

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

AUKSĖ KAZLAUSKAITĖ

Epigenetinio laikrodžio rezultatai priklauso nuo paros laiko

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovas:

Prof. Dr. Artūras Petronis

Darbo konsultantas:

Karolis Koncevičius

Vilnius 2024

Turinys

SANTRAUKA	4
SUMMARY	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 DNR sekos modifikacija.....	8
1.1.1 DNR sekos metilinimo procesas ląstelėse	10
1.1.2 Biologinės DNR metilinimo funkcijos	12
1.2 Epigenetiniai laikrodžiai.....	13
1.2.1 Chronologinio amžiaus epigenetiniai laikrodžiai	13
1.2.2 Biologinio amžiaus epigenetiniai laikrodžiai.....	15
1.2.3 Kiti epigenetiniai laikrodžiai.....	15
1.3 Cikliniai osciliuojantys procesai.....	16
1.3.1 Osciliacijos organizme.....	17
1.3.2 DNR modifikacijos lygio osciliacijos.....	19
1.3.3 Osciliacijų įtaka epigenetinių laikrodžių rezultatams	19
2. METODAI	21
2.1 Asmenų kvietimas dalyvauti tyrime ir tyrimo grupės	21
2.2 Kraujo mėginių surinkimo ir apdorojimo schema.....	21
2.3 MACS - magnetinis ląstelių sortiravimas.....	23
2.4 Ląstelių lizė ir fiksacija.....	23
2.5 Tėkmės citometrija	24
2.5.1 FACS - fluorescencija aktyvuotas ląstelių sortiravimas	24
2.5.2 Tėkmės citometrija T ląstelių subtipų analizei	25
2.6 Genominės DNR apdorojimas.....	27
2.6.1 Genominės DNR skyrimas	27
2.6.2 gDNR bisulfitinė konversija ir DNR modifikacijos analizė	27
2.6.3 DNR modifikacijos duomenų analizė.....	28
2.7 RNR apdorojimas	29
2.7.1 RNR skyrimas.....	29
2.7.2 Kopijinės DNR sintezė	29
2.7.3 Realus laiko PGR	30
3. REZULTATAI	31
3.1 Epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų variabilumas kraujo mėginiuose	31

3.2 Ląstelių skaičiaus variabilumas kraujo mėginiuose	33
3.3 Epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų variabilumas išgrynintų kraujo ląstelių mėginiuose.....	34
3.4 Ląstelių subtipų skaičiaus variabilumas išgrynintų T ląstelių mėginiuose.....	38
3.5 Citozinų modifikacijos lygio variabilumas išgrynintų kraujo ląstelių mėginiuose	39
3.6 DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų lygio variabilumas išgrynintų kraujo ląstelių mėginiuose	41
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	45
4.1 Epigenetinių laikrodžių rezultatai priklauso nuo paros laiko	45
4.2 Išorinio variabilumo įtaka epigenetinių laikrodžių rezultatams	46
4.3 Vidinio variabilumo įtaka epigenetinių laikrodžių rezultatams	49
5. IŠVADOS	51
Asmeninio indėlio aprašas	52
Padėkos.....	53
Literatūros sąrašas:.....	54
Priedai.....	66

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Auksė Kazlauskaitė

Epigenetinių laikrodžių rezultatai priklauso nuo paros laiko

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Šio darbo metu siekta iširti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatams daro įtaką išorinio (ląstelių skaičiaus) ir/ar vidinio (DNR modifikacijos) variabilumo sukelta citozinų modifikacijos lygio kaita paros eigoje. Pirmiausia parodyta, kad 13-os iš 17-os skirtingų epigenetinių laikrodžių pateikiami rezultatai statistiškai reikšmingai osciliuoja 24 val., eigoje ir dėl šios priežasties priklauso nuo paros laiko. Šią variaciją iš dalies paaiškina išorinis variabilumas kadangi parodyta, jog tirtuose mėginiuose NK, B ir CD4 T ląstelių proporcijos statistiškai reikšmingai osciliuoja paros eigoje ir šiems ląstelių tipams Horwath pan-tissue 2013 laikrodis pateikia skirtingą spėjimą amžių palyginus su visuminiu kraujo mėginiu. Tačiau, įtaką daro ir vidinis variabilumas, kadangi dalis osciliacijų laikrodžių rezultatuose išliko ištyrus išgrynintų T ląstelių mėginius, beto šiuose mėginiuose statistiškai reikšmingai osciliavo CD4, bet ne CD8 T ląstelių proporcija. Papildomai, nustatyta, kad neutrofilų atveju vidutiniškai 4,3%, o T ląstelių - 7,7% epigenetinių laikrodžių naudojamų citozinų persidengia su tais, kurių modifikacijos lygis osciliuoja paros eigoje. Galiausiai, parodyta, kad vidinio variabilumo nepaaiškina DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų kiekio kitimai 24 val., eigoje, tačiau išvados patvirtinimui reikalingi išsamesni tyrimai. Apibendrinus, ateityje siekiant užtikrinti tyrimų, kuriuose yra naudojami epigenetiniai laikrodžiai, tikslumą, turi būti atsižvelgiama į ląstelių tipų proporcijas bei mėginių surinkimo laiką.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Auksė Kazlauskaitė

Epigenetic Clock Predictions Depend on the Time of Day

Master thesis

SUMMARY

The aim of this work was to investigate whether epigenetic clock results are influenced by extrinsic (cell number) and/or intrinsic (DNA modification) variability in the modification levels of cytosines over the course of a day. Firstly, it is shown that the results provided by 13 out of 17 different epigenetic clocks oscillate statistically significantly over the course of 24 hours and therefore depend on the time of day. This variation is partly explained by extrinsic variability as the proportions of NK, B and CD4 T cells were shown to oscillate statistically significantly over the course of the day in the samples tested and the Horwath pan-tissue 2013 clock gives different predicted ages for these cell types compared to the whole blood sample. However, internal variability is also a factor, as some clocks still retained oscillations in their results in the purified T-cell samples. The proportion of CD4, but not CD8, T-cells oscillated statistically significantly in these samples as well. In addition, it was found that for neutrophils on average 4.3% and for T cells 7.7% of the cytosines used by epigenetic clocks overlap with those whose level of modification oscillates over the course of the day. Finally, it has been shown that internal variability is not explained by variations in the levels of transcripts of proteins regulating DNA methylation over 24 h., but further studies are needed to confirm this conclusion. In summary, in future, the proportions of cell types and the timing of sample collection must be taken into account to ensure the accuracy of studies using epigenetic clocks.

ĮVADAS

Tyrinėjant žmogaus epigenomą, buvo identifikuoti citozinai, kurių modifikacijos lygis priklauso nuo asmens amžiaus. Tokių citozinų pagrindu sukurti epigenetiniai laikrodžiai (angl., epigenetic clocks), galintys nuspėti asmens chronologinį ar biologinį amžių (Bernabeu et al., 2023). Vadovaujantis panašiu principu, buvo sukurti mitoziniai laikrodžiai, leidžiantys nuspėti ląstelės dalijimūsi skaičių (Teschendorff, 2020), arba įvertinantys telomerų ilgį (Lu, Seeboth, et al., 2019). Visų šių epigenetinių laikrodžių grindžiamai analizei dažniausiai yra naudojamas kraujas. Kraujo mėginių paėmimo procedūra yra nesudėtinga, reikalaujanti tik minimalios intervencijos ir beveik neturinti nepageidaujamų efektų (Galena, 1992). Kita vertus, kraujas yra heterogeniškas audinys, sudarytas iš įvairių leukocitų tipų, kurių kiekvienas turi skirtingą ir tik jam būdingą epigenetinį profilį. Papildomai, dėmesį patraukė gerai žinomas reiškinys: neutrofilų, limfocitų, monocitų ir kitų ląstelių tipų kiekiai - o tokiu būdu ir proporcijos - osciluoja paros eigoje, tai vadinama cirkadiniu ritmu (Aroca-Crevillén et al., 2020; Born et al., 1997). Dėl šių priežasčių, skirtingais paros laikais surinkti kraujo mėginiai atskleidžia citozinų modifikacijos lygio skirtumus. Taigi, ląstelių skaičiaus variabilumas ir su juo susiję epigenominiai svyravimai gali daryti įtaką epigenetinių laikrodžių rezultatams. Be leukocitų tipų ir jų santykių svyravimų dar buvo atrastas ciklinis viduląstelinis epigenetinis variabilumas: atskirų kraujo ląstelių tipų epigenomuose yra citozinų, kurių modifikacijos lygis osciluoja 24 val., eigoje (G. Oh et al., 2019). Tokia vidinė citozinų modifikacijos lygio variacija taip pat gali daryti įtaką epigenetinio laikrodžio rezultatams. Siekiant užtikrinti tyrimų, taikančių epigenetinius laikrodžius, tikslumą ir informatyvumą svarbu ištirti laikrodžių pateiktų rezultatų variabilumą paros eigoje ir tam darančių veiksnių įtaką.

Tikslas: Ištirti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatams daro įtaką išorinio (ląstelių skaičiaus) ir/ar vidinio (DNR modifikacijos) variabilumo sukelta citozinų modifikacijos lygio kaita paros eigoje.

Uždaviniai:

1. Ištirti ar iš kraujo ląstelių mėginių gauti epigenetinio amžiaus įvertinimai svyruoja paros eigoje.
2. Įvertinti ar kraujo mėginiuose, paros eigoje, keičiasi skirtingų ląstelių tipų proporcijos ir kaip nuo ląstelių tipo priklauso epigenetinis amžius.
3. Ištirti ar iš išgrynintų neutrofilų ir T ląstelių mėginių gauti epigenetinių laikrodžių rezultatai svyruoja paros eigoje.
4. Įvertinti ar skirtingų T ląstelių subtipų proporcijos keičiasi paros eigoje.

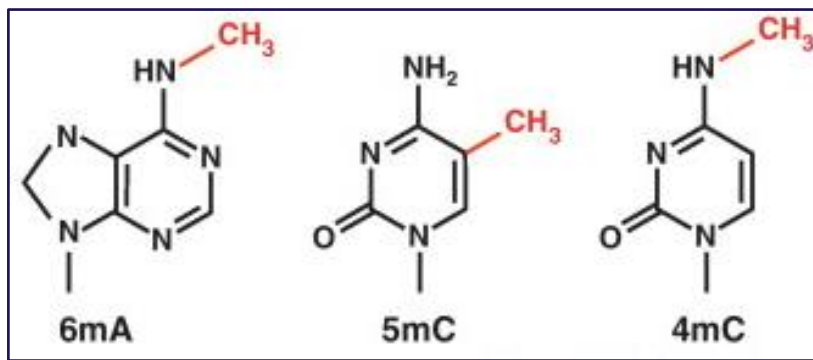
5. Ištirti ar išgrynintų neutrofilų ir T ląstelių mėginiuose randama citozinų, kurių modifikacijos lygis keistųsi paros eigoje, ir įvertinti jų persidengimą su citozinais, naudojamais epigenetinių laikrodžių rezultatams sudaryti.
6. Ištirti ar išgrynintų neutrofilų ir T ląstelių mėginiuose keičiasi DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų kiekis paros eigoje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 DNR sekos modifikacija

Nors visos to paties daugialąsčio organizmo ląstelės turi identišką DNR seką, neretai jos būna itin skirtingos tiek morfologiškai ir funkciškai - sudaro skirtingus organus ir audinius - tiek genų raiškos atžvilgiu. Kokia yra šių skirtumų priežastis? Iš esmės, žinduolinių ląstelių branduoliuose saugoma DNR seka gali nulemti genų raiškos ir funkcijos skirtumus populiacijoje, jei joje atsirastų DNR sekos pokyčių - mutacijų. Tačiau, mutacijų dažnis vienoje žmogaus genomo vietoje per vieną individą kartą tėra $1 - 1,25 \times 10^{-8}$, taigi mutacijų atsiradimas negali paaiškinti skirtingų ląstelių tipų variacijos individe (1000 Genomes Project Consortium et al., 2010; Kong et al., 2012). Tačiau, tokią didelę ląstelių tipų variaciją gali paaiškinti epigenetiniai skirtumai. Epigenetika lemia genų raiškos ir funkcijos skirtumus ląstelėse nekeičiant DNR sekos, o tik modifikuojant ją arba su ja susijusius histonų baltymus (Waterland, 2006). Tai reiškia, kad net jei dviejose ląstelėse yra tokia pati DNR seka, jos funkciškai gali skirtis, kadangi minėta seka bus nevienodai modifikuota. Taigi, epigenetika yra mokslas, kuris analizuoja tiesiogines DNR sekos modifikacijas tokias kaip metilinimas, acetilinimas ar hidroksi-metilinimas, chromatiną sudarančių histonų potransliacines modifikacijas ir variantus bei RNR molekulių kontroliuojamus genų raiškos mechanizmus bei visų šių procesų įtaką ląstelių veiklai ir funkcijai (Delcuve et al., 2016).

Iš visų epigenetinių procesų, DNR modifikacija, o konkrečiau metilinimas, yra labiausiai tiriamas ir analizuojamas. Tai grįžtama ir natūraliai vykstanti, DNR sekoje esančio nukleotido citozino, cheminė modifikacija, kurios metu prijungiama metilo grupė (-CH₃) prie 5 anglies atomo pirimidino žiede taip sukuriama 5-metilcitoziną (1.1 Pav., 5mC) (Adams, 1995). Šis procesas yra būdingas tiek eukariotams tiek prokariotams, išskyrus tokius organizmus kaip mielės (*Saccharomyces cerevisiae*) ir apvalioji kirmėlė (*Caenorhabditis elegans*). Pastarųjų DNR sekoje metilintų citozino beveik nerandama arba jų kiekiai yra labai nedideli <0,1% (Hu et al., 2015; Tang et al., 2012). Papildomai, prokariotuose citozinas gali būti metilinamas kitoje pozicijoje pirimidino žiede taip sukuriama N4-metilcitoziną (1.1 Pav., 4mC) (Ehrlich et al., 1987). Galiausiai, be citozino, genome gali būti metilinamas ir adeninas (1.1 Pav., 6mA), ši modifikacija taip pat randama prokariotuose ir augaluose (Ehrlich et al., 1985; Karanthamalai et al., 2020). 4mC ir 6mA prokariotinių organizmų atžvilgiu yra svarbūs DNR sekų apsaugai nuo endonukleazių ir yra restrikcijos-modifikacijos sistemos dalis, o 6mA dalyvauja augalų vystymosi ir atsako į stresą procesuose (Jiménez-Ramírez et al., 2022; Oliveira, 2021).



1.1 Pav. Modifikuoti DNR sekos nukleotidai. 6-metiladeninas (6mA), 5-metilcitozinas (5mC), 4-metilcitozinas (4mC). Raudona spalva pažymėta prie nukleotido prijungiama metilo grupė. Iliustracijos šaltinis (Davis et al., 2013).

Didžioji dalis citozinų, kurie gali būti modifikuojami žinduolių ląstelėse, yra randama 5'-CpG-3' dinukleotiduose. CpG dinukleotidas tai citozinas ir po jo DNR sekoje esantis guaninas sujungti fosfodiesteriniu ryšiu. Žmogaus genome randama ~28 mln CpG dinukleotidų, iš kurių ~70-80% yra metilinti (Lister et al., 2009; Y. Luo et al., 2014). Nepaisant to, CpG dinukleotidų skaičius yra mažesnis nei būtų galima tikėtis (Bird, 1986). To priežastis - mutageniškumas, kadangi spontaninis metilcitozino deamininimas sukuria timino nukleotidą (Cooper et al., 2010). Ši pažaida genome nėra atpažįstama ir po DNR replikacijos sukelia C → T pasikeitimą taip prarandant buvusį CpG dinukleotidą. Tikėtina, jog dėl šios priežasties CpG dinukleotidai sudaro <2% visų genomo dinukleotidų (Long et al., 2017). Papildomai, CpG dinukleotidai genome yra pasiskirstę netolygiai. Regionai, turintys tankiai išsidėsčiusius CpG dinukleotidus, sudaro CpG salas. CpG sala tai bent 200 bazių porų ilgio genominiis regionas, kuriame GC kiekis yra >50%, o CpG dažnis (nustatytas / tikėtinas) >0,6 (Illingworth & Bird, 2009). ~70% CpG salų yra susijusios su genų promotoriais ir turi geno transkripcijos pradžios vietą, taip pat CpG salos lieka nemetilintos (Deaton & Bird, 2011). Kitos genomo vietos, kur CpG dinukleotidai randami dideliu tankumu tai pasikartojančios genomo sekos - centromeros, satelitinės sekos - ten CpG dinukleotidai randami modifikuoti (Scelfo & Fachinetti, 2019).

Likę modifikuoti citozinai identifikuoti ne-CpG dinukleotiduose (Y. He & Ecker, 2015). Citozino modifikacija kitoje genomo vietoje negu CpG dinukleotidas parodyta neuronuose, oocituose ir embioninėse kamieninėse ląstelėse (de Mendoza et al., 2021; Ramsahoye et al., 2000). Embrioininėse ląstelėse ši modifikacija yra praturtinta genų sekose po pirmojo egzono, bet ne reguliaciniuose regionuose, taip pat ne-CpG modifikacija buvo pašalinta įvykus ląstelių diferenciacijai (Lister et al., 2009). Kandangi embrioininėse kamieninėse ląstelėse ~25% modifikuotų citozinų yra randami ne-CpG dinukleotiduose, sudaroma prielaida, kad genų raiškos reguliavimui šiose ląstelėse yra naudojami kitokie procesai negu diferencijuosiose (*ibid.*). Smegenų ląstelėse ne-CpG modifikacija taip pat yra praturtinta genų sekose ir yra svarbi su

metilcitozinu sąveikaujančio MeCP2 (angl. methyl-CpG binding protein 2) kontroliuojamam genų raiškos slopinimui (Kinde et al., 2016).

1.1.1 DNR sekos metilinimo procesas ląstelėse

Eukariotuose DNR metilinimo procesą atlieka ir kontroliuoja kelios klasės baltymų. Tai baltymai, kurie katalizuoja metilinimą (angl., writers), modifikuoja ar šalina metilinimo žymę (angl., erasers) ir tie, kurie atpažįsta ir gali prisijungti prie šios modifikacijos (angl., readers). Metilo grupės prijungimą prie citozino atlieka DNR metiltransferazės (Dnmt) ir jos priklauso pirmajai baltymų klasei. Jų žinomos trys: Dnmt1, Dnmt3a ir Dnmt3b. Visos trys DNR metiltransferazės turi panašią struktūrą - baltymo sekos C gale yra katalizinis domenas, o sekos N gale - reguliacinis domenas (Gowher & Jeltsch, 2018). Metilinimo procese metilo grupės donoras yra S-adenozilmetioninas (SAM), tad DNR metiltransferazės perkelia metilo grupę nuo SAM, taip sukuriant metilcitoziną ir S-adenozilhomocisteiną (SAH). Ląstelėse SAH molekulė toliau dalyvauja metionino cikle ir po adenozino atskyrimo yra paverčiama homocisteinu, vėliau, veikiant metionino sintazei ir kofaktoriui B12 - metioninu, ir galiausiai metionino adenozil transferazė, panaudodama ATP, katalizuoja SAM sukūrimą, kuris toliau gali veikti kaip metilo grupės donoras (Lauinger & Kaiser, 2021). Pagrindinis skirtumas tarp minėtų trijų DNR metiltransferazių yra DNR seka, kurią jos atpažįsta aukštesniu afiniškumu. Dnmt1 atpažįsta ir sąveikauja su hemimetilinta DNR, kuri yra sukuriama DNR replikacijos metu (Bashtrykov et al., 2012). Judant replikacinei šakutei, viena DNR seka lieka originali ir išlaiko metilcitoziną, tačiau antroji seka yra naujai susintetinta ir joje citozinas yra metilintas (Petryk et al., 2021). Netrukus po tokios hemimetilintos DNR sukūrimo, Dnmt1 ją atpažįsta ir prisijungia bei katalizuoja citozino metilinimą (*ibid.*). Šis procesas ir Dnmt1 leidžia tiksliai atkurti prieš DNR replikaciją, toje genomineje pozicijoje buvusią modifikaciją. Taip pat, Dnmt1 dalyvauja metilinimo pažeidimų taisyme ir palaiko DNR metilinimo išlaikymą diferencijuojamose ląstelėse (Mortusewicz et al., 2005). Dnmt1 baltymo svarbą parodo ir tai, kad organizmai, turintys Dnmt1 mutaciją žūsta dar embrioninėje stadijoje (Li et al., 1992). Kitos dvi DNR metiltransferazės - Dnmt3a ir Dnmt3b yra vadinamos de novo, kadangi jos gali metilinti ne tik hemimetilintą, bet ir visai nemetilintą DNR seką (Okano et al., 1999). Žinduolių ląstelių genome jos metilina palindromines CpG pozicijas, tačiau taip pat gali sukurti ne-CpG pozicijų metilinimą (Y. He & Ecker, 2015). Šios DNR metiltransferazės ypač svarbios embriono vystymosi metu, kadangi įvykus embriono DNR demetilinimui, jos atkuria prarastas DNR sekos modifikacijas. Nors šių DNR metiltransferazių funkcijos persidengia, Dnmt3b mutantai žūsta embriono stadijoje, o Dnmt3a praėjus ~4 savaitėms po gimimo (Okano et al., 1999). Tai rodo, kad abu baltymai yra reikalingi ir atlieka savitas funkcijas DNR modifikacijos atžvilgiu. Dnmt3a užtikrina imprintingo procesus ir satelitinių

regionų metilinimą gametogenezės metu, o Dnmt3b reguliuoja metilinimo procesus embriono vystymosi laikotarpiu (T. Chen et al., 2003). Be aprašytų Dnmt, ląstelėse veikia ir Dnmt3L, tačiau ši DNR metiltransferazė neturi katalizinio domeno, todėl negali katalizuoti metilinimo (Hata et al., 2002). Nepaisant to, šis baltymas prisijungia prie Dnmt3a ir Dnmt3b ir užtikrina jų veikimą bei dalyvauja imprintingo procesų reguliavime (*ibid.*).

Antroji klasė baltymų, dalyvaujančių DNR modifikacijos procese, yra fermentai keičiantys arba šalinantys metilo grupę nuo citozino. DNR sekos demetilinimas gali būti pasyvus arba aktyvus. Pasyvus demetilinimas vyksta, kai ląstelei dalijantis, po DNR replikacijos sukurtoje hemimetilintoje sekoje Dnmt1 negali atlikti citozino metilinimo (Kagiwada et al., 2013). Taip gali nutikti dėl kelių priežasčių - sumažėjusi Dnmt baltymų raiška ar aktyvumas, netinkama baltymo lokacija, SAM trūkumas - todėl citozinas naujai susintetintoje DNR sekoje nėra modifikuojamas ir informacija yra prarandama. Priešingai pasyviame procesui, aktyviame DNR sekos demetilinimui yra reikalingi papildomi baltymai galintys tiesiogiai pašalinti arba modifikuoti metilcitoziną ir tai vyksta nepriklausomai nuo DNR replikacijos (Zhu, 2009). Žinduolių ląstelėse nėra baltymo, galinčio pašalinti metilo grupę nesukuriant tarpinių produktų, todėl aktyvus demetilinimas vyksta keliais etapais. Pagrindiniai baltymai šiame procese yra Tet (angl. ten-eleven translocation) šeimos metilcitozino dioksigenazės, kurios žinomos trys: Tet1, Tet2, Tet3 (Kohli & Zhang, 2013). Tet baltymai katalizuoja 5-metilcitozino metilo grupės oksidaciją taip sukuriant 5-hidroksimetilcitoziną (5hmC) (Tahiliani et al., 2009). Sukurtas 5hmC nėra vien tarpinis demetilinimo proceso produktas, tačiau yra svarbus genų raiškos reguliacijai, kadangi blokuoja MeCP2 prisijungimą (Valinluck et al., 2004). Beto 5hmC yra praturtintas smegenų audiniuose (Kriaucionis & Heintz, 2009). Po 5hmC sukūrimo seka kitos oksidacijos reakcijos, kurių metu 5hmC paverčiamas į 5-formilcitoziną (5fC) ir galiausiai į 5-karboksicitoziną (5caC) (Ito et al., 2011). 5fC ir 5caC yra atpažįstami timino DNR glikozilazės (TDG), kuri pašalina modifikuotą citoziną ir inicijuoja nemonifikuoto citozino įterpimą BER (angl. base excision repair) reparacijos būdu (Y.-F. He et al., 2011). Tokiu būdu modifikuotas citozinas pakeičiamas tokiu, kuris neturi jokios cheminės modifikacijos. Tiek DNR metiltransferazės tiek Tet metilcitozino dioksigenazės yra svarbios DNR metilinimo dinamikos palaikymui ląstelių diferenciacijos, daljimosi ir senėjimo procesų metu.

Paskutinioji DNR metilinimo procese dalyvaujanti baltymų klasė tai fermentai atpažįstantys ir galintys sąveikauti su modifikuotu citozinu. Žinomos trys tokių baltymų šeimos: MBD (angl. methyl-CpG-binding domain), UHRF (angl. ubiquitin like with PHD and RING finger domains) ir cinko-pirštelių (angl. zinc-finger). MBD šeimą sudaro 11 baltymų, kurie turi vieną metilintą CpG dinukleotidą prisijungiantį domeną, o šeimai priklauso tokie baltymai kaip MBD1, MBD2 ir MeCP2 (Nan et al., 1993). Be metilintą citoziną atpažįstančio domeno, šie baltymai turi

transkripcijos represijos domeną (TRD), kuris gali sąveikauti su chromatino struktūrą keičiančiais kompleksais bei kitais represoriais, ir tokiu būdu reguliuoti genų raišką (Nan et al., 1998). Beto, nustatyta, kad MBD3 baltymas turi taškinę mutaciją dėl kurios, sąveika su metilinta DNR nevyksta, tačiau gali vykti su 5hmC, o MBD4 turi glikozilazės domeną, kuris svarbus 5mC deaminavimo sukeltų pažeidimų reparacijoje (Hashimoto et al., 2012; Yildirim et al., 2011). Kitai metilintą DNR atpažinti gebančiai baltymų šeimai - cinko pirštelių - priklauso aštuoni baltymai (Hudson & Buck-Koehntop, 2018). Šios šeimos baltymai turi cinko pirštelių motyvą, kuris leidžia sąveikauti tiek su metilinta tiek su nemetilinta DNR seka ir inicijuoti genų raiškos represiją (Filion et al., 2006). Šeimos narys - KAISO, kitaip nei kiti šeimos baltymai, atpažįsta ir prisijungia prie dviejų CpG dinukleotidų, o KLF4 gali veikti kaip transkripcijos aktyvatorius (Prokhortchouk et al., 2001; Wan et al., 2017). Galiausiai, UHRF šeimos baltymai - UHRF1 ir UHRF2 yra sudaryti iš bent penkių skirtingų funkcinų domenų ir su didesniu efektyvumu atpažįsta hemimetilintą DNR seką (Arita et al., 2008; Sidhu & Capalash, 2017). Dėl šios priežasties UHRF1 sąveikauja su Dnmt1 ir pritraukia ją prie hemimetilintos DNR taip užtikrinant DNR modifikacijos išlaikymą po replikacijos, o UHRF2 gali atpažinti ir sąveikauti su 5hmC (Bostick et al., 2007; Zhou et al., 2014). Taigi, šios šeimos baltymų funkcija yra ne tik reguliuoti genų raišką, bet ir kontroliuoti DNR metilinimo palaikymo procesus ląstelėse.

