



ROLA N-HOMOCYSTEINYLACJI BIAŁEK
W PATOMECHANIZMIE ZABURZEŃ ZWIĄZANYCH
Z HIPERHOMOCYSTEINEMIA
I PARAOKSONAZY 1 W OCHRONIE
PRZED N-HOMOCYSTEINYLACJĄ

Autoreferat



GRUDZIEŃ 2022

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU
Katedra Biochemii i Biotechnologii

Spis treści

1	Imię i nazwisko.....	2
2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
3	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	2
4	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.....	3
4.1	Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2	Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych	3
4.3	Cel naukowy i osiągnięte wyniki.....	6
4.3.1	Wprowadzenie do tematyki badań	6
4.3.2	Cel badań.....	8
4.3.3	Identyfikacja N-homocysteinyłowanych białek w materiale biologicznym.....	8
4.3.4	N-Homocysteinyłacja elastyny i kolagenu	9
4.3.5	N-Homocysteinyłacja cytochromu c.....	13
4.3.6	Mapowanie N-homocysteinyłacji białek drożdży	16
4.3.7	Rola paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinyłacją.....	20
4.3.8	Podsumowanie	21
4.4	Pozostałe osiągnięcia.....	22
4.5	Plany badawcze	26
4.6	Referencje	27
5	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	32
6	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	33
6.1	Osiągnięcia dydaktyczne	33
6.2	Osiągnięcia organizacyjne	35
6.2.1	Organizacja konferencji	35
6.2.2	Kierowanie grantami	35
6.2.3	Udział w komisjach	35
6.3	Osiągnięcia popularyzujące naukę	36
7	Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.....	36

1 *Imię i nazwisko*

Joanna Peřa-Kaján

2 *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.*

- ❖ 2006 – Doktor chemii w zakresie biochemii, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję białek człowieka. Kopromotorzy: prof. dr hab. Hieronim Jakubowski, prof. dr hab. Tomasz Twardowski. Recenzenci: prof. dr hab. Andrzej Guranowski (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), prof. dr hab. Edward Bald (Uniwersytet Łódzki).
- ❖ 2001 – Magister biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej: Immunodetekcja podjednostek ferrytyny roślinnej w produktach translacji *in vitro*. Promotor: prof. dr hab. Tomasz Twardowski. Recenzent: prof. dr hab. Ewa Tomaszewska (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu).

3 *Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.*

- ❖ 2017-obecnie – Adiunkt w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Kierownik Zespołu Biochemii;
- ❖ 2015-2017 – Specjalista w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;
- ❖ 2007-2009 – Post-doc w Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA;
- ❖ 2006-2014 – Starszy referent techniczny w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;
- ❖ 2003 – Pięciomiesięczny staż w Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA;
- ❖ 2001-2006 – Studia doktoranckie w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Przerwy w pracy naukowej:

Dwie przerwy związane z przebywaniem na urloпах macierzyńskich i wychowawczych, łącznie 27 miesięcy:

- 05.05.2009-21.09.2009 – pierwsza przerwa macierzyńska;
- 22.10.2010-31.08.2012 – druga przerwa macierzyńska.

4 *Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.*

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Rola N-homocysteinyłacji białek w patomechanizmie zaburzeń związanych z hiperhomocysteinemią i paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinyłacją

4.2 Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi siedem publikacji eksperymentalnych i dwie publikacje przeglądowe. Jest to zbiór powiązanych tematycznie prac, które opisują badanie roli N-homocysteinyłacji białek w patomechanizmie zaburzeń związanych z hiperhomocysteinemią oraz badanie fizjologicznej funkcji paraoksonazy 1, enzymu hydrolizującego tiolakton homocysteiny. Prace eksperymentalne wchodzące w skład osiągnięcia naukowego w pewnej mierze stanowią kontynuację badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, w której analizowałam wpływ N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję białek. Dwie publikacje eksperymentalne (nr 1, 3) i jedna publikacja przeglądowa (nr 2) zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego „Proteomika ilościowa w drożdżowym modelu hiperhomocysteinemii” (Grant Opus, Narodowe Centrum Nauki), którego byłam kierownikiem, natomiast praca eksperymentalna nr 4 została zrealizowana w ramach kierowanego przeze mnie projektu badawczego własnego „Rola N-homocysteinyłacji tropoelastyny w procesie utraty elastyczności naczyń krwionośnych w miażdżycy tętnic” (Projekt własny, MNiSzW). Dwie z prac eksperymentalnych (nr 5, 6) powstały częściowo w oparciu o wyniki uzyskane podczas realizacji rozprawy doktorskiej. We wszystkich dziewięciu publikacjach cyklu habilitacyjnego jestem pierwszym autorem (w pracy nr 3 mój wkład był równy z drugim autorem). W trzech pracach eksperymentalnych (nr 1, 4, 6) i w pracach przeglądowych (nr 2, 5) jestem autorem korespondencyjnym.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Perła-Kaján J** ✉, Malinowska A, Zimny J, Cysewski D, Suszyńska-Zajczyk J, Jakubowski H. ✉ Proteome-wide analysis of protein lysine N-homocysteinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research*. **2021**; 20: 2458-2476. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00937.

IF 4,466; MNiSW 100 pkt. Cytowania: 2 (Google Scholar), 2 (Scopus*), 1 (WoS)

Wkład habilitantki: zaprojektowanie i koordynacja badań, udział w analizach 2DE i identyfikacji białek metodą MS, przygotowanie białek do analiz MS, analiza danych,

przygotowanie manuskryptu, włączając ryciny i tabele, pozyskanie finansowania badań, korespondencja z czasopismem i przygotowanie odpowiedzi na recenzje.

2. **Perła-Kaján J** ✉, Jakubowski H. ✉ Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia. *Int J Mol Sci.* **2019**; 20: 3140. doi: 10.3390/ijms20133140. **Praca przeglądowa.**

IF 5,923; MNiSW 100 pkt. Cytowania: 50 (Google Scholar), 40 (Scopus*), 36 (WoS)

Wkład habilitantki: konceptualizacja pracy, zebranie literatury, napisanie pierwszej wersji manuskryptu i współudział w dalszych modyfikacjach, przygotowanie Ryc. 1 i Tabel 1,2,4 i S1, pozyskanie finansowania badań, korespondencja z czasopismem.

3. **Perła-Kaján J**, Borowczyk K, Głowacki R, Nygård O, Jakubowski H. ✉ Paraoxonase 1 Q192R genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans. *FASEB J.* **2018**;32:6019-1024. doi: 10.1096/fj.201800346R.

IF 4,966; MNiSW 140 pkt. Cytowania: 21 (Google Scholar), 15 (Scopus*), 17 (WoS)

Wkład habilitantki: pomiar aktywności paraoksonazowej i arylesterazowej PON 1, pomiar poziomu białka PON1, statystyczna analiza danych, przygotowanie Ryc. 2.

4. **Perła-Kaján J**, Utyro O, Rusek M, Malinowska A, Sitkiewicz E, Jakubowski H. ✉ N-Homocysteinylolation impairs collagen cross-linking in cystathionine β -synthase-deficient mice: a novel mechanism of connective tissue abnormalities. *FASEB J.* **2016**;30:3810-3821. doi: 10.1096/fj.201600539.

IF 4,966; MNiSW 140 pkt. Cytowania: 36 (Google Scholar), 24 (Scopus*), 25 (WoS)

Wkład habilitantki: udział w planowaniu badań, przygotowanie próbek do pomiaru i pomiar tHcy, S-Hcy, N-Hcy, hydroksyproliny, pirydynolin, pomiar poziomu telopeptydu C kolagenu typu I, C-końcowego propeptydu prokolagenu typu I i aktywności Lox, analiza danych, udział w przygotowaniu manuskryptu, udział w pozyskaniu finansowania badań.

5. **Perła-Kaján J** ✉, Jakubowski H. ✉ Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids.* **2012**; 43:1405-17. doi: 10.1007/s00726-012-1321-z. **Praca przeglądowa.**

IP 3,072 MNiSW 100 pkt. Cytowania: 128 (Google scholar), 81 (Scopus*), 80 (WoS)

Wkład habilitantki: zebranie literatury, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, przygotowanie Tabeli 1, korespondencja z czasopismem.

6. **Perła-Kaján J** ✉, Gryszczyńska A, Mielcarek S, Jakubowski H. ✉ Cation exchange HPLC analysis of desmosines in elastin hydrolysates. *Anal Bioanal Chem.* **2011**;401:2473-9. doi: 10.1007/s00216-011-5346-z.

IF 3,286; MNiSW 70 pkt. Cytowania: 8 (Google Scholar), 7 (Scopus*), 8 (WoS)

Wkład habilitantki: planowanie badań, izolacja elastyny z organów zwierzęcych, przygotowanie próbek do pomiaru desmozyn w hydrolizatach elastyny, analiza danych, walidacja metody pomiaru desmozyn, udział w opracowaniu metody pomiaru desmozyn,

udział w pomiarach HPLC, przygotowanie manuskryptu, zapewnienie finansowania badań, korespondencja z czasopismem.

7. **Perła-Kaján J**, Jakubowski H. ✉ Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *FASEB J.* **2010**;24:931-6. doi: 10.1096/fj.09-144410.

IF 4,966; MNiSW 140 pkt. Cytowania: 109 (Google scholar), 67 (Scopus*), 67 (WoS)

Wkład habilitantki: pomiar aktywności paraoksonazowej i arylesterazowej PON1, analiza wyników.

8. **Perła-Kaján J**, Stanger O, Luczak M, Ziółkowska A, Malendowicz LK, Twardowski T, Lhotak S, Austin RC, Jakubowski H. ✉ Immunohistochemical detection of N-homocysteinylation proteins in humans and mice. *Biomed Pharmacother.* **2008**; 62:473-9. doi: 10.1016/j.biopha.2008.04.001.

IF 6,529; MNiSW 100 pkt. Cytowania: 62 (Google Scholar), 43 (Scopus*), 46 (WoS)

Wkład habilitantki: udział w planowaniu badań, uzyskanie przeciwciał specyficznych względem N-Hcy-białek w króliku, detekcja N-Hcy-białek metodą dot-blot, udział w prowadzeniu hodowli komórkowych, immunohistochemiczne barwienie preparatów ludzkich tkanek, przygotowanie rycin 1,2 i 3.

9. **Perła-Kaján J** ✉, Marczak Ł, Kaján L, Skowronek P, Twardowski T, Jakubowski H. ✉ Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome C. *Biochemistry.* **2007**; 46:6225-31. doi: 10.1021/bi602463m.

IF 2,952; MNiSW 100 pkt. Cytowania: 66 (Google Scholar), 55 (Scopus*), 55 (WoS)

Wkład habilitantki: udział w planowaniu badań, modyfikacja cytochromu c tiolaktone Hcy, trawienie enzymatyczne N-Hcy-cytochromu c, komputerowa analiza danych, pomiary spektrofotometryczne, pomiary podatności na proteolizę, pomiary metodą dichroizmu kołowego, opracowanie i analiza wyników, przygotowanie publikacji, włączając ryciny i tabele, korespondencja z czasopismem.

*Scopus – bez autocytowań

Kopie artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe znajdują się w załączniku 11, a oświadczenie o udziale w powstaniu pracy habilitantki i współautorów znajdują się w załącznikach odpowiednio 7 i 8.

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: **990** (wg wykazu z 2021 r.), **431** (wg wykazów z lat, w których opublikowano artykuły)

Sumaryczny Impact Factor publikacji cyklu: **41,126**

Suma cytowani publikacji cyklu: **482** (Google Scholar), **354** (Scopus, **334** bez autocytowań), **335** (Web of Science)

Indeks Hirscha: **12** (Google Scholar), **11** (Scopus, Web of Science)

4.3 Cel naukowy i osiągnięte wyniki

4.3.1 Wprowadzenie do tematyki badań

Homocysteina (Hcy) jest niebiałkowym aminokwasem siarkowym, biorącym udział w przemianach metioniny i cysteiny. Początki badań nad Hcy sięgają roku 1932, w którym została po raz pierwszy otrzymana w formie utlenionej (homocystyny) przez demetylację metioniny kwasem siarkowym [1]. Zainteresowanie nią wzrosło w latach 60., kiedy stwierdzono jej obecność w moczu dzieci z wadami wrodzonymi, upośledzeniem umysłowym i zaburzeniami rozwoju [2, 3], a następnie odkryto, że za homocystinurię (stan podwyższonego stężenia Hcy w moczu) odpowiada niedobór lub brak aktywności β -syntazy cystationinowej (CBS) [4]. Zaobserwowano, że dzieci obciążone niedoborem CBS wykazują nieprawidłowości między innymi w obrębie tętnic. W roku 1969 McCully stwierdził i opisał podobieństwo zmian w tętnicach u dziecka z uszkodzonym metabolizmem kobalaminy (witaminy B₁₂) ze zmianami obserwowanymi u dziecka z niedoborem CBS i postawił hipotezę, że są one powiązane z podwyższonym stężeniem homocysteiny, homocystyny lub pochodnej homocysteiny [5]. Odkrycia te i wyniki kolejnych badań, zainicjowały uformowanie poglądu, że nawet umiarkowanie podwyższony poziom Hcy jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w populacji ogólnej. Obecnie, po 90 latach od odkrycia Hcy i po 60 latach od jej identyfikacji w moczu człowieka, wiemy, że jest ona powiązana z ponad setką chorób i zaburzeń oraz śmiertelnością. Oprócz chorób sercowo-naczyniowych Hcy jest biomarkerem między innymi chorób centralnego układu nerwowego, komplikacji ciąży, nowotworów, chorób oczu, nerek, wątroby i układu kostnego [6].

Normalny zakres Hcy w osoczu człowieka wynosi 5-15 $\mu\text{mol/L}$. Stan podwyższonego stężenia Hcy w osoczu lub surowicy nazywany jest hiperhomocysteinemią (HHcy), która czasami klasyfikowana jest jako łagodna, umiarkowaną i ciężką [7].

Skąd zatem bierze się nadmiar Hcy w organizmie? Jedynym źródłem tego aminokwasu jest egzogenna metionina przyjmowana z pokarmem. Metionina spożywana w nadmiarze już od lat 70. uznawana jest za jeden z najtoksyczniejszych aminokwasów [8]. Poziom Hcy jest regulowany głównie przez dwie reakcje: remetylację do metioniny (katalizowaną przez syntazę metioniny lub metyltransferazę betaina-homocysteina) oraz transsulfurację do cysteiny (katalizowaną przez CBS oraz γ -lizę cystationinową). Niedobór aktywności enzymów metabolizujących Hcy lub ich kofaktorów jest jednym z czynników wpływających na podwyższenie stężenia Hcy w organizmie.

Biorąc pod uwagę złożoną etiologię zaburzeń powiązanych z HHcy można się spodziewać, że w ich rozwój zaangażowanych jest kilka mechanizmów. Niektóre z zaproponowanych mechanizmów toksycznego działania Hcy opisałam w pracach przeglądowych w 2007 [9] i 2019 roku [10] (publikacja 2 cyklu habilitacyjnego). Szczególną uwagę poświęciłam procesowi N-homocysteinylicacji białek oraz mechanizmom epigenetycznym, z którymi N-homocysteinylicacja może oddziaływać. Zagadnieniom tym poświęcony jest również niniejszy autoreferat.

Ze względu na swoje podobieństwo strukturalne do metioniny, Hcy może być błędnie rozpoznana przez syntetazę Met-tRNA (MetRS) i wprowadzona do pierwszego etapu aktywacji aminokwasu, w wyniku czego powstaje Hcy-AMP. Hcy nie zostaje jednak wbudowana w łańcuch białkowy podczas translacji, lecz dzięki aktywności naprawczej MetRS, jest uwolniona z AMP w postaci cyklicznego tioestru – tiolaktonu Hcy. Wiązanie tioestrowe tiolaktonu Hcy jest wysoce reaktywne w stosunku do grup ϵ -aminowych reszt lizyny białek. Tiolakton Hcy, jak wykazał Jakubowski, ma zdolność modyfikacji grup ϵ -aminowych reszt Lys białek w reakcji zwanej N-homocysteinylicacją, w wyniku czego powstają N-homocysteinylowane białka (N-Hcy-białka) [11].

N-Homocysteinyłacja została zaobserwowana w hodowlach ludzkich komórek w roku 1997, kiedy Jakubowski stwierdził obecność [³⁵S]-Hcy w hydrolizatach białek zredukowanych DTT wyizolowanych z ludzkich fibroblastów oraz komórek raka piersi hodowanych z [³⁵S]-Met. Hcy ta była wprowadzona do białek posttranslacyjnie przez acylację łańcuchów bocznych reszt Lys [12]. Dzięki eksperymentom polegającym na inkubacji białek z tiolaktonem Hcy Jakubowski wykazał, że stałe szybkości drugiego rzędu reakcji N-homocysteinyłacji są proporcjonalne do liczby reszt lizyny indywidualnych białek, co świadczy o tym, że głównym determinantem reaktywności białek z tiolaktonem Hcy jest liczba reszt Lys w łańcuchu białkowym [13]. Jakubowski stwierdził również, że N-homocysteinyłacja powoduje utratę aktywności enzymów (trypsyna i MetRS) oraz agregację białek (fibrynogen, albumina, IgG, trypsyna, transferryna, hemoglobina, cytochrom c, mioglobina i RNaza A) [13], natomiast Liu i współpracownicy obserwowali inhibicję aktywności oksydazy lizynowej pod wpływem reakcji z tiolaktonem Hcy [14]. W kolejnych badaniach Jakubowski wykazał, że N-homocysteinyłacja białek zachodzi w hodowlach komórek śródbłonna żyły pępowinowej człowieka w fizjologicznych stężeniach Hcy, Met i kwasu foliowego [15] oraz w organizmie człowieka (odkrycie N-Hcy-białka w ludzkim osoczu) [16, 17]. Co ciekawe okazało się, że większość, bo około 70% Hcy obecnej we krwi człowieka jest związana amidowo z białkami (N-związana). Najwyższy udział w puli N-związanej Hcy ma hemoglobina (27,8 μM), albumina (2,8 μM) i γ-globulina (0,7 μM). Inne białka krwi tj. fibrynogen, transferryna, antytrypsyna, HDL i LDL zawierają niższe stężenia N-związanej Hcy (około 20 nM) [18].

