



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii

Adrianna Żukowska

**Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny
w modelach *in vitro*, *in vivo* oraz u pacjentów z żylną chorobą
zakrzepowo-zatorową**

Analysis of extranuclear histones and homocysteine in *in vitro*, *in vivo* models
and patients with venous thromboembolism

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie biotechnologia

Doctoral dissertation in the field of natural sciences
in the discipline of biotechnology

Promotor: dr hab. inż. Joanna Zeyland, prof. UPP
Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet
Przyrodniczy w Poznaniu

Promotor pomocniczy: dr hab. Joanna Perła-Kaján,
prof. UPP
Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet
Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 2025

.....

imię i nazwisko promotora / promotorów / promotora pomocniczego

Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny w modelach in vitro, in vivo oraz u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowozatorową” została przygotowana pod moim/naszym kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora rozprawy

.....

Podpis promotora / promotora pomocniczego rozprawy

.....

Adrianna Żukowska

imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.:

„Analiza zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny w modelach in vitro, in vivo oraz u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową” napisałem samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data

.....

podpis autora rozprawy

Składam serdeczne podziękowania

*Pani Promotor i Promotor pomocniczy za wsparcie, przekazaną wiedzę, poświęcony czas,
możliwość rozwoju i pomoc w realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej,*

*Kolegom i Koleżankom z Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w
Poznaniu za wszelką pomoc i życzliwą atmosferę w pracy,*

Narzeczonemu za okazaną cierpliwość, wsparcie i motywację do pracy,

Najbliższej Rodzinie za nieustające wsparcie i możliwość nauki,

oraz Przyjaciółom za troskliwość i dobre słowo.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Wyniki badań przedstawione w pracy zostały częściowo uzyskane podczas realizacji projektów OPUS 2019/33/B/NZ4/01760 i 2021/43/B/NZ3/01008 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

Spis treści

Wykaz skrótów	6
Streszczenie.....	10
Streszczenie w języku angielskim	11
1. Wstęp.....	12
1.1 Epigenetyka.....	12
1.2 Histony jądrowe	12
1.3 Warianty histonów	14
1.3.1 H1.....	14
1.3.2 H2A.....	17
1.3.3 H2B	17
1.3.4 H3.....	18
1.3.5 H4.....	19
1.4 Modyfikacje potranslacyjne.....	19
1.5 Histony zewnątrzkomórkowe	20
1.5.1 DAMP	21
1.6 Homocysteina	22
1.7 Choroby sercowo-naczyniowe.....	25
1.8 Choroby neurodegeneracyjne	25
1.8.1 Choroba Alzheimera	26
1.8.1.1 Model ApoE KO	26
1.8.2 Stwardnienie zanikowe boczne.....	27
1.8.2.1 Model SOD1	28
1.9 Histony zewnątrzkomórkowe w stanach patologicznych	29
1.10 PTM w stanach patologicznych	30
1.11 Osie organ-organ.....	32
2. Cel pracy	35

3.	Materiały i metody	37
3.1	Odczynniki	37
3.2	Materiał mysi	38
3.2.1	Pobranie materiału do badań.....	38
3.3	Materiał ludzki	39
3.4	Hodowle komórkowe.....	39
3.4.1	Metody pracy z hodowlami komórkowymi	39
3.4.1.1	Traktowanie komórek	39
3.4.1.2	Przygotowanie komórek do analizy immunocytochemicznej	40
3.4.1.3	Analiza hodowli komórkowych licznikiem komórek.....	40
3.4.2	Izolacja białek	40
3.4.2.1	Frakcja cytoplazmatyczna.....	40
3.4.2.2	Frakcja jądrowa.....	41
3.5	Izolacja białek z organów myszy	41
3.5.1	Oznaczanie stężenia białek metodą taninową.....	41
3.5.2	Oznaczanie stężenia białek metodą Bradford	42
3.5.3	Oznaczanie stężenia białek próbą ninhydrynową	42
3.5.4	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym - SDS-PAGE.....	43
3.5.5	Western blotting	44
3.5.6	Dot blotting	45
3.5.7	Oznaczanie stężenia całkowitej homocysteiny	46
3.5.7.1	Metoda 1	46
3.5.7.2	Metoda 2	47
3.5.8	Pomiar poziomu przeciwciał anty-H1 metodą ELISA	47
3.5.9	Modyfikacja histonu tiolaktonem homocysteiny	48
3.5.10	Derywatyzacja histonów bezwodnikiem propionowym.....	49
3.5.11	Spektrometria mas	49

3.5.12	Pomiar wolnych grup tiolowych metodą Elmana	50
3.6	Statystyczna analiza danych	50
4.	Wyniki.....	51
4.1	Model komórkowy	52
4.1.1	Czynniki stresowe i <i>N</i> -homocysteinylacja histonu	53
4.1.2	Żywotność komórek HUVEC	56
4.1.3	Pomiar tHcy i histonów zewnątrzkomórkowych	59
4.1.4	Obrazowanie mikroskopowe histonu H1	62
4.2	Mysie modele chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych.....	65
4.2.1	ApoE KO–Osocze.....	65
4.2.2	ApoE KO–Organy.....	67
4.2.3	SOD1–Osocze.....	71
4.2.4	SOD1–Organy.....	73
4.3	Analiza modyfikacjach potranslacyjnych w komórkach N2A AD	76
4.4	Model ludzki	80
5.	Dyskusja.....	84
5.1	Analiza modelu <i>in vitro</i>	85
5.2	Mysie modele chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych.....	87
5.3	Zmiany w modyfikacjach potranslacyjnych	94
5.4	Analiza materiału pacjentów z VTE	96
5.5	Podsumowanie	99
6.	Wnioski	101
	Wykaz tabel i rycin	103
	Bibliografia	107

Wykaz skrótów

A β – amyloid β

AD – Choroba Alzheimera

ADP – adenozynodwufosforan

AHCY – hydrolaza adenozylohomocysteiny

ALS – stwardnienie zanikowe boczne

ANOVA – analiza wariancji

APP – białko prekursorowe amyloidu

ApoE – apolipoproteina E

ApoE KO – myszy z knock-outem genu ApoE

ATP – adenozynotrójfosforan

BBB – bariera krew–mózg

BHMT – S-metylotransferaza betaina-homocysteina

BLMH – hydrolaza bleomycyny

BPHL – białko podobne do hydrolazy bifenyłu

CaMKII – kinaza białkowa II zależna od Ca²⁺/kalmoduliny

CBS – syntaza β -cystationiny

CENP-A – histon centromerowy A

CSE – γ -liaza cystationinowa

CLEC – receptory typu lektynowego

CVD – choroby układu sercowo-naczyniowego

Cys – cysteina

DAMP – wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (ang. *Danger Associated Molecular Patterns*)

DDR – odpowiedź na uszkodzenia DNA (ang. *DNA Damage Response*)

DNMTs – metylotransferazy DNA

dsDNA – dwuniciowy DNA

DTNB – 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesan)

fALS – dziedziczne ALS

FTD-ALS – otępienie czołowo-skroniowe związane z ALS

gH1 – domena globularna histonu H1

GCL – ligaza γ -glutamylcysteinowa

GS – syntetaza glutaminowa

GSH – glutation

HE – encefalopatia wątrobowa

HHcy – hiperhomocysteinemia

HMGB1 – białko o wysokiej ruchliwości (ang. *High Mobility Group Protein B1*)

Hcy – homocysteina

HTL – tiolakton homocysteiny

HUVEC – pierwotne ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej

HZK – zewnątrzkomórkowe histony

Met – metionina

MAT – adenozylotransferaza metioniny

MRS – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa

MTR – syntaza metioninowa

MTRR – reduktaza syntazy metioninowej

NAFLD – niealkoholowe stłuszczenie wątroby

NCP – C-końcowa domena nukleosom

ND – choroby neurodegeneracyjne

NET – zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilów (ang. *Neutrophil Extracellular Traps*)

NOD – receptory NOD-podobne (ang. *Nucleotide Oligomerization Domain*)

N2A AD – komórkowy model choroby Alzheimera z mutacją szwedzką

N-Hcy-histon – *N*-homocysteinyłowany histon

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PAMP – wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PRR – receptory rozpoznające wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*)

PS1 – presenilina 1

PS2 – presenilina 2

ROS – reaktywne formy tlenu

SAH – S-adenozylhomocysteina

SAM – S-adenozylometionina

sALS – sporadyczne ALS

Ser – seryna

SLE – toczeń rumieniowaty

SOD1 – myszy transgeniczne z nadekspresją ludzkiej, zmutowanej formy dysmutazy
ponadtlenkowej 1

TNB – kwas 5-nitro-2-tiobenzoesowy

TLR9 – receptory toll-podobne (ang. *Toll-like Receptors*)

tHcy – całkowita homocysteina

VTE – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie

Zewnątrzjądrowe histony (HZ) mogą być zaangażowane w progresję różnych chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych, w których wykazano, że histon H1 jest uwalniany poza komórkę, działając toksycznie na neurony i zwiększając reaktywność mikrogleju. Podwyższone stężenie homocysteiny (Hcy) zostało powiązane z ponad 100 schorzeniami. Hiperhomocysteinemia (HHcy, Hcy >15 μ M) stanowi czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Celem pracy była ocena potencjalnego wpływu HHcy na HZ, co może wpływać na rozwój chorób sercowo-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych. Analizy przeprowadzono na liniach komórkowych ludzkiego śródbłónka HUVEC oraz mysiej neuroblastomy z mutacją szwedzką (N2A AD), próbkach osocza, mózgu, wątroby i śledziony pochodzących od myszy B6.129P2-Apoe^{tm1Unc} (ApoE KO) i B6SJL. SOD1-G93A (SOD1), oraz osocza pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (VTE). Stężenie Hcy i HTL określono metodą HPLC, HZ analizowano za pomocą technik Western Blot i immunohistochemii, natomiast PTM histonów badano metodą LC-MS/MS. Żywotność oraz rozmiar komórek oceniano z licznikiem komórek Countness 3. Traktowanie komórek Hcy i HTL wpływa na zwiększenie ekspresji histonu H1 i jego transport do jądra komórkowego. W komórkach stresowanych Hcy dochodzi do zwiększenia poziomu histonu H1 w cytoplazmie i medium hodowlanym, natomiast HTL powoduje zwiększenie H1 tylko w cytoplazmie. Komórki hodowane w obecności histonu i N-Hcy-histonu wykazują wyższe stężenia tHcy w medium hodowlanym. W modelach *in vivo* dochodzi do istotnego wzrostu HZ H1, anti-H1 IgG i tHcy w osoczu. U myszy ApoE KO wykazano wzrost stężenia tHcy w wątrobie i śledzionie, a u zwierząt SOD1 tylko w wątrobie. W obu modelach *in vivo* zaobserwowano istotny wzrost poziomu HZ H1 i H3 we wszystkich badanych organach, z wyjątkiem wątroby myszy ApoE KO, gdzie nie wykazano istotnej różnicy w poziomie HZ H3. Hcy i HTL wpływają na PTM histonów powodując zaburzenia w funkcjonowaniu białek. W osoczu pacjentów z VTE i HHcy wykazano zwiększony poziom histonu H1 i anti-H1 IgG w porównaniu do grupy z normlanym poziomem Hcy. Homocysteina i wiek są determinantami podwyższonego poziomu histonu H1 w osoczu osób z VTE. Uzyskane wyniki wskazują na istotną zależność między homocysteiną a zewnątrzjądrowymi histonami, co może stanowić podstawę do wykorzystania tych białek jako biomarkerów progresji chorób.

Słowa kluczowe: histony zewnątrzjądrowe, homocysteina, choroby neurodegeneracyjne, choroby sercowo-naczyniowe

Streszczenie w języku angielskim

Extranuclear histones may play a role in the progression of various diseases, including neurodegenerative disorders, where histone H1 is released into the extracellular space, affecting neurons and microglia. Elevated homocysteine (Hcy) have been linked to more than 100 disorders. Hyperhomocysteinemia (HHcy, Hcy>15 μ M) is a risk factor for cardiovascular and neurodegenerative diseases. The objective of this study was to evaluate the potential influence of HHcy on extracellular histones, which could have implications for disease progression. The study was conducted on HUVEC and N2A AD cell lines grown in hyperhomocysteinemic conditions, plasma, brain, liver and spleen from the Apoetm1Un (ApoE KO) and SOD1G93A (SOD1) mouse models and human plasma from patients with venous thromboembolism (VTE). Hcy was quantified by HPLC, while levels of extranuclear histones were analyzed by Western blotting and immunohistochemistry. The cell viability and size were assayed with Countess 3 instrument, while histone PTMs were examined via LC-MS/MS. Treatment of cells with Hcy and HTL increased histone H1 expression and its nuclear transport. Stress induced by Hcy resulted in increased H1 levels in the cytoplasm and medium, whereas HTL increased H1 levels only in the cytoplasm. Cells cultured with histone and *N*-Hcy-histone showed increased tHcy levels in the medium. *In vivo* models showed a significant increase in extranuclear H1, anti-H1 IgG and tHcy in plasma. ApoE KO mice showed increased tHcy levels in the liver and spleen, while SOD1 mice showed increased tHcy in the liver and decreased levels in the spleen compared to controls. Both *in vivo* models showed significant increases in extranuclear H1 and H3 levels in all tissues analyzed, except for H3 levels in the liver of ApoE KO mice, which showed no significant change. Elevated Hcy and HTL levels affected histone PTMs, leading to protein dysfunction. Higher levels of histone H1 and anti-H1 IgG were observed in the plasma of VTE patients with HHcy compared to those with normal Hcy levels. Homocysteine and age were determinants of elevated plasma H1 levels in individuals with VTE. The results indicate a significant association between homocysteine and extranuclear histones, suggesting their potential use as biomarkers of disease progression.

Key words: extranuclear histones, homocysteine, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases

1. Wstęp

1.1 Epigenetyka

Informacja genetyczna każdego organizmu jest zapisana w postaci specyficznej, dla każdego osobnika, sekwencji nukleotydowej kwasu deoksyrybonukleinowego. DNA nie jest samoistną jednostką, a do jego prawidłowego funkcjonowania potrzebuje białek histonowych, z którymi tworzy jednostkę funkcjonalną zwaną chromatyną. Transkrypcja genów zależy między innymi od modyfikacji białek histonowych. Modyfikacje te nie wpływają na sekwencję DNA, dlatego określa się je jako zmiany epigenetyczne (Lucchesi, 2018).

W 1942 roku dr C.H. Waddington sformułował pojęcie „epigenetyki” jako zjawiska wyjaśniającego zdarzenia biologiczne, których nie mogły opisać znane wówczas zasady genetyki (Waddington, 1936, 1950, 2012). Dzięki licznym badaniom w tym zakresie, obecnie definiujemy epigenetykę jako dziedzinę badań łączącą genotyp z fenotypem, przy jednoczesnym braku zmian w sekwencji DNA (J. Lee i in., 2013). Odkrycie sekwencji DNA jako kodu genetycznego przyczyniło się do zrozumienia mechanizmów dziedziczenia informacji, co pozwoliło na wyróżnienie trzech głównych systemów dziedziczności epigenetycznej: modyfikacji histonowych, metylacji DNA oraz mechanizmów opartych na RNA. Rozwój nauki przyczynia się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących w organizmach ludzkich, w tym regulacji epigenetycznej. Dzięki temu coraz lepiej rozumiemy procesy starzenia, procesy poznawcze, a także choroby psychiczne i nowotwory. Coraz więcej doniesień naukowych sugeruje, że zmiany w poziomie histonów i ich modyfikacjach potranslacyjnych (PTM) mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie wielu chorób (Basavarajappa & Subbanna, 2021; Kalbitz i in., 2015; J. Lee i in., 2013).

1.2 Histony jądrowe

Ludzki genom składa się z około trzech miliardów par zasad, co daje ponad dwa metry długości nici DNA przy pełnym rozciągnięciu. Aby pomieścić tak ogromną ilość informacji, organizmy pakują swoje geny w kompleksy polimerowe zwane chromatyną, której podstawową jednostką jest nukleosom. Nukleosom to oktamer, złożony z dwóch kopii każdego z podstawowych histonów (H2A, H2B, H3, H4), wokół którego owinięty jest DNA, a histony łącznikowe H1

stabilizują powstałą strukturę (McGinty & Tan, 2015). Nukleosomy kondensują DNA, tworząc segmenty zawierające około 146 par zasad, co umożliwia im efektywne funkcjonowanie jako centra sygnałowe dla procesów związanych z DNA. Ze względu na swoją strukturę, nukleosom działa jako rusztowanie dla wiązania białek, aktywacji lub represji transkrypcyjnej oraz wspomaga modyfikacje potranslacyjne (Anderson & Turko, 2015).

Histony rdzeniowe to małe białka, o masie 10-15 kDa i zbliżonej strukturze, obejmującej centralny region α -helikalny oraz domeny N- i C-końcowe. Region centralny składa się z trzech α -helis, połączonych dwiema pośrednimi α -helisami, określanymi jako $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$. Krótsze helisy $\alpha 1$ i $\alpha 3$ zapętłają się, tworząc zwartą strukturę, która spina centralną helisę $\alpha 2$. Histony wiążą się ze sobą tworząc heterodimery H2A–H2B i H3–H4, które mają silny ładunek dodatni, co stanowi kluczowy element wiążący DNA (McGinty & Tan, 2015).

Histony łącznikowe H1 są większe od rdzeniowych, ponieważ ich masa przekracza 20 kDa (Saha & Dalal, 2021) i charakteryzują się wysoką zawartością lizyn, sięgającą do 28,9%. (Ye i in., 2017a). Histon łącznikowy H1 wiąże się z rdzeniem powstałego nukleosomu i DNA łącznika, wpływając na zagęszczenie chromatyny we włókna 30 nm. H1 zbudowany jest z centralnej domeny globularnej i nieustrukturyzowanych N- i C-końców (McGinty & Tan, 2015). Badania pokazują, że domena globularna (gH1) i C-końcowa (NCP) są zaangażowane w wiązanie i zagęszczanie chromatyny. Wyodrębniono dwie klasy oddziaływań gH1-NCP:

1. Symetryczne, gdzie gH1 wiąże się w diadzie oddziaływując na DNA łącznikowy, rozciągający się po obu stronach.
2. Asymetryczny, gdzie gH1 wiąże się w pobliżu diady i oddziałuje z 10-20 pz łącznikowego DNA, rozciągającego się z jednej strony nukleosomu (McGinty & Tan, 2015).

1.3 Warianty histonów

1.3.1 H1

Histony stanowią aż połowę masy chromosomu eukariotycznego, jednakże odgrywają one także inne role, niżeli tylko regulacji transkrypcji. Badania wykazały, że histony wpływają m.in. na ekspresję genów, segregację chromosomów oraz naprawę DNA. Specyficzne wymagania procesów chromosomalnych doprowadziły do wyewoluowania odrębnych wariantów histonów (Henikoff & Smith, 2015). Ekspresja histonów kanonicznych jest zależna od replikacji i ma miejsce w fazie S cyklu komórkowego, kiedy to ekspresja wariantów histonów może być zależna lub niezależna od replikacji. Największą liczbą wariantów charakteryzuje się histon łącznikowy, u którego zostało opisanych aż 11 wariantów występujących u ssaków. Można je podzielić na:

- somatyczne (H1.0-H1.5 i H1.10),
- specyficzne dla jąder (H1.6, H1.7 i H1.9),
- specyficzny dla oocytów (H1.8) (Noberini i in., 2020; Ye i in., 2017a).

Geny histonów somatycznych H1.1-5 oraz histonów rdzeniowych są zlokalizowane na chromosomie 6, natomiast H1.0 i H1.10 znajdują się odpowiednio na chromosomie 22 i 3. Oprócz lokalizacji, histony somatyczne różnią się czasem ekspresji. W fazie S cyklu komórkowego dochodzi do ekspresji H1.1-5, podczas gdy H1.0 i H1.10 ulegają ekspresji przez cały cykl komórkowy (Nozaki & Kanai, 2021). Warianty różnią się między sobą cechami i funkcjami takimi, jak ciężar cząsteczkowy, poziom ekspresji, powinowactwo do chromatyny, fenotyp delecyjny oraz interakcje (Lai i in., 2022; Ye i in., 2017a). Warianty somatyczne histonu H1 podlegają ekspresji we wszystkich typach komórek i tkankach, jednak każdy typ tkanki posiada charakterystyczny wzór wariantów H1. Pozostałe warianty histonu H1 są specyficzne dla jąder i oocytów (Hergeth & Schneider, 2015).

Tabela 1. Porównanie podtypów histonów łącznikowych. Tabela pochodzi z publikacji (Żukowska & Perła-Kaján, 2024) za zgodą redakcji.

	Nazwa	Masa, kDa	Zawartość Lys [Liczba;%]	Funkcja
Niezależne od cyklu komórkowego	H1.0	22,9	56; 28,9%	Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu występuje w komórkach, które są w końcowych etapach różnicowania lub mają niskie tempo podziału (Di Liegro i in., 2018; Hergeth & Schneider, 2015).
Zależne od cyklu komórkowego	H1.1	21,8	57; 26,6%	Kondensacja łańcuchów nukleosomów w włókna o wyższej strukturze. Regulacja transkrypcji poszczególnych genów poprzez przebudowę chromatyny, odstępy między nukleosomami oraz metylację DNA (Clausell i in., 2009).
	H1.2	21,4	59; 27,8%	Utrzymanie stabilnych struktur wyższego rzędu chromatyny i nukleosomów. Regulacja dynamiki chromatyny oraz poziomu transkrypcji niektórych genów docelowych (Clausell i in., 2009; Gokey i in., 2023). Rekrutacja ligazy ubikwitynowej Cul4A/PAF1. Represja transkrypcji za pośrednictwem p53 (Hergeth & Schneider, 2015).
	H1.3	22,4	67; 27,7%	Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu (Clausell i in., 2009). Hamowanie transkrypcji niekodującego RNA h19 (Hergeth & Schneider, 2015).
	H1.4	21,9	62; 28,4%	Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu. Regulacja szlaków odpowiedzi na stres (Gokey i in., 2023).
	H1.5	22,6	65; 28,9%	Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu. Rekrutacja podstawowych enzymów modyfikujących histony (Behrends & Engmann, 2020).

Niezależne od cyklu komórkowego	H1.6	22,1	40; 19,4%	Tworzenie bardziej rozluźnionej chromatyny wymaganej do prawidłowej regulacji chromosomów podczas mejozy, takiej jak homologiczna rekombinacja (Machida i in., 2016).
	H1.7	28,1	22; 8,6%	Niezbędny dla prawidłowej spermatogenezy i męskiej płodności. Wymagany do prawidłowej restrukturyzacji komórek oraz kondensacji DNA podczas fazy wydłużania spermiogenezy. Bierze udział w przejściu histonowo-protaminowym chromatyny plemników i późniejszej produkcji funkcjonalnych plemników (Tanaka i in., 2006).
	H1.8	35,8	53; 15,3%	Kontrola ekspresji genów podczas oogenezy i wczesnej embriogenezy, prawdopodobnie poprzez zaburzenie struktury chromatyny. Niezbędny do meiotycznego dojrzewania oocytów w stadium pęcherzyka zarodkowego (Choppakatla i in., b.d.).
	H1.9	25,6	23; 10%	Zaangażowanie w przebudowę chromatyny i/lub regulację transkrypcji podczas spermiogenezy, procesu dojrzewania spermatyd do plemników (Clausell i in., 2009; W. Yan i in., 2003).
	H1.10	22,5	47; 19.3%	Kondensacja łańcuchów nukleosomów w włókna o wyższej strukturze. Regulacja transkrypcji poszczególnych genów poprzez przebudowę chromatyny, odstępy między nukleosomami oraz metylację DNA (Ye i in., 2017b). Progresor mitotyczny (Hergeth & Schneider, 2015).

1.3.2 H2A

Histon H2A to jeden z histonów rdzeniowych, który tak jak wszystkie histony, zbudowany jest z 3 domen: N-końcowej, globularnej i C-końcowej. Domena N-końcowa jest bogata w lizyny, dlatego często ulega modyfikacjom potranslacyjnym (T. Higashi i in., 2007). W domenie globularnej H2A występują reszty kwasowe wspólne z innymi histonami, które sprzyjają upakowaniu struktury nukleosom-nukleosom poprzez interakcję domeny N-końcowej z domeną histonu H4. Domena C-końcowa H2A znajduje się blisko histonu H3, co sugeruje możliwość połączenia C-końca H2A z N-końcem H3. W somatycznych komórkach ludzkich zidentyfikowano osiem wariantów H2A: H2A.X, H2A.Z.1, H2A.Z.2.1, H2A.Z.2.2, H2A.Bbd, makroH2A1.1, makroH2A1.2 i makroH2A2 (El Kennani i in., 2017; Talbert & Henikoff, 2010). Warianty te posiadają wspólną konserwatywną domenę globularną, ale różnią się głównie budową domeny C-końcowej (Osakabe & Molaro, 2023). Warianty histonów mogą zastępować kanoniczne białka w nukleosomie, co może wpływać na transkrypcję. Modyfikacje kowalencyjne histonów odgrywają kluczową rolę w molekularnych mechanizmach regulacji epigenetycznej (Deribe i in., 2010). W związku z tym, że domeny N- i C-końcowe histonu H2A wystają poza rdzeń struktury nukleosomu, tam są głównie zlokalizowane PTM. Zróżnicowanie wzorów modyfikacji wynika z różnic w sekwencji aminokwasowej pomiędzy wariantami histonu H2A. W wariantcie makroH2A brakuje części reszt aminokwasowych modyfikowanych w innych wariantach histonu. Wspólne PTM dla wszystkich wariantów H2A obejmują monoubikwitynację lizyny K119 lub jej homologiczne odpowiedniki na domenie C-końcowej (M. Higashi i in., 2010) oraz acetylację lizyn w domenie N-końcowej (Choi i in., 2009; Corujo & Buschbeck, 2018).

1.3.3 H2B

Histon H2B to kolejny histon rdzeniowy, który ulega wymianie w nukleosomie szybciej niż pozostałe histony rdzeniowe. Podobnie jak H2A, H2B zbudowany jest z trzech domen, w tym domeny globularnej, która składa się z trzech helis $\alpha 1$ - $\alpha 3$ oraz dwóch pętli L1-L2 (Mariño-Ramírez i in., 2005). W domenie N-końcowej zidentyfikowano wysoce konserwatywny region składający się z 30-37 reszt aminokwasowych, który odgrywa kluczową rolę w ekspresji genów i naprawie DNA (Mao i in., 2016). W porównaniu do H1 i H2A, H2B nie posiada aż tylu wariantów (Parra i in., 2006). Pierwotnie można było wymienić 4 wersje HB2: H2B.1, H2B.W,

subH2B i H2B.E, ale w 2022 Raman i inni odkryli kolejne warianty histonu: H2B.O, H2B.L i H2B.N, H2B.K (Raman i in., 2021a).

Tabela 2. Miejsca ekspresji wariantów H2B na podstawie Raman i in. 2021a.

Wariant	Miejsce ekspresji
H2B.E	neurony
H2B.W	jądra/plemniki
subH2B	
H2B.O	
H2B.N	jajniki/oocyty
H2B.L	
H2B.K	
H2B.1	jądra/ plemniki, jajniki/oocyty

Autorzy sugerują, że warianty H2B mogą odgrywać kluczową rolę w spermatogenezie i oogenezie. Nowo odkryte podtypy histonów wykazują cechy, które nie były wcześniej obserwowane. H2B.L ma na przykład niższy ładunek w porównaniu do innych histonów i zawiera w domenie N-końcowej powtórzenia poliglutaminowe, co może wpływać na jego funkcjonalność oraz prowadzić do luźniejszego upakowania chromatyny (Raman i in., 2021b).

1.3.4 H3

Histon H3 posiada siedem wariantów, które można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej grupy zaliczają się warianty H3.1 i H3.2, uznawane za histony kanoniczne, których ekspresja jest zależna od replikacji. Druga grupa, niezależna od replikacji, obejmuje wariant H3.3, histon centromerowy A (CENP-A), H3.3C, H3.Y2 i H3.Y1 (Amatori i in., 2021; Kirkiz i in., 2023). Histony grupy pierwszej różnią się między sobą tylko jednym aminokwasem w pozycji 96 - jest to cysteina dla H3.1 i seryna dla H3.2 (Elsaesser i in., 2010). Histon H3.3 może zastępować H3.1 i H3.2 w promotorach aktywnych genów w sposób zależny lub niezależny od replikacji, a także wpływać na aktywację genów i regulację ekspresji. Jest on kodowany przez dwa geny – *H3FA* i *H3FB* – które różnią się w obrębie sekwencji niekodującej (Szenker i in., 2011). CENP-A to specyficzny wariant histonu, odkładany na centromerach. Odgrywa on istotną rolę w stabilności genomu przez udział w składaniu kinetochoru. Ludzki CENP-A ma homologiczną

sekwencję domeny C-końcowej (ponad 50% podobieństwa), natomiast domena N-końcowa jest unikalna w porównaniu do wsp. wariantów histonu H3 (Fukagawa & Earnshaw, 2014). Ekspresja H3.3C zachodzi w kanalikach nasiennych, gdzie wpływa na kolokalizację z euchromatyną i aktywnie transkrybowanymi genami. Wariant H3.Y1 uczestniczy w regulacji odpowiedzi komórkowych na stres oraz w regulacji transkrypcji, podczas gdy funkcja H3.Y2 nie została jeszcze w pełni wyjaśniona (Amatori i in., 2021).

1.3.5 H4

Histon H4, będący białkiem rdzeniowym, zbudowany jest podobnie jak inne białka nukleosomu, pełniąc ważną rolę w regulacji struktury chromatyny. Domeny N-końcowe H4 wystają poza powierzchnię nukleosomu i są wrażliwe na trawienie trypsyną. Usunięcie tych domen nie powoduje znaczących zmian w dynamice DNA, lecz wpływa na zwiększenie odległości między miejscami wejścia i wyjścia DNA. Domeny te tworzą interakcje z dimerem H2A–H2B zarówno wewnątrz, jak i między nukleosomami (Ghoneim i in., 2021). Modyfikacje potranslacyjne H4 pełnią kluczową rolę jako efektory chromatyny, kontrolując procesy takie jak replikacja, transkrypcja DNA, naprawa i regulacja nukleosomów. Zmiany w modyfikacjach histonu H4 w jego domenie N-końcowej mogą prowadzić do zaburzeń rozwojowych oraz przyczyniać się do rozwoju nowotworów (Pang i in., 2020).

Jedynym wariantem histonu H4 występującym u ludzi jest H4G, który został zidentyfikowany w nowotworze piersi. Wariant H4G posiada w 85% podobną sekwencję aminokwasową co kanoniczny H4, a jego gen jest zlokalizowany na chromosomie 6 (Long i in., 2019). Pang i wsp. wykazali, że wariant H4G rozluźnia chromatynę jąderkową i zwiększa transkrypcję rRNA (Pang i in., 2020).

1.4 Modyfikacje potranslacyjne

Rozwój proteomiki opartej na spektrometrii mas i dostępność analizatorów o wysokiej precyzji określania masy przyczyniły się do identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych (PTM). Postępy te umożliwiły mapowanie PTM do określonych reszt aminokwasowych i wykrywanie wariantów występujących w małych ilościach.

Modyfikacje potranslacyjne histonów są kluczowe dla procesów wymagających dostępu do DNA takich jak transkrypcja, replikacja i naprawa. Hipoteza kodu histonowego,

zaproponowana przez Strahla i Allisa, zakłada, że określone PTM lub ich kombinacje mogą regulować procesy komórkowe poprzez zmianę struktury chromatyny (mechanizm cis) lub generowanie miejsc wiązania dla białek efektorowych (mechanizm trans) (Strahl & Allis, 2000). Białka efektorowe posiadają ewolucyjnie konserwatywne domeny zdolne do rozpoznawania specyficznych PTM i inicjowania kaskady dalszych zdarzeń. Kod histonowy obejmuje wszystkie modyfikacje potranslacyjne, które przejściowo lub stabilnie wpływają na białka histonowe (Anderson & Turko, 2015). W tym kontekście możliwe jest rozróżnienie modyfikacji takich jak acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja i cytrulinacja (Andrés i in., 2020).

Tabela 3. Funkcje PTM na podstawie Anderson i Turko, 2015

PTM	Wpływ
Acetylacja	Wzrost ekspresji genów
Metylacja	Regulacja transkrypcji, przebudowa chromatyny, naprawa DNA, przekazywanie sygnału
Ubikwitynacja	Zmiana powinowactwa interakcji histon-histon w obrębie nukleosomu, wskazanie obecności uszkodzeń DNA
Fosforylacja	Regulacja mitozy i dynamiki strukturalnej nukleosomu

1.5 Histony zewnątrzkomórkowe

Pomimo że histony kojarzone są głównie z funkcjami jądrowymi, badania pokazują, że mogą być uwalniane do cytoplazmy i przestrzeni międzykomórkowej. W 2002 roku po raz pierwszy opisano uwolnienie wszystkich histonów z apoptycznej chromatyny z trzech różnych linii komórek nowotworowych (Wu i in., 2002). W kolejnym roku Zeerleder i in. opisali zwiększony poziom nukleosomów w osoczu pacjentów z ciężką postacią sepsy i wstrząsem septycznym (Zeerleder i in., 2003). Te badania pozwoliły Xu i in. wykazać, że zewnątrzkomórkowe histony (HZK) przyczyniają się do dysfunkcji śródbłonna, niewydolności narządów i śmierci zwierząt modelowych. Zidentyfikowali oni zewnątrzkomórkowe H3 i H4 jako główne białka odpowiedzialne za posocznice, donieśli o działaniu ochronnym przeciwciał antyhistonowych i aktywowanego białka C, proteazy serynowej, która rozszczepia histony i zmniejsza ich cytotoksyczność (Richards i in., 2023; Xu i in., 2009). Od tego czasu zewnątrzjądrowe i

zewnątrzkomórkowe histony zostały zaobserwowane w różnych schorzeniach (Richards i in., 2023).

HZK występują w osoczu w postaci białek wolnych od DNA, nukleosomów lub jako element zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilów (ang. *Neutrophil Extracellular Traps*, NET). Po uwolnieniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą działać jako wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (ang. *Danger Associated Molecular Patterns*, DAMP), inicjując lub zaostrzając reakcje zapalne w różnych tkankach. Badania wykazują, że efekty immunostymulujące wywołane przez HZK wolne od DNA znacznie różnią się od tych indukowanych przez histony związane z DNA, obecne w nukleosomach lub NET (Richards i in., 2023). Wykazano, że H3 oddziałuje z pozakomórkowym DNA, wzmacniając aktywację TLR9 (ang. *Toll-like Receptors*), prowadząc do uwolnienia interleukiny prozapalnej przez komórki Kupffera w wątrobach mysich (McRae i in., 2024). HZK mogą indukować wytwarzanie trombiny w ludzkim osoczu w sposób zależny od receptorów TLR2 i TLR4. W związku z tym, że mikroglej również wyraża te receptory, a HZK zidentyfikowano w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), sugeruje się, że histony zewnątrzjądrowe mogą nasilać odpowiedzi prozapalne w OUN poprzez aktywację mikrogleju (McRae i in., 2024).

