>	254	ATTTTGAAAAATATTGATGATTAGTTAATA	ATAAACTTCTAAAACAACATCCCT
McrBC	<i>Myh7</i>	201	TGAGGGCCAACTTTGAGCTT	CCCACTCCTCACATGGGTTT
McrBC	<i>Mfsd6l</i>	205	GGAACCTGAGCCAGCGATT	AGGAACGGAGTCACACAGGCAT
McrBC	<i>Gata6</i>	249	GCGTAAGAAGTACATACATTAAGTC	CAGTGTGGTTCTCTTTCTGCCT
McrBC	<i>Map3k6</i>	166	TGTTTCGTTGGACTCGCTGCT	GTCAGGGAGAAGGGGAGAGCCG
McrBC	<i>Ctbp2</i>	279	GTAAGGAGGACCCAGGATTA	CCCACCTTCTATAAATGCC
NaHSO ₃	<i>Myh7</i>	244	ATAGAATTCTATTGAGGGTTAATTTGAGTTTGG	ATAAAGCTTTATAATATACTCCACATCACCACCC
NaHSO ₃	<i>Ctbp2</i>	282	ATAGAATTCAGGGGGTGTTAAGGTTATAATTTT	ATAAAGCTTTAAAACCTTAACAATACCAATCTCAC

5. Model I: dorosła mysz MRL/MpJ

5.1. Wyniki

5.1.1. Porównanie globalnych profili metylacji DNA u myszy MRL/MpJ i szczepów kontrolnych C57BL/6J i BALB/c

Za pomocą zagęszczenia metylovanego DNA przez immunoprecypitację i hybrydyzację na mikromacierzach promotorowych otrzymano genomowe profile metylacji DNA dla zestawu tkanek trzech szczepów myszy laboratoryjnych: mającego zwiększone zdolności regeneracyjne MRL/MpJ oraz dwóch szczepów kontrolnych C57BL/6 i BALB/c. Układ sond stosowanej mikromacierzy umożliwiał badanie regionów promotorowych (20.404) oraz wysp CpG (15.980), które mogą znajdować się w pobliżu miejsc startu transkrypcji, pierwotnych transkryptów genów, a także stosunkowo niewielkiej liczby regionów międzygenowych.

Wykorzystane tkanki (szpik kostny, wątroba, małżowina uszna, serce i śledziona) pochodziły od niezranionych samic w wieku 8 tygodni. Dla trzech szczepów myszy i pięciu tkanek otrzymano 15 genomowych profili metylacji, z których każdy reprezentował połączone próbki genomowego DNA od trzech osobników. Poprzez porównanie genomowych profili metylacji DNA trzech szczepów laboratoryjnych myszy zidentyfikowano regiony DNA, które zostały wzbogacone w różnym stopniu w zależności od szczepu myszy i które określone zostały jako regiony DMR (ang. *differentially methylated regions*). Znalezione regiony DMR powiązano następnie z genami, które były zlokalizowane w ich sąsiedztwie, czyli do 5000 pb powyżej i do 1000 pb poniżej miejsc startu transkrypcji lub w obrębie pierwotnego transkryptu.

Region DMR określony został jako *hipometylowany*, jeżeli poziom wzbogacenia był dla myszy MRL/MpJ mniejszy niż u szczepów kontrolnych, czyli metylacja DNA u myszy MRL/MpJ była niższa, niż u obu szczepów kontrolnych, natomiast region DMR uznano za *hipermetylowany*, jeżeli poziom wzbogacenia był dla myszy MRL/MpJ wyższy niż u obu szczepów kontrolnych, czyli metylacja DNA u myszy MRL/MpJ była wyższa, niż u szczepów kontrolnych.

Należy podkreślić, że region hipometylowany oznacza w tej pracy region DMR o niższym poziomie metylacji niż w próbce referencyjnej, ale niekoniecznie region o znikomej metylacji. Analogicznie region hipermetylowany oznacza region o wyższej metylacji DNA niż w próbce referencyjnej, lecz niekoniecznie o 90-100% metylacji. Ponadto region DMR związany z danym genem może stanowić tylko niewielką część jego rejonu regulatorowego, czyli region hipometylowany może być tylko częścią regionu promotorowego wykazującego znaczny stopień metylacji, a region

hipermetylowany może oznaczać kilka zmetylowanych dinukleotydów CpG w regionie promotorowym generalnie słabo zmetylowanym. Kryteria określające region DMR omówiono szczegółowo w rozdziale 4.3.1.

5.1.2. Charakterystyka DMR wyróżniających mysz MRL/MpJ

Najwięcej regionów DMR wyróżniających mysz MRL/MpJ w porównaniu ze szczepami kontrolnymi C57BL/6J i BALB/c zidentyfikowano w szpiku kostnym (281), a najmniej w małżowinie usznej (81) (Tabela 3, Tabela 4). Dla większości tkanek przeważały regiony hipermetylowane, przy czym dla szpiku kostnego i wątroby stanowiły one ponad 70% wszystkich regionów DMR, a dla małżowiny usznej i serca około 60%. Jedynie dla śledziony zaobserwowano przewagę regionów hipometylowanych, które stanowiły około 70% wszystkich regionów DMR w tej tkance (Tabela 3).

Zidentyfikowane regiony DMR podzielono ze względu na lokalizację względem miejsca startu transkrypcji. Region DMR został określony jako *dystalny*, jeżeli znajdował się od -5000 pz do -500 pz, *proksymalny*, jeżeli znajdował się on od -500 pz do +100 pz względem miejsca transkrypcji, *wewnątrzgenowy*, jeżeli znajdował się w obrębie pierwotnego transkryptu oraz *międzygenowy*, jeżeli znajdował się dalej niż -5000 pz od miejsca startu transkrypcji i nie był położony w obrębie pierwotnego transkryptu. We wszystkich analizowanych tkankach znaleziona liczba regionów dystalnych DMR przeważała nad proksymalnymi, natomiast międzygenowe regiony były najmniej liczne, co jednak wynika przede wszystkim z projektu mikromacierzy, w której umieszczono stosunkowo niewielką liczbę sond w regionach międzygenowych. Regiony dystalne wiążą się z działaniem odległych elementów regulatorowych, np. enhancerów, czyli sekwencji wzmacniaczy chromosomowych i alternatywnych promotorów (Tabela 3).

Tabela 3 Liczba, rozmiar i lokalizacja charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ regionów DMR.

		Szpick kostny	Wątroba	Małżowina uszna	Serce	Śledziona	Wspólne
Poziom metylacji DNA	Hipometylowane	72	46	36	75	114	2
	Hipermetylowane	209	122	45	116	57	8
Liczba genów	Hipometylowane	56	44	34	69	92	2
	Hipermetylowane	198	114	40	107	38	3
Rozmiar	<250	23	12	6	11	14	-
	250-500	91	51	20	48	46	-
	500-750	84	59	24	51	47	6
	>750	83	46	31	50	64	4
Lokalizacja względem promotora	Dystalne	130	84	48	91	96	3
	Proksymalne	90	51	20	41	41	2
	Wewnątrzgenowe	38	24	7	16	18	-
	Międzygenowe	23	9	6	12	16	5

Tabela 4 Geny położone w sąsiedztwie charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ regionów DMR w małżowinie usznej.

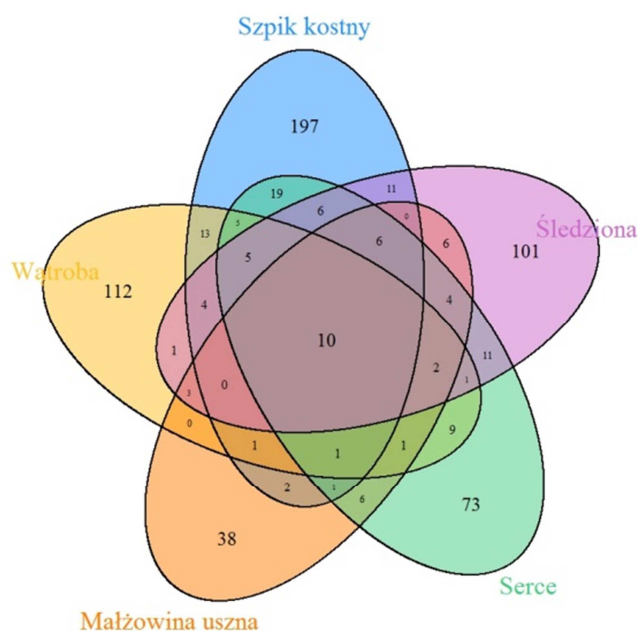
Nazwa	Chr	Początek	Koniec	C57BL/6J	BALB/c	MRL/MpJ
<i>Cnga3</i>	chr1	37273757	37273996	0,8	0,5	1,8
<i>Prlh</i>	chr1	92848564	92849198	1,9	2,9	0,6
<i>En1</i>	chr1	122500167	122500406	1,8	2,1	0,7
<i>Ren2</i>	chr1	135244187	135246656	2,1	2,5	0,8
<i>Optc</i>	chr1	135803133	135803482	3,6	3,7	1,6
<i>4931440L10Rik</i>	chr1	136442905	136443639	1,3	1,0	2,6
<i>Tnnt2</i>	chr1	137734988	137736673	1,0	0,9	2,9
<i>Rgs4</i>	chr1	171680139	171680683	0,3	0,0	3,1
<i>Nos1ap</i>	chr1	172488325	172489190	1,2	1,0	3,1
<i>Fcgr2b</i>	chr1	172906312	172906987	1,7	2,2	0,4
<i>Bcl2l11</i>	chr2	127950385	127950624	2,4	2,0	0,9
<i>Mcm8</i>	chr2	132639634	132640288	1,0	0,7	2,2
<i>Rya3</i>	chr2	153742209	153742463	2,8	2,3	1,1
<i>BC018465</i>	chr2	154048431	154048780	2,4	2,5	1,0
<i>Vapb</i>	chr2	173560552	173561327	0,3	0,7	1,9
<i>Tpd52</i>	chr3	8966192	8966468	0,9	1,0	2,1
<i>Gm5148</i>	chr3	37624779	37626218	1,1	0,4	2,4
<i>Uox</i>	chr3	146258303	146259276	2,0	2,0	0,8
<i>Uox</i>	chr3	146259903	146260812	0,3	0,2	2,0
<i>Pcsk9</i>	chr4	106136394	106138318	0,9	1,1	2,4
<i>Bsnd</i>	chr4	106167006	106167345	2,5	1,9	0,7
<i>Maneal</i>	chr4	124540650	124541396	0,7	0,6	2,6
<i>Gjb4</i>	chr4	127030714	127031369	1,9	1,5	5,1
<i>Rbp7</i>	chr4	148830650	148831853	2,5	1,9	0,5
<i>Kcnab2</i>	chr4	151854300	151854554	2,3	2,4	1,1
<i>Ski</i>	chr4	154598359	154599429	0,1	0,4	1,6
<i>Trfr2</i>	chr5	138010417	138011564	1,6	1,7	0,3
<i>Ghrhr</i>	chr6	55326006	55326575	2,0	1,9	0,8
<i>Tmem40</i>	chr6	115710410	115711362	2,5	2,3	1,0
<i>H1foo</i>	chr6	115892020	115893754	1,9	1,9	0,7
<i>Zscan22</i>	chr7	13482077	13482326	1,3	1,2	0,1
<i>Zfp428</i>	chr7	25290998	25291276	1,0	0,8	3,1
<i>Slc28a1</i>	chr7	88257446	88257775	1,5	1,8	0,5
<i>Htra4</i>	chr8	26150844	26151187	0,3	0,6	1,7
<i>Lonrf1</i>	chr8	37313285	37313736	0,6	0,7	1,8
<i>D030016E14Rik</i>	chr8	48621288	48621749	0,6	0,0	2,1
<i>Tm6sf2</i>	chr8	72596793	72597242	1,3	1,4	0,2
<i>Kifc3</i>	chr8	97637777	97638027	2,3	2,8	1,1
<i>Tbrg1</i>	chr9	37467057	37467817	0,2	0,5	2,0
<i>Gm8884</i>	chr9	48261250	48261792	3,5	2,6	1,0
<i>Eif1b</i>	chr9	120398788	120399332	0,7	0,6	2,0
<i>Ppil4</i>	chr10	7509779	7510958	0,3	0,1	1,4
<i>Zc3h12d</i>	chr10	7587001	7587665	1,7	1,5	0,5
<i>Arl1</i>	chr10	88191503	88192282	0,2	0,0	1,3
<i>Yeats4</i>	chr10	116661781	116662540	0,7	0,4	1,8
<i>Cpsf6</i>	chr10	116814283	116815261	0,2	0,1	1,2
<i>Npc111</i>	chr11	6132442	6132686	1,0	0,8	2,2
<i>Cops3</i>	chr11	59654752	59655702	0,3	0,4	1,5
<i>Fam18b</i>	chr11	62690533	62691505	1,0	0,4	2,4
<i>Gas2l2</i>	chr11	83242222	83242886	2,9	3,2	1,3
<i>Gas2l2</i>	chr11	83243442	83243878	1,9	1,8	0,6
<i>Osbp17</i>	chr11	96909374	96910572	1,9	2,1	0,7
<i>Hsd17b1</i>	chr11	100938341	100938690	1,8	1,7	0,6
<i>Msgn1</i>	chr12	11218036	11218673	1,3	1,6	0,0
<i>Inf2</i>	chr12	113824037	113824901	0,7	0,7	1,9
<i>Btbd6</i>	chr12	114211732	114212601	2,5	2,1	0,9
<i>Akr1e1</i>	chr13	4607703	4608482	0,0	0,0	3,1
<i>Zdhc11</i>	chr13	74098871	74100310	2,3	2,0	1,0
<i>Arsk</i>	chr13	76237743	76238342	0,6	0,5	1,7
<i>Gm7120</i>	chr13	120276144	120277193	1,7	1,3	3,7
<i>Pxk</i>	chr14	8928640	8929546	0,2	0,1	1,6
<i>Pibf1</i>	chr14	99495716	99496140	1,9	1,3	4,3
<i>Fam105b</i>	chr15	27562080	27562932	0,6	0,6	1,7
<i>Naga</i>	chr15	82169679	82170243	2,7	2,0	1,0
<i>Cyp2d22</i>	chr15	82208073	82209452	0,4	0,9	2,3
<i>Mcrs1</i>	chr15	99081644	99081893	1,1	1,3	0,0
<i>Krtap14</i>	chr16	88825671	88826015	1,2	1,2	3,1
<i>Cyp4f14</i>	chr17	33056077	33056731	1,4	1,6	0,3

Nazwa	Chr	Początek	Koniec	C57BL/6J	BALB/c	MRL/MpJ
<i>Ring1</i>	chr17	34161008	34161337	2,4	2,0	0,9
<i>Tnf</i>	chr17	35338904	35339578	2,0	2,6	0,6
<i>Ticam2</i>	chr18	46733459	46734858	0,6	0,4	3,7
<i>Ankrd1</i>	chr19	36195732	36195982	0,6	0,5	1,9
<i>Gpr50</i>	chrX	68914681	68916559	1,1	1,1	2,5
<i>Ikbkg</i>	chrX	71673409	71673878	1,1	1,2	2,8
<i>Mid1</i>	chrX	166427869	166428603	2,5	2,7	0,7

SKALA

5.1.3. Regiony DMR wspólne dla wszystkich zbadanych tkanek

Zidentyfikowano 10 regionów DMR, które były wspólne dla wszystkich zbadanych tkanek (Rysunek 1, Tabela 5). Regiony te zostały powiązane z pięcioma genami kodującymi następujące białka: aldoketoreduktazę *Akr1e1*, wewnątrzkomórkowe białko wiążące retinol - *Rbp7*, odpowiedzialne za tworzenie i segmentację mezodermy przyosiowej - *Msgn1*, *Cops3* - białko kompleksu sygnałsomu *Cop9*, *Cpsf6* - białko biorące udział w obróbce potranskrypcyjnej RNA, oraz 5 pięcioma międzygenowymi wyspami CpG. Najbliższymi genami dla trzech wysp CpG położonych na chromosomie 9 były geny *Trim43a* (+17,3 kpz), *Trim43b* (+17,5 kpz) i *Trim43c* (+19,5 kpz), które ulegają ekspresji w embronie przed implantacją (Stanghellini et al. 2009). Pozostałe dwie wyspy znajdowały się w pobliżu genu *Rasa2* (-1,9 kpz) kodującego białko z rodziny Ras aktywujące p21 oraz genu *Rdcd2* kodującego czynnik programowanej śmierci komórkowej (-9,0 kpz).



Rysunek 1 Współwystępowanie charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ regionów DMR w różnych tkankach.

Tabela 5 Regiony DMR charakterystyczne dla myszy MRL/MpJ we wszystkich pięciu zbadanych tkankach.

W tabeli przedstawiono lokalizacje i wyniki wzbogacenia metylovanego DNA dla regionów DMR dla myszy C57BL/6J (B6), BALB/c (Bc) i MRL/MpJ (M).

W nawiasach podano najbliższe geny zlokalizowane w pobliżu międzygenowych wysp CpG.

Nazwa	Chr	Start	Koniec	Szpik kostny			Wątroba			Małżowina uszna			Serce			Śledziona		
				B6	Bc	M	B6	Bc	M	B6	Bc	M	B6	Bc	M	B6	Bc	M
<i>Rbp7</i>	chr4	148830650	148831853	1,7	1,8	0,5	3,2	1,8	0,5	2,5	1,9	0,5	2,4	2,0	0,3	2,4	2,5	0,4
CGI(<i>Trim43a</i>)	chr9	88494209	88494858	0,2	0,0	1,8	0,5	0,0	1,7	0,1	0,0	1,4	0,4	0,0	1,7	0,1	0,0	1,2
CGI(<i>Trim43c</i>)	chr9	88753512	88754171	0,0	0,0	1,8	0,2	0,0	1,7	0,1	0,0	1,3	0,2	0,0	1,9	0,1	0,0	1,3
CGI(<i>Trim43b</i>)	chr9	88961199	88961948	0,3	0,0	2,2	0,7	0,0	1,8	0,5	0,0	1,7	0,5	0,0	2,3	0,2	0,0	1,9
CG I(<i>Rasa2</i>)	chr9	96437157	96437816	1,1	1,2	4,3	0,9	0,8	4,7	0,2	0,5	3,9	0,7	0,7	4,1	1,0	1,8	4,1
<i>Cpsf6</i>	chr10	116814283	116815261	0,5	0,3	2,9	0,5	0,1	1,6	0,2	0,1	1,2	0,5	0,2	2,2	0,1	0,2	1,6
<i>Cops3</i>	chr11	59654752	59655702	0,2	0,7	3,1	0,9	0,6	2,7	0,3	0,4	1,5	0,4	0,5	3,0	0,5	0,5	1,9
<i>Msgn1</i>	chr12	11218036	11218673	2,3	2,4	0,2	2,0	1,8	0,3	1,3	1,6	0,0	2,2	2,0	0,8	1,7	1,5	0,1
<i>Akr1e1</i>	chr13	4607703	4608482	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	2,7
CGI(<i>Pdcd2</i>)	chr17	15673304	15673974	0,1	0,2	1,7	0,1	0,2	1,9	0,1	0,2	2,1	0,3	0,1	2,1	0,1	0,1	2,0
			SKALA	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0									

5.1.4. Powiązanie regionów DMR z różnicami w ekspresji genów

Metylacja DNA jest ważnym mechanizmem regulacji ekspresji genów. Obecność regionu DMR w regionie promotorowym lub w obrębie pierwotnego transkryptu genu mogła wskazywać na inną regulację epigenetyczną danego genu, a tym samym skutkować zmianą poziomu ekspresji genu. W celu powiązania regionów DMR z różnicami w ekspresji genów zostały one zestawione z globalnymi profilami ekspresji genów otrzymanymi dla badanych tkanek przy użyciu mikromacierzy ekspresyjnej. Genomowe profile ekspresji uzyskano dla tego samego zestawu tkanek w taki sposób, że po homogenizacji danej próbki, z części materiału izolowano RNA, a z części DNA. Dzięki temu odpowiednie profile metylacji DNA i ekspresji genów reprezentowały nie tylko ten sam szczep i narząd, ale faktycznie te same próbki.

Regiony DMR zostały powiązane z odpowiadającymi im genami, których poziom ekspresji różnił się przynajmniej dwukrotnie pomiędzy myszą MRL/MpJ a oboma szczepami kontrolnymi (Tabela 6). Przykładami genów, których poziom ekspresji był odwrotnie skorelowany z poziomem metylacji DNA jest *Akr1e1*, który był hipermetylowany i wykazywał obniżoną ekspresję w każdej z badanych tkanek u myszy MRL/MpJ oraz *Rbp7*, który był hipometylowany u myszy MRL/MpJ w każdej z tkanek, ale którego ekspresja była wykrywana jedynie w uchu i sercu (dane mikromacierzowe, Tabela 6).

Tabela 6 Zestawienie regionów DMR i genów o przynajmniej dwukrotnej różnicy w poziomie ekspresji między myszą MRL/MpJ i szczepami kontrolnymi C57BL/6J i BALB/c.

W tabeli przedstawiono wyniki wzbogacenia metylovanego DNA dla regionów DMR (MeDIP) i poziomy ekspresji genów, czyli znormalizowane sygnały mikromacierzowe (mRNA) dla myszy C57BL/6J (B6), BALB/c (Bc) i MRL/MpJ (M).

Czcionką czerwoną oznaczono geny powiązane z hipermetylowanym regionem DMR, których poziom ekspresji było obniżony, a czcionką zieloną geny powiązane z hipometylowanymi regionami DMR, których poziom ekspresji był podwyższony, natomiast czcionką czarną geny, dla których różnica w poziomie ekspresji nie wykazywała odwrotnej korelacji z poziomem metylacji DNA. Poziom ekspresji genów, który był poniżej progu detekcji oznaczono czarnym tłem.

