



**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ**  
Polskiej Akademii Nauk

mgr inż. Jacek Wróblewski

# **„Zaburzenia sygnalizacji płciowej u myszy z deficytem syntazy $\beta$ -cystationiny”**

Praca doktorska  
wykonana pod kierunkiem  
prof. dr hab. Hieronima Jakubowskiego  
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

POZNAŃ 2019

1.	Wstęp .....	4
1.1.	Homocysteina.....	7
1.2.	Hiperhomocysteinemia .....	8
1.3.	Tiolakton homocysteiny .....	10
1.4.	Wpływ Hcy na zdrowie .....	10
1.5.	Homocysteina a rozród .....	11
1.6.	Mysie modele hiperhomocysteinemii.....	11
1.7.	Rozmnażanie u myszy.....	13
1.7.1.	Zachowania seksualne u myszy.....	13
1.7.2.	Białka MUP .....	15
	Budowa i Funkcja.....	15
	Genetyka .....	16
1.7.2.1.	Kompleks zgodności tkankowej.....	19
1.7.2.2.	Feromony - substancje lotne.....	19
2.	Cel pracy .....	21
3.	Materiały i metody .....	22
3.1.	Materiały .....	22
3.1.1.	Materiał badawczy .....	22
3.1.2.	Ważniejsze odczynniki.....	24
3.1.3.	Enzymy .....	24
3.1.4.	Materiały do transferu Western Blot .....	24
3.1.5.	Przeciwciała i testy ELISA.....	24
3.1.6.	Roztwory .....	24
3.1.7.	Ważniejsza aparatura .....	27
3.2.	Metody .....	28
3.2.1.	Pomiar stężenia białka całkowitego metodą taninową .....	28
3.2.2.	Pomiar stężenia kreatyniny w moczu .....	28
3.2.3.	Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) ..	28
3.2.4.	Przygotowanie prób białek moczu mysiego do analizy metodami spektrometrii mas ..	29
3.2.5.	Izolacja białek .....	29
3.2.6.	Western Blot .....	30
3.2.7.	Izolacja RNA.....	31
3.2.8.	Real-Time RT-qPCR .....	32
3.2.9.	Analiza poziomu testosteronu w moczu myszy .....	34

3.2.10. Analizy behawioralne .....	35
3.2.11. Spektrometria mas .....	36
4. Wyniki.....	38
4.1. Stężenie białka całkowitego w moczu myszy .....	38
4.2. Analiza jakościowa białek MUP .....	38
4.2.1. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących ..	38
4.3. Spektrometria mas .....	40
4.4. Western blot – analiza ilościowa białek MUP w ekstraktach tkankowych .....	47
4.4.1. Analiza wpływu genotypu na produkcję białek w wątrobie .....	47
4.4.2. Analiza poziomu białek MUP w nerkach .....	49
4.5. Real-Time RT qPCR .....	51
4.5.1. Poziom transkrypcji genów <i>mup</i> .....	52
4.5.2. Poziom transkrypcji genu <i>Zhx2</i> .....	57
4.5.3. Poziom transkrypcji genów wybranych receptorów hormonów u samic .....	58
4.6. Analiza poziomu testosteronu metodą ELISA .....	64
4.7. Analizy behawioralne .....	64
4.7.1. Analiza zainteresowania śladem zapachowym .....	64
4.7.2. Analiza odpowiedzi hormonalnej na podłoże od osobników płci przeciwnej .....	66
5. Dyskusja.....	69
6. Wnioski.....	76

## Wykaz skrótów

AMP	adenozylomonofosforan
BLMH	hydrolaza bleomycyny
BPHL	hydrolaza bisfenolu
CBS	Syntetaza $\beta$ -cystationinowa
CSE	$\gamma$ -liaza cystationinowa
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
Hcy	homocysteina
HDL	lipoproteina wysokiej gęstości
HHcy	hiperhomocysteinemia
HTL	tiolakton homocysteiny
MAT	S-adenozylotransferaza metioninowa
Met	metionina
MetRS	syntetaza metionilo-tRNA
MHC	główny układ zgodności tkankowej
MS	syntaza metioninowa
MTHFR	syntetaza metylenotetrahydrofolianu
N-Hcy	N-związana homocysteina
PON1	paraoksonaza 1
SAH	S-adenozylu-homocysteina
SAM	S-adenozylu-metionina
S-Hcy	S-związana homocysteina
tHcy	'całkowita homocysteina', ang. 'Total Hcy'
THF	tetrahydrofolian

## Streszczenie

Białka MUP są produkowane w wątrobie i wydzielane w moczu wielu ssaków. Biorą one udział w sygnalizacji zapachowej poprzez wiązanie wysoce lotnych cząsteczek feromonów. Niektóre z białek z tej rodziny również samodzielnie mogą wywołać odpowiedź behawioralną. Poziom tych białek został ponadto powiązany z tempem metabolizmu, wydatkowaniem energii oraz starzeniem się.

Homocysteina (Hcy), będąca niebiałkowym aminokwasem, produkowana jest w organizmie z metioniny i może być metabolizowana do innych aminokwasów siarkowych. Na drodze modyfikacji potranslacyjnych może być również włączana do białek. Dzieje się to przez modyfikacje reszt lizynowych przez wysoce reaktywny metabolit Hcy – tiolakton homocysteiny, bądź poprzez formowanie mostków disiarczkowych z cysteiną.

Podwyższony poziom Hcy w osoczu – hiperhomocysteinemia (HHcy) oraz w moczu (homocystynuria), zostały powiązane nie tylko z chorobami układu krążenia i neurodegeneracyjnymi, ale także z zaburzeniami przebiegu ciąży, rozwoju płodowego u ludzi, a nawet niepłodnością, obserwowaną u samic myszy z ciężką genetyczną HHcy.

W niniejszej dysertacji badano jak HHcy wpływa na ekspresję białek MUP i sygnalizację płciową u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, powszechnie używanego modelu HHcy. W tym celu przeanalizowano poziomy białek MUP w moczu, wątrobach i nerkach. Określono również poziomy mRNA dla tych białek, a także czynników, które mogą regulować ich ekspresję. Zmiany w składzie proteomu moczu potwierdzono za pomocą spektrometrii mas. Dodatkowo, wpływ obserwowanych zmian jakościowych oraz ilościowych na funkcjonowanie systemu sygnalizacji płciowej zbadano w testach behawioralnych.

## **Abstract**

Major Urinary Proteins (MUPs), produced in the liver of many mammals, are excreted in the urine. They participate in scent signaling through binding of highly volatile pheromone molecules. Also, some MUPs can trigger behavioral response themselves. MUP levels have also been associated with metabolism rate, energy expenditure and senescence.

Non-protein amino acid Homocysteine (Hcy), is produced from dietary methionine and can be metabolized to other sulfur amino acids. It can also be incorporated into proteins either by post-translational modification of lysine residues through its highly reactive metabolite – Hcy thiolactone (HTL) or by forming disulfide bonds with cysteine residues.

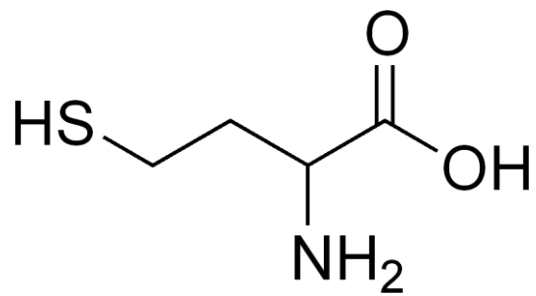
Elevated plasma Hcy (hyperhomocysteinemia, HHcy) as well as urinary Hcy (homocystinuria) are associated with pregnancy complications in humans and female infertility in mice with severe genetic HHcy.

This study investigates, how HHcy affects MUPs expression and scent signaling in *Cbs*<sup>-/-</sup> mice, a widely used model of HHcy. To achieve this, MUP protein levels were analyzed in urine, livers and kidneys. Also, their mRNA levels in livers was assessed, together with the mRNA levels of potential factors that might regulate MUP levels. Changes in MUP composition were confirmed with mass spectrometry. Additionally, impact of observed qualitative and quantitative changes on sexual signaling was examined in behavioral analysis.

# 1. Wstęp

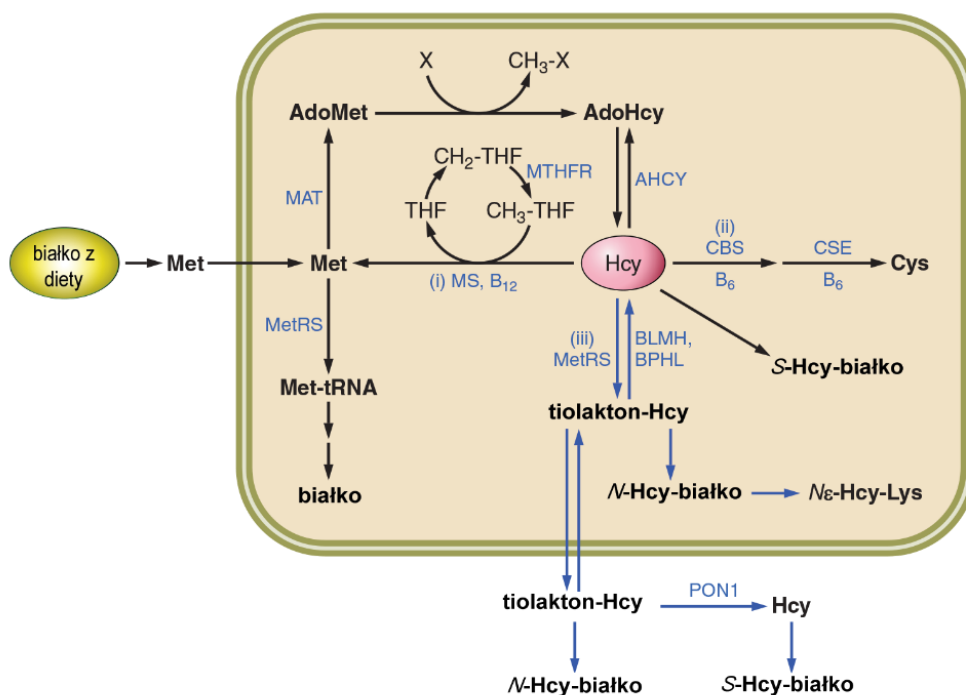
## 1.1. Homocysteina

Homocysteina (Hcy) (Rys. 1) jest niebiałkowym aminokwasem siarkowym, który powstaje w metabolizmie metioniny (Met). Ta ostatnia ulega adenylacji do S-Adenozylo-metioniny (SAM), która wykorzystywana jest w organizmie jako donor grupy metylowej – po jej oddaniu powstaje S-Adenozylo-Homocysteina (SAH). Po odłączeniu adenozyliny uwalniana jest cząsteczka Hcy. Proces przekształcania Hcy z powrotem do Met jest katalizowany przez enzym Syntazę metioninową (MS), przy udziale 5-metylenotetrahydrofolianu i witaminy B12. Hcy ulega również transsulfuracji do cysteiny, katalizowanej przez dwa enzymy, syntazę  $\beta$ -cystationinową (CBS) i  $\gamma$ -liazę cystationinowa (CSE) katalizuje przekształcenie cystationiny do cysteiny. Obydwie reakcje szlaku transsulfuracji Hcy



Rysunek 1. Wzór strukturalny cząsteczki homocysteiny

zachodzą przy udziale witaminy B6. W normalnych warunkach Hcy nie gromadzi się w organizmie, jednak nadmiar Met w pożywieniu, czy też upośledzenie funkcji enzymów powiązanych z metabolizmem Hcy prowadzi do jej akumulacji. Zwiększenie stosunku ilościowego Hcy/Met skutkuje zwiększoną częstością zachodzenia trzeciego szlaku metabolizmu Hcy – wskutek działania syntetazy metionylo-tRNA dochodzi do powstania tiolaktonu Hcy (HTL), który poprzez reakcję N-homocysteinylicacji przyłącza się do reszt lizynowych w białkach. Szlak ten został szerzej opisany w rozdziale 1.3. niniejszej rozprawy. Innym możliwym sposobem inkorporacji Hcy do białek jest S-homocysteinylicacja – Hcy może tworzyć mostki disiarczkowe z cysteiną w białkach. Metabolizm Hcy przedstawiony został na Rys. 2, poniżej.



Rysunek 2. Metabolizm Homocysteiny w organizmie człowieka. Zaznaczono szlak remetylacji (i), transsulfuracji (ii) oraz tiolaktonu Hcy (iii). Prostokąt symbolizuje komórkę, białe tło osocze, a owal układ pokarmowy. AdoMet-adenozylometionina, BPHL – enzym podobny do hydrolazy bisfenylu, CBS –  $\beta$ -syntaza cystationinowa, MAT-S-adenozylotransferaza metioninowa, Met – metionina, MetRS – syntetaza Metionilo-tRNA, MS – syntaza metioninowa, MTHFR- reduktaza metylenotetrahydrofolianu, THF- tetrahydrofolian, wg [1]

## 1.2. Hiperhomocysteinemia

Sumaryczne stężenie Hcy w postaci wolnej (zredukowanej) oraz związanej mostkami disiarczkowymi (utlenionej) określane jest jako całkowita Hcy (tHcy). Należy jednak zaznaczyć, że nazwa ta może być myląca, ponieważ obejmuje tylko Hcy, otrzymaną poprzez traktowanie próby czynnikiem redukującym – nie dotyczy zaś tiolaktonu Hcy, czy Hcy N-związanej z białkami lub lizyną.

Fizjologiczne stężenie tHcy mieści się w przedziale 5-15  $\mu\text{mol/L}$ . Stan, w którym dochodzi do podwyższenia stężenia Hcy w osoczu krwi powyżej tego poziomu nazywany jest hiperhomocysteinemią (HHcy). Genetyczny wariant tej choroby, uwarunkowany mutacjami genów kodujących enzymy biorące udział pośrednio lub bezpośrednio w metabolizmie Hcy nazywany jest homocystynurią. Nazwa tej choroby wywodzi się od faktu obserwacji w moczu chorych wysokiego stężenia homocysteiny. Wśród enzymów, których brak lub dysfunkcja prowadzi do omawianego stanu, należy wymienić: CBS, reduktazę



N - (5,10) - metylenotetrahydrofolianu (MTHFR), MS oraz hydrolazę SAH. Niedobór CBS jest wadą stosunkowo rzadką – na świecie występuje z częstością między 1:200 000 a 1:335 000, jednak częstość ta jest znacznie wyższa w krajach takich jak: Irlandia (1:65 000), Niemcy (1:17 800), Norwegia (1:6 400) czy Katar (1:1 800), wg danych NIH [2]. Objawy kliniczne homocystynurii obejmują zwężenie soczewki, upośledzenie umysłowe, anomalia szkieletowe podobne do obserwowanych w zespole Marfana, a także zakrzepica [3]. Genetyczna HHcy, spowodowana mutacjami genu *CBS* nazywana jest hiperhomocysteinemią ciężką, ponieważ dochodzi do znacznego przekroczenia normy tego aminokwasu. Lekka HHcy również może się jednak przyczynić się do powstania patologicznego stanu w organizmie, a obok mutacji w innych genach odpowiadających pośrednio za efektywność metabolizowania Hcy (np. gen *MTHFR*, kodujący enzym metylotransferazę tetrahydrofolianu, która poprzez metylację tetrahydrofolianu do metylenotetrahydrofolianu – donora reszty metylowej w reakcji remetylacji – umożliwia przekształcanie Hcy do Met), mogą ją powodować również uwarunkowania środowiskowe, takie jak np. nieodpowiednia dieta – bogata w czerwone mięso lub z niedostateczną ilością witamin z grupy B. Wykazano, że podwyższony poziom Hcy w osoczu krwi powiązany jest z obniżoną zdolnością poznawczą, demencją oraz chorobą Alzheimera [4], zakrzepicą i chorobami układu krwionośnego [5], komplikacjami w przebiegu ciąży oraz wadami wrodzonymi [6–9], czy też spadkiem jakości nasienia u mężczyzn [10].

Pomimo iż Hcy jest aminokwasem niebiałkowym, istnieją trzy potranslacyjne mechanizmy warunkujące obecność tego aminokwasu w białkach [1]. Pierwszy z nich wynika z obecności w cząsteczce grupy tiolowej, za pomocą której dochodzi do tworzenia się mostków siarczkowych z obecnymi w białkach grupami tiolowymi. Proces ten nazywany jest S – Homocysteinyłacją. U zdrowych ludzi, przyłączona w ten sposób do białek Hcy jest główną składową całkowitej Hcy w osoczu i przenoszona jest na białkach takich jak albumina [11] czy  $\gamma$ -globulina [12]. W mniejszych ilościach, S – związana Hcy (S-Hcy) występuje też na białkach takich jak transtyretyna [13], lipoproteina wysokiej gęstości (HDL) i kwaśna  $\alpha_1$ -glikoproteina [14]. U zdrowych ludzi, stężenie S-Hcy w osoczu kształtuje się na poziomie 10  $\mu$ M [15].

Drugi mechanizm polega na demetylacji reszt Met w białkach przez zredukowane jony miedzi ( $\text{Cu}^+$ ) lub żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) [16]. Trzeci mechanizm włączania Hcy do struktury białek wiąże się z jej enzymatyczną konwersją do tiolaktonu Hcy i jest omówiony w następnym rozdziale niniejszej pracy.

### 1.3. Tiolakton homocysteiny

Wskutek dwuetapowej reakcji katalizowanej przez syntetazę metionilo-tRNA (MARS). W pierwszym etapie Hcy jest aktywowana przez ATP tworząc Hcy-AMP. W drugim etapie zachodzi cyklizacja do tiolaktonu-Hcy poprzez powstanie wiązania tioestrowego pomiędzy grupą tiolową i karboksylową zaktywowanej Hcy w Hcy-AMP, z jednoczesnym usunięciem AMP z cząsteczki [17–21]. W przypadku nagromadzenia Hcy w organizmie zwiększa się również stężenie HTL, mimo tego, iż znane są enzymy mające zdolność hydrolizy HTL. Pierwszym z nich jest hydrolaza bleomycyny (BLMH) – enzym opisany jako rozkładający chemioterapeutyk – bleomycynę, działający wewnątrz komórki. Drugi z nich, paraoksonaza 1 (PON1) – jest zewnątrzkomórkową hydrolazą paraoksonu, kolejny to enzym podobny do ludzkiej hydrolazy bisfenylu (BPHL), który posiada najwyższą z poznanych aktywności tiolaktonazowych [22]. HTL z racji swojej wysokiej reaktywności zdolny jest do przyłączania się do grup ε-aminowych reszt lizynowych w białkach. Proces ten zwany jest N-homocysteinylacją i prowadzi do zmian strukturalnych i często upośledzenia funkcji zmodyfikowanych w ten sposób białek [23], może to również indukować stan zapalny [24,25], odpowiedź autoimmunologiczną [26–29], czy śmierć komórek [30,31]. Szlak tiolaktonu Hcy został przedstawiony na Rys 2.

### 1.4. Wpływ Hcy na zdrowie

Mutacje w genach powiązanych z metabolizmem Hcy, czy też czynniki środowiskowe, takie jak nieodpowiednia dieta (bogata w czerwone mięso), nadużywanie alkoholu lub palenie tytoniu [32] – prowadzą do powstania hiperhomocysteinemii. Stan ten można podzielić na trzy stopnie: HHcy lekka, pomiędzy 12 a 20 μmol/L, wywołana jest najczęściej przez niedobory witamin z grupy B, istotnych w konwersji Hcy do innych aminokwasów. U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek obserwuje się wariant umiarkowany, w przedziale stężeń Hcy 20-100 μmol/L. Ciężka HHcy natomiast jest obserwowana jedynie u osób z mutacjami mocno upośledzającymi metabolizm Hcy, głównie w genie *Cbs*, a stężenia Hcy obserwowane w osoczu krwi sięgają wartości powyżej 100 μmol/L [33]. Spektrum opisanych schorzeń wywołanych HHcy skupia się na chorobach układu krwionośnego, takich jak zakrzepica [34–

36], choroba naczyniowo-sercowa [37–39], czy udar niedokrwienny [5,40]. Wykazano również wpływ HHcy na układ nerwowy – tempo atrofii mózgu zwiększa się wraz ze wzrostem poziomu Hcy, a efekt ten można zmniejszyć poprzez suplementację witaminami z grupy B [41]. Liczne badania wykazują zależność pomiędzy poziomem tHcy, a występowaniem chorób neurodegeneracyjnych oraz zmniejszoną zdolnością poznawczą [42–46]. Zaobserwowano też powstawanie złogów przypominających  $\beta$ -amyloid, powstających wskutek działania HTL – N-homocysteinylicacji [31,47]. Autopsja pacjentów z chorobą Alzheimera oraz demencją ujawniła, że mieli oni zwiększony poziom N-Homocysteinylicacji białek *tau* oraz MAP1 [48].

## 1.5. Homocysteina a rozród

Wśród wielu negatywnych skutków nadmiaru Hcy na zdrowie – zaczynają się również wyłaniać negatywny wpływ HHcy na rozród. Już pierwsze opisane przypadki homocystynurii [49,50] pozwalały wnioskować, że Hcy wpływa niekorzystnie na rozwój płodowy człowieka, a chorzy na homocystynurię są upośledzeni umysłowo i wykazują wiele wad wrodzonych, takich jak arachnodaktylię, dolichostenomelię, wysoko wysklepione podniebienie, stopę wydrążoną, oraz zwichnięcie soczewki oka. Ponadto zaobserwowano u nich stan zapalny w nerkach oraz rozwój nadciśnienia w młodym wieku.

Podwyższony poziom Hcy u matki został natomiast powiązany ze zwiększonym występowaniem stanu przedrzucawkowego [51–53], poronień [54–56], przedwczesnych porodów [57], a także zmniejszoną wagą noworodków [58]. Trzeba również zaznaczyć, iż mysz model homocystynurii, homozygotyczne myszy z *knock-outem* genu *Cbs* są nieplodne, a homozygotyczne potomstwo cechuje się wysoką śmiertelnością po urodzeniu [59,60].

## 1.6. Mysie modele hiperhomocysteinemii

Z racji problematyczności prowadzenia badań populacyjnych na ludziach, a także niepełnym przełożeniu doświadczeń *in vitro* na cały organizm w badaniach często używane są zwierzęta laboratoryjne. Wśród nich, organizmem modelowym najczęściej wybieranym do badań na ssakach jest mysz domowa, *Mus musculus*, która od dawna wykorzystywana jest w laboratoriach z uwagi na łatwość hodowli, pokrewieństwo filogenetyczne oraz podobną fizjologię do ludzkiej czy też dostępność wielu różnorodnych szczepów [61]. Wśród istotnych

z punktu widzenia badań nad chorobami genetycznymi nie bez znaczenia jest również zsekwencjonowany genom i łatwość otrzymywania myszy o pożądanym cechach poprzez modyfikacje genetyczne.

Najczęściej używanym mysim modelem ciężkiej hiperhomocysteinemii są myszy z knock-outem genu *Cbs*, u których gen ten został całkowicie wyłączony, jednak wprowadzony został dodatkowo konstrukt zawierający gen ludzkiej B-syntazy cystationinowej z mutacją, która jedynie upośledza funkcję białka – kontrolowany przez promotor mMT-I, aktywowany jonami cynku. W ten sposób, podając po urodzeniu młodych roztwór  $ZnCl_2$  w wodzie do picia – udaje się zwiększyć przeżywalność miotu, jednocześnie jednak efekty *knock-out'u* ujawniają się dość szybko, co ułatwia prowadzenie badań z wykorzystaniem tych myszy [62,63]. Ich fenotyp jest dość charakterystyczny – oprócz hiperhomocysteinemii (średni poziom tHcy to  $250\mu M$ ) występuje łysienie w obszarze twarzoczaszki, myszy mają wydłużone palce, obserwowana jest mniejsza masa ciała niż u myszy heterozygotycznych, a także rozwija się u nich stłuszczenie wątroby [60].

Innym wykorzystywanym modelem HHcy są myszy z knock-outem genu reduktazy metylenotetrahydrofolianu [64–66], co ciekawe, samce *Mthfr*<sup>-/-</sup> są nieplodne, ale efekt knock-outu tego genu częściowo niweluje suplementacja betainą [67]. U homozygot obserwuje się ponadto zmniejszoną masę ciała, krótszy ogon, często o nieprawidłowym kształcie, co często obserwowane jest w mysim modelu defektów cewy nerwowej (NTD), myszy ct [68]. Oprócz zaburzeń neuropatologicznych i zwiększonego odkładania się tłuszczu w aorcie, sporadycznie występuje kifoza. Homozygoty cechuje też wolniejszy rozwój – futro pojawiało się u nich 5 dni później niż u myszy typu dzikiego, opóźnione było również dojrzewanie zewnętrznych narządów płciowych, co nie wpływało jednak na ich zdolność rozrodczą [64].

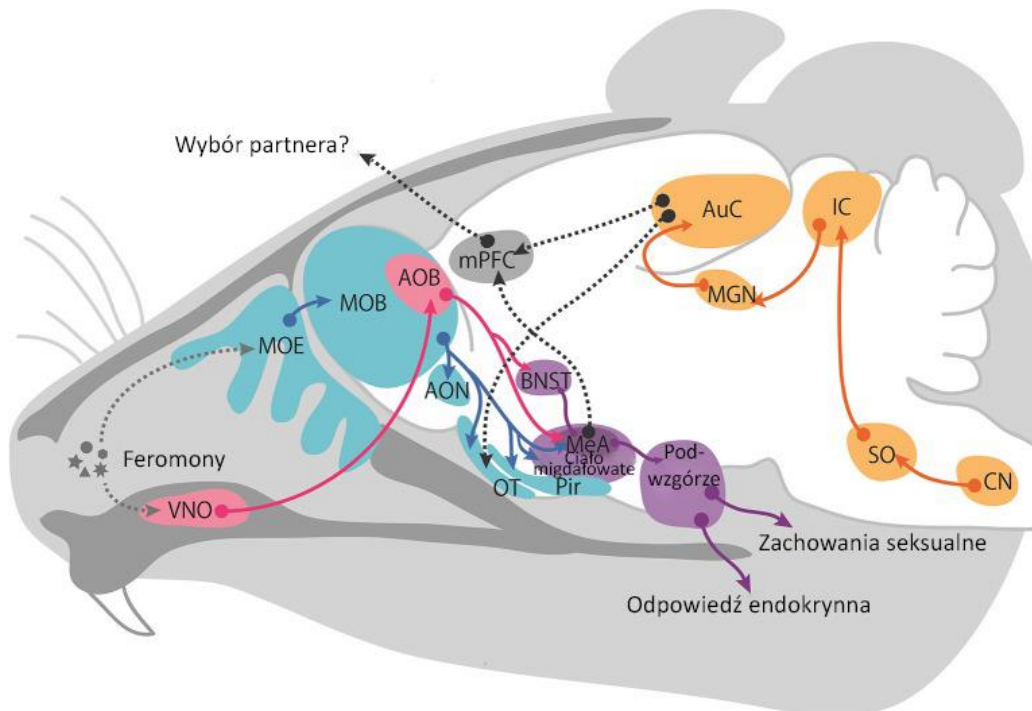
Oprócz modeli genetycznych tej choroby – często stosowanymi w badaniach są myszy hodowane z użyciem specjalnej diety. Ponieważ wiadomo, iż homocysteina produkowana jest w organizmie z metioniny, w celu wywołania HHcy myszy prowadzone są na dietach wysokometioninowych. Inny model zakłada dietę zawierającą homocysteinę, czy też jej tiolakton. Można również spotkać się z badaniami, które zakładają dootrzewnowe podawanie roztworu Hcy [69–71], czy HTL [72].

## **1.7. Rozmnażanie u myszy**

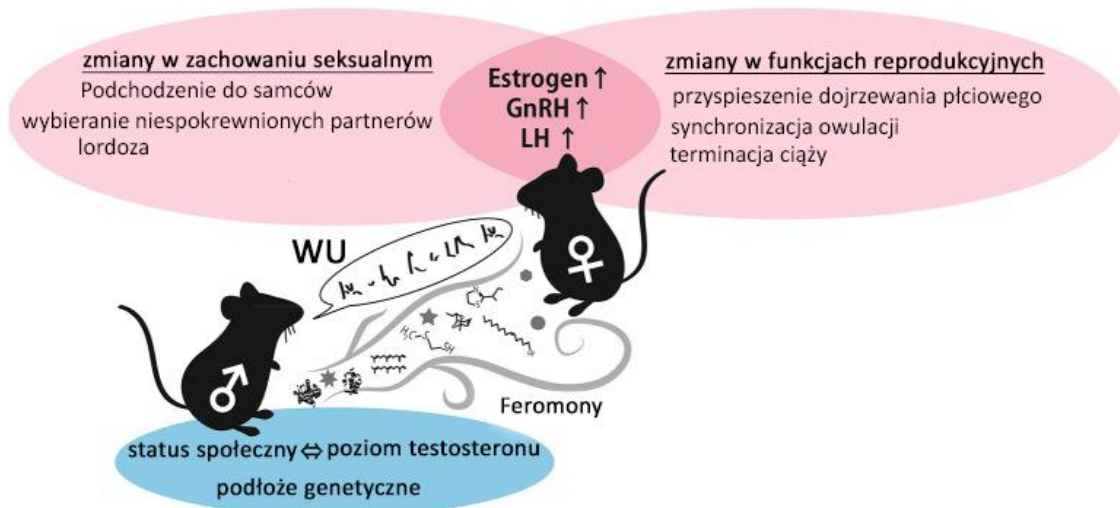
Oprócz występowania podobieństwa anatomicznego – myszy posiadają ważne z punktu widzenia fizjologii człowieka organy o zbliżonej budowie, również geny kodujące białka mysie są średnio w 85% identyczne z ludzkimi. Dzięki temu badania prowadzone na tych zwierzętach są dobrym modelem do opisywania analogicznych problemów u ludzi. Niniejsza praca skupia się wokół tematu rozrodu, toteż zasadne wydaje się opisanie mechanizmów związanych z tym zagadnieniem u myszy, a białka MUP mają potencjał wykorzystania jako markery zaburzeń rozrodu.