Po koniec lat 90. ze względu na ówczesny brak metod detekcji Hcy związanej amidowo z białkami oraz pojawiające się sugestie, że tiolakton Hcy może mieć wpływ na rozwój miażdżycy przez modyfikowanie białek, Ferguson i współpracownicy uzyskali i scharakteryzowali przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko N-Hcy-LDL. Autorzy wykazali specyficzność wytworzonych przeciwciał względem N-Hcy-LDL, N-Hcy-hemoglobiny i N-Hcy-albuminy, których 40% reszt Lys zostało zmodyfikowanych tiolaktonem Hcy oraz brak reakcji owych przeciwciał z Hcy, homocystyną oraz utlenioną, acetylowaną oraz metyloowaną LDL [19].

W badania nad N-homocysteinyłacją zaangażowałam się podczas stażu w University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA, w trakcie studiów doktoranckich. Staż odbyłam pod kierunkiem prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego (załącznik 10 do wniosku), który powierzył mi zadanie izolacji i oczyszczenia poliklonalnych przeciwciał specyficznych względem N-homocysteinyłowanych białek. Jako materiał do opracowania metody izolacji specyficznych przeciwciał otrzymałam preparat surowicy królików immunizowanych hemocjaniną skorupiaka morskiego (KLH, ang. *keyhole limpet hemocyanin*). Do oczyszczenia specyficznych przeciwciał użyłam aminoheksyloagarozy, którą zmodyfikowałam tiolaktonem Hcy, w wyniku czego uzyskałam N-homocysteinyłowaną-aminoheksyloagarozę. W złożu tym Hcy przyłączona jest za pomocą swojej grupy karboksylowej do grupy aminowej aminoheksyloagarozy, podobnie jak ma to miejsce w N-homocysteinyłowanym białku, w którym Hcy przyłączona jest do grupy ε-aminowej reszty lizyny. Wykazałam specyficzność wyizolowanych przeciwciał względem epitopu N-Hcy-Lys, używając N-Hcy-albuminy, N-Hcy-transferryny, N-Hcy-hemoglobiny i N-Hcy-antytrypsyny jako kompetytorów wiązania immunoglobulin z antygenem – N-Hcy-hemoglobina [20].

Po powrocie ze stażu w USA kontynuowałam realizacją pracy doktorskiej w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN gdzie, samodzielnie przeprowadziłam immunizację królików i uzyskałam przeciwciała specyficzne względem N-homocysteinyłowanych białek, które w dalszych latach (w trakcie i po doktoracie) wykorzystywałam do identyfikacji N-Hcy-białek. Opis tych analiz zawarty jest w jednej z publikacji cyklu habilitacyjnego [21] (publikacja 8 cyklu habilitacyjnego).

Od czasu odkrycia N-związanej Hcy w ludzkim osoczu, zidentyfikowano kilkaset N-homocysteinylowanych białek w kilkunastu badaniach nad specyficznymi białkami oraz kilku analizach proteomicznych. Niniejszy cykl habilitacyjny obejmuje analizę miejsc N-homocysteinyłacji dwóch specyficznych białek cytochromu c [22] (publikacja 9 cyklu habilitacyjnego) i kolagenu [23] (publikacja 4 cyklu habilitacyjnego) oraz całego proteomu (drożdże *Saccharomyces cerevisiae*) [24] (publikacja 1 cyklu habilitacyjnego).

Tiolakton Hcy jako substancja potencjalnie toksyczna i szkodliwa dla organizmu jest z niego usuwany na dwa sposoby, przez hydrolizę enzymatyczną [25-27] oraz filtrację nerkową [28]. Jedną z trzech znanych tiolaktonaz i jednocześnie pierwszą, w której wykryto aktywność tiolaktonazową, jest paraoksonaza 1 (PON1). Cykl habilitacyjny obejmuje wykazanie, że aktywność PON1 chroni przed N-homocysteinyłacją białek [29] (publikacja 7 cyklu habilitacyjnego) oraz jest skorelowana z poziomem tiolaktonu Hcy u ludzi [30] (publikacja 3 cyklu habilitacyjnego).

4.3.2 Cel badań

Podczas badań w szczególności interesowała mnie odpowiedź na pytania: Czy N-homocysteinyłacja białek może mieć związek z zaburzeniami obserwowanymi w HHcy lub czy może je wyjaśniać? Czy wpływa na inne funkcje białka niż enzymatyczne? Czy uniemożliwia zachodzenie innych modyfikacji posttranslacyjnych? Czy paraoksonaza 1 jest skorelowana z poziomem tiolaktonu Hcy i czy hydrolizując go chroni przed N-homocysteinyłacją białek?

Celem pracy było zbadanie roli N-homocysteinyłacji białek w patomechanizmie zaburzeń powiązanych z HHcy oraz stwierdzenie czy paraoksonaza 1 chroni przed szkodliwym działaniem tiolaktonu Hcy. Cel ten został osiągnięty przez realizację następujących zadań:

- wykazanie obecności N-Hcy-białek w zmienionym chorobowo materiale biologicznym,
- zbadanie wpływu N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję elastyny i kolagenu,
- zbadanie wpływu N-homocysteinyłacji na strukturę i funkcję cytochromu c,
- identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji w proteomie i wpływu HHcy na proteostazę,
- zbadanie fizjologicznej roli paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinyłacją.

4.3.3 Identyfikacja N-homocysteinylowanych białek w materiale biologicznym

HHcy wywołana czynnikami genetycznymi lub żywieniowymi prowadzi do nagromadzenia we krwi i organach nie tylko tHcy (Hcy uwolniona w skutek redukcji wiązań disiarczkowych w próbce), ale również tiolaktonu Hcy i N-Hcy-białek [11]. Jednym z zaburzeń genetycznych wywołującym HHcy u myszy jest inaktywacja genu kodującego transporter folianu sprzężonego z protonem (*Pcft*, ang. *proton-coupled folate transporter*). Wykazaliśmy, że stężenia zarówno tHcy jak i N-związanej Hcy są istotnie podwyższone w osoczu oraz sercu, płucu, wątrobie i nerce myszy z mutacją genu *Pcft* w porównaniu z organizmami kontrolnymi. Wyjątkiem był mózg, w którym nie stwierdziłam istotnej statystycznie różnicy w poziomie tHcy i N-związanej Hcy między badanymi grupami zwierząt. Najwyższy wzrost N-związanej Hcy zaobserwowałam w osoczu (prawie 25-krotny) oraz w wątrobie i sercu (odpowiednio około 4 i 3-krotny) [18, 31].

N-Hcy-białka zidentyfikowałam w materiale biologicznym za pomocą uzyskanych podczas doktoratu specyficznych króliczych przeciwciał poliklonalnych (praca 8 cyklu habilitacyjnego [21]). Wykazałam użyteczność przeciwciał do identyfikacji N-Hcy-białek metodą dot-blot z wykorzystaniem komercyjnych białek zmodyfikowanych tiolaktonem Hcy *in vitro*. Sygnał uzyskany z użyciem specyficznych przeciwciał był proporcjonalny do ilości N-Hcy-białka w zakresie od 0,02-0,3 µg białka. Stwierdziłam również obecność N-Hcy-białka w komórkach raka piersi MCF-7 hodowanych w

obecności tiolaktonu Hcy, przy czym sygnał uzyskany ze specyficznymi przeciwciałami był proporcjonalny do stężenia tiolaktonu Hcy (0,01-2 mM) użytego w hodowli. Najważniejszym osiągnięciem opisywanej pracy było immunohistochemiczne zidentyfikowanie N-Hcy-białka w skrawkach mięśnia sercowego i zastawki aorty pochodzących od pacjentów kardiochirurgii. Ponadto wytworzone przeze mnie przeciwciała zostały wykorzystane przez współpracowników z McMaster University w Kanadzie do identyfikacji N-Hcy-białek w blaszce miażdżycowej myszy $ApoE^{-/-}$ będących na diecie wysokometioninowej (0,5% Met w wodzie pitnej przez 18 tygodni), które wykazały silniejszy sygnał ze specyficznymi przeciwciałami niż myszy na diecie kontrolnej [21] (praca 8 cyklu habilitacyjnego). Myszy $ApoE^{-/-}$ cierpią na miażdżycę, która nasila się pod wpływem diety wysokometioninowej wywołującej HHcy. Dieta wysokometioninowa u myszy powoduje podwyższenie poziomu tiolaktonu Hcy [31, 32] oraz N-Hcy-białka [31]. Wykazanie obecności N-Hcy-białka w ludzkich i mysich tkankach zmienionych chorobowo (objętych miażdżycą) potwierdziło hipotezę, że N-homocysteinyłacja białek może być jednym z mechanizmów toksyczności HHcy [21] (praca 8 cyklu habilitacyjnego).

4.3.4 N-Homocysteinyłacja elastyny i kolagenu

N-Homocysteinyłowane białka stają się podatne na utlenienie i agregację oraz nabywają właściwości antygenowe [9, 11]. Zaburzenia metabolizmu Hcy, którym często towarzyszy nasilona N-homocysteinyłacja białek [10], zwiększają ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia i prowadzą m.in. do zmian w strukturze i funkcji włókien elastycznych naczyń krwionośnych [33, 34].

Ze względu na fakt, że N-homocysteinyłacja dotyczy reszt Lys, a reszty te zaangażowane są w tworzenie wiązań poprzecznych głównych białek tkanki łącznej, elastyny i kolagenu, postawiłam hipotezę, że N-homocysteinyłacja może zaburzać dojrzewanie białek tkanki łącznej polegające na tworzeniu wiązań poprzecznych, które zapewniają mechaniczne właściwości tej tkanki. Kierowałam grantem badawczym finansowanym przez MNiSzW, którego celem było zbadanie, czy reszty Lys tropoelastyny ulegają modyfikacji tiolaktonem Hcy i czy wpływa to na konwersję tropoelastyny do elastyny.

Podczas tworzenia włókien elastycznych, mikrofibryle fibryliny tworzą rusztowanie dla rozpuszczalnej tropoelastyny, która jest przekształcana do nierozpuszczalnej elastyny. Dojrzewanie tropoelastyny zachodzi dzięki oksydazie lizynowej, która katalizuje oksydacyjną deaminację specyficznych reszt lizyny do allizyny. Dalsza reakcja między resztami lizyny i allizyny prowadzi do powstania wiązań poprzecznych – desmozyny i izodesmozyny, istotnych dla rozciągliwości włókien elastycznych, wymaganej do prawidłowego funkcjonowania tętnic, skóry i płuc [35].

Analizę desmozyny (Des) i izodesmozyny (isoDes) w elastynie rozpoczęłam od opracowania metody pomiaru wiązań poprzecznych w elastynie wyizolowanej uprzednio z organów myszy. Moim celem było uzyskanie metody, która pozwoliłaby na szybką i czułą analizę wiązań poprzecznych przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczonego. Aby go zrealizować, wykorzystałam kationowymienną kolumnę używaną w naszym laboratorium do pomiaru stężenia Hcy, zastosowałam jednak elucję gradientową, dłuższy czas rozdziału oraz detekcję w świetle UV. Ze względu na obecność pięciu ładunków dodatnich w strukturze desmozyny (czterech na resztach Lys oraz jednego na atomie azotu pierścienia pirydynowego), Des i isoDes wiążą się do hydrofilowego, anionowego polimeru – poli(2-sulfoetyloaspartamidu) – wypełniającego kolumnę, znacznie silniej niż aminokwasy i eluowane są w tym samym czasie. Ze względu na specyfikę widm absorpcyjnych Des i isoDes mogą być monitorowane przez pomiar absorpcji w świetle UV przy długości fali odpowiednio 240 nm i 268 nm. Opracowana przez nas metoda charakteryzuje się zakresem liniowości od 4 do 2000 pmoli Des i

isoDes (odpowiednio $r^2=1,0000$ i $r^2=0,9995$), limitem detekcji odpowiednio 2 i 4 pmol oraz odzyskiem 108,8% [36] (publikacja 6 cyklu habilitacyjnego).

Przy użyciu opracowanej metody zbadałam poziom desmozyn w elastynie płuc myszy z niedoborem PCFT, które mają 20-krotnie wyższy poziom tHcy osocza w porównaniu ze zwierzętami *Pcft^{+/+}* [31]. Zaobserwowałam tendencję do obniżonego poziomu desmozyn elastyny płucnej myszy *Pcft^{-/-}* (odpowiednio 1,5- i 1,6-krotnie) w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego *Pcft^{+/+}*, chociaż różnica nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ($p=0,12$ i $0,08$). Mogłyby to sugerować, że HHcy zmniejsza stopień usieciowania elastyny w płucu myszy. Wyniki te są zbliżone do rezultatów wcześniejszych badań przeprowadzonych na szczurach, w których niedobór witaminy B₆ [33] lub dootrzewnowe wstrzyknięcia mieszaniny Hcy+Met [37] podniosły poziom Hcy w osoczu i obniżyły poziom desmozyn w elastynie. Nie zostały jednak potwierdzone przeze mnie we wstępnych badaniach przeprowadzonych na myszach z HHcy wywołaną mutacją w genie *Cbs* (nieopublikowane, praca inżynierska). Potrzebnych jest więcej badań, aby stwierdzić rzeczywisty wpływ HHcy na wiązania poprzeczne elastyny.

Zbadałam również poziomy desmozyn w elastynie wyizolowanej z narządów myszy z niedoborem odporności CBySmn.CB17-Prkdcscid/J (SCID) [38] oraz typu dzikiego C57BL6/J. Zgodnie z oczekiwaniem u myszy obu szczepów poziom desmozyn był najwyższy w elastynie płucnej, a najniższy w elastynie wątroby. Ponadto poziomy desmozyn były istotnie niższe w płucach i sercu, ale nie w nerkach i wątrobie myszy CBySmn.CB17-Prkdcscid/J w porównaniu z myszami typu dzikiego C57BL 6/J. Poziomy Des + isoDes były istotnie niższe w elastynie w izolowanej z płuc, serca, nerek i wątroby zmutowanych myszy w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych. Wyniki te wskazują, że obniżone usieciowanie elastyny jest nowym fenotypem przyczyniającym się do patologii myszy SCID z niedoborem odporności [36] (publikacja 6 cyklu habilitacyjnego).

U ludzi ciężka HHcy spowodowana niedoborem CBS powoduje nieprawidłowości tkanki łącznej w większości układów organizmu, w tym kostnym i naczyniowym [39]. HHcy związana z niedoborem MTHFR została również powiązana z nieprawidłowościami kości u człowieka [40, 41]. Podobne zaburzenia tkanki łącznej wpływające na strukturę kości obserwuje się również u myszy *Cbs^{-/-}* [42, 43]. Ludzie z homocystynurią charakteryzują się problemami z tkanką łączną, w tym zwiotczeniem stawów, koślawością kolan, kifoskoliozę, deformacją klatki piersiowej, ciężką osteoporozą, zwichnięciem soczewki i chorobami naczyń krwionośnych (rozszerzenie i zakrzepica) [4]. Badanie kolagenu skórnych pacjentów z homocystynurią wykazało, że sieciowanie kolagenu uległo znacznemu zmniejszeniu, a rozpuszczalność białka znacznie wzrosła, co odzwierciedla funkcjonalny defekt sieciowania kolagenu [44].

Kolagen jest głównym składnikiem tkanki łącznej włóknistej ścięgien i kości [45] i najbardziej obfitym białkiem, które stanowi 25–35% całkowitego białka w ciele ssaków. Włókna kolagenowe zapewniają tkance łącznej wsparcie strukturalne i odporność na siły rozciągające. Właściwości mechaniczne kolagenu wynikają ze specyfiki wiązań poprzecznych obejmujących reszty lizyny w obrębie oraz między łańcuchami kolagenu [46]. Wiązania poprzeczne występują w kolagenach kości i chrząstek, gdzie zapewniają wytrzymałość na rozciąganie i mechaniczną stabilność włókienek kolagenowych, wymagane do normalnego funkcjonowanie tkanek łącznych. Tworzenie usieciowania jest inicjowane katalizowaną przez oksydazę lizylową (Lox) konwersją określonej reszty lizyny i hydroksylizyny odpowiednio do aldehydów allizyny i hydroksyalizyny [47, 48]. Allizyna lub hydroksyalizyna reagują spontanicznie z grupą ε-aminową sąsiedniej reszty lizyny tworząc addukt zasadę Schiffa, który dojrzewa do pirydynoliny (Pyd) [49]. Potrójna helisa kolagenu zawiera od jednego do dwóch wiązań poprzecznych. Główne kolageny włóknotwórcze (typ I, II i III) mają cztery miejsca tworzenia wiązań

poprzecznych, po jednym w każdym z krótkich końców niehelikalnych cząsteczek kolagenu (telopeptydów) i dwa w regionie potrójnej helisy, blisko jego końców N i C [45, 46].

Mechanizmy powstawania nieprawidłowości tkanki łącznej obserwowane w HHcy nie są w pełni wyjaśnione. Chcąc poszerzyć rozpoczęte na elastynie badania wpływu HHcy na tworzenie wiązań poprzecznych w białkach tkanki łącznej, w ramach projektu kierowanego przez prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego, rozpoczęłam badania nad N-homocysteinylacją kolagenu. Planowałam odpowiedzieć na pytanie czy kolagen jest N-homocysteinylowany oraz czy modyfikacja ta ulega nasileniu w warunkach HHcy wywołanej mutacją w genie *Cbs*. Do badań wykorzystywałam myszy *Cbs*^{-/-}, u których obserwowałam 68-krotny wzrost poziomu tHcy w moczu, 54-krotny wzrost poziomu tHcy w osoczu, 30-krotnie podwyższony poziom N-Hcy-białka moczu i 11-krotnie podwyższony poziom N-Hcy-białka osocza w porównaniu z myszami kontrolnymi *Cbs*^{+/+} [23, 31].

Po wyizolowaniu kolagenu myszy, odkryłam, że N-związana Hcy była obecna w całkowitym kolagenie kostnym myszy *Cbs*^{-/-} w stężeniu 3,3 pmol N-Hcy/μg kolagenu. U myszy *Cbs*^{-/-} poziom N-Hcy wzrósł 14,8-krotnie do 49 pmol N-Hcy/μg kolagenu kostnego. Wykazałam również, że frakcja rozpuszczalnego w kwasach kolagenu ogona myszy *Cbs*^{-/-} zawierała 0,7 pmol N-Hcy/μg kolagenu, który to poziom wzrósł do 58 pmol N-Hcy/μg kolagenu u zwierząt *Cbs*^{-/-}. Poziom S-związanej Hcy był albo równy albo niższy niż N-Hcy. Z racji tego, że kolagen nie zawiera reszt Cys, jedyna S-związana Hcy obecna w kolagenie połączona jest wiązaniem disiarczkowym z Hcy N-związaną. Podsumowując, zmierzyłam zawartość N- i S-związanej Hcy w całkowitym kolagenie kości i serca oraz we frakcji rozpuszczalnej w kwasie kolagenu ogona myszy i we wszystkich przypadkach obserwowałam wzrost poziomu Hcy zawartej w kolagenie u zwierząt z mutacją w genie *Cbs*.