Tkanka	Nazwa genu	MeDIP			mRNA			Lokalizacja
		B6	Bc	M	B6	Bc	M	
Szpik kostny	2610109H07Rik	0,9	0,7	2,1	260	854	128	dystalny
	Akr1e1	0,0	0,0	3,5	533	432	91	proksymalny
	<i>Cd72</i>	1,0	1,8	3,8	7919	9353	3919	dystalny
	Fcamr	0,7	1,2	2,4	140	160	20	proksymalny
	<i>Gm16515</i>	0,6	0,7	2,0	2550	2077	6913	dystalny
	Gpr132	1,1	1,1	3,2	461	353	119	dystalny
	<i>H2-Aa</i>	1,7	1,9	0,4	103	98	38	dystalny
	<i>Nlrp3</i>	2,2	2,0	0,7	1162	1630	569	proksymalny
	<i>Ntm</i>	0,3	0,9	2,0	95	119	580	proksymalny
	Phlda3	1,8	1,8	0,4	89	145	341	dystalny
	Plscr4	0,5	0,2	2,2	84	102	38	dystalny
	Spata16	3,1	3,4	0,3	21	28	74	dystalny
	Ticam2	0,6	0,4	2,1	1033	1323	174	proksymalny
	<i>Tnni1</i>	1,3	1,3	2,7	532	276	1387	dystalny
Wątroba	2510049J12Rik	0,7	0,1	2,0	135	172	40	dystalny
	Akr1e1	0,0	0,0	2,4	4470	3786	673	proksymalny
	<i>Gpr56</i>	0,2	0,9	2,2	1050	1028	3605	proksymalny
	Slc1a2	0,6	0,5	1,6	6574	4546	1438	dystalny
	Ttc39a	2,4	2,2	0,8	219	335	3205	dystalny
Mażowina uszna	Akr1e1	0,0	0,0	3,1	918	691	129	proksymalny
	BC018465	2,4	2,5	1,0	27	24	86	dystalny
	Fcgr2b	1,7	2,2	0,4	146	99	43	proksymalny
	<i>Krtap14</i>	1,2	1,2	3,1	56	6	5171	wewnątrzgenowy
	<i>Optc</i>	3,6	3,7	1,6	161	159	57	wewnątrzgenowy
	Rbp7	2,5	1,9	0,5	166	267	805	dystalny
	Ticam2	0,6	0,4	3,7	120	136	49	proksymalny
<i>Zfp428</i>	1,0	0,8	3,1	42	47	95	dystalny	
Serce	3110035E14Rik	3,2	2,4	0,5	21	57	133	proksymalny
	<i>Acaa1b</i>	1,2	1,2	2,5	146	242	602	proksymalny
	Agr2	2,4	1,9	0,8	26	25	68	proksymalny
	Akr1e1	0,0	0,0	2,4	1951	1216	501	proksymalny
	Alox5	1,0	1,0	2,3	2453	1422	432	proksymalny
	Capg	0,7	1,0	2,0	2030	4190	536	proksymalny
	Fcgr2b	3,3	2,4	0,6	48	115	16	proksymalny
	<i>Lnx1</i>	1,9	1,6	0,5	1916	2027	876	dystalny
	Metap11	0,7	0,8	1,9	2528	2283	710	dystalny
	Rbp7	2,4	2,0	0,3	2367	1144	6062	dystalny
	Tmem179	1,2	1,5	3,1	2035	1711	538	proksymalny
Śledziona	Akr1e1	0,0	0,0	2,7	538	536	72	proksymalny
	<i>Capg</i>	2,3	2,6	1,2	12070	13476	4015	dystalny
	<i>Cldn13</i>	3,2	3,4	1,4	4588	4633	1126	proksymalny
	Cnga3	0,7	1,0	2,3	41	46	13	dystalny
	D030028A08Rik	1,8	1,8	0,6	470	549	151	dystalny
	Maneal	0,8	0,8	2,6	69	72	28	dystalny
	<i>Nbl1</i>	2,6	3,1	1,5	387	415	840	proksymalny
	Nmral1	0,6	0,0	1,7	76	86	34	proksymalny
	<i>Nos1ap</i>	1,0	1,2	3,3	568	526	1235	dystalny
	<i>Serpina3n</i>	0,2	0,2	1,5	3329	3102	6661	dystalny

MeDIP SKALA 0,0 1,0 2,0 3,0 4,0 5,0

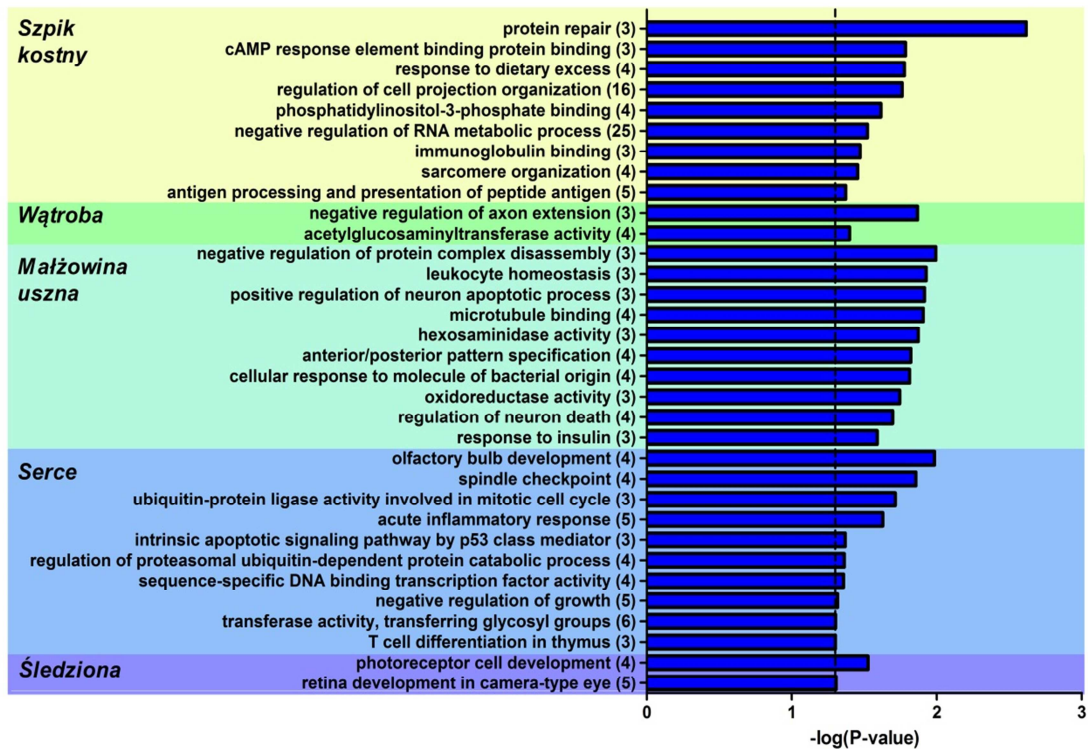
5.1.5. Analiza ontologiczna genów związanych z regionami DMR

W celu rozpoznania kontekstu biologicznego dla odnalezionych regionów DMR przeprowadzono analizę ontologiczną powiązanych z nimi genów (Rysunek 2). Regiony hipometylowane oraz hipermetyleowane były analizowane jako jedna grupa, co przez zwiększenie liczby genów w analizie ułatwia znalezienie funkcjonalnych adnotacji w wypadku stosunkowo niewielkich grup genów. Dla każdej z badanych tkanek znaleziono charakterystyczne zestawy kategorii funkcjonalnych, z których żadna nie była wspólna dla wszystkich tkanek. Dodatkowo podobne kategorie funkcjonalne zostały powiązane w klaster, których nazwa oraz poziom wzbogacenia pochodziły od kategorii funkcjonalnej o najwyższym poziomie istotności statystycznej (Rysunek 3).

W przypadku małżowiny usznej analiza ontologiczna 73 genów zmapowanych do regionów DMR wskazała na istotne statystycznie zagęszczenie genów należących do kilku interesujących z punktu widzenia regeneracji klasterów funkcjonalnych (Rysunek 3, Tabela 7). Najliczniejszym z nich był klaster związany z „*pozytywną regulacją apoptozy neuronów*”, w skład którego wchodziło 20 genów (Tabela 7). Apoptoza, która stymuluje kompensacyjną proliferację komórek poprzez uwolnienie czynników wzrostu i mitogenów (Bergmann and Steller 2010) uznawana jest za siłą napędową regeneracji w różnych modelach tego procesu. Inhibicja apoptozy u kijanek *Xenopus laevis* hamuje odrastanie ogona (Tseng et al. 2007). Ważnym klasterem był klaster „*odpowiedzi komórkowej na cząsteczki pochodzenia bakteryjnego*”, a więc potencjalnie związanych z regulacją odpowiedzi zapalnej (8 genów). Odpowiedź zapalna jest wywołana przez napływające do miejsca zranienia komórki układu odpornościowego, które są odpowiedzialne za zwalczanie drobnoustrojów oraz usuwanie pozostałości uszkodzonych tkanek. Dodatkowo komórki układu odpornościowego wydzielają w miejscu zranienia szereg czynników wzrostu i cytokin, które stymulują obecne w miejscu zranienia komórki do naprawy (Martin and Leibovich 2005). Co interesujące, myszy nokautowe PU.1 pozbawione makrofagów i neutrofilów goją rany w podobnym tempie co myszy typu dzikiego, ale procesowi temu nie towarzyszy powstawanie blizny (Martin et al. 2003). Kolejnym godnym uwagi był klaster genów „*tworzenia przednio-tylnego wzorca ekspresji*” (8 genów). Różnicowanie się proliferujących komórek jest konieczne do odtworzenia prawidłowej architektury tkanek w miejscu uszkodzenia.

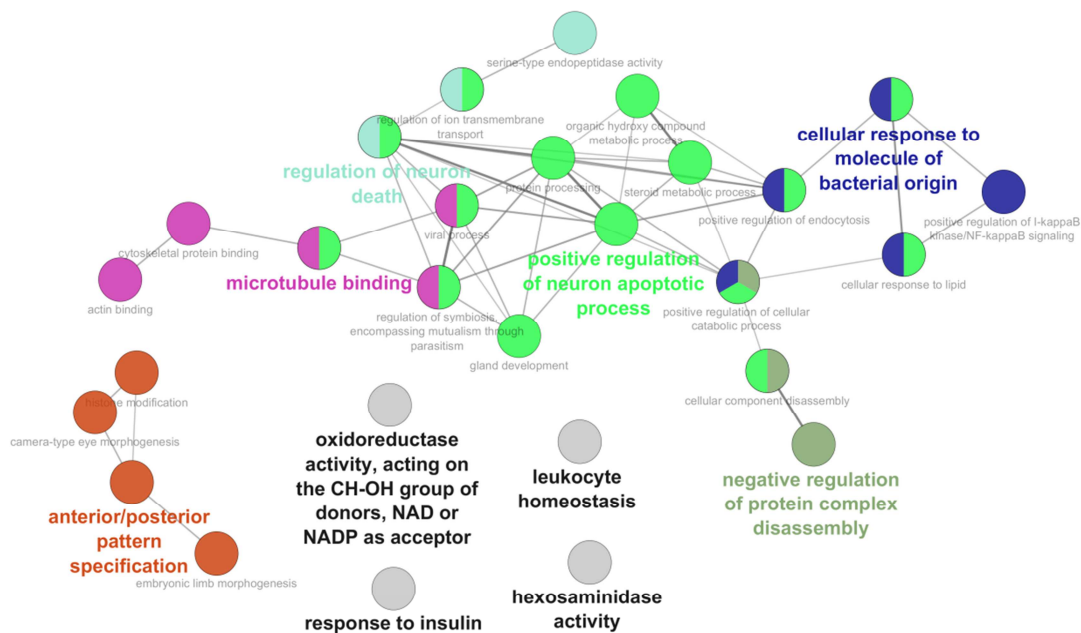
W odniesieniu do pozostałych tkanek potencjalne asocjacje między wyznaczonymi kategoriami ontologicznymi, a potencjałem regeneracyjnym nie wydają się tak oczywiste jak w małżowinie usznej, aczkolwiek warto odnotować moduły genowe

związane z przetwarzaniem antygeny oraz z sygnalizacją za pośrednictwem kinazy fosfatydylinozytolowej (PI3K) znalezione w wypadku szpiku kostnego.



Rysunek 2 Analiza ontologiczna grup genów zmapowanych do regionów DMR charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ.

Wyniki dla reprezentatywnej kategorii przedstawiono jako ujemny logarytm dziesiętny z wyznaczonej wartości istotności statystycznej testu hipergeometrycznego p po korekcie Benjaminiego-Hochberga. W nawiasie podano liczbę genów związanych z daną kategorią funkcjonalną.



Rysunek 3 Analiza ontologiczna genów związanych z regionami DMR charakterystycznymi dla myszy MRL/MpJ w małżowinie usznej.

Na rysunku przedstawiono kategorie o poziomie istotności $p < 0,05$ oraz istotne po korekcie Benjaminiego-Hochberga. Kategorie o podobnej funkcji zostały połączone w klaster kategorii których nazwa odpowiada kategorii o największym poziomie istotności.

Tabela 7 Zestawienie genów należących do klastrów funkcjonalnych.

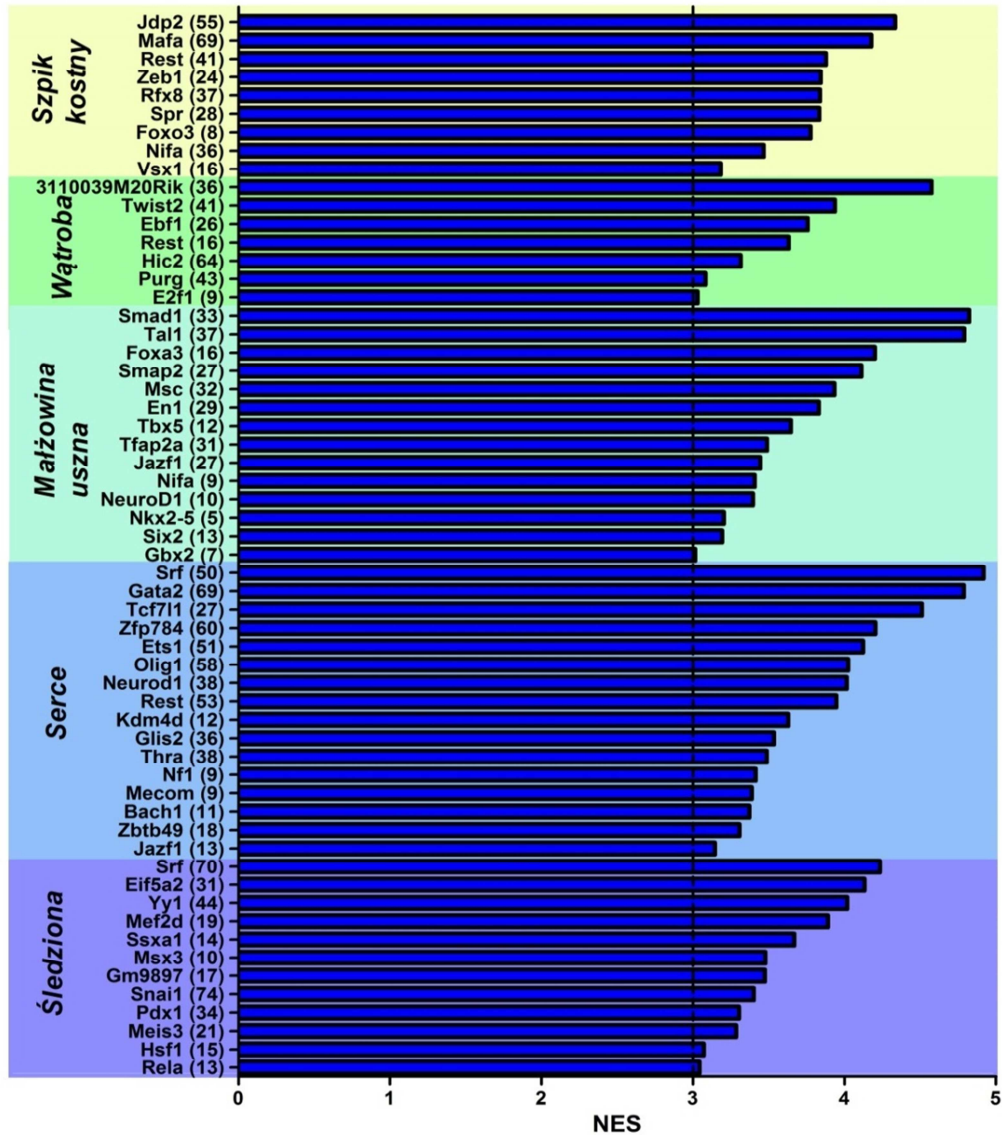
Klaster wymienione w tekście zostały wyróżnione. Poziom wzbogacenia (ES) został wyrażony jako ujemny logarytm dziesiętny z wartości istotności statystycznej p wyznaczonej dla danego klastra w teście hipergeometrycznym. Wszystkie wyniki podane w tabeli były istotne po korekcie Benjaminiego-Hochberga.

Klaster	ES	Liczba genów	Hipometylowane	Hipermetylowane
positive regulation of neuron apoptotic process	3,98	20	<i>Bcl2l11, Fcgr2b, Gas2l2, Ghrhr, Hsd17b1, Kcnab2, Kifc3, Mid1, Nos1ap, Osbp17, Tnf</i>	<i>Akr1e1, Ankrd1, Cnga3, Cops3, Cyp2d22, Npc111, Pcsk9, Ticam2, Vapb</i>
microtubule binding	3,07	10	<i>Bcl2l11, Gas2l2, Inf2, Kifc3, Tnf</i>	<i>Ankrd1, Npc111, Pxx, Tnnt2, Vapb</i>
anterior/posterior pattern specification	2,70	8	<i>Bcl2l11, En1, Mcrs1, Msgn1, Ring1</i>	<i>Cnga3, Ski, Yeats4</i>
hexosaminidase activity	2,54	3	<i>Naga</i>	<i>4931440L10Rik, Maneal</i>
leukocyte homeostasis	2,53	3	<i>Bcl2l11, Fcgr2b</i>	<i>lkbkg</i>
cellular response to molecule of bacterial origin	2,28	8	<i>Fcgr2b, Osbp17, Tnf</i>	<i>Akr1e1, Ankrd1, lkbkg, Pcsk9, Ticam2</i>
negative regulation of protein complex disassembly	2,11	6	<i>Gas2l2, Mid1, Osbp17, Tnf</i>	<i>Akr1e1, Pcsk9</i>
oxidoreductase activity	2,08	3	<i>Hsd17b1, Kcnab2</i>	<i>Akr1e1</i>
regulation of neuron death	1,90	7	<i>Bcl2l11, Kcnab2, Nos1ap, Tnf</i>	<i>Cnga3, Htra4, Pcsk9</i>
response to insulin	1,78	3	<i>Ghrhr, Prlh</i>	<i>Pcsk9</i>

5.1.6. Identyfikacja transkrypcyjnych czynników regulatorowych genów związanych z regionami DMR

W celu określenia potencjalnych czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów związanych z regionami DMR, przeprowadzono analizę motywów sekwencyjnych zlokalizowanych w pobliżu ich miejsc startu transkrypcji (do 500 pb powyżej miejsca startu transkrypcji TSS) (Rysunek 4, Tabela 8). Wśród genów związanych z regionami DMR w małżowinie usznej, największe zagęszczenie miejsc wiązania obserwuje się dla czynnika Smad1 (33 z 73 genów), związanego ze szlakiem sygnałowym Tgf β /Bmp. Największa liczba genów (37 z 73 genów) jest powiązana z czynnikiem Tal1, który reguluje proces neowaskularyzacji (Tang et al. 2006) oraz jest wymagany do prawidłowego procesu regeneracji płetw u danio pręgowanego (Hasegawa et al. 2015).

Potencjalne czynniki regulatorowe wyznaczone w sposób analogiczny dla grup genów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w ekspresji (ta analiza nie została zamieszczona w niniejszej pracy) nie pokrywają się z czynnikami transkrypcyjnymi związanymi z regionami DMR.



Rysunek 4 Potencjalne czynniki regulatorowe genów położonych w sąsiedztwie regionów DMR charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ – analiza zagęszczenia motywów sekwencyjnych w regionach promotorowych powyżej 500 pz od miejsc startu transkrypcji TSS.

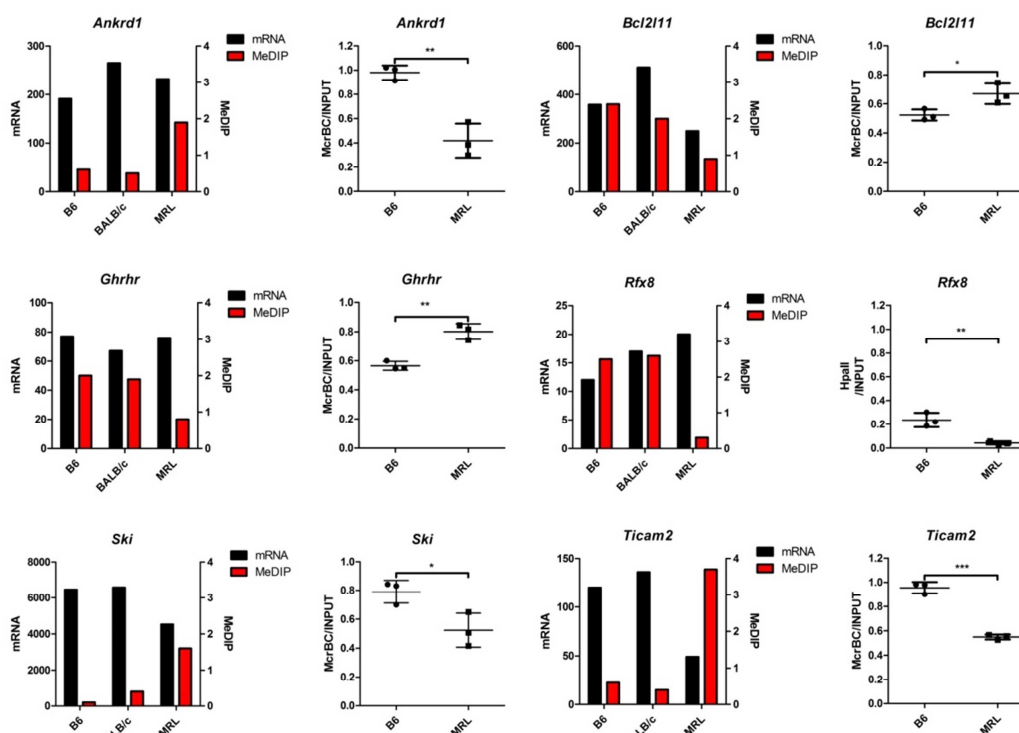
Wyniki przedstawiono jako znormalizowany wynik wzbogacenia NES (ang. *Normalised Enrichment Score*). W nawiasie podano liczbę genów regulowaną przez dany czynnik transkrypcyjny.

Tabela 8 Geny powiązane z charakterystycznymi dla myszy MRL/MpJ regionami DMR i ich potencjalne czynniki regulatorowe.

Czynnik	NES	Liczba genów	Liczba motywów	Hipometylowane	Hipermetrylowane
Smad1	4,823	33	9	<i>BC018465, Bcl2l11, Bsnd, Cyp4f14, En1, Fcgr2b, Gas2l2, Ghrhr, Hsd17b1, Kifc3, Mid1, Msgn1, Nos1ap, Optc, Osbp17, Prlh, Rya3, Slc28a1, Tmem40</i>	<i>4931440L10Rik, Ankrd1, Cnga3, Cops3, Fam105b, Gjb4, Gpr50, Krtap14, Npc111, Pibf1, Rgs4, Tnnt2, Tpd52, Zc3h12</i>
Tal1	4,791	37	19	<i>BC018465, Bcl2l11, Bsnd, Cyp4f14, Fcgr2b, Gas2l2, Ghrhr, Hsd17b1, Inf2, Kifc3, Mid1, Msgn1, Nos1ap, Optc, Osbp17, Prlh, Rbp7, Rya3, Tmem40, Tnf, Uox</i>	<i>4931440L10Rik, Ankrd1, Arl1, Cnga3, Gjb4, Gm5148, Gpr50, Ikbkg, Krtap14, Npc111, Pxx, Tbrg1, Tnnt2, Tpd52, Zc3h12d, Zfp428</i>
Foxa3	4,201	16	7	<i>Bcl2l11, Bsnd, En1, Gas2l2, Ghrhr, Kcnab2, Mid1, Msgn1, Optc, Uox</i>	<i>Ankrd1, Gjb4, Ikbkg, Tpd52, Vapb, Zfp428</i>
Smad2	4,112	27	4	<i>BC018465, Bsnd, Cyp4f14, En1, Fcgr2b, Gas2l2, Ghrhr, Hsd17b1, Kifc3, Mid1, Msgn1, Nos1ap, Optc, Prlh, Rbp7, Slc28a1, Tmem40, Tnf, Trfr2</i>	<i>Eif1b, Gjb4, Gm7120, Npc111, Pibf1, Pxx, Tnnt2, Tpd52</i>
Msc	3,934	32	4	<i>BC018465, Bsnd, Cyp4f14, En1, Gas2l2, Ghrhr, Hsd17b1, Inf2, Kifc3, Mid1, Msgn1, Optc, Osbp17, Prlh, Rya3, Slc28a1, Tmem40, Tnf, Uox</i>	<i>4931440L10Rik, Ankrd1, D030016E14Rik, Fam18b, Gjb4, Gm5148, Gpr50, Krtap14, Npc111, Pxx, Tnnt2, Tpd52, Zc3h12d</i>
En1	3,83	29	9	<i>Bsnd, Cyp4f14, En1, Gas2l2, Hsd17b1, Kcnab2, Kifc3, Mcrs1, Mid1, Msgn1, Nos1ap, Osbp17, Rbp7, Uox</i>	<i>4931440L10Rik, Ankrd1, Cnga3, Cops3, Cpsf6, Eif1b, Krtap14, Npc111, Pcsk9, Pibf1, Tbrg1, Tnnt2, Tpd52, Vapb, Zfp428</i>
Tbx5	3,646	12	2	<i>BC018465, Bsnd, Cyp4f14, Mid1, Msgn1, Nos1ap, Prlh, Rya3</i>	<i>Ankrd1, Gjb4, Gpr50, Tpd52</i>
Tfap2a	3,489	31	3	<i>BC018465, Bcl2l11, Bsnd, Cyp4f14, En1, Fcgr2b, Gas2l2, Ghrhr, H1foo, Hsd17b1, Inf2, Kifc3, Mid1, Nos1ap, Optc, Prlh, Rya3, Slc28a1</i>	<i>Ankrd1, Arl1, Cnga3, Fam18b, Gjb4, Mcm8, Npc111, Pibf1, Pxx, Tnnt2, Tpd52, Zc3h12d, Zfp428</i>
Jazf1	3,445	27	2	<i>BC018465, Bcl2l11, Cyp4f14, En1, Fcgr2b, Ghrhr, Hsd17b1, Mid1, Msgn1, Nos1ap, Optc, Prlh, Ring1, Tnf, Trfr2</i>	<i>Cnga3, Cpsf6, Fam18b, Gjb4, Gpr50, Htra4, Krtap14, Npc111, Pibf1, Tnnt2, Tpd52, Zc3h12d</i>
Nifa	3,408	9	2	<i>BC018465, Cyp4f14, En1, Kifc3, Optc, Tmem40</i>	<i>Gjb4, Ikbkg, Krtap14</i>
NeuroD1	3,396	10	2	<i>En1, Kcnab2, Mid1, Optc, Rbp7, Tnf, Uox</i>	<i>4931440L10Rik, Gjb4, Tnnt2</i>
Nkx2-5	3,203	5	1	<i>BC018465, Msgn1</i>	<i>Cops3, Cpsf6, Fam18b</i>
Six2	3,192	13	4	<i>Bsnd, En1, Hsd17b1, Kifc3, Mid1, Msgn1, Nos1ap</i>	<i>Ankrd1, Cnga3, Gjb4, Tpd52, Vapb, Zfp428</i>
Gbx2	3,015	7	1	<i>Kifc3, Msgn1, Optc, Slc28a1, Uox</i>	<i>Ankrd1, Rgs4</i>

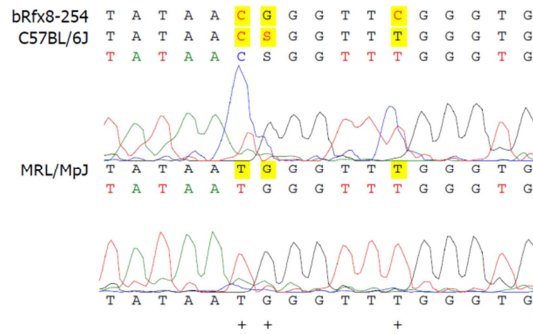
5.1.7. Weryfikacja wyników mikromacierzowych dla wybranych regionów DMR

Weryfikację mikromacierzowych odczytów poziomów metylacji DNA wybranych regionów DMR wykonano za pomocą ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych po reakcji trawienia DNA za pomocą enzymu McrBC, który trawi DNA zawierające 5-mC, lub HpaII, który trawi niezmetylowane DNA. Do walidacji wybrano regiony DMR położone w pobliżu genów *Ghrhr* (receptor somatoliberyny, małżowina uszna), *Bcl2l11* (facylitator apoptozy, małżowina uszna), *Ski* (protoonkogen regulujący szlak sygnałowy Tgf β , małżowina uszna), *Ankrd1* (czynniki transkrypcyjny oraz białko cytoszkieletu, małżowina uszna), *Rfx8* (czynnik transkrypcyjny, śledziona) (Rysunek 5). Dodatkowo status metylacyjny genu *Rfx8* został potwierdzony za pomocą sekwencjonowania wodorosiarczynowego (Rysunek 6). Uzyskano wyniki oznaczeń były zgodne z rezultatami pomiarów mikromacierzowych.



