

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 śródbłonka naczyń. Zarówno immortalizowaną linię ludzkich komórek śródbłonka mikrowaskularnego (HMEC-1) jak i pierwotne komórki śródbłonka izolowane z żyły pępowinowej (HUVEC). W organizmie człowieka komórki śródbłonka, 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 fibrynolizy. Jedną z istotnych funkcji komórek śródbłonka 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 śródbłonka 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 śródbłonka, 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 śródbłonka. 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-CI-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 antyangiogennego 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 angiogennego 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 angiogennego.

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 śródbłónka, zwłaszcza ich potencjału angiogennego. 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.

Oskar Nisielch
13.01.2025