
1	Wprowadzenie	4
1.1	Metabolizm homocysteiny.....	4
1.2	Formy homocysteiny we krwi człowieka	8
1.3	Toksyczność homocysteiny	9
1.3.1	Krzepnięcie i fibrynoliza	12
1.3.2	Kurczliwość naczyń krwionośnych	16
1.3.3	Reakcja zapalna	16
1.3.4	Odpowiedź na niesfałdowane białka	17
1.3.5	S-homocysteinyłacja białek.....	19
1.4	Tiolakton homocysteiny – powstawanie i właściwości	23
1.5	Znaczenie biologiczne tiolaktonu homocysteiny.....	26
1.5.1	Indukcja apoptozy i odpowiedzi na niesfałdowane białka.....	26
1.5.2	N-homocysteinyłacja białek	27
1.5.3	Immunogenność N-homocysteinyłowanych białek	32
1.6	Detoksyfikacja tiolaktonu homocysteiny	33
1.7	Białka modelowe	35
1.7.1	Cytochrom c	36
1.7.2	Mioglobina.....	42
1.7.3	Ferrytyna	44
1.7.4	Transferyna.....	45
2	Cel pracy	48
3	Materiały i metody	50
3.1	Odczynniki.....	51
3.2	Roztwory	52
3.3	Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny.....	54
3.4	Oznaczanie stężenia wolnych grup tiolowych	55
3.5	Blokowanie grup tiolowych białek amidem kwasu jodooctowego..	55
3.6	Immunizacja królików	55
3.7	Analiza białek w żelach poliakrylamidowych	57
3.8	Chromatografia powinowactwa	58
3.8.1	Białko A-agarozą	58
3.8.2	ω -Aminoheksylo-agarozą.....	58
3.9	Płytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej (ELISA).....	59
3.10	Wykrywanie białek zaadsorbowanych na błonie (Dot-blot)	61
3.11	Immunocytochemia na poziomie ultrastrukturalnym	62
3.12	Rezonans plazmonów powierzchniowych	63

3.13	Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS	64
3.14	Dichroizm kołowy	65
3.15	Trawienie białek trypsyną	69
3.16	Desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą z detekcją czasu przelotu (MALDI/TOF).....	71
3.16.1	Wyznaczanie masy cząsteczkowej białek	71
3.16.2	Uzyskiwanie map peptydowych.....	72
3.17	Analiza map peptydowych.....	72
3.18	Analiza statystyczna.....	73
4	Wyniki.....	74
4.1	Proces N-homocysteinyłacji białka	74
4.1.1	Cytochrom c	75
4.1.2	Mioglobina.....	80
4.1.3	Transferyna.....	83
4.1.4	Ferrytyna	84
4.2	Identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji in vitro	85
4.3	Wpływ N-homocysteinyłacji na strukturę drugorzędową białka ...	86
4.4	Wpływ N-homocysteinyłacji na stan redoks żelaza hemu	94
4.4.1	Cytochrom c	94
4.4.2	Mioglobina.....	97
4.5	Podatność N-Hcy-cytochromu c na proteolizę.....	101
4.6	Stabilność termiczna N-Hcy-białek	103
4.6.1	Ferrytyna	103
4.6.2	Transferyna.....	104
4.7	Immunogenność N-homocysteinyłowanych białek.....	106
4.7.1	Produkcja przeciwciał anti-N-Hcy-białko	106
4.7.2	Oczyszczanie IgG specyficznych względem N-Hcy-białka.....	109
4.7.3	Immunodetekcja N-Hcy-białek	113
4.7.4	Ludzkie przeciwciała anti-N-Hcy-białko	119
5	Dyskusja.....	122
5.1	Stopień N-homocysteinyłacji.....	122
5.2	Miejsca preferencyjnej N-homocysteinyłacji in vitro.....	123
5.3	N-homocysteinyłacja a struktura białka.....	128
5.4	Równowaga oksydacyjno-redukcyjna	131
5.5	Immunogenne właściwości N-Hcy-białka	132
6	Wnioski	136

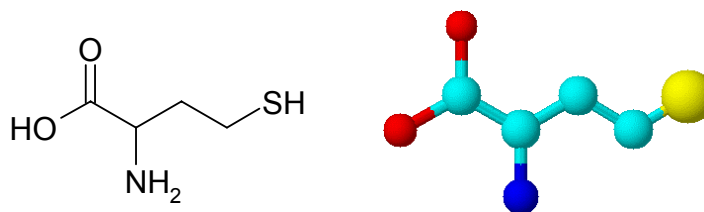
7	Streszczenie	137
8	Piśmiennictwo	138
9	Aneks I - Wykaz skrótów	146
10	Aneks II - Wykaz rysunków i tabel.....	148
11	Aneks III - Dorobek naukowy	152

1 Wprowadzenie

Homocysteina (Hcy) jest niebiałkowym aminokwasem siarkowym, uczestniczącym w metabolizmie metioniny (Met) i cysteiny (Cys). Pomimo ważnej roli, jaką homocysteina odgrywa w przemianach wymienionych aminokwasów, jej podwyższony poziom może być szkodliwy dla organizmu i wskazuje na ryzyko wystąpienia chorób krążenia. Podwyższone stężenie Hcy obserwuje się również w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych, nerek i in. Choroby krążenia są najczęstszą przyczyną zachorowalności i umieralności w krajach rozwiniętych. Dobrze poznane czynniki ryzyka: hipercholesterolemia, nadciśnienie, palenie tytoniu, czy otyłość, nie wyjaśniają wszystkich przypadków pojawienia się choroby krążenia. Rośnie zatem zainteresowanie nowymi czynnikami ryzyka, jak hiperhomocysteinemia. Świadczy o tym gwałtownie rosnąca, od połowy lat 90., liczba publikacji dotyczących homocysteiny. Jednym z głównych celów licznie prowadzonych badań nad metabolizmem homocysteiny, jest wyjaśnienie mechanizmu toksyczności tego aminokwasu. Poznanie szlaków metabolicznych homocysteiny, sposobów ich regulacji oraz negatywnych efektów jakie Hcy wywołuje jest podstawą do opracowania metod diagnostycznych i terapeutycznych. W dalszych podrozdziałach wprowadzenia przedstawione zostaną szlaki metaboliczne homocysteiny oraz formy w jakich aminokwas ten występuje. Informacje te będą przydatne do analizy postulowanych mechanizmów toksyczności homocysteiny. Jeden z nich, polegający na N-homocysteinytacji białek przez tiolakton homocysteiny, jest przedmiotem niniejszej rozprawy.

1.1 Metabolizm homocysteiny

Homocysteina (Rysunek 1) powstaje podczas przemian metabolicznych metioniny w cyklu aktywowanego metylu (Rysunek 2).



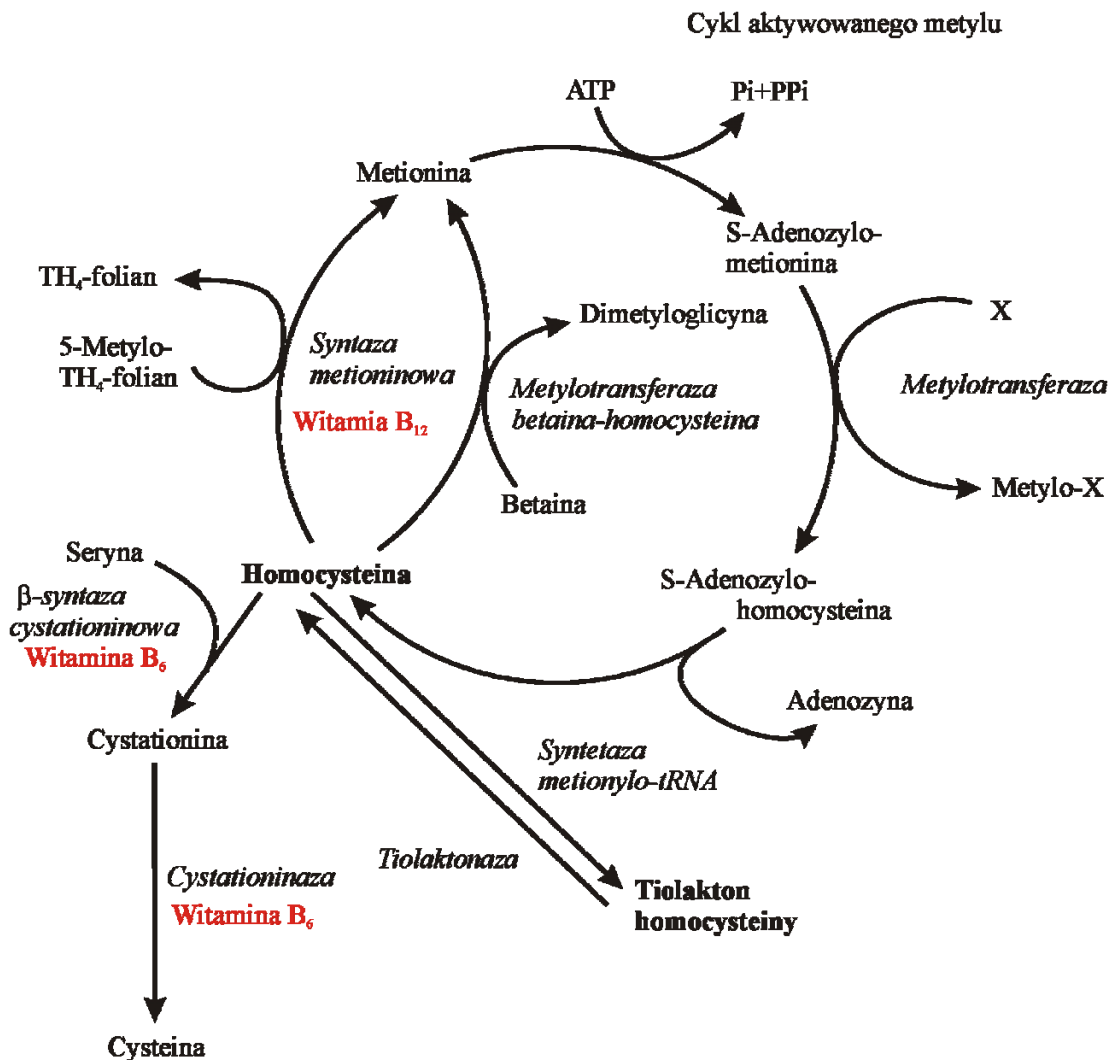
Rysunek 1. Homocysteina; wzór strukturalny i model przestrzenny (atomy węgla – kolor turkusowy, siarki – żółty, tlenu – czerwony, azotu – granatowy)

Cykl ten dostarcza grup metylowych do metylacji RNA, DNA, białek i małych cząsteczek takich jak octan guanidyny czy glicyna. Bezpośrednim prekursorem homocysteiny jest S-adenozylhomocysteina (SAH), która ulega hydrolizie do Hcy i adenozyliny, w reakcji katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny (EC 3.3.1.1). Hcy może ulegać remetylacji do metioniny za pośrednictwem dwóch enzymów. Pierwszy z nich, syntaza metioniny (EC 2.1.1.13), występuje we wszystkich tkankach. Drugi, zwany metylotransferazą betaina: homocysteina (EC 2.1.1.5), jest obecny w wątrobie, a u niektórych gatunków także w nerkach. Donorem grup metylowych do regeneracji metioniny może być 5-metylotetrahydrofolian (MTHF) lub betaina, w zależności który z enzymów katalizuje reakcję remetylacji. W kolejnym etapie cyklu aktywowanego metylu adenozylotransferaza metioninowa (EC 2.5.1.6) aktywuje Met do S-adenozylometioniny (SAM). Reakcja polega na przeniesieniu grupy adenozylowej z ATP na atom siarki metioniny. Grupa metylowa Met jest aktywowana wskutek przyjęcia dodatniego ładunku przez sąsiedni atom siarki, co decyduje, że SAM jest cząsteczką bardziej reaktywną niż N⁵-metylotetrahydrofolian. Grupa metylowa SAM jest następnie przenoszona przez metylotransferazę na akceptor, np. fosfatydyloetanolaminę. Z SAM powstaje w ten sposób S-adenozylhomocysteina i cykl się zamyka. Opisany szlak reakcji, zwany transmetylacją prawdopodobnie zachodzi we wszystkich komórkach.

Homocysteina może również ulegać dwuetapowej przemianie do cysteiny, katalizowanej przez β -syntazę cystationiny (EC 4.2.1.22) i cystationinazę (EC 4.4.1.1). Występowanie szlaku transsulfurylacji ograniczone jest prawdopodobnie do wątroby, nerek, jelita cienkiego i trzustki [1].

Homocysteina ze względu na podobieństwo strukturalne do metioniny może ulegać błędnej aktywacji przez syntetazę metionyno-tRNA (MetRS). Wbudowanie Hcy do białka, jest jednak niemożliwe, ze względu na istniejący mechanizm naprawczy MetRS. W konsekwencji reakcji naprawczej powstaje

tiolakton homocysteiny (HTL) [2], który może ulegać enzymatycznej hydrolizie do Hcy [3-5]. Ta ścieżka metabolizmu Hcy, ze względu na swoje konsekwencje dla struktury i funkcji białek, została szczegółowiej opisana w dalszej części rozprawy (Rozdział 1.4).



Transsulfurylacja

Rysunek 2. Metabolizm homocysteiny obejmuje cykl aktywowanego metylu, transsulfurylację oraz cyklizację do tiolaktonu homocysteiny. Pi – ortofosforan, PPI – pirofosforan, TH₄-folian – tetrahydrofolian, X – akceptor grupy metylowej

Podsumowując, w komórce homocysteina może ulegać następującym przemianom:

- metylacji do metioniny,
- transsulfurylacji do cysteiny,
- błędnej aktywacji przez AARS i przekształceniu do tiolaktonu homocysteiny,

a także

- eksportowi do płynów zewnątrzkomórkowych: osocza krwi i moczu.

Wewnątrzkomórkowe stężenie Hcy jest ściśle regulowane przez jej eksport [6, 7]. W normalnych warunkach komórki eksportują znaczną ilość homocysteiny. Poziom eksportu odzwierciedla równowagę między produkcją wewnątrzkomórkową a metabolizmem komórkowym. Metabolizm Hcy wewnątrzkomórkowej zależy od enzymów komórkowych i poziomu witamin, podczas gdy poziom Hcy zewnątrzkomórkowej odzwierciedla przemiany metaboliczne wewnątrz komórki, eksport komórkowy oraz pobieranie Hcy przez komórkę [7-9]. Pobieranie Hcy zewnątrzkomórkowej przez komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej i linii EA.hy 926 komórki śródbłonna zachodzi przez Na^+ -niezależny system L i Na^+ -zależny system ASC [10, 11]. Z użyciem specyficznych inhibitorów przekaźników aminokwasów stwierdzono, że w kulturach komórek HeLa pobieranie Hcy zachodzi głównie przez Na^+ -zależny system A i przekaźniki glutaminianu [12]. Hultberg i wsp. wykazali [7-9], że znaczący wpływ na poziom Hcy zewnątrzkomórkowej kultur komórek HeLa mają jony miedzi. Nawet niskie stężenia tych jonów (0,1-1 $\mu\text{mol/l}$) zwiększają stężenie zewnątrzkomórkowej Hcy. Fakt ten tłumaczono obniżeniem zewnątrzkomórkowej frakcji zredukowanych tioli, co z kolei prowadzi do zahamowania pobierania Hcy przez komórkę [7]. Konsekwentnie, dodaniu związków antyoksydacyjnych, takich jak tiole do hodowli kultur komórek HeLa, towarzyszy obniżenie stężenia zewnątrzkomórkowej Hcy [13]. W kulturach komórek raka wątroby (ang. *hepatoma*) obserwowano nieco inny efekt; jedynie N-acetylocysteina (NAC) w najwyższym testowanym stężeniu (4 mmol/l) obniżała stężenie zewnątrzkomórkowej Hcy, podczas gdy ditiol, ditiotreitrol (DTT) i kwas α -liponowy (LA) podwyższały stężenie zewnątrzkomórkowej Hcy, prawdopodobnie głównie jako wynik zwiększonego uwalniania tego aminokwasu [12].

Metabolizm homocysteiny jest zależny od kofaktorów będących pochodnymi witamin. Syntaza metioniny zawiera kobalaminę jako grupę prostetyczną, a grupa metylowa przenoszona na S-adenozylhomocysteinę pochodzi z 5-metylotetrahydrofolianu. Obydwa enzymy szlaku transsulfurylacji zawierają fosforan pirydoksalu jako grupę prostetyczną. Niedobór którejkolwiek z tych witamin, związany jest z podwyższonym poziomem Hcy [1]. Wysokie stężenie

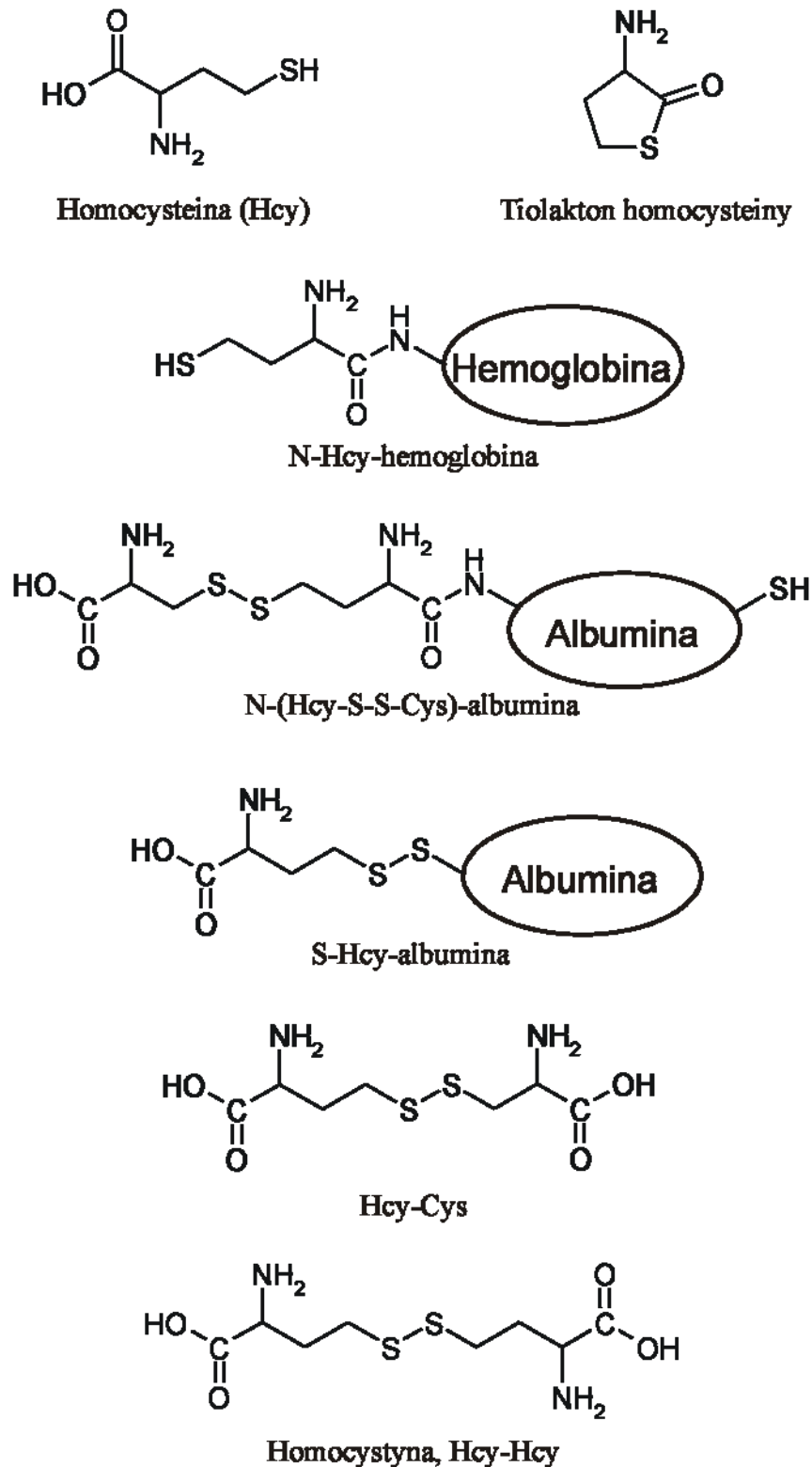
Hcy prowadzi do wzrostu stężenia SAH i w konsekwencji inhibicji transmetylacji [14].

Jedną z reakcji wpływających na poziom homocysteiny w osoczu jest remetylacja Hcy do metioniny. Znaczenie metylotransferaz w regulacji poziomu Hcy osocza nie jest jednak dokładnie zdefiniowane. Transgeniczne myszy nieposiadające N-metylotransferazy fosfatydyloetanolaminy, enzymu występującego w wątrobie, który katalizuje powstanie SAH podczas konwersji fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholiny, wykazują o połowę niższą zawartość Hcy osocza niż myszy dzikie. Wnioskuje się, że N-metylotransferaza fosfatydyloetanolaminy jest ważnym źródłem homocysteiny osocza [15].

Cząsteczki homocysteiny biorące udział w opisanych przemianach występują w stanie zredukowanym. Istnieje kilka innych form tego aminokwasu.

1.2 Formy homocysteiny we krwi człowieka

Homocysteina może występować w formie wolnej lub związanej z białkami, zredukowanej bądź utlenionej [16] (Rysunek 3). Główną frakcją homocysteiny we krwi człowieka stanowi Hcy połączona wiązaniem amidowym z białkiem (Rozdział 1.5.2). N-Hcy-hemoglobina (grupa ϵ -aminowa lizyny acylowana homocysteina) stanowi 75% tej puli a N-Hcy-albumina – 22% [17]. W osoczu krwi człowieka obecna jest również tiocykliczna forma homocysteiny, tiolakton homocysteiny, który reprezentuje do 0,29% całkowitej Hcy osocza [18, 19]. Niewielki procent Hcy stanowi również jej postać zredukowana. Przeważająca większość utlenionej Hcy jest związana wiązaniami dwusiarczkowymi do reszt cysteiny białek, pozostała część natomiast, występuje w formie niskcząsteczkowych dwusiarczków - homocystyny (Hcy-Hcy) i mieszanego dwusiarczku z cysteina (Hcy-Cys) [16, 20].



Rysunek 3. Formy homocysteiny we krwi człowieka

1.3 Toksyczność homocysteiny

Podwyższony poziom Hcy w osoczu człowieka jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób krążenia, zawału, nowotworów, choroby Alzheimera i in. Zakres „prawidłowego” stężenia Hcy w osoczu człowieka,

ustalony na podstawie badań klinicznych, wynosi 5-15 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 1) [16].

Tabela 1. Przedziały stężeń homocysteiny w osoczu krwi człowieka

Zakres normalny		5-15 $\mu\text{mol/l}$
Hiperhomocysteinemia	Łagodna	15-25 $\mu\text{mol/l}$
	Średniozaawansowana	25-50 $\mu\text{mol/l}$
	Ostra/poważna	50-500 $\mu\text{mol/l}$

Z podwyższonym stężeniem Hcy w organizmie człowieka wiążą się dwa terminy: homocystynuria i hiperhomocysteinemia. Mudd i wsp. [20] zaproponowali, aby terminem homocystynuria określać wrodzone wady metabolizmu, charakteryzowane przez znacznie podwyższone stężenia całkowitej Hcy osocza lub surowicy, np. poważne niedobory β -syntazy cystationiny, reduktazy metylenotetrahydrofolianu, czy zaburzenia w transporcie lub metabolizmie kobalaminy (witamina B₁₂). Hiperhomocysteinemia jest to podwyższone stężenie „całkowitej” Hcy w osoczu lub surowicy. Pod pojęciem „całkowitej” Hcy, autorzy ci rozumieją homocysteinę uwolnioną po redukcji wszystkich wiązań dwusiarczkowych w próbie. Pula ta nie zawiera Hcy związanej wiązaniem amidowym z białkiem [20], jak i prawdopodobnie tiolaktonu homocysteiny [19].

Pacjenci z homocystynurią, spowodowaną wrodzonymi wadami metabolizmu homocysteiny, cierpią na poważną hiperhomocysteinemię, ze stężeniem Hcy osocza sięgającym nawet 500 $\mu\text{mol/l}$. Osoby z chorobami krążenia (wieńcową, naczyniową mózgu, obwodową naczyń) wykazują zwykle łagodną, a pacjenci cierpiący na choroby nerek – średniozaawansowaną hiperhomocysteinemię.

Poziom Hcy jest uwarunkowany czynnikami demograficznymi, genetycznymi, nabytymi, a także stylem życia (Tabela 2) [16].

Tabela 2. Czynniki determinujące poziom homocysteiny we krwi człowieka

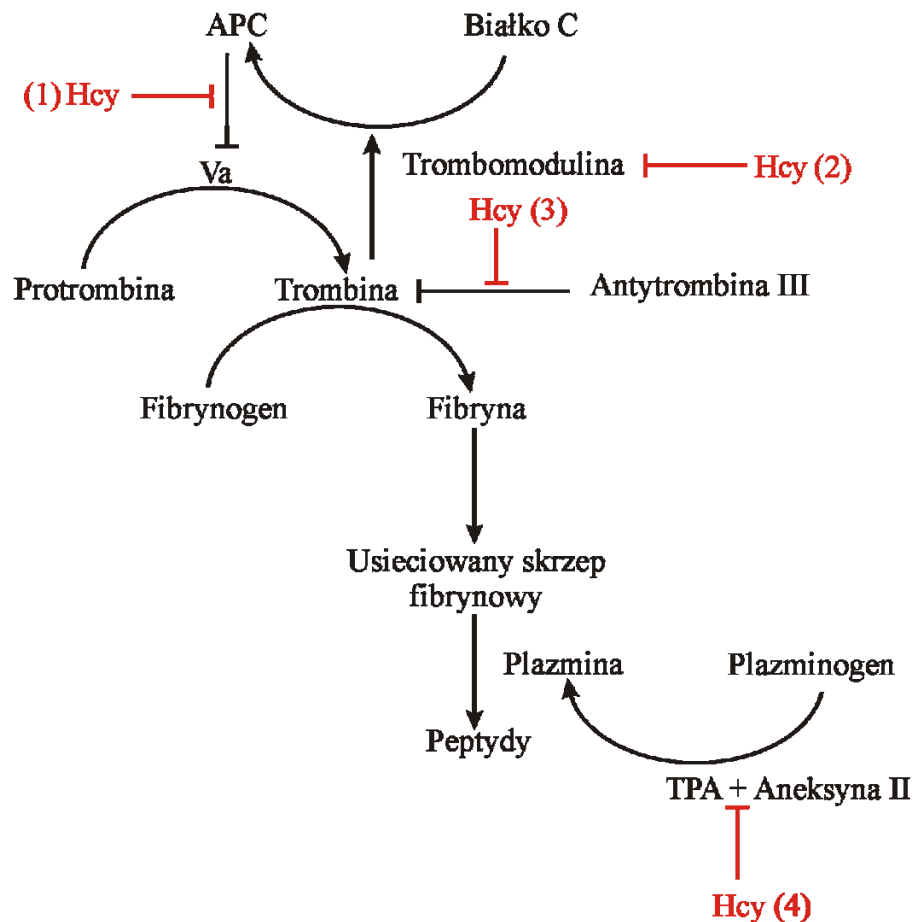
	Czynnik	Opis
Demograficzny	Wiek	Stężenie całkowitej Hcy osocza wzrasta z wiekiem
	Płeć	Mężczyźni mają wyższe stężenie całkowitej Hcy osocza niż kobiety w tym samym wieku
	Pochodzenie etniczne	Brak zgodności danych
Genetyczny	Reduktaza metylenotetrahydrofolianu (MTHFR)	W obecności NADPH przekształca 5,10-metylenotetrahydrofolian do 5-metylenotetrahydrofolianu, który jest substratem dla syntazy metioniny. Opisano kilkanaście mutacji powodujących niedobór MTHFR
	Syntaza metioniny (MS)	Enzym zależny od witaminy B ₁₂ . Prowadzone są badania nad związkiem mutacji MS a hiperhomocysteinemią
	β-Syntaza cystationiny (CBS)	Enzym zależny od witaminy B ₆ . Opisano kilkaset przypadków niedoboru CBS w homocystynurii
Nabyty	Niedobór witamin (B ₁₂ i B ₆ , folian)	Wymagane do aktywności enzymów metabolizujących Hcy
	Choroba nerek	Średniozaawansowana hiperhomocysteinemia i podwyższone ryzyko choroby krążenia
	Transplantacja serca i innych organów	Łagodna do średniozaawansowanej hiperhomocysteinemia
	Niedoczynność tarczycy	Podwyższone stężenie Hcy, które może być znormalizowane L-tyroksyną
Styl życia	Palenie tytoniu	Podwyższone stężenie Hcy
	Nadmiar alkoholu	Podwyższone stężenie Hcy, prawdopodobnie na skutek złego wchłaniania pokarmów
	Brak ruchu	Podwyższone stężenie Hcy
	Nadmiar kawy	Podwyższone stężenie Hcy

Od wielu lat trwają prace nad wyjaśnieniem szkodliwego działania homocysteiny w organizmie człowieka. Na poziomie molekularnym zaproponowano kilka mechanizmów toksyczności Hcy, w tym zależne od grupy tiolowej [21], homocysteino-specyficzne jak homocysteinyłacja białek [22], inhibicja komórkowych reakcji metylacji [14] i indukcja UPR (ang. *unfolded protein response*). Wiele grup badawczych skupiło swoje wysiłki na wpływie podwyższonego poziomu Hcy na komórki śródbłonna, ponieważ tkanka ta ma zasadnicze znaczenie dla regulacji i utrzymania funkcji układu krążenia [21]. W kulturach ludzkich komórek śródbłonna aorty nie zachodzi ekspresja aktywnej formy CBS i dlatego w komórkach tych nie przebiega transsulfurylacja. Brak głównego szlaku metabolizmu Hcy mógłby tłumaczyć wrażliwość komórek śródbłonna nawet na łagodny wzrost stężenia Hcy, występujący u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, której towarzyszy hiperhomocysteinemia [16].

Komórki śródbłonna naczyniowego, poprzez ekspresję i uwalnianie wielu aktywnych białek, są kluczowym regulatorem procesu krzepnięcia, skurczu naczyń krwionośnych i reakcji zapalnych. Wśród tych białek istotną rolę odgrywa trombomodulina, która jest niezbędna do aktywacji białka C, będącego endogennym czynnikiem przeciwzakrzepowym, przeciwzapalnym i profibrynolitycznym. Patogenna rola Hcy może być związana z jej zdolnością do generowania anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru, które przyczyniają się do peroksydacji LDL [23] i uszkodzenia śródbłonna tętniczego [24]. Homocysteina wykazuje zatem działanie toksyczne w stosunku do śródbłonna naczyniowego. Może również zwiększać proliferację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz agregację płytek krwi, a także wpływać na krzepnięcie i fibrynolizę [25]. Homocysteina indukuje lub działa synergistycznie z innymi czynnikami wywołującymi miażdżycę [26].

1.3.1 Krzepnięcie i fibrynoliza

Nadkrzepliwość i hamowanie fibrynolizy są zaburzeniami funkcji śródbłonna naczyniowego obserwowanymi podczas aterogenezy, czyli rozwoju miażdżycy. Powiązanie podwyższonego poziomu homocysteiny z chorobami krążenia skłoniło badaczy do wnikliwej analizy wpływu Hcy na proces krzepnięcia i fibrynolizy (Rysunek 4).



Rysunek 4. Wpływ homocysteiny na krzepnięcie krwi i fibrynolizę

Znalezienie związku pomiędzy poziomem homocysteiny we krwi a zakrzepicą jest przedmiotem badań Undas i wsp. [27]. Istotnym procesem dla utrzymania hemostazy jest regulacja aktywności czynnika Va kaskady krzepnięcia. Czynniki Va powstaje na skutek proteolitycznej aktywacji czynnika V trombiną, jest natomiast proteolitycznie inaktywowany przez aktywowane białko C (APC, ang. *activated protein C*). Wyniki badań *in vitro* pozwalają wnioskować, że stężenie Hcy wykraczające poza zakres normalny ma toksyczny wpływ na śródbłonek, prawdopodobnie przez tworzenie wolnych rodników podczas utleniania grup tiolowych. Hcy, Cys lub HTL nie mają wpływu na aktywację czynnika Va przez trombinę α , jednak czynnik Va pochodzący z czynnika V traktowanego Hcy o stężeniu 10-450 $\mu\text{mol/l}$ jest inaktywowany przez APC w ograniczonym stopniu. Zahamowanie inaktywacji wzrasta wraz z podwyższeniem stężenia Hcy. Homocysteina wiąże się wiązaniami dwusiarczkowymi z resztami Cys czynnika V. Autorzy postawili hipotezę, że prozakrzepowa tendencja związana z hiperhomocysteinemią, może wynikać z zaburzonej inaktywacji czynnika Va przez APC (Rysunek 4 (1)) [27].

Trombomodulina jest specyficznym śródbłonkowym receptorem komórkowym, który tworzy kompleks z trombiną. Kompleks ten jest odpowiedzialny za przekształcenie białka C do APC. Badano mechanizm obniżenia aktywacji białka C i ekspresję trombomoduliny w komórkach śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC, ang. *human umbilical vein endothelial cells*) oraz w komórkach nerki małpy CV-1(18A) z nadekspresją ludzkiej trombomoduliny. Stwierdzono, że Hcy o stężeniu 5 mmol/l działa prozakrzepowo, przez zmniejszenie ekspresji trombomoduliny na powierzchni komórki i hamowanie aktywacji białka C (Rysunek 4 (2)) [28].

Na podstawie wyników badań *in vivo*, kwestionuje się jednak wpływ podwyższonego poziomu homocysteiny na aktywację białka C przez trombinę oraz inaktywację czynnika V przez APC. Lentz i wsp. [29] wykazali, że czułość czynnika V na aktywowane białko C jest niezmienną u małp z łagodną hiperhomocysteinemią, u myszy z niedoborem β -syntazy cystationiny i ludzi z ostrą/poważną hiperhomocysteinemią. Ponadto dwa badania kliniczne przeprowadzone na dużej liczbie pacjentów nie wykazały związku między hiperhomocysteinemią, a odpornością APC na inaktywację [30, 31].

Innym przykładem wpływu homocysteiny na proces krzepnięcia są wyniki uzyskane przez Nishinaga i wsp. [32]. Grupa ta stwierdziła redukcję pojemności wiązania siarczanu heparyny przez antytrombinę III komórek śródbłonka po inkubacji z 1 mmol/l Hcy, Cys lub 2-merkaptoetanołem. Traktowanie metioniną i waliną nie spowodowało podobnej redukcji. Antytrombina III reguluje proces krzepnięcia poprzez inhibicję trombiny, czynnika IXa, Xa i XIa. Aktywność inhibitorowa jest zwiększona w obecności heparyny. Hcy dodana do kultur komórek śródbłonka aorty świni, redukuje ilość antytrombiny III związanej do powierzchni komórki. Przypuszczalnie efekt ten jest wywołany nadtlaniem wodoru, powstającym podczas utleniania tioli. Hipotezę tę potwierdza fakt, że katalaza inkubowana z komórkami śródbłonka traktowanymi Hcy, w odróżnieniu od dysmutazy ponadtlankowej, zapobiega zmniejszeniu ilości antytrombiny III na powierzchni komórek. Dodatkowo jony miedzi, które katalizują powstawanie nadtlanku wodoru, wzmacniają efekt inhibitorowy. Na podstawie opisanych wyników postawiono hipotezę, że zahamowana ekspresja antykoagulującego siarczanu heparyny na powierzchni komórek śródbłonka traktowanych

homocysteina, może przyczyniać się do powstawania zakrzepicy (Rysunek 4 (3)) [32].

Równowaga między procesami krzepnięcia i fibrylizy jest istotna dla prawidłowego funkcjonowania układu krążenia. Komórki śródbłonna modulują aktywność fibrynolityczną przez syntezę i wydzielanie specyficznego tkankowo aktywatora plazminogenu (TPA, ang. *tissue plasminogen activator*) i inhibitora-1 aktywatora plazminogenu. Hajjar i wsp. [33] wykazali, że inkubacja komórek śródbłonna z D,L-Hcy o stężeniu 0,1-7,5 mmol/l powoduje selektywną redukcję miejsc wiązania TPA do aneksyny II, receptora komórek śródbłonna. Jest to kolejny mechanizm, przez który Hcy może zaburzać funkcję komórek śródbłonna, indukując prozakrzepowe właściwości powierzchni ścian naczyń krwionośnych (Rysunek 4 (4)) [33].

Hipotezę, zgodnie z którą uszkodzonej funkcji komórek śródbłonna towarzyszy hiperhomocysteinemia, potwierdziły również wyniki badań prowadzonych *in vivo* na ludziach i zwierzętach. Van den Berg i wsp. [34] badali dysfunkcję śródbłonna u młodych pacjentów z zarostową chorobą tętnic (ang. *arterial occlusive disease*) i łagodną hiperhomocysteinemią. Stężenia czynnika von Willebranda, glikoproteiny warunkującej proces hamowania krwawienia, i trombomoduliny osocza były podwyższone, ale obniżyły się po leczeniu hiperhomocysteinemii kwasem foliowym i pirydoksyną.

U królików z hiperhomocysteinemią, skrzepy fibrynowe składają się z cienkich, ciasno upakowanych włókien, które są odporne na fibrylizę. Tworzenie skrzepów odpornych na fibrylizę, może bezpośrednio przyczyniać się do zwiększonego ryzyka wystąpienia zakrzepicy w przypadku hiperhomocysteinemii [35]. Najnowsze badania wykazały, że modyfikacja fibrynogenu tiolaktonem homocysteiny, zwiększa odporność skrzepów fibrynowych na lizę [36] (Rozdział 1.5.2).

W populacji człowieka również stwierdzono, że poziom Hcy osocza jest skorelowany z właściwościami skrzepu fibrynowego, takimi jak przepuszczalność i podatność na lizę. U osób zdrowych oraz cierpiących na chorobę niedokrwienną serca (CAD, ang. *coronary artery disease*) przepuszczalność skrzepu fibrynowego spada ze wzrostem poziomu Hcy, fibrynogenu oraz z wiekiem, rośnie natomiast ze wzrostem poziomu folianu. Przeciwnie, wzrost poziomu Hcy, fibrynogenu oraz wiek powodują spadek

podatności skrzepu na lizę, a wzrost poziomu folianu zwiększa podatność na fibrynolizę. Skrzep powstały z osocza osób ze stężeniem Hcy powyżej 14,5 $\mu\text{mol/l}$ wykazuje około 20% mniejszą przepuszczalność niż skrzep osób z niższym poziomem Hcy. Podobny wpływ hiperhomocysteinemii na właściwości skrzepu fibrynowego obserwuje się u pacjentów z CAD. Redukcja poziomu Hcy wywołana przyjmowaniem folianu powoduje wzrost przepuszczalności i podatności skrzepu na fibrynolizę [37].

1.3.2 Kurczliwość naczyń krwionośnych

Homocysteina wpływa nie tylko na procesy krzepnięcia i fibrynolizy, ale również na skurcz błony mięśniowej naczyń krwionośnych. Aminokwas ten zmienia właściwości komórek śródbłonna przez zaburzenie produkcji lub biodostępności przekaźników naczyniowoczynnych, takich jak: endotelina-1 (ET-1) [38], tlenek azotu [39] i prostacyklina [40]. Jest to zgodne z doniesieniami, że hiperhomocysteinemia u ludzi jest związana z zależnym od śródbłonna rozszerzeniem (ang. *endothelium-dependent vasodilation*) błony mięśniowej naczyń krwionośnych [41, 42].

Endoteliny są to peptydy, które powodują skurcz błony mięśniowej naczyń krwionośnych. Inkubacja komórek śródbłonna w obecności Hcy o stężeniu 0,01-0,1 mmol/l, obniża produkcję ET-1, a także stężenie wewnątrzkomórkowej Hcy, prawdopodobnie za pośrednictwem reaktywnych form tlenu. Inkubacja komórek dodatkowo z zewnątrzkomórkowymi inhibitorami wolnych rodników (dysmutazą ponadtlenkową, katalazą i mannitolem) redukuje wpływ Hcy na produkcję ET-1. Akumulacja zewnątrzkomórkowej homocysteiny inhibuje powstawanie endoteliny-1 przez produkty oksydacyjne [11].

1.3.3 Reakcja zapalna

W rozwoju miażdżycy zasadniczą rolę odgrywają prozapalne cytokiny. Wydzielane są przez aktywowane komórki śródbłonna i przyciągają do miejsca uszkodzenia ściany naczynia krwionośnego monocyty, limfocyty T oraz neutrofile. W linii komórek śródbłonna aorty człowieka (HAEC, ang. *human aortic endothelial cells*) D,L-Hcy indukuje ekspresję mRNA prozapalnej cytokiny MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) i interleukiny-8 (IL-8) oraz uwolnienie cytokin do medium komórkowego. Indukcja ekspresji obu cytokin, zachodzi już przy stężeniu D,L-Hcy równym

10 $\mu\text{mol/l}$, a efekt maksymalny jest obserwowany przy stężeniu 50 $\mu\text{mol/l}$. Medium komórkowe z HAEC traktowanych Hcy pobudza chemotaksję ludzkich monocytów krwi obwodowej. Efekt ten jest specyficzny dla L-Hcy, ponieważ nie obserwowano go dla L-homocystyny, L-Cys, L-Met. Ponadto, D-Hcy nie indukuje ekspresji chemokin, co wskazuje na specyficzność enancjomeryczną. Homocysteina nie ma wpływu na ekspresję innych cytokin, np. czynnika martwicy nowotworów- α czy interleukiny-1 β [43]. Indukcja ekspresji MCP-1 i IL-8 przez homocysteinę zachodzi przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Czynnikiem ten stymuluje produkcję cytokin, chemokin i cząsteczek adhezji leukocytów (ang. *leukocyte adhesion molecules*), które uważane są za przyczyniające się do wystąpienia reakcji zapalnej w obrębie naczynia krwionośnego i aterosklerozy [44, 45].

1.3.4 Odpowiedź na niesfałdowane białka

Homocysteina może zaburzać tworzenie wiązań dwusiarczkowych i fałdowanie białek wewnątrz siateczki śródplazmatycznej (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) [46], dlatego też jeden z proponowanych mechanizmów uszkodzenia naczynia krwionośnego przez homocysteinę, obejmuje stres siateczki śródplazmatycznej i aktywację odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR, ang. *unfolded protein response*). Siateczka śródplazmatyczna jest miejscem fałdowania i dojrzewania białek transbłonowych, sekrecyjnych i występujących na terenie ER. ER zawiera wiele białek opiekuńczych (ang. *chaperones*), np. GRP78, GRP94, kalneksynę, kalretikulinę i izomerazę dwusiarczkową białek, które pomagają w prawidłowym zwijaniu się łańcuchów polipeptydowych i zapobiegają agregacji fałdujących się intermediatów. Wymienione białka opiekuńcze, tworzą system kontroli jakości, aby jedynie prawidłowo pofałdowane białka były kierowane do aparatu Golgiego, w celu dalszej obróbki i sekrecji. Warunki patologiczne i/lub środki zaburzające prawidłowe fałdowanie i dojrzewanie białek, aktywują odpowiedź na niesfałdowane białka. UPR to zintegrowany wewnątrzkomórkowy szlak przekazywania sygnału, który jest odpowiedzią na stres ER. Polega na zwiększeniu ekspresji genów białek opiekuńczych ER, zahamowaniu translacji i degradacji niesfałdowanych białek. UPR jest pośredniczona przez obecne w ER białka IRE1, ATF6 (ang. *activating transcription factor 6*) i

kinazę ER PKP-podobną (PERK, ang. *PKP-like ER kinase*), których aktywacja zależy od dysocjacji z GRP78 na skutek stresu siateczki śródplazmatycznej. Odpowiedź na niesfaldowane białka zapewnia przeżycie komórki przez szybkie i skuteczne przeciwdziałanie stresowi ER. Brak tej odpowiedzi, jak również trwający zbyt długo poważny stres ER, wywołują śmierć apoptotyczną komórki i przyczyniają się do patogenezy wielu stanów chorobowych w organizmie człowieka, włączając chorobę Alzheimera, Parkinsona i cukrzycę [47].

Homocysteina (5 mmol/l), podobnie jak inne induktory stresu ER, obniża ekspresję mRNA zewnątrzkomórkowej dysmutazy nadadtlenkowej (EC-SOD, ang. *extracellular superoxide dismutase*) i sekrecję tego białka w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cells*) szczura. Ponadto powoduje wzrost ekspresji mRNA GRP78 i aktywuje PERK. Tauryna (0,5-10 mmol/l) zapobiega procesom indukowanym przez homocysteinę [48].

W badaniach prowadzonych na linii komórkowej ARP-19 (ang. *retinal-pigmented epithelial cell line*) wykazano, że D,L-Hcy powoduje ponad 4-krotny wzrost ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*). L-HTL i DTT powodują odpowiednio 7,9 i 8,8-krotny wzrost ekspresji VEGF, natomiast L-Cys nie ma istotnego wpływu [49]. VEGF jest sekrecyjną glikoproteiną, która powoduje zmiany przepuszczalności warstwy komórek śródbłonka [50], a jej ekspresja wzrasta w odpowiedzi na czynniki wywołujące stres siateczki śródplazmatycznej [51]. Do takich czynników należy homocysteina, która zaburza tworzenie wiązań dwusiarczkowych i fałdowanie białek wewnątrz ER [46]. W celu stwierdzenia, czy Hcy aktywuje UPR, badano ekspresję genów stresu ER. Zaobserwowano wzrost ekspresji GADD153 i GPR78 pod wpływem D,L-Hcy, L-HTL i DTT. Podczas UPR synteza białka jest zahamowana przez fosforylację czynnika inicjującego translację eIF2 α . Zahamowanie inicjacji translacji, paradoksalnie prowadzi do zwiększonej ekspresji ATF4 (ang. *activating transcription factor 4*). Struktura mRNA ATF4 zawiera kilka krótkich otwartych ramek odczytu, które poprzedzają funkcjonalną sekwencję kodującą. Fosforylacja eIF2 α stwarza warunki, które faworyzują reinicjację i syntezę ATF4 w komórkach poddanych stresowi ER. D,L-Hcy indukuje ekspresję VEGF w linii ludzkich komórek ARP-19 przez aktywację transkrypcji VEGF zależną od ATF4 [49].

1.3.5 S-homocysteinyłacja białek

Homocysteina ma zdolność tworzenia wiązań dwusiarczkowych z resztami cysteiny białek, co jest potencjalnym mechanizmem toksycznego wpływu Hcy na śródbłonek i rozwoju miażdżycy [52]. Zredukowane, utlenione i związane z białkiem formy Hcy, Cys i Cys-Gly osocza podlegają reakcjom utleniania i redukcji oraz wymiany dwusiarczkowej [53]. Reszty cysteiny białek zaangażowane są w funkcję wielu enzymów, białek strukturalnych i receptorów, dlatego interakcja z nimi może zaburzać pewne szlaki metabolizmu komórkowego. W celu zbadania roli homocysteiny w uszkodzeniu śródbłonna przeprowadzono eksperymenty polegające na wiązaniu Hcy, Cys i glutationu do białek w liniach komórek człowieka eksponowanych na Hcy i jony miedzi. Dodanie jonów miedzi, które uczestniczą w utlenianiu grup tiolowych, powoduje wzrost poziomu frakcji tioli związanych z białkami. Spośród badanych związków tiolowych, Hcy wykazuje najwyższą tendencję do tworzenia wiązań dwusiarczkowych z białkami. Zaproponowano, że takie działanie Hcy jest jednym z powodów jej szkodliwego wpływu na komórkę [54].

Homocysteina ma wyższe od cysteiny powinowactwo do miejsc wiążących Cys białek osocza *in vitro* i *in vivo*. Z tego względu Hcy może zastępować Cys związaną do białka, jednak cysteina nie może zastąpić homocysteiny [53].

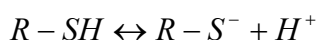
Wiązanie homocysteiny do białka osocza jest dwufazowe. W pierwszym etapie, Hcy wypiera cysteinę związaną z białkiem wiązaniem dwusiarczkowym przez reakcję substytucji nukleofilowej z udziałem jonu tiolanowego Hcy (Hcy-S⁻). Reakcja ta jest szybka i nie zależy od dostępu tlenu. Jest to zgodne z faktem, że w pH obojętnym reakcje wymiany tiol-dwusiarczek przebiegają z dużą szybkością. Drugi etap, polega na utlenianiu tioli, jest wolniejszy i zależny od obecności tlenu [55].

Głównym białkiem wiążącym Hcy wiązaniem dwusiarczkowym w osoczu krwi jest albumina (zawiera około 1 cząsteczki Hcy na 100 cząsteczek białka) i γ -globulina (wiąże około 3,4 cząsteczki Hcy na 100 cząsteczek białka). Inne proteiny zawierają ponad 10-krotnie mniej S-Hcy-białka niż albumina [56].

Albumina stanowi ponad 50% białka osocza i jej stężenie wynosi 0,6-0,75 mmol/l. Każdy z łańcuchów (A, B) homodimeru albuminy fałduje się w trzy domeny strukturalnie (I, II, III) zdefiniowane przez 17 wiązań

dwusiarczkowych, utworzonych przez 34 reszty cysteiny (Rysunek 7, str. 29).

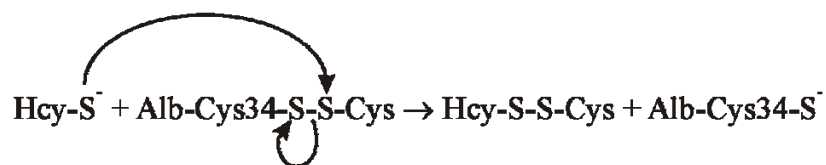
Jedna z reszt cysteiny albuminy (Cys 34) nie uczestniczy w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych. Wartość pK_a grupy tiolowej tej reszty, w odróżnieniu od większości niskocząsteczkowych aminotioili obecnych w osoczu, jest bardzo niskie i wynosi około 5. Z tego względu w warunkach fizjologicznego pH, albumina występuje głównie jako jon tiolanowy, który jest silnie reaktywny w stosunku do metali, tioli i dwusiarczków. Jon tiolanowy powstaje w wyniku dysocjacji grupy tiolowej (Reakcja 1).



Reakcja 1

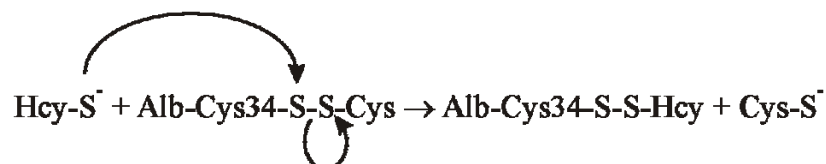
Reszta Cys 34 około 1/3 cząsteczek albuminy jest zaangażowana w wiązanie dwusiarczkowe [57], np. z Hcy lub Cys. Zastąpienie cysteiny związanej z Cys 34 albuminy-Cys34-S-S-Cys przez homocysteinę może zachodzić dwoma szlakami:

1) grupa tiolowa homocysteiny reaguje z siarką cysteiny związanej z albuminą tworząc mieszany dwusiarczek Hcy-Cys i wolny anion tiolanowy albuminy (Reakcja 2);



Reakcja 2

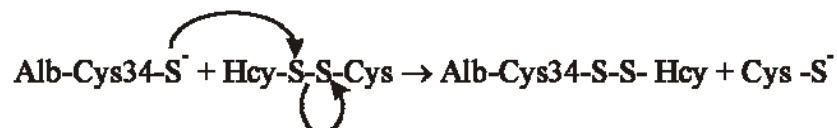
i/lub 2) grupa tiolowa homocysteiny wchodzi w reakcję z siarką Cys 34 albuminy tworząc albuminę-Cys34-S-S-Hcy i wolny anion tiolanowy cysteiny (Reakcja 3).



Reakcja 3

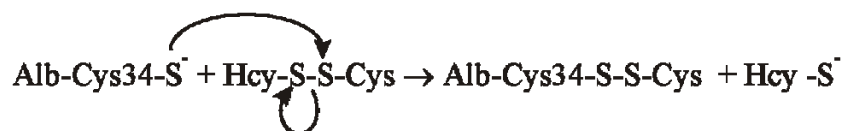
Sengupta i wsp. [58] postulują, że w warunkach fizjologicznego pH przeważa reakcja 1, co uzasadniają wartością pK_a anionów tiolanowych. pK_a anionu tiolanowego albuminy jest niższe (około 5) niż anionu tiolanowego cysteiny (około 8,2). Z tego względu w pH 7,4 anion tiolanowy albuminy będzie

bardziej stabilny termodynamicznie niż anion tiolanowy Cys, faworyzując reakcję 1. W początkowej fazie reakcji 1, homocysteina preferencyjnie atakuje atom siarki cysteiny albuminy-Cys34-S-S-Cys, tworząc anion tiolanowy albuminy i mieszany dwusiarczek Hcy-Cys. W drugiej fazie reakcji, anion tiolanowy albuminy atakuje Hcy-Cys preferencyjnie na siarkę homocysteiny i powstaje albumina-Hcy i anion tiolanowy cysteiny (Reakcja 4).



Reakcja 4

Anion tiolanowy albuminy może też atakować siarkę Cys w dwusiarczku Hcy-Cys i powstaje albumina-Cys i anion tiolanowy Hcy (Reakcja 5).