Po stwierdzeniu, że myszy kolagen ulega N-homocysteinytacji oraz że ulega ona nasileniu w warunkach HHcy, moim kolejnym celem było stwierdzenie, które reszty Lys kolagenu są podatne na modyfikację tiolaktonem Hcy. W pierwszym etapie zidentyfikowałam reszty Lys, które ulegają modyfikacji *in vitro*. W kolagenie typu I ogona szczura zmodyfikowanym 50-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu Hcy zidentyfikowaliśmy siedem reszt N-Hcy-Lys, z których pięć (K160, K266, K583, K1085, K1225) było położonych w łańcuchu α1 kolagenu (Col1α1) i dwie (K1070, K1146) w łańcuchu α2 (Col1α2). Dwie reszty N-Hcy-Lys były zlokalizowane w regionie N-końcowym (K266) i C-końcowym (K1085), jedna reszta była zlokalizowana w środku (K583), i jedna (K160) w niehelikalnym rejonie telopeptydu. W następnym etapie badań analizie miejsc N-homocysteinytacji poddałam kolagen wyizolowany z ogona myszy *Cbs*^{-/-}. Zidentyfikowaliśmy jedną resztę N-Hcy-Lys zlokalizowaną w pozycji K160 w łańcuchu α1 kolagenie typu I wyizolowanym z kości myszy *Cbs*^{-/-}. Potraktowanie kolagenu wyizolowanego z kości myszy tiolaktonem Hcy spowodowało pojawienie się dwóch dodatkowych reszt N-Hcy-Lys (K266 i K1070) w Col1A2. Sugeruje to, że reszta K160 jest dominującym miejscem N-homocysteinytacji *in vivo*. Co ważne, reszta K160 w mysim kolagenie Col1A1 odpowiada reszcie K170 w kolagenie Col1A1 człowieka, która zaangażowana jest w tworzenie wiązania poprzecznego Pyd [46]. Podsumowując, **zidentyfikowaliśmy resztę Lys w kolagenie mysim, która ulega N-homocysteinytacji *in vivo*, co mogłoby blokować udział tej reszty w tworzeniu wiązania poprzecznego**. Kolejnym etapem moich badań była więc analiza poziomu wiązań poprzecznych w kolagenie mysim.

Przed przystąpieniem do badania poziomu wiązań poprzecznych w kolagenie myszy *Cbs*^{-/-} postanowiłam sprawdzić czy inaktywacja genu *Cbs* istotnie wpływa na poziom kolagenu. W tym celu oznaczyłam poziom hydroksyproliny (Hyp) w hydrolizatach kolagenu wyizolowanego z organów myszy *Cbs*^{-/-} i *Cbs*^{+/+}. Okazało się, że poziom kolagenu był istotnie wyższy w sercu (0.33 vs. 0.15 μg Hyp/mg serca, p=0.0003) i ogonie (13.6 vs. 9.3 μg Hyp/mg suchej masy ogona, p=0.0003) myszy *Cbs*^{-/-}, natomiast w kościach, zaobserwowałam tendencję do podwyższonego poziomu kolagenu u myszy *Cbs*^{-/-} w porównaniu do myszy *Cbs*^{+/+} (0.90 vs. 0.65 μg Hyp/mg kości, p=0.14) [23] (publikacja 4 cyklu

habilitacyjnego). Nasze ustalenia, że poziom kolagenu był podwyższony w ogonie i sercu myszy *Cbs*^{-/-} sugerują, że rozregulowana akumulacja kolagenu może również przyczynić się do powstania zaburzeń tkanki łącznej obserwowanych w ciężkiej HHcy. HHcy nasila syntezę i akumulację kolagenu w hodowlach mięśni gładkich [50] i komórek wątroby [51] traktowanych Hcy oraz w wątrobach myszy z HHcy indukowaną dietą o wysokiej zawartości Met [51].

Wiedząc, że kolagen ulega zwiększonej N-homocysteinytacji oraz akumulacji u myszy *Cbs*^{-/-} w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, mogłam przystąpić do najważniejszej analizy a więc do zbadania czy HHcy wpływa na wiązania poprzeczne w kolagenie. W badaniach tych wykorzystałam opracowaną wcześniej i opisaną powyżej metodę pomiaru wiązań poprzecznych elastyny [36] (publikacja 6 cyklu habilitacyjnego), z zastosowaniem fluorescencyjnej detekcji pirydynoliny i deoksyperydynoliny (Pyd/Dpd). Zmierzyłam poziomy Pyd/Dpd w kolagenie wyizolowanym z organów myszy *Cbs*^{-/-} i *Cbs*^{+/-}. Odkryłam, że poziom Pyd/Dpd znormalizowany na poziom kolagenu był zredukowany w sercu (426 vs. 717 pmol [Pyd/Dpd]/mg kolagenu) i ogonie (61 vs. 291 pmol [Pyd/Dpd]/mg kolagen) oraz że była tendencja do zredukowanego poziomu Pyd/Dpd w kolagenie kości (321 vs. 515 pmol [Pyd/Dpd]/mg kolagenu) u myszy *Cbs*^{-/-} w porównaniu ze zwierzętami *Cbs*^{+/-} [23] (publikacja 4 cyklu habilitacyjnego).

Nieprawidłowości tkanki łącznej obserwowane w HHcy mogłyby być związane również z uszkodzonym obrotem kolagenu. Obrót kolagenu generuje wolne i związane z peptydami Dpd, które są uwalniane do krwi. Aby określić wpływ HHcy spowodowanej niedoborem *Cbs* na degradację kolagenu, za pomocą kompetycyjnego testu ELISA zmierzyłam ilość całkowitej Dpd osocza myszy. Przed pomiarem badane próbki poddałam hydrolizie kwasowej w celu uwolnienia Dpd z peptydów kolagenowych. Stwierdziłam, że poziomy Dpd w osoczu były istotnie obniżone u myszy *Cbs*^{-/-} względem myszy *Cbs*^{+/-} (0,92 vs. 2,74 nM, $p=0,0003$). Aby dokładniej zbadać, jak niedobór *Cbs* wpływa na syntezę i degradację kolagenu, zmierzyłam poziomy markerów syntezy (PICP, ang. *procollagen I C-terminal propeptide*) i obrotu (CTXI, ang. *cross-linked C-telopeptide of type I collagen*) kolagenu w osoczu myszy *Cbs*^{-/-} i kontrolnych. Poziomy CTXI w osoczu były istotnie niższe u myszy *Cbs*^{-/-} w stosunku do myszy *Cbs*^{+/-} (22,0 vs 60,1 pg/ml, $p=0,043$). Stwierdziłam również że poziomy PICP w osoczu miały tendencję do wzrostu u myszy *Cbs*^{-/-} w stosunku do zwierząt *Cbs*^{+/-} ($5,1 \pm 1,0$ vs $3,8 \pm 1,1$ pg/ml, $p=0,18$), zgodne z wynikami pomiaru Hyp w kolagenie [23] (publikacja 4 cyklu habilitacyjnego).

Za obniżenie poziomu usieciowania kolagenu u myszy *Cbs*^{-/-} mogłaby być odpowiedzialna zmniejszona aktywność oksydazy lizylowej (Lox, EC 1.4.3.13). Lox jest oksydoreduktazą zależną od miedzi, która katalizuje oksydacyjną deaminację reszt Lys w wyniku czego powstają reszty allizylowe, amoniak i nadtlenek wodoru. Generowanie reszt allizylowych jest wymagane dla późniejszego tworzenia wiązań poprzecznych stabilizujących włókna kolagenu. Możliwość tę potwierdzałyby wyniki badań biochemicznych oksydazy lizylowej, w których stwierdzono, że tiolakton Hcy, ulegający akumulacji w stanach HHcy u ludzi i myszy [31, 32], nieodwracalnie inhibuje aktywność Lox. Aby przetestować tę hipotezę, zmierzyłam aktywność Lox u myszy *Cbs*^{-/-} i *Cbs*^{+/-} i odkryłam, że aktywność Lox w sercu i wątrobie była podobna u myszy *Cbs*^{-/-} i *Cbs*^{+/-} i wynosiła odpowiednio 9,4 vs. 10,1 jednostek/min/ μ g białka; $p = 0,61$ oraz $3,5 \pm 1,8$ vs. $2,4 \pm 0,4$ jednostek/min/ μ g białka; $p = 0,14$. W celu potwierdzenia tego wyniku wykonana została również analiza poziomu mRNA Lox za pomocą ilościowej RT-PCR. Używając mRNA *Gapdh* jako odniesienia, odkryliśmy, że ekspresja mRNA Lox w sercu myszy *Cbs*^{-/-} była podwyższona $1,88 \pm 0,18$ -krotnie w stosunku do zwierząt *Cbs*^{+/-} ($p < 0,05$). Aby potwierdzić ten wynik, dodatkowo zmierzaliśmy poziom mRNA Lox, używając β -aktyny jako genu referencyjnego i stwierdziliśmy, że wyniki były podobne: Lox mRNA był podwyższony $2,36 \pm 0,16$ -krotnie u myszy *Cbs*^{-/-} w stosunku do zwierząt *Cbs*^{+/-} ($p < 0,05$). Stwierdziliśmy więc, że ani ekspresja Lox, ani aktywność nie

przyczyniają się do obniżenia poziomu wiązań poprzecznych kolagenu u myszy *Cbs*^{-/-} [23] (publikacja 4 cyklu habilitacyjnego).

Podsumowując, **najważniejszym odkryciem przedstawionej pracy jest stwierdzenie redukcji poziomu wiązań poprzecznych Pyd/Dpd w kolagenie myszy *Cbs*^{-/-}, któremu towarzyszył wzrost poziomu N-związanej Hcy**, co może leżeć u podstaw nieprawidłowości tkanki łącznej w HHcy. Zarówno wiązanie poprzeczne jak i N-homocysteinyllacja mogą dotyczyć tych samych reszt Lys, na co wskazuje zidentyfikowanie Lys 160 jako ulegającej N-homocysteinyllacji w niehelikalnym regionie N-telopeptydu Col1A1.

Odkrycie zmniejszonego poziomu produktów degradacji kolagenu (Dpd i CTXI) w osoczu myszy *Cbs*^{-/-} można by wyjaśnić na dwa sposoby: albo przez zmniejszone usieciowanie kolagenu albo przez zahamowany obrót kolagenu kostnego u myszy *Cbs*^{-/-} w porównaniu do zwierząt dzikich. Bardziej prawdopodobny wydaje się pierwszy scenariusz ponieważ niedobór mysiego Cbs nie wpływa istotnie na poziom kolagenu w kościach oraz występuje tendencja do obniżonego usieciowania kolagenu kostnego. Drugi scenariusz jest mało prawdopodobny ponieważ poziom PICP (markera syntezy kolagenu) w osoczu, nie był zmieniony przez genotyp Cbs. Zatem, zmniejszonego poziomu całkowitego Dpd i CTXI w osoczu odzwierciedlają zmniejszone sieciowanie kolagenu kostnego, najprawdopodobniej spowodowane przez podwyższoną N-homocysteinyllację kolagenu w myszy *Cbs*^{-/-}.

CTXI w osoczu, ale nie markery syntezy kolagenu I i III (PICP i N-końcowy propeptyd z prokolagenu III), są również obniżone u pacjentów z niedoborem CBS [52], co sugeruje, że HHcy podobnie wpływa na metabolizm kolagenu u myszy i ludzi. Podsumowując, nasze dane sugerują mechanizm, który przynajmniej częściowo wyjaśnia nieprawidłowości w tkance łącznej obserwowane u myszy HHcy i ludzi. Zgodnie z tym mechanizmem w warunkach HHcy powstaje więcej tiolaktonu Hcy, który następnie powoduje N-homocysteinyllację reszt lizyny kolagenu, która z kolei zaburza tworzenie wiązań poprzecznych Pyd, które są niezbędne dla prawidłowej struktury włókien kolagenowych. Nasze dane wskazują na krytyczną rolę w tym mechanizmie reszty lizyny K160, zlokalizowanej w N-telopeptydzie Col1A1. Do nieprawidłowości tkanki łącznej w HHcy mogą również przyczyniać się tkankowo specyficzne zmiany w poziomie kolagenu [23] (publikacja 4 cyklu habilitacyjnego).

4.3.5 N-Homocysteinyllacja cytochromu c

Cytochrom c ze względu na dobrą rozpuszczalność, wysoką stabilność oraz łatwość oczyszczania i krystalizacji jest jednym z najlepiej poznanych białek. Reszty Lys stanowią aż 18% wszystkich reszt aminokwasowych tego białka a więc jest w znacznym stopniu narażone na modyfikację tiolaktonem Hcy. Z wczesnych badań nad N-homocysteinyllacją cytochromu c wiadomo było, że modyfikacja ta powoduje multimeryzację, a po wprowadzeniu powyżej 5 moli Hcy/mol białka – precypitację. Po zmodyfikowaniu 75% reszt Lys, 50% cząsteczek cytochromu c jest w formie nierozpuszczalnej [13]. Ze względu na powyższe cechy cytochrom c był jednym z pierwszych białek, które wykorzystałam w badaniu N-homocysteinyllacji *in vitro*. Moim celem była identyfikacja miejsc ulegających preferencyjnej modyfikacji tiolaktonem Hcy oraz scharakteryzowanie wpływu tej modyfikacji na strukturę i funkcję cytochromu c.

Cytochrom c jest białkiem łańcucha oddechowego, gdzie jego funkcja polega na przenoszeniu elektronów zgodnie z kierunkiem rosnącego potencjału oksydoredukcyjnego, z reduktazy cytochromowej, zwanej kompleksem cytochromu b-c1, do kompleksu oksydazy cytochromowej. W skład struktury cytochromu c wchodzi 104-aminokwasowy łańcuch polipeptydowy oraz grupa hemowa. Atom żelaza hemu po przejęciu elektronu przechodzi z formy utlenionej żelazowej (Fe³⁺, ang. *ferric*) do formy zredukowanej żelazowej (Fe²⁺, ang. *ferrous*). Reszty Lys łańcucha białkowego są z

jednej strony podatne na N-homocysteinyłację a z drugiej zasadnicze dla kontaktu cytochromu c z partnerami reakcji, reduktazą i oksydazą cytochromową. Oprócz pełnienia funkcji nośnika elektronów, cytochrom c bierze również udział w apoptozie, w której jest zaangażowany w aktywację kaspazy [53].

Badania nad N-homocysteinyłacją cytochromu c prowadziłam na białku pochodzącym z serca konia, które modyfikowałam tiolaktonem Hcy *in vitro*. Na podstawie analiz spektrometrycznych MALDI-TOF stwierdziłam, że białko potraktowane 4-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu Hcy jest mieszaniną cząsteczek niezmodyfikowanych (natywnych) oraz takich z przyłączonymi od jednej do czterech reszt N-związanej Hcy. Przyłączenie jednej reszty Hcy powoduje wzrost masy białka o 117,17 Da. Po stwierdzeniu jaki jest zakres modyfikacji cytochromu c tiolaktonem Hcy, postanowiłam sprawdzić które reszty Lys ulegają preferencyjnej N-homocysteinyłacji. Białko nietraktowane tiolaktonem Hcy a także zmodyfikowane 2- i 4-krotnym nadmiarem molowym odczynnika, zredukowałam DTT, następnie zablokowałam grupy tiolowe jodoacetamidem i strawiłam białko trypsyną. Peptydy trypsynowe poddałam analizie MALDI-TOF. Cytochrom c zmodyfikowany 2-krotnym nadmiarem molowym tiolaktonu Hcy ulega modyfikacji w dwóch miejscach, na reszcie Lys 8 lub 13 oraz Lys 86 lub 87. Dwukrotne zwiększenie stężenia tiolaktonu Hcy powoduje modyfikację dwóch dodatkowych reszt Lys 99 i 100. Reszty Lys stanowiące preferencyjne miejsca modyfikacji przez tiolakton Hcy znajdują się w obrębie zwrotów β łańcucha polipeptydowego, z jednym wyjątkiem Lys 8, który znajduje się w obrębie α -helisy. Wymienione reszty lizyny są również podatne na modyfikacje przez inne czynniki elektrofilowe, takie jak bezwodnik octowy [54], trinitrobenzenosulfonian [55], fosforan pirydoksalu [56] czy 4-hydroksy-2-nonenal [57].

N-Homocysteinyłacja reszt Lys prowadzi do zmiany ładunku na powierzchni białka. Wysoce zasadowa grupa aminowa reszty lizyny ($pK_a=10,5$) jest zastąpiona przez mniej zasadową grupę α -aminową N-związanej reszty Hcy ($pK_a \sim 6,7$) [16, 53]. Reszty Lys są istotne dla funkcji cytochromu c poprzez udział w tworzeniu wiązań elektrostatycznych, które umożliwiają interakcję z oksydazą cytochromu c [52]. Z poprzednich badań wiadomo, że modyfikacja Lys 13 powoduje osłabienie interakcji cytochromu c z oksydazą cytochromową [58]. Acetylowanie cytochromu c prowadzi do spadku jego pI, co z kolei zapobiega interakcji z reduktazą i oksydazą cytochromu c [54]. Aktywność cytochromu c zmniejsza się wraz ze wzrostem stopnia acetylacji [55]. Można oczekiwać, że N-homocysteinyłacja również dezaktywuje cytochrom c poprzez zmniejszenie ładunku dodatniego na powierzchni białka.

Podczas inkubacji cytochromu c z tiolaktonem Hcy zaobserwowałam zmianę barwy roztworu białka. Widmo absorpcji cytochromu c w zakresie widzialnym jest czułe na stopień utlenienia atomu żelaza w pierścieniu porfiryńowym i charakteryzuje się występowaniem pasma Soreta i Q [155]. Dla ferricytochromu c typowe jest jedno szerokie pasmo z maksimum absorpcji przy długości fali około 530 nm, natomiast dla ferrocycyochromu c w obrębie pasma Q charakterystyczne są dwa maksima absorpcji: przy około 520 nm i 550 nm. Natywny cytochrom c przed inkubacją z tiolaktonem Hcy znajduje się w stanie utlenionym, o czym świadczy widmo absorpcji białka. Inkubacja cytochromu c z tiolaktonem Hcy powoduje zmianę widma absorpcji świadczącą o redukcji żelaza hemu. Tirole o niskiej masie cząsteczkowej, a także grupy sulfhydrylowe białek są utleniane przez jony metali przejściowych, na przykład Fe^{+3} . Podczas tej reakcji żelazo Fe^{+3} zostaje zredukowane do Fe^{+2} .

