

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Katechiny: interakce s lidským sérovým albuminem a
ovlivnění jeho glykace methylglyoxalem**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Mgr. Veronika Staňková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....

Mgr. Veronika Staňková

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Veronika Staňková

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Název práce: Katechiny: interakce s lidským sérovým albuminem a ovlivnění jeho glykace methylglyoxalem.

Katechiny (flavan-3-oly) jsou polyfenolické látky vyšších rostlin vyznačující se širokým spektrem biologických a farmakologických vlastností. První část této práce se zaměřuje na studium interakcí čtyř katechinů, konkrétně (-)-katechinu, (-)-gallokatechinu, (-)-katechingallátu a (-)-gallokatechingallátu s lidským sérovým albuminem (HSA). HSA je hlavním transportním proteinem v krevním séru, který ovlivňuje metabolismus, biodostupnost a biologickou aktivitu látek *in vivo*. Vazebná schopnost katechinů k HSA byla hodnocena *in vitro* s využitím UV/VIS spektroskopie, fluorescenční spektroskopie a gelové elektroforézy (nativní a SDS-PAGE). Vazebná schopnost katechinů k HSA se lišila v závislosti na jejich chemické struktuře a koncentraci. Stěžejním strukturním rysem nezbytným pro interakci katechinu s molekulou HSA se ukázala být přítomnost zbytku kyseliny gallové a počet OH skupin ve struktuře. Druhá část práce hodnotí schopnost katechinů ovlivnit neenzymovou glykaci lidského sérového albuminu zprostředkovanou methylglyoxalem. Neenzymová glykace bílkovin je proces, který hraje roli v patogenezi řady civilizačních onemocnění. Schopnost katechinů inhibovat glykaci HSA zprostředkovanou methylglyoxalem byla hodnocena *in vitro* pomocí UV/VIS spektroskopie a fluorescenční spektroskopie. Pomocí fluorescenční spektroskopie byla hodnocena schopnost inhibovat produkci jak nespecifických koncových produktů pokročilé glykace (total AGEs), tak specifického markeru argpyrimidinu. Antiglykační působení jednotlivých katechinů se lišilo v závislosti na jejich struktuře a koncentraci. Vyšší antiglykační schopnost byla zjištěna u katechinů se zbytkem kyseliny gallové ve struktuře.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Veronika Staňková

Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Title of thesis: Catechins: interaction with human serum albumin and affecting its glycation by methylglyoxal.

The catechins (flavan-3-ols) are polyphenolic substances of higher plants exerting a wide spectrum of biological and pharmacological properties. The first part of this thesis was focused on the study of potential interactions of four catechins (namely (-)-catechin, (-)-gallocatechin, (-)-catechin gallate, and (-)-gallocatechin gallate) with human serum albumin (HSA). HSA is the main transport protein in the blood serum, which influences the metabolism, bioavailability and biological activity of drugs *in vivo*. Binding ability of catechins to HSA was evaluated *in vitro* using UV/VIS spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and gel electrophoresis (native and SDS-PAGE). Binding ability of catechins to HSA varied depending on their chemical structure and concentration. The presence of galloyl moiety and number of hydroxyl groups were found to be key structural features essential for catechin interaction with the molecule of HSA. In the second part of this work, the ability of catechins to influence methylglyoxal-induced non-enzymatic glycation of human serum albumin is evaluated. Non-enzymatic glycation of proteins plays an important role in the pathogenesis of different lifestyle diseases. The ability of catechins to inhibit methylglyoxal-induced glycation of HSA was evaluated *in vitro* using UV/VIS spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The ability of catechins to inhibit production of both non-specific advanced glycation end-products (total AGEs) and specific marker argpyrimidine was evaluated using the fluorescence spectroscopy. The antiglycation activity of catechins varied depending on their structure and concentration. Higher antiglycation ability was found in catechins containing the galloyl moiety in their structure.