Reakcja 5

Ponieważ pK_a wolnej homocysteiny (około 9) jest wyższe niż pK_a wolnej cysteiny (około 8,2) [59, 60], anion tiolanowy Cys będzie bardziej stabilny termodynamicznie w pH 7,4 niż anion tiolanowy Hcy [58]. Gilbert [61] wykazał, że kiedy anion tiolanowy atakuje niesymetryczny dwusiarczek, tiolem opuszczającym dwusiarczek jest ten, który ma niższe pK_a . Albumina człowieka pośredniczy w przekształceniu Hcy do formy dwusiarczkowej (homocystyna lub mieszany dwusiarczek Hcy-Cys) przez reakcję wymiany tiol-dwusiarczek (zastąpienie jednego z tioli dwusiarczku przez inną grupę tiolową).

Główną rolę w procesie powstawania homocystyny odgrywa wymiana tiol-dwusiarczek. Drugorzędne znaczenie ma utlenianie Hcy, zależne od jonów miedzi związanych z albuminą. Białko to transportuje 5-10% całkowitej miedzi obecnej we krwi. Po usunięciu miedzi z albuminy przekształcenie Hcy do formy dwusiarczkowej, jest zredukowane jedynie o 20%. Sengupta i wsp. postulują, że Hcy i Hcy-Cys mogą szkodliwie oddziaływać na układ krążenia przez reakcje wymiany tiol-dwusiarczek [62].

Badania *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że post-translacyjna modyfikacja białek przez homocysteinę, polegająca na S-homocysteinytacji, może mieć ważne konsekwencje funkcjonalne (Tabela 3).

Tabela 3. Przykłady i konsekwencje S-homocysteinytacji białek

Białko	Ilość Hcy/pozycja	Funkcja białka	Efekt S-homocysteinytacji
Fibronektyna [63]	5 cząsteczek Hcy na 1 cząsteczkę białka, głównie w regionie C-końcowym, w obrębie lub sąsiedztwie domeny wiążącej fibrynę	Wiązanie fibronektyny do fibryny jest ważne dla procesu krzepnięcia krwi i gojenia się ran	Inhibicja wiązania fibryny
Transtyretyna [64, 65]	Cys 10	Transportuje tyroksynę i kompleks białko wiążące retinol-retinal. Jest zaangażowana w tworzenie złogów amyloidowych w schorzeniach zwanych amyloidozami	Może mieć udział w powstawaniu chorób amyloidowych
Aneksyna II [66, 67]	Cys 9	Dokujące białko powierzchniowe komórek śródbłonna dla tkankowego aktywatora plazminogenu	Inhibicja wiązania tkankowego aktywatora plazminogenu
Czynnik Va [27]	Cys 539, Cys 585, Cys 1085, Cys 1960, Cys 2113	Istotny kofaktor kompleksu protrombiny, który przekształca protrombinę w trombinę	Zahamowanie inaktywacji czynnika Va przez aktywowane białko C (Rysunek 4)

Wiele potencjalnie szkodliwych efektów homocysteiny zostało scharakteryzowanych na podstawie badań prowadzonych *in vitro* lub na liniach komórkowych. Badania te napotykają na określone ograniczenia. Przede wszystkim większość z nich prowadzona jest przy stężeniach homocysteiny przekraczających stężenia fizjologiczne, a nawet patologiczne. Ponadto, większość szkodliwych efektów homocysteiny było powtórzonych przez inne związki tiolowe, np. cysteinę, która nie ma związku z miażdżycą.

Poza tym, homocysteina dodana do hodowli komórkowych, ulega przekształceniom (enzymatycznym i nieenzymatycznym) do innych metabolitów, jednak w większości badań toksyczności Hcy procesy te nie były analizowane. Jednym z metabolitów homocysteiny, o potencjalnym udziale w patologii chorób krążenia, jest jej tiocykliczna forma – tiolakton homocysteiny.

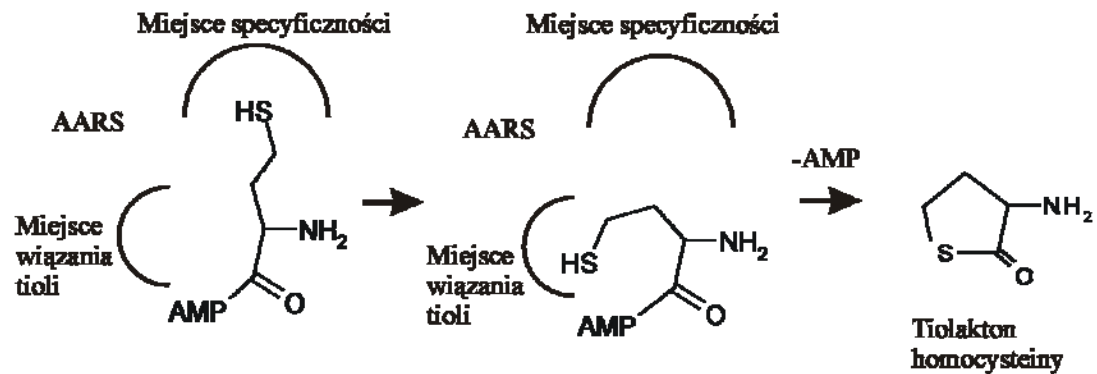
1.4 Tiolakton homocysteiny – powstawanie i właściwości

Na początkowym etapie translacji, ze względu na podobieństwo strukturalne do niektórych aminokwasów, homocysteina może być błędnie aktywowana przez syntetazy aminoacylo-tRNA (AARS). *In vitro* błędną aktywację Hcy przeprowadzają 3 syntetazy klasy I: metionylowa (MetRS), izoleucylowa (IleRS) i leucylowa (LeuRS) [2]. Dwie inne syntetazy: walilowa (ValRS) (klasa I) i lizylowa (LysRS) (klasa II) aktywują Hcy mniej wydajnie. Homocysteina nie zostaje włączona do syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego ze względu na mechanizm korekcyjny syntetaz. Jako produkt reakcji naprawczej błędnie aktywowanej Hcy powstaje tiolakton homocysteiny (HTL). Przekształcenie homocysteiny do HTL jest dwuetapowe. W pierwszym etapie (Reakcja 6), odpowiednia AARS z udziałem ATP katalizuje aktywację homocysteiny. Produktem jest homocysteinylo-adenylan przyłączony do AARS.



Reakcja 6

W drugim etapie (Reakcja 7), grupa tiolowa łańcucha bocznego Hcy, reaguje z aktywowaną grupą karboksylową Hcy, z utworzeniem tiolaktonu homocysteiny. *In vivo* HTL powstaje z homocysteiny w reakcji katalizowanej przez MetRS u *E. coli* [68], *S. cerevisiae* [69] oraz w liniach komórek ssaczych, takich jak HeLa (ang. *human cervical carcinoma*), RAG (ang. *mouse renal carcinoma*) i CHO (ang. *chinese hamster ovary*). HTL nie jest natomiast syntetyzowany przez normalne fibroblasty człowieka (GM 1374) i myszy (Balb/c 3T3).



Reakcja 7

W normalnych komórkach ssaczych jak i drożdżowych, homocysteina ulega przemianie do cysteiny, co prowadzi do niskiego stosunku Hcy/Met i obniżenia syntezy HTL. Wysoki stosunek Hcy/Met powoduje wzmożoną syntezę tiolaktonu homocysteiny przez MeRS [70]. Ludzkie linie komórkowe z rozregulowanym metabolizmem Hcy (mutacja w genie β -syntazy cystationiny i/lub aminopteryna, która zapobiega remetylacji homocysteiny do metioniny przez syntazę metioninową) produkują więcej HTL niż komórki normalne [71]. W obecności fizjologicznych stężeń Hcy, Met i kwasu foliowego, ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej, przekształcają Hcy do tiolaktonu homocysteiny. Wydajność tego przekształcenia jest wprost proporcjonalna do stężenia homocysteiny i odwrotnie proporcjonalna do stężenia metioniny, co potwierdza zaangażowanie MetRS w ten proces. Kwas foliowy inhibuje syntezę HTL przez obniżenie stężenia Hcy i podniesienie stężenia Met w komórkach śródbłonna [56].

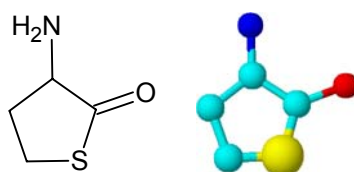
W powstawaniu tiolaktonu homocysteiny u *E. coli* oprócz MetRS uczestniczą też IleRS i LeuRS [72]. Z powodu kompartmentacji metabolizmu homocysteiny w komórkach *E. coli*, endogenna Hcy (powstająca na szlaku metabolizmu Met), ulega reakcji korekcyjnej przez MetRS [73]. Egzogenna Hcy (pobrana z medium komórkowego) ulega błędnej aktywacji i reakcji korekcyjnej przez IleRS i LeuRS [72].

Syntetaza metionilo-tRNA posiada 3 ważne rejony w centrum aktywnym: 1) miejsce zawierające Asp 52 i Arg 233, które wiążą odpowiednio grupy α -aminowe i karboksylowe aminokwasów będących substratami; 2) centrum specyficzności obejmujące Trp 305, Phe 197 i Tyr 15, które preferencyjnie wiąże łańcuch boczny prawidłowego substratu – Met; 3) miejsce wiązania tioli, które reaguje z grupą tiolową łańcucha bocznego Hcy i ułatwia tworzenie wiązania tioestrowego podczas reakcji naprawczej. Interakcje między metioniną a Trp 305 i Tyr 15 prawdopodobnie polegają na wiązaniu

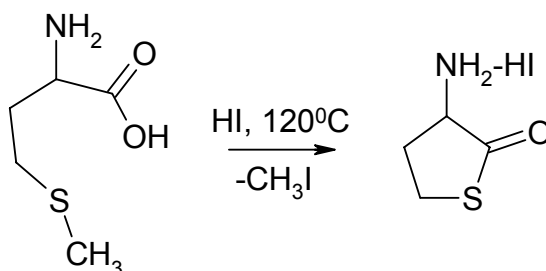
grupy metylowej Met przez hydrofobowy łańcuch boczny Trp 305 i utworzeniu wiązania wodorowego między atomem siarki Met a wodorem grupy hydroksylowej Tyr 15. Grupa metylowa metioniny znajduje się pomiędzy łańcuchem bocznym Trp 305 i Phe 197. Prawdopodobnie wiązanie wodorowe między siarką Met a Tyr 15, może tworzyć się tylko wtedy, gdy grupa metylowa jest związana w miejscu aktywnym przez interakcje z Trp 305. W przypadku homocysteiny, która nie ma grupy metylowej, wiązanie wodorowe najprawdopodobniej nie powstaje, ponieważ Hcy jest luźniej związana z centrum aktywnym [74].

Synteza tiolaktonu homocysteiny jest uniwersalna i zachodzi we wszystkich dotychczas badanych organizmach, takich jak: człowiek, mysz, drożdże, rośliny i bakterie.

Tiolakton homocysteiny jest cyklicznym tioestrem (Rysunek 5), który w warunkach laboratoryjnych można otrzymać przez wewnątrzcząsteczkową kondensację metioniny (Reakcja 8).

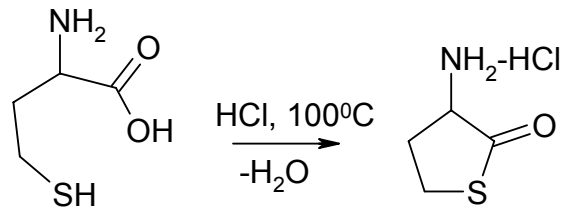


Rysunek 5. Tiolakton homocysteiny; wzór strukturalny i model przestrzenny (atomy węgla – kolor turkusowy, siarki – żółty, tlenu – czerwony, azotu – granatowy)



Reakcja 8

Metionina ogrzana do temp. 120°C w obecności jodowodoru przez 4 h zostaje przekształcona do HTL z uwolnieniem jodku metylu. Wewnątrzcząsteczkowa kondensacja homocysteiny do HTL zachodzi w obecności HCl (Reakcja 9).



Reakcja 9

W warunkach fizjologicznych (pH 7,4; 37°C) okres półtrwania HTL wynosi około 25 h. W środowisku alkalicznym hydrolizuje do Hcy (w 0,1 M NaOH w temperaturze pokojowej całkowicie hydrolizuje w przeciągu 15 minut). Podobnie jak wszystkie tioestry, HTL absorbuje światło UV z maksimum absorpcji przy 240 nm i współczynnikiem ekstynkcji $\epsilon_{240} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ze względu na pK_a grupy α -aminowej (7,1) oraz wolną grupę karboksylową, w pH około 8 HTL jest w przewodzie obojętny, natomiast w pH około 6 – głównie naładowany dodatnio [75].

1.5 Znaczenie biologiczne tiolaktonu homocysteiny

Tiolakton homocysteiny działa cytotoksycznie, powodując apoptozę komórek i indukując odpowiedź na niesfaldowane białka. Ponadto jest wysoce reaktywny w stosunku do białek, które w jego obecności ulegają modyfikacji i nabywają właściwości antygenowych.

1.5.1 Indukcja apoptozy i odpowiedzi na niesfaldowane białka

Tiolakton homocysteiny (0,05-0,2 mmol/l) indukuje niezależną od szlaku kaspazy apoptozę komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [76]. Wykazuje również toksyczny wpływ na ludzkie promieloidalne komórki HL-60. Apoptoza komórek HL-60 indukowana przez HTL (0,5 mmol/l), jest zależna od indukowanej nadtleniem wodoru aktywacji kaspazy 3 [77]. HTL wywołuje apoptozę kultur komórkowych ludzkich trofoblastów, przy czym efekt ten może być ograniczony przez antyoksydanty, takie jak witamina C czy N-acetylocysteina. W porównaniu z komórkami kontrolnymi inkubowanymi z 0,4 mmol/l Cys, komórki inkubowane z 0,4 mmol/l HTL wykazują zwiększoną ekspresję białka p53 i proapoptotycznego białka Bak. Ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 i proapoptotycznego białka Bax, nie ulega zmianie w odpowiedzi na HTL [78].

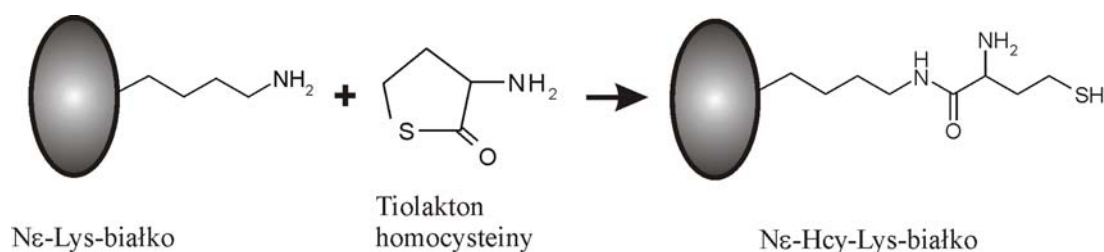
Zarówno homocysteina (1 mmol/l) jak i HTL (0,25 mmol/l) indukują apoptozę linii komórek HUVEC, jednak HTL znacznie wydajniej aktywuje

kaspazę 3 i indukuje wydzielanie IL-8. Efekt wywołany przez Hcy i HTL, tak jak w przypadku ludzkich trofoblastów, jest redukowany w obecności antyoksydantów. Antyoksydanty zwiększają przeżywalności komórek poddanych działaniu Hcy lub HTL, aczkolwiek nie eliminują całkowicie apoptozy. Programowana śmierć komórek indukowana przez homocysteinę i jej pochodną, jest jedynie w pewnym stopniu zależna od udziału reaktywnych form tlenu [79]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że dyskutowane efekty są obserwowane przy niższych stężeniach HTL niż Hcy.

Tiolakton homocysteiny (10 mmol/l) indukuje UPR w linii komórek ARP-19 (ang. *retinal-pigmented epithelial cell line*), o czym świadczy podwyższenie poziomu ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyń, a także GADD153 i GPR78. Wzrost ekspresji VEGF, indukowany tiolaktonem homocysteiny, jest prawie 2-krotnie wyższy, niż indukowany przez Hcy o takim samym stężeniu [49].

1.5.2 N-homocysteinyłacja białek

Powstający w komórce tiolakton homocysteiny ulega sekrecji, hydrolizie do Hcy, a także jest wprowadzany do białek wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Energia bezwodnikowego wiązania Hcy~AMP jest zachowana w wiązaniu tioestrowym HTL, które jest bardzo podatne na reakcje z nukleofilami. W warunkach fizjologicznych (pH 7,4; 37°C) preferencyjnie reaguje z grupą ϵ -aminową reszt lizyny białek. Grupa ϵ -aminowa wolnej lizyny wykazuje 3-krotnie wyższą reaktywność względem HTL niż grupa α -aminowa [75]. Mechanizm inkorporacji homocysteiny do łańcucha polipeptydowego polega na acylacji grupy ϵ -aminowej reszt lizyny przez zaktywowaną grupę karboksylową HTL (Rysunek 6) [71].



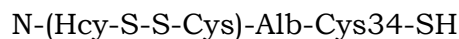
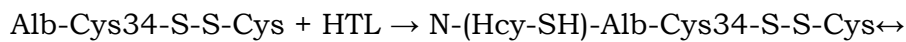
Rysunek 6. N-homocysteinyłacja białka

N-homocysteinyłacja białek była początkowo odkryta w kulturach komórkowych [22, 56, 71], a następnie w organizmie człowieka [80, 81]. We krwi człowieka obecne są zarówno tiolakton homocysteiny [81-83] jak i N-

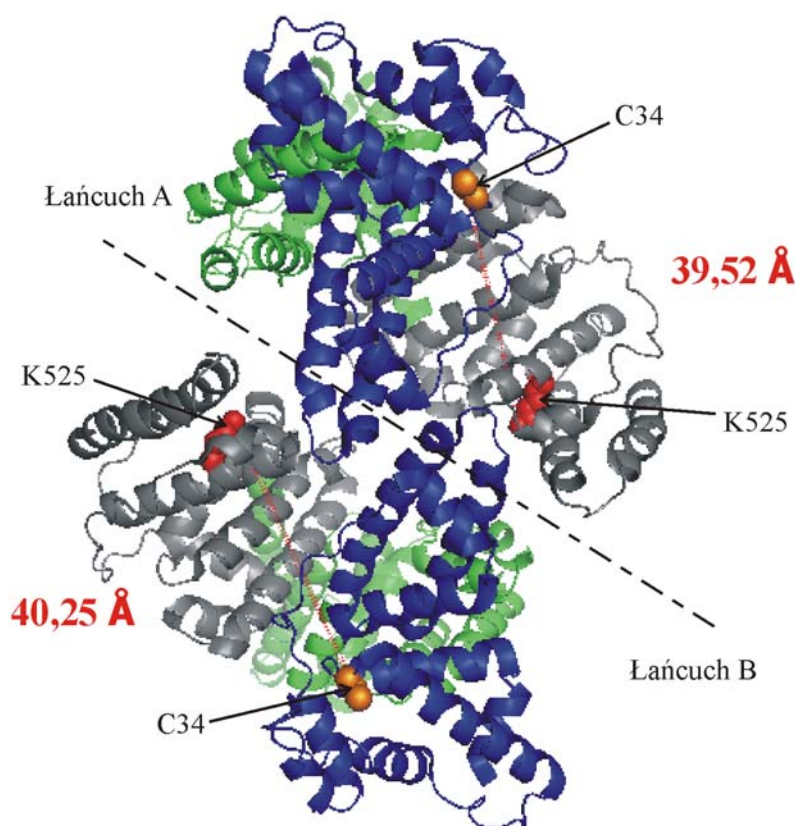
homocysteinyłowane białka [17, 80, 84]. Stężenie HTL u zdrowych ludzi waha się od 0 do 34,8 nmol/l, a średnie wynosi $2,82 \pm 6,13$ nmol/l ($n = 60$), co stanowi od 0 do 0,28% całkowitej Hcy (średnio $0,023 \pm 0,05\%$) [18]. W osoczu człowieka Hcy związana wiązaniem amidowym z białkiem stanowi od 0,3 do 23% całkowitej Hcy. N-Hcy-białka są zatem ważnym komponentem metabolizmu Hcy u człowieka. Około 0,6% cząsteczek hemoglobiny zawiera jedną cząsteczkę Hcy połączoną wiązaniem amidowym lub peptydowym. Albumina surowicy i γ -globuliny zawierają około 0,36% N-Hcy-białka. Pozostałe białka (LDL, HDL, transferyna, antytrypsyna i fibrynogen) zawierają 0,04-0,1% N-Hcy-białka.

Intensywność N-homocysteinyłacji białek w kulturach komórek śródbłonna wzrasta ze wzrostem stężenia Hcy i spada ze wzrostem stężenia kwasu foliowego i HDL. W większości przebadanych surowic człowieka poziom N-Hcy-białek rośnie również ze wzrostem poziomu Hcy. W niektórych przypadkach mimo wysokiego stężenia Hcy surowicy nie obserwuje się wysokiej zawartości N-Hcy-białka, co może być spowodowane wysokim poziomem tiolaktonazy/paraoksonazy (Rozdział 1.6). Poziom N-Hcy-białka jest negatywnie skorelowany ze stężeniem metioniny, kwasu foliowego i HDL.

Około 0,36% cząsteczek albuminy surowicy człowieka, zawiera jedną cząsteczkę Hcy, przyłączoną wiązaniem amidowym [56]. We krwi człowieka występują dwie podstawowe formy albuminy [57]: albumina-Cys34-SH, zwana merkaptoalbuminą oraz albumina-Cys34-S-S-Cys; te dwie formy stanowią odpowiednio dwie trzecie i jedną trzecią, całkowitej albuminy. W obiegu obecne są również albumina-Cys34-S-S-Hcy [85] oraz N-Hcy-albumina [17], które stanowią ok. 1-2% albuminy i zawierają ponad 80% Hcy osocza [22]. Preferencyjnym miejscem N-homocysteinyłacji albuminy, jest reszta Lys 525. Formy dwusiarczkowe albuminy ulegają N-homocysteinyłacji szybciej niż merkaptoalbumina, zatem reaktywność reszt Lys albuminy z HTL zależy od statusu reszty Cys 34. W N-homocysteinyłowanej albuminie-Cys34-S-S-Cys ma miejsce wymiana tioldwusiarczków między nowo wprowadzoną Hcy a dwusiarczkiem na Cys 34 i regeneracja wolnej grupy tiolowej na Cys 34 (Reakcja 10).

**Reakcja 10**

N-homocysteinyłacja mieszaniny dwóch głównych form albuminy krążących we krwi prowadzi do jednego produktu, którym jest N-(Hcy-SH)-albumina-Cys34-SH. Wymiana tiol-dwusiarczek zachodzi w układzie trans, między różnymi cząsteczkami albuminy. Wewnątrzcząsteczkowa wymiana tiol-dwusiarczek jest mało prawdopodobna ze względu na odległość dzielącą Cys 34 (domena I) i Lys 525 (domena III) w strukturze albuminy.



Rysunek 7. Struktura przestrzenna dimeru albuminy człowieka z uwzględnieniem podziału na domeny: I (kolor niebieski), II (zielony), III (szary). Zaznaczono dystans między atomem siarki łańcucha bocznego C34 a atomem azotu łańcucha bocznego K525 w łańcuchu A i B. Narysowano według 1bm0.pdb [86]

Ze względu na niskie pK_a (około 5) anionu tiolanowego Cys 34, jest on bardziej stabilny termodynamicznie niż anion tiolanowy Hcy. Niskie pK_a tiolanu Cys 34 sprawia również, że wymiana tiol-dwusiarczek N-(Hcy-SH)-albuminy-Cys34-SH z albuminą-Cys34-S-S-Cys jest termodynamicznie bardziej uprzywilejowana niż z Cys. Również inne N-homocysteinyłowane białka, takie jak: transferyna, hemoglobina, cytochrom c, fibrynogen,

antytrypsyna i mioglobina mogą usuwać Cys z dwusiarczkowej formy albuminy (albumina-Cys34-S-S-Cys), uwalniając grupę tiolową cysteiny 34. Wiązanie dwusiarczkowe na konserwatywnej reszcie Cys 34 ułatwia przekształcenie N-homocysteinyłowanej merkaptalbuminy do formy bardziej podatnej na proteolizę. Formy N-(Hcy-SH)-albumina-Cys34-S-S-Cys i albumina-Cys34-S-S-Hcy są bardziej podatne na proteolizę niż albumina-Cys34-SH. Ugrupowanie dwusiarczkowe na Cys 34 może odgrywać istotną rolę w ułatwianiu proteolitycznego rozkładu N-homocysteinyłowanej albuminy. N-homocysteinyłowana albumina poddana działaniu H₂O₂ tworzy agregaty [87].

N-homocysteinyłacja prowadzi do inaktywacji enzymów takich jak MetRS oraz trypsyna, przy czym spadek aktywności jest proporcjonalny do stopnia modyfikacji. MetRS ulega pełnej inaktywacji, gdy 8-9 reszt Hcy jest wprowadzonych na cząsteczkę białka (co odpowiada ok. 33% zmodyfikowanych reszt Lys), natomiast trypsyna jest inaktywowana po związaniu 11-12 reszt Hcy na cząsteczkę białka (zmodyfikowanych ok. 88% reszt Lys) [22].

Modyfikacja tiolaktonem homocysteiny lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) powoduje spadek aktywności związanej z nią paraoksonazy (PON). Enzym PON zapobiega rozwojowi miażdżycy, ponieważ chroni LDL [88] i HDL [89] przed peroksydacją lipidów [90]. Znaczny spadek aktywności enzymu w HDL inkubowanej z HTL sugeruje, że N-homocysteinyłacja HDL może obniżać jej właściwości ochronne przeciwko uszkodzeniu oksydacyjnemu i przeciwko toksyczności tiolaktonu homocysteiny (Rozdział 1.6) [90].

Wydaje się, że dla rozwoju miażdżycy duże znaczenie ma modyfikacja lipoprotein, w szczególności LDL. Utlenienie LDL jest istotnym etapem rozwoju płytki miażdżycowej. Kowalencyjne zmiany wprowadzane w LDL (acetylacja, utlenienie, glikozylacja) zwiększają pobieranie lipoproteiny i magazynowanie cholesterolu wewnątrz komórki. Ponadto utleniona lub glikozyłowana LDL indukuje peroksydację lipidów w kulturach komórkowych [91, 92]. Modyfikacja reszt His i Lys apolipoproteiny B (apo-B 100) 4-hydroksy-2-nonenalem przekształca LDL do formy aterogennej, która pobierana jest przez makrofagi, prowadząc do tworzenia komórek piankowych [93]. W obecności tiolaktonu homocysteiny LDL ulega N-homocysteinyłacji. N-Hcy-LDL, produkt acylacji HTL grup ε-aminowych

reszt Lys apo-B, może być również uwikłany we wzrost aterogenności LDL [94]. Poparciem tej hipotezy jest fakt, że N-Hcy-LDL jest bardziej podatna na spontaniczną precypitację niż niezmodyfikowany odpowiednik oraz ulega szybszej internalizacji za pośrednictwem receptorów błonowych makrofagów, co prowadzi do większej akumulacji cholesterolu wewnątrz komórki [95].

Uważa się, że podwyższony poziom adduktu N-Hcy-LDL może odzwierciedlać wysokie stężenie Hcy. Jest to potencjalny marker diagnostyczny do wykrywania podwyższonego stężenia Hcy w systemach biologicznych. N-Hcy-LDL wywołuje odpowiedź immunologiczną, dzięki czemu możliwe było wyprodukowanie przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko temu adduktowi [96].

N-Hcy-LDL indukuje produkcję nadtlenu wodoru przez ludzkie komórki śródbłonna aorty (HAEC) i spadek żywotności tychże komórek. N-homocysteinylowana LDL zostaje wprowadzona do komórek, po czym na skutek hydrolitycznej degradacji uwalniana jest Hcy. D,L-Hcy, podobnie jak inne związki tiolowe, może generować reaktywne formy tlenu: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru oraz rodnik hydroksylowy, i inicjować peroksydację lipidów. Wyniki te potwierdziły przypuszczenia, że peroksydacja lipidów indukuje uszkodzenie i śmierć komórek śródbłonna [97].

Tiolakton homocysteiny, podobnie jak Hcy, ma wpływ na proces fibrynolizy. Skrzepy z osocza traktowanego HTL ulegają lizie wolniej niż skrzepy kontrolne, a wielkość tego efektu zależy od stężenia HTL. Fibrynogen zmodyfikowany HTL tworzy skrzepy podobne do skrzepów powstających z fibrynogenu królików z hiperhomocysteinemią; cienkie, ciasno upakowane i bardziej odporne na fibrynolizę niż skrzepy kontrolne. Na podstawie opisanych wyników Sauls i wsp. sugerują, że N-homocysteinyłacja fibrynogenu, może prowadzić do wzrostu odporności skrzepów fibrynowych na lizę, przez co przyczyniać się do zwiększonego ryzyka chorób krążenia związanych z hiperhomocysteinemią [36].

N-homocysteinyłacja fibrynogenu zwiększa pojemność wiązania tkankowego aktywatora plazminogenu i spowalnia aktywację plazminogenu przez TPA, nie wpływa natomiast na wiązanie plazminogenu do fibryny. Reszty lizyny fibrynogenu pełnią ważną funkcję w procesie krzepnięcia krwi, ponieważ są głównym miejscem wiązania enzymów fibrynolitycznych i miejscem cięcia

dla plazminy. Kilka z 12 zidentyfikowanych N-homocysteinylowanych reszt Lys fibrynogenu znajduje się w pobliżu miejsc wiązania TPA i plazminogenu. Prawdopodobnie N-homocysteinyłacja reszt lizyny fibrynogenu prowadzi do osłabionej fibrynoлизy [98]. Hipoteza ta wydaje się być poparta przez najnowsze wyniki badań Undas i wsp. [37], którzy wykryli korelację między poziomem Hcy osocza a właściwościami skrzepu fibrynowego u ludzi (Rozdział 1.3.1).

Zagrożenie dla funkcji komórek i całego organizmu, jakie stwarza tiolakton homocysteiny i N-Hcy-białka, nie pozostało bez ewolucyjnej odpowiedzi – powstały systemy usuwania obu komponentów.

1.5.3 Immunogenność N-homocysteinylowanych białek

Modyfikacje (karbamylacja, acetylacja, etylacja, metylacja) reszt Lys albuminy, fibrynogenu lub LDL indukują powstawanie przeciwciał o wysokiej specyficzności przeciwko danej modyfikacji u zwierząt eksperymentalnych [99]. Autoprzeciwciała skierowane przeciwko utlenionej LDL, adduktowi LDL z malonyldialdehydem lub 4-hydroksynonenalem zidentyfikowano *in vivo* [100]. Również białka zmodyfikowane tiolaktonem homocysteiny mogą być fizjologicznie szkodliwe i wywoływać odpowiedź immunologiczną. Ferguson i wsp. jako pierwsi udowodnili, że N-homocysteinyłowana LDL jest immunogenna i uzyskali przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko adduktowi N-Hcy-LDL. Scharakteryzowali specyficzność rozpoznawania adduktów N-Hcy-białko surowicy. Poliklonalne królicze przeciwciała specyficzne względem N-homocysteinyłowanej LDL wiążą króliczą LDL, hemoglobinę i albuminę, których 40% reszt Lys zostało zmodyfikowanych HTL. W kompetycyjnych reakcjach ELISA, Hcy, homocystyna ani utleniona LDL. LDL, której reszty Lys zostały zmodyfikowane przez acetylację lub metylację, nie konkurują z N-Hcy-LDL o wiązanie surowicy immunizowanego zwierzęcia [96].

We krwi człowieka obok N-Hcy-albuminy i N-Hcy-hemoglobiny [17], występują specyficzne wobec nich autoprzeciwciała. Undas i wsp. wykazali, że immunoglobuliny specyficznie rozpoznające epitop Nε-Hcy-Lys na N-homocysteinylowanych białkach są obecne w organizmie człowieka. Poziom przeciwciał anty-Nε-Hcy-Lys-białko w surowicy jest pozytywnie skorelowany ze stężeniem całkowitej Hcy, nie jest natomiast skorelowany z poziomem Cys i Met osocza. W grupie mężczyzn z przebyłym zawałem, średni poziom

autoprzeciwciał anty-Nε-Hcy-Lys-białko, był około 50% wyższy, niż w kontrolnej grupie osób zdrowych. U kobiet nie obserwuje się podobnej zależności. Na podstawie tych danych postawiono hipotezę, że Nε-Hcy-Lys-białko może być nowym autoantygenem człowieka, przyczyniającym się do aktywacji odpowiedzi immunologicznej [101], która jest ważnym modylatorem aterogenezy [102].

Badano zależność przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek z chorobą niedokrwinną serca (CAD, ang. *coronary artery disease*). Seropozytywność względem przeciwciał Nε-Hcy-Lys-białko, jest 5-krotnie częstsza wśród pacjentów z CAD, niż w grupie kontrolnej (52,3% vs 10,0%; $p = 0,0001$). Również poziomy Hcy są wyższe u pacjentów z CAD (mediana 13,0 $\mu\text{mol/l}$ vs 12,1 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,026$). Co ważne 41,2% osób z całkowitą Hcy > 14,5 mmol/l jest seropozytywnych w porównaniu z 25,5% osób z normalnym poziomem Hcy ($p = 0,048$). Znaleziono słabą korelację między przeciwciałami anty-Nε-Hcy-Lys-białko a poziomem Hcy ($r = 0,16$; $p = 0,03$). Seropozytywność względem anty-Nε-Hcy-Lys-białko jest niezależnym prognostykiem (ang. *predictor*) wczesnej choroby niedokrwiennej serca (OR, 14,82; 95% CI, 4,47 do 49,19; $p = 0,00002$). Przeciwciała anty-Nε-Hcy-Lys-białko są skorelowane z poziomem białka C-reaktywnego ($r = 0,24$; $p = 0,002$). Seropozytywność względem przeciwciał anty-Nε-Hcy-Lys-białko nie wykazuje związku z polimorfizmem MTHFR C677T, jest natomiast związana z wczesną CAD. Autoimmunologiczna odpowiedź względem N-homocysteinylowanej albuminy, może stanowić nowy mechanizm zaangażowany we wczesny rozwój choroby niedokrwiennej serca [103].

1.6 Detoksyfikacja tiolaktonu homocysteiny

Pogląd na temat biologicznego znaczenia tiolaktonu homocysteiny został poparty przez odkrycie jego hydrolaz. HTL będąc związkiem szkodliwym, musi być detoksyfikowany lub usuwany z organizmu. Rzeczywiście, w ludzkiej surowicy zidentyfikowano enzym o masie cząsteczkowej 45 kDa, będący białkowym komponentem HDL, który specyficznie hydrolizuje HTL do Hcy. Enzym ten nazwano tiolaktonazą. Do swojej aktywności i stabilności wymaga jonów wapnia, jest natomiast inhibowany przez izoleucynę i penicylaminę. Badania specyficzności substratowej wykazały, że HTL jest prawdopodobnie naturalnym substratem dla tiolaktonazy, która

hydrolizuje również inne substraty, np. octan fenylu, octan p-nitrofenylu i paraokson. N-końcowa sekwencja aminokwasowa tiolaktonazy jest identyczna z sekwencją paraoksonazy PON1 człowieka. Paraoksonaza detoksyfikuje organiczne fosforany. Naturalny substrat i funkcja tego enzymu były nieznane. Zarówno tiolaktonaza, jak i paraoksonaza, występują w surowicy ssaków, przy czym surowica królika i myszy zawiera 5-10-krotnie więcej tiolaktonazy i paraoksonazy niż surowica człowieka. Obu enzymów nie wykrywa się w surowicy ptaków. Paraokson i octan fenylu inhibują hydrolizę HTL przez tiolaktonazę, co wskazuje, że te trzy związki są hydrolizowane przez ten sam enzym. Oba enzymy mają tę samą masę cząsteczkową oraz są Ca^{2+} -zależnymi składnikami HDL. Tiolaktonaza/paraoksonaza przez detoksyfikowanie HTL może odgrywać istotną rolę w ochronie białek przed N-homocysteinylacją [3].

Paraoksonaza człowieka jest produktem polimorficznego genu *PON1* [104]. Dwa z polimorfizmów tego genu skutkują w podstawieniu reszt aminokwasowych w pozycjach 55 i 192 w białku PON1. Wpływ polimorfizmu na hydrolizę organofosforanów zależy od substratu, np. izoforma R192 wykazuje wysoką aktywność w stosunku do paraoksonu a forma Q192 – niską. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia w przypadku sarinu. Polimorfizm 192 reszty aminokwasowej nie zmienia natomiast aktywności enzymu w stosunku do octanu fenylu [105].

Forma tiolaktonazy o wysokiej aktywności zapewnia lepszą ochronę przeciwko N-homocysteinytacji białek niż forma o niskiej aktywności. W populacji człowieka wysoka aktywność tiolaktonazowa związana jest z allelami L55 i R192, częściej występującymi u ludzi rasy czarnej niż białej, podczas gdy niska aktywność jest związana z allelami M55 i Q192, przeważającymi u ludzi rasy białej [106].

Łaciński i wsp. badali aktywność tiolaktonazową paraoksonazy-1 (PON1) u ludzi. Wykazano silną korelację między aktywnością hydrolityczną PON-1 w stosunku do HTL i paraoksonu. Wyniki analizy genotypów PON1 pozwoliły stwierdzić, że genotypy PON1-192-RR i PON1-55-LL są związane z wyższą aktywnością tiolaktonazową. Aktywność tiolaktonazowa skorelowana jest negatywnie z wiekiem i całkowitą Hcy osocza, natomiast pozytywnie koreluje z całkowitym cholesterolem. Autorzy sugerują, że głównymi determinantami aktywności tiolaktonazowej u człowieka są genotypy PON1, poziom całkowitej Hcy i wiek [107].

Odkryto również wewnątrzkomórkowy enzym hydrolizujący HTL u drożdży [4] oraz w ludzkim łożysku [5]. Metodą spektrometrii masowej oba te białka zidentyfikowano jako hydrolazę bleomycyny [4, 5]. Homogenne rekombinowane formy drożdżowej i ludzkiej hydrolazy bleomycyny, otrzymane na drodze ekspresji w *E. coli*, również posiadają zdolność hydrolizy tiolaktonu homocysteiny [4]. Wykazano, że tiolakton homocysteiny jest fizjologicznym substratem hydrolazy bleomycyny, enzymu, który chroni komórki przed jego toksycznością [108].

Niehydrolizowany tiolakton homocysteiny jest usuwany z organizmu człowieka z moczem. Stężenie HTL w moczu (11-85 nmol/l, n (wielkość próby) = 19) jest około 100-krotnie wyższe niż w osoczu (<0,1-22,6 nmol/l, n = 20). HTL stanowi 2,5-28,3% całkowitej Hcy w moczu, podczas gdy HTL osocza stanowi <0,002-0,29% całkowitej Hcy osocza. Stężenie tiolaktonu homocysteiny w moczu, w przeciwieństwie do stężenia homocysteiny, jest negatywnie skorelowane z pH moczu. Pojawia się sugestia, że status protonowy wpływa na wydalanie tiolaktonu homocysteiny [19].

Wydalanie HTL z moczem, obecność komórkowych i pozakomórkowych enzymów hydrolizujących HTL, jak również reaktywność HTL z białkami tłumaczą względnie niski poziom tiolaktonu homocysteiny obserwowany w osoczu zdrowego człowieka.

1.7 Białka modelowe

N-homocysteinylacja może być indukowana *in vitro* przez inkubację białek z tiolaktonem homocysteiny. Zmodyfikowane w ten sposób cząsteczki białkowe stanowią użyteczny model eksperymentalny do badań zmian strukturalnych i funkcjonalnych indukowanych modyfikacją [22, 90, 109, 110]. Jako białka modelowe do badań wybrałam metaloproteiny zawierające żelazo:

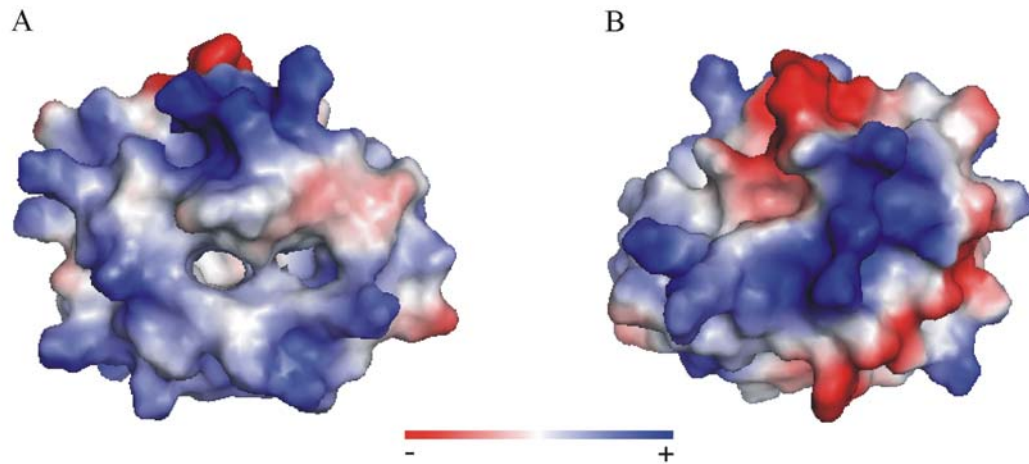
1. hemowe: cytochrom c i mioglobinę oraz
2. niehemowe białka uczestniczące w metabolizmie żelaza: ferrytynę i transferynę.

Przy wyborze cząsteczek modelowych kierowałam się cechami strukturalnymi i funkcjonalnymi białek. Ze względu na fakt, że Hcy związana z białkiem wiązaniem amidowym, wpływa na właściwości oksydacyjno-redukcyjne grup tiolowych białek [22, 87], należy się spodziewać, że N-homocysteinylacja wpłynie istotnie na potencjał

oksydacyjno-redukcyjny białek zawierających żelazo. W strukturze trzeciorzędowej cytochromu c, reszty lizyny, eksponowane na powierzchni cząsteczki, są istotne dla funkcji pełnionej przez to białko [111]. Mioglobina w warunkach denaturujących może tworzyć fibryle amyloidowe przez asocjację segmentów rozfałdowanego łańcucha polipeptydowego [112]. Transferyna, dzięki dużej liczbie reszt lizynowych w łańcuchu polipeptydowym, charakteryzuje się wysoką stałą szybkości reakcji N-homocysteinyłacji [80]. Modyfikacja ferrytyny przez tiolakton homocysteiny, nie była dotychczas badana. Wiadomo jednak, że osoby cierpiące na chorobę niedokrwinną serca wykazują podwyższony poziom ekspresji łańcucha L ferrytyny [113].

1.7.1 Cytochrom c

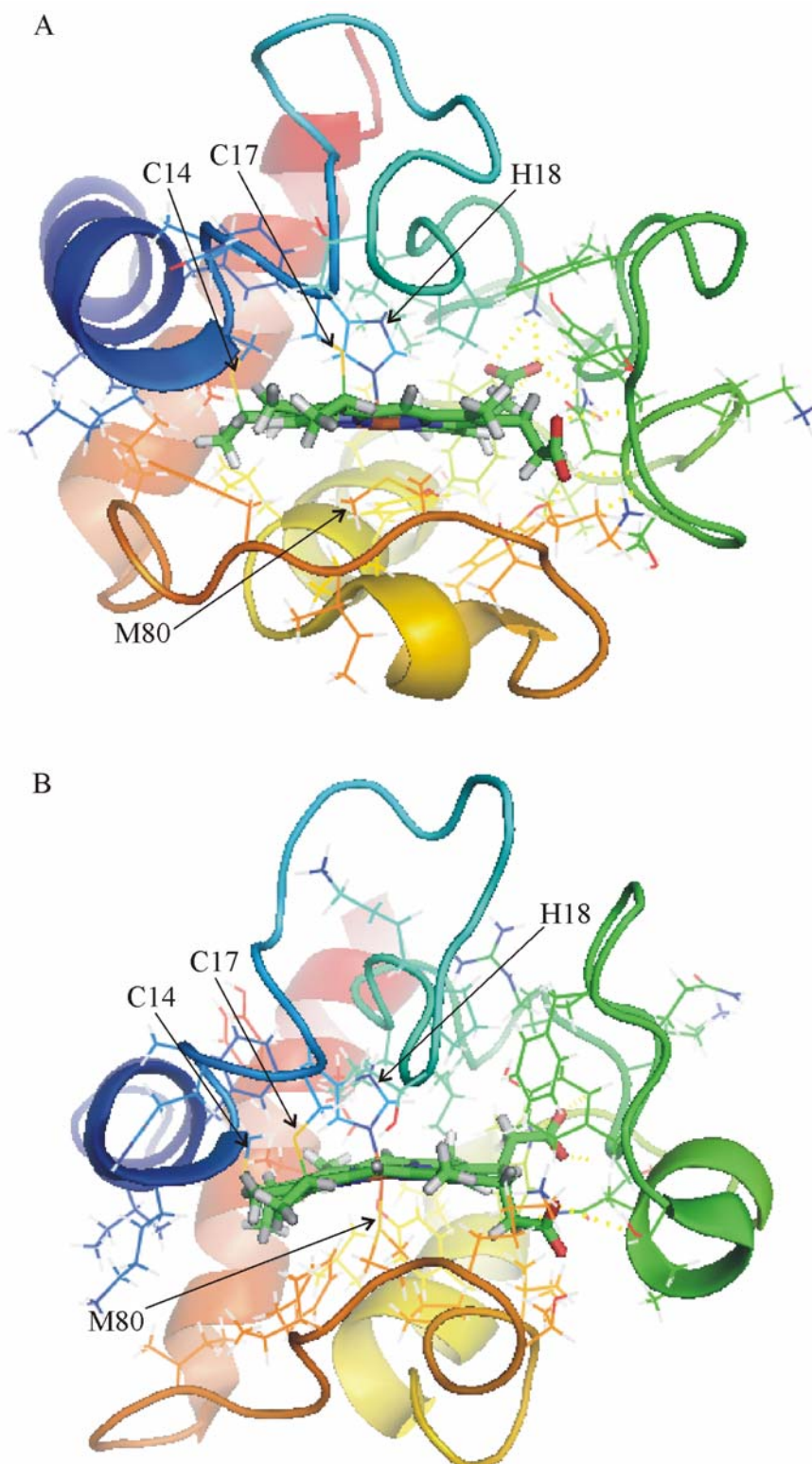
Cytochrom c uczestniczy w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym oraz bierze udział w procesie apoptozy [114]. Ze względu na cechy fizyko-chemiczne, takie jak: rozpuszczalność, stabilność oraz łatwość oczyszczania i krystalizacji, jest to jedno z najlepiej poznanych białek. Cytochrom c ma konserwatywną strukturę, bardzo zbliżoną zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Składa się z łańcucha polipeptydowego o długości 104 reszt aminokwasowych oraz grupy prostetycznej, którą stanowi hem (żelazoprotoporfiryna IX). Białkowy i niebiałkowy komponent cytochromu c, połączone są dwoma wiązaniami tioeterowymi pomiędzy łańcuchami winylowymi hemu, a grupami tiolowymi reszt cysteiny 14 i cysteiny 17. Ligandami aksjalnymi żelaza hemu są histydyna 18 i metionina 80. Struktura łańcucha polipeptydowego jest doskonale przystosowana do funkcji pełnionej przez białko. Hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów otaczają grupę hemową, dzięki czemu wykazuje ona duże powinowactwo do elektronów. Znaczna część reszt aminokwasowych eksponowanych na powierzchni białka, jest naładowana dodatnio (Arg, Lys) (Rysunek 8), co ma zasadnicze znaczenie dla kontaktu cytochromu c z partnerami reakcji. Stwierdzono, że modyfikacja Lys 13 powoduje osłabienie interakcji cytochromu c z oksydazą cytochromową [111].



Rysunek 8. Model trójwymiarowej struktury cytochromu c ze wskazaniem dodatnio (kolor niebieski) oraz ujemnie (czerwony) naładowanych reszt aminokwasowych eksponowanych na powierzchni białka. Widok od strony szczeliny hemu (A) i od strony przeciwnej (B). Narysowano według 1ocd.pdb [115]

Cytochrom c występuje pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną, gdzie stanowi integralną część łańcucha oddechowego. Przytrzymywany jest przy błonie wewnętrznej przez oddziaływania jonowe. Przenosi elektrony nieenzymatycznie, zgodnie z kierunkiem rosnącego potencjału oksydoredukcyjnego, z reduktazy cytochromowej, zwanej kompleksem cytochromu b-c₁, do kompleksu oksydazy cytochromowej. Atom żelaza hemu po przyjęciu elektronu przechodzi z formy żelazowej (Fe³⁺, ang. *ferric*) do formy żelazawej (Fe²⁺, ang. *ferrous*).

Na podstawie wyników badań krystalograficznych stwierdzono, jedynie nieznaczne zmiany strukturalne białka spowodowane zmianą stopnia utlenienia atomu żelaza hemu; natomiast badania oparte na metodzie NMR wskazały na występowanie istotnych różnic strukturalnych [115] (Rysunek 9).



Rysunek 9. Różnice strukturalne w miejscu wiązania hemu pomiędzy ferrocytochromem (A) a ferricytochromem (B) serca konia. Narysowano według: 1ocd.pdb (A) i 2frc.pdb (B) [115]

Utleniony i zredukowany cytochrom c, będące w roztworze, różnią się w pewnym stopniu strukturą drugorzędową. Dla przykładu, reszty 49-54 ferrocytochromu zwijają się w helisę, natomiast w strukturze

ferricytochromu przybierają postać kilku pętli. Kolejną różnicą jest rozmieszczenie struktur β harmonijki, które w ferricytochromie obejmują reszty aminokwasów 17-19 oraz 30-32, natomiast w ferrocytochromie reszty 38-40 i 57-59.

Na rysunku 9 zaznaczono łańcuchy boczne kilku najważniejszych reszt aminokwasowych, które w zależności od stopnia utlenienia atomu żelaza zmieniają swoją orientację w stosunku do grupy hemowej. Oprócz cysteiny 14 i 17 oraz histydyny 18 i metioniny 80, które są najbardziej zaangażowane w interakcje z hemem, zidentyfikowano około 40 reszt aminokwasowych wrażliwych na stan redoks atomu żelaza, z czego zmiany większości reszt wykazano zarówno metodami krystalograficznymi, jak i NMR [116].

Cortese i wsp. sugerują, że w warunkach fizjologicznych cytochrom c występuje w dwóch konformacjach o podobnej aktywności transportu elektronów, rozpuszczalnej i związanej z błoną [117]. Zmianę konformacji cytochromu c zaobserwowano we wczesnej fazie apoptozy. Przypuszcza się, że może to być spowodowane wiązaniem się białka ze zmienionymi podczas apoptozy błonami wewnątrzkomórkowymi. Jemmerson i wsp. postulują, że cytochrom c związany z błoną jest czynnikiem koaktywującym kaspazę w komórkach hybridomy T [114].

W latach 80. ubiegłego wieku Okunuki i wsp. prowadzili badania nad chemiczną modyfikacją cytochromu c. Autorzy wykazali, że inkubacja białka z bezwodnikiem octowym w obojętnym pH prowadzi do acylacji głównie grupy α -aminowej aminokwasu N-końcowego oraz grupy ϵ -aminowej reszt lizyny, a czasami także grupy hydroksylowej reszt tyrozyny i grupy tiolowej reszt cysteiny. Acetylowane białka różnią się od niemodyfikowanych enzymatycznie i elektrostatycznie. Acetylacja powoduje utratę ładunku dodatniego i obniżenie wartości pI białka, a w konsekwencji uniemożliwia oddziaływanie z reduktazą i oksydazą cytochromową [118].

Cytochrom c mięśnia sercowego wołu modyfikowano szerokim zakresem stężeń bezwodnika octowego, od ekwimolarnego do 10- i 20-krotnego nadmiaru molowego w stosunku do grupy ϵ -aminowej. Modyfikacja cytochromu c ekwimolarnym stężeniem bezwodnika octowego spowodowała powstanie mieszaniny białek zawierających do 3 acetylowanych reszt Lys. Rezultatem modyfikacji 10-krotnym nadmiarem bezwodnika octowego było białko z acetylowanymi 6-12 resztami Lys. 20-krotny nadmiar substancji

modyfikującej spowodował acetylację grup ϵ -aminowych wszystkich reszt Lys oraz grup hydroksyloowych dwóch lub czterech reszt Tyr w białku (takie formy autorzy nazwali odpowiednio 20- i 22-acetylo-cytochromem c). Najbardziej reaktywna, w stosunku do bezwodnika octowego, okazała się reszta lizyny 22. Kolejną, preferencyjnie acetylowaną grupą, jest lizyna 13. Reszty tyrozyny ulegają modyfikacji dopiero po acetylacji wszystkich lizyn w białku.

Acylacja reszt lizyny nie wpływa na widmo absorpcji cytochromu c, ani na jego podatność na proteolizę termolizyną. Dopiero acylacja, również reszt tyrozyny, zmienia widmo absorpcji oraz zwiększa podatność na proteolizę. Widmo 20- i 22-acetylo-ferrytochromu c charakteryzuje się mniej intensywnym i przesuniętym do 528 nm pasmem, które w przypadku natywnego białka ma maksimum przy 530 nm, występowaniem dodatkowego pasma z maksimum przy 620 nm oraz bardziej intensywnym pasmem Soreta z maksimum przesuniętym z 408 nm do 401 nm. Z drugiej strony zmodyfikowany ferrytochrom c nie różni się spektralnie od natywnego. Można więc wnioskować, że konformacja acetylowanego cytochromu c, z wyjątkiem białka zmodyfikowanego w najwyższym stopniu, jest zwarta i sztywna, podczas gdy konformacja 20- i 22-acetylo-cytochromu c jest znacznie zmieniona.