1.1.2 Biologinės DNR metilinimo funkcijos

DNR metilinimo funkcija iš dalies priklauso nuo jos lokacijos genome. Didžioji dalis žmogaus genomo sudaryta iš nekoduojančių pasikartojančių sekų ir transpozabilių elementų (Deniz et al., 2019). Įvykus šių elementų raiškai ir insercijai, būtų pažeistas genomo stabilumas, genų sekos suardytos, įvyktų mutacijos (*ibid.*). Nekoduojančių genomo elementų sekų metilinimas užtikrina, kad tai neįvyktų, taigi apsaugo genomo stabilumą (Schulz et al., 2006). Priešingai nei nekoduojančios genomo vietos, CpG salos lieka nemetilintos ir skatina genų raišką, užtikrinant chromatino prieinamumą ir transkripcijos faktorių prisijungimą (Deaton & Bird, 2011). Tačiau, jei CpG sala yra metilinta, tuomet pasireiškia stabilus genų raiškos slopinimas (Mohn et al., 2008). Dėl šios priežasties metilinimo kontroliuojama genų raiška svarbi imprintingo, diferenciacijos ir vystymosi procesams (Choi et al., 2005; Shen et al., 2007). Minėtas CpG salų metilinimas apsunkina transkripcijos faktorių prisijungimą bei pritraukia metilo grupę prisijungiančius ir slopinimą skatinančius baltymų kompleksus tokiu būdu reguliuojant genų raišką (Bogdanović & Veenstra, 2009). Galiausiai, esant metilinimui geno pirmajame egzone pasireiškia to geno raiškos slopinimas tuo tarpu metilinimas po pirmojo egzono siejamas su raiškos aktyvacija besidalinančiose ląstelėse (Aran et al., 2011; Brenet et al., 2011). Taigi, DNR metilinimas yra būtinas genomo stabilumo palaikymui ir genų raiškos reguliacijai.

1.2 Epigenetiniai laikrodžiai

Nors pagrindinė epigenetinių procesų funkcija yra kontroliuoti genų raišką, papildomai buvo pastebėta, kad DNR modifikacijos lygis koreliuoja su amžiumi, mirtingumo rizika ir biologine individo būseną (Horvath, 2013). Senstant, genome vyksta DNR modifikacijos lygio regresija link vidurkio ir didėja entropijos laipsnis, todėl dalis CpG dinukleotidų palaipsniui keičia modifikacijos lygį (Seale et al., 2022). Dėl šios priežasties, remiantis minėta koreliacija, yra kuriami įvairūs matematiniai modeliai ir algoritmai, galintys panaudoti DNR modifikacijos duomenis ir suteikti papildomos informacijos apie asmenį. Tokie modeliai bendrai vadinami epigenetiniais laikrodžiais. Kuriant epigenetinį laikrodį DNR modifikacijos ir transformuotiems, bet nebūtinai kintamojo (amžius, mirtingumas) duomenims pritaikomas reguliuojamas regresijos, pavyzdžiui elastinių tinklų modelis (angl., ElasticNet model) taip atrenkant informatyvius citozinas ir sukuriant kintamąjį apskaičiuoti galinčią matematinę formulę (Field et al., 2018). Šios strategijos pagrindu sukurti epigenetiniai laikrodžiai galintys pateikti asmens chronologinį ir biologinį amžių, mirtingumo riziką, ląstelių pasidalijimo skaičių ar telomerų ilgį. Pirmosios kartos laikrodžiai - Horvath 2013 ir Hannum 2013 - buvo skirti kuo tiksliau nuspėti asmens chronologinį amžių, tačiau, pastebėta, kad šių laikrodžių spėjimo netikslumai t.y. per didelis arba per mažas amžius nebuvo tik klaidos, o turėjo asociaciją su ligomis ir mirtingumu (Oblak et al., 2021). Dėl šios priežasties sukurti antros kartos laikrodžiai tokie kaip Levine PhenoAge 2018, Lu GrimAge 2019, kurie naudoja daugiau skirtingų parametrų ir informacijos apie individą (KMI, rūkymo statusas, kraujospūdis) bei pateikia spėjimus apie asmens organizmo biologinį amžių - funkcinę kūno organų ir audinių būseną (Margiotti et al., 2023). Galiausiai, trečios kartos laikrodis - Dunedin PoAm 2020, geba įvertinti individo senėjimo greičio kitimą (*ibid.*). Taigi, remiantis DNR modifikacijos informatyvumu yra sukurta įvairių epigenetinių laikrodžių algoritmų, vertinančių skirtingas individo savybes.

1.2.1 Chronologinio amžiaus epigenetiniai laikrodžiai

Epigenetiniai laikrodžiai gali būti klasifikuojami pagal tai, kokio tipo rezultata pateikia. Pirmoji kategorija tai chronologinio amžiaus epigenetiniai laikrodžiai, kurie remdamiesi DNR modifikacijos duomenimis pateikia spėjimą apie asmens chronologinį amžių. Vieni pirmųjų ir populiariausių chronologinio amžiaus laikrodžių yra Horvath 2013 ir Hannum 2013. Pastarasis laikrodis sukurtas išanalizavus 656-ių įvairaus amžiaus asmenų kraujo mėginius ir naudoja 71-ą specifinį CpG dinukleotidą chronologinio amžiaus spėjimui sukurti (Hannum et al., 2013). Koreliacija tarp spėjamo ir tikrojo amžiaus yra 96%, o spėjimo paklaida - 3,9 metai (*ibid.*). Visgi, laikrodis buvo sukurtas remiantis suaugusių asmenų (>19 metų) kraujo mėginiais, todėl jo tikslumas mažėja analizuojant vaikų arba ne kraujo mėginius. Horvath 2013 (kitaip Horvath Pan-

Tissue) epigenetinis laikrodis sukurtas panaudojus 7844-is mėginius surinktus iš 51-o audinio tipo iš įvairaus amžiaus asmenų įtraukiant naujagimius ir vaikus (Horvath, 2013). Chronologinio amžiaus spėjimui sudaryti naudojami 353-ys CpG dinukleotidai, o koreliacija tarp spėjamo ir tikrojo amžiaus yra 96%, su 3,6 metų spėjimo paklaida (*ibid.*). Horvath 2013 laikrodis leidžia išlaikyti didesnę tikslumą tiriant mėginius, surinktus platesnėse amžiaus ribose, palyginus su Hannum 2013 laikrodžiu, beto, nėra apsiribojama tik kraujo mėginiais. Kiek vėliau pasirodė Horvath 2018 (kitai Horvath Skin and Blood) laikrodis specialiai sukurtas kraujo, keratinocitų, fibroblastų, endotelio ir seilių mėginiais tirti (Horvath et al., 2018). Šis laikrodis naudoja 391-ą CpG dinukleotidą ir yra jautresnis, gali nustatyti epigenetinio amžiaus padidėjimą Hutchinsono Gilfordo progerijos sindromo atveju, nors kiti laikrodžiai skirtumo nerodė (*ibid.*). Kiti chronologinio amžiaus laikrodžiai tai Weidner 2014, kuris išsiskiria tuo, kad naudoja 3-is CpG dinukleotidus, tačiau nurodo amžių tik su 4,5 metų paklaida, o tikslumą patvirtina ir tai, kad laikrodis pateikia mažesnę amžių indukuotoms pluripotentinėms kamieninėms ląstelėms, o didesnę - ligų, kurios lemia priešlaikinį telomerų ilgio sumažėjimą, atveju (Weidner et al., 2014). Visgi, šis laikrodis sukurtas naudojant DNR modifikacijos duomenis gautus bisulfitinio pirosekvenavimo būdu, todėl rezultatų tikslumas mažėja, jei naudojami metilinimo gardelių metodu gauti duomenys, reikalingos papildomos duomenų apdorojimo procedūros (Declerck & Vanden Berghe, 2018). Kitas laikrodis - Lin 2016 - naudoja 99-is CpG dinukleotidus, o koreliacija tarp spėjamo ir tikrojo amžiaus yra 97%, spėjimo paklaida vos 3,45 metai (Lin et al., 2016). Papildomai, buvo patikrinta, ar didinant mėginių, naudojamų laikrodžio kūrimui, skaičių nuo 335-ių iki 12710-ies didėja rezultatų tikslumas (Q. Zhang et al., 2019). Ši tendencija pasitvirtino - Zhang 2019 laikrodžio chronologinio amžiaus spėjimai darėsi tikslesni, tačiau, mažėjo sąsaja tarp pagreitėjusio epigenetinio senėjimo ir mirties t.y. biologinio amžiaus informatyvumas mažėjo (*ibid.*). Iki dabar aprašyti epigenetiniai laikrodžiai naudoja duomenis gautus metilinimo gardelių arba pirosekvenavimo būdu, tačiau abu metodai yra brangūs ir reikalauja specifinės įrangos. Dėl šios priežasties, sukurtas Vidal-Bralo 2016 laikrodis, kuris naudoja 8-is CpG dinukleotidus ir gali būti adaptuotas pigesnei metilinimo analizei MS-SNuPE metodu (Vidal-Bralo et al., 2016). Šio laikrodžio rezultatai nepaveikiami lyties, rūkymo ir ląstelių subpopuliacijų skirtumų bei pateikia rezultatus su 6,07 metų paklaida (*ibid.*). Visi aprašyti epigenetiniai laikrodžiai pateikia spėjimus apie asmens chronologinį amžių dideliu tikslumu, bet Horvath 2013 ir Zhang 2019 laikrodžiai išsiskiria kaip geriausi dėl aukščiausio tikslumo ir galimybės juos pritaikyti įvairiems audiniams bei ląstelių tipams (Bergsma & Rogaeva, 2020). Nepaisant sėkmės įvertinant chronologinį asmens amžių, pastebėta, kad daugumos laikrodžių atveju, padidėjęs epigenetinis amžius koreliuoja su ligos ir mirtingumo rizika, kuriant prielaidą, kad laikrodžiai yra informatyvūs ne tik chronologinio bet ir biologinio amžiaus atžvilgiu.

1.2.2 Biologinio amžiaus epigenetiniai laikrodžiai

Antroji epigenetinių laikrodžių kategorija tai biologinio amžiaus laikrodžiai, kurie remdamiesi DNR modifikacijos duomenimis pateikia spėjimą apie asmens organų ir audinių fiziologinę būseną. Šie laikrodžiai nurodo, kokio amžiaus turėtų būti tiriamas individas pagal jo fiziologinę būseną. Vienas populiariausių - Levine PhenoAge 2018 laikrodis atspindi įvairių su senėjimu susijusių padarinių riziką, tokių kaip mirtis, vėžinis susirgimas, Alzheimerio liga, fizinis funkcionalumas (Levine et al., 2018). Laikrodis naudoja 513-a CpG dinukleotidų, ir pateikia asmens biologinį amžių, kurio sąsaja su mirties rizika yra itin aukšta - biologinio amžiaus padidėjimas vieneriais metais palyginus su chronologiniu amžiumi lemia 4,5% didesnę mirties riziką (*ibid.*). Kitas populiarus biologinis laikrodis yra Lu GrimAge 2019. Šio laikrodžio atveju, DNR modifikacijos duomenys pirmiausia naudojami įvertinti 7-į kraujo plazmos baltymų ir rūkymo lygį, po to ši informacija pritaikoma nustatant laiką likusį iki mirties ar ligos įvykio (Lu, Quach, et al., 2019). Lu GrimAge 2019 laikrodis pateikia tiksliausią laiką likusį iki mirties, vėžinio susirgimo ar koronarinės širdies ligos (*ibid.*). Taip pat senėjimo pagreitinėjimas pagal šį laikrodį siejamas su kognityvinių funkcijų praradimu ir smegenų kraujotakos sistemos pažeidimais vyresniame amžiuje (Hillary et al., 2021). Praėjus trims metams buvo pristatyta patobulinta laikrodžio versija - Lu GrimAge2 2022. Ši laikrodžio versija pritaiko papildomų dviejų logaritmiškai transformuotų kraujo plazmos baltymų lygio informaciją ir suteikia tikslesnius mirtingumo spėjimus palyginus su senesne laikrodžio versija (Lu et al., 2022). Taip pat, remiantis Lu GrimAge 2019 laikrodžio algoritmu ir iš DNR modifikacijos duomenų gautais papildomais fiziologiniais parametrais, apibūdinančiais asmens fizinio pasiruošimo lygį, sukurtas Jokai DNAmFitAge 2022 laikrodis. Remiantis šiuo laikrodžiu mažesnis epigenetinis amžius nurodo stipresnę fizinį pasiruošimą ir mažesnę su amžiumi susijusių ligų ir mirtingumo riziką (McGreevy et al., 2023). Kitas - Zhang 2017 laikrodis, naudojantis vos 10 CpG dinukleotidų išsiskiria, kadangi pateikia ne amžiaus skaičių metais, bet mirties rizikos įvertinimą (Y. Zhang et al., 2017). Jeigu Zhang 2017 laikrodžio rezultatas yra 1, 2-5 arba 5+ tuomet mirties rizika (angl., hazard ratio) 95% pasitikėjimo intervale yra 2,16, 3,42 ir 7,36 karto atitinkamai didesnė, lyginant su 0, tad gauti įvertinimai gali būti naudojami stratifikuojant ligos paveiktus asmenis (*ibid.*). Galiausiai, sukurtas laikrodis, kuris įvertina asmens epigenetinio senėjimo greitį esamuoju laiku - Belsky DunedinPACE 2022. Šio laikrodžio rezultatai leidžia įvertinti senėjimą stabdančių intervencijų poveikį ar gyvenimo įpročių pakeitimo įtaką epigenetiniam senėjimui (Belsky et al., 2022).

1.2.3 Kiti epigenetiniai laikrodžiai

Dalis biologinių amžių įvertinančių laikrodžių išsiskiria, kadangi jie pateikia specifinius spėjimus apie organizmo ląstelėse vykstančius procesus. Yang epiTOC 2016 laikrodis naudoja

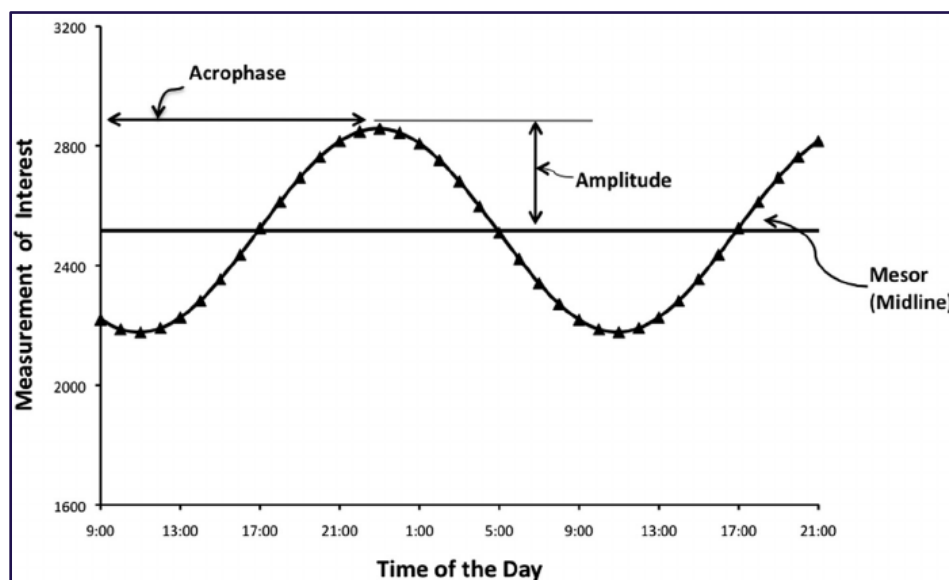
DNR modifikacijos informaciją iš 385-ių CpG dinukleotidų, kurie yra randami Polycomb komplekso kontroliuojamų genų promotoriuose (Yang et al., 2016). Vaisiaus audiniuose šios genomo vietos yra nemetilintos, tačiau ląstelei senstant, su kiekvienu pasidalijimu, modifikacijos lygis didėja. Dėl šios priežasties Yang epiTOC 2016 laikrodžis pateikia informaciją apie ląstelės pasidalijimų skaičių. Beto, laikrodžio tikslumą patvirtina tai, kad vėžinių audinių atveju stebimas padidėjęs pasidalijimų skaičius lyginant su sveiku audiniu (*ibid.*). Praėjus keturiems metams pateikta patobulinta laikrodžio versija - Teschendorff epiTOC2 2020. Ši laikrodžio versija naudoja tik 163-is CpG dinukleotidus, o gaunami rezultatai gali būti naudingi ne tik nustatant ląstelių mitozinį amžių, bet ir vėžio diagnostikos bei rizikos įvertinimo tikslais (Teschendorff, 2020). Kitas laikrodžis, vertinantis bendrą ląstelių pasidalijimų skaičių, tai Youn MiAge 2018. Laikrodžis naudoja 268-is CpG dinukleotidus, kurie nėra specifiniai audiniui su prielaida, kad dalijantis ląstelėms, replikacijos metu, yra kaupiamos paveldimos stochastinės DNR modifikacijos pažaidos (Youn & Wang, 2018). Taip pat 13-os skirtingų vėžio tipų atvejais, padidėjęs laikrodžio rodiklis prognozavo prastesnį išgyvenamumą (*ibid.*). Galiausiai sukurtas Lu DNAmTL 2019 laikrodžis, kuris remiantis 140-ies CpG dinukleotidų modifikacijos lygiu, įvertina asmens telomerų ilgį, kuris siejasi su individo amžiumi (Lu, Seeboth, et al., 2019).

Sukurti epigenetiniai laikrodžiai naudojami ieškant su liga susijusių skirtumų bei ateityje galėtų būti pritaikyti klinikinio stebėjimo ir įvertinimo tikslais. Tai leistų identifikuoti asmenis, kurie yra ligos rizikos grupėje dar prieš pasireiškiant ligai. Taip pat laikrodžio rezultatų stebėjimas leistų įvertinti epigenetinį senėjimą lėtinančių intervencijų efektyvumą ir gyvenimo įpročių pokyčių poveikį ligos rizikai. Beto, epigenetiniai laikrodžiai svarbūs aiškinantis vystymosi ir senėjimo procesų sąsajas. Galiausiai, šie algoritmai turi perspektyvą pritaikymui kriminologijoje - nusikaltimo vietų tyrimuose, individo amžiaus identifikavimui. Nepaisant perspektyvų, dar nėra tvirtai žinoma ką matuoja šie laikrodžiai - senėjimo pasekmes ar priežastis. Tolimesni šios srities tyrimai padės geriau suprasti kokią įtaką senėjimo procesams daro epigenomo pakitimai. Epigenetiniai laikrodžiai yra ganėtinai nauja mokslo sritis ir trūksta tyrimų, įvertinančių laikrodžių rezultatų atsikartojamumą bei tikslumą paros eigoje, reikalingi algoritmų patobulinimai, užtikrinantys pastovų rezultatų tikslumą visos gyvenimo trukmės ribose bei skirtingose etninėse grupėse. Tai įgyvendinus, bus užtikrintas sėkmingas epigenetinių laikrodžių integravimas į klinikinę praktiką, mokslinius tyrimus ar kriminologiją.

1.3 Cikliniai osciliuojantys procesai

Epigenetiniai laikrodžiai kuriami tolygių DNR modifikacijos pokyčių, vykstančių su laiku, pagrindu. Tokia DNR modifikacijos kaita yra linijinis procesas, kuris apibūdina veiksmą, vykstantį

nuolat ir pastoviai iki kol yra pasiekiamas pabaigos taškas, kuriame atitinkamas kintamasis yra pasikeitęs, kitoks, negu buvo pradiniam taške. Linijinių procesų pavyzdžiai tai fermentų katalizės ir degradacijos reakcijos, ląstelių senėjimas ir jau minėtas nuo amžiaus priklausomų citozinų modifikacijos lygio pokytis. Tačiau, tai nėra vienintelė dinamika, kurią galima rasti gamtoje. Kitokio tipo - cikliniai osciliuojantys - procesai apibūdina veiksmą, kuris yra ritmingas, periodiškai pasikartojantis ir lemia nuolatinį kintamojo reikšmės pokytį apie vidurkį. Jei linijiniai procesai gali būti nuspėjami, tai osciliuojančius procesus nuspėti yra kebliau, taip pat, šių procesų sistemos yra sudėtingesnės, su papildomais grįžtamaisiais ryšiais (Kruse & Jülicher, 2005). Siekiant geriau suprasti osciliuojančius procesus ir jų įtaką epigenetinių laikrodžių rezultatams, svarbu žinoti kokiais terminais apibūdinama osciliacija (1.2 Pav.). Svarbiausi jų - akrofazė, mesor, periodas ir amplitudė. Akrofazė tai laikas, kai osciliuojančio kintamojo reikšmė pasiekia aukščiausią tašką (Cornelissen, 2014). Mesor tai vidutinė osciliuojančio kintamojo reikšmė, amplitudė - skirtumas tarp aukščiausios / žemiausios kintamojo reikšmės ir mesor, o periodas tai laikas per kurį įvyksta vienas osciliacijos ciklas nuo pradžios iki pabaigos (*ibid.*). Ciklinio proceso pavyzdys tai daugumos organizmų prisitaikymas gyventi šviesos / tamsos - cirkadiniu - ritmu. Cirkadinis, 24 val., ritmas užtikrina organizmo prisitaikymą, suteikia galimybę nuspėti, kaip kūnas turėtų reaguoti artimiausiu metu. Pavyzdžiui, tamsiuoju laiku melatonino gamyba suaktyvėja taip užtikrinant sklandžią ir tolygią miego ciklo pradžią (Reddy et al., 2018).



1.2 Pav. Osciliacijos pavyzdys ir ją apibūdinantys parametrai. X ašis - paros laikas, Y ašis - kintamojo reikšmė. Ilustracijos šaltinis(Lucey & Bateman, 2014).

1.3.1 Osciliacijos organizme

Kaip minėta, geriausiai žinomas ciklinis osciliuojantis procesas biologijoje yra organizmo cirkadinis ritmas. Tai 24 val., trukmės ciklas, kurio metu keičiasi individo fiziniai, psichologiniai

ir elgesio parametrai. Dažnu atveju, šis ritmas yra suderintas su nakties / dienos ciklu ir kontroliuoja miego režimą, hormonų gamybą, apetitą, virškinimą ir kūno temperatūrą (Vitaletna et al., 2001). Šį cirkadinį ritmą reguliuoja kiekvienos ląstelės biologinis laikrodis, o visus procesus tarpusavyje sinchronizuoja SCN (angl., suprachiasmatic nucleus) smegenų dalis, kuri, taip pat, yra atsakinga už melatonino gamybą (*ibid.*). Mechanistine prasme, biologinis ląstelės laikrodis tai grįžtamaisiais ryšiais paremtas ir osciliuojantis procesas, kontroliuojantis minėto laikrodžio genų raišką. CLOCK ir BMAL1 baltymai sudaro heterodimerą, kuris jungiasi prie promotorių, turinčių E dėžutę, ir aktyvina PER, CRY šeimos bei kitų šio laikrodžio kontroliuojamų genų transkripciją (Saini et al., 2019). Naujai susintetinti PER ir CRY baltymai taip pat sudaro heterodimerus, kurie grįžtamai blokuoja CLOCK ir BMAL1 transkripcijos aktyvacijos veiklą (Sato et al., 2006). Taigi, PER ir CRY baltymų stabilumo / degradacijos greitis reguliuoja biologinio laikrodžio periodą, o visų šių laikrodžio genų raiška osciliuoja 24 val., periodu (Buhr & Takahashi, 2013). Papildomai, organizmui senstant, osciliuojančių genų raiška mažėja taip skatinant organizmo jautrumą, ypač, cirkadinio ritmo išsiderinimui (Wolff et al., 2023). Be genų raiškos, cikliniai procesai stebimi ir įvairių fiziologinių funkcijų - kūno temperatūros, hormonų gamybos, sekrecijos į kraują atžvilgiu (Brown et al., 2002; Lightman, 2016). Beto, pastebėta, kad cikliškai keičiasi ir kraują sudarančių skirtingų ląstelių tipų proporcijos. Parodyta, kad žiurkių kraujyje neutrofilų, monocitų ir limfocitų proporcijos priklauso nuo metų sezono, tokia pati tendencija pasikartojo ir mongolijos žiurkėnų atveju - žiemos periodu limfocitų, neutrofilų, eozinofilų, bazofilų ir monocitų proporcijos sumažėja (Kuznetsova et al., 2016; Pushkin et al., 2017). Žmogaus organizmo atveju skirtingų kraujo ląstelių tipų kaita stebima net ir paros eigoje. Nakties metu sumažėja monocitų, NK ląstelių ir limfocitų skaičiai, padidėja interleukino-2 gamyba (Born et al., 1997). 24 val., periodu osciliuoja beveik visų kraujo ląstelių tipų skaičiai: granulocitų, monocitų, T ir B limfocitų (Bollinger et al., 2011; Haus & Smolensky, 1999). Visgi, labiausiai ciklinės cirkadinės savybės būdingos neutrofilams - paros metu kinta jų skaičius ir fenotipas, o tai daro įtaką bendram organizmo atsakui į uždegimines reakcijas (Aroca-Crevillén et al., 2020). Ciklinė imuninės sistemos variacija būtina užtikrinant sklandų jos veikimą, iš anksto parengiant organizmo atsaką į uždegimines ar mikrobines reakcijas, skatinant audinių atsinaujinimą ir gijimą (Scheiermann et al., 2013). Taigi, cikliniai osciliuojantys procesai būdingi daugumai organizmų ir vyksta skirtinguose lygmenyse: ląstelės - audinių - kūno. Dėl šios priežasties užtikrinamas prisitaikymas prie aplinkos, o to svarbą patvirtina ir tai, kad cirkadinio ritmo, miego režimo išsiderinimai sukelia didesnę vėžio, psichiatrinių ir metabolinių ligų riziką (Takahashi et al., 2008).

1.3.2 DNR modifikacijos lygio osciliacijos

Iš visų ciklinių procesų išsiskiria DNR modifikacija. Viena prasme tai linijinis procesas, toks konservatyvus ir griežtas, kad jo pagrindu galima nusakyti organizmo chronologinį ar biologinį amžių. Kita prasme, parodyta, kad DNR modifikacijai būdinga ir ciklinė kaita. DNR modifikacija veikia kaip ciklinių procesų sąsajos su linijiniais procesais pavyzdys. Šie procesai gali daryti įtaką vienas kitam bei ląstelės ir organizmo veiklai. Pirmiausia parodyta, kad pelių plaučių ir kepenų genome yra citozinų, kurių modifikacijos lygis osciliuoja paros eigoje (G. Oh et al., 2018). Plaučių audinyje šie citozinai sudarė 35,6%, o kepenų - 8,2%, visų 7-oje chromosomoje esančių citozinų (*ibid.*). Vėliau rezultatai atkartoti žmogaus neutrofilų mėginiuose, kuriuose osciliuojantys citozinai sudarė 8,55% visų tirtų citozinų, beto pastebėta, jog šie citozinai persidengia su tais, kurie yra diferenciškai modifikuoti vėžinių, psichiatrinų ir metabolinių ligų atvejais, nurodant galimą sąsają su ligos priežastimis arba pasekmėmis (G. Oh et al., 2019). Visgi, akivaizdžiausią linijinio ir ciklinio proceso ryšį parodo tai, kad citozino modifikacijos lygio osciliacijos akrofazė, nurodo kaip keisis to citozino modifikacijos lygis su amžiumi (*ibid.*). Jei akrofazė pasiekta nakties metu, tuomet su amžiumi to citozino modifikacijos lygis mažės ir atvirkščiai dienos akrofazės atveju, beto osciliacijų amplitudė senstant darosi mažesnė, o osciliacija prasčiau išreikšta (E. S. Oh & Petronis, 2021). Dėl šių priežasčių siūloma, kad citozinų modifikacijos osciliacijų parametrų išsiderinimas gali daryti įtaką visam ląstelės epigenomui ir taip sukelti ankstesnę regresiją link vidurkio ar netgi sietis liga (*ibid.*). Epigenomo stabilumo svarbą patvirtina tyrimai su ilgai gyvenančių (>90 metų) asmenų krauju. Šių asmenų genome identifikuoti regionai, kuriuose DNR modifikacijos entropija yra mažesnė, taigi modifikacijos kaitos stabilumo išlaikymas siejasi su ilgaamžiškumu (H.-T. Wang et al., 2024). Taip pat modifikacijos lygio osciliacijų sąsaja su liga patvirtina tyrimai su pelėmis. Citozinai, kurių DNR modifikacija ritmiškai keitėsi, buvo identifikuoti pelių smegenų audiniuose ir, pastebėta, kad Prader-Willi sindromo atveju didžioji dalis šių osciliacijų buvo prarasta arba pakeitė savo parametrus (Coulson et al., 2018). Tiksliai DNR modifikacijos ciklinės kaitos priežastis nėra žinoma. Vienas galimas paaiškinimas - paros eigoje kintanti Dnmt ir Tet genų raiška bei aktyvumas arba, nors mažiau tikėtina, kintantis S-adenozilmetionino ir S-adenozilhomocisteino santykis (Xia et al., 2015). Apibendrinus, DNR modifikacijai būdinga ne tik linijinė, bet ir ciklinė kaita.