### **1.7.1. Zachowania seksualne u myszy**

Myszy są zwierzętami społecznymi. Oznacza to, że tworzą hierarchię i sieci powiązań społecznych między sobą. Jako zwierzęta nocne natomiast – mają słabo rozwinięty wzrok, a więc ich zachowania i interakcje polegać muszą na innych zmysłach, wśród których jednym z najistotniejszych jest zmysł powonienia. Nie są jednak znane dokładne mechanizmy, które rządzą zachowaniem seksualnym u myszy. Wiadomo jednak, że preferencje w doborze partnera oraz kopulacja są zależne od feromonów i podlegają synchronizacji z owulacją, co zapewnia sukces reprodukcyjny. Na system sygnalizacji seksualnej u myszy składa się kilka elementów – są to między innymi wydzielane z moczem lotne feromony, białka MUP, a także szereg krótkich peptydów pochodzących od białek głównego układu zgodności tkankowej (MHC), prawdopodobnie niosący informacje charakterystyczne dla danego osobnika. Funkcjonowanie systemu sygnalizacji seksualnej przedstawiono na rysunkach poniżej (Rys 3 i 4). Elementy sygnałowe tego układu zawarto w tabeli (Rys. 5).



Rysunek 3. Zaproponowany przez Asaba i in. [73] schemat reakcji na samcze sygnały seksualne i wokalizowanie u samic. Kolorem różowym zaznaczono łańcuch lemieszowo-nosowy, łańcuch węchowy – kolorem niebieskim, łańcuch słuchowy – żółtym, a linia szara przerywana reprezentuje możliwy łańcuch zintegrowany. Skróty: opuszka węchowa (AOB), wewnętrzne jądro węchowe (AON), kora słuchowa (AuC), Jądro łożyskowe prążka krańcowego (BNST), jądra ślimakowe (CN), wzgórek dolny (IC), środkowe ciało migdałowe (MeA), ciało kolankowate przyśrodkowe (MGN), główna opuszka węchowa (MOB), główny nabłonek węchowy (MOE), środkowa kora przedczołowa (mPFC), guzek węchowy (OT), kora gruszkowata (Pir), jądro oliwkowe górne przyśrodkowe (SO), narząd lemieszowo-nosowy (VNO).



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie elementów sygnalizacji seksualnej u myszy [73]. Wokalizacja ultradźwiękowa (WU) i regulowane przez testosteron feromony samców wpływają na zachowania seksualne i funkcje reprodukcyjne u samic poprzez zwiększenie poziomu estrogenu, gonadoliberyny (GnRH) i hormonu luteinizującego (LH).

	Feromony	Źródło	Organy sensoryczne	Efekt
Nielotne	ESP1	Płyn łzowy samców	NLN	Lordoza
	Darcyna	Mocz	NLN	Uwaga seksualna samic
Lotne	$\alpha$ - i $\beta$ - Farnezyany	Gruczoł napletkowy samców	NLN NW	Indukcja owulacji, przyspieszenie dojrzewania płciowego, atraktant samic
	DHB 2,3-dehydro-exo-brewikomina	Mocz	NLN	Indukcja owulacji, przyspieszenie dojrzewania płciowego, atraktant samic
	SBT 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol	Mocz	NLN	Indukcja owulacji, przyspieszenie dojrzewania płciowego, atraktant samic
	MTMT (Metyltio)metanetiol	Mocz	NW	Atraktant samic
	Z5-14:OH (Z)-5-tetradecen-1-ol	Gruczoł napletkowy samców	NW	Atraktant samic
	Estrogeny	Mocz	?	przyspieszenie dojrzewania płciowego, terminacja ciąży

Rysunek 5. Przegląd feromonów, ich działania oraz miejsca wydzielania u myszy. Tabela wg [73]

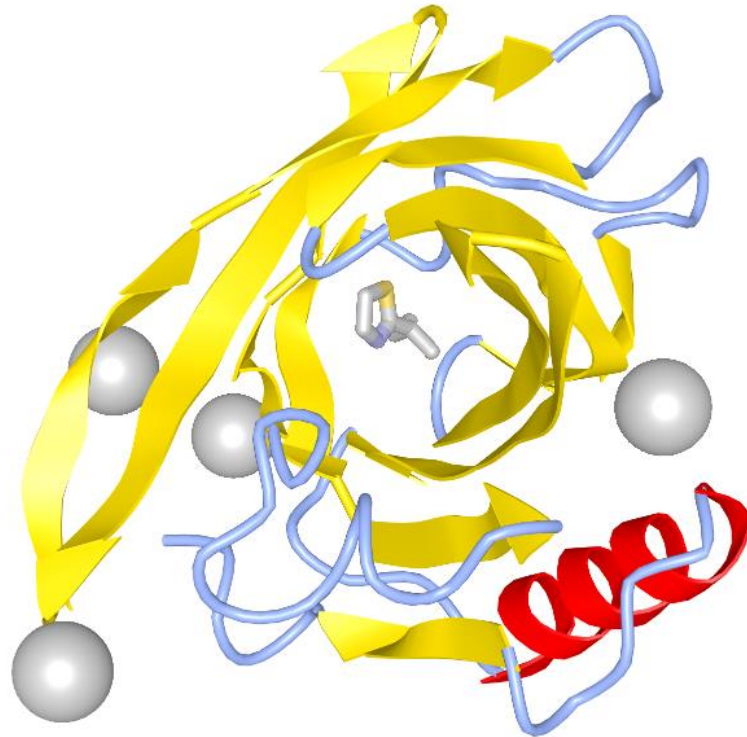
### 1.7.2. Białka MUP

Proteinuria u człowieka jest stanem patologicznym i świadczy o zaburzonej pracy nerek, toteż podczas pierwszych prób przeniesienia badań nad niewydolnością nerek na model myszy [74] i szczurzy [75] doniesiono, iż białko w moczu występuje u gryzoni w wysokich stężeniach. Nie podjęto jednak prób wyjaśnienia tego fenomenu aż do lat 60-tych XX wieku, kiedy ukazały się pierwsze publikacje na temat białek w moczu u gryzoni [76,77]. Obecne w moczu myszy białka są wysoce homologiczną grupą co najmniej 21 białek z rodziny lipokalin i noszą nazwę głównych białek moczu (*ang. Major Urinary Proteins*), czy też  $\alpha$ 2u-globulin, opisywanych w literaturze skrótem MUP. Oprócz myszy i szczurów, gdzie pełną one ważną rolę w sygnalizacji chemicznej, znaleziono je także u wielu innych ssaków łżyskowych.

#### Budowa i Funkcja

Białka należące do rodziny MUP (Rys. 6) pełnią kilka funkcji, wśród których najważniejszą wydaje się być przenoszenie sygnałów płciowych – odpowiadają one za transport i spowolnione uwalnianie do środowiska [78] wysoce lotnych cząsteczek feromonów, takich jak specyficznie wydzielane wyłącznie w moczu: 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol (w skrócie SBT lub DHT), 6-hydroksy-6-metylo-3-heptanon (HMH) oraz 2,3-dehydro-exo-brewikomina (DHB). Te niewielkie (około 20kDa) białka należą do rodziny lipokalin [79], zbudowane są z 8 beta-harmonijek ułożonych w antyrównoległą beta beczułkę, otwartą z jednej strony, z alfa helisami

na obu końcach, w ten sposób tworzy się wewnątrz struktury III-rzędowej swoista kieszeń, do której wnętrza mogą się wiązać z wysokim powinowactwem wymienione wcześniej lotne cząsteczki feromonów.



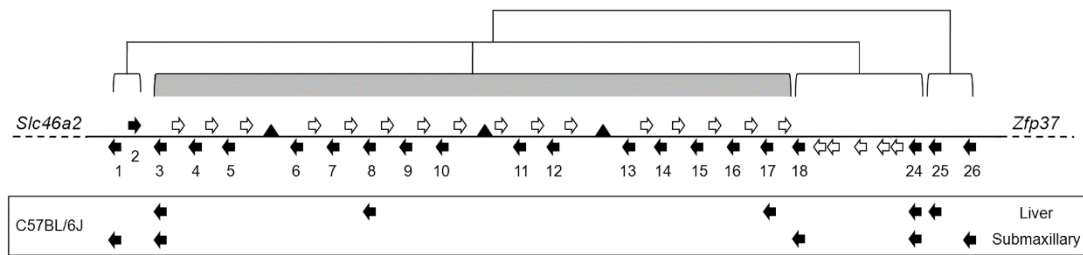
Rysunek 6. Struktura trójwymiarowa białka Mup-I (produkt genu Mup9) z widoczną cząsteczką feromonu SBT wg [80]. Cząsteczka feromonu ulega wiązaniu wewnątrz środowiska hydrofobowego na jednym z końców B-beczułki, uformowanym przez boczne łańcuchy reszt Phe56, Leu58, Leu60, Ile63, Leu72, Phe 74, Met87, Val100, Tyr102, Phe108, Ala121, Leu123, Leu134, and Tyr138. Z prekursorowego białka MUP-I, o długości 180aa odcięto 18 reszt aminokwasowych od N-końca. Struktura zdeponowana w bazie Protein Data Bank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1I06>

Pomimo różnic w składzie aminokwasowym, wiązanie danej cząsteczki feromonu nie jest determinowane rodzajem białka MUP – różnice w sekwencji I-rzędowej dotyczą głównie aminokwasów, które w III-rzędowej białka znajdują się na powierzchni zewnętrznej i nie wpływają na powinowactwo do ligandu [81].

## Genetyka

Białka MUP kodowane są u myszy przez geny *Mup* zlokalizowane na chromosomie 4, w klastrze obejmującym 21 genów oraz 20 pseudogenów, przedstawionym na rycinie poniżej (Rys. 7).



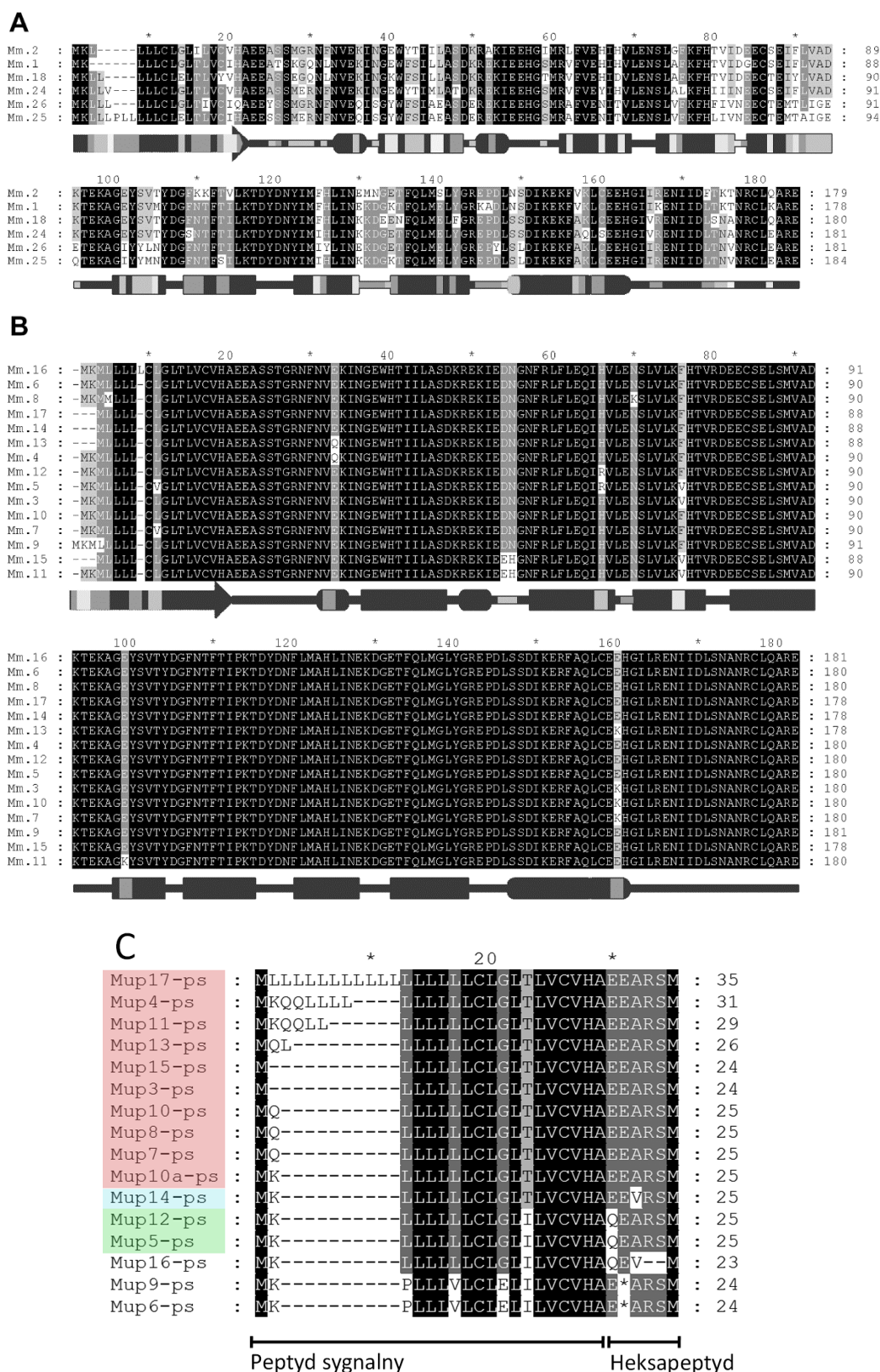


Rysunek 7. Schematycznie przedstawiony klaster genów oraz pseudogenów *Mup* u myszy C57BL/6J. Strzałkami przedstawiono kierunek odczytu dla każdego z genów (strzałka czarna) oraz pseudogenów (strzałka biała). Klaster znajduje się na chromosomie 4, pomiędzy genami *Slc46a2*, a *Zfp37*, wg [82].

## Różnorodność białek MUP

Dane literaturowe na temat białek MUP mówią o ich znacznym zróżnicowaniu – już w 1982 roku opublikowano doniesienie o różnicach w profilach tych białek w moczu pomiędzy szczepami laboratoryjnymi myszy – pomimo obecności takiej samej liczby genów *Mup* [83]. W literaturze opisywane są jako grupa 14-20 różnych białek, co może sugerować, iż są one wykorzystywane przez myszy do identyfikacji osobniczej – tezę tę popierają publikacje [84,85] – myszy uczą się osobniczych informacji zapachowych, a wprowadzone przez badaczy zmiany w indywidualnych profilach białek MUP powodowały zmiany w rozpoznawaniu informacji osobniczych, co nie miało miejsca w przypadku modyfikacji elementów głównego układu zgodności tkankowej. Hipotezę odwrotną natomiast prezentuje podejście Thoß i wsp. [86] – sugerujące iż wariacja w genach *Mup* pomiędzy dzikimi osobnikami myszy jest na tyle niewielka, że geny te raczej nie mogą służyć do rozróżniania osobników – po zbadaniu zróżnicowania sekwencji mikrosatelitarnych w obrębie klastra genów *Mup* okazało się, że cechują się one nadzwyczaj niskim zróżnicowaniem allelicznym w porównaniu do 18 innych markerów otaczających klaster genów *Mup*.

Pomimo niskiego zróżnicowania allelicznego genów *Mup*, ilość genów kodujących białka MUP jest znaczna. Same sekwencje białkowe, będące produktem translacji tych genów są do siebie bardzo podobne, a różnice między poszczególnymi białkami są często na poziomie pojedynczych aminokwasów. Zróżnicowanie sekwencji aminokwasowych w rodzinie białek MUP przedstawiają ryciny poniżej (Rys. 8).



Rysunek 8. Zróznicowanie sekwencji aminokwasowych białek MUP. A – ułożone sekwencje aminokwasowe białek MUP klasy A, B – ułożone sekwencje aminokwasowe białek MUP klasy B, C – ułożone sekwencje pseudogenów klasy B z zaznaczonymi kodonami stop (\*) oraz przerwami (-). Kolorami wyszczególniono trzy różne sekwencje heksapeptydowe, które mogą być potencjalnymi produktami pseudogenów. Kolorem czarnym zaznaczono sekwencje o najmniejszej zmienności, kolorem szarym o pośredniej i kolorem białym o największej zmienności. Poniżej sekwencji schematycznie przedstawiono odcinany peptyd sygnalny w formie strzałki, prostokąt symbolizuje region β-harmoninki, a owal – α-helisy, za [82].

### 1.7.2.1. Kompleks zgodności tkankowej

Pomimo przenoszenia informacji o płci czy działania jako feromony – białka MUP mogą nie być nośnikiem informacji o stopniu pokrewieństwa między osobnikami, chociaż ich wysoka różnorodność u myszy mogłaby to sugerować. Prawdopodobnie funkcję taką pełną inne cząsteczki, regulowane przez główny kompleks zgodności tkankowej. Wyróżniono dwie grupy molekuł, potencjalnie wpływających na dobór partnera seksualnego u myszy. Pierwszą z nich stanowią małe, niejonowe lotne cząsteczki o masie poniżej 300Da, jednak mechanizm ich regulacji nie jest poznany. Na drugą grupę składają się krótkie, nietlone i jonowe ligandy peptydowe, często pochodzące z innych białek, w tym MHC oraz MUP, mogących stanowić system rozpoznawania osobników, które pozostawiły swój ślad zapachowy na długo po wyparowaniu jego lotnych składowych [87,88].

Ciekawym eksperymentem badającym krótkie peptydy zawierające motywy wiązane przez białka MHC, były badania Sturm i wsp. Grupa ta zidentyfikowała w moczu myszy 17 peptydów pasujących do motywów H2-K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup>, -K<sup>d</sup> lub -L<sup>d</sup>, co ciekawe jednak – peptydy te nie korespondowały z typem MHC badanych myszy, co sugeruje ich niezależną produkcję, lub obecność w moczu poniżej poziomu detekcji ( $10^{-11}$ M). Badacze odkryli obecność u myszy wysoce wyspecjalizowanych neuronów w narządzie lemieszowo-nosowym, które specyficznie rozpoznają wspomniane peptydy o stężeniach rzędu  $10^{-14}$  M – możliwe więc, że myszy w ten sposób rozpoznają inne osobniki o dużym stopniu pokrewieństwa [89].

### 1.7.2.2. Feromony - substancje lotne

Wśród substancji znajdujących się w składzie moczu mysiego należy również wyróżnić substancje lotne, sklasyfikowane jako feromony. Należy tu wymienić  $\alpha$ - i  $\beta$ -farnezeny, które są atraktantami dla samic i mogą wywoływać u nich owulację oraz przyspieszać dojrzewanie płciowe wraz z białkami MUP, a u samców pozwalają oznaczyć terytorialność [90,91]. Inne dobrze poznane feromony to 2-sec-butyl-4,5-dihydro-1,2,4-triazol oraz 3,4-dehydro-exo-brewikomina, których poziom regulowany jest przez testosteron. Po dodaniu ich do moczu wykastrowanych samców zwiększają jego atrakcyjność dla samic oraz mogą indukować owulację – co ciekawe jednak – by reakcja samic na te substancje miała miejsce – potrzebny

jest prawdopodobnie inny składnik obecny w moczu, który pełni rolę transportera do narządu lemieszowo-nosowego [91–94]. W moczu samców wykryto jeszcze metyltio-metanetiol (MTMT) [95] oraz (Z)-5-tetradecen-1-ol (Z5-14:OH) [96], które również są potencjalnie atrakcyjne dla samic i mają swoje receptory w opuszkach węchowych.

## 2. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy jest zbadanie wpływu hiperhomocysteinemii na sygnalizację seksualną u myszy poprzez realizację celów pośrednich. Na cele pośrednie składają się:

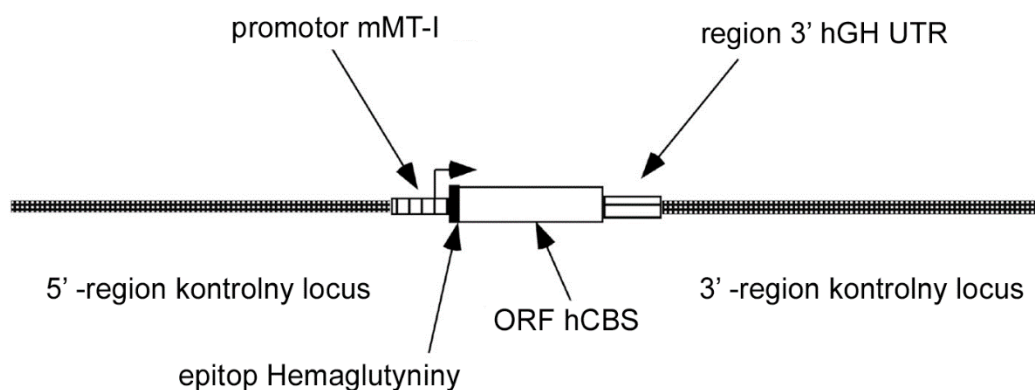
1. Zbadanie zmian ilościowych białek MUP, wywołanych *knock-outem* genu *Cbs*
2. Zbadanie zmian jakościowych w profilach białkowych moczu myszy typu *Cbs*<sup>-/-</sup>
3. Identyfikacja mechanizmów, które odpowiadają za regulację obserwowanych zmian jakościowych i ilościowych
4. Analiza zaburzeń w działaniu sygnalizacji seksualnej poprzez eksperymenty behawioralne.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Materiały

##### 3.1.1. Materiał badawczy

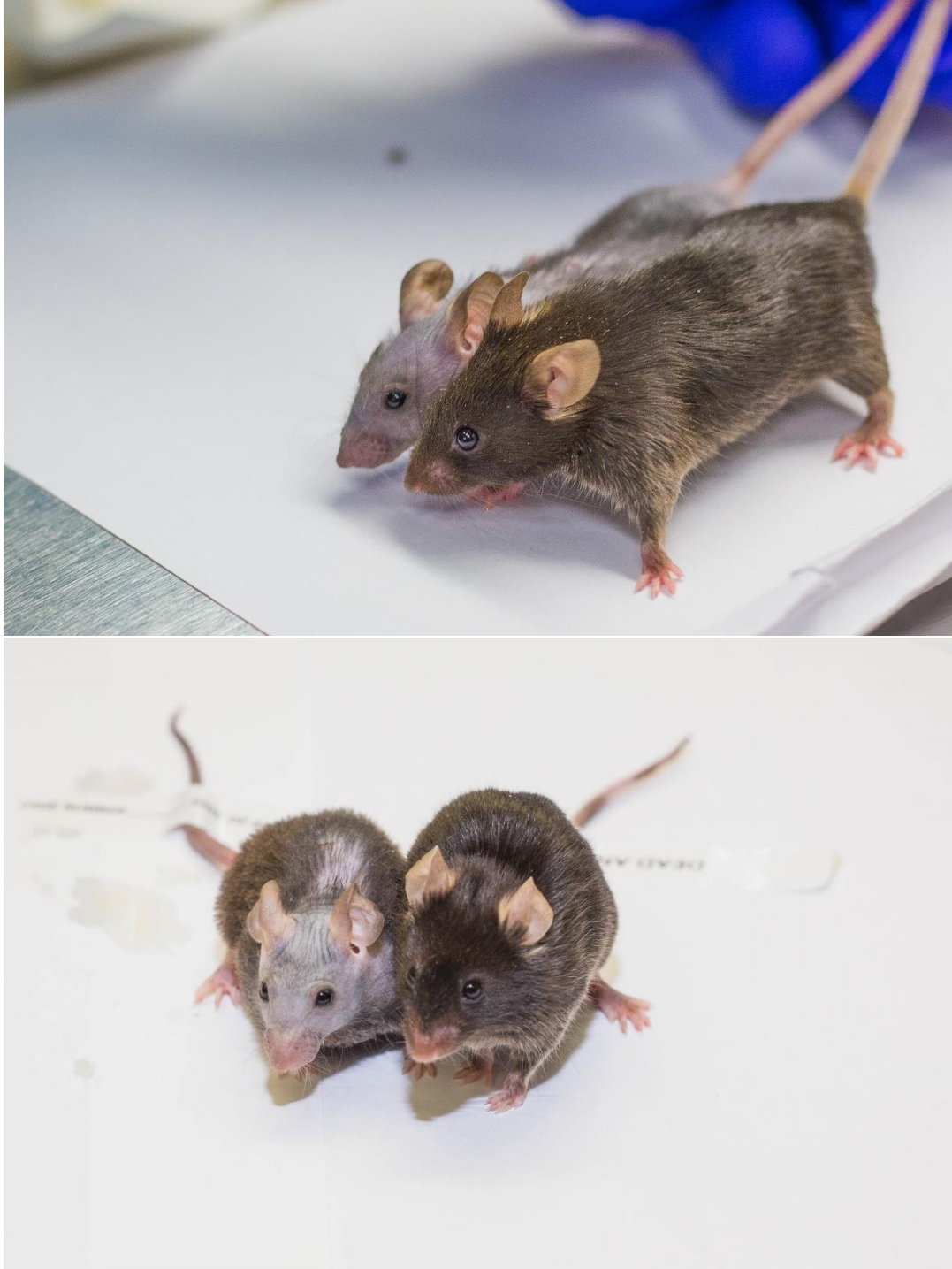
W badaniach zostały wykorzystane homozygotyczne, transgeniczne myszy Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup> [60,97] z genetyczną inaktywacją genu *Cbs* (oznaczane dalej jako *Cbs*<sup>-/-</sup>) oraz myszy heterozygotyczne, pochodzące od rodzicielskich samców *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz samic *Cbs*<sup>+/-</sup>. Myszy te zostały otrzymane dzięki uprzejmości prof. Warrena Krugera z Fox Chase Cancer Center, PA, USA, a ich hodowla była prowadzona przez laboratorium prof. Hieronima Jakubowskiego w New Jersey Medical School, Rutgers University, Newark, NJ, USA. U myszy Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup> oprócz wprowadzenia konstrukt inaktywującego ekspresję genu *Cbs* [59], wprowadzono konstrukt (Rys. 9) zawierający ludzki gen, kodujący dysfunkcyjną beta syntazę cystationiny – noszący najczęściej występującą mutację 833T>C, upośledzającą funkcję enzymu. Gen ten regulowany jest za pomocą promotora mMT-I, a więc jego ekspresja zachodziła pod wpływem jonów cynku. Zabieg ten pozwala na znaczne zwiększenie przeżywalności myszy homozygotycznych poprzez podawanie matkom w okresie ciąży i karmienia roztworu 25mM chlorku cynku w wodzie do picia, jednocześnie jednak nie łagodząc innych objawów obserwowanych w homocystynurii, które występowały u homozygotycznego potomstwa.



Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie wprowadzonego transgenu. Promotor metalotioneiny I (mMT-I) pozwala na regulację ekspresji hCBS poprzez dodatek cynku w wodzie do picia, ponadto ulega wysokiej ekspresji w nerkach i wątrobie, symulując endogenną ekspresję CBS. Epitop hemaglutyniny został wprowadzony na N-końcu CBS w celu łatwiejszej identyfikacji białka wprowadzonego przez transgen od białka mysiego. Konstrukt zawiera również 5' oraz 3' regiony kontrolne genu mMT-I, w celu zminimalizowania różnic w ekspresji w wyniku różnych miejsc integracji konstrukt, wg [60]

Myszy karmione były karmą Rodent Diet 5053 (Purina). Wygląd tych myszy przedstawiono na zdjęciach poniżej (Rys. 10). Do analiz wykorzystywano mocz oraz wątroby i nerki pobrane

od osobników, które po osiągnięciu 8 tygodni życia były uśmiercane z wykorzystaniem dwutlenku węgla. Pobrane organy oraz mocz niezwłocznie zamrażano w suchym lodzie i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .



*Rysunek 10. Fotografie myszy *Cbs-/-* (z lewej) oraz kontrolnej *Cbs+/-* (z prawej). Widoczne typowe cechy fenotypowe – wydłużenie części twarzoczaszki, słabszy wzrost, łysienie w obrębie głowy oraz wydłużone palce (myszy w wieku 8 tygodni).*

### **3.1.2. Ważniejsze odczynniki**

Akrylamid (Sigma Aldrich), Bis-akrylamid (Sigma Aldrich), Kwas pikrynowy (Sigma Aldrich), Tris-base (Sigma Aldrich), Fenol (Sigma Aldrich), CAPS (Sigma Aldrich), SDS (Sigma Aldrich), TEMED (Sigma Aldrich), APS (Sigma Aldrich), Glicyna (Sigma Aldrich), dNTP (DNA Gdańsk), Inhibitory proteaz (Sigma Aldrich), Tri-Zone (Novazym), Chloroform (Sigma Aldrich), Zestaw do izolacji Total RNA purification KIT(Novazym)

### **3.1.3. Enzymy**

Polimeraza iTaq MasterMix (Bio-Rad), odwrotna transkryptaza RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), DNAza I RapidOut (ThermoFisher Scientific)

### **3.1.4. Materiały do transferu Western Blot**

Bibuła do blottingu 7,5 cm x 10 cm (Bio-rad), membrana PVDF 0,2  $\mu$ m (Sigma Aldrich)

### **3.1.5. Przeciwciała i testy ELISA**

Anty GAPDH (Sigma Aldrich), Anty-Mup1 (Abcam), Testosterone ELISA Kit (Abcam)

### **3.1.6. Roztwory**

#### **Odczynnik Taninowy:**

98 mL 1 M HCl

2 mL fenol

10 g tanina

#### **Alkaliczny odczynnik pikrynowy:**

20 mL 0,2 M NaOH

4 mL 0,025 M kwas pikrynowy

#### **Bufor SB do elektroforezy SDS-PAGE:**

3,55 mL H<sub>2</sub>O



1,25 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8

2,5 mL glicerol

2 mL 10% SDS

0,2 mL 0.5% bromophenol blue

Bezpośrednio przed użyciem dodawano 5%  $\beta$ -merkaptoetanolu

**40% Akrylamid/Bis (29%T, 1%C):**

38,67 g Akrylamid

1,33 g Bis-akrylamid

Uzupełnić H<sub>2</sub>O do objętości 100 ml

**1.5 M Tris-HCl pH 8.8:**

27,23 g Tris-base

80 mL H<sub>2</sub>O

Ustalić pH do wartości 8.8, dopełnić H<sub>2</sub>O do objętości 150 ml

**0.5 M Tris-HCl pH 6.8:**

6 g Tris-base

60 mL H<sub>2</sub>O

Ustalić pH do wartości 6.8, dopełnić H<sub>2</sub>O do objętości 100 ml

**Żel rozdzielający SDS-PAGE 14%:**

1,88 mL H<sub>2</sub>O

56  $\mu$ L 50% glicerol

1,26 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8.8

50  $\mu$ L 10% SDS

1,74 mL 40% akrylamid/bis

10  $\mu$ L TEMED

20  $\mu$ L 10% APS

**Żel zagęszczający SDS-PAGE:**

1,46 mL H<sub>2</sub>O

0,5 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6.8

50  $\mu$ L 10% SDS

311,5  $\mu$ L 40% akrylamid/bis

6  $\mu$ L TEMED

10  $\mu$ L 10% APS

**Bufor elektrodowy 10x:**

30,3 g Tris-Base

144,1 g Glicyna

10 g SDS

Dopełnić do objętości 1 L

**Roztwór barwiący Coomassie Brilliant Blue:**

50% Metanol

10% kwas octowy

0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250

**Odbarwiacz do żeli SDS-PAGE:**

50% Metanol

10% kwas octowy

**Tris-CAPS 5x:**

36,34 g Tris-Base

44,26 g CAPS

Uzupełnić H<sub>2</sub>O do objętości 1 L

**Bufor do transferu katodowy:**

20 mL Tris-Caps 5x

1 mL 10% SDS

79 mL H<sub>2</sub>O

**Bufor do transferu anodowy:**

20 mL Tris-CAPS 5x

15 mL Metanol

65 mL H<sub>2</sub>O

**TBST:**

0,9 g NaCl

2 mL 1M Tris pH 7.5

500 µL 20% Tween20

**Bufor RIPA:**

0,5 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5

100 µL Triton X-100

20 µL 0,5M DTT

100 µL 10%SDS

### **3.1.7. Ważniejsza aparatura**

Lustrzanka cyfrowa Canon 550D z obiektywem 18-55 mm, podręczna lampa UV, aparat do elektroforezy żelowej Tetra IV cell (Bio-Rad), czytnik płytek wielodołkowych BioTek, Czytnik płytek wielodołkowych TECAN, termocykler CFX96 (Bio-Rad), termocykler T-100 (Bio-rad), Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), Nanodrop 2000 (thermo Scientific),

Homogenizator ultradźwiękowy Sonoplus HD2070 MS72 z trzpieniem UW 2070 (Bandelin), G:Box (Syngene)

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Pomiar stężenia białka całkowitego metodą taninową

Białko całkowite w próbkach – zarówno moczu, jak również izolatach białkowych z organów mysich mierzone było metodą taninową. Metoda została zaadaptowana do wykonywania na płytkach 96-dołkowych. Odczynnik taninowy oraz roztwór 0,1% gumy arabskiej ogrzano przed użyciem do temperatury 30°C. Do 100 µL 50 – krotnie rozcieńczonej próbki dodawano 100 µL odczynnika taninowego. Płytkę inkubowaną była przez 10 minut w 30°C, po czym dodawano 150 µL roztworu gumy arabskiej i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=595$  nm. Do sporządzenia krzywej standardowej wykorzystywano roztwór albuminy bydlęcej dla zakresu stężeń 20-100 µg/mL.

### 3.2.2. Pomiar stężenia kreatyniny w moczu

Zawartość kreatyniny w próbkach moczu mierzono z wykorzystaniem metody pikrynowej, przystosowanej do pomiarów na płytkach 96-dołkowych. Do 50 µL 25 – krotnie rozcieńczonego moczu mysiego oraz roztworu standardu – kreatyniny w stężeniu 40 µg/mL – dodawano 250 µL alkalicznego odczynnika pikrynowego za pomocą pipety wielokanałowej. Na każdy rząd analizowanych prób przypadł jeden dołek zawierający roztwór standardu. Pomiar absorbancji następował przy długości fali  $\lambda=490$  nm co 1 minutę. Stężenie kreatyniny obliczane było ze wzoru:

$$\frac{\Delta A_{próbkki}}{\Delta A_{std}} \times C_{std} = C_{próbkki}$$

Gdzie  $\Delta A$  stanowiło różnicę wartości absorbancji pomiędzy 8, a 3 minutą reakcji dla próbki oraz standardu (std), a C oznacza stężenie standardu (std) oraz próbki. Dla każdego rzędu obliczenia wykonywane były oddzielnie.

### 3.2.3. Elektoroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Próby moczu denaturowano poprzez wymieszanie z buforem SB w stosunku 1:1 i inkubację w termobloku przez 5 minut w 95°C. Zdenaturowane próby nanoszono na 14% żel SDS-PAGE i prowadzono rozdzielanie przez około 40 minut, wykorzystując napięcie:

80 V do momentu wejścia prób w żel zagęszczający

120 V do momentu wejścia prób w żel rozdzielający

200 V do zakończenia elektroforezy

Żel poddawano następnie wizualizacji - barwiono na gorąco z wykorzystaniem roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue, po czym wykonywano zdjęcie z użyciem aparatury G:Box (Syngene).

#### **3.2.4. Przygotowanie prób białek moczu mysiego do analizy metodami spektrometrii mas**

Objętość moczu, zawierającą 25 lub 100 µg (w zależności od ilości późniejszych analiz) białka dopełniono do 500 µL za pomocą 20 mM roztworu dwuwęglanu amonu. Całość przeniesiono do filtra wirowniczego Millipore Amicon MWCO 3k, o wartości odcięcia 3 kDa i wirowano 20 minut przy 14 000 g, w temperaturze 4°C. Po zakończeniu wirowania filtrat usunięto, a retentat uzupełniono do objętości 500 µL 20 mM dwuwęglanem amonu i ponownie zwirowano w podanych wcześniej warunkach. Procedurę powtórzono trzykrotnie, po czym wkłady filtracyjne umieszczono w pozycji odwróconej w nowych probówkach wirowniczych i wirowano przez 5 minut przy 1 000 g, w temperaturze 4°C. Zebrany retentat przeniesiono do probówek wirowniczych typu eppendorff o objętości 1,5 mL i zamrożono, po czym umieszczono w wyparce próżniowej CentriVap, gdzie poddane zostały procesowi liofilizacji przez około 1 godzinę – do całkowitego wysuszenia. Tak przygotowane próbki zostały wysłane do analizy metodami spektrometrii mas.

#### **3.2.5. Izolacja białek**

Całkowite białko z tkanek izolowane było poprzez trzykrotną sonikację, każdorazowo przez 10 sekund z 30 – sekundowymi przerwami na lodzie, w celu schłodzenia próbki. Sonikacja prowadzona była poprzez umieszczenie trzpienia homogenizatora ultradźwiękowego w probówce z buforem i tkanką, przy ustawieniu 70% mocy urządzenia, w 1,5 mL probówkach wirowniczych typu eppendorff, w buforze RIPA zawierającym 200-krotnie rozcieńczone

inhibitory proteaz (Sigma). Na 1 mg tkanki dodawano 10  $\mu$ L buforu. Po zakończeniu sonikacji próby wirowano przez 20 minut w 4°C, 13 500 RPM, supernatant stanowiący izolat białkowy rozporcjowano i zamrożono. Stężenie białka mierzono metodą taninową.

### **3.2.6. Western Blot**

Przed przystąpieniem do transferu, arkusz bibuły do transferu oraz 14% żel poliakryloamidowy z rozdzielonymi elektroforetycznie ekstraktami z tkanek (odpowiednio 10  $\mu$ g oraz 15  $\mu$ g białka/ścieżkę dla wątrób i nerek) po zakończeniu elektroforezy inkubowano przez 10 minut w buforze do transferu katodowym. Podobnie, arkusz bibuły oraz membranę PVDF aktywowaną przez zanurzenie w metanolu, inkubowano przez 10 minut w anodowym buforze do transferu. Po wysyceniu buforami układano na anodzie aparatu do transferu półsuchego kanapkę w kolejności: 1) bibułę nasączoną buforem anodowym, 2) membranę PVDF, 3) żel poliakryloamidowy, 4) bibułę nasączoną buforem katodowym. Po złożeniu kanapki przyciśnięto ją katodą i zamknięto pokrywą. Transfer prowadzono przy stałym natężeniu prądu 120 mA przez 30 minut. Po zakończeniu transferu membranę inkubowano w TBST przez 10 minut, po czym blokowano w 5% roztworze białek mleka w TBST, w 4°C przez noc, na kołyszce laboratoryjnej. Zablockowaną membranę inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Nadmiar przeciwciał usuwano poprzez 3-krotną inkubację przez 10 minut w buforze TBST. Następnie membranę inkubowano w roztworze przeciwciał II-rzędowych w TBST w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, po czym ponownie przepłukano 3-krotnie przez 10 minut w buforze TBST. Membranę następnie inkubowano przez 1 minutę z substratem do chemiluminescencji, po czym umieszczano w przeźroczystej koszulce na dokumenty, którą zamykano na gorąco. Tak przygotowaną membranę umieszczano w kasecie z kliszą fotograficzną, prowadząc naświetlanie w kilku przedziałach czasowych – od 3 sekund do 30 sekund. Klisze fotograficzne wywoływano przez umieszczenie na 30 sekund w roztworze wywoływacza, odpłukanie, a następnie umieszczenie na 30 sekund w roztworze utrwalacza, wypłukanie i osuszenie. Wywołane klisze fotografowano z wykorzystaniem aparatury G-Box (Syngene) i analizowano za pomocą programu GeneTools (Syngene).

Dla białek wątroby wykorzystywano zoptymalizowane rozcieńczenia przeciwciał: I-rzędowych anti-GAPDH 1:5 000/II-rzędowych 1:40 000 oraz dla anti-MUP 1:30 000/

II-rzędowych 1:40 000; dla białek nerek wykorzystywano rozcieńczenia przeciwciał I-rzędowych anti-GAPDH 1:5 000/ II-rzędowych 1:10 000 oraz dla anti-MUP 1:15 000/II-rzędowych 1:15 000.

### **3.2.7. Izolacja RNA**

Przed rozpoczęciem izolacji RNA tkankę rozcierano z wykorzystaniem młyna kulkowego w 2 mL probówkach typu eppendorff z wykorzystaniem cyrkonowych kulek o średnicy 4 mm, lub za pomocą moździerza i tłuczka – w ciekłym azocie. Niezależnie od użytej metody, około 50 mg roztartej tkanki zalewano 1 mL odczynnika 3-zone i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Do probówek dodano następnie 200  $\mu$ L chloroformu i przez 15 sekund energicznie wstrząsano, po czym pozostawiono na 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, próby wirowano w 4°C przy 12 000 g przez 15 minut, fazę wodą zbierano do nowych probówek, do których dodawano taką samą objętość 70% etanolu i mieszano. Następnie prowadzono oczyszczanie RNA z wykorzystaniem kulek magnetycznych Novabeads, wg zaleceń producenta – do każdej probówki dodano 25  $\mu$ L zawiesiny kulek magnetycznych i inkubowano 10 minut, po czym umieszczano je w statywie magnetycznym i wylewano supernatant. Kulki dwukrotnie przepłukiwano 70% etanolem. Po usunięciu i odparowaniu pozostałości etanolu poprzez pozostawienie otwartych probówek na statywie magnetycznym – kulki zawieszono w 50  $\mu$ L wody dejonizowanej, traktowanej DEPC i inkubowano przez 5 minut na termowyrzäsarce w 65°C, przy 800 rpm. Po tym czasie otwarte probówki inkubowano przez dodatkowe 5 minut w 65°C. Tak przygotowane próbki przenoszono do statywu magnetycznego i zbierano supernatant zawierający RNA do świeżych probówek. Stężenie oraz czystość otrzymanego RNA oznaczano z wykorzystaniem spektrometru NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific). Próbki poddawano DNazowaniu z wykorzystaniem zestawu RapidOUT DNA Removal KIT(ThermoFischer Scientific), zgodnie z protokołem producenta – reakcję prowadzono przez 30 minut w 37°C.

Po zakończeniu trawienia DNazę usuwano poprzez dodanie odczynnika DRR i inkubację przez 2-3 minuty, z kilkukrotnym mieszaniem probówek oraz wirowanie 1 minutę przy 800g. Supernatant wolny od DNA oraz DNaz przenoszono do nowych probówek, stężenia RNA mierzono z wykorzystaniem spektrometru NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific).

### 3.2.8. Real-Time RT-qPCR

Pierwszym etapem analizy jest synteza cDNA. Do tego celu niezbędne było przygotowanie mieszaniny matrycy RNA oraz starterów – w tym przypadku polinukleotydów tyminowych zakończonych jednym z trzech pozostałych nukleotydów, o całkowitej długości 18-20 nt (Sigma-Aldrich). Mieszaninę przygotowano zgodnie z tabelą poniżej:

Matryca RNA	1 µg
Oligo dT (70µM)	1 µL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	Dopełnić do 12,5 µL

Do każdej probówki zawierającej matrycę RNA i oligo dT dodawano mieszaninę reakcyjną:

Bufor 5x	4 µL
RiboLock (inhibitory RNAz)	0,5 µL
dNTP	2 µL
Odwrotna transkryptaza RevertAid	1 µL

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w termocyklerze przez 60 minut w 42°C, a następnie 10 minut w 70°C.

Otrzymane cDNA po uprzednim 20-krotnym rozcieńczeniu wykorzystywano jako matrycę w reakcji Real-Time qPCR. Mieszanina reakcyjna przygotowywana była zgodnie z tabelą poniżej:



H <sub>2</sub> O Milli-Q	1,8 µL
iTaq Real-Time PCR MasterMix	5 µL
Starter F	0,6 µL
Starter R	0,6 µL
Matryca cDNA (20x rozcieńczona)	2 µL

Startery wykorzystywane w analizach zostały zaprojektowane w programie Primer3plus [98], za wyjątkiem starterów obejmujących grupy genów kodujących białka MUP – z racji wysokiej homologii konieczne było ręczne projektowanie starterów (zamówionych w firmie Sigma-Aldrich) Wszystkie zaprojektowane sekwencje, wykorzystywane w analizach przedstawione są w tabeli poniżej:

Nazwa	Sekwencja	Powielany produkt
MupallF	TGTCTGGAGAATTCCTTAG	Specyficzny dla cDNA większości genów <i>mup</i>
MupallR2	GTTCTCGCCATAGAGC	
MupdlF	GGATGGGAAACCTCCAG	Specyficzny dla cDNA genów <i>mup</i> centralnych
MupdlR	ATGTTCAAGTACCAGGTCCA	
darcynaF	ATTCTGTAACGTATGATGGATCG	Specyficzny dla cDNA genu kodującego Darcynę
darcynaR	ATGGATAGGAAGGACTGATCC	
Mup3/21F	GGTATTGGTTTTCTATTGCTGAA	Specyficzny dla cDNA genu <i>mup3</i>
Mup3R	TCTGTTTGTTCACCAATCGC	
AR_Fwd	TTGCCTGGCTTCCGCAAC	Specyficzny dla cDNA genu receptora androgenowego
AR_Rev	TGCAAAGTAGAGCATCCTGGA	
PgrAB_Fwd	GGTGGGCCTTCTAACGAG	Specyficzny dla cDNA genu receptora progesteronu
PgrAB_Rev	GACCACATCAGGCTCAATGCT	
PgrB_Fwd	GGTCCCCTTGCTTGCA	Specyficzny dla cDNA podjednostki $\beta$ genu receptora progesteronu
PgrB_Rev	CAGGACCGAGGAAAAAGCAG	
GHR_Fwd	AAACTCCGAGGTCTCAGGTATG	Specyficzny dla cDNA genu receptora hormonu wzrostu
GHR_Rev	TGGTGTAGCCTCACTTCCAG	
THRa_Fwd	GACAAGGCCACCGTTATCACTAC	Specyficzny dla cDNA podjednostki $\alpha$ genu receptora tyroksyny
THRa_Rev	CAGCAGCTGTCATACTTGAGGA	
THRb_Fwd	ACAAGCACCCATCGTGAATG	Specyficzny dla cDNA podjednostki $\beta$ genu receptora tyroksyny
THRb_Rev	TGGCAGCTCACAAAACATGG	
Esr1_Fwd	TGCGCAAGTGTACGAAGTG	Specyficzny dla cDNA podjednostki $\alpha$ genu receptora estrogenu
Esr1_Rev	TCTGACGCTTGTGCTTCAAC	
Esr2_Fwd	AGGAATGGTCAAGTGTGGATCC	Specyficzny dla cDNA podjednostki $\beta$ genu receptora estrogenu
Esr2_Rev	TGGCTTTGTTCAGGCAATGC	
Act_FW	GGCACACACCTTCTACAATG	Specyficzny dla cDNA $\beta$ -aktyny
Act_Rev	TGGATGGCTACGTACATGGCT	

Reakcję prowadzono zgodnie ze schematem, pomiar fluorescencji barwnika SybrGreen następował każdorazowo po etapie elongacji:

Etap	Czas (min:sek)	Temperatura (°C)	
Denaturacja wstępna	2:00	95	
Denaturacja	00:15	95	40x
Annealing	00:20	58-64 (w zależności od starterów)	
Elongacja	00:20	68	

Końcowym etapem po zakończeniu reakcji powielania było sporządzenie krzywej topnienia, zgodnie z tabelą poniżej:

Etap	Czas (min:sek)	Temperatura(°C)
Denaturacja	00:15	95
Renaturacja	00:15	60
Gradient temperatur	20:00	60↗95

Wartości  $C_t$  dla poszczególnych prób wyznaczone zostały automatycznie przez oprogramowanie CFX Manager firmy Bio-Rad.

Otrzymane wyniki analizowano z wykorzystaniem metody  $\Delta\Delta C_t$ , która pozwala na wyznaczenie względnej ilości transkryptu w badanych próbach poprzez wyznaczenie różnic ( $\Delta$ ) pomiędzy  $C_t$  genu badanego i genu referencyjnego (w tym przypadku genu kodującego  $\beta$ -aktynej), a następnie różnicy pomiędzy obliczonymi wartościami dla grupy kontrolnej i badawczej. Otrzymałą wartość podstawiano do wzoru pozwalającego obliczyć krotność zmiany ( $F_c$ ):

$$F_c = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

### 3.2.9. Analiza poziomu testosteronu w moczu myszy

Zawartość testosteronu w moczu badanych myszy obu płci mierzono za pomocą reakcji immunoenzymatycznej – z wykorzystaniem zestawu testosterone ELISA Kit (Abcam). Analizę

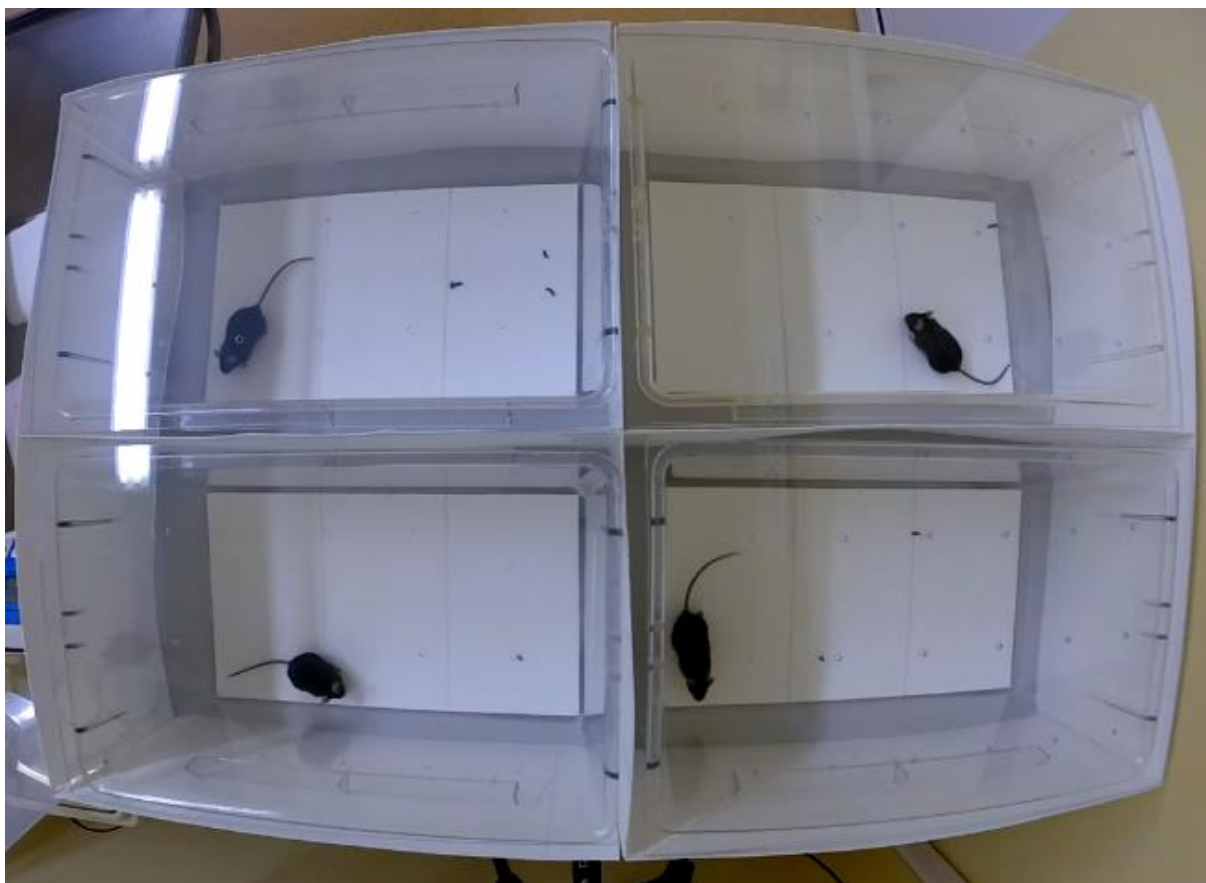
proawodno zgodnie z zaleceniami producenta – w skrócie – po wcześniejszym przygotowaniu niezbędnych odczynników nałożono po 25  $\mu\text{L}$  badanego moczu oraz roztworów standardowych do dołków na płytce wielodołkowej, po czym do każdego dołka dodano po 100  $\mu\text{L}$  konjugatu Testosteron-HRP i inkubowano w temperaturze 37°C pod przykryciem. Po upływie godziny zawartość dołków usunięto i trzykrotnie przemyto za pomocą 300  $\mu\text{L}$  buforu przemywającego, po czym usunięto płyn z dołków. Do każdego dołka nałożono po 100  $\mu\text{L}$  substratu TMB i inkubowano w 37°C. Po upływie 15 minut dodano 100  $\mu\text{L}$  roztworu Stop, delikatnie wymieszano i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=450\text{ nm}$ . Optymalną krzywą standardową i równanie regresji otrzymano w programie CurveExpert Basic.

### **3.2.10. Analizy behawioralne**

Testy behawioralne prowadzone były na 12 samcach i 12 samicach szczepu C57BL/6J w wieku 8 tygodni. Myszy testowe na 24 godziny przed eksperymentem były umieszczone w klatce uprzednio zajmowanej przez osobniki płci przeciwnej. Miało to na celu pobudzenie zainteresowania badanym moczem oraz (u samic) wywołanie owulacji i zsynchronizowanie cyklu menstruacyjnego pomiędzy osobnikami [99,100].

#### **Przebieg testu (wg [101,102]):**

Mysz testowa umieszczana była w klatce o wymiarach 27 cm x 42 cm x 18 cm wyłożonej grubym papierem GB003 (36,6 cm x 20,4 cm), przykrytej przezroczystą plexi. Klatka testowa podzielona na 3 rejony: testowy, neutralny i kontrolny. W rejonie testowym nakrapiano 2 krople po 8  $\mu\text{L}$  badanego moczu. W rejonie kontrolnym – 2 krople po 8  $\mu\text{L}$  wody dejonizowanej Milli-Q. Każdorazowo mysz umieszczana była w rejonie neutralnym. Czas trwania testu wynosił 30 minut, z czego pierwsze 10 minut było nagrywane z wykorzystaniem kamery cyfrowej. Równocześnie badane były 4 myszy – klatki przedzielone były barierą nie pozwalającą myszom na widzenie się. Układ testowy widoczny jest na zdjęciu poniżej (Rys.11).



Rysunek 11. Układ testowy do wykonywania analiz behawioralnych. 4 klatki o wymiarach 27 cm x 42 cm x 18 cm z przegrodami ograniczającymi widoczność otoczenia. Region testowy i kontrolny klatki wybierany był losowo. Pokrywy, zawierające otwory wentylacyjne wykonano z poliwęglanu.

Zebrane po zakończeniu każdego testu bibuły były fotografowane z wykorzystaniem lustrzanki cyfrowej w świetle UV i analizowane w programie graficznym. Czas spędzany przez mysz w danym regionie był mierzony z wykorzystaniem stworzonego na te potrzeby oprogramowania analizującego 10-minutowe nagranie wideo.

Wykonano również analizy, mające na celu sprawdzenie odpowiedzi hormonalnej na mocz myszy płci przeciwnej o odmiennym genotypie. W tym celu myszy trzymane przez 14 dni w swoich klatkach przenoszono do klatek ze ściółką pochodzącą od myszy płci przeciwnej o genotypach  $Cbs^{-/-}$  oraz  $Cbs^{+/-}$ . Po 24 godzinach myszy ( $n=20$ ) uśmiercono i pobrano ich wątroby w celu przeprowadzenia analiz Real-Time RT qPCR dla transkryptów genów wybranych receptorów hormonów – *Esr1*, *Ar*, *Ghr*, *Thra* oraz *Thrβ*.

### 3.2.11. Spektrometria mas

Liofilizaty białek moczu mysiego poddawane były analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas (przeprowadzone w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii

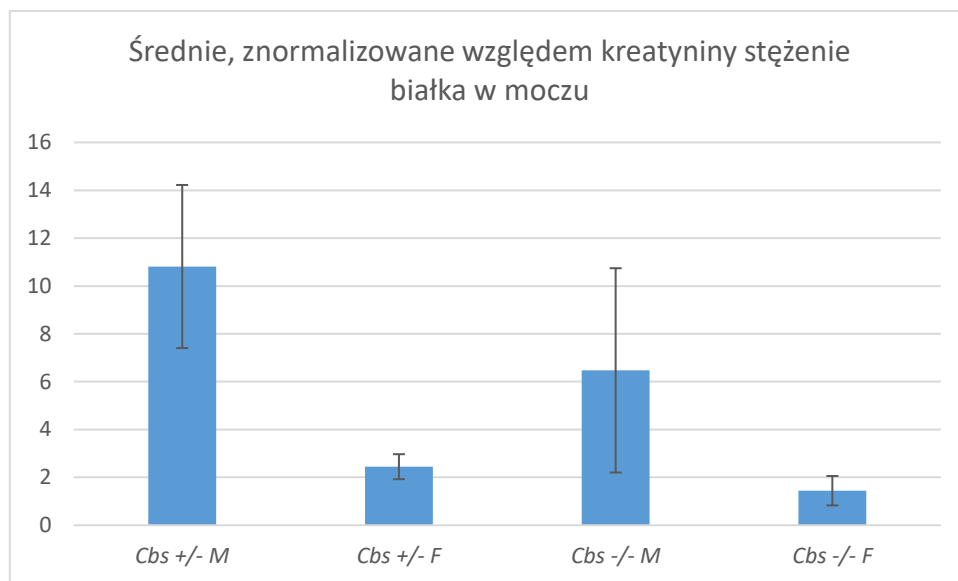
i Biofizyki w Warszawie). Część materiału przeznaczona była na określenie składu białkowego badanego moczu poprzez analizę na spektrometrze masowym ze źródłem jonowym typu electrospray (ESI), bez poddawania próbek trawieniu oraz rozdzielaniu chromatograficznemu, lecz przez bezpośredni nastrzyk do źródła. Dzięki temu możliwe było określenie mas poszczególnych występujących w próbce moczu białek MUP.

Kolejna część poddawana była trawieniu trypsyną, redukowana DTT i alkirowana IAA. Powstałe peptydy analizowane były na hybrydowym kwadropolowym spektrometrze masowym Q Exactive (ThermoFischer Scientific). Zastosowana w tym przypadku analityka pozwala na tzw. Sekwencjonowanie *de-novo* powstałych w wyniku trawienia peptydów, dzięki uzyskaniu zjonizowanych fragmentów różnej długości, które powstają wskutek kolizji z cząsteczkami gazu obojętnego obecnego w urządzeniu. Analiza ta umożliwia również wykrywanie modyfikacji reszt lizynowych poprzez N-homocysteinylację – w tym celu do oprogramowania MASCOT wprowadzona została dodatkowa modyfikacja opcjonalna o masie 174 Da, odpowiadająca karbamidometylowanej N-związanej homocysteinie.

## 4. Wyniki

### 4.1. Stężenie białka całkowitego w moczu myszy

Mierzone metodą taninową stężenie białka całkowitego w moczu myszy przedstawione zostało na wykresie poniżej (Rys. 12). Stężenie białka zostało znormalizowane względem poziomu kreatyniny w moczu. Można zaobserwować znacznie obniżony poziom białka w moczu, a więc białek MUP u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>. Zarówno u samców, jak i samic z knock-outem genu *Cbs* stwierdzono obniżenie badanych wartości o około 40% względem grupy kontrolnej.



