

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
Zespół Biosyntezy Białka

**Marta Sikora**

**Metabolizm tiolaktonu homocysteiny  
i rola procesu N-homocysteinytacji białek**

Rozprawa doktorska

Promotorzy:

Prof. dr hab. Hieronim Jakubowski

Prof. dr hab. Tomasz Twardowski

Poznań 2010

*Panu prof. dr hab. Hieronimowi Jakubowskiemu  
Składam serdeczne podziękowania  
Za powierzenie mi interesującego tematu badań  
Oraz wszelką pomoc, wyrozumiałość i niezwykle cenne uwagi podczas jego realizacji.*

*Panu Prof. dr hab. Tomaszowi Twardowskiemu  
Składam serdeczne podziękowania  
Za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy,  
Życzliwość, wyrozumiałość i wsparcie.*

*Dziękuję za okazaną pomoc i życzliwą współpracę:  
Prof. dr hab. Maciejowi Stobieckiemu i dr Łukaszowi Marczakowi,  
Prof. dr hab. Andrzejowi Guranowskiemu i dr Jarosławowi Zimmemu,  
Dr Rafałowi Głowackiemu,  
Mgr Joannie Suszyńskiej.*

*Wszystkim pracownikom Pracowni Biochemii tRNA  
Dziękuję za miłą atmosferę i wszelką pomoc.*

*Pani Krystynie Ludwiczak dziękuję za okazaną życzliwość.*

*Wspaniałym koleżankom z Zespołu Biosyntezy Białka,  
W szczególności Agacie Tyczewskiej, Kamilli Żywickiej, Joannie Perla-Kaján  
Dziękuję za twórcze dyskusje i serdeczną atmosferę.*

*Mojej Rodzinie  
Dziękuję za zrozumienie i wsparcie.*

## Spis treści:

<b>1. Wprowadzenie</b> .....	<b>6</b>
1.1 Metabolizm homocysteiny.....	6
1.2 Metabolizm i toksyczność homocysteiny u <i>Escherichia coli</i> .....	8
1.3 Hiperhomocysteinemia .....	10
1.4 Terapia witaminowa a obniżanie poziomu homocysteiny.....	12
1.5 Prawdopodobne patomechanizmy chorób układu krążenia związane z Hcy .....	14
1.5.1 Stres oksydacyjny .....	15
1.5.2 Inhibicja oksydazy lizynowej.....	16
1.5.3 Procesy zapalne.....	16
1.6 Formy występowania Hcy w ludzkim organizmie i ich efekt biologiczny .....	17
1.6.1 Formy utlenione Hcy .....	17
1.6.2 S-adenozylhomocysteina (SAH).....	20
1.7 Tiołakton homocysteiny .....	20
1.8 N-homocysteinylacja białek .....	24
1.9 Konsekwencje funkcjonalne N-homocysteinylacji białek.....	27
1.9.1 Zakrzepica.....	29
1.9.2 Stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedź na niesfaldowane białka .....	32
1.9.3 Immunogenność N-homocysteinylowanych białek .....	33
1.10 Zaangażowanie tiołaktonu Hcy w choroby układu krążenia .....	35
1.11 Detoksykacja tiołaktonu homocysteiny .....	35
<b>2. Cel pracy</b> .....	<b>39</b>
<b>3. Materiały i metody</b> .....	<b>40</b>
3.1 Materiał biologiczny .....	40
3.2 Odczynniki.....	41
3.3 Roztwory.....	43
3.4 Modyfikacja białek tiołaktonem homocysteiny.....	46
3.5 Trawienie trypsyną białek dostępnych komercyjnie oraz zawartych w surowicy ...	46
3.7 Analiza peptydów białek surowicy ludzkiej w układzie LC-MS/MS .....	48
3.8 Określanie miejsc modyfikacji białek homocysteiną .....	49
3.9 Izolacja hydrolazy bleomycyny (BLH) z łożyska ludzkiego .....	49
3.9.1 Chromatografia jonowymienna.....	50
3.9.2 Testy aktywności enzymatycznej hydrolazy bleomycyny .....	50

3.9.3 Sączenie molekularne .....	51
3.9.4 Rozdział chromatograficzny na kolumnie hydroksypatytywowej .....	51
3.9.5 Analiza białek w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych i denaturujących .....	51
3.10 Oznaczanie specyficzności substratowej tiolaktonazy wyizolowanej z łożyska ludzkiego.....	54
3.11 Hodowla linii komórkowej HeLa .....	54
3.12 Transformacja bakterii <i>E.coli</i> plazmidami zawierającymi shRNA specyficzne wobec genu hydrolazy bleomycyny metodą <i>heat shock</i> .....	54
3.13 Oczyszczanie plazmidowego DNA .....	55
3.14 Transfekcja komórek HeLa plazmidami .....	55
3.15 Testy żywotności komórek HeLa .....	56
3.16 Izolacja białek z komórek HeLa .....	57
3.17 Western blot.....	58
3.18 Oznaczanie ilości tiolaktonu Hcy w mediach hodowlanych komórek HeLa za pomocą HPLC .....	59
3.19 Hodowla kultur <i>Escherichia coli</i> .....	60
3.20 Oznaczanie ilości tiolaktonu Hcy w mediach hodowlanych <i>E.coli</i> za pomocą HPLC .....	60
3.21 Oznaczanie Hcy N-związanej z białkiem .....	61
3.22 Eksperymenty z wywołaniem szoku cieplnego w hodowlach <i>E.coli</i> .....	61
<b>4. Wyniki i dyskusja.....</b>	<b>62</b>
4.1 Metabolizm homocysteiny oraz inhibicja wzrostu u <i>E.coli</i> .....	62
4.1.1 Kumulacja tiolaktonu Hcy a inhibicja wzrostu <i>E.coli</i> .....	62
4.1.2 Wpływ octanu sodu na szybkość wzrostu i kumulację tiolaktonu Hcy w hodowlach <i>E.coli</i> .....	64
4.1.3 Wpływ Ile, Leu, Met na szybkość wzrostu i kumulację tiolaktonu Hcy w hodowlach <i>E.coli</i> prowadzonych z dodatkiem Hcy .....	67
4.1.4 Inkorporacja Hcy do białek.....	71
4.1.5 Koszt energetyczny syntezy tiolaktonu Hcy w hodowlach <i>E.coli</i> z dodatkiem Hcy ..	74
4.1.6 Wpływ Hcy na żywotność komórek bakteryjnych. ....	75
4.1.7 Wpływ Hcy na wrażliwość komórek <i>E.coli</i> na szok cieplny .....	76
4.2 Hydrolaza bleomycyny jako enzym o aktywności hydrolizującej tiolakton Hcy ....	76
4.2.1 Izolacja i identyfikacja enzymu o aktywności tiolaktonazy Hcy z łożyska ludzkiego.....	77

4.2.2	Specyficzność substratowa ludzkiej tiolaktonazy/hydrolazy bleomycyny .....	82
4.2.3	Rola BLH w metabolizmie Hcy w komórkach ludzkich .....	83
4.3	Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji w białkach <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> . .....	90
4.3.1	Analiza białek zmodyfikowanych HTL za pomocą spektrometrii mas – ocena stopnia modyfikacji białek <i>in vitro</i> . .....	90
4.3.2.	Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji w białkach <i>in vitro</i> . .....	95
4.3.2.1.	Albumina ludzka .....	95
4.3.2.2.	Hemoglobina.....	102
4.3.2.3	Fibrynogen .....	104
4.3.3.	Analiza fragmentacyjna wybranych N-homocysteinyłowanych peptydów albuminy ludzkiej.....	108
4.3.4	Analiza ilościowa peptydu albuminy zawierającego zmodyfikowaną resztę lizyny 525 w próbach surowic ludzkich pochodzących od pacjentów z chorobą wieńcową oraz od pacjentów z mutacją w genie <i>CBS</i> . .....	110
<b>5.</b>	<b>Wnioski .....</b>	<b>117</b>
<b>6.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>Wykaz skrótów .....</b>	<b>127</b>
<b>8.</b>	<b>Wykaz rysunków i tabel .....</b>	<b>130</b>

## 1. Wprowadzenie

### 1.1 Metabolizm homocysteiny

Homocysteina (Hcy) jest niebiałkowym aminokwasem siarkowym. Jedynym znanym źródłem homocysteiny w ludzkim organizmie jest metionina (Met) pochodząca z białek przyjmowanych z pokarmem (mięso, mleko, jaja itp.). Metionina jest uwalniana z białek w układzie trawiennym, a następnie jako wolny aminokwas jest transportowana wraz z krwią do poszczególnych organów i pobierana przez komórki. Wewnątrz komórek, metionina jest wykorzystywana do syntezy nowych białek, a także S-adenozylometioniny (SAM), uniwersalnego donora grup metylowych, w tzw. cyklu aktywowanego metylu, podczas którego powstaje również homocysteina.

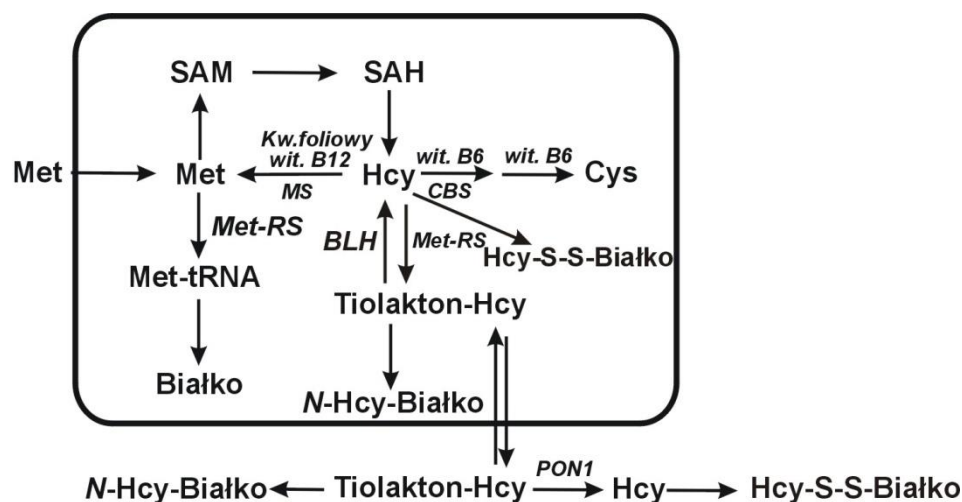
Aktywacja metioniny do SAM zachodzi przy udziale adenozylotransferazy metioninowej (EC 2.5.1.6). Reakcja polega na przeniesieniu grupy adenozylowej z ATP na atom siarki metioniny. Grupa metylowa metioniny jest aktywowana na skutek przyjęcia dodatniego ładunku przez sąsiedni atom siarki, co sprawia, że SAM jest cząsteczką bardzo reaktywną. Następnie grupa metylowa z SAM jest przenoszona przez metylotransferazę na akceptor (np. cytozynę w DNA). W ten sposób z SAM powstaje S-adenozylhomocysteina (SAH), która w reakcji katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny (EC 3.3.1.1) ulega hydrolizie do Hcy i adenozyliny. Enzymatyczna hydroliza SAH jest jedynym znanym źródłem Hcy w ludzkim organizmie (**Rys.1**). Metionina może zostać odtworzona poprzez transfer grupy metylowej z 5,10-metylotetrahydrofolianu na homocysteinę, w reakcji katalizowanej przez syntazę metioniny (MS), (EC 2.1.1.13). Do remetylacji niezbędna jest witamina B<sub>12</sub> oraz 5,10-metylotetrahydrofolian, w którego powstawanie zaangażowana jest reduktaza 5,10-metylotetrahydrofolianu (MTHFR), (E.C 1.5.1.20). Jest to jeden z dwóch znanych enzymów (obok mutazy metylmalonylu CoA), które wymagają metylkobalaminy (biologicznie aktywnej formy witaminy B<sub>12</sub>) jako koenzymu. Innym enzymem biorącym udział w remetylacji Hcy do metioniny jest metylotransferaza betaina : homocysteina (EC 2.1.1.5), w przypadku której donorem grupy metylowej jest betaina lub trimetyloglicyna. Ta alternatywna reakcja zachodzi jedynie w wątrobie i nerkach, w przeciwieństwie do remetylacji Hcy katalizowanej przez syntazę metioniny, która zachodzi prawdopodobnie we wszystkich tkankach. Aktywna forma metioniny – SAM – jest podstawowym donorem grupy metylowej w wielu reakcjach, np. metylacji DNA, RNA, hormonów, lipidów czy też neuroprzekazników.

Homocysteina może również ulegać konwersji do cysteiny. W pierwszym etapie szlaku transsulfurylacji, Hcy i seryna ulegają kondensacji do cystationiny, przy udziale  $\beta$ -syntazy cystationiny (CBS), (EC 4.2.1.22). Następnie  $\gamma$ -liaza cystationiny (EC 4.4.1.1) deaminuje oraz hydrolizuje cystationinę do kwasu  $\alpha$ -ketobutyrowego i cysteiny. Nadmiar cysteiny jest utleniany do tauryny lub organicznych siarczanów lub też jest wydalany z moczem. W warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy tworzeniem i degradacją homocysteiny, około 50% Hcy ulega remetylacji do Met, a nadmiar Hcy jest transportowany do krwioobiegu.

Oba enzymy uczestniczące w szlaku transsulfurylacji wymagają fosforanu pirydoksalu (aktywna forma witaminy B<sub>6</sub>) jako kofaktora. Szlak ten ograniczony jest do wątroby, nerek, jelita cienkiego i trzustki [1]. W związku z tym, że metabolizm Hcy uzależniony jest od kofaktorów będących pochodnymi witamin, niedobór którejkolwiek z nich (witaminy B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> czy kwasu foliowego) jest skorelowany z podwyższonym poziomem homocysteiny w organizmie, czyli hiperhomocysteinemią [1].

Ze względu na swoje podobieństwo strukturalne do metioniny, Hcy może być rozpoznana i błędnie aktywowana zamiast Met przez syntetazę metionyno- tRNA (MetRS). Jednak wbudowaniu Hcy do białka zapobiega mechanizm naprawczy MetRS, w wyniku którego powstaje tiolakton homocysteiny (HTL). Tioester ten jest reaktywny i łączy się wiązaniem amidowym z grupą  $\epsilon$ -aminową reszty lizyny w białkach, powodując N-homocysteinylację białka [2]. Homocysteina może również ulegać konwersji do S-nitrozo-Hcy, SAH, dwusiarczków Hcy, kwasu homocysteinowego [3].

Synteza tiolaktonu Hcy wzrasta, gdy reakcje remetylacji i transsulfurylacji zostają zaburzone przez mutacje w genach kodujących CBS, MS, czy MTHFR, lub też przy niedoborach 5,10-metylotetrahydrofolianu.



**Rysunek 1. Schemat przedstawiający metabolizm Hcy u ludzi.** Odwracalna enzymatyczna hydroliza SAH do Hcy oraz adenozyliny jest jedynym źródłem Hcy w ludzkim organizmie. Poziom Hcy jest regulowany na drodze remetylacji do Met, katalizowanej przez enzym syntazę metioninową (MS), a także na drodze transsulfurylacji do cystationiny, a następnie cysteiny, katalizowanej przez enzymy  $\beta$ -syntazę cystationową (CBS) oraz  $\gamma$ -liazę cystationiny. Poziom syntezy HTL zależy od czynników predysponujących do miażdżycy (hiperhomocysteinemia, dieta bogata w Met), a także od aktywności tiolaktonazowej enzymów wewnątrzkomórkowego - hydrolazy bleomycyny (BLH) oraz zewnątrzkomórkowego – paraoksonazy osocza związanej z HDL (PON1). Hcy tworzy mostki dwusiarczkowe, szczególnie z białkami (Hcy-S-S-białka). Tiolakton Hcy reaguje spontanicznie z białkami, tworząc N-Hcy-białka. Rysunek wg [4].

## 1.2 Metabolizm i toksyczność homocysteiny u *Escherichia coli*

U *E.coli* w obróbkę Hcy, tj. zapobieganie jej inkorporacji do białek poprzez tworzenie cyklicznego tioestru – tiolaktonu Hcy, zaangażowane są, poza syntetazą metionilo-tRNA, także syntetazy izoleucylo-tRNA (IleRS) oraz leucylo-tRNA (LeuRS). Reakcje te, znane w literaturze anglojęzycznej pod nazwą *editing* (obróbka), zapobiegają translacyjnej inkorporacji Hcy do białek. Jak wykazano w 1995 r. [5], wszystkie trzy wymienione enzymy są odpowiedzialne za *editing* egzogennej homocysteiny (pobieranej z medium hodowlanego), natomiast jedynie MetRS jest zaangażowana w obróbkę endogennej Hcy (powstającej na ścieżce biosyntezy metioniny). Endogenna Hcy jest dostępna i obrabiana tylko przez syntetazę metionilo-tRNA [6]. Z drugiej strony, egzogenna Hcy jest dostępna i podlega obróbce przez każdą syntetazę, która może ją błędnie aktywować. To sugeruje, że proces *editingu* Hcy w komórkach bakteryjnych jest uzależniony od kompartmentyzacji metabolizmu Hcy, co może powodować ograniczenie dostępu niektórych syntetaz do poszczególnych aminokwasów wewnątrzkomórkowych.

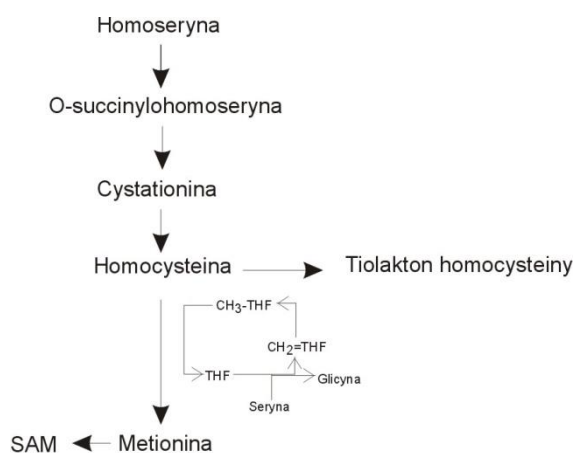


W komórkach *E.coli* Hcy powstaje w reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -liazę cystationinową z cystationiny, lub też w reakcji katalizowanej przez S-rybozylohomocysteinazę (LuxS), która rozkłada S-rybozylohomocysteinę do homocysteiny oraz 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedion (DPD) [7]. Niskie stężenia Hcy ( $\geq 0,5$  mM) dodawane do medium minimalnego hamują wzrost *E.coli* [8]. Badacze Tuite i wsp. sugerują, że toksyczność Hcy w *E.coli* jest spowodowana zaburzeniami w biosyntezie aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. W przeprowadzonych badaniach wykazali, że izoleucyna oraz jej prekursor-  $\alpha$ -keto- $\beta$ -metylwalerian (KMV), dodawane do hodowli, których wzrost został zahamowany przez Hcy, powodują zniesienie tej inhibicji [9]. Na tej podstawie zasugerowano, że Hcy blokuje pierwszy etap biosyntezy izoleucyny, mianowicie konwersję treoniny do  $\alpha$ -ketobutyranu, przeprowadzaną przez deaminazę treoninową (TD). Jak wykazano, Hcy hamuje aktywność TD *in vitro*, a ponadto podwyższona aktywność TD częściowo chroni przed toksycznym efektem Hcy. Jednakże zastosowanie wyższych stężeń Hcy (np. 8mM) powoduje inhibicję wzrostu *E.coli*, która nie może zostać w pełni odwrócona przez dodatek izoleucyny do medium. To wskazuje, że Hcy w wyższych stężeniach wywiera o wiele bardziej złożony wpływ na fizjologię komórek. Prawdopodobnie ważną rolę odgrywa kumulacja tiolaktonu Hcy w tych warunkach.

Roe i wsp. wykazali, że w obecności słabych kwasów organicznych, w lekko kwaśnym pH, zostaje zahamowana ścieżka biosyntezy metioniny, w wyniku czego następuje nadmierna kumulacja homocysteiny [8]. Słabe kwasy organiczne, ze względu na swoje właściwości antybakteryjne, są stosowane jako konserwanty żywności. Ich toksyczność jest wieloczynnikowa i obejmuje m.in. zdolność swobodnej dyfuzji niezdysoncjowanych kwasów przez błony komórkowe i uwalnianie protonów w cytoplazmie, obniżanie pH cytoplazmatycznego [10], interkalację niezdysoncjowanych kwasów do błony lipidowej w warunkach niskiego pH zewnętrznego [11] oraz zmiany w równowadze anionów [12]. Zgodnie z tymi mechanizmami, inhibicja wzrostu bakterii jest zależna od pH. Liczne badania nad mechanizmem działania kwasów organicznych wykazały, że inhibicja wzrostu jest spowodowana zmianami w pH cytoplazmatycznym oraz statusie energetycznym komórki. Roe i wsp. zaobserwowali, że metionina odwraca efekt inhibicji wzrostu *E.coli* spowodowanej słabymi kwasami organicznymi, a ponadto, że produkty pośrednie ścieżki biosyntezy metionina - homoseryna, O-succinylohomoseryna, cystationina - nie mają takich samych właściwości odwracających

efekt inhibicji (**Rys.2**). Badacze Ci zasugerowali, że octan hamuje aktywność któregoś z enzymów w ścieżce biosyntezy metioniny, co prowadzi do kumulacji Hcy. Jednak przeprowadzone przez nich badania wykluczyły udział transmetylaz MetH i MetE oraz hydroksymetylotransmetylasy serynowej GlyA, enzymów biorących udział w biosyntezie metioniny bezpośrednio z homocysteiny. Nadekspresja tych enzymów nie chroniła przed inhibitorowym wpływem octanu.

Z badań przeprowadzonych przeze mnie podczas wykonywania tej pracy doktorskiej wynika, że hodowla komórek *E.coli* z octanem sodu nie powoduje wzmożonej syntezy tiolaktonu Hcy w komórkach, co wyklucza możliwość, że dochodzi do kumulacji Hcy.



**Rysunek 2. Schemat ścieżki biosyntezy metioniny u *E.coli*.** SAM, S-adenozylometionina; THF, tetrahydrofolian.

### 1.3 Hiperhomocysteinemia

Stan patologiczny, w którym stężenie całkowitej homocysteiny (tHcy) w osoczu lub surowicy jest znacznie podwyższone, określany jest mianem hiperhomocysteinemii [13]. Hiperhomocysteinemia jest niezależnym czynnikiem ryzyka chorób układu krążenia [14], udaru mózgu [15], zarostowej choroby naczyń krwionośnych (ang. *occlusive vascular disease*) [16], czy też zakrzepicy żyłnej [17]. Podwyższony poziom Hcy odgrywa również istotną rolę w dysfunkcji łożyska [18] oraz w przypadku chorób neurodegeneracyjnych [19]. Nadmiar homocysteiny powoduje dysfunkcję śródbłonna naczyń krwionośnych, a także indukuje apoptotyczną śmierć komórek związanych z

chorobą zakrzepową, łącznie z komórkami śródbłonna [20] oraz komórkami mięśni gładkich [21].

Już 40 lat temu McCully postulował, że podniesiony poziom Hcy może powodować wzrost ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia, po tym jak zaobserwował uszkodzenia ścian tętnic w przypadku zaburzeń metabolicznych metioniny [22]. Kilka lat później, Wilcken i Wilcken wykazali, że pacjenci z potwierdzoną angiograficznie chorobą wieńcową, charakteryzowali się podwyższonym stężeniem Hcy [23]. Na podstawie tych badań zasugerowano, że nawet łagodna hiperhomocysteinemia jest związana z wyższym ryzykiem wystąpienia zawału serca, choroby tętnic obwodowych i zakrzepicy żyłnej [17, 24, 25].

Stężenie tHcy w osoczu zdrowych osób waha się w przedziale 5-15  $\mu\text{M}$ . Pacjenci z łagodną postacią hiperhomocysteinemii mają stężenie tHcy na poziomie 15-25  $\mu\text{M}$ . Wyższe stężenia tHcy (25-50  $\mu\text{M}$ ) występują u pacjentów z chorobą nerek w fazie końcowej. Mutacje w genach odpowiedzialnych za metabolizm Hcy, jak np.  $\beta$ -syntazy cystationowej (*CBS*), syntazy metioniny (*MS*), reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu (*MTHFR*), czy metylotransferazy betaina : homocysteina (*BHMT*), prowadzą do poważnej postaci hiperhomocysteinemii (stężenie Hcy 50-500  $\mu\text{M}$ ), zwanej homocystynurią. Najczęstszą genetyczną przyczyną homocystynurii jest homozygotyczna mutacja w genie *CBS*. Ta genetyczna wada objawia się szeregiem cech fenotypowych, takich jak: upośledzenie umysłowe, osteoporoza, nieprawidłowości w budowie szkieletu czy też otłuszczenie wątroby. Jednakże to choroby układu krążenia stanowią główną przyczynę śmiertelności u nieleczonych pacjentów posiadających tę mutację [26]. Chociaż homozygotyczna mutacja w genie *CBS* występuje rzadko, to heterozygotyczna mutacja *CBS* występuje u około 1% ogólnej populacji i jest skorelowana z chorobą układu krążenia.

Dorośle myszy z wyłączonym genem *MTHFR* (hetero- i homozygoty) wykazują akumulację lipidów w aorcie przypominającą wczesne uszkodzenia miażdżycowe, a także obserwuje się u nich zmiany patologiczne w obrębie mózgu [27]. Chociaż zmiany te nie są tak zaawansowane jak w innych modelach mysich z miażdżycą (np. z wyłączonym genem *ApoB* czy receptora LDL), to wskazują na udział łagodnej postaci hiperhomocysteinemii w rozwoju zmian miażdżycowych [28]. Natomiast u myszy z mutacją w genie *CBS* obserwuje się uszkodzenie wątroby. Wykazano także nasilone wiązanie monocytów do

komórek śródbłonka u szczurów z hiperhomocysteinemią, co jest jednym z pierwszych etapów rozwoju zmian miażdżycowych [29].

Obserwacje, że obniżanie poziomu Hcy poprzez suplementację diety witaminami z grupy B zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia u pacjentów z mutacją w genie *CBS*, świadczą o istotnej roli Hcy w powstawaniu miażdżycy oraz zakrzepicy naczyń krwionośnych. Stwierdzono, że obniżenie Hcy osocza prowadzi do ok. 21-24% redukcji ryzyka wystąpienia nagłego pogorszenia u pacjentów z wysokim ryzykiem wystąpienia udaru mózgu, ale nie u pacjentów po zawale serca [30]. Na podstawie tych badań można wnioskować, że Hcy odgrywa większą rolę w powstawaniu udaru mózgu niż zawału serca, co jest zgodne z obserwacjami, że u nieleczonych pacjentów z mutacją w *CBS*, ataki chorobowe ze strony układu nerwowo-naczyniowego występują osiem razy częściej niż zawały serca. Ponadto, odpowiednio wcześnie rozpoczęta terapia zapobiega także chorobom mózgu u pacjentów z mutacją w genie *MTHFR* [31]. Badania nad hiperhomocysteinemią na modelach zwierzęcych również dostarczają mocnych dowodów o przyczynowej roli Hcy w rozwoju chorób układu krwionośnego [32].

Poziom homocysteiny osocza zależy od wielu czynników, m.in. demograficznych, genetycznych, a także od stylu życia czy płci. Palenie tytoniu, zbyt duża konsumpcja kawy czy alkoholu oraz brak ruchu, mogą powodować wzrost poziomu Hcy [33]. Wiek, płeć męska, jak również wiek pomenopauzalny u kobiet są również skorelowane z wysokim poziomem Hcy [34]. Umiarkowana hiperhomocysteinemia jest powszechna u alkoholików, jednak ograniczone spożycie alkoholu przyczynia się prawdopodobnie do redukcji poziomu tHcy. Stężenie tHcy wzrasta po spożyciu wina i spirytusu, ale nie po konsumpcji piwa, prawdopodobnie z powodu wysokiej zawartości w nim kwasu foliowego i witaminy B6 [35].

### **1.4 Terapia witaminowa a obniżanie poziomu homocysteiny**

Terapia witaminowa kwasem foliowym, pirydoksyną (witamina B<sub>6</sub>) oraz kobalaminą (witamina B<sub>12</sub>) redukuje poziom homocysteiny i przywraca funkcjonalność śródbłonka naczyń krwionośnych. Wzbogacanie produktów zbożowych w kwas foliowy w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie od 1996 r. spowodowało wzrost stężenia kwasu foliowego i spadek stężenia homocysteiny we krwi ludzi, a co za tym idzie, odnotowano spadek śmiertelności z powodu udaru mózgu [36].

Wald i wsp. przewidują, że redukcja poziomu homocysteiny o 3  $\mu\text{mol/l}$  wiązałaby się z 24% spadkiem ryzyka wystąpienia udaru mózgu oraz 16% spadkiem ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej serca (ang. *coronary artery disease*, CAD). Natomiast zastosowana terapia witaminowa pozwoliła na zaobserwowanie korelacji pomiędzy wyższym poziomem homocysteiny a ryzykiem powtórnego wylewu; zostało ono zmniejszone w grupie przyjmującej wysoką dawkę witamin [37].

Undas i wsp. zbadali wpływ przyjmowania kwasu foliowego (1 mg dziennie) na poziom przeciwciał przeciwko formie N-Hcy-albuminy oraz formie N-Hcy-hemoglobiny [38]. Zaobserwowano, że poziom przeciwciał przeciw tym N-homocysteinyłowanym białkom spadł znacząco po 3-miesięcznej terapii kwasem foliowym u osób zdrowych. Natomiast u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca nie zaobserwowano znaczącej redukcji poziomu tych przeciwciał. Kolejne 3 miesiące terapii nie dały rezultatu w postaci dalszego obniżenia poziomu przeciwciał, zarówno u pacjentów, jak i osób zdrowych. Jednakże wyjściowy poziom homocysteiny i jej obniżenie zaindukowane kwasem foliowym było bardzo podobne w obu grupach. Co więcej, okazało się, że u zdrowych osób wykazujących hiperhomocysteinemię poziom przeciwciał przeciw formie N-Hcy-albuminy jest raczej związany z ilością kwasu foliowego obecnego w osoczu, a nie z całkowitą zawartością homocysteiny [38].

Brak wpływu kwasu foliowego na poziom przeciwciał przeciwko formie N-Hcy białek u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (pomimo, iż z wysoką efektywnością redukuje on poziom homocysteiny) sugeruje, że zaawansowane zmiany patogenne nie mogą być zniwelowane przez terapię obniżającą całkowitą zawartość homocysteiny [38]. Z drugiej strony, na podstawie obserwacji, że kwas foliowy obniża poziom przeciwciał przeciwko N-Hcy-białkom u osób zdrowych sugeruje się, iż początkowe zmiany patogenne, (które mogą zachodzić u potencjalnie zdrowych osób) są odwracalne. W tym kontekście, zapobiegawcza terapia obniżająca poziom homocysteiny byłaby wskazana.

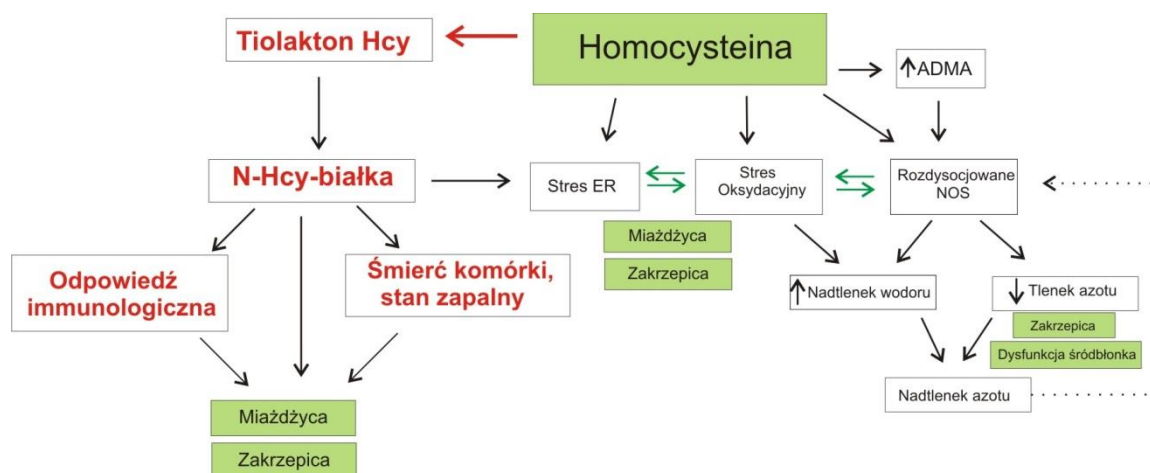
Według najnowszych badań, terapia obniżająca poziom Hcy, polegająca na przyjmowaniu 2,5 mg kwasu foliowego, 50 mg witaminy B6 oraz 1 mg witaminy B12 przez pięć lat, może obniżyć ryzyko wystąpienia udaru mózgu, natomiast nie może złagodzić efektów udaru po jego wystąpieniu. Zaobserwowano także znaczne obniżenie ryzyka wystąpienia udaru mózgu u osób poniżej 70 roku życia, które uczestniczyły w terapii obniżającej poziom Hcy, nie uczestnicząc równolegle w terapii przeciwzakrzepowej czy obniżającej poziom lipidów, a także u osób z hiperhomocysteinemią [39].

### 1.5 Prawdopodobne patomechanizmy chorób układu krążenia związane z Hcy

Cechy charakterystyczne chorób układu krążenia, takie jak dysfunkcja śródbłonka, aktywacja odpowiedzi immunologicznej, czy zakrzepica, obserwuje się także u ludzi i zwierząt z hiperhomocysteinemią [32]. Stopień uszkodzenia śródbłonka w przypadku hiperhomocysteinemii jest podobny jak w przypadku hipercholesterolemii.

Komórki śródbłonka pełnią istotną funkcję w regulowaniu i utrzymaniu układu krwionośnego w zdrowej kondycji. Jedną z pierwszych cech miażdżycy jest zniszczenie śródbłonka naczyń krwionośnych, a subtelne zmiany jego funkcji pojawiają się wcześniej niż możliwe do wykrycia zmiany strukturalne. Kontrola metaboliczna śródbłonka jest skomplikowana. W główny system regulatorowy zaangażowana jest syntaza tlenku azotu (NOS), która syntetyzuje tlenek azotu (NO), indukujący rozszerzanie naczyń krwionośnych i regulujący ich napięcie. Wysoki poziom Hcy upośledza funkcjonowanie śródbłonka, powodując jego zniszczenie, zarówno u ludzi jak i zwierząt. Wskazuje to na wrażliwość warstwy śródbłonkowej na zmiany w poziomie Hcy osocza, co związane jest prawdopodobnie z brakiem ścieżki transsulfurylacji Hcy do Cys w tych komórkach [40].

Istnieje kilka mechanizmów prowadzących do patologicznych zmian w komórkach śródbłonka, w które zaangażowana jest Hcy. Należą do nich m.in. tworzenie reaktywnych form tlenu, takich jak anion nadadtlenkowy ( $O_2^-$ ) (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) w reakcji utleniania Hcy [41], hipometylacja [42], wzrost poziomu stresu siateczki śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) i indukcja odpowiedzi na niesfałdowane białka (ang. *unfolded protein response*, UPR) (omówione w rozdziale 1.9.2) [43], zmiana w równowadze pro- i antykoagulacyjnej sprzyjająca trombozie [44], aktywacja i agregacja płytek krwi [45], proliferacja komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [46], N-homocysteinylacja białek (omówiona w rozdziale 1.8) [47] oraz indukcja wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej (omówiona w rozdziale 1.9.3) [48].



**Rysunek 3. Prawdopodobne mechanizmy rozwoju chorób układu krążenia związane z Hcy.** Zależna od tiolaktonu Hcy N-homocysteinyłacja białek powoduje zniszczenie białek oraz śmierć komórek. N-Hcy-białka indukują odpowiedź immunologiczną, a także zakrzepicę spowodowaną N-homocysteinyłacją fibrynogenu. Ponadto N-Hcy-białka i Hcy mają zdolność indukcji stresu siateczki śródplazmatycznej (ER) oraz odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR). Indukowany przez Hcy stres oksydacyjny i ER może przyspieszać rozwój miażdżycy i zakrzepicy poprzez powstający stan zapalny i apoptozę w komórkach naczyń krwionośnych. Stres oksydacyjny może przyczyniać się do dysfunkcji śródbłónka i zakrzepicy poprzez powstające reaktywne formy tlenu, np. nadtlenki. Hcy powoduje także podwyższenie poziomu asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), co może spowodować rozdzysocjowanie syntazy tlenu azotu (NOS), czego rezultatem jest obniżenie produkcji NO, a wzmożenie produkcji nadtlenku wodoru. Reakcja utleniania nadtlenku wodoru i tlenu azotu generuje powstanie nadtlenku azotu i obniża biodostępność NO, co prowadzi do dysfunkcji śródbłónka. Nadtlenek azotu z kolei może spowodować dalsze rozdzysocjowanie NOS (Rysunek na podstawie [32]).

### 1.5.1 Stres oksydacyjny

Hiperhomocysteinemia sprzyja oksydacyjnemu uszkodzeniu śródbłónka poprzez inhibicję syntazy tlenu azotu, a w konsekwencji obniżenie biodostępności NO. Upośledzenie zależnego od tlenu azotu rozkurczania naczyń u zwierząt z hiperhomocysteinemią [49] jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, że Hcy obniża biodostępność NO w liniach komórkowych śródbłónka [50]. Obniżona biodostępność NO może się również przyczyniać do zakrzepicy oraz miażdżycy, gdyż pochodzący ze śródbłónka NO hamuje agregację płytek krwi i adhezję leukocytów. Przyczyna upośledzonej biodostępności NO w przypadku hiperhomocysteinemii jest złożona, jednak na podstawie badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych sugeruje się, że główną

przyczyną jest stres oksydacyjny indukowany Hcy, prowadzący do przyspieszonej oksydacyjnej inaktywacji NOS [49].

W normalnych warunkach tlenek azotu detoksykuje homocysteinę tworząc S-nitrohomocysteinę. Jednak nadmiar Hcy nie jest całkowicie neutralizowany przez NO i ulega ona auto-utlenieniu do homocystyny, w wyniku czego powstają reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), które są toksyczne dla komórek śródbłonna - powodują wzrost adhezji monocytów do tych komórek [51]. Homocysteina obniża aktywność enzymów o właściwościach antyoksydacyjnych, takich jak peroksydaza glutationu (Gpx-1), która w prawidłowych warunkach neutralizuje wolne rodniki i zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa, która pełni funkcje ochronne wobec ścian naczyń krwionośnych podczas stresu oksydacyjnego [50].

Wolne rodniki tlenowe powstające w wyniku autoutleniania Hcy w osoczu inicjują utlenianie lipidów, a utlenione formy LDL (ang. *low density lipoprotein*) aktywują płytki krwi i powodują powstawanie miażdżycy.

### 1.5.2 Inhibicja oksydazy lizynowej

Hiperhomocysteinemia związana jest także ze zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM), co prowadzi do obniżenia elastyczności ścian naczyń krwionośnych. Oksydaza lizynowa (LOX) jest jednym z enzymów zaangażowanych w dojrzewanie ECM. Homocysteina inhibuje aktywność LOX w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, a w mechanizmie tym uczestniczą reaktywne formy tlenu [52]. Inhibicja LOX zachodzi już w niskim stężeniu Hcy (35  $\mu\text{M}$ ) i może powodować powstawanie niedojrzałej formy ECM oraz wzrost rozpuszczalności elastyny i kolagenu. Utrata normalnych właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej jest prawdopodobnie powiązana z jej większą podatnością na uszkodzenia powodowane przez miażdżycę. Hcy podwyższa również poziom ekspresji enzymów zaangażowanych w degradację ECM *in vivo* oraz *in vitro* [53, 54], a zmniejsza poziom ekspresji fibrilliny-2, białka strukturalnego włókien elastycznych w aorcie kurczaka [55].

### 1.5.3 Procesy zapalne

Miażdżyca jest chorobą przebiegającą ze stanem zapalnym, za który odpowiedzialne są przede wszystkim cytokiny, mające charakter prozapalny, a których



zwiększoną produkcję indukuje homocysteina. Podwyższona w wyniku hiperhomocysteinemii aktywacja czynnika NF-kappaB (NF-κB) w tkankach aorty prowadzi do zwiększonej ekspresji VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*) - molekuly o charakterze prozapalnym, a także czynników prozapalnych RAGE (ang. *receptor for advanced glycation endproducts*) i EN-RAGE (ang. *ligand for the receptor for advanced glycation end products*). Wszystkie wymienione czynniki są zaangażowane w powstawanie miażdżycy oraz stan zapalny naczyń krwionośnych [56].

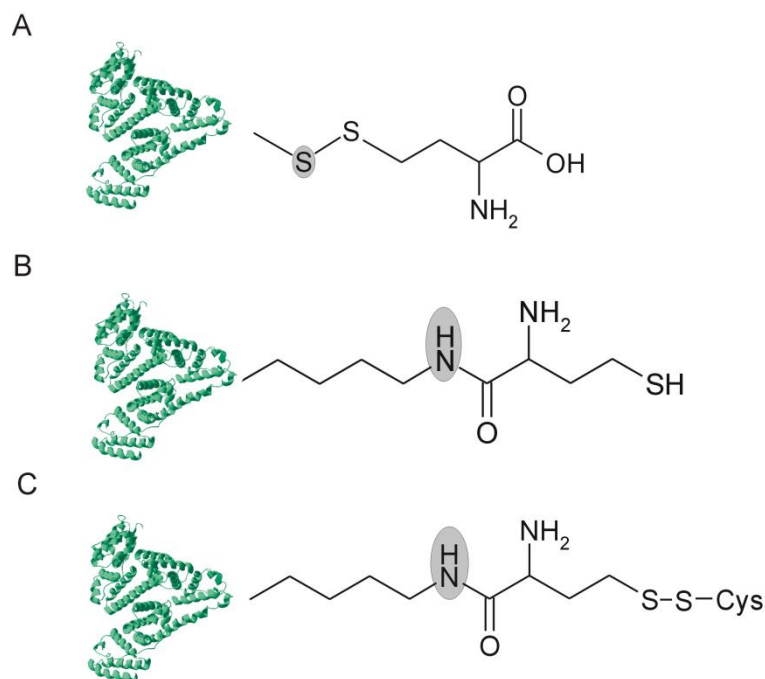
### 1.6 Formy występowania Hcy w ludzkim organizmie i ich efekt biologiczny

Do całkowitej homocysteiny osocza (tHcy) zalicza się zarówno wolną homocysteinę, jak i tę związaną z białkiem wiązaniem dwusiarczkowym. Na wolną Hcy składa się zredukowana Hcy (z wolną grupą -SH), stanowiąca ~1% tHcy, oraz formy utlenione: homocystyna (utleniony dwusiarczek Hcy, Hcy-S-S-Hcy), stanowiąca 5-10% tHcy; mieszany dwusiarczek (Hcy-S-S-Cys), który stanowi 5-10% tHcy oraz Hcy związana z białkiem (Hcy-S-S-Białko), stanowiąca ok. 80% tHcy w krwioobiegu.

W standardowych metodach określania całkowitej Hcy stosuje się pH zasadowe, co prowadzi do hydrolizy tiolaktonu Hcy do Hcy i w związku z tym pula tHcy może być zawyżona. Przyłączanie się Hcy do białek za pośrednictwem tiolaktonu homocysteiny prowadzi do utworzenia stabilnego wiązania amidowego pomiędzy grupą ε-aminową reszty lizyny białka a grupą karbonylową tiolaktonu homocysteiny, a proces ten nazywany jest N-homocysteinylacją (**Rys. 4 B i C**). Homocysteina związana wiązaniem amidowym z białkiem nie może zostać oszacowana w standardowym teście oceniającym ilość całkowitej Hcy osocza, w którym stosuje się czynniki redukujące - zrywające wiązania dwusiarczkowe i uwalniające Hcy, a jedynie może zostać uwolniona od białka poprzez hydrolizę kwasową. Mechanizm biosyntezy HTL oraz N-Hcy-białek, a także szkodliwość tych metabolitów zostały opisane szczegółowo w rozdziałach 1.7 oraz 1.8.

#### 1.6.1 Formy utlenione Hcy

L-homocysteina tworzy z resztą cysteiny białka stabilne wiązanie kowalencyjne dwusiarczkowe poprzez reakcje wymiany tiol-dwusiarczek. Reakcja przyłączania Hcy do białek poprzez wiązanie dwusiarczkowe jest nazywana S-homocysteinylacją (**Rys. 4 A**).



**Rysunek 4. Addukty Hcy z białkami osocza.** (A) Białko S-homocysteinylowane na grupie tiolowej reszty cysteiny, (B) Białko N-homocysteinylowane na grupie  $\epsilon$ -aminowej reszty lizyny, (C) Białko N-homocysteinylowane na grupie  $\epsilon$ -aminowej reszty lizyny. Hcy może tworzyć mostek dwusiarczkowy z Cys (rysunek na podstawie [57]).

Białkiem ulegającym S-homocysteinytacji w największym stopniu w osoczu krwi jest albumina, jako że jest to białko występujące w największej ilości w osoczu, w stężeniu 34-48 mg/ml (512-723  $\mu$ M). Cząsteczka albuminy (masa molekularna 66.4 kDa) zawiera 585 aminokwasów, w tym 35 reszt cysteinowych, z czego 34 tworzą wewnątrzłańcuchowe wiązania dwusiarczkowe, które są schowane w obrębie struktury cząsteczki. Cysteina występująca w pozycji 34 znajdująca się na powierzchni albuminy, ma bardzo niską wartość pKa grupy  $-SH$  (pKa  $\sim$ 5), w związku z tym w pH fizjologicznym albumina występuje głównie jako jon tiolanowy, silnie reaktywny w stosunku do metali, tioli i dwusiarczków. Tworzenie wiązania dwusiarczkowego z homocysteiną lub cysteiną sprzyja ekspozycji reszty Cys<sup>34</sup> [58].