1.3.3 Osciliacijų įtaka epigenetinių laikrodžių rezultatams

Iš pirmo žvilgsnio atrodytų, kad epigenetiniai laikrodžiai, paremti linijiniais kitimais, nėra susiję su osciliuojančiais procesais. Visgi, jie nėra atskirti ir organizme vykstančių procesų osciliacijos, tikėtina, gali daryti įtaką laikrodžių rezultatams. Epigenetinių laikrodžių analizei

dažniausiai naudojami kraujo mėginiai, kadangi jų paėmimo procedūra yra nesudėtinga, reikalaujanti tik minimalios intervencijos ir beveik neturinti šalutinių efektų (Galena, 1992). Taip pat kraujo paėmimą galima nesunkiai pakartoti ar atlikti reguliariai. Kita vertus, kraujas yra heterogeniškas audinys, sudarytas iš įvairių leukocitų tipų, kurių kiekvienas turi skirtingą ir tik jam būdingą epigenetinį profilį. Beto, skirtingų kraujo ląstelių tipų proporcijos keičiasi paros eigoje (Aroca-Crevillén et al., 2020; Born et al., 1997). Jei skirtingų ląstelių tipų proporcijos keičiasi, tuomet, ištyrus skirtingu paros laiku surinktus kraujo mėginius, būtų identifikuoti citozinų modifikacijos lygio skirtumai. Tokiu atveju, šie skirtumai būtų tik kintančių ląstelių tipų proporcijų ir skirtingų jų epigenomų sukeltas artefaktas. Taigi, toks išorinis - ląstelių skaičiaus skirtumo sukeltas epigenetinis variabilumas gali daryti įtaką ir epigenetinių laikrodžių rezultatams. Taip pat, nustatyta, jog individualių kraujo ląstelių tipų epigenomuose yra citozinų, kurių modifikacijos lygis osciliuoja 24 val., eigoje (G. Oh et al., 2019). Tokia vidinė citozinų modifikacijos lygio variacija taip pat gali daryti įtaką epigenetinio laikrodžio rezultatams, kadangi šie citozinai gali persidengti su tais, kurių modifikacijos lygis yra naudojamas epigenetinio laikrodžio spėjimui sukurti. Šio darbo metu siekta iširti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatams daro įtaką išorinio (ląstelių skaičiaus) ir/ar vidinio (DNR modifikacijos) variabilumo sukelta citozinų modifikacijos lygio kaita paros eigoje. Geriau supratus epigenetinio amžiaus kaitą paros eigoje būtų užtikrinta tikslesnė epigenetinių laikrodžių algoritmais grindžiama analizė.

2. METODAI

2.1 Asmenų kvietimas dalyvauti tyrime ir tyrimo grupės

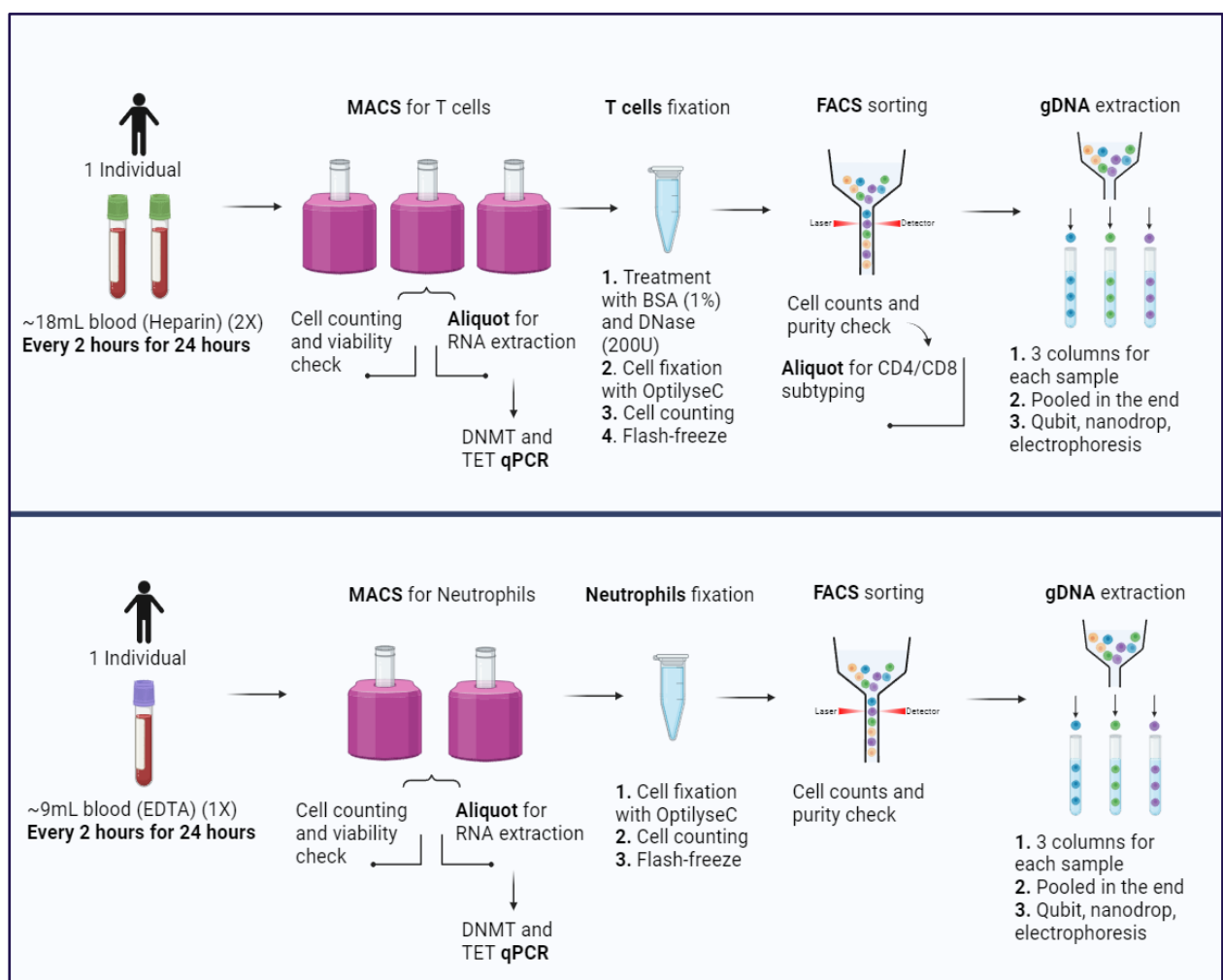
Šis tyrimas buvo vykdomas bendradarbiaujant su Respublikine Vilniaus Psichiatrijos ligonine (RVPL). RVPL dirbantys gydytojai - tyrėjai vykdė donorų, tinkamų šiam tyrimui, paiešką remiantis Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimu, numeriu SCHEPIGENE2020 (leidimo data: 2020 11 24). Donorų kraujo mėginiai taip pat buvo renkami ir dalinai apdorojami RVPL.

Tyrimo tikslais buvo renkamos dvi individų grupės: kontrolinių asmenų ir šizofrenija sergančių asmenų. Šizofrenija sergančių asmenų grupės įtraukimo į tyrimą kriterijai buvo šie: būti nuo 18-os iki 50-ies metų amžiaus, atitikti šizofrenijos kriterijus naudojant DSM-5 "M.I.N.I." tarptautinę neuropsichiatrinę apklausą, neturėti protinio atsilikimo, nutukimo ($KMI > 30$) ar sunkių somatinių ligų, bent 6 mėnesius iki tyrimo pradžios būti nevartojus narkotinių medžiagų, teisiškai veiksnūs, nėra teismo nutartimi pripažinti neveiksnūs sveikatos priežiūros ar kitose srityse, supranta savo bei tyrėjų įsipareigojimus, asmens psichikos būseną pakankama, kad galėtų kritiškai įvertinti tyrimo esmę. Kontrolinės grupės įtraukimo į tyrimą kriterijai buvo šie: būti nuo 18-os iki 50-ies metų amžiaus, nėra sirgę jokia psichine liga, neturi psichinėmis ligomis sergančių pirmos eilės giminaičių, neturi protinio atsilikimo, nutukimo ($KMI > 30$) ar sunkių somatinių ligų, bent 6 mėnesius iki tyrimo pradžios nevartoję narkotinių medžiagų, asmuo veiksnus. Jei asmuo atitinka visus tos grupės įtraukimo į tyrimą kriterijus ir sutinka dalyvauti biomediciniame tyrime, tuomet gydytojas - tyrėjas asmeniui pateikia ir paprašo pasirašyti informuoto asmens sutikimo formą (IASF). Tik po IASF pasirašymo asmuo gali būti įtrauktas į tyrimą ir jam suteikiamas kodas. Apdorojant mėginius ir analizuojant duomenis naudojami tik užkoduoti tyrimo dalyvių duomenys niekaip neleidžiantys susieti asmens su turimais jo duomenimis. Šio tyrimo metu analizuoti mėginiai gauti iš 5 šizofrenija sergančių asmenų ir 1 kontrolinio asmens.

2.2 Kraujo mėginių surinkimo ir apdoravimo schema

Iš tyrimo sutikusių dalyvauti asmenų kraujo buvo gaunami neutrofilai ir T ląstelės (2.1 Pav.). Išskiriant neutrofilus, iš to paties asmens kas 2 valandas buvo paimamas vienas 10 mL kraujo mėgintuvėlis su EDTA antikoagulantu. Gautas kraujas buvo apdorotas taikant MACS (angl., magnetic-activated cell sorting) metodą, po kurio buvo įvertintas gautos neutrofilų frakcijos skaičius bei gyvybingumas. Toliau neutrofilai buvo fiksuojami dvejais skirtingais būdais: RNR išskyrimui ir tolimesniam neutrofilų sortiravimui FACS (angl., fluorescence assisted cell sorting) metodu. Papildomai, buvo surenkama likusi ląstelių frakcija po neutrofilų išgryninimo taip sukuriant visų kraujo ląstelių išskyrus neutrofilus mėginius. Toliau šie mėginiai bus vadinami

WBC-Neu frakcija (angl., white blood cells minus neutrophils). Išskiriant T ląsteles, iš to paties asmens kas 2 valandas buvo paimami du 10 mL kraujo mėgintuvėliai su antikoagulantu heparinu. Kaip ir neutrofilų atveju, kraujas buvo apdorojamas MACS metodu, įvertinamas ląstelių skaičius bei gyvybingumas ir ląstelės fiksuojamos tolimesniems etapams. Tačiau, prieš fiksaciją, T ląstelės papildomai buvo inkubuojamos su deoksiribonukleaze ir jaučio serumo albuminu, siekiant išlaikyti kuo aukštesnį ląstelių gyvybingumą ir apdoravimo FACS metodu efektyvumą. Galiausiai, iš neutrofilų ir T ląstelių išskirta RNR buvo panaudota realaus laiko PGR atlikimui, o iš MACS ir FACS metodais apdorotų ląstelių buvo išskirta genomine DNR (gDNR) tolimesnei DNR modifikacijos analizei. Iš WBC-Neu mėginių, gDNR buvo išskirta neatlikus ląstelių sortiravimo FACS metodu. Papildomai, buvo atlikta T ląstelių tėkmės citometrijos analizė, siekiant įvertinti CD4 ir CD8 T ląstelių santykius.



2.1 Pav. Kraujo mėginių surinkimo ir apdoravimo schema. Viršuje - T ląstelių apdoravimo schema. Apačioje - neutrofilų apdoravimo schema. MACS - magnetinis ląstelių sortiravimas, FACS - fluorescencija aktyvuojamas ląstelių sortiravimas. gDNA - genomine DNR. Iliustracija sukurta naudojant BioRender.com.

2.3 MACS - magnetinis ląstelių sortiravimas

Gavus kraujo mėginius, jie nedelsiant buvo apdoroti MACS metodu. Šio metodo pagrindas - antikūnai, konjuguoti su magnetinėmis dalelėmis. Neigiamos selekcijos metu, šie antikūnai sąveikauja su įvairiomis kraują sudarančiomis ląstelėmis ir naudojant magnetą kartu su jomis yra pritraukiami prie mėgintuvėlio sienelės. Surinkus laisvą nuo magneto suspensiją, joje lieka tik norimos išgryninti ląstelės, kadangi su jomis antikūnai, konjuguoti su magnetinėmis dalelėmis, nesąveikauja. Gaunama galutinė neutrofilų arba T ląstelių suspensija, kurios grynumas yra iki ~95% remiantis gamintojo aprašymu.

Neutrofilų gryninimui buvo naudotas EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Kit („STEMCELL Technologies,, Kanada). Laikytasi gamintojo protokolo, viso apdoroti ~9 mL kraujo. Į kraują pridėta po 50 µL/mL antikūnų ir magnetinių dalelių tirpalų, sumaišyta ir inkubuota 5 min. Po inkubacijos pridėta 1X PBS („Gibco” JAV) su 1 mM EDTA iki galutinio 12 mL tūrio. Ši suspensija 10 min., inkubuota EasySep™ EasyEights™ magnetu („STEMCELL Technologies” Kanada). Po inkubacijos, nepašalinus mėgintuvėlių iš magneto, nusiurbta 10 mL ląstelių suspensijos, likusi ląstelių frakcija (WBC-neu) surinkta, centrifuguota 10 min., 300 x g, supernatantas pašalintas, o ląstelės užšaldytos skystame azote. Į nusiurbtą ląstelių suspensiją pridėtas toks pat kiekis antikūnų bei magnetinių dalelių kaip pirmą kartą, inkubuota 5 min., kambario temperatūroje ir dar 5 min., magnetu. Vėl nepašalinus mėgintuvėlių iš magneto, surinkta ląstelių suspensija, perkelta į naują mėgintuvėlį ir inkubuota magnetu dar du kartus 5 ir 10 min., atitinkamai, papildomai antikūnai ir magnetinės dalelės nebuvo pridėti. Po ketvirtos inkubacijos magnetu, neutrofilų suspensija centrifuguota 10 min., 300 x g. Supernatantas pašalintas, o ląstelės suspenduotos 1 mL 1X PBS („Gibco” JAV) su 1 mM EDTA. T ląstelių gryninimui naudotas EasySep™ Direct Human T cell Isolation Kit („STEMCELL Technologies” Kanada), apdorota ~18 mL kraujo. Protokolas toks pat kaip gryninant neutrofilus, tačiau naudotas 1X PBS („Gibco” JAV) be EDTA.

Po MACS tiek neutrofilai tiek T ląstelės buvo suskaičiuotos bei įvertintas ląstelių gyvybingumas naudojant MoxiZ mini automatinį ląstelių skaičiuotuvą („ORFLO Technologies” JAV) ir gamintojo protokolą. Ląstelių skaičius gautas naudojant šią formulę: $X * 10^5 * (\text{skiedimo faktorius}) * 1 \text{ mL (suspensijos tūris)} = \text{ląstelių skaičius}$, kur X yra skaičiuotuvo pateikiamas skaičius. Gyvybingumo įvertinimą procentais apskaičiuoja prietaisas, remdamasis Coulter principo analize.

2.4 Ląstelių lizė ir fiksacija

Po MACS ir ląstelių skaičiaus bei gyvybingumo įvertinimo 4×10^6 T ląstelių ir 6×10^6 neutrofilų buvo atidėta RNR išskyrimui. Šios ląstelių suspensijos centrifuguotos 10 min., 300 x g,

supernatantas pašalintas, o ląstelės suspenduotos 600 μ L DNA/RNA Shield™ („Zymo Research” JAV) lizės buferio. Gautas mėginys užšaldytas skystame azote ir saugotas -80°C iki RNR išskyrimo dienos. RNR išskyrimui atidėtas ląstelių skaičius vidutiniškai sudaro iki 30% gauto galutinio ląstelių skaičiaus.

Likusios ląstelės po MACS buvo fiksuotos naudojant Optilyse C™ („Beckman Coulter” JAV) reagentą remiantis modifikuotu gamintojo protokolu. Neutrofilų ir T ląstelių suspensijos centrifuguotos 10 min., 300 x g, supernatantas pašalintas, o ląstelės suspenduotos 5 ir 4 mL Optilyse C™ reagento atitinkamai. Po 5 min., inkubacijos švelniai vartant mėginius, pridėta 2M glicino („Sigma Aldrich” JAV) tirpalo iki galutinės 10% koncentracijos. Po 5 min., inkubacijos kambario temperatūroje ląstelės vėl centrifuguotos 10 min., 300 x g, supernatantas pašalintas, o ląstelės suspenduotos 1 mL Optilyse C™ su 10% 2M glicino tirpalo ir suskaičiuotos su MoxiZ mini automatiniu ląstelių skaičiuotuvu pagal anksčiau aprašytą metodiką. Gautas mėginys užšaldytas skystame azote ir saugotas -80°C iki FACS sortiravimo dienos.

T ląstelės prieš fiksaciją su Optilyse C™ reagentu papildomai buvo inkubuotos 10 min., su 200 vienetų deoksiribonukleazės („Thermo Scientific” JAV) ir 1% jaučio serumo albuminu („Sigma Aldrich” JAV) siekiant pagerinti ląstelių išsilaikymą fiksacijos ir šaldymo metu. Po inkubacijos iškart pereita prie fiksacijos aprašytos ankstesnėje pastraipoje.

Pasibaigus 24 valandų trukmės eksperimentui, iš vieno asmens surenkama 12-a neutrofilų arba 12-a T ląstelių mėginių kraują imant kas 2 val., 24 val., laikotarpyje. Toks 12-os neutrofilų arba T ląstelių mėginių rinkinys toliau bus vadinamas cirkadine kolekcija. WBC-neu mėginių kolekciją iš viso sudarė 23-ys mėginiai.

2.5 Tėkmės citometrija

2.5.1 FACS - fluorescencija aktyvuotas ląstelių sortiravimas

Po cirkadinės kolekcijos, kurią sudaro 12-a neutrofilų arba 12-a T ląstelių mėginių, surinkimo šie mėginiai yra papildomai gryninami FACS sortiravimo metodu griežtai vienos dienos eigoje. FACS metodas veikia panašiai kaip MACS, tačiau antikūnai yra konjuguoti su fluoroforais, o ne magnetinėmis dalelėmis. Prietaisas įvertina antikūnų, sąveikaujančių su kiekviena ląstele, fluorescenciją ir tuomet nukreipia ją į vieną iš dviejų kanalų: šiukšlių arba išgrynintų ląstelių. Šio metodo pagrindu gaunamos itin grynos, $>99\%$ švarumo ląstelių suspensijos.

Pilna cirkadinė kolekcija atšildoma šilto vandens vonelėje ir filtruojama per 35 μ M filtrą, pridėdama 2 mL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio („Invitrogen” JAV). Iš šios suspensijos 100 μ L tūrio yra atidedama į atskirą mėgintuvėlį ir sumaišoma su 200 μ L eBioscience™ ląstelių dažymo buferio. Tokiu būdu gaunami sortiravimui naudojami nedažyti ląstelių mėginiai. Likusios ląstelės centrifuguojamos 10 min., 400 x g, supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos

1 mL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio su antikūnais. Vienam mėginiui dažyti naudoti šie antikūnai ir jų kiekiai: CD45-PE/Cy7 (#557748) 2,5 µL, CD3-FITC (#555339) 30 µL, CD19-BV605 (#562653) 7,5 µL, CD16-APC (#561304) 2,5 µL, CD15-PE (#555402) 30 µL, CD14-BV421 (#565283) 5 µL (visi antikūnai iš „BD Pharmingen” JAV). Ląstelės su antikūnų mišiniu inkubuotos tamsoje, lede 30 min. Po inkubacijos pridėta 2 mL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio ir centrifuguota 10 min., 400 x g. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos 1 mL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio be antikūnų. Sortiravimas atliktas VMTI „Inovatyvios medicinos centras” naudotas FACS Aria II tėkmės citometras. Tam, kad ląstelė būtų nukreipta į išgrynintų neutrofilų kanalą, ji turi turėti turėti šias žymes: CD45-PE/Cy7, CD15-PE ir CD16-APC (ši žymė būna ne pas kiekvieną donorą). Tam, kad T ląstelė būtų nukreipta į išgrynintų T ląstelių kanalą, ji turi turėti turėti šias žymes: CD45-PE/Cy7 ir CD3-FITC. Kitos ląstelės, neturinčios fluorescencijos pagal išvardytas žymes, yra nukreipiamos į šiukšlių kanalą.

Po sortiravimo gauta ląstelių suspensija centrifuguojama 10 min., 500 x g, supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos 1 mL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio be antikūnų. Ląstelės suskaičiuojamos su MoxiZ mini automatinio ląstelių skaičiuotuvu pagal anksčiau aprašytą metodiką. Po skaičiavimo, į tris mėgintuvėlius padalinama po 1×10^6 ląstelių ir pradedamas genomines DNR skyrimas. Likusios ląstelės centrifuguotos 10 min., 600 x g, supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos 1 mL Optilyse C™ su 10% 2M glicino tirpalo. Gautas mėginys užšaldomas skystame azote ir saugomas -80°C.

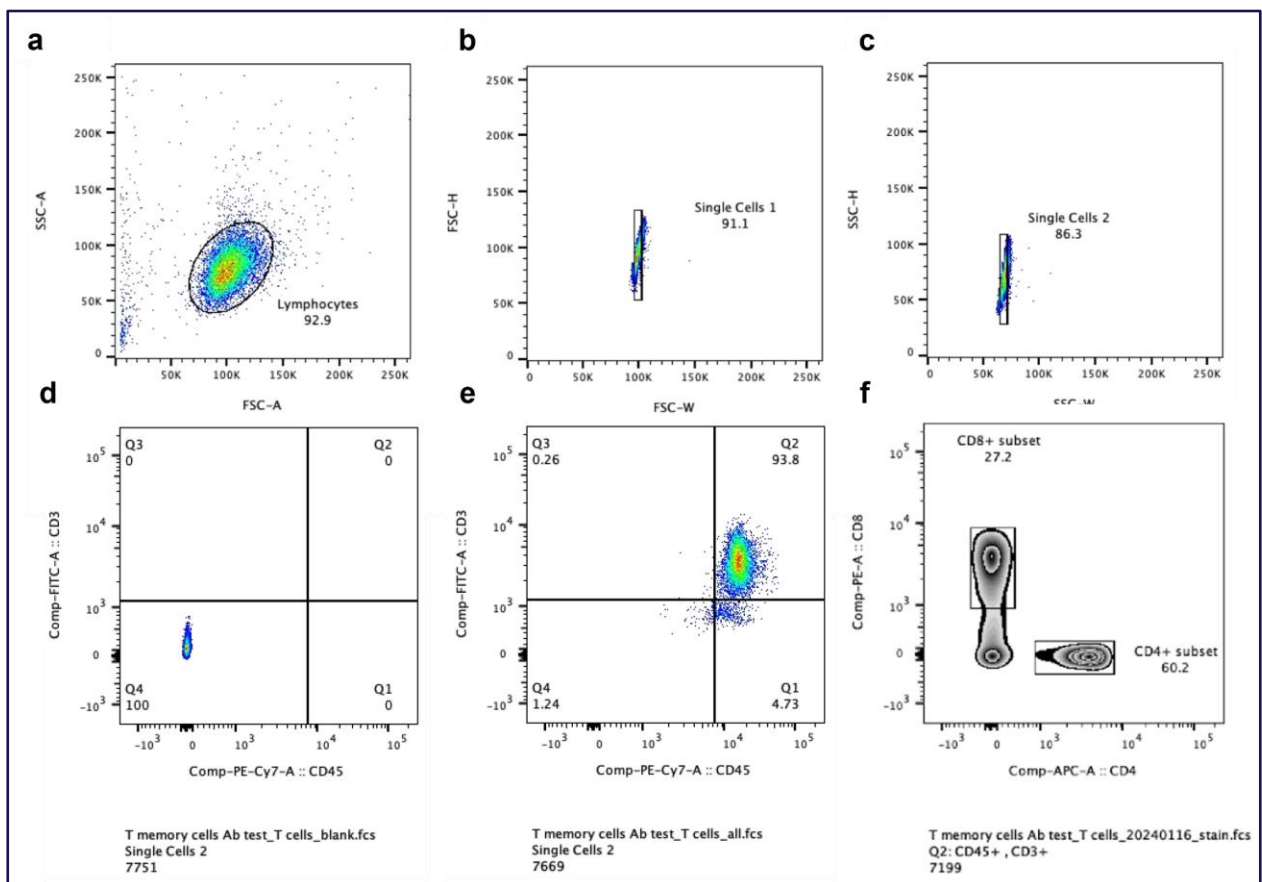
2.5.2 Tėkmės citometrija T ląstelių subtipų analizei

Siekiant gauti T ląstelių populiaciją sudarančių ląstelių subtipų santykius, buvo atlikta papildoma tėkmės citometrijos analizė su išsortiruotomis T ląstelėmis. Ši analizė veikia panašiu principu kaip FACS sortiravimas, tačiau nevyksta ląstelių nukreipimas į skirtingus kanalus, gaunami tik analizės duomenys.

T ląstelės likusios po sortiravimo atšildomos, padalinamos po 1×10^5 ląstelių į du mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 5 min., 900 x g. Po centrifugavimo supernatantas nusiurbiamas ir vienas mėginys suspenduojamas 150 µL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio, taip gaunant nedažytą kontrolinį mėginį. Antras mėginys suspenduojamas 50 µL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio su antikūnais. Vienam mėginiui dažyti naudoti šie antikūnai ir jų kiekiai: CD45-PE/Cy7 (#557748) 0,25 µL, CD3-FITC (#561806) 2 µL, CD4-APC (#555349) 0,5 µL, CD8-PE (#344705) 0,5 µL (visi antikūnai iš „BD Pharmingen” JAV, išskyrus CD8-PE, kuris yra iš „BioLegend” JAV). Ląstelės inkubuojamos tamsoje, lede 55 min. Po inkubacijos, į visus mėginius pridėtas 1 mL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio ir centrifuguota 5 min., 900 x g, supernatantas pašalintas, o ląstelės suspenduojamos 150 µL eBioscience™ ląstelių dažymo buferio

be antikūnų. Tėkmės citometrija atlikta VMTI „Inovatyvios medicinos centras” naudotas FACS Aria II tėkmės citometras. Fluorescencijos kompensacijai atlikti buvo naudoti kompensacijos rutuliukai (#552843, „BD Pharmingen” JAV), dažyti tuo pačiu būdu kaip ir T ląstelės.

Analizės metu surinkta >10 000 įvykių, atvaizduojančių ląsteles. Prieš imuninių žymenų analizę buvo atmesti ląstelių dublikatai (2.2 Pav. A, B, C) ir pasirinktos tik tos ląstelės, kurios turėjo CD45 ir CD3 žymenį (2.2 Pav. E, ketvirtis Q2). Naudojant CD4 ir CD8 žymenis, analizės įvykiai padalinti į CD4 T ląsteles (CD4+CD8-) ir CD8 T ląsteles (CD4-CD8+) (2.2 Pav. F). Įvykių procentinės dalies įvertinimo metu, laikyta, kad 100% yra visi CD45+CD3+ įvykiai, analizė atlikta su „FlowJo” programine įranga. Statistinė analizė ir grafikų braižymas atliktas naudojant R programinę kalbą (4.3.1) RStudio programavimo aplinkoje. Osciliacijų paieška CD4 ir CD8 T ląstelių proporcijų duomenyse atlikta pritaikius bibliotekos „matrixTests” funkciją `col_cosinor`. Ši funkcija taiko kosinuso testą (Cornelissen, 2014) ir patikrina duomenų periodiškumą 24 val., atžvilgiu kiekvienam duomenų lentelės stulpeliui ir pateikia statistinės analizės duomenis (p vertę, R2, mesor, amplitudė bei akrofazę) (R: Cosinor, n.d.). Daugybinio testavimo korekcijai taikytas Bonferroni metodas.