Rysunek 5 Weryfikacja mikromacierzowych oznaczeń poziomu metylacji DNA dla wybranych regionów DMR wykonana przy użyciu trawiącego DNA zawierającego 5-mC enzymu McrBC i metody qPCR.

Po lewej stronie przedstawiono wyniki poziomu metylacji (MeDIP) i ekspresji genów (mRNA) uzyskane w eksperymentach mikromacierzowych, a po prawej rezultaty oznaczania poziomu metylacji DNA dla myszy C57BL/6J (B6) i MRL/MpJ (MRL) wykonane przy użyciu enzymów McrBC i HpaII. Wyniki przedstawiono jako stosunek ilości niestrawionego DNA w stosunku do niestrawionego DNA użytego w reakcji (INPUT). Istotność statystyczną oznaczono za pomocą dwuśladowego heteroskedastycznego testu t-Studenta. Poziomy istotności oznaczono * dla $p \leq 0.05$, ** dla $p \leq 0.01$ i *** dla $p \leq 0.001$.



Rysunek 6 Fragment chromatogramu sekwencyjnego regionu DMR zidentyfikowanego w śledzienie dla genu *Rfx8* po reakcji konwersji wodorosiarczynowej DNA.

U myszy MRL/MpJ obserwowana jest hipometylacja regionu promotorowego genu *Rfx8* w śledzienie. Po reakcji konwersji niezmetylowana cytozyna ulega deaminacji do uracylu i jest odczytywana w sekwencjonowaniu DNA jako tymina.

5.2. Dyskusja

5.2.1. Otrzymanie genomowych profili metylacji DNA

Jednym z głównych zamierzeń podjętych w tej pracy było określenie potencjalnych związków między wyróżniającymi cechami profili metylacji DNA myszy MRL/MpJ, a jej zdolnościami regeneracyjnymi. W opublikowanych badaniach wstępnych przeprowadzono analizę genomowych profili metylacji DNA u pięcioletniogodniowych samców myszy MRL/MpJ i C57BL/6J w trzech tkankach: wątrobie, śledzionie i sercu (Gornikiewicz et al. 2013). Uzyskane wyniki pozwoliły zaobserwować kilka charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ cech, odróżniających ją od myszy C57BL/6J. Przede wszystkim globalne profile metylacji DNA myszy MRL/MpJ miały większą liczbę regionów DMR w odległych regionach promotorowych, czyli powyżej 500 pb od miejsca startu transkrypcji oraz wykazywały większe podobieństwo międzytkankowe wyrażone wartością korelacji Pearsona. Ponadto w każdej z tkanek zaobserwowano hipometylację wielu genów homeotycznych oraz genów związanych z rozwojem embrionalnym (Gornikiewicz et al. 2013).

Duża część różnic w metylacji DNA między tymi dwoma szczepami myszy nie musiała wiązać się jednak ze zwiększonymi zdolnościami do regeneracji. W celu wyselekcjonowania mniejszej liczby, ale charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ różnic, postanowiono wykorzystać drugi szczep kontrolny, mysz BALB/c, która podobnie jak mysz C57BL/6J nie jest zdolna do zamykania otworów w uszach (Li et al. 2001). Szczepy C57BL/6J i BALB/c nie są blisko spokrewnione ani między sobą, ani z myszą MRL/MpJ. Należy zaznaczyć, że brak dla myszy MRL/MpJ blisko spokrewnionego szczepu referencyjnego niewykazującego podwyższonych zdolności regeneracyjnych, jak to ma miejsce w wypadku np. określonego szczepu nokautowego i szczepu wyjściowego. Zatem na wyniki analizy profili metylacji DNA tych trzech szczepów mogą do pewnego stopnia wpływać także różnice genetyczne. Ponadto w drugim profilowaniu wykorzystano samice w wieku 8 tygodni, czyli po osiągnięciu dojrzałości hodowlanej.

Genomowe profile metylacji DNA uzyskano przy wykorzystaniu immunoprecypitacji metylovanego DNA połączonej z analizą frakcji wzbogaconego DNA za pomocą mikromacierzy DNA (MeDIP-chip), które umożliwiły badanie profili metylacji DNA w regionach promotorowych oraz wyspach CpG. W badaniu uzyskano genomowe profile metylacji DNA dla pięciu tkanek: małżowiny usznej, szpiku kostnego, śledziony, wątroby i serca. Zwiększone zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ są wyraźnie manifestowane w małżowinie usznej, dlatego znalezione w niej regiony DMR wydają się stosunkowo łatwe do powiązania z tym zjawiskiem. Szpik kostny oraz śledziona

zostały zbadane ze względu na ich role w funkcjonowaniu układu immunologicznego, który pełni ważną rolę w procesie gojenia ran. Natomiast serce i wątroba zostały zestawione jako narządy o odpowiednio niskiej i wysokiej zdolności do regeneracji.

5.2.2. Regiony DMR charakterystyczne dla myszy MRL/MpJ

Większość regionów DMR była specyficzna dla każdej z tkanek, jednak dziesięć regionów DMR znaleziono we wszystkich pięciu badanych tkankach (Tabela 5). Wspólne dla wszystkich tkanek regiony DMR było położone w obrębie regionów promotorowych genów *Akr1e1*, *Cops3*, *Cpsf6*, *Msgn1* i *Rbp7* oraz pięciu wysp CpG. We wszystkich zbadanych tkankach, oprócz śledziony, zaobserwowano wśród regionów DMR przewagę regionów hipermetylowanych. Ponadto przeważały dystalne regiony DMR, czyli położone powyżej 500 pb względem miejsca startu transkrypcji. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami porównania genomowych profili metylacji DNA u pięcioletniogodniowych samców myszy MRL/MpJ i C57BL/6J (Gornikiewicz et al. 2013).

Oczekiwaną konsekwencją zaobserwowanych różnic w profilach metylacji DNA jest różnica w poziomie ekspresji genów, z którymi są one powiązane. Zidentyfikowano bardzo nieliczną grupę genów, które wykazywały zarówno różnice metylacji DNA, jak i w ekspresji między myszą MRL/MpJ a dwoma szczepami kontrolnymi. Jeszcze mniej genów wykazywało odwrotną korelację między znalezionymi różnicami w metylacji DNA i ekspresji w takim porównaniu. Wynik ten nie jest jednak zaskakujący, jeśli uwzględnić nałożenie na siebie kilku ostrych kryteriów selekcji, czyli: (i) różnicy w statusie metylacji DNA wyrażone identyfikacją DMR (ii) dwukrotnej różnicy w poziomie ekspresji genu (iii) wymogu obu tych różnic między MRL/MpJ a dwoma szczepami kontrolnymi BALB/c i C57BL/6J. Przyjęcie tak ostrych kryteriów miało na celu identyfikację najistotniejszych czynników charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ.

Wśród genów różnie metylowanych we wszystkich tkankach jedynie dla *Akr1e1* (wszystkie tkanki) i *Rbp7* (serce i małżowina uszna) zaobserwowano negatywną relację między poziomem metylacji DNA i poziomem ekspresji genu. Ekspresja genu *Msgn1* nie została wykryta w badaniu mikromacierzowym w żadnej z tkanek, natomiast dla genów *Cops3* i *Cpsf6* nie zaobserwowano znaczących zmian w poziomie ekspresji związanych z obecnością regionu DMR (Tabela 9).

Dla większości zbadanych genów nie znaleziono wyraźnej zależności pomiędzy obecnością regionów DMR i różnicami ekspresji (Tabela 6). Obecność regionu DMR była powiązana z dwukrotną zmianą poziomu ekspresji 14 genów dla szpiku kostnego, 4 genów dla wątroby, 8 dla małżowiny usznej, 11 genów dla serca i 10 genów dla śledziony. Jednak tylko dla części z tych genów występowała negatywna korelacja między znalezionymi regionami DMR a różnicami w poziomie ekspresji genów.

Tabela 9 Zestawienie charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ regionów DMR (MeDIP) wspólnych dla wszystkich tkanek i poziomów ekspresji genów z nimi związanych (mRNA).

W tabeli przedstawiono wyniki wzbogacenia metylovanego DNA dla regionów DMR (MeDIP) i poziomy ekspresji genów (mRNA) dla myszy C57BL/6J (B6), BALB/c (Bc) i MRL/MpJ (M).

Czcionką czerwoną oznaczono geny powiązane z hipermetrylowanym regionem DMR, których poziom ekspresji było dwukrotnie obniżony, a czcionką zieloną geny powiązane z hipometrylowanymi regionami DMR, których poziom ekspresji był dwukrotnie podwyższony, natomiast czcionką czarną geny, dla których różnice w poziomie ekspresji nie wykazywały odwrotnej korelacji z poziomem metylacji DNA. Poziom ekspresji genów, który był poniżej progu detekcji oznaczono czarnym tłem.

Tkanka	Nazwa	MeDIP			mRNA		
		B6	Bc	M	B6	Bc	M
Szpik kostny	Akr1e1	0,0	0,0	3,5	533	432	91
	Cops3	0,2	0,7	3,1	3509	2493	3743
	Cpsf6	0,5	0,3	2,9	7766	7894	6427
	Msgn1	2,3	2,4	0,2	12	21	13
	Rbp7	1,7	1,8	0,5	24	23	26
Wątroba	Akr1e1	0,0	0,0	2,4	4470	3786	673
	Cops3	0,9	0,6	2,7	4153	2821	3135
	Cpsf6	0,5	0,1	1,6	2333	2028	2501
	Msgn1	2,0	1,8	0,3	15	13	12
	Rbp7	3,2	1,8	0,5	19	8	46
Małżowina uszna	Akr1e1	0,0	0,0	3,1	918	691	129
	Cops3	0,3	0,4	1,5	2370	2846	1963
	Cpsf6	0,2	0,1	1,2	4213	3947	3545
	Msgn1	1,3	1,6	0,0	10	7	8
	Rbp7	2,5	1,9	0,5	166	267	805
Serce	Akr1e1	0,0	0,0	2,4	1951	1216	501
	Cops3	0,4	0,5	3,0	4967	3936	4773
	Cpsf6	0,5	0,2	2,2	3132	2741	2713
	Msgn1	2,2	2,0	0,8	20	14	25
	Rbp7	2,4	2,0	0,3	2367	1144	6062
Śledziona	Akr1e1	0,0	0,0	2,7	538	536	72
	Cops3	0,5	0,5	1,9	2182	2124	1415
	Cpsf6	0,1	0,2	1,6	6573	5079	5286
	Msgn1	1,7	1,5	0,1	27	79	22
	Rbp7	2,4	2,5	0,4	15	9	10

MeDIP SKALA 0,0 1,0 2,0 3,0 4,0 5,0

Taka niewielka liczba genów wykazujących korelacje między statusem metylacji DNA i ekspresji nie jest czymś nietypowym w przypadku badań genomowych przeprowadzonych na tkankach, a nie liniach komórkowych i może mieć kilka przyczyn (Liang et al. 2011, Sim et al. 2014). Przede wszystkim w przeprowadzonych badaniach wykorzystano DNA i RNA wyizolowane z całych narządów, które składają się z wielu różnych rodzajów komórek o charakterystycznych dla siebie profilach metylacji DNA i ekspresji genów. Zatem w jednym z typów komórek może mieć miejsce silna metylacja DNA, a w innym silna ekspresja danego genu. Dodatkowo, jeden gen może być regulowany przez wiele regionów DMR, które mogą być zlokalizowane w regionie promotorowym, ale również w obrębie odległych enhancerów lub brzegów i szelfów wysp CpG. Ponadto, dla danego genu mogą występować diametralnie różne wartości ekspresji dla różnych wariantów transkrypcyjnych. Co istotne, metylacja DNA nie jest jedynym mechanizmem regulującym ekspresję genów. Oznacza to, że sam brak metylacji DNA nie skutkuje wzrostem poziomu ekspresji genu, a jedynie czyni ją możliwą w przypadku pojawienia się odpowiedniego sygnału z otoczenia.

5.2.3. Wybrane geny położone w sąsiedztwie regionów DMR w małżowinie usznej i implikacje z potencjałem regeneracyjnym myszy MRL/MpJ

Eksperymenty oparte na przeszczepach tkanek wskazują, że zdolności regeneracyjne są silnie zależne od organizmu biorcy. Mimo ich niepowodzenia, np. próba przeniesienia zdolności do zamykania otworów w uszach przez komórki szpiku kostnego (Kench et al. 1999), nie oznacza, że w żadnym stopniu komórki szpiku kostnego nie wspomagają procesu zamykania otworów w uszach, a jedynie, że cecha ta nie jest zależna wyłącznie od nich. Obecność regionu DMR w pozostałych tkankach może mieć znaczenie dla zdolności zamykania otworów w uszach, jeżeli komórki z niej pochodzące infiltrują miejsce zranienia (śledziona, szpik kostny) lub tkanka ta produkuje hormony lub czynniki wzrostu wydzielane do krwi (wątroba). Zatem, analiza regionów DMR w każdej z tkanek może być cennym źródłem informacji, np. odmienny status metylacyjny genu *Fcgr3* (szpik kostny), którego ekspresja rośnie podczas gojenia ran u płodów (Teusner et al. 2006), genu *H2-Aa* (szpik kostny), którego ekspresja spada podczas regeneracyjnego zamykania otworów w uszach u myszy MRL/MpJ, czy genu *Rnf7* (śledziona), który to gen pełni rolę w stabilizacji czynnika *Hif1a* podczas procesu zamykania otworów w uszach (Gourevitch et al. 2014). Dodatkowo w tkankach nieuszkodzonych zaobserwowane różnice w poziomie metylacji DNA nie muszą skutkować znaczącymi zmianami w poziomie ekspresji

genów, ale mogą one mieć wpływ dopiero po zranieniu zwierząt lub na późniejszych etapach gojenia rany.

Zwiększone zdolności regeneracyjne zaobserwowano wprawdzie w szeregu tkanek myszy MRL/MpJ, jednak bardzo często ograniczały się one do jednego doniesienia lub niezależne zespoły miały trudności w powtórzeniu uzyskanych wyników, stąd w tej pracy skupiono się na analizie regionów DMR znalezionych w małżowinie usznej. Przedstawione poniżej rozważania dotyczące implikacji między statusem metylacyjnym wybranych genów u myszy MRL/MpJ a potencjałem regeneracyjnym mają na celu przede wszystkim wskazanie możliwych kierunków dalszych prac badawczych. Należy podkreślić, że poniższa część dyskusji jest oparta o subiektywną interpretację dostępnych danych literaturowych i nie ma charakteru konkluzyjnego. Podsumowanie informacji dotyczących poziomu wzbogacenia, analizy ontologicznej, identyfikacji nadrzędnych czynników transkrypcyjnych oraz lokalizacji chromosomowych wybranych regionów DMR zidentyfikowanych w małżowinie usznej przedstawiono w poniższej tabeli (Tabela 10).

Tabela 10 Zestawienie danych dotyczących wybranych regionów DMR w małżowinie usznej charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ.

W tabeli przedstawiono najważniejsze geny znajdujących się w pobliżu regionów DMR, lokalizację regionów DMR w postaci koordynat genomowych i w centymorganach (cM), ich poziom wzbogacenia (MeDIP), poziom ekspresji genu (mRNA), przynależność do kategorii funkcjonalnej (GO: Ap – apoptoza, Diff – różnicowanie komórek, Inf – stan zapalny), potencjalne czynniki transkrypcyjne regulujące te geny (TF) oraz położenie w obrębie loci cechy ilościowej (QTL). Wartości ekspresji obciążone dużym błędem pomiaru lub brak informacji o poziomie ekspresji (ND) oznaczono czarnym tłem.

Nazwa	Chr	Początek	Koniec	MeDIP			mRNA			Apo	GO Diff	Inf	Smad1	TF Tal1	En1	cM	QTL
				B6	BALBc	MRL	B6	BALBc	MRL								
<i>Prlh</i>	chr1	92848564	92849198	1,9	2,9	0,6	35	36	28						46	Sth1	
<i>En1</i>	chr1	122500167	122500406	1,8	2,1	0,7	ND	ND	ND						53	Sth1	
<i>Optc</i>	chr1	135803133	135803482	3,6	3,7	1,6	188	164	27						58	Sth1	
<i>Nos1ap</i>	chr1	172488325	172489190	1,2	1,0	3,1	729	546	701						77		
<i>Fcgr2b</i>	chr1	172906312	172906987	1,7	2,2	0,4	2438	2636	2312						78		
<i>Bcl2l11</i>	chr2	127950385	127950624	2,4	2,0	0,9	358	512	249						62		
<i>Vapb</i>	chr2	173560552	173561327	0,3	0,7	1,9	2110	1773	3432						97		
<i>Pcsk9</i>	chr4	106136394	106138318	0,9	1,1	2,4	261	170	134						50		
<i>Gjb4</i>	chr4	127030714	127031369	1,9	1,5	5,1	16047	16831	12613						62	Heal8	
<i>Rbp7</i>	chr4	148830650	148831853	2,5	1,9	0,5	166	267	805						79	Heal8	
<i>Kcnab2</i>	chr4	151854300	151854554	2,3	2,4	1,1	657	523	362						83	Heal8	
<i>Ski</i>	chr4	154598359	154599429	0,1	0,4	1,6	6462	6582	4532						86	Heal8	
<i>Ghrhr</i>	chr6	55326006	55326575	2,0	1,9	0,8	77	67	76						27	Sth5	
<i>Tmem40</i>	chr6	115710410	115711362	2,5	2,3	1,0	3032	2168	3706						54	Sth5	
<i>Kifc3</i>	chr8	97637777	97638027	2,3	2,8	1,1	1916	1620	2137						47	Heal1	
<i>Eif1b</i>	chr9	120398788	120399332	0,7	0,6	2,0	2002	2207	1369						72	Sth9	
<i>Arl1</i>	chr10	88191503	88192282	0,2	0,0	1,3	8308	8957	6535						44	Chr10b	
<i>Yeats4</i>	chr10	116661781	116662540	0,7	0,4	1,8	3118	2672	3588						65	Chr10	
<i>Cpsf6</i>	chr10	116814283	116815261	0,2	0,1	1,2	4213	3947	3545						65	Chr10	
<i>Cops3</i>	chr11	59654752	59655702	0,3	0,4	1,5	2370	2846	1963						38		
<i>Gas2l2</i>	chr11	83242222	83242886	2,9	3,2	1,3	ND	ND	ND						50	Heal10	
<i>Gas2l2</i>	chr11	83243442	83243878	1,9	1,8	0,6	ND	ND	ND						50	Heal10	
<i>Osbpl7</i>	chr11	96909374	96910572	1,9	2,1	0,7	481	475	417						61	Heal10	
<i>Hsd17b1</i>	chr11	100938341	100938690	1,8	1,7	0,6	33	31	63						64	Heal10	
<i>Msgn1</i>	chr12	11218036	11218673	1,3	1,6	0,0	10	7	8						6	Chr12	
<i>Inf2</i>	chr12	113824037	113824901	0,7	0,7	1,9	2032	1878	3795						61		
<i>Akr1e1</i>	chr13	4607703	4608482	0,0	0,0	3,1	918	691	129						3		
<i>Pxk</i>	chr14	8928640	8929546	0,2	0,1	1,6	3046	2299	2732						5		
<i>Pibf1</i>	chr14	99495716	99496140	1,9	1,3	4,3	80	83	85						46		
<i>Fam105b</i>	chr15	27562080	27562932	0,6	0,6	1,7	2612	2388	3219						10		
<i>Cyp2d22</i>	chr15	82208073	82209452	0,4	0,9	2,3	844	816	942						39		
<i>Mcrs1</i>	chr15	99081644	99081893	1,1	1,3	0,0	1871	1724	1686						56		
<i>Krtap14</i>	chr16	88825671	88826015	1,2	1,2	3,1	56	6	5171						51		
<i>Cyp4f14</i>	chr17	33056077	33056731	1,4	1,6	0,3	16	100	24						18		
<i>Ring1</i>	chr17	34161008	34161337	2,4	2,0	0,9	4125	4520	5517						18		
<i>Tnf</i>	chr17	35338904	35339578	2,0	2,6	0,6	351	216	274						19		
<i>Ticam2</i>	chr18	46733459	46734858	0,6	0,4	3,7	120	136	49						25	Heal9	
<i>Ankrd1</i>	chr19	36195732	36195982	0,6	0,5	1,9	191	265	232						31		
<i>Ikbkg</i>	chrX	71673409	71673878	1,1	1,2	2,8	1360	1522	960						38		
		MeDIP	SKALA	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0								

5.2.3.1. Geny związane z apoptozą

Najliczniejszą grupą genów związanych z regionami DMR w małżowinie usznej stanowiły geny odpowiedzialne za „regulację apoptozy neuronów” (20 genów,

Tabela 7). Apoptoza jest ważnym elementem regeneracji, który umożliwia kontrolę liczby komórek w miejscu zranienia, niszczenie zbędnych komórek oraz przemodelowanie miejsca zranienia. Enzymami odpowiedzialnymi za indukcję i postęp apoptozy są kaspazy. Myszy nokautowe pozbawione genów kaspaz *Casp3^{-/-}* i *Casp7^{-/-}* wykazują obniżoną apoptozę w tkankach. U myszy nokautowych występuje późniejsze, niż u myszy typu dzikiego, gojenie ran grzbietu, co jest efektem się wolniejszego powstawania błony podstawnej oraz mniejszym stopniem migracji keratynocytów w miejscu zranienia. Kaspaza-3 i kaspaza-7 aktywują fosfolipazę *iPLA₂*, co skutkuje zwiększoną produkcją kwasu arachidonowego, który jest prekursorem prostaglandyny *E₂* (*PGE₂*). *PGE₂* stymuluje proliferację komórek, regenerację tkanek oraz gojenie ran (Li et al. 2010). Warto wspomnieć, że u myszy MRL/MpJ obserwowana jest stale podwyższona aktywność kaspazy-3 i apoptozy (Bedelbaeva et al. 2010). Zatem prawidłowa kontrola procesu apoptozy, w szczególności odpowiednia równowaga pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek, wydaje się być kluczowa dla przebiegu regeneracji.