Modyfikacja grup ϵ -aminowych nie zmienia zasadniczej struktury cytochromu c, wpływa jednak na jego aktywność. Względna aktywność cytochromu c spada liniowo wraz ze wzrostem stopnia acylacji i jest utracona całkowicie po wprowadzeniu 6 lub więcej grup acetylowych. Spadek ładunku spowodowany przez acylację bezwodnikiem bursztynowym jest większy niż przez acetylację, dlatego modyfikacja już 4 reszt lizynowych bezwodnikiem bursztynowym powoduje inaktywację białka. Utrata aktywności, spowodowana acylacją bezwodnikiem octowym i bursztynowym, jest proporcjonalna do spadku zasadowości cytochromu c, a jego zasadowość jest istotna dla aktywności [119].

Na podstawie wyników badań nad termiczną denaturacją ferrytochromu c serca konia stwierdzono, że jest to białko bardzo stabilne termicznie, z temperaturą przejścia (ang. *transition temperature*) równą $100,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$. Widmo absorpcji ferrytochromu c wykazuje maksima absorpcji przy 415 nm (pasmo Soreta), 520 nm (pasmo β) i 550 nm (pasmo α). Wartości te odpowiadają natywnej aksjalnej koordynacji hemu z histydyną 18 i

metioniną 80. Podczas podnoszenia temperatury do 88°C w pH obojętnym spektrum absorpcji cytochromu c zmienia się jedynie nieznacznie potwierdzając wysoką stabilność termiczną białka. Zmiany obejmują przesunięcie maksimum absorpcji z 415 do 416 nm oraz z 550 do 551,6 nm. Obecność chlorowodoru guanidyny (GdnHCl) ułatwia termiczne rozfałdowywanie i obniża temperaturę denaturacji. W 4 M GdnHCl struktura ferrocytochromu c pozostaje niezmienną w zakresie temperatur 10-40°C. Podwyższenie temperatury do 90°C powoduje znaczną zmianę konformacji łańcucha polipeptydowego w otoczeniu hemu, która objawia się przesunięciem maksimum absorpcji pasma Soreta do 420,4 nm i pasma α do 551,3 nm oraz spadkiem intensywności obu tych pasm. W 6,6 M GdnHCl przy 20°C ferrocytochrom c wykazuje spektrum typowe dla stanu niskospinowego z maksimum absorpcji przy 553, 523,8 i 418,2 nm. Spektrum to przypisano nienatywnej ligacji żelaza hemu zwanej bis-His z histydyną 18 jako piątym ligandem i histydyną 26 i/lub histydyną 33 jako szóstym ligandem. W skrajnie denaturujących warunkach (94°C, 6,6 M GdnHCl) spektrum absorpcji białka, wskazuje na występowanie hemu w stanie wysokospinowym z histydyną 18 jako jedynym ligandem aksjalnym. Podgrzanie roztworu cytochromu c do 94°C, powoduje przesunięcie maksimum absorpcji do 424 nm, 551,3 nm oraz zanik pasma β . Podczas termicznej denaturacji ferrocytochromu c, przechodzi zatem ze stanu natywnego niskospinowego do stanu wysokospinowego [120].

Termostabilność ferrocytochromu c konia, porównywalna jest do stabilności białek izolowanych z termofilnych bakterii. Ferricytochrom c jest mniej stabilny w warunkach podwyższonej temperatury. Wyższa stabilność ferrocytochromu w porównaniu z ferricytochromem jest spowodowana wzmocnionym wiązaniem pomiędzy żelazem hemu a metioniną 80. T_m rozwijania ferrocytochromu wynosi 100,6°C w nieobecności denaturanta w pH obojętnym. Temperatura przejścia ferricytochromu wynosi 57,4°C (dane pochodzące ze spektroskopii absorpcyjnej) i 85,4°C (wartość uzyskana z różnicowej kalorymetrii skaningowej, DSC, ang. *differential scanning calorimetry*) (pH 7,0). Wymienione wartości T_m są różne, ponieważ odnoszą się do dwóch procesów zachodzących podczas denaturacji ferricytochromu c. Pierwszy z nich jest opisany jako wymiana liganda na szóstej pozycji aksjalnej żelaza hemu, podczas gdy drugi tłumaczony jest jako całkowite rozfałdowanie dobrze zdefiniowanej struktury trzeciorzędowej łańcucha

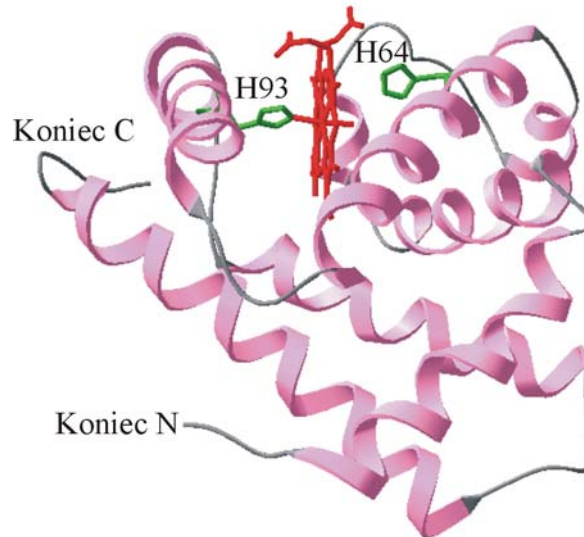
polipeptydowego. Podczas rozfałdowywania wiązanie Fe-His 18 pozostaje nienaruszone, natomiast wiązanie Met 80-Fe jest rozerwane zarówno w ferro- jak i ferricytochromie c. Po tym rozerwaniu szósta pozycja koordynacyjna jest dostępna dla interakcji z potencjalnymi wewnątrzłańcuchowymi ligandami hemu, takimi jak His 26, His 33, Lys 72, Lys 73 i Lys 79. Nienatyczna ligacja hemu bis-His występuje w obu stanach oksydacyjnych cytochromu c w obecności wysokich stężeń GdnHCl w pH obojętnym [120].

Lizyny stanowią aż 18% wszystkich reszt aminokwasowych cytochromu c, przez co jest on w znacznym stopniu narażony na modyfikację tiolaktonem homocysteiny. Stała szybkości N-homocysteinylacji cytochromu c wynosi $36 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ (25°C) i $150 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ (37°C). Modyfikacja ta powoduje multimeryzację białka, a po wprowadzeniu powyżej 5 moli Hcy/mol białka – precypitację. Po zmodyfikowaniu 75% reszt Lys, 50% cząsteczek cytochromu c jest w formie rozpuszczalnej [22].

1.7.2 Mioglobina

Mioglobina jest białkiem złożonym, podobnie jak cytochrom c posiadającym hem jako grupę prostetyczną. W przeciwieństwie jednak do cytochromu, będącego białkiem mitochondrialnym, zlokalizowana jest w cytoplazmie komórkowej. Struktura mioglobiny została po raz pierwszy rozwiązana prawie 50 lat temu przez John'a Kendrew i wsp. Łańcuch polipeptydowy tego białka składa się z 153 reszt aminokwasowych, które zwijają się w osiem helis α (około 75% łańcucha polipeptydowego) oznaczonych literami od A do H. Pomiędzy odcinkami helikalnymi znajdują się odcinki o strukturze niehelikalnej. Wnętrze mioglobiny tworzą reszty aminokwasów niepolarnych (Leu, Val, Phe, Met). Jedyne reszty polarne we wnętrzu stanowią dwie reszty histydyny 64 i 93 (Rysunek 10), pomiędzy którymi jest umieszczona grupa prostetyczna. Atom żelaza hemu oddziałuje z sześcioma ligandami. Cztery z nich, to położone na jednej płaszczyźnie atomy azotu czterech pierścieni pirolowych. Pierścień imidazolowy łańcucha bocznego histydyny 93 (His proksymalna) dostarcza piątego liganda, stabilizując grupę hemową i odsuwając atom żelaza od płaszczyzny hemu o około 0,03 nm. Histydyna 64 (dystalna) nie wiąże się z grupą hemową. Szósta pozycja koordynacyjna, nie obsadzona w mioglobinie nieutlenowanej, służy jako miejsce wiązania O_2 , jak również innych potencjalnych ligandów (CO, NO).

W momencie wiązania tlenu (mioglobina utlenowana) atom żelaza przesuwa się z powrotem w kierunku płaszczyzny porfiryny [121, 122]. Atom żelaza w hemie występuje w postaci jonu żelazawego (Fe^{2+}) lub żelazowego (Fe^{3+}). Mioglobina z żelazem utlenionym nazywa się ferrimioglobina, natomiast ze zredukowanym – ferromioglobina. Jedynie ta druga zdolna jest do wiązania tlenu.



Rysunek 10. Struktura przestrzenna mioglobiny serca konia z grupą hemową (kolor czerwony), która wiąże O_2 ; w otoczeniu reszt histydyny proksymalnej (H93) i dystalnej (H64) (zielony). Narysowano z 1azi.pdb [123]

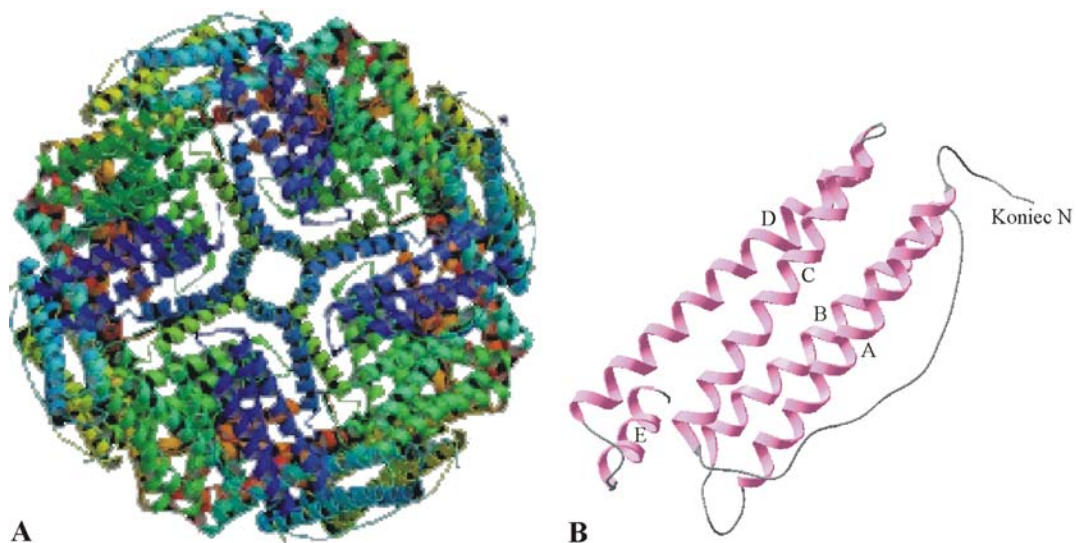
Mioglobina odwracalnie wiąże tlen cząsteczkowy i ułatwia transport O_2 z erytrocytów do mitochondriów podczas zwiększonej aktywności metabolicznej lub służy jako jego rezerwuuar w warunkach hipoksji czy anoksji. W odróżnieniu od hemoglobiny, mioglobina ma pojedyncze miejsce wiązania O_2 , a w konsekwencji jej krzywa wysycenia tlenem ma kształt hiperboli.

Najbardziej znaną rolą mioglobiny jest magazynowanie tlenu cząsteczkowego w mięśniach. Funkcja ta jest szczególnie istotna w przypadku ssaków morskich i nurkujących ptaków, kiedy brak wdychanego tlenu jest kompensowany O_2 uwalnianym z mioglobiny [124]. Kolejną funkcją mioglobiny jest buforowanie stężenia O_2 , tak aby pozostawało ono stałe niezależnie od indukowanego aktywnością fizyczną wzrostu strumienia tlenu z kapilary do mitochondrium [125]. Postuluje się również, że

mioglobina ułatwia dyfuzję O_2 , uczestniczy w fosforylacji oksydacyjnej [126], chroni przed uszkodzeniem oksydacyjnym [127] i inaktywuje enzymy [128]. Stała szybkości N-homocysteinyłacji mioglobiny wynosi $40 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ (25°C). Reszty lizyny stanowią 12% wszystkich reszt aminokwasowych mioglobiny. Podobnie jak w przypadku cytochromu c, po wprowadzeniu powyżej 5 moli Hcy/mol białka, mioglobina zaczyna precypitować [22].

1.7.3 Ferrytyna

Ferrytyna zbudowana jest ze sferycznej skorupy białkowej oraz znajdującego się w jej wnętrzu rdzenia żelazowego. Ciężar cząsteczkowy wynosi około 450 – 500 kDa. Komponent białkowy (apoferrytyna) składa się z 24 podjednostek o masie około 20 kDa, które łącząc się ze sobą za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych, tworzą otoczkę o średnicy wewnętrznej około 80 Å i zewnętrznej około 120 Å. Każda z podjednostek ferrytyny ma budowę wiązki 4 helis α (helisa A, B, C i D) z piątą krótszą helisą (E), tworzącą kąt 60° z osią wiązki (Rysunek 11).



Rysunek 11. Czwartorzędowa struktura ferrytyny śledziona konia (A) i trzeciorzędowa struktura podjednostki H ferrytyny człowieka (B), składająca się z helis α A – E. Narysowano według 1ies.pdb [129] i 2fha.pdb [130]

Ważną cechą strukturalną ferrytyny jest obecność dwóch typów kanałów występujących w ścianie białkowej w punktach łączenia podjednostek. Kanały 4-krotne, występujące w liczbie 6, utworzone są przez 4 helisy E pochodzące z 4 różnych podjednostek i przebiegają wzdłuż 4-krotnej osi symetrii skorupy białkowej. Kanały te, dzięki obecności 12 reszt leucyny, mają hydrofobowy charakter i służą do transportu małych molekuł, takich

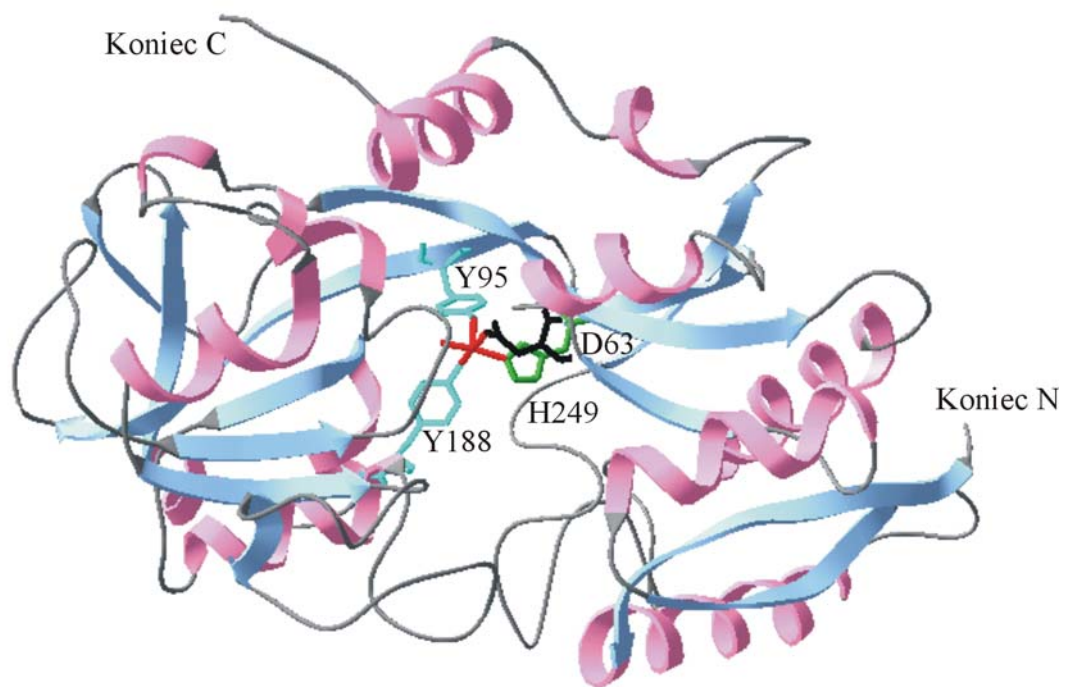
jak: tlen cząsteczkowy i czynniki redukujące. Drugi typ kanałów, to kanały 3-krotne. Jest ich osiem i przebiegają wzdłuż 3-krotnej osi symetrii apoferrytyny. Wykazują charakter hydrofilowy ze względu na łańcuchy boczne 3 kwasów glutaminowych i 3 kwasów asparaginowych i stanowią główną drogę transportu żelaza.

Funkcją ferrytyny jest magazynowanie, transport i regulowanie wewnątrzkomórkowego poziomu żelaza. Jedna cząsteczka białka gromadzi do 4500 atomów Fe^{III} w formie rozpuszczalnej i aktywnej biologicznie. Ferrytyna utrzymuje stężenie żelaza na poziomie wymaganym przez komórkę i chroni przed toksycznym wpływem nadmiaru tego pierwiastka [131].

Zgodnie z moją wiedzą, dotychczas nie prowadzono badań nad N-homocysteinylacją ferrytyny. W podjednostce lekkiej, która dominuje w ferrytynie śledziona konia, wybranej przeze mnie do badań, reszty lizyny stanowią jedynie 5%.

1.7.4 Transferyna

Transferyna jest syntetyzowana w postaci prekursora zbudowanego z 698 reszt aminokwasowych, z czego 19 N-końcowych reszt aminokwasowych tworzy peptyd sygnałowy. Dojrzałe białko jest monomerem o ciężarze cząsteczkowym około 79 kDa, zbudowanym z 679 reszt aminokwasowych. Cząsteczka transferyny jest stabilizowana przez 19 wewnątrzłańcuchowych mostków dwusiarczkowych i chroniona przez 3 jednostki cukrowe, z których dwie GlcNAc są związane wiązaniem N-glikozydowym do reszt Asn 413 i 611, natomiast jedna GalNAc wiązaniem O-glikozydowym do reszty Ser 32 (Swiss-Prot P02787, <http://us.expasy.org/sprot>). Łańcuch polipeptydowy transferyny dzieli się na dwa ewolucyjnie związane płaty (ang. *lobe*): N (336 reszt aminokwasowych) i C (343 reszty aminokwasowe), połączone krótką sekwencją (ang. *spacer*). Każdy płat obejmuje dwie domeny, składające się z serii helis α , które otaczają centralny szkielet harmonijek β (Rysunek 12).



Rysunek 12. Struktura przestrzenna płata N transferyny surowicy człowieka z zaznaczonym jonem żelaza oraz resztami kwasu asparaginowego 63 (kolor czarny), Tyr 95, Tyr 188 (niebieski) oraz His 249 (zielony). Według 1d3k.pdb [132]

Domeny białkowe transferyny tworzą głębokie, hydrofilowe miejsca wiązania żelaza. Miejsca wiązania metalu obu płatów mają cztery konserwatywne reszty aminokwasowe: dwie tyrozyny, kwas asparaginowy i histydynę (Rysunek 12). Reszty aminokwasowe znajdujące się w pobliżu (Gly 65, Glu 83, Tyr 85, Arg 124, Lys 206, Ser 248 i Lys 296 płata N-końcowego) stabilizują miejsce wiązania metalu i ogrywiają istotną rolę w uwalnianiu żelaza. Wykazano, że Lys 206 i Lys 296 położone na przeciwległych domenach płata N-końcowego, są połączone ze sobą wiązaniem wodorowym w formie „zamkniętej”, związanej z żelazem. W obniżonym pH, wiązanie to ulega zerwaniu, umożliwiając rotację domen z utworzeniem konformacji „otwartej”, która sprzyja uwalnianiu żelaza.

Transferyna jest produkowana głównie w hepatocytach. Wykrywa się ją w wielu płynach ustrojowych, włączając osocze krwi, żółć, płyn owodniowy, mózgowo-rdzeniowy, limfę i mleko. Stężenie transferyny w osoczu wynosi 2-3 g/l, a okres połowicznego rozpadu *in vitro* wynosi 8 dni. Poziom transferyny poniżej 0,1 g/l związany jest ze zwiększonym występowaniem infekcji, zaburzeń wzrostu i anemii. Transferyna, jak wiele innych białek osocza, nabyła wiele dodatkowych funkcji poza pierwotną aktywnością

wiązania i transportu żelaza. Konsekwencją wysokiego stężenia wolnego żelaza w organizmie jest między innymi zwiększony wzrost patogenów. Parkkinen i wsp. wykazali, że apotransferyna wiążąc żelazo, zapobiega rozwojowi infekcji bakteryjnej [133]. Dodatkowo Burns i wsp. odkryli zdolność apotransferyny do redukcji adhezji gram-dodatnich i gram-ujemnych bakterii do powierzchni, dlatego też sugeruje się, że antybakteryjne właściwości apotransferyny nie są jedynie ograniczone do redukcji poziomu wolnego żelaza [134]. Transferyna jest także zaangażowana we wzrost i różnicowanie oraz inhibuje apoptozę ludzkich komórek nowotworowych jajnika. Szlak apoptotyczny wiodący przez aktywację Myc, ligand Fas (FasL), czynnik martwicy nowotworów α oraz TRAIL (ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) prowadzi do zwiększenia ekspresji ferrytyny, czego skutkiem jest redukcja wewnątrzkomórkowego poziomu żelaza. Żelazo związane przez transferynę wystarcza jednak do uzupełnienia poziomu tego metalu w komórce, przez co zapobiega śmierci komórki [135, 136].

Stała szybkości N-homocysteinylacji transferyny wynosi $150 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ (25°C) i $560 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ (37°C). Transferyna pozostaje rozpuszczalna nawet po wprowadzeniu 20 moli Hcy/mol białka, jednak ulega precypitacji przy wyższych poziomach modyfikacji [22]. W łańcuchu polipeptydowym transferyny jest 58 reszt lizyny, co stanowi 8%.

Biorąc pod uwagę rolę homocysteiny, jako niezależnego czynnika ryzyka chorób krążenia oraz rozpatrując N-homocysteinylację, jako potencjalny mechanizm toksyczności tego aminokwasu, potrzebne są kompleksowe badania N-Hcy-białek. Ich celem jest nie tylko zrozumienie mechanizmu modyfikacji tiolaktonem homocysteiny, ale także uzyskanie głębszego wglądu w patofizjologiczną funkcję HTL, mając na uwadze dostarczenie nowych biomarkerów diagnostycznych dla chorób człowieka, które są związane z podwyższonym poziomem homocysteiny.

2 Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu N-homocysteinylacji na strukturę i funkcję wybranych białek. Podwyższony poziom homocysteiny (Hcy) w osoczu związany jest z chorobami krążenia, Alzheimera i nowotworowymi. Prawdopodobnym wyjaśnieniem szkodliwego działania Hcy w organizmie człowieka jest wpływ tiolaktonu Hcy (HTL) na metabolizm białek. Ze względu na strukturalne podobieństwo homocysteiny do metioniny, może być ona błędnie rozpoznawana przez syntetazę Met-tRNA, w wyniku czego powstaje Hcy-adenylan. Homocysteina nie jest wbudowywana do rosnącego łańcucha polipeptydowego ze względu na aktywność korekcyjną syntetazy Met-tRNA. Jako produkt reakcji korekcyjnej powstaje tiolakton homocysteiny. HTL reaguje z resztami aminokwasowymi lizyny (Lys) białek. Na podstawie wyników dotychczasowych badań stwierdzono, że zmodyfikowane w ten sposób białka różnią się strukturalnie i funkcjonalnie od niezmodyfikowanych odpowiedników. Skutkiem N-homocysteinylacji jest prawdopodobnie nabycie właściwości antygenowych przez białko, tak że jest ono rozpoznawane przez organizm jako obce i indukuje odpowiedź immunologiczną. Ferguson i wsp. [96] udowodnili występowanie przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek w surowicy królików immunizowanych Nε-Hcy-Lys-LDL. Zakładamy, że ma miejsce bezpośrednia korelacja struktury i funkcji cząsteczek. W tym kontekście realizacja celu wymagała wykonania następujących zadań:

1. Identyfikacja reszt Lys ulegających preferencyjnej N-homocysteinylacji.
2. Określenie wpływu modyfikacji tiolaktonem homocysteiny na strukturę drugorzędową białek oraz ich stabilność termiczną.
3. Zbadanie podatności N-Hcy-białek na proteolizę.
4. Określenie wpływu N-homocysteinylacji na własności oksydacyjno-redukcyjne białek hemowych.
5. Uzyskanie przeciwciał przeciw N-homocysteinylowanym białkom przez immunizację królików Nε-Hcy-Lys-KLH.
6. Opracowanie metody izolacji i oczyszczania przeciwciał skierowanych przeciwko N-homocysteinylowanym białkom z surowicy królików immunizowanych Nε-Hcy-Lys-KLH.

7. Stwierdzenie aktywności i specyficzności frakcji immunoglobulin uzyskanych po izolacji i oczyszczaniu.
8. Wykorzystanie uzyskanych przeciwciał do wykrywania N-homocysteinylowanych białek w materiale biologicznym.
9. Identyfikacja przeciwciał klasy IgM specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek w surowicy człowieka.
10. Analiza zależności między poziomem immunoglobulin klasy IgM skierowanych przeciwko N-homocysteinylowanym białkom a stężeniem Hcy i lipidów u pacjentów z chorobami krążenia.

3 Materiały i metody

Króliki

Dwa 10-tygodniowe samce królików rasy białej kalifornijskiej

Surowice człowieka

Surowice 157 pacjentów, wraz z danymi, otrzymałam od prof. dr. hab. Wiesława Trzeciaka i dr. Mariusza Łacińskiego z Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Poznaniu. Dane dotyczyły wieku, płci, występowania choroby niedokrwiennej serca (ICD), liczby głównych naczyń wieńcowych objętych zmianami miażdżycowymi (scler), poziomu całkowitego cholesterolu (TC), HDL-C, LDL-C, TAG oraz Hcy. Pacjentów podzielono na grupy biorąc pod uwagę obecność ICD oraz zaawansowanie miażdżycy (Tabela 4). Charakterystykę chorych podzielonych na grupy w zależności od scler przedstawiono w tabeli (Tabela 5).

Tabela 4 Podział chorych na grupy

ICD ⁻	ICD ⁺ (n=98)		
Scler 0 (n=59)	Scler 1 (n=16)	Scler 2 (n=33)	Scler 3 (n=49)

Scler – liczba zajętych tętnic wieńcowych

Tabela 5 Charakterystyka grup chorych

	Scler 0 (n=59)	Scler 1 (n=16)	Scler 2 (n=33)	Scler 3 (n=49)
Płeć (M/K)	35/24	14/2	27/6	36/13
Wiek*	53,9±10,4	55,9±12,7	57,3±9,1	62,6±7,5
TC* (mmol/l)	6,21±1,20	6,54±0,89	6,71±1,25	6,62±1,49
HDL-C* (mmol/l)	1,39±0,34	1,27±0,39	1,15±0,27	1,29±0,39
LDL-C* (mmol/l)	4,15±1,11	4,35±0,67	4,46±1,25	4,35±1,33
TAG* (mmol/l)	1,88±0,94	1,85±0,71	2,60±1,30	1,96±1,35
Hcy [§] (μM)	13,20 (5,25-35,40)	14,25 (9,15-25,20)	14,80 (7,15-26,30)	17,10 (7,79-50,00)
lnHcy*	2,58±0,34	2,68±0,37	2,67±0,36	2,86±0,40

TC – cholesterol całkowity, HDL-C – cholesterol frakcji HDL, LDL-C – cholesterol frakcji LDL, TAG – triacyloglicerole, Hcy – homocysteina, * średnia±odchylenie standardowe, § mediana i zakres wartości

Tkanki człowieka

Fragmenty tkanek pochodzące z układu krążenia pacjentów otrzymałam od prof. Olafa Stanger'a (Department of Cardiac Surgery, Atherosclerosis Research, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria). Skrawki, po utrwaleniu formaliną lub utrwalaczem Bouin'a, zatopione zostały w parafinie.

3.1 Odczynniki

Białka (Sigma):

albumina surowicy człowieka, albumina surowicy wołu, hemoglobina człowieka, holotransferyna człowieka, apoferrytyna i ferrytyna śledziona konia, mioglobina mięśni szkieletowych konia, cytochrom c serca konia, hemocyjanina skałoczepego morskiego *Megathura crenulata*

Przeciwciała:

1. Anty-IgM człowieka, specyficzne względem łańcucha μ , sprzężone z alkaliczną fosfatazą, kozie (Sigma)
2. Anty-IgG królika (cała cząsteczka), sprzężone z alkaliczną fosfatazą, kozie (Sigma)
3. Anty-IgG królika (H & L), sprzężone z peroksydazą chrzanową, kozie (Rock)
4. Monoklonalne anty-IgG królika (specyficzne względem łańcucha γ , sprzężone z peroksydazą chrzanową, klon RG-96 (Sigma)

Enzym (Worthington Biochemical Corporation):

Trypsyna trzustki wołu

Kolumny (Sigma):

1. BiałkoA, rekombinowane, unieruchomione na kulkach agarozowych, zawiesina zawierająca 0,01% tiomersal
2. ω -Aminoheksylo-agaroz, zawiesina w 0,5 M NaCl zawierająca 0,02% tiomersal (18 μ mol diaminoheksanu na ml upakowanego żelu)

Radioaktywny tiolakton homocysteiny [35 S] HTL oraz surowice królika rasy nowozelandzkiej białej przed i po immunizacji N-Hcy-KLH [137] otrzymane były w laboratorium prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego.

Pozostałe odczynniki chemiczne stosowane w doświadczeniach pochodziły z następujących firm:

Sigma:

pełny adiuwant Freund, niepełny adiuwant Freund, 4-chloro-1-naftol, dietanolamina, DL-ditiotreitol, NH_4HCO_3 , o-fenylendiamina (OPD), fosforan p-nitrofenolu (PNPP), glicyna, amid kwasu jodooctowego (IAA), kwas 5,5'-dwutio-bis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB; odczynnik Ellman'a), kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), L-lizyna, nadsiaroczan amonu (APS), nadtlenek wodoru, 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna (TMB), N,N,N',N'-

tetrametyloetylenodwuamina (TEMED), tiolakton L-homocysteiny, tri(hydroksymetylo)-aminometan (Trizma), Tween 20, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄

Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. Gliwice:

KCl, NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, kwas cytrynowy, kwas octowy (CH₃COOH)

Bio-Rad:

30% akrylamid/N,N'-bismetylenoakrylamis (37,5:1); 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% (w/v) dodecylosiarczan sodu (SDS)

Fluka:

DL-Hcy

Merck:

MgCl₂, kwas trifluorooctowy (CF₃COOH), acetonitryl (CH₃CN)

Dako:

Surowica kozia, DAKO LSAB2 System-HPR, płynny substrat DAB-system chromogenu

3.2 Roztwory

Bufor do modyfikacji białek tiolaktonem homocysteiny, pH 7,4

100 mM K₂HPO₄ doprowadzony do pH 7,4 za pomocą 100 mM KH₂PO₄
0,2 mM EDTA

Bufory do chromatografii powinowactwa

Bufor płuczający, pH 8,6

0,05 M Tris-HCl

0,15 M NaCl

Bufor elucyjny, pH 2,3

50 mM Glicyna

150 mM NaCl

Bufor neutralizujący, pH 7,7

0,5 M Na₂HPO₄ doprowadzony do pH 7,7 za pomocą 0,5 M NaH₂PO₄

Roztwory do ELISA

PBS, pH 7,3

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na₂HPO₄

1,4 mM KH₂PO₄

Bufor opłaszczający, pH 9,6

0,1 M Na₂CO₃
0,1 M NaHCO₃

Bufor rozcieńczający

PBS
0,25% BSA
0,05% Tween 20

Bufor płuczący

0,05% Tween 20-PBS

Bufor do OPD – substrat dla peroksydazy chrzanowej

24 mM kwas cytrynowy
52 mM Na₂HPO₄

Bufor do pNPP – substrat dla alkalicznej fosfatazy, pH 9,8

10 mM dietanolamina
0,5 mM MgCl₂

Bufory do wykrywania białek zaadsorbowanych na błonie (Dot-blot)

Bufor TBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
500 mM NaCl

Bufor płuczący, TTBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
500 mM NaCl
0,05% Tween 20

Roztwór blokujący

1% BSA-TBS

Bufor do rozcieńczania przeciwciał

1% BSA-TTBS

Roztwory do elektroforezy

Bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących

50 mM Tris
374 mM glicyna
0,1% (w/v) SDS

Roztwór utrwalający

50% metanol
10% kwas octowy

Roztwór odbarwiający

5% metanol
7% kwas octowy

Bufor do rezonansu plazmonów powierzchniowych

HBS-EP

0,01 M HEPES, pH 7,4
3 mM EDTA
0,15 M NaCl
0,005% surfaktant P-20

Zestaw odczynników do aktywacji powierzchni chip'a (Biacore)

NHS – imid kwasu N-hydroksybursztynowego
EDC – karboimid N-etylo-N'-(dietylamino)propylu
1 M etanolamina-HCl, pH 8,5

3.3 Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny

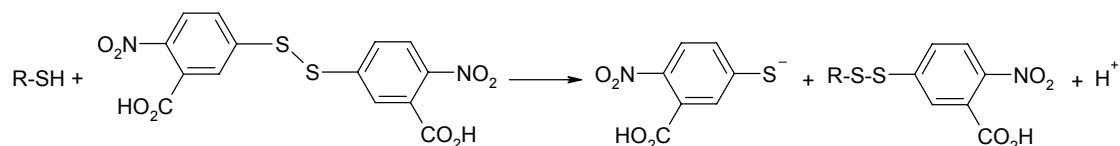
Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny prowadzona była w buforze do modyfikacji białek HTL, pH 7,4; z dodatkiem lub bez 0,2 mM EDTA. Modyfikacja białek do oceny stopnia N-homocysteinyłacji, oceny zawartości elementów struktury drugorzędowej, podatności na proteolizę i pomiarów widm absorpcji UV-VIS, prowadzona była w temperaturze pokojowej przez około 22 h. Inkubacja ferrytyny i transferyny z HTL do pomiarów stabilności termicznej odbywała się w temperaturze 25°C przez 17 h.

Modyfikacja białek [³⁵S]HTL

Albuminę (14,7 μM, 73,5 μM) i ferrytynę (15,6 μM, 78 μM) inkubowano z 5,8 μM [³⁵S]HTL (specyficzna aktywność 12000 Ci/mol) w 100 mM buforze fosforanowym, pH 7,4; 0,2 mM EDTA w temperaturze 37°C przez 24 h. W odstępach 1 h pobierano 1 μl roztworu białka, rozcieńczano 10-krotnie 100 mM buforem fosforanowym, pH 7,4; 0,2 mM EDTA, redukowano 1 μl 100 mM DTT w 37°C przez 15 minut. Białko strącano 1 ml 10% TCA na lodzie przez 15 minut i przesączało przez filtr Fiber Glass (Whatman). Filtr przepłukiwano 3 ml 5% TCA i 1 ml zimnego etanolu. Następnie filtry suszono pod lampą przez 15 minut, umieszczano w 5 ml płynu scyntylicyjnego i zliczano radioaktywność na licznku Beckman, model LS 5000TA.

3.4 Oznaczanie stężenia wolnych grup tiolowych

Do oznaczenia stężenia grup tiolowych używano kwasu 5,5'-dwutio-bis(2-nitrobenzoesowego) (DTNB; odczynnik Ellman'a) [138], który w obecności wolnych grup tiolowych uwalnia żółty produkt reakcji (kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy) z maksimum absorpcji przy 412 nm (Reakcja 11).

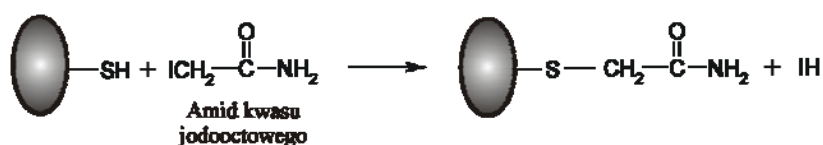


Reakcja 11

Współczynnik ekstynkcji kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego przy 412 nm wynosi $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. DTNB o stężeniu równym przewidywanemu stężeniu grup tiolowych w próbce inkubowano z roztworem białka przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mierzono absorbancję przy długości fali 412 nm na spektrofotometrze Beckman DU-65 lub Varian Cary 50.

3.5 Blokowanie grup tiolowych białek amidem kwasu jodooctowego

Blokowanie grup tiolowych reszt cysteiny i homocysteiny białek poprzedzone było redukcją wiązań dwusiarczkowych za pomocą DTT. Białka redukowano 0,45-5 mM DTT w temperaturze pokojowej przez 5 minut (w przypadku białek przed trawieniem trypsyną inkubację prowadzono w temperaturze 55°C przez 45 minut). Alkilację grup tiolowych (Rysunek 13) prowadzono amidem kwasu jodooctowego o stężeniu 1-40 mM w ciemności w temperaturze 37°C (w przypadku białek przed trawieniem trypsyną inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 15 minut).



Rysunek 13. Zablockowanie grupy tiolowej białka przez amid kwasu jodooctowego

3.6 Immunizacja królików

Doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt zostały wykonane za **zgoda Lokalnej Komisji Etycznej** w Poznaniu, wydanej na podstawie zezwoleń

indywidualnych nr 179/2004 i 180/2004, zgodnie z ustawą o ochronie zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997r. z późniejszymi zmianami. Immunizacja obejmowała: pobieranie krwi z żyły brzeżnej ucha i podskórne wstrzyknięcia antygeny. Według „Skali Inwazyjności” badań na żywych kręgowcach wymienione zabiegi zaliczają się odpowiednio do I° i III° inwazyjności. Prace zostały przeprowadzone w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt Akademii Rolniczej w Poznaniu.

W celu uzyskania przeciwciał poliklonalnych specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek, immunizowano dwa samce królików rasy kalifornijskiej białej (Zdjęcie 1) białkiem Nε-Hcy-Lys-KLH (ang. *keyhole lymphet hemocyanin*). Zwierzęta pochodziły z hodowli Zygmunta Pohla (Gniezno).



Zdjęcie 1. Królik rasy kalifornijskiej białej

Po zakupieniu, 10-tygodniowe króliki nie były poddawane żadnym zabiegom przez dwa tygodnie, w celu zaaklimatyzowania się do nowego otoczenia i złagodzenia stresu spowodowanego transportem i zmianą warunków otoczenia.

Przygotowanie antygeny obejmowało:

1. Rozpuszczenie KLH (20 mg/ml) w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,4; 0,2 mM EDTA, 0,9 M NaCl.
2. Usunięcie sacharozy z roztworu KLH przez ultrafiltrację na filtrach o punkcie odcięcia 30 kDa (Millipore) i płukanie buforem, w którym rozpuszczono białko.
3. Zmodyfikowanie KLH 50 mM HTL przez 16 h w 37°C.
4. Ocenę stopnia modyfikacji KLH przez pomiar stężenia grup tiolowych z użyciem odczynnika Ellman'a.
5. Zemulgowanie 1,4 mg adduktu Nε-Hcy-Lys-KLH w 1 ml buforu fosforanowego w 1 ml pełnego, a w kolejnych wstrzyknięciach niepełnego, adiuwanta Freund'a.

Immunizacja została przeprowadzona według harmonogramu przedstawionego w tabeli (Tabela 6).

Tabela 6. Etapy immunizacji królików

Dzień immunizacji	Czynność
1	Pobranie ok. 3 ml krwi z żyły brzeżnej ucha
	Iniekcja 1,5-2 ml mieszaniny N-Hcy-KLH (1,05-1,4 mg) z pełnym adiuwantem Freund'a
14	Iniekcja 1,5 ml mieszaniny N-Hcy-KLH (1,05 mg) z niepełnym adiuwantem Freund'a
35	Iniekcja 1,5 ml mieszaniny N-Hcy-KLH (1,05 mg) z niepełnym adiuwantem Freund'a
50	Pobranie ok. 10 ml krwi z żyły brzeżnej ucha.
64	Iniekcja 1,5 ml mieszaniny N-Hcy-KLH (1,05 mg) z niepełnym adiuwantem Freund'a
105	Pobranie ok. 2-5 ml krwi z żyły brzeżnej ucha.
	Iniekcja 1,5 ml zmodyfikowanej surowicy z niepełnym adiuwantem Freund'a
126	Pobranie ok. 22-25 ml krwi z żyły brzeżnej ucha
133	Iniekcja 1,5 ml mieszaniny N-Hcy-KLH (1,05 mg) z niepełnym adiuwantem Freund'a
140	Pobranie ok. 13-14 ml krwi z żyły brzeżnej ucha

Uzyskaną krew wirowano przy 10 000g przez 10 minut w celu uzyskania surowicy. Surowicę przechowywano w -80°C .

3.7 Analiza białek w żelach poliakrylamidowych

Żele poliakrylamidowe przygotowywano według schematu przedstawionego w tabeli (Tabela 7). Mieszaniny (nie zawierające APS i TEMED) odgazowywano pod próżnią przez około 15 minut. Po dodaniu APS i TEMED mieszaniny wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji przez około 1h.

Tabela 7. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych

	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 12%
30% akrylamid/bis	1,98 ml	6 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	378 ml	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	3,75 ml
10% SDS	150 μl	150 μl
Woda destylowana, dejonizowana	9 ml	5,03 ml
TEMED	15 μl	7,5 μl
10% APS	75 μl	75 μl
Całkowita objętość	15 ml	15 ml

Na żel nakładano 1 μl frakcji przeciwciał związanych do N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozy oraz 10 μl standardu masy cząsteczkowej białka (Bio-Rad).

3.8 Chromatografia powinowactwa

Metodę chromatografii powinowactwa stosowano w celu izolacji przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinyłowanych białek. Technika ta opiera się na selektywnym wiązaniu, w tym przypadku immunoglobulin, do liganda unieruchomionego na nośniku. Oddziaływanie to ma charakter niekowalencyjny i opiera się na wiązaniach wodorowych, jonowych siłach van der Waalsa lub oddziaływaniach hydrofobowych. Naruszenie stabilności oddziaływań w kompleksie ligand-substancja izolowana i elucja izolowanej substancji odbywa się w buforze o niskim pH [139].

3.8.1 Białko A-agaroza

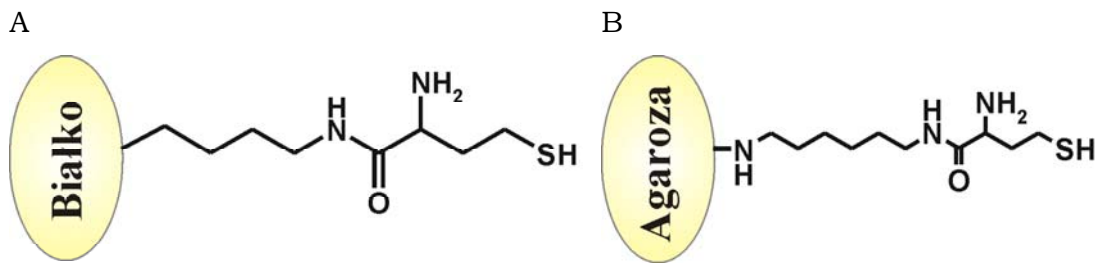
Agaroza opłaszczona białkiem A pochodzącym z bakterii *Staphylococcus aureus* wiąże region Fc przeciwciał klasy IgG królika oraz człowieka (podklasy 1, 2, 4). Białko A (ang. *staphylococcal protein A*, SpA) jest proteiną powierzchniową składającą się z pięciu powtarzających się podjednostek (A-E). Wiąże ono immunoglobuliny IgG poprzez ich fragment Fc [139].

Izolację przeciwciał prowadzono według następującej procedury:

1. Upakowanie 2 ml zawiesiny kolumny w szklanej pipecie pasteurowskiej (objętość upakowanej kolumny 1 ml).
2. Nakładanie na kolumnę 5 ml 2,5- lub 5-krotnie rozcieńczonej w buforze płuczającym surowicy królika.
3. Przemycie kolumny buforem płuczającym (10 ml) i zbieranie frakcji o objętości 1 ml.
4. Wymywanie zaadsorbowanych przeciwciał buforem elucyjnym (5 ml) do probówek zawierających bufor neutralizujący w objętości $\frac{1}{4}$ wymywanej frakcji.
5. Zagęszczenie wyizolowanych IgG do 100 μ l i przemycie buforem płuczającym na filtrach o punkcie odcięcia 10 kDa (Millipore).

3.8.2 ω -Aminoheksylo-agaroza

W przypadku izolacji molekuł wiążących się do ligandów niskocząsteczkowych, stosuje się kolumny, w których ligand jest umieszczony na grupie dystansowej, np. aminoheksanie. Grupa dystansowa zapewnia dostępność i ekspozycję niskocząsteczkowego liganda (reszta Hcy) dla substancji wielkocząsteczkowej (przeciwciało).



Rysunek 14. Porównanie N ϵ -Hcy-Lys-białka (A) i N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozy (B)

Oczyszczanie przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek prowadzono według następującej procedury:

1. Modyfikacja ω -aminoheksylo-agarozy 18 mM tiolaktonem homocysteiny w buforze do modyfikacji białek HTL, przez 16 h, w temperaturze 37°C.
2. Upakowanie 1 ml Hcy-N ω -aminoheksylo-agarozy w szklanej pipiecie pasteurowskiej (objętość upakowanej kolumny 0,5 ml).
3. Nakładanie na kolumnę immunoglobulin wyizolowanych na białku A, rozcieńczonych do 0,5 ml w buforze płuczającym.
4. Przemycie kolumny buforem płuczającym (10 ml) i zbieranie frakcji o objętości 1 ml.
5. Wymywanie zaadsorbowanych przeciwciał buforem elucyjnym (5 ml) do probówek zawierających bufor neutralizujący w objętości $\frac{1}{4}$ wymywanej frakcji.
6. Zagęszczenie do 100 μ l i przemycie buforem płuczającym frakcji IgG związanych (frakcje I i II) i niezwiązanych (frakcje 1-4) do kolumny na filtrach o punkcie odcięcia 10 kDa (Millipore).

3.9 Płytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej (ELISA)

Użyto 96-dołkowych polistyrenowych płytek mikrotitracyjnych (Fisher Scientific, Fisherbrand Flat Bottom 96 Well Plate lub Nunc, F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate). W testach immunoenzymatycznych stosowano przeciwciała drugorzędowe wyznakowane alkaliczną fosfatazą lub peroksydazą chrzanową. Do środowiska reakcji dodaje się chromogennych substratów enzymatycznych, które w wyniku reakcji dają produkty barwne. Natężenie barwy, które jest proporcjonalne do ilości związanego, znakowanego enzymem odczynnika, a zatem proporcjonalne do ilości związanego antygeny lub przeciwciała, odczytuje się w spektrofotometrze – czytniku do płytkowego testu ELISA.

Wykrywanie i oznaczanie ilościowe oraz określanie aktywności i swoistości przeciwciał wykonywano zgodnie z procedurą:

1. Opłaszczanie płytki mikrotitracyjnej 200 μ l roztworu antygeny o stężeniu 10 μ g/ml w buforze opłaszczającym w temperaturze pokojowej lub 37°C przez 2 h.
2. 3-krotne płukanie płytki mikrotitracyjnej buforem płuczającym.
3. Zablokowanie wolnych miejsc na powierzchni dołka 250 μ l roztworu 5% odtłuszczonego mleka w proszku (Spółdzielnia Mleczarska, Gostyń) w temperaturze pokojowej lub 37°C przez 3 h lub 3% roztworem BSA.
4. 3-krotne płukanie płytki mikrotitracyjnej buforem płuczającym.
5. Dodanie do każdego z dołków odpowiednio rozcieńczonych surowic królika lub człowieka, bądź przeciwciał w objętości 150 μ l na dołek. Rozcieńczenia wykonano w buforze rozcieńczającym do testów ELISA. Inkubacja prowadzona była przez 16 h w 4°C. W przypadku testów konkurencyjnych, inkubację prowadzono w obecności odpowiedniego kompetytora (Lys, Hcy-Lys, albumina, N-Hcy-albumina, hemoglobina, N-Hcy-hemoglobina, transferyna, N-Hcy-transferyna, antytrypsyna, N-Hcy-antytrypsyna). W przypadku oznaczeń IgM człowieka surowicę rozcieńczano 1:80 w buforze rozcieńczającym do testów ELISA bez lub z 2,5 mM Hcy-Lys. Poziom IgM wyznaczano przez odjęcie od odczytu bez kompetytora wartość otrzymaną w obecności kompetytora. Dla każdego pomiaru wykonywano dwa powtórzenia.
6. 5-krotne płukanie płytki mikrotitracyjnej buforem płuczającym.
7. Dodanie do każdego z dołków 100 μ l przeciwciał antyimmunoglobulinowych znakowanych peroksydazą chrzanową lub alkaliczną fosfatazą rozcieńczonych 1:2000. Rozcieńczenia wykonywane w buforze rozcieńczającym do testów ELISA. Inkubacja prowadzona przez 1 h w temperaturze pokojowej lub 37°C.
8. 4-krotne płukanie płytki mikrotitracyjnej buforem płuczającym.
9. Wywołanie reakcji barwnej. Dla peroksydazy chrzanowej jako substratu używano o-fenylenodiaminy (OPD) lub 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB). Substratem dla alkalicznej fosfatazy był fosforan p-nitrofenolu (PNPP) o stężeniu 1 mg/ml rozpuszczony w buforze bezpośrednio przed użyciem.

10. Po upływie 30 minut odczytanie absorbancji przy 405 (fosforan p-nitrofenolu) nm, 450 nm (TMB) lub 492 nm (OPD) na czytniku do płytek ELISA firmy Bio-Rad (Model 550).

Reakcje kontrolne:

1. Kontrola z pominięciem antygeny (odczyt odejmowany od odczytu z antygenem).
2. Kontrola z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego (odczyt odejmowany od odczytu z przeciwciałem).
3. Kontrola z pominięciem przeciwciała drugorzędowego (odczyt <0,02 OD, pomijany).

3.10 Wykrywanie białek zaadsorbowanych na błonie (Dot-blot)

W metodzie tej enzymy sprzężone z przeciwciałami drugorzędownymi katalizują reakcję powstawania barwnego, nierozpuszczalnego produktu, którego umiejscowienie zależy od miejsca występowania enzymu i zarazem interesującego nas antygeny. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości związanego enzymu, a ta z kolei zależy od ilości przyłączonego do antygeny przeciwciała pierwszorzędowego.

Wykrywanie białek unieruchomionych na błonie nitrocelulozowej (Schleicher & Schuell, PROTRAN, BA 85, 0,45 μm , ref. 401180) wykonywano w następujący sposób:

1. Namoczenie błony nitrocelulozowej w TBS przez 10 minut i wysuszenie na powietrzu przez 15 minut.
2. Umieszczenie błony w aparacie mikrofiltracyjnym Bio-Dot (Bio-Rad).
3. Rehydratacja błony buforem TBS: nałożenie po 100 μl TBS, podłączenie próżni, zassanie buforu, odłączenie próżni.
4. Unieruchomienie antygeny na błonie nitrocelulozowej: nałożenie 100 μl antygeny o stężeniu 0,015-6 $\mu\text{g/ml}$ na dołek, inkubacja 10 minut w temperaturze pokojowej, podłączenie próżni i zassanie roztworu białka. 2-krotne przepłukanie 100 μl TBS zassanym pod wpływem próżni.
5. Wyjęcie błony z aparatu i inkubacja w roztworze blokującym przez 1 h w temperaturze pokojowej z lekkim wytrząsaniem.
6. Inkubacja w roztworze przeciwciał królika anty-N-Hcy-białko rozcieńczonych 1:100 przez 3 h w temperaturze pokojowej z lekkim wytrząsaniem.

7. Płukanie TTBS przez 15 minut zmieniając bufor co 5 minut.
8. Inkubacja w roztworze przeciwciała drugorzędowego sprzężonego z peroksydazą chrzanową rozcieńczonego 1:10000 przez 1 h w temperaturze pokojowej z lekkim wytrząsaniem.
9. 5-minutowe płukanie TTBS oraz dwa 5-minutowe płukania TBS.
10. Przygotowanie substratu dla peroksydazy: 60 mg 4-chloro-1-naftolu w 20 ml schłodzonego w -20°C etanolu zmieszano z 100 ml TBS zawierającego 60 μl 30% H_2O_2 . Inkubację membrany z roztworem substratu dla peroksydazy chrzanowej prowadzono w temperaturze pokojowej z lekkim wytrząsaniem przez 30 minut.
11. Przepłukanie błony wodą, osuszenie pomiędzy warstwami bibuły i zeskanowanie.
12. Analiza intensywności plamek w programie Image Quant 5.1.

3.11 Immunocytochemia na poziomie ultrastrukturalnym

Doświadczenia przeprowadzono w Katedrze Embriologii i Histologii, Akademii Medycznej w Poznaniu we współpracy z prof. L. Melandowiczem i lek. med. A. Ziółkowską. Immunodetekcję białek N-homocysteinylowanych wykonano na skrawkach zastawki aortalnej i mięśniu sercowym, wg procedury:

1. Pocięcie fragmentów tkanek zatopionych w parafinie.
2. Usunięcie parafiny ze skrawków przez przeprowadzenie przez szereg od ksylenu do 70% alkoholu etylowego.
3. Hamowanie aktywności endogennej peroksydazy 1% H_2O_2 przez 30 minut.
4. Inkubacja z surowicą kozią (Dako) rozcieńczoną 1:20 w PBS, przez 30 minut.
5. Inkubacja z roztworem przeciwciał królika anty-N-Hcy-białko rozcieńczonych 1:100 w PBS z 2 mM DTT, przez 2-3 h w temperaturze pokojowej.
6. 3-krotne płukanie w PBS przez 3-5 minut, z lekkim wytrząsaniem.
7. Inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z biotyną (Dako) przez 15 minut.
8. 3-krotne płukanie w PBS przez 3-5 minut, z lekkim wytrząsaniem.
9. Inkubacja ze streptawidyną sprzężoną z peroksydazą chrzanową (Dako) przez 15 minut.