Redukcję żelaza hemu cytochromu c zaobserwowałam również po jego inkubacji z N-(Hcy-SH)-albuminą lub N-(Hcy-SH)-albuminą-Cys34-S-CAM (CAM – karboksyamidometylowana pochodna), przy czym albumina-Cys34-S-CAM nie wpływała na stan redoks żelaza hemu. Inkubacja N-Hcy-cytochromu c z żelazicyjankiem potasu spowodowała utlenienie N-Hcy-cytochromu c, zmiana ta była jednak przejściowa i żelazo hemu powracało do stanu zredukowanego w ciągu 30 minut.

Redukcję żelaza hemu po inkubacji cytochromu c z tiolaktonem Hcy potwierdziłam na podstawie analizy widma dichroizmu kołowego w region Soreta (350-490 nm). Kształt widma dichroizmu kołowego N-Hcy-cytochromu c w tym zakresie różnił się istotnie od widma białka natywnego. Widmo dichroizmu kołowego natywnego cytochromu c obejmowało dwa główne piki Soreta znajdujące się przy 404 nm (dodatni) i 415 nm (ujemny) i było podobne do opublikowanych widm ferricytochromu c [59]. N-Homocysteinyłacja prowadziła do stopniowego obniżenia pasma dodatniego i zastąpienia ujemnego pasma dodatnim, które przesunęło się w kierunku fal dłuższych (423 nm). Pasma przy 423 nm, wraz z ujemnym pasmem przy 330 nm, jest typowe dla ferrocycyochromu c.

Reakcja tiolaktonu Hcy z dowolną z czterech podatnych na modyfikację reszt lizynowych ferricytochromu c prowadzi do powstania N-(Hcy-SH)-Cyt c(Fe^{+3}). Żelazo hemowe ulega redukcji przez tiolan N-związanej Hcy, co prowadzi do powstania N-homocysteinyłowanego ferrocycyochromu c, N-(Hcy-S•)-Cyt c(Fe^{+2}). Redukcja zachodzi w układzie trans pomiędzy cząsteczkami N-(Hcy-SH)-Cyt c(Fe^{+3}) a także między N-(Hcy-SH)-Cyt c(Fe^{+3}) i innymi N-homocysteinyłowanymi białkami ((Hcy-SH)-białko). Redukcja wewnątrzcząsteczkowa jest mało prawdopodobna, ponieważ miejsca N-homocysteinyłacji znajdują się zbyt daleko od żelaza hemu. Dimeryzacja między rodnikami tiolowymi z różnych cząsteczek N-homocysteinyłowanego ferrocycyochromu c, N-(Hcy-S•)-Cyt c(Fe^{+2}), prowadzi do powstania multimerycznych form N-homocysteinyłowanego cytochromu c obserwowanych na nieredukujących żelach SDS-PAGE [13]. Co ciekawe, utlenianie N-homocysteinyłowanego cytochromu c równomolowym stężeniem żelazicyjanku prowadzi do przejściowego utworzenia formy żelazowej, która następnie jest redukowana z powrotem do żelazawej przez N-związany tiol Hcy zmodyfikowanego cytochromu c.

Znając zakres N-homocysteinyłacji cytochromu c oraz jej wpływ na stan redoks żelaza hemu, istotne było stwierdzenie czy modyfikacja ta zmienia konformację łańcucha polipeptydowego. Aby odpowiedzieć na to pytanie wykorzystałam metodę dichroizmu kołowego. Informacji o strukturze drugorzędowej białka dostarcza region widma dichroizmu kołowego o długościach fal poniżej 250 nm, w powstaniu którego dominują udziały łańcucha peptydowego. Widmo dichroizmu kołowego cytochromu c serca końskiego z minimum przy 208 i 222 nm, typowe dla białek, które charakteryzują się dużym udziałem α -helisy, nie był znacząco zmieniony przez N-homocysteinyłację. Analiza danych z użyciem serwisu DICROWEB [60] nie wykazała zmian składu struktury drugorzędowej na skutek traktowania tiolaktonem Hcy. Brak zmian konformacji głównego łańcucha polipeptydowego cytochromu c w odpowiedzi na N-homocysteinyłację nie jest zaskakujący. Cytochrom c jest bardzo stabilnym białkiem i nawet wysoka temperatura nie zmienia jego struktury drugorzędowej [61]. Ponadto struktura zredukowanego cytochromu c jest bardziej stabilna niż formy utlenionej, głównie ze względu na wzmocnione wiązanie między żelazem hemowym i Met80 w ferrocycyochromie c [62]. Podobnie, nie obserwowano większych zmian strukturalnych w N-homocysteinyłowanej formie LDL [63], mioglobine, transferynie i ferrytynie (Peřła-Kaján, dane niepublikowane).

Aby ustalić, czy N-homocysteinyłacja wpływa na strukturę cytochromu c, przeprowadziłam również analizę podatności N-Hcy-cytochromu c na proteolizę trypsyną, chymotrypsyną i pronazą. Forma N-homocysteinyłowana białka była bardziej odporna na trawienie proteolityczne niż forma niezmodyfikowana, przy czym wielkość zmian zależna była od stopnia modyfikacji. Zwiększona oporność N-Hcy-cytochromu c na proteolizę może wynikać z przejścia ferricytochromu c do bardziej stabilnego termodynamicznie ferrocycyochromu c, który jest bardziej odporny na proteolizę (przez proteinazę K) niż ferricytochrom c [64]. W przypadku jednej z form N-homocysteinyłowanej albuminy (N-(Hcy-SH)-albumina-Cys-SH)) również obserwowano spadek podatności na trawienie proteazami, trypsyną i chymotrypsyną [65].

Podsumowując, w niniejszej pracy zidentyfikowane zostały cztery preferencyjne miejsca N-homocysteinyłacji w cytochromie c *in vitro*, stwierdzono istnienie subtelnych zmian strukturalnych objawiających się zwiększoną odpornością N-Hcy-cytochromu c na degradację proteolityczną oraz zmianą stanu redoks żelaza hemu. Nie wykazano natomiast, aby N-homocysteinyłacja powodowała istotne zmiany struktury drugorzędowej białek [22] (publikacja 9 cyklu habilitacyjnego).

Brak zmian struktury drugorzędowej cytochromu c pod wpływem N-homocysteinyłacji został również potwierdzony przez innych badaczy [66-68] a N-homocysteinyłacja cytochromu c jest jedną z rozpoznawalnych modyfikacji posttranslacyjnych białek hemowych, która może być kolejnym mechanizmem wyzwalania funkcji apoptotycznej cytochromu c [69]. Pojawiła się również sugestia, że N-Hcy-cytochrom c może być związany z autofagią u myszy z HHcy po niedokrwieniu mózgu [70]. Uważa się, że procesy starzenia i rozwój niektórych chorób człowieka mogą być spowodowane nieefektywnym usuwaniem uszkodzonych białek [71]. N-Homocysteinyłacja może zwiększać odporność białek na proteolizę [22, 65], zaburzając ich usuwanie przez systemy proteolityczne organizmu i powodując tym samym patofizjologiczne efekty.

4.3.6 Mapowanie N-homocysteinyłacji białek drożdży

Analiza miejsc N-homocysteinyłacji albuminy i fibrynogenu [72], wraz z uzyskanymi przeze mnie wynikami dotyczącymi cytochromu c, sugerują, że istnieją inne czynniki niż elementy struktury drugorzędowej, które determinują pozycje N-homocysteinyłacji w łańcuchu białkowym. Analizę miejsc N-homocysteinyłacji w odniesieniu do struktury białka poszerzyłam w dalszych badaniach o proteom drożdży [24] (praca nr 1 cyklu habilitacyjnego).

Miejsca N-homocysteinyłacji w łańcuchu białkowym znane są dla kilkadziesiątu białek, w tym dla kolagenu [23] i cytochromu c [22], których odkrycie zalicza się do cyklu habilitacyjnego. W roku 2015 nie było szeroko zakrojonych badań proteomicznych ukierunkowanych na mapowanie miejsc N-homocysteinyłacji w całym proteomie, podczas gdy mapy innych modyfikacji posttranslacyjnych np. acetylacji, metylacji czy ubikwitynacji znane są od lat dla wielu organizmów modelowych. W tym czasie uzyskałam finansowanie na realizację projektu, którego celem była identyfikacja miejsc N-homocysteinyłacji w białkach drożdży oraz zbadanie towarzyszących jej zmian w ekspresji białek pod wpływem podwyższonego stężenia Hcy.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są jednokomórkowym eukariotycznym organizmem modelowym, często wykorzystywanym w badaniach biomedycznych. Wybrałam ten model badawczy ze względu na możliwość porównania lokalizacji zidentyfikowanych miejsc N-homocysteinyłacji z innymi modyfikacjami posttranslacyjnymi, zmapowanymi w proteomie drożdży, np. acetylacji, fosforylacji i ubikwitynacji. Badania proteomiczne w których dotychczas zmapowano miejsca N-homocysteinyłacji obejmują białka z hodowli komórek HCT116 raka jelita grubego, które oddziałują z MetRS [73], białka komórek HeLa traktowanych tiolaktonem Hcy [74] oraz białka neuronalnych komórek macierzystych z nadekspresją MetRS [75]. Mapowanie N-homocysteinyłacji w proteomie drożdży nie było wcześniej wykonane. Moim głównym celem było zmapowanie miejsc N-homocysteinyłacji zachodzącej *in vivo*, w hodowli w warunkach kontrolnych, a także podczas wzrostu drożdży suplementowanych Hcy lub Hcy tiolaktonem. Następnie, aby zbadać, czy różne czynniki wpływają na podatność reszt lizyny na N-homocysteinyłację *in vivo* i *in vitro*, inkubowaliśmy białko drożdży z tiolaktonem Hcy i zidentyfikowaliśmy miejsca modyfikacji zachodzącej *in vitro*.

N-Homocysteinyłowane peptydy identyfikowaliśmy poprzez wzrost masy peptydu w wyniku modyfikacji Lys przez S-karbamidometylo-Hcy (redukcja DTT, alkilacja jodoacetamidem) lub S-metylotio-Hcy (redukcja TCEP, alkilacja MMTS), o odpowiednio 174 lub 163 Da. Analiza bioinformatyczna miejsc N-homocysteinyłacji obejmowała: analizę wzbogacenia (ang. *enrichment*)

(za pomocą narzędzia bioinformatycznego STRING [76]) pod kątem lokalizacji komórkowej i szlaków KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), ocenę dystrybucji w proteomie drożdży, analizę struktury pierwszorzędowej sekwencji otaczających miejsca N-Hcy-Lys (za pomocą narzędzi: Two Sample Logo [77] i pLogo [78]) oraz analizę struktury drugorzędowej.

W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowanych zostało 68 reszt N-Hcy-Lys w 35 białkach drożdży. Na podstawie analizy lokalizacji komórkowej stwierdziłam, że N-Hcy-białka modyfikowane *in vivo* zlokalizowane są w cytozolu (21 białek, 63%), mitochondrium (13 białek, 37%), rybosomie (10 białek, 29%), błonie komórkowej (10 białek, 29%), ścianie komórkowej (4 białka, 11%) i widełkach replikacji jądrowej (2 białka, 6%). Analiza wzbogacania pod kątem szlaków KEGG wykazała, że N-Hcy-białka modyfikowane *in vivo* są zaangażowane w glikolizę/glukoneogenezę, metabolizm węgla, metabolizm metanu, biosyntezę antybiotyków i aminokwasów, biosyntezę metabolitów wtórnych, rybosom i szlaki metaboliczne. Aby ocenić rozmieszczenie miejsc N-Hcy-Lys w proteomie drożdży, obliczyłam liczbę zidentyfikowanych miejsc przypadających na jedno białko. Stwierdziłam na tej podstawie, że 40%, 34%, 17% i 9% N-homocysteinylowanych białek zawierało odpowiednio jedno, dwa, trzy i cztery miejsca modyfikacji.

Następnie zbadałam, jak struktura pierwszorzędowa białka wpływa na podatność reszty lizyny na N-homocysteinylację. Analizę sekwencji aminokwasowych otaczających miejsca N-Hcy-Lys *in vivo* przeprowadziłam przy użyciu narzędzi bioinformatycznych Two Sample Logo [77] i pLogo [78]. Aplikacje te pozwalają na porównanie eksperymentalnego zestawu peptydów z zestawem referencyjnym. Zestaw referencyjny stanowiły wszystkie peptydy zawierające niezmodyfikowaną resztę Lys zidentyfikowane w naszym zestawie danych. Analiza za pomocą Two Sample Logo wykazała, że N-homocysteinylowane reszty Lys w najbliższym sąsiedztwie były otoczone głównie obojętnymi, hydrofobowymi i nieekspozowanymi na powierzchnię resztami aminokwasowymi (alanina, glutamina, walina, seryna). Dodatnio (lizyna) i ujemnie (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy) naładowane reszty aminokwasowe występowały odpowiednio w pozycjach +3, -3, -9 i +4, +8. Analiza za pomocą narzędzia pLogo nie wykazała jednak żadnej istotnej statystycznie preferencji występowania konkretnej reszty aminokwasowej w sąsiedztwie miejsc N-Hcy-Lys *in vivo*.

W kolejnym etapie analiz zadałam pytanie czy miejsca N-Hcy-Lys są zlokalizowane w obrębie określonej struktury drugorzędowej białek. Aby na nie odpowiedzieć, przeanalizowałam dane o strukturze drugorzędowej N-Hcy-białek zebrane w bazie UniProt. Dane dotyczące struktury drugorzędowej reszt N-Hcy-Lys były dostępne dla 41% miejsc N-Hcy-Lys zidentyfikowanych *in vivo*. Wśród tych 28 miejsc N-Hcy-Lys, 46%, 42% i 12% było zlokalizowanych odpowiednio w obrębie β harmonijki, helisy α i skrętu β .

Aby zbadać, czy różne czynniki wpływają na podatność reszt lizyny na N-homocysteinylację *in vivo* i *in vitro*, zmodyfikowałam białka drożdży za pomocą tiolaktenu Hcy *in vitro*. Zidentyfikowałam 197 reszt N-Hcy-Lys w 82 białkach N-homocysteinylowanych *in vitro*. Większość białek N-homocysteinylowanych *in vitro* miała lokalizację cytozolową (56 białek) i rybosomalną (44 białka). Szesnaście z nich występowało w obrębie błony plazmatycznej, a cztery w nukleosomach jądrowych (kompleks ochronny widełek replikacyjnych). Analiza wzbogacania pod kątem KEGG wykazała, że wśród N-Hcy-białek zmodyfikowanych *in vitro* najbardziej wzbogaconymi szlakami KEGG były rybosom, glikoliza/glukoneogeneza, biosynteza aminokwasów, metabolizm węgla, biosynteza antybiotyków i metabolitów wtórnych oraz metabolizm metanu. Aby ocenić rozmieszczenie miejsc N-Hcy-Lys w proteomie drożdży, obliczyłam liczbę zidentyfikowanych miejsc przypadających na dane białko. Okazało się, że 52%, 22%, 9%, 4% i 13% zmodyfikowanych białek zawierało odpowiednio 1, 2, 3, 4 i 5 lub więcej miejsc modyfikacji.

Następnie chciałam wyjaśnić, czy pierwszorzędowa struktura białka może wpływać na lokalizację N-homocysteinyłacji zachodzącej *in vitro*. Podobnie jak w przypadku miejsc zmodyfikowanych *in vivo*, analizę sekwencji aminokwasowych otaczających miejsca N-homocysteinyłacji *in vitro* przeprowadziłam przy użyciu narzędzi Two Sample Logo [77] i pLogo [78]. Miejsca podatne na N-homocysteinyłację *in vitro* były otoczone głównie obojętnymi, hydrofobowymi i nieeksponowanymi na powierzchnię białka aminokwasami (alanina, glicyna, leucyna, walina), zubożone w dodatnio naładowane, hydrofilowe i eksponowane na powierzchni reszty (lizyna, seryna, arginina, kwas asparaginowy, arginina, fenyloalanina). Różniło się to od miejsc N-Hcy-Lys *in vivo*, gdzie preferencja nie była tak wyraźna. Analiza za pomocą narzędzia pLogo wykazała, że jedyne statystycznie istotne wzbogacenie wystąpiło w pozycji -1, gdzie w peptydach N-homocysteinyłowanych częściej występowała reszta alaniny (częstotliwość 17,22%, $p=0,002$).

Aby odpowiedzieć na pytanie, czy miejsca N-homocysteinyłacji *in vitro* występują preferencyjnie w obrębie określonej struktury drugorzędowej, przeanalizowałam dane zebrane w bazie UniProt. Dane dotyczące struktury drugorzędowej N-homocysteinyłowanych reszt Lys były dostępne dla 45% miejsc N-Hcy-Lys zidentyfikowanych w naszym badaniu. Spośród tych 89 miejsc N-Hcy-Lys *in vitro* z dostępnymi informacjami o strukturze drugorzędowej, 66%, 30% i 4% było zlokalizowanych odpowiednio w obrębie α helisy, β harmonijki i zwrotu β .

Porównując uzyskane wyniki identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji w proteomie drożdży z wynikami innych badań obejmującymi cały proteom ludzkich linii komórkowych [73-75], można stwierdzić pewne podobieństwa. Obejmują one lokalizację N-Hcy-białek, ich udział w budowaniu rybosomu i brak jednolitego wzorca sekwencji reszt aminokwasowych otaczających miejsca N-homocysteinyłacji. Lokalizacja większości N-Hcy-białek w cytoplazmie i mitochondriach jest zgodna z miejscem syntezy tiolaktonu Hcy, która zachodzi w tych dwóch kompartmentach odpowiednio przez MES1 i MSM1 oraz zdolnością do swobodnego przemieszczania się tiolaktonu Hcy przez błony biologiczne.

Znajomość reszt Lys białek ulegających N-homocysteinyłacji dała mi wgląd w możliwe konsekwencje tej modyfikacji. N-Homocysteinyłacja *in vivo* jest ukierunkowana na białka zaangażowane w glikolizę/glukoneogenezę, metabolizm węgla, metabolizm metanu, biosyntezę aminokwasów, antybiotyków oraz metabolitów wtórnych, rybosomów i szlaków metabolicznych. Modyfikacja ta może mieć szkodliwy wpływ na funkcje komórki.

