

Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Hiperhomocysteinemia, Dynamika Telomerów, Markery  
Senescencji, BLMH, GLOD4 i Choroba Alzheimer:  
Badania na Ludziach i Modelach Mysich

Olga Utyro

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Hieronim Jakubowski

Praca doktorska  
wykonana pod kierunkiem  
prof. Hieronima Jakubowskiego  
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Poznaniu  
oraz w  
Department of Microbiology,  
Biochemistry and Molecular  
Genetics, New Jersey Medical School,  
Rutgers University, Newark, NJ, USA

Poznań 2019



Wyniki badań przedstawione w pracy zostały częściowo uzyskane podczas wykonywania zadań badawczych projektu PRELUDIUM 9, realizowanego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki

**Spis treści**

1 Wstęp .....	6
1.1 Homocysteina – budowa i metabolizm .....	6
1.2. Hiperhomocysteinemia.....	7
1.2.1 Niedobór $\beta$ -syntazy cystationiny (CBS) u ludzi .....	8
1.2.2 Niedobór $\beta$ -syntazy cystationiny (Cbs) u myszy .....	9
1.3 Telomery.....	10
1.4 Senescencja komórkowa.....	10
1.4.1 Przyczyny senescencji .....	11
1.4.2 Znaczenie białka Klotho .....	12
1.5 Udział mtDNA w starzeniu komórkowym.....	12
1.6 Choroba Alzheimerera .....	13
1.6.1 Klasyfikacja choroby Alzheimerera.....	13
1.6.2 Model myszy choroby Alzheimerera .....	14
1.7 Hydrolaza bleomycyny i jej niedobór u myszy .....	14
1.8 Białko zawierające domenę glioksalazową 4 (GLOD4) .....	15
2 Cel pracy .....	17
3 Materiały .....	18
3.1 Odczynniki i enzymy .....	18
3.2 Oligonukleotydy .....	18
3.3 Materiał myszy.....	21
3.3.1 Hodowla myszy.....	21
3.3.2 Pozyskanie materiału .....	21
3.3.3 Genotypowanie myszy.....	21
3.4 Materiał ludzki .....	22
3.4.1 DNA pacjentów o genotypie Cbs <sup>-/-</sup> .....	22
3.4.2 Próbkę mózgow osób z chorobą Alzheimerera .....	23
4 Metody .....	24
4.1 Techniki wykorzystane do pracy z RNA .....	24
4.1.1 Izolacja RNA .....	24
4.1.2 Elektroforeza RNA w żelu agarozowym.....	24
4.1.3 Traktowanie DNazą.....	25

4.1.4 Odwrotna transkrypcja (RT).....	25
4.2 Techniki wykorzystywane do pracy z DNA.....	26
4.2.1 Izolacja DNA .....	26
4.2.2 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym .....	26
4.2.3 Łańcuchowa reakcja polimerazy DNA (PCR) .....	27
4.2.4 Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR) .....	27
4.3 Techniki wykorzystane do pracy z białkami.....	30
4.3.1 Izolacja białek do elektroforezy SDS-PAGE.....	30
4.3.2 Izolacja białek do elektroforezy dwukierunkowej.....	30
4.3.3 Oznaczanie ilości białka w roztworze .....	31
4.3.4 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym - metoda SDS-PAGE .....	33
4.3.5 Western blotting.....	34
4.3.6 Elektroforeza dwukierunkowa.....	35
4.4 Oznaczanie stężenia homocysteiny w osoczu myszy .....	38
4.5 Pomiar długości telomerów .....	39
4.5.1 Telomery mysie.....	39
4.5.2 Telomery ludzkie.....	40
4.6 Pomiar ilości mitochondrialnego DNA u myszy.....	40
4.7 Pomiar mRNA markerów senescencji.....	40
4.8 Pomiar mRNA <i>Glod4</i> u myszy .....	41
4.9 Pomiar mRNA <i>GLOD4</i> u ludzi .....	41
4.10 Pomiar ilości białka GLOD4 .....	42
4.11. Zastosowane metody statystyczne.....	42
5 Wyniki.....	43
5.1 Analiza długości telomerów ludzi z deficytem CBS .....	43
5.1.1 Efekt hiperhomocysteinemii, wieku i płci na długość telomerów .....	43
5.1.2 Determinanty długości telomerów u ludzi - regresja wieloraka .....	46
5.2 Analiza markerów starzenia się u myszy <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> .....	48
5.2.1. Wpływ genu <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> na długość telomerów .....	48
5.2.2 Wpływ poziomu homocysteiny na długość telomerów we krwi .....	53
5.2.3 Determinanty długości telomerów u myszy – analiza wieloraka.....	53
5.2.4 Poziom mRNA telomerazy ( <i>Tert</i> ) w mózgu i wątrobie myszy <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> .....	57
5.2.5 Poziom mitochondrialnego DNA u myszy <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> .....	60
5.2.6 Senescencja zachodzi intensywniej w wątrobie myszy <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> .....	66

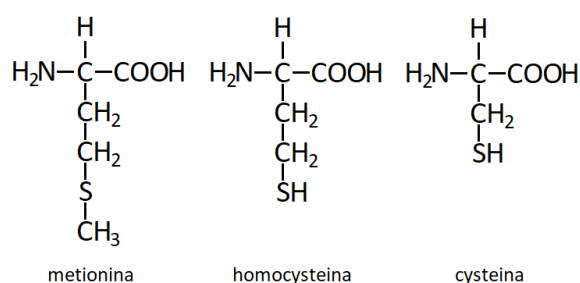
---

5.3 Poziom Glod4 w mózgu, modele mysie.....	73
5.3.1 Ekspresja mRNA <i>Glod4</i> .....	73
5.3.2 Ilość białka Glod4 u myszy .....	77
5.4 Wpływ genu <i>Blmh</i> na strukturę białka Glod4 u myszy.....	80
5.5 Poziom GLOD4 w mózgu u ludzi z chorobą Alzheimera.....	82
5.5.1 Poziom mRNA <i>GLOD4</i> .....	82
5.5.2 Poziom białka GLOD4.....	83
6 Dyskusja .....	85
6.1 <i>Locus CBS</i> jest determinantem długości telomerów u ludzi .....	85
6.2 Deficyt <i>Cbs</i> przyspiesza senescencje, redukuje poziom mtDNA, ale nie zmienia długości telomerów u myszy .....	87
6.2.1. Genotyp <i>Cbs</i> i długość telomerów.....	87
6.2.2 Genotyp <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> obniża ilość mtDNA u myszy .....	87
6.2.3. Genotyp <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> wpływa na poziom markerów senescencji .....	88
6.3. Interakcje pomiędzy BLMH i GLOD4 w mózгах myszy 5xFAD i pacjentów z chorobą Alzheimera .....	92
6.4 Wnioski.....	94
7 Literatura.....	95
8 Skróty .....	107
9 Załączniki .....	109

## 1 Wstęp

### 1.1 Homocysteina – budowa i metabolizm

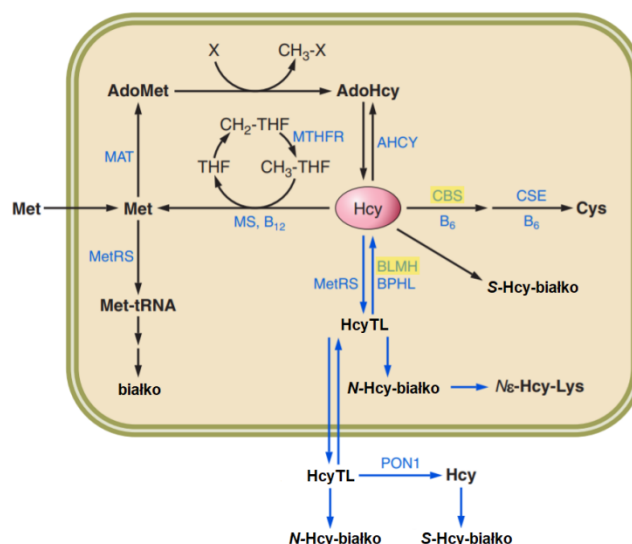
Homocysteina (Hcy) to aminokwas siarkowy, budową przypominający cysteinę (Cys) i metioninę (Met) (Rysunek 1.1).



Rysunek 1.1 Wzory strukturalne metioniny, homocysteiny i cysteiny.

Jedynym znanym źródłem Hcy w organizmie człowieka jest przyjmowana wraz z pokarmem – metionina białkowa. W rezultacie reakcji metioniny z ATP, katalizowanej przez adenozylotransferazę metioniny (MAT, EC 2.5.1.6), powstaje S-adenozyl-L-metionina (AdoMet). Ta, na drodze demetylacji, jest przekształcana do S-adenozylhomocysteiny (AdoHcy) z której, w wyniku działania hydrolazy S-adenozylhomocysteiny (AHCY, EC 3.3.1.1), powstaje Hcy (Rysunek 1.2) (Kumar *et al.* 2017).

W normalnych warunkach, niemalże cała komórkowa Hcy ulega enzymatycznej remetylacji do metioniny w wyniku działania syntazy metioninowej (MS, EC 2.1.1.13). Może być także przekształcana do cysteiny na drodze dwuetapowej reakcji transsulfurylacji, przy udziale  $\beta$ -syntazy cystationiny (CBS, EC 4.2.1.22) oraz  $\gamma$ -liazy cystationiny (CSE, EC 4.4.1.1). Gdy te drogi przemian metabolicznych homocysteiny zostają ograniczone, Hcy jest przekształcana do tiolaktonu Hcy (HcyTL) (Jakubowski 2018), który jest metabolizowany do homocysteiny przez jeden z trzech enzymów: cytoplazmatyczną hydrolazę bleomycyny (BLMH, EC:3.4.22.40) (Zimny *et al.* 2006), mitochondrialną hydrolazę bifenyłu (BPHL, (EC:3.1.-.-) (Marsillach *et al.* 2014), lub zewnątrzkomórkowo – przez paraoksonazę 1 (PON1, EC:3.1.1.2) (Jakubowski 2000) (Rysunek 1.2).



Rysunek 1.2 Schemat metabolizmu homocysteiny (Hcy) w organizmie człowieka, na podstawie (Jakubowski 2018).

Uwolniona do osocza homocysteina, występuje w kilku formach: zredukowanej, utlenionych dwusiarczków: Hcy-Hcy, Cys-Hcy, lub jest związana z białkami. (Mudd *et al.* 2000). Ta ostatnia forma stanowi około 75% ogółu Hcy w osoczu (tHcy, ang. *total homocysteine*). Znane są trzy sposoby włączania Hcy do białka: pierwszy – przez wiązanie disiarczkowe łańcucha bocznego cysteiny (Jakubowski 2019): S-homocysteinyłacja, drugi - przez wiązanie peptydowe utworzone przez połączenie grupy tioestrowej tiolaktonu Hcy, z resztą  $\epsilon$ -aminową łańcucha bocznego lizyny: N-homocysteinyłacja (Jakubowski 1997, 1999, 2002), trzeci – przez demetylację reszt metioniny białkowej do Hcy, katalizowaną przez zredukowane kationy miedzi lub żelaza (Borowczyk *et al.* 2018). N-homocysteinyłacja białek może skutkować utratą ich funkcji (Jakubowski 1999) oraz tworzeniem struktur podobnych do amyloidu (Perła-Kaján *et al.* 2007; Paoli *et al.* 2010). Białka N-homocysteinyłowane mogą także indukować odpowiedź autoimmunologiczną (Undas *et al.* 2005).

## 1.2. Hiperhomocysteinemia

Hiperhomocysteinemia (HHcy) to stan w którym poziom Hcy w osoczu człowieka przekracza 15  $\mu\text{M}$ . Klinicznie wyróżnia się trzy kategorie HHcy: umiarkowaną (15-30  $\mu\text{M}$ ), pośrednią (30-100  $\mu\text{M}$ ) i ciężką (>100  $\mu\text{M}$ ) (Maron and Loscalzo 2009). Podwyższony poziom Hcy dotyczy 5-8% populacji (Clarke *et al.* 1991). Nieprawidłowa dieta – uboga w witaminy B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> i B<sub>12</sub> oraz kwas foliowy, stosowanie niektórych leków oraz choroby nerek i cukrzyca (Nygård *et*

*al.* 1998; van Guldener 2006) prowadzą do umiarkowanej i pośredniej HHcy. Przyczyną ciężkiej HHcy jest determinowany genetycznie niedobór enzymów metabolizmu Hcy, np.:  $\beta$ -syntazy cystationiny.

HHcy jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (Clarke *et al.* 1991; Homocysteine Studies Collaboration 2002), naczyniowych mózgu (Agnati *et al.* 2005) i neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera (Seshadri *et al.* 2002; Hooshmand *et al.* 2013). Postępujący rozwój HHcy jest cechą charakterystyczną starzenia się (Henry *et al.* 2012). Średni poziom Hcy w surowicy osób powyżej 65-roku życia, wynosi blisko 16,5  $\mu\text{mol/l}$  (Rodríguez *et al.* 2006). Wyższy poziom Hcy odnotowuje się u mężczyzn niż u kobiet (Dankner *et al.* 2004), choć różnice zacierają się po okresie menopauzy (Fonseca *et al.* 1999). HHcy jest pozytywnie skorelowana ze śmiertelnością; wraz ze wzrostem poziomu Hcy o 5  $\mu\text{mol/l}$  ryzyko śmierci wzrasta o 33,6% (Fan *et al.*, 2017).

### **1.2.1 Niedobór $\beta$ -syntazy cystationiny (CBS) u ludzi**

Enzym CBS bierze udział w pierwszym etapie przekształcenia Hcy w cysteinę, a jego aktywność katalityczna jest zależna od poziomu witaminy B<sub>6</sub>, której aktywna forma pełni funkcję kofaktora (Rysunek 1.2). Białko to ulega ekspresji w mózgu, wątrobie, i trzustce (Renga 2011). Znane są 164 zmiany w kanonicznej sekwencji ludzkiego genu *Cbs*: mutacje punktowe, insercje i delecje (Kožich *et al.* 2018). Najczęściej spotykanymi są: mutacja p.I278T oraz p.G307S, które prowadzą do znacznego obniżenia aktywności enzymu i tym samym, podwyższenia poziomu Hcy we krwi (Kraus *et al.* 1999). Rośnie wówczas także poziom tiolaktonu Hcy – około dwudziestokrotnie, oraz udział białek N-homocysteinylowanych w osoczu (Jakubowski *et al.*, 2008). W sekwencji genu *Cbs*, ze znaczną częstotliwością, pojawia się także insercja o długości 68 pz (844ins68), jednakże nie powoduje ona obniżenia aktywności enzymatycznej (Tsai *et al.* 1996).

#### **1.2.2.1 Obraz kliniczny**

Niedobór białka CBS, spowodowany mutacją homozygotyczną występuje nieczęsto; szacuje się że występuje ona raz na 122 000 urodzeń (Moorthie *et al.* 2014). Konsekwencją takiego niedoboru najczęściej jest zatorowość oraz miażdżyca naczyń krwionośnych, a także opóźnienie umysłowe (Mudd *et al.*



1985; Summers *et al.* 2006). Główną przyczyną śmiertelności jest zakrzepica, około 50% nieleczonych pacjentów ma zdarzenie zakrzepowe przed 30-tym rokiem życia (McCully 1969) i około 20-25% umiera w wieku 30-50 lat (Mudd *et al.* 1985).

#### **1.2.2.2. Leczenie**

Leczenie chorych z obniżoną aktywnością białka CBS, polega głównie na redukcji poziomu Hcy. U około połowy pacjentów skuteczne jest podawanie witaminy B<sub>6</sub> – prekursora fosforanu pirydoksalu, będącego kofaktorem enzymu CBS (Barber and Spaeth 1969; Mudd *et al.* 1985). Takich pacjentów nazywa się wówczas „B<sub>6</sub>-responders” – w znaczeniu: reagujący na leczenie witaminą B<sub>6</sub> (Fowler *et al.* 1978), mowa tu głównie o osobach z mutacją p.I278T (Shih *et al.* 1995). Dla osób które nie odpowiadają na leczenie witaminą B<sub>6</sub>, zaleca się ograniczenie spożywania metioniny oraz suplementację witaminami z grupy B (Komrower *et al.* 1966). Niezależnie od sposobu podjętego leczenia, pacjenci poddani kuracji mają znacznie mniej problemów klinicznych niż pacjenci nieleczeni (Yap *et al.* 2000).

#### **1.2.2 Niedobór β-syntazy cystationiny (Cbs) u myszy**

Jednym z pierwszych mysich modeli HHcy wywołanej genetycznie był ten, w którym myszy pozbawiono genu *Cbs*. W konsekwencji większość homozygotycznych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> umierała w trzecim lub czwartym tygodniu życia (Watanabe *et al.* 1995). Aby obniżyć wysoką śmiertelność myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> stworzono model transgeniczny, w którym wprowadzono gen pod kontrolą promotora metalotioneinowego, kodujący ludzkie białko CBS zawierające mutację p.I278T, (Tg-I278T) (Wang *et al.* 2005; Gupta *et al.* 2009). Myszy te, na tle genetycznym C57BL6 skrzyżowano z opisanymi powyżej myszami *Cbs*<sup>-/-</sup>, uzyskując szczep Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup>. Tym sposobem zniesiono letalność, poprzez suplementację cynkiem w czasie ciąży i laktacji, podczas gdy stężenie Hcy w osoczu pozostawało ekstremalnie wysokie - około 250 μmol/l. U myszy Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup> występuje charakterystyczne łysienie w okolicach nosa i oczu, ich sierść jest rzadsza i bez połysku, myszy są mniejsze, o zgarbionej sylwetce (Gupta *et al.* 2009). Obserwuje się stłuszczenia wątroby oraz krótszą o około 20% długość życia, w porównaniu do myszy kontrolnych: odpowiednio 613 dni i 821 dni, (p<0,0003) (Gupta *et al.* 2009). W mózgu myszy Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup> podwyższony jest poziom białka i mRNA 5-lipooxygenazy, obserwowane

również u chorych na chorobę Alzheimera (Li *et al.* 2017). Co więcej, w obrębie zakrętu zębatego (fragment hipokampu) u tych myszy odnotowuje się podwyższony poziom białka fosfo- $\tau$  i  $\beta$ -amyloidu (Khayati *et al.* 2017). Te same badania wskazują też na wzmożoną ponad dwukrotnie, degenerację neuronów w mózgach myszy Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup>.

### 1.3 Telomery

Telomery, chroniąc końce chromosomów, są kluczowe w utrzymaniu stabilności genomu (Blasco 2007). U człowieka i innych kręgowców, telomerowe DNA składa się z tandemowo powtórzonych sekwencji sześciu nukleotydów: TTAGGG (Meyne *et al.* 1989). Ilość powtórzeń i tym samym długość, jest zależna od gatunku: u człowieka wynosi ona 2,5-13 kpz, podczas gdy u myszy domowej, *Mus musculus*, jest to ponad 20 kpz (Hemann 2000; Njajou *et al.* 2007; Aviv *et al.* 2011). Telomery skracają się z każdym cyklem komórkowym, w rezultacie niezdolności do całkowitej replikacji końców chromosomu przez aparat replikacyjny (Hayflick 1965), ale także z powodu uszkodzeń oksydacyjnych (von Zglinicki 2002). Kiedy telomery stają się krytycznie krótkie i niezdolne do podziałów komórkowych, komórki wchodzą w stan senescencji replikacyjnej (van Deursen 2014). Aktywność telomerazy (TERT, ang. *telomerase reverse transcriptase*) – jedyne go znanego enzymu zdolnego do wydłużania telomerów – jest bardzo niska w komórkach somatycznych i niewystarczająca do odbudowy telomerów u człowieka (Marion *et al.* 2009). Aczkolwiek, ostatnie badania wskazują, że jest to możliwe, i że aktywność telomerazy wzrasta w komórkach w stanie tuż przed senescencją replikacyjną (Sun *et al.* 2019). Długość telomerów jest negatywnie skorelowana z wiekiem ludzi (Sanders and Newman 2013) i może służyć jako czynnik prognostyczny starzenia komórkowego, a w niektórych przypadkach, przedwczesnej śmierci (Ehrlebenbach *et al.* 2009; Mather *et al.* 2011). Z tego względu, długość telomerów rozważano jako biomarker starzenia i główny wyznacznik długości życia (Sanders *et al.* 2012).

### 1.4 Senescencja komórkowa

Termin senescencja komórkowa został wprowadzony, aby opisać stan wstrzymania wzrostu obserwowanego w starzejących się komórkach (Hayflick 1965). Od tego czasu, termin ten ewoluował i opisuje on także zmiany

w metabolizmie komórkowym, wydzielanie cytokin, regulację epigenetyczną i ekspresję białek. Wstrzymanie cyklu komórkowego zapobiega powieleniu uszkodzeń w kolejnej generacji komórek oraz szkodliwej transformacji do komórek nowotworowych (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Wiadomo że komórki w stanie senescencji są akumulowane w ciągu całego życia (Dimri *et al.* 1995).

#### 1.4.1 Przyczyny senescencji

Zazwyczaj wymienia się trzy główne przyczyny senescencji: senescencję replikacyjną (RS), indukowaną stresem przedwczesną senescencję (SIPS, ang. *stress-induced premature senescence*) i senescencję indukowaną przez onkogeny (OIS, ang. *oncogene-induced senescence*) (Kuilman *et al.* 2010). RS – ma miejsce w odpowiedzi na skracające się telomery, powoduje odpowiedź związaną z uszkodzeniem DNA (DDR, ang. *DNA damage response*). SIPS – zachodzi niezależnie od długości telomerów, i jest indukowana przez trwającą długo ekspozycję na cytotoksyczne dawki stresorów: m.in. stres oksydacyjny (Chen *et al.* 1995). Przyczyną OIS są onkogeny takie jak K-ras, Braf, PTEN and NF1 (Larsson 2011).

Komórki w stanie senescencji są aktywne metabolicznie, zmianie ulega ekspresja białek oraz ich sekrecja. Końcową fazę charakteryzuje fenotyp sekrecyjny związany z senescencją (SASP, ang. *senescence-associated secretory phenotype*) (Kuilman and Peepers 2009). Wydzielane czynniki należą do trzech głównych kategorii: czynniki sygnałowe (interleukiny, chemokiny i czynniki wzrostu), proteazy i nierozpuszczalne białka/macierz zewnątrzkomórkowa.

Cytokina zaangażowaną w wiele różnych funkcji biologicznych jest interleukina 6 (IL-6) - cytokina prozapalna. Jest związana z uszkodzeniami DNA i stresem wywołanym przez onkogeny (Lu *et al.* 2006; Kuilman *et al.* 2008). Większość komórek w stanie senescencji nadmiernie produkuje chemokiny takie jak interleukina 8 (IL-8) a także białko chemotaktyczne monocytów typu 1 (MCP-1, ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) (Shen *et al.* 2013; Yousefzadeh *et al.* 2018). Istotnie rośnie poziom inhibitora proteazy serynowej aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor-1*) (Goldstein *et al.* 1994; Vaughan *et al.* 2017). Białko PAI-1 długi czas było uważane za marker który raczej koreluje z senescencją niż na nią

wpływa (Mu and Higgins 1995); wykazano jednak, że jest niezbędne i wystarczające do indukcji senescencji replikacyjnej (Kortlever *et al.* 2006).

Inhibitor kinaz zależnych od cyklin (p21, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) może pośredniczyć w senescencji komórkowej przez ścieżkę zależną od białka p53 (Qian and Chen 2010). Podczas inicjacji hamowania cyklu komórkowego, rośnie poziom p53, który następnie aktywuje transkrypcję p21, w ten sposób zatrzymany zostaje cykl komórkowy (Shtutman *et al.* 2017). Podobnie jak w komórkach w stanie senescencji, w starzejących się komórkach centralnego układu nerwowego oraz neuronach u osób z chorobą Alzheimera, obserwowano wzrost poziomu p21 (McShea *et al.* 1997; Lüth *et al.* 2000).

#### **1.4.2 Znaczenie białka Klotho**

Gen *Klotho* (*Kl*) po raz pierwszy opisano u myszy. Mutacja w rejonie promotorowym *Kl* powoduje zaburzenia związane z wiekiem: miażdżycę, osteoporozę, zmiany skórne, niepłodność. Myszy z taką mutacją żyją zaledwie dwa miesiące, podczas gdy myszy typu dzikiego około dwóch lat (Kuro-o *et al.* 1997). Gen *Kl* koduje białko transmembranowe, będące receptorem czynnika wzrostu fibroblastów 23 (FGF23, ang. *fibroblast growth factor 23*) (Kuro-o 2019). Białko Klotho jest obecne we wszystkich tkankach organizmu, jest go najwięcej w mózgu i nerkach (Kuro-o *et al.* 1997). Obniżenie ekspresji  $\alpha$ Klotho powoduje spadek ekspresji białek związanych z senescencją, w tym białka p21 (Xu and Sun 2015).

#### **1.5 Udział mtDNA w starzeniu komórkowym**

Materiał genetyczny mitochondriów stanowi kolistą cząsteczkę DNA (mtDNA) o długości 16,5 kbp. Jedna lub dwie takie cząsteczki (Kukat *et al.* 2011), wraz z grupą białek tworzą mitochondrialny nukleoid (Gilkerson *et al.* 2013). Liczba mitochondriów w komórce jest zmienna i zależy albo od funkcji komórki (Lee and Wei 2012) oraz od fazy cyklu w którym aktualnie znajduje się komórka. Komórki mózgu zawierają średnio 2000 mitochondriów (Uranova *et al.* 2001), podczas gdy białe krwinki mniej niż 100 (Selak *et al.* 2011).

Mitochondria są organellami energetycznymi, w których produkowany jest ATP, a wraz z nim reaktywne formy tlenu. Ze względu na niewielkie możliwości

regeneracyjne mitochondriów i brak ochrony w postaci jądra komórkowego, mtDNA ulega licznym mutacjom, a w konsekwencji obniżeniu jego ilości w komórce (Malik and Czajka 2013). Badania wskazują że poziom mtDNA jest skorelowany zarówno z wiekiem jak i długością telomerów u ludzi. Podobnie u myszy, poziom mtDNA w wątrobie, maleje wraz z wiekiem (Quiros *et al.* 2017). Zaburzenia pracy mitochondriów są przyczyną starzenia się organizmu (Trifunovic *et al.* 2004) oraz procesów patologicznych, takich jak nowotworzenie (Qu *et al.* 2011) i stan zapalny (Escames *et al.* 2012).

## 1.6 Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's disease*) jest jednym z najczęstszych schorzeń neurodegeneracyjnych i wiodącą przyczyną demencji u osób starszych (Ballard *et al.* 2011). AD jest związana z zaburzeniami poznawczymi i utratą pamięci. Pod względem molekularnym jest związana z powstawaniem płytek starczych i splotków neurofibrylarnych złożonych odpowiednio z  $\beta$ -amyloidu i hiperfosforylowanego białka  $\tau$  (Hardy 2006).  $\beta$ -Amyloid powstaje poprzez sekwencję cięć białka prekursorowego amyloidu (APP, ang. *amyloid precursor protein*) przez  $\beta$ -sekretazę i  $\gamma$ -sekretazę. Produkowane są głównie dwie formy  $\beta$ -amyloidu, o długości 40 i 42 aminokwasów ( $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ ). Szczególnie istotna jest proporcja pomiędzy nimi, ponieważ to głównie  $A\beta_{42}$  oligomeryzuje i tworzy fibryle (Irvine *et al.* 2008). Prawdopodobne rozpoznanie AD można potwierdzić pośmiertnie, na podstawie dwóch cech histopatologicznych: blaszek amyloidowych i splotków neurofibrylarnych (Braak and Braak 1997). Skala Braaka charakteryzuje ich ilość i rozmieszczenie, faza VI charakteryzuje najbardziej zaawansowane stadium choroby.

### 1.6.1 Klasyfikacja choroby Alzheimera

Wyróżnia się dwa typy AD: rodzinny - uwarunkowany genetycznie, i sporadyczny - o nieznannej etiologii. Ze względu na wiek w którym występują pierwsze objawy mówimy o EOAD (ang. *early-onset AD*) - gdy objawy pojawiają się do 65 roku życia, ok 1-6% przypadków, oraz LOAD (ang. *late-onset AD*) - gdy objawy pojawiają się po 65 roku życia. Około 60% wczesnych zachorowań jest uwarunkowane genetycznie (Campion *et al.* 1999). Dotychczas znaleziono kilka genów, których mutacje są związane z zachorowalnością na alzheimera:

m. in. *APP* i *PSEN1*. *APP* to białko prekursorowe  $\beta$ -amyloidu: istotne, znalezione u chorych na alzheimera mutacje w sekwencji, najczęściej występują w miejscu bliskim cięcia przez sekretazę (Cruts and Van Broeckhoven 1998). Znane są m. in. mutacje „Szwedzka” (p.K670N, i M671L), „Londyńska” (p.V717I) oraz „Florydzka” (p.I716V), prowadzące do wzrostu produkcji  $\beta$ -amyloidu i rozwoju AD (Goate *et al.* 1991; Mullan 1992; Eckman *et al.* 1997). Presenilina 1 (*PSEN1*) to istotny składnik kompleksu  $\gamma$ -sekretazy (Wolfe *et al.* 1999) a mutacje w obrębie tego kodującego ją genu są główną przyczyną alzheimera u osób młodych (Theuns *et al.* 2000). Znanych jest 176 mutacji w genie *PSEN1*, głównie mutacje zmiany sensu, których konsekwencją jest zwiększenie stosunku  $A\beta_{42}$  do  $A\beta_{40}$  (Scheuner *et al.* 1996).

### 1.6.2 Model myszy choroby Alzheimera

W badania nad AD często wykorzystuje się modele mysie. Model 5xFAD charakteryzuje się bardzo szybką akumulacją  $\beta$ -amyloidu w mózgu – pierwsze płytki amyloidowe pojawiają się w drugim miesiącu życia - oraz dużą zawartością  $A\beta_{42}$ . Powstające płytki amyloidowe są podobne do tych występujących u ludzi. Jest to wynikiem zastosowania w tym modelu dwóch transgenów ludzkich: transgen kodujący białko *APP*, posiadające mutacje „Szwedzką”, „Londyńską” i „Florydzką” oraz transgen kodujący białko presenilinę 1: posiadający w sekwencji mutacje p.M156L i p.L286W. Wykazano, że myszy 5xFAD, oprócz akumulacji  $\beta$ -amyloidu w mózgu, wykazują zaburzenia pamięci (Oakley *et al.* 2006).

### 1.7 Hydrolaza bleomycyny i jej niedobór u myszy

Hydrolaza bleomycyny (BLMH) (EC:3.4.22.40), jeden z enzymów hydrolizujących tiolakton Hcy (Rysunek 1.2), należy do grupy proteaz cysteinowych. Została odkryta w trakcie badań nad terapią antynowotworową – deaminuje bleomycynę, lek przeciwnowotworowy (Okamura *et al.* 2011). BLMH jest badana w kontekście toksyczności Hcy (Zimny *et al.* 2006; Borowczyk *et al.* 2012; Suszyńska-Zajczyk *et al.* 2014) oraz chorób neurodegeneracyjnych takich jak AD (Kajiya *et al.* 2006) i choroba Huntingtona (Ratovitski *et al.* 2011). BLMH szybciej rozkłada tiolakton Hcy *in vitro* niż paraoksonaza 1 (Jakubowski 2018). W mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera, aktywność tiolaktonazowa oraz aminopeptydazowa białka BLMH

są znacząco zredukowane, w porównaniu do aktywności tego białka w mózгах osób zdrowych (Suszynska *et al.* 2010). Badania (Montoya *et al.* 1998) wykazały związek polimorfizm c.A1450G (p.I443V) genu *BLMH* z częstszą zapadalnością na AD, choć nie potwierdzono tego we wszystkich badaniach (Papassotiropoulos *et al.* 2000). *BLMH* posiada zdolność hydrolizy peptydów  $\beta$ -amyloidowych: 1-40, -1-42, 3-42 *in vitro* (Kajiya *et al.* 2006).

Brak aktywności *Blmh* u myszy, upośledza metabolizm tiolaktonu Hcy, który akumuluje się wówczas w mózgu, nerkach i moczu (Borowczyk *et al.* 2012). Myszy pozbawione aktywnego białka *Blmh*, są mniejsze a na ich ogonach pojawia się dermatoza (Schwartz *et al.* 1999). Zmiany zachodzą także w mózgu, u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> obserwuje się wzmożoną astroglejozę - wzrost ilości astrocytów spowodowany uszkodzeniem okolicznych neuronów. Myszy osiągają także gorsze rezultaty w teście wodnego labiryntu Morrisa (w którym sprawdzana jest sprawność hipokampu) (Montoya *et al.* 2007), co świadczy to o istotnej roli białka *BLMH* w mózgu. W wątrobie myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> zachodzi ekspresja nowego wariantu białka 4 zawierającego domenę glioksalazową (*Glod4*, ang. *glyoxalase domain-containing protein 4*) (Suszyńska-Zajczyk *et al.* 2014).

### **1.8 Białko zawierające domenę glioksalazową 4 (GLOD4)**

Funkcja białka *GLOD4* (in. *C17orf25*) jest nieznana. Gen *GLOD4* jest zlokalizowany w regionie chromosomu 17, wykazującym wysoką częstotliwość utraty heterozygotyczności w ludzkim raku wątrobowo-komórkowym (Qin *et al.* 2001). Składa się z 10 egzonów i 9 intronów, liczy 23 kpb (Wang *et al.* 2000). Porównanie sekwencji aminokwasowej białka *Glod4* przy użyciu Blast w UniProt ([www.uniprot.org/blast/](http://www.uniprot.org/blast/)) wskazuje, że występuje ono powszechnie, począwszy od owadów aż do człowieka, co sugeruje istotną funkcję tego białka w organizmach zwierzęcych. Ludzkie białko *Glod4* posiada 3 izoformy, różniące się długością i sekwencją aminokwasową. Izofirma pierwsza składa się z 313 aminokwasów i zawiera motywy poznanych domen białkowych takich jak domena glioksalazowa, domena oporności na antybiotyki a także domena charakterystyczna dla rodziny białek oporności na cytotoksyczny lek przeciwnowotworowy – bleomycynę ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_057164.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_057164.3)). Sugeruje się że białko *GLOD4*, podobnie jak inne białka glioksalazowe, jest częścią systemu detoksykacji metyloglioksalu w mitochondriach (Albee *et*

*al.* 2013; Hoos *et al.* 2013), nie zostało to jednak potwierdzone. Metyloglioksal powstaje jako produkt uboczny metabolizmu glukozy w szlaku glikolizy lub enzymatycznie przez fragmentację i eliminację fosforanów z triozofosforanów lub nieenzymatycznie poprzez reakcje rozpadu cukrów (Thornalley 1996). Metyloglioksal jest odpowiedzialny m. in. za glikację białek, powodującą ich niewłaściwe fałdowanie (Li *et al.* 2012). Białka te wówczas agregują, co może prowadzić do tworzenia się płytek amyloidowych, procesu charakterystycznego dla choroby Alzheimera (Gomes *et al.* 2005). Białko GLOD4 oddziałuje z mitochondrialnym białkiem NUDT9 o aktywności ADP-rybozo pirofosfatazy (Zhang *et al.* 2003).

W literaturze istnieje kilka wzmianek dotyczących białka GLOD4 w kontekście choroby Alzheimera i zmian zachodzących w mózgu. W badaniach prowadzonych na populacji społeczności arabskiej północnego Izraela, charakteryzującej się wysokim odsetkiem ludzi chorych na Alzheimera, wykazano że polimorfizm *GLOD4* rs2750012 był związany z częstszym występowaniem tej choroby (Sherva *et al.* 2011). W mysim modelu AD, 3xTg-AD, w hipokampie rocznych myszy poziom białka Glod4 był niemalże 1,5 razy wyższy niż u myszy typu dzikiego (Yu *et al.* 2015). W innym mysim modelu AD (CVN-AD) poziom izoformy 3 białka Glod4 był nieznacznie wyższy niż u kontroli, i taki poziom utrzymywał się od 6 tygodnia życia (Hoos *et al.* 2013). Zatem, doniesienia te zdecydowanie sugerują, że białko Glod4 jest zaangażowane w procesy związane z chorobami ośrodkowego układu nerwowego.



## 2 Cel pracy

### **Celem pracy było określenie wpływu zaburzeń metabolizmu homocysteiny na proces starzenia się i neurodegeneracji.**

Podwyższony poziom Hcy jest cechą charakterystyczną starzenia się i jest związany chorobami sercowo-naczyniowymi, osteoporozą oraz chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym - z AD (Smith and Refsum 2016). Ostatnie badania wskazują że śmiertelność ogólna jest dodatnio skorelowana z poziomem Hcy (Mendonça *et al.* 2018). Ludzie genetycznie pozbawieni możliwości metabolizmu Hcy do cysteiny, cierpią z powodu chorób podobnych do tych, występujących u ludzi starszych. Obniżenie aktywności białka CBS przyczynia się do skrócenia długości życia, zarówno u ludzi (Mudd *et al.* 1985) jak i u myszy (Watanabe *et al.* 1995). Z kolei obniżenie aktywności białka BLMH, zaangażowanego w metabolizm tiolaktonu Hcy, prowadzi do uszkodzenia neuronów u myszy (Montoya *et al.* 2007).

Zakładano, że podwyższony poziom Hcy, wywołany inaktywacją białka Cbs poprzez skrócenie długości telomerów, wpływa na senescencję komórkową oraz zmianę poziomu markerów starzenia się, prowadząc do zwiększonej śmiertelności. Jako nowy marker starzenia się wytypowano białko Glod4, którego zmianę zaobserwowano uprzednio u myszy pozbawionych genu *Blmh*.

Aby sprawdzić powyższe założenia wykonano następujące zadania badawcze:

1. Określenie długości telomerów w kontekście genotypu, płci i wieku oraz poziomu homocysteiny u ludzi z deficytem CBS i w grupie kontrolnej.
2. Ustalenie długości telomerów u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i ich zmienności tkankowej w dwóch grupach wiekowych.
3. Porównanie poziomu markerów senescencji u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i myszy typu dzikiego.
4. Analiza ilości mRNA i białka GLOD4 u ludzi z AD oraz w trzech modelach mysich, związanych z AD.

## 3 Materiały

### 3.1 Odczynniki i enzymy

Odczynniki wykorzystywane w doświadczeniach zakupione zostały głównie w firmach Sigma-Aldrich, POCh oraz BioShop Canada Inc. i ich pochodzenie nie miało znaczenia dla przebiegu doświadczenia. Pozostałe odczynniki i enzymy wymieniono w trakcie opisu metod badawczych (Rozdział 4).

### 3.2 Oligonukleotydy

Tabela 3.1. Stosowane oligonukleotydy: nazwy, sekwencja i zastosowanie.