1.5.1 DAMP

Pierwszą linią obrony organizmu jest odporność wrodzona, która aktywowana jest po wystąpieniu stanów zapalnych wywołanych przez patogeny lub uszkodzenia tkanek. Patogeny są rozpoznawane przez układ odpornościowy jako wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP), natomiast stany zapalne prowadzą do uwolnienia wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniami (Richards i in., 2023). DAMP to endogenne cząsteczki, które w warunkach homeostazy znajdują się wewnątrz komórki. Do uwolnienia DAMP może dojść na skutek wielu czynników takich jak:

1. Fizyczne: urazy, promieniowanie,
2. Chemiczne: toksyny, osmolalność,
3. Metaboliczne: niedokrwienie, reperfuzja.

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej DAMP są rozpoznawane przez inne komórki poprzez interakcję z receptorami rozpoznającymi wzorce (PRR), które zwiększają mechanizmy

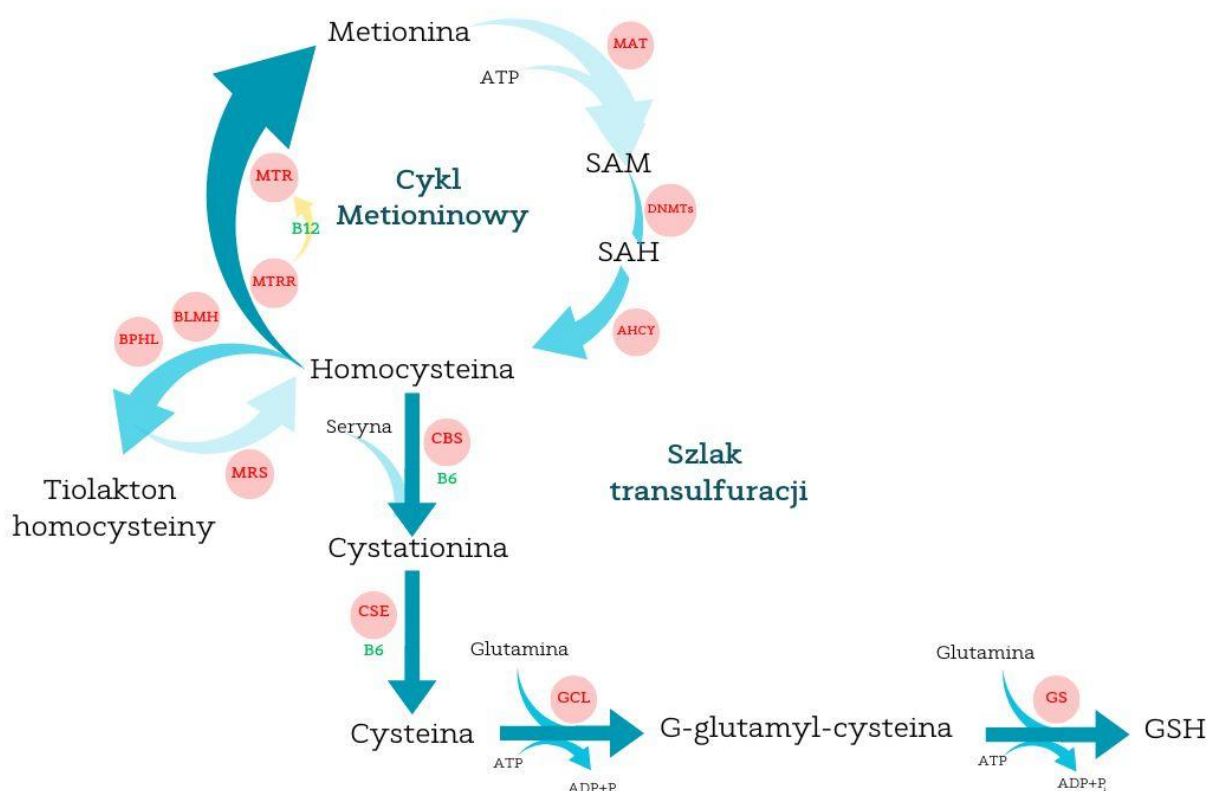
odpowiedzi na stres (Murao i in., 2021). Aktywacja PRR na komórkach odpornościowych indukuje kaskadę cząsteczek prozapalnych, w tym cytokin i chemokin, powodując rekrutację innych komórek odpornościowych, co prowadzi do indukcji odpowiedzi zapalnej. Jednymi z PRR są receptory TLR2 i TLR4, które zostały powiązane z licznymi chorobami zapalnymi. W toku badań zauważono, że histony mogą wiązać się bezpośrednio z anionowymi cząsteczkami błony komórkowej, takimi jak fosfolipidy, kwasy tejchojowe, kardiolipiny i polisacharydy (Richards i in., 2023).

Stan zapalny jest niezbędnym procesem fizjologicznym, służącym do eliminacji patogenów, usuwania uszkodzonych komórek i naprawy tkanek. Jednakże przewlekły stan zapalny prowadzi do nadmiernego wydzielania DAMP, co prowadzi do patologicznych stanów związanych z zapaleniem. Zwiększone poziomy DAMP wykazano w wielu chorobach sercowo-naczyniowych, metabolicznych, reumatycznych, nowotworowych i neurodegeneracyjnych (Murao i in., 2021; Richards i in., 2023). Wg badań McRae i in., TLR 2 i TLR4 pośredniczą w indukowanym przez histon H1, wydzielaniu NO przez mikroglej (McRae i in., 2024). Gilthorpe i in. wykazali, że tylko histony łącznikowe wykazują działanie cytotoksyczne na neurony i zwiększają reaktywność komórek mikrogleju (Gilthorpe i in., 2013). Receptor TLR4 pośredniczy w zwiększeniu cytotoksycznego działania histonu H1 na ludzkie komórki neuronalne (McRae i in., 2024). Yeung i in. udowodnili, że efekty wywoływane przez HZK są mediowane przez TLR2 w sposób niezależny od TLR4. W pierwotnych erytrocytach ludzkich HZK podnosiły poziom wewnątrzkomórkowych ROS, wapnia i aktywność kaspazy-3, prowadząc do śmierci komórek. Dodanie przeciwciał przeciwko TLR2 częściowo łagodziło cytotoksyczne działanie histonów (Yeung i in., 2019).

1.6 Homocysteina

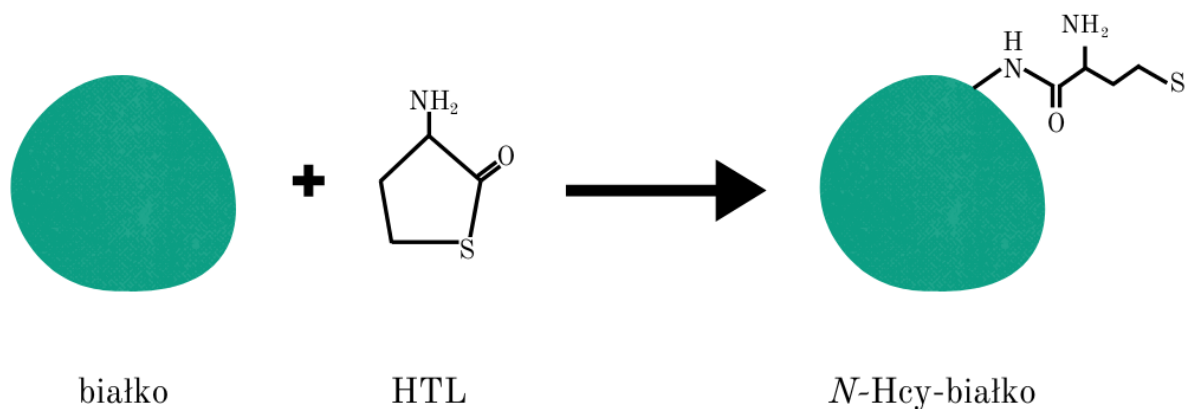
Homocysteina (Hcy) to aminokwas siarkowy powstający na drodze transmetylacji z metioniny (Met) (Y. Yan i in., 2020). W warunkach homeostazy około 50% homocysteiny jest remetylowane do metioniny, co pozwala utrzymać odpowiedni poziom Hcy w organizmie. Istnieje kilka szlaków remetylacji Hcy do Met (Rycina 1), z których jeden zależy od witamin z grupy B i kwasu foliowego, a drugi, niezależny od metabolizmu jednowęglowego, wykorzystuje betainę jako dawcę grupy metylowej (Škovierová i in., 2016). Betaina powstaje z choliny w reakcji katalizowanej przez S-metylotransferazę betaina-homocysteina (BHMT). Regulacja i ekspresja BHMT odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu poziomu Hcy w osoczu,

co może mieć znaczący wpływ na objawy kliniczne. Transsulfuracja to szlak przekształcania Hcy w cysteinę (Cys), który rozpoczyna się od reakcji kondensacji między Hcy a seryną (Ser), katalizowanej przez syntazę β -cystationiny (CBS) i prowadzącą do powstania cystationiny. Cystationina jest hydrolizowana przez liazę γ -cystationiny (CSE), tworząc Cys i α -ketomaślan. Oba enzymy szlaku transsulfuracji są zależne od witaminy B6. Prawidłowe funkcjonowanie tych enzymów jest niezbędne do skutecznego przekształcania Hcy w Cys oraz utrzymania optymalnego poziomu aminokwasów zawierających siarkę (Škovierová i in., 2016).



Rycina 1. Metabolizm homocysteiny; ATP – adenosynotrójfosforan, ADP – adenosynodwufosforan, SAM – S-adenozylometionina, SAH – S-adenozylhomocysteina, MAT – adenosylotransferaza metioniny, DNMTs – DNA-metylotransferazy, AHCY – adenosylhomocysteinaza, MTR – syntaza metioninowa, MTRR – reduktaza syntazy metioninowej, BLMH – hydrolaza bleomycyny, BPHL – hydrolaza amidów beta-laktamowych, MRS – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa, CBS – syntaza β -cystationiny, CSE – γ -liaza cystationinowa, GCL – ligaza γ -glutamylcysteinowa, GS – syntetaza glutaminowa, GSH – glutation.

W normalnych warunkach, stężenie totalnej homocysteiny (tHcy) w ludzkim organizmie wynosi między 5 μM a 15 μM . tHcy powyżej 15 μM prowadzi do stanu patologicznego zwanego hiperhomocysteinemią (HHcy) (Perła-Kaján i in., 2007), która przyczynia się do dysfunkcji i śmierci komórek spowodowanej zwiększoną liczbą uszkodzeń DNA oraz wadliwą odpowiedzią na powstałe uszkodzenia (DDR) (Y. Yan i in., 2020). HHcy wpływa na podstawowe procesy metaboliczne zmieniając proteom, który obejmuje metabolizm aminokwasów, białek i lipidów. Jednym z proponowanych mechanizmów toksyczności Hcy jest modyfikacja białek przez metabolit Hcy, tiolakton homocysteiny (HTL), który jest produktem reakcji syntetazy metionilo-tRNA (MRS). Hcy jest strukturalnie podobna do metioniny, przez co MRS błędnie aktywuje Hcy, tworząc adenylan homocysteiny. Łańcuch boczny tiolowy reaguje z aktywowaną grupą karboksylową Hcy, tworząc HTL. Badania wykazały, że HTL modyfikuje reszty lizyny w białkach w procesie *N*-homocysteinylacji, prowadząc do ich niewłaściwego fałdowania, agregacji i dysfunkcji (Rycina 2). Może to mieć duży wpływ na funkcjonowanie komórek i przyczyniać się do rozwoju wielu chorób, w tym chorób układu krążenia, neurodegeneracyjnych czy dysfunkcji nerek (Perła-Kaján i in., 2007).



Rycina 2. *N*-homocysteinylacja białek.

1.7 Choroby sercowo-naczyniowe

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) są główną przyczyną zgonów na całym świecie, odpowiadając rocznie za około 17,9 miliona zgonów, z czego cztery na pięć przypadków wynika z zawału serca lub udaru mózgu. CVD obejmują choroby serca i naczyń krwionośnych, takie jak choroba niedokrwienna serca, choroby naczyń mózgowych, reumatyczne choroby serca oraz inne schorzenia (*Cardiovascular Diseases*, b.d.). Czynniki ryzyka obejmują niezdrowy tryb życia, starzenie się oraz genetyczne predyspozycje. Chociaż objawy różnych chorób sercowo-naczyniowych mogą się różnić, to podstawowe mechanizmy, takie jak zaburzenia w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i zdolność mitochondriów do dostarczania tlenu, są często wspólne. W ostatnich latach wykazano, że modyfikacje epigenetyczne są zaangażowane w patofizjologię CVD i wpływają na regulację szlaków sygnałowych, metabolizmu oraz innych procesów biologicznych (Cheng i in., 2023).

Jednym z głównych mechanizmów nieprawidłowej regulacji w chorobach sercowo-naczyniowych są zmiany potranslacyjne białek, w tym histonów. Zaburzenia te mogą obejmować m.in. nieprawidłową metylację, acetylację czy fosforylację białek, co prowadzi do zaburzeń funkcji komórkowych, takich jak skurcze mięśni gładkich w naczyniach krwionośnych czy regulacja czynności serca. Kinaza białkowa II zależna od Ca^{2+} /kalmoduliny (CaMKII) fosforyluje kanały jonowe serca na konserwatywnych resztach seryny/treoniny, wpływając na ruchliwość kardiomiocytów. U pacjentów z niewydolnością serca zaburzenia fosforylacji prowadzą do zmian ciśnienia rozkurczowego i zaburzeń pracy serca (Cheng i in., 2023).

1.8 Choroby neurodegeneracyjne

Choroby neurodegeneracyjne (ND) są jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności i zgonów na świecie, obejmującą postępującą degenerację neuronów, co prowadzi do zaburzeń funkcji układu nerwowego. Chociaż przyczyny większości chorób neurodegeneracyjnych nie zostały jeszcze dokładnie poznane, badania genetyczne wskazują, że czynniki środowiskowe, takie jak toksyny, niedobory żywieniowe oraz predyspozycje genetyczne mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju tych schorzeń. Wśród czynników ryzyka chorób neurodegeneracyjnych zidentyfikowano podwyższony poziom homocysteiny, co sugeruje istotną rolę w patogenezie tych chorób.

1.8.1 Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD) jest jedną z najbardziej kosztownych i obciążających chorób współczesnego świata. Na całym świecie żyje około 50 milionów osób dotkniętych AD lub innymi formami demencji, a przewiduje się, że liczba ta podwoi się do 2050 roku (Scheltens i in., 2021).

AD charakteryzuje się postępującym, nieustępliwym, neurodegeneracyjnym zaburzeniem wpływającym na obszary kory mózgowej i hipokampu. Początkowo zmiany są wykrywalne w płacie czołowym i skroniowym, a następnie rozprzestrzeniają się na inne obszary mózgu. W chorobie Alzheimera dochodzi do nagromadzenia się nierozpuszczalnych form amyloidu β ($A\beta$) w płytkach w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i ścianach naczyń krwionośnych oraz agregacji białka tau w neuronach. $A\beta$ powstaje w wyniku proteolitycznego rozszczepienia białka prekursorowego amyloidu (APP) przez złożoną rodzinę enzymów (γ -sekreazy i β -sekreazy), które obejmują presenilinę 1 (PS1; kodowana przez *PSEN1*) i PS2 (kodowana przez *PSEN2*) (Masters i in., 2015).

Najczęstszym typem AD jest sporadyczna choroba Alzheimera, która najczęściej występuje u osób w wieku około 80 lat. W tej grupie patologia choroby wynika przede wszystkim z upośledzonego usuwania $A\beta$ z mózgu, co prowadzi do nagromadzenia toksycznych złogów. W tak podeszłym wieku, często występują choroby współistniejące takie jak choroba naczyniowo-mózgowa czy stwardnienie hipokampalne, które komplikują diagnozę i leczenie AD. W mniej niż 1% przypadków, AD przybiera formę dziedziczną, związaną z mutacjami w genach *APP*, *PSEN1* i *PSEN2*, co prowadzi do nadprodukcji $A\beta$. Obie formy choroby mają podobny przebieg kliniczny i biomarkery (Masters i in., 2015).

1.8.1.1 Model ApoE KO

Apolipoproteina E (ApoE) jest składnikiem lipoprotein obecnych w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w mięszu mózgu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Polimorfizm genu ApoE jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju późnej postaci choroby Alzheimera. U ludzi występują trzy izoformy ApoE: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ oraz $\epsilon 4$, a różnice w ich strukturze wpływają na zdolność do wiązania lipidów, receptorów i amyloidu- β ($A\beta$), który odkłada się w blaszkach amyloidowych w mózgu. Badania na ludziach i zwierzętach

jednoznacznie wskazują, że poszczególne izoformy ApoE różnicowo regulują neurozapalenie, hiperfosforylację białka tau, agregację oraz klirens A β . ApoE odgrywa kluczową rolę w homeostazie lipidów, pośrednicząc w transporcie lipidów między różnymi typami komórek, a także pełni istotną funkcję w rozwoju, utrzymaniu homeostazy i naprawie OUN oraz regulacji szlaków sygnałowych.

Zaburzenia w ekspresji ApoE zostały powiązane z patogenezą choroby Alzheimera (AD), m.in. poprzez zakłócenie integralności bariery krew–mózg (BBB). Oprócz AD, nieprawidłowa ekspresja ApoE jest również związana z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych, miażdżycy i hiperlipidemii (Husain i in., 2021).

Myszy homozygotyczne pod względem mutacji *ApoE*^{tm1Unc} wykazują wyraźny wzrost całkowitego poziomu cholesterolu w osoczu, na który nie ma wpływu ani wiek, ani płeć. Smugi tłuszczowe w proksymalnej aorcie występują już od trzeciego miesiąca życia i zwiększają się wraz z wiekiem, przechodząc w zmiany ze zmniejszoną ilością lipidów i bardziej wydłużonymi komórkami, co jest typowe dla bardziej zaawansowanego stadium zmian przedmiazdżycowych (Piedrahita i in., 1992). Myszy z knock-outem genu *ApoE* (ApoE KO) wykazują normalny poziom homocysteiny, nieprzekraczający 10 μ mol/l. Jednakże, u myszy na diecie bogatej w homocysteinę obserwuje się znaczący wzrost stężenia Hcy, co prowadzi do rozwoju hiperhomocysteinemii (Wilson i in., 2007).

Myszy ApoE KO charakteryzuje przewlekły stan zapalny, który prowadzi do uwolnienia DAMP. W miażdżycy wykazano wzrost HMGB1 (ang. *High Mobility Group Protein B1*), który został powiązany z progresją choroby (O. Krogmann i in., 2020). Badania na myszach ApoE KO na diecie zachodniej wykazały aż 6-krotny wzrost HMGB1, w porównaniu do kontroli (Zhu i in., 2022).

1.8.2 Stwardnienie zanikowe boczne

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) to śmiertelna choroba neurodegeneracyjna charakteryzująca się selektywną utratą zarówno górnych, jak i dolnych neuronów ruchowych (Bennett i in., 2019a). Jean-Martin Charcot, w XIX wieku, powiązał specyficzne wzorce uszkodzeń istoty białej i szarej rdzenia kręgowego z osłabieniem i zanikiem mięśni (Kok i in., 2021). W zależności od rodzaju neuronów dotkniętych chorobą, można wyróżnić dwa typy początkowych objawów klinicznych:

1. Kończynowe – osłabienie mięśni szkieletowych,
2. Opuszkowe – zaburzenia mowy.

Śmierć w wyniku choroby następuje po około 3 latach od momentu wystąpienia objawów. W większości przypadków pacjenci z ALS nie mają rodzinnej historii choroby i są klasyfikowani jako przypadki sporadycznego ALS (sALS), gdzie około 5% przypadków jest dziedzicznych (fALS) i związanych z mutacjami w genach SOD1, C9orf72, FUS oraz TDP-43 (Kok i in., 2021). Głównymi genami powiązаныmi z ALS są SOD1, C9orf72, FUS i TDP-43. W obu typach choroby, w większości przypadków, zauważono obecność agregatów białka TDP-43 w neuronach.

Badania sugerują, że nie tylko neurony, ale również komórki glejowe z mutacją SOD1 mogą przyczyniać się do degeneracji neuronów ruchowych (Bennett i in., 2019a). W fALS zidentyfikowano kilka mechanizmów prowadzących do degeneracji neuronów, w tym cytotoksyczność, stres oksydacyjny, agregację białek, autofagię, zaburzenia metabolizmu RNA oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA. Badania nad odpowiedzią DDR (ang. *DNA Damage Response*) wskazują, że uszkodzenia DNA oraz zaburzenia w tym szlaku mogą odgrywać kluczową rolę w patologii ALS. Co ciekawe, toksyczny fenotyp obserwowany w astrocytach, oligodendrocytach i mikrogleju pacjentów z ALS przyczynia się do degeneracji zdrowych neuronów ruchowych, zarówno przez bezpośredni kontakt, jak i wydzielane czynniki (Kok i in., 2021).

1.8.2.1 Model SOD1

Najczęściej stosowanym modelem do badania ALS jest transgeniczny model myszy SOD1^{G93A}, które wykazują ekspresję zmutowanej ludzkiej dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1), w której glicyna w pozycji 93 jest wymieniona na alaninę (SOD1^{G93A}). Myszy te rozwijają objawy ALS we wczesnym okresie życia (90-110 dni) i wykazują szybki spadek funkcji motorycznych, a ich przeżycie wynosi zazwyczaj 130-150 dni. Myszy transgeniczne SOD1^{G93A} rozwijają objawy takie jak postępująca gliozą, utrata neuronów ruchowych i wykazują szybki spadek masy ciała (Kreilaus i in., 2020).

Analiza osocza myszy SOD1^{G93A} wykazała zmniejszone poziomy części aminokwasów, między innymi cysteiny (Cys) i metioniny (Met), w porównaniu do myszy WT. Metionina jest istotnym elementem metabolizmu jednowęglowego, a obniżone poziomy Met i Cys mogą

świadczyć o nieprawidłowościach w szklaku metioninowym skutkujące obniżonym poziomem homocysteiny (Bame i in., 2014).

Ekspresja ludzkiej zmutowanej dysmutazy ponadtlenkowej 1 u myszy $SOD1^{G93A}$ jest pod kontrolą cistronowego ludzkiego promotora $SOD1$. Mutacje w genie $SOD1$ zostały powiązane z rodzinnym stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS lub choroba Lou Gehriga). U myszy rozwija się paraliż jednej lub więcej kończyn w ciągu kilku tygodni życia, a silne osłabienie mięśni można zaobserwować już w wieku 15 tygodni. W wieku 18-20 tygodni myszy wykazują wzrost stresu oksydacyjnego, a także zwiększone neurozapalenie (Barra i in., 1980; Tu i in., 1996). W rdzeniu kręgowym myszy $SOD1^{G93A}$ wykazano zwiększony poziom HMGB1, co sugeruje uwalnianie DAMP w następstwie progresji ALS. W badaniach wykazano, że neutralizacja HMGB1 za pomocą przeciwciał czasowo poprawiła chwyt tylnych kończyn, ale leczenie nie wpłynęło na funkcje motoryczne i przeżycie myszy. HMGB1 w minimalnym stopniu wpływa na neurozapalenie i postęp choroby (J. D. Lee i in., 2019).

1.9 Histony zewnątrzkomórkowe w stanach patologicznych

Wszystkie typy histonów mogą przenikać przez błony komórek nabłonka, wiążąc się z fosfolipidami, niezależnie od procesu endocytozy. Nabłonek bariery krew-mózg jest znacznie mniej przepuszczalny niż nabłonek obwodowy dzięki obecności ścisłych połączeń typu *tight junctions*. Histony mogą przenikać z surowicy do mózgu poprzez transcytozę, uszkodzenie połączeń międzykomórkowych lub migrację wspomaganą przez neutrofile. W przejściu histonów do centralnego układu nerwowego mogą pomagać inne wzorce molekularne związane z uszkodzeniami, takie jak peptydy $A\beta$ oraz białko HMGB1. W chorobie Alzheimera, peryferyjne peptydy $A\beta$ przechodzą przez BBB i dostają się do parenchymy mózgu. H1 może bezpośrednio wiązać się z tymi peptydami i razem z nimi przekraczać BBB. Innym możliwym sposobem na przedostanie się histonów do mózgu jest tworzenie kompleksów z DAMP uwalnianych z komórek nekrotycznych (Richards i in., 2023).

Pacjenci cierpiący na choroby Alzheimera i Parkinsona wykazują wysoki poziom histonów w surowicy (Bolton i in., 1999). Histony obecne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą niszczyć komórki glejowe, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania neuronów (Gilthorpe i in., 2013). Udowodniono, że histon H1 posiada działanie neuroimmunomodulacyjne, co oznacza, że aktywuje astrocyty, prowadząc do zwiększonej

reaktywności tych komórek. Coraz więcej dowodów sugeruje, że neurony i komórki glejowe mogą uwalniać histony do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, choć proces ten nie jest jeszcze w pełni zrozumiany (Richards i in., 2023).

Histon H1 jest obecny w cytozolu neuronów i astrocytów, szczególnie w obrębie płytek amyloidowych w tkance mózgowej mysiego modelu choroby Alzheimera. Obecność histonów w cytozolu może być pierwszym etapem dalszego uwolnienia do przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub wskazywać na transport do błony komórkowej. W innych badaniach stwierdzono, że histon H1 może wchodzić w interakcje z peptydem amyloidu β , co prowadzi do zmiany konformacji obu białek w kierunku większej zawartości struktur β . To z kolei powoduje tworzenie grubych agregatów amyloidowych, większych niż te, które tworzą się bez udziału histonu H1, sugerując, że histon ten wspomaga fałdowanie monomerów A β 1-42 i promuje asocjację fibryli amyloidowych (Roque i in., 2012).

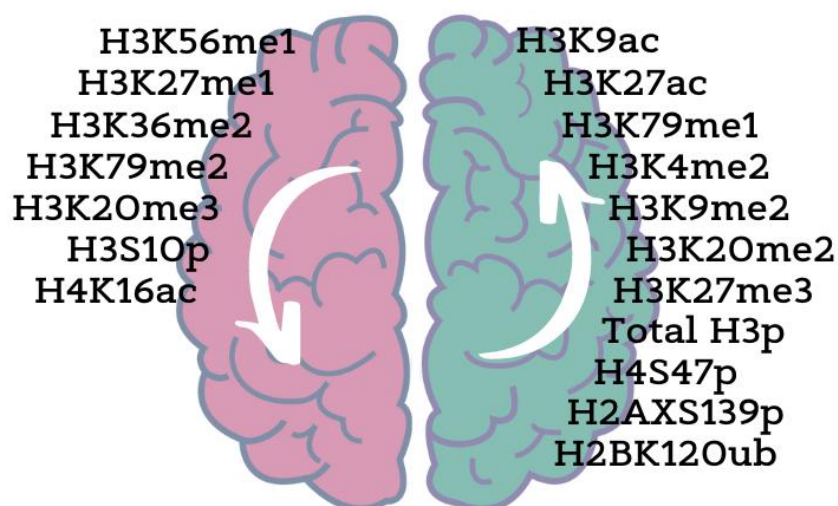
Wszystkie histony łącznikowe i rdzeniowe są wykrywalne w płynie mózgowo-rdzeniowym ludzi zdrowych, a zmiany w ich poziomie mogą być związane ze stanami chorobowymi. Shah i in. wykazali, że histon H4 jest uwalniany z serc szczurów podczas niedokrwienia i reperfuzji. W badaniach *in vitro* wykazali, że histony były toksyczne dla pierwotnych kardiomiocytów, poprzez mechanizm zależny od sygnalizacji TLR4 i NF- κ B. Selekttywne zmniejszanie poziomu histonu H4 za pomocą cyklicznego peptydu HIPe powodowało zmniejszenie rozległości zawału serca *in vivo* (Shah i in., 2022). Podwyższony poziom zewnątrzkomórkowych histonów u pacjentów z chorobami neurologicznymi sugeruje, że histony mogą stanowić potencjalne biomarkery diagnostyczne oraz być użyteczne w monitorowaniu progresji tych chorób (Richards i in., 2023).

1.10 PTM w stanach patologicznych

W analizach markerów epigenetycznych związanych z różnymi chorobami zidentyfikowano liczne zmiany w modyfikacjach potranslacyjnych histonów. Badania prowadzone na pacjentach z chorobą Alzheimera wykazały, że wzory modyfikacji potranslacyjnych w tej chorobie różni się od tych występujących w procesie starzenia. Wykazano, że u osób dotkniętych AD doszło do zwiększenia poziomu acetylacji lizyny 9 i 27 na histonie H3 oraz spadku poziomu H3K122ac w płacie skroniowym (Santana i in., 2023). Zmiany w acetylacji powiązано ze zwiększeniem ekspresji i transkrypcją genów *CREBBP*, *EP300* i *TRRAP* kodujących

acetylotransferazę HAT, która jest odpowiedzialna za acetylację lizyny 9 i 27 (Santana i in., 2023).

Metylacja, obok acetylacji, jest jedną z kluczowych modyfikacji regulujących mechanizmy transkrypcji, stabilność genomu i szereg procesów chorobowych związanych z nowotworami oraz chorobami neurodegeneracyjnymi (Persico i in., 2022; Santana i in., 2023). W korze przedczołowej pacjentów z AD wykazano wzrost poziomu H3K4me3, H3K9me2 i białek HMT katalizujących te modyfikację. Zmiany te były związane z upośledzeniem pamięci i funkcji synaptycznych oraz hiperfosforylacją białka tau (Nativio i in., 2020). W danych literaturowych można znaleźć informację także o wzroście poziomu H3K4me2, H3K27me3, H3K79me1 oraz spadkiem H3K79me2, H3K36me2, H3K27me1 i H3K56me1 (Santana i in., 2023).



Rycina 3. Zmiany PTM zidentyfikowane w ludzkim mózgu osób z chorobą Alzheimera (Santana i in., 2023).

W badaniach na mózgach AD wykazano obecność fosforylowanego H1.2. Wiąże się on ze strukturami amyloidowymi utworzonymi z amyloidu A β 1-42 i α -synukleiny, charakterystycznymi dla chorób Alzheimera i Parkinsona. H1 został zidentyfikowany w rozproszonych i zagregowanych płytkach β -amyloidu (Saha & Dalal, 2021). Wykazano, że za pomocą detergentów można zmienić konformację CTD histonu łącznikowego w strukturę β , zdolną do tworzenia włókien przypominających wstążki, co sugeruje, że histony H1 mogą tworzyć włókna amyloidopodobne (Duce i in., 2006; Roque i in., 2012). Liczba zmian we wzorze metylacji w chorobie Alzheimera może świadczyć o ich istotnym udziale w rozwoju choroby (Nativio i in., 2020; Persico i in., 2022).

W badaniach pośmiertnych kręgosłupa osób ALS wykryto globalne zmiany w metylacji i hydroksymetylacji, co skutkowało zmianami w ekspresji genów zaangażowanych w reakcje immunologiczne i zapalne. W badaniach nad ALS i otępieniem czołowo-skroniowym (FTD-ALS) zidentyfikowano zwiększoną metylację H3K4me3 oraz H3K27me3, które mają znaczenie dla funkcji neurologicznych (Bennett i in., 2019b). Analiza mysiego modelu ALS wykazała, że stres oksydacyjny wywołuje uszkodzenia neuronów ruchowych poprzez szlak deacetylazy histonowej LSD1, która demetyluje H3K4me2. Regulacja poziomu LSD1 jest uznawana za potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu ALS (Choi i in., 2009). W innych badaniach stwierdzono wzrost poziomów H3K9me3, H3K27me3 i H4K20me3 wokół sekwencji powtórzeń dipeptydowych *DRE* w tkance mózgowej osób z ALS. W drożdżowym modelu nadekspresji genu *FUS* został wykazany obniżony poziom fosforylacji H3S10, który w normalnych warunkach wspiera acetylację H3K14. Pokazuje to, że jedna zmiana we wzorze modyfikacji potranslacyjnych może globalnie wpłynąć na procesy chorobowe. W tym samym modelu zaobserwowano obniżenie poziomu H3K14ac i H3K56ac, które biorą udział w odpowiedzi na uszkodzenie DNA (Bennett i in., 2019a).

Pomimo rosnącej wiedzy na temat modyfikacji epigenetycznych w ALS, mechanizmy, poprzez które potranslacyjne modyfikacje histonów wpływają na rozwój choroby, nie są jeszcze w pełni poznane. Jednakże niektóre profile epigenetyczne można zidentyfikować we krwi, co może prowadzić do ich wykorzystania jako biomarkerów diagnostycznych lub prognostycznych (Bennett i in., 2019b). Cobos i Torrente sugerują, że leki ukierunkowane na mechanizmy epigenetyczne mogą poprawić rokowania u pacjentów z ALS, jednak potrzebne są dalsze badania w tym zakresie. Wskazują enzymy ATM, ATR i DNA-PKcs jako potencjalne miejsca terapeutyczne, skutkujące regulacją fosforylacji H2AX, oraz kinazę Aurora B jako cel terapeutyczny dla regulacji fosforylacji H3S10 (Cobos & Torrente, 2022).

1.11 Osie organ-organ

Zdrowy ludzki organizm funkcjonuje w sposób zintegrowany, a termin "osie organów" odnosi się do komunikacji pomiędzy różnymi organami za pomocą mechanizmów komórkowych, hormonalnych oraz molekularnych (Armutcu, 2019). Skuteczna komunikacja między organami jest kluczowa dla utrzymania homeostazy organizmu, jednak w stanach patologicznych zaburzenia w jednym organie mogą wpływać na funkcjonowanie innych. Wiele stanów patofizjologicznych, takich jak otyłość, cukrzyca typu 2 czy niealkoholowe stłuszczenie

wątroby (NAFLD), charakteryzuje się utratą koordynacji między organami, co przyczynia się do progresji chorób (Armutcu, 2019).

Jedną z najważniejszych osi komunikacyjnych w organizmie człowieka jest oś mózg-wątroba-jelito, która obejmuje interakcje między układem nerwowym, wątrobą oraz przewodem pokarmowym (M. Yan i in., 2023). W tej osi komunikacja obejmuje szlaki endokrynne, metaboliczne, immunologiczne oraz humoralne. Mózg kontroluje aktywność komórek odpornościowych w jelitach i wątrobie, co wpływa na funkcje poznawcze oraz zdrowie psychiczne poprzez modulację mikrobiomu oraz odpowiedzi immunologicznej (Teratani i in., 2020).

Istotnym elementem osi mózg-wątroba-jelita są znaczniki epigenetyczne. Metylacja odgrywa kluczową rolę w rozwoju, imprintingu, kontroli transkrypcji, strukturze chromatyny oraz ogólnej stabilności genomu. W stanie przedrzucawkowym dochodzi do zmian w metylacji DNA genów kontrolujących rozwój mózgu oraz wątroby płodu, co sugeruje istnienie silnych powiązań między tymi narządami. Ponadto produkowany w wątrobie β -hydroksymaślan, po dotarciu do mózgu, działa jako inhibitor deacetylaz histonów, co wpływa na zwiększenie ekspresji czynnika neurotroficznego, wykorzystywanego w leczeniu zaburzeń psychicznych (M. Yan i in., 2023).

Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu osi zostały powiązane z kilkoma chorobami między innymi z chorobą Alzheimera. Przypuszcza się, że u pacjentów z AD, niezrównoważone wytwarzanie i usuwanie $A\beta$ odgrywa istotną rolę w rozwoju choroby. Wątroba jest kluczowym organem odpowiedzialnym za obwodowy metabolizm amyloidu- β , a zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do jego nadmiernego odkładania się białka w mózgu. Stan prozapalny towarzyszący chorobom wątroby może dodatkowo pogarszać usuwanie $A\beta$ i przyczyniać się do progresji choroby (M. Yan i in., 2023).

Mikrobiom jelitowy znajdujący się w przewodzie pokarmowym bierze udział w trawieniu i przekształcaniu pokarmu w składniki odżywcze potrzebne organizmowi do prawidłowego funkcjonowania. Mikrobiota wpływa na regulację układu nerwowego poprzez oś mózg-wątroba-jelito. Badania prowadzone na zwierzęcym modelu ALS wykazały, że zaburzenia mikrobiomu prowadzą do dysfunkcji bariery jelitowej, endotoksemii oraz systemowego stanu

zapalnego, co przyspiesza degenerację neuronów. Regulacja mikrobiomu może zmniejszać stan zapalny i spowalniać postęp chorób neurodegeneracyjnych (Hong i in., 2023).

Innym przykładem osi organ-organ jest oś wątroba-śledziona, którą po raz pierwszy opisano w 2013 roku (Tarantino, 2013). Śledziona ogrywa istotną rolę w modulacji układu odpornościowego, różnicowaniu i aktywacji komórek T i B, oraz produkcji przeciwciał. Makrofagi śledziony są zdolne do usuwania bakterii z krwi, co chroni przed ogólnoustrojowym zakażeniem. Widomo, że niektóre funkcje są wspólne dla wątroby i śledziony jak np. funkcja siateczkowo-śródbłonkowa (Keramida i in., 2018). Badania nad NAFLD wykazały, że w chorobie dochodzi do zwiększonego wychwytu glukozy przez śledzionę, przy jednoczesnym powiększeniu się organu, bez zauważalnej marskości. Autorzy postulują, że aktywność metaboliczna wątroby i śledziony jest powiązana, gdyż oba te organy są wrażliwe na insulinę (Keramida i in., 2018).

