

mgr Adrianna Żukowska ✉,

dr hab. Joanna Perła-Kaján ✉

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_561](https://doi.org/10.18388/pb.2021_561)

✉ autor korespondujący: [adrianna.zukowska@up.poznan.pl](mailto:adrianna.zukowska@up.poznan.pl), [kajan@up.poznan.pl](mailto:kajan@up.poznan.pl)

**Słowa kluczowe:** histon łącznikowy, acetylacja, metylacja, fosforylacja, nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, biomarker

**Wykaz skrótów:** CSC – nowotworowe komórki macierzyste; CTD – domena C-końcowa; DNA-PK – kinaza białkowa zależna od DNA; GD – domena globularna; HCC – rak wątrobowokomórkowy; HP1 – białko heterochromatynowe 1; MDM2 – ligaza białkowa E3; MS – spektrometria mas; NET – zewnętrzna komórka sieć neutrofilowa; NTD – domena N-końcowa; PDAC – gruczolak przewodowy trzustki; PTM – modyfikacja potranslacyjna; SCCA – antygen raka płaskonabłonkowego; SCCHN – rak płaskonabłonkowy głowy i szyi; SLE – toczeń rumieniowaty układowy

**Podziękowania:** Praca powstała podczas realizacji projektu OPUS (2021/43/B/NZ3/01008) finansowanego ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.

## STRESZCZENIE

Histony łącznikowe (H1) to zasadowe białka, które biorą udział w upakowaniu materiału genetycznego i regulacji ekspresji genów. Wraz z postępem badań odkryto, że stanowią najliczniejszą grupę histonów pod względem wariantów występujących u ludzi. Mimo, że warianty H1 różnią się nieznacznie strukturą pierwszorzędową, mogą pełnić różne funkcje, ulegać wielorakim modyfikacjom potranslacyjnym oraz mieć odmienne lokalizacje komórkowe. Oprócz jądra, histony H1 mogą występować w cytoplazmie, na powierzchni komórek i w przestrzeni międzykomórkowej. W tych miejscach pełnią rolę wspomagającą dla układu odpornościowego i działają jako cząsteczki sygnałowe. Zmiany w poziomie histonów i ich modyfikacji potranslacyjnych zostały powiązane z wieloma chorobami człowieka i postuluje się, że niektóre z nich mogą służyć jako biomarkery lub cele terapeutyczne.

## WPROWADZENIE

Pierwsze doniesienia na temat histonów pochodzą z 1884 roku, kiedy Albrecht Kossel odkrył je jako składnik białkowy towarzyszący kwasowi nukleinowemu. Histony są konserwatywne, bogate w aminokwasy zasadowe i zlokalizowane głównie jądrach komórek eukariotycznych. Homologi histonów występują też w niektórych archeonach [1]. Ze względu na sposób powiązania z DNA, białka histonowe dzielimy na łącznikowe, które wiążąc się z DNA łącznikowym stabilizują chromosom oraz rdzeniowe, na które nawinięta jest helisa DNA, tworząc nukleosom. Histony łącznikowe, inaczej H1, to najbardziej zróżnicowana rodzina białek histonowych, do której u ssaków zaliczamy aż 11 podtypów (wariantów). Białka rdzeniowe z kolei dzielimy na 4 klasy, H2A, H2B, H3 i H4, wśród których również występują liczne warianty. Histony łącznikowe oraz rdzeniowe H2A i H2B są bogate w reszty lizyny, natomiast białka rdzeniowe H3 i H4 są bogate w reszty argininy.

Biorąc pod uwagę czas ekspresji w komórce, rozróżniamy histony kanoniczne, zależne od replikacji, których geny ulegają ekspresji w fazie S cyklu komórkowego oraz niezależne od replikacji, podlegające ekspresji podczas całego cyklu komórkowego. Geny histonów zależnych od replikacji są zgrupowane w klastry zawierających wiele genów histonowych [2].

Przez długi czas uważano histony za białka pełniące funkcję strukturalną (Tab. 1), związaną z upakowaniem DNA, jednak kolejne odkrycia wykazały, że rola histonów jest bardziej złożona. Modyfikacje potranslacyjne (PTM, ang. *post-translational modifications*) histonów są istotne dla procesów wymagających dostępu do DNA, włączając transkrypcję, replikację i naprawę. Zgodnie z zaproponowaną w 2000 roku przez Strahl i Allis [3] hipotezą kodu histonowego (ang. *histone code hypothesis*), specyficzne PTM lub ich kombinacje mogą regulować procesy komórkowe przez zmianę struktury chromatyny (mechanizm *cis*) lub generowanie miejsc wiążących dla białek efektorowych (mechanizm *trans*). Białka efektorowe mają ewolucyjnie konserwatywne domeny zdolne do rozpoznawania specyficznych PTM i inicjowania kaskady dalszych zdarzeń. W skład kodu histonowego wchodzi wszystkie PTM, które w sposób przejściowy lub stabilny wpływają na białka histonowe [4]. Możemy tu wyróżnić modyfikacje takie jak acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, czy cytrulinacja [5].

Oprócz funkcji strukturalnej i regulacyjnej, histonom przypisuje się działanie antybakteryjne (Tab. 1), są bowiem głównym składnikiem białkowym zewnętrznej komórki sieci neutrofilowych (NET, ang. *neutrophil extracellular traps*). Histony mogą mieć również szkodliwy wpływ na komórki gospodarza i przyczynić się do uszkodzenia śródbłonka, powstania stanu zapalnego, zakrzepicy, tworzenia NET oraz aktywacji płytek krwi. Podniesienie poziom histonów towarzyszy stanom zapalnym i potencjalnie może być biomarkerem ich progresji [6].

**Tabela 1.** Funkcja histonów H1 z podziałem na lokalizację.

| Lokalizacja                | Funkcja  |
|----------------------------|--|
| Jądro                      | Utrzymanie stabilności nukleosomów i chromosomów [9]<br>Epigenetyczna regulacja wielu procesów komórkowych przez kody histonowe [1]  |
| Cytoplazma                 | Uruchomienie procesu apoptozy, gdy następuje pęknięcie podwójnej nici DNA [9]  |
| Powierzchna komórki        | Promowanie apoptozy za pośrednictwem komórek [9]   |
| Przestrzeń międzykomórkowa | Sygnalizacja DAMP [49]<br>Działa jak toksyczne białko [1]<br>Oddziaływanie z receptorami TLR [49]<br>Regulacja układu odpornościowego i w powiązaniu z NET działanie przeciwdrobnoustrojowo [1,9,51] |

Histony zlokalizowano w płynach ustrojowych. Uwolnienie białek histonowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej związane jest z odpowiedzią na stres. Histony pozakomórkowe zostały zlokalizowane na powierzchni lub w cytoplazmie komórek odpornościowych, neuronów, komórek Schwanna czy w mikrogleju. Wysoki poziom histonów zewnątrzkomórkowych koreluje z pojawieniem się stanów zapalnych i może być potencjalnym biomarkerem i celem terapeutycznym dla stanów chorobowych, związanych z zapaleniem i zakrzepicą. Podobnie jak zaburzenia w ekspresji histonów, zmiany wzoru PTM zostały powiązane z wieloma procesami patofizjologicznymi i rozwojem chorób, co sugeruje, że część z nich może również służyć jako biomarkery i nowe cele terapeutyczne [4,7].

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA HISTONÓW H1

Histony łącznikowe są większe od histonów rdzeniowych, bowiem ich masa przekracza 20 kDa [8] (Tab. 2). Cechą charakterystyczną jest wysoka, sięgająca do 28,9% częstość występowania reszty lizyny w łańcuchu białkowym, z wyjątkiem wariantu H1.7, w którym lizyna stanowi zaledwie 8,6% wszystkich reszt aminokwasowych [9].

Podobnie jak histony rdzeniowe, histony H1 są zbudowane z trzech domen, N-końcowej, globularnej i C-końcowej (odpowiednio NTD, GD i CTD). Domena N-końcowa jest zbudowana z około 45 reszt aminokwasowych i dzieli się na dwa podregiony, z których jeden jest bogaty w reszty hydrofobowe, natomiast drugi ma charakter zasadowy i znajduje się blisko domeny globularnej [10,11]. Domena globularna to wysoce konserwatywny region około 80 aminokwasów, na który składają się trzy helisy, trzy pętle i dwa krótsze fragmenty struktury beta w kształcie spinki do włosów [10]. W obrębie tej domeny znajduje się kilka dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych ważnych dla wiązania nukleosomu [12]. Domena C-końcowa natomiast to najdłuższy fragment histonu H1 zbudowany z około 100 reszt aminokwasowych, bogaty w reszty lizyny, seryny i proliny [10, 11]. Ogony N- i C-końcowe są znacznie mniej konserwatywne niż domena globularna wśród wariantów histonów łącznikowych [13].