Nazwa	Seqwencja, 5'→3'	Zastosowanie
Blmh_plus_minus_fw	CACTGTAGCTGTACTCACAC	Ustalenie genotypu <i>Blmh</i> u myszy
Blmh_plus_rev	GCGACAGAGTACCATGTAGG	
Blmh_minus_rev	ATTTGTCACGTCCTGCACGACG	
Cbs_plus_minus_fw	GGTCTGGAATTCACTATGTAGC	Ustalenie genotypu <i>Cbs</i> u myszy
Cbs_plus_rev	CGGATGACCTGCATTCATCT	
Cbs_minus_rev	GAGGTCGACGGTATCGATA	
hAPP_fw	AGAGTACCAACTTGCATGACTACG	Ustalenie genotypu <i>5xFAD</i> u myszy, APP
hAPP_rev	ATGCTGGATAACTGCCTTCTTATC	
hPS1_fw	GCTTTTTCCAGCTCTCATTACTC	Ustalenie genotypu <i>5xFAD</i> u myszy, presinilina 1
hPS1_rev	AAAATTGATGGAATGCTAATTGGT	
qGlod4-1_fw	CTTGCTTCTAGCCAAGCTGT	Ustalenie poziomu mRNA <i>Glod4</i> u myszy
qGlod4-1_rev	AGACACTGCTAGAGTCACCT	
qGlod4-2_fw	ATCCTGACTCCGTTGGTGA	Ustalenie poziomu mRNA <i>Glod4</i> izoformy 2 u myszy
qGlod4-2_rev	TGCAGCCTTCACCATCATC	
qGlod4-3_fw	GTTCTAAACAGCCCAGATGTTC	Ustalenie poziomu mRNA <i>Glod4</i> izoformy 3 u myszy
qGlod4-3_rev	TTGTAGTCTCCGATGCCATAAT	
β -actin_fw	TGTTACCAACTGGGACGACA	Ustalenie poziomu

<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja, 5'→3'</b>	<b>Zastosowanie</b>
$\beta$ -actin_rev	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	mRNA $\beta$ -aktyny u myszy
qm_GAPDH_fw	CGTCCCGTAGACAAAATGGT	Ustalenie poziomu mRNA <i>Gapdh</i> u myszy
qm_GAPDH_rev	TTGATGGCAACAATCTCCAC	
qhGLOD4_1_fw	CACCCGGATAACAGAAGACAGTT	Ustalenie poziomu mRNA <i>GLOD4</i> izoformy 1 u ludzi
qhGLOD4_1_rev	CTTGATAGTCTCCGACGCCAT	
qhGLOD4_2_fw	GAAGAAGGCTGCAAAGCTGC	Ustalenie poziomu mRNA <i>GLOD4</i> izoformy 2 u ludzi
qhGLOD4_2_rev	TTCCAAAAGCTGCTGCATG	
qhGLOD4_3_fw	GCAGTGTCTGATCTTCAAAGTCC	Ustalenie poziomu mRNA <i>GLOD4</i> izoformy 3 u ludzi
qhGLOD4_3_rev	TTCTCCAAGATTGCTCACCTGG	
qhB2M_fw	GGGTTTCATCCATCCGACA	Ustalenie poziomu mRNA <i>B2M</i> u ludzi
ghB2M_rev	ACACGGCAGGCATACTCATC	
qhGAPDH_fw	CTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCAT	Ustalenie poziomu mRNA <i>GAPDH</i> u ludzi
qhGAPDH_rev	TGGAATCATATTGGAACATGTAAACC	
qhXPNPEP1_fw	TCATTGATGGTGACCGCATAG	Ustalenie poziomu mRNA <i>XPNPEP1</i> u ludzi
qhXPNPEP1_rev	CTCGCTCAGGATGGACTTGTAG	
tel_fw	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGT TTGGGTTAGTGT	Ustalenie długości telomerów u myszy i ludzi
tel_rev	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATC CCTATCCCTAACA	
malb_fw	CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGC GGAAGTGCTGTAGTGGATCCCTG	Ustalenie długości telomerów u myszy - albumina
malb_rev	GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCC GGAGAAGCATGGCCGCCTTT	
halb_fw	CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGC GAAATGCTGCACAGAATCCTTG	Ustalenie poziomu długości telomerów u ludzi - albumina
halb_rev	GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCC GAAAAGCATGGTCGCCTGTT	
mTert_fw	GTGAACAGCCTCCAGACAG	Ustalenie poziomu mRNA <i>Tert</i> u myszy
mTert_rev	TTCCTAACACGCTGGTCAA	

<b>Nazwa</b>	<b>Sekwencja, 5'→3'</b>	<b>Zastosowanie</b>
mPai-1_fw	ACGCCTGGTGCTGGTGAATGC	Ustalenie poziomu mRNA <i>Pai-1</i> u myszy
mPai-1_rev	ACGGTGCTGCCATCAGACTTGTG	
mMcp1_fw	GGGATCATCTTGCTGGTGAA	Ustalenie poziomu mRNA <i>Mcp-1</i> u myszy
mMcp1_rev	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	
mp21_fw	GGCAGACCAGCCTGACAGAT	Ustalenie poziomu mRNA <i>p21</i> u myszy
mp21_rev	TTCAGGGTTTTCTCTTGCAGAAG	
mIl-6_fw	TGGTACTCCAGAAGACCAGAGG	Ustalenie poziomu mRNA <i>Il-6</i> u myszy
mIl-6_rev	AACGATGATGCACTTGCAGA	
mKl_fw	TGTATGTGACAGCCAATGGAATCG	Ustalenie poziomu mRNA <i>Klotho</i> u myszy
mKl_rev	GAATACGCAAAGTAGCCACAAAGG	
qmMito_fw	CTAGAAACCCCGAAACCAA	Ustalenie poziomu mtDNA u myszy
qmMito_rev	CCAGCTATCACCAAGCTCGT	
qmB2M_fw	ATGGGAAGCCGAACATACTG	Ustalenie poziomu mtDNA u myszy - referencja <i>B2M</i>
qmB2M_rev	CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT	
qhMito_rev	TGGTTAGGCTGGTGTTAGGG	
oligo(dT)A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA	Odwrotna transkrypcja (synteza cDNA)
oligo(dT)C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTC	
oligo(dT)G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG	

### 3.3 Materiał myszy

#### 3.3.1 Hodowla myszy

Myszy, na tle genetycznym C57BL/6J o genotypie *Tg-I278T Cbs<sup>-/-</sup>, Blmh<sup>-/-</sup>*, 5xFAD (Rozdział 1) oraz myszy typu dzikiego były hodowane w zwierzętarni Rutgers–New Jersey Medical School Animal Facility w Stanach Zjednoczonych. Hodowlę myszy prowadzono w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności, w klatkach indywidualnie wentylowanych, ze stałym dostępem do wody (lub wody z 25 mM ZnCl<sub>2</sub>, w celu indukcji promotora metaloproteinowego, Rozdział 1.2.2) oraz paszy standardowej dla gryzoni.

Badania zostały zaakceptowane przez Institutional Animal Care and Use Committee działającą przy Rutgers-New Jersey Medical School, Newark, NJ.

#### 3.3.2 Pozyskanie materiału

Krew pobierano z żyły policzkowej i w zależności od jej przeznaczenia: albo pozostawiano ją w temperaturze pokojowej przez 30-60 min. i wirowano w celu uzyskania surowicy, albo dodawano 0,5 M EDTA (stężenie końcowe 5 mM), a następnie wirowano, w celu uzyskania osocza. Wątrobę i mózg pobierano po uśmierceniu myszy dwutlenkiem węgla i przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz. Ilość osobników i ich wiek przedstawiono w Rozdziale 5 (Wyniki).

#### 3.3.3 Genotypowanie myszy

Wszystkie genotypowania wykonano metodą PCR (Rozdział 4.2.3). DNA z krwi, wątroby lub ogona myszy izolowano metodą fenolową (Rozdział 4.2.1).

##### 3.3.3.1 Myszy *Blmh<sup>-/-</sup>*

Do PCR wykorzystano system trzech starterów: *Blmh\_plus\_minus\_fw*, *Blmh\_plus\_rev*, *Blmh\_minus\_rev* (Rozdział 3.2). Para starterów *Blmh\_plus\_minus\_fw* oraz *Blmh\_plus\_rev* pozwalała na powielenie DNA myszy typu dzikiego i uzyskanie produktu o długości 650 pz. Para starterów *Blmh\_plus\_minus\_fw* oraz *Blmh\_minus\_rev* pozwalała na powielenie DNA myszy o genotypie *Blmh<sup>-/-</sup>* i uzyskanie produktu o długości 950 pz. Stosowano standardowy skład mieszaniny reakcyjnej i program powielania (Rozdział 4.2.3), przy czym temperatura stapiania starterów wynosiła 65°C a czas

powielania 90 s. Genotyp określano po przeprowadzeniu elektroforezy w żelu agarozowym (Rozdział 4.2.2) i analizie otrzymanych prążków.

### **3.3.3.2 Myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> (Tg-I278T)**

Do PCR wykorzystano system trzech starterów: *Cbs\_plus\_minus\_fw*, *Cbs\_plus\_rev*, *Cbs\_minus\_rev* (Rozdział 3.2). Para starterów *Cbs\_plus\_minus\_fw* oraz *Cbs\_plus\_rev* pozwalała na powielenie DNA myszy typu dzikiego i uzyskanie produktu o długości 300 pz. Para starterów *Cbs\_plus\_minus\_fw* oraz *Cbs\_minus\_rev* pozwalała na powielenie DNA myszy o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> i uzyskanie produktu o długości 176 pz. Stosowano standardowy skład mieszaniny reakcyjnej i program powielania (Rozdział 4.2.3), przy czym temperatura stapiania starterów wynosiła 60°C a czas powielania 30 s. Genotyp określano po przeprowadzeniu elektroforezy w żelu agarozowym (Rozdział 4.2.2) i analizie otrzymanych prążków.

### **3.3.3.3 Myszy 5xFAD**

Do PCR wykorzystano system dwóch par starterów: *hAPP\_fw*, *hAPP\_rev* oraz *hPS1\_fw*, *hPS1\_rev* (Rozdział 3.2). Para starterów *hAPP* pozwalała na powielenie DNA genu ludzkiego APP u myszy typu 5xFAD i uzyskanie produktu o długości 550 pz. Para starterów *hPS1* pozwalała na powielenie DNA genu ludzkiej preseniliny 1 u myszy typu 5xFAD i uzyskanie produktu o długości 525 pz. W przypadku DNA myszy typu dzikiego, stosując pary starterów *hAPP* oraz *hPS1* nie otrzymywano produktu powielania. Stosowano standardowy skład mieszaniny reakcyjnej i program powielania (Rozdział 4.2.3), przy czym temperatura stapiania obu par starterów wynosiła 62°C a czas powielania 60 s. Genotyp określano po przeprowadzeniu elektroforezy w żelu agarozowym (Rozdział 4.2.2) i analizie otrzymanych prążków.

## **3.4 Materiał ludzki**

### **3.4.1 DNA pacjentów o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup>**

Wykorzystano próbki DNA, uzyskanego z krwi pacjentów z mutacją w genie *Cbs* (n=26), obu płci, w wieku od jednego miesiąca do 57 lat oraz dopasowane wiekiem i płcią kontrole (n=28). Próbki otrzymano z Institute of Inherited Metabolic Disorders Charles University-First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague (20 chorych i 20 kontroli) oraz z Instytutu

Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (6 chorych i 8 kontroli). Krew pobierano na czczo i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu izolacji DNA. Badania zostały zaakceptowane przez komisję etycznej General University Hospital, Prague i Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

#### **3.4.2 Próbki mózgów osób z chorobą Alzheimera**

Otrzymano 6 próbek kory mózgu osób z chorobą Alzheimera oraz 6 próbek kory mózgu bez zmian typowych dla tej choroby, obu płci, w wieku 68-91 lat i stadiach I-VI w skali Braaka (Rozdział 1.6.1), pobranych od 4-23 godzin po śmierci. Próbki uzyskano dzięki uprzejmości Hyoung-gon Lee z Case Western Reserve University, Department of Pathology, Cleveland, OH.

## 4 Metody

### 4.1 Techniki wykorzystane do pracy z RNA

#### 4.1.1 Izolacja RNA

Izolację RNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Total RNA Purification Kit firmy Novazym. Odczynnik 3-Zone dodawano do rozdrobnionego, przy użyciu młyna kulowego (MM400, Retsch) oraz kulek cyrkonowych (d = 5 mm) lub moździerza, zmrożonego w ciekłym azocie materiału tkankowego. Po 15-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, wirowano w 4°C przez 10 min. przy 12000 g. Supernatant ekstrahowano chloroformem w stosunku 5:1. Ekstrakt po zmieszaniu z 70% etanolem w stosunku 1:1, nakładano na kolumnkę. Przemywano dwoma porcjami 70% etanolu a następnie eluowano ok. 50 µl wody wolnej od RNaz. Ilość oraz czystość uzyskanego RNA analizowano przy pomocy urządzenia NanoDrop2000, a ilość i jakość - wykonując elektroforezę w żelu agarozowym (Rozdział 4.1.2).

#### 4.1.2 Elektroforeza RNA w żelu agarozowym

Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym (Bio Standard, Prona Agarose), zawierającym Midori Green Advance DNA Stain (MG04, Nippon) w ilości 5 µl/100 ml żelu. Do próbek dodawano buforu obciążającego LBx6, po czym nanoszono je na żel. Proces prowadzono w temperaturze pokojowej, w aparacie do elektroforezy horyzontalnej (Clever Scientific), w buforze 1xTBE przy napięciu 120 V. Jakość RNA określano na podstawie intensywności prążków zawierających rRNA, odczytywanych w urządzeniu G:Box (Syngene).

Tabela 4.1 Bufory używane podczas elektroforezy w żelu agarozowym.

<b>TBE<sub>x</sub>10</b> (na 1 l)		<b>LB<sub>x</sub>6</b>	
Tris-HCl	108 g	Sacharoza	40% (w/v)
Kwas borowy	55 g	Cyjanoksylen FF	0,25% (w/v)
EDTA	7,5 g	Błękit bromofenolowy	0,25% (w/v)



### 4.1.3 Traktowanie DNazą

Przeprowadzano z użyciem DNazy I (EN0521, Thermo Scientific).

Tabela. 4.2. Skład mieszaniny reakcyjnej, traktowanie DNazą.

<b>Składniki</b>	<b>Stężenie</b>	<b>Ilość</b>
RNA	200-1000 ng	1 µg
Bufor	10 x	1 µl
DNaza	1 U/µl	1 µl
woda, wolna od RNaz	-	do 10 µl

Po 30-minutowej inkubacji w 30°C, dodawano 1 µl 50 mM EDTA, następnie inkubowano w 65°C przez 10 min.

### 4.1.4 Odwrotna transkrypcja (RT)

Reakcja odwrotnej transkrypcji była prowadzona z wykorzystaniem enzymu RevertAid™ Reverse Transcriptase (EP0441, Thermo Scientific), losowych heksamerów (SO142, Thermo Scientific) lub mieszaniny kotwiczących oligo(dT)<sub>23</sub> (Sigma-Aldrich, Rozdział 3.2) oraz mieszaniny dNTPów (mi-N1005S, Metabion).

Tabela. 4.3 Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji.

<b>Składniki</b>	<b>Stężenie</b>	<b>Ilość</b>
RNA traktowane DNazą	ok. 100 ng/µl	do 2 µg
Bufor	5 x	4 µl
dNTPy	10 mM	2 µl
odwrotna transkryptaza	200 U/µl	1 µl
losowe heksamery lub oligo (dT) <sub>23</sub>	100 µM	1 µl
woda, wolna od RNaz	-	do 20 µl

Mieszaninę inkubowano 60 min. w 42°C a następnie 10 min w 70°C.

## **4.2 Techniki wykorzystywane do pracy z DNA**

### **4.2.1 Izolacja DNA**

Przeprowadzana była metodą fenolową. Rozdrobniony, przy użyciu młyna kulowego (MM400, Retsch) oraz kulek cyrkonowych ( $d = 5 \text{ mm}$ ), lub moździerz schłodzonego w ciekłym azocie, materiał tkankowy albo krew pełną zawieszano w fenolu (Sigma-Aldrich) wysyconym  $0,1 \text{ M}$  Tris (Sigma-Aldrich) o  $\text{pH } 8$  z dodatkiem 8-hydroksyhinoliny (Roth). Inkubowano z wytrząsaniem przez godzinę, następnie wirowano  $10 \text{ min.}$  przy  $7500 \text{ g}$ . Supernatant zbierano i traktowano RNazą A (EN0531, Thermo-Scientific), proporcjonalnie: supernatant -  $25 \mu\text{l}$ , RNaza -  $0,05 \mu\text{l}$ ,  $0,5 \text{ M}$  Tris -  $2,5 \mu\text{l}$ . Inkubowano  $30 \text{ min.}$  w  $37^\circ\text{C}$ . Po tym czasie ekstrahowano mieszaniną: fenol  $\text{pH } 8$  : chloroform (POCH) (1:1) oraz chloroformem. Do ostatniego ekstraktu dodawano  $1/10$  (v/v)  $3 \text{ M}$  octanu sodu (POCH) ( $\text{pH } 5,2$ ) oraz  $3:1$  (v/v)  $97\%$  etanolu (POCH). DNA wytrącano przez noc w  $-20^\circ\text{C}$ , osadzano przez wirowanie przez  $20 \text{ min.}$  przy  $14000 \text{ g}$ , w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ . Osad przemywano  $70\%$  etanolem a następnie zawieszano w ilości wody dejonizowanej, proporcjonalnej do ilości materiału wyjściowego,  $10\text{-}50 \mu\text{l}$ . Ilość oraz czystość uzyskanego DNA określano przy pomocy urządzenia NanoDrop2000, a ilość i jakość - wykonując elektroforezę w żelu agarozowym (Rozdział 4.2.2).

### **4.2.2 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym**

Elektroforezę prowadzono w  $1\%$ ,  $2\%$  lub  $4\%$  żelu agarozowym (Bio Standard, Prona Agarose), zależnie od spodziewanej długości fragmentów DNA, zawierającym Midori Green Advance DNA Stain (MG04, Nippon) w ilości  $5 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$  żelu. Do próbek dodawano buforu obciążającego LBx6, po czym nanoszono je na żel. Proces prowadzono w temperaturze pokojowej, w aparacie do elektroforezy horyzontalnej (Cleaver Scientific), w buforze  $1\times\text{TBE}$  przy napięciu  $120 \text{ V}$ . Wielkość fragmentów DNA porównywano z wzorcem mas cząsteczkowych nanoszonym równocześnie z próbkami, odczytywanych w urządzeniu G:Box (Syngene).

### 4.2.3 Łańcuchowa reakcja polimerazy DNA (PCR)

PCR prowadzono w objętości 10-50  $\mu\text{l}$  (Tabela 4.4), z wykorzystaniem polimerazy DreamTaq Green (EP0711, Thermo Scientific) oraz mieszaniny deoksynukleotydów (mi-N1005S, Metabion).

Program typowej reakcji:

- 1 Denaturacja wstępna: 2 min., 95°C
- 2 Denaturacja: 15 s, 95°C
- 3 Stapianie starterów: 15 s,  $T_s$ °C
- 4 Synteza: 10-20 s, 72°C

$T_s$  - temperatura stapiania, dobierana eksperymentalnie na podstawie temperatur obliczanych przez algorytm dostępny na stronie internetowej <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Długość etapu syntezy zależała od długości amplifikowanego produktu PCR, przyjęto że szybkość polimeryzacji wynosi 1000 pz/minutę. Reakcję prowadzono w aparacie Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Kroki 2-4 powtarzano 30 lub 40 razy. Uzyskany produkt analizowano elektroforetycznie (Rozdział 4.2.2).

Tabela 4.4 Skład typowej mieszaniny reakcyjnej PCR.

<b>Składniki</b>	<b>Stężenie wyjściowe</b>	<b>Objętość</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
matryca DNA	20-50 ng/ $\mu\text{l}$	1,5 $\mu\text{l}$	3-7,5 ng/ $\mu\text{l}$
starter przedni	5 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
strater wsteczny	5 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
Bufor	10 x	1 $\mu\text{l}$	1 x
dNTPy	10 mM (każdy)	0,2 $\mu\text{l}$	0,2 mM
polimeraza	5 U/ $\mu\text{l}$	0,05 $\mu\text{l}$	0,025 U
H <sub>2</sub> O	-	do 10 $\mu\text{l}$	-

### 4.2.4 Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR)

Reakcję prowadzono w objętości 10 lub 16  $\mu\text{l}$ , przy użyciu zestawu iTaq firmy Bio-Rad. qPCR wykorzystywano do pomiaru ilości konkretnego mRNA, określania długości telomerów lub ilości mitochondrialnego DNA.

#### **4.2.4.1 Typowy przebieg reakcji wykorzystywanej do pomiaru ilości konkretnego mRNA**

- 1) Denaturacja wstępna: 2 min., 95°C
- 2) Denaturacja: 15 s, 95°C
- 3) Stapianie starterów: 15 s,  $T_s$ °C
- 4) Synteza: 10-20 s, 72°C
- 5) Krzywa topnienia 60-95°C

$T_s$  - temperatura stapiania, dobierana eksperymentalnie na podstawie temperatur obliczanych przez algorytm dostępny na stronie internetowej <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Długość etapu syntezy zależała od długości amplifikowanego produktu PCR, przyjęto że szybkość polimeryzacji wynosi 1000 pz/minutę. Reakcję prowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych w aparacie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System firmy Bio-Rad. Kroki 2-4 powtarzano 40 razy a każdym etapie syntezy następowało sczytywanie sygnału fluorescencji. Uzyskany produkt analizowano na podstawie krzywej topnienia oraz elektroforetycznie (Rozdział 4.2.2).

Tabela 4.5 Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR, pomiar mRNA.

<b>Składniki</b>	<b>Stężenie wyjściowe</b>	<b>Objętość</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
matryca cDNA	5,26 ng/ $\mu\text{l}$	3,8 $\mu\text{l}$	2 ng/ $\mu\text{l}$
starter przedni	5 $\mu\text{M}$	0,6 $\mu\text{l}$	0,3 $\mu\text{M}$
strater wsteczny	5 $\mu\text{M}$	0,6 $\mu\text{l}$	0,3 $\mu\text{M}$
iTaq	2 x	5 $\mu\text{l}$	1 x

#### **4.2.4.2 Przebieg reakcji wykorzystywanej do pomiaru długości telomerów**

- 1) Denaturacja wstępna: 15 min., 94°C
- 2) Stapianie starterów wstępne: 15 s, 49°C
- 3) Denaturacja: 15 s, 94°C

- 4) Denaturacja: 15 s, 94°C
- 5) Stapianie starterów (telomery): 10 s, 62°C
- 6) Synteza (telomery): 15 s, 74°C
- 7) Stapianie starterów (albumina) 10 s, 84°C
- 8) Synteza (albumina) 15 s, 88°C
- 9) Krzywa topnienia 65-95°C

Kroki 2-3 powtarzano dwukrotnie, kroki 4-8 powtarzano 32 razy (Cawthon 2009). Po każdym etapie syntezy oraz w trakcie kroku “krzywa topnienia” następowało sczytywanie sygnału fluorescencji. Reakcję prowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych w aparacie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System firmy Bio-Rad. Uzyskany produkt analizowano na podstawie krzywej topnienia oraz elektroforetycznie (Rozdział 4.2.2).

Tabela 4.6 Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR, pomiar telomerów.

<b>Składniki</b>	<b>Stężenie wyjściowe</b>	<b>Objętość</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
matryca DNA	160 ng/ $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
starter przedni	10 $\mu$ M	1,44 $\mu$ l	0,9 $\mu$ M
strater wsteczny	10 $\mu$ M	1,44 $\mu$ l	0,9 $\mu$ M
iTaq	2 x	6 $\mu$ l	0,75 x
H <sub>2</sub> O	-	2,12 $\mu$ l	-

W celu kontroli efektywności powielania produktu PCR, dla każdej pary starterów przeprowadzano dodatkowo reakcję ze zmienną ilością matrycy (np. 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 0 ng). Współczynnik kierunkowy krzywej, zależności cyklu od ilości DNA matrycy, świadczył o efektywności powielania.

#### **4.2.4.3 Przebieg reakcji wykorzystywanej do pomiaru mitochondrialnego DNA u myszy**

- 1) Denaturacja wstępna: 10 min., 95°C
- 2) Denaturacja: 15 s, 95°C
- 3) Stapianie starterów: 10 s, 60°C
- 4) Synteza: 15 s, 72°C
- 5) Krzywa topnienia 65-95°C

Kroki 2-4 powtarzano czterdziestokrotnie. Po każdym etapie syntezy oraz w trakcie kroku “krzywa topnienia” następowało sczytywanie sygnału fluorescencji. Reakcję prowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych w aparacie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System firmy Bio-Rad. Uzyskany produkt analizowano na podstawie krzywej topnienia oraz elektroforetycznie (Rozdział 4.2.2)

Tabela 4.7 Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR, pomiar mitochondrialnego DNA.

<b>Składniki</b>	<b>Stężenie wyjściowe</b>	<b>Objętość</b>	<b>Stężenie końcowe</b>
matryca DNA	10 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 ng/ $\mu$ l
starter przedni	5 $\mu$ M	0,6 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
strater tylni	5 $\mu$ M	0,6 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
iTaq	2 x	5 $\mu$ l	1 x
H <sub>2</sub> O	-	1,8 $\mu$ l	-

Przed dodaniem do mieszaniny reakcyjnej, DNA było sonikowane w łaźni ultradźwiękowej przez 5 min. przy 45 kHz (Malik *et al.* 2011, 2016).

### **4.3 Techniki wykorzystane do pracy z białkami**

#### **4.3.1 Izolacja białek do elektroforezy SDS-PAGE**

Białka izolowano z tkanki rozdrobnionej przy użyciu młyna kulowego (MM400, Retsh) oraz kulek cyrkonowych (d = 5 mm) lub moździerza chłodzonych ciekłym azotem, poprzez ekstrakcję 20 mM buforem fosforanowym o pH 7,4 z 2 mM EDTA, w stosunku: 1 ml buforu na 1 g tkanki, z dodatkiem inhibitorów fosfataz i proteaz (P8340, Sigma-Adrich oraz PHOSstop, Roche), po ich 200-krotnym rozcieńczeniu. Następnie sonikowano przy użyciu urządzenia Bandelin Sonopuls HD 2070, wirowano w 4°C przez 20 min. przy 15000 g. Zbierano supernatant, stężenie białka oznaczano jedną z opisanych metod (Rozdział 4.3.3).

#### **4.3.2 Izolacja białek do elektroforezy dwukierunkowej**

Białka izolowano z tkanki mózgu, rozdrobnionej przy użyciu młyna kulowego (MM400, Retsh) oraz kulek cyrkonowych (d = 5 mm), metodą fenolową

(Hurkman and Tanaka 1986). Do ok. 100 mg tkanki dodawano 900  $\mu$ l buforu ekstrakcyjnego HT (Tabela 4.8) z inhibitorem proteaz (2 mM PMSF), inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej, sonikowano na lodzie: 3 x 30 s z przerwą 10 s, wytrząsano przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Dodawano fenol wysycony wodą (z 0,1% 8-hydroksy-chinolina) w stosunku 1:1 i ponownie wytrząsano 10 min. Po tym czasie mieszaninę wirowano przez 10 min. przy 8 tys. rpm. Zbierano warstwę fenolową i ponownie ekstrahowano ją buforem ekstrakcyjnym HT w stosunku 1:1. Do warstwy fenolowej, ekstrahowanej dwukrotnie, dodawano 0,1 M octan amonu w metanolu w stosunku 5:1. Inkubowano co najmniej 2 doby w  $-20^{\circ}\text{C}$  w celu wytrącenia osadu białek. Po tym czasie wirowano 10 min. w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  przy 8 tys. rpm. Osad przemywano trzykrotnie 0,1 M octanem amonu w metanolu oraz dwukrotnie: acetonem. Wirowano w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  przy 8 000 rpm. Wysuszony osad zawieszano w 200  $\mu$ l roztworu rehydratacyjnego (Tabela 4.8), wytrząsano 1 h RT (po ~30 min. sonikowano 3 x 20 s, z 10 s przerwami) i zwirowywano. Ilość białka oznaczano przy pomocy zestawu 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences) postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

Tabela 4.8 Roztwory używane podczas izolacji białek do elektroforezy dwukierunkowej.

<b>Bufor ekstrakcyjny HT</b>		<b>Roztwór rehydratacyjny</b>	
sacharoza	0,7 M	mocznik	7 M
Tris HCl (pH 7,5)	0,5 M	tiomocznik	2 M
EDTA	50 mM	CHAPS	2% (w/v)
KCl	0,1 M		
DTT	2% (w/v)		

### 4.3.3 Oznaczanie ilości białka w roztworze

#### 4.3.3.1 Metoda taninowa

Użyto odczynnika taninowego (Tabela 4.9) (Mejbaum-Katzenelenbogen 1955). Pomiar prowadzono na płytkach 96-cio dołkowych (92696, TPP). Do 100  $\mu$ l roztworu białka dodawano 100  $\mu$ l odczynnika taninowego, inkubowano w  $30^{\circ}\text{C}$  przez 10 min. Następnie dodawano 100  $\mu$ l 0,2% (w/v) roztworu gumy arabskiej w wodzie. Za każdym razem, równoległe do badanych próbek,

wykonywano krzywą kalibracyjną składającą się z sześciu rozcieńczeń BSA (ALB001, BioShop) w wodzie (80, 40, 20, 10, 5, 2,5 µg/ml). Absorbancję mierzono po 5 minutach od wymieszania składników, przy długości fali 595 nm w czytniku płytek ELx 808 (BioTek). Wynik odczytywano z krzywej standardowej zależności stężenia białka w roztworze standardów od absorbancji.

Tabela 4.9 Odczynnik taninowy.

**Odczynnik taninowy**

HCl 1M	98 ml
Fenol	2 ml
Tanina	10 g

**4.3.3.2 Metoda Bradford**

Użyto odczynnika Bradford Reagent (B6916, Sigma-Aldrich)(Bradford 1976). Pomiar prowadzono w objętości 200 µl na płytkach 96-cio dołkowych (92696, TPP), z czego 40 µl stanowił odczynnik Bradford a 160 µl - rozcieńczone białko. Za każdym razem, równoległe do badanych próbek, wykonywano krzywą kalibracyjną składającą się z sześciu rozcieńczeń BSA (ALB001, BioShop) w wodzie (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 µg/ml). Absorbancję mierzono po 5 minutach od wymieszania składników, przy długości fali 595 nm w czytniku płytek ELx 808 (BioTek). Wynik odczytywano z krzywej standardowej zależności stężenia białka w roztworze od absorbancji.

**4.3.3.3 Metoda BCA**

Postępowano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu Micro BCA™ Protein Assay Kit (23235, Thermo Scientific). Pomiar prowadzono w objętości 100 µl na płytkach 96-cio dołkowych (92696, TPP), z czego 98 µl stanowiły odczynniki zestawu a 2 µl nierozcieńczone białko. Za każdym razem, równoległe do badanych próbek, wykonywano krzywą kalibracyjną składającą się z sześciu rozcieńczeń BSA (ALB001, BioShop) w wodzie (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 µg/µl). Absorbancję mierzono po 30-minutowej inkubacji w 37°C, przy długości fali 595 nm w czytniku płytek ELx 808 (BioTek). Wynik odczytywano z krzywej standardowej zależności stężenia białka w roztworze od absorbancji.



#### 4.3.4 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym - metoda SDS-PAGE

Białka rozdzielano przeprowadzając elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Laemmli 1970) z wykorzystaniem zestawu Mini-PROTEAN Tetra Cell firmy Bio-Rad.

Tabela 4.10 Skład żeli poliakrylamidowych.

<b>Żel rozdzielający 16%</b>		<b>Żel zagęszczający 4%</b>	
Akrylamid:Bisakrylamid 29:1, 30%	5,3 ml	Akrylamid:Bisakrylamid 29:1, 30%	0,8 ml
H <sub>2</sub> O	2 ml	H <sub>2</sub> O	2,1 ml
Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 M	2,5 ml	Tris-HCl, pH 6,8; 0,5 M	1 ml
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	40 µl
TEMED	100 µl	TEMED	40 µl
APS	10 µl	APS	4 µl

Wylewano minizele o wymiarach 8,6 x 6,7x 0,1 cm.

Tabela 4.11 Bufory używane do elektroforezy w żelach poliakrylamidowych.

<b>Bufor do próbek 5x</b>		<b>Bufor do elektroforezy 10x</b>	
Tris-HCl, pH 6,8	25 m M	Tris	30 g
SDS	10%	Glicyna	144 g
błękit bromofenolowy	0,25%	SDS	10 g
glicerol	50%		
2-merkaptoetanol	5%		

Próbki przygotowywano przez dodanie do roztworu białka (ok. 20 µg) buforu do próbek, w stosunku 4:1. Próbki inkubowano w temperaturze 95°C przez 5 min., przed nałożeniem na żel. Elektroforezę prowadzono przy zmiennym napięciu 90 V, 120 V a następnie 200 V.

Żel barwiono roztworem CBB przez kilka minut, podgrzewając go w kuchence mikrofalowej, następnie odbarwiano przez kilka godzin. Wielkość białek szacowano na podstawie równolegle nanoszonego wzorca mas cząsteczkowych: DualColorPrecision Plus Protein™ Dual Color Standards (1610374, Bio-Rad)

Tabela 4.12 Bufory do barwienia żeli.

<b>CBB</b>		<b>Roztwór odbarwiający</b>	
Comassie Briliat Blue R250	0,25% (w/v)	Metanol	40% (v/v)
Metanol	40% (v/v)	Kwas octowy	10% (v/v)
Kwas octowy	10% (v/v)	H <sub>2</sub> O	50% (v/v)
H <sub>2</sub> O	50% (v/v)		

#### 4.3.5 Western blotting

Transfer białek na membranę nitrocelulozową (1620112, Bio-Rad) lub PVDF (1620177, Bio-Rad) przeprowadzano w aparacie Western Blotting Transfer Systems (Bio-Rad). Umieszczano w nim kolejno: warstwę bibuły Whatman 3MM, membranę, żel, warstwę bibuły Whatman 3MM. Bibuły uprzednio namaczano w buforze do transferu (katodowym lub anodowym). Transfer prowadzono 20 min. przy 120 mA i 25V. Następnie membranę inkubowano przez 30 min. w roztworze blokującym. Po jego odmyciu, membranę inkubowano przez noc w 4°C, z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym rozcieńczonym w buforze TBST. Niespecyficznie związane przeciwciała odmywano buforem TBST, po czym membranę inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej z odpowiednio rozcieńczonym przeciwciałem drugorzędowym. Detekcji dokonywano za pomocą reakcji fluorescencji w urządzeniu Gene Gnome XRQ (Syngene) i oprogramowania (GeneSys, Syngene). Membranę umieszczano w odczynniku wywołującym Westar Supernova (XLS3, Cyanagen). Reakcję prowadzono do momentu pojawienia się prążków o pożądanej intensywności. Intensywność prążków określano przy pomocy programu (GeneTools, Syngene).

Tabela 4.13 Skład buforów do transferu

<b>Bufor katodowy</b>		<b>Bufor anodowy</b>	
Tris/Caps 5x	20 ml	Tris/Caps 5x	20 ml
SDS 10% (w/v)	1 ml	Metanol	15 ml
H <sub>2</sub> O	79 ml	H <sub>2</sub> O	65 ml

<b>Tris/Caps 5x</b>		<b>TBS 10x</b>	
Tris	36,34 g	Tris	24 g
CAPS	44,26 g	NaCl	88 g
H <sub>2</sub> O	do 1 l	H <sub>2</sub> O	do 1 l
<b>TBST 1 x</b>		<b>Roztwór blokujący</b>	
TBS 10x	100 ml	Mleko w proszku odtłuszczone	2,5 g
Tween 20	1 ml	TBST 1x	do 50 ml
H <sub>2</sub> O	do 1 l		

#### 4.3.6 Elektroforeza dwukierunkowa

##### 4.3.6.1 Ogniskowanie izoelektryczne

Mieszaninę (Rozdział 4.3.2) o objętości 200 µl, zawierającą 200µg białka w roztworze rehydratacyjnym z 0,28% (w/v) DTT oraz 0,5% amfolitu o pH 4-7 (Ampholyte, GE Healthcare), umieszczano w rynienkach ceramicznych wraz z paskami żelowymi z immobilizowanym gradientem pH 4-7 o długości 11cm (GE Healthcare). Ogniskowanie białek przeprowadzano w temperaturze 18°C w aparacie Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare) przez 20 godzin, do osiągnięcia 25 kVh (Tabela 4.14). Proces poprzedzono dwugodzinną rehydratacją pasywną.

Tabela 4.14 Program ogniskowania izoelektrycznego białek.

<b>Napięcie, typ</b>	<b>Napięcie, V</b>	<b>Czas</b>
Stałe	50	10 h
gradientowe	50 – 500	40 min.
Stałe	500	1 h
gradientowe	500 – 1000	20 min
gradientowe	1000 – 6000	2 h 30 min.
Stałe	6000	2 h 30 min.

##### 4.3.6.2 Przygotowanie pasków żelowych i elektroforeza

Paski żelowe po ogniskowaniu izoelektrycznym (Rozdział 4.3.6.1) inkubowano w buforze równoważącym pH (Tabela 4.15): 15 min. z dodatkiem 1% DTT

(redukcja mostków disiarczkowych) oraz 15 min. z dodatkiem 2,5% IAA (blokowanie wolnych grup tiolowych)

Tabela 4.15 Bufor równoważący.

**Bufor równoważący**

Tris-HCl pH 8,8	50 mM
Mocznik	6 M
Glicerol	30% (v/v)
SDS	2% (w/v)
błękit bromofenolowy	1% (w/v)

Paski płukano wodą destylowaną i wkładano po dwa pomiędzy płyty szklane (24 cm x 24 cm), gdzie znajdował się 11% żel poliakrylamidowy (Tabela 4.16) i mocowano przy pomocy 1% agarozy. Wzorzec mas cząsteczkowych (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) był наносzony na bibułę Whatman (~0,5 cm x 1 cm) i umieszczany na brzegu żelu. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 20°C, przy stałej mocy 5 W/żel przez 30 min., następnie 17 W/żel przez ok. 2,5 h. Rozdział odbywał się w aparacie Ettan Dalt Six (GE Healthcare).

Tabela 4.16 Skład żeli poliakrylamidowych do drugiego kierunku.

**Żel poliakrylamidowy 11% z SDS**

30% akrylamid:bisakrylamid	82,35 ml
1,5 M Tris pH 8,8	56,25 ml
10% SDS	2,25 ml
10% APS	1,125 ml
TEMED	148,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub>	do 225 ml

Tabela 4.17 Skład buforów do drugiego kierunku elektroforezy.

**Bufor anodowy 10x**

**Bufor katodowy 10x**

Tris base	0,25 mM	Tris base	25 mM
		glicyna	192 mM

SDS 1%

#### 4.3.6.3 Wybarwienie i utrwalanie żeli

Po elektroforezie żele przycinano i utrwalano przez minimum 1,5 h a następnie barwiono przez noc (Tabela 4.18). Nadmiar barwnika odpłukiwano pięciokrotnie wodą destylowaną

Tabela 4.18. Bufory do utrwalania żeli.

Utrwalacz		Wybarwiacz	
Etanol	50% (v/v)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10% (w/v)
kw. octowy	10% (v/v)	siarczan amonu	10% (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub>	40%(v/v)	Methanol	20% (v/v)
		5% Coomassie Brilliant Blue G-250	0,12% (w/v)

Tak przygotowane żele archiwizowano z wykorzystaniem skanera i oprogramowania LabScan (GE Healthcare), przy rozdzielczości 300 dpi i zastosowaniu czerwonego filtra.