Jak pokazują rezultaty tej pracy, u myszy MRL/MpJ zaobserwowano między innymi zmniejszony poziom metylacji DNA w regionie promotorowym genu *Bcl2l11* (*Bim*) należącego do rodziny *Bcl2*. Białka rodziny *Bcl2* kontrolują proces apoptozy, a jej poszczególni członkowie odpowiadają za inhibicję lub stymulację tego procesu. Zgodnie z wynikami mikromacierzowymi (Tabela 8), ekspresja tego genu na niskim poziomie jest obserwowana u wszystkich trzech szczepów myszy oraz jest nieznacznie niższa u myszy MRL/MpJ niż u C57BL/6J. Chociaż brakuje informacji na temat ekspresji *Bcl2l11* u szczepów kontrolnych podczas regeneracyjnego zamykania otworów w uszach, analiza histologiczna wskazuje na spadek ekspresji *Bcl2l11* w blastemie myszy MRL/MpJ w dniu 14 w porównaniu do dnia 5 po zranieniu, co jest również obserwowane w przypadku innych proapoptotycznych genów z rodziny *Bcl2*, *Bax* i *Bid* (Metcalf et al. 2006). Zmiana poziomu ekspresji genów związanych z apoptozą może mieć związek z przyspieszeniem wzrostu blastemy w tym okresie.

Innym ważnym genem należącym do tej grupy był gen *Ghrhr* kodujący receptor somatoliberyny, który u myszy MRL/MpJ miał mniejszy stopień metylacji. Ekspresja *Ghrhr* i *Ghrh* nie została wykryta przy użyciu oznaczeń mikromacierzowych w małżowinie usznej u żadnego z badanych szczepów myszy, ale potencjalnie jego

ekspresja może zostać zaindukowane w wyniku zranienia u myszy MRL/MpJ, u której obserwowany jest zmniejszony poziom metylacji DNA w jego pobliżu. Główną funkcją hormonu Ghrh jest pobudzenie przysadki mózgowej do wydzielania hormonu wzrostu, jednak może on również działać na wiele innych tkanek, np. wpływać na przeżywalność kardiomiocytów, wpływać na proliferację i apoptozę komórek trzustki (Kiaris et al. 2011). W przypadku ran skóry, Ghrh wpływa na proliferację i migrację fibroblastów oraz stymuluje ekspresję α -gładkiej aktyny, która odpowiada za obkurczanie brzegów rany, a tym samym przyspiesza gojenie ran (Dioufa et al. 2010). Gen *Ghrhr* jest położony w pobliżu *locus* cechy ilościowej na chromosomie 6 (Cheverud et al. 2012).

Kolejnym genem należącym do tej kategorii jest *Ankrd1*, który nie jest ekspresjonowany u żadnego z trzech szczepów myszy, ale ma wyższy poziom metylacji DNA u myszy MRL/MpJ. Ekspresja *Ankrd1* silnie wzrasta w ciągu 24 godzin po uszkodzeniu, utrzymuje się na podwyższonym poziomie podczas procesu gojenia rany skóry grzbietowej oraz jest obserwowana w większości komórek obecnych w miejscu zranienia. Nadekspresja *Ankrd1* stymuluje proces neowaskularyzacji (Shi et al. 2005). Jednym z mechanizmów działania *Ankrd1* jest regulacja ekspresji metaloproteinaz (MMP). Delecja genu *Ankrd1* skutkuje wzrostem ekspresji MMP-13 i MMP-10, jednak nie wpływa znacząco na poziom ekspresji MMP-2 i MMP-9 (Almodovar-Garcia et al. 2014), których zwiększony poziom jest obserwowany u myszy MRL/MpJ (Gourevitch et al. 2003). U myszy *Mmp13*^{-/-} obserwowane jest wolniejsze powstawanie ziarniny i jednocześnie zaburzenie procesów neowaskularyzacji objawiające się wzrostem liczby małych oraz brakiem dużych naczyń krwionośnych (Toriseva et al. 2012). Gojenie ran u myszy *Ankrd1*^{-/-} przebiega wolniej, co jest wynikiem zmniejszenia zdolności fibroblastów do migracji, mniejszym stopniem obkurczania brzegów rany oraz zwiększonym poziomem nekrozy (Samaras et al. 2015). Przedstawione dane wskazują, że *Ankrd1* niewątpliwie oddziałuje na proces gojenia ran, ale trudno na podstawie dostępnych informacji wyjaśnić mechanizm jego wpływu na potencjał regeneracyjny.

Warto zauważyć, że wspomniane nokautowe modele jednogenowe wskazują na związek z regeneracją, ale nie tłumaczą efektów wielogenowych. Procesy regeneracyjne są złożone, a badania dotyczą przeważnie jednego wybranego aspektu jak np. szybkość gojenia czy migracja fibroblastów. Wolne gojenie można kojarzyć jako niekorzystne dla regeneracji, jednak paradoksalnie wolne gojenie może np. utrudniać powstawanie blizny, która blokuje procesy naprawcze.

5.2.3.2. Geny związane z różnicowaniem komórek

W małżowinie usznej zaobserwowano obecność szeregu regionów DMR w pobliżu genów związanych z „tworzeniem przednio-tylnego wzorca ekspresji” (8 genów, Tabela 7) w tym m.in. genów: *En1* i *Msgn1* (kodujących białka homeotyczne), *Ski* (protoonkogen), *Yeats4*, *Ring1*, *Mcrs1* (kodujących białka kompleksów modelujących strukturę chromatyny). Nadreprezentacja tych genów może tłumaczyć zdolność do tworzenia blastemy u myszy MRL/MpJ oraz łączyć się z jej embrionalnymi cechami metabolizmu (Naviaux et al. 2009).

Geny *Msgn1* i *En1* ulegają ekspresji na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego i pełnią rolę w tworzeniu mezodermy przyosiowej (Chalamalasetty et al. 2014) oraz różnicowaniu się somitów w kierunku skóry, mięśni i brunatnej tkanki tłuszczowej (Atit et al. 2006). Krótkotrwała ekspresja *En1* w somitach jest charakterystyczna dla pewnej linii komórek, które ulegną zróżnicowaniu w jedną z kilku populacji fibroblastów stromalnych obecnych w skórze grzbietowej. Fibroblasty pełnią funkcje wydzielnicze i biorą udział w przemodelowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej w przypadku zranienia. Udział procentowy fibroblastów w powstałej z tej linii komórkowej w skórze rośnie wraz z wiekiem. Fibroblasty linii komórek *En1* posiadają na powierzchni swojej komórki białko markerowe Cd26, znane też jako peptydaza Dpp4 (ang. *dipeptidyl peptidase-4*). Inhibicja aktywności Cd26, skutkuje wolniejszym gojeniem ran skóry grzbietowej, ale przy jednoczesnym zmniejszeniu powierzchni blizny (Rinkevich et al. 2015). Ponadto inhibitory Dpp4 są stosowane jako leki w cukrzycy typu II i wpływają na gojenie ran (Sinagra et al. 2015). U myszy MRL/MpJ zaobserwowano obniżoną metylację DNA w genie *En1* w porównaniu do szczepów kontrolnych. Obniżona metylacja DNA regionu regulatorowego genu *En1* u myszy MRL/MpJ mogłaby zatem sugerować zmiany w liczebności poszczególnych populacji fibroblastów w skórze. Określenie efektów obniżonego statusu metylacyjnego *En1* u myszy MRL/MpJ wymagałoby dodatkowych badań. Warto zauważyć, że jak wskazują analizy bioinformatyczne, *En1* jest potencjalnym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym szereg genów powiązanych z regionami DMR zidentyfikowanymi w małżowinie usznej myszy (Tabela 7) oraz jest położony w obrębie *locus* cechy ilościowej *Sth1* (Masinde et al. 2001).

U myszy MRL/MpJ zauważono zwiększoną metylację DNA w obrębie odległego regionu promotorowego genu *Ski*, której towarzyszyła nieznacznie obniżona ekspresja tego genu. *Ski* jest ekspresowany w większości tkanek myszy oraz pełni rolę w wielu biologicznych funkcjach. Rola genu *Ski* w procesie gojenia ran została najlepiej poznana u szczura, a ekspresja tego genu następuje w większości komórek biorących

w nim udział (Liu et al. 2006). Gen *Ski* u szczura zwiększa tempo proliferacji fibroblastów (Liu et al. 2010). U szczura zwiększenie ekspresji genu *Ski* poprzez transfekcję plazmidem skutkuje szybszą reepitalizacją ran skóry grzbietowej oraz szybszym powstawaniem ziarniny. Ponadto w przypadku nadekspresji *Ski* u szczura obserwuje się mniejszą migrację makrofagów do miejsca zranienia, obniżenie produkcji Il16a i Tnf oraz zmniejszenie rozmiarów blizny (Li et al. 2011). Gen *Ski* wpływa na proces gojenia ran poprzez regulację aktywności białka Smad3 oraz wytwarzania kolagenu typu I (Liu et al. 2010). Dodatkowo gen *Ski* jest regulowany przez Ppar δ , czynnik transkrypcyjny biorący udział w różnicowaniu komórek (Li et al. 2012, Giordano Attianese and Desvergne 2015). Opisane efekty w dużej mierze są związane z wpływem *Ski* na zachowanie fibroblastów w miejscu zranienia. Fibroblasty w miejscu zranienia proliferują, migrują do krawędzi rany, wpływają na stan zapalny, produkują białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz różnicują się do miofibroblastów, które powodują obkurczanie brzegów rany. Rola *Ski* na proces gojenia ran u myszy nie została dotychczas zbadana. Podczas gdy u szczura *Ski* stymuluje proliferację fibroblastów, u myszy wpływ tego genu wydaje się być odwrotny. Delecja jednej lub dwóch kopii genu *Ski* u myszy skutkuje zwiększeniem tempa proliferacji komórek MEF (ang. *mouse embryonic fibroblasts*), a jego nadekspresja powoduje zatrzymanie postępu cyklu komórkowego w fazie G₁ (Shinagawa et al. 2001). Gen *Ski* wydaje się być zatem szczególnie interesującym czynnikiem mogącym wpływać na proces regeneracji, zwłaszcza że jest położony w sąsiedztwie *locus* cechy ilościowej na chromosomie 4 *Heal8* (Cheverud et al. 2012).

5.2.3.3. Geny związane z odpowiedzią zapalną

Trzecią ważną grupą genów o odmiennym statusie metylacji DNA były geny należące do kategorii ontologicznej „*odpowieź komórkowa na cząsteczki pochodzenia bakteryjnego*”, do której należały m.in. *Fcgr2b*, kodujący białko receptora immunoglobulin, *Ticam2* kodujący białko związane z receptorami *toll-like*, *Tnf*, kodujący czynnik martwicy nowotworu, *Ikbkg*, kodujący modyfikator NF- κ B, *Gas2l2* kodujący białko oddziałujące z adozynowym receptorem A_{2A}. Geny należące do tej kategorii ontologicznej uczestniczą w odpowiedzi na infekcje bakteryjne, ale mają szereg innych funkcji związanych z działaniem układu odpornościowego. Nadreprezentacja genów związanych z odpowiedzią zapalną może wskazywać na epigenetyczne podłoże obserwowanych różnic w odpowiedzi immunologicznej pomiędzy myszą MRL/MpJ, a szczepami niewykazującymi podwyższonej zdolności do regeneracji. Trudno jest wytłumaczyć naturę tych różnic, zwłaszcza że zostały one zidentyfikowane w nieuszkodzonej tkance. Jednocześnie odpowiedź zapalna prowadzona jest przez

różne wysoce wyspecjalizowane populacje komórek. Niemniej na uwagę zasługują dwa geny związane z regulacją odpowiedzi zapalnej *Ticam2* i *Gas2l2*.

Zwiększony poziom ekspresji i zwiększony poziom metylacji DNA jest obserwowany dla genu *Ticam2* w szpiku kostnym i małżowinie usznej myszy MRL/MpJ. *Ticam2* jest jednym z kilku białek adaptorowych, które pośredniczą pomiędzy receptorami Tlr z białkami odpowiedzialnymi za wzmacnianie sygnału i przekazywanie go do jądra komórkowego. W wyniku stymulacji receptorów Tlr następuje produkcja cytokin prozapalnych i interferonów, które wpływają na stan zapalny (Sheedy and O'Neill 2007).

Gen *Gas2l2* wykazuje obniżony stopień metylacji DNA. Gen *Gas2l2* koduje białko regulujące aktywność receptora adenozyнового A_{2A} (*Adora2a*), którego ekspresja powoduje zwiększenie poziomu cAMP w komórce (Wu et al. 2013). Receptor adenozynowy A_{2A} pełni istotną funkcję w regulacji odpowiedzi zapalnej (Arasa et al. 2014). Jego działanie skutkuje, m.in. zmniejszeniem produkcji cytokiny zapalnej Tnf przez makrofagi na rzecz czynników stymulujących angiogenezę, Vegf (Macedo et al. 2007). Farmakologiczna blokada aktywności tego receptora skutkuje zmniejszeniem rozmiarów blizny (Perez-Aso, Chiriboga and Cronstein 2012), co jest również obserwowane u myszy *Adora2a*^{-/-} (Hu et al. 2013).

5.2.4. Smad1, transkrypcyjny czynniki regulatorowy genów związanych z DMR w małżowinie usznej

Gojenie ran jest ściśle związane ze szlakiem sygnałnym Tgfβ. Czynniki Tgfβ1 i Tgfβ2 stymulują receptor Tgfβr1, co powoduje fosforylację czynnika Smad3 i skutkuje ekspresją wielu genów macierzy zewnątrzkomórkowej związanych z powstawaniem blizny, m.in. kolagenu I, III, IV, fibronektyny, lamininy, osteopontyny, osteonektyny, tenascyny (Munoz-Felix, Gonzalez-Nunez and Lopez-Novoa 2013). Jednocześnie przewaga czynnika Tgfβ3 nad pozostałymi izoformami wiązana jest z bezbliznowym gojeniem ran u płodu (Shah, Foreman and Ferguson 1995).

W przypadku zamykania otworów w uszach sytuacja wydaje się nie być jedynie konsekwencją obecności lub braku któregoś z tych czynników po zranieniu. Z jednej strony myszy *Tgfβ1*^{-/-}*Rag2*^{-/-} są zdolne do częściowego zamykania otworów w uszach (Arthur et al. 2010). Z drugiej, gojenie rany u myszy *Smad3*^{-/-} skutkuje powstawaniem większych niż początkowe otworów w uszach o skomplikowanych kształtach (Arany et al. 2006). Ponadto u myszy z punktową mutacją w genie *Tgfβr1*, która skutkuje permanentną częściową aktywacją tego receptora, zaobserwowano zamykanie otworów w uszach (Liu et al. 2011).

Analiza sekwencji nukleotydowych zlokalizowanych w pobliżu promotorów genów powiązanych z regionami DMR zidentyfikowanymi w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ wykazała nadreprezentację motywów sekwencyjnych rozpoznawanych przez czynnik transkrypcyjny Smad1. Czynniki te również mogą być aktywowane przez Tgf β 1 oraz przez białka Bmp lub przez inny receptor tego szlaku, białko Alk1 (*Acvr11*). Ekspresja Alk1 wzrasta podczas gojenia ran, a działanie ścieżki Alk1/Smad1 może hamować działanie ścieżki Tgf β 1/Smad3 (Munoz-Felix et al. 2013). Mimo że nadekspresja Smad1 w keratynocytach spowalnia gojenie ran grzbietu, między innymi poprzez ograniczenie zdolności tych komórek do migracji (Lewis et al. 2014), zaobserwowane różnice w metylacji DNA mogą wskazywać na złożoną regulację szlaku Tgf β /Bmp podczas regeneracyjnego zamykania otworów w uszach u myszy MRL/MpJ.

5.3. Podsumowanie

W przeprowadzonym badaniu zidentyfikowano zespół regionów DNA odróżniających mysz MRL/MpJ, szczep zdolny do zamykania otworów w uszach, od myszy kontrolnych C57BL/6J i BALB/c, które takiej cechy nie posiadają. Wykorzystanie dwóch szczepów kontrolnych nieposiadających zdolności do zamykania otworów w małżowinie usznej pozwoliło na zmniejszenie liczby zaobserwowanych różnic międzyszczepowych, które niekoniecznie mogły mieć związek z badanym zjawiskiem. Oznaczenia przeprowadzono w szeregu tkanek (małżowina uszna, śledziona, szpik kostny, serce, wątroba), które nie były poddane zranieniu. Zidentyfikowane regiony DMR były w dużej mierze charakterystyczne dla każdej z tkanek, jednak 10 regionów DMR było wspólnych dla wszystkich zbadanych tkanek. Wśród nich znajdowało się 5 regionów DMR zlokalizowanych w pobliżu promotorów genów *Akr1e1*, *Cops3*, *Cpsf6*, *Mgn1* i *Rbp7*.

W analizie zidentyfikowanych regionów DMR skupiono się na małżowinie usznej, ponieważ obserwowany w niej proces regeneracji został najlepiej dotąd zbadany. Trzeba jednocześnie pamiętać, że komórki w obrębie szpiku kostnego, czy śledziony, mogą odzwierciedlać populację cyrkulujących komórek, które infiltrują ewentualne miejsce uszkodzenia, natomiast wątroba może produkować czynniki wpływające na proces regeneracji, które są uwalniane do krwi. Ponadto w badaniach wykorzystano całe narządy, w skład których wchodzi wiele różnych rodzajów komórek, a więc zaobserwowane różnice dotyczyć będą przede wszystkim dominującej dla danej tkanki populacji komórek, będą więc odzwierciedlać największe różnice w poziomie metylacji DNA.

Regiony DNA o odmiennym statusie metylacyjnym w małżowinie usznej były położone w obrębie regionów promotorowych genów związanych z apoptozą, różnicowaniem komórek (tworzeniem przednio-tylnego wzorca ekspresji genów) oraz regulacją działania odpowiedzi immunologicznej, co może sugerować epigenetyczne podłoże obserwowanych między szczepami różnic w postaci tworzenia blastemy w miejscu zranienia oraz przebiegu i charakteru odpowiedzi zapalnej. Wśród 73 genów powiązanych z regionami DMR w małżowinie usznej genów, 33 podlega regulacji przez czynnik transkrypcyjny *Smad1*, który jest ważnym mediatorem szlaku sygnałowego TGF β /Bmp. Wiele ze zidentyfikowanych regionów DMR, zasługuje na szczególne zainteresowanie ze względu na położenie w obrębie *loci* cechy ilościowej odpowiedzialnych za zdolność do zamykania otworów w uszach (np. *Gas2l2*, *Ghrhr*, *Gjb4*, *Rbp7*, *Ticam2*, *Ski*). Mimo zaobserwowania różnic w poziomie metylacji DNA w regionach promotorowych tych genów, w tkankach nieuszkodzonych nie wykryto

znaczących różnic w poziomie ekspresji większości z tych genów, niemniej nie wyklucza to możliwości jej indukcji po zranieniu.

Część ze zidentyfikowanych regionów DMR jest związana z genami o dobrze poznanej roli w procesie gojenia ran skóry (np. *Adora2a*, *Ankrd1*, *Ski*, *Ghrhr*). W badaniach dotyczących funkcji tych genów w procesie gojenia ran zwracano uwagę na szereg właściwości kluczowych dla tego procesu, jak angiogeneza, stan zapalny, zdolność do migracji i proliferacji komórek, szybkość gojenia ran skóry grzbietowej oraz powstawanie blizny. Wprawdzie u myszy MRL/MpJ nie są obserwowane zwiększone zdolności regeneracyjne w odpowiedzi na ten typ uszkodzenia, jednak odmienna regulacja tych genów w małżowinie usznej może być wystarczająca do zaindukowania w niej odpowiedzi regeneracyjnej. Potencjalny związek tych genów z procesem regeneracji u myszy MRL/MpJ wydaje się interesujący i może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań.

6. Model II: serca noworodków myszy C57BL/6J

6.1. Wyniki

6.1.1. Porównanie globalnych profili metylacji DNA serc noworodków myszy jednodniowych i serc mysich na późniejszych etapach rozwoju

Genomowe profile metylacji DNA reprezentujące serca jednodniowych (d1), siedmiodniowych (d7), dwutygodniowych (w2) i ośmiotygodniowych (w8) myszy C57BL/6J zostały otrzymane za pomocą techniki immunoprecypitacji zmetylowanego DNA i analizy za pomocą promotorowych mikromacierzy hybrydacyjnych obejmujących 20 404 regionów promotorowych oraz 15 980 wysp CpG. Regiony DNA, w których nastąpiły zmiany poziomu metylacji DNA zostały zidentyfikowane poprzez porównanie profili metylacji DNA uzyskanych dla serc myszy jednodniowych z profilami otrzymanymi dla serc pobranych na późniejszych etapach rozwoju. Narządy nie były poddane uszkodzeniom. Kryteria określające region DMR omówiono w rozdziale 4.3.1.4. Znalezione regiony DMR powiązano następnie z genami, które były zlokalizowane w ich sąsiedztwie, czyli do 5000 pz powyżej i 1000 pz poniżej miejsc startu transkrypcji lub granic pierwotnego transkryptu.

Należy u podkreślić, że określenie region DMR niekoniecznie oznacza, że dany region wykazuje niską lub wysoką metylację DNA, ale że w danym regionie występują znaczne różnice w poziomie metylacji DNA między porównywanymi próbkami. Region DMR przypisany do danego genu może obejmować jedynie część jego regionu regulatorowego.

Podczas gdy w porównaniu między dniem pierwszym i siódmym życia myszy znaleziono wyższą liczbę regionów DNA, które ulegają większemu wzbogaceniu w dniu siódmym, a więc wykazują wzrost poziomu metylacji DNA, to porównania między dniem pierwszym i drugim tygodniem oraz dniem pierwszym i ósmym tygodniem wyłoniły głównie regiony, które mają większe wzbogacenia w pierwszym dniu życia, a więc wykazują spadki poziomu metylacji DNA następujące po urodzeniu. Oznacza to, że w pierwszym tygodniu zmiany w profilach metylacji DNA związane były z procesem metylacji DNA, podczas gdy w późniejszych okresach przeważały procesy demetylacji DNA (Tabela 11). Ponadto w wielu regionach DNA zmiany w poziomie metylacji DNA między dniem pierwszym i siódmym nie utrzymywały się w kolejnych etapach rozwojowych, co może oznaczać dużą dynamikę epigenetycznego przeprogramowania lub zmiany w proporcjach różnych populacji komórek, jakie mogą zachodzić w sercu po urodzeniu. Większość regionów DMR znajdowała się w obrębie regionów dystalnych i charakteryzowała się rozmiarem w zakresie między 250 i 500 pz.

W porównaniu pomiędzy dniem pierwszym, w którym serce noworodka myszy doskonale regeneruje się i siódmym, w którym następuje utrata tych zdolności, zidentyfikowano 1113 regionów DMR zmapowanych do 1029 genów. Spośród regionów DMR znalezionych w porównaniu pomiędzy dniem pierwszym i siódmym 53 regiony, które zmapowano do 49 genów i 3 wysp CpG, wykazywały podobną zmianę w metylacji DNA w późniejszych etapach rozwojowych (Tabela 12). Wśród tych 53 regionów, 41 wykazywało wzrost, a 11 spadek poziomu metylacji DNA.

Tabela 11 Podstawowe informacje dotyczące regionów DMR zidentyfikowanych w porównaniu pomiędzy dniem pierwszym i późniejszymi stadiami rozwoju w sercach myszy.

Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmy tydzień).

		d1-d7	d1-w2	d1-w8
Liczba regionów DMR	Spadek	104	1410	2118
	Wzrost	1009	316	667
Liczba genów	Spadek	100	1314	1882
	Wzrost	929	294	636
Rozmiar regionów DMR	<250	126	168	292
	250-500	522	861	1372
	500-750	281	396	624
	>750	179	301	497
Lokalizacja regionów DMR względem genów	Dystalne	617	992	1221
	Proksymalne	297	301	975
	Wewnątrzgenowe	167	167	492
	Międzygenowe	32	37	96

Tabela 12 Regiony genomów wykazujące zmiany w poziomie metylacji DNA (DMR) w sercach noworodków myszy między pierwszym a siódmym dniem życia, które utrzymują się w kolejnych etapach rozwoju.

W tabeli przedstawiono poziom wzbogacenia metylowanego DNA (KS Score). Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmy tydzień).