OBSAH

1 Úvod	7
2 Teoretická část	9
2.1 Flavonoidy	10
2.1.1 Flavan-3-oly	14
2.1.2 Stabilita katechinů	16
2.2 Interakce flavonoidů s proteiny	17
2.2.1 Lidský sérový albumin	17
2.2.2 Interakce HSA s katechiny	18
2.3 Neenzymová glykace	20
2.3.1 Tvorba glykačních produktů (AGEs)	20
2.3.2 Methylglyoxal jako prekurzor AGEs, modifikace bílkovin	21
2.3.3 Inhibiční vlastnosti flavonoidů na tvorbu AGE	24
3 Cíl práce	27
4 Materiál a metodika	29
4.1 Chemikálie	30
4.2 Příprava zásobních roztoků	31
4.2.1 Příprava zásobních roztoků pro elektroforézu	31
4.3 UV/VIS absorpční spektroskopie	34
4.3.1 Stabilita roztoků katechinů	34
4.3.2 Interakce katechinů s HSA	34
4.3.3 Vliv katechinů na glykaci HSA	34
4.4 Fluorescenční spektroskopie	35
4.4.1 Interakce katechinů s HSA	35
4.4.2 Fluorimetrická titrace: interakce HSA s katechiny	35
4.4.3 Fluorescenční měření glykačních produktů	35
4.5 Elektroforéza	36
4.5.1 Nativní elektroforéza	36
4.5.2 SDS-PAGE elektroforéza	36
4.6 Statistická analýza	37
5 Výsledky	38
5.1 Interakce HSA	39
5.1.1 UV/VIS absorpční spektra	39

5.1.2 Fluorescenční spektra	45
5.1.3 Elektroforéza	54
5.2 Glykace HSA	55
5.2.1 Sledování vlivu katechinů na glykaci HSA pomocí UV/VIS spektroskopie	56
5.2.2 Měření fluorescence glykačních produktů	57
6 Diskuse	63
7 Závěr	70
Poděkování	72
8 Seznam zkratk	73
9 Literatura	76
10 Dodatek	83

1 Úvod

Tuto rigorózní práci jsem vypracovala na katedře biochemických věd FaF UK v Hradci Králové pod vedením doktorky Ivy Boušové, která se v rámci pracovní skupiny profesora Dršaty zabývá studiem neenzymové glykace proteinů a enzymů *in vitro* a schopností polyfenolických látek tento proces zpomalit.

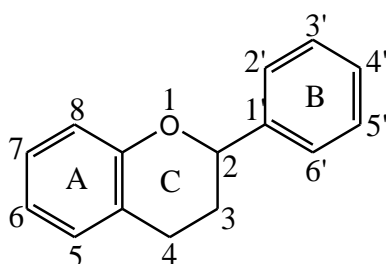
Má práce se dělí na dvě části. V části první jsem se zaměřila na studium interakce čtyř čajových katechinů s lidským sérovým albuminem (HSA) pomocí metod UV/VIS a fluorescenční spektroskopie a gelové elektroforézy (nativní a SDS-PAGE). Cílem bylo najít vztah mezi rozdílnou strukturou katechinů a jejich vazebnou schopností k albuminu. V části druhé jsem pak studovala schopnost katechinů inhibovat neenzymovou glykaci HSA vyvolanou glykačním činidlem methylglyoxalem pomocí metody UV/VIS a fluorescenční spektroskopie.

Čajové katechiny jsou aktivní látky polyfenolické struktury s řadou biologických vlastností. V řadě prací byly již popsány jejich antioxidační, antimutagenní, antidiabetické, antibakteriální, antivirotické a protizánětlivé vlastnosti. Antiglykační působení katechinů pravděpodobně zahrnuje několik mechanismů. Studium inhibice glykace má potenciál v prevenci mikro- a makrovaskulárních komplikací u diabetických pacientů. Lidský sérový albumin je nejčastěji se vyskytujícím proteinem v krevním séru, jehož hlavní funkcí je transport a distribuce exogenních i endogenních molekul a metabolitů krve. Právě vazba katechinů k albuminu může hrát roli v jejich antiglykačním působení. Jako glykační činidlo jsem použila methylglyoxal, reaktivní α -oxoaldehydickou sloučeninu, jež je přirozeně tvořena ve všech savčích buňkách a hraje roli v procesu tvorby koncových produktů pokročilé glykace (AGEs). Jeho zvýšená tvorba byla zaznamenána právě u diabetických pacientů.