2. Cel pracy

Wzajemne oddziaływanie czynników ryzyka przyczynia się do powstawania i progresji wielu chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych oraz sercowo-naczyniowych. Wiadomo, że zmieniona ekspresja i akumulacja histonów pozakomórkowych, zwłaszcza histonów łącznikowych, jest cytotoksyczna i prowadzi do śmierci komórek, co potencjalnie przyczynia się do rozwoju chorób. Podwyższony poziom homocysteiny w organizmie został powiązany z wieloma chorobami takimi jak choroba Alzheimera, krążenia, udar czy depresja. Według aktualnej wiedzy, brak jest badań łączących oba te czynniki.

Hipoteza niniejszej pracy zakłada, że w stanach patologicznych związanych z podwyższonym poziomem homocysteiny dochodzi do wzrostu poziomu histonów zewnątrzjądrowych i/lub zewnątrzkomórkowych, głównie H1. Zakłada się, że istnieje korelacja pomiędzy poziomami zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiną, a ich interakcje mogą wpływać na progresję stanów patologicznych i/lub być ich markerami.

Główne założenia pracy zostały zweryfikowane na:

1. Liniach komórkowych ludzkiego śródbłónka (HUVEC) oraz mysiej neuroblastomy (N2A APP, K670N/M671L),
2. Mysim modelu choroby sercowo-naczyniowej/choroby Alzheimera B6.129P2-Apoe^{tm1Unc} (ApoE KO),
3. Mysim modelu stwardnienia zanikowego bocznego B6SJL. SOD1-G93A (SOD1),
4. Materiale od pacjentów kardiologicznych z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.

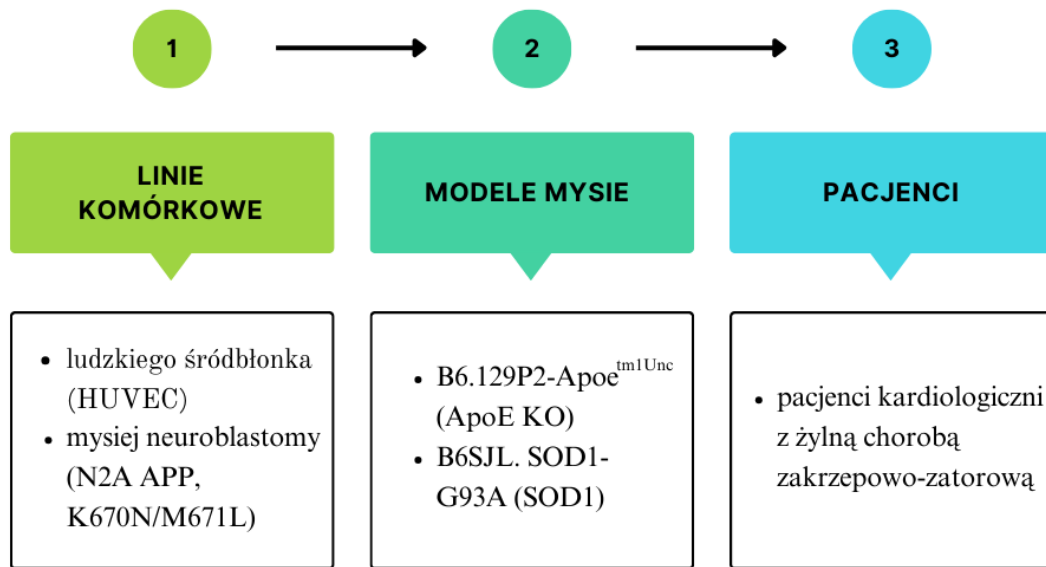
Szczegółowe cele pracy obejmują:

1. Zbadanie wpływu homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny na poziom histonów zewnątrzjądrowych i zewnątrzkomórkowych w liniach komórkowych ludzkiego śródbłónka,
2. Analizę wpływu histonów zewnątrzkomórkowych na stężenie homocysteiny i histonu zewnątrzjądrowego w liniach komórkowych ludzkiego śródbłónka,
3. Ocenę poziomów histonów zewnątrzkomórkowych w osoczu i zewnątrzjądrowych w mózgu, wątrobie i śledzionie w mysich modelach ApoE KO i SOD1,
4. Pomiar stężenia homocysteiny w osoczu, mózgu, wątrobie i śledzionie w mysich modelach ApoE KO i SOD1,
5. Analizę poziomu homocysteiny i modyfikacji potranslacyjnych w histonach w liniach

komórkowych mysiej neuroblastomy poddanych działaniu homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny,

6. Określenie poziomów histonów zewnątrzkomórkowych w osoczu pacjentów z żylną chorobą zatorowo-zakrzepową,
7. Analizę korelacji między histonami zewnątrzjądrowymi i zewnątrzkomórkowymi, a poziomem homocysteiny.

3. Materiały i metody



Rycina 4. Schemat badań.

3.1 Odczynniki

Większość odczynników wykorzystywanych w przeprowadzonych eksperymentach została zakupiona od firm Sigma-Aldrich oraz Thermo Fisher Scientific.

W badaniach zostały użyte przeciwciała:

- I-rzędowe: anty-GAPDH (5174, Cell Signaling), anty- β -aktyna (ab179467, Abcam), anty-H1 (SAB4501366, Sigma Aldrich), anty-H3 (ab1791, Abcam), anty-H3K9me2 (STJ11103432, St John's Laboratory), anty-transferyna (AB82411, Abcam),
- II-rzędowe: anty-królicze IgG (7074, Cell Signaling), anty-mysie IgG (A4416, Sigma Aldrich).

3.2 Materiał myszy

Myszy z wyłączonym genem *ApoE^{tm1Unc}*, transgeniczne B6SJL SOD-1 G93A Tg (SOD1) wyrażające zmutowaną formę ludzkiej dysmutazy ponadtlenkowej 1 i kontrolne C57BL/6 i B6SJL (WT) (Rycina 4), były hodowane w Zwierzętni Centrum Zaawansowanych Technologii UAM w Poznaniu.

Zwierzęta bytowały w grupach do 5 osobników w klatkach z indywidualnym wentylowaniem – 54 wymian powietrza/godzinę, wyposażonych w filtry Hepa, na regale IVC, w warunkach sterylnych. W klatkach znajdowała się odpylona ściółka osikowa, materiał gniazdowy oraz wzbogacenia (klocki drewniane, rurki). Zwierzęta miały stały dostęp do wody pitnej oraz paszy bytowej. Warunki w boksie doświadczalnym były optymalne dla dobrostanu zwierząt, tj. temperatura $22\pm1^{\circ}\text{C}$, względna wilgotność powietrza 55-60%, oświetlenie sztuczne regulowane automatycznie w cyklu 12 h światła/12 h ciemności, wymiana powietrza w pomieszczeniu 15-20 razy na godzinę. Charakterystykę myszy wykorzystanych w badaniach przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka myszy.

	Płeć	Liczba osobników	Wiek, miesiące	Średnia waga, g
ApoE KO	Samce	8	9	33,4
WT - C57BL/6		6	9	32,8
SOD1		5	3	brak danych
WT – B6SJL		8	3	brak danych

3.2.1 Pobranie materiału do badań

Krew oraz organy pobrano po uśmierceniu myszy ApoE KO, SOD1 oraz kontroli do obu modeli, poprzez eutanazyjną dyslokację kręgów szyjnych. Krew pobrano do probówek z EDTA, którego końcowe stężenie wynosiło 5 mM, a następnie odwirowano, aby uzyskać osocze. Organy po zamrożeniu w ciekłym azocie, przechowywano do dalszych analiz w temperaturze -80°C .

3.3 Materiał ludzki

50 próbek osocza pobranych od pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową otrzymaliśmy z Katedry Chemii Środowiskowej Uniwersytetu Łódzkiego. Wraz z próbkami uzyskano dane takie jak: wiek, płeć, poziom homocysteiny, cysteiny, cysteino-glicyny oraz glutationu. Materiał został podzielony ze względu na poziom Hcy, na dwie grupy:

1. Hcy < 11 $\mu\text{mol/l}$
2. Hcy > 18 $\mu\text{mol/l}$

3.4 Hodowle komórkowe

Analizy były prowadzone na liniach komórkowych ludzkiego śródbłónka (HUVEC) oraz liniach komórkowej mysiej neuroblasmy (komórkowy model choroby Alzheimera) z mutacją szwedzką N2a-APP (K670N/M671L) (N2A AD). Hodowle komórek HUVEC prowadzono w butelkach do kultur komórkowych T75 w pożywce Vascular Cell Basal Medium (PCS-100-030, ATCC) z dodatkiem 1x endogennych aminokwasów oraz 1x antybiotyku (penicylina/streptomycyna). Kultury komórkowe przechowywano w inkubatorze w temperaturze 37°C z dodatkiem 5% CO₂. Komórki N2A AD hodowano w butelkach do kultur komórkowych T75 w pożywce Gibco™ DMEM/F-12, GlutaMAX™ (10565018, Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem 10% FBS, 1x endogennych aminokwasów oraz 1x antybiotyku (penicylina/streptomycyna).

3.4.1 Metody pracy z hodowlami komórkowymi

3.4.1.1 Traktowanie komórek

Po osiągnięciu 70-80% konfluencji, komórki były poddane stresowi w pożywce DMEM bez metioniny (21013024, Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem dializowanego FBS, endogennych aminokwasów, leucyny oraz czynników stresowych: DL-homocysteiny i L-tiolaktonu homocysteiny w stężeniach 0,2-2 mM oraz histonu i histonu modyfikowanego HTL (N-Hcy-histon) o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Tak przygotowane hodowle były inkubowane przez 24 h w 37°C, z dodatkiem 5% CO₂. Następnie pobrano medium i zebrano komórki metodą trypsynizacji. Pobrane materiały przechowywano w temperaturze -20°C.

3.4.1.2 Przygotowanie komórek do analizy immunocytochemicznej

Komórki hodowano na szklanych płytkach 6-dołkowych (CC302, Sigma Aldrich). Po osiągnięciu konfluencji 60-70% były poddane 24h traktowaniu następującymi czynnikami: Hcy 2 mM, HTL 2 mM, histon 100 µg/ml, *N*-Hcy-histon 100 µg/ml (3.5.9). Następnie dołki z komórkami były przepłukiwane PBS i inkubowane z 4% paraformaldehydem w PBS przez 15 minut w celu utrwalenia komórek. Aby umożliwić wniknięcie przeciwciała do wnętrza komórek, wykonano permeabilizację 0,1% Tritonem X-100 w PBS przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem była inkubacja komórek w 0,1% BSA przez 60 minut, a następnie inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym w temperaturze 4°C przez noc. Następnego dnia komórki przemywano PBS i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym przez 60 minut. Po upływie godziny przeciwciało zlewano, a do komórek dodawano DAPI. Po 10 minutowej inkubacji DAPI było zlewane, a komórki przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Sygnały fluorescencji monitorowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 880 z filtrem 488 nm dla Alexa Fluor® 555 (H1) i filtrem 420-480 nm dla DAPI. Do obrazowania użyto obiektywu kontrastowego różnicowo-interferencyjnego Zeiss Plan-Apochromat X40/1.2 Oil. Analizy obrazów dokonano przy użyciu oprogramowania ImageJ Fiji 2.9.0.

3.4.1.3 Analiza hodowli komórkowych licznikiem komórek

Do 10 µl hodowli komórkowej dodano 10 µl barwnika Trypan Blue (T10282, Thermo Fisher), a następnie 10 µl tej mieszaniny nałożono na szkiełko komory do liczenia komórek (Countess 3, Thermo Fisher). Analiza obejmowała: liczbę żywych i martwych komórek, liczbę agregatów komórkowych oraz średnią wielkość żywych i martwych komórek.

3.4.2 Izolacja białek

3.4.2.1 Frakcja cytoplazmatyczna

Komórki zawieszono w 100 µl buforu do ekstrakcji (37513, Active Motif) z dodatkiem inhibitorów proteaz (P8340, Sigma-Adrich) i fosfataz (PHOSstop, Roche), a następnie homogenizowano mikrohomogenizatorem ręcznym z polipropylenu. Uzyskany homogenat przeniesiono do nowej probówki typu eppendorf 1,5 ml i inkubowano przez 30 minut na rotatorze w 4°C, w celu mechanicznej lizy komórek. Następnie próbki odwirowywano przy 10

000 g przez 15 minut w temperaturze 4°C. Supernatant, zawierający białka cytoplazmatyczne, przenoszono do nowych probówek, a osad poddawano dalszym reakcjom w celu ekstrakcji histonów jądrowych.

3.4.2.2 Frakcja jądrowa

Osad powstały po wirowaniu, opisany w podpunkcie 3.4.2.1, zawieszono w 200 µl 0,2 M H₂SO₄ i inkubowano w temperaturze 4°C przez 60 minut lub przez noc. Po tym czasie próbki były odwirowywane przy 16 000 g przez 10 minut w 4°C. Supernatant przenoszono do nowej probówki o pojemności 1,5 ml, do której dodawano kwas TCA (T6399, Sigma-Aldrich) o końcowym stężeniu 33%. Proces precypitacji białek przeprowadzano w temperaturze 4°C przez noc. Próbki ponownie odwirowywano przy 16 000 g przez 10 minut w temperaturze 4°C, supernatant odrzucano, a osad przemywano trzykrotnie acetonem słodzonym w -20°C. Próbki suszono przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a następnie zawieszano w 50 µl ddH₂O.

3.5 Izolacja białek z organów myszy

Fragmenty organów zawieszono w pięciokrotnej objętości buforu do ekstrakcji (37513, Active Motif) z dodatkiem inhibitorów proteaz (P8340, Sigma-Adrich) i fosfataz (PHOSstop, Roche). Izolacja białek cytoplazmatycznych przebiegała w sposób analogiczny jak opisano w podpunkcie 3.4.2.1.

3.5.1 Oznaczanie stężenia białek metodą taninową

Do 75 µl roztworu białka dodawano równą objętość odczynnika taninowego (Tabela 5) i inkubowano w 30°C przez 10 minut. Następnie dodawano 150 µl 0,1% roztworu gumy arabskiej. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm na spektrofotometrze płytkowym. Stężenie białka oznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej utworzonej dla BSA lub histonu z grasicy bydlęcej (A9418, H9250, Sigma-Aldrich) o stężeniach 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039, 0,019, 0,001 mg/ml. (Mejbaum-Katzenellenbogen, 1955).

Tabela 5. Odczynnik taninowy.

HCL 1M	98 ml
Fenol	2 ml
Tanina	10 g

3.5.2 Oznaczanie stężenia białek metodą Bradford

Do 160 μ l roztworu białka dodawano 40 μ l odczynnika Bradford (B6916, Sigma-Aldrich). Po 10 minutowej inkubacji zmierzono absorbancję na spektrofotometrze płytkowym przy długości fali 595 nm. Stężenie białka oznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej utworzonej dla BSA (A9418, Sigma-Aldrich) o stężeniach 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 oraz 1,25 μ g/ml.

3.5.3 Oznaczanie stężenia białek próbą ninhydrynową

Do 1 μ l roztworu zhydrolizowanego białka (hydroliza opisana w podpunkcie 3.7.5.2) dodawano 100 μ l odczynnika ninhydrynowego (Tabela 6). Reakcję przeprowadzano na płytce 96-dołkowej w łaźni wodnej przez 10 minut. Absorbancję mierzono przy długości fali 575 nm. Równocześnie wykonywano krzywą kalibracyjną, zawierającą od 1-10 μ g zhydrolizowanego BSA (A9418, Sigma-Aldrich). Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm.

Tabela 6. Bufory reakcyjne do próby ninhydrynowej.

Bufor octanu sodu 4 N (pH 5,5)		Roztwór chlorku cyny SnCl_2	
Trójwodny octan sodu	272,16 g	Glikol etylowy	500 μ l
Kwas octowy	100 ml	Chlorek cyny	50 mg
Woda	500 ml		

Odczynnik ninhydrynowy	
Ninhydrina	200 mg
Glikol etylowy	7,5 ml
Bufor octanu sodu	2,5 ml
SnCl_2	250 μ l

3.5.4 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym - SDS-PAGE

Białka rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym o wymiarach 8,6 x 6,8 x 0,75 mm (Tabela 7) w warunkach denaturujących (Laemmli 1970), z użyciem zestawu Mini-PROTEAN Tetra Cell (1658004EDU, Bio Rad).

Tabela 7. Składnik żeli.

	Rozdzielający 12%	Zagęszczający 4%
Akrylamid:Bisakrylamid 29:1, 40%	4,8 ml	1 ml
H ₂ O	6,9 ml	6,3 ml
Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 M	4 ml	–
Tris-HCl, pH 6,8; 0,5 M	–	2,5 ml
SDS 10%	160 µl	100 µl
TEMED	16 µl	10 µl
APS	160 µl	100 µl

Do roztworów białka (1-10 µg) o objętości 8 µl dodawano bufor do próbek w stosunku 4:1, a następnie inkubowano je w temperaturze 100°C przed 5 minut. Próbki białek rozdzielano równolegle ze wzorcem mas cząsteczkowych DualColorPrecision Plus Protein™ Dual Color Standards (1610374, Bio-Rad). Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy (Tabela 8) przy stałym napięciu 80 V, 120 V, 140 V i 160 V.

Tabela 8. Bufory używane do elektroforezy SDS-PAGE.

Bufor do próbek 5x		Bufor do elektroforezy 10x	
Tris-HCl, pH 6,8	25 mM	Tris	30 g
SDS	10%	Glicyna	144 g
błękit bromofenolowy	0,25%	SDS	10 g
glicerol	50%		
2-merkaptoetanol	5%		

Po zakończeniu elektroforezy, białka z żelu poddawano transferowi na membranę (3.5.5) lub barwiono roztworem CBB (Tabela 9) przez ok 5 min. Po tym czasie barwnik zlewano, a żel odbarwiano przez 90 minut lub przez noc.

Tabela 9. Bufory do barwienia żeli.

Bufory do barwienia żeli. CBB		Roztwór odbarwiający	
Comassie Brilliant Blue R250	0,25% (w/v)	Metanol	40% (v/v)
Metanol	40% (v/v)	Kwas octowy	10% (v/v)
Kwas octowy	10% (v/v)	H ₂ O	50% (v/v)
H ₂ O	50% (v/v)		

3.5.5 Western blotting

Białka z żelu były poddawane transferowi na membranę PVDF za pomocą urządzenia Western Blotting Transfer System (Bio-Rad). W szufladach transblottera umieszczano kolejno: bibułę Whatman 3 MM uprzednio namoczoną w buforze anodowym, membranę aktywowaną metanolem, a następnie buforem anodowym, żel namoczony w buforze katodowym i bibułę Whatman 3 MM namoczoną w buforze katodowym (Tabela 10). Transfer prowadzono przez 7 minut przy natężeniu prądu 120 mA i napięciu 25 V, po czym membranę inkubowano przez 60 minut w 3% roztworze BSA rozpuszczonym w TBST. Membrany, po płukaniu, inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym rozcieńczonym w TBST. Po inkubacji membrany płukano w TBST, a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi przez 60 minut (Tabela 10). Analizę membran przeprowadzano za pomocą detekcji fluorescencyjnej w urządzeniu Gene Genome XRQ (Syngene) z użyciem oprogramowania GeneSys (Syngene). Membrany były inkubowane z odczynnikiem Clarity Western ECL Substrate (1705061, Bio-Rad). Reakcja była prowadzona do momentu pojawienia się intensywnych prążków, których natężenie analizowano w programie GeneTools (Syngene).

Tabela 10. Skład buforów do Western Blottingu.

Tris/CAPS 5x		Bufor anodowy	
Tris	36,64 g	Tris/CAPS 5x	20 ml
CAPS	44,26 g	metanol	15 ml
Woda	1 L	Woda	65 ml

Laemli buffer 10x		Bufor katodowy	
Tris	30 g	Tris/CAPS 5x	20 ml
Glicyna	144 g	SDS 10%	1 ml
SDS	10 g	Woda	79 ml
Woda	1 L		

TBS 10x		TBST 1x	
Tris	24 g	TBS 10x	100 ml
NaCl	88 g	Tween 20	1 ml
Woda	1 L	Woda	900 ml

3.5.6 Dot blotting

Na membrany nitrocelulozowe naniesiono 2-6 μ l próbek i pozostawiono je do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez około 10 minut. Następnie membrany blokowano w 3% roztworze BSA przez 60 minut, po czym płukano je trzykrotnie przez 5 minut w TBS. Membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc. Następnie membrany płukano trzykrotnie po 15 minut w TBS, po czym inkubowano je z przeciwciałem drugorzędowym przez 60 minut. Tak przygotowane membrany inkubowano z odczynnikiem Clarity Western ECL Substrate (1705061, Bio-Rad), a ich analiza odbywała się w urządzeniu Gene Gnome XRQ (Syngene) za pomocą oprogramowania GeneSys (Syngene). Reakcję prowadzono do uzyskania plamek o zadowalającej intensywności, a ich natężenie analizowano w programie GeneTools (Syngene). Bufory wykorzystane w tej metodzie opisano w podrozdziale 3.5.5.

3.5.7 Oznaczanie stężenia całkowitej homocysteiny

Poziom tHcy uwolnionej wskutek redukcji wiązań disiarczkowych był analizowany za pomocą chromatografii cieczowej HPLC. Frakcja tHcy obejmuje wolną zredukowaną Hcy i *S*-związaną Hcy. Stężenie tHcy było analizowane w organach i osoczu modeli mysich, osoczu pacjentów oraz frakcjach cytoplazmatycznych i medium hodowli komórkowych.

3.5.7.1 Metoda 1

Do 2 μ l roztworu dodawano 2 μ l 0,5 M K_2HPO_4 z 50 mM DTT i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 3 μ l 3 N HCl i inkubowano przez 30 minut w 100°C. Po tym czasie próbki otwierano, a próbki suszono w 100°C przez 10 minut. Osad zawieszano w 100 μ l H_2O . Do analizy przygotowywano próbki standardu DL-Hcy (H4628, Sigma-Aldrich) o stężeniach 20, 10, 5 i 2,5 μ M.

Tabela 11. Bufory reakcyjne.

Roztwór stężony OPA		OPA	
Aldehyd ftalowy	0,1 g	NaOH 1M	5 ml
Metanol	7,5 ml	OPA	1 ml
Woda	7,5 ml	Woda	14 ml

System HPLC (Infinity 1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) składał się z degazera próżniowego czterokanałowego HiP, pompy gradientowej 4-tłokowej, automatycznego podajnika próbek, termostatu kolumny, detektora diodowego oraz detektora fluorescencyjnego. Próbkę o objętości 5 μ l była wstrzykiwana na kolumnę PolySULFOETHYL A (PolyLC) o wymiarach 35x21 mm, wielkości ziaren 5 μ M i porowatości 300Å. Eluowano ją izokratycznie przy użyciu 10 mM buforu fosforanowego o pH 6,6, zawierającego 25 mM NaCl, przy przepływie 0,36 ml/min. Do detekcji stosowano roztwór 2,5 mM OPA w 0,25 M NaOH, przy przepływie 0,18 ml/min. Fluorescencyjna pochodna tworzona w celi reakcyjnej (o średnicy 0,3 mm i długości 3 m) była wykrywana przy wzbudzeniu światem o długości fali 370 nm i emisji przy 480 nm. Czas rozdziału wynosił 210 sekund. Stężenie tHcy oznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej zależności stężenia standardu DL-Hcy od intensywności sygnału.

3.5.7.2 Metoda 2

Roztwory białek rozcieńczony 4-krotnie buforem fosforanowym (Tabela 12) z dodatkiem 0,2 M EDTA i 5 mM DTT (ED, D9760, Sigma-Aldrich) nakładano na filtry Amicon® Ultra Centrifugal Filter (10 kDa, UFC5010, Sigma-Aldrich). Próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 30 minut przy 10 000 g w 4°C.

Tabela 12. Bufor fosforanowy 100 mM pH 7,4.

KH ₂ PO ₄ 100mM	9,5 ml
K ₂ HPO ₄ 100mM	40,5 ml

30 µl przesączu zawierającego wolną homocysteinę przenoszono do nowych probówek Eppendorf o pojemności 1,5 ml, dodawano 2 µl 250 mM DTT i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po tym czasie próbki mieszało się z 5 µl 6 N HCl i inkubowano przez kolejne 30 minut w 100°C. Próbkę suszono próżniowo (CentriVap Benchtop Vacuum Concentrators, Labconco), a powstały osad ponownie zawieszano w 30 µl ddH₂O. Równocześnie konwertowano standardy DL-homocysteiny (H4628, Sigma-Aldrich) o stężeniach 10, 5, 2,5 i 1,25 µM. Pomiar stężenia powstałego po konwersji HTL odbywała się zgodnie z opisem w podrozdziale 3.7.5.1. Stężenie próbek docelowych analizowano na podstawie krzywej kalibracyjnej zależności stężenia standardu od wysokości pików.

3.5.8 Pomiar poziomu przeciwciał anty-H1 metodą ELISA

Płytkę 96-dołkową opłaszczono 100 µl antygenu o stężeniu 10 µg/ml i inkubowano przez 90 min w 37 °C z lekkim wytrząsaniem. Antygenem był preparat histonu bydlęcego (H5505, Sigma Aldrich), który jak wykazano na żelu SDS-PAGE (Rycina 6), którego 89% stanowi histon H1. Z tego względu, przeciwciała rozpoznające ten antygen, w dalszej części pracy nazwano przeciwciałami anty-H1 IgG. Następnie płytkę płukano buforem płuczającym i inkubowano z 2% BSA przez 90 minut w 37°C z wytrząsaniem. Po ponownym przepłukaniu, do każdego dołka nałożono 100 µl osocza rozcieńczonego 2,5-krotnie w buforze rozcieńczającym (Tabela 13) i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji płytkę przepłukiwano buforem płuczającym i inkubowano z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym przez 60 minut w 37°C. Dla próbek osocza ludzi użyto przeciwciała anty-królicze IgG (7074, Cell Signaling), który, według informacji producenta, wykazuje także

specyficzność do ludzkich białek, natomiast do analizy próbek mysich wykorzystano przeciwciało drugorzędowe anti-mysie IgG (A4416, Sigma Aldrich). Po tym czasie płytkę dokładnie przepłukiwano, a do każdego dołka dodawano 50 μ l TMB i inkubowano w temperaturze pokojowej przez około 30 minut. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 M H_2SO_4 i mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm.

Tabela 13. Bufory do ELISA.

Bufor opłaszczający		Bufor płuczący	
Na_2CO_3 0,2 mM	32 ml	10x PBS	50 ml
$NaHCO_3$ 0,2 mM	68 ml	H_2O	450 ml
H_2O	100 ml	Tween 20%	0,25 ml
Bufor rozcieńczający		Bufor blokujący – 2% BSA	
10x PBS	10 ml	BSA	1 g
BSA	0,25 g	1x PBS	50 ml
H_2O	90 ml	Tween 20%	0,025 ml
Tween 20%	0,05 ml		

3.5.9 Modyfikacja histonu tiolaktonem homocysteiny

W celu *N*-homocysteinytacji histonu, preparat tego białka (H5505, Sigma Aldrich) o stężeniu 1,5-2,5 mg/ml inkubowano w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,5 z 0,1 mM EDTA i 1% SDS (L3771, Sigma-Aldrich) z HTL o stężeniu końcowym 50-100 mM w obecności NaOH o końcowym stężeniu równym stężeniu HTL. Próbkę inkubowano w 55°C przez noc. Białko precypitowano schłodzonym acetonem w -20°C przez co najmniej 60 minut. Próbkę odwirowywano w 4°C przy 20 000 g przez 15 minut. Powstały osad przemywano trzykrotnie acetonem schłodzonym w -20°C. Białko suszono w temperaturze pokojowej przez około 20 minut. Osad zawieszano w początkowej objętości próbki i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz. W celu sprawdzenia poziomu modyfikacji mierzono stężenie białka (*N*-Hcy-histon) (3.5.9) oraz wolnych grup tiolowych (3.5.12). Tak przygotowane próbki *N*-Hcy-histonu były poddane analizie LC-MS/MS oraz użyte do traktowania hodowli komórkowych.

3.5.10 Derywatyzacja histonów bezwodnikiem propionowym

Roztwór 5 μ l histonów (H5505, Sigma Aldrich) o stężeniu 1 μ g/ μ l zmieszano z 5 μ l 100 mM wodorowęglanu amonu o pH 8, a następnie dodano 2 μ l 25% wodorotlenku amonu. Tak przygotowaną próbkę połączono z 20 μ l odczynnika propionowego (Tabela 14). Po kilku sekundach zmierzono pH za pomocą pasków wskaźnikowych. Jeśli pH mieszaniny było mniejsze niż 8, dodawano kroplami 25% wodorotlenek amonu, aż do osiągnięcia pH 8. Aby przyspieszyć reakcję derywatyzacji, próbki inkubowano w temperaturze 51°C przez około 20 minut, a następnie suszono próżniowo. Po wysuszeniu całą procedurę powtarzano dwukrotnie. Po trzech pełnych cyklach derywatyzacji, próbki zawieszano w 5 μ l 25% wodorowęglanu amonu i przechowywano w -80°C do dalszych analiz (Garcia i in., 2007).

Tabela 14. Bufor do derywatyzacji

Odczynnik propionowy	
Bezwodnik propionowy	75 μ l
D0-metanol 99% (151939, Sigma Aldrich)	25 μ l

3.5.11 Spektrometria mas

Wykrycie modyfikacji potranslacyjnych zostało zlecone do wykonania przez laboratorium zewnętrzne w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Analizę białek przeprowadzono przy użyciu spektrometru mas UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Niemcy), sterowanego przez oprogramowanie Compass for Flex (Flex Control, Flex Analysis, Bruker Daltonics). Do przygotowania próbek, 0,6 μ l roztworu matrycowego MALDI kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego w ACN z 0,1% kwasem trifluorooctowym zostało wymieszane w proporcji 1:1 z próbkami i nałożone na płytkę docelową AnchorChip. Przeprowadzono kalibrację zewnętrzną, korzystając z mieszaniny Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics). Masy monoizotopowe peptydów przypisano i wykorzystano do przeszukiwania baz danych. Dodatkowo, pięć najbardziej intensywnych pików z każdej próbki wybrano do fragmentacji w trybie LIFT. Dane uzyskane z analizy przetworzono za pomocą wyszukiwarki Mascot (Matrix Science, Londyn, Wielka Brytania). Parametry wyszukiwań

obejmowały identyfikację białek i miejsc modyfikacji: *N*-homocysteinyłacji, metylacji, acetylacji Lys oraz demetylacji metioniny (Perła-Kaján i in., 2021).

3.5.12 Pomiar wolnych grup tiolowych metodą Elmana

Pomiar wolnych grup tiolowych oparto na reakcji kolorymetrycznej, w której 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesan) (DTNB) reaguje z grupami sulfhydryłowymi, tworząc mieszaninę dwusiarczkową i chromogeny kwas 5-nitro-2-tiobenzoesowy (TNB). Reakcję prowadzono na płytkach 96-dołkowych. Do każdego dołka naniesiono 90 μ l próbki uzyskanej w podpunkcie 3.5.9 dodano 10 μ l 20 mM odczynnika Ellmana (D8130, Sigma-Aldrich). Płytkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym mierzono absorbancję przy długości fali 415 nm. Stężenie grup tiolowych obliczano na podstawie współczynnika ekstynkcji przy długości fali 415 nm równego $13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

3.6 Statystyczna analiza danych

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13 (StatSoft) i R studio. Normalność rozkładów została oceniona przy użyciu statystyki Shapiro-Wilka, a wyniki zostały przedstawione jako średnie $\pm$ SD. Różnice pomiędzy grupami zostały obliczone za pomocą testu T studenta. Określenie związku liniowego pomiędzy zmiennymi wykonano analizą korelacji Pearsona. Analiza związku pomiędzy wieloma zmiennymi została wykonana testem regresji wielorakiej.

4. Wyniki

Histony są jednymi z podstawowych białek warunkujących prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Mimo, że odkryto je stosunkowo dawno, ich funkcja nie jest w pełni poznana. Dzięki rozwojowi epigenetyki zauważono, że ich modyfikacje potranslacyjne mogą wpływać na regulację stanów chorobowych. Rola histonów zewnątrzkomórkowych jest słabiej poznana niż ich jądrowych odpowiedników (Richards i in., 2023; Żukowska & Perła-Kaján, 2024). Wiadomo jednak, że są one elementem komórkowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz składnikiem odpowiedzi immunologicznych. Chociaż histony są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, to podwyższenie stężenia histonów zewnątrzkomórkowych może działać toksycznie (Richards i in., 2023).

Zaburzenia jednostek jednowęglowych, prowadzące do upośledzenia remetylacji homocysteiny do metioniny, są związane z rozwojem patologicznego stanu określanego jako hiperhomocysteinemia (HHcy). Wykazano, że HHcy prowadzi m.in. do modyfikacji białek oraz uszkodzeń DNA, co może skutkować uwolnieniem cząsteczek DAMP, w tym histonów. Podwyższony poziom Hcy oraz histonów może przyczyniać się do nasilenia progresji chorób (Y. Yan i in., 2020).

Hipoteza niniejszej pracy zakłada, że w stanach patologicznych związanych z podwyższonym poziomem homocysteiny dochodzi do wzrostu poziomu histonów zewnątrzjądrowych i/lub zewnątrzkomórkowych, głównie H1 oraz, że istnieje korelacja pomiędzy poziomami zewnątrzjądrowych histonów i homocysteiny. Ich interakcje mogą wpływać na progresję stanów patologicznych i/lub być ich markerami.

W celu zweryfikowania hipotez pracy przeprowadzono analizy z wykorzystaniem modeli *in vitro*, *in vivo* i materiału pochodzącego od pacjentów kardiologicznych (Rycina 5).



Rycina 5. Graficzne przedstawianie wykorzystanych modeli badawczych.

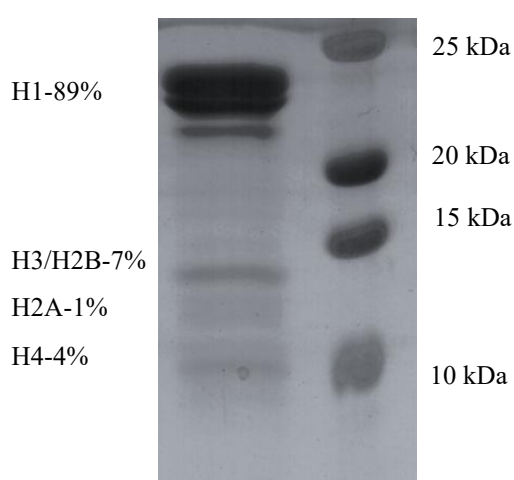
4.1 Model komórkowy

W celu stwierdzenia, czy podwyższone stężenie homocysteiny i jej metabolitów powoduje zwiększenie poziomu histonów zewnątrzjądrowych, przeprowadzono analizy z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkiego śródbłónka (HUVEC).

4.1.1 Czynniki stresowe i *N*-homocysteinyłacja histonu

Komórki były traktowane różnymi stężeniami Hcy, HTL, histonu oraz histonu zmodyfikowanego tiolaktonem homocysteiny. *N*-homocysteinyłowany histon (*N*-Hcy-histon) był przygotowywany według procedury opisanej w podpunkcie 3.5.9.

Skuteczność metody *N*-homocysteinyłacji została sprawdzona za pomocą analizy LC-MS/MS (3.5.11), a stopień modyfikacji białka określono metodą Ellmana (3.5.12). Rozdział elektroforetyczny (Rycina 6) i analiza spektrometrem (Tabela 15) wykazała, że histon bydlęcy składa się głównie z histonu łącznikowego.