10. 3-krotne płukanie w PBS przez 3-5 minut, z lekkim wytrząsaniem.
11. Inkubacja z roztworem diaminobenzydyny (DAB) (Dako) do pojawienia się zabarwienia, nie dłużej niż 5 minut.
12. Płukanie PBS.
13. Inkubacja z hematoksyliną przez około 1 minutę.
14. Płukanie wodą.
15. Przeprowadzenie przez szereg od alkoholu do ksylenu.
16. Nałożenie olejku kanadyjskiego i przykrycie szkiełkiem nakrywkowym.

Reakcje kontrolne:

1. Kontrola dodatnia z odparafinowaną tkanką inkubowaną z 50 mM HTL, przez 3 h, w 37°C.
2. Kontrola ujemna – przeciwciała anty-N-Hcy-białko przed naniesieniem na tkankę, inkubowane z N-Hcy-albuminą, natywną albuminą lub N-Hcy-albuminą z grupami –SH zablokowanymi IAA, o stężeniu 5 mg/ml, przez 3 h, w temperaturze pokojowej.
3. Kontrola ujemna z odparafinowaną tkanką inkubowaną z 2 mM DTT, przez 15 minut a następnie z 20 mM IAA, w ciemności, przez 1 h, w 37°C.

3.12 Rezonans plazmonów powierzchniowych

Rezonans plazmonów powierzchniowych (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) jest techniką pozwalającą mierzyć wiązanie się cząsteczek analizowanej próby z molekułami unieruchomionymi na powierzchni chip'a. Metoda ta pozwala na wykrycie zachodzących interakcji, bez potrzeby znakowania którejkolwiek z cząsteczek. Interakcja monitorowana jest przez pomiar stężenia cząsteczek, znajdujących się blisko powierzchni chip'a, utworzonej przez jednego z partnerów reakcji. Badana próba, zawierająca drugi komponent reakcji, przepływa nad powierzchnią. W momencie związania się dwóch partnerów, wzrasta lokalne stężenie i mierzona jest odpowiedź SPR. Rezonans plazmonów powierzchniowych powstaje, gdy światło jest odbijane od warstwy przewodzącej na granicy faz dwóch środowisk o różnych współczynnikach odbicia światła. W systemie Biacore środowiskami są badana próba oraz szkło chip'a, natomiast warstwą przewodzącą jest cienka warstwa złota na powierzchni chip'a. SPR powoduje redukcję intensywności światła odbitego przy specyficznym kącie odbicia. W

sytuacji, gdy cząsteczki w próbie badanej wiążą się do powierzchni chip'a, zmienia się stężenie oraz współczynnik odbicia i mierzona jest odpowiedź SPR. System Biacore mierzy kąt minimalnej intensywności światła odbitego. Odpowiedź SPR jest mierzona w jednostkach rezonansowych (RU, ang. *resonance unit*). 1 RU odpowiada zmianie kąta minimalnej intensywności o $0,0001^\circ$. Dla większości białek jest to w przybliżeniu równoważne zmianie stężenia około 1 pg/mm^2 powierzchni chip'a. Chip jest płytką szklaną pokrytą warstwą złota o grubości około 50 nm. Na powierzchni złota znajduje się warstwa karboksymetylowanego dekstranu, który stanowi macierz do kowalencyjnego wiązania białek oraz tworzy hydrofilowe środowisko interakcji między cząsteczkami.

Eksperymenty prowadzono na aparacie Biacore 2000. Na zaktywowanej powierzchni chip'a CM5 (Biacore) unieruchomiono, monoklonalne przeciwciało specyficzne względem IgG królika. Poziom związanego białka wyniósł 793,2 RU, co odpowiada ilości około 0,8 ng przeciwciała/ mm^2 . Na tak przygotowaną powierzchnię naniesiono 25 μl przeciwciał wyizolowanych z surowicy królika przed i po immunizacji, rozcieńczonych 1:1000 buforem HBS-P. Prędkość przepływu wynosiła 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Powierzchnię chip'a regenerowano 15 μl buforu elucyjnego o pH 2,3, przy prędkości przepływu 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ilość immunoglobulin królika związanych do przeciwciała monoklonalnego na powierzchni chip'a określono na podstawie różnicy odpowiedzi SPR przed i po reakcji z IgG królika.

3.13 Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS

Pomiary widm absorpcyjnych w zakresie UV-VIS wykonano przy użyciu spektrofotometru Beckman DU-65 lub Varian Cary 50.

W celu pomiaru redukcji cytochromu c rejestrowano widma absorpcyjne w zakresie spektralnym 200-700 nm w kuwecie kwarcowej o drodze 1 cm. Białko o stężeniu 20 mg/ml inkubowano w 100 mM buforze fosforanowym, pH 7,4; 0,2 mM EDTA, w temperaturze 24°C , z dodatkiem 20 mM HTL. W odpowiednich odstępach czasowych pobierano 4,5 μl z mieszaniny reakcyjnej, rozcieńczano 100-krotnie 100 mM buforem fosforanowym, pH 7,4; 0,2 mM EDTA i mierzono widmo absorpcyjne.

W celu wykazania, że cytochrom c jest redukowany przez N-Hcy-białko, inkubowano go z N-Hcy-albuminą. Przed modyfikacją tiolaktonem homocysteiny, albuminę (10mg/ml) inkubowano z 1 mM DTT w

temperaturze pokojowej przez 5 minut, po czym blokowano grupę tiolową Cys 34 albuminy amidem kwasu jodooctowego o stężeniu 8 mM w ciemności w temperaturze 37°C przez 30 minut. Zarówno przed, jak i po modyfikacji albuminy 0,4 mM HTL, usunięto związki niskocząsteczkowe przez wirowanie na filtrze o punkcie odcięcia 10 kDa (Millipore) i płukanie buforem. Przygotowaną w ten sposób N-Hcy-albuminę inkubowano z cytochromem c w stosunku molowym 1:1 w 100 mM buforze fosforanowym, pH 7,4; 0,2 mM EDTA, przez 77 h w temperaturze 24°C. Równolegle cytochrom c inkubowano bez dodatków oraz z albuminą niezmodyfikowaną HTL, ale z zablokowaną grupą tiolową Cys 34. Widma absorpcji wykonano po 24 i po 77 h inkubacji.

W celu pomiaru widm absorpcji mioglobiny białko zmodyfikowane tiolaktonem homocysteiny (1-8-krotny nadmiar molowy w stosunku do stężenia białka) rozcieńczono do stężenia 0,25-0,5 mg/ml w 20 mM buforze fosforanowym, pH 7,4; 0,04 mM EDTA.

3.14 Dichroizm kołowy

Dichroizm kołowy (CD, ang. *circular dichroism*) jest techniką spektroskopową do badania między innymi struktury białek w roztworze. Widmo dichroizmu kołowego powstaje na skutek różnej absorpcji światła spolaryzowanego kołowo w lewo w stosunku do światła spolaryzowanego kołowo w prawo przez optycznie czynną cząsteczkę. Widmo dichroizmu kołowego białek można podzielić na regiony, ze względu na pochodzenie eliptyczności. Poniżej 250 nm największy udział w powstaniu widma mają wiązania peptydowe i region ten dostarcza informacji o strukturze drugorzędowej białka. W bliskim nadfiolecie (250-350 nm) źródłem eliptyczności są fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan i wiązania dwusiarczkowe. W zakresie długości fali 350-550 nm (region Soreta) chromoforami są grupy niebiałkowe.

Wiele powszechnie występujących motywów konformacyjnych, włączając helisę α , harmonijkę β i pętlę, ma charakterystyczne widmo CD w dalekim nadfiolecie (178-250 nm). Dla przykładu widmo CD helisy α charakteryzuje się ujemną eliptycznością przy 222 i 208 nm oraz dodatnią eliptycznością przy 193 nm. Dla harmonijki β typowe jest szerokie ujemne pasmo przy 218 nm i intensywne dodatnie pasmo przy 195 nm, podczas gdy pętla wykazuje słabe szerokie pasmo w okolicy 217 nm i intensywne ujemne pasmo przy

200 nm. Dichroizm kołowy podlega prawu Beer'a mówiącemu, że widmo CD każdego składnika będącego w roztworze jest wprost proporcjonalne do stężenia tego składnika, a całe spektrum jest sumą wszystkich tworzących je widm. Widmo cząsteczki białka, będąc sumą widm elementów konformacyjnych budujących to białko, może być wykorzystane do oszacowania zawartości poszczególnych elementów struktury drugorzędowej głównego łańcucha polipeptydowego. Dichroizm kołowy znajduje również zastosowanie w badaniu interakcji białka z ligandem oraz stabilności białek w warunkach stresu np. temperatury. Zmiana widma spowodowana dodaniem liganda, denaturanta lub zmianą temperatury jest wprost proporcjonalna do ilości białka zmienionego przez dany czynnik [140].

Pomiary dichroizmu kołowego zostały przeprowadzone na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, we współpracy z dr. Pawłem Skowronkiem. Użyto dichrografu kołowego Jasco J-810. Widma CD prezentowane w pracy otrzymano jako średnią 2-4 kolejnych widm, od której odjęto linię podstawową zarejestrowaną dla 10 mM buforu fosforanowego, pH 7,4. Długość drogi optycznej wynosiła 0,1 cm dla pomiarów w regionie 180-300 nm oraz 1 cm w regionie 300-650 nm. Punkty widma rejestrowane były co 0,5 nm z szybkością 100 nm/min. Szerokość wiązki światła wynosiła 1 nm. Widma CD zostały wygładzone metodą Savitzky-Golay z szerokością konwolucji 17 lub za pomocą algorytmu 15-punktowego metodą przesuwających się średnich. Widma CD rejestrowano w układzie $\theta = f(\lambda)$, w jednostkach [mdeg], natomiast przedstawiono na wykresach w układzie $[\theta] = f(\lambda)$, w którym:

$$[\theta] = \frac{\theta^\lambda 10^5}{lcn}, \text{ gdzie:}$$

$[\theta]$ – średnia molowa eliptyczność na resztę aminokwasową (ang. *mean residue ellipticity*), (deg cm² dmol⁻¹),

θ^λ – intensywność CD obserwowana dla danej długości fali λ (mdeg),

l – długość drogi światła (nm),

c – stężenie molowe białka (μ M),

n – liczba aminokwasów.

Stężenie molowe białka zostało wyznaczone spektrofotometrycznie z użyciem molowego współczynnika ekstynkcji: $\epsilon_{409} = 135000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dla mioglobiny, $\epsilon_{410} = 106100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dla cytochromu c [141], $\epsilon_{280} = 114000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dla transferyny [142] i $\epsilon_{280} = 14690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dla ferrytyny [143].

Do pomiarów zawartości struktur drugorzędowych białka przygotowywano w następujący sposób:

1. Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny:

Białko	Stężenie białka, mM	Stężenie HTL, mM	Bufor	Czas, h	Temperatura, °C
Cytochrom c	0,80	0,80 1,6 3,2 6,4	100 mM bufor fosforanowy, pH 7,4; 0,2 mM EDTA	22	22
Mioglobina	0,57	0,57 1,14 2,28 4,56	100 mM bufor fosforanowy, pH 7,4; 0,2 mM EDTA	22	22
Ferrytyna	1	20	100 mM bufor fosforanowy, pH 7,4	17	25
Transferyna	0,25	20	100 mM bufor fosforanowy, pH 7,4	17	25

2. Usunięcie związków niskocząsteczkowych przez ultrafiltrację na filtrach Millipore 10 kDa lub na kolumnie odsalającej o średnicy 10 mm i długości 10 cm (Fast Desalting HR 10/10, Amersham Biosciences).

3. Rozcieńczenie białek w 10 mM buforze fosforanowym, pH 7,4, bezpośrednio przed pomiarem.

Pomiary stabilności termicznej białek przeprowadzono dzięki uprzejmości prof. Sándor Pongor (ICGEB, Triest, Włochy), z wykorzystaniem dichrografu kołowego Jasco J-810 z przyłączonym termostatem (Thermostate Grant Instruments Type GP200, Cambridge, England). Pomiary CD transferyny i ferrytyny prowadzono w kuwecie z możliwością regulacji temperatury. Widma CD otrzymano jako średnią z 4 kolejnych widm, od której odjęto linię podstawową uzyskaną z pomiaru widma buforu, w którym rozpuszczone było białko. Długość drogi optycznej wynosiła 0,1 cm. Widma CD rejestrowano w zakresie spektralnym 195-250 nm dla temperatur 25-75°C oraz 200-250 nm dla temperatur 85 i 90°C. Widma, które były „zaszumione” wygładzono metodą przesuwających się średnich z użyciem algorytmu 15-punktowego.

Do pomiarów stabilności termicznej transferynę i ferrytynę o stężeniu 20 mg/ml zmodyfikowano 20 mM HTL w 100 mM buforze fosforanowym, pH 7,4 w 25°C przez około 17 h. Następnie nieprzereagowany HTL i inne związki niskocząsteczkowe usunięto na kolumnie odsalającej o średnicy 10 mm i długości 10 cm (Fast Desalting HR 10/10, Amersham Biosciences).

Szybkość przepływu wynosiła 2 ml/min. Zastosowanym buforem był 10 mM bufor fosforanowy, pH 7,4; 100 mM NaCl. Następnie białko rozcieńczono do odpowiedniego stężenia (0,2 mg/ml w przypadku transferry, 0,1 mg/ml w przypadku ferrytyny) 5 mM buforem fosforanowym, pH 7,4; 50 mM NaCl. Tak przygotowane białko poddane zostało działaniu rosnących temperatur (25-90°C) w kuwecie połączonej z termostatem. Pomiar widm CD wykonywane były po 5 minutach od ustalenia się odpowiedniej temperatury.

Widma CD analizowałam przy użyciu serwera DICHROWEB [144]. Analiza danych polega na porównaniu widma CD badanego białka z widmami białek, zawartymi w zestawie referencyjnym białek, o znanych strukturach krystalograficznych, a tym samym znanej zawartości struktur drugorzędowych. Obliczenie na ile każdy z elementów struktury przyczynia się do powstania widma odbywa się z wykorzystaniem jednego z pięciu dostępnych algorytmów: SELCON3 [145, 146], CONTIN [147, 148], CDSSTR [149], VARSLC [150] i K2d [151]. W celu uzyskania jak najbardziej wiarygodnych wyników analizy widm CD cytochromu c i mioglobiny wykonano z wykorzystaniem 3 algorytmów: SELCON, CONTIN i CDSSTR. Dla każdego wyniku podano znormalizowane średnie odchylenie kwadratowe (NRMSD, ang. *normalized root mean square deviation*). Parametr ten świadczy o zgodności dopasowania widma eksperymentalnego oraz obliczonego i wyznaczany jest ze wzoru:

$$\left[\frac{\sum (\theta_{\text{exp}} - \theta_{\text{cal}})^2}{\sum (\theta_{\text{exp}})^2} \right]^{1/2}, \text{ gdzie:}$$

θ_{exp} – eliptyczność eksperymentalna,

θ_{cal} – eliptyczność obliczona (ang. *back-calculated spectra for the derived structure*).

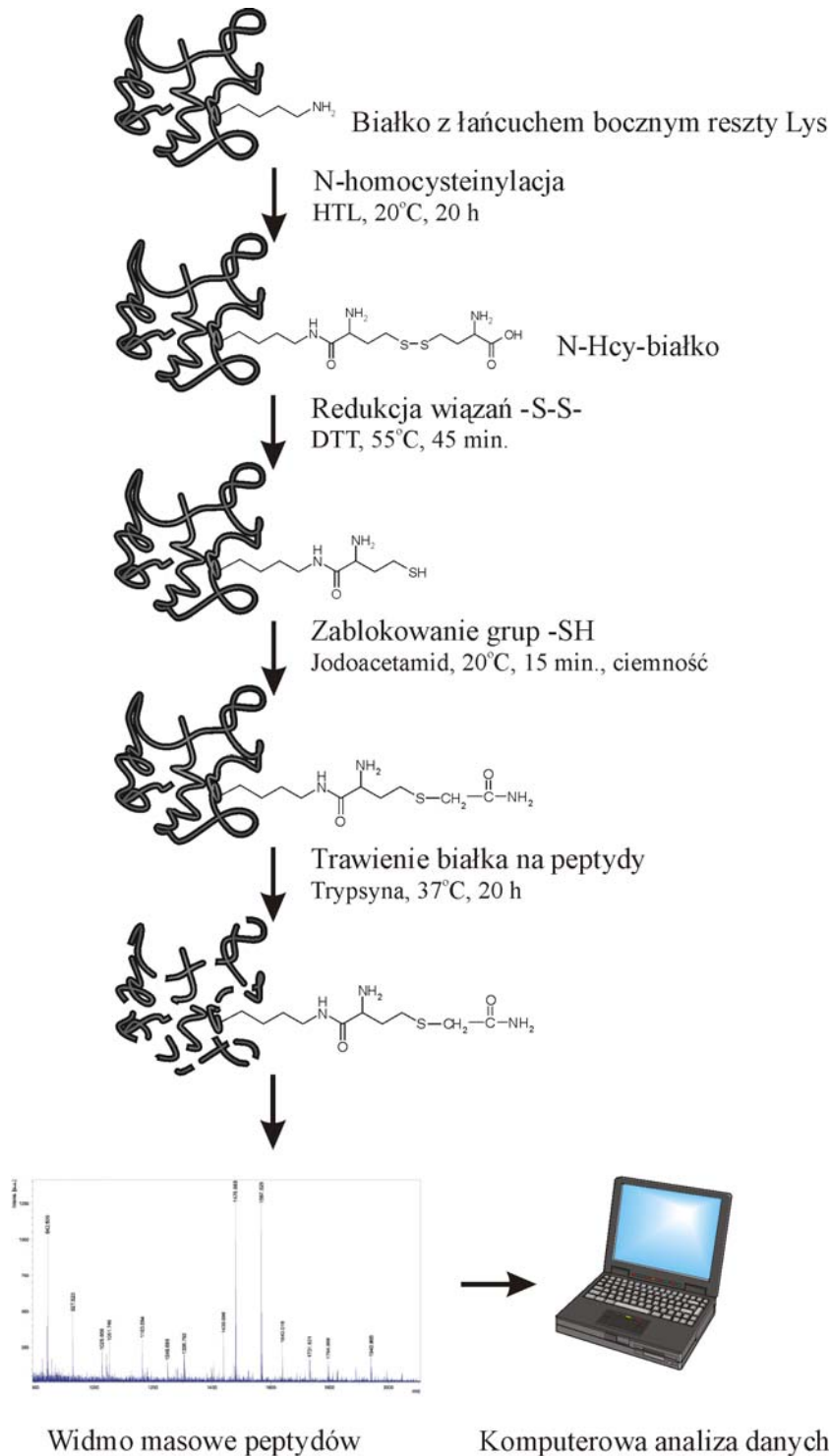
NRMSD używany jest do oceny jakości wyniku. Niska wartość jest koniecznym ale nie wystarczającym warunkiem dla wnioskowania o poprawności wyniku. Jeśli NRMSD jest wysokie (>0,1), dopasowanie obliczonej struktury drugorzędowej do rzeczywistej struktury jest prawdopodobnie niewłaściwe, jednak niska wartość tego parametru nie oznacza, że analiza jest poprawna. Parametr ten umożliwia porównanie wyników uzyskanych z użyciem różnych algorytmów i baz danych, dla wyboru najbardziej właściwej metody analizy i zestawu referencyjnego [144]. Frakcje struktur drugorzędowych białek w zestawach referencyjnych

określone są na podstawie struktur krystalograficznych [146]. Dany zestaw białek referencyjnych jest tym lepszy, im zawiera więcej typów elementów struktury obecnych w badanym białku [144]. Serwer Dichroweb oferuje 7 zestawów białek referencyjnych, różniących się wymaganym zakresem długości fali widma CD. Do analiz widm w zakresie 190-240 nm może być wykorzystany zestaw nr 4 lub 7. Wybrano zestaw nr 7, który oprócz widm 44 białek zawartych też w zestawie nr 4, zawiera widma 5 białek zdenaturowanych.

Struktury drugorzędowe podzielone są na 4 grupy: helisa α , która obejmuje helisy α i helisy 3_{10} , harmonika β , pętla oraz nieuporządkowane. Najkrótszą sekwencją, która może być zaliczona do pierwszych trzech kategorii, jest sekwencja dwuaminokwasowa. Ostatnia grupa obejmuje wszystkie pojedyncze reszty aminokwasowe zaliczone do klas takich jak mostki β , zgięcia, zatem nie zaliczone do żadnej ze zdefiniowanych klas strukturalnych [146]. Wyniki dla poszczególnych klas struktury drugorzędowej uśredniono i obliczono odchylenie standardowe.

3.15 Trawienie białek trypsyną

Trawienie białek trypsyną przeprowadzono jako jeden z etapów identyfikacji miejsc preferencyjnej N-homocysteinyłacji (Rysunek 15). 1 nmol białka w 0,1 M NH_4HCO_3 redukowano 0,45 mM DTT przez 45 minut w temperaturze 55°C, po czym wolne grupy tiolowe białka blokowano 1 mM IAA w ciemności przez 15 minut w temperaturze pokojowej (około 22°C). W kolejnym etapie białko poddawano trawieniu trypsyną (stosunek enzym:substrat 1:50) przez około 16 h w temperaturze 37°C. Trypsyna (EC 3.4.21.4) należy do proteaz serynowych, przecina wiązania peptydowe po resztach Lys i Arg. W dalszym etapie masy uzyskanych peptydów określano metodą MALDI/TOF (Rozdział 3.16.2). Ostatnim etapem była komputerowa analiza danych (Rozdział 3.17).



Rysunek 15. Etapy identyfikacji miejsc potranslacyjnego wbudowywania Hcy do białek *in vitro*

W celu określenia wpływu N-homocysteinyłacji na podatność białek na proteolizę cytochrom c zmodyfikowano 1-, 2-, 4- i 19- krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny. Białka o stężeniu 2 mg/ml inkubowano następnie z trypsyną (stosunek enzym:substrat 1:5) w 100 mM NH_4HCO_3 przez 1-15 h w temperaturze 37°C. W kolejnym etapie zmieszano w

stosunku 1:1 z barwnikiem obciążającym i po 5 minutowej denaturacji w 99°C, poddawano elektroforezie w 12% żelu denaturującym. Po zeskanowaniu żele analizowano programem ImageQuant 5.1. Z intensywności prążków obliczono procent niestrawionego białka.

3.16 Desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą z detekcją czasu przelotu (MALDI/TOF)

Analiza MALDI/TOF pozwala na oznaczenie masy cząsteczkowej peptydów i białek. Technika ta umożliwia badanie makrocząsteczek w postaci jonów pseudomolekularnych. W celu wytworzenia jonów, roztwór analizowanej substancji miesza się z matrycą, której rolą jest pochłonięcie energii lasera i przekazanie jej próbce. W przypadku białek o masach powyżej 10 kDa najczęściej stosowaną matrycą jest kwas synapinowy.

Widma masowe zostały wykonane przez dr. Łukasza Marcza na spektrometrze typu MALDI/TOF firmy Bruker Daltonics (Niemcy), model Autoflex, w Centrum Genomiki IChB PAN. Jonizacja następowała w wyniku wzbudzenia próbek promieniem lasera o długości fali 337 nm. Analizy prowadzono w trybie jonów dodatnich. Napięcie przyspieszające w źródle oraz opóźnienie wlotu jonów do analizatora (ang. *pulsed ion extraction*) było każdorazowo optymalizowane podczas analiz.

3.16.1 Wyznaczanie masy cząsteczkowej białek

Roztwóru białka o stężeniu 2 mg/ml zmieszano z roztworem matrycy (kwas synapinowy:50% acetonitryl) w stosunku 1:1 (0,5µl : 0,5µl) i naładano na płytkę stalową (ang. *target plate*) w celu krystalizacji. Ten sposób przygotowania i nakładania próbki nazywa się metodą wysychającej kropli. Spektrometr MALDI/TOF był kalibrowany wobec mieszaniny białek (standardów) o znanych masach cząsteczkowych. Analiza próbek badanych wykonywana była przy napięciu źródeł jonów 20 kV i 19 kV.

Dodatkowo przed nałożeniem na płytkę metalową, roztwory białek oczyszczano z użyciem mikrokolumnienek ZipTip U – C18, wielkość P10 (Millipore). Modyfikację z danym nadmiarem molowym tiolaktonu, przeprowadzano kilkakrotnie dla każdego białka, za każdym razem wykonując pomiary stopnia modyfikacji techniką MALDI/TOF. W pracy przedstawiono reprezentatywne widma masowe.

3.16.2 Uzyskiwanie map peptydowych

Mapy peptydowe białek otrzymano w celu identyfikacji miejsc wprowadzania homocysteiny lub jej pochodnych. Roztwór peptydów oczyszczano na kolumnie typu ZipTip U – C18, wielkość P10 (Millipore). Peptydy związane do kolumnienki wymywano roztworami o wzrastającym stężeniu acetonitrylu (10, 30, 50 i 100%). Każdą z uzyskanych w ten sposób czterech frakcji peptydów, o objętości około 0,5 μ l, наносono na płytke Prespotted AnchorChip (Bruker Daltonics), zawierającą na powierzchni matrycę (kwas α -cyjano-hydroksycynamonowy) i pozostawiano na powietrzu do wyschnięcia. Analiza próbek badanych wykonywana była przy napięciu źródeł jonów 19 kV i 17 kV.

3.17 Analiza map peptydowych

W celu określenia stopnia pokrycia sekwencji białka przez sekwencje zidentyfikowanych peptydów, mapy peptydowe porównywano z bazami sekwencji białkowych z użyciem dostępnego w Internecie programu Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Parametry analizy były następujące: tolerancja błędu pomiaru – 0,2 Da, dopuszczalne 2 miejsca w peptydzie, które nie uległy cięciu enzymatycznemu, karbaimidometylacja reszt cysteiny, możliwe utlenienie metioniny.

Identyfikację peptydów, które zawierają jedną lub dwie przyłączone reszty homocysteiny, przeprowadzono przy pomocy programu PepModSearch (<http://bioinfo.pl/~kajla/pepmodsearch/index.php>) [Kaján, niepublikowane]. W celu stwierdzenia, które peptydy z uzyskanego widma masowego pochodzą od analizowanego białka, PepModSearch wykorzystuje wynik teoretycznego trawienia białka wykonywany przez program MS-Digest (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msdigest.htm>).

PepModSearch wymaga wprowadzenia sekwencji aminokwasowej badanego białka oraz listy uzyskanych mas peptydowych. Na podstawie listy peptydów z trawienia teoretycznego przeprowadzonego przez MS-Digest, program Pepmodsearch wskazuje peptydy pochodzące od analizowanego białka. Najważniejszą zaletą tego programu jest identyfikacja peptydów, które są cięższe o daną masę od peptydów uzyskanych z teoretycznego trawienia. Podstawą metody jest założenie, że peptyd cięższy o daną liczbę daltonów ma związaną grupę chemiczną o ciężarze odpowiadającym tej różnicy. Program znajduje peptydy z jedną i dwoma (takimi samymi)

modyfikacjami. Wskazuje przy tym, które z peptydów mają swój niezmodyfikowany odpowiednik oraz te, których masa jest taka sama jak jednego z peptydów niezmodyfikowanych.

3.18 Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 5.1 PL [152, 153]. W celu stwierdzenia istotności różnic pomiędzy średnimi zawartościami elementów struktury drugorzędowej uzyskanymi metodą dichroizmu kołowego, przeprowadzono analizę wariancji. W przypadku występowania istotnych różnic między rozpatrywanymi, stosowano test post-hoc Tukeya w celu stwierdzenia, które z porównywanych średnich są odpowiedzialne za odrzucenie hipotezy zerowej o równości średnich w grupach. Normalność rozkładu zmiennych oceniano testem Shapiro-Wilka. Wszystkie wykazane różnice przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

4 Wyniki

Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny polegająca na acylacji grup ϵ -aminowych reszt lizyny, zachodzi we wszystkich dotychczas badanych organizmach, w tym człowieka [80, 81]. Wymagana jest wnikliwa analiza mechanizmu i skutków N-homocysteinyłacji, ponieważ jest to jedna z potencjalnych przyczyn toksyczności homocysteiny. Badania poświęcone temu zagadnieniu są ważne z kilku powodów: 1. modyfikacja ta zachodzi przy fizjologicznych stężeniach HTL w organizmie ludzkim; 2. N-homocysteinyłowane białka zawierają znaczną pulę Hcy, większą niż pula tzw. „całkowitej” Hcy; 3. N-homocysteinyłacja białek powoduje poważne konsekwencje fizjologiczne. Białka tracą swoje funkcje, są toksyczne oraz stają się autoantygenami wywołującymi odpowiedź immunologiczną.

4.1 Proces N-homocysteinyłacji białka

Białkami modelowymi, wybranymi przeze mnie, do badania procesu N-homocysteinyłacji *in vitro* są cytochrom c, mioglobina, ferrytyna i transferyna. Cechy strukturalne wymienionych cząsteczek przedstawiłam w tabeli (Tabela 8).

Tabela 8. Charakterystyka strukturalna białek modelowych

Białko	Masa cząsteczkowa [Da]		1**	2**	3
	*	**			
Cytochrom c serca konia	12359,5 (5,8; n=6)	11701,5	104	19 (18,3)	1OCD [115]
Mioglobina mięśni szkieletowych konia	16950,8 (10,7; n=4)	16951,4	153	19 (12,4)	1AZI [123]
Transferyna surowicy człowieka	78699,8 (294; n=6)	77079,8	679	58 (8,3)	1D3K [132]
Ferrytyna śledziony konia***, podjednostka L	20011,7 (44,9; n=7)	19977,6	175	9 (5,1)	1IER [129]

* Dane z pomiarów MALDI/TOF (odchylenie standardowe; n=ilość pomiarów)

** Dane obliczone z użyciem programu ProtParam ExPaSy

*** 8-12% heteropolimeru stanowią podjednostki H o masie około 21 kDa i 13 resztach Lys

1 – liczba reszt aminokwasowych, 2 – liczba reszt Lys (% reszt Lys), 3 – kod identyfikacyjny struktury, PDB ID [referencja]

4.1.1 Cytochrom c

Masa cząsteczkowa cytochromu c serca konia wyznaczona metodą MALDI/TOF wynosi około 12359,5 Da (Tabela 8). Na widmie masowym cytochromu c (Rysunek 16A) przy $m/z = 12360,91$ widoczny jest jon molekularny $[M+H]^+$. Pik o $m/z = 12567,37$ pochodzi od adduktu białka z matrycą, kwasem synapinowym. Pik o $m/z = 6180,115$ odpowiada dwukrotnej jonizacji cząsteczki białka $[M+2H]^{2+}$.

N-homocysteinyłacja, polegająca na modyfikacji grupy ϵ -aminowej reszty lizyny, jest równoznaczna ze zwiększeniem masy cząsteczkowej białka o 117,165 Da na każdą zmodyfikowaną resztę aminokwasową. Metoda MALDI/TOF umożliwia pomiar masy cząsteczkowej białka z dużą dokładnością (w pewnym zakresie mas), jest zatem odpowiednim narzędziem do oceny stopnia N-homocysteinyłacji.

Inkubacja cytochromu c z ekwimolarnym stężeniem HTL (na każdą cząsteczkę białka przypada jedna molekula tiolaktonu) powoduje pojawienie się cząsteczek z przyłączoną jedną resztą homocysteiny ($m/z = 12482,3$; względna intensywność pików około 14%) oraz w niewielkim stopniu z przyłączonymi 2 i 4 resztami Hcy (odpowiednio $m/z = 12616,05$ i $12824,01$; względna intensywność pików poniżej 2%). Na widmie widać również addukt białka z matrycą o $m/z = 12572,26$ (Rysunek 16B). Przyjmując, że suma względnych intensywności czterech pików, odpowiadających białku natywnemu oraz z przyłączonymi 1, 2 i 4 resztami Hcy, wynosi 118 i pochodzi od 100% cząsteczek białka obecnych podczas modyfikacji, obliczyłam procentowy udział każdej z form cytochromu po inkubacji z HTL. Wyniósł on odpowiednio: 85% dla cząsteczek natywnych, 12% dla cząsteczek z 1 resztą Hcy i po 1,5% dla cząsteczek z 2 i 4 resztami Hcy.

Modyfikacja cytochromu c 2-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny, prowadzi do powstania mieszaniny cząsteczek z przyłączonymi od 0 do 4 resztami Hcy (Rysunek 16C). Jon molekularny białka z przyłączoną 1 resztą Hcy przy $m/z = 12477,91$ charakteryzuje się względną intensywnością pików wynoszącą 30%, z 2 resztami Hcy przy $m/z = 12610,91$ – 20%, z 3 resztami Hcy przy $m/z = 12710,14$ – 7% i z 4 resztami Hcy przy $m/z = 12818,27$ – 3%. Procentowy udział poszczególnych form cytochromu c po modyfikacji wynosi odpowiednio 62,5% (białko natywne), 19% (białko z 1 -Hcy), 12,5% (białko z 2 -Hcy), 4% (białko z 3 -Hcy) i 2% (białko z 4 -Hcy).

Kolejne podwojenie nadmiaru molowego HTL podczas modyfikacji cytochromu c prowadzi do dalszego wzrostu udziału cząsteczek N-homocysteinylowanych w stosunku do cząsteczek natywnych (Rysunek 16D). Jon molekularny białka z przyłączoną 1 resztą Hcy przy $m/z = 12478,61$ charakteryzuje się względną intensywnością 70%, z 2 resztami Hcy przy $m/z = 12594,6$ – 34%, z 3 resztami Hcy przy $m/z = 12710,02$ – 13% i z 4 resztami Hcy przy $m/z = 12844,84$ – 8%. Procentowy udział poszczególnych form cytochromu c po modyfikacji wynosi odpowiednio 43% (białko natywne), 30% (białko z 1 -Hcy), 15% (białko z 2 -Hcy), 7% (białko z 3 -Hcy) i 5% (białko z 4 -Hcy).

Zaobserwowaną tendencję spadkową udziału formy natywnej przy wzroście stężenia HTL podczas modyfikacji, widać jeszcze wyraźniej przy 8-krotnym nadmiarze molowym czynnika modyfikującego. Inkubacja cytochromu c z 8-krotnym nadmiarem molowym HTL prowadzi do powstania mieszaniny cząsteczek białka z przyłączonymi od 0 do 9 reszt homocysteiny (Rysunek 16E). Udział poszczególnych form cytochromu c wraz z wartościami m/z ich jonów molekularnych oraz względną intensywnością pików przedstawiłam w tabeli (Tabela 9). Najbardziej liczny jest cytochrom z 2 przyłączonymi resztami Hcy ($m/z = 12588,02$; względna intensywność 100%), który stanowi 18% wszystkich cząsteczek białka. Jedynie 9% całej puli cząsteczek stanowi cytochrom natywny.

Tabela 9. Charakterystyka widma masowego cytochromu c zmodyfikowanego 8-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny

m/z	Względna intensywność, %	Liczba -Hcy/ cząsteczka białka	Udział w puli cząsteczek, %
12351,81	51	0	9
12469,35	88	1	16
12588,02	100	2,02	18
12708,27	90	3,04	16
12827,08	71	4,06	13
12944,28	53	5,06	9,5
13063,87	39	6,08	7
13176,85	27	7,04	5
13295,97	19	8,06	3,5
13404,34	16	8,98	3

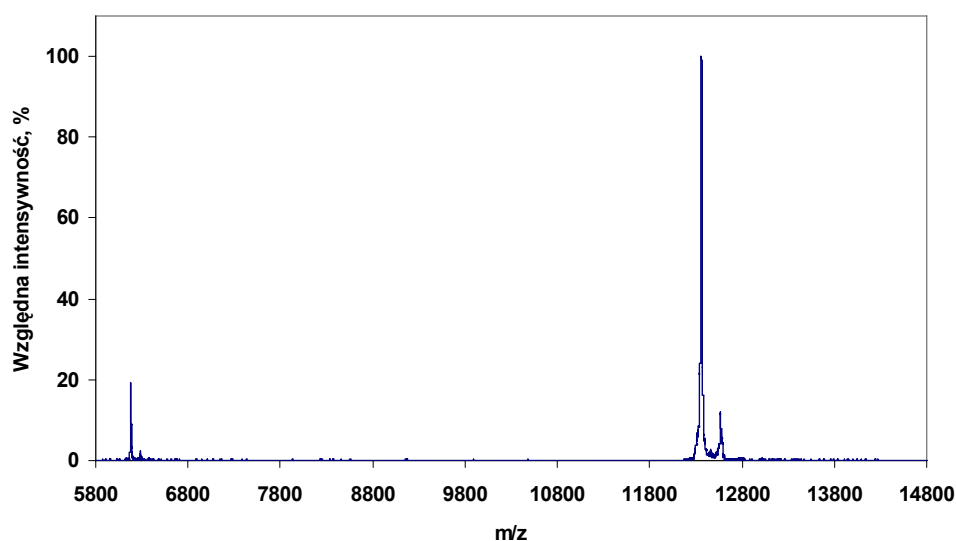
Modyfikacja tiolaktonem homocysteiny o stężeniu równym stężeniu grup ϵ -aminowych reszt lizyny, nie powoduje całkowitego zaniku formy natywnej (Tabela 10, Rysunek 16F). Niezmodyfikowany cytochrom c, stanowi 6,5% puli cząsteczek białka. Najliczniejszą frakcją są molekuly z 3 resztami Hcy, a maksymalna liczba zmodyfikowanych reszt wynosi 12. Pięć, z

dziewiętnastu obecnych w łańcuchu polipeptydowym cytochromu c reszt Lys, jest zatem chronionych lub niepodatnych na N-homocysteinyłację. Pojawia się pytanie, które reszty ulegają preferencyjnej modyfikacji.

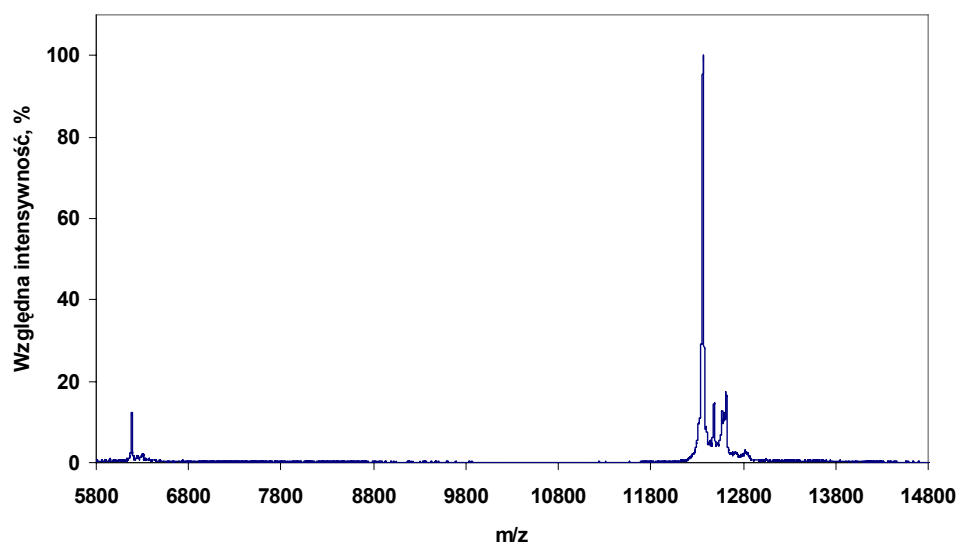
Tabela 10. Charakterystyka widma masowego cytochromu c zmodyfikowanego 19-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny

m/z	Względna intensywność, %	Liczba -Hcy /cząsteczka białka	Udział w puli cząsteczek, %
12362,37	45	0	6,5
12479,88	79	1	11
12597,32	94	2,0	13,5
12714,45	100	3,0	14,5
12831,11	93	4,0	13,5
12948,58	78	5,0	11
13065,98	63	6,0	9
13183,11	48	7,0	7
13298,06	35	7,98	5
13416,64	24	9,0	3,5
13530,49	16	9,97	2,5
13641,41	12	10,91	2
13756,06	9	11,89	1

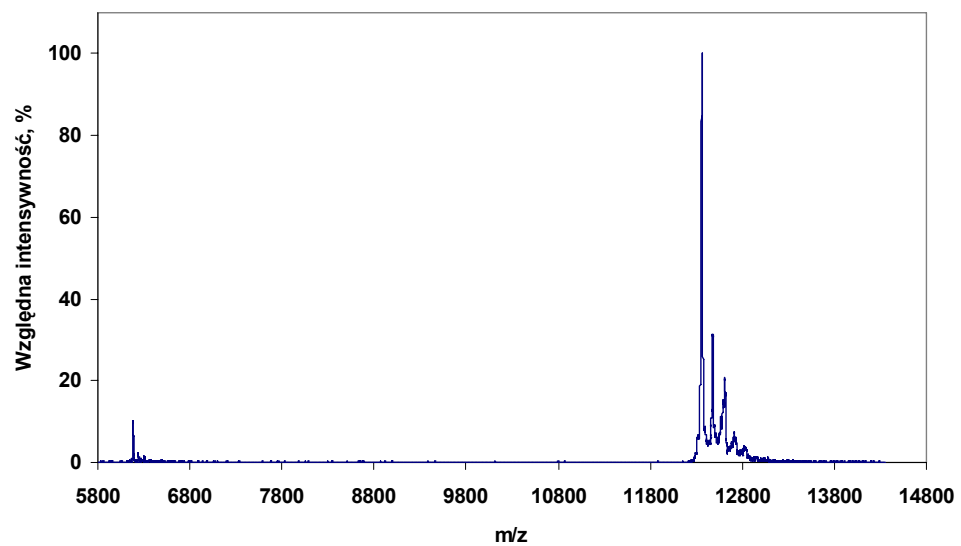
A



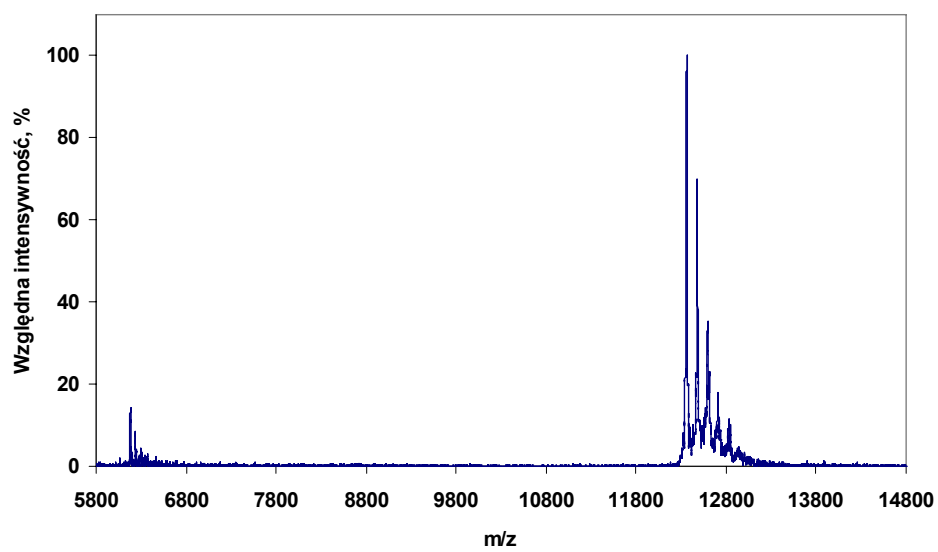
B



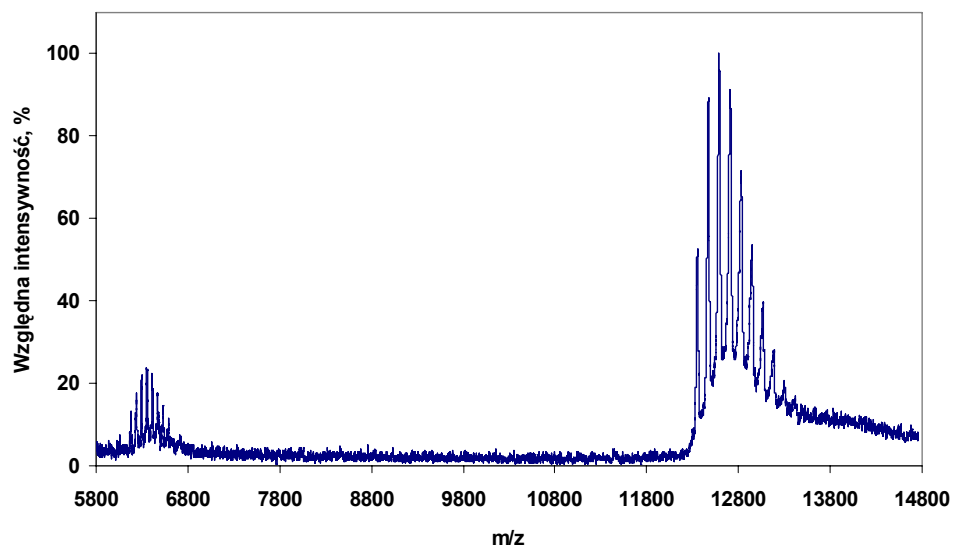
C



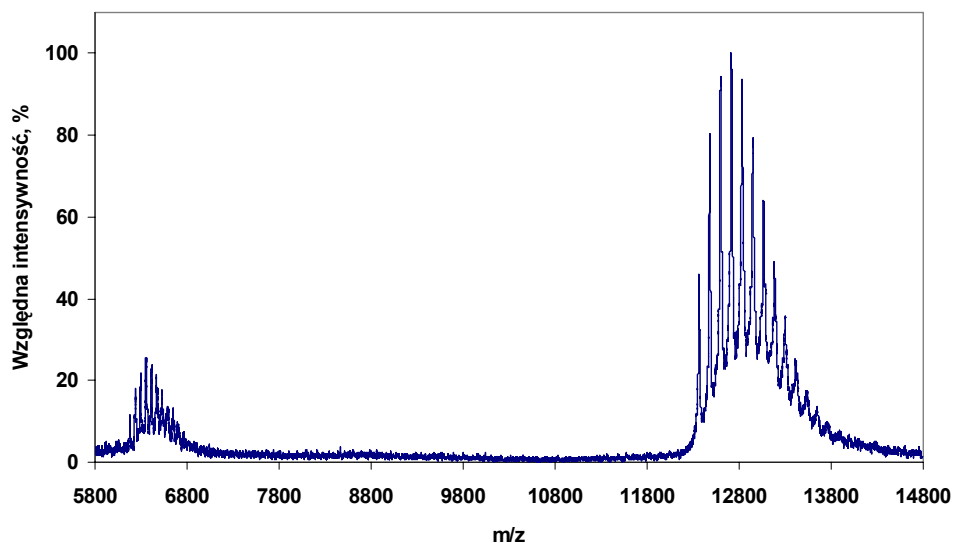
D



E



F



Rysunek 16. Widmo masowe cytochromu c przed i po modyfikacji tiolaktonem homocysteiny. Stosunek molowy HTL/białko wynosił: 0 (A), 1 (B), 2 (C), 4 (D), 8 (E) i 19 (F)

4.1.2 Mioglobina

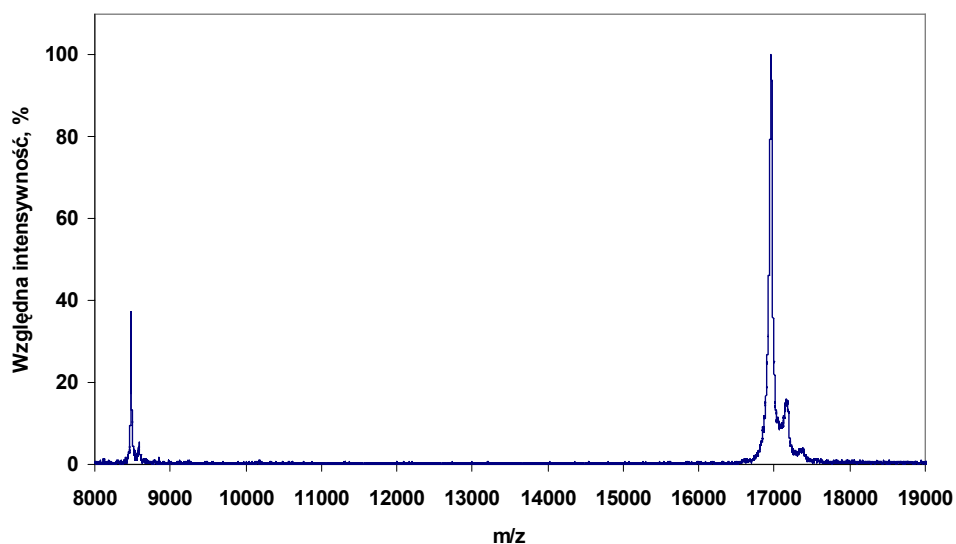
Masa cząsteczkowa mioglobiny mięśni szkieletowych konia wyznaczona metodą MALDI/TOF wynosi około 16950,8 Da i jest w przybliżeniu zgodna z masą obliczoną na podstawie sekwencji aminokwasowej (Tabela 8). Na widmie masowym mioglobiny (Rysunek 17A) przy $m/z = 16958,3$ widoczny jest jon molekularny $[M+H]^+$. Pik o $m/z = 8479,834$ odpowiada dwukrotnej jonizacji cząsteczki białka $[M+2H]^{2+}$. Na widmie obecny jest także pik adduktu białka z matrycą przy $m/z = 17161,96$.

Modyfikacja mioglobiny 2-krotnym nadmiarem molowym HTL prowadzi do utworzenia mieszaniny cząstek natywnych i N-homocysteinylowanych (Rysunek 17B). Jon molekularny białka z przyłączoną 1 resztą Hcy przy $m/z = 17069,57$ charakteryzuje się względną intensywnością piku wynoszącą 37%, natomiast z 2 resztami Hcy przy $m/z = 17186,89$ – 41%. Procentowy udział poszczególnych form mioglobiny po modyfikacji wynosi odpowiednio 56% (białko natywne), 21% (białko z 1 -Hcy) i 23% (białko z 2 -Hcy).

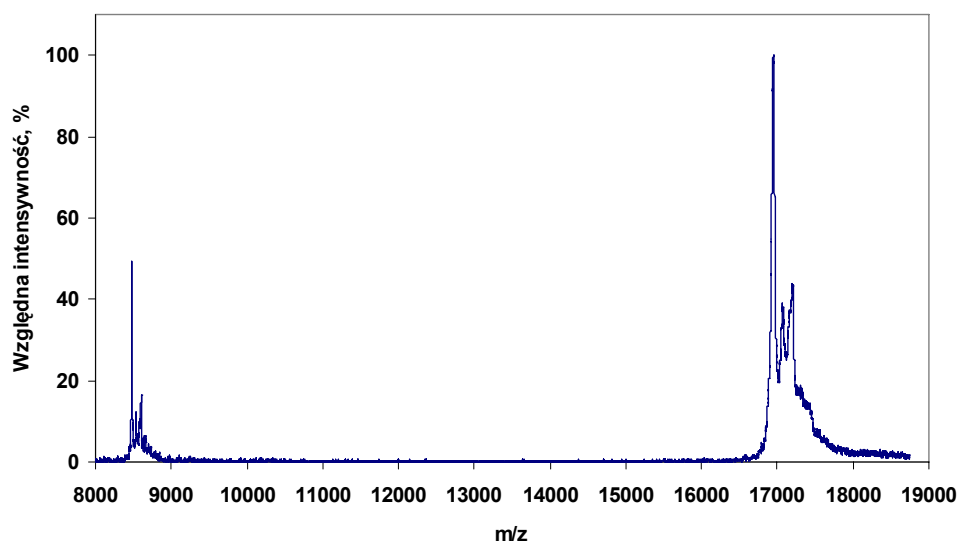
Inkubacja mioglobiny z 4-krotnym nadmiarem molowym HTL skutkuje, podobnie jak to ma miejsce w przypadku cytochromu c, we wzroście udziału form N-homocysteinylowanych (Rysunek 17C). Jon molekularny białka z przyłączoną 1 resztą Hcy przy $m/z = 17069,34$ charakteryzuje się względną

intensywnością 73%, z 2 resztami Hcy przy $m/z = 17197,26$ – 77%, z 3 resztami Hcy przy $m/z = 17311,33$ – 46% i z 4 resztami Hcy przy $m/z = 17446,93$ – 33%. Procentowy udział poszczególnych form mioglobiny po modyfikacji wynosi odpowiednio 30,5% (białko natywne), 22% (białko z 1 - Hcy), 23,5% (białko z 2 -Hcy), 14% (białko z 3 -Hcy) i 10% (białko z 4 -Hcy). Modyfikacja tiolaktonem homocysteiny o stężeniu równym stężeniu grup ϵ -aminowych reszt lizyny, powoduje przyłączenie średnio 10 reszt Hcy do cząsteczki mioglobiny (Rysunek 17D). Jak widać na widmie masowym, znaczny jest udział cząsteczek z liczbą zmodyfikowanych reszt Lys przekraczającą 10, a dochodzącą nawet do około 15. Na podstawie uzyskanego widma nie można określić udziału form mioglobiny zmodyfikowanej w różnym stopniu.