Histony H1 związane są z tworzeniem wyższych struktur organizacji chromatyny, stabilizują jej włókna zapobiegając transkrypcji oraz ślizganiu się nukleosomów [14]. Wiązanie histonów H1 hamuje rozwijanie nukleosomu, przez co ogranicza dostępność chromatyny. U ssaków opisano 11 wariantów histonu H1, w tym siedem wariantów somatycznych (H1.0-H1.5 i H1.10), trzy warianty specyficzne dla

jąder (H1.6, H1.7 i H1.9) oraz jeden wariant występujący w oocytach (H1.8) [9, 13]. Geny wariantów somatycznych H1.1-H1.5, razem z genami histonów rdzeniowych zlokalizowane są na chromosomie 6, natomiast geny podtypów H1.0 i H1.10 znajdują się odpowiednio na chromosomie 22 i 3 [7]. Geny ssaczych wariantów H1 powstały z duplikacji genu i są paralogami [10]. Ekspresja genów histonów H1.1-H1.5 jest zależna od replikacji i zachodzi w fazie S cyklu komórkowego, w przeciwieństwie do ekspresji genów dwóch pozostałych histonów somatycznych (H1.0 i H1.10), które są wariantami niezależnymi od cyklu komórkowego, a więc ulegają transkrypcji podczas całego cyklu komórkowego [7]. Każdy z wariantów H1 wykazuje specyficzne dla siebie cechy i funkcje, takie jak wielkość, poziom ekspresji, powinowactwo do chromatyny, fenotyp delecyny i interakcje ze specyficznymi partnerami [9,17]. Warianty somatyczne ulegają ekspresji we wszystkich typach komórek i tkanek, jednak każda tkanka ma swoją charakterystyczną kompozycję podtypów histonów H1. Sugeruje się, że H1.0 zastępuje podtypy somatyczne w zróżnicowanych komórkach [10].

Wykazano, że histon H1 wiąże się silnie do macierzy nukleosomalnych, a w warunkach niskiego zasolenia, może zagęszczać chromatynę i tworzyć wysoce zwarte, skręcone włókno 30 nm. Obserwacje te skłoniły do spekulacji, że histon H1 wpływa na hamowanie ekspresji genów poprzez utrudnienie wiązania czynników transkrypcyjnych i kofaktorów do nici DNA [8, 18]. Innym potencjalnym mechanizmem działania histonu H1 jest hamowanie ruchliwości nukleosomów, co prowadzi do zahamowania transkrypcji. Ograniczenie mobilności nukleosomów przez histony łącznikowe może wpływać na dostępność chromatyny dla cząsteczek regulatorowych [9,19]. Innymi czynnikami hamującymi aktywność transkrypcyjną są PTM histonu łącznikowego, takie jak acetylacja, metylacja i fosforylacja. Dla przykładu, izomeraza prolinowa P1 defosforyluje histon H1 prowadząc do destabilizacji w chromatynie, przez co może wpływać na transkrypcję powiązanych genów [20,21]. Thorslund i wsp. wykazali, że podczas naprawy podwójnych pęknięć DNA, histon H1 może ulegać poliubikwitynacji na lizynie 63, co sugeruje, że histon łącznikowy odgrywa rolę w procesie naprawy DNA [22].

Poszczególne histony H1 odgrywają specyficzne role w organizacji genomu i ekspresji genów [23]. Wynikające z sekwencji i modyfikacji potranslacyjnych różnice w sposobie wiązania wariantów H1 z nukleosomem wpływają na strukturę chromatyny i przyczyniają się do regulacji funkcji jądrowych, włączając transkrypcję, replikację i naprawę DNA oraz stabilność genomu [24]. Poziom poszczególnych

Tabela 2. Porównanie podtypów histonów łącznikowych.

|                                 | Nazwa   | Masa [kDa] | Zawartość Lys [liczba; %] | Miejsce ekspresji  | Funkcja   |
|---------------------------------|---|------------|---------------------------|--------------------|---|
| Niezależny od cyklu komórkowego | H1.0 (H1')  | 22,9       | 56; 28,9%                 | Komórki somatyczne | Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu, występuje w komórkach, które są w końcowych etapach różnicowania lub mają niskie tempo podziału [10, 55]  |
| Zależny od cyklu komórkowego    | H1.1  | 21,8       | 57; 26,6%                 | Komórki somatyczne | Kondensacja łańcuchów nukleosomów w włókna o wyższej strukturze. Regulator transkrypcji poszczególnych genów poprzez przebudowę chromatyny, odstępy między nukleosomami i metylację DNA [14]  |
|                                 | H1.2 (H1c; H1d; H1s-1)  | 21,4       | 59; 27,8%                 | Komórki somatyczne | Utrzymanie stabilnych struktur wyższego rzędu chromatyny i nukleosomów<br>Regulacja dynamiki chromatyn<br>Regulacja poziomu transkrypcji niektórych genów docelowych [14, 56]<br>Rekrutacja ligazy ubikwitynowej Cul4A/PAF1<br>Represor transkrypcji za pośrednictwem p53 [10]                          |
|                                 | H1.3 (H1c; H1s-2)   | 22,4       | 67; 27,7%                 | Komórki somatyczne | Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu [14]<br>Hamowanie transkrypcji niekodującego RNA h19 [10]  |
|                                 | H1.4 (H1b; H1s-4)   | 21,9       | 62; 28,4%                 | Komórki somatyczne | Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu<br>Regulacja szlaków odpowiedzi na stres [56]  |
|                                 | H1.5 (H1a; H1b; H1s-3)  | 22,6       | 65; 28,9%                 | Komórki somatyczne | Kondensacja łańcuchów nukleosomów w struktury wyższego rzędu<br>Rekrutują podstawowe enzymy modyfikujące histony [57]   |
| Niezależny od cyklu komórkowego | H1.6 (H1t)  | 22,1       | 40; 19,4%                 | Komórki jąder      | Formuje bardziej rozluźnioną chromatynę, która jest potrzebna do prawidłowej regulacji chromosomów podczas mejozy [58]  |
|                                 | H1.7 (H1t2; Testis-specific H1 histone; Haploid germ cell-specific nuclear protein 1) | 28,1       | 22; 8,6%                  | Komórki jąder      | Niezbędny dla prawidłowej spermatogenezy i męskiej płodności<br>Wymagany do prawidłowej restrukturyzacji komórek i kondensacji DNA podczas fazy wydłużania spermiogenezy<br>Bierze udział w przejściu histonowo-protaminowym chromatyny plemników i późniejszej produkcji funkcjonalnych plemników [59] |
|                                 | H1.8 (H1oo; osH1)   | 35,8       | 53; 15,3%                 | Oocyty             | Kontrola ekspresji genów podczas oogenezy i wczesnej embriogenezy, prawdopodobnie poprzez zaburzenie struktury chromatyny<br>Niezbędny do mejotycznego dojrzewania oocytów w stadium pęcherzyka zarodkowego [60]  |
|                                 | H1.9 (Putative spermatid-specific linker histone H1-like protein)                     | 25,6       | 23; 10%                   | Komórki jąder      | Zaangażowane w przebudowę chromatyny i/lub regulację transkrypcji podczas spermiogenezy, procesu dojrzewania spermatyd do plemników [14, 61]  |
|                                 | H1.10 (H1X)   | 22,5       | 47; 19,3%                 | Komórki somatyczne | Kondensacja łańcuchów nukleosomów w włókna o wyższej strukturze<br>Regulator transkrypcji poszczególnych genów poprzez przebudowę chromatyny, odstępy między nukleosomami i metylację DNA [9]<br>Progresor mitotyczny [10]  |

wariantów H1 różni się w zależności od typu komórek i podlega zmianom podczas procesów różnicowania i nowotworzenia [25]. Dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczej mikroskopii stwierdzono, że warianty somatyczne H1 wykazują specyficzną lokalizację w jądrze komórkowym. Warianty H1.2, H1.3 H1.5 i w mniejszym stopniu H1.0 są wzbogacone w rejonie peryferyjnym jądra komórkowego, a ich występowanie pokrywa się z bardziej upakowanym DNA. Przeciwnie, H1.10 i H1.4 są równomiernie rozmieszczone w całym jądrze, ze znacznym zagęszczeniem H1.10 w jąderku [25].

