



Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

Zakład Biologii RNA

Zespół Biosyntezy Białka

Dorota Gurda

**Mechanizmy zmian w transkrypcji genów wywołanych przez
homocysteinę w ludzkich komórkach śródbłonna
naczyń krwionośnych**

rozprawa doktorska

promotorzy:

prof. dr hab. Hieronim Jakubowski

prof. dr hab. Tomasz Twardowski

Poznań 2013

*Panu Prof. dr hab. Hieronimowi Jakubowskiemu
składam serdeczne podziękowania
za powierzenie mi interesującego tematu badań
oraz okazaną pomoc w trakcie jego realizacji*

*Panu Prof. dr hab. Tomaszowi Twardowskiemu
składam serdeczne podziękowania
za pomoc okazaną w trakcie prowadzenia prac laboratoryjnych,
wyrozumiałość i życzliwość*

*Panu Prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi
oraz Panu Prof. dr hab. Maciejowi Stobieckiemu
dziękuję za umożliwienie nawiązania współpracy*

*Dr Luizie Handschuh
serdecznie dziękuję za współpracę,
okazaną pomoc i zaangażowanie*

*Dr Łukaszowi Marczałowi
dziękuję za współpracę
i okazaną pomoc w realizacji pracy*

*Dr hab. prof. ICHB PAN Elizie Wyszko
serdecznie dziękuję za twórcze dyskusje,
okazaną pomoc i życzliwość*

*Mgr inż. Annie M. Kietrys oraz Mgr inż. Aleksandrze Szopie
bardzo dziękuję za pomoc i wsparcie oraz twórcze,
niekoniernie naukowe dyskusje i miłą atmosferę*

*Współpracownikom z Zakładu Biologii RNA
dziękuję za miłą atmosferę, życzliwość i wszelką pomoc*

*Moim Najbliższym dziękuję za wiarę,
miłość, wsparcie i zrozumienie*

*„Człowiek jest wielki nie przez to, co posiada, lecz przez to, kim jest;
nie przez to, co ma, lecz przez to, czym dzieli się z innymi.”*

Jan Paweł II

Kochani!

*Tylko dzięki Wam i Waszej trosce i miłości jestem tu gdzie jestem i jestem tym kim
jestem. Za co z całego serca dziękuję.*

Pracę dedykuję Rodzicom i Siostrze

Spis treści

1.	Wprowadzenie literaturowe	8
1.1.	Metabolizm homocysteiny	8
1.2.	Hiperhomocysteinemia	10
1.3.	Rola homocysteiny w rozwoju chorób układu krążenia	12
1.3.1.	Dysfunkcja śródbłonna naczyń krwionośnych	14
1.3.2.	Stres oksydacyjny	15
1.3.3.	Stres siateczki śródpolazmatycznej i odpowiedź na niesfałdowane białka ..	16
1.4.	Tiolakton homocysteiny	18
1.5.	Konsekwencje N-homocysteinyłacji białek	20
1.6.	Odpowiedź autoimmunologiczna przeciw N-homocysteinyłowanym białkom ..	24
1.7.	Mechanizmy eliminacji tiolaktonu homocysteiny	25
1.7.1.	Wydalanie tiolaktonu homocysteiny z moczem	26
1.7.2.	Paraoksonaza1	27
1.7.3.	Hydrolaza bleomycyny	28
1.8.	Mechanizmy regulacji ekspresji genów	29
1.8.1.	mikroRNA	30
1.8.2.	Epigenetyczna regulacja ekspresji genów	32
1.9.	Wpływ homocysteiny na regulację ekspresji genów	35
1.9.1.	Homocysteina a regulacja ekspresji genów za pomocą miRNA	36
1.9.2.	Homocysteina a epigenetyczna regulacja ekspresji genów	37
2.	Cel pracy	39
3.	Materiał i metody	40
3.1.	Materiał	40
3.2.	Odczynniki	40
3.3.	Gotowe zestawy do badań biochemicznych:	41
3.4.	Roztwory	42
3.5.	Żel poliakrylamidowy białkowy	43
3.6.	Hodowla komórek	43
3.7.	Test aktywności metabolicznej komórek HUVEC	44
3.8.	Modyfikacja białek surowicy bydłowej (FBS) tiolaktonem homocysteiny	45
3.10.	Izolacja całkowitego RNA z komórek HUVEC	46
3.11.	Trawienie prób całkowitego RNA deoksyrybonukleazą	47
3.12.	Analiza jakościowa i ilościowa preparatów RNA	48
3.13.	Eksperyment mikromacierzowy z zastosowaniem mikromacierzy dla transkryptomu	48
3.14.	Eksperyment mikromacierzowy z zastosowaniem macierzy dla miRNA	54
3.15.	Real-time PCR	56
3.16.	Izolacja białek histonowych z komórek HUVEC	62
3.17.	Western blot	63
3.18.	Analiza miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych <i>in vitro</i>	65
4.	Wyniki	67
4.1.	Testy aktywności metabolicznej komórek HUVEC	67
4.2.	Modyfikacja białek surowicy tiolaktonem homocysteiny	68
4.3.	Analiza ekspresji genów człowieka pod wpływem homocysteiny oraz jej metabolitów	70
4.3.1.	Zastosowanie mikromacierzy DNA do analizy profilu ekspresji transkryptomu pod wpływem homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek surowicy	70

4.3.2. Analiza poziomu mRNA genów różnicujących za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.....	82
4.4. Analiza zmian w profilu ludzkich miRNA pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów	94
4.4.1. Określenie zmian ludzkich miRNA w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i jej metabolitów za pomocą mikromacierzy	94
4.4.2. Analiza zmian poziomu ludzkich miRNA za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.....	101
4.5. Wpływ N-homocysteinyłacji białek histonowych na epigenetyczną regulację ekspresji genów człowieka	105
4.5.1. Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych <i>in vitro</i>	105
4.5.2. N-homocysteinyłacja białek histonowych w komórkach HUVEC	107
4.5.3. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na poziom acetylacji białek histonowych	110
5. Dyskusja.....	111
5.1. Analiza ekspresji genów człowieka pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów	111
5.1.1. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z metabolizmem aminokwasów	118
5.1.2. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z katabolizmem S-adenozylu-homocysteiny	120
5.1.3. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów.....	120
5.1.4. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych ze szlakiem sygnałowym kinazy mTOR	123
5.1.5. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych ze szlakiem LXR/RXR.....	124
5.1.6. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z niedotlenieniem	125
5.1.7. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z procesem angiogenezy	126
5.1.8. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z odpowiedzią na niesfałdowane białka.....	129
5.1.9. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z rozwojem odpowiedzi zapalnej.....	130
5.1.10. Wpływ Hcy oraz jej metabolitów na regulację ekspresji genów.....	133
5.1.11. Wpływ Hcy oraz jej metabolitów na dojrzewanie komórek nerwowych.	133
5.1.12. Wpływ Hcy oraz jej metabolitów na proces krzepnięcia krwi	134
5.2. Analiza ekspresji ludzkich miRNA pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów	135
5.3. Wpływ N-homocysteinyłacji białek histonowych na epigenetyczną regulację ekspresji genów człowieka	143
5.3.2. N-homocysteinyłacja białek histonowych w komórkach HUVEC	144
5.3.3. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na poziom acetylacji białek histonowych w komórkach HUVEC	145
6. Wnioski.....	149
7. Literatura:.....	151
8. Załącznik 1.....	166
9. Załącznik 2.....	171

Spis stosowanych skrótów:

ADMA - asymetryczna dimetyloarginina
AMP - adenzyno monofosforan
ApoA-I - Apolipoproteina A1
ApoE - Apolipoproteina E
ApoL1 - Apolipoproteina L1
ARG1 - arginaza 1
BIP - białko wiążące łańcuchy polipeptydowe
BLH - hydrolaza bleomycyny
CBS - syntaza β -cystationiny
CH₃-THF - 5,10-metylenotetrahydrofolian
DDAH - dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy
DNA - kwas deoksyrybonukleinowy
eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
ER - retikulum endoplazmatyczne
ERAD - degradacja białek związana z retikulum endoplazmatycznym
ERK 1/2 - kinaza aktywowana mitogenem
FBS - surowica wołowa
GFR - współczynnik przesączania kłębuszkowego
GPx - peroksydaza glutationu
Hcy - homocysteina
HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości
HIF1 α - czynnik indukowany niedotlenieniem
Hsp60 - białko szoku cieplnego
HTL - tiolakton homocysteiny
HUVEC - komórki ludzkiego śródbłonka żyły pępowinowej
ICAM1 - międzykomórkowa cząstka adhezyjna 1
IFGBP-3 - białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
LDL - lipoproteiny o małej gęstości
LOX1 - błonowy receptor dla utlenionych form LDL
LXR - receptor wątrobowy X

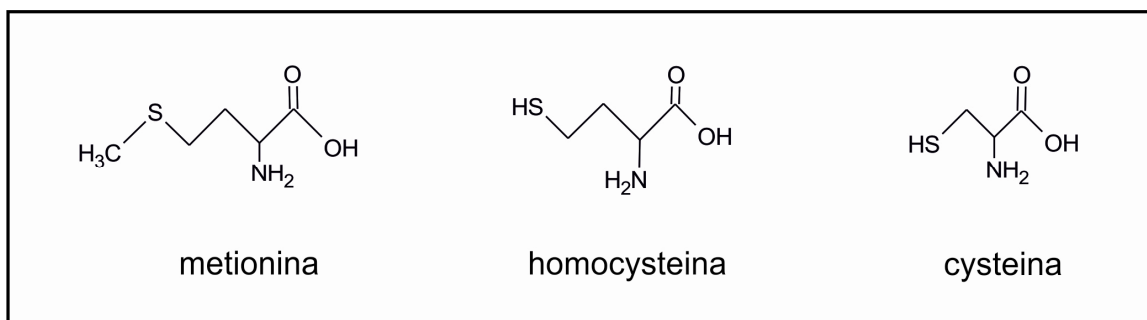
MCP1 - czynnik chemotaktyczny monocytów
miRISC - rybonukleoproteinowy kompleks wyciszający
miRNA - mikro RNA
mRNA - informacyjny RNA
MS - syntaza metioniny
MTHFR - 5-metylotetrahydrofolian
NCAM - nerwowa cząstka adhezyjna
ncRNA - niekodujące RNA
N-Hcy-białka - N-homocysteinyłowane białka
NO - tlenek azotu
oxLDL - utlenione formy LDL
PA - kwas fosfatydowy
PABP - białko wiążące sekwencję poli(A)
PON - paraoksonaza
pre-miRNA - prekursorowe mikro RNA
pri-miRNA - pierwotny transkrypt miRNA
qPCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RNA - kwas rybonukleinowy
RXR - receptor retinoidu X
SAH - S-adenozylhomocysteina
SAHH - hydrolaza S-adenozyl-homocysteiny
SAM - S-adenozylometionina
SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SynCAM-1 - synaptyczna cząstka adhezyjna 1
TG - triglicerydy
TNF α - czynnik martwicy nowotworów
tPA - aktywator plazminogenu
tRNA - transportujący RNA
uPA - aktywator plazminogenu typu urokinazy
UPR - odpowiedź na niesfałdowane białka
UTR - region nieulegający translacji
VCAM1 - naczyniowa cząstka adhezyjna 1
VEGFA - śródbłonkowy czynnik wzrostu
VLDL - lipoproteiny o bardzo małej gęstości

1. Wprowadzenie literaturowe

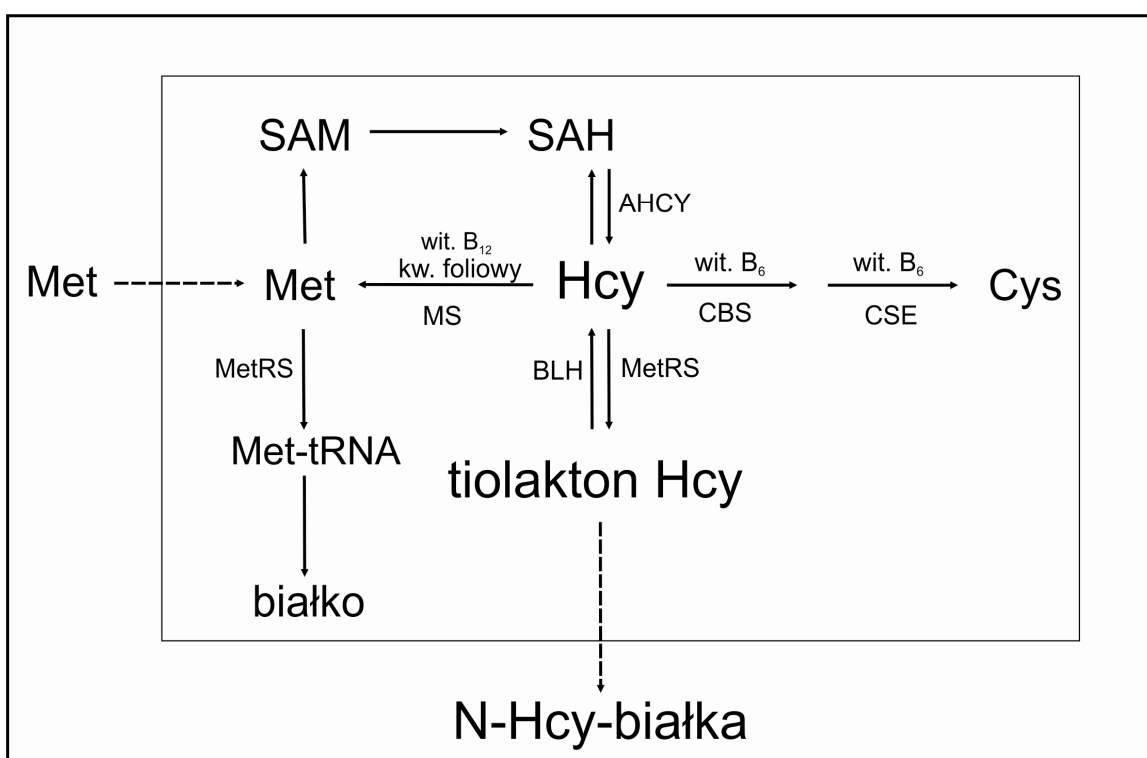
1.1. Metabolizm homocysteiny

Homocysteina (Hcy) jest niebiałkowym aminokwasem, pod względem struktury przypominającym białkowy aminokwas metioninę, od której różni się brakiem grupy metylowej (rysunek 1). W organizmie człowieka może ona powstawać jedynie z metioniny dostarczanej wraz z pokarmem. Metionina uwolniona z białek podczas procesu trawienia, wykorzystywana jest przez maszynę komórkową do syntezy nowych białek oraz S-adenozylometioniny (SAM), która pełni rolę uniwersalnego donora grupy metylowej. W wyniku reakcji metylacji SAM przekształcana jest do S-adenozylhomocysteiny, która następnie hydrolizowana jest do homocysteiny i adenozyliny. Hcy jest reużytkowana poprzez remetylację do metioniny, bądź jest przekształcana w reakcji transsulfurylacji do cysteiny (rysunek 2) [1]. Reakcja remetylacji katalizowana jest przez syntazę metioniny (MS), w której donorem grupy metylowej jest pochodna kwasu foliowego – 5,10-metylenotetrahydrofolian ($\text{CH}_3\text{-THF}$). Reakcja ta może również przebiegać z użyciem trimetyloglicyny (betainy), jako źródła grupy metylowej, jednakże mechanizm ten zachodzi głównie w wątrobie i nerkach. Transsulfurylacja Hcy zachodzi przy pomocy syntazy β -cystationiny (CBS) oraz γ -liazy cystationiny. Reużytkacja Hcy na drodze transsulfurylacji zachodzi jedynie w wątrobie, nerkach, trzustce i jelicie cienkim [2]. Metabolizm homocysteiny jest ściśle związany z obecnością witamin, które pełnią rolę kofaktorów reakcji enzymatycznych. Kobalamina (witamina B_{12}) jest kofaktorem syntazy metioniny (MS), natomiast pirydoksal-5-fosforanu (aktywna forma witaminy B_6) jest kofaktorem syntazy β -cystationiny (CBS) lub liazy γ -cystationiny. Niedobór którejkolwiek z tych witamin oraz kwasu foliowego, a także mutacje genów kodujących enzymy zaangażowane w reakcje remetylacji czy transsulfurylacji, powodują wzrost poziomu Hcy we krwi [2].

Hcy może również ulegać konwersji do cyklicznego tioestru – tiolaktonu homocysteiny (HTL). Szlak ten staje się dominującym, gdy remetylacja i transsulfurylacja zostają zaburzone poprzez wystąpienie defektów genetycznych enzymów zaangażowanych w metabolizm Hcy, takich jak syntaza metioniny (MS), syntaza β cystationiny (CBS) czy reduktaza metylotetrahydrofolianu (MTHFR) lub też na skutek niedoboru kwasu foliowego, witaminy B_6 i B_{12} w diecie.



Rysunek 1: Wzory strukturalne aminokwasów zaangażowanych w metabolizm homocysteiny.



Rysunek 2: Metabolizm Hcy u ludzi na podstawie [3].

Ze względu na strukturalne podobieństwo do metioniny, Hcy może być błędnie rozpoznana przez syntetazę metionilo-tRNA w reakcji aminoacylacji. Jednak dzięki aktywności korekcyjnej tego enzymu, nigdy nie dochodzi do wbudowania Hcy do cząsteczki peptydu w procesie translacji. W wyniku reakcji korekcyjnej syntetazy metionilo-tRNA z Hcy powstaje tiolakton homocysteiny. [4-7].

1.2. Hiperhomocysteinemia

Ponad 40 lat temu po raz pierwszy zaproponowano hipotezę, że Hcy może być związana z rozwojem chorób układu krążenia [8]. Wówczas McCully zaobserwował zmiany patologiczne w naczyniach krwionośnych u dzieci z hiperhomocysteinemią wywołaną wrodzonymi defektami genów związanych z metabolizmem metioniny. Hiperhomocysteinemia jest to patologiczny stan, charakteryzujący się podwyższonym poziomem homocysteiny we krwi (powyżej 15 μ M/l). Jest to czynnik ryzyka wielu chorób, w tym chorób układu krążenia czy chorób neurodegeneracyjnych [9, 10]. Wzrost poziomu Hcy we krwi może być spowodowany mutacjami w genach kodujących enzymy związane z metabolizmem Hcy (*CBS*, *MTHFR*) lub Met (*MS*), bądź też zbyt małą zawartością w diecie witaminy B₆, B₁₂ czy kwasu foliowego a także dietą wysokometioninową.

Reduktaza 5,10-metylotetrahydrofolianu katalizuje reakcję, w wyniku której dochodzi do powstania 5-metylotetrahydrofolianu (MTHFR), donora grupy metylowej do reakcji remetylacji, przebiegającej za pośrednictwem syntazy metioniny (MS). Niedobór MTHFR powodowany jest recesywną, autosomalną mutacją, która manifestuje się ciężką hiperhomocysteinemią i obniżonym poziomem metioniny. Objawy kliniczne obejmują wiele neurologicznych i naczyniowych powikłań, takich jak opóźnienie rozwoju, upośledzenie umysłowe, napady padaczkowe, nieprawidłowości motoryczne, a także miażdżyca. Objawy te mogą nasilać się z wiekiem. Znanych jest wiele mutacji, w obrębie tego genu, które skutkują różnym stopniem obniżenia aktywności kodowanego enzymu [10-15]. Na przykład homozygotyczna mutacja powodująca zamianę C na T w pozycji 667 (667C→T), czego skutkiem jest zamiana alaniny na walinę (Ala222Val), powoduje obniżenie aktywności enzymu o 70%. Natomiast gdy mutacja ta obejmuje tylko jeden allel genu MTHFR (fenotyp CT) aktywność białka zmniejsza się o 30%. Homozygotyczna mutacja w pozycji 1298 powodująca zamianę adeniny na cytozynę (1298A→C), skutkująca zamianą glutaminy na alaninę (Glu429Ala) wpływa na redukcję aktywności białka o 60%. Wczesna diagnoza, a także szybkie wdrożenie leczenia, mogą złagodzić skutki choroby [15].

Syntaza β -cystationiny (*CBS*) przeprowadza pierwszy etap reakcji transsulfurylacji, prowadzący do powstania cystationiny na skutek kondensacji Hcy z seryną. Mutacje genu *CBS* prowadzą do ciężkiej postaci hiperhomocysteinemii, która nieleczona prowadzi do upośledzenia umysłowego, przemieszczenia soczewek (*ectopia*

lentis), osteoporozy. Mutacje w genie *CBS* są związane z zaburzeniami w funkcjonowaniu układu krwionośnego [16]. Na podstawie wyników z badań przeprowadzonych na myszach z nadekspresją genu *Cbs* oraz na ludzkich liniach komórkowych pochodzących z wątroby i nerek dowiedziono, że cystationina chroni przed uszkodzeniem wątroby, zapobiega akumulacji tłuszczu w wątrobie i nerkach oraz chroni przed śmiercią komórek indukowaną stresem retikulum endoplazmatycznego (stres ER został omówiony w rozdziale 1.3.3.) [17]. Nadekspresja genu *Cbs* u myszy będących na diecie wysokometioninowej prowadzi również do obniżenia całkowitego poziomu Hcy we krwi, w porównaniu do zwierząt kontrolnych [18].

Związek mutacji w sekwencji genu *MTHFR*, *CBS* czy *MS* z podwyższonym ryzykiem chorób układu krążenia był badany przez wiele zespołów, zarówno na modelu zwierzęcym, jak i u ludzi. U hetero- jak i homozygotycznych myszy z wyciszonym genem *Mthfr* zaobserwowano podwyższony poziom homocysteiny we krwi, a także złogi tłuszczowe we wstępującym odcinku aorty. Co więcej, homozygoty (*Mthfr*^{-/-}) wykazywały zmniejszoną przeżywalność, a także nieprawidłowości w budowie mózdzku [19]. U myszy z wyciszonym genem *Cbs* (^{-/-}), a także *Mthfr* zaobserwowano znacząco podwyższony poziom N-homocysteinylowanych białek (konsekwencje N-homocysteinyłacji białek zostały opisane w rozdziale 1.5.) w surowicy krwi [20]. Podobne skutki mutacji genów związanych z metabolizmem Hcy zaobserwowano u ludzi. Pacjenci z mutacją *CBS* i *MTHFR* mieli podwyższony poziom zarówno Hcy, jak i HTL, a także znacząco podwyższony poziom N-Hcy-białek w surowicy krwi. Dodatkowo pacjenci *CBS* ^{-/-} mieli zwiększony poziom N-Hcy-fibrynogenu, co tłumaczy podwyższoną skłonność do rozwoju zmian miażdżycowych, obserwowaną u tych pacjentów [21].

Jednym ze sposobów obniżenia podwyższonego poziomu Hcy we krwi jest terapia witaminowa. Polega ona na suplementacji codziennej diety witaminami B₆, B₁₂, czy kwasem foliowym. Pacjentom z defektem genetycznym genu *CBS*, podawano witaminę B₆, co skutkowało znaczącym obniżeniem poziomu homocysteiny we krwi [22]. Terapia witaminowa polegająca na podawaniu witaminy B₆, B₁₂ oraz kwasu foliowego pozwoliła również obniżyć poziom Hcy we krwi pacjentów po przeszczepie nerki [23]. Suplementacja betainą noworodków z homozygotyczną mutacją *MTHFR* C1129T pozwoliła uniknąć patofizjologicznych konsekwencji, takich jak opóźniony rozwój mózgu, ciężki niedorozwój umysłowy i przedwczesna śmierć [24]. Jednak terapia witaminowa nie jest skuteczna we wszystkich przypadkach. Podczas badań

prowadzonych na grupie pacjentów z zaawansowaną miażdżycą, terapia ta okazała się nieskuteczna w obniżaniu podwyższonego poziomu Hcy [23]. Polimorfizm genu *CBS*, związany jest z podatnością na terapię obniżającą poziom Hcy we krwi. Kruger i wsp. wykazali, że nosiciele homozygotycznej mutacji w pozycji 699, powodującej zamianę cytozyny na tyminę (699C→T) oraz w pozycji 1080, skutkującą zamianą tyminy na cytozynę (1080T→C), wykazują zwiększoną podatnością na terapię kwasem foliowym, co wskazuje na konieczność genotypowania każdego z pacjentów, przed podjęciem leczenia [25]. Najnowsze wyniki badań wskazują, że nadekspresja genu *DDAH2* może być nowym narzędziem terapeutycznym, zapobiegającym dysfunkcji śródbłonna naczyń krwionośnych powodowaną przez hiperhomocysteinemię [26].

1.3. Rola homocysteiny w rozwoju chorób układu krążenia

Mimo ogromnego postępu medycyny choroby układu krążenia są wciąż podstawowym zagrożeniem dla zdrowia i życia człowieka, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. W Polsce jest to najczęstsza przyczyna hospitalizacji. Hiperhomocysteinemia jest niezależnym, rozpoznanym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób układu krążenia takich jak miażdżycy, choroba niedokrwienna serca, czy udar mózgu. Miażdżycy jest chorobą ścian naczyń krwionośnych o charakterze zapalnym, inicjowanym przez uszkodzenie śródbłonna. Komórki śródbłonna i substancje przez nie wytwarzane stanowią fizjologiczną zaporę dla czynników zapoczątkowujących proces przebudowy ścian naczyń krwionośnych (ang. *vascular remodeling*). W wyniku uszkodzenia śródbłonna na skutek oddziaływania takich czynników jak wysokie stężenie frakcji LDL cholesterolu, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy czy wolnych rodników, następuje wzrost przepuszczalności błony zewnętrznej naczynia dla lipoprotein frakcji LDL, gdzie następuje jego akumulacja. Pod wpływem czynników uwalnianych przez komórki śródbłonna takich jak wolne rodniki, enzymy czy angiotensyna, cząsteczki LDL ulegają modyfikacjom, w tym oksydacji, przez co nabierają właściwości silnie proaterogennych. Utlenione formy LDL (oxLDL) pełnią ważne funkcje w rozwoju blaszki miażdżycowej i jej destabilizacji. Uszkadzają śródbłonek naczyń krwionośnych, co ułatwia dalszą migrację czynników zapalnych, a także nasila adhezję płytek krwi. Powodują one również aktywację makrofagów, które w zwiększonych ilościach syntetyzują czynniki wzrostu, mediatory prozapalne i wolne

rodniki. Zmodyfikowane LDL łączą się z receptorami typu scavenger na powierzchni makrofagów. W początkowym etapie jest to zjawisko korzystne, ponieważ ogranicza negatywny wpływ zmodyfikowanej frakcji LDL na komórki śródbłonna i mięśni gładkich. Jednak pochłanianie zmodyfikowanych LDL nie podlega ujemnemu sprzężeniu zwrotnemu zależnemu od stężenia LDL w komórce. Po wchłonięciu zmodyfikowany LDL uwalnia cholesterol, który podlega reakcji estryfikacji, co powoduje przekształcenie makrofagów w komórki piankowate. Kiedy możliwość estryfikacji wolnego cholesterolu w komórce zostaje wyczerpana, dochodzi do wytrącania się kryształów wolnego cholesterolu, co powoduje rozpad komórek piankowatych i tworzenie się pozakomórkowych złogów cholesterolu, które dają początek blaszce miażdżycowej. Zmodyfikowane komórki mięśni gładkich zaczynają syntetyzować elementy tkanki łącznej, głównie kolagen, co zabezpiecza przed jej pęknięciem. Główne zagrożenie wynikające z powstawania blaszki miażdżycowej, związane jest z możliwością jej pęknięcia. Wówczas przedostające się do krwiobiegu składniki blaszki miażdżycowej powodują aktywację płytek krwi i wytworzenie zakrzepu, co grozi zahamowaniem przepływu krwi przez naczynie [27].

Uszkodzenie śródbłonna, aktywacja odpowiedzi immunologicznej czy zakrzepica obserwowane są również w hiperhomocysteinemii zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Dodatkowo, stopień uszkodzenia śródbłonna jest bardzo podobny do tego, obserwowanego w przebiegu hipercholesterolemii. Homocysteina jest również odpowiedzialna za rozwój stanu zapalnego w obrębie naczyń krwionośnych. Hiperhomocysteinemia u myszy wywołana dietą wysokometioninową prowadzi do wzrostu ekspresji genu kodującego białko adhezyjne VCAM 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) w komórkach śródbłonna aorty, przy czym wzrost ten jest wprost proporcjonalny do poziomu Hcy we krwi [28]. Podwyższony poziom Hcy u myszy z wyciszonym genem apolipoproteiny E (*ApoE -/-*), powodował powstawanie złogów tłuszczowych w ścianach naczyń krwionośnych, a także wzrost ekspresji receptorów typu scavenger CD36 i LOX1 (błonowy receptor dla oxLDL) w obrębie zmienionych naczyń. Hiperhomocysteinemia powodowała również wzrost poziomu utlenionych form LDL (oxLDL) w surowicy tych zwierząt [29]. U myszy *ApoE -/-* jak i *Cbs -/-* hiperhomocysteinemia powodowała znaczny wzrost całkowitego poziomu cholesterolu, jak i frakcji cholesterolu nie-HDL, któremu towarzyszył spadek poziomu frakcji cholesterolu HDL. Natomiast u pacjentów z chorobą naczyń wieńcowych

zaobserwowano negatywną korelację poziomu Hcy z poziomem HDL oraz ApoA-I, głównego składnika białkowego tej frakcji cholesterolu [30].

Na podstawie wyników tych badań można wnioskować, że podwyższony poziom Hcy we krwi może leżeć u podstaw patofizjologii miażdżycy. Postuluje się, że homocysteina angażuje wiele mechanizmów prowadzących w konsekwencji do rozwoju zmian miażdżycowych, które z czasem nasilają się. Należą do nich: N-homocysteinylacja białek (omówiona w rozdziale 1.4. i 1.5.), dysfunkcja śródbłonna naczyń krwionośnych, stres oksydacyjny, stres siateczki śródplazmatycznej i odpowiedź na niesfałdowane białka, wywoływanie odpowiedzi autoimmunologicznej (omówione w rozdziale 1.6.), obniżenie poziomu metylacji DNA (omówione w rozdziale 1.9.2.) [31].

1.3.1 Dysfunkcja śródbłonna naczyń krwionośnych

Warstwa komórek śródbłonna naczyń krwionośnych odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego. Ich rola polega na regulacji przepływu krwi, biorą udział w reakcji wytwarzania skrzepu w miejscach uszkodzeń naczyń, a także są ważne dla prawidłowego funkcjonowania komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Jedną z cech charakterystycznych dla wczesnych stadiów rozwoju miażdżycy jest uszkodzenie warstwy komórek śródbłonna. Dysfunkcja śródbłonna objawia się poprzez upośledzenie zdolności wazorelaksacji naczyń krwionośnych zależnej od komórek śródbłonna. Jest to cecha charakterystyczna dla stanów patologicznych takich jak nadciśnienie tętnicze, hiperholesterolemia i cukrzyca. W związku z tym, upośledzenie funkcji czynnościowej śródbłonna naczyń krwionośnych może być jednocześnie czynnikiem prognostycznym ryzyka rozwoju chorób układu krążenia. Hiperhomocysteinemia również upośledza prawidłowe funkcjonowanie komórek śródbłonna. Jednym z postulowanych mechanizmów wywoływanych przez hiperhomocysteinemię jest obniżenie dostępności tlenu azotu (NO), produkowanego przez syntazę tlenu azotu (eNOS) w komórkach śródbłonna. NO jest silnym czynnikiem wazodylatacyjnym produkowanym pod wpływem bodźców takich jak acetylocholina, trombina, bradykinina czy naprężenia ściany naczynia spowodowane przepływem krwi (ang. *shear stress*) [9]. Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach ludzkiego śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC)

dowodzą, że Hcy powoduje obniżenie produkcji NO, a także eNOS, zarówno na poziomie białka, jak i mRNA [32, 33]. Obniżenie dostępności NO przy hiperhomocysteinemii może być również spowodowane poprzez akumulację asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), naturalnego inhibitora eNOS. W warunkach fizjologicznych ADMA jest hydrolizowana do cytruliny i metyloaminy przez dimetyloaminohydrolazę dimetyloargininy (DDAH) [34]. Istnieją dwie izoformy tego enzymu DDAH1 i DDAH2. Izoforma DDAH1 występuje głównie w komórkach syntetyzujących neuronalną syntazę tlenu azotu, podczas gdy izoforma DDAH2 występuje w komórkach syntetyzujących eNOS [33]. Homocysteina jest zdolna do wiązania się z resztami lizyny w miejscu aktywnym enzymu, co wpływa na obniżenie jego aktywności [35]. Wykazano również, że Hcy może zaburzać proces transkrypcji genu DDAH2, powodując obniżenie poziomu mRNA co przyczyniło się do obniżenia ilości białka w komórkach śródbłonna. Zmiany te skutkowały akumulacją ADMA w medium hodowlanym i obniżeniem stężenia NO powodowanego spadkiem aktywności eNOS [26, 33].

1.3.2. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny wywołany przez podwyższony poziom homocysteiny może również wpływać na rozwój zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Hiperhomocysteinemia powoduje zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), między innymi poprzez zwiększenie ekspresji oksydazy NADPH w komórkach śródbłonna, a także podwyższony poziom utlenionych lipidów błon komórkowych. Czynniki te powodują wzmożoną ekspresję genu kodującego białko p53, które reguluje geny kierujące komórkę na drogę programowanej śmierci poprzez apoptozę. Wykazano bowiem, że aktywacja białka p53 poprzez stres oksydacyjny indukowany hiperhomocysteinemią prowadziła do wzrostu ekspresji genu *Noxa*, co prowadziło do wstąpienia komórek śródbłonna na drogę apoptozy [32]. Ponadto, anionorodnik ponadtlenkowy może reagować z NO, powodując powstanie anionorodnika nadnitrylowego. Może on reagować z tyrozyną, co przyczynia się do powstania nitrozotyrozyny. Zwiększony poziom nitrozotyrozyny obserwowano w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, narażonych na stres oksydacyjny wywołany hiperhomocysteinemią [36]. Hcy obniża również ekspresję silnych antyoksydantów,

takich jak peroksydaza glutationu (GPx), NKEF -B PAG, dysmutaza ponadtlenkowa czy klasteryna, obniżając możliwości obronne komórek przed negatywnym wpływem wolnych rodników [37].

1.3.3. Stres siateczki śródplazmatycznej i odpowiedź na niesfałdowane białka

W komórkach eukariotycznych siateczka śródplazmatyczna (ER) odpowiedzialna jest za dojrzewanie i prawidłowe fałdowanie białek. Retikulum posiada wiele białek, tzw. chaperonów (ang. *chaperone*), które pełnią funkcję ochronną dla nowo zsyntetyzowanych białek. Zapobiegają one przed niewłaściwym sfałdowaniem białka zanim zostanie ono dostarczone do aparatu Golgiego, gdzie zachodzi ich modyfikacja i dojrzewanie. Są to m.in. GRP78, GRP94 (ang. *growth arrest and DNA damage*), izomerazy białkowe, kalneksyna, czy kalretikulina. Dzięki tej wewnętrznej kontroli tylko prawidłowo sfałdowane białka mogą zostać skierowane do innych organelli komórkowych. Nieprawidłowo sfałdowane białka zostają zatrzymane w świetle ER w kompleksie z chaperonami, bądź są kierowane na drogę degradacji poprzez mechanizm degradacji związanej z ER (ERAD, ang. *ER-associated degradation*) lub autofagię. Wewnątrz ER panują szczególne warunki, które zapewniają poprawne fałdowanie białek, kiedy nowo powstały łańcuch polipeptydowy wchodzi do światła ER. Aby proces ten zachodził w komórce prawidłowo muszą zostać spełnione odpowiednie warunki środowiskowe, genetyczne oraz metaboliczne. Zaburzenie któregośkolwiek z tych czynników powoduje powstanie puli niesfałdowanych lub częściowo sfałdowanych białek, które wykazują skłonność do agregacji. Białka wiążące łańcuchy polipeptydowe, takie jak BIP czy GRP94 spowalniają reakcje zachodzące podczas fałdowania białek, zapobiegając tym samym nieprawidłowym oddziaływaniom, a także powstawaniu agregatów. Proces fałdowania białka obejmuje również powstawanie mostków dwusiarczkowych. Białkowe izomerazy dwusiarczkowe (ang. *protein disulfide isomerases*) są odpowiedzialne za kontrolę tej reakcji i chronią przed powstawaniem nieprawidłowych mostków dwusiarczkowych. Kalneksyna i kalretikulina oddziałują z oksydoreduktazą Erp57, która katalizuje tę reakcję. Akumulacja niesfałdowanych białek w świetle ER powoduje powstanie odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR, ang. *unfolded protein response*). Jest to szlak sygnałowy, który jest wywołany stresem ER, związanym z nagromadzeniem się dużej ilości

niesfałdowanych lub błędnie sfałdowanych białek. Długotrwały lub ciężki stres ER powoduje apoptotyczną śmierć komórek [38, 39].

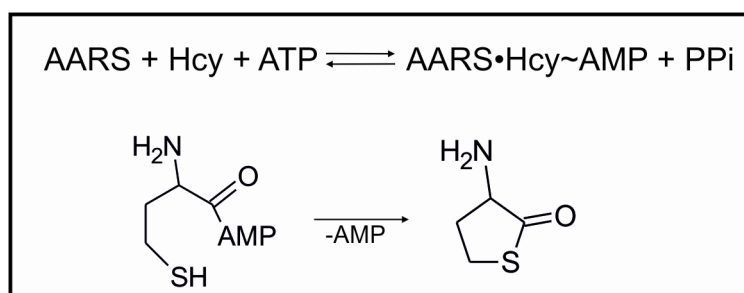
Hiperhomocysteinemia wywiera negatywny wpływ również na retikulum endoplazmatyczne. Podwyższony poziom Hcy we wnętrzu komórki powoduje, że może ona uczestniczyć w reakcji wymiany dwusiarczków z białkami ER, prowadząc do powstania niewłaściwie sfałdowanych białek membranowych i sekrecyjnych, takich jak trombomodulina czy czynnik von Willebranda [9]. Zaobserwowano także zaburzenia w strukturze retikulum endoplazmatycznego oraz w jego prawidłowym funkcjonowaniu pod wpływem Hcy [40]. Homocysteina zakłóca również syntezę DNA w komórkach HUVEC, powodując jej obniżenie. Zmiana ta jest wprost proporcjonalna do stężenia Hcy. Innym objawem stresu ER jest zaburzenie procesu ekspresji informacji genetycznej. Wyniki analizy mRNA pochodzącego z fragmentów naczyń krwionośnych ze zmianami miażdżycowymi u myszy z wyciszonym genem *ApoE* wskazują, że hiperhomocysteinemia powoduje stres ER. Zaobserwowano bowiem wzrost ekspresji genów kodujących chaperony i inne markery stresu ER u badanych myszy [9]. Homocysteina powoduje nadekspresję genu *GRP78*, a także wzrost syntezy jego produktu białkowego w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Podwyższenie poziomu ekspresji genów, których ekspresja indukowana jest stresem ER a także stresem komórkowym, takich jak pośredniczące w kierowaniu komórki na drogę apoptozy *GADD45*, *GADD153* (ang. *DNA damage inducing protein*), czy czynnika transkrypcyjnego *ATF-4*, a także *YY1* (ang. *transcriptional repressor protein*) jest kolejnym dowodem stresu ER wywołanego hiperhomocysteinemią [37, 41].

N-homocysteinyłowane białka mogą również wywoływać stres siateczki śródplazmatycznej. N-Hcy-białka akumulują się w wątrobie myszy z wyciszonym genem *Cbs* [20]. Myszy z wyciszonym genem *ApoE* będące na diecie wysokometioninowej miały podwyższony poziom N-Hcy-białek. Metodą barwienia immunohistochemicznego wykazano ich akumulację w obrębie złogów tłuszczowych w aorcie. N-homocysteinyłacja jest modyfikacją, która zwiększa podatność białek na tworzenie agregatów. Obecność agregatów N-Hcy-białek w retikulum endoplazmatycznym może powodować stress ER i rozwój UPR, co w konsekwencji może prowadzić do dysfunkcji komórki i apoptozy [42].

1.4. Tiolakton homocysteiny

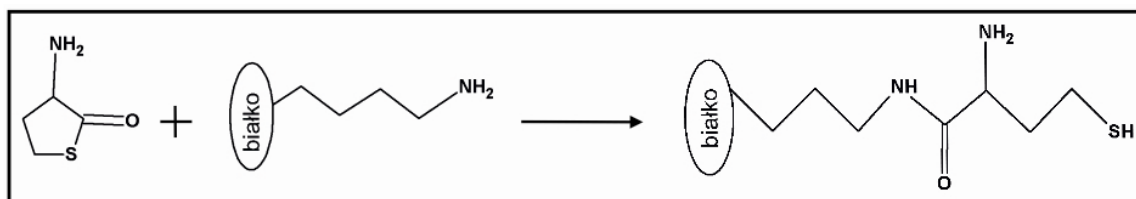
Tiolakton homocysteiny może tworzyć się w wyniku reakcji korekcyjnej syntetaz aminoacylo-tRNA. Reakcja aminoacylacji polega na aktywacji aminokwasu przez odpowiednią syntetazę tRNA, z wytworzeniem aminoacyloadenylnu jako produktu pośredniego, a następnie przeniesieniu go do tRNA. Niektóre aminokwasy, ze względu na podobieństwo strukturalne mogą być błędnie aktywowane. Reakcja korekcyjna (ang. *editing*) zachodzi dzięki aktywności hydrolitycznej tej grupy enzymów. Znane są dwa mechanizmy korekcyjne syntetaz aminoacylo-tRNA. Reakcja ta może polegać na hydrolizie niewłaściwego aminoacyloadenylnu (ang. *pre-transfer*) lub też na hydrolizie błędnie załadowanego tRNA (ang. *post-transfer*). Homocysteina ze względu na swoje podobieństwo strukturalne do metioniny, leucyny czy izoleucyny może być błędnie rozpoznana przez odpowiadające im syntetazy aminoacylo-tRNA. Homocysteina zostaje wówczas aktywowana z udziałem ATP. W wyniku tej reakcji powstaje adenyln homocysteiny (Hcy~AMP). W reakcję korekcyjną, w wyniku której dochodzi do usunięcia Hcy~AMP, z centrum aktywnego syntetazy metionilo-tRNA, zaangażowany jest boczny łańcuch tiolowy, który wypiera AMP z aktywowanej grupy karboksylowej Hcy, tworząc cykliczny tioester – tiolakton homocysteiny (rysunek 3). Energia wiązania anhydrowego Hcy~AMP zostaje zachowana w postaci wewnątrzcząsteczkowego wiązania tioestrowego tiolaktonu, w skutek czego tiolakton z łatwością acyluje wolne grupy aminowe lizyny. [7, 43, 44].

Wykazano, że HTL powstaje na drodze reakcji korekcyjnej syntetazy metionilo-tRNA w komórkach bakteryjnych, drożdżowych, w komórkach ssaczy jak i u ludzi [6, 45-49]. Dowiedziono również, że u bakterii *Escherichia coli* reakcję powstawania HTL mogą również przeprowadzać syntetazy leucylo- i izoleucylo-tRNA [45].



Rysunek 3: Reakcja powstawania tiolaktonu homocysteiny [7].

W warunkach fizjologicznych (pH 7,4, 37°C) tiolakton homocysteiny jest stabilny, a okres jego półrozpadu wynosi 25h. Natomiast w środowisku zasadowym HTL szybko hydrolizuje do Hcy. Wiązanie tioestrowe tiolaktonu jest bardzo podatne na reakcje z grupami nukleofilowymi, takimi jak wolne grupy aminowe białek, dlatego też w warunkach fizjologicznych HTL preferencyjnie reaguje z ϵ -aminową grupą lizyny, powodując wbudowanie Hcy do cząsteczki białka, co wykazano zarówno *in vitro* [43] jak i *in vivo* [48] (rysunek 4). ϵ -aminowa grupa lizyny wykazuje trzy razy większą reaktywność w stosunku do HTL, niż grupa α -aminowa lizyny. Dzięki niskiej wartości pKa grupy α -aminowej (pKa = 7,1), tiolakton homocysteiny może bardzo łatwo reagować z aldehydami, na przykład fosforanem pirydoksalu, o-ftalaldehydem czy streptomycyną. Na podstawie eksperymentów z użyciem kultur komórkowych dowiedziono, że w medium hodowlanym zawierającym antybiotyk – streptomycynę często stosowaną jako suplement medium komórkowego, okres półrozpadu HTL wynosi jedynie 10 min. Jest to spowodowane faktem, że reakcja tiolaktonu homocysteiny ze streptomycyną zachodzi 400 razy szybciej niż z lizyną [43, 47, 50].



Rysunek 4: Reakcja N-homocysteinyłacji białek przez tiolakton homocysteiny

W 1997 roku zaproponowano hipotezę, według której konwersja Hcy do HTL inicjuje szlak metaboliczny prowadzący do zmian patologicznych w organizmie. Na podstawie danych pochodzących z eksperymentów z użyciem ludzkich fibroblastów i komórek śródbłonna dowiedziono, że potranslacyjne modyfikacje białek komórkowych poprzez N-homocysteinyłację, mogą być mechanizmem inicjującym uszkodzenia komórkowe, co może prowadzić do powstawania stanów patologicznych. Początkowo małe ilości N-Hcy-białek, z czasem mogą się kumulować w organizmie, przyczyniając się do rozwoju stanów chorobowych [51]. Patofizjologiczne konsekwencje N-homocysteinyłacji białek obejmują również: odpowiedź autoimmunologiczną, toksyczność komórkową, stres siateczki śródplazmatycznej, aktywację odpowiedzi na niesfałdowane białka [3, 52]. Na podstawie danych pochodzących z eksperymentów z użyciem kultur komórkowych dowiedziono, że

modyfikacje potranslacyjne białek komórkowych poprzez N-homocysteinylację, inicjują uszkodzenia komórkowe, co może prowadzić do powstawania stanów patologicznych.

1.5. Konsekwencje N-homocysteinytacji białek

N-homocysteinytlacja białek powoduje upośledzenie ich funkcji poprzez zmiany w drugorzędowej strukturze białek. Reakcja ta zachodzi już przy 10 nM stężeniu tiolaktonu homocysteiny, a ilość reszt Lys w białku ulegających N-homocysteinytlacji jest wprost proporcjonalna do wzrostu stężenia HTL. Funkcja N-Hcy-białka jest tym bardziej zaburzona, im większa liczba reszt lizynowych jest zmodyfikowanych przez HTL. Modyfikacja ta zmienia ładunek lizyny, ponieważ grupa ϵ -aminowa lizyny ($pK_a = 10,5$) jest bardziej zasadowa niż α -aminowa grupa Hcy ($pK_a = 7,1$). W rezultacie do cząsteczki białka przyłączone zostają dodatkowe grupy tiolowe, co zwiększa podatność białka na utlenianie, tworzenie wewnątrzcząsteczkowych mostków dwusiarczkowych oraz agregację [43]. N-homocysteinytlacja białek, jest reakcją specyficzną wyłącznie dla homocysteiny, ponieważ HTL, cząsteczka odpowiedzialna za powstawanie tego rodzaju modyfikacji może powstawać jedynie z homocysteiny. Ponadto N-Hcy-białka stają się bardziej podatne na agregację, oraz na uszkodzenia spowodowane utlenianiem [3, 43, 53]. Co więcej, dzięki niskiej wartości pK_a ($pK_a = 6,67$) w warunkach fizjologicznych pH HTL jest neutralny dla komórek i może z łatwością przenikać przez błony komórkowe, powodując N-homocysteinytlację białek zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych [47, 51]. Reakcja N-homocysteinytlacji białek, początkowo zaobserwowana *ex vivo*, na podstawie eksperymentów z użyciem kultur komórkowych [47], zachodzi również u zwierząt jak i w organizmie człowieka [20, 21, 48]. Cytochrom c jest bardzo podatny na modyfikację tiolaktonem homocysteiny. N-homocysteinytlacja powoduje zmiany strukturalne tego białka, co skutkuje zmniejszoną podatnością na proteolizę, a także zmienia jego status redox. N-Hcy-cytochrom c jest również podatny na multimeryzację [54].

Białka krwi również łatwo ulegają modyfikacji pod wpływem HTL. Poziom N-Hcy-białek wykazuje pozytywną korelację z poziomem homocysteiny we krwi, a ilość wbudowanych cząsteczek Hcy do cząsteczki białka zależy od liczby reszt lizynowych w białku. Najwięcej cząsteczek Hcy wbudowanej do białka za pomocą

wiązania amidowego znaleziono w hemoglobinie (75%), albuminie (22%) oraz w γ -globulinie (2%). Wykazano również, że N-homocysteinyłowane formy innych białek, takich jak LDL, HDL, antytrypsyna, transferyna oraz fibrynogen są obecne we krwi, co pociąga za sobą poważne konsekwencje [48].

Albumina jest głównym białkiem surowicy krwi i stanowi ponad 90% białek surowicy. Pełni ona bardzo wiele funkcji biologicznych, jak utrzymywanie ciśnienia onkotycznego w naczyniach krwionośnych, posiada właściwości buforujące i oksydacyjne. Posiada również zdolność wiązania i transportu do tkanek docelowych kwasów tłuszczowych, bilirubiny, niektórych hormonów, toksyn czy leków. N-Hcy-albumina jest bardziej podatna na uszkodzenia oksydacyjne, a także na proteolizę. Wykazano, że modyfikacja ta zachodzi za równo *in vitro* jak i *in vivo*. Albumina jest białkiem łatwo ulegającym N-homocysteinyłacji, a łatwość z jaką zachodzi ta reakcja zależy od reszty Cys-34. Reakcja tiolaktonu homocysteiny z formą albumina-Cys³⁴-S-S-Cys zachodzi szybciej niż z merkптоalbuminą (albumina-Cys³⁴-SH). Cysteina 34 znajduje się na powierzchni białka i ma bardzo niską wartość pKa grupy tiolowej (pKa~5), co powoduje, że w warunkach fizjologicznych dominującą formą występowania albuminy jest jon tiolanowy, który łatwo reaguje z tiolami, dwusiarczkami i metalami [55].

Dominującymi miejscami przyłączenia grup tiolowych do cząsteczki albuminy poprzez wiązanie amidowe *in vitro* jest Lys-4, Lys-12, Lys-137, Lys-159, Lys-205, Lys-212 oraz Lys-525. Analiza struktury trzeciorzędowej białka potwierdziła, że wszystkie reszty lizyn podatnych na N-homocysteinyłację znajdują się na zewnątrz cząsteczki. Analiza albuminy pochodzącej z surowic pacjentów z hiperhomocysteinemią pozwoliła na lokalizację reszt Lys-525, Lys-137 oraz Lys-212 jako głównych miejsc modyfikacji [55, 56]. N-homocysteinyłacja Lys-525 w cząsteczce albuminy może służyć jako wskaźnik poziomu Hcy we krwi oraz N-Hcy-białek. Pacjenci z mutacją w genie *CBS* mają wyższy poziom N-homocysteinyłacji Lys-525, w porównaniu do pacjentów kontrolnych. Jest to także związane z wyższym poziomem Hcy oraz N-Hcy białek w tej grupie [57].

N-homocysteinyłacja albuminy pociąga za sobą poważne konsekwencje. Paoli i wsp. wykazali, że N-Hcy-albumina bydlęca zdolna jest do agregacji, a wytworzone agregaty są toksyczne, co wykazano na mysich komórkach śródbłonna. Agregaty N-Hcy-albuminy z czasem podlegają reorganizacji strukturalnej tworząc fibrylle i stuktury amyloidalne. Doniesienia te, mogą po części wyjaśnić negatywne skutki

hiperhomocysteinemii w organizmie człowieka, takie jak rozwój odpowiedzi zapalnej, nieprawidłowe funkcjonowanie komórek a także ich śmierć [58].

N-Hcy-albumina powoduje także zmiany w funkcjonowaniu komórek śródbłonna. N-Hcy-albumina dodana do medium hodowlanego, powodowała wzrost adhezji monocytów do warstwy komórek śródbłonna. Jednocześnie komórki te charakteryzowały się nadekspresją genów białek adhezyjnych *VCAM1* (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) i *ICAM1* (ang. *intracellular adhesion molecule 1*), która była zależna od czasu inkubacji i stężenia N-Hcy-albuminy. Wzrost poziomu mRNA dla tych genów skutkowało również wzrostem poziomu ich produktów białkowych. Cząsteczki te uczestniczą w przekazywaniu i wzmacnianiu sygnału o istniejącym stanie zapalnym. Przedłużający się stan zapalny w obrębie naczyń krwionośnych prowadzi z czasem do rozwoju zmian miażdżycowych. Ponadto inkubacja komórek z N-Hcy-albuminą spowodowała wzrost ekspresji genów związanych z mechanizmem remodelowania naczyń krwionośnych (ang. *vascular remodeling*): *ADAM17* (ang. *a disintegrin and metalloprotease domain 17*), *MCPI* (ang. *monocyte chemoattractant protein*), *Hsp60* (ang. *heat shock protein*). Proces ten jest charakterystyczny dla nadciśnienia tętniczego, czy miażdżycy [59].

Fibrynogen jest głównym białkiem biorącym udział w procesie krzepnięcia krwi. Proces ten polega na przekształceniu rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną sieć fibryny pod wpływem trombiny. Rozpuszczanie skrzepów fibryny (fibrynoliza) jest niezbędne podczas gojenia się ran, a także jako mechanizm obronny organizmu przed powstawaniem wewnątrznacyniowych zakrzepów, mogących stać się przyczyną zakrzepicy żylniej. Do inicjacji fibrynolizy niezbędnym etapem jest przekształcenie plazminogenu w aktywne proteolityczne białko - plazminę. Proces ten może zachodzić przy pomocy osoczowych (kalikreina) lub tkankowych czynników, takich jak tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) oraz aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA). Powstanie plazminy z nieaktywnego prekursora plazminogenu, warunkowane jest hydrolizą wiązania peptydowego pomiędzy arginina 560, a walina 561. Dwa powstałe w ten sposób łańcuchy połączone są mostkiem dwusiarczkowym i taka cząsteczka ma właściwości katalityczne. W pobliżu N-końca plazminy znajdują się obszary bogate w reszty lizyny, które warunkują powinowactwo do fibryny [27]. Fibrynogen łatwo ulega N-homocysteinylacji *in vitro* [48]. Modyfikacja ta powoduje zmiany strukturalne w białku. Struktura skrzepu fibrynowego powstałego z N-Hcy-fibryny jest bardziej zwarta, a co za tym idzie jest on mniej

przepuszczalny dla czynników fibrynolitycznych. Reszty Lys znajdują się również w miejscu wiązania się tPA i plazminogenu, gdzie zachodzi hydroliza plazminy, co tłumaczy zwiększoną odpornością N-Hcy-fibryny na fibrylizę [60]. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych *in vivo* dowodzą, że N-homocysteinyłacja zaburza biologiczną funkcję fibrynogenu, powodując zmiany w strukturze skrzepu fibrynowego. Zmiany te skutkują mniejszą podatnością N-Hcy-fibryny na fibrylizę, zarówno u pacjentów zdrowych, jak i z zaawansowanymi zmianami miażdżycowymi [61]. Obecność N-Hcy-fibrynogenu można również zauważyć we krwi pacjentów z hiperhomocysteinemią. Fakt, że posiada on właściwości prozakrzepowe, może tłumaczyć zwiększone ryzyko rozwoju zakrzepicy, obserwowane w tej grupie badawczej [21]. Tiolakton homocysteiny może również zaburzać proces krzepnięcia krwi, poprzez zwiększoną adhezję trombiny i aktywowanych płytek krwi do kolagenu i fibrynogenu. Zmiany te są wprost proporcjonalnie do stężenia HTL [62].