2.2 Pav. T ląstelių tėkmės citometrijos duomenų analizės schema. Grafikuose nurodytas įrašytų įvykių parinkimas sekančiam grafikui abėcėline tvarka. A, B, C - dubletų atmetimas. D - neigiamos kontrolės - nedažytų ląstelių - signalas. E - teigiamų T ląstelių parinkimas pagal CD45 ir CD3 žymenis. F - CD4 ir CD8 T ląstelių parinkimas.

2.6 Genominės DNR apdorojimas

2.6.1 Genominės DNR skyrimas

Baigus sortiruoti cirkadinę mėginių kolekciją, ląstelės buvo suskaičiuotos, padalintos į tris mėgintuvėlius po 1×10^6 ląstelių ir pradėtas genominės DNR (gDNR) skyrimas. gDNR skyrimui naudotas NucleoSpin® Tissue XS („Macherey-Nagel” Vokietija) komercinis rinkinys ir gamintojo pateikiamas protokolas su pakeitimais. Mėginiai centrifuguojami 10 min., 600 x g, supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos 100 µL T1 ląstelių lizės buferio, pridedama 20 µL proteinazės K. Mėginiai inkubuoti 56 °C per nakt. Po inkubacijos pridedama 100 µL B3 lizės buferio, maišyta ir inkubuota 70 °C 5 min. Po inkubacijos pridedama 90 µL 100% etanolio ir lizatas perkeliamas į DNR gryninimo kolonėlę. Kolonėlė centrifuguojama 1 min., 11 000 x g. Kolonėlės membrana praplaunama su 60 µL B5 buferio du kartus, po kiekvieno pridėjimo centrifuguojant 1 min., 11 000 x g. Trečias praplovimas atliekamas su 100 µL 70% etanolio, centrifuguojama 1 min., 14 000 x g du kartus. Galiausiai į kolonėlę pridedama 22 µL ir 27 µL eliacijos buferio T ląstelių ir neutrofilų ląstelėms atitinkamai, inkubuojama 3 min., ir centrifuguojama 2 min., 14 000 x g. Po išskyrimo atliekamas gautos gDNR koncentracijos ir kokybės įvertinimas, ilgalaikiam saugojimui mėginiai laikomi -80°C.

Išskirtos gDNR koncentracija įvertinta naudojant Qubit BR dsDNA rinkinį („Invitrogen” JAV) remiantis gamintojo protokolu ir Qubit 4 fluorimetru („Invitrogen” JAV). Papildomai, gDNR koncentracija ir kokybės santykiai įvertinti su nanodrop 2000 spektrofotometru („Thermo Scientific” JAV). Siekiant patvirtinti, kad išskirta gDNR nėra fragmentuota, atlikta elektroforezės gelio analizė. Elektroforezė vykdyta su 100 ng gDNR, 1X TAE buferyje ir 1% TAE agarozės gelyje, 30 min., 100 V.

2.6.2 gDNR bisulfitinė konversija ir DNR modifikacijos analizė

Išskyrus gDNR, atlikta bisulfitinė konversija ir DNR modifikacijos analizė naudojant HumanMethylationEPIC v2.0 BeadChip metilinimo gardeles („Illumina” JAV) išskyrus WBC-neu mėginius, kurių modifikacijos analizė atlikta naudojant HumanMethylation450K BeadChip („Illumina” JAV). Bisulfitinei konversijai naudotas EZ DNA Methylation™ komercinis rinkinys („Zymo Research” JAV). Kiekvienam laiko taškui bisulfitinė konversija atlikta triplikatais, naudojant po 750 ng gDNR. gDNR inkubuota 30 min., 42 °C su 7,5 µL M skiedimo buferio, po inkubacijos pridėta 97,5 µL CT - konversijos reagento. Visa kita atlikta remiantis gamintojo pateiktu protokolu. 500 ng gDNR po bisulfitinės konversijos buvo panaudota metilinimo mikrogardelių analizei atliktoje “The Centre for Applied Genomics” Toronte pagal užsakymą. Analizė atlikta triplikatais.

2.6.3 DNR modifikacijos duomenų analizė

DNR modifikacijos duomenys apdoroti naudojant R programinę kalbą ir „minfi” biblioteką (Aryee et al., 2014). Pašalinti visi mėginiai, kurie turėjo daugiau negu 3% prasto įvertinimo ($p < 0,05$) detekcijos signalų ir po pašalinimo duomenys normalizuoti „noob” metodu (Heiss & Just, 2019; Triche et al., 2013). Taip pat atliktas funkcinis normalizavimas po kurio metilintų ir nemetilintų kanalų informacija panaudota metilinimo beta vertėms apskaičiuoti (Fortin et al., 2014). Jei po duomenų apdorojimo liko tik viena techninė replika, toks mėginys buvo pašalintas.

Łastelių tipų proporcijų analizė remiantis DNR modifikacijos duomenimis atlikta taikant Houseman (Houseman et al., 2012) algoritmą su Salas korekcija (Salas et al., 2022). Gavus rezultatus techninės replikos buvo apjungtos apskaičiuojant jų vidurkį. Epigenetinio amžiaus įvertinimai šiems laikrodžiams: Hannum 2013, Horwath pan tissue 2013, Horwath Skin and blood 2018, Levine PhenoAge 2018, Zhang 2019, Lu GrimAge 2019, Teschendorff epiTOC2 2020, Lu GrimAge2 2022 ir Jokai FitAge 2022 gauti DNR modifikacijos duomenis įkėlus į DNR metilinimo amžiaus skaičiuoklę (<https://dnamage.clockfoundation.org>). Weidner 2014, Lin 2016, Vidal-Bralo 2016, Zhang mortality risk 2017 laikrodžių rezultatai gauti naudojant R programinę kalbą ir „methylCIPHER” biblioteką, o Belsky Dunedin PACE 2022 naudojant „DunedinPACE” biblioteką (Thrush et al., 2022). Youn Miage 2018 laikrodžio rezultatai gauti remiantis autorių aprašyta procedūra (Youn & Wang, 2018). Gavus rezultatus techninės replikos buvo apjungtos. Tolimesnė statistinė analizė ir grafikų braižymas atliktas naudojant R programinę kalbą (4.3.1) RStudio programavimo aplinkoje. Osciliacijų paieška epigenetinio amžiaus, ląstelių tipų proporcijų ir DNR modifikacijos duomenyse atlikta pritaikius bibliotekos „matrixTests” funkciją `col_cosinor`, kuri taiko kosinuso testą (Cornelissen, 2014) ir patikrina duomenų periodiškumą 24 val., atžvilgiu bei pateikia statistinės analizės duomenis (p vertę, R², mesor, amplitudė bei akrofazę) (R: Cosinor, n.d.). Daugybinio testavimo korekcija atlikta Bonferroni metodu.

Wang et al 2023 (GSE224807) ir Reinius et al 2012 (GSE35069) publikuotų DNR modifikacijos duomenų analizė atlikta tik su duomenimis gautais HumanMethylation450k metilinimo gardelių pagrindu. Pasirinkti 23 donoriai iš Wang et al 2023 ir 6 iš Reinius et al 2012 duomenų rinkinių, kadangi jie turėjo DNR modifikacijos duomenis visiems kraujo ląstelių tipams ir visuminiam kraujo mėginiui. Apskaičiuotas vidutinis skirtumas tarp amžiaus, gauto išgrynintame ląstelių tipe ir visuminiame kraujo mėginyje visų donorų atžvilgiu. Epigenetinio amžiaus skirtumas palygintas taikant Studento T testą.

2.7 RNR apdorojimas

2.7.1 RNR skyrimas

Po kraujo apdorojimo MACS metodu, ląstelės buvo suspenduotos 600 μ L DNA/RNA Shield™ („Zymo Research” JAV) lizės buferio ir saugotos -80°C . RNR išskyrimo dieną visi vienos cirkadinės kolekcijos mėginiai buvo atšildyti and ledo ir pradėtas RNR skyrimas naudojant komercinį mirVana™ miRNA rinkinį („Invitrogen” JAV). Iškart po atšildymo į mėginį pridedama 600 μ L lizės buferio, maišoma purtyklėje ir pridedama 60 μ L miRNR homogenato reagento. Lizatas inkubuojamas 10 min., lede. Po inkubacijos pridedama 600 μ L fenolio:chloroformo tirpalo, maišoma purtyklėje ir centrifuguojama 5 min., 10 000 x g kambario temperatūroje. Po centrifugavimo surenkama tik viršutinė - vandeninė - mėginio fazė ir perkeliama į naują švarų mėgintuvėlį. Į šį mėginį pridedama 1,25 karto tūrio kambario temperatūros 100% etanolio ir lizatas perkeliamas į gryninimo kolonėlę, centrifuguojama 20 s., 10 000 x g. Į kolonėlę pridedama 5 μ L deoksiribonukleazės ir 75 μ L DNR ardančio buferio, inkubuojama kambario temperatūroje 15 min. Po inkubacijos pridedama 700 μ L pirmojo praplovimo buferio, centrifuguojama 20 s., 10 000 x g. Atliekami dar du praplovimai su 500 μ L antrojo praplovimo buferio, kiekvieną kartą centrifuguojant po buferio pridėjimo. Po, dar vieną kartą centrifuguojamos tuščios kolonėlės 1 min., 10 000 x g., siekiant pašalinti visus ankstesnių buferių likučius. Ant membranos pridedama 50 μ L 95°C eliacijos buferio, centrifuguojama 30 s., didžiausiu greičiu. Gauta RNR saugoma -80°C .

2.7.2 Kopijinės DNR sintezė

RNR išskirta iš pilnos cirkadinės kolekcijos, kurią sudaro 12-a neutrofilų arba T ląstelių mėginių surinktų skirtingu paros metu, buvo panaudota kopijinės DNR sintezei. Sinteze atlikta naudojant komercinį RevertAid First strand cDNA synthesis („Thermo Scientific” JAV) rinkinį. Reakcijai naudotas vienodas RNR kiekis iš visų cirkadinės kolekcijos mėginių. Vienai reakcijai atlikti, sumaišoma 125 ng RNR su 1 μ L pradmenų, pridedama vandens be nukleazių iki galutinio 12 μ L tūrio. Taip pat į reakciją pridedama 4 μ L 5X reakcijos buferio, 1 μ L ribonukleazių inhibitoriaus, 2 μ L nukleotidų mišinio ir 1 μ L RevertAid M-MuLV RT transkriptazės. Mišinys švelniai sumaišomas ir inkubuojamas termocikleryje 5 min., 25°C laipsnių temperatūroje ir 60 min., 42°C laipsnių temperatūroje. Reakcija sustabdoma mišinį inkubuojant 5 min., 70°C laipsnių temperatūroje. Sintezės reakcijos kontrolinis mėginys gaunamas tokiu pačiu būdu, tačiau į reakcijos mišinį nėra dedama RevertAid M-MuLV RT transkriptazė. Kopijinė DNR saugoma -20°C iki realaus laiko PGR atlikimo.

2.7.3 Realus laiko PGR

Gauta kopijinė DNR panaudota realaus laiko PGR reakcijai su TaqMan™ pradmenimis („Applied Biosystems” JAV). Naudoti šie pradmenys skirtingų DNR metiltransferazių: Dnmt3A (#4331182, ID Hs01027162_m1), Dnmt3B (#4331182, ID Hs00171876_m1), Dnmt1 (#4331182, ID Hs00945899_m1) ir TET šeimos metilcitozino dioksigenazių transkriptų gausinimui: Tet1 (#4331182, ID Hs00286756_m1), Tet2 (#4331182, ID Hs00325999_m1), Tet3 (#4331182, ID Hs00896441_m1). Kontrolinių - nuolatinės raiškos - genų transkriptų gausinimui naudoti šie pradmenys: TBCB (#4331182, ID Hs00998434_m1), TBP (#4331182, ID Hs00427620_m1). Realus laiko PGR atlikimui naudotas Maxima Probe qPCR polimerazės rinkinys („Thermo Scientific” JAV). Vienai reakcijai atlikti sumaišomi 5 µL Maxima qPCR buferio, 0,5 µL atitinkamo TaqMan™ pradmens, 10 ng kopijinės DNR, pridedama vandens be nukleazių iki galutinio 10 µL tūrio. Mišinys švelniai sumaišomas ir inkubuojamas termocikleryje 10 min., 95°C laipsnių temperatūroje polimerazės aktyvacijai. Po to seka 40 ciklų denatūracijos (15 s., 95°C) ir sekos pratęsimo (60 s., 60°C) etapų. Visos reakcijos atliktos triplikatais taip pat kiekvienai pradmenų porai atliktos kontrolinės reakcijos: reakcija be pridėtos kopijinės DNR ir kopijinės DNR sintezės kontrolinė reakcija. Gautų rezultatų analizė atlikta su “Bio-Rad CFX Manager, ir Rstudio programine įranga. Pirmiausia apjungtos mėginių replikos paskaičiuojant jų vidurkį, tuomet santykinė raiška pagal $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formulę. ΔCt reikšmė gauta iš analizuojamo geno Ct vertės atėmus nuolatinės raiškos geno Ct vertę, o $\Delta\Delta Ct$ - iš specinio laiko taško ΔC atėmus suvidurkintą visų 12-os laiko taškų ΔC vertę. Ct tai ciklas, reikalingas pasiekti transkripto detekcijos limitą. Gavus santykinę geno raiškos vertę, statistinė analizė ir grafikų braižymas atliktas naudojant R programinę kalbą (4.3.1) RStudio programavimo aplinkoje. Osciliacijų paieška atlikta pritaikius bibliotekos „matrixTests” funkciją `col_cosinor`.

3. REZULTATAI

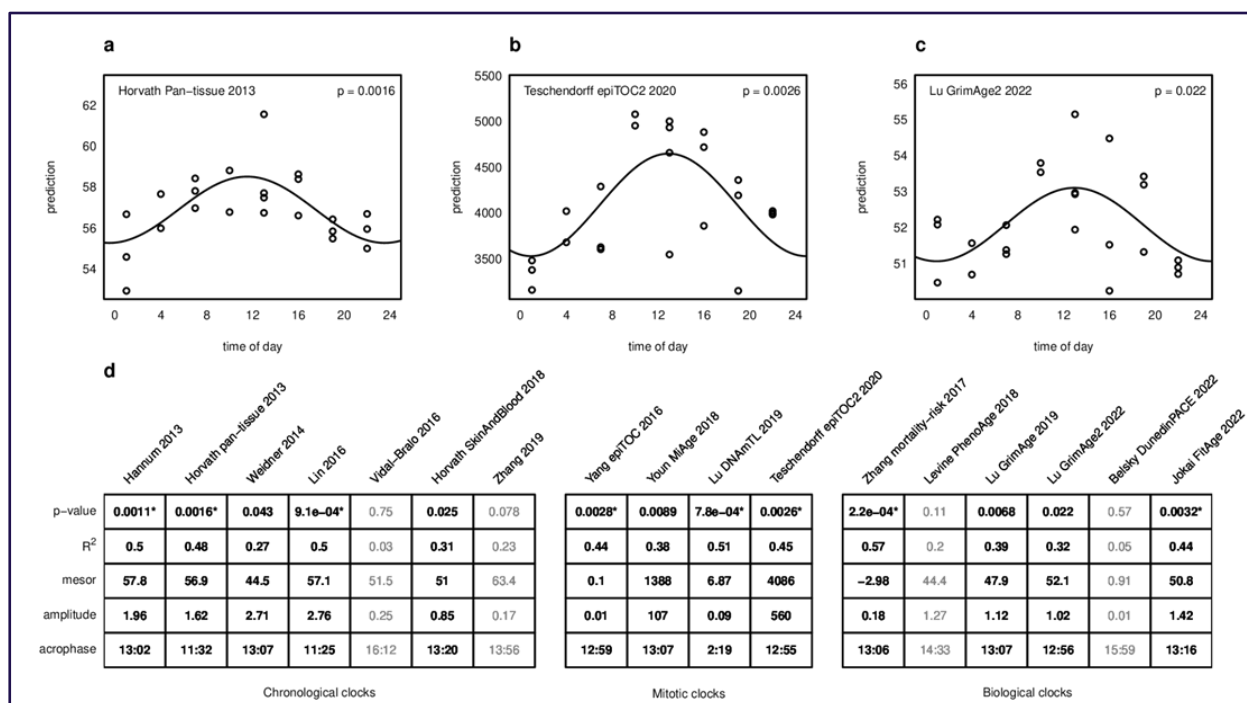
Šio darbo metu siekta ištirti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatams daro įtaką išorinio (ląstelių skaičiaus) ir/ar vidinio (DNR modifikacijos) variabilumo sukelta citozinių modifikacijos lygio kaita paros eigoje. Tikslui pasiekti, atlikta kraują atstojančių WBC-neu mėginių analizė. Patikrinta ar paros eigoje svyruoja epigenetinių laikrodžių rezultatai ir skirtingų ląstelių tipų proporcijos. Taip pat įvertinta ar skirtingi ląstelių tipai pateikia skirtingą to paties individo epigenetinį amžių naudojant publikuotus duomenis. Siekiant pašalinti ląstelių tipų proporcijų kaitos įtaką, tokia pati epigenetinio amžiaus analizė atlikta su išgrynintų neutrofilų ir T ląstelių mėginiais. Papildomai, T ląstelių atveju, įvertinta CD4 ir CD8 subtipų kaita paros eigoje. Beto, ištirta ar išgrynintų ląstelių mėginiuose randami citozinai, kurių modifikacija osciliuotų paros eigoje ir ar šie citozinai yra naudojami epigenetinių laikrodžių algoritmuose. Galiausiai, patikrinta ar keičiasi DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų kiekis paros eigoje. Dalis šio darbo rezultatų buvo publikuoti moksliniame straipsnyje „Epigenetic age oscillates during the day”, autoriai Karolis Koncevičius, Akhil Nair, Aušrinė Šveikauskaitė, Agnė Šeštokaitė, Auksė Kazlauskaitė, Audrius Dulskas, Artūras Petronis, išspausdintame žurnale *Aging Cell* (2024) (Koncevičius et al., 2024).

3.1 Epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų variabilumas kraujo mėginiuose

Siekiant ištirti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatai osciliuoja paros eigoje, buvo išanalizuoti WBC-neu mėginiai, surinkti kas 3 valandas 72 val., eigoje, viso - 23 mėginiai. WBC-neu mėginiai tai ląstelių frakcija gauta po neutrofilų pašalinimo iš kraujo MACS (magnetinis ląstelių sortiravimas) metodu. Visiems WBC-neu mėginiams buvo gauti 17-os skirtingų epigenetinių laikrodžių rezultatai ir atlikta statistinė analizė, leidžianti patikrinti, ar skirtingu paros metu gauti laikrodžių epigenetiniai amžiai osciliuoja - ritmingai keičiasi. Tai atlikus nustatyta, kad 13-os iš tirtų 17-os epigenetinių laikrodžių pateikiami rezultatai statistiškai reikšmingai osciliuoja paros eigoje - pateikia skirtingą rezultatą priklausomai nuo paros laiko (3.1 Pav.). Iš 7-ių skirtingų laikrodžių, nustatančių asmens chronologinį amžių, 5-ių laikrodžių rezultatai osciliavo paros eigoje: Hannum 2013 ($p = 0,0011$), Horwath pan-tissue 2013 ($p = 0,0016$), Weidner 2014 ($p = 0,043$), Lin 2016 ($p = 9,1e-04$), Horwath skin and blood 2018 ($p = 0,025$) (3.1 Pav., A, D). Iš šių, trijuose (Hannum 2013, Horwath pan-tissue 2013, Lin 2016) osciliacijos išliko statistiškai reikšmingos po daugybinio testavimo korekcijos. Visų tirtų mitozinių laikrodžių rezultatai taip pat osciliavo statistiškai reikšmingai: Yang epiTOC 2016 ($p = 0,0028$), Youn MiAge 2018 ($p = 0,0089$), Lu DNAmTL 2019 ($p = 7,8e-04$), Teschendorff epiTOC2 2020 ($p = 0,0026$) (3.1 Pav. B, D). Po daugybinio testavimo korekcijos tik Youn MiAge 2018 tapo statistiškai nepatikimas.

Galiausiai, iš 6-ių laikrodžių, nustatančių biologinį asmens amžių, 4-ių osciliacijos buvo statistiškai reikšmingos: Zhang mortality-risk 2017 ($p = 2,2e-04$), Lu GrimAge 2019 ($p = 0,0068$), Lu GrimAge2 2022 (0,022), Jokai FitAge 2022 ($p = 0,0032$) (3.1 Pav., C, D). Taip pat, Zhang mortality-risk 2017 ir Jokai FitAge 2022 laikrodžių rezultatai išliko statistiškai reikšmingi po daugybinio testavimo korekcijos.

Visų chronologinių ir biologinių laikrodžių atžvilgiu, dienos metu, nuo ~11 val., iki ~14 val., tirtas 52 metų donoras buvo vyriausio amžiaus, o naktį nuo ~23 val., iki ~01 val., - jauniausias. Šio asmens amžius remiantis Horwath pan-tissue 2013 laikrodžiu buvo 58,5 metai ~11:30 val., o vakare, ~23:30 val., - 55,3 metai. Rezultatus patvirtina ir tai, jog Lu DNAmTL 2019 laikrodžio pateiktas telomerų ilgis nakties metu buvo didžiausias - osciliacijos akrofazė pasiekta 02:19 val. Didžiausią variaciją tarp spėjamo asmens amžiaus parodė Lin 2016 laikrodis: skirtumas tarp mažiausio ir didžiausio spėto amžiaus 24 val., eigoje buvo 5,5 metai. Priešingai, Horwath Skin and Blood 2018 laikrodis rodė mažiausią variaciją - 1,7 metai. Apibendrinant, ištyrus WBC-neu mėginius parodyta, kad epigenetinio laikrodžio rezultatai priklauso nuo paros laiko.

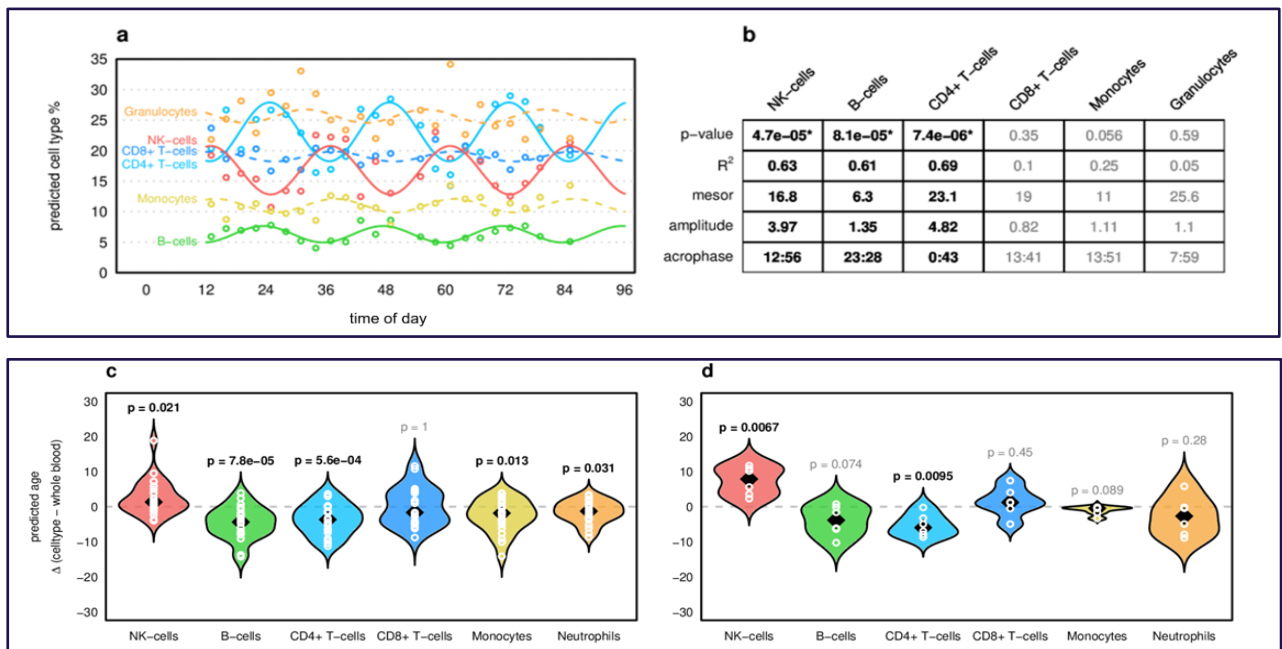


3.1 Pav. Įvairių chronologinių, mitozinių ir biologinių epigenetinių laikrodžių skirtingu paros metu pateikiamų rezultatų osciliacijų analizė WBC-neu mėginiuose. Horwath pan-tissue 2013 (A), Teschendorff epiTOC2 2020 (B) ir Lu GrimAge2 2022 (C) laikrodžių rezultatų osciliacijos kreivės WBC-neu mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 72 val., eigoje iš 52-ejų metų individo. X ašis - paros laikas, Y ašis - laikrodžio pateiktas spėjimas. Vientisa kreivė žymi statistiškai reikšmingą rezultatų osciliaciją. (D) Visų tirtų laikrodžių osciliacijų parametrai. Paryškinta spalva pažymėti laikrodžiai, kurių osciliacijos buvo statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$), pridėtas * ženklas nurodo statistiškai reikšmingų osciliacijų išlikimą po daugybinio testavimo korekcijos Bonferroni metodu.

3.2 Ląstelių skaičiaus variabilumas kraujo mėginiuose

Papildomai, WBC-neu mėginiuose buvo įvertinta skirtingų ląstelių tipų proporcijų kaita 24 val., eigoje. WBC-neu mėginiai buvo surenkami po neutrofilų pašalinimo MACS metodu taip sukuriant visų kraujo ląstelių išskyrus neutrofilus mėginius. Nepaisant to, kad neutrofilai buvo atskirti, MACS gryninimas nepašalina visų kraujyje cirkuliuojančių neutrofilų. Remiantis ląstelių tipų proporcijų nustatymu bioinformatiniais metodais (Houseman et al., 2012; Salas et al., 2022), WBC-neu mėginiuose yra likę nuo 10% iki 20% neutrofilų (1 Priedas). Minėti bioinformatiniai metodai išanalizuoja DNR modifikacijos duomenis ir pateikia tą mėginį sudarančių skirtingų kraujo ląstelių tipų proporcijų spėjimus. Atlikus gautų rezultatų statistinę analizę, nustatyta, kad WBC-neu mėginiuose 24 val., periodu osciliuoja trys ląstelių tipai: CD4 T ląstelės ($p = 4,7e-05$), B ląstelės ($p = 8,1e-05$) ir NK (angl., natural killers) ląstelės ($p = 7,4e-06$) (3.2 Pav., A, B). CD4 T ląstelės ir B ląstelės pasiekia aukščiausią skaičių naktį, ~24 val, o NK ląstelės dieną, ~12 val. Beto, NK ir CD4 T ląstelių osciliacijų kreivės yra priešingų akrofazių.

Norint geriau suprasti, kokią įtaką amžiaus spėjimams gali daryti skirtingi ląstelių tipai, išanalizuoti viešai prieinami Reinius et al 2012 (Reinius et al., 2012) ir Wang et al 2023 (X. Wang et al., 2023) tyrimų duomenys. Šie mokslininkai atliko DNR modifikacijos tyrimus su skirtingomis išgrynintomis kraujo ląstelėmis ir visuminiais kraujo mėginiais. Peranalizuoti 6 skirtingi ląstelių tipai: NK, B, CD4, CD8 T ląstelės, neutrofilai ir monocitai. Visiems šiems ląstelių tipams ir visuminiais kraujo mėginiais, chronologinis amžius buvo įvertintas taikant Horwath pan-tissue 2013 epigenetinį laikrodį. Nustačius atitinkamo ląstelių tipo epigenetinį amžių, iš jo buvo atimtas epigenetinis amžius gautas iš to paties asmens visuminio kraujo mėginio. Tai atlikta siekiant sužinoti ar specifinio ląstelių tipo pateikiamas amžius nesiskiria, yra didesnis/mažesnis už amžių, kuris gaunamas ištyrus visuminį kraujo mėginį. Abiejuose duomenų rinkiniuose tik NK ląstelės pateikė vidutiniškai 3,59 metais didesnę amžių negu visuminis kraujo mėginys (3.2 Pav., C, D), o B ir CD4 T ląstelės pateikė vidutiniškai 4,46 ir 4,44 metais mažesnę amžių atitinkamai (3.2 Pav., C, D). Statistiškai nereikšmingas skirtumas tarp laikrodžio pateiktų amžių nustatytas CD8 T ląstelių atveju. Monocitų ir Neutrofilų atveju, statistinis reikšmingumas skyrėsi tarp Reinius et al 2012 ir Wang et al 2023 duomenų, tačiau tendencija išliko panaši - abu ląstelių tipai rodė minimaliai mažesnę amžių negu visuminis to asmens kraujo mėginys (3.2 Pav., C, D). Apibendrinus, WBC-neu mėginiuose parodyta, kad NK, B ir CD4 T ląstelių tipų proporcijos osciliuoja paros eigoje, o išanalizavus publikuotus duomenis pastebėta, kad Horwath pan-tissue 2013 laikrodis pateikia skirtingą amžių NK, B ir CD4 T ląstelių mėginiais palyginus su visuminio kraujo mėginiu gautu iš to paties individo.