Jedną z możliwych konsekwencji wystąpienia N-homocysteinyłacji białka jest zapobieganie innym modyfikacjom posttranslacyjnym, np. ubikwitynacji. Porównanie lokalizacji miejsc ubikwitynacji i N-homocysteinyłacji białek drożdży wykazało, że 34 miejsca N-Hcy-Lys obecne w 20 białkach mogą być również zaangażowane w tworzenie wiązania izopeptydowego z C-końcową resztą Gly ubikwityny (ostatni etap kaskady ubikwitynacji), co może interferować z takim procesami jak apoptoza, odpowiedź na stres, biogeneza rybosomów i cykl komórkowy. Wśród tych 20 białek znajduje się dziesięć białek rybosomalnych, 14 zaangażowanych w proces biosyntezy związków azotoorganicznych, 11 biorących udział w translacji, osiem zaangażowanych w przetwarzanie rRNA, i pięć włączonych w procesy metaboliczne ADP. Sugestia, że N-homocysteinyłacja może zapobiegać ubikwitynacji u drożdży nie znalazła potwierdzenia w badaniu Bretes i Zimnego [79], w którym autorzy obserwowali pozytywną korelację między poziomem endogennego tiolaktonu Hcy i ubikwitynacji białka. W badaniu tym jednak nie był mierzony poziom N-homocysteinyłacji białka drożdży.

Drugą modyfikacją posttranslacyjną, której wystąpienie może być zaburzone przez N-homocysteinyłację jest acetylacja. Aż 30% miejsc N-Hcy-Lys *in vivo* zidentyfikowanych w naszym

badaniu pokrywa się z miejscami acetylacji u drożdży zidentyfikowanymi przez Henriksena i wsp. [80]. Poza ubikwitynacją i acetylacją, również metylacja i sukcylnylacja mogą zachodzić na tych samych reszta Lys co N-homocysteinylnylacja, na przykład zidentyfikowane jako N-homocysteinylnowane, Lys 30 czynnika elongacyjnego 1- α jest miejscem metylacji, a Lys 22 histonu H2A.2 – sukcylnylacji.

Inną możliwą konsekwencją N-homocysteinylnylacji jest deregulacja ekspresji genów i obrotu białek. Aby przetestować tę możliwość postanowiłam wyjaśnić, czy wysoki poziom Hcy wywołuje zmiany w ekspresji białek drożdży. Zmiany proteomu drożdży wywołane traktowaniem D,L-Hcy przez 3 godziny analizowano przy użyciu metod SILAC (ang. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) i iTRAQ (ang. *isobaric tags for relative and absolute quantification*). Zidentyfikowałam w sumie deregulowanych 70 białek – 38 o podwyższonej (1,06-3,58-krotnie) i 32 – obniżonej ekspresji (0,21-0,88-krotnie). Eksperymenty SILAC przeprowadzone w trzech stężeniach Hcy (0,2, 1, 5 mmo/L), wykazały, że zmiany ekspresji większości białek o podwyższonej ekspresji zidentyfikowane we wszystkich trzech warunkach stężenia Hcy i potwierdzone przez iTRAQ były zależne od stężenia Hcy. Poziom większości białek o obniżonej ekspresji był również zależny od stężenia Hcy, z kilkoma wyjątkami, w tym MET17, MET6 i ALD6.

Analizę wzbogacania białek, których ekspresja uległa zmianie w odpowiedzi na HHcy za pomocą narzędzia STRING, przeprowadzono pod kątem komponentu komórkowego, procesów biologicznych, funkcji molekularnej i szlaków KEGG. Większość białek o zmienionej ekspresji zlokalizowanych jest w cytoplazmie i mitochondrium. Niektóre z nich występują jako część nukleoidów mitochondrialnych (ALD4, HSP60, ILV5, LPD1), macierzy mitochondrialnej (ALD4, ALD5, ARG5,6, ARG7, ARG8, BAT1, HSP60, ILV5, LPD1), kompleksu syntazy karbamoilofosforanowej (CPA1, CPA2), kompleksu reduktazy siarczynowej (NADPH) (MET10, MET5) i kompleksu eukariotycznego czynnika elongacji translacji 1 (TEF1, TEF4). Pięć najważniejszych procesów biologicznych, w których biorą udział białka o zmienionej ekspresji to proces metaboliczny małych cząsteczek, proces biosyntezy aminokwasów komórkowych, proces biosyntezy kwasu karboksylowego, proces biosyntezy α -aminokwasów i proces metabolizmu aminokwasów komórkowych. Istotnie wzbogaconymi funkcjami molekularnymi białek o zmienionej ekspresji są aktywność katalityczna, aktywność oksydoreduktazy, wiązanie jonów, wiązanie małych cząsteczek i wiązanie anionów, podczas gdy wzbogacone szlaki KEGG to szlaki metaboliczne, biosynteza antybiotyków, metabolity wtórne i kwas 2-oksokarboksylowy.

Najważniejszym osiągnięciem przedstawianej pracy jest zidentyfikowanie białek zawierających reszty N-Hcy-Lys w drożdżach. Niektóre ze zidentyfikowanych miejsc N-homocysteinylnylacji *in vivo* pokrywają się ze znanymi miejscami modyfikacji posttranslacyjnych, co może mieć znaczenie w funkcjonalnej proteomice, poprzez regulację aktywności białka, lokalizacji, oddziaływania z innymi cząsteczkami i stabilności. Opisane odkrycia sugerują, że N-homocysteinylnylacja białek i rozregulowanie proteostazy komórkowej wpływającej na białka rybosomalne, biosyntezę aminokwasów i zmiany w podstawowych szlakach komórkowych, przyczyniają się do toksyczności podwyższonego poziomu Hcy u drożdży. Białka homologiczne mogą brać udział w toksyczności HHcy w komórkach ludzkich i zwierzęcych [24] (publikacja 1 cyklu habilitacyjnego).

Zmiany ekspresji genów wywołane przez HHcy obserwowane w wykonanych przez nas eksperymentach na drożdżach, znajdują również potwierdzenie w innych badaniach prowadzonych na liniach komórkowych i organizmach wyższych. Przeglądając się wynikom badań nad metabolizmem i patofizjologią Hcy, można wnioskować, że efekty jakie wywołuje HHcy zależą od płci i tkanki. Złożoność odpowiedzi na HHcy opisano w pracy przeglądowej [10] należącej do cyklu habilitacyjnego (publikacja 2 cyklu habilitacyjnego), w której dokonano między innymi zestawienia szlaków biologicznych modulowanych przez HHcy wywołaną w liniach komórkowych oraz organizmach modelowych – myszach i szczurach. W pracy przeglądowej skupiliśmy się na

epigenetycznej regulacji ekspresji genów w warunkach HHcy. Hcy i jej metabolity ze względu na swoje powiązanie z metabolizmem jednostek jednowęglowych, zaburzają epigenetyczną kontrolę ekspresji genów na poziomie metylacji DNA, modyfikacji histonów oraz niekodujących RNA. Dokonałmy przeglądu literatury wszystkich trzech wymienionych poziomów regulacji. Publikacja zawiera zestawienie efektów HHcy na procesy metylacji DNA *in vitro* i *in vivo*, obejmujące wpływ na poziomy SAM, SAH, SAM/SAH, metylotransferaz DNA i metylację DNA promotorów genów, ekspresję genów i poziom białek. W szczególności chciałabym podkreślić rolę modyfikacji histonów w regulacji ekspresji genów w HHcy, jako że zachodzą one m.in. na resztach Lys, które mogą podlegać procesowi N-homocysteinylicacji. Czynniki, które wpływają na poziom tHcy, a więc dieta (wysoki poziom Met, niedobór folianu i kobalaminy), wiek, płeć oraz czynniki genetyczne, wpływają na modyfikacje histonów, włączając acetylację, metylację i N-homocysteinylicację. Co bardzo ważne, znaleziono powiązanie między poziomem N-homocysteinylowanego na reszcie Lys 79 histonu H3, a poziomem Hcy i ekspresją genów związanych w rozwoju wad cewy nerwowej w mózgach płodów ludzkich [10] (publikacja 2 cyklu habilitacyjnego).

4.3.7 Rola paraoksonazy 1 w ochronie przed N-homocysteinylicacją

Opisane w publikacjach cyklu habilitacyjnego, przykłady N-homocysteinylicacji, która wpływa na funkcje białek oraz może zaburzać zachodzenie innych modyfikacji posttranslacyjnych [22-24] (publikacje 1, 4, 9 cyklu habilitacyjnego), świadczą o toksyczności tiolaktonu Hcy. Tiolakton Hcy jest predyktorem ostrego zawału mięśnia sercowego u osób z chorobą sercowo-naczyniową, niezależnym od znanych czynników ryzyka i tHcy osocza. Poziomy tiolaktonu Hcy nie ulegają redukcji na skutek terapii kwasem foliowym i witaminą B₁₂, które obniżają poziom tHcy [81].

Jednym z mechanizmów usuwania tiolaktonu Hcy z organizmu jest filtracja nerkowa i wydalanie z moczem [28, 32]. Drugim sposobem pozbywania się tej reaktywnej formy Hcy jest hydroliza enzymatyczna.

Pierwsze doniesienia na temat tiolaktonazowej aktywności ludzkiej surowicy pochodzą z badań Dudman i wsp. [82], natomiast Jakubowski wykazał, że za tę aktywność odpowiedzialna jest paraoksonaza 1 (PON1), zależny od wapnia enzym, przenoszony przez lipoproteinę o dużej gęstości (HDL) [26]. Nazwa tego enzymu pochodzi od zdolności do hydrolizy paraoksonu, aktywnego metabolitu insektycydu parationu.

W publikacji przeglądowej [83] należącej do cyklu habilitacyjnego (publikacja 5 cyklu habilitacyjnego) obok opisu struktury białka PON1, mechanizmu katalizy enzymatycznej, polimorfizmów genu *PON1*, a także powiązań między genotypem, aktywnością a stanami chorobowymi, przedyskutowane zostały funkcje enzymu, wokół których istnieje sporo kontrowersji. Uważa się, że PON1 przyczynia się do przeciwmiażdżycowych funkcji HDL u myszy [84] i ludzi [85, 86], jednak dokładny mechanizm leżący u podłoża tego działania nie jest dokładnie poznany. Myszy z uszkodzonym genem *Pon1* mają większe zmiany miażdżycowe w aortach niż kontrolne [84, 87] i są również bardziej wrażliwe na neurotoksyczność wywołaną przez dootrzewnowe nastrzyki tiolaktonu Hcy [88].

Metaanaliza obejmująca 43 badania przeprowadzone na ludziach (łącznie 11 212 przypadków z chorobą wieńcową serca i 12 786 kontrolnych) wykazała, że warianty polimorficzne PON1 nie mają związku (M55, (-107)T) lub są słaba powiązanie (R192) z chorobą wieńcową serca [89]. Bhattacharyya i wsp. stwierdzili jednak, że genotyp PON1 QQ192 jest zasocjowany z obniżoną aktywnością PON1 i z podwyższonym poziomem ogólnoustrojowych wskaźników stresu oksydacyjnego. Osoby z genotypem PON1 RR192 charakteryzują się niższym poziomem ogólnoustrojowych wskaźników stresu oksydacyjnego w porównaniu z osobami posiadającymi genotyp PON1 QQ192 oraz dopasowanymi pod względem wieku, płci i rasy. Ponadto, u osób z

genotypem PON1 Q192 istotnie częściej występowała choroba wieńcowa, natomiast u osób z najwyższego kwartyłu aktywności paraoksonazy i arylerazy PON1 obserwowano niższą częstość wystąpienia zawału serca, udaru mózgu oraz zgonu z przyczyn ogólnych [85].

Odkrycie tiolaktonazowej aktywności białka PON1 [26] rzuciło nowe światło na fizjologiczną funkcję PON1 oraz dało podwaliny do postawienia hipotezy zgodnie z którą ochronna funkcja tego enzymu może być związana z hydrolizą tiolaktonu Hcy i zapobieganiem N-homocysteinytacji białek [26, 83].

Okazało się, że PON1 chroni przed akumulacją N-Hcy-białka *in vitro* [15, 90], dlatego istotne stało się stwierdzenie, czy taką samą zależność można zaobserwować w organizmie człowieka. Aby określić funkcję PON1 *in vivo*, zbadaliśmy, jak naturalna zmienność w aktywności tiolaktonazy PON1 wpływa na poziom N-Hcy-białka w osoczu człowieka. Badanie zostało przeprowadzone na próbkach osocza i surowicy pochodzących od 28 pacjentów z niedoborem β -syntazy cystationinowej. Odkryliśmy, że poziom N-Hcy-białka w osoczu jest negatywnie skorelowany z aktywnością tiolaktonazową w surowicy ($r=-0,43$, $p=0,01$). Stwierdziliśmy także, że aktywności enzymatyczne białka PON1 względem sztucznych substratów są słabiej skorelowane (paraokson, $r=-0,36$, $p=0,025$) lub w ogóle nie korelują (octan fenylu, γ -tiobutyrolakton) z poziomem N-Hcy-białka osocza. Wykazaliśmy również, że aktywność tiolaktonozowa PON1 jest silnie skorelowana z aktywnością paraoksonazową, natomiast nie koreluje z aktywnością arylerazowa. Te wyniki pozwoliły stwierdzić, że aktywność tiolaktonazowa PON1 jest wyznacznikiem poziomu N-Hcy-białka w osoczu oraz może zapobiegać N-homocysteinytacji białek *in vivo* [29] (publikacja 7 cyklu habilitacyjnego). W publikacji przeglądowej [83] należącej do cyklu habilitacyjnego (publikacja 5 cyklu habilitacyjnego) opisano doniesienia sugerujące, że hydrolizując tiolakton Hcy, a więc ograniczając N-homocysteinytację białek, PON1 może chronić przez miażdżycą, zakrzepicą i chorobą mózgu. Potwierdzenie powiązania aktywności PON1 z poziomem N-Hcy-białka płynie również z badań na zwierzętach. Myszy *Pon1*^{-/-} które mają uszkodzoną zdolność hydrolizy tiolaktonu Hcy, cechuje podwyższony poziom N-Hcy-białka i wydają więcej tiolaktonu Hcy z moczem niż myszy *Pon1*^{+/+} [88]. Myszy *Pon1*^{-/-} są również bardziej wrażliwe na neurotoksyczność tiolaktonu Hcy [88].

Aby uzyskać głębszy wgląd w fizjologiczną funkcję PON1 u człowieka wykonaliśmy badanie wpływu polimorfizmów w genie *PON1* na poziom tiolaktonu Hcy wydalanego z moczem. Jednym z najlepiej poznanych polimorfizmów genu *PON1*, który wpływa na aktywność enzymatyczną, jest zamiana reszty glutaminy (wariant Q) na resztę argininy (wariant R) w pozycji 192 łańcucha polipeptydowego PON1. Naszym celem było sprawdzenie, czy polimorfizm PON1-192, jest powiązany z poziomem tiolaktonu Hcy w moczu. Badanie przeprowadziliśmy na grupie 233 osób z chorobą wieńcową, którzy uczestniczyli w programie WENBIT (ang. *Western Norway B-Vitamin Intervention Trial*) [91]. Nosiciele allelu *PON1*-192R mieli istotnie niższe poziomy tiolaktonu Hcy (znormalizowanego na kreatyninę) niż osoby posiadające allel *PON1*-192Q. Osoby z niską aktywnością paraoksonazy PON1 w surowicy miały istotnie wyższe stężenie tiolaktonu Hcy w porównaniu z osobami o wysokiej aktywności paraoksonazy. W odróżnieniu od paraoksonazy, aktywność arylerazy i poziom białka PON1, nie były powiązane ze stężeniem tiolaktonu Hcy. Podsumowując, odkrycia te sugerują, że PON1 hydrolizuje tiolakton Hcy u ludzi i moduluje niekorzystne efekty HHcy [30] (publikacja 3 cyklu habilitacyjnego). W tej publikacji po raz pierwszy zostało pokazane, że poziomy tiolaktonu Hcy są powiązane z polimorfizmem Q192R genu *PON1* i aktywnością paraoksonazową białka PON1 u ludzi.

4.3.8 Podsumowanie

Celem badań było wykazanie roli N-homocysteinytacji białek w patomechanizmie zaburzeń związanych z HHcy oraz stwierdzenie czy paraoksonaza 1 chroni przed szkodliwym działaniem tiolaktonu Hcy.

Stwierdzono obecności N-Hcy-białka w ludzkich i mysich tkankach objętych miażdżycą, co potwierdziło hipotezę, że N-homocysteinyłacja białek może być jednym z mechanizmów toksyczności HHcy [21] (publikacja 8 cyklu habilitacyjnego). Zauważono redukcję poziomu wiązań poprzecznych P_{yl}/D_{pd} w kolagenie myszy *Cbs*^{-/-}, któremu towarzyszył wzrost poziomu N-homocysteinyłacji, co sugeruje, że jednym z mechanizmów powstawania nieprawidłowości tkanki łącznej obserwowanych w HHcy jest N-homocysteinyłacja kolagenu [23] (publikacja 4 cyklu habilitacyjnego). Wykazano istnienie subtelnych zmian strukturalnych objawiających się zwiększoną odpornością N-Hcy-cytochromu c na degradację proteolityczną oraz zmianą stanu redoks żelaza hemu, co wskazuje, że N-homocysteinyłacja może interferować z funkcją białek hemowych [22] (publikacja 9 cyklu habilitacyjnego). Zmapowano miejsca N-homocysteinyłacji w proteomie drożdży, dzięki czemu możliwe było stwierdzenie, że częściowo pokrywają się one ze znanymi miejscami innych modyfikacji posttranslacyjnych, co może mieć znaczenie w funkcjonalnej proteomice, poprzez regulację aktywności białka, lokalizacji, oddziaływania z innymi cząsteczkami i stabilności. Stan HHcy, któremu towarzyszy N-homocysteinyłacja białek, wywołuje deregulację poziomów białek włączając białka rybosomalne, a także zaangażowane w biosyntezę aminokwasów i podstawowe szlaki komórkowe. Homologiczne białka mogą brać udział w toksyczności HHcy w komórkach ludzkich i zwierzęcych [24] (publikacja 1 cyklu habilitacyjnego).