W krwiobiegu zdrowych osób stężenie Alb-Cys<sup>34</sup>-S-S-Hcy waha się w granicach 3-12  $\mu$ M. Podejście terapeutyczne mające na celu obniżenie homocysteiny związanej z białkiem za pomocą wysokich stężeń egzogennych tioli, nie dało oczekiwanych rezultatów. Stabilność wiązania dwusiarczkowego białko-S-S-Hcy jest związana z wysoką wartością pKa ( $\sim$ 10) grupy tiolowej Hcy. Natomiast pKa grupy  $-SH$  cysteiny wynosi tylko  $\sim$ 8,3. Wyższe pKa grupy  $-SH$  homocysteiny ma kilka ważnych konsekwencji: (a) anion

tiolanowy w fizjologicznym pH występuje w niskim stężeniu, (b) pomimo, iż <1% Hcy występuje w formie anionu tiolanowego, jest on bardzo reaktywnym nukleofilem, (c) wiązanie dwusiarczkowe między białkiem a Hcy jest silniejsze niż z innymi tiolami, mającymi grupy –SH o niższej wartości pKa, a także (d) konsekwentnie, wymiana homocysteiny z kompleksu białko-S-S-Hcy na inne tiole jest mocno ograniczona.

Znaczną ilość wewnątrzkomórkowych Hcy-S-S-białek zaobserwowano w tkankach gryzoni. Na przykład, Hcy-S-S-białka stanowią ~42% tHcy w wątrobie, nerkach, sercu i płucach szczura. W mózgu oraz mózdzku szczura, Hcy-S-S-białka stanowią odpowiednio 30,4% oraz 5,3% tHcy [59]. Jednakże do tej pory nie zbadano czy jakiegokolwiek ludzkie białka wewnątrzkomórkowe zawierają Hcy związaną wiązaniem dwusiarczkowym.

Formy dwusiarczkowe Hcy występujące w osoczu nie wywierają prawdopodobnie szkodliwego wpływu na organizm ludzki [4, 60]. Na podstawie przeprowadzonych *ex vivo* badań dotyczących potencjalnej szkodliwości Hcy-S-S-białek wewnątrzkomórkowych, sugeruje się, że metalotioneina (białko wiążące jony cynku) ulega S-homocysteinytacji w hodowli ludzkich komórek śródbłona aorty (ang. *human aortic endothelial cells*, HAECs). Dodanie Hcy do medium hodowlanego powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wolnego cynku, co z kolei powoduje indukcję ekspresji genów wczesnej odpowiedzi wzrostu, jak np. *Egr-1* (ang. *early growth response -1*). Ponadto zaobserwowano wzrost ilości reaktywnych form tlenu. Efekt ten przypisano tworzeniu się dwusiarczków Hcy z metalotioneiną. Jednakże na podstawie obserwacji, że na wiązanie Hcy nie wpływa glutation o stężeniu 10 mM oraz, że cysteina nie tworzy dwusiarczku z tym białkiem [61], można zasugerować inny mechanizm odpowiedzialny za wiązanie Hcy do metalotioneiny, mianowicie N-homocysteinytację. Podobnie jak inne białka, metalotioneina może być modyfikowana przez tiolakton Hcy. Metalotioneina jest białkiem o dużej zawartości reszt cysteinowych, uczestniczy prawdopodobnie w detoksykacji metali ciężkich, reguluje równowagę cynk/miedź, a także usuwa reaktywne formy tlenu. Metalotioneina odgrywa ważną rolę w regulacji potencjału komórkowego, metabolizmie tlenu azotu oraz homeostazie cynku. Ze względu na istotny udział cynku w funkcjach enzymatycznych i przewodzeniu sygnałów, upośledzone wiązanie cynku mogłoby mieć negatywne konsekwencje w wielu procesach komórkowych.

### 1.6.2 S-adenozylhomocysteina (SAH)

SAH jest bezpośrednim prekursorem Hcy i występuje w komórkach ludzkich oraz osoczu, w stężeniu odpowiednio mikromolarnym oraz nanomolarnym. Stężenie SAH jest 33-krotnie wyższe w ludzkim moczu niż osoczu [62].

Kumulacja S-adenozylhomocysteiny jest szkodliwa ze względu na zdolność tego metabolitu Hcy do hamowania wzrostu komórek śródbłonkowych oraz wywieranie wpływu na ekspresję genów poprzez zmiany wzoru metylacji DNA [10]. Ponadto, SAH występująca w osoczu jest dużo bardziej czułym wskaźnikiem chorób układu krążenia u ludzi niż całkowity poziom Hcy osocza. Wpływ podwyższonego poziomu SAH na metylację DNA wydaje się być tkankowo-zależny. U myszy z hiperhomocysteinemią, ilość tHcy osocza jest skorelowana pozytywnie z SAH w większości tkanek, z wyjątkiem nerek, natomiast negatywną korelację z metylacją DNA obserwuje się w wątrobie. Z drugiej strony, wzrost metylacji DNA występuje w mózgu oraz aorcie zwierząt z hiperhomocysteinemią [63].

### 1.7 Tiolakton homocysteiny

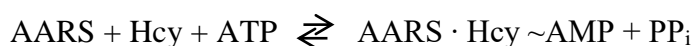
Tiolakton Hcy został odkryty w bakterjach *E.coli* oraz u drożdży jako produkt reakcji korekcyjnej syntetazy metionilo-tRNA [6, 64]. Odkrycie to jest cytowane w podręcznikach biochemii i biologii molekularnej [65-67]. Pierwsze doniesienia o tym, że HTL może być ważnym komponentem metabolizmu Hcy również u ssaków, pojawiły się wraz z odkryciem, że jest on syntetyzowany w ssaczych komórkach hodowanych *in vitro*, takich jak HeLa (komórki ludzkiego raka szyjki macicy), RAG (ang. *mouse adenocarcinoma*), CHO (ang. *chinese hamster ovary*) [68]. Ludzkie komórki nowotworowe produkują więcej HTL niż normalne, zdrowe komórki. Na podstawie wyników eksperymentów przeprowadzonych na ludzkich komórkach naczyń krwionośnych żyły pępowinowej (ang. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wykazano, że poziom syntezy HTL w tych komórkach jest wprost proporcjonalny do ilości Hcy, a odwrotnie proporcjonalny do stężenia metioniny. Dodatek kwasu foliowego hamuje syntezę HTL przez obniżenie stężenia Hcy i podniesienie stężenia Met.

Traktowanie tiolaktonem Hcy komórek epitelialnych indukuje stres siateczki śródplazmatycznej, odpowiedź na niesfałdowane białka [69], a także śmierć apoptotyczną ludzkich komórek śródbłonka naczyń krwionośnych [70], komórek promieloidowych [71]

oraz komórek trofoblastu łożyska ludzkiego [18]. Ponadto, egzogeny tiolakton Hcy powoduje inhibicję ścieżki sygnałowej insuliny w szczurzych komórkach wątrobowych [72].

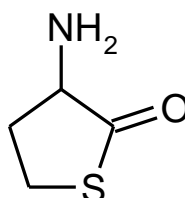
Toksyczność tiolaktonu Hcy wykazano także na przykładzie zwierząt - infuzje HTL do myszy czy szczurów, powodują śmierć tych zwierząt w ciągu kilku minut [73], a ekspozycja mysich lub szczurzych embrionów na HTL powoduje ich śmiertelność, upośledzenie wzrostu oraz anomalie rozwojowe [74]. Chroniczne traktowanie zwierząt tiolaktonem Hcy powoduje zmiany patofizjologiczne, podobne do obserwowanych u ludzi z genetyczną hiperhomocysteinemią [75].

Z możliwych form występowania Hcy, tiolakton Hcy oraz wolna zredukowana Hcy, występujące w ilości odpowiednio 1,4% oraz 2% całkowitej Hcy osocza, są najbardziej szkodliwymi formami Hcy. Ze względu na podobieństwo strukturalne homocysteiny do takich aminokwasów jak metionina, izoleucyna i leucyna, może ona być błędnie aktywowana przez odpowiednie syntetazy aminoacylo-tRNA – powstaje adenylan homocysteiny (Hcy~AMP) z syntetazą metionylo-, leucylo- lub izoleucylo- tRNA. W ten sposób Hcy „wchodzi” w pierwszy etap biosyntezy białka. Wytworzone zostaje wysokoenergetyczne wiązanie estrowe pomiędzy grupą karboksylową aminokwasu a grupą hydroksylową 3' końcowej adenozyliny tRNA, z aminoacylo adenylanem jako produktem pośrednim. Tworzenie aminoacylo adenylanu jest najmniej dokładnym etapem w szlaku aminoacylacji tRNA. Niepasujące adenylany są pośrednio lub bezpośrednio niszczone dzięki zdolnościom korekcyjnym (ang. *editing*) syntetaz aminoacylo tRNA. Korekcja ta może zachodzić dwoma alternatywnymi ścieżkami: 1) przed transferem (ang. *pre-transfer*), tzn. zachodzi hydroliza niewłaściwego aminoacylo adenylanu lub 2) po transferze (ang. *post-transfer*) – poprzez hydrolizę niewłaściwie naładowanego tRNA. Ze względu na szybką dysocjację aminoacylo-tRNA od syntetazy aminoacylo –tRNA, najczęściej zachodzi korekcja przed transferem [76]. W większości przypadków mechanizm korekcji obejmuje hydrolizę adenylanu aminokwasu lub aminoacylowanego tRNA, w celu uwolnienia aminokwasu. Jednakże łańcuch boczny Hcy, a także homoseryny (Hse) czy ornityny (Orn) uczestniczy bezpośrednio w korekcji, czego skutkiem jest powstanie cyklicznych form tych aminokwasów. Syntetaza metionylo-tRNA (MetRS), a także u *Procaryota* IleRS i LysRS błędnie aktywują Hcy tworząc adenylan homocysteiny związane z syntetazą aminoacylo-tRNA:



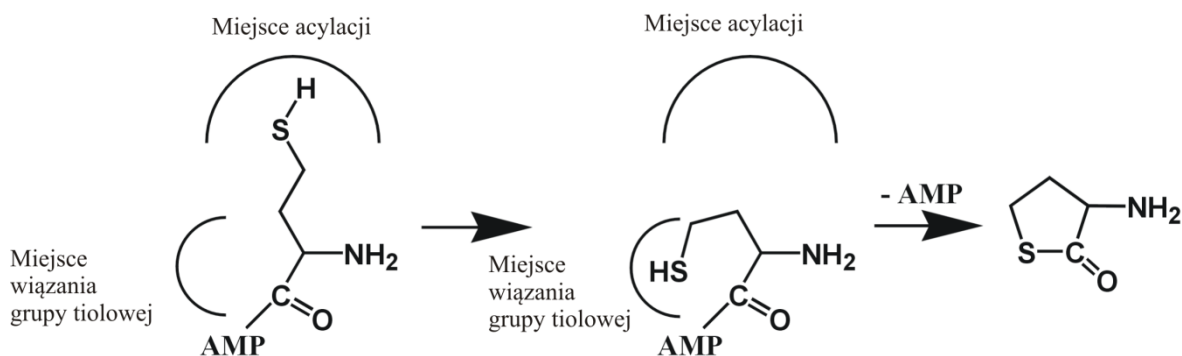
Tiolakton Hcy

Dalsza „obróbka” Hcy~AMP polega na wewnątrzcząsteczkowej reakcji, w której tiolowy łańcuch boczny Hcy wypiera AMP z aktywowanej grupy karboksylowej Hcy, tworząc w ten sposób nowy produkt - tiolakton Hcy (**Rys. 5**). Energia wiązania anhydrydowego Hcy~AMP zostaje zachowana w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu tioestrowym tiolaktonu. W związku z tym tiolakton z łatwością acyluje wolne grupy aminowe reszt lizyny białek [77].



**Rysunek 5.** Wzór strukturalny tiolaktonu homocysteiny.

Model miejsca acylacji (specyficzności) i miejsca wiązania tioli w syntezie metionilo-tRNA wyjaśnia, w jaki sposób MetRS kieruje Met i Hcy odpowiednio do miejsca specyficzności i wiązania tioli. Te dwa miejsca aktywne są ważne dla selektywności aminokwasów przez MetRS. Miejsce specyficzności wiąże preferencyjnie łańcuch boczny właściwego substratu – metioniny, a miejsce wiązania tioli preferencyjnie wiąże łańcuch boczny niepasującej Hcy. W ścieżce korekcyjnej, aktywowana grupa karboksylowa Hcy reaguje z atomem siarki jej łańcucha bocznego, dając produkt w postaci tiolaktonu Hcy (**Rys. 6**).



**Rysunek 6.** Tworzenie tiolaktonu Hcy na drodze cyklizacji Hcy~AMP katalizowane przez MetRS [78].

To, czy dany aminokwas przejdzie ścieżkę syntezy czy też korekty, jest zdeterminowane przez współzawodnictwo między reakcją aktywowanej grupy karboksylowej z łańcuchem aminokwasu a końcową adenozyzną tRNA<sup>Met</sup> (aktywowana grupa karboksylowa Met reaguje z grupą 2' hydroksylową końcowej adenozyzny tRNA<sup>Met</sup>, dając Met-tRNA<sup>Met</sup>). Metionina wchodzi na ścieżkę syntezy, ponieważ jej łańcuch boczny jest ściśle związany wiązaniem wodorowym i hydrofobowym w miejscu specyficzności, zapobiegając rywalizacji atomu siarki Met z 3' końcową adenozyzną tRNA<sup>Met</sup> o atom węgla grupy karboksylowej Met. Łańcuch boczny Hcy, który nie posiada grupy metylowej, reaguje z miejscem specyficzności znacznie słabiej niż łańcuch boczny Met. Umożliwia to łańcuchowi bocznemu Hcy interakcję z miejscem wiązania tioli, a następnie korekcję i cyklizację Hcy do tiolaktonu Hcy.

Odwracalna S-nitrozylacja Hcy zapobiega wiązaniu się jej zmodyfikowanego łańcucha bocznego do miejsca wiązania tioli w syntetazie aminoacylo-tRNA, natomiast wzmocnione zostaje wiązanie do miejsca acylacji, co prowadzi do utworzenia S-NO-Hcy-tRNA<sup>Met</sup>. Dalej następuje translacyjna inkorporacja S-NO-Hcy do białka, jak wykazano *in vitro* wykorzystując bakteryjną MetRS. Usunięcie grupy nitrowej powoduje powstanie białka zawierającego Hcy w miejscu normalnie zajmowanym przez Met. Katalityczna wydajność dla S-nitrozo-Hcy jest 80 razy niższa niż dla metioniny. Translacyjnie wbudowana w ten sposób Hcy obecna jest również w hodowanych ludzkich komórkach śródbłonna [79].

We wszystkich badanych typach komórek od bakterii i drożdży do człowieka Hcy ulega przekształceniu do tiolaktonu przez MetRS [80]. Do korekcji/obróbki endogennej Hcy, ważna jest domena C-końcowa MetRS. Ponadto, w komórkach *E.coli*, egzogenna Hcy jest przekształcana do tiolaktonu przez dwie inne syntetazy, IleRS oraz LeuRS [5].

Eksperymenty z użyciem L- i D-stereoizomerów Hcy wykazały, że za toksyczność Hcy w embrionach szczurzych najprawdopodobniej odpowiedzialne jest przekształcenie Hcy do tiolaktonu Hcy. Stereospecyficzność toksyczności Hcy jest podyktowana stereospecyficznością MetRS, która przekształca tylko L-Hcy do L-HTL, dlatego tylko forma L-Hcy, a nie forma D, jest toksyczna. Z drugiej strony, embriotoksyczność zarówno formy L- jak i D-HTL jest uwarunkowana identyczną chemiczną reaktywnością obu stereoizomerów HTL w stosunku do białek [81].

Szlak syntezy tiolaktonu Hcy staje się dominujący wówczas, gdy reakcje remetylacji lub transsulfurylacji są zaburzone przez zmiany genetyczne enzymów zaangażowanych w metabolizm Hcy, takich jak  $\beta$ -syntaza cystationinowa, syntaza metioniny, czy też reduktaza metylotetrahydrofolianu. Inną przyczyną nadmiernej produkcji HTL jest niedobór kwasu foliowego, witamin B<sub>6</sub> i B<sub>12</sub>.

Cykliczny tioester Hcy, jakim jest tiolakton Hcy, można otrzymać chemicznie przez wewnątrzcząsteczkową kondensację metioniny lub Hcy. Ogrzewanie metioniny w temperaturze 120°C, w obecności kwasu jodowodorowego przez 4 h, prowadzi do przekształcenia Met do HTL, z uwolnieniem jodku metylu. Wewnątrzcząsteczkowa kondensacja Hcy do tiolaktonu Hcy zachodzi w obecności HCl. Szybkość reakcji zależy od stężenia HCl oraz temperatury.

W warunkach fizjologicznych (pH 7,4; 36°C) okres półtrwania tiolaktonu wynosi około 25 h, co sugeruje, że jest bardziej stabilny niż inne wewnątrzkomórkowe aminoacylo-tioestry. W warunkach zasadowych HTL szybko hydrolizuje do Hcy (0,1 M NaOH w ciągu 15 minut całkowicie hydrolizuje HTL w temperaturze pokojowej). Podobnie jak wszystkie tioestry, HTL absorbuje światło UV z maksimum absorpcji przy 240 nm w środowisku wodnym. pK<sub>a</sub> grupy  $\alpha$ -aminowej HTL jest niezwykle niskie i wynosi 7,1, co sprawia, że w warunkach fizjologicznych jest neutralny i swobodnie dyfunduje przez błony komórkowe [80].

Grupa  $\alpha$ -aminowa tiolaktonu Hcy wykazuje dużą reaktywność w stosunku do aldehydów, takich jak fosforan pirydoksalu, o-ftalaldehid, czy streptomycyna (antybiotyk standardowo dodawany do pożywek do hodowli linii komórkowych). Reakcja HTL ze streptomycyną zachodzi około 400 razy szybciej niż reakcja HTL z lizyną. Natomiast reakcja HTL z o-ftalaldehidem, generująca powstanie fluorescencyjnego produktu, umożliwia precyzyjne określenie ilości tiolaktonu Hcy.

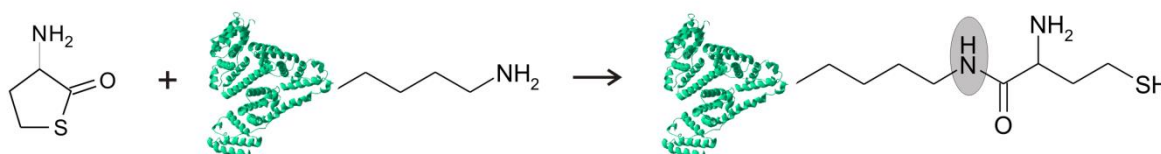
### **1.8 N-homocysteinyłacja białek**

Rola biologiczna HTL została odkryta stosunkowo niedawno, a reaktywność tej cząsteczki w warunkach fizjologicznych pozostała nieznaną aż do 1999 r. Fakt obecności Hcy N-związanej z białkami ludzkiego osocza po raz pierwszy opisano w 2000 r. [47]. Pierwsze doniesienia o tym, że Hcy związana z białkiem wiązaniem amidowym lub peptydowym jest prawdopodobnie ważnym elementem metabolizmu Hcy u człowieka, pochodzą z badań nad metabolizmem tiolaktonu Hcy w ludzkich kulturach tkankowych



[80]. Eksperymenty na linii komórek HUVEC wykazały, że podobnie jak poziom HTL, poziom N-Hcy-białek jest wprost proporcjonalny do ilości Hcy, a odwrotnie proporcjonalny do ilości metioniny. Suplementacja hodowli komórkowych kwasem foliowym hamuje syntezę zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowych N-Hcy-białek, poprzez ułatwienie konwersji Hcy do metioniny, zapobiegając pośrednio syntezie tiolaktonu Hcy. Liczne badania wykazały, że szlak syntezy tiolaktonu Hcy jest uniwersalny w różnych typach komórek, m.in. w ludzkich komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, a także *in vivo* u ludzi oraz myszy [47].

Ze względu na wysoką energię wiązania anhydrydowego ATP, zachowaną w wiązaniu tioestrowym tiolaktonu Hcy, cząsteczka ta jest reaktywna chemicznie i spontanicznie modyfikuje białka, tworząc addukty Hcy z białkiem (N-Hcy-białka), w których Hcy jest N-związana z grupą  $\epsilon$ -aminową reszty lizyny białka [80] (**Rys. 7**). Proces modyfikacji białka za pośrednictwem tiolaktonu homocysteiny nazywany jest N-homocysteinylacją.



**Rysunek 7. Schemat reakcji N-homocysteinylacji białek [82].**

Jedynie grupy aminowe łańcucha bocznego reszt lizyny w białkach są modyfikowane przez HTL, w przeciwieństwie do łańcuchów bocznych argininy, histydyny, seryny, czy treoniny. Ponadto, N-końcowe grupy  $\alpha$ -aminowe w ludzkiej albuminie, hemoglobinie, cytochromie c oraz fibrynogenie nie reagują z tiolaktonem Hcy. Tylko reszty lizyny występujące wewnątrz łańcucha białkowego zostały zidentyfikowane jako miejsca modyfikacji tiolaktonem Hcy [57]. W wolnej lizynie, grupa  $\epsilon$ -aminowa wykazuje 3 krotnie większą reaktywność w stosunku do HTL niż grupa  $\alpha$ -aminowa [77].

N-homocysteinylacja zachodzi już przy stężeniu tiolaktonu tak niskim jak 10 nM, co może wyjaśniać promiażdżycowe działanie Hcy na poziomie fizjologicznym. Proces ten jest specyficzny dla Hcy, gdyż tiolakton Hcy może powstać w ludzkim organizmie tylko z

Hcy. W normalnych warunkach, u zdrowych osób poziom tiolaktonu Hcy i N-Hcy-białek wynosi odpowiednio ~1,5% i 15% całkowitej ilości Hcy [78].

Każde białko obecne w surowicy ludzkiej ulega N-homocysteinyłacji proporcjonalnie do jego stężenia w surowicy oraz zawartości lizyn w danym białku. Hcy N-związana z białkiem jest obecna w albuminie z różnych organizmów, takich jak człowiek, owca, świnia, królik, szczur, mysz oraz kurczak, a także we wszystkich, do tej pory zbadanych, białkach krwi [83]. Stałe drugorzędowe tej reakcji dla indywidualnych białek wskazują, że reakcje tiolaktonu Hcy są relatywnie szybkie i zostają zakończone w ciągu kilku godzin w warunkach fizjologicznej temperatury i pH. Dla białek różniących się wielkością, od 104 do 698 aminokwasów, istnieje wyraźna korelacja pomiędzy zawartością lizyn, a reaktywnością tych białek z HTL. Większe białka, takie jak fibrynogen (3588 reszt aminokwasowych) czy LDL (~5000 aminokwasów), reagują z HTL około sześć razy mniej wydajnie, niż można by sądzić po zawartości lizyn. Wynika to z tego, że jedynie kilka z wielu reszt lizyny obecnych w białku stanowi miejsca preferencyjnej modyfikacji przez tiolakton Hcy, jak wykazano dla albuminy [57], fibrynogenu [84], czy też cytochromu c [85].

Jak wykazano w najnowszych badaniach, w warunkach predysponujących do rozwoju miażdżycy, takich jak hiperhomocysteinemia, poziom N-homocysteinyłowanych białek jest znacznie podwyższony, zarówno u ludzi [86], jak i myszy [27]. Zdrowe myszy karmione wysoko-metioninową dietą, podobnie jak i myszy z genetyczną hiperhomocysteinemią miały znacząco podwyższony poziom N-Hcy-białek w osoczu. Pomimo, iż poziom N-Hcy-białek w osoczu jest podwyższony nawet u myszy z łagodną formą hiperhomocysteinemii (stężenie tHcy ~37,5  $\mu\text{M}$ ), u zwierząt tych nie obserwuje się podwyższonego poziomu N-Hcy-białek w organach wewnętrznych – np. w wątrobie i sercu, w przeciwieństwie do myszy z bardzo poważną postacią hiperhomocysteinemii. Na podstawie tych badań dowiedziono, że N-homocysteinyłowane białka są ważnym, związanym ze stanem patologicznym, elementem metabolizmu Hcy.

W celu wyjaśnienia powiązania między hiperhomocysteinemią a wyższym ryzykiem wystąpienia chorób układu krążenia i śmiertelnością u pacjentów z chorobami nerek, zbadano u nich N-homocysteinyłację białek [87]. Zaobserwowano znacznie podwyższony poziom N-Hcy-białek u pacjentów z hiperhomocysteinemią oraz chorobą nerek, poddawanych hemodializie, w porównaniu do osób zdrowych [88]. Jednocześnie

zauważono u tych pacjentów niższy stosunek N-Hcy-białek/tHcy, w porównaniu z osobami zdrowymi. Może być to spowodowane wydajniejszym wydalaniem HTL z organizmu, w przypadkach, gdy poziom tHcy osocza jest wysoki.

Hiperhomocysteinemia jest związana ze zwiększoną śmiertelnością wśród pacjentów z chorobą wieńcową serca i u tych pacjentów obserwuje się zarówno podwyższony poziom tHcy, jak i N-Hcy-białek w osoczu [89]. Za pomocą przeciwciał przeciw N-Hcy-białkom, wykazano, że N-homocysteinyłowane białka są obecne w ludzkich tkankach układu krwionośnego [90, 91]. Większość, bo około 70% Hcy obecnej w ludzkiej krwi występuje w postaci N-związanej z białkiem, a tylko około 30% jako tHcy. Największa ilość Hcy związanej z białkiem we krwi ludzkiej jest obecna w hemoglobinie (0,6 %), albuminie (0,36 %) oraz  $\gamma$ -globulinach (0,36 %). Inne białka surowicy, takie jak HDL, LDL, fibrynogen, transferyna, antytrypsyna zawierają od 0,04 do 0,1 % N-Hcy-białek. N-Hcy-hemoglobina (białko występujące w największym stężeniu w ludzkiej krwi) jest obecna we krwi w stężeniu 12,7  $\mu$ M, co sprawia, że hemoglobina jest głównym rezerwuarem Hcy we krwi człowieka – zawiera 75% N-związanej Hcy. Albumina zawiera 22%, a  $\gamma$ -globuliny – 2% N-związanej Hcy. Pozostałe białka krwi zawierają około 1% N-związanej Hcy. Natomiast w osoczu krwi człowieka 90% Hcy związanej z białkami jest przenoszone na albuminie [77]. Stężenie Hcy związanej z białkiem w osoczu waha się od 0,1  $\mu$ mol/L do 13  $\mu$ mol/L, co stanowi do 25 % całkowitej Hcy osocza.

Specyficzne N-Hcy-peptydy w białkach osocza, zawierające N-homocysteinyłowane reszty lizyny, można wykryć za pomocą narzędzi proteomicznych w próbkach ludzkiego osocza, co dostarcza nowego narzędzia diagnostycznego służącego monitorowaniu modyfikacji białek tiolaktonem Hcy (szczegóły tych badań opisano w dalszej części rozprawy, w rozdziale p.t. Wyniki).

### **1.9 Konsekwencje funkcjonalne N-homocysteinyłacji białek**

Wbudowywanie Hcy do białek za pośrednictwem tiolaktonu homocysteiny może wpływać na fizjologię komórkową w wieloraki sposób. Taka modyfikacja białka może zaburzać jego fałdowanie, a także tworzyć białka o innych cechach (np. fibrynogen, którego zmienione pod wpływem modyfikacji właściwości opisano szczegółowo w rozdziale 1.9.1) lub też może prowadzić do indukcji odpowiedzi autoimmunologicznej (opisanej w rozdziale 1.9.3).

Intensywna N-homocysteinyłacja białek takich jak mioglobina, transferyna, globuliny, RNaza A prowadzi do ich multimeryzacji oraz zmian strukturalnych prowadzących do denaturacji i wytrącania tych białek [77]. Pojawienie się niesfałdowanych/zagregowanych białek w siateczce śródplazmatycznej (ER) aktywuje ścieżkę sygnałową, specyficzną odpowiedź na niesfałdowane białka (UPR), która może prowadzić do śmierci komórki na drodze apoptozy (udział N-Hcy-białek w indukcji stresu ER opisano w rozdziale 1.9.2).

N-homocysteinyłacja może także wpływać niekorzystnie na normalne funkcjonowanie lipoprotein o małej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL). Ze względu na wysokie stężenie LDL w osoczu pacjentów z hipercholesterolemią, większe ilości homocysteinyłowanego LDL mogą się gromadzić w wewnętrznych warstwach naczyń krwionośnych. Takie zmodyfikowane cząsteczki są bardziej wrażliwe na agregację oraz spontaniczną precypitację. Zmodyfikowany LDL może być pobierany przez makrofagi poprzez receptory błonowe lub fagocytozę znacznie szybciej niż natywny LDL, co prowadzi do wewnątrzkomórkowej kumulacji cholesterolu i tworzenia komórek piankowych [92]. Konsekwencją tego jest uszkodzenie śródbłonna naczyń i rozwój blaszek miażdżycowych.

Modyfikacja grupy  $\epsilon$ -aminowej reszty lizyny białka resztą Hcy zawierającą wolną grupę tiolową zaburza strukturę i funkcję białka. Bezpośrednim rezultatem N-homocysteinyłacji białka jest obniżenie wartości całkowitego ładunku dodatniego w białku, gdyż wysoce zasadowa grupa  $\epsilon$ -aminowa reszt lizyny białka ( $pK_a = 10,5$ ) jest zamieniona na mniej zasadową grupę  $\alpha$ -aminową Hcy ( $pK_a \sim 7$ ). Przykładem konsekwencji N-homocysteinyłacji białka jest zmiana podatności na trawienie proteolityczne N-Hcy-cytochromu c. N-Hcy-cytochrom c jest bardziej odporny na proteolityczną degradację przez trypsynę, chymotrypsynę czy proteinazę K niż białko natywne. Podwyższona odporność na proteolizę może wynikać z konwersji ferricytochromu c do bardziej stabilnej termodynamicznie formy ferrocycyochromu c [85, 93].

Jednakże wydaje się, że N-homocysteinyłacja może także wzmacniać odporność cytochromu c na proteolizę niezależnie od zmian strukturalnych związanych ze statusem redox, podobnie jak to wykazano dla N-Hcy-albuminy [57]. Ponadto, N-Hcy-albumina oraz N-Hcy-hemoglobina, w przeciwieństwie do swych natywnych form, są podatne na utlenianie, co prowadzi do powstawania nieodwracalnych uszkodzeń w białkach. W osoczu człowieka występują dwie główne formy albuminy: albumina-Cys<sup>34</sup>-S-S-Cys

(zawierająca cysteinę połączoną wiązaniem dwusiarczkowym z Cys<sup>34</sup> albuminy) oraz forma zwana merkaptoalbuminą : albumina-Cys<sup>34</sup>-SH (Cys<sup>34</sup> posiada wolną grupę tiolową). Te dwie formy stanowią odpowiednio dwie trzecie i jedną trzecią całkowitej ilości albuminy. W obiegu występują ponadto albumina-Cys<sup>34</sup>-S-S-Hcy oraz N-Hcy-albumina, które stanowią 1-2% całkowitej ilości albuminy, ale zawierają ponad 80% Hcy osocza [77]. Albumina-Cys<sup>34</sup>-S-S-Cys ulega N-homocysteinyłacji szybciej niż merkaptoalbumina, w związku z tym wnioskuje się, że N-homocysteinyłacja zależy od zmian strukturalnych w albuminie, zależnych z kolei od formy występowania reszty Cys<sup>34</sup> (zredukowanej lub utlenionej). N-homocysteinyłacja albuminy-Cys<sup>34</sup>-S-S-Cys oraz albuminy-Cys<sup>34</sup>-SH daje dwa różne produkty, odpowiednio: N-(Hcy-SH)-albuminę-Cys<sup>34</sup>-S-S-Cys i N-(Hcy-SH)-albuminę-Cys<sup>34</sup>-SH. Jednakże, dalsza wymiana tiol-dwusiarczek prowadzi do utworzenia pojedynczego produktu: N-(Hcy-S-S-Cys)-albumina-Cys<sup>34</sup>-SH, który jest bardziej podatny na proteolizę niż merkaptoalbumina: N-(Hcy-SH)-albumina-Cys<sup>34</sup>-SH. W związku z tym, dwusiarczek występujący przy Cys<sup>34</sup> ułatwia konwersję N-(Hcy-SH)-albuminy-Cys<sup>34</sup>-SH do proteolitycznie wrażliwej formy : N-(Hcy-S-S-Cys)-albuminy-Cys<sup>34</sup>-SH, co ułatwia pozbycie się N-homocysteinyłowanej formy merkaptoalbuminy.

Przeanalizowano również funkcje homocysteinyłowanej albuminy *in vitro*. Grupa Perna i wsp. przetestowała trzy różne leki: warfarynę, kwas salicyłowy i diazepam, które wiążą się do różnych miejsc w cząsteczce albuminy. Okazało się, że poziom wiązania warfaryny i kwasu salicyłowego przez homocysteinyłowaną albuminę nie różnił się od poziomu wiązania przez niemodyfikowaną albuminę. Zaobserwowano natomiast, że albumina homocysteinyłowana wiąże mniej diazepamu, w porównaniu z niemodyfikowaną albuminą [94]. Jest to zapewne spowodowane tym, że reszta Lys 525, główne miejsce N-homocysteinyłacji w albuminie [57], znajduje się w domenie wiążącej benzodiazepiny (grupa leków, do której należy m.in. diazepam).

### 1.9.1 Zakrzepica

Podwyższony poziom Hcy może zaburzać funkcje śródbłonna naczyń krwionośnych, zmieniając charakter powierzchni tych komórek z antykoagulacyjnej na prokoagulacyjną [95]. Komórki śródbłonna regulują aktywność fibrynolityczną poprzez syntezę i wydzielanie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA, ang. *tissue plasminogen activator*) oraz jego inhibitora. Tkankowy aktywator plazminogenu aktywuje

plazminogen, który przekształca się w podstawową proteazę fibrynolityczną – plazminę. Zarówno plazminogen, jak i t-PA wiążą się do powierzchni komórek śródbłonka, a w procesie tym pośredniczy białko zależne od wapnia – aneksyna II (Ann-II). Prozakrzepowy mechanizm działania homocysteiny polega m.in. na selektywnym upośledzeniu domeny wiążącej t-PA w aneksynie II, zwiększając w ten sposób ryzyko zatykania naczyń krwionośnych. Homocysteina tworzy wiązanie dwusiarczkowe z Cys 9 znajdującą się w obrębie domeny wiążącej aneksyny II, co uniemożliwia wiązanie t-PA. Już 11  $\mu\text{M}$  stężenie Hcy może w 50% zahamować wiązanie t-PA do aneksyny II [96].

Fibrynogen osocza jest czynnikiem ryzyka występowania choroby wieńcowej, udaru mózgu i śmiertelności niezależnej od układu krwionośnego [97]. Jest to podstawowe białko uczestniczące w procesie koagulacji krwi; polimeryzując tworzy struktury skrzepu fibrynowego. Wewnątrznaczyniowe odkładanie się fibryny jest związane z rozwojem miażdżycy. Proces fibrynolizy, w wyniku którego skrzepy fibrynowe zostają rozpuszczone, jest niezbędny do usuwania skrzepów podczas gojenia się ran, jak i do usuwania wewnątrznaczyniowych skrzepów, które mogą w przeciwnym razie prowadzić do trombony (trombozy). Inicjacja tego procesu następuje, gdy tkankowy aktywator plazminogenu i plazminogen wiążą się do skrzepu fibrynowego, a następnie aktywator plazminogenu trawi plazminogen do plazminy. Plazmina wiąże się do reszt lizyny fibryny i trawi trzy łańcuchy fibryny w wielu miejscach. Wydajny system fibrynolityczny chroni organizm przed miażdżycową chorobą naczyń krwionośnych i przed ostrym procesem trombozy.

Jak wiele innych białek, fibrynogen łatwo ulega modyfikacji przez tiolakton homocysteiny *in vitro* [98], co powoduje zmianę jego właściwości, a nawet denaturację [3, 48, 77, 99]. Modyfikacja ta zachodzi również *in vivo* u ludzi [86], a N-Hcy-fibrynogen posiada właściwości prozakrzepowe. Skrzepy powstające z N-Hcy-fibrynogenu *in vitro* mają bardziej zwartą strukturę, stają się mniej przepuszczalne dla czynników fibrynolitycznych i mniej podatne na lizę przy udziale kompleksu tPA/plazminy w porównaniu do skrzepów powstałych z normalnego fibrynogenu [84]. Zredukowana fibrynoliza u pacjentów z hiperhomocysteinemią jest najprawdopodobniej spowodowana małym rozmiarem porów w sieci fibryny i mniej wydajnym transportem czynników fibrynolitycznych przez skrzep [100]. Jak wykazano w pracy Sauls i wsp. [84] oraz w niniejszej pracy doktorskiej, niektóre z reszt lizyny podatnych na N-homocysteinylację znajdują się blisko miejsc wiązania tPA i plazminogenu lub blisko miejsca cięcia



obserwowaną u tych pacjentów. Na podstawie tych badań sugeruje się, że podwyższony poziom N-homocysteinylowanych białek jest odpowiedzialny za nasiloną zakrzepicę obserwowaną u pacjentów z genetycznie uwarunkowaną hiperhomocysteinemią wg następującego schematu:

Hcy → tiolakton Hcy → N-homocysteinyłacja → N-Hcy-fibrynogen → zakrzepica

Obniżanie poziomu Hcy osocza poprzez suplementację diety kwasem foliowym poprawia przepuszczalność skrzepów oraz podatność na proteolizę u ludzi, a więc taka terapia może mieć korzystny efekt przeciwwakrzepowy [102].

### 1.9.2 Stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedź na niesfałdowane białka

W komórkach eukariotycznych siateczka śródplazmatyczna jest głównym miejscem fałdowania i dojrzewania białek transbłonowych, sekrecyjnych oraz obecnych w ER. Znajduje się tam wiele białek pełniących funkcje ochronne (ang. *chaperon*), takie jak GRP78 (ang. *glucose-regulated protein 78*), GRP94, kalnexyna, kalretikulina i białkowa izomeraza dwusiarczkowa. Białka te działają na zasadzie systemu kontroli jakości, zapewniając, żeby tylko prawidłowo sfałdowane białka były kierowane do aparatu Golgiego, w celu dalszej obróbki i sekrecji. Warunki patologiczne lub/i czynniki zaburzające prawidłowe fałdowanie i dojrzewanie białek, aktywują odpowiedź na niesfałdowane białka - UPR (ang. *unfolded protein response*). UPR jest ścieżką sygnałową, która jest odpowiedzią na stres ER i obejmuje wzrost ekspresji genów białek opiekuńczych ER, zredukowaną translację wszystkich białek oraz degradację niesfałdowanych białek. Brak funkcjonalnej UPR, a także trwający zbyt długo silny stres ER może prowadzić do apoptotycznej śmierci komórek oraz przyczyniać się do patogenezy wielu chorób, jak np. choroba Alzheimera, Parkinsona, czy też cukrzyca [103, 104].

Homocysteina, tiolakton Hcy oraz ditiotreitrol (DTT) indukują stres ER poprzez aktywację czynników zarówno pro- jak i antyapoptycznych w hodowlach komórkowych, tkankowych oraz *in vivo*, co prowadzi do śmierci komórek [105].

Ponadto Hcy, tiolakton Hcy oraz DTT wzmagają ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) poprzez zależną od ATF-4 aktywację transkrypcji VEGF w komórkach ARPE-19 (ang. *human*



*retinal pigmented epithelial cell line*) [69]. VEGF jest glikoproteiną o istotnej roli w angiogenezie, powodującą również zmiany w przepuszczalności w warstwach komórek śródbłonna. Zmiany w regulacji ekspresji VEGF związane są z wieloma stanami patologicznymi zależnymi od angiogenezy, np. retinopatii cukrzyczej (ang. *diabetic retinopathy*). Silniejszymi od Hcy induktorami ekspresji VEGF są tiolakton homocysteiny i DTT, co sugeruje kluczową rolę grupy tiolowej w tym procesie. Prawdopodobnie potencjał redukcyjny tych związków interferuje z utlenianiem tioli i tworzeniem mostków dwusiarczkowych w białkach ER, hamując w ten sposób prawidłowe fałdowanie białek. Jednakże L-cysteina nie wykazuje wpływu na poziom ekspresji VEGF, a także nie powoduje stresu ER.

Z najnowszych badań wynika, że N-homocysteinyłowane białka kumulują się w wątrobie myszy transgenicznym z mutacją w genie *CBS* [106]. N-Hcy-białka mają zdolność tworzenia agregatów, które mogą indukować stres ER oraz UPR, np. N-Hcy-LDL mają zdolność do agregacji i indukcji śmierci komórek HUVEC [107]. Zaobserwowano, że w wątrobie myszy z ciężką hiperhomocysteinemią, w której kuluje się  $1857 \pm 452$  pmol N-Hcy-białka/mg białek wątrobowych, dochodzi do stresu retikulum endoplazmatycznego. Ponadto, zaangażowanie N-Hcy-białek w stres ER zostało wykazane we wcześniejszych badaniach, z których wynika, że u myszy z mutacją w genie *ApoE* (apolipoproteina E jest składnikiem chylomikronów, który łączy się z receptorem w komórkach wątrobowych, umożliwiając usuwanie tych lipoprotein z krwioobiegu), karmionych dietą o wysokiej zawartości metioniny, następuje wzrost poziomu N-Hcy-białek w uszkodzonych aortach [108].

Tiolakton Hcy modyfikując białka retikulum endoplazmatycznego prowadzi do zniszczenia białek wydzielniczych. Natomiast Hcy może uczestniczyć w reakcjach wymiany dwusiarczkowej z białkami ER. Te dwie reakcje mogą prowadzić do powstania niesfałdowanych białek. Jak wykazano, w komórkach ludzkich tiolakton Hcy jest silniejszym induktorem stresu ER i apoptozy niż Hcy, co sugeruje, że N-homocysteinyłacja może być dominującym szlakiem przyczyniającym się do powstania niesfałdowanych białek podczas stresu ER [69].

### 1.9.3 Immunogenność N-homocysteinyłowanych białek

Na podstawie badań na królikach, którym podawano zmodyfikowane tiolaktonem białka, takie jak LDL, czy KLH (ang. *keyhole limpet hemocyanine*), wykazano, że w

zasadzie każde N-Hcy-białko może być immunogenne [109]. Ze względu na to, że N-Hcy-białka są obecne w ludzkim organizmie, mogą być one rozpoznawane jako specyficzne antygeny i indukować w ten sposób odpowiedź immunologiczną. Testy specyficzności antygenowej z użyciem analogów strukturalnych epitopu N-Hcy-Lys oraz różnych N-Hcy-białek wykazały, że ludzkie przeciwciała IgG rozpoznają epitop N-Hcy-Lys znajdujący się na białkach zmodyfikowanych HTL. Ponadto istnieje korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał IgG anty-N-Hcy-Lys-białko a poziomem tHcy w osoczu, a nie zaobserwowano takiej korelacji z cysteiną ani metioniną. W związku z tym istnieje bezpośredni związek między Hcy a przeciwciałami IgG przeciwko N-Hcy-Lys-białkom, mianowicie Hcy jest najpierw przekształcana do tiolaktonu Hcy, który następnie modyfikuje białka dając N-Hcy-Lys-białka, a te z kolei indukują odpowiedź autoimmunologiczną.

Pacjenci z angiograficznie udokumentowaną chorobą wieńcową serca mają wyższy poziom przeciwciał IgG anty-N-Hcy-Lys-białko oraz tHcy w osoczu, w porównaniu z osobami zdrowymi [48]. Sugeruje to, że wzmożona produkcja tych przeciwciał jest cechą charakterystyczną miażdżycy. Jeżeli N-Hcy-Lys-białka są obecne w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, wówczas może dochodzić do powstawania kompleksów antygen-przeciwciało na powierzchni naczyń krwionośnych. Komórki śródbłonna pokryte przeciwciałami przeciw N-Hcy-Lys-białkom byłyby pobierane przez makrofagi poprzez receptor Fc, co prowadziło do uszkodzenia powierzchni naczyń. Jeśli antygen N-Hcy-Lys-białko, który inicjuje to uszkodzenie, byłby stale obecny, wówczas ciągłe próby naprawienia zniszczonej ściany naczyń prowadziłyby do powstawania złogów miażdżycowych.

Ponadto, hiperhomocysteinemia zaindukowana dietą wysokometioninową uruchamia wrodzoną odpowiedź immunologiczną i wzmacnia stan zapalny naczyń krwionośnych u myszy, objawiający się m.in. zwiększoną aktywacją jądrowego czynnika  $\kappa\text{B}$  w aorcie i nerkach oraz wzmożoną ekspresją  $\text{TNF-}\alpha$  w osoczu [53].

Przedstawiony powyżej mechanizm indukcji odpowiedzi immunologicznej wyjaśnia, dlaczego relatywnie małe ilości N-Hcy-białek, jakie występują w ludzkim organizmie mogą być szkodliwe. Przeciwciała rozpoznające epitop N-Hcy-Lys reagują prawdopodobnie z N-homocysteinylnymi białkami w wielu tkankach, co odzwierciedla niekorzystny efekt wywołany hiperhomocysteinemią w wielu organach [37].

### 1.10 Zaangażowanie tiolaktonu Hcy w choroby układu krążenia

Odkrycie, że Hcy ulega konwersji do tiolaktonu Hcy, który z kolei spontanicznie modyfikuje białka w ludzkich komórkach, stworzyło podstawy do sformułowania hipotezy o zaangażowaniu tiolaktonu Hcy w choroby układu krążenia [80]. Zgodnie z tą hipotezą, obserwuje się podwyższony poziom HTL w warunkach predysponujących do rozwoju chorób układu krwionośnego, jak w przypadku hiperhomocysteinemii spowodowanej mutacjami w genach *CBS* oraz *MTHFR* u ludzi, czy też dietą wysoko metioninową u myszy [110]. Modyfikacja białek, prowadząca do utworzenia stabilnych wiązań izopeptydowych, upośledza lub zmienia funkcje białek. Większość konsekwencji patofizjologicznych N-homocysteinyłacji białek, zidentyfikowanych do tej pory, obejmuje uszkodzenie białka lub komórki, aktywację adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej objawiającą się wzmożoną syntezą przeciwciał przeciw N-Hcy-białkom [109, 111] oraz nasiloną zakrzepicę, spowodowaną N-homocysteinyłacją fibrynogeny [84, 102].