## HISTONY H1 JAKO BIOMARKERY

Według słownika *National Cancer Institute* biomarkerem jest „cząsteczka biologiczna występująca we krwi, innych płynach ustrojowych lub tkankach, która jest oznaką normalnego lub nieprawidłowego procesu, stanu lub choroby. Biomarker można wykorzystać do sprawdzenia, jak dobrze organizm reaguje na leczenie choroby lub stanu.” Wyróżniamy kilka typów biomarkerów, np. umożliwiające wczesną detekcję, diagnozę, rokowanie, czy będące celem terapeutycznym [26]. Zmiany poziomów oraz specyficznych PTM wariantów histonów łącznikowych zostały powiązane z wieloma stanami chorobowymi i istnieją przesłanki, że w niektórych przypadkach mogą służyć jako ich biomarkery. Dla przykładu, sugeruje się, że warianty histonu H1 są biomarkerami użytecznymi do stratyfikacji pacjentów z nowotworami (Tab. 3) [13].

**Tabela 3.** Warianty histonu H1 będące potencjalnymi biomarkerami nowotworów

| Wariant histonu | Nowotwór                           |
|-----------------|------------------------------------|
| H1.0            | glejak złośliwy [30]               |
| H1.3            | gruczolak przewodowy trzustki [31] |
| H1.4            | rak płuc [34]                      |
| H1.4K34ac       | nasieniak [42]                     |
| H1.2T145p       | rak pęcherza moczowego; rak        |
| H1.4T145p       | wątrobowokomórkowy [8]             |

## ZMIANY EKSPRESJI POSZCZEGÓLNYCH WARIANTÓW HISTONÓW H1

Ekspresja histonów łącznikowych jest odmienna w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami zdrowymi. Ogólnie rzecz biorąc, warianty H1 zależne od replikacji ulegają wzmożonej syntezie w nowotworach jako rezultat zwiększonej proliferacji. Poziomy ekspresji niektórych wariantów H1 są skorelowane z konkretnym rodzajem nowotworu. Sugeruje się, że podtypy H1 mogą być biomarkerami przydatnymi do rozróżniania zmian łagodnych i złośliwych oraz do prognozowania przebiegu choroby [13]. Sato i wsp. wykazali, że ekspresja H1 jest ściśle powiązana ze stopniem złośliwości raka prostaty i wskazali na potencjalną możliwość wykorzystania poziomu H1 jako markera proliferacji komórek [27].

W komórkach gruczolaka jajnika wykazano 40% redukcję ogólnego poziomu mRNA histonu H1, w porównaniu do guzów łagodnych [9,28]. Odkryto również, że kilka

podtypów H1 (włączając H1.1-H1.5, H1.10, H1.0) różniło się poziomem ekspresji w złośliwych rakach jajników w porównaniu z łagodnymi gluczolakami. Ponadto profilowanie i hierarchiczna analiza skupień poziomu ekspresji podtypów H1 pozwoliła na odróżnienie gruczolaków jajnika (ang. *ovarian adenomas*) od gruczolakoraków (ang. *adenocarcinomas*) z 87,5% dokładnością, co daje nadzieję na możliwość wykorzystania podtypów H1 jako biomarkerów raka jajnika. Mędrzycki i wsp. sugerują, że oznaczenie profili ekspresji genów wariantów H1 metodą qRT-PCR może stanowić atrakcyjną alternatywę lub narzędzie pomocnicze dla obecnie stosowanych metod diagnostycznych polegających na przykład na analizie histopatologicznej. Obserwacje te powinny jednak zostać potwierdzone na większej liczbie próbek a także poszerzone o analizy ewentualnej korelacji między wzorem ekspresji wariantów H1 a etapem progresji nowotworu i/lub rokowaniem pacjenta [28].

## Histon H1.0

Histon H1.0 jest obecny na wysokim poziomie w zdrowych tkankach i ulega akumulacji podczas różnicowania. W odróżnieniu od wariantów H1 zależnych od replikacji, które ulegają ekspresji głównie w komórkach proliferujących, H1.0 powstaje zarówno w komórkach dzielących się jak i nie dzielących się. Jego poziomy są niskie w komórkach pluripotencyjnych, ale wzrastają w komórkach somatycznych, gdzie H1.0 zastępuje warianty H1 zależne od replikacji [29].

Nowotwory składają się z subpopulacji komórek o odmiennych fenotypach, właściwościach biologicznych oraz potencjale proliferacyjnym i różnicowania. Komórki niezróżnicowane, posiadające potencjał proliferacyjny i nazywane nowotworowymi komórkami macierzystymi (CSCs, ang. *cancer stem cells*) zawierają niski poziom H1.0. Zauważono, że ekspresja H1.0 jest związana z mniej agresywnym fenotypem komórek nowotworowych. W komórkach nowotworowych, szczególnie w przypadku nowotworów agresywnych i niezróżnicowanych, jego poziom spada. Odwracalne wyciszenie genu histonu H1.0 wpływa na stopień zróżnicowania komórek nowotworowych i przyczynia się do zdefiniowania, które komórki w obrębie nowotworu mogą utrzymać potencjał samoodnawiania (ang. *self-renewal*) i napędzać wzrost nowotworu. Co ważne, ekspresja H1.0 koreluje ze stanem zróżnicowania nowotworu, przeżyciem pacjenta oraz, na poziomie pojedynczych komórek, z markerami nowotworowych komórek macierzystych. Sugeruje się, że leczenie oparte na podwyższeniu poziomu H1.0 w komórkach nowotworowych może wzmocnić proces różnicowania i być korzystne dla procesu terapeutycznego [29].

Histon H1.0 jest potencjalnym markerem o wartości prognostycznej u pacjentów z glejakiem złośliwym. Poziom H1.0 jest skorelowany z histopatologicznym zaawansowaniem nowotworu. Glejaki bardziej agresywne i złośliwe mają niższe poziomy H1.0 [30]. Analiza kilkunastu typów nowotworów wykazała istotną korelację między niskim poziomem mRNA *H1F0* a złym rokowaniem pacjentów, także w przypadku czerniaka, raka wątroby, raka nerki i glejaka o niskim stopniu złośliwości, niezależną od innych cech



istotnych klinicznie. Inne warianty H1 albo nie stratyfikowały pacjentów, albo korelowały z przeżyciem pacjentów w odwrotny sposób w porównaniu z *H1F0*. Zatem zmiany w poziomach H1.0 są klinicznie istotne w przypadku wielu typów nowotworów [29].

#### Histon H1.2

Wśród wariantów somatycznych histonu H1, H1.2 jest najbardziej konserwatywny, co może wskazywać na pełnienie istotnej funkcji. Rzeczywiście, coraz więcej jest dowodów, że histon H1.2 odgrywa rolę w wielu procesach, włączając apoptozę, autofagię, kontrolę cyklu komórkowego, naprawę DNA i transkrypcję genów. Wariant ten jest zaangażowany w interakcje z czynnikami związanymi z odpowiedzią na uszkodzenia DNA i ze składnikami maszyneryi naprawczej DNA. Po uszkodzeniu DNA, histon H1 może ulegać wielu modyfikacjom potranslacyjnym, które umożliwiają odłączenie od nukleosomu, dekondensację chromatyny i wiązanie czynników naprawczych DNA. Wariant H1.2 może być też powiązany z procesem nowotworzenia i innymi chorobami, jednak charakter tych powiązań pozostaje w dużej mierze niewyjaśniony. Wysoka ekspresja wariantu H1.2 jest powiązana ze słabym rokowaniem pacjentów z nowotworami, na przykład trzustki. Wykazano, że H1.2 wiąże się do H3K27me<sub>3</sub>, przez co hamuje ekspresję genów supresorów wzrostu i promuje wzrost komórek nowotworowych. H1.2 może też wpływać na rozwój i proliferację komórek nowotworowych przez regulowanie aktywności transkrypcyjnej niektórych genów związanych z nowotworzeniem. Sugeruje się, że H1.2 jest kandydatem dla terapii przeciwnowotworowych [17].