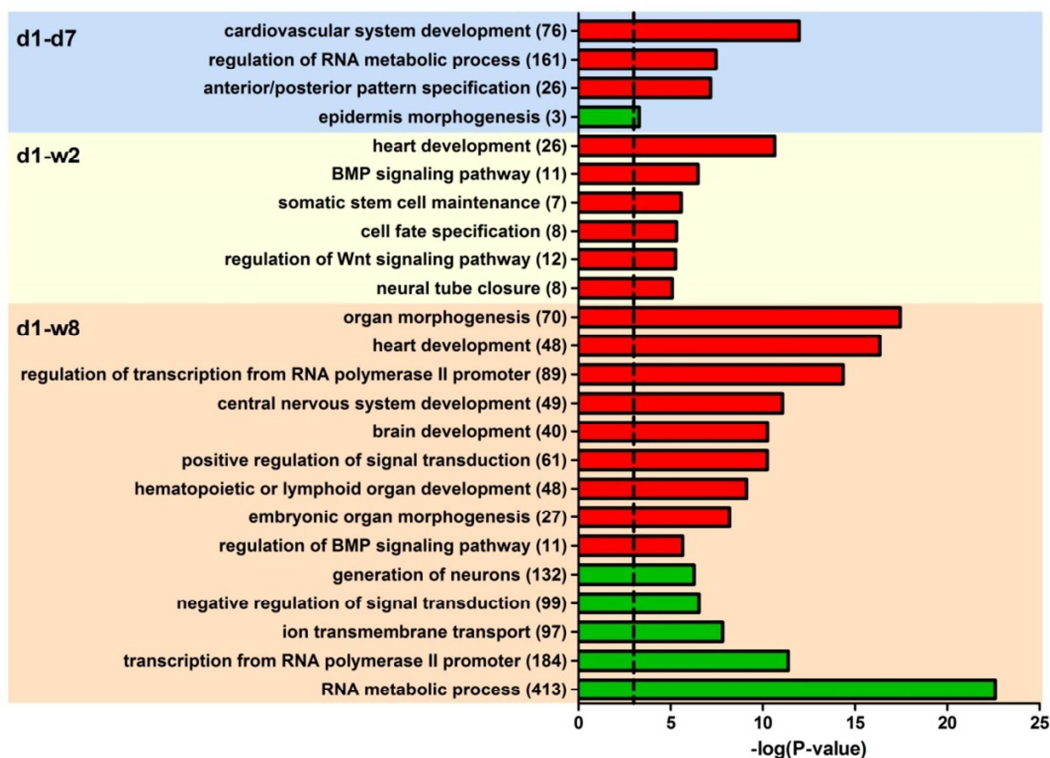
Nazwa	Chr	Początek	Koniec	1d	7d	w2	w8
<i>Tns1</i>	chr1	74114975	74115530	0,6	3,0	1,8	2,4
<i>Des</i>	chr1	75355824	75356378	0,9	2,0	2,0	2,7
<i>Rab17</i>	chr1	92864118	92864467	1,6	3,9	3,9	3,4
<i>Nuak2</i>	chr1	134209757	134210696	0,7	1,7	2,0	2,3
<i>Tnnt2</i>	chr1	137736774	137737403	0,9	3,0	3,0	2,2
<i>Lefty1</i>	chr1	182864242	182865106	1,4	3,1	3,0	2,9
<i>Lhx6</i>	chr2	35946450	35947289	0,5	2,2	1,6	1,9
<i>Lhx6</i>	chr2	35949528	35950186	1,1	3,0	3,1	3,4
<i>Nostrin</i>	chr2	68973623	68974477	2,3	1,1	0,8	0,9
<i>Sstr4</i>	chr2	148220436	148221295	0,6	2,3	1,7	2,0
<i>Cd40</i>	chr2	164880421	164881052	2,0	0,7	0,6	0,5
<i>Mecom</i>	chr3	30410787	30411346	1,2	2,5	3,3	3,3
<i>Gm5148</i>	chr3	37622863	37624133	0,9	3,1	3,3	3,7
<i>Mab21l2</i>	chr3	86353933	86355158	0,9	1,9	1,9	3,0
<i>Cdkn2b</i>	chr4	88952702	88953362	0,2	2,5	2,7	3,0
<i>C77080</i>	chr4	128915887	128916526	1,1	2,6	2,7	2,9
<i>Map3k6</i>	chr4	132806551	132807595	0,5	3,9	1,7	2,5
<i>Fzd1</i>	chr5	4755737	4755971	0,1	1,3	1,7	1,8
<i>Shroom3</i>	chr5	93238362	93239130	0,7	2,3	1,8	1,9
<i>Mn1</i>	chr5	111847574	111848208	1,3	3,2	3,8	2,9
<i>Ppp1cc</i>	chr5	122606677	122607201	0,7	1,9	2,0	1,9
<i>Lmod2</i>	chr6	24547425	24548282	0,8	2,4	2,3	3,1
<i>Bcl3</i>	chr7	20394611	20395266	1,2	3,2	2,7	2,8
<i>Rab4b</i>	chr7	27964782	27965011	2,9	1,2	1,3	1,3
<i>Zfp36</i>	chr7	29163180	29163414	1,8	0,6	0,3	0,0
<i>Csrp3</i>	chr7	56100632	56101879	0,4	1,9	1,5	2,0
<i>Wdr93</i>	chr7	86885192	86885964	1,7	4,8	3,7	3,4
<i>Furin</i>	chr7	87548697	87549574	2,2	0,5	0,5	0,3
<i>Artip2</i>	chr7	112787922	112788300	2,0	0,9	0,5	0,3
<i>Adm</i>	chr7	117769268	117770102	0,6	2,0	2,1	2,3
<i>Ctbp2</i>	chr7	140316498	140317137	1,1	2,5	2,5	3,0
<i>Snopc2</i>	chr8	4249167	4249806	1,0	3,2	2,2	2,3
<i>Rab20</i>	chr8	11479382	11479931	0,7	2,3	1,9	1,8
<i>Zfp423</i>	chr8	90186286	90186943	0,5	2,6	2,3	1,9
<i>B3gnt9-ps</i>	chr8	107783019	107783758	0,9	3,1	2,7	2,2
<i>Dpep3</i>	chr8	108503906	108504675	1,3	2,9	3,5	2,9
<i>Foxl1</i>	chr8	123650025	123653205	1,0	2,8	2,6	2,3
<i>Cryab</i>	chr9	50558948	50559377	1,1	2,9	2,3	2,4
<i>Nepn</i>	chr10	52108953	52109203	1,5	0,2	0,3	0,2
<i>Tns3</i>	chr11	8565621	8567070	0,9	2,2	2,0	2,1
<i>Foxc1</i>	chr13	31895562	31898055	0,5	2,2	2,0	2,4
<i>Nefm</i>	chr14	68743254	68743514	2,1	0,7	0,9	0,3
<i>Egr3</i>	chr14	70478666	70479415	1,6	4,2	3,6	3,8
<i>Abra</i>	chr15	41700529	41701078	0,8	2,2	2,0	2,1
<i>Sybu</i>	chr15	44583889	44584130	1,3	2,7	3,2	2,9
<i>Gata6</i>	chr18	11048159	11048891	0,2	2,6	1,9	2,6
<i>Pcnx13</i>	chr19	5690255	5691595	2,8	1,1	0,7	0,2
<i>Ehbp111</i>	chr19	5727081	5727850	1,9	0,8	0,4	0,1
<i>Slc25a45</i>	chr19	5878841	5879070	1,5	0,5	0,4	0,2
<i>Klhl13</i>	chrX	22941755	22942109	0,7	2,1	1,7	1,9

SKALA 0,0 1,0 2,0 3,0 4,0

6.1.2. Analiza ontologiczna genów związanych z regionami DMR charakterystycznych dla jednodniowych serc myszy

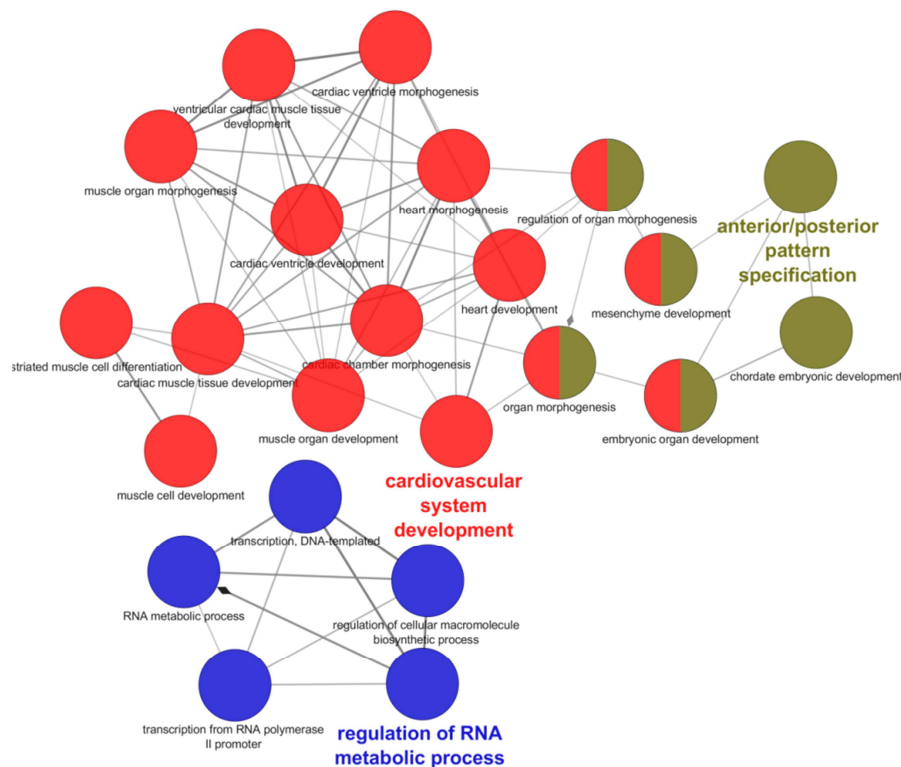
Analizy porównawcze przeprowadzono dla genów powiązanych z regionami DMR wyróżniającymi poszczególne etapy rozwoju serca. Geny związane z regionami DMR odpowiadającymi wzrostowi i spadkowi metylacji DNA w sercu po pierwszym dniu życia myszy były analizowane jako oddzielne grupy. W grupie genów powiązanych z regionami DMR odpowiadającymi wzrostowi poziomu metylacji DNA między dniem pierwszym i późniejszymi etapami rozwoju zaobserwowano nadreprezentację genów związanych z „rozwojem układu krążenia” i „rozwojem serca” (Rysunek 7, Rysunek 8). Ponadto, zaobserwowano nadreprezentację genów związanych z kategoriami funkcjonalnymi „tworzenia przednio-tylnego wzorca ekspresji” (dla przejścia między dniem pierwszym i siódmym), „szlakiem sygnałowym Bmp” i „regulacją szlaku sygnałowego Wnt” (dla przejścia między dniem pierwszym i drugim tygodniem). Regiony DMR wykazujące wzrost poziomu metylacji DNA pomiędzy dniem pierwszym i siódmym związane były z „rozwojem układu krążenia”. Wśród nich znajdowały się geny kodujące białka sarkomerów (*Des*, *Tnnt2*), czynników regulujących transkrypcję (*Gata6*, *Ctbp2*) i związanych z rozwojem organizmu (*Lefty1*, *Fzd1*). Dla genów związanych ze spadkiem poziomu metylacji DNA pomiędzy dniem pierwszym i siódmym wzbogaceniu uległa kategoria „rozwoju nabłonka” (*Fst*, *Klf4* i *Klf14*).

Subtelna równowaga między szlakami sygnałowymi Bmp i Wnt reguluje proces różnicowania się komórek układu sercowo-naczyniowego. Szlak sygnałowy Wnt w sposób dwufazowy i antagonistyczny wpływa na różnicowanie się kardiomiocytów i komórek krwiotwórczych. Na wczesnym etapie jego aktywacja stymuluje różnicowanie się embrionalnych komórek macierzystych w kardiomiocyty, podczas gdy hamuje różnicowanie się komórek w linii komórek hematopoetycznych i tworzących naczynia krwionośne. Natomiast na etapie późniejszym jego aktywacja zwiększa poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za hematopoezę i waskularyzację, jednocześnie hamując sygnalizację Bmp (Jain et al. 2015, Kattman et al. 2011, Naito et al. 2006, Nostro et al. 2008).



Rysunek 7 Analiza ontologiczna genów związanych z DMR zmieniającymi poziom metylacji DMR po urodzeniu w sercach myszy.

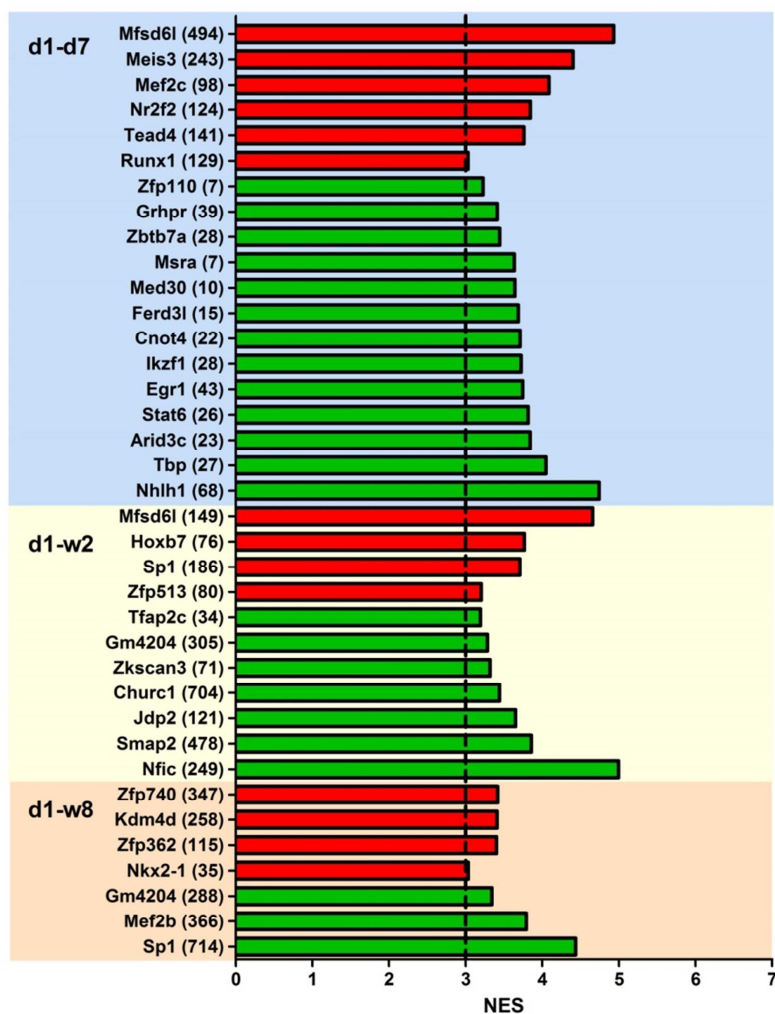
Na rysunku pokazano reprezentatywne kategorie dla klasterów funkcjonalnych. Wyniki przedstawiono jako ujemną wartość z dziesiętnego logarytmu z wyniku oznaczenia istotności statystycznej testu hipergeometrycznego po korekcie Bonferroniego. Za istotne przyjęto wyniki $p \leq 0,001$. Słupki czerwone odpowiadają kategoriom ontologicznym związanym z genami zmapowanymi do regionów DMR wykazujących wzrost, a słupki zielone spadek metylacji DNA w sercu po pierwszym dniu życia myszy. W nawiasach podano liczbę genów należących do danej kategorii funkcjonalnej. Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósm tydzień).



Rysunek 8 Powiązanie kategorii funkcjonalnych zidentyfikowanych dla regionów DMR dla przejścia między dniem pierwszym i siódmym w sercach noworodków myszy.

6.1.3. Identyfikacja transkrypcyjnych czynników regulatorowych genów związanych z regionami DMR charakterystycznymi dla serc jednodniowych noworodków myszy

Grupa genów skojarzonych z regionami DMR związanymi ze wzrostem w poziomie metylacji DNA między dniem pierwszym i siódmym wykazuje wzbogacenie w motywy sekwencyjne rozpoznawane przez szereg czynników transkrypcyjnych. Za najbardziej znamiennej wynik tej analizy można uznać wskazanie słabo scharakteryzowanego czynnika transkrypcyjnego Mfsd6l (ang. *Major Facilitator Superfamily Domain Containing 6-Like*), który potencjalnie reguluje 494 z 929 genów zmapowanych do regionów DMR (Rysunek 9). Wśród pozostałych przewidywanych czynników transkrypcyjnych wyróżnić można miogenny czynnik wzmacniający typu 2, Mef2c, białko homeotyczne Meis3, czynnik transkrypcyjny zaangażowany w różnicowanie się włókien mięśniowych Tead4 oraz Runx1, czynnik transkrypcyjny związany z hematopoezą.



Rysunek 9 Potencjalne czynniki transkrypcyjne rozpoznające motywy sekwencyjne występujące w regionach regulatorowych genów związanych z regionami DMR.

Wynik przedstawiono jako znormalizowany wynik wzbogacenia NES (ang. *normalised enrichment score*). Słupki czerwone odpowiadają kategoriom ontologicznym związanym z genami zmapowanymi do regionów DMR wykazujących wzrost, a słupki zielone spadek metylacji DNA w sercu po pierwszym dniu życia myszy. W nawiasach podano liczbę genów potencjalnie regulowanych przez dany czynnik transkrypcyjny. Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósm tydzień).

6.1.4. Relacja pomiędzy regionami DMR a ekspresją genów

W celu określenia, które z obserwowanych zmian w poziomie metylacji DNA wpływają na ekspresję genów, otrzymano przy użyciu mikromacierzy ekspresyjnej globalne profile ekspresji genów dla próbek odpowiadających badanym etapom rozwoju. Analogicznie, jak opisano w rozdziale 5.1.4, genomowe profile ekspresji uzyskano dla tego samego zestawu tkanek, co profile metylacji DNA. Zatem odpowiednie profile metylacji DNA i ekspresji genów odpowiadały tym samym zestawom próbek.

Ponadto zbadano też profile ekspresji genów w sercach w piętnastym (e15), szesnastym (e16), osiemnastym (e18) i dziewiętnastym (e19) dniu rozwoju

embrionalnego myszy. Regiony DMR odpowiadające przejściom pomiędzy badanymi etapami rozwoju zostały zestawione z odpowiadającymi im transkryptami, wykazującymi co najmniej półtorakrotne zmiany w ekspresji. Przyjęto inne kryterium selekcji transkryptów wykazujących różnice w ekspresji niż w poprzednio opisanym modelu (rozdział 5.1.4), ponieważ celem tej analizy było nie tylko wskazanie kluczowych różnic, ale przede wszystkim procesów determinowanych różnicami w statusie metylacyjnym genów. W ten sposób zidentyfikowano 216, 341 i 902 genów, których poziom ekspresji zmienia się wraz z poziomem metylacji DNA, odpowiednio pomiędzy dniem pierwszym i siódmym, dniem pierwszym i drugim tygodniem oraz dniem pierwszym i ósmym tygodniem (Tabela 13, Tabela 14, Rysunek 10, Rysunek 11, Rysunek 12).

W grupie genów, dla których znaleziono wzrost poziomu metylacji DNA skojarzony ze spadkiem ekspresji między pierwszym a siódmym dniem życia nadreprezentowane były geny związane z morfogenezą komory serca („*cardiac chamber morphogenesis*”, $p = 5,43E-6$, *Bmp10*, *Foxc1*, *Gata6*, *Myh7*, *Ube4b*, *Vangl2*). Dodatkowo w licznej grupie genów wykazujących wzrost metylacji DNA skojarzony ze wzrostem poziomu ekspresji zaobserwowano nadreprezentację genów związanych z adhezją komórek („*cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules*”, $p = 5,18E-4$, *Cdh1*, *Cdh13*, *Esam*, *Igsf9*, *Pcdhga12*, *Scarf2*), proliferacją mięśni gładkich („*smooth muscle cell proliferation*”, $p = 9,14E-4$, *Bmp4*, *Cdh13*, *Irak1*, *Nol3*, *Ptgir*) oraz organizacją aktomiozyny („*actomyosin structure organization*”, $p = 2,77E-4$, *Ankrd23*, *Asap3*, *Lmod2*, *Myh7b*, *Mypn*, *Neb*, *Tpm1*) Geny związane ze spadkiem metylacji DNA i wzrostem ekspresji nie wykazywały natomiast wspólnego kontekstu biologicznego.

Tabela 13 Relacja pomiędzy obecnością regionu DMR a zmianą w poziomie ekspresji genu w zależności od lokalizacji DMR względem genu.

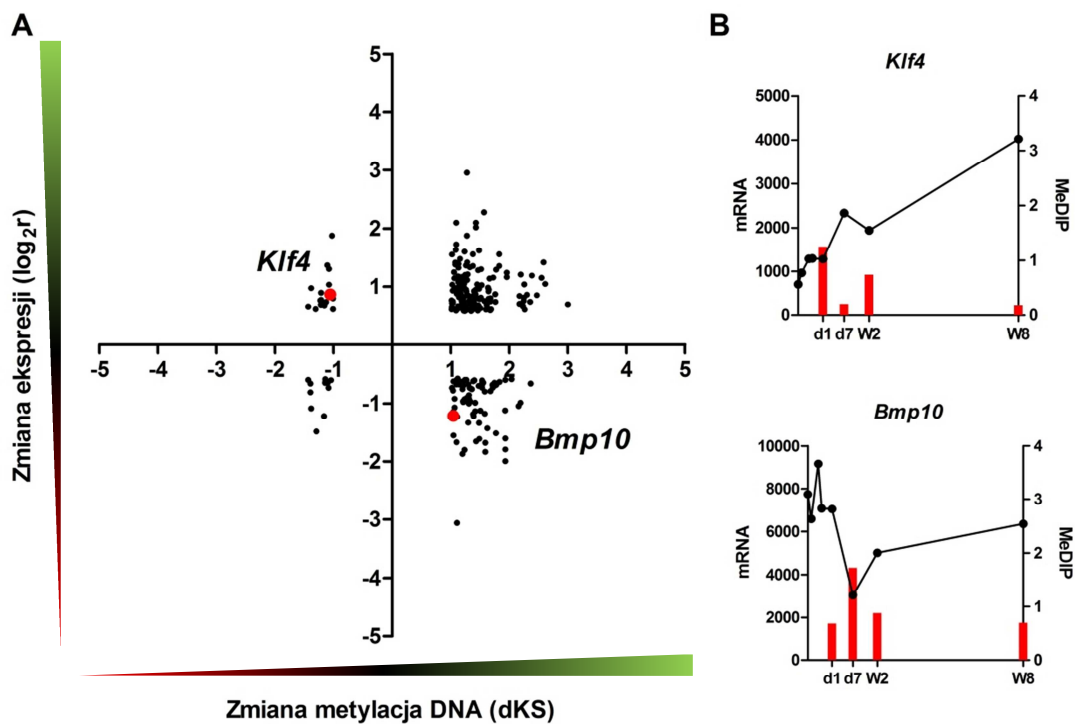
Liczby nie sumują się do całkowitej liczby genów, ponieważ jeden region DMR mógł być powiązany z wieloma transkryptami tego samego genu, a jeden transkrypt mógł być powiązany z kilkoma regionami DMR. Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmo tydzień).

	Relacja	Dystalny	Liczba regionów DMR	
			Proksymalny	Wewnątrzgenowy
d1-d7	MeDIP↑ Ekspresja↑	89	43	28
	MeDIP↑ Ekspresja↓	55	17	11
	MeDIP↓ Ekspresja↑	6	6	6
	MeDIP↓ Ekspresja↓	6	5	1
d1-w2	MeDIP↑ Ekspresja↑	21	17	19
	MeDIP↑ Ekspresja↓	14	21	9
	MeDIP↓ Ekspresja↑	146	30	50
	MeDIP↓ Ekspresja↓	27	119	44
d1-w8	MeDIP↑ Ekspresja↑	121	23	23
	MeDIP↑ Ekspresja↓	143	43	13
	MeDIP↓ Ekspresja↑	245	311	118
	MeDIP↓ Ekspresja↓	135	178	97

Tabela 14 Zestawienie genów, których poziom metylacji DNA i ekspresji zmienia się w sercu między dniem pierwszym i siódmym życia noworodków myszy.

Geny należące do funkcjonalnych kategorii wymienionych w tekście zostały zaznaczone pogrubioną czcionką.