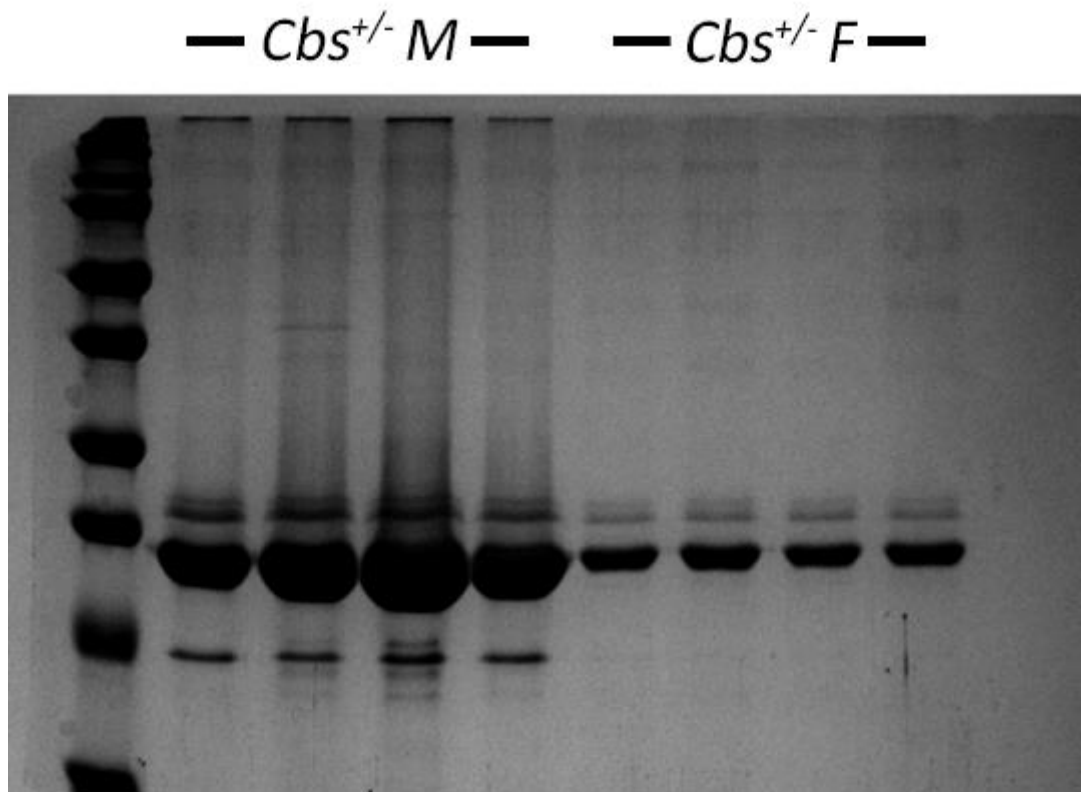
Rysunek 12. Stężenie całkowitego białka w moczu myszy, znormalizowane względem kreatyniny (mg białka/mg kreatyniny). Stężenie białka oznaczano metodą taninową, a kreatyniny za pomocą zmodyfikowanej reakcji Jaffe'a. Słupki reprezentują średnie wartości stężenia białka znormalizowane względem stężenia kreatyniny u samców ( $n=9$ ) i samic *Cbs*<sup>+/-</sup> ( $n=10$ ), oraz samców ( $n=12$ ) i samic ( $n=10$ ) myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami są istotne statystycznie ( $p<0.05$ ), myszy w wieku 8 tygodni

### 4.2. Analiza jakościowa białek MUP

#### 4.2.1. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

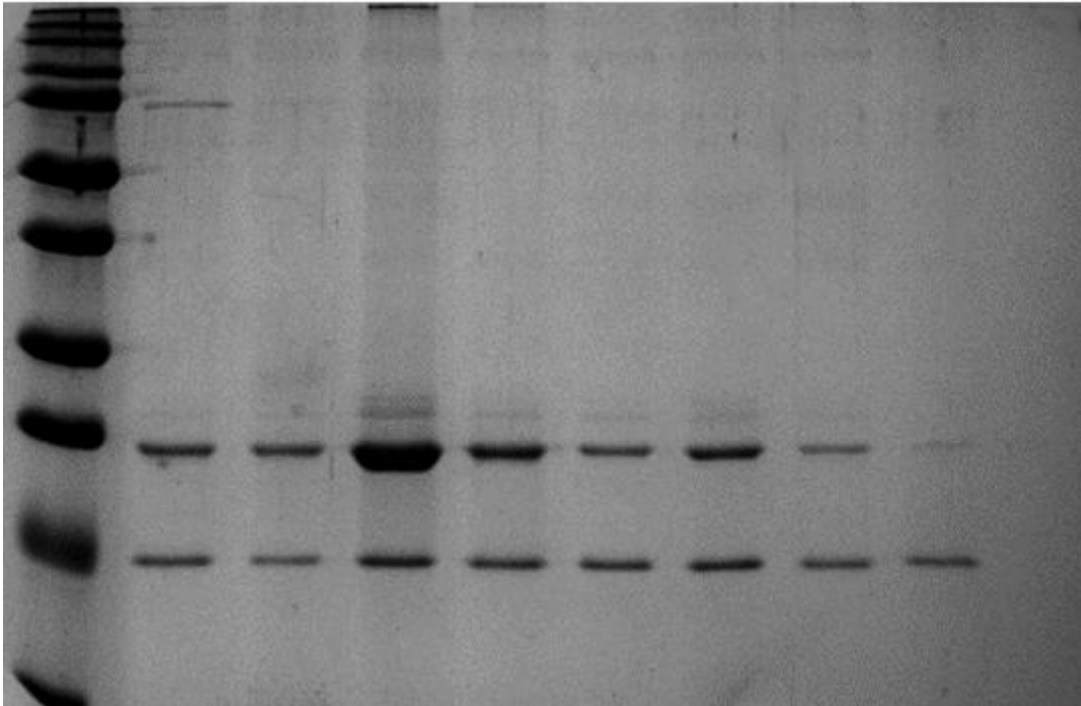
Białka moczu poddano analizie elektroforetycznej w warunkach denaturujących. Otrzymane elektroforegramy pozwoliły oprócz zaobserwowanych wcześniej zmian ilościowych na identyfikację zmian jakościowych w badanych próbkach moczu. Kluczową obserwacją wydaje się być tutaj obecność prążka odpowiadającego białku MUP20 znanym również pod nazwą darcyna. Białko to zostało zaklasyfikowane w literaturze jako występujące

jedynie u samców, gdzie pełni ono funkcję feromonu. Wykazano, iż jego obecność w śladach zapachowych powoduje u innych samców zwiększenie agresywności, a u samic natomiast pobudza pamięć, co zapewnia zwiększenie czasu spędzanego w sąsiedztwie śladu zapachowego, a także pozwala zwiększyć szanse na rozród [101]. Poniżej przedstawiono elektroforegramy (Rys. 13-14), obrazujące obserwowane zmiany ilościowe i jakościowe w białkach moczu myszy wywołane brakiem funkcjonalnego enzymu CBS.



Rysunek 13. Elektroforegram proteomu moczu myszy kontrolnych w wieku 8 tygodni. Ścieżka 1 – marker wielkości, ścieżki 2-5 – próbki moczu samców myszy  $Cbs^{+/-}$ , ścieżki 6-9 – próbki moczu samic  $Cbs^{+/-}$ . Widoczne są różnice ilościowe jak i jakościowe pomiędzy próbkami pochodzącymi od płci przeciwnej tego samego genotypu.

— *Cbs*<sup>-/-</sup> M —      — *Cbs*<sup>-/-</sup> F —



Rysunek 14. Elektroforegram proteomu moczu myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> w wieku 8 tygodni. Ścieżka 1 – marker wielkości, ścieżki 2-5 próbki moczu samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, ścieżki 6-9 – próbki moczu samic *Cbs*<sup>-/-</sup>. Różnice jakościowe i ilościowe pomiędzy osobnikami płci przeciwnej są słabo widoczne.

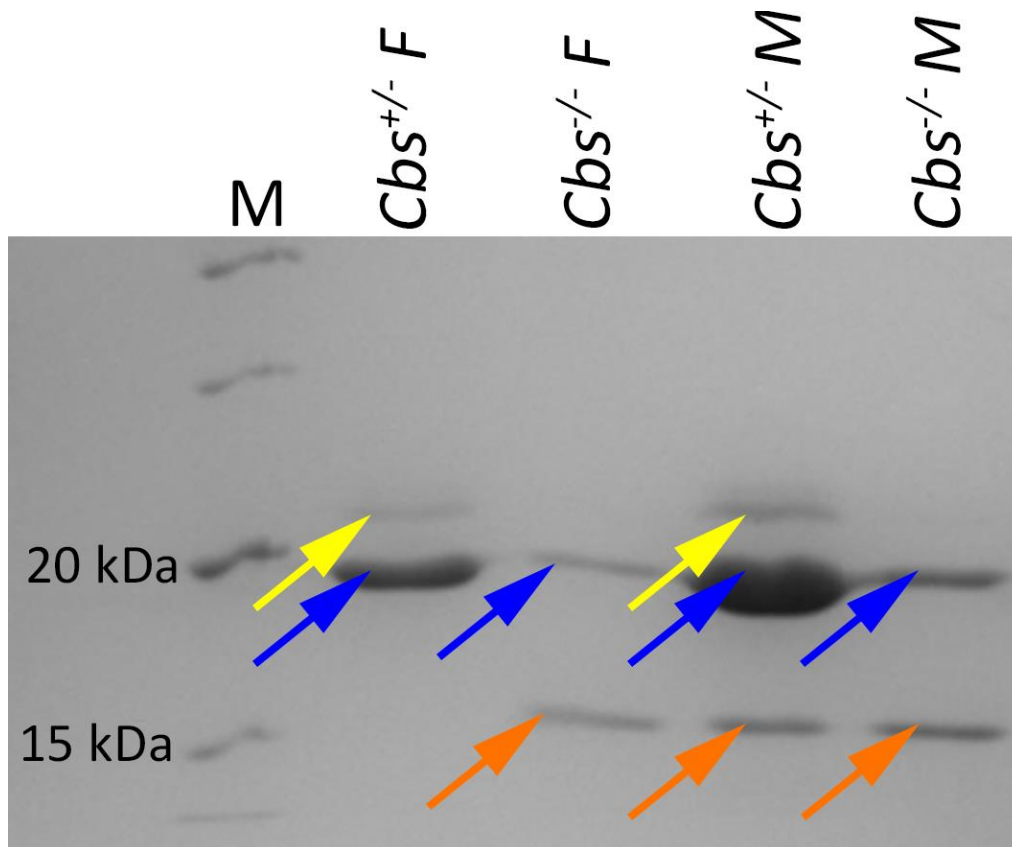
### 4.3. Spektrometria mas

W celu identyfikacji poszczególnych białek MUP przeprowadzono analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas. W celu identyfikacji białek wchodzących w skład prążka białkowego widocznego na elektroforegramie prążki wycięto z żelu, a białka w nich zawarte poddane zostały trawieniu trypsyną. Peptydy następnie wmywano z żelu oraz zidentyfikowano z zastosowaniem techniki MALDI-ToF. Zidentyfikowano w ten sposób w prążku obserwowanym na wysokości około 20 kDa białko Mup8, w prążku powyżej, na wysokości około 23 kDa, widocznym w próbkach myszy *Cbs*<sup>+/-</sup> białko Mup3, a w prążku na wysokości około 15 kDa darcynę (Rys. 15). Pomimo pokrycia sekwencji aminokwasowych powyżej 70%, w zidentyfikowanych peptydach, przypisanych do białek MUP, nie udało się znaleźć modyfikacji lizyny ze zmianą masy +174 Da, co sugeruje iż metoda ta nie jest stosowna do takich oznaczeń [103].

Ponieważ białka MUP są wysoce homologiczne, a ponadto rozdzielczość elektroforezy typu SDS-PAGE okazała się zbyt niska, wykonano dodatkowe analizy ESI-MS bez uprzedniego



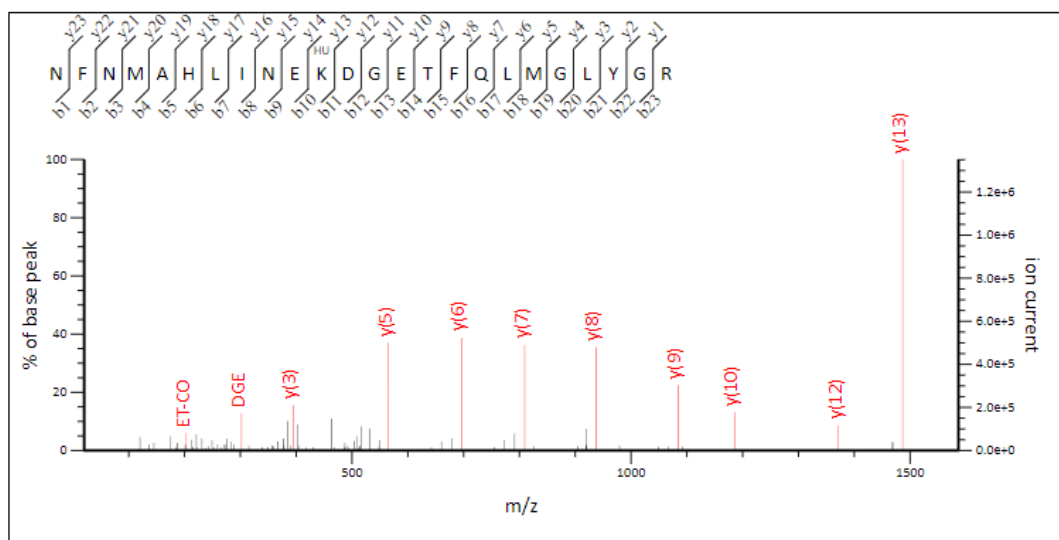
trawienia białek trypsyną. Umożliwiło to określenie mas białek MUP występujących u poszczególnych badanych myszy. Dodatkowo pozwoliło to potwierdzić, że prążek obserwowany na żelu SDS-PAGE na wysokości ~15 kDa to nietypowo występująca u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> darcyna, o masie 18 891 Da. Wyniki przedstawiono na Rys. 18-21.



Rysunek 15. Elektroforegram SDS-PAGE z zaznaczonymi prążkami poddanymi analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas. Strzałkami zaznaczono: kolorem żółtym – białko Mup3, kolorem niebieskim białko Mup 8/11 lub Mup14, a kolorem pomarańczowym Mup20, czyli darcynę. Ścieżka 1 – marker wielkości, ścieżka 2 – samica kontrolna *Cbs*<sup>+/+</sup>, ścieżka 3 – samica *Cbs*<sup>-/-</sup>, ścieżka 4 – samiec kontrolny *Cbs*<sup>+/+</sup>, ścieżka 5 – samiec *Cbs*<sup>-/-</sup>, myszy w wieku 8 tygodni.

Aby znaleźć miejsca modyfikacji reszt lizynowych obecnych w białkach MUP poprzez HTL, wykonano analizę typu shotgun z uprzednim trawieniem białek zawartych w moczu – bez wcześniejszego rozdzielenia elektroforetycznego. W wyniku tych analiz znaleziono peptydy z N-homocysteinylowaną lizyną, jednak ich widma fragmentacyjne nie pozwalają na pełne potwierdzenie miejsc modyfikacji, co zostało przedstawione na rysunkach poniżej. Peptyd ze zidentyfikowaną przez program Mascot N-homocysteinylacją lizyny K<sup>83</sup> w peptydzie o sekwencji NFNMAHLINEK\*DGETFQLMGLYGR był przypisywany do białka MUP2, a modyfikacja została znaleziona we wszystkich przeanalizowanych próbach, niezależnie od genotypu czy płci myszy – do badania wykorzystano mocz pochodzący od 4 samic oraz 4 samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, a

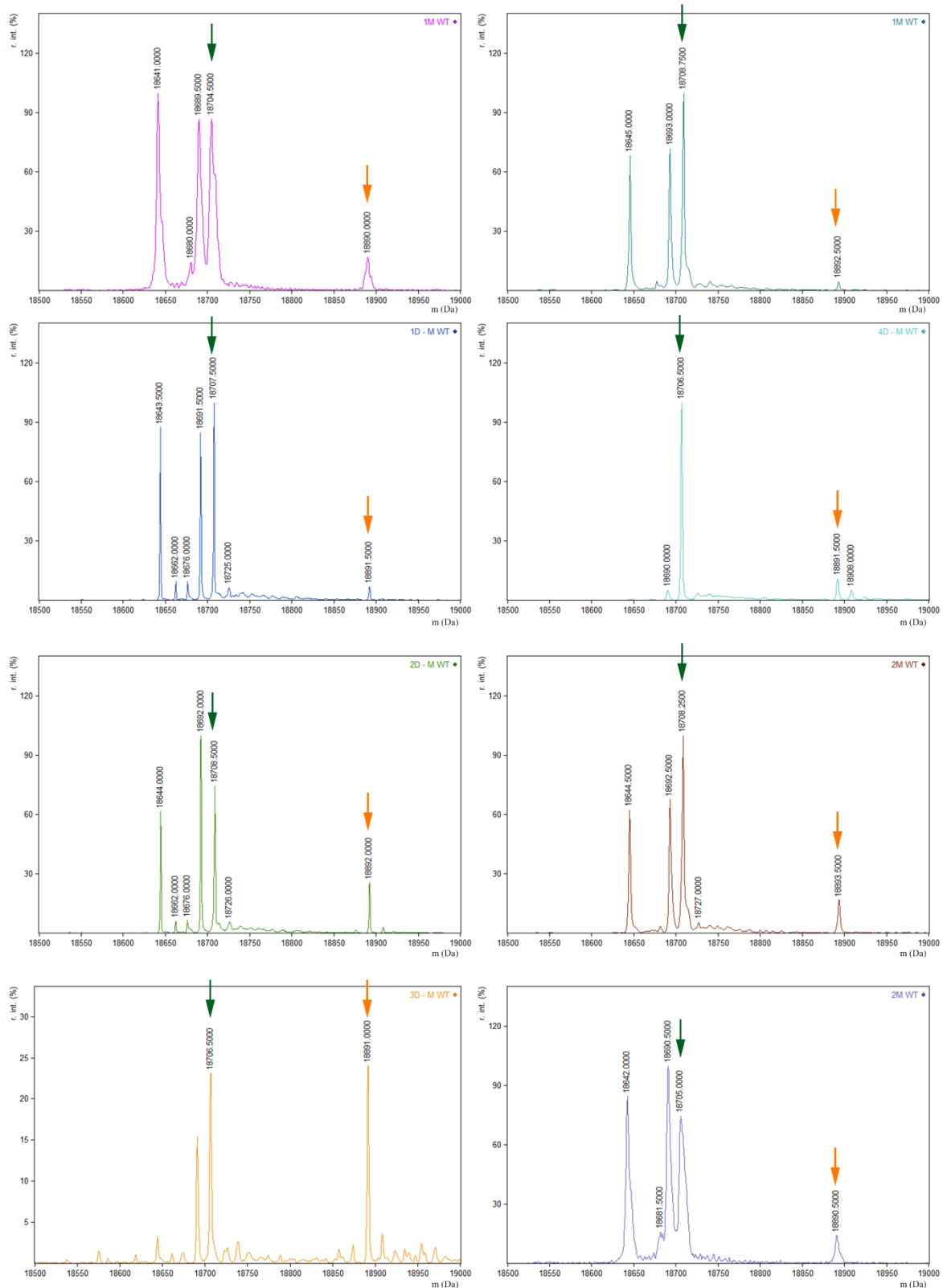
także 2 samic i 2 samców *Cbs*<sup>±/±</sup>. We wszystkich przypadkach pokrycie sekwencji białka MUP2 wynosiło ponad 90%. Przykładowe, reprezentatywne widmo fragmentacyjne oraz tabelę mas fragmentów peptydu ze zidentyfikowaną *N*-Hcy-Lys, pochodzące z programu Mascot przedstawiono poniżej (Rys 16 i 17).



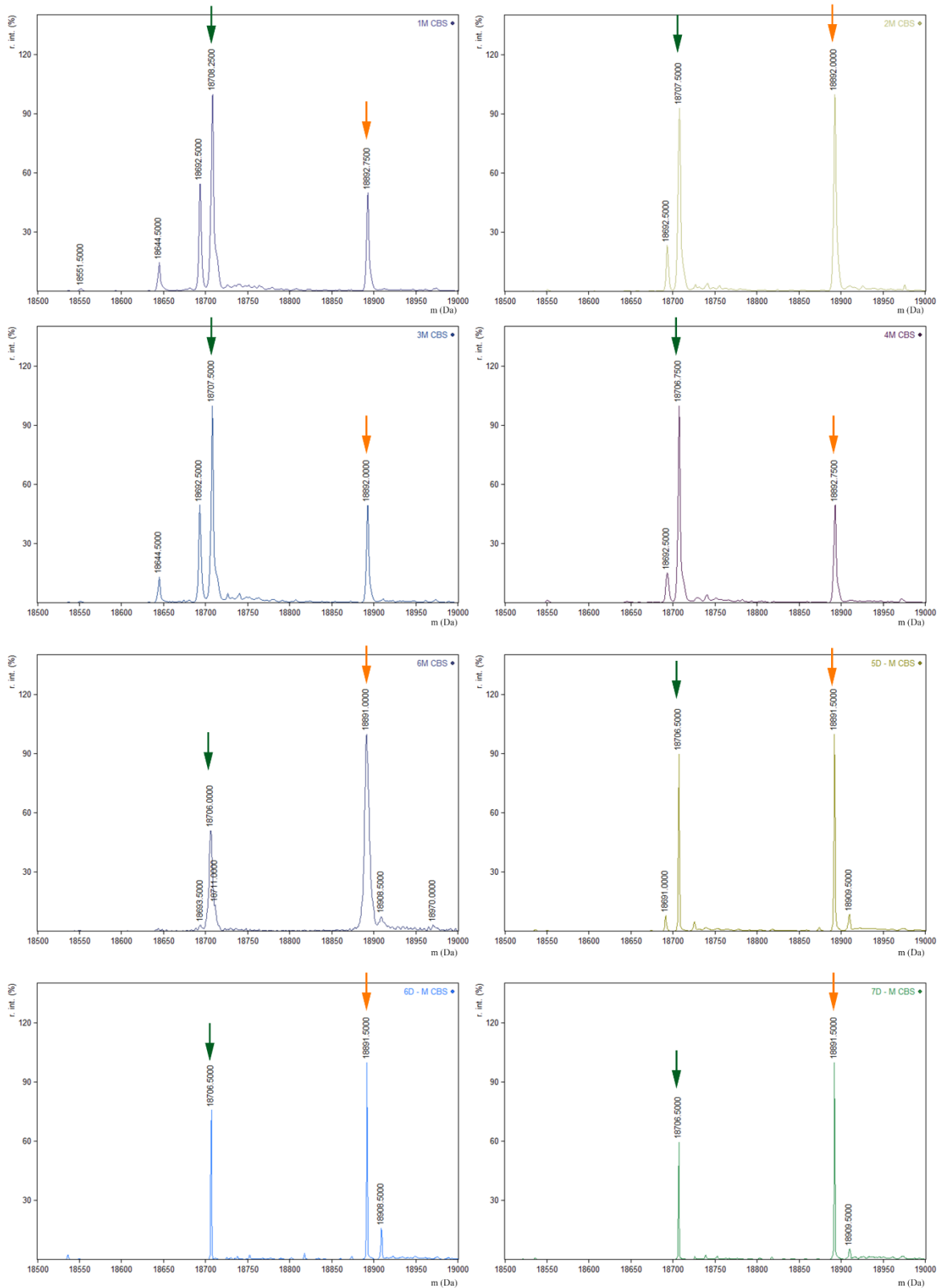
Rysunek 16. Reprezentatywne dla analizowanych prób widmo fragmentacyjne peptydu, zawierającego *N*-Hcy-Lys. Na podstawie mas poszczególnych fragmentów peptydu możliwe jest poznanie jego sekwencji oraz zidentyfikowanie miejsca modyfikacji.

#	a	a <sup>++</sup>	b	b <sup>++</sup>	b <sup>*</sup>	b <sup>+++</sup>	b <sup>0</sup>	b <sup>0++</sup>	Seq.	y	y <sup>++</sup>	y <sup>*</sup>	y <sup>+++</sup>	y <sup>0</sup>	y <sup>0++</sup>	#
1	87.0553	44.0313	115.0502	58.0287	98.0237	49.5155			N							24
2	234.1237	117.5655	262.1186	131.5629	245.0921	123.0497			F	2858.3423	1429.6748	2841.3157	1421.1615	2840.3317	1420.6695	23
3	348.1666	174.5870	376.1615	188.5844	359.1350	180.0711			N	2711.2738	1356.1406	2694.2473	1347.6273	2693.2633	1347.1353	22
4	479.2071	240.1072	507.2020	254.1047	490.1755	245.5914			M	2597.2309	1299.1191	2580.2044	1290.6058	2579.2203	1290.1138	21
5	550.2442	275.6258	578.2391	289.6232	561.2126	281.1099			A	2466.1904	1233.5989	2449.1639	1225.0856	2448.1799	1224.5936	20
6	687.3031	344.1552	715.2981	358.1527	698.2715	349.6394			H	2395.1533	1198.0803	2378.1268	1189.5670	2377.1427	1189.0750	19
7	800.3872	400.6972	828.3821	414.6947	811.3556	406.1814			L	2258.0944	1129.5508	2241.0679	1121.0376	2240.0838	1120.5456	18
8	913.4713	457.2393	941.4662	471.2367	924.4396	462.7235			I	2145.0103	1073.0088	2127.9838	1064.4955	2126.9998	1064.0035	17
9	1027.5142	514.2607	1055.5091	528.2582	1038.4826	519.7449			N	2031.9263	1016.4668	2014.8997	1007.9535	2013.9157	1007.4615	16
10	1156.5568	578.7820	1184.5517	592.7795	1167.5252	584.2662	1166.5411	583.7742	E	1917.8833	959.4453	1900.8568	950.9320	1899.8728	950.4400	15
11	1458.6980	729.8527	1486.6930	743.8501	1469.6664	735.3368	1468.6824	734.8448	K	1788.8408	894.9240	1771.8142	886.4107	1770.8302	885.9187	14
12	1573.7250	787.3661	1601.7199	801.3636	1584.6934	792.8503	1583.7093	792.3583	D	1486.6995	743.8534	1469.6729	735.3401	1468.6889	734.8481	13
13	1630.7465	815.8769	1658.7414	829.8743	1641.7148	821.3610	1640.7308	820.8690	G	1371.6726	686.3399	1354.6460	677.8266	1353.6620	677.3346	12
14	1759.7890	880.3982	1787.7840	894.3956	1770.7574	885.8823	1769.7734	885.3903	E	1314.6511	657.8292	1297.6245	649.3159	1296.6405	648.8239	11
15	1860.8367	930.9220	1888.8316	944.9195	1871.8051	936.4062	1870.8211	935.9142	T	1185.6085	593.3079	1168.5819	584.7946	1167.5979	584.3026	10
16	2007.9051	1004.4562	2035.9001	1018.4537	2018.8735	1009.9404	2017.8895	1009.4484	F	1084.5608	542.7840	1067.5343	534.2708			9
17	2135.9637	1068.4855	2163.9586	1082.4830	2146.9321	1073.9697	2145.9481	1073.4777	Q	937.4924	469.2498	920.4659	460.7366			8
18	2249.0478	1125.0275	2277.0427	1139.0250	2260.0161	1130.5117	2259.0321	1130.0197	L	809.4338	405.2205	792.4073	396.7073			7
19	2380.0883	1190.5478	2408.0832	1204.5452	2391.0566	1196.0320	2390.0726	1195.5399	M	696.3498	348.6785	679.3232	340.1652			6
20	2437.1097	1219.0585	2465.1046	1233.0560	2448.0781	1224.5427	2447.0941	1224.0507	G	565.3093	283.1583	548.2827	274.6450			5
21	2550.1938	1275.6005	2578.1887	1289.5980	2561.1622	1281.0847	2560.1781	1280.5927	L	508.2878	254.6475	491.2613	246.1343			4
22	2713.2571	1357.1322	2741.2520	1371.1297	2724.2255	1362.6164	2723.2415	1362.1244	Y	395.2037	198.1055	378.1772	189.5922			3
23	2770.2786	1385.6429	2798.2735	1399.6404	2781.2470	1391.1271	2780.2629	1390.6351	G	232.1404	116.5738	215.1139	108.0606			2
24									R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

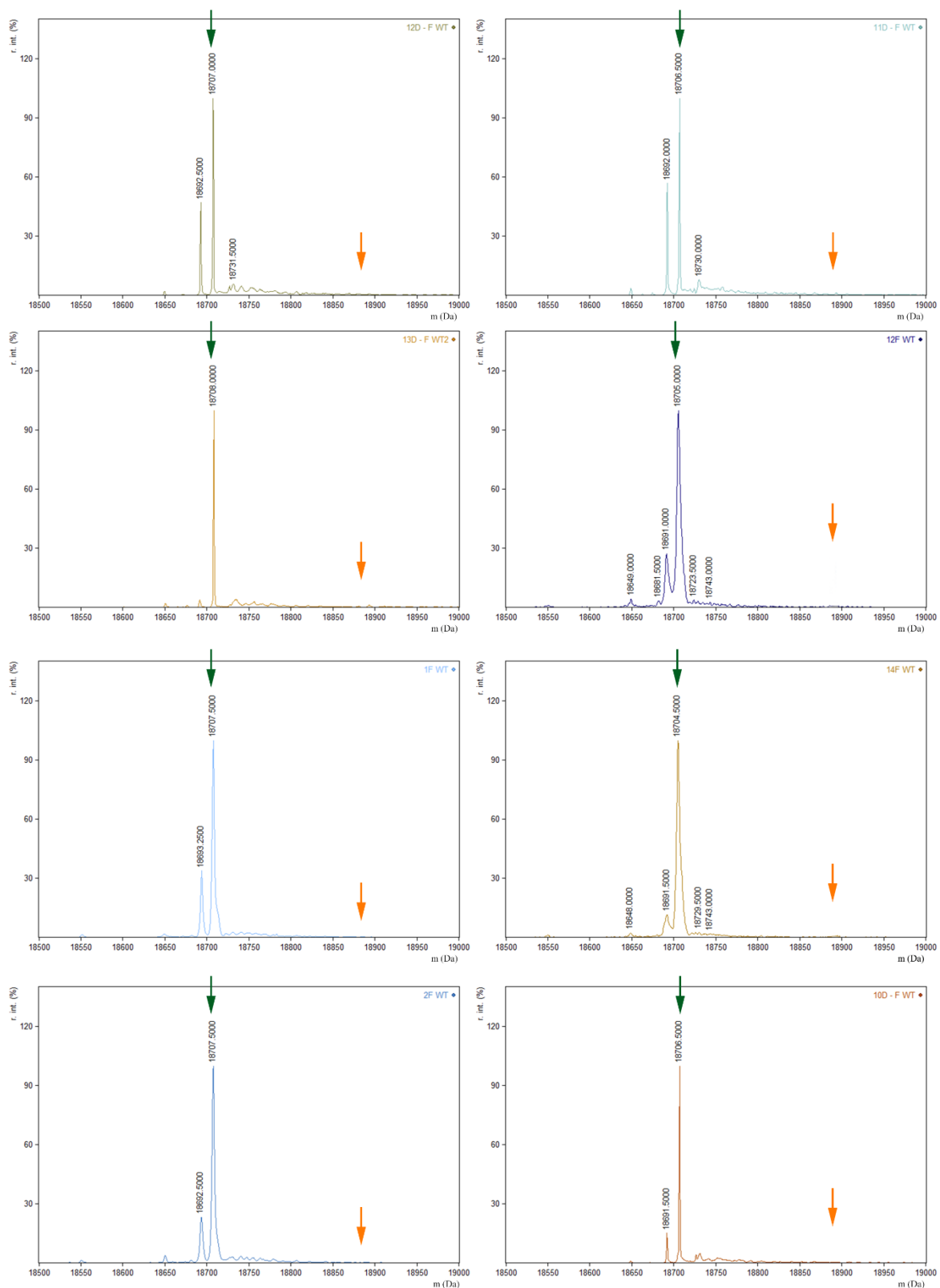
Rysunek 17. Reprezentatywna dla analizowanych prób tabela mas fragmentów peptydu zawierającego *N*-Hcy-Lys. Na podstawie mas poszczególnych fragmentów peptydu możliwe jest poznanie jego sekwencji oraz zidentyfikowanie miejsca modyfikacji.