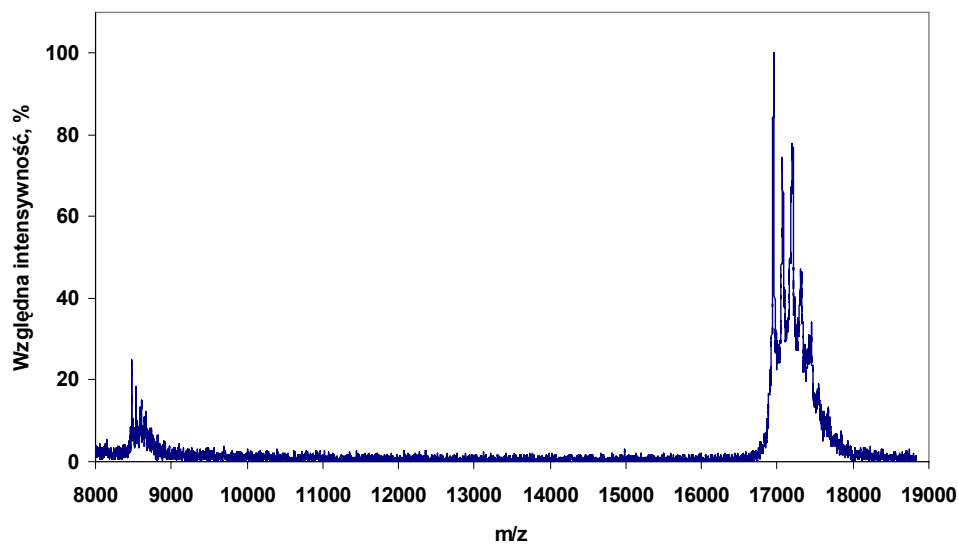
A



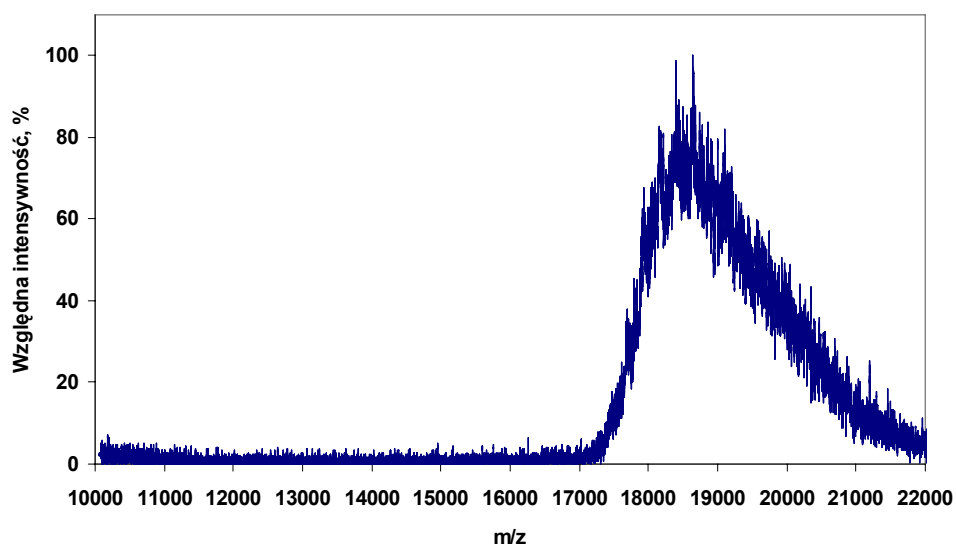
B



C



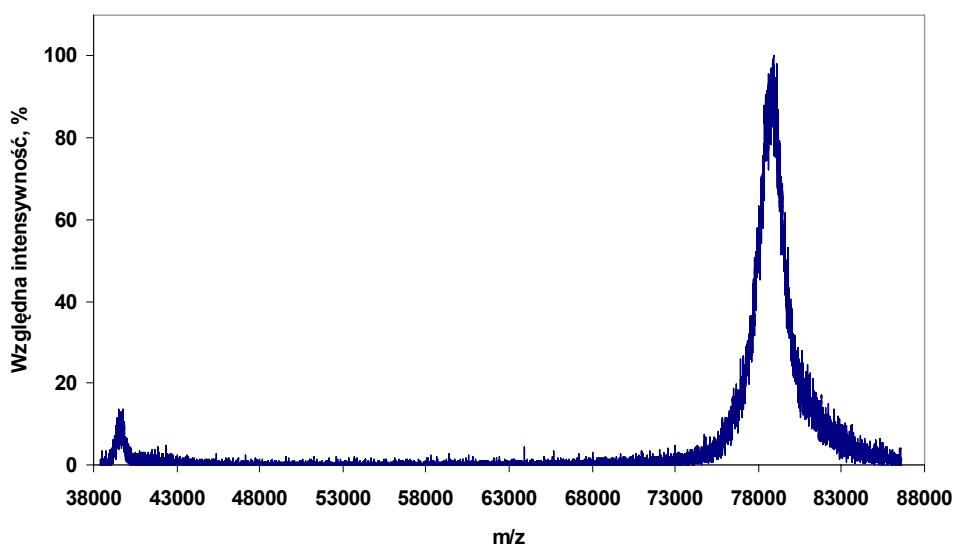
D



Rysunek 17. Widmo masowe mioglobiny przed (A) i po modyfikacji 2- (B), 4- (C) i 19-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny

4.1.3 Transferyna

Masa cząsteczkowa transferyny wyznaczona metodą MALDI/TOF wynosi w przybliżeniu 78700 Da (Rysunek 18). Masa cząsteczkowa obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej jest mniejsza, gdyż nie uwzględnia reszt cukrowych oraz dwóch jonów żelaza Fe^{3+} (Tabela 8).



Rysunek 18. Widmo masowe transferyny

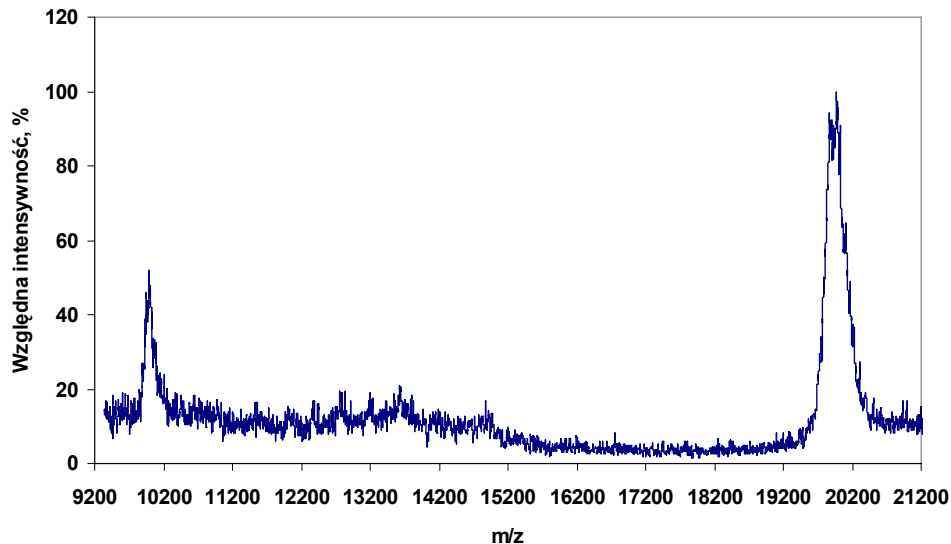
Dokładne określenie masy tak dużego białka cząsteczkowej nie jest możliwe, ze względu na zbyt niską rozdzielczość pomiaru. Nie można zatem stwierdzić

z cząsteczkami o jakiej masie mamy do czynienia po modyfikacji tiolaktonem homocysteiny. Z widma masowego odczytać można jedynie średnią masę białka, a co za tym idzie średnią liczbę przyłączonych reszt homocysteiny.

Transferyna zmodyfikowana 20-krotnym nadmiarem molowym HTL jest mieszaniną cząsteczek z przyłączonymi średnio 5 resztami Hcy. W mieszaninie obecne są molekuly zmodyfikowane zarówno w większym, jak i w mniejszym stopniu. Tiolakton homocysteiny o stężeniu równym stężeniu reszt lizyny powoduje modyfikację średnio 20 grup ϵ -aminowych cząsteczki transferyny. Dalsze podwyższenie nadmiaru tiolaktonu, do 200-krotnego powoduje przyłączenie około 22 reszt Hcy na cząsteczkę białka.

4.1.4 Ferrytyna

Masa cząsteczkowa ferrytyny wyznaczona metodą MALDI/TOF wynosi około 20000 Da (Rysunek 19). Widma masowe ferrytyny inkubowanej z od 4- do 200-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny nie wykazały zajścia modyfikacji.



Rysunek 19. Widmo masowe ferrytyny

W celu wykazania modyfikacji ferrytyny, inkubowałam białko z radioaktywnym HTL (rozdział 3.3) i wykonałam pomiary kinetyki reakcji. Stała szybkości N-homocysteinyłacji wyniosła $42,4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$. Dla porównania stała szybkości modyfikacji albuminy była równa $195,3 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$.

4.2 Identyfikacja miejsc N-homocysteinytacji *in vitro*

N-homocysteinytacji mogą ulegać grupy ε-aminowe tych reszt lizyny, które znajdują się na powierzchni cząsteczki białka. Ze względu na pofałdowanie łańcucha polipeptydowego pewne reszty aminokwasowe, znajdujące się wewnątrz cząsteczki białka, są chronione i niedostępne dla reakcji z czynnikiem modyfikującym.

Znajomość miejsc preferencyjnej modyfikacji jest istotna dla zrozumienia mechanizmu N-homocysteinytacji oraz ewentualnego wpływu modyfikacji na funkcję białka. W celu identyfikacji reszt lizynowych, ulegających preferencyjnej N-homocysteinytacji *in vitro*, przeprowadziłam opisaną procedurę (Rozdziały 3.15, 3.16.2). Stopień pokrycia sekwencji białka przez peptydy wyznaczony z użyciem programu Mascot oraz PepModSearch różni się dla poszczególnych białek (Tabela 11). Najwyższy stopień pokrycia sekwencji uzyskano dla mioglobiny, ok. 90%; nieco niższy dla cytochromu c, ok. 70%; natomiast dla ferrytyny i transferyny poniżej 50%.

Tabela 11. Pokrycie sekwencji białek modelowych przez peptydy. Średnia z n eksperymentów ± odchylenie standardowe

Białko	Stosunek białko:HTL	Mascot	PepModSearch	
			Wszystkie peptydy	Niezmodyfikowane peptydy
Cytochrom c	1:0	67±5,4(n=4)	74,5±5,7(n=4)	67,8±4,3(n=4)
	1:2	81±2,8(n=2)	93,3±2,7(n=2)	81,7±2,7(n=2)
	1:4	81±2,8(n=4)	93,9±2,7(n=4)	81,7±2,7(n=4)
Mioglobina	1:0	91,8±10,2(n=4)	94,4±9,8(n=4)	92,2±9 (n=4)
	1:2	93,5±3,5(n=2)	100,0±0(n=2)	93,8±3,2(n=2)
	1:4	72,7±24(n=4)	77,3±19,9(n=4)	76±20,8(n=4)
Ferrytyna	1:0	59(n=1)	54,0±26,8(n=1)	44,3±19,5(n=1)
	1:4	-	47,7±2,4(n=2)	44,5±2,8(n=2)
	1:40	-	50,7±1,5(n=2)	38,5±5,7(n=2)
Transferyna	1:0	42±9(n=3)	47,5±4,7(n=3)	35,6±5,8(n=3)
	1:4	35 (n=1)	38±0,3(n=2)	28,8±8,4(n=2)
	1:158	36±8,5(n=2)	38,1±10,8(n=2)	29,5±11,6(n=2)

Identyfikacja miejsc modyfikacji przez tiolakton homocysteiny powiodła się dla cytochromu c i transferyny. W przypadku mioglobiny i ferrytyny zidentyfikowane zostały peptydy o masie odpowiadającej przyłączeniu reszty homocysteinowej, jednak występowały one zarówno w białku natywnym, jak i zmodyfikowanym.

W cytochromie c zmodyfikowanym 2-krotnym nadmiarem molowym HTL, jako ulegające N-homocysteinytacji zidentyfikowano reszty Lys 8 lub 13 oraz 86 lub 87 (Tabela 12).

Tabela 12. Peptydy cytochromu c, w których zidentyfikowano N-homocysteinyłacje

Masa peptydu	Masa N-Hcy-peptydu	Sekwencja	Modyfikacja
1875,9573	2049,9300	8-KIFVQKCAQCHTVEK-22	-
1035,6389	1209,7480	80-MIFAGIKKK-88	-
1051,6338	1225,6400	80-MIFAGIKKK-88	1Met-ox
1507,8008	1855,8780	92-EDLIAYLKKATNE-104*	-

Met-ox – utlenienie metioniny, *peptyd z dwoma zmodyfikowanymi resztami Lys

Jeżeli w danym peptydzie występują 2 reszty Lys (oprócz lizyny na końcu sekwencji), nie jest możliwe stwierdzenie, która z nich uległa modyfikacji. W cytochromie inkubowanym z 4-krotnym nadmiarem molowym HTL, oprócz wymienionych reszt, zidentyfikowane zostały N-Hcy-Lys 99 i N-Hcy-Lys 100 (Tabela 12).

W transferynie zmodyfikowanej 4- i 158-krotnym nadmiarem molowym HTL, mimo dość niskiego stopnia pokrycia sekwencji białka przez sekwencje peptydów, wykryto 3 miejsca ulegające modyfikacji (Tabela 13). Należą do nich reszty Lys 25, Lys 39 i Lys 638.

Tabela 13. Peptydy transferyny, w których zidentyfikowano N-homocysteinyłacje

Masa peptydu	Masa N-Hcy-peptydu	Sekwencja	Modyfikacja
2621,2274	2795,3300	17-CQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVK-39	1-Met-ox
1543,8154	1717,8050	26-SVIPSDGPSVACVKK-40	-
2112,0582	2459,7950	22-DHMKSVIPSDGPSVACVKK-40*	1-CAM-C
1442,7062	1616,5720	631-DDTVCLAKLHDR-642	-

Met-ox – utlenienie metioniny, 1-CAM-C – karboiminometylacja cysteiny, *peptyd z dwoma zmodyfikowanymi resztami Lys

4.3 Wpływ N-homocysteinyłacji na strukturę drugorzędową białka

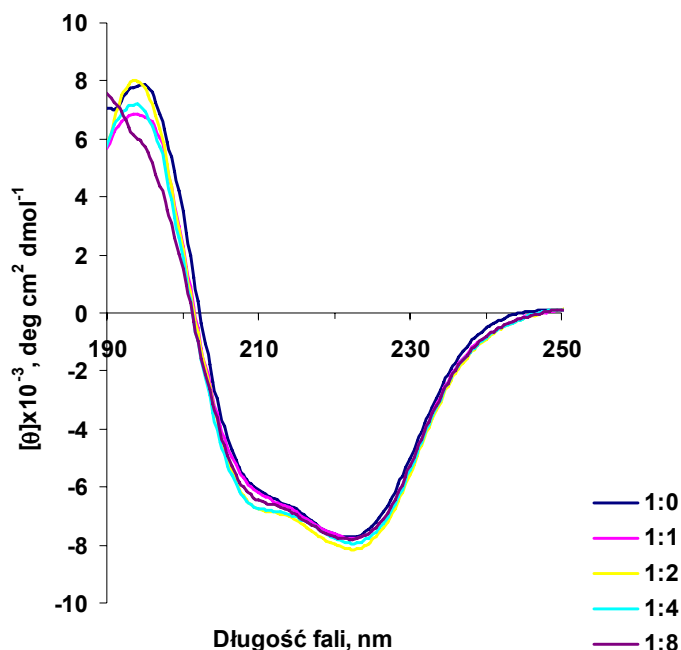
Tiolakton homocysteiny indukuje stres siateczki śródplazmatycznej i odpowiedź na niesfałdowane białka w linii komórek ARPE-19, przy czym jest prawie dwukrotnie skuteczniejszy niż homocysteina [49]. Nie wiadomo w jaki sposób HTL przyczynia się do rozfałdowywania białek. Jedną z hipotez zakłada, że za uszkodzenie białek sekrecyjnych i aktywację UPR odpowiada N-homocysteinyłacja [154]. Modyfikacja białek tiolaktonem homocysteiny

polegająca na kowalencyjnym przyłączeniu homocysteiny do grupy ϵ -aminowej reszt lizyny powoduje agregację, utratę aktywności i indukcję syntezy specyficznych przeciwciał [75]. Nasuwa się zatem pytanie, jaki aspekt struktury białka zostaje naruszony przez N-homocysteinyłację. Czy N-homocysteinyłacja zmienia konformację głównego łańcucha polipeptydowego? Szukając odpowiedzi na to pytanie, przeanalizowałam zawartość elementów struktury drugorzędowej czterech N-Hcy-białek modelowych, posługując się metodą dichroizmu kołowego (CD) (Rozdział 3.14).

Widmo CD białka w obszarze dalekiego nadfioletu, dostarcza danych o konformacji głównego łańcucha polipeptydowego. Badaniu poddano cytochrom c i mioglobinę zmodyfikowane HTL w stosunku molowym od 1:0 do 1:8, ferrytynę zmodyfikowaną 20-krotnym oraz transferynę zmodyfikowaną 80-krotnym nadmiarem molowym HTL. Zawartość struktur drugorzędowych oznaczono z użyciem trzech algorytmów dostępnych w serwerze Dichroweb: CDSSTR, SELCON3 i CONTIN. Wyniki uzyskane z użyciem algorytmu CDSSTR obarczone są najniższym odchyleniem standardowym NRMSD, natomiast dla algorytmu SELCON3 wartość ta jest najwyższa. Dane uzyskane dla mioglobiny, ferrytyny i transferyny, pochodzące ze wszystkich trzech algorytmów są podobne, natomiast dla cytochromu c różnica w zawartości struktur drugorzędowych oznaczonych trzema metodami jest obciążona najwyższym odchyleniem standardowym wahającym się pomiędzy 0,02-0,08.

Przebieg widm CD cytochromu c i N-Hcy-cytochromu c jest zbliżony. Bez względu na stężenie molowe HTL użytego do modyfikacji, linie widma CD charakteryzują się dwoma minimami przy około 208 i 222 nm, typowymi dla białek z przewagą helis α (Rysunek 20).

Na podstawie przebiegu widm CD w dalekim nadfiolecie, oznaczono udział poszczególnych typów konformacji głównego łańcucha polipeptydowego (Tabela 14, Rysunek 21).



Rysunek 20. Widmo dichroizmu kołowego cytochromu c w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

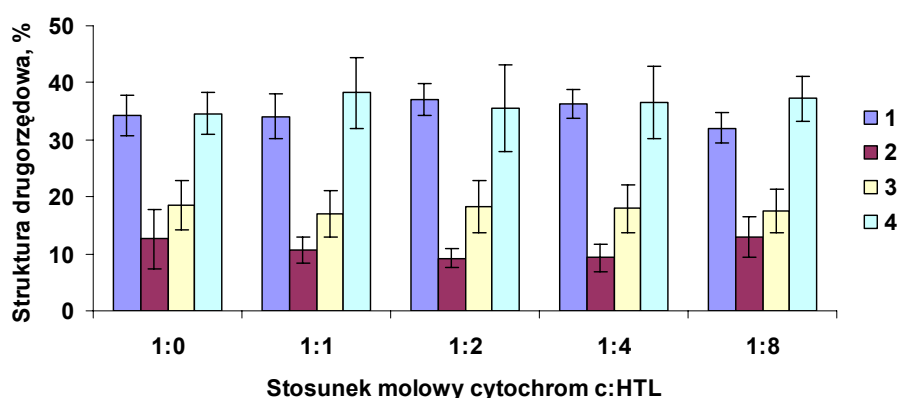
Wg bazy danych Swiss-Prot, w cytochromie c (P00004) 41,3% łańcucha polipeptydowego występuje w formie helisy α , 6,7% w postaci harmonijki β oraz 51,9% pętli. Zawartość helisy α w cytochromie c, obliczona na podstawie widm CD, jest nieco niższa i wynosi 34% dla białka natywnego. Najbliżej wyniku pochodzącego z bazy danych, jest wartość uzyskana przez CDSSTR. Również w przypadku harmonijki β wartość podawana przez CDSSTR jest najbliższa wartości z bazy danych. W pozostałych algorytmach jest ona zawyżona. Struktura pętli jest reprezentowana przez 51,9% długości łańcucha polipeptydowego, podczas gdy wynik analizy widm CD wskazuje, że jest to jedynie 19%. Ponad 35% łańcucha polipeptydowego zgodnie z danymi CD jest sklasyfikowana jako nieuporządkowana.

Podsumowując, metoda dichroizmu kołowego, nie wykazała istotnych statystycznie zmian w zawartości struktur drugorzędowych w cytochromie c zachodzących pod wpływem N-homocysteinyłacji (Rysunek 21).

Tabela 14. Zawartość struktur drugorzędowych cytochromu c obliczona z użyciem algorytmów SELCON3, CONTIN i CDSSTR

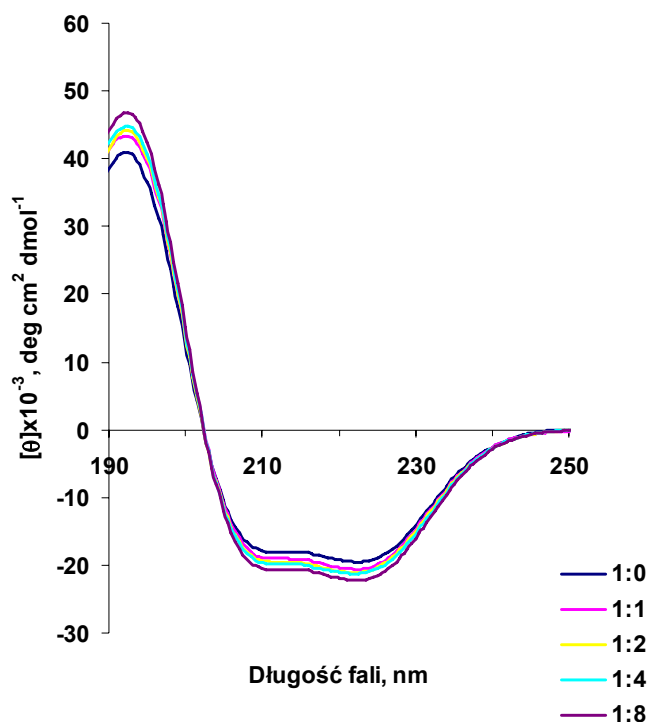
Cyt:HTL	Algorytm	1	2	3	4	NRMSD
1:0	CDSSTR	0,38	0,07	0,21	0,34	0,03
	SELCON3	0,34	0,14	0,21	0,31	0,15
	CONTIN	0,31	0,17	0,14	0,39	0,06
	Średnia	0,34	0,13	0,19	0,35	-
	SD	0,04	0,05	0,04	0,04	-
1:1	CDSSTR	0,38	0,08	0,18	0,36	0,04
	SELCON3	0,34	0,12	0,21	0,34	0,20
	CONTIN	0,30	0,12	0,13	0,45	0,08
	Średnia	0,34	0,11	0,17	0,38	-
	SD	0,04	0,02	0,04	0,06	-
1:2	CDSSTR	0,40	0,10	0,18	0,32	0,04
	SELCON3	0,37	0,10	0,23	0,30	0,18
	CONTIN	0,35	0,07	0,14	0,44	0,10
	Średnia	0,37	0,09	0,18	0,36	-
	SD	0,03	0,02	0,05	0,08	-
1:4	CDSSTR	0,39	0,07	0,19	0,35	0,02
	SELCON3	0,36	0,12	0,22	0,31	0,19
	CONTIN	0,34	0,09	0,13	0,43	0,07
	Średnia	0,36	0,09	0,18	0,37	-
	SD	0,02	0,02	0,04	0,06	-
1:8	CDSSTR	0,35	0,09	0,19	0,37	0,03
	SELCON3	0,31	0,14	0,20	0,34	0,21
	CONTIN	0,30	0,16	0,13	0,41	0,06
	Średnia	0,32	0,13	0,18	0,37	-
	SD	0,03	0,04	0,04	0,04	-

1 – helisa α , 2- harmonijka β , 3 – pętla, 4 – nieuporządkowane, SD – odchylenie standardowe, NRMSD – znormalizowane odchylenie standardowe



Rysunek 21. Zawartość procentowa struktur drugorzędowych cytochromu c w zależności od nadmiaru molowego HTL. 1-helisa α , 2-harminijka β , 3-pętla, 4-nieuporządkowane

W przypadku mioglobiny natywnej i zmodyfikowanej tiolaktonem homocysteiny o wzrastającym stężeniu, linie widm CD mają zbliżony kształt z pasmami ujemnej eliptyczności przy 208 i 222 nm oraz pasmem dodatniej eliptyczności przy 196 nm (Rysunek 22).



Rysunek 22. Widmo dichroizmu kołowego mioglobiny w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

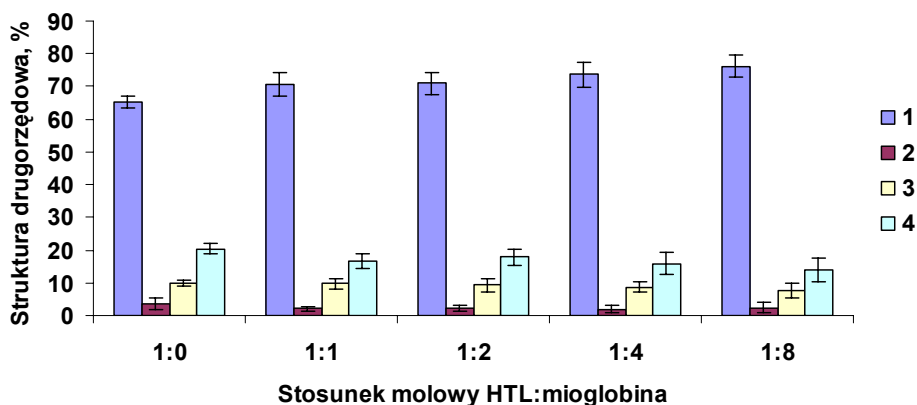
W miarę zwiększania nadmiaru molowego tiolaktonu homocysteiny, wzrasta nieznacznie intensywność pasm, co znajduje swoje odzwierciedlenie w przewidywanej zawartości struktur drugorzędowych mioglobiny (Rysunek 23, Tabela 15). Oszacowana zawartość helisy α jest zbliżona do zawartości pochodzącej z bazy danych Swiss-Prot (P68086). W bazie danych wynosi ona 74,5%, podczas gdy w eksperymencie dla białka natywnego 65%. Zawartość harmonijki β wynosi wg bazy danych około 2%, co jest w zgodzie z danymi eksperymentalnymi. Zawartość pętli wynosi około 10% zarówno w bazie danych jak i w eksperymencie.

Tabela 15. Zawartość struktur drugorzędowych mioglobiny obliczona z użyciem algorytmów SELCON3, CONTIN i CDSSTR

Mb:HTL	Algorytm	1	2	3	4	NRMSD
1:0	CDSSTR	0,67	0,04	0,09	0,19	0,01
	SELCON3	0,63	0,05	0,10	0,20	0,06
	CONTIN	0,65	0,02	0,11	0,22	0,02
	Średnia	0,65	0,04	0,10	0,20	-
	SD	0,02	0,02	0,01	0,02	-
1:1	CDSSTR	0,75	0,02	0,08	0,14	0,01
	SELCON3	0,68	0,03	0,10	0,18	0,06
	CONTIN	0,69	0,02	0,11	0,18	0,01
	Średnia	0,71	0,02	0,10	0,17	-
	SD	0,04	0,01	0,02	0,02	-
1:2	CDSSTR	0,75	0,03	0,07	0,15	0,01
	SELCON3	0,69	0,02	0,10	0,19	0,06
	CONTIN	0,69	0,01	0,11	0,20	0,02
	Średnia	0,71	0,02	0,09	0,18	-
	SD	0,04	0,01	0,02	0,03	-
1:4	CDSSTR	0,78	0,03	0,07	0,12	0,01
	SELCON3	0,71	0,02	0,09	0,19	0,06
	CONTIN	0,72	0,01	0,10	0,17	0,01
	Średnia	0,74	0,02	0,09	0,16	-
	SD	0,04	0,01	0,02	0,03	-
1:8	CDSSTR	0,80	0,04	0,06	0,10	0,01
	SELCON3	0,74	0,02	0,07	0,17	0,05
	CONTIN	0,74	0,01	0,10	0,15	0,02
	Średnia	0,76 (p=0,01)	0,02	0,08	0,14	-
	SD	0,03	0,02	0,02	0,04	-

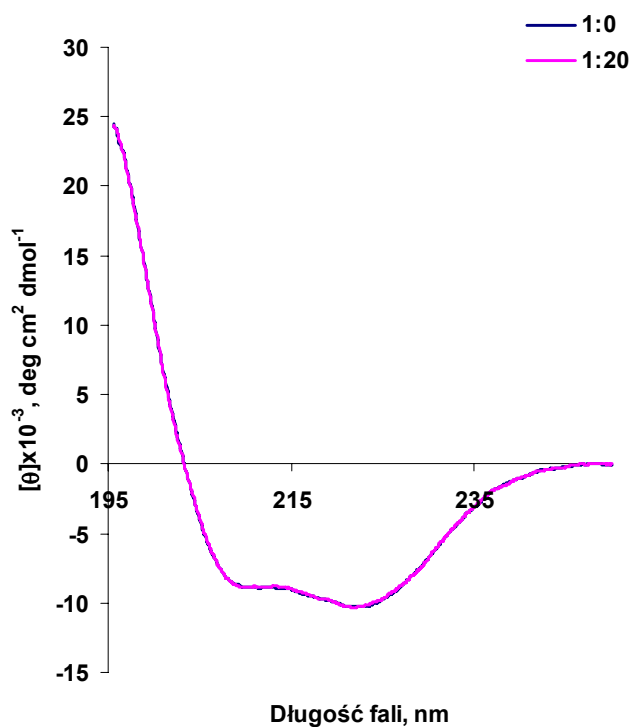
1 – helisa α , 2- harmonijka β , 3 – pętla, 4 – nieuporządkowane, SD – odchylenie standardowe, NRMSD – znormalizowane odchylenie standardowe

Analiza wariancji wykazała istotne różnice w zawartości helisy α w mioglobinie zmodyfikowanej wzrastającym stężeniem HTL ($p=0,02$). Test Tukeya wykazał, że za odrzucenie hipotezy zerowej jest odpowiedzialna wartość średnia mioglobiny zmodyfikowanej 8-krotnym nadmiarem HTL, która istotnie różni się od średniej charakteryzującej białko natywne ($p=0,01$). W miarę wzrostu stężenia HTL rośnie zawartość helisy α , jednak różnice te z wyjątkiem białka zmodyfikowanego 8-krotnym nadmiarem HTL, są nieistotne statystycznie (Rysunek 23).



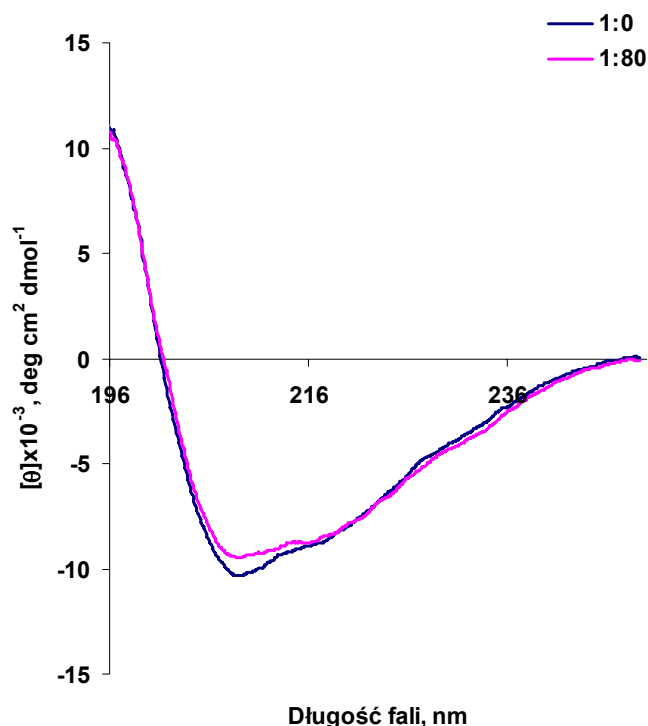
Rysunek 23. Zawartość procentowa struktur drugorzędowych mioglobiny w zależności od nadmiaru molowego HTL. 1-helisa α , 2-harminijka β , 3-pętla, 4-nieuporządkowane

Widma CD ferrytyny natywnej i N-homocysteinylowanej 20-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny nakładają się, co świadczy o braku zmian zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych.



Rysunek 24. Widmo dichroizmu kołowego ferrytyny w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

Kształt widma CD transferyny jest typowy dla białek z udziałem harmonijki β (Rysunek 25).



Rysunek 25. Widmo dichroizmu kołowego transferyny w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

Zgodnie z bazą danych Swiss-Prot (P02787) w N-końcowym płacie liczącym 331 aminokwasy helisa α stanowi 33,8% natomiast harmonijka β – 19,3%. Pozostałe 46,9% łańcucha polipeptydowego przybiera strukturę pętli. Podobnie jak w przypadku cytochromu c, dane pochodzące z algorytmu CDSSTR są najbliższe wartości z bazy danych (Tabela 16).

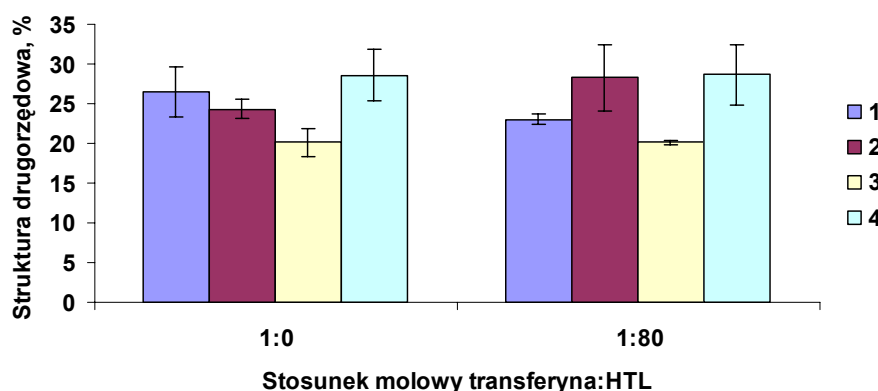
Tabela 16. Zawartość struktur drugorzędowych transferyny obliczona z użyciem algorytmów SELCON3, CONTIN i CDSSTR

Trf:HTL	Algorytm	1	2	3	4	NRMSD
1:0	CDSSTR	0,30	0,23	0,19	0,28	0,03
	SELCON3	0,25	0,25	0,22	0,26	0,11
	CONTIN	0,24	0,25	0,19	0,32	0,07
	Średnia	0,26	0,24	0,20	0,29	-
	SD	0,03	0,01	0,02	0,03	-
1:80	CDSSTR	0,23	0,28	0,20	0,29	0,03
	SELCON3	0,22	0,33	0,21	0,25	0,09
	CONTIN	0,24	0,24	0,20	0,32	0,05
	Średnia	0,23	0,28	0,20	0,29	-
	SD	0,01	0,04	0,00	0,04	-

1 – helisa α , 2- harmonijka β , 3 – pętla, 4 – nieuporządkowane, SD – odchylenie standardowe, NRMSD – znormalizowane odchylenie standardowe

Analiza widm transferyny natywnej i zmodyfikowanej 80-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny, wskazuje na brak istotnych

statystycznie różnic w zawartości elementów struktury drugorzędowej (Rysunek 26).



Rysunek 26. Zawartość procentowa struktur drugorzędowych transferyny w zależności od nadmiaru molowego HTL. 1-helisa α , 2-harminijka β , 3-pętla, 4-nieuporządkowane

Podsumowując, dane pochodzące z pomiarów eliptyczności N-Hcy-białek w dalekim nadfiolecie, wskazują na nieznaczne lub brak zmian w konformacji głównego łańcucha polipeptydowego powodowanych N-homocysteinylacją.

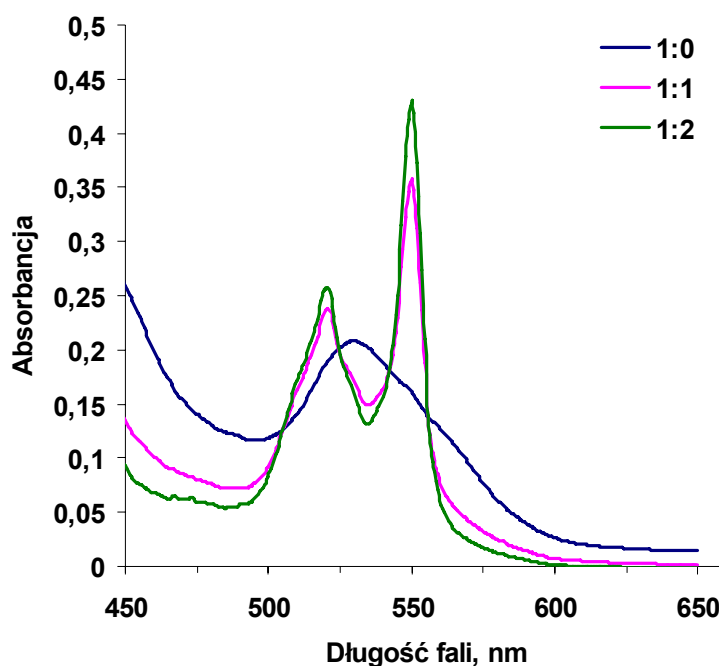
4.4 Wpływ N-homocysteinylacji na stan redoks żelaza hemu

N-homocysteinylacja białka powoduje pojawienie się dodatkowych grup tiolowych, które mogą ulegać reakcjom utlenienia-redukcji. Utlenianie tioli jest katalizowane przez jony metali przejściowych, głównie przez jony żelaza i miedzi. Jony żelaza wchodzą w skład m. in. białek hemowych, gdzie pełnią ważną funkcję przyjmowania elektronów, czy wiązania ligandów.

4.4.1 Cytochrom c

Spektrum absorpcji cytochromu c, w zakresie widzialnym jest czułe na koordynację, stan spinowy oraz stopień utlenienia atomu żelaza w pierścieniu porfirynowym. Charakteryzuje się występowaniem pasma Soreta i Q [155]. Intensywność i pozycje tych pasm mogą się zmieniać w zależności od warunków fizyko-chemicznych, jako wynik zmian w kompozycji ligandów aksjalnych żelaza hemu [120]. Aksjalna koordynacja ma wpływ na spektrum absorpcji białek hemowych [156, 157]. Dla ferocytochromu c w obrębie pasma Q charakterystyczne są dwa maksima absorpcji: przy około 520 nm i 550 nm, natomiast dla ferricytochromu c typowe jest jedno szerokie pasmo z maksimum przy około 530 nm. Widmo absorpcji

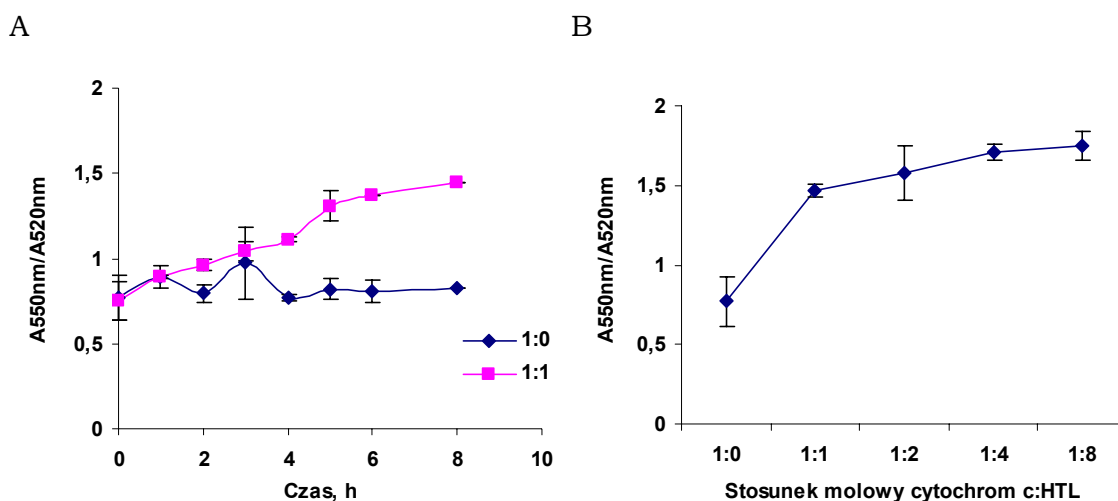
cytochromu c inkubowanego z rosnącym nadmiarem molowym HTL świadczy o redukcji żelaza hemu (Rysunek 27).



Rysunek 27. Widmo absorpcyjne cytochromu c w regionie widzialnym. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

Przed modyfikacją białko znajduje się w formie utlenionej. Inkubacja już z ekwimolarnym stężeniem HTL powoduje redukcję żelaza hemu, o czym świadczy pojawienie się pasm absorpcji przy 520 i 550 nm. Stosunek A_{550}/A_{520} , będący wskaźnikiem redukcji, rośnie z czasem inkubacji białka z HTL oraz ze wzrostem stężenia HTL użytego do modyfikacji (Rysunek 28).

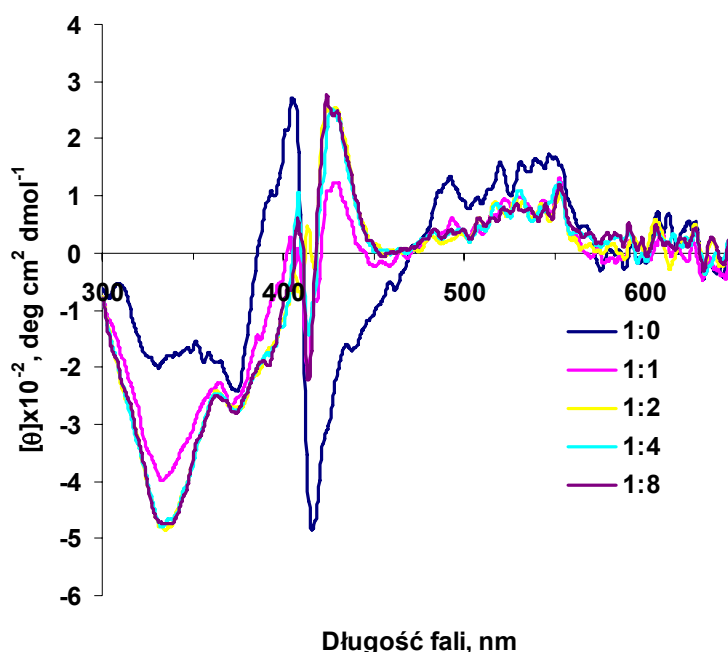
W celu wykazania, że redukcja cytochromu c może zachodzić pod wpływem Hcy przyłączonej do białka wiązaniem amidowych, N-Hcy-cytochrom c inkubowałam z N-Hcy-albuminą (Rozdział 3.13). Po 24 h inkubacji z N-Hcy-albuminą stosunek A_{550}/A_{520} cytochromu c wynosił 1,04, a po 77 h wzrósł do 1,2. Stosunek A_{550}/A_{520} cytochromu c inkubowanego bez dodatków oraz z albuminą nie uległ zmianie w czasie i wynosił odpowiednio 0,88 i 0,94.



Rysunek 28. Zależność stosunku A550/A520 od czasu modyfikacji cytochromu c inkubowanego z HTL w stosunku molowym 1:1 i bez dodatku HTL (1:0) [A] oraz od nadmiaru molowego HTL [B]. Dane są średnią z trzech eksperymentów \pm odchylenie standardowe

O redukcji żelaza hemu zachodzącej podczas N-homocysteinyłacji świadczy też widmo CD w regionie Soreta (Rozdział 3.14). W tym zakresie długości fali widoczne są istotne różnice w położeniu i intensywności pasm eliptyczności zachodzące pod wpływem inkubacji z HTL. Można zatem wnioskować o znaczących zmianach w interakcji hem – łańcuch polipeptydowy w porównaniu z natywnym cytochromem c (Rysunek 29).

Widmo CD cytochromu c w regionie Soreta charakteryzuje się pasmem dodatniej eliptyczności o maksimum przy około 404 nm oraz silnie negatywnym pasmem przy około 415 nm. Jest to widmo typowe dla ferricytochromu c. Pod wpływem N-homocysteinyłacji zmniejsza się intensywność pasma dodatniego i przesuwa się ono w kierunku fal dłuższych, do około 408 nm. Pasma negatywne również zmniejsza swoją intensywność. Pojawia się natomiast silnie dodatnie pasmo z maksimum przy około 423 nm oraz negatywne pasmo przy około 330 nm, cechy charakterystyczne dla widma CD zredukowanego cytochromu c. Dalsze zwiększanie stężenia HTL (4 i 8-krotny nadmiar molowy) użytego do modyfikacji nie powoduje już różnicy w widmie CD w porównaniu do 2-krotnego nadmiaru.

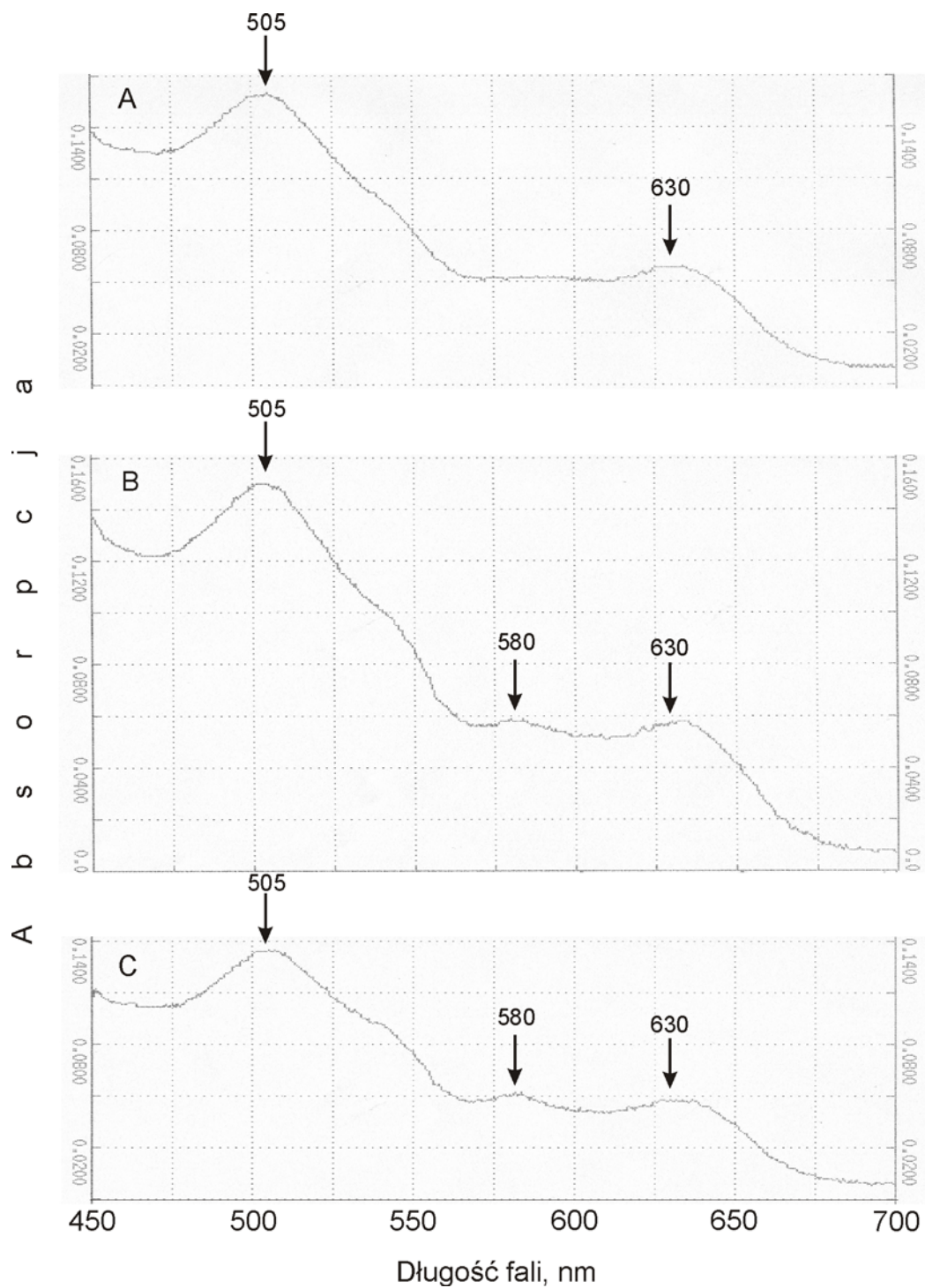


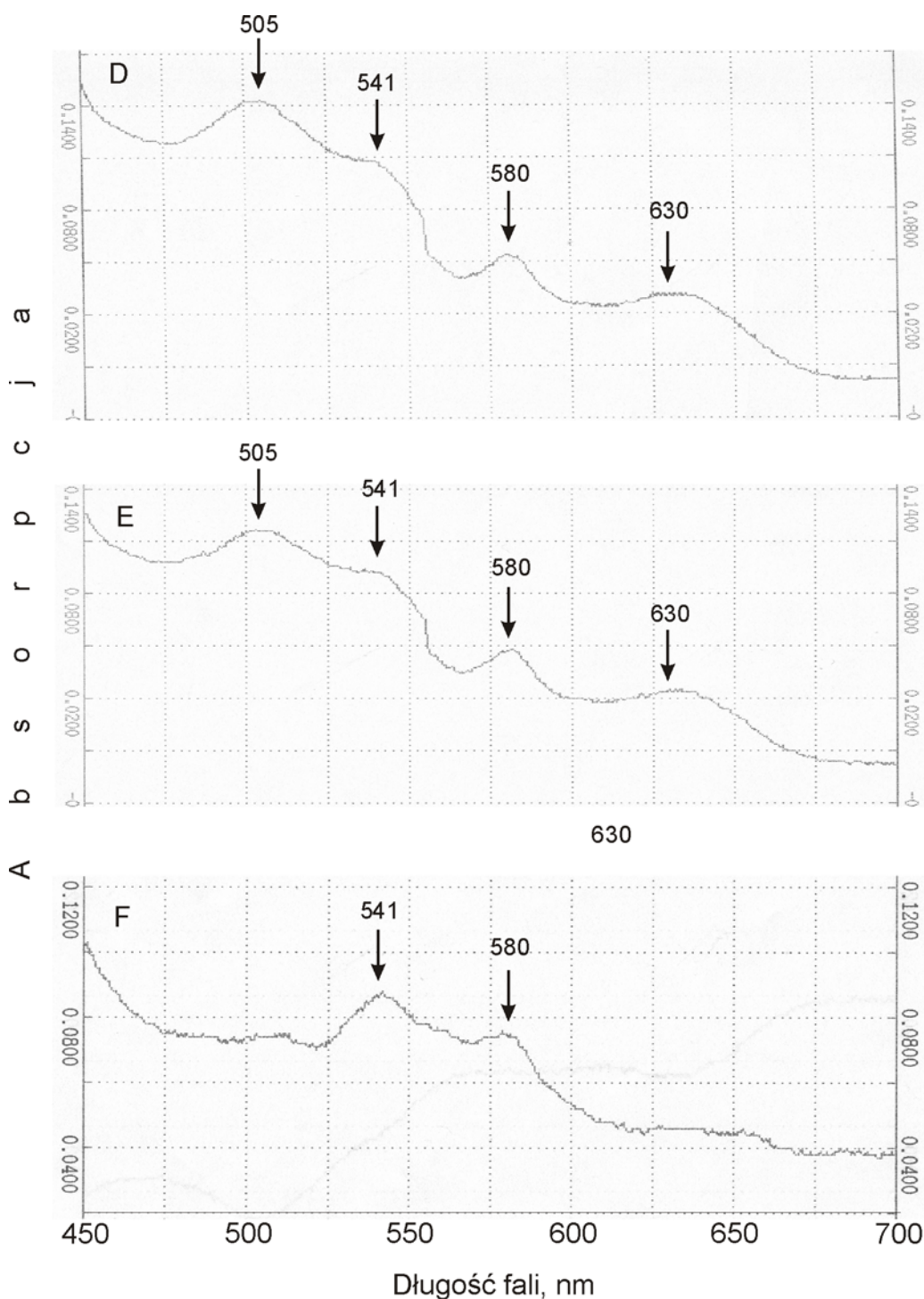
Rysunek 29. Widmo dichroizmu kołowego cytochromu c w regionie Soreta i widzialnym. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

4.4.2 Mioglobina

Mioglobina jest białkiem hemowym, odpowiedzialnym za magazynowanie tlenu w mięśniach. Swoją funkcję pełni dzięki grupie prostetycznej, a w szczególności jonowi żelaza, które wiąże tlen i inne ligandy. Zdolność do wiązania ligandów jest zależna od stopnia utlenienia żelaza. Stopień utlenienia żelaza mioglobiny można określić na podstawie widma absorpcji. Widmo absorpcji mioglobiny natywnej i zmodyfikowanej ekwimolarnym stężeniem HTL w regionie Soreta charakteryzuje się występowaniem pasma z maksimum przy długości fali 409 nm. Delikatne przesunięcie tego maksimum (do 410,7 nm) ma miejsce w mioglobinie zmodyfikowanej 8-krotnym nadmiarem molowym HTL. Widmo absorpcji mioglobiny natywnej jest widmem typowym dla metmioglobiny (Mb^{III}) i charakteryzuje się występowaniem pasma z maksimum przy około 505 nm i 630 nm (Rysunek 30A). W tej formie żelazo występuje w stanie utlenionym a szósta pozycja koordynacyjna jest obsadzona przez cząsteczkę wody (tzw. żelazo 6-koordynacyjne, stan wysokospinowy). W widmie absorpcji mioglobiny zmodyfikowanej tiolaktonem homocysteiny w stosunku molowym 1:1 pasmo z maksimum przy około 505 nm nie zmienia się (Rysunek 30B). Zaczyna się

natomiast pojawiać pasmo z maksimum przy około 580 nm. Jego intensywność wzrasta wraz ze wzrostem nadmiaru molowego HTL użytego do modyfikacji (Rysunek 30C-F). Przy stosunku molowym mioglobina:HTL 1:4 pojawia się pasmo z maksimum przy długości fali około 541 nm (Rysunek 30D). Obecność pasm o maksimach przy około 505, 541, 580 i 630 nm w mioglobinie zmodyfikowanej od 1- do 8-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny wskazuje na występowanie mieszaniny metmioglobiny i oksymioglobiny. W widmie absorpcji mioglobiny zmodyfikowanej 25-krotnym nadmiarem molowym HTL nie obserwuje się pasm charakterystycznych dla metmioglobiny (505 i 630 nm) (Rysunek 30F). Występują w nim natomiast pasma typowe dla oksymioglobiny ($\text{Mb}^{\text{II}}\text{O}_2$) z maksimum przy około 541 i 580 nm. W tej formie mioglobiny żelazo występuje w stanie zredukowanym, a szósta pozycja koordynacyjna jest obsadzona przez cząsteczkę tlenu.