Lipoproteiny są to kompleksy składające się z estrów cholesterolu, triglicerydów oraz polarnej powłoki zawierającej fosfolipidy, wolny cholesterol oraz białka (apolipoproteiny), które uczestniczą w transporcie i metabolizmie lipidów. Lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL, ang. *high density lipoprotein*) pełnią główną rolę w mechanizmie obronnym przeciwko rozwojowi zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Pełnią one funkcję antyoksydacyjną, a także biorą udział w transporcie zwrotnym cholesterolu, czyli transporcie z komórek tkanek obwodowych do wątroby, gdzie dochodzi do jego eliminacji na drodze syntezy kwasów żółciowych. Natomiast frakcja cholesterolu LDL (ang. *low density lipoprotein*) odpowiada za transport cholesterolu do komórek w celu regeneracji. Tiolakton homocysteiny, poprzez N-homocysteinyłację może również zaburzać metabolizm lipoprotein. N-homocysteinyłacja białkowej komponenty LDL, ApoB100 powoduje zwiększoną podatność cząsteczek LDL na agregację, a także zwiększone pobieranie N-Hcy-LDL przez makrofagi, co wskazuje na zwiększenie jego właściwości prozapalnych [51]. Cząsteczki N-Hcy-LDL powodują również zmiany w funkcjonowaniu komórek śródbłonna: zwiększają stres oksydacyjny a także powodują apoptozę komórek, która może być spowodowana upośledzeniem wymiany jonowej przez membranę. Inkubacja komórek śródbłonna z N-Hcy-LDL wywołuje bowiem upośledzenie aktywności komórkowej ATPazy sodowo-potasowej, enzymu odpowiedzialnego za utrzymanie homeostazy jonowej w komórce. Innym negatywnym skutkiem wywoływanym przez N-Hcy-LDL jest zwiększenie stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek. Wykazano

również korelację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia z poziomem anionorodnika nadnitylowego, co jest oznaką stresu oksydacyjnego, z czym związany jest również spadek stężenia tlenu azotu [63].

N-homocysteinyłacja białkowej komponenty lipoprotein o wysokiej gęstości, powoduje przyłączenie dużej liczby grup –SH, już po 10 minutach inkubacji z HTL. Modyfikacja ta nie skutkuje jednak zwiększoną podatnością na uszkodzenia oksydacyjne. N-homocysteinyłacja powoduje natomiast obniżenie aktywności paraoksonazy (PON), enzymu związanego z cząsteczką HDL, zaangażowanego w detoksyfikację fosforanów organicznych (PON omówiona w rozdziale 1.7.1). Zmiany te mogą być wynikiem zmian konformacyjnych związanych z przyłączeniem grup tiolowych do cząsteczki HDL. Modyfikacje białkowej komponenty tej cząsteczki mogą również wpływać na interakcje z warstwą fosfolipidową, a także na interakcje pomiędzy cząsteczką HDL a PON. Paraoksonaza jest enzymem wykazującym naturalnie, osobnicze różnice w swojej aktywności, co wiąże się z podatnością HDL na modyfikację przez HTL. Wykazano bowiem, że frakcja HDL wyizolowana z normolipemicznych surowic charakteryzujących się niższą aktywnością PON była bardziej podatna na przyłączanie grup tiolowych. Natomiast wyższa aktywność PON chroniła HDL przed N-homocysteinyłacją [64].

1.6. Odpowiedź autoimmunologiczna przeciw N-homocysteinyłowanym białkom

Oprócz negatywnych skutków N-homocysteinyłacji białek opisanych w poprzednim rozdziale, modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny pociąga za sobą również inne konsekwencje. N-Hcy-białka mogą być rozpoznawane przez organizm jako antygen i zdolne są do wywoływania odpowiedzi autoimmunologicznej. Przeciwciała przeciwko N-Hcy-białkom obecne są we krwi zarówno zwierząt, jak i ludzi z podwyższonym poziomem homocysteiny [52, 65]. Przeciwciała te specyficznie rozpoznają epitop N-Hcy-Lys. Wyniki doświadczeń testów immunoenzymatycznych (ELISA) dowodzą, że N-Hcy-albumina, N-Hcy-hemoglobina oraz N-Hcy-transferyna są efektywnymi kompetitorami, podczas gdy natywne odpowiedniki N-Hcy-białek nie konkurują o miejsce wiązania do przeciwciała. N-Hcy-białka z zablokowaną grupą tiolową przy pomocy jodoacetamidu również nie są dobrymi kompetitorami. Wskazuje

to, że grupa tiolowa przyłączona przez wiązanie amidowe do cząsteczki białka jest istotna dla rozpoznawania przez przeciwciała [65].

Poziom przeciwciał przeciwko N-Hcy-białkom jest skorelowany dodatnio z poziomem N-Hcy-białek jak i homocysteiny we krwi, ale nie z poziomem metioniny czy cysteiny. Zaproponowano, że przeciwciała te mogą służyć jako czuły i specyficzny marker do monitorowania poziomu N-Hcy-białek w tkankach [42]. Podwyższone miano przeciwciał wykazano u mężczyzn z chorobą wieńcową w porównaniu do zdrowych mężczyzn [65, 66]. Podwyższony poziom przeciwciał o około 50% zaobserwowano również u mężczyzn po udarze mózgu [65]. W obu przypadkach u kobiet poziom przeciwciał przeciwko N-Hcy-białkom był niższy niż u mężczyzn. Jest to związane z niższym poziomem Hcy we krwi kobiet objętych badaniem. Podwyższony poziom przeciwciał przeciwko N-Hcy-albuminie oraz N-Hcy-hemoglobinie zaobserwowano również u pacjentów poddawanych dializowaniu przez długi okres czasu, u których występowała łagodna hiperhomocysteinemia. Ponadto obecność przeciwciał korelowała z występowaniem stresu oksydacyjnego. U tych pacjentów wykazano podwyższony poziom 8-izoprostaglandyny $F_{2\alpha}$ (8-IZO-PG $F_{2\alpha}$), czułego markera stresu oksydacyjnego [67].

Przeciwciała przeciwko N-Hcy-białkom mogą mieć również związek z rozwojem miażdżycy. N-homocysteinylacji mogą ulegać białka zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowe. Przyłączenie grup tiolowych do białek powierzchniowych komórek śródbłonna może być immunogenne, wywołując odpowiedź ze strony organizmu. Wytworzenie kompleksów N-Hcy-białko-przeciwciało (antygen-przeciwciało) może być sygnałem dla makrofagów do ich pochłonięcia przez receptor Fc, powodując uszkodzenie ściany naczynia krwionośnego. Jeśli obecność N-Hcy-białek na powierzchni komórek śródbłonna, będzie się utrzymywać przez dłuższy czas (długotrwała hiperhomocysteinemia), wywołując miejscowy stan zapalny, doprowadzi to z czasem do powstania blaszki miażdżycowej [68].

1.7. Mechanizmy eliminacji tiolaktonu homocysteiny

Podwyższony poziom homocysteiny, a także jej metabolitów (HTL oraz N-Hcy-białek) pociąga za sobą bardzo poważne konsekwencje dla organizmu. Ich wpływ na organizmy żywe, zarówno prokariotyczne jak i eukariotyczne był

przedmiotem badań wielu zespołów. Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują na wysoką toksyczność HTL oraz N-Hcy-białek. Dlatego też, organizmy żywe musiały wykształcić mechanizmy chroniące przed ich negatywnym wpływem. Mechanizmy te mogą zapobiegać tworzeniu się HTL, jak i jego detoksykacji. Wewnątrzkomórkowa transmetylacja Hcy do metioniny czy transsulfuryjacja do cysteiny (omówione w rozdziale 1.1), a także wiązanie Hcy z cząsteczką albuminy (albumina-S-S-Hcy) [55] to mechanizmy zapobiegające powstawaniu HTL. Znane są również enzymatyczne jak i nieenzymatyczne mechanizmy detoksyfikacji HTL, w które zaangażowane są paraoksonaza, hydrolaza bleomocyny oraz wydalanie tiolaktonu homocysteiny z moczem.

1.7.1. Wydalanie tiolaktonu homocysteiny z moczem

Stężenie tiolaktonu homocysteiny u pacjentów z hiperhomocysteinemią jest dużo niższe, niż wynikałoby to z wcześniejszych badań nad metabolizmem Hcy na modelu komórkowym [47]. Jedną z podstawowych metod eliminacji tiolaktonu homocysteiny z ludzkiego organizmu jest wydalanie z moczem. Zawiera on około 100 razy więcej HTL niż krew. HTL obecny w moczu stanowi znacznie większą pulę homocysteiny (2,5 do 28%), niż HTL w surowicy krwi (<0,002% do 0,29%). W oparciu o współczynnik przesączania kłębuszkowego (GFR, ang. *glomerular filtration rate*) obliczono, że powyżej 95% HTL z krwi ulega przesączeniu w kłębuszkach nerkowych do moczu, a tylko 0,3 - 3,8% ulega resorpcji zwrotnej. Prawdopodobnym mechanizmem ułatwiającym wydalanie HTL z moczem jest nabywanie dodatniego ładunku przez α -aminową grupę HTL, który zapobiega przed resorpcją zwrotną w kanalikule nerkowym. W krwioobiegu HTL jest neutralny ($pK=7,1$), podczas gdy w moczu nabiera dodatniego ładunku w wyniku kwaśnego pH moczu. Dodatni ładunek α -aminowej grupy HTL, sprawia, że wykazuje on dużo większe powinowactwo do ujemnie naładowanej błony filtracyjnej kłębuszków nerkowych, co powoduje, że możliwe jest jego wydajne wydzielanie przez kanaliki nerkowe do moczu ostatecznego. Negatywna korelacja pomiędzy wartością pH a stężeniem HTL w moczu potwierdza tę hipotezę. Wydalanie HTL z moczem pozwala na jego wydajną eliminację z krwioobiegu i zapobieganie negatywnym skutkom jego obecności, takim jak N-homocysteinylacja białek [69].

1.7.2. Paraoksonaza1

Detoksykacja tiolaktonu homocysteiny możliwa jest również na drodze enzymatycznej. Jednym ze znanych enzymów uczestniczących w hydrolizie HTL (aktywność HTazy) jest występująca w krwioobiegu paraoksonaza 1, związana z frakcją HDL. Jest to białko o masie cząsteczkowej 45 kDa, którego aktywność zależna jest od jonów wapnia. Wykazano, że aktywność tiolaktonazowa PON1 jest selektywna wobec tiolaktonu L-homocysteiny [70]. Pierwsze doniesienia o właściwościach hydrolitycznych HTL pochodzą z eksperymentów z użyciem kultur komórkowych. Jednak wówczas nie znano jeszcze aktywności HTazowej PON1, ponieważ do tej pory, enzym ten był znany wyłącznie z właściwości detoksyfikacyjnych fosforanów organicznych. Dodatek fizjologicznych stężeń HDL do medium hodowlanego, powodował obniżenie stężenia HTL i N-Hcy-białek w komórkach śródbłonna [47].

Aktywność enzymatyczna paraoksonazy/tiolaktonazy u ludzi determinowana jest przez naturalnie występującą zmienność genetyczną. W obrębie sekwencji promotora genu *PON1* człowieka zidentyfikowano trzy polimorfizmy, które wpływają na aktywność HTazową enzymu. Polimorfizm sekwencji promotorowej występuje w pozycji -107 (C lub T), -824 (A lub G) oraz -907 (C lub T). Tylko dwa warianty, spośród wymienionych polimorfizmów wpływają na zwiększoną aktywność transkrypcyjną promotora *PON1*. Cytosyna w pozycji - 107 powoduje zwiększenie aktywności transkrypcyjnej 2 razy, natomiast A w pozycji - 824 około 1,7 razy. Polimorfizm regionu paromotorowego *PON1* ma również wpływ na stężenie białka w surowicy krwi i jego aktywność enzymatyczną. Obecność w sekwencji nukleotyduw tyminy w pozycji -107, guaniny -824 oraz cytozyny w pozycji -907 jest związana z niższą aktywnością enzymatyczną, natomiast występowanie cytozyny w pozycji -107, adeniny w pozycji -824, a także guaniny w pozycji - 907 skorelowane jest ze zwiększonym stężeniem i aktywnością enzymu w surowicy [71]. Mutacje w obrębie sekwencji kodującej genu *PON1* mają również wpływ na aktywność enzymatyczną białka. Zidentyfikowano substytucje, które skutkują zamianą aminokwasów w pozycji 55 i 192 sekwencji białka. Leucyna w pozycji 55 i arginina w pozycji 192 związane są z wyższą aktywnością tiolaktonazową, podczas gdy obecność metioniny w pozycji 55 i glutaminy w pozycji 192 związane są z mniejszą aktywnością enzymatyczną. W surowicy osób o genotypie związanym z wyższą aktywnością enzymatyczną PON1, hydroliza HTL zachodzi znacznie szybciej,

w porównaniu z osobami o mniej korzystnym genotypie pod względem aktywności enzymu, co skutkowało większą akumulacją Hcy i mniejszą zawartością N-Hcy-białek w badanych próbkach [72]. Również u pacjentów, u których hiperhomocysteinemia występowała na skutek mutacji w genie *CBS*, większa aktywność HTazowa skorelowana była z mniejszym poziomem N-Hcy-białek w surowicy krwi [73]. Właściwości antymiażdżycowe PON1 potwierdzono również u myszy. Transgeniczne myszy wykazujące zwiększoną aktywność paraoksonazy, będące na wysokotłuszczowej diecie miały o 60% mniejsze zmiany miażdżycowe w porównaniu z myszami typu dzikiego. Zaobserwowano również zmniejszenie ekspresji *Mcp1* u transgenicznych myszy, który jest jednym ze wskaźników uszkodzenia oksydacyjnego frakcji LDL i pełni główną rolę w aktywacji monocytów [74].

Wyniki tych badań wskazują, że paraoksonaza/tiolaktonaza chroni przed uszkodzeniem białek na skutek N-homocystenyacji, których akumulacja prowadzi do rozwoju stanu zapalnego, co w konsekwencji może skutkować rozwojem chorób układu krążenia. Aktywność tiolaktonazowa PON1 tłumaczy również właściwości frakcji HDL chroniące organizm przed rozwojem miażdżycy.

1.7.3. Hydrolaza bleomycyny

Paraoksonaza jest enzymem zewnątrzkomórkowym, dlatego też komórki wykształciły inny mechanizm chroniący przed negatywnymi skutkami konwersji Hcy do HTL. Wewnątrzkomórkowym enzymem, zdolnym do hydrolizy HTL jest hydrolaza bleomycyny (BLH). Jest to proteza cysteinowa, której nazwa pochodzi od zdolności do deaminacji leku przeciwnowotworowego - bleomycyny.

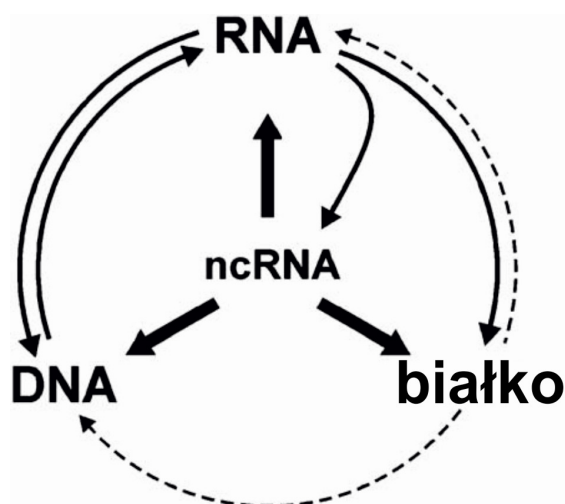
Ekspresja genu BLH jest zarówno tkankowo, jak i komórkowo specyficzna. Najwięcej mRNA hydrolazy bleomycyny występuje w jądrach, mięśniach szkieletowych i trzustce, a także w nowotworowych liniach komórkowych takich jak HeLa czy HL-60. Nie zidentyfikowano obecności tego enzymu w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, co wiąże się z ich zwiększoną podatnością na toksyczny wpływ homocysteiny. Enzym ten występuje nie tylko u ludzi; zidentyfikowano go również u drożdży [75] i ssaków [76]. Zarówno drożdżowa, jak i ludzka BLH wykazują specyficzność substratową w stosunku do tiolaktonu L-Hcy. Stereoizomer D nie jest hydrolizowany przez żaden z enzymów. Ponadto hydrolaza

bleomycyny dużo wydajniej hydrolizuje tiolakton homocysteiny niż paraoksonaza1. Aktywność tiolaktonazowa BLH jest około 100 razy wyższa, niż zewnątrzkomórkowej PON1. Wykazano, że także u drożdży pełni od funkcję ochronną przed toksycznym wpływem HTL na komórki. Drożdże, pozbawione aktywności tiolaktonazowej/BLH miały spowolniony wzrost w obecności Hcy w pożywce hodowlanej. Dodatek 10 mM Hcy powodował również obniżenie żywotności drożdży [75]. Myszy z mutacją genu *Blmh*, u których hiperhomocysteinemię wywołano przy pomocy wysokometioninowej diety wydalają z moczem więcej HTL, niż myszy z aktywnym genem *Blmh*. Ponadto akumulacja tiolaktonu homocysteiny zachodziła w mózгах, jak i nerkach zmutowanych myszy. Również metabolizm HTL był mniej wydajny u myszy pozbawionych enzymu, w porównaniu do myszy z aktywnym genem *Blmh*. Hydrolaza bleomycyny pełni również ważną funkcję ochronną przeciwko neurotoksycznym właściwościom HTL. Mutacja genu *Blmh* spowodowała wystąpienie napadów padaczkowych u myszy 30 - 60 min po dootrzewnowym wstrzyknięciu HTL [77].

Funkcja hydrolazy bleomycyny związana jest również z rozwojem choroby Alzheimera. Analiza *post mortem* aktywności enzymatycznej BLH w ekstraktach pobranych z mózгów pacjentów z chorobą Alzheimera wykazała, spadek aktywności aminopeptydazowej jak i tiolaktonazowej BLH [78].

1.8. Mechanizmy regulacji ekspresji genów

Centralny dogmat biologii molekularnej wyjaśniał jednokierunkowy przepływ informacji genetycznej w organizmach żywych, od DNA jako nośnika informacji genetycznej, poprzez RNA stanowiącego matrycę dla białek, do białek będących produktem końcowym ekspresji genów. Dziś wiemy, że równie ważną funkcję pełnią także mechanizmy regulatorowe, które decydują o tym kiedy i jaki gen zostaje „włączony” czy „wyłączony”. Odkrycie niekodujących RNA (ncRNA) pozwoliło uzupełnić nasze pojęcie o przepływie informacji genetycznej. Dowiedziono, że zarówno ncRNA jak i białka mogą regulować ekspresję genów (rysunek 5). Innym, również ważnym mechanizmem regulacji ekspresji informacji genetycznej są epigenetyczne modyfikacje DNA i białek histonowych. Dzięki nim możliwe są dynamiczne zmiany struktury chromatyny, przez co jest ona bardziej lub mniej dostępna dla czynników transkrypcyjnych.



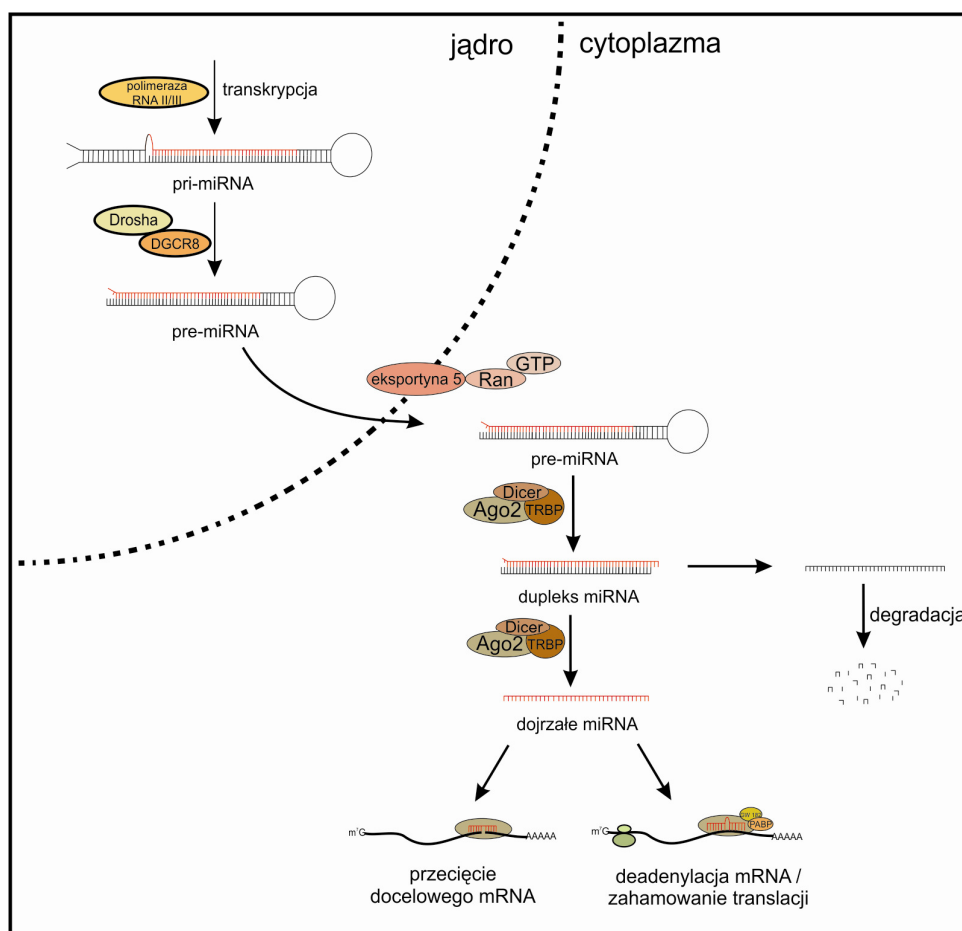
Rysunek 5. Schemat przepływu informacji genetycznej uwzględniający rolę niekodujących RNA [79].

1.8.1. mikroRNA

MikroRNA (miRNA) to krótkie, około 21-nukleotydowe, niekodujące RNA, które są zdolne do potranslacyjnej regulacji ekspresji genów. Szacuje się, że u ssaków miRNA kontrolują ekspresję około 50% genów kodujących białka. Regulacja ta polega na parowaniu miRNA z docelowym mRNA. U ssaków jest to z reguły nie w pełni komplementarne parowanie w rejonie 3'UTR (ang. *untranslated region*) mRNA z nukleotydami w pozycji 2 - 8 na końcu 5' miRNA (ang. *seed region*). Większość miejsc wiązania miRNA zlokalizowanych jest w rejonie 3'UTR docelowych mRNA, jednak u zwierząt miejsca wiązania mogą znajdować się również w rejonie 5'UTR, a także w sekwencji kodującej genu. Co więcej parowanie miRNA w obrębie regionu 5' UTR powoduje raczej aktywację translacji docelowego mRNA, niż jej zahamowanie [80].

Biogeneza miRNA w komórce zaczyna się od ich syntezy w jądrze przez polimerazę II lub III RNA, w postaci długich transkryptów (pri-miRNA), tworzących strukturę spinki do włosów (ang. *hairpin*), które na końcu 5' mają pozycji siódmej metylowaną guanozynę (ang. *cap*) oraz sekwencję poli(A) na końcu 3'. (rysunek 6.) Dalsza obróbka pri-miRNA odbywa się przy udziale enzymów należących do rodziny RNaz III: Drosha i Dicer. Enzym Drosha tworzy kompleks z białkiem wiążącym dwuniciowe RNA DGCR8, który zdolny jest do hydrolizy pri-miRNA, do około 70-nukleotydowych pre-miRNA o strukturze spinki do włosów. Pre-miRNA są

następnie transportowane do cytoplazmy przez eksportynę 5. Tam są one substratem dla endonukleazy Dicer, która hydrolizuje je do około 21 nukleotydowych dwuniciowych miRNA. Następnie jedna z nici duplesu zwana nicią wiodącą (ang. *guide strand*) włączana jest do rybonukleoproteinowego kompleksu miRISC (ang. *miRNA-induced silencing complex*), podczas gdy druga z nici (miRNA*) (ang. *passenger strand*) ulega degradacji. O tym, która z nici duplesu miRNA/miRNA* zostanie skierowana na drogę degradacji decyduje stabilność termodynamiczna jego końców. Do kompleksu miRISC zostaje włączona ta z nici, której koniec 5' jest słabiej zaangażowany w wiązania typu Watson-Crick z drugą nicią duplesu [81]. Najlepiej scharakteryzowanymi składnikami kompleksu miRISC są białka z rodziny *Argonaute* (Ago) oraz GW182 (ang. *glycine-tryptophan repeat-containing protein of 182kDa*). U ssaków znane są cztery białka Ago (Ago1 - Ago4), jednak to Ago2 decyduje o aktywności nukleazowej kompleksu RISC, ponieważ posiada ono domenę o aktywności RNazy H (domena PIWI).



Rysunek 6: biogeneza miRNA u ssaków [82].

Znane są dwa mechanizmy potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, w których uczestniczą miRNA: degradacji mRNA oraz hamowania translacji i deadenylacji. Wybór jednego z tych mechanizmów zależy od komplementarności sekwencji miRNA do sekwencji docelowej mRNA. Jeśli parowanie od 2 do 8 nukleotydu od końca 5' miRNA jest całkowite lub niemal całkowite dochodzi do przecięcia sekwencji docelowej mRNA, a miRNA pozostaje niezmieniony i może brać dalej udział w rozpoznawaniu i degradacji kolejnych mRNA. Jeśli natomiast parowanie miRNA z sekwencją docelową nie jest kompletne dochodzi do zahamowania translacji i/lub deadenylacji docelowego mRNA. Deadenylacja zachodzi z udziałem białka GW182, którego koniec aminowy oddziałuje z białkiem Ago, podczas gdy koniec karboksylowy oddziałuje z białkiem wiążącym sekwencję poli(A) (PABP) i angażuje deadenylazy CCR4 i CAF1. Nie wiadomo dokładnie na czym polega mechanizm zahamowania translacji. mRNA, którego ekspresja została zahamowana zostaje skierowany do ciałek P (ang. *P bodies*) [80, 81].

1.8.2. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów

Epigenetyka jest nauką zajmującą się dziedzicznymi zmianami w ekspresji genów, które nie są spowodowane zmianami w sekwencji DNA. Zmiany te spowodowane są rearanżacją struktury chromatyny, na skutek modyfikacji jej składników DNA i/lub białek histonowych. Modyfikacje te stanowią sygnał dla białek odpowiedzialnych za przebudowę chromatyny, co prowadzi do jej większej lub mniejszej kondensacji, a co za tym idzie zmniejszonej lub zwiększonej ekspresji genów. Mechanizmy epigenetyczne mogą różnić się pomiędzy osobnikami czy tkankami, a także zmieniać się w czasie np. podczas wzrostu czy starzenia się organizmu, pod wpływem czynników zewnętrznych czy też jako odpowiedź na stany chorobowe [83].

W jądrach komórek eukariotycznych DNA jest ściśle upakowany w postaci chromatyny. Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom, który zbudowany jest z białek histonowych. Pojedynczy nukleosom zbudowany jest z fragmentu DNA o długości 147 par zasad, który nawinięty jest na oktamer histonowy, zawierający po dwa histony H2A, H2B, H3 i H4. Histon H1, zwany też łącznikowym, spina strukturę rdzenia, umożliwiając tym samym nawinięcie DNA. Dzięki oddziaływaniom histonów łącznikowych z łańcuchem DNA pomiędzy poszczególnymi nukleosomami, możliwe

jest utworzenie heliakalnych struktur wyższego rzędu, zwanych solenoidami. Solenoidy ulegając kolejnym zwinięciom, aż do powstania chromosomów, pozwalają na jeszcze większe upakowanie materiału genetycznego [84, 85].

Histony są małymi białkami (masa cząsteczkowa poniżej 23kDa), które w swojej budowie posiadają elastyczny N-końcowy fragment wystający z nukleosomu, oraz globularną C-końcową domenę tworzącą rdzeń. Dzięki dużej zawartości aminokwasów zasadowych, przede wszystkim lizyny i argininy, histony zyskują charakter zasadowy i polikationowy. Umożliwia im to oddziaływanie z negatywnie naładowanym łańcuchem DNA lub z białkami [84, 85].

Struktura chromatyny pełni podstawową funkcję w regulacji ekspresji informacji genetycznej. N-końcowe ogony histonów oddziałując z DNA i sąsiadującymi nukleosomami umożliwiają dynamiczne zachodzenie zmian w strukturze chromatyny, zwiększając lub zmniejszając tym samym dostępność dla czynników transkrypcyjnych. Aminokwasy takie jak arginina, lizyna, treonina i seryna wchodzące w skład białek histonowych mogą ulegać potranslacyjnym modyfikacjom takim jak acetylacja, metylacja, fosforylacja, ADP-rybozylacja, sumoilacja i ubikwitynacja. Modyfikacje o charakterze epigenetycznym zauważono również w nici DNA [84-86].

Acetylacja polega na przyłączeniu reszty acetylowej do ϵ -aminowej grupy reszty lizyny. Postuluje się, że modyfikacja ta przyczynia się głównie do rozluźnienia struktury chromatyny, co sprzyja zwiększeniu aktywności transkrypcyjnej acetylowanych regionów, a także związana jest z naprawą DNA. Modyfikacja ta wpływa na zmniejszenie dodatniego ładunku białek histonowych, co powoduje zwiększenie ich powinowactwa do negatywnie naładowanej nici DNA, a co za tym idzie udostępnienie wybranych sekwencji dla białek regulujących transkrypcję. Postuluje się również, że acetylacja może zmieniać strukturę N-końcowych ogonów histonowych poprzez zwiększenie zawartości struktur α -helikalnych. Jak dotąd, u ludzi zidentyfikowano pięć klas enzymów z grupy acetylotransferaz. Acetylowane reszty lizyny służą jako miejsce wiązania białek zawierających bromodomenę, motyw strukturalny charakterystyczny dla niektórych czynników transkrypcyjnych czy białek odpowiedzialnych za zmiany w strukturze chromatyny. Na przykład acetylacja lizyny 16 histonu H4 w stanowi sygnał do kondensacji chromatyny *in vivo* [85, 87-89].

Metylacja polega na przyłączeniu grupy metylowej do lizyny bądź argininy. Lizyna ma możliwość przyłączenia jednocześnie aż trzech grup metylowych, podczas gdy tylko dwie grupy metylowe mogą być przyłączone równocześnie do argininy.

Modyfikacja ta, w przeciwieństwie do acetylacji nie zmienia wypadkowego ładunku białek histonowych. Zwiększenie ilości grup metylowych powoduje zwiększenie powinowactwa histonów do DNA obdarzonego ujemnym ładunkiem. Modyfikacji tej podlegają głównie histony H3 i H4. Metylacja związana jest głównie z naprawą uszkodzeń w DNA oraz z regulacją aktywności transkrypcyjnej. Dowiedziono, że metylowana lizyna 4., 36. i 79. histonu H3 służą jako sygnał aktywacji transkrypcji, natomiast metylacja lizyny 9., 27. i 20. histonu H3 rozpoznawane są jako sygnał inhibicji transkrypcji. Metylacja histonu H3 w pozycji K79 czy dimetylacja histonu H4 w pozycji K20 służą jako miejsce rozpoznania dla białek odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń w DNA [87-90].

Fosforylacja białek histonowych związana jest z regulacją transkrypcji, naprawą uszkodzeń w DNA oraz kondensacją chromatyny. Fosforylacja histonu H3 w pozycji S10 i S28 związana jest z kondensacją chromatyny podczas mitozy, natomiast fosforylacja histonu H3 w pozycji T3 jest niezbędna do właściwego podziału chromosomów podczas metafazy [87, 89, 90].

Ubikwitynacja jest modyfikacją związaną z aktywacją bądź represją transkrypcji, wyciszeniem aktywności niektórych obszarów DNA poprzez tworzenie heterochromatyny, a także naprawą DNA. Przykładem może być ubikwitynacja histonu H2A w pozycji K119, która związana jest z represją transkrypcji. Znane są również doniesienia o aktywacji transkrypcji regionów chromatyny podlegających tej modyfikacji, jak na przykład ubikwitynacja histonu H2B w pozycji K120 [87, 89].

Sumoilacja polega na przyłączeniu do aminokwasu białka SUMO - małego białka stanowiącego część ubikwityny. Modyfikacja ta przeciwdziała zarówno ubikwitynacji, jak i acetylacji, a związana jest z wyciszaniem genów w komórkach ssaczy [85, 87].

ADP-rybozylacja polega na przyłączeniu do aminokwasu reszt cukrowych. Zarówno histony rdzeniowe, jak i histon łącznikowy H1 mogą być mono- lub poli-ADP-rybozylowane. Wykazano, że ADP-rybozylacja argininy i glutaminy związana jest z naprawą uszkodzeń w DNA oraz z proliferacją komórek. Modyfikacja histonu H2A w pozycji S129 oraz histonu H4 w pozycji S1 związane są z naprawą uszkodzeń w obu niciach DNA [85, 87].

W 2000 roku zaproponowano hipotezę kodu histonowego, która wyjaśnia związek potranslacyjnych modyfikacji białek histonowych ze zmianami w strukturze chromatyny, a co za tym idzie z regulacją ekspresji informacji genetycznej. Według tej

teorii potranslacyjne modyfikacje histonów stanowią specyficzny wzór, który wpływa na zmiany w funkcjonowaniu DNA poprzez modyfikację struktury chromatyny. Jednak pomimo wielu badań prowadzonych w tym zakresie, nie znaleziono dotąd uniwersalnego „języka” modyfikacji dla organizmów żywych [91, 92].

1.9. Wpływ homocysteiny na regulację ekspresji genów

Jednym z negatywnych efektów podwyższonego poziomu homocysteiny we krwi jest również zmiana ekspresji genów, które pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane są w patofizjologię hiperhomocysteinemii. Jednym z mechanizmów, przyczyniających się do zmiany poziomu ekspresji genów jest obniżenie metylacji DNA, obserwowane pod wpływem homocysteiny. Homocysteina może jednak indukować zmiany ekspresji genów, angażując inne, nieznanne mechanizmy. Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że Hcy powoduje stres oksydacyjny, poprzez powstawanie reaktywnych form tlenu. Może również pośrednio przyczynić się do powstawania stresu oksydacyjnego, poprzez zmniejszenie ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne: peroksydazę glutationu i dysmutazę ponadtlenkową [93, 94]. Inną konsekwencją podwyższonego poziomu Hcy we krwi jest stress siateczki śródplazmatycznej. Homocysteina powoduje wzrost ekspresji genów kodujących białka, których podwyższony poziom jest charakterystyczny dla tego stanu, takich jak dekarboksylaza kwasu glutaminowego (*GADD45*, *GADD153*), *ATF4*, *YY1* [95]. Według jednej z hipotez, konwersja Hcy do HTL, który reagując z białkami powoduje obniżenie ich aktywności lub całkowitą utratę pełnionych przez nie funkcji, jest przyczyną obserwowanych negatywnych skutków hiperhomocysteinemii. Capasso i wsp. wykazali, że N-homocysteinylowane białka przyczyniają się również do zmiany ekspresji genów. Inkubacja z N-Hcy-albuminą spowodowała zwiększoną adhezję monocytów do warstwy komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Było to związane z nadekspresją genów kodujących cytokiny regulujące proces adhezji (*VCAM1*, *ICAM1*) oraz genów, których produkty białkowe związane są z procesem remodelowania naczyń krwionośnych (*ADAM17*, *MCPI*, *Hsp60*) [59].

Przeływ informacji genetycznej w komórce prowadzi od DNA, poprzez mRNA do białka. Dlatego też analizy proteomiczne również mogą być dobrym odzwierciedleniem reakcji transkrypcyjnej na dany czynnik. Dwukierunkowy rozdział

białek wyizolowanych z komórek śródbłonka poddanych inkubacji z Hcy, pozwolił na zidentyfikowanie białek o odmiennej akumulacji na żelu poliakrylamidowym, w porównaniu do warunków kontrolnych. Wykazano zwiększoną akumulację białek związanych z rozwojem miażdżycy, takie jak wimentyna, katepsyna B, czy białko EB-1 związane z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein EB1*). Natomiast białko związane z tioredoksyną (ang. *thioredoxin-related protein*), wykazywało obniżoną akumulację pod wpływem Hcy. Sądzi się, że białko to ma właściwości antymiażdżycowe poprzez podtrzymywanie aktywności syntazy tlenu azotu [96]. Hiperhomocysteinemia może być wywołana dietą wysokometioninową, jak również może być skutkiem mutacji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm Hcy, takich jak *CBS* czy *MTHFR*. Jednakże hiperhomocysteinemia spowodowana przez mutacje genetyczne powoduje inne skutki dla organizmu, niż hiperhomocysteinemia indukowana dietą wysokometioninową. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez zespół DiBello, myszy z wyciszonym genem *Cbs* wykazywały odmienną odpowiedź organizmu na podwyższony poziom Hcy, w porównaniu do tych, u których hiperhomocysteinemia wywołana została poprzez zwiększoną zawartość metioniny w diecie. U myszy będących na diecie wysoko metioninowej wykazano podwyższoną akumulację białek zaangażowanych w metabolizm azotu i mocznika, a także białek związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny. Myszy z wyciszonym genem *Cbs* wykazywały obniżony poziom arginazy 1 (ARG1) oraz podniesiony poziom tlenu azotu (NO), co może wskazywać na wczesne uszkodzenie wątroby. Oba rodzaje hiperhomocysteinemii powodowały zwiększenie poziomu hydrolazy S-adenozylu-homocysteiny (SAHH) [16].

1.9.1. Homocysteina a regulacja ekspresji genów za pomocą miRNA

Z danych literaturowych wiadomo, że miRNA ulegają wysokiej ekspresji w układzie sercowo-naczyniowym. Biorą one udział w regulacji procesów komórkowych takich jak różnicowanie, wzrost czy apoptoza. Przy pomocy eksperymentów z użyciem enzymów kluczowych dla powstawania miRNA (Dicer i Drosha) wykazano, iż cząsteczki te pełnią główne funkcje w regulacji takich procesów jak angiogeneza, proliferacja komórek czy procesy zapalne w obrębie naczyń krwionośnych. Zaburzenia w funkcjonowaniu miRNA mogą prowadzić do powstania stanów chorobowych [97-102]. Profil ekspresji miRNA w ścianach naczyń

krwionośnych z rozwiniętymi zmianami miażdżycowymi znacznie różni się od profilu ekspresji miRNA zdrowych naczyń [103]. Także u pacjentów po przebytym zawale wykazano zmiany w ekspresji genów kodujących miRNA. Pacjenci ci mieli znacznie podwyższony poziom miR-423-5p, miR-320a, miR-22 oraz miR-92b w porównaniu do osób zdrowych [104]. Podwyższony poziom Hcy ma również wpływ na regulację ekspresji genów przy pomocy miRNA. Wykazano, że hiperhomocysteinemia powoduje wzrost ekspresji genu kodującego białko Dicer w mysich kardiomiocytach, a także zmienia profil ekspresji genów kodujących miRNA. Wyraźne obniżenie poziomu miR-188 pod wpływem Hcy, sugeruje zaangażowanie miRNA w procesy związane z patofizjologicznym wpływem Hcy [105].

1.9.2. Homocysteina a epigenetyczna regulacja ekspresji genów

Metabolizm homocysteiny w komórkach związany jest również z epigenetyczną regulacją ekspresji genów za pomocą metylacji DNA. W komórkach metionina przekształcana jest do S-adenozylometioniny, która jest donorem grupy metylowej do reakcji metylacji. S-adenozylhomocysteina, która powstaje jako produkt uboczny tej reakcji, ma zdolność inhibicji aktywności SAM-zależnych metylotransferaz DNA. Hiperhomocysteinemia u szczurów spowodowana wysokometioninową dietą spowodowała obniżenie stężenia SAM oraz wzrost stężenia SAH [106]. Zaburzony stosunek SAM/SAH zaobserwowano również u myszy z hiperhomocysteinemią spowodowaną mutacją w genie *Mthfr* [19]. Dzięki badaniom prowadzonym na liniach komórkowych [83], zwierzętach [106] i ludziach [107] wykazano, że hiperhomocysteinemia prowadzi do inhibicji metylacji genomowego DNA, powodując zmiany we wzorze metylacji w regionach promotorowych. U myszy z hiperhomocysteinemią poziom SAH był skorelowany z tkankowo specyficznymi zmianami poziomu metylacji genu H19 w wątrobie, nerkach i mózgu [107]. Na podstawie wyników eksperymentów przeprowadzonych na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych wykazano, że Hcy przyczynia się do zmiany stopnia metylacji sekwencji promotora genu *DDAH2* [33], czy *FGF2* kodującego czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor-2*) [108]. Natomiast u pacjentów z chorobami nerek odnotowano 50% spadek aktywności metylotransferaz DNA, przy podwyższonym poziomie SAH. Zbadano również związek hipometylacji pod wpływem

Hcy z powstawaniem zmian miażdżycowych. Podwyższony poziom SAH hamuje metylację białka p21ras, które przekazuje sygnały związane ze wzrostem, różnicowaniem i przeżywalnością komórek. Obniżenie poziomu metylacji genu kodującego to białko skutkuje zmniejszeniem syntezy DNA, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania proliferacji komórek śródbłonna i hamuje odbudowę zniszczonej ściany naczyń krwionośnych. Wysokie stężenie Hcy jest również związane z remodelowaniem chromatyny i inhibicją aktywności metylotransferazy I DNA w tych komórkach [109, 110].

2. Cel pracy

Podwyższony poziom homocysteiny we krwi, wywiera niekorzystny wpływ na organizm człowieka. Postuluje się, że homocysteina angażuje wiele mechanizmów (omówione szczegółowo w rozdziałach 1.2. - 1.6.) prowadzących w konsekwencji do rozwoju zmian miażdżycowych, które z czasem nasilają się. Jednakże molekularny mechanizm, leżący u podstaw patofizjologii hiperhomocysteinemii nie jest do końca poznany. Do tej pory nie przeanalizowano globalnej odpowiedzi transkryptomu ludzkiego na podwyższony poziom Hcy oraz jej metabolitów (HTL oraz N-Hcy-białek) oraz mechanizmów regulujących ekspresję genów człowieka, które są zaangażowane w tę odpowiedź. Aby poznać rolę metabolitów homocysteiny w patofizjologii hiperhomocysteinemii oraz uzyskać wgląd w molekularne mechanizmy, badałam zmiany w ekspresji genów wywołane przez homocysteinę, tiolakton homocysteiny a także N-Hcy-białka. Cele niniejszej pracy doktorskiej obejmowały analizę:

- zmian poziomu ekspresji genów w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek;
- zmian poziomu ludzkich miRNA pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek;
- wpływu N-homocysteinyłacji białek histonowych na epigenetyczną regulację ekspresji genów w komórkach HUVEC.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

Materiał biologiczny stanowiły komórki ludzkiego śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC), które zakupiono w firmie Lonza.

3.2. Odczynniki

Sigma-Aldrich:

homocysteina (D,L-Hcy), tiolakton homocysteiny (L-tiolakton-Hcy), DMSO, EDTA, HClO₄, tripsyna, surowica bydlęca (FBS), jodoacetamid (IAA), ditiotreitrol (DTT), azydek sodu (NaN₃), PMSF, żelatyna, nadsiaraczan amonu (APS), wodorofosforan sodu jednozasadowy, wodorofosforan sodu dwuzasadowy, dwuwęglan amonu, błękit bromofenolowy, wodorowęglan sodu, Tween20, kwas 5,5'-ditiobis-2nitrobenzoesowy (DTNB).

BioShop:

albumina, Comassie Brilliant Blue G-250, MES, Tris, dodecylosiarczan sodu (SDS), 20 x SSC, Bis-Tris, acetonitryl (ACN), mieszanina akrylamid/bisakrylamid (37,5:1), glicyna, glicerol, siarczan amonu, PBS, odczynnik Bradford.

Millipore:

Filtry o punkcie odcięcia 10 kDa

New England Biolabs:

rekombinowane ludzkie histony: H1, H2A, H2B, H3, H4

Promega:

chymotrypsyna bawola 70 U/mg

Abcam:

przeciwciało poliklonalne przeciwko przeciwciałom króliczym, królicze przeciwciało poliklonalne przeciwko histonowi H3, królicze przeciwciało poliklonalne przeciwko acetylacji lizyny 9. na histonie H3, roztwór BCIP/NBT

Polskie Odczynniki Chemiczne:

metanol, kwas solny, kwas ortofosforowy, izopropanol, etanol, octan sodu, wodorotlenek sodu.

Ambion:

woda wolna od nukleaz

Fermentas:

białkowy marker wielkości

Lonza:

pożywka do hodowli komórek ludzkiego śródbłonka żyły pępowinowej EGM2

Serva:

Triton X100, TEMED, β -merkaptoetanol,

3.3. Gotowe zestawy do badań biochemicznych:

Zestaw do izolacji całkowitego RNA mirVana, Ambion

Zestaw do analizy jakościowej RNA Agilent RNA 6000 nano kit, Agilent Technologies

Zestaw do odwrotnej transkrypcji, SuperScript® Indirect cDNA Labeling System, Invitrogen

Zestaw do odwrotnej transkrypcji Real time PCR RivertAid H Minus First cDNA Synthesis Kit, Frementas

Zestaw do Real time PCR DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit, Finnzymes

Zestaw do znakowania cDNA barwnikami fluorescencyjnymi

Zestaw do znakowania miRNA barwnikami fluorescencyjnymi ULS microRNA Labeling Kit, Kreatcech Diagnostics

Zestaw do oczyszczania wyznakowanego fluorescencyjnie cDNA, Qiagen

Zestaw do mierzenia aktywności metabolicznej kultur komórkowych TOX8, Sigma

Zestaw do oznaczania stężenia białka metodą Bradford, Bio Rad

3.4 Roztwory

3.4.1. Bufor fosforanowy do modyfikacji białek tiolaktonem homocysteiny

200 mM Na_2HPO_4

200 mM NaH_2PO_4

2 mM EDTA

pH 7,4

3.4.2. Roztwór do barwienia żeli białkowych Silver Blue

1,5 M kwas ortofosforowy

10% siarczan amonu

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

25% metanol

3.4.3. Bufor do elektroforezy (5 x MES SDS running Buffer)

250 mM MES

250 mM Tris

5 mM EDTA

0,5% SDS

pH 6,8

3.4.4. Bufor do transferu białek z żelu na membranę

20% metanol

25 mM Tris

192 mM glicyna

3.4.5. Bufor PBST (1000ml):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,1% Tween 20

pH 7,4

3.4.6. Bufor obciążający (2 x bufor Laemmli):

4% SDS

20% glicerol

10% 2-merkaptoetanol

0,004% błękit bromofenolowy

0,125 M Tris HCl, pH 6,8

3.5. Żel poliakrylamidowy białkowy

4% żel zagęszczający

1,25 M bis-tris pH 6,8	1,72 ml
akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)	1,92 ml
H ₂ O	2,36 ml
10% APS	60 µl
TEMED	6 µl

15% żel rozdzielający

1,25 M bis tris pH 6,8	4,64 ml
akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)	7,2 ml
H ₂ O	4,16 ml
10% APS	160 µl
TEMED	16 µl

3.6. Hodowla komórek

Hodowlę komórek ludzkiego śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) prowadzono na pożywce EBM2 (Lonza) z dodatkiem 2% FBS, antybiotyku i czynników wzrostu, w temperaturze 37 °C z 5% dodatkiem CO₂, na butelkach pokrytych 1% żelatyną. Podczas wszystkich eksperymentów stosowano komórki pomiędzy czwartym a dziesiątym pasażem. Po osiągnięciu konfluencji 80-90% prowadzono hodowlę stresową przez 24h bez dodatku antybiotyku. W tym celu do medium hodowlanego dodawano homocysteinę, tiolakton homocysteiny do końcowego stężenia 1, 10, 100, 1000 µM, a także modyfikowaną tiolaktonem homocysteiny w stężeniach 0,2 mM, 1 mM, 5 mM, 25 mM surowicę bydlęcą (FBS) do końcowego stężenia 2% w pożywce hodowlanej.

3.6.1. Przechowywanie kultur komórkowych

W celu przechowania komórek HUVEC przygotowano pożywkę do krioprezerwacji zawierającą 30% FBS oraz 10% DMSO. Komórki przepłukano buforem PBS, a następnie naczynie hodowlane pokryto trypsyną w celu odklejenia komórek od podłoża. Trypsynę inaktywowano poprzez dodanie pożywki hodowlanej zawierającej 2% FBS. Zawiesinę komórek przeniesiono do 15 ml probówki typu falcon i zwirowano 3 min, 1600 x g. Osad komórek zawieszono w uprzednio przygotowanym medium i przeniesiono do 1ml probówek do krioprezerwacji (5×10^6 komórek na probówkę). Probówki umieszczono w łaźni izopropanolowej, zapewniającej optymalne warunki zamrażania komórek ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) i umieszczono w temp. -80°C przez 16 h. Następnie komórki przeniesiono do ciekłego azotu, gdzie były przechowywane.

3.7. Test aktywności metabolicznej komórek HUVEC

W celu określenia cytotoksyczności homocysteiny i jej metabolitów (tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek) na komórki HUVEC przeprowadzono pomiar aktywności metabolicznej komórek za pomocą rezazuryny (Tox 8, Sigma). Test ten pozwala na oznaczenie aktywnych metabolicznie, żywych komórek. Rezazuryna wchodząca w skład odczynnika, ma kolor ciemnoniebieski. We wnętrzu żywych komórek barwnik ten ulega redukcji do czerwonej rezorufiny. Ilość żywych komórek w hodowli jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego zredukowanego produktu. Pomiar kowarsji rezazuryny do rezorufiny może być mierzony spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie. W celu dokonania pomiaru komórki HUVEC posiano na płytce 24-dołkowej i inkubowano 24h z Hcy, HTL i N-Hcy-białkami, jak podano w punkcie 3.6. Po zakończeniu inkubacji zebrano medium hodowlane i dodano 10% roztwór rezazuryny w pożywce EGM2. Płytki hodowlane inkubowano 2 h w inkubatorze (37°C , 5% CO_2). Po zakończonej inkubacji ilość powstałej rezorufiny mierzono spektrofotometrycznie w czytniku płytek przy długości fali 600 nm.

3.8. Modyfikacja białek surowicy bydłowej (FBS) tiolaktonem homocysteiny

W celu uzyskania różnego stopnia modyfikacji białek surowicy bydłowej, prowadzono reakcję modyfikacji przez 14 h w temp. 37 °C z dodatkiem tiolaktonu homocysteiny do końcowego stężenia 25, 5, 1 oraz 0,2 mM. Reakcję modyfikacji prowadzono według protokołu:

Składnik reakcji	Ilość użyta do reakcji
Surowica bydłowa	700 μ l
0,1 M Bufor fosforanowy pH 7,4 z 1 mM EDTA	200 μ l
tiolakton homocysteiny o stężeniu 250 mM, 50 mM, 10 mM, 2 mM	100 μ l

Tabela 1: Skład mieszaniny reakcyjnej do modyfikacji białek surowicy wołowej tiolaktonem homocysteiny.

W celu redukcji mostków dwusiarczkowych, po zakończonej inkubacji do próbek zmodyfikowanej surowicy dodano 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,4 z dodatkiem 2 mM DTT, a następnie przeniesiono na filtry o punkcie odcięcia 10 kDa i wirowano 15 min przy obrotach 10 000 x g, do momentu zredukowania objętości na filtrze do około 100 μ l. Po skończonym wirowaniu przesącz usunięto. Wirowanie powtórzono trzykrotnie. Następnie próbki surowicy przemyto trzykrotnie 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,4 i wirowano jak poprzednio. Po zakończonym wirowaniu białka surowicy rozcieńczono 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,4 do stężenia 50 mg/ml. Stopień modyfikacji białek surowicy mierzono przy pomocy odczynnika Ellmana (DTNB).

3.9. Określanie stopnia N-homocysteinylacji białek surowicy przy pomocy DTNB

W celu określenia stopnia modyfikacji białek surowicy przeprowadzono reakcję z DTNB według protokołu:

Składnik reakcji	Ilość użyta do reakcji
Białko o stężeniu 50 mg/ml	2 μ l
0,1 M Bufor fosforanowy pH 7,4	40 μ l
5 mM DTNB	10 μ l

Tabela 2: Skład mieszaniny reakcyjnej do określenia stopnia N-homocysteinylacji białek surowicy bydłowej.

Próby inkubowano 5 min w temperaturze 21 °C. Równocześnie z próbami N-Hcy-białek surowicy bydłowej wykonano pomiar dla prób homocysteiny o znanym stężeniu w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Reakcja ta polega na zdolności DNTB (kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy) do reakcji z grupami tiolowymi w środowisku obojętnym. W wyniku tej reakcji powstaje kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy o żółtym zabarwieniu, którego intensywność mierzono spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 412 nm. Współczynnik ekstynkcji dla tionitrobenzenu wynosi 13600 M⁻¹ cm⁻¹ [111].

3.10. Izolacja całkowitego RNA z komórek HUVEC

Izolację całkowitego RNA z komórek HUVEC prowadzono przy użyciu zestawu mirVana (Ambion):

- Komórki po hodowli przemyto dwukrotnie buforem PBS.
- W celu odklejenia komórek do naczynia hodowlanego dodano 2 ml trypsyny (Sigma), naczynia hodowlane inkubowano 2 min w temp. 37 °C. Po odklejeniu komórek od podłoża, w celu inaktywacji trypsyny, do komórek dodano pożywki hodowlanej w ilości dwukrotnie większej niż użyta uprzednio trypsyna.
- Zawiesinę komórek przeniesiono do probówek 15 ml typu falcon i wirowano 3 min przy obrotach 1600 x g; supernatant usunięto.

- Do osadu komórkowego dodano bufor do lizy w ilości 600 μl na 2×10^7 komórek oraz 60 μl miRNA Enrichment Buffer i rozpipetowano. Po otrzymaniu konfluentnej zawiesiny, komórki lizowano przez 10 min na lodzie.
- Następnie dodano 600 μl mieszaniny fenol-chloroform w stosunku 5:1 i worteksowano 1 min.
- W celu separacji faz, próbki wirowano 5min przy obrotach 14 000 x g.
- Zebrano fazę wodną i przeniesiono do czystych probówek 1,5 ml. Następnie dodano 1,25 objętości 96% etanolu w stosunku do objętości fazy wodnej i dokładnie wymieszano.
- 700 μl mieszaniny fazy wodnej i 96% etanolu przeniesiono na filtr i wirowano jak poprzednio
- Całkowite RNA osadzone na filtrze oczyszczano poprzez przepłukanie 700 μl buforem miRNA Wash Solutnion 1, a następnie dwukrotne przepłukanie 500 μl buforem miRNA Wash Solution 2/3. Próbkę wirowano jak poprzednio.
- Całkowite RNA eluowano poprzez naniesienie na filtr 100 μl wody wolnej od nukleaz podgrzanej do temp. 95 °C.