#### 4.3.6.4 Trawienie białek

W celu identyfikacji białek, plamkę zawierającą białko, wycinano z żelu przy pomocy czystych szklanych pipet. Wycięty fragment umieszczano w probówce wykonanej z polimeru o niskim powinowactwie do białek. Przemycano 50 mM roztworem węglań amonu z 50% acetonitrylem a następnie jedynie acetonitrylem i oba te płukania powtórzono raz jeszcze. Do osadu dodawano następnie 100 µl mieszaniny 10 mM DTT z 50 mM węglaniem amonu i inkubowano w 56°C przez 45 min. Do osadu dodawano 100 µl 55 mM jodoacetamidu w 50 mM węglanie amonu i inkubowano przez 30 min. w ciemności w temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu 50 mM roztworem węglań amonu z 50% acetonitrylem, a następnie z samym acetonitrylem osad suszono. Białka trawiono trypsyną (Promega) (20 ng/µl) w 50 mM węglanie amonu w objętości 10 µl, prowadząc inkubację przez noc w 37°C. Do roztworu trawionych białek dodawano 1 µl acetonitrylu z 1% kwasem trifluorooctowym, sonikowano w łaźni ultradźwiękowej przez 5 min. i inkubowano przez 0,5 h w 4 °C.

#### **4.3.6.5 Identyfikacja białek w spektrometrze MALDI-ToF**

Identyfikację białek przeprowadzono za pomocą spektrofotometru MALDI-ToF (Autoflex III, Burker Germany) metodą PMF (ang. *peptide mass fingerprinting*). Na płytkę AnchorChip 600- $\mu\text{m}$  (Bruker Daltonics) nakładano mieszaninę peptydów o objętości 0,5  $\mu\text{l}$ , otrzymanych po trawieniu białek z żelu (Rozdział 4.3.6.4), oraz taką samą objętość roztworu matrycy (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy rozpuszczony w 50% acetonitrylu z 0,1% kwasu trifluorooctowego). Spektrometr kalibrowano przy użyciu markerów peptydowych (Peptide Calibration Standards 1, Burker) o zakresie mas 700-3500 Da. Jonizacja próbek następowała w wyniku wzbudzenia promieniem lasera o długości fali 337 nm. Widma peptydowe opracowywano przy pomocy oprogramowania Burker Flex Analysis, a następnie identyfikowano w oparciu o bazę programu MASCOT wybierając parametry: karboamidometylacja węgla (modyfikacja niezmienna), oksydacja metioniny (modyfikacja zmienna) oraz trawienie trypsyną.

#### **4.4 Oznaczanie stężenia homocysteiny w osoczu myszy**

Homocysteinę całkowitą, czyli sumę homocysteiny wolnej zredukowanej i S-związanej (Maron and Loscalzo 2006) oznaczano przy użyciu HPLC (Chwatko and Jakubowski 2005; Perła-Kajan *et al.* 2016). Do 10  $\mu\text{l}$  osocza myszy dodawano 90  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  z 2 mM DTT. Całość nakładano na filtr 3 kDa (UFC5003BK, Milipore), inkubowano 5 min., następnie zwirowywano przy 14 000 g w 4°C, w celu otrzymania 30  $\mu\text{l}$  filtratu. Do filtratu dodawano kolejno 2  $\mu\text{l}$  250 mM DTT, inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej oraz 5  $\mu\text{l}$  6 M HCl i inkubowano 30 min. w 100°C. Próby zwirowywano i suszono próżniowo (CentriVap Benchtop Vacuum Concentrators, Labconco). Po wysuszeniu dodawano 30  $\mu\text{l}$  wody destylowanej, w której zawieszano próbę. Połowę objętości używano do analiz HPLC.

Wykorzystano metodę w której homocysteina jest przekształcana do tiolaktonu homocysteiny, rozdzielania na kolumnie kationowymiennej, poddawana derywatywacji z odczynnikiem OPA (P1378, Sigma-Aldrich) i określana ilościowo z użyciem fluorescencji. Na system do oznaczeń Infinity 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) składały się: odgazowywacz HiP, podwójna pompa, autosampler o dużej wydajności, przedział

termostatowany kolumny, detektor diodowy oraz detektor fluorescencyjny. Próba o objętości 5  $\mu\text{l}$  była nastrzykiwana na kolumnę PolyCATA, 35x21 mm, 5  $\mu\text{M}$ , 300Å (PolyLC), eluowana izokratycznie 10 mM buforem fosforanowym o pH 6,6, zawierającym 5 mM NaCl, przy przepływie 36 ml/min. Do detekcji używano roztworu 2,5 mM OPA (P1378, Sigma-Aldrich) w 0,25 M NaOH, pompowanego z prędkością 18 ml/min., który łącząc się z homocysteiną, w czasie przejścia przez celkę reakcyjną (0,3 mm I.D. 3 m), tworzył fluorescencyjną pochodną, rejestrowaną przez detektor Jasco 1520 fl - przy wzbudzeniu 370 nm i emisji 480 nm. Wynik odczytywano z krzywej standardowej zależności stężenia standardów homocysteiny od absorbancji.

## 4.5 Pomiar długości telomerów

### 4.5.1 Telomery mysie

Wykorzystano krew, wątrobę i mózg myszy Cbs<sup>-/-</sup> i WT, obydwu płci. DNA izolowano metodą fenolową (Rzodział 4.2.1) a długość telomerów określano metodą opisaną w Rozdziale 4.2.4.2. Wartości Cq uzyskane w programie CFX Manager™ Software dla sygnału telomerów oraz albuminy stanowiły podstawę dalszych obliczeń.

W pierwszym kroku obliczano średnią arytmetyczną Cq dwóch pomiarów technicznych (Cq<sub>tel1</sub>, Cq<sub>tel2</sub>):

Dla telomerów:

$$Cq_{tel} = \frac{Cq_{tel1} + Cq_{tel2}}{2}$$

Dla albuminy:

$$Cq_{alb} = \frac{Cq_{alb1} + Cq_{alb2}}{2}$$

Następnie obliczano  $\Delta Cq$ :

$$\Delta Cq = Cq_{tel} - Cq_{alb}$$

Które posłużyło do obliczenia  $\Delta\Delta Cq$  badanej grupy: od wartości  $\Delta Cq$  danej próby odejmowano wartość  $\Delta Cq_{\text{śr}}$ , będącą średnią arytmetyczną wszystkich  $\Delta Cq$  w danej serii:

$$\Delta\Delta Cq_A = \Delta Cq_A - \Delta Cq_{\text{śr}}$$

Następnie wartości  $\Delta\Delta Cq$  zamieniano na wartości liniowe. Dla próby A:

$$A = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Te, posłużyły do określenia wartości stosunku długości telomerów pomiędzy badanymi grupami oraz obliczeń istotności statystycznych, wykonanych za pomocą testu t-Studenta (dwustronny, dla zmiennych losowych). Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p \leq 0,05$ .

#### **4.5.2 Telomery ludzkie**

Wykorzystano DNA z krwi osób z niedoborem genu *Cbs* oraz osób zdrowych (Rozdział 3.4.1). Długość telomerów określano metodą opisaną w rozdziale 4.2.4.2. Uzyskane w programie CFX Manager™ Software wartości  $Cq$  dla sygnału telomerów oraz albuminy stanowiły podstawę dalszych obliczeń (Rozdział 4.5.1).

#### **4.6 Pomiar ilości mitochondrialnego DNA u myszy**

Wykorzystano krew myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i WT. DNA izolowano metodą fenolową (Rozdział 4.2.1) a ilość mitochondrialnego DNA określano metodą opisaną w rozdziale 4.2.4.3. Wartości  $Cq$  uzyskane w programie CFX Manager™ Software dla sygnału mitochondrialnego DNA oraz genu referencyjnego B2M stanowiły podstawę dalszych obliczeń. Zastosowano metodę  $\Delta\Delta Ct$  (Livak and Schmittgen 2001). Istotność statystyczną określano przy pomocy testu t-Studenta (dwustronny, dla zmiennych losowych). Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p \leq 0,05$ .

#### **4.7 Pomiar mRNA markerów senescencji**

Względna ilość mRNA określano metodą qPCR (Rozdział 4.2.4.1). Wykorzystano mRNA z wątrób i mózgów myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i WT. RNA izolowano z wykorzystaniem odczynnika 3-Zone (Rozdział 4.1.1), traktowano DNazą (Rozdział 4.1.3) a uzyskane RNA poddawano odwrotnej transkrypcji (Rozdział



4.1.4). Mierzono względną ilość mRNA genów: *Mcp1*, *Il-6*, *p21*, *Pai-1*, *Tert* oraz *Kl*, jako referencję wykorzystano mRNA  $\beta$ -aktyny. Wartości C<sub>q</sub> uzyskane w programie CFX Manager™ Software dla sygnału markerów RNA oraz genu referencyjnego stanowiły podstawę dalszych obliczeń. Zastosowano metodę  $\Delta\Delta$ Ct (Livak and Schmittgen 2001). Istotność statystyczną określano przy pomocy testu t-Studenta (dwustronny, dla zmiennych losowych). Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p \leq 0,05$ .

#### **4.8 Pomiar mRNA *Glod4* u myszy**

Względną ilość mRNA określano metodą qPCR (Rozdział 4.2.4.1). Wykorzystano mRNA z mózgow myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> oraz *Blmh*<sup>+/+</sup>. RNA izolowano z wykorzystaniem odczynnika 3-Zone (Rozdział 4.1.1), traktowano DNazą (Rozdział 4.1.3) a uzyskane RNA poddawano odwrotnej transkrypcji (Rozdział 4.1.4). Mierzono względną ilość mRNA *Glod4*: izoforma 1, izoforma 2, izoforma 3 (Załącznik 9.2), jako referencję wykorzystano mRNA  $\beta$ -aktyny oraz *Gapdh*. Wartości C<sub>q</sub> uzyskane w programie CFX Manager™ Software dla sygnału mRNA *Glod4* oraz genu referencyjnego stanowiły podstawę dalszych obliczeń. Zastosowano metodę  $\Delta\Delta$ Ct (Livak and Schmittgen 2001). Istotność statystyczną określano przy pomocy testu t-Studenta (dwustronny, dla zmiennych losowych). Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p \leq 0,05$ .

#### **4.9 Pomiar mRNA *GLOD4* u ludzi**

Względną ilość mRNA określano metodą qPCR (Rozdział 4.2.4.1). Wykorzystano mRNA z mózgow ludzi z chorobą Alzheimera i osób zdrowych (Rozdział 4.3.2 ). RNA izolowano z wykorzystaniem odczynnika 3-Zone (Rozdział 4.1.1), traktowano DNazą (Rozdział 4.1.3) a uzyskane RNA poddawano odwrotnej transkrypcji (Rozdział 4.1.4). Mierzono względną ilość mRNA *Glod4*: izoforma 1, izoforma 2, izoforma 3 (Załącznik 9.1), jako referencję wykorzystano mRNA  $\beta$ -aktyny, *GAPDH* oraz *XPNPEP1*. Wartości C<sub>q</sub> uzyskane w programie CFX Manager™ Software dla sygnału mRNA *Glod4* oraz genu referencyjnego stanowiły podstawę dalszych obliczeń. Zastosowano metodę  $\Delta\Delta$ Ct (Livak and Schmittgen 2001). Istotność statystyczną określano przy pomocy testu t-Studenta (dwustronny, dla zmiennych losowych). Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p \leq 0,05$ .

#### 4.10 Pomiar ilości białka GLOD4

Względna ilość białka określano metodą Western blotting (Rozdział 4.3.4). Wykorzystano materiał mózgow myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> oraz *Blmh*<sup>+/+</sup> (Rozdział 3.3.1) oraz mózgow ludzi z chorobą Alzheimera i kontroli (Rozdział 3.4.2). Zastosowano przeciwciała: anty-Glod4 (OAGA00314, AVIVA) - specyficzne wobec środkowej części łańcucha białka ludzkiego, anty-Glod4 (NBP2-60713, Novus Biologicals) - skierowane wobec fragmentowi od 263 do 313 aminokwasu ludzkiego białka Glod4, anty- $\beta$ -aktyna (EPR16769, Abcam) - skierowane wobec fragmentowi od 50 do 150 aminokwasu ludzkiej  $\beta$ -aktyny, anty-GAPDH (PLA0125, Sigma) – skierowane wobec aminokwasów 250-300 ludzkiego GAPDH oraz przeciwciało anty-królik (7074, Cell Signaling). Względna ilość białka Glod4 w grupie myszy, określano jako średnią arytmetyczną stosunków intensywności prążka Glod4 do intensywności prążka  $\beta$ -aktyny. Istotność statystyczną określano przy pomocy testu t-Studenta (dwustronny, dla zmiennych losowych). Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p \leq 0,05$ .

#### 4.11. Zastosowane metody statystyczne

W analizach statystycznych do porównania dwóch grup zmiennych wykorzystano dwustronny test t-Studenta. Związek pomiędzy wiekiem, poziomem homocysteiny i innymi zmiennymi był analizowany z użyciem korelacji Pearsona i regresji liniowej. Za pomocą regresji wielorakiej, sporządzono modele korelacji wybranych parametrów. Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p < 0,05$ . Używano programów Microsoft Excel oraz Statistica (StatSoft).

## 5 Wyniki

### 5.1 Analiza długości telomerów ludzi z deficytem CBS

Niedobór białka CBS u ludzi, jest przyczyną podwyższonego poziomu homocysteiny we krwi. Chorzy cierpią z powodu miażdżycy naczyń krwionośnych oraz ich niedrożności wywołanej przez skrzep. Konsekwencją jest skrócenie długości życia o ok 20-25% (przed 30-50 rokiem życia) (Mudd *et al.* 1985). Zbadano zatem czy telomery, ulegające skróceniu wraz z wiekiem, są związane również z przedwczesną śmiercią pacjentów o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup>.

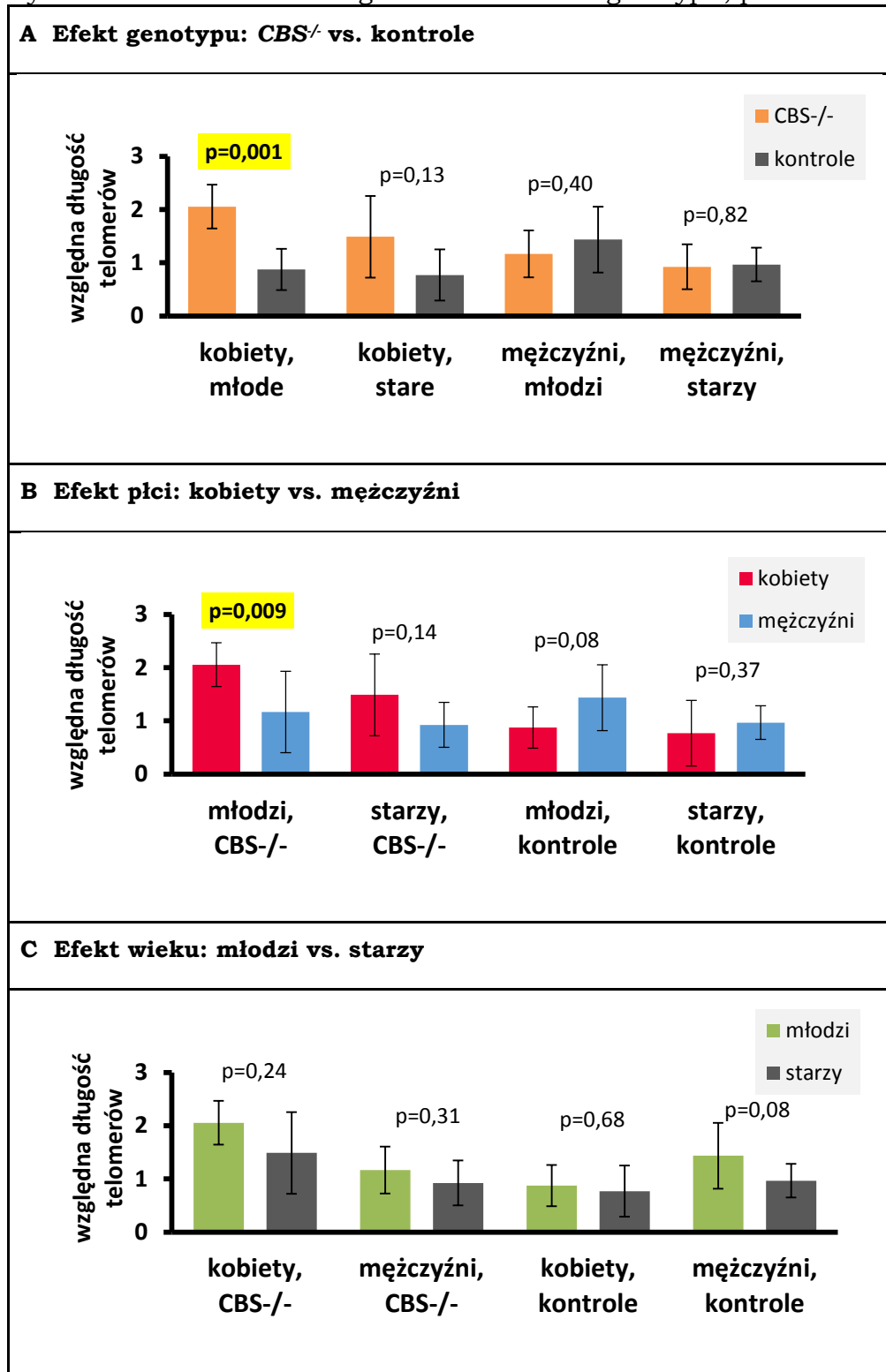
#### 5.1.1 Efekt hiperhomocysteinemii, wieku i płci na długość telomerów

Analizie poddano zależność długości telomerów od wieku, płci i poziomu homocysteiny u pacjentów genotypie *CBS*<sup>-/-</sup> i dopasowanych do nich, względem wieku i płci, osób stanowiących kontrolę w badaniu. Analizę wykonano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Podziału na osoby “stare” i “młode” dokonano na podstawie mediany wieku wszystkich uczestników badania, która wyniosła 28,5 roku.

Zaobserwowano wpływ genotypu na długość telomerów: młode kobiety o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup> miały dłuższe telomery niż młode kobiety zdrowe (odpowiednio: 2,06 vs. 0,88,  $p=0,001$ ). Zależność ta występowała także w grupie kobiet starych ale nie była statystycznie istotna ( $p=0,13$ ). Przeciwnie, w żadnej z grup męskich nie obserwowano wpływu genotypu na długość telomerów (Rysunek 5.1 A).

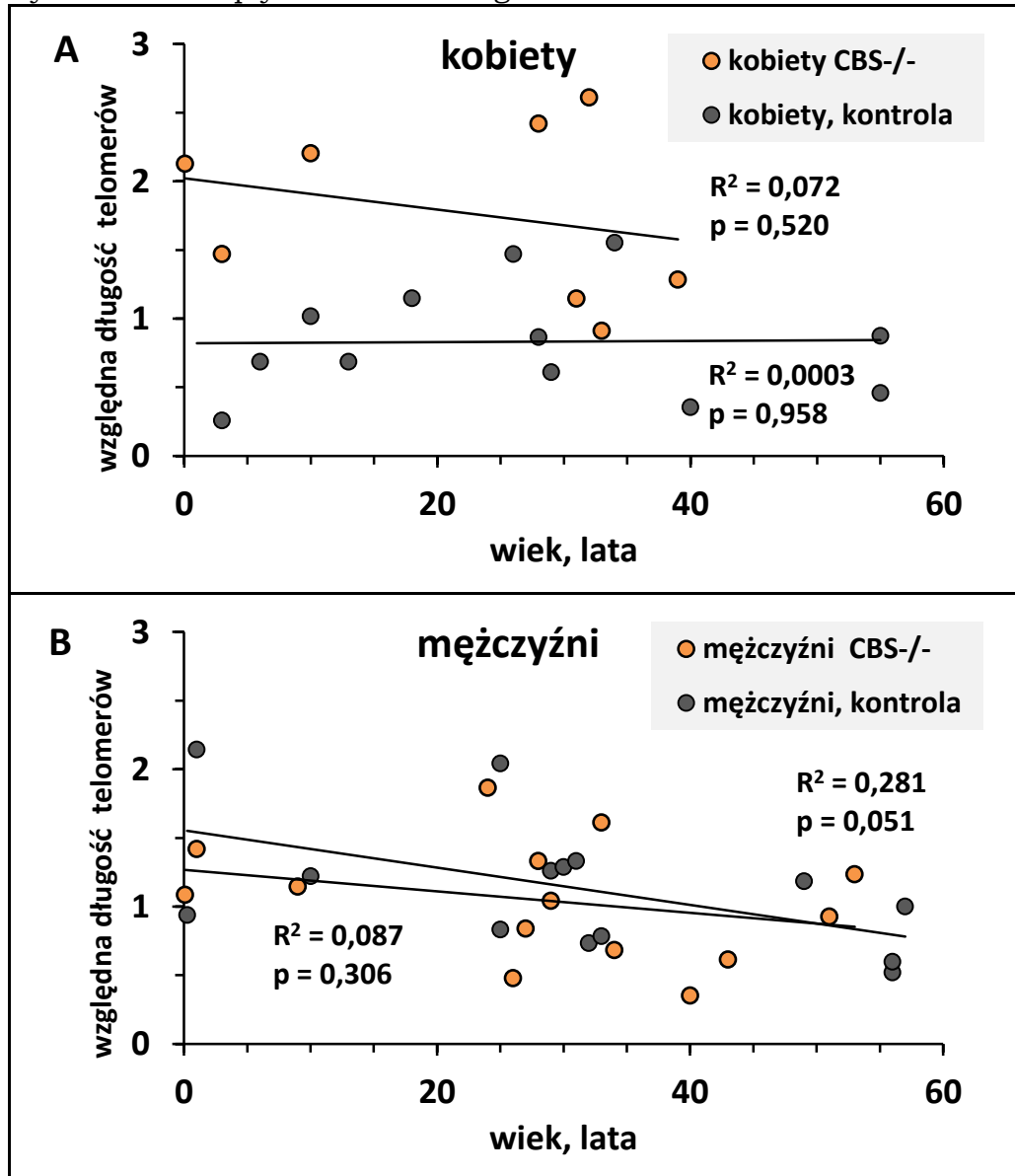
W grupie osób młodych o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup> kobiety miały dłuższe telomery niż mężczyźni (2,06 vs. 1,17,  $p=0,009$ ). Jednak, w pozostałych grupach (młodych i starych osób zdrowych, starych osób o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup>) zależność wpływu płci na długość telomerów nie została znaleziona. U mężczyzn stanowiących kontrolę w badaniu znaleziono trend skracania telomerów wraz z wiekiem ( $p=0,008$ ). W pozostałych grupach nie zaobserwowano zależności długości telomerów od wieku.

Rysunek 5.1. Zależność długości telomerów od genotypu, płci i wieku u ludzi



Sprawdzono także czy istnieje liniowa korelacja pomiędzy długością telomerów a poziomem Hcy, osobno u kobiet i mężczyzn. W żadnym przypadku nie uzyskano zależności istotnej statystycznie, przy czym zauważono tendencję do skracania długości telomerów wraz z wiekiem u zdrowych mężczyzn ( $p=0,051$ ), ale nie u kobiet ( $p=0,958$ ) (Rysunek 5.2).

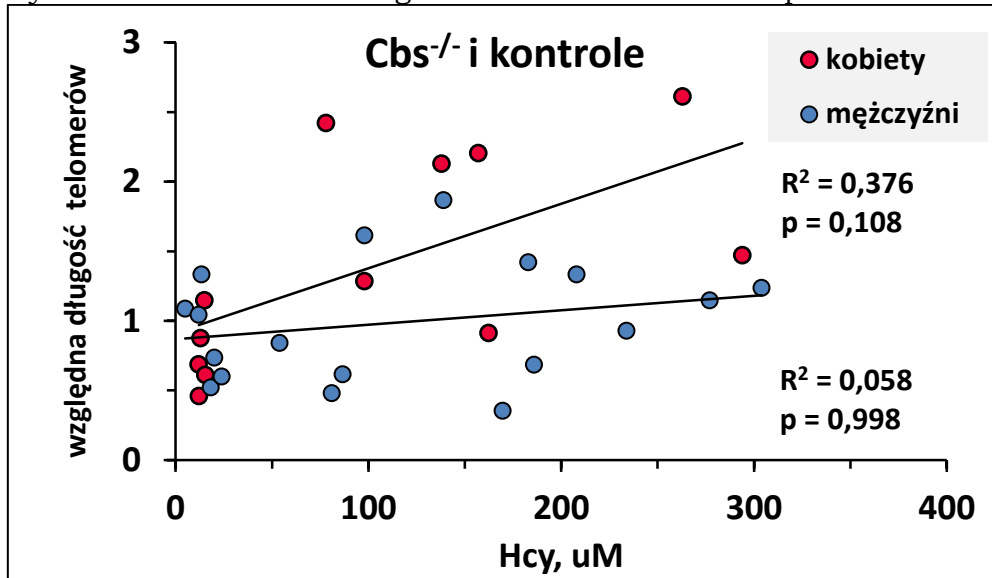
Rysunek. 5.2 Wpływ wieku na długość telomerów u ludzi.



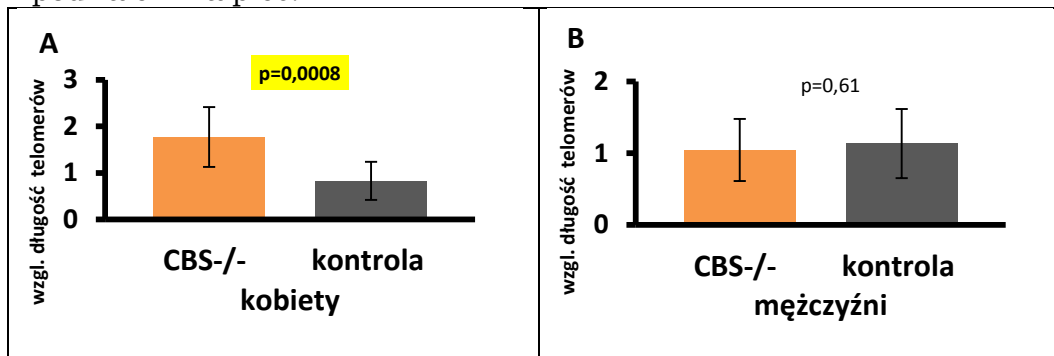
Zbadano również liniową zależność długości telomerów od poziomu Hcy. Poziom Hcy w osoczu został zmierzony przez pracowników instytutu w Pradze, skąd pochodziły próby DNA (Rozdział 3.4.1), i wskazywał w większości przypadków na ciężką HHcy. Wykazano że, nie istnieje istotna statystycznie korelacja liniowa długości telomerów od poziomem Hcy ( $p=0,108$  dla kobiet,  $p=0,998$  dla mężczyzn) (Rysunek 5.3). Analiza testem t-Studenta wykazała

jednak że, przy ciężkiej HHcy, która jest charakterystyczna dla osób o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup>, telomery kobiet o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup> były istotnie dłuższe niż te u kobiet grupy kontrolnej ( $p=0,0008$ ) (Rysunek 5.4 A). U mężczyzn genotyp *CBS* nie był przyczyną zmienności długości telomerów (Rysunek 5.4 B).

Rysunek 5.3 Zależność długości telomerów u ludzi od poziomu homocysteiny.



Rysunek 5.4 Zależności długości telomerów od genotypu *CBS* u ludzi, z podziałem na płeć.



### 5.1.2 Determinanty długości telomerów u ludzi - regresja wieloraka

Związek LTL i zmiennych niezależnych (płci, wieku, poziomu Hcy oraz genotypu *Cbs*) został przedstawiony w Tabeli 5.1. Korelacja Pearsona dla grupy badanej: pacjentów *Cbs*<sup>-/-</sup> i osób zdrowych, wskazuje że LTL jest skorelowana z tHcy (pozytywnie), genotypem *Cbs* (dłuższe telomery u pacjentów *Cbs*<sup>-/-</sup> w porównaniu do osób kontrolnych), płcią (dłuższe u kobiet niż u mężczyzn) i wiekiem (negatywnie). W grupie kobiet, LTL jest skorelowana: pozytywnie z poziomem tHcy w osoczu, i genotypem *Cbs*. U mężczyzn nie obserwowano zależności istotnej statystycznie (Tabela 5.1).

Dzięki regresji wielorakiej możliwe było ustalenie parametrów w największym stopniu wpływających na długość telomerów. Parametry mające niewielki wpływ, usuwano – pozostawiając jedynie te, tworzące najlepszy model. Analiza z wykorzystaniem regresji wielorakiej (Tabela 5.1) wskazuje że, tHcy i płeć są determinantami LTL, podczas gdy wiek jest negatywnie związany ze skracaniem długości telomerów, a ich wspólny model wyjaśnia 46% zmienności długości telomerów. W grupie kobiet, determinantem długości telomerów był genotyp *Cbs*. Wiek był negatywnym determinantem długości telomerów u mężczyzn ale nie u kobiet. Wraz z genotypem wyjaśniał 19% zmienności długości telomerów u mężczyzn.

Tabela 5. 1 Determinanty długości telomerów u pacjentów *Cbs*<sup>-/-</sup> i osób zdrowych.

	korelacja Pearsona		regresja wieloraka			
			model 1: Hcy		model 2: genotyp <i>Cbs</i>	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
kobiety (n=22)						
wiek	-0,44	0,152	-0,18	0,551	-0,17	0,373
Hcy	0,61	<b>0,034</b>	0,52	0,110		
genotyp <i>Cbs</i>	-0,73	<b>0,008</b>			-0,54	<b>0,009</b>
			F = 3,02, <i>P</i> = 0,099, R <sup>2</sup> = 0,27		F = 4,92, <i>P</i> = <b>0,019</b> , R <sup>2</sup> = 0,34	
mężczyźni (n=29)						
wiek	-0,42	0,091	-0,42	0,089	-0,43	<b>0,026</b>
Hcy	0,28	0,273	0,28	0,245		
genotyp <i>Cbs</i>	-0,28	0,272			0,13	0,469
			F = 2,42, <i>P</i> = 0,125, R <sup>2</sup> = 0,26		F = 2,94, <i>P</i> = 0,071, R <sup>2</sup> = 0,19	
obie płcie (n=51)						
płeć	0,48	<b>0,009</b>	0,46	<b>0,005</b>	0,34	<b>0,012</b>
wiek	-0,41	<b>0,026</b>	-0,29	0,067	-0,25	0,061
Hcy	0,37	<b>0,047</b>	0,33	<b>0,035</b>		
genotyp <i>Cbs</i>	-0,41	<b>0,026</b>			-0,23	0,073
			F = 7,19, <i>P</i> = <b>0,001</b> , R <sup>2</sup> = 0,46		F = 5,13, <i>P</i> = <b>0,004</b> , R <sup>2</sup> = 0,20	

$\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej, F – miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy, R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

## 5.2 Analiza markerów starzenia się u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>

Niedobór  $\beta$ -synatzy cystationiny (CBS) jest rzadką chorobą metaboliczną, która powoduje podwyższenie stężenia Hcy we krwi oraz skraca długość życia u ludzi. Podobnie, myszy TgI278T *Cbs*<sup>-/-</sup>, genetycznie pozbawione aktywności białka *Cbs*, żyją krócej niż myszy typu dzikiego (Gupta *et al.* 2009). Wiadomo, że wraz z wiekiem skróceniu ulegają telomery, dlatego też postuluje się, że mogą być one wyznacznikiem długości życia (Sanders *et al.* 2012).

Celem badań było ustalenie czy skrócenie długości życia myszy Tg-I278T *Cbs*<sup>-/-</sup> jest spowodowane ich przedwczesnym starzeniem się. Zmierzono długość telomerów i poziom mRNA telomerazy - odpowiedzialnej za wydłużanie telomerów, określono poziom mRNA markerów senescencji oraz mRNA *Klotho* - będącego wskaźnikiem przeciwstarzeniowym, a także określono ilość mitochondrialnego DNA u tych myszy.

### 5.2.1. Wpływ genu *Cbs*<sup>-/-</sup> na długość telomerów

Analizie poddano myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz WT, obydwu płci. Długość telomerów mierzono we krwi, mózgu i wątrobie. Analizowano wpływ genotypu *Cbs*, płci, wieku oraz poziomu homocysteiny na długość telomerów u myszy.

Do pomiaru długości telomerów w mózgu i wątrobie wykorzystano DNA od 43 myszy, 20 samic i 23 samców, w wieku 63-408 dni. Grupę, oznaczoną na wykresach jako osobniki "młode" stanowiły myszy w wieku 63-66 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki "stare" stanowiły myszy w wieku 354-408 dni.

Do pomiaru długości telomerów we krwi wykorzystano DNA 80 myszy, 40 samic i 40 samców, w wieku 36-473 dni. Grupę, oznaczoną na wykresach jako osobniki "młode" stanowiły myszy w wieku 36-77 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki "stare" stanowiły myszy w wieku 108-473 dni. Do poniższych analiz wykorzystano test t-Studenta.

#### 5.2.1.1 Genotyp *Cbs*<sup>-/-</sup> nie wpływa na długość telomerów u myszy

Porównywano osobniki o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz myszy typu dzikiego w grupie młodych samców, starych samców, młodych samic i starych samic (Rysunek 5.5 A-C). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w długości telomerów w żadnej z grup w mózgu, wątrobie, krwi.



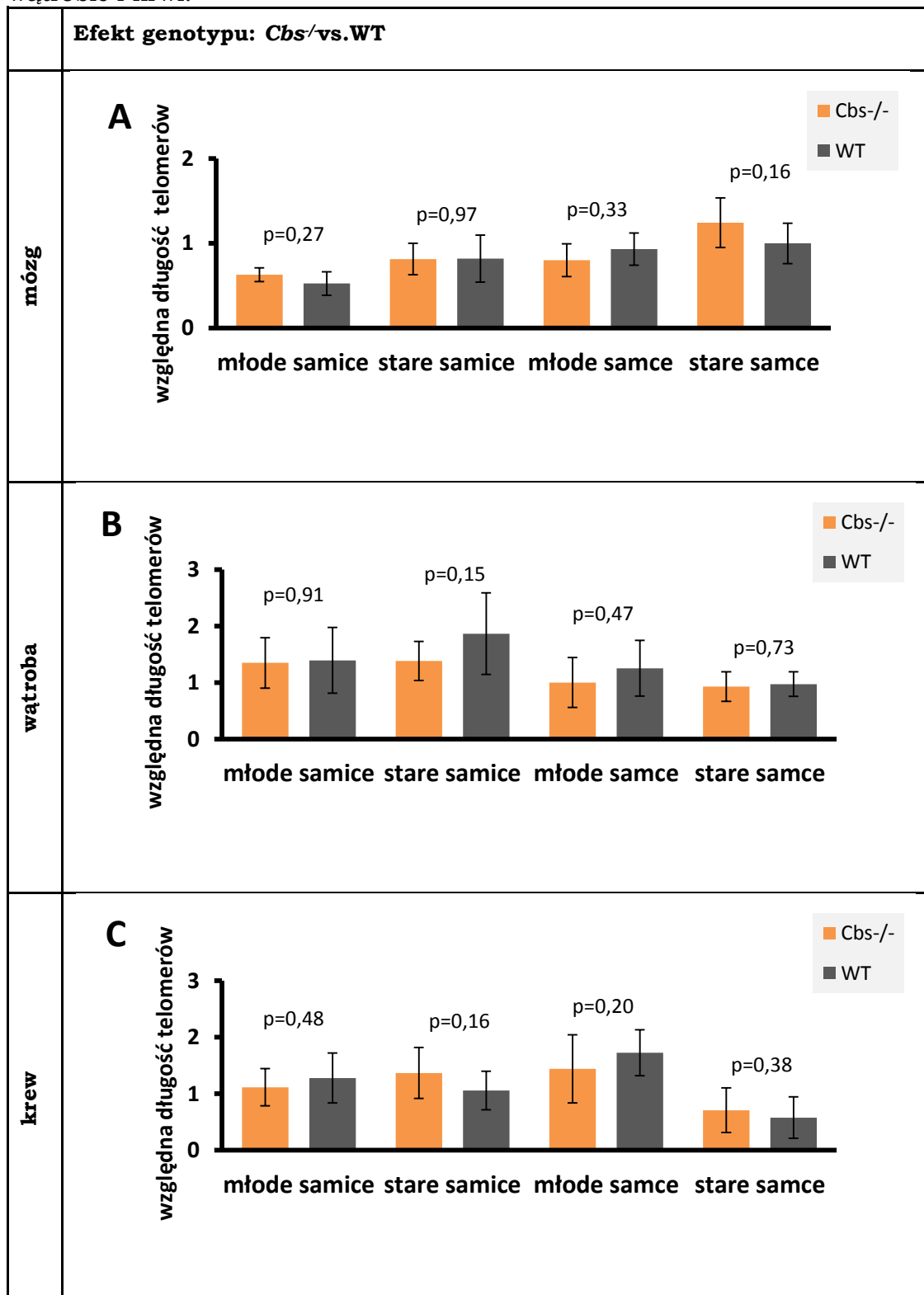
### **5.2.1.2. Płeć istotnie wpływa na długość telomerów u myszy**

Porównywano samice i samców w grupie młodych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, starych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, młodych myszy typu dzikiego i starych myszy typu dzikiego (Rysunek 5.6 A-C). Istotne różnice w długości telomerów zaobserwowano głównie u starych osobników. W mózgu starych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> telomery były krótsze niż u starych samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (0,84 vs. 1,24,  $p=0,01$ ), natomiast w wątrobie i krwi odwrotnie - samice miały dłuższe telomery; odpowiednio: w wątrobie: 1,38 vs. 0,93,  $p=0,01$  oraz we krwi: 1,4 vs. 0,7,  $p=0,02$ . Podobnie dla starych myszy typu dzikiego: w wątrobie i we krwi, telomery były dłuższe u samic: 1,87 vs. 0,97,  $p=0,02$  oraz 1,2 vs. 0,6,  $p=0,02$ ; natomiast w mózgu nie zaobserwowano różnic w długości telomerów między płciami. U młodych myszy, jedynie w mózgu, zaobserwowano różną długość telomerów w zależności od płci - młode samice miały krótsze telomery niż młode samce (0,53 vs. 0,93,  $p=0,02$ ).

