



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Praca doktorska:

**Wpływ inhibicji deiminaz peptydyloargininowych
oraz wyciszenia genu *PAD4* na wybrane funkcje
komórek śródbłónka oraz parametry epigenomu**

Doctoral thesis:

**The impact of peptidylarginine deiminase
inhibition and *PAD4* gene silencing on selected
endothelial cell functions and epigenome
parameters**

Oskar Ciesielski

Promotor:

dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ

Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Instytut Biofizyki

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Źródła finansowania

1. Grant w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Diamentowy Grant (VIII Edycja)” DI2018 01894; 2019–2024. Tytuł projektu: *Analiza epigenetycznego profilu modyfikacji wybranych arginin histonów rdzeniowych i wynikające z nich konsekwencje dla innych modyfikacji potranslacyjnych oraz funkcjonowania śródbłónka naczyniowego.*

Kierownik: **mgr Oskar Ciesielski**; Opiekun naukowy: dr hab. Aneta Balcerczyk prof. UŁ



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



Diamentowy
Grant

2. Środki Katedry Biologii Nowotworów i Epigenetyki przyznane w ramach subwencji



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

3. Dofinansowanie przyznane przez Szkołę Doktorską BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi



SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem
Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi

Spis treści

I.	Wstęp teoretyczny	1
1.	Rola wybranych potranslacyjnych modyfikacji białek w regulacji metabolizmu komórek.....	1
1.1.	Fosforylacja	2
1.2.	Metylacja	3
1.3.	Acetylacja	6
1.4.	Cytrulinacja.....	9
1.4.1.	Reakcja cytrulinacji	9
1.4.2.	Deiminazy peptydyloargininowe	10
1.4.3.	Fizjologiczny potencjał cytrulinacji	11
1.4.4.	Rola cytrulinacji w stanach patologicznych	13
1.4.4.1.	Cytrulinacja w zaburzeniach immunologicznych.....	13
1.4.4.2.	Cytrulinacja w nowotworach	14
1.4.5.	Inhibitory PAD	16
2.	Epigenetyczny aspekt PTMs – modyfikacje histonów	17
2.1.	Omówienie wybranych PTMs histonów	18
2.1.1.	Metylacja histonów.....	19
2.1.2.	Acetylacja histonów	21
2.2.	Epigenetyczny aspekt cytrulinacji białek	24
3.	Śródbłonek naczyniowy.....	27
3.1.	Fizjologiczne funkcje śródbłonka naczyniowego.....	27
3.1.1.	Angiogeneza	30
3.2.	Epigenetyczna regulacja funkcji komórek śródbłonka	32
II.	Cele pracy i hipoteza badawcza	33
III.	Materiały	34
1.	Linie komórkowe	34
2.	Odczynniki chemiczne	34
3.	Inhibitory deiminaz peptydyloargininowych	34
IV.	Metody	36
1.	Hodowla komórek	36
2.	Izolacja komórek HUVEC z żył pępowinowych	36
3.	Oznaczenie przeżywalności/prolifracji komórek śródbłonka	37
3.1.	Test redukcji resazuryny	37
3.2.	Test wychwytu czerwieni obojętnej	38
4.	Analiza poziomu białek techniką Western blotting	38
4.1.	Przygotowanie całkowitych lizatów komórkowych	38
4.2.	Izolacja frakcji histonowej metodą kwaśnej ekstrakcji	39
4.3.	Oznaczenia stężenia białka metodą Pierce’a.....	40
4.4.	Western blotting	40
5.	Immunofluorescencyjna analiza antygenów	42
6.	Analiza ekspresji wybranych genów w komórkach śródbłonka	42
6.1.	Izolacja mRNA, reakcja odwrotnej transkrypcji	42
6.2.	qPCR	42
7.	Analiza progresji cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej (FACS)	43
8.	Test tworzenia struktur pseudokapilarnych na podłożu Matrigel™	44
9.	Analiza zdolności migracyjnych komórek śródbłonka – test zarastania rysy.....	45
10.	Oznaczenie aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej	45
11.	Oznaczenie profilu wydzielania regulatorów angiogenezy	46
12.	Oznaczenie poziomu NO* z wykorzystaniem sondy DAF-FM DA.....	47
13.	Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem sondy H ₂ DCF DA	47
14.	Ocena funkcji mitochondriów – Seahorse Mito Stress Test	48
15.	Ocena uszkodzeń DNA – test kometowy.....	49
16.	Analizy <i>in silico</i> interakcji badanych inhibitorów z DNA	50
17.	Przygotowanie komórek HMEC-1 PAD4 KD.....	50
17.1.	Przygotowanie DNA plazmidowego do transformacji	50
17.1.1.	Hodowla <i>Escherichia coli</i>	50
17.1.2.	Izolacja i analiza DNA plazmidowego	51
17.2.	Produkcja cząstek lentiwirusowych w komórkach 293FT.....	51
17.3.	Transdukcja komórek HMEC-1.....	52
17.4.	Weryfikacja wyciszenia <i>PAD4</i>	53

17.5.	Analizy komórek HMEC-1 PAD4 KD	53
18.	Analiza statystyczna wyników	53
V.	Wyniki	54
1.	Wpływ inhibitorów PADs na wybrane funkcje komórek śródbłonna – potencjał angiogeny	54
1.1.	Weryfikacja ekspresji PAD i poziomów H3cit w komórkach śródbłonna.....	54
1.2.	Analizy cytotoxyczności inhibitorów PAD i ocena potencjału inhibitorowego	54
1.3.	Analizy wpływu inhibitorów PAD na cykl komórkowy i proliferację ECs	57
1.4.	Analiza potencjału angiogenego ECs poddanych działaniu inhibitorów PADs	60
1.5.	Badanie konsekwencji zahamowania aktywności PAD w kontekście homeostazy redoks	67
2.	Analiza wybranych efektów wyciszenia <i>PAD4</i> w HMEC-1	71
3.	Analiza interakcji cytrulinacji z innymi PTMs histonów w HMEC-1	75
3.1.	Cytrulinacja <-> acetylacja	75
3.2.	Cytrulinacja <-> metylacja	77
3.2.1.	Wpływ aktywności SET7/9 na profil cytrulinacji H3.....	77
3.2.2.	Analizy potencjalnych interakcji metylacja <-> cytrulinacja.....	78
3.3.	Analiza wpływu inhibitorów PADs na wybrane regulatory struktury chromatyny	79
VI.	Dyskusja	81
VII.	Podsumowanie i wnioski.....	94
	Uwagi końcowe i przyszłe kierunki badań	95
	Streszczenie w języku polskim	96
	Abstract.....	100
	Spis rysunków.....	103
	Spis tabel	105
	Bibliografia:	106
	Kopie prac stanowiących części składowe rozprawy doktorskiej	121

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

Skrót	Wyjaśnienie w języku angielskim	Wyjaśnienie w języku polskim
ACAP	Anti-citrullinated protein antibodies	Przeciwciała przeciwko cytrulinowanym białkom
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	Dezintegryna i metaloproteinaza z motywami trombospondyny
Akt	Protein kinase B	Kinaza białkowa B
ALL	Acute lymphocytic leukemia	Ostra białaczka limfoblastyczna
ANG1	Angiopoietin 1	Angiopoetyna 1
APMA	4-Aminophenylmercuric acetate	Octan 4-aminofenyloctęciowy
ARTN	Artemin	Artemina
ATII	Angiotensin II	Angiotensyna II
ATIII	Antithrombin III	Antytrombina III
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated kinase	Kinaza ATM
ATP	Adenosine triphosphate	Adenozynotrójfosforan
BBCLA	BB-Cl-amidine	BB-Cl-amidyna
BRD4	Bromodomain-containing protein 4	Białko zawierające bromodomenę 4
BSA	Bovine Serum Albumin	Surowicza albumina wołowa
c-SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	Protoonkogenowa kinaza tyrozynowa Src
CBP	CREB binding protein	Białko wiążące CREB
CBX5	Chromobox protein homolog 5	Homolog 5 białka chromobox
CCL2	Chemokine ligand 2	Ligand 2 chemokiny
CCNA	Cyclin A	Cyklina A
CCNB	Cyclin B	Cyklina B
CCND	Cyclin D	Cyklina D
CCNE	Cyclin E	Cyklina E
CCNY	Cyclin Y	Cyklina Y
CDK	Cyclin-dependent kinases	Kinazy zależne od cyklin
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation-sequencing	Immunoprecypitacja chromatyny i sekwencjonowanie
ChK1	Checkpoint kinase 1	Kinaza punktu kontrolnego 1
CLA	Cl-amidine	Cl-amidyna
COL1A	Collagen, type I, alpha 1	Kolagen typu 1, alfa 1
Ctrl	Control	Kontrola
CVDs	Cardiovascular diseases	Choroby układu krążenia
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand family	Rodzina ligandów Chemokiny z motywem C-X-C
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate	Diocan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenyloindol
DNMT1	DNA methyltransferase 1	Metylotransferaza DNA 1
DOT1L	Histone H3K79 methyltransferase	Metylotransferaza histonowa H3K79
DOX	Doxycycline	Doksycyklina
DPPIV	Dipeptidyl peptidase-4	Dipeptydylopeptydaza-4
E2F1	Transcription factor E2F1	Czynnik transkrypcyjny E2F1
ECM	Extracellular matrix	Macierz zewnątrzkomórkowa

ECs	Endothelial cells	Komórki śródbłonna
EDN1	Endothelin 1	Endotelina 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kwas wersenowy
EG-VEGF	Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego pochodzący z gruczołów dokrewnych
EGF	Epidermal growth factor	Naskórkowy czynnik wzrostu
EMT	Epithelial–mesenchymal transition	Przejście epithelialno-mezenchymalne
ENG	Endoglin	Endoglin
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Śródbłonna syntaza tlenku azotu
ERK	Extracellular signal-regulated kinases	Kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2	Metylotransferaza Wzmacniacz homologu zeste 2
FA	F-amidine	F-amidyna
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Sortowanie komórek z wykorzystaniem fluorescencji
FBS	Fetal bovine serum	Płodowa surowica bydlęca
FDA	Food and Drug Administration	Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych Ameryki
FGF	Fibroblast growth factor	Czynniki wzrostu fibroblastów
FGFR	Fibroblast growth factor receptors	Receptory dla czynników wzrostu fibroblastów
FOXO	Forkhead box O Transcription factors	Czynniki transkrypcyjno FOXO
FSC	Forward scatter channel	Rozpraszanie przednie
G9a	G9a methyltransferase	Metylotransferaza G9a
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Dehydrogenaza 3-fosforanu gliceryny
GNDF	Glial cell line-derived neurotrophic factor	Czynnik neurotroficzny pochodzący z komórek glejowych
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Kwaśne białko włókiennkowe
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GSK3β	Glycogen synthase kinase-3 beta	Kinaza syntazy glikogenu-3 beta
H ₂ DCF DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	Diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
HAEC	Human Aortic Endothelial Cells	Ludzkie komórki śródbłonna aortalnego
HATs	Histone/lysine acetyltransferases	Acetylotransferazy histonowe/lizynowe
HB-EGF	Heparin-binding EGF	EGF wiążący heparynę
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	Zrównoważony roztwór soli Hanka
HDACs	Histone deacetylases	Deacetylazy histonowe
HDACi	Histone deacetylases inhibitors	Inhibitor deacetylaz histonowych
HGF	Hepatocyte growth factor	Czynnik wzrostu hepatocytów
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1	Ludzkie komórki śródbłonna mikrowaskularnego 1
HP1	Heterochromatin proteins 1	Białka heterochromatyny 1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Fosforybozylotransferaza hipoksantyny 1
Hsp70	70 kilodalton heat shock proteins	Białka szoku cieplnego o masie 70 kilodaltonów
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule	Cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein	Białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
IL-1B	Interleukin 1 beta	Interleukina 1 beta

IL6	Interleukin 6	Interleukina 6
IL8	Interleukin 8	Interleukina 8
ING4	Inhibitor of growth protein 4	Białko inhibitorowe wzrostu 4
JAK	Janus kinases	Kinazy janusowe
KD	Gene Knock-down	Wyciszenie genu
LB	Luria-Bertani growth medium	Pożywka Luria-Bertani
LEP	Leptin	Leptyna
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A	Lizyno-specyficzna demetylaza 1
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent	Odczynnik do izolacji białek ssaczych
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	Kinazy aktywowane mitogenami
MBP	Myelin basic protein	Podstawowe białko mieliny
MeCP	Methyl CpG binding protein	Białko wiążące metylo CpG
MIP	Macrophage inflammatory protein	Białko zapalne makrofagów
MMPs	Matrix metalloproteinases	Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
mTOR	Mammalian target of rapamycin kinase	Kinaza ssaczy cel rapamycyny
NETs	Neutrophil extracellular traps	Zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe
NO*	Nitric oxide	Tlenek azotu
OCR	Oxygen consumption rate	Szybkość zużycia tlenu
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	Inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1
p300	Histone acetyltransferase p300	Acetylotransferaza histonowa p300
p53	Cellular tumor antigen p53	Komórkowy antygen nowotworowy p53
PADs	Peptidyl arginine deiminases	Deiminazy peptydyloargininowe
PAF	Platelet-activating factor	Czynnik aktywujący płytki krwi
PAI1 (SERPINE1)	Plasminogen activator inhibitor-1	Inhibitor aktywatora plazminogenu 1
PBS	Phosphate-buffered saline	Sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PCAF	P300/CBP-associated factor	Czynnik związany z p300/CBP
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Antygen jądrowy proliferacji komórek
PD-ECGF	Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor	Czynnik wzrostu komórek śródbłónka pochodzący z płytek krwi
PDGF	Platelet-derived growth factor	Płytkopochodny czynnik wzrostu
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule	Cząsteczka adhezji komórek śródbłónka i płytek krwi
PEDF (SERPINF1)	Pigment epithelium-derived factor	Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego
PGI₂	Prostacyclin	Prostacyklina
phAkt	Phosphorylated Akt kinase	Ufosforylowana kinaza Akt
phChK1	Phosphorylated ChK1	Ufosforylowana ChK1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Kinaza fosfoinozytolu 3
PIGF	Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein	Łóżyskowy ludzki czynnik wzrostu
PKMTs	Protein Lysine Methyltransferases	Metylotransferazy lizynowe
PLG	Plasminogen	Plazminogen
PLK1A	Polo-like kinase 1	Kinaza polopodobna 1
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	Fluorek fenylometylosulfonylu

PRL	Prolactin	Prolaktyna
PRMTs	Protein Arginine Methyltransferases	Metylotransferazy argininowe
PSPN	Persephin	Persephin
PTMs	Protein post-translational modifications	Modyfikacje potranslacyjne białek
PTN	Pleiotrophin	Pleiotropina
PTX3	Pentraxin-related protein 3	Białko związane z pentraksyną 3
PVDF	Polyvinylidene fluoride	Polifluorek winylidenu
qPCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RA	Rheumatoid arthritis	Reumatoidalne zapalenie stawów
Rb	Retinoblastoma protein	Białko siatkówczaka
RFP	Red fluorescent protein	Białko czerwonej fluorescencji
RFT	-	Reaktywne formy tlenu
SAM	S-Adenosyl methionine	S-Adenozylometionina
SET7/9	Lysine methyltransferase SETD7	Lizynowa metylotransferaza SET7/9
shRNA	Short hairpin RNA	Krótkie RNA o strukturze spinki do włosów
SSC	Side Scatter Channel	Rozproszenie boczne
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Przebieżnik sygnału i aktywator transkrypcji 3
t-BOOH	tert-Butyl hydroperoxide	Wodoronadtlenek tert-butyłu
TAF	Transcription initiation factors	Czynniki inicjacji transkrypcji
TECs	Tumour Endothelial Cells	Komórki śródbłonna związane z nowotworem
TF	Transcription factors	Czynniki transkrypcyjne
TF	Tissue factor	Czynnik tkankowy
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor	Inhibitor szlaku czynnika tkankowego
TGF α	Transforming growth factor alpha	Transformujący czynnik wzrostu alfa
TIE2	Angiopoietin-1 receptor	Receptor angiopoetyny 1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases	Tkankowy inhibitor metaloproteinaz
TNF α	Tumor necrosis factor α	Czynnik martwicy nowotworów
tPA	Tissue-type plasminogen activator	Tkankowy aktywator plazminogenu
TSP	Thrombospondins	Trombospondyny
TXA2	Thromboxane A2	Tromboksan A2
uPA	Urokinase-type plasminogen activator	Urokinazowy aktywator plazminogenu
UPAR	Urokinase plasminogen activator surface receptor	Receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu
VASH1	Vasohibin-1	Wazohibina-1
VCAM	Vascular cell adhesion protein	Naczyniowe białko adhezji komórek
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego C
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptors	Receptory czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego
VIM	Vimentin	Wimentyna
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell	Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych
vWF	von Willebrand factor	Czynnik von Willebranda

Część informacji przedstawiona w ramach wstępu teoretycznego została wcześniej opublikowana w ramach pracy przeglądowej:

1. **Ciesielski O**, Biesiekierska M, Panthu B, Soszyński M, Pirola L, Balcerczyk A. *Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives*. Cellular and Molecular Life Sciences 2022 Jan 25;79(2):94. DOI: 10.1007/s00018-022-04126-3.

Natomiast część wyników w pracy oryginalnej:

2. **Ciesielski O**, Pirola L, Balcerczyk A. *Peptidylarginine Deiminases Inhibitors Decrease Endothelial Cells Angiogenic Potential by Affecting Akt Signaling and the Expression and Secretion of Angiogenic Factors*. Cellular Physiology and Biochemistry. 2024 Feb 19;58(1):63-82. DOI: 10.33594/000000683.

Oświadczenia współautorów oraz kopie prac załączono na końcu rozprawy.

Łączny IF = **11,734**

Łączna liczba punktów MEiN = **280**

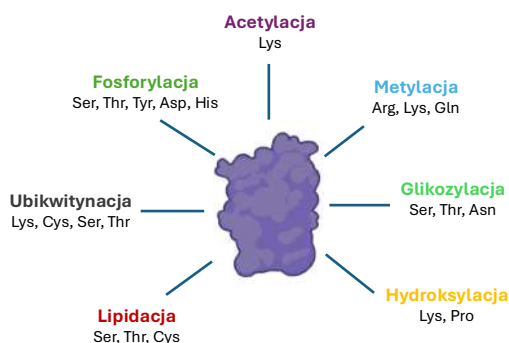
I. Wstęp teoretyczny

1. Rola wybranych potranslacyjnych modyfikacji białek w regulacji metabolizmu komórek

Termin potranslacyjne modyfikacje białek (PTMs, ang. *Post-Translational Modifications*) odnosi się do wszystkich addycji, subtrakcji grup funkcyjnych do aminokwasów tworzących białko czy też ich konwersji. Obecnie stosowany jest głównie w odniesieniu do enzymatycznych reakcji kowalencyjnej addycji m.in. grup funkcyjnych, cukrów, nukleotydów lub lipidów do bocznych łańcuchów aminokwasowych białek. Jednak do PTMs zaliczyć należy także proteolityczne cięcie białek i nieodwracalne transformacje aminokwasów, w tym stanowiącą temat niniejszej rozprawy – cytrulinację [1]. Oddzielną grupę stanowią modyfikacje białek będące skutkiem ich reakcji z cząsteczkami wykazującymi dużą reaktywność takimi jak np. reaktywne formy tlenu (RFT).

Wielkość proteomu szacowana jest obecnie na poziomie miliona białek, co oznacza, że jest on znacznie większy niż ludzki genom zawierający około 20 000 genów. Wynika to z faktu, że pojedynczy gen kodować może wiele białek w wyniku m.in. alternatywnego splicingu, rekombinacji genetycznej, inicjacji transkrypcji z różnych promotorów, ale także z mnogości możliwych PTMs które powodują dalszy wzrost złożoności proteomu względem genomu. Według największej bazy danych zbierającej dane dotyczące białek – UniProt, obecna liczba poznanych PTMs wynosi około 650 [*UniProt Vocabulary of PTM*, 24.06.2024]. Dynamiczny wzrost w tym obszarze możliwy jest dzięki opracowaniu nowych technik i narzędzi badawczych zwłaszcza spektrometrii masowej.

PTMs zachodzić mogą zarówno na etapie syntezy białek, co powoduje ich fałdowanie w odpowiednie struktury, jak i poprzez modyfikację już dojrzałych białek w odpowiedzi na stymulatory w celu aktywacji czy represji szlaków sygnałowych [2]. Modyfikacje umożliwiają dywersyfikację i kontrolę funkcji białek w komórce poprzez zmiany w ich konformacji, aktywności i stabilności, wpływając na regulację m.in.: transkrypcji genów, progresji cyklu komórkowego, różnicowania, szlaków sygnałowych czy odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji kontrolując funkcjonowanie całego organizmu [2]. Jak wspomniano, obecnie termin PTMs odnosi się głównie do enzymatycznych kowalencyjnych modyfikacji, wśród których najlepiej poznane to: fosforylacja, acetylacja i metylacja (*Rysunek 1.1*). Większość PTMs jest dynamiczna [3]. Zmiana lub wprowadzenie niepożądanego PTMs wywołuje zaburzenia biologicznych funkcji białka co w wielu przypadkach stanowi podłoże molekularne dla rozwoju stanów patologicznych. W bazie danych PTMD 1.0, gdzie gromadzone są

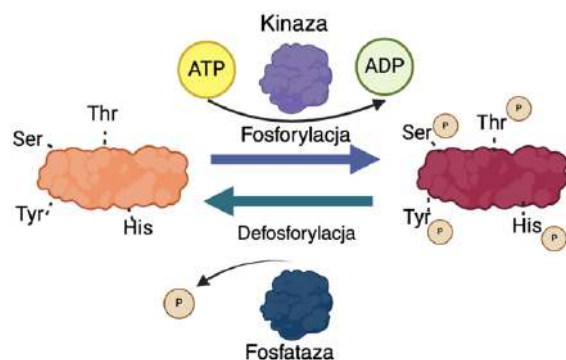


Rysunek 1.1. Wybrane kowalencyjne PTMs białek i modyfikowane aminokwasy w łańcuchu. Lys – lizyna, Arg – arginina, Gln – glutamina, Ser – seryna, Thr – treonina, Asn – asparagina, Pro – prolina, Cys – cysteina, His – histydyna. Opracowanie własne.

informacje o powiązaniach PTMs ze stanami patologicznymi, opisano dotychczas 275 stanów chorobowych [4].

1.1. Fosforylacja

Fosforylacja białek była jedną z pierwszych odkrytych modyfikacji potranslacyjnych, z racji tego jest też jedną z najlepiej poznanych. Równocześnie jest też jedną z najistotniejszych PTMs, zawiadującą m.in. aktywacją lub inaktywacją enzymów czy receptorów białkowych [5]. Na poziomie biochemicznym fosforylacja polega na dołączeniu grupy fosforanowej ($-PO_4$) z adenozyno trifosforanu (ATP, ang. *adenosine triphosphate*) do polarnych aminokwasów [6], reakcja ta jest w pełni odwracalna (*Rysunek 1.2*). Fosforylacja przeprowadzana jest przez kinazy – enzymy z rodziny fosfotransferaz (EC 2.7.x.x) [7]. Natomiast, defosforylacja białek prowadzona jest przez fosfatazy [2]. Dołączenie grupy fosforanowej skutkuje zmianą profilu białka z hydrofobowego (apolarnego) na hydrofilowy (polarny), co umożliwia zmianę konformacji podczas interakcji z innymi białkami i formowanie kompleksów [8]. Modyfikacji podlegają głównie seryna, treonina i tyrozyna, przy czym seryna stanowi aż 86% fosforylowanych reszt aminokwasowych w białkach, a treonina ok 11% [2,9]. U ludzi opisano dotychczas 568 kinaz i 156 fosfataz białkowych [2]. Fosforylacja reguluje większość z istotnych procesów komórkowych związanych z regulacją transkrypcji, podziałem i wzrostem komórek, syntezą białek, transdukcją sygnału i modulacją szlaków sygnałowych oraz różnicowaniem i starzeniem komórek. Jednym z ważniejszych białek podlegających fosforylacji jest p53, które po modyfikacji m.in. przez kinazę Chk2 działa jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genów hamujących progresję cyklu komórkowego i aktywujący mechanizmy naprawy DNA [10,11]. Białkowa kinaza serynowo-treoninowa Akt określana również jako kinaza białkowa B (PKB, ang. *Protein Kinase B*) stanowi kluczowy element wielu kaskad sygnalizacyjnych, a jej aktywacja zachodzi między innymi w wyniku fosforylacji przez



Rysunek 1.2. Schematyczna ilustracja procesów fosforylacji i defosforylacji białek Opracowanie własne na podstawie: [2].

kinazę 3-fosfoinozytolu (PI3K ang. *Phosphoinositide 3-kinase*) [12]. W literaturze opisano ponad 100 substratów dla Akt w tym inne kinazy białkowe np. kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3, ang. *Glycogen Synthase Kinase 3*), regulatory cyklu komórkowego i proliferacji np. ssaczy cel rapamycyny (mTOR, ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) i czynniki transkrypcyjne (TF, ang. *Transcription Factors*),

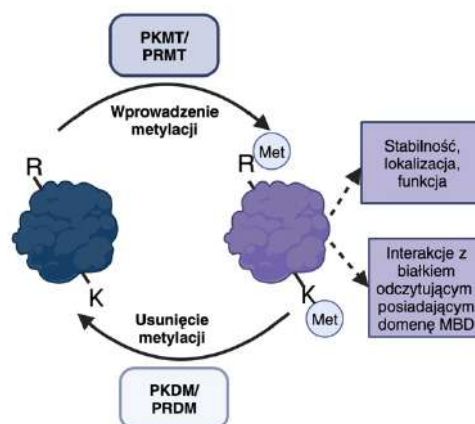
w tym te należące do rodziny forkhead box O (FOXO, ang. *Forkhead Box O Transcription Factors*) [13]. Mnogość celów sprawia, że kinaza Akt i regulowane przez nią kaskady sygnałowe stanowią dobry przykład istotności fosforylacji w modulacji funkcji komórek. Kolejnym dobrze opisanym szlakiem sygnałowym zależnym od fosforylacji i defosforylacji białek jest szlak kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK, ang. *Mitogen-activated protein kinases*); jeden z najstarszych ewolucyjnie szlaków przekazywania sygnału i regulacji metabolizmu [14]. Odpowiedzialny jest on m.in. za regulację

odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe, proliferację, migrację, wzrost i apoptozę komórek [14, 15].

Zaburzenia w fosforylacji białek i aktywności kinaz/fosfataz mogą skutkować zahamowaniem lub całkowitym zablokowaniem istotnych szlaków sygnałowych, co prowadzić może do rozwoju stanów patologicznych. W literaturze opisano zwłaszcza wiele powiązań między zaburzoną fosforylacją białek a rozwojem chorób nowotworowych. Wykazano m.in., że zwiększona aktywność kinazy tyrozynowej c-SRC jest bezpośrednio związana z nowotworzeniem [16,17]. W ostatnich latach opracowano wiele inhibitorów kinazy c-SRC [18], a niektóre z nich zostały zaakceptowane do użytku klinicznego przez amerykańską organizację *Food and Drug Administration* (FDA), m.in. Dasatinib używany w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej i białaczki limfatycznej [19]. Również zaburzenia w aktywności opisanej wyżej kinazy Akt a tym samym szlaków sygnałowych których jest częścią mogą być przyczyną nowotworzenia. Utrzymywana przez szlak PI3K/Akt równowaga pomiędzy podziałami/wzrostem komórek, a programowaną śmiercią jest zaburzona w większości nowotworów [20], zwiększona aktywność Akt jest wiązana z wzrostem tempa proliferacji i przeżywalności komórek nowotworowych [21]. Mając na uwadze niezwykle istotną rolę tych enzymów w regulacji nowotworzenia czy metastazy, opracowanie specyficznych inhibitorów kinaz stanowi dużą nadzieję na rozwinięcie celowanych terapii opartych na związkach, które w porównaniu do stosowanych standardowo w chemioterapii cytostatyków wykazywać mogą mniejszą toksyczność. Na całym świecie opracowano ponad 120 związków tzw. niewielkich inhibitorów kinaz, a 68 z nich zostało już zatwierdzonych przez FDA [2, 22]. Szeroko zbadano także rolę fosforylacji w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Fosforylacja białka Tau wykazuje działanie protekcyjne wobec neuronów, jednak jej nadmiar wiązany jest z rozwojem choroby Alzheimera [2, 23]. Wskazywane jest również zaangażowanie tej modyfikacji w chorobach metabolicznych jak cukrzyca typu drugiego, gdzie dane wskazują na zaburzenia w fosforylacji ponad 1000 białek [2, 24].

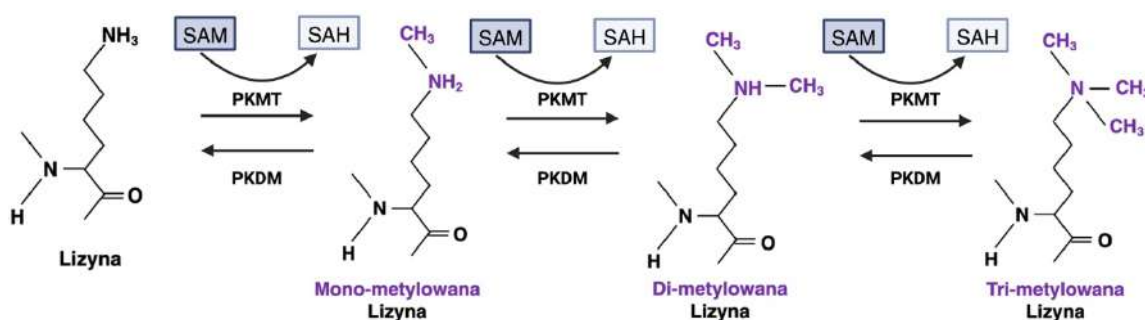
1.2. Metylacja

Metylacja białek polega na dołączeniu grupy metylowej (-CH₃) do aminokwasów. Najczęściej metylacja przeprowadzana jest na resztach arginy i lizyny, jednak możliwa jest również w przypadku asparaginy, kwasu asparaginowego, cysteiny, glicyny, glutaminy, leucyny i histydy [2]. Modyfikacja zmienia zarówno właściwości aminokwasów i zwiększa hydrofobowość białek, co może hamować wiązanie substratów do zmodyfikowanego miejsca aktywnego lub domeny wiążącej. Jednak, w większości przypadków jej efekty są wynikiem interakcji zmodyfikowanych białek z białkami „odczytującymi” metylację, które posiadają strukturę wiążącą grupę metylową (MBD, ang. *Methyl Binding Domain*) [25]



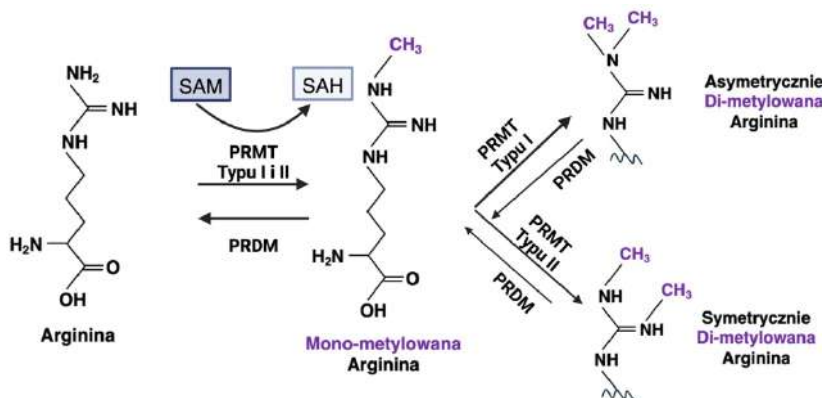
Rysunek 1.3. Metylacja białek jest dynamiczna, wprowadzana jest przez PRMTs lub PKMTs, usuwana przez PKDMs lub PRDMs. Metylacja może wpływać bezpośrednio na stabilność, strukturę i funkcję białek lub poprzez ich interakcję z białkami odczytującymi które zawierają domenę MBD. Opracowanie własne.

(Rysunek 1.3). Donorem grupy metylowej w reakcji jest *S*-adenozyno-L-metionina (SAM, ang. *S*-adenosino-L-methionine), a w zależności od modyfikowanego aminokwasu przeprowadzają ją metylo-transferazy lizynowe (PKMTs, ang. *Protein Lysine Methyl-transferases*) lub metylo-transferazy argininowe (PRMTs, ang. *Protein Arginine Methyl-transferases*). Lizyna podlegać może mono-, di- lub trimetylacji (Rysunek 1.4), a arginina mono- lub di- metylacji (Rysunek 1.5). Przy czym dimetylacja argininy może zajść w dwóch różnych konfiguracjach, zależnie od przeprowadzającego ją enzymu (Rysunek 1.5) [26]. Zarówno stopień metylacji reszt aminokwasowych, jak i konfiguracja w przypadku argininy ma kluczowe znaczenie w roli jaką dana modyfikacja odgrywa w regulacji funkcji danego białka.



Rysunek 1.4. Schematyczne przedstawienie procesu metylacji lizyny. Opracowanie własne.

PKMTs podzielić można na dwie kategorie. Pierwszą grupą są enzymy zawierające domenę SET odpowiedzialną za aktywność metylotransferazy, do których zalicza się większość PKMTs np. G9a, SET7/9, KMT2A i EZH2, wykazujące zdolność do modyfikacji zarówno białek histonowych, jak i nie-histonowych [27]. Drugą grupą są metylotransferazy zaliczane do rodziny siedmio- β -niciowych (ang. *seven- β -strand*) charakteryzujące się strukturą β -kardki i niezawierające domeny SET [28]. Pierwszą i do niedawna jedyną PKMT tego rodzaju była DOT1L, jednak w ostatnich latach opisano 15 kolejnych enzymów tego typu modyfikujących białka niehistonowe [28]. Są one w większości specyficzne wobec jednego celu, na przykład METTL21A specyficznie metylująca Hsp70 [30]. Dotychczas w literaturze opisano dziewięć PRTMs, które są dodatkowo podzielone na trzy typy [31].



Rysunek 1.5. Schematyczne przedstawienie procesu metylacji argininy. Opracowanie własne

Przez wiele lat metylacja była uważana za modyfikację nieodwracalną, aż do momentu, gdy zespół Shi i wsp. w 2004 roku opisał pierwszą lizyno-specyficzną demetylazę [32] (LSD1, ang. *Lysine Specific Demethylase*). Obecnie wyróżnia się już dwie liczne klasy demetylaz lizynowych: (i) zawierających domenę LSD lub (ii) zawierających domenę Jumonji C (JmJC) [33]. Znacznie słabiej poznane są mechanizmy demetylacji argininy [33]. W roku 2007 odkryto pierwszą specyficzną demetylazę arginino-specyficzną zawierającą domenę JmJC - JMJD6 [34]. Metylacja argininy może być także usunięta w wyniku cytrulinacji [35]

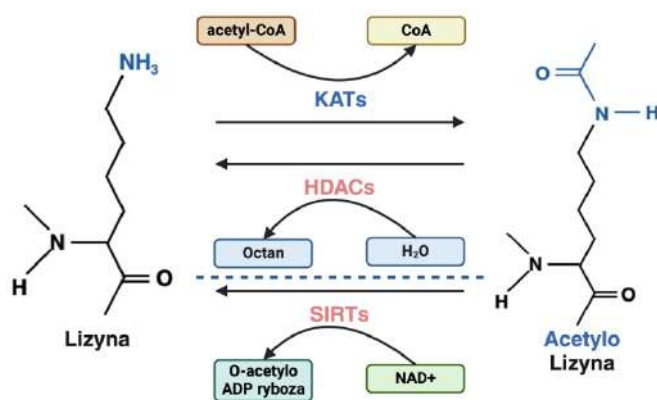
Jedną z głównych funkcji metylacji jest kontrola ekspresji genów poprzez modyfikację białek histonowych. Do pozostałych istotnych fizjologicznie funkcji regulowanych przez metylację należą: regulacja naprawy DNA, obróbki RNA, znakowanie lokalizacyjne, regulacja stabilności oraz aktywności białek i udział w transdukcji sygnału [2]. Metylacja zaangażowana jest w wiele interakcji z innymi PTMs. Przykłady takich interakcji znaleźć można w mechanizmach regulujących progresję cyklu komórkowego. Kinaza PLK1A, która jest istotnym regulatorem progresji z fazy G₂/S i cytokinezy [36], regulowana jest zarówno przez fosforylację w pozycji Thr210p jak i metylację w pozycji Lys209me1 [37]. Inaktywacja PLK1A zachodząca w wyniku uszkodzenia DNA wywołwana jest zniesieniem Thr210p i skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego. Efekt ten jest wzmocniony przez wprowadzenie Lys209me1 przez metylotransferazę G9a lub SETD6 [25, 37, 38]. Opisana „współpraca” na linii fosforylacja <=> metylacja uniemożliwia więc progresję cyklu w komórkach z uszkodzonym DNA. Poza regulacją transkrypcji z poziomu histonów, metylacji podlega też szereg czynników transkrypcyjnych. PRTM1 metyluje FOXO1 w pozycjach Arg248me i Arg250me, które zawarte są w motywie rozpoznawanym i fosforylowanym przez Akt. Skutkuje to tym samym zablokowaniem możliwości jego fosforylacji i zwiększa jego aktywność regulującą transkrypcję [39, 40].

W ostatnich latach publikowane jest coraz więcej badań opisujących rolę metylacji białek nie-histonowych w stanach patologicznych. Wiele typów nowotworów charakteryzuje się zwiększonymi poziomami ekspresji metylotransferaz, co często związane jest ze słabą prognozą. Zwiększona ekspresja G9a została wykryta u pacjentów z rakiem żołądka [41], a wyciszenie ekspresji tego enzymu skutkowało zmniejszeniem tempa wzrostu i zdolności metastazy w liniach ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc (A549 i H1299) [42]. Rosnąca liczba doniesień wskazuje na istotną rolę LSD1 w rozwoju i progresji chorób nowotworowych. Nadekspresja LSD1 została wykryta w wielu typach nowotworów, a jej rola w regulacji przejścia eptelialo-mezynchemalnego oparta jest na aktywności względem histonów [43]. Przykładem niehistonowego celu LSD1 jest białko p53 z którego usuwa metylację, co może skutkować zahamowaniem pro-apoptotycznych właściwości tego białka i początkiem nowotworzenia [44]. Zwiększona ekspresja SET7 łączona jest z gorszą prognozą u pacjentek z rakiem piersi, gdzie enzym ten reguluje ważne szlaki sygnałowe zaangażowane w kontrolę proliferacji, a wyciszenie jego ekspresji w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231 skutkowało zarówno zmniejszeniem tempa ich proliferacji i liczby tworzonych kolonii [45]. Opracowanych zostało wiele cząsteczek hamujących działanie metylotransferaz lub demetylaz, a niektóre z nich znajdują się

obecnie na etapie badań klinicznych. Jedynym zaakceptowanym przez FDA związkiem (2020 rok) związanym z metylacją białek jest inhibitor metylotransferazy EZH2 - EPZ-6438 (Tazemetostat), stosowany w leczeniu mięsaka nabłonkowego i chłoniaka grudkowego [46,47]. Inhibitor metylotransferaz typu I: GSK3368715 znajdował się na etapie I fazy badań klinicznych jednak zaobserwowano zbyt wiele niepożądanych efektów i badania zakończono [48]. Powyższy przykład doskonale ilustruje problemy z jakimi zmagają się badacze przy translacji swoich badań z laboratorium do kliniki. Intensywnie badane są także implikacje metylacji w kontekście innych zaburzeń, w tym chorób neurodegeneracyjnych. W badaniu kohortowym wskazano, że metylacja Tau może być powiązana z mniejszą zapadalnością na chorobę Alzheimera, poprzez zmniejszenie formowania fibryli białka Tau [49]. Wyniki dostępnych badań wskazują także na powiązania pomiędzy metylacją białek a rozwojem chorób metabolicznych w tym cukrzycy [50], ale także chorób układu krążenia [2, 51].

1.3. Acetylacja

Acetylacja białek została po raz pierwszy opisana w roku 1964 przez zespół Vincent'a Allfrey'a [52] i już wtedy autorzy postulowali o istotnej regulacyjnej roli tej modyfikacji, zwłaszcza w kontekście ekspresji genów. Z chemicznego punktu widzenia acetylacja polega na kowalencyjnym przyłączeniu do białka grupy acetylowej (Ac), której donorem jest acetylo-CoA [53]. Modyfikacji tej najczęściej ulegają łańcuchy boczne ϵ -amino lizyny, ale inne aminokwasy również mogą być acetylowane. Reakcję przedstawiono schematycznie na *Rysunku 1.6*.



Rysunek 1.6. Schematyczne przedstawienie reakcji acetylacji i deacetylacji białek. Enzymatyczna acetylacja prowadzona przez KATs z acetylo-CoA jako donorem grupy acetylowej. Deacetylacja prowadzona przez KDACS (HDACs) w mechanizmie zależnym od klasy enzymu. Opracowanie własne.

Acetylacja reguluje funkcje białek poprzez: (i) zwiększenie ich stabilności i oporności na degradację, (ii) zmianę ich lokalizacji w komórce oraz (iii) hamowanie aktywności enzymatycznej w wyniku modyfikacji miejsc aktywnych. Efekty molekularne acetylacji są wynikiem zmian w konformacji modyfikowanego białka, zmianą jego ogólnego ładunku lub też interakcji z białkami odczytującymi acetylację, zawierającymi w swojej strukturze α -helikalne bromodomeny, które wiążą i rozpoznają acetylo-lizynę [54]. Acetylacja jest w pełni odwracalna i dynamicznie przeprowadzana w odpowiedzi na sygnały wewnątrz lub zewnątrzkomórkowe. Reakcję katalizują acetylotransferazy lizynowe (KATs lub HATs, odpowiednio: ang. *Lysine Acetyltransferases* lub *Histone Acetyltransferases*), podzielone na trzy główne rodziny wykazujące podobieństwo sekwencji: (i) rodzina enzymów p300 i CBP związanych głównie z acetylacją histonów, (ii) rodzina MYST, której nazwa stanowi akronim

tworzących ją enzymów: MOZ, Ybf2, Sas2, TIP60 i (iii) rodzina enzymów GNAT do której zalicza się HAT1 i KAT2A [2, 55]. Usunięcie grupy acetylowej przeprowadzane jest przez deacetylazy lizynowe (KDACs lub HDACs, odpowiednio: ang. *Lysine Deacetylases* lub ang. *Histone Deacetylases*). KDACs podzielone są na cztery główne klasy w oparciu o podobieństwo sekwencji i wymagany kofaktor [55]. Podział znanych obecnie KDACs przedstawiono w *Tabeli 1.1*. Należy wspomnieć, że białka mogą być również acetylowane na drodze nieenzymatycznej w wyniku działania wysokoreaktywnych metabolitów np. acetylofosforanu jednak mechanizmy tego zjawiska są wciąż słabo poznane [2, 56].

Tabela 1.1. Zestawienie KDACs należących klas I-IV. Przygotowano na podstawie [55, 57 i 58].

Klasa KDACs	Enzym	Kofaktor	Wybrane cele molekularne
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Zn ²⁺	Histony, p53, NF-κB
IIA	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9		Histony
IIB	HDAC6, HDAC9		Histony, tubulina, Hsp
III	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5, SIRT6, SIRT7	NAD ⁺	Histony, tubulina, p54, TAF
IV	HDAC11	Zn ²⁺	Histony, tubulina, p54, TAF

Badania nad acetylacją białek, podobnie jak nad metylacją przez wiele lat skupione były wokół modyfikacji białek histonowych i jej wpływu na epigenetyczną regulację genów, która została przedstawiona w *Rozdziale 2*. Obecnie zidentyfikowano już tysiące miejsc w białkach, które mogą podlegać acetylacji i opisano wpływ tej modyfikacji w regulacji szeregu procesów komórkowych [59, 60]. Globalna analiza wykazała, że ponad 40% białek podlegających acetylacji związane jest z regulacją ekspresji genów, włączając w to histony, czynniki transkrypcyjne i inne regulatory transkrypcji [60]. Poza transkrypcją, acetylacja zaangażowana jest w regulację cyklu komórkowego, naprawy DNA, homeostazy redoks, szlaków sygnałowych, fałdowania białek i autofagii [60,61]. Jednym z pierwszych opisanych niehistonowych substratów dla KATs było białko p53 [62]. Acetylacja p53 przeprowadzana jest przez wiele typów KATs, m.in. PCAF [63], na kilku lizynach i w większości przypadków wpływa na zwiększenie wiązania tego czynnika do DNA promując transkrypcję zależnych od niego genów, co skutkuje zatrzymaniem wzrostu komórki lub apoptozą [63]. Kolejnym z przykładów jest czynnik STAT3, który poza aktywacją przez fosforylację w pozycji Tyr705 podlega także acetylacji w pozycji Lys685 przez CBP, co jak wykazały badania na komórkach nerki (HEK293) i raka wątroby (HepG2) wpływa na zdolność STAT3 do interakcji z DNA, a zahamowanie aktywności KDACs skutkowało zwiększeniem jego lokalizacji jądrowej [64,65]. Również wspomniany wcześniej czynnik FOXO1 podlega acetylacji, która nie tylko osłabia jego wiązanie do DNA, ale zwiększa też poziom ufosforylowania wpływając na jego lokalizację w komórce [58, 66]. Ponad 100 białek zaangażowanych w regulację transkrypcji podlega acetylacji [60], co umacnia pozycję tej modyfikacji jako jednego z głównych regulatorów ekspresji genów. W kontekście regulacji cyklu komórkowego przez acetylację dobrym przykładem są niezbędne w jego progresji kinazy zależne od cyklin (CDK, ang. *Cyclin Dependent Kinases*). Status acetylacji CDK1, jak pokazały badania wykonane na ludzkich komórkach nerki (HEK293T) regulowany jest przez p300 i SIRT1 i ma ogromne znaczenie w regulacji interakcji CDK1 z cykliną B. Acetylacja CDK1 zachodzi w miejscu aktywnym kinazy w pozycji Lys33 co hamuje jej interakcję z cykliną B i progresję cyklu w fazie G₂/M [67]. Acetylacja odgrywa również rolę w regulacji funkcji białek związanych z mechanizmami

naprawy DNA m.in. Rb [60]. Wciąż słabo poznanym aspektem jest rola acetylacji w modulacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Badania Okumura i wsp. 2006, w których modelem również były komórki HEK293T wykazały, że jeden z głównych negatywnych regulatorów szlaku PI3K/Akt – PTEN jest acetylowany przez p300 w obrębie miejsca aktywnego, co powoduje zahamowanie jego funkcji [68]. Acetylacja kinazy Akt hamuje jej aktywację przez fosforylację, a wyniki badań przeprowadzonych na modelu mysim wskazują, że aktywność SIRT1 umożliwia deacetylację i aktywację Akt [69, 70]. Odwrotny efekt w kontekście szlaku PI3K/Akt wykazuje acetylacja RICTOR, która wzmacnia aktywność kinazową kompleksu mTORC2 względem Akt, a tym samym tego szlaku [71]. Ponadto, acetylacji podlegają niemal wszystkie enzymy związane z metabolizmem, w tym te biorące udział w glikolizie, glukoneogenezie, cyklu kwasu trikarboksylowego, cyklu mocznikowym i metabolizmie kwasów tłuszczowych [2, 72]. W próbkach z ludzkiej wątroby wykryto 1300 acetylo-lizyn na 1047 białkach [72], co sugeruje olbrzymią rolę acetylacji w regulacji metabolizmu.

Zaburzenia w acetylacji mogą być przyczyną rozwoju stanów patologicznych. Związane jest to zazwyczaj z profilem acetylacji histonów, który w sposób bezpośredni zaangażowany jest w regulację ekspresji genów w tym pro- i anty-onkogenów. Jednak zidentyfikowano też niehistonowe białka, których status acetylacji determinować może rozwój stanów patologicznych. Badania przeprowadzone na próbkach tkankowych raka wątroby i komórkach HepG2 wykazały, że acetylacja kinazy fosfoglicerynowej 1 promuje proliferację komórek i nowotworzenie [73]. Wiele nowotworów charakteryzuje się zwiększonymi poziomami ekspresji KDACs m.in. rak prostaty, rak piersi [2,74]. U pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) wykryto zwiększoną ekspresję HDAC3, a zahamowanie aktywności tego enzymu w linii komórkowej limfoblastycznej B pobranej od pacjenta z ALL (Sup-B15) skutkowało zahamowaniem szlaku sygnałowego JAK-STAT i zwiększeniem wrażliwości komórek na leki, w tym MG-132 [75]. Niezwykle obiecujące wyniki zarówno badań *in vitro* i *in vivo* sprawiły, że KDACs stały się atrakcyjnym celem w opracowywaniu terapii celowanych skierowanych na acetylację. Szereg inhibitorów KDACs (KDACi, ang. *lysine deacetylases inhibitors*) został opracowany w ostatnich 20 latach, a kilka z nich zostało już zaakceptowanych przez FDA do stosowania w terapiach (Tabela. 1.2).

Tabela 1.2. Zestawienie inhibitorów deacetylaz lizynowych zaakceptowanych przez FDA do użytku w terapiach. Przygotowano w oparciu o [76 i 77].

KDACi	Zastosowanie	Cel molekularny	Rok akceptacji FDA
Vorinostat	Skórny chłoniak T-komórkowy	Klasa I KDACs i HDAC6	2006
Romidepsin	Skórny chłoniak T-komórkowy	HDAC6	2009
Belinostat	Chłoniaki T-komórkowe	Wszystkie klasy KDACs	2014
Panobinostat	Nawrotowy Szpiczak mnogi	Wszystkie klasy KDACs	2015

Zmiany w poziomach acetylacji białek wykrywane są również w chorobach metabolicznych, co ma związek ze wspomnianą już globalną acetylacją enzymów zaangażowanych w regulację metabolizmu. Cukrzyca i otyłość powiązane mogą być z mutacjami w obrębie celów acetylacji w białkach [78]. Hiperglikemia poprzez zwiększenie puli dostępnego acetylo-CoA prowadzić może do

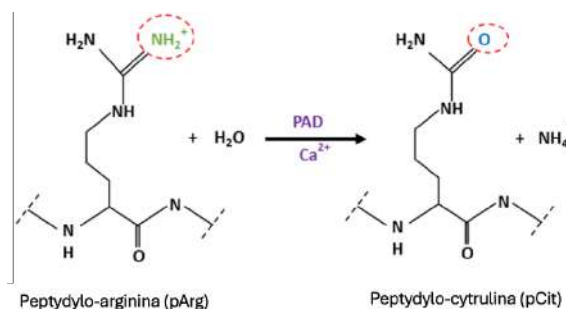
nadmiernej acetytacji białek i zmiany ich funkcji [79]. Opisano także rolę acetytacji w chorobach układu krążenia (CVDs, ang. *Cardiovascular diseases*), na przykład aktywność SIRT1 chroni komórki śródbłonka przed apoptozą indukowaną końcowymi produktami zaawansowanej glikacji poprzez zmniejszanie acetytacji p53 [80].

1.4. Cytrulinacja

Cytrulinacja białek to enzymatyczna PTMs, która podobnie jak omówione już acetyljacja i metylacja wprowadzana jest zarówno na białkach histonowych i niehistonowych. Jednak w odróżnieniu od nich jest reakcją znacznie słabiej poznaną, co wynika w dużej mierze z wciąż słabo rozwiniętych specyficznych dla niej metod badawczych.

1.4.1. Reakcja cytrulinacji

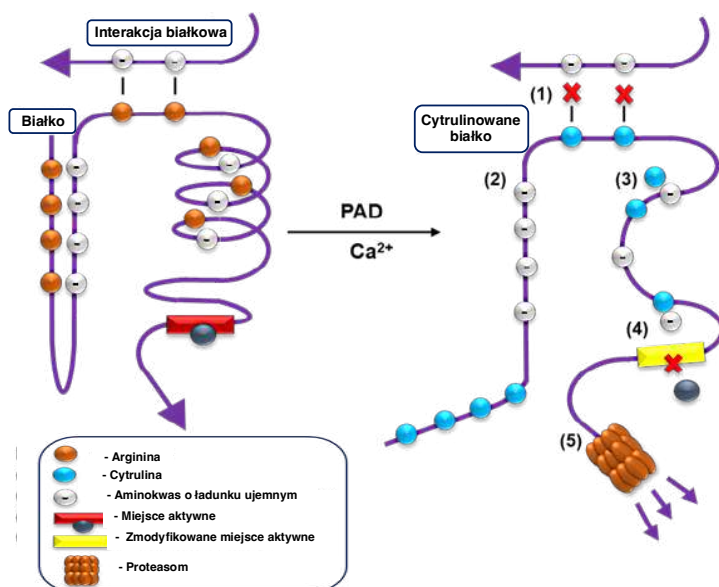
Obecność cytruliny w białkach zwierzęcych została stwierdzona już ponad 65 lat temu, kiedy to Rogers i Simmonds opisali jej wykrycie w białkach włosów szczurów [81]. Przez wiele lat mechanizm jej wprowadzania pozostawał nieodkryty. Jednak tuż po odkryciu enzymów przeprowadzających cytrulinację: deiminaz peptydyloargininowych (PADs, ang. *Peptidylarginine deiminases*) i kilku ich substratów, badania nad cytrulinacją przybrały na sile. Z biochemicznego punktu widzenia cytrulinacja białek różni się od omawianych już PTMs, nie polega na przyłączeniu (lub odłączeniu) określonej grupy chemicznej do reszt aminokwasowych, ale na konwersji argininy do niekodowanego aminokwasu cytruliny. Reakcja ta zachodzi wyłącznie w łańcuchach polipeptydowych a nie wolnych aminokwasach. Chemiczny mechanizm reakcji polega na zastąpieniu pierwszorzędowej grupy ketiminowej argininy przez grupę ketonową, co skutkuje utratą ogólnego dodatniego ładunku argininy [82] (*Rysunek 1.7*). Prowadzi to do



Rysunek 1.7. Schematyczne przedstawienie reakcji cytrulinacji białek. Reakcja katalizowana jest przez wapnio-zależne enzymy PAD. [Grafika przygotowana do publikacji Ciesielski i wsp. 2022].

relatywnie niedużej zmiany masy ok. +0,98 Da, co czyni ją niezwykle trudną do wykrywania zwłaszcza przy wykorzystaniu spektrometrii masowej. W ostatnich latach opracowane zostało jednak wiele nowatorskich metod badawczych ukierunkowanych na wykrywanie cytrulinowanych białek, w tym z wykorzystaniem znaczników biotynowo-tiolowych, które umożliwiają pewniejszą identyfikację cytrulinowanych białek [83]. Badania z roku 2018 przeprowadzone poprzez analizę danych proteomicznych z 30 typów ludzkich tkanek wskazały, że około 209 białek podlega cytrulinacji, i pewnie liczba ta wciąż będzie wzrastać [84]. Cytrulinacja jest obecnie uważana za reakcję nieodwracalną, nie odkryto żadnych enzymów wykazujących zdolność do „de-cytrulinacji”, jednak należy mieć na uwadze, że podobnie sądzono o metylacji. Mimo niewielkiej zmiany masy molekularne efekty wprowadzenia cytruliny w strukturę białek są istotne. Podobnie jak w przypadku acetytacji gdzie niwelowany jest dodatni ładunek lizyny, tak i w cytrulinacji utrata dodatniego ładunku argininy skutkować może

zmianami elektrostatycznymi i konformacyjnymi. Wpływa to na funkcje białek poprzez modyfikację miejsc aktywnych, interakcji białko – białko/kwasy nukleinowe, podatności na degradację lub lokalizację w komórce [82]. Molekularne konsekwencje cytrulinacji białek przedstawiono na [Rysunku 1.8](#). Ciekawym aspektem jest ewolucyjne pochodzenie enzymów PADs, a tym samym cytrulinacji. Cummings i wsp. w swojej pracy postulują, że enzymy PADs wprowadzone zostały do komórek zwierzęcych jako nowy mechanizm PTMs poprzez horyzontalny transfer genów z *Cyanobacteriace* [85]. PADs pochodzące z *Cyanobacteriace* wykazują aktywność katalityczną względem białek zwierzęcych [85]. Dodatkowo PADs lub ich homologów nie wykryto dotychczas w powszechnie stosowanych organizmach modelowych m.in. drożdżach czy też *Drosophila sp.*, stanowić to może jedno z wyjaśnień, dlaczego dotychczas cytrulinacja jest wciąż dość słabo poznana PTMs.



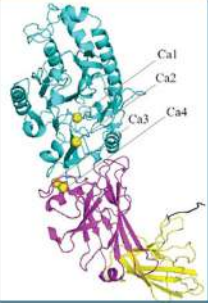
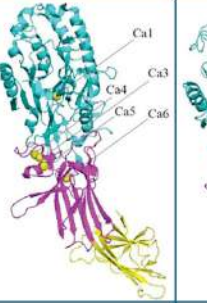
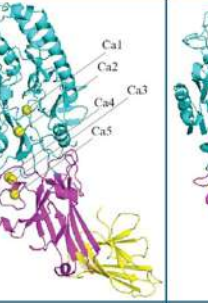
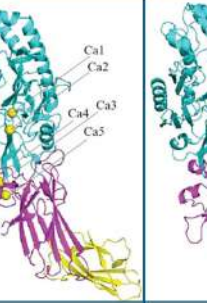
Rysunek 1.8. Molekularne efekty cytrulinacji białek.

- (1) Zaburzenie interakcji białko – białko
 - (2) Zaburzenie interakcji aminokwasów i formowania wiązań wodorowych
 - (3) Zmiany konformacyjne
 - (4) Utrata funkcji w wyniku modyfikacji miejsca aktywnego
 - (5) Zwiększenie podatności na degradację.
- [Grafika przygotowana do publikacji Ciesielski i wsp. 2022]

1.4.2. Deiminazy peptydyloargininowe

Pomimo wykrycia cytrulinacji w roku 1958, aż do 1977 roku nie znano ani mechanizmu, ani enzymów przeprowadzających tę reakcję [86]. Badania nad aktywnością i ekspresją PADs prowadzone były intensywnie dopiero w latach 90 XX wieku [87]. PADs zaliczane są do rodziny hydrolaz cysteinowych (EC 3.5.3.15). Obecnie wyróżnia się pięć izoform PADs: PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 i PAD6, które wykazują zróżnicowanie zarówno pod względem substratów, jak i poziomów ekspresji w różnych tkankach [82]. Mechanizm działania PADs oparty jest na nukleofilowym ataku cysteiny, zlokalizowanej w ich miejscu aktywnym, na grupę guanidynową argininy, co skutkuje utworzeniem pośredniego acylo-enzymu, który ulega następnie hydrolizacji do cytruliny [82, 88]. Izoformy wykazują względem siebie 70 – 95% homologii w sekwencji aminokwasowej, a ich długość mieści się w zakresie od 663 do 694 aminokwasów [88]. Struktury krystaliczne, lokalizację w komórce oraz główne miejsca ekspresji izoform PADs przedstawiono na [Rysunku 1.9](#). W ludzkim genomie, geny kodujące izoformy PADs zlokalizowane są na chromosomie 1 w regionie 1p35-36, o średniej długości 355 kbp, wykryto też wiele wariantów transkrypcyjnych PADs które różnią się spektrum substratowym, a tym samym funkcją [89]. Działanie PADs regulowane jest przez stężenia jonów wapnia, a każda z izoform zawiera różną liczbę

miejsz ich wiązania (*Rysunek 1.9*). Związanie Ca^{2+} prowadzi do zmian konformacyjnych PADs, które indukują powstanie aktywnego centrum aktywnego [90]. Miejsce aktywne PADs zawiera istotne katalitycznie: cysteinę (w pozycji C645 – C647 zależnie od izoformy) i histydynę oraz dwie stabilizujące reakcję reszty asparaginianowe [82].

	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4	PAD6
Struktura krystaliczna					
Lokalizacja w komórce	Cytoplazma	Cytoplazma/ Jądro	Cytoplazma	Cytoplazma/ Jądro	Cytoplazma
Główne miejsca ekspresji	Skóra, macica	Mięśnie szkieletowe, śledziona, mózg, ślinianki, macica	Mieszki włosowe, naskórek	Układ krwionośny, krwiotwórczy i limfatyczny	Jajniki, jądra, limfocyty krwi obwodowej

Rysunek 1.9. Zestawienie struktur krystalicznych, lokalizacji i miejsc ekspresji izoform PADs. Wykorzystano struktury krystaliczne zamieszczone w pracy Missouri i wsp. [87], z zaznaczeniem miejsc wiązania jonów wapnia. Opracowano na podstawie [82, 87 i 89].

Nie każda arginina zlokalizowana w sekwencji białka może podlegać konwersji na cytrulinę. Wykazano, że znaczenie mają zarówno otaczające ją aminokwasy oraz struktura białka [91]. Spektrum substratowe izoform PADs znacząco się różni. Wyłącznie PAD2 i PAD4 posiadają sygnał lokalizacji jądrowej i mogą przeprowadzać cytrulinację białek histonowych. Izoforma PAD6 nie wykazuje aktywności katalitycznej [82].

1.4.3. Fizjologiczny potencjał cytrulinacji

Ostatnia dekada to duże postępy w obszarze wiedzy na temat zaangażowania cytrulinacji białek w regulację fizjologicznych procesów komórkowych. Jednak nadal jest to wiedza znacznie ograniczona w porównaniu do dobrze poznanych mechanizmów związanych z innymi PTMs białek. Liczba znanych białek, które podlegają cytrulinacji znacznie wzrosła, jak wspomniano każda z izoform PADs wykazuje inne spektrum substratowe. Najlepiej poznane białka modyfikowane przez daną izoformę przedstawiono w *Tabeli 1.3*. Obecnie regulacja komórkowych szlaków sygnałowych wiązana jest głównie z fosforylacją i innymi dobrze poznanymi PTMs, ale coraz więcej doniesień skłania naukowców do zauważenia cytrulinacji jako równie istotnej sygnatury sygnałowej. Modyfikacja ta może być istotnym sygnałem w regulacji szlaków związanych ze wzrostem i proliferacją komórek. Badania na linii MCF7 wykazały, że GSK3 β podlega cytrulinacji, co moduluje jego funkcję i prowadzi do jego translokacji do jądra, hamując szlak sygnałowy TGF β , istotny w regulacji przejścia epitelialno-mezenchymalnego [92]. Cytrulinacji podlega też β -katenina, modyfikacja wprowadzana przez PAD2 zwiększa jej podatność na degradację hamując tym samym szlak Wnt [93].

Tabela 1.3. Zestawienie poznanych celów białkowych danej izoformy PADs. Zmodyfikowano z tabeli przygotowanej pierwotnie na potrzeby publikacji Ciesielski i wsp. 2022.

Enzym	Najlepiej poznane modyfikowane białka
PAD1	Keratyna, Filagryna, MEK1-ERK1/2, MMP2
PAD2	MPB, CXCL10, CXCL11, wimentyna, aktyna, GFAP, Histony H3 i H4
PAD3	Filagryna, wimentyna, trichohyalina
PAD4	NFC1, NFC2, COL1A1, p300, ING4, TAF15, FUS, ADAMTS13, GSK3 β , Histony H1, H3 i H4
PAD6	α -tubulina

Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują też na bezpośrednie powiązanie pomiędzy poziomem ekspresji PAD4, a aktywacją szlaku sygnałowego PI3K/Akt, jednak dokładny mechanizm tej relacji nie jest znany [94,95]. Ponadto, również kinaza MEK1 może podlegać cytrulinacji przez PAD1 lub PAD2, co reguluje jej zdolność do fosforylacji ERK1/2 [96,97]. Ekspresja PADs i ich role, wiązane są obecnie głównie z odpowiedzią immunologiczną organizmu. Jednym z dobrze poznanych powiązań jest cytrulinacja cytokin CXCL10, CXCL11 i IL-8, która prowadzi do obniżenia ich aktywności jako chemoatraktantów i zdolności do interakcji z receptorami [98, 99]. Jak wspomniano, cytrulinację wykryto po raz pierwszy w białkach włosów szczurów. Dziś wiemy, że cytrulinacja występuje w wielu białkach strukturalnych regulując ich stabilność i zmniejszając podatność na degradację. Istotnie, białka strukturalne takie jak keratyna, filagryna czy też trichohyalina, cytrulinowane są przez PAD1 lub PAD3, co przyczynia się do zwiększenia ich stabilności i wspomaga pełnienie ich funkcji strukturalnych [100]. Wyniki z próbek tkanki płucnej wskazują, że PAD2 prowadzi cytrulinację fibuliny-5, co zmniejsza jej podatność na degradację proteolityczną i promuje elastogenność [101]. Zaś zahamowanie aktywności PAD2 w fibroblastach płuc noworodków, z wykorzystaniem inhibitora lub poprzez wyciszenie ekspresji, skutkowało tworzeniem znacznie mniej trwałych elastycznych włókien, co przyczyniać może się m.in. do rozwoju rozedmy płuc [101]. Innym istotnym białkiem strukturalnym stanowiącym cel dla PAD2 jest podstawowe białko mieliny (MBP, ang. *Myelin Basic Protein*) [82, 102]. W ostatnich latach pojawiło się też doniesienie, że cytrulinacja jest istotna w regulacji funkcji białek remodelujących macierz zewnątrzkomórkową (ECM, ang. *Extracellular matrix*) – metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs, ang. *Matrix Metalloproteinases*), gdzie hipercytrulinacja przyczyniać może się do zwiększenia ich aktywności [103]. Podobnie w przypadku rodziny SERPIN, z których niektóre działają jako modulatory ECM, wykazano, że mogą one stanowić cel dla PADs, a cytrulinacja istotnie wpływa na ich funkcje [104].

Doniesienia ostatnich 10 lat potwierdziły, że cytrulinacja jest istotnie związana z regulacją odpowiedzi immunologicznej i stanami autoimmunologicznym [82]. Największe poziomy ekspresji PADs obserwuje się w komórkach układu immunologicznego. Zwłaszcza wysokie poziomy PAD4 rejestrowane są w neutrofilach i innych leukocytach [82, 100], gdzie reguluje immunologiczne szlaki sygnałowe, ekspresję i aktywność cytokin. Jednak najlepiej opisanym dotychczas procesem zależnym od cytrulinacji jest powstawanie tzw. zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs, ang. *Neutrophil Extracellular Traps*). Jest to istotny mechanizm obrony organizmu przed wnikającymi

patogenami, polegający na litycznej śmierci neutrofilów, która skutkuje utworzeniem zewnątrzkomórkowych „siec” złożonych z dużych struktur chromatyny i białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej uwolnionych z martwych neutrofilów. NETs mogą wyłapywać patogeny i prowadzić tym samym do zahamowania rozprzestrzeniania się infekcji [105]. W literaturze opisano mechanizmy formowania NETs zależne od cytrulinacji histonów wprowadzanej przez PAD4 [82]. Według jednego z proponowanych mechanizmów, PAD4 przeprowadza hipercytrulinację histonów H3 i H4 w odpowiedzi na aktywację neutrofilów przez m.in. cytokiny prozapalne, co skutkuje dekondensacją chromatyny i jej uwolnienie z neutrofilów i formację NETs [82]. Również same cytrulinowane histony w środowisku zewnątrzkomórkowym wykazują działanie antybakteryjne, co zwiększa efektywność NETs [106]. Istotność cytrulinacji w tym procesie potwierdziły badania z zastosowaniem inhibitorów PAD, które zakłóciły powstawanie pułapek neutrofilowych zarówno u myszy jak i ludzi [107]. Mimo roli NETs w odpowiedzi na infekcję zaburzenia w ich formowaniu stanowią podłoże wielu stanów patologicznych, w tym tych, gdzie zmiana ulega aktywność PADs. PADs uczestniczą też w regulacji różnicowania limfocytów T, PAD2 moduluje aktywność TF odpowiedzialnych za determinowanie losu limfocytów T [108].

Interakcje na linii cytrulinacja $\leftrightarrow$ inne PTMs są obecnie intensywnie badane. Zwłaszcza interakcje cytrulinacja – metylacja zdają się mieć istotne znaczenie w regulacji prawidłowych funkcji komórek. Wspomniano już o metylacji arginin, która może być usuwana poprzez cytrulinację prowadzoną przez PAD4, jednak bardzo często argininy, które stanowią cel dla PRTM są też celem dla PADs i ich cytrulinacja wyklucza metylację, co stanowi interakcję kompetycyjną [109]. Przykładem białka, na którym zachodzi taka interakcja jest acetylotransferaza p300 [110]. Zarówno PRTM4 jak i PAD4 mogą modyfikować C-końcową argininę p300 w pozycji 2142, wywołując inne efekty biologiczne. Metylacja hamuje interakcję p300 z GRIP1 tym samym zmniejszając formowanie się kompleksu aktywującego ekspresję docelowych genów, odwrotny efekt wywołuje cytrulinacja która ułatwia formowanie kompleksu p300/GRIP1 [110]. Cytrulinacja i metylacja argininy modulują funkcje czynnika transkrypcyjnego E2F1 – prowadząc do ekspresji innych genów [109]. Cytrulinacja argininy w pozycji 109 zwiększa aktywność E2F1 względem promocji ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym [111], natomiast metylacja tej samej reszty promuje ekspresję genów związanych z apoptozą [112]. W literaturze znaleźć można też doniesienia o współpracy acetylacji i cytrulinacji. Acetylowane E2F1 wchodzi z interakcją z bromodomeną białka BRD4 i interakcja ta jest wspomagana przez cytrulinację arginin w otoczeniu acetylowanej lizyny. Istotność tej interakcji wykazano na komórkach HL60 gdzie zastosowanie inhibitora PADs zmniejszyło ilość kompleksów E2F1/BRD4 i poziomy ekspresji m.in. TNF α i IL-1 β [111].

1.4.4. Rola cytrulinacji w stanach patologicznych

1.4.4.1. Cytrulinacja w zaburzeniach immunologicznych

W wielu zaburzeniach immunologicznych obserwuje się zwiększoną aktywność PADs, a tym samym cytrulinacji białek. Zwłaszcza silne są powiązania pomiędzy PAD2/PAD4, a zaburzeniami

autoimmunologicznymi, co ma związek z produkcją specyficznych przeciwciał przeciwko własnym cytrulinowanym białkom – ACPAs (ang. *Anti-citrullinated protein antibodies*) [113]. W warunkach fizjologicznych układ immunologiczny nie reaguje na niskie ilości cytrulinowanych białek, jednak w wyniku ich nagromadzenia i utraty tolerancji produkowane są ACPAs, które dodatkowo napędzają procesy autoimmunologiczne [82]. Deregulacja PADs i cytrulinacji najlepiej opisana jest w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów (RA, ang. *Rheumatoid arthritis*) [114]. Schorzenia polegającego na immunologicznym uszkodzeniu stawów, charakteryzującego się nagromadzeniem autoprzeciwciał skierowanym przeciwko własnym modyfikowanym, zwłaszcza cytrulinowanym białkom [114]. W jednym z proponowanych mechanizmów PAD2 i PAD4 uwalniane są z makrofagów i monocytów rekrutowanych do stawów objętych stanem zapalnym. Następująca apoptoza i wzrastające stężenia Ca^{2+} powoduje odpowiednio ich uwolnienie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i zwiększenie ich aktywności [82]. PAD2 i PAD4 cytrulinują następnie białka komórkowe i zewnątrzkomórkowe w tym m.in. wimentynę, fibrynogen i α -enolazę. Nagromadzenie cytrulinowanych epitopów powoduje utratę tolerancji układu immunologicznego i produkcję ACPAs [82]. ACPAs wykrywane są u 75% pacjentów z RA i stymulują produkcję cytokin prozapalnych i formowanie NETs [115]. Indukcja powstawania nadmiernych NETs jest jednym z elementów wzmacniających objawy RA. Prowadzona przez PAD4, skutkuje uwolnieniem dodatkowej puli cytrulinowanych białek z neutrofili, co skutkować może wytworzeniem większej liczby ACPAs [82]. Obecnie rozważane jest wykorzystanie PADs jako celów terapii w RA, przykładowo zastosowanie inhibitora PAD4 w mysim modelu RA zmniejszyło formowanie NET i objawy choroby [116]. Kolejnym zaburzeniem autoimmunologicznym w którym wskazać można wyraźną rolę cytrulinacji jest stwardnienie rozsiane. Nadmierna cytrulinacja podstawowego białka mielinowego prowadzona przez PAD2 jest wskazywana obecnie jako jeden z mechanizmów rozwoju tego schorzenia [82, 117]. Inne zaburzenia autoimmunologiczne łączone z deregulacją funkcji PADs zebrano w Tabeli 1.4.

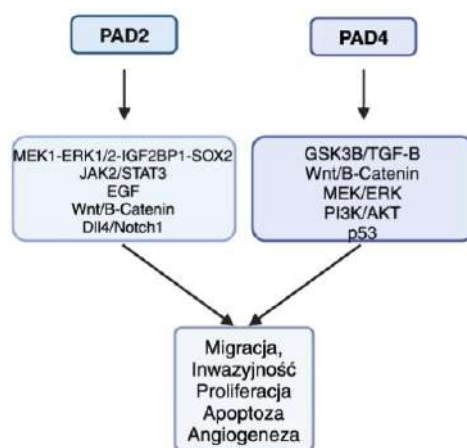
Tabela 1.4. Zestawienie obecnej wiedzy na temat zaangażowania PADs w choroby autoimmunologiczne. Zmodyfikowano z Ciesielski i wsp. 2022.

Izofорма PAD	Choroby	Rola w chorobie/cel molekularny
PAD1	Łuszczyca	Deregulacja różnicowania skóry/keratyna
PAD2	Stwardnienie rozsiane, RA, toczeń rumieniowaty	Hipercytrulinacja MBP/MBP, hipercytrulinacja wielu białek indukcja produkcji ACPAs, nadmierne formowanie NETs
PAD3	Łuszczyca, RA	Deregulacja różnicowania skóry/keratyna, hipercytrulinacja wielu białek indukcja produkcji ACPAs
PAD4	RA, Stwardnienie rozsiane, choroba zapalna jelit	Hipercytrulinacja wielu białek indukcja produkcji ACPAs, nadmierne formowanie NETs, epigenetyczna regulacja ekspresji genów

1.4.4.2. Cytrulinacja w nowotworach

W wielu typach nowotworów zaobserwowano deregulację profilu cytrulinacji białek i poziomów ekspresji PAD2, PAD4. Spośród PADs to udział tych dwóch izoform został zbadany najszerszej w progresji nowotworów, wynika to prawdopodobnie z dwóch faktów. Po pierwsze, PAD2 i PAD4 są izoformami obecnymi w największej liczbie tkanek [100]. Po drugie jako jedyne

zaangażowane są w epigenetyczną regulację genów. Sprawia to, że stanowią obecnie, wraz ze wzrastającą liczbą specyficznych odczynników m.in. przeciwciał, atrakcyjny cel badań pod kątem ich zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych. Mimo tego, ten obszar badań jest relatywnie nowy i znaczne postępy obserwowane są dopiero od ok. 15 lat. Zwiększone poziomy PAD2 obserwuje się w wielu typach nowotworów zwłaszcza złośliwych m.in. rak żołądka, rak wątroby, rak jelita grubego i rak piersi [118]. PAD4 jest również nadreprezentowane w wymienionych nowotworach i jego poziom wzrasta wraz ze stopniem agresywności choroby [119]. W literaturze proponuje się wykorzystanie obu izoform jako biomarkerów dla określonych typów nowotworów [119], jednak biorąc pod uwagę ich zaangażowanie w wiele zaburzeń immunologicznych należy opracować metody wykluczające fałszywe lub mylące diagnozy. Co więcej, dostępne są też doniesienia opisujące obniżone poziomy PAD2. Przykładowo, w badaniu z 2017 na próbkach tkankowych od Japońskich pacjentów cierpiących na raka jelita grubego, gdzie autorzy postulują, że PAD2 działać może jako supresor nowotworzenia [120]. Na poziomie molekularnym opisano dotąd kilka mechanizmów zaangażowania cytrulinacji w progresję chorób nowotworowych. Jednym z dobrze zbadanych celów dla PAD4, istotnym w omawianym zagadnieniu jest kinaza GSK3 β , regulująca funkcję TF zaangażowanych w modulację procesu nowotworzenia w tym m.in. proliferację i apoptozę [92, 121]. PAD4 reguluje lokalizację jądrową GSK3 β poprzez konwersję R344 do cytruliny, jak wykazały badania modyfikacja ta odpowiada za translokację GSK3 β do jądra [92, 122]. W komórkach MCF7 wyciszenie PAD4 skutkowało indukcją profilu związanego z EMT, zwiększając ich inwazyjność [92]. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy postulują, że PAD4 jest istotne w utrzymaniu fenotypu epitelialnego, co potwierdzają również wyniki od pacjentek z rakiem piersi, gdzie zmniejszone poziomy PAD4 związane były z większą inwazyjnością i agresywnością choroby [92]. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy postulują, że aktywność PAD4 istotna jest w utrzymaniu fenotypu epitelialnego, co potwierdzają również wyniki od pacjentek z rakiem piersi, gdzie zmniejszone poziomy PAD4 związane były z większą inwazyjnością i agresywnością choroby [92]. W badaniu z roku 2022 przeprowadzonym na liniach komórkowych raka jelita grubego (HCT116, HT29, SW620) wykazano jednak, że cytrulinacja GSK3 β promuje progresję nowotworu poprzez indukcję degradacji CDKN1A [121]. Co więcej, zwiększona ekspresja PAD4 związana była ze zwiększoną proliferacją i migracją komórek HCT116 [122]. Powyższe przykłady dobrze pokazują jak różną rolę pełnić może jedna modyfikacja w zależności od kontekstu w jakim jest wprowadzana.



Rysunek I.10. Zestawienie znanych obecnie szlaków sygnałowych potencjalnie regulowanych przez PAD2/PAD4. Regulując aktywację lub zahamowanie powyższych szlaków PAD2/PAD4 wpływają na istotne procesy komórkowe i prowadzić do rozwoju lub progresji nowotworów [opracowanie własne na podstawie doniesień zebranych w 188 i 119]

Ostatnie badania wskazują także na zaangażowanie PAD4 w regulację szlaku PI3K/Akt, wskazując, że zwiększona ekspresja PAD4 może skutkować nadmierną aktywacją tego szlaku i zwiększeniem

agresywności m.in. w komórkowych modelach raka nosogardzieli [95]. Podobną rolę pokazano również dla PAD2 w siatkówczaku: w linii komórkowej Y79 wyciszenie tego enzymu lub zastosowanie jego inhibitora skutkowało obniżeniem fosforylacji Akt a tym samym proliferacji i migracji *in vitro* [123]. Inne szlaki sygnałowe które w nowotworach regulowane mogą być przez PAD2/PAD4 przedstawiono na [Rysunku 1.10](#).

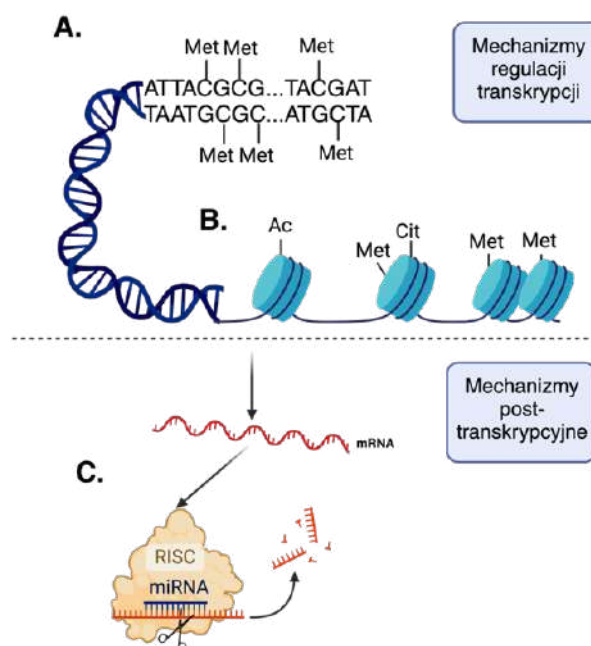
1.4.5. Inhibitory PAD

W ostatnich 20 latach opracowano wiele inhibitorów PADs. Ze względu na dużą homologię izoform PADs większość związków działa jako inhibitory *pan*-PAD, jednak opracowano też związki wykazujące większą specyficzność względem konkretnej izoformy. Wśród odwracalnych inhibitorów o szerokim spektrum substratowym można wymienić: streptomycynę i chlorotetracyklinę [82, 90]. Wykazują one słabą aktywność inhibitorową nawet przy wysokich stężeniach, co sprawia, że mało prawdopodobne jest ich praktyczne wykorzystanie [119]. Najwięcej uwagi poświęcono opracowaniu odwracalnych inhibitorów specyficznych wobec PAD4. Pierwszym związkiem był GSK121, na którego podstawie opracowano znacznie bardziej wydajne GSK199 i GSK484 [90]. GSK484 jest najsilniejszym odwracalnym inhibitorem PAD4 o $IC_{50} = 50$ nM. Obecnie w badaniach najszerzej wykorzystywane są nieodwracalne inhibitory, których działanie opiera się na kowalencyjnej modyfikacji cysteiny w centrum aktywnym PADs, niezbędnej w nukleofilowym ataku na substrat [82]. Na podstawie znanego substratu PAD4: amidu benzoilo-L-argininy poprzez wprowadzenie haloacetamidyny opracowano pierwszą serię nieodwracalnych inhibitorów PAD [90]. Wśród nich najlepsze wyniki osiągały Cl-amidyna (CLA) i F-amidyna (FA). Zwłaszcza CLA jest szeroko stosowana w badaniach i często stanowi odnośnik dla nowo opracowywanych związków [90]. Hamuje ona formację NETs *ex vivo* poprzez obniżenie H3cit [124], a w badaniach na modelach mysich zmniejszała intensywność stanów patologicznych związanych z cytrulinacją [125, 126]. Druga seria związków haloacetamidynowych została opracowana przez wprowadzenie grupy karboksylowej w pozycji *orto* grupy fenylovej CLA lub FA [90]. Powstałe *o*-CLA i *o*-FA wykazują silniejsze działanie niż oryginalne związki [127]. Trzecia seria haloacetamidynowych inhibitorów powstała poprzez wprowadzenie N-końcowej grupy bifenylovej i C-końcowej grupy benzimidazolowej. Opracowane w ten sposób BB-Cl-amidyna (BBCLA) i BB-F-amidyna (BBFA) wykazują nie tylko zwiększoną stabilność i biodostępność poprzez zwiększenie ich lipofilności, ale także większy potencjał inhibitorowy [90]. Z tych dwóch związków to BBCLA jest znacznie częściej stosowana w badaniach, ma większy czas półtrwania *in vivo* w porównaniu z CLA i FA, co prawdopodobnie odpowiada za jej większy potencjał inhibitorowy, ale i cytotoksyczność w komórkach U2OS [82]. BBCLA podobnie jak CLA hamuje formowanie NETs i H3cit [125]. Na podstawie CLA opracowano kilka związków wykazujących specyficzność względem PAD2, m.in. AMF30a i AMF32a [128]. W roku 2024 Wang i wsp. na podstawie struktury β -karboliny opracowali serię specyficznych inhibitorów PAD4, których skuteczność zaprezentowali na modelach raka piersi [129]. Spośród wymienionych, CLA, FA i BBCLA pozostają najrzeszej stosowanymi związkami. Jednak, wykazują one dużo działań niepożądanych [130].

2. Epigenetyczny aspekt PTMs – modyfikacje histonów

Proces ekspresji genów zależy od statusu przestrzennego chromatyny w komórce, który regulowany jest przez wiele mechanizmów. Chromatyna stanowi dynamiczny kompleks DNA związanego z białkami, głównie histonami i czynnikami transkrypcyjnymi, ale także innymi regulatorami. Podstawową jednostką upakowania DNA w chromatynie jest nukleosom składający się z DNA nawiniętego na oktamer histonowy, zbudowany z dimerów histonów H3-H4 otoczonych dimerami H2A-H2B [131]. Pomiędzy nukleosomami występuje tzw. linker DNA (łączy DNA) z którym związany jest histon H1. To właśnie odległość pomiędzy nukleosomami jest jednym z głównych czynników determinujących status przestrzenny chromatyny. Odległość ta jest większa w luźnej strukturze euchromatyny i znacznie mniejsza w upakowanej heterochromatynie [132]. Dostępność chromatyny dla czynników umożliwiających transkrypcję genów lub też jej upakowanie i zatrzymanie procesu ekspresji genów warunkowane jest w dużej mierze przez mechanizmy epigenetyczne.

Epigenetyka według klasycznej definicji odnosi się do dziedzicznych zmian w ekspresji genów, które nie są związane z bezpośrednią zmianą w sekwencji DNA. Wśród tych mechanizmów wyróżnia się: (i) metylację DNA, (ii) PTMs histonów oraz (iii) niekodujące RNA. Regulują one ekspresję genów zarówno na poziomie transkrypcyjnym (metylacja DNA i PTMs histonów) jak i post-transkrypcyjnym (miRNA). Na [Rysunku 1.11](#) schematycznie przedstawiono epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów.