		Metylacja	
		Spadek po dniu 1	Wzrost po dniu 1
Ekspresja	Wzrost po dniu 1	1110012J17Rik, 1300002K09Rik, D14Ert668e, Egfl7, Fam55d, Gpihbp1, Klf4, Lgals1, Lnx1, Ly6c1, Ly6i, Pde10a, Rassf2, Rbp4	1300002K09Rik, 4632428N05Rik, 4931428F04Rik, 9030425E11Rik, AI314180, Alpl, Ankrd23 , Apoc1, Apol7a, Apol9b, Aqp9, Asap3 , Atp11a, BC005624, Bcat1, Bcl3, Bhmt, Bmp4 , C330007P06Rik, C4a, Cacnb3, Ccbe1, Cd37, Cdh1 , Cdh13 , Cdk20, Chad, Chst15, Ckm2, Clip2, Cpb2, Cryba4, Cryz, Cyp1a2, Cyp8b1, Cyr61, D16H22S680E, Dhdds, Dhx57, Dll4 , Dmp1, Egr3 , Eps8l2, Esam , Fam149b, Fcrls, Fmnl1, Gjc2, Higd1b, Hlx, Hoxa3, Igfbp6, Igsf9 , Il17rc, Irak1 , Ifi1, Itpr2, Khk, Krt18, Lace1, Lig1, Lipc, Lmod2 , Lnx1, Ltbp3, Mamdc2, Mapk11, Masp1, Masp2, Mast1, Med12, Meox1, Mettl7b, Mst1, Mthfsd, Myh7b , Mypn , Nav1, Neb , Nfkbiz, Nol3 , Nr2f6, Nuak2, Osr1, Paqr4, Pcdhga12 , Pde4a, Pdlim7, Pdzk1, Pitpnm2, Pkn3, Pla2g12b, Plbd1, Plekhg3, Ppp1r14a, Praf2, Prkcdp, Ptgir , Ptgis, Rab17, Rasa4, Rgs16, Rtp3, Scarf2 , Scml4, Sec16b, Slc16a9, Slc25a29, Slc25a37, Slc39a4, Slc9a3r1, Spp2, St3gal2, Syne1, Tap2, Tcf15, Tcigr1, Tgfb3, Tlr12, Tmem143, Tmem154, Tmem88, Tns1, Tpm1 , Trim14, Tst, Ttk, Uox, Upb1, Zfp503, Zfp57
	Spadek po dniu 1	Cdk17, Cxhc4, Dgcr2, Fbxo30, Ggt5, Kcnn2, Ppfbp1, Ppfbp1, Stox2, Trrt1, Trpc1, Zmym2	9030624J02Rik, Adm, AI854703, Aldoc, Apc, Arhgap24, Bend6, Bmp10 , Bmp7, Cacna1d, Cdc37l1, Cdy1, Cryab, Elf4, Fam135a, Fam65b, Foxc1 , Fryl, Gata6 , Gipr, Gna13, Gtf2h2, H19, Hmga2, Igf2, Jmjd4, Kif13a, Klhl13, Krt80, Lamc2, Mal, Mansc1, Masp2, Max, Mthfd11, Myh7 , Ncoa4, Nip7, Npb, Ntn4, Pigw, Pin4, Pkdrej, Plagl1, Qtrtd1, Rpgr, Runx1t1, Sh3bp4, Slc22a17, Slc25a36, Srgap1, Tceanc, Tiam1, Tigd2, Timp4, Tlr5, Tmem164, Tns3, Ube4b , Ufsp1, Vangl2 , Zfp275, Zfp867



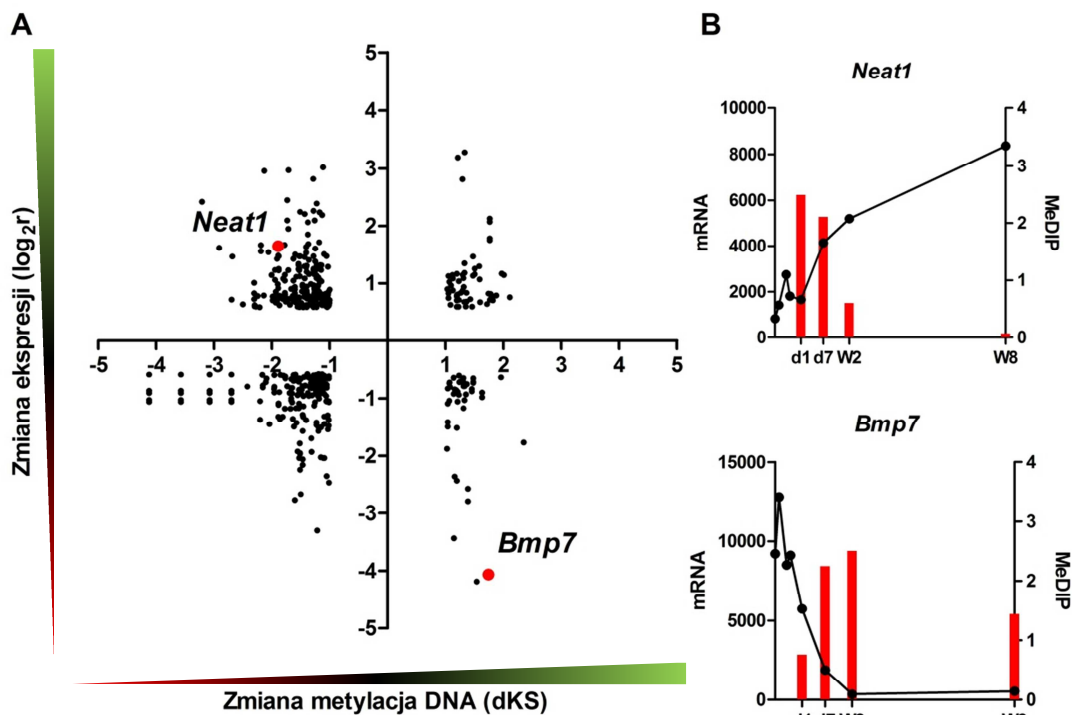
Rysunek 10 Relacja pomiędzy regionami DMR, a genami których poziom ekspresji zmienia się półtorakrotnie w sercu myszy pomiędzy dniem pierwszym i siódmym życia.

(A) Wykres rozrzutu prezentujący zmiany obserwowane pomiędzy DMR, a poziomem ekspresji genu.

(B) Przykładowe geny, których zmiana w poziomie ekspresji została powiązana ze zmianą metylacji DNA.

Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmo tydzień).

Zmiana metylacji DNA dKS odpowiada, zmiana ekspresji $\log_2(r)$ odpowiada wartości logarytmu przy podstawie 2 ze stosunku znormalizowanych sygnałów ekspresji wyznaczonych przy użyciu mikromacierzy.



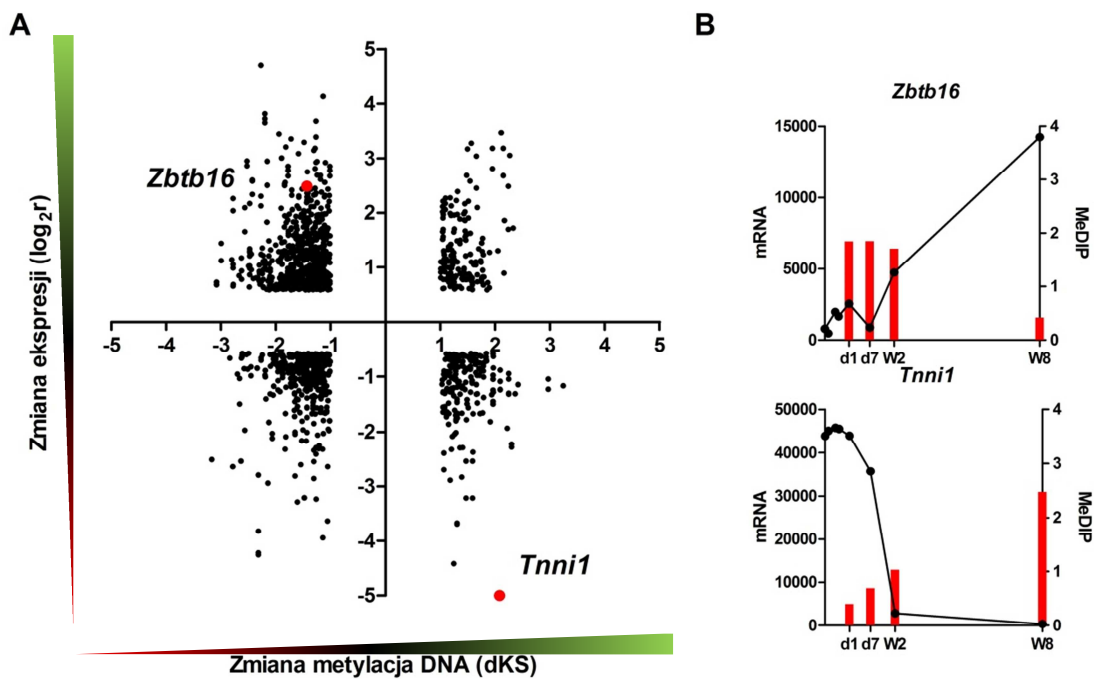
Rysunek 11 Relacja pomiędzy DMR, a genami których poziom ekspresji zmienia się półtorakrotnie w sercu myszy pomiędzy dniem pierwszym i drugim tygodniem życia.

(A) Wykres rozrzutu prezentujący zmiany obserwowane pomiędzy DMR a poziomem ekspresji genu.

(B) Przykładowe geny, których zmiana w poziomie ekspresji została powiązana ze zmianą metylacji DNA.

Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmy tydzień).

Zmiana metylacji DNA dKS odpowiada, zmiana ekspresji $\log_2(r)$ odpowiada wartości logarytmu przy podstawie 2 ze stosunku znormalizowanych sygnałów ekspresji wyznaczonych przy użyciu mikromacierzy.



Rysunek 12 Relacja pomiędzy DMR, a genami których poziom ekspresji zmienia się półtorakrotnie w sercu myszy pomiędzy dniem pierwszym i ósmym tygodniem życia.

(A) Wykres rozrzutu prezentujący zmiany obserwowane pomiędzy DMR a poziomem ekspresji genu.

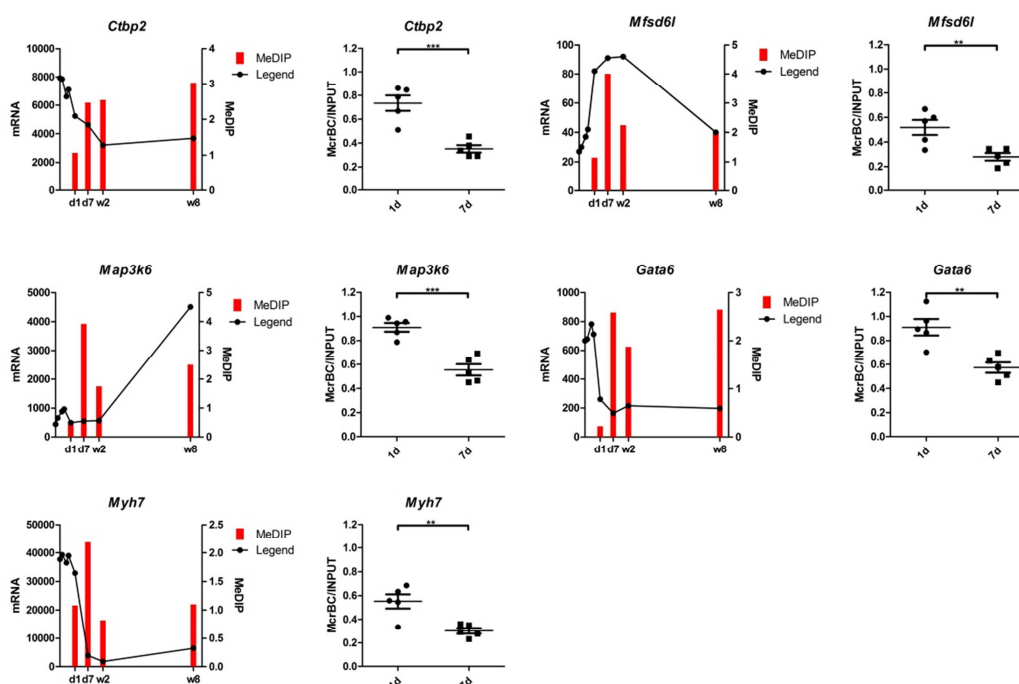
(B) Przykładowe geny, których zmiana w poziomie ekspresji została powiązana ze zmianą metylacji DNA.

Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmy tydzień).

Zmiana metylacji DNA dKS odpowiada, zmiana ekspresji $\log_2(r)$ odpowiada wartości logarytmu przy podstawie 2 ze stosunku znormalizowanych sygnałów ekspresji wyznaczonych przy użyciu mikromacierzy.

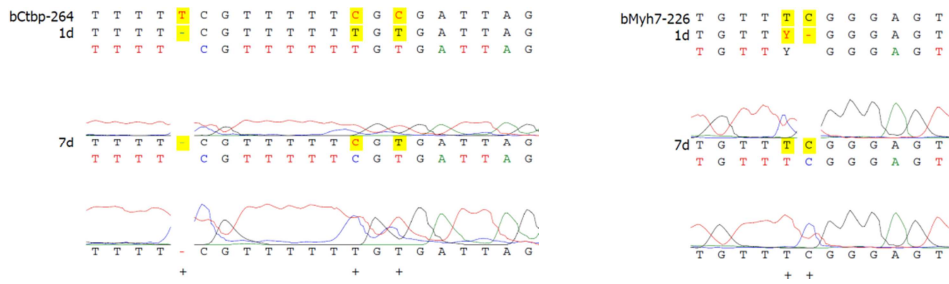
6.1.5. Weryfikacja mikromacierzowych wyników oznaczeń metylacji DNA w sercach myszy dla wybranych regionów DMR

Weryfikację wyników eksperymentów mikromacierzowych dla wybranych regionów DMR charakterystycznych dla przejścia między dniem pierwszym i siódmym w sercach noworodków myszy przeprowadzono za pomocą trawienia genomowego DNA przy użyciu enzymu McrBC trawiącego DNA zawierającego 5-mC i analizę tak przetworzonych matryc przy pomocy qPCR. Oznaczenia te wykonano dla wybranych genów: *Ctbp2* (represor transkrypcji), *Gata6* (aktywator transkrypcji), *Map3k6* (kinaza białkowa), *Mfsd6l* (czynniki transkrypcyjny), *Myh7* (białko miozyny) (Rysunek 13). Dodatkowo status metylacyjny genów *Ctbp2* i *Myh7* został potwierdzony za pomocą sekwencjonowania wodorosiarczynowego (Rysunek 14). Uzyskano wyniki oznaczeń były zgodne z rezultatami pomiarów mikromacierzowych.



Rysunek 13 Weryfikacja wyników eksperymentów mikromacierzowych dla wybranych regionów DMR przy użyciu trawiącego DNA zawierające 5-mC enzymu McrBC i analizy qPCR.

Po lewej stronie przedstawiono wyniki eksperymentów mikromacierzowych dla metylacji DNA (MeDIP) i ekspresji genów (mRNA), a po prawej rezultaty oznaczania poziomu metylacji DNA dla dnia 1 i dnia 7. Wyniki przedstawiono jako stosunek ilości niestrawionego DNA w stosunku do kontroli nietrawionego DNA (INPUT). Istotność statystyczną oznaczono za pomocą dwuśladowego heteroskedastycznego testu t-Studenta. Poziomy istotności oznaczono * dla $p \leq 0,05$ i ** dla $p \leq 0,01$ oraz *** dla $p \leq 0,001$. Wiek zwierząt oznaczono jako d1 (dzień pierwszy), d7 (dzień siódmy), w2 (drugi tydzień), w8 (ósmy tydzień).



Rysunek 14 Fragmenty chromatogramów sekwencyjnych regionów DMR zidentyfikowanych dla genów *Ctbp2* i *Myh7*.

W pierwszym tygodniu życia obserwowany jest wzrost poziomu metylacji DNA regionów promotorowych genów *Ctbp2* i *Myh7*. Po reakcji konwersji niezmetylowana cytozyna ulega deaminacji do uracylu i jest odczytywana w sekwencjonowaniu DNA jako tymina.

6.2. Dyskusja i podsumowanie

Niedawno opublikowane zostały pierwsze wyniki badań genomowych profili metylacji DNA w sercach noworodków myszy przeprowadzone przez dwa niezależne zespoły: Sim et al. (Sim et al. 2014) oraz Gilsbach et al. (Gilsbach et al. 2014). Ponadto zmiany w poziomie metylacji DNA genów należących do szlak sygnałowego Notch zostały opisane w kontekście zaniku zdolności regeneracyjnych w sercach noworodków myszy (Felician et al. 2014). Jak wykazano w pracy Sim et al., globalny poziom metylacji DNA w sercu ulega dynamicznym zmianom po urodzeniu, przy czym globalna demetylacja DNA następuje między drugim i czwartym tygodniem życia w sercu myszy. Jednocześnie inhibicja metylotransferaz DNA prowadzi do zahamowania binukleacji kardiomiocytów oraz skutkuje zwiększeniem ich proliferacji po urodzeniu (Sim et al. 2014). Gilsbach et al. zauważyli, że wzór epigenetycznych modyfikacji, metylacji DNA i modyfikacji histonów, dojrzałych kardiomiocytów ulega odwróceniu po uszkodzeniu serca i zaczyna przypominać wzór epigenetyczny obserwowany u noworodków (Gilsbach et al. 2014). Jednocześnie u kardiomiocytów pochodzących od dorosłych myszy w hodowli *in vitro* obserwuje się zachodzenie zmian w profilu transkrypcyjnym, które mają charakter przeciwny do zmian obserwowanych podczas różnicowania się kardiomiocytów *in vivo*. Podobny efekt obserwowany jest podczas regeneracji serca u noworodków myszy (O'Meara et al. 2015).

Badania Sim et al. (Sim et al. 2014) zostały przeprowadzone na lewych komorach pochodzących od jednodniowych i dwutygodniowych myszy za pomocą metody MeDIP-seq (immunoprecypitacja metylowanego DNA połączona z sekwencjonowaniem NGS), podczas gdy w pracy Gilsbach et al. (Gilsbach et al. 2014) porównano profile metylacji DNA z izolowanych kardiomiocytów jednodniowych i ośmiotygodniowych myszy za pomocą metody BS-seq (sekwencjonowanie NGS DNA poddanego konwersji wodorosiarczynowej).

W tej pracy zbadano natomiast genomowe profile metylacji DNA za pomocą metody MeDIP-chip, czyli immunoprecypitacji metylowanego DNA połączonego z badaniem mikromacierzowym w sercach pochodzących od jedno- i siedmiodniowych oraz dwu- i ośmiotygodniowych myszy. Ponieważ zdolności regeneracyjne serca zanikają w pierwszym tygodniu życia myszy, w niniejszej pracy skupiono się na zmianach zaobserwowanych pomiędzy dniem pierwszym i siódmym.

Zmiany w poziomie metylacji DNA związane z „rozwojem serca”, a tym samym prawdopodobnie połączone ze zdolnością do regeneracji zaobserwowano już w pierwszym tygodniu życia. Wiele tych zmian wiązało się ze wzrostem poziomu metylacji DNA, ale miało charakter tymczasowy w tym sensie, że nie utrzymywało się

w kolejnych etapach rozwoju (2w i 8w). Pomiędzy pierwszym dniem i drugim tygodniem oraz pierwszym dniem i ósmym tygodniem przeważają zmiany związane ze spadkiem poziomu metylacji DNA, co jest zgodne ze spadkiem globalnego poziomu metylacji DNA obserwowanego przez Sim et al. (Sim et al. 2014). Ponadto wśród genów zwiększających poziom metylacji DNA pomiędzy dniem pierwszym i ósmym tygodniem (dane niepokazane) zidentyfikowano geny *Notch1* i *Hey1* opisane w pracy Felician et al. (Felician et al. 2014).

Analiza zagęszczenia motywów sekwencyjnych w regionach regulatorowych genów powiązanych z regionami DMR wskazała, że geny ulegające procesowi metylacji w pierwszym tygodniu życia mogą być regulowane przez czynniki transkrypcyjne: Mef2c, Nr2f2, Tead4, Meis3 i Mfsd6l. Wiadomo, że pierwsze trzy z wymienionych czynników pełnią istotną rolę w regulacji rozwoju serca, a zaburzenia ich działania skutkują powstawaniem wielu wad wrodzonych serca. Łącznie 273 geny związane z tymi regionami DMR mogą być regulowane przez Mef2c, Nr2f2, Tead4. Nadekspresja czynnika Mef2c oraz Gata4 i Tbx5 w fibroblastach skutkuje ich przeprogramowaniem w komórki podobne do kardiomiocytów, które są zdolne do spontanicznych skurczy (Ieda et al. 2010). Czynniki Nr2f2 i Tead4 zostały powiązane z wrodzonymi wadami serca (Nakamura et al. 2011) i tetralogią Fallota u ludzi (Sheng et al. 2014). Czynniki Tead4, w wyniku stymulacji receptora α_1 -adrenergicznego, wywołują hipertrofię kardiomiocytów (Stewart et al. 1998) oraz wpływa na ekspresję czynnika Hif1 α pobudzając rozwój naczyń krwionośnych i ułatwiając powrót do zdrowia mięśnia sercowego po jego niedokrwieniu (Jin et al. 2011). Rola czynników Meis3 i Mfsd6l nie została dotąd opisana w kontekście funkcji serca, ale czynniki te mogą odpowiadać za regulację odpowiednio 243 i 494 z 929 genów powiązanych z regionami DMR ulegającymi metylacji w pierwszym tygodniu życia. W przypadku genów hipometylowanych zauważono zagęszczenie miejsc wiązania czynnika Stat6. Krótkotrwała zwiększona fosforylacja czynnika Stat6 jest obserwowana podczas stymulacji kardiomiocytów *in vitro* za pomocą interleukiny 13 (Il13), która stymuluje syntezę DNA w kardiomiocytach (O'Meara et al. 2015).

Wśród 1029 genów wykazujących zmiany poziomu metylacji DNA między pierwszym i siódmym dniem życia w sercach noworodków myszy znaleziono odwrotne korelacje z poziomem ekspresji dla 176 genów, w tym np. *Klf4* i *Bmp10*. Z danych literaturowych wiadomo, że nokaut genu *Klf4* w kardiomiocytach umożliwia ekspresję wielu genów w sercu embrionalnym w przypadku indukowanej hipertrofii (Yoshida et al. 2014). Ponadto zwiększona ekspresja *Klf4* następuje w wyniku zaburzenia działania szlaku CCM (ang. *Cerebral Cavernous Malformation*) odpowiedzialnego za prawidłowy rozwój układu krwionośnego, co skutkuje powstawaniem uszkodzeń serca u płodów

(Zhou et al. 2015). Ekspresja *Bmp10* spada gwałtownie pomiędzy pierwszym, a siódmym dniem po urodzeniu, czemu towarzyszy wzrost wzbogacenia metylowanego DNA w regionie promotorowym tego genu. Ekspresja genu *Bmp10* jest ograniczona do mięśnia sercowego oraz jest ona konieczna do jego prawidłowego rozwoju, ponieważ stwierdzono, że myszy *Bmp10*^{-/-} wykazują zmniejszoną proliferację kardiomiocytów. Jednocześnie *Bmp10* reguluje ekspresję specyficznych dla serca czynników transkrypcyjnych (*Mef2c*, *Nkx2.5*) (Chen et al. 2004). Nadekspresja *Bmp10* u noworodków myszy skutkuje zmniejszeniem rozmiaru serca w wyniku zaburzenia hipertrofii kardiomiocytów (Chen et al. 2006).

Wprawdzie najlepiej poznanym dotąd efektem działania metylacji DNA w regionach promotorowych genów na ich ekspresję jest represja, to znane są też mechanizmy podwyższania ekspresji genu wskutek metylacji DNA. Przy analizie tkanek, a zwłaszcza narządów takich jak serce, zawierających różne rodzaje komórek, należy mieć na względzie, że znalezione regiony DMR mogą pochodzić np. od kardiomiocytów, a skojarzone z nimi wzrosty ekspresji od np. fibroblastów. W takim wypadku pozytywna korelacja między metylacją DNA i ekspresją genu oznaczać mogłaby epigenetyczne różnicowanie komórek związane z metylacyjnym wyłączeniem ekspresji grupy genów w jednej, a indukcją ekspresji tych genów w drugiej grupie komórek.

Według obecnego stanu wiedzy jest to pierwsze badanie porównujące zmiany zachodzące w metylacji DNA następujące w pierwszym tygodniu życia u myszy, w którym to obserwowany jest zanik zdolności regeneracyjnych. Znacząca liczba regionów DNA zmienia swój status metylacyjny między dniem pierwszym i siódmym, przy czym geny związane z rozwojem serca ulegają w tym okresie przede wszystkim hipermetylacji. Geny związane z tymi regionami DMR są regulowane przez czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za prawidłowy rozwój i działanie serca. Uzyskane wyniki sugerują, że zanik zdolności regeneracyjnych serca może wiązać się z wyłączeniem genów zaangażowanych w mechanizmy rozwojowe. Nie musi to jednak oznaczać, że neonatalne mechanizmy regeneracji serca są tożsame z rozwojem serca.