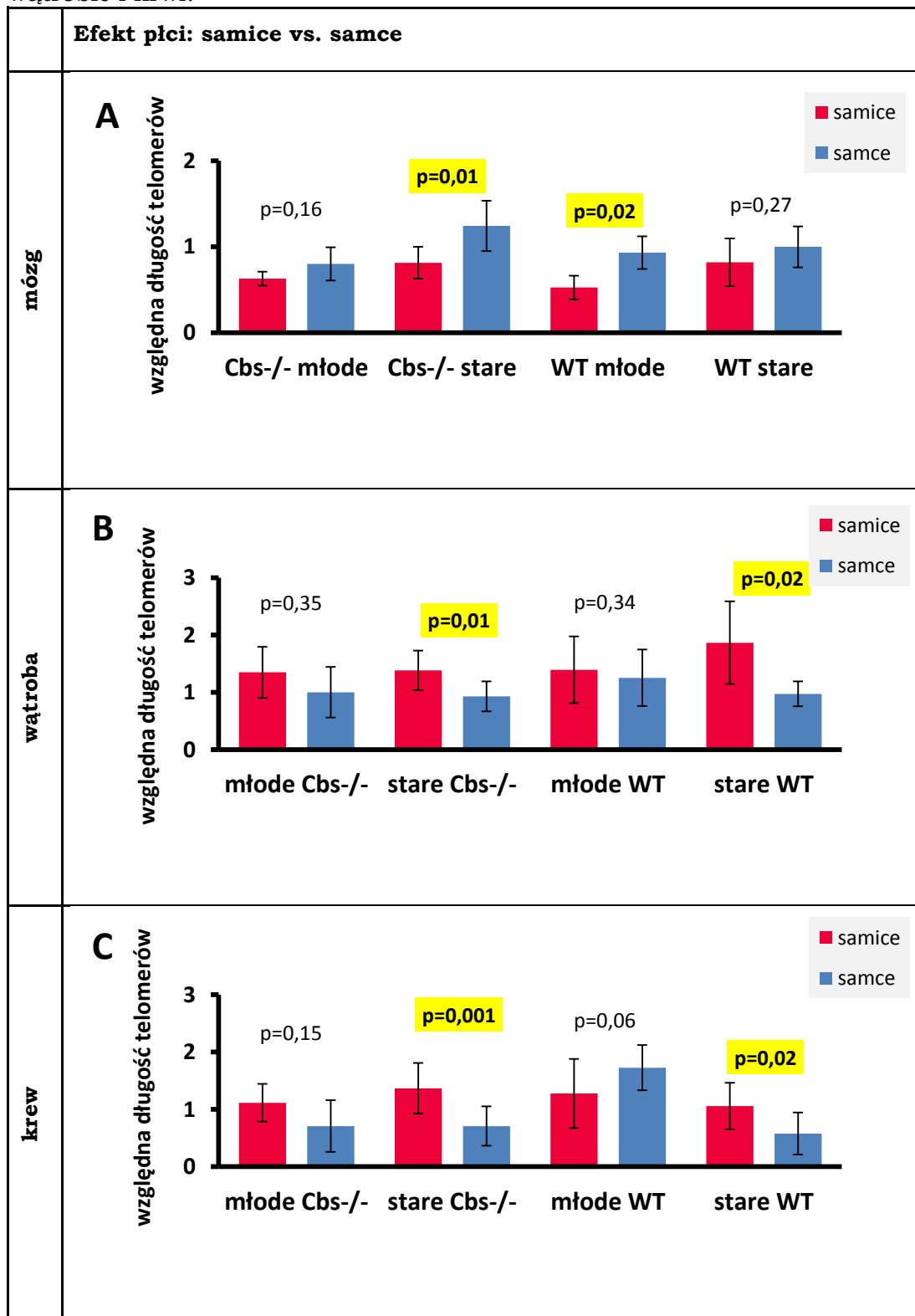
### **5.2.1.3 Wiek jest predyktorem LTL u myszy**

Porównywano długość telomerów u osobników młodych i starych w grupie samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, samic typu dzikiego i samców typu dzikiego (Rysunek 5.7 A-C). Istotne różnice długości telomerów zaobserwowano we krwi. Zarówno u samców *Cbs*<sup>-/-</sup> jak i typu dzikiego telomery były dłuższe u młodych osobników: 1,4 vs. 0,7,  $p=0,0007$  oraz 1,7 vs. 0,6,  $p=0,000005$ , odpowiednio dla *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego.

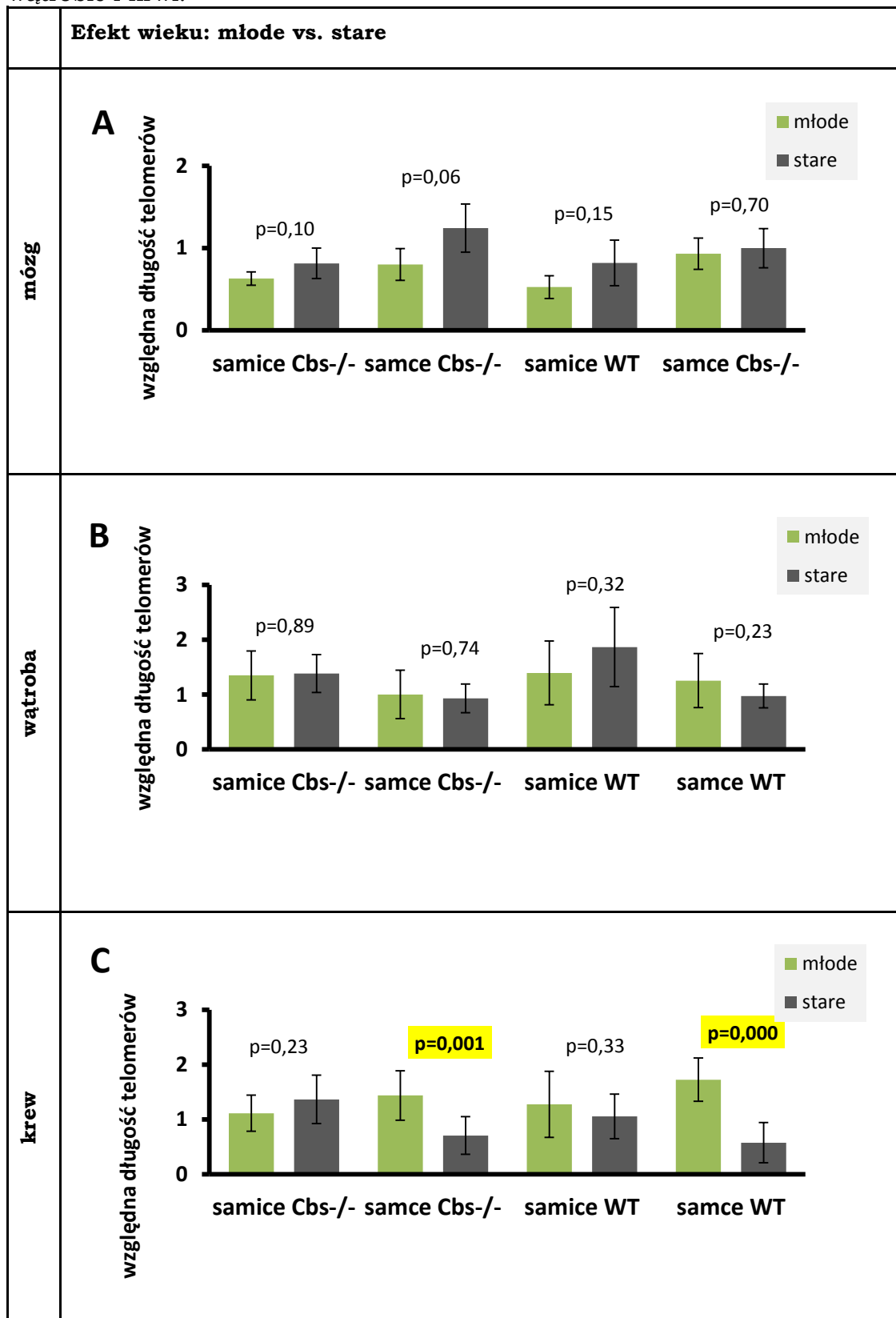
Rysunek 5.5. Zależność długości telomerów od genotypu u myszy, w mózgu, wątrobie i krwi.



Rysunek 5.6. Zależność długości telomerów od płci u myszy, w mózgu, wątrobie i krwi.



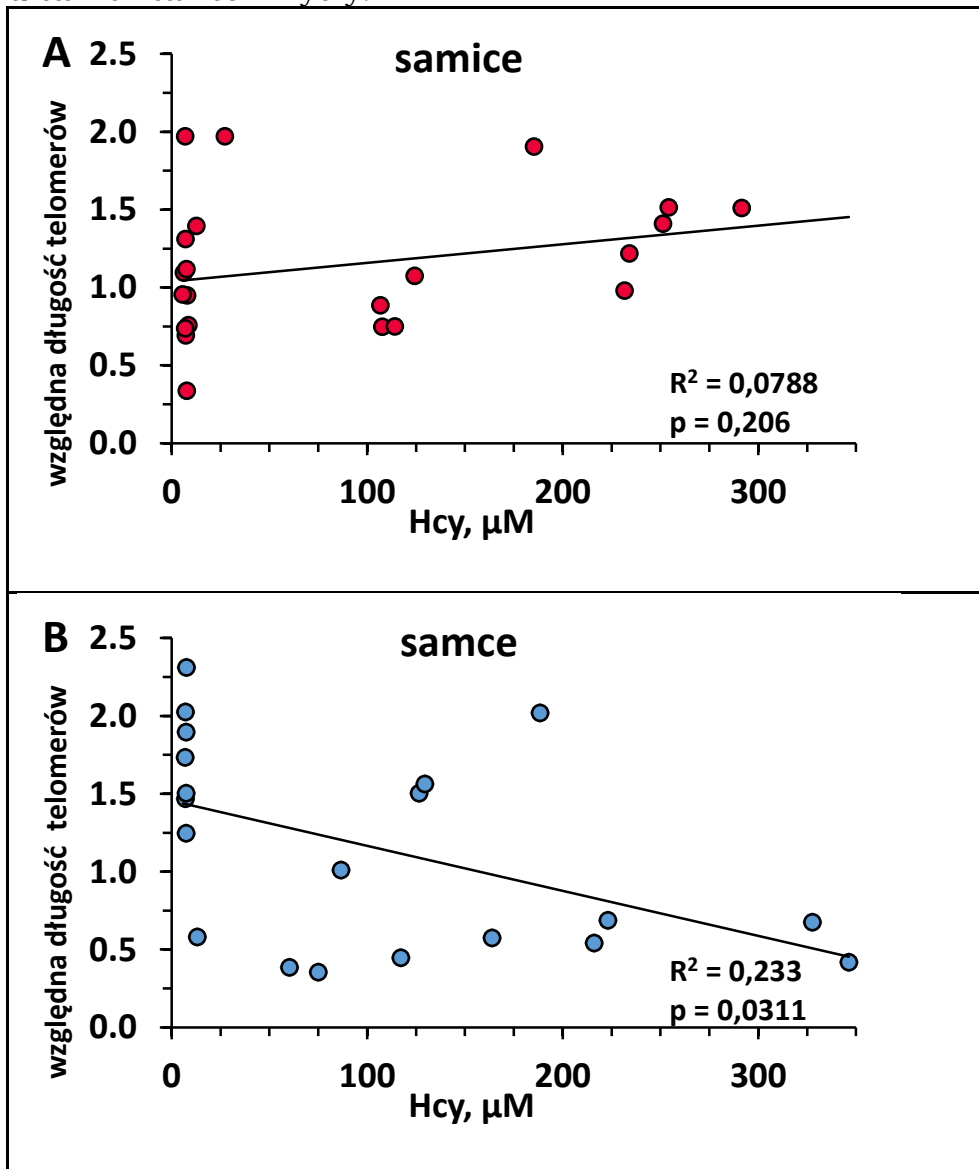
Rysunek 5.7. Zależność długości telomerów od wieku u myszy, w mózgu, wątrobie i krwi.



### 5.2.2 Wpływ poziomu homocysteiny na długość telomerów we krwi

Porównano względną długość telomerów we krwi i poziom całkowitej Hcy w osoczu myszy. Zbadano krew i osocze 43 myszy, 23 samic i 20 samców, zarówno *Cbs*<sup>-/-</sup> jak i typu dzikiego (Rysunek 5.8 A, B). Jedyne u samców zauważono istotną, ujemną korelację tych dwóch parametrów - ich telomery ulegają skróceniu wraz ze wzrostem poziomu homocysteiny. W przypadku samic nie zaobserwowano korelacji istotnych statystycznie ( $p=0,206$ ).

Rysunek 5.8. Wpływ poziomu homocysteiny na długość telomerów we krwi u samic i samców myszy.



### 5.2.3 Determinanty długości telomerów u myszy – analiza wieloraka

Związek długości telomerów w leukocytach (LTL) i wybranych zmiennych, został przedstawiony w Tabeli 5.2. W analizach, poza genotypem *Cbs*,

poziomem Hcy, wiekiem i płcią uwzględniono także mRNA *Tert* oraz mtDNA. Telomeraza (*Tert*) wpływa na długość telomerów poprzez ich wydłużanie, a poziom mtDNA rośnie wraz z wiekiem. Determinanty obydwu, zostały opisane w rozdziale 5.2.4. oraz 5.2.5.

Korelacja Pearsona dla grupy badanej, myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i myszy typu dzikiego, wskazuje że długość telomerów w mózgu była skorelowana z wiekiem myszy, płcią oraz poziomem mRNA *Tert* w całej grupie myszy. W grupach osobno, samic i samców istotnie różne były długości telomerów w zależności od wieku myszy. W wątrobie, LTL była skorelowana z płcią i mRNA *Tert*, dla całej grupy myszy i skorelowana jedynie z mRNA *Tert* u samic. U samców, analiza nie wykazała istotnych statystycznie korelacji długości telomerów z żądą, z wymienionych powyżej, zmiennych. We krwi, w grupie wszystkich myszy, LTL jest skorelowana z mtDNA, natomiast u samców na LTL istotnie wpływa wiek oraz ilość mtDNA.

Analiza za pomocą regresji wielorakiej (Tabela 5.2, 5.3, 5.4) miała za zadanie znalezienie modelu, w największym stopniu oddającego zależności długości telomerów od zbadanych zmiennych niezależnych. Z tego powodu, czynniki wpływające na model w najmniejszym stopniu były z niego usuwane. Wykazano że w mózgu: wiek i płeć są determinantami długości telomerów ( $p=0,001$  i  $p=0,000$  odpowiednio). U samców także genotyp *Cbs*, choć w mniejszym stopniu, wpływa na długość telomerów ( $p=0,059$ ) (Tabela 5.2).

W wątrobie, determinantem długości telomerów (TL) jest przede wszystkim mRNA *Tert*, płeć i wiek, (we wszystkich  $p<0,030$ ) i to zarówno dla całej grupy myszy jak i u samic. U samców nie znaleziono istotnych statystycznie zależności TL i wieku, genotypu *Cbs*, mRNA *Tert* oraz mtDNA (Tabela 5.3).

Długość telomerów zbadano również we krwi (Tabela 5.4). Regresję wieloraką wykonano w oparciu o dwa modele danych: pierwszy, uwzględniający poziom Hcy i drugi, uwzględniający genotyp *Cbs*. W obu, na LTL u samców negatywnie wpływał wiek, u samic również, choć zależność ta nie była statystycznie istotna. Cały model, uwzględniający poziom homocysteiny w przeciwieństwie do tego, uwzględniającego genotyp *Cbs* był statystycznie istotny. Determinantami długości telomerów był w nim poziom mtDNA, a wyniki odnosiły się do całej grupy myszy (Tabela 5.4).

Tabela 5.2 Względna długość telomerów w mózgu myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – regresja wieloraka.

	korelacja Pearsona		regresja wieloraka	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
<b>samicie</b>	n=20			
wiek	<b>0,49</b>	<b>0,040</b>	<b>0,66</b>	<b>0,011</b>
genotyp <i>Cbs</i>	-0,23	0,363		
mRNA <i>Tert</i>	-0,24	0,331		
mtDNA	0,001	0,996		
			F = 4,12, <i>P</i> = 0,036, R <sup>2</sup> = 0,26	
<b>samicie</b>	n=23			
wiek	<b>0,58</b>	<b>0,015</b>	<b>0,65</b>	<b>0,007</b>
genotyp <i>Cbs</i>	-0,37	0,146	-0,42	0,059
mRNA <i>Tert</i>	-0,05	0,836	0,31	0,180
mtDNA	0,06	0,829		
			F = 4,60, <i>P</i> = 0,021, R <sup>2</sup> = 0,51	
<b>obie płcie</b>	n=43			
płeć	<b>-0,56</b>	<b>0,000</b>	<b>-0,73</b>	<b>0,000</b>
wiek	<b>0,44</b>	<b>0,009</b>	<b>0,52</b>	<b>0,001</b>
genotyp <i>Cbs</i>	-0,17	0,332	-0,24	0,075
mRNA <i>Tert</i>	<b>-0,35</b>	<b>0,041</b>	0,12	0,440
mtDNA	0,27	0,112	-0,20	0,205
			F = 8,15, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,51	

$\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej,  
 F – miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy,  
 R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

Tabela 5.3 Względna długość telomerów w wątrobie myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – regresja wieloraka.

	korelacja Pearsona		regresja wieloraka	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
<b>samice</b>	n=20			
wiek	0,20	0,402	<b>-0,99</b>	<b>0,019</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,27	0,262		
mRNA <i>Tert</i>	<b>0,49</b>	<b>0,035</b>	<b>1,02</b>	<b>0,006</b>
mtDNA	0,36	0,125	0,54	0,0504
			F = 4,84, <i>P</i> = 0,015, R <sup>2</sup> = 0,49	
<b>samce</b>	n=23			
wiek	-0,29	0,195	-0,57	-0,108
genotyp <i>Cbs</i>	0,20	0,366		
mRNA <i>Tert</i>	-0,08	0,727	0,37	0,292
mtDNA	0,04	0,860		
	NS			
<b>obie płcie</b>	n=43			
płeć	<b>0,48</b>	<b>0,002</b>	<b>0,30</b>	<b>0,030</b>
wiek	-0,02	0,902	<b>-0,66</b>	<b>0,002</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,17	0,279		
mRNA <i>Tert</i>	<b>0,42</b>	<b>0,006</b>	<b>0,67</b>	<b>0,001</b>
mtDNA	0,14	0,374	0,29	0,067
			F = 8,40, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,43	

$\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej,  
 F - miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy,  
 R<sup>2</sup> - współczynnik determinacji, NS - model statystycznie nieistotny



Tabela 5.4 Względna długość telomerów we krwi myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – regresja wieloraka.

	korelacja Pearsona		regresja wieloraka			
			model 1: Hcy		model 2: genotyp <i>Cbs</i>	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
<b>samice</b>	n=40					
wiek	0,26	0,191	0,33	0,160	0,21	0,253
genotyp <i>Cbs</i>	-0,05	0,799			-0,06	0,708
<i>tHcy</i>	-0,02	0,936	-0,15	0,512		
mtDNA	-0,02	0,920	0,03	0,902	-0,07	0,681
	NS			NS		
<b>samce</b>	n=40					
wiek	<b>-0,76</b>	<b>0,000</b>	<b>-0,60</b>	<b>0,003</b>	<b>-0,47</b>	<b>0,015</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,40	0,059			0,09	0,550
<i>tHcy</i>	-0,31	0,148	0,09	0,690		
mtDNA	<b>0,64</b>	<b>0,001</b>	0,33	0,064	0,22	0,265
	F = 11,44, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,64			F = 7,52, <i>P</i> = 0,001, R <sup>2</sup> = 0,45		
<b>obie płcie</b>	n=80					
płeć	0,17	0,253	0,28	0,055	0,21	0,081
wiek	-0,31	0,157	-0,13	0,420	-0,15	0,268
genotyp <i>Cbs</i>	0,21	0,157			0,03	0,801
<i>tHcy</i>	-0,17	0,240	-0,04	0,800		
mtDNA	<b>0,38</b>	<b>0,008</b>	<b>0,43</b>	<b>0,012</b>	0,20	0,152
	F = 2,84, <i>P</i> = 0,026, R <sup>2</sup> = 0,25			NS		

$\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej,

F – miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy,

R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji, NS – model statystycznie nieistotny

#### 5.2.4 Poziom mRNA telomerazy (*Tert*) w mózgu i wątrobie myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>

Telomeraza jest enzymem wydłużającym telomery. U ludzi, jej aktywność w komórkach somatycznych jest niewielka, za to u myszy efektywnie wydłuża telomery (Gorbunova and Seluanov 2009).

Celem tego badania było ustalenie determinant mRNA *Tert*. Do pomiaru poziomu mRNA *Tert* w mózgu i wątrobie myszy wykorzystano 43 myszy, 20 samic i 23 samce, w wieku 63-408 dni. Grupę, oznaczoną jako osobniki “młode” stanowiły myszy w wieku 63-66 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki “stare” stanowiły myszy w wieku 354-408 dni.

##### 5.2.4.1 *Cbs*<sup>-/-</sup> obniża ekspresję *Tert* u młodych myszy

Genotyp *Cbs* miał największy wpływ na ekspresję *Tert* na poziomie mRNA u młodych osobników męskich (Rysunek 5.5 A, B) - zarówno w wątrobie jak i mózgu poziom mRNA *Tert* był niższy, u tych o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup>. Ponadto

w mózgu u starych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> poziom mRNA *Tert* był znacznie niższy niż u starych samic typu dzikiego (1,05 vs. 1,80, p=0,016).

#### **5.2.4.2 Płeć wpływa na mRNA *Tert***

Efekt płci był widoczny głównie u starych osobników typu dzikiego (Rysunek 5.5 C, D). Poziom mRNA *Tert* zarówno w mózgu jak i wątrobie był wyższy u samic. Zależność ta była prawdziwa również dla starych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, ale jedynie w wątrobie oraz u młodych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> w mózgu. Analiza wieloraka wykazała również związek płci i poziomu mRNA *Tert* w mysim mózgu (Tabela 5.2).

#### **5.2.4.3 Wiek wpływa na poziom mRNA *Tert* w wątrobie myszy**

Zależność ekspresji mRNA *Tert* od wieku była najwyraźniej widoczna w wątrobie. Podwyższony poziom mRNA *Tert* występował u osobników starych, w porównaniu do młodych: samic *Cbs*<sup>-/-</sup> (R=0,1), samic typu dzikiego (R=0,3), samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (R=0,2) i samców typu dzikiego (R=0,4). W przeciwieństwie do wątroby, w mózgu u młodych samców myszy typu dzikiego, ilość mRNA *Tert* była większa niż u samców starych (1,53 vs. 0,81, p=0,02) (Rysunek 5.5 E, F). Regresja wieloraka wykazała że wiek jest determinantem mRNA *Tert* w wątrobie, ale nie w mózgu (Tabela 5.5). W mózgu, poziom mRNA *Tert* był istotnie różny - zależny od płci myszy.

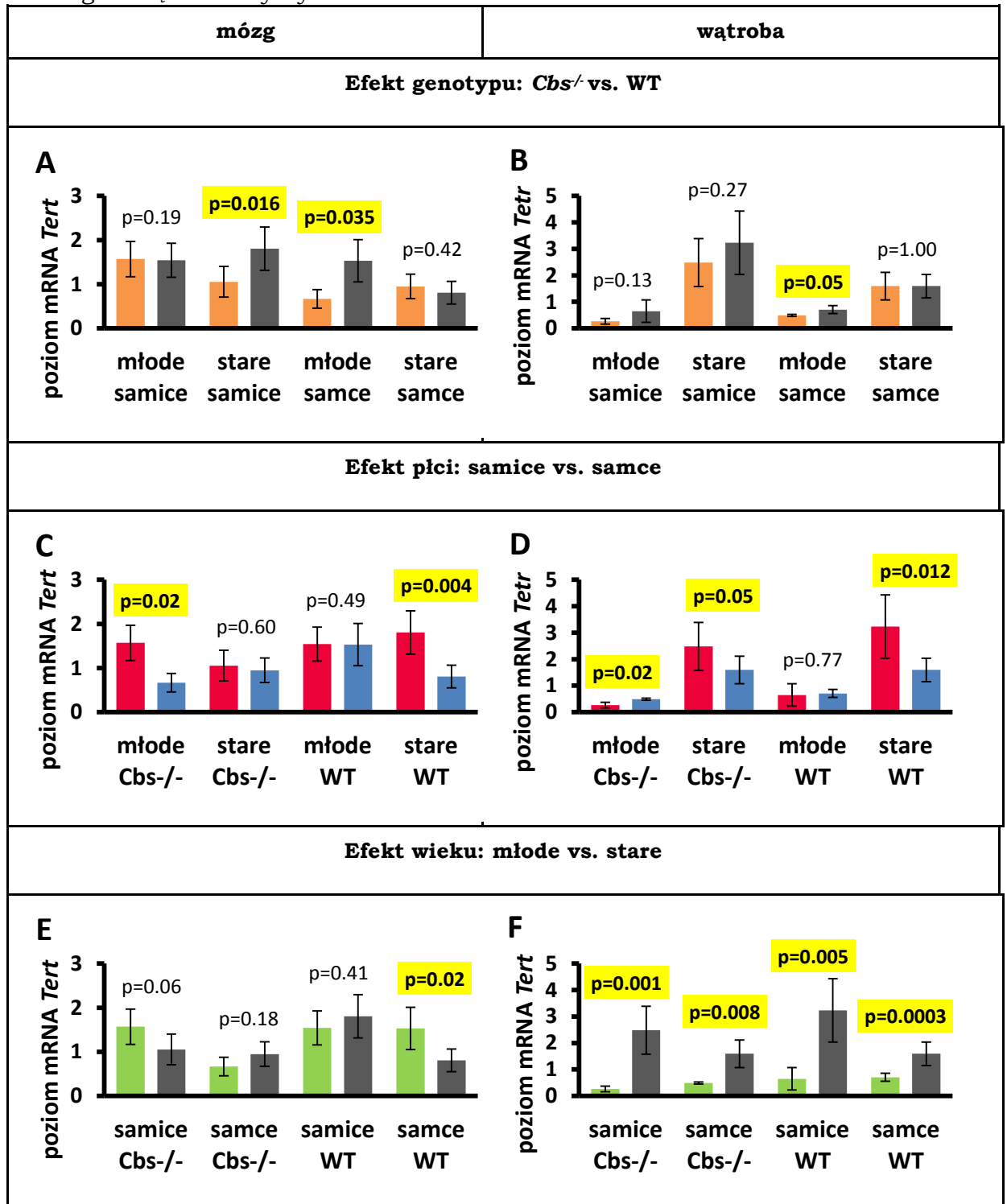
Rysunek 5.9. Zależność ilości mRNA *Tert* od genotypu *Cbs*, płci i wieku w mózgu i wątrobie myszy.

Tabela 5.5 Determinanty ekspresji *Tert* mRNA w mózgu i wątrobie myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – regresja wieloraka.

	Poziom mRNA <i>Tert</i> *			
	mózg		wątroba	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
<b>samice</b>	n=20		n=20	
wiek	-0,31	0,280	<b>0,74</b>	<b>0,000</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,19	0,453		
TL	0,08	0,765	<b>0,34</b>	<b>0,015</b>
mtDNA	0,26	0,371		
	NS		F = 25,58, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,76	
<b>samce</b>	n=23		n=23	
wiek	-0,67	0,196	<b>0,61</b>	<b>0,001</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,34	0,228		
TL	0,15	0,716		
mtDNA	0,34	0,245	0,301	0,068
	NS		F = 22,07, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,69	
<b>obie płcie</b>	n=43		n=43	
płeć	<b>-057</b>	<b>0,006</b>	-0,13	0,194
wiek	-0,34	0,070	<b>0,72</b>	<b>0,000</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,23	0,141		
TL	0,047	0,796	<b>0,37</b>	<b>0,000</b>
mtDNA	0,280	0,142		
	F = 2,95, <i>P</i> = 0,028, R <sup>2</sup> = 0,33		F = 28,86, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,695	

\* $\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej, F – miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy, R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji, NS – model statystycznie nieistotny

### 5.2.5 Poziom mitochondrialnego DNA u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>

Poziom mitochondrialnego DNA mierzono we krwi, mózgu i wątrobie u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz typu dzikiego, obydwu płci.

Do pomiaru ilości mtDNA w mózgu i wątrobie wykorzystano DNA od 43 myszy, 20 samic i 23 samców, w wieku 63-408 dni. Grupę, oznaczoną na wykresach jako osobniki “młode” stanowiły myszy w wieku 63-66 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki “stare” stanowiły myszy w wieku 354-408 dni.

Do pomiaru ilości mtDNA we krwi wykorzystano DNA od 75 myszy, 40 samic i 35 samców, w wieku 63-408 dni. Grupę, oznaczoną na wykresach jako osobniki “młode” stanowiły myszy w wieku 36-66 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki “stare” stanowiły myszy w wieku 354-408 dni. Istotność statystyczną różnic między dwoma grupami, analizowano testem t-Studenta.

#### **5.2.5.1 Genotyp *Cbs* wpływa na ilość mtDNA w wątrobie**

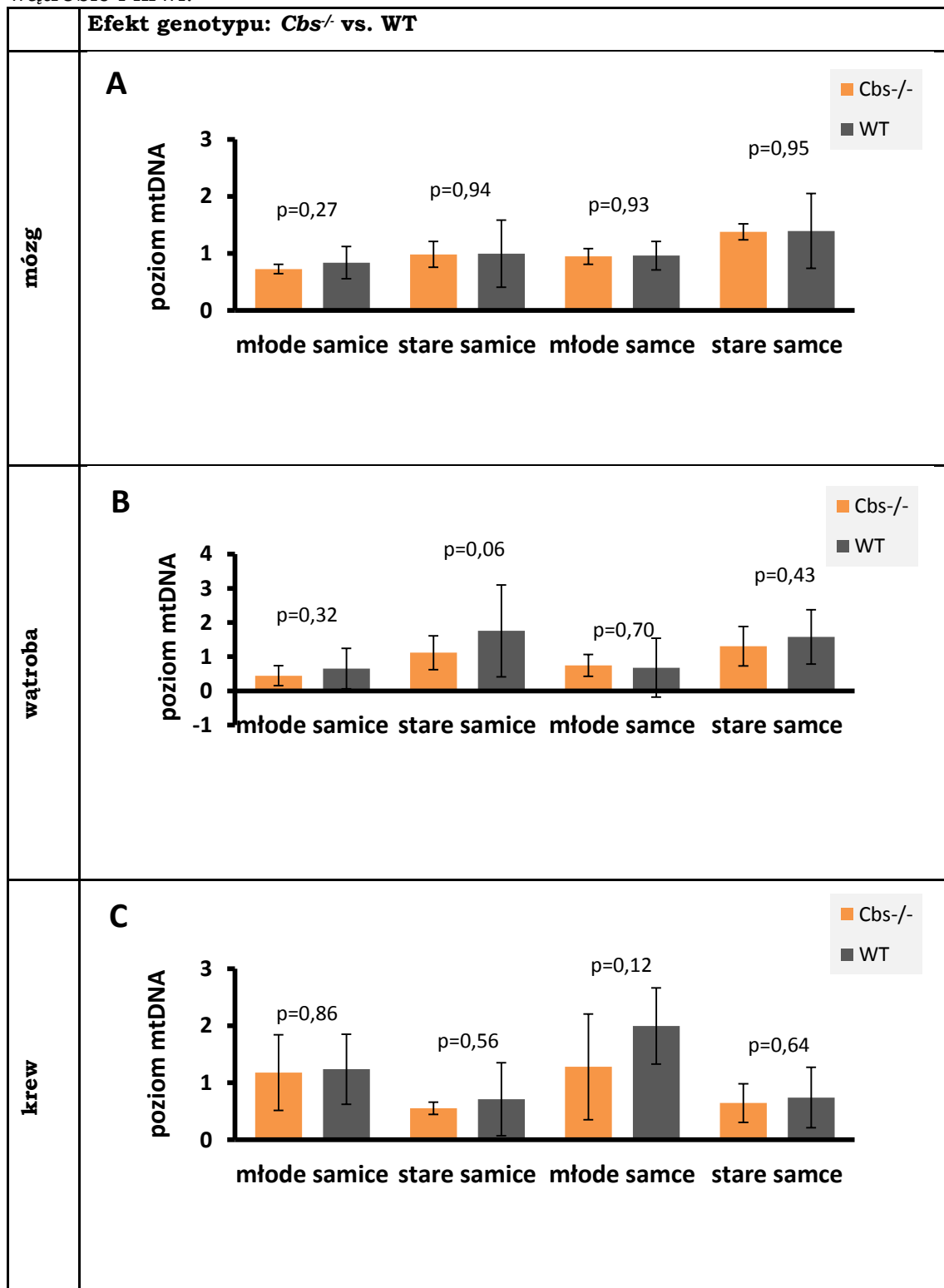
Porównywano osobniki o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> oraz myszy typu dzikiego w grupie młodych samców, starych samców, młodych samic i starych samic (Rysunek 5.10 A-C). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ilości mtDNA w mózgu, wątrobie i krwi.

#### **5.2.5.2. Płeć wpływa głównie na ilość mtDNA w mózgu**

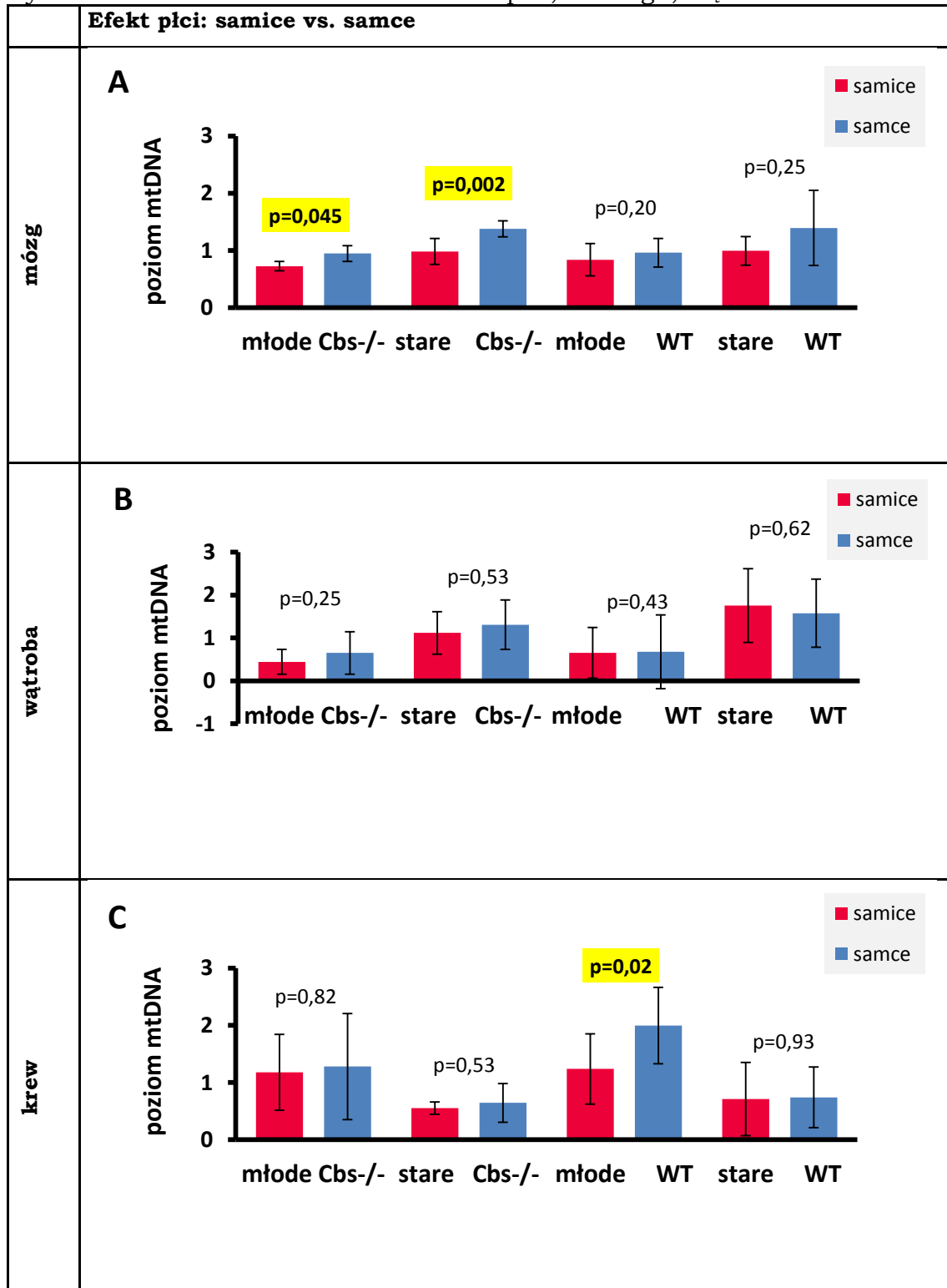
Porównywano samice i samców w grupie młodych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, starych myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, młodych myszy typu dzikiego i starych myszy typu dzikiego (Rysunek 5.11 A-C). Istotne różnice zaobserwowano głównie w mózgu. U myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>: istotnie więcej mtDNA jest u samców niż u samic, zarówno u osobników młodych jak i starych. Ponadto, we krwi u młodych samców typu dzikiego mtDNA jest więcej niż u młodych samic typu dzikiego (odpowiednio 2,0 vs. 1,24,  $p=0,02$ ).

#### **5.2.5.3 Zdecydowany efekt wieku na ilość mtDNA w badanych tkankach**

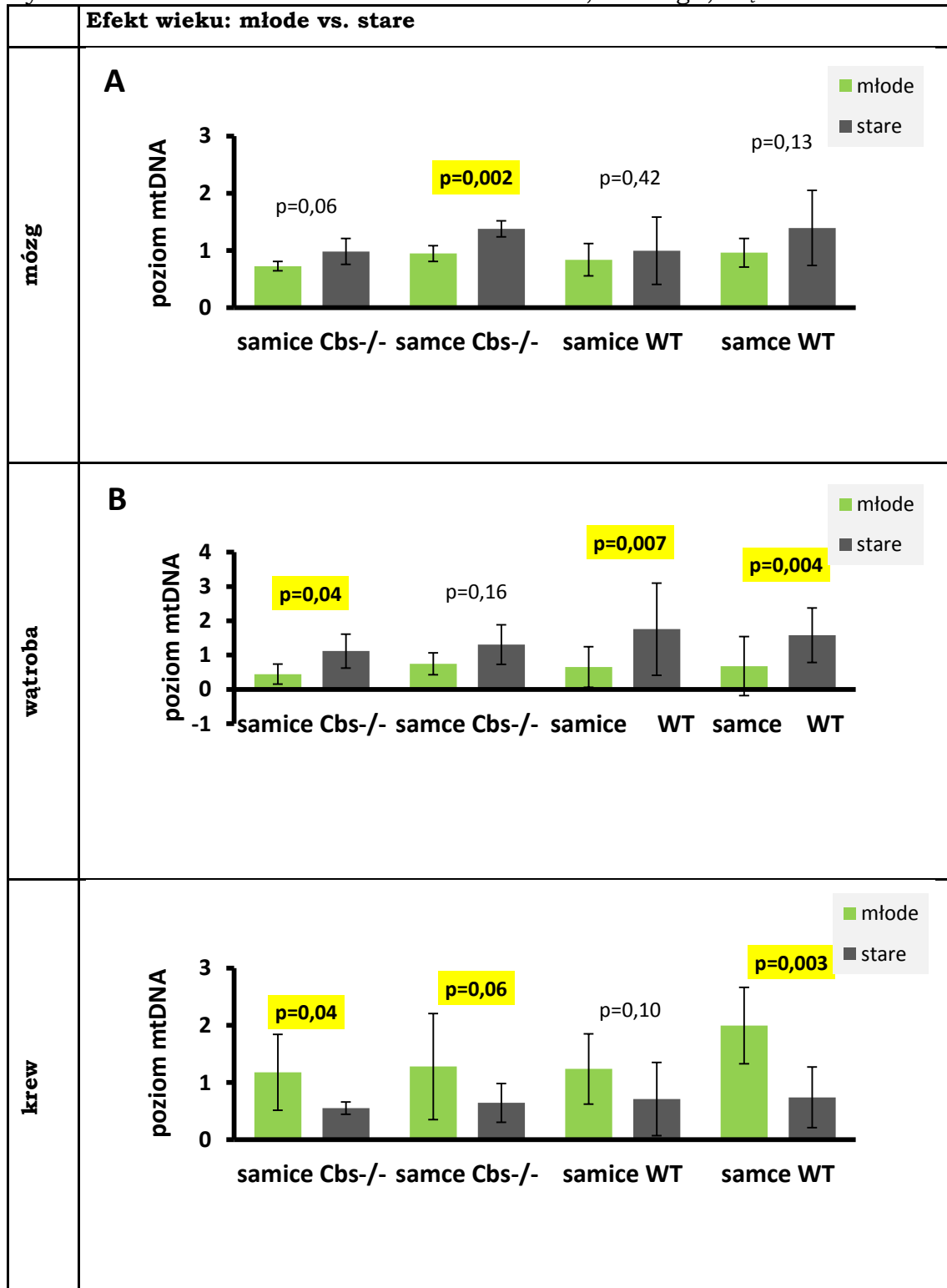
Porównywano osobniki młode i stare w grupie samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, samic typu dzikiego i samców typu dzikiego (Rysunek 5.12 A-C). Istotne statystycznie różnice zaobserwowano głównie w wątrobie i we krwi. Zarówno u myszy typu *Cbs*<sup>-/-</sup> jak i u myszy typu dzikiego w wątrobie starych osobników mtDNA jest więcej niż u młodych. Odwrotną zależność zaobserwowano we krwi, gdzie to u młodych osobników ilość mtDNA jest większa niż u starych (Rysunek 5.12).