3.11. Trawienie prób całkowitego RNA deoksyrybonukleazą

Zanieczyszczenie preparatów całkowitego RNA genomowym DNA mogłoby przyczynić się do uzyskania fałszywych wyników, dlatego też próby całkowitego RNA trawiono DNazą przy pomocy zestawu Turbo DNA - free (Ambion), według protokołu:

Składnik reakcji	Ilość użyta do reakcji
całkowite RNA (do 20 μg)	--- μl
5 x bufor	5 μl
DNaza	1,5 μl
woda	do 50 μl

Tabela 3: Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do DNazowania całkowitego RNA

- Wszystkie składniki reakcji wymieszano i zwirowano, a następnie inkubowano 30 min, 37°C

- Po inkubacji dodano 7,5 µl odczynnika inaktywującego DNazę, całość wymieszano i inkubowano 5 min, 21°C, z wytrząsaniem
- Następnie próby zwirowano 2 min, 12600 x g
- Zebrano dekant i przeniesiono do czystych 1,5 ml probówek
- Dodano 1/10 objętości 3 M octanu sodu pH 5,3 oraz 3 objętości 96% etanolu
- Próby pozostawiono do strącenia przez 16 h w temp. -20°C
- Następnie próby zwirowano 30 min, 4°C, 14 000 x g
- Zebrano supernatant, a osad przemyto 1 ml 75% etanolu, zwirowano 5 min 14 000 x g w temp pokojowej
- Po zwirowaniu etanol zebrano, a osad suszono 10 min na stole
- Osad zawieszono w 15 µl wody wolnej od nukleaz i rozpuszczano 30 min w temp. 4°C z wytrząsaniem

3.12. Analiza jakościowa i ilościowa preparatów RNA

Po rozpuszczeniu osadu, całkowite RNA analizowano pod względem ilościowym i jakościowym. Analiza ilościowa polegała na pomiarze absorbancji przy długości fali 260 oraz 280 nm (spektrofotometr Nanodrop 2000c). Analizy jakościowej dokonano przy pomocy elektroforezy kapilarnej (bioanalyzer Agilent 2100). W wyniku tej analizy każda z próbek całkowitego RNA otrzymała współczynnik RIN (ang. *RNA Integrity Number*), który mówi o stopniu degradacji analizowanych próbek. Wartość 1 odpowiada całkowitej degradacji próbki, natomiast wartość 10 świadczy o bardzo wysokiej jakości preparatu i o niskim stopniu degradacji.

3.13. Eksperyment mikromacierzowy z zastosowaniem mikromacierzy dla transkryptomu

3.13.1. Odwrotna transkrypcja

Pierwszym etapem eksperymentów mikromacierzowych jest odpowiednie przygotowanie materiału (mRNA). W tym celu przeprowadzono reakcję odwrotnej

transkrypcji, z zastosowaniem mieszaniny starterów politymidynowych, zakończonych dwoma nukleotydami – VN, gdzie V – dA, dC, dG a N – dA, dT, dC, dG. Zastosowanie tego typu starterów umożliwia przyłączenie ich tylko do 5' końca mRNA i zapewnia wydajną syntezę cDNA. Aby umożliwić późniejsze przyłączenie barwników fluorescencyjnych podczas syntezy nici DNA na matrycy mRNA zastosowano zmodyfikowane aminoallilonukleotydy. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono za pomocą zestawu Superscript Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen) według protokołu:

Składniki reakcji	Ilość użyta do reakcji
20 µg całkowitego RNA	x µl
Anchored oligo(dT) ₂₀ primer (2,5 µg/µl)	2 µl
Woda wolna od nukleaz	do 18 µl

70 °C, 5 min, następnie próby schłodzono na lodzie 1 min, po czym dodano:

Składniki reakcji	Ilość użyta do reakcji
5 x First-Strand buffer	6 µl
0,1 M DTT	1,5 µl
dNTP mix	1,5 µl
RNase OUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript III RT (400 U/µl)	2 µl

Tabela 4: skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji odwrotnej transkrypcji

Tak przygotowane próby inkubowano przez 3 h w temp. 42°C

Po skończonej inkubacji do każdej z prób dodano 15 µl przygotowanego na świeżo 1 M NaOH i inkubowano w temp 70 °C przez 10 min. Następnie dodano 15 µl 1 M HCl, całość wymieszano, a cDNA wytrącano poprzez dodanie 1/10 objętości 3 M octanu sodu pH 5,3 i 3 objętości 96% etanolu. Następnie postępowano zgodnie z procedurą zawartą w punkcie 1. (trawienie RNA DNazą) Osad rozpuszczono w 5 µl buforu do znakowania (0,1 M NaHCO₃, pH 9,5).

3.13.2. Znakowanie cDNA barwnikami fluorescencyjnymi

20 µg cDNA zawierającego aminoallilonukleotydy wyznakowano barwnikami fluorescencyjnymi. W tym celu zastosowano reakcję znakowania podczas której doszło do połączenia grupy aminoallilowej nukleotydu z estrem N-hydroksysukcynimidowym (NHS ester) z wytworzeniem wiązania amidowego. W reakcji tej zastosowano dwa rodzaje NHS estrów: z przyłączonym fluoroforem Alexa 555, bądź Alexa 647. Próby kontrolne znakowano barwnikiem Alexa 555, a próby badane barwnikiem Alexa 647. W tym celu zastosowano Superscript Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen). Do każdej porcji barwnika dodano 2 µl DMSO i wymieszano. Następnie barwniki dodano do cDNA rozpuszczonego w buforze do znakowania. Dodano wodę wolną od nukleaz do całkowitej objętości 10 µl. Całość inkubowano w ciemności przez 3h w temp 25°C, z wytrząsaniem 500 rpm.

Po zakończonej inkubacji cDNA z przyłączonym fluoroforem oczyszczano na kolumnach (MinElute Reaction Clean Up Kit, Qiagen). W tym celu do prób dodano 1,16 µl 3 M octanu sodu oraz 500 µl buforu PB. Całość przeniesiono na kolumny i wirowano przez 1 min, 12 000 x g. Następnie cDNA przemyto 700 µl buforu PE, wirowano jak poprzednio. Wyznakowane fluorescencyjnie cDNA eluowano 2 x 23 µl buforu EB podgrzanego do temp. 50°C. Jakość wyznakowanych fluorescencyjnie próbek (stężenie cDNA a także ilość przyłączonego barwnika fluorescencyjnego), oraz ich czystość sprawdzono przy pomocy spektrofotometru Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Do hybrydyzacji używano tylko próbki, w których do cDNA przyłączone zostało przynajmniej 300 pmoli barwnika fluorescencyjnego.

3.13.3. Hybrydyzacja cDNA z płytką mikromacierzową

Do oceny zmian w profilu ekspresji genów człowieka pod wpływem homocysteiny oraz jej metabolitów (tiolaktonu homocysteiny i N-Hcy-białek) stosowano całkowite genomowe mikromacierze One Array (Phalanx Biotech Group) zawierające 29 187 60 oligonukleotydowych sond oraz 1088 sond kontrolnych, odpowiadających wszystkim znanym genom człowieka. Każda sonda nadrukowana była na mikromacierz w dwóch powtórzeniach. Próbę kontrolną łączono

z odpowiadającą jej próbą badaną i zateżano do objętości 60 μ l. Proces hybrydyzacji ręcznej przeprowadzono według schematu:

ETAP I	Cross-linking 0,18 J	
ETAP II	Zapiekanie prób w piecyku hybrydyzacyjnym 60 °C, 10 min.	
ETAP III	Płukanie w 96% EtOH	15 s bez wytrząsania
		20 s z wytrząsaniem
ETAP IV	Kilkukrotne przepłukanie w wodzie destylowanej	
ETAP V	Prehybrydyzacja 1h, 21 °C w buforze podgrzany uprzednio do 50 °C (250 mM etanoloamina, 0,1% SDS, 200 mM Na ₂ CO ₃)	
ETAP VI	Płukanie	80% EtOH, 10 mM Na ₂ CO ₃
		Woda destylowana
ETAP VII	Suszenie szkiełka przez zwirowanie	
ETAP VIII	Hybrydyzacja z wyznakowaną fluorescencyjnie próbą 16–18 h, 40 °C w buforze do hybrydyzacji (500 mM NaH ₂ PO ₄ , 2% SDS, 2 mM EDTA, 2 x SSC)	
ETAP IX	Płukanie ręczne na mieszadle magnetycznym	1 x SSPE, 0,03% SDS 2 min 42 °C
		1 x SSPE, 2 min 21 °C
		0,1 x SSPE
ETAP X	Suszenie szkiełka przez zwirowanie	

Tabela 5: Schemat hybrydyzacji wyznakowanego fluorescencyjnie cDNA z płytką mikromacierzową.

Po zakończonym procesie hybrydyzacji płytki mikromacierzowe skanowano za pomocą skanera do mikromacierzy GenePix 4200AL (Molecular Devices) z rozdzielczością 5 μ m.

3.13.4. Analiza bioinformatyczna

Obrazy uzyskane w wyniku skanowania płytek mikromacierzowych, przekształcono na dane liczbowe za pomocą programu Gene Pix Pro 6.1. W tym celu zastosowano algorytm *seed region growing*, który służy do identyfikacji sond na podstawie intensywności sygnałów fluorescencyjnych i kształtu obrazu, z którego pochodzi sygnał. Jednocześnie każdej sondzie nadawany jest status „Good”, gdy dana

sonda wykazuje prawidłowy kształt, wielkość i intensywność sygnału pochodzącego od barwników fluorescencyjnych, „*Bad*”, gdy dana sonda nie spełnia któregokolwiek z podanych kryteriów lub „*Not Found*”, gdy intensywność sygnału jest zbyt niska by można było precyzyjnie ocenić jakość sygnału (rysunek 7.). Każdy z użytkowników może wpływać na parametry związane z nadawaniem statusu, jeśli parametry automatycznie wprowadzone przez program nie są odpowiednie dla analizowanych mikromacierzy. W przypadku mikromacierzy stosowanych w opisywanych eksperymentach mikromacierzowych (zarówno dla transkryptomu jak i dla miRNA) stosowano następujące parametry związane z nadawaniem statusu:

GOOD:

[SNR 647] ≥ 2 lub [SNR 555] ≥ 2

[F555 Median] ≥ 170 lub [F647 Median] ≥ 170

Sondy, którym nadano status „*Good*” charakteryzował stosunek średniej intensywności sondy do sygnału tła większy lub równy 2 oraz mediana intensywności sygnału pochodzącego od sondy dla poszczególnych kanałów większa lub równa 170.

BAD:

[B555 Median] ≥ 250 lub [B647 Median] ≥ 250

[Dia.] $<$

[F555 CV] ≥ 100 i [F647 CV] ≥ 100

[B555 SD] ≥ 1000 lub [B647 SD] ≥ 1000

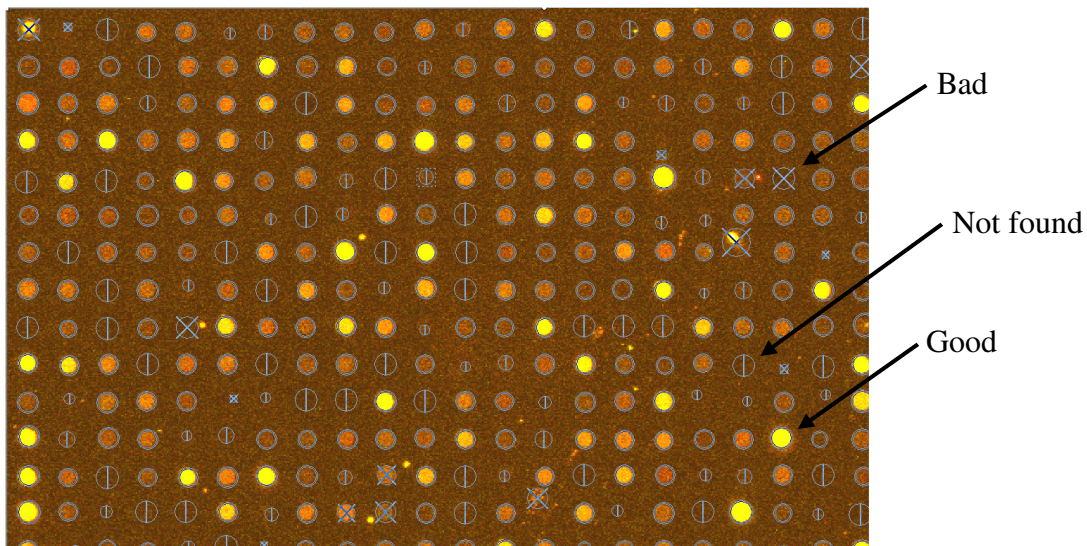
[F555 Median] = 65535 i [F647 Median] = 65535

Sondy, którym nadano ten status charakteryzował współczynnik wariacji intensywności sygnału pochodzącego od sondy dla każdego z analizowanych kanałów większy lub równy 100. Średnica sygnału sondy była większa niż 35 μ m, mediana intensywności tła dla jednego z kanałów była większa lub równa 250, mediana intensywności sygnału pochodzącego od sondy na każdym z kanałów była równa 65535, odchylenie standardowe sygnału pochodzącego od tła na jednym z analizowanych kanałów było równe 1000.

NOT FOUND:

[F555 Median] ≤ 170 i [F647 Median] ≤ 170

Sondy, którym nadano ten status posiadały medianę intensywności sygnału pochodzącego od sondy na obu analizowanych kanałach mniejszą lub równą 170.



Rysunek 7: Przykład analizy obrazu mikromacierzowego z zastosowaniem algorytmu *seed region growing*, w programie *Gene Pix Pro 6.1*. Na rysunku przedstawiono fragment płytki mikromacierzowej odpowiadający około 1/50 całej mikromacierzy.

3.13.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną ludzkich mikromacierzy genomowych oraz ludzkich miRNA przeprowadzono posługując się wolno dostępnym oprogramowaniem Bioconductor R (v. 2.13.1) oraz pakietem Limma (<http://www.r-project.org>). W pierwszym etapie wykonano normalizację danych w obrębie mikromacierzy metodą Loess oraz pomiędzy mikromacierzami metodą Aquantile. Normalizacja polega na wykonaniu korekty tła dla każdej sondy poprzez odjęcie wartości intensywności tła od sygnału. Pozwoliło to na porównywanie danych w obrębie mikromacierzy, jak i pomiędzy mikromacierzami, dzięki zniwelowaniu tej części sygnału, która jest efektem niedoskonałości technicznych eksperymentu [112]. Na znormalizowanych danych mikromacierzowych przeprowadzono analizę porównawczą przy zastosowaniu odpowiednio dobranych modeli liniowych pakietu *limma* w R [113]. Do posiadanych danych mikromacierzowych dopasowano model liniowy, który określono za pomocą zaprojektowanej macierzy. Każdy z wierszy odpowiadał wierszowi w analizowanej mikromacierzy, natomiast każda kolumna odpowiadała współczynnikiowi opisującemu, z której próby, badanej czy kontrolnej, pochodzi sygnał z hybrydyzowanego cDNA. Pozwoliło to na obliczenie zmienności pomiędzy danymi pochodzącymi z poszczególnych mikromacierzy. Do analizy zmiany ekspresji genów stosowano

doświadczalną metodę Bayes pozwalającą zniwelować standardowe błędy przy obliczonych logarytmowanych krotnościach zmian ekspresji (ang. *log-fold changes*), szczególnie w przypadku eksperymentów składających się z małej ilości mikromacierzy.

Do eksperymentów mikromacierzowych z zastosowaniem macierzy dla ludzkiego transkryptomu stosowano model liniowy z powtórzeniami technicznymi. Natomiast do eksperymentów mikromacierzowych z zastosowaniem macierzy dla miRNA stosowano model liniowy z wymianą barwników (ang. *dye swaps*). Podejście to pozwoliło na oszacowanie ewentualnego wpływu barwników na wynik analizy danych mikromacierzowych (ang. *dye-effect*). Obliczona logarytmowana wartość krotności zmian ekspresji genów była skorygowana z uwzględnieniem wpływu barwników fluorescencyjnych.

Na podstawie analizy statystycznej wybrano tylko te geny, które spełniały kryterium Adj. P value < 0,05, co oznacza, że progowy poziom istotności (tzw. wartość P) wynosił 0,05, a przy obliczaniu wartości p uwzględniono poprawkę dla testowania wielokrotnego w celu ograniczenia liczby wyników fałszywie pozytywnych. Poprawkę dla wartości p (ang. *adjusted P value*) liczono metodą BH [114]. Przy takich założeniach prawdopodobieństwo uzyskania podobnego wyniku przez przypadek wynosi 5%.

3.14. Eksperyment mikromacierzowy z zastosowaniem macierzy dla miRNA

3.14.1. Znakowanie miRNA barwnikami fluorescencyjnymi

W celu wyznakowania miRNA barwnikami fluorescencyjnymi zastosowano metodę nieenzymatycznego znakowania kwasów nukleinowych, polegającą na związaniu fluoroforu (cyjaniny 3 lub 5) do guaniny w pozycji N7 wiązaniem koordynacyjnym. Do znakowania zastosowano zestaw do znakowania miRNA z puli całkowitego RNA ULS microRNA Labeling Kit (Kreatech Diagnostics). Jest to metoda, która ma taką samą wydajność w stosunku do krótkich, jak i do długich kwasów nukleinowych. Stad, też do reakcji znakowania używano tylko całkowitego RNA

wzbogaconego we frakcję małych RNA (>200nt) o bardzo wysokiej jakości (RIN>8,0), którą sprawdzono za pomocą bioanalyzera Agilent 2100, jak opisano w punkcie 3.12.

całkowite RNA (2 µg)	x µl
Cy 3/5	2 µl
10 x bufor do znakowania	2 µl
woda wolna od nukleaz	do 20 µl

Tabela 6: Skład mieszaniny reakcyjnej do znakowania miRNA barwnikami fluorescencyjnymi.

inkubacja 85°C, 30 min

Po inkubacji wyznakowane miRNA oczyszczono na kolumnach w następujący sposób:

- Wypełnienie kolumny rozpuszczono poprzez wytrząsanie
- Kolumny umieszczono w czystych 2 ml probówkach a następnie zwirowano 1 min przy obrotach 14 000 x g
- Przesącz odrzucono, a na kolumny naniesiono 300 µl wody wolnej od nukleaz i zwirowano jak poprzednio; przesącz odrzucono
- Tak przygotowane kolumny umieszczono w czystych 1,5 ml probówkach.
- Na kolumny naniesiono wyznakowane fluorescencyjnie miRNA i zwirowano jak poprzednio
- Otrzymany przesącz zawierał frakcję oczyszczonych i wyznakowanych miRNA

Jakość wyznakowanych fluorescencyjnie próbek (stężenie miRNA, a także ilość przyłączonego barwnika fluorescencyjnego), oraz ich czystość sprawdzono przy pomocy spektrofotometru Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Do hybrydyzacji używano tylko próbki, w których do miRNA przyłączone zostało przynajmniej 100 pmoli barwnika fluorescencyjnego.

3.14.2. Hybrydyzacja miRNA z płytką mikromacierzową

Do oceny zmian w profilu ekspresji genów kodujących ludzkie miRNA pod wpływem homocysteiny oraz jej metabolitów (tiolaktonu homocysteiny i N-Hcy-białek) stosowano mikromacierze microRNA OneArray (Phalanx Biotech Group) zawierające 1884 sondy w trzykrotnych powtórzeniach. W przypadku tych mikromacierzy

zastosowano podejście z wymianą barwników (ang. *dye swaps*). Oznacza to, że dwa powtórzenia techniczne zawierały próbę kontrolną i badaną wyznakowane odmiennymi barwnikami. W przypadku, gdy w pierwszym powtórzeniu próba kontrolna została wyznakowana Cy3 a próba badana Cy5, w kolejnym powtórzeniu próbę kontrolną wyznakowano Cy5, podczas gdy próbę badaną Cy3. Pozwoliło to zniwelować ewentualny wpływ barwników na wyniki analizy danych mikromacierzowych. Próbę kontrolną łączono z odpowiadającą jej próbą badaną i zateżano do objętości 15 - 19 μ l. Przeprowadzono proces hybrydyzacji automatycznej według schematu:

ETAP I	płukanie; 5 x SSC, 0,1% SDS, 1,5 min, 42°C	
ETAP II	prehybrydyzacja 5 x SSC, 0,1% SDS, 1% BSA, 1h, 42°C	
ETAP III	płukanie	5 min., 42 °C, woda milliQ
		1,5 min., 5 x SSC, 0.1% SDS
ETAP IV	nałożenie próbki, miRNA OneArray hybridization buffer II	
ETAP V	hybrydyzacja 18h, 42°C	
ETAPVI	płukanie	4 min., 42 °C, 5 x SSC, 0,1 % SDS
		6 min., 23 °C, 2 x SSC, 0,1 % SDS
		2 min., 23 °C, 0,2 x SSC
ETAPVII	suszenie 2 min, 30 °C	

Tabela 7: Schemat hybrydyzacji wyznakowanych fluorescencyjnie miRNA do płytki mikromacierzowej.

Po zakończonym procesie hybrydyzacji płytki mikromacierzowe skanowano za pomocą skanera do mikromacierzy GenePix 4200AL (Molecular Devices) z rozdzielczością 5 μ m.

3.15. Real-time PCR

Określanie poziomu mRNA genów za pomocą real-time PCR jest metodą składającą się z dwóch etapów. Pierwszy z nich stanowi odwrotna transkrypcja, gdzie dochodzi do przepisania całego mRNA na cDNA. W kolejnym etapie, na matrycy

cDNA przeprowadza się reakcją PCR w czasie rzeczywistym z użyciem starterów dla badanego genu.

3.15.1 Reakcja odwrotnej transkrypcji do real-time PCR

Całkowite RNA przepisano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji przy pomocy zestawu Riveraid H minus First Strand Synthesis cDNA Kit (Thermo Scientific)

1 µg całkowitego RNA	X µl
oligo(dT) ₁₈ primer (100 µM)	1 µl
woda wolna od nukleaz	do 12µl

70°C, 5 min

Próby schłodzono na lodzie, a następnie dodano:

5 x bufor (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	4 µl
10mM dNTP mix	2 µl
Inhibitor RNaz RiboLock (20u/ µl)	1 µl
Odwrotna transkryptaza M-MuLV (200u/ µl)	1 µl

Tabela 8: Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji do real-time PCR.

Reakcję prowadzono przez 1 h w temp 42 °C.

3.15.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji do miRNA real-time PCR

W celu potwierdzenia profilu ekspresji miRNA określonego za pomocą mikromacierzy, ekspresję wybranych miRNA potwierdzono za pomocą real-time PCR. W tym celu wybrano metodę z zastosowaniem primera typu stem loop, którego sześć ostatnich nukleotydów z końca 3' jest komplementarnych do sekwencji 5' końca dojrzałego miRNA (*ang. miRNA specific sequence*). W tym celu przygotowano następującą mieszaninę reakcyjną:

100 pg całkowitego RNA	x μ l
stem loop primer 250 pM	x μ l
woda wolna od nukleaz	do 6 μ l
70 °C, 5 min 0 °C, 2 min	
5 x bufor (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	3 μ l
dNTP mix 2,5 μ M x 4	1,5 μ l
odwrotna transkryptaza M-MuLV 0,5 U	2,5 μ l
inhibitor RNaz Ribolock 0,05 U	2 μ l

Tabela 9: Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji do miRNA.

Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji według schematu:

etap	temperatura	czas trwania
stabilizacja struktury	16 °C	30 min
odwrotna transkrypcja	42 °C	30 min
zakończenie reakcji	85 °C	5 min

Tabela 10: Warunki prowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA.

3.15.3. Reakcja real-time PCR

W celu analizy różnic poziomu ekspresji wybranych genów człowieka pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów (tiolaktonu homocysteiny i N-Hcy-białek) przeprowadzono reakcję real-time PCR. Reakcje prowadzono w termocyklerze Stratagene Mx 3005P (Agilent Technologies), za pomocą zestawu odczynników DyNAmo HS SYBR reen qPCR Kit (Finnzymes).

składniki reakcji	ilość użyta do reakcji
2 x qPCR Mater Mix	10 μ l
25 μ M ROX	0,2 μ l
starter forward 7,5 μ M	0,8 μ l
starter reverse 7,5 μ M	0,8 μ l
cDNA	0,8 μ l
woda wolna od nukleaz	do 20 μ l

Tabela 11: Skład mieszaniny reakcyjnej do real-time PCR.

Schemat reakcji przebiegał w następujący sposób:

temperatura	czas	ilość cykli
95 °C	10 min	1
95 °C	0:15 min	40
T _m	0:30 min	
72 °C	0:30 min	
95 °C	1 min	1
55 °C	0:30 min	1
95 °C	0:30 min	1

Tabela 12: Schemat przebiegu reakcji real-time PCR.

Na podstawie różnic wartości Ct pomiędzy próbą badaną a kontrolną z wykorzystaniem metody $-\Delta\Delta C_t$ obliczono relatywną różnicę poziomu ekspresji badanych genów. Jako gen referencyjny wybrano gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantyny (HPRT).

3.15.4. miRNA real-time PCR

W celu analizy różnicy poziomu ekspresji miRNA pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów (tiolaktonu homocysteiny i N-Hcy-białek) przeprowadzono reakcję real-time PCR.

składniki reakcji	ilość użyta do reakcji
2 x qPCR Mater Mix	10 μ l
25 μ M ROX	0,2 μ l
starter forward 1,5 μ M	4 μ l
uniwersalny starter reverse 0,7 μ M	1,87 μ l
cDNA	0,7 μ l
woda wolna od nukleaz	do 20 μ l

Tabela 13: Skład mieszaniny reakcyjnej do miRNA real-time PCR.

temperatura	czas	ilość cykli
95 °C	10 min	1
95 °C	0:15 min	40
Tm	1 min	
72 °C	0:30 min	
95 °C	1 min	1
55 °C	0:30 min	1
95 °C	0:30 min	1

Tabela 14: Schemat przebiegu reakcji miRNA real-time PCR.

Na podstawie różnic wartości Ct pomiędzy próbą badaną a kontrolną z wykorzystaniem metody $-\Delta\Delta C_t$ obliczono względną różnicę poziomu ekspresji badanych genów. Jako gen referencyjny wybrano gen kodujący miRNA 103.

3.15.5. Analiza statystyczna

Dane otrzymane w wyniku analizy real-time PCR oraz miRNA Real-time PCR poddano następnie analizie statystycznej. W tym celu stosowano program GraphPadPrism. Zastosowano test one way ANOVA umożliwiającą jednoczynnikową analizę wariancji. W teście tym przyjęto poziom istotności $P < 0,05$.

3.15.6. Sekwencje oligonukleotydów stosowanych do odwrotnej transkrypcji i real-time PCR

L.p.	Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja oligonukleotydu	Producent
1.	AHCY_F	5' CACGCGCATATCCCTGCTCGG 3'	Genomed
2.	AHCY_R	5' GATGTCGGCGACTTTGTAGGGC 3'	Genomed
3.	CBS_F	5' GCCAGGTTCGACTCCCCGGA 3'	Genomed
4.	CBS_R	5' GCTGGCGTTGCGGTACTGGT 3'	Genomed
5.	CD9_F	5' CTTCTGGCTTGCCGGGATTGCT 3'	Genomed
6.	CD9_R	5' GCGCCGGCTCCGATCAGAAT 3'	Genomed
7.	ESM1_F	5' GCGGTGGACTGCCCTCAACA 3'	Genomed
8.	ESM1_R	5' CCAGATGCCATGTCATGCTCTTTGC 3'	Genomed
9.	OS9_F	5' GCTGGCATGGAGCGGGA ACT 3'	Genomed

10.	OS9_R	5' TCTGTGCTCAGGATCCTCCTCTGT 3'	Genomed
11.	MTR_F	5' CTGCCAATGCCAAGGCAGCCT 3'	Genomed
12.	MTR_R	5' GTCCGGAAAGAGTCCGCCAC 3'	Genomed
13.	MTRR_F	5' CTGGCGCAAGGTTGGTGGAAAGT 3'	Genomed
14.	MTRR_R	5' TAACAGTGAAACCACGCCGCGC 3'	Genomed
15.	ANXA8_F	5' TGGGAAAGGTGCCCCCGAGG 3'	Genomed
16.	ANXA8_R	5' GCCTGCTCGTTGGTCCCGAT 3'	Genomed
17.	APOL1_F	5' GGCTGTGCTGTGTCCCTAATGGG 3'	Genomed
18.	APOL1_R	5' CACAGGCACCATTTCTGCAACGC 3'	Genomed
19.	MARCH1_F	5' AGAAGTGTGCATAACCATGAGTGGG 3'	Genomed
20.	MARCH1_R	5' TCTGCCTGTCCCTTGCGTCA 3'	Genomed
23.	MMP19_F	5' GCACGGACAGCCTCTGGAGC 3'	Genomed
24.	MMP19_R	5' ACAGGTAGTCCACGGGCGCC 3'	Genomed
25.	VEGFA_F	5' GGTGCCCGCTGCTGTCTAATGC 3'	Genomed
26.	VEGFA_R	5' TCAAGCTGCCTCGCCTTGCAAC 3'	Genomed
27.	NTN4_F	5' CGGAGGAGGACGCCAGGAG 3'	Genomed
28.	NTN4_R	5' GGAGCCCCGGGACCATAGCC 3'	Genomed
31.	DDX28_F	5' GTCCGCAGTCCCGACGAACC 3'	Genomed
32.	DDX28_R	5' GTCGAACCAGCACCGGCCTC 3'	Genomed
33.	ROBLD3_F	5' CGCCTACGACCGGAACGGGA 3'	Genomed
34.	ROBLD3_R	5' ACCAAAGCCTGGGCCATGCAG 3'	Genomed
35.	SCL44A3_F	5' GGGCGCCGAGTACCTGGTTTC 3'	Genomed
36.	SLC44A3_R	5' CCAGCCACCACCGAGTAGCC 3'	Genomed
37.	ST8SIA2_F	5' ATCGTGGGCAACTCGGGGGT 3'	Genomed
38.	ST8SIA2_R	5' AAGGCCCGCTGGATGACCGA 3'	Genomed
39.	NCEH1_F	5' GAAGAGCCACTGAAACGCAGCG 3'	Genomed
40.	NCEH1_R	5' GACCAGGACGCACTTGCACTTG 3'	Genomed
41.	HPRT_F	5' CTGAGGATTTGGAAAGGGTG 3'	Genomed
42.	HPRT_R	5' AATCCAGCAGGTCAGCAAAG 3'	Genomed

Tabela 15: Sekwencje starterów dla genów różnicujących stosowanych do reakcji real-time PCR.

L.p.	Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja oligonukleotydu	Producent
1.	uniwersal_R	5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3'	Genomed
2.	miR 34a_F	5' GTGTGGCAGTGTCTTAGCT 3'	Genomed
3.	miR 30e_F	5' GTTTGGTGTAAACATCCTTGAC 3'	Genomed
4.	miR 125b1_F	5' GTTTCCCTGAGACCCTAAC 3'	Genomed
5.	miR let7b_F	5' GGGTGAGGTAGTAGGTTGT 3'	Genomed
6.	miR 331 5p_F		Genomed
7.	miR 331 3p_F	5' TTGTGCCCTGGGCCTAT 3'	Genomed
8.	miR 103_F	5' GTAGCAGCATTGTACAGGG 3'	Genomed
9.	miR 1_F	5' GTTGGGTGGAATGTAAAGAAGT 3'	Genomed

10.	miR 196b_F	5' GTGGGGGTGATATGTTTGATAT 3'	Genomed
11.	miR 4728 5p_F	5' TTGTTGGGAGGGGAGAGG 3'	Genomed
12.	miR 1321_F	5'TTGGGGCAGGGAGGTGAA 3'	Genomed
13.	miR 4758_F	5' TTGTGTGAGTGGGAGCCG 3'	Genomed
14.	miR 34a_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACAACCAACC 3'	Genomed
15.	miR 30e_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACCTTCCA 3'	Genomed
16.	miR 125b1_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACCTCACA 3'	Genomed
17.	miR let7b_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACAACCCAC 3'	Genomed
18.	miR 331 5p_RT		Genomed
19.	miR 331 3p_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACCTTCTAG 3'	Genomed
20.	miR 103_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACCTCATAG 3'	Genomed
21.	miR 1_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACATACAT 3'	Genomed
22.	miR 196b_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACAACCCA 3'	Genomed
23.	miR 4728 5p_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACCTGCTTG 3'	Genomed
24.	miR 1321_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACATCACA 3'	Genomed
25.	miR 4758_RT	5'GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACCAGAGCCAACCAGCCC 3'	Genomed

Tabela 16: Sekwencje starterów dla genów kodujących miRNA stosowanych do reakcji odwrotnej transkrypcji oraz do real-time PCR.

3.16. Izolacja białek histonowych z komórek HUVEC

W celu zbadania, czy białka histonowe również ulegają N-homocysteinylacji *ex vivo* oraz czy N-homocysteinylacja wpływa na regulację ekspresji genów za pomocą mechanizmów epigenetycznych, z komórek HUVEC wyizolowano frakcję białek jądrowych wzbogaconych w białka histonowe według następującej procedury:

- Komórki po 24h inkubacji z homocysteiną, tiolaktonem homocysteiny lub N-Hcy-białkami surowicy, przemyto buforem PBS, a następnie trypsynizowano w celu odklejenia ich od podłoża.
- Po odklejeniu komórek trypsynę inaktywowano pożywką suplementowaną FBS.

- Komórki przeniesiono do 15 ml probówek typu falcon, a następnie zwirowano 3min, przy obrotach 1600 x g.
- Po zwirowaniu, supernatant usunięto, a osad komórkowy przemyto buforem PBS, komórki zwirowano jak poprzednio; czynność powtórzono dwukrotnie.
- Osad komórkowy zawieszono w buforze TEB (*ang. Triton Extraction Buffer*: 0,5% Triton X100, 2 mM PMSF, 0,2% NaN₃ w PBS), w ilości 1 ml na 1x10⁷ komórek
- Komórki lizowano przez 10 min na lodzie, delikatnie mieszając.
- Następnie lizat komórkowy zwirowano 10 min, 4°C, 10 000 x g, supernatant zawierający białka cytoplazmatyczne zebrano.
- Osad zawierający białka jądrowe przemyto połową objętości buforu TEB użytej poprzednio i wirowano jak poprzednio, supernatant zebrano.
- W celu zwiększenia wydajności izolacji osad zawierający białka jądrowe zawieszono w 500 µl buforu PBS i poddano sonikacji 4 x 0:15min, z amplitudą 75%.
- Próby zwirowano 30 min, 4 °C, 14 000 x g.
- Po wirowaniu supernatant zawierający rozpuszczone białka jądrowe przeniesiono do nowych probówek i dodano HClO₄ do końcowego stężenia 4%.
- Wytrącanie białek histonowych prowadzono w warunkach kwaśnych przez 16 h w temp. 4 °C delikatnie mieszając.
- Po ekstrakcji białka histonowe wirowano przez 10 min przy obrotach 2000 x g, 4°C.
- Osad zawierający białka histonowe zawieszono w buforze Laemmli, pH doprowadzono do zasadowego 0,1 M Tris.
- Stężenie białek mierzono za pomocą metody Bradford.

3.17. Western blot

- Przygotowano 15% denaturujący żel poliakrylamidowy białkowy Bis Tris, na który nałożono 20 µg białka, z dodatkiem buforu obciążającego LB dwa razy stężonego.

- Prowadzono elektroforezę SDS-PAGE w buforze 1 x MES running buffer, przy natężeniu prądu 150V do wejścia preparatów białkowych w żelu zagęszczającym, następnie 200V po przejściu preparatów do żelu rozdzielającego .
- Po zakończonej elektroforezie żel płukano w wodzie, a następnie w buforze do transferu.
- Następnie przygotowano membranę PVDF, poprzez zanurzenie jej na 2 min w metanolu, a następnie przez kilka minut w wodzie.
- Transfer białek histonowych na membranę przez prowadzono przez 1 h, przy natężeniu prądu 0,8 mA na 1 cm² żelu. W tym celu w aparacie do transferu ułożono 3 warstwy bibuły 3MM zanurzonej w buforze do transferu, następnie membranę, kolejno, żel i 3 warstwy zanurzonej w buforze do transferu bibuły 3MM.
- Po transferze membranę blokowano w roztworze 3% BSA rozpuszczonej w buforze w PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20 przez 1h w temp pokojowej.
- Żel po transferze wybarwiano roztworem Coomassie Silver Blue przez noc z delikatnym wytrząsaniem. Po wybarwieniu żel odbarwiano wodą, a następnie z żelu wycięto białka histonowe w celu identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji.
- Membranę płukano 5 min w buforze PBS, następnie 5 min w buforze buforze PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20, a następnie 5 min w buforze PBS, z wytrząsaniem 250 obr/min
- Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym przez noc w temp. 4 °C. Przeciwciała rozpuszczano w 3% roztworze BSA w buforze PBST w odpowiednim rozcieńczeniu, podanym w tabeli:

Przeciwciało I-rzędowe	stosowane rozcieńczenie
Anty N-Hcy-Lys	1:200
Anty Ac H3K9	1:500
Anty histon H3	1:1000

Tabela 17: Stężenie przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych do reakcji Western blot.

- Po inkubacji membranę płukano 4 x 15 min w buforze PBST.
- Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym (IgG skoniunkowanym z alkaliczną fosfatazą) 2 h w temperaturze pokojowej. Przeciwciało rozcieńczano w stosunku 1:500 w 3% roztworze BSA w buforze PBST.
- Po inkubacji membranę płukano jak poprzednio.
- Tak przygotowaną membranę poddawano detekcji za pomocą reakcji barwnej z odczynnikiem BCIP-NBT. Po wizualizacji membranę skanowano za pomocą systemu archiwizacji żeli (GelDOc-It, UVP).

3.18. Analiza miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych *in vitro*

Białka histonowe wydajnie ulegają N-homocysteinyłacji *in vitro* [43]. Aby poznać miejsca modyfikacji tych białek przez tiolakton homocysteiny przeprowadzono analizę peptydów białek histonowych za pomocą spektrometrii mas. W tym celu ludzkie rekombinowane białka histonowe modyfikowano 5 i 10 mM HTL przez 16 h w temp. 37 °C według następującej procedury:

składniki reakcji	ilość użyta do reakcji
białko histonowe H1, H2A, H2B, H3 lub H4 (stężenie 1mg/ml)	10 µl
tiolakton homocysteiny 50 mM lub 100 mM	1,5 µl
0,1 M bufor fosforanowy pH 7,4	3,5 µl

Tabela 18: Skład reakcji modyfikacji białek histonowych tiolaktonem homocysteiny.

Aby zredukować mostki dwusiarczkowe używano 5 mM DTT, następnie zablokowano grupy –SH powstałe po redukcji mostków dwusiarczkowych za pomocą 15 mM jodoacetamidu. W celu uzyskania peptydów o odpowiedniej długości po zakończonej modyfikacji białka histonowe trawiono chymotrypsyną. Do każdej z prób dodano 0,4 µl chymotrypsyny (0,5 µg/µl) w 25mM dwuwęglanie amonu. Trawienie prowadzono przez 16 h w temp. 37 °C.

Mieszaniny peptydów, uzyskane w wyniku trawienia białek histonowych chymotrypsyną i rozdzielone chromatograficznie peptydów (HPLC-UV), analizowano na

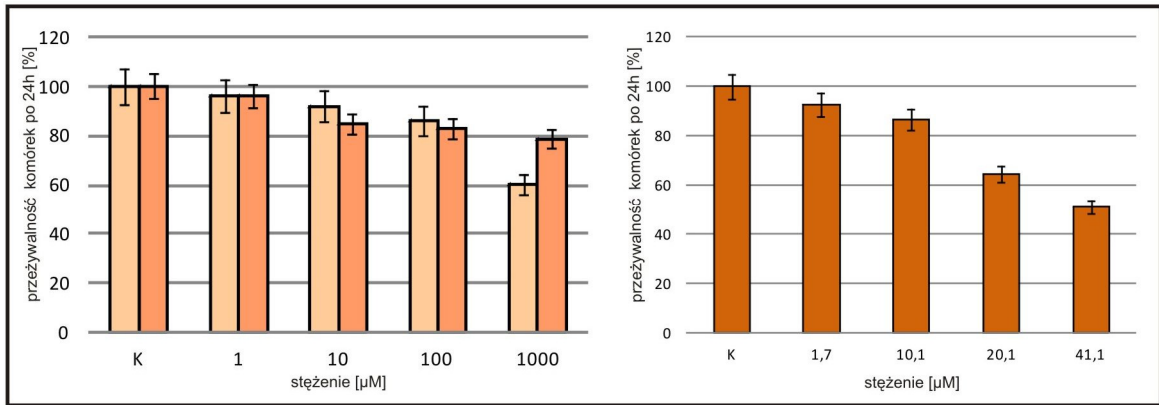
spektrometrze MALDI-ToF/ToF. Zebrane podczas rozdziału frakcje (1,5 min przy przepływie 1 ml/min) zatężono następnie do objętości 100 μ l. Dla poszczególnych frakcji wykonano widma masowe zebranych podczas rozdziału. W tym celu 0,5 μ l każdej z frakcji peptydów, nakładano na płytkę Prespotted Anchor Chip (Bruker Daltonics), zawierającą na powierzchni matrycę (kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy) i pozostawiano do wyschnięcia. Otrzymane w ten sposób zestawy mas peptydów analizowano w programie Mascot (www.matrixscience.com, licencja dla IChB PAN). Stopień pokrycia sekwencji białka przez sekwencje zidentyfikowanych peptydów określano poprzez porównanie z bazami sekwencji białkowych. Następnie w tym samym programie poszukiwano peptydów zawierających reszty Hcy przyłączone do reszt Lys.

4. Wyniki

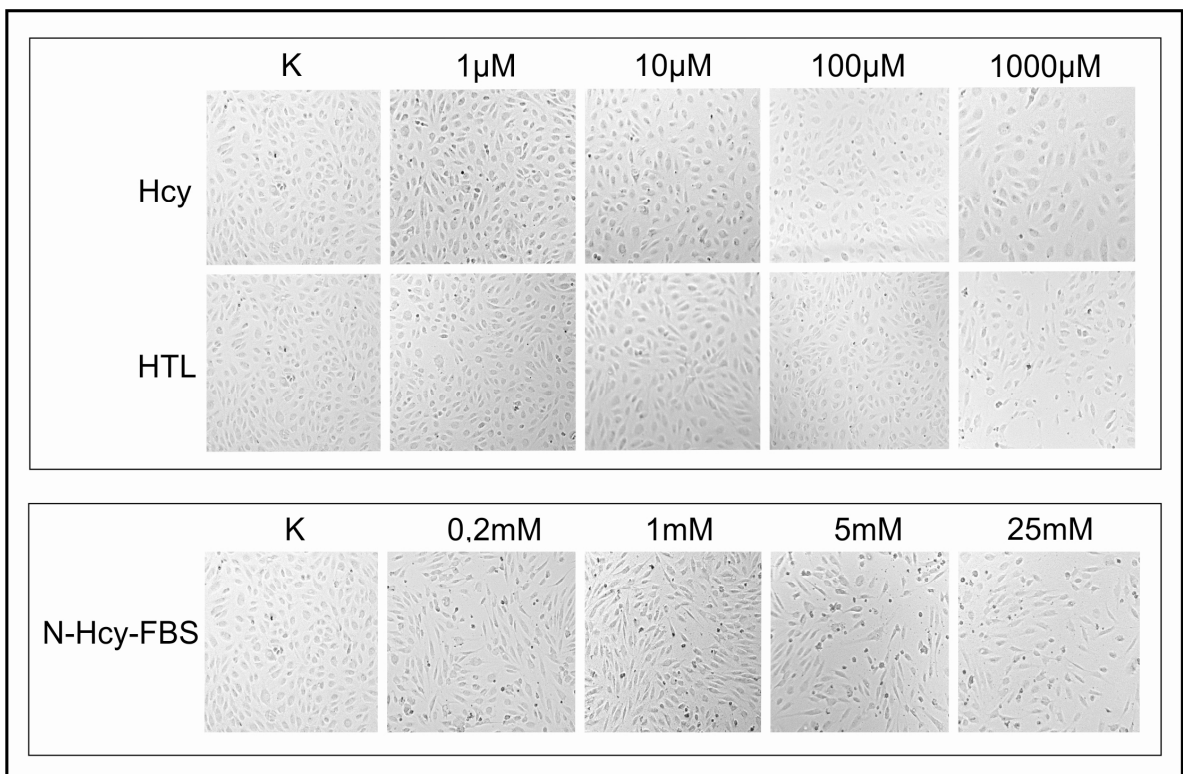
4.1. Testy aktywności metabolicznej komórek HUVEC

Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) inkubowano przez dobę z 1, 10, 100, 1000 μM homocysteiną oraz tiolaktonem homocysteiny w medium hodowlanym pozbawionym antybiotyku. Wpływ N-Hcy-białek na profil ekspresji komórek HUVEC badano poprzez dodatek do medium hodowlanego 2% surowicy wołowej (FBS) zmodyfikowanej 0,2, 1, 5, 25 mM tiolaktonem homocysteiny. Hodowlę prowadzono, jak poprzednio, przez 24h. Hodowlę kontrolną stanowiły komórki HUVEC inkubowane bez dodatku antybiotyku, oraz Hcy i HTL. W przypadku inkubacji komórek HUVEC z N-Hcy-FBS, do hodowli kontrolnej dodano surowicę, do której podczas reakcji modyfikacji zamiast tiolaktonu homocysteiny dodano bufor fosforanowy pH 7,4.

Aby sprawdzić, w jaki sposób warunki eksperymentalne wpływają na hodowlę komórkową, na wstępie przeprowadzono testy żywotności komórek poprzez pomiar aktywności metabolicznej komórek, z użyciem barwnika rezazuryny. Po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji z Hcy, HTL oraz N-Hcy-FBS, odczytywano absorbancję przy długości fali (600 nm) przy której rezorufina - metabolit rezazuryny - wykazuje maksimum absorbancji. Ilość powstałej rezorufiny jest wprost proporcjonalna do ilości żywych, aktywnych metabolicznie komórek w hodowli, ponieważ tylko takie zdolne są do redukcji rezazuryny. Na podstawie wyników pomiarów spektrofotometrycznych wykazano obniżenie żywotności komórek HUVEC o 20% pod wpływem 1000 μM Hcy, podczas gdy tiolakton homocysteiny w takim samym stężeniu powoduje spadek żywotności komórek do ok. 60%. Jednak największy wpływ na przeżywalność komórek HUVEC ma dodatek N-Hcy-białek do hodowli komórkowej. Inkubacja z N-Hcy-FBS zmodyfikowanym 25mM HTL spowodowała obniżenie przeżywalności komórek o połowę (rysunek 8).



Rysunek 8: Przeżywalność komórek HUVEC po 24 h inkubacji z homocysteiną, tiolaktonem Hcy oraz N-homocysteinylowanymi białkami surowicy bydłowej.



Rysunek 9: Hodowla komórek HUVEC po inkubacji z Hcy, HTL, N-Hcy-FBS przez 24 h.

4.2. Modyfikacja białek surowicy tiolaktonem homocysteiny

Liczbę przyłączonych grup tiolowych do reszt Lys w białkach surowicy bydłowej mierzono kolorymetrycznie, w obecności odczynnika Ellmana (DTNB). W tym celu wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 412 nm. Albumina stanowi ponad 90% białek surowicy. Niezmodyfikowana cząsteczka albuminy ma tylko jedną wolną grupę

-SH, pochodzącą od cysteiny 34. [55], dlatego też przyjęto, że pomiar absorbancji dla próby kontrolnej wynosi 1. Wzrost absorbancji w próbkach FBS poddanych modyfikacji tiolaktonem homocysteiny (w stężeniach 0,2 – 25 mM), spowodowany N-homocysteinyłacją reszt lizyny w albuminie, jest wprost proporcjonalny do stężenia czynnika modyfikującego. Modyfikacja FBS 5 mM i 25 mM tiolaktonem Hcy skutkowała przyłączeniem średnio 2,34 i 3,74 grup -SH, co oznacza, że w cząsteczce albuminy modyfikacji uległy średnio 2 oraz 3 reszty lizyny na cząsteczkę albuminy (tabela 19).

stężenie HTL użyte do modyfikacji surowicy <i>in vitro</i>	Ilość nM Hcy/ μ g białka	ilość grup SH [mol/mol]
0	0,195 \pm 0,005	1
0,2 mM	0,230 \pm 0,013	1,18 \pm 0,058
1 mM	0,334 \pm 0,014	1,72 \pm 0,091
5 mM	0,456 \pm 0,013	2,34 \pm 0,094
25 mM	0,729 \pm 0,011	3,74 \pm 0,112

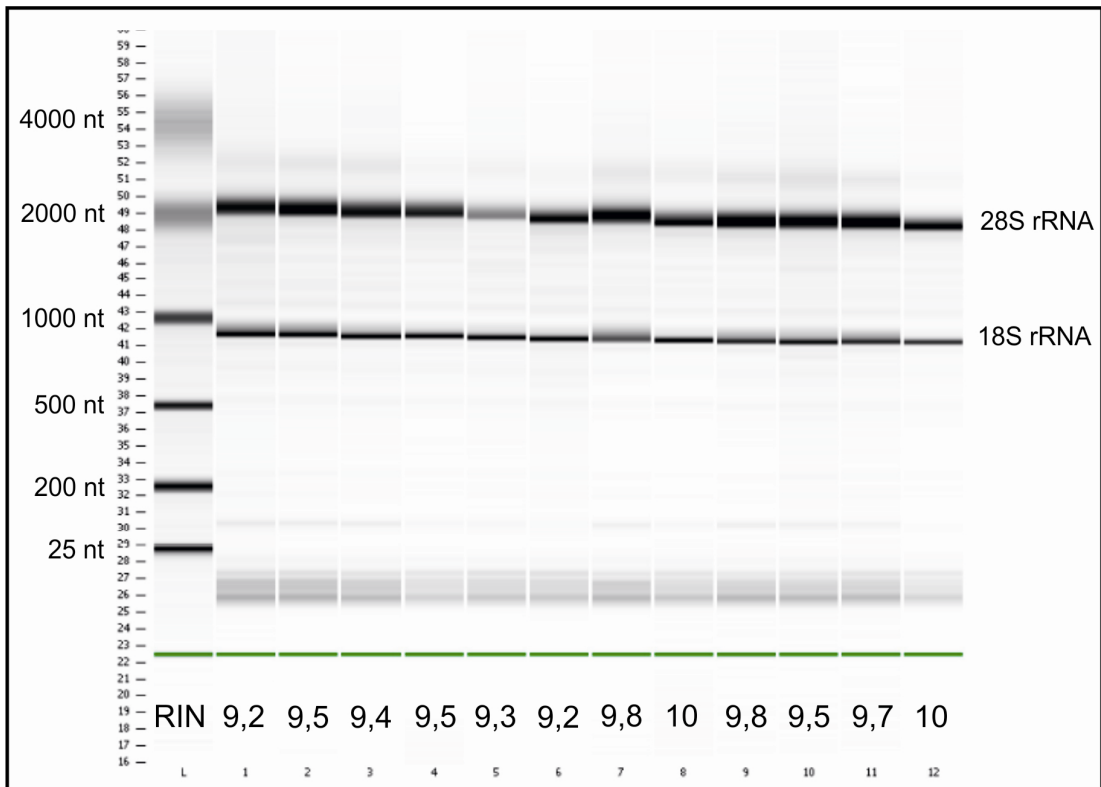
Tabela 19: Ilość Hcy (grup -SH) przyłączonych do cząsteczki albuminy w surowicy bydłowej stosowanej do 24h inkubacji w hodowli komórek HUVEC. Wyniki wyrażone są jako średnia arytmetyczna \pm SD.

Aby móc porównać wpływ N-Hcy-białek surowicy w z wpływem, jaki wywarły homocysteina i HTL na ekspresję genów w komórkach HUVEC wartości N-Hcy-białek stosowanych w eksperymentach wyrażono w μ M. Stężenia te obliczono na podstawie stopnia modyfikacji białek surowicy podanych w tabeli 13, oraz ilości FBS w hodowli komórkowej (2% = 1 mg/ml), zakładając że stężenie albuminy w FBS wynosi 50 mg/ml. Stężenia N-Hcy-białek surowicy dodawanych do hodowli komórkowych wynosiły odpowiednio: 2,7; 10,1; 20,1 oraz 41,1 μ M.

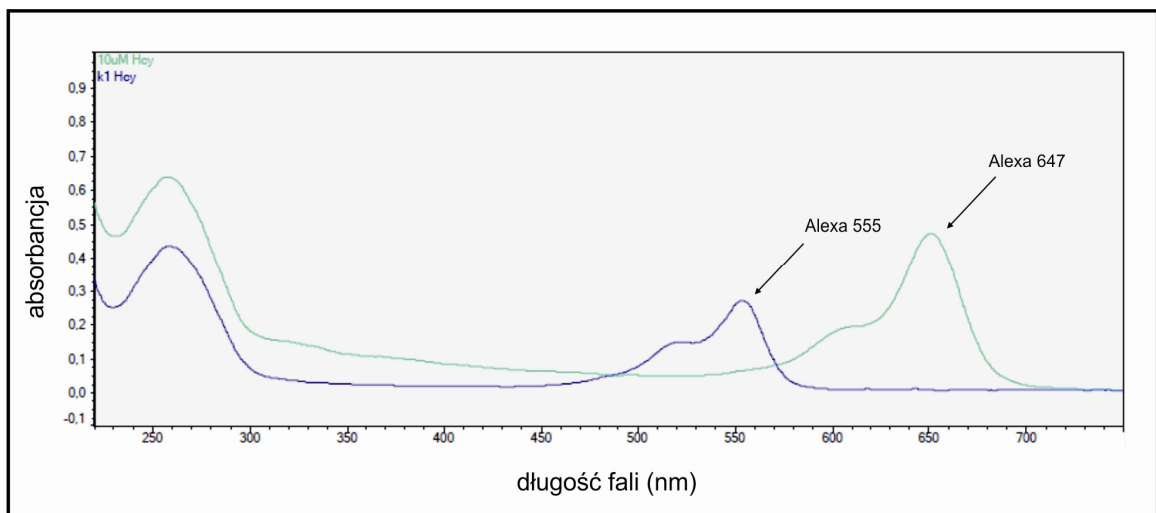
4.3. Analiza ekspresji genów człowieka pod wpływem homocysteiny oraz jej metabolitów

4.3.1. Zastosowanie mikromacierzy DNA do analizy profilu ekspresji transkryptomu pod wpływem homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek surowicy

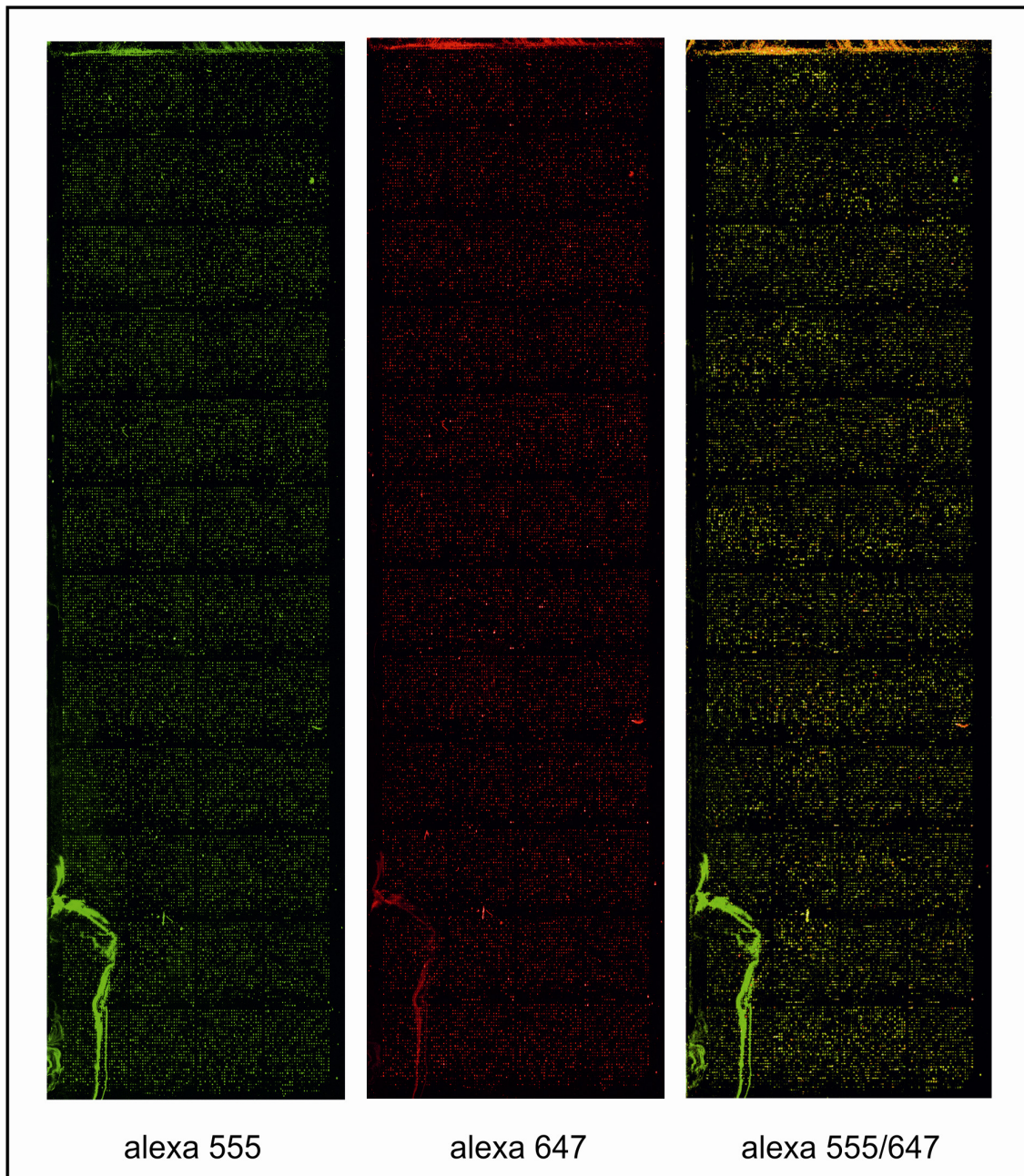
Technologia mikromacierzy DNA jest efektywnym narzędziem do monitorowania ekspresji dużej liczby genów jednocześnie. W jednym eksperymencie można zbadać względną ekspresję całego kompletu genów, które ulegają transkrypcji w komórkach i tkankach jednego, bądź wielu organizmów. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było przeanalizowanie ekspresji genów w komórkach HUVEC w warunkach, które prowadzą do powstania różnego poziomu N-Hcy-białek. Wszystkie eksperymenty mikromacierzowe zostały wykonane w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki we współpracy z dr Luizą Hanndschuh. Aby określić, które geny wykazują odmienną ekspresję w odpowiedzi na podwyższony poziom tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek stosowano genomowe ludzkie mikromacierze DNA, zawierające około 40 000 sond o długości 80 nt, odpowiadających wszystkim znanym ludzkim genom. W tym celu z hodowli komórkowej, zarówno poddanej działaniu stresu (inkubacja z dodatkiem Hcy, HTL i N-Hcy-FBS) jak i kontrolnej wyizolowano całkowity RNA. Jakość otrzymanych preparatów sprawdzano przy pomocy elektroforezy kapilarnej. 20 µg całkowitego RNA o wysokiej jakości (współczynnik RIN powyżej 8,0) przepisywano na cDNA, a następnie znakowano barwnikami fluorescencyjnymi. Próby badane wyznakowano barwnikiem Alexa 555, natomiast próby kontrolne Alexa 647. Tak przygotowane próbki poddane zostały hybrydyzacji. Mikromacierze dla każdego warunku eksperymentalnego wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych.