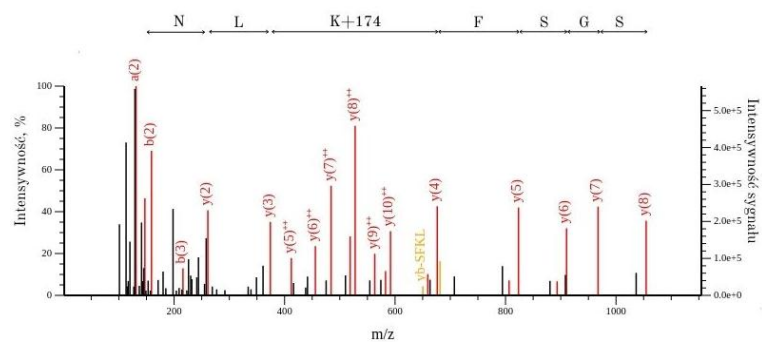
Rycina 6. Obraz elektroforetyczny histonu bydlęcego (H5505, Sigma Aldrich). Procentowy udział poszczególnych histonów.

Tabela 15. Histony zidentyfikowane w natywnym histonie bydlęcym (H5505, Sigma Aldrich).

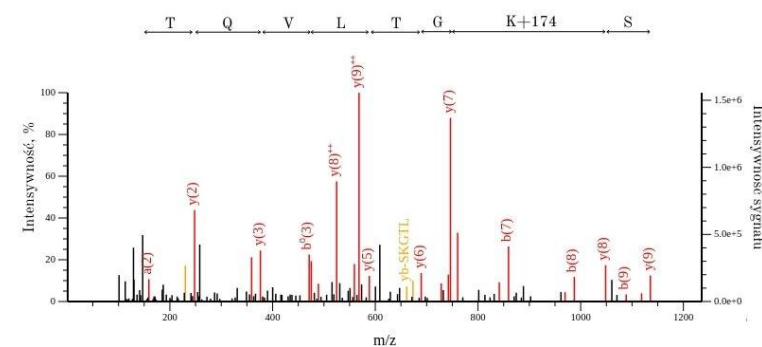
Histon	Pokrycie sekwencji, %	Score
H1.2	56	25344
H1.3	43	23287
H1.1	46	13294
H2B	26	343
H1.0	6	188
H2A	18	94

Zidentyfikowano trzy warianty histonu H1 (Rycina 7), dla których pokrycie sekwencji wynosiło 44-55%, w tym 15-20 reszt lizyny. Analizowano białko natywne i modyfikowane 50 mM HTL. Wykazano, że *N*-homocysteinyłacji uległo 82% reszt lizyny histonu H1.1, 85% – H1.1 oraz 86% – H1.3.

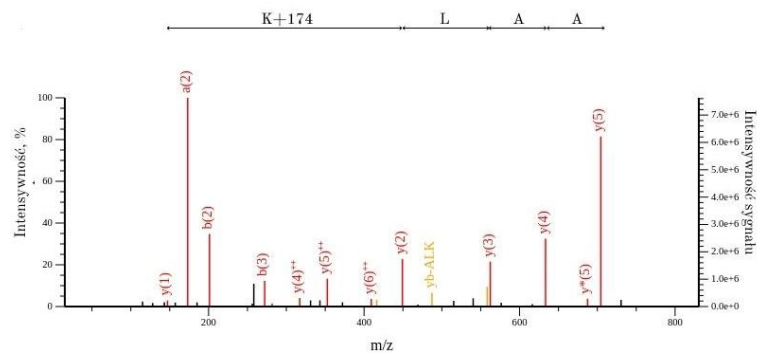
A



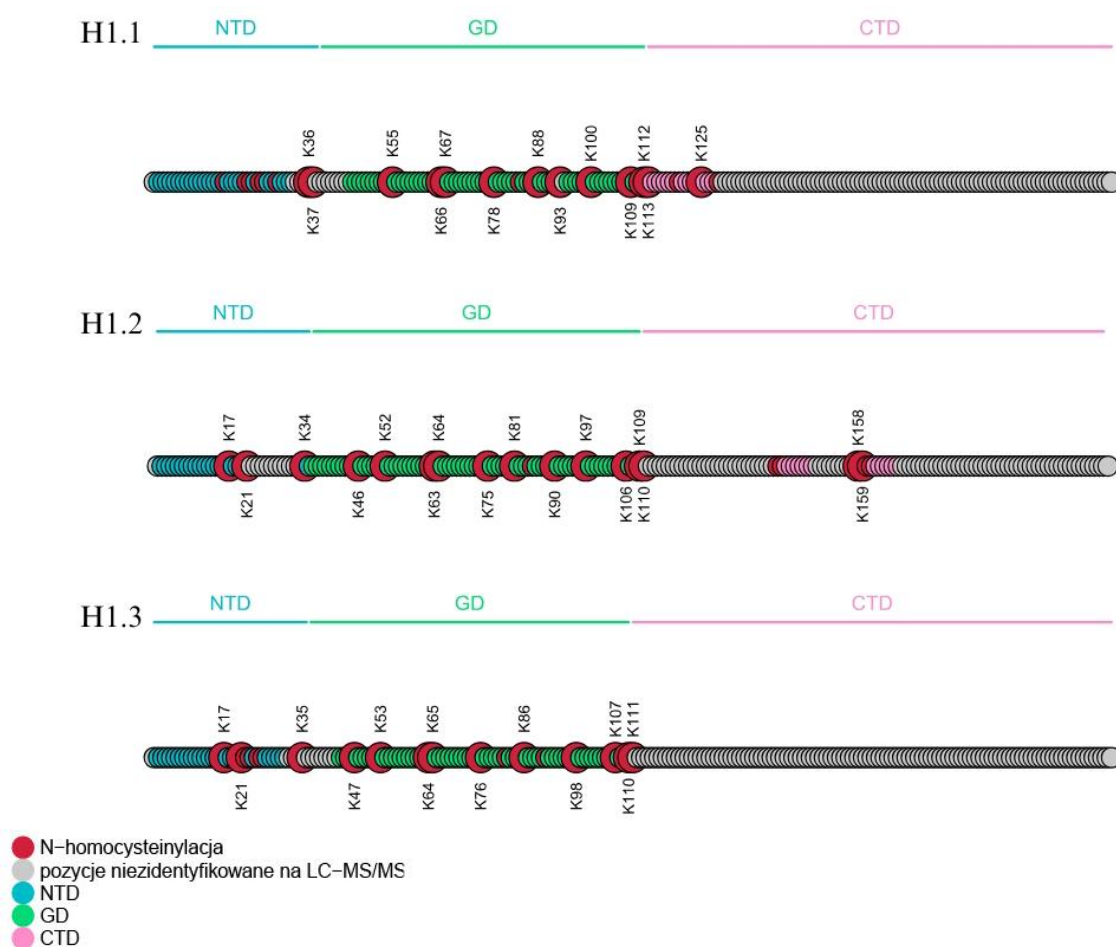
B



C



D



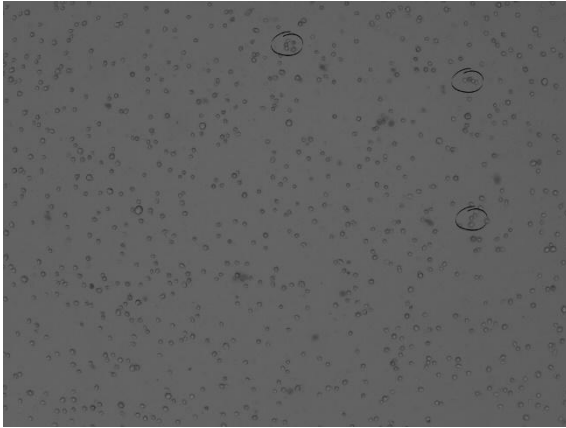
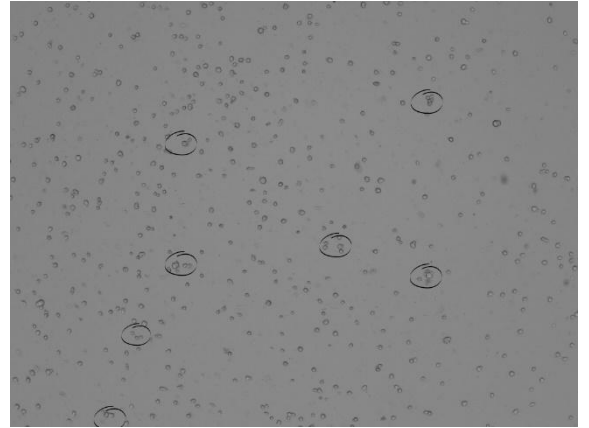
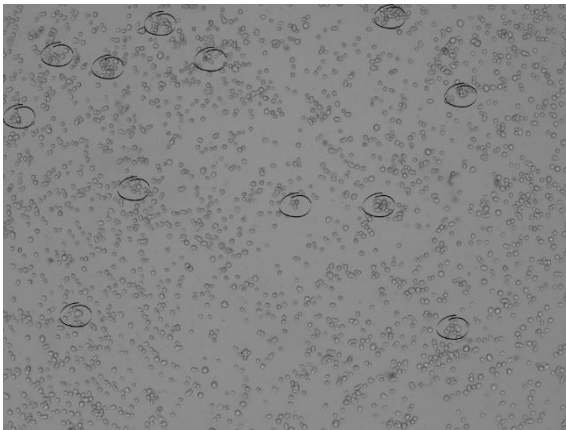
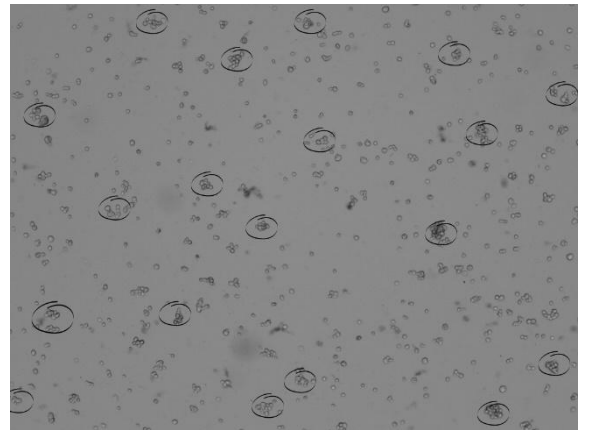
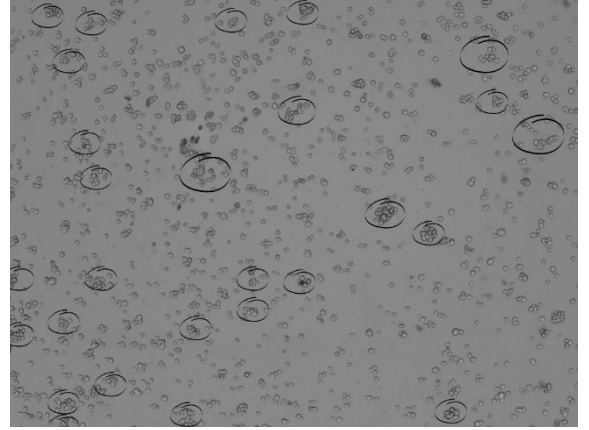
Rycina 7. *N*-Homocysteinyllacja histonu komercyjnego. A-C – Widma fragmentacyjne trzech *N*-Hcy-peptydów zlokalizowanych w histonie H1.1, H1.2, H1.3; D – Schemat zidentyfikowanych wariantów histonu H1 z zaznaczonymi resztami *N*-Hcy-Lys i pokryciem sekwencji (kolorem szarym oznaczono fragmenty łańcucha białkowego, które nie znalazły się wśród zidentyfikowanych peptydów).

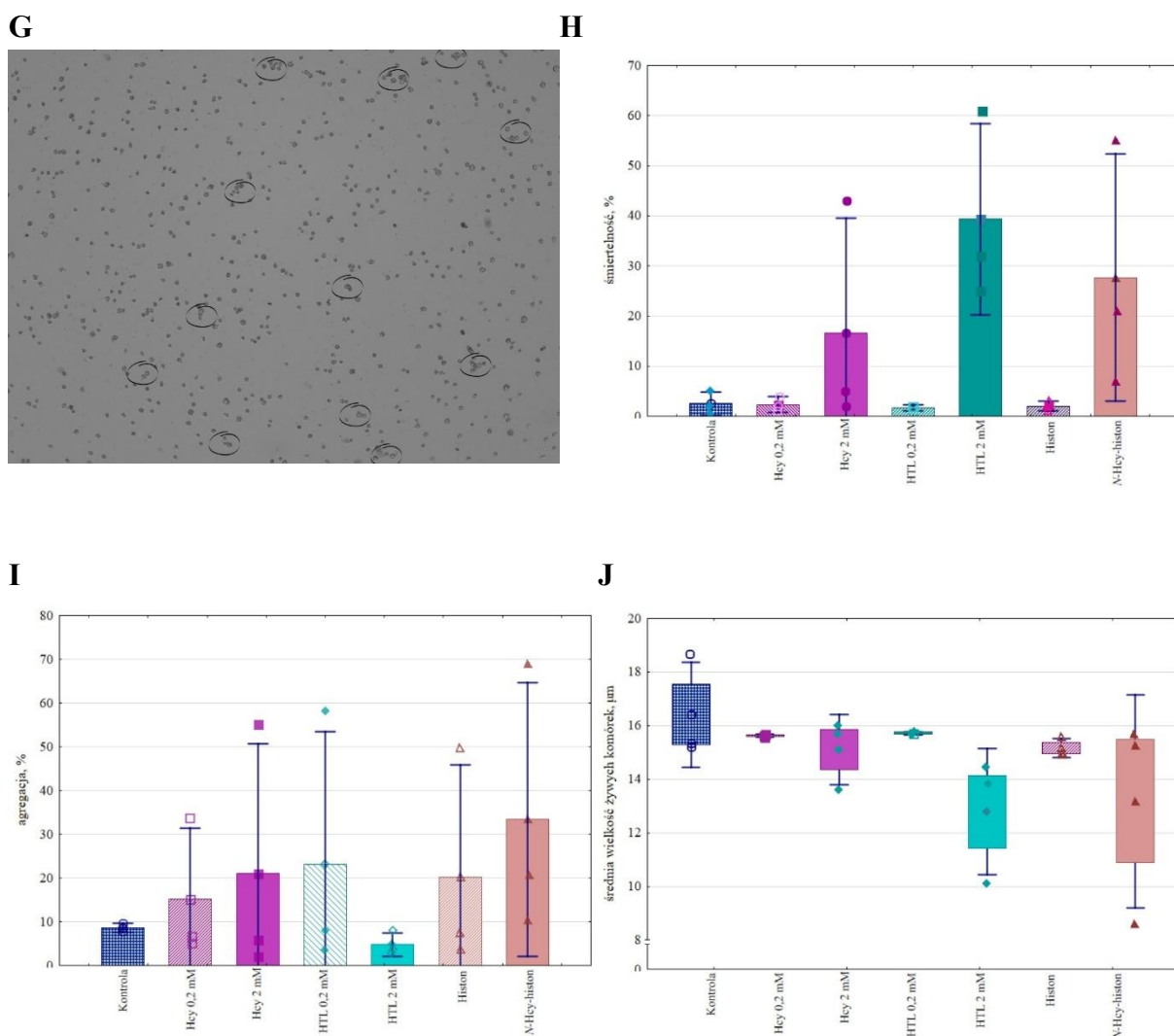
4.1.2 Żywotność komórek HUVEC

Dane literaturowe wskazują, że zwiększone poziomy Hcy i HTL, histonów wykazują działanie cytotoksyczne (Mercié i in., 2000; Richards i in., 2023). W związku z tymi doniesieniami przeanalizowano wpływ poniższych związków na przeżywalność komórek ludzkiego śródbłónka. Hodowle komórkowe poddano działaniu następujących czynników stresowych:

1. Hcy 0,2 mM,
2. Hcy 2 mM,
3. HTL 0,2 mM,
4. HTL 2 mM,
5. Histon 100 µg/ml,
6. *N*-Hcy-histon 100 µg/ml.

Hodowla prowadzona przez 24h w warunkach stresowych przyczyniła się do 6,6-krotnego wzrostu śmiertelności komórek traktowanych Hcy 2 mM , 15,7-krotnego komórek hodowanych w obecności HTL 2 Mm i 11,1-krotnego komórek hodowanych z *N*-Hcy-histonem. (Rycina 8 A-H). W odpowiedzi na stres dochodziło do zwiększonej agregacji komórek. Wykazano zbliżoną liczbę agregatów w hodowlach prowadzonych w obecności Hcy 2 mM, HTL 0,2 mM i histonu. Największą liczbę agregatów komórkowych zaobserwowano w komórkach traktowanych *N*-Hcy-histonem (3,9-krotnie więcej w porównaniu do kontroli), natomiast najmniejszą w komórkach traktowanych HTL 2 mM (Rycina 8 I). Komórki narażone na stres charakteryzowały się mniejszymi rozmiarami w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych, przy czym najmniejsze rozmiary obserwowano w komórkach traktowanych HTL 2 mM oraz *N*-Hcy-histonem (Rycina 8 J).

A**B****C****D****E****F**



Rycina 8. Komórki śródbłónki ludzkiego HUVEC traktowane czynnikami stresującymi wykazują zmiany w żywotności, agregacji oraz wielkości komórek. Zdjęcia mikroskopowe z zaznaczonymi agregatami komórek: A – Kontrola; B – Komórki traktowane Hcy 0,2 mM ; C – Komórki traktowane Hcy 2 mM; D – Komórki traktowane HTL 0,2 mM; E – Komórki traktowane HTL 2 mM; F – Komórki traktowane histonem 100 $\mu\text{g/ml}$; G – Komórki traktowane N-Hcy-histonem 100 $\mu\text{g/ml}$. Wykresy słupkowe przedstawiające: H – śmiertelność; I – agregację komórek; J – średnią wielkość żywych komórek.

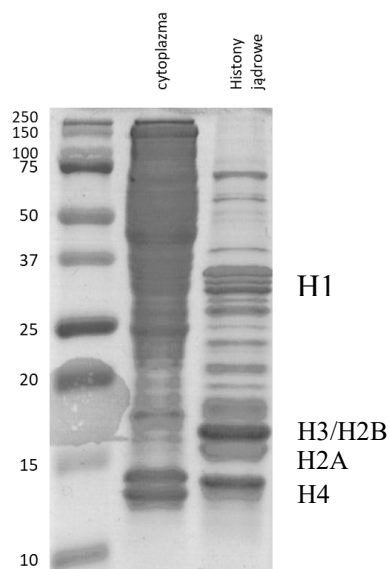
4.1.3 Pomiar tHcy i histonów zewnątrzkomórkowych

Hodowle komórkowe poddano działaniu następujących czynników stresowych:

1. Hcy 0,2 mM,
2. Hcy 2 mM,
3. HTL 0,2 mM,
4. HTL 2 mM,
5. Histon 100 µg/ml,
6. *N*-Hcy-histon 100 µg/ml.

Po 24 h hodowli w warunkach stresowych komórki oraz medium zostały zebrane do osobnych probówek typu Eppendorf. Z komórek wyizolowano białka cytoplazmatyczne, które posłużyły do pomiarów tHcy (3.5.7) oraz histonów zewnątrzjądrowych (3.5.5).

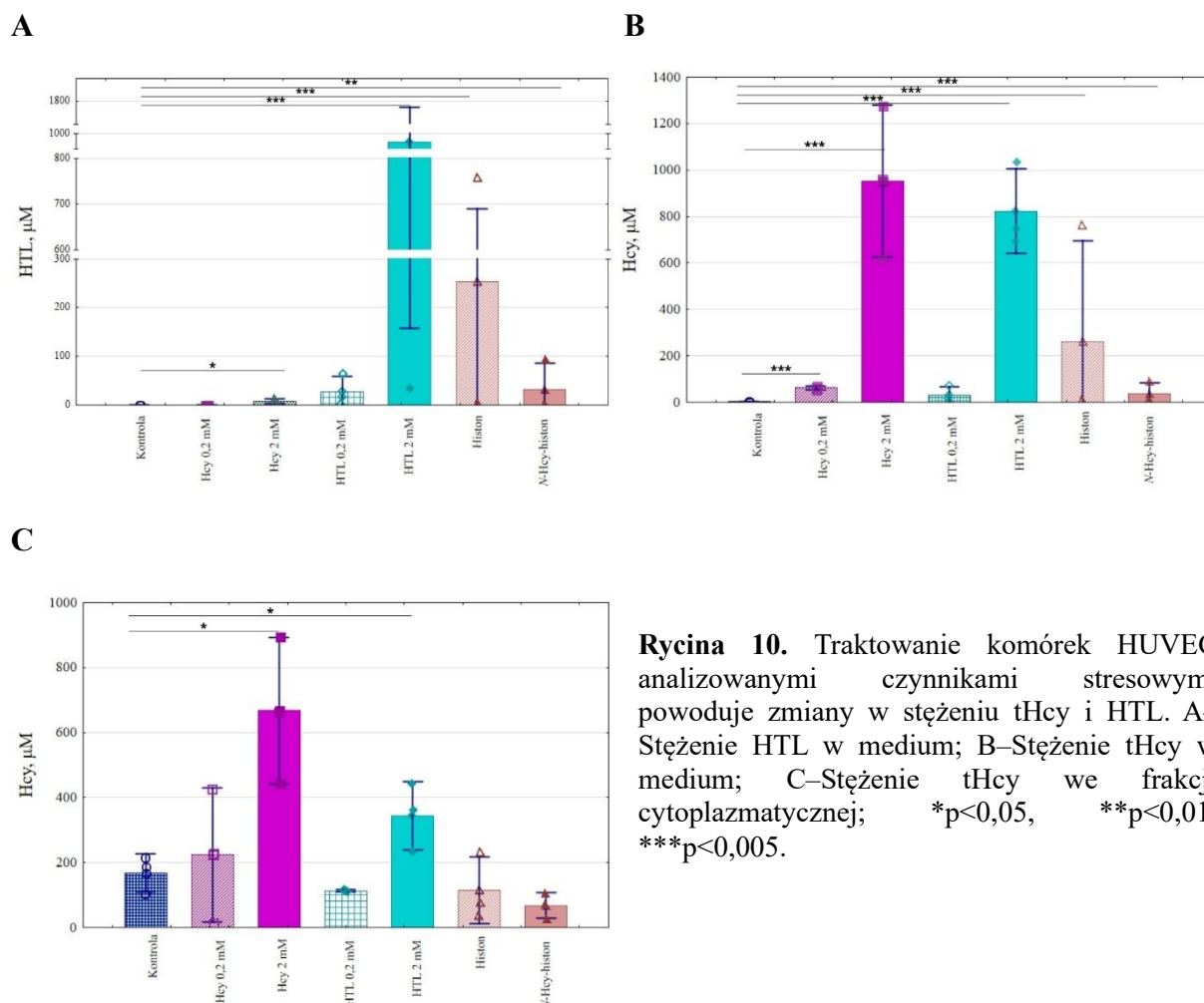
Białka cytoplazmatyczne były izolowane na podstawie protokołu izolacji opisanego w pracy Shechter i in. (Shechter i in., 2007), która skutecznie rozdziela frakcje cytoplazmatyczną i jądrową (Rycina 9).



Rycina 9. Sprawdzenie skuteczności metody izolacji białek cytoplazmatycznych. Obraz elektroforezy w 14% żelu w warunkach redukujących w obecności SDS (SDS-PAGE). Wyniki nieopublikowane dr Ewy Bretes.

Analiza medium komórkowego wykazała istotny wzrost stężenia tiolaktonu homocysteiny w medium komórek traktowanych Hcy 2 mM ($p=0,027$), HTL 2 mM ($p=0,000045$), histonem ($p=0,000001$) i *N*-Hcy-histonem ($p=0,0023$) (Rycina 10 A). Poziom tHcy był istotnie wyższy we wszystkich warunkach stresowych, z wyjątkiem medium komórek traktowanych HTL 0,2 mM, w porównaniu do warunków kontrolnych (Rycina 10 B). Najwyższe stężenie tHcy

wykazano w medium komórek traktowanych Hcy 2 mM i HTL 2 mM (odpowiednio $p=0,0073$, $p=0,0014$). Stresowanie komórek histonem oraz *N*-Hcy-histonem również spowodowało istotny wzrost poziomu tHcy (odpowiednio $p=0,0001$, $p=0,039$). We frakcjach cytoplazmatycznych istotny wzrost stężenia tHcy zauważono tylko w przypadku hodowli w obecności Hcy 2 mM i HTL 2 mM ($p=0,021$, $p=0,023$) (Rycina 10 C).

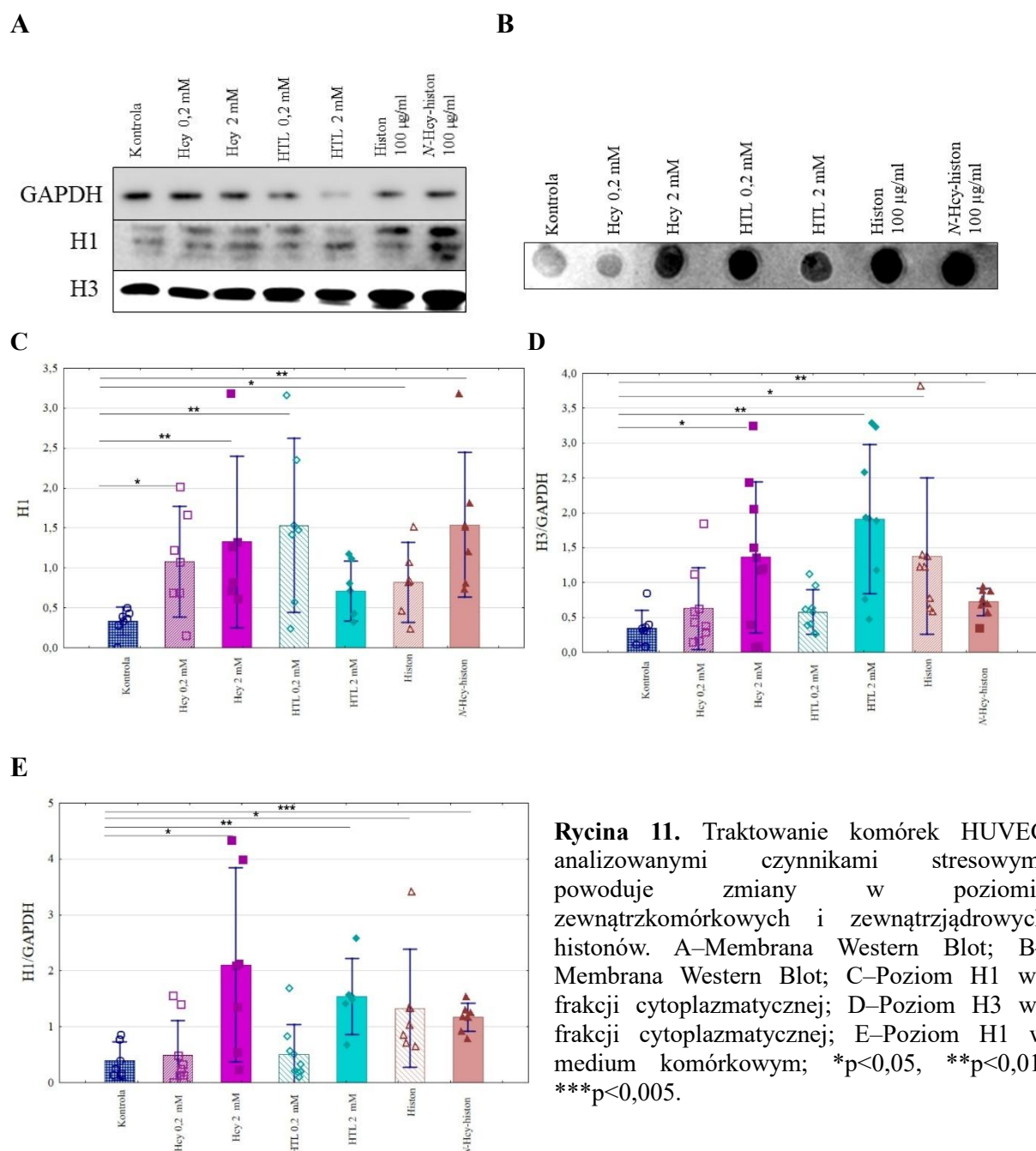


Rycina 10. Traktowanie komórek HUVEC analizowanymi czynnikami stresowymi powoduje zmiany w stężeniu tHcy i HTL. A–Stężenie HTL w medium; B–Stężenie tHcy w medium; C–Stężenie tHcy we frakcji cytoplazmatycznej; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,005$.

We frakcjach cytoplazmatycznych wykazano istotny wzrost poziomów histonu H1 i H3 we wszystkich analizowanych przypadkach z wyjątkiem Hcy 0,2 mM i HTL 0,2 mM. Największy poziom H1 odnotowano w przypadku komórek hodowanych z Hcy 2 mM, gdzie był on 4,4-krotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych ($p=0,039$). Hodowle traktowane HTL 2 mM, histonem oraz *N*-Hcy-histonem wykazywały zbliżone poziomy cytoplazmatycznego H1, istotnie wyższe niż hodowle kontrolne (odpowiednio $p=0,0052$, $p=0,0226$, $p=0,0005$) (Rycina 11 A). Najwyższy poziom H3 stwierdzono w frakcji cytoplazmatycznej komórek rosnących w obecności HTL 2 mM ($p=0,0024$). Traktowania Hcy 2 mM oraz histonem spowodowały podobny wzrost poziomu histonu H3 w stosunku do hodowli kontrolnej (odpowiednio

$p=0,0312$, $p=0,0356$). Najniższy, lecz istotny, wzrost H3 wykazano dla komórek traktowanych *N*-Hcy-histonu ($p=0,0067$) (Rycina 11 B).

Analiza medium komórkowego wykazała, że traktowanie komórek HTL 2 mM nie powoduje istotnego wzrostu poziomu histonu H1. Zbliżone ilości H1 zaobserwowano w próbkach medium komórek stresowanych Hcy 0,2 mM, Hcy 2 mM, HTL 0,2 mM oraz *N*-Hcy-histonem (odpowiednio $p=0,0029$, $p=0,0065$, $p=0,024$, $p=0,0091$), natomiast najniższy wzrost odnotowano w próbkach medium komórek traktowanych histonem ($p=0,023$) (Rycina 11 C).

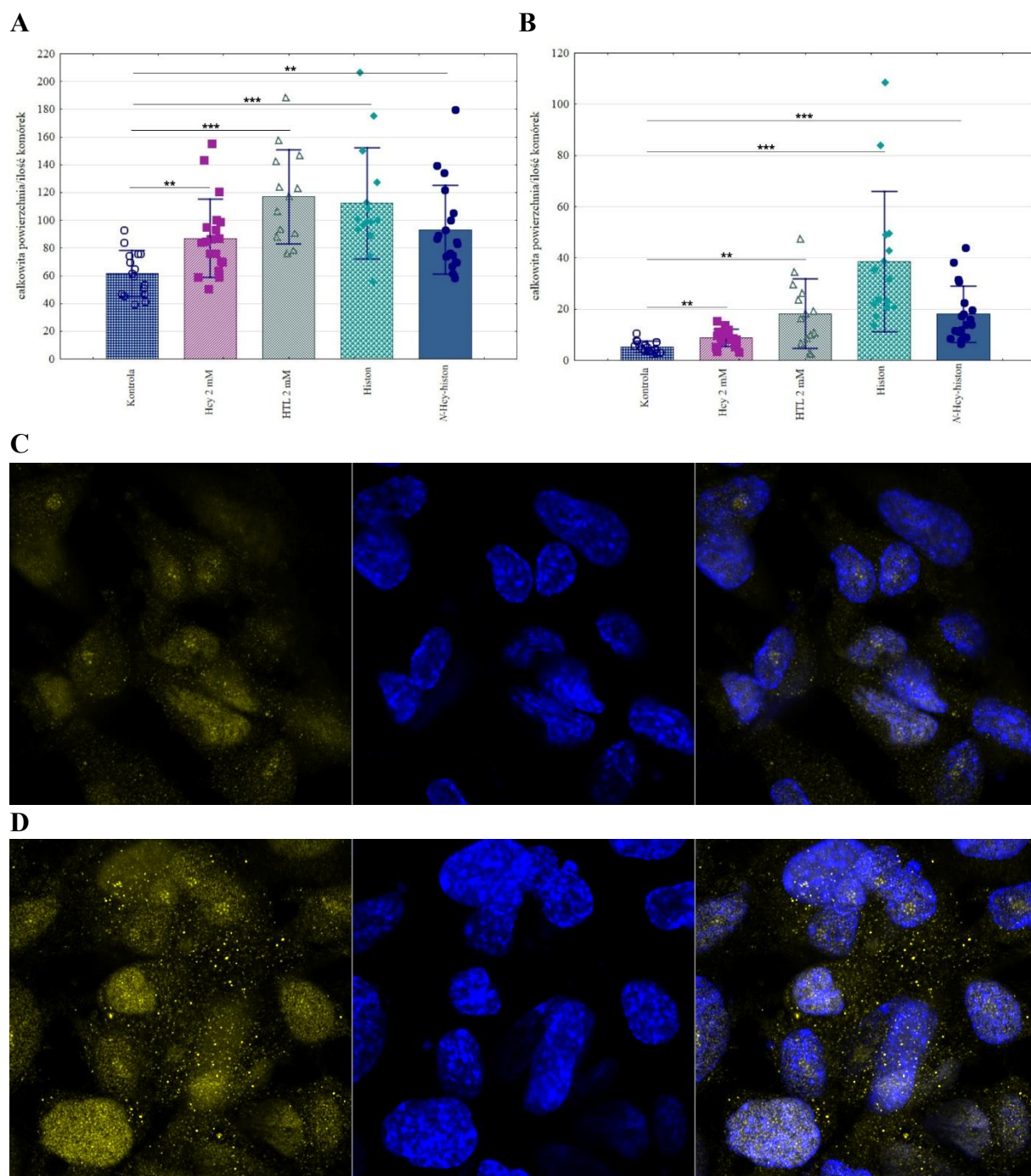


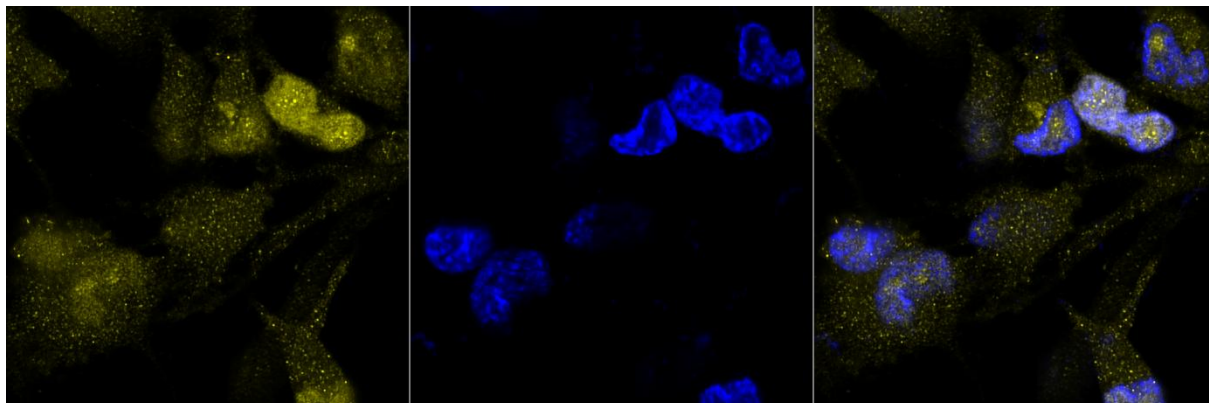
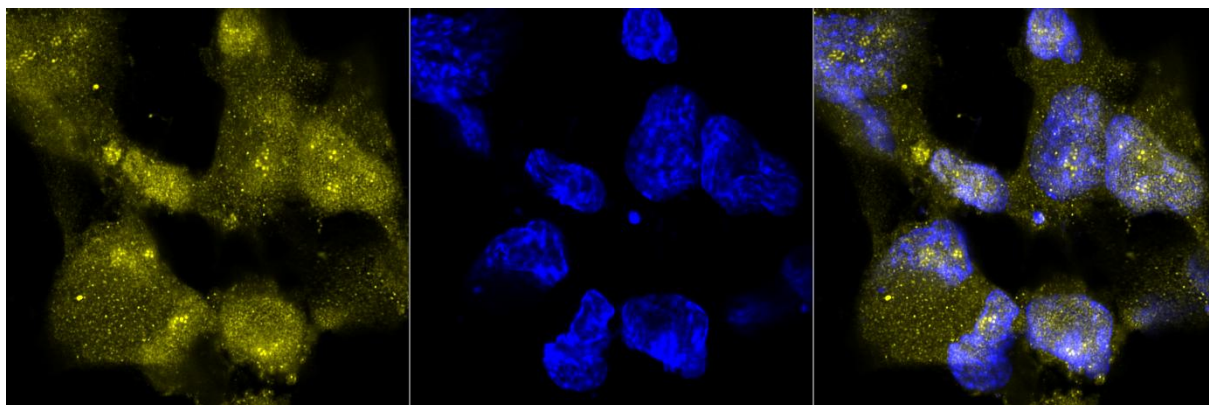
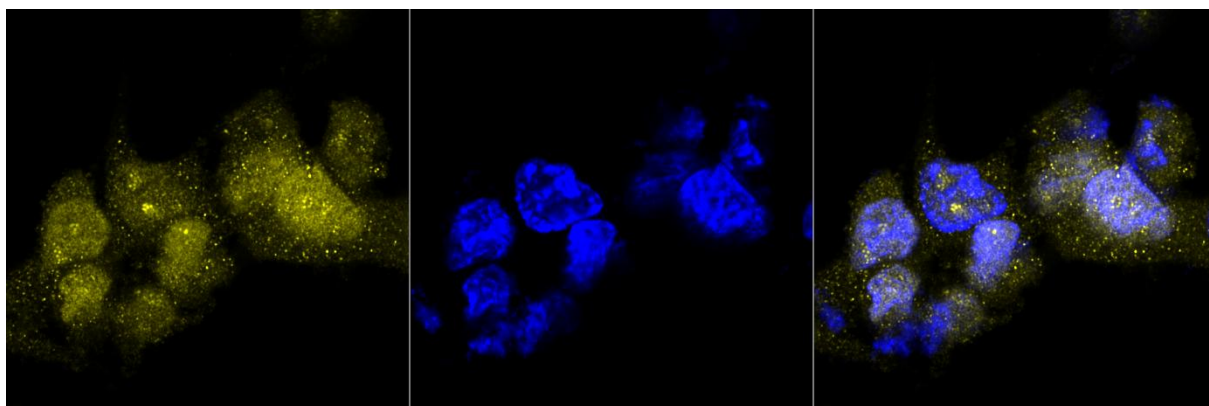
Rycina 11. Traktowanie komórek HUVEC analizowanymi czynnikami stresowymi powoduje zmiany w poziomie zewnątrzkomórkowych i zewnątrzjądrowych histonów. A–Membrana Western Blot; B–Membrana Western Blot; C–Poziom H1 we frakcji cytoplazmatycznej; D–Poziom H3 we frakcji cytoplazmatycznej; E–Poziom H1 w medium komórkowym; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,005$.