Rysunek 5.10. Zależność ilości mtDNA od genotypu *Cbs* u myszy; w mózgu, wątrobie i krwi.

Rysunek 5.11 Zależność ilości mtDNA od płci, w mózgu, wątrobie i krwi.



Rysunek 5.12 Zależność ilości mtDNA od wieku, w mózgu, wątrobie i krwi.





#### 5.2.5.4 Regresja wieloraka mtDNA

Związek mtDNA i zmiennych niezależnych w mózgu, wątrobie i krwi został przedstawiony w Tabeli 5.6. Regresja wieloraka grupy badanej, myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i myszy typu dzikiego, wskazuje że ilość mtDNA w mózgu i krwi jest skorelowana z płcią i wiekiem. Korelacja wieku i mtDNA jest istotna statystycznie również dla samców, w przeciwieństwie do samic. Determinantami mtDNA w wątrobie są wiek oraz genotyp *Cbs*.

Tabela 5.6. Poziom mtDNA w mózgu, wątrobie i krwi myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – regresja wieloraka.

	Względna długość telomerów*					
	mózg		wątroba		krew	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
<b>samice</b>	n=20		n=20		n=40	
wiek	0,45	0,0501	<b>0,71</b>	<b>0,000</b>	-0,29	0,089
genotyp <i>Cbs</i>	0,10	0,642	<b>0,35</b>	<b>0,034</b>	0,08	0,609
	F = 2,29, <i>P</i> = 0,132, R <sup>2</sup> = 0,21		F = 13,10, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,60		F = 1,81, <i>P</i> = 0,179, R <sup>2</sup> = 0,04	
<b>samce</b>	n=23		n=23		n=40	
wiek	<b>0,49</b>	<b>0,023</b>	<b>0,62</b>	<b>0,002</b>	<b>-0,58</b>	<b>0,000</b>
genotyp <i>Cbs</i>	0,003	0,988	0,10	0,580	0,24	0,101
	F = 3,18, <i>P</i> = 0,063, R <sup>2</sup> = 0,24		F = 5,92, <i>P</i> = 0,010, R <sup>2</sup> = 0,37		F = 12,35, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,46	
<b>obie płcie</b>	n=43		n=43		n=80	
płeć	<b>0,41</b>	<b>0,003</b>			<b>0,26</b>	<b>0,019</b>
wiek	<b>0,42</b>	<b>0,002</b>	<b>0,24</b>	<b>0,048</b>	<b>-0,48</b>	<b>0,000</b>
genotyp <i>Cbs</i>			<b>0,68</b>	<b>0,000</b>		
	F = 10,34, <i>P</i> = 0,002, R <sup>2</sup> = 0,34		F = 17,67, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,47		F = 11,80, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,22	

\* $\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej,  
F – miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy,  
R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji,

### 5.2.6 Senescencja zachodzi intensywniej w wątrobie myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>

Wybrane markery mRNA (*p21*, *Il-6*, *Pai-1*, *Mcp-1*) pozwalają ocenić w jakim stopniu, w badanych tkankach, zachodzi senescencja. Wyniki zebrano w dwóch tabelach, oddzielnie dla mózgu i wątroby (Tabela 5.6 oraz Tabela 5.6). Wartości R to iloraz wartości średnich arytmetycznych, uzyskanych dla: myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> w stosunku do myszy typu dzikiego - efekt genotypu, samic do samców - efekt płci, oraz myszy starych do myszy młodych - efekt wieku. Do tych analiz wykorzystano test t-Studenta.

Dodatkowo, wykonano analizę regresji wielorakiej, mającej na celu określenie jak zmienia się poziom markerów senescencji wraz z wiekiem, genotypem *Cbs* i płcią, a także długością telomerów (TL), poziomem mRNA *Tert* oraz mtDNA. W każdym z przypadków wybrano model najlepiej obrazujący zachodzące między nimi zależności.

Do pomiaru poziomu mRNA telomerazy w mózgu i wątrobie wykorzystano 43 myszy, 20 samic i 23 samce, w wieku 63-408 dni. Grupę, oznaczoną na w Tabeli 5.7 i 5.8 jako osobniki "młode" stanowiły myszy w wieku 63-66 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki "stare" stanowiły myszy w wieku 354-408 dni.

Efekt genotypu *Cbs* na ekspresję markerów senescencji był widoczny głównie w wątrobie (Tabela 5.7). Poziom mRNA *p21*, podobnie jak poziom mRNA *Pai-1*, był podwyższony u młodych samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, odpowiednio: 8,23 razy,  $p=0,030$  oraz 11,24 razy  $p=0,032$ . Zarówno u młodych samic jak i u młodych samców *Cbs*<sup>-/-</sup> podwyższony był poziom mRNA *Mcp-1*, odpowiednio 8,47 razy  $p=0,018$  oraz 4,24 razy  $p=0,005$ . W wątrobie odnotowano również zmianę poziomu mRNA *Il-6*: u młodych samic typu dzikiego poziom był niższy niż u młodych samców typu dzikiego ( $R=0,29$ ,  $p=0,010$ ).

Mniejsze zmiany występowały w mózgu (Tabela 5.8), przy czym nie były one związane z genotypem *Cbs*<sup>-/-</sup>. U starych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> obserwowano wyższy poziom mRNA *p21* oraz *Il-6* niż u starych samców *Cbs*<sup>-/-</sup> (odpowiednio:  $R=3,85$ ,  $p=0,002$  oraz  $R=2,14$ ,  $p=0,002$ ). Obecność mRNA *Kl* oznaczono jedynie w mózgu, ponieważ w wątrobie mRNA *Kl* był niewykrywalny przy zastosowaniu tej metody badawczej. Poziom mRNA *Kl* w mózgu myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> był około dwa razy wyższy u młodych samic niż u samic starych.

Analiza za pomocą regresji wielorakiej (Tabela 5.9) miała za zadanie znalezienie modelu, w największym stopniu oddającego zależności danego markera senescencji od zbadanych zmiennych niezależnych. Z tego powodu, czynniki wpływające na model w najmniejszym stopniu, były z niego usuwane. Wykazano że w mózgu: poziom markerów senescencji korelował głównie z wiekiem (mRNA *Il-6*, *Kl*), płcią (mRNA *p21*) oraz poziomem mtDNA (mRNA *Il-6*, *Pai-1*). W wątrobie natomiast poziom markerów senescencji i genotyp *Cbs*, statystycznie istotnie korelował z wiekiem (mRNA *Mcp-1*), oraz poziomem mtDNA (mRNA *Il-6*) (Tabela 5.8).

Tabela 5.7. Poziom markerów senescencji w wątrobie.

		<i>p21/β-aktyna</i>		<i>p21/Gapdh</i>	
porównywana grupa		R*	P	R*	P
efekt genotypu ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	<b>8,23</b>	<b>0,030</b>	<b>8,49</b>	<b>0,007</b>
	stare samice	<b>4,96</b>	<b>0,032</b>	3,82	0,321
	młode samce	3,04	0,097	<b>3,83</b>	<b>0,045</b>
	stare samce	2,15	0,070	2,35	0,111
efekt płci (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,76	0,455	1,79	0,333
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	<b>3,11</b>	<b>0,043</b>	2,26	0,269
	młode WT	0,65	0,105	0,81	0,373
	stare WT	1,34	0,358	1,39	0,502
efekt wieku (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,76	0,569	1,17	0,790
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,34	0,603	1,48	0,518
	samice WT	0,46	0,065	0,53	0,254
	samce WT	0,95	0,843	0,91	0,733
porównywana grupa		<i>Il-6/β-aktyna</i>		<i>Il-6/Gapdh</i>	
porównywana grupa		R*	P	R*	P
efekt genotypu ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	5,72	0,154	4,92	0,301
	stare samice	0,84	0,525	0,98	0,976
	młode samce	2,42	0,063	<b>4,97</b>	<b>0,002</b>
	stare samce	1,04	0,923	1,51	0,245
efekt płci (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,69	0,594	0,40	0,232
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,71	0,252	1,05	0,913
	młode WT	<b>0,29</b>	<b>0,010</b>	<b>0,41</b>	<b>0,044</b>
	stare WT	0,88	0,796	1,63	0,318
efekt wieku (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,35	0,060	0,21	0,245
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,35	0,066	0,55	0,200
	samice WT	<b>0,05</b>	<b>0,002</b>	<b>0,04</b>	<b>0,031</b>
	samce WT	<b>0,15</b>	<b>0,037</b>	<b>0,17</b>	<b>0,004</b>
porównywana grupa		<i>Pai-1/β-aktyna</i>		<i>Pai-1/Gapdh</i>	
porównywana grupa		R*	P	R*	P
efekt genotypu ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	<b>11,24</b>	<b>0,032</b>	<b>7,42</b>	<b>0,049</b>
	stare samice	<b>4,69</b>	<b>0,006</b>	3,10	0,058
	młode samce	0,77	0,571	1,34	0,408
	stare samce	2,01	0,350	0,54	0,343
efekt płci (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	8,87	0,075	4,73	0,120
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,39	0,211	0,52	0,373
	młode WT	0,61	0,230	0,86	0,676
	stare WT	0,17	0,136	0,09	0,105
efekt wieku (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	<b>3,82</b>	<b>0,021</b>	2,24	0,134
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,17	0,253	0,25	0,291
	samice WT	1,59	0,360	0,94	0,918
	samce WT	0,44	0,219	<b>0,10</b>	<b>0,031</b>

	porównywana grupa	<i>Mcp-1/β-aktyna</i>		<i>Mcp-1/Gapdh</i>	
		R*	P	R*	P
<b>efekt genotypu</b> ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	<b>8,74</b>	<b>0,018</b>	<b>11,89</b>	<b>0,012</b>
	stare samice	1,39	0,174	0,63	0,516
	młode samce	<b>4,24</b>	<b>0,005</b>	<b>8,97</b>	<b>0,029</b>
	stare samce	3,23	0,051	2,77	0,153
<b>efekt płci</b> (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,57	0,359	1,02	0,974
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	<b>0,39</b>	<b>0,034</b>	0,73	0,542
	młode WT	0,76	0,422	0,77	0,616
	stare WT	0,91	0,893	3,20	0,253
<b>efekt wieku</b> (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,77	0,456	0,60	0,527
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,19	0,053	0,43	0,213
	samice WT	<b>0,12</b>	<b>0,000</b>	0,03	0,093
	samce WT	0,15	0,157	0,13	0,197

**P** oznacza wartość istotności statystycznej obliczonej za pomocą testu t-Studenta **\*R** oznacza stosunek wartości u porównywanych grup myszy

Tabela 5.8 Poziom markerów senescencji w mózgu.

	porównywana grupa	<i>p21/β-aktyna</i>		<i>p21/Gapdh</i>	
		R*	P	R*	P
<b>efekt genotypu</b> ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	<b>1,94</b>	<b>0,035</b>	1,59	0,365
	stare samice	1,36	0,243	1,56	0,215
	młode samce	0,77	0,541	0,93	0,861
	stare samce	0,61	0,138	1,03	0,919
<b>efekt płci</b> (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,72	0,206	1,51	0,102
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	<b>3,85</b>	<b>0,002</b>	<b>2,43</b>	<b>0,042</b>
	młode WT	0,69	0,127	0,89	0,403
	stare WT	1,74	0,054	1,61	0,151
<b>efekt wieku</b> (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,98	0,927	0,84	0,661
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	2,19	0,132	1,35	0,450
	samice WT	0,68	0,197	0,83	0,700
	samce WT	1,73	0,072	1,50	0,202

		<i>Il-6/β-aktyna</i>		<i>Il-6/Gapdh</i>	
porównywana grupa		R*	P	R*	P
efekt genotypu ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	2,01	0,286	1,08	0,843
	stare samice	0,88	0,252	0,99	0,958
	młode samce	0,71	0,375	1,29	0,579
	stare samce	<b>0,57</b>	<b>0,038</b>	0,87	0,579
efekt płci (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,90	0,383	0,85	0,810
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	<b>2,14</b>	<b>0,002</b>	<b>1,82</b>	<b>0,010</b>
	młode WT	0,67	0,135	1,02	0,468
	stare WT	1,38	0,077	1,60	0,169
efekt wieku (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,22	0,634	0,66	0,113
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,37	0,401	1,41	0,495
	samice WT	<b>0,53</b>	<b>0,038</b>	0,61	0,201
	samce WT	1,09	0,695	0,95	0,824
porównywana grupa		<i>Pai-1/β-aktyna</i>		<i>Pai-1/Gapdh</i>	
		R*	P	R*	P
efekt genotypu ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	1,10	0,801	1,08	0,785
	stare samice	<b>0,56</b>	<b>0,047</b>	0,60	0,091
	młode samce	0,43	0,326	0,85	0,750
	stare samce	1,00	0,998	1,36	0,252
efekt płci (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	2,13	0,199	1,40	0,454
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,85	0,716	0,66	0,246
	młode WT	0,83	0,369	1,10	0,398
	stare WT	1,52	0,178	1,50	0,062
efekt wieku (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,85	0,118	1,96	0,076
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,73	0,656	0,93	0,861
	samice WT	0,93	0,805	1,09	0,693
	samce WT	1,70	0,290	1,49	0,248
porównywana grupa		<i>Mcp-1/β-aktyna</i>		<i>Mcp-1/Gapdh</i>	
		R*	P	R*	P
efekt genotypu ( <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup> /WT)	młode samice	0,97	0,937	0,79	0,158
	stare samice	1,23	0,194	1,42	0,241
	młode samce	0,98	0,945	1,85	0,091
	stare samce	1,09	0,840	1,16	0,687
efekt płci (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	1,03	0,937	0,53	0,070
	stare <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,62	0,348	0,67	0,287
	młode WT	1,04	0,455	1,24	0,232
	stare WT	<b>0,55</b>	<b>0,034</b>	0,55	0,106
efekt wieku (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,92	0,753	0,59	0,184
	samce <i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	0,56	0,460	0,74	0,604
	samice WT	1,16	0,522	1,05	0,849
	samce WT	0,62	0,071	<b>0,46</b>	<b>0,046</b>

	porównywana grupa	<i>Kl/β-aktyna</i>		<i>Kl/Gapdh</i>	
		<b>R*</b>	<b>P</b>	<b>R*</b>	<b>P</b>
<b>efekt genotypu</b> ( <i>Cbs</i> <sup>-</sup> /WT)	młode samice	1,39	0,192	1,48	0,253
	stare samice	0,77	0,525	0,88	0,733
	młode samce	0,53	0,132	1,26	0,382
	stare samce	0,78	0,462	1,10	0,558
<b>efekt płci</b> (samice/samce)	młode <i>Cbs</i> <sup>-</sup>	<b>2,50</b>	<b>0,010</b>	1,51	0,314
	stare <i>Cbs</i> <sup>-</sup>	1,56	0,168	1,15	0,583
	młode WT	0,96	0,439	1,29	0,134
	stare WT	1,57	0,289	1,44	0,308
<b>efekt wieku</b> (młode/stare)	samice <i>Cbs</i> <sup>-</sup>	<b>1,83</b>	<b>0,016</b>	<b>2,08</b>	<b>0,047</b>
	samce <i>Cbs</i> <sup>-</sup>	1,14	0,734	1,59	0,083
	samice WT	1,02	0,971	1,23	0,580
	samce WT	1,67	0,083	1,38	0,093

**P** oznacza wartość istotności statystycznej obliczonej za pomocą testu t-Studenta **\*R** oznacza stosunek wartości u porównywanych grup myszy

Tabela 5.9 Poziom RNA markerów senescencji w mózgu i wątrobie myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – regresja wieloraka

	mRNA <i>Pai-1</i>				mRNA <i>p21</i>				mRNA <i>Mcp1</i>				mRNA <i>Il-6</i>				mRNA <i>Kl</i>	
	mózg		wątroba		mózg		wątroba		mózg		wątroba		mózg		wątroba		mózg	
	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>	$\beta$	<i>P</i>
<b>samice (n = 20)</b>																		
wiek	-0,15	0,524	-0,21	0,362					0,14	0,621	0,23	0,476	<b>0,69</b>	<b>0,001</b>	-0,15	0,497	<b>-0,48</b>	<b>0,043</b>
<i>genotyp</i>	-0,16	0,520	<b>-0,34</b>	<b>0,021</b>													<b>-0,34</b>	<b>0,016</b>
TL			-0,11	0,436	0,16	0,536			0,14	0,609								
Tert	0,42	0,116	0,71	<b>0,006</b>	-0,10	0,696			-0,05	0,851	<b>0,15</b>	<b>0,006</b>	<b>0,39</b>	<b>0,037</b>	<b>0,62</b>	<b>0,004</b>	0,17	0,443
mtDNA	-0,21	0,419	<b>0,64</b>	<b>0,002</b>			0,04	0,856							<b>0,61</b>	<b>0,002</b>		
	NS		F = 15,7, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> =0,87		F = 0,26, <i>P</i> = 0,774, R <sup>2</sup> =0,14		F = 5,44, <i>P</i> = 0,017, R <sup>2</sup> =0,03		NS		F = 4,84, <i>P</i> = 0,015, R <sup>2</sup> =0,49		F = 9,76, <i>P</i> = 0,002, R <sup>2</sup> =0,57		F = 20,0, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,86		F = 3,70, <i>P</i> = 0,047, R <sup>2</sup> = 0,32	
<b>samce (n = 23)</b>																		
wiek	-0,31	0,207	-0,30	0,327					1,22	<b>0,002</b>	<b>0,52</b>	<b>0,005</b>	<b>0,68</b>	<b>0,039</b>	<b>0,62</b>	<b>0,015</b>	-0,48	0,060
<i>genotyp</i>	0,31	0,207	-0,30	0,139							<b>-0,47</b>	<b>0,034</b>					-0,14	0,321
TL					<b>-0,72</b>	<b>0,002</b>	-0,03	0,880	<b>-1,13</b>	<b>0,003</b>			-1,10	<b>0,003</b>				
Tert			<b>0,76</b>	<b>0,020</b>	0,11	0,554	-0,50	0,082	0,01	0,960			0,10	0,645	<b>-0,65</b>	<b>0,016</b>	0,18	0,468
mtDNA							0,36	0,189							<b>0,73</b>	<b>0,001</b>		
	F = 4,66, <i>P</i> = 0,031, R <sup>2</sup> =0,61		F = 4,46, <i>P</i> = 0,020, R <sup>2</sup> =0,35		F = 8,78, <i>P</i> = 0,004, R <sup>2</sup> =0,57		NS		F = 6,17, <i>P</i> = 0,010, R <sup>2</sup> =0,63		F = 13,0, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> =0,78		F = 5,19, <i>P</i> = 0,016, R <sup>2</sup> =0,56		F = 8,9, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,66		F = 3,26, <i>P</i> = 0,069, R <sup>2</sup> = 0,32	
<b>obie płcie (n = 43)</b>																		
płeć					<b>-0,35</b>	<b>0,044</b>	-0,15	0,270	<b>0,46</b>	<b>0,010</b>								
wiek			-0,22	0,140					0,32	0,061	<b>0,43</b>	<b>0,002</b>	<b>0,45</b>	<b>0,008</b>	0,25	0,093	<b>-0,40</b>	<b>0,011</b>
<i>genotyp</i>	0,19	0,270	<b>-0,52</b>	<b>0,001</b>			<b>-0,52</b>	<b>0,001</b>			<b>-0,43</b>	<b>0,001</b>			-0,19	0,112		
TL					<b>-0,36</b>	<b>0,028</b>			-0,20	0,259			-0,28	0,095				
Tert	0,15	0,378			0,001	0,993							<b>0,38</b>	<b>0,019</b>			<b>0,31</b>	<b>0,044</b>
mtDNA	<b>-0,43</b>	<b>0,018</b>													<b>0,56</b>	<b>0,000</b>		
	F = 3,27, <i>P</i> = 0,037, R <sup>2</sup> =0,27		F = 7,11, <i>P</i> = 0,003, R <sup>2</sup> =0,29		F = 6,0, <i>P</i> = 0,002, R <sup>2</sup> =0,30		F = 8,5, <i>P</i> = 0,001, R <sup>2</sup> =0,31		F = 3,2, <i>P</i> = 0,036, R <sup>2</sup> =0,23		F = 13,5, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> =0,43		F = 4,9, <i>P</i> = 0,007, R <sup>2</sup> =0,26		F = 16,9, <i>P</i> = 0,000, R <sup>2</sup> = 0,57		F = 8,41, <i>P</i> = 0,001, R <sup>2</sup> = 0,34	

\* $\beta$  - współczynnik  $\beta$  po uwolnieniu od skali, *P* - wartość istotności statystycznej, F – miara rozbieżności między hipotetycznym a rzeczywistym stanem rzeczy, R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji, NS – model statystycznie nieistotny



## 5.3 Poziom Glod4 w mózgu, modele mysie

### 5.3.1 Ekspresja mRNA *Glod4*

#### 5.3.1.1 Myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>

Do pomiaru poziomu mRNA *Glod4* w mózgu wykorzystano 43 myszy, 20 samic i 23 samce, w wieku 63-408 dni. Grupę, oznaczoną jako osobniki “młode” stanowiły myszy w wieku 63-66 dni, a grupę oznaczoną jako osobniki “stare” stanowiły myszy w wieku 354-408 dni.

Zgodnie z obecną wiedzą białko Glod4 posiada trzy izoformy; odpowiadające im mRNA poddano analizie. Izofomy, druga i trzecia mRNA *Glod4* różnią się od izofomy pierwszej w niewielkim stopniu i nie było możliwe oznaczenie jedynie izofomy pierwszej. Ponieważ, jak pokazują poniższe wyniki, poziom izofomy trzeciej jest dużo niższy niż izofomy pierwszej, a izoforna druga nie została oznaczona w poniższych wynikach, z powodu jej niskiego poziomu, przyjęto oznaczenie izoforna 1 dla oznaczeń sumy ilości mRNA wszystkich izoform.

Zbadano poziom izofomy pierwszej i trzeciej mRNA *Glod4* u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>. Zostały one porównane pod względem genotypu, płci oraz wieku. Blisko dwukrotnie więcej mRNA *Glod4* izofomy pierwszej było w mózgu samic o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> w porównaniu do samców *Cbs*<sup>-/-</sup>, zarówno u osobników młodych jak i starych (Tabela 5.10 B). Podobnie dla myszy typu dzikiego, u nich też poziom mRNA *Glod4* izofomy pierwszej był dwukrotnie większy ale zmianę tę obserwowano jedynie u osobników młodych. Poziom izofomy trzeciej mRNA *Glod4* ulegał istotnej zmianie jedynie ze względu na płć; był on niemalże dwukrotnie podwyższony u młodych samic typu dzikiego w porównaniu do młodych samców (1,55 vs. 0,78, p=0,03) (Tabela 5.11 B).

Tabela 5.10. Poziom izoformy pierwszej mRNA *Glod4* w mózgu myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, wpływ genotypu, płci i wieku

<b>A Efekt genotypu: <i>Cbs</i><sup>-/-</sup> vs. WT</b>								
		referencja	R*	P	<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	±	WT	±
młode	samice	aktyna	0,63	0,20	1,02	0,10	1,62	0,83
		Gapdh	0,84	0,66	1,60	0,27	1,91	1,31
	samce	aktyna	0,72	0,11	0,58	0,31	0,81	0,08
		Gapdh	0,87	0,47	0,75	0,38	0,87	0,08
stare	samice	aktyna	1,06	0,75	1,47	0,31	1,38	0,59
		Gapdh	1,31	0,11	1,45	0,32	1,10	0,35
	samce	aktyna	0,87	0,51	0,84	0,15	0,97	0,44
		Gapdh	0,80	0,34	0,67	0,21	0,84	0,35

<b>B Efekt płci: samice vs. Samce</b>								
		referencja	R*	P	samice	±	samce	±
<i>Cbs</i>	młode	aktyna	<b>1,75</b>	<b>0,04</b>	1,02	0,10	0,58	0,31
		Gapdh	<b>2,12</b>	<b>0,02</b>	1,60	0,27	0,75	0,32
	stare	aktyna	<b>1,75</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,47	0,31	0,84	0,15
		Gapdh	<b>2,15</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,45	0,32	0,67	0,21
WT	młode	aktyna	<b>1,99</b>	<b>0,02</b>	1,62	0,83	0,81	0,08
		Gapdh	<b>2,19</b>	<b>0,02</b>	1,91	1,31	0,87	0,08
	stare	aktyna	1,42	0,20	1,38	0,59	0,97	0,44
		Gapdh	1,31	0,22	1,10	0,35	0,84	0,35

<b>C Efekt wieku: młode vs. Stare</b>								
		referencja	R*	P	młode	±	stare	±
samice	<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	aktyna	<b>0,69</b>	<b>0,02</b>	1,02	0,10	1,47	0,31
		Gapdh	1,10	0,47	1,60	0,27	1,45	0,32
	WT	aktyna	0,69	0,12	0,58	0,31	0,84	0,15
		Gapdh	1,12	0,69	0,75	0,38	0,67	0,21
samce	<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	aktyna	1,17	0,61	1,62	0,83	1,38	0,59
		Gapdh	1,73	0,18	1,91	1,31	1,10	0,35
	WT	aktyna	0,84	0,42	0,81	0,08	0,97	0,44
		Gapdh	1,04	0,84	0,87	0,08	0,84	0,35

**P** oznacza wartość istotności statystycznej obliczonej za pomocą testu t-Studenta, **\*R** oznacza stosunek wartości u porównywanych grup myszy

Tabela 5.11. Poziom mRNA *Glod4* izoformy 3 u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, wpływ genotypu, płci i wieku.

<b>A Efekt genotypu: <i>Cbs</i><sup>-/-</sup> vs. WT</b>								
		referencja	R*	P	<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	±	WT	±
młode	samice	aktyna	0,52	0,11	0,80	0,30	1,55	0,74
		Gapdh	0,80	0,45	1,29	0,62	1,61	0,52
	samce	aktyna	1,09	0,83	0,85	0,57	0,78	0,37
		Gapdh	1,27	0,59	1,09	0,75	0,86	0,47
stare	samice	aktyna	0,62	0,11	0,89	0,36	1,45	0,62
		Gapdh	1,10	0,77	1,31	0,86	1,19	0,48
	samce	aktyna	1,12	0,77	1,37	0,88	1,22	0,79
		Gapdh	0,94	0,87	1,00	0,53	1,06	0,64

<b>B Efekt płci: samice vs. Samce</b>								
		referencja	R*	P	samice	±	samce	±
<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	młode	aktyna	0,94	0,89	0,80	0,30	0,85	0,57
		Gapdh	1,18	0,71	1,29	0,62	1,09	0,75
	stare	aktyna	0,65	0,29	0,89	0,36	1,37	0,88
		Gapdh	1,31	0,47	1,31	0,86	1,00	0,53
WT	młode	aktyna	<b>1,99</b>	<b>0,03</b>	1,55	0,74	0,78	0,37
		Gapdh	<b>1,87</b>	<b>0,02</b>	1,61	0,52	0,86	0,47
	stare	aktyna	1,18	0,60	1,45	0,62	1,22	0,79
		Gapdh	1,12	0,70	1,19	0,48	1,22	0,64

<b>C Efekt wieku: młode vs. Stare</b>								
		referencja	R*	P	młode	±	stare	±
samice	<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	aktyna	0,90	0,70	0,80	0,30	0,89	0,36
		Gapdh	0,98	0,97	1,29	0,62	1,31	0,86
	WT	aktyna	0,62	0,39	0,85	0,57	1,37	0,88
		Gapdh	1,09	0,84	1,09	0,75	1,00	0,53
samce	<i>Cbs</i> <sup>-/-</sup>	aktyna	1,08	0,81	1,55	0,74	1,45	0,62
		Gapdh	1,35	0,23	1,61	0,52	1,19	0,48
	WT	aktyna	0,64	0,24	0,78	0,37	1,22	0,79
		Gapdh	0,81	0,55	0,86	0,47	1,06	0,64

**P** oznacza wartość istotności statystycznej obliczonej za pomocą testu t-Studenta, **\*R** oznacza stosunek wartości u porównywanych grup myszy

### 5.3.1.2 Myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> (1,5 miesięczne)

Do pomiaru mRNA *Glod4* wykorzystano 19 myszy, 12 samców i 7 samic w wieku 39-51 dni. Badano jak zmienia się poziom mRNA *Glod4* izoformy pierwszej w kontekście genotypu i płci myszy. W żadnej z grup nie odnotowano różnic w poziomie mRNA *Glod4* izoformy 1, przy zastosowaniu mRNA aktyny jak i *Gapdh* jako referencji (Tabela 5.12). Z powodu zbyt małego sygnału nie oznaczono izoformy 2 mRNA *Glod4*. Podobnie, u myszy o genotypie *Blmh*<sup>-/-</sup> poziom mRNA *Glod4* izoformy 3 był zbyt niski do oznaczeń, natomiast u osobników o genotypie *Blmh*<sup>+/-</sup> poziom mRNA był znaczny, ale około 32 razy niższy niż izoformy 1 (dane niepokazane).

Tabela 5.12. Poziom mRNA *Glod4* izoformy 1 u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup>, wpływ genotypu i płci.

Efekt genotypu: <i>Blmh</i> <sup>-/-</sup> vs. WT							
	referencja	R*	P	<i>Blmh</i> <sup>-/-</sup>	±	WT	±
<b>samice</b>	aktyna	1,13	0,601	1,00	0,28	0,88	0,25
	<i>Gapdh</i>	0,91	0,656	1,06	0,33	1,17	0,21
<b>samce</b>	aktyna	1,20	0,440	1,24	0,55	1,04	0,30
	<i>Gapdh</i>	1,02	0,923	1,07	0,56	1,05	0,30
Efekt płci: samice vs. samce							
	referencja	R*	P	<i>Blmh</i> <sup>-/-</sup>	±	WT	±
<b><i>Blmh</i><sup>-/-</sup></b>	aktyna	0,80	0,436	1,00	0,28	1,24	0,55
	<i>Gapdh</i>	0,99	0,976	1,06	0,33	1,07	0,56
<b>WT</b>	aktyna	0,85	0,472	0,88	0,25	1,04	0,30
	<i>Gapdh</i>	1,11	0,523	1,17	0,21	1,05	0,27

*P* oznacza wartość istotności statystycznej obliczonej za pomocą testu t-Studenta, *\*R* oznacza stosunek wartości u porównywanych grup myszy

### 5.3.1.3 Myszy o genotypach *Blmh* i *5xFAD* (4,5 miesięczne)

Wykorzystano materiał mózgu myszy w wieku 115-155 dni o genotypach:

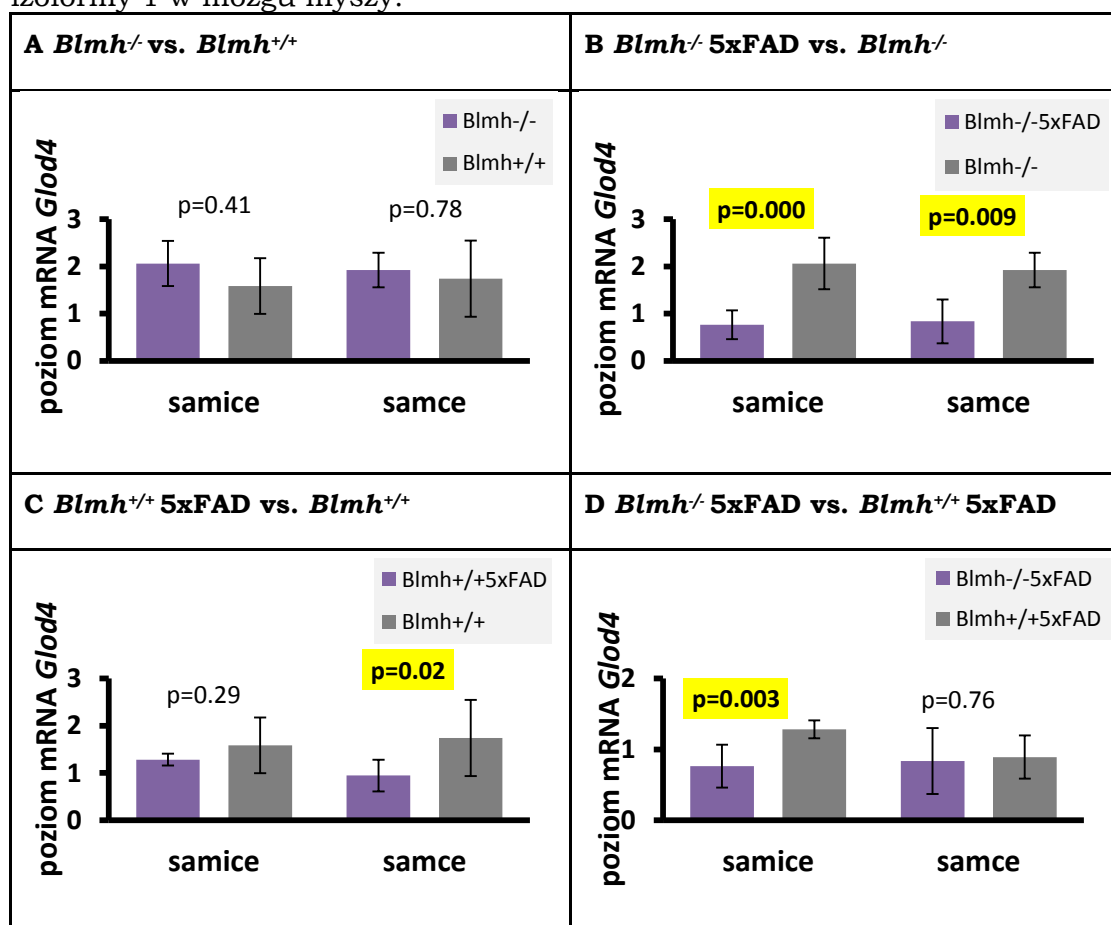
- *Blmh*<sup>+/+</sup>, 8 myszy
- *Blmh*<sup>-/-</sup>, 4 myszy
- *Blmh*<sup>+/+</sup> 5xFAD, 22 myszy
- *Blmh*<sup>-/-</sup> 5xFAD, 15 myszy

Genotyp *Blmh* nie miał wpływu na poziom mRNA *Glod4* u myszy, zarówno samic i samców gdy porównywano ze sobą myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> oraz *Blmh*<sup>+/+</sup> (Rysunek 5.13 A). Gdy badano wpływ genotypu *Blmh* u myszy 5xFAD, poziom

mRNA *Glod4*, był znacząco obniżony (0,76 vs. 1,28,  $p=0,003$ ) u samic pozbawionych genu *Blmh* (Rysunek 5.13 D).

Genotyp 5xFAD miał znaczny wpływ na poziom mRNA *Glod4* izoformy 1, zależnie i niezależnie od genotypu *Blmh*. Samce myszy typu dzikiego miały większy poziom mRNA *Glod4* niż myszy o genotypie 5xFAD (1,74 vs. 0,94,  $p=0,02$ ) (Rysunek 5.13 C). Co więcej, obecność genotypu 5xFAD oraz niedobór genu *Blmh* miały synergistyczny wpływ na poziom mRNA *Glod4*, powodując jego obniżenie u obydwu płci: o 63% ( $p=0,0004$ ) u samic i o 57% ( $p=0,009$ ) u samców (Rysunek 5.13 B).

Rysunek 5.13 Wpływ genotypu *Blmh* i 5xFAD na poziom mRNA *Glod4* izoformy 1 w mózgu myszy.