Rysunek 10: Przykładowy rozdział elektroforetyczny prób całkowitego RNA za pomocą Bioanalizatora Agilent 2100, z oznaczonymi wartościami współczynnika RIN dla każdej z analizowanych prób.



Rysunek 11: Przykładowe widmo dla pomiaru absorbancji w zakresie UV-VIS próbek całkowitego RNA wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnym, wygenerowane za pomocą spektrofotometru Nanodrop 2000c. Próbę kontrolną wyznakowano barwnikiem Alexa 555, natomiast próbę badaną wyznakowano barwnikiem Alexa 647.



Rysunek 12: Obraz mikromacierzy dla ludzkiego transkryptomu zawierającej sondy odpowiadające wszystkim znanym genom człowieka uzyskany po zeskanowaniu płytki mikromacierzowej za pomocą skanera mikromacierzy GenePix 4200AL (Molecular Devices) z rozdzielczością 5 μm , po hybrydyzacji z fluorescencyjnie wyznakowanym cDNA kontrolnym (Alexa 647) i pochodzącym z próby badanej (Alexa 555).

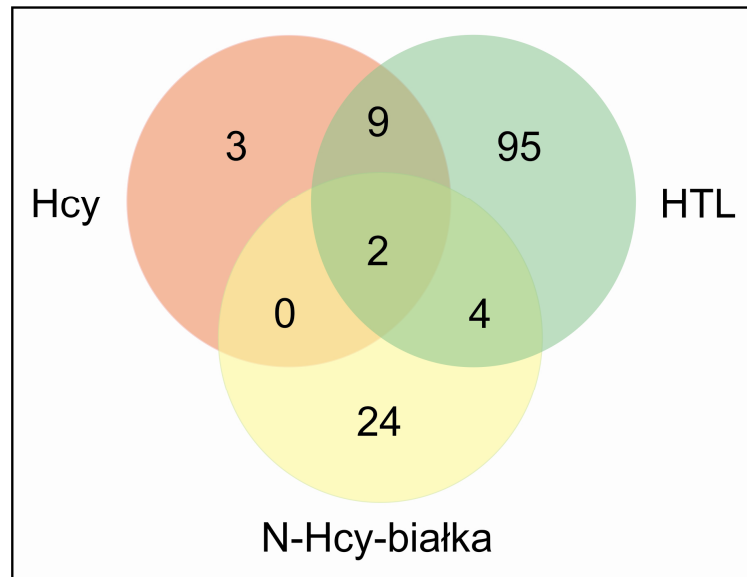
W wyniku analiz obrazów mikromacierzy wytypowano listę genów różnicujących, które wykazują odmienną w stosunku do komórek kontrolnych ekspresję pod wpływem Hcy, HTL oraz N-Hcy-FBS w zastosowanych warunkach eksperymentalnych. Zidentyfikowano 14 genów różnicujących na podstawie analizy mikromacierzowej dla Hcy (tabela 20), 110 genów o zmienionej ekspresji pod

wpływem HTL (tabela 21), oraz 30 genów, których ekspresja pod wpływem N-Hcy-białek uległa zmianie (tabela 22).

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że homocysteina i tiolakton homocysteiny wpływają na zmianę ekspresji tych samych genów. Spośród listy genów różnicujących w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny tylko trzy są inne niż te, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem tiolakotnu Hcy. Grupę wspólną stanwiły geny: *MARCH1*, *LMX1A*, *PCDHB7*, *KRT27*, *SLC44A3*, *IFI30*, *CD209*, *ROBLD3*, *SLC22A9*, *LRRIQ1* oraz *PHACTR4*. Wykazano wzrost ekspresji genów *SLC22A9*, *ROBLD3* oraz *MARCH1* oraz obniżenie poziomu mRNA *LMX1A*, *PCDH37*, *KRT27*, *SLC44A3* a także *CD209* pod wpływem Hcy oraz HTL.

N-Hcy-białka powodują zmiany ekspresji innej grupy genów, niż Hcy i tiolakton homocysteiny. Spośród genów wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem N-Hcy-białek tylko sześć genów było wspólnych z tymi, które wykazywały odmienną ekspresję pod wpływem HTL. W tej grupie znalazły się *MYL6*, *DNAJB7*, *ESM1*, *SULT1E1*, *LRRIQ1*, *PHACTR4*. Ekspresja genów *MYL6*, *ESM1* wzrosła pod wpływem HTL oraz N-hcy-białek, w przeciwieństwie do genu *SULT1E1*, dla którego wykazano spadek ekspresji pod wpływem HTL a także N-Hcy-białek. Natomiast poziom mRNA *DNAJB7* obniżył się pod wpływem tiolaktonu homocysteiny, natomiast zaobserwowano wzrost poziomu mRNA tego genu pod wpływem N-Hcy-białek. W tym przypadku prawdopodobne jest, że w regulację ekspresji zaangażowany jest również inny mechanizm, niezależny od N-homocysteinyłacji.

Zidentyfikowano jedynie dwa geny różnicujące, których ekspresja uległa zmianie zarówno pod wpływem homocysteiny, jak również jej metabolitów (*LRRIQ1* oraz *PHACTR4*). Poziom mRNA tych genów ulegał obniżeniu zarówno pod wpływem homocysteiny, jak również HTL i N-Hcy-białek, co wskazuje na wspólny mechanizm regulacji ich ekspresji na drodze N-homocysteinyłacji.



Rysunek 13: Diagram ilustrujący geny różnicujące, których ekspresja została zmieniona pod wpływem Hcy, HTL oraz N-Hcy-białek. Zidentyfikowano 11 genów wspólnych różnicujących pod wpływem Hcy i HTL, sześć genów wspólnych różnicujących pod wpływem HTL i N-Hcy-białek oraz dwa geny wspólne, różnicujące pod wpływem Hcy i N-Hcy-białek. Zaobserwowano tylko dwa geny wspólne, których ekspresja była zmieniona we wszystkich trzech badanych warunkach eksperymentalnych (LRRIQ1 oraz PHACTR4).

L. p.	symbol genu	numer identyfikacyjny*	nazwa genu**	krotność zmiany***	
				10 μ M	1000 μ M
1.	SLC22A9	114571	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 9	1,48	7,14
2.	ROBLD3	28956	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2	1,21	4,90
3.	DNAJC2	129450	DnaJ homolog subfamily C member 28	1,18	3,99
4.	IFI30	10437	interferon gamma-inducible protein 30	1,83	3,71
5.	MARCH1	55016	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1, E3 ubiquitin protein ligase	1,28	3,72
6.	IGIP	492311	IgA-inducing protein homolog (Bos taurus)	-1,93	-3,09
7.	LMX1A	4009	LIM homeobox transcription factor 1, alpha	2,58	2,69
8.	KRT27	342574	keratin 27	-1,18	-6,55
9.	PCDHB7	56129	protocadherin beta 7	-1,35	-7,17
10.	PHACTR4	65979	phosphatase and actin regulator 4	-1,31	-7,61
11.	ST8SIA2	8128	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2	-1,42	-10,56
12.	SLC44A3	126969	solute carrier family 44, member 3	-2,68	-12,47
13.	CD209	30835	CD209 molecule	-1,1	-3,68
14.	LRRIQ1	84125	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	-2,22	-116,10

Tabela 20: Lista genów różnicujących pod wpływem homocysteiny Adj. *P* value <0,05. Na czerwono zaznaczono geny, dla których profil ekspresji pod wpływem homocysteiny potwierdzono za pomocą real-time PCR.

* Numer identyfikacyjny w bazie danych Gene NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

** Zgonie z opisem w bazie danych Gene NCBI

*** Adj. *P* value <0,05

L.p.	symbol genu	numer identyfikacyjny*	nazwa genu**	krotność zmiany***	
				10 µM	1000 µM
1.	MAT1A	4143	methionine adenosyltransferase I	4,46	22,06
2.	MB	4151	myoglobin	4,22	18,66
3.	ICAM1	3383	intercellular adhesion molecule 1	2,56	17,30
4.	MTR	4548	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	2,84	15,42
5.	VAV3	10451	vav 3 guanine nucleotide exchange factor	4,58	13,84
6.	SERPINA9	327657	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9	3,67	12,73
7.	CD9	928	CD9 molecule	3,55	11,75
8.	CBS	875	cystathionine-beta-synthase	4,73	10,60
9.	THAP1	55145	THAP domain containing, apoptosis associated protein 1	2,72	9,99
10.	NCEH1	57552	neutral cholesterol ester hydrolase 1	2,64	9,95
11.	TNNT2	7139	troponin T type 2 (cardiac)	3,27	9,67
12.	AMOTL2	51421	angiomin like 2	3,24	9,48
13.	PPAP2B	8613	phosphatidic acid phosphatase type 2B	3,73	8,05
14.	ALDH1L1	10840	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	2,98	7,92
15.	APOA5	116519	apolipoprotein A-V	-2,59	-7,07
16.	PLG	5340	plasminogen	2,76	6,76
17.	CYP2S1	29785	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	2,74	6,66
18.	HPSE2	60495	heparanase 2	2,73	6,64
19.	ESM1	11082	endothelial cell-specific molecule 1	2,25	6,59
20.	VWF	7450	von Willebrandt factor	3,67	6,44
21.	PPAP2C	607126	phosphatidic acid phosphatase type 2C	2,41	6,29
22.	MTRR	4552	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	2,31	6,27
23.	APOA4	337	apolipoprotein A-IV	2,68	6,23

24.	SETD2	29072	histone-lysine N-methyltransferase SETD2 (EC 2.1.1.43)	17,93	6,08
25.	APOL1	8542	apolipoprotein L, 1	3,79	5,86
26.	HERPUD2	64224	homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 2	4,61	5,79
27.	MARCH1	55016	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1, E3 ubiquitin protein ligase	4,14	5,46
28.	EZH2	2146	enhancer of zeste homolog 2	2,31	5,36
29.	APOB	338	apolipoprotein B	2,4	5,29
30.	LRP8	7804	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	3,49	5,02
31.	FABP3	2170	FABP3 fatty acid binding protein 3, muscle and heart	3,73	4,97
32.	APOL5	80831	apolipoprotein L, 5	2,3	4,93
33.	APOO	79135	apolipoprotein O	2,27	4,82
34.	ANTXR2	118429	anthrax toxin receptor 2	1,59	4,80
35.	MTHFD2	10797	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	2,2	4,58
36.	SLC22A9	114571	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 9	2,45	4,42
37.	CRSP7	9441	mediator complex subunit 26	1,68	4,4
38.	VCAM1	7412	vascular cell adhesion molecule 1	2,17	4,31
39.	AHCY	191	adenosylhomocysteinase	3,63	4,29
40.	TNFRSF12A	51330	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	2,07	4,19
41.	LPL	4023	lipoprotein lipase	1,61	4,03
42.	SETD7	80854	lysine methyltransferase 7	1,07	3,9
43.	NT5DC4	284958	5'-nucleotidase domain containing 4	1,26	3,9
44.	IFI30	10437	interferon gamma-inducible protein 30	1,11	3,7
45.	EHMT1	79813	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	2,02	3,69
46.	ROBLD3	28956	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2	2,24	3,65
47.	SCARF1	8578	scavenger receptor class F, member 1	1,51	3,65

48.	CYBASC3	220002	cytochrome b561 family, member A3	2,01	3,63
49.	DDIT4L	115265	DNA-damage-inducible transcript 4-like	1,39	3,46
50.	APOL6	80830	apolipoprotein L, 6	2,58	3,32
51.	TLE2	7089	transducin-like enhancer of split 2	1,07	3,17
52.	NSD1	64324	nuclear receptor binding SET domain protein 1	2,52	3,16
53.	ADSSL1	122622	adenylosuccinate synthase like 1	2,08	3,13
54.	ANGPT4	51378	angiopoietin 4	2,55	3,12
55.	SMOC2	64094	SPARC related modular calcium binding 2	1,59	3,02
56.	PAPPA2	60676	pappalysin 2	1,58	2,99
57.	BTN3A2	11118	butyrophilin, subfamily 3, member A2	1,61	2,9
58.	APOA1B	128240	apolipoprotein A-I binding protein	3,73	2,86
59.	EP300	2033	E1A binding protein p300	2,06	2,79
60.	APOA4	107690	apolipoprotein A-IV	2,68	2,68
61.	JARID2	3720	jumonji, AT rich interactive domain 2	3,57	2,7
62.	TNNI3	7137	troponin I type 3 (cardiac)	2,22	2,66
63.	CH25H	9023	cholesterol 25-hydroxylase	1,32	2,53
64.	H2AFY	9555	H2A histone family, member Y	1,71	2,46
65.	EHMT2	10919	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	1,69	2,46
66.	HIST1H2BK	85236	histone cluster 1, H2bk	2,26	2,46
67.	SLC2A12	154091	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12	2,19	2,45
68.	ELP2	55250	elongator acetyltransferase complex subunit 2	2,09	2,41
69.	MBD3	53615	methyl-CpG binding domain protein 3	1,54	2,39
70.	UBE2G1	7326	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1	1,79	2,36
71.	MSR1	4481	macrophage scavenger receptor 1	3,43	2,15
72.	EPC1	80314	enhancer of polycomb homolog 1	1,77	2,02
73.	IL20RA	53832	interleukin 20 receptor, Ralpha	-2,18	-2,14
74.	CCDC129	223075	coiled-coil domain containing 129	-2,51	-2,14

75.	DOT1L	84444	DOT1-like, histone H3 methyltransferase	-2,52	-2,19
76.	PIGL	9487	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L	-2,73	-2,31
77.	SHMT1	6470	serine hydroxymethyltransferase 1	-1,13	-2,43
78.	FGB	2244	fibrinogen beta chain	-2,36	-2,45
79.	ANGPTL3	27329	angiopoietin-like 3	-2,16	-2,71
80.	PFK	5211L	phosphofructokinase, liver	-2,48	-2,72
81.	JMJD2B	23030	lysine (K)-specific demethylase 4B	-1,87	-2,98
82.	SUV420H2	84787	suppressor of variegation 4-20 homolog 2	-1,89	-3,33
83.	ZNF135	1357694	zinc finger protein 135	-1,21	-3,39
84.	C1QTNF4	114900	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	-3,18	-3,52
85.	IRF2	3660	interferon regulatory factor 2	-2,3	-3,75
86.	IBRDC2	255488	E3 ubiquitin-protein ligase IBRDC2	-4,24	-3,94
87.	HIST1H2AJ	8330	histone cluster 1, H2ak	-2,73	-4,12
88.	CD209	30835	CD209 molecule	-2,1	-4,28
89.	HDLBP	3069	high density lipoprotein binding protein	-1,29	-4,57
90.	ANGPT2	285	angiopoietin 2	2,64	2,16
91.	ANXA8	653145	annexin A8	-2,21	-4,66
92.	BRD8	10902	bromodomain containing 8	-2,79	-4,78
93.	SCL44A3	126969	solute carrier family 44, member 3	-1,27	-5,32
94.	PCDHB7	56129	protocadherin beta 7	-2,33	-5,52
95.	APOLD1	81575	apolipoprotein L domain containing 1	-1,13	-5,56
96.	USP11	8237	ubiquitin specific peptidase 11	-4,13	-6,17
97.	MMRN1	22915	multimerin 1	-2,68	-6,25
98.	LMX1A	4009	LIM homeobox transcription factor 1, alpha	-2,14	-6,27
99.	KRT27	342574	keratin 27	-2,55	-6,45
100.	CBX2	12416	chromobox 2	-5,97	-7,06
101.	VEGFA	7422	vascular endothelial growth factor A	-4,37	-7,37

102.	LRRIQ1	84125	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	-5,97	-8,91
103.	PHACTR	465979	phosphatase and actin regulator 4	-2,47	-8,93
104.	HIST1H1B	3009	histone cluster 1, H1b	-7,7	-9,38
105.	SMYD3	64754	SET and MYND domain containing 3	-2,75	-11,25
106.	PTPN6	5777	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	-3,13	-12,12
107.	NTN4	59277	netrin 4	-2,87	-12,24
108.	SCUBE1	80274	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1	-2,19	-12,37
109.	MMP19	4327	matrix metalloproteinase 19	-2,45	-12,75
110.	PTPRB	5787	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	-4,07	-16,67

Tabela 21: Lista genów wykazujących największe różnice w ekspresji pod wpływem tiolaktonu homocysteiny w porównaniu do kontroli. Na czerwono zaznaczono geny, dla których profil ekspresji pod wpływem tiolaktonu homocysteiny potwierdzono za pomocą real-time PCR., Adj. P value < 0,05

* Numer identyfikacyjny w bazie danych Gene NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

** Zgodnie z opisem w bazie danych Gene NCBI

*** Adj. P value < 0,05

L. p.	symbol genu	numer identyfikacyjny*	nazwa genu**	krotność zmiany***	
				10,1 μM	41,1 μM
1.	MYL12B	103910	myosin, light chain 12B, regulatory	1,79	48,46
2.	OS9	10956	osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin	2,41	21,88
3.	MRPS5	64969	mitochondrial ribosomal protein S5	2,56	12,55
4.	ESM1	11082	endothelial cell-specific molecule 1	19,6	10,55
5.	DNAJB7	150353	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 7	2,47	10,41
6.	DOCK1	1793	dedicator of cytokinesis 1	-8,02	-15,11
7.	MELL1	27390	mel transforming oncogene-like 1	-1,75	-48,02
8.	MYL6	4637	myosin, light chain 6	1,68	7,00
9.	RP11-30M20.2	26121	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (S. cerevisiae)	2,56	4,12

10.	CHD5	1003	cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)	1,16	3,95
11.	LOC40139	4013	hypothetical gene supported by BC063892	-1,1	-4,54
12.	EPHX1	2052	epoxide hydrolase 1, microsomal	4,71	9,53
13.	EIF3S6IP	51386	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	-1,02	-8,88
14.	SLC25A18	83733	solute carrier family 25 (glutamate carrier), member 18	4,99	8,67
15.	EEF1A1	1915	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	-2,5	-46,91
16.	ZNF227	1357694	zinc finger protein 227	-1,39	-29,87
17.	SPRY3	10251	sprouty homolog 3 (Drosophila)	-1,49	-10,74
18.	BCNP1	199786	family with sequence similarity 129, member C	-1,1	-6,01
19.	PRKAB2	5565	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	-3,13	-9,81
20.	KRT25C	147183	keratin 25C	-3,86	-4,06
21.	PLB1	151056	phospholipase B1	1,14	2,26
22.	DPEP2	64174	dipeptidase 2	-1,39	-22,66
23.	CGI-12	51001	MTERF domain containing 1	-1,14	-8,97
24.	EDF1	8721	endothelial differentiation-related factor 1	-1,98	-2,25
25.	CORIN	10699	corin, serine peptidase	-6,36	-21,04
26.	MPO	4353	myeloperoxidase	-6,36	-4,66
27.	SULT1E1	6783	sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	-1,7	-9,26
28.	PHACTR4	65979	phosphatase and actin regulator 4	-1,21	-4,69
29.	DDX28	55794	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28	-6,11	-22,04
30.	LRRIQ1	84125	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	-1,15	-30,41

Tabela 22: Lista genów różnicujących pod wpływem N-Hcy-białek surowicy. Listę genów uszeregowano według zmniejszającej się krotności zmiany ekspresji. Na czerwono zaznaczono geny, dla których profil ekspresji pod wpływem N-Hcy-białek potwierdzono za pomocą real-time PCR..

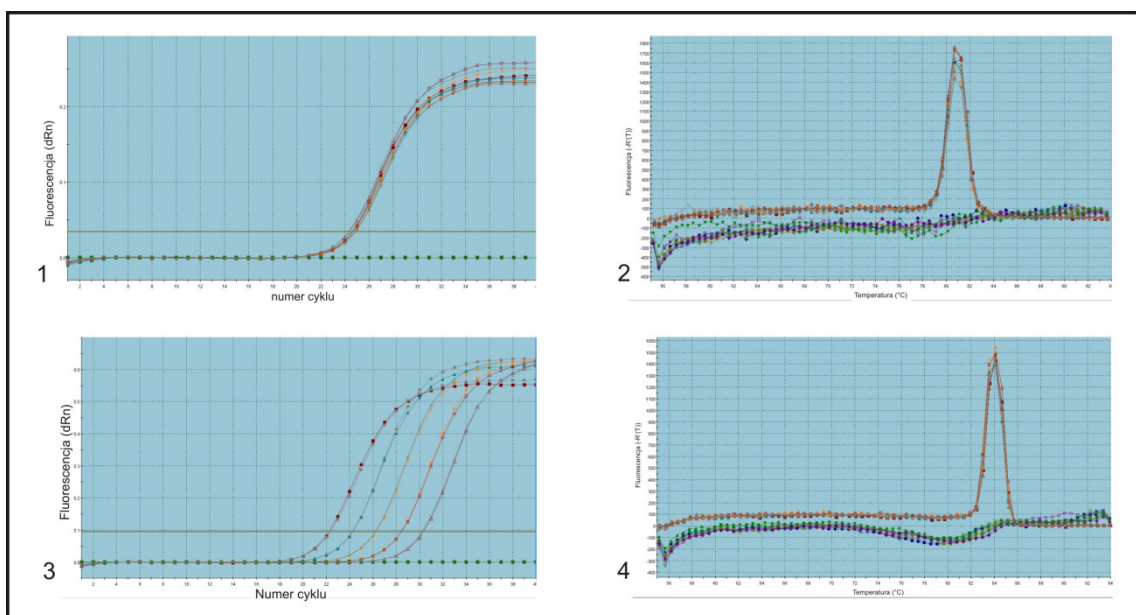
* Numer identyfikacyjny w bazie danych Gene NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

** Zgonie z opisem w bazie danych Gene NCBI

*** Adj. P value, 0,05.

4.3.2. Analiza poziomu mRNA genów różnicujących za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym

Spośród genów różnicujących, których ekspresja różniła się przynajmniej czterokrotnie w porównaniu z kontrolą, wybrano te które potencjalnie mogą być zaangażowane w powstawanie chorób układu krążenia. Następnie zmiany w ekspresji wybranych genów (zaznaczonych na w czerwono tabelach 18 - 20) potwierdzono przy pomocy ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*, *quantitative PCR*, *qPCR*). Analizę ilościową qPCR dwudziestu wybranych genów przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej. Pierwszym etapem tej metody jest analiza stosowanych starterów, zarówno dla genu referencyjnego, jak i genów badanych, techniką rozcieńczeń matrycy [115]. W tym celu przeprowadzono reakcję qPCR dla pięciu kolejnych pięciokrotnych rozcieńczeń matrycy cDNA. Po uzyskaniu dla każdego z analizowanych rozcieńczeń wartości Ct, uzyskano krzywe standardowe dla wszystkich genów różnicujących oraz dla genu referencyjnego (*HPRT*).



Rysunek 14: Analiza jakości produktów reakcji Real-time PCR.

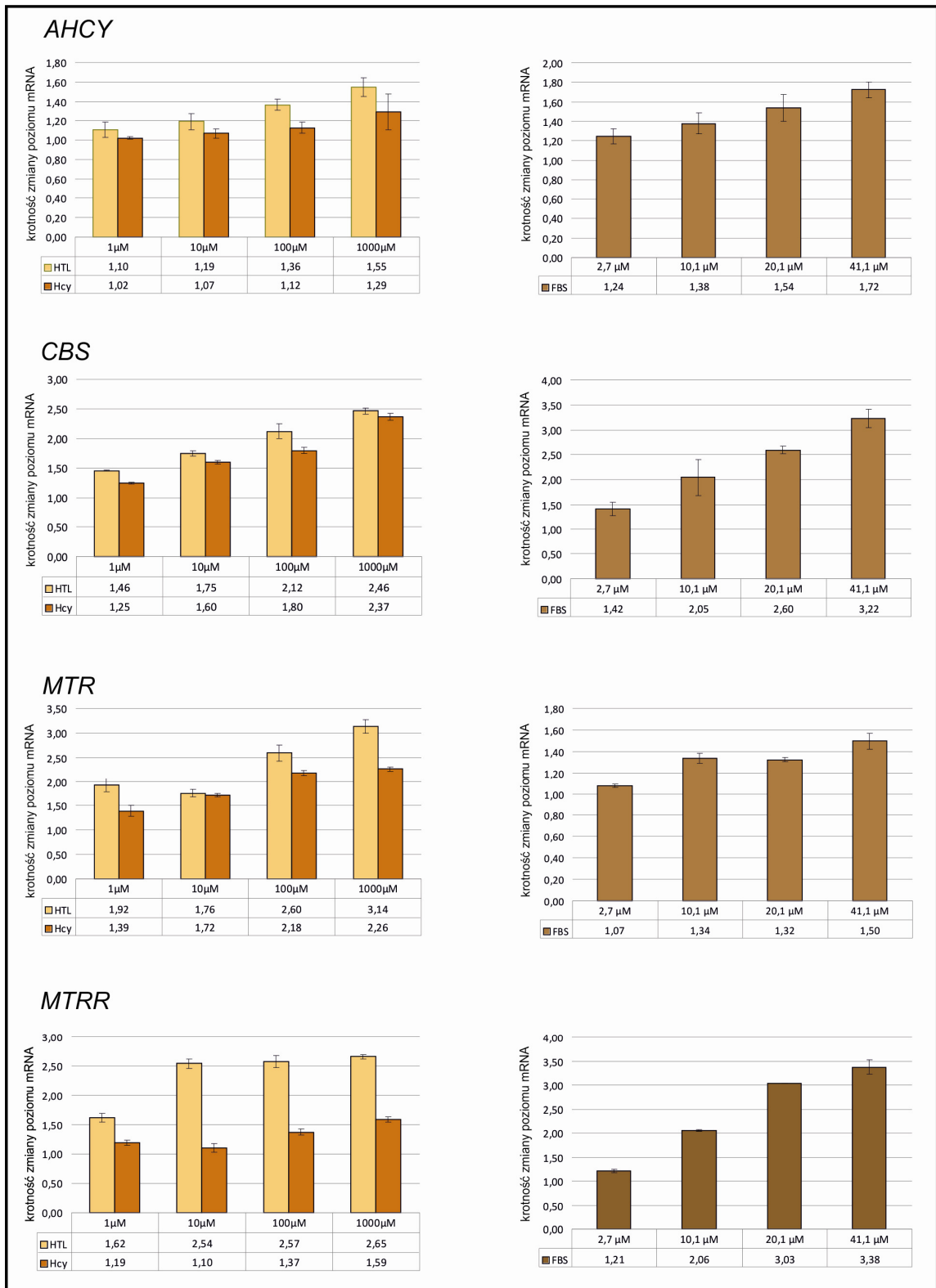
1 - Krzywa przyrostu produktu podczas trwania reakcji qPCR, 2 - Przykładowa krzywa topnienia starterów dla wybranego genu badanego (*AHCY*), 3 - Krzywe przyrostu produktu podczas reakcji qPCR dla kolejnych pięciokrotnych rozcieńczeń matrycy, 4 - krzywa topnienia starterów dla genu referencyjnego (*HPRT*).

Wartość Ct oznacza wartość progową fluorescencji, inaczej numer cyklu, w którym wykryta fluorescencja przekracza zdefiniowany próg, po przekroczeniu którego kinetyka reakcji wchodzi w fazę wzrostu wykładniczego. Jakość uzyskanych produktów qPCR analizowano na podstawie krzywych topnienia (rysunek 14).

Do analizy względnego poziomu ekspresji genów badanych zastosowano metodę $-\Delta\Delta Ct$. Warunkiem stosowania tej relatywnej metody jest uzyskanie takiej samej wydajności reakcji qPCR dla genu badanego i referencyjnego. W tym celu wykonano wykres zależności ΔCt (różnica pomiędzy wartościami Ct genu badanego i referencyjnego dla tej samej początkowej ilości matrycy), od logarytmu stężenia matrycy. Wartości nachylenia krzywej obliczone na podstawie sporządzonych wykresów, dla każdego z genów badanych były mniejsze niż 0,1, co oznacza, że obie reakcje charakteryzują się bardzo zbliżoną wydajnością dzięki czemu możliwe było zastosowanie metody $-\Delta\Delta Ct$. Następnie dla każdego genu badanego obliczono różnicę ekspresji pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek na podstawie różnicy wartości Ct uzyskanej podczas reakcji qPCR, dla prób badanych i próby kontrolnej (bez dodatku Hcy, HTL i N-Hcy-białek).

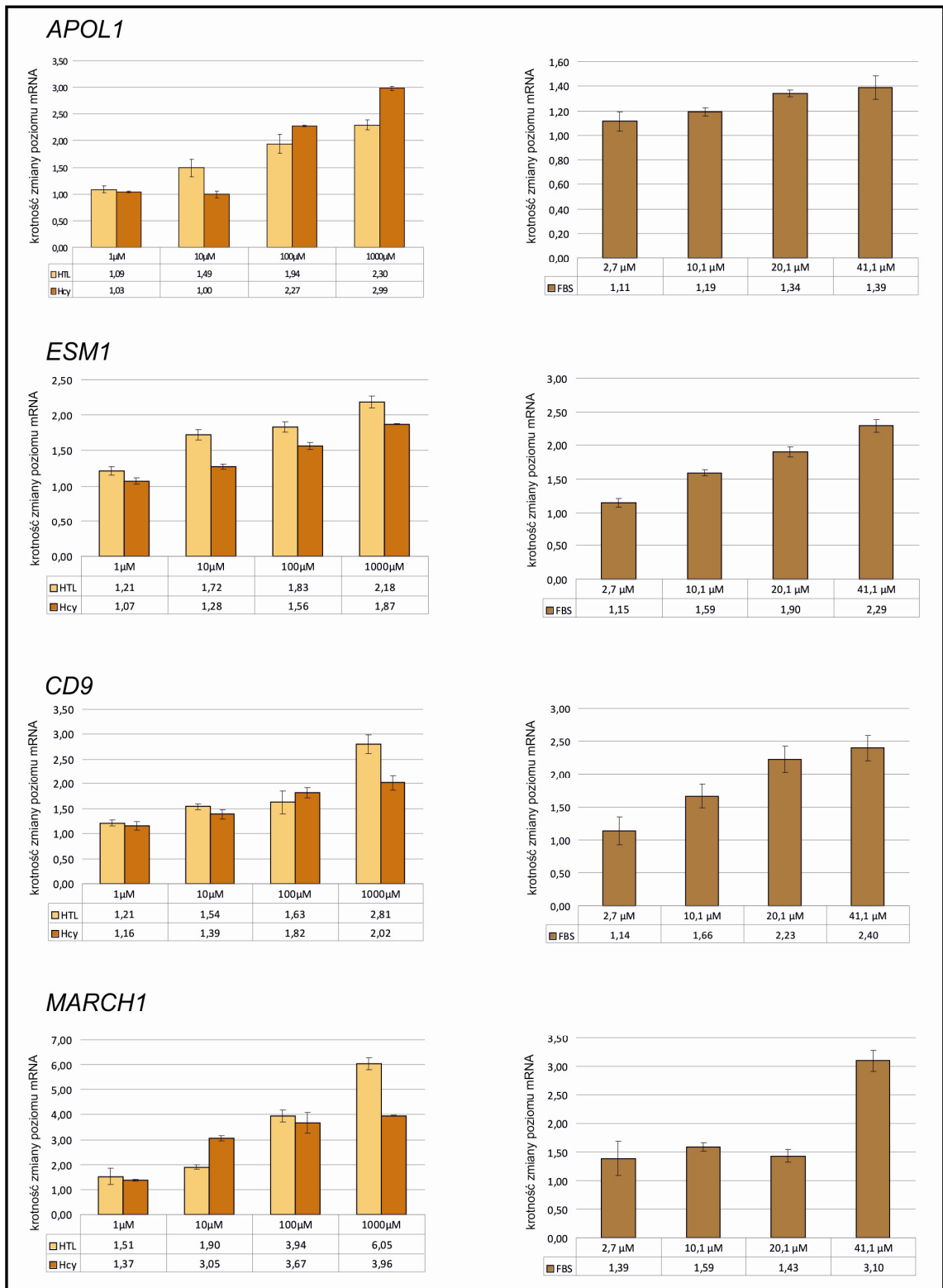
Przeprowadzone analizy real-time PCR pozwoliły dokładnie przeanalizować ekspresję badanych genów pod wpływem homocysteiny, jak również jej metabolitów. Pośród przeanalizowanych genów osiem wykazywało istotny statystycznie ($P < 0,05$) wzrost ekspresji pod wpływem homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny a także N-Hcy-białek. Były to: *AHCY*, *CBS*, *ESM1*, *MTR*, *MTRR*, *APOLI*, *MARCH*, *CD9*. Zaobserwowano wzrost ekspresji genu *AHCY* o ponad 50% ($1,55 \pm 0,1$) pod wpływem 1000 μM HTL. Hcy w tym samym stężeniu wpływała na wzrost ekspresji tego genu prawie o 30% ($1,29 \pm 0,18$). Natomiast N-Hcy-białka surowicy, zmodyfikowane w najwyższym stopniu, powodowały prawie dwukrotny wzrost poziomu mRNA tego genu ($1,72 \pm 0,08$). Wykazano także wzrost poziomu mRNA *CBS* pod wpływem Hcy oraz jej metabolitów, który po 24h inkubacji z 1000 μM Hcy i HTL zwiększał się ponad dwukrotnie ($2,37 \pm 0,06$ oraz $2,46 \pm 0,05$) oraz ponad trzykrotnie pod wpływem dodatku 41,1 μM N-Hcy-białek do pożywki hodowlanej ($3,22 \pm 0,18$). Zarówno Hcy, jak i jej metabolity powodowały wzrost poziomu mRNA *APOLI* w komórkach HUVEC po 24h inkubacji. Wykazano prawie trzykrotny wzrost ekspresji tego genu pod wpływem 1000 μM Hcy ($2,99 \pm 0,03$),

podczas gdy HTL stosowany w tym samym stężeniu powodował ponad dwukrotny wzrost ekspresji w porównaniu do kontroli ($2,3 \pm 0,09$). Białka surowicy zmodyfikowane HTL w najwyższym stopniu wpływały na wzrost poziomu mRNA *APOLI10* prawie 40% ($1,39 \pm 0,1$). Wykazano prawie dwukrotny wzrost poziomu mRNA *ESM1* pod wpływem 1000 μM Hcy ($1,87 \pm 0,01$), podczas gdy HTL w tym samym stężeniu spowodował ponad dwukrotny wzrost poziomu mRNA tego genu ($2,18 \pm 0,09$). Największe zmiany ekspresji genu *ESM1* zaobserwowano pod wpływem N-Hcy-białek. Inkubacja z 41,1 μM białek zmodyfikowanych tiolaktonem homocysteiny wpłynęła na ponad dwukrotny wzrost poziomu mRNA tego genu ($2,29 \pm 0,09$). Przeanalizowano również poziom mRNA *MTR* pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek. Zwiększył się on ponad dwukrotnie pod wpływem 1000 μM Hcy ($2,26 \pm 0,05$) oraz ponad trzykrotnie pod wpływem 1000 μM HTL ($3,14 \pm 0,14$). N-Hcy-białka w najmniejszym stopniu zaburzały ekspresję tego genu, powodując jej wzrost o 50% po inkubacji z 41,1 μM N-Hcy-białkami surowicy ($1,5 \pm 0,05$). Największy wpływ na wzrost mRNA *MTRR* miały N-Hcy-białka, ponieważ dodatek surowicy bydłowej, zmodyfikowanej w najwyższym stopniu, do pożywki hodowlanej skutkowało wzrostem poziomu mRNA tego genu o ponad trzy razy w porównaniu do kontroli ($3,38 \pm 0,15$). Inkubacja z 1000 μM Hcy objawiała się wzrostem ekspresji genu *MTRR* o 60% ($1,59 \pm 0,05$), podczas gdy tiolakton homocysteiny w tym samym stężeniu wpływał na podniesienie poziomu mRNA *MTRR* o ponad dwa razy ($2,65 \pm 0,04$). Wyniki real – time PCR dla genu *MARCH1* pozwoliły przeanalizować jego ekspresję w odpowiedzi na wysokie stężenie Hcy i HTL, a także na obecność N-Hcy-białek. Zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji genu *MARCH1*, którego ekspresja pod wpływem 1000 μM Hcy wzrosła prawie czterokrotnie ($3,96 \pm 0,05$). HTL w najwyższym stężeniu spowodował ponad sześciokrotny wzrost poziomu mRNA tego genu ($6,05 \pm 0,02$), podczas gdy dodatek 41,1 μM N-Hcy-białek surowicy przyczynił się do wzrostu ekspresji *MARCH1* o ponad trzy razy ($3,1 \pm 0,18$). Ostatnim genem w tej grupie był *CD9*. Zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost poziomu mRNA po inkubacji z 1000 μM Hcy ($2,02 \pm 0,15$), podczas gdy HTL w tym samym stężeniu wywołał prawie trzykrotny wzrost ekspresji tego genu ($2,81 \pm 0,19$). Dodatek do medium hodowlanego białek surowicy zmodyfikowanych najwyższym stężeniem HTL przyczynił się do ponad dwukrotnej zmiany w poziomie mRNA *CD9* ($2,4 \pm 0,02$).

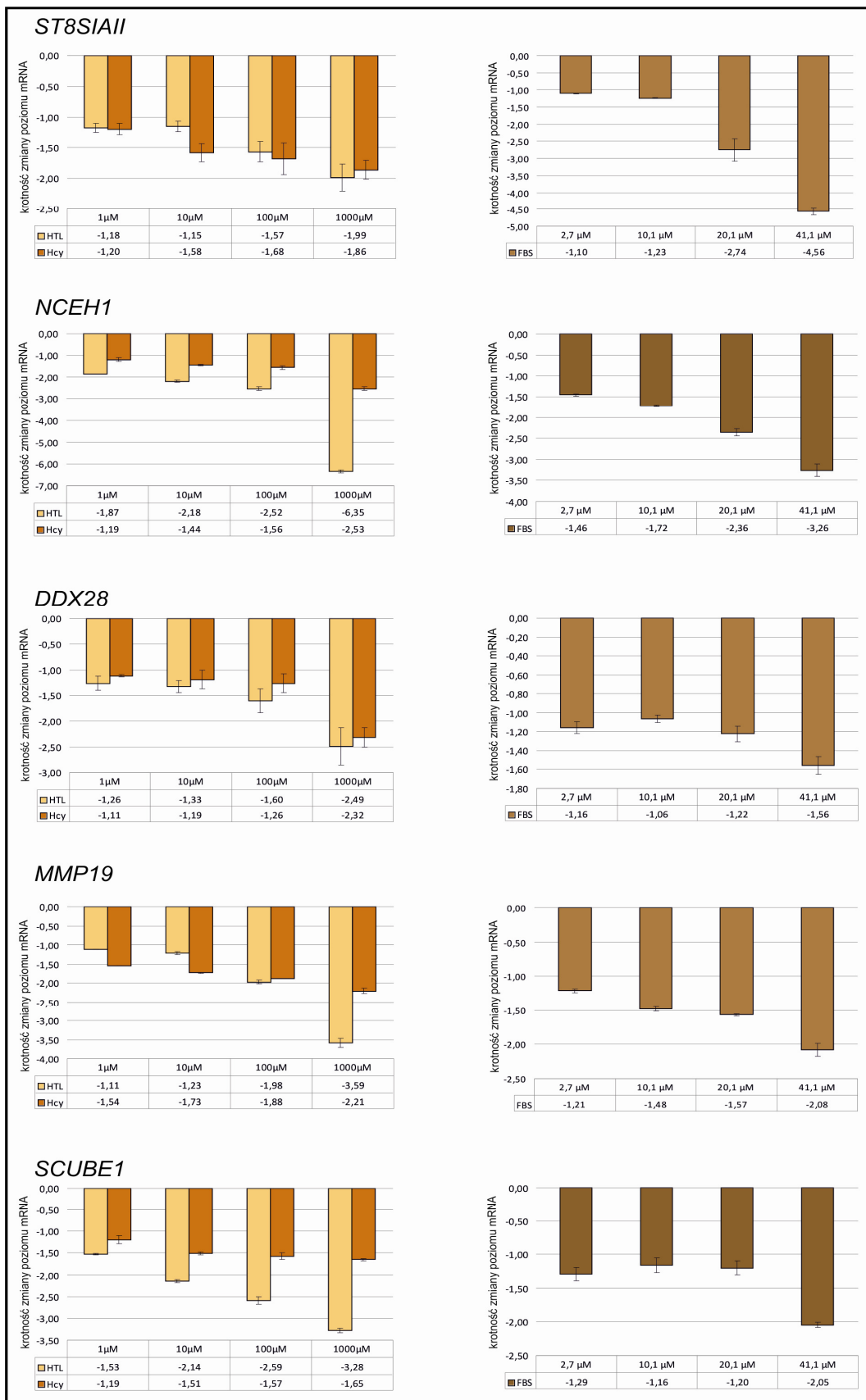


Rysunek 15: Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na profil ekspresji genów AHCY, CBS, MTR, MTRR; $P < 0,05$

Drugą grupę genów stanowiły takie, których poziom mRNA ulegał obniżeniu w odpowiedzi na dodatek Hcy, tiolaktonu homocysteiny oraz N-hcy-białek do pożywki hodowlanej ($P < 0,05$). W tej grupie znalazło się pięć genów: *MMP19*, *DDX28*, *ST8SIAII*, *NCEH1*, *SCUBE1*. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwoliły stwierdzić znaczący spadek mRNA *MMP19* pod wpływem zarówno Hcy, jak i jej metabolitów. Wykazano ponad dwukrotne obniżenie ekspresji tego genu pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ Hcy ($-2,21 \pm 0,09$), podczas gdy inkubacja z tiolaktonem Hcy w tym samym stężeniu spowodowała obniżenie poziomu mRNA *MMP19* o ponad trzy razy ($-3,59 \pm 0,18$). Dodatek $41,1 \mu\text{M}$ N-Hcy-białek do medium hodowlanego spowodował ponad dwukrotne obniżenie ekspresji badanego genu ($-2,08 \pm 0,09$). Inkubacja komórek HUVEC zarówno z $1000 \mu\text{M}$ Hcy jak i HTL spowodowała ponad dwukrotne obniżenie poziomu mRNA *DDX28* ($-2,32 \pm 0,18$ oraz $-2,49 \pm 0,16$). N-Hcy-białka wywarły taki sam efekt na ekspresję tego genu, powodując jej obniżenie o ponad 50% po inkubacji z białkami surowicy zmodyfikowanymi w najwyższym stopniu HTL ($-1,56 \pm 0,1$). Zarówno $1000 \mu\text{M}$ Hcy jak i HTL wpłynęły na prawie dwukrotne obniżenie poziomu mRNA *ST8SIAII* ($-1,86 \pm 0,15$ pod wpływem Hcy, $-1,99 \pm 0,12$ pod wpływem HTL). N-Hcy-białka wywarły największy wpływ na ekspresję tego genu, co zaobserwowano poprzez ponad czterokrotne obniżenie poziomu mRNA *ST8SIAII* po inkubacji z $41,1 \mu\text{M}$ N-Hcy-białkami surowicy ($-4,56 \pm 0,1$). Wykazano obniżenie poziomu mRNA *NCEH1* w komórkach HUVEC po inkubacji z Hcy ($-2,53 \pm 0,08$) i HTL ($-6,35 \pm 0,05$) w stężeniu $1000 \mu\text{M}$. Ten sam efekt zaobserwowano również pod wpływem $41,1 \mu\text{M}$ N-Hcy-białek dodanych do medium hodowlanego ($-3,26 \pm 0,14$). Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz zaobserwowano spadek poziomu mRNA *SCUBE1* zarówno pod wpływem Hcy jak i jej metabolitów. 24h inkubacja komórek HUVEC z $1000 \mu\text{M}$ Hcy spowodowała prawie dwukrotne obniżenie ekspresji tego genu ($-1,65 \pm 0,02$), podczas gdy inkubacja z HTL w tym samym stężeniu wpłynęła na obniżenie poziomu mRNA ponad trzy razy ($-3,28 \pm 0,05$). Wykazano również dwukrotną redukcję poziomu mRNA *SCUBE1* pod wpływem $41,1 \mu\text{M}$ N-Hcy-białek surowicy ($-2,05 \pm 0,04$).



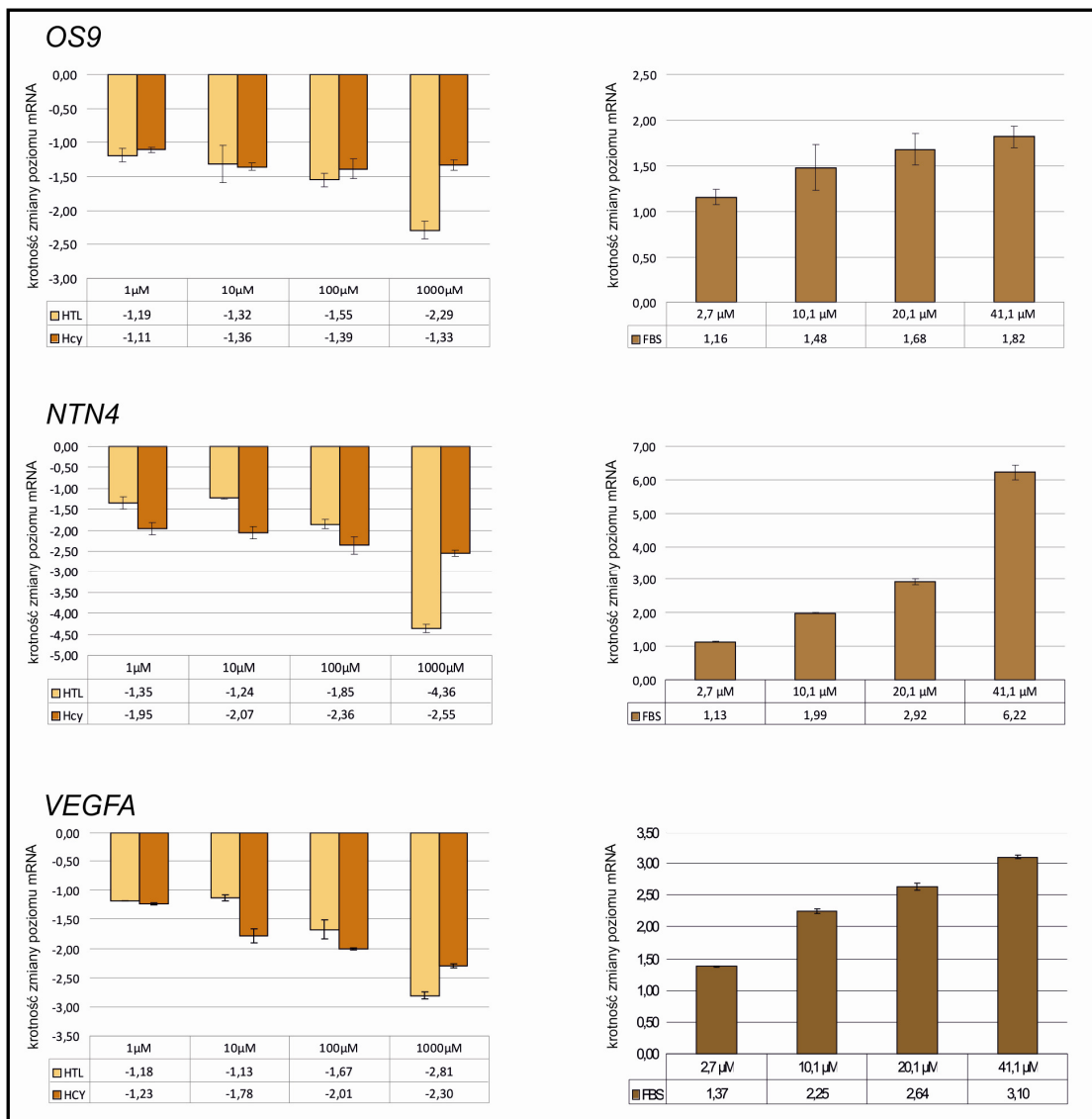
Rysunek 16: Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na profil ekspresji genów APOL1, ESM1, CD9, MARCH1; $P < 0,05$.



Rysunek 17: Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na profil ekspresji genów *ST8SIAII*, *NCEH1*, *DDX28*, *MMP19*, *SCUBE1*; $P < 0,05$.

Za pomocą techniki real-time PCR zidentyfikowano również takie geny, których istotne statystycznie zmiany ekspresji prawdopodobnie indukowane są również innym niż N-homocysteinyłacja mechanizmem ($P < 0,05$). Są to: *SLC44A3*, *ANXA8*, *APOA5*, *ROBLD3*, *VEGFA*, *NTN4*, *OS9*. Wykazano spadek ekspresji genu *SLC44A3* o ponad 70% pod wpływem 1000 μM Hcy, podczas gdy tiolakton homocysteiny w tym samym stężeniu przyczynił się do ponad trzykrotnego obniżenia poziomu mRNA *SLC44A3*. N-Hcy-białka surowicy wpłynęły w odmienny sposób na ekspresję tego genu, powodując jej wzrost, który wyniósł ponad dwa razy, po inkubacji z 41,1 μM N-Hcy-białkami surowicy. Zaobserwowano znaczący spadek poziomu mRNA genu *VEGFA* pod wpływem 1000 μM Hcy ($-2,31 \pm 0,03$) i 1000 μM HTL ($-2,81 \pm 0,09$). Natomiast inkubacja komórek HUVEC z białkami surowicy zmodyfikowanymi w najwyższym stopniu tiolaktonem homocysteiny spowodowała ponad trzykrotny wzrost ekspresji tego genu w porównaniu do kontroli ($3,1 \pm 0,03$). Przeanalizowano także profil ekspresji genu *OS9* pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek. Inkubacja z 1000 Hcy i HTL w tym samym stężeniu spowodowała obniżenie poziomu ekspresji badanego genu ($-1,33 \pm 0,08$ pod wpływem 1000 μM Hcy oraz $-2,29 \pm 0,13$ pod wpływem 1000 μM HTL). Natomiast dodatek do pożywki hodowlanej białek surowicy bydlęcej zmodyfikowanych w najwyższym stopniu wpłynął pozytywnie na poziom mRNA tego genu, co zaobserwowano poprzez prawie dwukrotny wzrost ekspresji w porównaniu do kontroli ($1,82 \pm 0,11$). 1000 μM Hcy oraz tiolakton homocysteiny stosowany w tym samym stężeniu powodował znaczący spadek poziomu mRNA *NTN4* ($-2,55 \pm 0,07$ po inkubacji z Hcy oraz $-4,36 \pm 0,01$ po inkubacji z HTL). N-Hcy-białka wywierają odmienny efekt na ekspresję tego genu, powodując ponad sześciokrotny wzrost poziomu jego mRNA po inkubacji z białkami surowicy bydlęcej zmodyfikowanymi w najwyższym stopniu HTL ($6,22 \pm 0,22$). Ekspresja genu *APOA5* była również zmieniona pod wpływem Hcy; zaobserwowano ponad dwukrotnie obniżenie poziomu ekspresji tego genu przy najwyższym stosowanym stężeniu ($-2,53 \pm 0,13$). Inkubacja z 1000 μM HTL znacznie bardziej wpłynęła na obniżenie poziomu mRNA tego genu w porównaniu do kontroli, bowiem wykazano ponad dwunastokrotny spadek poziomu ekspresji badanego genu ($-12,51 \pm 0,01$). N-Hcy-białka wywarły zupełnie odmienny efekt na poziom mRNA *APOA5*, powodując wzrost jego poziomu o ponad dwa razy ($2,4 \pm 0,1$ po inkubacji z białkami surowicy

zmodyfikowanej w najwyższym stopniu). 1000 μM Hcy przyczyniła się do wzrostu poziomu mRNA *ROBLD3* o prawie 80% ($1,75 \pm 0,04$), natomiast wzrost poziomu mRNA tego genu wywołany przez HTL stosowany w tym samym stężeniu wynosił prawie 40% ($1,38 \pm 0,02$). N-Hcy-białka surowicy wywarły negatywny efekt na ekspresję genu *ROBLD3* powodując jej obniżenie o ponad 60% ($-1,66 \pm 0,05$) pod wpływem 41,1 μM N-Hcy-białek surowicy.