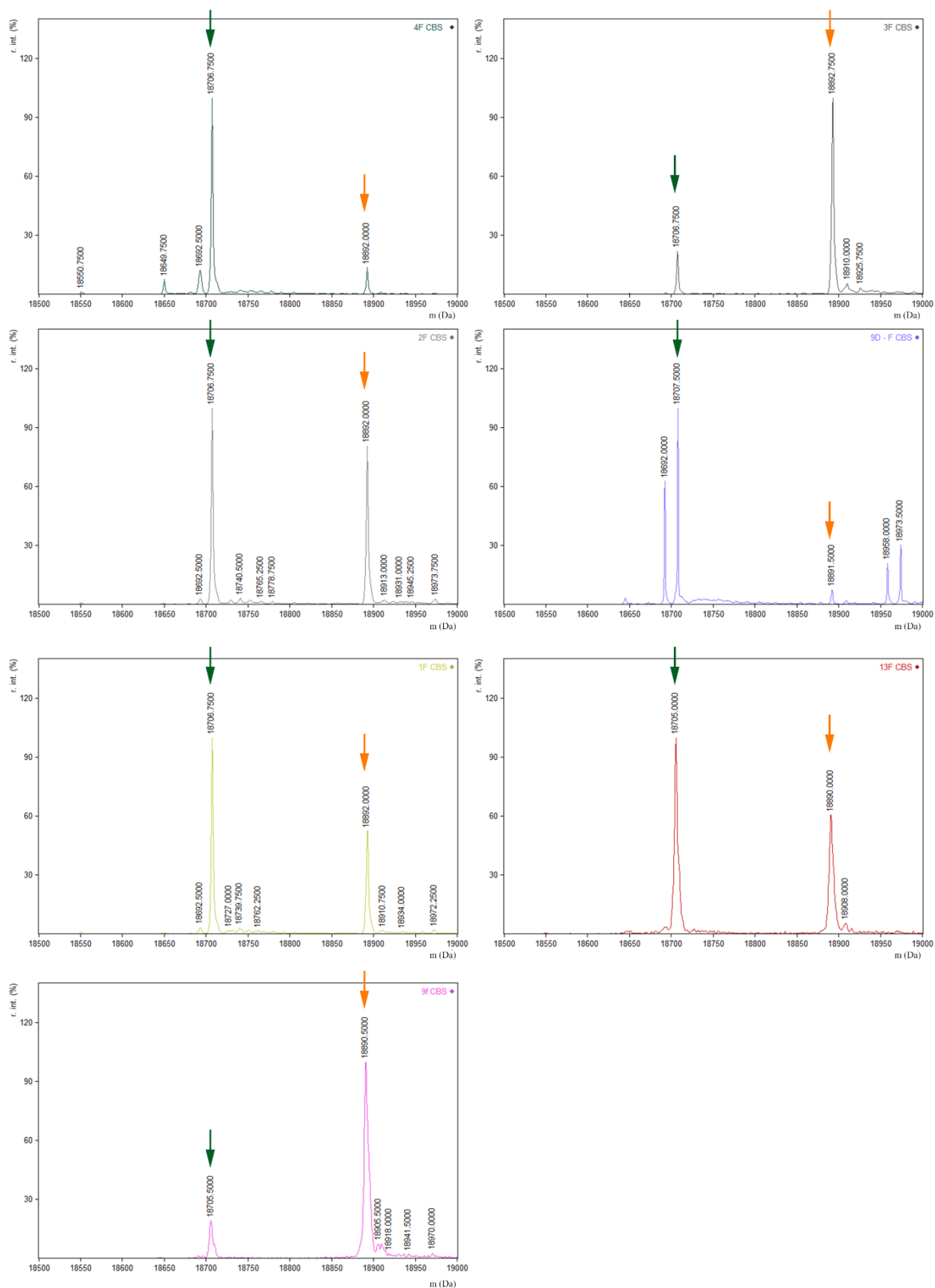
Rysunek 18. Widma ESI-MS dla białek moczu samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (n=8). Pomarańczowymi strzałkami zaznaczono pozycję pików darcyny o masie około 18 891 Da, zielonymi strzałkami zaznaczono natomiast pozycję pików o masie 18 705 Da, odpowiadającej białku Mup2. Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 19. Widma ESI-MS dla białek moczu samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (n=8). Pomarańczowymi strzałkami zaznaczono pozycję pików darcyny o masie około 18 891 Da, zielonymi strzałkami zaznaczono natomiast pozycję pików o masie 18 705 Da, odpowiadającej białku Mup2. Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 20. Widma ESI-MS dla białek moczu samic *Cbs*<sup>+/−</sup> (n=8). Pomarańczowymi strzałkami zaznaczono teoretyczną pozycję pików darcyny o masie około 18 891 Da, który nie został wykryty w badanych próbach; zielonymi strzałkami zaznaczono natomiast pozycję pików o masie 18 705 Da, odpowiadającej białku *Mup2*. Myszy w wieku 8 tygodni.



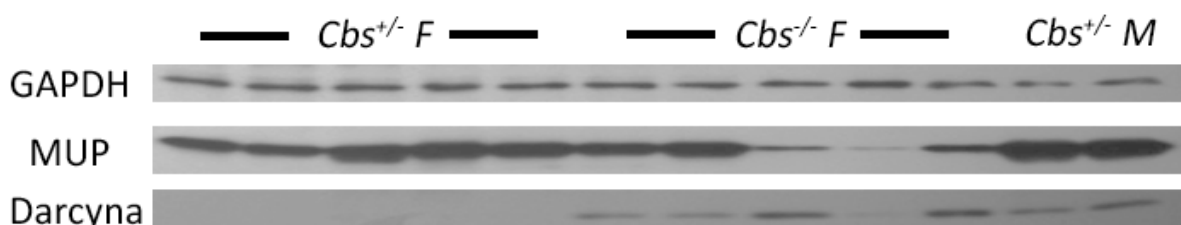
Rysunek 21. Widma ESI-MS dla białek moczu samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (n=7). Pomarańczowymi strzałkami zaznaczono pozycję pików darcyny o masie około 18 891 Da, niezauważonych wcześniej w moczu innych samic. Zielonymi strzałkami zaznaczono natomiast pozycję pików o masie 18 705 Da, odpowiadających białku *Mup2*. Myszy w wieku 8 tygodni.

## 4.4. Western blot – analiza ilościowa białek MUP w ekstraktach tkankowych

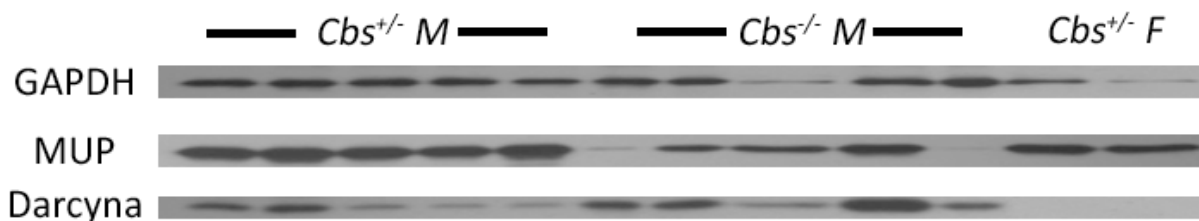
W celu określenia mechanizmu zmniejszonej ekskrecji białek MUP do moczu konieczne było zbadanie, czy zaobserwowane różnice wynikają ze zmienionego poziomu ekspresji tych białek w wątrobie, czy też występują zaburzenia na późniejszym etapie – to jest wydzielaniu białek do moczu w nerkach.

### 4.4.1. Analiza wpływu genotypu na produkcję białek w wątrobie

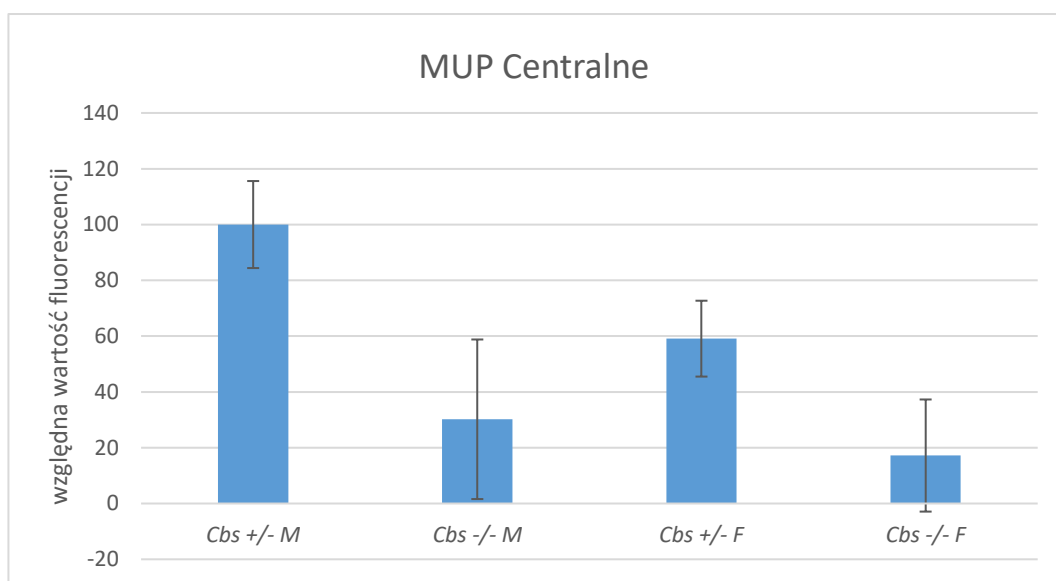
Ekspresja białek MUP u myszy zachodzi w wątrobie[77]. Dlatego też zasadne było sprawdzenie różnic w poziomach tych białek w ekstraktach z wątrób pobranych od 8-tygodniowych myszy. Ekstrakty białkowe po rozdziale w 14% żelu poliakryloamidowym przenoszono na mebrany z polifluorku winylidenu (PVDF) o średnicy porów 0,2  $\mu\text{m}$ . Po inkubacji z przeciwciałami I- i II-rzędowymi białka MUP wizualizowano z wykorzystaniem kliszy fotograficznej i fotografowano za pomocą aparatu G-box. Tak przygotowane cyfrowe wersje poddawano analizie densytometrycznej. Należy jednak zaznaczyć, że białka MUP nie stanowią grupy obserwowanej jako jeden prążek. Stąd analizie poddawano główny prążek MUP, obserwowany na wysokości około 20 kDa, traktowany jako centralne białka MUP oraz prążek odpowiadający darcynie na wysokości  $\sim 15$  kDa. Uzyskane wyniki przedstawiono poniżej (Rys. 22-25). Wyniki porównania dla samców i samic przeprowadzono dzięki wykonaniu dodatkowych analiz porównawczych 5 samców oraz 5 samic kontrolnych. Jako białko odniesienia wykorzystano dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH).



Rysunek 22. Wykonany w 4 powtórzeniach Western blot przedstawiający porównanie prążków MUP centralnych oraz darcyny u samic  $Cbs^{+/-}$  i  $Cbs^{-/-}$  w wątrobach. Ścieżki 1-5 przedstawiają prążki dla samic  $Cbs^{+/-}$ , 6-10 dla samic  $Cbs^{-/-}$ , 11-12 dla samców  $Cbs^{+/-}$  jako odniesienia. Myszy w wieku 8 tygodni.

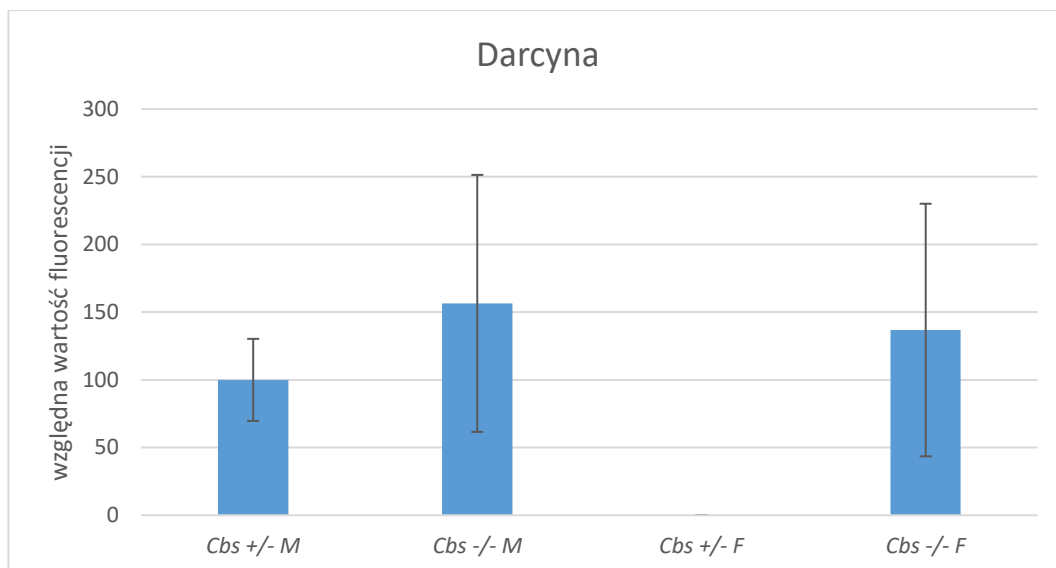


Rysunek 23. Wykonany w 4 powtórzeniach Western blot przedstawiający porównanie prążków MUP centralnych oraz darcyny u samców *Cbs*<sup>+/-</sup> i *Cbs*<sup>-/-</sup> w wątrobach. Ścieżki 1-5 przedstawiają prążki dla samców *Cbs*<sup>+/-</sup>, 6-10 dla samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, 11-12 dla samic *Cbs*<sup>+/-</sup> jako odniesienie. Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 24. Porównanie poziomu akumulacji białek MUP centralnych w wątrobach. Na wykresie słupkowym przedstawiono, znormalizowane względem grupy samców kontrolnych (*Cbs*<sup>+/-</sup>), wartości luminescencji Western blot, otrzymane poprzez analizę w programie Syngene GeneSys. Różnice istotne statystycznie zaobserwowano pomiędzy samcami *Cbs*<sup>-/-</sup> względem *Cbs*<sup>+/-</sup>, krotność zmiany 0,302 ( $p=0,001$ ) oraz pomiędzy samicami *Cbs*<sup>-/-</sup> względem *Cbs*<sup>+/-</sup>, krotność zmiany 0,292 ( $p=0,002$ ), a także pomiędzy kontrolnymi grupami samców i samic *Cbs*<sup>+/-</sup>, krotność zmiany 0,591 ( $p=0,001$ ).



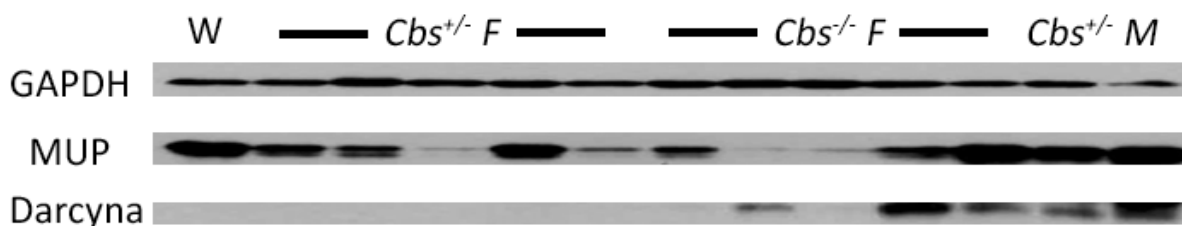


Rysunek 25. Porównanie poziomu akumulacji darcyny w wątrobach. Na wykresie słupkowym przedstawiono, znormalizowane względem grupy samców kontrolnych ( $Cbs^{+/-}$ ), wartości luminescencji Western blot, otrzymane poprzez analizę w programie Syngene GeneSys. Przedstawione na wykresie słupki reprezentują zbliżone wartości (brak różnic istotnych statystycznie) luminescencji pomiędzy grupami samców  $Cbs^{-/-}$  względem  $Cbs^{+/-}$ , a także samic  $Cbs^{-/-}$  względem samców  $Cbs^{+/-}$  oraz  $Cbs^{-/-}$ . Sugeruje to, iż poziom darcyny u samic  $Cbs^{-/-}$  jest zbliżony do poziomu akumulacji tego białka u samców, podczas, gdy u samic kontrolnych  $Cbs^{+/-}$  białko nie zostało wykryte.

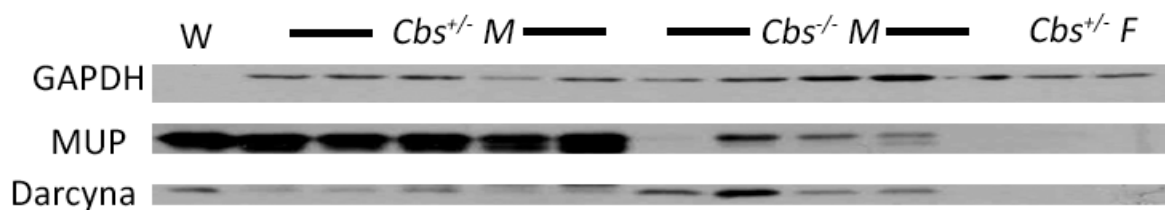
Badania te pozwalają stwierdzić, że u myszy typu  $Cbs^{-/-}$  poziom białek MUP ulega znacznemu obniżeniu już w wątrobie, co wskazuje na regulację poziomu tych protein już na etapie transkrypcji, bądź translacji.

#### 4.4.2. Analiza poziomu białek MUP w nerkach

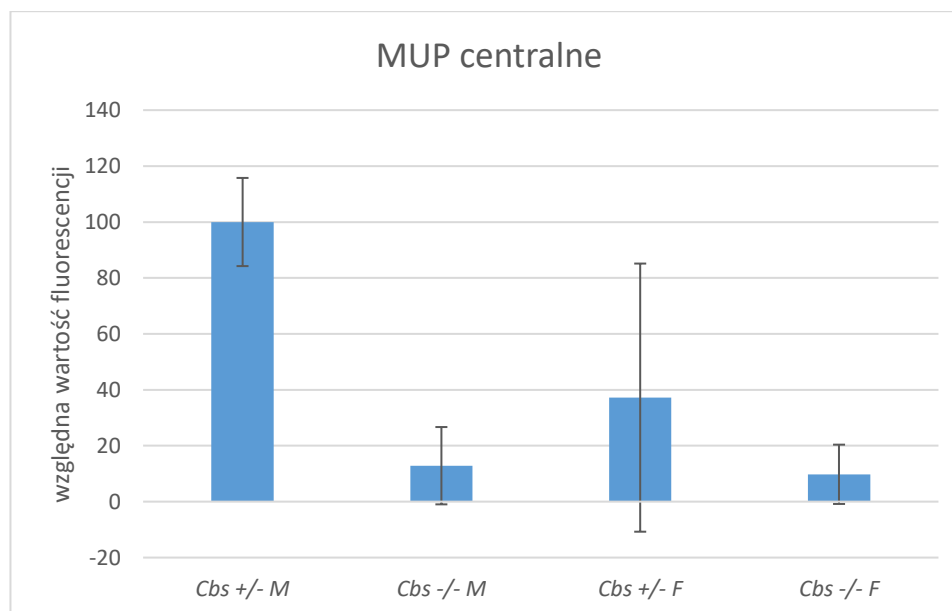
W celu wykluczenia problemów z sekrecją białek MUP do moczu u myszy  $Cbs^{-/-}$ , przeprowadzono również analogiczne do powyższych analizy dla ekstraktów z nerek. Zależności pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi prezentują tendencję podobną do zmian widocznych w wątrobach. Ponadto, ponieważ na żel nanoszono również (jako kontrolę) sześciokrotnie rozcieńczony izolat białek wątroby, można stwierdzić, iż poziom białek MUP w nerkach jest resztkowy. Można więc uznać, że białka te nie odkładają się w nerkach w innych proporcjach niż obserwowane jest to na etapie ich ekspresji w wątrobie. Opisane wyniki przedstawiono poniżej (Rys. 26-29).



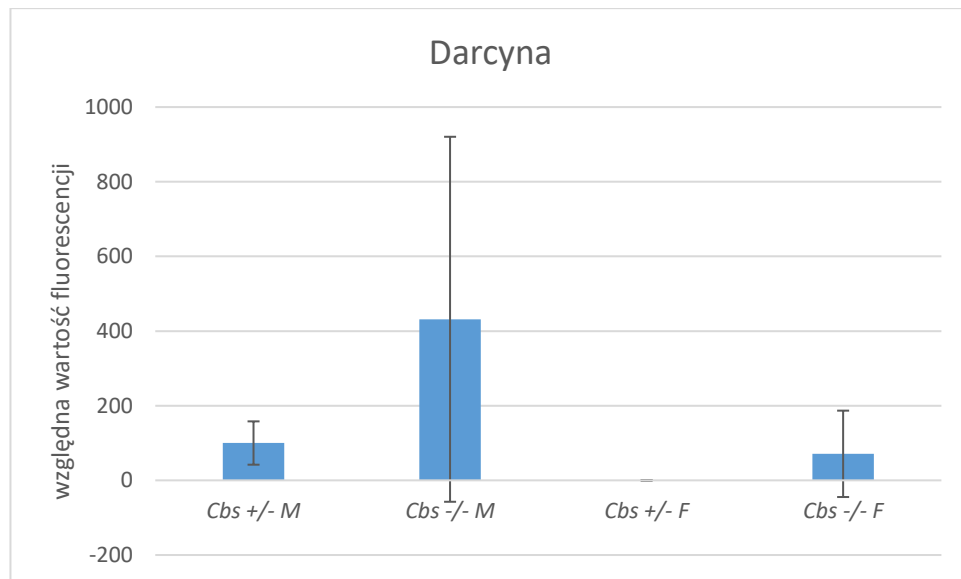
Rysunek 26. Western blot, wykonany w 3 powtórzeniach, przedstawiający porównanie prążków MUP centralnych oraz darcyny u samic Cbs<sup>+/-</sup> i Cbs<sup>-/-</sup> w nerkach. Ścieżka 1 przedstawia prążki dla 6 – krotnie rozcieńczonej próby izolatu białka z wątroby kontrolnej, ścieżki 2-6 przedstawiają prążki dla samic Cbs<sup>+/-</sup>, 7-11 dla samic Cbs<sup>-/-</sup>, 12-13 dla samców Cbs<sup>+/-</sup> jako odniesienie. Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 27. Western blot, wykonany w 3 powtórzeniach, przedstawiający porównanie prążków MUP centralnych oraz darcyny u samców Cbs<sup>+/-</sup> i Cbs<sup>-/-</sup> w nerkach. Ścieżka 1 przedstawia prążki dla 6 – krotnie rozcieńczonej próby izolatu białka z wątroby kontrolnej, ścieżki 2-6 przedstawiają prążki dla samców Cbs<sup>+/-</sup>, 7-11 dla samców Cbs<sup>-/-</sup>, 12-13 dla samic Cbs<sup>+/-</sup> jako odniesienie. Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 28. Porównanie poziomu akumulacji białek MUP centralnych w nerkach. Na wykresie słupkowym przedstawiono znormalizowane względem grupy samców kontrolnych (Cbs<sup>+/-</sup>) wartości luminescencji Western blot, otrzymane poprzez analizę w programie Syngene GeneSys. Różnice istotnie statystycznie zaobserwowano pomiędzy samcami Cbs<sup>-/-</sup> względem Cbs<sup>+/-</sup>, krotność zmiany 0,13 ( $p < 0,001$ ), a także pomiędzy kontrolną grupą samic Cbs<sup>+/-</sup> i samców Cbs<sup>+/-</sup>, krotność zmiany 0,098 ( $p = 0,02$ ).



Rysunek 29. Porównanie poziomu akumulacji darcyny w nerkach. Na wykresie słupkowym przedstawiono znormalizowane względem grupy samców kontrolnych ( $Cbs^{+/-}$ ) wartości luminescencji Western blot, otrzymane poprzez analizę w programie Syngene GeneSys. Przedstawione na wykresie słupki reprezentują zbliżone wartości (brak różnic istotnych statystycznie) luminescencji pomiędzy grupami samców  $Cbs^{-/-}$  względem  $Cbs^{+/-}$  a także samic  $Cbs^{-/-}$  względem samców  $Cbs^{+/-}$  oraz  $Cbs^{-/-}$ . Sugeruje to, iż poziom darcyny u samic  $Cbs^{-/-}$  jest zbliżony do poziomu akumulacji tego białka u samców – u samic kontrolnych  $Cbs^{+/-}$  natomiast, białko nie zostało wykryte.

#### 4.5. Real-Time RT qPCR

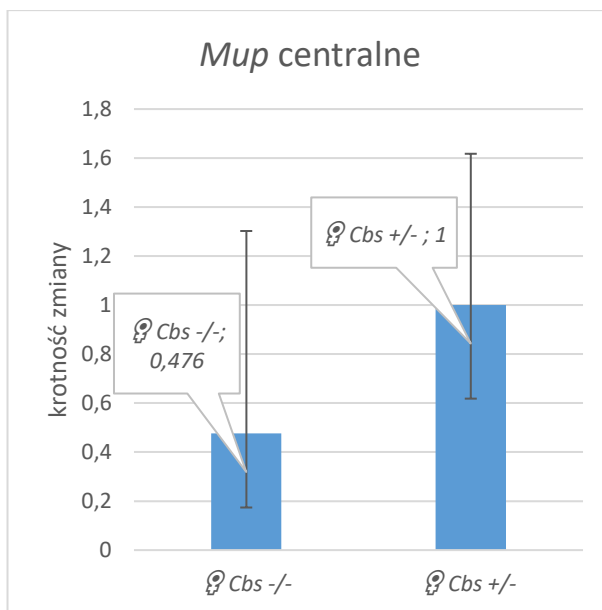
W celu dalszego wyjaśnienia mechanizmu regulacji ekspresji białek MUP wykonano szereg analiz typu Real-Time RT qPCR, zarówno dla produktów transkrypcji genów *Mup*, jak i czynnika transkrypcyjnego *Zhx2*, regulującego transkrypcję genów *Mup*. Zbadano także ilość mRNA receptorów hormonów, których poziom wpływać może na poziom białek MUP w moczu oraz mRNA istotnego ze względu na płodność genu *Timp1*. Odpowiednie analizy poprzedziła izolacja całkowitego RNA, którego czystość potwierdzono z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop2000, mierząc absorbancję próbek przy długościach fali 230 nm, 260 nm oraz 280 nm. Zakładano przy tym, że próbka nadaje się do dalszej analizy jeśli wartości współczynników  $A_{260}/A_{280}$  oraz  $A_{260}/A_{230}$  wynosiły pomiędzy 1,8 a 2,1. Próby spełniające ten warunek po traktowaniu DNAzą wykorzystywano do syntezy cDNA, stanowiącego matrycę do analiz ilościowych metodą Real-Time qPCR.