Badając rolę PON 1 stwierdzono, że aktywność tiolaktonazowa PON1 jest wyznacznikiem poziomu N-Hcy-białka w osoczu oraz może zapobiegać N-homocysteinyłacji białek *in vivo* [29] (publikacja 7 cyklu habilitacyjnego). Poziomy tiolaktonu Hcy są powiązane z polimorfizmem Q192R genu *PON1* i aktywnością paraoksonazową białka PON1 u ludzi. Osoby z niską aktywnością paraoksonazy PON1 w surowicy miały istotnie wyższe stężenie tiolaktonu Hcy w porównaniu z osobami o wysokiej aktywności paraoksonazy, co sugeruje, że PON1 hydrolizuje tiolakton Hcy u ludzi i moduluje niekorzystne efekty HHcy [30] (publikacja 3 cyklu habilitacyjnego).

4.4 Pozostałe osiągnięcia

Po uzyskaniu stopnia doktora, równolegle do kierowania dwoma grantami, byłam i jestem wykonawcą grantów kierowanych przez prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego. Jako efekt powstało dotychczas dziewięć prac eksperymentalnych. Dzięki realizacji stażu podoktorskiego w USA powstała jedna publikacja eksperymentalna. Jestem również współautorem dwóch prac przeglądowych niewłączonych do osiągnięcia naukowego. Przed uzyskaniem stopnia doktora napisałam dwie prace przeglądowe w języku polskim oraz byłam współautorem dwóch prac eksperymentalnych.

Ważnym nurtem moich badań są prace związane z czynnikami ryzyka udaru. Od roku 2017 jestem głównym badaczem projektów naukowych kierowanych przez prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego o tematach: *Determinanty i wartość prognostyczna tiolaktonu homocysteiny u ludzi z udarem* oraz *Determinanty tiolaktonu homocysteiny u ludzi zdrowych*. Celem tych badań jest poznanie nowych czynników ryzyka udaru a w szczególności określenie wartości prognostycznej tiolaktonu Hcy oraz stwierdzenie jakie parametry są zasocjowane z poziomem tiolaktonu Hcy u ludzi zdrowych i z udarem. Mój udział w projektach polegał na opracowaniu dokumentacji potrzebnej do otrzymania zgód Komisji Bioetycznej na pozyskanie próbek od chorych z udarem oraz zdrowych ochotników, rekrutacji ochotników, współpracy ze szpitalem w celu organizacji poboru próbek od pacjentów oraz zdrowych ochotników, organizacji bazy danych, obróbce danych, statystycznej analizie danych, korespondencji z ochotnikami oraz analizach biochemicznych próbek, w tym pomiarze aktywności PON1 w surowicy.

Uzyskane przeze mnie wyniki pomiaru aktywności PON1 w surowicy zostały wykorzystane do wyselekcjonowania z puli 300 ochotników 100 osób, które poddano analizie proteomicznej w celu

identyfikacji różnic w poziomie białek osocza skorelowanych z aktywnością i genotypem PON1. Okazało się, że polimorfizm PON1-Q192R u człowieka i indukowany genotyp Pon1^{-/-} u myszy związane są z podobnymi zmianami w proteomie osocza. Białkami, których poziomy były najbardziej zmienione przez polimorfizm PON1-192 i genotyp Pon1^{-/-} były białka uczestniczące w metabolizmie lipoprotein. Ponadto u człowieka zmiany proteomiczne, które były zależne od genotypu PON1 dotyczyły białek związanych z krzepnięciem krwi, kaskadami dopełniacza/krzepnięcia, odpowiedzią ostrej fazy i odpowiedzią immunologiczną. Nasze odkrycia sugerują, że PON1 oddziałuje ze szlakami molekularnymi niezbędnymi dla homeostazy krwi. Modulacja tych interakcji przez genotyp PON1 może wyjaśniać związek między PON1 a chorobami sercowo-naczyniowymi i neurologicznymi [92].

PON 1 może być związana z chorobami neurologicznymi włączając chorobę Alzheimera [93]. Pacjenci z łagodnym upośledzeniem funkcji poznawczych (MCI, ang. *mild cognitive impairment*) mają niską aktywność arylosterazową PON1 [94], która jest związana z podwyższonym ryzykiem wystąpienia demencji naczyniowej [95]. Zbadanie aktywności PON1 w odniesieniu do zmian struktury i funkcji mózgu było przedmiotem moich kolejnych badań [96]. Dzięki nawiązaniu współpracy przez Profesora Jakubowskiego z Profesorem A. Davidem Smithem z Wielkiej Brytanii otrzymaliśmy próbki moczu oraz surowicy pacjentów z projektu badawczego VITACOG [97]. Celem projektu VITACOG było stwierdzenie czy obniżenie tHcy przez suplementację witaminami z grupy B hamuje atrofię mózgu u osób starszych z MCI. Wzięło w nim udział 196 pacjentów z MCI w wieku 77,6±4,8 lat, którzy zostali poddani 2-letniej suplementacji dzienną dawką 0,8 mg kwasu foliowego, 0,5 mg witaminy B₁₂ i 20 mg witaminy B₆ lub placebo. Próbki krwi i moczu zostały zebrane przed przystąpieniem do programu oraz po 24 miesiącach suplementacji witaminami. Okazało się, w grupie traktowanej witaminami atrofia mózgu była o 30% zahamowana w porównaniu z osobami przyjmującymi placebo a wpływ suplementu był większy w grupie o wyższym początkowym stężeniu tHcy. Ponadto wskaźnik atrofii był mniejszy o 53% u pacjentów należących do najwyższego kwartylu tHcy [97]. Traktowanie witaminami miało pozytywny wpływ na funkcje poznawcze, pamięć epizodyczną i semantyczną u osób z poziomem tHcy powyżej mediany (11,3 μmol/L) przed przystąpieniem do badania [98].

Mój udział w opisanym badaniu [96] polegał na pomiarze dwóch aktywności PON1, paraoksonazowej i arylosterazowej oraz na ich podstawie, określeniu polimorfizmu Q192R genu *PON1* [99, 100]. Uczestniczyłam również w statystycznej analizie danych. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników, stwierdziliśmy, że PON1 to nowy czynnik związany z zaburzeniami funkcji poznawczych u osób z MCI. W grupie osób przyjmujących placebo aktywność arylosterazowa PON1 przed rozpoczęciem suplementacji, w odróżnieniu od aktywności paraoksonazowej i polimorfizmu PON1-192, była istotnie związana z funkcją poznawczą, pamięcią epizodyczną i skupieniem uwagi/szybkością przetwarzania pod koniec badania. Oprócz aktywności arylosterazowej, predyktorami globalnej funkcji poznawczej były początkowe stężenie żelaza i triglicerydów. Suplementacja witaminami grupy B zniósła powiązanie PON1 z funkcjami poznawczymi. Są to pierwsze dowody eksperymentalne sugerujące, że PON1 może odgrywać rolę w ośrodkowym układzie nerwowym, wpływając na poznanie w domenie ogólnej (poznanie globalne), a także w bardziej szczegółowych dziedzinach, takich jak pamięć epizodyczna i skupienie uwagi/szybkość przetwarzania. Wyniki te potwierdzają również koncepcję, zgodnie z którą PON1 jest czynnikiem ryzyka pogorszenia funkcji poznawczych w MCI. Efekt ten może zostać zniesiony przez witaminy z grupy B, wskazując tym samym na nowy pozytywny aspekt leczenia witaminą B na ośrodkowy układ nerwowy [96].

Wyniki opisaney pracy wskazują, że aktywność arylosterazowa PON1 jest negatywnie skorelowana z poziomem żelaza, glinu i krzemu w surowicy pacjentów z MCI [96]. Zaburzenie homeostazy w mózgu metali takich jak żelazo, miedź, cynk i wapń jest ściśle związane z rozwojem choroby Alzheimera

[101]. Ze względu na fakt, że nie było wiadome jak poziom różnych pierwiastków wpływa na funkcje poznawcze u pacjentów z MCI, przeprowadziliśmy badanie, w którym określiliśmy powiązanie między poziomem żelaza, miedzi, arsenu, glinu i krzemu a wskaźnikiem atrofii mózgu i funkcjami poznawczymi, a także ich interakcję z tHcy i Cys i wpływ witamin grupy B na te powiązania. Stwierdziliśmy, że poziom żelaza w surowicy pacjentów z MCI na początku badania był głównym determinantem atrofii mózgu i funkcji poznawczych po dwóch latach badania. Inne pierwiastki (glin, arsen, miedź, krzem) nie były związane ze wskaźnikiem atrofii mózgu w grupie placebo. Przed rozpoczęciem suplementacji żelazo, cysteina i homocysteina były istotnie pozytywnie skorelowane ze wskaźnikiem atrofii mózgu. Efekty Hcy na tempo atrofii mózgu były modyfikowane przez żelazo i cysteinę. Wyjściowe poziomy żelaza, miedzi, glinu i krzemu były istotnie powiązane z jedną lub kilkoma domenami poznawczymi: pamięcią semantyczną, werbalną pamięcią epizodyczną, uwagą/szybkością przetwarzania i funkcją wykonawczą. Pod koniec badania w grupie placebo początkowy poziom żelaza, miedzi, glinu i krzemu były predyktorami funkcji poznawczych w co najmniej jednej domenie poznawczej (pamięć semantyczna, werbalna pamięć epizodyczna, wzrokowo-przestrzenna pamięć epizodyczna, uwaga/szybkość przetwarzania i globalne poznanie). Pod koniec badania zależności takie nie były obserwowane w grupie przyjmującej witaminy z grupy B. Odmienne wpływy poziomu żelaza, miedzi, glinu, krzemu i homocysteiny w surowicy na funkcje poznawcze i atrofię mózgu u osób z MCI sugerują, że upośledzenie funkcji poznawczych jest niezależne od atrofii mózgu u tych pacjentów [102].

Modyfikacja białek przez tiolakton Hcy skutkuje nabyciem właściwości immunogennych i indukcją produkcji specyficznych autooprzeciwciał. Przeciwciała te są związane z udarem oraz chorobą wieńcową [103, 104]. Nie było jednak wiadomo czy są powiązane z funkcjami poznawczymi oraz czy witaminy B zmieniają te powiązania. Wyniki kolejnych badań przeprowadzonych na próbkach od pacjentów z MCI z programu VITACOG, w których powstaniu uczestniczyłam, sugerują, że autooprzeciwciała przeciwko N-Hcy-białku mogą osłabiać funkcjonowanie mózgu (uwaga/szybkość przetwarzania i globalne poznanie), jednak bez wpływu na atrofię mózgu. Okazało się, że autooprzeciwciała przeciwko N-Hcy-białku to nowy czynnik związany z zaburzeniami funkcji poznawczych, które mogą być złagodzone przez witaminy z grupy B. U osób z MCI przed przystąpieniem do programu suplementacji, autooprzeciwciała przeciwko N-Hcy-białku były istotnie powiązane z zaburzeniami globalnych funkcji poznawczych, pamięci epizodycznej oraz szybkości uwagi/przetwarzania. Pod koniec badania (po okresie przyjmowania suplementacji witaminami) autooprzeciwciała przeciwko N-Hcy-białku były powiązane z upośledzonym poznaniem globalnym i szybkością uwagi/przetwarzania. W grupie placebo, przed rozpoczęciem suplementacji autooprzeciwciała przeciwko N-Hcy-białku były predyktorami homocysteiny, globalnych funkcji poznawczych i szybkości uwagi/przetwarzania, ale nie atrofii mózgu na końcowym etapie badania. Powyższych zależności nie zaobserwowaliśmy w grupie osób przyjmujących witaminy grupy B, co wskazuje, że zniosły one asocjacje autooprzeciwciał anty-N-Hcy-białko z funkcjami poznawczymi [105].

Zespół prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego zidentyfikował reszty Lys albuminy [106, 107] i fibrynogenu człowieka [72] ulegające N-homocysteinyłacji *in vivo*. Miałam udział w odkryciu, że poziom N-homocysteinyłacji białek jest podwyższony w mysich modelach HHcy [18, 31], oraz jestem współautorem pracy, w której zidentyfikowano 28 reszt Lys albuminy ulegających N-homocysteinyłacji *in vivo* u myszy [108]. Stwierdzono również, że dwie z nich (Lys 212 i Lys 525) ulegają preferencyjnej modyfikacji tiolaktonem Hcy *in vitro*, a ilość peptydu niosącego zmodyfikowane w/w reszty Lys jest proporcjonalna do stężenia tiolaktonu Hcy użytego do modyfikacji. Te same reszty Lys zostały również zidentyfikowane w osoczu myszy, co świadczy o tym, że ulegają modyfikacji tiolaktonem Hcy również *in vivo*. Samice i samce myszy *Cbs*^{-/-} miały znacząco podwyższone poziomy modyfikacji K212Hcy i K525Hcy w surowicy albuminy w stosunku do samic i

samców typu dzikiego (*Cbs*^{+/-}). Dodatkowo stwierdzono, że poziomy modyfikacji K212Hcy były znacznie wyższe u samców niż u samic myszy zarówno *Cbs*^{-/-} jak i kontrolnych. Mój udział w badaniach polegał na pomiarze tHcy w osoczu myszy z niedoborem genu *Cbs* (n=23) oraz kontrolnych (n=12), co pozwoliło stwierdzić, że tHcy wyjaśniała odpowiednio 7,5% i 3,8% wariacji poziomu K212Hcy i K525Hcy [108].

Niedobór β -syntazy cystationiny (CBS) jest rzadką chorobą genetyczną charakteryzującą się silnie podwyższonym poziomem tHcy i jej metabolitów w osoczu [11] oraz zmianami patologicznymi w obrębie układu sercowo-naczyniowego, kostnego i nerwowego [4]. Nielezione powikłania naczyniowe u pacjentów z CBS^{-/-} są powodem przedwczesnej śmierci (20–25% śmiertelność w wieku 30–50 lat) [109]. Mechanizmy molekularne prowadzące do skrócenia długości życia pacjentów z niedoborem CBS nie są w pełni poznane. Skrócenie telomerów i liczba kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA) są związane z chorobami człowieka i ze skróconą długością życia, dlatego jednym z wyjaśnień śmiertelności u osób z niedoborem CBS mogłoby być skracanie telomerów lub zmiany liczby kopii mtDNA. Wzięłam udział w badaniu mającym na celu zbadanie długości telomerów i liczby kopii mtDNA w leukocytach pacjentów z niedoborem CBS i osób kontrolnych. Mój udział w badaniu polegał na pomiarze poziomu tHcy w osoczu pacjentów CBS^{-/-} (n=23) oraz dobranej pod względem wieku i płci grupie kontrolnej (n=28), statystycznej analizie wyników i przygotowaniu wykresów do publikacji. Stwierdziliśmy, że długość telomerów była znacznie zwiększona w ciężkiej HHcy u pacjentów CBS^{-/-} płci żeńskiej, ale bez zmian u pacjentów CBS^{-/-} płci męskiej z ciężką HHcy, w porównaniu z odpowiadającymi osobami z grupy kontrolnej, którzy mieli normalny poziom tHcy w osoczu. Analiza regresji wielorakiej pozwoliła stwierdzić, że długość telomerów była powiązana z genotypem CBS u kobiet, ale nie u mężczyzn. Genotyp CBS^{-/-} natomiast nie miał istotnego wpływu na liczbę kopii mtDNA. Podsumowując wykazaliśmy, że gen CBS wpływa na długość telomerów u kobiet. Dzięki przeprowadzeniu powyższych analiz można było stwierdzić, że ani skrócenie telomerów, ani zmniejszona liczba kopii mtDNA nie przyczynia się do skrócenia życia pacjentów z niedoborem CBS [110].

Podobnie jak u ludzi, również w przypadku myszy niedobór CBS powoduje ciężką HHcy i skrócenie długości życia. Zbadaliśmy możliwe powiązanie markerów senescencji, mtDNA i telomerów z długością życia myszy *Cbs*^{-/-}. Odkryliśmy, że poziomy mRNA p21, Pai-1, Mcp1 i Il-6 związane ze starzeniem się były istotnie podwyższone (2-10-krotnie) w wątrobie, podczas gdy p21 było podwyższone w mózgu myszy *Cbs*^{-/-} w porównaniu z myszami *Cbs*^{+/-} w sposób zależny od płci i wieku. Genotyp *Cbs*^{-/-}, w odróżnieniu od płci i wieku, nie miał wpływu na długość telomerów we krwi, wątrobie i mózgu myszy, natomiast poziom mtDNA miał tendencję do obniżenia się w wątrobie, ale nie w mózgu i krwi, samic *Cbs*^{-/-}. Genotyp *Cbs*^{-/-} znacząco obniżył ekspresję mRNA telomerazy w mózgu, ale nie wątroby, w sposób zależny od płci i wieku. Analiza regresji wielorakiej wykazała, że markery senescencji i mtDNA wątroby (w odróżnieniu od mózgu) były związane z genotypem *Cbs*. Natomiast długość telomerów we krwi, mózgu i wątrobie nie była związana z genotypem *Cbs* lub HHcy, ale była związana z płcią (w mózgu wątroby) i wiekiem (w mózgu i krwi). Podsumowując, odkrycia te sugerują, że zmiany ekspresji markerów starzenia i poziomów mtDNA, ale nie skracanie telomerów, mogą odpowiadać za skrócenie długości życia myszy *Cbs*^{-/-}. Mój udział w badaniu polegał na pomiarze poziomu tHcy w osoczu myszy *Cbs*^{-/-} (n=40) oraz dobranej pod względem wieku i płci grupie kontrolnej (n=40). Brałam również udział w statystycznej analizie wyników i przygotowałam wykresy do publikacji [111].