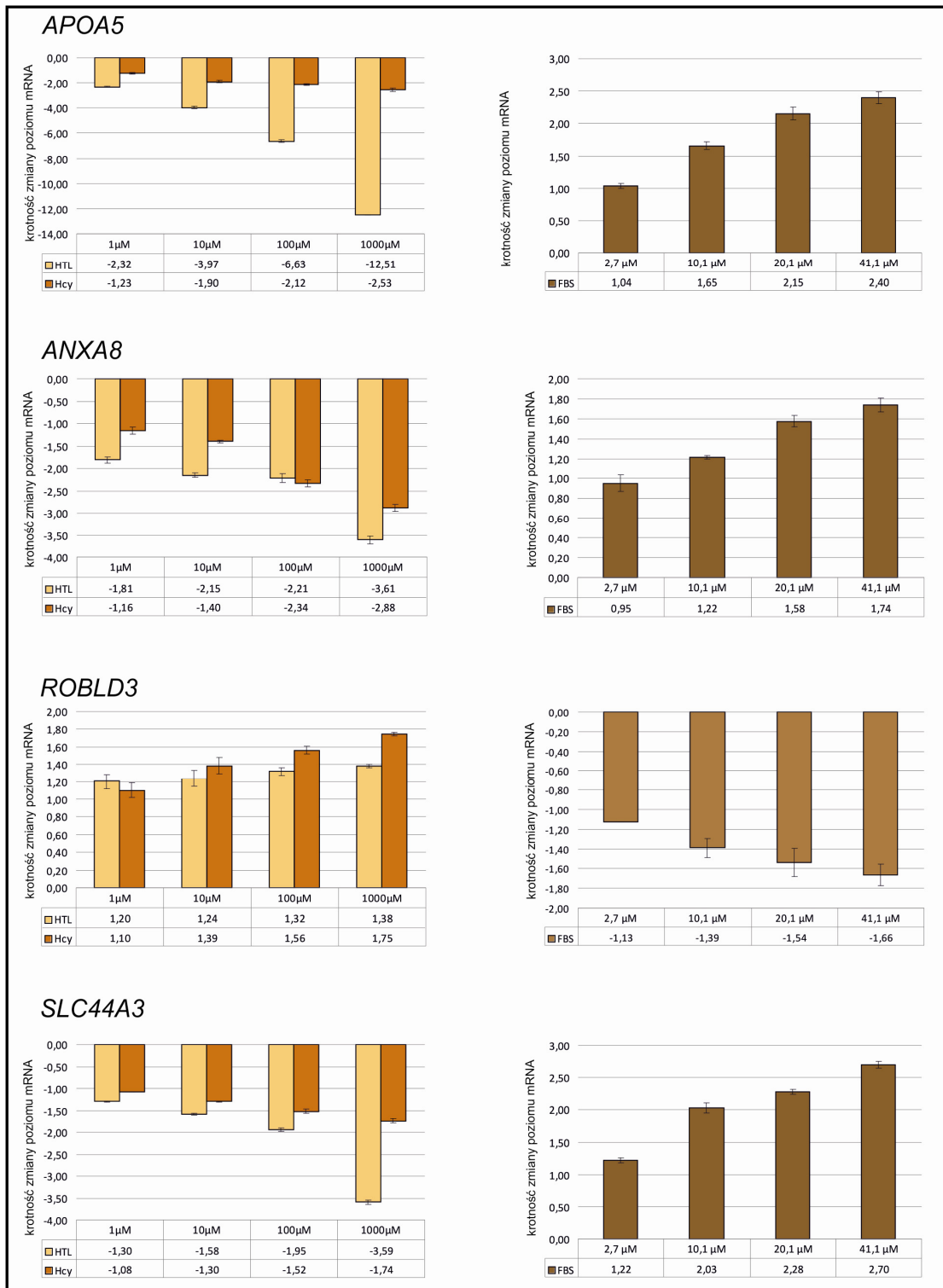
Rysunek 18: Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na profil ekspresji genów *OS9*, *NTN4*, *VEGFA*; $P < 0,05$.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano zmianę ekspresji genu *ANXA8* po 24h inkubacji zarówno z Hcy, HTL i N-Hcy-białkami. Jednakże zmiany te były odmienne dla Hcy i HTL niż dla N-Hcy-białek surowicy. Zarówno 1000 μM Hcy

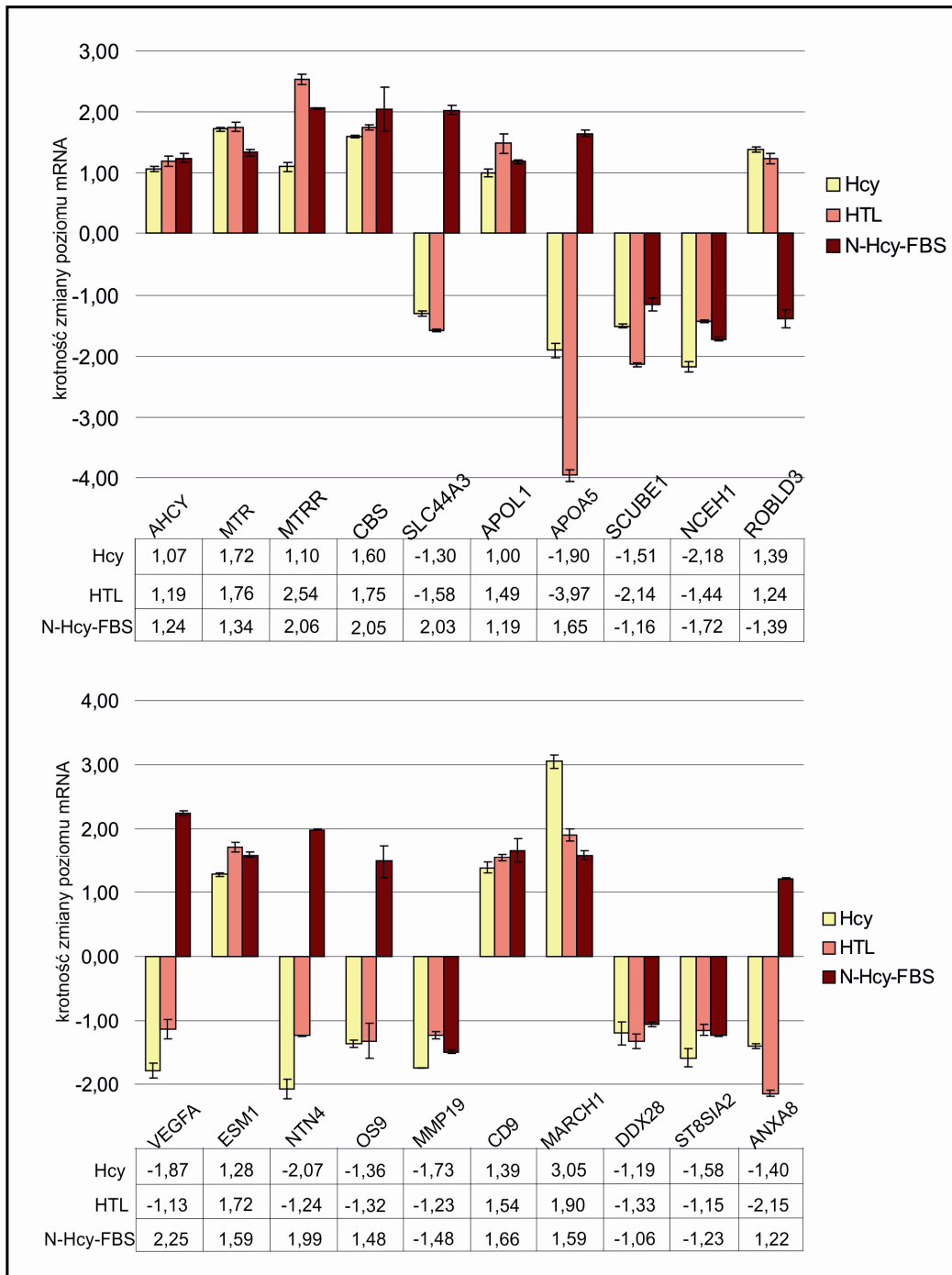
jaki i HTL w tym stężeniu przyczyniły się do znaczącego spadku poziomu mRNA *ANXA8* ($-2,88 \pm 0,08$ oraz $-3,61 \pm 0,09$). Zaobserwowano wzrost ekspresji *ANXA8* o ponad 70% pod wpływem białek surowicy zmodyfikowanych w najwyższym stopniu ($1,74 \pm 0,07$).

Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły wyniki uzyskane za pomocą mikromacierzy dla wszystkich wybranych genów, mimo że wartości zmiany ekspresji pod wpływem Hcy i jej metabolitów różnią się w zależności od zastosowanej metody badawczej. Zastosowana w niniejszej pracy technika mikromacierzy jest metodą szacunkową, która pozwala na identyfikację puli genów, które w danych warunkach eksperymentalnych wykazują wzrost lub spadek ekspresji. Jednak metoda ta również jest obciążona możliwością popełnienia błędów. Dlatego też, aby uwiarygodnić wyniki uzyskane w ten sposób, dla wybranej grupy genów przeprowadzono reakcję real-time PCR. Ta technika jest bardziej czuła w porównaniu do mikromacierzy, pozwala bowiem na określenie poziomu ekspresji genu, który występuje w komórce nawet w kilku kopiach. Dlatego też wyniki uzyskane na podstawie tych dwóch metod eksperymentalnych mogą się od siebie różnić. Jednak niezależnie od stosowanej metody zmiana ekspresji dla danego genu zawsze pozostaje taka sama, to znaczy, że jeśli dla danego genu zaobserwowano spadek poziomu ekspresji za pomocą mikromacierzy, to przy pomocy techniki real-time PCR również wykazano spadek obniżenie ekspresji dla tego genu. Zastosowanie techniki real-time PCR pozwoliło dodatkowo uzyskać informacje o zmianie ekspresji wybranej puli genów w każdym z analizowanych warunków eksperymentalnych, niezależnie od tego, dla którego warunku był on genem różnicującym.

Stopień modyfikacji białek surowicy 1 mM tiolaktonem homocysteiny, po przeliczeniu na μM N-Hcy-białek dodanych do medium hodowlanego korelował z $10\mu\text{M}$ stężeniem Hcy i HTL stosowanym w eksperymentach. Pozwoliło to przeanalizować wpływ tych samych stężeń Hcy i jej metabolitów na ekspresję genów w komórkach HUVEC (rysunek 20). Dzięki temu jeszcze wyraźniej widać, jak odmienny jest wpływ N-Hcy-białek na ekspresję badanych genów, z czym mogą wiązać się zupełnie inne mechanizmy komórkowe, które uruchamiane są w odpowiedzi na obecność N-Hcy-białek.



Rysunek 19: Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na profil ekspresji genów APOA5, ANXA8, ROBLD3, SLC44A3; $P < 0,05$.

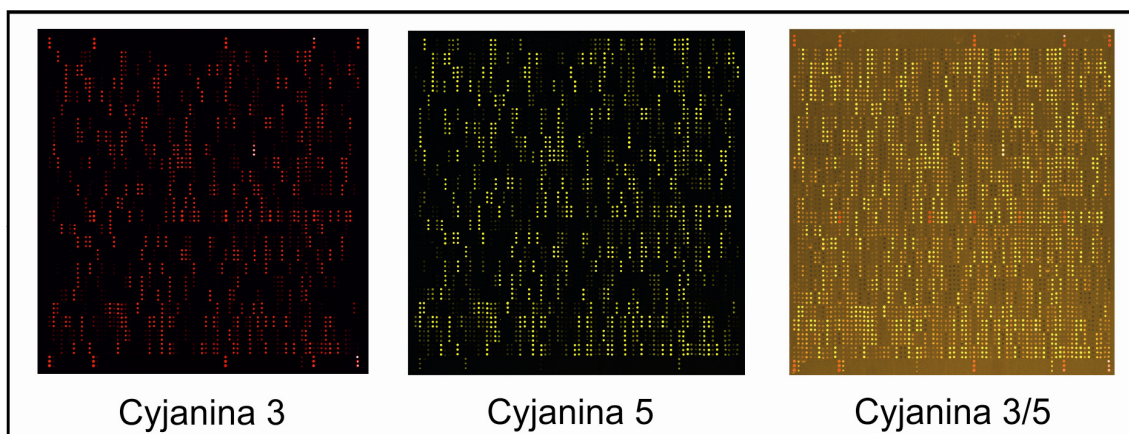


Rysunek 20: Zmiany w ekspresji ludzkich genów indukowane 10 μ M stężeniem Hcy, HTL oraz N-Hcy-białek surowicy w medium hodowlanym określone za pomocą real-time PCR; $P < 0,05$.

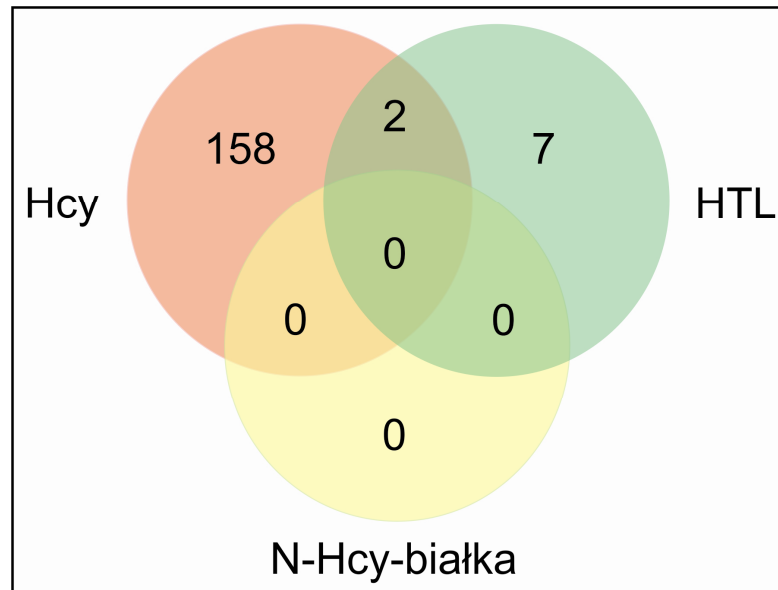
4.4. Analiza zmian w profilu ludzkich miRNA pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów

4.4.1. Określenie zmian ludzkich miRNA w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i jej metabolitów za pomocą mikromacierzy

W celu sprawdzenia wpływu Hcy, HTL oraz N-Hcy-FBS na ekspresję genów kodujących miRNA, przeprowadzono eksperymenty mikromacierzowe z zastosowaniem mikromacierzy dla ludzkich miRNA, zawierających 1237 sond, komplementarnych do wszystkich znanych ludzkich miRNA. Każda sonda nadrukowana była na mikromacierzy w trzykrotnym powtórzeniu. Dla każdego warunku eksperymentalnego wykonano dwa powtórzenia biologiczne. Eksperymenty mikromacierzowe wykonano w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki we współpracy z dr Luizą Handschuh. Ponieważ komórki HUVEC mają ograniczoną liczbę podziałów, co więcej wykazano, że stare komórki śródbłonka wykazują inny profil ekspresji genów, a zwłaszcza miRNA, niż młode komórki śródbłonka [116], wszystkie eksperymenty przeprowadzono na komórkach HUVEC będących na tym samym etapie rozwoju, pomiędzy czwartym a dziesiątym pasażem. Analizę obrazów mikromacierzowych wykonano tak, jak w przypadku mikromacierzy genomowych.



Rysunek 21: Obraz mikromacierzy dla ludzkich miRNA zawierającej sondy odpowiadające wszystkim znanym miRNA człowieka uzyskany po zeskanowaniu płytki mikromacierzowej za pomocą skanera mikromacierzy GenePix 4200AL (Molecular Devices) z rozdzielczością 5 μm , po hybrydyzacji z fluorescencyjnie wyznakowanymi miRNA z komórek kontrolnych (cyjanina 3) oraz miRNA pochodzącymi z próby badanej (cyjanina 5).



Rysunek 22: Diagram ilustrujący miRNA różnicujące, których ekspresja została zmieniona pod wpływem Hcy, HTL oraz N-Hcy-białek. Zidentyfikowano 160 miRNA, których profil ekspresji zmienił się pod wpływem Hcy oraz 9 miRNA wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem HTL. Dla tych grup tylko 2 miRNA były wspólne. W wyniku analiz mikromacierzowych nie zidentyfikowano miRNA różnicujących pod wpływem N-Hcy-białek surowicy w komórkach HUVEC.

Korektę tła wykonano za pomocą metody Subtract. Normalizację danych w obrębie mikromacierzy wykonano metodą Loess. Analizę statystyczną wykonano w programie R Bioconductor i pakiecie Limma. Ponieważ różnice w ekspresji miRNA pod wpływem badanych związków były niższe niż w przypadku mikromacierzy genomowych (zwłaszcza pod wpływem Hcy), wyboru genów różnicujących dokonano w oparciu o następujące kryteria 1) Adj P value < 0,05, 2) Log FC \geq 0,6 lub LogFC \leq 0,6. Analizy te pozwoliły określić zmiany w profilu ekspresji miRNA w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy, HTL oraz N-Hcy-FBS. Uzyskane wyniki wskazują, że niskie stężenia zarówno Hcy jak i HTL (1, 10 μ M) nie wpływają na profil ludzkich miRNA. Zidentyfikowano łącznie 160 miRNA różnicujących pod wpływem homocysteiny (147 o podwyższonej ekspresji, 13 o obniżonej ekspresji) (tabela 24). W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano łącznie 9 miRNA wykazujących podwyższoną ekspresję pod wpływem tiolaktonu homocysteiny (tabela 23). Na podstawie przeprowadzonych analiz nie wykazano istotnych różnic w poziomie ekspresji genów ludzkich miRNA pod wpływem N-Hcy-białek. Można także zauważyć, że homocysteina i tiolakton homocysteiny powodują zmianę profilu ekspresji innych

grup miRNA. Zidentyfikowano bowiem tylko dwa wspólne miRNA (miR-331, miR-125 b1) spośród obu grup miRNA różnicujących pod wpływem Hcy i HTL.

L.p.	miRNA	numer w bazie danych miRBase	krotność zmiany	
			100 μ M	1000 μ M
1.	hsa-miR-let 7b	MI0000650	3,51	20,11
2.	hsa-miR-34a	MI0000268	2,88	18,83
3.	hsa-miR-30e	MI0000749	6,35	15,9
4.	hsa-miR-200c	MI0000342	2,13	6,38
5.	hsa-miR-377	MI0000785	2,46	6,41
6.	hsa-miR-200b	MI0000650	5,47	6,59
7.	hsa-miR-331	MI0000812	5,27	6,24
8.	hsa-miR-192	MI0000234	4,76	6,53
9.	hsa-miR-125 b1	MI0000446	5,72	7,36

Tabela 23: Lista ludzkich miRNA różnicujących wykazujących największe różnice w ekspresji pod wpływem HTL w komórkach HUVEC. Na czerwono zaznaczono miRNA, których profil ekspresji pod wpływem HTL potwierdzono za pomocą real-time PCR.

L.p.	miRNA	numer w bazie danych miRBase	krotność zmiany*	
			100 μ M	1000 μ M
1.	hsa-miR-1	MIMAT0000416	1,32	2,95
2.	hsa-miR-576-3p	MIMAT0004796	1,49	1,84
3.	hsa-miR-1246	MIMAT0005898	1,94	2,82
4.	hsa-miR-2116-5p	MIMAT0011160	1,37	2,62
5.	hsa-miR-32-3p	MIMAT0004505	2,41	2,53
6.	hsa-miR-4290	MIMAT0016921	1,99	2,49
7.	hsa-miR-1825	MIMAT0006765	1,92	2,48
8.	hsa-miR-4646-3p	MIMAT0019708	2,11	2,45
9.	hsa-miR-595	MIMAT0003263	1,70	2,4
10.	hsa-miR-4701-3p	MIMAT0019799	2,37	1,79
11.	hsa-miR-608	MIMAT0003276	1,48	2,28
12.	hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	2,28	1,33
13.	hsa-miR-4701-5p	MIMAT0019798	2,23	2,47
14.	hsa-miR-4687-5p	MIMAT0019774	2,03	2,21
15.	hsa-miR-297	MIMAT0004450	2,40	2,21
16.	hsa-miR-877-3p	MIMAT0004950	1,81	2,2
17.	hsa-miR-4722-3p	MIMAT0019837	1,71	2,17
18.	hsa-miR-4685-3p	MIMAT0019772	2,17	2,86
19.	hsa-miR-4728-3p	MIMAT0019850	2,00	2,15
20.	hsa-miR-1322	MIMAT0005953	2,15	1,82
21.	hsa-miR-483-3p	MIMAT0002173	2,10	2,14
22.	hsa-miR-328	MIMAT0000752	1,82	2,1
23.	hsa-miR-1233-3p	MIMAT0005588	1,99	2,1

24.	hsa-miR-4651	MIMAT0019715	1,74	2,06
25.	hsa-miR-1183	MIMAT0005828	1,69	2,03
26.	hsa-miR-1976	MIMAT0009451	2,03	2,74
27.	hsa-miR-675-3p	MIMAT0006790	2,03	1,74
28.	hsa-miR-4455	MIMAT0018977	2,02	1,67
29.	hsa-let-7a	MIMAT0000062	1,91	2,03
30.	hsa-miR-3940-5p	MIMAT0019229	1,42	1,96
31.	hsa-miR-296-3p	MIMAT0004679	1,93	2,01
32.	hsa-miR-196b	MIMAT0004929	1,75	1,93
33.	hsa-miR-1260	MIMAT0005911	1,92	2,95
34.	hsa-miR-1281	MIMAT0005939	1,89	1,62
35.	hsa-miR-1273f	MIMAT0020601	1,96	1,30
36.	hsa-miR-1268	MIMAT0005922	1,87	1,37
37.	hsa-miR-766-3p	MIMAT0003888	1,85	2,04
38.	hsa-miR-1224-3p	MIMAT0005459	1,86	1,98
39.	hsa-miR-634	MIMAT0003304	1,74	1,84
40.	hsa-miR-3198	MIMAT0015083	1,92	1,32
41.	hsa-miR-4763-5p	MIMAT0019912	1,84	2,27
42.	hsa-miR-4685-5p	MIMAT0019771	1,63	1,84
43.	hsa-miR-1207-5p	MIMAT0005871	1,78	1,60
44.	hsa-miR-4507	MIMAT0019044	1,83	1,37
45.	hsa-miR-1234-3p	MIMAT0005589	1,75	1,37
46.	hsa-miR-1260b	MIMAT0015041	1,58	1,79
47.	hsa-miR-1273a	MIMAT0005926	1,50	1,79
48.	hsa-miR-3149	MIMAT0015022	1,75	1,99
49.	hsa-miR-3135b	MIMAT0018985	1,83	2,13
50.	hsa-miR-1321	MIMAT0005952	1,51	1,83
51.	hsa-miR-3960	MIMAT0019337	1,58	1,77
52.	hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	1,75	2,23
53.	hsa-miR-27b-5p	MIMAT0004588	1,69	1,98
54.	hsa-miR-4769-3p	MIMAT0019923	1,74	1,36
55.	hsa-miR-2392	MIMAT0019043	1,70	1,38
56.	hsa-miR-4498	MIMAT0019033	1,70	1,97
57.	hsa-miR-1225-3p	MIMAT0005573	1,69	1,46
58.	hsa-miR-4481	MIMAT0019015	1,79	2,04
59.	hsa-miR-125b-1	MIMAT0000423	1,7	2,14
60.	hsa-miR-4433-3p	MIMAT0018949	1,74	1,42
61.	hsa-miR-1229-3p	MIMAT0005584	1,69	1,89
62.	hsa-miR-1243	MIMAT0005894	1,64	1,72
63.	hsa-miR-1587	MIMAT0019077	1,68	1,29
64.	hsa-miR-3656	MIMAT0018076	1,72	1,50
65.	hsa-miR-4710	MIMAT0019815	1,68	1,30
66.	hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	1,61	1,87
67.	hsa-miR-4656	MIMAT0019723	1,68	1,33
68.	hsa-miR-205-3p	MIMAT0009197	1,67	1,86
69.	hsa-miR-4502	MIMAT0019038	1,64	1,88
70.	hsa-miR-3127-5p	MIMAT0014990	1,63	1,76

71.	hsa-miR-4728-5p	MIMAT0019849	1,63	1,65
72.	hsa-miR-1228-5p	MIMAT0005582	1,62	1,63
73.	hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	1,63	3,20
74.	hsa-miR-2278	MIMAT0011778	1,59	1,88
75.	hsa-miR-3620-3p	MIMAT0018001	1,49	1,41
76.	hsa-miR-4713-5p	MIMAT0019820	1,61	1,47
77.	hsa-miR-4649-5p	MIMAT0019711	1,61	1,31
78.	hsa-miR-4758-5p	MIMAT0019903	1,61	1,29
79.	hsa-miR-3622a-3p	MIMAT0018004	1,64	1,46
80.	hsa-miR-4763-3p	MIMAT0019913	1,58	1,82
81.	hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	1,58	1,76
82.	hsa-miR-620	MIMAT0003289	1,53	1,69
83.	hsa-miR-4769-5p	MIMAT0019922	1,61	1,33
84.	hsa-miR-3147	MIMAT0015019	1,57	1,37
85.	hsa-miR-1182	MIMAT0005827	1,50	1,69
86.	hsa-miR-1228-3p	MIMAT0005583	1,52	1,64
87.	hsa-miR-449b-3p	MIMAT0009203	1,54	1,43
88.	hsa-miR-4419b	MIMAT0019034	1,52	1,42
89.	hsa-miR-3692-5p	MIMAT0018121	1,56	1,66
90.	hsa-miR-4787-5p	MIMAT0019956	1,61	1,47
91.	hsa-miR-3646	MIMAT0018065	1,53	1,72
92.	hsa-miR-3162-3p	MIMAT0019213	1,54	1,39
93.	hsa-miR-4717-3p	MIMAT0019830	1,54	1,66
94.	hsa-miR-4430	MIMAT0018945	1,54	1,72
95.	hsa-miR-2467-3p	MIMAT0019953	1,52	1,69
96.	hsa-miR-1181	MIMAT0005826	1,53	1,94
97.	hsa-miR-1972	MIMAT0009447	1,52	1,62
98.	hsa-miR-4463	MIMAT0018987	1,52	1,73
99.	hsa-miR-4472	MIMAT0018999	1,50	1,83
100.	hsa-miR-3196	MIMAT0015080	1,5	1,79
101.	hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	1,53	1,42
102.	hsa-miR-4750-5p	MIMAT0019887	1,5	1,69
103.	hsa-miR-4667-3p	MIMAT0019744	1,51	1,64
104.	hsa-miR-3940-3p	MIMAT0018356	1,47	1,58
105.	hsa-miR-4800-5p	MIMAT0019978	1,49	1,66
106.	hsa-miR-3944-3p	MIMAT0018360	1,48	1,57
107.	hsa-miR-147	MIMAT0000251	1,48	1,55
108.	hsa-miR-605	MIMAT0003273	-1,31	-1,64
109.	hsa-miR-562	MIMAT0003226	-1,31	-1,71
110.	hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	-1,34	-1,69
111.	hsa-miR-519e-5p	MIMAT0002828	-1,34	-1,89
112.	hsa-let-7f-1-3p	MIMAT0004486	-1,35	-1,79
113.	hsa-miR-567	MIMAT0003231	-1,37	-1,66
114.	hsa-miR-215	MIMAT0000272	-1,38	-1,49
115.	hsa-miR-548b-5p	MIMAT0004798	-1,27	-1,41
116.	hsa-miR-4417	MIMAT0018929	-1,13	-1,43
117.	hsa-miR-3613-5p	MIMAT0017990	-1,34	-1,51
118.	hsa-miR-4774-3p	MIMAT0019930	-1,55	-1,75

119.	hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	1,50	1,33
120.	hsa-miR-382-5p	MIMAT0000737	1,40	1,67
121.	hsa-miR-762	MIMAT0010313	1,43	1,65
122.	hsa-miR-3605-5p	MIMAT0017981	1,44	1,87
123.	hsa-miR-4440	MIMAT0018958	1,37	1,78
124.	hsa-miR-3665	MIMAT0018087	1,42	1,89
125.	hsa-miR-4764-5p	MIMAT0019914	1,44	1,76
126.	hsa-miR-3689b-5p	MIMAT0018180	1,42	1,99
127.	hsa-miR-3691-5p	MIMAT0018120	1,40	1,56
128.	hsa-miR-3148	MIMAT0015021	1,36	1,77
129.	hsa-miR-4459	MIMAT0018981	1,37	1,56
130.	hsa-miR-4706	MIMAT0019806	1,37	1,89
131.	hsa-miR-4644	MIMAT0019704	1,35	1,66
132.	hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	1,37	1,34
133.	hsa-miR-3194-5p	MIMAT0015078	1,35	1,63
134.	hsa-miR-4640-5p	MIMAT0019699	1,37	1,58
135.	hsa-miR-4632-3p	MIMAT0019688	1,36	1,46
136.	hsa-miR-4505	MIMAT0019041	1,35	1,89
137.	hsa-miR-4687-3p	MIMAT0019775	1,35	1,49
138.	hsa-miR-4510	MIMAT0019047	1,36	1,58
139.	hsa-miR-4279	MIMAT0016909	1,35	1,44
140.	hsa-miR-765	MIMAT0003945	1,35	1,27
141.	hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	1,41	1,29
142.	hsa-miR-4534	MIMAT0019073	1,34	1,30
143.	hsa-miR-3613-3p	MIMAT0017991	1,36	1,49
144.	hsa-miR-4793-3p	MIMAT0019966	1,36	1,67
145.	hsa-miR-3662	MIMAT0018083	1,36	1,46
146.	hsa-miR-921	MIMAT0004971	1,34	1,58
147.	hsa-miR-1299	MIMAT0005887	1,33	1,88
148.	hsa-miR-616-3p	MIMAT0004805	1,33	1,43
149.	hsa-miR-548m	MIMAT0005917	1,32	1,67
150.	hsa-miR-525-3p	MIMAT0002839	-1,31	-1,99
151.	hsa-miR-331-5p	MIMAT0004700	-1,31	-2,2
152.	hsa-miR-4669	MIMAT0019749	1,41	1,34
153.	hsa-miR-4739	MIMAT0019868	1,45	1,40
154.	hsa-miR-1226-3p	MIMAT0005577	1,48	1,68
155.	hsa-miR-3141	MIMAT0015010	1,41	1,39
156.	hsa-miR-1306-3p	MIMAT0005950	1,62	1,97
157.	hsa-miR-1250-5p	MIMAT0005902	1,50	1,86
158.	hsa-miR-1224-5p	MIMAT0005458	1,50	1,69
159.	hsa-miR-4462	MIMAT0018986	1,46	1,87
160.	hsa-miR-3972	MIMAT0019357	1,47	1,77

Tabela 24: Lista ludzkich miRNA różnicujących wykazujących największe różnice w ekspresji pod wpływem homocysteiny w komórkach HUVEC. Na czerwono zaznaczono miRNA, których profil ekspresji pod wpływem homocysteiny potwierdzono za pomocą real-time PCR.

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych na postawie mikromacierzy, dla wybranych miRNA (zaznaczonych na czerwono w tabelach 23 i 24) przeprowadzono reakcję real-time PCR. Wyboru miRNA dokonano na podstawie analizy potencjalnych miejsc wiązania miRNA do regionu 3' UTR genów człowieka, których zmienioną ekspresję pod wpływem Hcy, HTL oraz N-Hcy-FBS wykazano na podstawie eksperymentów mikromacierzowych (tabela 25). Do dalszej analizy profilu ekspresji miRNA za pomocą real-time PCR wybrano te miRNA, których potencjalne docelowe miejsca oddziaływania znajdowały się w rejonie 3'UTR genów, których zmienioną ekspresję pod wpływem Hcy i jej metabolitów wykazano za pomocą mikromacierzy a następnie potwierdzono stosując technikę real-time PCR. Analizę bioinformatyczną przeprowadzono przy pomocy darmowych programów dostępnych w internecie: TargetScan (www.targetscan.org) oraz miRDB (www.miRDB.org).

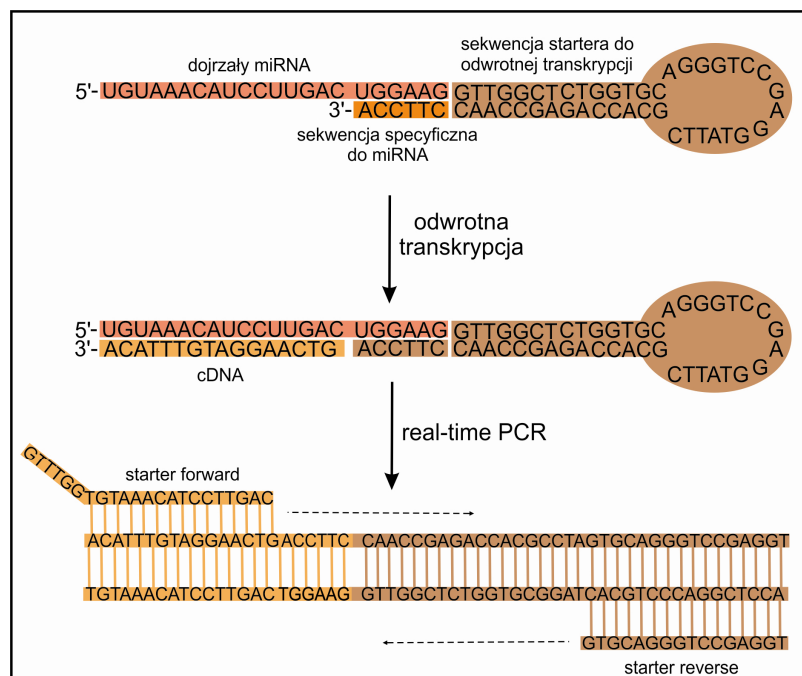
miRNA	gen docelowy	liczba potencjalnych miejsc wiązania w regionie 3'UTR	lokalizacja potencjalnego miejsca oddziaływania miRNA
hsa-miR-1	<i>VEGFA</i>	1	1510 - 1516 nt 3'UTR
hsa-miR-196b	<i>MARCH1</i>	1	3741 - 3748 nt 3'UTR
hsa-miR-1321	<i>PAPPA</i>	1	3336 - 3342 nt 3'UTR
	<i>MARCH1</i>	1	73 - 79 nt 3'UTR
	<i>MMP19</i>	1	833 - 839 nt 3'UTR
hsa-miR-4728-5p	<i>ST8SIA2</i>	1	626 - 693 nt 3'UTR
	<i>APOA5</i>	2	3933 - 3939nt; 4085 - 4091 nt 3'UTR
	<i>HPSE2</i>	1	1236 - 1242 nt 3'UTR
hsa-miR-4758-5p	<i>MTR</i>	1	821 - 827 nt 3'UTR
hsa-miR-331-5p/3p	<i>MARCH1</i>	1	1214-1221 nt 3'UTR
hsa-miR-125b1	<i>VEGFA</i>	1	25 - 31nt 3'UTR
hsa-miR-34a	<i>NTN4</i>	1	606 - 613 nt 3'UTR
	<i>VEGFA</i>	1	2899 - 2906 nt 3'UTR

Tabela 25: Potencjalne miejsca wiązania wybranych ludzkich miRNA w regionie 3'UTR mRNA genów docelowych na podstawie analizy TargetScan i miRDB.

4.4.2. Analiza zmian poziomu ludzkich miRNA za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym

Analiza ekspresji miRNA za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym jest dość trudna, ze względu na długość miRNA (~22 nt), niewielkie, czasem jednonukleotydowe, różnice w sekwencji dojrzałych miRNA pomiędzy przedstawicielami tej samej rodziny, a także ze względu na obecność sekwencji dojrzałego miRNA w pierwotnym transkrypcjach (pri-miRNA) i w prekursorach (pre-miRNA) [117]. Aby jak najbardziej zwiększyć specyficzność analizy zmian poziomu ludzkich miRNA pod wpływem Hcy i jej metabolitów, a także maksymalnie zmniejszyć ryzyko uzyskania fałszywych wyników, do odwrotnej transkrypcji miRNA zastosowano startery, które na końcu 5' posiadały kilkunukleotydową pętlę, natomiast sześć nukleotydów z końca 3' startera było komplementarnych do sekwencji końca 5' miRNA (rysunek 23) [118].

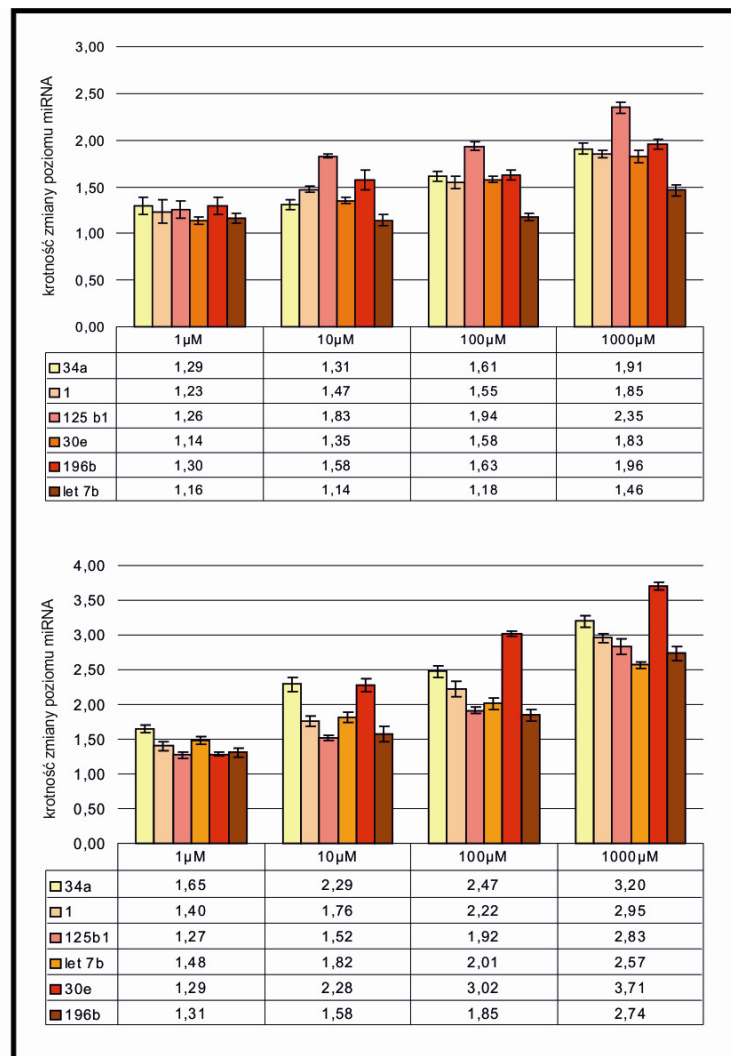
Uzyskane w ten sposób cDNA, stosowano jako matrycę do qPCR. Dalsze etapy reakcji wykonano tak samo jak w przypadku analizy zmian poziomu mRNA dla genów różnicujących z mikromacierzy genomowych.



Rysunek 23: Schemat analizy poziomu miRNA za pomocą real-time PCR z zastosowaniem startera typu trzonek-pętla (ang. stem loop).

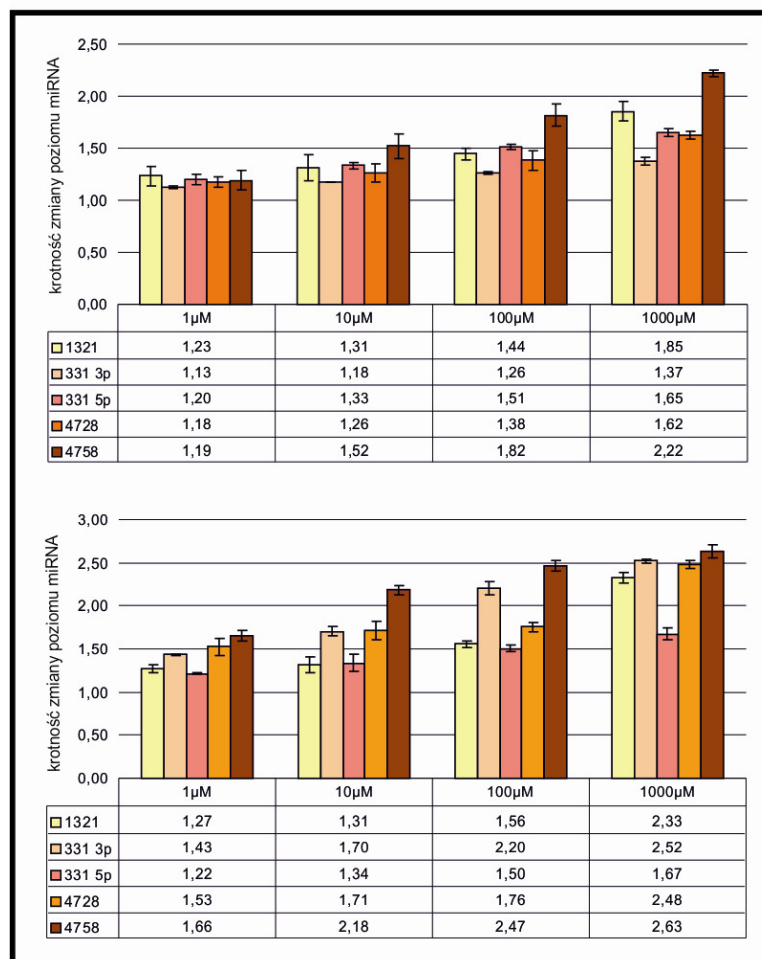
Analizę ilościową qPCR dziesięciu wybranych miRNA przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej, tak jak poprzednio (rozdział 4.3.2). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że homocysteina i tiolakton homocysteiny powodują istotną statystycznie ($P < 0,05$) zmianę ekspresji genów kodujących miRNA, natomiast N-homocysteinyłowane białka tylko w niewielkim stopniu wpływają na zmiany w profilu ludzkich miRNA ($P < 0,05$).

Gen kodujący miR-34a charakteryzował prawie dwukrotny wzrost ekspresji po inkubacji z Hcy w najwyższym stężeniu ($1,91 \pm 0,06$) natomiast inkubacja z $1000 \mu\text{M}$ HTL spowodowała ponad trzykrotny wzrost ekspresji tego genu ($3,2 \pm 0,09$). Ekspresja genu kodującego miR-1 wzrosła niemal dwukrotnie pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ Hcy



Rysunek 24: Zmiany w profilu ekspresji miR-34a, miR-1, miR-125 b1, miR-30e, miR-196b, miR-let7b pod wpływem homocysteiny (górny wykres) i tiolaktonu homocysteiny (dolny wykres) w komórkach HUVEC; $P < 0,05$.

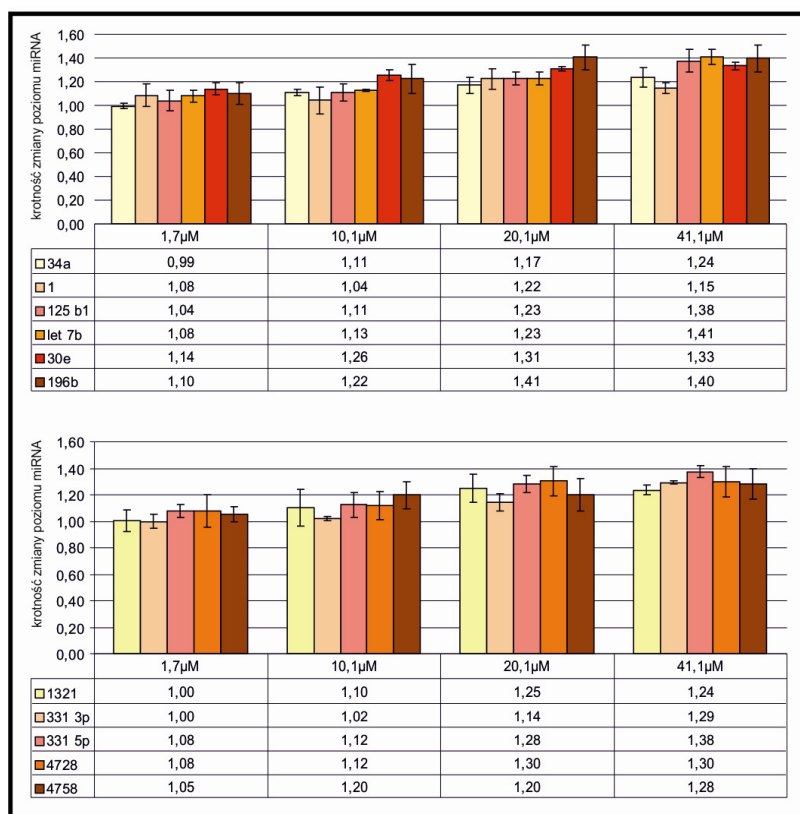
($1,85 \pm 0,04$), natomiast $1000 \mu\text{M}$ HTL spowodował niemal trzykrotny wzrost poziomu ekspresji ($2,95 \pm 0,06$). Ekspresja genu miR-125b1 uległa zwiększeniu o ponad dwa razy zarówno pod wpływem Hcy ($2,35 \pm 0,06$) jak i HTL ($2,83 \pm 0,11$), stosowanymi w stężeniu $1000 \mu\text{M}$, w porównaniu do kontroli. Homocysteina w najwyższym stężeniu wpłynęła także na znaczne podwyższenie poziomu ekspresji genu kodującego miR-30e o $1,83 \pm 0,07$ razy, natomiast HTL w tym samym stężeniu spowodował podwyższenie poziomu tego miRNA o $3,71 \pm 0,05$ w stosunku do kontroli. Na podstawie wykonanych eksperymentów zaobserwowano ponad 40% wzrost poziomu miR-let 7b pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ Hcy ($1,46 \pm 0,06$), podczas gdy tiolakton homocysteiny w tym samym stężeniu ponad dwukrotny wzrost poziomu tego miRNA ($2,57 \pm 0,04$) w porównaniu do kontroli. Po 24h inkubacji z Hcy wykazano prawie dwukrotny wzrost poziomu



Rysunek 25: Zmiany w profilu ekspresji miR-1321, miR-331 5p, miR-331 3p, miR-4728, miR-4758 pod wpływem homocysteiny (górny wykres) oraz tiolaktanu homocysteiny (dolny wykres) w komórkach HUVEC; $P < 0,05$.

miR-196b ($1,96 \pm 0,05$ przy najwyższym stężeniu Hcy), natomiast inkubacja z tiolaktonem homocysteiny spowodowała wzrost poziomu miR-196b o prawie 3 razy ($2,74 \pm 0,1$ przy najwyższym stężeniu HTL). Poziom miR-331 ulegał podwyższeniu pod wpływem Hcy i HTL, natomiast poziom nici miR-331 3p jest znacznie bardziej podwyższony w badanych warunkach eksperymentalnych ($1,37 \pm 0,03$ pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ Hcy oraz $2,52 \pm 0,02$ pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ HTL) niż nici 5p ($1,65 \pm 0,04$ pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ Hcy oraz $1,67 \pm 0,07$ pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ HTL), co może sugerować, że ta właśnie nić była wybierana jako nić wiodąca przez kompleks miRISC (rysunek 6). Poziom miR-1321 również wzrastał w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i HTL. Zaobserwowano prawie dwukrotny wzrost poziomu tego miRNA po inkubacji z $1000 \mu\text{M}$ Hcy ($1,85 \pm 0,1$) oraz wzrost o $2,33 \pm 0,07$ razy pod wpływem $1000 \mu\text{M}$ HTL w porównaniu do kontroli. Przeanalizowano również wpływ homocysteiny i HTL na poziom miR-4728. Wykazano istotny wzrost poziomu tego miRNA po 24 h inkubacji z Hcy oraz HTL, który wynosił odpowiednio $1,62 \pm 0,04$ oraz $2,48 \pm 0,05$ dla najwyższego stosowanego stężenia. Odnotowano również znaczący wzrost poziomu miR 4758 pod wpływem Hcy i HTL. Najwyższe stosowane w eksperymencie stężenia tych związków spowodowały ponad dwukrotny wzrost poziomu tego miRNA ($2,22 \pm 0,03$ oraz $2,63 \pm 0,07$) w porównaniu do kontroli (rysunek 22). Wyniki przeprowadzonych analiz profilu ekspresji miRNA w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny za pomocą techniki real-time PCR potwierdzają wcześniejsze wyniki eksperymentów mikromacierzowych przeprowadzonych dla ludzkich miRNA.

Analiza real-time PCR profilu wybranych miRNA wykazała, że N-homocysteinyłowane białka mają niewielki wpływ na zmiany profilu miRNA w komórkach HUVEC. Dodatek N-Hcy-FBS do pożywki hodowlanej spowodował wzrost poziomu wybranych miRNA jedynie o 15 - 40%, co potwierdza wyniki uzyskane na podstawie mikromacierzy dla ludzkich miRNA (rysunek 26) w komórkach HUVEC.



Rysunek 26: Zmiany w profilu ludzkich miRNA pod wpływem N-homocysteinylowanych białek w komórkach HUVEC; (A) miR-1, miR-30e, miR-34a, miR-125 b1, miR-let 7b, miR-196b; (B) miR-1321, miR-331 3p, miR-331 5p, miR-4727, miR-4758; $P < 0,05$.

4.5. Wpływ N-homocysteinyłacji białek histonowych na epigenetyczną regulację ekspresji genów człowieka

4.5.1. Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych *in vitro*

Histony są białkami zasadowymi, które w swojej sekwencji aminokwasowej zawierają dużo reszt Lys, potencjalnych miejsc oddziaływania tiolaknotu homocysteiny. Aby określić miejsca N-homocysteinyłacji białek histonowych, ludzkie rekombinowane histony zmodyfikowano 5 i 10 mM HTL, a następnie poddano analizie za pomocą spektrometrii mas. Wyniki wykonanych analiz MALDI ToF/ToF umożliwiły określenie miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych. Do analizy wim fragmentacyjnych używano programu FindMod (www.expasy.ch/tools/findmod), który umożliwia poszukiwanie miejsc modyfikacji potranslacyjnych. Masa peptydu zawierającego

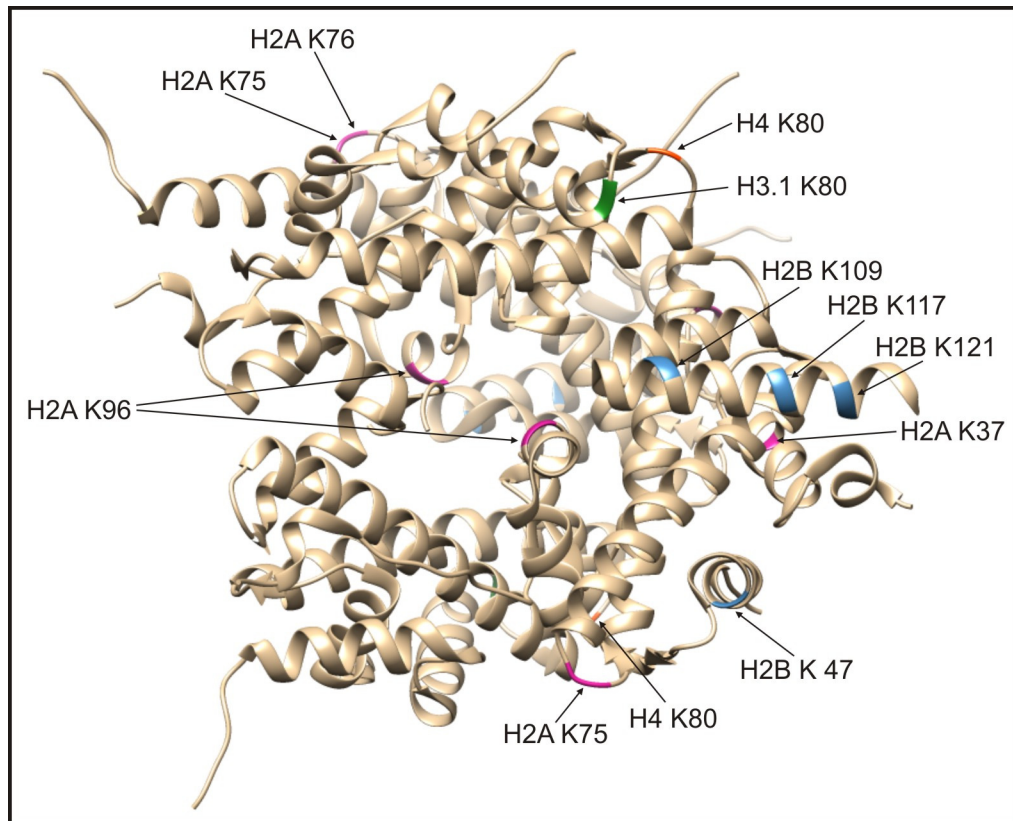
przyłączoną resztę Hcy jest większa o 174 Da względem peptydu niezmodyfikowanego. W przypadku gdy przyłączonych jest więcej reszt Hcy masa analizowanego peptydu wzrasta o $n * 174$ Da. W ten sposób zidentyfikowano sześć miejsc modyfikacji dla histonu H1, pięć miejsc modyfikacji dla histonu H2A, cztery miejsca modyfikacji dla histonu H2B, dwa miejsca modyfikacji dla histonu H3.1 oraz trzy miejsca modyfikacji dla histonu H4 (tabela 26). Wszystkie miejsca zidentyfikowane miejsca N-homocysteinytacji są zlokalizowane na zewnątrz struktury białowej (rysunek 28). Widma fragmentacyjne zostały wykonane w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki we współpracy z dr Łukaszem Marczakiem.

nazwa histonu	numer w bazie danych Genebank	miejsce modyfikacji
H1	P07305	Lys 59, Lys 69, Lys 82, Lys Lys 85, Lys 97, Lys 103
H2A	AAN59960	Lys 6, Lys 37, Lys 75, Lys 76, Lys 96
H2B	AAN59961	Lys 47, Lys 109, Lys 117, Lys 121
H3.1	AAN10051	Lys 24, Lys 80
H4	AAM83108	Lys 6, Lys 13, Lys 80

Tabela 26: Miejsca N-homocysteinytacji białek histonowych *in vitro* określone za pomocą spektrometru MALDI-ToF/ToF.

<p>Histon H1 TENST SAPAA KPKRA KASKK STDHP KYSDM IVAAI QAEKN RAGSS RQSIQ KYIKS HYKVG ENADS QIKLS IKRLV TTGVL KQTKG VGASG SFRLA KSDEP KKSVA FKTK KEIKK VATPK KASKP KKAAS KAPTK KPKAT PVKKA KKKLA ATPKK AKPK TVKAK PVKAS KPKKA KPVKP KAKSS AKRAG KKK</p> <p>Histon H2A SGRGK QGGKA RAKAK SRSSR AGLQF PVGRV HRLLR KGNYS ERVGA GAPVY LAAVL EYLTA EILEL AGNAA RDNKK TRIIP RHLQL AIRND EELNK LLGRV TIAQG GVLPN IQAVL LPKKT ESHHK AKGK</p> <p>Histon H2B PEPAK SAPAP KKGSK KAVTK AQKKD GKRRK RSRKE SYSIY VYKVL KQVHP DTGIS SKAMG IMNSF VNDIF ERIAG EASRL AHYNK RSTIT SREIQ TAVRL LLPGE LAKHA VSEGT KAVTK YTSSK</p> <p>Histon H3.1 ARTKQ TARKS TGGKA PRKQL ATKAA RKSAP ATGGV KKPHR YRPGT VALRE IRRYQ KSTEL LIRKL PFQRL VREIA QDFKT DLRFQ SSAVM ALQEA CEAYL VGLFE DTNLC AIHAK RVTIM PKDIQ LARRI RGERA</p> <p>Histon H4 SGRGK GKGGL GKGGGA KRHRK VLRDN IQGIT KPAIR RLARR GGVKR ISGLI YEETR GVLKV FLENV IRDAV TYTEH AKRKT VTAMD VVYAL KRQGR TLYGF GG</p>

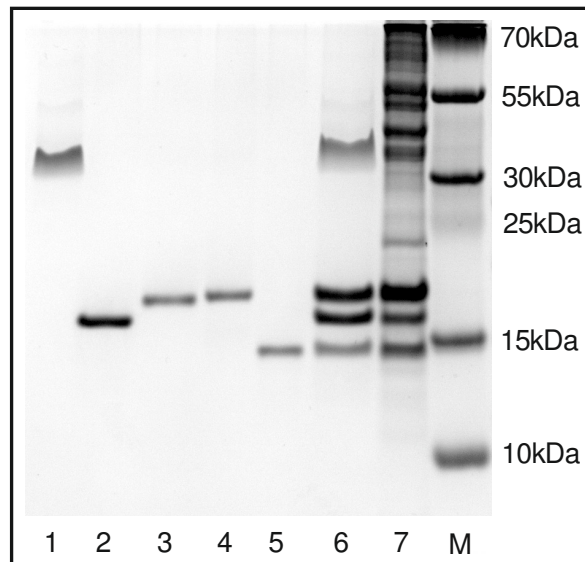
Rysunek 27: Sekwencja aminokwasowa białek histonowych. Na czerwono zaznaczono reszty lizyny ulegające N-homocysteinytacji *in vitro*.