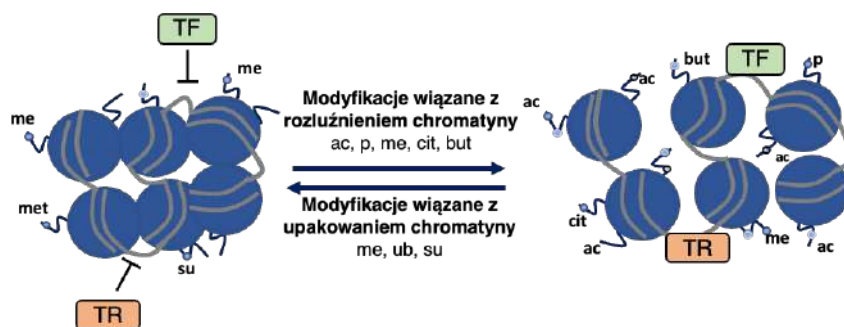
Rysunek 1.11. Schematyczne przedstawienie mechanizmów epigenetycznych. A. – metylacja DNA, B. – PTMs histonów i C – mechanizmy miRNA. Opracowanie własne.

Epigenetyka stoi u podstaw rozwoju organizmów. Wszystkie komórki zawierają identyczną informację genetyczną i wyłącznie od profilu ekspresji genów, który modulowany jest właśnie przez wymienione mechanizmy, determinowane jest różnicowanie i rozwój określonych komórek. Epigenom jest niezwykle dynamiczny i podatny na zmiany w odpowiedzi zarówno na sygnały wewnętrzne, jak i zewnątrzkomórkowe, co sprawia, że jest istotnym mechanizmem adaptacyjnym. Wykazano, że

Środowisko zewnętrzne człowieka znacznie wpływa na profil modyfikacji epigenetycznych. Opisano wpływ stresu związanego z wojną, klęskami głodu i występowaniem zespołu stresu pourazowego, a modyfikacjami profilu metylacji DNA [133]. Zmiany w obrębie epigenomu, a tym samym w ekspresji genów w naturalny sposób prowadzić mogą do zaburzeń i rozwoju wielu chorób w tym nowotworowych [134]. Dynamiczność i odwracalność większości z modyfikacji epigenetycznych czyni je atrakcyjnymi celami w terapiach. Podczas analizy epigenomu kluczowe jest by mieć na uwadze współpracę pomiędzy każdym z poziomów regulacji epigenetycznej, a także z ostrożnością odnosić się do wpływu pojedynczych modyfikacji. W komórce, mechanizmy epigenetyczne pozostają nie tylko w stałej korelacji ze sobą, zwłaszcza na linii metylacja DNA $\leftrightarrow$ PTMs histonów, ale także z szeregiem innych procesów komórkowych i szlaków sygnałowych, w tym tych modyfikowanych przez PTMs białek niehistonowych.

2.1. Omówienie wybranych PTMs histonów

Histony to białka o średniej masie cząsteczkowej wahającej się w granicach 11-20 kDa, które dzięki posiadaniu w swojej sekwencji dużej liczby aminokwasów zasadowych mogą tworzyć kompleksy z DNA [135]. Jak nadmieniono wyżej, histony są podstawowym elementem nukleosomów. Składają się z domeny globularnej, odpowiadającej za oddziaływania z DNA i innymi białkami, w tym za oddziaływania histon – histon w oktamerze [136]. Poza domeną globularną istotną rolę w regulacji funkcji histonów odgrywają ich C- i N-końce. N-końce nazywane są także „ogonami histonowymi”, to głównie w ich obrębie zachodzą PTMs [136]. W ujęciu teoretycznym PTMs histonów modulują ekspresję genów bezpośrednio poprzez modyfikacje w ładunkach i strukturach ogonów histonowych, co w efekcie powoduje zmiany w oddziaływaniach: histony-DNA i skutkuje rozluźnieniem lub kondensacją struktury chromatyny. W sposób pośredni natomiast, stanowić mogą miejsce wiązania się białek posiadających odpowiednie domeny wiążące i wykazujące aktywność promującą lub supresorową. Modyfikacje ogonów histonowych to jeden z najlepiej poznanych mechanizmów epigenetycznych. Schematyczny wpływ wybranych PTMs histonów przedstawiono na [Rysunku 1.12](#).



Rysunek 1.12. Schematyczne przedstawienie wpływu PTMs histonów na stan przestrzenny chromatyny. ac – acetylacja; p – fosorylacja; me – metylacja; cit – cytrulinacja; but – butyrylacja; ub – ubikwitynacja; su – sumoylacja. Opracowanie własne

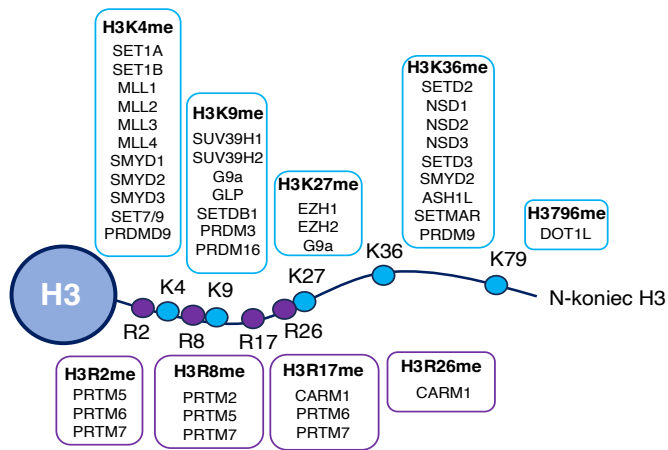
W obszarze badań PTMs histonów wciąż niezwykle żywa jest dyskusja na temat istnienia tak zwanego „kodu histonowego” – hipotezy, według której pojedyncze modyfikacje histonów komunikują się ze sobą wywołując określone zmiany w profilu ekspresji genów. Postulowano także, że określony kod histonowy przypisany może być do konkretnego stanu chorobowego [137]. Interakcje pomiędzy pojedynczymi PTMs mogą zachodzić w formie kompetycyjnej czy też sferycznej, zarówno lokalnie, jak

i dystalnie. Jednak są one w dużej mierze zależne od miejsc ich wprowadzenia, typów, tempa ich wprowadzania/usuwania oraz kontekstu komórkowego. Tym samym w ostatnich latach coraz częściej odchodzi się od hipotezy kodu histonowego. Dzięki postępom w technikach badawczych, w tym tych związanych z PTMs białek i globalnymi badaniami transkrypcyjnymi w ostatnich latach odkrywane jest coraz więcej rodzajów PTMs histonów, między innymi jest cytrulinacja.

Jedną z trudności badań dotyczących PTMs histonów jest fakt, że enzymy wprowadzające te modyfikacje nie są specyficzne wyłącznie wobec białek histonowych, ale też innych białek, w tym tych zaangażowanych w regulację transkrypcji. Powoduje to, że zastosowanie inhibitorów czy też nawet wyciszenie ekspresji konkretnych enzymów, nie stanowi idealnego modelu do badania wpływu konkretnej modyfikacji na stan chromatyny, ze względu na dużą liczbę celów dla tych enzymów. Przydatne w tym aspekcie jest zastosowanie innych modeli badawczych w których występuje mniej homologów czy też enzymów pełniących podobne funkcje jak np. *Saccharomyces cerevisiae* czy *Caenorhabditis elegans*. Mutacje lub zmiany w aktywności enzymów wprowadzających PTMs histonów i następujące w wyniku tego modyfikacje profilu PTMs histonów znacznie wpływają na ekspresję genów, a tym samym na funkcje komórki. Zaburzenia w profilu PTMs histonów stoją często u podłoża chorób nowotworowych i ze względu na swój dynamizm i potencjał odwracalności stanowią atrakcyjne cele terapeutyczne. Zbliżonym działem epigenetyki jest obszar badający warianty białek histonowych, których występowanie jest również jednym z ważnych regulatorów stanu chromatyny [138]. Kanoniczne histony mogą być zastąpione przez niekanoniczne warianty, np. histon H3 zastępowany w aktywnych genach przez histon H3.3 [139]. Warianty odgrywają ważne role nie tylko w regulacji transkrypcji, ale także w segregacji chromosomów i procesach naprawy DNA [139, 140].

2.1.1. Metylacja histonów

Proces metylacji histonów z chemicznego punktu widzenia nie różni się od opisanego już mechanizmu metylacji białek niehistonowych. Prowadzony jest przez tę samą grupę enzymów oraz zachodzi głównie na resztach lizynowych i argininowych. Najszerzej zbadano modyfikacje ogona histonowego H3, na resztach lizynowych w pozycjach K4, K9 i K27 i argininowych w pozycjach R2, R8, R17 i R26. Metylacja stanowić może zarówno sygnał hamujący lub promujący transkrypcję, zależnie od miejsca i stopnia modyfikacji. Na [Rysunku 1.13](#) przedstawiono wybrane miejsca metylacji ogona histonowego H3 oraz enzymy wprowadzające modyfikację. Metylacja reguluje transkrypcję genów w sposób bezpośredni – zmieniając interakcję histonów z DNA, ale częściej ma to miejsce w wyniku umożliwienia bądź zahamowania wiązania aktywatorów lub represorów transkrypcji do promotorów genów. Ważnym aspektem jest interakcja metylowanej lizyny, z białkami zawierającymi chromodomenę, z których jedną z najlepiej opisanych rodzin są białka heterochromatynowe (HP, ang. *Heterochromatin proteins*), w tym HP1 które specyficznie wiąże się z trimetylowaną lizyną 9 histonu 3 (H3K9me3). Prowadzi to do formowania wyższych struktur upakowania chromatyny, a tym samym represji ekspresji genów [141].



Rysunek I.13. Reszty argininowe i lizynowe podlegające metylacji w ogonie histonu H3 i przeprowadzające je enzymy. Opracowanie własne na podstawie danych literaturowych.

Metylacja lizyny 4 histonu 3 (H3K4me1, me2, me3) jest jedną z najlepiej poznanych PTM histonów. Uważa się, że jest to sygnatura epigenetyczna związana z aktywnymi transkrypcyjnie genami. Dzięki profilowaniu genome-wide ustalono, że zwiększone poziomy H3K4me1 znajdują się w regionach enhancerowych, H3K4me2 na końcach 5' transkrybowanych genów a H3K4me3 w regionach promotorowych aktywnie transkrybowanych genów [142, 143]. Wiele badań wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie H3K4me w regulację transkrypcji, ale istnieją też doniesienia wskazujące, że w niektórych sytuacjach sygnatura ta nie pełni istotnej roli [142]. Zaproponowano kilka mechanizmów w jaki H3K4me1 reguluje transkrypcję. Główny zakłada, że H3K4me1 zlokalizowane w regionach enhancerowych ułatwia ich interakcję z regionami promotorowymi poprzez tworzoną pętlę chromatyny, wykazano też, że nukleosomy na których zlokalizowana jest ta sygnatura wykazują większe zdolności wiązania czynników remodelujących chromatynę, co ułatwia transkrypcję [142]. Jednym z enzymów wprowadzających mono-metylację (H3K4me1) jest SET7/9. Badania na linii komórkowej mysich mioblastów C2C12 wykazały, że zależna od SET7/9 H3K4me1 promuje transkrypcję genów miogennych np. *MYOD*, *MYOGENIN* [144]. Wyciszenie SET7/9 w ludzkiej linii śródbłonna mikronaczyniowego (HMEC-1) skutkowało zmianami w ekspresji ponad 8000 genów [145]. Zaburzenia w metylacji H3K4 wykrywane są w wielu typach nowotworów. Zarówno obniżenie jak i zwiększenie poziomów metylacji H3K4 związane jest z prognozą w chorobach nowotworowych [146]. Co dodatkowo wskazuje na błędne założenia hipotezy jednego kodu histonowego i wyraźną zależność efektu modyfikacji od jej kontekstu i lokalizacji.

Kolejną z dobrze poznanych sygnatur epigenetycznych jest metylacja lizyny 9 (H3K9me1, me2, me3). W literaturze opisywana jest jako marker nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny, obecny zarówno w konstytutywnej jak i fakultatywnej heterochromatynie. Zwiększone poziomy H3K9me2 i H3K9me3 korelują ze zmniejszoną dostępnością transkrypcyjną DNA i obniżoną transkrypcją genów [143]. Dokładne mechanizmy tej negatywnej regulacji genów nie są jeszcze dobrze poznane, zakłada się jednak, że głównym mechanizmem jest blokowanie przyłączania TF i kompleksów polimerazy RNA [147]. Jak już wspomniano, białka HP1 a zwłaszcza izoformy HP1α i HP1β wiążą się do H3K9me2 i H3K9me3 poprzez swoje chromodomeny i łączą się tworząc kompleksy białkowe, które zbliżają do siebie nukleosomy powodując upakowanie chromatyny [143, 148]. HP1α/β mogą

dotatkowo rekrutować inne białka odpowiedzialne za remodelowanie chromatyny m.in. deacetylazy histonowe [143]. Jednym z enzymów odpowiedzialnych za wprowadzanie H3K9me2/3 na promotorach aktywnych transkrypcyjnie genów zlokalizowanych w euchromatinie i tym samym ich represję, jest G9a [149]. Aktywność G9a i poziomy wprowadzanych przez nią modyfikacji są zwiększone w warunkach hipoksji, co ma duże znaczenie zwłaszcza w przypadku nowotworów, gdzie represja genów przez aktywność G9a promować może proliferację i przeżywalność [150]. W wielu typach nowotworów zaobserwowano zwiększone poziomy G9a m.in. rak piersi, rak prostaty [151], co bezpośrednio związane jest ze zmniejszoną ekspresją genów supresorowych. Metylacja H3K9, w tym ta regulowana przez G9a zaangażowana jest również w promowanie EMT i hamowanie apoptozy, co potwierdza silne powiązania między zaburzeniami w H3K9me2/3, a agresywnością nowotworu i potencjałem do przerzutowania [151]. Kilka z inhibitorów G9a badane było pod kątem ich wykorzystania jako potencjalnych leków, jednak dotychczas żaden z nich nie doszedł do etapu prób klinicznych. Jeden z najbardziej obiecujących związków: BIX-01294 wykazywał zdolność do hamowania wzrostu kilku linii nowotworowych indukując zmniejszenie poziomów H3K9me2, jednak wykazywał również dużą cytotoksyczność względem komórek prawidłowych, co znacznie zmniejszyło potencjał jego wykorzystania [151].

LSD1 jest jednym z enzymów usuwających grupy metylowe z H3K4 i H3K9. W ujęciu ogólnym działa jako represor ekspresji genów, poprzez usuwanie H3K4me1/2, lub jej aktywator, poprzez usuwanie H3K9me2 [152]. Wykazano, że LSD1 uczestniczy m.in. w aktywacji ekspresji genów zależnych od receptora estrogenowego alfa [153] i represji neuronalnych genów w tkankach nieneuronalnych [154, 155]. W badaniach wykonanych na komórkach HMEC-1 wyciszenie ekspresji LSD1 spowodowało zwiększenie poziomów białek HP1, rozregulowanie proliferacji i uruchomienie mechanizmów naprawy DNA [156]. Zwiększoną produkcję LSD1 zarejestrowano w wielu typach nowotworów m.in. prostaty, piersi i płuc [152]. Farmakologiczne zahamowanie aktywności LSD1 wydaje się obiecującym celem terapii przeciwnowotworowych. Obecnie kilka specyficznych inhibitorów LSD1 znajduje się na różnych etapach badań klinicznych, między innymi GSK2879552 (II faza badań klinicznych) lub CC-90011 (I faza badań klinicznych) [157].

Metylacja argininy w ogonach histonowych i jej epigenetyczna rola jest znacznie słabiej zbadana w porównaniu do metylacji lizyny. Może to być spowodowane słabym poznaniem mechanizmów jej demetylacji i relatywnie niedawnym odkryciu PRDMs, przez co nie stanowiła ona atrakcyjnego odwracalnego celu, który mógłby znaleźć zastosowanie w terapiach. Co istotne w przypadku tej PTMs histonów, różne strukturalnie typy dimetylacji wywierają mogą odwrotne efekty [26, 31].

2.1.2. Acetylacja histonów

W odróżnieniu od opisanej wyżej metylacji efekty acetylacji histonów regulujące status transkrypcji są bardziej bezpośrednie. Redukcja pozytywnego ładunku lizyny hamuje wiązanie się modyfikowanych histonów do DNA tym samym powodując rozluźnienie chromatyny, umożliwiając przyłączanie TF i aktywację transkrypcji. I odwrotnie, usunięcie grupy acetylowej przywraca ładunek

reszty lizynowej co prowadzi do zwiększenia upakowania chromatyny. Globalna hiperacetylacja znacznie zwiększa odległości pomiędzy nukleosomami [158]. Z tego powodu uważa się, że jest sygnałem promującym transkrypcję. Jednak należy mieć też na uwadze, że rozluźnienie chromatyny może powodować represję transkrypcji, tworząc przestrzeń dla przyłączania czynników represorowych, kompleksów remodelujących chromatynę oraz modulatorów innych PTMs histonów np. metylacji. Acetylowane lizyny mogą być rozpoznawane przez liczne białka, w tym te zawierające bromodomeny, które tworzą kompleksy aktywujące transkrypcję [159, 160]. Przykładem takiego białka jest BRD4, który wykrywa wysoko acetylowane regiony chromatyny i po przyłączeniu do acetylo-lizyny promuje transkrypcję poprzez aktywację polimerazy RNA II [161]. Dodatkowo wykazano, że deacetylacja histonów jest wysoce skorelowana z metylacją CpG, co jeszcze bardziej potwierdza jej rolę w inaktywacji transkrypcji [162]. Praktycznie każda z lizyn zlokalizowanych w ogonach histonowych stanowić może cel dla KATs/KDACs, które ze względu na ich pierwotne wykrycie jako enzymy modyfikujące histony określa się też w literaturze jako HATs/HDACs. Acetylacja może regulować ekspresję określonych genów poprzez ulokowanie w ich regionach promotorowych lub też powodować globalną ekspresję genów, gdy wprowadzona jest w wielu obszarach chromatyny zarówno w regionach kodujących i niekodujących [163]. Podobnie jak w przypadku metylacji, najszerzej zbadano acetylację ogona histonu H3. Dobrze poznane modyfikacje to acetylacja lizyn w pozycjach 4, 9, 14 i 27 [143]. Zarówno acetylacja, jak i deacetylacja histonów pełnią istotne role w regulacji ekspresji genów niezbędnych do różnicowania komórek, progresji cyklu komórkowego i metabolizmu.

Lizyny 4 i 9 (K4, K9) w ogonie histonu H3 stanowią miejsce przeprowadzenia zarówno acetylacji, jak i opisanej wyżej metylacji. W przypadku H3K4 zarówno acetylacja, jak i metylacja postrzegane są obecnie jako sygnatury odpowiadające za promowanie transkrypcji. Dokładny genomowy rozkład H3K4ac, w odróżnieniu od H3K4me3 nie jest jeszcze poznany, jednak niedawne badanie przeprowadzone przez zespół Kang i wsp. z wykorzystaniem ludzkiej limfoblastycznej linii komórkowej (K625) rzuciły nieco światła na ten niezbadany dotąd obszar [164]. Zwiększone poziomy H3K4ac wykryto zarówno w obrębie miejsca inicjacji transkrypcji, jak i w regionach enhancerowych [164]. Zahamowanie wprowadzania acetylacji na H3K4 poprzez zastosowanie inhibitora p300 skutkowało obniżeniem poziomów metylacji H3K4, co wskazuje na wyraźną interakcję pomiędzy tymi modyfikacjami [164]. Badania wskazujące na korelację między acetylacją, a metylacją H3K4 przeprowadzono również wcześniej na drożdżach [165]. Wyniki badania z wykorzystaniem techniki ChIP-seq przeprowadzone na prawidłowych komórkach piersi (MCF10A), jak i liniach nowotworowych raka piersi: MCF7 oraz MDA-MB-231, wykazały wysokie poziomy globalnego poziomu H3K4ac na wczesnych etapach rozwoju nowotworu i spadek tej modyfikacji z jednoczesnym zwiększeniem globalnych poziomów H3K4me3 na zaawansowanych etapach rozwoju nowotworu [166]. Modyfikacje H3K9 stanowią dobry przykład kompetycyjnej rywalizacji pomiędzy acetylacją a metylacją, które wywołują odwrotne efekty ekspresyjne. W przypadku wprowadzenia grupy acetylowej niemożliwa jest interakcja białek HP1 α/β z H3K9me3, co skutkuje zwiększeniem dostępności transkrypcyjnej DNA.

H3K9ac bardzo często występuje łącznie z H3K14ac w regionach enhancerowych aktywnych transkrypcyjnie genów [167, 168]. H3K9ac i H3K4me3 często zlokalizowane są w obrębie tych samych regionów promotorowych i współpracują w pozytywnej regulacji transkrypcji [169]. Postulowana przez Gates'a i wsp. rola w regulacji transkrypcji dla H3K9ac zlokalizowanego obok H3K4me3 polega na umożliwieniu progresji procesu transkrypcji z etapu jej inicjacji do elongacji [170]. Obecnie żaden inhibitor HATs nie jest stosowany w terapiach nowotworowych jednak wyniki z badań *in vitro* wskazują na potencjał ich zastosowania w przyszłości po opracowaniu lub też znalezieniu lepszych związków. Jednym z dostępnych obecnie inhibitorów jest związek C646 hamujący aktywność p300/CBP, który w badaniach wykonywanych na nowotworowych liniach komórkowych hamuje zarówno rozwój, jak i inwazyjność niektórych typów nowotworów. Ekspresja p300/CBP była znacznie zwiększona w pięciu badanych liniach nowotworów żołądka w porównaniu do linii komórek prawidłowych, a zahamowanie aktywności HATs poprzez zastosowanie C646 w liniach nowotworowych zatrzymało ich proliferację, migrację i obniżyło potencjał inwazyjny [171]. Podobne działanie C646 pokazano w modelu raka trzustki, gdzie obniżeniu H3K9ac i H3K27ac towarzyszyło zmniejszenie ekspresji regulatorów cyklu komórkowego – cykliny B i CDK1, odpowiedzialnych za progresję G2/M [172].

Ze względu na potencjał terapeutyczny inhibitorów HDACs to właśnie rolę tych enzymów w kontekście regulacji ekspresji genów zbadano najlepiej. Deacetylacja histonów przeprowadzana jest przez wszystkie klasy HDACs. Ich rekrutacja odbywa się w wyniku kilku poznanych mechanizmów, a wiele HDACs wchodzi w skład wielobiałkowych kompleksów [173]. Białko MeCP2 rozpoznające metylację DNA rekrutuje HDACs do deacetylacji zmetylowanych już miejsc promotorowych co powoduje obniżenie transkrypcji genów [174]. HDACs poprzez deacetylację histonów uczestniczą w regulacji ekspresji genów kluczowych w podtrzymaniu prawidłowych funkcji komórek, w tym tych związanych z cyklem komórkowym, apoptozą i naprawą uszkodzeń DNA. To właśnie dlatego zaburzenie ich funkcji jest tak powszechne w wielu typach nowotworów, gdzie rejestruje się zwiększone poziomy ekspresji HDACs, które związane są zarówno z tumorogenezą jak i progresją i zwiększeniem stopnia agresywności nowotworów. Większość nowotworów charakteryzuje się globalnym spadkiem acetylacji histonów, co prowadzić może do ekspresji onkogenów [175]. Poza nadekspresją HDACs obserwowane są także ich mutacje, zwłaszcza w białaczkach [176]. HDAC1 wykazuje aktywność hamującą apoptozę i promującą proliferację. Wykazano, iż wyciszenie ekspresji HDAC1 w komórkach HeLa skutkuje zahamowaniem ich proliferacji [177]. Zwiększona ekspresja HDAC5 wykryta została w próbkach rdzeniaka pierwotnego, a jej wyciszenie z wykorzystaniem siRNA zmniejszyło wzrost i przeżywalność ludzkich linii komórkowych rdzeniaka wielopostaciowego [178]. Istotnym aspektem jest także zaangażowanie HDACs w modulację funkcji komórek śródbłonna w kontekście neoangiogenezy. Zastosowanie inhibitorów HDACs ma bardzo duży potencjał w terapiach nowotworowych. W aspekcie acetylacji histonów, HDACi mogą powodować przywrócenie ekspresji genów supresorowych i inicjować zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych, czy też nawet ich apoptozę [179]. Poza wymienionymi w Tabeli 1.2 Zaakceptowanymi przez FDA HDACi na szeroką skalę

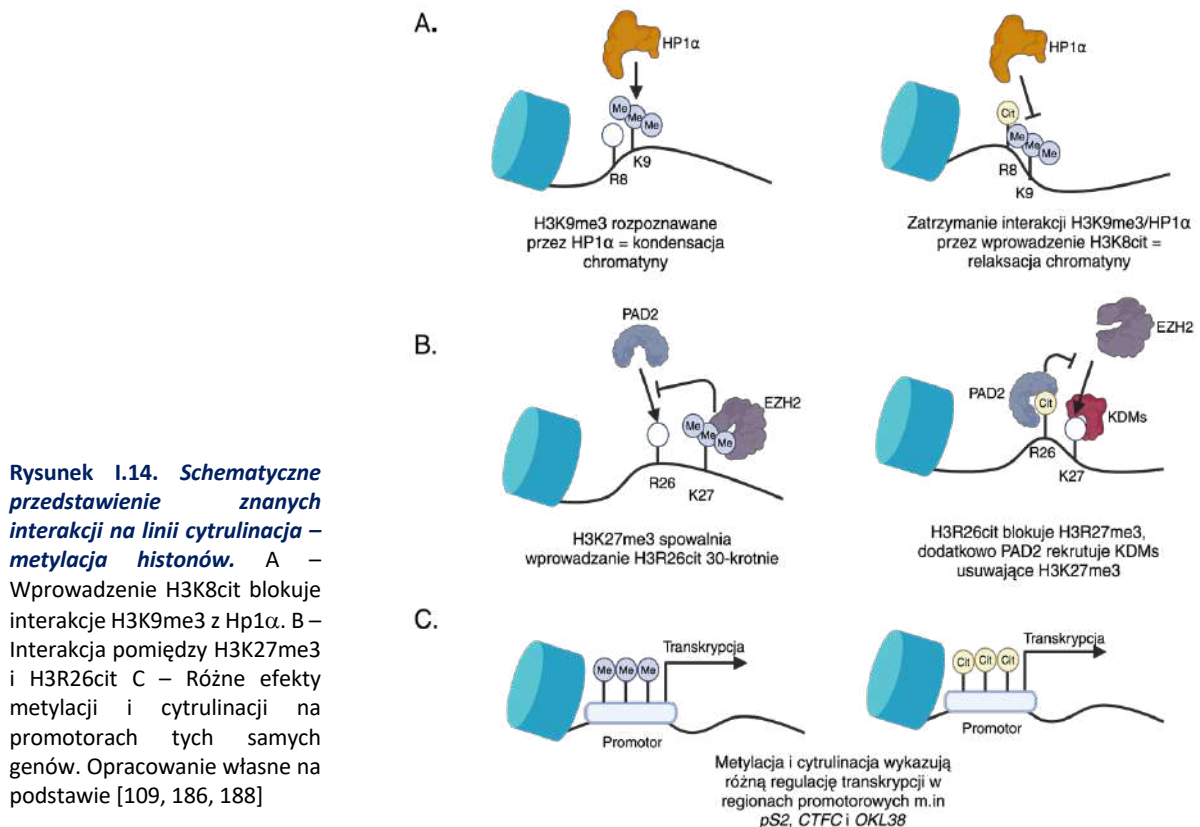
poszukuje się innych związków wykazujących podobne właściwości. W ostatnim czasie coraz więcej badań opisuje możliwość wykorzystania związków pochodzenia naturalnego w terapiach nowotworowych. Jednym z takich związków jest resweratrol, który działa jako inhibitor pan-HDACs [180] i na podstawie którego opracowywane są obecnie nowe inhibitory. Podobny potencjał wykazywać mogą polifenole, w tym gallusan epigallokatechiny, który w przeprowadzonych przez nas badaniach na modelu śródbłonkowym wykazuje silną aktywność inhibitorową względem HDACs [Ciesielski i wsp. 2020, 181].

2.2. Epigenetyczny aspekt cytrulinacji białek

PADs regulują ekspresję genów poprzez modyfikację TF i/lub szlaków sygnałowych oraz bezpośrednio poprzez cytrulinację histonów. Jak już wspomniano wyłącznie PAD2 i PAD4 są zdolne do prowadzenia cytrulinacji histonów, a główne doniesienia na ten temat opierają się na modelach nowotworowych stąd praktycznie niewiele wiadomo na temat roli cytrulinacji histonów w regulacji prawidłowych funkcji komórek. Jednak, liczba badań opisujących ten aspekt wciąż się zwiększa. Zaangażowanie cytrulinacji histonów w formowanie NETs poprzez dekondensację chromatyny wskazuje, że może mieć ona molekularne efekty podobne do acetylacji. Zarówno acetylacja jak i cytrulinacja skutkują utratą ujemnego ładunku aminokwasu, co wpływa bezpośrednio na interakcję z DNA. Dlatego też obecnie uważa się cytrulinację za modyfikację związaną z promowaniem ekspresji genów, co dodatkowo potwierdza fakt, że PAD4 i cytrulinacja H3 zlokalizowane były w obrębie promotorów aktywnych transkrypcyjnie genów [182]. Nie odkryto dotychczas żadnej domeny białkowej która rozpoznawałaby specyficznie cytrulinę w sekwencji białek, co sprawia, że nieznane są mechanizmy regulacji ekspresji genów przez cytrulinację histonów. Dodatkowo, nieznane są procesy, które odpowiadają za rekrutację PAD4 lub PAD2 do DNA. Nie posiadają one domeny wiążącej DNA i dlatego spekuluje się, że rekrutowane są najpewniej w wyniku interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi czy też wchodzą w skład kompleksów białkowych regulujących ekspresję genów [100]. Cytrulinacji podlegają reszty argininowe obecne w ogonach każdego z histonów, ale najszerzej opisano modyfikacje H3 i H4 [157]. PAD4 odpowiada za modyfikację arginin R2, R8, R17 histonu 3 [100] i to głównie na nich oparta jest obecna wiedza dotycząca cytrulinacji histonów. W porównaniu z obecnym stanem wiedzy na temat roli acetylacji/metylacji histonów w regulacji ekspresji genów, wpływ cytrulinacji jest znacznie słabiej poznany. Dostępne doniesienia wskazują na zaangażowanie PAD2 i H3R26cit w ekspresję genów podczas różnicowania oligodendrocytów i istotną rolę PAD4 i cytrulinacji H3 w ekspresji genów w embrionalnych komórkach macierzystych [102, 110, 183] i różnicowaniu komórek [184]. PAD2 wydaje się być także istotnym regulatorem ekspresji genów docelowych szlaku receptora estrogenowego α [185].

Interakcje metylacja $\leftrightarrow$ cytrulinacja są istotne nie tylko ze względu na kompetycyjność względem tych samych reszt argininowych, ale także w aspekcie kolokalizacji metylowanych reszt lizynowych i argininowych podlegających deiminacji. W roku 2013 Sharma i wsp. wykazali taką interakcję w obrębie H3R8cit i H3K9me3 [186]. W linii komórkowej raka piersi MCF7, cytrulinacja

H3R8cit wprowadzana przez PAD4 hamowała rozpoznawanie H3K9me3 przez HP1 α , a tym samym promowała ekspresję genów m.in. TNF α i innych cytokin zapobiegając kondensacji struktury chromatyny [186]. Efekt ten nie był obserwowany w przypadku zahamowania aktywności PAD4, gdzie HP1 α wchodziło w interakcję z H3K9me3 promując upakowanie chromatyny [186]. Dodatkowo badania zespołu Wiesie i wsp. 2019 przeprowadzone na komórkach mysich pokazały, że HP1 γ ulega cytrulinacji prowadzonej przez PAD4, a modyfikowane argininy znajdują się w obrębie chromodomeny tego białka co bezpośrednio upośledza jego wiązanie do H3K9me3 [187]. Hamowanie interakcji HP1/H3K9me3 może być również istotne w procesie globalnej dekondensacji chromatyny podczas formowania NETs. Metylacja i cytrulinacja rywalizować mogą w regionach promotorowych genów, wywołując odmienne efekty transkrypcyjne (*Rysunek 1.14*) [109]. Negatywną interakcję pomiędzy metylacją i cytrulinacją reszt aminokwasowych zlokalizowanych obok siebie w ogonie histonu H3 zaobserwowano także w przypadku H3R26cit i H3K27me3. Przełomowe badanie zespołu Clancy i wsp. z roku 2017 w doskonały sposób ilustrują tę interakcję zarówno z wykorzystaniem modyfikowanych sekwencji peptydowych, jak i w modelach komórkowych [188].



Wprowadzenie H3K27me3 przez EZH2 powoduje spowolnienie wprowadzania H3R26cit przez PAD2 około 30-krotnie, o wiele istotniejszy efekt obserwowany był w stronę odwrotną, gdzie H3R26cit hamuje wprowadzenie H3K27me3 blisko 30 000-krotnie [188]. Z biochemicznego punktu widzenia utrudnienie a w praktyce uniemożliwienie wprowadzenia H3K27me3 wywoływane jest zmianą struktury ogona histonowego wywołowaną przez H3R26cit i utratą dodatniego ładunku argininy w pozycji 26 co utrudnia interakcję EZH2 z sąsiadującą lizyną 27 [188]. W modelu ludzkich komórek raka piersi TDF47, autorzy pokazali, że interakcja ta jest istotna w regulacji ekspresji genów zależnych

od ER α i co istotne, PAD2 może dodatkowo odpowiadać za rekrutację KDMs, usuwających H3K27me₃, umożliwiając transkrypcję genów [188].

W kontekście podobnych interakcji cytrulinacji z acetylacją obecnie praktycznie brak doniesień literaturowych. Wspominano już o regulacji funkcji acetylotransferazy p300 przez cytrulinację, jednak nie opisano dotychczas bezpośrednich interakcji między modyfikowanymi aminokwasami. W ogólnym obrazie, zahamowanie cytrulinacji H3 i H4 z wykorzystaniem CLA w mysich zygotach równocześnie zmniejszyło acetylację m.in. H3K9, H3K18, a autorzy postulują, że cytrulinacja histonów sprzyja wprowadzaniu acetylacji [189]. We wcześniejszym badaniu z 2009 roku wykazano, że cytrulinacja powiązana może być również z deacetylacją. W komórkach raka piersi (MDA-MB231) PAD4 współpracuje z HDAC1 w represji genów regulowanych przez promotor pS2 [190].

Tak jak w przypadku innych PTMs histonów, efekty cytrulinacji są wysoce zależne od miejsca jej przeprowadzenia. O ile uogólnienie i traktowanie cytrulinacji jako PTMs histonów promującej transkrypcję może być przydatne w analizach, należy mieć na uwadze, że efekty mogą być odwrotne, tak jak w przypadku genów, których ekspresja obniżana jest przez cytrulinację m.in. *OKL38* [191]. Zespół Zhang i wsp. opisał opracowanie programowalnego systemu edycji epigenetycznej umożliwiającego wprowadzanie cytrulinacji histonów w zadanym miejscu genomu, opartego na technice CRISPR [192]. System ten może rekrutować PADs do wprowadzania modyfikacji H3 co skutkuje aktywacją lub represją ekspresji genów, przyszłe badania z wykorzystaniem tej techniki umożliwią znaczne poszerzenie obecnego stanu wiedzy na temat epigenetycznej roli cytrulinacji histonów [192]. Częściowo opisano mechanizm działania PAD2 i H3cit w patogenezie raka piersi. Wyciszenie PAD2 w komórkach raka piersi MCF7 zahamowało ich proliferację, co autorzy korelują z obniżeniem ekspresji genów *PTN* i *MAGE12*, wiązanych z progresją szeregu typów nowotworów [185]. W kolejnym badaniu, zaprezentowano wyniki świadczące o ważnej roli H3R26cit wprowadzanej przez PAD2 w promowaniu ekspresji genów zależnych od ER α , jednego z wiodących regulatorów w raku piersi [193]. Podobny mechanizm przedstawiono w przypadku raka prostaty, gdzie wykazano, że cytrulinacja histonów reguluje wiązanie się receptora androgenowego do genów docelowych, zaś wyciszenie PAD2 w linii komórkowej gruczolaka prostaty (LNCaP), skutkuje obniżeniem ich proliferacji i przeżywalności [194]. Kilka niezależnych badań potwierdziło, że PAD4 jest rekrutowane przez p53 do promotorów jego docelowych genów, gdzie przeprowadza konwersję argininy lub metyloargininy do cytruliny, usuwając tym samym efekty tej modyfikacji [119, 191]. W linii komórkowej ludzkiego kostniakomięsa U2OS ustalono, że reszty cytruliny obecne są na promotorze genów docelowych p53: *p21/WAF1*, a zahamowanie lub wyciszenie PAD4 zwiększa ich ekspresję, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy [195]. Cytrulinacja histonów przeprowadzana przez PAD4, która nie jest ściśle związana z epigenetyczną regulacją ma miejsce podczas omówionego już mechanizmu formowania NETs, który w ostatnich latach przyciąga coraz więcej uwagi również w kontekście zaangażowania w progresję i przerzutowanie nowotworów [196].

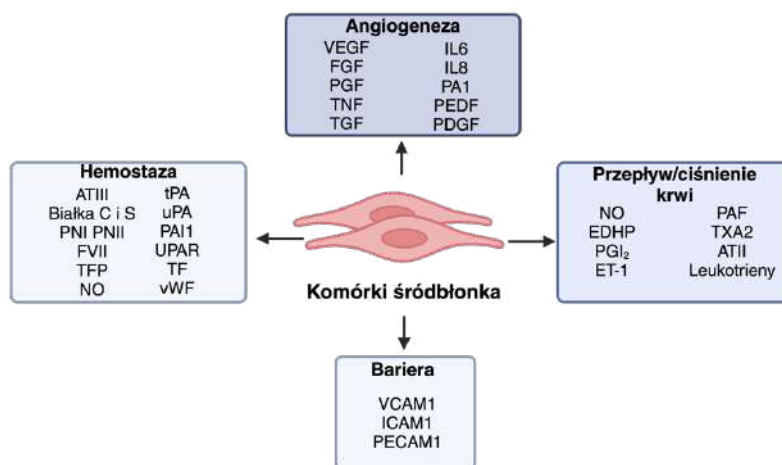
3. Śródbłonek naczyń

Śródbłonek to pojedyncza warstwa komórek wyścielająca wewnętrzne ściany naczyń krwionośnych i limfatycznych, o łącznej powierzchni ok. 1000 m² i wadze 1 kg [197]. Jest niezwykle istotnym i wysoce aktywnym metabolicznie elementem naczyń. Przez wiele lat jego rola była marginalizowana i postrzegany był jedynie jako warstwa *jądrzastego celofanu* [197], stanowiącego fizyczną półprzepuszczalną barierę między krążącą krwią i środowiskiem pozanacyniowym. Jednak obecnie wiemy, że śródbłonek i jego prawidłowe funkcjonowanie jest niezbędne w zapewnieniu homeostazy organizmu. Produkuje i wydziela wiele czynników o szerokim spektrum biologicznym, dodatkowo na jego powierzchni prezentowane są liczne antygeny, cząsteczki sygnałowe i receptory przez co niektórzy badacze traktują go wręcz jako jeden z narządów człowieka, mianowicie jako *rozproszony organ endokryny* [198].

Komórki śródbłonna (ECs, ang. *Endothelial Cells*) zaliczane są do nabłonków wyspecjalizowanych i powstają z mezodermy podczas rozwoju embrionalnego i różnicowania się hemangioblastów w angioblasty [199]. Pojedyncze ECs są zazwyczaj płaskie o grubości ok 0,2 μm i wymiarach 10 x 30 μm. Ich fenotyp jest wysoce zależny od lokalizacji. Nawet u jednej osoby komórki śródbłonna pobrane z różnych miejsc układu krwionośnego wykazywać mogą nie tylko inny kształt, ale także profil ekspresji antygenów, czy wydzielanych czynników regulatorowych [200]. W naczyniach, ECs ułożone są na ECM, do której ściśle przylegają dzięki receptorom integrynowym [198]. Za adhezję i komunikację pomiędzy sąsiadującymi komórkami odpowiadają kompleksy połączeń międzykomórkowych, wśród których wyróżnia się połączenia ściste, połączenia przylegające i połączenia szczelinowe [201]. Rodzaj połączenia i ekspresja kompleksów zależą od rodzaju naczyń i określonej dla danej lokalizacji przepuszczalności [201]. Od strony skierowanej do światła naczynia ECs pokryte są warstwą glikokaliksu [202], który tworzony jest przez sieć proteoglikanów, glikoprotein i glikozaminoglikanów, odgrywających istotne rolę w utrzymaniu homeostazy naczyń [202]. Jednym z najważniejszych elementów glikokaliksu jest siarczan heparanu, istotny w regulacji przepuszczalności, rozpoznawaniu ligandów przez receptory i procesach immunologicznych [202]. Większość energii wymaganej do funkcjonowania ECs uzyskują w wyniku beztlenowego procesu glikolizy [203].

3.1. Fizjologiczne funkcje śródbłonna naczyniowego

Komórki śródbłonna są kluczowymi regulatorami procesów istotnych w utrzymaniu homeostazy całego organizmu. Do głównych funkcji ECs należą: (i) stanowienie fizycznej bariery i regulowanie komunikacji między krwią, a tkankami, (ii) regulacja przepływu i ciśnienia krwi, (iii) kontrola potencjału fibrynolitycznego i antykoagulacyjnego, (iv) regulacja procesu angiogenezy. Na [Rysunku 1.15](#) przedstawiono główne czynniki wydzielane przez ECs zaangażowane w regulację wymienionych wyżej procesów.



Rysunek I.15. Zestawienie czynników produkowanych i wydzielanych przez ECs
Opracowanie własne na podstawie: [198, 204].

Poprzez swoje położenie w naczyniach krwionośnych monowarstwa ECs uczestniczy w dwukierunkowym transporcie i wymianach substancji rozpuszczonych i cząsteczek pomiędzy krążącą krwią i tkankami [204, 205]. Przepuszczalność bariery śródbłonkowej jest różna w różnych odcinkach naczyń krwionośnych, najmniejszą obserwuje się w tętniczkach, a największą w żyłkach [206]. Woda i substancje rozpuszczone swobodnie przenikają przez barierę śródbłonkową, a makrocząsteczki w większości transportowane są na drodze transcytozy. Transport na drodze transcytozy zależny jest od obecności wyspecjalizowanych struktur błonowych zwanych kaweolami. Istotnym białkiem błonowym obecnym w kaweolach i uczestniczącym w transcytozie jest białko PV-1 [207], które reguluje m.in. przepuszczalność płucnych ECs dla białek osocza, w tym albuminy [207]. Poza transportem substancji, bariera śródbłonkowa zapobiega także wynaczynieniu komórek krwi, jednak umożliwia przenikanie leukocytów przez ściany naczyń krwionośnych w procesie zwanym migracją przezśródbłonkową. Celem tego procesu jest usunięcie czynników powodujących stan zapalny w tkankach [208].

Śródbłonek reguluje ciśnienie i prawidłowy przepływ krwi poprzez wydzielanie w odpowiedzi na bodźce mechaniczne i biochemiczne, szeregu czynników zarówno wazodylatacyjnych, jak i wazokonstrykcyjnych [198] (*Rysunek I.13*). Czynniki te powodują odpowiednio rozkurcz lub skurcz mięśni gładkich naczyń, skutkując rozszerzeniem lub zwężeniem światła naczyń i regulacją przepływu krwi. Jednym z najważniejszych czynników wydzielanych przez ECs, nie tylko w kontekście przepływu krwi, jest tlenek azotu (NO^{*}), syntetyzowany między innymi przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS, ang. *Endothelial Nitric Oxide Synthase*). NO^{*} jest silnym wazodylatatorem, wykazuje zdolność przenikania do komórek mięśni gładkich naczyń, aktywuje cyklazę guanylową co powoduje obniżenie aktywności kinazy łańcucha lekkiego miozyny i relaksacją naczyń krwionośnych a tym samym spowolnienie przepływu krwi [209]. Do innych wazodylatorów wydzielanych przez śródbłonek należą również: prostacyklina PGI₂ i leukotrieny C₃ i C₄ [198, 210], z których każdy charakteryzuje się innym mechanizmem działania. Do głównych wazokonstryktorów wydzielanych przez komórki śródbłonna należą: endotelina 1 (ET-1), angiotensyna II (AII), czynnik aktywujący płytki (PAF, ang. *Platelet Activation Factor*) i tromboksan A₂ (TA₂) [210, 211]. Zwłaszcza ET-

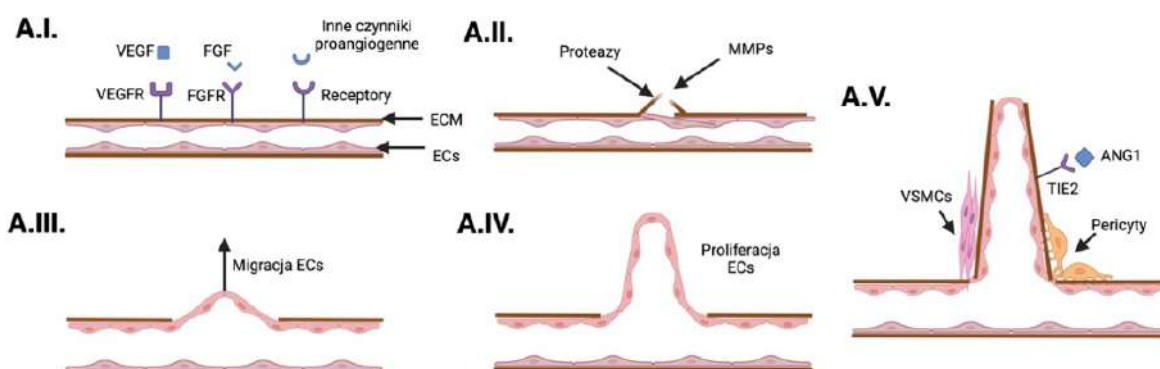
1 jest szczególnie istotnym wazokonstryktorem, którego działanie oparte jest na interakcjach z receptorem endoteliny typu A (ETA) zlokalizowanymi na komórkach mięśni gładkich. Po aktywacji receptora ETA dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w komórkach mięśniowych co prowadzi do skurczu mięśni [212] i zwężenia światła naczynia. W warunkach fizjologicznych większość z wymienionych substancji wytwarzana jest przez śródbłonek w niewielkich ilościach [198] i pozostają one w ściśle określonej równowadze, która regulowana jest w odpowiedzi na sygnały zewnętrzne lub wewnętrzne.

Hemostaza, to system mechanizmów zapobiegających wyciekowi krwi z uszkodzonych naczyń krwionośnych i utrzymujących jej płynność w stanach fizjologicznych. Koagulacja i fibrynoliza to procesy wieloetapowe, składające się z szeregu zdarzeń, mechanizmów komórkowych i biochemicznych, które utrzymują płynność krwi w naczyniach, a także odpowiadają za tworzenie skrzepów podczas urazu i późniejsze ich rozpuszczanie. Hemostaza tym samym opiera się na równowadze pomiędzy czynnikami antykoagulacyjnymi/prokoagulacyjnymi oraz czynnikami fibrynolitycznymi/antyfibrynolitycznymi. Lokalizacja ECs na wewnętrznych ścianach naczyń krwionośnych i ich bogaty profil wydzielniczy sprawiają, że są one kluczowymi elementami utrzymującymi hemostazę, biorą udział w regulacji zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzpo pochodnego szlaku koagulacji krwi oraz fibrynolizy [213]. Już w latach 70 i 80 XX wieku naukowcy zauważyli, że na powierzchni śródbłonna prezentowane są cząsteczki biorące udział w regulacji krzepnięcia krwi [214]. ECs produkują i wydzielają wiele regulatorów hemostazy, niektóre z nich przedstawiono na [Rysunku 1.13](#). Do czynników antykoagulacyjnych wydzielanych przez śródbłonek należą: antytrombina III (ATIII), inhibitor zewnątrzpo pochodnego szlaku krzepnięcia, NO[•], EPCR, THBM, kofaktor heparyny II. ATIII jest jednym z głównych inhibitorów krzepnięcia krwi, hamuje aktywowane czynniki krzepnięcia w tym trombinę i FIXa, FXa, FXIa, FXIIa [198, 214]. TFPI natomiast jest inhibitorem aktywacji FVII poprzez hamowanie tworzenia kompleksu tego czynnika z uwolnionym z uszkodzonych ECs czynnikiem tkankowym (TF, ang. *Tissue Factor*), a tym samym inicjacji zewnątrzpo pochodnego szlaku krzepnięcia krwi [214]. ECs wydzielają także czynniki prokoagulacyjne, w tym głównie TF, PAF i vWF [198, 214]. ECs są ważne w utrzymaniu potencjału fibrynolitycznego, odpowiadają za produkcję m.in. aktywatorów plazminogenu, które przekształcają plazminogen w aktywną plazminę doprowadzając do rozłożenia złożeń fibrynowych. Przez ECs wydzielane są m.in. tkankowy aktywator plazminogenu (tPA ang. *Tissue plasminogen activator*), urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA, ang. *Urokinase plasminogen activator*) [198, 214]. Dla utrzymania równowagi fibrynolitycznej ECs produkują i wydzielają także proteazy serynowe zaliczane do rodziny SERPIN, które są inhibitorami fibrynolizy, wśród nich największe znaczenie obecnie przypisuje się PAI-1 (SERPIN E1), ale wydzielane są także inne SERPINy w tym np. PEDF (SERPIN F1) [215, 216]. W ogólnym zarysie hemostatyczna rola śródbłonna w warunkach fizjologicznych polega na utrzymaniu płynności krwi poprzez wydzielanie czynników antykoagulacyjnych i utrzymaniu jej swobodnego przepływu przez naczynia poprzez promowanie fibrynolizy.

Zaburzenie funkcji śródbłonka stoi u podstaw wielu stanów patologicznych. Głównie są to choroby układu krążenia, cukrzyca, ale także nowotwory. Dobrym przykładem są zaburzenia w regulacji przepływu krwi, wywołane m.in. obniżeniem produkcji NO^{*} co prowadzić może do rozwoju nadciśnienia [217], które jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju CVDs, takich jak choroba wieńcowa, niewydolność serca czy migotanie przedsionków [218, 219].

3.1.1. Angiogeneza

W literaturze często jako flagową funkcję ECs opisuje się regulację angiogenezy. Według definicji, angiogeneza to: wieloetapowy proces powstawania nowych naczyń krwionośnych z już istniejących [220]. Jest to proces odrębny od waskuologenezy – powstawania naczyń krwionośnych *de novo*, która zachodzi głównie podczas embriogenezy i prowadzi do powstania pierwszej sieci mikronaczyń [221]. Angiogeneza jest istotna w embriogenezie, ale ma miejsce również w późniejszym życiu i jest kluczowa w procesie naprawy tkanek zwłaszcza przy zarastaniu ran, podczas cyklu menstruacyjnego, rozwoju mięśni i regeneracji wyściółki organów [222]. O ile fizjologiczna angiogeneza jest niezwykle ważna dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania organizmu, postulować można, że jest równie istotna w rozwoju i progresji chorób nowotworowych. Obecnie proponowane jest kilka mechanizmów przebiegu procesu angiogenezy.



Rysunek 1.16. Przebieg procesu angiogenezy. Dokładny opis poszczególnych etapów w tekście. **A. I:** Inicjacja, **A. II:** Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej, **A.III:** Migracja ECs, **A.IV:** Proliferyacja ECs, **A.V:** Dojrzewanie i stabilizacja naczynia Opracowanie własne na podstawie [198, 222]

W warunkach fizjologicznych wyróżnia się dwa główne modele angiogenezy: angiogenezę kielkującą, i angiogenezę wgłobienową [222], spośród których to ten pierwszy przedstawiany jest w literaturze jako główny mechanizm. Proces angiogenezy kielkującej przebiega w pięciu etapach (**Rysunek 1.1**): (i) Inicjacja angiogenezy poprzez pobudzenie ECs przez sygnały proangiogenne, w tym głównie czynniki wzrostowe spośród których najistotniejsza jest rodzina naczyniowo-śródbłonkowych czynników wzrostu (VEGF, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), ale też czynniki wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *Fibroblast Growth Factor*) i czynniki wzrostowe pochodzenia płytkowego (PDGF, ang. *Platelet Derived Growth Factor*), (ii) degradacja błony podstawnej otaczającej naczynie krwionośne w wyniku aktywności proteaz, w tym głównie MMPs, (iii) adhezja i migracja ECs stymulowana czynnikami proangiogennymi i obecnością integryn, (iv) intensywna proliferacja komórek śródbłonka, formowanie struktur kapilarnych prowadzących do powstania nowego naczynia krwionośnego, (v) dojrzewanie i stabilizacja ścian naczynia, poprzez zwiększenie jej integralności

i zmniejszenie przepuszczalności m.in. w wyniku indukcji szlaków sygnałowych zależnych od oddziaływania angiopoteny-1 z receptorem prezentowanym przez ECs – Tie2 [222].

Podsumowując, w trakcie opisanego procesu angiogenezy komórki śródbłonna poza funkcjami wydzielniczymi wykazują też wzrost zdolności migracyjnych, proliferacyjnych oraz tworzenia struktur kapilarnych. Proces ten, jest ściśle regulowany przez równowagę pomiędzy czynnikami pro- i anty-angiogennymi, spośród których najważniejsze produkowane i wydzielane są przez komórki śródbłonna. Do najważniejszych czynników proangiogennych należą wymienione już czynniki wzrostowe takie jak VEGF, EGF, [223], ale także proteazy odpowiedzialne za degradację ECM – głównie MMPs [224], czy też czynniki transkrypcyjne np. HIF-1 α [225]. Istotnym czynnikiem proangiogennym jest także NO^{*} [220]. Wśród czynników antyangiogennych wymienić można VASH1, trombospondyny, inhibitory TIMP hamujące działanie MMPs i SERPINy w tym PEDF [226]. Ważnymi szlakami sygnałowymi w angiogenezie ECs są zwłaszcza MEK/ERK, MAPK i PI3K/AKT [227].

Angiogeneza jest niezwykle istotna w kontekście progresji nowotworów. Na początku rozwoju guza, gdy nie nabrał on jeszcze cech złośliwości odżywia się poprzez pobieranie tlenu i substancji odżywczych z otaczających tkanek na drodze dyfuzji. Po wzroście guza do rozmiarów około 1 – 2 mm otaczające tkanki nie są w stanie go odżywiać, co stwarza potrzebę wytworzenia przez nowotwór sieci naczyń krwionośnych, które będą dostarczać tlen i substancje odżywcze do nowotworu [228]. Mikrośrodowisko guza charakteryzuje się warunkami, które powodują wydzielanie wielu czynników wzrostowych, cytokin i chemokin wykazujących działanie aktywujące ECs i proangiogenne. W nowotworowej angiogenezie równowaga jej regulatorów przesuwana się w stronę wydzielania czynników proangiogennych, co nazywa się *przełączeniem angiogennym* (ang. *angiogenic switch*), promującym angiogenezę nowotworu. Zwłaszcza warunki hipoksji powodują wzrost wydzielania VEGF-A przez guza [229]. W nowotworach ECs poddawane są przewlekłej stymulacji czynnikami wzrostu i niedotlenieniu przez co zmieniają swój fenotyp w kierunku tzw. *nowotworowych komórek śródbłonna* (TEC, ang. *Tumour Endothelial Cells*) [229]. Tworzone przez nie naczynia krwionośne charakteryzują się dużymi nieprawidłowościami w morfologii m.in. wykazują zwiększoną przepuszczalność, co wpływa na przepływ krwi [229]. Angiogeneza, jest bezpośrednio zaangażowana w progresję chorób nowotworowych. Nowopowstałe naczynia krwionośne niezbędne są do odżywiania guza oraz do metastazy. Wnioskować więc można, że hamowanie procesu angiogenezy jawi się jako jedno z możliwych podejść terapeutycznych. Takie podejście postulował m.in. Folkman już w roku 1971 przedstawiając założenia terapii antyangiogennych, które oparte są na zagłodzeniu guza nowotworowego poprzez zaburzenie formowania nowych naczyń krwionośnych i/lub degradację tych już istniejących [230]. Zatrzymanie patologicznej angiogenezy może być też przydatne w przypadku innych chorób, głównie w CVDs, ale także w RA [231]. Obecnie FDA zaakceptowało już wiele związków antyangiogennych do wykorzystania w terapiach, ciągle głównie nakierowanych na inhibicję szlaku VEGF/VEGFR [232]. Pierwszym antyangiogennym lekiem zaakceptowanym w 2004 roku był Bevacizumab (AvastinTM) – przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko VEGFA [233]. Jednak

mimo pozytywnych rezultatów stosowanych obecnie związków, wciąż wykazują one wiele działań niepożądanych, co wymusza potrzebę opracowywania nowych leków.

3.2. Epigenetyczna regulacja funkcji komórek śródbłonna

Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że mechanizmy epigenetyczne są niezwykle istotne w regulacji funkcji ECs, a nawet odgrywać mogą decydującą rolę w ich aktywacji. Relatywnie dobrze poznano rolę statusu acetylacji histonów w regulacji ECs. Wysokie siły ścinania łączone są ze zwiększoną aktywnością acetylotransferazy p300, która acetyluje histony H3 i H4 w regionach promotorowych *eNOS* [234]. W roku 2005 Fish i wsp. opublikowali badania, które wyraźnie wskazują, że śródbłonkowo-specyficzna ekspresja *eNOS* jest regulowana epigenetycznie [235]. W ECs regiony promotorowe tego genu i inne sekwencje regulatorowe charakteryzują się wzbogaceniem sygnatur: H3K9ac, H4K12ac oraz H3K4me2/me3 [235]. Acetylacja histonów prowadzona przez KAT7 zaangażowana jest w regulację wielu genów w ECs, a wyciszenie tego enzymu m.in. w HUVEC skutkowało zmniejszonym potencjałem angiogennym w tym obniżeniem migracji i zdolności do tworzenia struktur pseudokapilarnych, co autorzy wiążą ze zmianą w ekspresji 263 genów, m.in. wielu regulatorów angiogenezy takich jak *VEGFR2* [236]. Wiele opublikowanych badań łączy szlak sygnałowy VEGF/VEGFR ze statusem acetylacji histonów/aktywnością HATs m.in., PCAF, p300 i CBP z potencjałem angiogennym ECs [237, 238]. Również deacetylacja histonów jest istotna w funkcjonowaniu ECs, zarówno HDAC3 i HDAC5 uznawane są obecnie jako negatywne regulatory angiogenezy hamują ekspresję odpowiednio *VEGFA* lub *FGF* [239, 240]. HDAC7 natomiast promuje migrację i tworzenie struktur pseudokapilarnych przez HUVEC oraz progenitorowe komórki śródbłonna [241]. Powyższe dane wskazują, że acetylacja histonów może być jednym z głównych epigenetycznych regulatorów funkcji ECs, zwłaszcza w kontekście angiogenezy. O wiele mniej wiemy na temat metylacji histonów w ECs. Z wykorzystaniem analizy ChIP-seq Duan i wsp. wykazali, że H3K79me2 wprowadzane przez DOT1L odpowiada za regulację genów angiogennych, w tym *VEGFR2* [242]. A wyciszenie ekspresji DOT1L w HUVEC skutkowało zmniejszeniem ich przeżywalności i potencjału angiogennego [242]. Globalna inhibicja PKMTs i PRMTs, w tym metylacji histonów z zastosowaniem związków AMI-1 lub AMI-5 zaindukowała profil angiostatyczny w komórkach HMEC-1 [243]. Podobnie, zahamowanie aktywności G9a i obniżenie poziomów H3K9me w tym samym modelu skutkowało obniżeniem zdolności proliferacyjnych ECs [244]. Także wspomniana już wcześniej LSD1 wydaje się ważnym modulatorem funkcji ECs, odpowiadając m.in. za regulację proliferacji, mechanizmów naprawy DNA i odpowiedź zapalną, jak wykazały badania przeprowadzone na linii HMEC-1 z wyciszeniem LSD1 [156].

Podsumowując, działanie wybranych mechanizmów epigenetycznych w regulacji funkcji ECs jest obecnie dobrze poznane, zwłaszcza w kontekście angiogenezy. Jednak rola mniej poznanych PTMs histonów, w tym cytrulinacji, pozostaje wciąż słabo zbadana. Biorąc pod uwagę obiecujący potencjał terapeutyczny, badanie PTMs histonów i innych białek w kontekście regulacji funkcji ECs i angiogenezy wydaje się zasadne.

II. Cele pracy i hipoteza badawcza

W prezentowanej rozprawie doktorskiej postawiono trzy główne cele badawcze:

1. *Określenie wpływu farmakologicznej inhibicji cytrulinacji na funkcję komórek śródbłónka, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału angiogennego,*
2. *Analizę konsekwencji wyciszenia ekspresji PAD4 dla wybranych funkcji komórek śródbłónka, weryfikacja modelu farmakologicznego,*
3. *Wykazanie potencjalnych interakcji na linii cytrulinacja <-> inne PTMs histonów w komórkach śródbłónka.*

Postawiono następującą hipotezę badawczą:

Aktywność PADs i cytrulinacja białek odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji komórek śródbłónka.

III. Materiały

1. Linie komórkowe

- ✦ **HMEC-1** (ang. *Human Microvascular Endothelial Cells*) – immortalizowana linia ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego (ATTC, Manassas, USA).
- ✦ **HUVEC** (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) – pierwotne ludzkie komórki śródbłónka izolowane z żyły pępowinowej. Komórki izolowane zgodnie z protokołem opisanym w [IV.2](#).
- ✦ **HAEC** (ang. *Human Aortic Endothelial Cells*) – immortalizowana linia ludzkich komórek śródbłónka aortalnego (ATTC, Manassas, USA).
- ✦ **HMEC-1 PAD4 KD** (ang. *PAD4 knockdown*) – immortalizowana linia ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego z wyciszoną ekspresją genu PAD4. Linia przygotowana w toku realizacji niniejszej pracy doktorskiej zgodnie z opisem w [IV.16](#).
- ✦ **HMEC-1 SET7/9 KD** (ang. *SET7/9 knockdown*) – immortalizowana linia ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego z wyciszoną ekspresją genu SET7/9.
- ✦ **HMEC-1 LSD1 KD** (ang. *LSD1 knockdown*) – immortalizowana linia ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego z wyciszoną ekspresją genu LSD1.
- ✦ **HMEC-1 G9a KD** (ang. *G9a knockdown*) – immortalizowana linia ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego z wyciszoną ekspresją genu G9a.
- ✦ **293FT** – pochodna macierzystej linii komórkowej opracowanej z komórek nabłonkowych ludzkiej embrionalnej tkanki nerkowej - HEK293. (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

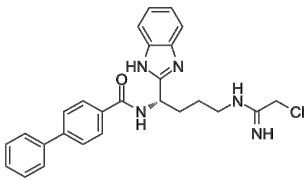
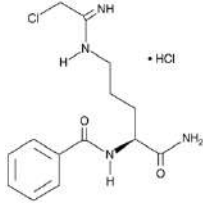
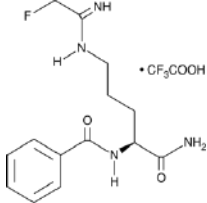
2. Odczynniki chemiczne

Odczynniki chemiczne wykorzystywane w prezentowanych badaniach były najwyższej możliwej jakości, odpowiednie do danego zastosowania. Wszystkie użyte odczynniki podane są wraz z producentem w rozdziale: *IV Metody*. Skład używanych buforów również podawany jest w miejscu ich pierwszego zastosowania.

3. Inhibitory deiminaz peptydyloargininowych

Inhibitory zakupione zostały bezpośrednio od producentów: BB-Cl-amidina (MedChemExpress, New Jersey, US), Cl-amidina i F-amidina (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Roztwory inhibitorów przygotowane zostały zgodnie z zaleceniami producenta poprzez rozpuszczenie w dimetylosulfotlenku (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Podczas traktowania komórek upewniano się by końcowe stężenie DMSO w próbach nie było toksyczne dla komórek i nie wpływało na wyniki analiz. W [Tabeli III. 1](#). przedstawiono charakterystykę zastosowanych związków.

Tabela III.1 Podsumowanie właściwości biochemicznych inhibitorów zastosowanych w badaniach. Tabela przygotowana do publikacji Ciesielski i wsp. 2024

Inhibitor	BB-Cl-amidyna	Cl-amidyna	F-amidyna
Preferowana nazwa IUPAC	N-[(1S)-4- [(1-amino-2-chloroethylidene) amino]-1-(1H-benzimidazol-2-yl) butyl]- 4-phenylbenzamide	N-[(2S)-1-amino-5-[(1-amino-2-chloroethylidene) amino]-1-oxopentan-2-yl] benzamide	N-[(2S)-1-amino-5- [(1-amino-2-fluoroethylidene) amino]-1-oxopentan-2-yl] benzamide
Masa [g/mol]	459,97	310,78	294,32
Wzór chemiczny			
Potencjał inhibitorowy względem PADS <i>in vitro</i>	$k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD1} = 16\,100 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD2} = 4\,100 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD3} = 6\,800 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD4} = 13\,300 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD1} = 37,000 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD2} = 1200 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD3} = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD4} = 13,000 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD1} = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD2} = 380 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD3} = 170 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $k_{\text{inact}}/K_i \text{ PAD4} = 3000 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
Mechanizm inhibicji	Kowalencyjna modyfikacja miejsca aktywnego PADS w pozycji Cys645.		

IV. Metody

1. Hodowla komórek

Komórki hodowane były w naczyniach hodowlanych: butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm² lub 25 cm² (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), szalkach o średnicy 6 cm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) lub 10 cm (Saersted, Nümbrecht, Niemcy), płytkach 96-, 12-, 24- lub 6-dołkowych (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA lub Greiner, Kremsmünster, Austria). W przypadku hodowli komórek HUVEC powierzchnia hodowlana pokrywana była dodatkowo 1% roztworem żelatyny (Chempur, Piekary Śląskie, Polska) w ddH₂O.

- ☒ Pożywka hodowlana dla komórek śródbłonna: MCDB131 (Corning Life Sciences, NY, USA) suplementowane: 10 mM L-Glutaminą (Corning Life Sciences, NY, USA), 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*; EurX, Gdańsk, Polska) i 10 nM śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (EGF, ang. *Endothelial Growth Factor*, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA).
- ☒ Pożywka hodowlana dla komórek 293FT: DMEM (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) suplementacja: 10 mM L-glutaminą, 10% FBS i antybiotykami (penicylina/streptomycyna).

Hodowlę komórek prowadzono w inkubatorze PHCBI MCO-1701A (PHC Europe, Breda, Holandia), w standardowych warunkach: 37°C, 5% CO₂. Komórki pasażowane były po osiągnięciu około 80% konfluencji. Monowarstwę komórek dwukrotnie przemywano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS, ang. *Phosphate Buffered Saline*) o składzie: 3 mM KCl, 145 mM NaCl, 10 mM KH₂PO₄. Do odklejenia komórek wykorzystywany był 0,25% roztwór trypsyny z wersenianem sodu (Trypsin/EDTA, Corning Life Sciences, NY, USA). Po odklejeniu się komórek od podłoża, zawieszano je w świeżej porcji pożywki. Gęstość zawiesiny komórkowej oznaczana była z wykorzystaniem błękitu trypanu (Corning Life Sciences, NY, USA) w komorze Thoma lub w automatycznym liczniku komórek Countess 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Określoną objętość zawiesiny komórek (najczęściej 1/10 lub 1/5 w zależności od planu eksperymentalnego) przenoszono do nowego naczynia hodowlanego i całość uzupełniano świeżą pożywką do zadanej przez producenta naczynia objętości końcowej.

2. Izolacja komórek HUVEC z żył pępowinowych

Komórki HUVEC izolowane były z żył pępowinowych pobranych od pacjentek Szpitala Wielospecjalistycznego Medeor (ul. Ciesielska 8, Łódź). Izolacja prowadzona była według opisanego w literaturze protokołu Jaffe i wsp. [245] wykorzystującego kolagenazę typu II. Materiał do izolacji stanowiły 15 – 20 cm fragmenty pępowiny, przechowywane i transportowane w sterylnym zbilansowanym roztworze soli Hanksa (HBSS, ang. *Hanks Balanced Salt Solution*) o składzie: 13,41 mM KCl, 2,20 mM KH₂PO₄, 0,34 mM NaCl, 1,58 mM Na₂HPO₄, 27,75 mM glukoza, 5,34 mM NaHCO₃, 20 mM kwas N-(2-hydroksyetylo) piperazyno-N'-etylosulfonowy (HEPES), 0,2 mM NaOH, 100 µg/ml gentamycyna, pH 7,3). Izolacja komórek śródbłonna odbywała się w czasie nie przekraczającym 24 h od momentu pobrania pępowiny.

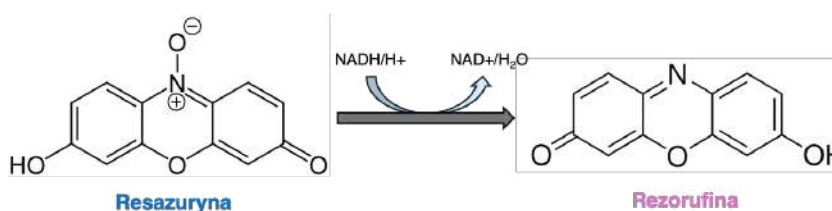
Procedura izolacji HUVEC: żyłę pępowinową przepłukiwano dwukrotnie roztworem HBSS wprowadzając go bezpośrednio w światło żyły z wykorzystaniem strzykawki. Jeden z końców żyły zamykano używając peana chirurgicznego, drugim końcem wprowadzano roztwór kolagenazy typu II tak by wypełnić całą żyłę, a następnie również zamykano go peanem. Pępowinę inkubowano w inkubatorze w standardowych warunkach hodowli przez 15 minut. Po inkubacji zwalniano zaciski i żyłę przepłukiwano dwukrotnie roztworem HBSS, zbierając cały płyn do sterylnej probówki o objętości 50 ml. Zawiesinę wirowano (1 300 rpm, 5 min), supernatant usuwano, a uzyskany osad komórek zawieszano w pełnej pożywce MCDB131 z dodatkiem antybiotyków (penicylina/streptomycyna, 100x). Wyizolowaną zawiesinę komórek wysiewano na naczyn o powierzchni 25 cm². Po 24 godzinach zmieniano pożywkę na świeżą i kontynuowano hodowlę. Komórki wykorzystywane były w eksperymentach w obrębie pasażów: 3-5. W celu przeprowadzenia badań z wykorzystaniem komórek z ludzkich pępowin uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Łódzkiego (nr decyzji: 15/KBBN-UŁ/III/2019 i 16 (III)/KBBN-UŁ/I/2021-2022). Wszystkie badania przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi przepisami i wytycznymi Deklaracji Helsińskiej: nie zbierano, nie przechowywano i nie procedowano żadnych danych dotyczących dawców, a pobrane próbki były całkowicie zanonimizowane.

3. Oznaczenie przeżywalności/prolifracji komórek śródbłotka

3.1. Test redukcji resazuryny

Przeżywalność komórek śródbłotka traktowanych inhibitorami PAD oznaczano z wykorzystaniem testu redukcji resazuryny. Do przygotowania roztworu roboczego resazuryny w ddH₂O wykorzystano sól sodową resazuryny (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Zasada metody: Test oparty jest na pomiarze zdolności żywych komórek do redukcji wykazującej słabą fluorescencję resazuryny do silnie fluorescencyjnej rezorufiny (Rysunek IV.1.).



Rysunek IV.1. Schematyczne przedstawienie zasady testu redukcji resazuryny. Resazuryna redukowana jest w mitochondriach żywych komórek do rezorufiny. Opracowanie własne

Plan doświadczenia: Komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki w gęstości 5 000 komórek/dołek w przypadku HUVEC i 7 000 komórek/dołek, w przypadku HMEC-1. Komórki następnie inkubowano w standardowych warunkach hodowli przez 16-20 godz. w celu umożliwienia ich adhezji do powierzchni naczynia. Następnie, komórki traktowano inhibitorami PAD w zakresie stężeń 0,1-10 μM i inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach hodowlanych. Po upływie inkubacji usuwano pożywkę hodowlaną z komórek i przemywano je dwukrotnie roztworem PBS z dodatkiem jonów i glukozy (0,8 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM D-glukoza). Do dołków płytki dodawano następnie roztwór roboczy resazuryny o stężeniu 0,0125 mg/ml i kontynuowano inkubację w warunkach hodowli

przez 2 godziny. Po jej zakończeniu przenoszono po 50 μ l supernatantu do dołków czarnej okrągłodennej płytki 96-dołkowej (Greiner, Kremsmünster, Austria). Pomiary fluorescencji wykonywano z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Fluoroscant Ascent (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) przy $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$.

3.2. Test wychwytu czerwieni obojętnej

Test wychwytu czerwieni obojętnej wykorzystano do oceny roli inhibitorów PAD w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego przez wodoronadtlenek *tert*-butylu (t-BOOH).

Zasada metody: Test opiera się na zdolności żywych komórek do aktywnego wychwytu i gromadzenia barwnika eurohodinowego – czerwieni obojętnej w lizosomach.

Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiewano na płytkę 96-dołkową (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), w gęstości 20 000 komórek/dołek w 100 μ l medium hodowlanego. Komórki traktowano inhibitorami PAD: 1 μ M BBCLA, 10 μ M CLA lub 10 μ M FA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godz. Po zakończonej inkubacji komórki traktowane inhibitorami poddano działaniu 10 mM t-BOOH i inkubowano w warunkach hodowli przez godzinę. Na płytce uwzględniono wszystkie wymagane kontrole pozytywne i negatywne. Po upływie inkubacji z t-BOOH z komórek usuwano pożywkę i dołki płytki przemywano dwukrotnie PBS z jonami $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ i glukozą. Następnie do komórek dodano roztwór NR (40 μ g/ml NR w medium hodowlanym) w objętości 100 μ l/dołek i komórki inkubowano z barwnikiem w warunkach hodowli przez 2 godz. Po zakończeniu inkubacji usuwano roztwór NR, a płytkę ponownie przemywano dwukrotnie PBS z jonami $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ i glukozą. Następnie do dołków nanoszono po 150 μ l odczynnika NR (50% etanol, 1% lodowaty kwas octowy w ddH₂O) i kontynuowano inkubację już na wytrząsarce przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję prób oznaczano przy $\lambda = 540 \text{ nm}$ z wykorzystaniem czytnika BioTek Eon™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, Vermont, USA).

4. Analiza poziomu białek techniką Western blotting

W celu potwierdzenia aktywności inhibitorowej związków względem enzymów PAD na podstawie cytrulinacji histonu H3 i określenia ich wpływu na poziom wybranych białek wiązanych z architekturą chromatyny i progresji cyklu komórkowego zastosowano technikę Western blotting.

4.1. Przygotowanie całkowitych lizatów komórkowych

Całkowite lizaty komórkowe przygotowywano z użyciem komercyjnego odczynnika M-PER (ang. *Mammalian Protein Extraction Reagent*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Plan doświadczenia: Komórki śródbłonna wysiewano na szalki hodowlane o średnicy 6 cm w gęstości 1 mln komórek/szalka w 3 ml medium hodowlanego. Komórki inkubowano w warunkach hodowli przez 16-20 godz. by umożliwić ich adhezję do podłoża. Po tym czasie komórki traktowane były badanymi stężeniami inhibitorów i inkubowane ze związkami przez 16 godz.

Protokół izolacji z wykorzystaniem M-PER:

1. Dwukrotne przepłukanie monowarstwy komórek roztworem PBS.

2. Odklejenie komórek od powierzchni hodowlanej z wykorzystaniem 125 μ l 0,25% trypsyny i zbieranie zawiesiny komórek do sterylnych probówek.
3. Wirowanie zawiesiny komórek: 3 000 rpm/5min/4°C.
4. Usunięcie supernatantu i przemycie osadu komórek dwukrotnie zimnym PBS. Przygotowanie roztworu roboczego odczynnika M-PER poprzez dodanie inhibitorów proteaz – HALT Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w stosunku 1:10 objętości końcowej.
5. Zawieszenie osadu komórek w zadanej objętości M-PER, według producenta 60 μ l M-PER na 1 mln komórek.
6. Inkubacja próbek na lodzie przez 10 minut, wirowanie 14 000 rpm/10 min/4°C.
7. Przeniesienie supernatantu – lizatu komórkowego do sterylnych probówek o objętości 1,5 ml. Próbkę przechowywano w -20°C do momentu wykorzystania w analizach.

4.2. Izolacja frakcji histonowej metodą kwaśnej ekstrakcji

Analizy profilu modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych prowadzone były z wykorzystaniem ekstraktów przygotowanych metodą kwaśnej ekstrakcji, która umożliwia zachowanie profilu modyfikacji, co jest kluczowym aspektem w przeprowadzonych analizach.

Zasada metody: Histony to białka bogate w zasadowe aminokwasy, takie jak lizyna i arginina, co sprawia, że są one stabilne w warunkach kwaśnych. Dodanie do lizatu komórkowego roztworu silnego kwasu (H_2SO_4) prowadzi do obniżenia pH roztworu i denaturacji większości białek niehistonowych. Histony, dzięki swojej strukturze i wysokiemu ładunkowi dodatniemu, pozostają rozpuszczalne w tych warunkach. Bufory wykorzystywane podczas ekstrakcji:

- Bufor lizujący: 10 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 0,5 mM DTT, 1,5 mM PMSF, dopełnione do zadanej objętości wodą destylowaną
- Bufor rozpuszczający: 20 mM TRIS pH = 8,0, 100 mM KCl, 10 mM Tween 20, 10% glicerol, 0,2 mM EDTA, 1mM DTT, 1,5 mM PMSF, dopełnione do zadanej objętości wodą destylowaną

Plan doświadczenia: Komórki śródbłonna wysiewano na szalki o średnicy 10 cm (Saersted, Nümbrecht, Niemcy), gęstość 5 mln komórek na szalkę w 8 ml pożywki MCDB131. Komórki inkubowano w warunkach hodowli przez 16–20 godz. by umożliwić ich adhezję do podłoża. Po tym czasie komórki traktowano badanymi związkami i kontynuowano inkubację w warunkach hodowli przez kolejne 16 godz. Następnie przeprowadzano kwaśną ekstrakcję zgodnie z poniższym protokołem:

1. Dwukrotne przepłukanie monowarstwy komórek zimnym roztworem PBS.
2. Zebranie komórek z wykorzystaniem skrobaka (Greiner, Kremsmünster, Austria) i zawieszenie ich w zimnym roztworze PBS.
3. Wirowanie zawiesiny komórkowej 3 000 rpm/4 min/4°C, usunięcie supernatantu.
4. Dodanie do prób 375 μ l buforu lizującego i dokładne zawieszenie osadu poprzez worteksowanie
5. Wirowanie zawiesiny 10 000 rpm/10 min/4°C, usunięcie supernatantu.

6. Ponowne zawieszenie osadu w buforze lizującym – 250 μ l, po dokładnym zawieszeniu osadu do mieszaniny dodawano 3,6 μ l 18 M H_2SO_4 . Inkubacja prób na lodzie przez godzinę.
7. Po inkubacji próbki odwirowywano 13 000 rpm/20 min/4°C, a supernatant przenoszono do nowych sterylnych probówek.
8. Do próbek dodawano 1 ml zimnego acetonu (-20°C) i prowadzono 2-godziną inkubację w temperaturze -20°C.
9. Po zakończeniu inkubacji próbki odwirowywano: 13 000 rpm/20 min/4°C, a supernatant usuwano.
10. Osad histonów zawieszano w 75 μ l buforu rozpuszczającego.

4.3. Oznaczenia stężenia białka metodą Pierce’a

Stężenie białka zarówno w lizatach całkowitych jak i kwaśnych ekstraktach oznaczano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem odczynnika: Pierce Protein Assay 660 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). W analizach wykorzystywano protokół producenta.

Zasada metody: Test oparty jest na wiązaniu kompleksu metal-barwnik z białkiem, co skutkuje przesunięciem maksimum absorpcji barwnika. Czerwono-brązowy kompleks metal-barwnik zmienia barwę na kolor zielony po związaniu białka, co wywołane jest deprotonacją barwnika przy niskim pH i interakcjami z dodatnio naładowanymi grupami aminokwasów. Oznaczenia wykonywane były na płytkach 96-dołkowych. Stężenie białka w próbach określano na podstawie przygotowanej krzywej wzorcowej wykonanej dla albuminy surowicy wołowej, BSA (ang. *Bovine Serum Albumine*; Capricorn Scientific, Niemcy) w zakresie stężeń: 0,0625-2 mg/ml. Próby badane były one rozcieńczane ddH₂O w stosunku 1:1. Następnie dodawano odczynnik Pierce’a i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję oznaczano przy $\lambda = 660$ nm na czytniku BioTek Eon™ (Winooski, VT, USA).

4.4. Western blotting

Przygotowanie prób: badane próby przygotowywano poprzez rozcieńczenie ich w ddH₂O do zadanej ilości białka – 2 μ g dla ekstraktów histonowych, 20 μ g dla lizatów całkowitych i dodanie buforu Lammliego zawierającego β -merkaptotanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Próby denaturowano termicznie w termobloku w 85°C przez 5 minut.

Elektroforeza SDS-PAGE: Rozdział elektroforetyczny prowadzono w świeżo przygotowywanych żelach: 3% zagęszczającym i 10% rozdzielającym, w aparacie Mini-Protean (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA), w którym umieszczano przygotowane żele i następnie wlewano bufor do elektroforezy (25 mM TRIS, 192 mM glicyna, 0,1% SDS). Do studzienek żeli nanoszono zadane objętości prób badanych oraz marker mas: Page Ruler Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Rozdział prowadzono przez około 1,5 godz., przy napięciu 120 V w temperaturze pokojowej.

Transfer białek z żelu na membranę PVDF: Transfer białek prowadzono korzystając z systemu Mini-Protean (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym przygotowywano „kanapki do transferu” z wykorzystaniem bibuły filtracyjnej (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA), membrany PVDF (Merck Millipore, Burlington,

Massachusetts, USA), żelu po rozdziale oraz gąbek dostarczonych przez producenta zestawu. Membrana PVDF przed wykorzystaniem aktywowana była poprzez zanurzenie w 99% metanolu na 1 minutę. Gotowe „kanapki do transferu” umieszczano w aparacie, który zalewano buforem do transferu (25 mM TRIS, 192 mM glicyna, 20% metanol). Transfer mokry prowadzono przy natężeniu 370 mA przez 90 minut, w temperaturze 4°C.

Immunodetekcja: Po zakończonym transferze membrany blokowano w celu uniknięcia niespecyficznego wiązania się przeciwciał, poprzez umieszczenie membran w roztworze blokującym: 5% odtłuszczone mleko w TBST (1 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,9, 0,5% Tween 20) na czas od 1 do 2 godzin w RT. Następnie membrany umieszczano w roztworach przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych w 3% BSA w TBST (Tabela IV.1.), i inkubowano zgodnie z zaleceniami producenta. Po zakończeniu inkubacji i 3-krotnym przepłukaniu membran buforem TBST, przeprowadzano 2-godziną inkubację membran z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową. W ostatnim kroku membrany 3-krotnie płukano roztworem TBST. **Detekcja i wizualizacja białek:** Kompleksy białko-przeciwciała drugorzędowe wykrywano poprzez inkubowanie membran w roztworze SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), wykorzystując reakcję chemiluminescencyjną peroksydazy chrzanowej z H₂O₂ i luminolem. Sygnał chemiluminescencji rejestrowany był z wykorzystaniem chemiluminometru Azure300 (Azure Biosystems, Dublin, USA).

Tabela IV. 1. Spis przeciwciał wykorzystanych w badaniach.

Antygen	Pochodzenie	Rozcieńczenie przeciwciał	Producent	Numer katalogowy
H3R2cit + R8cit + R17cit	Królik	1:1000	abcam, Cambridge, UK	ab5103
H4R3cit	Królik	1:1000	abcam, Cambridge, UK	ab81797
H3ac	Królik	1:1000	abcam, Cambridge, UK	ab47915
H3K9/14ac	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#9677
H3K9me3	Królik	1:1000	ActiveMotif, Tegernheim, Niemcy	#39161
H3K4me1	Królik	1:1000	ActiveMotif, Tegernheim, Niemcy	#61633
Histone H3	Mysz	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#3638
HP1α	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#2616
HP1γ	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#2619
CHAF1A	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#5480
ChK1	Królik	1:1000	abcam, Cambridge, UK	ab47574
phChK1	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#2348
p53	Królik	1:750	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#9282
PCNA	Mysz	1:2000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#2586
AKT	Królik	1:1000	Abclonal, Woburn, USA	A18120
phAKT (S473)	Królik	1:1000	Abclonal, Woburn, USA	AP1208
GSK3β	Mysz	1:1000	Santa Cruz Biotech., Dallas, USA	sc-81462
PI3K	Królik	1:1000	Abclonal, Woburn, USA	A4992
SET7/9	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#2813
LSD1	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#2184
PAD1	Królik	1:500	abcam, Cambridge, UK	ab181762
PAD2	Królik	1:1000	abcam, Cambridge, UK	ab16478
PAD3	Mysz	1:500	Santa Cruz Biotech., Dallas, USA	sc-393622
PAD4	Mysz	1:250	Santa Cruz Biotech., Dallas, USA	sc-166645
β - actin	Mysz	1:1000	Santa Cruz Biotech., Dallas, USA	sc-69879
GAPDH	Królik	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA	#5174

Przeciwciało II ^o	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent	Numer
AffiniPure Anti-Rabbit IgG (H+L)	Koza	1:10 000	Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, USA	111-007-003
AffiniPure Anti-Mouse IgG (H+L)	Koza	1:10 000	Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, USA	115-006-003

5. Immunofluorescencyjna analiza antygenów

W celu określenia lokalizacji PAD2 i PAD4 w komórkach HMEC-1 zastosowano metodę barwienia immunofluorescencyjnego.