### 1.11 Detoksykacja tiolaktonu homocysteiny

Ze względu na szkodliwe działanie tiolaktonu Hcy, organizmy wykształciły mechanizmy ochronne detoksykujące tiolakton Hcy lub zapobiegające jego tworzeniu. Na przykład, usuwanie Hcy przez transmetylację do metioniny i transulfurylację do cysteiny wewnątrz komórek oraz tworzenie S-Hcy-albuminy w osoczu, skutecznie zapobiega konwersji Hcy do tiolaktonu Hcy. Natomiast jednym z podstawowych sposobów detoksykacji HTL (w przeciwieństwie do tHcy) jest jego usuwanie z organizmu wraz z moczem [112].

Stężenie tiolaktonu Hcy w moczu jest ~100 razy wyższe niż osoczu. Prawidłowy poziom HTL w moczu waha się w granicach od 11 do 485 nmol/L, co stanowi 2,5-28% tHcy występującej w moczu. Jest to znacznie większa frakcja HTL niż ta występująca w osoczu (<0,002% do 0,29%). Słaba korelacja pomiędzy tiolaktonem Hcy a tHcy w osoczu oraz brak tej korelacji w moczu sugeruje, że Hcy, metaboliczny prekursor tiolaktonu Hcy, nie jest główną determinantą stężenia tiolaktonu Hcy u ludzi. Ważną rolę odgrywają prawdopodobnie inne czynniki takie jak kwas foliowy, metionina czy aktywność tiolaktonazowa lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Tylko 0,4-3,8% tiolaktonu Hcy ulega reabsorpcji w nerkach, a >95% filtrowanego HTL jest wydalane. Wykazano, że ilość HTL w moczu negatywnie koreluje z pH moczu, pomimo iż nie zauważono korelacji

między ilością tHcy w moczu a jego pH [112]. Na podstawie tej obserwacji sugeruje się, że status jonizacji grupy  $\alpha$ -aminowej tiolaktonu Hcy ( $pK=7,1$ ) wpływa na jego wydalanie z moczem. Nienaładowana forma HTL jest wydalana z moczem, w którym nabywa ładunku dodatniego na skutek kwaśnego środowiska. Dodatkowo naładowana forma HTL nie ulega reabsorpcji w kanalikach nerkowych.

Bardzo ważną rolę w metabolizmie/detoksykacji tiolaktonu homocysteiny odgrywa tiolaktonaza homocysteiny (HTLaza), znana wcześniej jako paraoksonaza (PON1), której nazwa pochodzi od zdolności do hydrolizy paraoksonu. Enzym ten jest syntetyzowany wyłącznie w wątrobie i związany jest z frakcją HDL osocza [113, 114]. Stężenie PON1 w osoczu wynosi  $\sim 50\mu\text{g/ml}$  ( $\sim 1\mu\text{mol/L}$ ). Enzym ten jest niekompetycyjnie inhibitowany przez izoleucynę oraz penicylaminę oraz wykazuje zależność od jonów wapnia. Paraokson oraz octan fenylu inhibują hydrolizę tiolaktonu Hcy przez tiolaktonazę, co wskazuje, że ten sam enzym posiada obie aktywności: paraoksonazową oraz tiolaktonazową. Surowica królików oraz myszy zawiera 5-10 razy więcej tego enzymu niż ludzka surowica.

Jak wykazano, PON1 ulegająca ekspresji w transgenicznych myszach chroni przed miażdżycą [115]. Udowodniono, że wysoki poziom aktywności tiolaktonazowej *in vitro* chroni białka osocza przed N-homocysteinyłacją [113], a HDL hamuje tworzenie tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych *ex vivo* [116]. Zaobserwowano, że aktywność tiolaktonazy homocysteiny PON1 jest skorelowana z podwyższonym stężeniem LDL, HDL oraz ich komponentami w przypadku pacjentów cierpiących na CAD, natomiast tej zależności nie stwierdzono u osób zdrowych. To sugeruje, że aktywność tiolaktonazowa może być regulowana w różny sposób u chorych na chorobę wieńcową serca oraz u osób zdrowych [117]. Aktywność PON1 jest genetycznie zdeterminowana przez polimorfizmy, przede wszystkim zamianę leucyny 55 na metioninę (L55M) oraz glutaminy 192 na argininę (Q192R), które to obok CAD oraz całkowitego stężenia cholesterolu są głównymi determinantami aktywności tiolaktonazowej u ludzi.

Modyfikacje strukturalne cząsteczek HDL mają duże znaczenie i wpływ na aktywność enzymu PON1. Lipoproteiny o wysokiej gęstości są wrażliwe na modyfikacje strukturalne, takie jak np. utlenianie, glikozylację, homocysteinyłację i degradację enzymatyczną. W badaniach prowadzonych na hodowlach komórkowych wykazano, że homocysteina obniża aktywność promotorów PON1 i ApoAI [118]. Zaobserwowano znaczne obniżenie aktywności paraoksonazy we frakcji utlenionych cząsteczek HDL i

zasugerowano, że inaktywacja PON1 może być przyczyną obniżonego efektu ochronnego przeciw cząsteczkom LDL i utlenianiu błony komórkowej [119, 120]. Zmiany strukturalne w cząsteczkach HDL mogą odgrywać rolę w patogenezie miażdżycy i chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera.

Tiolaktonaza/paraoksonaza PON1 obecna w osoczu występuje zewnątrzkomórkowo, natomiast enzymem posiadającym aktywność tiolaktonazową występującym wewnątrz komórek, jest hydrolaza bleomycyny (BLH). Nazwa enzymu pochodzi od jego aktywności – deamidacji leku przeciwnowotworowego bleomycyny. Enzym ten odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w metabolizmie Hcy u ludzi oraz drożdży. Ludzka BLH jest zaangażowana w chorobę Alzheimera (uczestniczy w obróbce prekursora białka amyloidowego, ang. *amyloid precursor protein*, dając produkt w postaci peptydu beta-amyloidu), a genetyczny polimorfizm tego enzymu, zamiana izoleucyny 443 na walinę, jest związany ze wzrostem ryzyka zachorowania na tę chorobę [121]. Suszyńska i wsp. wykazali, że poziom aktywności tiolaktonazowej i aminopeptydazowej związanej z BLH jest niższy w mózgach osób chorych na chorobę Alzheimera [122]. Zarówno ludzka jak i drożdżowa BLH, posiadają prawie identyczną strukturę molekularną i należą do rodziny proteaz cysteinowych, wykazujących aktywność aminopeptydazową. Enzym ten charakteryzuje się dużą konserwatywnością ewolucyjną i powszechnym występowaniem, co wskazuje na jego zachowawczą funkcję komórkową. Jednakże pierwotna funkcja BLH pozostawała długo niewyjaśniona, a naturalne substraty tego enzymu nieznane. Jedyną biologicznie znaczącą, poznaną funkcją była deamidacja bleomycyny [123]. Jak wykazano w pracy Zimny i wsp. oraz w niniejszej rozprawie doktorskiej, aktywna forma tego enzymu, wykazująca aktywność tiolaktonazy Hcy, występuje w ludzkim łożysku [124].

BLH pochodząca z drożdży (yBLH), w przeciwieństwie do ludzkiej BLH (hBLH), jest białkiem wiążącym się z DNA, działającym jako negatywny regulator ekspresji genu *GAL* kodującego galaktokinazę. W 2006 r. Zimny i wsp. wykazali, że tiolakton Hcy jest naturalnym substratem hydrolazy bleomycyny, która kontroluje poziom HTL u drożdży [124]. Hydroliza HTL zachodzi w miejscu aktywności aminopeptydazowej BLH. Wewnątrzkomórkowa tiolaktonaza nie została wcześniej opisana ani u ludzi ani u drożdży. Jak wykazano, tiolaktonazy ludzka i drożdżowa różnią się od dwóch innych znanych tiolaktonaz: ludzkiej tiolaktonazy osocza oraz roślinnej tiolaktonazy [125]. Tiolaktonaza PON1 posiada szeroką specyficzność (tio)laktonazową, a roślinna tiolaktonaza charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową hydrolazy  $\alpha$ -aminoacylo

(tio)estrowej. Natomiast specyficzność substratowa ludzkiej i drożdżowej HTLazy jest ograniczona do L- $\alpha$ -aminoacylo tioestrów, estrów aminokwasów siarkowych oraz amidów aminokwasów. BLH przyczynia się do powstania oporności na toksyczność Hcy u drożdży, prawdopodobnie dzięki zdolności do hydrolizy HTL. U ludzi natomiast, BLH ulega zróżnicowanej ekspresji w zależności od typu tkanki. Przykładowo, mRNA BLH ulega ekspresji na poziomie niskim do umiarkowanego w większości przetestowanych ludzkich organów. Podwyższony poziom mRNA BLH obserwuje się w jądrach, trzustce, mięśniach szkieletowych. Niski poziom ekspresji natomiast zaobserwowano w wątrobie, nerkach, jelicie grubym, leukocytach krwi obwodowej [126]. Ponadto, aktywna forma BLH ulega ekspresji w ludzkim łożysku. Ludzka BLH ulega także ekspresji w sposób zależny od typu komórek. Na przykład, wysoki poziom ekspresji mRNA BLH występuje w ludzkich liniach komórek nowotworowych, jak HeLA, HL-60 lub ludzkich komórkach raka piersi. Aktywność HTLazy stwierdzono także w ludzkich fibroblastach, natomiast nie obserwuje się jej w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC). Brak aktywności HTLazy/BLH w komórkach śródbłonna może przyczyniać się do wrażliwości tych komórek na toksyczne działanie Hcy [43].

Ze względu na istotny udział Hcy w patologii chorób układu krążenia, a w szczególności jej cyklicznego tioestru - tiolaktonu Hcy, zasadne jest prowadzenie badań nad metabolizmem HTL oraz N-homocysteinyłowanych białek. Badania te mają na celu m.in. zrozumienie konsekwencji i mechanizmu modyfikacji białek tiolaktonem Hcy. Jednak celem nadrzędnym jest opracowanie metody diagnostycznej pozwalającej na wczesne wykrywanie, a co za tym idzie zapobieganie chorobom układu krążenia związanym z podwyższonym stężeniem Hcy we krwi człowieka.

## 2. Cel pracy

Celem pracy było dokładniejsze poznanie metabolizmu tiolaktonu Hcy i roli procesu N-homocysteinyłacji białek. Szkodliwy wpływ Hcy na komórki ssacze i drożdżowe jest wynikiem konwersji Hcy do tiolaktonu Hcy, który może być toksyczny z dwóch powodów. Po pierwsze, konwersja Hcy do HTL wymaga ATP, powodując straty energii komórkowej, a dalej inhibicję wzrostu, jak to wykazano u drożdży [64]. Po drugie, tiolakton Hcy jest reaktywnym produktem pośrednim, który modyfikuje białka w procesie N-homocysteinyłacji [99]. Aby w pełni poznać metabolizm HTL istotne było ustalenie, czy któryś z wymienionych mechanizmów toksyczności tiolaktonu Hcy przyczynia się do inhibicji wzrostu przez Hcy u *Escherichia coli*.

Istnieje kilka mechanizmów detoksykacji tiolaktonu Hcy w komórkach ssaczy. Jednakże do tej pory nieznanym był enzym hydrolizujący HTL wewnątrzkomórkowo. Kolejnym celem pracy była zatem identyfikacja enzymu hydrolizującego HTL wewnątrz komórek ludzkich oraz zweryfikowanie hipotezy, że taki enzym mógłby chronić komórki ludzkie przed toksycznością homocysteiny.

Analiza mechanizmu N-homocysteinyłacji, a w szczególności poszukiwanie preferencyjnych miejsc przyłączania się Hcy w białkach człowieka, jest istotna ze względu na potencjalne możliwości diagnostyczne. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, preferencyjnym miejscem modyfikacji ludzkiej albuminy *in vivo* oraz *in vitro* jest Lys 525 [57]. Badacze Sauls i wsp. wykryli także kilka miejsc N-homocysteinyłacji w ludzkim fibrynogenu *in vitro* [84]. W związku z tym, kolejnym celem pracy było sprawdzenie, czy istnieją inne modyfikowane reszty lizyny w ludzkiej albuminie oraz fibrynogenu, a także które reszty lizyny ulegają N-homocysteinyłacji w ludzkiej hemoglobinie, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, w surowicy ludzkiej. Ponadto istotne z diagnostycznego punktu widzenia było także określenie zależności między ilością peptydu zawierającego zmodyfikowaną resztę Lys 525 a całkowitym stężeniem tHcy w próbach surowic pochodzących od pacjentów z chorobą wieńcową serca, czy też z mutacją w genie *CBS*.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Materiał biologiczny

##### Szczepy bakteryjne:

- *Escherichia coli* szczep DH5 $\alpha$  (Gibco BRL)
- Dziki szczep *Escherichia coli* MG1655 oraz jego warianty z brakiem różnych proteaz:
- PhB1907 ( $\Delta clpXP$ ),
- AM228 ( $\Delta lon::kan^R$ ),
- AM229 ( $\Delta lon::kan^R lexAI(Ind-) malF::Tn10 (tet^R)$ )

zostały dostarczone przez prof. Zafri Humayun (UMDNJ-New Jersey Medical School).

##### Surowice ludzkie od pacjentów ze stwierdzoną chorobą wieńcową serca:

Surowice wraz z danymi, pochodzące od 29 pacjentów, u których stwierdzono zmiany miażdżycowe różnego stopnia otrzymano w ramach współpracy od prof. dr hab. Wiesława Trzeciaka i dr Mariusza Łacińskiego z Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Surowice scharakteryzowano wcześniej pod względem ilościowej zawartości m.in. Hcy, poziomu całkowitego cholesterolu (TCH), HDL, LDL.

##### Surowice ludzkie od pacjentów z mutacjami w genie $\beta$ -syntazy cystationinowej (CBS):

Surowice pochodzące od 21 pacjentów z Holandii, w wieku 14-74 lat, chorych na homocystinurię z powodu mutacji w genie CBS, otrzymano od dr Godfrieda H.J. Boers'a z Radboud University Medical Center, Nijmegen, w Holandii. Aktywność CBS w fibroblastach pochodzących od tych pacjentów wynosiła mniej niż 2,5% w stosunku do aktywności CBS u osób zdrowych. Pacjenci zostali wstępnie zdiagnozowani w wieku od 2 do 54 lat na podstawie klinicznych objawów niedoboru CBS (ektopia soczewek, osteoporoza) w połączeniu z oceną ilościową ciężkiej postaci hiperhomocysteinemii oraz hipermetioninemii. Wszyscy pacjenci poddawani byli terapii obniżającej poziom Hcy (witamina B<sub>6</sub>) [86].

##### Łożysko ludzkie

Ludzkie łożysko otrzymano ze Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu.



### **Linia komórek HeLa**

Linie komórek ludzkiego raka szyjki macicy HeLa zakupiono w firmie **ATCC**.

### **3.2 Odczynniki**

#### **Białka ludzkie (Sigma):**

Albumina, hemoglobina, fibrynogen.

#### **Aminokwasy:**

Tiolakton homocysteny (D,L-HTL), , izoleucyna (L-Ile), leucyna (L-Leu), metionina (L-Met), metionina radioaktywna (**Sigma**)

homocysteina (D,L-Hcy)-**Fluka**

Radioaktywny tiolakton homocysteiny D,L-[61] HTL otrzymano w laboratorium prof. dr hab. Hieronima Jakubowskiego wg procedury zawartej w [127].

#### **Enzymy:**

Trypsyna wieprzowa (Sequencing Grade Modified Trypsin) (**Promega**)

Rekombinowaną ludzką hydrolazę bleomycyny (hBLH) otrzymano od Dr. L. Joshua-Tor i P.A. O'Farell

#### **Przeciwciała (Abcam):**

- monoklonalne IgG mysie, specyficzne wobec hydrolazy bleomycyny
- poliklonalne królicze, anty-IgG myszy – H&L (HRP), sprzężone z peroksydazą chrzanową
- monoklonalne IgG anty-GAPDH

#### **Ultrafiltry (Millipore):**

Microcon, Centriplus, o punkcie odcięcia 10 kDa, 30kDa

#### **Płytki do chromatografii cienkowarstwowej - TLC:**

- płytki celulozowe (**Analtech**)
- płytki celulozowe i krzemionkowe (**Merck**)

**Plazmidy (SuperArray):**

Plazmidy zawierające specyficzną wobec genu hydrolazy bleomycyny sekwencję shRNA, pod kontrolą promotora U1, kodujące gen oporności na neomycynę. W zestawie producent oferuje 4 plazmidy z różną, specyficzną wobec genu docelowego sekwencją shRNA oraz jeden plazmid z kontrolnym shRNA, zawierającym sekwencję, która nie interferuje z genami ludzkimi, mysimi i szczurzymi.

**Kolumny do analizy HPLC:**

- Kolumna kationitowa – Polysulfoethyl aspartamide column (2x35 mm, 5µm, 300Å, **PolyLC,Inc.**)
- Kolumna z odwróconą fazą C18 (4x250 mm, 4 µm, **Merck LiChroCART 250-4**)

**Gotowe zestawy do badań biochemicznych:**

- zestaw do oczyszczania plazmidów zanieczyszczonych endotoksynami bakteryjnymi EndoFree Plasmid Maxi Kit (**Qiagen**)
- zestaw do detekcji przeciwciał poprzez chemiluminescencję Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (**Perkin Elmer**)
- zestaw do pomiaru żywotności komórek na podstawie ilości ATP CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (**Promega**)

**Pozostałe odczynniki:**

**Sigma:**

Dwuwęglan amonu ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), amid kwasu jodooctowego (IAA), fosforan potasu jednozasadowy ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosforan potasu dwuzasadowy ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fosforan sodu jednozasadowy ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosforan sodu dwuzasadowy ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), siarczan amonu ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), hydroksyapatyt, glicyna, izopropanol, kwas etylenodiamino-tetraoctowy (EDTA), błękit bromofenolowy, akrylamid, N,N' –metylenobisakrylamid, nadsiarczan amonu (APS),  $\beta$ -merkaptioetanol, G418, TOX8, Tween 20, E-64d, o-phtaldialdehyd, kwas cytrynowy, uwodniony siarczan magnezu ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), tiamina, siarczan żelaza ( $\text{FeSO}_4$ ), glukoza, witaminy do RPMI 1640, antybiotyk-antymukotyk do hodowli komórkowych

**Fluka:**

Ditiotreitol (DTT), ampicylina

**Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh):**

Chlorek sodu (NaCl), chlorek potasu (KCl), kwas solny (HCl), wodorotlenek sodu (NaOH), alkohol metylowy, kwas octowy (CH<sub>3</sub>COOH), butanol, octan etylu, amoniak

**Pharmacia:**

DEAE-Sephacel, Superdex 200

**BioShop:**

Tris, chude mleko w proszku, medium hodowlane RMPI 1640, bydlęca surowica płodowa (ang. *fetal bovine serum*, FBS)

**BioRad:**

Dodecylosiarczan sodu (SDS), Coomassie Brilliant Blue G-250, odczynnik Bradford

**Fermentas:**

Marker białkowy do żeli denaturujących Page Ruler Prestained Protein Ladder

**Perkin Elmer:**

Membrana z polifluorku winylidenu - PVDF

**Invitrogen:**

Lipofectamine 2000

**Serva:**

Tetrametyloetylenodwuamina (TEMED), agarozą, pepton, trypton, wyciąg drożdżowy, bacto-agar

**Merck:**

Kwas trifluorooctowy –TFA (CF<sub>3</sub>COOH), acetonitryl (CH<sub>3</sub>CN)

**Bachem:**

4-metylo-7-coumarylamid (R-AMC)

**PAA:**

Trypsyna-EDTA 10x

**MPP:**

PBS w tabletkach

### 3.3 Roztwory

Bufor do modyfikacji białek tiolaktonem homocysteiny

100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2 mM EDTA

doprowadzano do pH 7,4 za pomocą  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących

30,2 g Tris

144,2 g glicyna

10 g SDS

Dopełniano  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml

Bufor do elektroforezy białek w warunkach natywnych

30,2 g Tris

144,2 g glicyna

Dopełniano  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml

Bufor SB (ang. *sample buffer*) obciążający, do rozdzielania elektroforetycznego białek w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących (4x stężony)

2,5 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 ( $C_k=200$  mM)

2 ml  $\beta$ -merkaptoetanol ( $C_k=20\%$ )

0,8 g SDS ( $C_k=8\%$ )

15 mg błękitu bromofenolowego ( $C_k=0,15\%$ )

4 ml glicerolu ( $C_k=40\%$ )

Dopełniano  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml

Roztwór barwiący do żeli białkowych

500 ml metanolu

100 ml kwasu octowego

2,5 g Błękitu Coomassie'ego G-250

Dopełniano  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml

Roztwór odbarwiający do żeli białkowych

100 ml metanolu

50 ml kwasu octowego

Dopełniano  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml

Mieszanka inkubacyjna do oznaczania specyficzności substratowej tiolaktonazy

5 µl substratu (estry aminokwasów)

0,5 µl 50mM DTT

5 µl 1M buforu fosforanowego pH 7,4

10 µl tiolaktonazy wyizolowanej z łożyska ludzkiego

29,5 µl H<sub>2</sub>O

Bufor do transferu białek z żelu na membranę (Western Blot)

3 g Tris

14,2 g glicyna

200 ml metanol

Dopełniano H<sub>2</sub>O do 1000 ml

Pożywka płynna LB z ampicyliną

10 g Bacto-trypton

5 g wyciągu drożdżowego

10 g NaCl

Dopełniano H<sub>2</sub>O do 1000 ml i sterylizowano przez autoklawowanie

Do 1000 ml wysterylizowanej i schłodzonej pożywki (do temp. ok. 50°C) dodawano 1 ml roztworu ampicyliny (100mg/ml)

Pożywka stała z ampicyliną

2 g Bacto-trypton

1,25 g wyciągu drożdżowego

1,25 g NaCl

3,75 g bacto-agaru

Dopełniano H<sub>2</sub>O do 250 ml i sterylizowano przez autoklawowanie

Do 250 ml wysterylizowanej i schłodzonej pożywki (do temp. ok. 50°C) dodawano 0,25 ml roztworu ampicyliny (100mg/ml) i wylewano na płytki

Pożywka SOC

20 g Bacto-trypton

5 g wyciągu drożdżowego

0,5 g NaCl

Dopełniano H<sub>2</sub>O do 1000 ml i sterylizowano przez autoklawowanie

Pożywka minimalna z kwasem cytrynowym, pH 6,0

20 mM kwas cytrynowy

56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.4 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

7.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

6 μM FeSO<sub>4</sub>

4 μM tiamina

0.2% glukoza

Do medium dodawano, w zależności od przeprowadzanego doświadczenia, D,L-Hcy (0.5 – 8 mM), i/lub izoleucynę (0.2 – 1.6 mM), leucynę (0.2 – 1.6 mM), metioninę (0.2 – 1.6 mM), jak opisano w rozdziale p.t. Wyniki.

## Metody

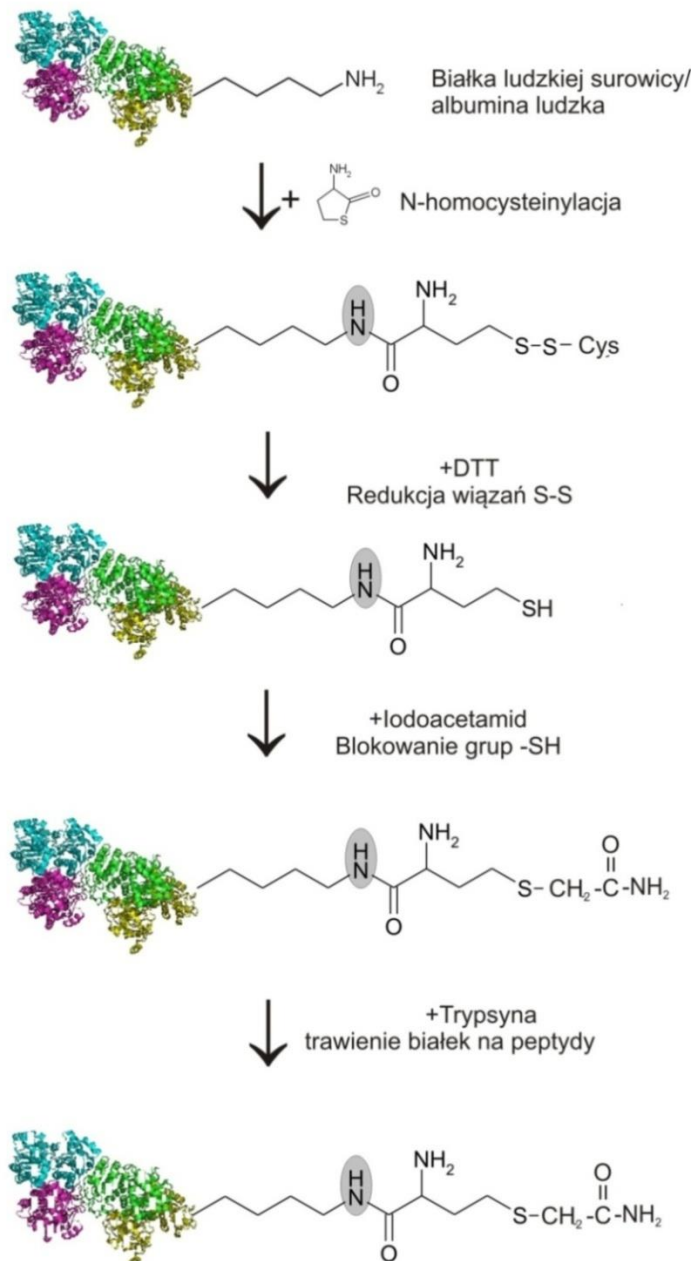
### 3.4 Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny

Modyfikacje białek tiolaktonem homocysteiny prowadzono w buforze fosforanowym o pH 7.4, z dodatkiem 0,2 mM EDTA. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C przez 17 h [77].

### 3.5 Trawienie trypsyną białek dostępnych komercyjnie oraz zawartych w surowicy

W celu identyfikacji miejsc preferencyjnej N-homocysteinyłacji ludzkie białka modelowe (albuminę, hemoglobinę oraz fibrynogen) zmodyfikowane tiolaktonem Hcy *in vitro* (lub też w przypadku poszukiwania miejsc N-homocysteinyłacji *in vivo* - surowice niemodyfikowane HTL) poddano trawieniu trypsyną. Białka o stężeniu 1 μg/μl zawieszono w 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (lub surowicę rozcieńczoną 60-krotnie) redukowano za pomocą 1 mM DTT przez 5 minut w temperaturze 95°C. Następnie uwolnione grupy tiolowe białek blokowano za pomocą 4 mM IAA w ciemności przez 20 minut, w temperaturze pokojowej (ok. 22°C). Tak przygotowane białka/surowice poddawano trawieniu trypsyną (stosunek enzym:substrat 1:50), przez 17 h, w temperaturze 37°C (**Rys. 9**). Trypsyna (EC 3.4.21.4), należąca do grupy peptydaz katalizuje hydrolizę wiązań peptydowych po resztach lizyny i argininy (z wyjątkiem, gdy po Lys lub Arg występuje prolina).

W kolejnym etapie powstałe peptydy rozdzielano metodą HPLC na kolumnie C18 (o odwróconej fazie) lub frakcjonowano na mikrokolumnienkach typu Zip-Tip, lub też w przypadku peptydów surowicy, poddawano analizie metodą LC/MS (rozdział 3.7). Rozdział metodą HPLC przeprowadzano w gradiencie 0-60% acetonitryl/woda z 0,1% TFA - przepływ ustalono na 1 ml/minutę. Zebrane frakcje odparowywano na koncentratorze Speedvac do objętości 100  $\mu$ l. Poszczególne frakcje nakładano na stalową płytkę do analizy MALDI-TOF.



Rysunek 9. Schemat trawienia białek modelowych oraz surowicy ludzkiej za pomocą trypsyny, w celu identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji *in vitro*.

### 3.6 Spektrometria mas MALDI-ToF

Spektrometria mas MALDI-ToF (ang. *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*) polega na wzbudzaniu laserem próbki zmieszanej z matrycą i analizie otrzymanych jonów poprzez pomiar czasu ich przelotu w analizatorze. Dzięki temu możliwe jest określenie masy cząsteczkowej peptydów i białek z dużą precyzją. W metodzie tej światło lasera jest absorbowane przez cząsteczki matrycy (do analizy peptydów stosuje się kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy), które przekazują energię lasera do cząsteczek badanej substancji uwięzionych w sieci krystalicznej matrycy. W wyniku desorpcji następuje jonizacja cząsteczek poprzez przyłączenie protonu i następnie jony są przyspieszane w polu elektrycznym i kierowane do analizatora. Analizatory mierzące czas przelotu (ang. *time of flight*) rozdzielają jony według stosunku masy ( $m$ ) do ładunku ( $z$ ) ( $m/z$ ), przy czym cięższe jony poruszają się wolniej niż lżejsze. MALDI jest tzw. metodą jonizacji „miękkiej” i w związku z tym w trybie jonizacji dodatkowo generowane są w większości pojedynczo naładowane jony (z jednym przyłączonym protonem  $[M+H]^+$ ). Analizy w trybie jonów dodatnich są powszechnie wykonywane podczas analizy białek i peptydów.

Widma masowe wykonane zostały w Centrum Genomiki IChB PAN, przez dr Łukasza Marcza, na spektrometrze typu MALDI-ToF firmy Bruker Daltonics (Niemcy), model Autoflex. Próbki nanoszono na płytkę MALDI i mieszano z nasyconym roztworem matrycy (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy) w stosunku 1:1 (0,5 $\mu$ l:0,5 $\mu$ l). Jonizacja następowała w wyniku wzbudzania próbek promieniem lasera o długości fali 337 nm. Analizy prowadzono w trybie jonów dodatnich, z użyciem reflektora przedłużającego tor lotu jonów. W celu uzyskania dobrej jakości widm masowych bezpośrednio przed analizami optymalizowano napięcie przyspieszające w źródle oraz opóźnienie wlotu jonów do analizatora (ang. *pulsed ion extraction*). Kalibracji spektrometru mas dokonywano raz na 4 analizy przy użyciu mieszaniny peptydów o znanych masach, w zakresie od 700 – 4000 Da (Bruker Peptide Calibration Standards). Dla każdej próbki rejestrowano widma mas uzyskane w wyniku zsumowania przynajmniej 180 impulsów lasera.

### 3.7 Analiza peptydów białek surowicy ludzkiej w układzie LC-MS/MS

Próbki strawionych surowic ludzkich były analizowane w układzie tandemowego spektrometru mas LC-ESI/QToF (jonizacja poprzez elektrorozpraszanie, analizator kwadrupolowy i czasu przelotu) sprzężonego z chromatografem cieczowym nanoLC



(Proxeon EasyNanoLC oraz Bruker microTOFq). Mieszaninę peptydów zatężano na prekolumnie C18 o średnicy 5  $\mu\text{m}$  (Nano Separations) w buforze A (0,1% kwas mrówkowy w wodzie). Następnie peptydy rozdzielano na właściwej kolumnie C18 (średnica wewnętrzna 100  $\mu\text{m}$ , długość 150 mm; Nano Separations) w 30-minutowym gradiencie 0-60% buforu B (90% acetonitryl, 0,1% kwas mrówkowy), a stosowany przepływ wynosił 300 nl/min. Dane analizowano przy użyciu programów komputerowych DataAnalysis oraz BioTools (Bruker Daltonics).

#### **3.8 Określanie miejsc modyfikacji białek homocysteina**

Mapy peptydowe, uzyskane w wyniku trawienia białek trypsyną i rozdziale chromatograficznym peptydów (HPLC-UV), analizowano na spektrometrze MALDI-ToF. Wykonano widma masowe poszczególnych frakcji (1,5 min. przy przepływie 1 ml/min) zebranych podczas rozdziału. 0,5  $\mu\text{l}$  każdej z frakcji peptydów, zatężonych uprzednio do objętości 100  $\mu\text{l}$ , nakładano na płytkę Prespotted Anchor Chip (Bruker Daltonics), zawierającą na powierzchni matrycę (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy) i pozostawiano do wyschnięcia.

Otrzymane w ten sposób zestawy mas peptydów analizowano w programie Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com), licencja dla IChB PAN). Stopień pokrycia sekwencji białka przez sekwencje zidentyfikowanych peptydów określano poprzez porównanie z bazami sekwencji białkowych. Następnie w tym samym programie poszukiwano peptydów zawierających jedną lub dwie reszty Hcy przyłączone do reszty Lys.

#### **3.9 Izolacja hydrolazy bleomycyny (BLH) z łożyska ludzkiego**

Wszystkie etapy izolacji enzymu przeprowadzano w temperaturze 4°C. Fragment łożyska ludzkiego (80g) zawieszono w 20 mM buforze fosforanowym (fosforan sodu) o pH 6,8, następnie homogenizowano w robocie kuchennym do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Po odwirowaniu osadu, zbierano surowy ekstrakt (supernatant), który wysalano 70% siarczanem amonu. Całość wirowano, a osad zawierający wytrącone białka rozpuszczano w 1 ml 20mM buforu fosforanowego pH 6,8. Następnie przeprowadzono

dializę ekstraktu wobec 20 mM buforu fosforanowego pH 6,8. Poszczególne etapy izolacji i oczyszczania enzymu przedstawiono schematycznie na **Rys. 10**.

### 3.9.1 Chromatografia jonowymienna

Chromatografia jonowymienna stosowana jest do rozdzielu związków na podstawie różnicy ich ładunku elektrycznego. Metoda ta pozwala rozdzielić białka o niewielkiej różnicy ładunku i nie powoduje ich denaturacji. Ekstrakt po dializie nakładano na kolumnę wypełnioną anionitem DEAE Sephacel. Objętość kolumny wynosiła 25,7 cm<sup>3</sup>. Rozdział prowadzono w 4°C, w gradiencie 20 mM buforu fosforanowego / KCl (maksymalne stężenie KCl - 0,5 M). Zebrane podczas rozdzielu frakcje 5 ml poddawano testowi na aktywność enzymatyczną hydrolizy tiolaktonu Hcy.

### 3.9.2 Testy aktywności enzymatycznej hydrolazy bleomycyny

**Test 1: z użyciem HTL.** Mieszanina reakcyjna zawierała 50 mM fosforan potasu (pH7,5), 10 mM HTL, 1 mM DTT oraz analizowaną frakcję (5µl). Inkubację przeprowadzano w temperaturze 37°C. W odpowiednim czasie reakcję zatrzymywano poprzez przeniesienie 3µl mieszaniny na płytkę z warstwą krzemionkową do chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Płytki rozwijano w układzie: octan etylu:izopropanol:amoniak:woda (27:23:5:3). Następnie płytki osuszano i wizualizowano w świetle ultrafioletowym, przy długości fali 240 nm. W próbach zawierających aktywność HTL-azową, plamy pochodzące od HTL miały znacznie mniejszą intensywność lub zniknęły całkowicie.

**Test 2: z użyciem R-AMC (arginino-aminometylokumarylamid).** Do tego testu używano sztucznego substratu dla hydrolazy bleomycyny – R-AMC, w stężeniu 0,1 mM. Produkt reakcji hydrolizy R-AMC, AMC, wykazuje znacznie wyższą fluorescencję przy długości fali 350 nm niż substrat. Ponadto podczas chromatografii cienkowarstwowej produkt migruje z czołem rozpuszczalnika, podczas gdy substrat pozostaje w miejscu startu (nałożenia próby).

### 3.9.3 Sączenie molekularne

Metoda ta pozwala na rozdział białek na podstawie ich masy cząsteczkowej. Frakcje po rozdziale na kolumnie jonowymiennej, które wykazywały aktywność HTL-azową, zagęszczano na filtrach Centriplus, o punkcie odcięcia 30 kDa. Tak przygotowane preparaty nakładano na kolumnę Superdex 200, o objętości 113 cm<sup>3</sup>. Rozdział prowadzono w 4°C, w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,4. Zebrane po rozdziale 5ml frakcje poddawano testowi na aktywność enzymatyczną hydrolizy HTL.

### 3.9.4 Rozdział chromatograficzny na kolumnie hydroksyapatytowej

Mechanizm rozdziału białek na kolumnie hydroksyapatytowej polega na tworzeniu specyficznych kompleksów grup karboksylowych białek z jonami wapnia na kryształach hydroksyapatytowych oraz niespecyficznym przyciąganiu dodatnio naładowanych grup aminowych białek i ujemnie naładowanym złożem. Frakcje posiadające aktywność hydrolizującą HTL, po rozdziale na kolumnie wypełnionej Superdex 200, poddawano dializie wobec 5mM buforu fosforanowego. Próby nanoszono na kolumnę wypełnioną hydroksyapatytem, następnie kolumnę przemywano buforem fosforanowym (pH 7,4) o wzrastającym stężeniu (5-200 mM).

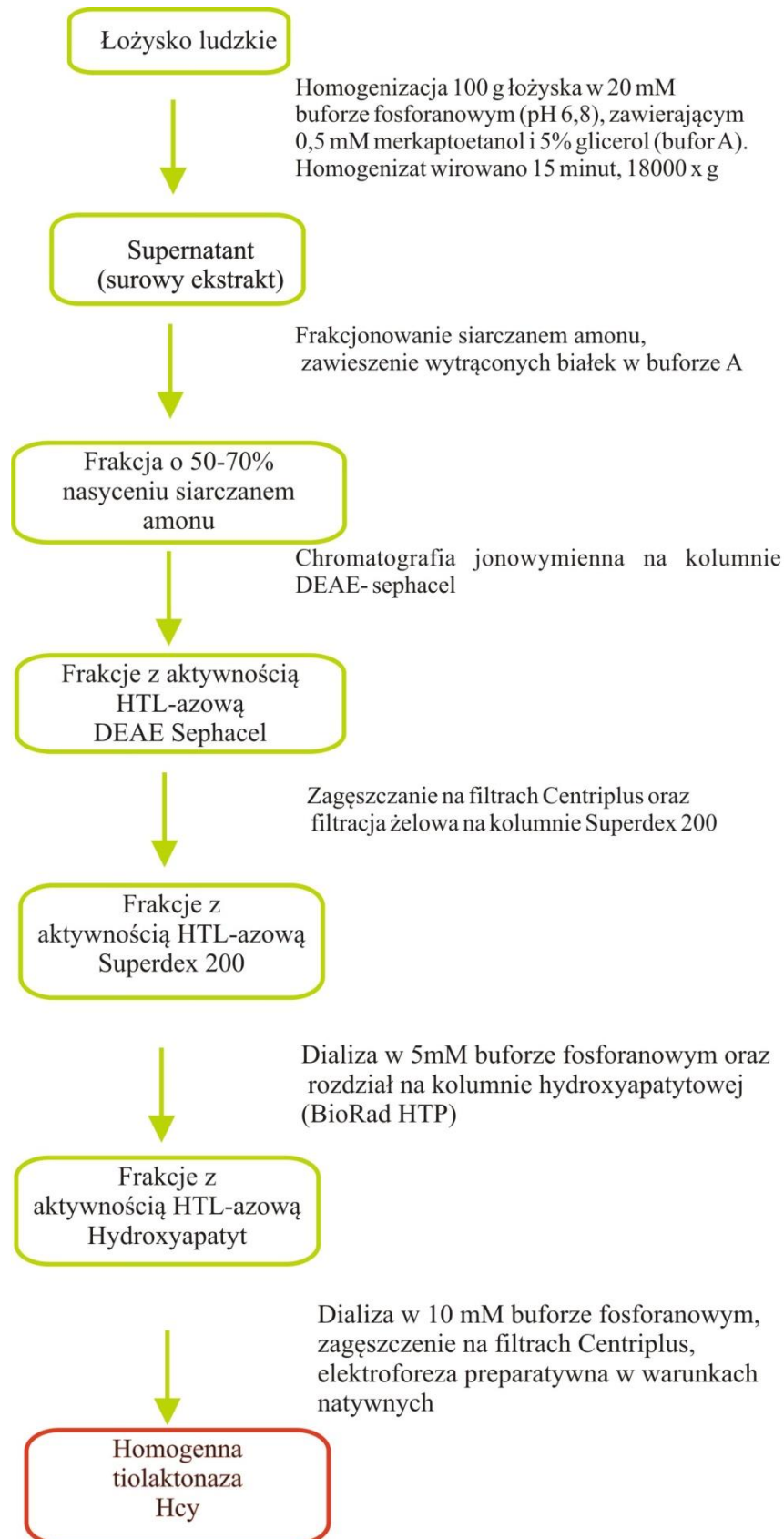
### 3.9.5 Analiza białek w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych i denaturujących

Żele poliakrylamidowe przygotowywano wg schematu przedstawionego w tabeli (**Tabela 1**). Po dodaniu katalizatorów reakcji polimeryzacji (APS i TEMED), mieszaniny wylewano między szyby o wymiarach 12cm x 12 cm i pozostawiano do polimeryzacji na około 1h. Elektroforezę prowadzono w 4°C, przy natężeniu prądu ok. 20 mA. Do każdej próby dodawano bufor obciążający zawierający barwnik –błękit bromofenolowy, jako wskaźnik migracji próby na żelu.

	Żel denaturujący		Żel natywny	
	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 12%	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 8%
30:0,8 akrylamid:bisakrylamid	0,4 ml	3,2 ml	0,415 ml	1,546 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,74 ml	-	0,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2 ml	-	1,26 ml
10% SDS	30 $\mu$ l	80 $\mu$ l	-	-
Woda destylowana, dejonizowana	2,545 ml	2,66 ml	1,575 ml	2,124 ml
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	12 $\mu$ l	20 $\mu$ l
10% APS	40 $\mu$ l	70 $\mu$ l	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Całkowita objętość mieszaniny	3,765 ml	8,02 ml	2,522 ml	5,056 ml

**Tabela 1. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych.**

Po skończonym rozdziale elektroforetycznym, żele wybarwiano w roztworze Coomasie Brilliant Blue G-250, następnie odbarwiano i utrwalano w roztworze kwasu octowego i metanolu.



Rysunek 10. Schemat poszczególnych etapów izolacji enzymu o aktywności tiolaktonazowej z łożyska ludzkiego.

### 3.10 Oznaczanie specyficzności substratowej tiolaktonazy wyizolowanej z łożyska ludzkiego

Wyizolowany enzym inkubowano z poszczególnymi substratami, w temperaturze 30°C. W określonym czasie nanoszono 1 µl mieszaniny na płytkę celulozową do TLC. Następnie płytkę rozwijano w układzie butanol:kwas octowy:woda (4:1:1), suszono i pryskano 0,04 % roztworem ninhydryny w 50% etanolu. Płytkę umieszczano do wyschnięcia na kilka minut w inkubatorze, w temp. ok. 100 °C.

### 3.11 Hodowla linii komórkowej HeLa

Linie komórek HeLa hodowano w temp. 37°C, przy 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. Jako pożywkę stosowano RPMI 1640, z dodatkiem 10% FBS (bydłęcej surowicy płodowej), witamin oraz antybiotyków standardowo używanych w hodowli ludzkich komórek. Po osiągnięciu przez komórki 100% konfluencji, poddawano je trypsynizacji (inkubując z trypsyną przez kilka minut, aż do momentu odklejenia się komórek od podłoża) i następnie przesiewano na inne naczynia hodowlane, inaktywując trypsynę poprzez dodanie pożywki zawierającej surowicę.

W celu transfekcji komórek HeLa plazmidami zawierającymi shRNA specyficzne wobec hydrolazy bleomycyny, najpierw stransformowano tymi plazmidami bakterie *E.coli* DH5α, które namnażano, a następnie oczyszczano plazmidy i poddawano komórki HeLa transfekcji. Plazmidy zawierały gen oporności na ampicylinę oraz neomycynę, umożliwiającą stabilną selekcję stransfekowanych komórek. Doświadczalnie ustalono wartość najmniejszego stężenia G418 (analog neomycyny), przy którym niestransfekowane komórki nie przeżywały. Jest to tzw. „stężenie efektywne”, które wynosiło 0,25 mg/ml.

### 3.12 Transformacja bakterii *E.coli* plazmidami zawierającymi shRNA specyficzne wobec genu hydrolazy bleomycyny metodą *heat shock*

Do 100µl zawiesiny komórek kompetentnych DH5α dodawano 2 µl plazmidu (zawierającego gen oporności na ampicylinę) i inkubowano 45 min. na lodzie. Zawiesinę ogrzewano przez 90 sekund w temp. 42°C, a następnie chłodzono 5 min. na lodzie. Do transformowanych komórek dodawano 800 µl płynnej pożywki SOC i wytrząsano 1h w

temp. 37°C przy 350 obr./min. Bakterie wirowano przy prędkości 4000 obr/min, 2 min., w temperaturze pokojowej, następnie supernatant dekantowano, a osad zawieszano w 200µl pożywki SOC. 100 µl zawiesiny bakteryjnej наносono na płytkę z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w temp. 37°C. Następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii transformowanych plazmidem.

#### **3.13 Oczyszczanie plazmidowego DNA**

Z płytki z pożywką stałą, na której wyrosły pojedyncze kolonie transformowanych bakterii pobierano 1 kolonię, szczepiono nią 2,5 ml pożywki LB z ampicyliną i inkubowano przez 6h w temp. 37°C, z wytrząsaniem 300 obr/min. Następnie pobierano 1 ml zaszczepki i dodawano do 100 ml świeżej pożywki LB z ampicyliną. Hodowlę prowadzono dalej w 37°C, przez noc, z wytrząsaniem 300 obr/min. Hodowlę nocną wirowano (4000 rpm, 25 min, 4°C), a plazmidowe DNA oczyszczano wg protokołu producenta. Wykorzystywany przez mnie zestaw do izolacji plazmidów (EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen) pozwala na usunięcie endotoksyn bakteryjnych. Po zakończeniu izolacji mierzono ilość plazmidowego DNA za pomocą spektrofotometru, przy długości fali 260 nm. Następnie sprawdzano czystość wyizolowanego preparatu na 1% żelu agarozowym. W celu sprawdzenia obecności insertu w plazmidowym DNA preparaty trawiono enzymem restrykcyjnym PstI - inkubowano 3 µg plazmidowego DNA, 2 µl enzymu PstI (10 U/µl), 2 µl buforu 0<sup>+</sup> (10x stężonego), 11 µl H<sub>2</sub>O, w 37°C przez 17h. Produkty cięcia enzymem PstI widoczne na 1% żelu agarozowym, o wielkości 3871 bp oraz 991 bp, świadczą o obecności pożądanej sekwencji w wektorze plazmidowym.