Rysunek 28: Struktura ludzkich histonów rdzeniowych narysowana wg 3AFA.pdb [119] z zaznaczonymi miejscami N-homocysteinyłacji. Kolorem różowym zaznaczono miejsca modyfikacji histonu H2A, kolorem niebieskim zaznaczono miejsca modyfikacji histonu H2B, kolorem zielonym zaznaczono miejsca modyfikacji histonu H3.1, kolorem pomarańczowym zaznaczono miejsca modyfikacji histonu H4. Dostępna w bazie danych PDB struktura nie zawiera Lys6 histonu H2A, Lys24 histonu H3.1 oraz Lys6 i Lys13 histonu H4.

4.5.2. N-homocysteinyłacja białek histonowych w komórkach HUVEC

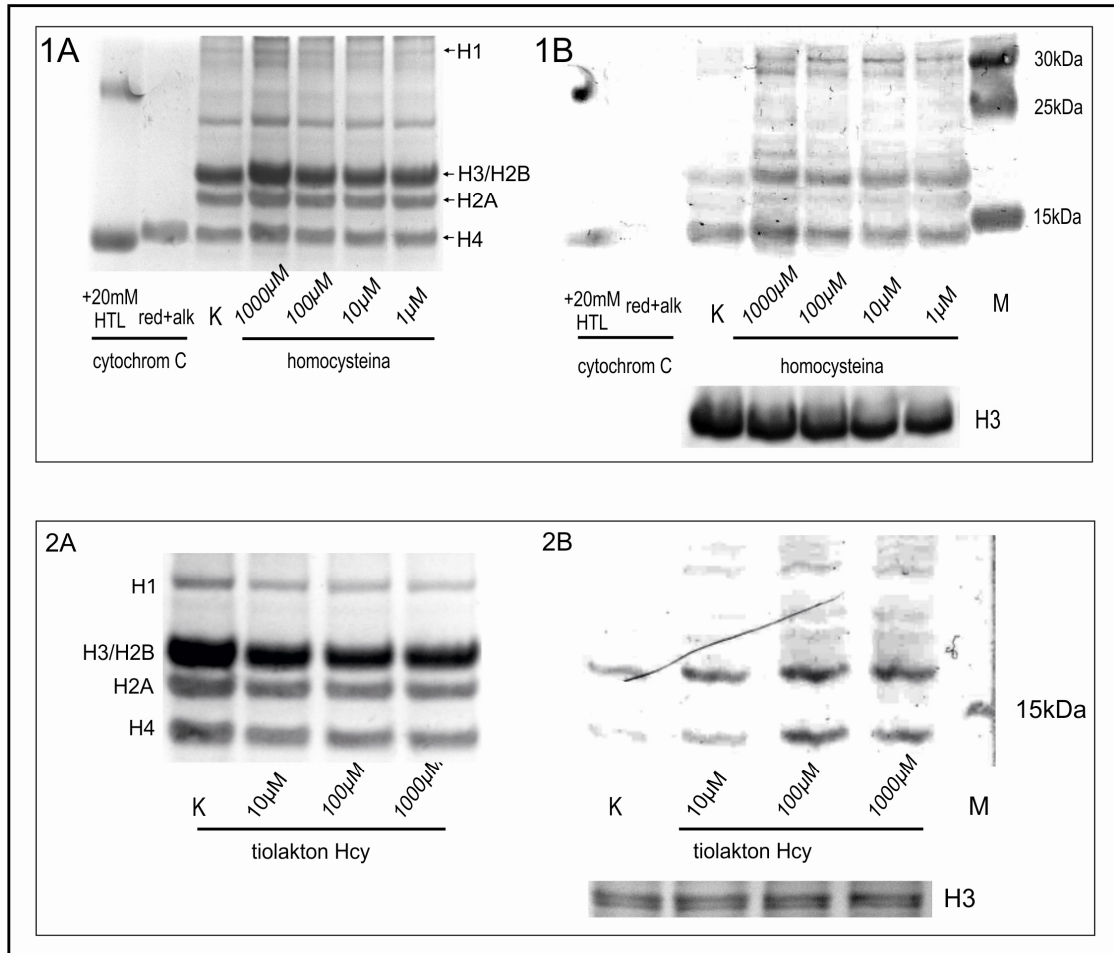
W celu weryfikacji hipotezy czy homocysteina poprzez mechanizm N-homocysteinyłacji może wpływać na epigenetyczną regulację ekspresji genów człowieka, postanowiono zbadać czy białka histonowe również ulegają N-homocysteinyłacji *ex vivo*. Po 24h inkubacji komórek HUVEC z homocysteiną i tiolaktonem homocysteiny (1 - 1000 μ M) wyizolowano frakcję białek jądrowych wzbogaconych o pulę białek histonowych. Jakość otrzymanych preparatów sprawdzano podczas rozdziału elektroforetycznego w 15% żelu poliakrylamidowym białkowym (rysunek 28).



Rysunek 28: Rozdział elektroforetyczny białek histonowych w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS. 1 - ludzki rekombinowany histon H1, 2 - ludzki rekombinowany histon H2A, 3 - ludzki rekombinowany histon H2B, 4 - ludzki rekombinowany histon H3, 5 - ludzki rekombinowany histon H4, 6 - ludzkie rekombinowane histony, 7 - ekstrakt jądrowy wyizolowany z komórek HUVEC wzbogacony o frakcję białek histonowych, M - marker wielkości.

Następnie wykonano Western blot z przeciwciałami króliczymi specyficznie rozpoznającymi epitop –N-Hcy-Lys w białku. Jako przeciwciało referencyjne zastosowano przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko histonowi H3. Specyficzność przeciwciał przeciwko N-Hcy-białkom potwierdzono, poprzez specyficzne rozpoznanie cytochromu c zmodyfikowanego *in vitro* 20 mM HTL, oraz brak rozpoznania tego białka po redukcji mostków dwusiarczkowych 10 mM DTT a następnie alkilacji wolnych grup tiolowych 40 mM jodoacetamidem (rysunek 29 1A i 1B). Wyniki wykonanych eksperymentów sugerują, że białka histonowe ulegają N-homocysteinyłacji w komórkach HUVEC, a reakcja ta zachodzi z wydajnością wprost proporcjonalną do stężenia Hcy i HTL. Jednak aby potwierdzić tę hipotezę należałoby wykonać analizę ilościową miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych *ex vivo* w zależności od stężenia czynnika modyfikującego. Widoczny sygnał dla ścieżki kontrolnej najprawdopodobniej pochodzi również od N-homocysteinyłacji białek histonowych, która mogła zajść pod wpływem metioniny obecnej w medium hodowlanym, która podczas inkubacji została przekształcona do homocysteiny i następnie do tiolaktonu homocysteiny. Ponadto histony H3 i H4 preferencyjnie ulegają w komórkach N-homocysteinyłacji, z czym związany jest większy stopień ich modyfikacji. Także histon łącznikowy H1 jest mniej podatny na tę modyfikację. Ulega

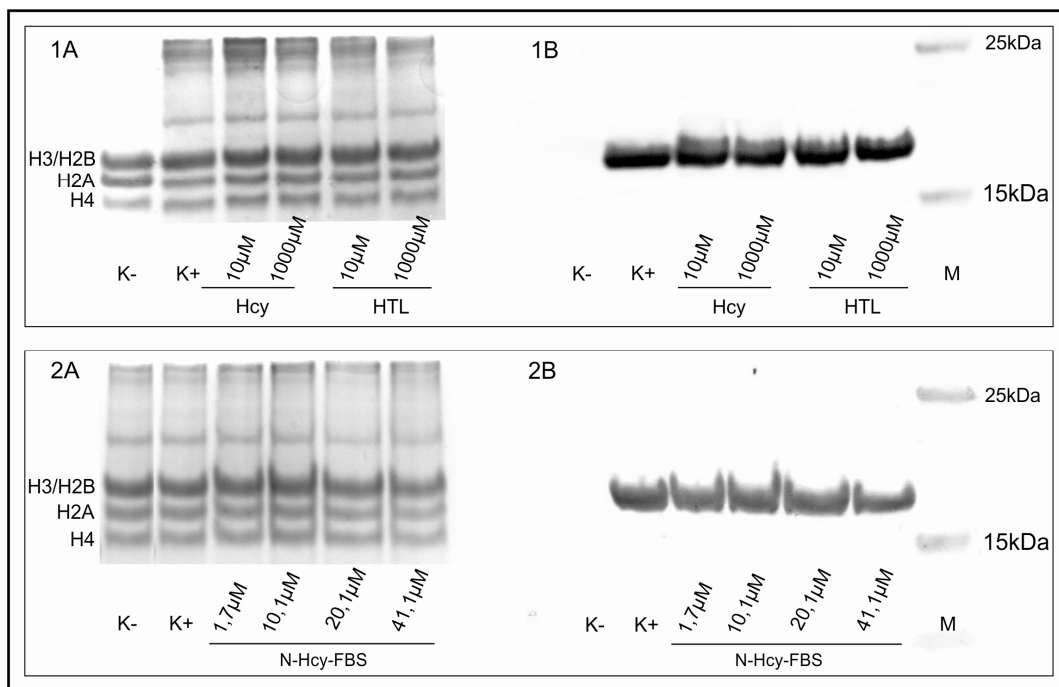
jej w niewielkim stopniu jedynie przy wysokich stężeniach Hcy i HTL (100 i 1000 μM) (rysunek 29). Może być to spowodowane większą dostępnością reszt lizynowych histonów H3 i H4 dla tiolaktonu homocysteiny w komórce.



Rysunek 29: N-homocysteinyłacja białek histonowych *ex vivo*. 1A - rozdzielanie elektroforetyczne białek histonowych wyizolowanych z komórek HUVEC po 24h inkubacji z homocysteiną (1 – 1000 μM) w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS wybarwionym Coomassie Silver Blue; 1B - obraz membrany nitrocelulozowej po reakcji Western blot z użyciem przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanemu białkom; 2A - rozdzielanie elektroforetyczne białek histonowych wyizolowanych z komórek HUVEC po 24h inkubacji z HTL (10 – 1000 μM) w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS wybarwionym Coomassie Silver Blue; 2B - obraz membrany nitrocelulozowej po reakcji Western blot z zastosowaniem przeciwciał przeciwko N-homocysteinyłowanemu białkom; K – białka histonowe wyizolowane z komórek HUVEC inkubowanych bez dodatku Hcy i HTL do pożywki hodowlanej.

4.5.3. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na poziom acetylacji białek histonowych

Ponieważ acetylazy histonów, tak samo jak tiolakton homocysteiny rozpoznają specyficznie ϵ -aminowe grupę reszty Lys w sekwencji aminokwasowej, postanowiono sprawdzić czy N-homocysteinyłacja białek histonowych może wpływać na ich stopień acetylacji. W tym celu wykonano western blot z przeciwciałem poliklonalnym skierowanym przeciwko monoacetylacji lizyny 9 na histonie H3. Kontrolę specyficzności przeciwciał stanowiły ludzkie rekombinowane białka histonowe. Ponieważ zostały one wyprodukowane w systemie bakteryjnym, nie posiadają modyfikacji potranslacyjnych. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów nie zaobserwowano zmiany poziomu acetylacji Lys9 histonu H3 w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny jak i HTL. Natomiast zaobserwowano obniżenie poziomu acetylacji Lys9 histonu H3 pod wpływem N-Hcy-białek surowicy (rysunek 30).



Rysunek 30: Poziom acetylacji lizyny 9 histonu H3 w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy, HTL, oraz N-Hcy białek. 1A – rozdział elektroforetyczny białek histonowych wyizolowanych z komórek HUVEC po inkubacji z homocysteiną i HTL w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS wybarwionym Coomassie Silver Blue; 1B – poziom acetylacji H3K9 w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i HTL (obraz membrany nitrocelulozowej po Western blot), 2A – rozdział elektroforetyczny białek histonowych wyizolowanych z komórek HUVEC po inkubacji z N-homocysteinyłowanymi białkami surowicy bydlęcej w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS wybarwionym Coomassie Silver Blue; 2B - poziom acetylacji H3K9 pod wpływem N-Hcy-białek surowicy (obraz membrany nitrocelulozowej po Western blot); K+ - białka histonowe wyizolowane z komórek HUVEC inkubowanych bez dodatku HTL i N-Hcy-białek surowicy bydlęcej do pożywki hodowlanej, K- - ludzkie rekombinowane białka histonowe.

5. Dyskusja

Podwyższony poziom homocysteiny w organizmach żywych pociąga za sobą wiele negatywnych konsekwencji. Hiperhomocysteinemia jest uważana za czynnik ryzyka rozwoju chorób układu krążenia czy chorób neurodegeneracyjnych. Jedną z hipotez toksyczności homocysteiny związana jest z jej konwersją do cyklicznego tioestru – tiolaktonu homocysteiny [51]. Tiolakton homocysteiny zdolny jest do modyfikacji białek na drodze N-homocysteinyłacji. N-homocysteinyłowane białka zdolne są do wywołania odpowiedzi autoimmunologicznej, stresu siateczki śródplazmatycznej czy dysfunkcji komórek śródbłonna. Jednak aby poznać odpowiedź ludzkiego organizmu na podwyższony poziom homocysteiny we krwi, należy zbadać mechanizmy molekularne leżące u podstaw obserwowanych procesów. Dlatego celem niniejszej pracy była globalna analiza ludzkiego transkryptomu pod wpływem homocysteiny oraz jej metabolitów, a także poznanie mechanizmów regulujących tę odpowiedź za pomocą miRNA czy modyfikacji epigenetycznych.

5.1. Analiza ekspresji genów człowieka pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów

Stężenia badanych związków oraz czas trwania eksperymentu, były tak dobrane, aby w warunkach *ex vivo* stworzyć model odpowiadający hiperhomocysteinemii występującej *in vivo*. Tiolakton homocysteiny jest stabilny w warunkach fizjologicznych pH i temperatury (okres półrozpadu wynosi 25 h). Jednak w pożywce hodowlanej jego okres półrozpadu ulega znacznemu skróceniu do 3,5 h [47]. Oznacza to, że po dwunastogodzinnej inkubacji, w medium hodowlanym pozostaje mniej niż 10% początkowego stężenia HTL. Nie wiadomo jednak, czy zmiany indukowane tiolaktonem homocysteiny w komórkach HUVEC są na tyle trwałe, aby po 24 h inkubacji uzyskać wiarygodne wyniki. W tym celu przeprowadzono porównawczy eksperyment mikromacierzowy, który polegał na porównaniu profilu ekspresji genów w komórkach HUVEC po 12 i po 24 godzinach inkubacji. Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz porównawczych nie zidentyfikowano genów różnicujących

w tych warunkach eksperymentalnych (Adj. P value < 0,05); dlatego też można sądzić, że 24-godzinna inkubacja z HTL w różnych stężeniach nie miała wpływu na uzyskane wyniki. Wysokie stężenia Hcy i HTL (1000 μ M) stosowane w eksperymencie, nie występują u ludzi, nawet z genetycznie uwarunkowaną hiperhomocysteinemią. Jednak związki te dodawane były do pożywki hodowlanej, co oznacza, że musiały one przeniknąć najpierw do komórek. Ponieważ HTL w warunkach fizjologicznych pH jest neutralny dla komórek, może z łatwością przenikać przez błonę komórkową [47, 51]. Zmiany patologiczne w organizmie człowieka spowodowane są konwersją Hcy do HTL [51]. Komórki HUVEC wydajnie metabolizują Hcy obecną w pożywce do tiolaktonu homocysteiny, a stężenie powstałego HTL jest wprost proporcjonalne do stężenia Hcy w pożywce i stanowi około 5% stężenia Hcy [47]. Dlatego też, aby zaobserwować wpływ egzogennej Hcy na komórki HUVEC, zasadne było stosowanie tak wysokich stężeń Hcy, podczas eksperymentów. Co więcej wyniki badań opisane w niniejszej pracy wskazują, że tylko wysokie stężenia Hcy były w stanie wywołać zmiany w profilu ekspresji genów, które można było wykryć za pomocą metod stosowanych w niniejszej pracy.

Aby zbadać wpływ badanych związków na przeżywalność komórek HUVEC przeprowadzono test aktywności metabolicznej. Ilość żywych komórek po zakończonej inkubacji była wprost proporcjonalna do stężenia homocysteiny i HTL, a także do stopnia modyfikacji białek surowicy. Po 24h inkubacji z homocysteiną odnotowano 20% spadek żywotności komórek HUVEC przy najwyższym stosowanym stężeniu (1000 μ M), podczas gdy tiolakton homocysteiny spowodował śmierć 40% komórek. Wyniki tego eksperymentu są zgodne z poprzednio opublikowanymi doniesieniami, które wskazują, że HTL jest dużo bardziej toksyczny dla komórek, niż Hcy [47, 120]. Największy wpływ na przeżywalność komórek miały białka surowicy zmodyfikowane tiolaktonem Hcy. Dodatek do hodowli komórkowej 41,1 μ M N-Hcy-białek przyczynił się do śmierci około 50% komórek.

Aby przeanalizować globalną odpowiedź transkryptomu ludzkiego w warunkach hiperhomocysteinemii, zastosowano technikę mikromacierzy. Ponieważ szkodliwy wpływ homocysteiny na organizmy żywe związany jest z jej konwersją do bardzo reaktywnego tiolaktonu homocysteiny [51], który modyfikuje białka w reakcji N-homocysteinylacji wpływając tym samym na utratę lub upośledzenie ich funkcji biologicznej [43], postanowiono zbadać również wpływ HTL oraz N-Hcy-białek na poziom ekspresji genów człowieka. W tym celu wykonano eksperymenty

mikromacierzowe z użyciem mikromacierzy dla ludzkiego transkryptomu zawierających sondy odpowiadające wszystkim znanym ludzkim genom. W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano listę genów, wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem homocysteiny, a także jej metabolitów. Zidentyfikowano 14 genów różnicujących pod wpływem Hcy, 110 genów o zmienionej ekspresji pod wpływem HTL, oraz 30 genów, których ekspresja pod wpływem N-Hcy-białek uległa zmianie. Warto podkreślić, że homocysteina i tiolakton homocysteiny powodują zmiany w ekspresji tych samych genów, ponieważ aż 11 spośród 14 zidentyfikowanych genów, których ekspresja pod wpływem Hcy była zmieniona znalazło się w grupie genów różnicujących pod wpływem HTL. N-Hcy-białka surowicy bydłowej oddziaływały w inny sposób na komórki HUVEC, powodując zmiany w ekspresji innych genów, niż Hcy i HTL. Tylko 6 z grupy 30 genów o odmiennej ekspresji pod wpływem N-Hcy-białek było wspólnych z grupą genów różnicujących pod wpływem tiolaktonu homocysteiny. Capasso i wsp. również przeanalizowali odpowiedź ludzkiego transkryptomu pod wpływem N-Hcy-albuminy [59]. Jednak wyniki tej pracy nie są spójne z wynikami eksperymentów mikromacierzowych prezentowanych w niniejszej pracy. Jest wiele przyczyn, dla których rezultaty obu wykonanych analiz mogą być tak odmienne. Po pierwsze sam eksperyment z zastosowaniem kultur komórkowych dość mocno różnił się w obu pracach. Unieśmiertelnione komórki śródbłonka (EAhy926) inkubowano z N-Hcy-albuminą, podczas gdy kontrolną hodowlę komórek stanowiły komórki hodowane z niezmodyfikowaną albuminą oraz bez dodatku albuminy. Natomiast komórki HUVEC inkubowano z N-Hcy-białkami surowicy, a jako kontrolę stosowano komórki inkubowane z niezmodyfikowaną surowicą bydłą. Technika mikromacierzy polega na analizie zmian w profilu ekspresji genów w próbie badanej w porównaniu do próby kontrolnej. Otrzymane wyniki w dużej mierze zależą od tego, jaką próbę kontrolną zastosujemy. Komórki HUVEC, stanowiące model badawczy w niniejszej pracy są komórkami śmiertelnymi, bardzo wrażliwymi na warunki, w których prowadzona jest hodowla. Dlatego też hodowla bez dodatku albuminy do pożywki hodowlanej przez 24 h spowodowałaby śmierć komórek. Zastosowanie innych warunków eksperymentalnych oraz wykonanie innego rodzaju analiz wpłynęło na uzyskanie odmiennych wyników.

Mikromacierze są narzędziem umożliwiającym przeprowadzenie globalnej analizy transkryptomu. Jednak, jak każda metoda o wysokiej wydajności, nie jest pozbawiona ryzyka popełnienia błędów. W celu weryfikacji przeprowadzonych analiz

mikromacierzowych, ekspresję wybranych 20 genów wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów potwierdzono za pomocą real-time PCR. Na podstawie wykonanych eksperymentów potwierdzono zmiany ekspresji badanych genów, uzyskane na podstawie mikromacierzy.

W celu poszukiwania szlaków metabolicznych, na które wpływają homocysteina oraz jej metabolity w komórkach HUVEC, poprzez zmianę ekspresji genów kodujących białka pełniące istotną rolę w tych ścieżkach, wykonano analizę bioinformatyczną za pomocą programu *Ingenuity Pathway Analysis*. Dane mikromacierzowe, potwierdzone za pomocą real-time PCR przeanalizowano pod kątem zaangażowania badanych genów człowieka w konkretne szlaki metaboliczne i sygnałowe z uwzględnieniem zmian w ich ekspresji pod wpływem homocysteiny, HTL oraz N-Hcy-białek. Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy zaobserwowano, że geny, dla których wykazano zmiany ekspresji pod wpływem Hcy oraz jej metabolitów są związane z wieloma ścieżkami metabolicznymi i sygnałowymi, których zaburzenie lub odmienne funkcjonowanie może w istotny sposób przyczyniać się do występowania obserwowanych negatywnych skutków podwyższonego poziomu homocysteiny we krwi. Przeprowadzone analizy pozwoliły zidentyfikować udział genów różnicujących pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów w takich procesach jak metabolizm aminokwasów w komórce, metabolizm kwasu foliowego, metabolizm lipidów, szlak sygnałowy indukowany niedotlenieniem, produkcja tlenu azotu i synteza reaktywnych form tlenu, szlak sygnałowy mTOR oraz LXR/RXR a także inhibicja procesu angiogenezy. Udział genów różnicujących w określonych szlakach metabolicznych i sygnałowych szczegółowo przedstawiono w tabeli 27.

Funkcja	Szlak metaboliczny/ sygnałowy	Nazwa genu	Zmiana ekspresji pod wpływem Hcy	Zmiana ekspresji pod wpływem HTL	Zmiana ekspresji pod wpływem N-Hcy-białek
Metabolizm aminokwasów	Metabolizm homocysteiny	CBS	2,37 ± 0,06	2,46 ± 0,05	3,22 ± 0,18
		MTR	2,26 ± 0,05	3,14 ± 0,14	1,50 ± 0,07
	Metabolizm L-metioniny	MTR	2,26 ± 0,05	3,14 ± 0,14	1,50 ± 0,07
		MTRR	1,59 ± 0,05	2,65 ± 0,04	3,38 ± 0,15
	Synteza cysteiny	CBS	2,37 ± 0,06	2,46 ± 0,05	3,22 ± 0,18
Inne	Synteza gangliozydów	CD9	2,02 ± 0,15	2,81 ± 0,19	2,40 ± 0,2
		ST2SIAII	-1,86 ± 0,15	-1,99 ± 0,22	-4,56 ± 0,1
	Katabolizm S-andenozylo-homocysteiny	AHCY	1,29 ± 0,18	1,55 ± 0,1	1,72 ± 0,08
	Metabolizm kwasu foliowego	MTR	2,26 ± 0,05	3,14 ± 0,14	1,50 ± 0,07
Metabolizm lipidów	Dystrybucja cholesterolu	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
		CBS	2,37 ± 0,06	2,46 ± 0,05	3,22 ± 0,18
	Wyrzut cholesterolu	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
		NCEH1	-2,53 ± 0,08	-6,35 ± 0,05	-3,26 ± 0,14
	Metabolizm kwasów tłuszczowych	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
		CD9	2,02 ± 0,15	2,81 ± 0,19	2,40 ± 0,2

		ST2SIAII	-1,86 ± 0,15	-1,99 ± 0,22	-4,56 ± 0,1
		VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
	Gromadzenie się cholesterolu	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
		CBS	2,37 ± 0,06	2,46 ± 0,05	3,22 ± 0,18
		NCEH1	-2,53 ± 0,08	-6,35 ± 0,05	-3,26 ± 0,14
	Synteza lipidów	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
		CD9	2,02 ± 0,15	2,81 ± 0,19	2,40 ± 0,2
		VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
		ST2SIAII	-1,86 ± 0,15	-1,99 ± 0,22	-4,56 ± 0,1
	Metabolizm pochodnych lipidowych składników błony komórkowej	CD9	2,02 ± 0,15	2,81 ± 0,19	2,40 ± 0,2
		ST2SIAII	-1,86 ± 0,15	-1,99 ± 0,22	-4,56 ± 0,1
		VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
	Gromadzenie się triacylogliceroli	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
		CBS	2,37 ± 0,06	2,46 ± 0,05	3,22 ± 0,18
		NCEH1	-2,53 ± 0,08	-6,35 ± 0,05	-3,26 ± 0,14
	Inne	Synteza czynnika aktywującego płytki krwi	VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09
Adhezja granulocytów i diapedeza					
Szlak sygnałny eNOS					
Angiogeneza					
Odpowiedź na niesfałdowane białka		VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
		OS9	-1,33 ± 0,08	-2,29 ± 0,13	1,82 ± 0,11

Powstawanie zmian miażdżycowych	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
	CBS	2,37 ± 0,06	2,46 ± 0,05	3,22 ± 0,18
	VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
Szlak sygnałowy interleukin i produkcji makrofagów	APOL1	2,99 ± 0,03	2,3 ± 0,08	1,39 ± 0,1
Produkcja NO i ROS w makrofagach				
Adhezja komórek śródbłonna	NTN4	-2,55 ± 0,07	-4,36 ± 0,1	6,22 ± 0,22
	VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
Inhibicja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej	MMP19	-2,21 ± 0,09	-3,59 ± 0,18	-2,08 ± 0,09
Szlak sygnałowy LXR/RXR	APOA5	-2,53 ± 0,13	-12,51 ± 0,01	2,40 ± 0,1
	APOL1	2,99 ± 0,03	2,3 ± 0,08	1,39 ± 0,1
Szlak sygnałowy mTOR	VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 ± 0,03
	ROBLD3	1,75 ± 0,04	1,38 ± 0,02	-1,66 ± 0,06
Szlak sygnałowy HIF1 α	MMP19	-2,21 ± 0,09	-3,59 ± 0,18	-2,08 ± 0,09
	VEGFA	-2,30 ± 0,03	-2,81 ± 0,09	3,10 0,03

Tabela 27: Udział genów wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem homocysteiny, HTL oraz N-Hcy-białek surowicy w szlakach metabolicznych i sygnałowych człowieka, na podstawie IngenuityPathway Analysis. Podane wartości krotności zmiany ekspresji wyrażone są jako średnia arytmetyczna z odchyleniem standardowym.

5.1.1. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z metabolizmem aminokwasów

Spośród genów, których poziom ekspresji ulegał zmianie pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek surowicy bydłowej były takie, których funkcja w organizmie człowieka jest ściśle związana z metabolizmem aminokwasów. Były to geny: *CBS*, *MTR* oraz *MTRR*. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano wzrost poziomu mRNA *CBS* pod wpływem Hcy oraz jej metabolitów. Zauważono także odmienny profil ekspresji genu *MTR* pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek. Tak samo jak w przypadku genu *CBS*, poziom mRNA *MTR* był podwyższony w porównaniu do kontroli. Ostatnim genem w tej grupie, którego ekspresja pod wpływem Hcy i jej metabolitów została przeanalizowana był gen *MTRR*. Ekspresja tego genu wzrosła we wszystkich warunkach eksperymentalnych, przy czym największy wpływ na wzrost mRNA *MTRR* miały N-Hcy-białka.

CBS (syntaza β -cystationiny) jest odpowiedzialna wraz z γ -liazą cystationiny za usuwanie Hcy na drodze transsulfurylacji. Defekty genetyczne związane z obniżeniem lub całkowitym brakiem aktywności tego białka prowadzą do stanu hiperhomocysteinemii, co wykazano zarówno u zwierząt [18] jak i u ludzi [21]. U heterozygotycznych myszy z mutacją genu *Cbs* zaobserwowano nie tylko hiperhomocysteinemię, ale także podwyższony poziom S-adenozylu-homocysteiny. Dodatkowo, podwyższony poziom Hcy był skorelowany z dysfunkcją śródbłona naczyń krwionośnych u tych zwierząt [121]. Podwyższony poziom mRNA *CBS* pod wpływem homocysteiny a także jej metabolitów jest dość zaskakujący, ponieważ komórki śródbłona naczyń krwionośnych mają bardzo niską lub nie mają aktywności enzymatycznej tego białka [122]. Jednakże podwyższony poziom mRNA genu *CBS* nie musi przekładać się na podwyższony poziom białka, lub też na zwiększoną aktywność syntazy β -cystationiny. Wykazano bowiem, że czynnik martwicy nowotworów (TNF α) powoduje zwiększenie udziału degradacji homocysteiny na drodze transsulfurylacji, co jest związane ze zwiększeniem aktywności enzymatycznej *CBS*. Jednocześnie TNF α zdolny jest do specyficznej proteolizy, w wyniku której powstaje skrócona forma białka, pozbawiona C-końcowej domeny regulatorowej. Skutkuje to zmniejszeniem wrażliwości białka na jego aktywator allosteryczny S-adenozylu-metioninę oraz jest związane z utratą aktywności katalitycznej. Co więcej, hydroliza *CBS* przez TNF α jest

potranslacyjnym mechanizmem regulatorowym, ponieważ nie zauważono zmian poziomu ani mRNA ani białka [123].

Metabolizm genów *MTR* oraz *MTRR* jest ściśle ze sobą powiązany. Pierwszy z nich koduje kobalaminozależną syntazę metioniny, natomiast produktem białkowym drugiego genu jest reduktaza syntazy metioniny. Jest ona niezbędna do aktywacji syntazy metioniny a co za tym idzie, pełni ważną rolę wraz z syntazą metioniny w usuwaniu homocysteiny na drodze remetylacji. Chen i współpracownicy wykazali, że zmiana poziomu mRNA *MTR* jest wprost proporcjonalna do poziomu SAM i odwrotnie proporcjonalna do poziomu SAH w tkankach mysich [124]. Zauważono, że spadek ekspresji mRNA dla *MTRR* spowodowany mutacją punktową związany był z podwyższonym poziomem Hcy we krwi oraz ryzykiem powstawania wrodzonych wad serca [125]. Wzrost ekspresji genów *MTR* oraz *MTRR* pod wpływem Hcy i jej metabolitów wykazany w niniejszej pracy uwidacznia zaangażowanie mechanizmu obronnego, pozwalającego na skuteczne usuwanie homocysteiny z komórki na drodze remetylacji do metioniny, a także stanowi potwierdzenie na poziomie molekularnym wcześniejszych doniesień literaturowych dotyczących metabolizmu Hcy w komórce. Jednakże zmiany te mogą być tłumaczone dwojako. Z jednej strony może być to mechanizm prowadzący do eliminacji Hcy z komórki, z drugiej, może to być również skutek podwyższonej aktywności hydrolazy SAH (opisanej w rozdziale 5.1.2.), co prowadzi do powstania dodatkowej puli Hcy w organizmie. Funkcjonowanie białek o charakterze enzymatycznym mierzone jest za pomocą ich aktywności. Wykazany wzrost ekspresji tych genów pod wpływem Hcy i jej metabolitów nie jest pełną informacją o aktywności tych enzymów w komórce, ponieważ wzrost poziomu mRNA nie musi przekładać się na wzrost poziomu białka.

Pośród grupy genów, których ekspresja pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek została przeanalizowana był również gen *SLC44A3*. Wykazano spadek ekspresji tego genu pod wpływem homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny. N-Hcy-białka surowicy wpłynęły w odmienny sposób na ekspresję tego genu, powodując jej wzrost. Gen ten koduje białko należące do grupy białek SLC44, które pełnią funkcję transportera choliny. Białko SLC44A3 jest jednym z najmniej poznanych w tej rodzinie. Jego synteza zachodzi między innymi w takich tkankach jak nerki, jelito kręte czy w okrężnicy [126]. Filogenetycznie białko to najbliższym spokrewnione jest z białkiem SLC44A1, które zaangażowane jest w transport choliny przez błonę mitochondrium, gdzie wykorzystywana jest ona jako donor grupy metylowej do syntezy metioniny na

drodze remetylacji homocysteiny [126]. Obniżenie poziomu mRNA *SLC44A1*, oraz jego produktu białkowego objawiało się brakiem choliny w mitochondriach [127]. Możliwe jest, że białko SLC44A3 pełni podobną funkcję.

5.1.2. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z katabolizmem S-adenozylu-homocysteiny

Gen *AHCY* koduje hydrolazę, która katalizuje hydrolizę S-adenozylu-homocysteiny (SAH) do adenozyliny i homocysteiny [128]. Zaobserwowano wzrost ekspresji tego genu pod wpływem zarówno homocysteiny, jak również HTL oraz N-Hcy-białek surowicy. U organizmów eukariotycznych hydroliza SAH jest głównym mechanizmem usuwania SAH, która powstaje jako produkt działania SAM-zależnych metylotransferaz. U ludzi brak aktywności enzymatycznej *AHCY* związany jest ze znacznie podwyższonym poziomem metioniny, a co za tym idzie również Hcy, co pociąga za sobą poważne konsekwencje [129]. Ponieważ wiele metylotransferaz DNA wykazuje większe powinowactwo do SAH niż do SAM, może ona stanowić silny inhibitor reakcji metylacji w komórce. Konwersja SAH do Hcy jest odwracalna, dlatego też podwyższony poziom homocysteiny w organizmie wpływa na obniżenie poziomu całkowitej metylacji DNA, a pośrednio na zmiany w ekspresji genów [83]. Wykazano także pozytywną korelację poziomu mRNA tego genu z poziomem Hcy w tkankach mysich [124].

5.1.3. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów

Pośród grupy genów, których zmiany w ekspresji zostały szczegółowo przeanalizowane były również te geny, których funkcja w organizmie człowieka związana jest z metabolizmem lipidów. Były to: *APOLI*, *APOA5*, *SCUBE1* oraz *NCEH1*. Zarówno Hcy, jak i jej metabolity powodowały wzrost poziomu mRNA *APOLI* w komórkach HUVEC po 24h inkubacji. Apolipoproteina L1 (APOL1) jest białkiem, które w krwiobiegu związane jest głównie z apolipoproteina ApoA1, stanowiącej białkową komponentę lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) [130].

Sugeruje się, że stężenie APOL1 ma związek z poziomem frakcji HDL w organizmie, a lipoproteina ta uczestniczy w wymianie tłuszczów pomiędzy frakcją HDL a lipoproteinami zawierającymi głównie triglicerydy (TG) [131, 132]. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy poziomem APOL1 z poziomem triglicerydów oraz hiperglikemią. Dlatego też poziom apolipoproteiny L1 może być uznany, za marker ryzyka rozwoju miażdżycy [133, 134]. Hipotezę tę może potwierdzać fakt, że białko APOL1 znaleziono również w naczyniach krwionośnych o fenotypie miażdżycowym [135]. Funkcja apolipoproteiny L1 jest również związana z indukcją śmierci komórkowej na drodze autofagii. APOL1 w swojej budowie zawiera domenę BH3 – charakterystyczną dla białek z rodziny Bcl-2 pełniących główną rolę w procesie programowanej śmierci komórki. Wykazano, że akumulacja APOL1 zaburza homeostazę lipidową, co powoduje indukcję śmierci komórek na drodze autofagii [136].

Innym białkiem zaangażowanym w regulację stężenia triglicerydów w organizmie jest apolipoproteina A5 (ApoA5). Pełni ono rolę głównego regulatora poziomu triglicerydów w organizmie. Wraz z apolipoproteina C3 stanowią wymienne składniki frakcji VLDL i HDL cholesterolu przyczyniających się do obniżania poziomu TG. ApoA5 rozpoznaje i przyłącza się do miejsc akumulacji TG na błonie ER hepatocytów. W ten sposób uniemożliwia sekrecję TG do cytozolu, gdzie będą stanowiły tłuszczową komponentę apolipoproteiny B i zostaną przetransportowane do aparatu Golgiego, w celu sekrecji poza komórkę [137]. Wykazano, że nadekspresja genu kodującego tę lipoproteinę u myszy związana była z obniżonym poziomem triglicerydów, w wyniku wzmożonego katabolizmu frakcji VLDL cholesterolu. Wyciszenie tego genu manifestowało się wyraźnym podwyższeniem poziomu TG u tych zwierząt [138, 139]. Apolipoproteina A5 bierze również udział w metabolizmie frakcji cholesterolu HDL. U transgenicznych myszy z nadekspresją genu *ApoA5* zaobserwowano podwyższoną aktywność acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej. Jest on enzym pełniący główną rolę w transporcie zwrotnym cholesterolu z naczyń krwionośnych do wątroby. Ponadto nadekspresja *ApoA5* spowodowała redystrybucję cholesterolu z frakcji VLDL do HDL cholesterolu [139]. U myszy o genotypie *ApoA5^{+/+} ApoE^{-/-}* zauważono o 70% mniejsze blaszki miażdżycowe w naczyniach krwionośnych w porównaniu do myszy o genotypie *ApoE^{-/-}*. Blaszkami miażdżycowymi myszy *ApoA5^{+/+} ApoE^{-/-}* wykazywały więcej cech stabilności oraz miniejsze cechy rozwijającego się miejscowo stanu zapalnego. Myszy te wykazywały również obniżony

poziom cholesterolu całkowitego oraz triglicerydów [140]. Zaobserwowano znaczący spadek ekspresji genu *APOA5* pod wpływem homocysteiny oraz tiolaktonu homocysteiny. Sugeruje to upośledzenie mechanizmów odpowiedzialnych za metabolizm cholesterolu w warunkach hiperhomocysteinemii, co jest poważnym czynnikiem zaangażowanym w patofizjologię miażdżycy. Jednak N-Hcy-białka wywarły zupełnie odmienny efekt na poziom mRNA *APOA5*, powodując wzrost jego poziomu, co sugeruje aktywację innych mechanizmów w komórkach HUVEC, w które zaangażowane może być to białko pod wpływem N-Hcy-białek.

Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz zaobserwowano spadek poziomu mRNA *SCUBE1* zarówno pod wpływem Hcy jak i jej metabolitów. Gen *SCUBE1* koduje białko sekrecyjne, związane z błonami komórkowymi. Wykazuje on specyficzną ekspresję w komórkach śródbłonna różnych naczyń krwionośnych, w tym również komórkach HUVEC. W komórkach tych ekspresja tego genu obniża się pod wpływem stymulacji przez cytokiny prozapalne i lipopolisacharydy. Może to wskazywać na zaangażowanie tego białka w odpowiedź na czynniki prozapalne [141]. Ekspresję genu *SCUBE1* odnotowano również w płytkach krwi, którego ekspresja wzrasta po ich aktywacji. Może to dowodzić o roli tego białka w sprzyjaniu agregacji płytek i ich aglutynacji, co jest związane z patogenezą miażdżycy. Hipotezę tę potwierdza również obecność tego białka w blaszkach miażdżycowych [142]. W niniejszej pracy wykazano istotny spadek ekspresji genu *SCUBE1* w komórkach HUVEC po inkubacji zarówno z homocysteiną jak i jej metabolitami. Prezentowane wyniki potwierdzają negatywne skutki jakie wywiera podwyższony poziom Hcy w organizmie ludzkim. Jednym z rezultatów hiperhomocysteinemii jest bowiem aktywacja czynników prozapalnych [120]. Obniżenie poziomu mRNA *SCUBE1* potwierdza te doniesienia.

Wykazano obniżenie poziomu mRNA *NCEH1* w komórkach HUVEC po inkubacji z Hcy, tiolaktonem homocysteiny jak również z N-Hcy-białkami surowicy. NCEH1 (neutralna hydrolaza estrów cholesterolu 1) jest białkiem pełniącym ważną rolę w rozwoju zmian miażdżycowych w ścianach naczyń krwionośnych. Jego funkcja polega na hydrolizie estrów cholesterolu w makrofagach, co jest głównym etapem w transporcie zwrotnym cholesterolu. [143]. Wysokie stężenie lipidów w blaszce miażdżycowej jest również czynnikiem ryzyka jej pęknięcia. Okazaki i wsp. wykazali, że gen *NCEH1* wykazuje ekspresję w ludzkich i mysich makrofagach, a jego produkt białkowy katalizuje reakcję hydrolizy estrów cholesterolu w tych komórkach.

Nadekspresja genu *NCEH1* zahamowała także całkowicie powstawanie estrów cholesterolu w makrofagach [143, 144]. *NCEH1* bierze również udział w transformacji makrofagów w komórki piankowe. Wykazano, że inkubacja z acetylowaną frakcją cholesterolu LDL spowodowała wzrost zawartości estrów cholesterolu w makrofagach z wyciszonym genem *NCEH1*. Ten sam rezultat uzyskano poprzez inkubację makrofagów z utlenioną frakcją cholesterolu (oxLDL) oraz lipoproteinami o bardzo niskiej gęstości (VLDL). Wyciszenie ekspresji tego genu nasiliło również zmiany miażdżycowe u myszy. Białki miażdżycowe zawierały więcej estrów cholesterolu oraz wolnego cholesterolu w porównaniu do myszy z aktywnością *NCEH1* [145]. Obserwowany, znaczący spadek poziomu mRNA pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek w komórkach HUVEC może świadczyć o upośledzeniu procesu hydrolizy estrów cholesterolu w warunkach hiperhomocysteinemii, co może być związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju miażdżycy.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wyjaśniają negatywny wpływ hiperhomocysteinemii na metabolizm lipidów, co może być czynnikiem sprzyjającym rozwojowi miażdżycy.

5.1.4. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych ze szlakiem sygnałowym kinazy mTOR

Analizę wpływu Hcy i jej metabolitów na profil ekspresji genów w komórkach HUVEC wykonano również dla genu *ROBLD3*. Hcy i HTL przyczyniły się do wzrostu poziomu mRNA *ROBLD3*. Białko *ROBLD3* wchodzi w skład białkowego kompleksu oddziałującego z GTPazą Rag potrzebną do zainicjowania szlaku sygnałowego mTORC1 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 1*). mTOR jest kinazą serynowo-treoninową, która reguluje wzrost komórek, ich proliferację, ruchliwość, a także proces biosyntezy białka czy transkrypcję. Szlak mTORC aktywowany jest w lizosomach komórek ssaczych między innymi przez aminokwasy [146, 147]. Lizosomy są głównym miejscem degradacji białek oraz zawracania aminokwasów z powrotem do obiegu. Jest to szlak odpowiedzialny za kontrolę wzrostu komórek. U ludzi mutacja genu *ROBLD3* powoduje wyraźne opóźnienie wzrostu [148], co również wykazano na mysich zarodkach [149, 150]. Wzrost ekspresji genu *ROBLD3*

w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i tiolaktonu homocysteiny może świadczyć o aktywacji szlaku mTORC1 w tych komórkach. Homocysteina metabolizowana jest w komórce na drodze remetylacji do metioniny, transsulfurylacji do cysteiny, bądź też przekształcana jest do HTL w reakcji korekcyjnej syntetaz metionylo-tRNA [45, 46]. Dlatego też możliwe jest, iż szlak ten jest aktywowany w komórkach HUVEC pod wpływem hiperhomocysteinemii, natomiast N-homocysteinylowane białka mogą wywierać negatywny wpływ na szlak kinazy mTORC, o czym może świadczyć spadek poziomu mRNA *ROBLD3*.

Innym genem, którego produkt białkowy jest związany z regulacją szlaku kinazy mTOR jest gen *APOL1*. Apolipoproteina L1 wykazuje również duże powinowactwo do kwasu fosfatydowego (PA) i kardiolipiny - dimeru fosfoglicerolu i kwasu fosfatydowego. Wykazano, że kwas fosfatydowy bierze udział w szlaku sygnałnym mTOR. Jest to czynnik mitogeny, który ma zdolność oddziaływania z tą samą domeną co rapamycyna, co jest niezbędne do aktywacji białek efektorowych tego szlaku. Zatem związanie PA przez *APOL1* może inhibować aktywację szlaku kinazy mTOR, a następnie aktywować programowaną śmierć komórki na drodze autofagii [136]. Wykazany wzrost mRNA *APOL1* w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy, HTL, jak również N-Hcy-białek surowicy może sugerować, że zarówno homocysteina jak i jej metabolity są zdolne do wywołania programowanej śmierci komórek nie tylko na drodze apoptozy, ale także na drodze autofagii.

5.1.5. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych ze szlakiem LXR/RXR

Receptor wątrobowy X (LXR) należy do rodziny receptorów jądrowych, które zaangażowane są w metabolizm cholesterolu, glukozy i kwasów tłuszczowych. Jest on aktywowany w komórkach po związaniu odpowiedniego ligandu. Eksperymenty z zastosowaniem syntetycznego ligandu dla receptora LXR u homozygotycznych myszy z wyciszonym genem *ApoE* oraz genem kodującym receptor dla frakcji cholesterolu LDL pozwalają sądzić, że jego rola związana jest z zapobieganiem rozwojowi miażdżycy. U myszy, którym podawano syntetyczny ligand zaobserwowano podwyższony poziom frakcji cholesterolu HDL i fosfolipidów [151, 152]. Wykazano również, że ligandy

receptora LXR powodują obniżenie ekspresji genu *APOA5* w linii komórek raka wątrobowokomórkowego, co manifestowało się również spadkiem poziomu białka. Podobne wyniki uzyskano dla transgenicznych myszy z ludzkim genem *ApoA5*. Wykazano, że zwierzęta te miały obniżony poziom apolipoproteiny A5 w surowicy krwi, co było związane ze spadkiem mRNA tego genu. Represja genu *APOA5* spowodowana była przez aktywację czynnika transkrypcyjnego SREBP-1 przez aktywowany receptor LXR. Ponadto transfekcja komórek HepG2 kwasem 9-cis-retinoidowym również wpłynęła na spadek poziomu mRNA *APOA5*. Może to sugerować, że regulacja poziomu triglicerydów za pomocą *APOA5* może odbywać się poprzez utworzenie heterodimeru receptora LXR z receptorem retinoidu X (RXR) [153]. Wykazano bowiem, że czynnik transkrypcyjny RXR może również pełnić rolę w regulacji metabolizmu lipidów po wytworzeniu heterodupleksu LXR/RXR [154]. Heretodupleks LXR/RXR może również wpływać na zwiększenie zdolności makrofagów do fagocytozy [155]. Wykazany spadek ekspresji genu *APOA5* w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny oraz tiolaktonu homocysteiny może być wynikiem indukcji tego mechanizmu regulacyjnego. Dowodzi to również negatywnego wpływu hiperhomocysteinemii na metabolizm lipidów, co może sprzyjać rozwojowi miażdżycy.

5.1.6. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z niedotlenieniem

Niedotlenienie tkanek manifestuje się indukcją szlaku sygnałowego czynnika indukowanego niedotlenieniem 1 (ang. *hypoxia-inducible factor 1*; HIF-1). W warunkach fizjologicznych HIF-1 jest ubikwitynylowany i kierowany na drogę degradacji. Gdy dochodzi do niedotlenienia tkanek, HIF-1 jest stabilizowany, następnie wiąże się w rejonie promotorowym genu *VEGFA*, kodującego czynnik wzrostu komórek śródbłonna i przyczynia się do aktywacji ekspresji mRNA *VEGFA*, który stymuluje proces angiogenezy [156-158]. *VEGFA* stymuluje produkcję tlenku azotu (NO), poprzez aktywację śródbłonkowej izoformy syntazy tlenku azotu (eNOS), na drodze zależnej od kinazy aktywowanej AMP [159, 160]. Z drugiej jednak strony wysokie stężenie NO może indukować produkcję VEGF w komórkach. Wykazano

bowiem koekspresję *eNOS* i *VEGFA* a także *eNOS* i *HIF-1* w komórkach raka piersi [161]. NO jest ważnym czynnikiem wazodylatacyjnym, utrzymującym homeostazę w naczyniach krwionośnych. Na podstawie badań przeprowadzonych na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych wykazano, że hiperhomocysteinemia obniża produkcję NO, co jest wynikiem zmniejszonej ekspresji eNOS w tych komórkach [33]. Obserwowany spadek ekspresji genu *VEGFA* pod wpływem homocysteiny oraz tiolaktonu homocysteiny potwierdza te doniesienia.

5.1.7. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z procesem angiogenezy

Jedną z konsekwencji hiperhomocysteinemii jest upośledzenie prawidłowego funkcjonowania warstwy śródbłonna naczyń krwionośnych. Jest to również jedna z cech rozwoju zmian miażdżycowych w obrębie łożyska naczyniowego. Na podstawie wyników analizy zmian w ekspresji genów pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek wykazano, że hiperhomocysteinemia wpływa także na upośledzenie procesu angiogenezy w komórkach HUVEC. Zaobserwowano bowiem odmienny profil ekspresji genów *VEGFA*, *ESM1* oraz *NTN4*. Dowiedziono, że komórki HUVEC poddane działaniu Hcy, HTL i N-Hcy-białek surowicy bydłowej wykazują odmienną ekspresję genu *NTN4* Hcy oraz HTL, powodowały znaczący spadek poziomu mRNA dla tego genu. N-Hcy-białka wywierają odmienny efekt na ekspresję genu *NTN4*, powodując istotny wzrost poziomu jego mRNA po inkubacji z białkami surowicy bydłowej zmodyfikowanymi HTL. Gen *NTN4* koduje białko, które wchodzi w skład błon komórkowych. Jego największą ilość zaobserwowano w komórkach serca [162]. Jego funkcja jest związana z procesem angiogenezy, co wykazano w komórkach śródbłonna *Danio rerio* [163], jak też w limfatycznych komórkach śródbłonna [164], poprzez aktywację kinaz p42/p44 MAPK i Akt/PI3. NTN4 pełni także rolę w rozwoju komórek epitelialnych w odpowiedzi na stymulację czynnikiem wzrostu fibroblastów. Białko NTN4 bierze udział w czasowym zahamowaniu zmian kształtu komórek i fosforylacji wewnątrzkomórkowej kinazy aktywowanej miogenem (EKR 1 i 2) [165]. Spadek ekspresji genu *NTN4* pod wpływem Hcy i HTL może świadczyć o upośledzeniu

procesu angiogenezy przez homocysteinę regulowanego na drodze zależnej od kinaz p42/p44 MAPK i Akt/PI3.

Homocysteina i tiolakton homocysteiny wpływają w odmienny sposób na poziom ekspresji genu *VEGFA*, niż N-Hcy-białka. Na podstawie wykonanych eksperymentów wykazano spadek poziomu mRNA *VEGFA* po 24h inkubacji z Hcy i HTL. Zmiany te były wprost proporcjonalne do stężenia obu związków. Może to być związane z inną, ważną funkcją, jaką pełni VEGFA. Białko VEGFA jest istotnym czynnikiem w szlaku sygnałowym związanych z tworzeniem naczyń krwionośnych [166]. Podwyższony poziom homocysteiny w komórkach również wpływa na profil ekspresji tego genu. Oosterbaan i wsp. wykazali, że hiperhomocysteinemia związana jest z obniżeniem poziomu mRNA podczas rozwoju kurzych zarodków, co spowodowało upośledzenie rozwoju naczyń krwionośnych podczas embriogenezy [167]. Było to związane z uszkodzeniem komórek śródbłonna pod wpływem Hcy, czego następstwem są zaburzenia procesu angiogenezy. Poziom białka VEGFA jest regulowany przez CD9 na drodze sygnałowej Wnt. Rodzina genów *Wnt* koduje wiele glikoprotein, których funkcja związana jest z regulacją embriogenezy, różnicowania komórek, a także ich adhezję i ruchliwość. Nadekspresja genu *CD9* spowodowała spadek ekspresji genu *Wnt1*, a także wiele genów uczestniczących w szlaku Wnt. Jednym z takich genów jest *VEGFA* [168]. Wykazany spadek poziomu mRNA *VEGFA* w komórkach HUVEC po inkubacji zarówno z Hcy jak i z HTL może świadczyć o upośledzeniu procesu angiogenezy pod wpływem hiperhomocysteinemii. Co więcej, poziom mRNA *VEGFA* w komórkach HUVEC może podlegać regulacji poprzez gen *CD9*, dla którego wykazano wzrost ekspresji pod wpływem Hcy i jej metabolitów.

Jednym z genów pośredniczących w procesie tworzenia naczyń krwionośnych jest *ESM1*. Gen ten koduje rozpuszczalny proteoglikan – siarczan dermatanu. Ulega on ekspresji głównie w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, gdzie uczestniczy w szlaku sygnałowym prowadzącym do powstawania nowych naczyń krwionośnych [169, 170]. Ponadto jego poziom jest ściśle regulowany poprzez białko VEGFA. Wykazano ścisłą zależność pomiędzy *VEGFA* oraz *ESM1*, zarówno na poziomie mRNA jak i białka w limfatycznych komórkach śródbłonna [171, 172]. Wyniki tych badań stoją jednak w sprzeczności z wynikami otrzymanymi na podstawie analiz mikromacierzowych i real-time PCR dla genu *ESM1* pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek. Wykazano bowiem znaczący wzrost poziomu ekspresji tego genu po 24h inkubacji. Wzrost ten był wprost proporcjonalny do stężenia Hcy i HTL, oraz do

stopnia N-homocysteinylacji białek surowicy bydłęcej. Brutsch i wsp. wykazali, że białko ESM1 jest głównym czynnikiem uczestniczącym w procesie angiogenezy. Wykazali oni, że wyciszenie genu *ESM1* w komórkach HUVEC skutkowało utratą zdolności wzrostowych, dodatkowo stymulacja komórek VEGFA nie skutkowała przywróceniem tych zdolności komórkom [173]. Dlatego też wzrost poziomu mRNA *ESM1* może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów naprawczych w komórkach, mających na celu przywrócenie homeostazy procesu angiogenezy, zaburzoną, przez hiperhomocysteinemię.