Plan doświadczenia: W doświadczeniach wykorzystywano płytki Nunc™ Lab-Tek™ (#155411PK, ThermoFisher Scientific, Manassas, USA). Komórki HMEC-1 wysiewano na płytki w gęstości 20 000 komórek na dołek w 200 ul pożywki hodowlanej. Komórki inkubowano przez 12–16 godz. w warunkach hodowli. Po tym czasie komórki utrwalano z wykorzystaniem 4% roztworu paraformaldehydu w PBS przez 45 minut. Następnie, w celu zmniejszenia liczby niespecyficznych wiązań przeciwciał próby blokowano przez godzinę w RT w buforze blokującym (8% BSA, 0,2% TRITON, 1X PBS). Po zakończeniu blokowania komórki przepłukiwano 3-krotnie buforem PBT (PBS z dodatkiem 0,2% Triton X-100). Komórki inkubowano przez noc z przeciwciałami pierwszorzędowymi w 4°C. Komórki ponownie przepłukano a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi w ciemności przez godzinę w RT. Po inkubacji komórki ponownie płukano a następnie dodawano roztwór 1,4-diazabicyklo [2.2.2] oktan - DABCO (ThermoFisher Scientific, Manassas, USA) zawierający barwnik kontrastowy - 4',6'-diamidyno-2-fenylindol (DAPI). Obserwacji i dokumentacji fotograficznej dokonywano z wykorzystaniem mikroskopu AxioImager A1 (Carl ZeissAG, Oberkochen, Niemcy) wyposażonego w kamerę AxioCam MRc5 CCD (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy), stosując ten sam czas ekspozycji.

6. Analiza ekspresji wybranych genów w komórkach śródbłónka

Zmiany ekspresji genów analizowano metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej qPCR (ang. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*).

6.1. Izolacja mRNA, reakcja odwrotnej transkrypcji

Izolację mRNA z komórek HMEC-1 oraz HUVEC wykonywano z użyciem komercyjnego kolumnienkowego zestawu do izolacji – Invitrap SpinCell mRNA Kit (Strattec Biomolecular, Birkenfeld, Niemcy). Stężenie oraz jakość wyizolowanego mRNA oznaczano spektrofotometrycznie na czytniku Eon™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). Wyizolowane mRNA przechowywano w temperaturze -80°C. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano za pomocą PrimeScript RT Master Mix (Takara, Japonia) zgodnie z instrukcją załączoną do produktu. Uzyskane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

6.2. qPCR

Analizy qPCR prowadzono przy użyciu termocyklera Eco Real-Time PCR (Illumina, San Diego, Kalifornia, USA). Reakcję przeprowadzano w płytkach 48-dołkowych (Illumina, San Diego, Kalifornia,

USA). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 μ l i zawierała: 0,2 nM primerów (Tabela IV.2.), matrycę cDNA, sondę fluorescencyjną SYBR Green Perfect Real Time (Takara, Japonia) i wodę wolną od DNAaz/RNAaz (Corning Life Sciences, NY, USA).

Przebieg reakcji PCR: Aktywacja polimerazy w 96°C przez 2 minuty, następnie 40 cykli w następujących po sobie warunkach: 96°C przez 5 s i 60°C przez 30 s. Normalizację ekspresji genów przeprowadzano według metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ opisanej przez Livaka i wsp. [246], a jako gen referencyjny wykorzystano gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową, *HPRT1* (ang. *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*).

Tabela IV.2. Sekwencje primerów wykorzystywanych w badaniach.

Analizowany gen	Sekwencja primeru 1 (5' → 3')	Sekwencja primeru 2 (5' → 3')
<i>HPRT1</i>	ATGGACAGGACRGAACGTCTT	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA
<i>CCNA</i>	ACTGGTGGTCTGTGTTCTGTGA	GATGCCAGTCTTACTCATAGCTGAC
<i>CCNB</i>	TGGTGAATGGACACCAAVTC	TAGCATGCTTCGATGTGGCA
<i>CCND</i>	ATGCCAACCTCCTCAACGACC	TCTGTTCTCGCAGACCTCCA
<i>CCNE</i>	CAGGGAGCGGGATGCG	GGTCACGTTTGCCTTCCTCT
<i>CCNY</i>	TGGCAGAAGCGAACAACCTG	AGGCGAGAGATGGCCTCAAG
<i>VEGFA</i>	CTACCTCCACCATGCCAAGT	ATGATTCTGCCCTCCTCCTT
<i>VEGFC</i>	CAGCAACACTACCACAGTGTCA	CTCCAGCATCCGAGGAAAACAT
<i>SERPINE1</i>	TGTCATAGTCTCAGCCCGCA	AAAAGGACTGTTCTGTGGGG
<i>SERPINF1</i>	GCGTATCCACAGGCCCA	GGGCTGGCAGGGTTCTG
<i>EDN1</i>	GAGCTCCAGAAACAGCAGTC	TATCCATCAGGGACGAGCAG
<i>IL6</i>	CTCATTCTGCCCTCFAGCC	GACCGAAGGCGCTTGTGGA
<i>IL8</i>	ACCGGAAGGAACCATCTCAC	GGCAAACTFCACCTTCACAC
<i>CCL2</i>	TCTCAAATGAAGCTCGCACT	TGGGGCATTGATTGCATCTGG
<i>VIM</i>	TACCGGAGACAGGTGCAGT	CGTTCCAGGGACTCATTGGTT
<i>IGFBP2</i>	GCTGGTCATGGGCGAGGG	TGGTCATCGCCATTGTCTGC
<i>IGFBP3</i>	CCTACCTGCTGCCAGCGCC	GGTGCGTGCTGGAGACGGAC
<i>TIMP1</i>	TGACATCCGGTTCGTCTACA	CTGCAGTTTTCCAGCAATGA
<i>PAD2</i>	CGCGTGAGGCGGTGTA	TCCTCAGCTCCCCATCAC
<i>PAD4</i>	CCATCCTGCTGGTGAACGTGT	GAAGTCCTTGGGGTCTTCG
<i>HDAC3</i>	TGGTGAATGGACACCAACTC	TAGCATGCTTCGATGTGGCA
<i>HDAC5</i>	ATGCCAACCTCCTCAACGACC	TCTGTTCTCGCAGACCTCCA
<i>p300</i>	CCAGACCAGCATGACAGATTTC	GCTTCCTCTTGGAGCAGATCAG
<i>NRF2</i>	GCTATACTCTTCCGTCGC	GTCCAGCAGGACATGGATT
<i>TXNR1</i>	AGGAACGCTCTCGGAATTGG	TGCCCTCTGATAAGCCTTC
<i>TXNR2</i>	GCAGGAGCATGTTGAGGTCT	CCCTCAGGCACACCATCTTT
<i>DNMT1</i>	TCCCACTCGAGCCTTCATA	GTGGAAGCCGGCAAAGC
<i>CBX5</i>	CTCCGGAACAACAGCTTCT	ATAGAATGCCCGACCTGAC

7. Analiza progresji cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej (FACS)

W celu oceny wpływu badanych inhibitorów cytrulinacji na progresję cyklu komórkowego wykorzystano cytometryczną metodę pomiaru zawartości DNA w komórce z użyciem jodku propidyny (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Przygotowanie komórek do analizy cytometrycznej FACS (ang. *Flourescence Activated Cell Sorting*) przeprowadzono w oparciu o metodę opisaną w literaturze [156].

Plan doświadczenia: Komórki śródbłonna wysiewano na płytki o średnicy 6 cm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w gęstości 500 000 komórek/szalka w 3 ml medium hodowlanego. Komórki inkubowano w warunkach hodowli przez 16-20 godz. by umożliwić ich adhezję do podłoża, a następnie

traktowano inhibitorami PADs i kontynuowano inkubację w warunkach hodowli przez 16, 24, 32 lub 48 godzin. Po jej zakończeniu komórki trypsinizowano, zawieszono w wirówce 3 000 rpm/5 min, a osad przemywano dwukrotnie PBS i zawieszano w PBS.

Przygotowanie prób do analizy FACS:

1. Komórki utrwalano w 70% etanolu przez 24 godziny w temperaturze 4°C.
2. Etanol usuwano poprzez odwirowanie 7 000 rpm/5 min/4°C, następnie próby przemywano dwukrotnie roztworem PBS.
3. Osad komórek zawieszano w 500 µl PBS zawierającym 0,4 mg/ml RNAazę A (AppliChem, Niemcy) i 5 µg/ml jodek propidyny. Próby inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C w ciemności.
4. Po zakończonej inkubacji próby poddawano analizie FACS (LSRII, Becton Dickinson, USA).
5. Uzyskane wyniki analizowano wykorzystując oprogramowanie FlowJo (FlowJo, USA). W celu identyfikacji subpopulacji komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego wykorzystano parametry rozpraszania przedniego (FSC, ang. *Forward Scatter Channel*) i rozproszenia bocznego (SSC, ang. *Side Scatter Channel*). Na pierwszym etapie bramkowania usunięto zanieczyszczenia wykonując wykres zależności SSC-A od FSC-A, następnie w celu wykluczenia dubletów i zaagregowanych komórek wykonano bramkowanie FSC-H vs. FSC-A. By wykluczyć resztę zanieczyszczeń oraz niektóre z komórek apoptotycznych wykonano wykres SSC-H vs. SSC-A. W ostatnim etapie komórki bramkowano wykonując wykres zależności parametrów PE-A vs PE-W. Przygotowywano histogram prezentujący zależność pozytywnych zliczeń komórek od PE-A. Bramkowanie komórek najpierw przeprowadzano w próbie kontrolnej, a następnie takie same parametry zastosowano w próbach badanych. Kończącą analizę subpopulacji komórek wykonano z wykorzystaniem algorytmu, który dopasowuje krzywe Gaussa do każdej z faz cyklu komórkowego.

8. Test tworzenia struktur pseudokapilarnych na podłożu Matrigel™

Tworzenie przez komórki śródbłonna struktur kapilarnych to jeden z kluczowych etapów angiogenezy *in vivo*. Analizę tego zjawiska w warunkach *in vitro* umożliwia test tworzenia struktur pseudokapilarnych przeprowadzany w wysokobiałkowym podłożu Matrigel™ (Corning Life Sciences, NY, USA) nałożonym do dołków płytki µ-Slide Angiogenesis (Ibidi, Niemcy), w stężeniu 5 mg/ml. Płytki inkubowano w warunkach hodowli w inkubatorze przez 30 min w celu usieciowania podłoża.

Plan doświadczenia: Komórki śródbłonna wysiewano na płytki 6-dołkowe w gęstości 250 000 komórek/dołek w 3 ml medium hodowlanego. Po 12-16 godzinnej inkubacji w warunkach hodowli umożliwiającej adhezję komórek do podłoża, traktowano je inhibitorami PAD (1 µM BBCLA, 10 µM CLA lub 10 µM FA) i kontynuowano inkubację w warunkach hodowli przez 16 godz. Po jej zakończeniu komórki trypsinizowano i wirowano 1 300 rpm/3 min, zawieszano w pełnym, przefiltrowanym medium hodowlanym, a następnie wysiewano po 7000 komórek/dołek – HMEC-1 i 6000 komórek/dołek – HUVEC na płytkę µ-Slide Angiogenesis w końcowej objętości 50 µl. Tak przygotowane płytki

inkubowano w warunkach hodowli przez 6 godzin – HMEC-1 i 8 godzin – HUVEC. Po zakończonej inkubacji utworzone struktury pseudokapilarne barwiono przez 15 minut roztworem 3 μ M Calcein-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w PBS z jonami. Wybarwione struktury obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Japonia) wyposażonym w kamerę Zeiss AcioCamERc5s (Zeiss, Niemcy). Na podstawie wykonanych zdjęć prowadzono analizę parametryczną i charakterystykę utworzonych przez struktur pseudokapilarnych w programie ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) z nakładką Angiogenesis Analyzer (autor: Giles Carpentier, Universite Paris Est Creteil).

9. Analiza zdolności migracyjnych komórek śródbłónka – test zarastania rysy

W celu analizy kolejnego z istotnych etapów angiogenezy – migracji komórek śródbłónka wykorzystano test zarastania rysy (ang. *wound healing*) Metoda oparta jest na wykonaniu rysy w monowarstwie komórek i obserwacji ich migracji w celu jej zarośnięcia. Wykluczono wpływ podziałów komórkowych na zarastanie rysy poprzez zastosowanie cytostatyku: mitomycyna-C (Molekula Group, Monachium, Niemcy #50-07-7)

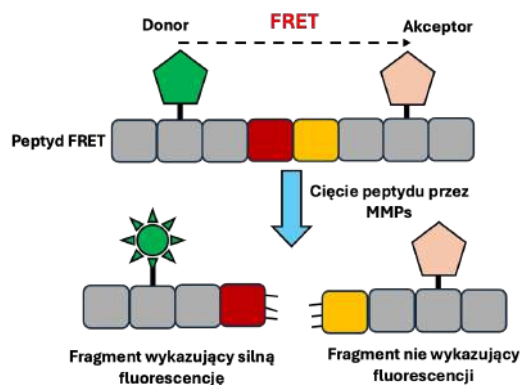
Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 i HUVEC wysiewano na 24-studzienkowe płytki (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w gęstości 400 000 komórek/dotek w 2 ml medium hodowlanego. Po 16-20 godzinnej inkubacji w warunkach hodowli komórki traktowano inhibitorami PAD: 1 μ M BBCLA, 10 μ M CLA lub 10 μ M FA i następnie prowadzono inkubację w warunkach hodowli przez kolejne 16 godz. Po zakończeniu inkubacji wykonywano rysę w monowarstwie komórek z wykorzystaniem sterylnej końcówki do pipet o pojemności 200 μ l. Następnie medium znad komórek zbierano i uzupełniano świeżą porcją MDCB131 z dodatkiem 10 μ g/ml mitomycyny C (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Prowadzono 8 godz. inkubację w warunkach hodowli. W czasach 0, 2, 4, 6 i 8 godzin od początku doświadczenia wykonywano zdjęcia rys z wykorzystaniem mikroskopu Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Japonia) wyposażonego w kamerę Zeiss AcioCamERc5s (Zeiss, Niemcy). Analizę zdjęć i procesu zarastania rys przeprowadzano z wykorzystaniem programu ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) z nakładką Wound Healing Tool [247].

10. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

W celu oznaczenia całkowitej aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) wykorzystano komercyjny zestaw: MMP Activity Assay Kit (ab112146, Abcam, UK). Procedurę doświadczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

Zasada metody: działanie zestawu oparte jest na wykorzystaniu zjawiska bezpromienistego rezonansowego transferu energii (FRET). Zestaw zawiera sondę – peptyd FRET stanowiący cel dla MMPs w którym fluorescencja jednej z jego części wygaszana jest przez drugą i jedynie po przecięciu peptydu przez MMPs wykazywana jest fluorescencja $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ (Rysunek IV. 3.).

Zestaw może być wykorzystany jedynie do mierzenia całkowitej aktywności MMPs, niemożliwe jest odczytanie indywidualnych wartości dla poszczególnych izoform MMPs.



Rysunek IV.3. Przedstawienie działania sondy FRET zastosowanej w zestawie MMP Activity Assay Kit (Abcam, UK). Wewnątrz wygaszony substrat peptydowy FRET jest trawiony przez MMPs w wyniku czego powstaje wysoce fluorescencyjny fragment peptydowy. Wzrost fluorescencji jest proporcjonalny do aktywności proteazy. Grafika przygotowana w oparciu o materiały producenta zestawu ab112146, firmę Abcam.

Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiewano na 6-dołkowe płytki w gęstości 700 000 komórek/dołek w 3 ml medium hodowlanego. Po 16-20 godzinnej inkubacji w warunkach hodowli komórki, potraktowano inhibitorami PAD: 1 μ M BBCLA, 10 μ M CLA lub 10 μ M FA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godzin. Jako pozytywną kontrolę hamowania aktywności MMPs komórki HMEC-1 potraktowano 20 μ g/ml doksycykliną (DOX).

1. Po 16 godzinach inkubacji z nad komórek zebrano supernatant, który inkubowano przez 3 godziny z 2 mM octanem 4-aminofenylortęci (APMA) w celu aktywacji MMPs.
2. Supernatanty aktywowane APMA przeniesiono do dołków czarnej płytki 96-dołkowej z U-kształtnym dnem (Greiner, Kremsmünster, Austria) i dodano MMP Green Substrate.
3. Odczytywano fluorescencję we wszystkich próbach w 5-minutowych odstępach, pomiędzy którymi płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej. Fluorescencję prób mierzone przy $\lambda_{ex} = 490$ nm i $\lambda_{em} = 525$ nm, na czytniku do mikropłytek Fluoroscanner Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).
4. Wyniki opracowano zgodnie z wytycznymi producenta, odnosząc je wobec kontroli negatywnej (komórki niczym nie traktowane) i kontroli pozytywnej (komórki traktowane DOX).

11. Oznaczenie profilu wydzielania regulatorów angiogenezy

Profil wydzielania regulatorów angiogenezy (cytokin/chemokin/regulatorów wzrostu) przez komórki HMEC-1 oznaczano z wykorzystaniem zestawu: Proteome Profiler Human Angiogenesis Array (R&D Systems, USA).

Zasada metody: Zestaw Proteome Profiler Human Angiogenesis Array oparty jest na membranowym, „kanapkowym” teście immunologicznym wykrywającym 55 białek związanych z regulacją angiogenezy. Główne etapy testu: (i) próbki mieszane są z koktajlem biotynylowanych przeciwciał, (ii) membrany wyznakowane przeciwciałami specyficznymi dla danego białka zalewane są następnie przygotowanymi próbkami i inkubowane przez noc w 4°C, (iii) kompleksy białko-przeciwciało są wizualizowane z wykorzystaniem odczynników chemiluminescencyjnych, a rejestrowany sygnał jest proporcjonalny do ilości związanego białka.

Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiewano na szalki o średnicy 6 cm w gęstości 3,5 mln komórek/szalka w 3 ml medium hodowlanego i inkubowano przez 16 – 20 godzin by umożliwić adhezję

komórek. Komórki traktowano następnie inhibitorami PAD: 1 μ M BBCLA, 10 μ M CLA lub 10 μ M FA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godzin. Po zakończeniu inkubacji, z nad komórek zebrano supernatanty, krótko odwirowano i rozcieńczono zgodnie z instrukcją producenta. Do supernatantów dodano koktajl biotynylowanych przeciwciał wykrywających i tak przygotowanymi mieszaninami zalano membrany. Całość inkubowano z supernatantami na kołysce laboratoryjnej przez noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji membrany przepłukano zgodnie z wytycznymi producenta i zalano roztworem zawierającym streptawidynę-HRP i odczynnik chemiluminescencyjny. Sygnały chemiluminescencyjne z membran wizualizowano przy użyciu chemiluminometru Azure 300 (Azure Biosystems, USA). Wyniki następnie analizowano z wykorzystaniem programu ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) z nakładką: Protein Array Analyzer, zgodnie z instrukcją producenta i wskazówkami autora pakietu [248].

12. Oznaczenie poziomu NO[•] z wykorzystaniem sondy DAF-FM DA

Poziom NO[•] wydzielanego przez ECs badano z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej – diocjanu 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluorofluoresceiny (DAF-FM DA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Zasada metody: DAF-FM DA biernie dyfunduje przez błony komórkowe i wewnątrz komórek jest deacetylowany przez wewnątrzkomórkowe esterazy tworząc DAF-FM. Sonda wykazuje niską fluorescencję, dopóki nie zareaguje z NO[•], tworząc fluorescencyjny benzotriazol.

Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiewano na czarną płytkę 96-dołkową (Greiner, Kremsmünster, Austria), w gęstości 20 000 komórek/dołek w objętości 100 μ l medium hodowlanego. Komórki inkubowano w warunkach hodowli 12-16 godz. w celu umożliwienia im adhezji do podłoża. Po tym czasie komórki traktowano inhibitorami PAD: 1 μ M BBCLA, 10 μ M CLA lub 10 μ M FA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godz. Po zakończeniu inkubacji usuwano supernatant z nad komórek, przemywano je dwukrotnie roztworem PBS z jonami Ca²⁺/Mg²⁺ i glukozą, następnie do dołków płytki dodawano po 50 μ l roztworu roboczego 2 μ M DAF-FM DA w PBS z jonami Ca²⁺/Mg²⁺ i glukozą. Fluorescencję prób oznaczano przy λ_{ex} = 495 nm i λ_{em} = 510 nm, w czasie 0 oraz po 30 minutach po dodaniu sondy z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Fluoroscanner Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

13. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem sondy H₂DCF DA

Produkcję RFT przez komórki HMEC-1 traktowane inhibitorami PAD analizowano z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej – diocjanu 2',7' dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF DA; MedChemExpress, USA). Po inkubacji z inhibitorami PAD w komórkach HMEC-1 indukowano stres oksydacyjny poprzez inkubację z wodoronadtlenkiem *tert*-butylu (t-BOOH).

Zasada metody: H₂DCF DA biernie dyfunduje do komórek, gdzie poddany jest działaniu wewnątrzkomórkowych esteraz i ulega utlenieniu przez RFT tworząc wysoce fluorescencyjną 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF).

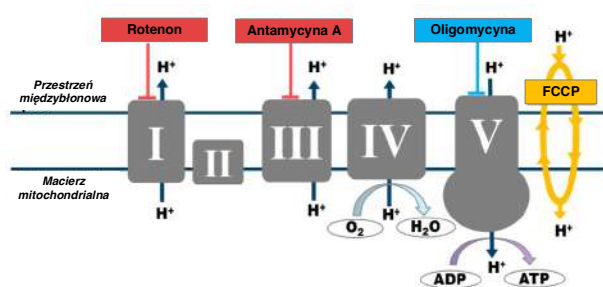
Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiano na czarną płytkę 96-dołkową (Greiner, Kremsmünster, Austria), w gęstości 20 000 komórek/dołek w końcowej objętości 100 µl. Komórki inkubowano w warunkach hodowli 12-16 godz. w celu umożliwienia im adhezji do podłoża. Po tym czasie traktowano je inhibitorami PAD: 1 µM BBCLA, 10 µM CLA lub 10 µM FA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godz. Po zakończonej inkubacji komórki traktowane inhibitorami poddano działaniu 10 µM t-BOOHi inkubowano w warunkach hodowli przez godzinę. Na płytce uwzględniono wszystkie wymagane kontrole pozytywne i negatywne. Po zakończeniu inkubacji zlewano supernatant z nad komórek, przemywano je dwukrotnie roztworem PBS z jonami Ca²⁺/Mg²⁺ i glukozą. Następnie do dołków płytki dodawano 50 µl roztworu roboczego 5 µM H₂DCF DA w PBS z jonami Ca²⁺/Mg²⁺ i glukozą. Fluorescencję prób oznaczano przy $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ w czasie 0 oraz 30, 60 i 90 minut po dodaniu sondy z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Fluoroscanner Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

14. Ocena funkcji mitochondriów – Seahorse Mito Stress Test

W celu oceny funkcji mitochondriów w komórkach HMEC-1 z farmakologicznie zahamowaną aktywnością PAD użyto urządzenia Agilent Seahorse XFp (Agilent Technologies, USA) i zestawu Agilent Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, USA). Test umożliwia pomiar kluczowych parametrów funkcji mitochondriów poprzez bezpośrednie monitorowanie szybkości zużycia tlenu (OCR, ang. *Oxygen Consumption Rate*) przy wykorzystaniu modulatorów oddychania komórkowego, (*Rysunek IV.4.*): (i) Oligomycyna – dodawana jako pierwsza, hamuje syntazę ATP (kompleks V), obniżając OCR, co pozwala na ocenę produkcji ATP w komórkach; (ii) Cyjanek karbonylu-4 (trifluorometoksy) fenylohydrazon (FCCP) – drugi modulator, odspiera potencjał błony mitochondrialnej poprzez zmianę gradientu protonów. Skutkuje to zwiększeniem zużycia tlenu przez kompleks IV, pozwalając na obliczenie zapasowej pojemności oddechowej – miary zdolności komórki do reagowania na zwiększone zapotrzebowanie na energię lub stres; (iii) Rotenon + Antamycyna A – trzeci zestaw modulatorów, zatrzymuje oddychanie mitochondrialne, umożliwiając pomiar oddychania niemitchondrialnego.

Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiewane były na 8-dołkowe płytki Seahorse XFp Cell Culture Miniplates w gęstości końcowej 7 000 komórek/dołek w 80 µl medium hodowlanego. Do dwóch dołków płytki dodano wyłącznie pełną pożywkę bez komórek – dołki korygujące odczyt. Komórki inkubowano w warunkach hodowli przez 12 godz. w celu umożliwienia im adhezji do powierzchni płytek. Po tym czasie traktowano je inhibitorami PAD: 1 µM BBCLA, 10 µM CLA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godz. W trakcie trwania inkubacji komórek z inhibitorami przygotowywano kartridże sensorowe – XFp Sensor Cartridge – sensory były inkubowane w ddH₂O w 37°C bez dopływu CO₂ przez noc, a następnie 60 minut przed pomiarem ddH₂O zastąpiono

odczynnikiem kalibrującym XF Calibrant. wykonywano w medium pomiarowym: Seahorse XF DMEM suplementowaną 1 mM pirogronianem, 2 mM L-glutaminą i 10 mM glukozą (Agilent Technologies, USA). Po zakończonej inkubacji komórki dwukrotnie przemywano przygotowanym medium pomiarowym, a następnie przed rozpoczęciem analizy podobnie jak kartridże, komórki inkubowano przez 60 minut w 37°C bez dopływu CO₂. W czasie inkubacji do dołków (portów) kartridża sensorowego nanoszono wymienione wyżej modulatory ETC zgodnie z zaleceniami producenta, z uwzględnieniem kolejności ich iniekcji: 1,5 µM oligomycyna, 1 µM FCCP, 0,5 µM Rotenon/ 0,5 µM Antamycyna A i dokonywano pomiarów OCR oraz szybkość uwalniania protonów. Wyniki analizowane były w dostarczonym przez producenta programie Seahorse Wave.



Rysunek IV.4. Schematyczna wizualizacja przebiegu oceny funkcji mitochondriów w systemie Seahorse [zmodyfikowana grafika z instrukcji producenta zestawu pomiarowego - Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress Test].

15. Ocena uszkodzeń DNA – test kometowy

Uszkodzenia DNA w komórkach HMEC-1 oceniano przy użyciu testu kometowego. Po inkubacji z inhibitorami PAD w komórkach HMEC-1 indukowano uszkodzenia DNA poprzez inkubację z H₂O₂.

Plan doświadczenia: Komórki HMEC-1 wysiewano na szalki o średnicy 3 cm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w gęstości 15 000 komórek/szalka w objętości 2 ml. Komórki inkubowano w warunkach hodowli 12-16 godz. w celu umożliwienia im adhezji do podłoża. Po tym czasie traktowano je inhibitorami PAD: 1 µM BBCLA, 10 µM CLA lub 10 µM FA i inkubowano w warunkach hodowli przez 16 godz. Po zakończonej inkubacji komórki traktowane inhibitorami poddano działaniu 150 µM H₂O₂ i inkubowano w warunkach hodowli przez 30 minut. W doświadczeniu uwzględniono wszystkie wymagane kontrole pozytywne i negatywne. Szkiełka mikroskopowe pokrywano 1% roztworem agarozy. Po zakończeniu inkubacji komórki zawieszano w 1% roztworze agarozy, nanoszono na szkiełko podstawowe, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Po stężeniu agarozy zdejmowano szkiełka nakrywkowe i przez godzinę przeprowadzano lizę komórek w 4°C zalewając szkiełka podstawowe roztworem lizującym (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl o pH 10) z dodatkiem schłodzonego Triton X-100 (na 100 ml buforu lizującego dodano 1 ml Tritonu). Proces ten miał na celu lizę błony komórkowej i uwolnienie DNA z jądra komórkowego, odseparowanie białek od DNA. Następnie, szkiełka umieszczano w buforze rozwijającym (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) na 20 minut w 4°C, po czym przeprowadzano elektroforezę agarozową przy napięciu 29 V przez 20 minut. Po zakończeniu elektroforezy, szkiełka trzykrotnie przepłukiwano wodą. Po wyschnięciu szkiełka barwiono roztworem 1 µg/ml DAPI przygotowanym w ddH₂O. W każdym eksperymencie analizowano 100 (po 50 w jednym pomiarze) komórek. Pomiary i dokumentację fotograficzną wykonywano za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse E400 (Minato, Tokio, Japonia) wyposażonego w kamerę Jenoptik

ProgRes MF Cool (Jena, Niemcy) wyniki analizowano z wykorzystaniem program LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Praga, Czechy)

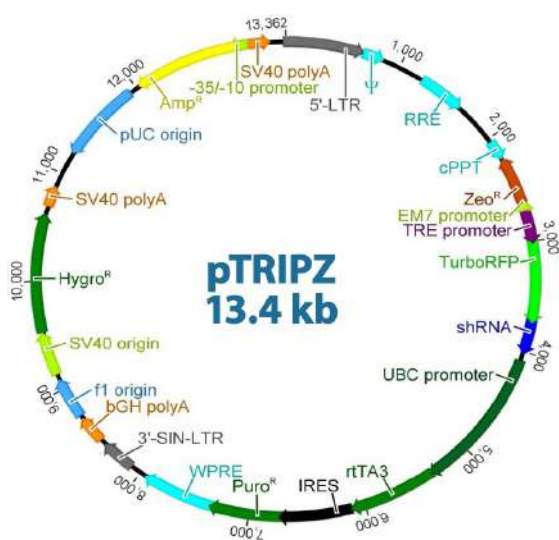
16. Analizy *in silico* interakcji badanych inhibitorów z DNA

Struktury ligandów opracowano w programie Gaussian 03 oraz GaussView 4.1.2. Krystaliczną strukturę DNA pobrano z bazy danych Protein Data Bank (PDB ID: 1BNA) i za pomocą pakietu ADT 1.5.6rc3 przygotowano do dokowania. Symulacje dokowania ligandów przeprowadzono w AutoDock 4.2, siatkę obliczeniową skonfigurowano tak, by obejmowała całą strukturę DNA z odstępem wynoszącym 0,375 Å. Najlepsze pozycje ligandów wybrano w celu przygotowania reprezentatywnych kompleksów, które wizualizowano w GaussView 4.1.2.

17. Przygotowanie komórek HMEC-1 PAD4 KD

Poza omówionymi wyżej doświadczeniami wykorzystującymi inhibitory PADs, w niniejszej pracy przygotowano i wykorzystano także komórki HMEC-1 z wyciszoną ekspresją *PAD4*. W tym celu wykorzystano indukowalny system - TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA (Horizon Discovery, Perkin Elmer, UK). Który oparty jest na użyciu shRNA dostarczanego do komórek docelowych poprzez transdukcję

częstkami lentiwirusowymi. Wektory zaprojektowane są w sposób, który umożliwia ekspresję shRNA a tym samym wyciszenie ekspresji wyłącznie w obecności doksycykliny (DOX). Wyciszenie *PAD4* prowadzono z wykorzystaniem plazmidu pTRIPZ: klon V2THS_48865 (#RHS4696-200683408, Horizon Discovery, Perkin Elmer, UK). Jako kontrolę użyto wektor pTRIPZ non-Target (NT, non-silencing shRNA, #RHS4743, Horizon Discovery, Perkin Elmer, UK). Mapę wektora pTRIPZ i sekwencje wykorzystanych shRNA przedstawiono na Rysunku IV.3. Komórki HMEC-1 PAD4 KD przygotowano zgodnie ze wskazówkami producenta systemu TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA.



Gen docelowy	Sekwencja
NT	GGAAAGAATCAAGGAGG
<i>PAD4</i>	TATTGCAGCTTCTTAGAGC

Rysunek IV.4. A. Mapa wektora pTRIPZ (Horizon Discovery, Perkin Elmer, UK). B. Sekwencje shRNA zawarte w dostarczonych przez producenta plazmidach pTRIPZ (Horizon Discovery, Perkin Elmer, UK).

17.1. Przygotowanie DNA plazmidowego do transformacji

17.1.1. Hodowla *Escherichia coli*

Plazmidy shRNA Horizon namnażane były w bakterii *Escherichia coli*, szczep Top10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Stosowano podstawową pożywkę Luria-Bertani (LB) o niskiej zawartości soli, skład: 10 g Trypton (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 5 g NaCl (ChemPur, Piekary Śląskie, Polska) i 5 g ekstraktu drożdżowego w 1 L ddH₂O. Zgodnie z wytycznymi producenta plazmidów przygotowano pożywki hodowlane:

- ☒ Namnażającą – pożywka LB z dodatkiem 50 µg/ml Zeocyny (InvivoGen, San Diego, USA) i 100 µg/ml karbenicyliny (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy).
- ☒ Izolacyjną – pożywka LB 100 µg/ml karbenicyliny (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy).

Bakterie namnażano w pożywce namnażającej przez 16 godz. w temperaturze 37°C z wytrząsaniem, następnie wykonywano posiew redukcyjny i płytki inkubowano 16 godz. w cieplarni 37°C. Z posiewów redukcyjnych wybierano po 3 kolonie, które wykorzystywano do zaszczepienia w pożywce izolacyjnej w objętości 10 ml. Bakterie namnażano przez 16 godz. w temperaturze 37°C z wytrząsaniem po czym izolowano DNA plazmidowe (DNaP).

17.1.2. Izolacja i analiza DNA plazmidowego

Izolacja DNaP przeprowadzana była z wykorzystaniem kolumnkowego zestawu do lizy alkalicznej firmy Promega (PureYield MidiPrep, Promega, USA), zgodnie z wytycznymi producenta. Uzyskane DNaP analizowano i identyfikowano pod kątem poprawności sekwencji, korzystając ze wskazówek producenta. DNaP trawiono enzymem restrykcyjnym Sall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA): 250 ng DNaP inkubowano z 0,25 µl Sall przez 15 minut w 37°C, reakcję następnie zatrzymywano przez 10 min inkubację w temperaturze 65°C. Przeprowadzano rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym w TAE, wykorzystywano marker mas: Gen'O Ruler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Rozdział prowadzono przez 1 godzinę przy napięciu 100 V, po czym wyniki wizualizowano z wykorzystaniem systemu Azure 300 (Azure Biosystems, USA). Uzyskane wyniki porównywano ze stężeniem i jakością badanych prób i na tej podstawie wybierano próby, które wykorzystano w transfekcji komórek 293FT i produkcji cząstek lentiwirusowych.

17.2. Produkcja cząstek lentiwirusowych w komórkach 293FT

Produkcję cząstek lentiwirusowych prowadzono z wykorzystaniem komórek 293FT i zestawu firmy Takara: Lenti-X™ Packaging Single Shots (Takara, Japonia). Podczas wykonywania czynności związanych z produkcją i wykorzystaniem Lentiwirusów stosowano się ściśle do przepisów związanych z zachowaniem bezpieczeństwa i higieny pracy określonych przez *Recombinant DNA Advisory Committee*. Pożywka hodowlana DMEM 293FT filtrowana była przez filtry o porach 0,45 µm.

Protokół produkcji cząsteczek lentiwirusowych Lenti-NonTarget (L-NT) i Lenti-PAD4 (L-PAD4):

1. Komórki 293FT wysiano na szalki o średnicy 10 cm w gęstości 5 mln/szalka w 8 ml pełnej pożywki DMEM 293FT. Komórki hodowano w standardowych warunkach przez 24 godz.
2. W sterylnej probówce rozcieńczano DNaP (NT lub PAD4) do ilości 7 µg w 600 µl ddH₂O.
3. DNaP dodawano do probówki zawierającej Lenti-X Packaging Mix. Mieszaninę worteksowano przez 20 sekund po czym inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min.
4. Po inkubacji dodawano całość mieszaniny transfekcyjnej zawierającej DNaP i Lenti-X Packaging Mix do komórek 293FT.
5. Komórki 293FT inkubowano z mieszaniną transfekcyjną w warunkach hodowli przez 4 godziny, po tym czasie do szalek dodano 6 ml świeżej porcji pożywki hodowlanej. Po 24 godzinach od

transfekcji komórki obserwowano pod mikroskopem świetlnym oraz fluorescencyjnym w celu oceny żywotności komórek i wydajności transformacji.

6. Hodowlę komórek kontynuowano w standardowych warunkach przez 96 godz. W czasach 48 i 96 godzin od transfekcji zbierano supernatant z nad komórek i szalki zalewano świeżą porcją pożywki. Zebrane supernatanty zawierające cząstki lentiwirusowe krótko odwirowywano i filtrowano z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych o porach 0,25 μm . Przygotowane supernatanty lentiwirusowe: L-NT i L-PAD4 przechowywano w wyraźnie oznaczonym pojemniku w temperaturze -80°C do momentu ich wykorzystania.

17.3. Transdukcja komórek HMEC-1

Komórki HMEC-1 transdukowane były wytworzonymi cząstkami lentiwirusowymi. Wykorzystano komórki HMEC-1 charakteryzujące się prawidłową morfologią oraz progresją cyklu komórkowego. Transdukcję prowadzono z wykorzystaniem czynnika zwiększającego jej wydajność – bromku heksadymetryny (Polybrene, Merck, Niemcy). Po przeprowadzeniu transdukcji, komórki selekcjonowane były z wykorzystaniem 1 $\mu\text{g/ml}$ puromycyny (Gibco, USA) przez 10 dni w standardowych warunkach hodowli.

Protokół transdukcji HMEC-1 cząstkami lentiwirusowymi:

1. Komórki HMEC-1 wysiewano na płytki 6-dołkowe w gęstości 300 000 komórek na dołek w końcowej objętości 2 ml filtrowanej (0,45 μm) pożywki hodowlanej i inkubowane w warunkach hodowli przez 12-16 godzin.
2. Zmieniano pożywkę hodowlaną na świeżą nie zawierającą FBS i do komórek HMEC-1 dodawano Polybrene do końcowego stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$. Komórki inkubowano w warunkach hodowli przez 30 minut.
3. Po inkubacji z Polybrene do komórek dodawano różną objętości supernatantu lentiwirusowego: 100, 200 lub 500 μl bezpośrednio do pożywki hodowlanej. Komórki inkubowano z cząstkami lentiwirusowymi przez 1 godzinę w warunkach hodowli.
4. Dołki płytki uzupełniano pełną świeżą pożywką MCDB131 i kontynuowano inkubację komórek przez 6 lub 12 godz.
5. Po upływie czasu inkubacji z nad komórek zbierano pożywkę zawierającą cząstki lentiwirusowe i dołki płytki uzupełniano świeżą porcją pełnej pożywki MCDB131. Kontynuowano hodowlę w standardowych warunkach przez 48 godz. w międzyczasie obserwując komórki pod mikroskopem świetlnym.
6. Po 48 godzinach hodowli z nad komórek zebrano starą pożywkę hodowlaną i dodano medium hodowlane zawierające 1 $\mu\text{g/ml}$ puromycyny. Hodowlę kontynuowano przez 10 dni, zmieniając pożywkę selekcyjną co drugi dzień, aż do momentu, gdy wszystkie komórki w dołkach kontrolnych były martwe, a w dołkach badanych pozostały jedynie komórki ekspresujące shRNA. Po tym czasie komórki potraktowano DOX i obserwowano czerwoną fluorescencję komórek. Wyprowadzono

stabilne linie komórkowe HMEC-1 PAD4 KD, które analizowano pod kątem stopnia wyciszenia badanego genu *PAD4*.

17.4. Weryfikacja wyciszenia *PAD4*

Weryfikację wyciszenia *PAD4* w wybranych klonach HMEC-1 prowadzono na poziomie transkrypcyjnym i białka odpowiednio z wykorzystaniem opisanych wyżej technik qPCR oraz Western blotting. Kontrolę w analizach stanowiły komórki HMEC-1 NT. Najlepszy stopień wyciszenia uzyskano w przypadku linii HMEC-1 PAD4 KD 6.1, która w pracy określana jest skrótem PAD4 KD.

17.5. Analizy komórek HMEC-1 PAD4 KD

Wszystkie analizy wykonywane z wykorzystaniem przygotowanych komórek HMEC-1 PAD4 KD prowadzono analogicznie do opisanych już wyżej metod. Poziomy białek oceniano przy użyciu techniki Western blottingu ([Metody 4.](#)), ekspresję mRNA z wykorzystaniem qPCR ([Metody 6.](#)). Wykonano także test tworzenia struktur pseudokapilarnych ([Metody 8.](#)).

18. Analiza statystyczna wyników

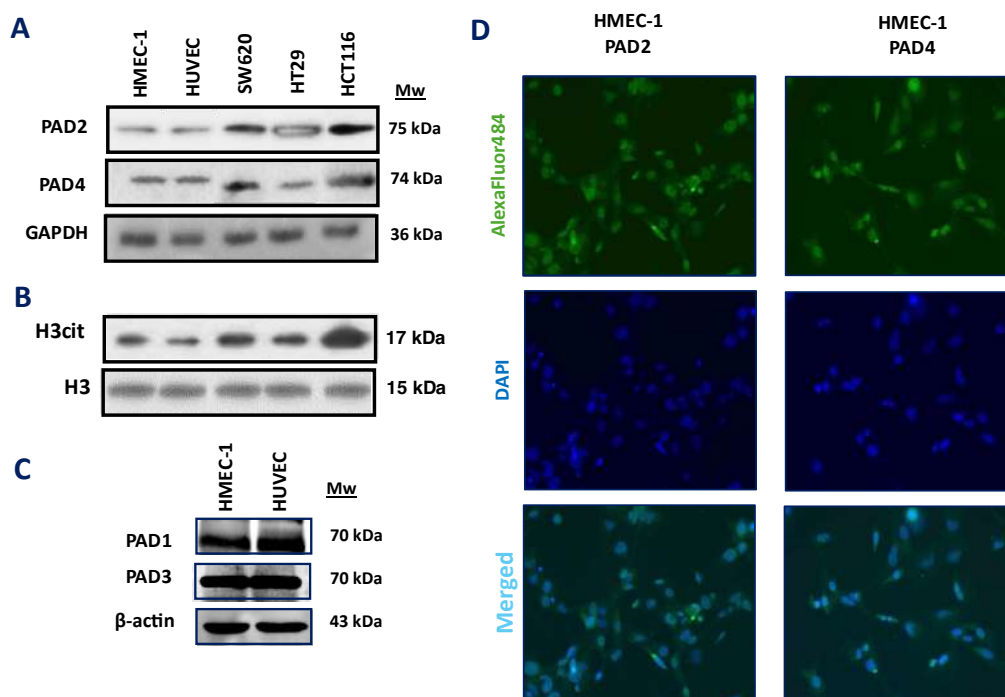
Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad Prism (v. 9.0, GraphPad, San Diego, Kalifornia, USA). Różnice między grupami oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA i analizy post hoc za pomocą testu Dunnetta, lub przy wykorzystaniu testu t-Studenta. Istotność wyników prezentowana jest na wykresach oznaczeniami: ***<0,0001, **<0,001, *<0,05.

V. Wyniki

1. Wpływ inhibitorów PADs na wybrane funkcje komórek śródbłónka – potencjał angiogeny

1.1. Weryfikacja ekspresji PAD i poziomów H3cit w komórkach śródbłónka

W komórkach HMEC-1 i HUVEC z wykorzystaniem techniki Western blotting, porównano poziomy dwóch izoform: PAD2 i PAD4, które zdolne są do przeprowadzania cytrulinacji histonów (*Rysunek V.1A*). Poziomy te porównywano z wybranymi liniami nowotworowymi (*Rysunek V.1A*). Tą samą techniką analizowano także obecność cytrulinacji histonów w wybranych modelach (*Rysunek V.1B*). Zarówno w przypadku wybranych izoform PADs jak i H3cit najintensywniejsze sygnały chemiluminescencji zarejestrowano dla linii HCT116 i SW620, w obu typach ECs poziomy były porównywalne (*Rysunek V.1A i V.1B*). W ECs potwierdzono także obecność pozostałych funkcjonalnych izoform PADs (*Rysunek V.1C*). Z wykorzystaniem barwienia immunofluorescencyjnego analizowano następnie lokalizację izoform PAD2 i PAD4 w komórkach HMEC-1. Zdjęcia zaprezentowane na *Rysunku V.1C* wskazują na lokalizację obu izoform zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym, co potwierdza, że cytrulinacja histonów w ECs prowadzona może być zarówno przez PAD2 i PAD4.

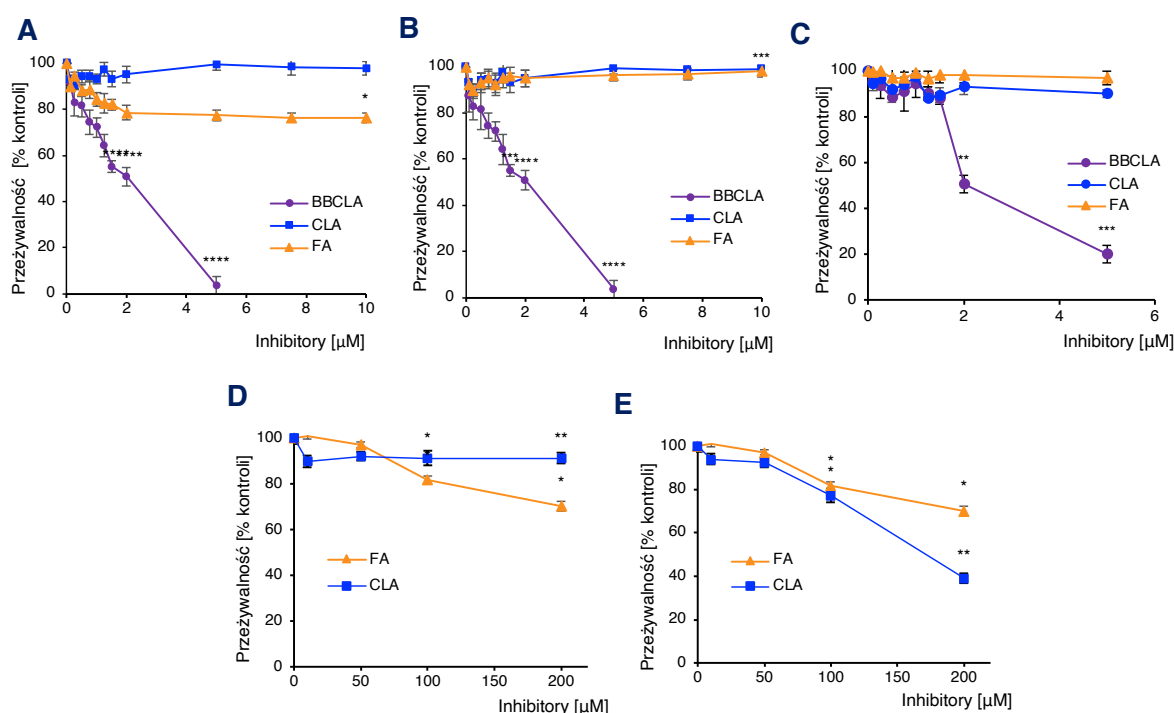


Rysunek V.1. Weryfikacja obecności izoform PADs w wybranych modelach komórkowych **A:** Poziom PAD2 i PAD4 w wybranych modelach ECs i liniach nowotworowych; reprezentatywny WB; $n = 3$; **B:** Poziom H3cit w wybranych modelach ECs i liniach nowotworowych; reprezentatywny WB; $n = 3$; **C:** Weryfikacja obecności pozostałych izoform PADs w HMEC-1 i HUVEC; **D:** Immunofluorescencyjna analiza lokalizacji PAD2 i PAD4 w komórkach HMEC-1. Jądra komórkowe wybarwiono 10 μ M DAPI. Powiększenie 10x; reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe; $n = 4$.

1.2. Analizy cytotoksyczności inhibitorów PAD i ocena potencjału inhibitorowego

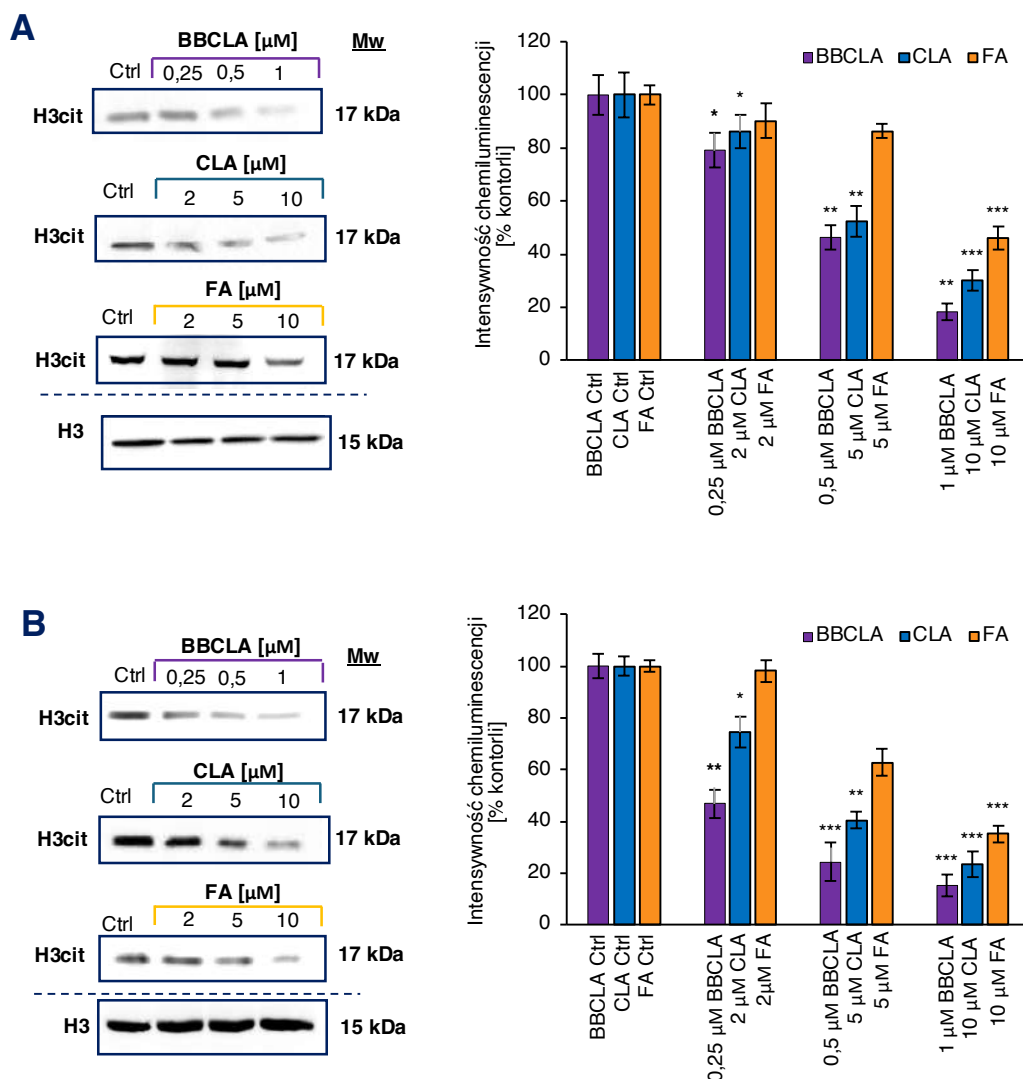
Po potwierdzeniu obecności PAD2, PAD4 oraz H3cit w obu badanych typach ECs, z wykorzystaniem testu redukcji resazuryny zbadano cytotoksyczność wybranych inhibitorów PADs. Charakterystykę stosowanych inhibitorów przedstawiono w Tabeli III.1 (*III. Materiały*). Komórki HMEC-1 i HUVEC traktowane były stężeniami inhibitorów w zakresie: BBCLA 0,25-5 μ M, CLA 0,25-10 μ M lub FA 0,25-10 μ M przez 24 godziny. Analizy wykazały, że w badanych zakresach stężeń wyłącznie BBCLA

ma działanie cytotoksyczne, IC_{50} dla HMEC-1: $1,75 \mu M \pm 0,13 \mu M$, dla HUVEC: $1,97 \mu M \pm 0,08 \mu M$ (*Rysunek V.2A i V.2B*). CLA i FA nie powodowały istotnych spadków przeżywalności ECs. W celu dalszej analizy cytotoksyczności badanych związków dla ECs wykorzystano kolejny typ komórek śródbłonna – aortalną linię HAEC, gdzie uzyskano podobne wyniki; IC_{50} BBCLA wyniosło $1,99 \mu M \pm 0,16 \mu M$ i brak cytotoksyczności CLA i FA w badanych zakresach stężeń (*Rysunek V.2.C*). Tak duże rozbieżności pomiędzy BBCLA a pozostałymi inhibitorami sprawiły, że zdecydowano się sprawdzić efekty wywoływane przez wyższe stężenia CLA i FA. Komórki HMEC-1 (*Rysunek V.2.D*) i HUVEC (*Rysunek V.2.E*) traktowano zatem wyższymi stężeniami CLA i FA ($25-200 \mu M$) przez 24 godz. W HMEC-1 IC_{50} badanych związków ponownie znajduje się powyżej zastosowanych eksperymentalnie stężeń, natomiast w HUVEC wyznaczone IC_{50} dla CLA to $175,67 \mu M \pm 2,54 \mu M$.



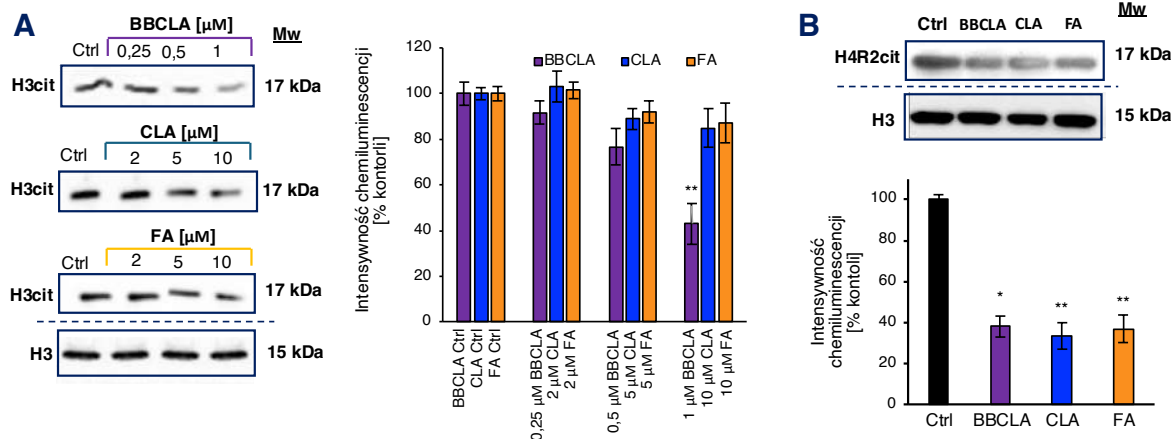
Rysunek V.2. Cytotoksyczność badanych inhibitorów. Przeżywalność ECs traktowanych inhibitorami PADs przez 24 godz.: **A:** HMEC-1, **B:** HUVEC, **C:** HAEC. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 5$. Przeżywalność ECs traktowanych wyższymi stężeniami CLA lub FA przez 24 godz.: **D:** HMEC-1, **E:** HUVEC. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta, istotność statystyczną zaprezentowano jako: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola.

Na podstawie powyższych analiz wybrano nietoksyczne stężenia inhibitorów PADs, które badano pod względem ich potencjału do hamowania przeprowadzania procesu cytrulinacji H3 w ECs. Wykorzystano zatem stężenia 0,25, 0,5 i 1 μM BBCLA lub 2, 5 i 10 μM zarówno CLA i FA. Z wykorzystaniem WB analizowano poziom ogólnej cytrulinacji H3 po 16 godz. inkubacji ECs z inhibitorami (*Rysunek V.3A i V.3B*). BBCLA najsilniej hamował wprowadzanie H3cit w obu modelach ECs, zmniejszając poziom tej sygnatury ponad 4-krotnie przy najwyższym zastosowanym stężeniu (*Rysunek V.3A i V.3B*). Efekty CLA i FA były do siebie zbliżone, oba związki obniżyły poziom H3cit niemal 3-krotnie przy najwyższym stężeniu w obu typach ECs (*Rysunek V.3A i V.3B*).



Rysunek V.3. Weryfikacja potencjału inhibitorowego badanych związków. A i B: Poziom H3cit w ECs traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz. Jako białko referencyjne wykorzystano H3. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, a wykresy przedstawiają analizę densytometryczną sygnału. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; istotność statystyczną zaprezentowano jako: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola.

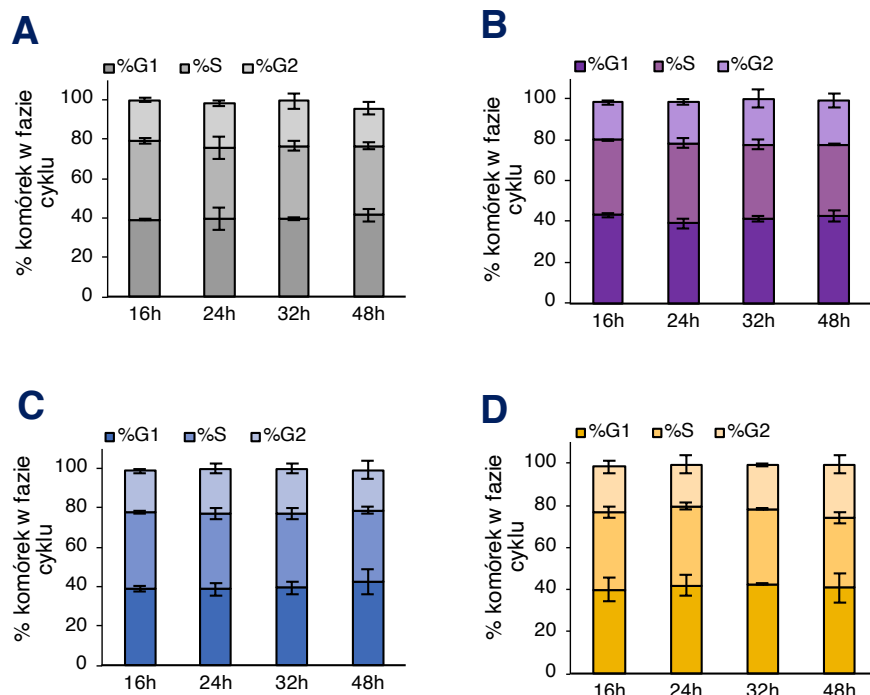
Poza 16 godz. czasem inkubacji, powszechnie stosowanym w podobnego typu badaniach, analizowano również efekty 5-godzinnej, inkubacji ECs z inhibitorami. Jednak w tym przypadku istotny spadek H3cit zaobserwowano wyłącznie w przypadku 1 μM BBCLA (Rysunek V.4A). Dodatkowo, oznaczono również wpływ badanych inhibitorów PADs na poziom innej modyfikacji potranslacyjnej wprowadzanej przez PAD2/PAD4, a mianowicie H4R2cit. Komórki HMEC-1 inkubowano przez 16 godz. z inhibitorami, a wyniki wskazują, że każdy z badanych związków na podobnym poziomie istotnie obniża poziom tej modyfikacji do ok. 40% kontroli (Rysunek V.4B). Podsumowując, stwierdzono, że wyłącznie BBCLA wykazuje działanie cytotoksyczne względem ECs i na podstawie uzyskanych wyników wybrano optymalny czas inkubacji – 16 godz. oraz stężenia inhibitorów PADs, które efektywnie hamują cytrulinację H3: 1 μM BBCLA, 10 μM CLA i FA.



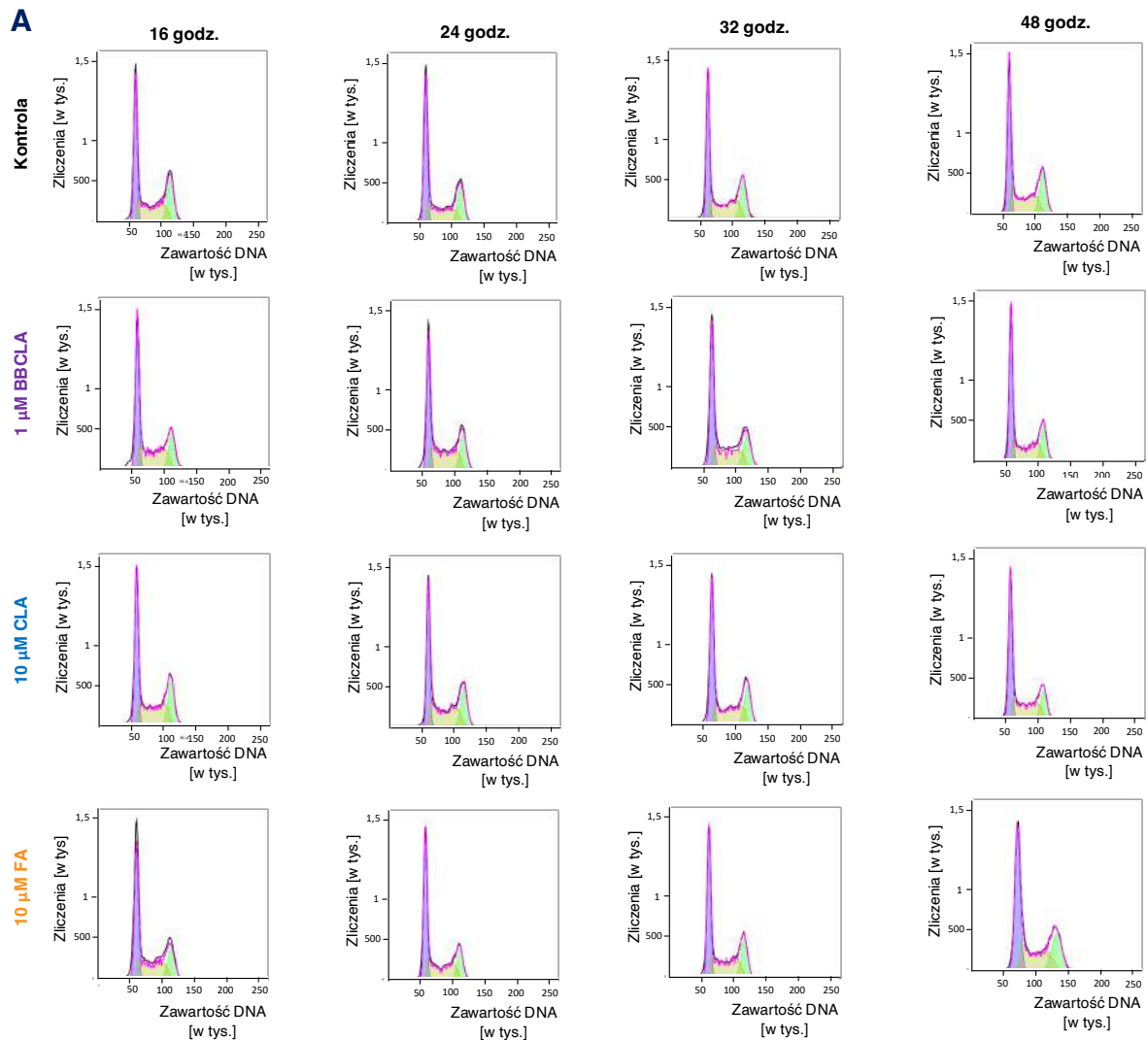
Rysunek V.4. Weryfikacja potencjału inhibitorowego badanych związków; **A:** Poziom H3cit w HMEC-1 inkubowanych z inhibitorami PADs przez 5 godz.; **B:** Poziom H4R2 w HMEC-1 inkubowanych z inhibitorami PADs przez 16 godz. W powyższych analizach jako białko referencyjne wykorzystano H3. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, a wykresy przedstawiają analizę densytometryczną sygnału. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$, Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; istotność statystyczną zaprezentowano jako: $p^{**} < 0,001$, $p^{*} < 0,05$ vs. kontrola.

1.3. Analizy wpływu inhibitorów PAD na cykl komórkowy i proliferację ECs

W kolejnym etapie badano wpływ zahamowania aktywności PADs w ECs na progresję cyklu komórkowego. W tym celu komórki HMEC-1 traktowano wybranymi powyżej stężeniami inhibitorów z zastosowaniem kilku czasów inkubacji: 16, 24, 32 i 48 godz. Przy użyciu techniki cytometrii przepływowej analizowano odsetek komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (**Rysunek V.5**). Na **Rysunku V.6** przedstawiono reprezentatywne histogramy z analizy przeprowadzonej w programie FlowJo. Nie stwierdzono istotnych zmian pomiędzy komórkami kontrolnymi, a komórkami poddanymi działaniu inhibitorów.

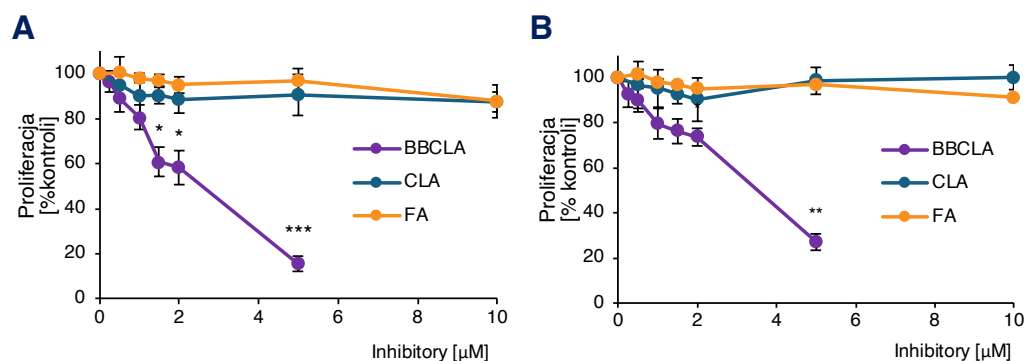


Rysunek V.5. Wpływ inhibitorów PAD na progresję cyklu komórkowego HMEC-1. Wykresy przedstawiają procent komórek HMEC-1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Komórki inkubowano przez podany czas odpowiednio z **B:** 1 μM BBCLA, **C:** 10 μM CLA lub **D:** 10 μM FA, wyniki porównywano do komórek kontrolnych: **A**. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD ($n = 3$). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta $p^{*} < 0,05$ vs. kontrola.



Rysunek V.6. Cytometryczna analiza cyklu komórkowego. A: Progresja cyklu komórkowego HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16, 24, 32 lub 48 godz. Przedstawiono reprezentatywny histogram dla każdego punktu czasowego. DNA barwiono roztworem jodku propidyny ($n = 3$). Histogramy przygotowano w oparciu o zliczenia komórek.

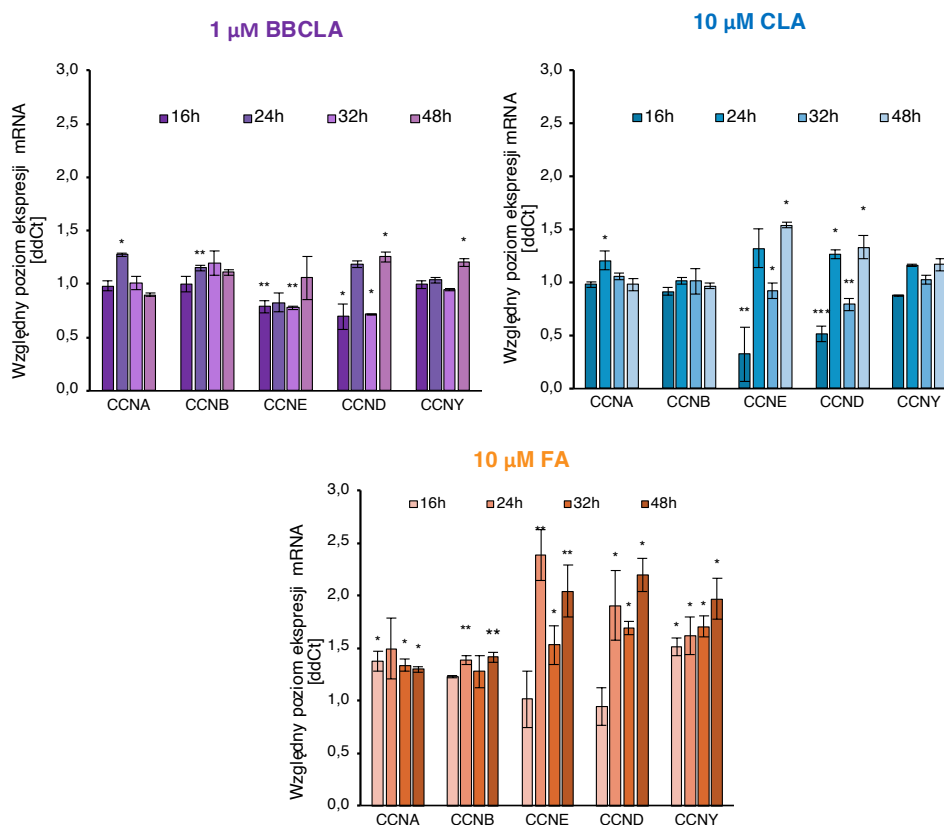
W celu dalszej weryfikacji przeprowadzono test proliferacji z wykorzystaniem metody redukcji resazuryny. Komórki HMEC-1 inkubowano z inhibitorami przez 48 godz. w zakresach stężeń analogicznych jak przy inkubacji 24 godz. Istotny statystycznie ($p^* < 0,05$), cytotoksyczny wpływ na proliferację komórek śródbłonna zaobserwowano jedynie przy wyższych stężeniach BBCLA ($> 1 \mu\text{M}$), których nie stosowano w kolejnych analizach (*Rysunek V.7A i V.7B*). CLA i FA nie wywierały żadnego efektu w badanym zakresie stężeń.



Rysunek V.7. Proliferacja ECs traktowanych inhibitorami PAD. Proliferacja HMEC-1 (**A**) lub HUVEC (**B**) traktowanych inhibitorami PADs przez 48 godz. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD ($n=3$). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA,

test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{***}<0,0001$, $p^{**}<0,001$, $p^{*}<0,05$ vs. kontrola.

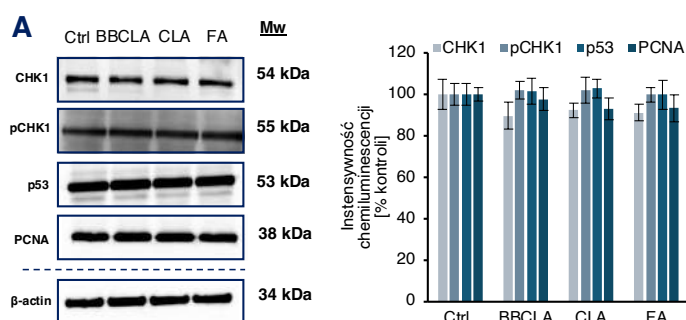
Równolegle z prowadzonymi analizami cytometrycznymi sprawdzano jak zahamowanie aktywności PADs wpływa na profil ekspresji wybranych cyklin zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Potraktowanie komórek HMEC-1 inhibitorami: BBCLA: 0,25, 0,5 i 1 μ M oraz CLA/FA: 2, 5 i 10 μ M, znacznie modyfikowało profil ekspresyjny (CCNA, CCNB, CCNE, CCND, CCNY), w sposób zależny od danego czasu inkubacji (Rysunek V.8). Stwierdzono, że BBCLA i CLA znacząco ($p^{*}<0,05$ lub $p^{**}<0,001$) zmniejszają ekspresję genów dla cykliny E (CCNE) i cykliny D (CCND) w HMEC-1 po 16 godz. inkubacji (Rysunek V.8). Dodatkowo, zarówno BBCLA i CLA istotnie zwiększyły ekspresję cykliny A (CCNA) po 24 godz. inkubacji ($p^{*}<0,05$), ale najwięcej efektów na ekspresję cyklin wywarła inkubacja z FA (Rysunek V.8). W każdym punkcie czasowym inkubacja z FA istotnie zwiększyła ekspresję CCNY ($p^{*}<0,05$) (Rysunek V.8). Jednak przedstawiona analiza cytometryczna wskazuje, że stwierdzone, istotne statystycznie zmiany w ekspresji wybranych cyklin nie są wystarczające do modyfikacji cyklu komórkowego.



Rysunek V.8. Profil ekspresji cyklin w ECs traktowanych inhibitorami PAD. Względny poziom ekspresji mRNA dla wybranych cyklin w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16, 24, 32 i 48 godz. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{**}<0,001$, $p^{*}<0,05$ vs. kontrola.

Analizowano również poziomy wybranych białek związanych z progresją cyklu komórkowego: kinazy ChK1, jej aktywnej formy fosforylowanej pChK1, p53 oraz PCNA. Żaden z inhibitorów nie wywołał istotnych efektów na poziom badanych białek w HMEC-1 (Rysunek V.9). Stwierdzono zatem, że zahamowanie PADs działaniem wybranych stężeń stosowanych inhibitorów nie wywiera istotnego

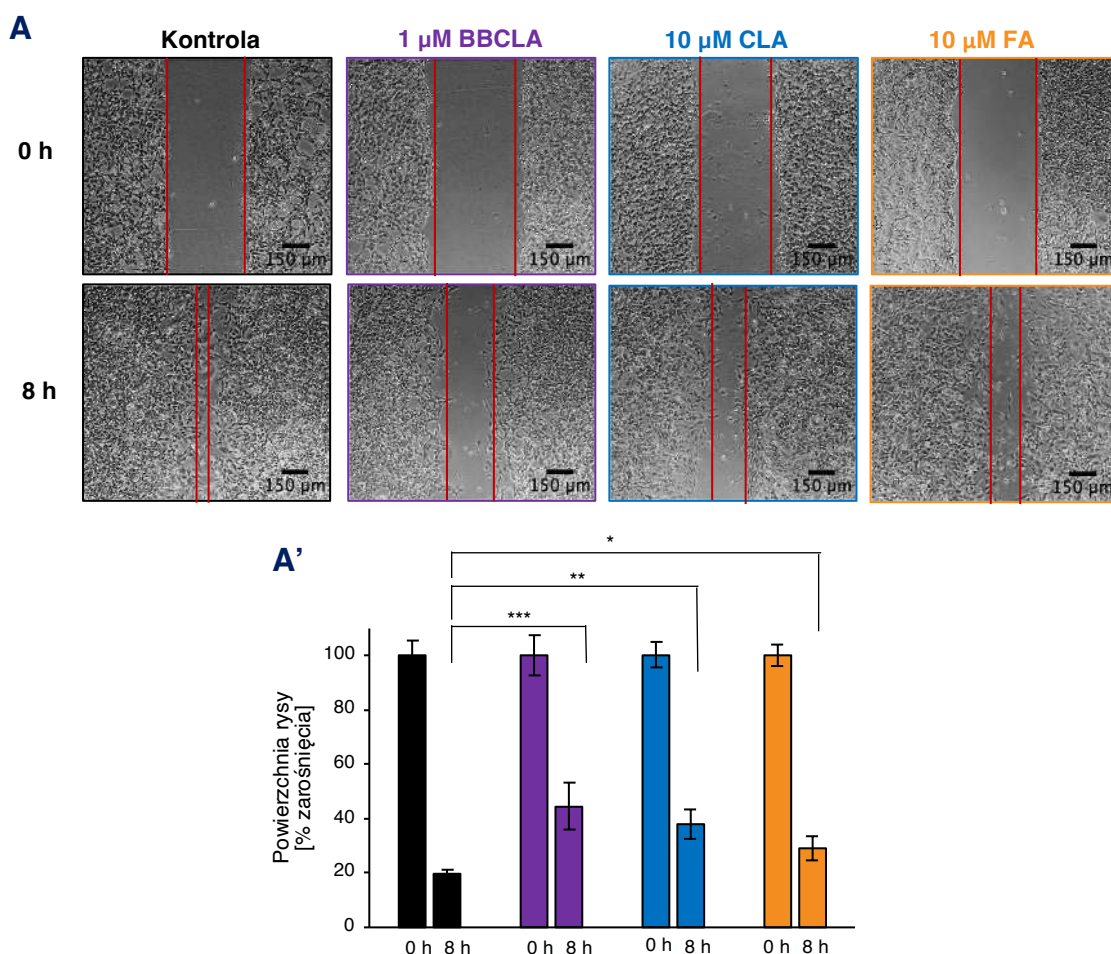
efektu zarówno na proliferację, jak i progresję cyklu komórkowego HMEC-1, mimo istotnych zmian w profilu ekspresyjnym cyklin.



Rysunek V.9. Poziom białek związanych z cyklem komórkowym HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD. HMEC-1 traktowano inhibitorami PADs przez 16 godz. Jako białko referencyjne wykorzystano β-aktynę. Przedstawione WB są reprezentatywne, a wykres przedstawia analizę densytometryczną chemiluminescencji. Dane przedstawiono jako średnia ± SD (n = 3). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta *p<0,05 vs. kontrola.

1.4. Analiza potencjału angiennego ECs poddanych działaniu inhibitorów PADs

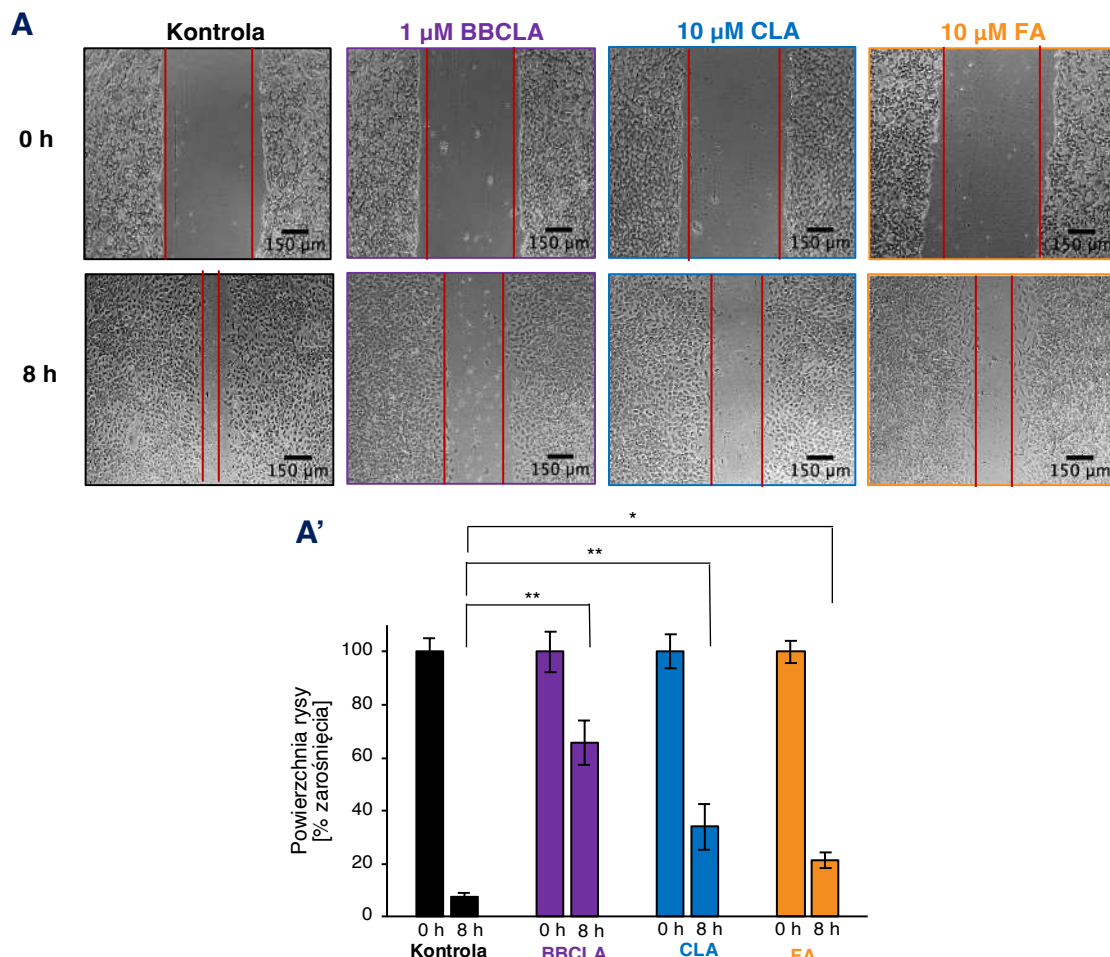
W kolejnych etapach badań analizowano parametry istotne w angiogenezie, m.in. migrację komórek, tworzenie struktur pseudokapilarnych oraz profil wydzielniczo – transkrypcyjny ECs. Na początku, analizowano zdolności migracyjne ECs, kluczowe w procesie angiogenezy *in vivo*. W tym celu HMEC-1 (*Rysunek V.10*) i HUVEC (*Rysunek V.11*) traktowano inhibitorami PADs przez 16 godz., a następnie zdolności migracyjne oceniano w oparciu o test zarastania rysy.



Rysunek V.10. Analiza zdolności migracyjnych HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD. Komórki HMEC-1 preinkubowano z inhibitorami przez 16 godz. **A** Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe HMEC-1 wykonane w czasie 0 i 8 godzin po wykonaniu rysy. **A'**: Analiza obszaru zarastania rys przeprowadzona przy użyciu nakładki Wound healing w programie ImageJ. Dane

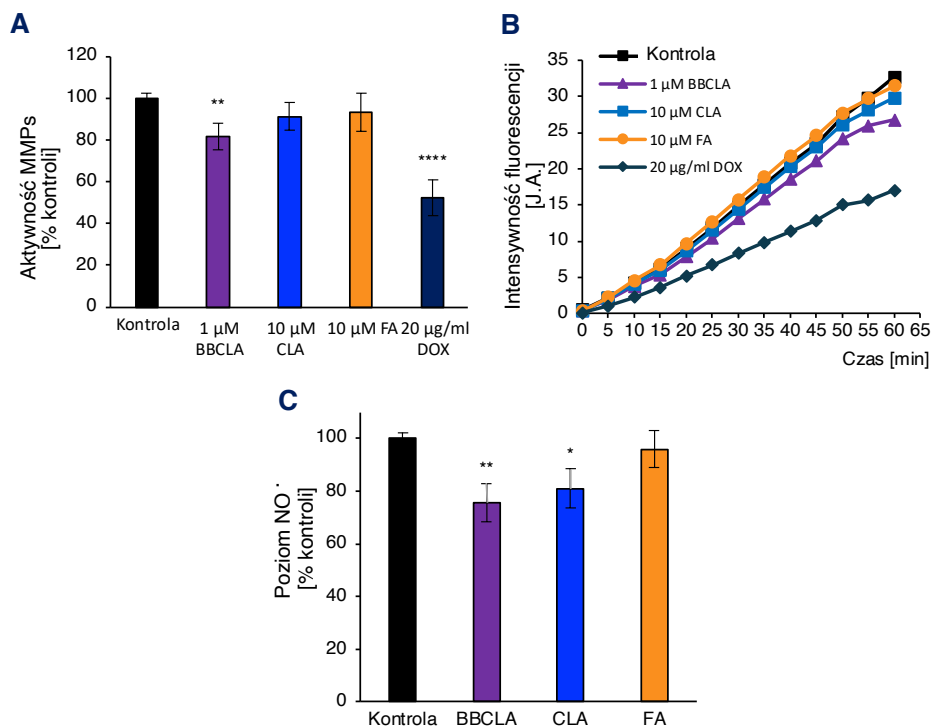
przedstawiono jako średnia $\pm$ SD ($n = 3$). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola.

Zahamowanie aktywności PADs znacznie zmniejszyło migrację obu typów ECs w porównaniu do kontroli. Ponownie najsilniejsze efekty zaobserwowano w przypadku BBCLA, gdzie powierzchnia zarośnięcia rasy była o około 50% mniejsza w odniesieniu do komórek kontrolnych (*Rysunek V10 i V.11*).