#### **3.14 Transfekcja komórek HeLa plazmidami**

W celu transfekcji komórki HeLa plazmidami posiewano je na 6-dołkowe płytki hodowlane. Komórki hodowano w pożywce RPMI 1640, z 10% FBS, witaminami oraz antybiotykami, aż do uzyskania konfluencji ok.70%. Do wykonania transfekcji pobrano po 4µg oczyszczonego, plazmidowego DNA, zawieszano w 250 µl czystego medium RPMI 1640 (bez żadnych dodatków) i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Równocześnie przygotowywano odczynnik do transfekcji komórek - kationitowy liposom - Lipofectamina 2000 (Invitrogen), który tworzy kompleksy z cząsteczkami kwasów nukleinowych, ułatwiając przenikanie przez błony komórkowe. Lipofectaminę 2000,

zawieszoną w medium RPMI 1640, inkubowano 10 min, w temp. pokojowej. Po tym czasie mieszano plazmidowe DNA z Lipofectaminą 2000 i inkubowano przez 20 min w temp. pokojowej. Stosunek ilościowy plazmidowego DNA do Lipofectaminy 2000 wynosił 1:2,5. Komórki przed podaniem w/w mieszaniny, płukano dwukrotnie czystą pożywką RPMI 1640, pozostawiając ostatecznie po 1,5 ml czystego medium w każdym dołku hodowlanym. Dodawano kolejno po 500 µl mieszaniny DNA-Lipofectamina 2000 do każdego dołka. Komórki inkubowano ok. 3h w temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie wymieniano pożywkę na RPMI 1640 suplementowaną FBS, witaminami, antybiotykami oraz 0,25 mg/ml G418. Hodowlę/selekcję stransfekowanych komórek prowadzono przez około 3 tygodnie, aż do uzyskania stabilnych linii komórkowych.

#### **3.15 Testy żywotności komórek HeLa**

W celu oceny cytotoksyczności Hcy lub HTL wobec komórek HeLa stosowano następujące testy:

##### **1) pomiar ilości ATP**

Żywotność komórek HeLa oceniano przy użyciu zestawu CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Zasada działania testu opiera się na założeniu, że ilość ATP w komórkach koreluje z żywotnością komórek. W skrócie, metoda ta polega na lizie błon komórkowych, uwolnieniu ATP, inhibicji endogennych ATPaz oraz dostarczeniu lucyferyny, lucyferazy i innych reagentów koniecznych do pomiaru ATP za pośrednictwem reakcji bioluminescencji. Dostarczona w zestawie termostabilna lucyferaza w obecności Mg<sup>2+</sup>, ATP i tlenu katalizuje reakcję utleniania lucyferyny, w wyniku czego powstaje oxylucyferyna, emitująca światło, które można zarejestrować za pomocą luminometru. Jednocześnie następuje inhibicja endogennych enzymów, uwolnionych w trakcie lizy komórek (np.ATPaz). W celu wykonania pomiaru ilości ATP (oceny żywotności komórek) w komórkach HeLa, komórki te posiewano na płytkę hodowlaną 96-dołkową (powierzchnia jednego dołka 0,625 cm<sup>2</sup>). Następnie dodawano różne stężenia HTL i inkubowano płytkę 24 h w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Płytkę po wyjęciu z inkubatora (37°C), pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej (ok. 22°C), po czym dodawano 100µl gotowej mieszaniny wszystkich reagentów potrzebnych do pomiaru ATP (Cell Titer-Glo<sup>®</sup> Reagent) do 100µl medium hodowlanego, w którym inkubowano komórki. Płytkę mieszano delikatnie przez 2 minuty,



aby zaindukować lizę komórek. W celu stabilizacji sygnału luminescencyjnego płytkę inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej. Sygnał luminescencji odczytywano na luminometrze Centro LB 960 (Berthold Technologies).

#### **2) pomiar aktywności metabolicznej komórek za pomocą rezazuryny**

Test ten (TOX8, Sigma) pozwala na mierzenie aktywności metabolicznej żywych komórek. Zasada jego działania polega na tym, że barwnik rezazuryna wchodzi do żywych komórek, gdzie jest redukowany do rezorufiny. Ilość przekształconych cząsteczek rezazuryny do rezorufiny jest proporcjonalna do liczby metabolicznie aktywnych, żywych komórek obecnych w hodowli. Roztwór rezazuryny ma kolor ciemnoniebieski, a bioredukcja tego barwnika obniża ilość formy utlenionej (niebieskiej) powodując jednoczesny wzrost ilości produktu zredukowanego (rezorufiny) o kolorze czerwonym. Stopień konwersji odczynnika w roztworze mierzony jest spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie.

W celu wykonania pomiaru żywotności komórek HeLa, posiewano je na płytkę 24- lub 6-dołkową, do pożywki hodowlanej dodawano Hcy lub HTL i inkubowano całość przez 24 lub 48 h. Po danym czasie pożywkę usuwano z warstwy komórek, dodawano 10% roztwór TOX8 w RMPI 1640 i inkubowano płytkę przez 1h w inkubatorze hodowlanym. Po tym czasie roztwór zbierano i wirowano (5 min, 14 000 rpm).

Ilość rezorufiny w roztworze mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm (max absorpcji dla rezorufiny), a przy długości fali 690 nm mierzono tło.

#### **3.16 Izolacja białek z komórek HeLa**

W celu wykonania analizy Western Blot, z komórek HeLa izolowano białka metodą zamrażania/rozmrzania. Komórki rosnące w naczyniu hodowlanym poddawano trypsynizacji, zbierano komórki zawieszono w roztworze, które następnie zwirowywano (5 000 x g, 5 min, 4°C) i usuwano roztwór trypsyny. Osad komórkowy przemywano buforem PBS i ostatecznie zawieszano w 20 µl buforu PBS zawierającego inhibitory proteaz. Tak przygotowane próbki mrożono w -80°C (ok.10 min), a następnie rozmrażano w temp. 37°C. Czynności te powtarzano trzykrotnie, po czym zawiesinę komórek zwirowywano (13 000 x g, 5 min, 4°C) i zbierano supernatant zawierający białka. Stężenie uzyskanych w ten sposób białek mierzono na PicoDropie.

### 3.17 Western blot

Metoda Western Blot, pozwalająca na ocenę stopnia ekspresji wybranego białka, polega na jego identyfikacji za pomocą specyficznych przeciwciał. W pierwszym etapie przeprowadza się elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Po rozdzieleniu żel jest umieszczany na membranie PVDF i w polu elektrycznym indukowane jest przeniesienie białek z żelu na membranę. Następnie membranę poddaje się immunodetekcji specyficznym przeciwciałem. Poszczególne etapy wykonywano w sposób następujący:

1. Na 12% białkowy żel denaturujący nakładano 20µg mieszaniny białek zawieszonych w buforze obciążającym SB i przeprowadzano elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), przy natężeniu prądu 25 mA, w temperaturze 4°C. Po skończonym rozdzieleniu, żel przepłukiwano w wodzie, a następnie w buforze do transferu.
2. Przygotowano membranę PVDF, zanurzając ją na 1,5-2 minut w metanolu, następnie 5 min. w wodzie, a na koniec w buforze do transferu.
3. Membranę oraz żel układano w aparacie do transferu firmy Sigma (blot w warunkach pół-suchych). Najpierw nakładano 3 warstwy bibuły 3 MM zanurzonej w buforze do transferu, następnie żel, kolejno membranę PVDF i ponownie 3 warstwy bibuły 3 MM zanurzonej w buforze do transferu.
4. Transfer białek z żelu na membranę przeprowadzono przez 3h, przy natężeniu prądu 2 mA.
5. Po transferze, membranę blokowano w 5% roztworze chudego mleka w proszku rozpuszczonego w roztworze PBS z dodatkiem 0,05% Tween20. Blokowanie membrany, która ma duże powinowactwo do wiązania białek (w tym przeciwciał), zapobiega niespecyficznemu wiązaniu się do niej przeciwciał pierwszo- lub drugorzędowych. Membranę inkubowano z roztworem blokującym przez noc, w 4°C.
6. Kolejno membranę płukano dwa razy po 5 minut w buforze PBS z 0,05% Tween20.
7. Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym (anty-BLH) przez 2 h, w temperaturze pokojowej. Przeciwciało rozcieńczano w stosunku 1:200 w 3% roztworze BSA w PBS+0,05% Tween20.
8. Membranę płukano 4 x 15 minut w buforze PBS z 0,05% Tween20.
9. W kolejnym etapie membranę inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym (IgG skonjugowanym z peroksydazą chrzanową HRP), rozcieńczonym w stosunku 1:2000 w

3% roztworze BSA w PBS+0,05% Tween20, przez 2 h, w temperaturze pokojowej, po czym płukano 4 x 15 minut w buforze PBS z 0,05% Tween20.

10. Tak przygotowaną membranę poddawano detekcji chemiluminescencyjnej. W tym celu membranę inkubowano w ciemności z odczynnikiem Western Lightning przez 1 min., a po umieszczeniu jej w folii plastikowej eksponowano na kliszę rentgenowską przez około 3 min.

#### **3.18 Oznaczanie ilości tiolaktonu Hcy w mediach hodowlanych komórek HeLa za pomocą HPLC**

W celu sprawdzenia stopnia konwersji Hcy do HTL lub oceny szybkości hydrolizy HTL w hodowlach komórek linii HeLa, komórki te hodowano w 37°C, w pożywce RPMI 1640, zawierającej witaminy, 10% FBS oraz antybiotyki, na płytce 6- lub 24- dołkowej, do osiągnięcia konfluencji 80-90%. Następnie pożywkę zmieniano na taką, która nie zawierała antybiotyków i dodawano do hodowli 0, 1, 3, 5, 10 lub 20 mM Hcy, w celu oceny stopnia konwersji Hcy do HTL. Komórki inkubowano dalej w tych samych warunkach i po czasie 0, 6, 24, 48 h pobierano po 500 µl medium hodowlanego i wykonywano analizę. Aby ocenić szybkość hydrolizy HTL w liniach HeLa z obniżoną ekspresją hydrolazy bleomycyny, do hodowli dodawano 100 µM HTL. Po czasie 0, 1, 2, 6,5 h pobierano po 500 µl medium komórkowego i wykonywano analizę. Medium przechowywano w -70 °C.

W celu oznaczenia ilości HTL, zebrane próby przygotowywano do analizy HPLC wg następującej procedury:

500 µl medium nanoszono na filtr Millipore o punkcie odcięcia 10 kDa. Filtrowano poprzez wirowanie przy 10.000 rpm, 15 min., w 4°C. Filtraty pozbawione białek doprowadzono do pH 8,0 za pomocą 10 µl 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a następnie ekstrahowano HTL za pomocą 1ml mieszaniny chloroform/metanol (w stosunku 2:1), w temperaturze pokojowej. Następnie HTL reekstrahowano z fazy organicznej za pomocą 0,2 ml 0,1M HCl. Fazę wodną, w której znajdował się HTL, liofilizowano na koncentratorze Speedvac i rozpuszczono w 20µl dejonizowanej wody. Wydajność odzysku HTL tą metodą wynosi około 60%. Tak przygotowane próby nanoszono na kolumnę kationitową (SCX) i poddawano analizie na HPLC.

### 3.19 Hodowla kultur *Escherichia coli*

Kultury bakterii *E.coli* hodowano w pożywce minimalnej z kwasem cytrynowym, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem 200 obr/min, w szklanych kolbkach z bocznym ramieniem o objętości 125 ml. Wzrost bakterii monitorowano wykonując pomiary na kolorymetrze Kletta-Summersona. 100 jednostek Kletta odpowiada ilości  $2 \times 10^8$  komórek/ml (w przybliżeniu 0,7 OD).

### 3.20 Oznaczanie ilości tiolaktonu Hcy w mediach hodowlanych *E.coli* za pomocą HPLC

Po zakończeniu eksperymentu mającego na celu pomiar szybkości wzrostu bakterii *E.coli*, pobierano 300  $\mu$ l hodowli, zwirowywano (14,000 x g, 2 min, 4°C), a następnie media komórkowe pozbawione komórek przechowywano w temp. -20°C, do wykonania analizy. Następnie medium rozcieńczano 100-krotnie wodą, pobierano 10  $\mu$ l, наносono na kolumnę kationitową i poddawano analizie HPLC.

Z uwagi na fakt, iż przy wartościach pH poniżej swojego  $pK_a$  tiolakton Hcy jest kationem, ulega on retencji na kolumnie kationitowej. Analizy wykonywano na systemie Beckman-Coulter System Gold Nouveau HPLC, posiadającym detektor fluorescencji Jasco 1520. Do analizy pojedynczych próbek używano ręcznego podajnika próbek (7725i Rheodyne), z pętlą 0,1 ml. Próbki (10-20  $\mu$ l) наносono na kolumnę kationitową polysulfoethyl aspartamid (150x1mm, 5  $\mu$ m, 300 Å) (PolyLC). Kolumnę przemywano izokratycznie 10 mM buforem fosforanowym (fosforan sodu), o pH 6,6, zawierającym 5mM NaCl, szybkość przepływu wynosiła 0,15 ml/min. Do oceny ilościowej HTL stosowano postkolumnową derywatyzację, z użyciem roztworu 2,5 mM o-ftalaldehydu (OPA) w 0,25 M NaOH, a następnie detekcję fluorescencyjną. W warunkach zasadowych tiolakton Hcy jest prawie całkowicie hydrolizowany do Hcy, która następnie reaguje z OPA, dając pochodną wykazującą intensywną fluorescencję. Mieszanina próby z roztworem OPA w NaOH przepływa przez pętlę (ang. *teflon tubing reaction coil*) o wymiarach 0,3 mm x 3m, a następnie jest monitorowana na detektorze fluorescencyjnym Jasco 1520, przy długości fali wzbudzenia 370 nm oraz długości fali emisji 480 nm.

### 3.21 Oznaczanie Hcy N-związanej z białkiem

Hodowle bakterii *E.coli* prowadzono do osiągnięcia gęstości 100 jednostek Kletta, po czym do hodowli dodawano 4 mM D,L-Hcy. W określonych odstępach czasu pobierano 5 ml próby hodowli, które zwirowywano, a komórki bakteryjne (osad) przechowywano w temperaturze -20°C, do czasu wykonania analiz. Po odmrożeniu komórki zawieszano w 0,5 ml 50 mM buforu fosforanowego, pH 7,4, zawierającego 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA i następnie poddawano sonikacji (3x15 s, na lodzie). Surowe ekstrakty wirowano, a stężenie białka znajdującego się w supernatancie określano przy użyciu odczynnika Bradford. Wolną, nie związaną z białkami Hcy, usuwano z roztworu białkowego poprzez 8 cykli filtracji (30 min, 10,000 g) na filtrach Millipore o punkcie odcięcia 10kDa, rozcieńczając buforem zawierającym DTT. Przygotowane w ten sposób próbki białek poddawano hydrolizie z 6N HCl zawierającym 0,1 M DTT, w temp. 120°C przez 1h.

Tak przygotowane hydrolizaty liofilizowano, następnie rozpuszczano w 5 µl wody, z czego 3 µl nakładano na płytkę celulozową (5 x 4 cm) do chromatografii cienkowarstwowej. Jako znacznik do każdej próbki dodawano D,L-[<sup>35</sup>S]Hcy-tiolakton (40,000 Ci/mol, 7,000 cpm/płytkę). Płytki rozwijano dwukierunkowo: w pierwszym kierunku układ rozwijający składał się z butanolu:kwasu octowego:wody (4:1:1), natomiast do rozdziału płytek w drugim kierunku używano układu rozwijającego: 2-propanol:octan etylu:woda:amoniak (12:12:1:0.12). Tiolakton Hcy lokalizowano za pomocą autoradiografii, przy użyciu filmu Kodak BioMax MR, 4h ekspozycji w 4°C. Następnie HTL eluowano z płytki 60µl 2mM HCl i poddawano analizie na HPLC.

### 3.22 Eksperymenty z wywołaniem szoku cieplnego w hodowlach *E.coli*

Hodowlę komórek *E.coli* prowadzono do wartości 50 jednostek Kletta, w temp. 37°C, w obecności lub przy braku Hcy. W celu sprawdzenia poziomu ekspresji białek szoku cieplnego podwyższano temp. hodowli do 45°C. Komórki pochodzące z eksperymentu kontrolnego (hodowli w 37°C) oraz te, poddane szokowi cieplnemu (ang. *heat shock*) (0,1 ml) znakowano 0,1 mM [<sup>35</sup>S]- L-metioniną (150 000 cpm), przez 15 min. Wyznakowane radioaktywną metioniną białka analizowano za pomocą SDS-PAGE, na 12 % żelu poliakrylamidowym, a następnie wizualizowano na filmie Kodak Biomax MR.

## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1 Metabolizm homocysteiny oraz inhibicja wzrostu u *E.coli*

Nadmiar Hcy powoduje inhibicję wzrostu komórek bakteryjnych, takich jak *Escherichia coli* [8, 9], a także śmierć komórek ssaczy [99] i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [124]. Szkodliwy wpływ Hcy na komórki ssacze i drożdżowe jest związany z konwersją Hcy do tiolaktonu Hcy, który może być toksyczny z dwóch powodów. Po pierwsze, konwersja Hcy do HTL wymaga ATP, powodując straty energii komórkowej, a w konsekwencji inhibicję wzrostu, jak to wykazano u drożdży [64]. Po drugie, tiolakton Hcy jest reaktywnym produktem pośrednim, który modyfikuje białka w procesie N-homocysteinytacji, zmieniając lub upośledzając ich funkcje, co ostatecznie prowadzi do zahamowania wzrostu, a następnie śmierci komórek, jak to ma miejsce w komórkach ssaków, w tym człowieka [99].

Celem badań było ustalenie, czy któryś z wymienionych mechanizmów toksyczności tiolaktonu Hcy przyczynia się do inhibicji wzrostu *Escherichia coli*.

Przedstawione wyniki zostały opublikowane w pracy "Homocysteine editing and growth inhibition in *Escherichia coli*", Sikora, Jakubowski, *Microbiology*, 2009 [128].

#### 4.1.1 Kumulacja tiolaktonu Hcy a inhibicja wzrostu *E.coli*

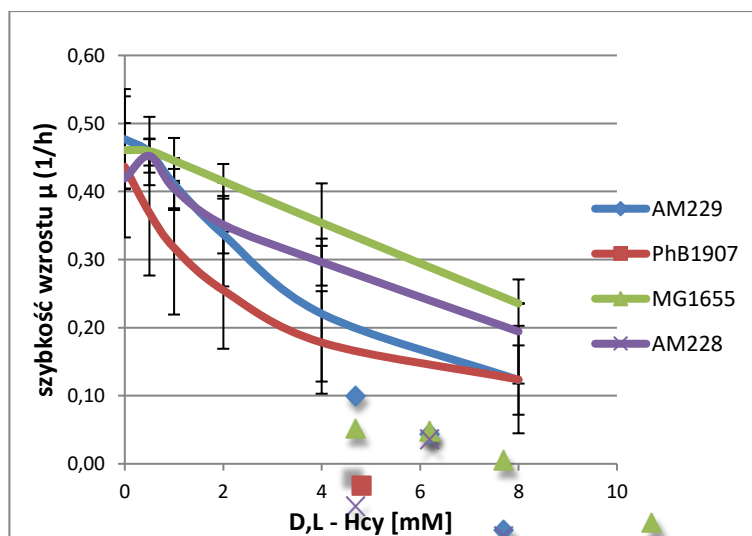
We wszystkich organizmach Hcy wchodzi w pierwszy etap biosyntezy białka i tworzy produkt pośredni - Hcy-AMP w reakcji katalizowanej przez syntetazę metionyl-tRNA (MetRS) [78]. Błędnie aktywowana Hcy ulega obróbce, której produktem jest tiolakton Hcy. A zatem Hcy nie jest przenoszona na tRNA, co zapobiega jej translacyjnej inkorporacji do białek. U *Escherichia coli*, poza MetRS, dwa inne enzymy biorą udział w obróbce Hcy i biosyntezie HTL, a mianowicie syntetaza izoleucylo-tRNA (IleRS) oraz syntetaza leucylo-tRNA (LeuRS) [5]. Ze względu na wyjątkowo niską wartość  $pK_a$  (6,7), w warunkach fizjologicznych HTL posiada ładunek obojętny, co pozwala na dyfuzję HTL z komórek i gromadzenie się w medium hodowlanym [64]. Komórki *E.coli* (szczep MG1655 oraz jego warianty z brakiem różnych proteaz : PhB1907 ( $\Delta clpXP$ ), AM228 ( $\Delta lon::kan^R$ ), AM229 ( $\Delta lon::kan^R lexA1(Ind-) malF::Tn10 (tet^R)$ ) hodowano na pożywce minimalnej o pH 6,0 przez 8 h, po czym mierzono poziom tiolaktonu Hcy w mediach hodowlanych za pomocą HPLC (**Tabela 2**):

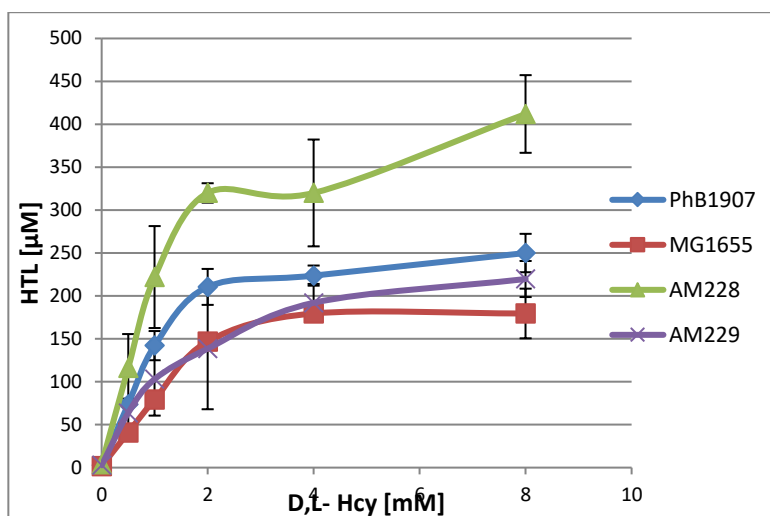
Szczep <i>E.coli</i>	HTL [ $\mu\text{M}$ ]
MG1655	1,0
PhB1907	5,0
AM228	2,4
AM229	1,4

Tabela 2. Produkcja HTL przez poszczególne szczepy *E.coli*.

Wykazano, że szczep PhB1907 ( $\Delta clpXP$ ) produkuje największą ilość HTL -  $5\mu\text{mol/l}$ , pozostałe szczepy wytwarzają mniej HTL – 1-2,4  $\mu\text{mol/l}$ . W celu sprawdzenia, czy metaboliczna konwersja Hcy do tiolaktonu Hcy może wpływać na szybkość wzrostu, komórki *E.coli* hodowano w medium minimalnym o pH 6,0, z 0,4 % glukozą jako źródłem węgla oraz z dodatkiem 0; 0,5; 1; 2; 4; 8 mM D,L-Hcy. Wzrost bakterii monitorowano co 40 minut za pomocą aparatu Kletta-Summersona, a stężenia tiolaktonu-Hcy w mediach hodowlanych mierzono po zakończeniu każdego eksperymentu (8h). Specyficzne szybkości wzrostu ( $\mu$ ) obliczano z zależności  $\mu = \ln 2/t$  [1/h], gdzie  $t$  oznacza czas podwojenia hodowli (ang. *doubling time*) w godzinach.

A.



**B.**

**Rysunek 11. Inhibicja wzrostu i kumulacja tiolaktonu Hcy w hodowlach *E.coli*, do których dodawano D,L-Hcy.** Szczepy *E.coli*: MG1655, PhB1907, AM228 i AM229 hodowano w medium minimalnym z dodatkiem różnych stężeń D,L-Hcy. Szybkości wzrostu (A) oraz stężenia tiolaktonu Hcy (B) przedstawiono jako funkcje stężenia D,L-Hcy.

Proporcjonalnie do stężenia D,L-Hcy w medium hodowlanym zaobserwowano inhibicję wzrostu szczepów *E.coli* MG1655, PhB1907, AM228 i AM229 (**Rys. 11 A**). Ponadto, w stosunku do poziomu wyjściowego, stężenie HTL w hodowlach bakteryjnych wzrastało około 100-krotnie (do 200-400 µM), proporcjonalnie do stężenia D,L-Hcy. Wyższe stężenia tiolaktonu Hcy zaobserwowano w hodowlach szczepów PhB1907 i AM228 niż w MG1655 (**Rys. 11 B**). Stwierdzono natomiast, że dodawany egzogennie do medium hodowlanego tiolaktonek Hcy (w tych samych stężeniach; 200-400 µM), nie powoduje inhibicji wzrostu *E.coli*, podobnie jak wykazali we wcześniejszych badaniach Tuite i wsp. [9].

#### 4.1.2 Wpływ octanu sodu na szybkość wzrostu i kumulację tiolaktonu Hcy w hodowlach *E.coli*

W 2002 r. Roe i wsp. [8] zasugerowali, że inhibicja wzrostu *E.coli* pod wpływem octanu sodu jest spowodowana gromadzeniem Hcy w komórkach bakteryjnych. Słabe kwasy organiczne, ze względu na swoje właściwości antybakteryjne, są stosowane jako konserwanty żywności. Badacze ci zaobserwowali, że metionina odwraca efekt inhibicji wzrostu *E.coli* spowodowanej słabymi kwasami organicznymi, a ponadto, że produkty

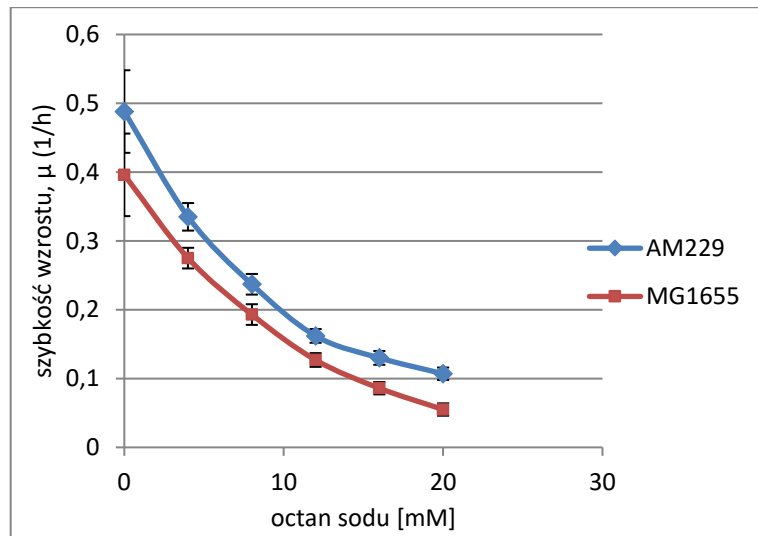


pośrednie ścieżki biosyntezy metioniny - homoseryna, O-succinylohomoseryna, cystationina - nie mają takich samych właściwości odwracających efekt inhibicji. Na tej podstawie zasugerowali, że octan hamuje aktywność któregoś z enzymów w ścieżce biosyntezy metioniny, co prowadzi do kumulacji Hcy. Jednak przeprowadzone przez nich badania wykluczyły udział transmetylaz MetH i MetE oraz hydroksymetylotransmetylasy serynowej GlyA, enzymów biorących udział w biosyntezie metioniny bezpośrednio z homocysteiny. Nadekspresja tych enzymów nie chroniła przed inhibitorowym wpływem octanu.

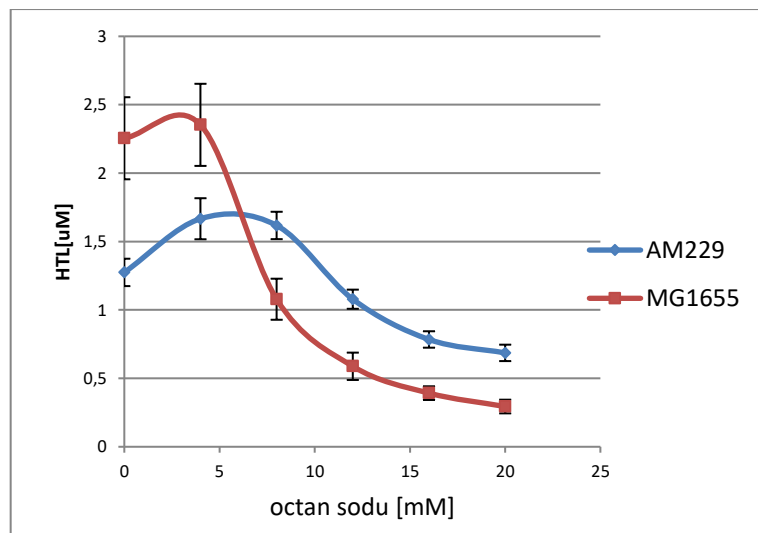
W celu weryfikacji tezy, że hodowla komórek z octanem prowadzi do kumulacji Hcy, wykonano eksperymenty mające na celu sprawdzenie, czy konwersja Hcy do tiolaktonu Hcy odgrywa rolę w inhibicji wzrostu zależnej od octanu sodu. Ze względu na to, że kumulacja Hcy prowadzi do gromadzenia tiolaktonu Hcy [83], mierzono szybkości wzrostu oraz poziom tiolaktonu Hcy w hodowlach szczepów *E.coli*: MG1655 oraz AM229, hodowanych w medium minimalnym, z dodatkiem octanu sodu w stężeniach od 0 do 20 mM.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, octan inhibuje wzrost badanych szczepów *E.coli* (**Rys. 12 A**), jednakże, co zaskakujące, stwierdzono, że dodatek octanu sodu obniża 2-6 krotnie podstawowy poziom tiolaktonu Hcy w hodowlach (**Rys. 12 B**). Natomiast jak wykazano we wcześniejszych doświadczeniach (rozdział 4.1.1), wraz ze wzrastającym stężeniem Hcy kumulacja HTL wzrasta aż 100 krotnie w stosunku do poziomu wyjściowego (**Rys. 11 B**). W związku z tym można wykluczyć, że dochodzi do gromadzenia się Hcy w komórkach *E.coli* pod wpływem octanu. Zaobserwowana przez badaczy Roe i wsp. kumulacja Hcy może wynikać z zastosowania do badania niespecyficznego wobec Hcy metody analizy. W badanych próbach ilość poszczególnych aminokwasów oceniano przy użyciu automatycznego analizatora Applied Biosystems 420H, z zastosowaniem detektora UV. Homocysteina, jako aminokwas niestandardowy, występujący w białkach w znacznie mniejszych ilościach niż pozostałe aminokwasy, jest dużo trudniejsza do wykrycia i dokładnej analizy ilościowej, zwłaszcza jeśli używa się detektora UV, który charakteryzuje się znacznie niższą czułością niż np. detektor fluorescencyjny. Ponadto, w wykonywanej przez badaczy analizie nie zastosowano próby odniesienia w postaci standardu homocysteiny.

A.



B.



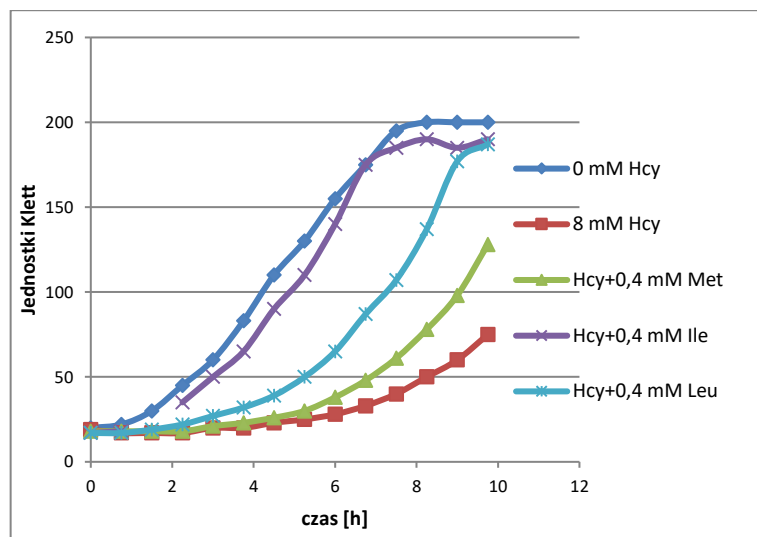
**Rysunek 12. Poziom tiolaktanu Hcy nie wzrasta w kulturach *E.coli* hodowanych w obecności octanu.** Szczepy MG1655 oraz AM229 hodowano na pożywce minimalnej, z dodatkiem 0-20 mM octanu sodu. Szybkości wzrostu (A) oraz stężenia tiolaktanu Hcy (B) przedstawiono jako funkcje stężenia octanu sodu.

#### 4.1.3 Wpływ Ile, Leu, Met na szybkość wzrostu i kumulację tiolaktonu Hcy w hodowlach *E.coli* prowadzonych z dodatkiem Hcy.

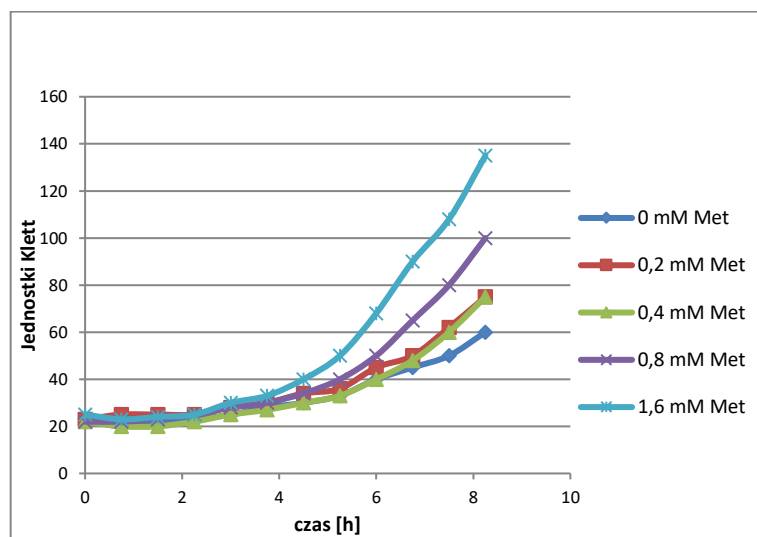
W 2005 r. Tuite i wsp. zaproponowali, że inhibicja wzrostu *E.coli* przez Hcy jest spowodowana hamowaniem aktywności deaminazy treoninowej, co prowadzi do niedoboru izoleucyny (Ile) w komórkach [9]. Deaminaza treoninowa jest enzymem biorącym udział w pierwszym etapie biosyntezy izoleucyny u *E.coli*. Autorzy obserwowali zniesienie efektu inhibicji wzrostu komórek w wyniku dodatku do hodowli bakteryjnych Ile. Jednakże stymulujący wpływ Ile mógł być również spowodowany tym, że aminokwas ten zapobiega metabolicznej konwersji Hcy do tiolaktonu Hcy, reakcji katalizowanej przez IleRS. U *E.coli* egzogenna Hcy ulega konwersji do tiolaktonu Hcy za pośrednictwem MetRS, IleRS oraz LeuRS [5]. Suplementacja hodowli bakteryjnych odpowiednim aminokwasem (Met, Ile czy Leu) zapobiega zatem syntezie tiolaktonu Hcy przez daną syntetazę. W związku z tym, jeżeli synteza tiolaktonu Hcy powoduje inhibicję wzrostu, wówczas zapobieganie syntezie HTL powinno przyspieszyć wzrost bakterii.

Postanowiono zatem sprawdzić jaki wpływ ma obecność 0.4 mM Ile, Met lub Leu na wzrost hodowli *E.coli* MG1655 prowadzonych z dodatkiem (8 mM) lub bez Hcy. Okazało się, że kultury suplementowane zarówno Hcy, jak i Ile, rosły porównywalnie szybko do hodowli *E.coli* w warunkach kontrolnych, bez Hcy (**Rys. 13 A**). Suplementacja hodowli prowadzonych z dodatkiem 8 mM Hcy metioniną i leucyną (0; 0.2; 0.4; 0.8 i 1.6 mM) również przyspiesza wzrost komórek, jednakże mniej wyraźnie niż Ile (**Rys. 13 B i C**). Kontrolne doświadczenia wykazały ponadto, że dodatek Met, Ile czy też Leu, przy braku Hcy w hodowli, nie przyspieszał wzrostu *E.coli*.

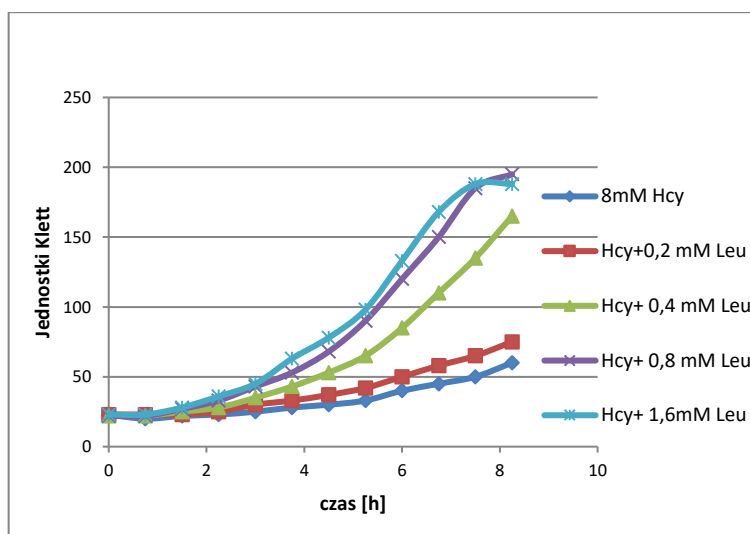
A.



B.



C.



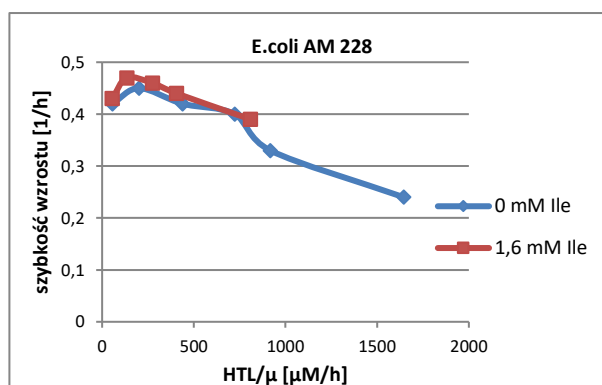
**Rysunek 13. Dodatek izoleucyny, leucyny lub metioniny przyspiesza wzrost hodowli *E.coli* prowadzonych z dodatkiem Hcy.** (A) Szczip *E.coli* MG1655 hodowano w medium minimalnym z dodatkiem (8mM) lub bez D,L-Hcy oraz 0,4 mM Met, Ile lub Leu. (B i C) Szczip MG1655 hodowano w medium minimalnym, z dodatkiem 8mM D,L-Hcy oraz 0; 0,2; 0,4; 0,8 i 1,6 mM Met (B) lub Leu (C). 100 jednostek Klett odpowiada  $2 \times 10^8$  komórek/ml.

Aby sprawdzić związek pomiędzy szybkością wzrostu a poziomem kumulowanego tiolaktonu Hcy, szczepy *E.coli* MG1655, PhB1907 i AM228 hodowano w obecności różnych stężeń D,L-Hcy (0; 0,5; 1; 2; 4 lub 8 mM), z dodatkiem (1,6 mM) lub przy braku Ile. Szybkość wzrostu komórek monitorowano za pomocą kolorymetru Kletta-Summersona, a ilość tiolaktonu Hcy określano metodą opisaną w rozdziale 3.24. Obliczano także szybkości wzrostu oraz normalizowano stężenia HTL na szybkość wzrostu. Na podstawie tych doświadczeń zaobserwowano, że w normalnych warunkach hodowlanych, przy braku izoleucyny, szybkość wzrostu była skorelowana ze znormalizowanym stężeniem HTL (**Rys. 14 A, B, C**). Natomiast gdy Ile była obecna w hodowli, znormalizowane stężenia HTL ulegały obniżeniu, a szybkość wzrostu przyspieszeniu, w przypadku każdego testowanego stężenia D,L-Hcy. Wcześniej stwierdzono, że Ile nie zapobiega transportowi Hcy do komórek *E.coli* [9]. Na podstawie uzyskanych wyników można zatem wnioskować, że stymulujący wpływ Ile w tych warunkach polega, przynajmniej częściowo, na zahamowaniu gromadzenia tiolaktonu Hcy w komórkach.

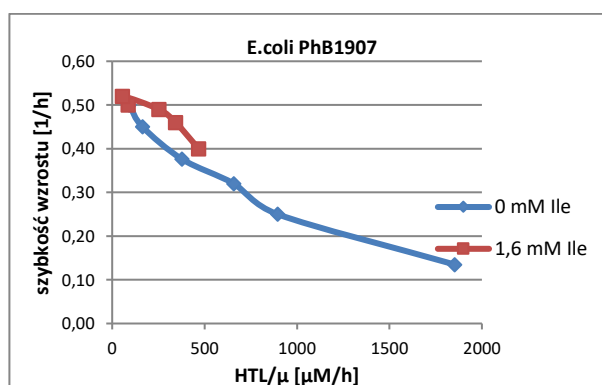
Następnie badano wpływ różnych stężeń Ile, Met oraz Leu (0; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 mM) na szybkości wzrostu i kumulację HTL, w hodowlach prowadzonych z dodatkiem 8mM D,L-Hcy. Wykazano, że znormalizowane stężenia HTL ulegały obniżeniu, podczas gdy szybkości wzrostu zwiększały się w obecności wzrastających stężeń Ile, Met czy Leu (**Rys. 14 D**).

Ze względu na to, że Ile, Met czy też Leu nie zapobiegają transportowi Hcy do komórek *E.coli* oraz nie wpływają na szybkość wzrostu bakterii w przypadku braku Hcy, stymulujący wpływ na wzrost komórek jest najprawdopodobniej spowodowany inhibicją syntezy tiolaktonu Hcy przez te aminokwasy. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że zwiększona synteza tiolaktonu Hcy katalizowana przez syntetazy IleRS, MetRS oraz LeuRS przyczynia się do zahamowania wzrostu w hodowlach *E.coli* prowadzonych z dodatkiem Hcy.

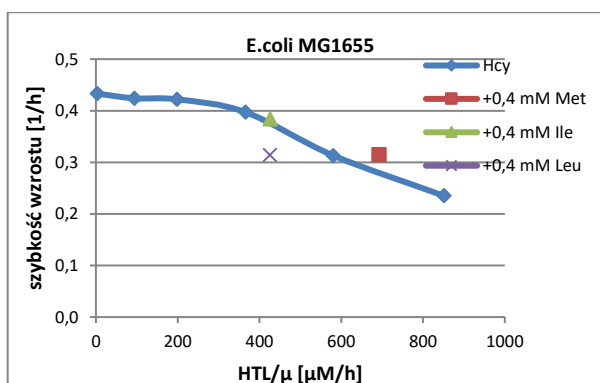
A.



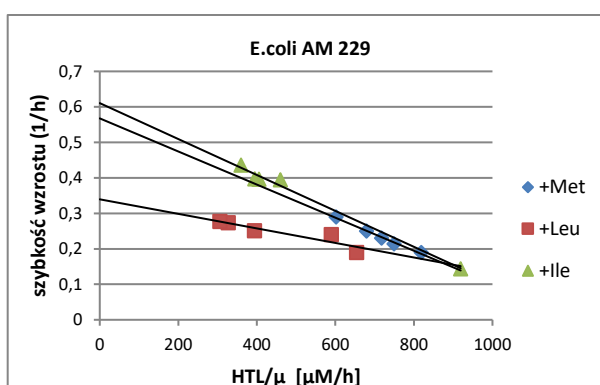
B.



C.



D.



**Rysunek 14. Szybkość wzrostu zależy od kumulacji tiolaktonu Hcy.** (A i B) Szczepy *E. coli* PhB1907 i AM228 hodowano w medium minimalnym, z dodatkiem (0; 0.5; 1; 2; 4, 8 mM) lub bez D,L-Hcy, w obecności lub przy braku 1,6 mM Ile. (C) Szczep *E. coli* MG1655 hodowano w medium minimalnym, z dodatkiem (0.5; 1; 2; 4, 8 mM) lub bez D,L-Hcy lub z 8mM D,L-Hcy + 0,4 mM Ile, Leu lub Met. (D) Szczep *E. coli* AM 229 hodowano w medium minimalnym z dodatkiem 8mM D,L-Hcy i w obecności (0.2; 0.4; 0.8; 1.6 mM) lub przy braku Ile, Met lub Leu. Dla każdej hodowli obliczano szybkości wzrostu, a ilość tiolaktonu Hcy mierzono po zakończeniu eksperymentów. Szybkości wzrostu przedstawiono jako funkcje tiolaktonu Hcy do szybkości wzrostu.

#### 4.1.4 Inkorporacja Hcy do białek

Obserwacja, że kumulacja tiolaktonu Hcy wpływa na szybkość wzrostu bakterii doprowadziła do postawienia pytania, czy to synteza HTL hamuje wzrost, czy też być może następująca później N-homocysteinylacja białek jest przyczyną inhibicji. Wykonano zatem doświadczenia mające na celu określenie, czy Hcy gromadzona jest w komórkach *E. coli* jako N-związana z białkami.