Jednym z genów, których profil ekspresji ulegał zmianie w warunkach hiperhomocysteinemii był gen *MMP19*. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwalają stwierdzić znaczący spadek mRNA *MMP19* pod wpływem zarówno Hcy, jak i jej metabolitów. Gen *MMP19* koduje białko, które należy do rodziny metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, które zaangażowane są w wiele procesów takich jak wzrost i proliferacja komórek, a także angiogeneza czy apoptoza. Synteza tego białka zachodzi w wielu rodzajach komórek. Komórki mięśni gładkich, komórki mioepitelialne czy keratynocyty charakteryzuje stały poziom syntezy tego białka, podczas gdy w komórkach śródbłonna, w monocytach czy makrofagach poziom tego białka może ulegać regulacji [174-176]. Brauer i wsp. wykazali, że MMP19 zdolne jest do specyficznego cięcia plazminogenu, w wyniku którego powstają trzy produkty podobne do angiostatyny, białka będącego produktem proteolizy plazminogenu, który jest inhibitorem procesu angiogenezy, powodując zahamowanie proliferacji i migracji komórek śródbłonna. Dowiedziono również, że produkty proteolizy kolagenu zdolne są do inhibicji proliferacji komórek śródbłonna oraz wytwarzania przez nie struktur podobnych do kapilar [177]. Wykazane obniżenie ekspresji genu *MMP19* pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek, może więc być efektem uruchomienia mechanizmów niwelujących negatywny wpływ homocysteiny i jej metabolitów na komórki śródbłonna. Znane są bowiem tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP4), których synteza wzrasta pod wpływem hiperhomocysteinemii u myszy *CBS*^{-/-} [178]. Białko MMP19 jest także zdolne do stymulacji proliferacji komórek. Wykazano bowiem, że nadekspresja genu kodującego tę metaloproteinazę powoduje wzrost proliferacji keratynocytów, a także migrację komórek i adhezję do włókien kolagenu typu I. Spowodowane jest to proteolizą IFGBP-3 (ang. *insulin like growth factor binding protein -3*) – białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu, co zwiększa przekazywanie sygnału zależne od insulinopodobnego czynnika wzrostu [176]. Zatem

wykazany spadek ekspresji *MMP19* pod wpływem homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek potwierdza doniesienia o upośledzeniu proliferacji komórek śródbłonna pod wpływem homocysteiny. Co więcej, na podstawie zaprezentowanych wyników można wnioskować, że zahamowanie proliferacji komórek śródbłonna może odbywać się nie tylko według mechanizmu zależnego od VEGFA ale także od *MMP19*.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że zarówno Hcy, jak i HTL, a także N-Hcy-białka upośledzają proces proliferacji *ex vivo*, co może mieć poważne konsekwencje dla funkcjonowania komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, warunkujących prawidłową angiogenezę. Inhibicja ta może być wynikiem zaburzeń wielu mechanizmów regulujących ten proces, na które wpływa homocysteina i jej metabolity.

5.1.8. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z odpowiedzią na niesfaldowane białka

Podwyższony poziom Hcy w komórce pociąga za sobą szereg negatywnych konsekwencji. Jedną z nich jest stres siateczki śródplazmatycznej (omówiony w rozdziale 1.3.3.) rozwijający się w odpowiedzi na nagromadzenie się zbyt dużej ilości niesfaldowanych lub błędnie sfaldowanych białek. Pośród genów wykazujących odmienny profil ekspresji pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek surowicy, były również geny, których profil ekspresji zmienia się w komórkach, w których rozwija się stres ER. Do grupy tej należały geny: *VEGFA* oraz *OS9*. Na podstawie analizy danych mikromacierzowych i real-time PCR wykazano znaczący spadek poziomu mRNA genu *VEGFA* pod wpływem Hcy i HTL. Natomiast inkubacja komórek HUVEC z białkami surowicy zmodyfikowanymi tiolaktonem homocysteiny spowodowała znaczący wzrost ekspresji tego genu. Przeanalizowano także profil ekspresji genu *OS9* pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek. Inkubacja Hcy i HTL spowodowała obniżenie poziomu ekspresji badanego genu. Natomiast dodatek do pożywki hodowlanej N-Hcy-białek surowicy bydlęcej wpłynął pozytywnie na poziom mRNA tego genu, co zaobserwowano poprzez wzrost ekspresji.

Gen *VEGFA* (ang. *vascular endothelial growth factor A*) koduje białko, którego synteza i dojrzewanie odbywa się w siateczce śródplazmatycznej [179]. Pełni ono również ważną rolę w procesie tworzenia naczyń krwionośnych. Transkrypcja tego genu jest również ściśle związana z odpowiedzią na niesfałdowane białka w świetle ER. Wykazano bowiem, że wzrost poziomu mRNA *VEGFA* jest związany ze stresem ER w komórce [180, 181]. OS9 to białko również występujące w ER [182, 183], które uczestniczy w procesie rozpoznawania niesfałdowanych lub błędnie sfałdowanych glikoprotein w siateczce śródplazmatycznej. Rozpoznaje specyficznym, a następnie wiąże się ono z łańcuchem polipeptydowym [184] lub też z łańcuchem cukrowym [185] glikoproteiny. W ten sposób „naznaczona” glikoproteina zostaje zatrzymana w świetle ER. Christianson i wsp. zasugerował, że OS9 oddziałuje wspólnie z chaperonem GRP94 w świetle ER oraz ligazą ubikwitynową Hrd11-SEL1L, co jest niezbędne do degradacji białek na drodze mechanizmu ERAD [182]. Spadek poziomu białka OS9 związany jest również z upośledzeniem mechanizmu degradacji niesfałdowanych lub błędnie sfałdowanych białek. Jedną z negatywnych konsekwencji wywołanych przez hiperhomocysteinemię jest stres ER jako odpowiedź na niesfałdowane białka [37]. Mechanizm ten zachodzi poprzez konwersję Hcy do HTL. Ten z kolei poprzez modyfikację potranslacyjną białek na drodze N-homocysteinylacji jest zdolny do wywołania stresu ER. Wykazano znaczący wzrost poziomu mRNA genów *VEGFA* oraz *OS9* po 24h inkubacji komórek HUVEC z dodatkiem N-Hcy-białek surowicy bydłowej. Wzrost ten skorelowany był ze stopniem modyfikacji białek używanych w eksperymencie. Wyniki wykonanych analiz pozwalają sądzić, że wzrost ekspresji tych genów pod wpływem N-Hcy-białek skorelowany jest z rozwijającym się stresem siateczki śródplazmatycznej w komórkach pod wpływem zmodyfikowanych białek.

5.1.9. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję genów związanych z rozwojem odpowiedzi zapalnej

Podwyższony poziom homocysteny w krwi przyczynia się również do rozwoju odpowiedzi zapalnej. Na podstawie wyników eksperymentów prezentowanych w niniejszej pracy wykazano, że w rozwój odpowiedzi zapalnej zaangażowane są geny *CD9* oraz *MARCH1*, których ekspresja pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów

została zmieniona. Poziom mRNA *MARCH1* oraz *CD9* ulegał wyraźnemu podwyższeniu po inkubacji zarówno homocysteiną, jak również tiolaktonem homocysteiny czy N-Hcy-białkami surowicy.

CD9 należy do rodziny tetraspanin, które biorą udział w wielu procesach komórkowych zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Pełnią on funkcję w odpowiedzi immunologicznej, proliferacji czy różnicowaniu komórek, a także tworzeniu przerzutów nowotworowych. W swojej budowie zawierają one domeny, dzięki którym mogą one oddziaływać z innymi białkami transmembranowymi [186]. CD9 jest białkiem komórek śródbłonna i wraz z CD151 odpowiada za oddziaływanie z białkami VCAM1 i ICAM1 warunkując ich właściwości adhezyjne do warstwy śródbłonna naczyń krwionośnych podczas migracji leukocytów do miejsca, gdzie wytworzył się stan zapalny [187].

Również apolipoproteina L1 jest białkiem zaangażowanym w rozwój odpowiedzi zapalnej. Wykazano bowiem wzrost poziomu mRNA *APOLI* pod wpływem czynnika martwicy nowotworów α oraz interferonu γ – głównych mediatorów prozapalnych, których podwyższoną ekspresję zaobserwowano w zmianach miażdżycowych naczyń krwionośnych [188]. Dlatego też wzrost ekspresji tego genu w komórkach HUVEC po inkubacji z homocysteiną, jak również z jej metabolitami, może świadczyć o pozapalnym charakterze zmian w warunkach hiperhomocysteinemii.

Miażdżyca jest chorobą, w przebiegu której dochodzi do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego w obrębie zmienionych naczyń krwionośnych. Również podwyższony poziom homocysteiny we krwi przyczynia się do rozwoju odpowiedzi zapalnej. Zobserwowany wzrost poziomu mRNA *CD9*, *MARCH1* oraz *APOLI* i pod wpływem Hcy, jak również HTL i N-Hcy-białek, może być tłumaczony odpowiedzią komórek na inkubację z N-homocysteinylowanymi białkami, które były dodane bezpośrednio do pożywki hodowlanej, bądź też powstały w komórkach HUVEC na drodze N-homocysteinylacji po dodaniu czynnika modyfikującego (Hcy lub HTL). N-Hcy-białka wywołują odpowiedź autoimmunologiczną, co wykazano zarówno u zwierząt, jak i u ludzi [42].

Rozwój odpowiedzi zapalnej podlega również mechanizmom regulacyjnym. Regulacja ta może odbywać się za pomocą białka ESM1. Może ono specyficznie wiązać się do receptora białek ICAM LFA-1. Oddziaływanie ICAM-LFA-1 jest niezbędne do migracji leukocytów z krwi do tkanek oraz do rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Wiązanie ESM1 do receptora LFA-1 uniemożliwia związanie ICAM,

co wykazano na linii komórkowej Jurkat [189]. Stąd wykazany wzrost ekspresji genu *ESMI* pod wpływem homocysteiny, HTL jak również N-Hcy-białek może świadczyć o indukcji mechanizmów obronnych w komórkach HUVEC.

Inny mechanizm regulujący powstawanie odpowiedzi zapalnej może zachodzić z udziałem białka MARCH1. Białko to należy do rodziny ligaz ubikwitynowych, katalizujących reakcję ubikwitynacji białek, polegającą na przyłączeniu ubikwityny do cząsteczki białka z wytworzeniem wiązania pomiędzy C-końcową glicyną ubikwityny a ϵ -aminową grupą lizyny w białku docelowym [190]. Ubikwitynacji mogą ulegać białka regulatorowe, dla których modyfikacja ta jest niezbędna do zachodzenia wielu procesów fizjologicznych. Drugą grupę białek stanowią te, które zostały błędnie sfałdowane, bądź też mają inne defekty strukturalne. Ubikwitynacja tej grupy białek prowadzi do ich degradacji [191]. Prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego w organizmie człowieka jest również regulowane za pomocą tej modyfikacji. Białko MARCH1 katalizuje reakcję ubikwitynacji cząsteczek MHC klasy II podczas prezentacji antygeny w komórkach dendrytycznych. Wykazano, że wyciszenie ekspresji genu *MARCH1* spowodowało znaczny spadek ubikwitynacji cząsteczek MHC klasy II w komórkach dendrytycznych człowieka, oraz na modelu mysim, co wpłynęło na opóźnienie dojrzewania tych komórek [192-194]. Stymulacja ludzkich monocytów interleukiną 10, cytokiną o silnych właściwościach przeciwzapalnych, spowodowała znaczny wzrost ekspresji tego genu [195]. Jednym z białek docelowych dla ligazy ubikwitynowej MARCH1 jest czynnik martwicy nowotworów α (TNF α), potężnego induktora odpowiedzi zapalnej w komórkach [196]. U homozygotycznych myszy z wyciszonym genem *ApoE* oraz *Cbs*, u których indukowano hiperhomocysteinemię zaobserwowano zaawansowaną miażdżycę oraz akumulację makrofagów w zmienionych miażdżycowo naczyniach krwionośnych. Natomiast w surowicy tych zwierząt wykazano podwyższony poziom TNF α jak również czynnika chemotaktycznego monocytów (MCP1) [197]. Dlatego też wzrost ekspresji genu *MARCH1* w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy a także jej metabolitów może również sugerować uruchomienie mechanizmów regulacyjnych w tych komórkach o charakterze przeciwzapalnym.

5.1.10. Wpływ Hcy oraz jej metabolitów na regulację ekspresji genów

Przeprowadzone analizy mikromacierzowe, których wyniki potwierdzono za pomocą qPCR pozwoliły wykazać, że ekspresja genu *DDX28* również zostaje zmieniona pod wpływem Hcy, HTL oraz N-Hcy-białek. Inkubacja komórek HUVEC z Hcy jak i HTL a także N-Hcy-białkami surowicy spowodowała obniżenie poziomu mRNA *DDX28*. *DDX28* jest białkiem stosunkowo mało poznanym. Na podstawie dotychczasowych doniesień literaturowych można sądzić, że białko to ma właściwości helikazy RNA. Zawiera ono konserwatywny motyw DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) i jest ono zlokalizowane zarówno w jądrze, jak i w mitochondriach, dlatego też przypuszcza się, że może ono być zaangażowane w kontakt pomiędzy tymi dwoma kompartmentami komórki [198]. W swojej sekwencji aminokwasowej zawiera ono sygnały lokalizacji jądrowej, jak i mitochondrialnej, co potwierdza tę hipotezę [199]. Wykazano również, że białko to wchodzi w skład kompleksów rybonukleoproteinowych, które mogą oddziaływać z wewnętrzną stroną błony mitochondrialnej [200]. Zaobserwowany spadek ekspresji genu *DDX28* w komórkach HUVEC zarówno pod wpływem Hcy jak również jej metabolitów, może świadczyć o dużym oddziaływaniu homocysteiny na komórki śródbłonna, z czym również związana jest zmiana sposobu ekspresji informacji genetycznej.

5.1.11. Wpływ Hcy oraz jej metabolitów na dojrzewanie komórek nerwowych

Przeprowadzone analizy pozwoliły na przeanalizowanie profilu ekspresji genu *ST8SIA2*. Wykazano spadek ekspresji tego genu zarówno pod wpływem Hcy, jak również HTL i N-Hcy-białek. Jednak to białka surowicy zmodyfikowane tiolaktonem homocysteiny spowodowały największe obniżenie poziomu mRNA tego genu.

Wykonane eksperymenty mikromacierzowe pozwoliły na wyłonienie genów, których profil ekspresji pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów zmieniał się w porównaniu do kontroli. Następnie spośród grupy genów różnicujących wybrano te, które wykazywały największe zmiany w ekspresji w warunkach eksperymentu oraz potencjalnie funkcja ich związana jest z rozwojem chorób układu krążenia. W grupie tej znalazł się również gen *ST8SIA2*. Jednak jego funkcja związana jest z patofizjologią

schizofrenii. Białko kodowane przez ten gen należy do grupy polisialotransferaz, które katalizują reakcję polisializacji nerwowej cząstki adhezyjnej (NCAM) [201] oraz synaptycznej cząstki adhezyjnej 1 (synCAM-1) [202]. Kwas polisialowy osłabia adhezję NCAM, przez co ułatwia między innymi migrację komórek nerwowych czy wzrost neurytów [203, 204]. Na podstawie eksperymentów przeprowadzonych na myszach z wyciszonym genem *Ncam* wykazano, że reakcja polisializacji NCAM jest niezbędna również do zachowania plastyczności synaps nerwowych co jest szczególnie ważne w procesie zapamiętywania informacji [205]. Polisialotransferazy regulują również funkcjonowanie neurologicznie aktywnych cząsteczek, takich jak mózgowy czynnik neurotroficzny (BDNF), dopamina, czy czynnik wzrostu fibroblastów [206]. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) w regionie paromotorowym genu *ST8SIA2* jest również związany z występowaniem schizofrenii [207]. Isomura i wsp. wykazali, że białko *ST8SIA2* pochodzące od pacjentów chorujących na schizofrenię miało zmniejszoną aktywność o 10-30%, w porównaniu z białkiem zdrowych ludzi. Jego zmniejszona aktywność związana była z mniejszą wydajnością reakcji polisializacji białka adhezyjnego NCAM, w hodowli komórkowej w porównaniu z białkiem kontrolnym [208]. Wykazany znaczący spadek ekspresji genu *ST8SIA2* w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy, HTL i N-Hcy-białek surowicy, może sugerować upośledzenie szlaku polisializacji białka adhezyjnego NCAM pod wpływem hiperhomocysteinemii. Wykazano również, że kwas polisialowy pełni ważną rolę w prawidłowym rozwoju mózgu, biorąc udział w migracji i różnicowaniu prekursorów komórek nerwowych [209]. Wyniki wykonanych eksperymentów są zgodne z doniesieniami o hiperhomocysteinemii jako czynnika ryzyka rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

5.1.12. Wpływ Hcy oraz jej metabolitów na proces krzepnięcia krwi

Przeanalizowano również wpływ Hcy i jej metabolitów na profil ekspresji genu *ANXA8* w komórkach HUVEC. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów za wykazano zmianę ekspresji genu *ANXA8* po 24h inkubacji zarówno z Hcy, HTL i N-Hcy-białkami. Jednakże zmiany te były odmienne dla Hcy i HTL niż dla N-Hcy-białek surowicy. Zarówno Hcy jak i HTL przyczyniły się do znaczącego

spadku poziomu mRNA *ANXA8*. Zaobserwowano wzrost ekspresji *ANXA8* pod wpływem białek surowicy zmodyfikowanych HTL. Gen *ANXA8* koduje białko należące do rodziny aneksyn, białek wiążących jony Ca^{2+} i fosfolipidy. Między innymi funkcja tego białka polega na inhibicji aktywności fosfolipazy A2, której rola polega na hydrolizie fosfolipidów. *ANXA8* bierze również udział w inhibicji procesu krzepnięcia krwi, poprzez upośledzenie przekształcania się protrombiny w trombinę pod wpływem kompleksu aktywowanych czynników krzepnięcia Xa-Va, w obecności fosfolipidów [150]. Obniżenie poziomu mRNA *ANXA8* w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i tiolaktonu homocysteiny może potwierdzać prozakrzepowy charakter zmian indukowanych hiperhomocysteinemią. Dodatkowo odmienny wpływ N-Hcy-białek surowicy na ekspresję tego genu sugeruje, że mechanizm ten jest niezależny od mechanizmu N-homocysteinylacji.

5.2. Analiza ekspresji ludzkich miRNA pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów

miRNA stanowią rodzinę krótkich, niekodujących RNA, o ogromnym potencjale regulacyjnym ekspresji genów. Dlatego też postanowiono zbadać, czy podwyższony poziom homocysteiny i jej metabolitów w komórkach jest w stanie indukować mechanizm regulacji ekspresji genów na drodze RNAi. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że miRNA ulegają odmiennej ekspresji w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny i HTL. Jednakże homocysteina zmienia profil ludzkich miRNA tylko w wysokich stężeniach (100 μM oraz 1000 μM). Może to być związane z większym efektem cytotoksycznym tiolaktonu homocysteiny w komórkach śródbłonna [120]. Natomiast N-Hcy-białka surowicy bydłowej nie wpływają na profil ludzkich miRNA. Jednakże aby w pełni zrozumieć, mechanizmy w które zaangażowane są miRNA w warunkach hiperhomocysteinemii należy poznać geny docelowe dla miRNA wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem Hcy i HTL. W tym celu wykonano analizę bioinformatyczną za pomocą programu Ingenuity Pathway Analysis. Dane mikromacierzowe, potwierdzone za pomocą real-time PCR przeanalizowano pod kątem zaangażowania badanych ludzkich miRNA w konkretne szlaki metaboliczne i sygnałowe z uwzględnieniem genów docelowych zidentyfikowanych na podstawie analizy sekwencji regionu 3'UTR, a także zmian

w ekspresji miRNA pod wpływem homocysteiny i HTL. Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy zaobserwowano, że miRNA charakteryzujące się odmienną ekspresją pod wpływem Hcy i HTL mogą brać udział w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w wiele szlaków w komórce takich jak proliferacja komórek, angiogeneza, rozwój odpowiedzi zapalnej czy metabolizm lipidów, co szczegółowo przedstawiono w tabeli 27.

Gen kodujący miR-34a charakteryzował wzrost ekspresji po inkubacji z Hcy i tiolaktonem homocysteiny. Na podstawie doniesień literaturowych, można sądzić o roli tego miRNA w regulacji procesu starzenia komórek. Ito i wsp. wykazali, że poziom tego miRNA zwiększa się w starzejących się komórkach śródbłonna. Ponadto wykazano, że genem docelowym dla miR-34a jest gen *SIRT1*, który reguluje proces starzenia się komórek poprzez deacetylację genu kodującego białko p53 [210]. Zaproponowano również udział miR-34a w starzeniu się komórek mięśnia sercowego, z czym może być związane upośledzenie czynności kardiomiocytów obserwowane z wiekiem [211]. Zwiększoną ekspresję tego miRNA zaobserwowano również w blaszkach miażdżycowych w ścianach naczyń krwionośnych w porównaniu do zdrowych naczyń [103, 212]. Wykazany wzrost ekspresji miR-34a w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i HTL jest zgodny z tymi doniesieniami. Hiperhomocysteinemia prowadzi bowiem do dysfunkcji komórek śródbłonna, które nabierają fenotypowych cech starzejących się komórek, co jest również czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy. W oparciu o dane pochodzące z wykonanej analizy bioinformatycznej, można przypuszczać, że miR-34a może regulować również ekspresję genów *NTN4* oraz *VEGFA* pod wpływem homocysteiny, ponieważ w sekwencji regionu 3'UTR tych genów znaleziono potencjalne miejsca wiązania dla tego miRNA. Zaobserwowane obniżenie ekspresji obu genów pod wpływem Hcy i tiolaktonu homocysteiny może przemawiać za tą hipotezą.

Ekspresja genu kodującego miR-1 znacząco wzrosła pod wpływem Hcy, jak również HTL. miR-1 jest jednym z najpowszechniej występujących miRNA w mięśniu sercowym [213]. Kuwabara i wsp. donoszą, że jest on uwalniany z kardiomiocytów u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, z czym związany jest wzrost jego poziomu we krwi. Sugeruje, że może to być dobry wczesny marker martwicy mięśnia sercowego.

miRNA	zmiana ekspresji pod wpływem Hcy/HTL	metoda weryfikacji	gen	zmiana ekspresji pod wpływem Hcy/HTL	szlak sygnałowy/ metaboliczny
miR-1	↑	analiza bioinformatyczna	VEGFA	↓	angiogeneza, proliferacja komórek, szlak sygnałowy HIF1 α
miR-30e	↑	potwierdzone eksperymentalnie	NCEH1	↓	metabolizm lipidów
miR-34a	↑	potwierdzone eksperymentalnie	NTN4	↓	angiogeneza
		potwierdzone eksperymentalnie	VEGFA	↓	angiogeneza, proliferacja komórek, szlak sygnałowy HIF1 α
		analiza bioinformatyczna	NCEH1	↓	metabolizm lipidów
miR-125 b1	↑	analiza bioinformatyczna	VEGFA	↓	angiogeneza, proliferacja komórek, szlak sygnałowy HIF1 α
miR-196b	↑	analiza bioinformatyczna	NTN4	↓	angiogeneza
miR-331 3p	↑	analiza bioinformatyczna	MMP19	↓	adhezja granulocytów i diapedeza, inhibicja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, angiogeneza
		analiza bioinformatyczna	SCUBE1	↓	odpowiedź zapalna, aktywacja płytek krwi
miR-1321	↑	analiza bioinformatyczna	SCUBE1	↓	odpowiedź zapalna, aktywacja płytek krwi
miR-4728	↑	analiza bioinformatyczna	APOA5	↓	metabolizm lipidów
		analiza bioinformatyczna	ST8SIA2	↓	rozwój komórek nerwowych, synteza gangliozydów

Tabela 28: Udział miRNA w regulacji ekspresji genów wykazujących spadek ekspresji pod wpływem homocysteiny i HTL w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych.

Co więcej, wzrost poziomu miR-1 we krwi można oznaczyć zanim można zaobserwować wzrost stężenia powszechnie stosowanych wczesnych markerów, troponiny T czy kinazy kreatynowej w surowicy krwi [214]. Wykazano również, że regulacja apoptozy przez miR-1 w kardiomiocytach zachodzi poprzez gen Bcl-2, należący do rodziny genów związanych z kontrolą procesu apoptozy w tych komórkach [43, 215]. Wzrost poziomu miR1 powodował również inhibicję proliferacji komórek mięśni gładkich [216]. Stahlhut wsp. wykazał, że miR1 odpowiada także za regulację procesu angiogenezy u *Danio rerio*, co jest związane z obniżeniem ekspresji genu *VEGFA* przez ten miRNA [217]. Wyniki analizy profilu ekspresji pod wpływem Hcy i HTL są zgodne z tymi doniesieniami. Zaobserwowany wzrost poziomu miR-1 w komórkach HUVEC może być tłumaczony regulacją procesu angiogenezy w komórkach śródbłonna za pomocą mechanizmu RNAi. Na podstawie wyników analizy bioinformatycznej wykazano, że gen *VEGFA* może być genem docelowym dla miR-1 również u człowieka. Znaleziono bowiem jedno miejsce wiązania dla tego miRNA w rejonie 3'UTR mRNA *VEGFA* (tabela 25). Ponadto, wzrost poziomu miR-1 był odwrotnie proporcjonalny do ekspresji genu *VEGFA* pod wpływem Hcy i HTL w komórkach HUVEC. Wykazano również, że rejon 3'UTR mRNA *VEGFA* może być również miejscem wiązania miR-125b, jednakże są to dwa odrębne miejsca, zlokalizowane w początkowym i końcowych odcinkach 3'UTR. Ekspresja genu miR-125b1 uległa zwiększeniu o ponad dwa razy zarówno pod wpływem Hcy jak i HTL. Jest to zgodne z prezentowanymi wcześniej wynikami eksperymentów przeprowadzonych dla transkryptomu ludzkiego, bowiem miR-125b1 również bierze udział w regulacji procesu proliferacji w komórkach ludzkich [218]. Ekspresja miR-125b1 również wyraźnie wzrasta w starzejących się komórkach śródbłonna. Jak wykazali Rippe i wsp. pełni on także funkcję regulatora ekspresji genów kodujących białka uważane za mediatory stanu zapalnego, związane z rozwojem zmian miażdżycowych [116]. Doniesienia te pozwalają potwierdzać prozapalny i promiażdżycowy wpływ hiperhomocysteinemii. Na podstawie prezentowanych wyników można sądzić, że w proces ten zaangażowana jest również regulacja ekspresji genów za pomocą miRNA.

Homocysteina oraz tiolakton homocysteiny wpłynęły także na znaczne podwyższenie poziomu ekspresji genu kodującego miR-30e. Najnowsze doniesienia literaturowe pozwalają sądzić o związku miR-30e z patofizjologią miażdżycy. Wykazano bowiem, że miR-30e wykazuje obniżoną ekspresję blaszek

miażdżycowych myszy z wyciszonym genem *ApoE*. Zidentyfikowano również gen docelowy tego miRNA. Jest to gen *SOC3* (ang. *cytokine signaling 3*), którego produkt białkowy zaangażowany jest w szlak sygnałowy związany ze zmniejszaniem odpowiedzi zapalnej oraz apoptozy. Obserwowano jego podwyższoną ekspresja w naczyniach krwionośnych objętych zmianami miażdżycowymi [212]. Wyniki analizy profilu ekspresji miR30e pod wpływem Hcy oraz HTL nie są zgodne z tym doniesieniem. Wykazano bowiem znaczący wzrost ekspresji miR-30e w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy oraz tiolaktonu homocysteiny. Tę rozbieżność wyników można tłumaczyć odmiennymi modelami badawczymi. Blaszką miażdżycową złożoną jest z wielu rodzajów komórek, w tym komórek śródbłonna, makrofagów czy fibroblastów. Obniżenie poziomu miR-30e jest uśrednionym wynikiem profilu ekspresji tego miRNA w komórkach tworzących blaszkę miażdżycową. Wyniki badań w niniejszej pracy dotyczą tylko jednego rodzaju komórek, dlatego też wyniki te trudno porównywać. Z drugiej jednak strony wykazany wzrost ekspresji miR-30e w komórkach HUVEC może być zgodny z tymi doniesieniami, ponieważ hiperhomocysteinemia jest stanem niefizjologicznym, który wywołuje również odpowiedź zapalną [120], dlatego możliwe jest, że wzrost ekspresji miR-30e w analizowanym modelu badawczym, świadczy o inhibicji ekspresji genu *SOC3* i rozwoju odpowiedzi zapalnej.

Zarówno Hcy jak i tiolakton homocysteiny zmieniły profil ekspresji miR-let 7b w komórkach HUVEC, powodując wzrost jego ekspresji. Profil ekspresji miR-let 7b jest odmienny w różnych typach komórek śródbłonna, jednak komórkach HUVEC ten miRNA charakteryzuje się niskim poziomem ekspresji [219]. Genem docelowym tego miRNA jest gen *TIMP1*, kodujący tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, białek biorących udział w procesie angiogenezy [220]. Dowiedziono również, że miR-let7b charakteryzuje się podwyższoną ekspresją w komórkach mózgu z postępującym procesem neurodegeneracji pod wpływem białek prionowych [221]. Wykazany wzrost ekspresji miR-let 7b w komórkach HUVEC pod wpływem zarówno Hcy jak również HTL może wskazywać na upośledzenie procesu angiogenezy przez hiperhomocysteinemię, na drodze regulacji aktywności ekspresji genów zaangażowanych w ten proces przez miRNA.

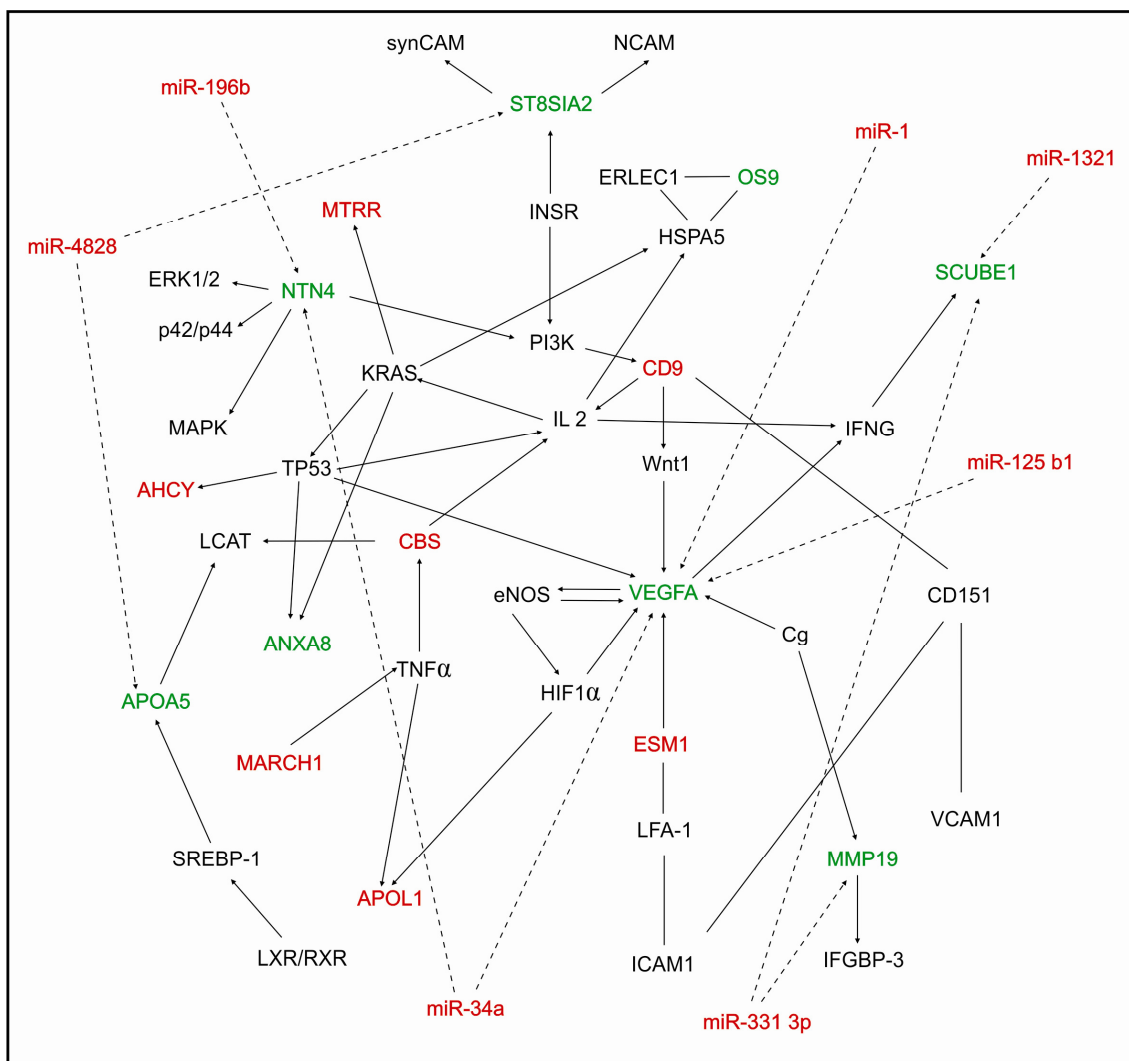
Wyniki przeprowadzonych analiz dla miR-196b wykazują także wzrost jego poziomu pod wpływem Hcy i HTL. Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują, że miR-196b jest niezbędny w procesach migracji komórek śródbłonna oraz tworzenia

przez nie tubuli. Wyciszenie tego miRNA wyraźnie upośledziło oba te procesy w ludzkich i mysich komórkach śródbłonka. Wykazano również, że ekspresja tego miRNA jest regulowana poprzez czynnik wzrostu VEGFA wydzielany przez komórki śródbłonka, co wpływa na zwiększenie ekspresji miR-196b [222]. Najnowsze doniesienia wskazują również na funkcję miR-196b w procesie proliferacji komórek nowotworowych. Ma i wsp. wykazali wzrost ekspresji tego miRNA w komórkach glejaka wielopostaciowego, co było związane z krótszym przeżyciem pacjentów, oraz zwiększoną proliferacją w nowotworowych liniach komórkowych z nadekspresją miR-196b [223]. Podwyższenie poziomu miR-196b w komórkach HUVEC pod wpływem Hcy i tiolaktonu homocysteiny można tłumaczyć zaangażowaniem komórkowych mechanizmów, mających zniwelować negatywny wpływ podwyższonego poziomu homocysteiny na proces angiogenezy.

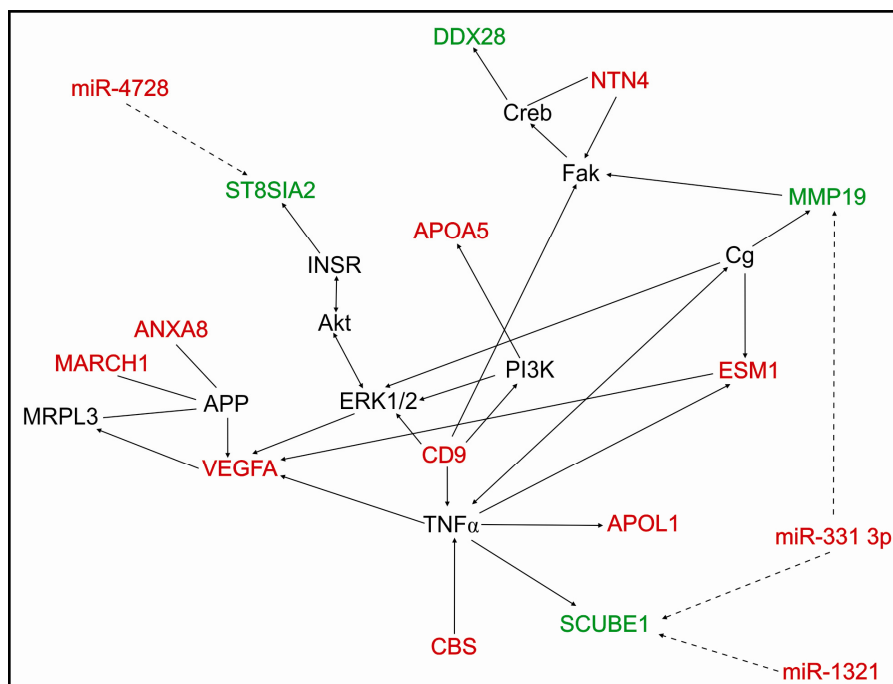
Pośród miRNA wybranych do analizy metodą real-time PCR były także miR-331 3p/5p, miR-1321, miR-4728 oraz miR-4758. Wszystkie wymienione miRNA ulegały zwiększonej ekspresji w komórkach śródbłonka, w odpowiedzi na homocysteinę i tiolaktonu homocysteiny. Wykazano, że poziom miR-331 ulegał podwyższeniu pod wpływem Hcy i HTL, natomiast poziom nici miR-331 3p jest znacznie bardziej podwyższony w badanych warunkach eksperymentalnych w porównaniu do nici 5p, co może sugerować, że ta właśnie nić była wybierana jako nić wiodąca przez kompleks miRISC (rysunek 6).

miRNA stanowią bardzo dużą rodzinę krótkich RNA. Obecnie w bazie miRBase (<http://www.mirbase.org/>) zdeponowanych jest ponad 2000 sekwencji dojrzałych ludzkich miRNA. Ponieważ regulacja za pomocą mechanizmu RNAi jest skomplikowana, wiele z nich nie ma dotąd poznanej funkcji. Tak też jest w przypadku pewnej grupy miRNA poddanej analizie profilu ekspresji w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów. Wyniki analizy bioinformatycznej, pozwoliły określić potencjalne miejsca wiązania w rejonie 3'UTR genów, których ekspresja została zmieniona w badanych warunkach eksperymentalnych (tabela 28). Jednym z możliwych genów docelowych miR-1321 jest gen *MARCH1* oraz *MMP19* który, jak wykazano w niniejszej pracy wykazuje spadek ekspresji pod wpływem Hcy jak również jej metabolitów. Spośród przypuszczalnych miejsc wiązania miR-4728 jest mRNA genów *APOA5* a także *ST8SIAII*, których ekspresja jest obniżona pod wpływem Hcy i HTL. Potencjalne miejsca oddziaływania miR-4758 to sekwencja kodująca syntazę metioniny. Natomiast genem docelowym dla miR-331 może być również gen

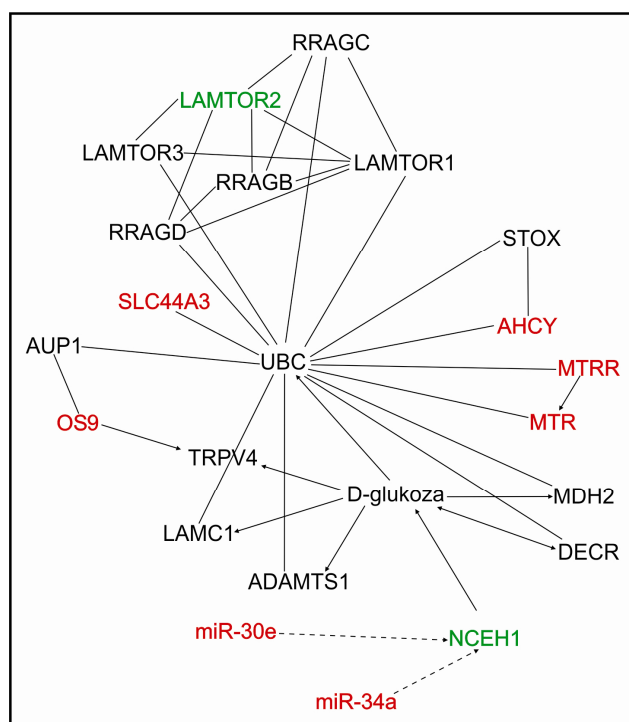
MARCH1. Możliwym jest, że w przypadku tych genów regulacja ekspresji pod wpływem homocysteiny i/lub jej metabolitów w komórkach HUVEC zachodzi z udziałem miRNA. Potrzebne są jednak dalsze badania, ażeby zbadać i wyjaśnić wskazane potencjalne mechanizmy regulacyjne. Ponadto, nie można wykluczyć, że geny których ekspresja wzrosła pod wpływem Hcy, HTL czy też N-Hcy-białek nie są regulowane przy pomocy miRNA. Wiadomo bowiem, że regulacja ta może również przyczyniać się do wzrostu ekspresji genu docelowego [224].



Rysunek 31: Przedstawienie szlaków sygnałowych i metabolicznych człowieka, w które zaangażowane są geny wykazujące odmienną ekspresję pod wpływem Hcy oraz HTL w komórkach HUVEC, z uwzględnieniem potencjalnych oddziaływań miRNA:mRNA (linia przerywana). Strzałkami zaznaczono oddziaływania mRNA:mRNA. Linia ciągła oznacza wiązanie zachodzące pomiędzy produktami białkowymi tych genów. Na czerwono zaznaczono geny ulegające zwiększonej ekspresji, na zielono zaznaczono geny o obniżonej ekspresji.



Rysunek 32: Przedstawienie szlaków sygnałowych i metabolicznych człowieka, w które zaangażowane są geny wykazujące odmienną ekspresję pod wpływem N-Hcy-białek surowicy w komórkach HUVEC, z uwzględnieniem potencjalnych oddziaływań miRNA:mRNA (linia przerywana). Strzałkami zaznaczono oddziaływania mRNA:mRNA. Linia ciągła oznacza wiązanie zachodzące pomiędzy produktami białkowymi tych genów. Na czerwono zaznaczono geny ulegające zwiększonej ekspresji, na zielono zaznaczono geny o obniżonej ekspresji.



Rysunek 33: Przedstawienie szlaków sygnałowych i metabolicznych człowieka, w które zaangażowane są geny wykazujące odmienną ekspresję pod wpływem N-Hcy-białek surowicy w komórkach HUVEC, z uwzględnieniem potencjalnych oddziaływań miRNA:mRNA (linia przerywana). Strzałkami zaznaczono oddziaływania mRNA:mRNA. Linia ciągła oznacza wiązanie zachodzące pomiędzy produktami białkowymi tych genów. Na czerwono zaznaczono geny ulegające zwiększonej ekspresji, na zielono zaznaczono geny o obniżonej ekspresji.

5.3. Wpływ N-homocysteinyłacji białek histonowych na epigenetyczną regulację ekspresji genów człowieka

Regulacja ekspresji genów może odbywać się w komórkach również za pomocą modyfikacji epigenetycznych DNA i/lub białek histonowych. Wiadomo, że hiperhomocysteinemia związana jest z obniżeniem poziomu metylacji DNA na drodze inhibicji metylotransferaz DNA przez S-adenozyl-homocysteinę [83]. Nie wiadomo jednak czy hiperhomocysteinemia może powodować modyfikacje białek histonowych oraz czy obserwowana *in vitro* [43] wydajna N-homocysteinyłacja białek histonowych zachodzi również *in vivo*. Dlatego też postanowiono zbadać czy homocysteina zdolna jest do regulacji ekspresji genów w komórkach HUVEC na drodze regulacji epigenetycznej.

5.3.1. Określenie miejsc N-homocysteinyłacji białek histonowych *in vitro*

Zastosowanie bardzo czułej metody o wysokiej rozdzielczości, jaką jest spektrometria mas pozwoliło na zidentyfikowanie reszt lizyny w białkach histonowych, które preferencyjnie ulegają modyfikacji tiolaktonem homocysteiny w warunkach *in vitro*. Na podstawie wyników wykonanych analiz zidentyfikowano więcej miejsc N-homocysteinyłacji dla histonów H1, H2A oraz H2B w porównaniu do histonów H3 i H4. Jest to dość zaskakujące, ponieważ w komórkach HUVEC to właśnie histony H3 i H4 ulegają w większym stopniu N-homocysteinyłacji (wyniki omówione w rozdziale 4.5.1). Ta różnica może być spowodowana faktem, że struktura drugorzędowa białek w warunkach *in vitro* może różnić się w znacznym stopniu od konformacji, którą przyjmuje białko w warunkach wewnątrzkomórkowych. Stąd może wynikać różnica w dostępności reszt lizyny do modyfikacji pomiędzy tymi dwoma warunkami eksperymentalnymi. Jednakże aby potwierdzić tę hipotezę należy wykonać dodatkowe analizy za pomocą spektrometrii mas i przeanalizować białka histonowe pochodzące z komórek HUVEC inkubowanych z Hcy czy HTL pod kątem potencjalnych miejsc N-homocysteinyłacji.

5.3.2. N-homocysteinyłacja białek histonowych w komórkach HUVEC

Aby zbadać wpływ homocysteiny na epigenetyczną regulację ekspresji genów, postanowiono w pierwszym etapie sprawdzić czy tiolakton homocysteiny jest zdolny do N-homocysteinyłacji histonów w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. W tym celu zastosowano przeciwciała królicze specyficznie rozpoznające epitop –N-Hcy-Lys w białku. Wyniki wykonanych eksperymentów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że białka histonowe ulegają N-homocysteinyłacji w komórkach HUVEC, a reakcja ta zachodzi z wydajnością wprost proporcjonalną do stężenia Hcy i HTL. Dodatkowo histony H3 i H4 preferencyjnie ulegają w komórkach N-homocysteinyłacji, z czym związany jest większy stopień ich modyfikacji. Także histon łącznikowy H1 nie jest podatny na tę modyfikację. Ulega jej w niewielkim stopniu jedynie przy wysokich stężeniach Hcy i HTL (100 i 1000 μM). Może być to spowodowane większą dostępnością reszt lizynowych histonów H3 i H4 dla HTL w komórce, bądź też większą ich zawartością sekwencji aminokwasowej w porównaniu do histonów H2A i H2B. Natura chemiczna tiolaktonu homocysteiny sprawia, że może on łatwo przenikać przez błony komórkowe, powodując N-homocysteinyłację białek wewnątrzkomórkowych [47, 51]. Histony są białkami o charakterze zasadowym, które w swojej sekwencji aminokwasowej zawierają wiele reszt lizyny – potencjalnych miejsc oddziaływania z HTL. Wykazano także, że ulegają one wydajnie N-homocysteinyłacji *in vitro* [51]. Jednak białka w warunkach *in vitro* mogą przybierać inną konformację, niż w naturalnym środowisku komórki. Dlatego też dostępność reszt lizyny białek histonowych mogła być większa w warunkach *in vitro*, niż wewnątrz komórek. Prezentowane wyniki wykonanych eksperymentów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że białka histonowe ulegają N-homocysteinyłacji *ex vivo*, w stopniu wprost proporcjonalnym do stężenia czynnika modyfikującego.

5.3.3. Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na poziom acetylacji białek histonowych w komórkach HUVEC

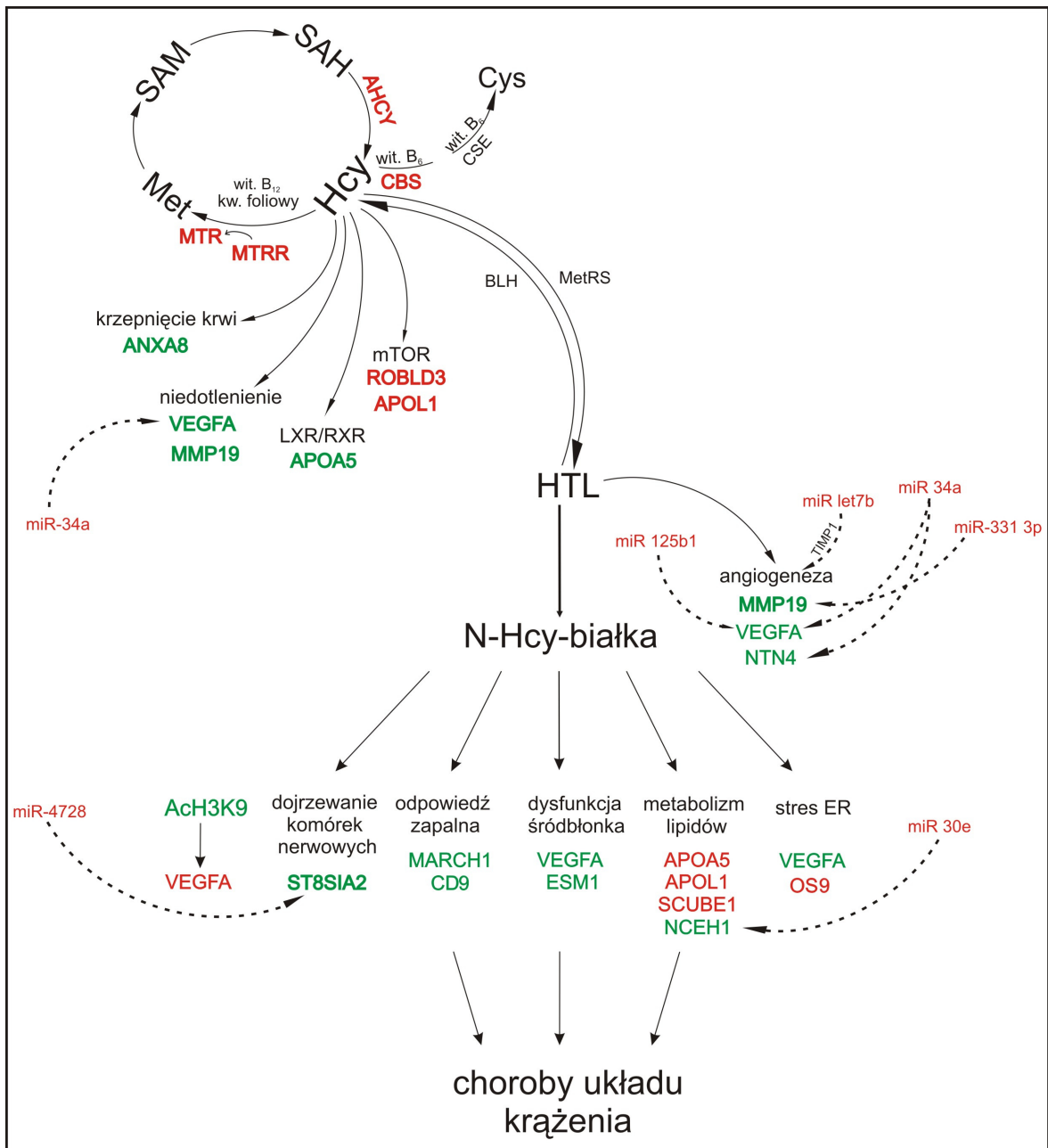
Histony są białkami, które są obiektem modyfikacji potranslacyjnych, powodujących większą lub mniejszą zdolność oddziaływania z DNA, dzięki czemu DNA może być bardziej lub mniej dostępny dla czynników transkrypcyjnych, co wpływa na regulację ekspresji genów. Acetylacja polega na przyłączeniu grupy acetylowej do ϵ -aminowej grupy reszty Lys w białku. Sugeruje się, że powoduje ona wzrost ekspresji genów. Przyłączenie reszty acetylowej jest związane z neutralizacją dodatniego ładunku lizyny, co wpływa na rozluźnienie oddziaływań histon-histon oraz histon-DNA, a przez to zwiększa dostępność DNA dla czynników transkrypcyjnych w jądrze [225]. Ponieważ, acetylazy histonów, tak samo jak tiolakton homocysteiny rozpoznają specyficznie ϵ -aminową grupę reszty Lys w sekwencji aminokwasowej, postanowiono zbadać czy N-homocysteinyłacja białek histonowych może wpływać na ich stopień acetylacji. W tym celu wykonano Western blot z przeciwciałem poliklonalnym skierowanym przeciwko monoacetylacji lizyny 9 na histonie H3. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów nie zaobserwowano zmiany poziomu acetylacji Lys9 histonu H3 w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny jak i HTL. Natomiast zaobserwowano obniżenie poziomu acetylacji Lys9 histonu H3 pod wpływem N-Hcy-białek surowicy. Istnieje wiele doniesień literaturowych mówiących o związku hiperhomocysteinemii z epigenetyczną regulacją ekspresji genów poprzez metylację DNA. Podwyższony poziom homocysteiny jest skorelowany z obniżeniem poziomu metylacji DNA, ponieważ S-adenozylhomocysteina, jeden z metabolitów szlaku prowadzącego do przekształcenia metioniny w Hcy, jest silnym inhibitorem metylotransferaz DNA [83]. Hipometylacja DNA związana jest również ze wzrostem poziomu acetylacji. Taką zależność wykazano pod wpływem homocysteiny w komórkach śródbłonna [226]. Zauważono również wzrost poziomu acetylacji H3K9 w astrocytach pod wpływem Hcy, co było związane z zaburzeniem funkcjonowania mitochondriów w tych komórkach [227]. Jednakże wysoki poziom SAH w komórce, nie zawsze objawia się spadkiem metylacji genomowego DNA, co wykazali Delvin i Fwsp, sugerując że mechanizm ten może być tkankowo specyficzny [107]. Dokładnie odwrotny wpływ SAH wykazali Safari i wsp, którzy zaobserwowali spadek acetylacji H3K9, co było skorelowane z podwyższoną ekspresją genu *VEGFA* w embrionach bydłecych [228]. Hipotezę tę potwierdzają wyniki prezentowane w niniejszej pracy.

Wykazany spadek poziomu acetylacji H3K9 pod wpływem N-Hcy-białek może korelować ze zwiększoną ekspresją genu *VEGFA* w komórkach HUVEC w tych właśnie warunkach. Niezmienny poziom acetylacji H3K9 pod wpływem Hcy i HTL, mógł być również związany z niskim stopniem N-homocysteinyłacji białek histonowych.

Na podstawie prezentowanych wyników można wnioskować o zaangażowaniu epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach HUVEC pod wpływem homocysteiny. Są to mechanizmy ściśle związane ze szlakiem N-homocysteinyłacji.

Podsumowanie

Hiperhomocysteinemia wpływa na zmiany w profilu ekspresji ludzkich genów. Na podstawie wyników prezentowanych w niniejszej pracy można sądzić, że regulacja zmian ekspresji genów pod wpływem homocysteiny a także jej metabolitów obejmuje szereg mechanizmów komórkowych, w tym również regulację ekspresji genów za pomocą miRNA a także mechanizmów epigenetycznych (rysunek 34). Geny, których profil ekspresji zmieniał się pod wpływem homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny oraz N-Hcy-białek zaangażowane są w szereg bardzo istotnych szlaków sygnałowych i metabolicznych w komórkach, takich jak angiogeneza (*VEGFA*, *ESM1*, *NTN4*), odpowiedź na niesfałdowane białka (*VEGFA*, *OS9*), rozwój odpowiedzi zapalnej (*CD9*, *MARCH1*), szlak indukowany niedotlenieniem (*VEGFA*), metabolizm lipidów (*APOLI*, *APOA5*, *SCUBE1*, *NCEH1*), metabolizm aminokwasów (*CBS*, *MTR*, *MTRR*), szlak sygnałowy kinazy mTOR (*APOLI*, *ROBLD3*) czy LXR/RXR (*APOA5*). Ponadto wymienione szlaki metaboliczne i sygnałowe mogą być regulowane za pomocą miRNA na drodze RNAi. miR-1, miR-34a, miR-125 b1, oraz miR-331 3p poprzez regulację ekspresji genów docelowych mogą mieć udział w regulacji procesu angiogenezy. miR-1, miR-34a oraz miR-125 b1 poprzez swoje geny docelowe mogą mieć wpływ na adhezję komórek śródbłonna oraz na szlak sygnałowy indukowany niedotlenieniem. Funkcja miR-34a, miR-30e a także miR-4728 może być związana z regulacją metabolizmu lipidów. Rozwój odpowiedzi zapalnej może również być regulowany za pomocą miR-331-3p oraz miR-1321. Zidentyfikowano również epigenetyczny mechanizm regulacji genów w komórkach HUVEC pod wpływem N-homocysteinylowanych białek za pomocą acetylacji Lys9 histonu H3. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu wymienionych szlaków metabolicznych pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów mogą mieć poważne konsekwencje dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Co więcej mechanizmy te leżą u podstaw patofizjologii miażdżycy. Zidentyfikowane mechanizmy regulacyjne indukowane hiperhomocysteinemią, mogą w przyszłości stanowić potencjalne cele terapeutyczne, chroniące przed negatywnymi skutkami podwyższonego poziomu homocysteiny we krwi.