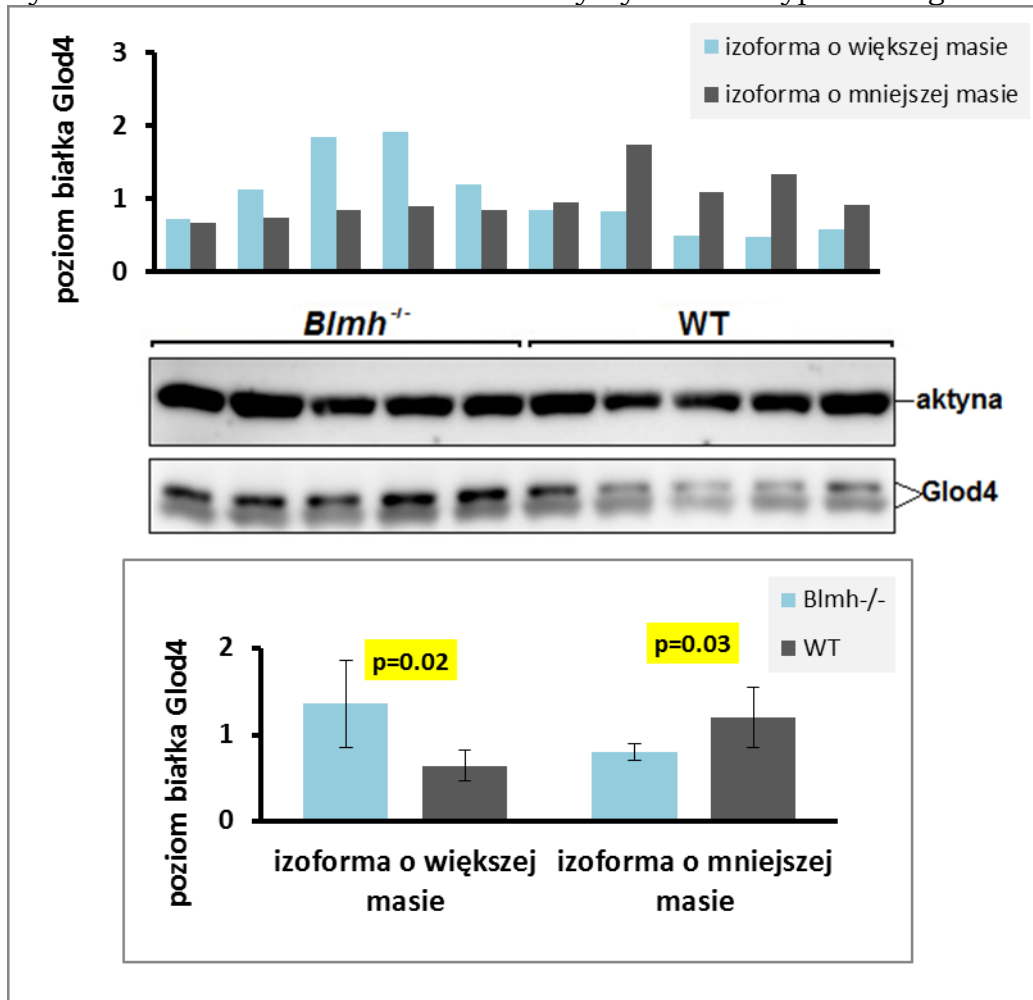
### 5.3.2 Ilość białka Glod4 u myszy

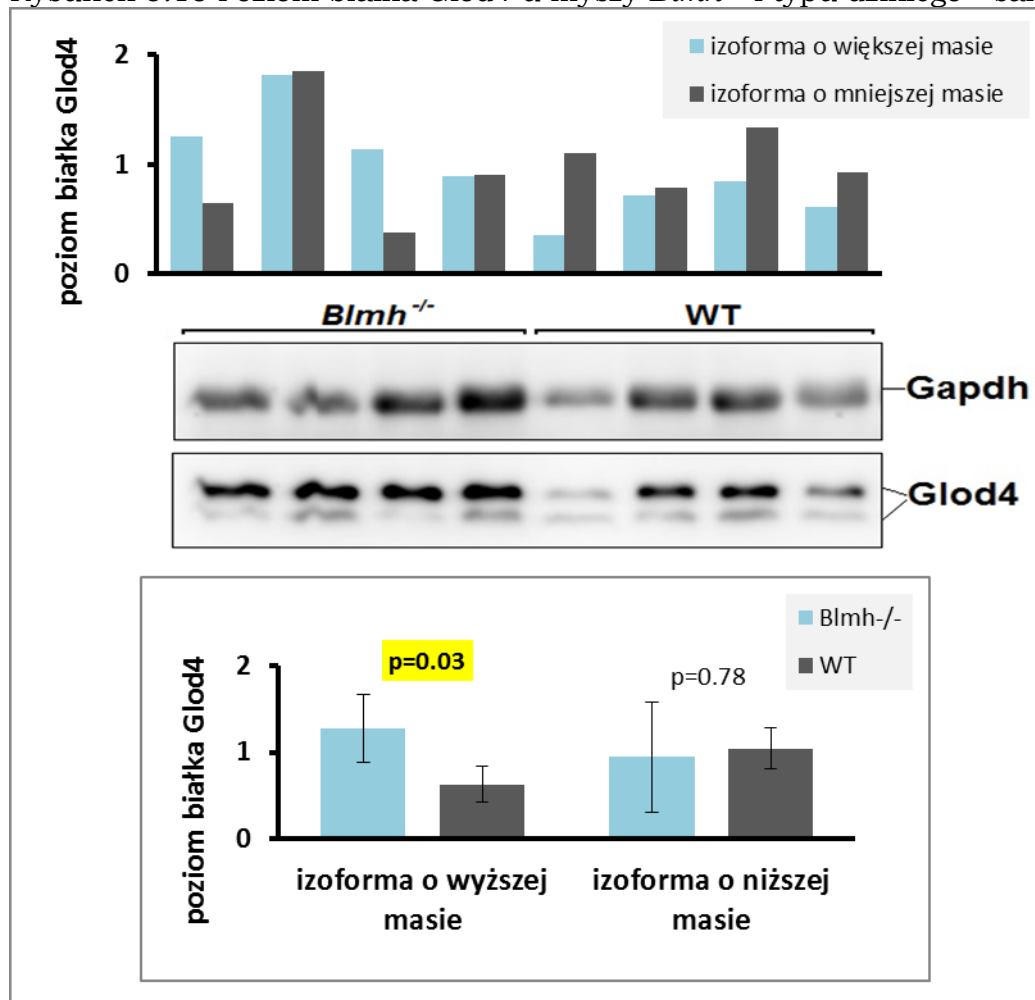
#### 5.3.2.1 Myszy *Blmh*<sup>-/-</sup>

Poziom białka Glod4 w mózgu u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> i myszy typu dzikiego zbadano metodą Western blot. Określono poziom dwóch izoform tego białka o masie około 33 kDa.

Poziom izoformy o większej masie cząsteczkowej był wyższy u samców myszy z niedoborem genu *Blmh* niż myszy typu dzikiego ( $R=2,11$ ;  $p=0,02$ ), natomiast poziom izoformy o niższej masie cząsteczkowej był istotnie niższy u tych myszy ( $R=0,66$ ,  $p=0,03$ ) (Rysunek 5.14).

U samic zależność ta była prawdziwa jedynie dla izoformy o wyższej masie cząsteczkowej ( $R=1,27$ ,  $p=0,03$ ), samice *Blmh*<sup>-/-</sup> miały wyższy poziom Glod4 wyższej izoformy niż myszy typu dzikiego; dla drugiej izoformy nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (Rysunek 5.15).

Rysunek 5.14 Poziom białka Glod4 u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego – samce.

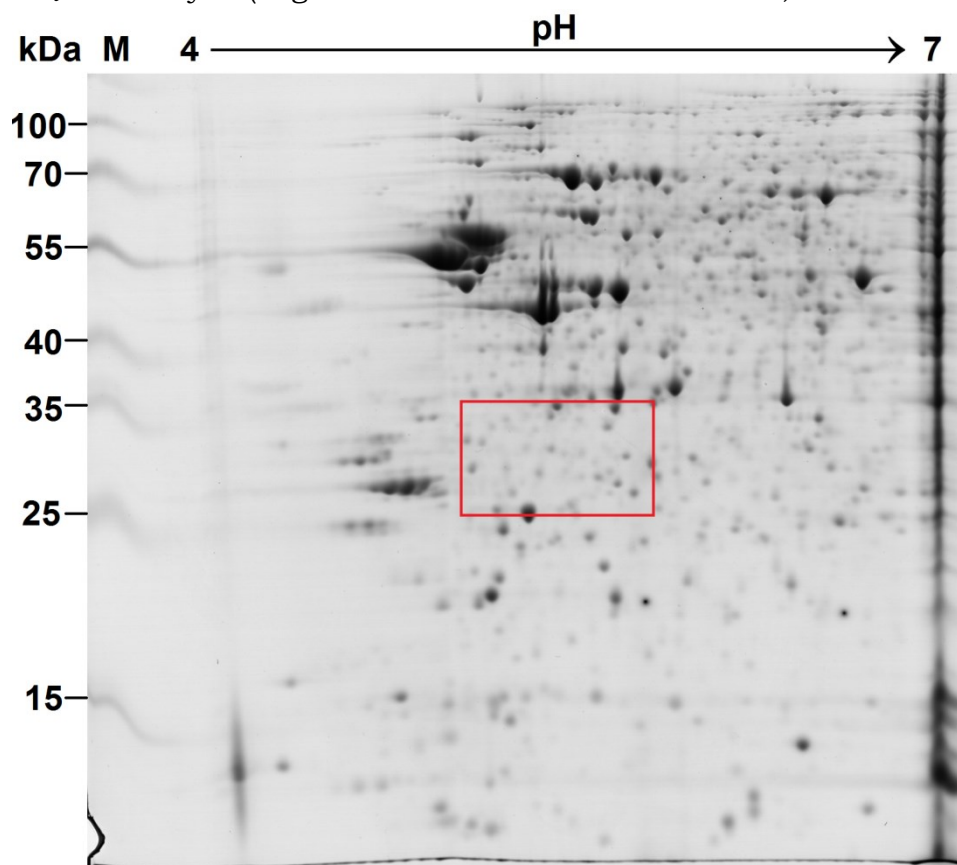
Rysunek 5.15 Poziom białka Glod4 u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> i typu dzikiego - samice

#### 5.4 Wpływ genu *Blmh* na strukturę białka Glod4 u myszy

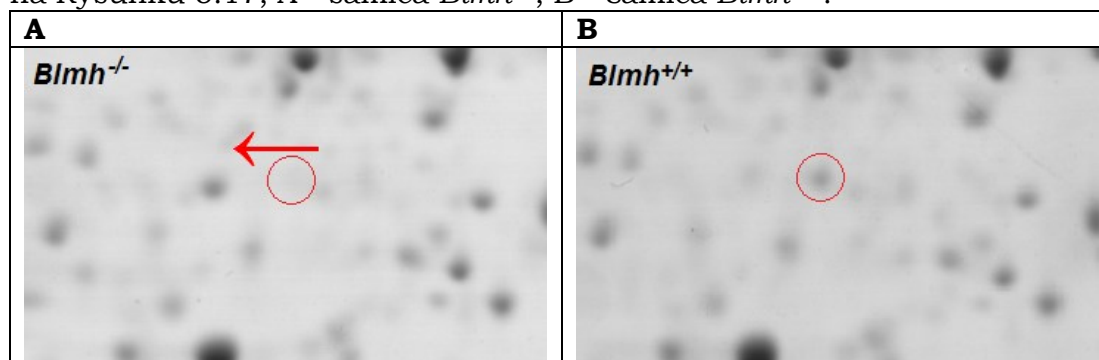
W celu identyfikacji zmian struktury białka Glod4 w mysim mózgu, zależnej od genu *Blmh*, wykonano elektroforezę dwukierunkową. Analizie proteomu poddano mózgi samic myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> i *Blmh*<sup>+/+</sup> (Rysunek 5.16). Potwierdzono obecność dwóch izoform białka Glod4. Pierwsza z nich, o bardziej kwasowym pI, jest obecna u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup>, natomiast druga - u *Blmh*<sup>+/+</sup> (Rysunek 5.16).



Rysunek 5.16 Mapa proteomiczna mózgu mysiego, M – wzorzec mas cząsteczkowych (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).



Rysunek 5.17 Obszar mapy proteomicznej mysiego mózgu, zaznaczony ramką na Rysunku 5.16, A - samica *Blmh*<sup>-/-</sup>, B - samica *Blmh*<sup>+/+</sup>.



Identyfikacja izoformy Glod4 u *Blmh*<sup>+/+</sup> została wykonana na podstawie 16 dopasowań, pokryciu sekwencji równym 54% (Tabela 5.13) i wartości *score* wynoszącej 161. Dokładnie taki sam wynik uzyskano dla izoformy białka Glod4 u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup>, o zmienionym pI. Sekwencje zminokwasowe zidentyfikowanych peptydów były jednakowe dla obu izoform białka Glod4: tych występujących u myszy *Blmh*<sup>+/+</sup> a także myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> i nie pozwoliły na jednoznaczne przyporządkowanie do jednej z trzech izoform białka Glod4, dostępnych w bazie Uniprot (uniprot.org) (Załącznik 9.4).

Podjęto również próbę identyfikacji białka w mózgu myszy *Blmh<sup>+/+</sup>*, z plamki znajdującej się w miejscu izoformy Glod4 o mniejszym pI. Identyfikacja nie była jednoznaczna, Glod4 zostało oznaczone na 5 miejscu listy możliwych białek, na podstawie 10 dopasowań, pokryciu sekwencji równym 44% i wartości *score* wynoszącej 178.

Tabela 5.13 Pokrycie sekwencji białka Glod4 w mózgu myszy, analiza w programie Mascot\*.

**Izoforma białka Glod4 u myszy *Blmh<sup>+/+</sup>* i *Blmh<sup>-/-</sup>***

---

```

1 MATRRALHFV FKVKNRFTV HFFRDVLGMQ VLRHEEFEEG CKAACNGPYD
51 GKWSKTMVGF GPEDDHFVAE LTNYNGIGDY KLGNDFMGIT LASSQAVSNA
101 RKLEWPLSKV AEGIFETEAP GGYKFYLDQR SPSQSDPVLK VTLAVSDLQK
151 SLNYWSNLLG MKIYEQDEEK QRALLGYADN QCKLELQGIQ GAVDHAAAFG
201 RIAFSCPQKE LPDLEDLMKR ESHSILTPLV SLDTPGKATV QVVILADPDG
251 HEICFVGDEA FRELSKMDPK GSKLLDDAME ADKSDEWFAT RNKPKASG

```

\*Czerwona czcionka oznacza zidentyfikowane peptydy

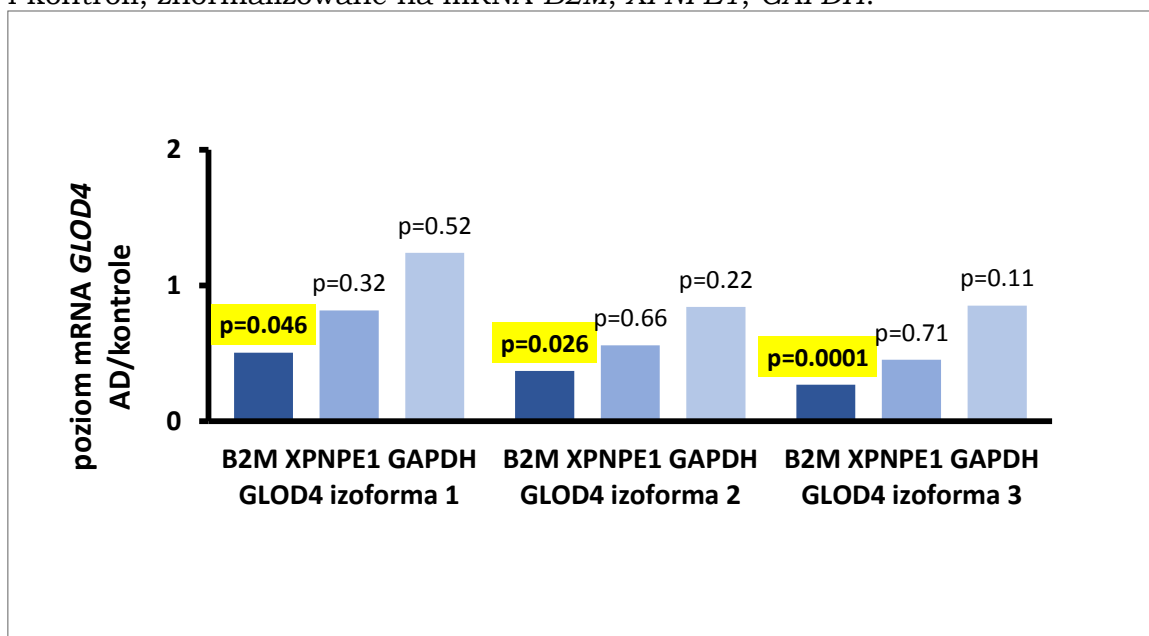
## 5.5 Poziom GLOD4 w mózgu u ludzi z chorobą Alzheimera

### 5.5.1 Poziom mRNA GLOD4

Pomiar poziomu trzech izoform mRNA *GLOD4* wykonano z wykorzystaniem trzech genów referencyjnych, jako że nie jest znana jedna uniwersalna referencja, której poziom nie zmienia się w mózgu osób z chorobą Alzheimera. Jako referencje wybrano mRNA beta-2 mikroglobuliny (*B2M*), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) oraz Xaa-Pro aminopeptydazy 1 (*XPNPEP1*) (Wang *et al.* 2012; Durrenberger *et al.* 2012).

Spośród tych trzech referencji, jedynie przy zastosowaniu *B2M*, uzyskano istotne statystycznie różnice, choć ogólna tendencja jest zachowana również przy użyciu pozostałych. Poziom mRNA każdej z trzech izoform mRNA *GLOD4* był niższy w grupie osób z chorobą Alzheimera. Dla izoformy pierwszej przy normalizacji do poziomu mRNA *B2M* stosunek ten wyniósł 0,51,  $p=0.046$ , dla izoformy drugiej 0,37,  $p=0,026$ , dla izoformy trzeciej 0,27,  $p=0,0001$ .

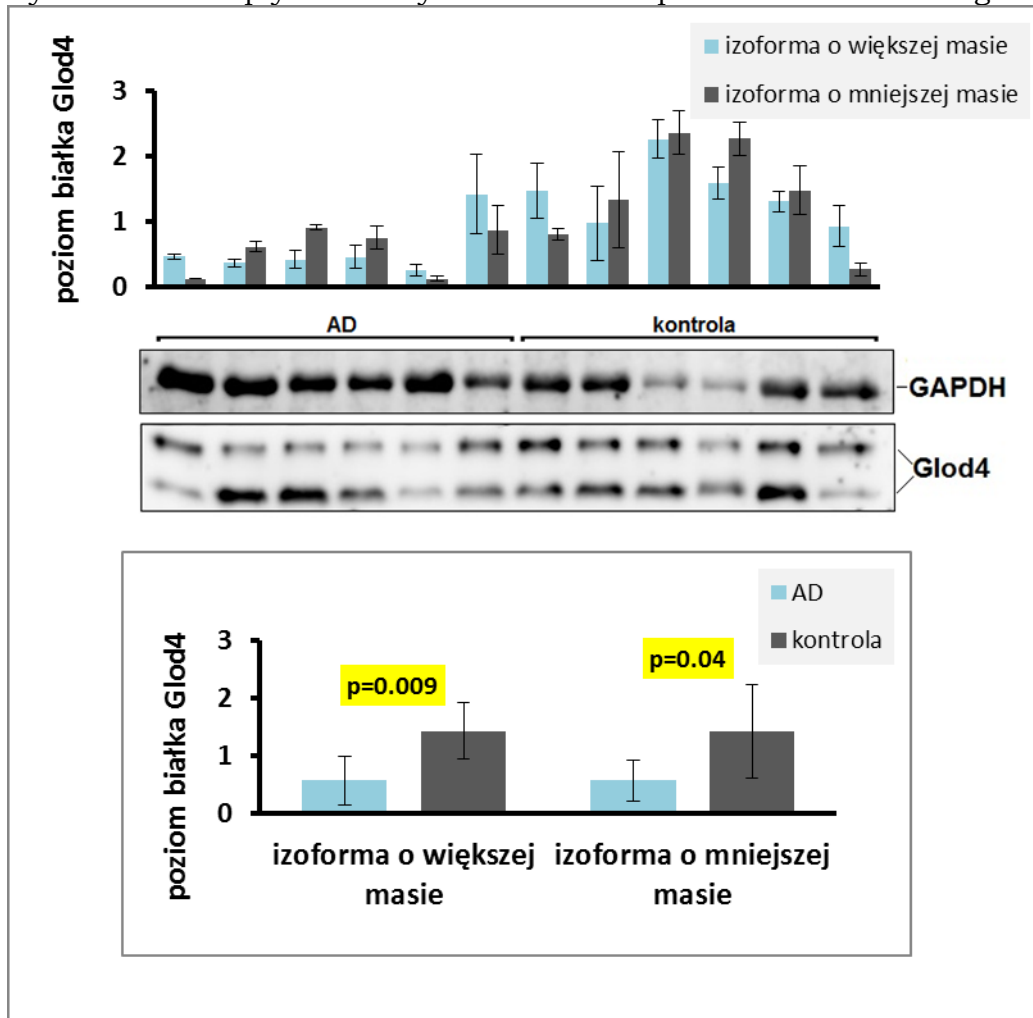
Wykres 5.17 Ekspresja mRNA *GLOD4* w mózgu u ludzi z chorobą Alzheimera i kontroli, znormalizowane na mRNA *B2M*, *XPNPE1*, *GAPDH*.



### 5.5.2 Poziom białka GLOD4

Poziom białka GLOD4 w mózgu u osób z chorobą Alzheimera i kontroli zbadano metodą Western blot. Określono poziom dwóch izoform tego białka. Poziom każdej z nich, u osób z AD był obniżony blisko dwukrotnie (Rysunek 5.19). Stosunek pomiędzy poziomem GLOD4 u osób z AD a kontrolą dla izoformy o wyższej masie wyniósł 0,4 przy  $p=0,009$  a dla izoformy o mniejszej masie 0,4 przy  $p=0,04$ .

Rysunek 5.18 Wpływ choroby Alzheimera na poziom GLOD4 w mózgu.



## 6 Dyskusja

Skutkiem inaktywacji genu *CBS*, jest HHcy. Prowadzi ona do przedwczesnej śmierci zarówno u ludzi jak i u myszy. Celem niniejszej pracy było ustalenie czy skrócenie długości życia, związane z podwyższonym poziomem Hcy, jest wynikiem przedwczesnego starzenia się organizmu.

Analizie poddano telomery, których długość ulega skróceniu w wyniku starzenia się, oraz mRNA telomerazy, enzymu którego poziom i aktywność wpływa na długość telomerów. Ponieważ starzenie komórkowe może zachodzić niezależnie od stanu telomerów, zbadano także poziom innych markerów senescencji, w tym mRNA cytokin, chemokin oraz białek regulacyjnych. Określono, jak pod wpływem Hcy zmienia się poziom mtDNA, którego w starzejącym się organizmie jest mniej. Co więcej, zbadano wpływ Hcy na mRNA *Kloto*, białka któremu przypisuje się aktywność przeciwdziałającą starzeniu się.

Otrzymane wyniki wskazują że, HHcy jest związana z długością telomerów u ludzi, ale nie ma wpływu na ich zmianę u myszy. Stan senescencji komórkowej, wywołany podwyższonym poziomem Hcy u myszy, zachodzi w większym stopniu w wątrobie niż w mózgu i jest niezależny od długości telomerów.

### 6.1 *Locus CBS* jest determinantem długości telomerów u ludzi

Badania przeprowadzono z udziałem pacjentów *CBS*<sup>-/-</sup>, u których obserwuje się ciężką postać HHcy, oraz osób zdrowych. Ustalono że, znacząco dłuższe telomery występowały u kobiet – pacjentek *CBS*<sup>-/-</sup> niż u kobiet zdrowych. U mężczyzn, ani ostra HHcy, ani obniżona aktywność CBS nie wpływała na długość telomerów. W tym badaniu, po raz pierwszy wykazano że długość telomerów jest związana z genem zaangażowanym w metabolizm Hcy – CBS, którego inaktywacja wywołuje ostrą postać HHcy.

Poszukiwania *loci* powiązanych z długością telomerów w leukocytach, przeprowadzone na próbie ponad 37 tysięcy osób, wskazały siedem genów (Codd *et al.* 2013). Pięć z nich (*TERC*, *TERT*, *NAF1*, *OBFC1*, *RTEL1*) jest zaangażowanych w biologię telomerów, dla pozostałych dwóch (*ZNF208* i *ACYP2*) związek z telomerami nie jest znany, a pula ich wszystkich

odpowiada za 1,23% zmienności długości telomerów u ludzi. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują że gen CBS, białka zaangażowanego w konwersję homocysteiny do cysteiny, może być kolejnym *locus* DNA człowieka, wpływającym na dynamikę telomerów w leukocytach, w sposób zależny od płci i wieku. Długość telomerów ulegała zmianie u kobiet: były one dłuższe, u tych o genotypie CBS<sup>-/-</sup>, a efekt ten był obserwowany jedynie u młodszych, a nie u starszych kobiet.

Pomimo że, zbadano względnie małą ilość próbek pacjentów CBS<sup>-/-</sup> i kontroli, badanie było na tyle czułe by u mężczyzn wykryć znany związek długości telomerów z wiekiem i płcią (Sanders and Newman 2013; Müezziner *et al.* 2013). Brak natomiast istotnego związku długości telomerów i wieku u kobiet, może być spowodowane zbyt małą liczbą uczestników badania lub wpływem różnicowania etnicznego Europy Środkowej (Müezziner *et al.* 2013).

Uzyskane wyniki, mówiące o tym że genotyp CBS<sup>-/-</sup> wpływa na długość telomerów u kobiet ale nie u mężczyzn, sugerują że telomery nie są zaangażowane w skrócenie długości życia pacjentów o genotypie CBS<sup>-/-</sup>. Dodatkowo, pozytywna korelacja poziomu homocysteiny i długości telomerów we krwi u kobiet, ale nie u mężczyzn, wskazuje na małe prawdopodobieństwo udziału Hcy lub jej metabolitów w proces skracania się telomerów.

Dotychczasowe badania wpływu Hcy na długość telomerów u człowieka ograniczają się do analizy osób z łagodną postacią hiperhomocysteinemii, a uzyskane wnioski nie są jednoznaczne. W badaniu dwóch i pół tysiąca osób w Belgii nie odnotowano związku telomerów i homocysteiny (Bekaert *et al.* 2007), podobnie, - w grupie 1715 kobiet ze Stanów Zjednoczonych (Liu *et al.* 2013). Natomiast negatywna korelacja długości telomerów i Hcy została potwierdzona w grupie niemal trzech tysięcy osób z Niemiec (Pusceddu *et al.* 2019) i w badaniach bliźniąt w Wielkiej Brytanii (Richards *et al.* 2008). Jedynie w badaniu włoskim, na grupie 195 mężczyzn, przy średnich wartościach Hcy wynoszących 16,2 µM zaobserwowano o około 30% dłuższe telomery niż w grupie mężczyzn o niskim poziomie Hcy (6,0 µM) (Paul *et al.* 2009). Nie jest jasne, jakie są powody rozbieżności wyników uzyskanych w poszczególnych badaniach. Należy jednak pamiętać że, zmienność długości telomerów w powyższych analizach była nieznaczna, co mogło być rezultatem jedynie niewielkiego podwyższenia poziomu Hcy. Analiza wpływu ostrej postaci

HHcy, którą przedstawiono w tej pracy, prawdopodobnie może mieć dużo większe znaczenie dla tego typu badań.

## **6.2 Deficyt Cbs przyspiesza senescencję, redukuje poziom mtDNA, ale nie zmienia długości telomerów u myszy**

Zastosowanie mysiego modelu *Cbs*<sup>-/-</sup> pozwoliło zbadać, czy skracanie długości telomerów oraz/albo przyspieszona senescencja czy zmiany w mtDNA mogłyby wyjaśnić zredukowaną długość życia związaną z deficytem CBS. Myszy o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup>, podobnie jak ludzie o genotypie *CBS*<sup>-/-</sup> żyją krócej (Gupta *et al.* 2009), z tego powodu i długość telomerów może ulegać skróceniu. Założenie to jest związane z teorią senescencji komórkowej, wywoływanej zbyt krótkimi telomerami (Harley 1991), której rezultatem jest śmierć komórki. Czy genotyp *Cbs*<sup>-/-</sup> wpływa na długość telomerów i czy przyspiesza senescencję nie zostało do tej pory wyjaśnione.

### **6.2.1. Genotyp Cbs i długość telomerów**

W tym badaniu wykazano, że genotyp *Cbs* oraz Hcy nie przyczyniają się do modyfikacji długości telomerów we krwi, mózgu oraz wątrobie badanych myszy, a obserwowane zmiany związane były jedynie z płcią oraz wiekiem. Telomery obecne w mysiej krwi, były dłuższe u młodszych myszy. W wątrobie dłuższe telomery obserwowano u samic, natomiast krótsze u samców. Zależności te są podobne do tych, obserwowanych u ludzi. Natomiast wcześniejsze badania na szczurach, wskazują że podobna zależność może być uniwersalna również dla gryzoni (Cherif *et al.* 2003).

Długość telomerów zależy w dużym stopniu od ilości i aktywności telomerazy (Bodnar *et al.* 1998). Z tego powodu u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> określono również poziom mRNA *Tetr*. Zaobserwowano, związany z genotypem *Cbs*, niższy poziom mRNA *Tert* w mózgu oraz mniejsze zmiany mRNA *Tert* w wątrobie. Zatem HHcy oraz brak aktywności *Cbs* nie wpływają w sposób znaczący na poziom telomerów ale mogą wpływać na czynnik je regulujący – mRNA telomerazy. Co istotne, zastosowana metoda badawcza pozwoliła uchwycić zmiany poziomu mRNA *Tert* zależne od wieku, stąd wniosek że różnice wywołane przez HHcy są dużo mniejsze niż zmiany wywołane naturalnym starzeniem się.

### **6.2.2 Genotyp Cbs<sup>-/-</sup> obniża ilość mtDNA u myszy**

Mitochondria, jako organella mające ciągły kontakt z reaktywnymi formami tlenu, są stale narażone na uszkodzenia oksydacyjne, których skutki kumulują się z wiekiem np. w postaci mutacji mtDNA. Postuluje się że kumulacja mutacji mtDNA powoduje obniżenie poziomu DNA w mitochondrium (Malik and Czajka 2013). Celem badania było ustalenie czy poziom mtDNA u myszy maleje u starszych myszy i czy proces ten następuje szybciej u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>. Wykazano tkankowo-specyficzną zmienność ilości DNA w mitochondriach wraz z wiekiem oraz niewielki związek genotypu *Cbs* z poziomem mtDNA w wątrobie.

Rezultaty opisanych tu badań wskazują że, poziom mtDNA w wątrobie i mózgu jest niższy u osobników młodych, dwumiesięcznych niż u myszy starszych, rocznych, natomiast we krwi przeciwnie - maleje wraz z wiekiem. Zmiany poziomu mtDNA, specyficzne dla danej tkanki były obserwowane poprzednio (Masuyama *et al.* 2005). Wykazano tam że poziom mtDNA w mózgu, w trakcie życia myszy fluktuuje nieznacznie, natomiast w wątrobie osiąga maksimum w piątym miesiącu życia, następnie spada i w piętnastym miesiącu osiąga poziom nieznacznie wyższy od tego, w drugim tygodniu życia. U szczurów, poziom mtDNA u 31-miesięcznych osobników jest znacznie wyższy, w wątrobie i mózgu, niż u osobników 7-miesięcznych (Gadaleta *et al.* 1992). Zaprezentowane wyniki wskazują silny związek mtDNA z wiekiem myszy, oraz w mniejszym stopniu z genotypem *Cbs* - jedynie wątrobie. Zmiany spowodowane niedoborem aktywności *Cbs*, czego skutkiem jest HHcy oraz stres oksydacyjny, są istotne w kontekście zmian ilości mtDNA w wątrobie.

### **6.2.3. Genotyp *Cbs*<sup>-/-</sup> wpływa na poziom markerów senescencji**

Senescencja, czyli proces starzenia się komórki, zachodzi pod wpływem niekorzystnych czynników zewnętrznych. Aby sprawdzić w jakim stopniu HHcy wpływa na poziom senescencji, wykorzystano myszy modelu *Cbs*<sup>-/-</sup>, u których poziom Hcy jest znacznie podwyższony oraz myszy typu dzikiego. Poziomy mRNA markerów senescencji: *p21*, *Il-6*, *Mcp-1*, *Pai-1* oraz *Kl*, określano w mózgu i wątrobie.

#### **6.2.3.1. Wątroba**

Ustalono że, ekspresja czterech badanych w wątrobie markerów senescencji rośnie pod wpływem zmian wywołanych genotypem *Cbs*<sup>-/-</sup>. Poziomy mRNA *p21*,



związanego z zatrzymaniem cyklu komórkowego i tym samym opóźnieniem rozwoju nowotworów w wątrobie u myszy (Willenbring *et al.* 2008), był blisko osiem razy wyższy u młodych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> i o blisko pięć razy u starych samic *Cbs*<sup>-/-</sup>. Podwyższony, choć mniej znaczący, poziom mRNA *p21*, występował także u samców, a tendencja większych zmian u młodszych osobników została zachowana. Wysoki poziom mRNA *p21* u myszy, występuje w mysim modelu stłuszczenia wątroby (Yahagi *et al.* 2004), a u ludzi, jest związany z zachorowaniem na niealkoholowe stłuszczenie wątroby i jest oznaką że możliwości replikacyjne hepatocytów zostały wyczerpane (Richardson *et al.* 2007). Podwyższony poziom mRNA *p21* w wątrobie u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>, wskazuje na senescencję, może być także wskaźnikiem postępu uszkodzeń wątroby u tych myszy (Robert *et al.* 2005), które w konsekwencji zmian prowadzą do stłuszczenia wątroby (Gupta *et al.* 2008).

Podobnie, ekspresja mRNA *Pai-1* w wątrobie była podwyższona u samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, ale nie u samców. U młodych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> poziom mRNA *Pai-1* był dwukrotnie wyższy niż u starych samic. Sugeruje to zależny od płci i wieku wpływ genotypu *Cbs*<sup>-/-</sup> na poziom tego inhibitora aktywatora plazminogenu. Co więcej, genotyp *Cbs*, mRNA *Tert* oraz mtDNA silnie ze sobą korelują. Znaczące podwyższenie poziomu ekspresji *Pai-1* jest obserwowane w modelach mysich uszkodzenia wątroby (Dimova and Kietzmann 2008). U ludzi, wzrost stężenia PAI-1 jest związany z marskością wątroby ale także ze zmianami ją poprzedzającymi, takimi jak: choroba wątroby spowodowana alkoholem (ang. *alcoholic liver disease* ALD) czy niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD). Sugeruje się że, we wczesnych stadiach stłuszczenia wątroby, PAI-1 jest kluczowym modulatorem wątrobowego transportu lipidów, podczas gdy w stadiach późniejszych PAI-1 przyczynia się do stanu zapalnego (Thuy *et al.* 2008).

Ekspresja mRNA *Mcp-1* była większa u myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> i zmiana ta dotyczyła w podobnym stopniu samic i samców. Różnica ekspresji pomiędzy młodymi a starymi osobnikami *Cbs*<sup>-/-</sup> była istotna w grupie wszystkich osobników, oraz w grupie jedynie samców. Wykazano że istnieje istotny związek pomiędzy wiekiem, genotypem *Cbs* oraz poziomem mRNA *Mcp-1*. Zadaniem MCP-1 jest regulacja rekrutacji monocytów do tkanek i ich późniejsze różnicowanie do makrofagów. Jego ekspresja wzrasta u pacjentów z przewlekłymi chorobami zapalnymi, w tym z zaburzeniami czynności wątroby, zapaleniem

wątroby, marskość wątroby (Marsillach *et al.* 2005; Rull *et al.* 2009). Białko to może być zaangażowane w podtrzymywanie uszkodzenia wątroby i zwłóknienie, poprzez wzrost syntezy kolagenu (Marra *et al.* 1999).

U myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> poziom mRNA *Il-6* był znacznie podwyższony u osobników młodych oraz nie zmieniony u osobników starych. Znaleziono związek poziomu mRNA *Il-6* z mtDNA w grupie wszystkich badanych myszy, oraz z mRNA *Tert* - osobno dla samic i samców. U samic, genotyp *Cbs*<sup>-/-</sup>, mtDNA oraz mRNA *Tert*, znacząco wpływają na poziom mRNA *Il-6* w wątrobie. Interleukina 6 jest białkiem kluczowym do utrzymania homeostazy w wątrobie, bierze udział w jej regeneracji (Schmidt-Arras and Rose-John 2016). i jest jednym z głównych sygnałów propagujących i utrzymujących senescencję (Rodier and Campisi 2011). IL-6 wpływa na wiele funkcji chroniących wątrobę: indukuje mitozę, działa przeciwapoptotycznie i przeciwzapalnie oraz zapobiega stłuszczeniu wątroby (El-Assal *et al.* 2004). Prezentowane w pracy wyniki są zgodne z tymi, uzyskanymi w poprzednich badaniach na myszach i szczurach. Zarówno u zdrowych ale starzejących się szczurów (Maeso-Díaz *et al.* 2018), jak i u myszy (Luo *et al.* 2019), poziom wątrobowego mRNA i białka IL-6 rośnie wraz z wiekiem. Podwyższony poziom mRNA *Il-6*, w tym przypadku u samic myszy *Cbs*<sup>-/-</sup> może zatem wskazywać na ich wzmożone starzenie się i być jednym z powodów ich przedwczesnej śmierci. U ludzi, wysoki poziom IL-6 w osoczu jest związany z większą śmiertelnością w wieku starczym (Ferrucci *et al.* 1999) oraz redukcją siły i masy mięśniowej i niższą siłą fizyczną (Chung *et al.* 2009).

### **6.2.3.2 Mózg**

Nagromadzenie komórek w stanie senescencji może pełnić rolę w rozwoju chorób wieku starczego. Chociaż związek senescencji w mózgu i neurodegeneracji nie został jeszcze dobrze poznany, istnieją przesłanki mówiące o ekspresji markerów senescencji w rozwoju fenotypu sekrecyjnego (SASP) w astrocytach, mikrogleju i neuronach w fazie post-mitotycznej w starzejącym się mózgu (Bhat *et al.* 2012; Jurk *et al.* 2012; Safaiyan *et al.* 2016). Indukcja senescencji mogłaby być w tym przypadku mechanizmem alternatywnym, biorącym udział w rozwoju chorób neuro-degeneracyjnych. W prezentowanej pracy wykazano że genotyp *Cbs* wpływał w pewnym stopniu na ich poziom w mózgu.

Istotny efekt genotypu *Cbs* na poziom *p21* w mózgu, odnotowano dla młodych samic. Poziom mRNA *p21* był wówczas niemalże dwukrotnie wyższy u myszy o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> niż u myszy typu dzikiego. Ustalono istotny związek poziomu mRNA u myszy z długością telomerów oraz płcią. Wiadomo, że w mysim modelu starzenia się, białko p21 jest związane ze stanem senescencji neuronów. Wówczas ekspresja p21 wzrasta wraz z wiekiem myszy, poziomem Il-6 i uszkodzeniem DNA (Jurk *et al.* 2012). Z drugiej strony, badania na komórkach ludzkich nerwiaka zarodkowego (ang. *neuroblastoma*) pokazują że pięciodniowe traktowanie homocysteiną powoduje znaczny wzrost poziomu mRNA i białka p21 (Currò *et al.* 2014). Wzrost poziomu mRNA *p21* w mózgu, w tym przypadku jedynie u samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, sugeruje że to samice są bardziej podatne na działanie homocysteiny.

Poziom ekspresji mRNA *Pai-1* ulegał obniżeniu w mózgu u starych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> blisko dwukrotnie, czyli obserwowano zmianę odwrotną do tej, zachodzącej w wątrobie. Niewiele wiadomo o konsekwencjach fizjologicznych obniżonego poziomu *Pai-1* w mózgu. Badania kory przedczołowej osób chorych na alzheimera wskazują że, poziom białka PAI-1 nie ulega zmianie w trakcie rozwoju choroby (Fabbro and Seeds 2009). U myszy APP/PS1, modelu o zwiększonej produkcji β-amyloidu w mózgu poziom *Pai-1* jest podwyższony; niedobór *Pai-1* natomiast, zmniejsza poziom akumulacji β-amyloidu (Liu *et al.* 2011).

W mózgu, jedynie u starych samców o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> poziom mRNA *Il-6* ulegał obniżeniu. Analiza wieloraka wskazuje negatywną korelację poziomu mRNA *Il-6* z wiekiem oraz mRNA *Tert*. U szczurów, poziom *Il-6* zmienia się podczas życia postnatalnego, z największą ekspresją osiąganą w hipokampie dorosłych (Gadient and Otten 1994). Podawanie homocysteiny i wywołana tym samym lekka hiperhomocysteinemia, powoduje wzrost ekspresji *Il-6* oraz *Mcp-1* na poziomie mRNA i białka w korze mózgowej hipokampie szczurów (Kumar and Sandhir 2019). Hcy promuje, zależne od dawki, uwalnianie *Il-6* w dojrzałych astrocytach szczurzych (Longoni *et al.* 2018). Obserwowany w tym przypadku spadek poziomu mRNA *Il-6*, w stosunku do obserwacji podwyższenia poziomu mRNA *Il-6* wskazuje na regiospecyficzną zależność poziomu tego mRNA w mózgu. Obniżenie ilości mRNA *Il-6* jedynie u starych samców świadczy o zmianach w mózgu, zależnych od wieku. Nie są one jednak tożsame z tymi uzyskiwanymi na liniach komórkowych (Longoni *et al.*

2018). U ludzi, wzrost poziomu IL-6 w mózgu jest związany z Chorobą Parkinsona (Mogi *et al.* 1994), stwardnieniem rozsianym (Woodrooffe and Cuzner 1993) i chorobą Alzheimera (Bauer *et al.* 1991; Strauss *et al.* 1992).