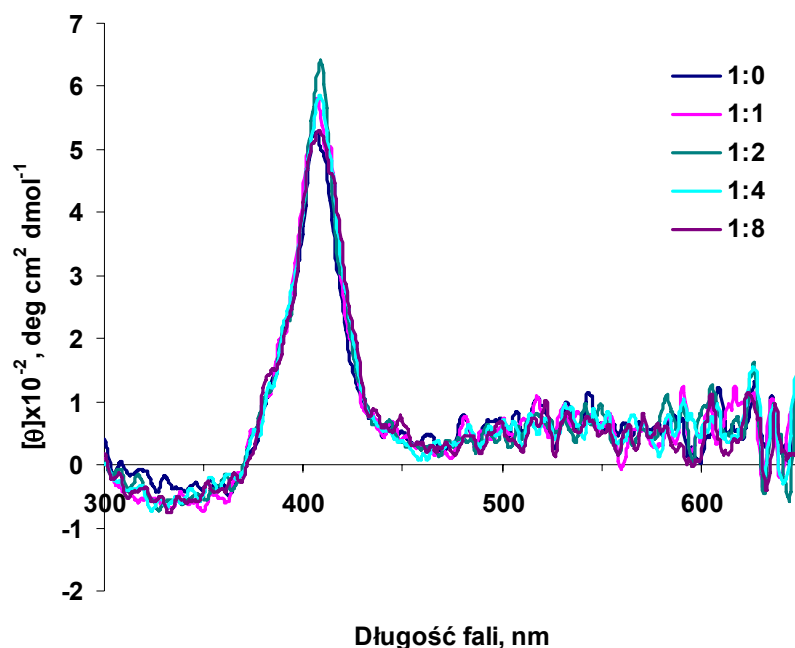




Rysunek 30. Wpływ modyfikacji tiolaktonem homocysteiny (HTL) na widmo absorpcji mioglobiny (Mb) w regionie widzialnym. Warunki pomiaru: 10 mM bufor fosforanowy, pH 7,4, stężenie mioglobiny 29,5 μ M. Stosunek molowy Mb:HTL podczas modyfikacji wynosił: A - 1:0, B - 1:1, C - 1:2, D - 1:4, E - 1:8, F - 1:25

Maksimum absorpcji mioglobiny natywnej i zmodyfikowanej tiolaktonem homocysteiny w regionie Soreta występuje przy 409 nm, jednak intensywność absorpcji jest znacznie wyższa w białkach zmodyfikowanych HTL. Widma CD w regionie dalekiego UV mioglobiny natywnej i

zmodyfikowanej HTL są podobne, co wskazuje na brak zmian w konformacji białka. Widma CD w regionie Soreta (Rysunek 31) również mają zbliżony przebieg, z maksimum pasma przy ok. 407 (1:0, 1:1, 1:8) nm lub 409 nm (1:2, 1:4).



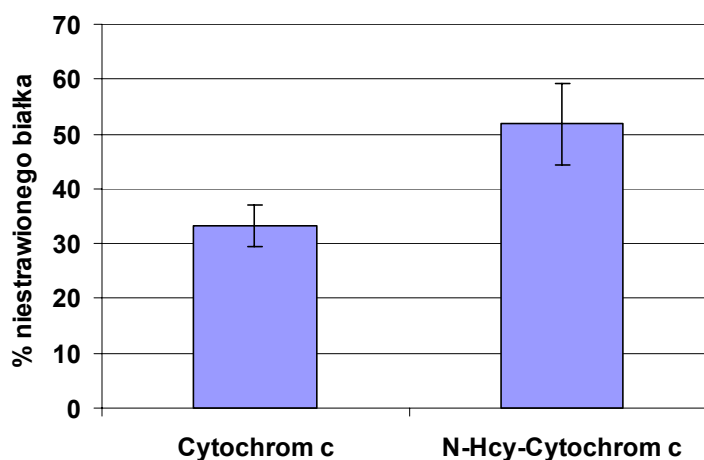
Rysunek 31. Widmo dichroizmu kołowego mioglobiny w regionie Soreta i widzialnym. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji

4.5 Podatność N-Hcy-cytochromu c na proteolizę

Zmiany strukturalne spowodowane przez N-homocysteinylację mogą wpływać na proteolityczną wymianę białek. Częsteczka uszkodzonego białka powinna być degradowana szybciej niż białko niezmienione, ale z drugiej strony modyfikacja może uniemożliwiać proteolizę, czego skutkiem byłyby akumulacja uszkodzonych białek w organizmie.

Aby uzyskać odpowiedź na pytanie, czy N-homocysteinylacja zmienia podatność na proteolizę, przeprowadzono trawienie cytochromu c trypsyną (3.15). Przed trawieniem cytochrom c zmodyfikowano tiolaktonem homocysteiny o stężeniu równym stężeniu reszt lizynowych w białku. Liczba reszt lizyny w cytochromie c zawarta jest w tabeli (Tabela 8). Po modyfikacji oznaczono liczbę przyłączonych reszt Hcy do białka metodą MALDI/TOF. Po modyfikacji 19-krotnym nadmiarem molowym HTL, otrzymano mieszaninę cząsteczek cytochromu c N-homocysteinylowanych w różnym stopniu; z 1

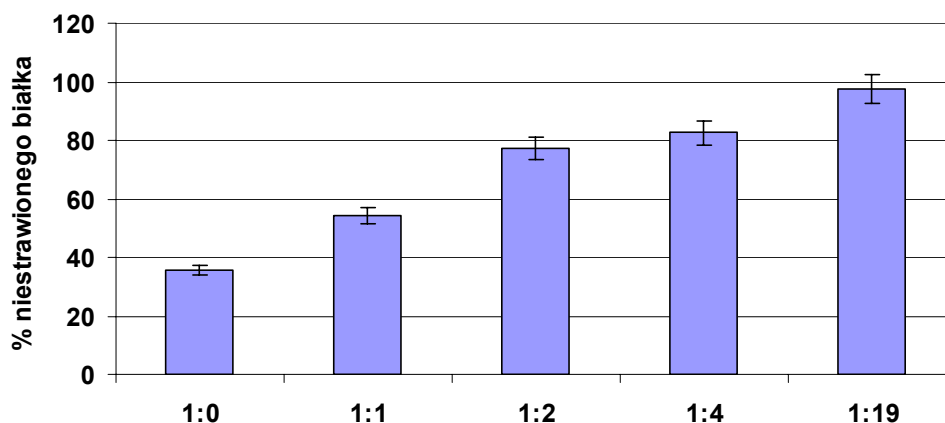
do 12 zmodyfikowanymi resztami lizyny. N-Hcy-białko poddano trawieniu trypsyną przez 6 h i oznaczono procent białka niestrawionych (Rysunek 32).



Rysunek 32. Podatność cytochromu c na proteolizę trypsyną. Dane są średnią z 3 eksperymentów \pm odchylenie standardowe. N-Hcy-białko zmodyfikowane zostało ekwimolarnym stężeniem HTL w stosunku do stężenia reszt lizyny

Obserwuje się istotną statystycznie różnicę w podatności N-Hcy-białka na proteolizę w stosunku do niezmodyfikowanego odpowiednika. Natywny cytochrom c jest trawiony szybciej ($p=0,018$).

Dodatkowo trawieniu trypsyną poddano cytochrom c zmodyfikowany 1-, 2-, 4- i 19-krotnym nadmiarem molowym HTL. Po modyfikacji oznaczono liczbę przyłączonych reszt Hcy do białka metodą MALDI/TOF. Cytochrom c zmodyfikowany ekwimolarnym stężeniem HTL jest mieszaniną cząsteczek z przyłączonymi od 1 do 4 reszt homocysteiny. Inkubacja tego samego białka z 2-krotnym nadmiarem HTL powoduje przyłączenie od 1 do 6 reszt homocysteiny na cząsteczkę cytochromu c, natomiast 4- i 8-krotny nadmiar czynnika modyfikującego skutkuje w od 1 do 10 zmodyfikowanych reszt lizyny. Po 1 godzinnym trawieniu tak zmodyfikowanych cytochromów c trypsyną oznaczono procent niestrawionego białka (Rysunek 33).



Rysunek 33. Wpływ stopnia modyfikacji cytochromu c tiolaktonem homocysteiny na podatność na trawienie trypsyną. Podano nadmiar molowy HTL podczas modyfikacji

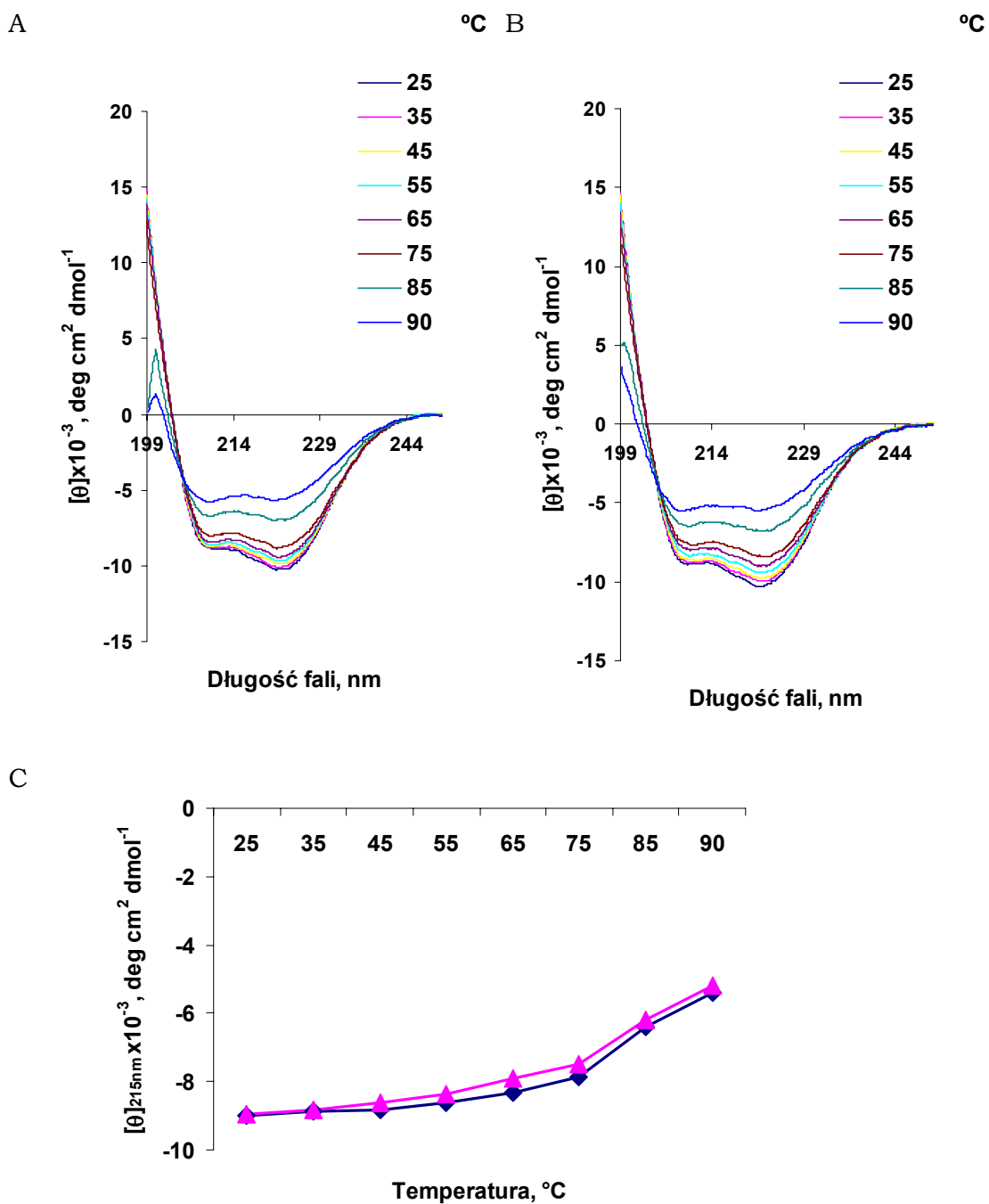
Wraz ze wzrostem liczby zmodyfikowanych reszt lizyny spada podatność cytochromu c na trawienie trypsyną.

4.6 Stabilność termiczna N-Hcy-białek

W celu określenia szkodliwości danej modyfikacji dla struktury białka przeprowadza się pomiary stabilności zmienionego wariantu cząsteczki w obecności czynników stresowych i porównuje ze stabilnością białka natywnego. Czynnikiem stresowym może być np. temperatura, pH, czy obecność czynnika denaturującego. Dla oszacowania wpływu N-homocysteinyłacji na stabilność ferrytyny i transferyny przeprowadziłam pomiary widm CD w podwyższonej temperaturze (Rozdział 3.14).

4.6.1 Ferrytyna

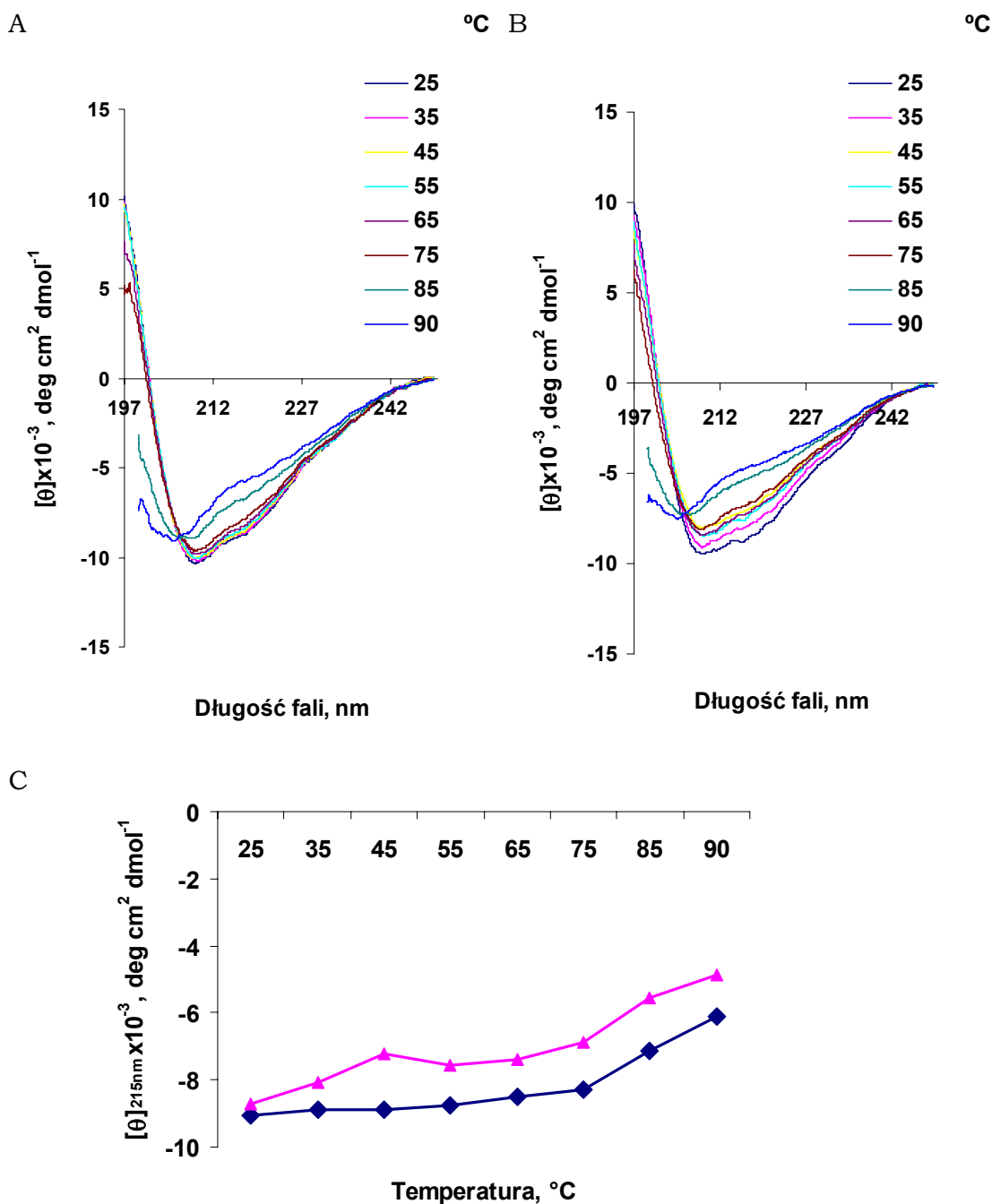
Widma CD ferrytyny natywnej i zmodyfikowanej 20-krotnym nadmiarem molowym HTL w zakresie dalekiego nadfioletu są zbliżone (Rysunek 34A,B). Oba białka podobnie reagują na podwyższoną temperaturę, co w szczególności widać na wykresach przedstawiających zależność eliptyczności przy 215 nm od temperatury (Rysunek 34C). Zależność ta jest wskaźnikiem stopnia rozfałdowania białka. W temperaturze 25-75°C następuje powolne rozfałdowywanie łańcucha polipeptydowego zarówno ferrytyny jak i N-Hcy-ferrytyny. Powyżej 75°C ma miejsce gwałtowne, dalsze rozfałdowanie.



Rysunek 34. Wpływ temperatury na strukturę drugorzędową ferrytyny (A) i N-Hcy-ferrytyny śledziona konia (B). Stabilność termiczna N-Hcy-ferrytyny (▲) nie różni się zasadniczo od stabilności ferrytyny (◆) (C)

4.6.2 Transferyna

Wyniki pomiaru stabilności termicznej transferyny wskazują, że jest ona stabilna w temperaturze do 65°C (Rysunek 35A,B).



Rysunek 35. Wpływ temperatury na strukturę drugorzędową transferyny (A) i N-Hcy-transferyny (B). Rozplątanie łańcucha polipeptydowego N-Hcy-transferyny (▲) rozpoczyna się w niższej temperaturze i przebiega gwałtowniej niż transferyny (◆) (C)

W przedziale 25-65°C widma są bardzo zbliżone, co wskazuje na brak znacznych zmian w konformacji łańcucha polipeptydowego. Znaczne rozfałdowanie ma miejsce dopiero w temperaturze 75°C i postępuje wraz ze wzrostem temperatury do 90°C. W przypadku białka zmodyfikowanego 80-krotnym nadmiarem HTL widma wyglądają podobnie z tą różnicą, że zauważalne są zmiany w strukturze w niższych temperaturach. Widoczne

jest to szczególnie na wykresie przedstawiającym zależność eliptyczności przy 215 nm od temperatury (Rysunek 35C), gdzie dla białka zdenaturowanego widoczne są dwa przejścia między 35 a 45°C oraz między 75 a 85°C.

Przeprowadzono również pomiary widm CD po obniżeniu temperatury do 25°C; wynik w zgodzie z danymi literaturowymi wskazuje, że rozfałdowanie jest procesem nieodwracalnym.

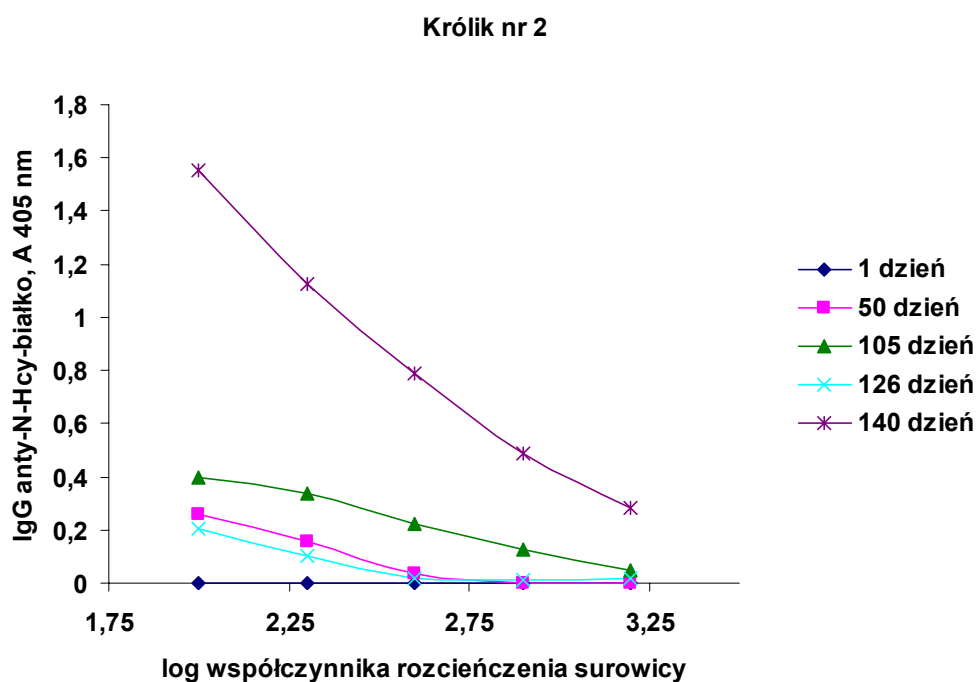
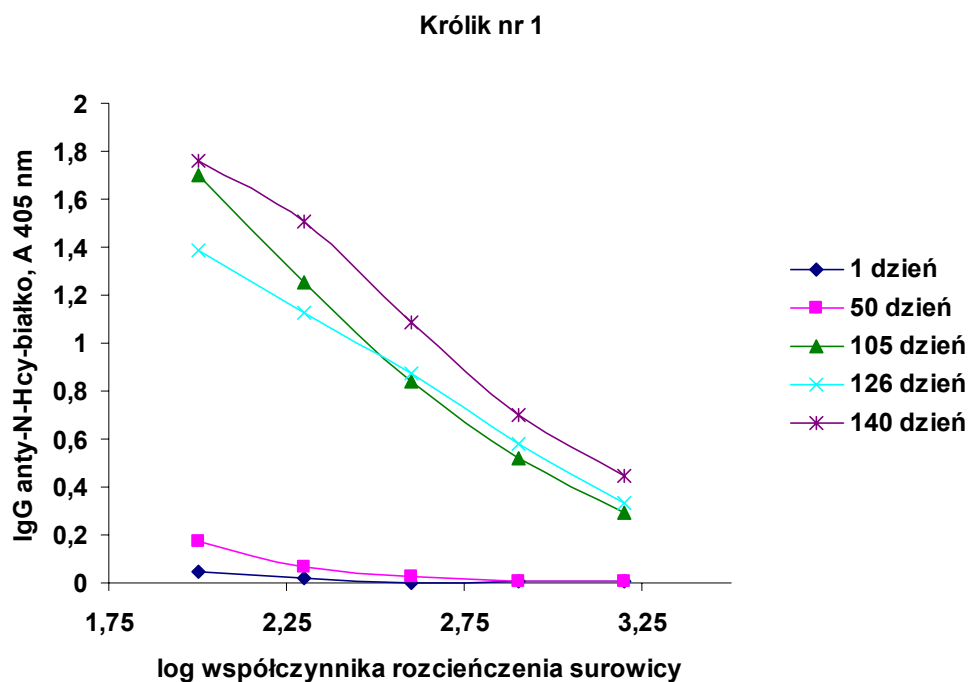
4.7 Immunogenność N-homocysteinylowanych białek

N-homocysteinyłacja powoduje pojawienie się na białku epitopu, który jest rozpoznawany przez specyficzne przeciwciała [75]. Ferguson i wsp. [96] oraz Undas i wsp. [101] wykazali obecność przeciwciał anty-N-Hcy-białko w surowicy królików immunizowanych N-Hcy-białkami. Dotychczas nie była znana metoda oczyszczania przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek. Nie wykazano również ich użyteczności do detekcji N-Hcy-białek zmodyfikowanych w różnym stopniu.

Istotne stało się zatem uzyskanie przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinylowanych białek, wykazanie ich specyficzności, opracowanie metody oczyszczania oraz wykorzystanie ich jako narzędzie do detekcji N-Hcy-białek.

4.7.1 Produkcja przeciwciał anty-N-Hcy-białko

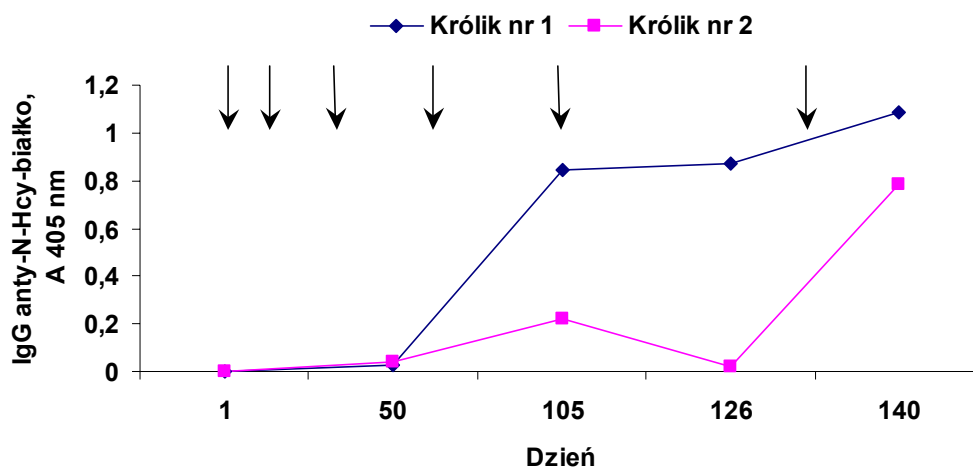
W celu uzyskania przeciwciał skierowanych przeciwko N-Hcy-białkom, immunizowano dwa króliki rasy kalifornijskiej białej N-Hcy-KLH (Rozdział 3.6). Na podanie antygeny króliki odpowiedziały produkcją przeciwciał, jednakże profil odpowiedzi obu zwierząt znacznie się różni. Poziom przeciwciał w surowicy królika nr 1 pozostał na niskim poziomie po 3 iniekcjach N-Hcy-KLH, znacząco wzrósł po 4 iniekcji antygeny i utrzymał się na względnie stałym poziomie do końca trwania eksperymentu. (Rysunek 36).



Rysunek 36. Krzywe rozcieńczeń surowicy królików nr 1 i 2. W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-albumina. Niespecyficzne wiązanie, z Hcy-Lys jako kompetytorem, zostało odjęte od wiązania w obecności Lys

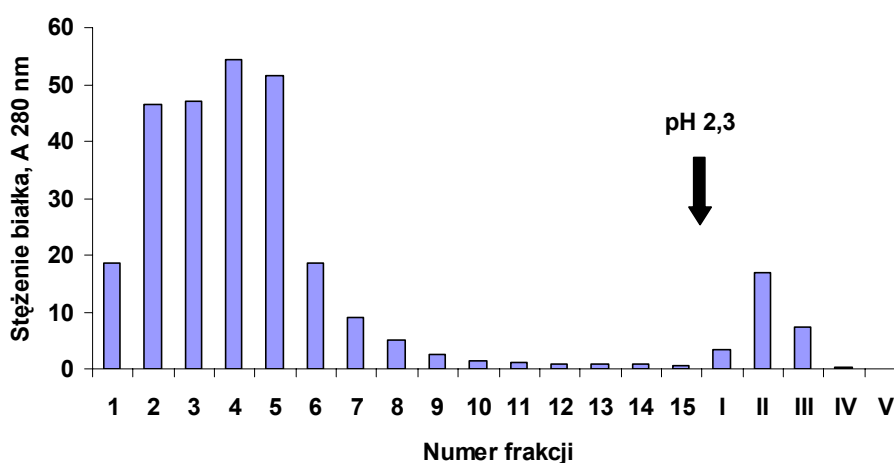
Królik nr 2 natomiast zareagował gwałtowną produkcją przeciwciał dopiero po 6 immunizacji N-Hcy-KLH, kiedy to poziom jego immunoglobulin zbliżył się do poziomu IgG w surowicy królika nr 1.

Produkcja specyficznych IgG obydwu królików w odpowiedzi na kolejne dawki antygeny przedstawiona jest na wykresie (Rysunek 37).



Rysunek 37. Porównanie odpowiedzi immunologicznej królika nr 1 i 2 na immunizację N-Hcy-KLH (strzałki oznaczają podanie antygeny). W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-albumina. Niespecyficzne wiązanie w obecności Hcy-Lys jako kompetytora zostało odjęte od wiązania w obecności Lys

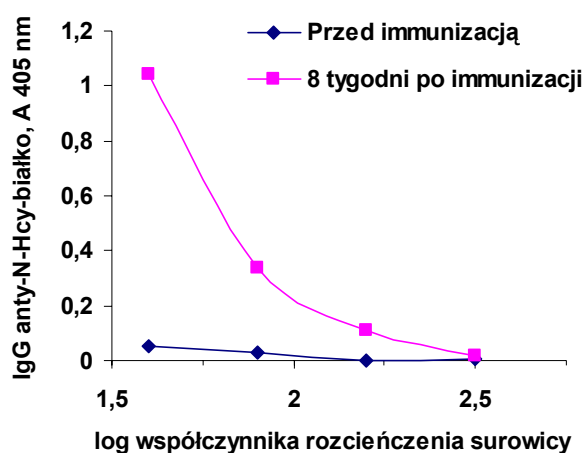
Do identyfikacji N-Hcy-białek wykorzystano przeciwciała wyizolowane metodą chromatografii powinowactwa do białka A. Reprezentatywny profil elucji białek z kolumny przedstawiono na wykresie (Rysunek 38).



Rysunek 38. Izolacja przeciwciał z 4 ml surowicy królika nr 1 pobranej w 126 dniu immunizacji. Frakcje I-V zawierają IgG

4.7.2 Oczyszczanie IgG specyficznych względem N-Hcy-białka

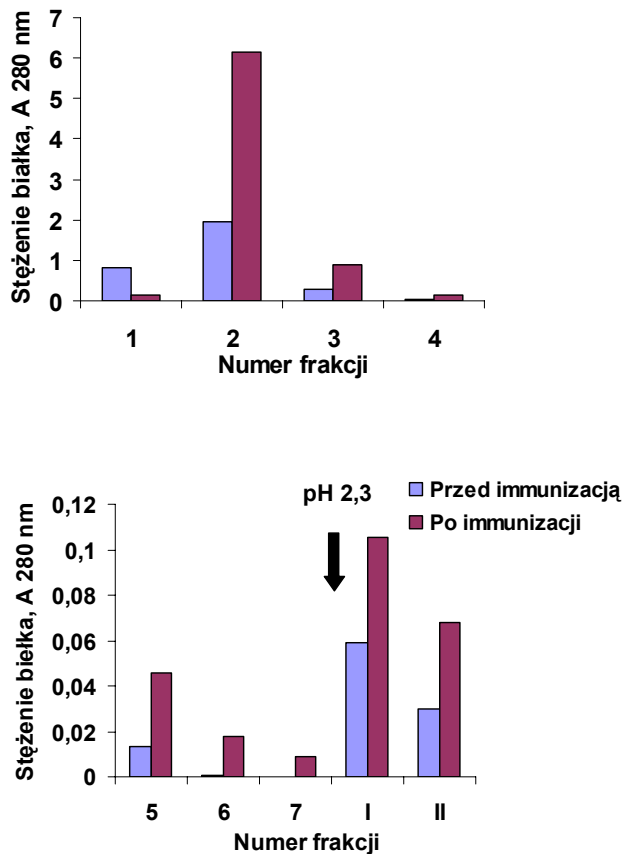
Materiałem do izolacji była, dostarczona przez prof. H. Jakubowskiego, surowica królika immunizowanego N-Hcy-KLH oraz kontrolnie surowica zwierzęcia przed immunizacją. W pierwszym etapie techniką rezonansu plazmonów powierzchniowych (Rozdział 3.12) wykazałam, że po 8 tygodniach od podania antygeny, w surowicy królika znajduje się około 2-krotnie więcej immunoglobulin klasy G niż przed immunizacją. Frakcja przeciwciał specyficznych względem N-Hcy-albuminy jest natomiast około 20-krotnie wyższa po 8 tygodniach od immunizacji, jak wskazują wyniki eksperymentów ELISA (Rysunek 39).



Rysunek 39. Krzywe rozcieńczeń surowicy królika przed i po immunizacji N-Hcy-KLH. W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-albumina. Niespecyficzne wiązanie, z IAA-N-Hcy-albuminą jako antygenem, zostało odjęte od wiązania z N-Hcy-albuminą

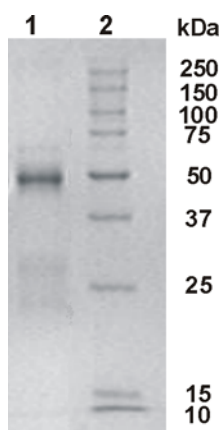
W celu izolacji IgG z 1 ml surowicy królika immunizowanego N-Hcy-KLH wykonano chromatografię powinowactwa na kolumnie białko A-agaroz, jak opisano w rozdziale 3.8.1. Frakcję przeciwciał wyizolowano również z 1 ml surowicy zwierzęcia przed immunizacją. Kolejnym etapem było oczyszczenie przeciwciał specyficznie rozpoznających epitop N-Hcy-Lys. Wymagane było uzyskanie podłoża, które selektywnie wiązałyby IgG anty-N-Hcy-białko. Podłoże takie powinno zawierać epitopy, identyczne lub podobne do tych obecnych na N-homocysteinyłowanych białkach. Wymóg taki spełnia N ω -Hcy-aminoheksylo-agaroz. Kolumnę tę przygotowano wg opisu w rozdziale 3.8.2. Stopień modyfikacji kolumny wyniósł 7,38 μ mol Hcy wprowadzonej na ml upakowanego żelu.

Po nałożeniu puli IgG pochodzących z surowicy królika immunizowanego, niewielka część IgG zatrzymała się na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozie i została wmyta buforem o pH 2,3 (Rysunek 40).



Rysunek 40. Chromatografia króliczych IgG na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarosie

Aby potwierdzić czystość preparatu przeciwciał anti-N-Hcy-białko, frakcję immunoglobulin wmytych z N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozy poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu (Rozdział 3.7). W żelu widoczne są łańcuchy ciężkie (ok. 50 kDa) i lekkie (ok. 25 kDa) IgG (Rysunek 41), co potwierdza czystość preparatu przeciwciał.



Rysunek 41. Obraz elektroforezy w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących:

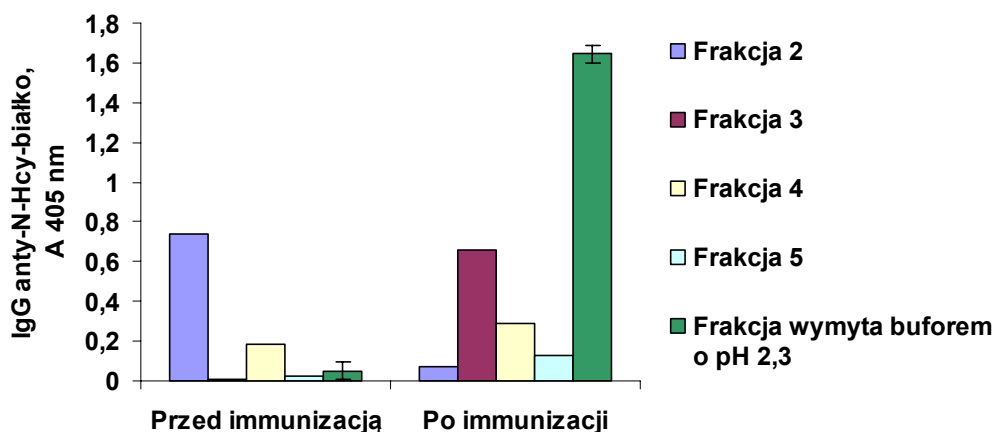
1 - przeciwciało anti-N-Hcy-białko królika oczyszczone na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozie, 2 - standardy masy cząsteczkowej białka (Bio-Rad)

Kolejnym etapem było określenie aktywności immunoglobulin zatrzymanych na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozie oraz IgG niezwiązanych do kolumny. Jak widać na profilu chromatografii (Rysunek 40), jedynie niewielka frakcja IgG surowicy zwierzęcia immunizowanego zatrzymuje się na kolumnie i jest wymyta buforem o niskim pH. Frakcja ta zawiera jednak większość aktywności przeciwciała anti-N-Hcy-białko. Frakcja IgG niezwiązanych do kolumny zawiera większość białka, jednak znacznie mniej aktywności przeciwciała anti-N-Hcy-hemoglobina.

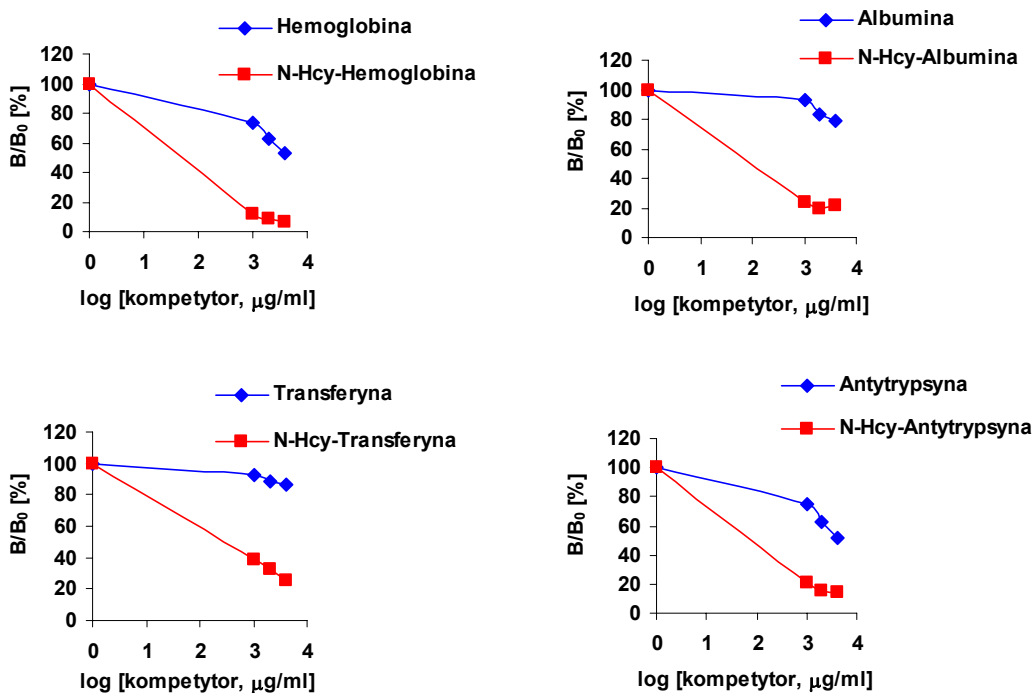
Dla porównania z puli IgG surowicy królika nieimmunizowanego jedynie bardzo mała frakcja przeciwciał o aktywności anti-N-Hcy-białko związała się do N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozy. Frakcja niezatrzymana na kolumnie zawiera większość białka i większość aktywności przeciwciała (Rysunek 42).

Na podstawie opisanych wyników można wnioskować, że przeciwciała anti-N-Hcy-białko, obecne w surowicy zwierzęcia immunizowanego N-Hcy-KLH, mają specyficzne powinowactwo do N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozy.

Specyficzność przeciwciał anti-N-Hcy-białko, zatrzymanych na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozie, została potwierdzona konkurencyjnym testem ELISA (Rozdział 3.9). Kompetitorami w tych eksperymentach są N-Hcy-hemoglobina, N-Hcy-albumina, N-Hcy-transferyna i N-Hcy-antytrypsyna oraz ich natywne odpowiedniki. Każde z N-homocysteinyłowanych białek jest dobrym kompetytorem wiązania przeciwciał do antygeny, N-Hcy-hemoglobiny. Białka niezmodyfikowane nie są kompetitorami (albumina, transferyna) lub są słabymi kompetitorami (hemoglobina, antytrypsyna), ponad 100-krotnie słabszymi niż N-Hcy-białko (Rysunek 43).



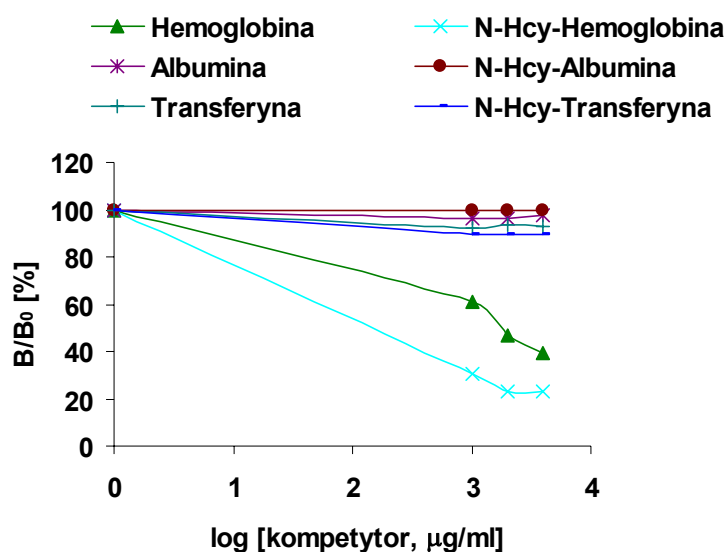
Rysunek 42. Aktywność przeciwciał specyficznych względem N-Hcy-białka IgG niezwiązanych, frakcje 2-5, i związanych IgG wmytych buforem o niskim pH (połączone frakcje I i II). W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-hemoglobina. Niespecyficzne wiązanie, z hemoglobina jako antygenem, zostało odjęte od wiązania z N-Hcy-hemoglobina



Rysunek 43. Specyficzność przeciwciał anty-N-Hcy-białko oczyszczonych na Nω-Hcy-aminoheksylo-agarozie. Wyniki przedstawiono jako B/B₀, gdzie B – ilość IgG związanych do N-Hcy-hemoglobiny w obecności konkpetytora, B₀ – ilość IgG związanych bez konkpetytora

Podobne eksperymenty przeprowadzono również z frakcją niezatrzymaną na kolumnie. Albumina i transferyna zmodyfikowane HTL i natywne nie są konkpetytorami wiązania IgG do N-Hcy-hemoglobiny. Zarówno N-Hcy-

hemoglobina, jak i natywna hemoglobina są kompetytorami, przy czym N-Hcy-białko jest 10-krotnie silniejszym niż natywne (Rysunek 44).



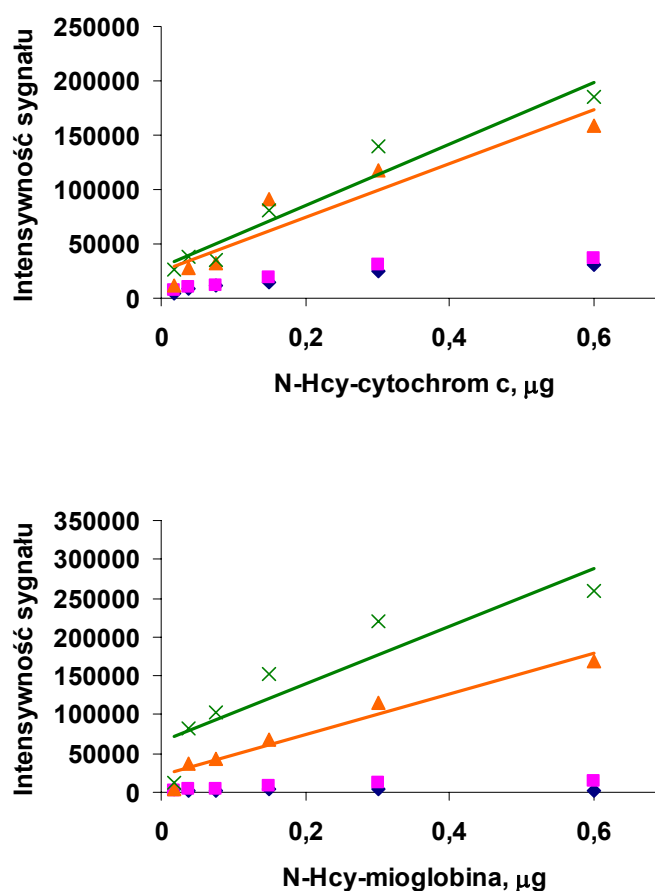
Rysunek 44. Specyficzność przeciwciał niezwiązanych do Nω-Hcy-aminoheksylo-agarozy. Wyniki przedstawiono jako B/B₀, gdzie B – ilość IgG związanych w obecności kompetytora, B₀ – ilość IgG związanych bez kompetytora

Podsumowując, IgG zatrzymane na Nω-Hcy-aminoheksylo-agarozie i wymyte buforem o pH 2,3, zawierają frakcję przeciwciał anty-Hcy-białko, które specyficznie rozpoznają epitop N-Hcy-Lys obecny na białkach zmodyfikowanych tiolaktonem homocysteiny. Frakcja IgG niezwiązana do kolumny zawiera niespecyficzne przeciwciała, rozpoznające obie, N-homocysteinylowaną i natywną hemoglobinę człowieka.

4.7.3 Immunodetekcja N-Hcy-białek

Immunoglobuliny rozpoznające epitop N-Hcy-Lys na białkach zmodyfikowanych tiolaktonem homocysteiny mogą być skutecznym narzędziem do wykrywania zmodyfikowanych cząsteczek w materiale biologicznym. Celem mojej pracy było wykazanie możliwości takiego zastosowania. Przeciwciała skierowane przeciwko N-homocysteinylowanym białkom, uzyskane przez immunizację królików N-Hcy-KLH i oczyszczanie na kolumnie białko A-agarozą wykorzystałam do identyfikacji N-Hcy-albuminy, N-Hcy-hemoglobiny, N-Hcy-mioglobiny i N-Hcy-cytochromu c metodą dot-blot (Rozdział 3.10). Białka te zmodyfikowałam HTL w stosunku molowym 1:1, 1:5 i 1:10. Jako kontrolę zastosowałam białka natywne, nietraktowane tiolaktonem homocysteiny.

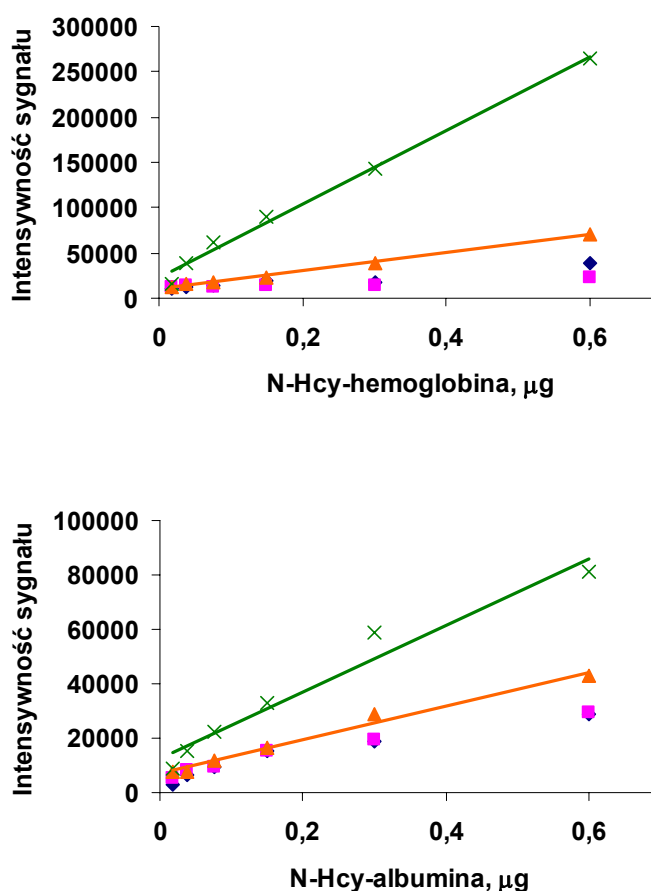
W przypadku N-Hcy-cytochromu i zmodyfikowanego ekwimolarnym stężeniem HTL różnica w odczycie między białkiem zmodyfikowanym a natywnym pojawia się już przy ilości cytochromu c równej 18,7 ng, jednak różnica ta jest na poziomie tła. Znacznie silniejszą odpowiedź daje cytochrom c zmodyfikowany 5-krotnym nadmiarem molowym HTL, przy czym 2-krotny wzrost nadmiaru czynnika modyfikującego nie skutkuje w podwojeniu sygnału. Nadal jednak zostaje zachowany przyrost intensywności sygnału wraz ze wzrostem ilości N-Hcy-białka (Rysunek 45).



Rysunek 45. Immunoidentyfikacja N-Hcy-cytochromu c i N-Hcy-mioglobiny metoda dot-blot. Białko natywne ♦, białko zmodyfikowane HTL w stosunku molowym 1:1 ■, 1:5 ▲, 1:10 x

Przeciwciała anty-Hcy-białko dają wyraźny sygnał z mioglobina (300 ng) zmodyfikowaną HTL w stosunku 1:1. Wzrost stopnia modyfikacji zwiększa czułość metody tak, że już 37 ng mioglobiny zmodyfikowanej 5-krotnym nadmiarem HTL jest wykrywane. Różnica w intensywności sygnału pomiędzy mioglobina zmodyfikowaną 5- i 10-krotnym nadmiarem HTL jest większa, niż w przypadku cytochromu c (Rysunek 45).

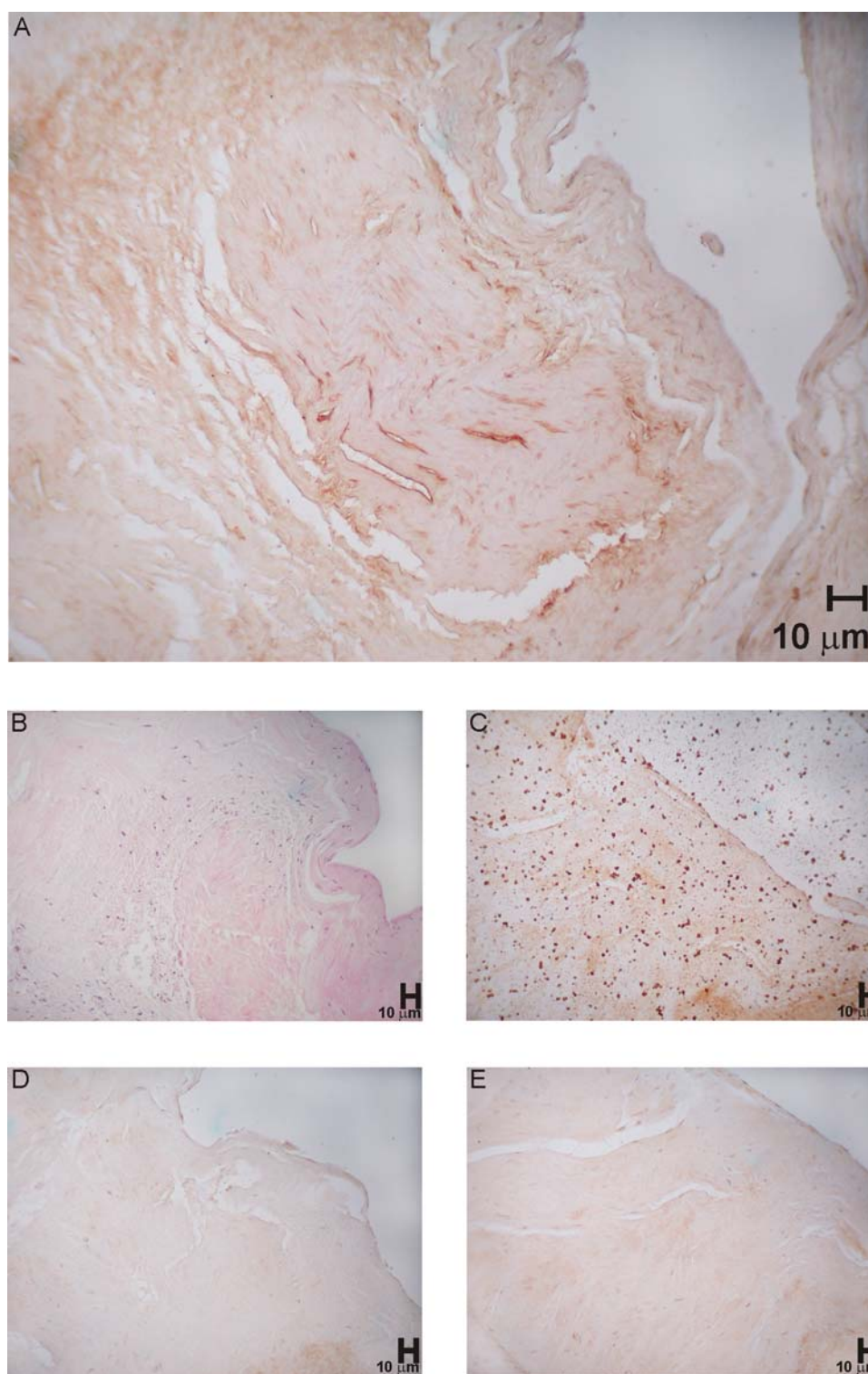
Natywne hemoglobina i albumina są dość silnie rozpoznawane przez królicze IgG, dlatego w ich przypadku czułość metody jest niższa. W obu przypadkach białka zmodyfikowane ekwimolarnym stężeniem HTL nie różnią się od odpowiedzi na poziomie białek natywnych. Dopiero modyfikacja 5- i 10-krotnym nadmiarem molowym HTL powoduje, że białka te dają intensywny sygnał w reakcji dot-blot. Różnica intensywności sygnału uzyskanego w przypadku tych dwóch stopni N-homocysteinyłacji jest istotna (Rysunek 46).