Szczególnie interesujące jest wskazanie czynnika transkrypcyjnego *Mfsd6l* jako potencjalnego nadrzędnego czynnika regulacji rozwoju, a być może, regeneracyjnej naprawy serca, zwłaszcza że dotąd czynnik ten pozostaje słabo scharakteryzowany i nie był badany w kontekście rozwoju lub regeneracji serca.

Uzyskane profile metylacji DNA i ekspresji genów reprezentują całe serca, a więc zaobserwowane zmiany dotyczą mieszaniny wielu rodzajów komórek, przede wszystkim: kardiomiocytów, fibroblastów oraz komórek endotelialnych. Chociaż kluczowym aspektem regeneracji serca jest proliferacja kardiomiocytów, warto

pamiętać, że pozostałe typy komórek tworzą środowisko dla ich wzrostu, tym samym również odgrywają rolę w tym procesie. Fibroblasty serca mogą stanowić nawet 2/3 wszystkich komórek obecnych w sercu oraz odpowiedzialne są za wytwarzanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej i czynników wzrostu, które wspomagają wzrost i funkcje kardiomiocytów (Porrello and Olson 2014).

7. Uwagi końcowe

Epigenetyczne mechanizmy regulacji od wielu lat były przedmiotem intensywnych badań w wielu procesach biologicznych takich jak nowotworzenie, czy różnicowanie się komórek. Jednak dopiero w ostatnim czasie zwrócono uwagę na ich rolę w procesie regeneracji. Epigenetyczne przeprogramowanie może towarzyszyć procesowi regeneracji, co skutkuje zwiększeniem zdolności do proliferacji i różnicowania się komórek w miejscu uszkodzenia. W tym sensie w przypadku zranienia obserwowane będą procesy metylacji/demetylacji DNA oraz zmiany struktury chromatyny, które będą skutkowały ekspresją genów umożliwiającą zachodzenie procesu regeneracji. Z drugiej strony epigenetyczne mechanizmy mogą regulować działanie szlaków sygnałowych prowadząc je na tory umożliwiające bezbliznowe gojenie ran lub mogą warunkować zdolności do ekspresji kluczowych dla tego procesu genów.

W pracy tej otrzymano i zbadano globalne profile metylacji DNA dla dwóch modeli regeneracji u ssaków: (i) dorosłej myszy MRL/MpJ, która jest zdolna do bezbliznowego zamykania otworów w uszach oraz (ii) serca noworodków myszy, u których do piątego dnia życia zwierzęcia zachodzi bezbliznowa naprawa różnych typów uszkodzeń.

W przypadku myszy MRL/MpJ zaobserwowano szereg regionów DMR, które odróżniają ją od dwóch użytych w pracy szczepów kontrolnych, u których nie zaobserwowano zwiększonych zdolności regeneracyjnych, myszy C57BL/6J i BALB/c. Charakterystyczne dla myszy MRL/MpJ regiony DMR zidentyfikowane w małżowinie usznej położone były w sąsiedztwie genów związanych z regulacją procesu apoptozy, tworzenia przednio-tylnego wzorca ekspresji genów oraz odpowiedzi zapalnej, które to procesy są silnie związane z procesami gojenia ran i regeneracji. Wiele z genów położonych w sąsiedztwie regionów DMR zidentyfikowanych w małżowinie usznej ma dobrze poznaną funkcję w procesie gojenia ran i wiadomo, że wpływa na wiele aspektów z nim związanych, takich jak angiogeneza, migracja komórek, szybkość zamykania rany oraz tworzenie blizny. Dodatkowo część ze zidentyfikowanych regionów położona była w obrębie *loci* cechy ilościowej (QTL) powiązanych ze zdolnościami do regeneracyjnego zamykania otworów w małżowinie usznej. Powiązanie regionów DMR znalezionych w małżowinie usznej z potencjałem regeneracyjnym myszy MRL/MpJ, chociaż nie jest jednoznacznie udowodnione, wydaje się być szczególnie interesujące, jako punkt wyjścia do dalszych badań. W pracy uzyskano również genomowe profile metylacji DNA dla innych tkanek: wątroby, śledziony, szpiku kostnego oraz serca, ale tu wyniki analiz nie wskazują na

tego rodzaju asocjacje z potencjałem regeneracyjnym myszy MRL/MpJ jak w wypadku małżowiny usznej.

W przypadku serca noworodków myszy porównano zmiany zachodzące w genomowych profilach metylacji DNA po urodzeniu, przy czym skupiono się na różnicach zaobserwowanych pomiędzy dniem pierwszym i siódmym po urodzeniu, czyli przed i po utracie zdolności do regeneracji. Regiony DMR charakterystyczne dla przejścia między dniem pierwszym i siódmym dotyczyły głównie zwiększenia poziomu metylacji DNA oraz były powiązane z szeregiem genów odpowiedzialnych za morfogenezę serca oraz regulowanych przez czynniki transkrypcyjne zaangażowane w jej prawidłowy przebieg.

Chociaż w modelach regeneracji myszy MRL/MpJ i regeneracji serc noworodków normalnych myszy nie zaobserwowano wspólnych regionów DMR w obu z nich zauważono, że regiony DMR związane są z genami związanymi z procesem różnicowania się komórek, a w szczególności w tworzenie przednio-tylnego wzorca ekspresji genów. Zatem wydaje się prawdopodobne, że zdolności regeneracyjne lub ich zanik może wiązać się z obecnością regulatorów procesów morfogenezy lub ich epigenetycznym wyłączeniem.

Warto jednak zwrócić uwagę na to, że oba te modele różnią się mechanizmem zachodzenia procesu regeneracji. U myszy MRL/MpJ geny związane z rozwojem embrionalnym mogą wpływać na plastyczność komórek w małżowinie usznej, które w przypadku uszkodzenia ulegają odróżnicowaniu, przez co możliwe jest powstanie blastemy, struktury obserwowanej u ryb i płazów podczas regeneracji. Cecha ta w znaczący sposób odróżnia proces gojenia ran od innych szczepów myszy i ssaków, u których proces regeneracji, jeżeli zachodzi, oparty jest na aktywacji tkankowych komórek macierzystych. Tymczasem w przypadku serc noworodków myszy obserwowana w procesie regeneracji jest proliferacja istniejących już kardiomiocytów lub sercowych komórek progenitorowych. Regeneracja dotyczy tu zatem komórek, których przeznaczenie jest już określone. W tym sensie zaobserwowane regiony DMR odnosić się będą w większym stopniu do epigenetycznego wyłączenia szlaków sygnałowych.

Analizy wykonane w niniejszej pracy wykazały małe pokrycie się DNA, regionów DMR z różnicami w poziomie ekspresji genów, co było szczególnie widoczne w przypadku tkanek myszy MRL/MpJ, C57BL/6J i BALB/c. Z jednej strony może to wynikać z dość surowych kryteriów, które zostały zastosowane do identyfikacji regionów DMR, ale również ze względu na zastosowanie całych narządów, a nie izolowanych populacji komórek jednego rodzaju. Warto zwrócić uwagę, że z tego względu, obserwowane różnice w profilach metylacji DNA reprezentowały

przeważającą frakcją komórek, tymczasem proces regeneracji może zależeć od stosunkowo niewielkiej frakcji komórek zlokalizowanych w danej tkance lub do niej migrujących. Z drugiej strony uzyskane wyniki wydają się wskazywać na istnienie różnic w profilach metylacji DNA, które dotyczą znacznej części komórek w badanych tkankach i mogą wpływać na zdolności regeneracyjne.

Odróżnicowywanie się komórek, które połączone jest z ekspresją genów związanych z mechanizmami metylacji/demetylacji DNA zostało zaobserwowane w kilku modelach regeneracji. Zatem mechanizmy epigenetyczne stanowią interesujący cel molekularny do rozwoju terapii stymulujących proces regeneracji lub wpływających na poprawę procesu gojenia ran. Istnieje kilka leków wykorzystywanych w „terapiach epigenetycznych”, które są wykorzystywane w leczeniu chorób nowotworowych. Są to m.in. inhibitory metylotransferaz: DNA 5-azacytydyna (Vidaza®) i 5-aza-deoksycytydyna (Dacogen®), które są analogami cytozyny oraz inhibitory deacetylaz histonów: kwas suberanilohydroksamowy (Zolinza®), romidepsyna (Istodax®), belinostat (Beleodaq®). Niestety zastosowanie tych leków w terapii jest niewielkie ze względu na ich niską selektywność. Większą selektywnością odznaczają się leki epigenetyczne drugiej generacji, których celem molekularnym są inne niż deacetylazy histonów enzymy modyfikujące strukturę chromatyny, a które działają w określonych lokalizacjach chromosomowych (Valdespino and Valdespino 2015).

Uzyskane wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań. W szczególności warto byłoby sprawdzić, czy zaobserwowane różnice w metylacji DNA dla poszczególnych genów wpływają na ich poziom ekspresji podczas regeneracyjnego zamykania otworów w uszach lub po uszkodzeniu serca u noworodków myszy. Ponadto warto byłoby sprawdzić, czy proces regeneracji może być stymulowany za pomocą czynników wpływających na poziom metylacji DNA.

8. Spis skrótów

BER - ang. *base excision repair*

CGI - ang. *CpG island*

CHARM - ang. *comprehensive high-throughput arrays for relative methylation*

cM - centymorgan

CPSG – ang. chondroitin sulfate proteoglycans

dKS – różnica w wyniku wzbogacenia w teście Kołmogorowa-Smirnowa

DMR - ang. *differentially methylated regions*

Dnmt - ang. *DNA methyltransferase*

GFAP – ang. glial fibrillary acidic protein

Hdac - ang. *histone deacetylase*

iPSC - ang. *induced pluripotent stem cells*

KS - wynik wzbogacenia w teście Kołmogorwa-Smirnowa

MBD - ang. *methyl-CpG binding domain*

MBP - ang. *methyl binding proteins*

MeDIP - ang. *methylated DNA immunoprecipitation*

MEF - ang. *mouse embryonic fibroblasts*

MG – komórki Müllera

MGPC - ang. *Müller glia progenitor cell*

MMP – ang. *matrix metalloproteinase*

NES - ang. *Normalised Enrichment Score*

ROS – ang. *reactive oxygen species*

PRC1/2 - ang. *Polycomb Repressive Complex 1/2*

pz - par zasad

QTL - ang. *quantitative trait loci*

RMA - ang. *Robust Multi-array Average*

RRBS - ang. *reduced representation bisulphite sequencing*

sFrp - ang. *secreted Frizzled-Related Proteins*

SRA - ang. *SET and RING associated domain*

TIMP – ang. *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*

9. Literatura

- Abdullah, I., J. J. Lepore, J. A. Epstein, M. S. Parmacek & P. J. Gruber (2005) MRL mice fail to heal the heart in response to ischemia-reperfusion injury. *Wound Repair Regen*, 13, 205-8.
- Adriaens, M. E., M. Jaillard, L. M. Eijssen, C. D. Mayer & C. T. Evelo (2012) An evaluation of two-channel ChIP-on-chip and DNA methylation microarray normalization strategies. *BMC Genomics*, 13, 42.
- Alfaro, M. P., M. Pagni, A. Vincent, J. Atkinson, M. F. Hill, J. Cates, J. M. Davidson, J. Rottman, E. Lee & P. P. Young (2008) The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 18366-71.
- Almodovar-Garcia, K., M. Kwon, S. E. Samaras & J. M. Davidson (2014) ANKRD1 acts as a transcriptional repressor of MMP13 via the AP-1 site. *Mol Cell Biol*, 34, 1500-11.
- Arany, P. R., K. C. Flanders, T. Kobayashi, C. K. Kuo, C. Stuelten, K. V. Desai, R. Tuan, S. I. Rennard & A. B. Roberts (2006) Smad3 deficiency alters key structural elements of the extracellular matrix and mechanotransduction of wound closure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9250-5.
- Arasa, J., P. Martos, M. C. Terencio, F. Valcuende-Cavero & M. C. Montesinos (2014) Topical application of the adenosine A2A receptor agonist CGS-21680 prevents phorbol-induced epidermal hyperplasia and inflammation in mice. *Exp Dermatol*, 23, 555-60.
- Arthur, L. M., R. M. Demarest, L. Clark, D. Gourevitch, K. Bedelbaeva, R. Anderson, A. Snyder, A. J. Capobianco, P. Lieberman, L. Feigenbaum & E. Heber-Katz (2010) Epimorphic regeneration in mice is p53-independent. *Cell Cycle*, 9, 3667-73.
- Atit, R., S. K. Sgaier, O. A. Mohamed, M. M. Taketo, D. Dufort, A. L. Joyner, L. Niswander & R. A. Conlon (2006) Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol*, 296, 164-76.
- Aurora, A. B., E. R. Porrello, W. Tan, A. I. Mahmoud, J. A. Hill, R. Bassel-Duby, H. A. Sadek & E. N. Olson (2014) Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest*, 124, 1382-92.
- Barrero, M. J. & J. C. Izpisua Belmonte (2011) Regenerating the epigenome. *EMBO Rep*, 12, 208-15.
- Beare, A. H., A. D. Metcalfe & M. W. Ferguson (2006) Location of injury influences the mechanisms of both regeneration and repair within the MRL/MpJ mouse. *J Anat*, 209, 547-59.
- Bedelbaeva, K., D. Gourevitch, L. Clark, P. Chen, J. M. Leferovich & E. Heber-Katz (2004) The MRL mouse heart healing response shows donor dominance in allogeneic fetal liver chimeric mice. *Cloning Stem Cells*, 6, 352-63.
- Bedelbaeva, K., A. Snyder, D. Gourevitch, L. Clark, X. M. Zhang, J. Leferovich, J. M. Cheverud, P. Lieberman & E. Heber-Katz (2010) Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5845-50.
- Bergmann, A. & H. Steller (2010) Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*, 3, re8.
- Bindea, G., B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W. H. Fridman, F. Pages, Z. Trajanoski & J. Galon (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25, 1091-3.
- Blankenhorn, E. P., G. Bryan, A. V. Kossenkov, L. D. Clark, X. M. Zhang, C. Chang, W. Horng, L. S. Pletscher, J. M. Cheverud, L. C. Showe & E. Heber-Katz (2009) Genetic loci that regulate healing and regeneration in LG/J and SM/J mice. *Mamm Genome*, 20, 720-33.

- Blankenhorn, E. P., S. Troutman, L. D. Clark, X. M. Zhang, P. Chen & E. Heber-Katz (2003) Sexually dimorphic genes regulate healing and regeneration in MRL mice. *Mamm Genome*, 14, 250-60.
- Borgens, R. B. (1982) Mice regrow the tips of their foretoes. *Science*, 217, 747-50.
- Buckley, G., A. D. Metcalfe & M. W. Ferguson (2011) Peripheral nerve regeneration in the MRL/MpJ ear wound model. *J Anat*, 218, 163-72.
- Buckley, G., J. Wong, A. D. Metcalfe & M. W. Ferguson (2012) Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. *J Anat*, 220, 3-12.
- Canhamero, T., L. V. Garcia & M. De Franco (2014) Acute Inflammation Loci Are Involved in Wound Healing in the Mouse Ear Punch Model. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3, 582-591.
- Chadwick, R. B., L. Bu, H. Yu, Y. Hu, J. E. Wergedal, S. Mohan & D. J. Baylink (2007) Digit tip regrowth and differential gene expression in MRL/MpJ, DBA/2, and C57BL/6 mice. *Wound Repair Regen*, 15, 275-84.
- Chalamalasetty, R. B., R. J. Garriock, W. C. Dunty, Jr., M. W. Kennedy, P. Jailwala, H. Si & T. P. Yamaguchi (2014) Mesogenin 1 is a master regulator of paraxial presomitic mesoderm differentiation. *Development*, 141, 4285-97.
- Chen, H., S. Shi, L. Acosta, W. Li, J. Lu, S. Bao, Z. Chen, Z. Yang, M. D. Schneider, K. R. Chien, S. J. Conway, M. C. Yoder, L. S. Haneline, D. Franco & W. Shou (2004) BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*, 131, 2219-31.
- Chen, H., W. Yong, S. Ren, W. Shen, Y. He, K. A. Cox, W. Zhu, W. Li, M. Soonpaa, R. M. Payne, D. Franco, L. J. Field, V. Rosen, Y. Wang & W. Shou (2006) Overexpression of bone morphogenetic protein 10 in myocardium disrupts cardiac postnatal hypertrophic growth. *J Biol Chem*, 281, 27481-91.
- Cheng, X. H., H., Zhang, X.; 2011. *Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG recognition, and Demethylation in Mammals*. San Diego: Academic Press.
- Cheverud, J. M., H. A. Lawson, R. Funk, J. Zhou, E. P. Blankenhorn & E. Heber-Katz (2012) Healing quantitative trait loci in a combined cross analysis using related mouse strain crosses. *Heredity (Edinb)*, 108, 441-6.
- Cimini, M., S. Fazel, H. Fujii, S. Zhou, G. Tang, R. D. Weisel & R. K. Li (2008) The MRL mouse heart does not recover ventricular function after a myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*, 17, 32-9.
- Clark, L. D., R. K. Clark & E. Heber-Katz (1998) A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin Immunol Immunopathol*, 88, 35-45.
- Colwell, A. S., T. M. Krummel, W. Kong, M. T. Longaker & H. P. Lorenz (2006) Skin wounds in the MRL/MPJ mouse heal with scar. *Wound Repair Regen*, 14, 81-90.
- D'Uva, G., A. Aharonov, M. Lauriola, D. Kain, Y. Yahalom-Ronen, S. Carvalho, K. Weisinger, E. Bassat, D. Rajchman, O. Yifa, M. Lysenko, T. Konfino, J. Hegesh, O. Brenner, M. Neeman, Y. Yarden, J. Leor, R. Sarig, R. P. Harvey & E. Tzahor (2015) ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat Cell Biol*, 17, 627-38.
- Davis, T. A., M. Amare, S. Naik, A. L. Kovalchuk & D. Tadaki (2007) Differential cutaneous wound healing in thermally injured MRL/MPJ mice. *Wound Repair Regen*, 15, 577-88.
- Davis, T. A., J. D. Longcor, K. C. Hicok & G. G. Lennon (2005) Prior injury accelerates subsequent wound closure in a mouse model of regeneration. *Cell Tissue Res*, 320, 417-26.
- Dioufa, N., A. V. Schally, I. Chatzistamou, E. Moustou, N. L. Block, G. K. Owens, A. G. Papavassiliou & H. Kiaris (2010) Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18611-5.
- Drenckhahn, J. D., Q. P. Schwarz, S. Gray, A. Laskowski, H. Kiriazis, Z. Ming, R. P. Harvey, X. J. Du, D. R. Thorburn & T. C. Cox (2008) Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell*, 15, 521-33.

- Fazzari, M. J. & J. M. Grealley (2010) Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Methods Mol Biol*, 620, 243-65.
- Felician, G., C. Collesi, M. Lusic, V. Martinelli, M. D. Ferro, L. Zentilin, S. Zacchigna & M. Giacca (2014) Epigenetic modification at Notch responsive promoters blunts efficacy of inducing notch pathway reactivation after myocardial infarction. *Circ Res*, 115, 636-49.
- Fitzgerald, J., C. Rich, D. Burkhardt, J. Allen, A. S. Herzka & C. B. Little (2008) Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 16, 1319-26.
- Fry, E. J., H. B. Stolp, M. A. Lane, K. M. Dziegielewska & N. R. Saunders (2003) Regeneration of supraspinal axons after complete transection of the thoracic spinal cord in neonatal opossums (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol*, 466, 422-44.
- Gawronska-Kozak, B. (2004) Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 10, 1251-65.
- Gilsbach, R., S. Preissl, B. A. Gruning, T. Schnick, L. Burger, V. Benes, A. Wurch, U. Bonisch, S. Gunther, R. Backofen, B. K. Fleischmann, D. Schubeler & L. Hein (2014) Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat Commun*, 5, 5288.
- Giordano Attianese, G. M. & B. Desvergne (2015) Integrative and systemic approaches for evaluating PPARbeta/delta (PPARD) function. *Nucl Recept Signal*, 13, e001.
- Gornikiewicz, B., A. Ronowicz, J. Podolak, P. Madanecki, A. Stanislawska-Sachadyn & P. Sachadyn (2013) Epigenetic basis of regeneration: analysis of genomic DNA methylation profiles in the MRL/MpJ mouse. *DNA Res*, 20, 605-21.
- Goss, R. J. & L. N. Grimes (1975) Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J Morphol*, 146, 533-42.
- Gourevitch, D., L. Clark, P. Chen, A. Seitz, S. J. Samulewicz & E. Heber-Katz (2003) Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev Dyn*, 226, 377-87.
- Gourevitch, D., A. V. Kossenkov, Y. Zhang, L. Clark, C. Chang, L. C. Showe & E. Heber-Katz (2014) Inflammation and Its Correlates in Regenerative Wound Healing: An Alternate Perspective. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3, 592-603.
- Gourevitch, D. L., L. Clark, K. Bedelbaeva, J. Leferovich & E. Heber-Katz (2009) Dynamic changes after murine digit amputation: the MRL mouse digit shows waves of tissue remodeling, growth, and apoptosis. *Wound Repair Regen*, 17, 447-55.
- Grisel, P., A. Meinhardt, H. A. Lehr, L. Kappenberger, Y. Barrandon & G. Vassalli (2008) The MRL mouse repairs both cryogenic and ischemic myocardial infarcts with scar. *Cardiovasc Pathol*, 17, 14-22.
- Hampton, D. W., A. Seitz, P. Chen, E. Heber-Katz & J. W. Fawcett (2004) Altered CNS response to injury in the MRL/MpJ mouse. *Neuroscience*, 127, 821-32.
- Hasegawa, T., T. Nakajima, T. Ishida, A. Kudo & A. Kawakami (2015) A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration. *Dev Biol*, 399, 80-90.
- Hattori, N., Y. Imao, K. Nishino, N. Hattori, J. Ohgane, S. Yagi, S. Tanaka & K. Shiota (2007) Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells*, 12, 387-96.
- Hattori, N., K. Nishino, Y. G. Ko, N. Hattori, J. Ohgane, S. Tanaka & K. Shiota (2004) Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*, 279, 17063-9.
- Heber-Katz, E. (1999) The regenerating mouse ear. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 415-9.
- Heber-Katz, E., P. Chen, L. Clark, X. M. Zhang, S. Troutman & E. P. Blankenhorn (2004a) Regeneration in MRL mice: further genetic loci controlling the ear hole closure trait using MRL and M.m. Castaneus mice. *Wound Repair Regen*, 12, 384-92.
- Heber-Katz, E., J. Leferovich, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch & L. Clark (2004b) The scarless heart and the MRL mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 785-93.

- Helmo, F. R., J. R. Machado, C. S. Guimaraes, P. Teixeira Vde, M. A. dos Reis & R. R. Correa (2013) Fetal wound healing biomarkers. *Dis Markers*, 35, 939-44.
- Hirose, K., N. Shimoda & Y. Kikuchi (2013) Transient reduction of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine is associated with active DNA demethylation during regeneration of zebrafish fin. *Epigenetics*, 8, 899-906.
- Hu, X., H. Ran, W. Dechang, W. Yibing, F. Yongqiang & L. Qiang (2013) Absence of the adenosine A(2A) receptor attenuates hypertrophic scarring in mice. *J Burn Care Res*, 34, e161-7.
- Ieda, M., J. D. Fu, P. Delgado-Olguin, V. Vedantham, Y. Hayashi, B. G. Bruneau & D. Srivastava (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142, 375-86.
- Iskandar, B. J., E. Rizk, B. Meier, N. Hariharan, T. Bottiglieri, R. H. Finnell, D. F. Jarrard, R. V. Banerjee, J. H. Skene, A. Nelson, N. Patel, C. Gherasim, K. Simon, T. D. Cook & K. J. Hogan (2010) Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J Clin Invest*, 120, 1603-16.
- Jain, R., D. Li, M. Gupta, L. J. Manderfield, J. L. Ifkovits, Q. Wang, F. Liu, Y. Liu, A. Poleshko, A. Padmanabhan, J. C. Raum, L. Li, E. E. Morrissey, M. M. Lu, K. J. Won & J. A. Epstein (2015) HEART DEVELOPMENT. Integration of Bmp and Wnt signaling by Hopx specifies commitment of cardiomyoblasts. *Science*, 348, aaa6071.
- Janky, R., A. Verfaillie, H. Imrichova, B. Van de Sande, L. Standaert, V. Christiaens, G. Hulselmans, K. Herten, M. Naval Sanchez, D. Potier, D. Svetlichnyy, Z. Kalender Atak, M. Fiers, J. C. Marine & S. Aerts (2014) iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003731.
- Jesty, S. A., M. A. Steffey, F. K. Lee, M. Breitbach, M. Hesse, S. Reining, J. C. Lee, R. M. Doran, A. Y. Nikitin, B. K. Fleischmann & M. I. Kotlikoff (2012) c-kit+ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13380-5.
- Jin, Y., J. Wu, X. Song, Q. Song, B. L. Cully, A. Messmer-Blust, M. Xu, S. Y. Foo, A. Rosenzweig & J. Li (2011) RTEF-1, an upstream gene of hypoxia-inducible factor-1alpha, accelerates recovery from ischemia. *J Biol Chem*, 286, 22699-705.
- Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13, 484-92.
- Katsuyama, T. & R. Paro (2011) Epigenetic reprogramming during tissue regeneration. *FEBS Lett*, 585, 1617-24.
- Kattman, S. J., A. D. Witty, M. Gagliardi, N. C. Dubois, M. Niapour, A. Hotta, J. Ellis & G. Keller (2011) Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*, 8, 228-40.
- Kench, J. A., D. M. Russell, V. A. Fadok, S. K. Young, G. S. Worthen, J. Jones-Carson, J. E. Henson, P. M. Henson & D. Nemazee (1999) Aberrant wound healing and TGF-beta production in the autoimmune-prone MRL/+ mouse. *Clin Immunol*, 92, 300-10.
- Kiaris, H., N. L. Block, A. G. Papavassiliou & A. V. Schally (2011) GHRH and wound healing. *Commun Integr Biol*, 4, 82-3.
- Koh, K. P. & A. Rao (2013) DNA methylation and methylcytosine oxidation in cell fate decisions. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 152-61.
- Kohli, R. M. & Y. Zhang (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502, 472-9.
- Kostyk, S. K., P. G. Popovich, B. T. Stokes, P. Wei & L. B. Jakeman (2008) Robust axonal growth and a blunted macrophage response are associated with impaired functional recovery after spinal cord injury in the MRL/MpJ mouse. *Neuroscience*, 156, 498-514.
- Kwon, Y. J., K. G. Lee & D. Choi (2015) Clinical implications of advances in liver regeneration. *Clin Mol Hepatol*, 21, 7-13.