W latach 2007-2009 odbyłam staż podoktorski w *University of Medicine and Dentistry New Jersey Medical School* (obecnie *Rutgers University*) pod kierunkiem dr. Włodka Mandeckiego. Pracowałam nad realizacją grantu finansowanego przez National Institutes of Health w ramach \$1000 Genome

Program. W projekcie planowano wykorzystać rybosomy do sekwencjonowania kwasów nukleinowych. W tym celu konieczne było zoptymalizowanie metody FRET (ang. *single-pair fluorescence resonance energy transfer*) a w szczególności maszynerii składającej się z tRNA wyznakowanego barwnikiem fluorescencyjnym oraz białek wyznakowanych wygaszaczem fluorescencji. W stosowanym przeze mnie układzie donorem był specyficzny aminoacylo-tRNA wyznakowany barwnikiem fluorescencyjnym natomiast akceptorem czynnik elongacyjny EF-Tu sprzężony z wygaszaczem. Jednym z wyzwań było umieszczenie wygaszacza w odpowiednim miejscu cząsteczki EF-Tu. Wygaszacz ten łączy się z grupami tiolowymi reszt Cys białka. EF-Tu *E.coli* ma trzy reszty cysteiny, Cys81, Cys137 i Cys255, które mogą połączyć się z wygaszaczem, co komplikowałoby interpretację wyników. Aby uniknąć zakłóceń podczas znakowania wygaszaczem, trzy reszty Cys występujące naturalnie w EF-Tu u *E. coli* zostały zmutowane odpowiednio do Ser, Ala i Val. Stwierdzono, że aktywność powstałego mutantu trójpunktowego (o nazwie EF-Tu SAV) nie odbiegała od aktywności białka EF-Tu typu dzikiego. Po usunięciu reszt Cys występujących naturalnie w EF-Tu uzyskano dziesięć białek zmutowanych, z tylko jedną resztą Cys wprowadzoną w 10 różnych pozycjach. Moim zadaniem była nadprodukcja zmutowanych form EF-Tu w *E. coli*, ich izolacja, oczyszczenie i przetestowanie aktywności w celu wybrania najbardziej aktywnych i nadających się do wykorzystania w projekcie sekwencjonowania. Zmutowane cząsteczki EF-Tu poddałam nadekspresji w formie białka fuzyjnego z S-transferazą glutationową (GST), która umożliwiła mi ich izolację i oczyszczenie. Właściwości obu typów zmutowanego EF-Tu, czyli natywnego i połączonego z GST, oceniłam z użyciem kilku metod *in vitro* tj. pomiarem zdolności białek do wiązania GDP i aminoacylo-tRNA, a także ich aktywności w translacji łańcucha mRNA poli(U) na poli(Phe). Na podstawie wyników tych testów, do dalszych badań wybrano trzy najbardziej aktywne mutanty EF-Tu: EF-Tu SAVK324C, EF-Tu SAVG325C i EF-Tu SAVE348C. Analizę funkcjonalną mutantów EF-Tu oraz białka natywnego przeprowadziłam czterema metodami: wiązania GDP, inhibicji deacylacji aminoacylo-tRNA przez EF-Tu, opóźnienia migracji aminoacylo-tRNA w żelu i translacji *in vitro* (synteza poliPhe na łańcuchu poliU). Najbardziej aktywne formy EF-Tu były testowane również w formie białek fuzyjnych z GST [112]. Wyniki moich badań znacząco przyczyniły się do opracowania metody identyfikacji inhibitorów interakcji między EF-Tu i tRNA u bakterii, kluczowego etapu biosyntezy białka. Metodę tę wykorzystano do wysokoprzepustowej identyfikacji antybiotyków, które aktualnie są w fazie testów na zwierzętach (załącznik 9 do wniosku).

4.5 Plany badawcze

Doświadczenie w identyfikacji miejsc N-homocysteinyłacji w indywidualnych białkach oraz w proteomie drożdży, wykorzystuję obecnie do badania proteomów mysich modeli HHcy genetycznej i dietetycznej. Wyniki uzyskane dla proteomów poszczególnych organów myszy pozwolą wyłonić białka szczególnie podatne na modyfikację tiolaktonem Hcy, określić cechy strukturalne białek determinujące tę podatność oraz uzyskać wgląd w patomechanizm HHcy związany z N-homocysteinyłacją białek.

W ostatnich latach oczy wielu naukowców zwróciły się w kierunku nowej jednostki chorobowej COVID-19. Zgromadzone dowody sugerują, że metabolizm jednowęglowy odgrywa ważną rolę w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2, co opisałam w pracy przeglądowej [113]. Ze względu na fakt, że pacjenci z COVID-19 prezentują zróżnicowane nasilenie objawów klinicznych, od braku objawów, poprzez mniej i bardziej nasilone, aż do śmierci, istotne jest określenie czynników determinujących nasilenie choroby. Z gorszym przebiegiem choroby wiąże się podeszły wiek i choroby współistniejące, zwłaszcza przewlekła obturacyjna choroba płuc, otyłość, cukrzyca, choroby układu krążenia i nadciśnienie. Objawy długiego COVID-19 są podobne do tych prezentowanych przez osoby cierpiące na niedobór witaminy B₁₂ (niedokrwistość złośliwa) [113]. W odpowiedzi na pytanie

co różnicuje pacjentów o różnych stopniach nasilenia objawów COVID-19 pomóc mogą badania proteomiczne i metabolomiczne. Analiza ponad dwudziestu badań proteomicznych dotyczących osocza i surowicy pacjentów z COVID-19 ujawniła rozregulowanie trzech szlaków: kaskady dopełniacza i krzepnięcia, oddziaływań cytokin z receptorami cytokin a metabolizm cholesterolu [114]. Ze względu na fakt, że dysponujemy materiałem biologicznym od osób, które wzięły udział w badaniu determinant tiolaktonu Hcy u ludzi zdrowych planujemy poszerzyć te analizy o ankietę dotyczącą wystąpienia i przebiegu choroby COVID-19 u tych osób. Na jej podstawie oraz z wykorzystaniem zgromadzonych danych na temat poziomu parametrów biochemicznych oraz polimorfizmów w genach metabolizmu homocysteiny i jej pochodnych, planujemy poszukiwanie determinant stopnia nasilenia COVID-19 a także wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych.

W kręgu moich zainteresowań pozostaje rola paraoksonazy 1 w detoksykacji tiolaktonu Hcy zarówno w modelu mysim z niedoborem PON1 [84] jak i u człowieka, w stanach patologicznych takich jak udar oraz schyłkowa niewydolność nerek. Chciałabym zbadać jak niedobór PON1 wpływa na miejsca N-homocysteinyłacji w proteomie myszy oraz czy interferują one z występowaniem innych modyfikacji posttranslacyjnych. Istnieje wiele dowodów na obniżoną aktywność paraoksonazy 1 w stanach patologicznych u ludzi, takich jak choroba wieńcowa, niewydolność nerek, choroba Alzheimera, cukrzyca, zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem i udar niedokrwienny [83]. Pacjenci ze schyłkową niewydolnością nerek otrzymujący terapię nerkozastępczą cierpią na chorobę sercowo-naczyniową, która jest główną przyczyną ich śmiertelności. Wykazują zaburzenia metaboliczne, które mogą przyspieszać rozwój blaszek miażdżycowych, na przykład nieprawidłowości lipoproteinowe i nadciśnienie. Interesujące byłoby zbadanie jak aktywności PON1 wpływają na poziom tiolaktonu Hcy w moczu pacjentów z niewydolnością nerek oraz czy jest czynnikiem determinującym czas przeżycia po transplantacji nerek.

4.6 Referencje

1. Butz, L.W. and V.d. Vigneaud, *THE FORMATION OF A HOMOLOGUE OF CYSTINE BY THE DECOMPOSITION OF METHIONINE WITH SULFURIC ACID*. Journal of Biological Chemistry, 1932. **99**: p. 135-142.
2. GERRITSEN, T., J.G. VAUGHN, and H.A. WAISMAN, *The identification of homocystine in the urine*. Biochem Biophys Res Commun, 1962. **9**: p. 493-6.
3. CARSON, N.A. and D.W. NEILL, *Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland*. Arch Dis Child, 1962. **37**: p. 505-13.
4. MUDD, S.H., et al., *HOMOCYSTINURIA: AN ENZYMATIC DEFECT*. Science, 1964. **143**(3613): p. 1443-5.
5. McCully, K.S., *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*. Am J Pathol, 1969. **56**(1): p. 111-28.
6. Smith, A.D. and H. Refsum, *Homocysteine - from disease biomarker to disease prevention*. J Intern Med, 2021. **290**(4): p. 826-854.
7. Mudd, S.H., et al., *Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(7): p. 1704-6.
8. Benevenga, N.J., *Toxicities of methionine and other amino acids*. J Agric Food Chem, 1974. **22**(1): p. 2-9.
9. Perła-Kaján, J., T. Twardowski, and H. Jakubowski, *Mechanisms of homocysteine toxicity in humans*. Amino Acids, 2007. **32**(4): p. 561-72.
10. Perła-Kaján, J. and H. Jakubowski, *Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13): p. 3140.
11. Jakubowski, H., *Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease*. Physiol Rev, 2019. **99**(1): p. 555-604.

12. Jakubowski, H., *Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures - Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(3): p. 1935-1942.
13. Jakubowski, H., *Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels*. Faseb Journal, 1999. **13**(15): p. 2277-2283.
14. Liu, G., K. Nellaiappan, and H.M. Kagan, *Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32370-7.
15. Jakubowski, H., et al., *Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells - Implications for atherosclerosis*. Circulation Research, 2000. **87**(1): p. 45-51.
16. Jakubowski, H., *Homocysteine thiolactone: Metabolic origin and protein homocysteinylation in humans*. Journal of Nutrition, 2000. **130**(2): p. 377S-381S.
17. Jakubowski, H., *Homocysteine is a protein amino acid in humans - Implications for homocysteine-linked disease*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(34): p. 30425-30428.
18. Jakubowski, H., *Homocysteine in protein structure/function and human disease*. 2013: Springer.
19. Ferguson, E., et al., *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.
20. Perła, J., et al., *Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on Nomega-homocysteinyl-aminohexyl-Agarose*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **807**(2): p. 257-61.
21. Perła-Kaján, J., et al., *Immunohistochemical detection of N-homocysteinylation proteins in humans and mice*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(7): p. 473-9.
22. Perła-Kaján, J., et al., *Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome c*. Biochemistry, 2007. **46**(21): p. 6225-31.
23. Perła-Kaján, J., et al., *N-Homocysteinylation impairs collagen cross-linking in cystathionine β -synthase-deficient mice: a novel mechanism of connective tissue abnormalities*. FASEB J, 2016. **30**(11): p. 3810-3821.
24. Perła-Kaján, J., et al., *Proteome-Wide Analysis of Protein Lysine N-homocysteinylation in Saccharomyces cerevisiae*. J Proteome Res, 2021. **20**(5): p. 2458-2476.
25. Zimny, J., et al., *Protective mechanisms against homocysteine toxicity - The role of bleomycin hydrolase*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(32): p. 22485-22492.
26. Jakubowski, H., *Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase - A protective mechanism against protein N-homocysteinylation*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(6): p. 3957-3962.
27. Marsillach, J., et al., *Human valacyclovir hydrolase/biphenyl hydrolase-like protein is a highly efficient homocysteine thiolactonase*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110054.
28. Chwatko, G. and H. Jakubowski, *Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(2): p. 408-415.
29. Perla-Kaján, J. and H. Jakubowski, *Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans*. FASEB J, 2010. **24**(3): p. 931-6.
30. Perła-Kaján, J., et al., *Paraoxonase 1 Q192R genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans*. FASEB J, 2018: p. fj201800346R.
31. Jakubowski, H., et al., *Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice*. Faseb Journal, 2009. **23**(6): p. 1721-1727.
32. Chwatko, G., et al., *Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice*. Faseb Journal, 2007. **21**(8): p. 1707-1713.
33. Myers, B.A., et al., *Effect of vitamin B-6 (pyridoxine) deficiency on lung elastin cross-linking in perinatal and weanling rat pups*. Biochem J, 1985. **229**(1): p. 153-60.

34. Baumbach, G.L., et al., *Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice*. *Circ Res*, 2002. **91**(10): p. 931-7.
35. Vrhovski, B. and A.S. Weiss, *Biochemistry of tropoelastin*. *Eur J Biochem*, 1998. **258**(1): p. 1-18.
36. Perla-Kaján, J., et al., *Cation exchange HPLC analysis of desmosines in elastin hydrolysates*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **401**(8): p. 2473-9.
37. Griffiths, R., N. Tudball, and J. Thomas, *Effect of induced elevated plasma levels of homocystine and methionine in rats on collagen and elastin structures*. *Connect Tissue Res*, 1976. **4**(2): p. 101-6.
38. Bosma, M., W. Schuler, and G. Bosma, *The scid mouse mutant*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1988. **137**: p. 197-202.
39. Harvey Mudd, S., H.L. Levy, and J.P. Kraus, *Disorders of Transsulfuration*, in *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, D.L. Valle, et al., Editors. 2019, McGraw-Hill Education: New York, NY.
40. McLean, R.R., et al., *Association of a common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bone phenotypes depends on plasma folate status*. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(3): p. 410-8.
41. Abrahamsen, B., et al., *MTHFR c.677C>T polymorphism as an independent predictor of peak bone mass in Danish men--results from the Odense Androgen Study*. *Bone*, 2006. **38**(2): p. 215-9.
42. Robert, K., et al., *Cystathionine beta synthase deficiency affects mouse endochondral ossification*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2005. **282**(1): p. 1-7.
43. Gupta, S., et al., *Mouse models of cystathionine beta-synthase deficiency reveal significant threshold effects of hyperhomocysteinemia*. *FASEB J*, 2009. **23**(3): p. 883-93.
44. Kang, A.H. and R.L. Trelstad, *A collagen defect in homocystinuria*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(10): p. 2571-8.
45. Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner, *Collagens--structure, function, and biosynthesis*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(12): p. 1531-46.
46. Eyre, D.R., M.A. Weis, and J.J. Wu, *Advances in collagen cross-link analysis*. *Methods*, 2008. **45**(1): p. 65-74.
47. Hornstra, I.K., et al., *Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(16): p. 14387-93.
48. Mäki, J.M., et al., *Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice*. *Circulation*, 2002. **106**(19): p. 2503-9.
49. Fujimoto, D., et al., *The structure of pyridinoline, a collagen crosslink*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978. **84**(1): p. 52-7.
50. Majors, A., L.A. Ehrhart, and E.H. Pezacka, *Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 2074-81.
51. Lei, W., et al., *Homocysteine Induces Collagen I Expression by Downregulating Histone Methyltransferase G9a*. *PLoS One*, 2015. **10**(7): p. e0130421.
52. Lubec, B., et al., *Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1315**(3): p. 159-62.
53. Jiang, X. and X. Wang, *Cytochrome C-mediated apoptosis*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 87-106.
54. Rieder, R. and H.R. Bosshard, *The cytochrome c oxidase binding site on cytochrome c. Differential chemical modification of lysine residues in free and oxidase-bound cytochrome c*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(17): p. 6045-53.
55. Wada, K. and K. Okunuki, *Studies on chemically modified cytochrome c. II. The trinitrophenylated cytochrome c*. *J Biochem*, 1969. **66**(2): p. 249-62.

56. Aviram, I. and A. Schejter, *Distinction between oxidizing and reducing sites of cytochrome c by chemical modification with pyridoxal phosphate*. FEBS Lett, 1973. **36**(2): p. 174-6.
57. Isom, A.L., et al., *Modification of Cytochrome c by 4-hydroxy- 2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(8): p. 1136-47.
58. Margoliash, E., et al., *Amino-Acid Sequence of Horse Heart Cytochrome C : The Complete Amino-acid Sequence*. Nature, 1961. **192**(4808): p. 1125-1127.
59. Myer, Y.P., *Conformation of cytochromes. II. Comparative study of circular dichroism spectra, optical rotatory dispersion, and absorption spectra of horse heart cytochrome c*. J Biol Chem, 1968. **243**(9): p. 2115-22.
60. 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.
61. Varhac, R., M. Antalík, and M. Bánó, *Effect of temperature and guanidine hydrochloride on ferrocycytochrome c at neutral pH*. J Biol Inorg Chem, 2004. **9**(1): p. 12-22.
62. Berghuis, A.M. and G.D. Brayer, *Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome c*. J Mol Biol, 1992. **223**(4): p. 959-76.
63. Ferretti, G., et al., *Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells*. J Cell Biochem, 2004. **92**(2): p. 351-60.
64. Wang, L. and N.R. Kallenbach, *Proteolysis as a measure of the free energy difference between cytochrome c and its derivatives*. Protein Sci, 1998. **7**(11): p. 2460-4.
65. Glowacki, R. and H. Jakubowski, *Cross-talk between Cys(34) and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(12): p. 10864-10871.
66. Kumar, T., G.S. Sharma, and L.R. Singh, *Existence of molten globule state in homocysteine-induced protein covalent modifications*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113566.
67. Sharma, G.S. and L.R. Singh, *Corrigendum to "Conformational status of cytochrome c upon N-homocysteinylation: Implications to cytochrome c release" [Arch. Biochem. Biophys. 614 (2017) 23-27]*. Arch Biochem Biophys, 2017. **618**: p. 44.
68. Sharma, G.S. and L.R. Singh, *Conformational status of cytochrome c upon N-homocysteinylation: Implications to cytochrome c release*. Arch Biochem Biophys, 2017. **614**: p. 23-27.
69. Lin, Y.W., *Structure and function of heme proteins regulated by diverse post-translational modifications*. Arch Biochem Biophys, 2018. **641**: p. 1-30.
70. Tyagi, N., et al., *Tetrahydrocurcumin ameliorates homocysteinylation mediated cytochrome-c mediated autophagy in hyperhomocysteinemia mice after cerebral ischemia*. J Mol Neurosci, 2012. **47**(1): p. 128-38.
71. Terman, A., *Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage?* Redox Rep, 2001. **6**(1): p. 15-26.
72. Sikora, M., et al., *Identification of N-homocysteinylation sites in plasma proteins*. Amino Acids, 2014. **46**(1): p. 235-44.
73. Wang, D., et al., *Colonic Lysine Homocysteinylation Induced by High-Fat Diet Suppresses DNA Damage Repair*. Cell Rep, 2018. **25**(2): p. 398-412.e6.
74. Chen, N., et al., *Chemical proteomic profiling of protein N-homocysteinylation with a thioester probe*. Chem Sci, 2018. **9**(10): p. 2826-2830.
75. Mei, X., et al., *Inhibiting MARSs reduces hyperhomocysteinemia-associated neural tube and congenital heart defects*. EMBO Mol Med, 2020. **12**(3): p. e9469.
76. Szklarczyk, D., et al., *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D607-D613.