4.1.4 Obrazowanie mikroskopowe histonu H1

W celu oceny wpływu czynników stresowych na zmiany w poziomie i lokalizacji histonu H1, komórki HUVEC poddano traktowaniu Hcy i HTL o stężeniu 2 mM, histonem i *N*-Hcy-histonem o stężeniu 100 µg/ml, a następnie przeprowadzono analizę immunocytochemiczną.

Obserwacje z użyciem mikroskopu konfokalnego wykazały istotny wzrost poziomu histonu H1 zarówno w jądrze komórkowym (Rycina 12 B) jak i poza nim (Rycina 12 A). Komórki traktowane Hcy 2 mM wykazywały 66% wzrost zewnątrzjądrowego oraz 32% wzrost jądrowego histonu H1 (odpowiednio $p=0,00165$; $p=0,0039$) (Rycina 12 D). Największy poziom zewnątrzjądrowego H1 wykryto w komórkach traktowanych histonem (Rycina 12 F) (wzrost 6-krotny w porównaniu do warunków kontrolnych, $p=0,00007$), a najwyższy poziom jądrowego H1 odnotowano w preparatach traktowanych HTL 2 mM (Rycina 12 E) (wzrost o 90% w stosunku do kontroli, $p=0,000007$). Komórki traktowane HTL 2 mM ($p=0,0012$) oraz *N*-Hcy-histonem ($p=0,00014$) wykazywały zbliżone poziomy zewnątrzjądrowego H1. Co ciekawe, komórki traktowane histonem miały wyższy poziom jądrowego H1 (Rycina 12 G) (wzrost o 82%), niż komórki traktowane *N*-Hcy-histonem (wzrost o 51%) (odpowiednio $p=0,00011$, $p=0,0017$).



E**F****G**

Rycina 12. Traktowanie komórek Hcy, HTL, histonem i *N*-Hcy-histonem promuje ekspresję histonu H1. Analiza H1 w komórkach ludzkiego śródbłónka HUVEC za pomocą immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej z użyciem przeciwciała anti-H1. Wykresy słupkowe poziomu histonu H1 A – poza jądrem; B – w jądrze. Zdjęcia mikroskopowe preparatów: C – Komórki kontrolne; D – Komórki traktowane Hcy 2 mM ; E – Komórki traktowane HTL 2 mM; F – Komórki traktowane histonem 100 µg/ml; G – komórki traktowane *N*-Hcy-histonem 100 µg/ml. Komórki HUVEC zostały poddane działaniu wspomnianych czynników stresowych przez 24 h w temperaturze 37 °C. Kontrole stanowiły komórki nietraktowane. Istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$.

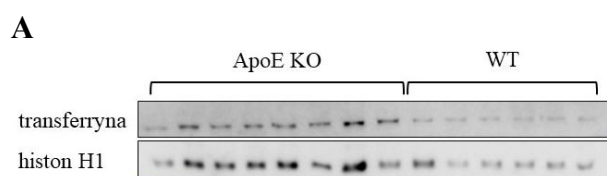
4.2 Mysie modele chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych

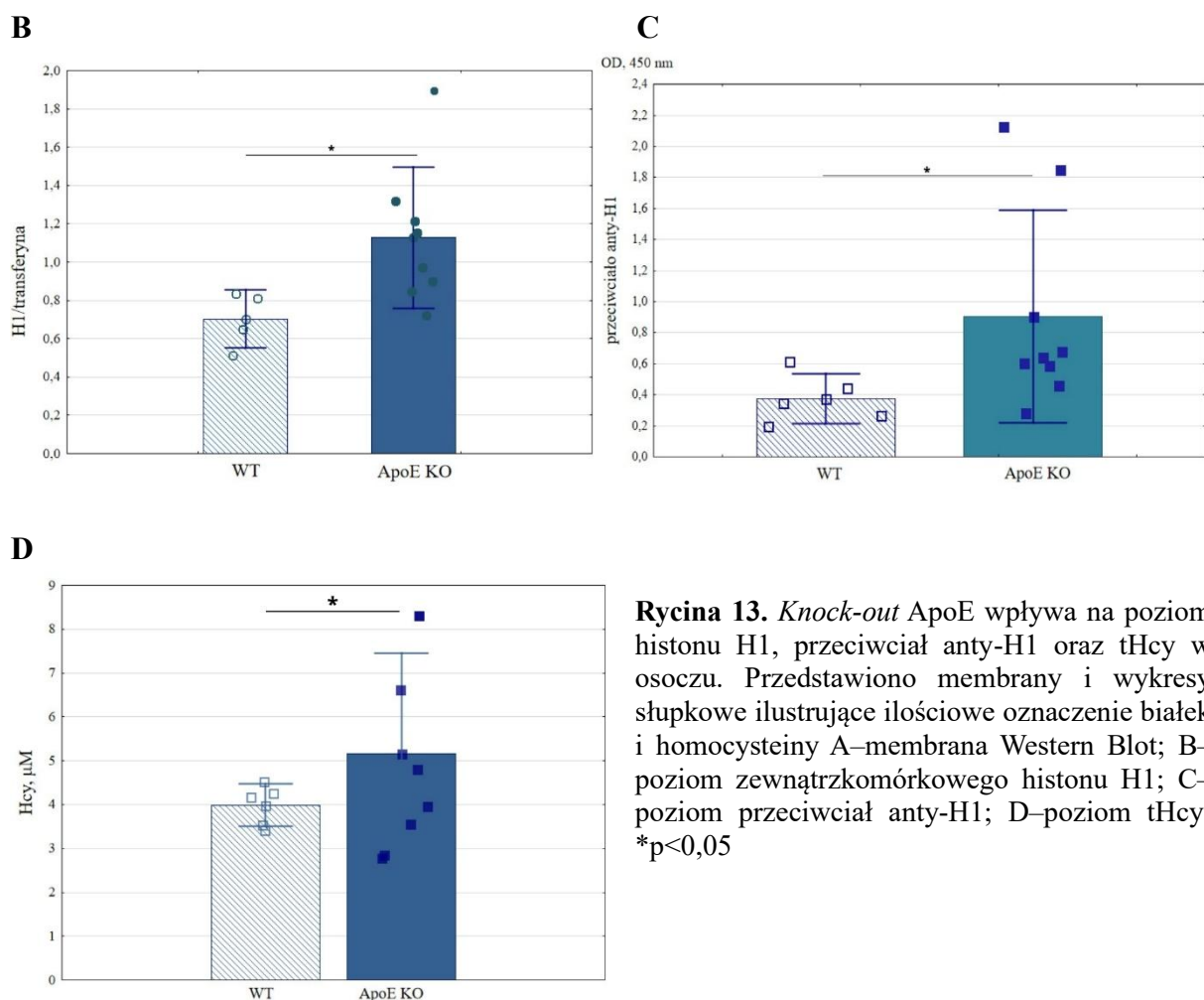
W związku z potwierdzeniem w modelu *in vitro* hipotezy zakładającej, że podwyższony poziom Hcy prowadzi do wzrostu poziomu histonów zewnątrzjądrowych, postanowiono zbadać, czy podobne zjawisko ma miejsce w modelach *in vivo*. Do badań wybrano mysie modele chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Wykorzystano myszy ApoE KO oraz SOD1 wraz z odpowiadającymi im zwierzętami kontrolnymi, z których pobrano osocze, mózg, śledzionę i wątrobę. Z tkanek wyizolowano białka cytoplazmatyczne (3.4.2.1). Wszystkie materiały przeanalizowano pod kątem poziomu tHcy (3.5.7) oraz histonów zewnątrzjądrowych (3.5.5).

4.2.1 ApoE KO–Osocze

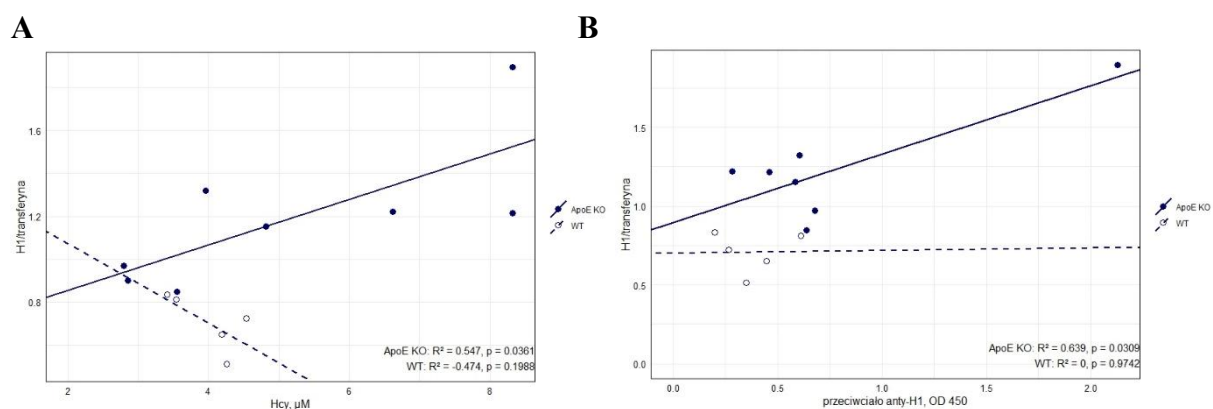
Zgodnie z doniesieniami opisanymi we wstępie niniejszej pracy (1.9), histony zewnątrzjądrowe i zewnątrzkomórkowe mogą przyczyniać się do rozwoju różnych chorób, w tym neurodegeneracyjnych i nowotworów. Opierając się na tej wiedzy przeanalizowaliśmy poziom histonów zewnątrzkomórkowych w mysim modelu chorób sercowo-naczyniowych i choroby Alzheimera (ApoE KO).

Analiza Western Blot (Rycina 13 A-B) wykazała, że w osoczu myszy ApoE KO dochodzi do 50% wzrostu poziomu zewnątrzkomórkowego histonu H1 w porównaniu do myszy kontrolnych ($p=0,0104$). W celu sprawdzenia, czy zewnątrzkomórkowy histon H1 ma właściwości antygenowe, zbadano poziom przeciwciał specyficznych względem tego białka. Wzrost poziomu H1 w przestrzeni międzykomórkowej u myszy ApoE KO spowodował ponad dwukrotny wzrost przeciwciał anti-H1 w stosunku do myszy kontrolnych ($p=0,048$) (Rycina 13 C). Analiza HPLC (Rycina 13 D) wykazała, że myszy ApoE KO mają o 60% wyższe stężenie tHcy w porównaniu do zwierząt kontrolnych ($p=0,0297$).





Analiza korelacji Pearsona wykazała istotną, pozytywną zależność między poziomem H1 i stężeniem tHcy oraz między poziomem H1 a poziomem przeciwciał anti-H1 u myszy ApoE KO (Rycina 14). Nie wykazano istotnej korelacji u myszy kontrolnych.



Rycina 14. Analiza korelacji u myszy ApoE KO i WT. A– pomiędzy poziomem H1 a tHcy; B– pomiędzy poziomem H1 a anti-H1.

Aby sprawdzić, czy Hcy jest determinantą poziomu H1 w osoczu wykonano analizę regresji wielorakiej. Wykazano, że tHcy wpływa na zwiększenie się ilości histonów H1 u myszy, podobnie jak genotyp (wyraźna tendencja) (Tabela 16).

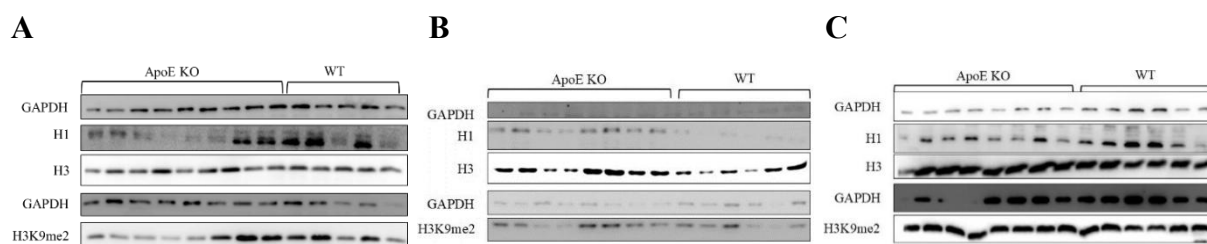
Tabela 16. Determinanty dla zewnątrzkomórkowego histonu H1.

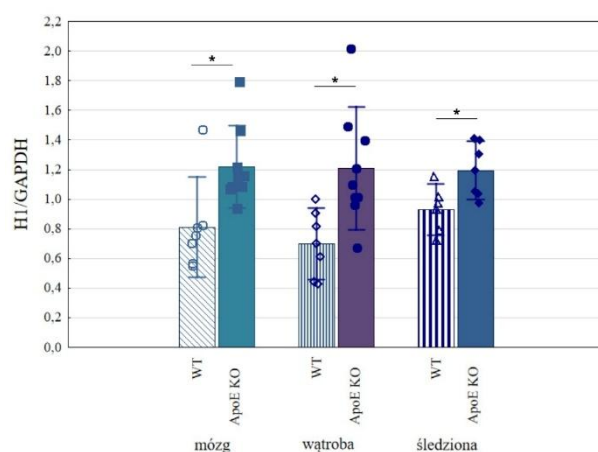
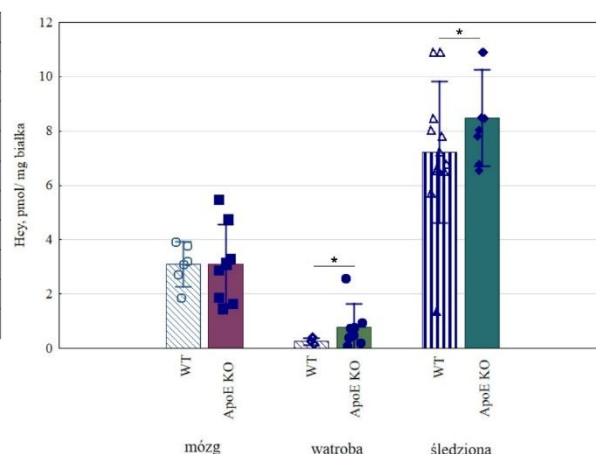
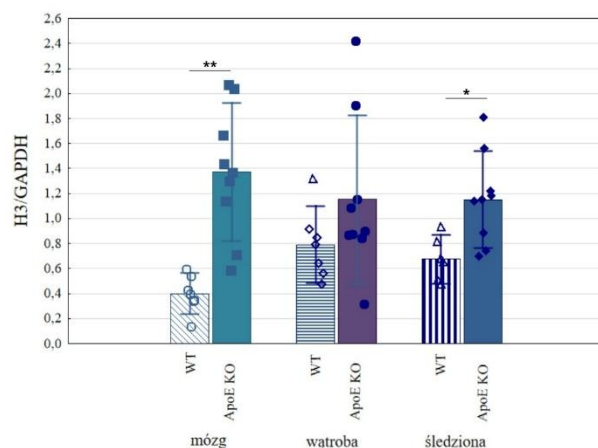
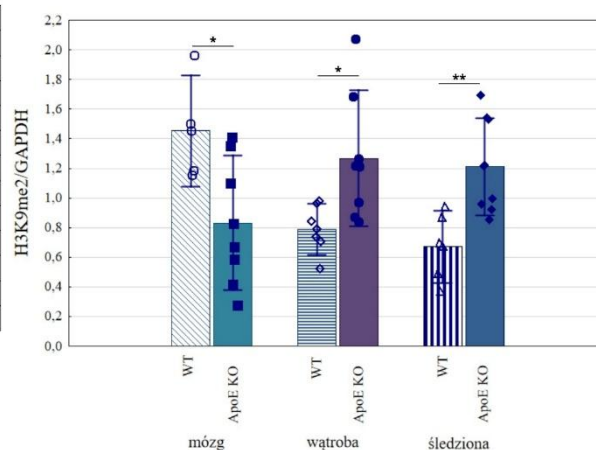
	Poziom zewnątrzkomórkowego H1	
	β^*	Wartość p
tHcy	0,4979	0,016
Przeciwciało anti-H1	0,2931	0,136
Genotyp	0,3923	0,063
F= 10,131; p= 0,00304; R ² = 0,77152		

4.2.2 ApoE KO–Organy

Zmiany w poziomach tHcy i H1 w osoczu myszy skłoniły do analizy ich zawartości we frakcjach cytoplazmatycznych wyizolowanych z mózgu, wątroby i śledziony. Histon H3 jest najczęściej badanym histonem w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, dlatego zdecydowano się również sprawdzić jego poziom oraz obecność modyfikacji H3K9me2.

W analizowanych organach myszy ApoE KO dochodzi do istotnego statystycznie wzrostu poziomu histonu H1 (Rycina 15 A-D). Ilość białka w mózgu, wątrobie i śledzionie zwiększyła się odpowiednio o 30%, 50% i 70% w porównaniu do myszy kontrolnych (odpowiednio $p=0,0288$, $p=0,0201$, $p=0,0435$). U myszy ApoE KO wykazano istotny statystycznie wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego H3 w śledzionie o około 50% ($p=0,0288$), natomiast w mózgu aż o 250% ($p=0,0013$) w porównaniu do myszy kontrolnych. W wątrobie nie zaobserwowano istotnej różnicy w poziomach histonu H3 między grupami (Rycina 15 F). Pomimo zwiększonej ilości H3 w mózgu, w organie tym wykazano zmniejszony o 55% poziom H3K9me2 względem grupy kontrolnej ($p=0,0469$). W wątrobie i śledzionie stwierdzono kolejno 60 i 80% wzrost modyfikacji (odpowiednio $p= 0,0352$, $p=0,0094$) (Rycina 15 G).

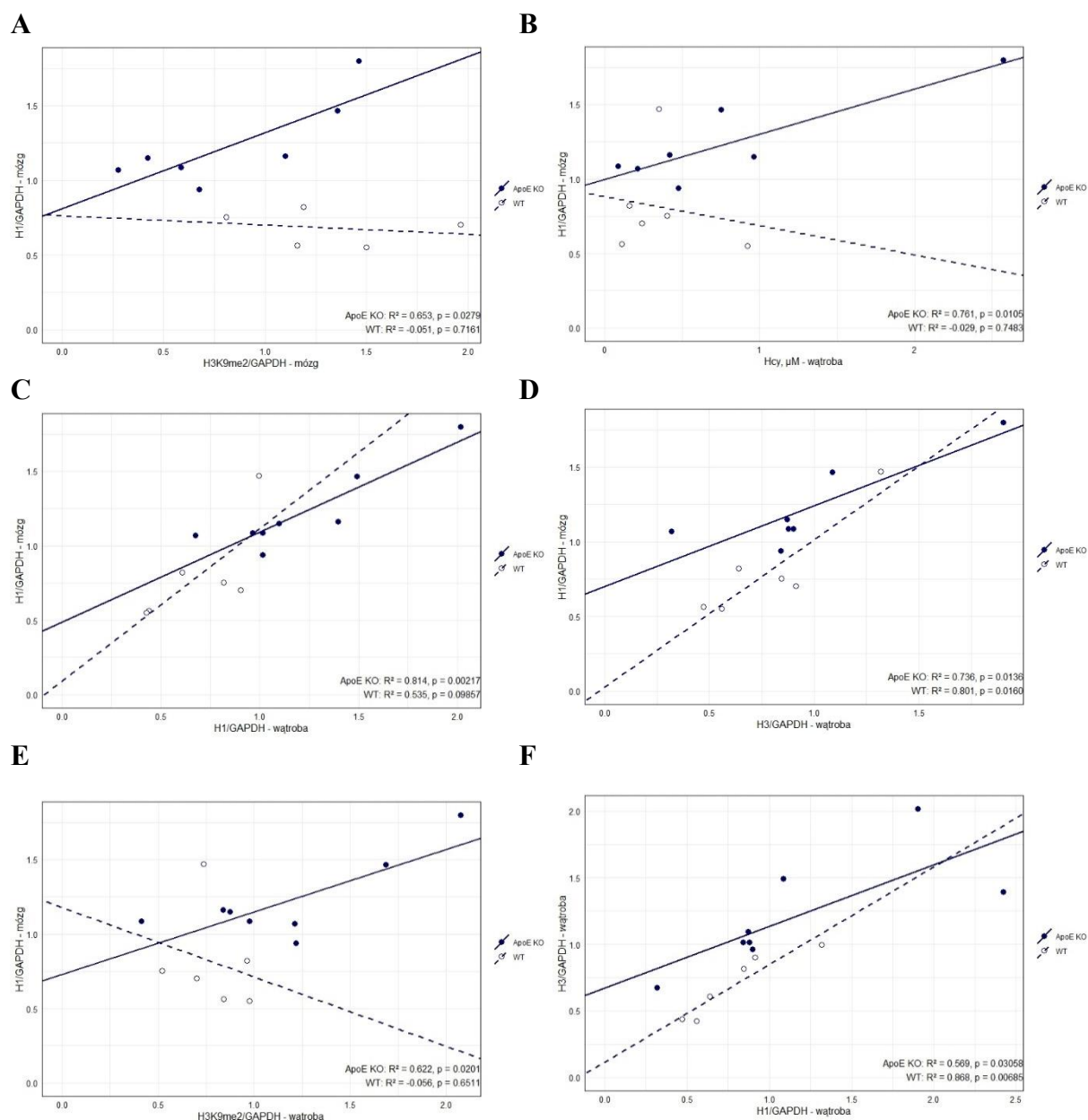


D**E****F****G**

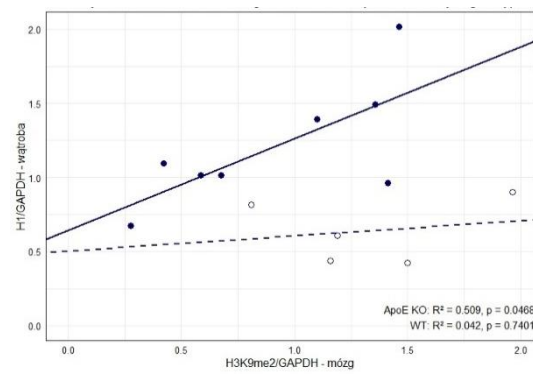
Rycina 15. Knock-out ApoE wpływa na poziom histonu H1, przeciwciał anti-H1 oraz tHcy w mózgu, wątrobie i śledzionie. Przedstawiono membrany i wykresy słupkowe ilustrujące ilościowe oznaczenie histonów i homocysteiny. Membrany Western Blot: A–mózg; B–wątroba; C–śledziona; D–poziom zewnątrzjądrowego histonu H1; E–stężenie tHcy; F–poziom zewnątrzjądrowego histonu H3; G poziom modyfikacji H3K9me2; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

W celu sprawdzenia potencjalnych zależności między badanymi organami wykonano analizę korelacji Pearsona dla zmierzonych parametrów. Zauważono, że histon H1 w mózgu myszy ApoE KO wykazuje pozytywną korelację z H3K9me2 w mózgu ($p = 0,0279$) oraz ze wszystkimi, zmierzonymi parametrami wątroby tj.: tHcy ($p = 0,0105$), H1 ($p = 0,00217$), H3 ($p = 0,0136$), H3K9me2 ($p = 0,0201$) (Rycina 16 A-E). Wątrobowy H1 wykazuje także pozytywną korelację z H3 w tym samym organie i modyfikacją H3K9me2 w mózgu (Rycina 16 F, G). Zależności pomiędzy H3 w wątrobie a H1 w mózgu i wątrobie wykazano w obu grupach myszy. W związku z małą liczebnością grup przeanalizowano także korelacje z widoczną tendencją i zauważono, że histon H1 w osoczu (Rycina 16 H) wykazał tendencję do negatywnej korelacji z H3K9me2 w wątrobie ($p = 0,0686$), tak samo jak tHcy w mózgu do H3K9me2 (Rycina 16 I,

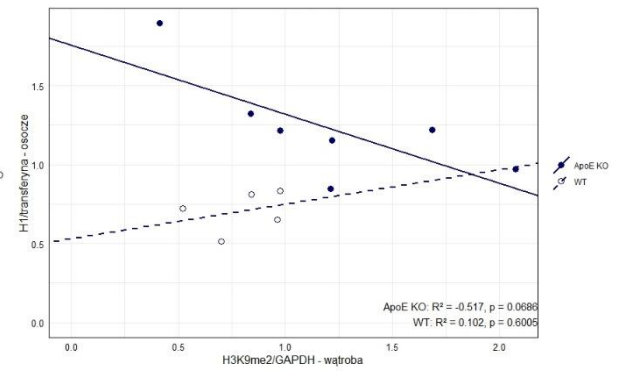
$p=0,0634$) w mózgu, H1 w wątrobie (Rycina 16 L, $p=0,089$) i tHcy w śledzionie (Rycina 16 K, $p=0,0714$). H1 w wątrobie wykazał tendencję do negatywnej korelacji z tHcy (Rycina 16 M, $p=0,089$), a pozytywną do H3K9me2 zmierzonych w tym samym organie (Rycina 16 N, $p=0,0691$). Totalna Hcy w śledzionie wykazywała tendencję do pozytywnej korelacji z H1 w mózgu (Rycina 16 J, $p=0,098$), a śledzionowy H3K9me2 do modyfikacji w wątrobie (Rycina 16 O, $p=0,098$).



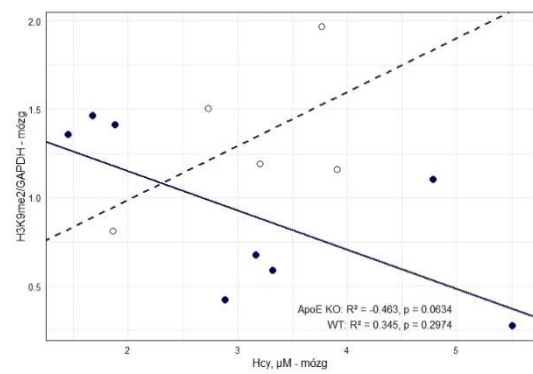
G



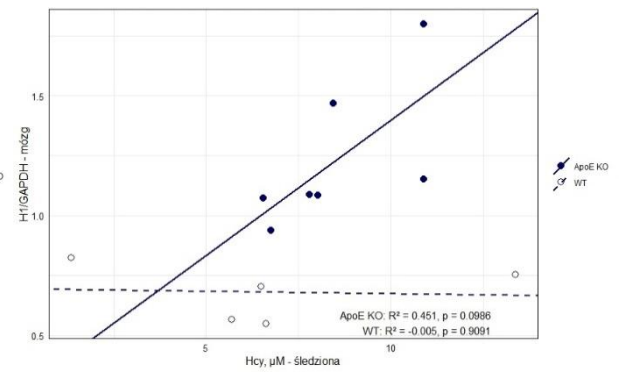
H



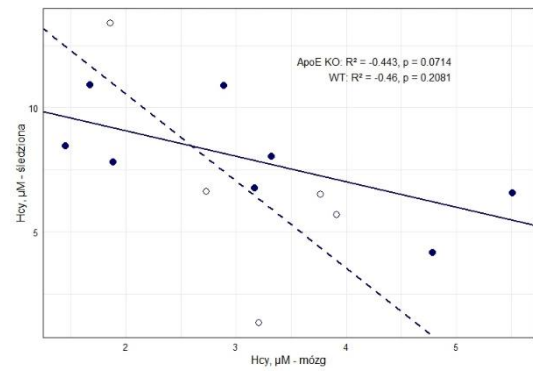
I



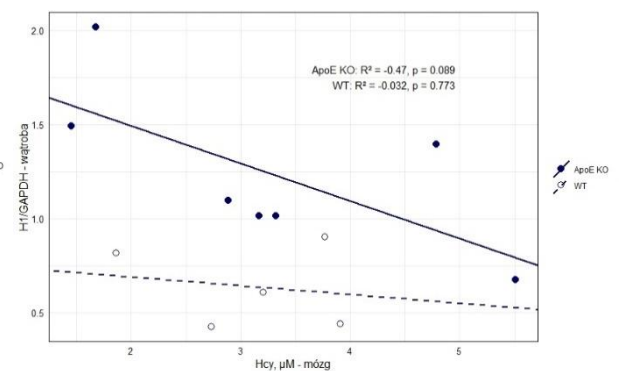
J



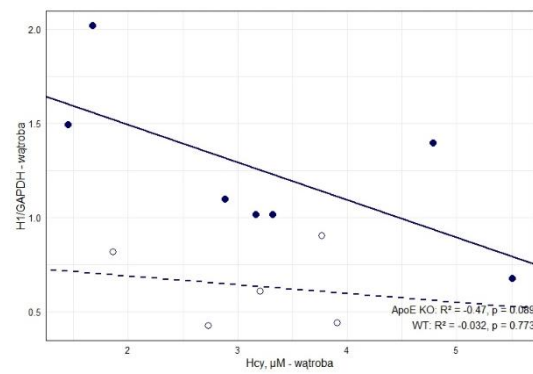
K



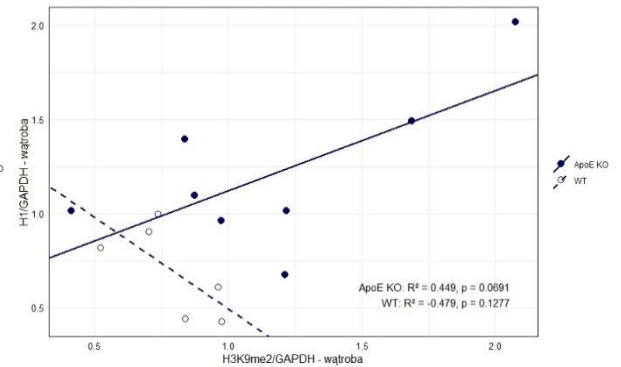
L



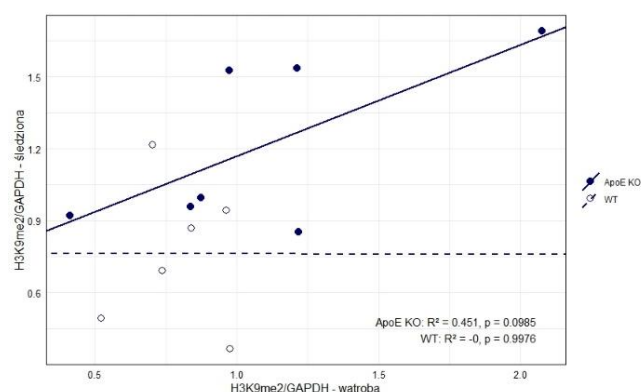
M



N



O

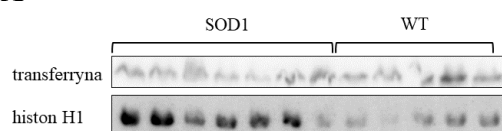


Rycina 16. Analiza korelacji Pearsona u myszy ApoE KO i WT: A–H1 do H3K9me2 w mózgu; B–H1 w mózgu do Hcy w wątrobie; C–H1 w mózgu do H1 w wątrobie; D–H1 w mózgu do H3 w wątrobie; E–H1 w mózgu do H3K9me2 w wątrobie; F–H1 do H3 w wątrobie; G–H1 w wątrobie do H3K9me2 w mózgu; H–H1 w osoczu do H3K9me2 w wątrobie; I–Hcy do H3K9me2 w mózgu; J–H1 w mózgu do Hcy w śledzionie; K–Hcy w śledzionie do Hcy w mózgu; L–H1 w wątrobie do Hcy w mózgu; M–H1 do Hcy w wątrobie; N–H1 do H3K9me2 w wątrobie; O–H3K9me2 w wątrobie do H3K9me2 w śledzionie.

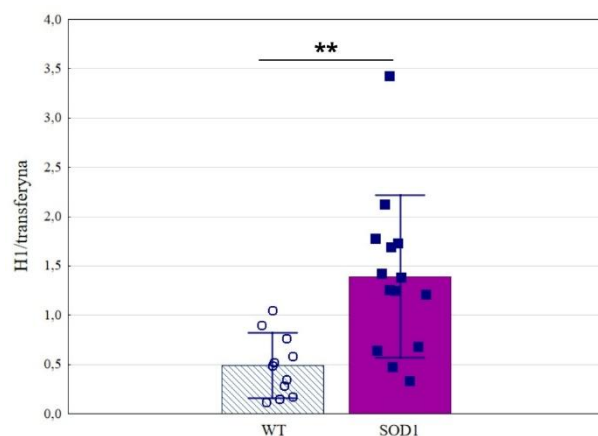
4.2.3 SOD1–Osocze

Podobnie jak w poprzednim modelu, u myszy SOD1, będących modelem stwardnienia zanikowego bocznego, zmierzono poziom tHcy, H1 i przeciwciał anti-H1 w osoczu. Analiza Western Blot osocza (Rycina 17 A-B) wykazała istotny, prawie 3-krotny wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego H1 ($p=0,0038$) i przeciwciał anti-H1 o 38% ($p=0,0225$) względem myszy kontrolnych (Rycina 17 C). Analiza HPLC wykazała ponad 60% wzrost stężenia tHcy w osoczu myszy SOD1 w porównaniu do zwierząt kontrolnych ($p=0,029$) (Rycina 17 D).