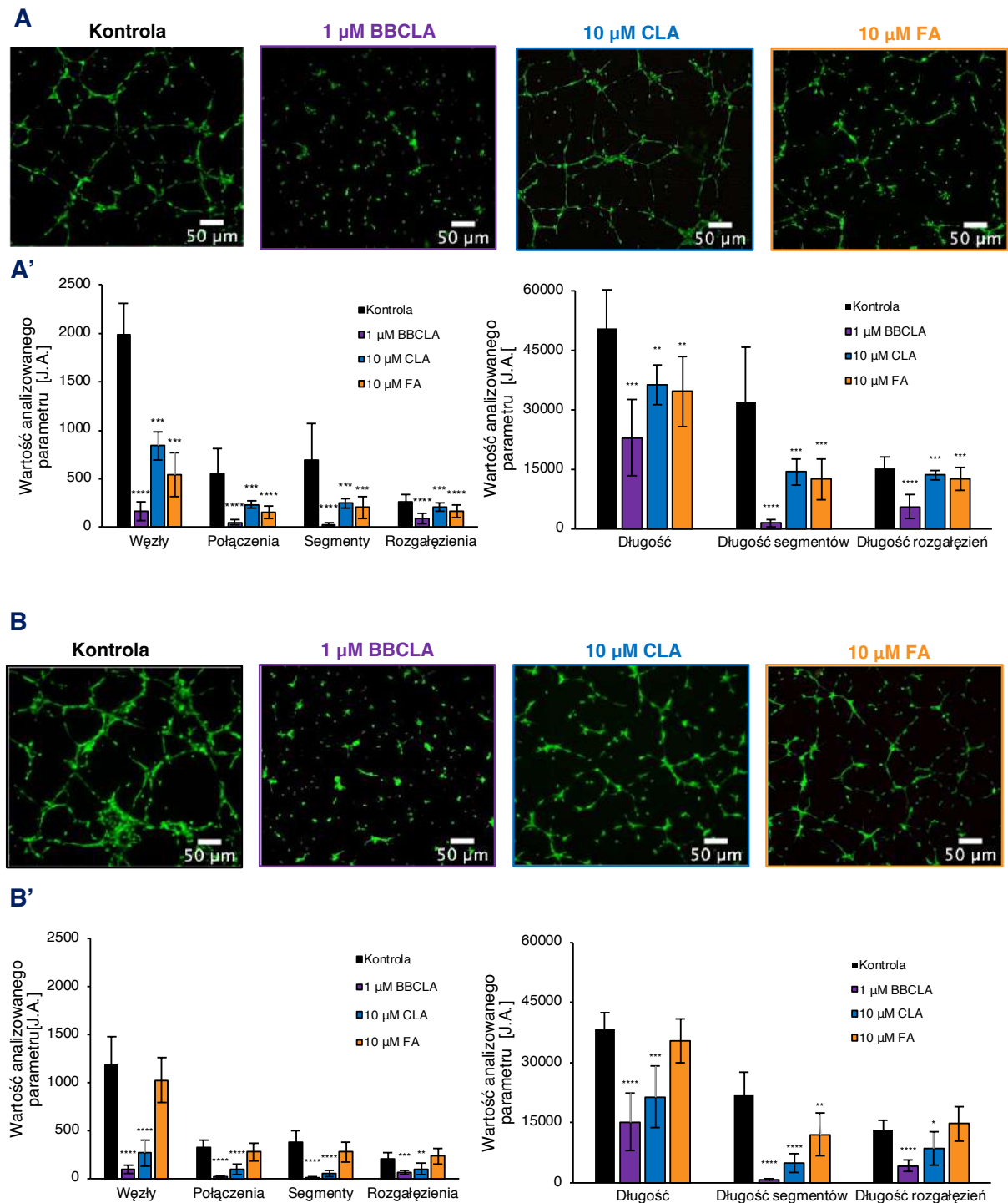
Rysunek V.11. Analiza zdolności migracyjnych HUVEC traktowanych inhibitorami PAD. Komórki HUVEC pre-inkubowano z inhibitorami przez 16 godz. **A** Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe HUVEC wykonane w czasie 0 i 8 godzin po wykonaniu rasy. **A'**: Analiza obszaru zarostania rasy przeprowadzona przy użyciu nakładki Wound Healing w programie ImageJ. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD ($n = 3$). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola.

W celu wyjaśnienia obserwowanych efektów zbadano całkowitą aktywność metaloproteinaz (MMPs) oraz produkcję NO^* . Uzyskane wyniki pokazały, że całkowita aktywność MMPs jest istotnie statystycznie obniżona jedynie w komórkach poddanych działaniu BBCLA (* $p < 0,001$), w przypadku pozostałych związków (CLA i FA) nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian (*Rysunek V.12A i V.12B*). Natomiast analiza poziomu NO^* , wykonana przy użyciu sondy DAF-FM DA pokazała, że zarówno BBCLA i CLA istotnie statystycznie (odpowiednio ** $p < 0,001$ i * $p < 0,05$) obniżyły ilość NO^* (*Rysunek V.12C*).



Rysunek V.12. Analiza aktywności MMPs i poziomu NO* w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD. **A i B:** Całkowita aktywność MMPs w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz, zaprezentowana jako % kontroli (**A**) i w postaci wykresu kinetycznego intensywności fluorescencji w ciągu 60 min (**B**) ($n = 3$). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post hoc Dunnetta. **C:** Analiza produkcji NO* w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz. Dane przedstawione jako średnia $\pm$ SD ($n = 4$). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola.

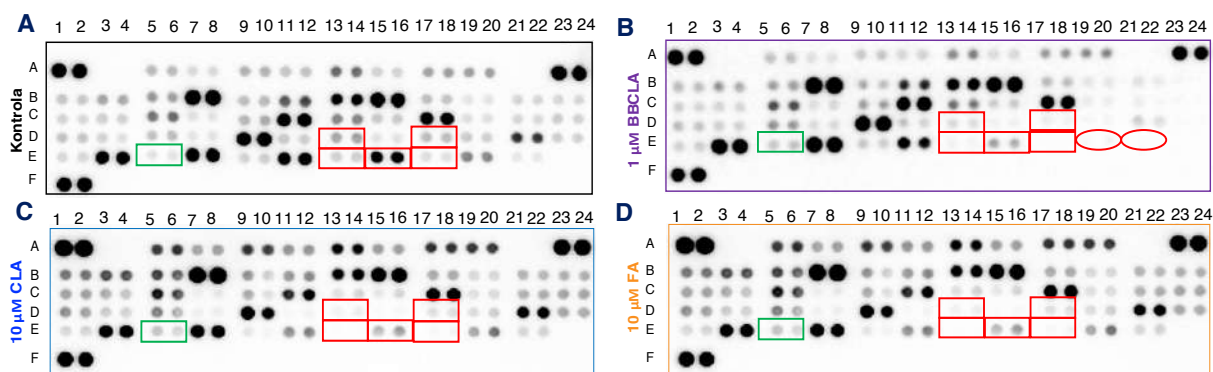
Do oceny wpływu inhibitorów PAD na kolejny istotny etap angiogenezy, mianowicie tworzenia struktur kapilarnych, wykorzystano podłoże Matrigel™. HUVECs i HMEC-1 preinkubowano z inhibitorami PADs przez 16 godz., po czym komórki przenoszono na Matrigel™ i obserwowano wytworzone struktury po kolejnych 6 godz. inkubacji. Sieci utworzonych pseudokapilar barwiono z wykorzystaniem kalceiny-AM w końcowym stężeniu 3 μ M i fotografowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (*Rysunek V.13A i V.13B*). Każdy z zastosowanych inhibitorów istotnie wpłynął na organizację i parametry morfologiczne sieci kapilarnych (*Rysunek V.13*). Ponownie, w obu modelach ECs najsilniejsze efekty zarejestrowano w komórkach traktowanych BBCLA, widoczne jest to zarówno w aspekcie liczby węzłów, połączeń, segmentów, rozgałęzień, jak również długości powstałych struktur. W komórkach HMEC-1 istotne statystycznie efekty stwierdzono dla wszystkich trzech badanych inhibitorów (*Rysunek V.13A i A'*), zaś w przypadku HUVEC, istotne statystycznie zmiany, związane z ograniczeniem tworzenia się sieci pseudonaczyń zaobserwowano w przypadku BBCLA i CLA (*Rysunek V.13B i B'*).



Rysunek V.13. Test formowania struktur pseudokapilarnych przez komórki śródbłonna traktowane inhibitorami PADs przez 16 godz. **A** i **B** Reprezentatywne zdjęcia wytworzonych struktur wybarwionych 3 μM kalceiną AM, powiększenie 4x, $n = 9$. **A** – HMEC-1, **B** – HUVEC. Na wykresach **A'** i **B'** zaprezentowano analizę parametryczną struktur wytworzonych przez HMEC-1 lub HUVEC, odpowiednio. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, $n = 9$. Statystyka: jednoczynnikowa analiza ANOVA, test post-hoc Dunnetta (** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$).

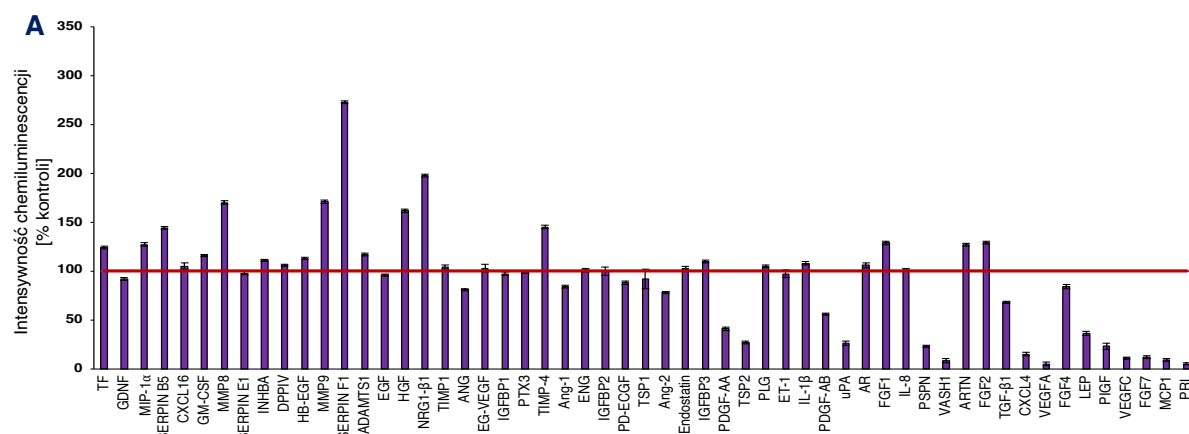
Aby wyjaśnić molekularne podłoże anty-angiogenne działania inhibitorów PADs przeanalizowano profil wydzielniczy HMEC-1 traktowanych badanymi związkami przez 16 godz. W tym celu wykorzystano komercyjny zestaw membran typu dot-blot Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit™, pozwalający na oznaczenie poziomów białek zaangażowanych w regulację procesu angiogenezy, wydzielanych przez komórki do pożywki hodowlanej. Na *Rysunku V.14A, B, C i D* przedstawiono reprezentatywne membrany dot-blot.

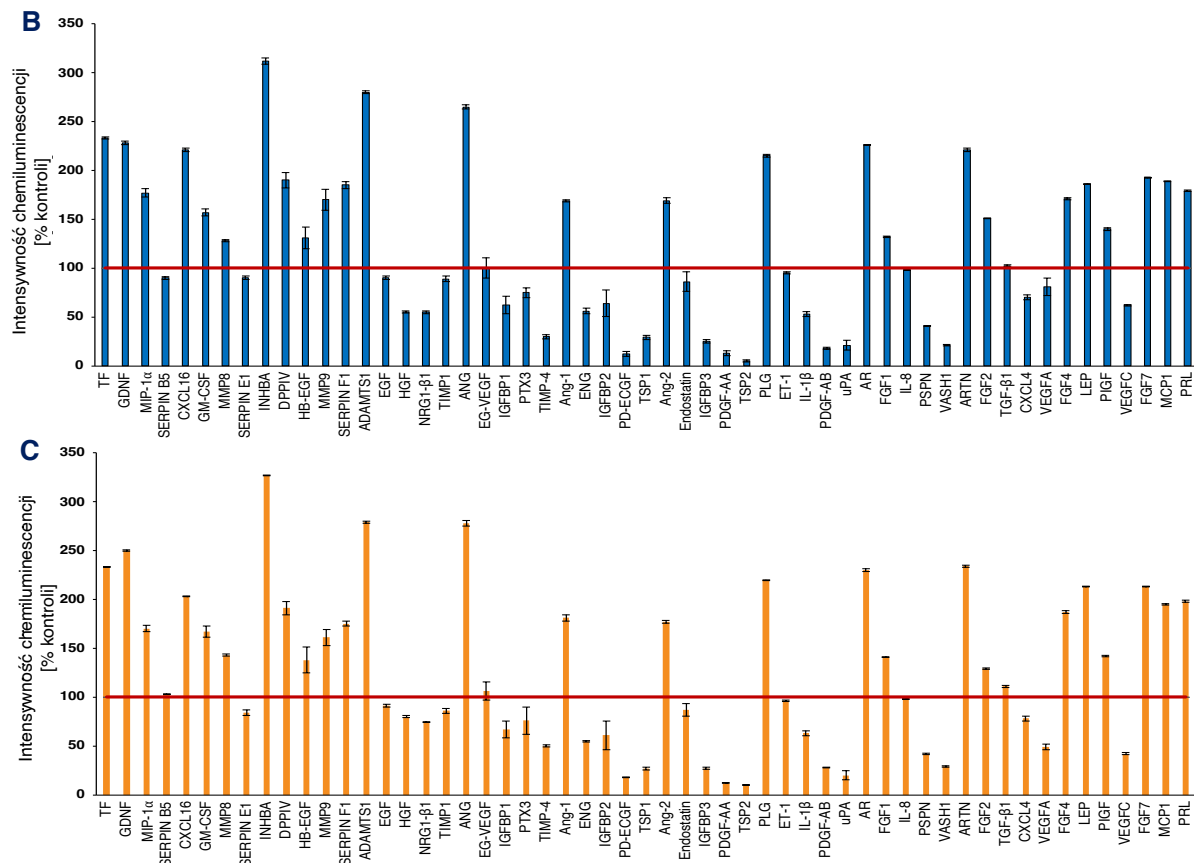
	1, 2	3, 4	5, 6	7, 8	9, 10	11, 12	13, 14	15, 16	17, 18	19, 20	21, 22	23, 24
A	Ctrl(+)	-	ActivinA	ADAMTS	ANG	Ang-1	Ang-2	AST	AR	Artemin	-	Ctrl(+)
B	TF	CXCL16	CD26	EGF	EG-VEGF	CD105	COLXVII	ET-1	FGF-1	FGF-2	FGF-4	FGF-7
C	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IL-1 β	IL-8	TGF- β 1	Leptin	CCL2
D	MIP-1 α	MMP8	MMP9	NRG1 β 1	TSG-14	PD-ECGF	PDGF-AA	PDGF-BB	PSPN	CXCL4	PIGF	Prolactin
E	Maspin	PAI-1	PEDF	TIMP1	TIMP4	TSP-1	TSP-2	uPA	VASH	VEGF	VEGFC	-
F	Ctrl(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ctrl(-)



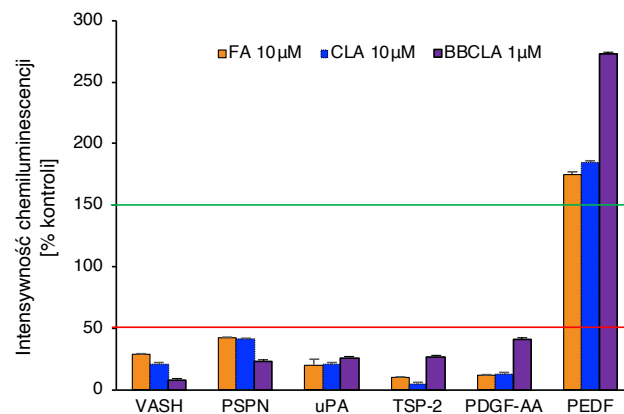
Rysunek V.14 Analiza profilu wydzielniczego HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs. **A B C i D:** reprezentatywne membrany dot-blot z zestawu Proteome Profiler Angiogenesis Array, inkubowane z pożywką hodowlaną zebraną z HMEC-1 odpowiednio kontrola, inkubowanych z BBCLA, CLA i FA. **Czerwonymi** prostokątami zaznaczono białka których wydzielanie obniżyły wszystkie inhibitory, **zielone** prostokąty to białka których wydzielanie było zwiększone.

Wśród najistotniejszych zmian wykryto znaczne zmniejszenie wydzielania VEGFA i VEGFC w komórkach HMEC-1 traktowanych BBCLA (*Rysunek V.15A*), odpowiednio do 5% i 11% kontroli. Zmiany te w komórkach traktowanych CLA i FA były łagodniejsze, w przypadku CLA obniżenie VEGFA względem kontroli do 81% i VEGFC do 49% (*Rysunek V.15B*), dla FA odpowiednio 49% i 42% (*Rysunek V.15C*). Na *Rysunku V.15* przedstawiono także analizę densytometryczną pozostałych czynników, których analizę umożliwił zestaw Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit™. Ogólny profil zmian był zbliżony w przypadku CLA i FA, i odrębny dla BBCLA. Do czynników, na których podobny efekt miały wszystkie trzy zastosowane inhibitory (*Rysunek V.16*) należą: silny inhibitor angiogenezy PEDF, podwyższony o 50% względem kontroli, a także obniżone poniżej 50% kontroli PDGF-AA, TSP-2, uPA, PSPN, VASH.





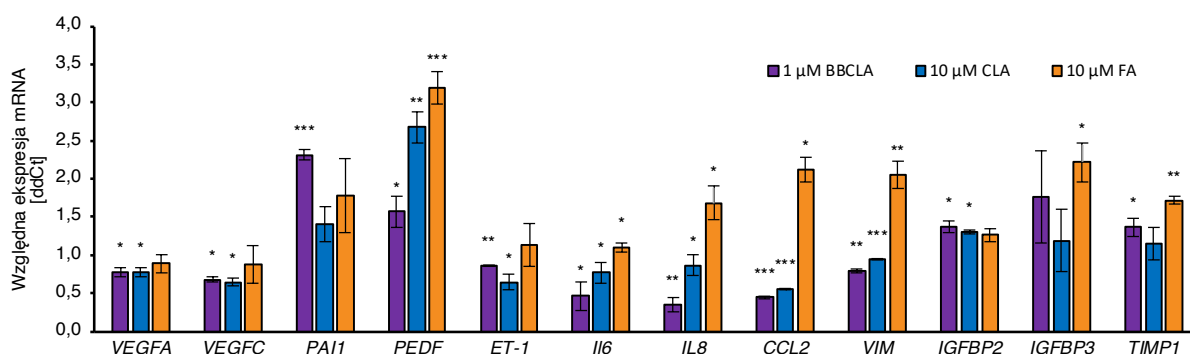
Rysunek V.15. Kwantyfikacja sygnałów chemiluminescencyjnych – zestaw Angiogenesis Array Kit. A, B i C: kwantyfikacja sygnału chemiluminescencyjnego każdego z punktów na membranach, komórki inkubowano odpowiednio z **A** – BBCLA, **B** – CLA, **C** – FA. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, średnia $\pm$ SD, $n = 2$. Wyjaśnienie skrótów na wykresach zawarto w Spisie skrótów.



Rysunek V.16. Kwantyfikacja i zestawienie czynników, których wydzielanie modulują inhibitory PAD. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, średnia $\pm$ SD, $n = 2$.

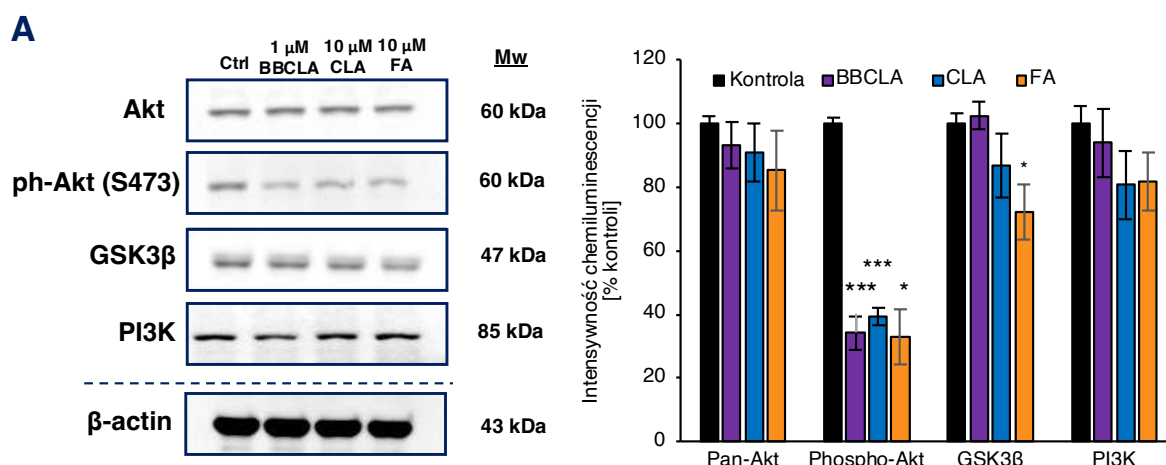
Zarejestrowane zmiany w produkcji wybranych, wyżej wymienionych białek zweryfikowano na poziomie transkrypcyjnym z wykorzystaniem qPCR (**Rysunek V.17**). Stwierdzono, istotnie statystycznie obniżenie ekspresji *VEGFA* i *VEGFC* pod wpływem BBCLA i CLA (* $p < 0,05$), ale nie FA. Wszystkie inhibitory natomiast silnie zwiększyły ekspresję *PEDF*, co koreluje z opisanym wyżej większym poziomem wydzielania tego czynnika. Podobnie zwiększenie ekspresji i wydzielania innego enzymu z rodziny SERPIN – PAI1, zaobserwowano w przypadku komórek traktowanych BBCLA. Ponadto pod wpływem BBCLA i FA zarejestrowano zwiększenie ekspresji *TIMP-1*, będącego inhibitorem metaloproteinaz. Natomiast BBCLA i CLA obniżały istotnie ekspresję *ET-1*. Dodatkowo BBCLA i CLA istotnie zwiększyły ekspresję *IGFBP2*, a inhibitor FA poziom mRNA dla *IGFBP3* (**Rysunek V.17**).

Oznaczono także ekspresję kilku czynników, które poza zaangażowaniem w regulację angiogenezy uczestniczą również w procesach zapalnych. Ekspresja *IL6*, *IL8* i *CCL2* była istotnie obniżona w wyniku inkubacji z BBCLA i CLA (* $p < 0,05$), natomiast odwrotny efekt wywołała inkubacja z FA (* $p < 0,05$). Podobny schemat odpowiedzi na działanie inhibitorów zaobserwowano dla *VIM* (Rysunek V.17).



Rysunek V.17. Ekspresja genów związanych z regulacją angiogenezy lub stanem zapalnym w komórkach HMEC-1. Komórki HMEC-1 inkubowano z inhibitorami PADs przez 16 godz. Wyniki qPCR normalizowano względem ekspresji *HPRT1*, dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post hoc Dunnetta *** $< 0,0001$, ** $< 0,001$, * $< 0,05$ vs. kontrola.

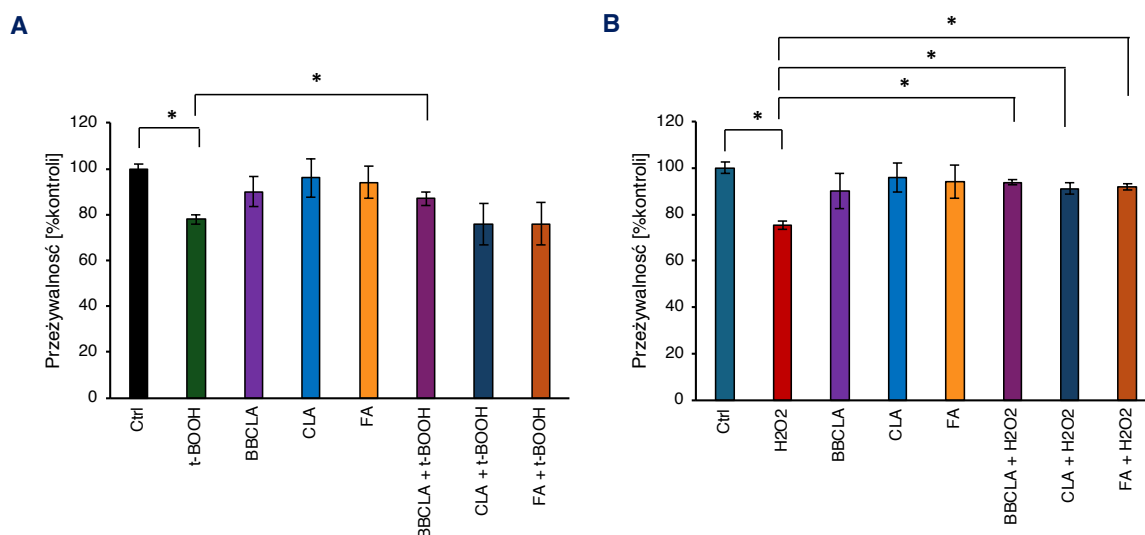
Biorąc pod uwagę ogólny antyangiogenywny efekt farmakologicznej inhibicji aktywności PADs zdecydowano się zbadać status jednego z najistotniejszych szlaków sygnałowych – PI3K/AKT. Komórki HMEC-1 traktowano inhibitorami PADs przez 16 godz., następnie poprzez WB analizowano poziomy wybranych białek badanego szlaku: Akt, fosforylowaną aktywną formę Akt (pAkt), PI3K i GSK3 β (Rysunek V.18). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w poziomach PI3K, a GSK3 β obniżony był istotnie jedynie przez FA (* $p < 0,05$). Natomiast, traktowanie komórek HMEC-1 każdym z inhibitorów skutkowało obniżeniem aktywnej, ufosforylowanej formy białka – ph-Akt (** $p < 0,0001$ dla BBCLA i CLA, * $p < 0,05$ dla FA). Poziom ph-AKT w porównaniu do formy nieaktywnej został obniżony do ok. 40% przez wszystkie inhibitory PADs, co wskazuje, że aktywność PADs może być istotna właśnie na etapie aktywacji tego szlaku na poziomie fosforylacji Akt (Rysunek V.18).



Rysunek V.18. Analiza szlaku PI3K/AKT w komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs. A. – reprezentatywne membrany przedstawiające poziomy pan-Akt, ph-AKT, GSK3 β i PI3K w HMEC-1 traktowanych inhibitorami przez 16 godz. Jako kontrolę nakładania wykorzystano β -aktynę, $n = 3$ B. – analiza densytometryczna sygnałów chemiluminescencyjnych. Sygnał pAkt normalizowano względem pan-Akt. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta, **** $< 0,0001$, * $< 0,05$ vs. kontrola.

1.5. Badanie konsekwencji zahamowania aktywności PAD w kontekście homeostazy redoks

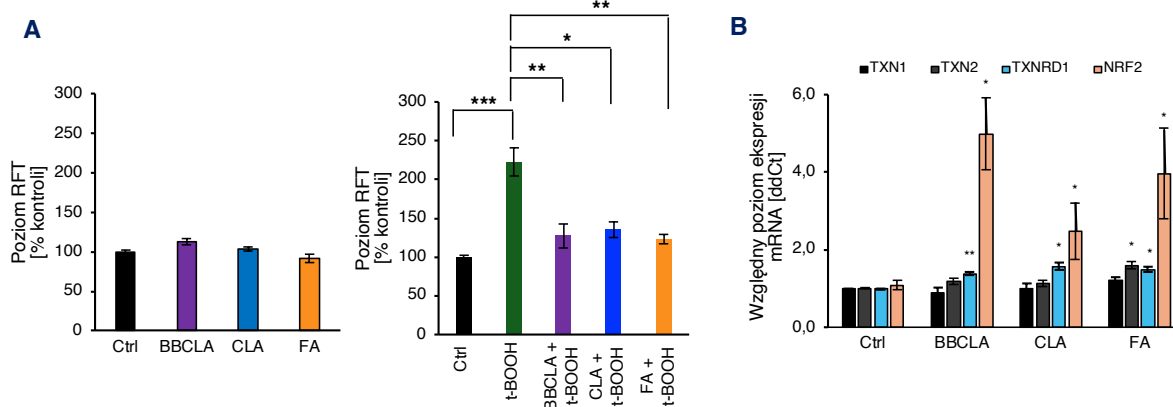
W kolejnym etapie badań starano się zbadać wpływ zahamowania aktywności PADs w HMEC-1 na wybrane aspekty homeostazy redoks oraz wyjaśnić podłoże obserwowanej większej cytotoksyczności BBCLA względem pozostałych inhibitorów PADs (*Rysunek V.2*). Analizowano efekty zahamowania PADs na cytotoksyczność wywołaną czynnikami wywołującymi stres oksydacyjny. W tym celu wykorzystano zarówno utleniacz organiczny: t-BOOH, jak i nieorganiczny: H₂O₂. Komórki HMEC-1 preinkubowano z inhibitorami PADs przez 16 godz. a następnie poddawano działaniu 10 μ M t-BOOH lub 150 μ M H₂O₂, przeżywalność komórek oznaczano z wykorzystaniem testu wychwyty czerwieni obojętnej. Wcześniejsza inkubacja HMEC-1 z BBCLA istotnie statystycznie zwiększyła (*p< 0,05) przeżywalność względem komórek traktowanych t-BOOH (*Rysunek V.19A*). W przypadku H₂O₂ podobny efekt zaobserwowano dla każdego z zastosowanych inhibitorów (*p< 0,05) (*Rysunek V.19B*).



Rysunek V.19. Analiza wpływu inhibitorów PAD na przeżywalność HMEC-1 traktowanych t-BOOH lub H₂O₂.
A: Przeżywalność ECs traktowanych inhibitorami PADs przez 24 godz i t-BOOH przez 2 godz. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, n = 3 **B:** Przeżywalność ECs traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz. i H₂O₂ przez godzinę. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, n = 3. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Próby analizowano vs. kontrola i t-BOOH/ H₂O₂ vs. ko-traktowanie: inhibitor PADs + t-BOOH/ H₂O₂. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: *p<0,05.

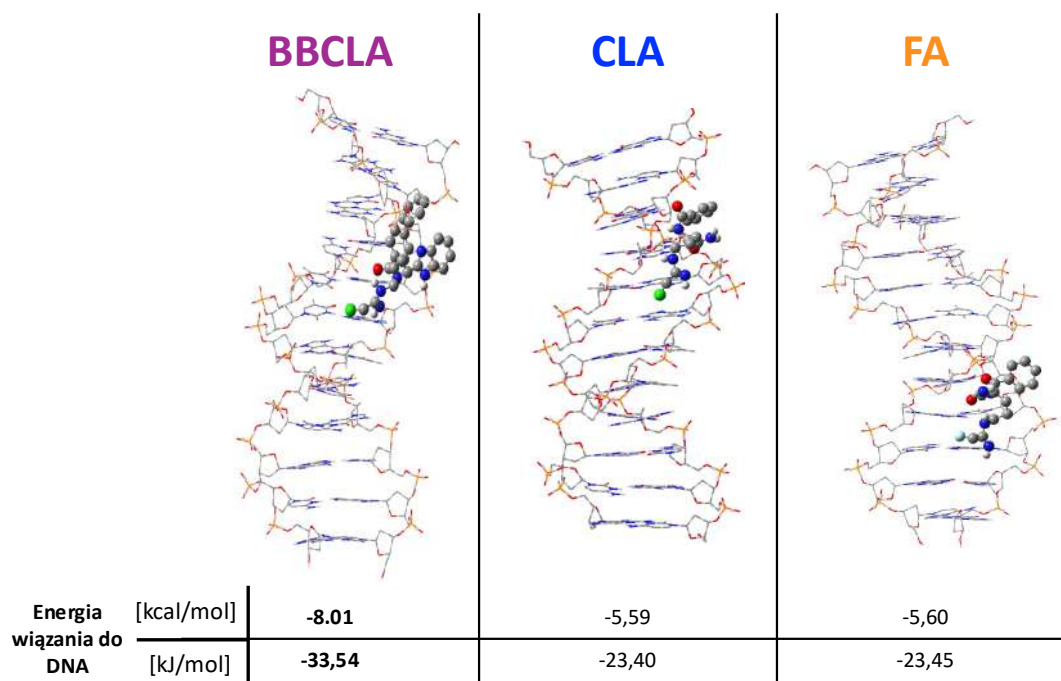
Z wykorzystaniem sondy H₂DCF DA analizowano poziomy RFT zarówno w komórkach HMEC-1 inkubowanych wyłącznie z inhibitorami PAD, jak i w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu wywołanemu 10 μ M t-BOOH. Potraktowanie komórek wyłącznie inhibitorami PADs nie wywołało istotnych zmian w produkcji RFT (*Rysunek V.20A*). Natomiast preinkubacja z inhibitorami, podobnie jak w powyższych analizach cytotoksyczności, istotnie zmniejszyła produkcję RFT po inkubacji komórek z 10 μ M t-BOOH (*Rysunek V.20A'*). Najmniej istotny statystycznie efekt zaobserwowano w przypadku CLA (*p< 0,05), a zbliżone efekty wywołała inkubacja z BBCLA i FA (**p< 0,001). Następnie, z wykorzystaniem qPCR analizowano względną poziomą ekspresji genów, których produkty zaangażowane są w regulację homeostazy redoks. Wszystkie inhibitory PADs po 16 godz. inkubacji istotnie (*p<0,05) zwiększyły w HMEC-1 poziom ekspresji *TXNRD1* oraz *NRF2* (*Rysunek V.20B*).

Natomiast nie zaobserwowano zmian w *TXN1*, a poziom *TXN2* zwiększyła wyłącznie inkubacja z FA (*Rysunek V.20B*).



Rysunek V.20. Poziom RFT i ekspresja genów związanych z homeostazą redoks w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD.
A: Produkcja RFT w komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz i produkcja RFT w komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami przez 16 godz. i 2 godz. inkubacji z t-BOOH, dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, $n = 4$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Próby analizowano vs. kontrola i t-BOOH vs. ko-traktowanie inhibitor PAD + t-BOOH. **B:** Względny poziom ekspresji genów związanych z homeostazą redoks w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz. Wyniki normalizowano względem ekspresji HPRT1, dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{***} < 0,0001$, $p^{**} < 0,001$, $p^{*} < 0,05$ vs. kontrola.

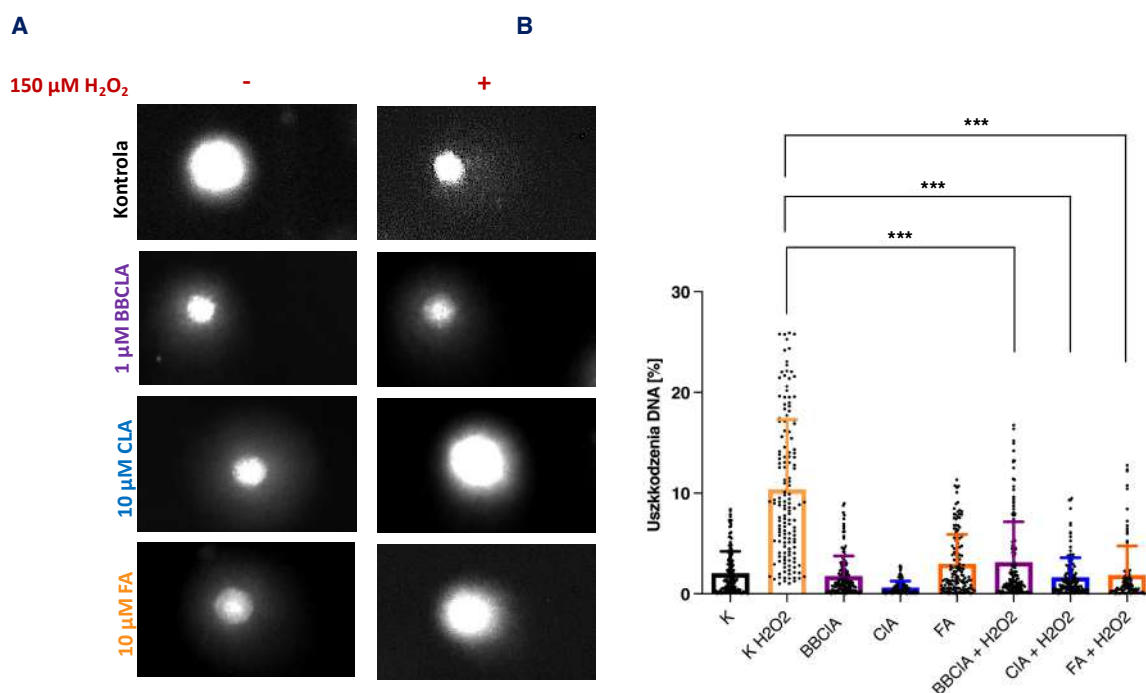
Ze względu na zastanawiającą rozbieżność w IC_{50} badanych inhibitorów PAD w ECs zdecydowano się zweryfikować czy obserwowana wysoka cytotoksyczność BBCLA związana może być spowodowana uszkodzeniami DNA. W pierwszej kolejności przy użyciu metod *in silico* analizowano potencjał wiązania się badanych związków do struktury DNA (*Rysunek V.21*). Według przeprowadzonych analiz wszystkie inhibitory PAD mogą wiązać się do DNA w małym rowku a obliczone energie wiązania wskazują, że to właśnie BBCLA posiadać może największą zdolność do interakcji DNA (-33,54 kJ/mol).



Rysunek V.21. Analiza *in silico* wiązania badanych inhibitorów PAD do struktury DNA. Struktury badanych inhibitorów PADs dokowano do modelu DNA (PDB ID: 1BNA). Wyniki analizy wizualizowano w programie GaussView 4.1.2

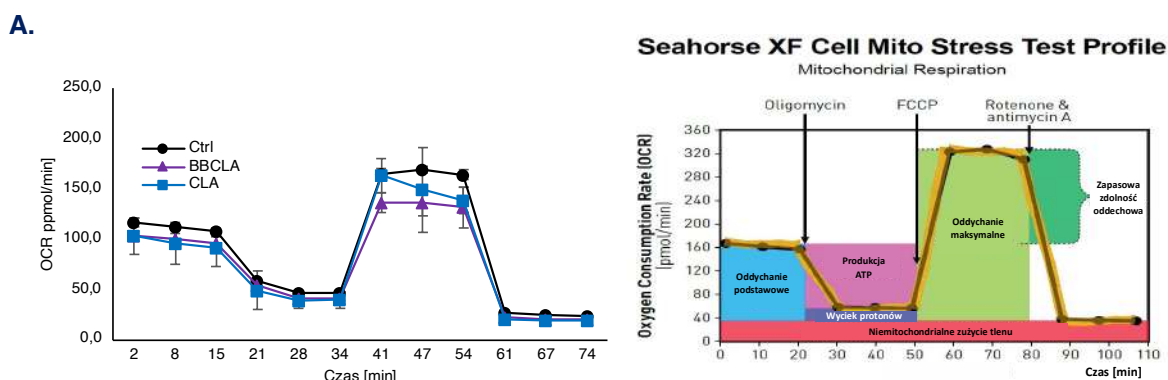
Następnie z wykorzystaniem testu kometowego analizowano procent uszkodzeń DNA w komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD przez 16 godz. (*Rysunek V.22*). Wniosując na

podstawie analiz *in silico*, cytotoksyczność BBCLA spowodowana mogła być właśnie uszkodzeniami DNA. Jednak żaden z zastosowanych inhibitorów nie powodował istotnych uszkodzeń DNA w zastosowanym stężeniu. Te wyniki w połączeniu z opisanym wyżej efektem cytoprotekcyjnym przed H_2O_2 skłoniły do analizy wpływu pre-inkubacji HMEC-1 z inhibitorami PADs na uszkodzenia oksydacyjne DNA wywoływane H_2O_2 . Pre-inkubacja HMEC-1 z inhibitorami PADs istotnie statystycznie ($*p < 0,0001$) chroniła HMEC-1 przed uszkodzeniami DNA wywołanymi H_2O_2 (*Rysunek V22B*). Wyniki te wyraźnie wskazują, że inhibitory PADs w podanych stężeniach nie tylko nie indukują uszkodzeń DNA, ale wykazują działanie protekcyjne przed działaniem H_2O_2 .



Rysunek V.22. Test kometowy. **A.** Reprezentatywne zdjęcia z testu kometowego, komórki HMEC-1 preinkubowano z inhibitorami PADs a następnie poddawano działaniu 150 μM H_2O_2 przez 30 min. **B:** Analiza uszkodzeń DNA w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD przez 16 godz i H_2O_2 przez 30 min. Wyniki na wykresie przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: test t-Studenta: *** $p < 0,0001$.

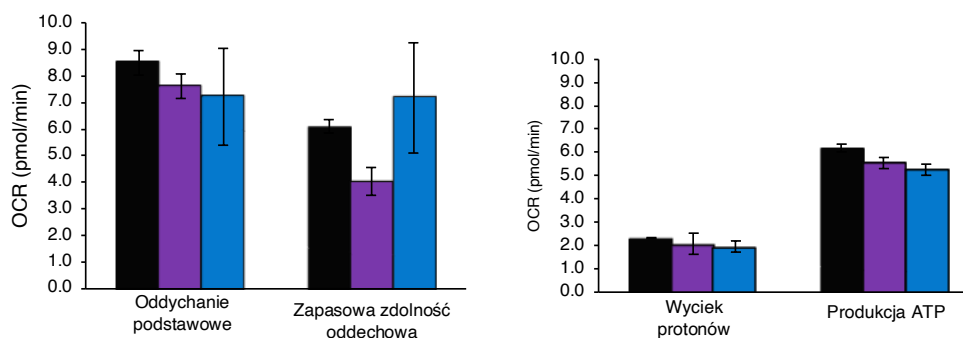
Dodatkowo zdecydowano się zbadać wpływ zahamowania aktywności PAD na funkcję mitochondriów w HMEC-1. W tym celu wykorzystano aparat Seahorse i test MitoStress Test pozwalający ocenić szereg parametrów mitochondrialnych. Analizy wykonano wyłącznie dla BBCLA i CLA. Nie wykryto istotnych statystycznie zmian w profilu oddychania po potraktowaniu komórek inhibitorami PADs (*Rysunek V.23*).



Rysunek V.23. Analiza oddychania w HMEC-1 traktowanych BBCLA lub CLA. **A:** wykres OCR, wygenerowane po analizie w programie Wave, przedstawiające wpływ 16 godz. inkubacji HMEC-1 z BBCLA lub CLA na oddychanie mitochondrialne. Dane

przedstawiono jako średnia + SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: test ANOVA, post-hoc Tuckeya, $*p < 0,05$. B: reprezentatywny wykres OCR, proponowany przez producenta.

Analizy nie wykazały także żadnych istotnych zmian w analizowanych parametrach mitochondrialnych w tym m.in. w zapasowej zdolności oddechowej i produkcji ATP (*Rysunek V.24*).



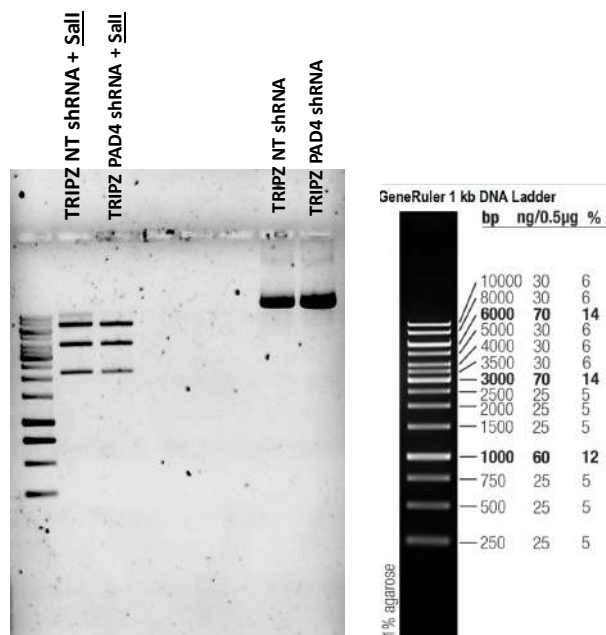
Rysunek V.24. Analiza wybranych parametrów mitochondrialnych w HMEC-1 traktowanych BBCLA lub CLA. Wykresy wygenerowane po analizie w programie Wave, przedstawiające wpływ 16 godz. inkubacji HMEC-1 z BBCLA lub CLA na wybrane parametry funkcji mitochondriów, dane przedstawiono jako średnia + SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: test ANOVA, post-hoc Tuckeya, $*p < 0,05$.

Biorąc pod uwagę wyniki zebrane w tym podrozdziale, podsumować można, że farmakologiczne zahamowanie aktywności PADs może zwiększać zdolność komórek HMEC-1 do ochrony przed stresem oksydacyjnym wywołanym czynnikami organicznymi i nieorganicznymi. Dodatkowo inhibitory PADs wykazują działanie protekcyjne przed uszkodzeniami DNA wywołanymi H_2O_2 .

2. Analiza wybranych efektów wyciszenia PAD4 w HMEC-1

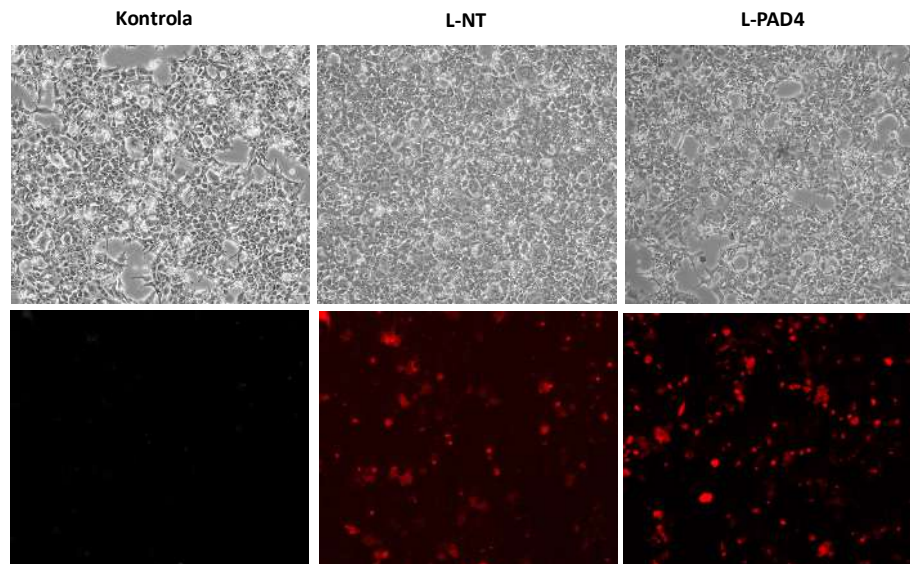
Wyniki zaprezentowane w poprzednim rozdziale, opisujące wpływ zastosowania farmakologicznego zahamowania aktywności PAD na potencjał angiogeny ECs stanowiły podstawę do przeprowadzenia głębszych analiz związków pomiędzy cytrulinacją a funkcją komórek śródbłoka. Zdecydowano się zweryfikować czy obserwowane efekty związane są rzeczywiście aktywnością PAD, a nie są wynikiem niespecyficznego działania badanych związków. Z wykorzystaniem techniki indukowalnego wyciszenia genów poprzez shRNA w komórkach HMEC-1 wyciszono ekspresję PAD4. Izoformę tę wybrano ze względu na fakt, że w literaturze to właśnie ona implikowana jest w regulacji największej liczby szlaków komórkowych oraz w większym stopniu niż PAD2 odpowiadać ma za przeprowadzanie cytrulinacji histonów. Szczegółowy opis przygotowania komórek HMEC-1 PAD4 KD przedstawiono w *Sekcji IV Metody*.

Plazmidy zawierające sekwencje shRNA zarówno kontrolne NT (non-Target), jak i wyciszającą PAD4 namnażano w *E. coli* szczep Top10. Zgodnie ze wskazówkami producenta weryfikowano prawidłowość ich sekwencji poprzez specyficzne trawienie enzymem restrykcyjnym – Sall (*Rysunek V.25*).



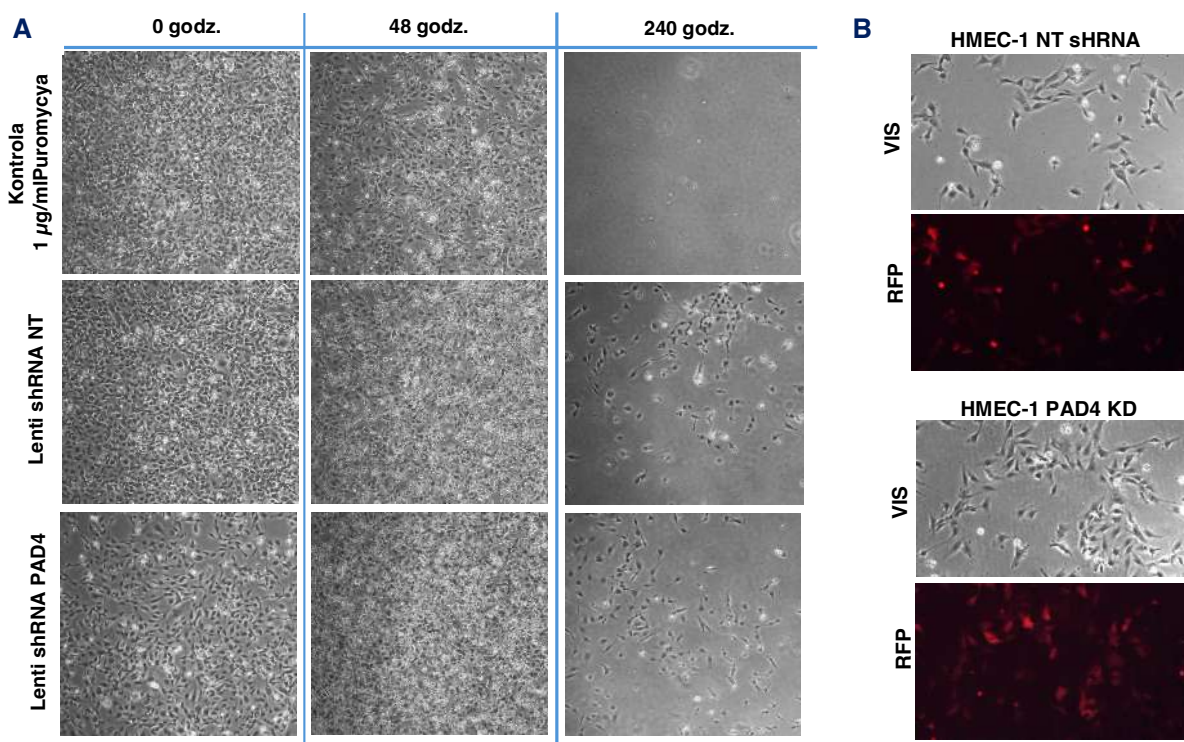
Rysunek V.25. Analiza plazmidów shRNA: reprezentatywne zdjęcie żelu agarozowego po rozdzieleniu trawionych i nietrawionych próbek DNAP. Obserwowane fragmenty o wielkości: 7104 bp, 4028 bp, 2188 bp. Wykorzystany marker mas: GeneRuler 1 kbp (ThermoFisher).

Wybrane DNAP o prawidłowym profilu trawienia restrykcyjnego posłużyły następnie do produkcji cząstek lentiwirusowych w komórkach 293FT, które prowadzono z wykorzystaniem zestawu Lenti-X™ Packaging Single Shots (Takara, Japonia). Produkcję wirusów i sukces transformacji komórek 293FT umożliwiała wizualizacja ekspresji RFP znajdującego się w sekwencji DNAP (*Rysunek V.26*). Produkcję wirusów prowadzono przez 92 godz., zbierając je w czasie 48 i 92 godz. od rozpoczęcia eksperymentu.



Rysunek V.26. Produkcja lentiwirusów w 293FT: Zdjęcia mikroskopowe komórek 293FT transfekowanych mieszaniną do produkcji cząsteczek lentiwirusowych, powiększenie 4x. (L-NT: lentiwirus Non-Target, L-PAD4: lentiwirus PAD4);

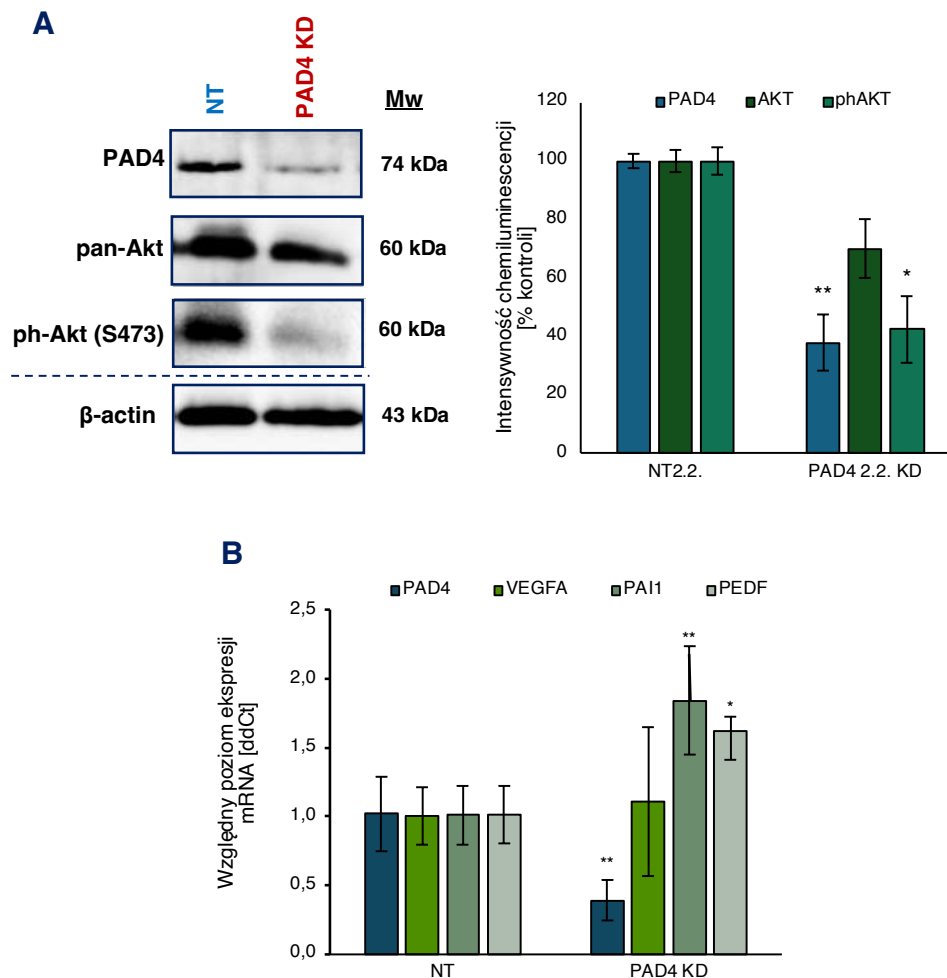
Zebrane cząstki lentiwirusowe wykorzystano do transdukcji komórek HMEC-1, transformanty stabilnie ekspresyjące wprowadzone shRNA selekcjonowano z wykorzystaniem puromycyny przez 10 dni (*Rysunek V.27A*). Po zakończonej selekcji wyprowadzono stabilne linie HMEC-1 NT i HMEC-1 PAD4 KD, które traktowano 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DOX w celu indukcji wyciszenia docelowego genu *PAD4* i aktywacji ekspresji RFP (*Rysunek V.27B*).



Rysunek V.27. Selekcja oraz wyprowadzenie stabilnych linii HMEC-1 NT i HMEC-1 PAD4 KD. A: reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe wykonane podczas selekcji komórek 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycyny w czasach 0, 48 i 240 godz, powiększenie 10x; B: Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe wizualizujące ekspresję białka RFP w komórkach HMEC-1 transdukowanych lentiwirusami. Zdjęcie wykonane po 48 godz. inkubacji komórek z 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DOX, powiększenie 10x.

Po wyprowadzeniu stabilnych linii HMEC-1 NT i HMEC-1 PAD4 KD stopień wyciszenia ekspresji *PAD4* analizowano zarówno na poziomie białka (*Rysunek V.28A*), jak i transkryptu (*Rysunek V.28B*). Łącznie analizowano sześć linii HMEC-1 PAD4 KD, z których największym stopniem wyciszenia

charakteryzowała się HMEC-1 PAD4 KD 6.1, wykorzystywana w prezentowanych analizach. Na poziomie transkryptu ekspresja *PAD4* obniżona była do ok. 38% kontroli – komórek NT (*Rysunek V.28B*), natomiast na poziomie białka do ok. 40% kontroli (* $p < 0,001$) (*Rysunek V.28A*).

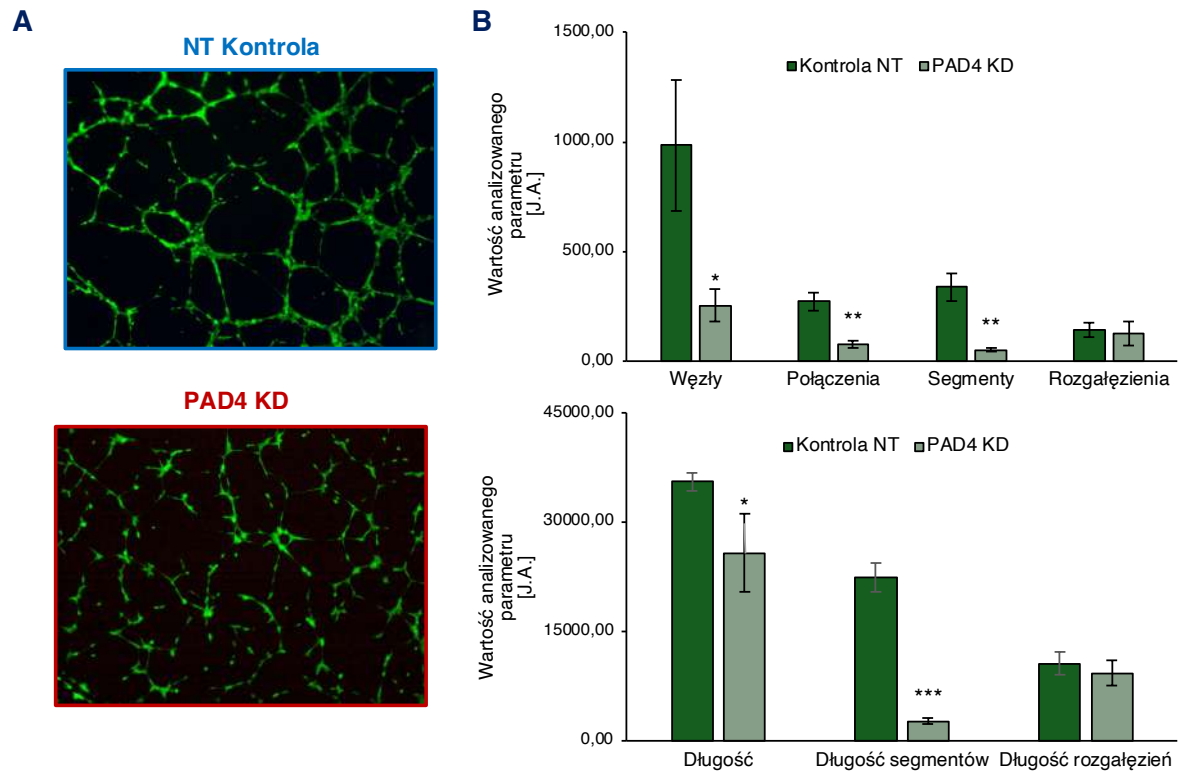


Rysunek V.28. Weryfikacja wyciszenia PAD4 w przygotowanych komórkach HMEC-1 PAD4 KD. **A:** Weryfikacja wyciszenia PAD4 na poziomie białka oraz analiza poziomów form kinazy Akt w komórkach HMEC-1 NT i HMEC-1 PAD4 KD. Jako kontrolę nakładania wykorzystano β -aktynę, $n = 2$. **A':** Analiza densytometryczna sygnałów chemiluminescencyjnych. Sygnał pAkt normalizowano względem pan-Akt. Analiza statystyczna: test t-Studenta; **B:** Weryfikacja wyciszenia PAD4 na poziomie mRNA oraz poziomy ekspresji wybranych genów w komórkach HMEC-1 PAD4 KD. Wyniki normalizowano względem ekspresji HPRT1. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD $n = 2$, test t-Studenta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola – komórki NT.

W komórkach HMEC-1 PAD4 KD, podobnie jak w przypadku komórek traktowanych inhibitorami PAD, z wykorzystaniem WB analizowano poziomy zarówno natywnej formy Akt jak i aktywnej formy fosforylowanej (ph-Akt S473) (*Rysunek V.28A*). Podobnie jak w przypadku wyników z modelu farmakologicznego, zaprezentowanych na *Rysunku V.7* w komórkach z wyciszoną ekspresją *PAD4* zaobserwowano istotne (* $p < 0,05$) obniżenie ph-Akt do ok. 40% kontroli (*Rysunek V.28A*). Może to wskazywać na kluczową rolę izoformy PAD4 w regulacji szlaku PI3K/Akt. W odróżnieniu od wyników uzyskanych dla inhibitorów PADs, wyciszenie PAD4 nie miało wpływu na ekspresję *VEGFA* (*Rysunek V.28B*). Natomiast podobny trend zmian, w odniesieniu do modelu farmakologicznego, zaobserwowano natomiast w przypadku *PAI1* i *PED*, których ekspresja była istotnie (* $p < 0,001$ lub * $p < 0,05$) zwiększona w HMEC-1 PAD4 KD (*Rysunek V.28B*).

W kontekście analizy potencjału angiogenego zdecydowano się zbadać zdolność komórek HMEC-1 PAD4 KD do tworzenia sieci struktur pseudokapilarnych. Specyficzne obniżenie aktywności

PAD4 poprzez jej wyciszenie skutkowało istotnym spadkiem zdolności komórek HMEC-1 do tworzenia sieci pseudonaczyń, co wizualizują zdjęcia i wykresy z analiz parametrycznych przedstawionych na *Rysunku V.29*. Wyciszenie PAD4 istotnie obniżyło wszystkie analizowane parametry poza liczbą i długością rozgałęzień (*Rysunek V.29B*). Uzyskane wyniki korelują z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu inhibitorów PADs, efekt zahamowania tworzenia pseudokapilar nie jest jednak aż tak silny jak w przypadku BBCLA, a zbliżony bardziej do efektów CLA i FA.



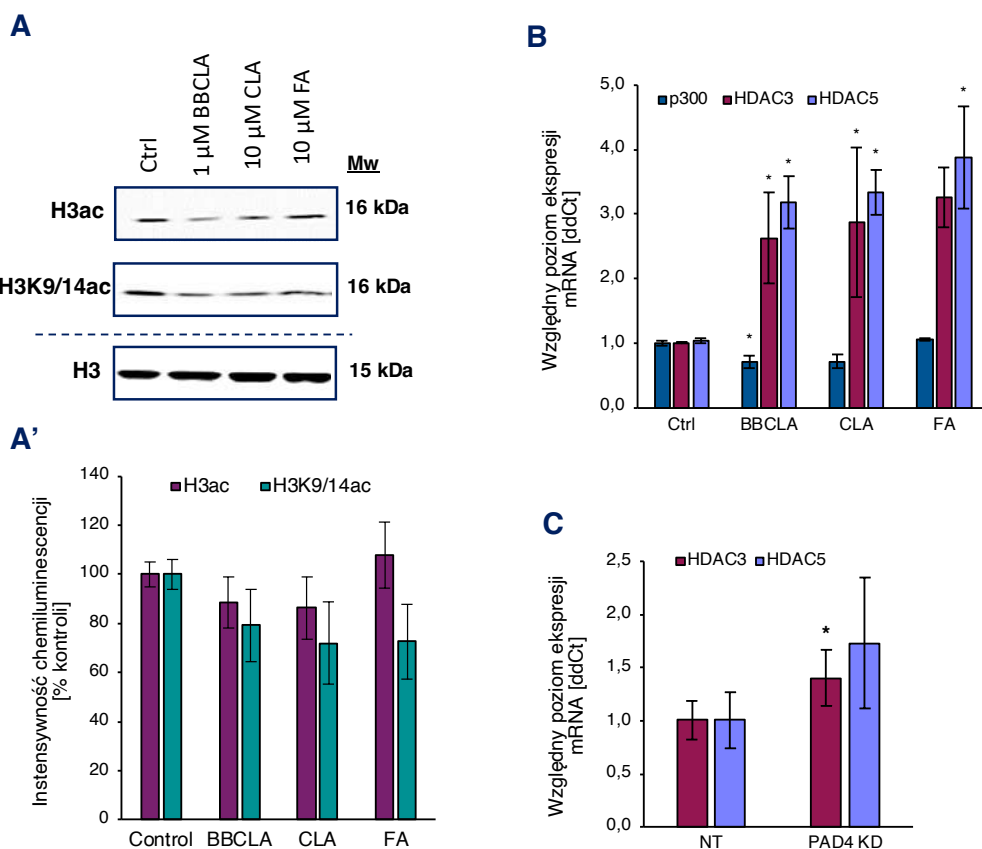
Rysunek V.29. Test formowania struktur kapilarnych przez komórki z wyciszeniem PAD4. **A:** reprezentatywne zdjęcia wytworzonych struktur wybarwionych kalceiną AM, powiększenie 4x, $n = 3$. **B:** wykresy przedstawiają analizę parametryczną wytworzonych struktur. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, $n = 3$. Statystyka: test t-Studenta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. kontrola.

3. Analiza interakcji cytrulinacji z innymi PTMs histonów w HMEC-1

W związku z opisanymi dotychczas interakcjami pomiędzy PTMs histonów, w kolejnym etapie badań zdecydowano się zbadać potencjalne interakcje pomiędzy cytrulinacją a innymi PTMs histonów. Skupiono się na najlepiej poznanych PTMs histonów, acetylacji oraz metylacji. Analizy te prowadzono w większości z wykorzystaniem farmakologicznych inhibitorów PAD.

3.1. Cytrulinacja <-> acetylacja

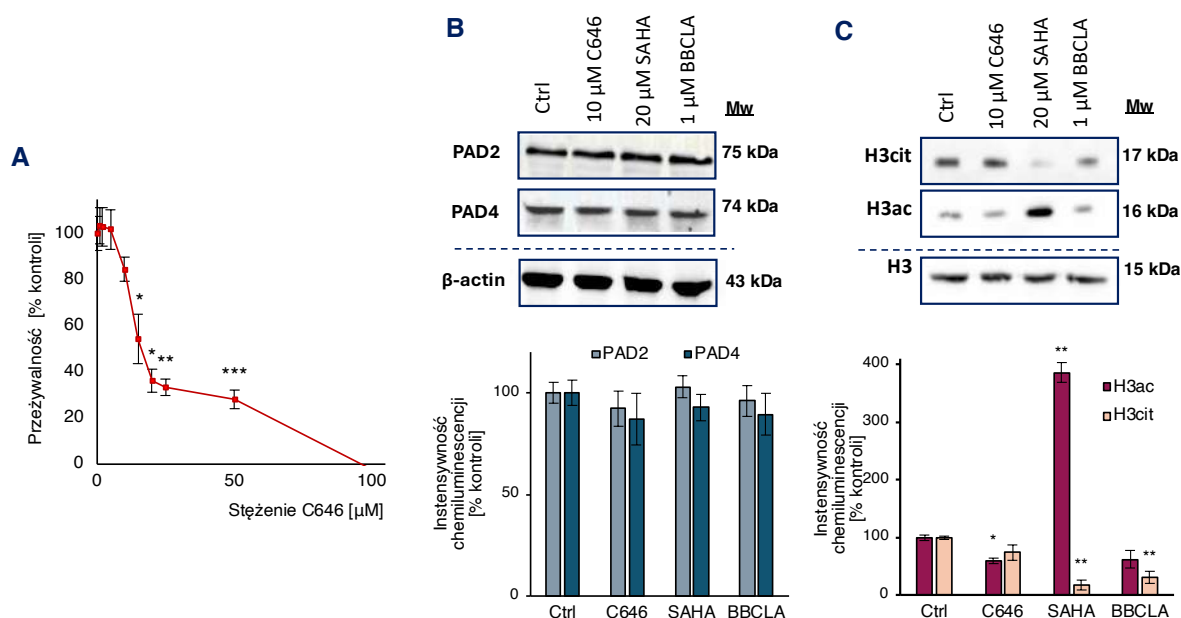
Analizowano wpływ inhibitorów PADs na poziomy acetylacji H3 i enzymów regulujących tę modyfikację. Przy użyciu qPCR oznaczono ekspresję genów dla acetylotransferazy *p300* oraz dwóch deacetylaz *HDAC3* i *HDAC5* w komórkach HMEC-1 inkubowanych z inhibitorami PADs przez 16 godz. (Rysunek V.30B). Każdy z inhibitorów zwiększył ekspresję genów *HDAC3* i *HDAC5* (* $p < 0,05$), w przypadku *p300* istotną zmianę – spadek ekspresji zaobserwowano wyłącznie w przypadku BBCLA (Rysunek V.30B). Biorąc pod uwagę opisane wyniki zdecydowano się sprawdzić poziomy ogólnej acetylacji H3 (H3ac) i H3K9/14ac w HMEC-1 z zahamowaną aktywnością PADs (Rysunek V.30A). Nie zarejestrowano jednak istotnych statystycznie zmian w analizowanych modyfikacjach (Rysunek V.30A). Zmiany w ekspresji *HDAC3* i *HDAC5* analizowano także w komórkach HMEC-1 PAD4 KD 6.1, gdzie istotny statystycznie (* $p < 0,05$) wzrost względnego poziomu mRNA zaobserwowano tylko w przypadku *HDAC3* (Rysunek V.30C).



Rysunek V.30. Analiza statusu acetylacji histonów przy zahamowaniu aktywności PAD. **A:** Poziomy H3ac i H3K9/14ac w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz., wykres (**A'**) przedstawia analizę densytometryczną sygnałów. Jako białko referencyjne wykorzystano H3. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany. Dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; **B:** Względny poziom ekspresji *p300*, *HDAC3* i *HDAC5* w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs przez 16 godz. Wyniki normalizowano względem ekspresji *HPRT1*, dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. **C:** Względny poziom ekspresji *HDAC3* i *HDAC5* w HMEC-1 PAD4 KD. Wyniki normalizowano względem ekspresji *HPRT1*. Dane

przedstawiono jako średnią $\pm$ SD $n = 3$, test t-Studenta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^* < 0,05$ vs. kontrola.

By ocenić wpływ zahamowania wprowadzania lub usuwania acetylacji histonów na cytrulinację wykorzystano zarówno inhibitor HATs – C646, jak i inhibitor HDACs – SAHA. Na [Rysunku V.31A](#) zaprezentowano przeżywalność HMEC-1 traktowanych C646 w zakresie stężeń 2-100 μ M przez 24 godz. Na podstawie tej analizy wybrano stężenie 10 μ M C646 wykorzystywane w dalszych badaniach ([Rysunek V.31A](#)). Stosowano 20 μ M SAHA, podobnie jak w poprzednich badaniach opublikowanych przez nasz zespół [181]. Analizowano poziomy PAD2 i PAD4 w HMEC-1 traktowanych 10 μ M C646, 20 μ M SAHA oraz 1 μ M BBCLA przez 16 godzin, nie zarejestrowano jednak istotnych statystycznie zmian ([Rysunek V.31B](#)). Następnie zbadano wpływ zahamowania HATs lub HDACs na H3ac i H3cit. Związki C646 i SAHA w zastosowanych stężeniach działały zgodnie z założeniami względem profilu acetylacji, C646 obniżył poziom H3ac, a SAHA istotnie go podwyższył ([Rysunek V.31C](#)). W kontekście cytrulinacji, zahamowanie HATs z wykorzystaniem C646 nie wykazało istotnych efektów, jednak co zastanawiające zastosowanie SAHA w stopniu większym niż BBCLA silnie obniżyła poziom H3cit ([Rysunek V.31C](#)).



Rysunek V.31. Analiza cytrulinacji histonów przy zahamowaniu aktywności HATs lub HDACs. **A:** Przeżywalność HMEC-1 traktowanych C646 przez 24 godz. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD ($n = 3$). Analiza statystyczna: test t-Studenta. **B:** Poziomy PAD2 i PAD4 w komórkach HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z 10 μ M C646, 20 μ M SAHA lub 1 μ M BBCLA. Wykres przedstawia analizę densytometryczną sygnałów; **C:** Poziomy H3cit i H3ac w HMEC-1 traktowanych 10 μ M C646, 20 μ M SAHA lub 1 μ M BBCLA przez 16 godz. Wykres przedstawia analizę densytometryczną sygnałów. W analizach WB jako białko referencyjne wykorzystano H3 lub β -aktynę, na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, $n = 3$, a dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{***} < 0,0001$, $p^{**} < 0,001$, $p^* < 0,05$ vs. kontrola.

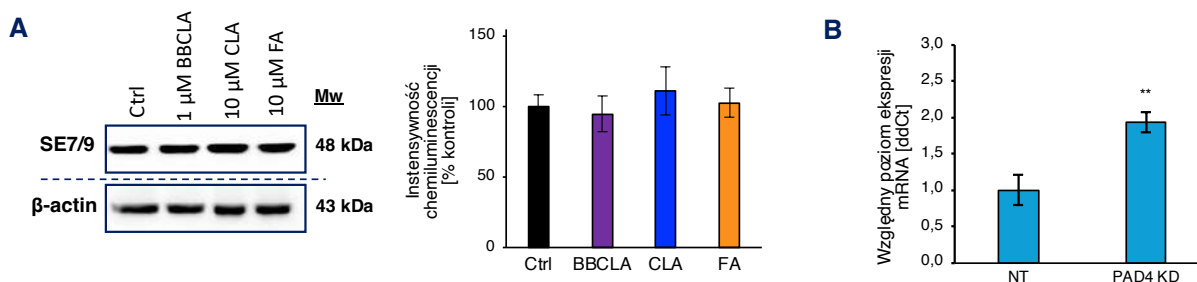
Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na istnienie potencjalnej interakcji pomiędzy cytrulinacją i acetylacją histonów w ECs. Zwłaszcza w kontekście HDACs, których ekspresję zwiększa zarówno inhibicja farmakologiczna (*HDAC3*, *HDAC5*), jak i wyciszenie ekspresji *PAD4* (tylko *HDAC3*). Może to być również istotne w kontekście obserwowanego antyangiogenego profilu ECs. Z drugiej strony, zahamowanie aktywności HDACs z wykorzystaniem SAHA znacznie obniża cytrulinację H3.

3.2. Cytrulinacja <-> metylacja

W analizach potencjalnych interakcji na linii cytrulinacja – metylacja histonów w HMEC-1 wykorzystywano przygotowane wcześniej w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki linie z wyciszoną ekspresją wybranych enzymów regulujących metylację: SET7/9, LSD1 lub G9a. Enzymy te wybrano ze względu na poznany już ogólny wpływ tych modyfikacji na funkcje komórek śródbłonna [145, 156, 243, 244]. Komórki te przygotowano z wykorzystaniem shRNA, analogicznie do opracowanych w tej pracy komórek HMEC-1 PAD4 KD.

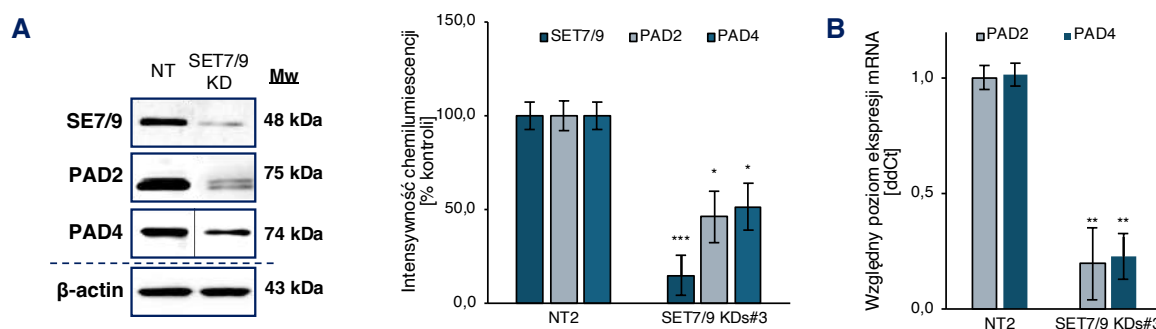
3.2.1. Wpływ aktywności SET7/9 na profil cytrulinacji H3

W pierwszym etapie oznaczono poziom metylotransferazy SET7/9 w komórkach HMEC-1 inkubowanych z inhibitorami PADs przez 16 godz. Żaden z zastosowanych inhibitorów nie powodował istotnych zmian w poziomie SET7/9 (*Rysunek V.32*). Jednak w komórkach HMEC-1 PAD4 KD zarejestrowano istotne ($p < 0,001$) zwiększenie względnej ekspresji SET7/9 (*Rysunek V.32B*)



Rysunek V.32. Analiza poziomu SET7/9 w komórkach inkubowanych z inhibitorami PAD. **A:** Poziom SET7/9 w komórkach HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z inhibitorami PADs. Wykres przedstawia analizę densytometryczną sygnałów. Jako białko referencyjne wykorzystano β-aktynę. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, $n = 3$, a dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett; **B:** Względny poziom ekspresji SET7/9 w HMEC-1 PAD4 KD. Wyniki normalizowano względem ekspresji HPRT1. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$, test t-Studenta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p < 0,05$ vs. kontrola.

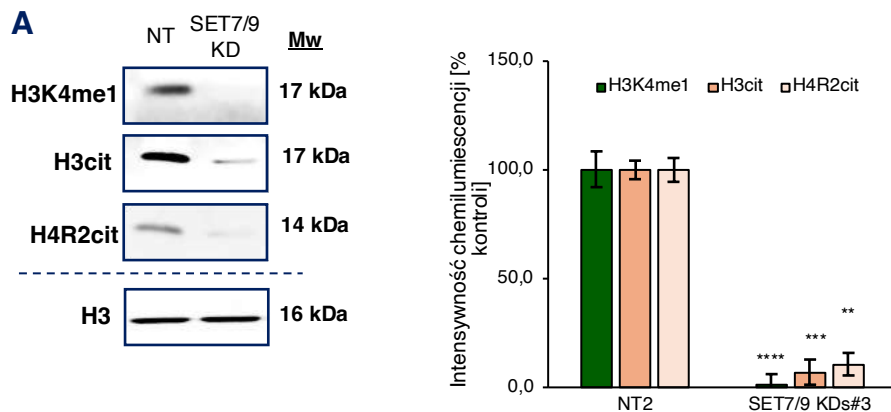
Analizy profilu cytrulinacji histonu H3 w komórkach HMEC-1 SET7/9 KD rozpoczęto od analizy ekspresji genów PAD2 i PAD4. W analizowanym klonie HMEC-1 SET7/9 KD, w którym ekspresja SET7/9 obniżona jest do około 30% względem komórek NT, zarejestrowano istotny spadek ($p < 0,001$), ekspresji obu analizowanych izoform (*Rysunek V.33B*). Wyniki te zweryfikowano następnie na poziomie białka, gdzie również zaobserwowano istotny ($p < 0,05$) spadek poziomów PAD2 i PAD4 w HMEC-1 SET7/9 KD (*Rysunek V.33A*).



Rysunek V.33. Analiza potencjalnych interakcji pomiędzy aktywnością SET7/9 a cytrulinacją. **A:** Poziomy PAD2 i PAD4 w komórkach HMEC-1 SET7/9 KD. Wykres przedstawia analizę densytometryczną sygnałów. Jako białko referencyjne

wykorzystano β -aktynę, na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, $n = 3$. Dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; **B**: Względny poziom ekspresji PAD2 i PAD4 w HMEC-1 SET7/9 KDs. Wyniki normalizowano względem ekspresji HPRT1. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{***} < 0,0001$, $p^{**} < 0,001$, $p^* < 0,05$ vs. kontrola.

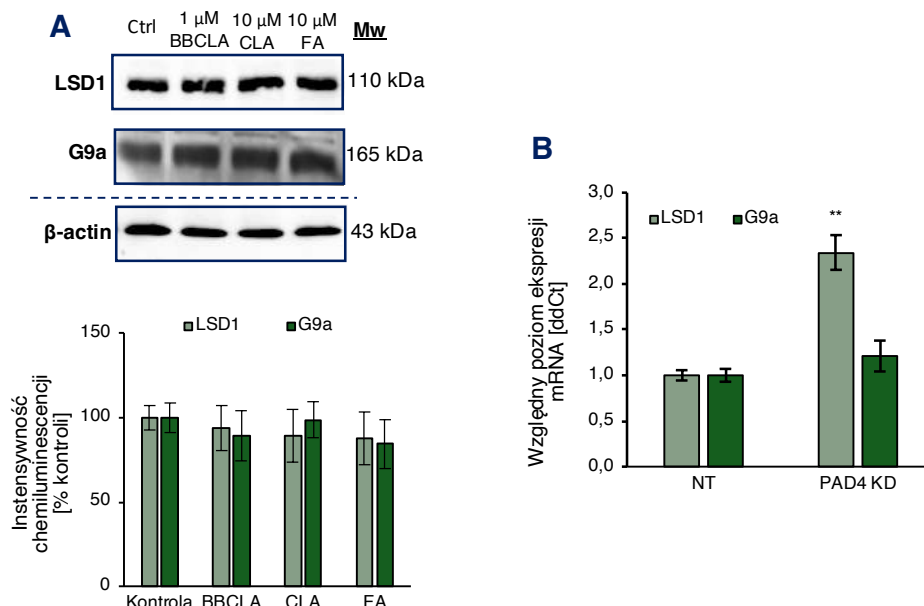
Analizy poziomów wybranych modyfikacji histonów zaprezentowane na [Rysunku V.34](#) wykazały, że wyciszenie SET7/9 nie tylko istotnie statystycznie obniża poziom H3K4me1 wprowadzanej przez ten enzym, ale także H3cit i H4R2cit. Sugeruje to istotną korelację pomiędzy aktywnością SET7/9, a wprowadzaniem cytrulinacji w H3R2, R8, R17 i H4R2.



Rysunek V.34. Analiza PTMs histonów w HMEC-1 SET7/9 KD. **A:** poziomy H3Kme1, H3cit, H4R2cit w komórkach HMEC-1 SET7/9 KD wykres przedstawia analizę densytometryczną sygnałów. Jako białko referencyjne wykorzystano H3. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, $n = 3$. Dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{***} < 0,0001$, $p^{**} < 0,001$ vs. kontrola.

3.2.2. Analizy potencjalnych interakcji metylacja <-> cytrulinacja

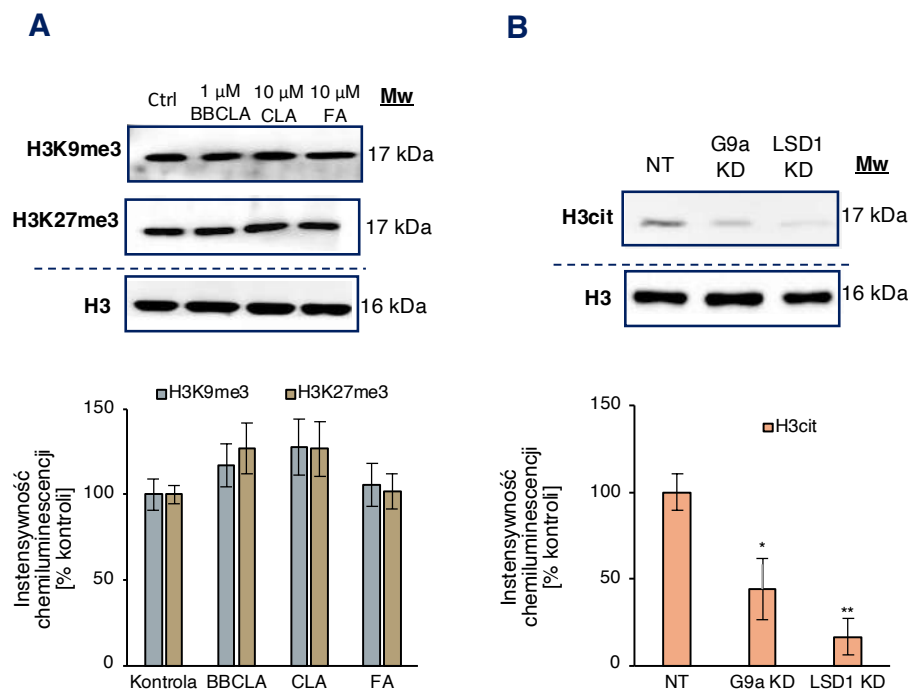
Podobnie jak w przypadku SET7/9 oznaczono też poziom LSD1 i G9a w HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z inhibitorami PADs ([Rysunek V.35A](#)) i również nie zarejestrowano żadnych istotnych statystycznie zmian. W komórkach HMEC-1 PAD4 KD analizowano poziom ekspresji genów dla *LSD1* i *G9a*. Zarejestrowano istotne zwiększenie ekspresji LSD1 ($**p < 0,001$) i brak zmian dla G9a ([Rysunek V.35B](#)).



Rysunek V.35. Poziom enzymów związanych z metylacją w HMEC-1 przy zahamowaniu aktywności PAD. **A:** Poziomy LSD1 i G9a w komórkach HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z inhibitorami PADs. Wykres przedstawia analizę densytometryczną

sygnałów. Jako białko referencyjne wykorzystano β -aktynę. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, $n = 3$. Dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; **B**: względne poziomy ekspresji LSD1 i G9a w komórkach HMEC-PAD4 KD. Wyniki normalizowano względem ekspresji HPRT1. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD $n = 2$. Analiza statystyczna: test t-Studenta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{**} < 0,001$ vs. kontrola.