2 Teoretická část

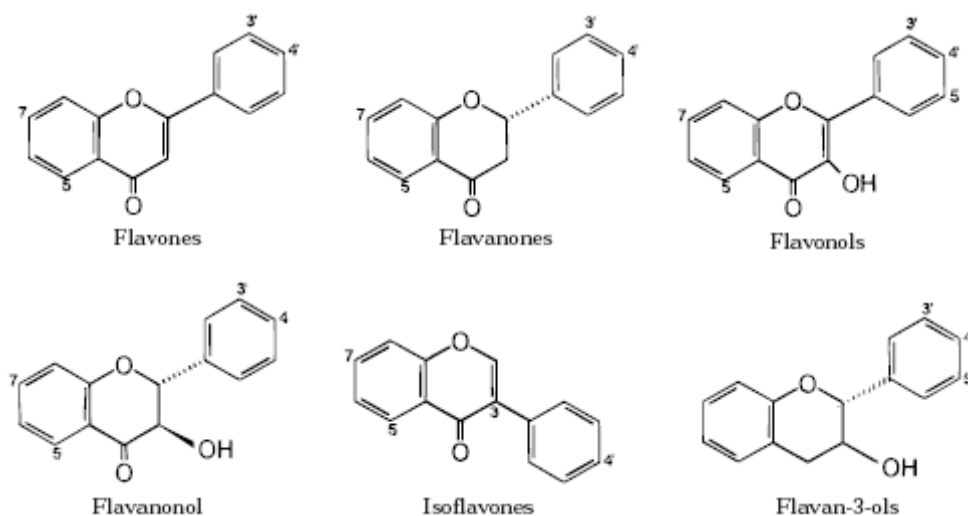
2.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou látky s polyfenolickou strukturou syntetizované jako sekundární metabolity většinou vyšších rostlin. Jsou významnou součástí lidské stravy, přičemž nalézt je můžeme v široké míře v ovoci, zelenině, obilninách, olivách, luštěninách, čokoládě a nápojích typu čaje, kávy a vína (Massimo D'Archivio et al. 2007). Syntéza flavonoidů v rostlinách vychází z aromatické aminokyseliny fenylnalaninu a malonyl-CoA (tzv. šikimátová cesta). Základem struktury flavonoidů je jádro flavanu (Obr. 1) obsahující 15 uhlíkových atomů uspořádaných do tří kruhů (označovaných A, B a C).



Obr. 1: Základ struktury flavonoidů (jádro flavanu) (Pietta 2000).

Podle stupně oxidace centrálního pyranového kruhu (kruh C) mohou být flavonoidy rozděleny do 6 hlavních podtříd: flavonoly, flavony, flavanony, isoflavony, flavanonoly a flavan-3-oly (Obr. 2). Jednotlivé sloučeniny se dále uvnitř své podtřídy liší substitucemi na kruzích A a B (Pietta 2000).



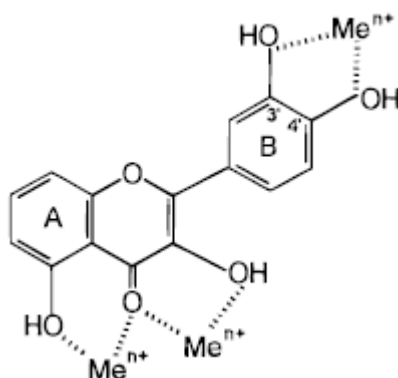
Obr. 2: Podtřídy flavonoidů (Pietta 2000).