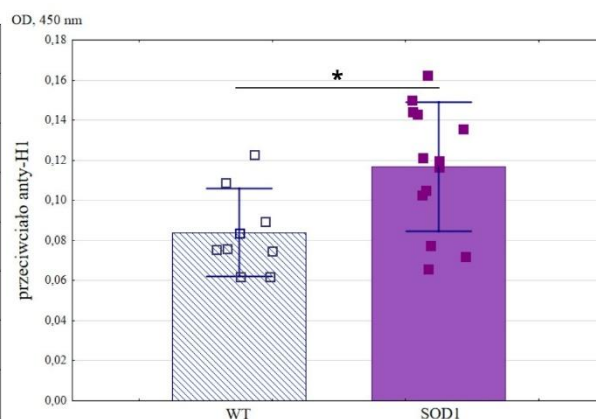
A



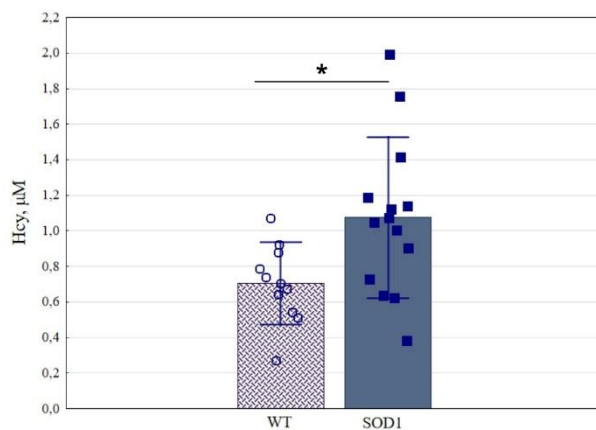
B



C



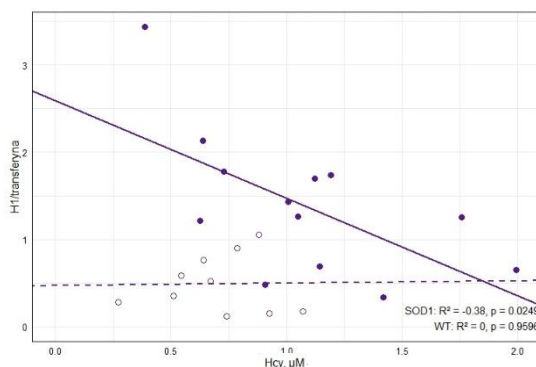
D



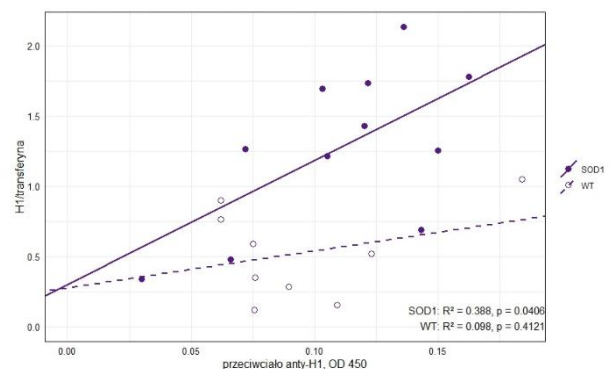
Rycina 17. Nadekspresja ludzkiego SOD1 wpływa na poziom histonu H1, przeciwciała anty-H1 i tHcy. Analiza osocza: A–membrana Western Blot; B–poziom zewnątrzkomórkowego histonu H1; C–poziom przeciwciał anty-H1; D–stężenie tHcy; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Analiza korelacji wykazała, że pomiędzy poziomem H1, a stężeniem tHcy zachodzi istotna, negatywna zależność, natomiast pomiędzy H1 a przeciwciałem anty-H1 – pozytywna (Rycina 18).

A



B



Rycina 18. Analiza korelacji Pearsona. A– pomiędzy H1 a tHcy; B– pomiędzy H1 a anty-H1.

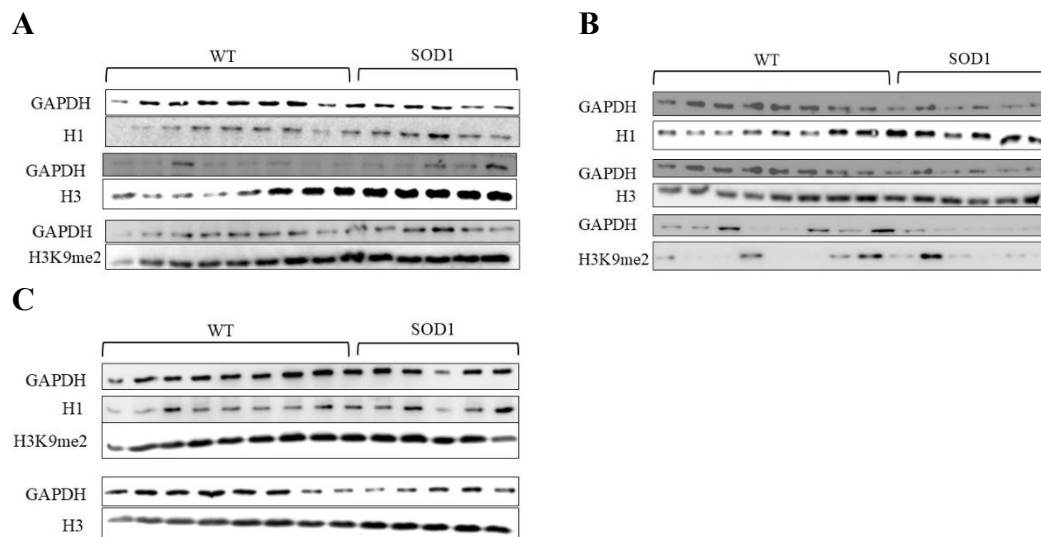
Aby określić czy Hcy jest determinantą powodującą wzrost poziomu H1 wykonano analizę regresji wielorakiej. Wykazano, że homocysteina i genotyp mają istotny wpływ na poziom zewnątrzkomórkowego H1 (Tabela 17).

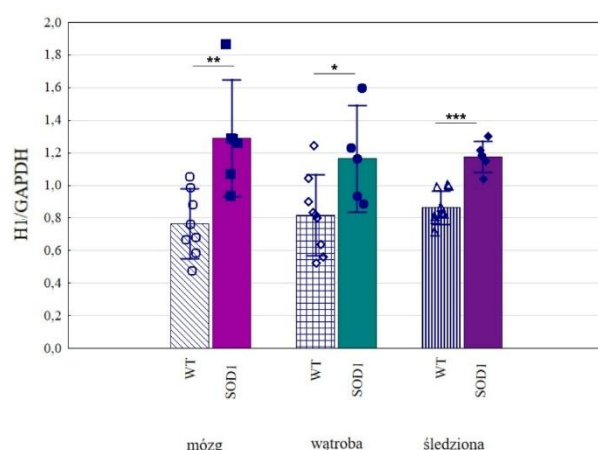
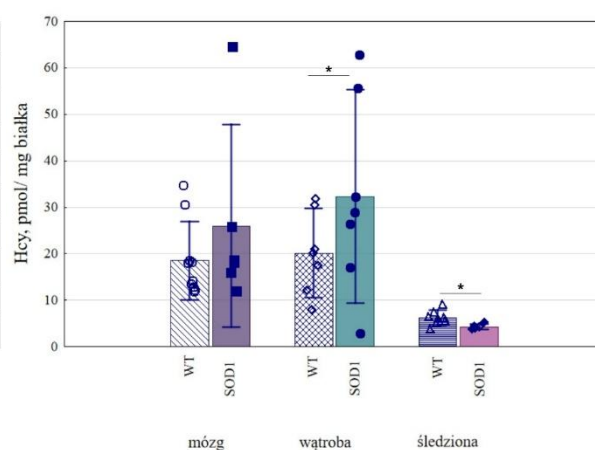
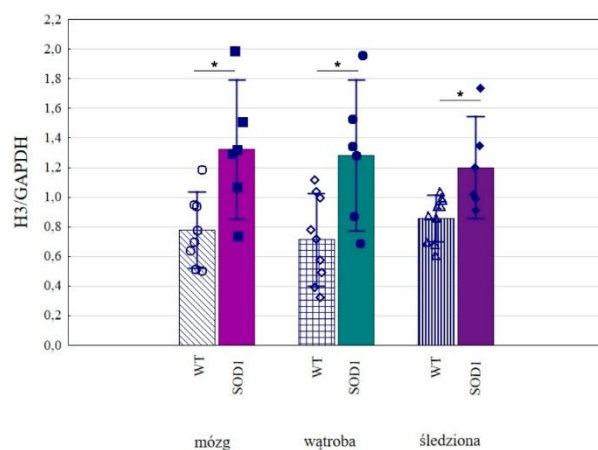
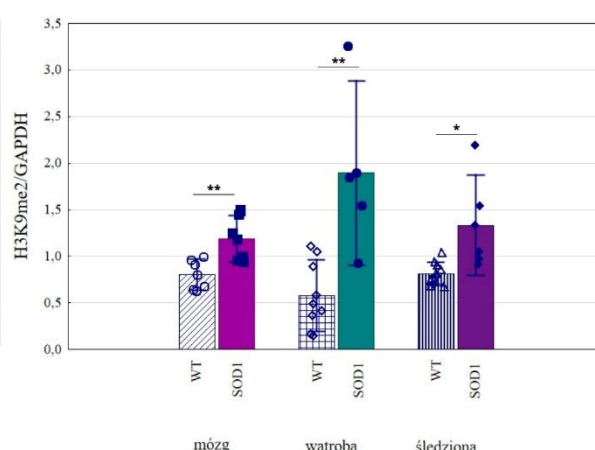
Tabela 17. Wyznaczenie determinanty dla zewnątrzkomórkowego H1.

	Poziom zewnątrzkomórkowego H1	
	β^*	Wartość p
tHcy	-0,5589	0,0076
Przeciwciała anty-H1	0,2423	0,1594
Genotyp	0,7831	0,0004
F= 7,334; p= 0,00205, $R^2 = 0,55004$		

4.2.4 SOD1–Organy

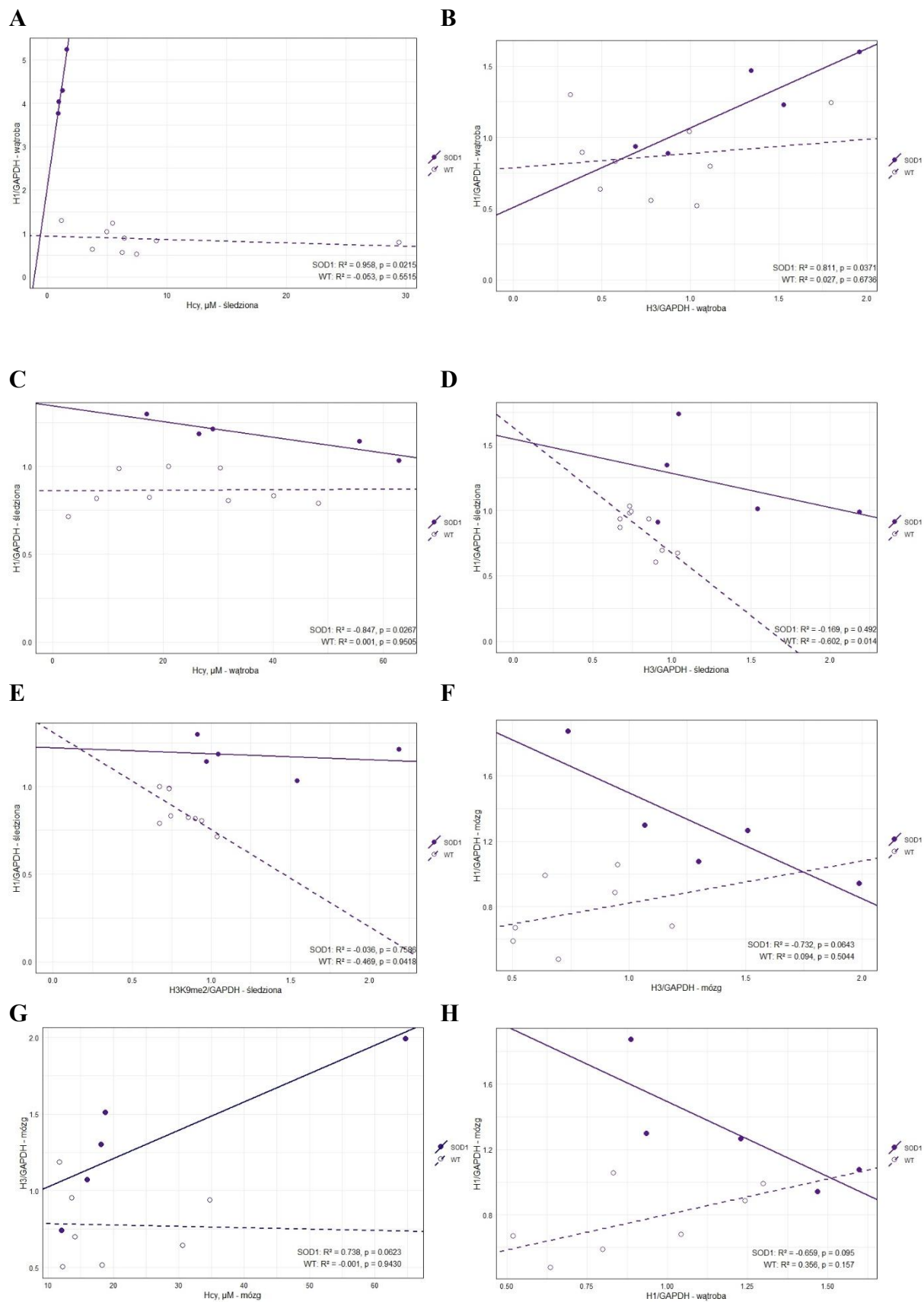
Wykonano analizy frakcji cytoplazmatycznych wyizolowanych z mózgu, wątroby i śledziony. Ocenie zostały poddane takie same parametry jak w modelu ApoE KO. Wykazano istotny wzrost poziomu histonu H1, H3 oraz modyfikacji H3K9me2 we wszystkich badanych organach myszy SOD1 w porównaniu z myszami kontrolnymi (Rycina 19). Największy przyrost poziomu H1 zaobserwowano w mózgu (69%, $p=0,0095$). W wątrobie i śledzionie wykazano wzrost H1 kolejno o 50% i 36% (odpowiednio $p=0,0241$, $p=0,0013$) (Rycina 19 A, D). Podobne wzrost zaobserwowano dla H3 w mózgu i wątrobie, kolejno o 70 i 80% (odpowiednio $p=0,0263$, $p=0,0284$) względem myszy kontrolnych. W śledzionie SOD1 wykazano 40% więcej H1 niż w organach myszy WT ($p=0,0243$) (Rycina 19 B-C, F). Wykazano ponad 200% wzrost poziomu modyfikacji H3K9me2 w wątrobie myszy SOD1 ($p=0,0058$), mniejsze różnice zaobserwowano w mózgu i śledzionie, gdzie różnica wynosiła 50% ($p=0,0057$) i 64% ($p=0,0149$) względem myszy kontrolnych. Stężenie tHcy (Rycina 19 E) było istotnie wyższe tylko w wątrobie (94%, $p=0,0388$), natomiast w śledzionie zauważono istotny spadek poziomu tHcy (32%, $p=0,0375$).



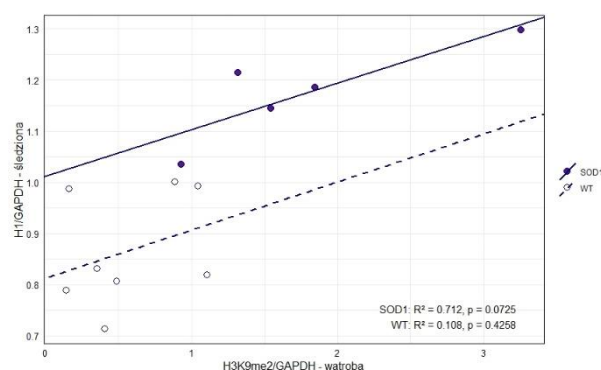
D**E****F****G**

Rycina 19. Nadekspresja ludzkiego SOD1 wpływa na poziom histonów, modyfikacji potranslacyjnych i tHcy w mózgu, wątrobie i śledzionie. Membrany Western Blot: A–mózg; B–wątroba, C–śledziona; D–poziom zewnątrzjądrowego histonu H1; E–stężenie tHcy; F–poziom zewnątrzjądrowego histonu H3; G–poziom modyfikacji H3K9me2; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Analogicznie do poprzednio omawianego modelu przeprowadzono analizę korelacji Pearsona. Zauważono, że myszy SOD1 wykazują silną, pozytywną korelację pomiędzy histonem H1 w wątrobie a tHcy w śledzionie (Rycina 20 A), oraz H1 w śledzionie i tHcy w wątrobie (Rycina 20 C). Wątrobowe H1 i H3 wykazują istotną korelację u myszy SOD1 (Rycina 20 B). W grupie myszy WT zaobserwowano istotną, negatywną korelację pomiędzy H1 a H3 i H3K9me2 w śledzionie (Rycina 20 D-E). Część z parametrów wykazywała wyraźną tendencję z wysokim R^2 . Mózgowy H3 wykazał tendencję do negatywnej zależności względem tHcy ($p = 0,0623$, Rycina 20 G) i pozytywną z H1 w mózgu ($p = 0,0643$, Rycina 20 F). H1 w mózgu wykazał także tendencję do negatywnej korelacji z H1 w wątrobie ($p = 0,095$, Rycina 20 H). Zaobserwowano tendencję do pozytywnej korelacji pomiędzy śledzionowym H1 a H3K9me2 w mózgu ($p = 0,0725$, Rycina 20 J).



I

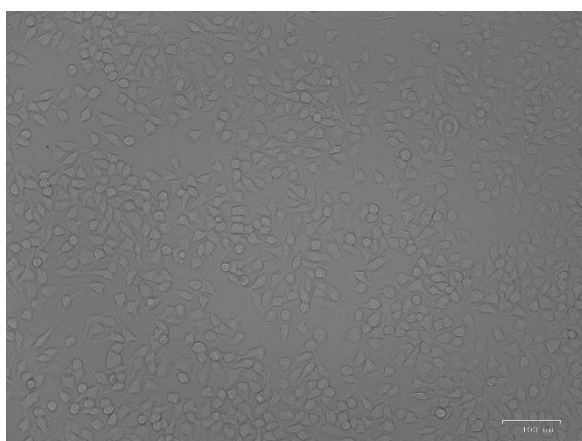


Rycina 20. Wykresy korelacji Pearsona dla SOD1 i WT; A–H1 w wątrobie do Hcy w śledzionie; B–H1 w wątrobie do H3 w wątrobie; C–H1 w śledzionie do Hcy w wątrobie; D–H1 do H3 w śledzionie; E–H1 do H3K9me2 w śledzionie; F–H1 do H3 w mózgu; G–Hcy do H3 w mózgu; H–H1 w mózgu do H1 w wątrobie; I–H1 w śledzionie do H3K9me2 w mózgu.

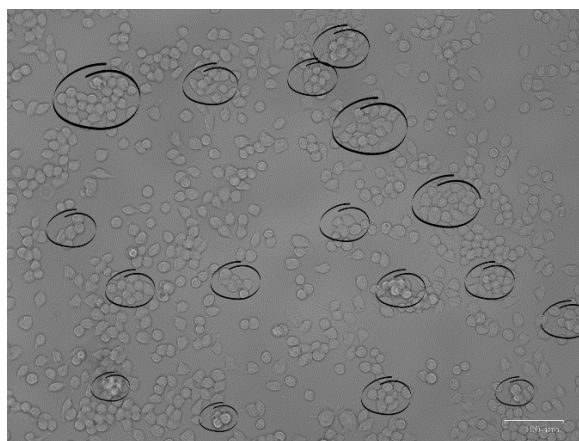
4.3 Analiza modyfikacjach potranslacyjnych w komórkach N2A AD

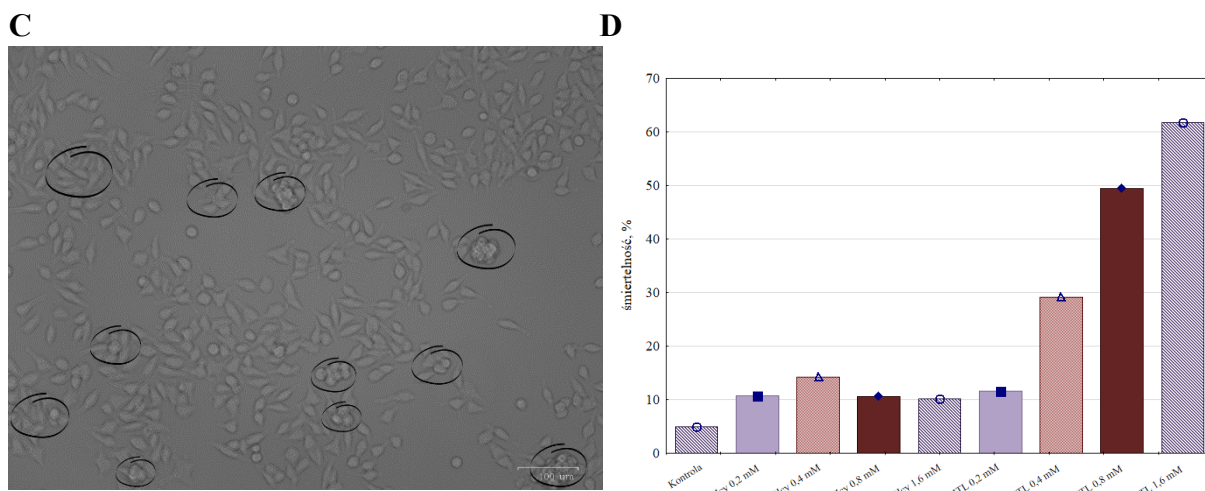
Jak wspomniano we wstępie, w chorobach sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych dochodzi do zmian w znacznikach epigenetycznych, które mogą wpływać na progresję chorób. Jednym z czynników wpływających na zmiany we wzorach PTM jest stres komórkowy (García-Giménez i in., 2021). W celu zidentyfikowania zmian we wzorze PTM histonów spowodowanych stresem homocysteinowym, komórki N2A z mutacją szwedzką (N2A AD), które są komórkowym modelem choroby Alzheimerera, traktowano różnymi stężeniami Hcy i HTL. Podobnie jak w poprzednim model komórkowym, zaobserwowano tworzenie się agregatów komórkowych i zwiększoną śmiertelność komórek N2A AD traktowanych HTL (Rycina 21).

A



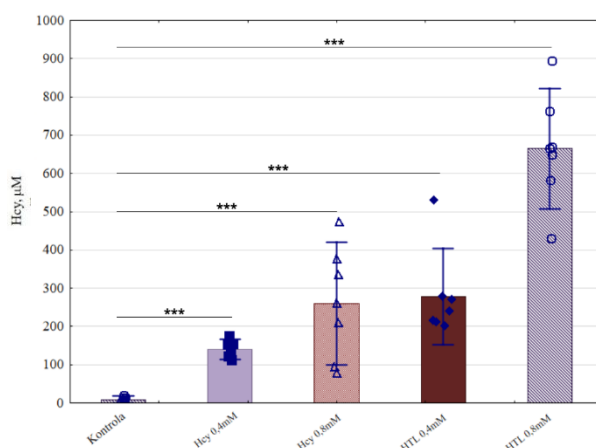
B





Rycina 21. Komórki neuroblastomy N2A AD traktowane homocysteiną i tiolaktonem homocysteiny wykazują zwiększoną śmiertelność i wzrost agregatów komórkowych. Kontrole stanowią komórki nietraktowane. Zdjęcia mikroskopowe A–komórek kontrolnych; B–N2A AD stresowanych 1,6 mM Hcy; C–N2A AD traktowanych 1,6 mM HTL; D–wykres słupkowy śmiertelności.

Poziom tHcy i modyfikacje PTM zostały zmierzony w ekstraktach białkowych, bez rozdzielania na frakcje jądrowe i cytoplazmatyczne. Wykazano istotny wzrost poziomu tHcy we wszystkich testowanych stężeniach Hcy i HTL w porównaniu do hodowli kontrolnych ($p < 0,001$) (Rycina 22).



Rycina 22. Komórki neuroblastomy N2A AD traktowane Hcy i HTL wykazują zwiększony poziom tHcy. Kontrole stanowią komórki nietraktowane. *** $p < 0,001$

Aby sprawdzić zmiany w histonowych PTM wykonano analizy LC-MS/MS. Mając na uwadze wcześniejsze doświadczenia z modyfikacjami histonu komercyjnego, do analizy PTM wykorzystano komórki poddane stresowi przy skrajnych stężeniach homocysteiny i tiolaktonu. Wyniki otrzymane ze spektrometru masowego wykazały, że dochodzi do licznych zmian w histonowych PTM (Tabela 18) co może prowadzić do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu komórek i progresji stanów patofizjologicznych.

Tabela 18. Modyfikacje potranslacyjne histonów komórek N2A AD: ac–acetylacja, b–butyrylacja, p–fosforylacja.

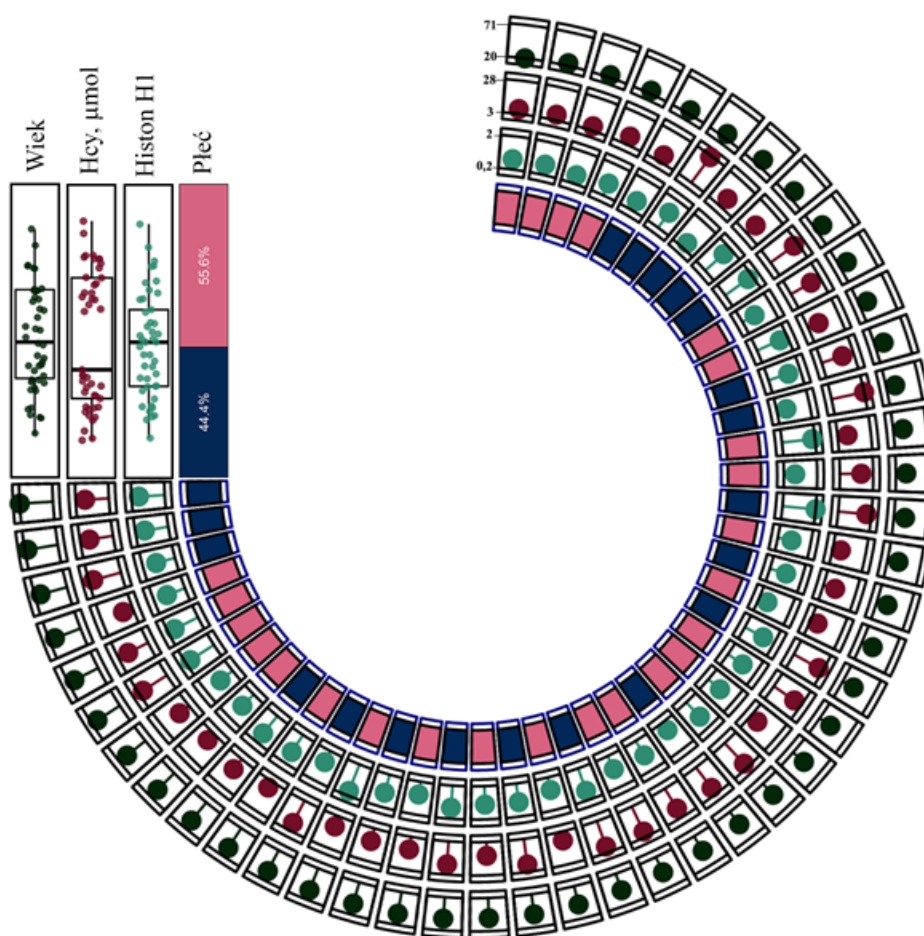
	kontrola	Hcy 0,2 mM	Hcy 2 mM	HTL 0,2 mM	HTL 2 mM
Histon H3					
H3.1K19ac	-	+	+	-	+
H3.1K28ac	-	+	+	-	+
H3.1K123ac	-	+	+	+	+
H3.1K15b	-	+	+	-	+
H3.1K19b	-	+	-	-	+
H3.1K38b	-	+	-	-	+
H3.1K80b	+	-	+	-	+
H3.1K123b	-	-	+	-	+
H3.1S58p	+	+	-	-	+
H3.1S29p		+	-	-	-
H3.1S11p	+	+	-	+	+
H3.1Y55p	-	-	+	-	-
H3.1T119p	-	-	+	-	+
Histon H4					
H4K78ac	+	-	-	+	+
H4K80ac	-	0	+	-	-
H4K9b	+	-	-	+	-
H4K21b	+	+	+	-	-
H4K60b	-	-	-	-	+

	kontrola	Hcy 0,2mM	Hcy 2mM	HTL 0,2 Mm	HTL 2mM
Histon H2A					
H2AJK96ac	+	-	-	-	-
H2A.XK6ac	+	-	-	-	+
H2A.VS10p	+	0	0	+	+
H2A T3 K6ac	+	+	+	-	+
H2A T3 K10ac	-	+	+	-	+
H2A T3 K96ac	+	-	-	-	-
H2A T2 K6ac	+	+	-	+	+
H2AT2 K10ac	-	+	-	+	+
Histon H2B					
H2B T2K86ac	-	+	-	+	+
H2B.U K86ac	-	+	-	+	+
Histon H1					
H1.0 K82ac	-	+	-	-	-
H1.0K85ac	-	+	-	-	-
H1.0 N-TERM	+	-	0	+	+
H1.2 K34ac	-	-	+	0	-
H1.10 S184p	-	-	-	+	+

4.4 Model ludzki

Z uwagi na to, że w modelach *in vitro* jak i *in vivo* potwierdzono hipotezę mówiącą, że podwyższony poziom Hcy związany jest z akumulacją zewnątrzjądrowego H1, istotne stało się sprawdzenie czy podobne zależności mają miejsce w organizmie człowieka, co mogłoby wpływać na progresję chorób. W analizowanych modelach mysich wykazano istotne zmiany w poziomach histonu H1, które towarzyszyły zwiększonym stężeniom homocysteiny w zmutowanych myszach, oraz istotną korelację pomiędzy poziomem tego białka a homocysteiną. W celu sprawdzenia, czy taka sama zależność występuje u ludzi, określono poziom zewnątrzkomórkowego histonu H1 w osoczu pacjentów z żylną chorobą zakrzepowozatorową (VTE). Badaniu poddano materiał pochodzący od osób z poziomem tHcy < 11 μM i > 18 μM .

Rycina 23 oraz Tabela 19 przedstawiają charakterystykę badanej grupy.

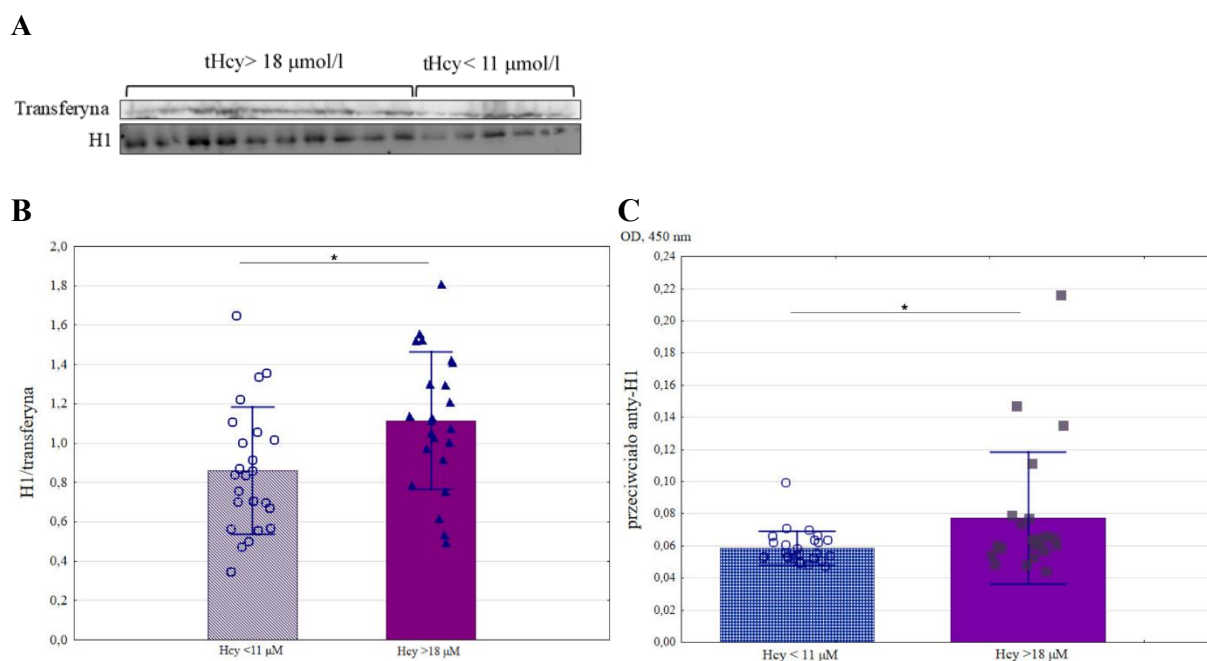


Rycina 23. Charakterystyka pacjentów z VTE.

Tabela 19. Opis grup pacjentów z VTE. Dane dotyczące wieku, płci, Hcy, Cys, CysGly i GSH otrzymano z Katedry Chemii Środowiskowej Uniwersytetu Łódzkiego.

Parametry \ Grupy	Hcy<11μmol/l	Hcy>18μmol/l	Wartość p
Wiek, lata	41±13	46±12	0,20658
Płeć, % (kobiety/ mężczyźni)	74/26	36/64	0,01139
Hcy, μM	7,97±2,11	21,96±2,63	0,00001
Cys, μM	155,2±40,82	217,13±49,37	0,00048
CysGly, μM	26,08±7,65	31,91±6,56	0,01023
GSH, μM	5,11±1,49	6,34±1,70	0,02371
H1/transferyna	0,85±0,32	1,11±0,34	0,01486
Anty-H1 IgG, OD 450	0,06±0,01	0,08±0,04	0,04438

Analiza osocza wykazała 30% wzrost poziomu histonu H1 (Rycina 24 A-B) i 32% przeciwciała anty-H1 (Rycina 24 C) w grupie pacjentów z HHcy w porównaniu do osób z normalnym poziomem tHcy (odpowiednio $p=0,0149$, $p=0,0268$).

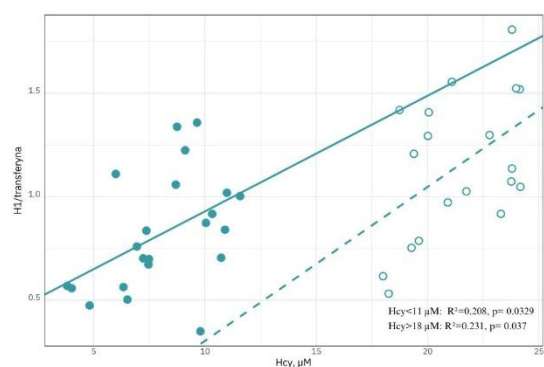


Rycina 24. Podwyższone stężenie homocysteiny u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową wpływa na zmiany w poziomie zewnątrzkomórkowego histonu H1 w osoczu. A–membrana Western Blot; B–wykres poziomu histonu H1; C–wykres poziomu przeciwciał anty-H1; * $p<0,05$.

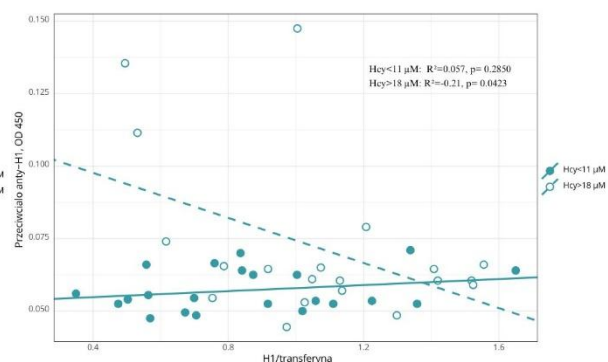
Przeprowadzono analizę korelacji dla wszystkich dostępnych parametrów (Hcy, Cys, CysGly, GSH), która wykazała, że histon H1 w obu grupach jest pozytywnie skorelowany z poziomem

homocysteiny, i negatywnie skorelowany z poziomem Cys w grupie z HHcy (Rycina 25 A, E). Wykazano także, że histon H1 i Hcy w grupie osób z normlanym poziomem Hcy jest pozytywnie skorelowany z wiekiem pacjentów (Rycina 25 B, D) oraz, że histon H1 w grupie z HHcy jest negatywnie skorelowany z poziomem przeciwciał anti-H1 (Rycina 25 B-C).