#### 4.5.1. Poziom transkrypcji genów *mup*

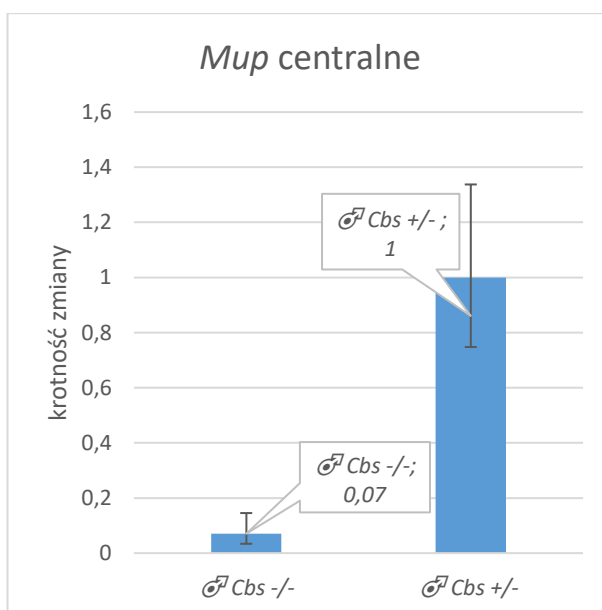
Istotne z punktu widzenia badanych zagadnień, jest określenie czy zmiany w ekspresji białek MUP obserwowane są już na poziomie transkrypcji. Stąd też wykonano analizy poziomu transkryptu dla kodujących je genów. Z uwagi jednak na wysokie podobieństwo sekwencji genów *mup*, jedna z par starterów jest specyficzna wobec mRNA więcej niż jednego genu. Stąd wyniki podzielono według transkryptu na *Mup centralne*, *Darcynę* oraz *Mup3*. Analizę przeprowadzono dla 4 samic *Cbs<sup>-/-</sup>*, 4 samic *Cbs<sup>+/-</sup>*, 3 samców *Cbs<sup>-/-</sup>* oraz 4 samców *Cbs<sup>+/-</sup>*. Obliczeń dokonywano względem genu  $\beta$ -aktyny z wykorzystaniem metody  $\Delta\Delta Ct$ . Jako grupy kontrolne do analiz porównawczych przyjęto myszy *Cbs<sup>+/-</sup>* o odpowiedniej płci.

##### **Mup centralne**

W grupie tej znajduje się większość genów *Mup*, dla których z uwagi na wysokie podobieństwo sekwencji transkryptów nie było możliwe zaprojektowanie starterów specyficznych wobec produktu transkrypcji pojedynczego genu. Wynik tej analizy pozwala więc oszacować zmianę ilości transkryptu wszystkich genów *Mup*, a co za tym idzie – ma przełożenie na całkowitą ilość białek MUP wydzielanych w moczu, jeśli regulacja zachodzi na poziomie transkrypcji. Samce *Cbs<sup>-/-</sup>* mają zdecydowanie obniżony poziom transkryptu genów *Mup* (0,07 względem *Cbs<sup>+/-</sup>*,  $p < 0,05$ ), podczas gdy u samic różnica nie jest istotna statystycznie. Wyniki dla samic oraz samców przedstawiono na wykresach słupkowych poniżej (Rys. 30 i 31).



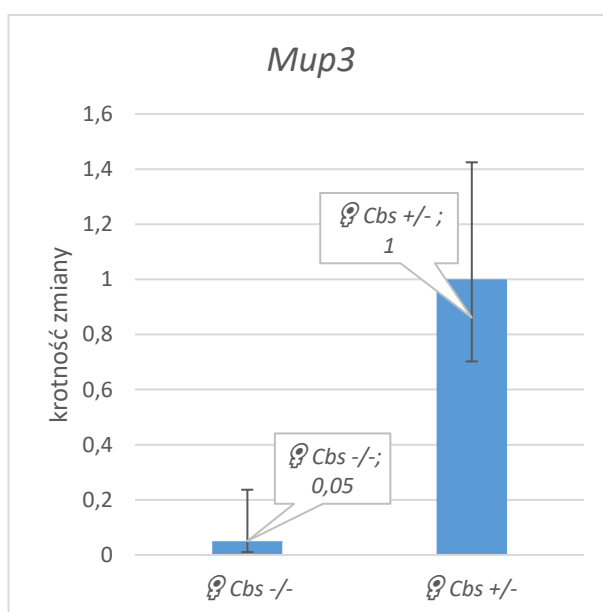
Rysunek 30. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genów *Mup* centralnych u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genów *Mup* centralnych u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=4$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=4$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genów *Mup* centralnych względem grupy kontrolnej wyniosła 0,476 ( $p=0,146$ ), zmiana nie jest istotna statystycznie.



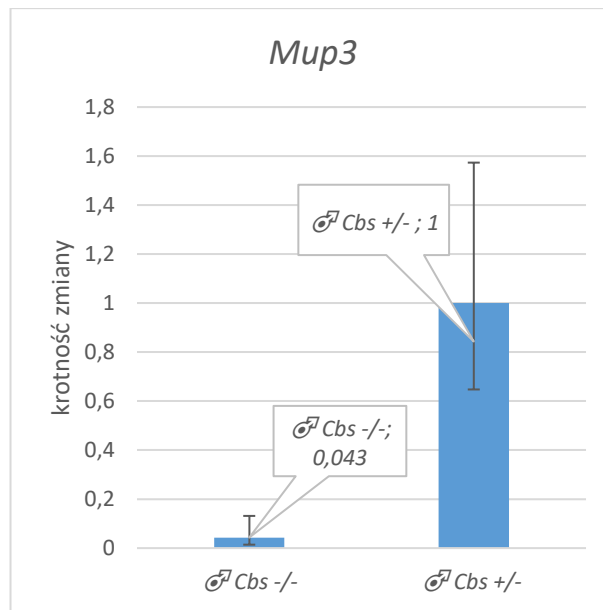
Rysunek 31. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genów *Mup* centralnych u samców. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genów *Mup* centralnych u samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=3$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=4$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genów *Mup* centralnych względem grupy kontrolnej wyniosła 0,070 ( $p=0,001$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 93% redukcję poziomu transkryptu genów *mup* centralnych.

## Mup3

Zbadano również poziom transkryptu genu *Mup3*, którego produkt, białko Mup3 udało się zidentyfikować w próbkach moczu metodą spektrometrii mas i obserwowano jego zmniejszoną ilość na elektroforegramach SDS-PAGE. Podobnie do wyników obserwowanych dla transkryptów genów *Mup* centralnych, również zaobserwowano znacznie zmniejszony poziom transkryptu genu *Mup3*, zarówno u samic, jak i u samców. Krotność zmiany poziomu transkryptu wyniosła u osobników z *knock-outem* genu *Cbs* odpowiednio 0,05 ( $p < 0,01$ ) i 0,043 ( $p < 0,01$ ). Wyniki przedstawiono na wykresach poniżej (Rys. 32 i 33). Powyższe rezultaty pozwalają potwierdzić wcześniejsze obserwacje dotyczące zmniejszenia ekspresji białek MUP wskutek *knock-outu* genu *Cbs*.



Rysunek 32. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Mup3* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Mup3* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=4$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=4$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *mup3* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,050 ( $p=0,009$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 95% redukcję poziomu transkryptu genu *Mup3*.

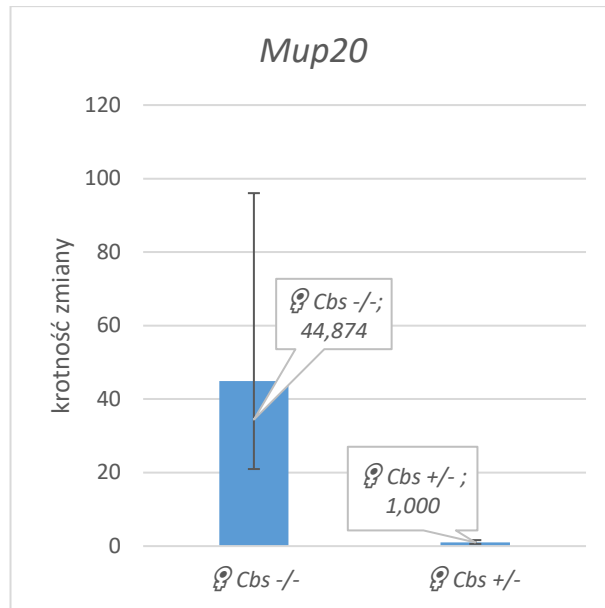


Rysunek 33. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Mup3* u samców. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Mup3* u samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=3$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=4$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *mup3* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,043 ( $p=0,004$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 96% redukcję poziomu transkryptu genu *Mup3*.

## Darcyna

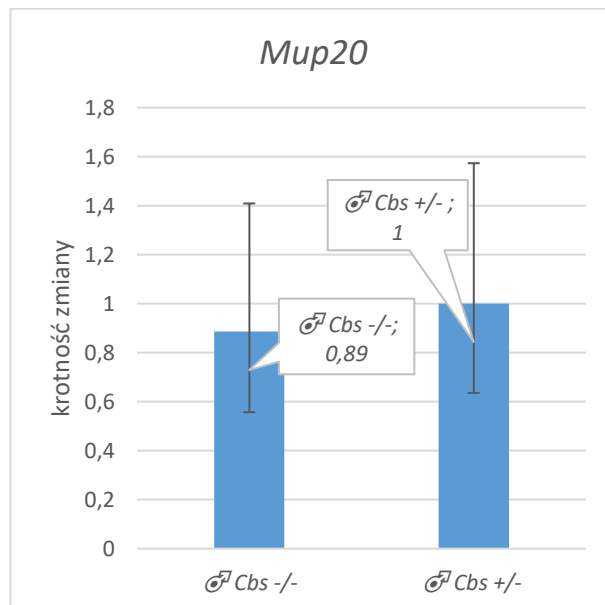
Istotnym z punktu widzenia obserwowanych wcześniej zmian jakościowych w profilach białkowych moczu mysiego pomiędzy zwierzętami *Cbs*<sup>-/-</sup>, a *Cbs*<sup>+/-</sup> było zbadanie poziomu transkryptu dla genu *Mup20*, którego produktem jest darcyna, opisywana w literaturze jako białko specyficzne dla samców [101]. Ponieważ na elektroforegramach SDS-PAGE próbek moczu oraz podczas analiz z wykorzystaniem spektrometrii mas białko to obserwowane było również u samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, kluczowe wydaje się wyjaśnienie czy gen *Mup20* jest nieaktywny u samic, czy też ekspresja darcyny regulowana jest posttranskrypcyjnie. Zaobserwowane wyniki przedstawiono na wykresach poniżej.

Krotność zmiany poziomu transkryptu genu *Mup20* u samic wyniosła 44,874 ( $p<0,05$ ), zmiana ta jest istotna statystycznie (Rys. 34).



Rysunek 34. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Mup20* (darcyny) u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Mup20* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona, n=4) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej, n=4). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Mup20* względem grupy kontrolnej wyniosła 44,874 ( $p=0,00017$ ), zmiana istotna statystycznie, zaobserwowano 4400% wzrost poziomu transkryptu.

Krotność zmiany poziomu transkryptu genu *Mup20* u samców wyniosła 0,886 ( $p>0,05$ ) i zmiana ta jest nieistotna statystycznie (Rys.35).

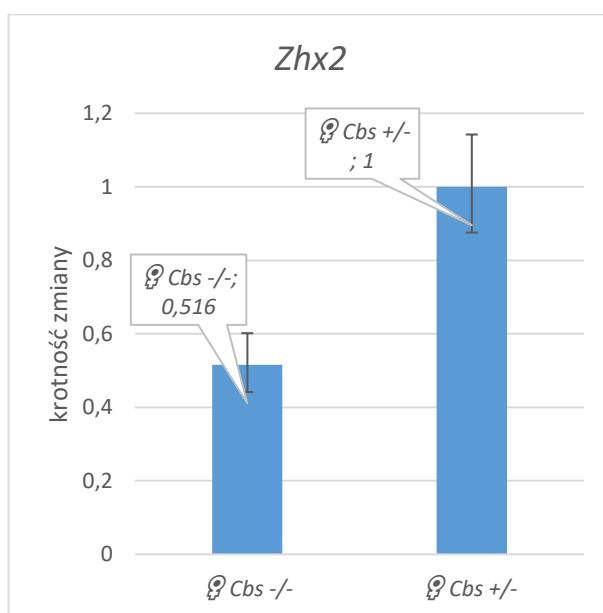


Rysunek 35. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Mup20* (darcyny) u samców. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Mup20* u samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona, n=3) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej, n=4). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Mup20* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,886 ( $p=0,391$ ), zmiana nie jest istotna statystycznie.

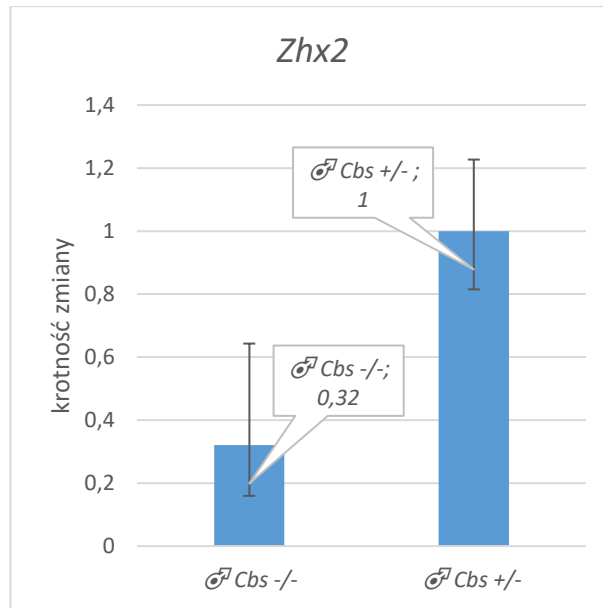


#### 4.5.2. Poziom transkrypcji genu *Zhx2*

W związku z zaobserwowanymi zmianami w profilach transkrypcji genów *Mup* zdecydowano, że zasadne będzie zbadanie również poziomu transkrypcji genu czynnika transkrypcyjnego *Zhx2*. Został on niedawno opisany w literaturze jako regulujący poziom ekspresji białek MUP [104]. Analizę przeprowadzono dla 4 samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, 4 samic *Cbs*<sup>+/-</sup>, 3 samców *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz 4 samców *Cbs*<sup>+/-</sup>. Obliczeń dokonywano względem genu  $\beta$ -aktyny z wykorzystaniem metody  $\Delta\Delta C_t$ . Jako grupy kontrolne do analiz porównawczych przyjęto zwierzęta *Cbs*<sup>+/-</sup> o odpowiedniej płci. Zarówno u samic (Rys. 36), jak i samców (Rys. 37) *Cbs*<sup>-/-</sup> zaobserwowano zmniejszony poziom transkryptu genu *Zhx2*. U samic zaobserwowano około dwukrotnie zmniejszony poziom mRNA tego genu – krotność zmiany wynosi 0,516 ( $p < 0,05$ ). U samców natomiast krotność zmiany badanego produktu wyniosła 0,320 ( $p < 0,05$ ).



Rysunek 36. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Zhx2* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta C_t$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Zhx2* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=4$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=4$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Zhx2* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,516 ( $p=0,0007$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 48,4% spadek poziomu transkryptu.



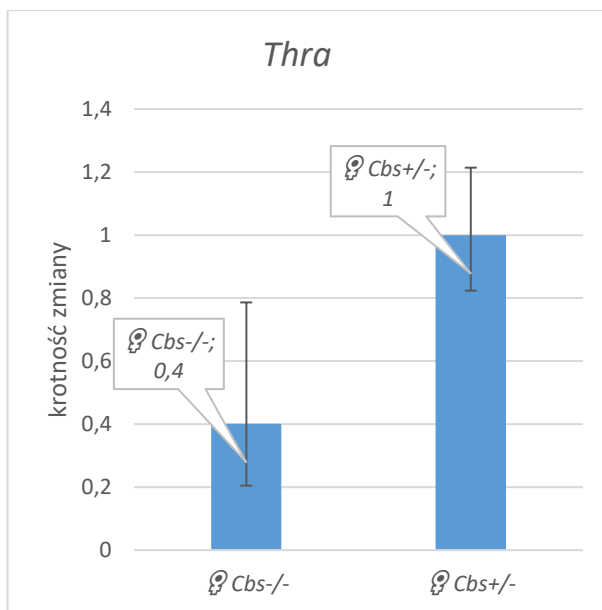
Rysunek 37. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Zhx2* u samców. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany (Fc) dla genu *Zhx2* u samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona, n=3) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej, n=4). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Zhx2* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,320 ( $p=0,0237$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 68% spadek poziomu transkryptu.

#### 4.5.3. Poziom transkrypcji genów wybranych receptorów hormonów u samic

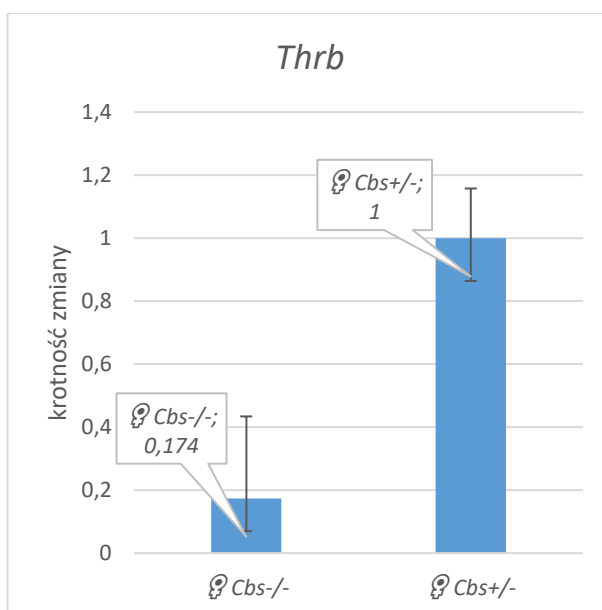
Celem zbadania możliwego innego, niezależnego od *Zhx2* mechanizmu regulacji ekspresji darcyny u samic, wykonano również szereg analiz poziomu transkryptu dla receptorów wybranych hormonów, które biorą udział w regulacji ekspresji białek MUP. Analizy wykonano wstępnie na grupie 3 samic *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz 3 samic *Cbs*<sup>+/-</sup>.

##### Receptory hormonów tarczycy – geny *Thra* i *Thrb*

Pierwsze dwa geny, których poziom transkryptu zmierzono to geny *Thra* oraz *Thrb*, kodujące receptory hormonów tarczycy. Zaobserwowano zmniejszony poziom mRNA dla obu tych genów u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, z czego zdecydowanie większa zmiana obserwowana była w przypadku drugiego z wymienionych transkryptów. Należy jednak zaznaczyć, że obserwowana różnica dla genu *Thra* ( $p>0,05$ ) nie jest istotna statystycznie (Rys. 38) – w przeciwieństwie do *Thrb* ( $p<0,05$ ), którego krotność zmiany wyniosła 0,17 (Rys. 39).



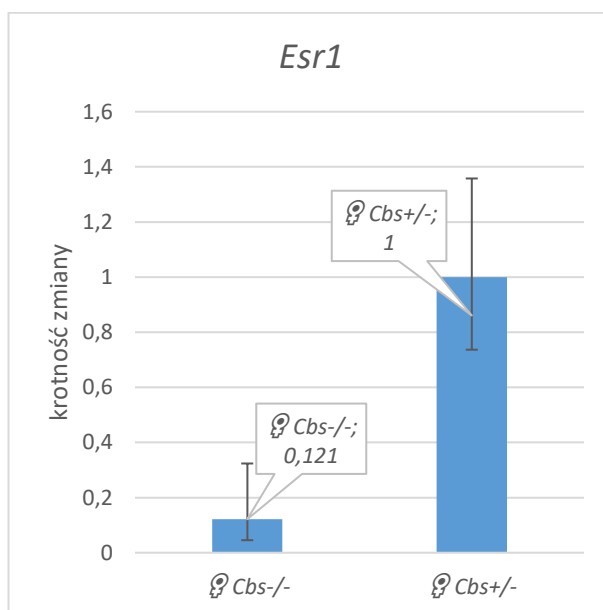
Rysunek 38. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Thra* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta C_t$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Thra* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=3$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=3$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Thra* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,401 ( $p=0,069$ ), zmiana nie jest istotna statystycznie.



Rysunek 39. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Thrb* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta C_t$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Thrb* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=3$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=3$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Thrb* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,174 ( $p=0,028$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 82,6% spadek poziomu transkryptu.

## Receptor estrogenu - gen *Esr1*

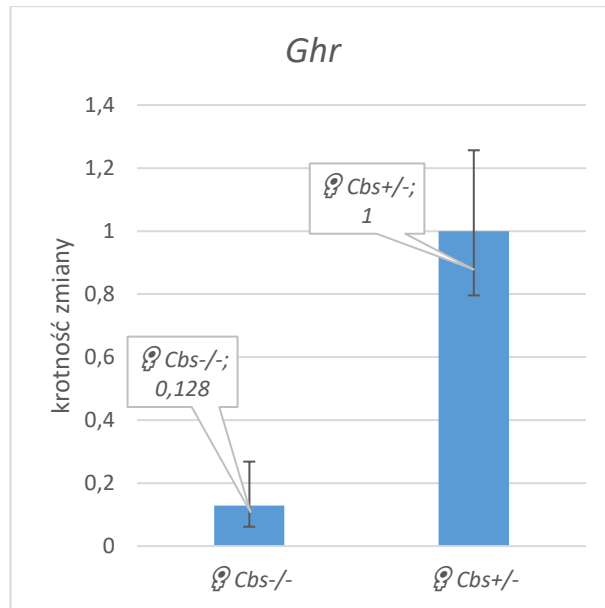
Kolejnym przeanalizowanym transkryptem było mRNA genu *Esr1*, kodującego receptor estrogenu. Z punktu widzenia obserwowanych zmian jakościowych, świadczących o maskulinizacji proteomu moczu samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, istotne wydawało się zbadanie poziomu receptora tego hormonu. Zaobserwowano spadek poziomu badanego transkryptu u myszy transgenicznych, z krotnością zmiany na poziomie 0,12 ( $p < 0,05$ ). Wyniki przedstawiono na wykresie poniżej (Rys. 40).



Rysunek 40. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Esr1* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Esr1* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=3$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=3$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Esr1* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,121 ( $p=0,022$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 87,9% spadek poziomu transkryptu.

## Receptor hormonu wzrostu – *Ghr*

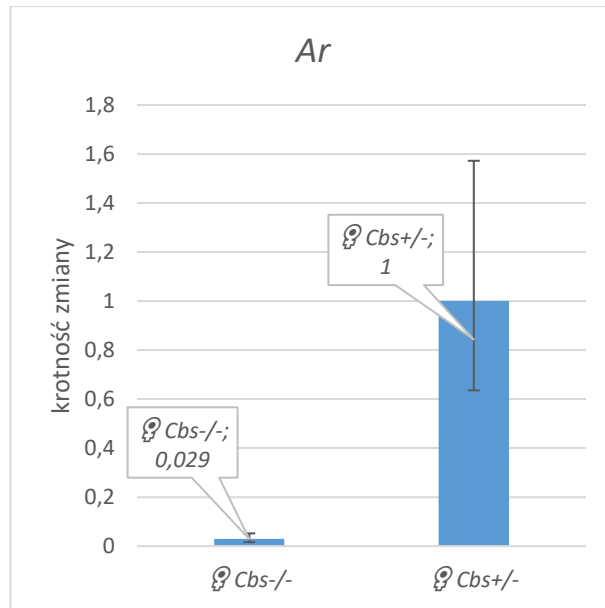
Przedostatnim analizowanym transkryptem było mRNA genu receptora hormonu wzrostu, *Ghr*. Zaobserwowano krotność zmiany poziomu transkryptu wynoszącą 0,128 ( $p < 0,05$ ), a więc zmniejszony o 86,2% poziom transkryptu u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> (Rys. 41).



Rysunek 41. Wykres krotności zmiany poziomu transkrypcji genu *Ghr* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkrypcji w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Ghr* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona, n=3) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej, n=3). Krotność zmiany dla transkrypcji genu *Ghr* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,128 ( $p=0,01$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 86,2% spadek poziomu transkrypcji.

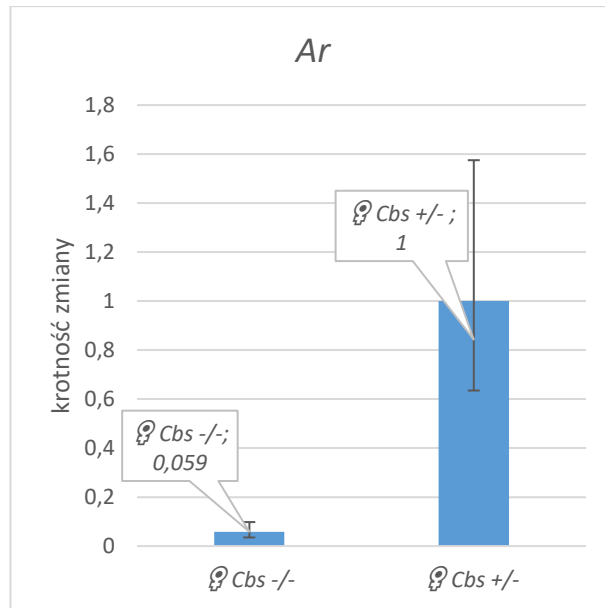
### Receptor androgenowy – gen *Ar*

Ostatnim z przebadanych mRNA genów receptorów hormonów jest mRNA receptora androgenu – *Ar*. W związku z tym, iż testosteron jest typowo męczym hormonem – spodziewano się wzrostu jego poziomu u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>. Zaobserwowano tymczasem, wbrew oczekiwaniom, że poziom mRNA receptora androgenowego jest znacznie obniżony u wspomnianych myszy. Krotność zmiany obserwowana dla transkrypcji genu *Ar* wyniosła 0,029 ( $p<0,05$ ), co przedstawione zostało na rycinie poniżej (Rys. 42).



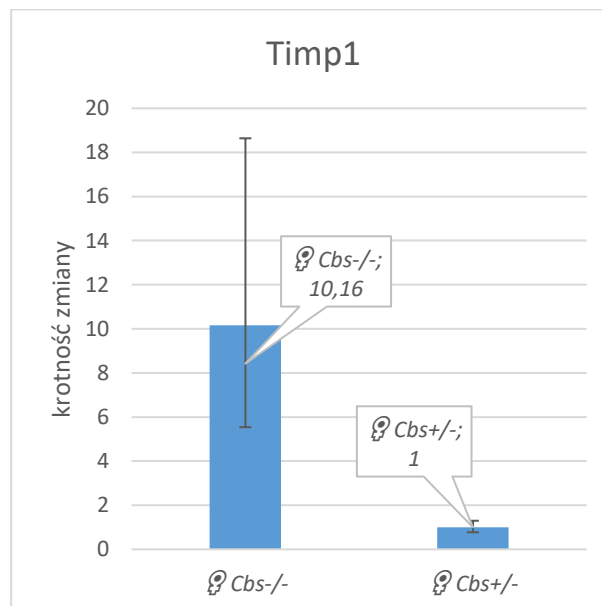
Rysunek 42. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Ar* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Ar* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona,  $n=3$ ) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej,  $n=3$ ). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Ar* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,029 ( $p=0,001$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 97,1% spadek poziomu transkryptu.

Celem weryfikacji obserwowanych zmian przeprowadzono dodatkowe analizy na grupie 4 samic *Cbs*<sup>-/-</sup> i 4 samic *Cbs*<sup>+/-</sup>, które wykorzystywane były do analiz opisanych w rozdziale 4.5.1. niniejszej pracy. Zbadano poziom transkryptu genów *Ar* oraz *Timp1*. Ustalono, iż pierwszy z wspomnianych transkryptów u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> występuje z krotnością zmiany 0,059 ( $p<0,05$ ), co odpowiada 94,1% redukcji transkrypcji genu receptora androgenowego (Rys. 43).



Rysunek 43. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Ar* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Ar* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona, n=4) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej, n=4). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Ar* względem grupy kontrolnej wyniosła 0,059 ( $p=0,0002$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 94,1% spadek poziomu transkryptu.

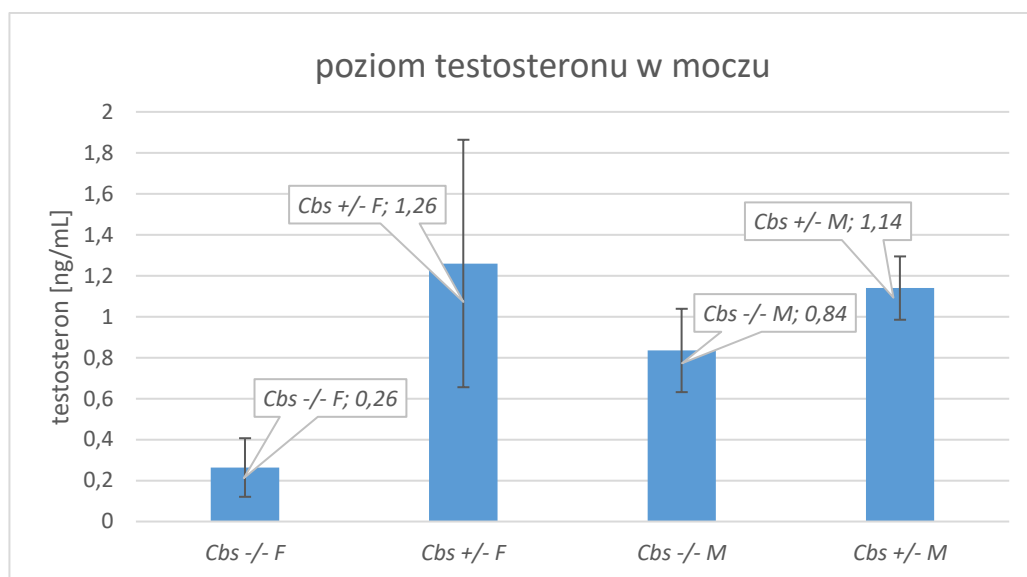
Krotność zmiany poziomu mRNA genu *Timp1* obserwowana u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> względem myszy zdrowych przedstawiona została na wykresie poniżej (Rys. 44) i wyniosła 10,162 ( $p<0.05$ )



Rysunek 44. Wykres krotności zmiany poziomu transkryptu genu *Timp1* u samic. Oznaczone metodą  $\Delta\Delta Ct$  względne ilości transkryptu w postaci wartości krotności zmiany ( $F_c$ ) dla genu *Timp1* u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (lewa strona, n=4) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (z prawej, n=4). Krotność zmiany dla transkryptu genu *Timp1* względem grupy kontrolnej wyniosła 10,162 ( $p=0,0004$ ), zmiana jest istotna statystycznie, zaobserwowano 1000,16% wzrost poziomu transkryptu.