V rostlinách zatím bylo identifikováno více než 8000 strukturně odlišných flavonoidů a jejich počet neustále narůstá (Pietta 2000). Je to právě díky jejich struktuře, kde volné hydroxylové skupiny mohou být substituovány (např. glykosylovány, acylovány), nebo se mohou v rostlinách vytvářet vysoce komplexní struktury (Massimo D'Archivio et al. 2007). Flavonoidy hrají ve fyziologii rostlin několik rozličných rolí. V rostlinách se většinou vyskytují v glykosylované formě, přispívají tak k barevnosti plodů, květů a listů, čímž zvyšují jejich atraktivitu pro opylující hmyz, adstringenční vlastnosti přispívají k ochraně rostlin proti škůdcům, hrají roli jako katalyzátory během světelné fáze fotosyntézy, antioxidační a UV-absorbční vlastnosti přispívají k ochraně rostlin před UV zářením (Pietta 2000). Příjem flavonoidů z potravy je v porovnání s hladinami dalších antioxidantů a vitamínů, jako jsou např. vit C, E a karotenoidy, podstatně vyšší (50 - 800 mg/den). Záleží však na pestrosti stravy, zejména příjmu ovoce, zeleniny a nápojů jako jsou např. čaj a červené víno. Rozdíly v příjmu vyplývají také ze stravovacích národních zvyklostí (Pietta 2000).

V poslední době se flavonoidy dostávají do popředí zájmu mnoha studií díky svým biologickým a farmakologickým vlastnostem. V řadě prací již byly prostudovány jejich pravděpodobné antioxidační, antivirotické, antibakteriální, protizánětlivé, vasodilatační, antiischemické a protinádorové vlastnosti (Procházková et al. 2011, Pietta 2000). Velká pozornost je věnována zejména vlastnostem antioxidačním, a to schopnosti vychytávat volné radikály, tlumit jejich produkci (Pietta 2000) a působit tak preventivně v rozvoji oxidačního stresu, jenž hraje významnou roli v patologii řady civilizačních onemocnění, jako jsou rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění nebo diabetes mellitus (Manach et al. 2004, Massimo D'Archivio et al. 2007, Pietta 2000).

Antioxidační aktivita řady flavonoidů je mnohem vyšší než vitamínu C či E (Procházková et al. 2011, Dufresne a Farnworth 2001) a liší se v závislosti na struktuře. Výsledky studií naznačují, že antioxidační síla flavonoidů může chránit buňky před škodlivými oxidačními účinky reaktivních forem kyslíku (ROS) (Dufresne a Farnworth 2001). *In vitro* antioxidační aktivita flavonoidů zahrnuje: a) schopnost inhibice oxidas (např. inhibice xanthinoxidasázy a proteinkinasy C zodpovědné za tvorbu superoxidového radikálu $O_2^{\cdot-}$) (Pietta 2000, Procházková et al. 2011), b) schopnost chelatovat ionty přechodných kovů (Fe^{2+} a Cu^+) (Obr. 3), jež potencují produkci vysoce reaktivního hydroxylového radikálu ($\cdot OH$) z peroxidu vodíku ve Fentonovově či Haber-Weissově reakci (Rice-Evans 2001, Pietta 2000, Procházková et al. 2011,

Kolečkář et al. 2012), c) schopnost přímého vychytávání ROS (Pietta 2000, Rice-Evans 2001, Kolečkář et al. 2012, Procházková et al. 2011), d) schopnost aktivace antioxidantních enzymů (aktivace detoxikačních enzymů II. fáze biotransformace xenobiotik) a redukce α -tokoferylového radikálu (podpora regenerace α - tokoferolu, důležitého antioxidantu buněčných membrán) (Procházková et al. 2011).