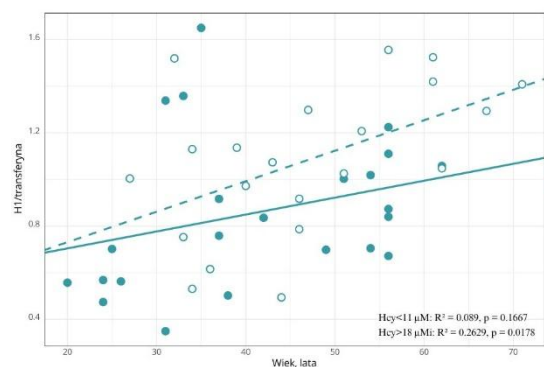
A



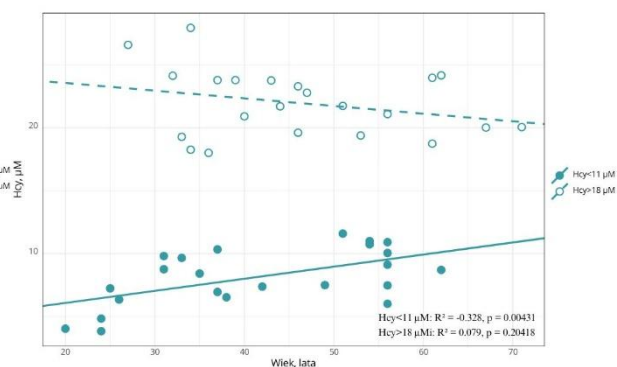
B



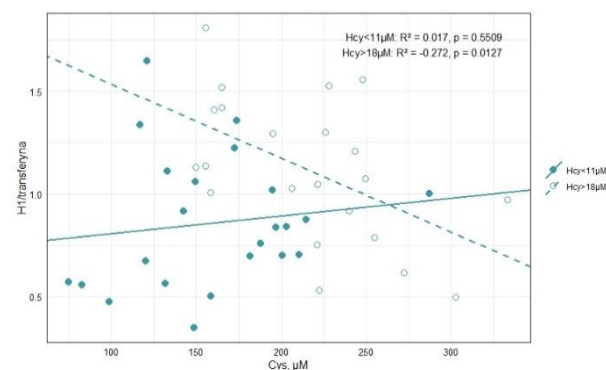
C



D

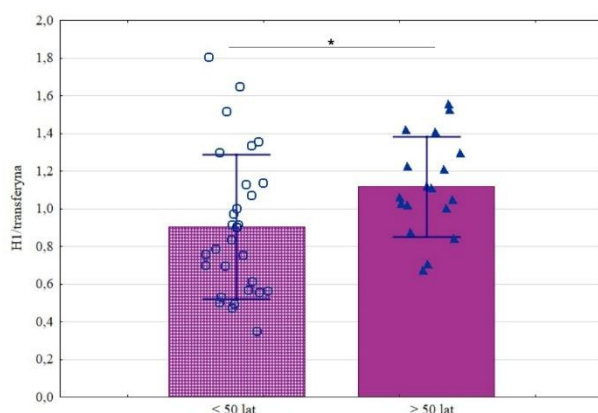


E



Rycina 25. Wykresy korelacji: A–pomiędzy poziomem H1 a Hcy; B–pomiędzy H1 a wiekiem; C–pomiędzy poziomem H1 a przeciwciałem; D–pomiędzy Hcy a wiekiem; E–pomiędzy H1 a Cys.

Poziom H1 był wyższy o prawie 30% w grupie pacjentów powyżej 50 roku życia w porównaniu z osobami młodszymi ($p=0,0166$) (Rycina 26). Obie grupy nie różniły się stężeniem homocysteiny ($p=0,95$).



Rycina 26. Wiek wpływa na zmiany w poziomie zewnątrzkomórkowego histonu H1. Wykres słupkowy pokazuje 28% wzrost H1 w grupie >50 lat.

Przeprowadzono analizę regresji wielorakiej, której celem było znalezienie determinantów poziomu H1 w osoczu pacjentów z VTE. Wykazano, że wiek, stężenie homocysteiny i cysteiny miały istotny wpływ na akumulację H1 (Tabela 20). Wzrost stężenia homocysteiny ($\beta^*=0,5078$), miał nieznacznie większy wpływ na poziom H1 niż wiek ($\beta^*=0,4745$). Cysteina wykazała odwrotny wpływ na ilość H1 ($\beta^*=-0,449$).

Tabela 20. Determinanty zewnątrzkomórkowego histonu H1 w osoczu pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową – regresja wieloraka.

	Poziom zewnątrzkomórkowego histonu H1	
	β^*	Wartość p
Płeć	0,0726	0,6386
Wiek	0,4745	0,0032
Hcy	0,5078	0,0108
Cys	-0,4486	0,0251
CysGly	0,0700	0,6860
GSH	0,0903	0,5703
Przeciwciało anti-H1	0,0551	0,7081
	F=3,5031, p=0,0062, R ² =0,2994	

5. Dyskusja

Wraz z postępem nauki odkryto, że histony, pierwotnie uznawane za białka związane z upakowaniem informacji genetycznej i zlokalizowane w jądrze komórkowym, mogą pełnić również inne funkcje poza jądrem komórkowym. Uwalnianie histonów z komórki może zachodzić zarówno aktywnie, jak i pasywnie, w wyniku uszkodzeń, stresu lub śmierci komórki. Po opuszczeniu nukleosomu histony mogą pełnić funkcje wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniami (DAMP) (X. Li i in., 2022). Histonowe DAMP wchodzi w interakcje z receptorami TLR i fosfolipidami błon komórkowych, prowadząc do uszkodzeń komórek poprzez indukcję uwalniania chemokin, cytokin i aktywację komórek odpornościowych w sąsiadujących komórkach, a także bezpośrednią cytotoksyczność. Działanie układu odpornościowego w dużej mierze opiera się na interakcji receptorów rozpoznających wzorce (PRR) z wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMP) lub DAMP. Pozakomórkowe histony, będące częścią DAMP, aktywują wrodzoną odpowiedź immunologiczną w sposób podobny do PAMP, wspierając dojrzewanie komórek odpornościowych. Histony obecne w przestrzeni międzykomórkowej mogą wiązać się z dwuniciowym DNA (dsDNA) lub białkiem o wysokiej ruchliwości (HMGB1), tworząc kompleksy DAMP, które inicjują i podtrzymują ogólnoustrojową odpowiedź zapalną oraz wywołują toksyczne uszkodzenia (X. Li i in., 2022).

Coraz więcej badań wskazuje, że zewnątrzjądrowe histony są obecne w wielu stanach patofizjologicznych (Żukowska & Perła-Kaján, 2024). Do tej pory jednak nie badano powiązania pomiędzy histonami zewnątrzjądrowymi a homocysteiną. Wykazano, że w ponad 100 stanach chorobowych występuje podwyższone stężenie homocysteiny. W niektórych przypadkach homocysteina służy jako biomarker, a w innych, takich jak choroby sercowo-naczyniowe czy choroby neurodegeneracyjne, może być bezpośrednim czynnikiem ryzyka (Smith & Refsum, 2021). Hcy może powodować uszkodzenia komórek poprzez stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA i aktywację czynników proapoptycznych (Ganguly & Alam, 2015). Zaburzenia w prawidłowej pracy komórek wywołane HHcy mogą prowadzić do aktywacji mechanizmów ochronnych komórki oraz uwolnienia histonów w postaci DAMP.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było stwierdzenie, czy homocysteina wpływa na uwalnianie histonów H1 jako DAMP oraz czy zaburzenia metabolizmu jednostek jednowęglowych, którym towarzyszy podwyższony poziom homocysteiny, zmieniają

modyfikacje potranslacyjne histonów, które mogą zaburzać funkcjonowanie białek i wpływać na rozwój chorób sercowo-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych.

Cel zrealizowano z wykorzystaniem modeli *in vitro*, *in vivo* oraz materiału pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.

5.1 Analiza modelu *in vitro*

Jednym z mechanizmów pozwalających na przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych jest tworzenie agregatów komórka-komórka. Agregacja ta może zachodzić między innymi dzięki interakcji białek powierzchniowych sąsiadujących komórek. Powstałe powiązania pozwalają regulować procesy takie jak apoptoza, migracja, proliferacja czy różnicowanie komórek, co wspiera utrzymanie homeostazy, zwłaszcza w warunkach stresowych (Ma i in., 2022).

Analiza hodowli komórkowej HUVEC wykazała zwiększoną śmiertelność spowodowaną działaniem badanych czynników stresowych, z których największą toksyczność wywołały HTL 2 mM, *N*-Hcy-histon oraz Hcy 2 mM (odpowiednio około 16-, 11-, 7-krotny wzrost śmiertelności). Wcześniejsze badania prowadzone na komórkach HUVEC wykazały, że linie komórkowe traktowane 200 μ M HTL ma 30-krotnie większą toksyczność w porównaniu do hodowli prowadzonej w obecności 200 μ M homocysteiny (Chubarov, 2021).

W niniejszej pracy każdy rodzaj czynnika stresowego, z wyjątkiem HTL 2 mM, powodował zwiększoną agregację komórkową, co może być związane z aktywacją mechanizmów przetrwania. Narażenie na bardzo silny stres może prowadzić do nagłej śmierci komórkowej, bez aktywacji wspomnianych mechanizmów, co może tłumaczyć najmniejszą liczbę agregatów w komórkach poddanych działaniu najwyższego stężenia HTL, które przyczyniło się do około 16-krotnego wzrostu śmiertelności w porównaniu do hodowli w warunkach kontrolnych.

Istnieje wiele mechanizmów toksyczności homocysteiny, a jednym z nich jest wzrost stresu oksydacyjnego (Chubarov, 2021), który może prowadzić do zwiększenia poziomu DAMP. Obecność homocysteiny w medium komórkowym może aktywować mechanizmy odpowiedzi na stres, a długotrwała ekspozycja na niekorzystne warunki powoduje przejście komórek w stan programowanej śmierci. Wykazano, że podczas apoptozy dochodzi do zmniejszenia wielkości komórek, natomiast w nekrozie komórki zwiększają swoją objętość (Fulda i in., 2010). Badania na podwójnych mutantach *Dictyostelium discoideum*, pozbawionych dwóch białek

sieciujących, wykazały zmniejszenie wielkości komórek o 3 μm w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rivero i in., 1996). Podobnie, w badaniach na komórkach HUVEC, zaobserwowano zmniejszenie wielkości komórek w odpowiedzi na stres, co wiązano z aktywacją mechanizmu autofagii, który pomaga komórkom przetrwać w trudnych warunkach, poprzez redukcję ich rozmiaru i degradację uszkodzonych organelli (M. Hu i in., 2024).

W niniejszej pracy wykazano sukcesywne zmniejszanie się rozmiarów żywych komórek linii komórkowej HUVEC w odpowiedzi na stres. Najmniejsze komórki zaobserwowano w hodowli poddanej działaniu HTL 2 mM i *N*-Hcy-histonu, co wskazuje na aktywację mechanizmów obronnych.

Ocena poziomu HTL w medium po hodowli komórek w obecności analizowanych czynników stresowych wykazała jego istotny wzrost w komórkach traktowanych HTL 2 mM, Hcy 2 mM, histonem oraz *N*-Hcy-histonem, przy czym najwyższe stężenie było obserwowane w przypadku stresu wywołanego HTL 2 mM. Poziom HTL w medium był niższy od użytego do hodowli, ze względu na hydrolizę HTL, *N*-homocysteinyłację białek obecnych w medium oraz transport do wnętrza komórki. Dodatkowo zaobserwowano, że stężenie tHcy w medium istotnie wzrosło we wszystkich analizowanych warunkach z wyjątkiem HTL 0,2 mM.

Analiza poziomu H1 w medium komórkowym wykazała istotny wzrost tego histonu w hodowlach komórkowych traktowanych Hcy 0,2 i 2 mM, HTL 0,2 mM, histonem i *N*-Hcy-histonem. Brak wzrostu poziomu H1 w medium hodowli komórkowych traktowanych HTL 2 mM może świadczyć o braku aktywacji wspomnianych mechanizmów obronnych i nagłej śmierci komórkowej, spowodowanej dużym poziomem stresu.

We frakcjach cytoplazmatycznych komórek wzrost poziomu tHcy zaobserwowano tylko w hodowlach poddanych działaniu najwyższego stężenia Hcy i HTL. Badania wykazały również istotny wzrost poziomu histonów H1 i H3 we frakcjach cytoplazmatycznych komórek traktowanych Hcy 2 mM, HTL 2 mM, histonem oraz *N*-Hcy-histonem. Najwyższy poziom H1 zaobserwowano w cytoplazmie komórek hodowanych w obecności Hcy 2 mM, a hodowle traktowane HTL 2 mM i histonem wykazywały podobne poziomy H1. Najniższy, choć istotny poziom cytoplazmatycznego H1, stwierdzono w przypadku komórek hodowanych z dodatkiem *N*-Hcy-histonu. Dla cytoplazmatycznego histonu H3 zaobserwowano odwrotną zależność – największy wzrost odnotowano w cytoplazmie komórek traktowanych HTL 0,2 mM. Stres Hcy 2 mM i histonem wykazały podobne poziomy H3, natomiast najmniejszy, istotny poziom, zaobserwowano w komórkach poddanych działaniu *N*-Hcy-histonu.

Komórki narażone na stres aktywują mechanizmy przetrwania i reorganizują swoje procesy, aby maksymalnie wydłużyć czas przeżycia. Jednym z mechanizmów reorganizacji jest nadekspresja histonu H1, który po transporcie do jądra komórkowego zmienia kondensację chromatyny, wspomagając utrzymanie stabilności genomu (Gurda i in., 2015; Y. Li i in., 2018a). Wysoki poziom H1 w komórce powoduje jego uwalnianie na zewnątrz, gdzie pełni funkcję histonowego DAMP. Tego rodzaju komunikacja komórka-komórka jest uważana za kluczowy sposób interakcji w warunkach stresu (Q. Zhang i in., 2013).

Zmiana organizacji funkcjonowania komórek i/lub całych kolonii komórkowych będzie stanowiła element mechanizmu przetrwania (Ma i in., 2022). Jak wykazano w badaniach, komórki narażone na działanie Hcy (Maler i in., 2003), HTL (Mercié i in., 2000) i zewnątrzkomórkowych histonów wykazują zmniejszoną żywotność spowodowaną aktywacją mechanizmu apoptozy (Beltrán-García i in., 2022). Hodowanie komórek we wspomnianych warunkach powoduje wzrost stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji stanów zapalnych (Beltrán-García i in., 2022; Mercié i in., 2000). Zwiększony poziom histonów w komórce i poza nią jest czynnikiem zaostrzającym stany patologiczne (Pérez-Cremades i in., 2023).

Wyniki niniejszej pracy sugerują, że stres spowodowany traktowaniem opisanymi warunkami powoduje zwiększenie interakcji pomiędzy komórkami i aktywację mechanizmu programowanej śmierci. Zwiększenie ekspresji histonu H1 i jego transport do jądra komórkowego, jest elementem przetrwania, prowadzącym do kondensacji chromatyny, w celu naprawy, powstałych na skutek stresu, uszkodzeń (Ouararhni i in., 2024), z drugiej strony, ich obecność poza jądrem wzmacnia stres oksydacyjny i śmierć komórek.

5.2 Mysie modele chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych

Wyniki otrzymane z doświadczeń prowadzonych na hodowlach *in vitro*, potwierdzające główną hipotezę niniejszej pracy, skłoniły nas do sprawdzenia opisanych założeń w modelach *in vivo*. Do analiz użyto dwóch modeli mysich: ApoE KO i SOD1, które są wykorzystywane w nauce odpowiednio, jako zwierzęce modele chorób sercowo-naczyniowych i choroby Alzheimera oraz stwardnienia zanikowego bocznego. Wykazaliśmy, że w osoczu myszy ApoE KO i SOD1 dochodzi do odpowiednio 30 i 50% wzrostu poziom Hcy w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Mimo, że w obu grupach wykazano istotnie wyższe stężenie homocysteiny, to różniły się one pomiędzy modelami. Zaobserwowano, że u myszy ApoE KO stężenie tHcy jest niemal 5-krotnie wyższe niż w przypadku zwierząt SOD1.

Podwyższony poziom tHcy w osoczu, w chorobach sercowo-naczyniowych został wielokrotnie opisany w literaturze. Wykazaliśmy, że średniego stężenia tHcy u myszy ApoE KO wynosiło około 5 $\mu\text{mol/l}$, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami mówiącymi o średnim stężeniu rzędu 3,5 $\mu\text{mol/l}$ (Handy i in., 2004; Xiaoling i in., 2016).

Zhang i in. wykazali, że poziom Hcy u 4 miesięcznych myszy SOD1 jest 1,8-krotnie wyższe w porównaniu do zwierząt kontrolnych i wynosi średnio 6,34 $\mu\text{mol/l}$ (X. Zhang i in., 2008). W metaanalizie z 2023 roku Hu i Wang wykazali, że stężenie homocysteiny u osób ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS) nie różni się istotnie od grupy kontrolnej (N. Hu & Wang, 2023). Jednakże wzrost Hcy w osoczu pojawia się dopiero po wystąpieniu objawów motorycznych (X. Zhang i in., 2010). W swojej pracy Hu i Wang wskazują, że średnie stężenie Hcy u osób z ALS wynosi 1,56 $\mu\text{mol/l}$ (N. Hu & Wang, 2023). Wyniki otrzymane przez Bame i in. pokazują równie niskie stężenia metioniny i cysteiny u myszy SOD1, co może sugerować zaburzenia w cyklu metioninowym, prowadzące do obniżenia poziomu homocysteiny (Bame i in., 2014).

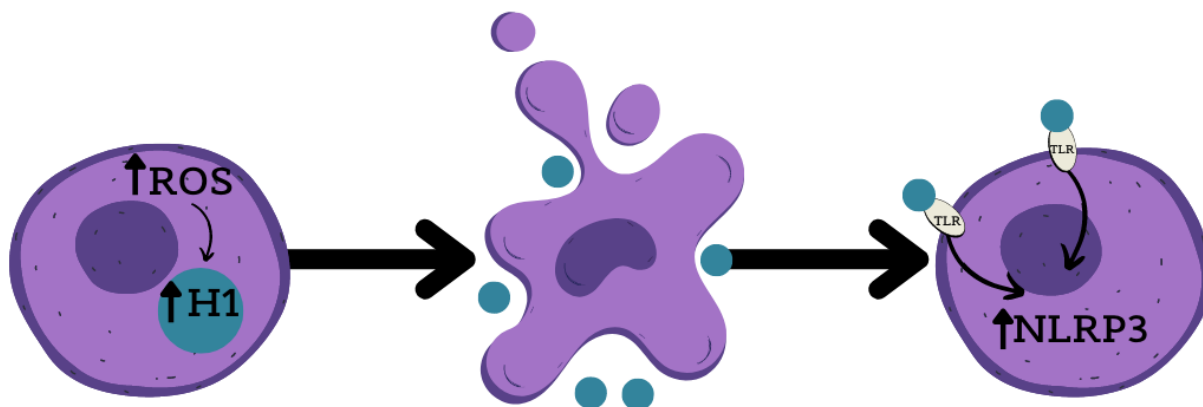
Średnie stężenie tHcy u myszy SOD1, analizowanych w tej pracy, wyniosło około 1,1 $\mu\text{mol/l}$, co jest zgodne z wynikami analizy osocza ludzi uzyskanymi przez Hu i Wang, lecz sprzeczne z danymi otrzymanymi w badaniach myszy SOD1 (X. Zhang i in., 2008). Niezgodność z wynikami z pracy Zhang i in. może być spowodowane różnym wiekiem analizowanych myszy. Autorzy zwracają uwagę, że u myszy przez nich analizowanych, dochodzi do znacznego obumarcia neuronów ruchowych. Nie posiadamy takich samych danych na temat zwierząt przez nas badanych. Zgodnie z pracą Zhang i in. z 2010, poziom Hcy wzrasta wraz z wystąpieniem objawów motorycznych (X. Zhang i in., 2010), więc możemy przypuszczać, że myszy analizowane w niniejszej pracy miały niższy poziom zaawansowania choroby niż zwierzęta opisane przez Zhang.

Wspólną, patologiczną cechą wielu chorób, w tym, neurodegeneracyjnych, jest nieprawidłowa i nadmierna akumulacja białek, z których część może funkcjonować jako alarminy DAMP (Thundiyil & Lim, 2015). W literaturze opisano różne DAMP takie jak HMGB1, HSP czy histony (Murao i in., 2021). Histony zewnątrzkomórkowe mogą wiązać się z receptorami PRR, aktywując odpowiedź immunologiczną, co prowadzi do uszkodzenia narządów i progresji stanów patologicznych. Mając na uwadze doniesienia o toksycznym działaniu histonu łącznikowego, postanowiliśmy zbadać jego nagromadzenie w osoczu opisanych modeli. Wykazaliśmy, że poziom zewnątrzkomórkowego histonu H1 jest istotnie wyższy w osoczu

myszy ApoE KO i SOD1, odpowiednio o 70 i 180%, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi.

Jak zostało wspomniane, zwiększone poziomy histonu H1 wykazują toksyczne działanie na komórki. W celu sprawdzenia, czy akumulacja H1 przyczynia się do wywołania odpowiedzi immunologicznej i produkcji specyficznych przeciwciał, wykonano analizę poziomu anty-H1 IgG w osoczu myszy. Według mojego stanu wiedzy, podobne analizy nie były wcześniej wykonywane. W niniejszej pracy wykazano znaczący wzrost poziomu IgG ukierunkowanych na H1 u ApoE KO i SOD1, odpowiednio o 215 i 30% w porównaniu do myszy kontrolnych, co potwierdza hipotezę, że zewnątrzkomórkowy H1 ma właściwości antygenowe.

Zwiększone stężenie Hcy powoduje wzrost stresu oksydacyjnego i śmierć komórek, (Škovierová i in., 2016), co może prowadzić do zwiększenia ilości DAMP w osoczu (Murao i in., 2021). Zewnątrzkomórkowe histony działające jako DAMP aktywują receptory TLR, co przyczynia się do wzrostu ich toksyczności i stanu zapalnego. Jednym z mechanizmów toksyczności jest ekspresja inflamasomu NLPR3 i interleukin prozapalnych IL-1 β poprzez szlak zależny od TLR9 (Y. Li i in., 2024). Aktywacja TLR9 prowadzi do uwolnienia reaktywnych form tlenu, które aktywują NLPR3, kaspazę 1 oraz powodują dalszą rekrutację komórek odpornościowych (Rycina 28). Ponadto zewnątrzkomórkowe histony indukują uszkodzenia komórek śródbłónka i nabłonka poprzez agregację płytek krwi (X. Li i in., 2022). Histony zewnątrzkomórkowe promują piroptozę makrofagów przełykaczy przez szlak zależny od NLRP3, co prowadzi do nasilenia stanu zapalnego w płucach (Jiang i in., 2021). W badaniach na myszach ApoE KO z dietetyczną hiperhomocysteinemią wykazano wzrost poziomu NLRP3, który był związany z nasileniem stanu zapalnego i progresją miażdżycy (Wang i in., 2017). Choć nie określono dokładnego mechanizmu aktywacji inflamasomu w warunkach HHcy, sugeruje się, że zwiększony poziom histonowych DAMP może być zaangażowany w ten proces.



Rycina 27. Uproszczony schemat aktywacji inflamasomu NLRP3 przez DAMP (kolor turkusowy).

W związku z istotnym wzrostem poziomów H1 i tHcy w osoczu analizowanych modeli mysich, przeprowadziliśmy analizę korelacji Pearsona, która wykazała istotną statystycznie pozytywną korelację pomiędzy tHcy a histonem H1 w modelu myszy ApoE KO. Co więcej, analiza regresji wielorakiej wykazała, że homocysteina jest determinantą poziomu H1. Odwrotna sytuacja ma miejsce w modelu SOD1, gdzie wykazano istotną statystycznie negatywną korelację pomiędzy tHcy a H1. W swojej pracy Zhi-Peng You zwrócił uwagę, że dysmutaza ponadtlenkowa wpływa negatywnie na poziom homocysteiny (You i in., 2018), co może wyjaśniać relację pomiędzy histonem a Hcy w tym modelu. Zwiększony poziom H1 w osoczu może być następstwem aktywacji układu odpornościowego obserwowanego w stwardnieniu zanikowym bocznym, niezależnie od stężenia tHcy (Zhao i in., 2013).

Coraz częstszym przedmiotem badań naukowców są tak zwane osie organ-organ, które mają odpowiadać za komunikację wewnątrz organizmu. Dane literaturowe wskazują, że przy ostrym uszkodzeniu mózgu wywołanym udarem dochodzi do zmian w obwodowej odpowiedzi immunologicznej. Liesz i in. wykazali, że podczas udaru niedokrwinnego białka DAMP zostają uwolnione do przestrzeni międzykomórkowej, co prowadzi do wydzielania cytokin i proliferacji śledzionowych komórek supresorowych, które działają hamująco na odpowiedź immunologiczną. Autorzy sugerują, że cząsteczki DAMP mogą odgrywać kluczową rolę w mechanizmie komunikacji między mózgiem a układem odpornościowym (Liesz i in., 2015). Inne badania potwierdziły, że DAMP uwalniane z uszkodzonego mózgu aktywują ekspresję inflamasomu NLRP3 i interleukiny 1 β , co prowadzi do nasilenia stanu zapalnego (Savage i in., 2012).

Biorąc pod uwagę powyższe dane istotne stało się sprawdzenie, czy w mysich modelach chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych dochodzi do wzrostu poziomów histonów

zewnątrzjądrowych i tHcy. Do badań użyto frakcji cytoplazmatycznych wyizolowanych z mózgu, śledziony i wątroby zwierząt modelowych, w których zmierzaliśmy, tak samo jak w osoczu, poziom tHcy i H1. Najczęściej analizowanym histonem w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, jest histon H3, dlatego zdecydowaliśmy się na dodanie tego białka oraz jego modyfikacji H3K9me2 do analiz.

Przeprowadzone analizy wykazały istotny wzrost poziomu zewnątrzjądrowego histonu H1 i H3 w mózgach myszy ApoE KO i SOD1. Co ciekawe, w obu modelach nie zaobserwowano istotnego wzrostu stężenia tHcy w tym organie. Ponadto stwierdzono, że w mózgach zwierząt ApoE KO dochodzi do spadku poziomu modyfikacji potranslacyjnej H3K9me2 w porównaniu do grupy kontrolnej, w przeciwieństwie do myszy SOD1, gdzie odnotowano jej znaczący wzrost.

H3K9me2 jest epigenetycznym markerem związanym z represją transkrypcji (Bennett i in., 2019a). Santana i in. wykazali, że w mózgach osób z chorobą Alzheimera poziom H3K9me2 ulega wzrostowi (Santana i in., 2023). Odwrotna sytuacja ma miejsce w chorobach sercowo-naczyniowych, gdzie spadek poziomu tej modyfikacji został powiązany ze zwiększonym ryzykiem miażdżycy (Harman i in., 2019). Badania wskazują na wzrost poziomu H3K9me2 w mózgach osób z chorobą Alzheimera (Rycina 3), Huntingтона, Parkinsona oraz ataksją Friedreicha (Basavarajappa & Subbanna, 2021), jednak nie badano jeszcze tej modyfikacji w kontekście ALS. Nasze badania wnoszą nowe informacje o zmianach epigenetycznych w chorobach neurodegeneracyjnych.

Analiza frakcji cytoplazmatycznej wątroby i śledziony wykazała istotny wzrost poziomów H1 i H3K9me2 w obu modelach mysich w odniesieniu do grupy kontrolnej. Poziom histonu H3 był istotnie wyższy w śledzionie zwierząt ApoE KO i SOD1, natomiast wątrobowy H3 wzrósł tylko u myszy SOD1 w porównaniu do osobników kontrolnych. Mimo że poziom tHcy w osoczu myszy ApoE KO był znacznie wyższy niż u zwierząt SOD1, w organach zaobserwowano odwrotną tendencję. W wątrobach obu modeli stwierdzono istotnie wyższy poziom tHcy w porównaniu do grup kontrolnych. W organach modelu ApoE KO wynosiło on średnio 1 pmol Hcy/mg białka, natomiast u SOD1 było to aż 33 pmol Hcy/mg białka. Uzyskane stężenie tHcy w śledzionie obu modeli było podobne, ale tendencja odwrotna – u myszy SOD1 wykazano istotny spadek poziomu homocysteiny w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Brakuje danych literaturowych na temat obecności opisywanych parametrów w wątrobie i śledzionie wskazanych modeli, w związku z czym, otrzymane przez nas wyniki dostarczają

nowych informacji na temat potencjalnej osi komunikacyjnej w chorobach neurodegeneracyjnych.

Oś mózg-wątroba-jelito to złożona sieć komunikacyjna, która łączy ośrodkowy układ nerwowy, wątrobę i jelita. Jednym z kluczowych aspektów tej osi jest wpływ na modulację aktywności komórek odpornościowych. Zarówno wątroba, jak i przewód pokarmowy mają istotny wpływ na funkcje poznawcze i zdrowie psychiczne poprzez regulację wrodzonej odporności i składu mikrobiomu jelitowego (Giuffrè & Moretti, 2023). Wątroba odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy składników odżywczych i energetycznych, a rozwój patologii wątrobowych często wiąże się z uwalnianiem związków, które mogą przyczyniać się do progresji chorób. Astrocyty są głównymi komórkami zaangażowanymi w syntezę glutaminy, której nadmiar prowadzi do neurochemicznej kaskady zdarzeń, zwiększając produkcję amoniaku w wątrobie, skutkującej rozwojem encefalopatii wątrobowej (HE) (Vegas-Suárez i in., 2022). Nagromadzenie amoniaku generuje wolne rodniki, które promują modyfikacje potranslacyjne niektórych białek w mózgu. Komórki mikrogleju i astroglejaka wykazują zwiększoną fagocytozę i endocytozę pod wpływem podwyższonego poziomu amoniaku, co powoduje zmiany w poziomie cytokin i hydrolaz lizosomalnych, sprzyjając rozwojowi neuropatologii, w tym HE. Neurozapalenie, często towarzyszące niewydolności wątroby, prowadzi do reaktywności mikrogleju, zwiększonej syntezy cytokin prozapalnych, rekrutacji monocytów i zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg. Istnieje również silna zależność między wątrobą a jelitami, która została opisana w licznych badaniach. Badacze powiązali słabe funkcje poznawcze i endotoksemię u pacjentów z chorobami wątroby, u których wcześniej rozwinęła się HE (Vegas-Suárez i in., 2022). Badania pokazują, że rozwój choroby Alzheimera może być związany z zaburzoną równowagą między produkcją a eliminacją amyloidu beta. Najnowsze prace naukowe koncentrują się na roli układu obwodowego, zwłaszcza wątroby, w usuwaniu A β . Zaburzenia w metabolizmie A β w narządach obwodowych, szczególnie w wątrobie, mogą przyczyniać się do progresji choroby Alzheimera. Ponadto zaburzenia wątrobowej regulacji glukozy mogą wywoływać hiperglikemię i zaburzać metabolizm glukozy w mózgu (Z. Huang i in., 2022). Zaburzenia osi mózg-jelita mogą znacząco przyczyniać się do patogenezы chorób neurodegeneracyjnych. Wykazano, że zmiany w składzie mikrobioty jelitowej mogą zwiększać przepuszczalność bariery jelitowej i aktywować odpowiedź immunologiczną, prowadząc do stanu zapalnego. Ten z kolei może osłabić barierę krew-mózg, sprzyjając neurozapaleniu, uszkodzeniu neuronów i ostatecznie neurodegeneracji (Kowalski & Mulak, 2019).

W pracy wykazano, że u myszy ApoE KO istnieje silna korelacja pomiędzy histonem H1 w mózgu a H3K9me2 w mózgu oraz wszystkimi, zmierzonymi parametrami wątrobowymi. Z kolei wątrobowy H1 pozytywnie koreluje z mózgowym H3K9me2. Wykazane korelacje pomiędzy mózgiem a wątrobą mogą wskazywać na komunikację w osi mózg-wątroba w modelu ApoE KO. Zaobserwowaliśmy także korelację pomiędzy tHcy w śledzionie a modyfikacją H3K9me2 w tym organie oraz tHcy w śledzionie i H1 w mózgu, co może wskazywać, że podwyższony poziom Hcy w jednym organie może być powiązany ze wzrostem poziomu H1 w innym organie. Opisana korelacja może wskazywać na komunikację w obrębie osi mózg-śledziona w modelu ApoE KO.

Nieco inna sytuacja miała miejsce u zwierząt SOD1. Wyniki uzyskane w pracy pokazują, że główną drogą komunikacyjną myszy SOD1 może być oś wątroba-śledziona. Świadczą o tym korelacje pomiędzy H1 jednego organu a Hcy drugiego. Śledzionowy H1 korelował pozytywnie także z H3K9me2 w wątrobie. Z kolei w mózgu zwierząt SOD1 zauważono negatywną zależność pomiędzy poziomem H1 a H3 i pozytywną między tHcy a H3 omawianego organu. Na podstawie tych danych można sugerować, że aktywny układ odpornościowy w stwardnieniu zanikowym bocznym przyczynia się do zmian w obrębie homocysteiny i zewnątrzjądrowych histonów.

W badaniach nad komunikacją pomiędzy mózgiem a śledzioną wykazano, że podczas udaru niedokrwiennego dochodzi do tymczasowego, odwracalnego zmniejszenia masy śledziony, przy jednoczesnym zwiększeniu liczby limfocytów w osoczu (Chiu i in., 2016). Zmiany w śledzionie oraz wywołany w niej stres oksydacyjny mogą powodować deregulację markerów epigenetycznych (M. Huang i in., 2022). Choć stwardnienie zanikowe boczne jest chorobą neurodegeneracyjną, w jej wczesnej fazie dochodzi do aktywacji odpowiedzi immunologicznej, której celem jest ratowanie obumierających neuronów ruchowych. Wraz z postępem choroby odpowiedź immunologiczna staje się szkodliwa i przyspiesza jej rozwój (Zhao i in., 2013). Thonhoff sugeruje, że w ALS występuje ogólnoustrojowy stan zapalny, obejmujący wrodzony układ odpornościowy. Monocyty obecne we krwi obwodowej pacjentów z ALS wykazują fenotyp prozapalny, bardziej nasilony u osób, u których choroba postępuje szybko. Komórki mieloidalne mogą migrować do śledziony, węzłów chłonnych, a nawet do ośrodkowego układu nerwowego (Thonhoff i in., 2018). Badania na myszach SOD1 wykazały, że w ALS dochodzi do aktywacji limfocytów NK w rdzeniu kręgowym, śledzionie i wątrobie, co opóźnia rozwój choroby (Liu & Wang, 2017).

Wyniki uzyskanych w ramach tej pracy badań wskazują na aktywną komunikację w obrębie osi organ-organ w obu mysich modelach. Różne osie biorące udział w komunikacji wynikają ze specyfiki badanych modeli. Potrzeba jednak dalszych badań, aby lepiej zrozumieć mechanizmy interakcji między narządami w chorobach neurodegeneracyjnych i sercowo-naczyniowych.