## 4.6. Analiza poziomu testosteronu metodą ELISA

Oznaczanie poziomu testosteronu w moczu badanych myszy wykonywano na 3 próbach moczu z każdej grupy myszy. Otrzymane wyniki świadczą o obniżeniu poziomu testosteronu u myszy z *knock-outem Cbs* obu płci, względem odpowiadających im myszy kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup>, jednak jedynie w przypadku samic różnica ta jest istotna statystycznie. Wyniki przedstawiono na wykresie poniżej (Rys. 45).



Rysunek 45. Wyniki analizy stężenia testosteronu w moczu, analizowane metodą ELISA. Zaobserwowano 79,9% mniejsze stężenie testosteronu u samic (F) *Cbs*<sup>-/-</sup> (n=3) względem samic kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup> (n=3), p=0,0426. Dla samców (M) różnica nie jest istotna statystycznie.

## 4.7. Analizy behawioralne

### 4.7.1. Analiza zainteresowania śladem zapachowym

Przeprowadzone eksperymenty behawioralne pozwoliły na oszacowanie, w jaki sposób myszy typu dzikiego (szczep C57BL/6J) będą reagować na ślady zapachowe od badanych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>. Eksperyment zaplanowany został tak, by zapachy nie mieszały się, a każda z myszy analizowana była względem każdego z badanych śladów zapachowych. Stąd w pojedynczym teście występował jeden ślad zapachowy po jednej stronie klatki testowej, po drugiej zaś nakrapiano wodę jako kontrolę. Mierzono czas spędzany w obu sektorach i obliczano stosunek obu wartości, co pozwoliło na określenie, czy oraz w jakim stopniu dany ślad zapachowy jest atrakcyjny bądź odstraszaający. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej, oddzielnie dla samców i samic. Ponadto zliczano również powierzchnię wypróżnień i kropli moczu.



Badany mocz względem H <sub>2</sub> O	n	10 min (film)	wypróżnienia	krople
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> M	12x3	1,12 (0,06)	1,16 (0,31)	0,78 (0,17)
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> M + 5mM Hcy	12x3	0,77 (0,000)	0,67 (0,12)	0,89 (0,35)
<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> M	12x2	0,90 (0,1)	0,61 (0,09)	1,65 (0,05)
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> F	12x3	0,99 (0,44)	1,5 (0,16)	0,83 (0,28)
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> F + 5mM Hcy	12x3	0,88 (0,03)	0,44 (0,01)	0,78 (0,17)
<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> F	12x2	0,99 (0,44)	1,56 (0,11)	0,52 (0,02)
H <sub>2</sub> O+ 5mM Hcy	12	0,83 (0,04)	1,5 (0,32)	0,87 (0,37)

Tabela 1. Zebrane wartości zmiennych dla testów behawioralnych przeprowadzonych na samicach. Wartości w kolumnach przedstawiają iloraz danej zmiennej (tj. czasu bądź powierzchni) dla badanego moczu oraz odpowiadającej jej wartości dla wody. Odpowiednie wartości-p dla testu t-studenta (jednostronnego) zamieszczono w nawiasach. Statystycznie istotne różnice zaznaczono kolorem żółtym.

Badany mocz względem H <sub>2</sub> O	n	10 min (film)	Wypróżnienia	krople
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> M	12x3	0,79 (0,000)	0,59 (0,049)	1,07 (0,38)
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> M + 5mM Hcy	12x3	0,95 (0,16)	2,29 (0,03)	1,13 (0,34)
<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> M	12x2	1,05 (0,27)	1,12 (0,38)	1,12 (0,31)
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> F	12x3	0,99 (0,45)	1,61 (0,11)	1,35 (0,11)
<i>Cbs</i> <sup>+/-</sup> F + 5mM Hcy	12x3	1,01 (0,4)	1,5 (0,2)	1,32 (0,22)
<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> F	12x2	1,05 (0,17)	0,78 (0,29)	1,14 (0,33)
H <sub>2</sub> O+ 5mM Hcy	12	0,86 (0,06)	1,43 (0,28)	0,60 (0,16)

Tabela 2. Zebrane wartości zmiennych dla testów behawioralnych przeprowadzonych na samcach. Wartości w kolumnach przedstawiają iloraz danej zmiennej (tj. czasu bądź powierzchni) dla badanego moczu oraz odpowiadającej jej wartości dla wody. Odpowiednie wartości-p dla testu t-studenta zamieszczono w nawiasach. Statystycznie istotne różnice zaznaczono kolorem żółtym.

Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że samice unikały moczu z dodatkiem Hcy, zarówno samczego, jak i od samic, jednak zachowywały się tak samo w stosunku do wody z dodatkiem Hcy. Możliwe więc, że 5mM homocysteina jest dla samic odstrasżająca, a takie stężenie występuje u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> [103]. W testach przeprowadzonych na samicach widać tendencję w preferowaniu moczu pochodzącego od samców kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup> w porównaniu z moczem samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, jest ona jednak nieistotna statystycznie (Tab. 1).

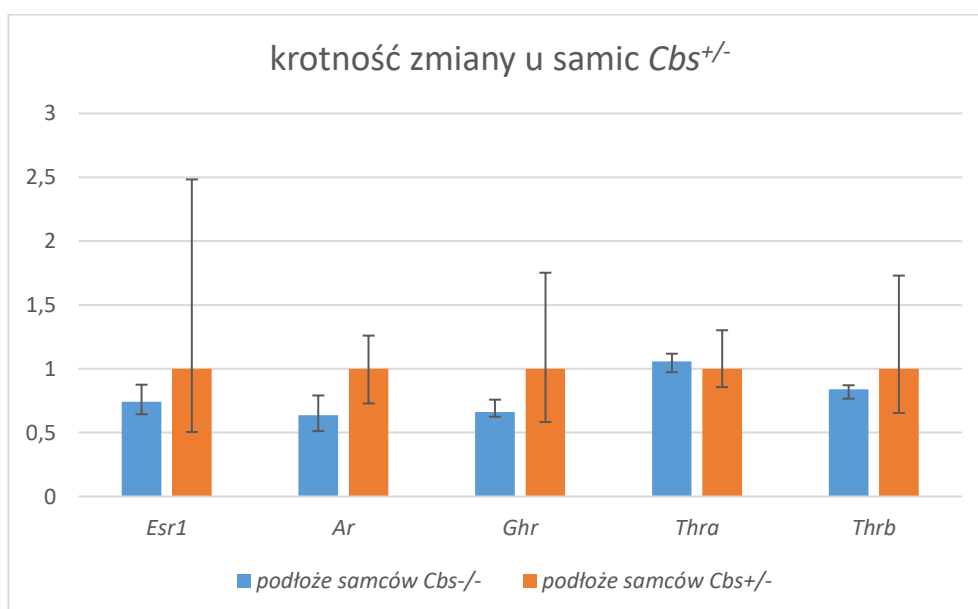
Samce (Tab. 2) natomiast unikają regionu z nakropionym moczem kontrolnym od samców *Cbs*<sup>+/-</sup>, nie wykazują analogicznych zmian wobec moczu od samców *Cbs*<sup>-/-</sup>. Sugeruje to, iż mocz samców z knock-outem genu *Cbs* nie zawiera informacji odstrasżającej innych samców i może

świadczyć o dysfunkcyjności komunikacji zapachowej. Samce *Cbs*<sup>-/-</sup> mogą nie być uznawane za zagrożenie przez samce dzikie.

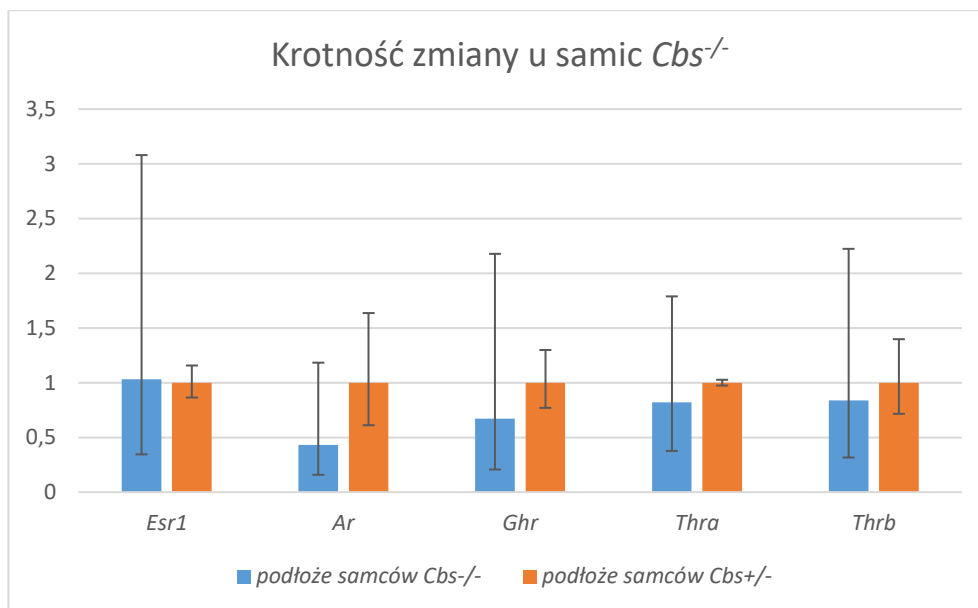
#### 4.7.2. Analiza odpowiedzi hormonalnej na podłoże od osobników płci przeciwnej

Ostatnim wykonanym eksperymentem, który miał na celu sprawdzenie funkcjonalności systemu sygnalizacji seksualnej u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, było badanie reakcji hormonalnej w odpowiedzi na wystawienie myszy na ściółkę od osobników płci przeciwnej. Sprawdzone w ten sposób jak samice oraz samce *Cbs*<sup>-/-</sup> i *Cbs*<sup>+/-</sup> reagują na zapach myszy płci przeciwnej, ze względu na ich genotyp. Z uwagi na charakter doświadczenia, zostało ono przeprowadzone na niewielkiej grupie 20 myszy (po 3 samce i 3 samice obu genotypów wystawionych na podłoże osobników *Cbs*<sup>-/-</sup> płci przeciwnej – łącznie 12 osobników - oraz po 2 samce i 2 samice obu genotypów – łącznie 8 osobników – wystawionych na bodźce osobników *Cbs*<sup>+/-</sup> płci przeciwnej). Mimo to udało się osiągnąć istotność statystyczną.

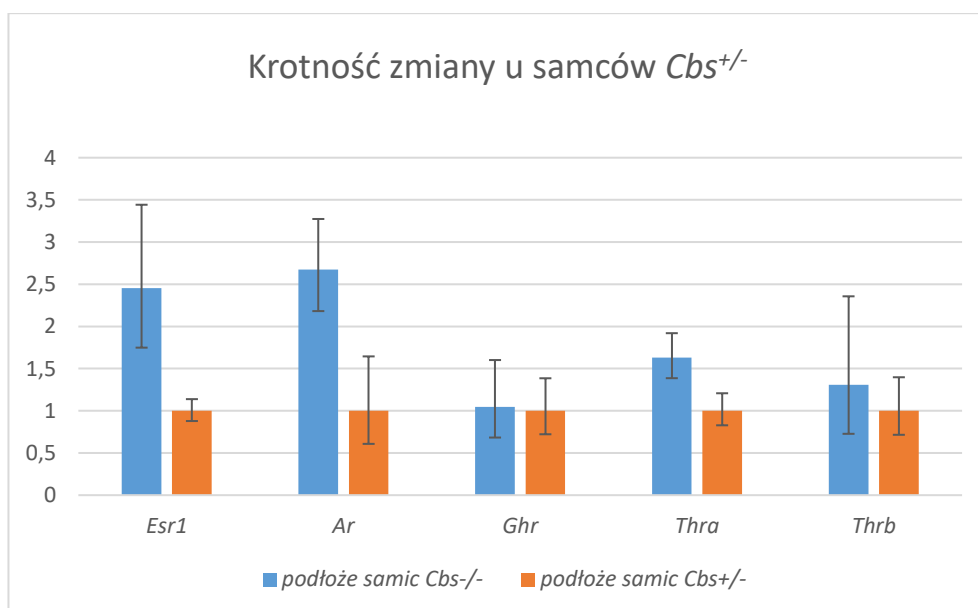
Ponieważ zarówno u samic kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup> (Rys. 46), jak i *Cbs*<sup>-/-</sup> (Rys. 47) różnice w reakcji na ściółkę od samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, względem samców kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup> są niewielkie (krotność zmiany pomiędzy 0,63 a 1,05) oraz poniżej progu istotności statystycznej ( $p > 0,05$ ) uznano, iż dysfunkcyjny gen *Cbs* nie przesądza o sukcesie rozrodczym u samców.



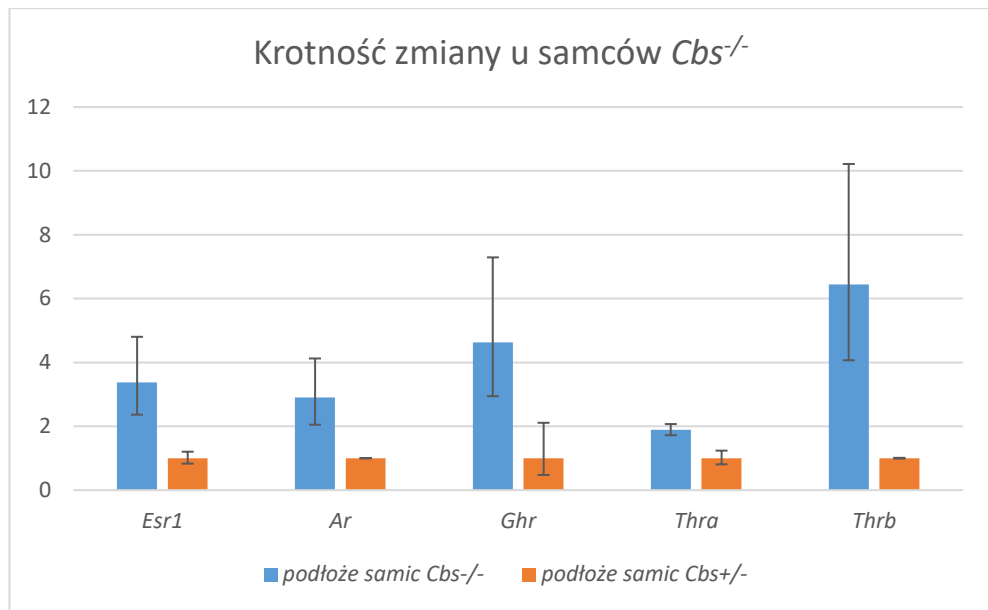
Rysunek 46. Zmiany w poziomie transkryptu wybranych receptorów hormonów w wątrobie u samic kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup>. Słupki reprezentują krotność zmiany ilości transkryptu w reakcji samic na ściółkę od samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (niebieski) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (pomarańczowy). Obserwowane różnice nie są istotne statystycznie, co może sugerować, iż u samców obecność mutacji w genie *Cbs* nie jest kluczowa dla wyboru partnera seksualnego przez samice kontrolne *Cbs*<sup>+/-</sup>. Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 47. Zmiany w poziomie transkryptu wybranych receptorów hormonów w wątrobie u samic  $Cbs^{-/-}$ . Słupki reprezentują krotność zmiany ilości transkryptu w reakcji samic na ściółkę od samców  $Cbs^{-/-}$  (niebieski) oraz  $Cbs^{+/-}$  (pomarańczowy). Obserwowane różnice nie są istotne statystycznie, co może sugerować, iż u samic obecność mutacji w genie *Cbs* nie jest kluczowa dla wyboru partnera seksualnego przez samice  $Cbs^{-/-}$ . Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 48. Zmiany w poziomie transkryptu wybranych receptorów hormonów w wątrobie u samców kontrolnych  $Cbs^{+/-}$ . Słupki reprezentują krotność zmiany ilości transkryptu w reakcji samic na ściółkę od samic  $Cbs^{-/-}$  (niebieski) oraz  $Cbs^{+/-}$  (pomarańczowy). Obserwowane różnice dla genów *Esr1*, *Ar* i *Thra* są istotne statystycznie, co sugeruje, iż u samic obecność mutacji w genie *Cbs* jest kluczowa dla wyboru partnera seksualnego przez samce  $Cbs^{+/-}$ . Myszy w wieku 8 tygodni.



Rysunek 49. Zmiany w poziomie transkryptyu wybranych receptorów hormonów w wątrobie u samców *Cbs*<sup>-/-</sup>. Słupki reprezentują krotność zmiany ilości transkryptyu w reakcji samic na ściółkę od samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (niebieski) oraz *Cbs*<sup>+/-</sup> (pomarańczowy). Obserwowane różnice dla genów *Esr1*, *Ar*, *Thra* oraz *Thrb* są istotne statystycznie, co sugeruje, iż u samic obecność mutacji w genie *Cbs* jest kluczowa dla wyboru partnera seksualnego przez samce *Cbs*<sup>-/-</sup>. Myszy w wieku 8 tygodni.

Odmienne niż u samic prezentuje się reakcja samców na ściółkę samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, względem samic kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup>. U samców kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup> (Rys. 48) transkrypcja wszystkich, poza *Ghr* oraz *Thrb*, badanych genów receptorów hormonów uległa zwiększeniu w reakcji na ściółkę samic *Cbs*<sup>-/-</sup> względem reakcji na ściółkę samic kontrolnych *Cbs*<sup>+/-</sup> ( $p < 0,05$ ). Obserwowany wyższy poziom transkrypcji genów *Ar* i *Esr1* może świadczyć o znacznie wyższej produkcji testosteronu wskutek ekspozycji na podłoże od samic *Cbs*<sup>-/-</sup> niż samic kontrolnych. U samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (Rys. 49) odpowiedź obejmuje zwiększenie poziomu transkrypcji dla wszystkich badanych genów ( $p < 0,05$ ).

## 5. Dyskusja

Wyniki analizy znormalizowanego względem poziomu kreatyniny stężenia białka w moczu wskazują, że homocystynuria prowadzi do obniżenia ekspresji białek MUP, stanowiących główną frakcję białek w moczu myszy. Podobny spadek stężenia białek MUP obserwowany jest u osobników starszych, o obniżonej zdolności rozrodczej [105]. Wiąże się to prawdopodobnie z tym, że sygnalizacja seksualna jest kosztowna energetycznie [106–108] – możliwe więc, że należy upatrywać przyczyny spadku ekspresji białek MUP, jako ligandów substancji lotnych obecnych w moczu. Ich ekspresja spada w związku z osłabieniem organizmu lub zdolności rozrodczej badanych myszy. Metoda zastosowana do oznaczeń stężenia białka całkowitego w moczu, chociaż nie jest standardowo wykorzystywana w tego typu analizach – jest metodą stosunkowo nieczułą na zanieczyszczenia. Ponadto cechuje ją wysoka powtarzalność oznaczeń oraz dokładność pomiaru [109]. Oznaczone wartości dla myszy kontrolnych są zbliżone do danych literaturowych [105], sięgając wartości od kilku do kilkunastu mg/ml.

Zaobserwowane na elektroforegramach zmiany jakościowe oraz ilościowe potwierdzają, iż *knock-out* genu *Cbs* skutkuje obniżeniem zawartości białek MUP w moczu. Ujawnia się ponadto odmienny rozkład prążków białkowych u samic *Cbs*<sup>-/-</sup>. Prążek, obserwowany na wysokości około 15 kDa wydaje się odpowiadać darcynie. Białko to, pomimo masy cząsteczkowej zbliżonej do innych białek z rodziny MUP – migruje w denaturującym żelu poliakryloamidowym w anomalny sposób i rozdziela się od głównego prążka, charakterystycznego dla tych białek, co zostało szczegółowo opisane przez Roberts i wsp. [101].

Zawarte w poszczególnych prążkach białka identyfikowano z wykorzystaniem rutynowo używanych w tym celu analiz metodami spektrometrii mas. Wycinki żelu, zawierające dany prążek białkowy poddawane są trawieniu trypsyną, a masy wyekstrahowanych peptydów oraz ich fragmentów porównywane są z bioinformatycznymi bazami danych. Analiza ta nosi nazwę peptydowego odcisku palca (ang. *peptide mass fingerprint*) i pozwala na oznaczenie białek obecnych w danym prążku [110]. Dodatkowo stosowaną, zwiększającą dokładność analizy metodą jest sekwencjonowanie *de novo* – peptydy o danej masie poddawane są fragmentacji cząsteczkami gazu obojętnego, a powstałe fragmenty pozwalają określić sekwencję oraz

ewentualne modyfikacje poszczególnych aminokwasów [111,112], w tym N-homocysteinyłację reszt lizynowych [113]. Wysokie pokrycie sekwencji dla zidentyfikowanych białek pozwala na potwierdzenie, że prążek widoczny na elektroforegramach białek moczu samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, na wysokości ~15 kDa odpowiada darcynie.

Dzięki temu, że białka MUP mają stosunkowo niewielką masę cząsteczkową, możliwe było również precyzyjne oznaczenie mas poszczególnych białek w moczu bez poddawania ich trawieniu enzymem proteolitycznym – analogicznie do analiz zastosowanych przez innych badaczy [85,101,114]. Oznaczenia jakościowe w niniejszej pracy wykonane zostały więc zgodnie z aktualnie przyjętymi standardami i nie powinny budzić wątpliwości.

Problematyczne okazało się jednak precyzyjne określenie miejsc N-homocysteinyłacji białek MUP, zaobserwowanej w znacznej ilości przez prof. Jakubowskiego [103]. Szybkość reakcji przyłączania cząsteczek HTL do reszt ε-aminowych lizyn w białku jest odwrotnie proporcjonalna do wartości jego punktu izoelektrycznego [115]. Mogłoby to również sugerować, że MUP są bardziej podatne na tę modyfikację, z uwagi na lekko kwaśne pH moczu. Wykonane analizy MS/MS nie pozwalają jednak z całkowitą pewnością oznaczyć miejsc N-homocysteinyłacji. Mimo, że zaobserwowano w trawionych trypsyną próbkach peptydy z masą powiększoną o 174 Da, co odpowiada tej modyfikacji, to wykryte fragmenty tych peptydów już modyfikacji nie zawierały. W związku z tym niemożliwe było ułożenie z nich pełnej sekwencji peptydu zawierającej N-Hcy-lizynę wewnątrz łańcucha. Znaleziony został jedynie jon odpowiadający modyfikowanej lizynie oraz kilka fragmentów oddalonych od miejsca modyfikacji o 1 aminokwas. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego fenomenu może być rozpad analizowanego łańcucha aminokwasowego wskutek zderzeń z cząsteczkami gazu obojętnego na zbyt małe fragmenty.

Analiza poziomu białek MUP w wątrobach i nerkach z wykorzystaniem techniki Western blot potwierdziła opisane dotychczas obserwacje – zmniejszony poziom akumulacji omawianych białek u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz nietypową obecność znacznych ilości darcyny u samic z homocystynurią. Wykorzystywane do analiz przeciwciało anty-Mup1, chociaż jest specyficzne względem całej grupy białek MUP z uwagi na ich wysokie podobieństwo, było jednak wystarczające do przeprowadzenia analiz.

W przypadku detekcji omawianych białek techniką Western blot w nerkach, konieczne było znaczne wydłużenie czasu naświetlania materiału światłoczułego, pomimo zastosowania większych stężeń białka oraz przeciwciał, niż w przypadku analiz prowadzonych na wątrobach. Analiza ta była przez to utrudniona, a przy wydłużonym czasie ekspozycji uwidaczniały się niespecyficzne prążki. Podczas badań obu tkanek, dla poszczególnych białek stosowano optymalne czasy ekspozycji. Stąd przedstawione obrazy reprezentujące wyniki analiz Western blot podzielone są na paski odpowiadające danym prążkom białkowym, nie są zaś zobrazowane jako jedna membrana. Jest to jednak sposób prezentacji występujący w literaturze [116], podobnie jak poddawanie analizie ilościowej jedynie głównego prążka MUP, pomimo obecności kilku prążków na elektroforegramach białek moczu [104].

Ostateczną weryfikacją obserwacji były analizy typu Real-Time RT-qPCR. Zmiany, które opisano są analogiczne do wcześniej przedstawionych danych. Mimo, iż analiza transkryptu obejmująca *Mup* centralne u samic nie jest istotna statystycznie – widać tendencję w kierunku obniżenia poziomu transkrypcji. U samców zaś, zależność ta jest ona zaś istotna statystycznie. Dopiero zbadanie poziomu transkryptu genu *Mup3* pokazuje wyraźne różnice w poziomie transkryptu u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> względem *Cbs*<sup>+/-</sup> dla obu płci - prawdopodobnie więc transkrypcja nie zachodzi jednakowo dla wszystkich badanych genów *Mup*.

Skala, z jaką zmieniona jest transkrypcja genu *Mup20* wskutek *knock-outu Cbs* sugeruje, iż darcyna nie ulega ekspresji u samic. Ponieważ jednak produkt reakcji PCR był obserwowany poniżej 35 cyklu, można wnioskować, że przynajmniej u myszy *Cbs*<sup>+/-</sup>, transkrypcja tego genu zachodzi, jednak na bardzo niskim poziomie. Obserwacja wysokiego poziomu transkryptu u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> jest zgodna z wcześniejszymi analizami – zarówno proteomu moczu, jak i wątroby. Odmiennie przedstawia się sytuacja w przypadku samców. Zmiana jest niewielka i nieistotna statystycznie. Pozwala to wnioskować, że darcyna ulega niezależnej względem pozostałych białek MUP regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji. Może to wiązać się z tym, że białko to nie jest jedynie nośnikiem lotnych substancji zapachowych i pełni funkcję samodzielnego feromonu, którego zadaniem jest zwiększyć szanse na napotkanie samicy i kopulację [101]. Ponadto, jako iż jest to feromon białkowy, jego obecność w śladach zapachowych jest znacznie dłuższa niż substancji lotnych. Niezależny mechanizm regulacji ekspresji może też świadczyć o istnieniu innej, nie poznanej dotąd funkcji darcyny.

Dane dotyczące poziomu transkryptu czynnika *Zhx2*, będącego znanym w literaturze regulatorem ekspresji genów *Mup* [104] pozwalają wnioskować, że zmiana w ilości transkryptu genu *Zhx2* przekłada się na całkowitą zmianę w ilości białek MUP, a różnica ta jest bardziej widoczna u samców niż samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, względem *Cbs*<sup>+/-</sup>. W celu wyjaśnienia mechanizmu zmienionej regulacji darcyny u samic przebadano również poziom transkryptu dla szeregu receptorów hormonów.

W przypadku receptorów hormonów tarczycowych, istotne statystycznie zmiany zaobserwano jedynie w przypadku genu *Thrb*. Prawdopodobnie fakt ten wiąże się z tym, że jest to wariant receptora, który ulega ekspresji głównie w wątrobie, podczas gdy gen *Thra* jest aktywny w podobnym stopniu we wszystkich tkankach [117]. Gen wariantu  $\alpha$  receptora hormonów tarczycy posiada w regionie promotora obszar regulatorowy, który może wiązać NR3B1 (receptor powiązany z estrogenem  $\alpha$ ). Ekspresja genu *Thra* może być sprzężona z poziomem estrogenu, aczkolwiek mechanizm regulacji pozostaje nieznan.

Pomimo znacznego obniżenia poziomu transkryptu receptora estrogenu *Esr1*, zmiany te mogą wynikać z zaburzonego cyklu menstruacyjnego, obserwowanego u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> [118]. Prawdopodobnie nie odpowiadają więc one za ekspresję darcyny, a jedynie potwierdzają opisane już w literaturze nieprawidłowości.

Kolejnym przeanalizowanym genem, był gen receptora hormonu wzrostu *Ghr*. Hormon ten jest czynnikiem regulującym ekspresję białek MUP, co więcej, u myszy z mutacją pozbawiającą je ekspresji tego hormonu obserwowano znaczny spadek poziomu białka w moczu [119]. W połączeniu z obserwowaną u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> zmniejszoną masą ciała [59] sugeruje to, że inaktywacja genu *Cbs* prowadzi do zaburzenia produkcji tego hormonu. Zmiana w poziomie ekspresji genu receptora hormonu wzrostu i w domyśle samego hormonu w wątrobach myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> wyjaśnić może jednak jedynie ogólny spadek poziomu ekspresji białek MUP. Hormon wzrostu nie jest jednak hormonem płciowym, stąd kwestia pojawienia się w moczu samic *Cbs*<sup>-/-</sup> białka MUP specyficznego dla samców nadal pozostaje niewyjaśniona.

Receptor hormonu androgenowego *Ar* pełni istotną rolę w rozwijaniu się żeńskich komórek rozrodczych i dojrzewaniu pęcherzyków jajnikowych, a jego poziom jest negatywnie skorelowany z poziomem ekspresji genu *Timp1* [120]. Obserwowany spadek poziomu mRNA receptora androgenowego *Ar* może więc, przynajmniej częściowo tłumaczyć zaburzenia



plodności obserwowane u samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, a zmiany te przekładają się ponadto na poziom testosteronu w moczu samic.