U *Escherichia coli*, Lon jest ATP-zależną proteazą, która degradowane niesfałdowane białka oraz niektóre białka regulatorowe przeznaczone do szybkiej degradacji. Mutacja w

genie *lon* u *E. coli* prowadzi do powstania fenotypu plejotropowego: wrażliwość na UV, mukoidoza, niższa wydajność w degradacji nieprawidłowych białek. Wszystkie te objawy fenotypowe są związane z utratą aktywności proteazowej. Inna proteaza – Clp, jest zależną od ATP proteazą zbudowaną z dwóch komponentów, podjednostki ATPazowej oraz podjednostki protezowej (ClpP) [129]. Sama podjednostka ClpP posiada tylko aktywność peptydazową. ATPazy ClpA oraz ClpX należą do rodziny ATPaz obecnych zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych. Jednakże, ATPazy Clp mogą pełnić nie tylko funkcje regulatorowe, ale także występować jako białka opiekuńcze niezależne od ClpP [130]. W celu oszacowania możliwego wpływu specyficznych proteaz na N-Hcy-białka, zbadano wpływ delecji proteaz Clp oraz Lon na kumulację N-związanej Hcy w białkach.

Szczepy *E. coli* MG 1655, AM228 ( $\Delta lon$ ) oraz PhB1907 ( $\Delta clpXP$ ) hodowano w medium minimalnym, bez Hcy lub z dodatkiem 4mM D,L-Hcy. Po określonym czasie (0; 0.5; 1; 2; 4; 24 h) pobierano próby i oznaczano poziom N-Hcy-białek wg metody opisanej w rozdziale 3.25. Poziom Hcy N-związanej z białkami w szczepie *E. coli* MG1655, rosnącym bez dodatku Hcy, wynosił  $58 \pm 17$  pmol/ $2 \times 10^8$  komórek (**Tabela 3**). W szczepach z brakiem proteaz, AM228 oraz PhB1907, zaobserwowano gromadzenie odpowiednio nieco mniejszych ( $43 \pm 13$  pmol / $2 \times 10^8$  komórek) i większych ( $73 \pm 26$  pmol / $2 \times 10^8$  komórek) ilości Hcy N-związanej z białkami (**Tabela 3**). W szczepie *E. coli* MG1655, hodowanym z dodatkiem 4mM D,L-Hcy, poziom Hcy N- związanej z białkami wzrósł znacząco, z 58 pmoli na  $2 \times 10^8$  komórek w hodowlach bez Hcy, do 151 pmoli na  $2 \times 10^8$  komórek po 0,5 h oraz 200 pmoli na  $2 \times 10^8$  komórek po 4 h hodowli w obecności 4 mM D,L-Hcy (**Tabela 3**). Podobnie, w komórkach *E. coli* AM228 ( $\Delta lon$ ) i PhB1907 ( $\Delta clpXP$ ) hodowanych w obecności Hcy przez 0,5-4 h zaobserwowano gromadzenie odpowiednio 106-315 pmoli Hcy N-związanej z białkiem na  $2 \times 10^8$  komórek oraz 238-209 pmoli Hcy N-związanej z białkiem na  $2 \times 10^8$  komórek. Po 24 h hodowli z Hcy, zauważono dalszy wzrost kumulacji Hcy N-związanej z białkiem, ale tylko w przypadku szczepu AM 228 ( $\Delta lon$ ) był on statystycznie znaczący ( $p=0,01$ ).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że zarówno proteaza Lon, jak i Clp nie mają znaczącego udziału w metabolizmie N-Hcy-białek u *E. coli*, w warunkach krótkiej hodowli. Jednakże, na podstawie uzyskanych danych, że po 24 h hodowli komórek *E. coli* AM 228 ( $\Delta lon$ ) z Hcy następuje dalszy wzrost kumulacji Hcy N-związanej z białkiem,



można zasugerować, że proteaza Lon być może uczestniczy w metabolizmie N-Hcy-białek w warunkach długotrwałej fazy stacjonarnej wzrostu bakterii.

W przypadku, gdy egzogenna Hcy jest nieobecna w hodowli, tiolakton Hcy kumuluje się z szybkością 470 pmol/h na ml hodowli, osiągając poziom 1900 pmol/ml hodowli po 4 h. Natomiast, gdy bakterie są hodowane w obecności egzogennej Hcy, HTL kumuluje się z szybkością 44 300 pmol/h na ml hodowli, do stężenia 177 300 pmol/ml po 4h hodowli. Obliczono zatem, że N-związana Hcy stanowi 3% lub 0,14% ilości tiolaktonu Hcy, odpowiednio w przypadku braku lub w obecności egzogennej Hcy. Relatywnie mały (około 4-krotny) wzrost ilości N-związanej Hcy podczas 4h hodowli, w porównaniu ze znacznym, około 100-krotnym wzrostem stężenia HTL obserwowanym w hodowlach prowadzonych z dodatkiem Hcy, wskazuje, że inkorporacja Hcy do białek za pośrednictwem HTL prawdopodobnie nie ma znaczącego udziału w inhibicji szybkości wzrostu obserwowanej w obecności Hcy.

Czas inkubacji z 4 mM D,L-Hcy	Hcy N-związana z białkami w szczepach <i>E. coli</i> (pmol/2x10 <sup>8</sup> komórek)		
	MG1655 *	AM228 *	PhB1907 *
0 h	58 ±17 <sup>#</sup>	43±13 <sup>#</sup>	73±26
0.5 h	151	106	238
1 h	-	150	149
2 h	301±62 <sup>#</sup>	223±3 <sup>#</sup>	142±68
4 h	200	315±169	209±90
24 h	337±26 <sup>#, §</sup>	703±11 <sup>#, §</sup>	641±273

**Tabela 3. Poziomy Hcy N-związanej z białkami badane w szczepach MG1655, AM228 i PhB1907 *E.coli*.** \* średnie wartości ± SD pochodzą z 2 niezależnych eksperymentów. <sup>#</sup>Dla szczepów MG1655 i AM228 różnice pomiędzy hodowlami 0h i 2h lub 24 h są statystycznie znaczące (p=0.04 do 0.001). <sup>§</sup>Różnice pomiędzy 24h hodowlami szczepów MG1655 i AM228 są statystycznie znaczące (p=0.01).

#### 4.1.5 Koszt energetyczny syntezy tiolaktonu Hcy w hodowlach *E.coli* z dodatkiem Hcy

Szacuje się, że synteza białek pochłania 95% energii potrzebnej do biosyntezy makrocząsteczek w komórkach *E.coli*. Do przyłączenia pojedynczego aminokwasu do białka wykorzystywana jest jedna cząsteczka ATP oraz dwie cząsteczki GTP. Oszacowano ponadto, że około 2% całkowitej energii wymaganej do biosyntezy białek w *E.coli* jest zużywane na translacyjną lub potranslacyjną obróbkę białek (ang. *editing*) w warunkach zrównoważonego wzrostu [131].

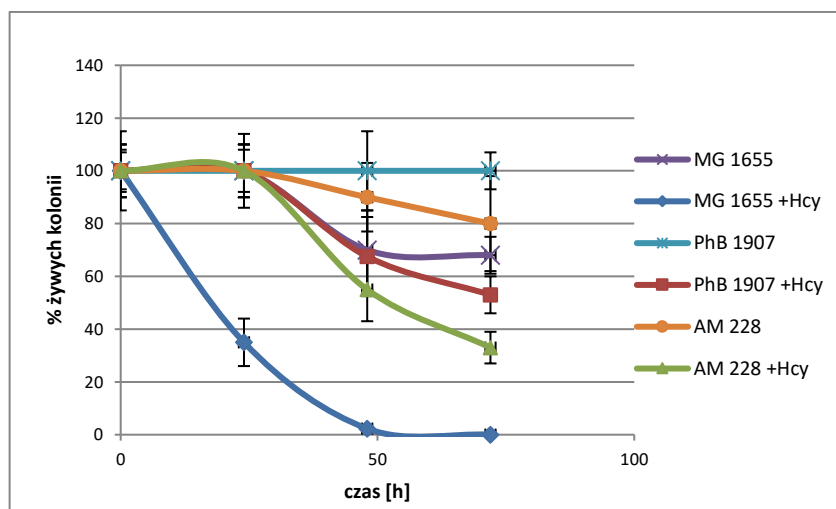
Produkcja bakteryjnego ATP jest obliczana na podstawie zużycia substratów i produkcji metabolitów, takich jak kwas mlekowy i octan. W analogiczny sposób można oszacować zużycie ATP dla metabolitu takiego jak tiolakton Hcy. Wykazano, że w bakteriach *E.coli* rosnących w medium minimalnym, jedna cząsteczka Hcy ulega „edycji” poprzez konwersję do tiolaktonu Hcy na 109 cząsteczek Met wprowadzanych do białka [132]. Biorąc pod uwagę, że aby doszło do utworzenia jednego mola HTL wymagana jest hydroliza jednego mola ATP, a aktywacja Met pochłania również jeden mol ATP na każdy mol tworzonych Met-tRNA, to bezproduktywna hydroliza ATP związana z obróbką Hcy jest relatywnie niska, równa ~1% zużycia ATP koniecznego do aktywacji Met podczas biosyntezy białka. Wykazano jednak, że kumulacja tiolaktonu Hcy w szczepach *E.coli*: MG1655, PhB1907, AM228 oraz AM229 wzrasta odpowiednio 180-, 45-, 130, oraz 150-krotnie (od 1.0; 5.0; 2.4 i 1.4  $\mu\text{M}$  przy braku Hcy do 180, 220, 300 i 210  $\mu\text{M}$  w obecności 4 mM egzogennej Hcy) (**Rys. 11**). Oznacza to, że w obecności egzogennej Hcy na każdy mol ATP zużywanego na aktywację Met, przeciętnie jeden mol ATP zużywany jest do syntezy tiolaktonu Hcy. W związku z tym, w przebadanych szczepach bakteryjnych, podczas suplementacji medium hodowlanego Hcy - bezproduktywne roztrwanie energii w postaci ATP wynosić może do 100% produktywnej konsumpcji ATP. Jako, że metionina stanowi 2,9% całkowitego składu aminokwasowego w białkach bakteryjnych, można oszacować, że straty energii ATP na obróbkę Hcy, w stosunku do całkowitej energii wymaganej do syntezy białka w komórkach *E.coli*, wzrastają z 0,029% w medium minimalnym do 2,9% w hodowlach z dodatkiem Hcy. Taki poziom dodatkowej konsumpcji ATP na obróbkę Hcy byłby trudny do zmierzenia eksperymentalnego. Jednak, mając na uwadze, że produkcja ATP jest powiązana z szybkością wzrostu komórek, wzrost ilości trwonionej energii może się przyczyniać do inhibicji ich wzrostu, co zaobserwowano w hodowlach *E.coli* z dodatkiem Hcy.

Tę konkluzję potwierdzają uzyskane dane, a mianowicie, że na skutek inhibicji gromadzenia tiolaktonu Hcy w hodowlach *E.coli* z dodatkiem Hcy, następuje przyspieszenie wzrostu komórek (**Rys.13**). Ponadto, szybkość wzrostu jest odwrotnie proporcjonalna do poziomu kumulacji tiolaktonu Hcy (**Rys.14**).

#### 4.1.6 Wpływ Hcy na żywotność komórek bakteryjnych.

W celu sprawdzenia jaki wpływ Hcy wywiera na żywotność komórek bakteryjnych szczepów: MG1655, AM228 ( $\Delta lon$ ) oraz PhB1907 ( $\Delta clp$ ), komórki hodowano w medium minimalnym, w 37°C z dodatkiem 4mM D,L-Hcy. Po czasie 0, 24, 48 oraz 72 godzin, hodowle bakteryjne wysiewano na płytki z pożywką stałą LB, z dodatkiem ampicyliny (bakterie te zawierają plazmidy z genem kodującym oporność na ampicylinę).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano, że egzogenna Hcy obecna w medium hodowlanym wpływa na zmniejszenie żywotności komórek wszystkich przebadanych szczepów *E.coli* proporcjonalnie do czasu hodowli (**Rys. 15**).



**Rysunek 15.** Hcy wpływa na przeżywalność bakterii *E.coli*. Procent żywych komórek przedstawiono jako funkcję czasu. Każdy punkt jest obliczony jako średnia pomiarów z trzech niezależnych doświadczeń.

Stwierdzono ponadto, że poszczególne szczepy bakteryjne wykazują zróżnicowaną wrażliwość na obecną w pożywce hodowlanej Hcy. Szczep MG1655 jest bardziej wrażliwy na Hcy niż szczep z brakiem proteazy Lon (AM228) oraz proteazy ClpXP (PhB1907). Zaobserwowano także, że dodatek Ile, Met lub Leu (1,6 mM) do hodowli z

homocysteiną nie wpływa na spadek żywotności komórek. Na tej podstawie można wnioskować, że kumulacja HTL (**Rys.13**) czy też głód izoleucynowy, nie prowadzą do śmierci komórek w zastosowanych do badań warunkach eksperymentalnych. Co więcej, za obniżenie żywotności *E.coli* nie jest też zapewne odpowiedzialny zaobserwowany niewielki wzrost poziomu N-Hcy-białek (**Tabela 3**).

#### 4.1.7 Wpływ Hcy na wrażliwość komórek *E.coli* na szok cieplny

Bakterie *E.coli* (szczepy MG1655, AM228 i PhB1907) hodowano w medium minimalnym, w obecności 4mM D,L-Hcy, do gęstości optycznej 50 Klettów (co odpowiada około 0,3 OD). Po osiągnięciu tej gęstości, bakterie przenoszono na 40 minut do 50°C aby wywołać szok cieplny. W przypadku hodowli kontrolnej szczepu MG1655 (bez Hcy) zaobserwowano 80% utratę żywotności komórek, podobną wartość spadku żywotności bakterii uzyskano dla hodowli z dodatkiem Hcy. W przypadku szczepu z brakiem proteazy Lon AM228, zaobserwowano, niezależnie od obecności Hcy, 90% spadek żywotności komórek. Szczep PhB1907 ( $\Delta clp$ ) stracił 30% żywotności zarówno w przypadku obecności, jak i braku Hcy.

Analizy SDS-PAGE profili białek przed oraz po szoku cieplnym (15 min, 50°C), w obecności oraz braku 4mM D,L-Hcy wykazały, że ekspozycja na Hcy nie wpływa na indukcję ekspresji białek szoku cieplnego w żadnym z przebadanych szczepów. Wyniki tych badań wskazują, że gromadzenie tiolaktonu Hcy w komórkach bakteryjnych nie wpływa na odpowiedź *heat shock* u *E.coli*.

#### 4.2 Hydrolaza bleomycyny jako enzym o aktywności hydrolizującej tiolakton Hcy

Jak wykazano, tiolakton Hcy jest bardziej szkodliwy dla komórek ludzkich niż Hcy, głównie ze względu na jego wysoką reaktywność w stosunku do białek i tworzenie wiązania amidowego z grupą  $\epsilon$ -aminową reszt lizyny w białku [77]. W wyniku tego procesu powstają białka o zmienionych właściwościach, co stwarza konieczność usuwania N-homocysteinylowanych białek na drodze degradacji proteolitycznej, podczas której zużywana jest energia komórkowa i następuje ograniczenie wzrostu komórek. Jak wcześniej szczegółowo opisano w rozdziale pt. Wstęp, N-homocysteinylowane białka są toksyczne i indukują odpowiedź immunologiczną. W celu zminimalizowania toksycznego wpływu tiolaktonu Hcy, organizmy zostały zmuszone do wytworzenia mechanizmów

umożliwiających pozbycie się tego szkodliwego metabolitu. We wszystkich organizmach, większość tiolaktonu Hcy jest eliminowana poprzez wydzielanie z komórek do medium zewnątrzkomórkowego. U myszy i ludzi, HTL jest usuwany z układu krążenia w nerkach, poprzez wydalanie z moczem [99]. Inną drogą jest enzymatyczna hydroliza HTL katalizowana przez zewnątrzkomórkowy enzym tiolaktonazę/paraoksonazę PON1. Do niedawna nie było wiadomo, czy wewnątrz komórek występuje enzym posiadający aktywność detoksykującą HTL. W roku 2006 Zimny i wsp. wykazali, że hydrolaza bleomycyny wyizolowana z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, posiada aktywność tiolaktonazy Hcy [133]. Zasugerowano zatem, że tiolakton Hcy jest jednym z naturalnych substratów BLH (wcześniej nie znano żadnego naturalnego substratu BLH).

Przeprowadzone podczas wykonywania niniejszej pracy badania dostarczyły dowodu na istnienie enzymu o aktywności tiolaktonazowej także w ludzkim łożysku. Natomiast badania na linii ludzkich komórek HeLa, w których BLH normalnie ulega ekspresji na stosunkowo wysokim poziomie, pozwoliły na zweryfikowanie hipotezy, że BLH chroni komórki ludzkie przed toksycznością Hcy, jak to ma miejsce w przypadku komórek drożdży [124]. Poza wyjaśnieniem podstawowych aspektów metabolizmu Hcy i jej roli w fizjologii komórkowej, ważnym elementem badań nad hydrolazą bleomycyny/tiolaktonazą jest również zgłębienie mechanizmów leżących u podstaw toksyczności Hcy prowadzącej do chorób układu krążenia. Przedstawione poniżej wyniki badań zostały częściowo opublikowane w pracy „Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase” Zimny J, Sikora M, Guranowski A, Jakubowski H, *J Biol Chem*, 2006r [124].

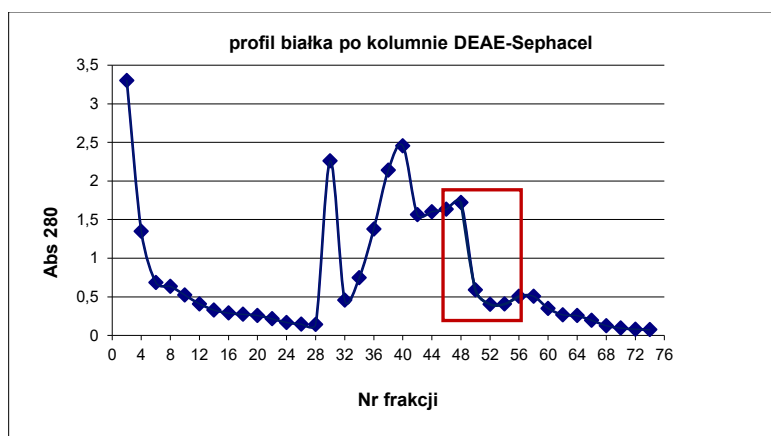
#### **4.2.1 Izolacja i identyfikacja enzymu o aktywności tiolaktonazy Hcy z łożyska ludzkiego**

Ze względu na stosunkowo łatwą dostępność, jako materiał badawczy będący źródłem aktywności hydrolizującej tiolakton Hcy wybrano ludzkie łożysko. Poszczególne etapy izolacji i oczyszczania enzymu opisano szczegółowo w rozdziale 3.9. W skrócie, łożysko poddano homogenizacji, uzyskany ekstrakt wysalano siarczanem amonu, a następnie poddano dializie wobec 20 mM buforu fosforanowego pH 6,8. Ekstrakt po dializie poddano rozdzielaniu na kolumnie jonowymiennej, pozwalającej na rozdział białek na podstawie różnicy w ich ładunku elektrycznym. Kolejnym etapem było frakcjonowanie białek pod względem ich masy cząsteczkowej – sączenie molekularne. Następnie uzyskane

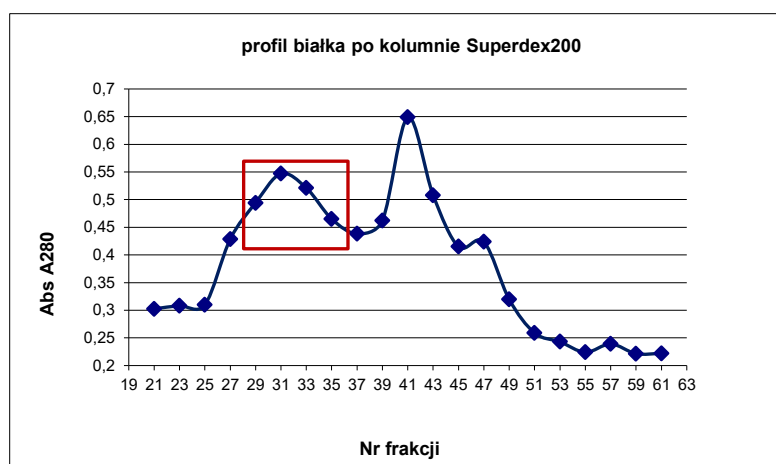
frakcje poddano rozdzielni na kolumnie hydroksyapatytowej, polegającym na specyficznym tworzeniu kompleksów grup karboksylowych białek z jonami wapnia na kryształach hydroksyapatytowych oraz niespecyficznym przyciąganiu dodatnio naładowanych grup aminowych białek i ujemnie naładowanym złożem.

**Rys. 16** przedstawia profile elucji białek w poszczególnych etapach izolacji enzymu, z zaznaczeniem frakcji wykazujących aktywność hydrolizującą tiolakton Hcy.

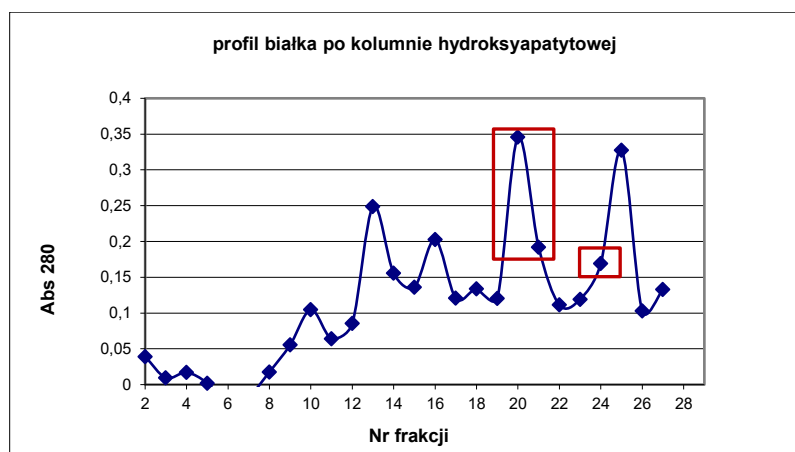
**A.**



**B.**

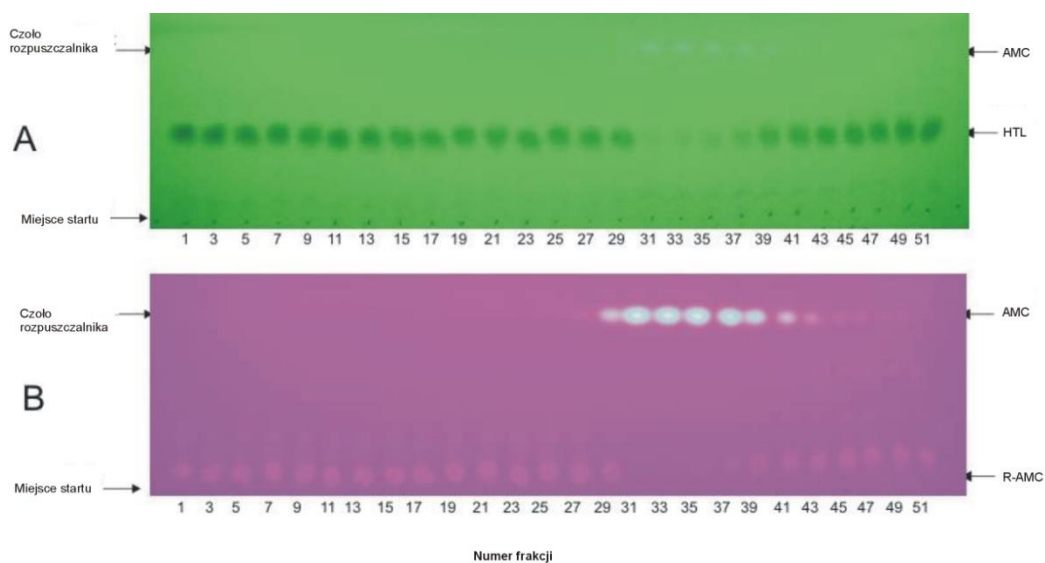


C.



**Rysunek 16. Profile elucji białek w poszczególnych etapach izolacji enzymu.** W ramce zaznaczono frakcje, w których wykryto aktywność hydrolizującą tiolakton Hcy. Po każdym rozdziale chromatograficznym we wszystkich frakcjach mierzono absorpcję przy długości fali 280nm. **A.** Profil białkowy po rozdziale na kolumnie DEAE Sephacel, **B.** Profil białkowy po rozdziale na kolumnie Superdex 200, **C.** Profil białkowy po rozdziale na kolumnie hydroksyapatytowej.

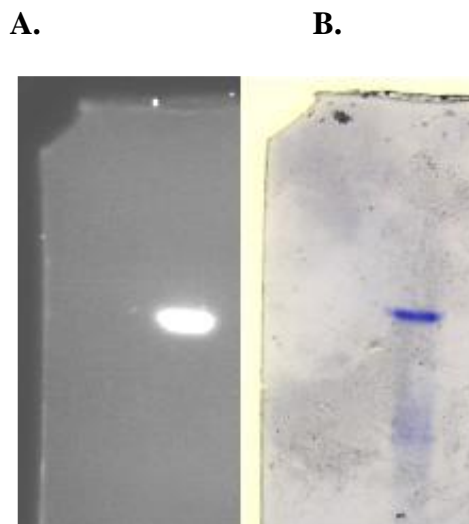
Ekstrakty białkowe uzyskane podczas wszystkich etapów izolacji tiolaktonazy Hcy z łożyska ludzkiego, a także poszczególne frakcje uzyskane po rozdzielach chromatograficznych poddawano inkubacji z tiolaktonem Hcy oraz sztucznym substratem arginino-aminometylokumarylamidem (R-AMC). Aktywności tiolaktonazową oraz aminopeptydazową monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (odpowiednio **Rys. 17 A i B**).



**Rysunek 17. Monitorowanie aktywności HTL-azowej oraz aminopeptydazowej na płytkach TLC po rozdiale na kolumnie Superdex200. A.** tiolakton Hcy wizualizowano przy długości fali 254 nm; widoczna jest zmiana intensywności plam pochodzących od HTL we frakcjach, które zawierają aktywność tiolaktonazową, **B.** aktywność aminopeptydazową enzymu monitorowano poprzez wizualizację produktu hydrolizy – AMC, przy długości fali 340 nm. Przy tej długości fali, fluorescencyjny produkt hydrolizy, AMC, jest widoczny na wysokości czoła rozpuszczalnika.

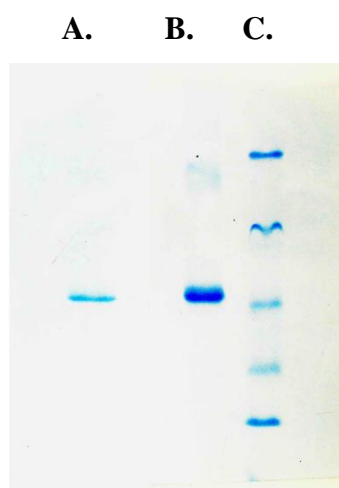
Częściowo oczyszczony enzym, po rozdiale na kolumnie hydroksyapatytowej, poddawano elektroforezie w warunkach niedenaturujących. Aktywność tiolaktonazową/aminopeptydazową monitorowano *in situ* w żelu, poprzez inkubację fragmentu żelu w roztworze zawierającym 100 mM bufor fosforanowy, 1mM DTT oraz 0.1 mM R-AMC. Po 10-15 minutach inkubacji, powstaje AMC - silnie fluorescencyjny produkt hydrolizy R-AMC. Następnie, ten sam fragment żelu wybarwiano w roztworze Coomassie Brilliant Blue R-250, aby uwidocznić białko (**Rys.18**).





**Rysunek 18.** Detekcja aktywności hydrolizującej R-AMC, po elektroforezie w 8% żelu poliakryloamidowym, w warunkach natywnych. Barwienie *in situ* w roztworze zawierającym R-AMC (A), oraz ten sam fragment żelu poddany barwieniu Coomassie Brilliant Blue R-250 (B).

Fragment żelu natywnego, w którym znajduje się aktywność tiolaktonazowa, wycinano i poddawano elucji w 20 mM buforze fosforanowym w celu doczyszczenia białka. Eluaty enzymu rozdzielano elektroforetycznie w warunkach denaturujących, w 12% żelu denaturującym SDS-PAGE (**Rys.19**).



**Rysunek 19.** Obraz elektroforetyczny tiolaktonazy z łożyska ludzkiego po oczyszczeniu. Elektroforezę wykonano w 12% żelu denaturującym. Ścieżka A – ludzka hydrolaza bleomycyny otrzymana z łożyska ludzkiego, B - rekombinowana ludzka hydrolaza bleomycyny, C- marker wielkości białek.

Tak oczyszczony enzym wycinano z żelu, poddawano trawieniu trypsyną, a powstałe peptydy przeanalizowano za pomocą spektrometrii mas MALDI-ToF w celu identyfikacji białka. Przy pomocy programu Mascot Server 1.9 (Bruker Daltonics) oraz bazy danych NCBI białko to zidentyfikowano jako ludzką hydrolazę bleomycyny.

#### 4.2.2 Specyficzność substratowa ludzkiej tiolaktonazy/hydrolazy bleomycyny

W kolejnym etapie wykonano doświadczenia mające na celu sprawdzenie specyficzności substratowej wyizolowanej hydrolazy bleomycyny. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że enzym wykazuje wysoką specyficzność w stosunku do L-stereoizomeru tiolaktonu Hcy, natomiast nie hydrolizuje izomeru D. Lakton L-homoseryny,  $\gamma$ -tiobutyrolakton oraz N-acetyl-DL-Hcy-tiolakton również nie są substratami dla tiolaktonazy/hydrolazy bleomycyny, co wskazuje, że do zajścia hydrolizy L-Hcy-tiolaktonu niezbędna jest obecność grupy  $\alpha$ -aminowej w substracie. Stwierdzono ponadto, że substratami dla ludzkiej hydrolazy bleomycyny są także estry metylowe L-Lys, L-Cys oraz L-Met, w przeciwieństwie do estrów metylowych  $\alpha$ -L-Ala,  $\beta$ -L-Ala, L-Lys, L-Trp (Tabela 4).

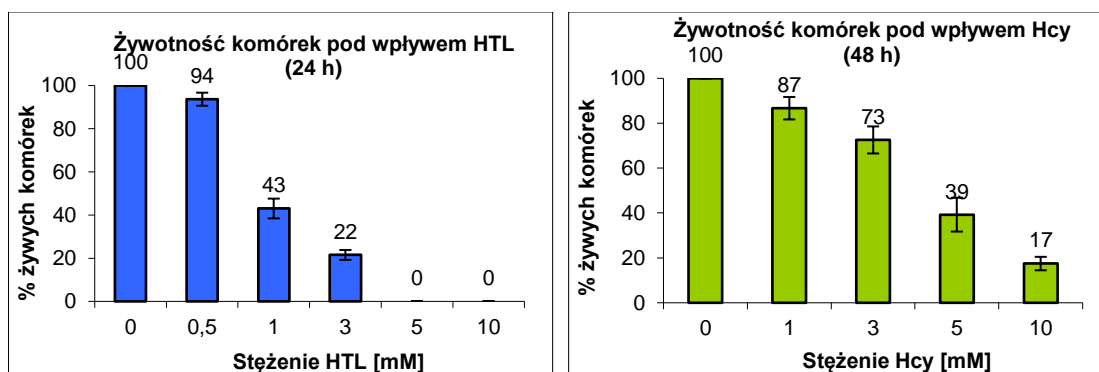
Substrat	Ludzka tiolaktonaza Hcy/hydrolaza bleomycyny
L-Hcy-tiolakton	++++
N-Acetyl-DL-HTL	-
Hse-lakton	-
ester metylowy $\alpha$ -Ala	-
ester metylowy $\beta$ -Ala	-
ester metylowy L-Lys	+
ester metylowy L-Cys	++
ester metylowy L-Met	++
ester metylowy D-Met	+
ester metylowy L-Tryp	-
Arginino 4-metylo-7-kumarylamid	++++

**Tabela 4.** Specyficzność substratowa ludzkiej hydrolazy bleomycyny/tiolaktonazy. Symbole "+" i "-" wskazują odpowiednio, że dany związek był substratem dla enzymu lub też był odporny na hydrolizę.

### 4.2.3 Rola BLH w metabolizmie Hcy w komórkach ludzkich

Ze względu na nowo odkrytą funkcję enzymu hydrolazy bleomycyny istotne było wyjaśnienie jej roli w fizjologii komórkowej, nie tylko ze względu na poznanie podstawowych mechanizmów metabolizmu Hcy, ale także ze względu na zaangażowanie tiolaktonu Hcy oraz Hcy w powstawanie chorób układu krążenia. Do badań wybrano linię ludzkich komórek raka szyjki macicy (HeLa), w których hydrolaza bleomycyny ulega ekspresji na wysokim poziomie.

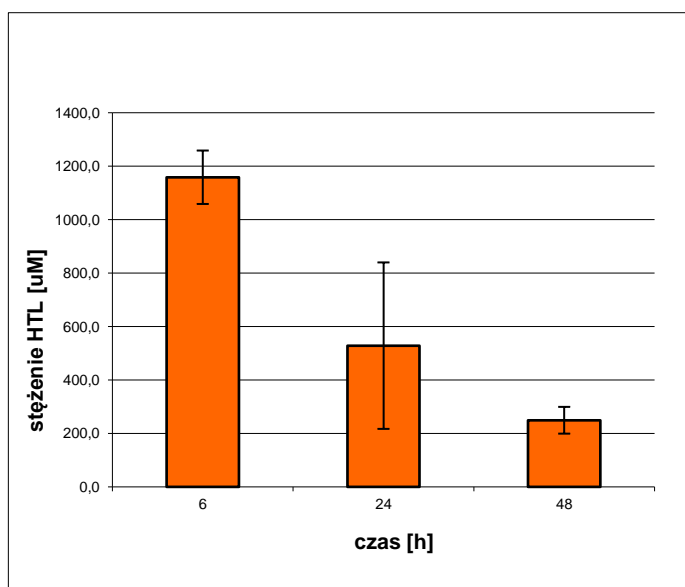
Na wstępie przeprowadzono testy żywotności komórek HeLa pod wpływem hodowli z dodatkiem homocysteiny oraz tiolaktonu Hcy, oparte na pomiarze aktywności metabolicznej komórek, z użyciem barwnika rezazuryny. Komórki HeLa inkubowano w medium hodowlanym pozbawionym antybiotyków z 0, 1, 3, 5 oraz 10 mM Hcy oraz równoległe z 0, 0.5, 1, 3, 5, 10 mM HTL. Po 24h oraz 48h inkubacji pobierano medium do pomiarów spektrofotometrycznych, mierząc ilość zredukowanej pochodnej metabolicznej rezazuryny – reزارufiny przy długości fali 570 nm. Rezarufina powstaje tylko w komórkach aktywnych metabolicznie. Jak się okazało, po 24h hodowli z Hcy, wszystkie komórki były nadal aktywne, nawet w medium zawierającym 10 mM Hcy. W związku z tym, zarejestrowanie potencjalnych różnic w ilości żywych komórek pomiędzy poszczególnymi próbami nie było możliwe. Natomiast przeprowadzone równoległe analogiczne pomiary aktywności metabolicznej komórek inkubowanych z HTL wykazały, że 24h inkubacja z 3mM HTL powoduje 80% spadek żywotności komórek HeLa, w porównaniu z komórkami hodowanymi bez HTL, a 5mM stężenie HTL powoduje całkowitą śmierć komórek HeLa (**Rys.20**).



**Rysunek 20.** Tiolakton Hcy jest znacznie bardziej toksyczny dla komórek HeLa niż Hcy. 24h inkubacja komórek z 5mM HTL powoduje śmierć wszystkich komórek (100% spadek żywotności), natomiast 48h inkubacja z 5mM Hcy powoduje 60 % spadek żywotności komórek.

Różnice w żywotności komórek pod wpływem Hcy zmierzono także po 48 h inkubacji i stwierdzono, że inkubacja komórek HeLa z 10 mM Hcy spowodowała spadek żywotności komórek o ponad 80%. Warty podkreślenia jest fakt, że HTL już w stężeniu 3 mM po 24h inkubacji powoduje podobny efekt (80% obniżenie żywotności komórek), co potwierdza wcześniejsze obserwacje, że dla komórek to właśnie HTL jest znacznie bardziej toksyczny niż Hcy.

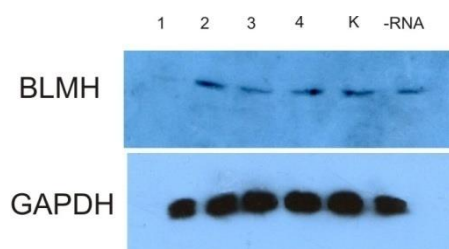
W celu sprawdzenia jaki jest stopień konwersji egzogennej Hcy do tiolaktonu Hcy w ludzkich komórkach HeLa, inkubowano je z dodatkiem 20 mM Hcy, w medium bez antybiotyków. Po 6, 24 oraz 48 h inkubacji pobierano próbkę medium hodowlanego, w którym oznaczano następnie ilość HTL za pomocą HPLC. Stwierdzono, że ok. 5% Hcy ulega konwersji do HTL już po 6 h inkubacji z Hcy. Ponadto zaobserwowano, że ilość HTL po 24 h inkubacji jest ok. połowę mniejsza w stosunku do ilości HTL po 6h. Wynika z tego, że HTL ulega dość szybko przemianom w komórkach - jest najprawdopodobniej hydrolizowany do Hcy, a także przyłącza się do grupy  $\epsilon$ -aminowej reszt lizyny białek. Po 48h ilość HTL ulega zmniejszeniu o połowę w stosunku do ilości po 24h inkubacji komórek z 20mM Hcy (**Rys.21**).



Rysunek 21. Synteza HTL w komórkach HeLa inkubowanych z 20 mM Hcy.

Aby zweryfikować hipotezę, że BLH chroni komórki przed toksycznością Hcy, wykorzystano metodę opartą na interferencji RNA. Linię komórek HeLa transfekowano plazmidami zawierającymi shRNA specyficzne wobec genu hydrolazy bleomycyny. Do

transfekcji użyto 4 różnych, komercyjnie zakupionych wariantów shRNA, z założeniem, że co najmniej jeden z nich będzie powodował efektywne wyciszenie ekspresji genu BLH. Przeprowadzono również transfekcje kontrolnym RNA, niespecyficznym wobec żadnego z genów obecnych w ludzkich komórkach. W celu sprawdzenia, który z wariantów shRNA najefektywniej obniża ekspresję genu BLH, zastosowano metodę Western Blot, z użyciem przeciwciała monoklonalnego specyficznego wobec hydrolazy bleomycyny. Dodatkowo sprawdzono poziom ekspresji BLH w komórkach nietransfektowanych żadnym plazmidem. Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, poziom ekspresji BLH najefektywniej obniża transfekcja wariantem shRNA nr 1. Jako pozytywną kontrolę, w celu weryfikacji dokładności zastosowanej metody, wykonano Western Blot z zastosowaniem przeciwciała specyficznego wobec dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej (GAPDH) (**Rys.22**).

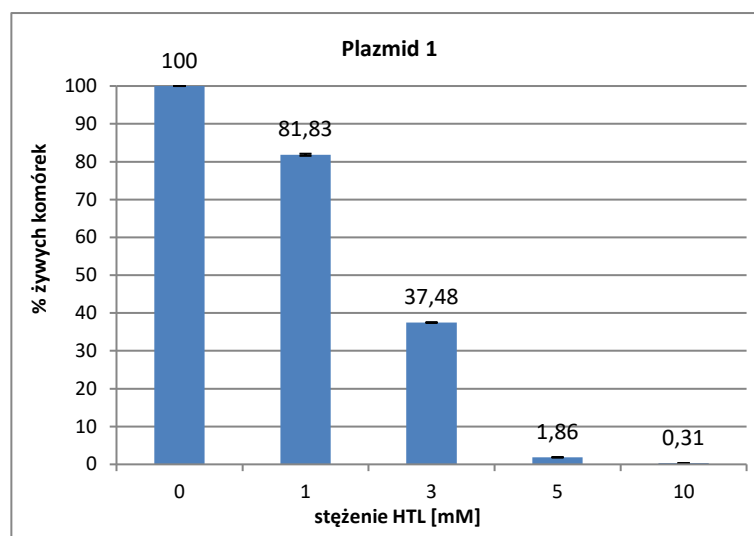


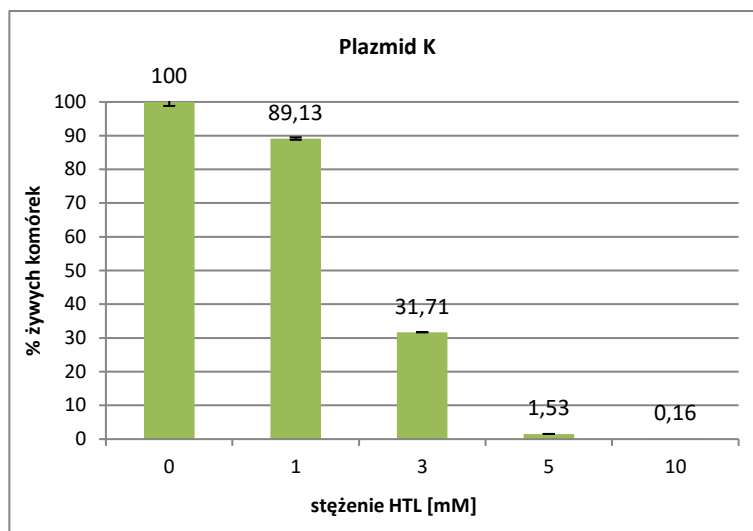
**Rysunek 22. Poziom ekspresji BLH oraz GAPDH po zastosowaniu metody Western Blot.** **A.** Obraz przedstawia poziom ekspresji BLH po transfekcji komórek HeLa plazmidami zawierającymi shRNA specyficzne wobec genu BLH (linie 1-4) oraz plazmidem zawierającym shRNA niespecyficzne wobec żadnego z genów występujących w komórkach ludzkich (linia K); linia -RNA oznacza poziom ekspresji BLH w komórkach nietransferowanych żadnym plazmidem **B.** poziom ekspresji GAPDH we wszystkich w/w klonach HeLa.

Dzięki obecności w plazmidzie genu oporności na neomycynę, umożliwiającym selekcję komórek z wprowadzonym wektorem, wyprowadzono linie komórkowe ze stabilnie wyciszonym genem BLH.

Wpływ poziomu ekspresji hydrolazy bleomycyny na żywotność komórek inkubowanych z tiolaktonem Hcy sprawdzono wykonując testy żywotności komórek stransfektowanych shRNA specyficznymi wobec BLH. Komórki HeLa, stransfektowane plazmidem zawierającymi shRNA nr 1, jako wariantem o największej skuteczności w

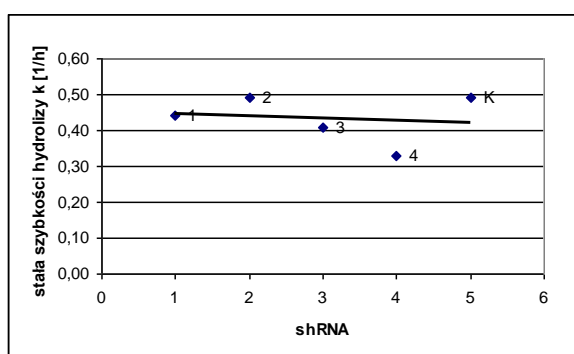
obniżaniu ekspresji BLH, oraz plazmidem zawierającym shRNA kontrolne, inkubowano przez 24 h bez HTL (kontrola) lub z następującymi stężeniami HTL: 1, 3, 5, 10 mM HTL, w medium komórkowym pozbawionym antybiotyków. Po tym czasie zmierzono na luminometrze ilość ATP w komórkach, która jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Jak się okazało, poziom żywotności komórek HeLa z wyciszonym genem BLH nie różnił się znacząco od żywotności komórek kontrolnych (**Rys.23**). Inkubacja z 1 mM HTL spowodowała spadek żywotności komórek do 81,8 oraz 89,1% odpowiednio dla plazmidu 1 (zawierającego shRNA nr 1) i plazmidu K (zawierającego shRNA kontrolne). Dla stężenia 3mM HTL procent żywych komórek wynosił 37,5 i 31,7 % odpowiednio dla plazmidu 1 i plazmidu K. Przy stężeniu 5mM zaobserwowano obniżenie żywotności komórek do niecałych 2 i 1,5 %, a inkubacja z 10 mM HTL spowodowała spadek żywotności komórek do 0,31 i 0,16% odpowiednio dla plazmidu 1 i plazmidu K.





**Rysunek 23. Przeżywalność komórek HeLa o zróżnicowanej ekspresji genu hydrolazy bleomycyny pod wpływem tiolaktonu Hcy.** Obniżenie ekspresji genu hydrolazy bleomycyny nie wpływa na przeżywalność komórek HeLa pod wpływem tiolaktonu Hcy. Procent żywych komórek przy danym stężeniu HTL, po 24h inkubacji, mierzono w odniesieniu do komórek hodowanych bez dodatku HTL.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie wpływu obniżenia ekspresji genu hydrolazy bleomycyny na szybkość hydrolizy tiolaktonu Hcy w komórkach HeLa (Rys.24). W tym celu prowadzono hodowlę komórek HeLa ze 100  $\mu\text{M}$  HTL, w medium pozbawionym antybiotyków. Po określonym czasie pobierano niewielką ilość medium, w którym oznaczano ilość HTL za pomocą HPLC.



**Rysunek 24. Szybkość hydrolizy tiolaktonu Hcy w komórkach HeLa ze zróżnicowanym poziomem ekspresji hydrolazy bleomycyny.** Szybkość hydrolizy tiolaktonu Hcy w komórkach HeLa zachodzi niezależnie od poziomu ekspresji hydrolazy bleomycyny. Stałe szybkości hydrolizy „k” dla poszczególnych plazmidów obliczono jako  $k = \ln 2/t$  [1/h], gdzie t oznacza czas hodowli komórek z Hcy. Poszczególne

wartości „k” zostały pomniejszone o wartość stałej szybkości hydrolizy HTL w samym medium komórkowym, bez komórek, która wynosi 0,13.

Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, hydroliza HTL w komórkach HeLa zachodzi z porównywalną szybkością we wszystkich badanych liniach, niezależnie od stopnia ekspresji hydrolazy bleomycyny. Stałe szybkości hydrolizy HTL różnią się nieznacznie dla poszczególnych linii z shRNA 1-4, w porównaniu do linii zawierającej plazmid z kontrolnym shRNA. Nie zaobserwowano spodziewanej różnicy w szybkości hydrolizowanego HTL pomiędzy linią z plazmidem zawierającym shRNA nr 1, a linią z shRNA kontrolnym.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zidentyfikowano nową aktywność ludzkiego enzymu hydrolazy bleomycyny, której naturalna rola w komórce do tej pory nie była znana. Wykazano, że enzym ten, występujący wewnątrz komórek, posiada zdolność hydrolizy tiolaktonu Hcy. BLH charakteryzuje się dużą konserwatywnością ewolucyjną i występuje powszechnie w królestwie zwierząt, co wskazuje na jej konserwatywne funkcje. Zarówno ludzka jak i drożdżowa BLH, posiadają prawie identyczną strukturę molekularną i należą do rodziny proteaz cysteinowych, posiadających aktywność aminopeptydazową. Jedyną do niedawna poznaną biologicznie znaczącą funkcją tego enzymu była deamidacja bleomycyny - leku przeciwnowotworowego [123]. BLH pochodząca z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (yBLH), w przeciwieństwie do ludzkiej BLH (hBLH), jest białkiem wiążącym DNA, działającym jako negatywny regulator ekspresji genu *GAL* (kodującego galaktokinazę). W pracy opublikowanej w 2006 r. przez Zimnego i wsp. wykazano, że tiolakton Hcy jest naturalnym substratem drożdżowej BLH i że oprócz funkcji regulatora ekspresji genu *GAL*, kontroluje poziom HTL u drożdży [124]. Jak wykazano, hydroliza HTL zachodzi w miejscu aktywności aminopeptydazowej BLH. Wewnątrzkomórkowa tiolaktonaza nie została wcześniej (tzn. przed pracą Zimnego i wsp.) opisana ani u ludzi ani u drożdży. Tiolaktonazy ludzka (hBLH) i drożdżowa (yBLH) różnią się od dwóch innych znanych wcześniej tiolaktonaz: ludzkiej tiolaktonazy osocza PON1 oraz roślinnej tiolaktonazy [125]. Zewnątrzkomórkowa tiolaktonaza PON1 posiada szeroką specyficzność (tio)laktonazową, a roślinna tiolaktonaza charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową hydrolazy  $\alpha$ -aminoacylo-(tio)estrowej. Natomiast specyficzność substratowa ludzkiej i drożdżowej BLH jest ograniczona do L- $\alpha$ -aminoacylo tioestrów, estrów aminokwasów siarkowych oraz amidów aminokwasów. Oczyszczone



ludzka i drożdżowa hydrolaza bleomycyny posiadają w stosunku do HTL aktywność katalityczną rzędu  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , jest ona  $\sim 100$  razy większa niż wydajność katalityczna ludzkiej tiolaktonazy osocza.

U ludzi hBLH ulega zróżnicowanej ekspresji w zależności od typu tkanki. Przykładowo, mRNA BLH ulega ekspresji na poziomie niskim do umiarkowanego w większości przetestowanych ludzkich organów. Niski poziom ekspresji jest obserwowany w wątrobie, nerkach, jelicie grubym, leukocytach krwi obwodowej [126]. Dużą ilość mRNA BLH zaobserwowano w jądrach, trzustce, mięśniach szkieletowych. Ponadto, jak wykazano w niniejszej pracy, aktywna forma BLH ulega także ekspresji w ludzkim łożysku. Ludzka BLH ulega także ekspresji w sposób zależny od typu komórek. Na przykład, wysoki poziom ekspresji mRNA BLH występuje w ludzkich liniach komórek nowotworowych, jak HeLa, HL-60 lub ludzkich komórkach raka piersi.

U drożdży, hydrolaza bleomycyny (yBLH) jest głównym enzymem o aktywności tiolaktonazowej, stanowiącym 70% aktywności hydrolizującej tiolakton Hcy. Na podstawie wyników eksperymentów przeprowadzonych z użyciem różnych szczepów drożdżowych zawierających mutacje w genie syntazy metioninowej oraz *BLH*, wykazano, że poziom HTL koreluje negatywnie z poziomem aktywności tiolaktonazowej [124]. Wynika z tego, że yBLH kontroluje poziom HTL, tworzonoego zarówno z endo-, jak i egzogennej Hcy. Ponadto, szczep niosący mutację w genie *BLH* jest bardziej wrażliwy na obecność egzogennej Hcy w medium hodowlanym niż szczep dziki. Zaobserwowano znacznie zmniejszoną żywotność (13%) komórek drożdży z mutacją w *BLH* podczas 60h hodowli z 10 mM Hcy, w porównaniu ze szczepem dzikim posiadającym aktywną BLH. Na podstawie powyższych danych, można stwierdzić, że yBLH przyczynia się do powstania oporności na toksyczność Hcy u drożdży, najprawdopodobniej dzięki zdolności hydrolizy HTL [124].

Natomiast, jak wykazano w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy, ludzka hydrolaza bleomycyny nie ma istotnego udziału w hydrolizie tiolaktonu Hcy w komórkach HeLa. Stwierdzono, że szybkość hydrolizy HTL nie różni się istotnie pomiędzy liniami komórkowymi, w których ekspresja BLH została obniżona za pomocą wektorów niosących shRNA a liniami kontrolnymi. Ponadto, obniżenie ekspresji BLH nie wpływa na żywotność komórek HeLa, a toksyczny wpływ HTL na komórki jest podobny zarówno w komórkach z obniżoną ekspresją BLH, jak i w liniach kontrolnych (w obu przypadkach 5 mM HTL powoduje całkowitą śmierć komórek).

Uzyskane wyniki eksperymentalne świadczą o tym, że pomimo iż hydrolaza bleomycyny jest wewnątrzkomórkowym enzymem posiadającym aktywność tiolaktonazową w komórkach HeLa to nie uczestniczy aktywnie w obronie tych komórek przed toksycznym wpływem HTL. Można się zatem spodziewać, że istnieją w komórkach także inne enzymy, które posiadają aktywność tiolaktonazową, a ich udział w detoksykacji HTL jest znacznie większy niż hydrolazy bleomycyny. Nie można też wykluczyć, że obserwowany efekt jest spowodowany specyficznym charakterem komórek nowotworowych, których dokładny metabolizm nie został w pełni poznany, a w innych typach ludzkich komórek – nienowotworowych, BLH może odgrywać większą rolę w ochronie przed toksycznym wpływem Hcy i HTL. Należałoby zatem w kolejnym etapie przebadać inne, nienowotworowe komórki pod kątem aktywności tiolaktonazowej BLH i określić jej udział w ochronie przed toksycznym wpływem HTL.

#### **4.3 Identyfikacja miejsc N-homocysteinylacji w białkach *in vitro* i *in vivo*.**

Modyfikacja białek tiolaktonem Hcy, polegająca na acylacji grup  $\epsilon$ -aminowych reszt lizyny, zachodzi we wszystkich przebadanych dotychczas organizmach, w tym u człowieka. Większość Hcy krążącej w ludzkiej krwi występuje w postaci N-związanej z hemoglobina i albumina. Hcy N-związana z białkami osocza stanowi 25% całkowitej Hcy osocza, a N-Hcy-albumina stanowi 90% N-Hcy-białek osocza. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, preferencyjnym miejscem N-homocysteinylacji *in vivo* oraz *in vitro* w albuminie jest Lys 525 [57]. Analiza mechanizmu N-homocysteinylacji, a w szczególności poszukiwanie preferencyjnych miejsc przyłączenia się Hcy w białkach człowieka, jest istotne ze względu na potencjalne możliwości wykorzystania wyników tych badań w diagnostyce.

##### **4.3.1 Analiza białek zmodyfikowanych HTL za pomocą spektrometrii mas – ocena stopnia modyfikacji białek *in vitro*.**

Metoda spektrometrii mas, a w szczególności technika wykorzystująca jonizację poprzez elektrorozpraszanie (ESI, ang. *electro-spray ionization*) w połączeniu z metodami chromatografii cieczowej umożliwia analizę białek zmodyfikowanych tiolaktonem Hcy i ocenę stopnia modyfikacji tych białek pod względem zawartości lizyn z przyłączoną resztą Hcy. Technika ta charakteryzuje się wysoką rozdzielczością oraz możliwością analizy

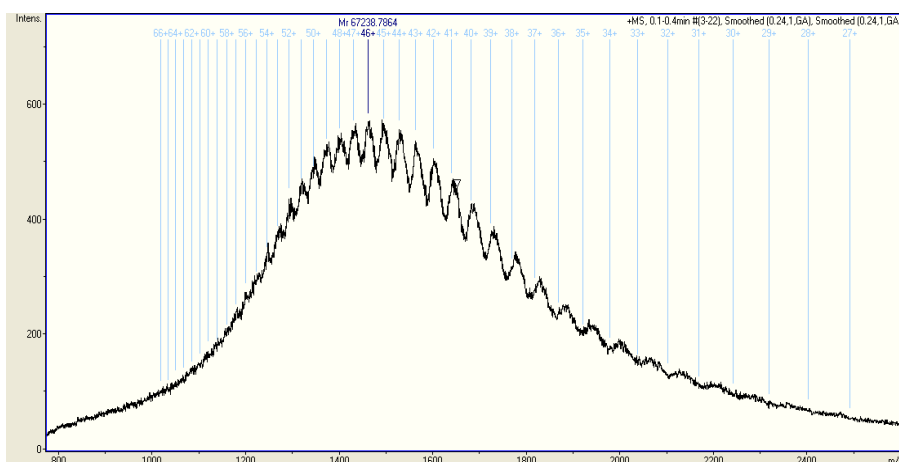
jonów wielokrotnie naładowanych, co pozwala na analizę nawet tak dużych białek jak albumina (~68 kDa). Inna technika spektrometrii mas – MALDI-ToF (ang. *matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight*) - jest z kolei bardziej użyteczna do określania masy cząsteczkowej niewielkich białek, do około 20 kDa. Widma większych białek cechuje bowiem niska rozdzielczość, co sprawia, że oznaczanie mas cząsteczkowych tą techniką jest przydatne jedynie w warunkach, gdy nie jest potrzebna wysoka precyzja w ich oznaczeniu.

Białkami modelowymi wybranymi do oceny stopnia modyfikacji tiolaktonem homocysteiny były albumina oraz hemoglobina ludzka. W celu oznaczenia stopnia N-homocysteinylacji tych białek, zmodyfikowano je 66-krotnym molarnym nadmiarem HTL (10mM), następnie poddano redukcji za pomocą DTT oraz alkilacji jodoacetamidem. W celu oddzielenia białka od pozostałych metabolitów, tak przygotowane próby poddawano ultrafiltracji na filtrach molekularnych o punkcie odcięcia 10 kDa, a następnie analizowano na spektrometrze mas typu ESI.

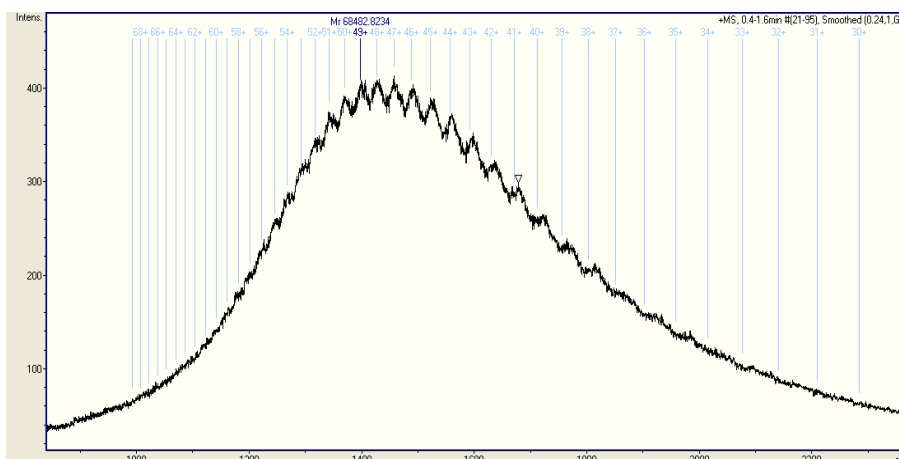
- Albumina ludzka

Białko to w formie natywnej występuje jako homodimer, a każdy z łańcuchów posiada 585 reszt aminokwasowych, z czego 49 stanowią reszty lizyny. Masa cząsteczkowa zakupionej komercyjnie natywnej ludzkiej albuminy (Sigma), wyznaczona na podstawie pomiarów ESI, wynosi 67 238 Da.

A.



## B.



**Rysunek 25. Widma masowe natywnej albuminy ludzkiej, przed modyfikacją (A) oraz zmodyfikowanej 66-krotnym nadmiarem molowym HTL (B).**

Na podstawie uzyskanych widm masowych N-Hcy-albuminy można stwierdzić, że modyfikacja albuminy zachodząca w obecności 66-krotnego nadmiaru molarnego HTL prowadzi do powstania mieszaniny cząsteczek o różnym stopniu modyfikacji, tzn. różniących się między sobą ilością przyłączonych reszt Hcy (**Rys. 25 B**). Średnia masa albuminy zmodyfikowanej HTL, wyznaczona za pomocą techniki ESI, wynosi 68 482 Da (**Rys. 25 A**). Zważywszy na fakt, że masa cząsteczkowa reszty Hcy wynosi 117 Da, a modyfikacja cząsteczką jodoacetamidu zwiększa masę Hcy o 57 Da, całkowita masa cząsteczkowa zalkilowanej reszty Hcy, przyłączonej wiązaniem amidowym do reszty lizyny, wynosi 174 Da. Na podstawie różnicy mas między albuminą natywną a średnią masą albuminy zmodyfikowanej tiolaktonem Hcy można obliczyć, że średnia ilość cząsteczek Hcy przyłączonych do cząsteczki albuminy wynosi 7.

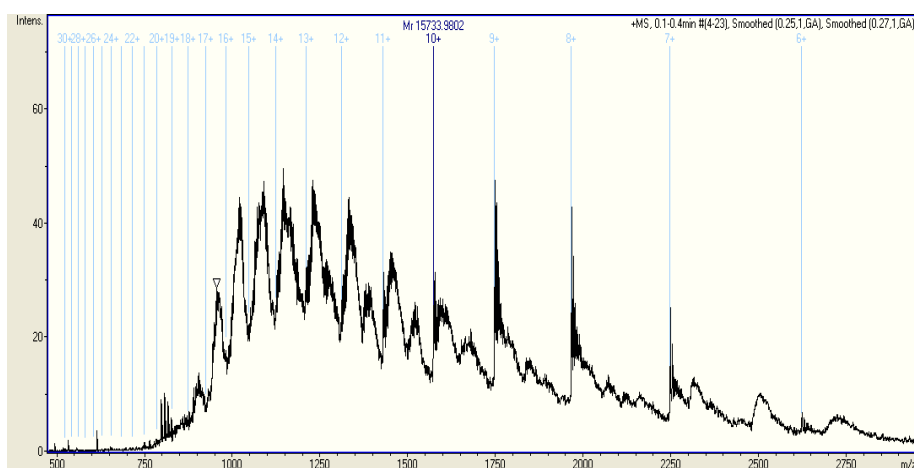
- Hemoglobina ludzka

Hemoglobina jest tetramerem, składającym się z dwóch podjednostek alfa oraz dwóch podjednostek beta ( $\alpha_2\beta_2$ ), które są ze sobą niekowalencyjnie związane. Łańcuch polipeptydowy podjednostki alfa składa się ze 141 aminokwasów, natomiast podjednostki beta ze 146 reszt aminokwasowych, a w każdym z nich znajduje się 11 reszt lizyny. Łańcuch białkowy każdej z podjednostek jest ściśle związany z niebiałkową grupą hemową (grupą prostetyczną), którą stanowi atom żelaza zamknięty w pierścieniu

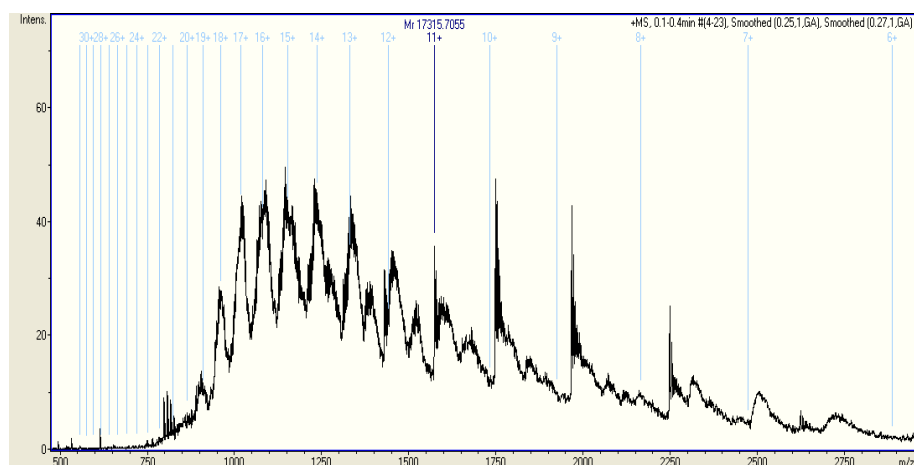
heterocyklicznym, zwanym porfirynowym. Atom żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$ ), który wiąże tlen, tworzy wiązania koordynacyjne z czterema atomami azotu w centrum pierścienia.

Masa cząsteczkowa hemoglobiny ludzkiej (Sigma), wyznaczona techniką ESI, wynosi odpowiednio 15 733 Da oraz 17 315 Da dla łańcucha  $\alpha$  i  $\beta$  (**Rys. 26 A i B**).

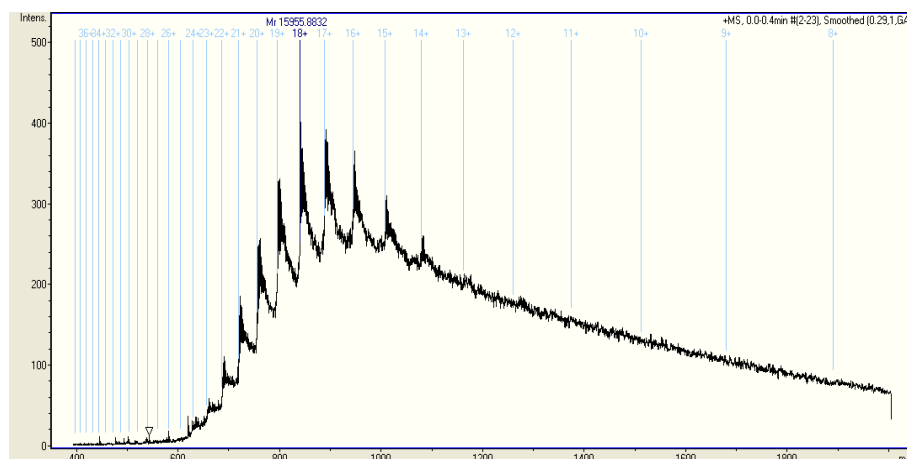
**A.**



**B.**



C.



**Rysunek 26. Widma masowe hemoglobiny ludzkiej. (A) łańcuch alfa przed modyfikacją HTL; (B) łańcuch beta przed modyfikacją HTL oraz (C) łańcuch alfa po modyfikacji HTL.**

Uzyskane widmo masowe N-Hcy-hemoglobiny pozwala na stwierdzenie, że w obecności 66-krotnego nadmiaru molarnego HTL, modyfikacji ulega jedna reszta lizyny łańcucha alfa, ponieważ średnia masa łańcucha alfa N-Hcy-hemoglobiny wynosi 15 955 Da (**Rys. 26 C**). Tak niski stopień modyfikacji wynika najprawdopodobniej z tego, że podczas modyfikacji hemoglobiny tak wysokim nadmiarem tiolaktonu Hcy, zmodyfikowane w największym stopniu cząsteczki białka ulegają wytrąceniu z roztworu [77]. W fazie rozpuszczalnej (w buforze) pozostają te cząsteczki, które uległy modyfikacji w mniejszym stopniu. Natomiast do analizy techniką ESI można użyć jedynie tych białek, które są rozpuszczone w roztworze. Łańcuch beta hemoglobiny nie jest widoczny na widmie masowym uzyskanym w wyniku tej analizy.

Tak niski zaobserwowany stopień N-homocysteinyłacji hemoglobiny w porównaniu do albuminy może wynikać też z innych czynników. Po pierwsze, hemoglobina charakteryzuje się dużo niższą wartością stałej szybkości N-homocysteinyłacji niż albumina (84 vs. 128  $M^{-1}h^{-1}$ ). Po drugie, łańcuch hemoglobiny zawiera 11 reszt lizyny, natomiast cząsteczka albuminy – 49. Jak wykazano, dla białek posiadających od 104 do 698 aminokwasów, a do takich należą zarówno albumina jak i hemoglobina, istnieje korelacja pomiędzy zawartością reszt lizyny w białku a ich reaktywnością z tiolaktonem Hcy [77]. W związku z tym, hemoglobina, jako białko o dużo niższej zawartości lizyn, może ulegać modyfikacji HTL w dużo niższym stopniu niż albumina.

Wykazano, że N-homocysteinyłacja białek w ludzkim osoczu zachodzi już przy 10 nM stężeniu tiolaktonu Hcy i wzrasta proporcjonalnie do wzrostu stężenia HTL. W warunkach sprzyjających syntezie tiolaktonu, jak np. przy podwyższonym poziomie Hcy, następuje wzrost stopnia N-homocysteinyłacji białek. HTL reaguje z większością białek, z szybkością podobną do szybkości reakcji HTL z odpowiednim stężeniem lizyny lub  $\alpha$ -N-acetylo-lizyny [77]. To wyjaśnia, dlaczego homocysteinyłacja koreluje lepiej z zawartością lizyn w białku niż z wielkością (masą cząsteczkową) białka.

#### 4.3.2. Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji w białkach *in vitro*.

N-homocysteinyłacji mogą ulegać grupy  $\epsilon$ -aminowe tych reszt lizyn, które znajdują się na powierzchni cząsteczki białka. Ze względu na pofałdowanie łańcucha polipeptydowego, reszty aminokwasowe znajdujące się wewnątrz cząsteczki białka są niedostępne i chronione przed interakcją z czynnikiem modyfikującym. Znajomość miejsc preferencyjnej modyfikacji jest istotna dla zrozumienia mechanizmu N-homocysteinyłacji oraz ewentualnego wpływu modyfikacji na funkcję białka. W celu identyfikacji reszt lizynowych ulegających preferencyjnej modyfikacji tiolaktonem Hcy *in vitro*, przeprowadzono procedurę opisaną szczegółowo w rozdziale 3.4., polegającą na modyfikacji *in vitro* wybranych białek tiolaktonem homocysteiny, następnie zmodyfikowane białka poddawano redukcji i alkilacji oraz trawieniu trypsyną. Powstałe peptydy rozdzielano poprzez frakcjonowanie na kolumnkach typu Zip-Tip lub też za pomocą HPLC, a następnie poddawano analizie za pomocą spektrometrii mas MALDI-ToF. Jako białka modelowe wybrano ludzką albuminę i hemoglobinę, gdyż są to białka, które występują w największej ilości we krwi oraz fibrynogen, w przypadku którego N-homocysteinyłacja ma poważne konsekwencje funkcjonalne związane z rozwojem zakrzepicy (rozdział 1.9.1)

##### 4.3.2.1. Albumina ludzka

W celu identyfikacji reszt lizyn ulegających modyfikacji tiolaktonem Hcy w albuminie ludzkiej *in vitro*, przeprowadzono doświadczenia równoległe dla czterech prób (A-D):

- A. Białko modyfikowane 10 mM HTL poddane redukcji wiązań dwusiarczkowych za pomocą DTT i alkilacji jodoacetamidem, następnie trawione trypsyną

- B. Białko modyfikowane 10 mM HTL (66- krotny nadmiar molarny HTL wobec białka), a następnie trawione trypsyną
- C. Białko natywne (próbka kontrolna) poddawane redukcji wiązań dwusiarczkowych za pomocą DTT oraz alkilacji jodoacetamidem przed trawieniem trypsyną
- D. Białko natywne (próbka kontrolna) poddawane bezpośrednio trawieniu trypsyną

Peptydy powstałe w wyniku trawienia prób albuminy A-D, oczyszczano oraz frakcjonowano na mikrokolumnkach ZipTip, z fazą odwróconą C18. Do wymywania poszczególnych frakcji peptydów używano 4 różnych stężeń acetonitrylu (4 frakcje: 10, 30, 50 i 100% ACN). W ten sposób uzyskane frakcje peptydowe nakładano na płytkę stalową do analizy MALDI-ToF i mieszano z matrycą (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy).

Taki sposób przygotowania prób do analizy MALDI-ToF pozwolił na uzyskanie dwukrotnie wyższego stopnia pokrycia sekwencji badanego białka przez peptydy, w porównaniu z procedurą, w której nie frakcjonowano peptydów (76% vs. 38%). Stopień pokrycia sekwencji białka przez peptydy wyznaczano z użyciem programu Mascot oraz PepModSearch.

Uzyskane w wyniku analizy MALDI-ToF widma pozwoliły na zidentyfikowanie peptydów zawierających reszty lizyny zmodyfikowane tiolaktonem homocysteiny. N-homocysteinyłowane peptydy zidentyfikowano jedynie wówczas, gdy były obecne w próbie A, w której białko modyfikowano HTL, następnie poddawano redukcji, alkilacji oraz trawieniu trypsyną, a nie wykrywano ich w próbach B-D.

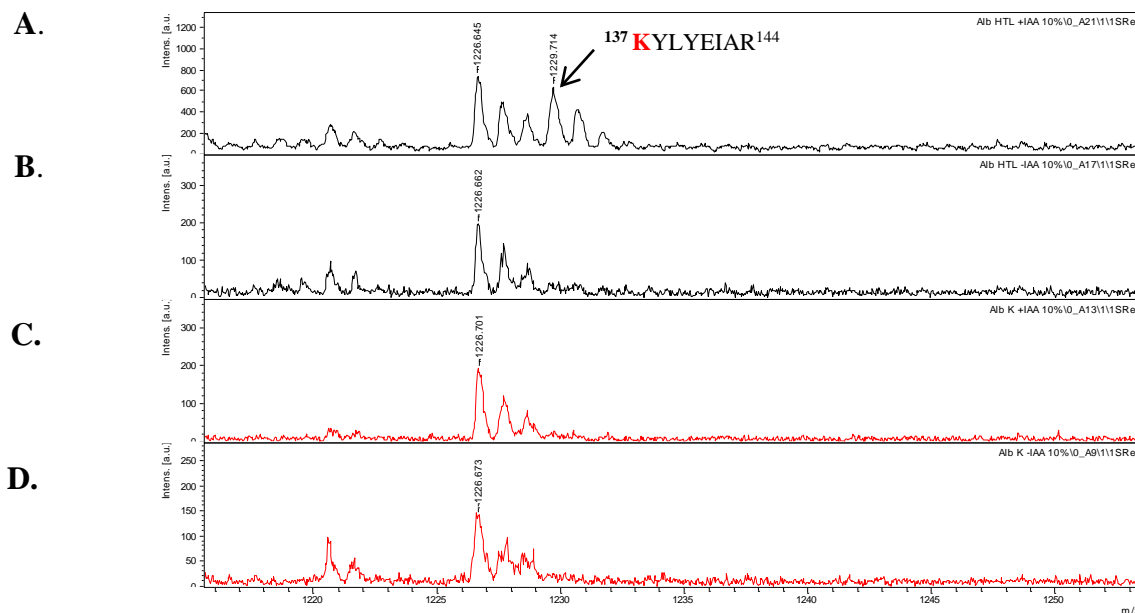
Do analizy widm (poszukiwania przesunięć mas peptydów zawierających modyfikacje względem peptydów natywnych) używano programu FindMod dostępnego na stronach SwissProt (<http://www.expasy.ch/tools/findmod/>). Program ten pozwala na analizę widm MALDI pod kątem poszukiwania modyfikacji potranslacyjnych. Poszukiwana masa zmodyfikowanych peptydów jest o 174 Da wyższa względem peptydu natywnego (gdy przyłączona jest jedna reszta Hcy, w przypadku modyfikacji n reszt lizyny, masa wzrasta o  $n \times 174$  Da).

W albuminie ludzkiej zidentyfikowano w ten sposób, frakcjonując peptydy na kolumnkach ZipTip, 5 miejsc preferencyjnej modyfikacji tiolaktonem homocysteiny.

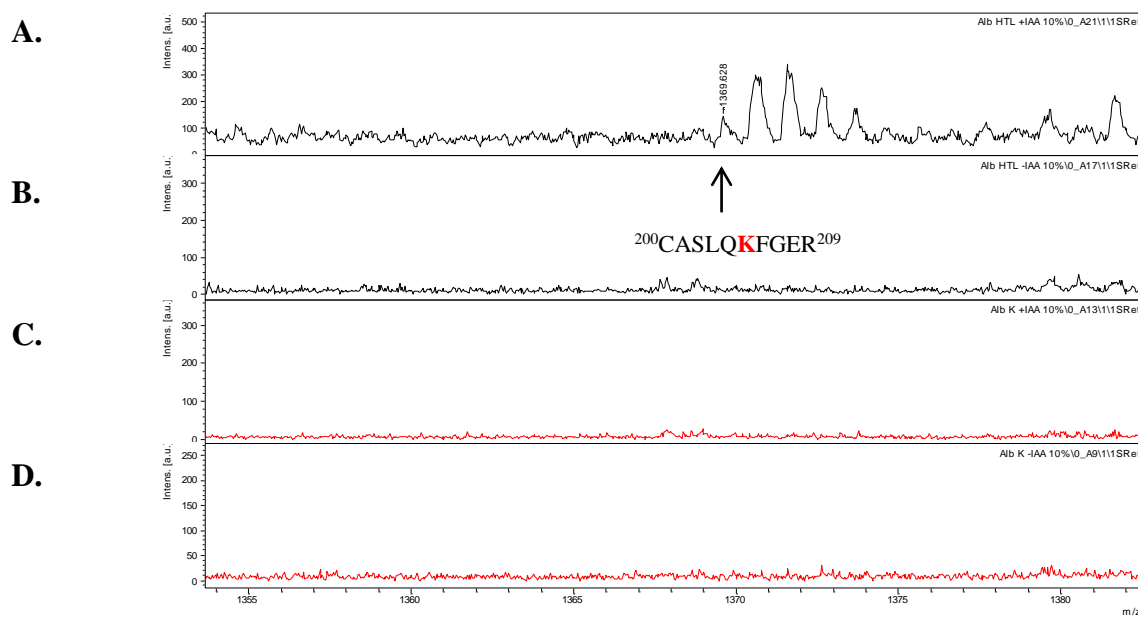


Poniższe widma uzyskane w wyniku analizy MALDI-ToF przedstawiają peptydy zawierające reszty lizyny z przyłączoną resztą homocysteiny (**Rys. 27**).

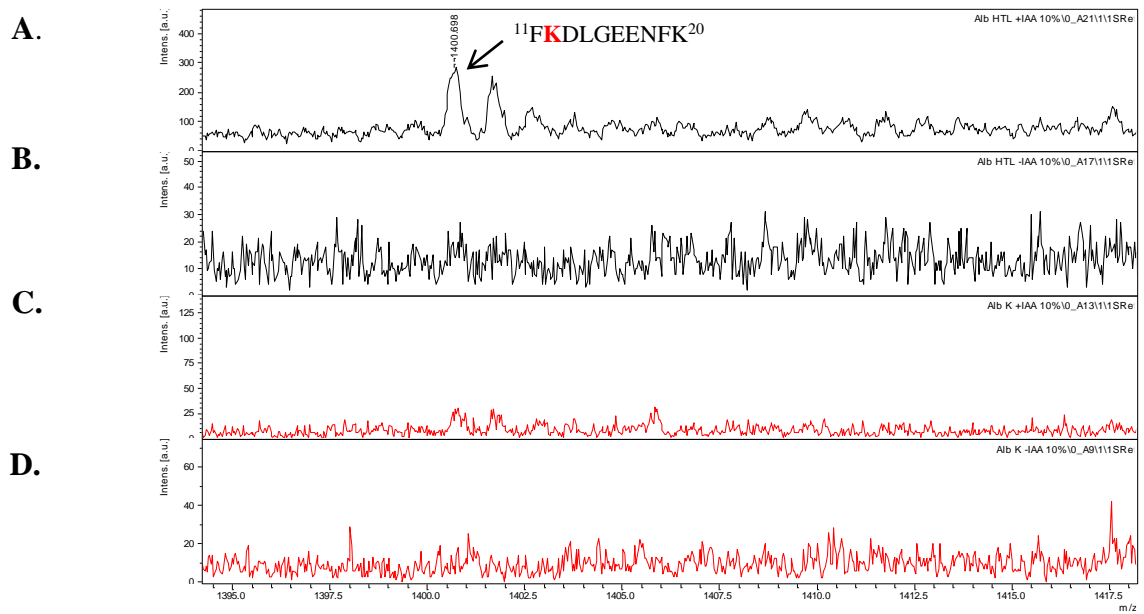
### 1. Zmodyfikowany peptyd zawierający Lys 137.



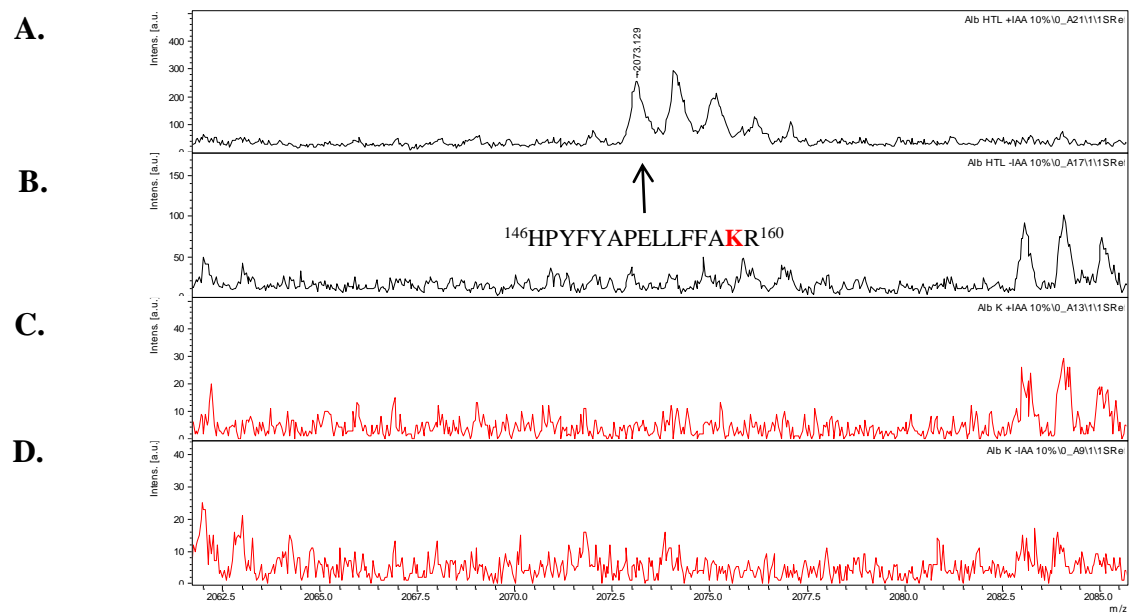
### 2. Zmodyfikowany peptyd zawierający Lys 205.



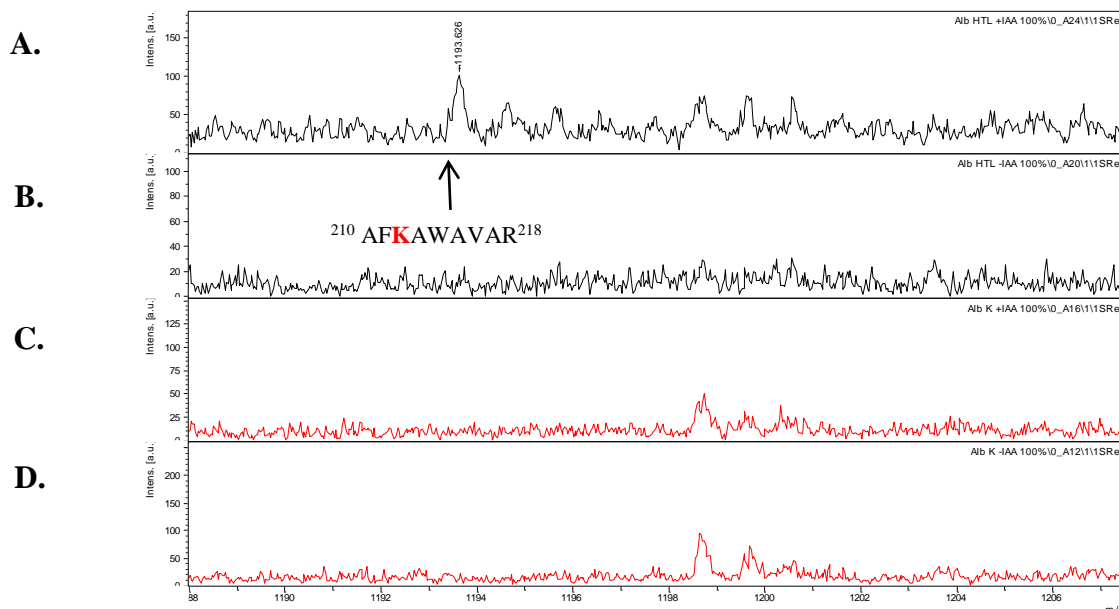
## 3. Zmodyfikowany peptyd zawierający Lys 12.



## 4. Zmodyfikowany peptyd zawierający Lys 159.



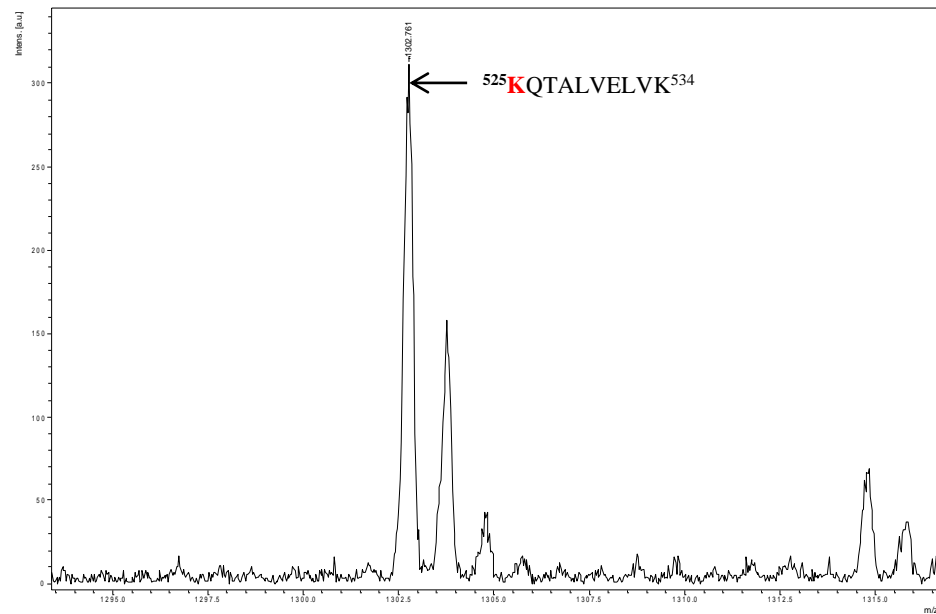
## 5. Zmodyfikowany peptyd zawierający Lys 212.



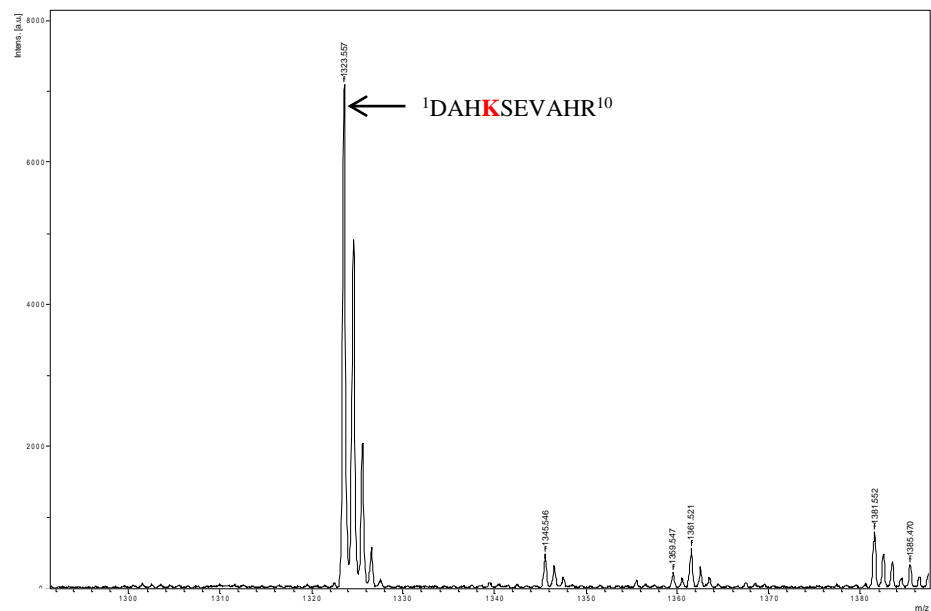
**Rysunek 27. Widma masowe peptydów albuminy zawierających lizyny z przyłączoną Hcy.** (A) Białko modyfikowane 10 mM HTL poddane redukcji i alkilacji, następnie trawione trypsyną, (B) Białko modyfikowane 10 mM HTL (66- krotny nadmiar molarny HTL wobec białka) nie poddane redukcji i alkilacji, trawione trypsyną, (C) Białko natywne (próbka kontrolna) poddana redukcji grup –S-S- oraz alkilacji przed trawieniem, (D) Białko natywne (próbka kontrolna) poddane jedynie trawieniu trypsyną.

Pomimo pomyslniej identyfikacji 5 miejsc N-homocysteinylacji w albuminie, stopień złożoności badanych prób był w dalszym ciągu tak duży, że prawdopodobnie miała miejsce supresja jonów występujących w mniejszych stężeniach, wynikająca z przesylenia jonów w komorze jonizacyjnej. Okazało się, że frakcjonowanie produktów trawienia trypsyną na mikrokolumnkach Zip-Tip jest niewystarczająco dokładną metodą, aby wyodrębnić wszystkie peptydy potencjalnie N-homocysteinylowane. W związku z tym, w celu identyfikacji dodatkowych reszt lizyny ulegających modyfikacji, trawione białko poddawano rozdzielowi za pomocą HPLC na kolumnie C18. Metoda ta jest znacznie dokładniejsza i pozwoliła na zidentyfikowanie dwóch kolejnych reszt lizyny będących miejscami modyfikacji HTL, mianowicie Lys 525 oraz Lys 4 (**Rys. 28**).

A.



B.



Rysunek 28. Widma masowe peptydów N-Hcy-albuminy zawierające zmodyfikowaną resztę Lys 525 (A) oraz resztę Lys 4 (B), po rozdiale na kolumnie C18 za pomocą HPLC.

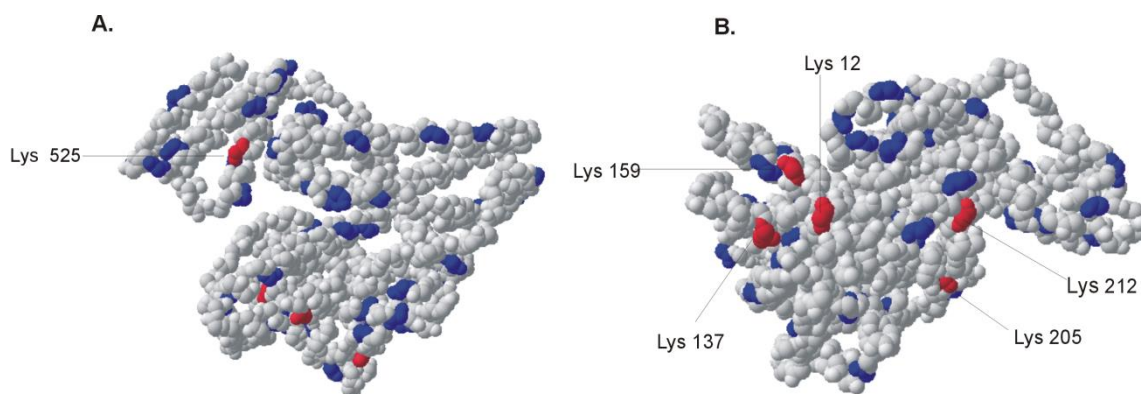
Łącznie zidentyfikowano 7 miejsc N-homocysteinytacji albuminy *in vitro*: Lys 4, Lys 12, Lys 137, Lys 159, Lys 205, Lys 212, Lys 525.