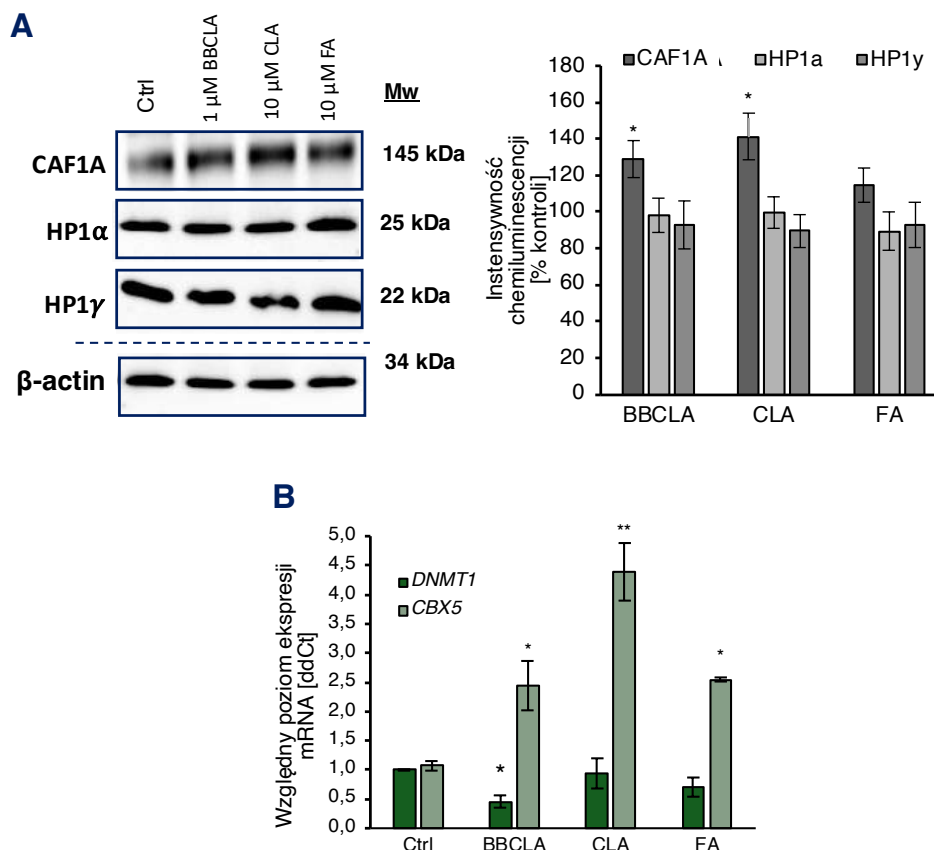
Analizowano poziom dobrze poznanych modyfikacji PTMs histonów: H3K9me3 i H3K27me3, dla których w literaturze przedstawiono już interakcję z cytrulinacją. W wykorzystanym modelu ECs zahamowanie PADs z wykorzystaniem wybranych inhibitorów nie wpłynęło na poziom tych modyfikacji (*Rysunek V.36A*). Badano również poziom H3cit w komórkach z wyciszoną ekspresją demetylazy LSD1 (HMEC-1 LSD1 KD) lub G9a (HMEC-1 G9a KD). Istotny spadek w cytrulinacji H3 zaobserwowano w obu analizowanych liniach komórkowych ($*p < 0,05$ w G9a KD i $*p < 0,001$ w LSD1 KD) (*Rysunek V.36B*).



Rysunek V.36. Analiza potencjalnych interakcji na linii cytrulinacja – metylacja. **A:** Poziomy H3K9me3 i H3K27me3 w komórkach HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z inhibitorami PADs. Na wykresie przedstawiono analizę densytometryczną; **B:** poziomy H3cit w komórkach HMEC-1 LSD1 KD i HMEC1 G9a KD. Wykres przedstawia analizę densytometryczną sygnałów. W analizach jako białko referencyjne wykorzystano H3. Na rysunku prezentowane są reprezentatywne membrany, $n = 3$. Dane na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$, Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta; Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p^{**} < 0,001$, $p^{*} < 0,05$ vs. kontrola.

3.3. Analiza wpływu inhibitorów PADs na wybrane regulatory struktury chromatyny

W ostatnim etapie analizowano efekty farmakologicznego zahamowania aktywności PADs i cytrulinacji w HMEC-1 na wybrane czynniki zaangażowane w regulację struktury chromatyny. Z wykorzystaniem techniki WB oznaczono poziomy: czynnika formowania chromatyny 1 (CAF1A, ang. *Chromatin assembly factor 1*) i izoform białka heterochromatynowego HP1 α oraz HP1 γ w HMEC-1 inkubowanych z inhibitorami przez 16 godz. (*Rysunek V.37A*). W przypadku obu izoform HP1 nie zaobserwowano istotnych zmian, natomiast zaobserwowano wzrost ekspresji genu kodującego HP1 α - CBX5 zaindukowany przez wszystkie inhibitory PADs (*Rysunek V.37B*). Poziom CAF1A wzrósł w komórkach traktowanych BBCLA lub CLA, ale nie FA (*Rysunek V.37A*). Analizowano także wpływ zastosowania inhibitorów PADs na ekspresję genu *DNMT1*, istotne zmiany wywołał jedynie BBCLA obniżając jego ekspresję (*Rysunek V.37B*).



Rysunek V.37. Analiza wpływu inhibitorów PADs na wybrane czynniki regulujące status chromatyny. A: Poziomy CAF1A, HP1α oraz HP1γ w komórkach HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z inhibitorami PADs. Przedstawiono reprezentatywne WB z trzech powtórzeń. Wykres wizualizuje densytometrię sygnału. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD ($n = 3$), Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. **B:** Względny poziom ekspresji DNMT1 i CBX5 w HMEC-1 inkubowanych przez 16 godz. z inhibitorami PADs, wyniki normalizowano względem ekspresji HPRT1. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD, $n = 3$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnetta. Istotność statystyczną wszystkich wyników zaprezentowano jako: $p < 0,05$ vs. kontrola.

Biorąc pod uwagę opisane wyżej wyniki, farmakologiczne zahamowanie wyłącznie cytrulinacji histonów może nie być wystarczające do istotnej modulacji statusu chromatyny w komórkach HMEC-1.

VI. Dyskusja

W ostatnich latach zaobserwować można duży postęp w obszarze badań nad cytrulinacją białek, także w kontekście epigenetycznym. Jednak nadal, fizjologiczna rola tej modyfikacji w regulacji metabolizmu komórkowego nie jest dobrze poznana. Zarówno cytrulinacja, jak i przeprowadzające ją enzymy PADs badane są wciąż głównie pod względem ich zaangażowania w patogenezę zaburzeń autoimmunologicznych, zwłaszcza reumatoidalnego zapalenia stawów, co wydaje się zasadne biorąc pod uwagę istotną rolę PAD4 w formowaniu NETs. Jednak, cytrulinacja jest także silnie wiązana ze stanem zapalnym, gdzie obserwowana jest zwiększona aktywność PADs. Zaskakująco, rola tej modyfikacji w regulacji funkcji komórek śródbłonna, które są jednymi z głównych regulatorów reakcji zapalnych, pozostaje praktycznie niezbadana. Ostatnie lata badań wykazały, że poza histonami, cytrulinowane mogą być także inne białka w tym takie, które istotne są w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania komórek śródbłonna. Wśród przykładów takich białek wymienić należy: α -tubulinę [249, 250], wimentynę [251, 252], fibrynogen [253, 254], metaloproteiny [103] i ADMTS-13 [255, 256].

W prezentowanej rozprawie wykorzystano dwie metody zahamowania cytrulinacji w komórkach śródbłonna: (i) farmakologiczną inhibicję PADs oraz (ii) specyficzne wyciszenie ekspresji *PAD4*. W pierwszym podejściu badawczym wykorzystywano dostępne komercyjnie nieodwracalne inhibitory PADs: BB-CI-amidynę (BBCLA), CI-amidynę (CLA) oraz F-amidynę (FA), ich charakterystykę zawarto w *Tabeli III.1*, w rozdziale *III. Metody*. Natomiast wyciszenie *PAD4* przeprowadzono z wykorzystaniem mechanizmów interferencji RNA (RNAi). Zdecydowano się zastosować dwa podejścia badawcze, ze względu na wciąż słabo opisane właściwości badanych inhibitorów i możliwość ich potencjalnych niespecyficznych oddziaływań. Porównanie tych wyników z wyciszeniem *PAD4* zapewniło szerszy kontekst dla badanych procesów. Izoforma *PAD4* została wytypowana do wyciszenia ze względu na najszerszej opisane dotąd spektrum substratowe, wzbogacone niedawno dzięki przekrojowemu badaniu proteomicznemu zespołu Nielsen i wsp. 2024 [257], a także na fakt, że to aktywność *PAD4* jest obecnie implikowana w wielu stanach patologicznych [82].

Jak przedstawiono już w *Rozdziale 3 wstępu teoretycznego*, komórki śródbłonna pełnią szereg istotnych funkcji. Zwłaszcza związanych z regulacją przepływu/ciśnienia krwi, utrzymania hemostazy oraz regulacji angiogenezy. W niniejszej pracy skupiono się na ocenie wpływu zahamowania cytrulinacji na funkcję komórek śródbłonna, z naciskiem na angiogenezę. Hamowanie angiogenezy, stanowi obecnie atrakcyjną metodę terapii, zwłaszcza w przypadku chorób nowotworowych, także ze względu na dobrze poznaną rolę mechanizmów epigenetycznych w regulacji tego procesu. Jednak analizując wpływ zahamowania cytrulinacji w komórkach śródbłonna, pod uwagę należy brać także inne funkcje tych komórek.

Jako podstawowe modele badawcze wybrano dwa typy komórek śródbłonna, immortalizowaną linię komórkową: HMEC-1, oraz komórki pierwotne izolowane z żyły pępowinowej HUVEC. Wykorzystanie dwóch rodzajów ECs, pozwala na dokładniejszą ocenę uzyskanych wyników, które

często różnią się w zależności od wybranego modelu [258]. W literaturze brak obecnie doniesień dotyczących ekspresji PADs w ECs. Jedyne dostępne obecnie dane, zawarte w bazie ProteinAtlas wskazują, że mRNA dla *PAD2* i *PAD4* obecne jest w większości tkanek człowieka [100]. Stąd w obu typach ECs zweryfikowano obecność zarówno tych enzymów jak i cytrulinacji H3 (*Rysunek V.1A, B i C*). W niniejszej pracy najwięcej uwagi zdecydowano się poświęcić izoformom PAD2 i PAD4, które jako jedyne zdolne są do translokacji do jądra komórki, gdzie modyfikują m.in. histony. W celu poprawnej identyfikacji obecności tych izoform w ECs jako kontrolę odniesienia wykorzystano wybrane linie raka jelita grubego (*Rysunek V.1A*). Zarówno poziom PAD2 i PAD4, jak i H3cit w obu typach ECs był porównywalny (*Rysunek V.1A i B*). Natomiast w odniesieniu do linii nowotworowych ilość tych enzymów w ECs była zauważalnie niższa niż w przypadku linii HCT116 i SW620, co pozostaje zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na zwiększoną ekspresję tych białek w nowotworach złośliwych [119]. Podobnie obserwowany poziom cytrulinacji histonów był znacznie większy w dwóch wymienionych liniach nowotworowych niż w ECs (*Rysunek V.1B*). W HMEC-1 i HUVEC potwierdzono także obecność innych funkcjonalnych izoform PADs (*Rysunek V.1C*), jednak w prowadzonych badaniach nie stanowiły one obiektu zainteresowania z uwagi na fakt, że nie są one zdolne do prowadzenia modyfikacji histonów, a także ich spektrum substratowe jest znacznie mniejsze niż w przypadku PAD2 i PAD4 [82]. Weryfikując możliwości modyfikacji histonów przez wybrane izoformy PADs, analizowano ich lokalizację subkomórkową z wykorzystaniem technik immunofluorescencyjnych (*Rysunek V.1D*). Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z dostępną literaturą wskazującą na lokalizację obu izoform zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym (*Rysunek V.1D*) [82, 87]. W przypadku PAD4 translokacja do jądra komórkowego możliwa jest dzięki obecności sekwencji sygnału lokalizacji jądrowej [259], natomiast w przypadku PAD2 dokładny mechanizm nie jest znany co stanowić może ciekawy obszar badawczy.

Ocenę cytotoksyczności badanych inhibitorów PADs, w celu ustalenia roboczych zakresów stężeń przeprowadzono z wykorzystaniem testu redukcji resazuryiny (*Rysunek V.2*). W przypadku tej analizy, kluczowej z punktu widzenia kolejnych eksperymentów, wykorzystano także dodatkowy model ECs – komórki śródbłonna aortalnego HAEC. Spośród wszystkich badanych związków, w zakresach stężeń 0,25 – 10 μM , jedynie BBCLA wykazała działanie cytotoksyczne, IC_{50} dla HMEC-1: 1,75 $\mu\text{M} \pm 0,13 \mu\text{M}$, dla HUVEC: 1,97 $\mu\text{M} \pm 0,08 \mu\text{M}$, dla HAEC: 1,99 $\mu\text{M} \pm 0,16 \mu\text{M}$ (*Rysunek V.2.A, B i C*). W przypadku CLA i FA badano także większy zakres stężeń (do 200 μM). Istotny spadek przeżywalności zaobserwowano tylko w przypadku CLA względem HUVEC: $\text{IC}_{50} = 175,67 \mu\text{M} \pm 2,54 \mu\text{M}$ (*Rysunek V.2D*). Istotnie większa cytotoksyczność BBCLA względem pozostałych dwóch inhibitorów wynikać może z odmiennej struktury chemicznej – obecności dodatkowego pierścienia benzoimidazolowego, który zwiększa czas półtrwania *in vivo* tego inhibitora i może utrudniać jego transport na zewnątrz komórki [90, 125]. Podobne wyniki opisujące cytotoksyczne działanie BBCLA uzyskano w przypadku komórek kostniakomięsaka U2OS, gdzie związek ten okazał się być około 20-krotnie bardziej toksyczny niż CLA [90]. Również w badaniach prowadzonych na limfocytach T CD4⁺ ten inhibitor wykazywał efekt

toksyczny w stężeniach powyżej 1 μM [90]. Dodatkowo, cytotoksyczność tego związku zaobserwowano także w przypadku zwierzęcych linii komórkowych psów: REM134 i CMEC [260]. Te istotne różnice w cytotoksyczności badanych związków względem ECs sprawiły, że zdecydowano się zbadać potencjalny genotoksyczny efekt BBCLA. Analizy z wykorzystaniem testu kometowego nie wykazały jednak istotnych statystycznie uszkodzeń DNA w komórkach HMEC-1 inkubowanych z inhibitorami PADs (*Rysunek V.22*). Zatem, wyjaśnienie wysokiej cytotoksyczności BBCLA względem komórek śródbłonna ($\text{IC}_{50} > 1,75 \mu\text{M} \pm 0,13 \mu\text{M}$) pozostaje wciąż kwestią otwartą, którą warto byłoby zbadać przy wykorzystaniu innych metod. W tym zakresie, badanie Sun i wsp. z roku 2022 wskazuje, że cytotoksyczność stężeń BBCLA $> 1 \mu\text{M}$ może mieć związek z indukcją stresu retikulum endoplazmatycznego (ang. *endoplasmic reticulum stress*) [261]. Zjawisko to zaobserwowano w przypadku linii komórkowej ostrej białaczki szpikowej (ALL), gdzie 2 μM BBCLA efektywnie indukowała apoptozę [261].

Ponieważ udało się potwierdzić lokalizacyjną możliwość przeprowadzania cytrulinacji histonów przez PAD2 i PAD4 (*Rysunek V.1C*), potencjał inhibitorowy badanych związków analizowano względem poziomu tej właśnie modyfikacji. Oba typy ECs inkubowano przez 16 godz. z nietoksycznymi stężeniami inhibitorów PADs, a następnie przy użyciu techniki WB analizowano poziom H3cit (H3R2R8R17cit) (*Rysunek V.3*), dodatkowo w HMEC-1 oceniano także poziom H4R2cit (*Rysunek V.4B*). W przypadku każdego z badanych związków najwyższe zastosowane stężenie indukowało silny spadek poziomu zarówno H3cit w obu typach ECs (*Rysunek V.3*), jak i H4R2cit w HMEC-1 (*Rysunek V.4C*). Największy, blisko 4-krotny spadek H3cit zaobserwowano w komórkach traktowanych BBCLA. Efekty wywołane przez CLA i FA były zbliżone (*Rysunek V.3*). Wybrano stężenia każdego z inhibitorów wykorzystywane na dalszych etapach badań (1 μM BBCLA, 10 μM CLA i 10 μM FA). Przy krótszym czasie inkubacji istotny spadek H3cit zaobserwowano wyłącznie w komórkach traktowanych BBCLA (*Rysunek V.4A*). W literaturze stężenia stosowane w przypadku każdego z zastosowanych związków znacznie różnią się w zależności od wykorzystywanego modelu badawczego. Opublikowane badania prowadzone są głównie w odniesieniu do potencjału związków do zahamowania formowania NETs, lub też na modelach nowotworowych. Z tego powodu trudno odnosić je do wyników uzyskanych w niniejszej rozprawie. W literaturze, Shi i wsp. w badaniu na modelu mysim z 2021 roku, stosowano 200 μM stężenie CLA uzasadniając ten fakt efektywną inhibicją PADs i formowaniem NETs [261]. BBCLA w badaniach *in vivo*, również na modelu mysim efektywnie zmniejszał H3cit przy stężeniu 7,5 mg/kg masy ciała [263]. W większości dostępnych obecnie badań oceniane są raczej efekty zastosowania badanych inhibitorów, a nie ich bezpośredni wpływ na poziom konkretnej modyfikacji.

W komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami oceniano następnie wpływ zahamowania wprowadzania cytrulinacji na proliferację i cykl komórkowy. Nie wykryto istotnych efektów traktowania badanymi związkami w różnych czasach inkubacji (16, 24, 32 i 48 godz.) na progresję cyklu komórkowego, którą analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (*Rysunek V.5* i *Rysunek V.6*). Dodatkowo, nie stwierdzono także istotnych zmian w poziomach białek związanych z progresją

cyklu komórkowego: Chk1, p53 i PCNA (*Rysunek V.9*). W literaturze natomiast, w badaniach na komórkach kostniakomięsaka U2OS traktowanych CLA zaobserwowano wzrost poziomów p53 i p21 [195]. Nie stwierdzono istotnych efektów 48 godz. inkubacji HMEC-1 z CLA/FA na proliferację, a w przypadku BBCLA istotne statystycznie obniżenie proliferacji zaobserwowano wyłącznie dla stężeń powyżej IC_{50} (*Rysunek V.7*). Dostępne doniesienia literaturowe wskazują jednak na zaangażowanie PADs w regulację progresji cyklu komórkowego zwłaszcza w przypadku linii nowotworowych. W badaniach na linii naskórkowego raka szyjki macicy CaSki, 3 μ M BBCLA zaindukował nie tylko zwiększenie poziomów p53 i p21, ale także zahamowanie progresji cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 [264]. Podobnych efektów nie zaobserwowano w prezentowanych tutaj badaniach na modelu śródbłonkowym. Także w komórkach siatkówczaka Y79, 48 godz. inkubacja z 2 μ M BBCLA skutkowałą zatrzymaniem progresji cyklu komórkowego i zwiększeniem odsetka komórek w fazie G_0 [123]. Natomiast CLA w stężeniu 25 μ M w połączeniu z docetaxelem indukowała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M i apoptozę w komórkach MCF7 [265]. Dodatkowo, zespół Li i wsp. w swoich badaniach przedstawił PAD4 jako istotny regulator ekspresji genów zależnych od p53 [195], a analizy koimmunoprecypitacyjne wykazały bezpośrednie interakcje pomiędzy PAD4 i p53 [195]. Wyciszenie PAD4 lub zahamowanie jego aktywności z wykorzystaniem CLA w komórkach kostniakomięsaka U2OS skutkowało zwiększoną ekspresją genów regulowanych przez p53 a tym samym zatrzymaniem cyklu komórkowego i indukcją apoptozy [195]. Brak podobnych efektów w przypadku analizowanej linii HMEC-1, dodatkowo traktowanej inhibitorami PADs przez kilka czasów inkubacji, pozwala stwierdzić, że cytrulinacja nie jest zaangażowana w regulację progresji cyklu komórkowego, a przynajmniej nie na poziomie analizowanych w pracy parametrów. Natomiast co intrygujące, biorąc pod uwagę opisane wyżej analizy, wykryto istotną modulację w profilu ekspresji mRNA cyklin w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs (*Rysunek V.8*). Poziom zmian zależny był od inhibitora oraz danego czasu inkubacji, jednak ich ogólny kierunek w przypadku BBCLA i CLA był porównywalny (*Rysunek V.8*). Co istotne, ekspresja *CCNE* i *CCND* związanych ze wzmożoną proliferacją komórek obniżona została w przypadku 16 godz. inkubacji z BBCLA lub CLA (*Rysunek V.8*). Ten czas inkubacji, wykorzystano wcześniej w analizie poziomu H3cit (*Rysunek V.3*), jak i późniejszych badaniach. Najsilniejsze zmiany zaobserwowano w komórkach traktowanych 10 μ M FA, która także jako jedyna indukowała zwiększenie ekspresji *CCNY* w każdym punkcie czasowym (*Rysunek V.8*). Jednak, te istotne zmiany w profilu ekspresji mRNA wybranych cyklin, nie miały przełożenia na progresję cyklu komórkowego. W tym miejscu warto zauważyć, że zmiany w poziomie mRNA nie zawsze muszą się przekładać na zwiększone poziomy funkcjonalnych białek, co najwyraźniej ma miejsce w przypadku opisywanych tutaj wyników.

Angiogeneza jest procesem wieloetapowym, regulowanym na kilku poziomach, w tym epigenetycznym. Etapy angiogenezy kietkującej, uważanej za najbardziej typowy model przebiegu tego procesu przedstawiono we wstępie teoretycznym (*Rysunek I.16*). Wśród najistotniejszych etapów wymienić należy proliferację i migrację komórek śródbłonka oraz ich zdolność do formowania struktur

kapilarnych. Procesy te regulowane są przez wiele czynników, w tym tych produkowanych i wydzielanych przez same komórki śródbłonna. W prezentowanych tutaj badaniach wykazano już, że zahamowanie aktywności PADs nie wywiera istotnego wpływu na cykl komórkowy i proliferację HMEC-1. W kolejnych etapach analizowano wpływ stosowanych inhibitorów na inne wybrane istotne procesy angiogenne oraz na profil wydzielniczo-transkrypcyjny komórek śródbłonna.

Migrację komórek, która jest jednym z pierwszych etapów angiogenezy *in vivo* (*Rysunek 1.16A.III*), oceniano na podstawie powszechnie stosowanego testu zarastania rasy. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że potraktowanie HMEC-1 lub HUVEC inhibitorami PADs przez 16 godz. istotnie statystycznie obniża ich migrację (*Rysunek V.10* i *Rysunek V.11*). Stopień zahamowania migracji obu typów komórek był porównywalny, a najsilniejszy efekt wywołała inkubacja z BBCLA (* $p < 0,0001$ w HMEC-1 (*Rysunek V.10*) i * $p < 0,001$ w HUVEC (*Rysunek V.11*)). W literaturze znaleźć można kilka doniesień opisujących podobne wyniki uzyskane w innych liniach komórkowych. 2 μ M BBCLA efektywnie hamowała migrację komórek raka piersi MCF10 w badaniu Horibata i wsp z 2017 roku [266]. Natomiast stężenie 500 nM tego związku wystarczające było do zatrzymania migracji miofibroblastów [267]. Zahamowanie zdolności komórek śródbłonna do migracji przez każdy ze stosowanych inhibitorów, wyraźnie wskazuje na zaangażowanie PADs w regulację tego procesu. Jednymi z najważniejszych regulatorów migracji *in vivo* są MMPs, które odpowiedzialne są za degradację ECM. Ich działanie promujące angiogenezę wynika także z uwalniania proangiogennych czynników z degradowanej ECM [224]. Aktywność MMPs jest istotna także w regulacji innych funkcji ECs, w tym tych związanych z hemostazą [268]. W kontekście tematu niniejszej rozprawy ostatnie doniesienia wskazują, że hipercytrulinacja MMP9, silnie zwiększa jej aktywność proteolityczną [103]. Dodatkowo, cytrulinowane MMPs są mniej podatne na działanie inhibitorów [103]. Pod uwagę warto też wziąć zwiększone poziomy ekspresji i aktywności MMPs w zapaleniu ożębnej [269], stanu związanego także ze wzmożoną aktywnością PADs [270]. Tym samym, zdecydowano się przeprowadzić analizę aktywności MMPs w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs. Analizy prowadzono za pomocą komercyjnego zestawu pozwalającego na ocenę całkowitej aktywności MMPs (*Rysunek V.12A i B*). Wyłącznie BBCLA istotnie obniżyła aktywność MMPs, co wskazuje, że może to być efekt niespecyficznego, działania tego inhibitora. Jednak pod uwagę należy także wziąć fakt, że BBCLA okazała się najsilniejszym spośród stosowanych inhibitorów (*Rysunek V.3*).

We wstępie teoretycznym (*Rozdział 3.1*) opisano już krótko rolę NO* jako jednego z najistotniejszych wazodylatorów. Jednak, poza regulacją przepływu krwi, tlenek azotu jest też istotną cząsteczką sygnalizacyjną, modulującą wiele procesów w komórkach śródbłonna, między innymi ich przeżywalność, proliferację i migrację [271]. Również angiogeneza jest procesem zależnym od wydzielanego z komórek śródbłonna NO*, a terapie nacelowane na zahamowanie aktywności eNOS są jednym z proponowanych podejść nie tylko w przypadku chorób nowotworowych [272], ale także CVDs [273, 274] i chorób mózgowo-naczyniowych [275]. Z drugiej strony jednak, zmniejszona produkcja NO* związana jest z ryzykiem wystąpienia miażdżycy [276] i dysfunkcją komórek śródbłonna.

Tym samym, w utrzymaniu prawidłowej funkcji tych komórek niezwykle istotna jest równowaga w ilości wydzielanego NO^{*}. W prezentowanych badaniach poziom NO^{*} wydzielanego przez komórki HMEC-1 oznaczano z wykorzystaniem sondy DAF-FM DA. 16 godz. inkubacja tych komórek z BBCLA lub CLA istotnie statystycznie obniżyła poziom NO^{*} wydzielanego przez komórki HMEC-1 (*Rysunek V.12C*). W przypadku komórek traktowanych FA nie zaobserwowano istotnych zmian. Analizując wyniki uzyskane z użyciem DAF-FM DA należy jednak zachować ostrożność mając na uwadze niespecyficzną tę sondy [277]. W aspekcie korelacji pomiędzy aktywnością PADs i produkcją NO^{*} brak obecnie danych literaturowych. Obniżenie poziomu NO^{*} w komórkach traktowanych BBCLA i CLA wyjaśniać może część z efektów obserwowanych w tych komórkach i wskazywać na zaangażowanie PADs w regulację funkcji komórek śródbłonna z poziomu tej cząsteczki sygnałowej. Pod uwagę należy wziąć także jednak brak podobnych wyników w przypadku komórek traktowanych FA, co wskazywać może na potencjalne niespecyficzne działanie dwóch pozostałych inhibitorów.

Kolejnym z istotnych procesów w angiogenezie kielkującej jest formowanie struktur kapilarnych (*Rysunek I.16A.IV*). Tworzenie struktur pseudokapilarnych jest procesem specyficznym dla komórek śródbłonna. Przebieg tego procesu *in vitro* oceniano poprzez wysianie komórek śródbłonna na powierzchnię przypominającą błonę podstawną – Matrigel™. Wpływ inhibitorów PADs na tworzenie struktur pseudokapilarnych przez HMEC-1 i HUVEC analizowano wykorzystując właśnie tę metodę, pozwalającą odzwierciedlić podobny proces zachodzący podczas angiogenezy kielkującej *in vivo*. W wyniku 16 godz. inkubacji z badanymi inhibitorami zdolność obu typów komórek śródbłonna do formowania tych struktur została istotnie obniżona (*Rysunek V.13*). Ponownie najsilniejszy efekt zaobserwowano w przypadku komórek traktowanych BBCLA, za co odpowiadać może także wspomniana już obniżona aktywność MMPs będąca efektem zastosowania tego związku (*Rysunek V.12A*). W komórkach HMEC-1 zaobserwowano istotne spadki wszystkich analizowanych parametrów opisujących wytworzone struktury pod wpływem inkubacji z każdym z inhibitorów (*Rysunek V.13A'*). Natomiast w HUVEC istotny statystycznie efekt zaobserwowano tylko dla BBCLA i CLA (*Rysunek V.13B'*). Wskazuje to, że inhibitory te istotnie wykazują potencjał do działania antyangiogennego, hamując migrację i obniżając zdolność ECs do formowania struktur pseudokapilarnych, procesów istotnych w angiogenezie *in vivo*, a efekty te widoczne są zwłaszcza w komórkach HMEC-1.

W celu dalszej weryfikacji i przedstawienia molekularnych podstaw dla opisanych wyżej wyników, przeprowadzono analizę profilu wydzielniczo-transkrypcyjnego istotnych regulatorów angiogenezy. Ich poziomy w HMEC-1 po 16 godz. inkubacji z inhibitorami PADs oceniano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu membran dot-blot – Angiogenesis Profiler (R&D Systems) (*Rysunek V.14*). W kontekście regulacji angiogenezy wykryto spadek wydzielania jednego z głównych jej regulatorów – VEGFA, efekt ten zaobserwowano dla każdego z inhibitorów (*Rysunek V.15*) jednak ponownie był on najbardziej nasilony w przypadku BBCLA (*Rysunek V.15A*). Podobny spadek zanotowano w przypadku VEGFC. Z wykorzystaniem qPCR analizowano względny poziom zarówno mRNA dla VEGFA i VEGFC, istotnie statystycznie (**p* < 0,05) obniżenie ekspresji zaobserwowano jednak

wyłącznie w HMEC-1 traktowanych BBCLA lub CLA (*Rysunek V.17*). Co istotne, w literaturze znaleźć można doniesienie wskazujące, że specyficzne wyciszenie PAD4 w ludzkich liniach erytroleukemii (HEL lub K562) z wykorzystaniem shRNA skutkowało spadkiem ekspresji *VEGFA* [278]. Zanotowano wzrost ekspresji genu *PEDF* (*Rysunek V.17*) oraz wydzielania PEDF (SERPIN F1) (*Rysunek V.16*), opisywanego w literaturze jako silnego inhibitora angiogenezy [216, 279, 280]. Wszystkie inhibitory zmniejszyły także poziom wydzielanego uPA, istotnego w regulacji homeostazy oraz proteolitycznej degradacji ECM (*Rysunek V.16*), podobnie zaobserwowano spadek wydzielania PSPN (*Rysunek V.16*). Zaobserwowano także spadek wydzielania TSP2 oraz VASH, przedstawianych w literaturze jako inhibitory angiogenezy (*Rysunek V.16*) [281, 282].

Na poziomie transkryptu wykazano także istotne statystycznie obniżenie ekspresji *ET-1*, *IL6*, *IL8*, *CCL2* i *VIM* w HMEC-1 traktowanych BBCLA i CLA (*Rysunek V.17*), czynniki kodowe przez te geny wśród szeregu pełnionych funkcji przedstawiane są także jako proangiogenne [251, 283, 284, 285, 286]. Jednak, potraktowanie HMEC-1 inhibitorem FA spowodowało wzrost ekspresji *IL8*, *CCL2* i *VIM* (*Rysunek V.17*). Wyjaśnieniem tego zjawiska może być niespecyficzne działanie inhibitora, który zgodnie z przeprowadzonymi analizami okazał się także być najłagodniejszym inhibitorem PADs w komórkach śródbłonna (*Rysunek V.3*). W HMEC-1 traktowanych BBCLA lub FA wykryto podwyższoną ekspresję genu *TIMP1* (*Rysunek V.17*), kodującego silny inhibitor MMPs [287], co dodatkowo wyjaśniać może obniżoną zdolność formowania struktur kapilarnych przez te komórki. Analizowano także ekspresję pro-angiogennych *IGFBP2* i *IGFBP3*, w przypadku pierwszego z genów istotne podwyższenie jego poziomu zaobserwowano w komórkach traktowanych BBCLA lub CLA, natomiast *IGFBP3* w komórkach traktowanych FA (*Rysunek V.17*).

W kontekście regulacji angiogenezy, najważniejsze wydają się być zaobserwowane zmiany w ekspresji i wydzielaniu *VEGFA* oraz *PEDF*, które pośrednio lub bezpośrednio odpowiadać mogą za obserwowane ogólne obniżenie potencjału angiogenego komórek śródbłonna. Należy jednak mieć na uwadze, że spektrum substratowe PADs, zwłaszcza w ECs, nie jest jeszcze dobrze poznane, stąd PADs mogą regulować ten proces z kilku poziomów, w tym cytrulinacji histonów. Wspomnieć należy także o potencjalnych działaniach niespecyficznych stosowanych inhibitorów i konieczności dalszej weryfikacji tych wyników w oparciu o inne modele.

W regulacji funkcji ECs istotny udział bierze szereg szlaków sygnałowych. W niniejszej rozprawie skupiono się na analizie poziomów wybranych parametrów szlaku PI3K/Akt. Istotna rola tego szlaku w modulacji metabolizmu komórek śródbłonna jest szeroko opisana w literaturze, odpowiada między innymi za regulację proliferacji, migracji, syntezy białek, metabolizm glukozy i angiogenezy [288]. Zwłaszcza w przypadku angiogenezy szeroko opisano także zależności pomiędzy poziomem *VEGFA* a aktywnością kinazy Akt [289]. Wzięto również pod uwagę wspomiane wcześniej zaangażowanie PADs w regulację szlaku PI3K/Akt (*I. Wstęp teoretyczny, Rozdział 1.4*). Analiza WB poziomów nieaktywnej Akt i aktywnej formy ph-Akt (S473), wyraźnie wskazała na istotnie obniżony poziom formy aktywnej tej kinazy po zahamowaniu aktywności PADs (*Rysunek V.18*). Efekt ten widoczny był przy każdym

z zastosowanych inhibitorów ($p^{***}<0,0001$ dla BBCLA i CLA, $p^{*}<0,05$ dla FA). W literaturze podobny efekt zaobserwowano we wspomnianej już linii Y79, gdzie BBCLA również obniżyła poziom ph-Akt [123]. Podobny efekt stwierdzono także w przypadku wyciszenia PAD4 w HMEC-1, co opisano dokładniej w jednym z kolejnych paragrafów. Obniżenie aktywacji kinazy Akt uzupełnia i wyjaśnia opisane wyżej antyangiogenne efekty zahamowania cytrulinacji w ECs. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian w poziomie PI3K, a poziom GSK3B istotnie zwiększyła wyłącznie inkubacja z FA (*Rysunek V.18*).

Zarówno fizjologiczna, jak i patologiczna angiogeneza jest zazwyczaj wynikiem wzrostu zapotrzebowania na tlen i składniki odżywcze. Prowadzi to do wzrastającego niedotlenienia tkanek i sprzyja produkcji RFT [290], które historycznie postrzegane były głównie przez pryzmat ich negatywnego wpływu na funkcje komórek. Późniejsze badania dowiodły, że RFT są także istotnymi cząsteczkami sygnałowymi [291], zwłaszcza z poziomu homeostazy oksydacyjno-antyoksydacyjnej. Również w regulacji angiogenezy i innych funkcji komórek śródbłonna RFT działają jak miecz obusieczny, ich wysokie stężenia są szkodliwe, natomiast niskie ilości niektórych rodników biorą udział w szlakach sygnałowych m.in. promując proliferację komórek [292]. RFT mogą stymulować angiogenezę bezpośrednio lub pośrednio, co ma miejsce na przykład w przypadku patologicznej angiogenezy w miażdżycy [290]. Również poziom jednego z głównych regulatorów angiogenezy – VEGFA zależny jest od wystąpienia warunków hipoksji [293]. Wobec prezentowanych w tej rozprawie badań warto także wspomnieć o coraz szerzej badanym wpływie RFT na aktywność szlaku PI3K/Akt [294]. Biorąc pod uwagę powyższe, zbadano konsekwencje zahamowania aktywności PADs na wybrane aspekty homeostazy redoks. Z wykorzystaniem testu wychwyty czerwieni obojętnej analizowano wpływ preinkubacji komórek HMEC-1 z inhibitorami PADs na przeżywalność komórek HMEC-1 poddanych następnie działaniu $10\ \mu\text{M}$ t-BOOH lub $150\ \mu\text{M}$ H_2O_2 (*Rysunek V.19*). Każdy z testowanych inhibitorów PADs istotnie statystycznie ($*p<0,05$) zwiększył przeżywalność komórek traktowanych H_2O_2 (*Rysunek V.19B*). W przypadku t-BOOH, istotny efekt cytoprotekcyjny wykryto wyłącznie w przypadku preinkubacji z BBCLA (*Rysunek V.19A*). Wskazuje to, że odpowiedź komórek HMEC-1 preinkubowanych z inhibitorami PADs zależna jest od rodzaju czynnika wywołującego stres oksydacyjny. Molekularne efekty t-BOOH, w porównaniu z H_2O_2 mogą być o wiele bardziej destrukcyjne dla komórek [295]. Inkubacja HMEC-1 z t-BOOH prowadziła także do silnego wzrostu produkcji RFT, który ulega istotnemu zmniejszeniu ($**p<0,001$ dla BBCLA i FA, $*p<0,05$ dla CLA) w przypadku wcześniejszego zahamowania aktywności PADs (*Rysunek V.20A*). Jednak co zastanawiające, inkubacja wyłącznie z inhibitorami PADs, bez indukcji stresu oksydacyjnego, nie ma istotnego wpływu na poziom RFT (*Rysunek V.20A*). Każdy z zastosowanych inhibitorów istotnie statystycznie ($*p<0,05$) zwiększył poziom mRNA *Nrf2* (*Rysunek V.20B*), jednego z ważnych czynników transkrypcyjnych regulującego ekspresję genów odpowiedzialnych za potencjał antyoksydacyjny komórki [296]. Efekt aktywacji szlaku *Nrf2*/HO-1 zaobserwowano także w przypadku zahamowania aktywności PADs w fibroblastach serca [297]. Dodatkowo inhibicja cytrulinacji w HMEC-1 skutkowała także zwiększeniem ekspresji reduktazy

tiorredoksyny 1 (*TXNRD1*) (*Rysunek V.20B*), która również wiązana jest ze wzrostem potencjału antyoksydacyjnego [298]. Może to częściowo wyjaśniać zarówno zwiększoną przeżywalność i obniżoną produkcję RFT w komórkach HMEC-1 preinkubowanych z inhibitorami PADs w warunkach stresu oksydacyjnego, wywołanego t-BOOH lub H₂O₂. Jednak w aspekcie regulacji angiogenezy zauważyć należy, że Nrf2 jest w literaturze opisywany jako jej pozytywny regulator [296]. Z wykorzystaniem metod *in silico* wykonano dokowanie struktur badanych inhibitorów do DNA, spośród nich największą zdolność do interakcji z DNA wykazała BBCLA (*Rysunek V.21*). Biorąc pod uwagę tę analizę wykonano test kometowy, który wykazał, że badane inhibitory nie tylko nie wywołują uszkodzeń DNA w HMEC-1, ale działają protekcyjnie wobec uszkodzeń indukowanych H₂O₂ (*Rysunek V.22*). Efekt każdego z inhibitorów był zbliżony, stanowi to dodatkowe podłoże dla opisanego wcześniej cytoprotekcyjnego działania związków przed działaniem H₂O₂ (*Rysunek V.19B*). Dodatkowo w komórkach HMEC-1 traktowanych BBCLA i CLA oceniano profil i podstawowe parametry oddychania mitochondrialnego (*Rysunek V.23* i *Rysunek V.24*). W analizach tych nie wykryto żadnych istotnych zmian, co pozostaje w zgodzie również z obserwowanym brakiem zmian w poziomie RFT (*Rysunek V.20A*). Postulować więc można, że zahamowanie aktywności PADs w komórkach HMEC-1 indukuje mechanizmy obronne przeciwko stresowi oksydacyjnemu, co może być też istotne w ogólnym antyangiogenym działaniu tych związków.

Wybrane efekty antyangiogenne inhibitorów PADs weryfikowano w oparciu o przygotowane komórki HMEC-1 PAD4 KD. Uzyskano obniżenie poziomu PAD4 do około 40% kontroli zarówno na poziomie białka (*Rysunek V.28A*), jak i transkryptu (*Rysunek V.28B*). Specyficzne wyciszenie izoformy PAD4 i istotny statystycznie (**p* < 0,001) obniżony poziom p-Akt, wyraźnie wskazuje na bezpośrednią rolę PAD4 w regulacji szlaku PI3K/Akt (*Rysunek V.28A*). Wyniki te pozostają w zgodzie zarówno z dostępnymi w literaturze danymi [94, 95, 123], jak i wynikami uzyskanymi w przypadku zastosowania inhibitorów PADs (*Rysunek V.18*). Analizowana tutaj fosforylacja kinazy Akt w pozycji S473, określana jest jako główny aktywator tej kinazy [13]. Za jej przeprowadzanie odpowiedzialny jest kompleks mTORC2 [299]. Tym samym biorąc pod uwagę brak spadku w poziomie PI3K w modelu farmakologicznym, zasadne wydaje się zbadanie w przyszłości poziomu i aktywności mTORC2 w komórkach śródbłonna z wyciszonym PAD4. W literaturze wskazano na potencjalną rolę PAD4 w regulacji ekspresji *SESN2* i *DDIT4*, będących negatywnymi regulatorami aktywacji mTORC1 [300]. Być może podobne zjawisko ma miejsce w przypadku aktywacji mTORC2 a tym samym fosforylacji S473 Akt w przedstawionym modelu śródbłonkowym. Potencjalna korelacja pomiędzy aktywnością PAD4 a fosforylacją Akt, ma duże implikacje nie tylko w kontekście potencjału angiogenego komórek śródbłonna, ale także jego pozostałych funkcji. Z klinicznego poziomu, deregulacja szlaku PI3K/Akt obserwowana jest w przypadku niektórych CVDs, w tym miażdżycy [301, 302].

Podobnie jak w modelu farmakologicznym, wyciszenie PAD4 spowodowało istotny wzrost ekspresji genów kodujących białka z rodziny SERPIN: *PEDF* i *PAI-1* (*Rysunek V.28B*), co wskazuje na rolę PAD4 również w regulacji hemostazy. Jednak, w komórkach HMEC-1 PAD4 KD nie zanotowano

istotnych zmian w poziomie ekspresji VEGFA (*Rysunek V.28B*). Sugeruje to, że obserwowane obniżenie wydzielania i ekspresji tego czynnika w modelu farmakologicznym (*Rysunek V.15* i *Rysunek V.17*) może być wynikiem aktywności innych izoform niż PAD4, w tym PAD2. Natomiast, podobnie jak w modelu farmakologicznym, wyciszenie PAD4 istotnie obniżyło zdolność HMEC-1 do formowania struktur pseudokapilarnych (*Rysunek V.29* i *Rysunek V.13*), potwierdza to zaangażowanie PAD4 w regulację tego procesu. W przyszłości planowane jest przeprowadzenie podobnych analiz na komórkach ze specyficzną wyciszoną ekspresją PAD2. Pozwoli to określić czy obserwowane spadki w ekspresji i wydzielaniu VEGFA związane są bezpośrednio z aktywnością PADs.

Potwierdzono zaangażowanie PADs i specyficznie PAD4, a tym samym cytrulinacji w regulację wybranych funkcji komórek śródbłonna. Przeprowadzone analizy jednoznacznie wskazują, że aktywność PADs istotna jest w aktywacji kinazy Akt, a tym samym efektów szlaku PI3K/Akt. Dodatkowo stwierdzono, że zahamowanie cytrulinacji znacznie modyfikuje profil transkrypcyjno-wydzielniczy HMEC-1, skutkując obniżeniem potencjału angiogennej komórek. Efekty te zaobserwowano w testach funkcjonalnych, także w przypadku pierwotnych komórek HUVEC. W analizowanym modelu farmakologicznym, potencjał inhibitorowy związków oceniano względem histonu H3, należy jednak mieć na uwadze fakt, że cytrulinacja zachodzić może na wielu innych białkach. Niedawne badanie proteomiczne wskazało wiele nowych potencjalnych celów dla PAD4 [257]. Stąd obserwowane efekty mogą nie być bezpośrednio powiązane z cytrulinacją histonów, a być wynikiem zahamowania cytrulinacji innych białek, o których wspomniano na wstępie dyskusji. Wśród innych znanych substratów PADs istotnych z poziomu regulacji angiogenezy wymienić należy także SERPINs w tym, antytrombinę i PAI-1, których aktywność jest obniżana przez cytrulinację [104]. Jak już wspomniano białka te są także istotne w regulacji angiogenezy. Dodatkowo badania z września 2024, istotne w obliczu przedstawianych tutaj analiz wskazują, że cytrulinacja czynnika H11- α , istotnego w regulacji m.in. ekspresji VEGFA, zwiększa jego stabilność [303]. W literaturze dostępne jest także badanie wykonane na modelu mysim wskazujące zaangażowanie PAD2 w regulację angiogenezy [304]. Li i wsp. w swoim badaniu z 2022 roku proponują także rolę PAD2 w aktywacji szlaku EGFR i promowaniu angiogenezy w gruczolaku płuc [305]. Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki pozostają w zgodzie z dostępnymi danymi literaturowymi, konieczne są jednak dalsze badania. Dodatkowo, wciąż rosnąca pula znanych substratów PADs pozwoli także bezpośrednio ocenić rolę modyfikacji konkretnego białka w regulacji metabolizmu komórek śródbłonna.

Wpływ zahamowania cytrulinacji na wybrane parametry epigenomu komórek śródbłonna analizowano z poziomu modyfikacji histonów. Zdecydowano się zbadać potencjalne pośrednie interakcje cytrulinacji z acetylacją, a także zależności pomiędzy cytrulinacją a metylacją. Istotne z punktu widzenia niniejszej rozprawy doniesienia literaturowe na ten temat przedstawiono we wstępie teoretycznym (*Wstęp Teoretyczny, Rozdział 2.2.*). Dodatkowo, w odróżnieniu od cytrulinacji histonów zarówno wpływ acetylacji, jak i metylacji histonów na regulację funkcji komórek śródbłonna został szeroko zbadany i opisany w literaturze [306, 307].

W komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs nie zarejestrowano istotnych statystycznie zmian w poziomie H3ac i H3K9/14ac (*Rysunek V.30A i A'*). Natomiast, na poziomie transkrypcyjnym każdy ze stosowanych inhibitorów istotnie statystycznie ($*p < 0,05$) zwiększył ekspresję *HDAC3* i *HDAC5* (*Rysunek V.30*). W przypadku komórek z wyciszoną ekspresją *PAD4*, istotny statystycznie ($*p < 0,05$) efekt widoczny był jedynie dla *HDAC3* (*Rysunek V.30*). Należy także zauważyć, że obie wspomniane izoformy HDACs przedstawiane są w literaturze jako negatywne regulatory angiogenezy [239, 240], co dodatkowo uzupełniać może obraz ogólnego antyangiogenego działania inhibitorów i wyciszenia *PAD4*. Inkubacja z BBCLA dodatkowo istotnie obniżyła ekspresję *p300*, jednak podobnego efektu nie stwierdzono w przypadku pozostałych inhibitorów, co sugerować może że nie jest to bezpośrednio efekt zahamowania PADs. Następnie, analizując wpływ zahamowania aktywności HDACs, z wykorzystaniem inhibitora SAHA, zarejestrowano istotny spadek poziomu H3cit w HMEC-1 (*Rysunek V.31C*). W celu wyjaśnienia tej obserwacji oceniono poziom *PAD2* i *PAD4* w komórkach traktowanych 20 μ M SAHA (*Rysunek V.31B*), nie wykryto jednak istotnych statystycznie zmian. Uzyskane wyniki wskazywać mogą tym samym na istnienie potencjalnej pośredniej interakcji pomiędzy aktywnością PADs a HDACs w komórkach śródbłonna. Podobne wyniki uzyskał w roku 2014 roku zespół Li i wsp. w komórkach promieloblastycznych HL-60, gdzie SAHA w stężeniu 10 μ M efektywnie hamował wprowadzanie H3cit [308]. Tym samym, prezentowane tutaj wyniki potwierdzają, że podobne interakcje zachodzić mogą również w komórkach śródbłonna. W literaturze opisano także współpracę *HDAC2* z *PAD4*, które wspólnie regulują ekspresję genów zależnych od p53 [309]. Zaznaczyć należy także, że zahamowanie HATs nie wywarło istotnego efektu na cytrulinację (*Rysunek V.31*), w literaturze również brak obecnie doniesień na ten temat.

Analizy potencjalnych interakcji cytrulinacji z metylacją rozpoczęto z poziomu metylotransferazy SET7/9, której aktywność w literaturze wiązana jest z regulacją m.in. proliferacji i angiogenezy [45], a w komórkach śródbłonna także z odpowiedzią na hiperglikemię [310]. Nie wykryto istotnego wpływu farmakologicznej inhibicji PADs na poziom SET7/9 (*Rysunek V.32A*). W modelu wyciszenia *PAD4* natomiast zarejestrowano istotny wzrost ekspresji genu kodującego ten enzym (*Rysunek V.32B*). Ta rozbieżność wynikać może z potencjalnych niespecyficznych efektów wyciszenia lub też niedostatecznego zahamowania aktywności PADs w modelu farmakologicznym. W dalszych analizach wykorzystano komórki HMEC-1 SET7/9 KD, w których wykryto istotne obniżenie *PAD2* i *PAD4* zarówno na poziomie białka, jak i transkryptu (*Rysunek V.33*), w pewnym sensie wyjaśniające istotne obniżenie w poziomach wprowadzanych przez nie modyfikacji H3cit i H4R2cit (*Rysunek V.34*). Wyniki te sugerują, że metylotransferaza SET7/9 może regulować poziom *PAD2* i *PAD4* w komórkach śródbłonna. W literaturze brak obecnie doniesień na ten temat. Z prezentowanych tutaj danych trudno jednakże jednoznacznie ustalić, czy interakcja ta ma formę bezpośredniej regulacji ekspresji PADs.

W kolejnych analizach skupiono się na istotnych z punktu widzenia komórek śródbłonna enzymach zawiadujących metylacją histonów: G9a i LSD1. Ostatnie badania wykazały, że zahamowanie aktywności G9a, zarówno farmakologiczne, jak i poprzez wyciszenie, hamuje proliferację HMEC-1

a także moduluje ekspresję genów związanych z progresją cyklu komórkowego [244]. Podobne badania przeprowadzone na komórkach HMEC-1 z wyciszeniem LSD1, potwierdziły zaangażowanie tego enzymu w regulację między innymi śródbłonkowej odpowiedzi zapalnej [311]. Oba enzymy opisano także krótko we wstępie teoretycznym. Farmakologiczna inhibicja PADs nie miała istotnego wpływu na poziomy LSD1 i G9a w HMEC-1 (*Rysunek V.35A*). Jednak w przypadku komórek HMEC-1 PAD4 KD zaobserwowano wzrost ekspresji *LSD1* na poziomie transkryptu (*Rysunek V.35B*), co jak w przypadku zwiększonej ekspresji SET7/9 wymaga dalszych badań, w celu identyfikacji mechanizmu interakcji.

W aspekcie potencjalnych pośrednich oddziaływań pomiędzy cytrulinacją a statusem metylacji konkretnych lizyn ogona histonowego H3 skupiono się na poziomie H3K9me3 i H3K27me3 (*Rysunek V.36A*). Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe (zebrane na *Rysunku I.14*), spodziewano się istotnych zmian w poziomie metylacji tych dwóch lizyn. Jednak w badanym układzie badawczym nie wykryto żadnych istotnych zmian (*Rysunek V.36A*). Natomiast, podobnie jak w przypadku wyciszenia SET7/9, zaobserwowano spadek cytrulinacji H3 zarówno w komórkach HMEC-1 G9a KD i HMEC-1 LSD1 KD (*Rysunek V.36B*). Jest to zaskakujące biorąc pod uwagę przeciwną funkcję w regulacji metylacji histonów tych enzymów. Tym samym uzyskane wyniki wskazują na zasadność przeprowadzenia dalszych analiz, zwłaszcza biorąc pod uwagę opisany wcześniej związek pomiędzy aktywnością SET7/9 a poziomem PAD2 i PAD4. Jednak zweryfikować należy także poziom wybranych modyfikacji histonów, a zwłaszcza H3K9me3 i H3K27me3 w komórkach HMEC-1 PAD4 KD, co planowane jest w przyszłości.

W celu przeprowadzenia wstępnej oceny ogólnego statusu chromatyny analizowano poziomy białek: CAF1A i izoform HP1 w HMEC-1 traktowanych inhibitorami przez 16 godz. (*Rysunek V.37A*). Istotną rolę cytrulinacji histonów w regulacji struktury chromatyny zauważyć można zwłaszcza podczas formowania NETs. W komórkach HMEC-1 istotny statystycznie efekt, zwiększenie poziomu CAF1A ($p < 0,05$), zaobserwowano wyłącznie w przypadku komórek traktowanych BBCLA lub CLA (*Rysunek V.37A*). Kompleks CAF1A odpowiedzialny jest za upakowanie chromatyny oraz uczestniczy w naprawie DNA [312]. Zwiększony poziom CAF1A może więc także wyjaśniać opisany wcześniej cytoprotekcyjny efekt inhibitorów PADs przed uszkodzeniami wywoływanymi przez H_2O_2 (*Rysunek V.22*). Brak zmian w poziomach izoform HP1 (*Rysunek V.37A*) sugeruje, że zahamowanie wyłącznie cytrulinacji histonów nie jest wystarczające dla zaindukowania zmiany konformacji przestrzennej chromatyny, lub też wywołane spadki w cytrulinacji nie są wystarczające. Wykryto natomiast zwiększenie ekspresji genu *CBX5* (*Rysunek V.37B*), kodującego izoformę HP1 α , należy jednak ponownie pamiętać, że nie zawsze zwiększenie poziomu mRNA równe jest zwiększonej ilości funkcjonalnego białka. Wspomnieć należy także o bezpośrednim wpływie cytrulinacji na aktywność i stabilność białek HP1 [187]. W wyniku inkubacji z BBCLA zmniejszeniu uległa ekspresja *DNMT1*, w literaturze brak dotychczas jakichkolwiek doniesień wskazujących na związek pomiędzy metylacją DNA a cytrulinacją, w tym cytrulinacją histonów. Dodatkowo, ponieważ efekt ten zaobserwowano wyłącznie dla jednego inhibitora, nie wykluczone, że może to być wynik działania niespecyficznego.

Przedyskutowane wyżej wyniki, przedstawiające wpływ zahamowania cytrulinacji na wybrane parametry epigenomu komórek śródbłónka wskazują na potrzebę przeprowadzenia dalszych dogłębnych analiz. Zwłaszcza w zakresie pośrednich interakcji PADs z HDACs oraz SET7/9. Z dostępnych wyników nie można również wnioskować o wpływie samej cytrulinacji oraz potencjalnych pośrednich interakcji z innymi PTMs histonów na profil ekspresji genów.

Podsumowując, w literaturze cytrulinacja przedstawiana jest głównie w kontekście immunologicznym. Jednak niniejsza rozprawa wskazuje, że cytrulinacja pełnić może również rolę w innych ważnych fizjologicznie procesach, w tym w komórkach śródbłónka, których prawidłowe funkcjonowanie istotne jest w utrzymaniu homeostazy całego organizmu człowieka.

VII. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, całość przedstawionych wyników wyraźnie wskazuje na istotną rolę PADs i cytrulinacji w regulacji funkcji komórek śródbłónka, zwłaszcza w kontekście potencjału angiogenego. Zaobserwowano spadek zdolności migracyjnych, tworzenia struktur pseudokapilarnych oraz modulację profilu transkrypcyjno – wydzielniczego komórek, w tym obniżenie wydzielania/ekspresji VEGFA i zwiększenie PEDF. Molekularne podłoże opisanych efektów stanowić może obniżenie aktywacji szlaku PI3K/Akt na poziomie kinazy Akt, co stwierdzono zarówno w modelu farmakologicznym i wyciszenia ekspresji *PAD4*. Dodatkowo wykazano potencjalne protekcyjne działanie badanych inhibitorów wobec stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano także modyfikację wybranych parametrów epigenomu. Wykazano potencjalną pośrednią interakcję na linii PADs <=> HDACs oraz SET7/9 <=> PADs.

Wnioski z przeprowadzonych badań:

1. *Farmakologiczna inhibicja PADs obniża ogólny potencjał angiogeny komórek śródbłónka, m.in. hamując aktywację szlaku PI3K/Akt na poziomie aktywacji kinazy Akt i zwiększając ekspresję i wydzielanie czynników anty-angiogeny przy równoczesnym obniżeniu wydzielania VEGFA.*
2. *Wyciszenie ekspresji PAD4 z wykorzystaniem shRNA wywołuje efekty zbliżone do modelu farmakologicznego, wskazując na zaangażowanie izoformy PAD4 w kształtowanie potencjału angiogenego komórek HMEC-1.*
3. *W komórkach HMEC-1 potwierdzono istnienie potencjalnych pośrednich interakcji na linii PADs <=> HDACs oraz SET7/9 <=> PADs.*

W toku przeprowadzonych badań udało się tym samym potwierdzić postawioną hipotezę badawczą:

Aktywność PADs i cytrulinacja białek odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji komórek śródbłónka.

Uwagi końcowe i przyszłe kierunki badań

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy poszerzają obecny stan wiedzy na temat roli cytrulinacji białek o dotychczas niezbadany obszar regulacji metabolizmu komórek śródbłonka. Jednak, mogą być również cenne z punktu widzenia innych obszarów badawczych, a zwłaszcza roli cytrulinacji w regulacji angiogenezy i procesie nowotworzenia. Być może dalsze badania pozwolą stwierdzić czy cytrulinacja, a zwłaszcza aktywność PAD4, podobnie jak chociażby acetylacja histonów, stanowić może potencjalny cel terapeutyczny. Obecnie duży nacisk kładziony jest na rolę PADs i cytrulinację w chorobach autoimmunologicznych, co wydaje się jak najbardziej słusznym podejściem, jak pokazują liczne doniesienia cytrulinacja i aktywność PADs przyczynia się zarówno do patogenez, jak i do progresji tych schorzeń. Niemniej jednak niniejsza rozprawa pokazuje, że istotne jest badanie cytrulinacji białek również w kontekście innych procesów.

W trakcie analizy przedstawionych wyników nasuwają się sugestie i wnioski, na temat tego co dopełniłoby prezentowane badania. Szczególnie w aspekcie modelu transkrypcyjnego wyciszenia PAD4 niezwykle zasadne wydaje się wykonanie profilowania ekspresji genów w oparciu o techniki NGS, a mianowicie RNA-seq. Analiza ta zapewniłaby szerszy obraz tego jak PAD4 przyczynia się do regulacji genów, nie tylko pod względem regulacji angiogenezy, na której skupiono się w niniejszej pracy, ale także innych procesów. Profilowanie mogłoby także zasugerować przyszłe kierunki badań.

Z punktu widzenia genów, których zmieniona ekspresja zaobserwowana została zarówno w modelu farmakologicznym i transkrypcyjnym, warto byłoby przeprowadzić analizy ChIP i zidentyfikować czy cytrulinacja histonów obecna jest w promotorach czy też ciałach tych genów. W podobnym zakresie i pod względem potencjalnych interakcji cytrulinacji i innym modyfikacji histonów kluczowe byłoby sprawdzenie kolokalizacji cytrulinacji i metylacji/acetylacji w obrębie wybranych genów. Warto również rozważyć czy proces cytrulinacji może być odwrócony, co obecnie wydaje się niemożliwe, jednak podobnie sądzono w przypadku dobrze opisanej obecnie metylacji białek.

Ponadto, realizacja rozprawy doktorskiej nasunęła pytania o rolę cytrulinacji i aktywności PAD4 w regulacji innych istotnych funkcji komórek śródbłonka. Zwłaszcza, stwierdzona zarówno w modelu farmakologicznym, jak i przy wyciszeniu PAD4 modyfikacja ekspresji SERPIN (PAI-1, PEDF) sugeruje, że cytrulinacja poza opisywanym tutaj zaangażowaniem w angiogenezę uczestniczyć może także w regulacji funkcji hemostatycznych komórek śródbłonka. Część wyników uzyskanych w toku realizacji niniejszej rozprawy posłużyła jako badania wstępne we wniosku grantowym w konkursie NCN PRELUDIUM 23, który został zakwalifikowany do finansowania (tytuł projektu: *Zmiany w profilu cytrulinacji białek oraz w strukturze chromatyny indukowane aktywnością deiminaz peptydylo-argininowych i ich konsekwencje dla hemostatycznych funkcji komórek śródbłonka*; Nr DEC-2024/53/N/NZ3/02799, kierownik: mgr Oskar Ciesielski). Realizacja tego projektu być może pozwoli na uzyskanie dalszych wyjaśnień odnośnie znaczenia cytrulinacji dla metabolizmu..

Streszczenie w języku polskim

W literaturze szeroko opisano rolę dobrze poznanych potranslacyjnych modyfikacji białek, takich jak choćby fosforylacja czy też metylacja w regulacji metabolizmu komórkowego. Jedną ze słabiej opisanych modyfikacji, również w tym zakresie, jest cytrulinacja białek. Modyfikacja ta, nazywana również deiminacją, polega na konwersji peptydyloargininy do peptydylocytruliny. Ma to istotne konsekwencje molekularne dla modyfikowanych białek, może zmieniać ich ładunek co wpływa na interakcję z innymi białkami, a także modyfikować miejsca aktywne hamując działanie enzymów. Modyfikacja ta przeprowadzana jest przez enzymy z rodziny deiminaz peptydyloargininowych (PADs). Wyróżnia się pięć izoform PADs, z których najszerzej zbadane zostały PAD2 i PAD4. Izoformy te jako jedyne zdolne są także do przeprowadzania cytrulinacji histonów, co sugeruje ich zaangażowanie w epigenetyczną regulację ekspresji genów. Jednak, fizjologiczne role tej modyfikacji są obecnie wciąż słabo poznane. Dotychczasowe doniesienia skupiają się zazwyczaj na wpływie cytrulinacji i wzmożonej aktywności PADs na występowanie chorób autoimmunologicznych. Dostępne są również badania wskazujące na zaangażowanie PADs w rozwój chorób nowotworowych.

W niniejszej pracy jako główny model badawczy wykorzystano ludzkie komórki śródbłónka naczyń. Zarówno immortalizowaną linię ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego (HMEC-1) jak i pierwotne komórki śródbłónka izolowane z żyły pępowinowej (HUVEC). W organizmie człowieka komórki śródbłónka, poza pełnieniem roli bariery między krążącą krwią a tkankami pełnią także wiele istotnych funkcji regulatorowych. Odpowiedzialne są między innymi za regulację przepływu krwi, jej ciśnienia oraz procesów krzepnięcia i fibrylizacji. Jedną z istotnych funkcji komórek śródbłónka jest także regulacja procesu angiogenezy, tworzenia nowych naczyń krwionośnych z już istniejących. Proces ten jest niezwykle istotny w procesach fizjologicznych m.in. w procesie gojenia ran, ale także w stanach patologicznych. Zwłaszcza w kontekście nowotworów patologiczna angiogeneza ma niezwykle istotne znaczenie, umożliwia dostarczanie tlenu i substancji odżywczych do guza powodując rozwój nowotworu, a także w późniejszych etapach umożliwiać może powstawanie przerzutów. W komórkach śródbłónka angiogeneza regulowana jest przez wiele mechanizmów, w tym epigenetycznych. Zahamowanie patologicznej angiogenezy stanowi obecnie atrakcyjną metodę terapii chorób nowotworowych, z tego powodu wciąż poszukuje się nowych mechanizmów które regulują ten proces. Dotychczas szeroko opisano wpływ dobrze poznanych modyfikacji białek w modulowaniu funkcji komórek śródbłónka, jednak w kontekście procesu cytrulinacji brak obecnie jakichkolwiek jednoznacznych informacji.

Zbadano wpływ zahamowania aktywności PADs a tym samym cytrulinacji białek, w tym histonów, na wybrane funkcje i parametry epigenomu komórek śródbłónka. W tym celu wykorzystano dwie metody zahamowania aktywności PADs: (i) model farmakologiczny z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych inhibitorów, (ii) model transkrypcyjny, tj. wyciszenie genu *PAD4* przez shRNA. W modelu farmakologicznym wykorzystano trzy komercyjne inhibitory PADs: BB-Cl-amidynę (BBCLA),

Cl-amidynę (CLA) i F-amidynę (FA). Wyciszenie ekspresji *PAD4* w komórkach HMEC-1 wykonano z wykorzystaniem shRNA dostarczanego do komórek poprzez transdukcję lentiwirusową.

Cytotoksyczność wybranych inhibitorów oceniano przy użyciu testu redukcji resazuryny. W pierwotnie badanym zakresie stężeń cytotoksyczne działanie w obu typach komórek śródbłónka zarejestrowano jedynie w przypadku BBCLA (w stężeniach $> 1,75 \mu\text{M}$). Wpływ inhibitorów na poziom cytrulinacji H3 w komórkach śródbłónka analizowano z wykorzystaniem techniki Western blotting. Spośród testowanych inhibitorów największy potencjał inhibitorowy względem wprowadzania cytrulinacji H3 w obu typach komórek śródbłónka była BBCLA, obniżając poziom tej modyfikacji do około 20% kontroli ($*p < 0,0001$). Żaden z zastosowanych inhibitorów PADs nie wywarł istotnych efektów na progresję cyklu komórkowego HMEC-1 ocenianą z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Istotnym modyfikacjom poddany został natomiast profil ekspresji wybranych cyklin, który analizowano z wykorzystaniem qPCR.

Efekty farmakologicznej inhibicji cytrulinacji na potencjał angiogeny komórek śródbłónka oceniano z wykorzystaniem wybranych testów funkcjonalnych oraz analizując profil wydzielniczo-transkrypcyjny. Zastosowanie każdego z inhibitorów spowodowało spadek zarówno zdolności migracyjnych, jak i potencjału do tworzenia struktur pseudokapilarnych. Zahamowanie aktywności PADs w HMEC-1 z wykorzystaniem BBCLA lub CLA istotnie zmniejszyło poziom wydzielanego NO^* (odpowiednio $*p < 0,001$ lub $*p < 0,05$). Dodatkowo, związek BBCLA jako jedyny istotnie statystycznie hamował całkowitą aktywność MMPs ($*p < 0,001$). Dodatkowo, każdy z inhibitorów zwiększył poziom ekspresji mRNA i wydzielania PEDF, silnego inhibitora angiogenezy. Zahamowanie aktywności PADs obniżyło także wydzielanie VEGFA, a w przypadku BBCLA i CLA zaobserwowano także spadek ekspresji genu kodującego ten czynnik. Farmakologiczne zahamowanie aktywności PADs w HMEC-1 skutkowało także cytoprotekcyjnym efektem przed działaniem H_2O_2 , dodatkowo istotnie statystycznie zmniejszając uszkodzenia DNA wywołane tym czynnikiem. Preinkubacja komórek HMEC-1 z inhibitorami zmniejszyła także poziom RFT produkowanych w warunkach stresu oksydacyjnego zaindukowanego t-BOOH ($*p < 0,001$). Na poziomie transkryptu zanotowano istotny wzrost ekspresji *Nrf2*, istotnego czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję genów związanych z potencjałem antyoksydacyjnym, co wyjaśniać może przedstawione wyżej efekty. Tym samym, wskazano także na zaangażowanie PADs w regulację wybranych parametrów homeostazy redoks. W celu wyjaśnienia molekularnego podłoża antyangiogenego efektu inhibitorów i zahamowania PADs w ECs badano poziomy wybranych elementów szlaku sygnałowego PI3K/Akt. Każdy z zastosowanych inhibitorów istotnie statystycznie obniżył poziom aktywnej formy kinazy Akt (pH-Akt S473) do około 40% kontroli ($p < 0,0001$ lub $*p < 0,05$), co wskazuje na zaangażowanie PADs w regulację szlaku PI3K/Akt, istotnego w kształtowaniu potencjału angiogenego komórek śródbłónka a także ich pozostałych funkcji. Tym samym, stwierdzić można, że aktywność PADs istotna jest w regulacji funkcji komórek śródbłónka, także w aspekcie ich potencjału angiogenego.

Komórki HMEC-1 PAD4 KD, przygotowano wykorzystując mechanizmy RNAi, a mianowicie shRNA. W tym modelu weryfikowano wybrane efekty zaobserwowane w przypadku modelu farmakologicznego. Stwierdzono podobny istotny statystycznie spadek w poziomie aktywnej formy kinazy Akt (pH-Akt S473) do około 40% kontroli ($p < 0,05$), co potwierdza zaangażowanie PADs i specyficznie PAD4 w regulację szlaku PI3K/Akt w komórkach HMEC-1. Potwierdzono także związek pomiędzy aktywnością PAD4, a ekspresją PEDF i PAI-1, dla których zanotowano istotnie statystycznie zwiększone poziomy mRNA ($*p < 0,05$ lub $*p < 0,001$). Nie zaobserwowano natomiast zmian w ekspresji VEGFA, co wskazuje, że zmiany wywołane przez BBCLA i CLA mogą być wynikiem ich działania niespecyficznego lub też zahamowania innych izoform PADs. Na poziomie funkcjonalnym, komórki HMEC-1 PAD4 KD miały istotnie obniżoną zdolność formowania struktur pseudokapilarnych, podobnie jak w modelu farmakologicznym. Powyższe potwierdza wnioski płynące z analiz modelu farmakologicznego i zaangażowanie PADs w regulację funkcji komórek śródbłonna, a szczególnie ich potencjału angiogenego.

Analizy wybranych parametrów epigenomu prowadzono z poziomu potencjalnych pośrednich interakcji pomiędzy aktywnością PADs/cytrulinacją a innymi PTMs histonów. W komórkach HMEC-1 wykazano potencjalną pośrednią interakcję na linii PADs – HDACs. Farmakologiczne zahamowanie aktywności PADs każdym z inhibitorów istotnie statystycznie zwiększyło ekspresję *HDAC3* i *HDAC5*, przy wyciszeniu PAD4 efekt ten zaobserwowano wyłącznie dla *HDAC3*. W kontekście poprzednich analiz wspomnieć należy, że izoformy te opisane są w literaturze jako negatywne regulatory angiogenezy. Zastosowanie inhibitora HDACs – SAHA, istotnie statystycznie ($p < 0,001$) zmniejszyło poziom cytrulinacji H3. Tym samym potwierdzono słuszność prowadzenia dalszych badań nad potencjalnymi pośrednimi lub bezpośrednimi interakcjami pomiędzy PADs a HDACs. W literaturze więcej informacji znaleźć można na temat potencjalnych interakcji cytrulinacji z metylacją histonów. W niniejszej pracy analizy te prowadzono z poziomu aktywności metylotransferazy SET7/9. Specyficzne wyciszenie jej ekspresji w komórkach HMEC-1, istotnie ($p < 0,05$) obniżyło zarówno ekspresję, poziom izoform PAD2 i PAD4, jak i cytrulinacji histonów. Podobny spadek w cytrulinacji H3 zaobserwowano w komórkach z wyciszeniem ekspresji LSD1 lub G9a. Wskazuje to na istnienie potencjalnej pośredniej interakcji pomiędzy aktywnością SET7/9, oraz LSD1 i G9a, a statusem cytrulinacji białek, w tym histonów. Farmakologiczna inhibicja PADs nie powodowała natomiast istotnych statystycznie zmian w poziomie zarówno SET7/9 jak i LSD1 i G9a. Jednak w komórkach HMEC-1 PAD4 KD, zanotowano zwiększoną ekspresję mRNA dla SET7/9 i LSD1. Inkubacja HMEC-1 z inhibitorami PADs nie powodowała także istotnych statystycznie zmian w poziomach H3K9me3 i H3K27me3, co biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe jest zaskakujące. Zahamowanie aktywności PADs nie miało istotnego efektu na strukturę chromatyny, którą analizowano pod względem poziomów izoform białka HP1, a istotne zwiększenie ($*p < 0,05$) CAF1A zanotowano wyłącznie w przypadku komórek traktowanych BBCLA lub CLA.

Podsumowując, przedstawione wyniki potwierdzają zaangażowanie PADs w kształtowanie funkcji komórek śródbłonna, zwłaszcza ich potencjału angiogenego. Aktywność PADs, w tym specyficznie PAD4, istotna jest w regulacji szlaku PI3K/Akt. Potwierdzono także istnienie potencjalnych pośrednich interakcji pomiędzy cytrulinacją, a innymi PTMs histonów w HMEC-1, zwłaszcza na poziomie PADs $\leftrightarrow$ HDACs i SET7/9 $\leftrightarrow$ PADs. Niniejsza rozprawa potwierdza także zasadność prowadzenia dalszych badań nad cytrulinacją białek. Zwłaszcza tych związanych z regulatorową funkcją tej modyfikacji, także poza aspektem stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej.

Abstract

The role of well-characterized post-translational protein modifications, such as phosphorylation or methylation, in regulating cellular metabolism is widely described. However, in this context, protein citrullination is one of the less studied modifications. Citrullination, also known as deimination, involves the conversion of peptidylarginine to peptidylcitrulline. The reaction has significant molecular consequences for modified proteins *via* altering their charge, which in turn impacts their interactions with other proteins or modifies the active sites, thereby inhibiting enzyme activity. Citrullination is catalyzed by enzymes from the peptidylarginine deiminase (PAD) family. To date five PAD isoforms are known, of which PAD2 and PAD4 have been most extensively studied. These isoforms are also the only ones capable of histone citrullination, suggesting their involvement in the epigenetic regulation of gene expression. However, the physiological roles of this modification remain poorly understood. Existing data largely focus on the influence of citrullination and increased PAD activity on autoimmune diseases. Recently there is also gathering evidence suggesting PADs involvement in the progression of cancer.

In the presented study, human endothelial cells were used as the primary research model. Including the immortalized human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) and primary endothelial cells isolated from the human umbilical vein (HUVEC). In the body, endothelial cells not only form a barrier between circulating blood and tissues but also perform many critical regulatory functions. These include regulating blood flow, blood pressure, coagulation, and fibrinolysis. One of the key functions of endothelial cells is the regulation of angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones. Angiogenesis is vital for not only for physiological processes, such as wound healing, but also plays a role in pathological conditions. In cancer, pathological angiogenesis is particularly significant as it supplies oxygen and nutrients to tumor, facilitating its growth and, in later stages, enabling metastasis. In endothelial cells, angiogenesis is regulated by numerous mechanisms, including epigenetics. Inhibiting pathological angiogenesis is currently an attractive strategy for cancer therapy, leading to ongoing research into novel mechanisms that regulate this process. While the role of well-studied protein modifications in modulating endothelial cell functions has been widely described, no conclusive information is currently available on the role of citrullination in this context.

This dissertation investigates the impact of inhibiting PAD activity, and thus citrullination of proteins, including histones, on selected functions and parameters of the epigenome of endothelial cells. Two methods were employed to inhibit PAD activity: (i) pharmacological approach using commercially available inhibitors, and (ii) a genetic silencing approach involving transcriptional silencing of the PAD4 gene. In the pharmacological model, three commercial PAD inhibitors were used: BB-CI-amidine (BBCLA), CI-amidine (CLA), and F-amidine (FA). PAD4 expression in HMEC-1 cells was silenced using shRNA delivered via lentiviral transduction.

The cytotoxicity of the selected inhibitors was analyzed using the resazurin reduction assay. Cytotoxic effects were observed only for BBCLA at concentrations $>1.75 \mu\text{M}$ in both endothelial cell

types. The effect of the inhibitors on H3 citrullination levels in endothelial cells was analyzed using Western blotting. BBCLA exhibited the highest inhibitory potential against H3 citrullination in both cell types, reducing this modification to approximately 20% of control levels (* $p < 0.0001$). None of the PAD inhibitors significantly altered the progression of the HMEC-1 cell cycle, as analyzed by flow cytometry. However, significant changes were observed in the expression profile of selected cyclins, which was analyzed using qPCR.

The effects of pharmacological inhibition of citrullination on the angiogenic potential of endothelial cells were assessed using functional assays and by analyzing secretory and transcriptional profiles. Each inhibitor reduced both the migratory capacity and pseudocapillary structure formation potential of endothelial cells. PAD activity inhibition in HMEC-1 cells with BBCLA or CLA significantly decreased NO• secretion (* $p < 0.001$ or * $p < 0.05$, respectively). Additionally, BBCLA significantly inhibited total MMP activity (* $p < 0.001$) in HMEC-1. Furthermore, each inhibitor increased mRNA expression and secretion of PEDF, a potent angiogenesis inhibitor. PAD activity inhibition also decreased VEGFA secretion, and in the case of BBCLA and CLA, a reduction in the expression of the gene encoding this factor was observed. Pharmacological inhibition of PAD activity in HMEC-1 cells also resulted in a cytoprotective effect against H₂O₂, significantly (* $p < 0.0001$) reducing DNA damage caused by this factor. Pre-incubation of HMEC-1 cells with the inhibitors also reduced ROS production under oxidative stress induced by t-BOOH (* $p < 0.001$). At the transcriptional level, a significant increase in Nrf2 expression was noted, a key transcription factor regulating genes related to antioxidant potential, which may explain the effects described above. Thus, PAD involvement in regulating selected redox homeostasis parameters was demonstrated. To elucidate the molecular basis of the inhibitors' antiangiogenic effects and PAD inhibition in endothelial cells, the levels of selected elements of the PI3K/Akt signaling pathway were analyzed. Each inhibitor significantly reduced the level of active Akt kinase (pH-Akt S473) to approximately 40% of control levels (* $p < 0.0001$ or * $p < 0.05$), suggesting PAD involvement in regulating the PI3K/Akt pathway, which plays a critical role in shaping the angiogenic potential of endothelial cells as well as their other functions. These findings indicate that PAD activity is crucial for regulating endothelial cell functions, including their angiogenic potential.

HMEC-1 PAD4 KD cells were generated using RNA interference mechanisms, specifically shRNA. In this model, selected effects observed in the pharmacological model were verified. A similar statistically significant decrease in active Akt kinase levels (pH-Akt S473) to approximately 40% of control (* $p < 0.05$) was found, confirming PAD involvement, particularly PAD4, in regulating the PI3K/Akt pathway in HMEC-1 cells. A relationship between PAD4 activity and the expression of PEDF and PAI-1 was also confirmed, with significantly increased mRNA levels observed for these factors (* $p < 0.05$ or * $p < 0.001$). No changes in VEGFA expression were observed, suggesting that the changes induced by BBCLA and CLA may result from non-specific effects or inhibition of other PAD isoforms. Functionally, HMEC-1 PAD4 KD cells exhibited a significantly reduced ability to form pseudocapillary structures, similar to the pharmacological model. These findings confirm the conclusions from the

pharmacological model and highlight PAD involvement in regulating endothelial cell functions, particularly their angiogenic potential.

Selected epigenome parameters were analyzed for potential indirect interactions between PAD activity/citrullination and other histone PTMs. In HMEC-1 cells, a potential indirect interaction between PADs and HDACs was demonstrated. Pharmacological inhibition of PADs significantly increased HDAC3 and HDAC5 expression, while PAD4 silencing showed this effect only for HDAC3. Notably, these isoforms are described in the literature as negative regulators of angiogenesis. Using the HDAC inhibitor SAHA significantly ($*p<0.001$) reduced H3 citrullination levels, confirming the validity of further studies on potential direct or indirect interactions between PADs and HDACs. The literature provides more information on potential interactions between citrullination and histone methylation. This study analyzed these interactions at the level of SET7/9 methyltransferase activity. Specific silencing of SET7/9 expression in HMEC-1 cells significantly ($*p<0.05$) reduced the expression and levels of PAD2 and PAD4 isoforms, as well as histone citrullination. A similar decrease in H3 citrullination was observed in cells with silenced LSD1 or G9a expression. This suggests a potential indirect interaction between SET7/9, LSD1, and G9a activity and the status of protein citrullination, including histones. Pharmacological inhibition of PADs did not significantly affect SET7/9, LSD1, or G9a levels. However, in HMEC-1 PAD4 KD cells, increased mRNA expression for SET7/9 and LSD1 was observed. PAD inhibitor treatment did not result in significant changes in H3K9me3 and H3K27me3 levels, which, considering the literature, is surprising. PAD inhibition did not significantly affect chromatin structure, as analyzed by HP1 isoform levels, while a significant increase ($*p<0.05$) in CAF1A was observed only in cells treated with BBCLA or CLA.

In summary, the presented results confirm PAD involvement in shaping endothelial cell functions, particularly their angiogenic potential. PAD activity, specifically PAD4, is crucial for regulating the PI3K/Akt pathway. Potential indirect interactions between citrullination and other histone PTMs in HMEC-1 cells were also confirmed, particularly at the PAD–HDAC and SET7/9–PAD levels. This dissertation also underscores the importance of further research into protein citrullination, especially concerning the regulatory function of this modification beyond inflammation and immune response contexts.