Ciekawą obserwacją wydaje się być wzrost poziomu transkrypcji genu *Timp1* u badanych myszy. Produkt tego genu – tkankowy inhibitor metalloproteinazy 1 – jest glikoproteiną istotną w wielu procesach biologicznych. Poprzez regulowanie metalloproteinaz wpływa na skład macierzy zewnątrzkomórkowej – co jest istotne w rozwoju embrionalnym, a także remodelowaniu i naprawie tkanek (np. gojenie ran) [121]. W literaturze opisano podwyższony poziom *Timp1* w uszkodzonych, czy objętych stanem zapalnym tkankach [122]. Powiązano go również z procesem nowotworzenia [123] oraz regulacją procesu implantacji zarodka [124]. Co ciekawe, specyficzny *knock-out* receptora androgenowego w komórkach osłonki pęcherzykowej u myszy powodował wzrost ekspresji *Timp1* [120]. Sam *knock-out* genu *Ar* we wszystkich komórkach nie prowadził co prawda do zaburzeń rozrodu, jednak przeprowadzony specyficznie w komórkach ziarnistych skutkowało zmniejszeniem miotu oraz zaburzeniami cyklu menstruacyjnego [125,126].

Przeprowadzone analizy behawioralne miały na celu nakreślenie funkcjonalnych konsekwencji zmian jakościowych i ilościowych w proteomie moczu myszy, powstałych wskutek inaktywacji genu *Cbs*. Testy te zostały jednak przeprowadzone w jasnej fazie cyklu dobowego, co mogło mieć wpływ na ich informatywność. Mimo to, zgromadzone dane pozwoliły na identyfikację tendencji w zachowaniach samic i samców w odpowiedzi na dane ślady zapachowe. Ponadto, wykonane analizy transkryptów w odpowiedzi na podłoże myszy płci przeciwnej pozwala na lepsze poznanie mechanizmów działania substancji zawartych w moczu myszy. Wyniki wspomnianych analiz nie różnią się znacząco u samic obu genotypów, biorąc pod uwagę genotyp samców, na których podłoże samice wystawiono. Może to sugerować, iż pomimo zmniejszonej całkowitej ekspresji białek MUP, to darcyna jest czynnikiem decydującym o reakcji organizmu samic na ślad zapachowy samców, ponieważ poziom ekspresji tego białka pod wpływem *knock-outu* genu *Cbs* u samców nie ulega zmianie.

U samców natomiast, zwiększony poziom receptorów hormonów tarczycy po 24h ekspozycji na ściółkę samic *Cbs*<sup>-/-</sup> względem samic *Cbs*<sup>+/-</sup>, może świadczyć o większym stresie wywołanym ekspozycją na ściółkę samic z *knock-outem* genu *Cbs*. Według danych literaturowych, u szczurów narażonych na stres obserwowano wzrost poziomu hormonów tarczycy 24 godziny po wystąpieniu czynnika stresującego, tj. uwięzieniu ogona w pułapce bez

możliwości oswobodzenia zwierzęcia [127]. Można więc podejrzewać, że mocz samic *Cbs*<sup>-/-</sup> rozpoznawany jest przez samce obu genotypów za czynnik stresujący w postaci wysokiego stężenia darcyny w moczu tych samic – prawdopodobnie są one postrzegane przez samce jako osobniki płci męskiej.

Tematyka omawiana w niniejszej pracy nie została opisana wcześniej w literaturze. Pomimo, iż białka MUP odkryto stosunkowo dawno, długo pozostawały poza obszarem zainteresowań badaczy. Nowe informacje na ich temat pojawiać zaczęły się dopiero w XXI wieku, jednak wiele zagadnień ich dotyczących pozostaje niewyjaśnionych. Niniejsza praca poszerza stan wiedzy na ten temat, rozbudowując go o zmiany w ekspresji białek MUP w kontekście zaburzeń metabolizmu homocysteiny. Bezpłodność samic oraz zaburzenia rozwoju płodowego w mysim modelu homocystynurii, wskazują na istotną rolę regulacji metabolizmu Hcy w kontekście rozrodu.

Wyniki zawarte w niniejszej dysertacji można jednak skonfrontować z danymi literaturowymi, które nie zostały przytoczone we wstępie. Białka MUP zostały bowiem w ostatnim czasie zidentyfikowane w wydzielinie pochwy myszy. Co więcej, zaobserwowano ich zmienny poziom w różnych fazach cyklu rozrodczego, co podkreśla ich istotną rolę w procesach rozrodczych. W omawianym doniesieniu [128] opisano również, iż jedno z białek ulegających zmienionej ekspresji to, oprócz innych białek z tej rodziny, Mup20 – darcyna. 4-krotna zmiana poziomu tego białka, zbadana za pomocą analizy peptydów metodami spektrometrii mas jest jednak dość subtelną zmianą w porównaniu z wynikami opisanymi w niniejszej dysertacji. Autorzy nie zastosowali ponadto metod, które nie opierałyby się o analizy inne niż spektrometria mas peptydów po trawieniu trypsyną, w celu potwierdzenia zaobserwowanych zmian. Nie zaprezentowali również danych, pozwalających na określenie poziomu ekspresji Mup20 względem pozostałych białek z tej rodziny, w kontraście do niniejszej pracy, gdzie jasno pokazano, że u samic *Cbs*<sup>-/-</sup> darcyna występuje na poziomie zbliżonym do obserwowanego u samców (przynajmniej w wątrobie oraz moczu). Obserwacja białek MUP w wydzielinie pochwy jest jednak bardzo interesująca i wydaje się być zasadne zbadanie tego zagadnienia w kontekście myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> w przyszłości. Tym bardziej, że inny zespół zaobserwował zmiany poziomu transkrypcji genu *mup20* podczas różnych faz cyklu rozrodczego u samic myszy CD-1, nie opisując jednak dokładniej tej obserwacji w swoim doniesieniu [129].

Interesujące zmiany w poziomach białek MUP w wątrobach zostały zaobserwowane również u myszy z knock-outem genu *ApoE* [130]. Autorzy sugerują, że zwiększony poziom białka Mup2 u tych myszy może być ochronnym mechanizmem kompensacyjnym, mającym na celu ochronę organizmu przed postępującym w tym modelu stłuszczeniem wątroby. Powołują się przy tym na zwiększenie wydatkowania energetycznego wskutek wzrostu poziomu białka Mup1 u myszy z cukrzycą [131] oraz poprawę gospodarki lipidowej [132], sugerując podobną funkcję białka Mup2. Możliwe, że analogiczny mechanizm występuje u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, u których również rozwija się stłuszczenie wątroby [59,133]. Pozbawienie mysiego modelu *apoE*<sup>-/-</sup> dodatkowo genu *eNOS* (nabłonkowej syntazy tlenku azotu), skutkowało zwiększoną ekspresją białek glukoneogenezy, syntezy kwasów tłuszczowych i cholesterolu, jak również obniżonym poziomem białek biorących udział w rozkładzie trójglicerydów, transporcie cholesterolu oraz transkrypcji, translacji i przetwarzaniu białek w retikulum endoplazmatycznym. Autorzy sugerują, że zmiany te mogą być, przynajmniej częściowo, regulowane przez białka MUP, których poziom ulegał największemu zmniejszeniu u myszy *apoE*<sup>-/-</sup> *eNOS*<sup>-/-</sup>, w odniesieniu do myszy *apoE*<sup>-/-</sup>. Zaobserwowano również zmniejszony poziom Apolipoproteiny A-I, co koreluje ze zmianami widocznymi w HHcy, wywołanej dietą u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> [134]. Autorzy wskazują dodatkowo na zmniejszenie poziomu PON1 w analizowanym modelu, wiążąc obniżony poziom HDL (którego PON1 jest komponentem) ze zwiększonym ryzykiem zakrzepicy i zdarzeń naczyniowo-sercowych oraz cukrzycą typu II. Analogicznie, wysokometioninowa dieta, która skutkowała HHcy również prowadziła do obniżenia poziomu HDL [135]. Na podstawie tych doniesień, obserwacje zawarte w niniejszej rozprawie pozwalają powiązać białka MUP z metabolizmem Hcy i wskazują na ich istotną rolę w homeostazie wątroby, jednocześnie wprowadzając nowe zagadnienie w kontekście wpływu Hcy na organizm.

## 6. Wnioski

1. *Knock-out* genu *Cbs* prowadzi u myszy do zmian ilościowych, jak i jakościowych w proteomie moczu myszy
2. U samic *Cbs*<sup>-/-</sup> obserwowane jest charakterystyczne dla samców białko MUP20 – darcyna.
3. Wspomniane zmiany są regulowane na etapie transkrypcji i spowodowane są zaburzeniami gospodarki hormonalnej oraz różnicami w poziomie ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Zhx2*
4. Obserwowane w mysim modelu homocystynurii zmiany w sygnalizacji seksualnej u myszy mają wpływ na sukces reprodukcyjny, co potwierdzają testy behawioralne.

## Literatura

1. Jakubowski H. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiological Reviews* [Internet]. (2018). Available from: <https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00003.2018>.
2. Reference GH. Homocystinuria [Internet]. Genetics Home Reference. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/homocystinuria>.
3. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, *et al.* The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37(1), 1–31 (1985).
4. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 346(7), 476–483 (2002).
5. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 288(16), 2015–2022 (2002).
6. Eskes TKAB. Homocysteine and human reproduction. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology.* 27, 157–67 (2000).
7. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy — review of our present understanding and therapeutic implications. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 93(2), 157–165 (2000).
8. Boyama BA, Cepni I, Imamoglu M, *et al.* Homocysteine in embryo culture media as a predictor of pregnancy outcome in assisted reproductive technology. *Gynecological Endocrinology.* 32(3), 193–195 (2016).
9. Fathe K, Person MD, Finnell RH. The Application of a Chemical Determination of N-Homocysteinylated Levels in Developing Mouse Embryos: Implication for Folate Responsive Birth Defects. *J Nutr Biochem.* 26(4), 312–318 (2015).
10. Aitken R. J., Flanagan H. M., Connaughton H., Whiting S., Hedges A., Baker M. A. Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function. *Andrology.* 4(2), 345–360 (2016).
11. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin. Chem.* 31(4), 624–628 (1985).
12. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J. Biol. Chem.* 277(34), 30425–30428 (2002).
13. Sass JO, Nakanishi T, Sato T, Sperl W, Shimizu A. S-homocysteinylated of transthyretin is detected in plasma and serum of humans with different types of hyperhomocysteinemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310(1), 242–246 (2003).
14. Hortin GL, Seam N, Hoehn GT. Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins. *Clin. Chem.* 52(12), 2258–2264 (2006).

15. Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.* 200(2), 218–229 (1992).
16. Borowczyk K, Suliburska J, Jakubowski H. Demethylation of methionine and keratin damage in human hair. *Amino Acids.* 50(5), 537–546 (2018).
17. Jakubowski H, Goldman E. Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett.* 317(3), 237–240 (1993).
18. Jakubowski H. Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(12), 4504–4508 (1990).
19. Jakubowski H. Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 10(3), 593–598 (1991).
20. Jakubowski H. Proofreading in vivo. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270(30), 17672–17673 (1995).
21. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J. Biol. Chem.* 272(3), 1935–1942 (1997).
22. Marsillach J, Suzuki SM, Richter RJ, *et al.* Human Valacyclovir Hydrolase/Biphenyl Hydrolase-Like Protein Is a Highly Efficient Homocysteine Thiolactonase. *PLOS ONE.* 9(10), e110054 (2014).
23. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, Lenkowski A, Wilhelm SE, Hoffman M. Modification of Fibrinogen by Homocysteine Thiolactone Increases Resistance to Fibrinolysis: A Potential Mechanism of the Thrombotic Tendency in Hyperhomocysteinemia. *Biochemistry.* 45(8), 2480–2487 (2006).
24. Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylation induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids.* 47(7), 1319–1339 (2015).
25. Capasso R, Sambri I, Cimmino A, *et al.* Homocysteinylation Promotes Increased Monocyte-Endothelial Cell Adhesion and Up-Regulation of MCP1, Hsp60 and ADAM17. *PLoS One* [Internet]. 7(2) (2012). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272033/>.
26. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43(10), 1011–1014 (2005).
27. Undas A, Jankowski M, Twardowska M, Padjas A, Jakubowski H, Szczeklik A. Antibodies to N-homocysteinylation albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb. Haemost.* 93(2), 346–350 (2005).
28. Undas A, Stepień E, Glowacki R, Tisończyk J, Tracz W, Jakubowski H. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylation proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. *Thromb. Haemost.* 96(3), 342–347 (2006).

29. Undas A, Perła J, Lacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke*. 35(6), 1299–1304 (2004).
30. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G. Effect of homocysteinylated of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J. Cell. Biochem*. 92(2), 351–360 (2004).
31. Paoli P, Sbrana F, Tiribilli B, *et al.* Protein N-homocysteinylated induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *J. Mol. Biol*. 400(4), 889–907 (2010).
32. Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? *Swiss Med Wkly*. 136(47–48), 745–756 (2006).
33. Gonin JM, Wilcox CS. Chapter 64 - Hyperhomocysteinemia [Internet]. In: *Therapy in Nephrology & Hypertension (Third Edition)*. Wilcox CS (Ed.), W.B. Saunders, Philadelphia, 725–730 (2008) [cited 2018 Oct 23]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416054849500666>.
34. McCully KS. Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 8(2), 211–219 (2015).
35. Sreckovic B, Sreckovic VD, Soldatovic I, *et al.* Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis. *Diabetes Metab Syndr*. 11(3), 179–182 (2017).
36. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, *et al.* Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest*. 107(6), 675–683 (2001).
37. Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, *et al.* Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation*. 102(11), 1227–1232 (2000).
38. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, *et al.* Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin. Chem*. 47(5), 887–892 (2001).
39. Knekt P, Reunanen A, Alfthan G, *et al.* Hyperhomocysteinemia: a risk factor or a consequence of coronary heart disease? *Arch. Intern. Med*. 161(13), 1589–1594 (2001).
40. Lu SS, Xie J, Su CQ, Ge S, Shi HB, Hong XN. Plasma homocysteine levels and intracranial plaque characteristics: association and clinical relevance in ischemic stroke. *BMC Neurol*. 18(1), 200 (2018).
41. Smith AD, Smith SM, Jager CA de, *et al.* Homocysteine-Lowering by B Vitamins Slows the Rate of Accelerated Brain Atrophy in Mild Cognitive Impairment: A Randomized Controlled Trial. *PLOS ONE*. 5(9), e12244 (2010).
42. Budge MM, de Jager C, Hogervorst E, Smith AD, the Oxford Project To Investigate M. Total Plasma Homocysteine, Age, Systolic Blood Pressure, and Cognitive Performance in Older People. *Journal of the American Geriatrics Society*. 50(12), 2014–2018 (2002).
43. McCaddon A, Hudson P, Davies G, Hughes A, Williams JHH, Wilkinson C. Homocysteine and Cognitive Decline in Healthy Elderly. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 12(5), 309–313 (2001).

44. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, Vitamin B12, and Serum Total Homocysteine Levels in Confirmed Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. 55(11), 1449 (1998).
45. Vogiatzoglou A, Refsum H, Johnston C, *et al.* Vitamin B12 status and rate of brain volume loss in community-dwelling elderly. *Neurology*. 71(11), 826–832 (2008).
46. Williams JH. Minimal hippocampal width relates to plasma homocysteine in community-dwelling older people. *Age and Ageing*. 31(6), 440–444 (2002).
47. Chung YC, Kruyer A, Yao Y, *et al.* Hyperhomocysteinemia exacerbates Alzheimer's disease pathology by way of the  $\beta$ -amyloid fibrinogen interaction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 14(7), 1442–1452 (2016).
48. Bossenmeyer-Pourié C, Smith AD, Lehmann S, *et al.* N-homocysteinylation of tau and MAP1 is increased in autopsy specimens of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Pathol.* (2019).
49. Carson NAJ, Neill DW. Metabolic Abnormalities Detected in a Survey of Mentally Backward Individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child*. 37(195), 505–513 (1962).
50. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 493–496 (1962).
51. Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: A risk factor for the development of severe preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 185(4), 781–785 (2001).
52. Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of nonsevere preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 189(2), 391–394 (2003).
53. Dodds L, Fell DB, Dooley KC, *et al.* Effect of Homocysteine Concentration in Early Pregnancy on Gestational Hypertensive Disorders and Other Pregnancy Outcomes. *Clinical Chemistry*. 54(2), 326–334 (2008).
54. Holmes VA, Wallace JMW, Alexander HD, *et al.* Homocysteine Is Lower in the Third Trimester of Pregnancy in Women with Enhanced Folate Status from Continued Folic Acid Supplementation. *Clinical Chemistry*. 51(3), 629–634 (2005).
55. Yin Y, Zhang T, Dai Y, Zheng X, Pei L, Lu X. Pilot study of association of anembryonic pregnancy with 55 elements in the urine, and serum level of folate, homocysteine and s-adenosylhomocysteine in shanxi province, china. *Journal of the American College of Nutrition*. 28(1), 50–55 (2009).
56. Rodríguez-Guillén M del R, Torres-Sánchez L, Chen J, *et al.* Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *salud publica mex*. 51(1), 19–25 (2009).
57. Kramer MS, Kahn SR, Rozen R, *et al.* Vasculopathic and thrombophilic risk factors for spontaneous preterm birth. *Int J Epidemiol*. 38(3), 715–723 (2009).
58. Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, *et al.* Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia*. 51(1), 29–38 (2008).



59. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, *et al.* Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *PNAS*. 92(5), 1585–1589 (1995).
60. Wang L, Chen X, Tang B, Hua X, Klein-Szanto A, Kruger WD. Expression of mutant human cystathionine beta-synthase rescues neonatal lethality but not homocystinuria in a mouse model. *Hum Mol Genet*. 14(15), 2201–2208 (2005).
61. MORSE HCI. Building a Better Mouse : One Hundred Years of Genetics and Biology. *The Mouse in Biomedical Research*. , 1–11 (2007).
62. Gupta S, Melnyk SB, Kruger WD. Cystathionine  $\beta$ -synthase-deficient mice thrive on a low-methionine diet. *FASEB J*. 28(2), 781–790 (2014).
63. Gupta S, Wang L, Kruger WD. Betaine supplementation is less effective than methionine restriction in correcting phenotypes of CBS deficient mice. *J Inherit Metab Dis*. 39(1), 39–46 (2016).
64. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, *et al.* Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human Molecular Genetics*. 10(5), 433–443 (2001).
65. Jadavji NM, Wieske F, Dirnagl U, Winter C. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency alters levels of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain tissue. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 3, 1–4 (2015).
66. Ghandour H, Chen Z, Selhub J, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit tissue-specific distribution of folates. *J. Nutr*. 134(11), 2975–2978 (2004).
67. Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol. Reprod*. 72(3), 667–677 (2005).
68. Seller MJ, Adinolfi M. The curly-tail mouse: An experimental model for human neural tube defects. *Life Sciences*. 29(16), 1607–1615 (1981).
69. Chen C, Surowiec SM, Morsy AH, Ma M. Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Atherosclerosis*. 160(1), 103–114 (2002).
70. Lee E-SY, Chen H, Soliman KFA, Charlton CG. Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents. *Neurotoxicology*. 26(3), 361–371 (2005).
71. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J. Thromb. Haemost*. 1(2), 300–306 (2003).
72. Borowczyk K, Tisończyk J, Jakubowski H. Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase. *Amino Acids*. 43(3), 1339–1348 (2012).
73. Asaba A, Hattori T, Mogi K, Kikusui T. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front Neurosci*. 8, 231 (2014).

74. Addis T. Proteinuria and cylinduria. *Proceedings of the California Academy of Sciences*. (2), 38–52 (1932).
75. Bell ME. Albuminuria in the normal male rat. *J Physiol*. 79(2), 191–193 (1933).
76. Roy AK, Neuhaus OW. Identification of rat urinary proteins by zone and immunoelectrophoresis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121(3), 894–899 (1966).
77. Finlayson JS, Asofsky R, Potter M, Runner CC. Major Urinary Protein Complex of Normal Mice: Origin. *Science*. 149(3687), 981–982 (1965).
78. Hurst JL, Robertson DHL, Tolladay U, Beynon RJ. Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Animal Behaviour*. 55(5), 1289–1297 (1998).
79. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*. 318(1), 1–14 (1996).
80. Timm DE, Baker LJ, Mueller H, Zidek L, Novotny MV. Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I). *Protein Science*. 10(5), 997–1004 (2001).
81. Darwish Marie A, Veggerby C, Robertson DHL, *et al.* Effect of polymorphisms on ligand binding by mouse major urinary proteins. *Protein Sci*. 10(2), 411–417 (2001).
82. Logan DW, Marton TF, Stowers L. Species Specificity in Major Urinary Proteins by Parallel Evolution. *PLOS ONE*. 3(9), e3280 (2008).
83. Clissold PM, Bishop JO. Variation in mouse major urinary protein (MUP) genes and the MUP gene products within and between inbred lines. *Gene*. 18(3), 211–220 (1982).
84. Cheetham SA, Thom MD, Jury F, Ollier WER, Beynon RJ, Hurst JL. The Genetic Basis of Individual-Recognition Signals in the Mouse. *Current Biology*. 17(20), 1771–1777 (2007).
85. Roberts SA, Prescott MC, Davidson AJ, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL. Individual odour signatures that mice learn are shaped by involatile major urinary proteins (MUPs). *BMC Biol* [Internet]. 16 (2018). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5921788/>.
86. Thoß M, Enk V, Yu H, *et al.* Diversity of major urinary proteins (MUPs) in wild house mice. *Scientific Reports*. 6, 38378 (2016).
87. Boehm T, Zufall F. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. *Trends in Neurosciences*. 29(2), 100–107 (2006).
88. Restrepo D, Lin W, Salcedo E, Yamazaki K, Beauchamp G. Odortypes and MHC peptides: complementary chemosignals of MHC haplotype? *Trends in Neurosciences*. 29(11), 604–609 (2006).
89. Sturm T, Leinders-Zufall T, Maček B, *et al.* Mouse urinary peptides provide a molecular basis for genotype discrimination by nasal sensory neurons. *Nature Communications*. 4, 1616 (2013).
90. Novotny M, Harvey S, Jemiolo B. Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia*. 46(1), 109–113 (1990).

91. Novotny MV, Ma W, Wiesler D, Zidek L. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc Biol Sci.* 266(1432), 2017–2022 (1999).
92. Novotny M, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *PNAS.* 82(7), 2059–2061 (1985).
93. Jemiolo B, Alberts J, Sochinski-Wiggins S, Harvey S, Novotny M. Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Animal Behaviour.* 33(4), 1114–1118 (1985).
94. Jemiolo B, Harvey S, Novotny M. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(12), 4576–4579 (1986).
95. Lin DY, Zhang S-Z, Block E, Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature.* 434, 470 (2005).
96. Yoshikawa K, Nakagawa H, Mori N, Watanabe H, Touhara K. An unsaturated aliphatic alcohol as a natural ligand for a mouse odorant receptor. *Nat. Chem. Biol.* 9(3), 160–162 (2013).
97. Wang Liqun, Jhee Kwang-Hwan, Hua Xiang, DiBello Patricia M., Jacobsen Donald W., Kruger Warren D. Modulation of Cystathionine  $\beta$ -Synthase Level Regulates Total Serum Homocysteine in Mice. *Circulation Research.* 94(10), 1318–1324 (2004).
98. Primer3Plus - Pick Primers [Internet]. . Available from: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>.
99. Wolff PR, Powell AJ. Urine patterns in mice: An analysis of male/female counter-marking. *Animal Behaviour.* 32(4), 1185–1191 (1984).
100. Marsden HM, Bronson FH. ESTROUS SYNCHRONY IN MICE: ALTERATION BY EXPOSURE TO MALE URINE. *Science.* 144(3625), 1469 (1964).
101. Roberts SA, Simpson DM, Armstrong SD, *et al.* Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol.* 8, 75 (2010).
102. Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C, Zagotto G. Absolute Configuration of 2-sec-Butyl-4,5-dihydrothiazole in Male Mouse Urine. *Chem Senses.* 28(9), 791–797 (2003).
103. Jakubowski H. Quantification of urinary S- and N-homocysteinylated protein and homocysteine-thiolactone in mice. *Analytical Biochemistry.* 508, 118–123 (2016).
104. Jiang J, Creasy KT, Purnell J, Peterson ML, Spear BT. Zhx2 (zinc fingers and homeoboxes 2) regulates major urinary protein gene expression in the mouse liver. *J. Biol. Chem.* 292(16), 6765–6774 (2017).
105. Garratt M, Stockley P, Armstrong SD, Beynon RJ, Hurst JL. The scent of senescence: sexual signalling and female preference in house mice. *Journal of Evolutionary Biology.* 24(11), 2398–2409 (2011).
106. Gosling LM, Roberts SC, Thornton EA, Andrew MJ. Life history costs of olfactory status signalling in mice. *Behav Ecol Sociobiol.* 48(4), 328–332 (2000).

107. Radwan J, Chadzinska M, Cichon M, *et al.* Metabolic costs of sexual advertisement in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Evol. Ecol. Res.* 8(5), 859–869 (2006).
108. Zala SM, Potts WK, Penn DJ. Exposing males to female scent increases the cost of controlling *Salmonella* infection in wild house mice. *Behav Ecol Sociobiol.* 62(6), 895–900 (2008).
109. Mejbaum-Katzenellenbogen W. [Turbidimetric micromethod of determination of proteins with tannin]. *Acta Biochim. Pol.* 2(3), 279–296 (1955).
110. Saraswathy N, Ramalingam P. 13 - Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF) [Internet]. In: *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. Saraswathy N, Ramalingam P (Eds.), Woodhead Publishing, 185–192 (2011) [cited 2019 May 20]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781907568107500134>.
111. Vyatkina K. De Novo Sequencing of Top-Down Tandem Mass Spectra: A Next Step towards Retrieving a Complete Protein Sequence. *Proteomes* [Internet]. 5(1) (2017). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372227/>.
112. Seidler J, Zinn N, Boehm ME, Lehmann WD. De novo sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics.* 10(4), 634–649 (2010).
113. Marczak Ł, Sikora M, Stobiecki M, Jakubowski H. Analysis of site-specific N-homocysteinylation of human serum albumin in vitro and in vivo using MALDI-ToF and LC-MS/MS mass spectrometry. *Journal of Proteomics.* 74(7), 967–974 (2011).
114. Armstrong SD, Robertson DHL, Cheetham SA, Hurst JL, Beynon RJ. Structural and functional differences in isoforms of mouse major urinary proteins: a male-specific protein that preferentially binds a male pheromone. *Biochem. J.* 391(Pt 2), 343–350 (2005).
115. Sharma GS, Kumar T, Singh LR. N-Homocysteinylation Induces Different Structural and Functional Consequences on Acidic and Basic Proteins. *PLOS ONE.* 9(12), e116386 (2014).
116. Giller K., Huebbe P., Doering F., Pallauf K., Rimbach G. Major urinary protein 5, a scent communication protein, is regulated by dietary restriction and subsequent re-feeding in mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 280(1757), 20130101 (2013).
117. Flamant F, Baxter JD, Forrest D, *et al.* International Union of Pharmacology. LIX. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Thyroid Hormone Receptors. *Pharmacological Reviews.* 58(4), 705–711 (2006).
118. Guzmán MA, Navarro MA, Carnicer R, *et al.* Cystathionine  $\beta$ -synthase is essential for female reproductive function. *Hum Mol Genet.* 15(21), 3168–3176 (2006).
119. Knopf JL, Gallagher JF, Held WA. Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Mol Cell Biol.* 3(12), 2232–2240 (1983).
120. Ma Y, Andrisse S, Chen Y, *et al.* Androgen Receptor in the Ovary Theca Cells Plays a Critical Role in Androgen-Induced Reproductive Dysfunction. *Endocrinology.* 158(1), 98–108 (2016).
121. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Dedicated to Professor H. Neurath on the occasion of his 90th birthday. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1477(1), 267–283 (2000).

122. Ulrich D, Hrynyszyn K, Pallua N. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Sera and Tissue of Patients with Dupuytren's Disease. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 112(5), 1279 (2003).
123. Kim Y-S, Kim S-H, Kang J-G, Ko J-H. Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. *BMB Rep*. 45(11), 623–628 (2012).
124. Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *Journal of Cellular Physiology*. 148(2), 228–234 (1991).
125. Sen A, Hammes SR. Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. *Mol Endocrinol*. 24(7), 1393–1403 (2010).
126. Walters KA, Middleton LJ, Joseph SR, *et al*. Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility. *Biol. Reprod*. 87(6), 151 (2012).
127. Helmreich DL, Tylee D. Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. *Horm Behav*. 60(3), 284–291 (2011).
128. Černá M, Kuntová B, Talacko P, Stopková R, Stopka P. Differential regulation of vaginal lipocalins (OBP, MUP) during the estrous cycle of the house mouse. *Scientific Reports*. 7(1), 11674 (2017).
129. Yip KS, Suvorov A, Connerney J, Lodato NJ, Waxman DJ. Changes in Mouse Uterine Transcriptome in Estrus and Proestrus. *Biol Reprod* [Internet]. 89(1) (2013). Available from: [https://academic.oup.com/biolreprod/article/89/1/13\\_1-12/2514045](https://academic.oup.com/biolreprod/article/89/1/13_1-12/2514045).
130. Suski M, Olszanecki R, Madej J, *et al*. Proteomic analysis of changes in protein expression in liver mitochondria in apoE knockout mice. *Journal of Proteomics*. 74(6), 887–893 (2011).
131. Hui X, Zhu W, Wang Y, *et al*. Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. *J. Biol. Chem*. 284(21), 14050–14057 (2009).
132. Zhou Y, Jiang L, Rui L. Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. *J. Biol. Chem*. 284(17), 11152–11159 (2009).
133. Hamelet J, Demuth K, Paul J-L, Delabar J-M, Janel N. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J. Hepatol*. 46(1), 151–159 (2007).
134. Suszyńska-Zajczyk J, Wróblewski J, Utyro O, Luczak M, Marczak L, Jakubowski H. Bleomycin hydrolase and hyperhomocysteinemia modulate the expression of mouse proteins involved in liver homeostasis. *Amino acids*. 46 (2014).
135. Velez-Carrasco W, Merkel M, Twiss CO, Smith JD. Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *J Nutr Biochem*. 19(6), 362–370 (2008).