Rysunek 34: Wpływ homocysteiny i jej metabolitów na ekspresję ludzkich genów oraz potencjalnie mechanizmy jej regulacji za pomocą miRNA i mechanizmów epigenetycznych. Na czerwono zaznaczono geny, których ekspresja wzrosła pod wpływem Hcy, HTL lub N-Hcy-białek w komórkach HUVEC; analogicznie na zielono zaznaczono geny, dla których wykazano obniżenie poziomu mRNA.

6. Wnioski

- Homocysteina oraz jej metabolity wpływają negatywnie na przeżywalność komórek HUVEC, jednak największy spadek przeżywalności wykazano pod wpływem N-Hcy-białek.
- Homocysteina, tiolakton homocysteiny oraz N-Hcy-białka wpływają na profil ekspresji genów w komórkach HUVEC. Homocysteina zmienia ekspresję tych samych genów co HTL, co może świadczyć o wspólnym mechanizmie patofizjologii. Natomiast N-Hcy-białka powodują zmiany innej grupy genów niż Hcy i HTL, co może być związane z innym patomechanizmem związanym z obecnością białek zmodyfikowanych tiolaktonem homocysteiny.
- Na podstawie prezentowanych wyników badań potwierdzono hipotezę zakładającą, że mechanizm toksyczności homocysteiny związany jest z jej konwersją do tiolaktonu homocysteiny, co powoduje także zmiany w ekspresji genów. Jednocześnie wykazano, że istnieją również inne mechanizmy, niezależne od ścieżki N-homocysteinylacji, związane z patofizjologią podwyższonego poziomu homocysteiny.
- Geny, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny a także N-Hcy-białek są zaangażowane w szereg bardzo istotnych szlaków sygnałnych i metabolicznych w komórkach, takich jak angiogeneza, odpowiedź na niesfałdowane białka, rozwój odpowiedzi zapalnej, szlak indukowany niedotlenieniem czy metabolizm lipidów. Nieprawidłowe funkcjonowanie tych szlaków metabolicznych może mieć poważne konsekwencje dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Mechanizmy te leżą także u podstaw rozwoju miażdżycy.
- Homocysteina oraz tiolakton homocysteiny indukują zmiany w profilu ludzkich miRNA w komórkach HUVEC, co może być związane z indukcją mechanizmu RNAi w warunkach hiperhomocysteinemii. Natomiast nie wykazano zmian w profilu ludzkich miRNA pod wpływem N-Hcy-białek.
- Określono potencjalne miejsca wiązania dla miRNA wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem homocysteiny oraz HTL. Na podstawie wykonanych

analiz wykazano, że zmiany ekspresji genów indukowane homocysteiną jak również jej metabolitami mogą być wywołane również na drodze mechanizmu RNAi.

- Zidentyfikowano preferencyjne miejsca N-homocysteinylacji białek histonowych *in vitro*: sześć miejsc modyfikacji w sekwencji histonu H1, pięć miejsc modyfikacji w sekwencji histonu H2A, cztery miejsca modyfikacji w sekwencji histonu H2B, dwa miejsca modyfikacji w sekwencji histonu H3.1 oraz trzy miejsca modyfikacji w sekwencji histonu H4.
- Białka histonowe ulegają N-homocysteinylacji *ex vivo* w stopniu wprost proporcjonalnym do stężenia czynnika modyfikującego.
- N-Hcy-białka powodują obniżenie poziomu acetylacji Lys9 histonu H3 w komórkach HUVEC. Natomiast homocysteina oraz tiolakton homocysteiny nie wpływają na poziom acetylacji Lys9 histonu H3 w komórkach HUVEC.
- Wykazane zmiany w poziomie acetylacji Lys9 histonu H3 w komórkach HUVEC mogą sugerować, że zmiany w ekspresji genów pod wpływem homocysteiny i jej metabolitów mogą być efektem epigenetycznej regulacji ekspresji genów.

7. Literatura:

- 1 Brosnan, J.T., *et al.* (2004) Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol* 51, 405-413
- 2 Brosnan, J.T. (2004) Homocysteine and cardiovascular disease: interactions between nutrition, genetics and lifestyle. *Can J Appl Physiol* 29, 773-780
- 3 Jakubowski, H. (2006) Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nurt* 136, 1741S-1749S
- 4 Kim, H.Y., *et al.* (1993) The relationship between synthetic and editing functions of the active site of an aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11553-11557
- 5 Jakubowski, H. (2000) Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein. *J Biol Chem* 275, 21813-21816
- 6 Jakubowski, H. and Goldman, E. (1993) Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Let* 317, 237-240
- 7 Jakubowski, H. and Fersht, A.R. (1981) Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic acids research* 9, 3105-3117
- 8 McCully, K.S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56, 111-128
- 9 Lentz, S.R. (2005) Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *JThromb Haemost* 3, 1646-1654
- 10 Goyette, P., *et al.* (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7, 551
- 11 Goyette, P., *et al.* (1995) Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 56, 1052-1059
- 12 Goyette, P., *et al.* (1996) Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet* 59, 1268-1275
- 13 van der Put, N.M., *et al.* (1995) Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346, 1070-1071
- 14 Frosst, P., *et al.* (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10, 111-113
- 15 Whitehead, V.M. (2006) Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *Br J Haematol* 134, 125-136

- 16 DiBello, P.M., *et al.* (2010) The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Proteomics* 9, 471-485
- 17 Maclean, K.N., *et al.* (2012) Cystathionine protects against endoplasmic reticulum stress-induced lipid accumulation, tissue injury, and apoptotic cell death. *J Biol Chem* 287, 31994-32005
- 18 Wang, L., *et al.* (2004) Modulation of cystathionine beta-synthase level regulates total serum homocysteine in mice. *Circ Res* 94, 1318-1324
- 19 Chen, Z., *et al.* (2001) Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10, 433-443
- 20 Jakubowski, H., *et al.* (2009) Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 23, 1721-1727
- 21 Jakubowski, H., *et al.* (2008) Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation protein levels in humans. *FASEB J* 22, 4071-4076
- 22 Yap, S., *et al.* (2001) Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 2080-2085
- 23 Biselli, P.M., *et al.* (2007) Effect of folate, vitamin B6, and vitamin B12 intake and MTHFR C677T polymorphism on homocysteine concentrations of renal transplant recipients. *Transplant Proc* 39, 3163-3165
- 24 Strauss, K.A., *et al.* (2007) Prevention of brain disease from severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Mol Genet Metabol* 91, 165-175
- 25 Kruger, W.D., *et al.* (2000) Polymorphisms in the CBS gene associated with decreased risk of coronary artery disease and increased responsiveness to total homocysteine lowering by folic acid. *Mol Genet Metabol* 70, 53-60
- 26 Liu, L.H., *et al.* (2012) Protection of DDAH2 Overexpression Against Homocysteine-Induced Impairments of DDAH/ADMA/NOS/NO Pathway in Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 30, 1413-1422
- 27 Dembińska-Kieć, A. and Naskalski, J.W. (2009) *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.*
- 28 Li, M., *et al.* (2006) Folic acid reduces adhesion molecules VCAM-1 expression in aortic of rats with hyperhomocysteinemia. *Int J Cardiol* 106, 285-288
- 29 Thampi, P., *et al.* (2008) Dietary homocysteine promotes atherosclerosis in apoE-deficient mice by inducing scavenger receptors expression. *Atherosclerosis* 197, 620-629

- 30 Liao, D., *et al.* (2006) Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ Res* 99, 598-606
- 31 Jakubowski, H. (2007) The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Clin Chem Lab Med* 45, 1704-1716
- 32 Lee, S.J., *et al.* (2005) Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine. *J Biol Chem* 280, 5781-5788
- 33 Zhang, J.G., *et al.* (2007) Dysfunction of endothelial NO system originated from homocysteine-induced aberrant methylation pattern in promoter region of DDAH2 gene. *Chin Med J* 120, 2132-2137
- 34 Dayal, S. and Lentz, S.R. (2005) ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 10 Suppl 1, S27-33
- 35 Stuhlinger, M.C., *et al.* (2003) Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 108, 933-938
- 36 Tyagi, N., *et al.* (2005) Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *American journal of physiology. Heart Circ Physiol* 289, H2649-2656
- 37 Outinen, P.A., *et al.* (1999) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 94, 959-967
- 38 Austin, R.C., *et al.* (2004) Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1, S56-64
- 39 Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol.* 18, 716-731
- 40 Austin, R.C., *et al.* (1998) Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H₂O₂ act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J Biol Chem* 273, 30808-30817
- 41 Zhang, C., *et al.* (2001) Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 276, 35867-35874
- 42 Perla-Kajan, J., *et al.* (2008) Immunohistochemical detection of N-homocysteinylated proteins in humans and mice. *Biomed Pharm* 62, 473-479
- 43 Jakubowski, H. (1999) Protein homocysteinylolation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 13, 2277-2283
- 44 Jakubowski, H. (2012) Quality control in tRNA charging. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 295-310

- 45 Jakubowski, H. (1990) Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4504-4508
- 46 Jakubowski, H. (1991) Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 10, 593-598
- 47 Jakubowski, H., *et al.* (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 87, 45-51
- 48 Jakubowski, H. (2002) Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 277, 30425-30428
- 49 Jakubowski, H. (2001) Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis. *J Nutr* 131, 2983S-2987S
- 50 Jakubowski, H. and Guranowski, A. (2003) Metabolism of homocysteine-thiolactone in plants. *J Biol Chem* 278, 6765-6770
- 51 Jakubowski, H. (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 272, 1935-1942
- 52 Perla, J., *et al.* (2004) Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on N-omega-homocysteinylation-aminohexyl-Agarose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 807, 257-261
- 53 Jakubowski, H. (1999) Misacylation of tRNA^{Lys} with noncognate amino acids by lysyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 38, 8088-8093
- 54 Perla-Kajan, J., *et al.* (2007) Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome C. *Biochemistry* 46, 6225-6231
- 55 Glowacki, R. and Jakubowski, H. (2004) Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 279, 10864-10871
- 56 Marczak, L., *et al.* (2011) Analysis of site-specific N-homocysteinylation of human serum albumin in vitro and in vivo using MALDI-ToF and LC-MS/MS mass spectrometry. *J Proteom* 74, 967-974
- 57 Sikora, M., *et al.* (2010) Direct monitoring of albumin lysine-525 N-homocysteinylation in human serum by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analyt Biochem* 405, 132-134
- 58 Paoli, P., *et al.* (2010) Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *J Mol Biol* 400, 889-907
- 59 Capasso, R., *et al.* (2012) Homocysteinylation of albumin promotes increased monocyte-endothelial cell adhesion and up-regulation of MCP1, Hsp60 and ADAM17. *PloS one* 7, e31388

- 60 Sauls, D.L., *et al.* (2006) Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochemistry* 45, 2480-2487
- 61 Undas, A., *et al.* (2006) Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 1397-1404
- 62 Malinowska, J., *et al.* (2012) Changes of blood platelet adhesion to collagen and fibrinogen induced by homocysteine and its thiolactone. *Clin Biochem* 45, 1225-1228
- 63 Vignini, A., *et al.* (2004) Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: an in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4558-4561
- 64 Ferretti, G., *et al.* (2003) Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism* 52, 146-151
- 65 Undas, A., *et al.* (2004) Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 35, 1299-1304
- 66 Undas, A., *et al.* (2005) Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb Haemost* 93, 346-350
- 67 Kolarz, M., *et al.* (2010) Antibodies against N-homocysteinylated proteins and their determinants in patients on long-term hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn* 120, 223-230
- 68 Jakubowski, H. (2005) Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 43, 1011-1014
- 69 Chwatko, G. and Jakubowski, H. (2005) Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem* 51, 408-415
- 70 Jakubowski, H. (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 275, 3957-3962
- 71 Leviev, I. and James, R.W. (2000) Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 516-521
- 72 Jakubowski, H., *et al.* (2001) Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Let* 491, 35-39
- 73 Perla-Kajan, J. and Jakubowski, H. (2010) Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *FASEB J* 24, 931-936
- 74 Tward, A., *et al.* (2002) Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106, 484-490
- 75 Zimny, J., *et al.* (2006) Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 281, 22485-22492

- 76 Borowczyk, K., *et al.* (2012) Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase. *Amino Acids* 43, 1339-1348
- 77 Borowczyk, K., *et al.* (2012) Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1. *J Alzheimers Dis* 30, 225-231
- 78 Suszynska, J., *et al.* (2010) Reduced homocysteine-thiolactonase activity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19, 1177-1183
- 79 Szymanski, M., *et al.* (2005) A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta* 1756, 65-75
- 80 Fabian, M.R., *et al.* (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Ann Rev Biochem* 79, 351-379
- 81 Krol, J., *et al.* (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Rev Genet* 11, 597-610
- 82 Winter, J., *et al.* (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biol* 11, 228-234
- 83 Lee, M.E. and Wang, H. (1999) Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 9, 49-54
- 84 Mateo Leach, I., *et al.* (2010) Pharmacoepigenetics in heart failure. *Curr Heart Failure Rep* 7, 83-90
- 85 Jenuwein, T. (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 11, 266-273
- 86 Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080
- 87 Fischle, W., *et al.* (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 172-183
- 88 Misri, S., *et al.* (2008) Telomeres, histone code, and DNA damage response. *Cytogenet Genome Res* 122, 297-307
- 89 Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13, 263-273
- 90 Turner, B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22, 836-845
- 91 Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705
- 92 Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148

- 93 Handy, D.E., *et al.* (2005) Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem* 280, 15518-15525
- 94 Upchurch, G.R., Jr., *et al.* (1997) Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272, 17012-17017
- 95 Sharma, P., *et al.* (2006) Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis* 5, 1
- 96 Fuchs, D., *et al.* (2005) Genistein blocks homocysteine-induced alterations in the proteome of human endothelial cells. *Proteomics* 5, 2808-2818
- 97 Ji, R., *et al.* (2007) MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 100, 1579-1588
- 98 Zhang, C. (2008) MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)* 114, 699-706
- 99 Suarez, Y., *et al.* (2007) Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100, 1164-1173
- 100 Kuehbacher, A., *et al.* (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101, 59-68
- 101 Poliseno, L., *et al.* (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108, 3068-3071
- 102 Jung, M., *et al.* (2009) MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* 13, 3918-3928
- 103 Raitoharju, E., *et al.* (2011) miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 219, 211-217
- 104 Goren, Y., *et al.* (2012) Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 14, 147-154
- 105 Mishra, P.K., *et al.* (2009) MicroRNAs are involved in homocysteine-induced cardiac remodeling. *Cell Biochem Biophys* 55, 153-162
- 106 Jiang, Y., *et al.* (2007) Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. *Acta Biochim Biophys Sin* 39, 657-667
- 107 Devlin, A.M., *et al.* (2005) Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 280, 25506-25511
- 108 Chang, P.Y., *et al.* (2008) Homocysteine inhibits arterial endothelial cell growth through transcriptional downregulation of fibroblast growth factor-2 involving G protein and DNA methylation. *Circ Res* 102, 933-941

- 109 Li, L., *et al.* (2009) Homocysteine harasses the imprinting expression of IGF2 and H19 by demethylation of differentially methylated region between IGF2/H19 genes. *Acta Biochim Biophys Sin* 41, 464-471
- 110 Ingrosso, D. and Perna, A.F. (2009) Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia. *Biochim Biophys Acta* 1790, 892-899
- 111 Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77
- 112 Smyth, G.K. and Speed, T. (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265-273
- 113 Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3
- 114 Benjamini, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 289-300
- 115 Scheffe, J.H., *et al.* (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)* 84, 901-910
- 116 Rippe, C., *et al.* (2012) MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Experim Gerontol* 47, 45-51
- 117 Benes, V. and Castoldi, M. (2010) Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50, 244-249
- 118 Chen, C., *et al.* (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33, e179
- 119 Tachiwana, H., *et al.* (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10454-10459
- 120 Kerkeni, M., *et al.* (2006) Comparative study on in vitro effects of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: evidence for a stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone. *Mol Cell Biochem* 291, 119-126
- 121 Dayal, S., *et al.* (2001) Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *CircRes* 88, 1203-1209
- 122 Chen, P., *et al.* (1999) Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 39, 93-109
- 123 Zou, C.G. and Banerjee, R. (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem* 278, 16802-16808

- 124 Chen, N.C., *et al.* (2010) Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *FASEB J* 24, 2804-2817
- 125 Zhao, J.Y., *et al.* (2012) Functional variant in methionine synthase reductase intron-1 significantly increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Circulation* 125, 482-490
- 126 Traiffort, E., *et al.* (2005) Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. *J Neurochem* 92, 1116-1125
- 127 Michel, V. and Bakovic, M. (2009) The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport. *FASEB J* 23, 2749-2758
- 128 De La Haba, G. and Cantoni, G.L. (1959) The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem* 234, 603-608
- 129 Baric, I., *et al.* (2004) S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4234-4239
- 130 Duchateau, P.N., *et al.* (1997) Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J Biol Chem* 272, 25576-25582
- 131 Duchateau, P.N., *et al.* (2000) Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *J Lipid Res* 41, 1231-1236
- 132 Duchateau, P.N., *et al.* (2001) Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res* 42, 620-630
- 133 Albert, T.S., *et al.* (2005) Apolipoprotein L-I is positively associated with hyperglycemia and plasma triglycerides in CAD patients with low HDL. *J Lipid Res* 46, 469-474
- 134 Li, Q., *et al.* (2009) Distribution and effect of apoL-I genotype on plasma lipid and apolipoprotein levels in Chinese normalipidemic and endogenous hypertriglyceridemic subjects. *Clin Chim Acta* 403, 152-155
- 135 Horrevoets, A.J., *et al.* (1999) Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 93, 3418-3431
- 136 Wan, G., *et al.* (2008) Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *J Biol Chem* 283, 21540-21549
- 137 Gao, X., *et al.* (2012) Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun* 427, 361-365
- 138 Pennacchio, L.A., *et al.* (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294, 169-173

- 139 Qu, S., *et al.* (2007) Effects of apoA-V on HDL and VLDL metabolism in APOC3 transgenic mice. *J Lipid Res* 48, 1476-1487
- 140 Grosskopf, I., *et al.* (2012) Apolipoprotein A-V modulates multiple atherogenic mechanisms in a mouse model of disturbed clearance of triglyceride-rich lipoproteins. *Atherosclerosis* 224, 75-83
- 141 Yang, R.B., *et al.* (2002) Identification of a novel family of cell-surface proteins expressed in human vascular endothelium. *J Biol Chem* 277, 46364-46373
- 142 Tu, C.F., *et al.* (2006) Localization and characterization of a novel secreted protein SCUBE1 in human platelets. *Cardiovascular Res* 71, 486-495
- 143 Okazaki, H., *et al.* (2008) Identification of neutral cholesterol ester hydrolase, a key enzyme removing cholesterol from macrophages. *J Biol Chem* 283, 33357-33364
- 144 Igarashi, M., *et al.* (2010) The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *CircRes* 107, 1387-1395
- 145 Sekiya, M., *et al.* (2009) Ablation of neutral cholesterol ester hydrolase 1 accelerates atherosclerosis. *Cell Metabolism* 10, 219-228
- 146 Wunderlich, W., *et al.* (2001) A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* 152, 765-776
- 147 Sancak, Y., *et al.* (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303
- 148 Bohn, G., *et al.* (2007) A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nature Medicine* 13, 38-45
- 149 Teis, D., *et al.* (2002) Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental Cell* 3, 803-814
- 150 Hauptmann, R., *et al.* (1989) Vascular anticoagulant beta: a novel human Ca²⁺/phospholipid binding protein that inhibits coagulation and phospholipase A₂ activity. Its molecular cloning, expression and comparison with VAC-alpha. *Eur J Biochem* 185, 63-71
- 151 Schultz, J.R., *et al.* (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development* 14, 2831-2838
- 152 Grefhorst, A., *et al.* (2002) Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 277, 34182-34190
- 153 Jakel, H., *et al.* (2004) The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c. *J Biol Chem* 279, 45462-45469

- 154 Nagy, L., *et al.* (2012) Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol Rev* 92, 739-789
- 155 Tabas, I. and Glass, C.K. (2013) Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 339, 166-172
- 156 Forsythe, J.A., *et al.* (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613
- 157 Olfert, I.M., *et al.* (2001) Chronic hypoxia attenuates resting and exercise-induced VEGF, flt-1, and flk-1 mRNA levels in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90, 1532-1538
- 158 Hudlicka, O., *et al.* (2002) Hypoxia and expression of VEGF-A protein in relation to capillary growth in electrically stimulated rat and rabbit skeletal muscles. *Exp Physiol* 87, 373-381
- 159 Brouet, A., *et al.* (2001) Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 32663-32669
- 160 Reihill, J.A., *et al.* (2007) AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 1084-1088
- 161 Kafousi, M., *et al.* (2012) Immunohistochemical study of the angiogenic network of VEGF, HIF1 α , VEGFR-2 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human breast cancer. *Pathol Oncol Res* 18, 33-41
- 162 Koch, M., *et al.* (2000) A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol* 151, 221-234
- 163 Lambert, E., *et al.* (2012) Netrin-4 acts as a pro-angiogenic factor during zebrafish development. *J Biol Chem* 287, 3987-3999
- 164 Larrieu-Lahargue, F., *et al.* (2010) Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood* 115, 5418-5426
- 165 Liu, Y., *et al.* (2004) Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol* 14, 897-905
- 166 Ferrara, N., *et al.* (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9, 669-676
- 167 Oosterbaan, A.M., *et al.* (2012) The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. *Microvasc Res* 83, 98-104
- 168 Huang, C.L., *et al.* (2004) MRP-1/CD9 gene transduction downregulates Wnt signal pathways. *Oncogene* 23, 7475-7483

- 169 Aitkenhead, M., *et al.* (2002) Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res* 63, 159-171
- 170 Abid, M.R., *et al.* (2006) Vascular endocan is preferentially expressed in tumor endothelium. *Microvasc Res* 72, 136-145
- 171 Shin, J.W., *et al.* (2008) Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis. *Blood* 112, 2318-2326
- 172 Rennel, E., *et al.* (2007) Endocan is a VEGF-A and PI3K regulated gene with increased expression in human renal cancer. *Experim Cell Res* 313, 1285-1294
- 173 Brutsch, R., *et al.* (2010) Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis. *Circ Res* 107, 592-601
- 174 Kolb, C., *et al.* (1999) Matrix metalloproteinase-19 in capillary endothelial cells: expression in acutely, but not in chronically, inflamed synovium. *Experim Cell Res* 250, 122-130
- 175 Sadowski, T., *et al.* (2003) Matrix metalloproteinase-19 expression in normal and diseased skin: dysregulation by epidermal proliferation. *J Invest Dermatol* 121, 989-996
- 176 Sadowski, T., *et al.* (2003) Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol Biol Cell* 14, 4569-4580
- 177 Brauer, R., *et al.* (2011) Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. *BMC Biochemistry* 12, 38
- 178 Narayanan, N., *et al.* (2013) Hyperhomocysteinemia during aortic aneurysm, a plausible role of epigenetics. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 5, 32-42
- 179 Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 18, 4-25
- 180 Miyagi, H., *et al.* (2013) Transcriptional regulation of VEGFA by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in ARPE-19 cells. *PloS one* 8, e55155
- 181 Ghosh, R., *et al.* (2010) Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PloS one* 5, e9575
- 182 Christianson, J.C., *et al.* (2008) OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nature Cell Biol* 10, 272-282
- 183 Bernasconi, R., *et al.* (2008) A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J Biol Chem* 283, 16446-16454

- 184 Satoh, T., *et al.* (2010) Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. *Mol Cell* 40, 905-916
- 185 Mikami, K., *et al.* (2010) The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. *Glycobiology* 20, 310-321
- 186 Yanez-Mo, M., *et al.* (2001) Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation* 8, 153-168
- 187 Barreiro, O., *et al.* (2005) Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* 105, 2852-2861
- 188 Zhaorigetu, S., *et al.* (2008) ApoL1, a BH3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Autophagy* 4, 1079-1082
- 189 Bechar, D., *et al.* (2001) Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 167, 3099-3106
- 190 Peng, J., *et al.* (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology* 21, 921-926
- 191 Schubert, U., *et al.* (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774
- 192 De Gassart, A., *et al.* (2008) MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3491-3496
- 193 Jahnke, M., *et al.* (2013) Ubiquitination of HLA-DO by MARCH family E3 ligases. *Eur J Immun* 43, 1153-1161
- 194 Li, F., *et al.* (2013) Altered MARCH1 ubiquitination-regulated dendritic cell immune functions during the early stage of zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in mice. *Immunology Lett* 150, 105-115
- 195 Thibodeau, J., *et al.* (2008) Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immun* 38, 1225-1230
- 196 Kim, W., *et al.* (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell* 44, 325-340
- 197 Zhang, D., *et al.* (2009) Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation* 120, 1893-1902
- 198 Valgardsdottir, R., *et al.* (2001) Cloning and characterization of MDDX28, a putative dead-box helicase with mitochondrial and nuclear localization. *J Biol Chem* 276, 32056-32063

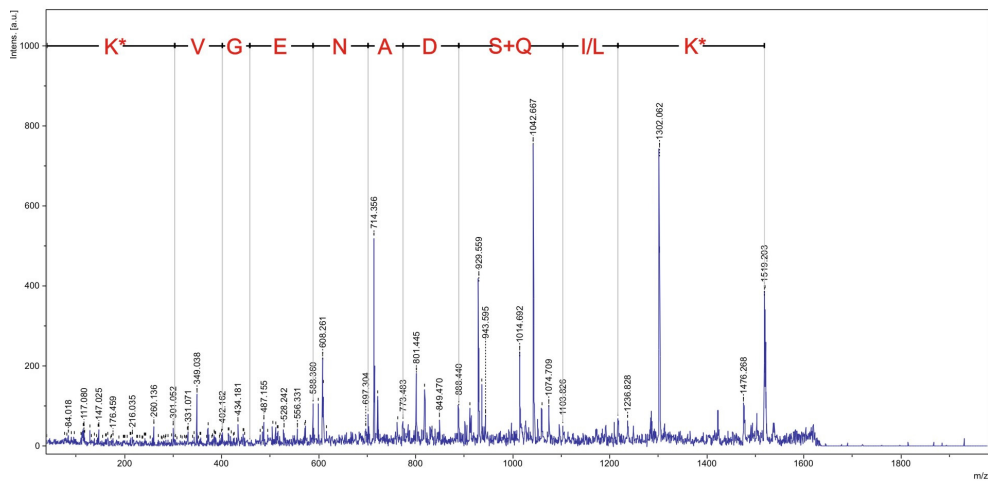
- 199 Valgardsdottir, R. and Prydz, H. (2003) Transport signals and transcription-dependent nuclear localization of the putative DEAD-box helicase MDDX28. *J Biol Chem* 278, 21146-21154
- 200 Valgardsdottir, R., *et al.* (2004) Regulated compartmentalization of the putative DEAD-box helicase MDDX28 within the mitochondria in COS-1 cells. *Exp Cell Res*
- 201 Muhlenhoff, M., *et al.* (2009) Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biol Chem* 390, 567-574
- 202 Rollenhagen, M., *et al.* (2012) Polysialylation of the synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM 1) depends exclusively on the polysialyltransferase ST8SiaII in vivo. *J Biol Chem* 287, 35170-35180
- 203 Angata, K., *et al.* (2002) ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J Biol Chem* 277, 36808-36817
- 204 Foley, D.A., *et al.* (2009) Identification of sequences in the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV that are required for the protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule, NCAM. *J Biol Chem* 284, 15505-15516
- 205 Shen, H., *et al.* (1997) Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J Neurosci* 17, 5221-5229
- 206 Sato, C. and Kitajima, K. (2013) Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. *Front Cell Neurosci* 7, 61
- 207 Arai, M., *et al.* (2006) Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biological Psychiatry* 59, 652-659
- 208 Isomura, R., *et al.* (2011) Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia. *J Biol Chem* 286, 21535-21545
- 209 Brocco, M., *et al.* (2003) Differential regulation of polysialyltransferase expression during hippocampus development: Implications for neuronal survival. *J Neurosci Res*
- 210 Ito, T., *et al.* (2010) MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 735-740
- 211 Boon, R.A., *et al.* (2013) MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495, 107-110
- 212 Han, H., *et al.* (2013) Differentiated miRNA expression and validation of signaling pathways in apoE gene knockout mice by cross-verification microarray platform. *Exp Mol Med* 45, e13
- 213 Vacchi-Suzzi, C., *et al.* (2013) Heart structure-specific transcriptomic atlas reveals conserved microRNA-mRNA interactions. *PloS one* 8, e52442

- 214 Kuwabara, Y., *et al.* (2011) Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet* 4, 446-454
- 215 Tang, Y., *et al.* (2009) MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J* 50, 377-387
- 216 Chen, J., *et al.* (2011) Induction of microRNA-1 by myocardin in smooth muscle cells inhibits cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 368-375
- 217 Stahlhut, C., *et al.* (2012) miR-1 and miR-206 regulate angiogenesis by modulating VegfA expression in zebrafish. *Development* 139, 4356-4364
- 218 Lee, Y.S., *et al.* (2005) Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem* 280, 16635-16641
- 219 McCall, M.N., *et al.* (2011) MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types. *BMC Medical Genomics* 4, 78
- 220 Otsuka, M., *et al.* (2008) Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest* 118, 1944-1954
- 221 Saba, R., *et al.* (2008) A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PloS one* 3, e3652
- 222 Plummer, P.N., *et al.* (2013) MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 73, 341-352
- 223 Ma, R., *et al.* (2012) Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PloS one* 7, e38096
- 224 Chen, Z., *et al.* (2013) Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *J Clin Invest* 123, 1057-1067
- 225 Backs, J. and Olson, E.N. (2006) Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res* 98, 15-24
- 226 Jamaluddin, M.D., *et al.* (2007) Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene. *Blood* 110, 3648-3655
- 227 Jin, Y., *et al.* (2011) Homocysteine levels impact directly on epigenetic reprogramming in astrocytes. *Neurochem Int* 58, 833-838
- 228 Jafari, S., *et al.* (2011) Improved in vitro development of cloned bovine embryos using S-adenosylhomocysteine, a non-toxic epigenetic modifying reagent. *Mol Reprod Dev* 78, 576-584

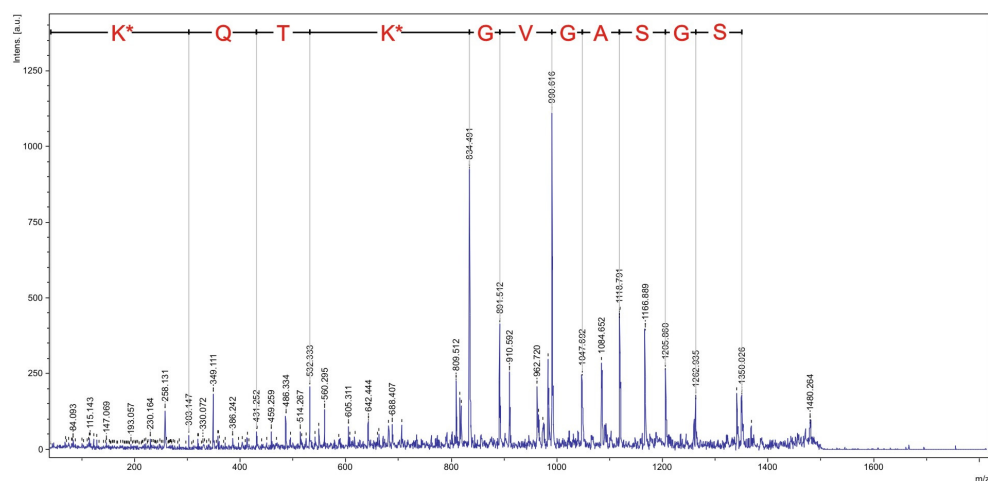
8. Załącznik 1

Widma fragmentacyjne miejsc N-homocysteinytacji białek histonowych

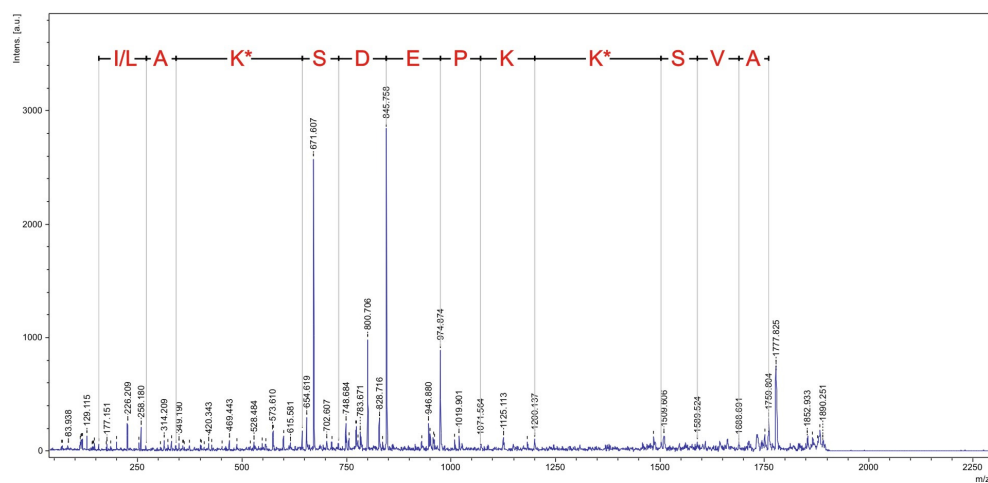
Lys 59 , 69



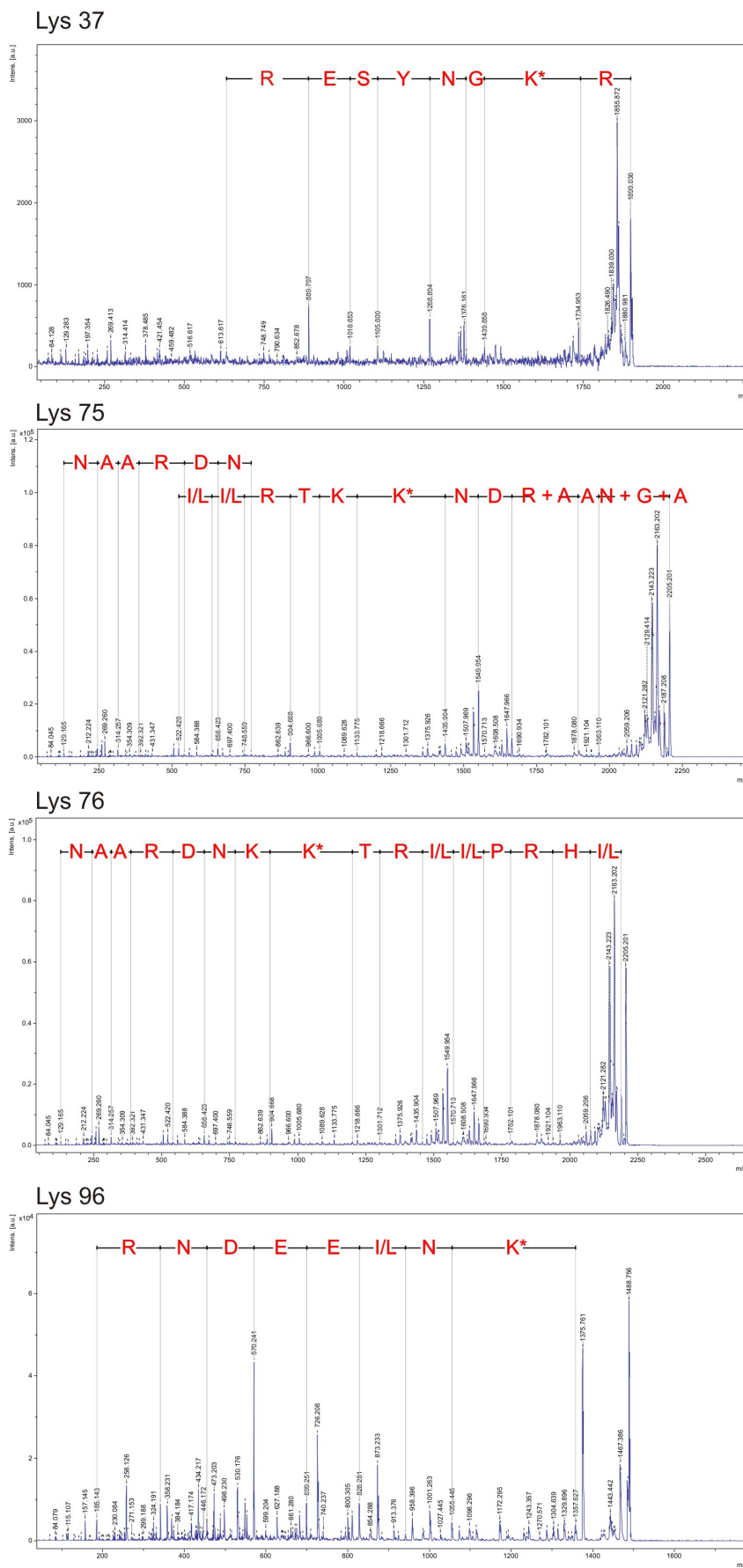
Lys 82 85



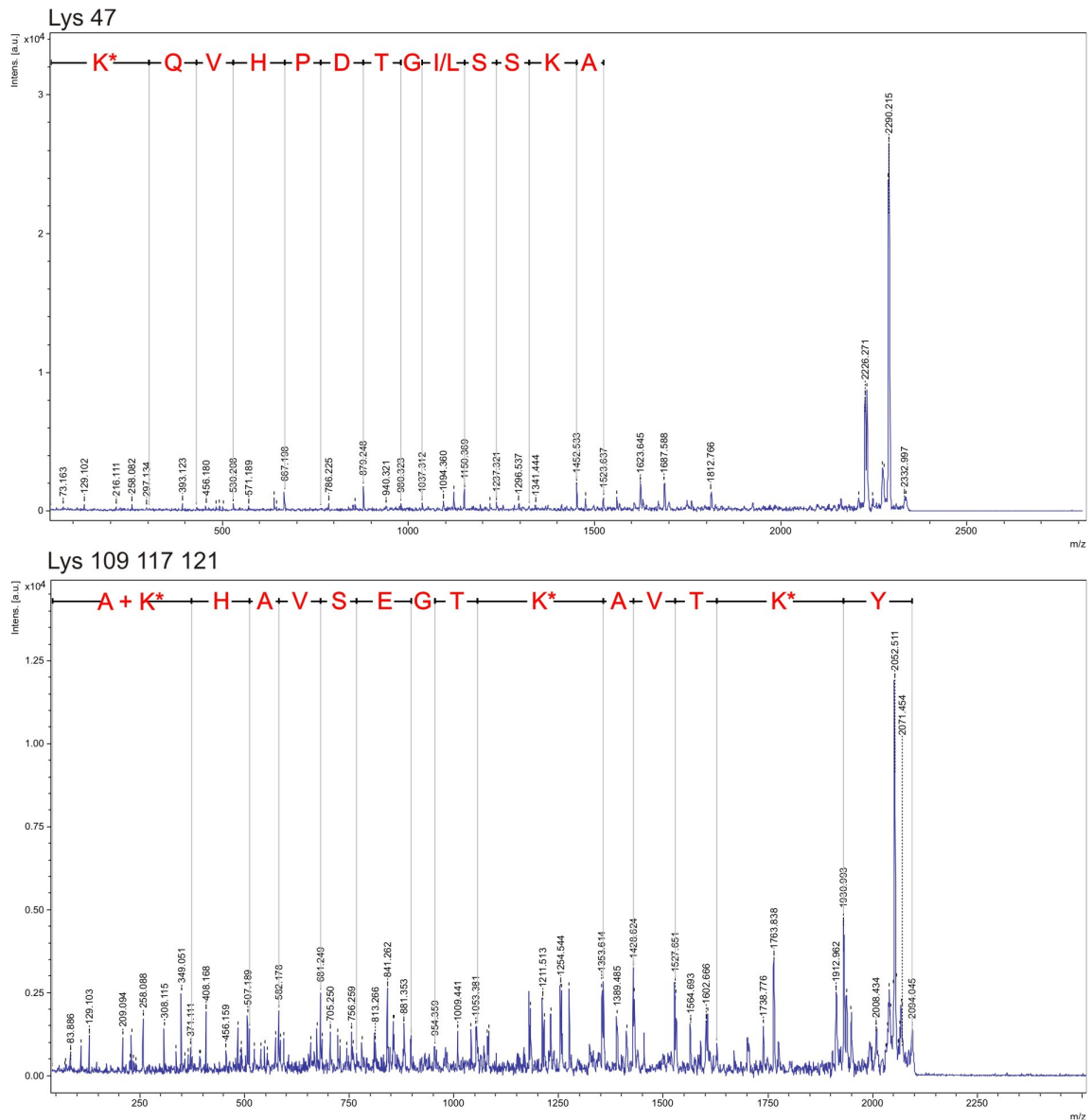
Lys 97 103



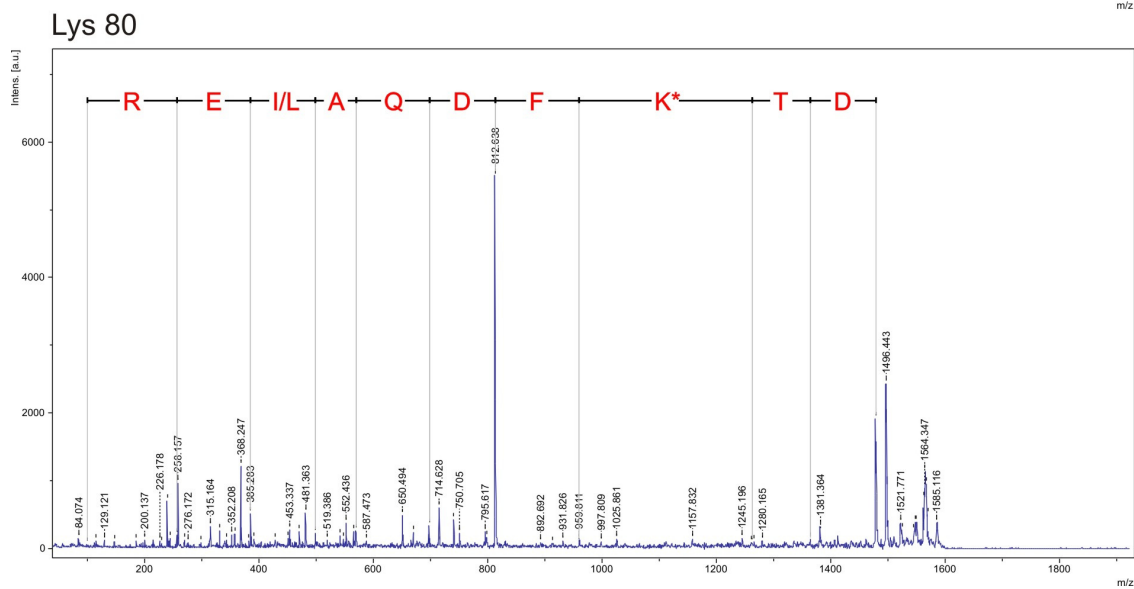
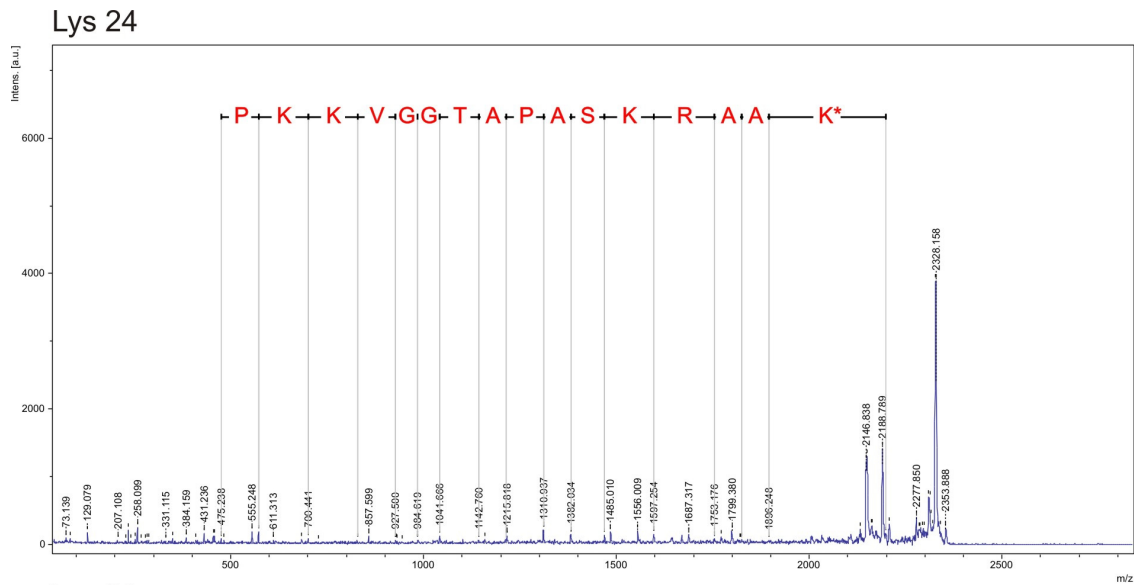
Rysunek 35: Widma fragmentacyjne N-Hcy-peptydów ludzkiego rekombinowanego histonu H1 uzyskane za pomocą techniki MALDI-ToF/ToF. Gwiazdką zaznaczono lizyny z przyłączoną resztą Hcy.



Rysunek 36: Widma fragmentacyjne N-Hcy-peptydów ludzkiego rekombinowanego histonu H2A uzyskane za pomocą techniki MALDI-ToF/ToF. Gwiazdką zaznaczono lizyny z przyłączoną resztą Hcy.

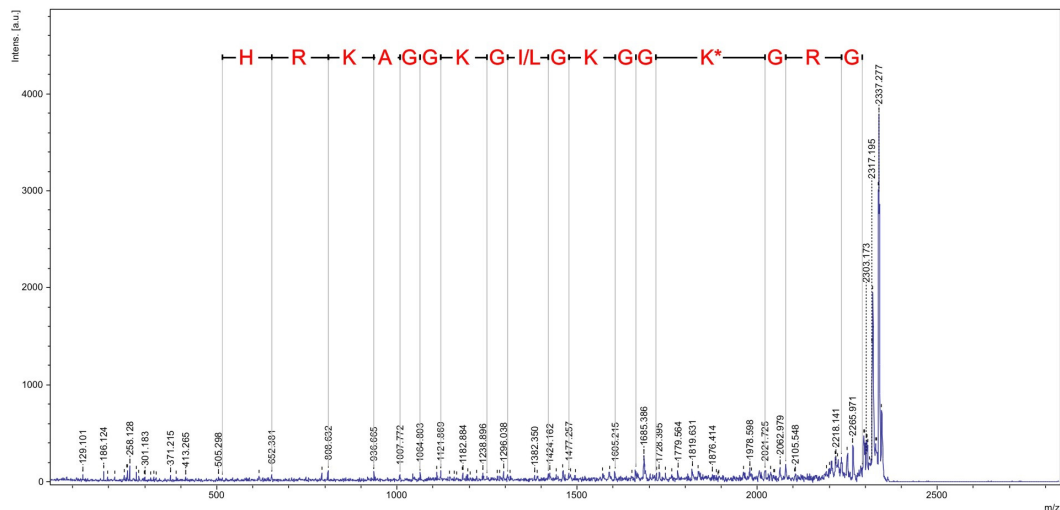


Rysunek 37: Widma fragmentacyjne N-Hcy-peptydów ludzkiego rekombinowanego histonu H2B uzyskane za pomocą techniki MALDI-ToF/ToF. Gwiazdką zaznaczono licznicy z przyłączoną resztą Hcy.

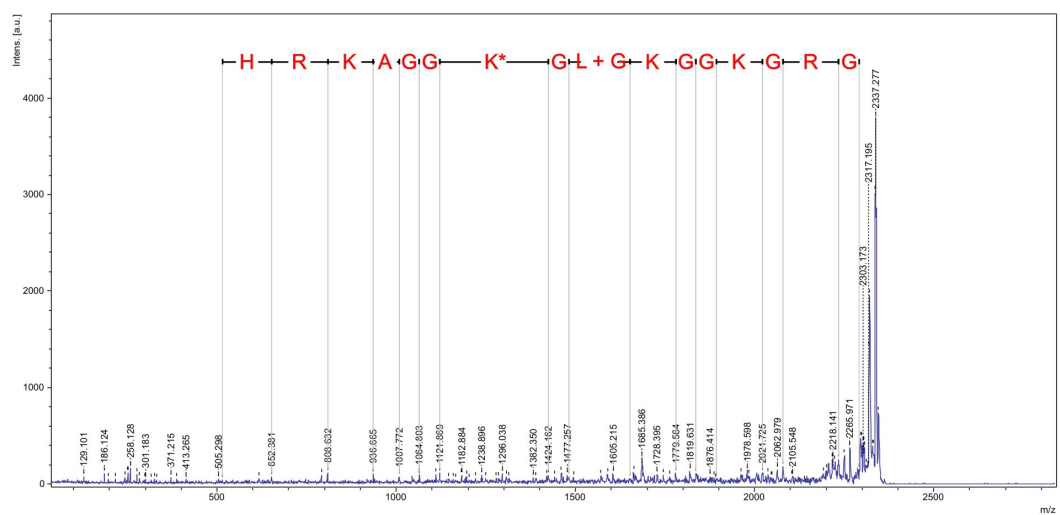


Rysunek 38: Widma fragmentacyjne N-Hcy-peptydów ludzkiego rekombinowanego histonu H3 uzyskane za pomocą techniki MALDI-ToF/ToF. Gwiazdką zaznaczono lizyny z przyłączoną resztą Hcy.

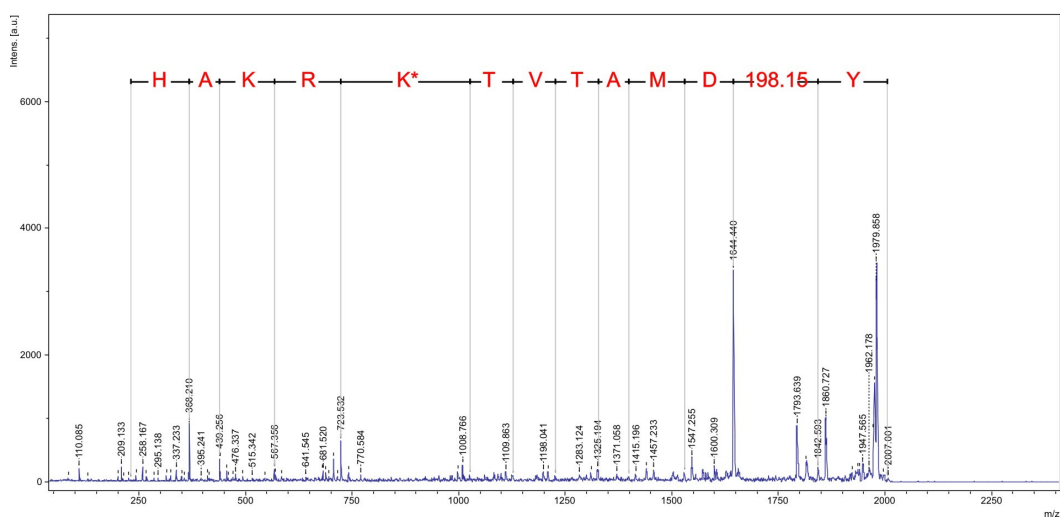
Lys 6



Lys 13



Lys 80



Rysunek 39: Widma fragmentacyjne N-Hcy-peptydów ludzkiego rekombinowanego histonu H4 uzyskane za pomocą techniki MALDI-ToF/ToF. Gwiazdką zaznaczono lizyny z przyłączoną resztą Hcy.

9. Załącznik 2

Dorobek naukowy

Publikacje:

1. Stepkowski T, Watkin E, McInnes A, **Gurda D**, Gracz J, Steenkamp ET. Distinct Bradyrhizobium [corrected] communities nodulate legumes native to temperate and tropical monsoon Australia. *Mol Phylogenet Evol.* 2012 May;63(2):265-77. doi: 10.1016/j.ympev.2011.12.020. Epub 2012 Jan 3.
2. **D. Gurda**, A.M. Kietrys, A. Szopa, T. Twardowski „Life with oxidative stress” (2012) *Chemical and Process Engineering*, 33 (4): 509-528
3. **D. Gurda**, A.M. Kietrys, A. Szopa, T. Twardowski „Czynniki elongacyjne wczoraj i dziś” (2009) *Od syntezy chemicznej do biologii syntetycznej* (red. M. Figlerowicz), OWN PAN, 201-214
4. Stepkowski T, Hughes CE, Law IJ, Markiewicz Ł, **Gurda D**, Chlebicka A, Moulin L. Diversification of lupine Bradyrhizobium strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl Environ Microbiol.* 2007 May;73(10):3254-64. Epub 2007 Mar 30.

Zgłoszenia patentowe:

1. P 402 291 „Sposób określania ekspresji cząsteczek miRNA”
Jakubowski H., **Gurda D.**, Handschuh L., Kietrys A. M., Suszyńska-Zajczyk J., Figlerowicz M., Twardowski T.
zgłoszenia dokonano 28.12.2012 w Urzędzie Patentowym RP
2. P 402 289 „Biomarker molekularny, narzędzie diagnostyczne do określania ryzyka chorób układu krążenia, zastosowanie biomarkerów molekularnych”
Jakubowski H., **Gurda D.**, Handschuh L., Kietrys A. M., Suszyńska-Zajczyk J., Figlerowicz M., Twardowski T. zgłoszenia dokonano 28.12.2012 w Urzędzie Patentowym RP

Doniesienia konferencyjne:

wystąpienia ustne:

1. "Searching for cardiovascular diseases biomarkers by human transcriptome analysis" **Gurda D.**, Handschuh L., Kawecka W., Gendaszewska-Darmach E., Figlerowicz M., Twardowski T., Jakubowski H.
IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH 2011, 12-15.10.2011 r. Kraków

wystąpienia posterowe:

1. "Analysis of changes in gene expression caused by protein N-homocysteinylation in human endothelial cells" Suszyńska J., **Gurda D.**, Sikora M., Twardowski T., Jakubowski H.
Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2008, 17-19.10.2008r. Kraków
2. "Molecular mechanism of cardiovascular diseases development on the basis of human transcriptome analysis" **Gurda D.**, Handschuh L., Kawecka W., Gendaszewska-Darmach E., Figlerowicz M., Twardowski T., Jakubowski
Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 11-14.09.2012 r. Poznań,
3. „The determination of changes in gene expression induced by homocysteine thiolactone as a tool for searching for cardiovascular diseases biomarkers" **Gurda D.**, Handschuh L., Kawecka W., Gendaszewska-Darmach E., Figlerowicz M., Twardowski T., Jakubowski H.
II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, 05-09.09.2011 r. Kraków

Projekty badawcze:

1. Projekt badawczy MNiSW Nr N401 065 32/1504 „Zmiany ekspresji genów indukowane wbudowaniem homocysteiny do białek człowieka”
11.05.2007 - 10.05.2010
2. Projekt badawczy europejski Nr UDA-POIG.01.03.01-30-097/08-06 „Nowe biomarkery dla diagnostyki wczesnych stadiów chorób układu krążenia człowieka”
01.04.2009 – 30.06. 2013
3. Projekt badawczy promotorski Nr N N401 597840 „Wpływ N-homocysteinyłacji białek histonowych na epigenetyczną regulację ekspresji genów człowieka”
27.05 2011 – 26.05.2013

Kursy i warsztaty:

Warsztaty "Biotechnology and Intellectual Property", organizator: ICGEB, 12-15.10.2011, Kraków.