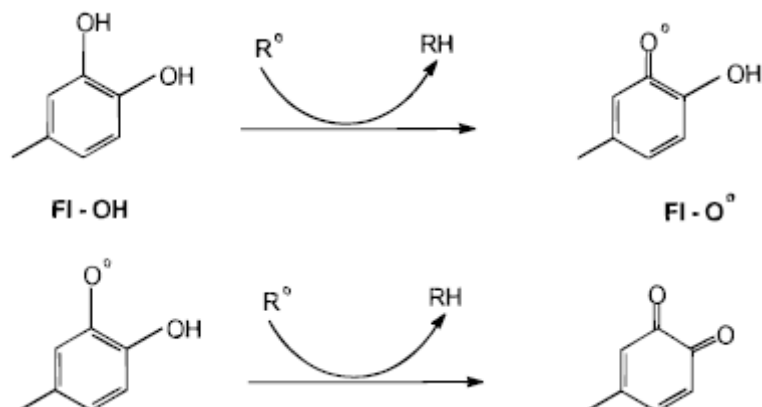


Obr. 3: Chelatace iontů přechodných kovů (Pietta 2000).

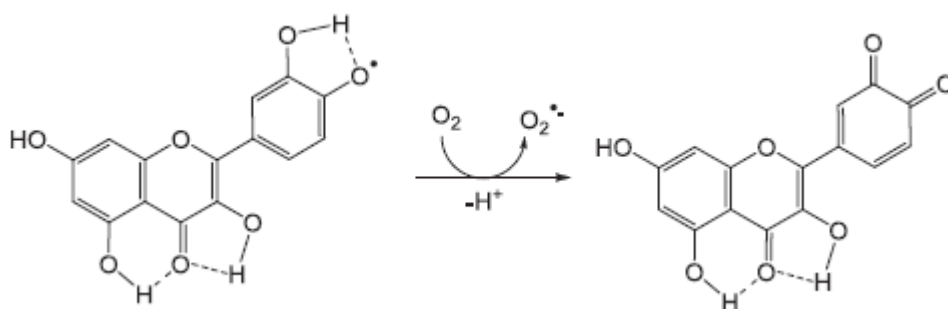
Metabolická modifikace flavonoidů *in vivo* může významně ovlivnit jejich antioxidantní aktivitu. *In vitro* byla již prokázána nižší antioxidantní aktivita jednotlivých metabolitů flavonoidů v porovnání s parentní sloučeninou, a to zřejmě v důsledku zablokování volných hydroxylových skupin schopných vychytávat volné radikály (Procházková et al. 2011).

Za určitých podmínek mohou flavonoidy vykazovat nežádoucí prooxidační působení. Prooxidační působení flavonoidů je nástrojem jejich baktericidní aktivity a může vyvolat apoptózu (Procházková et al. 2011). Za jiných podmínek však přispívá k tvorbě ROS a oxidačnímu poškození proteinů. Flavonoidy redukují reaktivní radikály za vzniku fenoxylového radikálu flavonoidu (Fl-O \cdot), který reaguje s dalším radikálem za vzniku stabilního *o*-chinonu (Obr. 4). Nežádoucí vedlejší reakcí může být reakce fenoxylového radikálu s kyslíkem, kdy dochází k vytvoření *o*-chinonu a reaktivního superoxidového radikálu. Fenoxylový radikál může taktéž způsobit oxidaci NADH či glutathionu (Pietta 2000, Procházková et al. 2011).

A)



B)



Obr. 4: (A) Tvorba fenoxylového radikálu při vychytávání volných radikálů flavonoidy (Pietta 2000),

(B) Prooxidační aktivita flavonoidů (Procházková et al. 2011).

Kromě antioxidačních vlastností jsou flavonoidy studovány i pro své antiglykační účinky. Jsou schopné přispívat ke snížení modifikace bílkovin během glykačního procesu (Lo et al. 2006, Wu a Yen 2005). Glykace bílkovin a tvorba glykačních produktů (AGEs – advanced glycation end-products) je zahrnuta v patogenezi řady civilizačních onemocnění (Turk 2010). Antiglykační působení flavonoidů pravděpodobně spočívá ve schopnosti vychytávání ROS (zejména peroxidu vodíku a superoxidu), jež jsou tvořeny během glykačního procesu, schopnosti vychytávání reaktivních dikarboxylových sloučenin (glyoxalu, methylglyoxalu, 3-deoxyglukosonu) a schopnosti chelatace iontů přechodných kovů, které oxidační procesy podporují (Obr. 3) (Wu a Yen 2005).