#### Histon H1.3

Histon H1.3 jest podtypem H1 o pośrednim powinowactwie do chromatyny, co powiązane jest z jej bardziej rozluźnioną i dostępną konformacją. Domena C-końcowa H1.3 może oddziaływać z metylotransferazami DNA, DNMT1 i DNMT3B, prowadząc do metylacji miejsc CpG i wyciszenia genów. W nowotworach hipermetylacja wysp CpG w regionach promotorowych jest skorelowana z wyciszeniem transkrypcyjnym genów supresorowych nowotworów lub genów istotnych dla wrażliwości na chemioterapię. Ekspresja H1.3 wewnątrz nowotworu w gruczolaku przewodowym trzustki (PDAC, ang. *pancreatic ductal adenocarcinoma*) związana jest z niskim przeżyciem i może służyć jako biomarker PDAC. Bauden i wsp. wykazali, że mediana przeżycia pacjentów z niską (niewykrywalną) ekspresją H1.3 wynosiła 46 miesięcy, z 5-letnim przeżyciem sięgającym 42%, w odróżnieniu od osób z wysoką ekspresją H1.3, u których mediana przeżycia wynosiła 28 miesięcy a 5-letnie przeżycie jedynie 11% [31]. Dokładności H1.3 jako biomarkera prognostycznego PDAC została oszacowana na 95% [31]. Dla porównania, obecnie stosowany marker, antygen CA19-9 charakteryzuje się 83% dokładnością [32].

#### Histon H1.4

Rak płuc to rodzaj nowotworu złośliwego o najwyższej zachorowalności i śmiertelności, jednakże żaden z obecnie stosowanych markerów, nie jest wystarczająco czuły, aby

jednoznacznie potwierdzał chorobę. Do diagnostyki raka używany jest między innymi antygen raka płaskonabłonkowego (SCCA, ang. *squamous cell carcinoma antigen*), którego dokładność wynosi 75,7% [33]. Badanie cytologiczne jest obecnie „złotym standardem” w diagnostyce raka płuc, jednak ma ono niską czułość. Dong i wsp. po przeanalizowaniu metylacji DNA całego genomu stwierdzili, że we wszystkich przebadanych typach nowotworu dochodzi do hipermetylacji genu H1.4 (*HIST1H4F*). Dokładność identyfikacji nowotworów płuc przy użyciu hipermetylacji *HIST1H4F* jako biomarkera wynosiła aż 98%. W odróżnieniu od większości opisanych wielogenowych paneli do diagnozy nowotworów, *HIST1H4F* jest potencjalnym markerem UCOM (ang. *universal-cancer-only methylation*). Spekuluje się, że metylacja genu *HIST1H4F* mogłaby mieć dużą wartość dla wczesnej diagnozy, szczególnie w badaniach przesiewowych w kierunku raka. Dong i wsp. sugerują, że demetylacja DNA w specyficznych locus histonów może być potencjalną wspólną strategią przyszłych terapii przeciwnowotworowych [34].

#### Histon H1.5

Histon H1.5, obok histonów H1.1 i H1.3 ulega wzmożonej ekspresji w komórkach pluripotencjalnych. Wysoki poziom H1.5 świadczy o dużym stopniu złośliwości oraz przerzutach nowotworu prostaty, natomiast w guzach łagodnych wykazano niski poziom tego wariantu. Immunohistochemiczne barwienie tego wariantu może być użyteczne w diagnostyce biopsji prostaty szczególnie z małymi ogniskami nowotworu [35]. Identyczny wzorzec H1.5 został zaobserwowany także w innych typach komórek nowotworowych np. niski poziom H1.5 występuje w guzach neuroendokrynych płuc o małym stopniu złośliwości, natomiast w złośliwych guzach nowotworowych poziom H1.5 jest znacznie wyższy [36,37].

#### MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE HISTONÓW H1

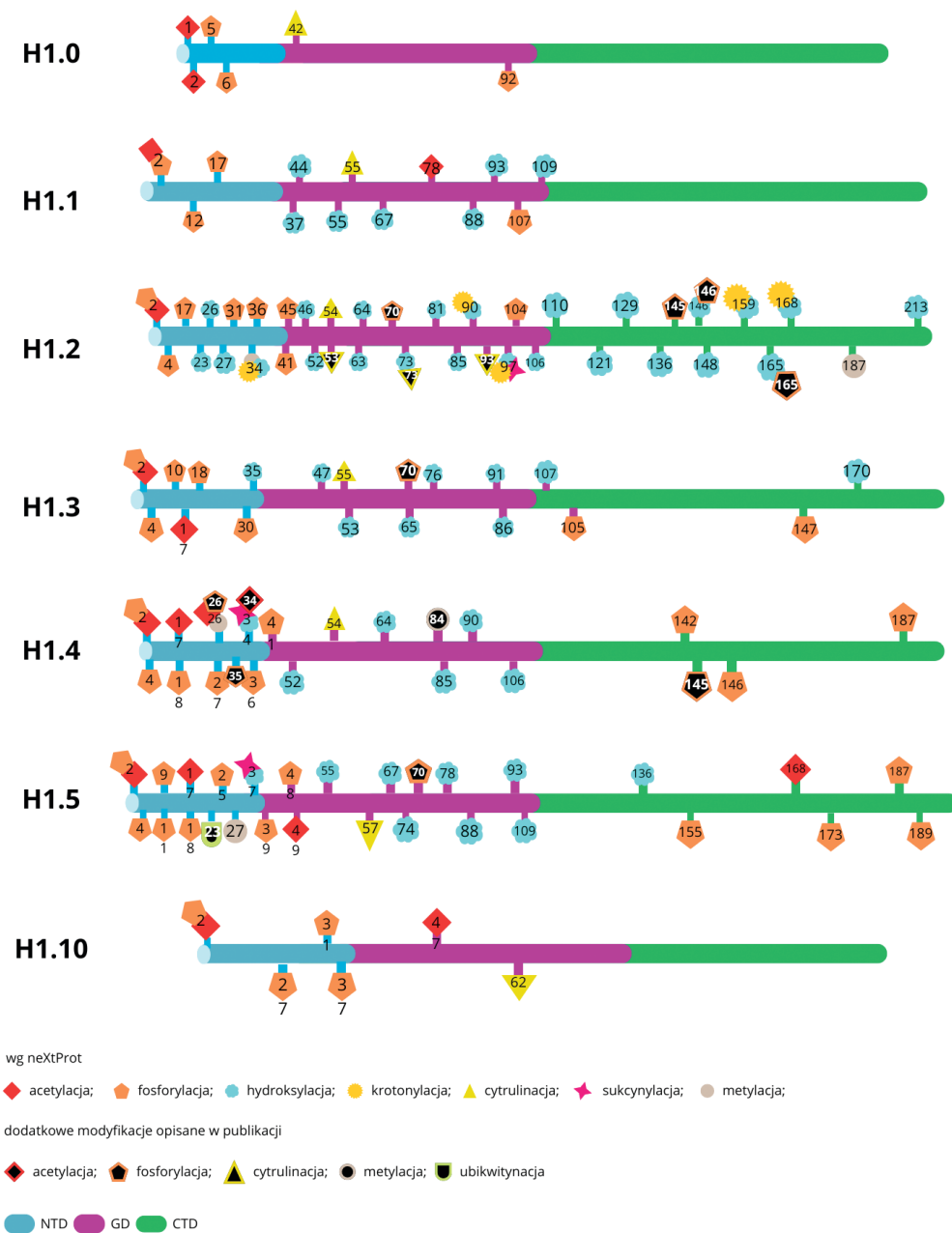
Rozwój proteomiki opartej na spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*) i dostępność analizatorów o wysokiej precyzji oznaczania masy, przyczyniły się do istotnego postępu w identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych, umożliwiając mapowanie PTM do specyficznych reszt aminokwasowych, jak również wykrywanie wariantów występujących w niewielkiej liczbie. Wyróżniamy trzy główne strategie proteomiczne, *top-down*, *middle-down*, i *bottom-up*. W metodzie *top-down* analizowane są natywne, nie poddane trawieniu proteazami białka, podczas gdy metody *middle-down* i *bottom-up* opierają się na badaniu odpowiednio dużych fragmentów i peptydów białkowych. W większości przypadków analiza PTM jest wykonywana z użyciem strategii *bottom-up*.