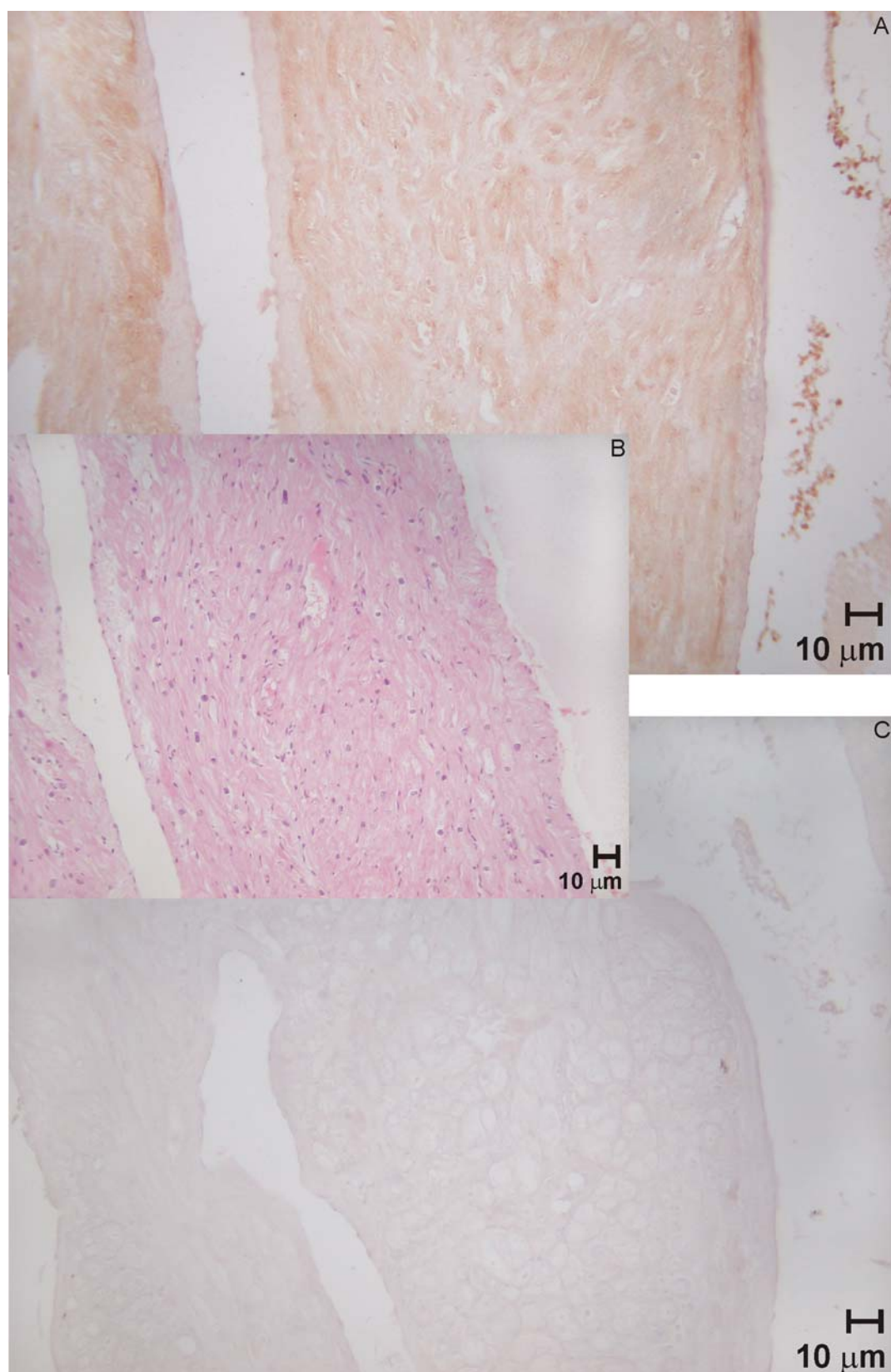
Rysunek 46. Immunoidentyfikacja N-Hcy-hemoglobiny i N-Hcy-albuminy metodą dot-blot. Białko natywne ♦, białko zmodyfikowane HTL w stosunku molowym 1:1 ■, 1:5 ▲, 1:10 x

Wyprodukowane przeciwciała rozpoznają N-homocysteinyłowane białka, przy czym intensywność sygnału jest zależna zarówno od ilości N-Hcy-białka jak i od stopnia modyfikacji co wskazuje, że przeciwciała te mogą być wykorzystane do ilościowej oceny poziomu N-Hcy-białka w materiale biologicznym.

IgG skierowane przeciwko N-Hcy-białku zastosowałam również do wykazania obecności N-homocysteinylowanych białek w tkankach pochodzących z układu krążenia pacjentów cierpiących na miażdżycę. Immunohistochemicznemu barwieniu, zgodnemu z procedurą opisaną w rozdziale 3.11, poddałam tkanki zastawki aorty i miokardium człowieka. W celu uwidocznienia jąder komórkowych i cytoplazmy skrawki, tkanek wybarwiłam hematoksyliną i eozyną. Hematoksylina wybarwia jądra komórkowe na fioletowo, natomiast eozyna zabarwia cytoplazmę na różowo (Rysunek 47B, Rysunek 48B). Tkanki inkubowane z króliczymi przeciwciałami specyficznymi względem N-Hcy-białka, wybarwiły się na brązowo, co świadczy o N-homocysteinytacji białek tkanki (Rysunek 47A, Rysunek 48A). Kontrolą pozytywną w doświadczeniu były skrawki inkubowane wcześniej z HTL, w celu modyfikacji białek. Zmodyfikowały się nie tylko białka, ale również poli-L-lizyna służąca do przyklejenia tkanki do szkiełka mikroskopowego (Rysunek 47C). W celu wykluczenia możliwości niespecyficznego wiązania przeciwciał do tkanki, wykonałam reakcje kontrolne negatywne: preinkubacja IgG z N-Hcy-albuminą (związanie specyficznego przeciwciała) oraz preinkubacja tkanki z IAA (zablokowanie grup tiolowych). N-Hcy-albumina okazała się skutecznym kompetytorem wiązania IgG anty-N-Hcy-białko do tkanki (Rysunek 47D, Rysunek 48C). Natywna albumina ani N-Hcy-albumina, której grupy -SH zostały zablokowane IAA, nie konkurowały z determinantami antygenowymi tkanki o wiązanie IgG. Inkubacja skrawków z IAA w pewnych przypadkach częściowo eliminowała reakcję IgG z epitopami tkanki (Rysunek 47E), w innych jednak powodowała odklejenie się skrawków od szkiełka mikroskopowego.



Rysunek 47. N-Hcy-białka zastawki aorty wykrywane za pomocą króliczych IgG (A), tkanka wybarwiona H+E (B), kontrola dodatnia – tkanka preinkubowana z HTL (C), kontrole ujemne – IgG preinkubowane z N-Hcy-albuminą (D), tkanka preinkubowana z IAA (E)



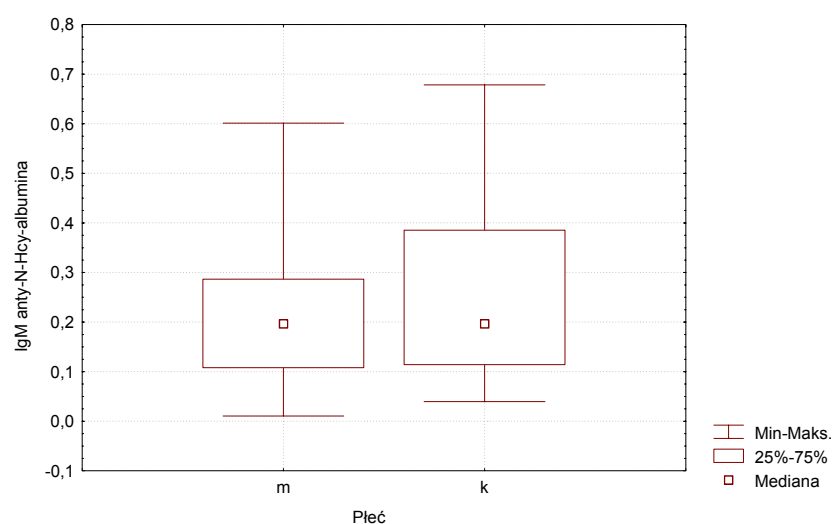
Rysunek 48. N-Hcy-białka miokardium wykrywane za pomocą króliczych IgG (A), tkanka wybarwiona H+E (B), kontrola ujemna – IgG preinkubowane z N-Hcy-albuminą (C)

4.7.4 Ludzkie przeciwciała anty-N-Hcy-białko

Doniesienia literaturowe wskazują, że IgG anty-N-Hcy-albumina są słabo skorelowane z poziomem homocysteiny oraz ich obecność jest niezależnym prognostykiem choroby niedokrwiennej serca [158]. Istotne stało się wykazanie obecności przeciwciał klasy IgM, specyficznych względem N-Hcy-albuminy w surowicy ludzkiej i wyznaczenie korelacji z poziomem homocysteiny, nasileniem choroby wieńcowej oraz parametrami gospodarki lipidowej.

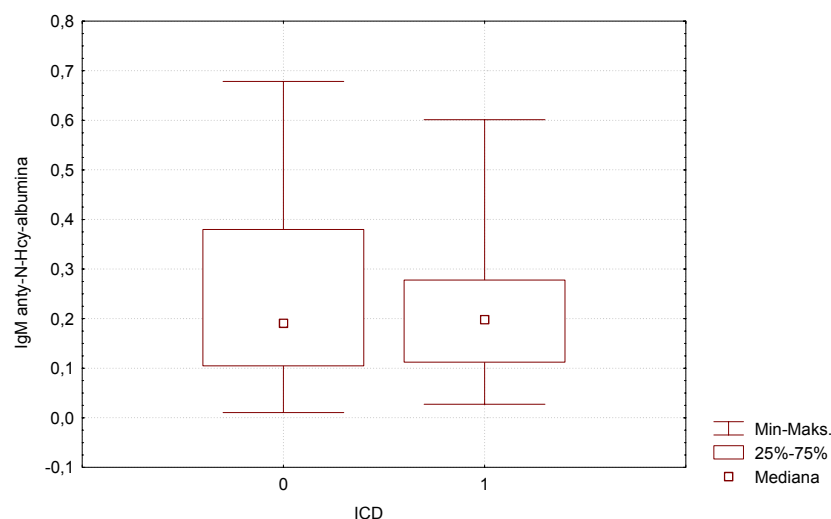
Badaniu poddano grupę 157 pacjentów, w których surowicy oznaczono poziom IgM anty-N-Hcy-albumina (Rozdział 3.9). Surowicę każdego pacjenta inkubowano ze związaną do płytki mikrotitracyjnej N-Hcy-albuminą. Niespecyficzne wiązanie eliminowano przez odjęcie odczytu uzyskanego od surowicy inkubowanej z kompetytorem N-Hcy-Lys. Poziom IgM każdej surowicy jest średnią dwóch pomiarów.

W celu porównania poziomu IgM w grupach pacjentów podzielonych ze względu na płeć, występowanie choroby niedokrwiennej serca (ICD) oraz liczby głównych naczyń wieńcowych objętych zmianami miażdżycowymi (scler) wykonano test Kruskala-Wallisa. Wyniki analizy pozwalają wyciągnąć wniosek, że płeć nie ma istotnego statystycznie wpływu na poziom przeciwciał anty-N-Hcy-albumina klasy IgM ($p=0,27$) (Rysunek 49).

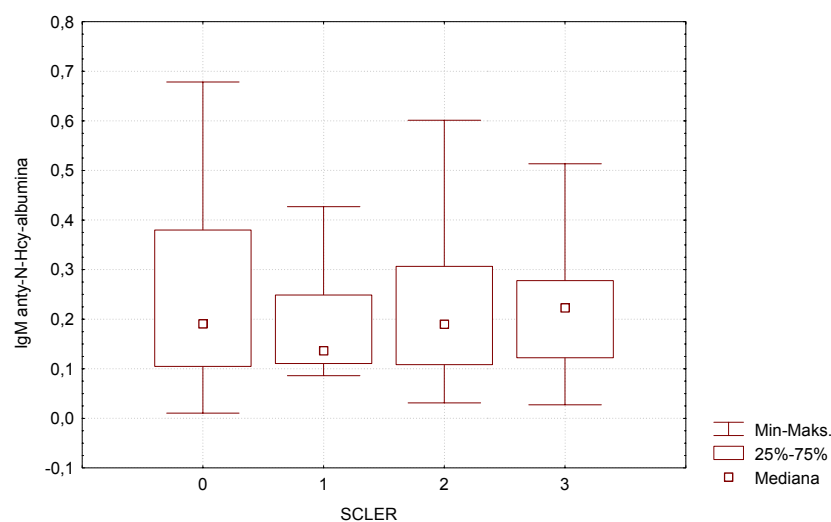


Rysunek 49. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina u mężczyzn (m) i kobiet (k)

Podobnie nie zaobserwowano zależności między poziomem IgM specyficznych względem N-Hcy-albuminy a ICD ($p=0,55$) (Rysunek 50) oraz stopniem zaawansowania miażdżycy ($p=0,71$) (Rysunek 51).



Rysunek 50. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina w zależności od występowania choroby niedokrwiennej serca (ICD)



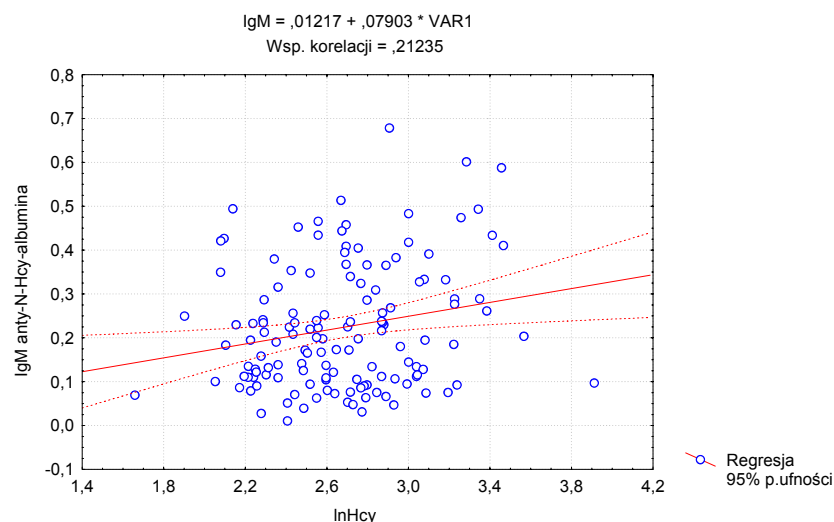
Rysunek 51. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina w podgrupach chorych z różną liczbą tętnic zajętych miażdżycą

Nie wykazano występowania korelacji liniowej między poziomem IgM anty-N-Hcy-albumina a wiekiem w grupie badanych osób. Kolejnym etapem analizy statystycznej było określenie korelacji między poziomem specyficznych IgM a całkowitym cholesterolem, cholesterolem frakcji HDL i LDL, triacyloglicerolami oraz homocysteiną. Współczynniki korelacji liniowej Pearsona przedstawiono w tabeli (Tabela 17).

Tabela 17. Współczynniki korelacji liniowej Pearsona między poziomem IgM anty-N-Hcy-albumina a wiekiem i parametrami osocza

	Wiek	TC	HDL-C	LDL-C	TAG	Hcy	lnHcy
r	-0,153	-0,082	0,041	-0,089	0,015	0,169	0,210
p	0,074	0,336	0,629	0,298	0,861	0,047	0,013

TC – cholesterol całkowity, HDL-C – cholesterol frakcji HDL, LDL-C – cholesterol frakcji LDL, TAG – triacyloglicerole, Hcy – homocysteina



Rysunek 52. Słaba dodatnia korelacja między logarytmem stężenia homocysteiny (μM) a poziomem IgM ($r=0,21$, $p=0,013$)

Istotną statystycznie słabą korelację odnotowano między poziomem przeciwciał a stężeniem homocysteiny, przy czym związek ten był silniejszy po zlogarytmowaniu stężenia homocysteiny (Rysunek 52). Nie zaobserwowano natomiast korelacji między poziomem IgM anty-N-Hcy-albumina a parametrami gospodarki lipidowej.

5 Dyskusja

N-homocysteinyłacja ma wpływ na strukturę oraz funkcję białek i może mieć istotne znaczenie w patogenezie chorób związanych z podwyższonym poziomem homocysteiny. Dyskusja wyników własnych zostanie poprowadzona od analizy zakresu N-homocysteinyłacji i poszukiwania reszt lizyny ulegających preferencyjnej modyfikacji, do wpływu tej modyfikacji na strukturę białek, z wynikającymi konsekwencjami dla ich funkcji. Konsekwencje te to zmiana stopnia utlenienia białek hemowych oraz nabycie właściwości antygenowych przez wszystkie N-Hcy-białka, przez co stają się one celem dla specyficznych przeciwciał.

5.1 Stopień N-homocysteinyłacji

Przystępując do badania wpływu N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję białek, należy odpowiedzieć na pytanie jak wykazać modyfikację i oszacować jej zakres. Monitorowanie procesu N-homocysteinyłacji można prowadzić na kilka sposobów. Jeden z nich polega na pomiarze absorpcji barwnego produktu reakcji nowopowstałych grup tiolowych z odczynnikiem Ellmana (DTNB). Zastosowanie tej metody jest możliwe jedynie w przypadku białek, które nie pochłaniają światła w zakresie absorpcji DTNB, czyli około 412 nm. Nie może być ona zatem wykorzystana do analizy białek zawierających żelazo, a do takich należą wybrane przeze mnie białka modelowe. Ograniczeniem tym nie jest obciążona metoda polegająca na modyfikacji radioaktywnym tiolaktonem homocysteiny ($[^{35}\text{S}]\text{HTL}$) i pomiarze radioaktywności N-Hcy-białka. Jeżeli nie dysponuje się $[^{35}\text{S}]\text{HTL}$, można oprzeć się na pomiarze masy cząsteczkowej białka przed i po modyfikacji. Możliwość taką daje spektrometria mas, np. technika MALDI/TOF. Metoda ta jest najbardziej użyteczna do określenia masy cząsteczkowej niewielkich białek (do około 20 kDa). Dokładność oznaczenia masy maleje bowiem wraz ze wzrostem wielkości analizowanej cząsteczki.

Z wcześniejszych badań wiadomo, że szybkość N-homocysteinyłacji jest proporcjonalna do zawartości reszt lizyny białka [22]. Cytochrom c i mioglobina zawierają po 19 reszt lizyny, transferyna – 58, a łańcuch lekki i ciężki ferrytyny, odpowiednio – 9 i 13 reszt lizyny (Tabela 8). Oznaczenie stopnia N-homocysteinyłacji białek modelowych wykonałam metodą MALDI/TOF. Na podstawie uzyskanych widm masowych N-Hcy-cytochromu

c i N-Hcy-mioglobiny stwierdzić można, że po modyfikacji mamy do czynienia z mieszaniną białek o różnym stopniu modyfikacji, który zależy od nadmiaru molowego HTL w stosunku do stężenia białka. Zwiększenie stężenia HTL, skutkuje ubytkiem formy natywnej, wzrostem zawartości form zmodyfikowanych w niższym stopniu i pojawieniem się cząsteczek z większą liczbą przyłączonych reszt Hcy. Porównując intensywność pików widma masowego N-Hcy-mioglobiny i N-Hcy-cytochromu c, zmodyfikowanych takim samym nadmiarem molowym HTL, stwierdzić można większy udział form N-homocysteinylowanych mioglobiny. Wnioskuje, że mioglobina jest bardziej podatna na N-homocysteinyłację niż cytochrom c. Jest to zgodne ze stałą szybkości modyfikacji tych dwóch białek, która jest nieco wyższa dla mioglobiny [22].

W przypadku transferyny, choć określona została jedynie przybliżona liczba zmodyfikowanych reszt lizyny, to zauważyć można wzrost masy cząsteczkowej białka, w miarę wzrostu stężenia HTL użytego do modyfikacji. Zaskakującą obserwacją jest brak zmiany widma masowego ferrytyny po inkubacji z tiolaktonem homocysteiny. Pomimo, że metodą spektrometrii mas nie wykazałam modyfikacji tego białka, wynik inkubacji z [³⁵S]HTL świadczy o zajściu N-homocysteinyłacji ferrytyny. Wyznaczona przez mnie stała szybkości modyfikacji tego białka jest ponad 4-krotnie niższa w porównaniu ze stałą szybkości modyfikacji albuminy.

5.2 Miejsca preferencyjnej N-homocysteinyłacji *in vitro*

Wyniki dotychczasowych badań [87, 98] wskazują, że pewne reszty lizyny białek ulegają preferencyjnej N-homocysteinyłacji. Identyfikacja tych reszt stała się możliwa dzięki zastosowaniu metod spektrometrii mas. Pierwszą, odkrytą pozycją ulegającą preferencyjnej modyfikacji, była Lys 525 albuminy człowieka, zidentyfikowana za pomocą technik HPLC i MALDI/TOF przez Głowackiego i Jakubowskiego [87]. Z peptydów pochodzących z N-Hcy-albuminy, autorzy ci, wydzielili peptyd ulegający N-homocysteinyłacji, a następnie po oznaczeniu jego masy i porównaniu jej z masami peptydów pochodzących z trawienia *in silico*, określili miejsce wbudowania homocysteiny.

Nieco inne podejście, do identyfikacji miejsc modyfikacji fibrynogenu człowieka, zastosował Sauls i wsp. [98]. W pierwszym etapie, N-Hcy-fibrynogen strawiono trypsyną i poddano analizie metodą MALDI/TOF.

Zidentyfikowano w ten sposób 3 miejsca modyfikacji. W drugim etapie, w celu zwiększenia pokrycia sekwencji białka przez sekwencje peptydów, zastosowano metodę LC-MS/MS. Technika ta pozwoliła na identyfikację kolejnych 9 reszt N-Hcy-Lys.

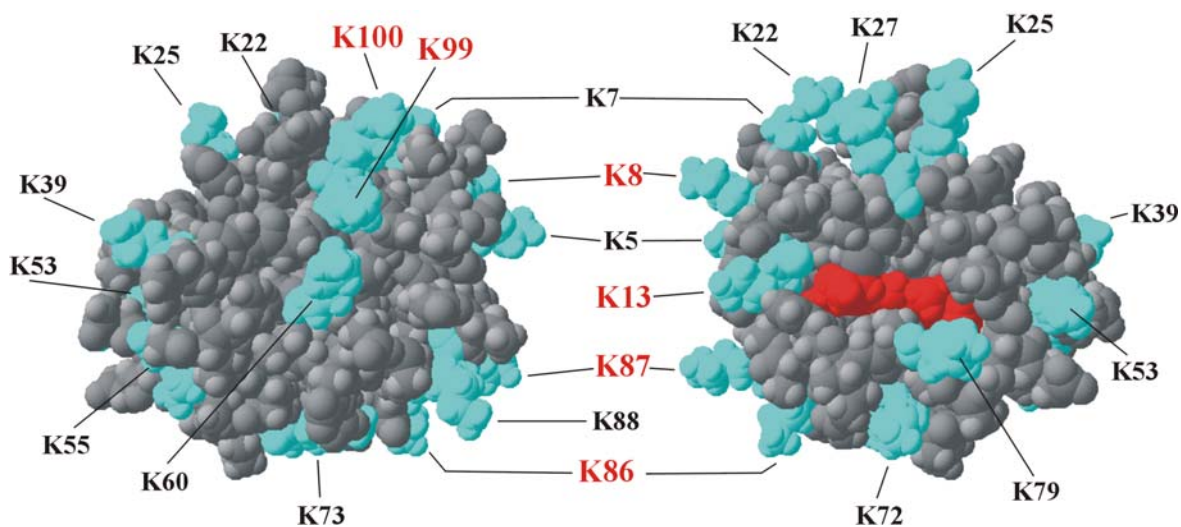
Podjęcie zastosowane przeze mnie jest prostsze od omówionych. Opiera się na oznaczeniu mas peptydów, uzyskanych po proteolitycznym trawieniu N-Hcy-białka, metodą MALDI/TOF. Analizę danych przeprowadziłam *in silico* używając programu PepModSearch. Umożliwia on szybkie odnalezienie peptydów, których masa wskazuje na modyfikację. Program ten może być wykorzystany w poszukiwaniu dowolnej modyfikacji potranslacyjnej białka. Uproszczenie metody identyfikacji N-homocysteinyłowanych reszt lizyny, wymagało przyjęcia dodatkowych ograniczeń, których celem było wykluczenie fałszywych wyników:

- eliminacja peptydów pochodzących z autolitycznego trawienia trypsyny lub ewentualnych zanieczyszczeń próby (wykonywana przez program PepModSerch na podstawie eksperymentalnej listy peptydów),
- zastosowanie małej tolerancji odchylenia masy peptydu (0,2 Da),
- wykluczenie z wyników pozytywnych, peptydów mających resztę lizyny jedynie na końcu sekwencji,
- uznanie za zmodyfikowane jedynie tych peptydów, które występują w N-Hcy-białku i nie występują w białku natywnym oraz
- powtórzenie wyniku co najmniej w trzech niezależnie wykonanych eksperymentach.

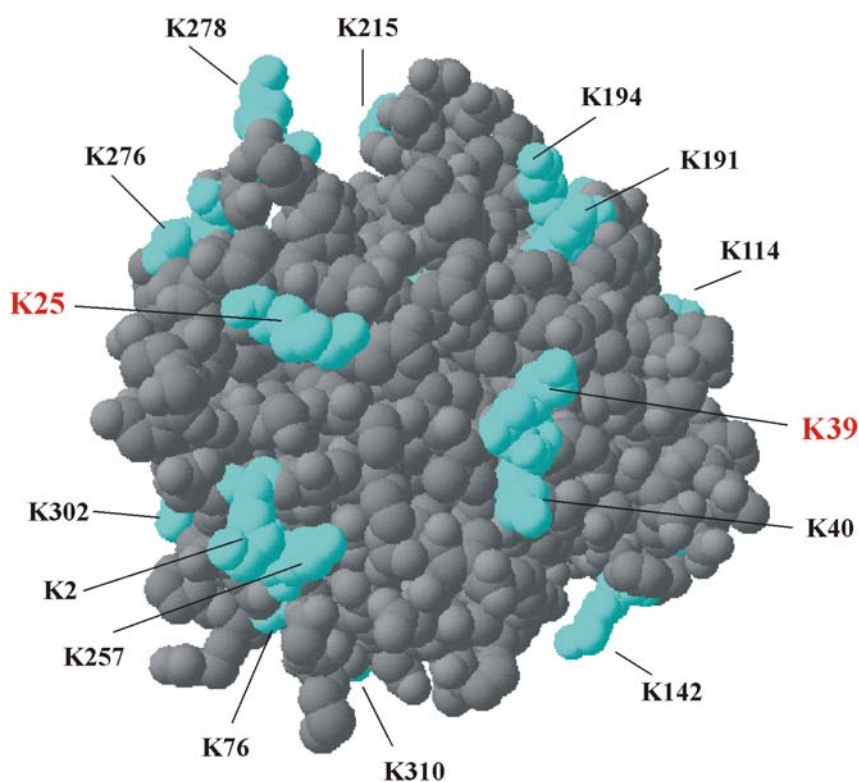
Podjęcie to umożliwiło identyfikację miejsc N-homocysteinyłacji cytochromu c oraz transferyny. Reszty zidentyfikowane w mioglobinie i ferrytynie, pojawiały się zarówno w białku natywnym, jak i zmodyfikowanym, dlatego nie zostały sklasyfikowane jako realne miejsca modyfikacji. Wynik należałoby potwierdzić innymi metodami, np. sekwencjonowaniem techniką tandemowej spektrometrii mas. Dodatkowo, w przypadku ferrytyny brak identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji może być spowodowany, np. niskim stopniem modyfikacji lub niewielką liczbą zidentyfikowanych peptydów ferrytyny.

Reszty Lys zidentyfikowane jako wiążące homocysteinę, zarówno cytochromu c (Rysunek 53), jak i transferyny (Rysunek 54) są eksponowane na powierzchni białka, co czyni je łatwo dostępnymi miejscami modyfikacji.

N-homocysteinylowane reszty Lys fibrynogenu również są umieszczone w pozycjach dostępnych dla rozpuszczalnika [98].



Rysunek 53. Struktura przestrzenna cytochromu c z wyróżnionymi resztami Lys (kolor niebieski) i grupą hemową (czerwony). Narysowano według 1ocd.pdb [115]. Widok z przodu i z tyłu. Reszty Lys 8 lub 13, 86 lub 87 oraz 99 i 100 zidentyfikowano jako miejsca przyłączenia Hcy *in vitro*



Rysunek 54. Struktura przestrzenna płata N transferyny z wyróżnionymi resztami Lys (kolor niebieski). Narysowano według 1d3k.pdb [132]. Reszty Lys 25 i 39 zidentyfikowano jako miejsca przyłączenia Hcy *in vitro*

Wszystkie reszty lizyny cytochromu c zidentyfikowane jako miejsca N-homocysteinyłacji, z wyjątkiem Lys 8, położone są w obrębie łańcucha polipeptydowego tworzącego pętle. Reszta Lys 8 tego białka wchodzi w skład helisy α , podobnie jak Lys 525 albuminy. W przypadku transferyny reszta Lys 25 występuje w obrębie helisy α , natomiast Lys 39 – harmonijki β . Analizując położenie N-homocysteinyłowanych reszt Lys fibrynogenu, również stwierdzić można, że ich położenie nie zależy od struktury drugorzędowej białka.

Podatność reszt lizyny na N-homocysteinyłację może zależeć nie tylko od stopnia ekspozycji na powierzchni białka, ale również od charakteru otaczających ją reszt aminokwasowych. Można przypuszczać, że preferencyjnej modyfikacji przez HTL ulegają te reszty lizyny, które sąsiadują z inną lizyną. Wynika to z obserwacji katalizy zasadowej (ang. *base catalysis*) reakcji nukleofilowych przez drugą cząsteczkę reagenta [159]. Możliwe również, że inna sąsiednia grupa nukleofilowa lub jakiegokolwiek łańcuch boczny aminokwasu, który może działać jak zasada i być akceptorem protonu (np. His, Ser, Cys, Asp), bierze udział w katalizowaniu modyfikacji lizyny w białku. W celu sprawdzenia słuszności tej hipotezy, przeanalizowałam otoczenie reszt K8, K13, K86, K87, K99, i K100 cytochromu c oraz K25 i K39 transferyny, przy wykorzystaniu opublikowanych struktur białkowych. Wyniki analizy struktury cytochromu c przedstawione zostały w tabeli (Tabela 18).

Tabela 18. Położenie reszt lizyny cytochromu c w stosunku do reszt lizyny, histydyny, cysteiny i asparagianu, w nawiasie podano odległość w Å, na podstawie 1ocd.pdb [115]. Podkreślono reszty Lys zidentyfikowane jako miejsca N-homocysteinyłacji

Reszta Lys	Sąsiedztwo			
	Lys ⁽¹⁾	His	Cys ⁽²⁾	Asp ⁽³⁾
5	7 (13,2) 8 (9,1)	-	-	93 (6,7)
7	5 (13,2) 8 (8,9)	-	-	-
8	5 (9,1)	-	-	-
13	-	-	14 (8,8) 17 (12,8)	-
22	25 (11,6) 27 (5,3)	-	-	-
25	22 (11,6) 27 (8,2)	-	-	-
27	22 (5,3) 25 (8,2)	-	-	-
39	-	-	-	-
53	-	-	-	50 (5,4)

Reszta Lys	Sąsiedztwo			
	Lys ⁽¹⁾	His	Cys ⁽²⁾	Asp ⁽³⁾
55	-	-	-	-
60	99 (5,2)	-	-	-
72	73 (14,7)	-	-	-
73	72 (14,7)	-	-	-
79	-	-	-	-
86	87 (10,5) 88 (11,5)	-	-	-
87	86 (10,5) 88 (11,1)	-	-	-
88	86 (11,5) 87 (11,1)	-	-	-
99	60 (5,2) 100 (7,7)	-	-	-
100	99 (7,7)	-	-	-

w nawiasie podano odległość między: ⁽¹⁾ azotem łańcuchów bocznych Lys; ⁽²⁾ azotem łańcucha bocznego Lys i siarką łańcucha bocznego Cys; ⁽³⁾ azotem łańcucha bocznego Lys i węglem γ Asp

N-homocysteinylowane reszty cytochromu c znajdują się w sąsiedztwie innych reszt Lys, a dodatkowo K13 występuje w pobliżu C14 i C17. Odległości pomiędzy azotami łańcuchów bocznych sąsiadujących reszt Lys wahają się od 5,2 do 14,7 Å. Aby zaszła kataliza zasadowa oddziałujące atomy powinny znajdować się w odległości umożliwiającej utworzenie przejściowego wiązania wodorowego, czyli około 3 Å.

W przypadku transferyny, reszta K25 znajduje się w oddaleniu od innych reszt lizyny, natomiast w jej pobliżu występują reszta S26 i S34 (odległość między azotem łańcucha bocznego K25 i siarką S26 oraz S34 wynosi odpowiednio 9,4 i 8,2 Å). Reszta K39 sąsiaduje z K40 oraz S10 (odległość między azotem łańcucha bocznego K39 i azotem K40 oraz siarką S10 wynosi odpowiednio 10,7 i 6,9 Å). Reszty lizyny zidentyfikowane jako ulegające modyfikacji HTL znajdują się w pobliżu reszt aminokwasowych mogących działać jak zasada, jednak ze zbliżoną częstością jak reszty nie wskazane jako ulegające modyfikacji.

Przeprowadzona przeze mnie analiza otoczenia aminokwasowego N-homocysteinylowanych reszt Lys albuminy i fibrynogenu, pozwoliła stwierdzić, że reszty te w większości przypadków znajdują się w sąsiedztwie innych reszt Lys. Reszta K525 sąsiaduje z K524 (odległość między azotami łańcuchów reszt Lys bocznych wynosi 12,5 Å w łańcuchu A i 12,1 Å w łańcuchu B) (1bm0.pdb [86]), a w przypadku regionu D fibrynogenu (1fzb.pdb [160]), pięć z siedmiu reszt Lys znajduje się w pobliżu innej reszty Lys.

We wszystkich wymienionych przypadkach odległości pomiędzy atomami potencjalnie uczestniczącymi w katalizie zasadowej są prawdopodobnie zbyt duże, aby mogła ona zachodzić.

5.3 N-homocysteinyłacja a struktura białka

Modyfikacja tiolaktonem homocysteiny powoduje zmiany strukturalne białek, które prowadzą do agregacji na skutek tworzenia wiązań dwusiarczkowych [22], a także nieodwracalnego uszkodzenia przez utlenianie [75, 87]. Wpływ N-homocysteinyłacji na strukturę białek analizowałam, badając stabilność termiczną, podatność na proteolizę oraz strukturę drugorzędową.

Na podstawie uzyskanych wyników odnotowałam wpływ modyfikacji na stabilność i podatność na proteolizę. N-Hcy-transferyna ma obniżoną odporność na podwyższoną temperaturę. Zmodyfikowane białko podlega rozfałdowywaniu w dwóch zakresach temperatury: od 25 do 45°C oraz powyżej 65°C. Może to być spowodowane tym, że po modyfikacji w mieszaninie znajdują się białka N-homocysteinyłowane w różnym stopniu. Cząsteczki zmodyfikowane bardziej rozfałdowują się w niższej temperaturze, prawdopodobnie ze względu na obniżoną stabilność. Zmodyfikowane w mniejszym stopniu rozfałdowują się w wyższej temperaturze podobnie jak natywne.

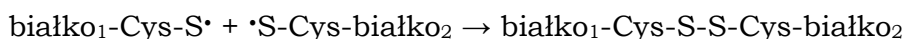
Brak wpływu modyfikacji na stabilność struktury ferrytyny, może być spowodowany niskim stopniem N-homocysteinyłacji lub wyjątkową stabilnością struktury tego białka.

N-homocysteinyłacja wpływa na podatność N-Hcy-białek na proteolizę. N-homocysteinyłowana merkaptoalbumina jest bardziej odporna na trawienie trypsyną i chymotrypsyną [87]. Podobnie, N-Hcy-cytochrom c jest trawiony w ograniczonym stopniu w porównaniu z białkiem natywnym.

Sądzi się, że niepełne usuwanie uszkodzonego materiału biologicznego prowadzi do starzenia się komórek (ang. *Garbage catastrophe theory of aging*). Oksydacyjne modyfikacje białek i gromadzenie się zmodyfikowanych cząsteczek wykryto w komórkach starzejących się [161], poddanych stresowi tlenowemu oraz w stanach patologicznych, takich jak miażdżyca, cukrzyca, dystrofia mięśniowa, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Alzheimer'a i Parkinson'a [162]. N-Hcy-cząsteczki białek mogłyby ulegać odkładaniu w komórkach i tkankach, prowadząc do stanów patologicznych.

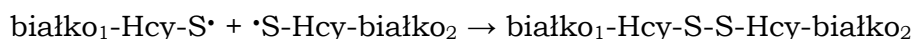
Modyfikacja tiolaktonem homocysteiny powoduje zmianę właściwości powierzchni białka. Grupa ε-aminowa Lys ($pK_a=10,5$) jest znacznie bardziej zasadowa niż grupa α-aminowa Hcy ($pK_a=7,1$) w N-Hcy-Lys, dlatego też po N-homocysteinyłacji zostaje utracony pozytywny ładunek reszt Lys [22]. Może to mieć istotne znaczenie dla białek, które dla pełnienia swojej funkcji wymagają odpowiedniego ładunku na swojej powierzchni, jak to ma miejsce w przypadku cytochromu c.

Grupy tiolowe wprowadzone do białka poprzez N-homocysteinyłację są dodatkowym miejscem ataku dla reaktywnych form tlenu. Grupy tiolowe białek utleniane są przez rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, a także kwas podchlorawy i nadtlenoazotyn. W wyniku reakcji rodnika hydroksylowego z białkiem oderwany zostaje atom wodoru i powstaje rodnik białkowy z niesparowanym elektronem. Jeśli niesparowany elektron jest zlokalizowany na resztach cysteiny, dochodzi do powstania kowalencyjnych dimerów białek:



Grupy tiolowe reszt cysteiny utleniane są do mostków disulfidowych, grup sulfenianowych, sulfinianowych lub sulfonianowych [163].

Analogiczna reakcja jest możliwa, jeśli niesparowany elektron znajdzie się na reszcie homocysteiny:



Łańcuchy boczne aminokwasów zawierających siarkę są najbardziej, obok aminokwasów aromatycznych, narażone na działanie rodnika hydroksylowego. Cysteina, cystyna i metionina są głównymi miejscami utleniania białek. W przypadku N-Hcy-białka dodatkowym miejscem podatnym na utlenienie jest reszta Hcy. Utlenienie może nastąpić na skutek bezpośredniej interakcji z utleniaczem, albo w wyniku wewnątrzcząsteczkowego transferu niesparowanego elektronu. Utlenienie Cys, zachodzące z szerokim spektrum utleniaczy, może przebiegać na drodze reakcji jedno-, jak i dwuelektronowych. Dla większości utleniaczy produktem utleniania jest rodnik tyłowy. Rodnik ten może ulegać dimeryzacji z utworzeniem dwusiarczku (cystyna) lub reakcji z tlenem cząsteczkowym, w wyniku której powstaje rodnik nadtlenkowy ($\text{ROO}\cdot$). Rodnik nadtlenkowy tworzy następnie oksykwas (RSO_2H i RSO_3H). Reakcja rodnika tyłowego z innym rodnikiem może zachodzić z szeroka gamą rodników, dlatego powszechnym produktem są mieszane dwusiarczki [164].

Produktami reakcji reszt cysteiny z utleniaczami dwuelektronowymi są często addukty, które będąc przeważnie nietrwałe dają oksokwasy lub reagując z innym tiolem dają dimery. Takie dwusiarczki mogą podlegać reakcjom naprawczym, ponieważ w większości układów biologicznych występują reduktazy i izomerazy disulfidowe aby utrzymać reszty Cys w formie zredukowanej [164]. Nasuwa się pytanie, czy komórkowe reduktazy, które utrzymują reszty cysteiny w formie zredukowanej, redukują też Hcy połączoną z białkiem wiązaniem amidowym.

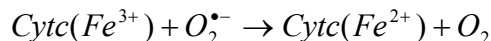
W celu uzyskania głębszego wglądu w strukturę N-Hcy-białek wykonałam eksperymenty dichroizmu kołowego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że w testowanym przedziale stężeń HTL, N-homocysteinyłacja nie powoduje istotnych zmian struktury drugorzędowej badanych białek modelowych. Analizowane białka należą do bardzo stabilnych i nawet działanie pewnego zakresu czynników stresowych, takich jak temperatura czy GdnHCl, nie wpływa na ich strukturę drugorzędową.

Ferretti i wsp. stwierdzili brak modyfikacji struktury i fizyko-chemicznych właściwości N-Hcy-LDL. Na podstawie analizy widm fluorescencji Trp nie stwierdzono znacznych zmian w pozycji maksimum emisji Trp w N-Hcy-LDL. Używając sondy fluorescencyjnej Laurdan wprowadzonej do N-Hcy-LDL, nie zaobserwowano zmiany wartości Gp ani pozycji maksimum emisji sondy [165].

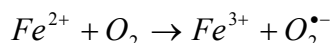
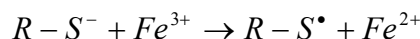
Utlenienie łańcuchów bocznych aminokwasów może powodować rozfałdowywanie łańcucha polipeptydowego i zmiany konformacyjne białka, co z kolei ma znaczenie dla funkcji biologicznej. Zmodyfikowane w ten sposób reszty są eksponowane na zewnętrznej, dostępnej dla wody powierzchni białka. Większość procesów utleniania, które zachodzą na łańcuchach bocznych, powoduje wzrost hydrofilowości reszt docelowych. Wiele wiązań C-H hydrofobowych łańcuchów bocznych jest przekształcanych do grup nadtlenkowych, alkoholowych lub karbonylowych, które mają większe momenty dipolowe i mogą uczestniczyć w wiązaniach wodorowych z cząsteczkami rozpuszczalnika. Utlenienie reszt aminokwasowych eksponowanych na powierzchni ma mniejszy wpływ na konformację białka niż utlenienie reszt aminokwasowych znajdujących się wewnątrz struktury [164]. Mogłoby to tłumaczyć brak wpływu N-homocysteinyłacji na strukturę drugorzędową białek.

5.4 Równowaga oksydacyjno-redukcyjna

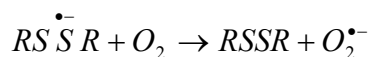
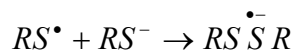
Jon żelaza hemu cytochromu c, podczas inkubacji z tiolaktonem homocysteiny, ulega redukcji, za którą może być odpowiedzialny anionorodnik ponadtlenkowy:



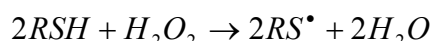
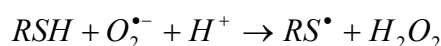
Anionorodnik ponadtlenkowy tworzony jest na drodze jednoelektronowej redukcji tlenu. Grupa tiolowa (-SH) ulega dysocjacji do jonu tiolanowego (-S-) i protonu (H⁺). Tiole niskocząsteczkowe, jak i grupy -SH białek, ulegają utlenianiu, które katalizowane jest przez jony metali przejściowych, np. żelaza. Produktami przeniesienia elektronu ze związku tiolowego na cząsteczkę tlenu są dwa rodniki, rodnik tiylowy (R-S[•]) i anionorodnik ponadtlenkowy:



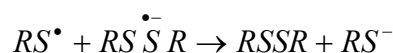
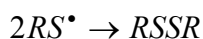
Reakcja rodnika tiylowego z jonem tiolanowym prowadzi do powstania anionorodnika disulfidowego, który reagując następnie z tlenem również powoduje utworzenie anionorodnika ponadtlenkowego:



Rodniki tiylowe mogą także powstawać podczas reakcji tioli z anionorodnikiem ponadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru:



Łańcuch reakcji wolnorodnikowego utleniania tioli ulega terminacji, gdy dwa rodniki tiylowe lub rodnik tiylowy i rodnik disulfidowy ulegają dimeryzacji:

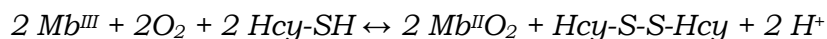


Redukcja ferricytochromu c do ferrocycyochromu c jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod detekcji anionorodnika ponadtlenkowego.

Cytochrom c ulega również redukcji pod wpływem homocysteiny związanej wiązaniem amidowym z białkiem. W mojej pracy użyłam albuminy, jednak można przypuszczać, że podobny efekt wywołałoby się każde inne N-Hcy-

białko. Aby wykluczyć możliwość redukcji cytochromu c przez grupę tiolową Cys 34 albuminy, grupę tę zablokowano IAA przed modyfikacją HTL.

Podczas N-homocysteinyłacji, redukcji ulega również mioglobina. Redukcja Mb^{III} do Mb^{II}O₂ zachodzi przypuszczalnie przez homocysteinę powstającą podczas inkubacji z tiolaktonem homocysteiny wg schematu:



5.5 Immunogenne właściwości N-Hcy-białka

Różnorodne modyfikacje reszt lizyny powodują, że białka stają się antygenami, przeciwko którym organizm wytwarza specyficzne przeciwciała. Nabycie cech antygenowych przez zmodyfikowane białka umożliwia ich detekcję z wykorzystaniem metod immunochemicznych opartych na reakcji antygen-przeciwciało. Z powodzeniem stosuje się je do wykrywania połączeń białka z 4-hydrokso-trans-2-nonenalem [166] czy malonyldialdehydem [100]. Specyficzne przeciwciała są ważnym narzędziem badawczym, umożliwiającym ilościową i jakościową analizę występowania zmodyfikowanych białek w materiale biologicznym pochodzącym, np. z tkanek zmienionych chorobowo.

N-Hcy-białka mogą mieć udział w rozwoju chorób związanych z podwyższonym poziomem homocysteiny takich jak miażdżycy. Produkcja specyficznych przeciwciał przez zwierzęta immunizowane tymi białkami dostarczyła dowodu na ich immunogenność [96, 101]. Zostało to poparte również wynikami moich badań. Króliki poddane iniekcji N-Hcy-KLH produkują przeciwciała specyficzne, nie tylko względem podanego antygeny, ale również względem wszystkich badanych N-homocysteinyłowanych białek. Wskazuje to na fakt, że białka te posiadają na swojej powierzchni podobny epitop, którym jest N-Hcy-Lys, jak wykazano w konkurencyjnych eksperymentach ELISA. N-Hcy-Lys jest konkurentem wiązania IgG [101], podobnie jak N-Hcy-addukty albuminy, hemoglobiny, antytrypsyny i transferyny. W odróżnieniu białka natywne nie są konkurentami.

Wykazana przeze mnie specyficzność uzyskanych immunoglobulin jest cechą umożliwiającą ich wykorzystanie do immunochemicznej detekcji N-Hcy-białek. Możliwość takiego zastosowania skłoniła mnie do opracowania metody oczyszczania przeciwciał anty-N-Hcy-białko. Zastosowana przeze mnie 2-etapowa chromatografia powinowactwa z wykorzystaniem białka A oraz N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozy okazała się skuteczną metodą

oczyszczania IgG anty-N-Hcy-białko. Frakcja przeciwciał zatrzymanych na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozie jest aktywna i specyficzna względem N-Hcy-białek.

Ferguson i wsp. [96] wykorzystali surowicę królików immunizowanych N-Hcy-LDL do detekcji białek w surowicy człowieka traktowanej tiolaktonem homocysteiny. Wyniki moich badań uzasadniają wnioskowanie, że IgG anty-Hcy-białko rozpoznają N-homocysteinylowane albuminę, cytochrom c, mioglobinę i hemoglobinę, przy czym intensywność odpowiedzi zależy od stopnia modyfikacji, jak i od ilości N-Hcy-białka. Przeciwciała są również użyteczne do analizy tkanek układu krwionośnego pacjentów cierpiących na miażdżycę, pod kątem występowania N-Hcy-białek. Z ich pomocą wykazałam obecność N-homocysteinylowanych białek w tkankach człowieka.

Obecność przeciwciał anty-N-Hcy-białko stwierdzono nie tylko w surowicy immunizowanych zwierząt doświadczalnych, ale również człowieka. Specyficzność antygenowa ludzkich autoprzeciwciał jest identyczna do specyficzności króliczych IgG wytworzonych przeciwko N-Hcy-białku, co wskazuje, że znaczna część odpowiedzi immunologicznej jest skierowana przeciwko tej samej determinancie antygenowej N-Hcy-Lys.

Poziom IgG anty-N-Hcy-białko u człowieka jest pozytywnie skorelowany ze stężeniem homocysteiny osocza. Stwierdzono również, że mężczyźni po przebytych zawałach wykazują wyższy poziom Hcy i IgG anty-N-Hcy-białko, niż osoby zdrowe [101]. Poziom immunoglobulin klasy M anty-N-Hcy-białko, a więc przeciwciał produkowanych jako pierwsza linia obrony po kontakcie organizmu z antygenem, nie jest skorelowany z płcią, wiekiem ani stopniem zaawansowania miażdżycy. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina jest natomiast słabo skorelowany dodatnio ze stężeniem homocysteiny osocza. Obecność immunoglobulin klasy IgM skierowanych przeciwko N-Hcy-białku, wskazuje na fakt, że organizm jest w początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej. Brak korelacji IgM z poziomem zaawansowania choroby może być spowodowany tym, że ta klasa immunoglobulin pojawia się w organizmie jako pierwsza i następnie jej poziom spada. Poziom IgM jest zatem odzwierciedleniem tego, zatem kiedy nastąpił kontakt z antygenem, kiedy pojawiło się w organizmie zmodyfikowane białko. Poziom IgM jest skorelowany dodatnio z poziomem Hcy, ponieważ im wyższe stężenie Hcy, tym może powstawać więcej HTL, tym więcej białek ulega modyfikacji i

pojawia się odpowiedź immunologiczna. Korelacja jest słaba, co może być związane z istnieniem innych czynników modyfikujących powstawanie HTL, N-Hcy-białka i IgM anty-N-Hcy-białko. Czynnikiem takim jest na przykład tiolaktonaza, która hydrolizując HTL zapobiega N-homocysteinyłacji białek [3]. W przypadku niektórych osób podwyższone stężenie Hcy nie znajduje odzwierciedlenia w zawartości N-Hcy-białka, co również tłumaczy się wysokim poziomem tiolaktonazy/paraoksonazy (Rozdział 1.6).

Sądzi się, że miażdżyca jest formą przewlekłego zapalenia [44, 100]. W badaniach *in vitro* [43, 167, 168], jak i w eksperymentach prowadzonych na myszach z hiperhomocysteinemią i brakiem apolipoproteiny E [169] wykazano, że homocysteina zwiększa produkcję prozapalnych cytokin i przyczynia się do rozwoju miażdżycy przez indukcję zapalenia. Nie jest wyjątkiem, że przeciwciała anty-N-Hcy-białko pełnią w patologii chorób związanych z podniesionym poziomem homocysteiny. Możliwe, że przyczyniają się do rozwoju miażdżycy, tak jak inne autoprzeciwciała rozpoznające białka zmienione przez glikozylację [170] lub utlenienie [102]. Opsonizacja N-Hcy-białek lub komórek mających na swojej powierzchni N-Hcy-białka przez autoprzeciwciała może prowadzić do ułatwionej fagocytozy przez makrofagi lub zabicia komórki z udziałem dopełniacza. Po zniszczeniu komórek są uwalniane z nich antygeny mogące wiązać się z autoprzeciwciałami. Powstałe w ten sposób kompleksy immunologiczne mogą odkładać się w tkankach. Krążące kompleksy mogą gromadzić się w ścianach naczyń, stawach i nerkach. Mogą także aktywować dopełniacz i indukować stany zapalne uszkodzające tkanki.

Hipoteza dotycząca patogennej roli autoprzeciwciał anty-N-Hcy-białko pozostaje do udowodnienia. Potwierdza ją fakt, że przeciwciała te, należące do klasy IgG są wykrywane u osób chorych częściej i w znacznie wyższych mianach niż u zdrowych [158]. Miano autoprzeciwciał patogennych powinno korelować ze stanem zaawansowania choroby.

Oprócz autoprzeciwciał, które mają bezpośredni wpływ na patogenezę choroby, w trakcie odpowiedzi autoimmunologicznej powstają również autoprzeciwciała, które są wyrazem wtórnej reakcji organizmu na uszkodzenie tkanki i uwolnienie antygenów. Przeciwciała te mogą, ale nie muszą mieć znaczenia w nasileniu procesu chorobowego.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań pozwalają wnioskować o niekorzystnym wpływie N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję białek. Objawia się on wzrostem odporności na proteolizę, spadkiem stabilności oraz nabyciem właściwości antygenowych przez N-Hcy-białko. Cechy te mogą sprzyjać, np. odkładaniu się uszkodzonych w ten sposób cząsteczek w tkankach i narządach, czy indukowaniu odpowiedzi immunologicznej. Wytwarzanie przeciwciał skierowanych przeciwko zmienionym, własnym białkom, może prowadzić do nasilenia się reakcji zapalnej, której wystąpienie jest ściśle związane z zapoczątkowaniem i progresją miażdżycy.