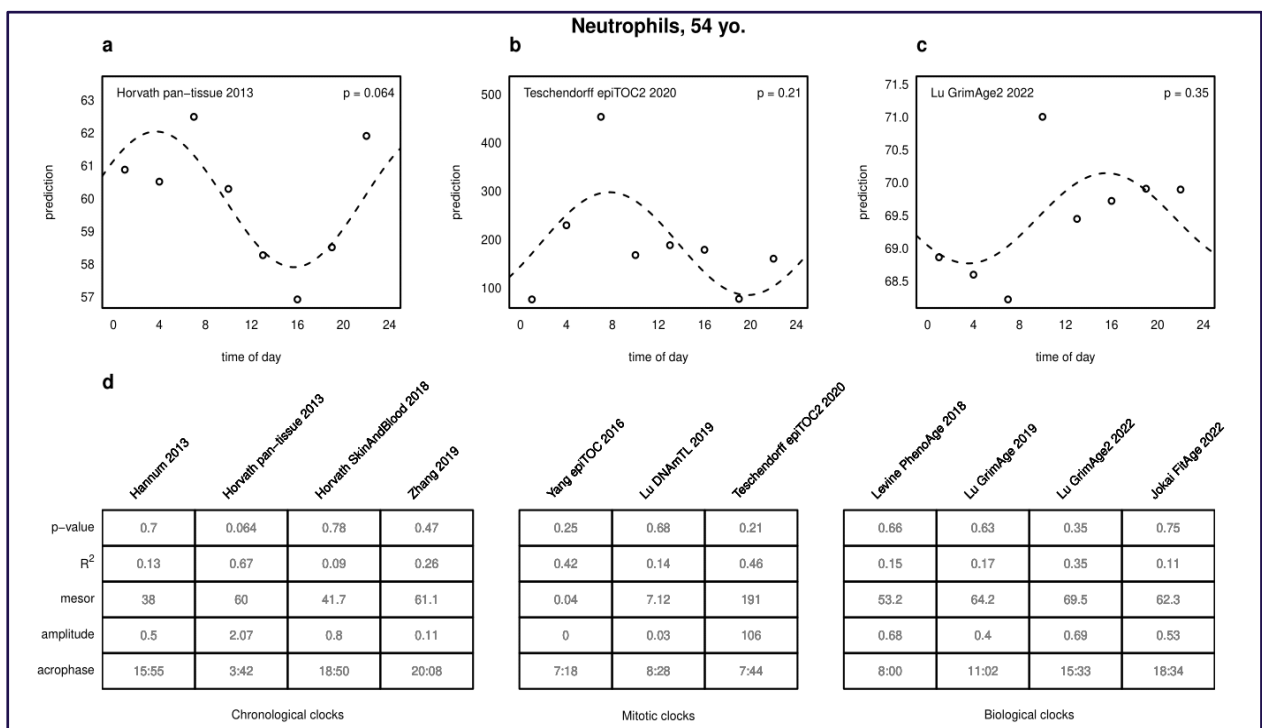
3.2 Pav. Įvairių kraujo ląstelių tipų proporcijų osciliacijų analizė WBC-neu mėginiuose ir Horwath Pan tissue 2013 epigenetinio laikrodžio rezultatai viešai prieinamiems ląstelių tipų duomenims. (A) šešių kraujo ląstelių tipų proporcijų osciliacijos WBC-neu mėginiuose. X ašis - paros laikas, Y ašis - Houseman metodu nustatyta ląstelių tipų proporcija mėginyje. Vientisa linija nurodo statistiškai reikšmingą ląstelių tipo proporcijų osciliaciją. (B) Osciliacijų parametrai. Paryškinta spalva pažymėti ląstelių tipai, kurių osciliacijos buvo statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$), pridėtas * ženklas nurodo statistiškai reikšmingų osciliacijų išlikimą po daugybinio testavimo korekcijos Bonferroni metodu. (C, D) Smuiko grafikai, rodantys Horwath pan-tissue 2013 epigenetinio laikrodžio pateikto amžiaus skirtumą tarp išgryninto ląstelių tipo ir visuminio kraujo mėginio (C) Reinius et al 2012 ir (D) Wang et al 2023 duomenims. X ašis - ląstelių tipas, Y ašis - skirtumas tarp amžiaus, gauto išgrynintame ląstelių tipe ir visuminiame kraujo mėginyje. Paryškinta spalva pažymėtas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) pagal Studento T testą.

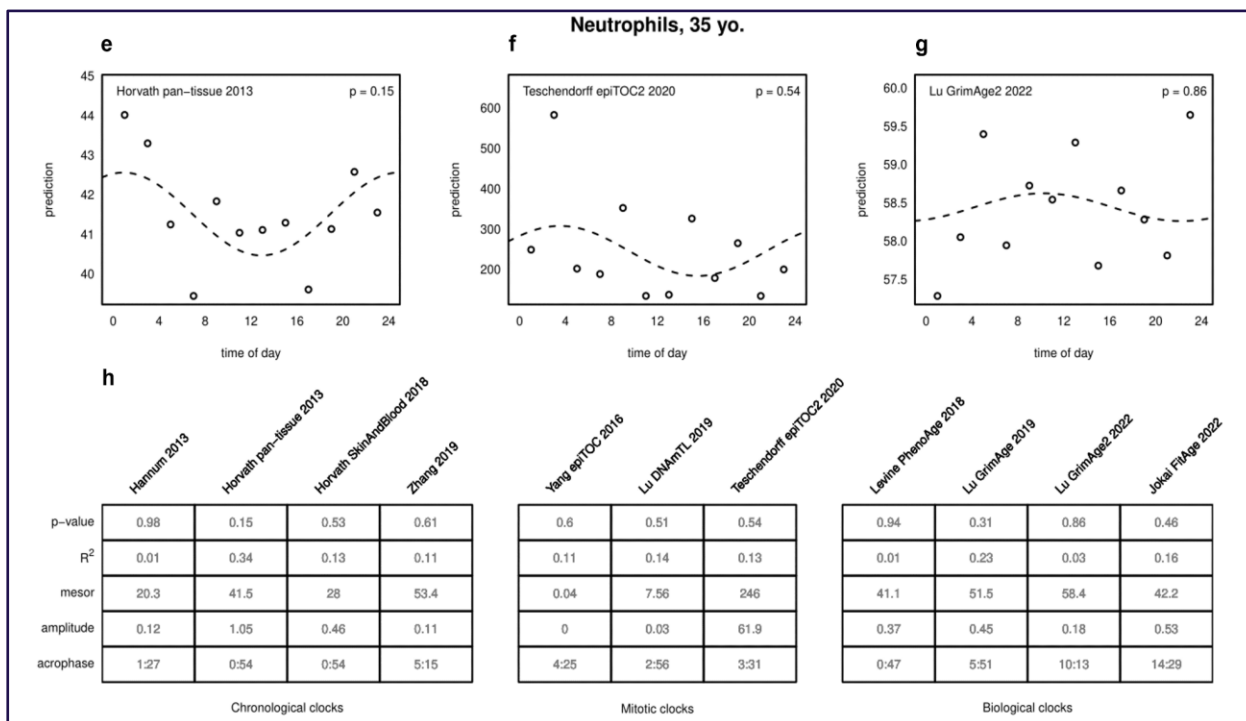
3.3 Epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų variabilumas išgrynintų kraujo ląstelių mėginiuose

Siekiant geriau suprasti, ar epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų osciliacijas WBC-neu mėginiuose sukėlė nustatyta skirtingų ląstelių tipų proporcijų kaita, nuspręsta išanalizuoti išgrynintų ląstelių mėginius. Tiriant tokius mėginius išvengiama ląstelių tipų proporcijų kaitos, kadangi analizuojamas specifinis ląstelių tipas buvo išgrynintas dviem metodais - MACS ir FACS (fluorescencija aktyvuotas ląstelių sortiravimas) po kurių mėginiuose nebelieka kitų ląstelių tipų priemaišų. Pasirinkta įvertinti epigenetinių laikrodžių pateikiamus rezultatus neutrofiluose ir T ląstelėse, kadangi tai yra dvi didžiausios kraujo ląstelių populiacijos (1 Priedas). Atlikta tokia pati osciliacijų paieškos analizė kaip ir WBC-neu mėginių atveju, tačiau negauti rezultatai šioms epigenetiniams laikrodžiams: Weidner 2014, Lin 2016, Vidal-Bralo 2016, Youn MiAge 2018,

Zhang mortality-risk 2017, Beisky DunedinPACE 2022. Iš viso išanalizuoti 3-jų asmenų mėginiai. 2-jų asmenų mėginiai buvo surinkti kas 2 val., 24 val., eigoje, viso 12-a mėginių. Iš vieno 52-ejų metų asmens gautos T ląstelės, o iš kito 35-ių metų asmens - neutrofilai. Trečiojo, 54-ių metų asmens, mėginiai buvo surinkti kas 3 val., 24 val., eigoje, viso 8-i mėginiai, tačiau iš šio asmens buvo gauti abu ląstelių tipai tuo pačiu metu.

Išanalizavus dviejų skirtingų donorų neutrofilų mėginius surinktus kas 2 ir 3 val., 24 val., eigoje statistiškai reikšmingų osciliacijų nebuvo rasta nei vieno tirto epigenetinio laikrodžio rezultatuose (3.3 Pav.). Vienitelis laikrodis, kurio rezultatai beveik pasiekė patikimumo ribą buvo Horwath Pan-tissue 2013 ($p = 0,064$ kas 3 val., ir $p = 0,15$ kas 2 val.). Tokios pačios rezultatų tendencijos buvo nustatytos abiem asmenims.

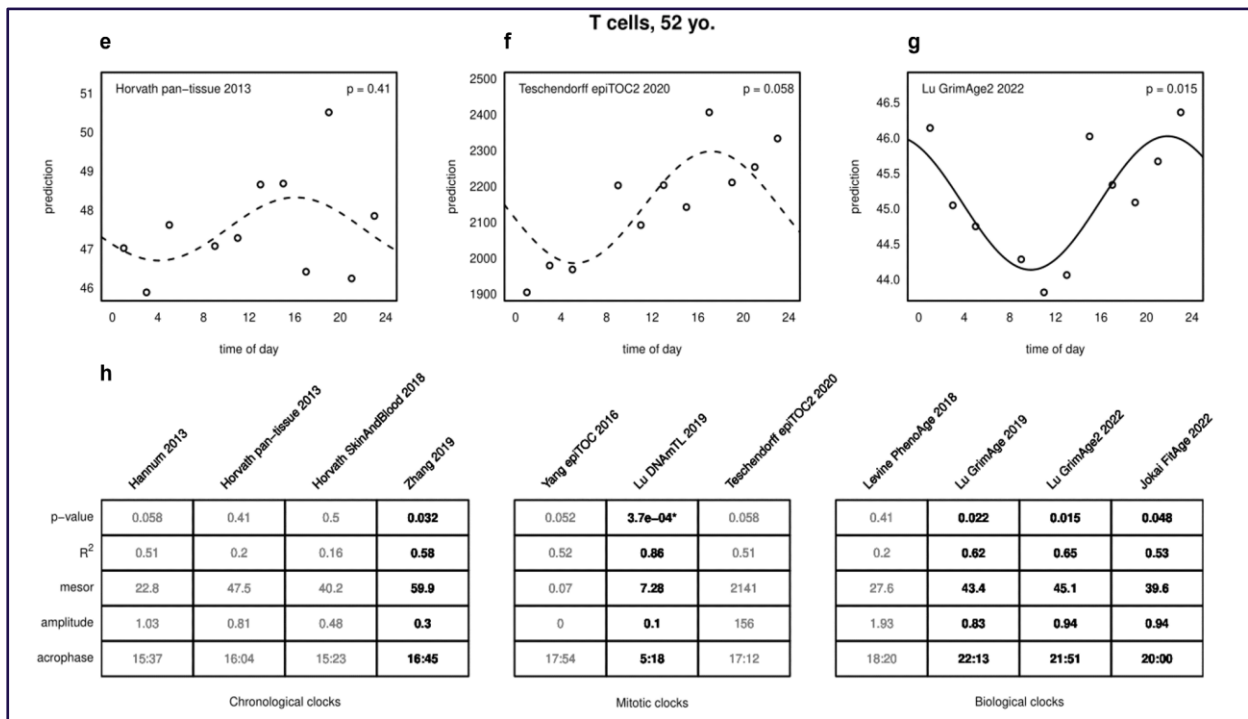




3.3 Pav. Įvairių chronologinių, mitozinių ir biologinių epigenetinių laikrodžių skirtingu paros metu pateikiamų rezultatų osciliacijų analizė MACS ir FACS metodais grynintuose neutrofilų mėginiuose. Horwath pan-tissue 2013 (A), Teschendorff epiTOC2 2020 (B) ir Lu GrimAge2 2022 (C) laikrodžių rezultatų osciliacijos kreivės neutrofilų mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių metų individo. Horwath pan-tissue 2013 (E), Teschendorff epiTOC2 2020 (F) ir Lu GrimAge2 2022 (G) laikrodžių rezultatų osciliacijos kreivės neutrofilų mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 35-ių metų individo. X ašis - paros laikas, Y ašis - laikrodžio pateiktas spėjimas. (D, H) Visų tirtų laikrodžių osciliacijų parametrai.

T lentelių atveju, nustatyta, kad 8-ių iš tirtų 11-os epigenetinių laikrodžių rezultatai statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) osciliuoja paros eigoje (3.4 Pav.). Mėginiuose, surinktuose kas 3 val., osciliavo Hannum 2013 ($p = 0,043$), Horwath Pan-tissue 2013 ($p = 0,043$) ir Horwath Skin and Blood 2018 ($p = 0,014$) laikrodžių rezultatai (3.4 Pav., A-D). Visi šie laikrodžiai pateikia spėjimus apie asmens chronologinį amžių, tačiau nei vieno iš jų osciliacijos neiškilo statistiškai reikšmingos po daugybinio testavimo korekcijos. Tikėtina, jog siekiant pagerinti tyrimo informatyvumą, mėginius reikėtų rinkti dažniau nei kas 3 val. Dažnesnis mėginių rinkimas patvirtintų (osciliacijos išliktų ir po daugybinio testavimo korekcijos) arba paneigtų (osciliacijos visai išnyktų) osciliacijų buvimą laikrodžio rezultatuose.

Rezultatai, gauti iš mėginių, surinktų kas 2 val., atskleidė kitokias tendencijas palyginus su mėginiais, surinktais kas 3 val. Laikrodžių rezultatai rodė osciliacijas kas 3 val., tapo statistiškai nereikšmingi mėginius surinkus didesniu dažniu (3.4 Pav. E-H). Iš laikrodžių, nustatančių asmens chronologinį amžių, tik Zhang 2019 laikrodžio rezultatai statistiškai reikšmingai osciliavo paros

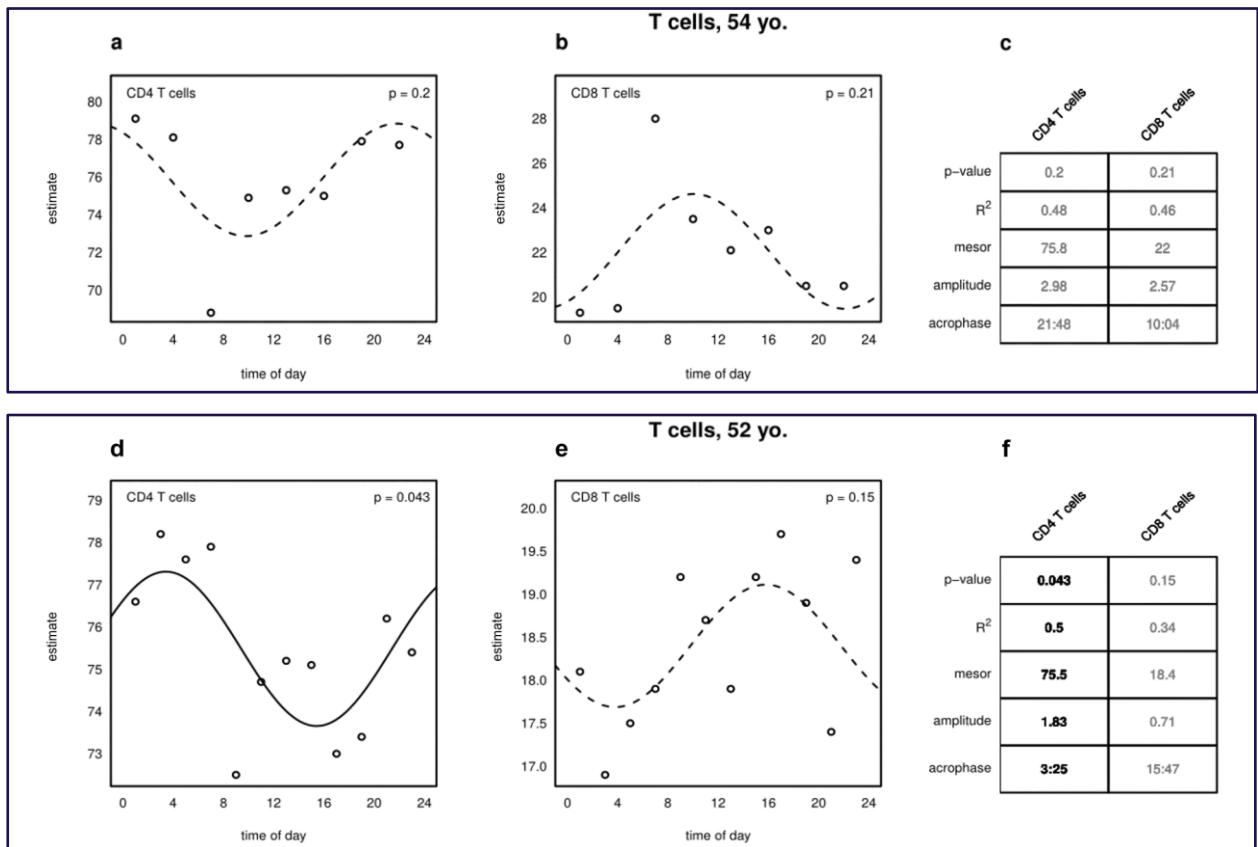


3.4 Pav. Įvairių chronologinių, mitozinių ir biologinių epigenetinių laikrodžių skirtingu paros metu pateikiamų rezultatų osciliacijų analizė MACS ir FACS metodais grynintuose T ląstelių mėginiuose. Horvath pan-tissue 2013 (A), Teschendorff epiTOC2 2020 (B) ir Lu GrimAge2 2022 (C) laikrodžių rezultatų osciliacijos kreivės T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių metų individo. Horvath pan-tissue 2013 (E), Teschendorff epiTOC2 2020 (F) ir Lu GrimAge2 2022 (G) laikrodžių rezultatų osciliacijos kreivės T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 52-ųjų metų individo. X ašis - paros laikas, Y ašis - laikrodžio pateiktas spėjimas. Vientisa kreivė žymi statistiškai reikšmingą rezultatų osciliaciją. (D, H) Visų tirtų laikrodžių osciliacijų parametrai. Paryškinta spalva pažymėti laikrodžiai, kurių osciliacijos buvo statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$), pridėtas * ženklas nurodo statistiškai reikšmingų osciliacijų išlikimą po daugybinio testavimo korekcijos Bonferroni metodu.

3.4 Ląstelių subtipų skaičiaus variabilumas išgrynintų T ląstelių mėginiuose

8-ių epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų osciliacijos išliko T ląstelių mėginiuose net ir po kitų ląstelių tipų pašalinimo. Dėl šios priežasties, tėkmės citometrijos metodu buvo įvertintos CD4 ir CD8 T ląstelių proporcijos bendruose T ląstelių mėginiuose. Abiejų tirtų individų atveju, daugiau negu du trečdalius visų T ląstelių sudarė CD4 T ląstelės ir mažiau negu vieną trečdalį - CD8 T ląstelės (3.5 Pav.). Atlikus ląstelių proporcijų osciliacijų analizę, nustatyta, kad mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 24 val., eigoje CD4 ir CD8 T ląstelių proporcijos statistiškai reikšmingai nesvyravo (3.5 Pav. A - C). Visgi, mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje CD4 T ląstelių proporcija statistiškai reikšmingai osciliavo 24 val., periodu ($p = 0,043$), bet CD8 T ląstelių - ne (3.5 Pav. D - F). Skirtumas tarp mažiausio ir didžiausio CD4 T ląstelių skaičiaus 24

val., eigoje buvo 3,66%. Ištyrus T ląstelių mėginius, nustatyta, kad CD4, bet ne CD8 T ląstelių proporcija osciliuoja paros eigoje.

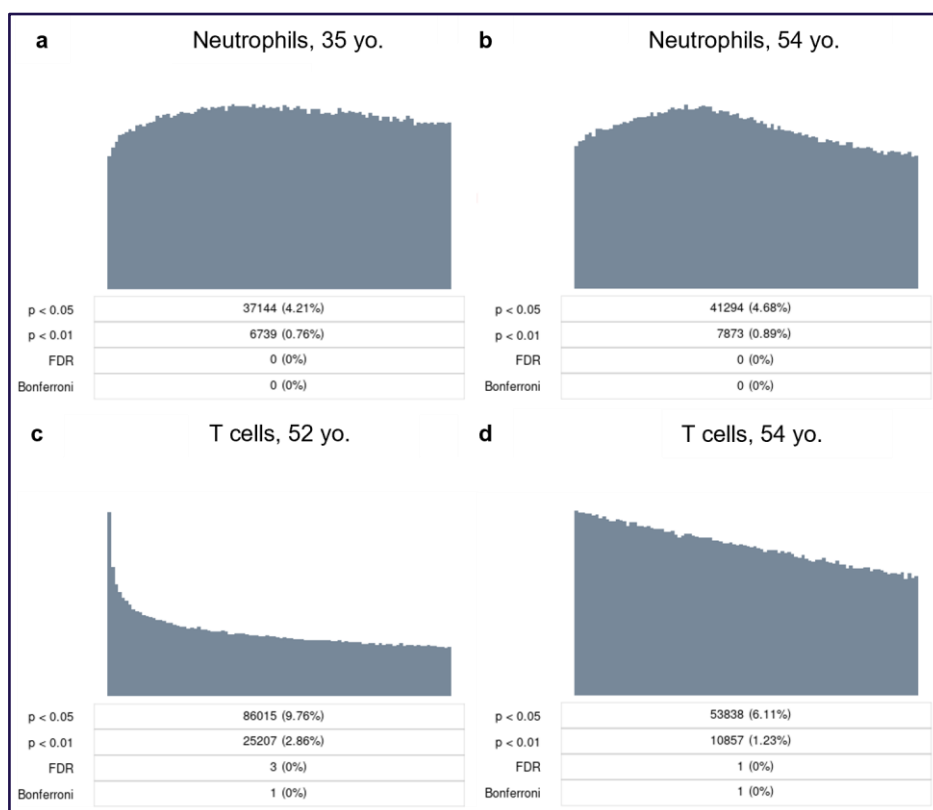


3.5 Pav. CD4 ir CD8 T ląstelių proporcijų osciliacijos analizė MACS ir FACS metodais grynintose T ląstelėse. CD4 (A) ir CD8 (B) T ląstelių skaičiaus osciliacijos kreivės T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių metų individo. CD4 (D) ir CD8 (E) T ląstelių skaičiaus osciliacijos kreivės T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 52-ejų metų individo. X ašis - paros laikas, Y ašis - tėkmės citometrijos metodu įvertinta CD4 / CD8 T ląstelių tipų proporcija mėginyje. (C, F) Ląstelių proporcijų osciliacijų parametrai. Paryškinta spalva pažymėtas ląstelių tipas, kurio osciliacijos buvo statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$).

3.5 Citozinų modifikacijos lygio variabilumas išgrynintų kraujo ląstelių mėginiuose

Kaip minėta, dalies epigenetinių laikrodžių pateikiamų rezultatų osciliacijos išliko net ir po kitų ląstelių tipų pašalinimo. Todėl be ląstelių subtipų proporcijų kaitos, siekta išanalizuoti ir DNR modifikacijos lygio kaitą paros eigoje. Visų pirma patikrinta, ar tirtų išgrynintų ląstelių genome randama citozinų, kurių modifikacijos lygis keistųsi - osciliuotų - 24 val., periodu. Tokių citozinų buvo rasta visuose trijuose induviduose, T ląstelėse ir neutrofiluose (3.6 Pav.). Neutrofilų mėginiuose, surinktuose tiek kas 2, tiek kas 3 valandas, statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) osciliuojančių modifikuotų citozinų rasta iki 5% (37 144 ir 41 294 citozinai atitinkamai). T ląstelių

atveju, individe, kurio kraujo mėginiai buvo surinkti kas 3 val., rasta ~6% (53 838) osciliuojančių modifikuotų citozinų ir šis skaičius padidėjo iki ~10% (86 015) mėginius surinkus didesniu dažniu - kas 2 val. Po daugybinio testavimo korekcijos statistiškai reikšmingai osciliuojančių modifikuotų citozinų neliko visuose duomenų rinkiniuose. Kiekvieno asmens 10-ies labiausiai osciliuojančių modifikuotų citozinų rinkiniai buvo unikalūs, sutampančių citozinų nerasta tiek tarp skirtingų donorų tiek tarp skirtingų ląstelių tipų (2, 3 Priedas).



3.6 Pav. Citozinų modifikacijos osciliacijų analizės p verčių dažnio histogramos. p verčių dažnio histogramos neutrofilų mėginiams, surinktiems kas 2 val., 24 val., eigoje iš 35-ių metų individo (A) ir mėginiams, surinktiems kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių (B) metų individo. p verčių dažnio histogramos T ląstelių mėginiams, surinktiems kas 2 val., 24 val., eigoje iš 52-ųjų metų individo (C) ir mėginiams, surinktiems kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių (D) metų individo. X ašis - p vertė nuo 0 iki 1, Y ašis - specifinio dydžio p vertės dažnis.

Parodžius, kad nedidelės dalies citozinų modifikacijai būdinga kaita paros eigoje, svarbu patikrinti ar epigenetiniai laikrodžiai amžiaus spėjimo sudarymui naudoja citozinius, kuriems būdinga minėta kaita. Iš visų ištirtų citozinų pirmiausia buvo atrinkti tie, kurių modifikacijos lygis yra naudojamas konkretaus epigenetinio laikrodžio spėjimams sudaryti. Po to patikrinta, ar tarp tų citozinų yra tokių, kurių modifikacijos lygis osciliuotų paros eigoje. Neutrofilų atveju vidutiniškai 4% ir 4,6% įvairių laikrodžių naudojamiems citozinams būdingos statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$) modifikacijos osciliacijos mėginiuose surinktuose kas 2 ir 3 val., atitinkamai (3.7 Pav.).