W przypadku histonów H1 analizy *bottom-up* następują pewne problemy. Wynikają one z sekwencji aminokwasowej tych białek, która obfituje w reszty lizyny. Z tego względu trawienie trypsyną skutkuje małymi, hydrofilowymi peptydami, które ze względu na słabe wiązanie do kolumn C18, są trudno wykrywalne przez spektrometrię masową. Efektem tego są niskie pokrycia sekwencji regionów bogatych w reszty Lys, np. domeny globularnej. Jedną z metod

zaradzenia temu problemowi jest propionylacja grup aminowych białek (grupy N-końcowe oraz wolne i monometylowane grupy ε-aminowe reszt Lys) przed lub po trawieniu trypsyną. Modyfikacja ta istotnie poprawia pokrycie sekwencji H1 w analizach MS [38].

Kolejnym problemem na jaki napotykają badacze PTM histonów, jest występowanie w różnych ilościach wielu podtypów lub wariantów o dużym podobieństwie sekwencji. Użycie strategii *bottom-up* skutkuje uzyskaniem peptydów, które można przypisać do wielu podtypów histonów. Aby ominąć tę niedogodność stosuje się metody rozdziału wariantów przed trawieniem białek, np. elektroforezą kapilarną lub dwukierunkową [5].

Dotychczas opisano kilkanaście PTM w histonach łącznikowych [39]. Aktualna mapa PTM wariantów H1 sporządzona na podstawie NeXtProt [40] przedstawiona jest na rycinie 1. Ich analiza doprowadziła do kilku wniosków. Wszystkie podtypy somatyczne ulegają modyfikacjom po-translacyjnym, a liczba zidentyfikowanych miejsc modyfikacji wydaje się zależeć od obfitości występowania danego podtypu. Wiele miejsc modyfikacji zidentyfikowano w najczęściej występujących wariantach H1.2 i H1.4, natomiast mało jest informacji na temat modyfikacji w podtypach będących na niskim poziomie, np. H1.0 i H1.10. Modyfikacje w domenach końcowych są często specyficzne dla podtypu, gdyż podobieństwo sekwencji tych rejonów jest mniejsze niż domeny globularnej. Najczęstszymi modyfikacjami hi-



Rycina 1. Modyfikacje po-translacyjne wariantów somatycznych histonów H1. Na podstawie neXtProt [40]. Dodatkowo zaznaczono PTM opisane w niniejszej pracy.

stonów łącznikowych są fosforylacje, metylacje i acetylacje [5].

Obecność modyfikacji potranslacyjnych H1, które indywidualnie lub przez wzajemne interakcje modulują strukturę i funkcję tych białek, czyni histony łącznikowe jeszcze bardziej zróżnicowanymi. Zasadowe reszty aminokwasowe, Lys i Arg, które stanowią 20-30% sekwencji H1, z jednej strony pośredniczą w interakcjach z DNA, a z drugiej są miejscami modyfikacji potranslacyjnych, które te interakcje modyfikują. Fosforylacja i krótkołańcuchowe acylacje (acetylacja, formylacja, propionylacja i krotonylacja) powodują obniżenie dodatniego ładunku histonów H1, co może skutkować oddysocjowaniem histonów łącznikowych od DNA i zwiększeniem dostępności chromatyny. Innymi PTM zidentyfikowanymi w histonach H1 są ubikwitynacja, cytrulinacja, 2-hydroksybutyrylacja, ADP rybozylacja, parylacja [8].

PTM histonów H1 zostały powiązane z nowotworami, chorobami autoimmunologicznymi i infekcjami wirusowymi [5]. Modyfikacjami opisanymi w powiązaniu z chorobami jest fosforylacja, metylacja, ubikwitynacja i cytrulinacja. Prowadzone są intensywne badania nad PTM histonów H1 związanymi z nowotworami, aby zidentyfikować potencjalne biomarkery progresji nowotworu [8], spersonalizować strategię terapeutyczne i zrozumieć mechanizmy leżące u podłoża chorób [5].

#### Metylacja

Metylacja H1 jest więc związana głównie z wyciszeniem transkrypcyjnym. Większość miejsc metylacji histonów łącznikowych jest zlokalizowanych w domenie N-końcowej. Metylacja Lys26 w NTD H1.4 jest najobficiej występującą metylacją w ludzkim histonie łącznikowym. Modyfikacja ta jest konserwatywna u kręgowców i odkrytą ją również u *Drosophila melanogaster*, co sugeruje ważną funkcję tej modyfikacji. Jest ona również przykładem interakcji (ang. *cross-talk*) między różnymi PTM. Jednoczesna fosforylacja Ser27 inhibuje wiązanie HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*) do H1.4 K26me, wpływając na upakowanie heterochromatyny [10].

Metylacje często zachodzą w miejscach regulatorowych ulegających licznym PTM (ang. *PTM-hot-spots*) w domenie globularnej, gdzie występują alternatywne rodzaje PTM. Większość *PTM-hot-spots* to reszty zlokalizowane w sąsiedztwie miejsc wiązania DNA. Uważa się, że metylacja może chronić reszty lizyny przed innymi modyfikacjami, zapobiegając rozluźnieniu chromatyny indukowanemu przez krótkołańcuchowe acylacje, a więc promując kondensację chromatyny [5].

Monometylacja Lys84 H1.4 (K84me1) jest związana z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (SCCHN, ang. *squamous cell carcinoma of the head and neck*) [5, 8]. Modyfikacja ta jest katalizowana przez metylotransferazę WHSC1, o której wiadomo, że dimetyluje Lys36 histonu H3. Lizyna 84 H1.4 znajduje się w wysoce konserwatywnym regionie domeny globularnej, co sugeruje, że modyfikacja ta może występować również w innych podtypach. Co więcej, rola acetylacji

Lys84 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA również została opisana. Analiza MS wykazała, że metylaza WHSC1 może oddziaływać z różnymi podtypami H1 i potwierdzono metylację *in vitro* kilku podtypów. WHSC1 ulega znacznej nadekspresji w komórkach SCCHN, gdzie monometylacja Lys 84 H1.4 indukuje zmiany w ekspresji ponad 400 genów [5].

#### Acetylacja

Acetylacja w histonach łącznikowych zachodzi zarówno w ogonach końcowych jak i w domenie globularnej [10]. Modyfikacja ta wpływa na wiązanie DNA i jest generalnie związana z rozluźnieniem struktury chromatyny i aktywną transkrypcją [10].

Acetylowane histony H1 pełnią wielorakie funkcje w organizmie człowieka, np. H1.4K34ac może rekrutować czynniki transkrypcyjne i wpływać na mobilność histonu łącznikowego, tym samym regulując transkrypcję [41]. Zmiana poziomu tej modyfikacji została powiązana ze zmianami komórkowymi w różnych typach nowotworów np. nasieniaku. Nasieniaki to nowotwory, których fenotyp przypomina komórki macierzyste. Zwiększony poziom acetylacji Lys34 histonu H1.4 jest rozpatrywany jako możliwy biomarker nasieniaków [42].

#### Fosforylacja

Fosforylacja histonu H1 została odkryta w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku [43] i dotychczas jest najlepiej przebadaną modyfikacją histonów łącznikowych [10]. Miejsca fosforylacji występują we wszystkich domenach, jednak najliczniej w domenach końcowych [5].

Opisano zmiany poziomu H1 i jego fosforylacji na poszczególnych etapach cyklu komórkowego. Poziom i fosforylacja H1 rosną podczas fazy S, G2, aż do mitozy, kiedy następuje gwałtowny spadek fosforylacji H1 i nie obserwuje się jej w fazie G1. W fazie tej poziom H1 jest najwyższy i spada przed startem fazy S [44,10]. Wykazano, że fosforylacja określonych wariantów H1, np. pT146H1.4 jest kluczowa dla kondensacji chromosomów mitotycznych i prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego [8].

Kilka miejsc fosforylacji w podtypach H1.2-H1.5 powiązано z progresją i rokowaniem nowotworu [5]. Fosforylację treoniny 145 H1.2 i H1.4 zidentyfikowano jako biomarkery inwazyjnego raka pęcherza moczowego o wysokim stopniu złośliwości i progresją przerzutową w raku wątrobowokomórkowym (HCC, ang. *hepatocellular carcinoma*) [8]. Również w raku pęcherza moczowego dochodzi do wzrostu poziomu fosforylacji treoniny 145 H1.2 i H1.4, przy czym poziom fosforylacji koreluje pozytywnie ze złośliwością nowotworu, inwazyjnością i szybkością proliferacji. Sugeruje się, że modyfikacja ta mogłaby służyć jako biomarker raka pęcherza. Co ciekawe, do fosforylacji treoniny 145 H1.2 dochodzi podczas uszkodzenia DNA przez kinazę zależną od DNA (DNA-PK, ang. *DNA-dependent protein kinase*). W innych badaniach wykazano, że MTA1 (ang. *metastasis-associated 1*) hamuje fosforylację treoniny 145 H1.2 poprzez pośredniczenie w proteasomalnej degradacji DNA-PK, co wiąże się z powstawaniem nowotworów i progresją prze-



rzutów HCC. Ekspresja H1.2T145p w liniach raka wątrobowokomórkowego hamuje onkogenną rolę MTA1, co pokazuje znaczenie fosforylacji histonów w terapii raka [5].