Spis rysunków

I. Wstęp teoretyczny	Strona
Rysunek I.1. Wybrane kowalencyjne PTMs białek i modyfikowane aminokwasy w łańcuchu	1
Rysunek I.2. Schematyczna ilustracja procesów fosforylacji i defosforylacji białek	2
Rysunek I.3. Wpływ metylacji na funkcje białek	3
Rysunek I.4. Schematyczne przedstawienie procesu metylacji lizyny	4
Rysunek I.5. Schematyczne przedstawienie procesu metylacji argininy	4
Rysunek I.6. Schematyczne przedstawienie reakcji acetylacji i deacetylacji białek	6
Rysunek I.7. Schematyczne przedstawienie reakcji cytrulinacji białek	9
Rysunek I.8. Molekularne efekty cytrulinacji białek	10
Rysunek I.9. Zestawienie struktur krystalicznych, lokalizacji i miejsc ekspresji izoform PADs	11
Rysunek I.10. Zestawienie znanych obecnie szlaków sygnałowych potencjalnie regulowanych przez PAD2/PAD4.	15
Rysunek I.11. Schematyczne przedstawienie mechanizmów epigenetycznych	17
Rysunek I.12. Schematyczne przedstawienie wpływu PTMs histonów na stan przestrzenny chromatyny	18
Rysunek I.13. Reszty argininowe i lizynowe podlegające metylacji w ogonie histonu H3 i przeprowadzające je enzymy.	20
Rysunek I.14. Schematyczne przedstawienie znanych interakcji na linii cytrulinacja – metylacja histonów	25
Rysunek I.15. Zestawienie czynników produkowanych i wydzielanych przez ECs	28
Rysunek I.16. Przebieg procesu angiogenezy	30
IV. Metody	Strona
Rysunek IV.1. Schematyczne przedstawienie zasady testu redukcji resazuryny	37
Rysunek IV.2. Przedstawienie działania sondy FRET zastosowanej w zestawie MMP Activity Assay Kit	46
Rysunek IV.3. Wizualizacja przebiegu oceny funkcji mitochondriów w systemie Seahorse	49
Rysunek IV.4. Mapa wektora pTRIPZ, Sekwencje shRNA	50
V. Wyniki	Strona
Rysunek V.1. Weryfikacja obecności izoform PADs w wybranych modelach komórkowych	54
Rysunek V.2. Cytotoksyczność badanych inhibitorów	55
Rysunek V.3. Weryfikacja potencjału inhibitorowego badanych związków.	56
Rysunek V.4. Weryfikacja potencjału inhibitorowego badanych związków	57
Rysunek V.5. Wpływ inhibitorów PAD na progresję cyklu komórkowego HMEC-1	57
Rysunek V.6. Cytometryczna analiza cyklu komórkowego	58
Rysunek V.7. Proliferacja ECs traktowanych inhibitorami PAD	58
Rysunek V.8. Profil ekspresji cyklin w ECs traktowanych inhibitorami PAD	59
Rysunek V.9. Poziom białek związanych z cyklem komórkowym w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD	60
Rysunek V.10. Analiza zdolności migracyjnych HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD	60
Rysunek V.11. Analiza zdolności migracyjnych HUVEC traktowanych inhibitorami PAD.	61
Rysunek V.12. Analiza aktywności MMPs i produkcji NO w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD	62
Rysunek V.13. Test formowania struktur pseudokapilarnych przez komórki śródbłonna traktowane inhibitorami PADs przez 16 godz	63

Rysunek V.14. Analiza profilu wydzielniczego w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs	64
Rysunek V.15. Kwantyfikacja sygnałów chemiluminescencyjnych – zestaw Angiogenesis Array Kit	64 – 65
Rysunek V.16. Kwantyfikacja i zestawienie czynników, których wydzielanie modulują inhibitory PAD	65
Rysunek V.17. Ekspresja genów związanych z regulacją angiogenezy lub stanem zapalnym w komórkach HMEC-1.	66
Rysunek V.18. Analiza szlaku PI3K/AKT w komórkach HMEC-1 traktowanych inhibitorami PADs	66
Rysunek V.19. Analiza wpływu inhibitorów PAD na przeżywalność HMEC-1 traktowanych t-BOOH lub H ₂ O ₂	67
Rysunek V.20. Produkcja RFT i ekspresja genów związanych z homeostazą redoks w HMEC-1 traktowanych inhibitorami PAD	68
Rysunek V.21. Analizy <i>in silico</i> wiązania badanych inhibitorów PAD do struktury DNA	68
Rysunek V.22. Test kometowy	69
Rysunek V.23. Analiza oddychania w HMEC-1 traktowanych BBCLA lub CLA	69
Rysunek V.24. Analiza wybranych parametrów mitochondrialnych w HMEC-1 traktowanych BBCLA lub CLA	70
Rysunek V.25. Analiza plazmidów shRNA	71
Rysunek V.26. Produkcja Lentiwirusów w 293FT	72
Rysunek V.27. Selekcja oraz wyprowadzenie stabilnych linii HMEC-1 NT i HMEC-1 PAD4 KD	72
Rysunek V.28. Weryfikacja wyciszenia PAD4 w przygotowanych komórkach HMEC-1 PAD4 KD	73
Rysunek V.29. Test formowania struktur kapilarnych przez komórki z wyciszeniem PAD4	74
Rysunek V.30. Analiza statusu acetylacji histonów przy zahamowaniu aktywności PAD	75
Rysunek V.31. Analiza cytrulinacji histonów przy zahamowaniu aktywności HATs lub HDACs	76
Rysunek V.32. Analiza poziomu SET7/9 w komórkach inkubowanych z inhibitorami PAD	77
Rysunek V.33. Analiza potencjalnych interakcji pomiędzy aktywnością SET7/9 a cytrulinacją	77
Rysunek V.34. Analiza PTMs histonów w HMEC-1 SET7/9 KD	78
Rysunek V.35. Poziom enzymów związanych z metylacją w HMEC-1 przy zahamowaniu aktywności PAD	78
Rysunek V.36. Analiza potencjalnych interakcji na linii cytrulinacja – metylacja	79
Rysunek V.37. Analiza wpływu inhibitorów PADs na wybrane czynniki regulujące status chromatyny	80

Spis tabel

I. Wstęp teoretyczny	Strona
Tabela I.1. Zestawienie KDACs należących do klas I-IV	7
Tabela I.2. Zestawienie inhibitorów KDACs zaakceptowanych przez FDA do użytku w terapiach	8
Tabela I.3. Zestawienie poznanych celów białkowych danej izoformy PADs	12
Tabela I.4. Zestawienie obecnej wiedzy na temat zaangażowania PADs w choroby autoimmunologiczne	14
III. Materiały	Strona
Tabela III.1. Podsumowanie właściwości biochemicznych inhibitorów zastosowanych w badaniach	35
IV. Metody	Strona
Tabela IV.1. Spis przeciwciał wykorzystanych w badaniach.	41 - 42
Tabela IV.2. Sekwencje primerów wykorzystywanych w badaniach.	43

Bibliografia:

1. Suskiewicz MJ. The logic of protein post-translational modifications (PTMs): Chemistry, mechanisms and evolution of protein regulation through covalent attachments. *BioEssays*. 2024;46(3). doi:https://doi.org/10.1002/bies.202300178
2. Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, et al. Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm*. 2023;4(3). doi:https://doi.org/10.1002/mco2.261
3. Macek B, Forchhammer K, Hardouin J, Weber-Ban E, Grangeasse C, Mijakovic I. Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(11):651-664. doi:https://doi.org/10.1038/s41579-019-0243-0
4. Xu H, Wang Y, Lin S, et al. PTMD: A Database of Human Disease-associated Post-translational Modifications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2018;16(4):244-251. doi:https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.06.004
5. Pang K, Wang W, Qin J, et al. Role of protein phosphorylation in cell signaling, disease, and the intervention therapy. *MedComm*. 2022;3(4). doi:https://doi.org/10.1002/mco2.175
6. Bilbrough T, Piemontese E, Seitz O. Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox. *Chemical Society Reviews*. 2022;51(13):5691-5730. doi:https://doi.org/10.1039/D1CS00991E
7. Balta EA, Wittmann MT, Jung M, et al. Phosphorylation Modulates the Subcellular Localization of SOX11. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;11. doi:https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00211
8. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio LL. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;40(2):271-280. doi:https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036
9. Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Frontiers in Genetics*. 2014;5. doi:https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00270
10. Yogosawa S, Yoshida K. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Science*. 2018;109(11):3376-3382. doi:https://doi.org/10.1111/cas.13792
11. Ashcroft M, Kubbutat MHG, Vousden KH. Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(3):1751-1758. doi:https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.1751
12. He Y, Sun MM, Zhang GG, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):1-17. doi:https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5
13. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017;169(3):381-405. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001
14. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011;75(1):50-83. doi:https://doi.org/10.1128/mmr.00031-10
15. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2015;35(6):600-604. doi:https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412
16. Pelaz SG, Tabernero A. Src: coordinating metabolism in cancer. *Oncogene*. 2022;41(45):4917-4928. doi:https://doi.org/10.1038/s41388-022-02487-4
17. Zhang J, Wang S, Jiang B, et al. c-Src phosphorylation and activation of hexokinase promotes tumorigenesis and metastasis. *Nature Communications*. 2017;8(1). doi:https://doi.org/10.1038/ncomms13732
18. Dang XW, Duan JL, Ye E, et al. Recent advances of small-molecule c-Src inhibitors for potential therapeutic utilities. *Bioorganic Chemistry*. 2023;142:106934-106934. doi:https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106934
19. Araujo J, Logothetis C. Dasatinib: A potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*. 2010;36(6):492-500. doi:https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.02.015
20. Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, Kalinsky K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016;82(4):943-956. doi:https://doi.org/10.1111/bcp.13021
21. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Research*. 2019;79(6):1019-1031. doi:https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-2738
22. Li J, Gong C, Zhou H, et al. Kinase Inhibitors and Kinase-Targeted Cancer Therapies: Recent Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(10):5489. doi:https://doi.org/10.3390/ijms25105489

23. Neddens J, Temmel M, Flunkert S, et al. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*. 2018;6(1). doi:https://doi.org/10.1186/s40478-018-0557-6
24. Batista TM, Ashok Kumar Jayavelu, Nicolai, et al. A Cell-Autonomous Signature of Dysregulated Protein Phosphorylation Underlies Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. 2020;32(5):844-859.e5. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.007
25. Di Blasi R, Blyuss O, Timms JF, Conole D, Ceroni F, Whitwell HJ. Non-Histone Protein Methylation: Biological Significance and Bioengineering Potential. *ACS Chemical Biology*. 2021;16(2):238-250. doi:https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00771
26. Blanc RS, Richard S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular Cell*. 2017;65(1):8-24. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003
27. Husmann D, Gozani O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2019;26(10):880-889. doi:https://doi.org/10.1038/s41594-019-0298-7
28. Falnes Pål Ø, Jakobsson Magnus E, Davydova E, Ho A, Małecki J. Protein lysine methylation by seven- β -strand methyltransferases. *Biochemical Journal*. 2016;473(14):1995-2009. doi:https://doi.org/10.1042/bcj20160117
29. Falnes PØ, Jędrzej Małecki, Herrera MC, Mads Bisgaard Bengtsen, Davydova E. Human seven- β -strand (METTL) methyltransferases - conquering the universe of protein lysine methylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2023;299(6):104661-104661. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104661
30. Jakobsson ME, Moen A, Bousset L, et al. Identification and Characterization of a Novel Human Methyltransferase Modulating Hsp70 Protein Function through Lysine Methylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(39):27752-27763. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.m113.483248
31. Hwang JW, Cho Y, Bae GU, Kim SN, Kim YK. Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Experimental & Molecular Medicine*. 2021;53(5):788-808. doi:https://doi.org/10.1038/s12276-021-00613-y
32. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*. 2004;119(7):941-953. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012
33. Zhang J, Jing L, Li M, He L, Guo Z. Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review). *Molecular Medicine Reports*. Published online April 1, 2019. doi:https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10111
34. Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *Science*. 2007;318(5849):444-447. doi:https://doi.org/10.1126/science.1145801
35. Raijmakers R, Zendman AJW, Egberts WV, et al. Methylation of Arginine Residues Interferes with Citrullination by Peptidylarginine Deiminases in vitro. *Journal of Molecular Biology*. 2007;367(4):1118-1129. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.054
36. Adriaans IE, Basant A, Ponsioen B, Glotzer M, Lens SMA. PLK1 plays dual roles in centralspindlin regulation during cytokinesis. *Journal of Cell Biology*. 2019;218(4):1250-1264. doi:https://doi.org/10.1083/jcb.201805036
37. Li W, Wang HY, Zhao X, et al. A methylation-phosphorylation switch determines Plk1 kinase activity and function in DNA damage repair. *Science Advances*. 2019;5(3). doi:https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7566
38. Feldman M, Zlata Vershinin, Inna Goliand, Elia N, Levy D. The methyltransferase SETD6 regulates Mitotic progression through PLK1 methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(4):1235-1240. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.1804407116
39. Yamagata K, Hiroaki Daitoku, Takahashi Y, et al. Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Molecular Cell*. 2008;32(2):221-231. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.013
40. Biggar KK, Li SSC. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;16(1):5-17. doi:https://doi.org/10.1038/nrm3915
41. Zhang C, Wei S, Hu J, Xiong Z. Upregulated expression of G9a is correlated with poor prognosis of gastric cancer patients. *Medicine*. 2019;98(48):e18212. doi:https://doi.org/10.1097/md.00000000000018212
42. Sun T, Zhang K, Pangeni RP, et al. G9a Promotes Invasion and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer through Enhancing Focal Adhesion Kinase Activation via NF- κ B Signaling Pathway. *Molecular Cancer Research*. 2020;19(3):429-440. doi:https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-20-0557
43. Kim D, Kim KI, Baek SH. Roles of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in homeostasis and diseases. *Journal of Biomedical Science*. 2021;28(1):41. doi:https://doi.org/10.1186/s12929-021-00737-3

44. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, et al. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*. 2007;449(7158):105-108. doi:<https://doi.org/10.1038/nature06092>
45. Si W, Zhou J, Zhao Y, Zheng J, Cui L. SET7/9 promotes multiple malignant processes in breast cancer development via RUNX2 activation and is negatively regulated by TRIM21. *Cell Death & Disease*. 2020;11(2). doi:<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2350-2>
46. Bhat KP, Ümit Kaniskan H, Jin J, Gozani O. Epigenetics and beyond: targeting writers of protein lysine methylation to treat disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(4):265-286. doi:<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00108-x>
47. Knutson SK, Warholc NM, Wigle TJ, et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(19):7922-7927. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1303800110>
48. El-Khoueiry AB, Clarke J, Neff T, et al. Phase 1 study of GSK3368715, a type I PRMT inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Published online May 26, 2023. doi:<https://doi.org/10.1038/s41416-023-02276-0>
49. Huseby CJ, Hoffman CN, Cooper GL, et al. Quantification of Tau Protein Lysine Methylation in Aging and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;71(3):979-991. doi:<https://doi.org/10.3233/jad-190604>
50. Yang Y, Luan Y, Yuan RX, Luan Y. Histone Methylation Related Therapeutic Challenge in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;8. doi:<https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.710053>
51. Papait R, Serio S, Pagiatakis C, et al. Histone Methyltransferase G9a Is Required for Cardiomyocyte Homeostasis and Hypertrophy. *Circulation*. 2017;136(13):1233-1246. doi:<https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.028561>
52. Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;16(4):258-264. doi:<https://doi.org/10.1038/nrm3931>
53. Marmorstein R. Structural and Chemical Basis of Histone Acetylation. *Novartis Foundation symposium*. Published online April 16, 2004:78-101. doi:<https://doi.org/10.1002/0470862637.ch6>
54. Bharath Kumar Gajjela, Zhou MM. Bromodomain inhibitors and therapeutic applications. *Current opinion in chemical biology*. 2023;75:102323-102323. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102323>
55. Tapias A, Wang ZQ. Lysine Acetylation and Deacetylation in Brain Development and Neuropathies. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2017;15(1):19-36. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.09.002>
56. Evgeniya Schastnaya, Doubleday PF, Maurer L, Sauer U. Non-enzymatic acetylation inhibits glycolytic enzymes in Escherichia coli. *Cell Reports*. 2023;42(1):111950-111950. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111950>
57. Chen D, Xu M, Wu B, Chen L. Histone deacetylases in hearing loss: Current perspectives for therapy. *Journal of Otology*. 2017;12(2):47-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.joto.2017.04.002>
58. Singh BN, Zhang G, Yi Lisa Hwa, Li JR, Dowdy SC, Jiang SW. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2010;10(6):935-954. doi:<https://doi.org/10.1586/era.10.62>
59. Choudhary C, Kumar C, Gnäd F, et al. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science*. 2009;325(5942):834-840. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1175371>
60. Narita T, Weinert BT, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;20(3):156-174. doi:<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>
61. Shvedunova M, Akhtar A. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Published online January 18, 2022. doi:<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00441-y>
62. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation Is Indispensable for p53 Activation. *Cell*. 2008;133(4):612-626. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.025>
63. Nagasaka M, Miyajima C, Aoki H, et al. Insights into Regulators of p53 Acetylation. *Cells*. 2022;11(23):3825. doi:<https://doi.org/10.3390/cells11233825>
64. Xia C, Tao Y, Li M, Che T, Qu J. Protein acetylation and deacetylation: An important regulatory modification in gene transcription (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020;20(4):2923-2940. doi:<https://doi.org/10.3892/etm.2020.9073>
65. Wang R, Cherukuri P, Luo J. Activation of Stat3 Sequence-specific DNA Binding and Transcription by p300/CREB-binding Protein-mediated Acetylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(12):11528-11534. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m413930200>

66. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(32):11278-11283. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0502738102>
67. Deota S, Rathnachalam S, Namrata K, et al. Allosteric Regulation of Cyclin-B Binding by the Charge State of Catalytic Lysine in CDK1 Is Essential for Cell-Cycle Progression. *Journal of Molecular Biology*. 2019;431(11):2127-2142. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.005>
68. Okumura K, Mendoza M, Bachoo RM, DePinho RA, Cavenee WK, Furnari FB. PCAF Modulates PTEN Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(36):26562-26568. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m605391200>
69. Jia Y, Shen K, Liu J, et al. The deacetylation of Akt by SIRT1 inhibits inflammation in macrophages and protects against sepsis. *Experimental Biology and Medicine*. 2023;248(11):922-935. doi:<https://doi.org/10.1177/15353702231165707>
70. Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, et al. The Deacetylase SIRT1 Promotes Membrane Localization and Activation of Akt and PDK1 During Tumorigenesis and Cardiac Hypertrophy. *Science Signaling*. 2011;4(182):ra46-ra46. doi:<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001465>
71. Glidden EJ, Gray LG, Vemuru S, Li D, Harris TE, Mayo MW. Multiple Site Acetylation of Rictor Stimulates Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2)-dependent Phosphorylation of Akt Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(1):581-588. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m111.304337>
72. Zhao S, Xu W, Jiang W, et al. Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science*. 2010;327(5968):1000-1004. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1179689>
73. Hu H, Zhu W, Qin J, et al. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Hepatology*. 2016;65(2):515-528. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.28887>
74. Yang J, Song C, Zhan X. The role of protein acetylation in carcinogenesis and targeted drug discovery. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13. doi:<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.972312>
75. Guo Y, Li X, He Z, et al. HDAC3 Silencing Enhances Acute B Lymphoblastic Leukaemia Cells Sensitivity to MG-132 by Inhibiting the JAK/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway. *Chemotherapy*. 2020;65(3-4):85-100. doi:<https://doi.org/10.1159/000500713>
76. Kraft FB, Hanl M, Feller F, Schäker-Hübner L, Hansen FK. Photocaged Histone Deacetylase Inhibitors as Prodrugs in Targeted Cancer Therapy. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):356. doi:<https://doi.org/10.3390/ph16030356>
77. Kraft FB, Hanl M, Feller F, Schäker-Hübner L, Hansen FK. Photocaged Histone Deacetylase Inhibitors as Prodrugs in Targeted Cancer Therapy. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):356. doi:<https://doi.org/10.3390/ph16030356>
78. Li C, Xu J, Yu Q, et al. Mutation of the novel acetylation site at K414R of BECN1 is involved in adipocyte differentiation and lipolysis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021;25(14):6855-6863. doi:<https://doi.org/10.1111/jcmm.16692>
79. Kumar S, Kim YR, Vikram A, et al. Sirtuin1-regulated lysine acetylation of p66Shc governs diabetes-induced vascular oxidative stress and endothelial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(7):1714-1719. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1614112114>
80. Li P, Zhang L, Zhou C, Lin N, Liu A. Sirt 1 activator inhibits the AGE-induced apoptosis and p53 acetylation in human vascular endothelial cells. *Journal of toxicological sciences*. 2015;40(5):615-624. doi:<https://doi.org/10.2131/jts.40.615>
81. ROGERS GE, SIMMONDS DH. Content of Citrulline and Other Amino-Acids in a Protein of Hair Follicles. *Nature*. 1958;182(4629):186-187. doi:<https://doi.org/10.1038/182186a0>
82. Ciesielski O, Biesiekierska M, Panthu B, Soszyński M, Pirola L, Balcerczyk A. Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(2). doi:<https://doi.org/10.1007/s00018-022-04126-3>
83. Shi Y, Li Z, Wang B, et al. Enabling Global Analysis of Protein Citrullination via Biotin Thiol Tag-Assisted Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2022;94(51):17895-17903. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03844>
84. Lee CY, Wang D, Wilhelm M, et al. Mining the Human Tissue Proteome for Protein Citrullination. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018;17(7):1378-1391. doi:<https://doi.org/10.1074/mcp.ra118.000696>
85. Cummings T, Gori K, Sánchez-Pulido L, et al. Citrullination Was Introduced into Animals by Horizontal Gene Transfer from Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;39(2). doi:<https://doi.org/10.1093/molbev/msab317>
86. Rogers GE, Harding HWJ, Llewellyn-Smith IJ. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1977;495(1):159-175. doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90250-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90250-1)

87. Mansouri P, Esmaeil Behmard, Sohrab Najafipour, Seyed Amin Kouhpayeh, Akbar Farjadfar. Peptidylarginine deiminase (PAD): A promising target for chronic diseases treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*. Published online August 1, 2024:134576-134576. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134576>
88. Witalison E, Thompson P, Hofseth L. Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation. *Current Drug Targets*. 2015;16(7):700-710. doi:<https://doi.org/10.2174/1389450116666150202160954>
89. Nava-Quiroz KJ, López-Flores LA, Pérez-Rubio G, Rojas-Serrano J, Falfán-Valencia R. Peptidyl Arginine Deiminases in Chronic Diseases: A Focus on Rheumatoid Arthritis and Interstitial Lung Disease. *Cells*. 2023;12(24):2829. doi:<https://doi.org/10.3390/cells12242829>
90. Mondal S, Thompson PR. Chemical biology of protein citrullination by the protein A arginine deiminases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2021;63:19-27. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.01.010>
91. Alghamdi M, Alasmari D, Assiri A, et al. An Overview of the Intrinsic Role of Citrullination in Autoimmune Disorders. *Journal of Immunology Research*. 2019;2019:1-39. doi:<https://doi.org/10.1155/2019/7592851>
92. Stadler SC, C. Theresa Vincent, Fedorov VD, et al. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 β activates TGF- β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(29):11851-11856. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1308362110>
93. Qu Y, Olsen JR, Yuan X, et al. Small molecule promotes β -catenin citrullination and inhibits Wnt signaling in cancer. *Nature Chemical Biology*. 2017;14(1):94-101. doi:<https://doi.org/10.1038/nchembio.2510>
94. Shen S, Wang X, Lv H, Shi Y, Xiao L. PADI4 mediates autophagy and participates in the role of ganoderic acid A monomers in delaying the senescence of Alzheimer's cells through the Akt/mTOR pathway. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2021;85(8):1818-1829. doi:<https://doi.org/10.1093/bbb/zbab054>
95. Chen H, Wei L, Luo M, et al. LINC00324 suppresses apoptosis and autophagy in nasopharyngeal carcinoma through upregulation of PAD4 and activation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Cell Biology and Toxicology*. 2021;38(6):995-1011. doi:<https://doi.org/10.1007/s10565-021-09632-x>
96. Qin H, Liu X, Li F, et al. PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling. *Cancer Letters*. 2017;409:30-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.019>
97. Xue T, Liu X, Zhang M, et al. PADI2-Catalyzed MEK1 Citrullination Activates ERK1/2 and Promotes IGF2BP1-Mediated SOX2 mRNA Stability in Endometrial Cancer. *Advanced Science*. 2021;8(6):2002831. doi:<https://doi.org/10.1002/advs.202002831>
98. Loos T, Mortier A, Mieke Gouwy, et al. Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation. *Blood*. 2008;112(7):2648-2656. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-149039>
99. Proost P, Loos T, Mortier A, et al. Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(9):2085-2097. doi:<https://doi.org/10.1084/jem.20080305>
100. Christophorou MA. The virtues and vices of protein citrullination. *Royal Society Open Science*. 2022;9(6). doi:<https://doi.org/10.1098/rsos.220125>
101. Sun B, Tomita B, Salinger AJ, et al. PAD2-mediated citrullination of Fibulin-5 promotes elastogenesis. *Matrix Biology*. 2021;102:70-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2021.07.001>
102. Falcão AM, Meijer M, Scaglione A, et al. PAD2-Mediated Citrullination Contributes to Efficient Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Cell Reports*. 2019;27(4):1090-1102.e10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.108>
103. Boon L, Ugarte-Berzal E, Martens E, et al. Citrullination as a novel posttranslational modification of matrix metalloproteinases. *Matrix Biology*. 2021;95:68-83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.10.005>
104. Ronak Tilvawala, Nemmara VV, Reyes AC, et al. The role of SERPIN citrullination in thrombosis. *Cell chemical biology*. 2021;28(12):1728-1739.e5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.07.009>
105. Rosazza T, Warner J, Sollberger G. NET formation – mechanisms and how they relate to other cell death pathways. *The FEBS Journal*. Published online October 26, 2020. doi:<https://doi.org/10.1111/febs.15589>
106. Tanner L, Ravi K.V. Bhongir, Karlsson CAQ, et al. Citrullination of extracellular histone H3.1 reduces antibacterial activity and exacerbates its proteolytic degradation. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2020;20(2):346-355. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.07.010>
107. Lewis HD, Liddle J, Coote JE, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nature Chemical Biology*. 2015;11(3):189-191. doi:<https://doi.org/10.1038/nchembio.1735>

108. Sun B, Chang HH, Salinger AJ, et al. Reciprocal regulation of Th2 and Th17 cells by PAD2-mediated citrullination. *JCI insight*. 2019;4(22). doi:<https://doi.org/10.1172/jci.insight.129687>
109. Harada K, Carr SM, Shrestha A, La NB. Citrullination and the protein code: crosstalk between post-translational modifications in cancer. *Philosophical transactions - Royal Society Biological sciences*. 2023;378(1890). doi:<https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0243>
110. Young Ho Lee, Coonrod SA, W. Lee Kraus, Mary Anne Jelinek, Stallcup MR. Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(10):3611-3616. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0407159102>
111. Fatemeh Ghari, Quirke A, Munro S, et al. Citrullination-acetylation interplay guides E2F-1 activity during the inflammatory response. *Science Advances*. 2016;2(2). doi:<https://doi.org/10.1126/sciadv.1501257>
112. Cho EC, Zheng S, Munro S, et al. Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *The EMBO Journal*. 2012;31(7):1785-1797. doi:<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.17>
113. Liu J, Gao J, Wu Z, et al. Anti-citrullinated Protein Antibody Generation, Pathogenesis, Clinical Application, and Prospects. *Frontiers in medicine*. 2022;8:802934. doi:<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.802934>
114. Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Current Opinion in Rheumatology*. 2018;30(1):72-78. doi:<https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000452>
115. Kurowska W, Kuca-Warnawin EH, Radzikowska A, Maśliński W. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Central European Journal of Immunology*. 2017;42(4):390-398. doi:<https://doi.org/10.5114/ceji.2017.72807>
116. Gajendran C, Fukui S, Sadhu NM, et al. Alleviation of arthritis through prevention of neutrophil extracellular traps by an orally available inhibitor of protein arginine deiminase 4. *Scientific Reports*. 2023;13(1):3189. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-023-30246-2>
117. Calabrese R, Zampieri M, Mechelli R, et al. Methylation-dependent PAD2 upregulation in multiple sclerosis peripheral blood. *Multiple Sclerosis Journal*. 2011;18(3):299-304. doi:<https://doi.org/10.1177/1352458511421055>
118. Teng Y, Chen Y, Tang X, Wang S, Yin K. PAD2: A potential target for tumor therapy. *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer/Biochimica et biophysica acta, CR Reviews on cancer*. 2023;1878(5):188931-188931. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188931>
119. Zhu D, Lu Y, Wang Y, Wang Y. PAD4 and Its Inhibitors in Cancer Progression and Prognosis. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2414. doi:<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112414>
120. Funayama R, Taniguchi H, Mizuma M, et al. Protein-arginine deiminase 2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. *Cancer Science*. 2017;108(4):713-718. doi:<https://doi.org/10.1111/cas.13179>
121. He R, Du S, Lei T, Xie X, Wang Y. Glycogen synthase kinase 3 β in tumorigenesis and oncotherapy (Review). *Oncology Reports*. 2020;44(6):2373-2385. doi:<https://doi.org/10.3892/or.2020.7817>
122. Luo X, Chang S, Xiao S, et al. PAD4-dependent citrullination of nuclear translocation of GSK3 β promotes colorectal cancer progression via the degradation of nuclear CDKN1A. *Neoplasia*. 2022;33:100835-100835. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100835>
123. Kim S, Song Y, Cho C, et al. Inhibition of protein arginine deiminase II suppresses retinoblastoma in orthotopic transplantation in mice. *Oncology Reports*. 2023;50(1). doi:<https://doi.org/10.3892/or.2023.8583>
124. Biron BM, Chung CS, O'Brien XM, Chen Y, Reichner JS, Ayala A. Cl-Amidine Prevents Histone 3 Citrullination and Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Improves Survival in a Murine Sepsis Model. *Journal of innate immunity*. 2016;9(1):22-32. doi:<https://doi.org/10.1159/000448808>
125. Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015;74(12):2199-2206. doi:<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205365>
126. Willis VC, Gizinski AM, Banda NK, et al. N- α -benzoyl-N⁵-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2011;186(7):4396-4404. doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001620>
127. Causey CP, Jones JE, Slack JL, et al. The Development of N- α -(2-Carboxyl)benzoyl-N⁵-(2-fluoro-1-iminoethyl)-L-ornithine Amide (o-F-amidine) and N- α -(2-Carboxyl)benzoyl-N⁵-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine Amide (o-Cl-amidine) As Second Generation Protein Arginine Deiminase (PAD) Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(19):6919-6935. doi:<https://doi.org/10.1021/jm2008985>

128. Muth A, Subramanian V, Beaumont E, et al. Development of a Selective Inhibitor of Protein Arginine Deiminase 2. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(7):3198-3211. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00274>
129. Zhu D, Lu Y, Yan Z, et al. A β -Carboline Derivate PAD4 Inhibitor Reshapes Neutrophil Phenotype and Improves the Tumor Immune Microenvironment against Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2024;67(10):7973-7994. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00030>
130. Martín T, Rebak AS, Massarenti L, et al. Applicability of Small-Molecule Inhibitors in the Study of Peptidyl Arginine Deiminase 2 (PAD2) and PAD4. *Frontiers in Immunology*. 2021;12. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.716250>
131. Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*. 2015;589(20PartA):2914-2922. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>
132. Wakim JG, Spakowitz AJ. Physical modeling of nucleosome clustering in euchromatin resulting from interactions between epigenetic reader proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2024;121(26). doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.2317911121>
133. Raza Z, Hussain SF, Foster VS, et al. Exposure to war and conflict: The individual and inherited epigenetic effects on health, with a focus on post-traumatic stress disorder. *Frontiers in Epidemiology*. 2023;3. doi:<https://doi.org/10.3389/fepid.2023.1066158>
134. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016;8(2):a019497. doi:<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019497>
135. Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Review of Proteomics*. 2005;2(5):719-729. doi:<https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.719>
136. Mersfelder EL, Parthun MR. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(9):2653-2662. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkl338>
137. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science*. 2001;293(5532):1074-1080. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1063127>
138. Borg M, Jiang D, Berger F. Histone variants take center stage in shaping the epigenome. *Current opinion in plant biology*. 2021;61:101991-101991. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101991>
139. Henikoff S, Smith MM. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015;7(1). doi:<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>
140. Kurumizaka H, Kujirai T, Takizawa Y. Contributions of Histone Variants in Nucleosome Structure and Function. *Journal of Molecular Biology*. 2021;433(6):166678. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.012>
141. Watanabe S, Mishima Y, Shimizu M, Suetake I, Takada S. Interactions of HP1 Bound to H3K9me3 Dinucleosome by Molecular Simulations and Biochemical Assays. *Biophysical Journal*. 2018;114(10):2336-2351. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.025>
142. Wang Z, Ren B. Role of H3K4 monomethylation in gene regulation. *Current opinion in genetics & development*. 2024;84:102153-102153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gde.2024.102153>
143. Zhang Y, Sun Z, Jia J, et al. Overview of Histone Modification. *Histone Mutations and Cancer*. 2020;1283:1-16. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1
144. Tao Y, Neppi RL, Huang ZP, et al. The histone methyltransferase Set7/9 promotes myoblast differentiation and myofibril assembly. *The journal of cell biology*. 2011;194(4):551-565. doi:<https://doi.org/10.1083/jcb.201010090>
145. Keating ST, Ziemann M, Okabe J, Abdul Waheed Khan, Aneta Balcerzyk, Assam El-Osta. Deep sequencing reveals novel Set7 networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(22):4471-4486. doi:<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1651-y>
146. Kumar A, Kumari N, Nallabelli N, Prasad R. Pathogenic and Therapeutic Role of H3K4 Family of Methylases and Demethylases in Cancers. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2019;34(2):123-132. doi:<https://doi.org/10.1007/s12291-019-00828-x>
147. Padeken J, Methot SP, Gasser SM. Establishment of H3K9-methylated heterochromatin and its functions in tissue differentiation and maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Published online May 13, 2022. doi:<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00483-w>
148. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001;410(6824):116-120. doi:<https://doi.org/10.1038/35065132>

149. Tachibana M. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes & Development*. 2005;19(7):815-826. doi:https://doi.org/10.1101/gad.1284005
150. Casciello F, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2015;6. doi:https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00487
151. Ni Y, Shi M, Liu L, et al. G9a in Cancer: Mechanisms, Therapeutic Advancements, and Clinical Implications. *Cancers*. 2024;16(12):2175-2175. doi:https://doi.org/10.3390/cancers16122175
152. Noce B, Di Bello E, Fioravanti R, Mai A. LSD1 inhibitors for cancer treatment: Focus on multi-target agents and compounds in clinical trials. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1120911. doi:https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1120911
153. Bennesch MA, Segala G, Wider D, Picard D. LSD1 engages a corepressor complex for the activation of the estrogen receptor α by estrogen and cAMP. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(18):8655-8670. doi:https://doi.org/10.1093/nar/gkw522
154. María Ceballos-Chávez, Rivero S, García-Gutiérrez P, et al. Control of neuronal differentiation by sumoylation of BRAF35, a subunit of the LSD1-CoREST histone demethylase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(21):8085-8090. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.1121522109
155. Yang GJ, Lei PM, Wong SY, Ma DL, Leung CH. Pharmacological Inhibition of LSD1 for Cancer Treatment. *Molecules*. 2018;23(12). doi:https://doi.org/10.3390/molecules23123194
156. Wojtala, Dąbek, Rybaczek, et al. Silencing Lysine-Specific Histone Demethylase 1 (LSD1) Causes Increased HP1-Positive Chromatin, Stimulation of DNA Repair Processes, and Dysregulation of Proliferation by Chk1 Phosphorylation in Human Endothelial Cells. *Cells*. 2019;8(10):1212. doi:https://doi.org/10.3390/cells8101212
157. Yang Y, Zhang M, Wang Y. The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Center*. 2022;2(4). doi:https://doi.org/10.1016/j.jncc.2022.09.002
158. Gorisch SM. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of Cell Science*. 2005;118(24):5825-5834. doi:https://doi.org/10.1242/jcs.02689
159. Josling GA, Selvarajah SA, Petter M, Duffy MF. The Role of Bromodomain Proteins in Regulating Gene Expression. *Genes*. 2012;3(2):320-343. doi:https://doi.org/10.3390/genes3020320
160. LeRoy G, Rickards B, Flint SJ. The Double Bromodomain Proteins Brd2 and Brd3 Couple Histone Acetylation to Transcription. *Molecular Cell*. 2008;30(1):51-60. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.018
161. Duan Y, Guan Y, Qin W, Zhai X, Yu B, Liu H. Targeting Brd4 for cancer therapy: inhibitors and degraders. *MedChemComm*. 2018;9(11):1779-1802. doi:https://doi.org/10.1039/c8md00198g
162. Lee HT, Oh S, Ro DH, Yoo H, Kwon YW. The key role of DNA methylation and histone acetylation in epigenetics of atherosclerosis. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*. 2020;9(3):419-434. doi:https://doi.org/10.12997/jla.2020.9.3.419
163. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M. Mapping Global Histone Acetylation Patterns to Gene Expression. *Cell*. 2004;117(6):721-733. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.023
164. Kang J, Kang Y, Kim A. Histone H3K4ac, as a marker of active transcription start sites and enhancers, plays roles in histone eviction and RNA transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2024;1867(2):195021-195021. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2024.195021
165. Guillemette B, Drogaris P, Hsiu-Hsu Sophia Lin, et al. H3 Lysine 4 Is Acetylated at Active Gene Promoters and Is Regulated by H3 Lysine 4 Methylation. *PLOS Genetics*. 2011;7(3):e1001354-e1001354. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001354
166. Messier TL, Gordon JAR, Boyd JR, et al. Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 2016;7(5):5094-5109. doi:https://doi.org/10.18632/oncotarget.6922
167. Krishanpal Karmodiya, Krebs AR, Mustapha Oulad-Abdelghani, Kimura H, Laszlo Tora. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics*. 2012;13(1). doi:https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-424
168. Armenta-Castro E, Reyes-Vallejo T, Máximo-Sánchez D, et al. Histone H3K9 and H3K14 acetylation at the promoter of the *LGALS9* gene is associated with mRNA levels in cervical cancer cells. *FEBS Open Bio*. 2020;10(11):2305-2315. doi:https://doi.org/10.1002/2211-5463.12973
169. Igolkina AA, Zinkevich A, Karandasheva KO, et al. H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3 and H3K9me3 Histone Tags Suggest Distinct Regulatory Evolution of Open and Condensed Chromatin Landmarks. *Cells*. 2019;8(9):1034. doi:https://doi.org/10.3390/cells8091034

170. Gates LA, Shi J, Rohira AD, et al. Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *Journal of Biological Chemistry*. Published online July 17, 2017:jbc.M117.802074. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>
171. Wang Y, Gu ML, Meng F, et al. Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines. 2017;51(6):1860-1868. doi:<https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4176>
172. Ono H, Kato T, Murase Y, et al. C646 inhibits G2/M cell cycle-related proteins and potentiates anti-tumor effects in pancreatic cancer. *Scientific Reports*. 2021;11(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-89530-8>
173. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*. 2007;1(1):19-25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.01.001>
174. Kavalali ET, Nelson ED, Monteggia LM. Role of MeCP2, DNA methylation, and HDACs in regulating synapse function. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 2011;3(3):250-256. doi:<https://doi.org/10.1007/s11689-011-9078-3>
175. Schizas D, Mastoraki A, Naar L, et al. Concept of histone deacetylases in cancer: Reflections on esophageal carcinogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(41):4635-4642. doi:<https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i41.4635>
176. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, et al. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nature Genetics*. 2006;38(5):566-569. doi:<https://doi.org/10.1038/ng1773>
177. Glaser KB, Li J, Staver MJ, Wei RQ, Albert DH, Davidsen SK. Role of Class I and Class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;310(2):529-536. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.043>
178. Milde T, Oehme I, Korshunov A, et al. HDAC5 and HDAC9 in Medulloblastoma: Novel Markers for Risk Stratification and Role in Tumor Cell Growth. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(12):3240-3252. doi:<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-0395>
179. Singh A, Bishayee A, Pandey A. Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients*. 2018;10(6):731. doi:<https://doi.org/10.3390/nu10060731>
180. Venturelli S, Berger A, Böcker A, et al. Resveratrol as a Pan-HDAC Inhibitor Alters the Acetylation Status of Histone Proteins in Human-Derived Hepatoblastoma Cells. *PLoS ONE*. 2013;8(8). doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073097>
181. Ciesielski O, Biesiekierska M, Balcerczyk A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Alters Histone Acetylation and Methylation and Impacts Chromatin Architecture Profile in Human Endothelial Cells. *Molecules*. 2020;25(10):2326. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25102326>
182. Zhang X, Gamble MJ, Stadler S, et al. Genome-Wide Analysis Reveals PADI4 Cooperates with Elk-1 to Activate c-Fos Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS Genetics*. 2011;7(6):e1002112-e1002112. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002112>
183. Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, et al. Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature*. 2014;507(7490):104-108. doi:<https://doi.org/10.1038/nature12942>
184. Zhu D, Zhang Y, Wang S. Histone citrullination: a new target for tumors. *Molecular Cancer*. 2021;20(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12943-021-01373-z>
185. Cherrington BD, Zhang X, McElwee JL, Morency E, Anguish LJ, Coonrod SA. Potential role for PAD2 in gene regulation in breast cancer cells. *PloS One*. 2012;7(7):e41242. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041242>
186. Sharma P, Azebi S, England P, et al. Citrullination of Histone H3 Interferes with HP1-Mediated Transcriptional Repression. Sullivan BA, ed. *PLoS Genetics*. 2012;8(9):e1002934. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002934>
187. Wiese M, Bannister AJ, Basu S, et al. Citrullination of HP1 γ chromodomain affects association with chromatin. *Epigenetics & Chromatin*. 2019;12(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13072-019-0265-x>
188. Clancy KW, Russell AM, Subramanian V, et al. Citrullination/Methylation Crosstalk on Histone H3 Regulates ER-Target Gene Transcription. *ACS Chemical Biology*. 2017;12(6):1691-1702. doi:<https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00241>
189. Kan R, Jin M, Subramanian V, Causey CP, Thompson PR, Coonrod SA. Potential role for PADI-mediated histone citrullination in preimplantation development. *BMC Developmental Biology*. 2012;12(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1471-213x-12-19>

190. Denis H, Deplus R, Pascale Putmans, Yamada M, Raphaël Métivier, Fuks F. Functional Connection between Deimination and Deacetylation of Histones. *Molecular and Cellular Biology*. 2009;29(18):4982-4993. doi:<https://doi.org/10.1128/mcb.00285-09>
191. Yao H, Li P, Venters BJ, et al. Histone Arg Modifications and p53 Regulate the Expression of OKL38, a Mediator of Apoptosis. 2008;283(29):20060-20068. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m802940200>
192. Zhang X, Bhattacharya A, Pu C, et al. A programmable CRISPR/dCas9-based epigenetic editing system enabling loci-targeted histone citrullination and precise transcription regulation. *Journal of genetics and genomics/Journal of Genetics and Genomics*. Published online June 1, 2024. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2024.05.010>
193. Zhang X, Bolt M, Guertin MJ, et al. Peptidylarginine deiminase 2-catalyzed histone H3 arginine 26 citrullination facilitates estrogen receptor target gene activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(33):13331-13336. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1203280109>
194. Wang L, Song G, Zhang X, et al. PADI2-Mediated Citrullination Promotes Prostate Cancer Progression. *Cancer Research*. 2017;77(21):5755-5768. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0150>
195. Li P, Yao H, Zhang Z, et al. Regulation of p53 Target Gene Expression by Peptidylarginine Deiminase 4. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(15):4745-4758. doi:<https://doi.org/10.1128/mcb.01747-07>
196. Chen Y, Hu H, Tan S, et al. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression, metastasis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*. 2022;11(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40164-022-00345-3>
197. Chia PY, Teo A, Yeo TW. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. *Frontiers in Medicine*. 2020;7. doi:<https://doi.org/10.3389/fmed.2020.542567>
198. Trojan P, Janik M, Małgorzata Przybyło. Śródbłonek - niedoceniany organ. 1. budowa i rola w procesach fizjologicznych. *Kosmos*. 2014;63(4):555-568.
199. Qiu J, Hirschi KK. Endothelial Cell Development and Its Application to Regenerative Medicine. *Circulation Research*. 2019;125(4):489-501. doi:<https://doi.org/10.1161/circresaha.119.311405>
200. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*. 2004;93(1):105-113. doi:<https://doi.org/10.1093/bja/ae163>
201. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiological Reviews*. 2004;84(3):869-901. doi:<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>
202. Pretorius D, Richter RP, Anand T, Cardenas JC, Richter JR. Alterations in heparan sulfate proteoglycan synthesis and sulfation and the impact on vascular endothelial function. *Matrix Biology Plus*. 2022;16:100121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2022.100121>
203. Leung S Wai Sum, Shi Y. The glycolytic process in endothelial cells and its implications. *Acta Pharmacologica Sinica*. Published online April 13, 2021. doi:<https://doi.org/10.1038/s41401-021-00647-y>
204. Wojtala M, Pirola L, Balcerzyk A. Modulation of the vascular endothelium functioning by dietary components, the role of epigenetics. *BioFactors*. 2016;43(1):5-16. doi:<https://doi.org/10.1002/biof.1306>
205. Yazdani S, Jaldin-Fincati JR, Pereira RVS, Klip A. Endothelial cell barriers: Transport of molecules between blood and tissues. *Traffic*. 2019;20(6):390-403. doi:<https://doi.org/10.1111/tra.12645>
206. Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends in Molecular Medicine*. 2021;27(4):314-331. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.11.006>
207. Jones JH, Friedrich E, Hong Z, Minshall RD, Malik AB. PV1 in Caveolae Controls Lung Endothelial Permeability. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2020;63(4):531-539. doi:<https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0102oc>
208. Timmerman I, Daniel AE, Kroon J, van Buul JD. Leukocytes Crossing the Endothelium: A Matter of Communication. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Published online 2016:281-329. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.005>
209. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2010;4(1):302-312. doi:<https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>
210. Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*. 1988;12(6):530-548. doi:<https://doi.org/10.1161/01.hyp.12.6.530>
211. Cau SBA, Evora PRB, Tostes RC. Vasoconstrictor Substances Produced by the Endothelium. *Endothelium and Cardiovascular Diseases*. Published online 2018:115-125. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812348-5.00009-x>

212. Abraham GR, Williams TL, Maguire JJ, Greasley PJ, Ambery P, Davenport AP. Current and future strategies for targeting the endothelin pathway in cardiovascular disease. *Nature cardiovascular research*. 2023;2(11):972-990. doi:<https://doi.org/10.1038/s44161-023-00347-2>
213. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell and Tissue Research*. 2021;387. doi:<https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>
214. De Pablo-Moreno JAD, Serrano LJ, Revuelta L, Sánchez MJ, Liras A. The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(15):8283. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms23158283>
215. FORSYTH KD, TALBOT V, BECKMAN I. Endothelial serpins-protectors of the vasculature? *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;95(2):277-282. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb06523.x>
216. Mehta PN, Giardina C. A model for angiogenesis suppression via SERPINF1 in the surrounding pro-acinar microenvironment during human fetal pancreas development. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. Published online October 26, 2023. doi:<https://doi.org/10.1101/2023.10.25.559143>
217. Bryan NS. Nitric oxide deficiency is a primary driver of hypertension. *Biochemical Pharmacology*. 2022;206:115325. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115325>
218. Fuchs FD, Whelton PK. High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension*. 2020;75(2):285-292. doi:<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14240>
219. Pirola L, Ciesielski O, Balcerzyk A. Fat not so bad? The role of ketone bodies and ketogenic diet in the treatment of endothelial dysfunction and hypertension. *Biochemical Pharmacology*. 2022;206:115346. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115346>
220. Munoz-Chnpuli R, Quesada AR, ngel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(17). doi:<https://doi.org/10.1007/s00018-004-4070-7>
221. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treatment and Research*. 2004;117:3-32. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8871-3_1
222. Ivanov AN, Chabbarov YR. Mechanisms of Physiological Angiogenesis. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*. 2023;59(3):914-929. doi:<https://doi.org/10.1134/s0022093023030237>
223. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care*. 2014;3(10):647-661. doi:<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0517>
224. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(2):267-285. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x>
225. Shi YH, Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2004;10(8):1082. doi:<https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i8.1082>
226. Rychli K, Kaun C, Hohensinner PJ, et al. The anti-angiogenic factor PEDF is present in the human heart and is regulated by anoxia in cardiac myocytes and fibroblasts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009;14(1-2):198-205. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00731.x>
227. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, Sun LP, Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023;8(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>
228. Deshpande N, Ren Y, Foygel K, Rosenberg J, Willmann JK. Tumor Angiogenic Marker Expression Levels during Tumor Growth: Longitudinal Assessment with Molecularly Targeted Microbubbles and US Imaging. *Radiology*. 2011;258(3):804-811. doi:<https://doi.org/10.1148/radiol.10101079>
229. Ciesielski O, Biesiekierska M, Panthu B, Vialichka V, Pirola L, Balcerzyk A. The Epigenetic Profile of Tumor Endothelial Cells. Effects of Combined Therapy with Antiangiogenic and Epigenetic Drugs on Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2606. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21072606>
230. Lopes-Coelho F, Martins F, Pereira SA, Serpa J. Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(7):3765. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms22073765>
231. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*. 2015;18(4):433-448. doi:<https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2>
232. Xu J, Tang Z. Progress on angiogenic and antiangiogenic agents in the tumor microenvironment. *Frontiers in Oncology*. 2024;14. doi:<https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1491099>

233. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical Therapeutics*. 2006;28(11):1779-1802. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.11.015>
234. Chen W, Bacanamwo M, Harrison DG. Activation of p300 Histone Acetyltransferase Activity Is an Early Endothelial Response to Laminar Shear Stress and Is Essential for Stimulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase mRNA Transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(24):16293-16298. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m801803200>
235. Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, et al. The Expression of Endothelial Nitric-oxide Synthase Is Controlled by a Cell-specific Histone Code. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(26):24824-24838. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m502115200>
236. Yan MS, Turgeon PJ, Man HSJ, et al. Histone acetyltransferase 7 (KAT7)-dependent intragenic histone acetylation regulates endothelial cell gene regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(12):4381-4402. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.001383>
237. Pillai S, Kovacs M, Srikumar Chellappan. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors by Rb and E2F1: Role of Acetylation. *Cancer Research*. 2010;70(12):4931-4940. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-0501>
238. Dutta D, Ray S, Home P, et al. Regulation of Angiogenesis by Histone Chaperone HIRA-mediated Incorporation of Lysine 56-acetylated Histone H3.3 at Chromatin Domains of Endothelial Genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(53):41567-41577. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m110.190025>
239. Park D, Park H, Kim Y, Kim H, Jeoung D. HDAC3 acts as a negative regulator of angiogenesis. *BMB Reports*. 2014;47(4):227-232. doi:<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.4.128>
240. Urbich C, Rössig L, Kaluza D, et al. HDAC5 is a repressor of angiogenesis and determines the angiogenic gene expression pattern of endothelial cells. *Blood*. 2009;113(22):5669-5679. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-196485>
241. Yu D, Chen W, Ren J, et al. VEGF-PKD1-HDAC7 signaling promotes endothelial progenitor cell migration and tube formation. *Microvascular Research*. 2014;91:66-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.10.006>
242. Duan Y, Wu X, Zhao Q, et al. DOT1L promotes angiogenesis through cooperative regulation of VEGFR2 with ETS-1. *Oncotarget*. 2016;7(43):69674-69687. doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11939>
243. Aneta Balcerzyk, Dorota Rybaczek, Wojtala M, Pirola L, Okabe J, Assam El-Osta. Pharmacological inhibition of arginine and lysine methyltransferases induces nuclear abnormalities and suppresses angiogenesis in human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*. 2016;121:18-32. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.013>
244. Wojtala M, Macierzyńska-Piotrowska E, Dorota Rybaczek, Pirola L, Aneta Balcerzyk. Pharmacological and transcriptional inhibition of the G9a histone methyltransferase suppresses proliferation and modulates redox homeostasis in human microvascular endothelial cells. *Pharmacological research*. 2018;128:252-263. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.014>
245. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. *Journal of Clinical Investigation*. 1973;52(11):2745-2756. doi:<https://doi.org/10.1172/jci107470>
246. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
247. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C: An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE* 2020;15.
248. Protein Array Analyzer for ImageJ - Gilles Carpentier Research Web Site: Computer Image Analysis. Free.fr. Published 2018. Accessed December 14, 2024. <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Protein-Array-Analyzer-for-ImageJ.html&lang=en>
249. Karki P, Birukova AA. Microtubules as Major Regulators of Endothelial Function: Implication for Lung Injury. *Frontiers in Physiology*. 2021;12. doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.758313>
250. Li G, Young CH, Snow B, et al. Identification and Characterization of the Lactating Mouse Mammary Gland Citrullinome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2634. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21072634>
251. Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an Integral Regulator of Cell Adhesion and Endothelial Sprouting. *Microcirculation*. 2014;21(4):333-344. doi:<https://doi.org/10.1111/micc.12111>
252. Bager CL, Joseph, Tang MHE, et al. Citrullinated and MMP-degraded vimentin is associated with chronic pulmonary diseases and genetic variants in PADI3/PADI4 and CFH in postmenopausal women. *Scientific Reports*. 2023;13(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-023-50313-y>
253. Elisabetta Dejana, Maria Grazia Lampugnani, Giorgi M, Gaboli M, Pier Carlo Marchisio. Fibrinogen induces endothelial cell adhesion and spreading via the release of endogenous matrix proteins and the recruitment

- of more than one integrin receptor. *Blood*. 1990;75(7):1509-1517.
doi:<https://doi.org/10.1182/blood.v75.7.1509.1509>
254. Joyce, Reinout Raijmakers, Alexander LE, et al. Mapping of citrullinated fibrinogen B-cell epitopes in rheumatoid arthritis by imaging surface plasmon resonance. *Arthritis Research & Therapy*. 2010;12(6):R219-R219. doi:<https://doi.org/10.1186/ar3205>
 255. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF., Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2006;4(6):1396-1404. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01959.x>
 256. Sorvillo N, Mizurini DM, Coxon C, et al. Plasma Peptidylarginine Deiminase IV Promotes VWF-Platelet String Formation and Accelerates Thrombosis After Vessel Injury. *Circulation Research*. 2019;125(5):507-519. doi:<https://doi.org/10.1161/circresaha.118.314571>
 257. Rebak AS, Hendriks IA, Elsborg JD, et al. A quantitative and site-specific atlas of the citrullinome reveals widespread existence of citrullination and insights into PAD14 substrates. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2024;31(6):977-995. doi:<https://doi.org/10.1038/s41594-024-01214-9>
 258. Lidington E, Moyes D, McCormack A, Rose M. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transplant Immunology*. 1999;7(4):239-246. doi:[https://doi.org/10.1016/s0966-3274\(99\)80008-2](https://doi.org/10.1016/s0966-3274(99)80008-2)
 259. Neira JL, Rizzuti B, Abián O, Salomé Araujo-Abad, Adrián Velázquez-Campoy, Romero J. Human Enzyme PAD14 Binds to the Nuclear Carrier Importin α 3. *Cells*. 2022;11(14):2166-2166. doi:<https://doi.org/10.3390/cells11142166>
 260. Ledet MM, Anderson R, Harman R, et al. BB-Cl-Amidine as a novel therapeutic for canine and feline mammary cancer via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *BMC Cancer*. 2018;18(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4323-8>
 261. Sun Y, Ma Y, Jia X, Yao Q, Chen J, Li H. Inducement of ER Stress by PAD Inhibitor BB-Cl-Amidine to Effectively Kill AML Cells. *Current Medical Science*. 2022;42(5):958-965. doi:<https://doi.org/10.1007/s11596-022-2637-x>
 262. Shi L, Aymonnier K, Wagner DD. Neutrophil stimulation with citrullinated histone H4 slows down calcium influx and reduces NET formation compared with native histone H4. *PLoS ONE*. 2021;16(5):e0251726-e0251726. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251726>
 263. Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, Tognoli ML, et al. Colorectal cancer liver metastatic growth depends on PAD4-driven citrullination of the extracellular matrix. *Nature Communications*. 2018;9(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07306-7>
 264. Albano C, Matteo Biolatti, Jasenka Mazibrada, et al. PAD-mediated citrullination is a novel candidate diagnostic marker and druggable target for HPV-associated cervical cancer. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2024;14. doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1359367>
 265. Li F, Miao L, Xue T, et al. Inhibiting PAD2 enhances the anti-tumor effect of docetaxel in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. 2019;38(1):414. doi:<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1404-8>
 266. Horibata S, Rogers KE, Sadegh D, et al. Role of peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in mammary carcinoma cell migration. *BMC Cancer*. 2017;17(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12885-017-3354-x>
 267. Sadiq A, Fert-Bober J. PAD inhibition downregulates the cellular fibrotic behavior of senescent myofibroblasts derived from dilated cardiomyopathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;180:117579. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117579>
 268. Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix Metalloproteinases Collagenase-2, Macrophage Elastase, Collagenase-3, and Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Impair Clotting by Degradation of Fibrinogen and Factor XII. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(42):33008-33013. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m001836200>
 269. Checchi V, Maravic T, Bellini P, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in Periodontal Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(14):4923. doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph17144923>
 270. Laugisch O, Wong A, Sroka A, et al. Citrullination in the periodontium—a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clinical Oral Investigations*. 2015;20(4):675-683. doi:<https://doi.org/10.1007/s00784-015-1556-7>
 271. Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atherosclerosis Supplements*. 2003;4(4):53-60. doi:[https://doi.org/10.1016/s1567-5688\(03\)00034-5](https://doi.org/10.1016/s1567-5688(03)00034-5)
 272. Lampson BL, Kendall SD, Ancrile BB, et al. Targeting eNOS in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*. 2012;72(17):4472-4482. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-0057>

273. Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends in Neurosciences*. 2004;27(5):283-289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.009>
274. Daiber A, Xia N, Steven S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(1):187. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms20010187>
275. Zhu J, Song W, Li L, Fan X. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. *Molecular Brain*. 2016;9(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13041-016-0211-9>
276. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Production in Human Atherosclerosis. *Circulation*. 1998;97(25):2494-2498. doi:<https://doi.org/10.1161/01.cir.97.25.2494>
277. Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;39(3):327-335. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017>
278. Kolodziej S, Kuvardina ON, Oellerich T, et al. PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation. *Nature Communications*. 2014;5(1). doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms4995>
279. Ren JG, Jie C, Talbot C. How PEDF prevents angiogenesis: a hypothesized pathway. *Medical Hypotheses*. 2005;64(1):74-78. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.05.016>
280. Yang H, Cheng R, Liu G, et al. PEDF inhibits growth of retinoblastoma by anti-angiogenic activity. *Cancer Science*. 2009;100(12):2419-2425. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01332.x>
281. Du H, Zhao J, Hai L, Wu J, Yi H, Shi Y. The roles of vasohibin and its family members: Beyond angiogenesis modulators. *Cancer Biology & Therapy*. 2017;18(11):827-832. doi:<https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1373217>
282. Streit M, Riccardi L, Velasco P, et al. Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(26):14888-14893. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14888>
283. Wu MH., Huang CY., Lin JA., et al. Endothelin-1 promotes vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Oncogene*. 2014;33(13):1725-1735. doi:<https://doi.org/10.1038/onc.2013.109>
284. Gopinathan G, Milagre C, Pearce OMT, et al. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Research*. 2015;75(15):3098-3107. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1227>
285. Peng Z, Pang H, Wu H, et al. CCL2 promotes proliferation, migration and angiogenesis through the MAPK/ERK1/2/MMP9, PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin signaling pathways in HUVECs. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022;25(2). doi:<https://doi.org/10.3892/etm.2022.11776>
286. Tan PHS, Chia SS, Toh SL, Goh JCH, Nathan SS. The Dominant Role of *IL-8* as an Angiogenic Driver in a Three-Dimensional Physiological Tumor Construct for Drug Testing. *Tissue Engineering Part A*. 2014;20(11-12):1758-1766. doi:<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0245>
287. Akahane T, Akahane M, Shah A, Connor CM, Thorgeirsson UP. TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Experimental Cell Research*. 2004;301(2):158-167. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.002>
288. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis. *Circulation Research*. 2002;90(12):1243-1250. doi:<https://doi.org/10.1161/01.res.0000022200.71892.9f>
289. Dellinger MT, Brekken RA. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 Is Required for VEGF-A/VEGFR2-Induced Proliferation and Migration of Lymphatic Endothelium. Kume T, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28947. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028947>
290. Kim YW., Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 2013;123(5):625-631. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-512749>
291. Krylatov AV, Maslov LN, Voronkov NS, et al. Reactive Oxygen Species as Intracellular Signaling Molecules in the Cardiovascular System. *Current Cardiology Reviews*. 2018;14(4):290-300. doi:<https://doi.org/10.2174/1573403x14666180702152436>
292. Alhayaza R, Haque E, Karbasiafshar C, Sellke FW, Abid MR. The Relationship Between Reactive Oxygen Species and Endothelial Cell Metabolism. *Frontiers in Chemistry*. 2020;8. doi:<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.592688>
293. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia Induces Vascular Endothelial Growth Factor in Cultured Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(52):31189-31195. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.31189>

294. Kma L, Baruah TJ. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2021;69(1):248-264. doi:<https://doi.org/10.1002/bab.2104>
295. Ma W, Kleiman NJ, Sun F, Spector A. Characteristics of tertiary butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide conditioned cells withdrawn from peroxide stress. *Experimental Eye Research*. 2004;78(5):1037-1039. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.01.007>
296. Zhou S, Ye W, Zhang M, liang J. The Effects of Nrf2 on Tumor Angiogenesis: A Review of the Possible Mechanisms of Action. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2012;22(2):149-160. doi:<https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v22.i2.60>
297. Stachowicz A, Sadiq A, Walker B, Sundararaman N, Fert-Bober J. Treatment of human cardiac fibroblasts with the protein arginine deiminase inhibitor BB-CI-amidine activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;167:115443. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115443>
298. Das SK, Sharma NK, Hasstedt SJ, et al. An Integrative Genomics Approach Identifies Activation of Thioredoxin/Thioredoxin Reductase-1-Mediated Oxidative Stress Defense Pathway and Inhibition of Angiogenesis in Obese Nondiabetic Human Subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism/Journal of clinical endocrinology & metabolism*. 2011;96(8):E1308-E1313. doi:<https://doi.org/10.1210/jc.2011-0101>
299. Sarbassov DD. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-1101. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1106148>
300. Wang Y, Li P, Wang S, et al. Anticancer Peptidylarginine Deiminase (PAD) Inhibitors Regulate the Autophagy Flux and the Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Activity *. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(31):25941-25953. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375725>
301. Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, Dimmeler S. Oxidized LDL Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration by an Inhibitory Effect on the Akt/Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway. *Circulation*. 2001;103(16):2102-2107. doi:<https://doi.org/10.1161/01.cir.103.16.2102>
302. Abeyrathna P, Su Y. The Critical Role of Akt in Cardiovascular Function. *Vascular pharmacology*. 2015;74:38-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.008>
303. Chen R, Lin Z, Shen S, et al. Citrullination modulation stabilizes HIF-1 α to promote tumour progression. *Nature Communications*. 2024;15(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-024-51882-w>
304. Mehrdad Khajavi, Zhou Y, Birsner AE, et al. Identification of Padi2 as a novel angiogenesis-regulating gene by genome association studies in mice. *PLoS Genetics*. 2017;13(6):e1006848-e1006848. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006848>
305. Li Y, Huang H, Chen X, et al. PAR2 promotes tumor-associated angiogenesis in lung adenocarcinoma through activating EGFR pathway. *Tissue and Cell*. 2022;79:101918. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101918>
306. Fang Z, Wang X, Sun X, Hu W, Miao QR. The Role of Histone Protein Acetylation in Regulating Endothelial Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9. doi:<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.672447>
307. Wei X, Yi X, Zhu XH, Jiang DS. Histone methylation and vascular biology. *Clinical Epigenetics*. 2020;12(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13148-020-00826-4>
308. Li Y, Liu Z, Liu B, et al. Citrullinated histone H3: A novel target for the treatment of sepsis. *Surgery*. 2014;156(2):229-234. doi:<https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.04.009>
309. Li P, Wang D, Yao H, et al. Coordination of PAD4 and HDAC2 in the regulation of p53 target gene expression. *Oncogene*. 2010;29(21):3153-3162. doi:<https://doi.org/10.1038/onc.2010.51>
310. Okabe J, Orłowski C, Balcerzyk A, et al. Distinguishing hyperglycemic changes by Set7 in vascular endothelial cells. *Circulation Research*. 2012;110(8):1067-1076. doi:<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.266171>
311. The Role of Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) in Shaping the Endothelial Inflammatory Response. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2021;55(5). doi:<https://doi.org/10.33594/000000436>
312. Volk A, Crispino JD. The role of the chromatin assembly complex (CAF-1) and its p60 subunit (CHAF1b) in homeostasis and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2015;1849(8):979-986. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.05.009>

**Kopie prac stanowiących części składowe rozprawy doktorskiej
oraz oświadczenia współautorów**

REVIEW



Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives

Oskar Ciesielski^{1,2} · Marta Biesiekierska¹ · Baptiste Panthu³ · Mirosław Soszyński¹ · Luciano Pirola³ · Aneta Balcerczyk¹

Received: 7 August 2021 / Revised: 29 December 2021 / Accepted: 3 January 2022 / Published online: 25 January 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Numerous post-translational modifications (PTMs) govern the collective metabolism of a cell through altering the structure and functions of proteins. The action of the most prevalent PTMs, encompassing phosphorylation, methylation, acylations, ubiquitination and glycosylation is well documented. A less explored protein PTM, conversion of peptidylarginine to citrulline, is the subject of this review. The process of citrullination is catalysed by peptidylarginine deiminases (PADs), a family of conserved enzymes expressed in a variety of human tissues. Accumulating evidence suggest that citrullination plays a significant role in regulating cellular metabolism and gene expression by affecting a multitude of pathways and modulating the chromatin status. Here, we will discuss the biochemical nature of arginine citrullination, the enzymatic machinery behind it and also provide information on the pathological consequences of citrullination in the development of inflammatory diseases (rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, psoriasis, systemic lupus erythematosus, periodontitis and COVID-19), cancer and thromboembolism. Finally, developments on inhibitors against protein citrullination and recent clinical trials providing a promising therapeutic approach to inflammatory disease by targeting citrullination are discussed.

Keywords Immune disorders · COVID-19 · Cancer · Peptidylarginine deiminases (PADs) · Anti-citrullinated proteins antibodies (ACPAs) · Neutrophil extracellular traps (NETs)

Introduction

Post-translational modifications of histone and non-histone proteins include covalent changes taking place on the amino acid side chain leading to the addition of a chemical group, such as acetyl, methyl, phosphoryl, glycosyl, which significantly change the properties of a protein, its conformation, localization and stability, and help to diversify the protein's functionalities [1, 2]. In addition to the above-mentioned

protein PTMs, particular attention has been given to peptidyl-arginine citrullination, that was found to be an important factor in regulation of the gene expression machinery and, consequently, a regulator of many physiological processes including skin keratinisation, plasticity of the central nervous system or regulation of the immune reactions, by affecting neutrophil extracellular traps (NETs) formation [3, 4]. Citrullination has been also identified as a potential therapeutic target, as conversion of peptidyl-arginine to peptidyl-citrulline plays an important role in promoting tumorigenesis and autoimmunity [5–7]. Recent studies have also shown an association between protein arginine citrullination and COVID-19 severity [8–10].

This review presents the recent advances in the field of protein citrullination and the role of this modification in immune disorders including rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, psoriasis, systemic lupus erythematosus, periodontitis and COVID-19. We survey the current-state-of-the-art regarding the enzymes catalysing the reaction, as well as their substrates. We review the identified citrullinated peptide epitopes that are proposed as disease markers,

✉ Aneta Balcerczyk
aneta.balcerczyk@biol.uni.lodz.pl

¹ Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

² The Bio-Med-Chem Doctoral School, University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

³ CarMeN Laboratory, INSERM Unit 1060, Lyon 1 University, 165 Chemin du Grand Revoyet, BP12, 69495 Pierre Bénite Cedex, France

specifically recognized in certain human autoimmune disorders, and discuss the diagnostic features and potential therapeutic value of anti-citrullinated protein antibodies based on ongoing clinical trials.

Methodology of literature search

Literature search strategy: Medline and Scopus databases were surveyed for original articles and literature reviews with the following keywords and terms, used alone or in combination: *citrullination*, *deimination*, *citrulline*, *peptidylarginine deiminase (PAD)*, *autoimmune disorders*, *rheumatoid arthritis*, *multiple sclerosis*, *systemic lupus erythematosus*, *periodontitis*, *psoriasis*, *inflammatory bowel disease*, *COVID-19*, *ACPA*, *NET*, *NET formation*, *NET disorders*, *therapeutic potential*, *anti-citrullination therapy*, *PAD inhibitors*. Adequate clinical trials were searched in the *NIH clinical trials register* (clinicaltrials.gov) and in *The European Council EU Clinical Trials Register* (<https://www.clinicaltrialsregister.eu>).

Biochemistry of the citrullination process

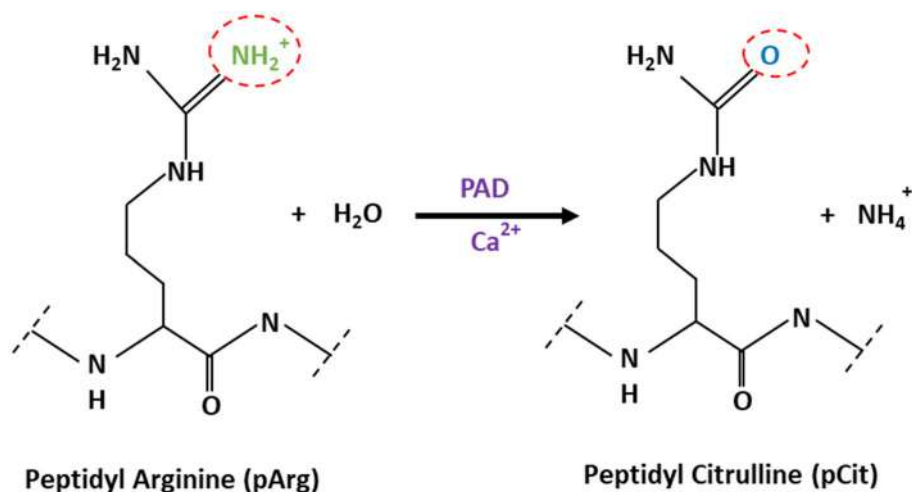
Protein citrullination is an irreversible PTM, and refers to the process of conversion of peptidyl-arginine (pArg) to peptidyl-citrulline (pCit). The reaction, known also as deimination, was first described in 1958 by Rogers and Simmonds [11]. As citrulline is not one of the 20 primary amino acids encoded by DNA, pCit only occurs in proteins following pArg deimination. Citrulline is also a metabolite of the urea cycle, the metabolic pathway mediating the detoxification of ammonia into urea, secreted in the urine [12]. Protein citrullination is catalysed by the peptidylarginine deiminase (PAD) enzyme family [13]. The reaction is, at present, considered to be an irreversible process, as no evidence for the existence of a de-citrullination reaction has been reported

yet. However, as it was the case with protein methylation, which was initially considered as an irreversible protein PTM prior to the discovery of histone demethylases, a group of decitrullinating enzymes may have yet to be discovered [14]. The chemical mechanism of the deimination reaction is based on a primary ketimine group being replaced by a ketone group, resulting in the loss of the positive charge of arginine and production of ammonia. In contrast to positively charged arginine, citrulline is neutral (Fig. 1) [15].

The loss of a positive charge caused by citrullination results in electrostatic and conformational changes of the modified protein, affecting its function by altering binding sites, protein–protein interaction and susceptibility to degradation [15, 16]. Citrullination substantially lowers the amino acid isoelectric point, from 11.41 for arginine to 5.91 for citrulline, thus affecting the acidity of the protein and its potential to form hydrogen bonds and inter amino acid electrostatic interactions (Fig. 2) [17].

The human “citrullinome” includes hundreds of proteins, some of the best known being (i) structural proteins: keratin, fibronectin, actin, tubulin, vimentin and (ii) proteins found in chromatin, notably histones [3]. Recently, protein citrullination has gained much of scientific interest, because of its role in several important biological processes, including skin keratinization, myelin formation and gene expression regulation [4, 5]. One of the best studied processes where citrullination plays a central role is the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), the immune system’s first line of defence against infections. While physiological arginine citrullination does occur in the regulation of many physiological pathways, because of its drastic effects on protein–protein interactions and epitope changes, dysregulated arginine citrullination may contribute to the development of severe pathological states [18]. Increased PAD activity, and thus increased protein citrullination, is strongly linked with the occurrence of autoimmune-mediated inflammatory

Fig. 1 Enzymatic conversion of positively charged arginine into neutral citrulline



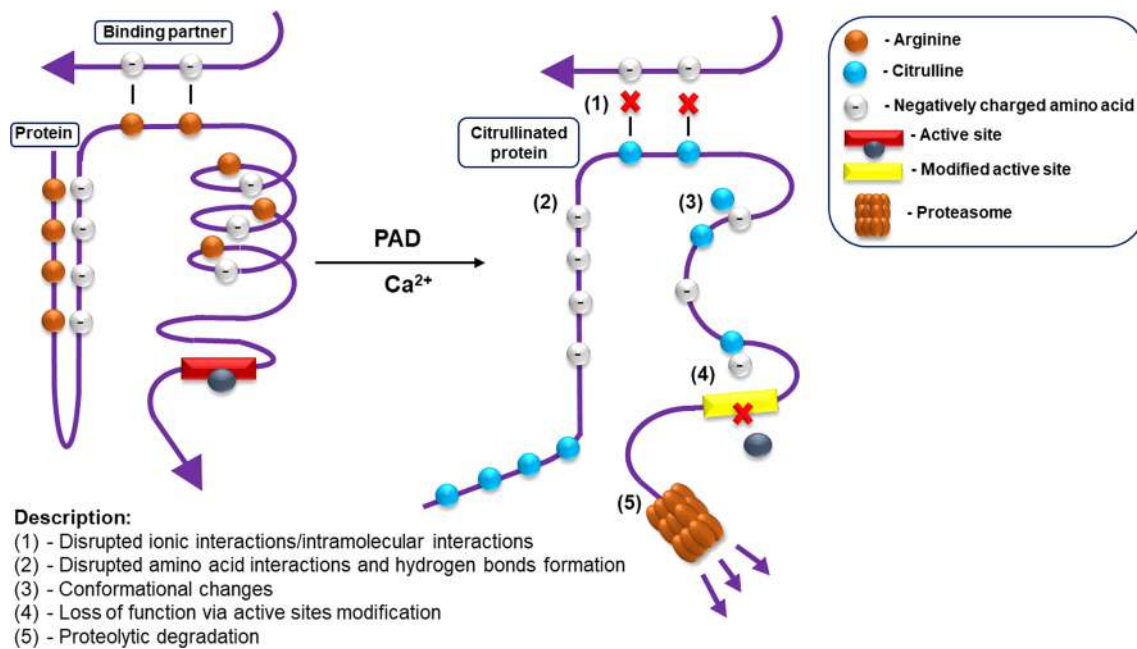


Fig. 2 The effects of citrullination on protein–protein interactions

responses such as rheumatoid arthritis (RA) [19]. Moreover, recent reports suggest that excessive protein citrullination may also play a crucial role in non-autoimmune inflammatory diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), or other inflammatory-linked conditions such as: thrombosis, atherosclerosis, psoriasis, cancer and Alzheimer disease [4]. The link between PAD activity and excessive inflammatory response is discussed in detail in the following sections.

Peptidylarginine deiminases: structure, function and tissue expression

Peptidylarginine deiminases or protein arginine deiminases (PADs), first reported in 1977, belong to the cysteine hydrolases enzyme family (EC 3.5.3.15). PADs drive arginine deimination via a nucleophilic attack of the active site cysteine on the arginine's guanidinium group, leading to the formation of an intermediate acyl-enzyme which is then hydrolyzed to citrulline [13]. There are five known isotypes of PADs: PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 and PAD6, with PAD6 being catalytically inactive, that are distributed in a myriad of human cell types showing a highly tissue-specific expression pattern and consequently perform various functions. All the human PAD isozymes have a length ranging from 663 to 694 amino acids, a molecular weight around 74 kDa and share 70–95% homology within their sequences [13], UniProtKB database]. The overall structure of PADs is composed of two N-terminal immunoglobulin-like domains with regulatory function which are connected

to a C-terminal catalytic domain. PAD2 and PAD4 crystallize as homodimers with the two holoenzyme's active sites exposed on the same face of the dimer [20, 21]. The PADs active site contains a conserved nucleophilic cysteine (C645 in PAD1 and 4; C647 in PAD2; C646 in PAD3), a conserved histidine (H471) and two aspartates (D350 and D473). The cysteine and histidine residues are the two catalytic residues, with the two aspartates acting to stabilize the positively charged peptidyl-arginine substrate between the active site cysteine and histidine. PADs contain 4 (PAD1), 5 (PAD3, 4) and 6 (PAD2) Ca^{2+} binding sites, and these are crucial for PADs catalytic activity, as calcium increases PAD activity by > 10,000 fold. Ca^{2+} binding at these sites leads to a series of conformational changes that induce a catalytically competent active site [22].

Only PAD2 and PAD4 isozymes contain a nuclear localization signal, targeting them to the nucleus where they deiminate histones H1, H3 and H4 [21, 23]. All PAD isotypes require a high concentration of calcium to perform their function, typically above 100 μM . Therefore, in most physiological states, PADs remain inactive. Upon binding of Ca^{2+} , PADs undergo a conformational change that moves the cysteine of the active site into a competent position for catalysis [21, 24]. As shown by Tarcsa et al., not all arginine residues within a polypeptide are amenable to citrullination by PADs. In the case of the two proteins: filaggrin and trichohyalin, the secondary structure is a determinant factor for arginine accessibility and potential conversion to citrulline [25]. Arginine residues in filaggrin, a protein rich in β -turn structures, were frequently citrullinated, as opposed to low

citrullination observed in trichohyalin, a protein in which single α -helix structures prevail [25]. Arginine residues located in disordered structures rapidly undergo the conversion to citrulline, with efficiency up to 95% [25, 26]. Furthermore, the reaction efficiency also depends on the amino acid sequence which contains the target arginine. Arginines located next to glutamic acid residues or flanked by prolines are reported to be less frequently citrullinated, in contrast to arginines proximal to aspartic acid residues, which are more likely to be a substrate for PADs [25, 27]. However, consensus sequences for arginine to citrulline conversion were reported only in filaggrin and trichohyalin, and no further studies involving other proteins have been published to date. Performing such studies on other targets is warranted as it would clarify whether these sequence-specific citrullination rules generally apply to known PAD targets.

As mentioned above, citrullination is crucial for several physiological processes, each being driven by one or more PAD isotypes. Processes reported to require PAD action include: skin differentiation (PAD1, PAD3), terminal differentiation of keratinocytes (PAD1, PAD3), brain and nervous system functioning (PAD2), immune cells differentiation (PAD2, PAD4), immune response—NET formation (PAD4) and proper functioning of the female reproductive system (PAD6). Table 1 summarises the most recent findings on the physiological roles of PAD isotypes and also presents the identified molecular targets/protein substrates.

Expression of PADs in immune cells

Different PAD isoforms present tissue-specific expression patterns [45] (Table 1). Due to the key role of PADs in mediating inflammatory responses, the identification of the expression of specific PADs isoforms in immune cells is of particular importance, allowing their identification as potential therapeutic targets. PAD1 and PAD3 gene and protein expression is very low in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), but detected in specific leukocytes populations (Table 2). On the contrary, gene expression of PAD2 and PAD4 was observed in PBMCs, with detectable expression in B cells, T cells, NK cells and monocytes (CD14⁺, CD3⁺, CD19⁺, CD56⁺). During monocyte to macrophage differentiation, PAD4 gene expression is lost, but PAD4 protein expression persists, indicating its stability. In contrast, PAD2 mRNA levels remain unchanged during monocyte to macrophage differentiation, but PAD2 protein is only detected in macrophages, as PAD2 translation is initiated during macrophage differentiation [46]. Expression of PAD4 in monocytes and PAD2/PAD4 in resting macrophages is, however, not associated to constitutive citrullination. A raise in cytosolic calcium concentration, as occurring during NETs formation or apoptosis, leading to an activatory conformational

Table 1 Physiological roles of PADs

PAD isotype	Expression profile	Known substrates	Physiological roles	Refs
PAD1	Immune cells, keratinocytes, hair follicle, epidermis, uterus	Keratin, Filaggrin, S100A3, MEK1-ERK1/2-MMP2 signalling enzymes	Skin differentiation, terminal differentiation of keratinocytes, epithelial-mesenchymal transition	[5, 28–30]
PAD2	Immune cells, spleen, thymus, skeletal muscle, brain, glial cells, colon, kidney, pancreas, breast, epidermal, bone marrow, salivary gland, secretory gland, ear, eye	MPB, CXCL10, CXCL11, Vimentin, Actin, GFAP, S100A3, Histone H3, Histone H4	Oligodendrocyte differentiation and myelination, brain plasticity, female reproduction, transcription regulation	[5, 29, 31–33]
PAD3	Immune cells, keratinocytes, hair follicles, nerves	Filaggrin, Vimentin, Trichohyalin, S100A3	Skin differentiation, hair follicle formation, terminal differentiation of keratinocytes	[5, 28, 29]
PAD4	Immune cells, brain, uterus, bone marrow, joints, cancerous tissues (e.g. breast carcinomas, lung carcinomas)	NF κ B, NCF2, S100A3, Collagen Type I, HAT p300, NPM1, GSK3 β , ING4, RPS2, FUS, EWS, TAF15, ADAMTS13, Histone H1 (R54Cit), Histone H2A (R3Cit), Histone H3 (R17Cit, R26Cit, R2Cit, R8Cit), Histone H4 (R23Cit, R3Cit)	Immune cells differentiation, cellular differentiation, NET formation, gene expression regulation, tumorigenesis	[5, 13, 28, 29, 33–41]
PAD6	Ovary, early embryo, testicles, ovum, oocyte, thymus	α -tubulin	Cytoskeletal reorganization in the egg and early embryo, preimplantation cleavage, early embryonic development, oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility	[42–44]

Table 2 Estimated protein expression levels based on HIPED (the Human Integrated Protein Expression Database), a unified database of protein abundance in human tissues, residing within GeneCards

Leukocytes/PAD isotype	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4	PAD6
Agranulocytes					
Monocytes	++	+++	—	++	—
B lymphocytes	+++	+	—	+	—
T lymphocytes					
CD4	—	—	—	—	—
CD8	—	+	—	+	—
Other	++	—	—	—	—
Nk-cells	—	+	—	+	—
Granulocytes					
Neutrophils	—	++	+	+++	—
Eosinophils	nd	nd	nd	+	nd
Basophils	nd	nd	nd	nd	nd

nd no data; — no expression; + low/++ moderate/+++ high estimated protein expression level

change by the binding of Ca^{2+} to the Ca^{2+} binding sites of PADs is necessary to induce their activation [29].

PAD inhibitors

The link between PAD activity and inflammatory conditions is strong, with citrullination being causal for the formation of NETs. Therefore, recent years have witnessed an ever growing interest in the development of PAD inhibitors (PADis).

Several reversible wide-spectrum PAD inhibitors have been identified, including streptomycin, minocycline, taxol, chlorotetracycline, ruthenium red and sanguinarine [47–50]. Even more attention has been devoted to the finding of specific PAD4 inhibitors, as PAD4 appears to be the main driver of most citrullination dependent diseases. Initially, GSK121 was identified as a lead compound in a screen for PAD4 inhibitors, and was the basis for lead optimization to produce the more potent and specific PAD4 inhibitors GSK484 and GSK199 [50]. These specific PAD4 inhibitors showed significant inhibition of protein citrullination and NET formation in human and mouse neutrophils [51]. In a recent study, Aliko et al. tested six compounds proposed as novel PAD4 inhibitors, one of which (compound 4—SC97362) showed significant inhibitory potential [52].

Reversible PADis are relatively weak inhibitors, most likely due to the small active site cavity which requires calcium binding to the enzyme to accommodate the side chain of peptidyl-arginine substrate [53]. Therefore, the most potent PADis described to date are compounds that covalently modify the active site cysteine, in an irreversible way [50]. An activity-based protein profiling high-throughput

screening platform identified NSC95397 and streptonigrin as irreversible PADis [50]. It was also shown that 2-chloroacetamide covalently binds to and inhibits PAD4 [54–56]. In 2006, Luo et al. described two compounds Cl-amidine and F-amidine which act as pan-PAD inhibitors through covalent modification of the active site cysteine in a time and concentration dependent manner [56, 57]. Both inhibitors have shown promising results for potential use as therapeutics. Cl-amidine reduced ex vivo NET formation by preventing histone H3 citrullination [58] and reduced the severity of arthritis by reducing the production of autoantibodies against citrullinated epitopes in a mouse model of collagen-induced arthritis [59]. F-amidine was shown to inhibit the citrullination of p300 by PAD4 [57]. Incorporation of a carboxylate moiety at the *ortho* position of Cl-amidine and F-amidine produced the second generation of PADis, namely *o*-Cl-amidine and *o*-F-amidine [50, 53]. These modified inhibitors show significant improvement of potency and selectivity, and are more potent in inhibiting histone H3 citrullination in HL-60 cells (> 100-fold) [50, 60]. Two more modifications of Cl-amidine and F-amidine were synthesized by introducing an N-terminal biphenyl group and a C-terminal benzimidazole group, namely BB-Cl-amidine and BB-F-amidine. The introduced groups increase the hydrophobicity, bioavailability and stability of the compounds [50]. Although these PADis show similar potency to Cl-amidine and F-amidine, BB-Cl-amidine has a longer half-life in vivo than Cl-amidine, and is also more cytotoxic to U2OS cells (~20 fold) [50, 61]. BB-Cl-amidine was shown to inhibit NET formation and to downregulate the expression of type I interferon genes in MRL/lpr mice [61]. Another derivative of Cl-amidine—PAD2-IN-1—is a potent and highly selective PAD2 inhibitor (over 95-fold and 79-fold more potent over PAD4 and PAD3, respectively) [62]. Interestingly, two peptidic PADis with C-terminal chloroacetamide- or fluoro-conjugated orthenine were identified in a small library: TDFA (Thr-Asp-F-amidine) and TDCA (Thr-Asp-Cl-amidine). These two compounds show high selectivity to specific PAD isoforms: TDFA towards PAD4 and TDCA towards PAD1 and PAD4 [50, 53]. Although numerous PADis have been reported in the literature, as presented in Table 3, Cl-amidine and BB-Cl-amidine remain the most investigated.

Protein citrullination as a hallmark of immune disorders

Findings of the recent years have permitted to establish that citrullination is a process strongly linked to inflammation [79]. Multiple studies show that most immune disorders are characterized by an excess of citrullinated proteins [19]. The human immune system in normal conditions is not self-reacting to citrullinated proteins. However, as citrullination

Table 3 An overview of PAD inhibitors

Type	Inhibitor	IUPAC name (from PubChem)	Inhibitory potential	Refs
Reversible inhibitors	Streptomycin	2-[(1R,2R,3S,4R,5R,6S)-3-(diaminomethylideneamino)-4-[(2R,3R,4R,5S)-3-[(2S,3S,4S,5R,6S)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-(methylamino)oxan-2-yl]oxy-4-formyl-4-hydroxy-5-methyl-oxolan-2-yl]oxy-2,5,6-trihydroxycyclohexyl]guanidine	IC ₅₀ PAD4 = 1.8 mM	[50, 55, 63]
	Minocycline	(4S,4aS,5aR,12aR)-4,7-bis(dimethylamino)-1,10,11,12a-tetrahydroxy-3,12-dioxo-4a,5,5a,6-tetrahydro-4H-tetracene-2-carboxamide	IC ₅₀ PAD4 = 620 μM	[48, 50, 64]
	Taxol	[4,12-diacetyloxy-15-(3-benzamido-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl)oxy-1,9-dihydroxy-10,14,17,17-tetramethyl-11-oxo-6-oxatetracyclo[11.3.1.0.3,10.0.4,7]heptadec-13-en-2-yl]benzoate	Pan-PAD inhibition at 12.5 mM	[49, 50, 65, 66]
	Chlortetracycline	(4S,4aS,5aS,6S,12aR)-7-chloro-4-(dimethylamino)-1,6,10,11,12a-pentahydroxy-6-methyl-3,12-dioxo-4a,5,5a-tetrahydrotetracene-2-carboxamide	IC ₅₀ PAD4 = 100 μM	[48, 50, 63, 67]
	Ruthenium red	Azane; ruthenium(2+); hexachloride; dihydrate	K _i PAD1 = 30 μM K _i PAD2: 17 μM K _i PAD3: 25 μM K _i PAD4: 10 μM	[50]
	Sanguinarine	24-methyl-5,7,18,20-tetraoxa-24-azoniahexacyclo[11.11.0.0.2,10.0.4,8.0.14,22.0.17,21]tetracos-1(24),2,4(8),9,11,13,15,17(21),22-nonaene	K _i PAD1 = 2000 μM K _i PAD2 = 100 μM K _i PAD3 = 60 μM K _i PAD4 = 80 μM	[50, 68]
	GSK121	(3-aminopiperidin-1-yl)(1-methyl-2-(1-methyl-1H-indol-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methanone 2,2,2-trifluoroacetate	IC ₅₀ PAD4 = 3.2 μM	[50, 51]
	GSK484	(3-amino-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-(8-(7-(cyclopropyl-methyl)-7-aza-bicyclo[4.3.0]nona-1(6),2,4,8-tetraen-8-yl)-5-methoxy-7-methyl-7,9-diaza-bicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-3-yl)-methanone	IC ₅₀ PAD4 = 50 nM	[50, 51, 69, 70]
	GSK199	(R)-(3-Aminopiperidin-1-yl)(2-(1-ethyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)-7-methoxy-1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methanone hydrochloride	IC ₅₀ PAD4 = 200 nM	[28, 50, 51, 71]
	NSC95397	2,3-bis(2-hydroxyethylsulfanyl)naphthalene-1,4-dione	K _i PAD1 = 175 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD2 = 1600 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD3 = 9150 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD4 = 4530 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 68, 72, 73]
Irreversible inhibitors	Streptonigrin	5-amino-6-(7-amino-6-methoxy-5,8-dioxoquinolin-2-yl)-4-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)-3-methylpyridine-2-carboxylic acid	K _i PAD1 = 3700 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD2 = 12,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD3 = 3500 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD4 = 440,000 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 74]
	2-chloro-acetamide	2-chloroacetamide	—	[50, 54, 75, 76]
	Cl-amidine	N-[(2S)-1-amino-5-[(1-amino-2-chloroethylidene)amino]-1-oxopentan-2-yl]benzamide	K _i PAD1 = 37,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD2 = 1200 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD3 = 2000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD4 = 13,000 M ⁻¹ min ⁻¹	[31, 51, 56, 58, 60, 61, 64]
	F-amidine	N-[(2S)-1-amino-5-[(1-amino-2-fluoroethylidene)amino]-1-oxopentan-2-yl]benzamide	K _i PAD1 = 2800 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD2 = 380 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD3 = 170 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD4 = 3000 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 54, 56, 62]
	o-Cl-amidine	N-α-(2-carboxyl)benzoyl-N5-(2-Chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide	K _i PAD1 = 100,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD2 = 40,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD3 = 8000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD4 = 50,000 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 60]
	o-F-amidine	N-α-(2-carboxyl)benzoyl-N5-(2-fluoro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide	K _i PAD1 = 40,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD2 = 180,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD3 = 7000 M ⁻¹ min ⁻¹ K _i PAD4 = 45,000 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 60]

Table 3 (continued)

Type	Inhibitor	IUPAC name (from PubChem)	Inhibitory potential	Refs
	BB-Cl-amidine	N-[(1S)-4-[(1-amino-2-chloroethylidene)amino]-1-(1H-benzimidazol-2-yl)butyl]-4-phenylbenzamide	K_i PAD1 = 16 100 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD2 = 4 100 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD3 = 6 800 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD4 = 13 300 M ⁻¹ min ⁻¹ EC ₅₀ PAD4 = 8.8 μM	[50, 56, 61, 70]
	BB-F-amidine	N-[(1S)-4-[(1-amino-2-fluoroethylidene)amino]-1-(1H-benzimidazol-2-yl)butyl]-4-phenylbenzamide	K_i PAD1 = 900 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD2 = 1200 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD3 = 3400 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD4 = 3750 M ⁻¹ min ⁻¹	[50]
	PAD2-IN-1	N-[(1S)-4-[(1-amino-2-fluoroethylidene)amino]-1-(4-ethoxy-1-methylbenzimidazol-2-yl)butyl]-3-oxo-1,2-dihydroisoindole-4-carboxamide	IC ₅₀ PAD2 = 8.3 μM	[50, 62]
	TDFA	N-Acetyl-L-threonyl-L-α-aspartyl-N5-(2-fluoroethanimidoyl)-L-ornithinamide	K_i PAD4 = 25,000 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 77, 78]
	TDCA	N-Acetyl-L-threonyl-L-α-aspartyl-N5-(2-chloroethanimidoyl)-L-ornithinamide	K_i PAD1 = 20,000 M ⁻¹ min ⁻¹ K_i PAD4 = 24,000 M ⁻¹ min ⁻¹	[50, 78]

substantially affects protein structure and folding, some epitopes may undergo changes or new epitopes may be formed upon protein citrullination, which in turn may trigger immune response against citrullinated host protein resulting in autoimmune reaction [80]. Moreover, in most patients with autoimmune-mediated conditions, PAD2 and PAD4 levels are elevated, further indicating a strong correlation between protein citrullination and these diseases [4]. In line with these observations, high levels of citrullinated proteins are often found in patients prior to the onset of rheumatoid arthritis [81].