Vidutiniškai didžiausią osciliuojančių modifikuotų citozinių skaičių - 5% - naudoja Zhang 2019 laikrodis. Mažiausias osciliuojančių modifikuotų citozinių skaičius - 4% - rastas keturiuose laikrodžiuose: Horvath Pan-tissue 2013, Yang epiTOC 2016, Teschendorff epiTOC2 2020 ir Lu DNAmTL 2019. T ląstelių atžvilgiu vidutiniškai 8,1% ir 7,3% modifikuotų citozinių, naudojamų laikrodžių spėjimų apskaičiavimui, statistiškai reikšmingai osciliavo mėginiuose surinktuose kas 2 ir 3 val., atitinkamai (3.7 Pav.). Vidutiniškai didžiausią osciliuojančių modifikuotų citozinių skaičių - 14% - naudoja Lu DNAmTL 2019 laikrodis, o mažiausią - 5% - Yang epiTOC 2016. Apibendrinus, visų tirtų individų ir ląstelių tipų genomuose rasta citozinių, kurių modifikacija statistiškai reikšmingai osciliuoja paros eigoje ir dalis šių citozinių patenka tarp tų, kurie yra naudojami epigenetinio laikrodžio spėjimui sukurti.

	Horvath pan-tissue	Horvath skin and blood	Zhang	epiTOC	epiTOC2	DNAmTL	PhenoAge
Tcell 2h 52 yo. ind.	14 / 353 4%	36 / 391 10%	45 / 514 9%	14 / 385 4%	11 / 163 7%	19 / 140 17%	32 / 513 6%
Tcell 3h 54 yo. ind.	29 / 353 9%	19 / 391 5%	35 / 514 7%	22 / 385 6%	11 / 163 7%	12 / 140 11%	28 / 513 6%
Neutrophil 2h 35 yo. ind.	17 / 353 5%	12 / 391 3%	20 / 514 4%	13 / 385 4%	5 / 163 3%	4 / 140 4%	27 / 513 5%
Neutrophil 3h 54 yo. ind.	10 / 353 3%	22 / 391 6%	28 / 514 6%	14 / 385 4%	8 / 163 5%	4 / 140 4%	22 / 513 4%

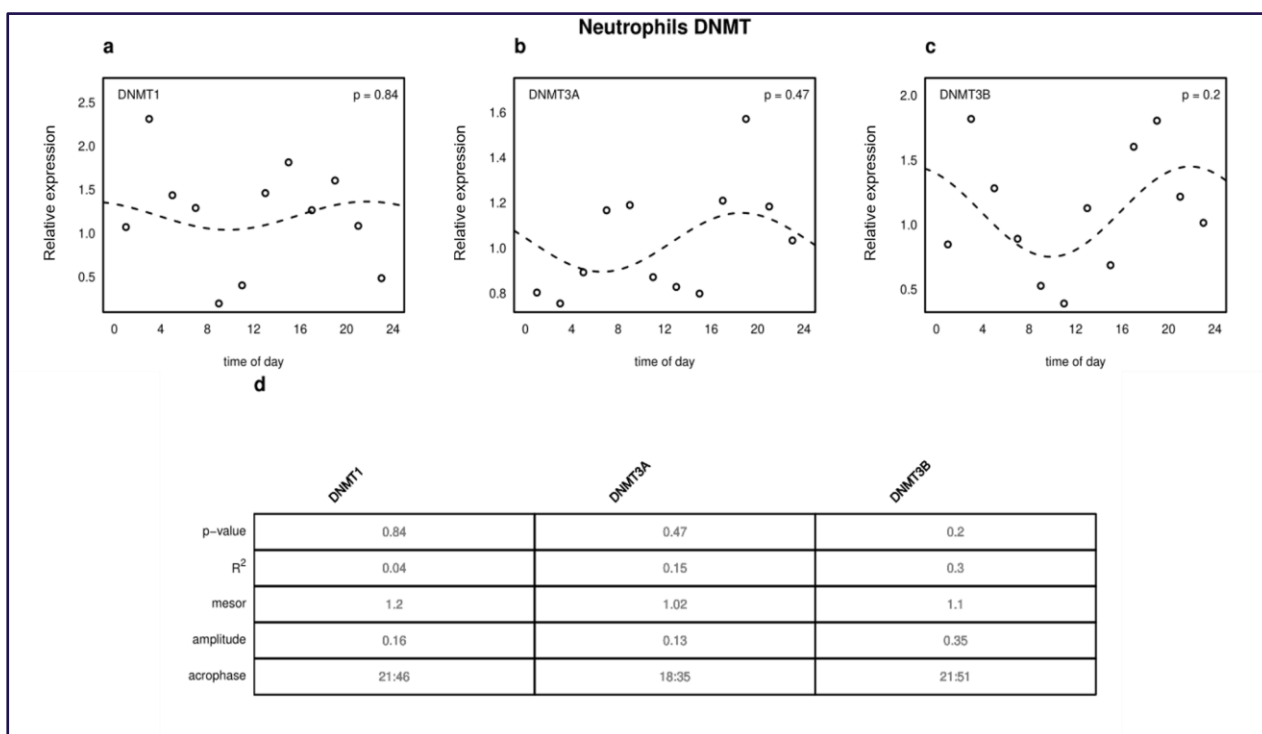
3.7 Pav. Osciliuojančių modifikuotų citozinių skaičius naudojamas skirtinguose epigenetiniuose laikrodžiuose. Kiekvienas stulpelis žymi skirtingą epigenetinį laikrodį, o eilutė - skirtingą donorą ir ląstelių tipą. Eilutės ir stulpelio sankirtoje nurodytas statistiškai reikšmingai osciliuojančių modifikuotų citozinių skaičius iš visų to laikrodžio naudojamų citozinių ir išraiška procentais. Tamsėjanti spalva žymi didėjanti osciliuojančių modifikuotų citozinių skaičių.

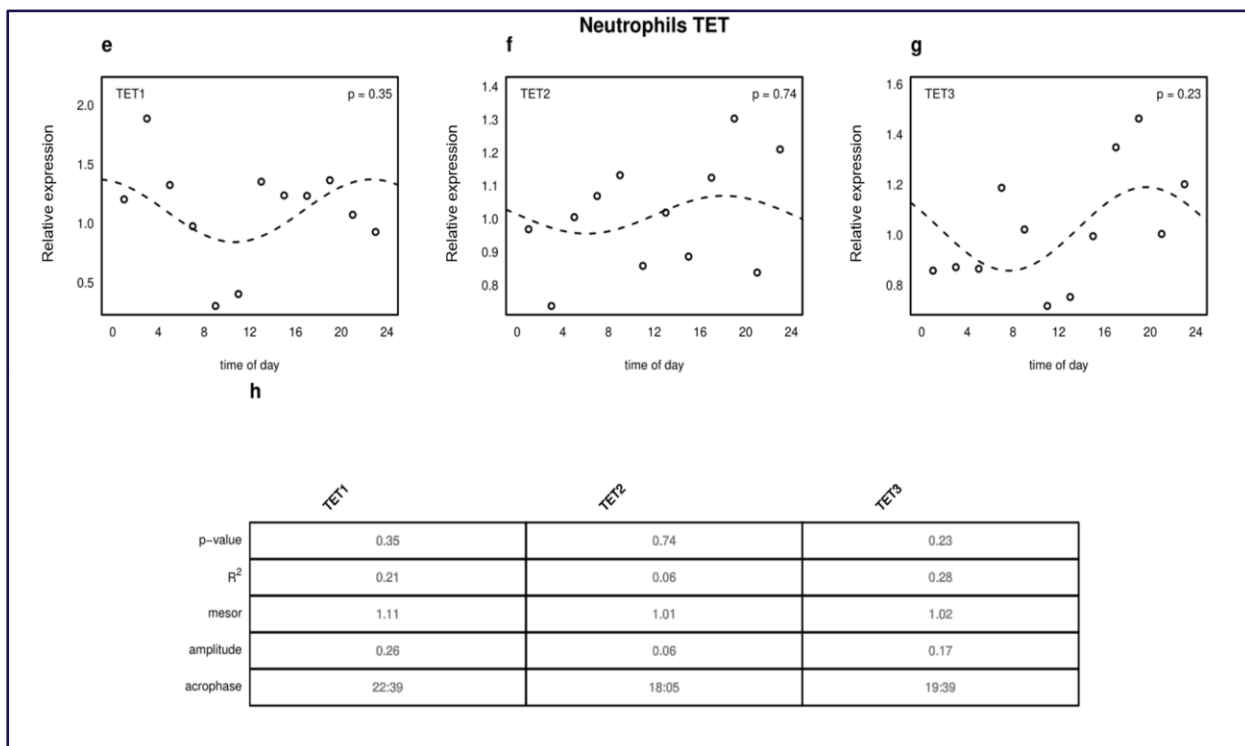
3.6 DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų lygio variabilumas išgrynintų kraujo ląstelių mėginiuose

Kadangi skirtingi epigenetiniai laikrodžiai vidutiniškai naudoja iki 10% ir 5% osciliuojančių modifikuotų citozinių T ląstelėse ir neutrofiluose atitinkamai, svarbu geriau suprasti, kas galėtų sukelti tokią modifikacijos lygio kaitą. Viena galimų priežasčių - DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų kiekio kaita ląstelėse paros eigoje. Siekiant atsakyti į šį klausimą atlikta realaus laiko PGR reakcija ir įvertintas DNR metiltransferazių (DNMT) ir Tet

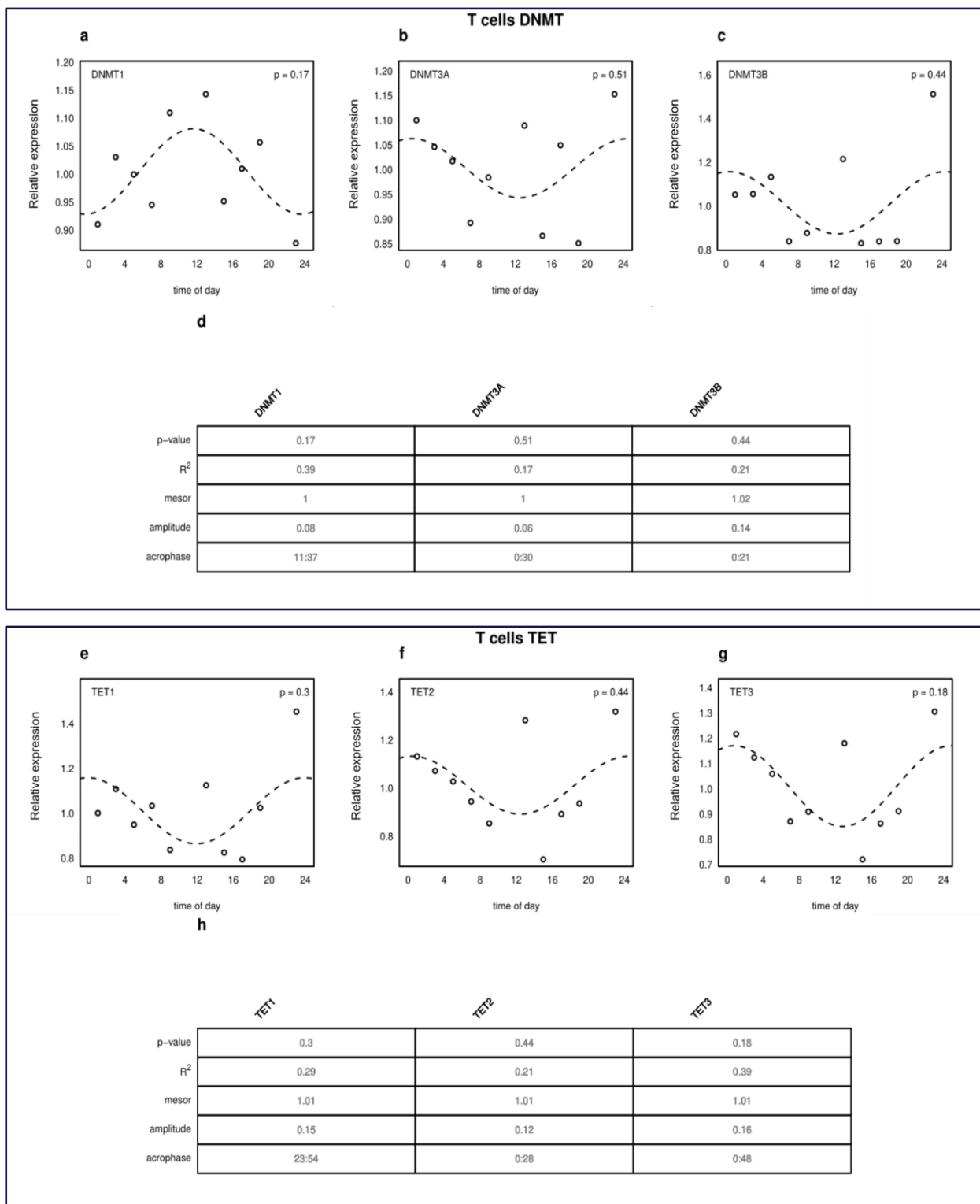
metilcitozino dioksigenazių (TET) šeimų genų transkriptų kiekis ląstelėse skirtingu paros laiku. Atliekant šį eksperimentą buvo naudoti neutrofilai ir T ląstelės gautos iš 32-ejų ir 24-ių metų individų atitinkamai, visos reakcijos atliktos triplikatais.

Neutrofilų atveju, vidutinis ciklas, reikalingas pasiekti transkripto detekcijos limitą *DNMT1* buvo 29.77, *DNMT3A* - 25.23, *DNMT3B* - 33.66, *TET1* - 33.01, *TET2* - 22.37, *TET3* - 23.21 ir *TBCB* (kontrolinis pastovios raiškos genas) - 25.88. T ląstelių atveju: *DNMT1* - 25.49, *DNMT3A* - 25.52, *DNMT3B* - 31.82, *TET1* - 28.67, *TET2* - 27.64, *TET3* - 26.08 ir *TBP* (kontrolinis pastovios raiškos genas) - 26.21. Atlikus analizę, skirtą įvertinti, ar transkripto kiekis osciliuoja paros eigoje, nustatyta, kad visų genų atveju tiek T ląstelėse tiek neutrofiluose transkripto kiekio svyravimai yra nereikšmingi (3.8 ir 3.9 Pav.). Apibendrinus, ištyrus 6-ių genų, svarbių modifikacijos reguliacijai ląstelėse, transkriptų kiekio kaitą paros eigoje, osciliacijos nebuvo aptiktos.





3.8 Pav. Įvairių genų transkriptų kiekio kaitos analizė neutrofiluose paros eigoje. DNMT1 (A), DNMT3A (B), DNMT3B (C), TET1 (E), TET2 (F), TET3 (G) genų transkriptų kiekio osciliacijos kreivės neutrofilų mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 32-ejų metų individo. X ašis - paros laikas, Y ašis - santykinė geno raiška. (D, H) Visų tirtų genų osciliacijų parametrai.



3.9 Pav. Įvairių genų transkriptų kiekio kaitos analizė T ląstelėse paros eigoje. DNMT1 (A), DNMT3A (B), DNMT3B (C), TET1 (E), TET2 (F), TET3 (G) genų transkriptų kiekio osciliacijos kreivės T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 24-ių metų individo. X ašis - paros laikas, Y ašis - santykinė geno raiška. (D, H) Visų tirtų genų osciliacijų parametrai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 Epigenetinių laikrodžių rezultatai priklauso nuo paros laiko

Šio darbo metu siekta ištirti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatai yra paveikiami išorinio ir/ar vidinio variabilumo sukeltos citozinų modifikacijos lygio kaitos 24 val., eigoje. Išorinis variabilumas apibrėžiamas kaip skirtingų kraujo ląstelių tipų proporcijų kaita kraujyje paros eigoje. Tuo tarpu vidinis variabilumas tai citozinų modifikacijos lygio kaita paros eigoje. Tiek išorinis tiek vidinis variabilumas gali daryti įtaką epigenetinių laikrodžių rezultatams, todėl svarbu geriau suprasti šios įtakos pasekmes ir priežastis. Atsakant į iškeltą klausimą, būtina tirti ne pavienius, o daugkartinius kraujo mėginius, surinktus iš to paties asmens. Dėl šios priežasties, darbo metu buvo pasirinkta išanalizuoti nedidelį skaičių individų, tačiau surenkant jų kraujo mėginius 24 - 72 val., eigoje kas 2 arba 3 valandas. Kraujas pasirinktas kaip pagrindinis tyrimo objektas, kadangi tai nesudėtingai gaunamas biologinis mėginys iš kiekvieno žmogaus, beto, dauguma epigenetinių laikrodžių yra kuriami ir pritaikyti kraujo mėginių analizei.

Visų pirma išanalizuoti WBC-neu mėginiai surinkti iš vieno asmens kas 3 valandas 72 val., eigoje. Tokia kraujo surinkimo schema leidžia ištirti, ar epigenetinių laikrodžių rezultatai svyruoja tos pačios paros eigoje. Esant pateikiamų rezultatų variacijai patikrinama ar ji yra ritminga - grįžta į pradžios tašką po tam tikro periodo, ir atitinka kosinuso kreivę (Doyle et al., 2022). Jei taip, tuomet tokia variacija nėra atsitiktinė ir yra laikoma osciliacija. Po analizės paaiškėjo, kad 13-os iš 17-os tirtų epigenetinių laikrodžių rezultatai osciluoja 24 val., periodu (3.1 Pav.). 8-ių laikrodžių rezultatų osciliacijos išliko statistškai reikšmingos ir po Bonferroni daugybinio testavimo korekcijos. Visų tirtų chronologinių ir biologinių laikrodžių reikšmės pasiekdavo didžiausią amžių dienos viduryje, o mažiausią - naktį. Laikrodis, įvertinantis telomerų ilgį - Lu DNAmTL 2019 taip pat osciliavo ir pateikdavo didžiausią telomerų ilgį nakties metu, kai asmens epigenetinis amžius buvo jauniausias pagal kitus laikrodžius. Tiksliausiai chronologinį amžių nurodydavo neosciliuojantis Vidal-Bravo 2016 laikrodis: vidutiniškai pateikdavo 51,5 metų amžių, kai tikrasis amžius yra 52 metai. Iš osciliuojančių - Horwath Skin and blood 2018, kuris vidutiniškai nurodydavo 51-ius metus. Labiausiai nuo tikro amžiaus nutolusius spėjimus pateikdavo Zhang 2019 (vidutiniškai 63,4 metai) ir Weidner 2014 (vidutiniškai 44,5 metai) laikrodžiai. Panašios osciliacijų tendencijos buvo pastebėtos ir epigenetinių laikrodžių, sukurtų remiantis principinėmis komponentėmis, rezultatuose. Iš 6-ių laikrodžių, 5-ių pateikiami rezultatai osciliavo (Koncėvičius et al., 2024). Taigi, parodyta, kad didžiosios dalies epigenetinių laikrodžių rezultatai osciluoja ir yra priklausomi nuo paros laiko. Panaši nepastovumo tendencija pastebėta tiriant metilinio gardelėse esančių zondų pateikiamų rezultatų variaciją laike. Išmatavus to paties asmens kraujo mėginius, surinktus tą pačią dieną, bet 75 ir 135 min., laiko intervalu, modifikacijos lygis

nesiskyrė, tačiau tarp surinktų mėginių padidinus laiko intervalą iki 285 min., pastebėta, kad gaunami modifikacijos lygio rezultatai tampa statistiškai reikšmingai skirtingi (Apsley et al., 2023). Papildomai buvo palygintas epigenetinis amžius tarp mėginių surinktų 12:45 val., ir 16:15 val., Apsley et al. 2023 tyrime (Koncėvičius et al., 2024). Pasirinkti 12:45 val., mėginiai, kadangi tai laikas, panašiausias į WBC-neu mėginiuose identifikuotos akrofazės laiką, ir 16:15 val., kadangi tai tolimiausias taškas nuo 12:45 val. Palyginus šių mėginių epigenetinį amžių, nustatytas statistiškai reikšmingas amžiaus skirtumas 9-ių iš tirtų 17-os epigenetinių laikrodžių atveju (*ibid.*). Vėlesniu dienos laiku laikrodžiai pateikė mažesnį epigenetinį amžių, tad statistiškai reikšmingai skiriasi ne tik modifikacijos lygis, bet ir apskaičiuotas epigenetinis amžius. Galiausiai, epigenetinio amžiaus skirtumai identifikuoti ir tarp mėginių surinktų vienos dienos intervalu monocitų bei PBMC (angl., peripheral blood mononuclear cells) mėginių atvejais (Komaki et al., 2022). Vidutinis epigenetinio amžiaus skirtumas tarp dviejų dienų Horwath pan-tissue 2013, Horwath skin and blood 2018 ir Levine PhenoAge 2018 laikrodžių atžvilgiais buvo 3,6 metai PBMC atveju ir 4,3 metai monocitų atveju (*ibid.*). Tai parodo, kad epigenetinio amžiaus kaita paros eigoje būdinga įvairaus tipo mėginiams ir tyrimams. Identifikuota variacija tarp pateikiamų laikrodžių rezultatų dienos eigoje gali mažinti tyrimų informatyvumą. Pavyzdžiui, tiriant jaunas asmenis su didele šeimos rizika šizofrenijai ar bipoliniam sutrikimui parodytas statistiškai reikšmingas Horwath Pan-tissue 2013 ir Hannum 2013 laikrodžių epigenetinio amžiaus skirtumas palyginus su kontroliniais asmenimis (Segura et al., 2023). Minėtas amžiaus skirtumas tarp tirtų grupių tėra ~1-eri metai, tuo tarpu skirtumas tarp didžiausio ir mažiausio to paties asmens amžiaus paros eigoje abiejų laikrodžių atžvilgiu yra 3,24 ir 3,9 metai. Taigi, skirtumas pastebėtas tarp grupių yra mažesnis negu paties laikrodžio rezultatų variacija 24 val., eigoje. Neatsižvelgus, kad epigenetinis amžius kinta, kelios tiriamosios grupės gali pasirodyti besiskiriančios, nors iš tiesų mėginiai tose grupėse buvo surinkti skirtingu paros metu. Pavyzdžiui, kontrolinių asmenų mėginius surinkus vėliau negu sergančiųjų - ligos paveikti asmenys pasirodytų senesni, o surinkus atvirkščiai - kad jie jaunesni nors iš tiesų biologinio skirtumo tarp jų nėra arba jis yra mažesnis. Dėl šios priežasties, atliekant DNR modifikacijos analizės tyrimus, reikėtų užtikrinti nekintantį kraujo surinkimo laiką iš visų dalyvių arba atsižvelgti į laiką duomenų analizės metu. Kraujo mėginių rinkimo laiko suvienodinimas užtikrintų tikslesnių rezultatų gavimą bei, tikėtina, prisidėtų prie rezultatų atkartojamumo gerinimo.

4.2 Išorinio variabilumo įtaka epigenetinių laikrodžių rezultatams

Epigenetinių laikrodžių rezultatų osciliacijos pirmiausiai pastebėtos WBC-neu mėginiuose. Šiuose mėginiuose didžioji dalis (80-90%) neutrofilų yra pašalinta, todėl jie visapusiškai neatstoja kraujo mėginių (1 Priedas). Tačiau, epigenetinių laikrodžių tyrimuose yra

naudojami ne tik visuminio kraujo, bet ir vienbranduolių kraujo ląstelių - PBMC frakcija, kurios sudėtyje taip pat nėra neutrofilų (D. He et al., 2019). Taigi, WBC-neu frakcija atkartoja mėginius naudojamus epigenetinių laikrodžių tyrimuose. Minėtuose WBC-neu mėginiuose yra išlikę visi skirtingi kraujo ląstelių tipai (1 Priedas). Dėl šios priežasties, vienas galimų epigenetinių laikrodžių rezultatų osciliacijos paaiškinimų yra skirtingų kraujo ląstelių tipų proporcijų kaita paros eigoje. Kiekvienas kraujo ląstelių tipas turi skirtingą ir tik tam tipui būdingą epigenetinį profilį (Roy et al., 2022). Taigi, jei įvairių ląstelių tipų proporcijos keičiasi paros eigoje, tuomet, kraujo mėginius ištyrus skirtingu paros metu, pamatytume citozinų modifikacijos lygio skirtumus. Tai reikštų, kad epigenetinio amžiaus skirtumai yra kintančių ląstelių tipų proporcijų ir skirtingų jų epigenomų nulemtas artefaktas, kuriam epigenetiniai laikrodžiai nėra atsparūs. Skirtingų kraujo ląstelių tipų skaičių kaita 24 val., eigoje buvo parodyta visų leukocitų atžvilgiu (Aroca-Crevillén et al., 2020; Born et al., 1997). Beto, neutrofilų, B ir T ląstelių proporcijos reikšmingai skiriasi tarp sveikų ir liga (šizofrenija) paveiktų asmenų net atsižvelgus į mėginių surinkimo laiką (Hannon et al., 2021; Villar et al., 2023). Dėl šių priežasčių patikrinta ar ir WBC-neu mėginiuose skirtingų ląstelių tipų skaičiai kinta paros eigoje. Tokie kitimai buvo pastebėti, o statistiškai reikšmingai osciliavo CD4 T ląstelių, B ląstelių ir NK ląstelių proporcijos (3.2 Pav.). Šiuo atveju skirtingų ląstelių tipų proporcijos buvo gautos bioinformatinių metodų pagrindu iš DNR modifikacijos duomenų, todėl ateityje, siekiant užtikrinti rezultatų tikslumą ir patikrinti atsikartojamumą, ląstelių skaičiaus kaitą reiktų įvertinti tiesioginiu tėkmės citometrijos metodu.

Taigi, ląstelių tipų proporcijos iš tiesų keičiasi paros eigoje, tačiau tai neturėtų jokios įtakos epigenetinio laikrodžio rezultatams, jei skirtingi ląstelių tipai pateiktų tokį patį epigenetinį amžių. Visgi, jei įvairūs ląstelių tipai nurodo skirtingą epigenetinį amžių, tuomet besikeičiančios ląstelių proporcijos darys įtaką ir viso kraujo mėginio epigenetinio amžiaus rezultatui. Siekiant tai patikrinti, išanalizuoti Reinius et al 2012 ir Wang et al 2023 publikuoti duomenys. Analizė atskleidė, kad Horwath pan-tissue 2013 epigenetinio laikrodžio atžvilgiu, statistiškai reikšmingai skirtingą nuo bendro kraujo mėginio epigenetinį amžių pateikia NK ląstelės, B ląstelės ir CD4 T ląstelės (3.2 Pav.) - tie patys ląstelių tipai, kurių proporcijos osciliuoja WBC-neu mėginiuose. NK ląstelės laikrodžio atžvilgiu atrodo vyresnės, o B ir CD4 ląstelės - jaunesnės. Ši tendencija atsikartoja ir kitų epigenetinių laikrodžių atžvilgiu, beto, patvirtinta, kad didesnė NK ląstelių proporcija koreliuoja su didesniu epigenetiniu amžiumi, o didesnė B ir CD4 T ląstelių proporcija priešingai - su mažesniu amžiumi (Koncėvičius et al., 2024). Apibendrinus, epigenetinis amžius, gautas iš skirtingų pavienių ląstelių tipų, skiriasi nuo amžiaus gaunamo iš viso kraujo mėginio. Tai paaiškina, kodėl besikeičiant skirtingų ląstelių tipų proporcijoms, epigenetinio laikrodžio rezultatai osciliuoja paros eigoje. Taigi, išorinis - ląstelių skaičiaus - variabilumas daro įtaką epigenetinių laikrodžių rezultatams. Tik Vidal-Bralo 2016 ir Zhang 2019 laikrodžiai yra nurodyti

kaip atsparūs ląstelių subpopuliacijų variacijos įtakai ir ši savybė pasitvirtino WBC-neu mėginiuose - abiejų laikrodžių rezultatai neosciliavo (Vidal-Bralo et al., 2016; Q. Zhang et al., 2019).