10 DAH <b>K</b> SEVAHR	20 F <b>K</b> DLGEEFK	30 ALVLI <b>A</b> FAQY	40 LQQCP <b>F</b> EDHV	50 KLVNE <b>V</b> TEFA	60 KTCVA <b>D</b> ESAE
70 NCDK <b>S</b> LHTLF	80 GDKLCT <b>V</b> ATL	90 RE <b>T</b> Y <b>G</b> EMADC	100 CA <b>K</b> Q <b>E</b> PERNE	110 C <b>F</b> LQ <b>H</b> KDDNP	120 NL <b>P</b> RL <b>V</b> RPEV
130 D <b>V</b> MCTAFHDN	140 E <b>E</b> T <b>F</b> L <b>K</b> <b>K</b> YLY	150 E <b>I</b> ARR <b>H</b> PYFY	160 A <b>P</b> ELL <b>F</b> <b>F</b> <b>A</b> <b>K</b> R	170 Y <b>K</b> AA <b>F</b> TECCQ	180 A <b>A</b> D <b>K</b> AA <b>C</b> LLP
190 KLDEL <b>R</b> DEGK	200 A <b>S</b> SA <b>K</b> Q <b>R</b> LKC	210 A <b>S</b> L <b>Q</b> <b>K</b> <b>F</b> GERA	220 F <b>K</b> AWA <b>V</b> ARLS	230 Q <b>R</b> FP <b>K</b> AEFAE	240 V <b>S</b> KL <b>V</b> T <b>D</b> LTK
250 V <b>H</b> TE <b>C</b> CHGDL	260 L <b>E</b> C <b>A</b> DD <b>R</b> ADL	270 A <b>K</b> Y <b>I</b> CENQDS	280 I <b>S</b> SK <b>L</b> KECCE	290 K <b>P</b> LL <b>E</b> K <b>S</b> HCI	300 A <b>E</b> V <b>E</b> N <b>D</b> EMPA
310 D <b>L</b> PS <b>L</b> A <b>A</b> D <b>F</b> V	320 E <b>S</b> K <b>D</b> V <b>C</b> K <b>N</b> Y <b>A</b>	330 E <b>A</b> K <b>D</b> V <b>F</b> L <b>G</b> M <b>F</b>	340 L <b>Y</b> E <b>Y</b> ARR <b>H</b> PD	350 Y <b>S</b> V <b>V</b> LL <b>L</b> RLA	360 K <b>T</b> Y <b>E</b> T <b>T</b> L <b>E</b> K <b>C</b>
370 C <b>A</b> A <b>A</b> D <b>P</b> HECY	380 A <b>K</b> V <b>F</b> D <b>E</b> F <b>K</b> PL	390 V <b>E</b> E <b>P</b> Q <b>N</b> L <b>I</b> KQ	400 N <b>C</b> E <b>L</b> F <b>E</b> Q <b>L</b> GE	410 Y <b>K</b> F <b>Q</b> N <b>A</b> L <b>L</b> V <b>R</b>	420 Y <b>T</b> K <b>K</b> V <b>P</b> Q <b>V</b> S <b>T</b>
430 P <b>T</b> L <b>V</b> E <b>V</b> S <b>R</b> N <b>L</b>	440 G <b>K</b> V <b>G</b> S <b>K</b> C <b>C</b> K <b>H</b>	450 P <b>E</b> A <b>K</b> R <b>M</b> P <b>C</b> A <b>E</b>	460 D <b>Y</b> L <b>S</b> V <b>V</b> L <b>N</b> Q <b>L</b>	470 C <b>V</b> L <b>H</b> E <b>K</b> T <b>P</b> V <b>S</b>	480 D <b>R</b> V <b>T</b> K <b>C</b> C <b>T</b> E <b>S</b>
490 L <b>V</b> N <b>R</b> R <b>P</b> C <b>F</b> S <b>A</b>	500 L <b>E</b> V <b>D</b> E <b>T</b> Y <b>V</b> P <b>K</b>	510 E <b>F</b> N <b>A</b> E <b>T</b> F <b>T</b> F <b>H</b>	520 A <b>D</b> I <b>C</b> T <b>L</b> S <b>E</b> K <b>E</b>	530 R <b>Q</b> I <b>K</b> <b>K</b> Q <b>T</b> A <b>L</b> V	540 E <b>L</b> V <b>K</b> H <b>K</b> P <b>K</b> A <b>T</b>
550 K <b>E</b> Q <b>L</b> K <b>A</b> V <b>M</b> D <b>D</b>	560 F <b>A</b> A <b>F</b> V <b>E</b> K <b>C</b> C <b>K</b>	570 A <b>D</b> D <b>K</b> E <b>T</b> C <b>F</b> A <b>E</b>	580 E <b>G</b> K <b>K</b> L <b>V</b> A <b>A</b> S <b>Q</b>	A <b>A</b> L <b>G</b> L	

**Rysunek 29. Sekwencja aminokwasów albuminy ludzkiej.** Kolorem czerwonym zaznaczono lizyny zidentyfikowane jako miejsca N-homocysteinytacji.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że zastosowanie tak precyzyjnej metody, jaką jest spektrometria mas umożliwia identyfikację tych reszt lizyny białek, które ulegają preferencyjnej N-homocysteinytacji. Reszty lizyny, które zidentyfikowano jako wiążące Hcy, są eksponowane na powierzchni albuminy, co czyni je łatwo dostępnymi miejscami dla modyfikacji (**Rys. 30**). Pośród reszt lizyny ulegających N-homocysteinytacji w albuminie jest Lys 525, określona wcześniej przez Głowackiego i Jakubowskiego jako miejsce preferencyjnej N-homocysteinytacji [57]. Autorzy zastosowali jednak nieco inny, od przedstawionego w niniejszej pracy doktorskiej, sposób przeprowadzenia eksperymentu. Z peptydów powstałych na skutek trawienia trypsyną N-Hcy-albuminy, autorzy ci wydzielili i oczyścili za pomocą HPLC peptyd ulegający N-homocysteinytacji. Oczyszczony N-Hcy-peptyd analizowali metodą MALDI-ToF i określili jego masę na 1301,8 Da, co odpowiada masie peptydu zawierającego Lys 525.

Natomiast zastosowane w niniejszej pracy podejście eksperymentalne umożliwiło zidentyfikowanie w albuminie 6 dodatkowych miejsc modyfikacji tiolaktonem Hcy, poza jedyną do tej pory opisaną w literaturze Lys 525. Obecność reszty Hcy przyłączonej do reszty Lys 137 i Lys 525 wiązaniem amidowym potwierdzono za pomocą tandemowej spektrometrii mas, poprzez wykonanie widm fragmentacyjnych peptydów zawierających te reszty lizyny (rozdział 4.3.3).



**Rysunek 30. Struktura przestrzenna ludzkiej albuminy (monomer), narysowana wg 1bm0.pdb [134].** Kolorem niebieskim zaznaczono wszystkie reszty lizyny, a kolorem czerwonym te z nich, które ulegają preferencyjnej N-homocysteinyłacji. (A) widok z tyłu, (B) widok z przodu. Dostępna w bazie danych PDB struktura albuminy nie zawiera Lys 4.

#### 4.3.2.2. Hemoglobina

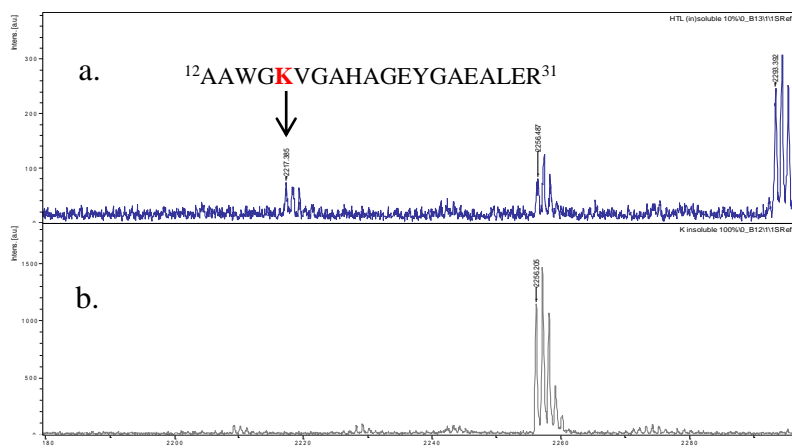
Na podstawie wyników eksperymentu przeprowadzonego na albuminie zaobserwowano, iż porównanie próbek białek alkilowanych, zarówno kontrolnej jak i modyfikowanej pozwala z dużym prawdopodobieństwem na określenie miejsca modyfikacji białka tiolaktonem Hcy. W związku z tym, eksperymenty na hemoglobinie i fibrynogenie prowadzono tylko na próbach modyfikowanych HTL, poddawanych redukcji za pomocą DTT, alkilacji jodoacetamidem, a następnie trawieniu trypsyną.

Ze względu na znacznie mniejszą masę cząsteczkową hemoglobiny, ilość peptydów powstających w wyniku trawienia proteolitycznego jest znacznie mniejsza, co czyni eksperymenty prowadzone na spektrometrze MALDI-ToF łatwiejsze (mniej cząsteczek w źródle jonów poprawia zakres dynamiczny spektrometru). Poszukiwanie miejsc N-homocysteinyłacji hemoglobiny prowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku

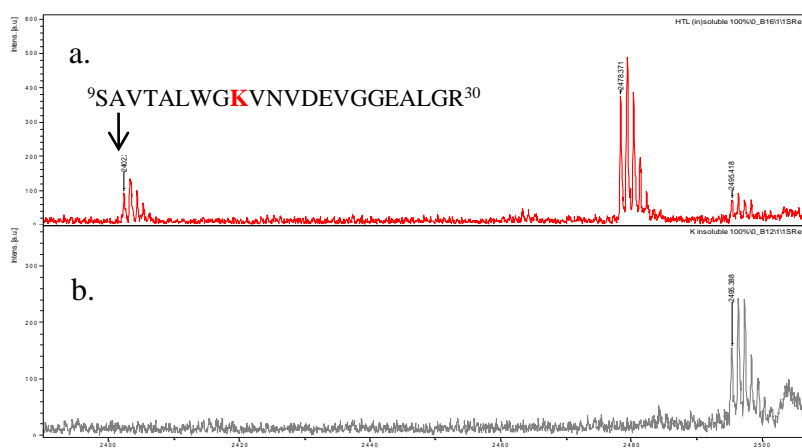
albuminy ludzkiej, jednakże frakcjonowanie peptydów metodą HPLC nie dawało poprawy pokrycia sekwencji białka przez peptydy, więc zrezygnowano z tego podejścia analitycznego. Peptydy frakcjonowano na mikrokolumnkach ZipTip C18, a pokrycie sekwencji hemoglobiny (obecnej w bazie danych) przez peptydy wynosiło 87% dla jednostki alfa oraz 76% dla podjednostki beta.

W przypadku hemoglobiny ludzkiej zidentyfikowano dwie reszty lizyny ulegające preferencyjnej N-homocysteinyłacji, mianowicie Lys 16 w łańcuchu  $\alpha$  (**Rys. 32 A**) oraz Lys 17 w łańcuchu  $\beta$  (**Rys. 32 B**). Obie reszty Lys, podobnie jak w przypadku albuminy, znajdują się na powierzchni białka (**Rys. 33**). W związku z tym, wydaje się prawdopodobne, że to właśnie ta cecha, czyli dostępność reszty lizyny, jest decydująca jeśli chodzi o miejsce preferencyjnej modyfikacji białek tiolaktonem Hcy.

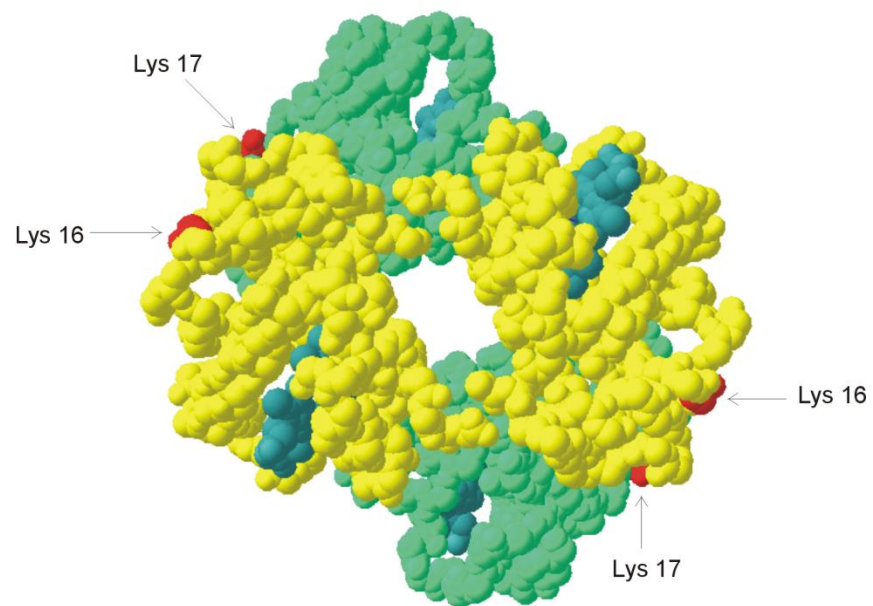
**A.**



**B.**



**Rysunek 31. Widma masowe peptydów hemoglobiny ludzkiej zawierających zmodyfikowane reszty lizyny, (A) Lys 16 w łańcuchu  $\alpha$ , (B) Lys 17 w łańcuchu  $\beta$ ; (a.) hemoglobina zmodyfikowana 66-krotnym nadmiarem molarnym HTL, (b.) próba kontrolna – hemoglobina natywna, nie modyfikowana HTL.**



**Rysunek 32. Struktura przestrzenna ludzkiej hemoglobiny, narysowana wg 2W6V.pdb [135].** Kolorem żółtym zaznaczono łańcuch alfa, kolorem zielonym łańcuch beta, grupy hemowe narysowano kolorem turkusowym. Kolorem czerwonym oznaczono lizyny, które ulegają preferencyjnej N-homocysteinylacji.

#### 4.3.2.3 Fibrynogen

Fibrynogen jest podstawowym białkiem uczestniczącym w procesie koagulacji krwi - polimeryzując tworzy struktury skrzepu fibrynowego. Białko to jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 340 kDa, złożoną z dwóch symetrycznych części. Każda z nich zawiera trzy łańcuchy peptydowe:  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ . Struktura cząsteczki fibrynogenu jest stabilizowana przez 29 wiązań dwusiarczkowych. Centralna domena E jest oddzielona od dwóch dalej położonych domen D regionem, w którym łańcuch polipeptydowy jest zwinięty, tworząc strukturę podobną do kolagenu. Końce aminowe wszystkich sześciu łańcuchów polipeptydowych, wchodzących w skład cząsteczki, są połączone wiązaniami dwusiarczkowymi z domeną E. Łańcuchy  $B\beta$  i  $\gamma$  koniec karboksylowy mają w domenie D, natomiast koniec dłuższego łańcucha  $A\alpha$  znajduje się w domenie  $\alpha C$ , która jest niekowalencyjnie związana z domeną E [136]. Proces polimeryzacji fibryny rozpoczyna się od hydrolizy fibrynopeptydów A i B od N-końca łańcuchów  $A\alpha$  i  $B\beta$  przez trombinę. Monomery fibryny asocjują, oddziaływania warstwowe pogrubiają włókna, dochodzi do ich rozgałęzienia i utworzenia złożonej sieci fibryny.



W wyniku procesu fibrynolizy skrzep fibrynowy zostaje rozpuszczony. Inicjacja tego procesu następuje w momencie związania tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) oraz plazminogenu (Pg) do skrzepu fibrynowego, gdzie tPA przecina plazminogen, w wyniku czego powstaje plazmina. Plazmina następnie hydrolizuje wszystkie trzy łańcuchy ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ ) w regionie pomiędzy domeną E a domenami D, a także w łańcuchu  $\alpha$ , w końcu aminowym związanym z domeną  $\alpha C$ . Miejsca wiązania dla tPA oraz plazminogenu w domenie  $\alpha C$  znajdują się w regionie  $A\alpha$  392-610 [137],  $\gamma$ 312-324 i  $A\alpha$  148-160 w domenie D [138]. Miejscami wiązania enzymów fibrynolitycznych do fibryny są natomiast reszty lizyny i tam też plazmina przecina łańcuchy podczas fibrynolizy.

Badacze Sauls i wsp. za pomocą techniki MALDI-ToF oraz LC-MS (ang. *liquid chromatography/mass spectrometry*) zidentyfikowali łącznie 12 N-homocysteinyłowanych reszt lizyny w cząsteczce fibrynogenu. Początkowa analiza metodą MALDI-ToF pozwoliła im na wykrycie tylko 3 miejsc modyfikacji w łańcuchu  $A\alpha$  (Lys 413, Lys 418 oraz Lys 448). Dalsza analiza z zastosowaniem techniki LC-MS i uzyskanie większego pokrycia sekwencji fibrynogenu przez peptydy (65%) pozwoliła na wykrycie dodatkowych 4 miejsc modyfikacji w łańcuchu  $A\alpha$ , 2 w łańcuchu  $B\beta$  i 3 N-homocysteinyłowanych reszt lizyny w łańcuchu  $\gamma$  [84].

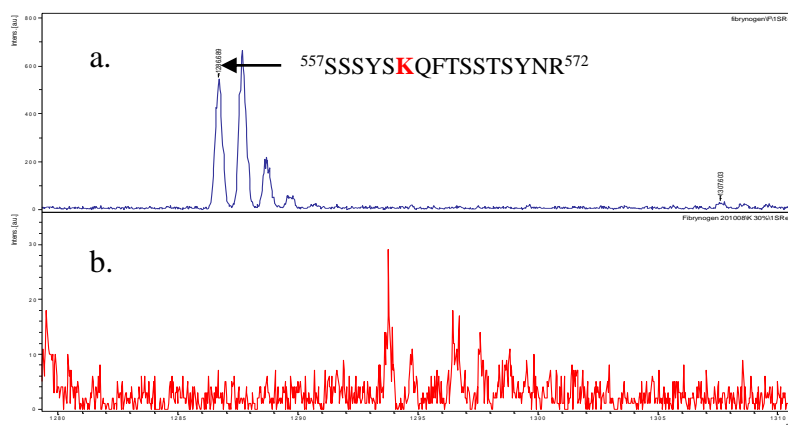
Zastosowane w niniejszej pracy podejście mające na celu zidentyfikowanie nowych miejsc modyfikacji tiolaktonem Hcy cząsteczki fibrynogenu polegało na analizie peptydów powstałych w wyniku trawienia trypsyną metodami MALDI-ToF oraz LC-MS (analogiczne jak w przypadku albuminy - rozdział 4.3.3.2).

Stosunkowo niskie pokrycie sekwencji fibrynogenu przez peptydy (41%) pozwoliło na zidentyfikowanie łącznie 9 reszt lizyny zawierających przyłączoną resztę homocysteiny (**Rys. 34**). Siedem z tych reszt znajduje się w łańcuchu  $A\alpha$  oraz dwie w łańcuchu  $B\beta$  (**Tabela 5**). W łańcuchu  $\gamma$  nie zidentyfikowano żadnej reszty lizyny ulegającej N-homocysteinyłacji. Pewnym ograniczeniem zastosowanej metody jest to, że jeżeli w danym peptydzie występują dwie reszty Lys (oprócz lizyny na końcu sekwencji), to nie jest możliwe stwierdzenie, która z nich uległa modyfikacji (jak w przypadku peptydu o masie 1984 Da, podanego w tabeli poniżej).

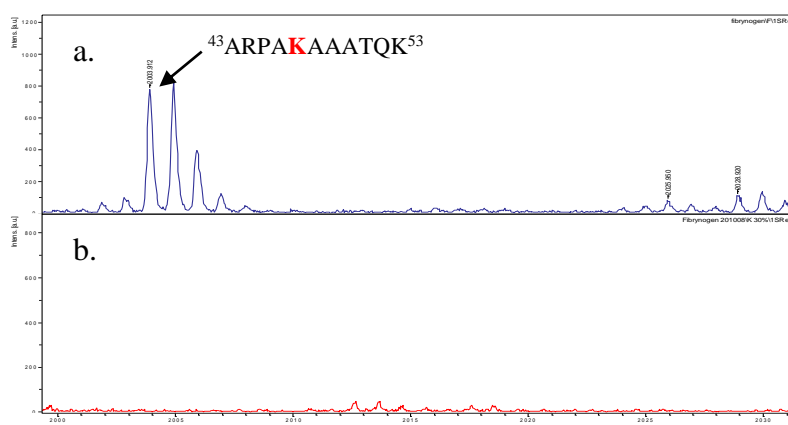
Masa peptydu [Da]	Masa N-Hcy-peptydu [Da]	Reszty aminokwasowe	Sekwencja
<b>ŁAŃCUCH A<math>\alpha</math></b>			
1384,686	1558,661	71-81	NSLFEYQ <b>K</b> NNK
1339,737	1513,667	220-230	SQLQ <b>K</b> VPPEWK
1245,716	1593,803	414-424	LVTS <b>K</b> GD <b>K</b> ELR
1267,649	1441,645	428-439	E <b>K</b> VTSGSTTTTR
1810,007	1984,001	445-461	TVT <b>K</b> TVIGPDGH <b>K</b> EVTK
1829,830	2003,912	557-572	SSSYS <b>K</b> QFTSSTSYNR
1007,586	1181,652	603-611	GHA <b>K</b> SRPVR
<b>ŁAŃCUCH B<math>\beta</math></b>			
1112,653	1286,689	43-53	ARPA <b>K</b> AAATQK
1906,871	2080,996	381-396	DNDGWLTSDP <b>R</b> KQCSK

Tabela 5. Peptydy fibrynogenu, w których zidentyfikowano lizyny ulegające N-homocysteinytacji *in vitro*.

A.



B.



Rysunek 33. Widma masowe peptydów fibrynogenu zawierających zmodyfikowane reszty lizyny 562 i 47, (A) Lys 562 w łańcuchu A $\alpha$  oraz (B) Lys 47 w łańcuchu B $\beta$ ; (a.) fibrynogen zmodyfikowany 66-krotnym nadmiarem molarnym HTL, (b.) próba kontrolna – fibrynogen natywny, nie modyfikowany HTL.

Zidentyfikowane przez Saulsa i wsp. reszty lizyny ulegające modyfikacji w łańcuchu A $\alpha$  fibrynogenu to Lys: 52, 129, 191, 230, 413, 418 oraz 448. Trzy z nich znajdują się w regionie domeny  $\alpha$ C zaangażowanym w wiązanie tPA i plazminogenu. W łańcuchu B $\beta$  autorzy pracy zidentyfikowali Lys 298 oraz 323, a w łańcuchu  $\gamma$ - Lys 125, 140, 205 jako reszty ulegające modyfikacji HTL. Natomiast wykryte w niniejszej pracy miejsca N-homocysteinytacji w łańcuchu A $\alpha$  to: Lys 78, 224, 418, 429, 448, 562 i 606, a w łańcuchu B Lys 47 oraz Lys 393. Pięć spośród siedmiu miejsc modyfikacji tiolaktonem Hcy w łańcuchu A $\alpha$  znajduje się w regionie domeny  $\alpha$ C zaangażowanym w wiązanie tPA i plazminogenu, mianowicie Lys 418, 429, 448, 562 i 606. Jedynie dwie reszty lizyny: 418 oraz 448, zostały wykryte także przez Saulsa i wsp. Różnice w identyfikacji pozostałych modyfikowanych tiolaktonem reszt lizyny mogą wynikać ze stosunkowo niskiego pokrycia sekwencji aminokwasowej fibrynogenu przez peptydu, wynoszącego ok. 40%, a zatem 60% peptydów było niedostępne do analizy. Natomiast pokrycie sekwencji uzyskane przez Saulsa i wsp. wynosiło 65%. Niestety w trakcie prowadzenia eksperymentów nie udało się poprawić tego wyniku. Tak niski stopień pokrycia sekwencji wynikać może z obecności dużej liczby reszt lizyny i argininy w fibrynogenu, co owocuje powstaniem sporej ilości fragmentów o masie poniżej 1000 Da po trawieniu trypsyną, które są w efekcie trudne do identyfikacji metodami spektrometrii mas.

N-homocysteinylowane reszty Lys 224, 448, 562, a także 606 znajdują się w sąsiedztwie miejsc kilku dobrze scharakteryzowanych mutacji fibrynogenu: Arg 275 $\rightarrow$ Cys, Arg 554 $\rightarrow$ Cys oraz Ser 532 $\rightarrow$ Cys. Stwierdzono, że istnienie tych mutacji jest powiązane z występowaniem zakrzepicy, a ich konsekwencją jest powstawanie cienkich, ściśle upakowanych włókien, charakteryzujących się wysoką odpornością na fibrylizę [139, 140]. Wprowadzone nowe reszty Cys pośredniczą w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych pomiędzy cząsteczką fibrynogenu a albuminą w osoczu. Wykazano jednocześnie, że dołączenie innego białka do domeny  $\alpha$ C fibrynogenu może zakłócać polimeryzację włókien fibryny [141].

Stwierdzono, że modyfikacja reszt lizyny za pośrednictwem HTL w cząsteczce fibrynogenu zmienia strukturę powstających skrzepów [102], które przypominają te tworzone przez fibrynogen niosący mutacje Arg 275 $\rightarrow$ Cys, Arg 554 $\rightarrow$ Cys oraz Ser 532 $\rightarrow$ Cys. Wydaje się zatem prawdopodobne, że wprowadzenie poprzez N-homocysteinytację, jednej lub więcej wolnych grup tiolowych w cząsteczkę fibrynogenu mogłoby wywoływać analogiczny efekt *in vivo*.

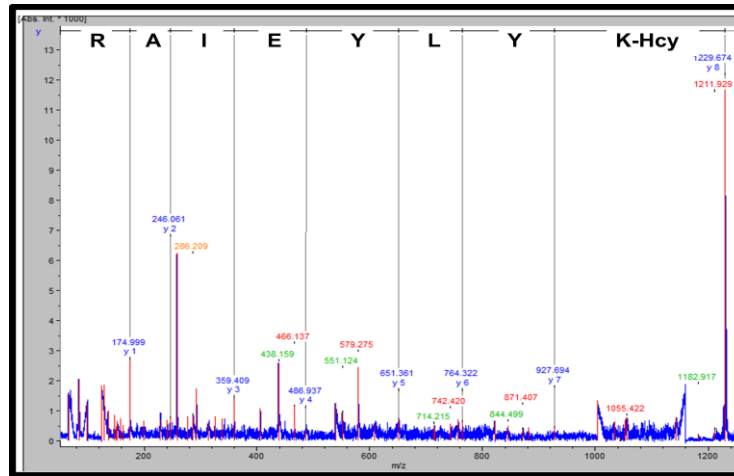
Modyfikacja aż 5 reszt lizyny, zidentyfikowanych w niniejszej pracy jako miejsca N-homocysteinyłacji, bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie enzymów fibrynolitycznych, może doprowadzić także do wzmożonej odporności na fibrynolizę. Istnieje także prawdopodobieństwo, że inne reszty lizyny w cząsteczce fibrynogenu, niewykryte za pomocą zastosowanych w pracy metod, mogą ulegać modyfikacji tiolaktonem homocysteiny.

W związku z tym, że modyfikacja fibrynogenu *in vitro* za pomocą HTL odzwierciedla sytuację, jaka panuje *in vivo* w warunkach podwyższonego stężenia Hcy [102], można stwierdzić, że tiolakton Hcy działa prozakrzepowo, wywołując stan, który jest nieodzownie związany z hiperhomocysteinemią.

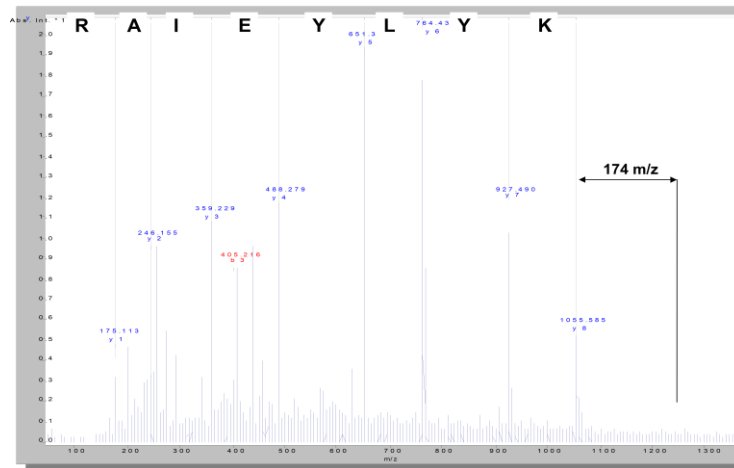
#### **4.3.3. Analiza fragmentacyjna wybranych N-homocysteinyłowanych peptydów albuminy ludzkiej.**

W celu ostatecznego potwierdzenia, że w wyniku procesu N-homocysteinyłacji do reszt lizyny w albuminie przyłączone zostają reszty homocysteiny wykonano analizę fragmentacyjną dwóch wybranych peptydów albuminy (zawierającego Lys 137 i Lys 525), zmodyfikowanych HTL *in vitro*. Wykorzystano do tego celu tandemową spektrometrię mas MS/MS oraz MALDI-ToF PSD (ang. *post source decay*). Analizy fragmentacji na spektrometrze MALDI-ToF różnią się zasadniczo od analiz fragmentacji wykonanych w komorze kolizyjnej tandemowych spektrometrów mas. Mianowicie w przypadku spektrometru MALDI-ToF obserwuje się jedynie tzw. jony metastabilne, powstałe po samoistnym rozpadzie jonu macierzystego w obszarze wolnym od pola (w tym przypadku jest nim analizator ToF). Taka fragmentacja jest delikatna i bardzo często nie obserwuje się odejścia grup modyfikujących resztę aminokwasową. Ponadto, głównym jonem obserwowanym na widmach PSD jest zawsze jon macierzysty (**Rys. 35 A**). Natomiast w przypadku metody MS/MS fragmentacja jonu następuje pod wpływem zderzeń z obojętnymi cząsteczkami gazu, którym najczęściej jest argon (można również stosować azot, hel, itp.), w wyniku których następuje rozpad wiązania peptydowego prowadząc do powstania serii jonów a,b,c oraz komplementarnych x,y,z [142]. Otrzymane w wyniku przeprowadzonych analiz widma fragmentacyjne potwierdzają istnienie w wybranych peptydach reszty homocysteiny (związanej z resztą Lys 137 oraz Lys 525) (**Rys.35**).

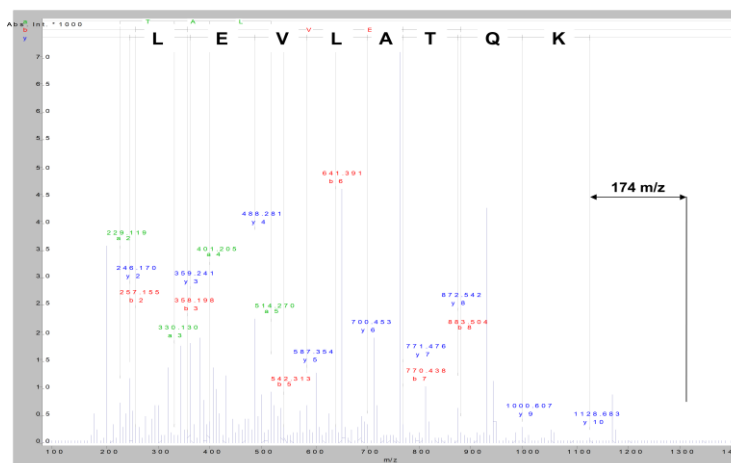
A.



B.



C.



**Rysunek 34. Widma fragmentacyjne peptydów albuminy o masach 1128,6 Da (A i B) oraz 1301,7 Da (C). A- widmo MALDI-ToF PSD, B i C – widma MS/MS.**

#### **4.3.4 Analiza ilościowa peptydu albuminy zawierającego zmodyfikowaną resztę lizyny 525 w próbach surowic ludzkich pochodzących od pacjentów z chorobą wieńcową oraz od pacjentów z mutacją w genie *CBS*.**

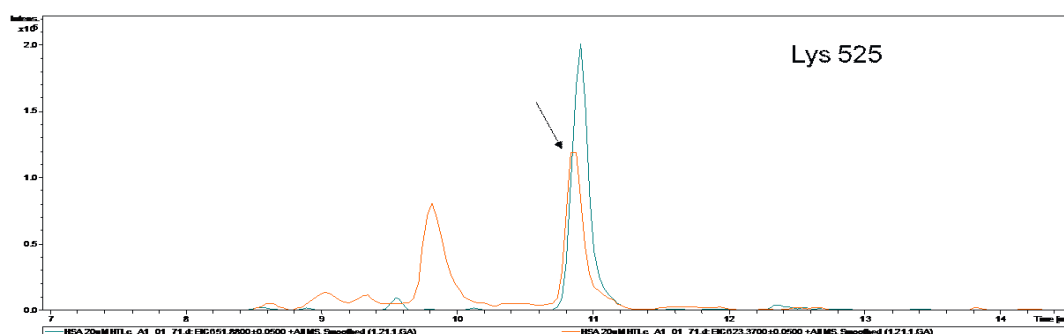
Identyfikacja oraz oznaczanie ilościowe peptydu zawierającego zmodyfikowaną tiolaktonem homocysteiny resztę Lys może potencjalnie służyć jako narzędzie diagnostyczne do monitorowania zagrożenia wystąpienia chorób układu krążenia (związanych z podwyższonym stężeniem Hcy w osoczu).

Do analiz miejsc N-homocysteinyłacji *in vivo* w próbach surowicy ludzkiej zastosowano metodę LC-MS (opisaną w rozdziale 3.7), która ze względu na bezpośrednie sprzężenie chromatografii ciekowej (LC) ze spektrometrem mas, charakteryzuje się znacznie lepszą czułością i wyższą rozdzielczością analiz niż metoda MALDI-ToF. Dodatkowo, w przeciwieństwie do spektrometrii MALDI-ToF, chromatograficzna analiza wszystkich peptydów odbywa się w sposób ciągły, co pozwala na ominięcie największej niedogodności metody MALDI, a mianowicie różnego stopnia homogenności próbek (peptydów) na płytce. Zastosowanie metody LC-MS pozwala na znacznie dokładniejsze pomiary ilościowe.

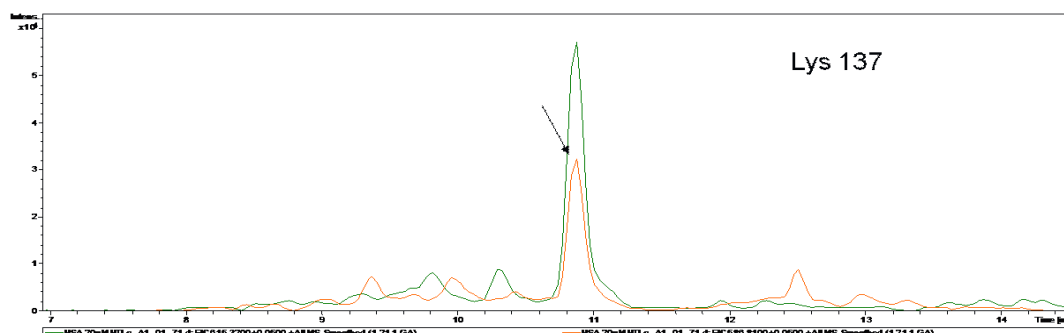
W celu określenia warunków rozdziału i czasu retencji N-homocysteinyłowanych peptydów, wykonano analizę LC-MS peptydów albuminy zmodyfikowanej tiolaktonem

Hcy *in vitro*. W analizowanych próbach zaobserwowano występowanie pików pochodzących zarówno od peptydu natywnego, jak i od peptydu zmodyfikowanego (**Rys. 36**). Wynika z tego, że w puli cząsteczek albuminy znajdujących się w badanej próbce nie wszystkie ulegają N-homocysteinyłacji. Wydaje się zatem prawdopodobne, że w puli białek zawsze pozostaje frakcja cząsteczek, które nie ulegają modyfikacji, pozostając w stanie natywnym, w danych warunkach przeprowadzanej reakcji modyfikacji za pomocą HTL.

A.



B.

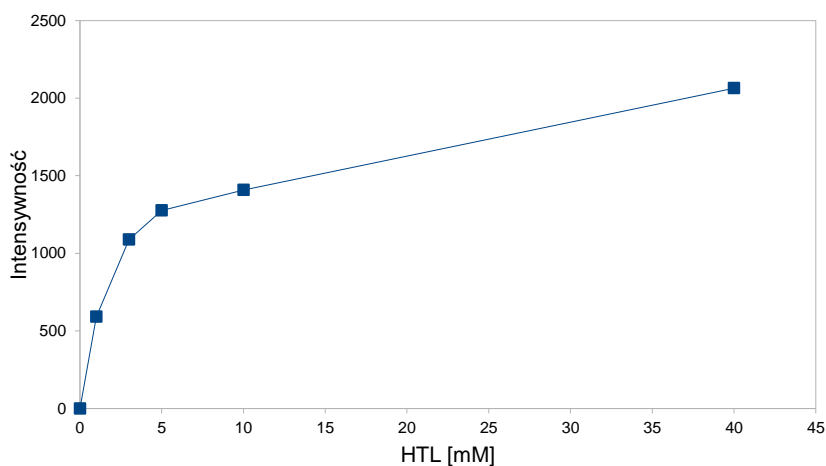


**Rysunek 35. Chromatogramy uzyskane po rozdziale LC-MS peptydów albuminy zmodyfikowanej *in vitro*.** Kolorem czerwonym oznaczono pik pochodzący od peptydów zawierających odpowiednio Lys 525 (A) oraz Lys 137 (B) bez przyłączonej reszty Hcy, natomiast kolorem zielonym oznaczono piki pochodzące od tych peptydów, ale zawierające przyłączoną resztę Hcy.

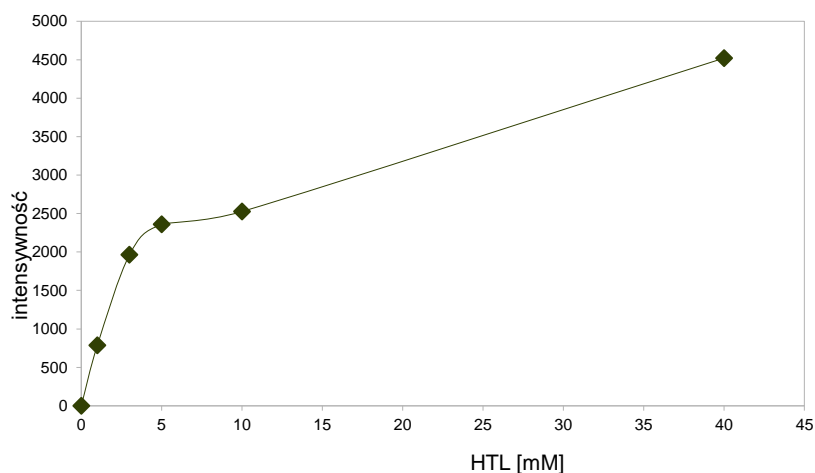
Za pomocą LC-MS wykonano także analizę zależności ilości zmodyfikowanych peptydów zawierających Lys 137 (o masie 1128,6 Da) oraz Lys 525 (o masie 1301,7 Da) od stężenia HTL użytego do modyfikacji albuminy ludzkiej *in vitro*. Zaobserwowano, że modyfikacja albuminy już 5 mM stężeniem HTL (33- krotnym nadmiarem molarnym) powoduje, że większość cząsteczek albuminy posiada przyłączoną resztę Hcy do Lys 525 lub 137. Dalsze zwiększanie stężenia HTL powoduje jedynie nieznaczny wzrost ilości zmodyfikowanego peptydu (**Rys. 31 A i B**). Intensywność sygnału pochodzącego od

peptydu zawierającego Lys 525, zmodyfikowanego 5 mM HTL, wynosi 2358 [AU] (jednostki arbitralne, ang. *arbitral units*), a modyfikacja 10 mM powoduje, że intensywność sygnału peptydu wzrasta jedynie do 2556 [AU]. Dopiero użycie do modyfikacji HTL o stężeniu 40 mM prowadzi do zwiększenia intensywności do wartości 4521 [AU].

**A.**



**B.**

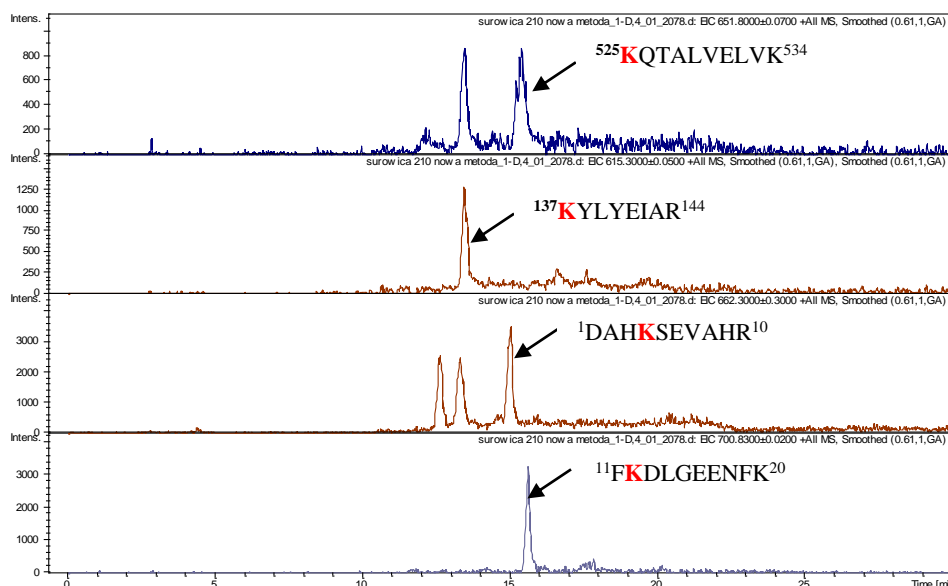


**Rysunek 36.** Wykres pokazujący ilość zmodyfikowanego peptydu 1228,6 Da zawierającego Lys 137 (A) oraz peptydu o masie 1301,7 Da (B) w zależności od stężenia HTL w reakcji N-homocysteinytacji.

W celu analizy zmodyfikowanych reszt lizyny *in vivo*, próby surowic ludzkich pochodzących od pacjentów ze stwierdzoną angiograficznie chorobą wieńcową serca poddawano redukcji za pomocą DTT, alkilacji IAA, a następnie trawieniu trypsyną. Tak



uzyskaną mieszaninę peptydów rozdzielano i analizowano metodą LC-MS. Na uzyskanych widmach masowych surowic zaobserwowano sygnały pochodzące od N-homocysteinyłowanych peptydów *in vivo* (zidentyfikowanych uprzednio w albuminie *in vitro*) (Rys. 37).



**Rysunek 37. Przykładowe widma masowe N-homocysteinyłowanych peptydów w surowicy ludzkiej (zawierającej 27  $\mu\text{M}$  tHcy), analizowanych za pomocą LC-MS.**

Jednakże w przypadku wielu prób surowic stosunek sygnału do szumu dla znacznej ilości N-homocysteinyłowanych peptydów był poniżej wartości progowej. Do dalszych analiz *in vivo* w surowicach ludzkich, wybrano zatem peptyd o masie 1301,7 Da ze zmodyfikowaną Lys 525. Stwierdzono bowiem, że ten peptyd występował w największej ilości, wobec czego obecna w nim reszta lizyny z przyłączoną resztą homocysteiny była łatwa do zidentyfikowania. Ze względu na obecność jonów podwójnie naładowanych w zastosowanej analizie ESI-MS, poszukiwanemu peptydowi (zawierającemu lizynę 525) odpowiada sygnał przy 651,8 m/z (stosunek masy do ładunku). Powstawanie jonów podwójnie naładowanych wynika ze specyficznych warunków energetycznych panujących w źródle ESI - dla peptydów w zakresie mas do około 4000 Da obserwuje się przeważnie przyłączanie dwóch protonów do jednego peptydu.

W celu standaryzacji analiz ilościowych peptydu zawierającego N-homocysteinyłowaną Lys 525, uzyskane wyniki intensywności sygnału pochodzącego od

tego peptydu odnoszono w poszczególnych próbach surowic do intensywności peptydu albuminy o masie 1148,6 Da i sekwencji aminokwasowej LVNEVTEFAK. Peptyd ten wybrano ze względu na jego łatwą identyfikację i wysoką intensywność w każdej badanej próbce, a także, ze względu na to, że nie ulega modyfikacji tiolaktonem Hcy (ze względu na brak reszty lizyny wewnątrz sekwencji peptydu). W związku z tym, w analizie ilościowej posługiwano się intensywnością względną peptydu 1301,7 Da (intensywność peptydu 1301,7 Da/intensywność peptydu 1148,6 Da).

Metodą LC-MS przeanalizowano próby surowic pochodzące od 29 pacjentów z chorobą wieńcową, zawierające różne stężenia tHcy. Większość z tych surowic zawierała tHcy w przedziale stężeń charakterystycznym dla łagodnej postaci hiperhomocysteinemii (10-100  $\mu\text{M}$ ). Dane pacjentów przedstawiono w **Tabeli 6**:

Płeć (M/K)	24/5
Wiek*	58,4 $\pm$ 11
ICD (+/-)	25/4
TCH* (mmol/l)	7,07 $\pm$ 1,72
HDL* (mmol/l)	1,20 $\pm$ 0,31
LDL*(mmol/l)	4,85 $\pm$ 1,82
TG* (mmol/l)	2,24 $\pm$ 1,60
tHcy* ( $\mu\text{M}$ )	19,06 $\pm$ 9,36

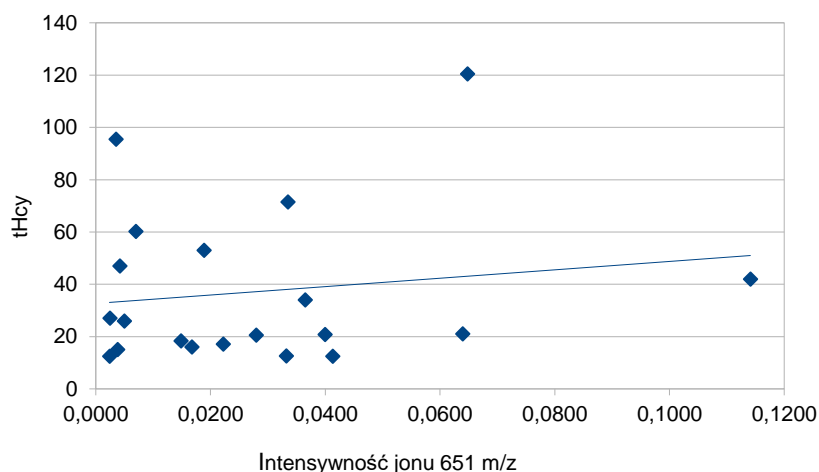
**Tabela 6. Charakterystyka chorych, których surowice przeanalizowano pod względem ilości jonu 651,8 m/z (ze zmodyfikowaną Lys 525).** ICD (ang. *Implantable cardioverter defibrillator*) – występowanie choroby niedokrwiennej serca, TCH- poziom całkowitego cholesterolu, HDL- lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL- lipoproteiny o niskiej gęstości, TG- trójglicerydy, tHcy- całkowita ilość homocysteiny, \*średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.