Abnormal PAD activity is now firmly associated with a number of immune disorders, such as: rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, periodontitis, psoriasis and inflammatory bowel disease (Table 4) [15, 82]. In the following sections the latest findings on PAD's involvement in immune system disorders, including COVID-19, recently affecting the world globally, are discussed.

PAD4-mediated NETs: the double edged sword of the immune system

Neutrophils, a subclass of blood granulocytes, constitute the vanguard of the human innate immune response to invading pathogens: bacteria, fungi and viruses [86, 87]. Their modes of action include: phagocytosis—consisting of the direct engulfing of pathogens, production of reactive oxygen species (ROS) and release of cytokines and chemokines, which recruit other immune cells and enhance the host immune response [88, 89]. In 2004, the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) was identified as a new mechanism of neutrophil action against invading pathogens [90]. NETs are composed of a decondensed chromatin scaffold decorated with factors possessing

high bactericidal properties such as: citrullinated histones, cathepsin G, lactoferrin, proteinase 3, neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO) and peptidoglycan-binding proteins [91]. NETs have been also reported to be highly effective in fighting viral infections by blocking viral replication through PKC (Protein Kinase C) pathway inhibition [89, 92]. As shown by numerous studies, NET formation is also a citrullination dependent process, mainly driven by PAD4-mediated citrullination of histone H3 [93]. Neutrophils show a high expression level for PAD4, further indicating an important function for this enzyme in cell specific immunoreactivity [94]. The classic NET activation pathway via the induction of the formation of terminal complement complexes (C5b–9) is described in detail in other reviews [95]. Briefly, during NET formation, PAD4 citrullinates histones in neutrophils, resulting in chromatin decondensation due to the loss of histone positive charges [29, 96]. Part of the citrullinated histones may be excised from the chromatic template and subsequently released in the extracellular space where anti-pathogen effects takes place [97]. The mechanism is schematically presented on Fig. 3. The importance of PAD4 action for NETs was initially shown in studies utilizing pan-PAD inhibitors, such as Cl-amidine, that significantly reduces NET formation [29]. Subsequently, novel reversible PAD4-specific inhibitors, belonging to the GSK family (GSK121, GSK199 and GSK484) were shown to be sufficient to disrupt mouse and human NET formation [51]. Several studies suggest also a role for PAD2 in NET action, however, in contrast to PAD4, PAD2 is currently not viewed as a factor required for NET formation, but rather as an intrinsic component of mature NETs [98–100]. Although beneficial during pathogen invasion, citrullination driven NET formation can also have detrimental effects on the host, thus it may

Table 4 Reported involvement of PADs in immune disorders

PAD isotype	Disease	Role in disease/molecular target (if applicable)	Refs
PAD1	Psoriasis	Changes in skin differentiation pathways/keratin	[13, 83]
PAD2	Multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, COVID-19	Hypercitrullination of MBP resulting in myelin sheet disruption /MBP	[84, 85]
PAD4	Rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, cancer, COVID-19	Hypercitrullination of many proteins e.g. vimentin, filaggrin, MP resulting in production of ACPAs and acute autoinflammatory reactions, excessive NET formation, gene expression regulation via histone citrullination	[5, 13, 31, 86]
PAD6	Infertility	Early embryonic arrest/unknown	[42, 43]

be perceived as a double edged sword. Increased action of PAD enzymes in NETs may result in loss of immune tolerance to citrullinated proteins, and recently multiple studies have shown that excessive NETs build up may contribute to the development of several autoimmune and autoinflammatory diseases [91].

Rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is an immune disorder in which protein citrullination plays a prominent role. RA is a chronic and progressive disease, characterized by a symmetric deformity of joints, which may result in structural damage to the joint and systemic inflammation [101]. A specific characteristic of the disease is the presence of high quantities of autoantibodies directed against post-translationally modified proteins in synovial tissue fluids [19]. Pathogenesis of RA can progress for decades, with initial years of asymptomatic autoimmunity, until symptoms, including tissues erosion and joint inflammation become apparent [102]. RA can cause disability as chronic synovial inflammation, as well as hyperplasia, drive joint damaging and bone thinning [103]. As shown by numerous reports, protein

citrullination, and thus PAD activity, is one of the main players in RA pathogenesis. In RA patients the expression, activity as well as activation of PAD2 and PAD4 are increased [104]. A model for increased PAD activity in inflamed joints proposed that PAD enzymes originate from monocytes and macrophages recruited to the joints [13, 46]. In this model, macrophages and monocytes rich in PADs are eventually degraded and undergo apoptosis, which causes PAD activation due to rising levels of calcium [46]. These activated PADs are then free to citrullinate both cellular and extracellular proteins, building an excessive pool of citrullinated proteins in the joints that eventually cause the loss of immune tolerance [19]. Some of the best known PAD2 and PAD4 targets in RA are: vimentin, fibrinogen, fibronectin, anti-thrombin and α -enolase [19]. When immune tolerance to citrullinated proteins is lost, anti-citrullinated proteins antibodies (ACPAs) are produced that recognize the newly formed epitopes [105]. ACPAs are detected in 75% of RA patients, and, therefore, their detection is used as a predictive method before disease onset as they are present in the serum of patients even 5 years prior to the symptomatic phase of the disease [3]. Although a large number of proteins are targeted by PADs in RA, only a few were identified as targets for ACPAs namely: vimentin, α -enolase and fibrinogen. These ACPAs demonstrate arthritogenic potential

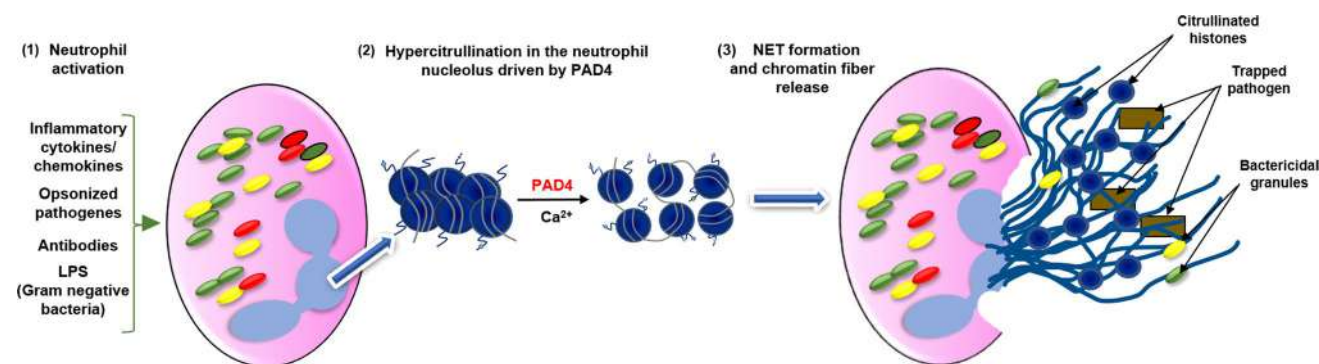


Fig. 3 Schematic presentation of the classical concept for PAD 4-mediated NET formation. (1) Neutrophils stimulated by a range of proinflammatory stimuli, including microbial agents, trigger a cascade of reactions that ultimately entrap and kill pathogens. (2) PAD4-

driven hypercitrullination of proteins, including histones, causes changes in the chromatin architecture and relaxation of its structure. (3) This allows neutrophils to release chromatin fibres that are able to bind and kill bacteria as well as degrade virulence factors

and greatly stimulate the progression of the autoimmune response, suggesting their direct involvement in the pathogenesis of RA. The biological actions of ACPAs include: stimulation/promotion of proinflammatory cytokine production, induction of osteoclastogenesis and stimulation of NET formation [105]. In vitro studies demonstrated that ACPAs from RA patients activate the complement via the classical and alternative pathway, which further exacerbate the autoimmune response in the joints [106]. It was also reported that ACPAs may stimulate macrophages to produce and release inflammatory mediators (e.g. TNF- α) in the joints [107, 108]. NETs are reported to be highly dysfunctional in RA, and serve as a driving force for increasing ACPAs [6]. PAD4-mediated NET formation leads to citrullination of histones H2A, H2B and H4 serving as antigens and, in addition, generation of citrullinated vimentin which stimulates the secretion of proinflammatory cytokines [109, 110]. Increased NET formation may be induced by inflammatory mediators such as: TNF- α , IL-8 and IL-17. These mediators are released by immune cells in large quantities in response to ACPAs and NETs, and amplify the occurrence of ACPAs antigens. Therefore, a cycle of NET formation and ACPAs accumulation can be hypothesized: the initial ACPAs induce inflammatory mediators which in turn activate NET formation and the production of even more ACPAs (Fig. 4) [111]. The vicious circle of reciprocal reinforcement of ACPAs and NETs does not apply, however, to all reported ACPAs. The use of monoclonal therapeutic antibodies designed to target citrullinated N-termini of histones 2A and 4 demonstrated that citrullinated histones are specific targets for therapeutic intervention with anti CitH2/H4 therapeutic antibodies, leading to a decrease in NET formation [111]. The development of therapeutic anti-citrullinated antibodies will be discussed more in detail in the paragraph "Diagnostic and therapeutic potential of citrullination". It was also recently reported that NETs can directly injure cartilage in RA, with PAD2 action directly contributing to this process [112]. To summarize, PAD catalytic activity and protein citrullination have been linked to the pathogenesis of RA for over 20 years, however, the role for NETs in RA etiology and the comprehension of the mechanisms leading to the development of strong autoimmune responses to citrullinated proteins still require further elucidation.

N-glycosylation determines the pathogenicity of ACPAs

N-linked glycans play an important role in immunity and, in autoimmune disease, the severity of the response to autoantibodies can be modulated by the degree of glycosylation on the Fc or variable domain (Fab) of immunoglobulins [113]. Several studies demonstrated that glycosylation patterns of ACPAs modulate their pathogenicity and change during autoimmune disease progression. To evaluate the

establishment of Fc glycosylation patterns on ACPAs before onset of rheumatoid arthritis and during the development of the disease, serum was collected at baseline from patients with ACPA-positive arthralgia—a joint pain condition predisposing to RA—and at a various follow-up time points. Within this cohort, the 57% of the participants who developed arthritis displayed a higher degree of ACPA-IgG1 Fc fucosylation at baseline and prior to diagnosis as compared to the fucosylation levels observed in total IgG1 [114]. Similarly, a strong enrichment of N-linked glycans on the Fab-domain of ACPAs IgG, leading to a 10–20 kDa higher molecular weight compared to non-autoreactive IgG, was identified in RA patients [115]. Structural analysis indicated that > 90% of ACPA-IgG Fab-domain contains highly sialylated glycans, representing a five-fold enrichment in sialylation as compared to control IgGs from the same donor [116]. High sialylation was more notable in ACPAs from synovial fluids than serum ACPAs from the same patient [116]. These data indicate that ACPAs glycosylation contribute to their arthritogenic potential and increased glycosylation stimulates the progression to RA. The measure of ACPAs glycosylation levels may potentially be used as a biomarker to monitor disease progression and ACPAs IgG glycosylation may be a target for disease treatment.

Multiple sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by demyelination of the central nervous system (CNS) [117]. Demyelination leads to loss of nerve signal transduction, causing severe adverse neurological effects that are clinically manifested as ataxia, weakness, visual loss, movement disorders, bladder dysfunction and even complete disability [118, 119]. The etiology and pathogenesis of MS still remains unclear. It is believed that genetic factors combined with environmental factors and vitamin D deficiency contribute towards a higher risk of MS development [120]. Another theory indicates that epigenetic changes, highly susceptible to environmental factors, passed from parents to progeny may also contribute to MS onset [121]. One of the proposed mechanisms for the occurrence of demyelination and MS development is the failure to maintain the myelin sheet structure due to excessive myelin basic protein (MBP) citrullination. MBP citrullination was shown to be carried out by PAD2, and increased expression of this isotype is reported in the white matter and peripheral blood of MS patients [84, 85]. Overexpression of PAD2 and the associated enhancement of citrullination of MBP in MS patients is the result of hypomethylation of the PAD2 gene promoter [84]. The role of PAD2 in demyelination is also supported by a study in which PAD2 knock-out mice exhibit no CNS citrullination and demyelination [65]. In healthy individuals, 18% of MBP arginines are citrullinated whereas in MS

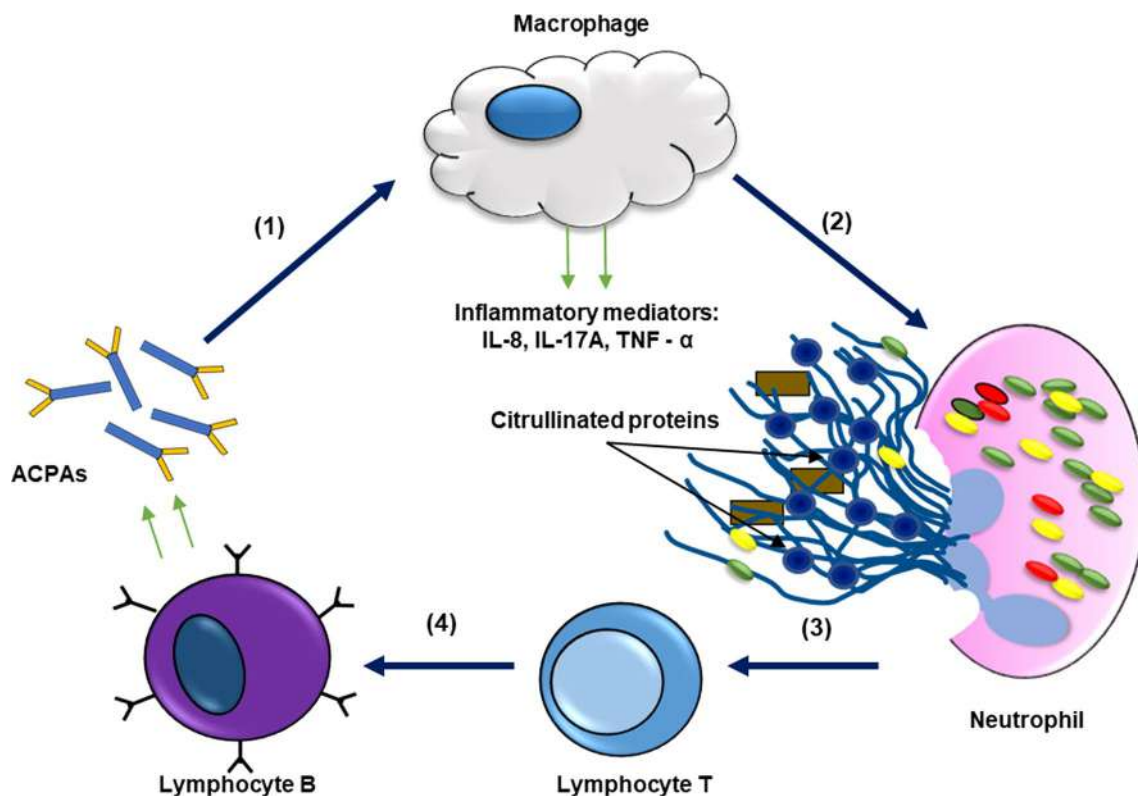


Fig. 4 The proposed role of NETs and increasing ACPAs level in rheumatoid arthritis. (1) ACPAs induce the production and release of inflammatory mediators by macrophages. (2) Inflammatory mediators secreted from macrophages induce NET formation. (3) Citrullinated

proteins released during NETosis are recognised by lymphocytes T. (4) Antigen presentation and induction of ACPA production resulting in a vicious inflammatory circle with an excessive immune response

patients the citrullinated arginine to total arginine ratio increases to approximately 45% [4]. The enhanced citrullination profile of MBP causes extensive loss of net positive charges and partial unfolding of MBP molecules. MBP hypercitrullination prevents the transition of lipid bilayers into compact multilayers, resulting in highly unstable myelin sheets and loss of proper nerve signal transduction [65]. To summarise, current evidence indicates that excessive protein citrullination, mediated by PAD2 overexpression, may be an etiologic factor in MS onset.

Systemic lupus erythematosus

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic systemic autoimmune disease that can manifest itself in any part of the body. Due to its heterogeneity in clinical manifestation, SLE diagnosis and treatment can be challenging [122]. SLE is characterized by loss of immune tolerance and abnormal B- and T-cell function, eventually leading to significant morbidity and mortality [122]. A hallmark of SLE is the release of a plethora of autoantibodies, including ACPAs [123]. Tissues of patients affected by SLE exhibit increased levels of citrullinated proteins. PAD4 is directly involved in SLE

through its role in NET formation and histone citrullination [124] while the role for PAD2 and other PAD isotypes in SLE has not yet been investigated. The observed high levels of citrullinated proteins contribute to the loss of immune tolerance and high production of ACPAs, which subsequently cause the detrimental autoimmune response in SLE [125].

Psoriasis

Psoriasis is a relatively common chronic immune-mediated skin disorder, displaying clinical manifestations of well-demarcated red scaly lesions on the skin [125]. Psoriasis lesions are typically found on the scalp, elbow and knees, and the disease may also be accompanied by arthritis as comorbidity [126]. The cause of psoriasis remains to be elucidated. Clinically, psoriasis results from rapid proliferation of keratinocytes in the epidermis' basal layer and high migration of excess keratinocytes to the skin's surface. Due to such rapid maturation, keratinocytes accumulate on the skin surface forming thick dry patches [127, 128]. The reason for the hyperproliferation of keratinocytes is unknown, however, the infiltration of immune cells in the skin may play a decisive role in lesion formation [126]. Recently,

Benhadou et al. showed that the contribution of immune cells, keratinocytes, endothelial cells and several other skin-resident cells is required for the maintenance and progression of psoriatic alterations [129]. There is also evidence supporting a driving role of citrullination in psoriasis. PAD1 is expressed at high level in keratinocytes, where it citrullinates keratin K1 during terminal differentiation [83]. Deimination of arginines in keratin K1 facilitates the compaction of keratin filaments, a phenomenon required for normal epidermis cornification [4]. Several groups reported that in skin samples from psoriasis patients there is loss of citrullinated keratin K1 [83, 126, 130]. Lack of citrullinated keratin K1 results in disturbed epidermis cornification, and may be a contributing factor to psoriasis. It was reported that, besides lowered citrullinated keratin K1 levels in psoriasis patients, psoriatic cornified cell layers displayed lowered levels of global protein citrullination [83]. As expression levels of PADs in psoriatic lesions are not altered, the PADs catalytic activity is enhanced in the course of the disease [130]. Lately, a role for NETs was proposed in psoriasis, but their role is not defined. In psoriatic patients, the amount of NETs formed was increased and correlated with disease severity [125]. The administration of a PAD4 inhibitor Cl-amidine alleviated the gravity of psoriatic lesions in a mouse model and decreased NETs formation, suggesting a role for both NETs and PAD4 activity in this disorder [131].

Periodontitis

Periodontitis (PD) is an inflammatory disease of the oral cavity affecting the tissues supporting teeth that, if left untreated, may result in teeth loss. PD is caused by the gram-negative anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis* [4, 132]. The *P. gingivalis* peptidylarginine deiminase enzyme (PPAD) can rapidly citrullinate both bacterial and human host proteins such as fibrinogen and α -enolase [4]. PPAD released from *P. gingivalis* can spread into the host's connective tissue, where can modify/citrullinate epidermal growth factor (EGF), thus blocking its recognition by the epithelium. This mechanism delays the local healing process and breaks the local protective epithelial cell-periodontal tissue barrier [132]. PPAD also generates a pool of new potent antigenic epitopes that, when present in excess, break the tolerance barrier, which will result in generating ACPAs and may induce an acute autoimmune response [132, 133]. High levels of ACPAs are observed in patients with aggressive form of periodontitis [134]. Analysis of the possible link between PD and RA (as the autoimmune response induced by *P. gingivalis* is similar to that observed during RA) revealed that host and microbial PAD activities are highly elevated in RA and non-RA periodontitis patients. Moreover, the severity of periodontal conditions was increased in patients with RA comorbidity as compared to healthy

individuals [133, 135]. Although PD is not an autoimmune disease itself, it may induce a severe autoimmune response of the host, where citrullinated proteins are an important factor for disease development.

Inflammatory bowel disease

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic inflammatory conditions characterized by inflammation of the intestinal mucosa. The two main subtypes of IBD include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) [136]. In UC patients, chronic inflammation is limited to the intestinal mucosae and in CD patients the inflammation can be transmural in the whole gastrointestinal tract [136], rendering CD more aggressive. In healthy human colon enzymatic PAD activity is negligible, suggesting that deimination processes are not physiologically required in the intestine. In contrast, PADs and citrullinated protein levels are increased in human UC [79]. As in the case of RA, elevated levels of citrullinated proteins may trigger an atypical immune response to the newly formed epitopes and high levels of ACPAs induce inflammation of the UC [136, 137]. Moreover, immunohistochemical staining of human UC samples demonstrated strong expression of both PAD2 and PAD4, and treatment of UC mice with Cl-amidine reduced inflammation [137]. A cohort study of 114 Japanese patients with UC suggested that specific PAD4 haplotypes previously known to be associated with RA are also found in UC [138]. Recent studies suggest an even more prominent role for PAD4 in IBD, as it was found that IBD occurrence was positively correlated with PAD4 and negatively correlated with PAD2 [82, 139]. Also, some researchers have tried to link IBD to NETs formation. Given the key role of citrullination in this process, higher correlation of increased PAD4 expression with IBD incidence may be explained. Inflamed colon of UC patients displayed increased NET formation and overexpression of NET-associated proteins, including citrullinated histones and PAD4, with both responses being diminished in subjects receiving streptonigrin, a selective PAD4 inhibitor [140, 141]. Similar results were recently reported by Li et al., in which NETs formation increased tissue damage and thrombotic tendency in IBD [142]. In conclusion, targeting NETs in IBD may provide an effective therapeutic approach to alleviate the disease [143].

COVID-19 and pulmonary diseases

COVID-19 is a novel disease caused by infection with the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [144]. The disease spread across the world from late 2019 causing a global pandemic and a plethora of global health, sociological and economical adverse effects [145, 146]. The disease can manifest itself with multiple

symptoms, making it hard to properly diagnose patients in the absence of a molecular test detecting the viral genome [147, 148]. The most common COVID-19 symptoms include: influenza-like symptoms, diarrhoea, anosmia, osteoarticular disorders and a cytokine storm which affects the functioning of the immune system [149]. The severity of the symptoms varies between patients, ranging from asymptomatic cases, to mild consequences, to lethal respiratory failure [150]. As scientists around the world race to find effective treatments to COVID-19, in addition to currently available preventive vaccination approaches, a link between the disease and protein citrullination starts to emerge. Sera from COVID-19 patients have elevated levels of citrullinated histone 3 as well as myeloperoxidase-DNA complexes, two specific markers of NETs [8]. Increased level of histone H3 citrullination in COVID-positive patients was found to be correlated with increased leukocyte, granulocytes and cytokine IL-8 levels, indicating the occurrence of an acute inflammatory response [9]. What is even more interesting, in the context of arginine deiminase's role in determining the severity of COVID-19, is that SARS-CoV-2 positive patients show increased levels of NET formation, and sera from those patients cause NET formation when added to control neutrophils [10, 151]. The lungs are the most devastated organ by COVID-19, and elevated NETs formation was reported in lung epithelial tissue and tracheal aspirate, indicating that NETs may be an important factor to the severity of the disease [151–153]. As PAD4 activity is essential for NET formation, and elevated levels of citrullinated H3 are detected in COVID-19, it may be possible that the virus alters PAD4 activity. A recent study by Arisan et al. based on transcriptomic data from patients' biopsies and in vitro experiments linked PADs activity to SARS-CoV-2 infection [154]. However, more studies on this subject must be performed to unravel the complete picture of PAD involvement, and NET formation, in COVID-19 [154]. Zuo et al. propose that the positive correlation between platelet count and citrullinated H3 levels, and thus the abnormal increased platelet count, is one of the possible explanations for the vascular clinical manifestations of COVID-19 [8, 151]. Interestingly, elevated levels of citrullinated circulating nucleosomes were reported in COVID-19 patients [150]. Cavalier et al. propose to use circulating citrullinated nucleosomes as biomarkers for COVID-19, as citrullination levels are positively correlated to disease severity [150]. SARS-CoV-2 is known to cause, in a percentage of patients, a post-acute COVID-19 syndrome, termed long-COVID, characterized by persistent symptoms and delayed long-term complications [155]. Such prolonged effects may result in even more excessive accumulation of citrullinated proteins, and, therefore, lead to loss of immune tolerance. A first case of increased levels of ACPA in a post-COVID-19 patient showing initial symptoms of RA was recently reported [156]. This may be the

first of many reported post-COVID-19 symptoms related to citrullination. These recent data linking citrullination and NETs to COVID-19 indicate that citrullination events may be highly relevant to the physiopathology of COVID-19 and more generally in pulmonary diseases associated with lung inflammation.

One of the COVID-associated pulmonary complications that develops even 6–8 weeks after initial infection with SARS-CoV-2, particularly in critically ill patients treated in intensive care units, is lung fibrosis, a condition that may also result from other causes such as cigarette smoking or long-term exposure to cigarette smoke. Although there is no data so far about protein citrullination level in COVID patients suffering from lung fibrosis, it was found that in a model of lung fibrosis induced by cadmium and carbon black (Cd/CB), two cigarette components providing a model for cigarette smoke, the level of citrullinated vimentin (Cit-vim) was significantly increased and was related with a TLR4-dependent activation of NF- κ B and the production of active TGF- β 1, CTGF (Connective Tissue Growth Factor) and IL-8 [157]. These ex vivo studies were confirmed in a mouse model in which control animals treated with Cit-vim developed TLR4-dependent lung tissue fibrosis, whereas *PAD2*^{-/-} mice, exposed to cadmium/carbon black did not generate high amounts of Cit-vim. This observation points at PAD2 as a promising potential factor in fibrosis treatment.

Cancer

Studies in cancer cell lines demonstrated that the occurrence of histone citrullination, mediated by PAD4, on p53-regulated genes, including p21, CIP1, WAF1 and OKL38 repressed their transcriptional activation, leading to cell cycle arrest and apoptosis [158, 159]. These findings are in support of the notion that targeting PAD4 and other PAD enzymes may provide a novel strategy to inhibit tumor growth [160]. Immunohistochemistry and western blot detection demonstrated PAD4 overexpression in various tumor types, especially adenocarcinoma. In these samples, PAD4 overexpression was found to be associated with cytokeratin, a widespread tumor marker, in a citrullinated form that rendered it resistant to the digestion by caspases [161]. Elevated PAD4 levels were also observed by ELISA in the blood of patients with malignant tumors, but not in blood of patients with benign tumors [162]. Similarly, overexpression of PAD2 was observed in prostate cancer and correlated to histone H3 citrullination [163]. Administration of the pan-PAD inhibitor Cl-amidine synergized with the androgen receptor inhibitor enzalutamide to decrease prostate cancer cells proliferation in vitro and in xenografts [163].

Besides the direct promoting effect of histone/protein citrullination on cancer growth, a recent study on a cohort

of 975 patients with cancer demonstrated that citrullinated histone H3, a marker of NETs and arterial thromboembolism, predicts the risk of all-cause mortality in patients with cancer [164].

Thrombosis

A study by Fuchs et al. proved for the first time that NETs perfused with blood caused platelet adhesion, activation and aggregation demonstrating that NETs provide a structural platform and biological stimulus for thrombus formation [165]. PAD4, by promoting histone citrullination and chromatin decondensation, was identified to regulate both NETs formation and promote pathological thrombosis [166]. The overexpression of PAD4 was shown to promote, in an *in vitro* system, chromatin decondensation and formation of NET-like structures in cell types that do not undergo this form of cell death [167]. That PAD4 is necessary to mediate NETs formation was demonstrated by gene targeting of PAD4. Neutrophils derived from PAD4 knock-out mice were unable to generate NETs upon exposure to bacteria or stimulation with chemokines [168], and PAD4 knock-out animals were more susceptible to bacterial infection [168]. The link between PAD4 activity, NETs formation and induction of thromboembolism has been demonstrated in PAD4 knock-out mice subjected to a stenosis model to promote deep vein thrombosis: upon intervention, < 10% of PAD4 knock-out animals produced a thrombus, as compared to 90% of the control wild type animals [169].

Diagnostic and therapeutic potential of citrullination

Recent years brought significant progress into the understanding of the role of the citrullination process in immune disorders. The growing body of evidence highlighting the importance of citrullination, and the identification of autoantibodies directed to the citrullinated peptides or proteins (ACPAs) has significantly broadened our understanding, and clinical characterization, of many immune disorders. The number of the ongoing clinical studies targeting PADs and the citrullination process is, however, currently limited to a few. The most advanced studies concern rheumatoid arthritis, and include diagnostic tests (Table 5) as well as interventional trials (Table 6).

The non-interventional studies aim at the identification and quantification of the prevalence of anti-citrullinated proteins antibodies directed against different citrullinated antigens, including collagen, fibrinogen, filaggrin or vimentin, to evaluate their diagnostic and prognostic value in rheumatoid arthritis progression (Table 5, NCT01078597, NCT03265236, NCT03224377). Monitoring of anti-cyclic

citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies and anti-mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) antibodies titers in RA, brought the conclusion that anti-CCP antibodies have a better diagnostic power than anti-MCV antibodies. However, anti-MCV antibodies have a higher sensitivity as compared to anti-CCP antibodies. A significant correlation has been found between anti-MCV antibodies titers and both the severity of RA and the disease-activity score (DAS28). Anti-MCV-positive patients presented lower reduction in disease activity and an increased number of swollen joints. This finding allowed concluding that anti-MCV antibodies titers may work as an indicator correlating the disease activity and patient outcome [170]. Also, an attempt was made to characterize the etiology of rheumatoid arthritis from lung level (NCT03832374), as it was found that diffuse interstitial pneumopathy and bronchial dysfunctions occur in one-third of RA patients, and that some subtypes of ACPAs are preferentially present in the lungs [171]. This study (NCT03832374), still ongoing, addresses a very important question regarding the subtype(s) of ACPAs with a preferential tropism for the lung, that might be responsible for the infection within parenchyma and pulmonary airways, and the overall increased morbidity and mortality among RA patients with lung co-morbidities.

Likewise, an observational study was performed to assess the impact of ACPA in RA participants who were treated with the immunosuppressive drug Abatacept or the tumor necrosis factor inhibitors (TNFis): adalimumab, certolizumab, etanercept or golimumab (NCT03663829). A total of 2052 patients were included of which 1415 were in the TNFis cohort ($n = 1053$ ACPA positive) and 637 in the Abatacept cohort ($n = 445$ ACPA positive). The baseline ACPA score was associated with an improvement in clinical response using a measure of clinical disease-activity index at 12 months for Abatacept therapy, but not for TNFis therapy [172].

As of today, most of the interventional trials are at an early clinical testing phase (Table 6). The most advanced clinical studies concern investigation of the effect of combination therapy of Abatacept and methotrexate on rheumatoid arthritis (NCT03492658). Abatacept (CTLA4-Ig) is a fusion protein, combining cytotoxic T cell antigen 4 (CTLA4) and IgG₁ Fc₁, dedicated to modulate the T cell co-stimulatory signal. Abatacept works as an immune checkpoint and downregulates immune responses mediated through the CD28–CD80/86 pathway. The dose ranging pilot study of patients with active RA, treated with both Abatacept and LEA29Y (Belatacept, a CTLA4-Ig variant), showed dose dependent reductions in the clinical manifestations of disease [173]. Following the pilot studies, an investigation of combined therapy with Abatacept and methotrexate, an immune system suppressant, is now ongoing for the determination of its effectiveness on RA phenotype, transcriptional

Table 5 Diagnostic studies based on citrullination in the immune disorders

Analyzed parameter	Disease	Clinical trial registration number	Phase of the study
Subtypes of ACPA	Rheumatoid arthritis	NCT03832374	Descriptive study
ACPA antibody	Rheumatoid arthritis	NCT03663829	Non-interventional study
Anti-MCV Ab and anti-CCP Ab	Rheumatoid arthritis	NCT01078597 NCT03265236 NCT03224377	Diagnostic test

The clinical trial registration number from www.clinicaltrials.gov is provided. *Anti-CCP Ab* anti-cyclic-citrullinated peptide antibody; *Anti-MCV Ab* anti-mutated-citrullinated vimentin antibody

Table 6 Targeting autoimmune diseases using ACPAs

Drug	Disease	Clinical trial registration number	Phase of the study
Abatacept, Methotrexate	Rheumatoid arthritis, rheumatic diseases	NCT03492658	Interventional trial, Phase 4
Enbrel	Psoriatic arthritis	NCT04428502	Observational trial
Enbrel	Rheumatoid arthritis	NCT04428424	Observational trial

The clinical trial registration number from www.clinicaltrials.gov is provided

profile of the disease, B cell receptor usage and functional parameters of circulating B cells expressing ACPA (NCT03492658). Patients will be randomized to treatment with (i) methotrexate monotherapy (10–25 mg once weekly) reference group or a (ii) combination therapy of methotrexate (10–25 mg once weekly) and Abatacept (125 mg subcutaneously once weekly) for 6 months, followed by methotrexate monotherapy (10–25 mg once weekly) in both groups for another 6 months. Phase II (NCT00254293) [174] and III (NCT00048568) of the trial gave promising results and showed that long-term treatment with Abatacept provided sustained efficacy with high RA patient retention [175].

Other ongoing clinical trials addressing the study of citrullination process are aiming to evaluate the effect of Enbrel treatment with regards to anti-cyclic citrullinated peptide in psoriatic arthritis activity (NCT04428502) and the impact of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in rheumatoid arthritis (NCT04428424). Enbrel, also known as Etanercept, is a TNF- α inhibitor used to treat autoimmune diseases. In previous studies Enbrel efficacy was compared with disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) commonly used in patients with rheumatoid arthritis. It was found that Enbrel leads to a much greater decrease of the serum levels of anti-CCP and RF in rheumatoid arthritis than DMARDs alone. This finding was compatible with a reduction in clinical disease activity [176], Ann Rheum Dis 2006 Jan;65(1):35–9). Moreover, to evaluate the efficacy and safety of Etanercept, the drug was given over a 2-years

period (25 mg twice per week) to patients suffering from different autoimmune disorders, including: ankylosing spondylitis (9 patients), juvenile rheumatoid arthritis (4 patients), rheumatoid arthritis (57 patients) and psoriatic arthritis (6 patients). This study confirmed the safety of Etanercept administration up to two years. Also, declined levels anti-CCP antibody and rheumatoid factor observed in this study, lead to the conclusion that a significant clinical response in different subclasses of arthritis patients can be achieved by Etanercept [177]. Further clinical studies on Etanercept and Abatacept addressing their anti-inflammatory potential will be necessary allow a full validation of their clinical value and, in the affirmative, a progression towards their routine clinical use.

As outlined above, the clinical studies addressing citrullination are focused around citrullinated protein antibodies as a diagnostic element to assess disease progression. However, a recent preclinical report delivered by Chirivi and co-workers provides evidence that ACPAs can also potentially be used as therapeutics for neutrophil-mediated inflammatory diseases such as inflammatory arthritis, pulmonary fibrosis, inflammatory bowel disease and sepsis [111]. Using these therapeutic ACPAs (tACPAs), particularly against citrullinated histones H2A and H4, it was found that in mice suffering from chronic arthritis these antibodies suppressed NET release and possibly initiated NET uptake by macrophages, resulting in reduced tissue damage in the joints [111].

Conclusions and future perspectives

Recent basic, preclinical and clinical research in the early diagnosis of autoimmune disease, particularly arthritis, has shown that conversion of selected arginine residues to citrulline and the immune response to citrullinated proteins are key elements of recognition and better understanding the etiology of these disorders. It was shown that ACPAs are also directly involved in the pathogenesis of autoimmune disorders at several levels through (i) ligation to Fc receptors [178], (ii) modification of the function of monocytes [179], (iii) differentiation of osteoclasts [128] and (iv) formation of extracellular DNA traps [6]. Recent research has also shown that there is a potential link between the histone specific ACPAs (directed to citH2A and citH4) and NETs that deserves to be investigated and may lead to promising new strategies in treatment of autoimmune diseases [180].

It is now becoming evident that further studies on the effects of protein citrullination, biochemistry of citrullinating enzymes and modification of cellular proteins, and also on generation of ACPAs, will significantly help in understanding the metabolic processes as well as pathophysiology of multiple disorders, not only of immune/autoimmune origin, but also metabolic disease and cancer. A deeper look into the “citrullinome” and the cross-talk between citrullination and other modified residues may bring the development of novel drugs acting against disorders associated with aberrant citrullination.

Author contributions All the authors participated in writing and preparing the presented version of the manuscript. OC, MB and AB raised the concept. OC, MB, BP, LP and AB conducted the literature review and wrote the first draft. OC and MS drew the figures and tables. All authors revised and approved the final manuscript.

Funding The presented review was supported the Polish Ministry of Higher Education under Diamond Grant (2019–2023): DI2018 018948.

Availability of data and material Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors have declared no conflict of interest.

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes

were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Bowman GD, Poirier MG (2014) Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. *Chem Rev* 115:2274–2295. <https://doi.org/10.1021/cr500350x>
2. Ramazi S, Zahiri J (2021) Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
3. Tilvawala R, Nguyen SH, Maurais AJ et al (2018) The rheumatoid arthritis-associated citrullinome. *Cell Chem Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.03.002>
4. Chirivi RGS (2013) Citrullination: a target for disease intervention in multiple sclerosis and other inflammatory diseases? *J Clin Cell Immunol*. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000146>
5. Yuzhalin AE (2019) Citrullination in cancer. *Can Res* 79:1274–1284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-2797>
6. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A et al (2013) NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
7. van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2014) How citrullination invaded rheumatoid arthritis research. *Arthritis Res Ther* 16:103. <https://doi.org/10.1186/ar4458>
8. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H et al (2020) Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>
9. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E et al (2020) Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in covid-19. *EBioMedicine* 58:102925. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102925>
10. Zuo Y, Yalavarthi S, Navaz S et al (2021) Autoantibodies stabilize neutrophil extracellular traps in COVID-19. <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254692>
11. Rogers GE, Simmonds DH (1958) Content of citrulline and other amino-acids in a protein of hair follicles. *Nature* 182:186–187. <https://doi.org/10.1038/182186a0>
12. Kaore SN, Amane HS, Kaore NM (2012) Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundam Clin Pharmacol* 27:35–50. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2012.01059.x>
13. Witalison E, Thompson P, Hofseth L (2015) Protein arginine deiminases and associated citrullination: physiological functions and diseases associated with dysregulation. *Curr Drug Targets* 16:700–710. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150202160954>
14. Slade DJ, Subramanian V, Fuhrmann J, Thompson PR (2013) Chemical and biological methods to detect post-translational modifications of arginine. *Biopolymers* 101:133–143. <https://doi.org/10.1002/bip.22256>
15. Alghamdi M, Alasmari D, Assiri A et al (2019) An overview of the intrinsic role of citrullination in autoimmune disorders. *J Immunol Res* 2019:1–39. <https://doi.org/10.1155/2019/7592851>
16. Ordóñez A, Martínez-Martínez I, Corrales FJ et al (2009) Effect of citrullination on the function and formation of

- antithrombin. *FEBS J* 276:6763–6772. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07391.x>
17. Orgován G, Noszál B (2011) The complete microspeciation of arginine and citrulline. *J Pharm Biomed Anal* 54:965–971. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.023>
 18. Lazarus RC, Buonora JE, Kamnaksh A et al (2017) Citrullination following traumatic brain injury: a mechanism for ongoing pathology through protein modification. *Protein Deimination Hum Health Dis*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58244-3_16
 19. Darrah E, Andrade F (2018) Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol* 30:72–78. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000452>
 20. Slade DJ, Fang P, Dreyton CJ et al (2015) Protein arginine deiminase 2 binds calcium in an ordered fashion: Implications for inhibitor design. *ACS Chem Biol* 10:1043–1053. <https://doi.org/10.1021/cb500933j>
 21. Arita K, Hashimoto H, Shimizu T et al (2004) Structural basis for Ca^{2+} -induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol* 11:777–783. <https://doi.org/10.1038/nsmb799>
 22. Mondal S, Thompson PR (2021) Chemical biology of protein citrullination by the protein arginine deiminases. *Curr Opin Chem Biol* 63:19–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.01.010>
 23. Deng Q, Pan B, Alam HB et al (2020) Citrullinated histone H3 as a therapeutic target for endotoxic shock in mice. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02957>
 24. Arita K, Shimizu T, Hashimoto H et al (2006) Structural basis for Histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *PNAS* 103:5291–5296. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509639103>
 25. Tarcsa E, Marekov LN, Mei G et al (1996) Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. *J Biol Chem* 271:30709–30716. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30709>
 26. Wood DD, Moscarello MA (1989) The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein. *J Biol Chem* 264:5121–5127. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83707-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83707-3)
 27. Nomura K (1992) Specificity and mode of action of the muscle-type protein-arginine deiminase. *Arch Biochem Biophys* 293:362–369. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90407-n](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90407-n)
 28. Jones J, Causey C, Knuckley B, Slack-Noyes J, Thompson P (2009) Protein arginine deiminase 4 (PAD4): current understanding and future therapeutic potential. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5:616–627
 29. Wang S, Wang Y (2013) Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta (BBA) Gene Regul Mechanisms* 1829:1126–1135. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.07.003>
 30. Qin H, Liu X, Li F et al (2017) PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling. *Cancer Lett* 409:30–41. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.019>
 31. Falcão AM, Meijer M, Scaglione A et al (2019) PAD2-mediated citrullination contributes to efficient oligodendrocyte differentiation and myelination. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.108>
 32. Horibata S, Coonrod SA, Cherrington BD (2012) Role for peptidylarginine deiminase enzymes in disease and female reproduction. *J Reprod Dev* 58:274–282. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-040>
 33. Mohanan S, Cherrington BD, Horibata S et al (2012) Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int* 2012:1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/895343>
 34. Zhai Q, Wang L, Zhao P, Li T (2017) Role of citrullination modification catalyzed by peptidylarginine deiminase 4 in gene transcriptional regulation. *Acta Biochim Biophys Sin* 49:567–572. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx042>
 35. Sorvillo N, Mizurini DM, Coxon C et al (2019) Plasma peptidylarginine deiminase IV promotes vWF-platelet string formation and accelerates thrombosis after vessel injury. *Circ Res* 125:507–519. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.314571>
 36. Lee Y-H, Coonrod SA, Kraus WL et al (2005) Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylation. *PNAS* 102:3611–3616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407159102>
 37. Stadler SC, Vincent CT, Fedorov VD et al (2013) Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear Gsk3 activates tgf-signaling and induces epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *PNAS* 110:11851–11856. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308362110>
 38. Guo Q, Fast W (2011) Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *J Biol Chem* 286:17069–17078. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.230961>
 39. Tanikawa C, Espinosa M, Suzuki A et al (2012) Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53–padi4 pathway. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/ncomms1676>
 40. Guo Q, Bedford MT, Fast W (2011) Discovery of peptidylarginine deiminase-4 substrates by protein array: antagonistic citrullination and methylation of human ribosomal protein s2. *Mol Biosyst* 7:2286. <https://doi.org/10.1039/c1mb05089c>
 41. Tanikawa C, Ueda K, Suzuki A et al (2018) Citrullination of RGG motifs in fet proteins by Pad4 regulates protein aggregation and Als susceptibility. *Cell Rep* 22:1473–1483. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.031>
 42. Esposito G, Vitale AM, Leijten FJP et al (2007) Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 273:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.005>
 43. Xu Y, Shi Y, Fu J et al (2016) Mutations in Padi6 cause female infertility characterized by early embryonic arrest. *Am J Hum Genet* 99:744–752. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.024>
 44. Choi M, Lee O-H, Jeon S et al (2010) The oocyte-specific transcription factor, Nobox, regulates the expression of PAD6, a peptidylarginine deiminase in the oocyte. *FEBS Lett* 584:3629–3634. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.037>
 45. Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2003) Pad, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease. *BioEssays* 25:1106–1118. <https://doi.org/10.1002/bies.10357>
 46. Vossenaar ER (2004) Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63:373–381. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.012211>
 47. Knuckley B, Causey CP, Pellechia PJ et al (2009) Haloacetamide-based inactivators of protein arginine deiminase 4 (PAD4): evidence that general acid catalysis promotes efficient inactivation. *ChemBioChem* 11:161–165. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900698>
 48. Knuckley B, Luo Y, Thompson PR (2008) Profiling protein arginine deiminase 4 (PAD4): a novel screen to identify PAD4 inhibitors. *Bioorgan Med Chem* 16:739–745. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.021>
 49. Pritzker LB, Moscarello MA (1998) A novel microtubule independent effect of paclitaxel: the inhibition of peptidylarginine deiminase from bovine brain. *Biochim Biophys Acta (BBA) Protein Struct Mol Enzymol* 1388:154–160. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00175-7)
 50. Mondal S, Thompson PR (2019) Protein arginine deiminases (PADs): biochemistry and chemical biology of protein

- citrullination. *Acc Chem Res* 52:818–832. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00024>
51. Lewis HD, Liddle J, Coote JE et al (2015) Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human net formation. *Nat Chem Biol* 11:189–191. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1735>
 52. Aliko A, Kamińska M, Falkowski K et al (2019) Discovery of novel potential reversible peptidyl arginine deiminase inhibitor. *Int J Mol Sci* 20:2174. <https://doi.org/10.3390/ijms20092174>
 53. Bicker KL, Thompson PR (2012) The protein arginine deiminases: structure, function, inhibition, and disease. *Biopolymers* 99:155–163. <https://doi.org/10.1002/bip.22127>
 54. Knuckley B, Causey CP, Jones JE et al (2010) Substrate specificity and kinetic studies of pads 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3. *Biochemistry* 49:4852–4863. <https://doi.org/10.1021/bi100363t>
 55. Knuckley B, Bhatia M, Thompson PR (2007) Protein arginine deiminase 4: evidence for a reverse protonation mechanism. *Biochemistry* 46:6578–6587. <https://doi.org/10.1021/bi700095s>
 56. Luo Y, Arita K, Bhatia M et al (2006) Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* 45:11727–11736. <https://doi.org/10.1021/bi061180d>
 57. Luo Y, Knuckley B, Lee Y-H et al (2006) A fluoroacetamide-based inactivator of protein arginine deiminase 4: design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Am Chem Soc* 128:1092–1093. <https://doi.org/10.1021/ja0576233>
 58. Biron BM, Chung C-S, O'Brien XM et al (2016) CL-amidine prevents histone 3 citrullination and neutrophil extracellular trap formation, and improves survival in a murine sepsis model. *J Innate Immun* 9:22–32. <https://doi.org/10.1159/000448808>
 59. Willis VC, Gizinski AM, Banda NK et al (2011) N- α -benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 186:4396–4404. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001620>
 60. Causey CP, Jones JE, Slack JL et al (2011) The development of N- α -(2-carboxyl)benzoyl-N5-(2-fluoro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide (O-F-amidine) and N- α -(2-carboxyl)benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide (O-cl-amidine) as second generation protein arginine Deiminase (PAD) inhibitors. *J Med Chem* 54:6919–6935. <https://doi.org/10.1021/jm2008985>
 61. Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA et al (2014) Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts net formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/LPR mice. *Ann Rheum Dis* 74:2199–2206. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205365>
 62. Muth A, Subramanian V, Beaumont E et al (2017) Development of a selective inhibitor of protein arginine deiminase 2. *J Med Chem* 7:3198–3211. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00274.s002>
 63. Teo CY, Shave S, Thean Chor AL et al (2012) Discovery of a new class of inhibitors for the protein arginine deiminase type 4 (PAD4) by structure-based virtual screening. *BMC Bioinform.* <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-s17-s4>
 64. Kosgodage US, Matewale P, Mastroianni G et al (2019) Peptidylarginine deiminase inhibitors reduce bacterial membrane vesicle release and sensitize bacteria to antibiotic treatment. *Front Cell Infect Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00227>
 65. Moscarello MA, Lei H, Mastronardi FG et al (2013) Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis Model Mech.* <https://doi.org/10.1242/dmm.010520>
 66. Forsgren A, Schmeling D, Quie PG (1974) Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. *J Infect Dis* 130:412–415. <https://doi.org/10.1093/infdis/130.4.412>
 67. Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J (2010) Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 12:209. <https://doi.org/10.1186/ar3000>
 68. Lewallen DM, Bicker KL, Madoux F et al (2014) A Fluoropol-ABPP PAD2 high-throughput screen identifies the first calcium site inhibitor targeting the pads. *ACS Chem Biol* 9:913–921. <https://doi.org/10.1021/cb400841k>
 69. Surolia R, Li FJ, Wang Z et al (2021) NETosis in the pathogenesis of acute lung injury following cutaneous chemical burns. *JCI Insight.* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147564>
 70. Zhou Y, An L-L, Chaerkady R et al (2018) Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33385-z>
 71. Koushik S, Joshi N, Nagaraju S et al (2017) PAD4: Pathophysiology, current therapeutics and future perspective in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 21:433–447. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1294160>
 72. Lazo JS, Nemoto K, Pestell KE et al (2002) Identification of a potent and selective pharmacophore for CDC25 dual specificity phosphatase inhibitors. *Mol Pharmacol* 61:720–728. <https://doi.org/10.1124/mol.61.4.720>
 73. Dubey N, Peng B-Y, Lin C-M et al (2018) NSC95397 suppresses proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells through MKP-1 and the ERK1/2 pathway. *Int J Mol Sci* 19:1625. <https://doi.org/10.3390/ijms19061625>
 74. Dreyton CJ, Anderson ED, Subramanian V et al (2014) Insights into the mechanism of streptonigrin-induced protein arginine deiminase inactivation. *Bioorg Med Chem* 22:1362–1369. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.12.064>
 75. Stone EM, Schaller TH, Bianchi H et al (2005) Inactivation of two diverse enzymes in the amidinotransferase superfamily by 2-chloroacetamide: dimethylargininase and peptidylarginine deiminase. *Biochemistry* 44:13744–13752. <https://doi.org/10.1021/bi051341y>
 76. Dreyton CJ, Jones JE, Knuckley BA, Subramanian V, Anderson ED, Brown SJ, Fernandez-Vega V, Eberhart C, Spicer T, Zuhl AM, Ferguson J, Speers AE, Wang C, Boger DL, Thompson P, Cravatt BF, Hodder P, Rosen H (2012) Optimization and characterization of a pan protein arginine deiminase (PAD) inhibitor. Reports from the NIH Molecular Libraries Program
 77. Zhao X, Gu C, Wang Y (2020) PAD4 selective inhibitor TDFA protects lipopolysaccharide-induced acute lung injury by modulating nuclear p65 localization in epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 88:106923. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106923>
 78. Jones JE, Slack JL, Fang P et al (2011) Synthesis and screening of a haloacetamide containing library to identify PAD4 selective inhibitors. *ACS Chem Biol* 7:160–165. <https://doi.org/10.1021/cb200258q>
 79. Makrygiannakis D, af Klint E, Lundberg IE, et al (2006) Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis* 65:1219–1222. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.049403>
 80. Nguyen H, James EA (2016) Immune recognition of citrullinated epitopes. *Immunology* 149:131–138. <https://doi.org/10.1111/imm.12640>
 81. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A et al (2010) Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233:34–54. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00850.x>
 82. Dragoni G, De Hertogh G, Vermeire S (2020) The role of citrullination in inflammatory bowel disease: a neglected player

- in triggering inflammation and fibrosis? *Inflamm Bowel Dis* 27:134–144. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa095>
83. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H et al (2000) Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* 114:701–705. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00936.x>
 84. Mastronardi FG, Noor A, Wood DD et al (2007) Peptidyl arginine deiminase 2 CPG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res* 85:2006–2016. <https://doi.org/10.1002/jnr.21329>
 85. Calabrese R, Zampieri M, Mechelli R et al (2011) Methylation-dependent PAD2 upregulation in multiple sclerosis peripheral blood. *Mult Scler J* 18:299–304. <https://doi.org/10.1177/1352458511421055>
 86. Messerer DA, Schmidt H, Frick M, Huber-Lang M (2021) Ion and water transport in neutrophil granulocytes and its impairment during sepsis. *Int J Mol Sci* 22:1699. <https://doi.org/10.3390/ijms22041699>
 87. DeLeo FR, Allen L-AH (2020) Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. *Faculty Rev*. <https://doi.org/10.12703/r/9-25>
 88. Scapini P, Cassatella MA (2014) Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 124:710–719. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-453217>
 89. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL et al (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30:459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
 90. Brinkmann V (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
 91. Mutua V, Gershwin LJ (2020) A review of neutrophil extracellular traps (nets) in disease: potential anti-nets therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08804-7>
 92. Hoeksema M, Tripathi S, White M et al (2015) Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. *Innate Immun* 21:736–745. <https://doi.org/10.1177/1753425915593794>
 93. Liu X, Arfman T, Wichapong K et al (2021) PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated net formation on immune-mediated disease. *J Thromb Haemost* 19:1607–1617. <https://doi.org/10.1111/jth.15313>
 94. Wang Y, Li M, Stadler S et al (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Exp Med* 206:i1–i1. <https://doi.org/10.1084/jem20620ia1>
 95. Ward PA, Fattahi F (2019) New strategies for treatment of infectious sepsis. *J Leukoc Biol* 106:187–192. <https://doi.org/10.1002/jlb.4mir1118-425r>
 96. Jiang D, Saffarzadeh M, Scharffetter-Kochanek K (2017) In vitro demonstration and quantification of neutrophil extracellular trap formation. *Bio Protoc*. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2386>
 97. Neeli I, Khan SN, Radic M (2008) Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 180:1895–1902. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1895>
 98. Hasler P, Giaglis S, Hahn S (2016) Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med Wkly*. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14352>
 99. Bawadekar M, Shim D, Johnson CJ et al (2017) Peptidylarginine deiminase 2 is required for tumor necrosis factor alpha-induced citrullination and arthritis, but not neutrophil extracellular trap formation. *J Autoimmun* 80:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.006>
 100. Holmes CL, Shim D, Kernien J et al (2019) Insight into neutrophil extracellular trap extracellular traps through systematic evaluation of citrullination and peptidylarginine deiminases. *J Immunol Res* 2019:1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/2160192>
 101. Cush J (2021) Rheumatoid arthritis: early diagnosis and treatment. *Med Clin North Am* 105:355–365. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.10.006>
 102. Weyand CM, Goronzy JJ (2020) The immunology of rheumatoid arthritis. *Nat Immunol* 22:10–18. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00816-x>
 103. Thomas R, Cope AP (2013) Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Oxf Med Online*. <https://doi.org/10.1093/med/9780199642489.003.0109>
 104. Damgaard D, Senolt L, Nielsen CH (2016) Increased levels of peptidylarginine deiminase 2 in synovial fluid from Anti-ccp-positive rheumatoid arthritis patients: association with disease activity and inflammatory markers. *Rheumatology* 55:918–927. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev440>
 105. Kurowska W, Kuca-Warnawin EH, Radzikowska A, Maśliński W (2017) The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Central Eur J Immunol* 42:390–398. <https://doi.org/10.5114/cej.2017.72807>
 106. Trouw LA, Haisma EM, Levarht EW et al (2009) Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum* 60:1923–1931. <https://doi.org/10.1002/art.24622>
 107. Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH (2010) Immune complexes containing citrullinated fibrinogen co-stimulate macrophages Via Toll-like receptor 4 and fcγ receptor. *Arthritis Rheum* 63:53–62. <https://doi.org/10.1002/art.30081>
 108. Lu M-C, Yu H-C (2019) The roles of anti-citrullinated protein antibodies in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Tzu Chi Med J* 31:5. https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_116_18
 109. Fan LY, He DY, Wang Q et al (2012) Citrullinated vimentin stimulates proliferation, pro-inflammatory cytokine secretion, and PADI4 and RANKL expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 41:354–358. <https://doi.org/10.3109/03009742.2012.670263>
 110. Song W, Ye J, Pan N et al (2021) Neutrophil extracellular traps tied to rheumatoid arthritis: points to ponder. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.578129>
 111. Chirivi RG, van Rosmalen JW, van der Linden M et al (2020) Therapeutic ACPA inhibits net formation: a potential therapy for neutrophil-mediated inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol* 18:1528–1544. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0381-3>
 112. Clarke J (2020) Regulatory eosinophils to the rescue. *Nat Rev Rheumatol* 17:68–68. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00564-0>
 113. Zhou X, Motta F, Selmi C et al (2021) Antibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 20:102804. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102804>
 114. Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA et al (2013) Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory FC glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 74:234–241. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203565>
 115. Rombouts Y, Willemze A, van Beers JJ et al (2015) Extensive glycosylation of ACPA-IGG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 75:578–585. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206598>
 116. Hafkenscheid L, Bondt A, Scherer HU et al (2017) Structural analysis of variable domain glycosylation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis reveals the presence of highly sialylated glycans. *Mol Cell Proteomics* 16:278–287. <https://doi.org/10.1074/mcp.m116.062919>

117. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E (2017) Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. *Cell J* 19(1):1–10. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4867>
118. McDonald WI, Ron MA (1999) Multiple sclerosis: the disease and its manifestations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1615–1622. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0506>
119. Huang W-J, Chen W-W, Zhang X (2017) Multiple sclerosis: pathology, diagnosis and treatments. *Exp Ther Med* 13:3163–3166. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4410>
120. Nourbakhsh B, Mowry EM (2019) Multiple sclerosis risk factors and pathogenesis. *Contin Lifelong Learn Neurol* 25:596–610. <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000725>
121. Koch MW, Metz LM, Kovalchuk O (2012) Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 9:35–43. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.226>
122. Shaikh MF, Jordan N, D'Cruz DP (2017) Systemic lupus erythematosus. *Clin Med* 17:78–83. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.17-1-78>
123. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y (2004) Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 34:501–537. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2004.07.002>
124. Liu Y, Lightfoot YL, Seto N et al (2018) Peptidylarginine deiminases 2 and 4 modulate innate and adaptive immune responses in TLR-7-dependent lupus. *JCI Insight* 3(23):e124729. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124729>
125. Hu SC-S, Yu H-S, Yen F-L et al (2016) Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep31119>
126. Chavanas S, Méchin M-C, Nachat R et al (2006) Peptidylarginine deiminases and deimination in biology and pathology: Relevance to skin homeostasis. *J Dermatol Sci* 44:63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.07.004>
127. Valdimarsson H, Bake BS, Jónsdóttir I, Fry L (1986) Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 7:256–259. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(86\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0167-5699(86)90005-8)
128. Pohla L, Ottas A, Kaldvee B et al (2020) Hyperproliferation is the main driver of metabolomic changes in psoriasis lesional skin. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59996-z>
129. Benhadou F, Mintoff D, del Marmol V (2018) Psoriasis: keratinocytes or immune cells—which is the trigger? *Dermatology* 235:91–100. <https://doi.org/10.1159/000495291>
130. Méchin M-C, Takahara H, Simon M (2020) Deimination and peptidylarginine deiminases in skin physiology and diseases. *Int J Mol Sci* 21:566. <https://doi.org/10.3390/ijms21020566>
131. Watanabe S, Iwata Y, Fukushima H et al (2020) Neutrophil extracellular traps are induced in a psoriasis model of interleukin-36 receptor antagonist-deficient mice. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76864-y>
132. Olsen I, Yamazaki K (2019) Can oral bacteria affect the microbiome of the gut? *J Oral Microbiol* 11:1586422. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1586422>
133. González-Feble J, Rodríguez-Lozano B, Sánchez-Piedra C et al (2020) Association between periodontitis and anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther*. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2121-6>
134. Dissick A, Redman RS, Jones M et al (2010) Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol* 81:223–230. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090309>
135. Laugisch O, Wong A, Sroka A et al (2015) Citrullination in the periodontium—a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clin Oral Invest* 20:675–683. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1556-7>
136. Janssen KM, Hop H, Vissink A et al (2020) Levels of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor, including IgA Isotypes, and articular manifestations in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Environ Res Public Health* 17:8054. <https://doi.org/10.3390/ijerph17218054>
137. Chumanovich AA, Causey CP, Knuckley BA et al (2011) Suppression of colitis in mice by Cl-amidine a novel peptidylarginine deiminase inhibitor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00435.2010>
138. Kang CP, Lee H-S, Ju H et al (2005) A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum* 54:90–96. <https://doi.org/10.1002/art.21536>
139. Howell KJ, Kraiczky J, Nayak KM et al (2018) Dna methylation and transcription patterns in intestinal epithelial cells from pediatric patients with inflammatory bowel diseases differentiate disease subtypes and associate with outcome. *Gastroenterology* 154:585–598. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.007>
140. Dragoni G, Innocenti T, Galli A (2020) Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease: How long before abandoning single-marker approaches? *Dig Dis* 39:190–203. <https://doi.org/10.1159/000511641>
141. Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D et al (2019) Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 13:772–784. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy215>
142. Li T, Wang C, Liu Y et al (2019) Neutrophil extracellular traps induce intestinal damage and thrombotic tendency in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 14:240–253. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz132>
143. Drury B, Hardisty G, Gray RD, G-tzer Ho (2021) Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel disease: pathogenic mechanisms and clinical translation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 12:321–333. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.03.002>
144. Liu Y-C, Kuo R-L, Shih S-R (2020) COVID-19: the first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J* 43:328–333. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.007>
145. Caggiano G, Castelnovo E, Kima R (2020) The global effects of covid-19-induced uncertainty. *SSRN Electron J*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3598710>
146. Verma P, Dumka A, Bhargava A et al (2021) A statistical analysis of impact of covid19 on the global economy and stock index returns. *SN Comp Sci*. <https://doi.org/10.1007/s42979-020-00410-w>
147. Grant MC, Geoghegan L, Arbyn M et al (2020) The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARS-COV-2; COVID-19): a systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries. *SSRN Electron J*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3582819>
148. Esakandari H, Nabi-Afjadi M, Fakkari-Afjadi J et al (2020) A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol Procedures Online*. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00128-2>
149. W-jie G, Ni Z-yi HuY et al (2020) Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 382:1708–1720. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
150. Cavalier E, Guiot J, Lechner K et al (2021) Circulating nucleosomes as potential markers to monitor COVID-19 disease progression. *Front Mol Biosci*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.600881>
151. Sen R, Garbati M, Bryant K, Lu Y (2021) Epigenetic mechanisms influencing COVID-19. *Genome* 64:372–385. <https://doi.org/10.1139/gen-2020-0135>

152. Middleton EA, He X-Y, Denorme F et al (2020) Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 136:1169–1179. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>
153. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A et al (2020) Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest* 130(11):6151–6157. <https://doi.org/10.1101/2020.06.15.20131029>
154. Arisan ED, Uysal-Onganer P, Lange S (2020) Putative roles for peptidylarginine deiminases in COVID-19. *Int J Mol Sci* 21:4662. <https://doi.org/10.3390/ijms21134662>
155. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A et al (2021) Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 27:601–615. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
156. Perrot L, Hemon M, Busnel J-M et al (2021) First flare of ACPA-positive rheumatoid arthritis after SARS-COV-2 infection. *Lancet Rheumatol*. [https://doi.org/10.1016/s2665-9913\(20\)30396-9](https://doi.org/10.1016/s2665-9913(20)30396-9)
157. Li FJ, Surolia R, Li H et al (2020) Citrullinated vimentin generated by cadmium/carbon black exposure mediates lung fibrosis C58 acute lung injury: atypical triggers. *Am J Respir Crit Care* 201:A5555. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2020.201.1_meetingabstracts.a5555
158. Yao H, Li P, Venters BJ et al (2008) Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of okl38, a mediator of apoptosis. *J Biol Chem* 283:20060–20068. <https://doi.org/10.1074/jbc.m802940200>
159. Li P, Yao H, Zhang Z et al (2008) Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4. *Mol Cell Biol* 28:4745–4758. <https://doi.org/10.1128/mcb.01747-07>
160. Zhu D, Zhang Y, Wang S (2021) Histone citrullination: a new target for tumors. *Mol Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01373-z>
161. Chang X, Han J (2006) Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog* 45:183–196. <https://doi.org/10.1002/mc.20169>
162. Chang X, Han J, Pang L et al (2009) Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-40>
163. Wang L, Song G, Zhang X et al (2017) PADI2-mediated Citrullination promotes prostate cancer progression. *Can Res* 77:5755–5768. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-0150>
164. De Leo F (2020) Faculty opinions recommendation of citrullinated histone H3, a biomarker for neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of mortality in patients with cancer. *Fac Opin Post-Publ Peer Rev Biomed Literature*. <https://doi.org/10.3410/f.735526100.793580550>
165. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D et al (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci* 107:15880–15885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107>
166. Martinod K, Wagner DD (2014) Thrombosis: tangled up in nets. *Blood* 123:2768–2776. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-463646>
167. Leshner M, Wang S, Lewis C et al (2012) PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00307>
168. Li P, Li M, Lindberg MR et al (2010) Pad4 is essential for anti-bacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207:1853–1862. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
169. Martinod K, Demers M, Fuchs TA et al (2013) Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci* 110:8674–8679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301059110>
170. Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Alkaabi J (2012) Evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Omani patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheumatol* 2012:1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/285854>
171. Kadura S, Raghu G (2021) Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease: manifestations and current concepts in pathogenesis and management. *Eur Respir Rev* 30:210011. <https://doi.org/10.1183/16000617.0011-2021>
172. Tymms K, Butcher B, Smith T et al (2021) Impact of anti-citrullinated protein antibody on tumor necrosis factor inhibitor or abatacept response in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Rheumatol* 8:67–72. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2020.20024>
173. Moreland LW, Alten R, Van Den Bosch F et al (2002) Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating Ctlα4ig and LEA29Y eighty five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 46:1470–1479. <https://doi.org/10.1002/art.10294>
174. Westhovens R, Kremer J, Moreland L et al (2009) Safety and efficacy of the selective co-stimulation modulator abatacept in patients with rheumatoid arthritis receiving background methotrexate: a 5-year extended phase iib study. *J Rheumatol* 36:736–742. <https://doi.org/10.3899/jrheum.080813>
175. Kremer JM, Peterfy C, Russell AS et al (2014) Long-term safety, efficacy, and inhibition of structural damage progression over 5 years of treatment with Abatacept in patients with rheumatoid arthritis in the Abatacept in Inadequate responders to methotrexate trial. *J Rheumatol* 41:1077–1087. <https://doi.org/10.3899/jrheum.130263>
176. Chen HA, Lin KC, Chen CH, Liao HT, Wang HP, Chang HN, Tsai CY, Chou CT (2006) The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:35–39. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.038851>
177. Chou C-T (2006) The clinical application OF etanercept in Chinese patients with rheumatic disease. *Mod Rheumatol* 16:206–213. <https://doi.org/10.3109/s10165-006-0486-2>
178. Anquetil F, Clavel C, Offer G et al (2015) IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol* 194:3664–3674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402334>
179. Lu M-C, Lai N-S, Yu H-C et al (2010) Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78 on monocytes/macrophages and stimulate tumor necrosis factor A production. *Arthritis Rheum* 62:1213–1223. <https://doi.org/10.1002/art.27386>
180. Harre U, Georgess D, Bang H et al (2012) Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 122:1791–1802. <https://doi.org/10.1172/jci60975>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Łódź, dnia 14.11.2024

mgr Oskar Ciesielski
Full name

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Affiliation

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w opublikowanie następującego przeglądowego artykułu naukowego: Oskar Ciesielski, Marta Biesiekierska, Baptiste Panthu, Mirosław Soszyński, Luciano Pirola, Aneta Balcerzyk. **Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives; Cellular and Molecular Life Sciences. 2022 Jan 25;79(2):94**, polegał na: stworzeniu planu publikacji, przeszukaniu literaturowych baz danych, przygotowaniu rysunków i tabel, przygotowania manuskryptu oraz nanoszeniu korekt podczas procesu publikacyjnego
Wkład ten szacuję na 55%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Oskara Ciesielskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.


.....
Podpis

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Łódź, dnia 14.11.2024

dr Marta Biesiekierska

Imię i nazwisko

Katedra Biofizyki Molekularnej

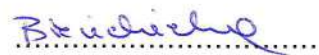
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

Afiliacja w dniu ukazania się publikacji

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w opublikowanie następującego przeglądowego artykułu naukowego: Oskar Ciesielski, Marta Biesiekierska, Baptiste Panthu, Mirosław Soszyński, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives**; Cellular and Molecular Life Sciences. 2022 Jan 25;79(2):94, polegał na: współudziale w tworzeniu planu publikacji, uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu i korektach podczas procesu publikacyjnego. Wkład ten szacuję na 10%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Oskara Ciesielskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.


.....
Podpis

PUBLICATION CO-AUTHOR STATEMENT

Lyon, date .29.11.2024

Prof. Baptiste Panthu
Full name

CarMeN Laboratory, INSERM Unit 1060,
Lyon 1 University, 165 Chemin du Grand Revoyet,
Pierre Bénite Cedex, France
Affiliation

STATEMENT

I declare that my contribution to the publication of the review article: Oskar Ciesielski, Marta Biesiekierska, Baptiste Panthu, Mirosław Soszyński, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives**; Cellular and Molecular Life Sciences. 2022 Jan 25;79(2):94, consisted of: participation in the preparation of the manuscript and corrections during the publication process. I estimate my contribution to be: 10%.

I also consent to the submission of the above-mentioned publication by Oskar Ciesielski MSc, as part of his doctoral dissertation.



.....
Signature

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Łódź, dnia 2.12.2024

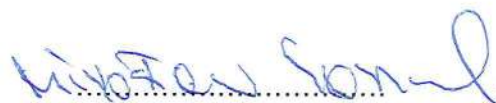
Prof. dr hab. Mirosław Soszyński
Full name

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Affiliation

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w opublikowanie następującego przeglądowego artykułu naukowego: Oskar Ciesielski, Marta Biesiekierska, Baptiste Panthu, Mirosław Soszyński, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives**; Cellular and Molecular Life Sciences. 2022 Jan 25;79(2):94, polegał na: uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu Wkład ten szacuję na 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Oskara Ciesielskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.


.....
Podpis

PUBLICATION CO-AUTHOR STATEMENT

Lyon, date NOV 28TH 2024

Prof. Luciano Pirola
Full name

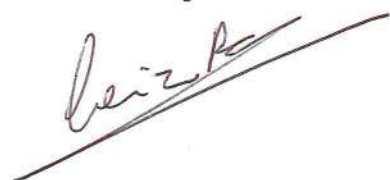
CarMeN Laboratory, INSERM Unit 1060,
Lyon 1 University, 165 Chemin du Grand Revoyet,
Pierre Bénite Cedex, France
Affiliation

STATEMENT

I declare that my contribution to the publication of the review article: Oskar Ciesielski, Marta Biesiekierska, Baptiste Panthu, Mirosław Soszyński, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives**; Cellular and Molecular Life Sciences. 2022 Jan 25;79(2):94, consisted of: participation in the preparation of the manuscript and corrections during the publication process. I estimate my contribution to be: 10%.

I also consent to the submission of the above-mentioned publication by Oskar Ciesielski MSc, as part of his doctoral dissertation.

L. PIROLA
.....
Signature



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Łódź, dnia 14.11.2024

dr hab. Aneta Balcerczyk, prof UŁ

Full name

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Affiliation

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w opublikowanie następującego przeglądowego artykułu naukowego: Oskar Ciesielski, Marta Biesiekierska, Baptiste Panthu, Mirosław Soszyński, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives**; Cellular and Molecular Life Sciences. 2022 Jan 25;79(2):94, polegał na: uczestnictwie w sporządzeniu planu publikacji, uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu, kontaktach z edytorem oraz uczestnictwie w poprawie manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów.

Wkład ten szacuję na 10%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Oskara Ciesielskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Aneta Balcerczyk
Podpis

Original Paper

Peptidylarginine Deiminases Inhibitors Decrease Endothelial Cells Angiogenic Potential by Affecting Akt Signaling and the Expression and Secretion of Angiogenic Factors

Oskar Ciesielski^{a,b} Luciano Pirola^c Aneta Balcerczyk^a

^aDepartment of Oncobiology and Epigenetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, Lodz 90-236, Poland, ^bThe Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland, ^cCarMeN Laboratory, INSERM Unit 1060, Lyon-1 University, 165 Chemin du Grand Revoyet, BP12, 69495, Pierre Bénite Cedex, France

Key Words

Citrullination • PADs inhibitors • Endothelial cells • Angiogenesis • Akt signaling

Abstract

Background/Aims: Endothelial cells (ECs) play a crucial role in various physiological processes, particularly those related to the cardiovascular system, but also those affecting the entire organism. The biology of ECs is regulated by multiple biochemical stimuli and epigenetic drivers that govern gene expression. We investigated the angiogenic potential of ECs from a protein citrullination perspective, regulated by peptidyl-arginine deiminases (PADs) that modify histone and non-histone proteins. Although the involvement of PADs has been demonstrated in several physiological processes, inflammation-related disorders and cancer, their role in angiogenesis remains unclear. **Methods:** To elucidate the role of PADs in endothelial angiogenesis, we used two human EC models: primary vein (HUVECs) and microvascular endothelial cells (HMEC-1). PADs activity was inhibited using irreversible inhibitors: BB-CI-amidine, CI-amidine and F-amidine. We analyzed all three steps of angiogenesis *in vitro*: proliferation, migration, and capillary-like tube formation, as well as secretory activities, gene expression and signaling in ECs. **Results:** All used PAD inhibitors reduced the histone H3 citrullination (H3cit) mark, inhibited endothelial cell migration and capillary-like tube formation, and favored an angiostatic activity in HMEC-1 cells, by increasing PEDF (pigment epithelium-derived factor) and reducing VEGF (vascular endothelial growth factor) mRNA expression and protein secretion. Additionally, BB-CI-amidine reduced the total activity of MMPs (Matrix metalloproteinases). The observed effects were underlined by the

inhibition of Akt phosphorylation. **Conclusions:** Our findings suggest that pharmacological inhibitors of citrullination are promising therapeutic agents to target angiogenesis.

© 2024 The Author(s). Published by
Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Introduction

The human vasculature, formed through angiogenesis and vasculogenesis, is a vital regulator of body homeostasis through the mobilization of metabolites and catabolites, gas exchange, and inter-organ communication via the transport of hormones and other regulatory or immune-related factors [1]. Endothelial cells (ECs) lining the inner wall of arterial, venous, and microvascular vessels form the endothelium, which is now widely considered as a metabolically active and key endocrine organ.

The endothelium secretes a plethora of factors such as nitric oxide, von Willebrand factor, and vascular endothelial growth factors (VEGFs), which modulate blood flow, coagulation, pressure, and wound healing [2]. Angiogenesis, leading to the *de novo* formation of blood vessels from pre-existing ones, is considered a flagship function of ECs, which under physiological condition occurs during embryogenesis, wound healing, and the menstrual cycle [3]. Conversely, abnormal angiogenesis contributes to the etiology of many pathologies including cancer, tumor neovascularization [4], diabetic vascular complications [5], and obesity [6]. Among the mechanisms contributing to the shift from physiological to pathological endothelium, epigenetic alterations, including histone post-translational modifications (PTMs), may play an indispensable role, as aberrant histone acetylation is a signature of hyperglycemic damage in cultured aortic endothelial cells [7] and histone methylation acts as a signature of persistent glycemic damage [8].

A more recently discovered histone post-translational modification (PTM) is arginine citrullination, which in contrast to most histone PTMs such as methylation and acetylation, appears to be irreversible as its reversal can only be achieved by histone replacement [9]. The enzymatic conversion of peptidyl-arginines to citrulline is catalyzed by a conserved family of peptidylarginine deiminases (PADs) [10]. Replacement of the arginine primary ketamine group with the citrulline side chain ketone group leads to the loss of a positive charge [11]. The human “citrullinome” includes thousands of proteins [12] and notably histones [9]. Accumulating evidence suggests that histone citrullination, by modulating chromatin status, cellular metabolism, and gene expression, contributes to pathological processes including cancer progression [13] and inflammation [14]. Citrullination is widely regarded as an immune related histone PTM, as it was shown that aberrant levels of citrullination occur in several autoimmune mediated diseases, notably rheumatoid arthritis, and COVID-19 [15].

Mechanistically, citrullinated decondensed chromatin from neutrophils acts as a scaffold for the formation of the so-called neutrophil extracellular traps (NETs), a net-like structures enriched in bactericidal proteins [16, 17] whose formation can also be induced by reactive nitrogen molecules such as nitric oxide and peroxynitrite [18]. The release of decondensed chromatin and the formation of NETs contribute to thrombus formation [19] and mice deficient in PAD4 were shown to be protected from thrombus formation after experimental induction of venous stenosis [20]. Similarly, exposure of the endothelium to citrullinated histone H3, as found in NETs, contributes to microvascular endothelial barrier dysfunction through the opening of cellular adherens junctions and reorganization of the actin cytoskeleton of endothelial cells [21]. Conversely, a recent study showed that free citrullinated histones exert beneficial effects on endothelial cell function [22].

Although widely studied in immune cells, the effects of protein citrullination on the endothelium remain largely unknown, although recent results from several groups suggest that citrullination may influence vascular function. The aim of our study was to investigate, by pharmacological targeting, the contribution of PADs to endothelial cells proliferation, vascularization *in vitro*, wounding potential and explore the subjacent molecular mechanisms.

Materials and Methods

Cell culture

Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1) were obtained from American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA, USA). Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were isolated from the veins of freshly collected umbilical cords, by collagenase type II digestion as described previously [23] and used for the experiments at passages 2-4. The study design and protocol involving the use of human umbilical cords were approved by the Bioethics Commission at the University of Lodz (Decision No. 15/KBBN-UŁ/III/2019 and 16 (III)/KBBN-UŁ/I/2021-22), all research was performed in accordance with relevant regulations and the guidelines of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the donors at the Medeor Multidisciplinary Hospital in Lodz, no data regarding the donors were collected and stored, and the samples were completely anonymized. Both endothelial cell types were cultured in MCDB131 medium (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (EurX, Gdansk, Poland), 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (Millipore, Burlington, MA, USA), and 10 mM glutamine (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA). For passaging and seeding, the cells were detached using 0.25% trypsin-EDTA solution (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA).

PAD inhibitors used in the study

Three commercially available PAD inhibitors were used: BB-Cl-amidine (cat. no. HY-111347, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA), Cl-amidine (cat. no. 506282, Merck, Darmstadt, Germany), and F-amidine (item no. 10610, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). All inhibitors were dissolved in DMSO (Chempur, Piekary Slaskie, Poland) according to the manufacturers' suggestions, aliquoted (to avoid freeze-refreeze cycles), and stored for up to 3 months according to the manufacturer's instructions. The final concentration of the solvent at the highest concentration of drugs did not exceed 0.6% of the volume sample and did not affect cellular metabolism, which was checked in the viability assay.

Cytotoxicity assay by resazurin reduction test

Cytotoxicity was analyzed by resazurin reduction to fluorescent resorufin, as described previously [24]. Cells were seeded onto 96-well plates at a density of 5,000 and 7,000 cells/well for HUVECs and HMEC-1 cells, respectively. After 16-20 h, the cells were treated with PAD inhibitors at a concentration range of 0.1-10 μ M for 24 h. After the indicated time, the culture medium was removed, and cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) containing Ca^{2+} / Mg^{2+} and 5.5 mM glucose. The cells were then incubated for 2 h in the washing buffer supplemented with 0.0125 mg/ml resazurin. After incubation, fluorescence was read on a Fluoroscan Ascent microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at $\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm.

Flow cytometry

Cell preparation for FACS analysis was based on a previously described method [25]. Briefly, ECs were plated on 6 cm dishes (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA), then after 16-20 h the cells were treated with PAD inhibitors. After 16 to 48 h of incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS, and centrifuged for 5 min at 200 $\times$ g. For DNA content analysis, cells were fixed in 70% ethanol for 24 h at 4 $^{\circ}$ C, centrifuged (10 min at 200 $\times$ g), washed with PBS, and centrifuged again (10 min at 200 $\times$ g). Cells were then resuspended in propidium iodide (PI) buffer containing RNase A (0.4 mg/ml; AppliChem, Darmstadt, Germany) and PI (5 μ g/ml; ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) in PBS and incubated for 30 min. Nuclear DNA content was measured using an LSRII flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Flow acquisition was performed using FlowJo software (FlowJo, Williamson Way Ashland, USA).

RNA isolation, reverse transcription, and Real-Time PCR

Cells were plated onto 6-well plates (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) and after 16-20 h treated with PAD inhibitors for 16 h. Total cellular RNA was isolated and purified using an InviTrap Spin Cell RNA mini kit (Strattec Molecular, Birkenfeld, Germany) in accordance with the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed using the PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time, Takara, Japan) according to the manufacturer's instructions. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) was performed using Eco Real-Time PCR (Illumina, San Diego, CA, USA). The final reaction volume was 10 µL and contained: 0.2 nM of forward and reverse primers (Table 1 for sequences), cDNA template, SYBR Green (Perfect Real Time, Takara, Japan), and DNAase/RNAase-free water (46-000-CV, Corning Life Sciences, Corning, USA). The reactions were incubated at 96 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 96 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. *HPRT1* was used as a reference for gene expression normalization, performed according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method described by Livak [26].