Ląstelių proporcijų įtaką epigenetinių laikrodžių rezultatams galima patikrinti taikant statistinę korekciją analizės metu arba tiriant išgrynintus kraujo ląstelių tipus. Šio darbo metu pasirinktas pastarasis būdas ir ištirtos T ląstelės bei neutrofilai išgryninti dviem etapais: pirmiausia MACS, o po to FACS metodu. Taip sukurti mėginiai neturintys kitų kraujo ląstelių tipų priemaišų remiantis tėkmės citometrijos metodu. Nepaisant to, ateityje, šią prielaidą reiktų patvirtinti bioinformatiniais metodais. Neutrofilų mėginiuose, surinktuose iš 2-jų šizofrenija sergančių pacientų, nei vieno tikrinto epigenetinio laikrodžio rezultatai neosciliavo (3.3 Pav.). Tai įrodytų, kad prieš tai matytas epigenetinio amžiaus osciliacijas sukėlė skirtingų ląstelių tipų kintančios proporcijos - tai pašalinus, dingo rezultatų osciliacijos. Tačiau, ši tendencija neatsikartojo neutrofilų mėginiuose, surinktuose iš 3-jų kontrolinių asmenų, kadangi Yang epiTOC 2016 ir Teschendorff epiTOC2 2020 laikrodžių rezultatų osciliacijos išliko (Koncėvičius et al., 2024). Šis skirtumas gali būti nulemtas ligos, kadangi parodyta, jog šizofrenija siejama su DNR modifikacijos pakitimais kraujo mėginiuose (C. Luo et al., 2021; Wei et al., 2022). Tačiau taip pat šis skirtumas gali būti nulemtas DNR modifikacijos analizės metodo. Pacientų mėginiai analizuoti su naujausia „Human Methylation EPIC V2 BeadChip“ metilinimo gardele, o kontrolinių asmenų su senesne versija - „Human Methylation EPIC V1 BeadChip“. Dalis metilinimo analizės zondu (~13%), buvusių senesniame gardelės modelyje, yra pašalinti iš naujos gardelės, taip pat reikalinga atnaujinta duomenų normalizavimo ir apdorojimo eiga, kuri gali sukurti minimalių techninių skirtumų tarp dviejų duomenų rinkinių (Noguera-Castells et al., 2023). Tikslėsių rezultatų gavimui, šį eksperimentą reiktų atlikti suvienodinus metilinimo gardeles ir įtraukus daugiau liga paveiktų asmenų.

Priešingai nei neutrofilų atveju, išgrynintų T ląstelių mėginiuose epigenetinių laikrodžių osciliacijos išliko net pašalinus kitų ląstelių tipų priemaišas, o mitozinis Lu DNAmTL 2019 laikrodis buvo reikšmingiausiai osciliuojantis (3.4 Pav.). Viena priežastis, kodėl osciliacijos galėjo išlikti rezultatuose, tai nepakankamas ląstelių išgryninimas. T ląstelės yra heterogeniška populiacija, išskiriamos CD4 naivių ir atminties, CD8 naivių ir atminties T ląstelių ir kiti subtipai (Sauls et al., 2019). Beto šie subtipai turi jiems būdingus epigenetinius profilius (Z. Zhang et al., 2022). Tėkmės citometrijos metodu įvertinus T ląstelių subtipų (CD4 ir CD8) proporcijų kaitą paros eigoje, pastebėta, kad CD4 T ląstelių proporcija osciliuoja mėginiuose, surinktuose kas 2 val., (3.5 Pav.). Šio ląstelių tipo proporcija osciliavo ir WBC-neu mėginiuose, beto CD4 T ląstelės pateikia kitokį epigenetinį amžių palyginus su visuminiu kraujo mėginiu (3.2 Pav.). Tai parodo, kad tiriant net išgrynintų T ląstelių mėginius, subtipų proporcijų kaita bent dalinai gali daryti įtaką

epigenetinio laikrodžio rezultatams. Siekiant šią įtaką suprasti geriau, analizę reikėtų pakartoti įtraukiant daugiau skirtingų T ląstelių subtipų. Nepaisant to, T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 3 val., nei CD4 nei CD8 T ląstelių proporcijos neosciliavo, bet epigenetinių laikrodžių rezultatai - osciliavo. Beto, statistinės analizės metu atlikus ląstelių tipų korekciją, epigenetinio amžiaus osciliacijos tapo nereikšmingos WBC-neu mėginiuose, bet epigenetinio amžiaus skirtumas tarp dviejų dienos taškų keturių laikrodžių rezultatuose vis vien išliko reikšmingas Apsley et al. 2023 tyrimo duomenyse (Koncvičius et al., 2024). Kadangi T ląstelių ir kontrolinių asmenų neutrofilų mėginiuose bei publikuotuose duomenyse epigenetinio amžiaus skirtumai išliko net atsižvelgus ar panaikinus ląstelių tipų proporcijų kaitą, tikėtina, kad įtaką daro ne tik išorinė - ląstelių skaičiaus - variacija, bet ir vidinė - pavienių citozinių modifikacijos lygio kaita paros eigoje.

4.3 Vidinio variabilumo įtaka epigenetinių laikrodžių rezultatams

Siekiant įvertinti vidinės variacijos įtaką epigenetinių laikrodžių rezultatams, atlikta pavienių citozinių, kurių modifikacijos lygis osciliuoja paros eigoje, paieška išgrynintų neutrofilų ir T ląstelių mėginiuose. Tokių citozinių rasta abiejuose ląstelių tipuose (3.6 Pav.). Neutrofiluose mažiau, tik ~5%, palyginus su T ląstelėmis 6-10%. Patvirtinus, kad tokie citozinai randami, patikrinta ar jie yra naudojami skirtingų epigenetinių laikrodžių spėjimams sudaryti, kadangi tai galėtų bent dalinai lemti laikrodžių rezultatams būdingas osciliacijų tendencijas (3.7 Pav.). Neutrofilų atžvilgiu, 7-iuose tikrintuose epigenetiniuose laikrodžiuose, citozinai, kurių modifikacijos lygis osciliuoja, neviršijo 5%, taigi vidinės variacijos įtaka rezultatams yra minimali. T ląstelių atveju, tirti epigenetiniai laikrodžiai naudoja didesnę kiekį osciliuojančių modifikuotų citozinių 7-8%. Labiausiai paveikiami Horwath Skin and Blood 2018, Zhang 2019, Teschendorff *epiTOC2* 2020 laikrodžiai, o didžiausią kiekį osciliuojančių modifikuotų citozinių naudoja mitozinis Lu DNAmTL 2019 laikrodis - vidutiniškai 14%. Papildomai, visiems šiems laikrodžiams buvo būdingos epigenetinio amžiaus osciliacijos išgrynintų T ląstelių atveju. Vidinės variacijos įtaką laikrodžio spėjimams patvirtina ir tai, kad išgrynintose T ląstelėse Lu DNAmTL 2019 laikrodžio rezultatai pasižymėjo stipriausiomis osciliacijomis, kurios išliko po daugybinio testavimo korekcijos, o šis laikrodis naudoja didžiausią kiekį citozinių, kurių modifikacija osciliuoja. Tikrinant osciliuojančių modifikuotų citozinių persidengimą su specifinių laikrodžių naudojamais citoziniais, buvo patikrinti tik 7-i laikrodžiai iš 11-os, kurie buvo analizuoti išgrynintų ląstelių mėginiuose. Taip yra todėl, kad 4-ių epigenetinių laikrodžių naudojami citozinių rinkiniai nebuvo žinomi. Ateityje, kai didesnės dalies epigenetinių laikrodžių algoritmai bus pritaikyti atnaujintai metilinio gardelių versijai, analizę reikėtų pakartoti įtraukiant daugiau skirtingų laikrodžių. Taip pat, reikalingi papildomi tyrimai patvirtinantys, kad citozinai, kurių modifikacija

osciliuoja nėra kintančių ląstelių subtipų sukeltas artefaktas, ypačiai, heterogeniškų T ląstelių atveju.

Galiausiai, patikrinta ar osciliuoja DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų genų transkriptų kiekis. Pelių atveju parodyta, kad *Dnmt3a* ir *Dnmt3b* genų raiška kinta laike ir dėlto lemia DNR modifikacijos pokyčius genome (Maekawa et al., 2012; Xia et al., 2015). Visgi, žmogaus transkriptų atveju, variacija neaptikta nei neutrofilų nei T ląstelių mėginiuose nei vieno iš 6-ių tirtų genų atveju (3.8 Pav. ir 3.9 Pav.). Dėl šios priežasties, *DNMT* ir *TET* šeimos genų raiškos lygio kaita nėra citozinų modifikacijos lygio osciliacijų priežastis. Visgi, šiai išvadai patvirtinti reikėtų pakartoti eksperimentą su didesne asmenų imtimi. Beto, ne tik transkripto kiekio kaita gali sukelti oscilacijas, bet ir paties baltymo arba S-adenozilmetionino kiekio variacija paros eigoje. Dėl šios priežasties, *DNMT* ir *TET* šeimų baltymų kiekis taip pat turėtų būti įvertintas panaudojant imunoblotų metodą. Galiausiai, epigenetinių laikrodžių analizė buvo atlikta su kitų asmenų išgrynintomis ląstelėmis negu transkriptų kiekio analizė. Dėl šios priežasties ateityje tiek epigenetinių laikrodžių tiek genų raiškos analizė turėtų būti atlikta su to paties asmens mėginiais.

Šio darbo metu parodyta, kad epigenetinių laikrodžių rezultatai priklauso nuo paros laiko ir šią variaciją didžiąja dalimi paaiškina išorinis - ląstelių skaičiaus, variabilumas ir mažąja - vidinis - pavienių citozinų modifikacijos lygio kaita paros eigoje. Siekiant užtikrinti ateities tyrimų tikslumą, turi būti atsižvelgiama į ląstelių tipų proporcijas bei mėginių surinkimo laiką. Ląstelių tipų korekcija statistinės analizės metu padidintų rezultatų tikslumą, tačiau pilnai nepanaikintų variacijos, kadangi laikrodžių rezultatų kaita išliko ir išgrynintų ląstelių mėginiuose. Taip pat korekcija galima tik tais atvejais, kai mėginių skaičius yra didesnis už kintamųjų, naudojamų regresijos modelyje, skaičių (Q. Chen et al., 2016). Dėl šios priežasties į ląstelių tipų proporcijas turi būti atsižvelgiama ne tik duomenų analizės metu, bet ir kuriant epigenetinius laikrodžius. Ateityje, nauji epigenetiniai laikrodžiai turėtų būti atsparūs skirtingų ląstelių tipų įtakai ir papildomai validuojami analizuojant mėginius, surinktus tos pačios paros eigoje. Tokie epigenetiniai laikrodžiai yra kuriami, tačiau jų rezultatai dar turės būti analizuojami ateityje (Tomusiak et al., 2023).

5. IŠVADOS

Atlikto darbo metu, padarytos šios išvados:

1. Ištyrus kraujo ląstelių mišinio be neutrofilų mėginius nustatyta, kad 13-os iš 17-os skirtingų epigenetinių laikrodžių pateikiami rezultatai statistiškai reikšmingai osciliuoja 24 val., eigoje ir dėl šios priežasties priklauso nuo paros laiko.
2. Nustatyta, kad kraujo ląstelių mišinio be neutrofilų mėginiuose NK ląstelių, B ląstelių ir CD4 T ląstelių proporcijos statistiškai reikšmingai osciliuoja 24 val., eigoje ir šiems ląstelių tipams Horwath pan-tissue 2013 laikrodis pateikia skirtingą spėjimą amžių palyginus su visuminiu kraujo mėginiu.
3. Ištyrus 11-os epigenetinių laikrodžių rezultatų kaitą 24 val., eigoje išgrynintuose neutrofiluose ir T ląstelėse, statistiškai reikšmingos amžiaus spėjimų osciliacijos pastebėtos 8-ių laikrodžių rezultatuose T ląstelėse.
4. Papildomai, išanalizavus išgrynintų T ląstelių mėginius, nustatyta, kad CD4, bet ne CD8 T ląstelių proporcija statistiškai reikšmingai osciliuoja 24 val., eigoje.
5. Išgrynintuose neutrofilų ir T ląstelių mėginiuose atitinkamai rasta 4,4% ir 7,9% citozinų, kurių DNR modifikacijos lygis statistiškai reikšmingai osciliuoja 24 val., eigoje. Neutrofilų atveju vidutiniškai 4,3%, o T ląstelių - 7,7% epigenetinių laikrodžių naudojamų citozinų persidengia su tais, kurių modifikacijos lygis osciliuoja.
6. Ištyrus DNR metilinimo procesą reguliuojančių baltymų transkriptų kiekio kitimus 24 val., eigoje, statistiškai reikšmingos osciliacijos nebuvo rastos.

Asmeninio indėlio aprašas

Eksperimentinio darbo planavimas, organizavimas, mėginių surinkimas ir apdorojimas, dalis duomenų analizės, baigiamojo darbo rengimas ir aprašymas bei su tyrimu susijusių biomedicininį tyrimų etikos dokumentų kuravimas atliktas savarankiškai su darbo vadovo ir konsultanto priežiūra.

Padėkos

Nuoširdi padėka darbo ir Chronoepigenetikos laboratorijos vadovui Artūriui Petroniui už pasitikėjimą, palaikymą, patarimus ir idėjas viso darbo metu pačiais įvairiausiai klausimais. Padėka RVPL personalui - Rugilei Jurkytei, Agnei Šarskutei, Gretai Grigentytei, Monikai Jasinskaitei, Augustei Matuzaitėi - Tomkienei, Laurai Junevič, Aušrai Koter, Tatjanai Šniak ir laboratorijos kolegoms - Rokui Reventui, Laurynui Viliui, Viltei Čereškaitei, Julijai Radevičiūtei ir Martynui Želniui, be kurių pagalbos sudėtingi 24 valandų trukmės eksperimentai būtų neįmanomi. Taip pat dėkoju Vytautui Kašėtai ir Astai Lučiūnaitei už pagalbą su ląstelių sortiravimu ir tekmės citometrija bei Akhil Nair už mėginių paruošimą DNR modifikacijos analizei Kanadoje, eksperimentinio dizaino ir protokolų įžvalgas bei nesibaigiančius patarimus ir padaršimus. Galiausiai, nuoširdi padėka Karoliui Koncevičiui už pagalbą atliekant duomenų analizę, o kartu ir Algiui Kriščiūnui bei Aušrinei Šveikauskaitei už pasiruošimą padėti ir atsakyti į klausimus susijusius su duomenų analize.

Literatūros sąrašas:

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Gibbs, R. A., Hurles, M. E., & McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061–1073.
- Adams, R. L. (1995). Eukaryotic DNA methyltransferases--structure and function. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 17(2), 139–145.
- Apsley, A. T., Ye, Q., Etzel, L., Wolf, S., Hastings, W. J., Mattern, B. C., Siegel, S. R., & Shalev, I. (2023). Biological stability of DNA methylation measurements over varying intervals of time and in the presence of acute stress. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*. <https://doi.org/10.1080/15592294.2023.2230686>
- Aran, D., Toperoff, G., Rosenberg, M., & Hellman, A. (2011). Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Human Molecular Genetics*, 20(4), 670–680.
- Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y., & Shirakawa, M. (2008). Recognition of hemimethylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature*, 455(7214), 818–821.
- Aroca-Crevillén, A., Adrover, J. M., & Hidalgo, A. (2020). Circadian Features of Neutrophil Biology. *Frontiers in Immunology*, 11, 576.
- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., & Irizarry, R. A. (2014). Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*, 30(10), 1363–1369.
- Bashtrykov, P., Jankevicius, G., Smarandache, A., Jurkowska, R. Z., Ragozin, S., & Jeltsch, A. (2012). Specificity of Dnmt1 for methylation of hemimethylated CpG sites resides in its catalytic domain. *Chemistry & Biology*, 19(5), 572–578.
- Belsky, D. W., Caspi, A., Corcoran, D. L., Sugden, K., Poulton, R., Arseneault, L., Baccarelli, A., Chamarti, K., Gao, X., Hannon, E., Harrington, H. L., Houts, R., Kothari, M., Kwon, D., Mill, J., Schwartz, J., Vokonas, P., Wang, C., Williams, B. S., & Moffitt, T. E. (2022). DunedinPACE, a DNA methylation biomarker of the pace of aging. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.73420>
- Bergsma, T., & Rogaeva, E. (2020). DNA Methylation Clocks and Their Predictive Capacity for Aging Phenotypes and Healthspan. *Neuroscience Insights*, 15, 2633105520942221.
- Bernabeu, E., McCartney, D. L., Gadd, D. A., Hillary, R. F., Lu, A. T., Murphy, L., Wrobel, N., Campbell, A., Harris, S. E., Liewald, D., Hayward, C., Sudlow, C., Cox, S. R., Evans, K. L., Horvath, S., McIntosh, A. M., Robinson, M. R., Vallejos, C. A., & Marioni, R. E. (2023). Refining epigenetic prediction of chronological and biological age. *Genome Medicine*, 15(1), 12.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209–213.

- Bogdanović, O., & Veenstra, G. J. C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5), 549–565.
- Bollinger, T., Leutz, A., Leliavski, A., Skrum, L., Kovac, J., Bonacina, L., Benedict, C., Lange, T., Westermann, J., Oster, H., & Solbach, W. (2011). Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells. *PloS One*, 6(12), e29801.
- Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M., & Fehm, H. L. (1997). Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *Journal of Immunology*, 158(9), 4454–4464.
- Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 317(5845), 1760–1764.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., & Scandura, J. M. (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS One*, 6(1), e14524.
- Brown, S. A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., & Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology: CB*, 12(18), 1574–1583.
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 217, 3–27.
- Chen, Q., Nian, H., Zhu, Y., Talbot, H. K., Griffin, M. R., & Harrell, F. E., Jr. (2016). Too many covariates and too few cases? - a comparative study. *Statistics in Medicine*, 35(25), 4546–4558.
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., & Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5594–5605.
- Choi, J. D., Underkoffler, L. A., Wood, A. J., Collins, J. N., Williams, P. T., Golden, J. A., Schuster, E. F., Jr, Loomes, K. M., & Oakey, R. J. (2005). A novel variant of Inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5514–5522.
- Cooper, D. N., Mort, M., Stenson, P. D., Ball, E. V., & Chuzhanova, N. A. (2010). Methylation-mediated deamination of 5-methylcytosine appears to give rise to mutations causing human inherited disease in CpNpG trinucleotides, as well as in CpG dinucleotides. *Human Genomics*, 4(6), 406–410.
- Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology & Medical Modelling*, 11, 16.
- Coulson, R. L., Yasui, D. H., Dunaway, K. W., Laufer, B. I., Vogel Ciernia, A., Zhu, Y., Mordaunt, C. E., Totah, T. S., & LaSalle, J. M. (2018). Snord116-dependent diurnal rhythm of DNA

- methylation in mouse cortex. *Nature Communications*, 9(1), 1616.
- Davis, B. M., Chao, M. C., & Waldor, M. K. (2013). Entering the era of bacterial epigenomics with single molecule real time DNA sequencing. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 192–198.
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–1022.
- Declerck, K., & Vanden Berghe, W. (2018). Back to the future: Epigenetic clock plasticity towards healthy aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 174, 18–29.
- Delcuve, G. P., Khan, D. H., Liyanage, V. R. B., Jahan, S., Rastegar, M., Kirshenbaum, L. A., & Davie, J. R. (2016). Epigenetics: Chromatin Organization and Function. In J. Backs & T. A. McKinsey (Eds.), *Epigenetics in Cardiac Disease* (pp. 1–35). Springer International Publishing.
- de Mendoza, A., Poppe, D., Buckberry, S., Pflueger, J., Albertin, C. B., Daish, T., Bertrand, S., de la Calle-Mustienes, E., Gómez-Skarmeta, J. L., Nery, J. R., Ecker, J. R., Baer, B., Ragsdale, C. W., Grützner, F., Escriva, H., Venkatesh, B., Bogdanovic, O., & Lister, R. (2021). The emergence of the brain non-CpG methylation system in vertebrates. *Nature Ecology & Evolution*, 5(3), 369–378.
- Deniz, Ö., Frost, J. M., & Branco, M. R. (2019). Regulation of transposable elements by DNA modifications. *Nature Reviews. Genetics*, 20(7), 417–431.
- Doyle, M. M., Murphy, T. E., Miner, B., Pisani, M. A., Luszczek, E. R., & Knauert, M. P. (2022). Enhancing cosinor analysis of circadian phase markers using the gamma distribution. *Sleep Medicine*, 92, 1–3.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Carreira, L. H., Ljungdahl, L. G., Kuo, K. C., & Gehrke, C. W. (1985). DNA methylation in thermophilic bacteria: N4-methylcytosine, 5-methylcytosine, and N6-methyladenine. *Nucleic Acids Research*, 13(4), 1399–1412.
- Ehrlich, M., Wilson, G. G., Kuo, K. C., & Gehrke, C. W. (1987). N4-methylcytosine as a minor base in bacterial DNA. *Journal of Bacteriology*, 169(3), 939–943.
- Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular Cell*, 71(6), 882–895.
- Filion, G. J. P., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., & Defossez, P.-A. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), 169–181.
- Fortin, J.-P., Labbe, A., Lemire, M., Zanke, B. W., Hudson, T. J., Fertig, E. J., Greenwood, C. M., & Hansen, K. D. (2014). Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biology*, 15(12), 503.
- Galena, H. J. (1992). Complications occurring from diagnostic venipuncture. *The Journal of Family*

Practice, 34(5), 582–584.

- Gowher, H., & Jeltsch, A. (2018). Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1191–1202.
- Hannon, E., Dempster, E. L., Mansell, G., Burrage, J., Bass, N., Bohlken, M. M., Corvin, A., Curtis, C. J., Dempster, D., Di Forti, M., Dinan, T. G., Donohoe, G., Gaughran, F., Gill, M., Gillespie, A., Gunasinghe, C., Hulshoff, H. E., Hultman, C. M., Johansson, V., ... Mill, J. (2021). DNA methylation meta-analysis reveals cellular alterations in psychosis and markers of treatment-resistant schizophrenia. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.58430>
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., & Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular Cell*, 49(2), 359–367.
- Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A. K., Chang, Y., Howerton, S. B., Vertino, P. M., Zhang, X., & Cheng, X. (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Research*, 40(11), 4841–4849.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129(8), 1983–1993.
- Haus, E., & Smolensky, M. H. (1999). Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiology International*, 16(5), 581–622.
- He, D., Yang, C. X., Sahin, B., Singh, A., Shannon, C. P., Oliveria, J.-P., Gauvreau, G. M., & Tebbutt, S. J. (2019). Whole blood vs PBMC: compartmental differences in gene expression profiling exemplified in asthma. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 15, 67.
- Heiss, J. A., & Just, A. C. (2019). Improved filtering of DNA methylation microarray data by detection p values and its impact on downstream analyses. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 15.
- He, Y., & Ecker, J. R. (2015). Non-CG Methylation in the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 16, 55–77.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C.-X., Zhang, K., He, C., & Xu, G.-L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303–1307.
- Hillary, R. F., Stevenson, A. J., Cox, S. R., McCartney, D. L., Harris, S. E., Seeboth, A., Higham, J., Sproul, D., Taylor, A. M., Redmond, P., Corley, J., Pattie, A., Hernández, M. D. C. V., Muñoz-Maniega, S., Bastin, M. E., Wardlaw, J. M., Horvath, S., Ritchie, C. W., Spires-Jones, T. L., ... Marioni, R. E. (2021). An epigenetic predictor of death captures multi-modal measures of brain health. *Molecular Psychiatry*, 26(8), 3806–3816.

- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14(10), R115.
- Horvath, S., Oshima, J., Martin, G. M., Lu, A. T., Quach, A., Cohen, H., Felton, S., Matsuyama, M., Lowe, D., Kabacik, S., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Maierhofer, A., Flunkert, J., Aviv, A., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., ... Raj, K. (2018). Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging*, 10(7), 1758–1775.
- Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., Christensen, B. C., Marsit, C. J., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., & Kelsey, K. T. (2012). DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics*, 13, 86.
- Hu, C.-W., Chen, J.-L., Hsu, Y.-W., Yen, C.-C., & Chao, M.-R. (2015). Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 465(1), 39–47.
- Hudson, N. O., & Buck-Koehntop, B. A. (2018). Zinc Finger Readers of Methylated DNA. *Molecules*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102555>
- Illingworth, R. S., & Bird, A. (2009). CpG islands – “A rough guide.” *FEBS Letters*, 583. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300–1303.
- Jiménez-Ramírez, I. A., Pijeira-Fernández, G., Moreno-Cálix, D. M., & De-la-Peña, C. (2022). Same modification, different location: the mythical role of N6-adenine methylation in plant genomes. *Planta*, 256(1), 9.
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., & Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO Journal*, 32(3), 340–353.
- Karanthamalai, J., Chodon, A., Chauhan, S., & Pandi, G. (2020). DNA N6-Methyladenine Modification in Plant Genomes-A Glimpse into Emerging Epigenetic Code. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020247>
- Kinde, B., Wu, D. Y., Greenberg, M. E., & Gabel, H. W. (2016). DNA methylation in the gene body influences MeCP2-mediated gene repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(52), 15114–15119.
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472–479.
- Komaki, S., Ohmomo, H., Hachiya, T., Sutoh, Y., Ono, K., Furukawa, R., Umekage, S., Otsuka-Yamasaki, Y., Minabe, S., Takashima, A., Tanno, K., Sasaki, M., & Shimizu, A. (2022).

- Evaluation of short-term epigenetic age fluctuation. *Clinical Epigenetics*, 14(1), 76.
- Koncevičius, K., Nair, A., Šveikauskaitė, A., Šeštokaitė, A., Kazlauskaitė, A., Dulskas, A., & Petronis, A. (2024). Epigenetic age oscillates during the day. *Aging Cell*, e14170.
- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W. S. W., Sigurdsson, G., Walters, G. B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D. F., Helgason, A., Magnusson, O. T., ... Stefansson, K. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 488(7412), 471–475.
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 324(5929), 929–930.
- Kruse, K., & Jülicher, F. (2005). Oscillations in cell biology. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(1), 20–26.
- Kuznetsova, E. V., Feoktistova, N. Y., Naidenko, S. V., Surov, A. V., Tikhonova, N. B., & Kozlovskii, J. E. (2016). Seasonal Changes in Blood Cells and Biochemical Parameters in the Mongolian Hamster (*Allocricetulus curtatus*). *Izvestiia Akademii Nauk. Serii Biologicheskaiia / Rossiiskaia Akademiia Nauk*, 4, 405–411.
- Lauinger, L., & Kaiser, P. (2021). Sensing and Signaling of Methionine Metabolism. *Metabolites*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/metabo11020083>
- Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10(4), 573–591.
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915–926.
- Lightman, S. (2016). Rhythms Within Rhythms: The Importance of Oscillations for Glucocorticoid Hormones. In P. Sassone-Corsi & Y. Christen (Eds.), *A Time for Metabolism and Hormones*. Springer.
- Lin, Q., Weidner, C. I., Costa, I. G., Marioni, R. E., Ferreira, M. R. P., Deary, I. J., & Wagner, W. (2016). DNA methylation levels at individual age-associated CpG sites can be indicative for life expectancy. *Aging*, 8(2), 394–401.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., & Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322.
- Long, M. D., Smiraglia, D. J., & Campbell, M. J. (2017). The Genomic Impact of DNA CpG Methylation on Gene Expression; Relationships in Prostate Cancer. *Biomolecules*, 7(1).

- Lu, A. T., Binder, A. M., Zhang, J., Yan, Q., Reiner, A. P., Cox, S. R., Corley, J., Harris, S. E., Kuo, P.-L., Moore, A. Z., Bandinelli, S., Stewart, J. D., Wang, C., Hamlat, E. J., Epel, E. S., Schwartz, J. D., Whitsel, E. A., Correa, A., Ferrucci, L., ... Horvath, S. (2022). DNA methylation GrimAge version 2. *Aging*, 14(23), 9484–9549.
- Lu, A. T., Quach, A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., Assimes, T. L., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2019). DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*, 11(2), 303–327.
- Lu, A. T., Seeboth, A., Tsai, P.-C., Sun, D., Quach, A., Reiner, A. P., Kooperberg, C., Ferrucci, L., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Harris, S. E., Corley, J., Taylor, A., Deary, I. J., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., Assimes, T. L., Chen, W., ... Horvath, S. (2019). DNA methylation-based estimator of telomere length. *Aging*, 11(16), 5895–5923.
- Lucey, B. P., & Bateman, R. J. (2014). Amyloid- β diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging*, 35 Suppl 2, S29–S34.
- Luo, C., Pi, X., Hu, N., Wang, X., Xiao, Y., Li, S., Sweeney, J. A., Bishop, J. R., Gong, Q., Xie, D., & Lui, S. (2021). Subtypes of schizophrenia identified by multi-omic measures associated with dysregulated immune function. *Molecular Psychiatry*, 26(11), 6926–6936.
- Luo, Y., Lu, X., & Xie, H. (2014). Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. *BioMed Research International*, 2014, 784706.
- Maekawa, F., Shimba, S., Takumi, S., Sano, T., Suzuki, T., Bao, J., Ohwada, M., Ehara, T., Ogawa, Y., & Nohara, K. (2012). Diurnal expression of Dnmt3b mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, 7(9), 1046–1056.
- Margiotti, K., Monaco, F., Fabiani, M., Mesoraca, A., & Giorlandino, C. (2023). Epigenetic Clocks: In Aging-Related and Complex Diseases. *Cytogenetic and Genome Research*, 163(5-6), 247–256.
- McGreevy, K. M., Radak, Z., Torma, F., Jokai, M., Lu, A. T., Belsky, D. W., Binder, A., Marioni, R. E., Ferrucci, L., Pośpiech, E., Branicki, W., Ossowski, A., Sitek, A., Spólnicka, M., Raffield, L. M., Reiner, A. P., Cox, S., Kobor, M., Corcoran, D. L., & Horvath, S. (2023). DNAmFitAge: biological age indicator incorporating physical fitness. *Aging*, 15(10), 3904–3938.
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M., & Schübeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Molecular Cell*, 30(6), 755–766.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8905–8909.