77. Vacic, V., L.M. Iakoucheva, and P. Radivojac, *Two Sample Logo: a graphical representation of the differences between two sets of sequence alignments*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(12): p. 1536-7.
78. O'Shea, J.P., et al., *pLogo: a probabilistic approach to visualizing sequence motifs*. *Nat Methods*, 2013. **10**(12): p. 1211-2.
79. Bretes, E. and J. Zimny, *Homocysteine thiolactone affects protein ubiquitination in yeast*. *Acta Biochim Pol*, 2013. **60**(3): p. 485-8.
80. Henriksen, P., et al., *Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol Cell Proteomics*, 2012. **11**(11): p. 1510-22.
81. Borowczyk, K., et al., *Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients: the WENBIT trial*. *J Intern Med*, 2019. **285**(2): p. 232-244.
82. Dudman, N.P., et al., *Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(3): p. 663-70.
83. Perła-Kaján, J. and H. Jakubowski, *Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism*. *Amino Acids*, 2012. **43**(4): p. 1405-17.
84. Shih, D.M., et al., *Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis*. *Nature*, 1998. **394**(6690): p. 284-7.
85. Bhattacharyya, T., et al., *Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk*. *JAMA*, 2008. **299**(11): p. 1265-76.
86. Kunutsor, S.K., et al., *Serum paraoxonase-1 activity and risk of incident cardiovascular disease: The PREVEND study and meta-analysis of prospective population studies*. *Atherosclerosis*, 2016. **245**: p. 143-54.
87. Shih, D.M., et al., *Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(23): p. 17527-35.
88. Borowczyk, K., D.M. Shih, and H. Jakubowski, *Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1*. *J Alzheimers Dis*, 2012. **30**(2): p. 225-31.
89. Wheeler, J.G., et al., *Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies*. *Lancet*, 2004. **363**(9410): p. 689-95.
90. Jakubowski, H., W.T. Ambrosius, and J.H. Pratt, *Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis*. *Febs Letters*, 2001. **491**(1-2): p. 35-39.
91. Ebbing, M., et al., *Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2008. **300**(7): p. 795-804.
92. Sikora, M., et al., *Genetic Attenuation of Paraoxonase 1 Activity Induces Proatherogenic Changes in Plasma Proteomes of Mice and Humans*. *Antioxidants (Basel)*, 2020. **9**(12).
93. Menini, T. and A. Gugliucci, *Paraoxonase 1 in neurological disorders*. *Redox Rep*, 2014. **19**(2): p. 49-58.
94. Bednarz-Misa, I., et al., *Paraoxonase 1 decline and lipid peroxidation rise reflect a degree of brain atrophy and vascular impairment in dementia*. *Adv Clin Exp Med*, 2020. **29**(1): p. 71-78.
95. Cervellati, C., et al., *Serum paraoxonase and arylesterase activities of paraoxonase-1 (PON-1), mild cognitive impairment, and 2-year conversion to dementia: A pilot study*. *J Neurochem*, 2015. **135**(2): p. 395-401.
96. Perła-Kaján, J., et al., *Paraoxonase 1, B Vitamins Supplementation, and Mild Cognitive Impairment*. *J Alzheimers Dis*, 2021. **81**(3): p. 1211-1229.
97. Smith, A.D., et al., *Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial*. *PLoS One*, 2010. **5**(9): p. e12244.

98. de Jager, C.A., et al., *Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2012. **27**(6): p. 592-600.
99. Eckerson, H.W., C.M. Wyte, and B.N. La Du, *The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism*. *Am J Hum Genet*, 1983. **35**(6): p. 1126-38.
100. Davies, H.G., et al., *The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin*. *Nat Genet*, 1996. **14**(3): p. 334-6.
101. Wang, L., et al., *Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Transl Neurodegener*, 2020. **9**: p. 10.
102. Jakubowski, H., et al., *B Vitamins Prevent Iron-Associated Brain Atrophy and Domain-Specific Effects of Iron, Copper, Aluminum, and Silicon on Cognition in Mild Cognitive Impairment*. *J Alzheimers Dis*, 2021.
103. Undas, A., et al., *Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans - Implications for atherosclerosis*. *Stroke*, 2004. **35**(6): p. 1299-1304.
104. Undas, A., et al., *Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2005. **93**(2): p. 346-350.
105. Włoczkowska, O., et al., *Anti-N-homocysteine-protein autoantibodies are associated with impaired cognition*. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2021. **7**(1): p. e12159.
106. Sikora, M., et al., *Direct monitoring of albumin lysine-525 N-homocysteinylated in human serum by liquid chromatography/mass spectrometry*. *Analytical Biochemistry*, 2010. **405**(1): p. 132-134.
107. Marczak, L., et al., *Analysis of site-specific N-homocysteinylated of human serum albumin in vitro and in vivo using MALDI-ToF and LC-MS/MS mass spectrometry*. *J Proteomics*, 2011. **74**(7): p. 967-74.
108. Sikora, M., et al., *Sex affects N-homocysteinylated at lysine residue 212 of albumin in mice*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 2669.
109. Mudd, S.H., et al., *The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency*. *Am J Hum Genet*, 1985. **37**(1): p. 1-31.
110. Utyro, O., et al., *Telomere length and mtDNA copy number in human cystathionine β -synthase deficiency*. *Free Radic Biol Med*, 2020. **160**: p. 219-226.
111. Utyro, O., J. Perła-Kaján, and H. Jakubowski, *The Cbs Locus Affects the Expression of Senescence Markers and mtDNA Copy Number, but not Telomere Dynamics in Mice*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(7).
112. Perła-Kajan, J., et al., *Properties of Escherichia coli EF-Tu mutants designed for fluorescence resonance energy transfer from tRNA molecules*. *Protein Eng Des Sel*, 2010. **23**(3): p. 129-36.
113. Perła-Kaján, J. and H. Jakubowski, *COVID-19 and One-Carbon Metabolism*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(8).
114. Costanzo, M., et al., *COVIDomics: The Proteomic and Metabolomic Signatures of COVID-19*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(5): p. 2414.

5 *Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.*

01.12.2007-31.03.2009 – Post-doc w Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA.

Podczas stażu doktorskiego brałam udział w realizacji projektu finansowanego przez National Institutes of Health, dotyczącego opracowania metody niskobudżetowego sekwencjonowania genomu człowieka z wykorzystaniem tRNA, którego kierownikiem był prof. dr hab. Wlodek Mandecki. Załącznik 9 do wniosku.

Zakres obowiązków: Ekspresja białek w bakteriiach *E.coli*, oczyszczanie białek, analiza aktywności mutantów EF-Tu, aminoacylacja, translacja *in vitro*, analiza tworzenia kompleksu potrójnego, znakowanie białek EF-Tu wygaszaczem, znakowanie tRNA

Finansowanie: National Institutes of Health (HG004364 The area of research – development of low cost genome sequencing methods using a tRNA approach

Publikacja: Perła-Kaján J, Lin X, Cooperman BS, Goldman E, Jakubowski H, Knudsen CR, Mandecki W. Properties of Escherichia coli EF-Tu mutants designed for fluorescence resonance energy transfer from tRNA molecules. Protein Eng Des Sel. 2010 Mar;23(3):129-36.

08.05.2003-24.10.2003 – Staż w Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School (obecnie New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Rutgers University), Newark, USA.

Badania prowadzone pod kierunkiem prof. dr. hab. Hieronima Jakubowskiego. Załącznik 10 do wniosku.

Zakres obowiązków: Pomiar poziomu i specyficzności przeciwciał anti-N-Hcy-białko metodą ELISA, analiza interakcji przeciwciał z antygenem metodą rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR, ang. *plasmon surface resonance*)

Publikacje: Perła J, Undas A, Twardowski T, Jakubowski H. Purification of antibodies against N-homocysteinylated proteins by affinity chromatography on N ω -homocysteinyl-aminohexyl-Agarose J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004; 807, 257-261.

Undas A, Perła J, Łaciński M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis Stroke 2004; 35, 1299-1304.

6 Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Osiągnięcia dydaktyczne

Kierowanie ukończonymi pracami dyplomowymi:

a) magisterskimi w języku polskim:

1. Tytuł pracy: Analiza zawartości homocysteiny u myszy z niedoborem hydrolazy bleomycyny będących na diecie wysokometioninowej Kierunek: Biotechnologia – 2022
2. Tytuł pracy: Porównanie zawartości homocysteiny w organach myszy na dietach z dodatkiem metioniny, homocysteiny i tiolaktanu homocysteiny Kierunek: Biotechnologia – 2022
3. Tytuł pracy: Polimorfizmy w genie MTHFR u osób z udarem i zdrowych; Kierunek: Biotechnologia – 2021
4. Tytuł pracy: Analiza zmian w proteomie wątroby myszy wywołanych dietą wysokometioninową; Kierunek: Biotechnologia – 2017

5. Tytuł pracy: Analiza zmian w proteomie kości myszy z niedoborem β -syntazy cystationinowej (opieka naukowa nad magistrantką, formalnym promotorem był prof. dr hab. Andrzej Guranowski); Kierunek: Biotechnologia – 2016
6. Tytuł pracy: Wpływ niedoboru β -syntazy cystationiny na homocysteinylację białek myszy oraz strukturę białek tkanki łącznej; Kierunek: Biotechnologia – 2015

b) magisterskimi w języku angielskim:

1. Tytuł pracy: Homocysteine level analysis in a mouse model of bleomycin hydrolase deficiency on a high-methionine diet Kierunek: Biotechnology – 2022
2. Tytuł pracy: Comparison of N-Hcy-protein levels in organs of mice feed with methionine, homocysteine and homocysteine thiolactone enriched diets Kierunek: Biotechnology – 2022

c) inżynierskimi:

1. Tytuł pracy: Analiza zawartości desmozyny w elastynie z tkanek myszy z hiperhomocysteinemią; Kierunek: Biotechnologia – 2020
2. Tytuł pracy: Analiza zawartości homocysteiny w białkach myszy z hiperhomocysteinemią; Kierunek: Biotechnologia – 2020
3. Tytuł pracy: Analiza wpływu homocysteiny na ekspresję mRNA i fosforylację wybranych białek rybosomalnych oraz kinaz Snf1 i Ypk3 u *Saccharomyces cerevisiae*; Kierunek: Biotechnologia – 2019
4. Tytuł pracy: Wpływ diety wysokometioninowej na poziom homocysteiny w organach myszy; Kierunek: Biotechnologia – 2015

Opieka naukowa nad studentami w ramach praktyk i staży:

1. Opieka nad studentem anglojęzycznym w ramach programu Erasmus plus – 01.10.2019 – 30.11.2019.
2. Opieka nad studentem anglojęzycznym w ramach programu Erasmus plus – 01.10.2019 – 17.10.2019.
3. Opieka nad czterotygodniową praktyką zawodową – 11.07.2022 – 05.08.2022.
4. Opieka nad czterotygodniową praktyką zawodową – 11.07.2022 – 05.08.2022.
5. Opieka nad czterotygodniową praktyką zawodową – 09.07.2018 – 06.08.2018.

Promotorstwo pomocnicze pracy doktorskiej mgr Adrianny Żukowskiej w trakcie realizacji.

Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotów: biochemia, chemia ogólna, podstawy chemii i chemia organiczna dla studentów na kierunkach biotechnologia, ogrodnictwo, rolnictwo, inżynieria rolnicza, informatyka stosowana, ochrona środowiska.

Udział w osiągnięciach studentów i doktorantów:

- Współautorstwo nagrodzonego pierwszą nagrodą wystąpienia ustnego magistrantki dr inż. Ewy Bretes Niny Bartnik pt. *Badanie asocjacji polimorfizmów genu receptora estrogenowego typu alfa (rs2234693) oraz genu apolipoproteiny E (rs429358 i rs7412) z udarem mózgu w populacji polskiej*, na IV Ogólnopolskiej Konferencji "Biotechnologia niejedno ma imię".

- Wyniki uzyskane podczas realizacji pracy magisterskiej Wojciecha Kusztala pt. *Analiza zmian w proteomie wątroby myszy wywołanych dietą wysokometioninową* zostały zaprezentowane na sesji referatowej oraz nagrodzone pierwszą nagrodą podczas I Ogólnopolskiego Sympozjum Nauk Przyrodniczo-Rolniczych w Poznaniu (załącznik 12 do wniosku).
- Nagroda Profesora Wacława Szybalskiego za najlepszy poster dla Utyro O, Peřła-Kaján J, Kubalska J, Kozich V, Jakubowski H. *Telomere length is not related to homocysteine and life span in cystathionine-β synthase-deficient mice and humans*. 3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018, Gdańsk, Sep 18-21, 2018 (załącznik 12 do wniosku).

6.2 Osiągnięcia organizacyjne

6.2.1 Organizacja konferencji

- Udział w Komitecie organizacyjnym hybrydowej konferencji międzynarodowej 13th International Conference on One-Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine; Poznań 12-16.09.2021.
- Udział w Komitecie organizacyjnym i naukowym hybrydowej konferencji Homocysteine Mini-Conference Poznań 2020; 25.09.2020.
- Udział w Komitecie organizacyjnym i naukowym konferencji międzynarodowej Homocysteine Mini-Conference Poznań 2019; 26.09.2019.

6.2.2 Kierowanie grantami

Numer grantu	Tytuł	Kwota brutto	Okres realizacji
MNiSzW DNK/SP/464778/2020*	13th International conference on One Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine	290 000 zł	01.07.20-30.09.21
Narodowe Centrum Nauki 2014/15/B/NZ2/01079	Proteomika ilościowa w drożdżowym modelu hiperhomocysteinemii	781 690 zł	17.05.15-16.04.20
MNiSzW N N401 230634	Rola N-homocysteinylation tropoelastyny w procesie utraty elastyczności naczyń krwionośnych w miażdżycy tętnic	160 000 zł	2007-2011

*Grant w ramach programu: Doskonała nauka – Wsparcie konferencji naukowych. W projekcie nie ma funkcji kierownika grantu. Habilitantka pełniła funkcję redaktora wniosku oraz osoby do bezpośredniego kontaktu.

6.2.3 Udział w komisjach

1. Sekretarz Komisji Rektorskiej ds. etyki badań naukowych prowadzonych z udziałem ludzi.
2. Udział w komisjach przetargowych jako przewodnicząca na dostawę:
 - mikroskopu z wyposażeniem,
 - analizatora wielkości cząstek nanometrycznych i potencjału zeta,
 - aparatu do prowadzenia i obrazowania wyników dPCR (digital PCR).
3. Udział w komisji przetargowej jako członek na zakup:

- zamrażarki niskotemperaturowej,
 - wirówki szybkoobrotowej,
 - UHPLC,
 - wirówki próżniowej,
 - systemu klatek indywidualnie wentylowanych oraz stacji wymiany klatek.
4. Udział w komisjach rekrutacyjnych na stanowisko doktoranta (pięć konkursów) i post-doca (cztery konkursy) do realizacji projektów badawczych w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UPP.
 5. Udział w komisji rekrutacyjnej Szkoły Doktorskiej.
 6. Udział w komisji rekrutacyjnej na adiunkta w Katedrze Biochemii i Biotechnologii UPP (dwa konkursy).

6.3 Osiągnięcia popularyzujące naukę

- Zorganizowanie i udział w prowadzeniu warsztatów z elementami prezentacji podczas Wagarów z Przyrodą (zajęcia dla uczniów szkół ponadpodstawowych, potencjalnych kandydatów na studia) w latach 2018 i 2019 pt. Szukamy igły w stogu siana, czyli poznajemy metodę Western blot.
- Zaproszenie i opieka nad gościem zagranicznym finansowanym w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”, dr M. Pajares, organizacja wykładów dr Pajares dla pracowników i studentów UP, w dniach 02-05.12.2019.

7 Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody (załącznik 12 do wniosku)

- Nagroda zespołowa III stopnia za działalność organizacyjną na rzecz katedr, wydziału i uczelni – 2022
- Nagroda Zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami – 2021
- List gratulacyjny JM rektora UP w Poznaniu za wyróżniające wyniki pracy naukowej w ostatnich czterech latach – 2021
- Nagroda zespołowa za osiągnięcia w pracy zawodowej – 2017
- Nagroda Zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami – 2013
- Nagroda Zespołowa za osiągnięcia w pracy zawodowej – 2013
- Nagroda Zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami – 2010
- Nagroda Zespołowa za osiągnięcia w pracy zawodowej – 2010

Ważniejsze szkolenia (załącznik 13 do wniosku)

- Udział w programie wsparcia dla kadry dydaktycznej realizowanego w ramach projektu „Najlepsi z natury! Zintegrowany program rozwoju Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu” obejmujący szkolenia:
 - ❖ Prognozowanie – 2022
 - ❖ Wystąpienia publiczne, retoryka, erystyka, prowadzenie dyskusji i debat, nowoczesna dydaktyka – 2021
 - ❖ Tworzenie i komponowanie infografik i slajdów – 2021
 - ❖ Nowoczesne graficzne formy notowania, prezentowania i przekazywania informacji oraz tworzenia przekazu pisemnego – 2021
 - ❖ Grywalizacja – innowacja w edukacji – 2021
 - ❖ Wykorzystanie mediów społecznościowych w procesie dydaktycznym – 2021
 - ❖ Obsługa programów do prezentacji multimedialnych – 2020
 - ❖ Kurs innowacyjnych kompetencji dydaktycznych – 2020
- OpenSAP course: Introduction to Statistics for Data Science – 2019
- Regresja logistyczna w badaniach medycznych i przyrodniczych – 2019
- Statystyka w medycynie – metody zaawansowane – 2018
- Statystyka w medycynie – metody analizy wariancji i analizy regresji – 2018
- Statistica – kurs podstawowy – 2017
- Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie; szkolenie dla osób wykonujących procedury; Szkolenie dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach (PoLLASA) – 2015
- Szkolenie dla osób przeprowadzających doświadczenia na zwierzętach (myszach, szczurach) – kurs doskonalący – 2013

Recenzje

40 recenzji dla 22 czasopism naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports W nawiasie podano liczbę recenzji dla danego czasopisma:

1. Amino Acids (10)
2. Redox Reports (5)
3. Metabolites (2)
4. Cancers (2)
5. Antioxidants (2)
6. Pharmaceuticals (2)
7. Scientific Reports (2)
8. Molecular Biology Reports (1)
9. Oxidative Medicine and Cellular Longevity (1)
10. Human Mutation (1)
11. International Journal of Environmental Research and Public Health (1)

12. Biomolecules (1)
13. International Journal of Medical Sciences (1)
14. Molecular Biology Reports (1)
15. British Journal of Nutrition (1)
16. Pharmaceuticaal Sciences (1)
17. Journal of Alzheimer Disease (1)
18. Journal of Yeast and Fungal Research (1)
19. International Journal of Sports Medicine (1)
20. International Journal of Neuroscience (1)
21. Bioengineered (1)
22. Journal of Clinical Medicine (1)

Recenzje wydawnicze w czasopismach polskich:

Postępy Biochemii (1)

Inne aktywności (załącznik 14 do wniosku)

Wolontariat wspierający Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Poznaniu podczas diagnostyki wirusa SARS-CoV-2 – 2020

.....

(podpis wnioskodawcy)