Mapowanie PTM H1 w liniach komórkowych raka piersi doprowadziło do identyfikacji fosforylowanej reszty tyrozyny 70 w H1.2, H1.3 i H1.5. Modyfikacja znajduje się w domenie globularnej, w regionie bardzo konserwatywnym w ludzkich podtypach H1.1 – H1.5. Na podstawie analizy sekwencji miejsca fosforylacji, eksperymentów z farmakologicznym hamowaniem kinazy, koimmunoprecypitacji i kolokalizacji stwierdzono, że wystąpienie tej modyfikacji jest katalizowane przez kinazę FAK. Stwierdzono istotnie wyższe poziomy fosforylacji tyrozyny w podtypach H1 w komórkach raka piersi w porównaniu z komórkami zdrowymi, co sugeruje rolę tej modyfikacji w raku piersi. Okazało się również, że fosforylacja tyrozyny 70 w raku piersi jest pozytywnie skorelowana ze wskaźnikiem proliferacji komórek, może więc mieć pronowotworową rolę [5].

Rodzina genów RAS stanowi najczęściej zmutowane onkogeny w wielu nowotworach [45]. Wykazano, że fosforylacja seryny 35 H1.4 tłumia mutacje Ras, co wskazuje na rolę supresorową fosforylacji. H1.4 S35p osłabia żywotność komórek, tworzenie kolonii, zatrzymanie fazy S, migrację i inwazję w linii komórkowej raka płaskonabłonkowego i gruczolakoraka z mutacjami Ras. Podobny efekt stwierdzono dla H1.4 S26p w komórkach raka żołądka. Mutacje Ras, którym towarzyszy aktywacja kaskady kinaz białkowych ERK2.2 tłumia fosforylację seryny 26 przez indukcję zależnej od MDM2 (ligaza białkowa E3) degradacji proteasomów kinazy Aurora B [5].

Modyfikacje potranslacyjne wariantu H1.2 są ważne dla odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Po uszkodzeniu DNA histon H1.2 ulega fosforylacji przez DNA-PK, [46], ubikwitynacji przez RNF8/RNF168 [47] i PARylacji (ang. *PARP1-dependent poly-ADP-ribosylation*) przez PARP1 [48], które są kluczowe dla naprawy DNA [17]. Fosforylacja Thr146 wyzwala zależną od p53 reakcję na uszkodzenie DNA, hamuje wzrost i migrację komórek nowotworowych. Fosforylacja Thr165 H1.2 jest markerem proliferacji i złośliwości nowotworu, a fosforylacja Tyr70 odgrywa rolę w proliferacji komórek nowotworowych. Metylacja Lys187 zwiększa upakowanie struktury nukleosomu. Ubikwitynacja Lys46 hamuje naprawę DNA przez osłabienie formowania zależnych od RNF8/RNF168 ognisk 53BP1, które są kluczowym komponentem sygnalizacji NHEJ (ang. *non-homologous end joining*). PARylacja Ser188 reguluje aktywację kinazy ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) [17]. Pojawiły się również doniesienia, że H1.2 hamuje ścieżkę naprawczą HR (ang. *homologous recombination*) przez bezpośrednią interakcję z domeną ATM HEAT i inhibicją wiązania ATM zależnego od kompleksu MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), które może być zahamowane przez PARylację końca C i dalszą dysocjację chromatyny i degradację proteasomalną [17].

#### Cytrulinacja

Cytrulinacja argininy 53 (H1R53ci) H1 katalizowana przez PADI4 (ang. *protein-arginine deiminase type-4*) zachodzi w obrębie miejsca wiązania DNA i skutkuje odłącze-

niem od chromatyny i jej dekondensacją, przez co stymuluje pluripotencję i utrzymanie komórek macierzystych. Cytrulinacja H1 R53 jest również związana z chorobami autoimmunologicznymi takimi jak toczeń rumieniowaty układowy (SLE). Powstawanie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET) ma, z jednej strony kluczowe znaczenie jako pierwsza linia obrony przed bakteriami, wirusami i pierwotniakami, natomiast z drugiej może odgrywać rolę w chorobach autoimmunologicznych, w których NEToza jest wywoływana przez stany zapalne. W procesie tym peptydy cytrulinowane histonów przedostają się do krwioobrotu, gdzie indukują powstawanie autooprzeciwciał. Cytrulinowane peptydy H1R53cit, H1.0R73cit i H1.0R93cit wykryto w aktywowanych neutrofilach. W surowicy pacjentów cierpiących na SLE zidentyfikowano cytrulinowany peptyd H1.2. Konieczne są dalsze badania, aby określić wartość predykcyjną cytrulinowanych peptydów H1 krążących we krwi [5].

#### Ubikwitynacja

Monoubikwitynowany histon H1.5 został powiązany z ochroną antywirusową w komórkach CD4+T odpornych na wirusa HIV-1. Niektóre ludzkie linie komórkowe są odporne na infekcję HIV-1 i wydzielają czynnik nazwany HRF (ang. *HIV-1 resistance factor*) zdolny do hamowania replikacji HIV-1. Stwierdzono, że choć H1.5 nie był wymagany do pośredniczenia przez HRF ochrony przeciwko HIV-1, jego ekspresja była niezbędna dla aktywności HRF. Postawiono hipotezę, że monoubikwitynowany H1.5 przyczynia się do ekspresji HRF i, że jego sekrecja do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może również ułatwiać transport HRF [5].

#### ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE HISTONY ŁĄCZNIKOWE

Histony łącznikowe, podobnie jak rdzeniowe i nukleosomy, wykrywane są w cytoplazmie, na powierzchni komórek i w płynach ustrojowych. Histony są uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez stymulowane, uszkodzone lub umierające komórki [1]. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą występować w kompleksie z DNA, z innymi białkami jądrowymi, w stanie wolnym [49] lub w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs, ang. *extracellular vesicles*) [50]. Wiązaniu histonów do powierzchni komórki sprzyja ich dodatni ładunek i anionowy charakter fosfolipidów błony komórkowej. Histony różnią się powinowactwem wiązania do poszczególnych fosfolipidów, przy czym histon H1 najsilniej wiąże się do fosfatydyloetanolaminy [49].

Wszystkie podtypy histonów mogą przechodzić przez błonę komórek nabłonka dzięki wiązaniu do fosfolipidów, niezależnie od endocytozy. Nabłonek bariery krew-mózg jest znacznie mniej przepuszczalny niż peryferyjny nabłonek dzięki obecności złączy ścisłych typu *tight junctions*. Dotychczas nie wiadomo, czy histony mogą przedostawać się przez nieuszkodzoną barierę krew-mózg. Histony przechodzą z surowicy do mózgu za pomocą transcytozy, rozzerwania połączeń między komórkami bariery krew-mózg między oraz migracji za pośrednictwem neutrofilów. Migracja histonów do centralnego układu nerwowego może być ułatwiona przez ich kotransport z innymi peryferyjnymi



DAMP (ang. *damage associated molecular pattern*), jak peptydy A $\beta$  i białko HMGB1 (ang. *high mobility group protein B1*). W chorobie Alzheimera peryferyjne peptydy A $\beta$  przechodzą przez barierę krew-mózg i dostają się do parenchymy mózgu. H1 może reagować z tymi peptydami i razem z nimi być przenoszony przez barierę krew-mózg. Histony mogą przejść do mózgu w kompleksach DAMP uwalnianych z komórek nekrotycznych. HMGB1 zawarty w DAMP nasila endocytozę [49].

Histony obecne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej niszczą komórki glejowe, które zapewniają prawidłowe funkcjonowanie neuronów. Histony H1, w odróżnieniu od histonów rdzeniowych, są neurotoksyczne [51]. Ponadto histon H1 ma działanie neuroimmunomodulacyjne, zwiększając reaktywność astrocytów, które przyjmują aktywną morfologię gwiazdzistą.