6 Wnioski

1. N-Hcy-białko jest mieszaniną molekuł zmodyfikowanych w różnym stopniu. Resztami Lys cytochromu c ulegającymi preferencyjnej N-homocysteinyłacji są Lys 8 lub 13, Lys 86 lub 87 oraz Lys 99 i 100. W przypadku transferyny zidentyfikowano trzy reszty Lys zmodyfikowane HTL: Lys 25, 39 i 638.
2. N-homocysteinyłacja może wywoływać subtelne zmiany strukturalne, objawiające się zwiększoną odpornością białka na proteolizę (N-Hcy-cytochrom c) oraz zmniejszoną odpornością na podwyższoną temperaturę (N-Hcy-transferyna). Modyfikacja ta nie wpływa jednak, na strukturę drugorzędową analizowanych białek modelowych.
3. Podczas N-homocysteinyłacji ma miejsce redukcja żelaza hemu cytochromu c i mioglobiny.
4. N ω -Hcy-aminoheksylo-agaroza jest użytecznym podłożem do oczyszczania przeciwciał specyficznych względem N-Hcy-białek. Przeciwciała te otrzymano przez immunizację królików N ϵ -Hcy-Lys-KLH. Dostępność uzyskanych immunoglobulin jest istotna dla rozwoju metod badania roli białek zmodyfikowanych tiolaktonem homocysteiny w przypadku chorób człowieka.
5. Przeciwciała anty-N-Hcy-białko są pomocnym narzędziem do detekcji białek zmodyfikowanych tiolaktonem homocysteiny, zarówno w białkach zmodyfikowanych *in vitro*, jak i w tkankach człowieka.
6. Immunoglobuliny klasy M, wykryte w surowicy krwi człowieka, są słabo skorelowane z poziomem homocysteiny, nie korelują natomiast z parametrami gospodarki lipidowej, ani wiekiem. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie IgM anty-N-Hcy-albumina w zależności od płci, występowania choroby niedokrwiennej serca ani stopnia zaawansowania choroby miażdżycowej.

7 Streszczenie

Homocysteina (Hcy) jest aminokwasem związanym z metabolizmem metioniny i cysteiny, którego stężenie w organizmie człowieka jest ściśle regulowane. Zaburzenia w homeostazie Hcy prowadzą do wzrostu jej stężenia w organizmie człowieka. Podwyższony poziom tego aminokwasu w osoczu jest czynnikiem ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Wśród hipotez mechanizmu toksyczności Hcy, popieranych rosnącą liczbą danych eksperymentalnych, jest niekorzystne oddziaływanie tiolaktonu homocysteiny (HTL) na białka.

Celem pracy było określenie wpływu modyfikacji tiolaktonem homocysteiny na strukturę i funkcję białek, z uwzględnieniem antygenowych właściwości N-homocysteinylowanych białek. Badania strukturalne przeprowadzono na białkach modelowych: cytochromie c, mioglobinie, ferrytynie i transferynie. Do badań immunologicznych wykorzystano zwierzęta doświadczalne, które służyły jako źródło specyficznych przeciwciał. Uzyskane IgG wykorzystano do identyfikacji N-Hcy-białek w tkankach układu krążenia pacjentów chorych na miażdżycę. Odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko N-Hcy-białku mierzono w surowicy ponad 150 osób z chorobą niedokrwienią serca oraz zdrowych.

Wyniki badań strukturalnych pozwoliły stwierdzić, że N-Hcy-białko jest mieszaniną molekuł z różną liczbą przyłączonych reszt Hcy, N-homocysteinyłacja nie wpływa na strukturę drugorzędową analizowanych białek modelowych, N-Hcy-cytochrom c jest bardziej odporny na proteolizę niż białko natywne oraz, że N-Hcy-transferyna ma zmniejszoną odporność na podwyższoną temperaturę. Zidentyfikowano również reszty lizyny ulegające preferencyjnej N-homocysteinyłacji.

Wyprodukowane przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko N-Hcy-białku mogą być oczyszczone na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarozie i służyć do detekcji białek zmodyfikowanych HTL. Za pomocą IgG anty-N-Hcy-białko wykazano obecność N-Hcy-białek w tkankach serca osób cierpiących na miażdżycę.

Ig M specyficzne względem N-Hcy-białka są słabo skorelowane dodatnio z poziomem homocysteiny osocza człowieka, nie korelują natomiast z parametrami gospodarki lipidowej, ani wiekiem.

8 Piśmiennictwo

1. Brosnan, J.T., R.L. Jacobs, L.M. Stead, and M.E. Brosnan, *Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(2): p. 405-13.
2. Jakubowski, H. and A.R. Fersht, *Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases*. Nucleic Acids Res, 1981. **9**(13): p. 3105-17.
3. Jakubowski, H., *Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 3957-62.
4. Zimny, J., D. Iwanowska, E. Starzynska, H. Jakubowski, and A. Guranowski, *Homocysteine thiolactone is a substrate of bleomycin hydrolase/cysteine protease/gal6 protein*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**: p. A23.
5. Perdziak, M., J. Zimny, H. Jakubowski, and A. Guranowski, *Human placental protein purified as homocysteine-thiolactone hydrolase has been identified as human bleomycin hydrolase*. Acta Biochim Polon, 2005. **50**((Suppl. 1)): p. 184.
6. Ueland, P.M. and H. Refsum, *Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy*. J Lab Clin Med, 1989. **114**(5): p. 473-501.
7. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *Higher export rate of homocysteine in a human endothelial cell line than in other human cell lines*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1448**(1): p. 61-9.
8. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures*. Toxicology, 1997. **117**(2-3): p. 89-97.
9. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress*. Toxicology, 1997. **123**(1-2): p. 33-40.
10. Ewadh, M.J., N. Tudball, and F.A. Rose, *Homocysteine uptake by human umbilical vein endothelial cells in culture*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1054**(3): p. 263-6.
11. Drunat, S., N. Moatti, J.L. Paul, A. Cogny, M.O. Benoit, and K. Demuth, *Homocysteine-induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products*. Eur J Biochem, 2001. **268**(20): p. 5287-94.
12. Hultberg, B., *Modulation of extracellular homocysteine concentration in human cell lines*. Clin Chim Acta, 2003. **330**(1-2): p. 151-9.
13. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *Thiol redox status influences extracellular concentration of homocysteine in HeLa cell cultures*. Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(12): p. 1243-7.
14. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines*. Toxicology, 2000. **147**(2): p. 69-75.
15. Noga, A.A., L.M. Stead, Y. Zhao, M.E. Brosnan, J.T. Brosnan, and D.E. Vance, *Plasma homocysteine is regulated by phospholipid methylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5952-5.
16. Jacobsen, D.W., *Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease*. Clin Chem, 1998. **44**(8 Pt 2): p. 1833-43.
17. Jakubowski, H., *Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30425-8.
18. Chwatko, G. and H. Jakubowski, *The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma*. Anal Biochem, 2005. **337**(2): p. 271-7.
19. Chwatko, G. and H. Jakubowski, *Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans*. Clin Chem, 2005. **51**(2): p. 408-15.
20. Mudd, S.H., J.D. Finkelstein, H. Refsum, P.M. Ueland, M.R. Malinow, S.R. Lentz, D.W. Jacobsen, L. Brattstrom, B. Wilcken, D.E. Wilcken, H.J. Blom, S.P. Stabler, R.H. Allen, J. Selhub, and I.H. Rosenberg, *Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(7): p. 1704-6.
21. McDowell, I.F. and D. Lang, *Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 369S-372S.
22. Jakubowski, H., *Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels*. Faseb J, 1999. **13**(15): p. 2277-83.

23. Heinecke, J.W., M. Kawamura, L. Suzuki, and A. Chait, *Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms*. J Lipid Res, 1993. **34**(12): p. 2051-61.
24. Starkebaum, G. and J.M. Harlan, *Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine*. J Clin Invest, 1986. **77**(4): p. 1370-6.
25. Epstein, F.H., *Homocysteine and atherothrombosis*. N Engl J Med, 1998. **338**: p. 1042-1050.
26. Thambyrajah, J. and J.N. Townend, *Homocysteine and atherothrombosis--mechanisms for injury*. Eur Heart J, 2000. **21**(12): p. 967-74.
27. Undas, A., E.B. Williams, S. Butenas, T. Orfeo, and K.G. Mann, *Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4389-97.
28. Lentz, S.R. and J.E. Sadler, *Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 1906-14.
29. Lentz, S.R., D.J. Piegors, J.A. Fernandez, R.A. Erger, E. Arning, M.R. Malinow, J.H. Griffin, T. Bottiglieri, W.G. Haynes, and D.D. Heistad, *Effect of hyperhomocysteinemia on protein C activation and activity*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2108-12.
30. Podda, G., E.M. Faioni, M.L. Zighetti, and M. Cattaneo, *No effect of fasting plasma total homocysteine on protein C activity in vitro*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2446-7.
31. Zarychanski, R. and D.S. Houston, *Plasma homocysteine concentration is not associated with activated protein C resistance in patients investigated for hypercoagulability*. Thromb Haemost, 2004. **91**: p. 1115-22.
32. Nishinaga, M., T. Ozawa, and K. Shimada, *Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1381-6.
33. Hajjar, K.A., *Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2873-9.
34. Van den Berg, M., G.H. Boers, D.G. Franken, H.J. Blom, G.J. Van Kamp, C. Jakobs, J.A. Rauwerda, C. Kluft, and C.D. Stehouwert, *Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(3): p. 176-81.
35. Sauls, D.L., A.S. Wolberg, and M. Hoffman, *Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(2): p. 300-6.
36. Sauls, D.L., E. Lockhart, and M. Hoffman, *Reaction of fibrinogen with homocysteine thiolactone renders the resulting fibrin clots resistant to lysis*. J Thromb Haemost, 2005. **3** (suppl 1): OR 130.
37. Undas, A., J. Brozek, M. Jankowski, Z. Siudak, A. Szczeklik, and H. Jakubowski, *Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1397-404.
38. Demuth, K., V. Atger, D. Borderie, M.O. Benoit, D. Sauvaget, S. Lotersztajn, and N. Moatti, *Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells*. Eur J Biochem, 1999. **263**(2): p. 367-76.
39. Upchurch, G.R., Jr., G.N. Welch, A.J. Fabian, J.E. Freedman, J.L. Johnson, J.F. Keaney, Jr., and J. Loscalzo, *Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17012-7.
40. Wang, J., N.P. Dudman, and D.E. Wilcken, *Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells*. Thromb Haemost, 1993. **70**(6): p. 1047-52.
41. Tawakol, A., T. Omland, M. Gerhard, J.T. Wu, and M.A. Creager, *Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans*. Circulation, 1997. **95**(5): p. 1119-21.
42. Chambers, J.C., O.A. Obeid, and J.S. Kooner, *Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(12): p. 2922-7.
43. Poddar, R., N. Sivasubramanian, P.M. DiBello, K. Robinson, and D.W. Jacobsen, *Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease*. Circulation, 2001. **103**(22): p. 2717-23.
44. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.

45. Berliner, J.A., M. Navab, A.M. Fogelman, J.S. Frank, L.L. Demer, P.A. Edwards, A.D. Watson, and A.J. Lusis, *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*. Circulation, 1995. **91**(9): p. 2488-96.
46. Lentz, S.R. and J.E. Sadler, *Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum*. Blood, 1993. **81**(3): p. 683-9.
47. Austin, R.C., S.R. Lentz, and G.H. Werstuck, *Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S56-64.
48. Nonaka, H., T. Tsujino, Y. Watari, N. Emoto, and M. Yokoyama, *Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine*. Circulation, 2001. **104**(10): p. 1165-70.
49. Roybal, C.N., S. Yang, C.W. Sun, D. Hurtado, D.L. Vander Jagt, T.M. Townes, and S.F. Abcouwer, *Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14844-52.
50. Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, and H.F. Dvorak, *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
51. Abcouwer, S.F., P.L. Marjon, R.K. Loper, and D.L. Vander Jagt, *Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(8): p. 2791-8.
52. Jacobsen, D.W., O. Catanescu, P.M. Dibello, and J.C. Barbato, *Molecular targeting by homocysteine: a mechanism for vascular pathogenesis*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(10): p. 1076-83.
53. Ueland, P.M., M.A. Mansoor, A.B. Guttormsen, F. Muller, P. Aukrust, H. Refsum, and A.M. Svardal, *Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other amino thiols in plasma comprise the redox thiol status—a possible element of the extracellular antioxidant defense system*. J Nutr, 1996. **126**(4 Suppl): p. 1281S-4S.
54. Hultberg, B., A. Andersson, and A. Isaksson, *Protein binding of homocysteine and other thiols in HeLa cell cultures after addition of homocysteine and copper ions*. Clin Chim Acta, 1998. **269**(2): p. 175-84.
55. Togawa, T., S. Sengupta, H. Chen, K. Robinson, I. Nonevski, A.K. Majors, and D.W. Jacobsen, *Mechanisms for the formation of protein-bound homocysteine in human plasma*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(3): p. 668-74.
56. Jakubowski, H., L. Zhang, A. Bardeguet, and A. Aviv, *Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis*. Circ Res, 2000. **87**(1): p. 45-51.
57. Peters, T., *All about albumin*. 1996, San Diego, CA: Academic Press Inc. pp. 51-54.
58. Sengupta, S., H. Chen, T. Togawa, P.M. DiBello, A.K. Majors, B. Budy, M.E. Ketterer, and D.W. Jacobsen, *Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30111-7.
59. Benesch, R.E. and R. Benesch, *The acid strength of the -SH group in cysteine and related compounds*. J Am Chem Soc, 1955. **77**: p. 5877-5881.
60. Reuben, D.M.E. and T.C. Bruice, *Reaction of thiol anions with benzene oxide and malachite green*. J Am Chem Soc, 1976. **98**: p. 114-121.
61. Gilbert, H.F., *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1990. **63**: p. 69-172.
62. Sengupta, S., C. Wehbe, A.K. Majors, M.E. Ketterer, P.M. DiBello, and D.W. Jacobsen, *Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46896-904.
63. Majors, A.K., S. Sengupta, B. Willard, M.T. Kinter, R.E. Pyeritz, and D.W. Jacobsen, *Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(8): p. 1354-9.
64. Sass, J.O., T. Nakanishi, T. Sato, W. Sperl, and A. Shimizu, *S-homocysteinylation of transthyretin is detected in plasma and serum of humans with different types of hyperhomocysteinemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(1): p. 242-6.

65. Lim, A., S. Sengupta, M.E. McComb, R. Theberge, W.G. Wilson, C.E. Costello, and D.W. Jacobsen, *In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49707-13.
66. Hajjar, K.A., L. Mauri, A.T. Jacovina, F. Zhong, U.A. Mirza, J.C. Padovan, and B.T. Chait, *Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9987-93.
67. Roda, O., M.L. Valero, S. Peiro, D. Andreu, F.X. Real, and P. Navarro, *New insights into the tPA-annexin A2 interaction. Is annexin A2 CYS8 the sole requirement for this association?* J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5702-9.
68. Jakubowski, H., *Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4504-8.
69. Jakubowski, H., *Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Embo J, 1991. **10**(3): p. 593-8.
70. Jakubowski, H. and E. Goldman, *Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells*. FEBS Lett, 1993. **317**(3): p. 237-40.
71. Jakubowski, H., *Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels*. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 1935-42.
72. Jakubowski, H., *Proofreading in vivo. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17672-3.
73. Gao, W., E. Goldman, and H. Jakubowski, *Role of carboxy-terminal region in proofreading function of methionyl-tRNA synthetase in Escherichia coli*. Biochemistry, 1994. **33**(38): p. 11528-35.
74. Kim, H.Y., G. Ghosh, L.H. Schulman, S. Brunie, and H. Jakubowski, *The relationship between synthetic and editing functions of the active site of an aminoacyl-tRNA synthetase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11553-7.
75. Jakubowski, H., *Molecular basis of homocysteine toxicity in humans*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(4): p. 470-87.
76. Mercie, P., O. Garnier, L. Lascoste, M. Renard, C. Closse, F. Durrieu, G. Marit, R.M. Boisseau, and F. Belloc, *Homocysteine-thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features*. Apoptosis, 2000. **5**(5): p. 403-11.
77. Huang, R.F., S.M. Huang, B.S. Lin, J.S. Wei, and T.Z. Liu, *Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells*. Life Sci, 2001. **68**(25): p. 2799-811.
78. Kamudhamas, A., L. Pang, S.D. Smith, Y. Sadovsky, and D.M. Nelson, *Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction?* Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(2): p. 563-71.
79. Kerkeni, M., M. Tnani, L. Chuniaud, A. Miled, K. Maaroufi, and F. Trivin, *Comparative Study on in Vitro Effects of Homocysteine Thiolactone and Homocysteine on HUVEC Cells: Evidence for a Stronger Proapoptotic and Proinflammatory Homocysteine Thiolactone*. Mol Cell Biochem, 2006.
80. Jakubowski, H., *Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 377S-381S.
81. Jakubowski, H., *Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis*. J Nutr, 2001. **131**(11): p. 2983S-7S.
82. Jakubowski, H., *The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples*. Anal Biochem, 2002. **308**(1): p. 112-9.
83. Daneshvar, P., M. Yazdanpanah, C. Cuthbert, and D.E. Cole, *Quantitative assay of plasma homocysteine thiolactone by gas chromatography/mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(4): p. 358-62.
84. Uji, Y., Y. Motomiya, N. Hanyu, F. Ukaji, and H. Okabe, *Protein-bound homocystamide measured in human plasma by HPLC*. Clin Chem, 2002. **48**(6 Pt 1): p. 941-4.
85. Mansoor, M.A., A.M. Svardal, and P.M. Ueland, *Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma*. Anal Biochem, 1992. **200**(2): p. 218-29.
86. Sugio, S., A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, and K. Kobayashi, *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. Protein Eng, 1999. **12**(6): p. 439-46.
87. Glowacki, R. and H. Jakubowski, *Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 10864-71.

88. Mackness, M.I., S. Arrol, C. Abbott, and P.N. Durrington, *Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase*. *Atherosclerosis*, 1993. **104**(1-2): p. 129-35.
89. Aviram, M., M. Rosenblat, C.L. Bisgaier, R.S. Newton, S.L. Primo-Parmo, and B.N. La Du, *Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(8): p. 1581-90.
90. Ferretti, G., T. Bacchetti, E. Marotti, and G. Curatola, *Effect of homocysteinylolation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity*. *Metabolism*, 2003. **52**(2): p. 146-51.
91. Pirillo, A., W. Zhu, G.D. Norata, T. Zanelli, L. Barberi, P. Roma, and A.L. Catapano, *Oxidized lipoproteins and endothelium*. *Clin Chem Lab Med*, 2000. **38**(2): p. 155-60.
92. Salvayre, R., N. Auge, H. Benoist, and A. Negre-Salvayre, *Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1585**(2-3): p. 213-21.
93. Uchida, K., S. Toyokuni, K. Nishikawa, S. Kawakishi, H. Oda, H. Hiai, and E.R. Stadtman, *Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis*. *Biochemistry*, 1994. **33**(41): p. 12487-94.
94. Olszewski, A.J. and K.S. McCully, *Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **14**(6): p. 683-93.
95. Naruszewicz, M., E. Mirkiewicz, A.J. Olszewski, and K.S. McCully, *Thiolation of low-density lipoprotein by homocysteine-thiolactone causes increased aggregation and interaction with cultured macrophages*. *Natr Metab Cardiovasc Dis*, 1994. **4**: p. 70-77.
96. Ferguson, E., S. Parthasarathy, J. Joseph, and B. Kalyanaraman, *Generation and initial characterization of a novel polyclonal antibody directed against homocysteine thiolactone-modified low density lipoprotein*. *J Lipid Res*, 1998. **39**(4): p. 925-33.
97. Rowley, D.A. and B. Halliwell, *Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds*. *FEBS Lett*, 1982. **138**(1): p. 33-6.
98. Sauls, D.L., E. Lockhart, M.E. Warren, A. Lenkowski, S.E. Wilhelm, and M. Hoffman, *Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia*. *Biochemistry*, 2006. **45**(8): p. 2480-7.
99. Steinbrecher, U.P., M. Fisher, J.L. Witztum, and L.K. Curtiss, *Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine*. *J Lipid Res*, 1984. **25**(10): p. 1109-16.
100. Yla-Herttuala, S., W. Palinski, M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, T.E. Carew, S. Butler, J.L. Witztum, and D. Steinberg, *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(4): p. 1086-95.
101. Undas, A., J. Perla, M. Lacinski, W. Trzeciak, R. Kazmierski, and H. Jakubowski, *Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis*. *Stroke*, 2004. **35**(6): p. 1299-304.
102. Binder, C.J., M.K. Chang, P.X. Shaw, Y.I. Miller, K. Hartvigsen, A. Dewan, and J.L. Witztum, *Innate and acquired immunity in atherogenesis*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1218-26.
103. Undas, A., M. Celinska-Lowenhoff, T.B. Domagala, T. Iwaniec, J. Dropinski, T. Lowenhoff, and A. Szczeklik, *Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(1): p. 193-9.
104. James, R.W., I. Leviev, J. Ruiz, P. Passa, P. Froguel, and M.C. Garin, *Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2000. **49**(8): p. 1390-3.
105. Humbert, R., D.A. Adler, C.M. Distèche, C. Hassett, C.J. Omiecinski, and C.E. Furlong, *The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism*. *Nat Genet*, 1993. **3**(1): p. 73-6.
106. Jakubowski, H., W.T. Ambrosius, and J.H. Pratt, *Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis*. *FEBS Lett*, 2001. **491**(1-2): p. 35-9.
107. Lacinski, M., W. Skorupski, A. Cieslinski, J. Sokolowska, W.H. Trzeciak, and H. Jakubowski, *Determinants of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase-1 (PON1) protein in humans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2004. **50**(8): p. 885-93.

108. Zimny, J., M. Sikora, A. Guranowski, and H. Jakubowski, *Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase*. J Biol Chem, 2006. **281**: p. 22485-22492.
109. Vidal, M., J. Sainte-Marie, J. Philippot, and A. Bienvenue, *Thiolation of low-density lipoproteins and their interaction with L2C leukemic lymphocytes*. Biochimie, 1986. **68**(5): p. 723-30.
110. Ferguson, E., N. Hogg, W.E. Antholine, J. Joseph, R.J. Singh, S. Parthasarathy, and B. Kalyanaraman, *Characterization of the adduct formed from the reaction between homocysteine thiolactone and low-density lipoprotein: antioxidant implications*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(7-8): p. 968-77.
111. Margoliash, E., E.L. Smith, G. Kreil, and H. Tuppy, *Amino-acid sequence of horse heart cytochrome c*. Nature, 1961. **192**: p. 1121-7.
112. Fandrich, M., V. Forge, K. Buder, M. Kittler, C.M. Dobson, and S. Diekmann, *Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15463-8.
113. You, S.A., S.R. Archacki, G. Angheloiu, C.S. Moravec, S. Rao, M. Kinter, E.J. Topol, and Q. Wang, *Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis*. Physiol Genomics, 2003. **13**(1): p. 25-30.
114. Jemmerson, R., J. Liu, D. Hausauer, K.P. Lam, A. Mondino, and R.D. Nelson, *A conformational change in cytochrome c of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles*. Biochemistry, 1999. **38**(12): p. 3599-609.
115. Qi, P.X., R.A. Beckman, and A.J. Wand, *Solution structure of horse heart ferricytochrome c and detection of redox-related structural changes by high-resolution 1H NMR*. Biochemistry, 1996. **35**(38): p. 12275-86.
116. Feng, Y., H. Roder, and S.W. Englander, *Redox-dependent structure change and hyperfine nuclear magnetic resonance shifts in cytochrome c*. Biochemistry, 1990. **29**(14): p. 3494-504.
117. Cortese, J.D., A.L. Voglino, and C.R. Hackenbrock, *Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c*. Biochemistry, 1998. **37**(18): p. 6402-9.
118. Takemori, S., K. Wada, K. Ando, M. Hosokawa, I. Sekuzu, and K. Okunuki, *Studies on cytochrome a. VIII. Reaction of cytochrome a with chemically modified cytochrome c and basic proteins*. J Biochem (Tokyo), 1962. **52**: p. 28-37.
119. Wada, K. and K. Okunuki, *Studies on chemically modified cytochrome c. I. The acetylated cytochrome c*. J Biochem (Tokyo), 1968. **64**(5): p. 667-81.
120. Varhac, R., M. Antalik, and M. Bano, *Effect of temperature and guanidine hydrochloride on ferrocyclochrome c at neutral pH*. J Biol Inorg Chem, 2004. **9**(1): p. 12-22.
121. Kendrew, J.C., G. Bodo, H.M. Dintzis, R.G. Parrish, H. Wyckoff, and D.C. Phillips, *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis*. Nature, 1958. **181**(4610): p. 662-6.
122. Kendrew, J.C., *Myoglobin and the structure of proteins*. Science, 1963. **139**: p. 1259-66.
123. Maurus, R., R. Bogumil, N.T. Nguyen, A.G. Mauk, and G. Brayer, *Structural and spectroscopic studies of azide complexes of horse heart myoglobin and the His-64-->Thr variant*. Biochem J, 1998. **332** (Pt 1): p. 67-74.
124. Kooyman, G.L. and P.J. Ponganis, *The physiological basis of diving to depth: birds and mammals*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 19-32.
125. Hochachka, P.W., *The metabolic implications of intracellular circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12233-9.
126. Wittenberg, J.B. and B.A. Wittenberg, *Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function*. Annu Rev Biophys Chem, 1990. **19**: p. 217-41.
127. Galaris, D., E. Cadenas, and P. Hochstein, *Redox cycling of myoglobin and ascorbate: a potential protective mechanism against oxidative reperfusion injury in muscle*. Arch Biochem Biophys, 1989. **273**(2): p. 497-504.
128. Miura, T., S. Muraoka, and Y. Fujimoto, *Inactivation of creatine kinase induced by dopa and dopamine in the presence of ferrylmyoglobin*. Chem Biol Interact, 1999. **123**(1): p. 51-61.
129. Granier, T., B. Gallois, A. Dautant, B. Langlois d'Estaintot, and G. Precigoux, *Comparison of the structures of the cubic and tetragonal forms of horse-spleen apoferritin*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1997. **53**(Pt 5): p. 580-7.

130. Hempstead, P.D., S.J. Yewdall, A.R. Fernie, D.M. Lawson, P.J. Artymiuk, D.W. Rice, G.C. Ford, and P.M. Harrison, *Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution*. J Mol Biol, 1997. **268**(2): p. 424-48.
131. Harrison, P.M. and P. Arosio, *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
132. Yang, A.H., R.T. MacGillivray, J. Chen, Y. Luo, Y. Wang, G.D. Brayer, A.B. Mason, R.C. Woodworth, and M.E. Murphy, *Crystal structures of two mutants (K206Q, H207E) of the N-lobe of human transferrin with increased affinity for iron*. Protein Sci, 2000. **9**(1): p. 49-52.
133. von Bonsdorff, L., L. Sahlstedt, F. Ebeling, T. Ruutu, and J. Parkkinen, *Apo-transferrin administration prevents growth of Staphylococcus epidermidis in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **37**(1): p. 45-51.
134. Ardehali, R., L. Shi, J. Janatova, S.F. Mohammad, and G.L. Burns, *The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apo-transferrin*. J Biomed Mater Res A, 2003. **66**(1): p. 21-8.
135. Fassl, S., C. Leisser, S. Huettenbrenner, S. Maier, G. Rosenberger, S. Strasser, M. Grusch, G. Fuhrmann, K. Leuhuber, D. Polgar, J. Stani, B. Tichy, C. Nowotny, and G. Krupitza, *Transferrin ensures survival of ovarian carcinoma cells when apoptosis is induced by TNFalpha, FasL, TRAIL, or Myc*. Oncogene, 2003. **22**(51): p. 8343-55.
136. Gomme, P.T., K.B. McCann, and J. Bertolini, *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. Drug Discov Today, 2005. **10**(4): p. 267-73.
137. Perla, J., A. Undas, T. Twardowski, and H. Jakubowski, *Purification of antibodies against N-homocysteinylated proteins by affinity chromatography on Nomega-homocysteinyl-aminohexyl-Agarose*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **807**(2): p. 257-61.
138. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys, 1959. **82**(1): p. 70-7.
139. Kraj, A. and J. Silberring, *Proteomika*. 2004, Kraków: Wydział Chemii UJ.
140. Greenfield, N., *Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis*. Trends in Analytical Chemistry, 1999. **18**(4): p. 236-244.
141. Gong, J., P. Yao, H. Duan, M. Jiang, S. Gu, and L. Chunyu, *Structural transformation of cytochrome c and apo cytochrome c induced by sulfonated polystyrene*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1293-300.
142. Ross, D.C., T.J. Egan, and L.R. Purves, *Periodate modification of human serum transferrin Fe(III)-binding sites. Inhibition of carbonate insertion into Fe(III)- and Cu(II)-chelator-transferrin ternary complexes*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12404-10.
143. Pace, C.N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray, *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): p. 2411-23.
144. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W668-73.
145. Sreerama, N. and R.W. Woody, *A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism*. Anal Biochem, 1993. **209**(1): p. 32-44.
146. Sreerama, N., S.Y. Venyaminov, and R.W. Woody, *Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy*. Protein Sci, 1999. **8**(2): p. 370-80.
147. Provencher, S.W. and J. Glockner, *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*. Biochemistry, 1981. **20**(1): p. 33-7.
148. van Stokkum, I.H., H.J. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle, and F.C. Groen, *Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra*. Anal Biochem, 1990. **191**(1): p. 110-8.
149. Compton, L.A. and W.C. Johnson, Jr., *Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication*. Anal Biochem, 1986. **155**(1): p. 155-67.
150. Manavalan, P. and W.C. Johnson, Jr., *Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra*. Anal Biochem, 1987. **167**(1): p. 76-85.
151. Andrade, M.A., P. Chacon, J.J. Merelo, and F. Moran, *Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network*. Protein Eng, 1993. **6**(4): p. 383-90.

152. Stanisz, M., *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny*. 2001, Kraków: StatSoft Polska.
153. *STATISTICA 5.1*. 1997, StatSoft.
154. Jakubowski, H., *Pathophysiological consequences of homocysteine excess*. J Nutr, 2006. **136**(6 Suppl): p. 1741S-1749S.
155. Butt, W.D. and D. Keilin, *Absorption spectra and some other properties of cytochrome c and of its compounds with ligands*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1962. **156**: p. 429-58.
156. Eaton, W.A. and R.M. Hochstrasser, *Single-crystal spectra of ferrimyoglobin complexes in polarized light*. J Chem Phys, 1968. **49**(3): p. 985-95.
157. Eaton, W.A. and R.M. Hochstrasser, *Electronic spectrum of single crystals of ferricytochrome-c*. J Chem Phys, 1967. **46**(7): p. 2533-9.
158. Undas, A., M. Jankowski, M. Twardowska, A. Padjas, H. Jakubowski, and A. Szczeklik, *Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men*. Thromb Haemost, 2005. **93**(2): p. 346-50.
159. Fersht, A., *Structure and mechanism in protein science, A guide to enzyme catalysis and protein folding*. 3Rev ed. 1999: W. H. Freeman. 650.
160. Spraggon, G., S.J. Everse, and R.F. Doolittle, *Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 455-62.
161. Terman, A., *Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage?* Redox Rep, 2001. **6**(1): p. 15-26.
162. Carini, M., G. Aldini, and R.M. Facino, *Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins*. Mass Spectrom Rev, 2004. **23**(4): p. 281-305.
163. Bartosz, G., *Druga twarz tlenu*. Wydanie drugie zmienione ed. 2003, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN. 447.
164. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
165. Ferretti, G., T. Bacchetti, C. Moroni, A. Vignini, L. Nanetti, and G. Curatola, *Effect of homocysteinylated low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells*. J Cell Biochem, 2004. **92**(2): p. 351-60.
166. Uchida, K., L.I. Szewda, H.Z. Chae, and E.R. Stadtman, *Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8742-6.
167. Wang, G. and K. O., *Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 233-40.
168. Wang, G., Y.L. Siow, and K. O., *Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappaB in THP-1 macrophages*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2840-7.
169. Hofmann, M.A., E. Lalla, Y. Lu, M.R. Gleason, B.M. Wolf, N. Tanji, L.J. Ferran, Jr., B. Kohl, V. Rao, W. Kiesel, D.M. Stern, and A.M. Schmidt, *Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model*. J Clin Invest, 2001. **107**(6): p. 675-83.
170. Virella, G., S.R. Thorpe, N.L. Alderson, E.M. Stephan, D. Atchley, F. Wagner, and M.F. Lopes-Virella, *Autoimmune response to advanced glycosylation end-products of human LDL*. J Lipid Res, 2003. **44**(3): p. 487-93.

9 Aneks I - Wykaz skrótów

AARS	syntetaza aminoacylo-tRNA
AMP	monofosforan adenozyiny
APC	aktywowane białko C
APS	nadsiarczan amonu
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	asparaginan
ATF4, 6	aktywujący czynnik transkrypcyjny 4, 6
ATP	trójfosforan adenozyiny
BSA	albumina surowicy wołowej
CAD, ICD	choroba niedokrwienna serca
CBS	β -syntaza cystationiny
CD	dichroizm kołowy
CHO	komórki jajnika chomika chińskiego
Cys	cysteina
DSC	różnicowa kalorymetria skaningowa
DTNB	kwask 5,5'-dwutio-bis(2-nitrobenzoesowy)
DTT	ditiotreitól
EC-SOD	zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa
EDC	karbomid N-etylo-N'-(dietylaminopropylu)
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
eIF2 α	eukariotyczny czynnik inicjujący 2 α
ELISA	plytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej
ER	siateczka śródplazmatyczna
ET-1	endotelina-1
GADD153	czynnik transkrypcyjny indukowany przez stres ER
GalNAc	N-acetylogalaktozamina
GdnHCl	chlorowodorek guanidyny
GlcNAc	N-acetyloglukozamina
Gln	glutamina
Glu	glutaminian
Gly	glicyna
GRP78	białko szoku cieplnego 70 kDa
GRP94	białko szoku cieplnego 90 kDa
HAEC	komórki śródbłónka aorty człowieka
Hcy	homocysteina
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości
HDL-C	cholesterol frakcji HDL
H+E	hematoksylina i eozyna
HeLa	komórki raka szyjki macicy
His	histydyna
HIV	ludzki wirus niedoboru immunologicznego
HTL	tiolakton homocysteiny
HUVEC	komórki śródbłónka ludzkiej żyły pępowinowej
IAA	amid kwasu jodooctowego
IgG	immunoglobulina klasy G
IgM	immunoglobulina klasy M
IL-8	interleukina-8
IleRS	syntetaza izoleucylo-tRNA
IRE1	kinaza serynowo-treoninowa i endonukleaza; białko transbłónowe, które inicjuje UPR

KLH	hemocyjanina skałoczepeu morskiego
LA	kwasy α-liponowe
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas
LDL	lipoproteina o niskiej gęstości
LDL-C	cholesterol frakcji LDL
Leu	leucyna
LeuRS	syntetaza leucylo-tRNA
Lys	lizyna
LysRS	syntetaza lizylo-tRNA
MALDI/TOF	desorpcja/jonizacja laserowa wspomaganą matrycą z detekcją czasu przelotu
MCP-1	białko chemotaksji monocytów 1
Met	metionina
MetRS	syntetaza metionylo-tRNA
MS	syntaza metioniny
MTHF	N ⁵ -metylotetrahydrofolian
MTHFR	reduktaza N ⁵ -metylotetrahydrofolianu
NAC	N-acetylocysteina
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NF-κB	czynnik jądrowy κB
NHS	imid kwasu N-hydroksybursztynowego
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
OPD	o-fenylendiamina
PERK	kinaza ER PKP-podobna
Phe	fenyloalanina
Pi	ortofosforan
PNPP	fosforan p-nitrofenolu
PON	paraoksonaza
PPi	pirofosforan
RAG	komórki raka nerki myszy
SAH	S-adenozylhomocysteina
SAM	S-adenozylometionina
SD	odchylenie standardowe
SDS	dodecylosiarczan sodu
Ser	seryna
SPR	rezonans plazmonów powierzchniowych
TAG	triacyloglicerol
TC	całkowity cholesterol
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuamina
TMB	3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna
TPA	specyficzny tkankowo aktywator plazminogenu
Trp	tryptofan
Tyr	tyrozyna
UPR	odpowiedź na niesfałdowane białka
Val	walina
ValRS	syntetaza walilo-tRNA
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
VSMC	komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych

10 Aneks II – Wykaz rysunków i tabel

Rysunki

- Rysunek 1. Homocysteina; wzór strukturalny i model przestrzenny (atomy węgla – kolor turkusowy, siarki – żółty, tlenu – czerwony, azotu – granatowy)5
- Rysunek 2. Metabolizm homocysteiny obejmuje cykl aktywowanego metylu, transsulfurylację oraz cyklizację do tiolaktonu homocysteiny. Pi – ortofosforan, PPi – pirofosforan, TH₄-folian – tetrahydrofolian, X – akceptor grupy metylowej.....6
- Rysunek 3. Formy homocysteiny we krwi człowieka.....9
- Rysunek 4. Wpływ homocysteiny na krzepnięcie krwi i fibrylizację 13
- Rysunek 5. Tiolakton homocysteiny; wzór strukturalny i model przestrzenny (atomy węgla – kolor turkusowy, siarki – żółty, tlenu – czerwony, azotu – granatowy)25
- Rysunek 6. N-homocysteinyłacja białka27
- Rysunek 7. Struktura przestrzenna dimeru albuminy człowieka z uwzględnieniem podziału na domeny: I (kolor niebieski), II (zielony), III (szary). Zaznaczono dystans między atomem siarki łańcucha bocznego C34 a atomem azotu łańcucha bocznego K525 w łańcuchu A i B. Narysowano według 1bm0.pdb [86]29
- Rysunek 8. Model trójwymiarowej struktury cytochromu c ze wskazaniem dodatnio (kolor niebieski) oraz ujemnie (czerwony) naładowanych reszt aminokwasowych eksponowanych na powierzchni białka. Widok od strony szczeliny hemu (A) i od strony przeciwnej (B). Narysowano według 1ocd.pdb [115]37
- Rysunek 9. Różnice strukturalne w miejscu wiązania hemu pomiędzy ferrocytochromem (A) a ferricytochromem (B) serca konia. Narysowano według: 1ocd.pdb (A) i 2frc.pdb (B) [115].....38
- Rysunek 10. Struktura przestrzenna mioglobiny serca konia z grupą hemową (kolor czerwony), która wiąże O₂; w otoczeniu reszt histydyny proksymalnej (H93) i dystalnej (H64) (zielony). Narysowano z 1azi.pdb [123]43
- Rysunek 11. Czwartorzędowa struktura ferrytyny śledziony konia (A) i trzeciorzędowa struktura podjednostki H ferrytyny człowieka (B), składająca się z helis α A – E. Narysowano według 1ies.pdb [129] i 2fha.pdb [130].....44
- Rysunek 12. Struktura przestrzenna płata N transferyny surowicy człowieka z zaznaczonym jonem żelaza oraz resztami kwasu asparaginowego 63 (kolor czarny), Tyr 95, Tyr 188 (niebieski) oraz His 249 (zielony). Według 1d3k.pdb [132]46
- Rysunek 13. Zablockowanie grupy tiolowej białka przez amid kwasu jodooctowego.....55
- Rysunek 14. Porównanie Nε-Hcy-Lys-białka (A) i Nω-Hcy-aminoheksylo-agarozu (B)59
- Rysunek 15. Etapy identyfikacji miejsc potranslacyjnego wbudowywania Hcy do białek *in vitro*.....70
- Rysunek 16. Widmo masowe cytochromu c przed i po modyfikacji tiolaktonem homocysteiny. Stosunek molowy HTL/białko wynosił: 0 (A), 1 (B), 2 (C), 4 (D), 8 (E) i 19 (F).....80
- Rysunek 17. Widmo masowe mioglobiny przed (A) i po modyfikacji 2- (B), 4- (C) i 19-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny.....83

Rysunek 18. Widmo masowe transferyny	83
Rysunek 19. Widmo masowe ferrytyny	84
Rysunek 20. Widmo dichroizmu kołowego cytochromu c w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	88
Rysunek 21. Zawartość procentowa struktur drugorzędowych cytochromu c w zależności od nadmiaru molowego HTL. 1-helisa α , 2-harminijka β , 3-pętla, 4-nieuporządkowane.....	89
Rysunek 22. Widmo dichroizmu kołowego mioglobiny w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	90
Rysunek 23. Zawartość procentowa struktur drugorzędowych mioglobiny w zależności od nadmiaru molowego HTL. 1-helisa α , 2-harminijka β , 3-pętla, 4-nieuporządkowane.....	92
Rysunek 24. Widmo dichroizmu kołowego ferrytyny w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	92
Rysunek 25. Widmo dichroizmu kołowego transferyny w dalekim nadfiolecie. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	93
Rysunek 26. Zawartość procentowa struktur drugorzędowych transferyny w zależności od nadmiaru molowego HTL. 1-helisa α , 2-harminijka β , 3-pętla, 4-nieuporządkowane.....	94
Rysunek 27. Widmo absorpcyjne cytochromu c w regionie widzialnym. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	95
Rysunek 28. Zależność stosunku A550/A520 od czasu modyfikacji cytochromu c inkubowanego z HTL w stosunku molowym 1:1 i bez dodatku HTL (1:0) [A] oraz od nadmiaru molowego HTL [B]. Dane są średnią z trzech eksperymentów \pm odchylenie standardowe.....	96
Rysunek 29. Widmo dichroizmu kołowego cytochromu c w regionie Soreta i widzialnym. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	97
Rysunek 30. Wpływ modyfikacji tiolaktonem homocysteiny (HTL) na widmo absorpcji mioglobiny (Mb) w regionie widzialnym. Warunki pomiaru: 10 mM bufor fosforanowy, pH 7,4, stężenie mioglobiny 29,5 μ M. Stosunek molowy Mb:HTL podczas modyfikacji wynosił: A – 1:0, B – 1:1, C – 1:2, D – 1:4, E – 1:8, F – 1:25	100
Rysunek 31. Widmo dichroizmu kołowego mioglobiny w regionie Soreta i widzialnym. Podano stosunek molowy białko:HTL podczas modyfikacji	101
Rysunek 32. Podatność cytochromu c na proteolizę trypsyną. Dane są średnią z 3 eksperymentów \pm odchylenie standardowe. N-Hcy-białko zmodyfikowane zostało ekwimolarnym stężeniem HTL w stosunku do stężenia reszt lizyny	102
Rysunek 33. Wpływ stopnia modyfikacji cytochromu c tiolaktonem homocysteiny na podatność na trawienie trypsyną. Podano nadmiar molowy HTL podczas modyfikacji	103
Rysunek 34. Wpływ temperatury na strukturę drugorzędową ferrytyny (A) i N-Hcy-ferrytyny śledziona konia (B). Stabilność termiczna N-Hcy-ferrytyny (\blacktriangle) nie różni się zasadniczo od stabilności ferrytyny (\blacklozenge) (C)	104
Rysunek 35. Wpływ temperatury na strukturę drugorzędową transferyny (A) i N-Hcy-transferyny (B). Rozplatanie łańcucha polipeptydowego N-Hcy-transferyny (\blacktriangle) rozpoczyna się w niższej temperaturze i przebiega gwałtowniej niż transferyny (\blacklozenge) (C)	105

Rysunek 36. Krzywe rozcieńczeń surowicy królików nr 1 i 2. W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-albumina. Niespecyficzne wiązanie, z Hcy-Lys jako kompetytorem, zostało odjęte od wiązania w obecności Lys.....	107
Rysunek 37. Porównanie odpowiedzi immunologicznej królika nr 1 i 2 na immunizację N-Hcy-KLH (strzałki oznaczają podanie antygeny). W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-albumina. Niespecyficzne wiązanie w obecności Hcy-Lys jako kompetytora zostało odjęte od wiązania w obecności Lys	108
Rysunek 38. Izolacja przeciwciał z 4 ml surowicy królika nr 1 pobranej w 126 dniu immunizacji. Frakcje I-V zawierają IgG	108
Rysunek 39. Krzywe rozcieńczeń surowicy królika przed i po immunizacji N-Hcy-KLH. W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-albumina. Niespecyficzne wiązanie, z IAA-N-Hcy-albuminą jako antygenem, zostało odjęte od wiązania z N-Hcy-albuminą.....	109
Rysunek 40. Chromatografia króliczych IgG na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarosie	110
Rysunek 41. Obraz elektroforezy w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących:.....	111
Rysunek 42. Aktywność przeciwciał specyficznych względem N-Hcy-białka IgG niezwiązanych, frakcje 2-5, i związanych IgG wymytych buforem o niskim pH (połączone frakcje I i II). W eksperymencie ELISA antygenem była N-Hcy-hemoglobina. Niespecyficzne wiązanie, z hemoglobina jako antygenem, zostało odjęte od wiązania z N-Hcy-hemoglobina	112
Rysunek 43. Specyficzność przeciwciał anty-N-Hcy-białko oczyszczonych na N ω -Hcy-aminoheksylo-agarosie. Wyniki przedstawiono jako B/B ₀ , gdzie B – ilość IgG związanych do N-Hcy-hemoglobiny w obecności kompetytora, B ₀ – ilość IgG związanych bez kompetytora	112
Rysunek 44. Specyficzność przeciwciał niezwiązanych do N ω -Hcy-aminoheksylo-agarosy. Wyniki przedstawiono jako B/B ₀ , gdzie B – ilość IgG związanych w obecności kompetytora, B ₀ – ilość IgG związanych bez kompetytora.....	113
Rysunek 45. Immunoidentyfikacja N-Hcy-cytochromu c i N-Hcy-mioglobiny metodą dot-blot. Białko natywne \blacklozenge , białko zmodyfikowane HTL w stosunku molowym 1:1 \blacksquare , 1:5 \blacktriangle , 1:10 \times	114
Rysunek 46. Immunoidentyfikacja N-Hcy-hemoglobiny i N-Hcy-albuminy metodą dot-blot. Białko natywne \blacklozenge , białko zmodyfikowane HTL w stosunku molowym 1:1 \blacksquare , 1:5 \blacktriangle , 1:10 \times	115
Rysunek 47. N-Hcy-białka zastawki aorty wykrywane za pomocą króliczych IgG (A), tkanka wybarwiona H+E (B), kontrola dodatnia – tkanka preinkubowana z HTL (C), kontrole ujemne – IgG preinkubowane z N-Hcy-albuminą (D), tkanka preinkubowana z IAA (E).....	117
Rysunek 48. N-Hcy-białka miokardium wykrywane za pomocą króliczych IgG (A), tkanka wybarwiona H+E (B), kontrola ujemna – IgG preinkubowane z N-Hcy-albuminą (C).....	118
Rysunek 49. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina u mężczyzn (m) i kobiet (k)	119
Rysunek 50. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina w zależności od występowania choroby niedokrwiennej serca (ICD).....	120
Rysunek 51. Poziom IgM anty-N-Hcy-albumina w podgrupach chorych z różną liczbą tętnic zajętych miażdżycą	120
Rysunek 52. Słaba dodatnia korelacja między logarytmem stężenia homocysteiny (μ M) a poziomem IgM ($r=0,21$, $p=0,013$)	121

- Rysunek 53. Struktura przestrzenna cytochromu c z wyróżnionymi resztami Lys (kolor niebieski) i grupą hemową (czerwony). Narysowano według 1ocd.pdb [115]. Widok z przodu i z tyłu. Reszty Lys 8 lub 13, 86 lub 87 oraz 99 i 100 zidentyfikowano jako miejsca przyłączenia Hcy *in vitro* 125
- Rysunek 54. Struktura przestrzenna płata N transferyny z wyróżnionymi resztami Lys (kolor niebieski). Narysowano według 1d3k.pdb [132]. Reszty Lys 25 i 39 zidentyfikowano jako miejsca przyłączenia Hcy *in vitro* 125

Tabele

Tabela 1. Przedziały stężeń homocysteiny w osoczu krwi człowieka	10
Tabela 2. Czynniki determinujące poziom homocysteiny we krwi człowieka	11
Tabela 3. Przykłady i konsekwencje S-homocysteinyłacji białek	22
Tabela 4 Podział chorych na grupy	50
Tabela 5 Charakterystyka grup chorych	50
Tabela 6. Etapy immunizacji królików	57
Tabela 7. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych.....	57
Tabela 8. Charakterystyka strukturalna białek modelowych.....	74
Tabela 9. Charakterystyka widma masowego cytochromu c zmodyfikowanego 8-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny.....	76
Tabela 10. Charakterystyka widma masowego cytochromu c zmodyfikowanego 19-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu homocysteiny.....	77
Tabela 11. Pokrycie sekwencji białek modelowych przez peptydy. Średnia z n eksperymentów ± odchylenie standardowe.....	85
Tabela 12. Peptydy cytochromu c, w których zidentyfikowano N-homocysteinyłacje	86
Tabela 13. Peptydy transferyny, w których zidentyfikowano N-homocysteinyłacje	86
Tabela 14. Zawartość struktur drugorzędowych cytochromu c obliczona z użyciem algorytmów SELCON3, CONTIN i CDSSTR	89
Tabela 15. Zawartość struktur drugorzędowych mioglobiny obliczona z użyciem algorytmów SELCON3, CONTIN i CDSSTR	91
Tabela 16. Zawartość struktur drugorzędowych transferyny obliczona z użyciem algorytmów SELCON3, CONTIN i CDSSTR	93
Tabela 17. Współczynniki korelacji liniowej Pearsona między poziomem IgM anty-N-Hcy-albumina a wiekiem i parametrami osocza	121
Tabela 18. Położenie reszt lizyny cytochromu c w stosunku do reszt lizyny, histydyny, cysteiny i asparaginianu, w nawiasie podano odległość w Å, na podstawie 1ocd.pdb [115]. Podkreślono reszty Lys zidentyfikowane jako miejsca N-homocysteinyłacji	126

11 Aneks III - Dorobek naukowy

Artykuły eksperymentalne

1. Undas A, **Perła J**, Łaciński M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke*, 2004 Jun;35(6):1299-304
2. **Perła J**, Undas A, Twardowski T, Jakubowski H. Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on N ω -homocysteinyl-aminohexyl-Agarose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2004 Aug 5;807(2):257-261

Artykuły przeglądowe

1. Skołodrzy J, **Perła J**, Smól J, Twardowski T. Metale ciężkie: żelazo, ołów i kadm – czy tylko zagrożenie dla roślin? *Ochrona Roślin*, 2001. 5/6: 2-6
2. **Perła J**, Twardowski T. Ferritin Zmienność ferrytyny w stanach patologicznych. *Postępy biologii komórki*, 2004. 31: 59-70
3. Jakubowski H, **Perła J**, Twardowski T, Łacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Undas A. Relationship between autoantibodies against N-homocysteinylation proteins, homocysteine, and stroke in humans. www.athero.org/commentaries, 2004
4. **Perła-Kaján J**, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of Homocysteine toxicity mechanisms in humans. *Amino Acids*, 2006. Przyjęty do druku.

Komunikaty konferencyjne ustne

1. **Perła J**. Regulatory mechanisms in ferritin biosynthesis - MPI-Poznań Ph.D. Students Meeting 17.01.2002
2. **Perła J**. Ferritin as a marker of cancer diseases?– Polish-German Seminar: Perspectives of structural and computational biology and their practical applications Poznań 25.11.2002
3. **Perła J**. Zmienność ferrytyny w stanach patologicznych – Seminarium instytutowe 16.12.2002
4. **Perła J**. Ferritin in cancer patients – Sesja Sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej 28.04.2003
5. **Perła J**. Polyclonal antibodies against N-homocysteinylation proteins – Sesja Sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej 01.04.2004

6. **Perła J**, Twardowski T, Jakubowski H. Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on N ω -homocysteinyl-aminohexyl-agarose – XV International Congress of the Polish Pharmacological Society Poznań 12-14.09.2004
7. Marczak Ł, **Perła-Kaján J**, Sikora M, Jakubowski H, Twardowski T. Wykorzystanie spektrometrii mas do badania stopnia N-homocysteinylation białek – Seminarium organizowane przez firmę Applied Biosystems Applera Polska „Proteomika w badaniach biologicznych” Poznań 02.06.2006

Komunikaty konferencyjne pisemne (plakaty)

1. **Perła J**, Twardowski T. Ferritin as a marker of cancer diseases?– Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław 18-22.09.2002
2. **Perła J**. Ferritin as a marker of cancer diseases?– Sesja Sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej 25.11.2002
3. **Perła J**. Ferritin in cancer patients - Sesja Sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej 28.04.2003
4. **Perła J**, Twardowski T, Jakubowski H. Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on N ω -homocysteinyl-aminohexyl-Agarose - 9th Workshop of the Molecular Biology section of the Hungarian Biochemistry Society, Sopron, Hungary 10-13.05.2004
5. **Perła J**, Twardowski T, Jakubowski H. Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on N ω -homocysteinyl-aminohexyl-Agarose - 4th Conference on Hyperhomocysteinemia, Saarbrücken, Germany, 14-16.04.2005
6. **Perła-Kaján J**, Marczak Ł. Wpływ N-homocysteinylation na strukturę i funkcję białek – Sesja Sprawozdawcza Instytutu Chemii Bioorganicznej 02-03.03.2006
7. **Perła-Kaján J**, Sikora M, Marczak Ł, Kaján L, Skowronek P, Twardowski T, Jakubowski H. The effect of N-homocysteinylation on protein structure and function – 1st BioScience Partnering Event: Berlin-Brandenburg meets Poznań 31.03.2006