Genotyp *Cbs* nie miał wpływu na dwa ostatnie badane markery senescencji w mózgu: mRNA *Mcp-1* oraz *Kl*. Mimo to, u samców znaleziono zależność świadcząca o wzroście mRNA *Mcp-1* u starszych osobników a poziom mRNA *Kl* malał wraz wiekiem myszy. MCP-1 powoduje rekrutację monocytów przez barierę krew-mózg, tym samym odgrywa kluczową rolę w tworzeniu przewlekłego stanu zapalnego, np. takiego jaki obserwuje się w chorobie Alzheimera (Sokolova i in., 2009). Myszy u których ekspresja MCP-1 jest wyższa, wykazują przyspieszoną neurodegenerację wywołaną senescencją (Yamamoto *et al.* 2005). Przy braku *Kl* natomiast, neurony hipokampa myszy wykazują podwyższoną apoptozę i wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i DNA, a funkcje poznawcze tych myszy są upośledzone (Kuro-o 2012). Ponadto, poziom białka *Klotho* maleje wraz z wiekiem (Duce *et al.* 2008), natomiast jego większa ekspresja, wydłuża życie myszy (Kurosu *et al.* 2005). Uzyskane wyniki wskazują że hiperhomocysteinemia nie wpływa na poziom mRNA *Mcp-1* oraz *Kl* w mózgu.

### **6.3. Interakcje pomiędzy BLMH i GLOD4 w mózgu myszy 5xFAD i pacjentów z chorobą Alzheimera**

Hydrolaza bleomycyny (BLMH) jest jednym z enzymów zdolnych do rozkładu tiolaktonu Hcy, metabolitu mającego związek z chorobami układu krążenia i chorobami neurologicznymi (Agnati *et al.* 2005; Hooshmand *et al.* 2013). Aktywność BLMH jest obniżona w mózgu u pacjentów chorych na chorobę Alzheimera (Suszynska *et al.* 2010). Myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> akumulują HcyTL w mózgu oraz wykazują astrogliozę, co wskazuje na patologię mózgu (Montoya *et al.* 2007). Nowy wariant białka *Glod4* został zidentyfikowany w mózgu myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> (Suszyńska-Zajczyk *et al.* 2014) a polimorfizm ludzkiego genu *GLOD4* jest związany z rodzinną postacią choroby Alzheimera (Papassotiropoulos *et al.* 2000).

W niniejszej pracy wykorzystano modele myszy u których podwyższony jest: poziom Hcy (*Cbs*<sup>-/-</sup>) (Gupta *et al.* 2008), tiolaktonu Hcy – metabolitu homocysteiny (*Blmh*<sup>-/-</sup>) (Borowczyk *et al.* 2012),  $\beta$ -amyloidu (5xFAD); oraz

nowy model: *Blmh*<sup>-/-</sup>5xFAD, a także korę mózgu pacjentów z AD i osób zdrowych.

Upřednio, potwierdzono że struktura białka Glod4 ulega zmianie w wątrobie pod wpływem genotypu *Blmh*<sup>-/-</sup> (Suszyńska-Zajczyk *et al.* 2014), oraz że aktywność białka BLMH spada w mózgu osób z AD (Suszynska *et al.* 2010). Prezentowane wyniki wskazują że zmiana struktury Glod4 zachodzi również w mózgu myszy *Blmh*<sup>-/-</sup>. Podobnie jak w wątrobie, białko Glod4 u myszy *Blmh*<sup>-/-</sup> zmienia swoją strukturę, stając się białkiem o mniejszej wartości pI.

Uzyskane rezultaty wskazują że poziom mRNA *Glod4* izoformy pierwszej jest nieznacznie wyższy u starych samic *Cbs*<sup>-/-</sup>, niż u samic typu dzikiego, w stosunku do samców obu genotypów. i odwrotnie, dla izoformy trzeciej, u młodych samic typu dzikiego, a nie tych o genotypie *Cbs*<sup>-/-</sup> poziom mRNA *Glod4* jest wyższy gdy wartości przyrównane są do samców odpowiednich płci. Co więcej, u młodych samic *Cbs*<sup>-/-</sup> poziom *Glod4* izoformy pierwszej jest niższy niż u samic starych, a zależność taka nie istnieje dla samic typu dzikiego oraz samców. Jedyne dostępne badania na temat zmian poziomu mRNA i białka *Glod4* od wieku, dotyczą grupy samców owcy domowej (*Ovis aries*) (Wang *et al.* 2019). W jądrach tych zwierząt, poziom *Glod4*, zarówno mRNA jak i białka jest niewielki w początkowym okresie życia, następnie wzrasta znacznie w okresie dojrzałości płciowej, i ten poziom utrzymuje się przez następne lata życia.

U myszy typu *Blmh*<sup>-/-</sup> genotyp nie wpływa na poziom mRNA *Glod4*, choć u tych myszy istnieje istotna różnica w poziomie białka *Glod4*. W mózgu samców i samic *Blmh*<sup>-/-</sup> oznaczono wyższe stężenie białka *Glod4* izoformy o większej masie, a izoformy o mniejszej masie było istotnie mniej u samców. Poziom mRNA *Glod4* u myszy 5xFAD wskazuje że obecność  $\beta$ -amyloidu jest związana z obniżeniem ilości mRNA *Glod4*, oraz że tło genetyczne *Blmh*<sup>-/-</sup> wzmacnia ten efekt. Podobnie u ludzi, poziom mRNA oraz białka GLOD4 w mózgu osób z chorobą Alzheimera był niższy niż u osób zdrowych. Poprzednie badania wskazują że polimorfizm *GLOD4*, którego konsekwencje są nieznane, koreluje z większą częstością występowania choroby Alzheimera (Sherva *et al.* 2011). Poziom białka *Glod4* lub jedynie izoformy trzeciej tego białka, jest wyższy w mózgu, obu dotychczas badanych mysich modelach choroby Alzheimera (Hoos *et al.* 2013; Yu *et al.* 2015). Postuluje się że białko GLOD4 może

posiadać aktywność glioksalazową i uczestniczyć w systemie detoksykacji w mitochondriach (Mannervik 2008).

#### **6.4 Wnioski**

(1) Genotyp *CBS* i HHcy wpływają na długość telomerów u kobiet, co identyfikuje *CBS* jako nowy *locus* ludzkiego genomu, wpływający na długość telomerów.

(2) U myszy genotyp *Cbs* nie ma wpływu na długość telomerów.

(3) Genotyp *Cbs* wpływa na poziom mtDNA oraz markerów senescencji, co świadczy o jej nasileniu, szczególnie w wątrobie myszy *Cbs*<sup>-/-</sup>.

(4) Związane z genotypem *Cbs*<sup>-/-</sup> skrócenie długości życia myszy, może być wytłumaczone zmianą ilości mtDNA i podwyższonym poziomem markerów senescencji ale nie skracaniem telomerów.

(4) Zidentyfikowano oddziaływania między BLMH and GLOD4 w mózgu pacjentów z AD i mysim modelem AD (5xFAD). Zaburzenie tych oddziaływań może przyczyniać się do rozwoju tej choroby.

## 7 Literatura

- Agnati L. F., Genedani S., Rasio G., Galantucci M., Saltini S., Filaferrero M., Franco R., Mora F., Ferré S., and Fuxe K. (2005). Studies on homocysteine plasma levels in Alzheimer's patients. Relevance for neurodegeneration. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **112**, 163–169. doi:10.1007/s00702-004-0154-7
- Albee A. J., Kwan A. L., Lin H., Granas D., Stormo G. D., and Dutcher S. K. (2013). Identification of Cilia Genes That Affect Cell-Cycle Progression Using Whole-Genome Transcriptome Analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *G3 GenesGenomesGenetics* **3**, 979–991. doi:10.1534/g3.113.006338
- Aviv A., Hunt S. C., Lin J., Cao X., Kimura M., and Blackburn E. (2011). Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Res.* **39**, e134–e134. doi:10.1093/nar/gkr634
- Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., and Jones E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 1019–1031. doi:10.1016/S0140-6736(10)61349-9
- Barber G. W., and Spaeth G. L. (1969). The successful treatment of homocystinuria with pyridoxine. *J. Pediatr.* **75**, 463–478. doi:10.1016/s0022-3476(69)80274-x
- Bauer J., Strauss S., Schreiter-Gasser U., Ganter U., Schlegel P., Witt I., Yolck B., and Berger M. (1991). Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett.* **285**, 111–114. doi:10.1016/0014-5793(91)80737-n
- Bekaert S., Meyer T. D., Rietzschel E. R., Buyzere M. L. D., Bacquer D. D., Langlois M., Segers P., Cooman L., Damme P. V., Cassiman P., Criekinge W. V., Verdonck P., Backer G. G. D., Gillebert T. C., and Oostveldt P. V. (2007). Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell* **6**, 639–647. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00321.x
- Bhat R., Crowe E. P., Bitto A., Moh M., Katsetos C. D., Garcia F. U., Johnson F. B., Trojanowski J. Q., Sell C., and Torres C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* **7**, e45069. doi:10.1371/journal.pone.0045069
- Blasco M. A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 640–649. doi:10.1038/nchembio.2007.38
- Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C.-P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., and Wright W. E. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* **279**, 349–352. doi:10.1126/science.279.5349.349
- Borowczyk K., Tisończyk J., and Jakubowski H. (2012). Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase. *Amino Acids* **43**, 1339–1348. doi:10.1007/s00726-011-1207-5
- Braak H., and Braak E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* **18**, 351–357.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Campion D., Dumanchin C., Hannequin D., Dubois B., Belliard S., Puel M., Thomas-Anterion C., Michon A., Martin C., Charbonnier F., Raux G., Camuzat A., Penet C., Mesnage V., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Brice A., and Frebourg T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 664–670. doi:10.1086/302553
- Campisi J., and d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740. doi:10.1038/nrm2233
- Cawthon R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* **37**, e21–e21. doi:10.1093/nar/gkn1027
- Chen Q., Fischer A., Reagan J. D., Yan L. J., and Ames B. N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid

- fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4337–4341.
- Cherif H., Tarry J. L., Ozanne S. E., and Hales C. N. (2003). Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1576–1583.
- Chung H. Y., Cesari M., Anton S., Marzetti E., Giovannini S., Seo A. Y., Carter C., Yu B. P., and Leeuwenburgh C. (2009). Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **8**, 18–30. doi:10.1016/j.arr.2008.07.002
- Chwatko G., and Jakubowski H. (2005). The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal. Biochem.* **337**, 271–277. doi:10.1016/j.ab.2004.11.035
- Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B., and Graham I. (1991). Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1149–1155. doi:10.1056/NEJM199104253241701
- Codd V., Nelson C. P., Albrecht E., Mangino M., Deelen J., Buxton J. L., Jan Hottenga J., Fischer K., Esko T., Surakka I., Broer L., Nyholt D. R., Mateo Leach I., Salo P., Hägg S., Matthews M. K., Palmen J., Norata G. D., O'Reilly P. F., Saleheen D., Amin N., Balmforth A. J., Beekman M., de Boer R. A., Böhringer S., Braund P. S., Burton P. R., de Craen A. J. M., Denniff M., Dong Y., Douroudis K., Dubinina E., Eriksson J. G., Garlaschelli K., Guo D., Hartikainen A.-L., Henders A. K., Houwing-Duistermaat J. J., Kananen L., Karssen L. C., Kettunen J., Klopp N., Lagou V., van Leeuwen E. M., Madden P. A., Mägi R., Magnusson P. K. E., Männistö S., McCarthy M. I., Medland S. E., Mihailov E., Montgomery G. W., Oostra B. A., Palotie A., Peters A., Pollard H., Pouta A., Prokopenko I., Ripatti S., Salomaa V., Suchiman H. E. D., Valdes A. M., Verweij N., Viñuela A., Wang X., Wichmann H.-E., Widen E., Willemsen G., Wright M. J., Xia K., Xiao X., van Veldhuisen D. J., Catapano A. L., Tobin M. D., Hall A. S., Blakemore A. I. F., van Gilst W. H., Zhu H., Erdmann J., Reilly M. P., Kathiresan S., Schunkert H., Talmud P. J., Pedersen N. L., Perola M., Ouwehand W., Kaprio J., Martin N. G., van Duijn C. M., Hovatta I., Gieger C., Metspalu A., Boomsma D. I., Jarvelin M.-R., Slagboom P. E., Thompson J. R., Spector T. D., van der Harst P., and Samani N. J. (2013). Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat. Genet.* **45**, 422–427e2. doi:10.1038/ng.2528
- Cruts M., and Van Broeckhoven C. (1998). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Ann. Med.* **30**, 560–565.
- Currò M., Gugliandolo A., Gangemi C., Risitano R., Ientile R., and Caccamo D. (2014). Toxic Effects of Mildly Elevated Homocysteine Concentrations in Neuronal-Like Cells. *Neurochem. Res.* **39**, 1485–1495. doi:10.1007/s11064-014-1338-7
- Dankner R., Chetrit A., Lubin F., and Sela B.-A. (2004). Life-style habits and homocysteine levels in an elderly population. *Ageing Clin. Exp. Res.* **16**, 437–442.
- van Deursen J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446. doi:10.1038/nature13193
- Dimova E. Y., and Kietzmann T. (2008). Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver. *Thromb. Haemost.* **100**, 992–1006.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., and Pereira-Smith O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367.
- Duce J. A., Podvin S., Hollander W., Kipling D., Rosene D. L., and Abraham C. R. (2008). Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia* **56**, 106–117. doi:10.1002/glia.20593
- Durrenberger P. F., Fernando F. S., Magliozzi R., Kashefi S. N., Bonnert T. P., Ferrer I., Seilhean D., Nait-Oumesmar B., Schmitt A., Gebicke-Haerter P. J., Falkai P., Grünblatt E., Palkovits M., Parchi P., Capellari S., Arzberger T., Kretschmar H., Roncaroli F., Dexter D. T., and Reynolds R. (2012). Selection of novel reference genes for use in the human central nervous system: a BrainNet Europe Study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **124**, 893–903. doi:10.1007/s00401-012-1027-z
- Eckman C. B., Mehta N. D., Crook R., Perez-tur J., Prihar G., Pfeiffer E., Graff-Radford N., Hinder P., Yager D., Zenk B., Refolo L. M., Mihail Prada C., Younkin S. G., Hutton M., and Hardy J. (1997). A New Pathogenic Mutation in the APP Gene (I716V) Increases the Relative Proportion of A $\beta$ 42(43). *Hum.*



- Mol. Genet.* **6**, 2087–2089. doi:10.1093/hmg/6.12.2087
- Ehrlenbach S., Willeit P., Kiechl S., Willeit J., Reindl M., Schanda K., Kronenberg F., and Brandstätter A. (2009). Influences on the reduction of relative telomere length over 10 years in the population-based Bruneck Study: introduction of a well-controlled high-throughput assay. *Int. J. Epidemiol.* **38**, 1725–1734. doi:10.1093/ije/dyp273
- El-Assal O., Hong F., Kim W.-H., Radaeva S., and Gao B. (2004). IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. *Cell Mol. Immunol.* **1**, 205–211.
- Escames G., López L. C., García J. A., García-Corzo L., Ortiz F., and Acuña-Castroviejo D. (2012). Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum. Genet.* **131**, 161–173. doi:10.1007/s00439-011-1057-y
- Fabbro S., and Seeds N. W. (2009). Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* **109**, 303–315. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05894.x
- Ferrucci L., Harris T. B., Guralnik J. M., Tracy R. P., Corti M. C., Cohen H. J., Penninx B., Pahor M., Wallace R., and Havlik R. J. (1999). Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* **47**, 639–646. doi:10.1111/j.1532-5415.1999.tb01583.x
- Fonseca V., Guba S. C., and Fink L. M. (1999). Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr. Rev.* **20**, 738–759. doi:10.1210/edrv.20.5.0381
- Fowler B., Kraus J., Packman S., and Rosenberg L. E. (1978). Homocystinuria. Evidence for three distinct classes of cystathionine beta-synthase mutants in cultured fibroblasts. doi:10.1172/JCI108976
- Gadaleta M. N., Rainaldi G., Lezza A. M. S., Milella F., Fracasso F., and Cantatore P. (1992). Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat. Res.* **275**, 181–193. doi:10.1016/0921-8734(92)90022-H
- Gadient R. A., and Otten U. (1994). Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res.* **637**, 10–14. doi:10.1016/0006-8993(94)91211-4
- Gilkerson R., Bravo L., Garcia I., Gaytan N., Herrera A., Maldonado A., and Quintanilla B. (2013). The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, doi:10.1101/cshperspect.a011080
- Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., and James L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704–706. doi:10.1038/349704a0
- Goldstein S., Moerman E. J., Fujii S., and Sobel B. E. (1994). Overexpression of plasminogen activator inhibitor type-1 in senescent fibroblasts from normal subjects and those with Werner syndrome. *J. Cell. Physiol.* **161**, 571–579. doi:10.1002/jcp.1041610321
- Gomes R., Sousa Silva M., Quintas A., Cordeiro C., Freire A., Pereira P., Martins A., Monteiro E., Barroso E., and Ponces Freire A. (2005). Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem. J.* **385**, 339–345. doi:10.1042/BJ20040833
- Gorbunova V., and Seluanov A. (2009). Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: From mice to beavers. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 3–9. doi:10.1016/j.mad.2008.02.008
- van Guldener C. (2006). Why is homocysteine elevated in renal failure and what can be expected from homocysteine-lowering? *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **21**, 1161–1166. doi:10.1093/ndt/gfl044
- Gupta S., Kühnisch J., Mustafa A., Lhotak S., Schlachterman A., Slifker M. J., Klein-Szanto A., High K. A., Austin R. C., and Kruger W. D. (2008). Mouse models of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency reveal significant threshold effects of hyperhomocysteinemia. *FASEB J.* **23**, 883–893. doi:10.1096/fj.08-120584
- Gupta S., Kühnisch J., Mustafa A., Lhotak S., Schlachterman A., Slifker M. J., Klein-Szanto A., High K. A., Austin R. C., and Kruger W. D. (2009). Mouse models of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency reveal significant threshold effects of

- hyperhomocysteinemia. *FASEB J.* **23**, 883–893. doi:10.1096/fj.08-120584
- Hardy J. (2006). A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* **52**, 3–13. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.016
- Harley C. B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* **256**, 271–282. doi:10.1016/0921-8734(91)90018-7
- Hayflick L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636. doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9
- Hemann M. T. (2000). Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4474–4478. doi:10.1093/nar/28.22.4474
- Henry O. R., Benghuzzi H., Taylor H. A., Tucci M., Butler K., and Jones L. (2012). Suppression of Homocysteine Levels by Vitamin B12 and Folate: Age and Gender Dependency in the Jackson Heart Study. *Am. J. Med. Sci.* **344**, 110–115. doi:10.1097/MAJ.0b013e31823782a5
- Homocysteine Studies Collaboration (2002). Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* **288**, 2015–2022. doi:10.1001/jama.288.16.2015
- Hoos M. D., Richardson B. M., Foster M. W., Everhart A., Thompson J. W., Moseley M. A., and Colton C. A. (2013). Longitudinal study of differential protein expression in an Alzheimer's mouse model lacking inducible nitric oxide synthase. *J. Proteome Res.* **12**, 4462–4477. doi:10.1021/pr4005103
- Hooshmand B., Polvikoski T., Kivipelto M., Tanskanen M., Myllykangas L., Erkinjuntti T., Mäkelä M., Oinas M., Paetau A., Scheltens P., van Straaten E. C. W., Sulkava R., and Solomon A. (2013). Plasma homocysteine, Alzheimer and cerebrovascular pathology: a population-based autopsy study. *Brain J. Neurol.* **136**, 2707–2716. doi:10.1093/brain/awt206
- Hurkman W. J., and Tanaka C. K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**, 802–806. doi:10.1104/pp.81.3.802
- Irvine G. B., El-Agnaf O. M., Shankar G. M., and Walsh D. M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Med. Camb. Mass* **14**, 451–464. doi:10.2119/2007-00100.Irvine
- Jakubowski H. (1997). Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J. Biol. Chem.* **272**, 1935–1942.
- Jakubowski H. (1999). Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13**, 2277–2283.
- Jakubowski H. (2000). Calcium-dependent Human Serum Homocysteine Thiolactone Hydrolase A protective mechanism against protein homocysteinylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 3957–3962.
- Jakubowski H. (2002). Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J. Biol. Chem.* **277**, 30425–30428. doi:10.1074/jbc.C200267200
- Jakubowski H. (2018). Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiol. Rev.* **99**, 555–604. doi:10.1152/physrev.00003.2018
- Jurk D., Wang C., Miwa S., Maddick M., Korolchuk V., Tsolou A., Gonos E. S., Thrasivoulou C., Saffrey M. J., Cameron K., and von Zglinicki T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell* **11**, 996–1004. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x
- Kajiya A., Kaji H., and Takeda T. I. and A. (2006). Processing of Amyloid  $\beta$ -Peptides by Neutral Cysteine Protease Bleomycin Hydrolase. *Protein & Peptide Letters*. <http://www.eurekaselect.com/56796/article>
- Khayati K., Antikainen H., Bonder E. M., Weber G. F., Kruger W. D., Jakubowski H., and Dobrowolski R. (2017). The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31**, 598–609. doi:10.1096/fj.201600915R
- Komrower G. M., Lambert A. M., Cusworth D. C., and Westall R. G. (1966). Dietary

- treatment of homocystinuria. *Arch. Dis. Child.* **41**, 666–671.
- Kortlever R. M., Higgins P. J., and Bernards R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat. Cell Biol.* **8**, 877–884. doi:10.1038/ncb1448
- Kožich V., Kraus J. P., and Majtan T. (2018). Cystathionine  $\beta$ -Synthase (CBS) Deficiency: Genetics. 'eLS'. pp. 1–12. (American Cancer Society) doi:10.1002/9780470015902.a0005935.pu b3
- Kraus J. P., Janosik M., Kožich V., Mandell R., Shih V., Sperandio M. P., Sebastio G., de Franchis R., Andria G., Kluijtmans L. A., Blom H., Boers G. H., Gordon R. B., Kamoun P., Tsai M. Y., Kruger W. D., Koch H. G., Ohura T., and Gaustadnes M. (1999). Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum. Mutat.* **13**, 362–375. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:5<362::AID-HUMU4>3.0.CO;2-K
- Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., and Peepers D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* **24**, 2463–2479. doi:10.1101/gad.1971610
- Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L. C. W., Douma S., van Doorn R., Desmet C. J., Aarden L. A., Mooi W. J., and Peepers D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019–1031. doi:10.1016/j.cell.2008.03.039
- Kuilman T., and Peepers D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94. doi:10.1038/nrc2560
- Kukat C., Wurm C. A., Spähr H., Falkenberg M., Larsson N.-G., and Jakobs S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13534–13539. doi:10.1073/pnas.1109263108
- Kumar A., Palfrey H. A., Pathak R., Kadowitz P. J., Gettys T. W., and Murthy S. N. (2017). The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr. Metab.* **14**,. doi:10.1186/s12986-017-0233-z
- Kumar M., and Sandhir R. (2019). Hydrogen sulfide suppresses homocysteine-induced glial activation and inflammatory response. *Nitric Oxide* **90**, 15–28. doi:10.1016/j.niox.2019.05.008
- Kuro-o M. (2012). Klotho and  $\beta$ Klotho. 'Endocrine FGFs and Klothos'. (Ed M Kuro-o) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp. 25–40. (Springer US: New York, NY) doi:10.1007/978-1-4614-0887-1\_2
- Kuro-o M. (2019). The Klotho proteins in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 27–44. doi:10.1038/s41581-018-0078-3
- Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R., and Nabeshima Y. I. (1997). Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45–51. doi:10.1038/36285
- Kurosu H., Yamamoto M., Clark J. D., Pastor J. V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O. P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., Shimomura I., Takayama Y., Herz J., Kahn C. R., Rosenblatt K. P., and Kuro-o M. (2005). Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309**, 1829–1833. doi:10.1126/science.1112766
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Larsson L.-G. (2011). Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 367–376. doi:10.1016/j.semcancer.2011.10.005
- Lee H.-C., and Wei Y.-H. (2012). Mitochondria and Aging. 'Advances in Mitochondrial Medicine'. (Eds R Scatena, P Bottoni and B Giardina) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp. 311–327. (Springer Netherlands: Dordrecht) doi:10.1007/978-94-007-2869-1\_14
- Li J., Barrero C., Gupta S., Kruger W. D., Merali S., and Praticò D. (2017). Homocysteine modulates 5-lipoxygenase expression level via DNA methylation. *Aging Cell* **16**, 273–280. doi:10.1111/acel.12550
- Li X.-H., Xie J.-Z., Jiang X., Lv B.-L., Cheng X.-S., Du L.-L., Zhang J.-Y., Wang J.-Z., and Zhou X.-W. (2012). Methylglyoxal induces tau hyperphosphorylation via promoting AGEs formation. *Neuromolecular*

- Med.* **14**, 338–348. doi:10.1007/s12017-012-8191-0
- Liu R.-M., van Groen T., Katre A., Cao D., Kadisha I., Ballinger C., Wang L., Carroll S. L., and Li L. (2011). Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 1079–1089. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.06.003
- Liu J. J., Prescott J., Giovannucci E., Hankinson S. E., Rosner B., and De Vivo I. (2013). One-carbon metabolism factors and leukocyte telomere length. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 794–799. doi:10.3945/ajcn.112.051557
- Livak K. J., and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Longoni A., Bellaver B., Bobermin L. D., Santos C. L., Nonose Y., Kolling J., dos Santos T. M., de Assis A. M., Quincozes-Santos A., and Wyse A. T. S. (2018). Homocysteine Induces Glial Reactivity in Adult Rat Astrocyte Cultures. *Mol. Neurobiol.* **55**, 1966–1976. doi:10.1007/s12035-017-0463-0
- Lu S.-Y., Chang K.-W., Liu C.-J., Tseng Y.-H., Lu H.-H., Lee S.-Y., and Lin S.-C. (2006). Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis* **27**, 1273–1284. doi:10.1093/carcin/bgi357
- Luo D., Li J., Chen K., Yin Y., Fang Z., Pang H., Rong X., and Guo J. (2019). Study on Metabolic Trajectory of Liver Aging and the Effect of Fufang Zhenzhu Tiaozhi on Aging Mice. *Front. Pharmacol.* **10**, . doi:10.3389/fphar.2019.00926
- Lüth H. J., Holzer M., Gertz H. J., and Arendt T. (2000). Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly co-localized with p21ras and p16INK4a. *Brain Res.* **852**, 45–55. doi:10.1016/s0006-8993(99)02178-2
- Maeso-Díaz R., Ortega-Ribera M., Fernández-Iglesias A., Hide D., Muñoz L., Hessheimer A. J., Vila S., Francés R., Fondevila C., Albillos A., Peralta C., Bosch J., Tacke F., Cogger V. C., and Gracia-Sancho J. (2018). Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. *Aging Cell* **17**, e12829. doi:10.1111/ace1.12829
- Malik A. N., and Czajka A. (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* **13**, 481–492. doi:10.1016/j.mito.2012.10.011
- Malik A. N., Czajka A., and Cunningham P. (2016). Accurate quantification of mouse mitochondrial DNA without co-amplification of nuclear mitochondrial insertion sequences. *Mitochondrion* **29**, 59–64. doi:10.1016/j.mito.2016.05.003
- Malik A. N., Shahni R., Rodriguez-de-Ledesma A., Laftah A., and Cunningham P. (2011). Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: Accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 1–7. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.067
- Mannervik B. (2008). Molecular enzymology of the glyoxalase system. *Drug Metabol. Drug Interact.* **23**, 13–27.
- Marion R. M., Strati K., Li H., Tejera A., Schoeftner S., Ortega S., Serrano M., and Blasco M. A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **4**, 141–154. doi:10.1016/j.stem.2008.12.010
- Maron B. A., and Loscalzo J. (2006). Homocysteine. *Clin. Lab. Med.* **26**, 591–609. doi:10.1016/j.cll.2006.06.008
- Maron B. A., and Loscalzo J. (2009). The treatment of hyperhomocysteinemia. *Annu. Rev. Med.* **60**, 39–54. doi:10.1146/annurev.med.60.041807.123308
- Marra F., Romanelli R. G., Giannini C., Failli P., Pastacaldi S., Arrighi M. C., Pinzani M., Laffi G., Montalto P., and Gentilini P. (1999). Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatol. Baltim. Md* **29**, 140–148. doi:10.1002/hep.510290107
- Marsillach J., Bertran N., Camps J., Ferré N., Riu F., Tous M., Coll B., Alonso-Villaverde C., and Joven J. (2005). The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease. *Clin. Biochem.* **38**, 1138–1140. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.09.006

- Marsillach J., Suzuki S. M., Richter R. J., McDonald M. G., Rademacher P. M., MacCoss M. J., Hsieh E. J., Rettie A. E., and Furlong C. E. (2014). Human Valacyclovir Hydrolase/Biphenyl Hydrolase-Like Protein Is a Highly Efficient Homocysteine Thiolactonase. *PLoS ONE* **9**, doi:10.1371/journal.pone.0110054
- Masuyama M., Iida R., Takatsuka H., Yasuda T., and Matsuki T. (2005). Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1723**, 302–308. doi:10.1016/j.bbagen.2005.03.001
- Mather K. A., Jorm A. F., Parslow R. A., and Christensen H. (2011). Is Telomere Length a Biomarker of Aging? A Review. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **66A**, 202–213. doi:10.1093/gerona/gfq180
- McCully K. S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* **56**, 111–128.
- McShea A., Harris P. L., Webster K. R., Wahl A. F., and Smith M. A. (1997). Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **150**, 1933–1939.
- Mejbaum-Katzenelenbogen W. (1955). Turbidymetryczna mikrometoda oznaczania białek taniną. *Acta Biochim Pol* **2**, 279–296.
- Mendonça N., Jagger C., Granic A., Martin-Ruiz C., Mathers J. C., Seal C. J., and Hill T. R. (2018). Elevated Total Homocysteine in All Participants and Plasma Vitamin B12 Concentrations in Women Are Associated With All-Cause and Cardiovascular Mortality in the Very Old: The Newcastle 85+ Study. *J. Gerontol. Ser. A* **73**, 1258–1264. doi:10.1093/gerona/gly035
- Meyne J., Ratliff R. L., and Moyzis R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG) among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **5**.
- Mogi M., Harada M., Kondo T., Riederer P., Inagaki H., Minami M., and Nagatsu T. (1994). Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* **180**, 147–150. doi:10.1016/0304-3940(94)90508-8
- Montoya S. E., Aston C. E., DeKosky S. T., Kamboh M. I., Lazo J. S., and Ferrell R. E. (1998). Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **18**, 211–212. doi:10.1038/ng0398-211
- Montoya S. E., Thiels E., Card J. P., and Lazo J. S. (2007). Astroglial and behavioral changes in mice lacking the neutral cysteine protease bleomycin hydrolase. *Neuroscience* **146**, 890–900. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.027
- Moorthie S., Cameron L., Sagoo G. S., Bonham J. R., and Burton H. (2014). Systematic review and meta-analysis to estimate the birth prevalence of five inherited metabolic diseases. *J. Inher. Metab. Dis.* **37**, 889–898. doi:10.1007/s10545-014-9729-0
- Mu X.-C., and Higgins P. J. (1995). Differential growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in senescent IMR-90 human diploid fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **165**, 647–657. doi:10.1002/jcp.1041650324
- Mudd S. H., Finkelstein J. D., Refsum H., Ueland P. M., Malinow M. R., Lentz S. R., Jacobsen D. W., Brattström L., Wilcken B., Wilcken D. E., Blom H. J., Stabler S. P., Allen R. H., Selhub J., and Rosenberg I. H. (2000). Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1704–1706.
- Mudd S. H., Skovby F., Levy H. L., Pettigrew K. D., Wilcken B., Pyeritz R. E., Andria G., Boers G. H. J., Bromberg I. L., Cerone R., Fowler B., Gröbe H., Schmidt H., and Schweitzer L. (1985). The natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 1–31.
- Müezziner A., Zaineddin A. K., and Brenner H. (2013). A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res. Rev.* **12**, 509–519. doi:10.1016/j.arr.2013.01.003
- Mullan M. (1992). Familial Alzheimer's disease: second gene locus located. *BMJ* **305**, 1108–1109. doi:10.1136/bmj.305.6862.1108
- Njajou O. T., Cawthon R. M., Damcott C. M., Wu S.-H., Ott S., Garant M. J., Blackburn E. H., Mitchell B. D., Shuldiner A. R., and Hsueh W.-C. (2007). Telomere length is paternally inherited and is associated with

- parental lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12135–12139. doi:10.1073/pnas.0702703104
- Nygård O., Refsum H., Ueland P. M., and Vollset S. E. (1998). Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 263–270. doi:10.1093/ajcn/67.2.263
- Oakley H., Cole S. L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., and Vassar R. (2006). Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuronal Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J. Neurosci.* **26**, 10129–10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
- Okamura Y., Nomoto S., Hayashi M., Hishida M., Nishikawa Y., Yamada S., Fujii T., Sugimoto H., Takeda S., Kodera Y., and Nakao A. (2011). Identification of the bleomycin hydrolase gene as a methylated tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma using a novel triple-combination array method. *Cancer Lett.* **312**, 150–157. doi:10.1016/j.canlet.2011.07.028
- Paoli P., Sbrana F., Tiribilli B., Caselli A., Pantera B., Cirri P., De Donatis A., Formigli L., Nosi D., Manao G., Camici G., and Ramponi G. (2010). Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *J. Mol. Biol.* **400**, 889–907. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.039
- Papassotiropoulos A., Bagli M., Jessen F., Frahnert C., Rao M. L., Maier W., and Heun R. (2000). Confirmation of the association between bleomycin hydrolase genotype and Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **5**, 213–215. doi:10.1038/sj.mp.4000656
- Paul L., Cattaneo M., D'Angelo A., Sampietro F., Fermo I., Razzari C., Fontana G., Eugene N., Jacques P. F., and Selhub J. (2009). Telomere length in peripheral blood mononuclear cells is associated with folate status in men. *J. Nutr.* **139**, 1273–1278. doi:10.3945/jn.109.104984
- Perla-Kajan J., Twardowski T., and Jakubowski H. (2007). Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* **32**, 561–572. doi:10.1007/s00726-006-0432-9
- Perla-Kajan J., Utyro O., Rusek M., Malinowska A., Sitkiewicz E., and Jakubowski H. (2016). N-Homocysteinylation impairs collagen cross-linking in cystathionine  $\beta$ -synthase-deficient mice: a novel mechanism of connective tissue abnormalities. *FASEB J.* **30**, 3810–3821. doi:10.1096/fj.201600539
- Pusceddu I., Herrmann W., Kleber M. E., Scharnagl H., Hoffmann M. M., Winklhofer-Roob B. M., März W., and Herrmann M. (2019). Subclinical inflammation, telomere shortening, homocysteine, vitamin B6, and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Eur. J. Nutr.* doi:10.1007/s00394-019-01993-8
- Qian Y., and Chen X. (2010). Tumor suppression by p53: making cells senescent. *Histol. Histopathol.* **25**, 515–526. doi:10.14670/HH-25.515
- Qin W. X., Wan D. F., Sun F. Y., Zhang P. P., Han L. W., Huang Y., Jiang H. Q., Zhao X. T., He M., Ye Y., Cong W. M., Wu M. C., Zhang L. S., Yang N. W., and Gu J. R. (2001). Cloning and characterization of a novel gene (C17orf25) from the deletion region on chromosome 17p13.3 in hepatocellular carcinoma\*. *Cell Res.* **11**, 209–216. doi:10.1038/sj.cr.7290088
- Qu F., Liu X., Zhou F., Yang H., Bao G., He X., and Xing J. (2011). Association between mitochondrial DNA content in leukocytes and colorectal cancer risk: a case-control analysis. *Cancer* **117**, 3148–3155. doi:10.1002/cncr.25906
- Quiros P. M., Goyal A., Jha P., and Auwerx J. (2017). Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **7**, 47–54. doi:10.1002/cpmo.21
- Ratovitski T., Chighladze E., Waldron E., Hirschhorn R. R., and Ross C. A. (2011). Cysteine Proteases Bleomycin Hydrolase and Cathepsin Z Mediate N-terminal Proteolysis and Toxicity of Mutant Huntingtin. *J. Biol. Chem.* **286**, 12578–12589. doi:10.1074/jbc.M110.185348
- Renga B. (2011). Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) and cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE). *Inflamm. Allergy Drug Targets* **10**, 85–91. doi:10.2174/187152811794776286
- Richards J. B., Valdes A. M., Gardner J. P., Kato B. S., Siva A., Kimura M., Lu X., Brown M. J., Aviv A., and Spector T. D. (2008). Homocysteine levels and leukocyte

- telomere length. *Atherosclerosis* **200**, 271–277.  
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.035
- Richardson M. M., Jonsson J. R., Powell E. E., Brunt E. M., Neuschwander-Tetri B. A., Bhathal P. S., Dixon J. B., Weltman M. D., Tilg H., Moschen A. R., Purdie D. M., Demetris A. J., and Clouston A. D. (2007). Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* **133**, 80–90.  
doi:10.1053/j.gastro.2007.05.012
- Robert K., Nehmé J., Bourdon E., Pivert G., Friguet B., Delcayre C., Delabar J.-M., and Janel N. (2005). Cystathionine  $\beta$  Synthase Deficiency Promotes Oxidative Stress, Fibrosis, and Steatosis in Mice Liver. *Gastroenterology* **128**, 1405–1415.  
doi:10.1053/j.gastro.2005.02.034
- Rodier F., and Campisi J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547–556. doi:10.1083/jcb.201009094
- Rodríguez J. J. V., Santolaria F., Martínez-Riera A., González-Reimers E., de la Vega Prieto M. J., Valls M. R. A., and Gaspar M. R. (2006). Clinical significance of homocysteine in elderly hospitalized patients. *Metabolism*. **55**, 620–627.  
doi:10.1016/j.metabol.2005.12.009
- Rull A., Rodríguez F., Aragonès G., Marsillach J., Beltrán R., Alonso-Villaverde C., Camps J., and Joven J. (2009). Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine* **48**, 273–279.  
doi:10.1016/j.cyto.2009.08.006
- Safaiyan S., Kannaiyan N., Snaidero N., Brioschi S., Biber K., Yona S., Edinger A. L., Jung S., Rossner M. J., and Simons M. (2016). Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat. Neurosci.* **19**, 995–998.  
doi:10.1038/nn.4325
- Sanders J. L., Boudreau R. M., Penninx B. W., Simonsick E. M., Kritchevsky S. B., Satterfield S., Harris T. B., Bauer D. C., and Newman A. B. (2012). Association of a Modified Physiologic Index With Mortality and Incident Disability: The Health, Aging, and Body Composition Study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **67**, 1439–1446.  
doi:10.1093/gerona/gls123
- Sanders J. L., and Newman A. B. (2013). Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? *Epidemiol. Rev.* **35**, 112–131. doi:10.1093/epirev/mxs008
- Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T. D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., and Younkin S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870.
- Schmidt-Arras D., and Rose-John S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* **64**, 1403–1415.  
doi:10.1016/j.jhep.2016.02.004
- Schwartz D. R., Homanics G. E., Hoyt D. G., Klein E., Abernethy J., and Lazo J. S. (1999). The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4680–4685. doi:10.1073/pnas.96.8.4680
- Selak M. A., Lyver E., Micklow E., Deutsch E. C., Onder O., Selamoglu N., Yager C., Knight S., Carroll M., Daldal F., Dancis A., Lynch D. R., and Sarry J.-E. (2011). Blood cells from Friedreich ataxia patients harbor frataxin deficiency without a loss of mitochondrial function. *Mitochondrion* **11**, 342–350. doi:10.1016/j.mito.2010.12.003
- Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P. F., Rosenberg I. H., D'Agostino R. B., Wilson P. W. F., and Wolf P. A. (2002). Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **346**, 476–483.  
doi:10.1056/NEJMoa011613
- Shen X. H., Xu S. J., Jin C. Y., Ding F., Zhou Y. C., and Fu G. S. (2013). Interleukin-8 prevents oxidative stress-induced human endothelial cell senescence via telomerase activation. *Int. Immunopharmacol.* **16**, 261–267. doi:10.1016/j.intimp.2013.04.003
- Sherva R., Baldwin C. T., Inzelberg R., Vardarajan B., Cupples L. A., Lunetta K., Bowrrat A., Naj A., Pericak-Vance M., Friedland R. P., and Farrer L. A. (2011). Identification of novel candidate genes for Alzheimer's disease by autozygosity mapping using genome wide SNP data. *J. Alzheimers Dis. JAD* **23**, 349–359.  
doi:10.3233/JAD-2010-100714

- Shih V. E., Fringer J. M., Mandell R., Kraus J. P., Berry G. T., Heidenreich R. A., Korson M. S., Levy H. L., and Ramesh V. (1995). A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 34–39.
- Shtutman M., Chang B.-D., Schools G. P., and Broude E. V. (2017). Cellular Model of p21-Induced Senescence. 'Oncogene-Induced Senescence'. (Ed MA Nikiforov) pp. 31–39. (Springer New York: New York, NY) doi:10.1007/978-1-4939-6670-7\_3
- Smith A. D., and Refsum H. (2016). Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment. *Annu. Rev. Nutr.* **36**, 211–239. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-050947
- Strauss S., Bauer J., Ganter U., Jonas U., Berger M., and Volk B. (1992). Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **66**, 223–230.
- Summers K. M., West J. A., Peterson M. M., Stark D., McGill J. J., and West M. J. (2006). Challenges in the diagnosis of Marfan syndrome. *Med. J. Aust.* **184**, 627–631.
- Sun L., Chiang J. Y., Choi J. Y., Xiong Z.-M., Mao X., Collins F. S., Hodes R. J., and Cao K. (2019). Transient induction of telomerase expression mediates senescence and reduces tumorigenesis in primary fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201907199. doi:10.1073/pnas.1907199116
- Suszynska J., Tisonczyk J., Lee H., Smith M. A., and Jakubowski H. (2010). Reduced Homocysteine-Thiolactonase Activity in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **19**, 1177–1183. doi:10.3233/JAD-2010-1311
- Suszyńska-Zajczyk J., Wróblewski J., Utyro O., Łuczak M., Marczak Ł., and Jakubowski H. (2014). Bleomycin hydrolase and hyperhomocysteinemia modulate the expression of mouse proteins involved in liver homeostasis. *Amino Acids* 1–10. doi:10.1007/s00726-014-1712-4
- Theuns J., Del-Favero J., Dermaut B., van Duijn C. M., Backhovens H., Van den Broeck M. V., Serneels S., Corsmit E., Van Broeckhoven C. V., and Cruts M. (2000). Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 325–331. doi:10.1093/hmg/9.3.325
- Thornalley P. J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **27**, 565–573. doi:10.1016/0306-3623(95)02054-3
- Thuy S., Ladurner R., Volynets V., Wagner S., Strahl S., Königsrainer A., Maier K.-P., Bischoff S. C., and Bergheim I. (2008). Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Humans Is Associated with Increased Plasma Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Concentrations and with Fructose Intake. *J. Nutr.* **138**, 1452–1455. doi:10.1093/jn/138.8.1452
- Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J. N., Rovio A. T., Bruder C. E., Bohlooly-Y M., Gidlöf S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H. T., and Larsson N.-G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423. doi:10.1038/nature02517
- Tsai M. Y., Bignell M., Schwichtenberg K., and Hanson N. Q. (1996). High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 1262–1267.
- Undas A., Jankowski M., Twardowska M., Padjas A., Jakubowski H., and Szczeklik A. (2005). Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb. Haemost.* **93**, 346–350. doi:10.1160/TH04-08-0493
- Uranova N., Orlovskaya D., Vikhreva O., Zimina I., Kolomeets N., Vostrikov V., and Rachmanova V. (2001). Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res. Bull.* **55**, 597–610. doi:10.1016/S0361-9230(01)00528-7
- Vaughan D. E., Rai R., Khan S. S., Eren M., and Ghosh A. K. (2017). PAI-1 is a Marker and a Mediator of Senescence. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1446–1452. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309451
- Wang L., Chen X., Tang B., Hua X., Klein-Szanto A., and Kruger W. D. (2005). Expression of mutant human cystathionine beta-synthase rescues neonatal lethality but not homocystinuria in a mouse model.