Coraz więcej dowodów wskazuje, że neurony i komórki glejowe mogą uwalniać histony do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jednak proces ten jest jeszcze w dużej mierze niewyjaśniony [49]. Warianty H1 wykrywane w cytoplazmie zostały powiązane z chorobami neurodegeneracyjnymi. H1 zidentyfikowano w cytozolu neuronów i astrocytów zlokalizowanych w obrębie płytek  $\beta$ -amyloidu w tkance mózgu w mysim modelu choroby Alzheimera. Obecność histonów w cytozolu może być pierwszym etapem dalszego uwolnienia do przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub wskazywać na przenoszenie do błony komórkowej. Pozajądrowa frakcja H1 jest przeważnie fosforylowana. Fosforylowany H1.2 wiąże się do struktur amyloidowych utworzonych z amyloidu A $\beta$ 1-42 i  $\alpha$ -synukleiny, charakterystycznych dla chorób Alzheimera i Parkinsona. H1 został zidentyfikowany w zagregowanych płytkach  $\beta$ -amyloidu i w płytkach rozproszonych [8].

Wykazano, że za pomocą detergentów można zmienić konformację CTD histonu łącznikowego w strukturę  $\beta$ , zdolną do tworzenia włókien przypominających wstążki (ang. *ribbon-like fibers*), co sugeruje, że histony H1 mogą tworzyć włókna amyloidopodobne [52]. W innych badaniach stwierdzono, że histon H1 może wchodzić w interakcję z peptydem  $\beta$ -amyloidowym, wywołując zmianę konformacji obu białek w kierunku wyższej zawartości struktury  $\beta$ . Powoduje to tworzenie grubszych agregatów amyloidowych, niż te tworzone bez udziału histonu łącznikowego. Sugeruje to, że histon H1 pomaga w fałdowaniu monomerów A $\beta$ 1-42 i promuje równoległą asocjację większej liczby fibryli [53].

Histony łącznikowe i rdzeniowe są wykrywalne w płynie mózgowo-rdzeniowym ludzi zdrowych. Podwyższony poziom krążących zewnątrzkomórkowych histonów u pacjentów z chorobami neurologicznymi wskazuje, że histony mogą być pomocne do diagnostyki i monitorowania progresji chorób [49]. Pacjenci cierpiący na choroby Alzheimera i Parkinsona, wykazują wysoki poziom histonów w surowicy [54].

Coraz więcej dowodów sugeruje, że histony krążące we krwi, które uwalniane są do krwioobiegu w wyniku śmierci komórek lub aktywacji komórek odpornościowych mogą

być również wykorzystane jako biomarkery do wykrywania raka oraz monitorowania progresji choroby podczas procesu leczenia [50].

## PODSUMOWANIE

Histony są bardzo konserwatywnymi białkami o istotnej funkcji polegającej na upakowaniu DNA i regulacji ekspresji genów, które posiadają liczne miejsca różnorodnych modyfikacji potranslacyjnych. Histony łącznikowe są najbardziej zróżnicowaną i niejednorodną grupą histonów. Ich szczególne cechy wynikają ze struktury pierwszorzędowej, bogatej w aminokwasy zasadowe. Reszty Lys i Arg w łańcuchu H1, z jednej strony nadają ładunek dodatni umożliwiając wiązanie DNA a z drugiej są miejscami docelowymi modyfikacji potranslacyjnych, które spełniają wielorakie funkcje. Badania nad modyfikacjami histonów, to względnie nowe i szybko rozwijające się pole badawcze, którego rozwój wynika z dostępności metod o coraz większej czułości i przepustowości, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów analizy. Prowadzą one do zgłębienia mechanizmów rozwoju chorób i dają nadzieję na odkrycie nowych biomarkerów i strategii terapeutycznych. Jak wykazano w niniejszej pracy, pewne zmiany w ekspresji i PTM wariantów histonów łącznikowych zostały powiązane z chorobami nowotworowymi, autoimmunologicznymi i neurodegeneracyjnymi. Pojawia się coraz więcej danych wskazujących na potencjalne zastosowanie wariantów histonów i ich modyfikacji do badań przesiewowych, diagnostyki, stratyfikacji pacjentów czy terapii celowanej. Dodatkowo wykrycie histonów w płynach ustrojowych, otwiera drogę do identyfikacji biomarkerów, których analiza ma mały stopień inwazyjności. Konieczna jest jednak standaryzacja podejścia i walidacja, aby określić potencjał histonów jako biomarkerów nowotworów czy innych stanów patologicznych. Poza histonami łącznikowymi, również histony rdzeniowe mogą być przydatne do diagnostyki oraz terapii chorób człowieka.

## PIŚMIENNICTWO

1. Chen R, Kang R, Fan X-G, Tang D (2014) Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis* 5:e1370–e1370
2. Henikoff S, Smith MM (2015) Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a019364
3. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45
4. Anderson KW, Turko IV (2015) Histone post-translational modifications in frontal cortex from human donors with Alzheimer's disease. *Clin Proteomics* 12:26
5. Andrés M, García-Gomis D, Ponte I, Suau P, Roque A (2020) Histone H1 Post-Translational Modifications: Update and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 21:5941
6. Moiana M, Aranda F, de Larrañaga G (2021) A focus on the roles of histones in health and diseases. *Clin Biochem* 94:12–19
7. Nozaki T, Kanai M (2021) Chemical Catalysis Intervening to Histone Epigenetics. *Acc Chem Res* 54:2313–2322
8. Saha A, Dalal Y (2021) A glitch in the snitch: the role of linker histone H1 in shaping the epigenome in normal and diseased cells. *Open Biol* 11:210124
9. Ye X, Feng C, Gao T, Mu G, Zhu W, Yang Y (2017) Linker Histone in Diseases. *Int J Biol Sci* 13:1008–1018
10. Hergeth SP, Schneider R (2015) The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep* 16:1439–1453