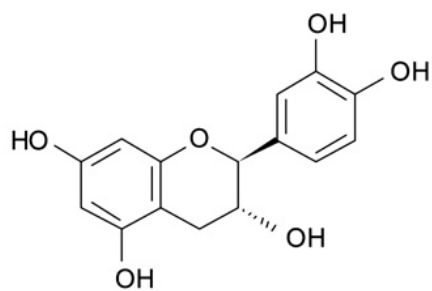
Předmětem studia této práce se staly katechiny, polyfenolické látky patřící do podtřídy flavan-3-olů.

2.1.1 Flavan-3-oly

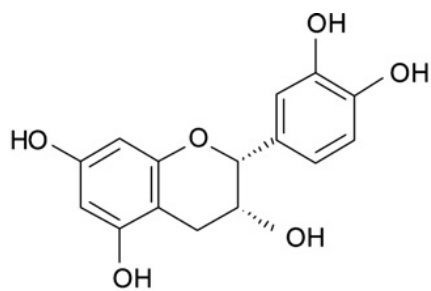
Flavan-3-oly (katechiny) jsou podtřídou flavonoidů obsahující ve své struktuře tříuhlíkatý řetězec s hydroxylovou skupinou na C₃ (Obr. 2), jenž může být esterifikována zbytkem kyseliny gallové (Ishii et al. 2010). Vyskytují se ve formě monomerů (katechiny), nebo jako polymery (proantokyanidiny). Narozdíl od ostatních podtříd flavonoidů se flavanoly nevyskytují v potravě v glykosylované podobě (Massimo D'Archivio et al. 2007). Ve struktuře flavan-3-olu se vyskytují dvě centra chiralit (C₂, C₃) (Kolečkář et al. 2012), a proto se jednotlivé katechiny liší prostorovým uspořádáním na kruhu C. Rozlišujeme katechiny s 2,3-*cis* strukturou (EC, EGC, ECG, EGCG), které jsou studovány zejména pro své antioxidační vlastnosti, a jejich epimery s 2,3-*trans* strukturou (C, GC, CG, GCG) (Obr.5) (Ishii et al. 2010). Katechiny můžeme najít v ovoci, jako jsou třešně nebo meruňky. Hlavním zdrojem je však zelený čaj (až 800 mg/l), dále čokoláda (600 mg/l) a červené víno (až 300 mg/l) (Massimo D'Archivio et al. 2007).

Čaj je již po staletí nejpopulárnějším nápojem v Asijských zemích, obecně je uváděn jako druhý nejčastěji konzumovaný nápoj na světě. Jedná se o produkt získaný z listů a pupenů rostliny čajovníku čínského (*Camellia sinensis*, Theaceae) (Cabrera et al. 2006, Song a Chun 2008).

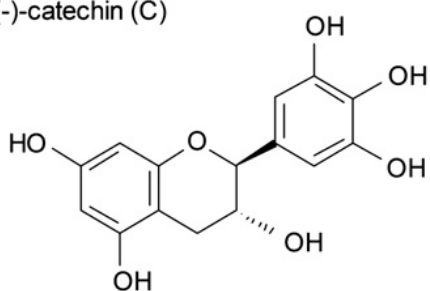
Čerstvé čajové lístky jsou významným zdrojem flavonoidů, a to zejména skupiny flavan-3-olů (katechinů). Mezi čtyři hlavní katechiny vyskytující se v nich patří (-)-epigallokatechin-3-gallát (EGCG), který tvoří asi 59 % všech obsažených katechinů, dále (-)-epigallokatechin (EGC) (19 %), (-)-epikatechin-3-gallát (ECG) (asi 13,6 %) a (-)-epikatechin (EC) (asi 6,4 %). Šálek zeleného čaje (2,5 g lístků zeleného čaje/200 ml vody) může obsahovat až 90 mg EGCG (Cabrera et al. 2006).