- Nan, X., Meehan, R. R., & Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 21(21), 4886–4892.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386–389.
- Noguera-Castells, A., García-Prieto, C. A., Álvarez-Errico, D., & Esteller, M. (2023). Validation of the new EPIC DNA methylation microarray (900K EPIC v2) for high-throughput profiling of the human DNA methylome. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, 18(1), 2185742.
- Oblak, L., van der Zaag, J., Higgins-Chen, A. T., Levine, M. E., & Boks, M. P. (2021). A systematic review of biological, social and environmental factors associated with epigenetic clock acceleration. *Ageing Research Reviews*, 69, 101348.
- Oh, E. S., & Petronis, A. (2021). Origins of human disease: the chrono-epigenetic perspective. *Nature Reviews. Genetics*, 22(8), 533–546.
- Oh, G., Ebrahimi, S., Carlucci, M., Zhang, A., Nair, A., Groot, D. E., Labrie, V., Jia, P., Oh, E. S., Jeremian, R. H., Susic, M., Shrestha, T. C., Ralph, M. R., Gordevičius, J., Koncevičius, K., & Petronis, A. (2018). Cytosine modifications exhibit circadian oscillations that are involved in epigenetic diversity and aging. *Nature Communications*, 9(1), 644.
- Oh, G., Koncevičius, K., Ebrahimi, S., Carlucci, M., Groot, D. E., Nair, A., Zhang, A., Kriščiūnas, A., Oh, E. S., Labrie, V., Wong, A. H. C., Gordevičius, J., Jia, P., Susic, M., & Petronis, A. (2019). Circadian oscillations of cytosine modification in humans contribute to epigenetic variability, aging, and complex disease. *Genome Biology*, 20(1), 2.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–257.
- Oliveira, P. H. (2021). Bacterial Epigenomics: Coming of Age. *mSystems*, 6(4), e0074721.
- Petryk, N., Bultmann, S., Bartke, T., & Defossez, P.-A. (2021). Staying true to yourself: mechanisms of DNA methylation maintenance in mammals. *Nucleic Acids Research*, 49(6), 3020–3032.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., & Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Development*, 15(13), 1613–1618.
- Pushkin, A. S., Drugova, E. D., Kamshilin, S. A., Obraztsov, N. V., Polekhina, O. V., Dvoretzkaya, S. I., & Churyumova, A. I. (2017). Seasonal Oscillations in Statistical Mean Measures of Blood Composition and Blood Cell Morphology in Healthy White Rats. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 51(9), 777–782.

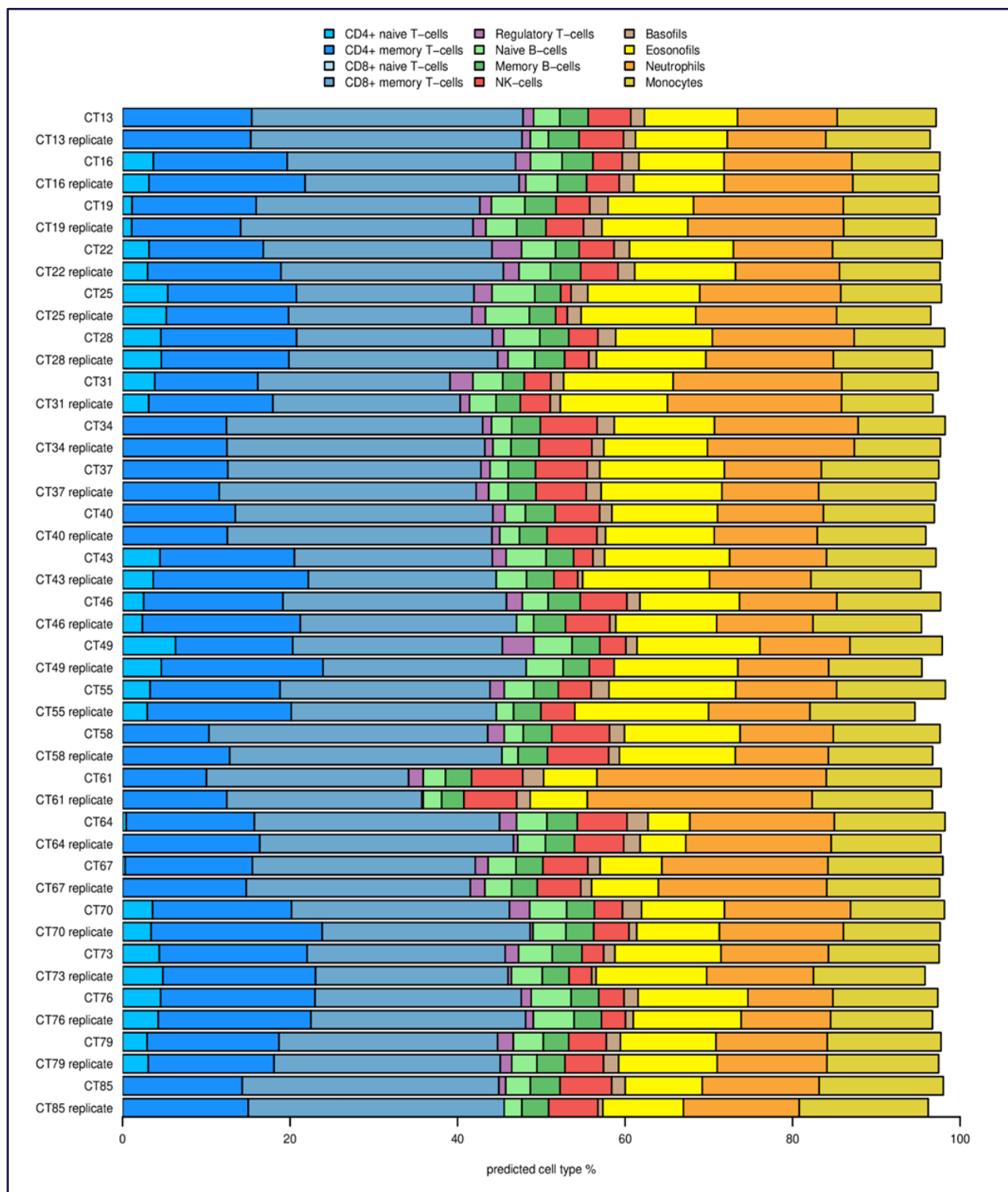
- Ramsahoye, B. H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5237–5242.
- R: Cosinor. (n.d.). Retrieved May 23, 2024, from <https://search.r-project.org/CRAN/refmans/matrixTests/html/cosinor.html>
- Reddy, S., Reddy, V., & Sharma, S. (2018). *Physiology, circadian rhythm*. <https://europepmc.org/books/nbk519507>
- Reinius, L. E., Acevedo, N., Joerink, M., Pershagen, G., Dahlén, S.-E., Greco, D., Söderhäll, C., Scheynius, A., & Kere, J. (2012). Differential DNA Methylation in Purified Human Blood Cells: Implications for Cell Lineage and Studies on Disease Susceptibility. *PLoS One*, 7(7), e41361.
- Roy, R., Ramamoorthy, S., Shapiro, B. D., Kaileh, M., Hernandez, D., Sarantopoulou, D., Arepalli, S., Boller, S. R., Singh, A., Bektas, A., Kim, J., Moore, A. Z., Tanaka, T., McKelvey, J., Zukley, L., Nguyen, C., Wallace, T., Dunn, C., Wersto, R., ... Sen, R. (2022). DNA methylation signatures reveal that distinct combinations of transcription factors specify human immune cell epigenetic identity. *Immunity*, 55(6), 1135.
- Saini, R., Jaskolski, M., & Davis, S. J. (2019). Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: structural aspects. *BMC Biology*, 17(1), 13.
- Salas, L. A., Zhang, Z., Koestler, D. C., Butler, R. A., Hansen, H. M., Molinaro, A. M., Wiencke, J. K., Kelsey, K. T., & Christensen, B. C. (2022). Enhanced cell deconvolution of peripheral blood using DNA methylation for high-resolution immune profiling. *Nature Communications*, 13(1), 761.
- Sato, T. K., Yamada, R. G., Ukai, H., Baggs, J. E., Miraglia, L. J., Kobayashi, T. J., Welsh, D. K., Kay, S. A., Ueda, H. R., & Hogenesch, J. B. (2006). Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nature Genetics*, 38(3), 312–319.
- Sauls, R. S., McCausland, C., & Taylor, B. N. (2019). *Histology, T-Cell Lymphocyte*. <https://europepmc.org/books/nbk535433>
- Scelfo, A., & Fachinetti, D. (2019). Keeping the Centromere under Control: A Promising Role for DNA Methylation. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080912>
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., & Frenette, P. S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 13(3), 190–198.
- Schulz, W. A., Steinhoff, C., & Florl, A. R. (2006). Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 310, 211–250.
- Seale, K., Horvath, S., Teschendorff, A., Eynon, N., & Voisin, S. (2022). Making sense of the

- ageing methylome. *Nature Reviews. Genetics*, 23(10), 585–605.
- Segura, A. G., de la Serna, E., Sugranyes, G., Baeza, I., Valli, I., Díaz-Caneja, C., Martín, N., Moreno, D. M., Gassó, P., Rodriguez, N., Mas, S., & Castro-Fornieles, J. (2023). Epigenetic age deceleration in youth at familial risk for schizophrenia and bipolar disorder. *Translational Psychiatry*, 13(1), 155.
- Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhang, L., Ahmed, S., Shu, J., Chen, X., Waterland, R. A., & Issa, J.-P. J. (2007). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genetics*, 3(10), 2023–2036.
- Sidhu, H., & Capalash, N. (2017). UHRF1: The key regulator of epigenetics and molecular target for cancer therapeutics. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(2), 1010428317692205.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935.
- Takahashi, J. S., Hong, H.-K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(10), 764–775.
- Tang, Y., Gao, X.-D., Wang, Y., Yuan, B.-F., & Feng, Y.-Q. (2012). Widespread existence of cytosine methylation in yeast DNA measured by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(16), 7249–7255.
- Teschendorff, A. E. (2020). A comparison of epigenetic mitotic-like clocks for cancer risk prediction. *Genome Medicine*, 12(1), 56.
- Thrush, K. L., Higgins-Chen, A. T., Liu, Z., & Levine, M. E. (2022). R methylCIPHER: A Methylation Clock Investigational Package for Hypothesis-Driven Evaluation & Research. In *bioRxiv* (p. 2022.07.13.499978). <https://doi.org/10.1101/2022.07.13.499978>
- Tomusiak, A., Floro, A., Tiwari, R., Riley, R., Matsui, H., Andrews, N., Kasler, H. G., & Verdin, E. (2023). Development of a novel epigenetic clock resistant to changes in immune cell composition. In *bioRxiv* (p. 2023.03.01.530561). <https://doi.org/10.1101/2023.03.01.530561>
- Triche, T. J., Jr, Weisenberger, D. J., Van Den Berg, D., Laird, P. W., & Siegmund, K. D. (2013). Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays. *Nucleic Acids Research*, 41(7), e90.
- Valinluck, V., Tsai, H.-H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., & Sowers, L. C. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Research*, 32(14), 4100–4108.

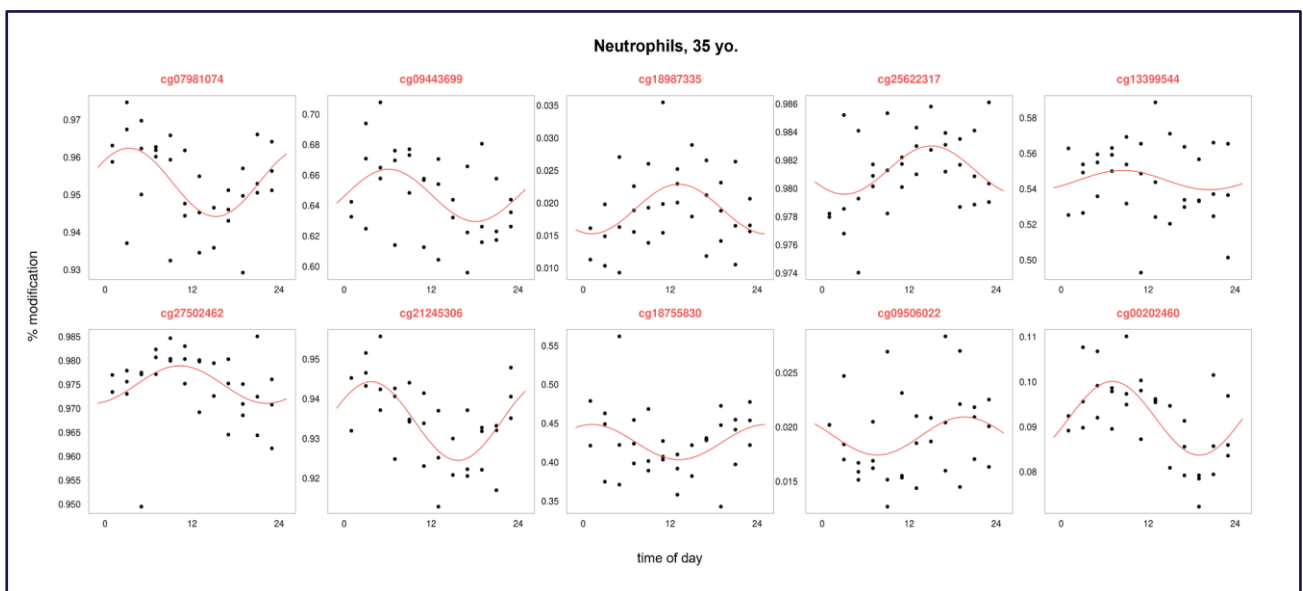
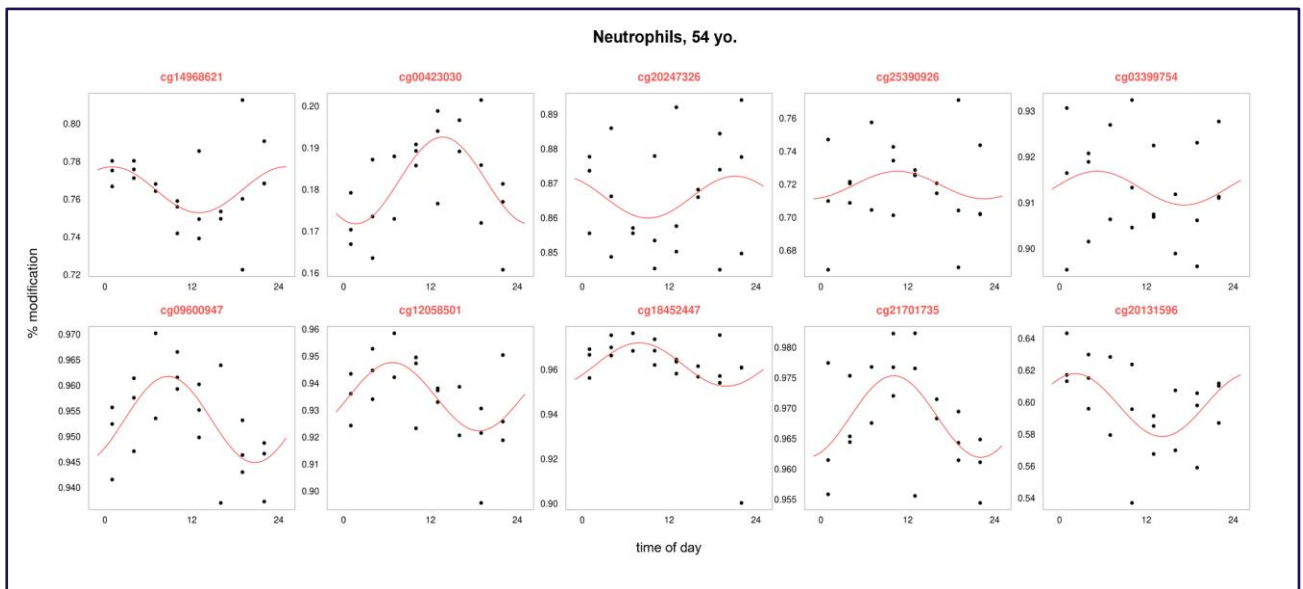
- Vidal-Bralo, L., Lopez-Golan, Y., & Gonzalez, A. (2016). Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults. *Frontiers in Genetics*, 7, 126.
- Villar, J. D., Stavrum, A.-K., Spindola, L. M., Torsvik, A., Bjella, T., Steen, N. E., Djurovic, S., Andreassen, O. A., Steen, V. M., & Le Hellard, S. (2023). Differences in white blood cell proportions between schizophrenia cases and controls are influenced by medication and variations in time of day. *Translational Psychiatry*, 13(1), 211.
- Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(2), 85–93.
- Wang, H.-T., Xiao, F.-H., Gao, Z.-L., Guo, L.-Y., Yang, L.-Q., Li, G.-H., & Kong, Q.-P. (2024). Methylation entropy landscape of Chinese long-lived individuals reveals lower epigenetic noise related to human healthy aging. *Aging Cell*, e14163.
- Wang, X., Campbell, M. R., Cho, H. Y., Pittman, G. S., Martos, S. N., & Bell, D. A. (2023). Epigenomic profiling of isolated blood cell types reveals highly specific B cell smoking signatures and links to disease risk. *Clinical Epigenetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01507-8>
- Wan, J., Su, Y., Song, Q., Tung, B., Oyinlade, O., Liu, S., Ying, M., Ming, G.-L., Song, H., Qian, J., Zhu, H., & Xia, S. (2017). Methylated cis-regulatory elements mediate KLF4-dependent gene transactivation and cell migration. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.20068>
- Waterland, R. A. (2006). Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *The Journal of Pediatrics*, 149(5 Suppl), S137–S142.
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K.-H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H., & Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*, 15(2), R24.
- Wei, H., Yuan, Y., Zhu, C., Ma, M., Yang, F., Lu, Z., Wang, C., Deng, H., Zhao, J., Tian, R., Zhu, W., Shen, Y., Yu, X., & Xu, Q. (2022). DNA Hyper-methylation Associated With Schizophrenia May Lead to Increased Levels of Autoantibodies. *Schizophrenia Bulletin Open*, 5(1), sgac047.
- Wolff, C. A., Gutierrez-Monreal, M. A., Meng, L., Zhang, X., Douma, L. G., Costello, H. M., Douglas, C. M., Ebrahimi, E., Pham, A., Oliveira, A. C., Fu, C., Nguyen, A., Alava, B. R., Hesketh, S. J., Morris, A. R., Endale, M. M., Crislip, G. R., Cheng, K.-Y., Schroder, E. A., ... Esser, K. A. (2023). Defining the age-dependent and tissue-specific circadian transcriptome in male mice. *Cell Reports*, 42(1), 111982.
- Xia, L., Ma, S., Zhang, Y., Wang, T., Zhou, M., Wang, Z., & Zhang, J. (2015). Daily variation in global and local DNA methylation in mouse livers. *PloS One*, 10(2), e0118101.
- Yang, Z., Wong, A., Kuh, D., Paul, D. S., Rakyan, V. K., Leslie, R. D., Zheng, S. C.,

- Widschwendter, M., Beck, S., & Teschendorff, A. E. (2016). Correlation of an epigenetic mitotic clock with cancer risk. *Genome Biology*, 17(1), 205.
- Yildirim, O., Li, R., Hung, J.-H., Chen, P. B., Dong, X., Ee, L.-S., Weng, Z., Rando, O. J., & Fazio, T. G. (2011). Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*, 147(7), 1498–1510.
- Youn, A., & Wang, S. (2018). The MiAge Calculator: a DNA methylation-based mitotic age calculator of human tissue types. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, 13(2), 192–206.
- Zhang, Q., Vallerga, C. L., Walker, R. M., Lin, T., Henders, A. K., Montgomery, G. W., He, J., Fan, D., Fowdar, J., Kennedy, M., Pitcher, T., Pearson, J., Halliday, G., Kwok, J. B., Hickie, I., Lewis, S., Anderson, T., Silburn, P. A., Mellick, G. D., ... Visscher, P. M. (2019). Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Medicine*, 11(1), 54.
- Zhang, Y., Wilson, R., Heiss, J., Breitling, L. P., Saum, K.-U., Schöttker, B., Holleczeck, B., Waldenberger, M., Peters, A., & Brenner, H. (2017). DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nature Communications*, 8, 14617.
- Zhang, Z., Butler, R., Koestler, D. C., Bell-Glenn, S., Warriar, G., Molinaro, A. M., Christensen, B. C., Wiencke, J. K., Kelsey, K. T., & Salas, L. A. (2022). Comparative analysis of the DNA methylation landscape in CD4, CD8, and B memory lineages. *Clinical Epigenetics*, 14(1), 173.
- Zhou, T., Xiong, J., Wang, M., Yang, N., Wong, J., Zhu, B., & Xu, R.-M. (2014). Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Molecular Cell*, 54(5), 879–886.
- Zhu, J.-K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual Review of Genetics*, 43, 143–166.

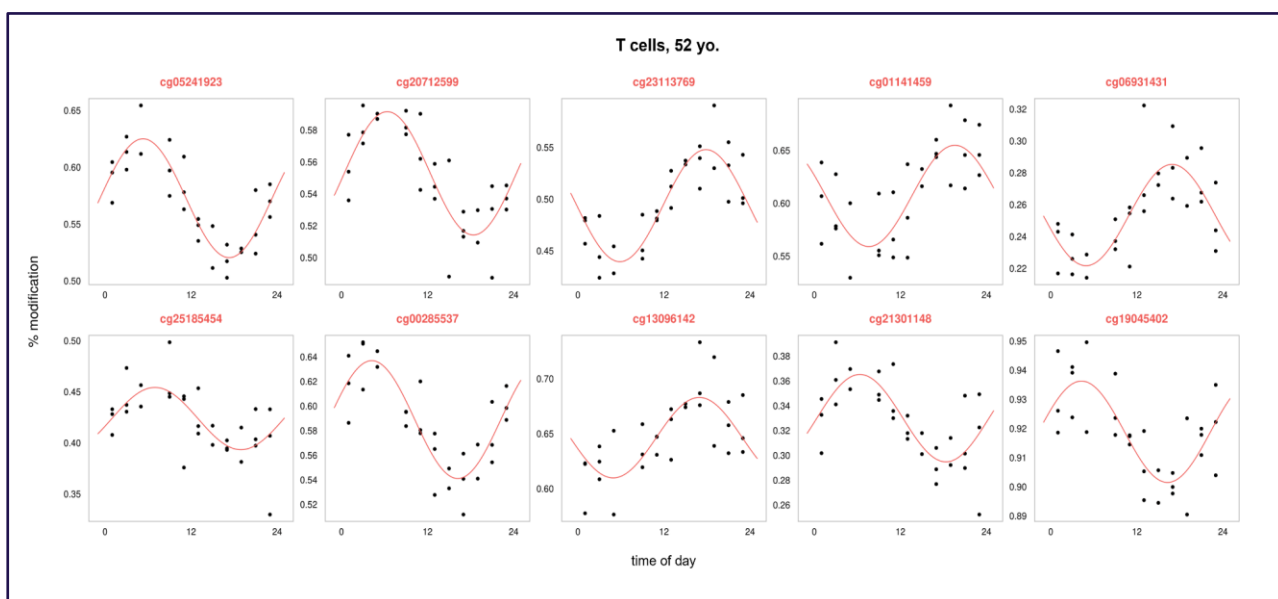
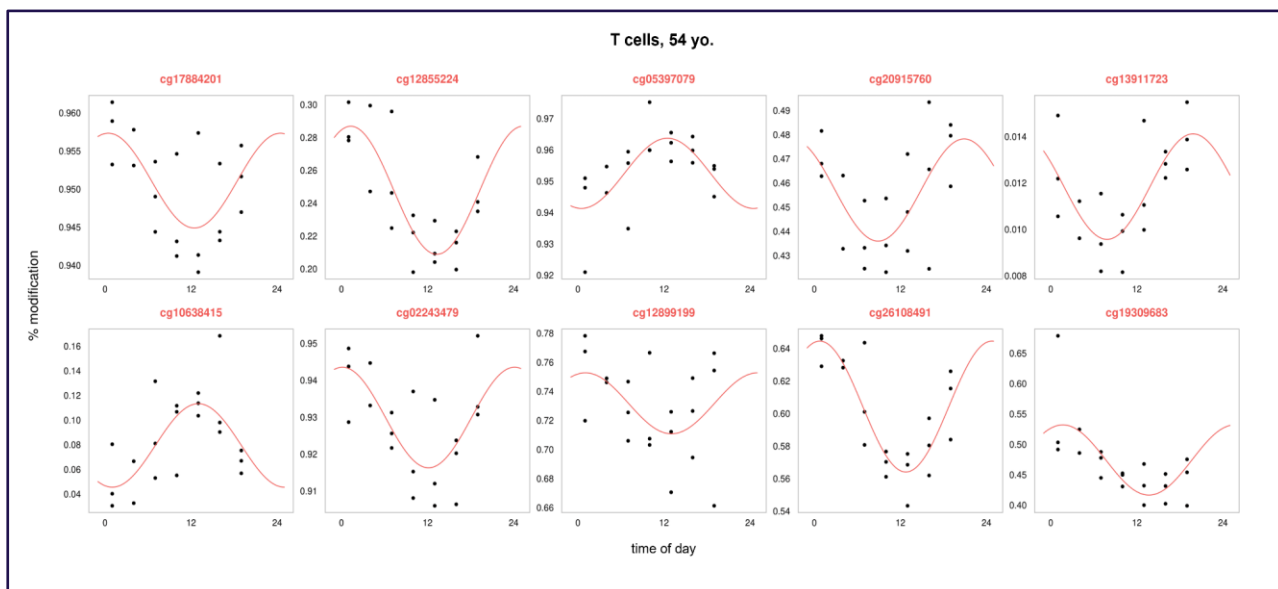
Priedai



1 Priedas Iš DNR modifikacijos duomenų nuspėtos ląstelių tipų proporcijos WBC-neu mėginiuose. Atlikta taikant Houseman (Houseman et al., 2012) algoritmą su Salas korekcija (Salas et al., 2022). X ašis - ląstelių tipų, nurodytų skirtingomis spalvomis, proporcijos, Y ašis - mėginiai išrikuoti pagal surinkimo laiką pradedant anksčiausiai surinktu ir baigiant paskutiniu mėginiu.



2 Priedas 10-ies labiausiai osciliuojančių modifikuotų citozinų profiliai neutrofilų mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių metų individo (viršuje) ir mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 35-ių (apačioje) metų individo. X ašis - DNR modifikacijos lygis procentine išraiška, Y - ašis paros laikas. Virš kiekvieno grafiko nurodytas specifinio citozino kodas.



3 Priedas 10-ies labiausiai osciluojančių modifikuotų citozinų profiliai T ląstelių mėginiuose, surinktuose kas 3 val., 24 val., eigoje iš 54-ių metų individo (viršuje) ir mėginiuose, surinktuose kas 2 val., 24 val., eigoje iš 52-ejų (apačioje) metų individo. X ašis - DNR modifikacijos lygis procentine išraiška, Y - ašis paros laikas. Virš kiekvieno grafiko nurodytas specifinio citozino kodas.