- Hum. Mol. Genet.* **14**, 2201–2208. doi:10.1093/hmg/ddi224
- Wang G., Huang C. H., Zhao Y., Cai L., Wang Y., Xiu S. J., Jiang Z. W., Yang S., Zhao T., Huang W., and Gu J. R. (2000). Genetic aberration in primary hepatocellular carcinoma: correlation between p53 gene mutation and loss-of-heterozygosity on chromosome 16q21-q23 and 9p21-p23. *Cell Res.* **10**, 311–323. doi:10.1038/sj.cr.7290058
- Wang Q., Ishikawa T., Michiue T., Zhu B.-L., Guan D.-W., and Maeda H. (2012). Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. *Int. J. Legal Med.* **126**, 943–952. doi:10.1007/s00414-012-0774-7
- Wang X., Li T., Liu N., Zhang H., Zhao X., and Ma Y. (2019). Characterization of GLOD4 in Leydig Cells of Tibetan Sheep During Different Stages of Maturity. *Genes* **10**. doi:10.3390/genes10100796
- Watanabe M., Osada J., Aratani Y., Kluckman K., Reddick R., Malinow M. R., and Maeda N. (1995). Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1585–1589. doi:10.1073/pnas.92.5.1585
- Willenbring H., Sharma A. D., Vogel A., Lee A. Y., Rothfuss A., Wang Z., Finegold M., and Grompe M. (2008). Loss of p21 permits carcinogenesis from chronically damaged liver and kidney epithelial cells despite unchecked apoptosis. *Cancer Cell* **14**, 59–67. doi:10.1016/j.ccr.2008.05.004
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T., and Selkoe D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* **398**, 513–517. doi:10.1038/19077
- Woodroffe M. N., and Cuzner M. L. (1993). Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: Detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine* **5**, 583–588. doi:10.1016/S1043-4666(05)80008-0
- Xu Y., and Sun Z. (2015). Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. *Endocr. Rev.* **36**, 174–193. doi:10.1210/er.2013-1079
- Yahagi N., Shimano H., Matsuzaka T., Sekiya M., Najima Y., Okazaki S., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Inoue N., Nakagawa Y., Takeuchi Y., Ohashi K., Harada K., Gotoda T., Nagai R., Kadowaki T., Ishibashi S., Osuga J., and Yamada N. (2004). p53 Involvement in the Pathogenesis of Fatty Liver Disease. *J. Biol. Chem.* **279**, 20571–20575. doi:10.1074/jbc.M400884200
- Yamamoto M., Horiba M., Buescher J. L., Huang D., Gendelman H. E., Ransohoff R. M., and Ikezu T. (2005). Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 in  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Show Accelerated Diffuse  $\beta$ -Amyloid Deposition. *Am. J. Pathol.* **166**, 1475–1485. doi:10.1016/S0002-9440(10)62364-4
- Yap S., Naughten E. R., Wilcken B., Wilcken D. E. L., and Boers G. H. J. (2000). Vascular Complications of Severe Hyperhomocysteinemia in Patients with Homocystinuria Due to Cystathionine  $\beta$ -Synthase Deficiency: Effects of Homocysteine-Lowering Therapy. *Semin. Thromb. Hemost.* **26**, 335–340. doi:10.1055/s-2000-8100
- Yousefzadeh M. J., Schafer M. J., Hooten N. N., Atkinson E. J., Evans M. K., Baker D. J., Quarles E. K., Robbins P. D., Ladiges W. C., LeBrasseur N. K., and Niedernhofer L. J. (2018). Circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 as a potential measure of biological age in mice and frailty in humans. *Aging Cell* **17**, e12706. doi:10.1111/acel.12706
- Yu J., Luo X., Xu H., Ma Q., Yuan J., Li X., Chang R. C.-C., Qu Z., Huang X., Zhuang Z., Liu J., and Yang X. (2015). Identification of the Key Molecules Involved in Chronic Copper Exposure-Aggravated Memory Impairment in Transgenic Mice of Alzheimer's Disease Using Proteomic Analysis. *J. Alzheimers Dis.* **44**, 455–469. doi:10.3233/JAD-141776
- von Zglinicki T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 339–344. doi:10.1016/S0968-0004(02)02110-2
- Zhang H.-T., Yan Z.-Q., Hu X.-B., Yang S.-L., and Gong Y. (2003). Interaction of C17orf25 with ADP-ribose pyrophosphatase NUDT9 detected via yeast two-hybrid method. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochim. Biophys. Sin.* **35**, 747–751.
- Zimny J., Sikora M., Guranowski A., and Jakubowski H. (2006). Protective mechanisms against homocysteine toxicity

the role of bleomycin hydrolase. *J. Biol. Chem.* **281**, 22485-22492.  
doi:10.1074/jbc.M603656200

## 8 Skróty

5xFAD - myszy model choroby Alzheimerera zawierający ludzki transgen z pięcioma mutacjami w genach APP i PSEN	DTT - ditiotreitol
APP - białko prekursorowe amyloidu	EDTA - kwas wersenowy
A $\beta$ – $\beta$ -amyloid	EOAD - choroba Alzheimerera o wczesnym początku
A $\beta_{40}$ - forma $\beta$ -amyloidu składająca się z 40 aminokwasów	GLOD4 - białko 4 zawierające domenę glioksalazową
A $\beta_{42}$ - forma $\beta$ -amyloid składająca się z 42 aminokwasów	H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub> – woda ultra czysta
B2M - $\beta$ -2-mikroglobulina	Hcy - homocysteina
BLMH - hydrolaza bleomycyny	HcyTL - tiolakton homocysteiny
BPHL - białko podobne do hydrolazy bifenyłu	HHcy – hiperhomocysteinemia
CAPS - kwas (cykloheksyloamino) propanosulfonowy	IAA - kwas indoliloctowy
CBB –Coomassie Brilliant Blue	IL-6 - interleukina 6
CBS - $\beta$ -syntaza cystationiny	kpz – tysiąc par zasad
cDNA - komplementarny DNA	LOAD - choroba Alzheimerera o późnym początku
Cq - cykl kwantyfikacji (ang. <i>quantification cycle</i> )	LTL – długość telomerów w leukocytach
CSE - $\gamma$ -liaza cystationiny	MCP-1 - białko chemotaktyczne monocytów typu 1
Cys - cysteina	Met - metionina
DNaza - deoksyrybonukleaza 1	mtDNA - DNA mitochondrialne
dNTPy - mieszanina deoksyrybonukleotydów	oligo(dT)23 kotwiczące - oligonukleotydy o długości 23 zasad złożone z 22 reszt tyminy i 1 reszty adeniny, cytozyny lub guaniny na 3'-końcu

OPA - aldehyd orto-ftalowy

p21 - białko oddziałujące z CDK 1

PAI-1 - inhibitor aktywatora  
plazminogenu 1

PCR - reakcja łańcuchowa  
polimerazy

pI – punkt izoelektryczny

PMSF - fluorek  
fenylometrylosulfonylu

PON1 - paraoksonaza 1

PSEN1 - presenilina 1

pz – para zasad, miara długości DNA

qPCR - ilościowy PCR (ang.  
*quantitative PCR*)

RTL - względna długość telomerów  
(ang. *relative telomere length*)

tHcy - homocysteina „całkowita”

w/v - wagowo/objętościowy

WT - typu dzikiego (ang. *wild type*)

## 9 Załączniki

Załącznik 9.1 Sekwencje izoform mRNA *GLOD4* u ludzi (z bazy EMBL-EBI, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk))

**Jasnoniebieski** - oznacza sekwencję homologiczną do tej która występuje w białku danej izoformy GLOD4

**Niebieski** - oznacza fragment RNA odróżniający izoformy

**Podkreślony** - oznacza sekwencję do której przyłączają się startery wykorzystane w badaniu.

Izoforma 1 AF177342.1

TGACGGCTGCGTGCGGCGGGAATC**ATGGCTGCTCGCAGAGCTCTGCACTTCGTATTCAA**  
**GTGGAAACCGCTTCCAGACGGCGCGTTTCTATCGGGACGTCCTGGGGATGAAGGTGGAG**  
**TCTTGCTCTGTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCTCTGACTAC**  
**ACCCGGATAACAGAAGACAGTTTCTCAAAGCCTTATGATGGGAAATGGAGTAAACAATG**  
**GTGGGATTTGGGCCTGAGGATGATCATTGTCGCAGAACTGACTTACAATTATGGCGTC**  
**GGAGACTACAAG**CCTTGGCAATGACTTTATGGGAATCACGCTCGCTTCTAGCCAGGCTGTC  
 AGCAACGCCAGGAAGCTGGAGTGGCCACTGACGGAAGTTGCAGAAGGTGTTTTTGAACC  
 GAGGCCCCGGGAGGATATAAGTTCTATTTGCAGAATCGCAGTCTGCCTCAGTCAGATCCT  
 GTATTAAAAGTAACTCTAGCAGTGTCTGATCTTCAAAGTCCTTGAACACTGGTGTAAAT  
 CTACTGGGAATGAAAATTTATGAAAAGATGAAGAAAAGCAAAGGGCTTTGCTGGGCTAT  
 GCTGATAACCAG**TGTAAGCTGGAGCTACAGGGCGTCAAGGGTGGGGTGGACCATGCAGCA**  
**GCTTTTGAAGAATTGCCTTCTCTTGCCCCAGAAAGAGTTGCCAGACTTAGAAGACTTG**  
**ATGAAAAGGGAGAACCAGAAGATTCTGACTCCCCTGGTGAGCCTGGACACCCAGGGAAA**  
**GCAACAGTACAGGTGGTCATTCTGGCCGACCCTGACGGACATGAAATTTGCTTTGTCGGG**  
**GATGAAGCATTTCGAGAACTTTCTAAGATGGATCCAGAGGGAAGCAAATTTGTTGGATGAT**  
**GCAATGGCAGCAGATAAAAGTGACGAGTGGTTTGCCAAACACAATAAACCCAAAGCTTCA**  
**GGTTAA**CGGAAGACATGATGCAGAGCAAGCCTCTGTGATTCTGCCAGCACCTGTGAGG  
 CCTGACGTGTCAGTTCCTAATAAATGCTCTTCTGATTTGTTTCCCGTACAGGCAAGGAGG  
 CTTGGGTAGTGCAGATTTGTGTATTTCAATCTTTGAAAGCTCTGATGTAATTTAGAAATG

AAATCCAATCATGAGTCCAGGTAGAGAACGCCTGCTGTAATCTACACTGTTGCTGCGACT  
GCGCATTCTGTATATAACTGTGTTGGATGAGTGACAGATGATTGTCCAGACTAGGACAGC  
GGCATGAACATGACTTTGGTTGGGATTGCGGATAGTTAGGGTTACCTCTGAATCGTGTAG  
CTTTTATGAGAGCAGCTGTGCAAGTGAATCCACATTAATGCCTTGTCGTGGTGCCATTCC  
CAGCGCCTGACGATACGCTCTTCTATTGTCTTATTCTGGCAGGTTTTGACGTTTTAAATT  
TTTTAAAGAAATTTTATTCCTTGGACCAAAGGTTTGGTTAACCACCCCTCTTACTTG  
CTTTCACATTTTGAGTGTCCAGAGGAAACAGAAAGGAATGAGTGTGTGACGTTGCTGCAC  
GCCTGACTCTGTGCGAGCTTCTTCTGTGTATATATTTTGTTTTATTTTTTCCGTGTAT  
ATTTTAAATCCCGACAGAACATCATGTGAGATTTCTTTAAAATGGATTAAACGATTTCTT  
CAGCCTGAAAAAAAAGGTTTTGAAAATGTTTTCTTGTAGTTTTGTTTGGTTCTAAACAAC  
AAATAGGTTTTAATCACTCGAAATGGAATTATATTGTGTATTCATTGAATAAATTTTTTT  
TGAAAGTAAAAAACC

## Izoforma 2 AF177343.1

CTTCGTGGACTGGGCTGTACGGTGCGCGTGACGGCTGCGTGCGGCGGGAATCATGGCTGC  
TCGCAGAGCTCTGCACTTCGTATTCAAAGTGGGAAACCGCTTCCAGACGGCGCCTTTCTA  
TCGGGACGTCCTGGGGATGAAGGTTCTGCGGCATGAGGAATTTGAAGAAGGCTGCAAAGC  
TGCCTGTAATGGGCCTTATGATGGGAAATGGAGTAAAACAATGGTGGGATTTGGGCCTGA  
GGATGATCATTGTCGCAGAACTGACTTACAATTATGGCGTCGGAGACTACAAGCTTGG  
CAATGACTTTATGGGAATCACGCTCGCTTCTAGCCAGGCTGTCAGCAACGCCAGGAAGCT  
GGAGTGGCCACTGACGGAAGTTGCAGAAGGTGTTTTGAAACCGAGGCCCGGGAGGATA  
TAAGTTCTATTTGCAGAATCGCAGTCTGCCTCAGTCAGATCCTGTATTAAAAGTAACTCT  
AGCAGTGTCTGATCTTCAAAGTCCTTGAACACTGTTGTAATCTACTGGGAATGAAAAT  
TTATGAAAAAGATGAAGAAAAGCAAAGGGCTTTGCTGGGCTATGCTGATAACCAGTGTAA  
GCTGGAGCTACAGGGCGTCAAGGGTGGGGTGGACCATGCAGCAGCTTTTGGAAAGAATTGC  
CTTCTCTTGCCCCAGAAAGAGTTGCCAGACTTAGAAGACTTGATGAAAAGGGAGAACCA  
GAAGATTCTGACTCCCCTGGTGGAGCCTGGACACCCAGGGAAAGCAACAGTACAGGTGGT  
CATTCTGGCCGACCCTGACGGACATGAAATTTGCTTTGTCTGGGGATGAAGCATTTCGAGA  
ACTTTCTAAGATGGATCCAGAGGGAAGCAAATTGTTGGATGATGCAATGTCAGCAGATAA  
AAGTGACGAGTGGTTTGCCAAACACAATAAACCCAAAGCTTCAGGTAAACGGAAGACATG  
ATGCAGAGCAAGCCTCTGTGATTCCCTGCCAGCACCTGTGAGGCCTGACGTGTCAGTTCC  
CAATAAATGCTCTTCTGATTTGTTTCCCGTACAGGCAAGGAGGCTTGGGTAGTGCAGATT  
TGTGTATTTCAATCTTTGAAAGCTCTGATGTAATTTAGAAATGAAATCCAATCATGAGTC  
CAGGTAGAGAACGCCTGCTGTAATCTACACTGTTGCTGGGACTGCGCATTCTGTATATAA  
CTGTGTTGGATGAGTGACAGATGATTGTCCAGACTAGGACAGCGGCATGAACATGACTTT  
GGTTGGGATTGCGGATAGTTAGGGTTACCTCTGAATCGTGTAGCTTTTATGAGAGCAGCT  
GTGCAAGTGAATCCACATTAATGCCTTGTCTGGTCCATTCCAGCGCCTGACGATACG  
CTCTTCTATTGTCTTATTCTGGCAGGTTTTGACGTTTTAAATTTTTTAAAGAAATTTTAT  
TCCTTGGACCAAAGGTTTTGGTTAACCACCCCTTACTTGCTTTCACATTTTGAGTG  
TCCAGAGGAAACAGAAAGGAATGAGTGTGTGACGTTGCTGCACGCCTGACTCTGTGCGAG  
CTTCTTTCTGTGTATATATTTTTGTTTTATTTTTTCCGTGTATATTTTTAATCCCGACAG

AACATCATGTGAGATTTCTTTAAAATGGATTAAACGATTTCTTCAGCCTGAAAAAAAAAGG  
TTTTGAAAATGTTTTCTTGTAGTTTTGTTTGGTCTAAACAACAATAGGTTTTAATCAC  
TCGAAATGGAATTATATTGTGTATTCATTGAATAAATTTTTTTTGAAGTAAAAAAA



## Izoforma 3 AK001488.1

GCTGTACGGTGCGCGTGACGGCTGCGTGCGGCGGGAACCATGGCTGCTCGCAGAGCTCTG  
CACTTCGTATTCAAAGTGGGAAACCGCTTCCAGACGGCGCGTTTCTATCGGGACGTCCTG  
GGGATGAAGGTTCTGCGGCATGAGGAATTTGAAGAAGGCTGCAAAGCTGCCTGTAATGGG  
CCTTATGATGGGAAATGGAGTAAAACAATGGTGGGATTTGGGCCTGAGGATGATCATT  
GTTCGCAGAACTGACTTACAATTATGGCGTTCGGAGACTACAAGCTTGGCAATGACTTTATG  
GGAATCACGCTCGCTTCTAGCCAGGCTGTCAGCAACGCCAGGAAGCTGGAGTGGCCACTG  
ACGGAAGTTGCAGAAGGTGTTTTGAAACCGAGGCCCGGGAGGATATAAGTTCTATTTG  
CAGAAATCGCAGTCTGCCTCAGTCAGATCCTGTATTAAAAGTAACTCTAG**GCAGTGTCTGAT**  
**CTTCAAAGTCC**TGAACTACTGGTGTAACTACTGGGAATGAAAATTTATGAAAAAGAT  
GAAGAAAAGCAAAGGGCTTTGCTGGGCTATGCCGATAA**CCAGGTGAGCAATCTTGGAGAA**  
**GAATAA**CCTGTTACTTTGAATTTGGCTTGTAACGAAGCTTATAAATGGCTTATAACCTT  
TATAAATGAAGTTAACATGAAGGTTGTTCCCATAGTTTCTTCACAGTGATTCAATATTTA  
TATAGATAAACAGAAGAAAATAAGTGATAACCTTACCACCCAGATATTACCTTGTTTTATA  
TTTGGGGATATATCTCTTCAGAAGTGAATTGCTTAATCCAAGAGATTGAATGGATTTAA  
TGCAAGATCTTTTTTCATCTTCTTTTTCTAATAACCCAGCGTTTGAGCACGATTTAGTCCT  
TGCACTTTGACCCTGCAATTCTACTCCTAGGAATTATTTTACAGATGTGCTCAACATACA  
TCGGCACAAAGAAGTGTGTGCAAGGTTATCTGCTGCAGCATTGTCTGTAATCACAATGTG  
TAAGAATCTCAGTGTCTATAGATTAGAGACATATTTTACGTAATTTACGGCTCATTTCATG  
GAATGGATTACTATGTCGCTAGCAAAAAGATTGAGGCAAATCTTTATGTATTGACATGGT  
AACATTAAGTGGAGAAAAACAAGGAACAGAATAATTTGTAAATTATAACCACCATTTGTGT  
AAAAAAAAAACATAGATGCGTGCAGTGCTTCTAGAAGGATACACAGGAAACTGTGGACT  
AGTTGTCTCTGGGGTGAGAGTAGGATAGAGACTCAGTTTTTACTTTATTCTTTAGTATA  
TAATATTTGAATTTTTCTACCACATACGTGTAATGAATGTATAACCTGTTCCAAAAATA  
ACCCCTTTCTATTTTTCAGTGTAAGCTGGAGCTACAGGGCGTCAAGGGTGGGGTGGACCA  
TGCAGCAGCTTTTGAAGAATTGCCTTCTCTTGCCCCAGAAAGAGGTAACGCTTGATAC  
CAGATCGTTTTGAGCTTTCTGACTAGCTAGTTCAACCCAGCTAAGAACTTTGTCCTTCCCT  
TCTTGAGGTCCTTTTTGATTGTGGCTTTAGTATCAAGTTCAGCAGTTGTTTCAAGAGCAG

CTGAGATAATAAATTCAAACAAATGGCGCCTTGTTCTTTATGGTATCTGATACTCCTCT  
AGGACTGACGAGGGCCGTGTCCTGAGTAGTGTGTGACCCCTGGCTCACGTTGCCTCTGTT  
TTCCTCAAGTTGCCAGACTTAGAAGACTTGATGAAAAGGGAGAACCAGAAGATTCTGACT  
CCCCTGGTGAGCCTGGACACCCCAGGGAAAGCAACAGTACAGGTGGTCATTCTGGCCGAC  
CCTGACGGTCATGAAATTTGCTTTGTGCGGGATGAAGCATTTCGAGAACTTTCTAAGATG  
GATCCAGAGGGAAGCAAATTGTTGGATGATGCAATGGCAGCAGATAAAAAGTGACGAGTGG  
TTTGCCAAACACAATAAACCCAAAGCTTCAGGTTAACGGAAGACATGATGCAGAGCAAGC  
CTCTGTGATTCTGCCAGCACCTGTGAGGCCTGACGTGTCAGTTCCCAATAAATGCTCT  
TCTGATTTGTTTTCCCGTACAGGCAAGGAGGCTTGGGTAGTGCAGATTTGTGTATTTCAAT  
CTTTGAAAGCTCTGATGTAATTTAGAAATGAAATCCAATCATGAGTCCAGGTAGAGAACG  
CCTGCTGTAATCTACACTGTTGCTGGGACTGCGCATTCTGTATATAACTGTGTTGGATGA  
GTGACAGATGATTGTCCAGACTAGGACAGCGGCATGAACATGACTTTGGTTGGGATTGCG  
GATAGTTAGGGTTACCTCTGAATCGTGTAGCTTTTATGAGAGCAGCTGTGCAAGTGAATC  
CACATTAATGCCTTGTCGTGGTGCCATTCCCAGCGCCTGACGATACGCTCTTCTATTGTC  
TTATTCTGGCAGGTTTTGACGTTTTAAATTTTTTAAAGAAATTTTATTCTTGGACCAA  
AGGTTTGGTTAACCACCCCTCTTACTTGCTTTCACATTTTGAGTGTCCAGAGGAAACA  
GAAAGGAATGAGTGTGTGACGTTGCTGCACGCCTGACTCTGTGCGAGCTTCTTTCTGTGT  
ATATATTTTGTTTTATTTTTTTCCGTGTATATTTTAATCCCGACAGAACATCATGTGAG  
ATTTCTTTAAATGGATTAAACGATTTCTTCAGCCTG

Załącznik 9.2 Sekwencje izoform mRNA *Glod4* u myszy (z bazy EMBL-EBI, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk))

**Fuksja** - Startery dla izoformy 1 mRNA *Glod4*

**Pomarańczowy** - startery dla izoformy 2 mRNA *Glod4*

**Turkusowy** - Startery dla izoformy 3 mRNA *Glod4*

Izoforma 1 AAH61012.1

ATGGCCACTCGTCGAGCTCTGCACTTCGTTTTCAAAGTGAAGAACCGCTTCCAGACAGTG  
 CATTCTTTTCGAGATGTCCTGGGGATGCAGGTTCTCCGCCATGAGGAATTTGAAGAAGGC  
 TGCAAAGCTGCATGCAATGGGCCTTATGATGGGAAGTGGAGTAAAACAATGGTGGGATTT  
 GGGCCCGAGGATGATCATTTTGTTCAGAAATTGACATACAATTATGGCATCGGAGACTAC  
 AAGCTTGGCAATGACTTCATGGGAATCACGCTTGCTTCTAGCCAAGCTGTCAGCAATGCC  
 AGGAAGCTGGAGTGGCCACTGAGTAAAGTTGCAGAAGGGATTTTTGAAACTGAAGCCCCA  
 GGAGGATATAAGTTCTACTTACAGGATAGAAGCCCATCTCAGTCAGATCCTGTATTAAAG  
 GTGACTCTAGCAGTGTCTGATCTCCAGAAGTCCTTGAACACTGGTCTAATCTCCTGGGA  
 ATGAAAATTTATGAGCAAGATGAGGAAAAGCAACGAGCTTTGCTGGGCTACGCTGATAAC  
 CAGTGTAAGCTAGAGCTACAGGGCATCCAGGGTGCAGTTGATCATGCAGCGGCCTTTGGA  
 AGAATTGCCTTTTCTTGTCTCAGAAAGAGTTGCCAGACTTAGAAGACTTGATGAAAAGG  
 GAGAGCCACTCGATCCTGACTCCGTTGGTGA GTCTGGACACCCCAGGGAAAGCCACAGTG  
 CAAGTGGTCATCCTGGCTGACCCTGATGGACATGAAATTTGCTTTGTTGGGGATGAAGCT  
 TTTTCGAGAACTCTCTAAGATGGATCCAAAAGGAAGCAAATTATTGGATGATGCAATGGAA  
 GCAGACAAAAGTGACGAGTGGTTTGTACGAGGAATAAACCAAAGGCTTCGGGTTAG

## Izoforma 2 BAE23546.1

ATGGCCACTCGTCGAGCTCTGCACTTCGTTTTCAAAGTGAAGAACCCTTCCAGACAGTG  
CATTCTTTTCGAGATGTCCTGGGGATGCAGGTTCTCCGCCATGAGGAATTTGAAGAAGGC  
TGCAAAGCTGCATGCAATGGGCCTTATGATGGGAAGTGGAGTAAAACAATGGTGGGATTT  
GGCCCCGAGGATGATCATTTTGTGTCAGAATTGACATACAATTATGGCATCGGAGACTAC  
AAGCTTGGCAATGACTTCATGGGAATCACGCTTGCTTCTAGCCAAGCTGT CAGCAATGCC  
AGGAAGCTGGAGTGGCCACTGAGTAAAGTTGCAGAAGGGATTTTTGAAACTGAAGCCCCA  
GGAGGATATAAGTTCTACTTACAGGATAGAAGCCCATCTCAGTCAGATCCTGTATTAAAG  
GTGACTCTAGCAGTGTCT GATCTCCAGAAGTCCTTGA ACTACTGGTCTAATCTCCTGGGA  
ATGAAAATTTATGAGCAAGATGAGGAAAAGCAACGAGCTTTGCTGGGCTACGCTGATAAC  
CAGTGTAAAGCTAGAGCTACAGGGCATCCAGGGTGCAGTTGATCATGCAGCGGCCTTTGGA  
AGAATTGCCTTTTCTTGTCTCAGAAAGAGTTGCCAGACTTAGAAGACTTGATGAAAAGG  
GAGAGCCACTCGATCCTGACTCCGTTGGTGA GTCTGGACACCCCAGGGAAAGCCACAGTG  
CAAGTGGTCATCCTGGCTGACCCTGATGGACATGAAATTTGCTTTGTTGGGGATGAAGCT  
TTTCGAGAACTCTCTAAGATGGATCCAAAAGGAAGCAAATTATTG GATGATGGTGAAGGC  
TGCA CAGACAGAGTTAGGACAGCAAATCCTGGCTGA

## Izoforma 3 BAB24818.1

ATGATCTGTGGCTCTGTTCTAAACAGCCCAGATGTTCTCCGCCATGAGGAATTTGAAGAA  
GGCTGCAAAGCTGCATGCAATGGGCCTTATGATGGGAAGTGGAGTAAAACAATGGTGGGA  
TTTGGGCCCGAGGATGATCATTGTTGTCAGAATTGACATACAATTATGGCATCGGAGAC  
TACAA GCTTGGCAAAGACTTCATGGGAATCACGCTTGCTTCTAGCCAAGCTGT CAGCAAT  
GCCAGGAAGCTGGAGTGGCCACTGAGTAAAGTTGCAGAAGGGATTTTTGAAACTGAAGCC  
CCAGGAGGATATAAGTTCTACTTACAGGATAGAAGCCCATCTCAGTCAGATCCTGTATTA  
AAGGTGACTCTAGCAGTGTCTGATCTCCAGAAGTCCTTGA ACTACTGGTCTAATCTCCTG  
GGAATGAAAATTTATGAGCAAGATGAGGAAAAGCAACGAGCTTTGCTGGGCTACGCTGAT  
AACCAGTGTAAGCTAGAGCTACAGGGCATCCAGGGTGCAGTTGATCATGCAGCGGCCTTT  
GGAAGAATTGCCTTTTCTTGTCTCAGAAAGAGTTGCCAGACTTAGAAGACTTGATGAAA  
AGGGAGAGCCACTCGATCCTGACTCCGTTGGTGA GTCTGGACACCCAGGGAAAGCCACA  
GTGCAAGTGGTCATCCTGGCTGACCCTGATGGACATGAAATTTGCTTTGTTGGGGATGAA  
GCTTTTCGAGA ACTCTCTAAGATGGATCCAAAAGGAAGCAAAT TATTGGATGATGCAATG  
GAAGCAGACAAAAGTGACGAGTGGTTTGCTACGAGGAATAAACCAAAGGCTTCGGGTTAG

Załącznik 9.3 Sekwencje aminokwasowe izoform ludzkiego białka GLOD4  
(z bazy UniProt, [www.uniprot.com](http://www.uniprot.com))

**Żółtym** – oznaczono sekwencje aminokwasowe różniące trzy izoformy

Izoforma 1 Q9HC38-1, 34,793 kDa

10	20	30	40	50
MAARRALHFV	FKVGNRFQTA	RFYRDVLGMK	VESCSVARLE	CSGAISAHCS
60	70	80	90	100
DYTRITEDSF	SKPYDGKWSK	TMVGFDPEDD	HFVAELTYNY	GVDYKLGND
110	120	130	140	150
FMGITLASSQ	AVSNARKLEW	PLTEVAEGVF	ETEAPGGYKF	YLQNRSLPQS
160	170	180	190	200
DPVLKVTLAV	SDLQKSLNYW	CNLLGMKIYE	KDEEKQRALL	GYADNQCKLE
210	220	230	240	250
LQGVKGGVDH	AAAFGRIFAFS	CPQKELPDLE	DLMKRENQKI	LTPLVSLDTP
260	270	280	290	300
GKATVQVVIL	ADPDGHEICF	VGDEAFRELS	KMDPEGSKLL	DDAMAADKSD
310				
EWF	AKHNKPK	ASG		

## Izoforma 2 Q9HC38-2, 33,233 kDa

10	20	30	40	50
MAARRALHFV	FKVGNRFQTA	RFYRDVLGMK	VLRHEEFEEG	CKAACNGPYD
60	70	80	90	100
GKWSKTMVGF	GPEDDHFVAE	LTYNYGVDY	KLGNDFMGIT	LASSQAVSNA
110	120	130	140	150
RKLEWPLTEV	AEGVFETEAP	GGYKFYLQNR	SLPQSDPVLK	VTLAVSDLQK
160	170	180	190	200
SLNYWCNLLG	MKIYEKDEEK	QRALLGYADN	QCKLELQGVK	GGVDHAAAFG
210	220	230	240	250
RIAFSCPQKE	LPDLEDLMKR	ENQKILTPLV	SLDTPGKATV	QVVILADPDG
260	270	280	290	
HEICFVGDEA	FRELSKMDPE	GSKLLDDAMA	ADKSDEWFAK	HNKPKASG

## Izoforma 3 Q9HC38-3, 21,258 kDa

10	20	30	40	50
MAARRALHFV	FKVGNRFQTA	RFYRDVLGMK	VLRHEEFEEG	CKAACNGPYD
60	70	80	90	100
GKWSKTMVGF	GPEDDHFVAE	LTYNYGVDY	KLGNDFMGIT	LASSQAVSNA
110	120	130	140	150
RKLEWPLTEV	AEGVFETEAP	GGYKFYLQNR	SLPQSDPVLK	VTLAVSDLQK
160	170	180		
SLNYWCNLLG	MKIYEKDEEK	QRALLGYADN	QVSNLGEE	

Załącznik 9.4 Sekwencje aminokwasowe izoform mysiego białka Glod4 (z bazy UniProt, [www.uniprot.com](http://www.uniprot.com))

**Żółtym** – oznaczono sekwencje aminokwasowe różniące trzy izoformy

Izoforma 1 Q9CPV4-1, 33,317 kDa

10	20	30	40	50
MATRRALHFV	FKVKNRFQTV	HFFRDVLGMQ	VLRHEEFEEG	CKAACNGPYD
60	70	80	90	100
GKWSKTMVGF	GPEDDHFVAE	LTYNYGIGDY	KLGNDFMGIT	LASSQAVSNA
110	120	130	140	150
RKLEWPLSKV	AEGIFETEAP	GGYKFYLQDR	SPSQSDPVLK	VTLAVSDLQK
160	170	180	190	200
SLNYWSNLLG	MKIYEQDEEK	QRALLGYADN	QCKLELQGIQ	GAVDHAAAFG
210	220	230	240	250
RIAFSCPQKE	LPDLEDLMKR	ESHSILTPLV	SLDTPGKATV	QVVILADPDG
260	270	280	290	
HEICFVGDEA	FRELSKMDPK	GSKLLDDAME	ADKSDEWFAT	RNKPKASG



## Izoforma 2 Q9CPV4-2, 32,410 kDa

10	20	30	40	50
MATRRALHFV	FKVKNRFQTV	HFFRDVLGMQ	VLRHEEFEEG	CKAACNGPYD
60	70	80	90	100
GKWSKTMVGF	GPEDDHFVAE	LTYNYGIGDY	KLGNDFMGIT	LASSQAVSNA
110	120	130	140	150
RKLEWPLSKV	AEGIFETEAP	GGYKFYLQDR	SPSQSDPVLK	VTLAVSDLQK
160	170	180	190	200
SLNYWSNLLG	MKIYEQDEEK	QRALLGYADN	QCKLELQGIQ	GAVDHAAAFG
210	220	230	240	250
RIAFSCPQKE	LPDLEDLMKR	ESHSILTPLV	SLDTPGKATV	QVVILADPDG
260	270	280	290	
HEICFVGDEA	FRELSKMDPK	GSKLLDD	GEG CTDRVRTANP	G

## Izoforma 3 Q9CPV4-3, 30,771 kDa

10	20	30	40	50
MICGSVLNSP	DVLRHEEFEE	GCKAACNGPY	DGKWSKTMVG	FGPEDDHFVA
60	70	80	90	100
ELTYNYGIGD	YKLGNDFMGI	TCLASSQAVSN	ARKLEWPLSK	VAEGIFETEA
110	120	130	140	150
PGGYKFYLQD	RSPSQSDPVL	KVTLAVSDLQ	KSLNYWSNLL	GMKIYEQDEE
160	170	180	190	200
KQRALLGYAD	NQCKLELQGI	QGAVDHAAAF	GRIAFSCPQK	ELPDLEDLMK
210	220	230	240	250
RESHSILTPL	VSLDTPGKAT	VQVVILADPD	GHEICFVGDE	AFRELSKMDP
260	270			
KGSKLLDDAM	EADKSDEWFA	TRNKPKASG		