11. Happel N, Doenecke D (2009) Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1–12
12. Zhou B-R, Jiang J, Feng H, Ghirlando R, Xiao TS, Bai Y (2015) Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones. *Mol Cell* 59:628–638
13. Noberini R, Restellini C, Savoia EO, Bonaldi T (2020) Enrichment of histones from patient samples for mass spectrometry-based analysis of post-translational modifications. *Methods San Diego Calif* 184:19–28
14. Clausell J, Happel N, Hale TK, Doenecke D, Beato M (2009) Histone H1 Subtypes Differentially Modulate Chromatin Condensation without Preventing ATP-Dependent Remodeling by SWI/SNF or NURF. *PLoS ONE* 4:e0007243
15. Espinosa LA, Ramos Y, Andújar I, et al (2021) In-solution buffer-free digestion allows full-sequence coverage and complete characterization of post-translational modifications of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 in a single ESI-MS spectrum. *Anal Bioanal Chem* 413:7559–7585
16. Happel N, Doenecke D (2009) Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1–12
17. Lai S, Jia J, Cao X, Zhou P-K, Gao S (2022) Molecular and Cellular Functions of the Linker Histone H1.2. *Front Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.773195>
18. Garcia-Saez I, Menoni H, Boopathi R, et al (2018) Structure of an H1-Bound 6-Nucleosome Array Reveals an Untwisted Two-Start Chromatin Fiber Conformation. *Mol Cell* 72:902–915.e7
19. Ura K, Hayes JJ, Wolffe AP (1995) A positive role for nucleosome mobility in the transcriptional activity of chromatin templates: restriction by linker histones. *EMBO J* 14:3752–3765
20. Raghuram N, Strickfaden H, McDonald D, Williams K, Fang H, Mizzen C, Hayes JJ, Th'ng J, Hendzel MJ (2013) Pin1 promotes histone H1 dephosphorylation and stabilizes its binding to chromatin. *J Cell Biol* 203:57–71
21. Sarg B, Lopez R, Lindner H, Ponte I, Suau P, Roque A (2015) Identification of novel post-translational modifications in linker histones from chicken erythrocytes. *J Proteomics* 113:162–177
22. Thorslund T, Ripplinger A, Hoffmann S, et al (2015) Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527:389–393
23. Sancho M, Diani E, Beato M, Jordan A (2008) Depletion of human histone H1 variants uncovers specific roles in gene expression and cell growth. *PLoS Genet* 4:e1000227
24. Fyodorov DV, Zhou B-R, Skoultchi AI, Bai Y (2018) Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:192–206
25. Salinas-Pena M, Rebollo E, Jordan A (2024) Imaging analysis of six human histone H1 variants reveals universal enrichment of H1.2, H1.3, and H1.5 at the nuclear periphery and nucleolar H1X presence. *eLife* 12:RP91306
26. Zhou Y, Tao L, Qiu J, Xu J, Yang X, Zhang Y, Tian X, Guan X, Cen X, Zhao Y (2024) Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther* 9:1–86
27. Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Nakanishi M, Wakita T, Ogura Y, Yatabe Y, Shirai T (2012) Histone H1 expression in human prostate cancer tissues and cell lines. *Pathol Int* 62:84–92
28. Medrzycki M, Zhang Y, McDonald JF, Fan Y (2012) Profiling of linker histone variants in ovarian cancer. *Front Biosci Landmark Ed* 17:396–406
29. Torres CM, Biran A, Burney MJ, et al (2016) The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science* 353:aaf1644
30. Gabrovsky N, Georgieva M, Laleva M, Uzunov K, Miloshev G (2013) Histone H1.0—a potential molecular marker with prognostic value for patients with malignant gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 155:1437–1442
31. Bauden M, Kristl T, Andersson R, Marko-Varga G, Ansari D (2017) Characterization of histone-related chemical modifications in formalin-fixed paraffin-embedded and fresh-frozen human pancreatic cancer xenografts using LC-MS/MS. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 97:279–288
32. Boyd LNC, Ali M, Leeflang MMG, Treglia G, Vries R de, Large TYSL, Besselink MG, Giovannetti E, Laarhoven HWM van, Kazemier G (2023) Diagnostic accuracy and added value of blood-based protein biomarkers for pancreatic cancer: a meta-analysis of aggregate and individual participant data. *eClinicalMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101747>
33. Zhao W, Yu H, Han Z, Gao N, Xue J, Wang Y (2015) Clinical significance of joint detection of serum CEA, SCCA, and bFGF in the diagnosis of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8:9506
34. Dong S, Li W, Wang L, et al (2019) Histone-Related Genes Are Hypermethylated in Lung Cancer and Hypermethylated HIST1H4F Could Serve as a Pan-Cancer Biomarker. *Cancer Res* 79:6101–6112
35. Khachaturov V, Xiao G-Q, Kinoshita Y, Unger PD, Burstein DE (2014) Histone H1.5, a novel prostatic cancer marker: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 45:2115–2119
36. Scaffidi P (2016) Histone H1 alterations in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1859:533–539
37. Hechtman JF, Beasley MB, Kinoshita Y, Ko HM, Hao K, Burstein DE (2013) Promyelocytic leukemia zinc finger and histone H1.5 differentially stain low- and high-grade pulmonary neuroendocrine tumors: a pilot immunohistochemical study. *Hum Pathol* 44:1400–1405
38. Lin S, Garcia BA (2012) Examining Histone Posttranslational Modification Patterns by High-Resolution Mass Spectrometry. In: *Methods Enzymol*. Elsevier, str 3–28
39. Kilichowska M, Kotliński M (2022) Histone H1 – struktura i funkcja. *Postępy Biochem* 68:410–424
40. neXtProt platform. <https://www.nextprot.org/>. Accessed 1 Jun 2024
41. Brockers K, Schneider R (2019) Histone H1, the Forgotten Histone. *Epigenomics* 11:363–366
42. Di Cerbo V, Schneider R (2013) Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation. *Brief Funct Genomics* 12:231–243
43. Balhorn R, Chalkley R, Granner D (1972) Lysine-rich histone phosphorylation. A positive correlation with cell replication. *Biochemistry* 11:1094–1098
44. Bleher R, Martin R (1999) Nucleo-cytoplasmic translocation of histone H1 during the HeLa cell cycle. *Chromosoma* 108:308–316
45. Ryan MB, Der CJ, Wang-Gillam A, Cox AD (2015) Targeting RAS-mutant cancers: is ERK the key? *Trends Cancer* 1:183–198
46. Kim K, Jeong KW, Kim H, Choi J, Lu W, Stallcup MR, An W (2012) Functional interplay between p53 acetylation and H1.2 phosphorylation in p53-regulated transcription. *Oncogene* 31:4290–4301
47. Thorslund T, Ripplinger A, Hoffmann S, et al (2015) Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527:389–393
48. Li X, Li C, Jin J, et al (2018) High PARP-1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP-1 inhibitor and SA-HA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects. *eBioMedicine* 38:47–56
49. Richards CM, McRae SA, Ranger AL, Klegeris A (2023) Extracellular histones as damage-associated molecular patterns in neuroinflammatory responses. *Rev Neurosci* 34:533–558
50. Tsoneva DK, Ivanov MN, Conev NV, Manev R, Stoyanov DS, Vinciguerra M (2023) Circulating Histones to Detect and Monitor the Progression of Cancer. *Int J Mol Sci* 24:942
51. Gilthorpe JD, Oozer F, Nash J, Calvo M, Bennett DL, Lumsden A, Pini A (2013) Extracellular histone H1 is neurotoxic and drives a pro-inflammatory response in microglia. *F1000Research* 2:148
52. Roque A, Teruel N, López R, Ponte I, Suau P (2012) Contribution of hydrophobic interactions to the folding and fibrillation of histone H1 and its carboxy-terminal domain. *J Struct Biol* 180:101–109
53. Roque A, Sortino R, Ventura S, Ponte I, Suau P (2015) Histone H1 Favors Folding and Parallel Fibrillar Aggregation of the 1–42 Amyloid- $\beta$  Peptide. *Langmuir* 31:6782–6790

54. Bolton, Russelakis-Carneiro, Betmouni, Perry (1999) Non-nuclear histone H1 is upregulated in neurones and astrocytes in prion and Alzheimer's diseases but not in acute neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:425-432
55. Di Liegro CM, Schiera G, Di Liegro I (2018) H1.0 Linker Histone as an Epigenetic Regulator of Cell Proliferation and Differentiation. *Genes* 9:310
56. Gokey NG, Ward JM, Milliman EJ, Deterding LJ, Trotter KW, Archer TK (2023) The Loss of the H1.4 Linker Histone Impacts Nascent Transcription and Chromatin Accessibility. *bioRxiv* 2023.05.14.540702
57. Behrends M, Engmann O (2020) Linker histone H1.5 is an underestimated factor in differentiation and carcinogenesis. *Environ Epigenetics* 6:dvaa013
58. Machida S, Hayashida R, Takaku M, Fukuto A, Sun J, Kinomura A, Tashiro S, Kurumizaka H (2016) Relaxed Chromatin Formation and Weak Suppression of Homologous Pairing by the Testis-Specific Linker Histone H1T. *Biochemistry* 55:637-646
59. Tanaka H, Matsuoka Y, Onishi M, Kitamura K, Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A, Okuyama A, Nishimune Y (2006) Expression profiles and single-nucleotide polymorphism analysis of human HANP1/H1T2 encoding a histone H1-like protein. *Int J Androl* 29:353-359
60. Choppakatla P, Dekker B, Cutts EE, Vannini A, Dekker J, Funabiki H Linker histone H1.8 inhibits chromatin binding of condensins and DNA topoisomerase II to tune chromosome length and individualization. *eLife* 10:e68918
61. Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM (2003) HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10546-10551



# Linker histones H1 in human disease

Adrianna Żukowska<sup>✉</sup>, Joanna Perła-Kaján<sup>✉</sup>

Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznań University of Life Sciences

<sup>✉</sup>corresponding authors: adrianna.zukowska@up.poznan.pl, kajan@up.poznan.pl

**Keywords:** linker histone, acetylation, methylation, phosphorylation, cancer, neurodegeneration, biomarker

## ABSTRACT

Linker histones (H1) are basic proteins that are part of the nucleosome structure in the cell nucleus and are involved in the packaging of genetic material and the regulation of gene expression. As research progressed, it was discovered that linker histones constitute the largest group of histones in terms of variants found in humans. Even though the H1 variants differ slightly in the primary structure, they can perform different functions, undergo multiple post-translational modifications and differ in cellular localization. In addition to the nucleus, histones H1 can occur in the cytoplasm, on the cell surface and in the intercellular space. In these places, they play a supporting role for the immune system and act as signaling molecules. Changes in the levels of histones and their post-translational modifications have been associated with many human diseases and it is postulated that some of them may serve as biomarkers or therapeutic targets.