- Laird, P. W. (2010) Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 11, 191-203.
- Lalley, A. L., N. A. Dymont, N. Kazemi, K. Kenter, C. Gooch, D. W. Rowe, D. L. Butler & J. T. Shearn (2015) Improved biomechanical and biological outcomes in the MRL/MpJ murine strain following a full-length patellar tendon injury. *J Orthop Res*.
- Leferovich, J. M., K. Bedelbaeva, S. Samulewicz, X. M. Zhang, D. Zwas, E. B. Lankford & E. Heber-Katz (2001) Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9830-5.
- Lewis, C. J., A. N. Mardaryev, K. Poterlowicz, T. Y. Sharova, A. Aziz, D. T. Sharpe, N. V. Botchkareva & A. A. Sharov (2014) Bone morphogenetic protein signaling suppresses wound-induced skin repair by inhibiting keratinocyte proliferation and migration. *J Invest Dermatol*, 134, 827-37.
- Li, F., Q. Huang, J. Chen, Y. Peng, D. R. Roop, J. S. Bedford & C. Y. Li (2010) Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal*, 3, ra13.
- Li, J., E. Gao, A. Vite, R. Yi, L. Gomez, S. Goossens, F. van Roy & G. L. Radice (2015) Alpha-catenins control cardiomyocyte proliferation by regulating Yap activity. *Circ Res*, 116, 70-9.
- Li, J., P. Li, Y. Zhang, G. B. Li, F. T. He, Y. G. Zhou, K. Yang & S. S. Dai (2012) Upregulation of ski in fibroblast is implicated in the peroxisome proliferator-activated receptor delta-mediated wound healing. *Cell Physiol Biochem*, 30, 1059-71.
- Li, P., P. Liu, R. P. Xiong, X. Y. Chen, Y. Zhao, W. P. Lu, X. Liu, Y. L. Ning, N. Yang & Y. G. Zhou (2011) Ski, a modulator of wound healing and scar formation in the rat skin and rabbit ear. *J Pathol*, 223, 659-71.
- Li, X., W. Gu, G. Masinde, M. Hamilton-Ulland, S. Xu, S. Mohan & D. J. Baylink (2001) Genetic control of the rate of wound healing in mice. *Heredity (Edinb)*, 86, 668-74.
- Li, X., S. Mohan, W. Gu, N. Miyakoshi & D. J. Baylink (2000) Differential protein profile in the ear-punched tissue of regeneration and non-regeneration strains of mice: a novel approach to explore the candidate genes for soft-tissue regeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1524, 102-9.
- Liang, P., F. Song, S. Ghosh, E. Morien, M. Qin, S. Mahmood, K. Fujiwara, J. Igarashi, H. Nagase & W. A. Held (2011) Genome-wide survey reveals dynamic widespread tissue-specific changes in DNA methylation during development. *BMC Genomics*, 12, 231.
- Liu, J., K. Johnson, J. Li, V. Piamonte, B. M. Steffy, M. H. Hsieh, N. Ng, J. Zhang, J. R. Walker, S. Ding, K. Muneoka, X. Wu, R. Glynne & P. G. Schultz (2011) Regenerative phenotype in mice with a point mutation in transforming growth factor beta type I receptor (TGFBRI). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 14560-5.
- Liu, X., P. Li, X. Y. Chen & Y. G. Zhou (2010) c-Ski promotes skin fibroblast proliferation but decreases type I collagen: implications for wound healing and scar formation. *Clin Exp Dermatol*, 35, 417-24.
- Liu, X., E. Zhang, P. Li, J. Liu, P. Zhou, D. Y. Gu, X. Chen, T. Cheng & Y. Zhou (2006) Expression and possible mechanism of c-ski, a novel tissue repair-related gene during normal and radiation-impaired wound healing. *Wound Repair Regen*, 14, 162-71.
- Macedo, L., G. Pinhal-Enfield, V. Alshits, G. Elson, B. N. Cronstein & S. J. Leibovich (2007) Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors. *Am J Pathol*, 171, 1774-88.
- Mahmoud, A. I., F. Kocabas, S. A. Muralidhar, W. Kimura, A. S. Koura, S. Thet, E. R. Porrello & H. A. Sadek (2013) Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*, 497, 249-53.
- Martin, P., D. D'Souza, J. Martin, R. Grose, L. Cooper, R. Maki & S. R. McKercher (2003) Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol*, 13, 1122-8.

- Martin, P. & S. J. Leibovich (2005) Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*, 15, 599-607.
- Masinde, G. L., R. Li, B. Nguyen, H. Yu, A. K. Srivastava, B. Edderkaoui, J. E. Wergedal, D. J. Baylink & S. Mohan (2006) New quantitative trait loci that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 x 1/SvJ inbred strains of mice. *Funct Integr Genomics*, 6, 157-63.
- Masinde, G. L., X. Li, W. Gu, H. Davidson, S. Mohan & D. J. Baylink (2001) Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ and SJL/J) mice F2 population. *Genome Res*, 11, 2027-33.
- McBrearty, B. A., L. D. Clark, X. M. Zhang, E. P. Blankenhorn & E. Heber-Katz (1998) Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11792-7.
- Metcalfe, A. D., H. Willis, A. Beare & M. W. Ferguson (2006) Characterizing regeneration in the vertebrate ear. *J Anat*, 209, 439-46.
- Moseley, F. L., M. E. Faircloth, W. Lockwood, M. S. Marber, K. A. Bicknell, P. Valasek & G. Brooks (2011) Limitations of the MRL mouse as a model for cardiac regeneration. *J Pharm Pharmacol*, 63, 648-56.
- Munoz-Felix, J. M., M. Gonzalez-Nunez & J. M. Lopez-Novoa (2013) ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev*, 24, 523-37.
- Naito, A. T., I. Shiojima, H. Akazawa, K. Hidaka, T. Morisaki, A. Kikuchi & I. Komuro (2006) Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19812-7.
- Nakamura, E., Y. Makita, T. Okamoto, K. Nagaya, T. Hayashi, M. Sugimoto, H. Manabe, G. Taketazu, H. Kajino & K. Fujieda (2011) 5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NR2F2 as candidate gene for congenital heart defects. *Eur J Med Genet*, 54, 354-6.
- Naseem, R. H., A. P. Meeson, J. Michael Dimaio, M. D. White, J. Kallhoff, C. Humphries, S. C. Goetsch, L. J. De Windt, M. A. Williams, M. G. Garry & D. J. Garry (2007) Reparative myocardial mechanisms in adult C57BL/6 and MRL mice following injury. *Physiol Genomics*, 30, 44-52.
- Naviaux, R. K., T. P. Le, K. Bedelbaeva, J. Leferovich, D. Gourevitch, P. Sachadyn, X. M. Zhang, L. Clark & E. Heber-Katz (2009) Retained features of embryonic metabolism in the adult MRL mouse. *Mol Genet Metab*, 96, 133-44.
- Nieto-Diaz, M., D. W. Pita-Thomas, T. Munoz-Galdeano, C. Martinez-Maza, R. Navarro-Ruiz, D. Reigada, M. Yunta, M. J. Caballero-Lopez, M. Nieto-Sampedro & R. Martinez-Maza (2012) Deer antler innervation and regeneration. *Front Biosci*, 17, 1389-401.
- Nostro, M. C., X. Cheng, G. M. Keller & P. Gadue (2008) Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell*, 2, 60-71.
- O'Meara, C. C., J. A. Wamstad, R. A. Gladstone, G. M. Fomovsky, V. L. Butty, A. Shrikumar, J. B. Gannon, L. A. Boyer & R. T. Lee (2015) Transcriptional reversion of cardiac myocyte fate during mammalian cardiac regeneration. *Circ Res*, 116, 804-15.
- Oh, Y. S., L. E. Thomson, M. C. Fishbein, D. S. Berman, B. Sharifi & P. S. Chen (2004) Scar formation after ischemic myocardial injury in MRL mice. *Cardiovasc Pathol*, 13, 203-6.
- Patel, A. N., F. Silva & A. A. Winters (2015) Stem cell therapy for heart failure. *Heart Fail Clin*, 11, 275-86.
- Perez-Aso, M., L. Chiriboga & B. N. Cronstein (2012) Pharmacological blockade of adenosine A2A receptors diminishes scarring. *Faseb j*, 26, 4254-63.
- Planello, A. C., J. Ji, V. Sharma, R. Singhanian, F. Mbabaali, F. Muller, J. A. Alfaro, C. Bock, D. D. De Carvalho & N. N. Batada (2014) Aberrant DNA methylation reprogramming during

induced pluripotent stem cell generation is dependent on the choice of reprogramming factors. *Cell Regen (Lond)*, 3, 4.

- Polizzotti, B. D., B. Ganapathy, S. Walsh, S. Choudhury, N. Ammanamanchi, D. G. Bennett, C. G. dos Remedios, B. J. Haubner, J. M. Penninger & B. Kuhn (2015) Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Sci Transl Med*, 7, 281ra45.
- Porrello, E. R., B. A. Johnson, A. B. Aurora, E. Simpson, Y. J. Nam, S. J. Matkovich, G. W. Dorn, 2nd, E. van Rooij & E. N. Olson (2011a) MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res*, 109, 670-9.
- Porrello, E. R., A. I. Mahmoud, E. Simpson, J. A. Hill, J. A. Richardson, E. N. Olson & H. A. Sadek (2011b) Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 331, 1078-80.
- Porrello, E. R., A. I. Mahmoud, E. Simpson, B. A. Johnson, D. Grinsfelder, D. Canseco, P. P. Mammen, B. A. Rothermel, E. N. Olson & H. A. Sadek (2013) Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 187-92.
- Porrello, E. R. & E. N. Olson (2014) A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem Cell Res*.
- Powell, C., A. R. Grant, E. Cornblath & D. Goldman (2013) Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Muller glia genome during retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 19814-9.
- Puente, B. N., W. Kimura, S. A. Muralidhar, J. Moon, J. F. Amatruda, K. L. Phelps, D. Grinsfelder, B. A. Rothermel, R. Chen, J. A. Garcia, C. X. Santos, S. Thet, E. Mori, M. T. Kinter, P. M. Rindler, S. Zacchigna, S. Mukherjee, D. J. Chen, A. I. Mahmoud, M. Giacca, P. S. Rabinovitch, A. Aroumougame, A. M. Shah, L. I. Szweda & H. A. Sadek (2014) The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell*, 157, 565-79.
- Rajnoch, C., S. Ferguson, A. D. Metcalfe, S. E. Herrick, H. S. Willis & M. W. Ferguson (2003) Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma. *Dev Dyn*, 226, 388-97.
- Rinkevich, Y., G. G. Walmsley, M. S. Hu, Z. N. Maan, A. M. Newman, M. Drukker, M. Januszyk, G. W. Krampitz, G. C. Gurtner, H. P. Lorenz, I. L. Weissman & M. T. Longaker (2015) Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science*, 348, aaa2151.
- Robey, T. E. & C. E. Murry (2008) Absence of regeneration in the MRL/MpJ mouse heart following infarction or cryoinjury. *Cardiovasc Pathol*, 17, 6-13.
- Sachadyn, P., X. M. Zhang, L. D. Clark, R. K. Naviaux & E. Heber-Katz (2008) Naturally occurring mitochondrial DNA heteroplasmy in the MRL mouse. *Mitochondrion*, 8, 358-66.
- Samaras, S. E., K. Almodovar-Garcia, N. Wu, F. Yu & J. M. Davidson (2015) Global deletion of Ankrd1 results in a wound-healing phenotype associated with dermal fibroblast dysfunction. *Am J Pathol*, 185, 96-109.
- Scacheri, P. C., G. E. Crawford & S. Davis (2006) Statistics for ChIP-chip and DNase hypersensitivity experiments on NimbleGen arrays. *Methods Enzymol*, 411, 270-82.
- Schubeler, D. (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517, 321-6.
- Seifert, A. W., S. G. Kiama, M. G. Seifert, J. R. Goheen, T. M. Palmer & M. Maden (2012) Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*, 489, 561-5.
- Senyo, S. E., M. L. Steinhauser, C. L. Pizzimenti, V. K. Yang, L. Cai, M. Wang, T. D. Wu, J. L. Guerquin-Kern, C. P. Lechene & R. T. Lee (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 493, 433-6.
- Shah, M., D. M. Foreman & M. W. Ferguson (1995) Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*, 108 (Pt 3), 985-1002.

- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski & T. Ideker (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 13, 2498-504.
- Shaw, T. & P. Martin (2009) Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes. *EMBO Rep*, 10, 881-6.
- Sheedy, F. J. & L. A. O'Neill (2007) The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *J Leukoc Biol*, 82, 196-203.
- Sheng, W., Y. Qian, P. Zhang, Y. Wu, H. Wang, X. Ma, L. Chen, D. Ma & G. Huang (2014) Association of promoter methylation statuses of congenital heart defect candidate genes with Tetralogy of Fallot. *J Transl Med*, 12, 31.
- Shi, Y., B. Reitmaier, J. Regenbogen, R. M. Slowey, S. R. Opalenik, E. Wolf, A. Goppelt & J. M. Davidson (2005) CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is up-regulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue. *Am J Pathol*, 166, 303-12.
- Shinagawa, T., T. Nomura, C. Colmenares, M. Ohira, A. Nakagawara & S. Ishii (2001) Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice. *Oncogene*, 20, 8100-8.
- Sim, C. B., M. Ziemann, A. Kaspi, K. N. Harikrishnan, J. Ooi, I. Khurana, L. Chang, J. E. Hudson, A. El-Osta & E. R. Porrello (2014) Dynamic changes in the cardiac methylome during postnatal development. *Faseb j*, 29, 1329-43.
- Sinagra, T., S. Merlo, S. F. Spampinato, R. D. Pasquale & M. A. Sortino (2015) High mobility group box 1 contributes to wound healing induced by inhibition of dipeptidylpeptidase 4 in cultured keratinocytes. *Front Pharmacol*, 6, 126.
- Smiley, D., M. A. Smith, V. Carreira, M. Jiang, S. E. Koch, M. Kelley, J. Rubinstein, W. K. Jones & M. Tranter (2014) Increased fibrosis and progression to heart failure in MRL mice following ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*, 23, 327-34.
- Smith, Z. D. & A. Meissner (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14, 204-20.
- Spruijt, C. G. & M. Vermeulen (2014) DNA methylation: old dog, new tricks? *Nat Struct Mol Biol*, 21, 949-54.
- Srour, M. K., J. L. Fogel, K. T. Yamaguchi, A. P. Montgomery, A. K. Izuhara, A. L. Misakian, S. Lam, D. L. Lakeland, M. M. Urata, J. S. Lee & F. V. Mariani (2015) Natural large-scale regeneration of rib cartilage in a mouse model. *J Bone Miner Res*, 30, 297-308.
- Stanghellini, I., G. Falco, S. L. Lee, M. Monti & M. S. Ko (2009) Trim43a, Trim43b, and Trim43c: Novel mouse genes expressed specifically in mouse preimplantation embryos. *Gene Expr Patterns*, 9, 595-602.
- Stewart, A. F., J. Suzow, T. Kubota, T. Ueyama & H. H. Chen (1998) Transcription factor RTEF-1 mediates alpha1-adrenergic reactivation of the fetal gene program in cardiac myocytes. *Circ Res*, 83, 43-9.
- Stewart, S., Z. Y. Tsun & J. C. Izpisua Belmonte (2009) A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19889-94.
- Sturzu, A. C., K. Rajarajan, D. Passer, K. Plonowska, A. Riley, T. C. Tan, A. Sharma, A. F. Xu, M. C. Engels, R. Feistritz, G. Li, M. K. Selig, R. Geissler, K. D. Robertson, M. Scherrer-Crosbie, I. J. Domian & S. M. Wu (2015) Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss. *Circulation*, 132, 109-21.
- Takayama, K., N. Shimoda, S. Takanaga, S. Hozumi & Y. Kikuchi (2014) Expression patterns of dnmt3aa, dnmt3ab, and dnmt4 during development and fin regeneration in zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 14, 105-10.
- Tang, J., F. Fang, D. F. Miller, J. M. Pilrose, D. Matei, T. H. Huang & K. P. Nephew (2015) Global DNA methylation profiling technologies and the ovarian cancer methylome. *Methods Mol Biol*, 1238, 653-75.

- Tang, T., Y. Shi, S. R. Opalenik, D. M. Brantley-Sieders, J. Chen, J. M. Davidson & S. J. Brandt (2006) Expression of the TAL1/SCL transcription factor in physiological and pathological vascular processes. *J Pathol*, 210, 121-9.
- Teusner, J. T., C. Goddard, D. A. Belford, V. Dunaiski & B. C. Powell (2006) Identification of a novel FcγRIII receptor that is up-regulated in fetal wound healing. *Wound Repair Regen*, 14, 405-12.
- Thuret, S., M. Thallmair, L. L. Horvath & F. H. Gage (2012) Enhanced functional recovery in MRL/MpJ mice after spinal cord dorsal hemisection. *PLoS One*, 7, e30904.
- Tolba, R. H., F. A. Schildberg, D. Decker, Z. Abdullah, R. Buttner, T. Minor & A. von Ruecker (2010) Mechanisms of improved wound healing in Murphy Roths Large (MRL) mice after skin transplantation. *Wound Repair Regen*, 18, 662-70.
- Toriseva, M., M. Laato, O. Carpen, S. T. Ruohonen, E. Savontaus, M. Inada, S. M. Krane & V. M. Kahari (2012) MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PLoS One*, 7, e42596.
- Tseng, A. S., D. S. Adams, D. Qiu, P. Koustubhan & M. Levin (2007) Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 301, 62-9.
- Tucker, B., H. Klassen, L. Yang, D. F. Chen & M. J. Young (2008) Elevated MMP Expression in the MRL Mouse Retina Creates a Permissive Environment for Retinal Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 1686-95.
- Turner, N. J., S. A. Johnson & S. F. Badyrak (2010) A histomorphologic study of the normal healing response following digit amputation in C57bl/6 and MRL/MpJ mice. *Arch Histol Cytol*, 73, 103-11.
- Ueno, M., B. L. Lyons, L. M. Burzenski, B. Gott, D. J. Shaffer, D. C. Roopenian & L. D. Shultz (2005) Accelerated wound healing of alkali-burned corneas in MRL mice is associated with a reduced inflammatory signature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 4097-106.
- Umer, M. & Z. Herceg (2013) Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods. *Antioxid Redox Signal*, 18, 1972-86.
- Valdespino, V. & P. M. Valdespino (2015) Potential of epigenetic therapies in the management of solid tumors. *Cancer Manag Res*, 7, 241-51.
- Vorotnikova, E., D. McIntosh, A. Dewilde, J. Zhang, J. E. Reing, L. Zhang, K. Cordero, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, E. Heber-Katz, S. F. Badyrak & S. J. Braunhut (2010) Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol*, 29, 690-700.
- Walsh, S., A. Ponten, B. K. Fleischmann & S. Jovinge (2010) Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res*, 86, 365-73.
- Ward, B. D., B. D. Furman, J. L. Huebner, V. B. Kraus, F. Guilak & S. A. Olson (2008) Absence of posttraumatic arthritis following intraarticular fracture in the MRL/MpJ mouse. *Arthritis Rheum*, 58, 744-53.
- Weber, M., J. J. Davies, D. Wittig, E. J. Oakeley, M. Haase, W. L. Lam & D. Schubeler (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*, 37, 853-62.
- Wu, Y. C., H. L. Lai, W. C. Chang, J. T. Lin, Y. J. Liu & Y. Chern (2013) A novel Galphas-binding protein, Gas-2 like 2, facilitates the signaling of the A2A adenosine receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3145-54.
- Xia, H., M. P. Krebs, S. Kaushal & E. W. Scott (2011) Enhanced retinal pigment epithelium regeneration after injury in MRL/MpJ mice. *Exp Eye Res*, 93, 862-72.
- Xin, M., Y. Kim, L. B. Sutherland, M. Murakami, X. Qi, J. McAnally, E. R. Porrello, A. I. Mahmoud, W. Tan, J. M. Shelton, J. A. Richardson, H. A. Sadek, R. Bassel-Duby & E. N. Olson

- (2013a) Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 13839-44.
- Xin, M., E. N. Olson & R. Bassel-Duby (2013b) Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 529-41.
- Yakushiji, N., M. Suzuki, A. Satoh, H. Ide & K. Tamura (2009) Effects of activation of hedgehog signaling on patterning, growth, and differentiation in *Xenopus* froglet limb regeneration. *Dev Dyn*, 238, 1887-96.
- Yakushiji, N., M. Suzuki, A. Satoh, T. Sagai, T. Shiroishi, H. Kobayashi, H. Sasaki, H. Ide & K. Tamura (2007) Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Dev Biol*, 312, 171-82.
- Yang, Y., H. Cheng, Y. Qiu, D. K. Dupee, M. Noonan, Y. D. Lin, S. Fisch, K. Unno, K. I. Sereti & R. Liao (2015) MicroRNA-34a Plays a Key Role in Cardiac Repair and Regeneration Following Myocardial Infarction. *Circ Res*.
- Yoshida, T., M. Yamashita, C. Horimai & M. Hayashi (2014) Kruppel-like factor 4 protein regulates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by modulating myocardin expression and activity. *J Biol Chem*, 289, 26107-18.
- Yu, H., S. Mohan, G. L. Masinde & D. J. Baylink (2005) Mapping the dominant wound healing and soft tissue regeneration QTL in MRL x CAST. *Mamm Genome*, 16, 918-24.
- Zeybel, M., T. Hardy, Y. K. Wong, J. C. Mathers, C. R. Fox, A. Gackowska, F. Oakley, A. D. Burt, C. L. Wilson, Q. M. Anstee, M. J. Barter, S. Masson, A. M. Elsharkawy, D. A. Mann & J. Mann (2012) Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med*, 18, 1369-77.
- Zhang, Y., I. Strehin, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, L. Clark, J. Leferovich, P. B. Messersmith & E. Heber-Katz (2015) Drug-induced regeneration in adult mice. *Sci Transl Med*, 7, 290ra92.
- Zhou, Z., D. R. Rawnsley, L. M. Goddard, W. Pan, X. J. Cao, Z. Jakus, H. Zheng, J. Yang, J. S. Arthur, K. J. Whitehead, D. Li, B. Zhou, B. A. Garcia, X. Zheng & M. L. Kahn (2015) The cerebral cavernous malformation pathway controls cardiac development via regulation of endocardial MEKK3 signaling and KLF expression. *Dev Cell*, 32, 168-80.
- Ziller, M. J., F. Muller, J. Liao, Y. Zhang, H. Gu, C. Bock, P. Boyle, C. B. Epstein, B. E. Bernstein, T. Lengauer, A. Gnirke & A. Meissner (2011) Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet*, 7, e1002389.