W celu sprawdzenia, czy istnieje korelacja między całkowitym poziomem Hcy (tHcy) a ilością (intensywnością) peptydu o masie 1301,7 Da w badanych surowicach ludzkich, wykonano test istotności współczynnika korelacji w programie SigmaPlot. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na istnienie istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem tHcy a ilością peptydu zawierającego zmodyfikowaną Lys 525 – poziom istotności  $p$  (ang. *p value*) wynosił  $1,4 \times 10^{-9}$ .

Podobną analizę przeprowadzono dla 21 prób surowic pochodzących od pacjentów z mutacjami w genie *CBS*. Pacjenci ci, pochodzący z Holandii, w przedziale wiekowym 14-74 lat, chorują na homocystynurię. Osoby te zostały zdiagnozowane w wieku 2-54 lat na podstawie objawów klinicznych charakterystycznych dla niedoboru  $\beta$ -syntazy

cystationiny. Stwierdzono u nich także poważną postać hiperhomocysteinemii oraz hipermetioninemii. Wszyscy pacjenci byli poddawani terapii obniżającej poziom tHcy (suplementacja witaminą B<sub>6</sub>). Jak wykazano w pracy Jakubowskiego i wsp., poziom N-Hcy-białek ( $3,02 \pm 2,27 \mu\text{M}$ ), tiolaktonu Hcy ( $14,4 \pm 30,4 \text{ nM}$ ) oraz tHcy ( $48,5 \pm 57,5 \mu\text{M}$ ) był podwyższony, jednakże wartości te, ze względu na wprowadzoną terapię, były znacznie niższe niż można by się było spodziewać. Zaobserwowano także podwyższenie względnego poziomu N-Hcy-fibrynogenu (N-Hcy-fibrynogen/całkowity fibrynogen), w porównaniu z osobami zdrowymi. Ponadto badacze zauważyli znaczącą pozytywną korelację między ilością N-Hcy-białek a stężeniem tHcy, między ilością N-Hcy-fibrynogenu a stężeniem tHcy lub HTL oraz między ilością N-Hcy-białek a całkowitą ilością fibrynogenu [86].

Przeprowadzony w niniejszej pracy doktorskiej test istotności współczynnika korelacji wskazuje na istnienie istotnej statystycznie korelacji między całkowitym stężeniem Hcy a ilością peptydu albuminy o masie 1301,7 Da w surowicach pacjentów posiadających mutacje w genie *CBS* (poziom istotności  $p=0,0038$ ) (**Rys. 38**).



**Rysunek 38.** Wykres przedstawiający korelację między całkowitym stężeniem Hcy a ilością peptydu albuminy o masie 1301,7 Da w surowicach pacjentów posiadających mutacje w genie *CBS*.

Ponadto wykazano, że ilość analizowanego peptydu jest prawie 3-krotnie wyższa w surowicach pacjentów z mutacją w genie *CBS* niż u pacjentów zdrowych (bez tej mutacji) i

różnica ta jest istotna statystycznie, co potwierdzono wykonując test t-Studenta ( $0,0285 \pm 0,027$  vs.  $0,0112 \pm 0,0113$ ; poziom istotności  $p=0,006$ ).

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej stwierdzić można, że nowym czynnikiem stosowanym do wykrywania ryzyka powstawania chorób układu krążenia, być może bardziej informatywnym niż ilość całkowitej Hcy, mogłaby stać się N-związana homocysteina. W tym kontekście istotne byłoby monitorowanie procesu N-homocysteinyłacji białek występujących we krwi człowieka. Przedstawione w niniejszej pracy metody oceny stopnia N-homocysteinyłacji białek, identyfikacji zmodyfikowanych reszt lizyny oraz oceny ilościowej N-Hcy-peptydów w białkach krwi człowieka są relatywnie mało skomplikowane, a jednocześnie wystarczająco dokładne, aby można było wykonywać te analizy na szerszą skalę. W szczególności, wykazana w pracy istotna statystycznie korelacja między całkowitą Hcy osocza, a ilością peptydu albuminy zawierającego N-Hcy-Lys 525, w surowicach pacjentów z mutacją w genie *CBS* oraz u pacjentów z chorobą wieńcową serca, daje możliwość stworzenia nowego narzędzia diagnostycznego w monitorowaniu ryzyka chorób układu krążenia u ludzi związanego z podwyższonym poziomem Hcy osocza.

## 5. Wnioski

- **Metabolizm homocysteiny oraz inhibicja wzrostu u *Escherichia coli***

1. Hodowla komórek bakteryjnych *Escherichia coli* w obecności homocysteiny powoduje inhibicję wzrostu komórek i podwyższoną syntezę tiolaktonu Hcy, podczas której zużywana jest energia w postaci ATP. Wykazano ponadto, że szybkości wzrostu bakterii są odwrotnie proporcjonalnie do ilości gromadzonego HTL.

2. Octan sodu inhibuje wzrost badanych szczepów *E.coli*, ale jednocześnie obniża 2-6 krotnie podstawowy poziom tiolaktonu Hcy w hodowlach. Uzyskane wyniki zaprzeczają zatem postawionej wcześniej w literaturze hipotezie [8], że do gromadzenia się Hcy w komórkach *E.coli* dochodzi pod wpływem octanu.

3. Zwiększona synteza tiolaktonu Hcy katalizowana przez syntetazy IleRS, MetRS oraz LeuRS przyczynia się do zahamowania wzrostu komórek w hodowlach *E.coli* prowadzonych z dodatkiem Hcy.

4. Inkorporacja Hcy do białek za pośrednictwem HTL nie ma prawdopodobnie znaczącego udziału w inhibicji szybkości wzrostu komórek *E.coli* obserwowanej w obecności Hcy- suplementacja hodowli homocysteiną nieznacznie podnosi poziom N-Hcy-białek w komórkach *E.coli*.

5. Gromadzenie tiolaktonu Hcy w komórkach bakteryjnych nie wpływa na odpowiedź *heat shock* u *E.coli*.

- **Izolacja i identyfikacja enzymu o aktywności tiolaktonazy Hcy z łożyska ludzkiego**

1. Z ludzkiego łożyska wyizolowano hydrolazę bleomycyny (BLH), która jest enzymem posiadającym aktywność hydrolizującą tiolakton Hcy wewnątrzkomórkowo.

2. Specyficzność substratowa ludzkiej tiolaktonazy (BLH) jest ograniczona do L- $\alpha$ -aminoacylo tioestrów, estrów aminokwasów siarkowych oraz amidów aminokwasów.

Enzym ten wykazuje wysoką specyficzną substratową w stosunku do L-stereoizomeru HTL, natomiast nie hydrolizuje formy D - HTL.

3. Tioakton Hcy jest znacznie bardziej toksyczny dla komórek HeLa niż homocysteina. 24h inkubacja komórek z 5mM HTL powoduje śmierć wszystkich komórek, natomiast 48h inkubacja z 5mM Hcy powoduje 60 % spadek żywotności komórek.

4. W komórkach HeLa zachodzi efektywna konwersja Hcy do HTL, który następnie ulega dość szybko przemianom w komórkach – jest najprawdopodobniej hydrolizowany do Hcy, a także przyłącza się do grupy ε-aminowej reszt lizyny białek.

5. Obniżenie poziomu ekspresji hydrolazy bleomycyny w komórkach HeLa, nie wpływa na ich przeżywalność w obecności tioaktonu Hcy. Prawdopodobnie BLH nie uczestniczy w ochronie komórek HeLa przed toksycznością Hcy.

6. Ludzka hydrolaza bleomycyny nie ma istotnego udziału w hydrolizie tioaktonu Hcy w komórkach HeLa. Istnieją prawdopodobnie inne enzymy o aktywności tioaktonazowej, których udział w hydrolizie HTL jest większy niż BLH.

- **Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji w białkach *in vitro* i *in vivo***

1. Niektóre reszty lizyny w białkach ulegają preferencyjnej modyfikacji tioaktonem Hcy – zidentyfikowano 7 reszt Lys w albuminie ludzkiej ulegających N-homocysteinyłacji: Lys 4, Lys 12, Lys 137, Lys 205, Lys 212 oraz potwierdzono preferencyjną modyfikację reszty Lys 525.

- w ludzkiej hemoglobinie zidentyfikowano dwie N-homocysteinyłowane reszty lizyny: Lys 16 w łańcuchu α oraz Lys 17 w łańcuchu β.

- w ludzkim fibrynogenie zidentyfikowano natomiast 9 reszt Lys, które ulegają modyfikacji tioaktonem Hcy: Lys 78, 224, 418, 429, 448, 562 i 606 w łańcuchu Aα oraz Lys 47 oraz Lys 393 w łańcuchu Bβ.

2. Za pomocą metody LC-MS/MS wykazano, że peptydy zawierające zmodyfikowane reszty Lys są wykrywalne w surowicy ludzkiej pacjentów z chorobą wieńcową serca oraz z mutacjami w genie *CBS*.

3. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na istnienie istotnej statystycznie korelacji pomiędzy całkowitym stężeniem Hcy a ilością peptydu albuminy zawierającego zmodyfikowaną Lys 525 w surowicach pacjentów z mutacjami w genie *CBS* oraz w surowicach pacjentów z chorobą wieńcową serca (poziom istotności  $p < 0,05$ ).

4. Ilość peptydu albuminy zawierającego zmodyfikowaną Lys 525 jest 3-krotnie większa w surowicach pacjentów z mutacją w genie *CBS* niż u pacjentów bez tej mutacji, a różnica ta jest istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Część wyników uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej została opublikowana w następujących publikacjach:

Zimny, J., **Sikora, M.**, Guranowski, A., Jakubowski, H., *Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase*. J Biol Chem, 2006. 281(32): p. 22485-92.

**Sikora, M.**, H. Jakubowski, *Homocysteine editing and growth inhibition in Escherichia coli*. Microbiology, 2009. 155(Pt 6): p. 1858-65.

## 6. Literatura

1. Brosnan, J., Jacobs, RL, Stead LM, Brosnan, ME, *Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism*. Acta Biochim Pol., 2004. **51**(2): p. 405-13.
2. Jakubowski, H., *Homocysteine-thiolactone and S-nitroso-homocysteine mediate incorporation of homocysteine into protein in humans*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(11): p. 1462-6.
3. Jakubowski, H., *Molecular basis of homocysteine toxicity in humans*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(4): p. 470-87.
4. Jakubowski, H., *The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(12): p. 1704-16.
5. Jakubowski, H., *Proofreading in vivo. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17672-3.
6. Jakubowski, H., *Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4504-8.
7. Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., Bassler, B. L., *The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule*. Mol Microbiol, 2001. **41**(2): p. 463-76.
8. Roe, A.J., O'Byrne, C., McLaggan, D., Booth, I. R., *Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 7): p. 2215-22.
9. Tuite, N.L., K.R. Fraser, and P. O'Byrne C, *Homocysteine toxicity in Escherichia coli is caused by a perturbation of branched-chain amino acid biosynthesis*. J Bacteriol, 2005. **187**(13): p. 4362-71.
10. Booth, I.R., *Regulation of cytoplasmic pH in bacteria*. Microbiol Rev, 1985. **49**(4): p. 359-78.
11. Stratford, M. and P.A. Anslow, *Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'*. Lett Appl Microbiol, 1998. **27**(4): p. 203-6.
12. Roe, A.J., McLaggan, D., Davidson, I., O'Byrne, C., Booth, I. R., *Perturbation of anion balance during inhibition of growth of Escherichia coli by weak acids*. J Bacteriol, 1998. **180**(4): p. 767-72.
13. Clarke, R., Daly, L., Robinson, K., Naughten, E., Cahalane, S., Fowler, B., Graham, I., *Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(17): p. 1149-55.
14. McCully, K.S., *Homocysteine and vascular disease*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 386-9.
15. Yoo, J.H. and S.C. Lee, *Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke*. Atherosclerosis, 2001. **158**(2): p. 425-30.
16. Kang, S.S., P.W. Wong, and M.R. Malinow, *Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease*. Annu Rev Nutr, 1992. **12**: p. 279-98.
17. den Heijer, M., Koster, T., Blom, H. J., Bos, G. M., Briet, E., Reitsma, P. H., Vandenbroucke, J. P., Rosendaal, F. R., *Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis*. N Engl J Med, 1996. **334**(12): p. 759-62.
18. Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S. D., Sadovsky, Y., Nelson, D. M., *Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction?* Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(2): p. 563-71.
19. Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W., Wolf, P. A., *Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2002. **346**(7): p. 476-83.
20. Hossain, G.S., van Thienen, J. V., Werstuck, G. H., Zhou, J., Sood, S. K., Dickhout, J. G., de Koning, A. B., Tang, D., Wu, D., Falk, E., Poddar, R., Jacobsen, W., Zhang, K., Kaufman, R. J., Austin, R. C., *TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30317-27.
21. Buemi, M., Marino, D., Di Pasquale, G., Floccari, F., Ruello, A., Aloisi, C., Corica, F., Senatore, M., Romeo, A., Frisina, N., *Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid*. Thromb Res, 2001. **104**(3): p. 207-13.
22. McCully, K.S., *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*. Am J Pathol, 1969. **56**(1): p. 111-28.
23. Wilcken, D.E. and B. Wilcken, *The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism*. J Clin Invest, 1976. **57**(4): p. 1079-82.
24. Brattstrom, L.E., J.E. Hardebo, and B.L. Hultberg, *Moderate homocysteinemia--a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease*. Stroke, 1984. **15**(6): p. 1012-6.



25. Stampfer, M.J., Malinow, M. R., Willett, W. C., Newcomer, L. M., Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P. V., Hennekens, C. H., *A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians.* *Jama*, 1992. **268**(7): p. 877-81.
26. Mudd, S.H., Havlik, R., Levy, H. L., McKusick, V. A., Feinleib, M., *Cardiovascular risk in heterozygotes for homocystinuria.* *Am J Hum Genet*, 1982. **34**(6): p. 1018-21.
27. Jakubowski, H., Perla-Kajan, J., Finnell, R. H., Cabrera, R. M., Wang, H., Gupta, S., Kruger, W. D., Kraus, J. P., Shih, D. M., *Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice.* *Faseb J*, 2009. **23**(6): p. 1721-7.
28. Chen, Z., Karaplis, A. C., Ackerman, S. L., Pogribny, I. P., Melnyk, S., Lussier-Cacan, S., Chen, M. F., Pai, A., John, S. W., Smith, R. S., Bottiglieri, T., Bagley, , W., Selhub, J., Rudnicki, M. A., James, S. J., Rozen, R., *Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition.* *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(5): p. 433-43.
29. Wang, G., Woo, C. W., Sung, F. L., Siow, Y. L., O, K., *Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(11): p. 1777-83.
30. Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M. J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M., McQueen, M. J., Probstfield, J., Fodor, G., Held, C., Genest, J., Jr., *Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease.* *N Engl J Med*, 2006. **354**(15): p. 1567-77.
31. Strauss, K.A., Morton, D. H., Puffenberger, E. G., Hendrickson, C., Robinson, D. L., Wagner, C., Stabler, S. P., Allen, R. H., Chwatko, G., Jakubowski, H., Niculescu, M. D., Mudd, S. H., *Prevention of brain disease from severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency.* *Mol Genet Metab*, 2007. **91**(2): p. 165-75.
32. Lentz, S.R., *Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis.* *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(8): p. 1646-54.
33. Refsum, H., Ueland, P. M., Nygard, O., Vollset, S. E., *Homocysteine and cardiovascular disease.* *Annu Rev Med*, 1998. **49**: p. 31-62.
34. Ueland, P.M., Nygard, O., Vollset, S. E., Refsum, H., *The Hordaland Homocysteine Studies.* *Lipids*, 2001. **36 Suppl**: p. S33-9.
35. van der Gaag, M.S., Ubbink, J. B., Sillanaukee, P., Nikkari, S., Hendriks, H. F., *Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine.* *Lancet*, 2000. **355**(9214): p. 1522.
36. Yang, Q., Botto, L. D., Erickson, J. D., Berry, R. J., Sambell, C., Johansen, H., Friedman, J. M., *Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002.* *Circulation*, 2006. **113**(10): p. 1335-43.
37. Wald, D.S., M. Law, and J.K. Morris, *Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis.* *Bmj*, 2002. **325**(7374): p. 1202.
38. Undas, A., Stępień, E., Glowacki, R., Tisończyk, J., Tracz, W., Jakubowski, H., *Folic acid administration and antibodies against homocysteinylation in subjects with hyperhomocysteinemia.* *Thromb Haemost*, 2006, in press. **96**: p. 342-7.
39. Saposnik, G., Ray, J. G., Sheridan, P., McQueen, M., Lonn, E., *Homocysteine-lowering therapy and stroke risk, severity, and disability: additional findings from the HOPE 2 trial.* *Stroke*, 2009. **40**(4): p. 1365-72.
40. Tawakol, A., Omland, T., Gerhard, M., Wu, J. T., Creager, M. A., *Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans.* *Circulation*, 1997. **95**(5): p. 1119-21.
41. McDowell, I.F. and D. Lang, *Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease.* *J Nutr*, 2000. **130**(2S Suppl): p. 369S-372S.
42. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines.* *Toxicology*, 2000. **147**(2): p. 69-75.
43. Zhang, C., Cai, Y., Adachi, M. T., Oshiro, S., Aso, T., Kaufman, R. J., Kitajima, S., *Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response.* *J Biol Chem*, 2001. **276**(38): p. 35867-74.
44. Harpel, P.C., Zhang, X., Borth, W., *Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis.* *J Nutr*, 1996. **126**(4 Suppl): p. 1285S-9S.
45. Harker, L.A., Ross, R., Slichter, S. J., Scott, C. R., *Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis.* *J Clin Invest*, 1976. **58**(3): p. 731-41.

46. Wang, H., Yoshizumi, M., Lai, K., Tsai, J. C., Perrella, M. A., Haber, E., Lee, M. E., *Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25380-5.
47. Jakubowski, H., *Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 377S-381S.
48. Jakubowski, H., *Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(10): p. 1011-4.
49. Weiss, N., Heydrick, S., Zhang, Y. Y., Bierl, C., Cap, A., Loscalzo, J., *Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 34-41.
50. Upchurch, G.R., Jr., Welch, G. N., Fabian, A. J., Freedman, J. E., Johnson, J. L., Keaney, J. F., Jr., Loscalzo, J., *Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17012-7.
51. Poddar, R., Sivasubramanian, N., DiBello, P. M., Robinson, K., Jacobsen, D. W., *Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease*. Circulation, 2001. **103**(22): p. 2717-23.
52. Raposo, B., Rodriguez, C., Martinez-Gonzalez, J., Badimon, L., *High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells*. Atherosclerosis, 2004. **177**(1): p. 1-8.
53. Hofmann, M.A., Lalla, E., Lu, Y., Gleason, M. R., Wolf, B. M., Tanji, N., Ferran, L. J., Jr., Kohl, B., Rao, V., Kisiel, W., Stern, D. M., Schmidt, A. M., *Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model*. J Clin Invest, 2001. **107**(6): p. 675-83.
54. Jourdeuil-Rahmani, D., Rolland, P. H., Rosset, E., Branchereau, A., Garcon, D., *Homocysteine induces synthesis of a serine elastase in arterial smooth muscle cells from multi-organ donors*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(3): p. 597-602.
55. Hill, C.H., R. Mecham, and B. Starcher, *Fibrillin-2 defects impair elastic fiber assembly in a homocysteinemic chick model*. J Nutr, 2002. **132**(8): p. 2143-50.
56. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
57. Glowacki, R. and H. Jakubowski, *Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 10864-71.
58. Christodoulou, J., P.J. Sadler, and A. Tucker, *A new structural transition of serum albumin dependent on the state of Cys34. Detection by 1H-NMR spectroscopy*. Eur J Biochem, 1994. **225**(1): p. 363-8.
59. Svardal, A., H. Refsum, and P.M. Ueland, *Determination of in vivo protein binding of homocysteine and its relation to free homocysteine in the liver and other tissues of the rat*. J Biol Chem, 1986. **261**(7): p. 3156-63.
60. Chambers, J.C., Ueland, P. M., Wright, M., Dore, C. J., Refsum, H., Kooner, J. S., *Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects*. Circ Res, 2001. **89**(2): p. 187-92.
61. Barbato, J.C., Catanescu, O., Murray, K., DiBello, P. M., Jacobsen, D. W., *Targeting of metallothionein by L-homocysteine: a novel mechanism for disruption of zinc and redox homeostasis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 49-54.
62. Stabler, S.P. and R.H. Allen, *Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry*. Clin Chem, 2004. **50**(2): p. 365-72.
63. Devlin, A.M., Bottiglieri, T., Domann, F. E., Lentz, S. R., *Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia*. J Biol Chem, 2005. **280**(27): p. 25506-11.
64. Jakubowski, H., *Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1991. **10**(3): p. 593-8.
65. Lewin, B., *Genes VIII*. 2004.
66. Netzler, D., *Biochemistry*. 2003.
67. Zubay, G., *Biochemistry*. 1997.
68. Jakubowski, H. and E. Goldman, *Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells*. FEBS Lett, 1993. **317**(3): p. 237-40.
69. Roybal, C.N., Yang S., Sun, C. W., Hurtado, D., Vander Jagt, D. L., Townes, T. M., Abcouwer, S. F., *Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism*

- involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14844-52.
70. Kerkeni, M., Tnani, M., Chuniaud, L., Miled A., Maaroufi, K., Trivin, F., *Comparative study on in vitro effects of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: evidence for a stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone*. Mol Cell Biochem, 2006. **291**(1-2): p. 119-26.
  71. Huang, R.F., Huang, S. M., Lin, B. S., Wei, J. S., Liu, T. Z., *Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells*. Life Sci, 2001. **68**(25): p. 2799-811.
  72. Najib, S. and V. Sanchez-Margalet, *Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(1): p. 119-26.
  73. Langmeier, M., Folbergrova, J., Haugvicova, R., Pokorný, J., Mares, P., *Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats*. Epilepsia, 2003. **44**(3): p. 299-304.
  74. Greene, N.D., L.E. Dunlevy, and A.J. Copp, *Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos*. Anat Embryol (Berl), 2003. **206**(3): p. 185-91.
  75. Endo, N., Nishiyama, K., Otsuka, A., Kanouchi, H., Taga, M., Oka, T., *Antioxidant activity of vitamin B6 delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats*. Br J Nutr, 2006. **95**(6): p. 1088-93.
  76. Jakubowski, H. and A.R. Fersht, *Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases*. Nucleic Acids Res, 1981. **9**(13): p. 3105-17.
  77. Jakubowski, H., *Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels*. Faseb J, 1999. **13**(15): p. 2277-83.
  78. Jakubowski, H., *Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis*. J Nutr, 2001. **131**(11): p. 2983S-7S.
  79. Jakubowski, H., *Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21813-6.
  80. Jakubowski, H., *Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels*. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 1935-42.
  81. Van Aerts LA, K.H., Postma NS, Pertijs JC, Copius-Peerboom JH, Eskes TH, *Stereospecific in vitro embryotoxicity of L-homocysteine in pre- and postimplantation rodent embryos*. Toxic in Vitro, 1993. **7**: p. 743-9
  82. Drunat, S., Moatti, N., Paul, J. L., Cogne, A., Benoit, M. O., Demuth, K., *Homocysteine-induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products*. Eur J Biochem, 2001. **268**(20): p. 5287-94.
  83. Jakubowski, H., *The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples*. Anal Biochem, 2002. **308**(1): p. 112-9.
  84. Sauls, D.L., Lockhart, E., Warren, M. E., Lenkowski, A., Wilhelm, S. E., Hoffman, M., *Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia*. Biochemistry, 2006. **45**(8): p. 2480-7.
  85. Perla-Kajan, J., Marczak, L., Kajan, L., Skowronek, P., Twardowski, T., Jakubowski, H., *Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome C*. Biochemistry, 2007. **46**(21): p. 6225-31.
  86. Jakubowski, H., G.H. Boers, and K.A. Strauss, *Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylated protein levels in humans*. Faseb J, 2008. **22**(12): p. 4071-6.
  87. Mallamaci, F., Zoccali, C., Tripepi, G., Fermo, I., Benedetto, F. A., Cataliotti, A., Bellanuova, I., Malatino, L. S., Solderini, A., *Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 609-14.
  88. Perna, A.F., Satta, E., Acanfora, F., Lombardi, C., Ingrosso, D., De Santo, N. G., *Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2006. **69**(5): p. 869-76.
  89. Anderson, J.L., Muhlestein, J. B., Horne, B. D., Carlquist, J. F., Bair, T. L., Madsen, T. E., Pearson, R. R., *Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease*. Circulation, 2000. **102**(11): p. 1227-32.
  90. Perla, J., Undas, A., Twardowski, T., Jakubowski, H., *Purification of antibodies against N-homocysteinylated proteins by affinity chromatography on Nomega-homocysteinyl-aminohexyl-Agarose*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **807**(2): p. 257-61.

91. Perła-Kajan, J., Stanger, O., Ziółkowska, A., Malendowicz, LK, Twardowski, T, Jakubowski, H, *Immunohistochemical detection of N-homocysteinylated proteins in cardiac surgery patients*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**: p. A36.
92. Naruszewicz, M., Mirkiewicz, E, Oleszewski, AJ, McCully, KS, *Thiolation of low-density lipoprotein by homocysteine-thiolactone causes increased aggregation and interaction with cultured macrophages*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 1994. **4**: p. 70-77.
93. Wang, L., Kallenbach, N. R., *Proteolysis as a measure of the free energy difference between cytochrome c and its derivatives*. Protein Sci, 1998. **7**(11): p. 2460-4.
94. Perna, A.F., Satta, E., Acanfora, F., Lombardi, C., Ingrosso, D., De Santo, N. G., *Increased plasma protein homocysteinylolation in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2006. **69**(5): p. 869-76.
95. Jacobsen, D.W., *Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease*. Clin Chem, 1998. **44**(8 Pt 2): p. 1833-43.
96. Hajjar, K.A., Mauri, L., Jacovina, A. T., Zhong, F., Mirza, U. A., Padovan, J. C., Chait, B. T., *Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9987-93.
97. Danesh, J., Danesh, J., Lewington, S., Thompson, S. G., Lowe, G. D., Collins, R., Kostis, J. B., Wilson, A. C., Folsom, A. R., Wu, K., Benderly, M., Goldbourt, U., Willeit, J., Kiechl, S., Yarnell, J. W., Sweetnam, P. M., Elwood, P. C., Cushman, M., Psaty, B. M., Tracy, R. P., Tybjaerg-Hansen, A., Haverkate, F., de Maat, M. P., Fowkes, F. G., Lee, A. J., Smith, F. B., Salomaa, V., Harald, K., Rasi, R., Vahtera, E., Jousilahti, P., Pekkanen, J., D'Agostino, R., Kannel, W. B., Wilson, P. , Tofler, G., Arocha-Pinango, C. L., Rodriguez-Larralde, A., Nagy, E., Mijares, M., Espinosa, R., Rodriguez-Roa, E., Ryder, E., Diez-Ewald, M. P., Campos, G., Fernandez, V., Torres, E., Marchioli, R., Valagussa, F., Rosengren, A., Wilhelmsen, L., Lappas, G., Eriksson, H., Cremer, P., Nagel, D., Curb, J. D., Rodriguez, B., Yano, K., Salonen, J. T., Nyssonen, K., Tuomainen, T. P., Hedblad, B., Lind, P., Loewel, H., Koenig, W., Meade, T. W., Cooper, J. A., De , Stavola, B., Knottenbelt, C., Miller, G. J., Bauer, K. A., Rosenberg, R. Det al., *Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis*. Jama, 2005. **294**(14): p. 1799-809.
98. Sauls, D.L., Lockhart, E., Warren, M. E., Lenkowski, A., Wilhelm, S. E., Hoffman, M, *Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia*. Biochemistry, 2006. **45**(8): p. 2480-7.
99. Jakubowski, H., *Pathophysiological consequences of homocysteine excess*. J Nutr, 2006. **136**(6 Suppl): p. 1741S-1749S.
100. Collet, J.P., Park, D., Lesty, C., Soria, J., Soria, C., Montalescot, G., Weisel, J. W., *Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1354-61.
101. Hanss, M. and F. Biot, *A database for human fibrinogen variants*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 89-90.
102. Undas, A., Brozek, J., Jankowski, M., Siudak, Z., Szczeklik, A, Jakubowski, H., *Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1397-404.
103. Kaufman, R.J., *Orchestrating the unfolded protein response in health and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1389-98.
104. Austin, R.C., S.R. Lentz, and G.H. Werstuck, *Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S56-64.
105. Roybal, C.N., Yang S., Sun, C. W., Hurtado, D., Vander Jagt, D. L., Townes, T. M., Abcouwer, S. F, *Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14844-52.
106. Jakubowski, H., Perla-Kajan, J., Finnell, R. H., Cabrera, R. M., Wang, H., Gupta, S., Kruger, W. D., Kraus, J. P., Shih, D. M, *Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylolation in mice*. Faseb J, 2009.
107. Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C., Vignini, A., Nanetti, L., Curatola, G., *Effect of homocysteinylolation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells*. J Cell Biochem, 2004. **92**(2): p. 351-60.
108. Perla-Kajan, J., Stanger, O., Luczak, M., Ziolkowska, A., Malendowicz, L. K., Twardowski, T., Lhotak, S., Austin, R. C., Jakubowski, H., *Immunohistochemical detection of N-homocysteinylated proteins in humans and mice*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(7): p. 473-9.

109. Undas, A., Perla, J., Lacinski, M., Trzeciak, W., Kazmierski R., Jakubowski, H., *Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis*. Stroke, 2004. **35**(6): p. 1299-304.
110. Chwatko, G., Boers, G. H., Strauss, K. A., Shih, D. M., Jakubowski, H., *Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice*. Faseb J, 2007. **21**(8): p. 1707-13.
111. Undas, A., Jankowski, M., Twardowska, M., Padjas, A., Jakubowski, H., Szczeklik, A., *Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men*. Thromb Haemost, 2005. **93**(2): p. 346-50.
112. Chwatko, G., Jakubowski, H., *Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans*. Clin Chem, 2005. **51**(2): p. 408-15.
113. Jakubowski, H., W.T. Ambrosius, and J.H. Pratt, *Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis*. FEBS Lett, 2001. **491**(1-2): p. 35-9.
114. Jakubowski, H., *Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylolation*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 3957-62.
115. Tward, A., Xia, Y. R., Wang, X. P., Shi, Y. S., Park, C., Castellani, L. W., Lusis, A. J., Shih, D. M., *Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice*. Circulation, 2002. **106**(4): p. 484-90.
116. Jakubowski, H., Zhang, L., Bardeguet, A., Aviv, A., *Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylolation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis*. Circ Res, 2000. **87**(1): p. 45-51.
117. Domaga<sup>3</sup>a, T.B., Łacinski, M., Trzeciak, W.H., Mackness, B., Mackness, M.I., Jakubowski, H., *The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (pon1) protein with coronary heart disease status*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2006. **52**: p. 3-9.
118. Mikael, L.G., J. Genest, Jr., and R. Rozen, *Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease*. Circ Res, 2006. **98**(4): p. 564-71.
119. Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R. A., Curatola, G., *Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2957-62.
120. Jaouad, L., C. Milochevitch, and A. Khalil, *PONI paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity*. Free Radic Res, 2003. **37**(1): p. 77-83.
121. Papassotiropoulos, A., Bagli, M., Jessen, F., Frahnert, C., Rao, M. L., Maier, W., Heun, R., *Confirmation of the association between bleomycin hydrolase genotype and Alzheimer's disease*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(2): p. 213-5.
122. Suszynska, J., Tisonczyk, J., Lee, HG., Smith, MA., Jakubowski, H. , *Reduced Homocysteine-Thiolactonase Activity in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis. , 2010 Epub ahead of print.
123. Wang, H., Ramotar, D., *Cellular resistance to bleomycin in Saccharomyces cerevisiae is not affected by changes in bleomycin hydrolase levels*. Biochem Cell Biol, 2002. **80**(6): p. 789-96.
124. Zimny, J., Sikora, M., Guranowski, A., Jakubowski, H., *Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22485-92.
125. Jakubowski, H. and A. Guranowski, *Metabolism of homocysteine-thiolactone in plants*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6765-70.
126. Bromme, D., Rossi, A. B., Smeekens, S. P., Anderson, D. C., Payan, D. G., *Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional expression, and enzymatic characterization*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6706-14.
127. Jakubowski, H., *Facile syntheses of [35S]homocysteine-thiolactone, [35S]homocystine, [35S]homocysteine, and [S-nitroso-35S]homocysteine*. Anal Biochem, 2007. **370**(1): p. 124-6.
128. Sikora, M. and H. Jakubowski, *Homocysteine editing and growth inhibition in Escherichia coli*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 6): p. 1858-65.
129. Hwang, B.J., Woo, K. M., Goldberg, A. L., Chung, C. H., *Protease Ti, a new ATP-dependent protease in Escherichia coli, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits*. J Biol Chem, 1988. **263**(18): p. 8727-34.
130. Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marszalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C., Zylicz, M., *The ClpX heat-shock protein of Escherichia coli, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone*. Embo J, 1995. **14**(9): p. 1867-77.

131. Ingraham, J.L., Maaløe, O. & Neidhardt, F. C. , *Growth of the bacterial cell.* . Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1983.
132. Jakubowski, H., *Energy cost of proofreading in vivo: the charging of methionine tRNAs in Escherichia coli.* Faseb J, 1993. **7**(1): p. 168-72.
133. Zimny, J., Iwanowska, D., Starzynska, E., Jakubowski, H. and Guranowski, A, *Homocysteine thiolactone is a substrate of bleomycin hydrolase/cysteine protease/gal6 protein.* Clin. Chem. Lab. Med., 2005. **43**: p. A 23.
134. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution.* Protein Eng, 1999. **12**(6): p. 439-46.
135. Savino, C., Miele, A. E., Draghi, F., Johnson, K. A., Sciara, G., Brunori, M., Vallone, B., *Pattern of cavities in globins: The case of human hemoglobin.* Biopolymers, 2009.
136. Medved, L. and W. Nieuwenhuizen, *Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin.* Thromb Haemost, 2003. **89**(3): p. 409-19.
137. Tsurupa, G. and L. Medved, *Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains.* Biochemistry, 2001. **40**(3): p. 801-8.
138. Nieuwenhuizen, W., Vermond, A., Voskuilen, M., Traas, D. W., Verheijen, J. H., *Identification of a site in fibrin(ogen) which is involved in the acceleration of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator.* Biochim Biophys Acta, 1983. **748**(1): p. 86-92.
139. Koopman, J., Haverkate, F., Grimbergen, J., Lord, S. T., Mosesson, M. W., DiOrio, J. P., Siebenlist, K. S., Legrand, C., Soria, J., Soria, C., et al., *Molecular basis for fibrinogen Dusart (A alpha 554 Arg-->Cys) and its association with abnormal fibrin polymerization and thrombophilia.* J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1637-43.
140. Marchi, R., Lundberg, U., Grimbergen, J., Koopman, J., Torres, A., de Bosch, N. B., Haverkate, F., Arocha Pinango, C. L., *Fibrinogen Caracas V, an abnormal fibrinogen with an Aalpha 532 Ser-->Cys substitution associated with thrombosis.* Thromb Haemost, 2000. **84**(2): p. 263-70.
141. Gorkun, O.V., Henschen-Edman, A. H., Ping, L. F., Lord, S. T., *Analysis of A alpha 251 fibrinogen: the alpha C domain has a role in polymerization, albeit more subtle than anticipated from the analogous proteolytic fragment X.* Biochemistry, 1998. **37**(44): p. 15434-41.
142. Biemann, K., *Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation.* Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 455-79.

**7. Wykaz skrótów**

AARS	syntetaza aminoacylo-tRNA
ADMA	dimetyloarginina
Ala	alanina
AMP	monofosforan adenozyne
ApoB	apolipoproteina B
ApoE	apolipoproteina E
APS	nadsiarczan amonu
Arg	arginina
ARPE-19	ludzka linia komórek nabłonka barwnikowego siatkówki
ATF-4	aktywujący czynnik transkrypcyjny 4
ATP	trójfosforan adenozyne
BHMT	metylotransferaza betaina : homocysteina
BLH	hydrolaza bleomycyny
CAD	choroba wieńcowa serca
CBS	$\beta$ -syntaza cystationiny
CHO	komórki jajnika chomika chińskiego
Cys	cysteina
D,L – [ <sup>35</sup> S] HTL	znakowany radioaktywnie tiolakton homocysteiny
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DPD	4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione
DTT	ditiotreitól
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
ER	siateczka śródplazmatyczna
ESI	jonizacja przez elektrorozpraszanie
FBS	bydlęca surowica płodowa
GAPDH	dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa
GRP78	białko szoku cieplnego 70 kDa
GRP94	białko szoku cieplnego 90 kDa
GTP	trójfosforan guanozyne
HAEC	ludzkie komórki śródbłonka aorty

hBLH	ludzka hydrolaza bleomycyny
Hcy	homocysteina
Hcy-AMP	adenylan homocysteiny
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości
HeLa	ludzkie komórki raka szyjki macicy
HL-60	ludzkie komórki białaczki promielocytowej
Hse	homoseryna
HTL	tiolakton homocysteiny
HUVEC	ludzkie komórki śródbłonna naczyń krwionośnych
IAA	amid kwasu jodooctowego
IgG	immunoglobulina klasy G
Ile	izoleucyna
IleRS	syntetaza izoleucyno-tRNA
KLH	hemocyjanina skałoczepu morskiego
KMV	$\alpha$ -keto- $\beta$ -metylvalerat
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości
Leu	leucyna
LeuRS	syntetaza leucylo-tRNA
LOX	oksydaza lizynowa
LuxS	S-rybozylohomocysteinaza
Lys	lizyna
MALDI-ToF	jonizacja laserowa wspomagana matrycą z detekcją czasu przelotu
Met	metionina
MetRS	syntetaza metionylo-tRNA
NO	tlenek azotu
NOS	syntaza tlenku azotu
MS	syntaza metioniny
MTHF	N <sup>5</sup> -metylotetrahydrofolian
MTHFR	reduktaza N <sup>5</sup> -metylotetrahydrofolianu
OPA	o-ftalaldehyd
Orn	ornityna
PBS	bufor fosforanowy
PON1	paraoksonaza



PVDF	polifluorek winylidenu
RAG	komórki raka nerki myszy
R-AMC	arginino aminometylokumarylamid
RNA	kwasy rybonukleinowe
ROS	reaktywne formy tlenu
SAH	S-adenozylhomocysteina
SAM	S-adenozylometionina
SCX	chromatografia kationowymienna
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z dodecylsiarczanem sodu
shRNA	kwasy rybonukleinowe o strukturze krótkiej spinki do włosów
S-nitrozo-Hcy	S-nitrozo homocysteina
TD	deaminaza treoniny
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodwuamina
tHcy	całkowita homocysteina
THF	tetrahydrofolian
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu
Trp	tryptofan
UPR	odpowiedź na niesfałdowane białka
Val	walina
VCAM-1	molekuła adhezyjna śródbłonna naczyń krwionośnych
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych
yBLH	drożdżowa hydrolaza bleomycyny

## 8. Wykaz rysunków i tabel

**Rysunki:**

<b>Rysunek 1.</b> Schemat przedstawiający metabolizm Hcy u ludzi.....	8
<b>Rysunek 2.</b> Schemat ścieżki biosyntezy metioniny u <i>E.coli</i> .....	10
<b>Rysunek 3.</b> Prawdopodobne mechanizmy rozwoju chorób układu krążenia związane z Hcy.....	15
<b>Rysunek 4.</b> Addukty Hcy z białkami osocza .....	18
<b>Rysunek 5.</b> Wzór strukturalny tiolaktonu homocysteiny .....	22
<b>Rysunek 6.</b> Tworzenie tiolaktonu Hcy na drodze cyklizacji Hcy~AMP katalizowane przez MetRS .....	22
<b>Rysunek 7.</b> Schemat reakcji N-homocysteinyłacji białek .....	25
<b>Rysunek 8.</b> N-homocysteinyłowane reszty lizyny w fibrynogenie.....	31
<b>Rysunek 9.</b> Schemat trawienia białek modelowych oraz surowicy ludzkiej za pomocą trypsyny, w celu identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji <i>in vitro</i> .....	47
<b>Rysunek 10.</b> Schemat poszczególnych etapów izolacji enzymu o aktywności tiolaktonazowej z łożyska ludzkiego.....	53
<b>Rysunek 11.</b> Inhibicja wzrostu i kumulacja tiolaktonu Hcy w hodowlach <i>E.coli</i> , do których dodawano D,L-Hcy.....	64
<b>Rysunek 12.</b> Poziom tiolaktonu Hcy nie wzrasta w kulturach <i>E.coli</i> hodowanych w obecności octanu.....	66
<b>Rysunek 13.</b> Dodatek izoleucyny, leucyny lub metioniny przyspiesza wzrost hodowli <i>E.coli</i> prowadzonych z dodatkiem Hcy.....	69
<b>Rysunek 14.</b> Szybkość wzrostu zależy od kumulacji tiolaktonu Hcy.....	71
<b>Rysunek 15.</b> Hcy wpływa na przeżywalność bakterii <i>E.coli</i> .....	75
<b>Rysunek 16.</b> Profile elucji białek w poszczególnych etapach izolacji enzymu .....	79
<b>Rysunek 17.</b> Monitorowanie aktywności HTL-azowej oraz aminopeptydazowej na płytkach TLC po rozdziale na kolumnie Superdex200 .....	80
<b>Rysunek 18.</b> Detekcja aktywności hydrolizującej R-AMC, po elektroforezie w 8% żelu poliakrylamidowym, w warunkach natywnych .....	81
<b>Rysunek 19.</b> 12% żel denaturujący, SDS-PAGE oczyszczonej tiolaktonazy z łożyska ludzkiego ..	81
<b>Rysunek 20.</b> Tiolakton Hcy jest znacznie bardziej toksyczny dla komórek HeLa niż Hcy.....	83
<b>Rysunek 21.</b> Synteza HTL w komórkach HeLa inkubowanych z 20 mM Hcy .....	84
<b>Rysunek 22.</b> Poziom ekspresji BLH oraz GAPDH po zastosowaniu metody Western Blot .....	85
<b>Rysunek 23.</b> Obniżenie ekspresji genu hydrolazy bleomycyny nie wpływa na przeżywalność komórek HeLa pod wpływem tiolaktonu Hcy .....	87
<b>Rysunek 24.</b> Szybkość hydrolizy tiolaktonu Hcy w komórkach HeLa zachodzi niezależnie od poziomu ekspresji hydrolazy bleomycyny.....	87

<b>Rysunek 25.</b> Widma masowe natywnej albuminy ludzkiej, przed modyfikacją (A) oraz zmodyfikowanej 66-krotnym nadmiarem molowym HTL (B).....	92
<b>Rysunek 26.</b> Widma masowe hemoglobiny ludzkiej przed modyfikacją HTL: (A) łańcuch alfa, (B) łańcuch beta oraz (C) łańcuch alfa po modyfikacji HTL.....	94
<b>Rysunek 27.</b> Widma masowe peptydów albuminy zawierających lizyny z przyłączoną Hcy.....	99
<b>Rysunek 28.</b> Widma masowe peptydów N-Hcy-albuminy zawierające zmodyfikowaną resztę Lys 525 (A) oraz resztę Lys 4 (B), po rozdiale na kolumnie C18 za pomocą HPLC.....	100
<b>Rysunek 29.</b> Sekwencja aminokwasów albuminy ludzkiej .....	101
<b>Rysunek 30.</b> Struktura przestrzenna ludzkiej albuminy (monomer), narysowana wg 1bm0.pdb	102
<b>Rysunek 31.</b> Widma masowe peptydów hemoglobiny ludzkiej zawierających zmodyfikowane reszty lizyny .....	102
<b>Rysunek 32.</b> Struktura przestrzenna ludzkiej hemoglobiny, narysowana wg 2W6V.pdb ..	104
<b>Rysunek 33.</b> Przykładowe widma masowe peptydów fibrynogenu zawierających zmodyfikowane reszty lizyny .....	106
<b>Rysunek 34.</b> Widma fragmentacyjne peptydów albuminy o masach 1228,6 Da (A i B) oraz 1301,7 Da (C) .....	110
<b>Rysunek 35.</b> Wykres pokazujący ilość zmodyfikowanego peptydu 1228,6 Da zawierającego Lys 137(A) oraz peptydu o masie 1301,7 Da (B) w zależności od stężenia HTL w reakcji N-homocysteinytacji Przykładowe chromatogramy po rozdiale LC/MS peptydów albuminy zmodyfikowanej <i>in vitro</i> .....	111
<b>Rysunek 36.</b> Wykres pokazujący ilość zmodyfikowanego peptydu 1228,6 Da zawierającego Lys 137(A) oraz peptydu o masie 1301,7 Da (B) w zależności od stężenia HTL w reakcji N-homocysteinytacji .....	112
<b>Rysunek 37.</b> Przykładowe widma masowe N-homocysteinylowanych peptydów w surowicy ludzkiej (zawierającej 27 $\mu$ M tHcy), analizowanych za pomocą LC/MS .....	113
<b>Rysunek 38.</b> Wykres przedstawiający korelację między całkowitym stężeniem Hcy a ilością peptydu albuminy o masie 1301,7 Da w surowicach pacjentów posiadających mutacje w genie <i>CBS</i> .....	115
<b><u>Tabele:</u></b>	
<b>Tabela 1.</b> Przygotowanie żeli poliakrylamidowych .....	52
<b>Tabela 2.</b> Produkcja HTL przez poszczególne szczepy <i>E.coli</i> .....	63
<b>Tabela 3.</b> Poziom Hcy N-związanej z białkami <i>E.coli</i> .....	73
<b>Tabela 4.</b> Specyficzność substratowa ludzkiej hydrolazy bleomycyny/tiolaktonazy .....	82
<b>Tabela 5.</b> Peptydy fibrynogenu, w których zidentyfikowano lizyny ulegające N-homocysteinytacji <i>in vitro</i> .....	106

**Tabela 6.** Charakterystyka chorych, których surowice przeanalizowano pod względem ilości jonu 651,8 m/z (ze zmodyfikowaną Lys 525).....114