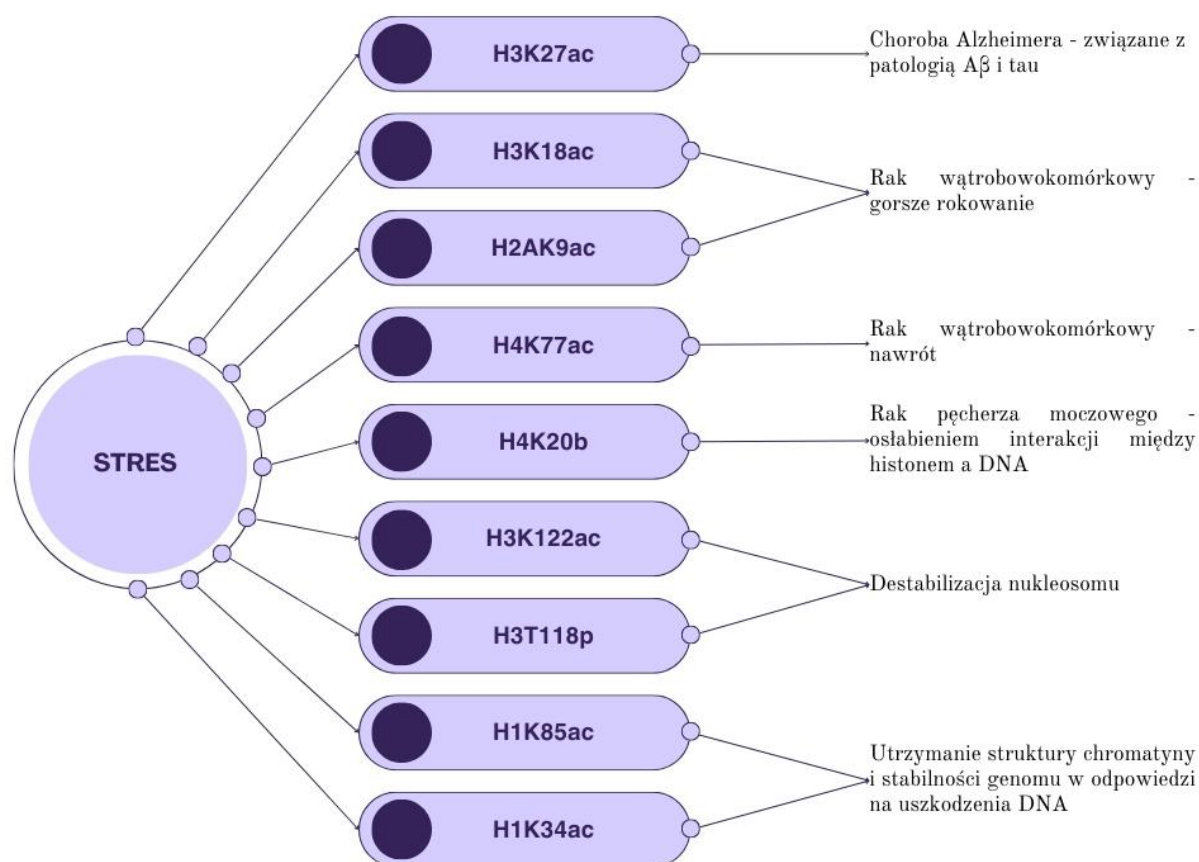
5.3 Zmiany w modyfikacjach potranslacyjnych

Modyfikacje potranslacyjne to kowalencyjne zmiany w białkach, które wpływają na ich właściwości poprzez proteolityczne rozszczepienie lub dodanie grup modyfikujących. PTM odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych, znacząco wpływając na strukturę, dynamikę i funkcje białek. Zaburzenia kanonicznych PTM zostały powiązane z wieloma chorobami, w tym z chorobami sercowo-naczyniowymi i neurodegeneracyjnymi (Ramazi & Zahiri, 2021). Biorąc pod uwagę wcześniej opisane wyniki uzyskane z hodowli *in vitro* i modeli *in vivo* chcieliśmy sprawdzić, czy stres wywołany Hcy i/lub HTL wpływa na zmiany w PTM histonów. W tym celu wykorzystaliśmy linię komórkową mysiej neuroblastomy N2A z mutacją szwedzką, będącą powszechnie używanym komórkowym modelem choroby Alzheimera.

Komórki N2A AD hodowane w obecności Hcy i HTL, wykazywały podobne zależności, jak wcześniej obserwowane w modelu komórkowym HUVEC. Zaobserwowaliśmy wzrost agregacji komórek, a stres wywołany HTL powodował zmiany w ich morfologii, związane ze zwiększoną śmiertelnością. Stwierdziliśmy wyższą śmiertelność komórek pod wpływem HTL niż Hcy, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań. W celu analizy zmian w PTM histonów wykorzystano ekstrakty białkowe bez podziału na frakcje cytoplazmatyczne i jądrowe. Pierwszym etapem analizy było sprawdzenie zmian w stężeniu tHcy komórek hodowanych w warunkach stresowych. Wykazaliśmy, że stężenie tHcy komórek traktowanych Hcy i HTL było istotnie wyższe w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. Analiza LC-MS/MS wykazała liczne zmiany w PTM histonów komórek traktowanych Hcy i HTL. W odniesieniu do grupy kontrolnej stwierdzono zmiany w następujących PTM histonów:

- H3: K19ac, K28ac, K123ac, K15b, K80b, T119p;
- H4: K78ac, K21b, K60b;
- H2A: K10ac;
- H2B: K86ac;
- H1: K34ac, S184p.

Niektóre z tych modyfikacji mają znane funkcje, natomiast inne wciąż pozostają niezbadane (Rycina 28), na przykład, acetylacja H3K27 była związana z genami odpowiedzialnymi za patologię A β i białka tau w chorobie Alzheimera, a także z genami *CRI*, *GPR22*, *KMO*, *PIM3*, *PSEN1* i *RGCC* (Marzi i in., 2018). W raku wątrobowokomórkowym wysokie poziomy H3K18ac, H3K77ac i H2AK9ac były związane z gorszym rokowaniem, a H4K77ac korelował z nawrotami choroby (Chai i in., 2021; S. P. Li i in., 2021). W nowotworze pęcherza moczowego H4K20b osłabiało interakcję między histonem a DNA, co wpływało na stabilność chromatyny (Xue i in., 2023). Niektóre modyfikacje histonów mogą wpływać na stabilność nukleosomów i strukturę chromatyny. Acetylacja lizyny 122 na histonie H3 destabilizuje nukleosomy, wpływając na ich funkcjonowanie (Pradeepa, 2017), a wzrost poziomu fosforylacji H3T118 osłabia interakcje między DNA a rdzeniem histonowym, zmieniając strukturę nukleosomu (Schmitz i in., 2020). Histon łącznikowy H1 odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu struktury chromatyny i stabilności genomu. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, H1K85 ulega dynamicznej acetylacji, jednak dane sugerują, że H1K85ac może nie być bezpośrednio zaangażowany w regulację transkrypcji, w przeciwieństwie do H1K34ac (Y. Li i in., 2018b).



Rycina 28. Schemat przedstawiający histonowe PTM i ich funkcje.

Badania wykazały, że stres komórkowy wywołany Hcy i HTL powoduje liczne zmiany w PTM histonów, z których część (H3K27ac, H3K18ac, H2AK9ab, H4K77ac i H4K20b), według danych literaturowych, jest powiązana z chorobami neurodegeneracyjnymi oraz nowotworowymi, co jednoznacznie wskazuje na epigenetyczną deregulację ekspresji genów w HHcy.

5.4 Analiza materiału pacjentów z VTE

Wyniki otrzymane z modeli *in vitro* i *in vivo*, które potwierdzają postawioną przez nas hipotezę, mówiącą, że homocysteina wpływa na uwalnianie histonów H1, skłoniły nas do przeanalizowania założeń na materiale pochodzącym od człowieka. Wykorzystano próbki pobrane od pacjentów kardiologicznych z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową, u których stężenie Hcy w osoczu wynosiło $<11 \mu\text{M}$ i $>18 \mu\text{M}$. Oprócz danych na temat poziomu Hcy otrzymaliśmy wyniki analizy stężeń Cys, CysGly i GSH, a także informacje na temat wieku i płci pacjentów.

Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa jest chorobą wieloczynnikową, w której patogenezie biorą udział czynniki dziedziczne i nabyte oraz ich wzajemne oddziaływanie. Jednym z ważnych czynników ryzyka jest trombofilia, definiowana jako skłonność do tworzenia zakrzepów w żyłach lub tętnicach. Termin ten jest częściej używany w powiązaniu z zakrzepicą żylną. HHcy jest uważana za jedno z czynników ryzyka zaburzeń krzepnięcia. Istnieje jednak wiele rozbieżności dotyczących poziomu homocysteiny i znaczenia potencjalnego leczenia hiperhomocysteinemii u pacjentów z VTE (Hirmerová, 2013). Brak wystarczających danych na temat powiązania HHcy z VTE oraz dowodów dotyczących pozytywnego wpływu terapii obniżającej poziom Hcy w profilaktyce choroby, skutkują brakiem jasnych wytycznych dotyczących leczenia HHcy u pacjentów. American College of Chest Physicians (ACCP) od 2004 roku kilkakrotnie dodawała i usuwała HHcy z listy czynników ryzyka i/lub czynników nawrotu VTE (Hirmerová, 2013). Badanie z 2024 wykazało istotny związek między HHcy a VTE. Rozpowszechnienie HHcy u pacjentów z VTE wynosiło 61,7% natomiast w grupie kontrolnej jedynie 4% (Ben Salah i in., 2024), co było zgodne z badaniami prowadzonymi w Turcji, gdzie częstość występowania HHcy u pacjentów z VTE wynosiła 63% w porównaniu z 27% w grupie kontrolnej (Köktürk i in., 2011). Z kolei analizy prowadzone w Holandii na grupie ponad 3415 osób, z których 49% stanowiły osoby z VTE, nie wykazały korelacji pomiędzy Hcy a ryzykiem wystąpienia choroby. Zważając na fakt wieloczynnikowości

choroby i powodów dla których może dojść do zwiększenia się poziomu Hcy w organizmie, ciężko jest jednoznacznie interpretować przedstawione wyniki. Aktualny stan wiedzy wskazuje, że nie ma istotnego związku pomiędzy mutacjami w genie MTHFR a wystąpieniem choroby, oraz że HHcy nie jest czynnikiem ryzyka nawrotu choroby (Ben Salah i in., 2024).

Kolejnym aspektem badań w odniesieniu do żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej jest analiza zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych. Neutrofile są tradycyjnie definiowane jako kluczowe komórki odporności wrodzonej, w której rozpoznanie patogenów za pomocą receptorów TLR, NOD (ang. *Nucleotide Oligomerization Domain*) i CLEC (receptory typu lektynowego) inicjuje szybkie reakcje immunologiczne, takie jak fagocytoza, degranulacja oraz tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET). Neutrofile pełnią kluczową rolę w odpowiedziach zapalnych i immunologicznych w zakrzepicy żyłnej, częściowo poprzez uwalnianie NET, czyli lepkich struktur przypominających sieć, złożonych z zdekoncentrowanej chromatyny połączonej z białkami cytoplazmatycznymi i ziarnistościami. Białka pochodzenia neutrofilowego, w tym histony, cytokiny, alarminy, defensyny, proteazy i mieloperoksydaza, wykazują między innymi działanie przeciwbakteryjne. Deregulacja NET przyczynia się do powstawania stanu zapalnego, odpowiedzi autoimmunologicznej oraz zakrzepicy tętniczej i żyłnej. NET są także opisywane w innych komórkach, takich jak monocyty, eozynofile i bazofile, jednak neutrofile uważa się za główne komórki tworzące NET w zakrzepicy żyłnej. NET aktywują krzepnięcie i ograniczają fibrynolizę przez tPA. Struktura chromatyny NET umożliwia polimeryzację fibryny, wiązanie VWF, adhezję płytek krwi i zatrzymywanie erytrocytów. Składniki NET, takie jak histony, nukleosomy, mieloperoksydaza i proteazy serynowe, również przyczyniają się do zakrzepicy przez prezentację czynników krzepnięcia (np. TF, FXII, FXI, trombiny) oraz degradację naturalnych antykoagulantów. Różnorodne bodźce, w tym autoprzeciwciała, cytokiny, aktywowane płytki krwi oraz obecność bakterii, grzybów i wirusów, mogą inicjować kaskady sygnalizacyjne prowadzące do produkcji NET w sposób zależny od środowiska i bodźca. Chociaż mechanizmy kierujące neutrofile do NETozy zamiast innych funkcji nie zostały jeszcze w pełni poznane, coraz lepiej rozumiemy kluczowe etapy ich aktywacji. NEToza to precyzyjnie regulowany proces, który obejmuje aktywację integryn powierzchniowych, receptorów i mechanosensorów. To z kolei prowadzi do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego, generacji reaktywnych form tlenu (ROS), zmian kształtu komórki oraz cytrulinacji białek, w tym histonów, katalizowanej przez enzym PAD4, co odgrywa kluczową rolę w rozluźnianiu struktury chromatyny. Następnie zmiany w cytoszkieletcie powodują demontaż otoczki jądrowej, umożliwiając uwolnienie

zdekonzentrowanej chromatyny do cytoplazmy. W odpowiedzi na stres cytotoksyczny uwalniane są mikrocząsteczki i pęcherzyki z siateczki śródplazmatycznej. Ostatecznie dochodzi do przerwania ciągłości błony plazmatycznej i wydzielenia rozwiniętego DNA do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w postaci NET (Colling i in., 2021).

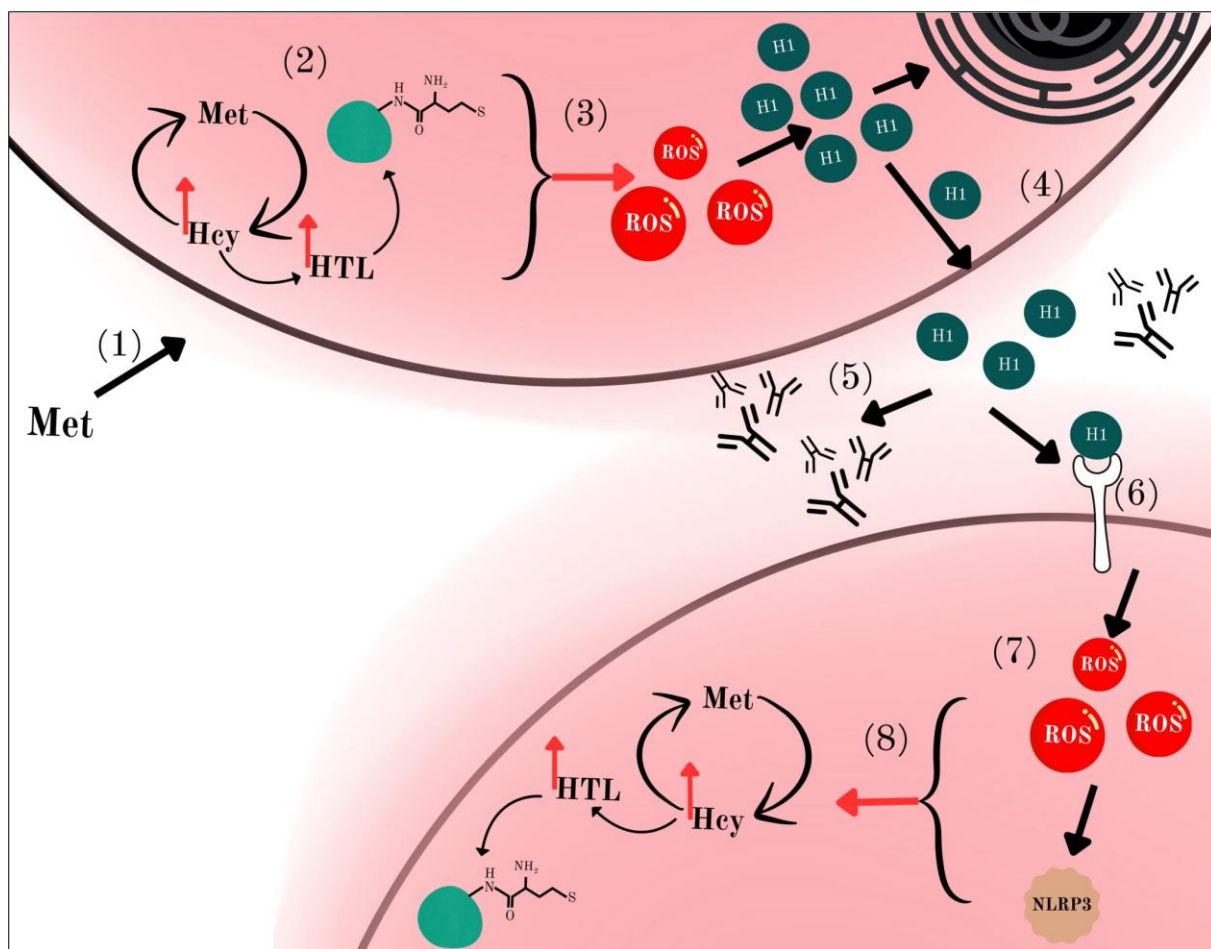
Wykazaliśmy, że u osób z VTE i HHcy dochodzi do istotnego wzrostu poziomu H1 i przeciwciał anti-H1 w osoczu w porównaniu do grupy z normalnym poziomem Hcy, co jest zgodne z przytoczonymi wcześniej informacjami o obecności NET i wzmożonej odpowiedzi autoimmunologicznej u pacjentów z VTE. H1 obecny w osoczu może być jednym z elementów NET. Wykazano istotną statystycznie pozytywną korelację między Hcy a H1 u analizowanych pacjentów. Osoby z HHcy miały podwyższony poziom przeciwciał anti-H1 IgG, który ku zaskoczeniu, był negatywnie skorelowany z histonem H1. Zaobserwowana rozbieżność z danymi uzyskanymi w modelach *in vivo* może wynikać, mimo deklaracji producenta, z niskiej specyficzności użytego przeciwciała względem ludzkich IgG. Uzyskane wyniki pozwoliły również na stwierdzenie, że poziom histonu H1 jest istotnie skorelowany z wiekiem w grupie z HHcy i wykazuje tendencję do pozytywnej korelacji w grupie z normalnym poziomem Hcy. Stężenie tHcy w osoczu osób bez HHcy było pozytywnie skorelowane z wiekiem, w odróżnieniu od pacjentów z HHcy. Jednocześnie stwierdzono negatywną korelację pomiędzy poziomem H1 a stężeniem Cys w grupie z HHcy oraz nie wykazano zależności między H1 a CysGly i GSH. Analiza regresji wielorakiej pozwoliła ustalić, że wiek i stężenie homocysteiny wpływają na zwiększenie się poziomu zewnątrzkomórkowego H1, przy czym większy wpływ ma Hcy. Aby potwierdzić, że wiek jest istotną determinantą dla H1 ponownie podzieliliśmy osocza pacjentów, tym razem ze względu na wiek. W związku z tym, że próbki pochodziły od osób z VTE, poziom Hcy w obu grupach był taki sam ($p=0,95$), lecz poziom H1 był istotnie wyższy w grupie osób starszych, co wskazuje, że wraz z wiekiem dochodzi do zwiększenia się poziomu zewnątrzkomórkowego histonu łącznikowego.

Jest mało doniesień skupiających się na ocenie poziomu przeciwciał specyficznych względem histonów. Jak pokazały badania prowadzone na osobach dotkniętych toczeniem rumieniowym (SLE), osocze pacjentów z SLE wykazywało wyższy poziom przeciwciał anti-H1 w porównaniu do osób zdrowych, co pozwoliło przypisać im roli markera choroby (Schett i in., 2002). Wykazano również, że w SLE przeciwciała anti-H1 przenikają przez barierę krew-mózg, gdzie wiążą się z zewnątrzjądrowymi H1 na powierzchni neuronów. Powstałe kompleksy immunologiczne są neurotoksyczne i mogą prowadzić do rozległej neurodegeneracji (Richards i in., 2023).

5.5 Podsumowanie

Zaburzenia w metabolizmie jednostek jednowęglowych prowadzą do wzrostu stężenia homocysteiny (Virtanen i in., 2006) oraz HTL, który reaguje z resztami lizyny białek, prowadząc do ich *N*-homocysteinylacji (Perła-Kaján i in., 2007). Wzrost stężenia Hcy, HTL i *N*-Hcy-białek skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego, uszkodzeniami DNA (Hermann & Sitdikova, 2021) oraz zaburzeniami integralności błony komórkowej (Zhao i in., 2018), oraz prowadzi do nadekspresji H1 (Gurda i in., 2015). W odpowiedzi na stres, zwiększona ilość H1 migruje do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w kondensacji chromatyny w celu naprawy powstałych uszkodzeń (Li i in., 2018; Ouarrarhni i in., 2024). H1 jest również uwalniany na zewnątrz komórki, gdzie pełni rolę histonowego DAMP (Murao i in., 2021). Obecność H1 w przestrzeni międzykomórkowej powoduje aktywację limfocytów B i produkcję przeciwciał anti-H1 (Serna-Rodríguez i in., 2022). Przeciwciała te mogą tworzyć neurotoksyczne kompleksy z H1 nasilając stan zapalny. Zewnątrzkomórkowe histony H1 mogą wiązać się z receptorami błonowymi, takimi jak TLR, prowadząc do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) i aktywacji mechanizmów odpowiedzialnych za produkcję inflamasomów NLRP3 (Richards i in., 2023). Enzymy metabolizmu jednostek jednowęglowych są wrażliwe na ROS (Chandran & Binniger, 2023; Martínez i in., 2017), co oznacza, że wzrost stresu oksydacyjnego w komórce zaburza ten szlak, prowadząc do zwiększenia stężenia homocysteiny, a tym samym HTL (Martínez i in., 2017). Wzajemne oddziaływanie homocysteiny i H1 napędza progresję stanów zapalnych i chorobowych (Rycina 29).

Nasze wyniki wskazują na istotną zależność pomiędzy homocysteiną a zewnątrzkomórkowymi histonami. Podwyższony poziom homocysteiny może nasilać stany zapalne, prowadząc do uwolnienia histonowych DAMP do cytoplazmy i układu krwionośnego. Warto również zauważyć, że stres wywołany histonem zaburzał metabolizm jednowęglowy, co skutkowało zwiększeniem stężenia HTL i tHcy w medium komórkowym.



Rycina 29. Hipotetyczny schemat zależności pomiędzy Hcy a H1: (1) Zwiększona ilość metioniny, (2) powoduje wzrost stężenia homocysteiny oraz HTL, który modyfikuje białka w procesie *N*-homocysteinylacji. (3) Wzrost stężenia Hcy i HTL powoduje wystąpienie stresu oksydacyjnego. (4) Stres oksydacyjny wpływa na zwiększenie ekspresji H1 z których część jest transportowana do jądra, a część – poza komórkę jako DAMP. (5) Histon H1 indukuje działanie układu odpornościowego powodując wytworzenie przeciwciał anti-H1. (6) H1 łączy się z receptorami TLR 2/4 na powierzchni komórek, co powoduje ich aktywację, (7) wzrost stężenia ROS w komórce i wytworzenie inflamasomu NLRP3. (8) Powstałe związki wpływają na zaburzenie metabolizmu jednostek jednowęglowych, co powoduje zwiększenie stężenia Hcy, HTL i *N*-Hcy-białek.

6. Wnioski

1. Traktowanie komórek Hcy i HTL powoduje aktywację mechanizmów ochronnych komórek powodujących zwiększoną ekspresję histonu H1 i jego transport do jądra komórkowego.
2. W komórkach stresowanych Hcy dochodzi do zwiększenia poziomu histonu H1 w cytoplazmie i medium komórkowym, natomiast traktowanie HTL powoduje zwiększenie H1 tylko w cytoplazmie.
3. Traktowanie komórek histonem i *N*-Hcy-histonem powoduje deregulację metabolizmu jednowęglowego, skutkujące zwiększeniem stężenia tHcy w medium komórkowym.
4. W mysich modelach chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych dochodzi do istotnego wzrostu zewnątrzkomórkowego histonu H1, przeciwciał anti-H1 IgG i tHcy w osoczu w porównaniu z grupami kontrolnymi.
5. U myszy ApoE KO wykazano wzrost stężenia tHcy w wątrobie i śledzionie, a u zwierząt SOD1 doszło do istotnego wzrostu tHcy w wątrobie i spadku w śledzionie w porównaniu z grupami kontrolnymi. Nie wykazano istotnych różnic w poziomie tHcy w mózgu obu modeli.
6. W obu modelach *in vivo* zaobserwowano istotny wzrost poziomu zewnątrzjądrowego H1 i H3 we wszystkich badanych organach, z wyjątkiem wątroby myszy ApoE KO, w której nie wykazano istotnej różnicy w poziomie zewnątrzjądrowego H3 w porównaniu do zwierząt kontrolnych.
7. W mysich modelach chorób neurodegeneracyjnych i sercowo-naczyniowych mogą zachodzić interakcje organ-organ, w których histony zewnątrzjądrowe funkcjonowałyby jako cząsteczki sygnałowe.
8. Zwiększone poziomy Hcy i HTL wpływają na PTM histonów, co może powodować zaburzenia w funkcjonowaniu tych białek.

9. W osoczu pacjentów z VTE i HHcy wykazano zwiększony poziom histonu H1 i anty-H1 IgG w porównaniu do grupy z normlanym poziomem Hcy.
10. Homocysteina i wiek są determinantami podwyższonego poziomu histonu H1 w osoczu osób z VTE.

Wykaz tabel i rycin

Tabela 1. Porównanie podtypów histonów łącznikowych. Tabela pochodzi z publikacji (Żukowska & Perła-Kaján, 2024) za zgodą redakcji.	15
Tabela 2. Miejsca ekspresji wariantów H2B na podstawie Raman i in. 2021a.	18
Tabela 3. Funkcje PTM na podstawie Anderson i Turko, 2015	20
Rycina 1. Metabolizm homocysteiny; ATP – adenozynotrójfosforan, ADP – adenozyndwufosforan, SAM – S-adenozylometionina, SAH – S-adenozylhomocysteina, MAT – adenozylotransferaza metioniny, DNMTs – DNA-metylotransferazy, AHCY – adenozylohomocysteinaza, MTR – syntaza metioninowa, MTRR – reduktaza syntazy metioninowej, BLMH – hydrolaza bleomycyny, BPHL – hydrolaza amidów beta-laktamowych, MRS – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa, CBS – syntaza β -cystationiny, CSE – γ -liaza cystationinowa, GCL – ligaza γ -glutamylcysteinowa, GS – syntetaza glutaminowa, GSH – glutation.....	23
Rycina 2. <i>N</i> -homocysteinyłacja białek.	24
Rycina 3. Zmiany PTM zidentyfikowane w ludzkim mózgu osób z chorobą Alzheimera (Santana i in., 2023).	31
Rycina 4. Schemat badań.	37
Tabela 4. Charakterystyka myszy.	38
Tabela 5. Odczynnik taninowy.	42
Tabela 6. Bufory reakcyjne do próby ninhydrynowej.	42
Tabela 7. Składnik żeli.	43
Tabela 8. Bufory używane do elektroforezy SDS-PAGE.	43
Tabela 9. Bufory do barwienia żeli.	44
Tabela 10. Skład buforów do Western Blottingu.	45
Tabela 11. Bufory reakcyjne.	46
Tabela 12. Bufor fosforanowy 100 mM pH 7,4.	47
Tabela 13. Bufory do ELISA.	48
Tabela 14. Bufor do derywatyzacji	49
Rycina 5. Graficzne przedstawianie wykorzystanych modeli badawczych.	52
Rycina 6. Obraz elektroforetyczny histonu bydlęcego (H5505, Sigma Aldrich). Procentowy udział poszczególnych histonów.	53
Tabela 15. Histony zidentyfikowane w natywnym histonie bydlęcym (H5505, Sigma Aldrich).	53
Rycina 7. <i>N</i> -Homocysteinyłacja histonu komercyjnego. A-C – Widma fragmentacyjne trzech <i>N</i> -Hcy-peptydów zlokalizowanych w histonie H1.1, H1.2, H1.3; D – Schemat zidentyfikowanych wariantów histonu H1 z zaznaczonymi resztami <i>N</i> -Hcy-Lys i pokryciem sekwencji (kolorem szarym oznaczono fragmenty łańcucha białkowego, które nie znalazły się wśród zidentyfikowanych peptydów).	55

Rycina 8. Komórki śródbłonka ludzkiego HUVEC traktowane czynnikami stresującymi wykazują zmiany w żywotności, agregacji oraz wielkości komórek. Zdjęcia mikroskopowe z zaznaczonymi agregatami komórek: A – Kontrola; B – Komórki traktowane Hcy 0,2 mM ; C – Komórki traktowane Hcy 2 mM; D – Komórki traktowane HTL 0,2 mM; E – Komórki traktowane HTL 2 mM; F – Komórki traktowane histonem 100 µg/ml; G – Komórki traktowane N-Hcy-histonem 100 µg/ml. Wykresy słupkowe przedstawiające: H – śmiertelność; I – agregację komórek; J – średnią wielkość żywych komórek.	58
Rycina 9. Sprawdzenie skuteczności metody izolacji białek cytoplazmatycznych. Obraz elektroforezy w 14% żelu w warunkach redukujących w obecności SDS (SDS-PAGE). Wyniki nieopublikowane dr Ewy Bretes.	59
Rycina 10. Traktowanie komórek HUVEC analizowanymi czynnikami stresowymi powoduje zmiany w stężeniu tHcy i HTL. A–Stężenie HTL w medium; B–Stężenie tHcy w medium; C–Stężenie tHcy we frakcji cytoplazmatycznej; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.....	60
Rycina 11. Traktowanie komórek HUVEC analizowanymi czynnikami stresowymi powoduje zmiany w poziomie zewnątrzkomórkowych i zewnątrzjądrowych histonów. A–Membrana Western Blot; B–Membrana Western Blot; C–Poziom H1 we frakcji cytoplazmatycznej; D–Poziom H3 we frakcji cytoplazmatycznej; E–Poziom H1 w medium komórkowym; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.	61
Rycina 12. Traktowanie komórek Hcy, HTL, histonem i N-Hcy-histonem promuje ekspresję histonu H1. Analiza H1 w komórkach ludzkiego śródbłonka HUVEC za pomocą immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej z użyciem przeciwciała anti-H1. Wykresy słupkowe poziomu histonu H1 A–poza jądrem; B–w jądrze. Zdjęcia mikroskopowe preparatów: C–Komórki kontrolne; D–Komórki traktowane Hcy 2 mM ; E–Komórki traktowane HTL 2 mM; F–Komórki traktowane histonem 100 µg/ml; G–komórki traktowane N-Hcy-histonem 100 µg/ml. Komórki HUVEC zostały poddane działaniu wspomnianych czynników stresowych przez 24 h w temperaturze 37 °C. Kontrole stanowiły komórki nietraktowane. Istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną, *p < 0,05.....	64
Rycina 13. <i>Knock-out</i> ApoE wpływa na poziom histonu H1, przeciwciał anti-H1 oraz tHcy w osoczu. Przedstawiono membrany i wykresy słupkowe ilustrujące ilościowe oznaczenie białek i homocysteiny A–membrana Western Blot; B–poziom zewnątrzkomórkowego histonu H1; C–poziom przeciwciał anti-H1; D–poziom tHcy; *p<0,05.....	66
Tabela 16. Determinanty dla zewnątrzkomórkowego histonu H1.	67
Rycina 15. <i>Knock-out</i> ApoE wpływa na poziom histonu H1, przeciwciał anti-H1 oraz tHcy w mózgu, wątrobie i śledzionie. Przedstawiono membrany i wykresy słupkowe ilustrujące ilościowe oznaczenie histonów i homocysteiny. Membrany Western Blot: A–mózg; B–wątroba; C–śledziona; D–poziom zewnątrzjądrowego histonu H1; E–stężenie tHcy; F–poziom zewnątrzjądrowego histonu H3; G poziom modyfikacji H3K9me2; *p<0,05; **p<0,01.	68
Rycina 16. Analiza korelacji Pearsona u myszy ApoE KO i WT: A–H1 do H3K9me2 w mózgu; B–H1 w mózgu do Hcy w wątrobie; C–H1 w mózgu do H1 w wątrobie; D–H1 w mózgu do H3 w wątrobie; E–H1 w	

mózgu do H3K9me2 w wątrobie; F–H1 do H3 w wątrobie; G–H1 w wątrobie do H3K9me2 w mózgu; H–H1 w osoczu do H3K9me2 w wątrobie; I–Hcy do H3K9me2 w mózgu; J–H1 w mózgu do Hcy w śledzionie; K–Hcy w śledzionie do Hcy w mózgu; L–H1 w wątrobie do Hcy w mózgu; M–H1 do Hcy w wątrobie; N–H1 do H3K9me2 w wątrobie; O–H3K9me2 w wątrobie do H3K9me2 w śledzionie.	71
Rycina 17. Nadekspresja ludzkiego SOD1 wpływa na poziom histonu H1, przeciwciała anti-H1 i tHcy. Analiza osocza: A–membrana Western Blot; B–poziom zewnątrzkomórkowego histonu H1; C–poziom przeciwciał anti-H1; D–stężenie tHcy; * $p<0,05$; ** $p<0,01$	72
Rycina 18. Analiza korelacji Pearsona. A– pomiędzy H1 a tHcy; B– pomiędzy H1 a anti-H1.	72
Tabela 17. Wyznaczenie determinanty dla zewnątrzkomórkowego H1.	72
Rycina 19. Nadekspresja ludzkiego SOD1 wpływa na poziom histonów, modyfikacji potranslacyjnych i tHcy w mózgu, wątrobie i śledzionie. Membrany Western Blot: A–mózg; B–wątroba, C–śledziona; D–poziom zewnątrzjądrowego histonu H1; E–stężenie tHcy; F–poziom zewnątrzjądrowego histonu H3; G–poziom modyfikacji H3K9me2; * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,005$	74
Rycina 21. Komórki neuroblastomy N2A AD traktowane homocysteiną i tiolaktonem homocysteiny wykazują zwiększoną śmiertelność i wzrost agregatów komórkowych. Kontrole stanowią komórki nietraktowane. Zdjęcia mikroskopowe A–komórek kontrolnych; B–N2A AD stresowanych 1,6 mM Hcy; C–N2A AD traktowanych 1,6 mM HTL; D–wykres słupkowy śmiertelności.	77
Rycina 22. Komórki neuroblastomy N2A AD traktowane Hcy i HTL wykazują zwiększony poziom tHcy. Kontrole stanowią komórki nietraktowane. *** $p<0,001$	77
Tabela 18. Modyfikacje potranslacyjne histonów komórek N2A AD: ac–acetylacja, b–butyrylacja, p–fosforylacja.	78
Rycina 23. Charakterystyka pacjentów z VTE.	80
Tabela 19. Opis grup pacjentów z VTE. Dane dotyczące wieku, płci, Hcy, Cys, CysGly i GSH otrzymano z Katedry Chemii Środowiskowej Uniwersytetu Łódzkiego.	81
Rycina 24. Podwyższone stężenie homocysteiny u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową wpływa na zmiany w poziomie zewnątrzkomórkowego histonu H1 w osoczu. A–membrana Western Blot; B–wykres poziomu histonu H1; C–wykres poziomu przeciwciał anti-H1; * $p<0,05$	81
Rycina 25. Wykresy korelacji: A–pomiędzy poziomem H1 a Hcy; B–pomiędzy H1 a wiekiem; C–pomiędzy poziomem H1 a przeciwciałem; D–pomiędzy Hcy a wiekiem; E–pomiędzy H1 a Cys.	82
Rycina 26. Wiek wpływa na zmiany w poziomie zewnątrzkomórkowego histonu H1. Wykres słupkowy pokazuje 28% wzrost H1 w grupie >50 lat.	83
Tabela 20. Determinanty zewnątrzkomórkowego histonu H1 w osoczu pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową – regresja wieloraka.	83
Rycina 27. Uproszczony schemat aktywacji inflamasyonu NLRP3 przez DAMP (kolor turkusowy). ...	90
Rycina 28. Schemat przedstawiający histonowe PTM i ich funkcje.	95
Rycina 29. Hipotetyczny schemat zależności pomiędzy Hcy a H1: (1) Zwiększona ilość metioniny, (2) powoduje wzrost stężenia homocysteiny oraz HTL, który modyfikuje białka w procesie N-	

homocysteinyłacji. (3) Wzrost stężenia Hcy i HTL powoduje wystąpienie stresu oksydacyjnego. (4) Stres oksydacyjny wpływa na zwiększenie ekspresji H1 z których część jest transportowana do jądra, a część – poza komórkę jako DAMP. (5) Histon H1 indukuje działanie układu odpornościowego powodując wytworzenie przeciwciał anty-H1. (6) H1 łączy się z receptorami TLR 2/4 na powierzchni komórek, co powoduje ich aktywację, (7) wzrost stężenia ROS w komórce i wytworzenie inflamasomu NLRP3. (8) Powstałe związki wpływają na zaburzenie metabolizmu jednostek jednowęglowych, co powoduje zwiększenie stężenia Hcy, HTL i *N*-Hcy-białek.....100

Bibliografia

Automatyczne aktualizowanie cytowań jest wyłączone. Aby zobaczyć bibliografię, wciśnij
Odśwież w zakładce Zotero.