Table 1. List of primers for quantitative PCR used in this study

Gene	Forward primer sequence 5'–3'	Reverse primer sequence 5'–3'
HPRT1	ATGGACAGGACRGAACGTCTT	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA
CCNA2	ACTGGTGGTCTGTGTTCTGTGA	GATGCCAGTCTTACTCATAGCTGAC
CCNB1	TGGTGAATGGACACCAAVTC	TAGCATGCTTCGATGTGGCA
CCND1	ATGCCAACCTCCTCAACGACC	TCTGTTCCCTCGCAGACCTCCA
CCNE1	CAGGGAGCGGGATGCG	GGTCACGTTTGCCTTCCTCT
CCNY	TGGCAGAAGCGAACAACCTG	AGGCGAGAGATGGCCTCAAG
VEGFA	CTACCTCCACCATGCCAAGT	ATGATTCTGCCCTCCTCCTT
VEGFC	CAGCAACACTACCACAGTGTC	CTCCAGCATCCGAGGAAAACAT
SERPINE1	TGTCATAGTCTCAGCCCGCA	AAAAGGACTGTTCTGTGGGG
SERPINF1	GCGTATCCACAGGCCCCA	GGGCTGGCAGGGTTCTG
EDN1	GAGCTCCAGAAACAGCAGTC	TATCCATCAGGGACGAGCAG
IL6	CTCATTCTGCCCTCFAGCC	GACCGAAGGCGCTTGTGGA
IL8	ACCGGAAGGAACCATCTCAC	GGCAAACTFCACCTTCACAC
CCL2	TCTCAAACCTGAAGCTCGCACT	TGGGGCATTGATTGCATCTGG
VIM	TACCGGAGACAGGTGCAGT	CGTTCCAGGGACTCATTGGTT
IGFBP2	GCTGGTCATGGGCGAGGG	TGGTCATCGCCATTGTCTGC
IGFBP3	CCTACCTGCTGCCAGCGCC	GGTGCGTGCTGGAGACGGAC
TIMP1	TGACATCCGGTTCGTCTACA	CTGCAGTTTTCCAGCAATGA

Western blotting

To determine the levels of PAD isoforms in ECs, HMEC-1 and HUVECs were seeded onto 60 mm dishes at 500, 000 cells/dish. After 24 h, total protein extract was prepared using Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) reagent according to the manufacturer's instructions. For histone citrullination assessments, cells were seeded onto 60 mm dishes (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) at 2, 500, 000 cells/dish and after 18–20 h treated with PAD inhibitors and incubated for 16 h. Histone extracts were prepared following an acid extraction protocol as described previously [24]. For the study of Akt signaling, HMEC-1 were seeded onto 60 mm dishes at 500, 000 cells/dish and, after 18–20 h, treated with PAD inhibitors for 16 h. Total protein was prepared using Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) reagent according to the manufacturer's instructions. The extracts were immunoblotted to determine the level of citrullination of histone H3. 1 µg of histone extract or 10 µg of total protein extract was loaded onto polyacrylamide gels and resolved using Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The membrane was then washed with TBST buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Tween20) and blocked in 3% freshly prepared non-fat milk in Tris-buffered saline with Tween (TBST) overnight at 4 °C with agitation. After incubation, the membranes were washed thrice for 5 min each in TBST at room temperature. Next, the membranes were probed with primary antibodies prepared according to suppliers' instructions, for PAD expression: anti-PAD1 (dilution 1:1, 000; cat. no. ab181762, Abcam, Cambridge, UK), anti-PAD2, (dilution 1:1, 000; cat. no. ab16478, Abcam, Cambridge, UK), anti-PAD3 (dilution 1:1, 000; cat. no. sc-393622, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), anti PAD4 (dilution 1:1, 000; cat. no. ab128086, Abcam, Cambridge, UK) and β-actin (dilution 1:1, 000; cat. no. sc-69879, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) was used as loading control. For histone citrullination, H3R2R8R17cit (dilution 1:1, 000; cat. no. ab47915, Abcam, Cambridge, UK), H3 (dilution 1:1, 000; cat. no. ab18521; Abcam, Cambridge, United-Kingdom) was used as loading control. For PI3K/Akt signaling analysis: Pan-Akt (dilution 1:1000; cat. no. A18120, ABclonal, Woburn, USA), Phosphorylated-Akt S473 (dilution 1:000; cat. no. AP1208, ABclonal, Woburn, USA), PI3 Kinase p85 alpha (dilution 1:1000; cat. no. A4992, ABclonal, Woburn, USA), GSK3β (dilution 1:1000; cat. no. sc-81462, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), and the aforementioned β-actin antibody was used as a loading control. The membranes were incubated with primary antibodies overnight and then washed thrice with TBST for 5 min. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (dilution 1:10, 000, cat. no. 111007003 AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) and cat. no. 115-006-003 AffiniPure F(ab)2 Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, USA) for 1.5 h at room temperature. The signal from the membranes was visualized using ECL (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) on the Azure 300 Chemiluminometer (Azure Biosystems, Sierra Trinity, USA).

Cytokines/chemokines/growth factors release assay

The release of selected angiogenesis-related proteins by endothelial cells was performed as previously described [27] using the Proteome Profiler Human Angiogenesis Array (R&D Systems, Minneapolis, USA). Cells were seeded onto 60 mm dishes at 3.5x10⁶ cells/dish and after 18–20 h treated with PAD inhibitors and incubated for 16 h. After incubation, the cell culture supernatants were collected, centrifuged, diluted, and mixed with a cocktail of biotinylated detection antibodies supplied by the manufacturer. The samples were then incubated overnight on a cytokine assay kit membrane. Following a wash to remove unbound material, streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagent were added to quantify protein levels. The signals from the membranes were visualized using an Azure 300 chemiluminometer (Azure Biosystems, Sierra Trinity, USA). The results were then analyzed and quantified using the Protein Array Analyzer tool in ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>), as described previously [28].

Matrix metalloproteinases (MMPs) activity kit

The total activity of MMPs in HMEC-1 cells treated with PAD inhibitors was measured using a fluorometric assay (MMP Activity Assay Kit, ab112146; Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, HMEC-1 cells were seeded onto 6-well plates at a density of 700, 000 cells/well, followed by treatment with the highest concentration of all inhibitors. As a positive control

for MMP inhibition, 20 µg/ml doxycycline (DOX) was used. After 16 h, the supernatant was collected and incubated for 3 h with 2 mM 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) to activate the MMPs. After that, the supernatants activated with APMA were transferred to a U-bottom 96-well plate, and MMP Green Substrate was added to the samples. Subsequently, fluorescence was read in all samples at 5-minute intervals using a Fluoroscan Ascent microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$.

Capillary-like tube formation assay

Endothelial capillary tube-like formation was assessed using Matrigel (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. A basement Matrigel membrane was diluted to a protein concentration of 5 mg/ml using a sterile medium MCDB131, that is, the same medium that we used for endothelial cell culture, and stored at -20 °C. Before the experiment, a sample of Matrigel was thawed (overnight at 4 °C), plated onto 15-well plates (Ibidi, Martinsried, Germany), and incubated at 37 °C for 30-40 min to allow polymerization. Then, endothelial cells in the complete cell culture medium were seeded onto Matrigel-coated plates; HMEC-1: 3, 000 cells/well, HUVECs 4, 000 cells/well. After 6 h (for HMEC-1) or 8 h (for HUVECs), the created structures were stained with calcein-AM (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) for 15 min. Endothelial cell capillary tubes were assessed by fluorescence and phase contrast microscopy (Nikon Eclipse TE200 microscope, Tokyo, Japan) with a Zeiss CCD video camera (AcioCamERc5s, Oberkochen, Germany). The characterization of the created structures was performed by measuring the number, length, and width of the capillary tubes using the Angiogenesis Analyzer tool in ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) [29].

Wound healing assay

Cells were seeded in 24-well plates at a density of 400, 000 cells/well. After overnight incubation, cells were pretreated with PAD inhibitors for 16 h before scratching the confluent monolayer. To exclude the influence of endothelial cells proliferation on wound closure, the medium was supplemented with the cytostatic agent mitomycin C (at a final concentration of 10 µg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) throughout the experiment. Next, the cells were incubated in inhibitor-free medium, and after 8 h, the size of the wound was measured. Cell migration was tracked using a phase-contrast microscope image analysis system (Nikon Eclipse TE200 microscope, Tokyo, Japan) with a Zeiss CCD video camera (AcioCamERc5s, Oberkochen, Germany). Wound healing inhibition analysis was performed using the Wound Healing Tool plugin in ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) [30].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prims 9.0 (GraphPad, San Diego, California, USA). Normality in the data distribution was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between groups were assessed by the one-way ANOVA and post hoc analysis by Dunnett's test was performed. Significance of the results is indicated on the graphs (***<0.0001, **<0.001, *<0.05), and all the results are shown for the treated condition vs control.

Results

The expression of PAD isoforms renders ECs susceptible to PAD inhibitors

We initially assessed the protein expression levels of PAD isoforms – PAD1, PAD2, PAD3 and PAD4 – in microvascular HMEC-1 and macrovascular HUVECs cells (Fig. 1A) and observed easily detectable PAD proteins levels in both cell types. Next, we tested the cytotoxicity of three PAD inhibitors, BB-Cl-amidine (BBCLA, 0.25 – 5 μM range), Cl-amidine (CLA, 0.25 – 10 μM range) and F-amidine (FA, 0.25 – 10 μM range) on both cell lines. BBCLA, which displays highest inhibitory potency towards several PAD isoforms (Table 2), exerted a cytotoxic effect with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 1.75 μM and 1.97 μM for HMEC-1 and HUVECs, respectively (Fig. 1B and 1D). Conversely, CLA and FA showed no major effects on cellular viability at the tested concentrations (Fig. 1B and 1D). We also investigated the effects of higher concentrations of CLA and FA and observed no cytotoxic effects up to 100 μM (data not shown). Next, PAD inhibitors were tested for biochemical inhibitory potency, which was assessed by analyzing histone H3 citrullination levels (H3Cit) (Fig. 1C and 1E). Given the high cytotoxicity of BBCLA, concentrations of 0.25, 0.5, and 1 μM were used. For both CLA and FA, concentrations of 2, 5 and 10 μM were selected. BBCLA was the most potent PAD inhibitor in both endothelial cell models, reducing histone citrullination more than 4-fold (Fig. 1C and 1E) at the highest concentration (1 μM). The inhibitory activity of CLA closely followed that of FA, lowering the H3cit mark by almost 3-fold in both EC models at the highest concentration. These data indicate that a high inhibition of H3cit is cytotoxic, while milder inhibition, halving H3Cit levels, may affect endothelial cell function without toxic effects.

Table 2. Summary of the biochemical properties of the inhibitors used in this study

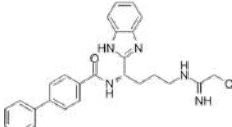
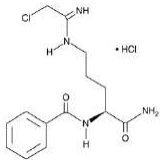
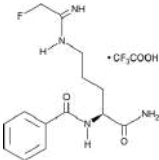
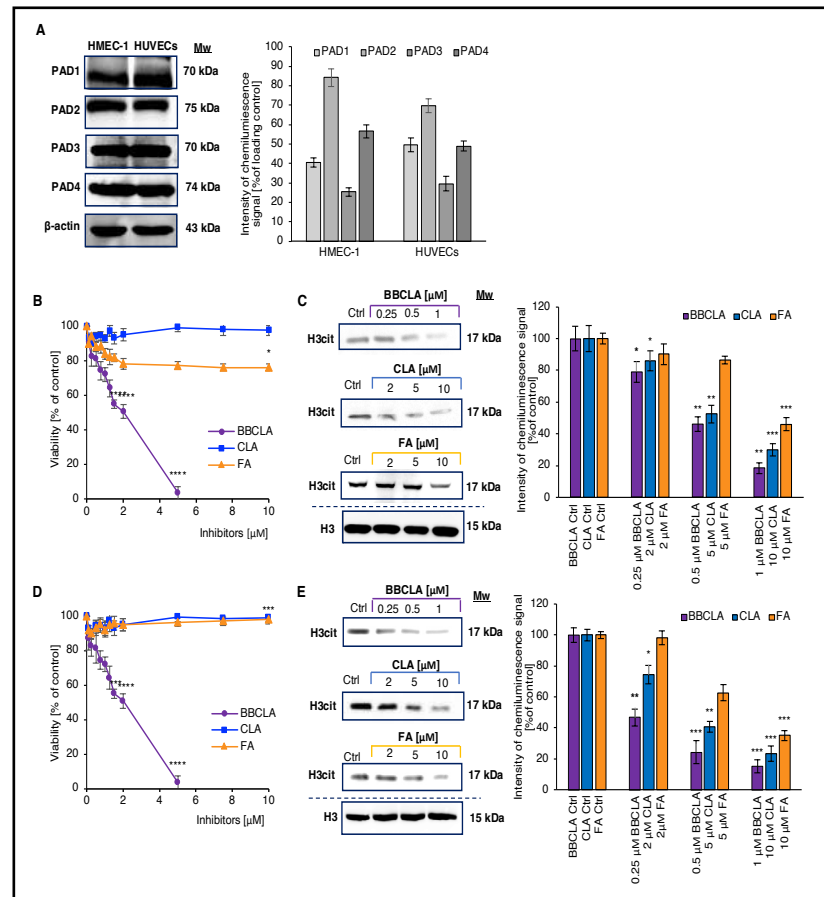
Inhibitor	BB-Cl-amidine	Cl-amidine	F-amidine
IUPAC name and molecular weight (MW)	N-[(1S)-4- [(1-amino-2 chloroethylidene) amino]-1-(1H-benzimidazol-2-yl) butyl]-4-phenylbenzamide MW = 459.97	N-[(2S)-1-amino-5-[(1-amino-2-chloroethyl-idene) amino]-1-oxopentan-2-yl] benzamide MW = 310.78	N-[(2S)-1-amino-5- [(1-amino-2-fluoroethyl- idene) amino]-1-oxopentan-2-yl] benzamide MW = 294.32
Chemical formula			
In vitro inhibitory potency against PADs (target and K_i)	k_{inact}/K_i PAD1 = 16 100 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD2 = 4 100 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD3 = 6 800 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD4 = 13 300 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	k_{inact}/K_i PAD1 = 37,000 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD2 = 1200 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD3 = 2000 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD4 = 13,000 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	k_{inact}/K_i PAD1 = 2800 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD2 = 380 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD3 = 170 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ k_{inact}/K_i PAD4 = 3000 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$
Inhibitory mechanism	Covalent modification of the active site residue Cys645 ²⁹		
Potential off-target effects on endothelial cells	Cytotoxicity at > 1 μM on both HUVEC and HMEC	Minor at the concentrations used in this study	Minor at the concentrations used in this study

Fig. 1. Expression of selected PAD isotypes in endothelial cells and the effect of their inhibition on cell viability and histone citrullination levels (abbreviations; Ctrl; Experimental control, BBCLA - BB-Cl-amidine, CLA - Cl-amidine, FA - F-amidine). A. Western blot analysis of PAD isoforms levels in ECs, representative blots from three independent experiments are shown, the chart visualizes densitometry of the chemiluminescence signal calculated vs loading control; B, D. Viability of endothelial cells treated with PAD inhibitors for 24 h: B. HMEC-1, D. HUVECs. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 5). Statistics: One-way ANOVA control vs. treated, post-hoc Dunnett's test, sample vs. control (*** <0.0001 , ** <0.001 , * <0.05). C, E.



Levels of histone citrullination in ECs treated with PAD inhibitors for 16 h. C. HMEC-1, E. HUVECs. The presented western blots are representative of three independent experiments, and the charts visualize densitometry of the chemiluminescence signal calculated vs. loading control, presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Statistics: one-way ANOVA control vs. treated, post-hoc Dunnett's test, sample vs. control (*** <0.0001 , ** <0.001 , * <0.05).

No significant effect of PAD inhibition on ECs cell cycle

No significant changes for the selected inhibitor concentrations were observed in a resazurin proliferation assay (Fig. 2B). A statistically significant effect on endothelial cell proliferation was observed only at higher concentrations of BBCLA ($>1 \mu\text{M}$), which were not used in subsequent experiments, and no significant results were obtained for either CLA or FA in the tested concentration range. HMEC-1 cells were treated with nontoxic concentrations of PAD inhibitors for several incubation times (16, 24, 32, and 48 h). HMEC-1 cells were treated with nontoxic concentrations of PAD inhibitors for several incubation times (16, 24, 32, and 48 h). Flow cytometry analysis showed no significant differences in the cell cycle progression of PAD inhibitor-treated HMEC-1 cells (Fig. 2C and D). A minor increase in the number of cells in the G_1 phase was detected after 16 h (Fig. 2C and D). Conversely, PAD inhibition significantly altered the expression profile of several cyclins in an incubation time dependent manner (Fig. 2A). Most notably, cyclin E (*CCNE*) and cyclin D (*CCND*) were found to be significantly decreased by all inhibitors after 16 h. Although the change in cyclin expression profile was not sufficient to alter the cell cycle of PAD inhibitor-treated HMEC-1 cells, the change in *CCNE* and *CCND* expression may be responsible for the slight increase in the percentage of cells in the G_0/G_1 phase after 16 h.

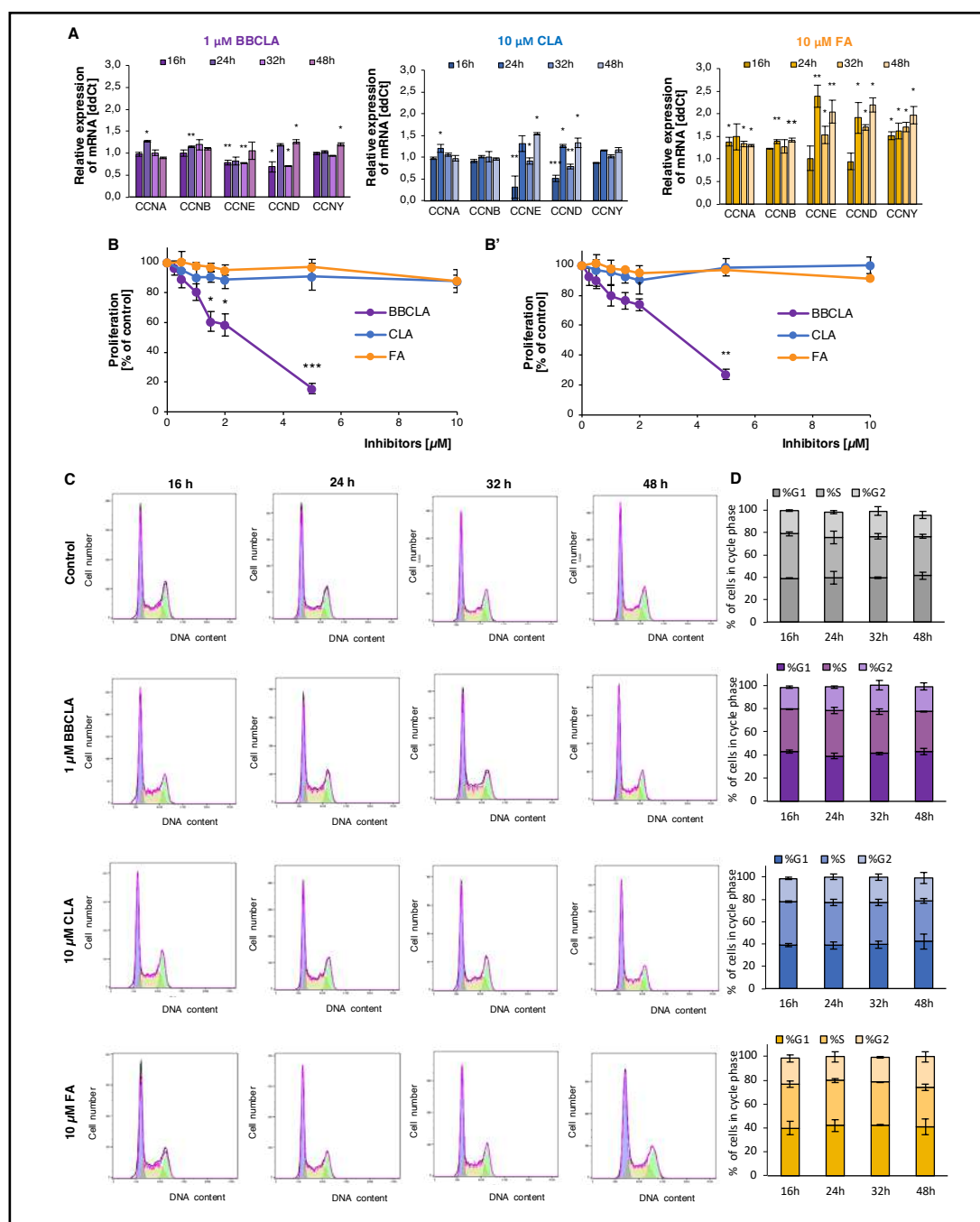


Fig. 2. A. Cyclin mRNA expression profile in PAD inhibitor-treated HMEC-1 over a time-course incubation time 16-48h. Data are presented relative to untreated cells. Statistics: One-way Anova control vs. treated, post-hoc Dunnett's test, sample vs. control ($***<0.0001$, $**<0.001$, $*<0.05$). B. Proliferation of HMEC-1 (B) treated with PAD inhibitors for 48 h. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Statistics: One-way ANOVA, control vs. treated, post-hoc Dunnett's test, sample vs. control ($***<0.0001$, $**<0.001$, $*<0.05$). B'. Proliferation of HUVECs cells treated with PAD inhibitors for 48 h. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Statistics: One-way ANOVA, control vs. treated, post-hoc Dunnett's test, sample vs. control ($***<0.0001$, $**<0.001$, $*<0.05$). C. Cell cycle progression in PAD inhibitor-treated ECs. A. Flow cytometry plots from HMEC-1 cells treated with PAD inhibitors for 16, 24, 32 or 48 h. DNA was stained using propidium iodide/RNaseA solution. Representative plot from each time point is shown (n = 3). D. Percentage of HMEC-1 cells in each phase of the cell cycle at each incubation time, analyzed by propidium iodide flow cytometry staining, and presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Statistical analysis was performed using ANOVA and post-hoc Dunnett's test, sample vs. control

Pharmacological inhibition of PADs affects *in vitro* capillary tube formation and „wound healing” in HMEC1 and HUVECs

Subsequently, we used selected PAD inhibitor concentrations to investigate the contribution of protein citrullination to the regulation of angiogenesis-like responses in our *in vitro* EC models. As pharmacological inhibition of PADs affected cell viability and proliferation of endothelial cells, we analyzed the response of HMEC1 and HUVECs cells to PAD inhibitors in terms of angiogenic potential by performing the capillary-tube formation assay (Fig. 3) and cell migration assay (Fig. 4). The inhibition of PADs by the three different inhibitors affected the organization and several morphological parameters of the capillary net. Inhibitory effects on tube formation were observed in both HMEC-1 cell lines (Fig. 3A) and HUVECs (Fig. 3B), with stronger de-structuration of capillary tube formation by BBCLA compared to CLA and FA in HMEC-1 and no significant results for FA in HUVECs.

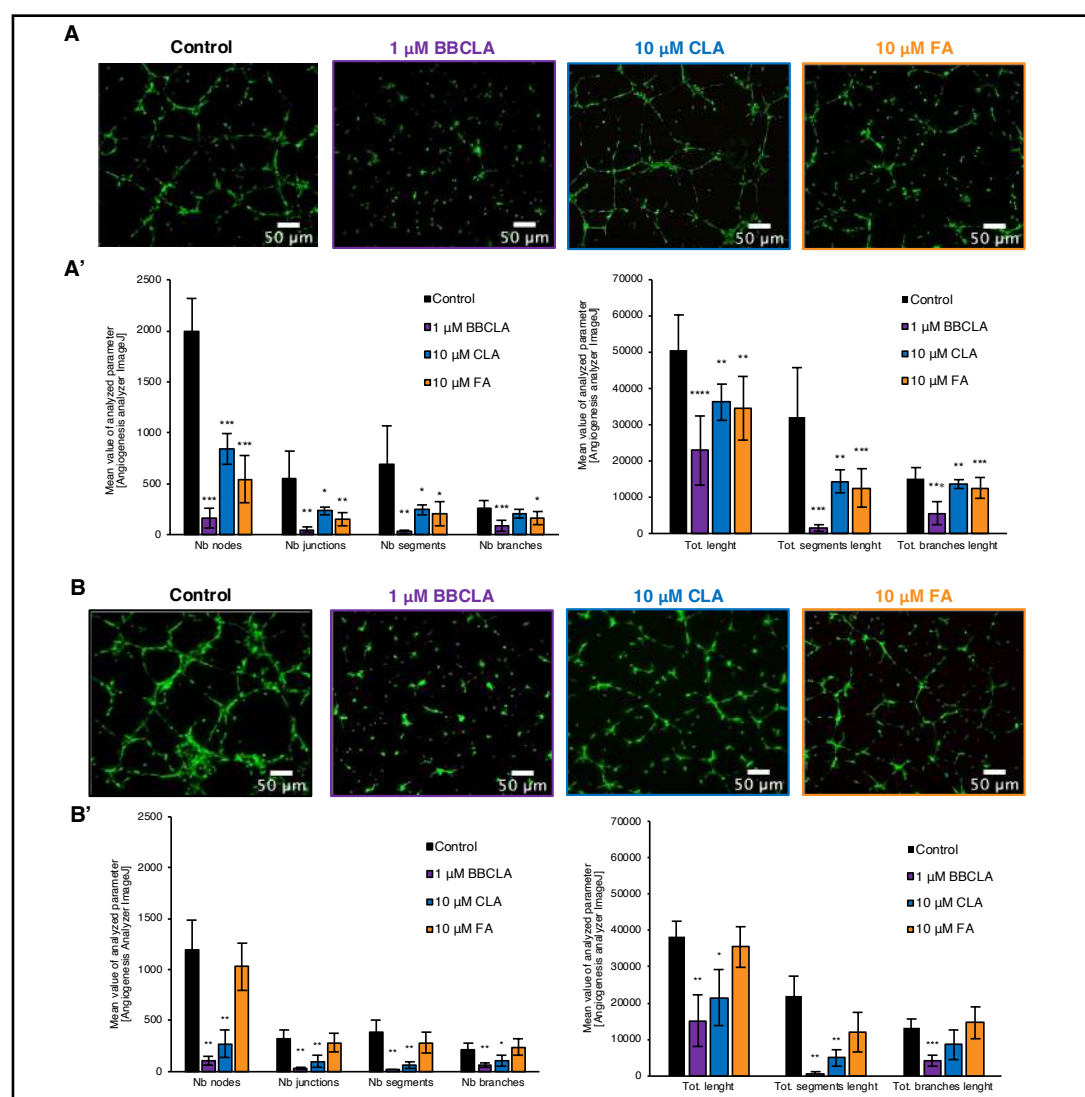


Fig. 3. Inhibition of capillary-like tube formation by PADs inhibitors in HMEC-1 and HUVECs in Matrigel matrix (Abbreviations: Nb, number; Tot. - Total). A. HMEC-1 and B. HUVECs panels containing representative pictures of BBCLA, CLA and FA treatments on the formation of the capillary-like structures stained with Calcein-AM, magnification 4x. Images are representative of five independent experiments. A'. and B'. show the analysis of the parameters characterizing capillary-like structures after PAD inhibition in HMEC-1 and HUVECs endothelial cells respectively. Data are presented as mean $\pm$ SD, n = 9. Statistics: one-way ANOVA control vs. treated, post-hoc Dunnett's test (*** <0.0001 , ** <0.001 , * <0.05).

Next, we monitored endothelial cell migration potential. In both HMEC-1 and HUVECs, cell migration, as seen by the filling of the “wounded” area after 8 h, was almost complete in vehicle-treated cells (Fig. 4). Conversely, significantly reduced cell migration was observed upon pre-incubation with the BBCLA, CLA and FA, with a slightly stronger effect of BBCLA (Fig. 4A', 4B'). Thus, inhibition of PADs suppressed the migration of HMEC-1 and HUVECs into cell-free areas. Overall, pharmacological inhibition of PADs destabilizes capillary-like tube formation and cell migration, which are two processes necessary for angiogenesis.

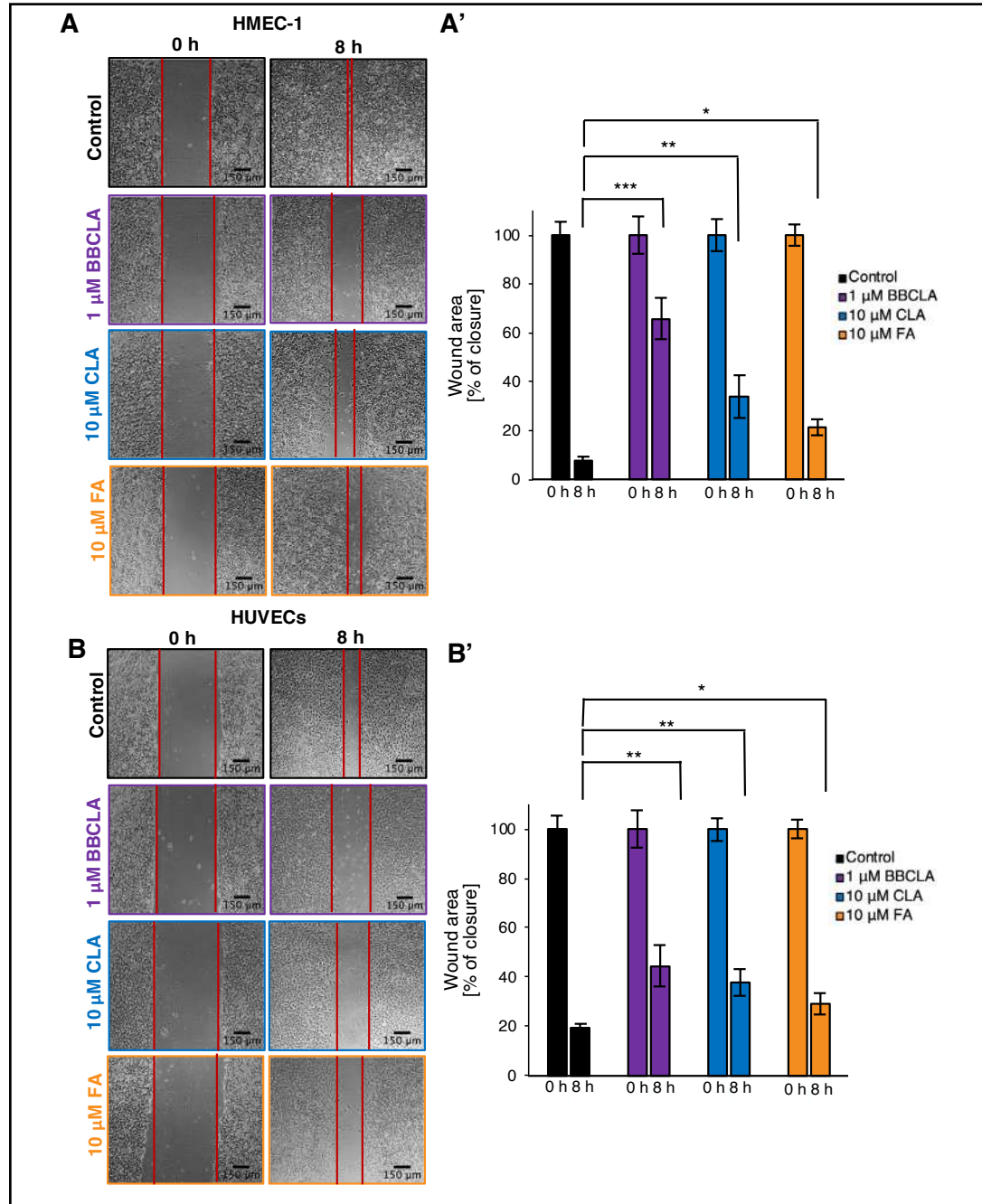


Fig. 4. Inhibition of PADs activity in endothelial cells inhibited cell migration in a wound-healing assay. Cells were pretreated with PAD inhibitors for 16 h before creating a scratch in the confluent monolayer. Next, the cells were incubated in inhibitor-free medium, and after 8 h, the size of the wound was measured. A, B. Representative phase-contrast images of HMEC-1 cells and HUVECs taken at 0 and 8 h post-scratch, magnification 10x. A', B'. Wound healing area analysis was performed using the Wound Healing Tool plugin in ImageJ. Data are presented as mean $\pm$ SD. Statistics: one-way ANOVA control vs. treated ($*** < 0.0001$, $** < 0.001$, $* < 0.05$).

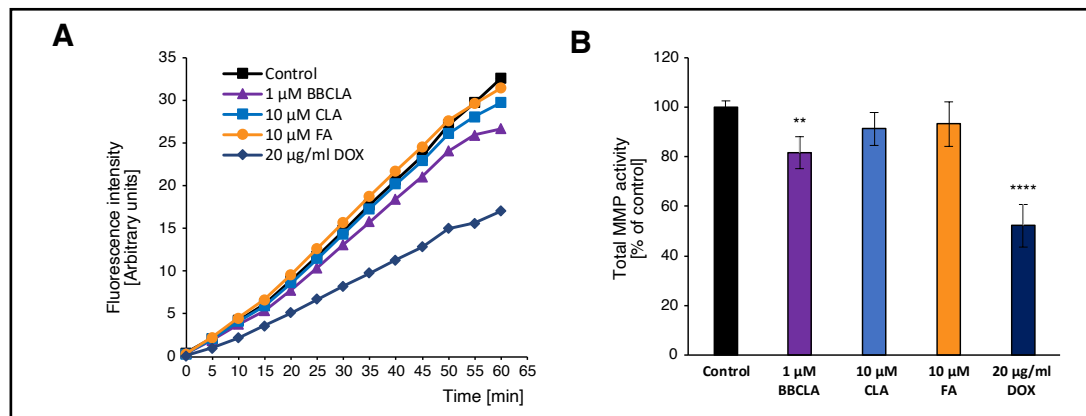


Fig. 5. Total MMP activity in PAD inhibitor treated HMEC-1. A. Kinetic graph of total MMP activity in HMEC-1 treated with PAD inhibitors for 16 h, in relative fluorescence intensity units over 60 min with 5 min measurement interval. B. Total MMP activity in HMEC-1 cells treated with PAD inhibitors for 16 h, data presented as percentage of control, mean $\pm$ SD ($n = 3$). Statistics: one-way ANOVA control vs. treated, post-hoc Dunnett's test (*** <0.0001 , ** <0.001 , * <0.05).

With the results of PAD inhibition on ECs capillary formation and migration we monitored the activity of the MMPs one of the key players in the analyzed angiogenesis processes. We found that the total MMP activity was significantly lowered in the HMEC-1 upon 16 h incubation with 1 μ M BBCLA (Fig. 5A, B). However, no significant reduction in enzyme activity was observed upon 10 μ M CLA and 10 μ M FA treatment.

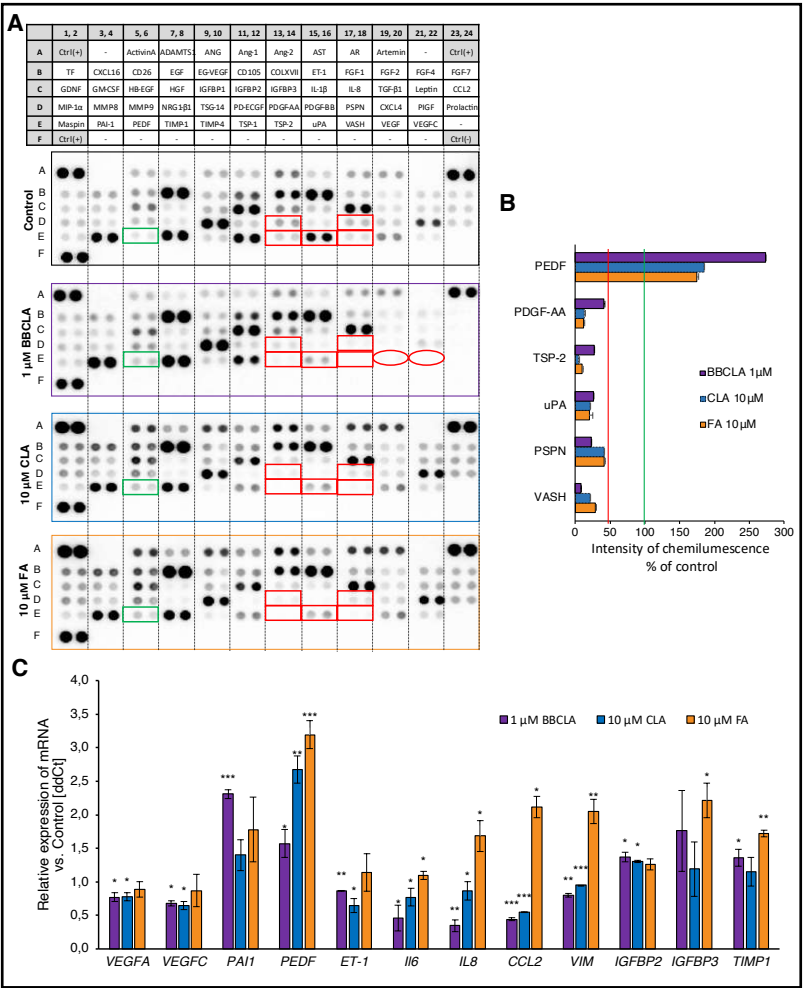
PADs inhibitors induce an anti-angiogenic profile in HMEC-1 and affect Akt activation

To evaluate the effects of PAD inhibitors on ECs functions, we analyzed the secretory profile of HMEC-1 treated with inhibitors for 16 h. Fig. 5A shows the signals of the secreted cytokines, chemokines, and growth factors released in the conditioned medium in response to PADs inhibitors. Among the most prominent features, we detected decreased secretion of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) and Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGFC) upon BBCLA treatment of HMEC-1 to 5% and 11% of the control, respectively. We have highlighted these significant changes in the appropriate representative dot-blot membranes (Fig. 6A, B). In the case of the other two inhibitors, VEGFs downregulation was milder: CLA: 81% for VEGFA and 62% for VEGFC; FA: 49% for VEGFA and 42% for VEGFC (Fig. 6A, B). These results were then verified at the transcriptional level, and we found that BBCLA and CLA, but not FA treatment, significantly reduced *VEGFA* and *VEGFC* mRNA expression. In addition, we detected increased serpinE1 (PAI1) and serpine F1 (PEDF) levels (Fig. 6A, B), which was also supported by concordant changes in the expression levels of the respective genes (Fig. 6C). Overall, the modulation of the secretion pattern was almost coincident with CLA and FA, whereas BBCLA also displayed specific modulation of endothelial cells. We also found several inflammatory genes downregulated in BBCLA- and CLA-treated HMEC-1 cells, namely Interleukin-6 (*IL6*), Interleukin-8 (*IL8*), and C-C Motif Chemokine Ligand 2 (*CCL2*) with an opposite effect in FA-treated cells (Fig. 6C).

Given the multiple anti-angiogenic responses observed upon PAD inhibitor treatment, we monitored the activation status of PI3K-Akt signaling (Fig. 7). In HMEC-1 cells treated for 16 h with the three PAD inhibitors, the expression levels of the key PI3K-Akt signaling enzymes, total Akt, PI3K p85 adapter subunit were not affected by inhibitor treatment, and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) was only mildly downregulated by FA (Fig. 7A and 7B). In contrast, the activation status of the PI3K-Akt signaling pathway was inhibited by the three inhibitors, as Akt phosphorylation at Ser473 was reduced by $>60\%$ (Fig. 7A and 7B). Thus, PI3K-Akt signaling may be a downstream target of PAD inhibition. In Fig. 8, we propose a mechanism for the observed anti-angiogenic profile of endothelial cells treated with PAD inhibitors.

Fig. 6. Release of angiogenesis-related molecules from HMEC-1 treated with PAD inhibitors for 16 h. A. Representative images of dot blot membranes from the Angiogenesis Array. Green rectangles, proteins upregulated by more than 50% by all inhibitors; red rectangles, proteins downregulated by more than 50% by all inhibitors; circles, proteins downregulated by BBCLA only. B. Quantification of the chemiluminescent signal of each membrane spot from PAD inhibitor-treated cell membranes is presented as mean percentage of control membrane, mean + SD (n = 2). (Abbreviations for A, B: TF – Tissue Factor; GDNF – Glial Cell Derived Neurotrophic Factor; MIP-1 α – Macrophage Inflammatory Protein 1; MASPIN – Serpin Family B Member 5; CXCL16 – C-X-C

Motif Chemokine Ligand 16; GM-CSF – Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; PAI-1- Serpin Family E Member 1; INHBA – Inhibin Subunit Beta A; DPPIV – Dipeptidyl peptidase-4; HB-EGF – Heparin Binding EGF Like Growth Factor; PEDF – Serpin Family F Member 1; ADAMTS1 – ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 1; EGF – Epidermal Growth Factor; HGF – Hepatocyte Growth Factor; NRG1- β 1 – Neuregulin 1; TIMP1 – TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1; ANG – Angiogenin; EG-VEGF – Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor; IGFBP1 – Insulin Like Growth Factor Binding Protein 1; TSG-14, tumor necrosis factor-stimulated gene 14 (also known as PTX3 – Pentraxin 3); TIMP-4 – TIMP Metalloproteinase Inhibitor 4; Ang-1 – Angiopoietin 1; CD 105 – Endoglin; IGFBP2 – Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2; PD-ECGF – Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor; TSP1 – Thrombospondin 1; Ang-2 – Angiopoietin-2; IGFBP3 – Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3; PDGF-AA – Platelet Derived Growth Factor Subunit A; TSP2 – Thrombospondin 2; AST – Angiostatin; ET-1 – Endothelin 1; IL-1 β – Interleukin 1 Beta; PDGF-AB – Platelet Derived Growth Factor Subunit B; uPA – Plasminogen Activator, Urokinase; AR – Amphiregulin; FGF-1 – Fibroblast Growth Factor 1 acidic; IL-8 – Interleukin 8; PSPN – Persephin; VASH1 – Vasohibin 1; FGF-2 – Fibroblast Growth Factor 2 basic; TGF- β 1 – Transforming Growth Factor Beta 1; CXCL4 – Platelet Factor 4; VEGFA – Vascular Endothelial Growth Factor A; FGF4 – Fibroblast Growth Factor 4; PIGF – Placental growth factor; VEGFC – Vascular Endothelial Growth Factor C; FGF-7 – Fibroblast Growth Factor 7; MCP1 – Monocyte Chemoattractant Protein-1.) C. Expression of angiogenesis and inflammatory genes in HMEC-1 after 16h of incubation with PAD inhibitors vs. untreated control normalized to the expression of HPRT1; data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Statistics one-way ANOVA control vs. treated, post-hoc Dunnett's test (***<0.0001, **<0.001, *<0.05).



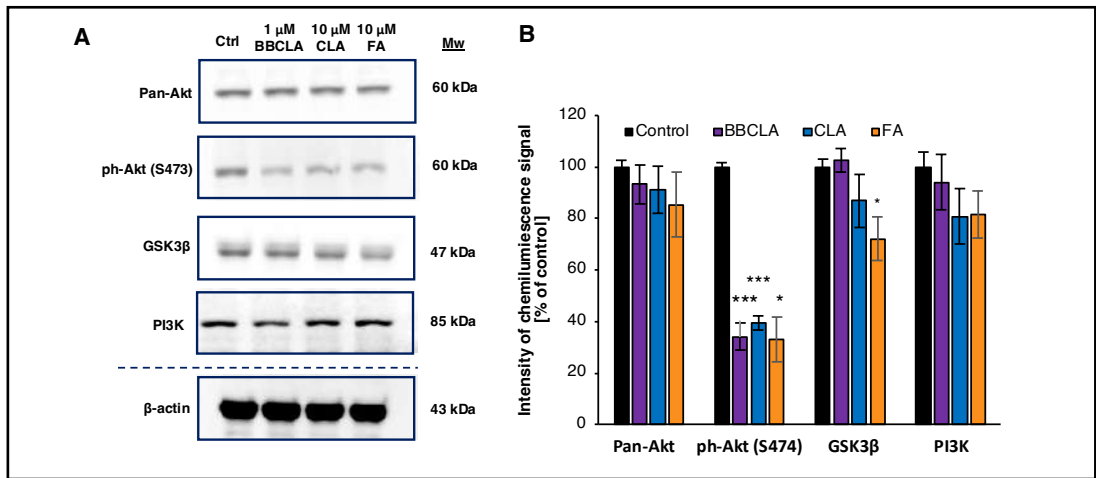


Fig. 7. Inhibition of Akt phosphorylation in HMEC-1 cells treated with PAD inhibitors for 16 h. A. Representative immunoblot of total Akt (Pan-Akt), phosphorylated Akt (on Ser 473), PI3K adapter subunit p85 and GSK3β in HMEC-1 cells treated with the indicated PAD inhibitors (BBCLA, CLA, and FA) for 16 h. B. Quantification of Pan-Akt, phosphorylated Akt, PI3K and GSK3β immunoblotting signals calculated using β-actin as loading control, the signal of ph-Akt(S474) was normalized to the level of Pan-Akt. Data are presented as mean ± SD (n = 3). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, post-hoc Dunnett's test (***<0.0001, **<0.001, *<0.05).

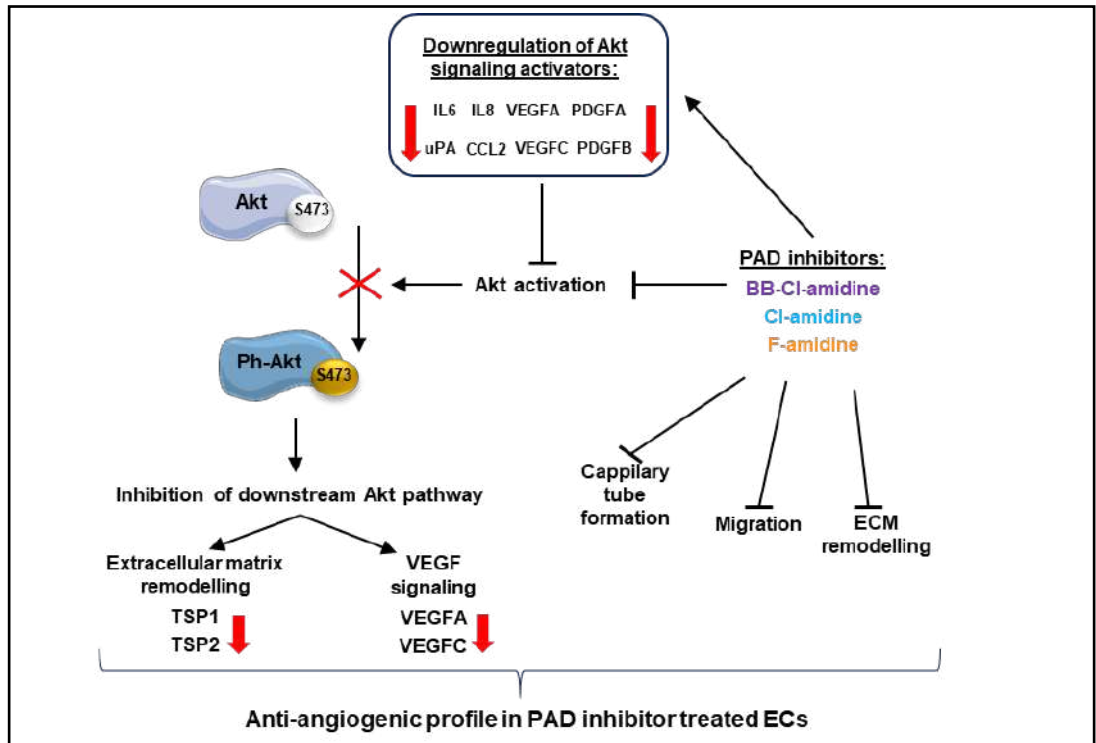


Fig. 8. Proposed mechanism of action of PAD inhibitors in the alteration of Akt signaling and modulation of the angiogenic potential of ECs. (Abbreviations: Akt – protein kinase B, Ph-Akt – phosphorylated protein kinase B; CCL-2 - Monocyte Chemoattractant Protein-1(MCP1); ECM- extracellular matrix; IL6, 8 – Interleukin 6, 8; PDGFA, PDGFB - Platelet Derived Growth Factor Subunit A, Subunit B; TSP1, 2 - Thrombospondin 1, 2; uPA - Plasminogen Activator; VEGFA, C - Vascular Endothelial Growth Factor A, C.

Discussion

Endothelial cells play a foundational role in vascular biology, influencing development, repair, and the maintenance of homeostasis within the cardiovascular system. Their functions are regulated by multiple stimuli and signaling pathways. In our study, we specifically explore the role of protein citrullination in endothelial cell function. By employing pharmacological approaches, we demonstrate that the inhibition of PADs affects endothelial cells proliferation, *in vitro* capillary tube formation and wound healing. Furthermore, PADs inhibitors extensively altered the endothelial cells secretion of multiple cytokines and angiogenic factors, defining citrullination as a PTM contributing to the regulation of endothelial cells biology. In recent years, numerous angiostatic molecules have been identified as target enzymes involved in the determination of histone PTMs patterns, such as histone deacetylases (HDACs) and histone methyltransferases (HMTs) [31], suggesting a promising strategy to inhibit endothelial proliferation. Our previous works demonstrated that broad inhibition of arginine and lysine methyltransferases suppresses angiogenesis [32] and the specific inhibition of G9a HMT suppresses the proliferation of human microvascular endothelial cells [33].

Using the immortalized microvascular (HMEC-1) and primary macrovascular (HUVECs) endothelial cells, as the experimental models, we found that both cell types express noticeable amounts of the PAD isoforms PAD1, 2, 3, and 4 at the protein level (Fig. 1A). Incubation of cells with the PAD inhibitor – BBCLA led to strong inhibition of cell viability, with an IC_{50} of approximately 2 μ M BBCLA. In contrast, CLA and FA treatments did not affect cell viability at concentrations of up to 10 μ M (Fig. 1B, D). The observed cytotoxic effect of BBCLA may be linked to its different chemical structure and longer *in vivo* half-life compared to CLA and FA, additionally BBCLA was also found to be almost 20-fold more cytotoxic than CLA to U2OS cells [10]. Upon treatment of endothelial cells with CLA, FA (up to 10 μ M), and BBCLA (up to 1 μ M to exclude cytotoxic effects of the inhibitor), the three inhibitors effectively inhibited histone H3 arginine citrullination by > 50% at the highest concentrations tested (Fig. 1C, E). PADs inhibitors affected the proliferation machinery, altering the expression profile of selected cyclins and notably lowering *CCNE* and *CCND* after 16 h (Fig. 2A/B). However, no significant changes in cell cycle progression were observed during the 16, 24, 32, and 48 h inhibition periods by flow cytometry, with only a slight but non-significant increase in G_0/G_1 percentage of cells after 16 h of treatment with PAD inhibitors (Fig. 2C, D). Recent data from nasopharyngeal carcinoma cells suggest that PAD4 promotes cell cycle progression, as its overexpression lowers the percentage of cells in the G_0/G_1 phase [34].

Next, we examined the effects of PAD inhibition on the angiogenic potential of ECs using standard assays. Using a Matrigel™-based assay, we studied the generation of capillary-like structures by HMEC-1 with different measurable features, including the number and length of nodes, junctions, segments, and branches, which were significantly inhibited by the three inhibitors (Fig. 3A, A'). Similarly, inhibition of capillary-like structures formation was observed in HUVECs (Fig. 3B, B'). The three inhibitors also prevented cell spreading in a „wound healing” assay (Fig. 4). Given these findings, and to study the possible underlying mechanisms, we analyzed the total activity of MMPs in HMEC-1 cells treated with PAD inhibitors for 16 h (Fig. 5). We observed that only 1 μ M BBCLA significantly lowered the total MMPs activity, which may in part explain the strong anti-angiogenic effects on ECs treated with this compound, as MMPs are crucial for extracellular matrix (ECM) reorganization during both capillary formation and cell migration [35, 36]. We then analyzed the release of chemokines, cytokines, and angiogenic factors into the culture medium, and we observed extensive changes upon incubation of HMEC-1 cells with PADs (Fig. 6). In keeping with the reduced *in vitro* formation of a capillary network and reduced wound healing, PAD inhibitor-treated HMEC-1 cells displayed reduced secretion of angiogenic factors VEGFA and VEGFC. Furthermore, 1 μ M BBCLA induced secretion and increased mRNA expression of *PAI-1* in HMEC-1 (Fig. 6A, 6C), which is involved in the regulation of blood coagulation and is reported

to be inactivated by citrullination [37]. As citrullinated serpins contribute to pathological thrombus formation in several autoimmune conditions, including rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and ulcerative colitis [38], PAD-induced inhibition of serpine citrullination, although not investigated in this study, may also contribute to endothelial health. Also, it has recently been shown that exogenously added PAI-1 inhibits angiogenesis *in vivo* [39]. Moreover, the secretion of uPA, a molecule that plays a role in the proteolytic degradation of the ECM [40], was decreased by each PAD inhibitor. As PAI-1 functions as a uPA inhibitor, its increased secretion coupled with decreased uPA levels may significantly lower the ability of ECs to modulate the ECM, thereby inhibiting angiogenesis. In addition, all the PAD inhibitors used in this study convergently upregulated PEDF (Serpin F1) secretion (up to almost 300% and 200% of the control for BBCLA and CLA/FA, respectively) and *PEDF* mRNA expression in HMEC-1 (Fig. 6A, 6C). *In vitro* mouse studies showed that PEDF inhibited migration and tube formation by dermal microvascular endothelial cells, consistent with the results of our study on human ECs [41, 42].

As PAD activity is strongly linked to inflammation, we also report that PAD inhibition by BBCLA and CLA downregulated the expression of *IL-6*, *IL-8*, *VIM*, and *CCL2* in HMEC-1 cells (Fig. 6C). In contrast, FA treatment increased the expression of these factors, a phenomenon that requires further insight and may be an effect of different substrate specificity of the inhibitors, the lower inhibitory potential of FA or an off-target effect of the compound. It cannot be excluded that the strong anti-angiogenic profile of BBCLA-treated HMEC-1 may also be related to the significant lowering of *CCL2* and *IL8* expression, strong pro-angiogenic factors that are also reported to regulate the expression of VEGF [43]. Studies performed on peripheral blood cells have shown that citrullination of histone H3 arginine 8 (H3R8), driven by PAD4, is required for the expression of IL-8 and other immune genes such as TNF-alpha [44]. Vimentin is one of the best studied PAD substrates, and functions as a pro-angiogenic molecule [45] and in our study it was also downregulated by BBCLA and CLA. Although we have discussed the citrullination of several angiogenesis-related proteins, such as serpins and vimentin, the human citrullinome may encompass hundreds of either anti- or pro-angiogenic molecules that require citrullination to be activated or deactivated, given the profound molecular effects of this modification. A prominent PAD substrate is fibrinogen, which promotes angiogenesis [46], and to date, no other significant proteins from an angiogenic perspective were shown to be affected by citrullination.

Recently, PAD4 has been shown to be an important component in the activation of the PI3K/AKT pathway [47, 48], which is an important regulator of VEGFA production [49]. In addition, PAD2 may be involved in the activation of Akt and downstream cancer progression, as BBCLA treatment of retinoblastoma cell line Y79 reduced the levels of activated Akt [50]. Our observation that all three PAD inhibitors reduce Akt Serine 473 phosphorylation by > 60% (Fig. 7A, 7B) suggests that inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway is among downstream events secondary to PADs inhibition by BBCLA, CLA, and FA. Surprisingly, given the significant changes in activated Akt, no changes in total Akt and PI3K protein expression levels were noticeable, and the level of GSK3 β a protein downstream of the pathway, was reduced only upon FA treatment (Fig. 7A, 7B). Inhibition of Akt phosphorylation provides a molecular background for the observed anti-angiogenic effect, as the PI3K/Akt pathway is widely regarded as the key regulator of angiogenesis and Akt activation is one of the most important events in mitogenic cell signaling [51, 52, 53]. All three PAD inhibitors act in a similar manner in our ECs model, with lowered Akt phosphorylation, possibly dependent on the decreased levels of its activators, such as VEGFA and IL6, or through other mechanism(s) which should be addressed in further studies. The occurrence of angiogenesis depends on the activation of the three VEGF receptors (VEGFRs) tyrosine kinases by the hormones VEGF A, B, and C [54], which act intracellularly by activating, among others, the PI3K-Akt signaling pathway [55], which we showed to be affected by PAD inhibitors treatment. Whether other mitogenic signaling cascades, and particularly the RAS-Raf-MAPK signaling, are affected by PAD inhibitors in endothelial cells remains to be determined.

Our findings complement the limited existing studies regarding the role of PAD activity in angiogenesis and endothelial biology [56, 57]. We showed that irreversible PAD inhibitors affect key endothelial cell processes, such as capillary tube formation and wound healing, by lowering the capacity of cells to destabilize the ECM, inducing PEDF expression and secretion, decreasing VEGF expression and secretion, affecting the expression of cyclin CCNE and CCND, and, most importantly, lowering the levels of activated Akt. The results presented in this study provide further evidence that citrullination and PAD inhibitors may prove to be therapeutic targets, not only in autoinflammatory disorders but also in other pathologies. Based on the isoform-specific inhibitory potencies of the three inhibitors we used (Table 2) and the prominent effects of BBCLA, we infer that PAD4, which contains a nuclear localization signal (NLS) [58] and is strongly inhibited by BBCLA, may be the main isoform mediating endothelial histone citrullination. However, this hypothesis needs to be further validated using a specific knockout of each PAD isoform.

Conclusion

To summarize, we show that pharmacological inhibition of PADs in ECs resulted in subsequent significant decrease in histone citrullination, capillary-tube like formation, wound healing, Akt phosphorylation and expression/secretion of selected angiogenic factors. The obtained data indicate a possible role for citrullination in the regulation of angiogenesis.

Acknowledgements

Author Contributions

AB and OC conceived the study and its design; AB and OC developed the methods and performed experiments; All authors analyzed and interpreted the data and collectively wrote the manuscript.

Funding Sources

The presented study was supported by the Polish Ministry of Higher Education under Diamond Grant (2019-2023): DI2018 018948 and by the financing provided by The BioMedChem Doctoral School of University of Lodz and Polish Academy of Sciences.

Statement of Ethics

The study design and protocol involving the use of human umbilical cords were approved by the Bioethics Commission at the University of Lodz (Decision No. 15/KBBN-UŁ/III/2019 and 16 (III)/KBBN-UŁ/I/2021-22), all research was performed in accordance with relevant regulations and the guidelines of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the donors at the Medeor Multidisciplinary Hospital in Lodz, no data regarding the donors were collected and stored, and the samples were completely anonymized.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Folkman J: Angiogenesis. *Annual Review of Medicine* 2006;57:1–18.
- 2 Chung AS, Ferrara N: Developmental and pathological angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2011;27:563–584.
- 3 Cao Y, Arbiser J, D'Amato RJ, D'Amore PA, Ingber DE, Kerbel R, et al.: Forty-year journey of Angiogenesis Translational Research. *Science Translational Medicine* 2011;3.
- 4 Kerbel RS: Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine* 2008;358:2039–2049.
- 5 Fadini GP, Albiero M, Bonora BM, Avogaro A: Angiogenic abnormalities in diabetes mellitus: Mechanistic and clinical aspects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2019;104:5431–5444.
- 6 Cheng R, Ma J: Angiogenesis in diabetes and obesity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2015;16:67–75.
- 7 Pirola L, Balcerzyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, et al.: Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Research* 2011;21:1601–1615.
- 8 Miao F, Chen Z, Genuth S, Paterson A, Zhang L, Wu X, et al.: Evaluating the role of epigenetic histone modifications in the metabolic memory of type 1 diabetes. *Diabetes* 2014;63:1748–1762.
- 9 Yu K, Proost P: Insights into peptidylarginine deiminase expression and citrullination pathways. *Trends in Cell Biology* 2022;32:746–761.
- 10 Mondal S, Thompson PR: Chemical Biology of protein citrullination by the protein arginine deiminases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2021;63:19–27.
- 11 Witalison E, Thompson P, Hofseth L: Protein arginine Deiminases and associated citrullination: Physiological functions and diseases associated with dysregulation. *Current Drug Targets* 2015;16:700–710.
- 12 Rebak AS, Hendriks IA, Elsborg JD, Buch-Larsen SC, Nielsen CH, Terslev L, et al.: A quantitative and site-specific atlas of the citrullinome reveals widespread existence of citrullination and insights into PAD14 substrates. *Nat Struct Mol Biol.* 2024 Feb 6. doi: 10.1038/s41594-024-01214-9.
- 13 Wang L, Song G, Zhang X, Feng T, Pan J, Chen W, et al.: PAD12-mediated Citrullination promotes prostate cancer progression. *Cancer Research* 2017;77:5755–5768.
- 14 Neeli I, Khan SN, Radic M: Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *The Journal of Immunology* 2008;180:1895–1902.
- 15 Ciesielski O, Biesiekierska M, Panthu B, Soszyński M, Pirola L, Balcerzyk A: Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: Recent advances and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022;79.
- 16 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532–1535.
- 17 Mutua V, Gershwin LJ: A review of neutrophil extracellular traps (nets) in disease: Potential anti-nets therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2020;61:194–211.
- 18 Manda-Handzlik A, Bystrzycka W, Cieloch A, Glodkowska-Mrowka E, Jankowska-Steifer E, Heropolitanska-Pliszka E, et al.: Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019;77:3059–3075.
- 19 Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al.: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:15880–15885.
- 20 Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, et al.: Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110:8674–8679.
- 21 Meegan JE, Yang X, Beard RS, Jannaway M, Chatterjee V, Taylor-Clark TE, et al.: Citrullinated histone 3 causes endothelial barrier dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;503:1498–1502.
- 22 Osca-Verdegal R, Beltrán-García J, Paes AB, Nacher-Sendra E, Novella S, Hermenegildo C, et al.: Histone citrullination mediates a protective role in endothelium and modulates inflammation. *Cells* 2022;11:4070.
- 23 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation* 1973;52:2745–2756.

- 24 Ciesielski O, Biesiekierska M, Balcerczyk A: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) alters histone acetylation and methylation and impacts chromatin architecture profile in human endothelial cells. *Molecules* 2020;25:2326.
- 25 Wojtala, Dąbek, Rybaczek, Śliwińska, Świdarska, Słapek, et al.: Silencing lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1) causes increased HP1-positive chromatin, stimulation of DNA repair processes, and dysregulation of proliferation by Chk1 phosphorylation in human endothelial cells. *Cells* 2019;8:1212.
- 26 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–408.
- 27 Wojtala M, Rybaczek D, Wielgus E, Sobalska-Kwapis M, Strapagiel D, Balcerczyk A. The role of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in shaping the endothelial inflammatory response. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2021;55.
- 28 Carpentier, G. Protein array analyzer for ImageJ. Faculté des Sciences et Technologie, Université Paris Est Creteil, Val de Marne, France Available at <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/Protein-Array-Analyzer-for-ImageJ.html> Accessed January 8, 2023.
- 29 Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, et al.: Angiogenesis analyzer for imagej — a comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin bead assay.” *Scientific Reports* 2020;10:11568.
- 30 Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C: An image J plugin for the high throughput image analysis of *in vitro* scratch wound healing assays. *PLOS ONE* 2020;15.
- 31 Xu S, Alam S, Margariti A: Epigenetics in vascular disease – therapeutic potential of New Agents. *Current Vascular Pharmacology* 2014;12:77–86.
- 32 Balcerczyk A, Rybaczek D, Wojtala M, Pirola L, Okabe J, El-Osta A: Pharmacological inhibition of arginine and lysine methyltransferases induces nuclear abnormalities and suppresses angiogenesis in human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology* 2016;121:18–32.
- 33 Wojtala M, Macierzyńska-Piotrowska E, Rybaczek D, Pirola L, Balcerczyk A: Pharmacological and transcriptional inhibition of the G9A histone methyltransferase suppresses proliferation and modulates redox homeostasis in human microvascular endothelial cells. *Pharmacological Research* 2018;128:252–263.
- 34 Chen H, Wei L, Luo M, Wang X, Zhan Y, Mao Y, et al.: PAD4 Inhibitor Promotes DNA damage and Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Environmental Toxicology* 2021;36:2291–2301.
- 35 Ghajar CM, George SC, Putnam A: Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression* 2008;18:251–278.
- 36 Rohani MG, Parks WC: Matrix Remodeling by MMPs During Wound Repair. *Matrix Biology* 2015;44–46:113–121.
- 37 Thompson PR: Citrullination inhibits serpin activity. *The FASEB Journal* 2018;32:104.3.
- 38 Tilvawala R, Nemmara VV, Reyes AC, Sorvillo N, Salinger AJ, Cherpokova D, et al.: The role of Serpin citrullination in thrombosis. *Cell Chemical Biology* 2021;28:1728-1739.
- 39 Stefansson S, Petittclerc E, Wong Michael KK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA: Inhibition of angiogenesis *in vivo* by plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:8135–8141.
- 40 Stepanova V, Jayaraman P-S, Zaitsev SV, Lebedeva T, Bdeir K, Kershaw R, et al.: Urokinase-type plasminogen activator (UPA) promotes angiogenesis by attenuating proline-rich homeodomain protein (PRH) transcription factor activity and de-repressing vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor expression. *Journal of Biological Chemistry* 2016;291:15029–15045.
- 41 Michalczyk ER, Chen L, Fine D, Zhao Y, Mascarinas E, Grippo PJ, et al.: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a regulator of wound angiogenesis. *Scientific Reports* 2018;8:11142.
- 42 Belkacemi L, Zhang SX: Anti-tumor effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF): Implication for cancer therapy. A mini-review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2016;35:10.1186/s13046-015-0278-7.
- 43 Martin D, Galisteo R, Gutkind JS: CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFκB through the CBM (CARMA3/BCL10/malt1) complex. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:6038–6042.
- 44 Sharma P, Azebi S, England P, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, et al.: Citrullination of histone H3 interferes with HP1-mediated transcriptional repression. *PLoS Genetics* 2012;8:e1002934.

- 45 Dave JM, Bayless KJ: Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation* 2014;21:333–344.
- 46 Shiose S, Hata Y, Noda Y, Sassa Y, Takeda A, Yoshikawa H, et al.: Fibrinogen stimulates *in vitro* angiogenesis by choroidal endothelial cells via autocrine VEGF. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2004;242:777–783.
- 47 Chen H, Wei L, Luo M, Wang X, Zhu C, Huang H, et al.: Linc00324 suppresses apoptosis and autophagy in nasopharyngeal carcinoma through upregulation of PAD4 and activation of the PI3K/akt signaling pathway. *Cell Biology and Toxicology* 2021;38:995–1011.
- 48 Shen S, Wang X, Lv H, Shi Y, Xiao L: PADI4 mediates autophagy and participates in the role of Ganoderic acid a monomers in delaying the senescence of alzheimer's cells through the AKT/mtor pathway. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2021;85:1818–1829.
- 49 Jiang B-H, Liu L-Z: PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2008;1784:150–158.
- 50 Kim S, Song Y, Cho C, Kim H, Fang S, Jo D, et al.: Inhibition of protein arginine deiminase II suppresses retinoblastoma in orthotopic transplantation in mice. *Oncology Reports* 2023;50:146.
- 51 Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV: Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 2006;5:512–518.
- 52 Lee MY, Luciano AK, Ackah E, Rodriguez-Vita J, Bancroft TA, Eichmann A, et al.: Endothelial AKT1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111:12865–12870.
- 53 Shiojima I, Walsh K: Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation Research* 2002;90:1243–1250.
- 54 Claesson-Welsh L: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Vascular Pharmacology* 2012;56:308.
- 55 Jiang B-H, Liu L-Z: PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2008;1784:150–158.
- 56 Khajavi M, Zhou Y, Birsner AE, Bazinet L, Rosa Di Sant A, Schiffer AJ, et al.: Identification of PADI2 as a novel angiogenesis-regulating gene by genome association studies in mice. *PLOS Genetics* 2017;13:e1006848.
- 57 Horibata S, Rogers KE, Sadegh D, Anguish LJ, McElwee JL, Shah P, et al.: Role of peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in mammary carcinoma cell migration. *BMC Cancer* 2017;17:378.
- 58 Wang Y, Chen R, Gan Y, Ying S: The roles of pad2- and pad4-mediated protein citrullination catalysis in cancers. *International Journal of Cancer* 2020;148:267–276.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Łódź, dnia 14.11.2024

mgr Oskar Ciesielski
Full name

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Affiliation

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w opublikowanie następującego oryginalnego artykułu naukowego: Oskar Ciesielski, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Peptidylarginine Deiminases Inhibitors Decrease Endothelial Cells Angiogenic Potential by Affecting Akt Signaling and the Expression and Secretion of Angiogenic Factors; Cellular physiology and biochemistry. 2024 Feb DOI: 10.33594/000000683**, polegał na: przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń, analizie danych, przygotowaniu figur, przygotowaniu manuskryptu oraz jego poprawach zgodnie z uwagami recenzentów
Wkład ten szacuję na 70%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Oskara Ciesielskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

.....*Oskar Ciesielski*.....
Podpis

PUBLICATION CO-AUTHOR STATEMENT

Lyon, date Nov 23th 2024

Prof. Luciano Pirola
Full name

CarMeN Laboratory, INSERM Unit 1060,
Lyon 1 University, 165 Chemin du Grand Revoyet,
Pierre Bénite Cedex, France
Affiliation

STATEMENT

I declare that my contribution to the publication of the original article: Oskar Ciesielski, Luciano Pirola, Aneta Balcerzyk. **Peptidylarginine Deiminases Inhibitors Decrease Endothelial Cells Angiogenic Potential by Affecting Akt Signaling and the Expression and Secretion of Angiogenic Factors; Cellular physiology and biochemistry. 2024 Feb DOI: 10.33594/000000683**, consisted of: participation in the preparation of the manuscript, data analysis and corrections during the publication process.

I estimate my contribution to be: 10%.

I also consent to the submission of the above-mentioned publication by Oskar Ciesielski MSc, as part of his doctoral dissertation.

L. PIROLA

Signature



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Łódź, dnia 14.11.2024

dr hab. Aneta Balcerczyk, prof UŁ

Full name

Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Affiliation

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w opublikowanie następującego oryginalnego artykułu naukowego: Oskar Ciesielski, Luciano Pirola, Aneta Balcerczyk. **Peptidylarginine Deiminases Inhibitors Decrease Endothelial Cells Angiogenic Potential by Affecting Akt Signaling and the Expression and Secretion of Angiogenic Factors, Cellular physiology and biochemistry. 2024 Feb DOI: 10.33594/000000683**, polegał na: nadzorowaniu prowadzonych eksperymentów, analizie wyników, kontaktach z edytorem oraz uczestnictwie w poprawie manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów.

Wkład ten szacuję na 20%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Oskara Ciesielskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.


Podpis

Całkowity dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach:

1. **Ciesielski O.**, Pirola L., Balcerczyk A. *Peptidylarginine Deiminases Inhibitors Decrease Endothelial Cells Angiogenic Potential by Affecting Akt Signaling and the Expression and Secretion of Angiogenic Factors*. Cellular Physiology and Biochemistry 2024, DOI: 10.33594/000000683
IF = 2,5; MEiN = 140; Cytowania = 1
2. Liudvytska O., Ponczek M.B., **Ciesielski O.**, Krzyżanowska-Kowalczyk J., Kowalczyk M., Balcerczyk A., Kołodziejczyk-Czepas J., *Rheum rhaponticum and Rheum rhabarbarum Extracts as Modulators of Endothelial Cell Inflammatory Response*. Nutrients 2023, DOI: 10.3390/nu15040949
IF = 6,706; MEiN = 140; Cytowania = 6
3. Pirola L., **Ciesielski O.**, Balcerczyk A., *Fat not so bad? The role of ketone bodies and ketogenic diet in the treatment of endothelial dysfunction and hypertension*. Biochemical Pharmacology 2022, DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115346
IF = 6,1; MEiN = 100; Cytowania = 4
4. **Ciesielski O.**, Biesieksierska M., Panthu B., Szoszyński M., Pirola L., Balcerczyk A., *Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives*. Cellular and Molecular Life Sciences 2022, DOI: 10.1007/s00018-022-04126-3
IF = 9,234; MEiN = 140; Cytowania = 66
5. **Ciesielski O.**, Biesieksierska M., Balcerczyk A., *Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Alters Histone Acetylation and Methylation and Impacts Chromatin Architecture Profile in Human Endothelial Cells*, Molecules 2020, DOI: 10.3390/molecules25102326
IF = 4,927; MEiN = 100; Cytowania = 42
6. **Ciesielski O.**, Biesieksierska M., Panthu B., Vialichka V., Pirola L., Balcerczyk A., *The Epigenetic Profile of Tumor Endothelial Cells. Effects of Combined Therapy with Antiangiogenic and Epigenetic Drugs on Cancer Progression*, International Journal of Molecular Sciences 2020, DOI: 10.3390/ijms21072606
IF = 6,208; MEiN = 140; Cytowania = 26
7. Pirola L., **Ciesielski O.**, Balcerczyk A., *The Methylation Status of the Epigenome: Its Emerging Role in the Regulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Growth, and Potential for Drug Targeting*, Cancers 2018, DOI: 10.3390/cancers10080268
IF = 6,639; MEiN = 140; Cytowania = 34

Łączny IF = **42,314**

Łączna liczba punktów MEiN = **900**

Łączna liczba cytowań (wg. Scopus) = **180**

Indeks Hirscha (wg. Scopus) = **5**

Rozdziały w monografiach:

1. Pirola L., **Ciesielski O.**, Biesieksierska M., Balcerczyk A., *Modulation of noncoding RNAs (ncRNAs) and their potential role as therapeutics*, Medical Epigenetics (Second Edition), Chapter 32, Volume 29 in Translational Epigenetics 2021,
MEiN = 50 pkt.

Prezentacje i postery konferencyjne:

1. EMBO Workshop: Mechanisms of Citrullination Regulation in Health and Disease, 8 – 11.07.24, Tuluza, Francja. Prezentacja posteru (Flash Talk): *Inhibitors of peptidyl-arginine deiminases and histone citrullination decrease the angiogenic potential and Akt activation in human endothelial cells*, **O. Ciesielski**, K. Nowak, A. Gabryanczyk, A. Balcerczyk
2. XI Sesja Łódzkiego Środowiska Chemików, 12.06.2024, Prezentacja ustna: Molekularne efekty inhibicji cytrulinacji: spojrzenie na regulację angiogenezy, **O. Ciesielski**, K. Nowak, A. Gabryanczyk, A. Balcerczyk. Wystąpienie wyróżnione 3 nagrodami za najlepszą prezentację
3. Seminarium Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, 20.05.2024, Łódź. Prezentacja ustna: Epigenetyczna regulacja angiogenezy z poziomu cytrulinacji białek w modelu ludzkich komórek śródbłonna mikronaczyniowego, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
4. 1st FEBS-IUBMB-ENABLE, 16 – 18.11.22, Sevilla, Hiszpania. Prezentacja ustna (Short Talk): *Exploring the links between histone citrullination and methylation in human endothelial cells*, **O. Ciesielski**, K. Górecka, A. Balcerczyk Publikacja pokonferencyjna (abstrakt): FEBS openBio; <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13608> **IF = 2,693/MEiN = 70 pkt.**
5. The Biochemistry Global Summit – the 25th IUBMB, 46th FEBS and 15th PABMB Congresses, 09-14.07.2022, Lizbona, Portugalia. Prezentacja ustna (Short Talk): *Conversion of arginine to citrulline alters the angiogenic and epigenetic profile of human endothelial cells*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk Publikacja pokonferencyjna (abstrakt): FEBS openBio; <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13442> **IF = 2,693/MEiN = 70 pkt.**
6. IUBMB-FEBS-PABMB Young Scientists' Forum, 06-09.07.2022, Vimeiro, Portugalia. Prezentacja posteru: *Conversion of arginine to citrulline alters the angiogenic and epigenetic profile of human endothelial cells*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
7. FASEB The Epigenome in Human Health and Diseases Conference, 18-20.10.2021, Nancy, Francja. Prezentacja ustna: *Inhibition of peptidylarginine deiminases driven histone citrullination affects the angiogenic potential of endothelial cells*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
8. Young in Cancer Research – Interdisciplinary Scientific Conference. 7 – 8.05.2022. Prezentacja ustna: *Protein citrullination and its implication in cancer progression and metastasis*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
9. International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology, 25 – 26.02.2021, Warszawa, Prezentacja ustna: *Pharmacological inhibition of peptidylarginine deiminases driving histone citrullination and its impact on endothelial cells proliferation*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
10. Nauka I Pasja – kluczem do sukcesu, 11.06.2021, 11.06.2021, Rzeszów, Prezentacja ustna: *Proces cytrulinacji w ostrych stanach zapalnych*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
11. II Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa z cyklu Badania Młodych Naukowców „Wiedza – Inspiracja – Pasja”, 04.10.2019, Łódź Prezentacja ustna: *Wpływ galusanu epigallokatechiny (EGCG) na potranslacyjne modyfikacje lizyny histonu 3 i reorganizację chromatyny w komórkach śródbłonna naczyniowego*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk
12. Konferencja Naukowa TYGIEL 2019 Lublin, 23-24 marca 2019 r. Prezentacja posteru: *Wpływ galusanu epigallokatechiny na proliferację komórek śródbłonna naczyniowego. Epigenetyczny potencjał związku do modyfikacji struktury chromatyny*. **O. Ciesielski**, M. Biesiekińska, A. Balcerczyk
13. VII Konferencja Biologii Molekularnej, 12 – 14.04.2018, Łódź, Prezentacja posteru: *Perspektywy wykorzystania galusanu epigallokatechiny w terapiach wspomagających leczenie chorób nowotworowych*, **O. Ciesielski**, A. Balcerczyk

Doświadczenie badawcze:**Granty:**

1. Grant NCN PRELUDIM, 2024 – 2026, edycja 23. Tytuł projektu: *Zmiany w profilu cytrulinacji białek oraz w strukturze chromatyny indukowane aktywnością deiminaz peptydylo-argininowych i ich konsekwencje dla hemostatycznych funkcji komórek śródbłoka.*
Rola w grantcie: **Kierownik projektu**, Rodzaj: Krajowy, NCN, Kwota: 140 000 zł
2. Grant w ramach programu „Diamantowy Grant” MEiN, VIII edycja 2019. Tytuł projektu: *Analiza epigenetycznego profilu modyfikacji wybranych arginin histonów rdzeniowych i wynikające z nich konsekwencje dla innych modyfikacji potranslacyjnych oraz funkcjonowania śródbłoka naczyniowego.*
Rola w grantcie: **Kierownik projektu**, Rodzaj: Krajowy, MEiN Kwota: 220 000 zł
3. NAWA Polonium 2019 – 2021, Tytuł projektu: *Exploring the link between ketogenesis and epigenetics.* Prowadzony we współpracy z CarMeN Laboratory Lyon, Francja.
Rola w grantcie: **Wykonawca**, Kierownik projektu: dr hab. Aneta Balcerczyk, pro Uł, Rodzaj: Międzynarodowy, NAWA
4. Studencki Grant Badawczy Uł 2018-2019: *The influence of epigallocatechin gallate (EGCG) on angiogenic potential and epigenetic parameters of vascular endothelium (HMEC-1) in tumor co-culture conditions.*
Rola w grantcie: **Kierownik projektu**, Rodzaj: Grant Wewnętrzny Uł Kwota: 3500 zł

Staże i wyjazdy naukowe:

1. **03 – 25.09.2021** – Wyjazd naukowy do INSERM CARMEN, Lyon, Francja w ramach projektu: NAWA Polonium Exploring the link between ketogenesis and epigenetics,
2. **04 – 08 .2018** – Staż w Katedrze Biofizyki Molekularnej Uł 2018 pod opieką dr hab. Anety Balcerczyk (360 godz.) w ramach inicjatywy "Staż na start. Program wsparcia studentów Uniwersytetu Łódzkiego"
3. **01-30.09.2017** – Praktyki zawodowe w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Zakład Chemii Bioorganicznej, Łódź 2017, opiekun praktyk: dr Agnieszka Krakowiak

Otrzymane nagrody i wyróżnienia:

1. Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla Najlepszych Doktorantów I stopnia **2023**
2. Nagroda Santander Universidades za działalność na rzecz uczelni oraz aktywność społeczną **2023**,
3. Wyróżnienie za aktywność Doktorancką na rzecz i dla dobra Uniwersytetu Łódzkiego **2022**,
4. Międzynarodowa nagroda w postaci stypendium wyjazdowego przyznanego przez Federację Europejskich Stowarzyszeń Biochemicznych (FEBS) na 1st FEBS-IUBMB-ENABLE, **16 – 18.11.2022**, Sewilla, Hiszpania
5. Międzynarodowa nagroda w postaci stypendium wyjazdowego przyznanego przez Federację Europejskich Stowarzyszeń Biochemicznych (FEBS) na IUBMB-FEBS-PABMB Young Scientists' Forum, **06-09.07.2022**, Vimeiro, Portugalia oraz The Biochemistry Global Summit – the 25th IUBMB, 46th FEBS and 15th PABMB Congresses **09-14.07.2022**, Lizbona, Portugalia 2022
6. Laureat w ramach programu Diamantowy Grant MEiN **2019**,
7. II miejsce w plebiscycie Osobowość Roku w kategorii Nauka (Województwo Łódzkie) Dziennika Łódzkiego **2019**
8. List gratulacyjny Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za wybitne wyniki w nauce przyznany w latach: **2018, 2019 i 2020**
9. Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych studentów przyznane w latach: **2016, 2017, 2018, 2019, 2020**

Aktywności popularyzatorskie, organizacyjne i inne:

1. Opiekun studentów zagranicznych w ramach programów Erasmus+ i Mobility Direct na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ **2024** – obecnie,
2. Członkostwo w Uczelnianej Radzie Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Łódzkiego –uczestniczenie w posiedzeniach rady, zatwierdzanie rozporządzeń m.in. dotyczących dofinansowań dla doktorantów na UŁ oraz organizacja wydarzeń popularyzujących naukę i kształcenie w szkołach doktorskich **2020 - 2022**
3. Członkostwo w Polskim Towarzystwie Biochemicznym **2019 - obecnie**,
4. Członkostwo w Studenckim Kole Młodych Biofizyków UŁ **2017 – obecnie**
5. Współorganizacja VIII Konferencji Biologii Molekularnej **12 – 14.04.2018**, Łódź
6. Współorganizacja i prowadzenie zajęć w ramach Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki w Łodzi **21.04.2023**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla uczniów szkół podstawowych – „*Moc zjawiska dyfuzji jak ją badać i obserwować*” – mgr **Oskar Ciesielski**, mgr Anna Gabryanczyk, dr Anna Selmi, mgr Karolina Górecka, lic Natalia Chrzan, dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ
7. Współorganizacja i prowadzenie zajęć w ramach Nocy Biologów w Łodzi **13.01.2023**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla uczniów szkół podstawowych – „*H₂O– wystarczy kropla – badania fizykochemicznych właściwości wody*” – mgr **Oskar Ciesielski**, mgr Anna Gabryanczyk, dr Anna Selmi, mgr Karolina Górecka, lic Natalia Chrzan, dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ
8. Współorganizacja i prowadzenie warsztatów eksperymentalnych dla studentów 2 roku Biotechnologii UŁ w ramach cyklu: „*PoCOVIDowy zawrót głowy*” **02.08.2021**. Temat warsztatów: „*Techniki Biologii Molekularnej*” – mgr **Oskar Ciesielski**, mgr inż. Marta Biesiekierska, dr Anna selmi, dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ
9. Współorganizacja i prowadzenie warsztatów eksperymentalnych dla uczniów liceów w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii Temat warsztatów: „*Strefa mocy antyoksydantów – badanie przeciutleniających właściwości ekstraktów z owoców i warzyw*” – mgr **Oskar Ciesielski**, lic. Natalia Chrzan, lic. Karolina Górecka, dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ
10. Współorganizacja i prowadzenie zajęć w ramach ogólnopolskiej „Nocy Biologów” **10.01.2020**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla uczniów szkół podstawowych – „*Jak wygląda nowotwór? Jedna z najpowszechniejszych chorób cywilizacyjnych pod lupą*” – lic Oskar Ciesielski dr hab. Aneta Balcerczyk, prof. UŁ Varvara Vialichka, mgr inż. Marta Biesiekierska,
11. Współorganizacja i prowadzenie cyklu warsztatów eksperymentalnych w ramach czwartej edycji Instytutu Kreatywnej Biologii **22.11.2019** organizowanych przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, zajęcia dla uczniów szkół podstawowych i ponadpodstawowych „*Jak wygląda nowotwór? Jedna z najpowszechniejszych chorób cywilizacyjnych pod lupą*” –lic. **Oskar Ciesielski**, mgr inż. Marta Biesiekierska, mgr Varvara Vialichka, dr hab. Aneta
12. Współorganizacja i prowadzenie warsztatów w ramach Nocy Biologów **11.01.2019**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla gimnazjalistów i uczniów szkół podstawowych – „*Czy wiesz, co jesz? Sprawdzanie właściwości antyoksydacyjnych owoców i warzyw*” – lic. **Oskar Ciesielski**, mgr inż. Marta Biesiekierska, mgr Arkadiusz Dąbek, mgr Martyna Wojtala, dr hab. Aneta Balcerczyk
13. Zajęcia dla licealistów na Wydziale BiOŚ, UŁ **27.09.2018** - wykład i warsztaty dla licealistów z I Liceum Ogólnokształcącego im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. Potencjał redoks, ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej substancji pochodzenia roślinnego, obrazowanie komórek w mikroskopie świetlnym: parametryczno-morfologiczna ocena wielkości komórek – **Oskar Ciesielski**, Varvara Vialichka, mgr inż. Marta Biesiekierska, mgr Arkadiusz Dąbek, dr hab. Aneta Balcerczyk
14. Współorganizacja i prowadzenie warsztatów w ramach XVIII Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi **16-23.04.2018** – warsztaty prowadzone na rynku Manufaktury w Łodzi. Temat: „*Wolne rodniki vs Antyoksydanty*” (oznaczanie zdolności antyoksydacyjnej produktów spożywczych, przeprowadzanie reakcji oscylacyjnych redoks) – Katarzyna Słapek, **Oskar Ciesielski**, mgr Arkadiusz Dąbek
15. Współorganizacja i prowadzenie warsztatów w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii **17.11.2017, 15.12.2017, 19.01.2018**– warsztaty dla uczniów szkół ponadpodstawowych z regionu Łódzkiego. „*Wolne rodniki kontra Antyoksydanty – kto z tej walki wyjdzie zwycięsko*” (oznaczanie zdolności antyoksydacyjnej, obserwacja bioluminescencji glonów), Martyna Lesiak, **Oskar Ciesielski**, mgr Arkadiusz Dąbek, dr hab. Łukasz Pułaski, prof. nadz. UŁ