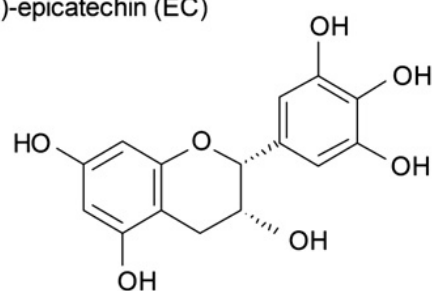
(-)-catechin (C)



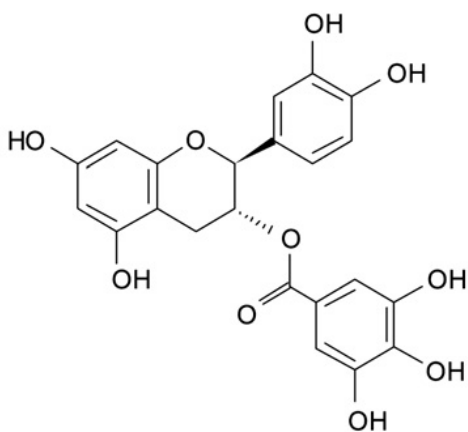
(-)-epicatechin (EC)



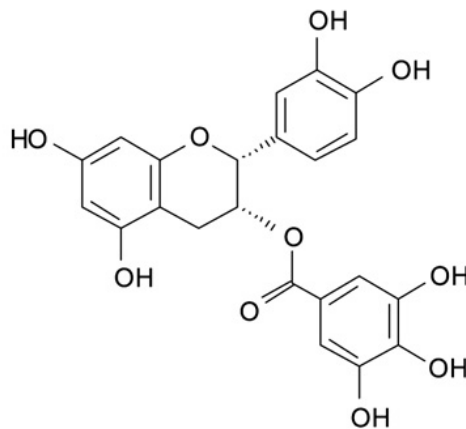
(-)-gallocatechin (GC)



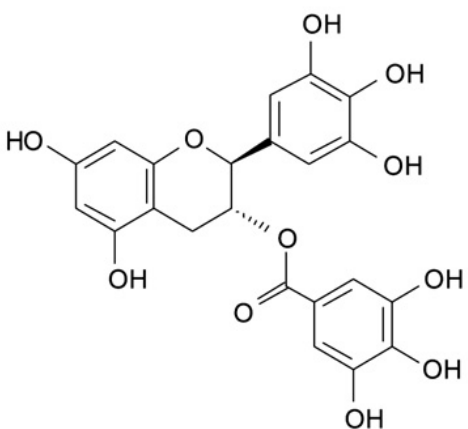
(-)-epigallocatechin (EGC)



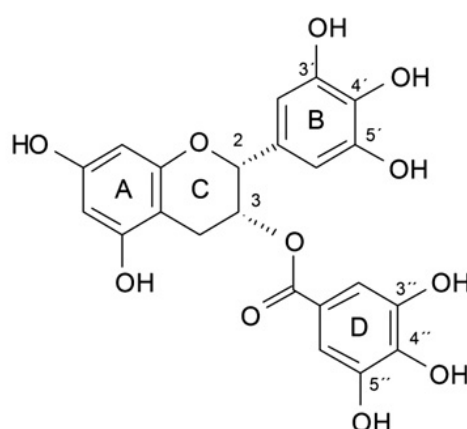
(-)-catechin gallate (Cg)



(-)-epicatechin gallate (ECg)



(-)-gallocatechin gallate (GCg)



(-)-epigallocatechin gallate (EGCg)

Obr. 5: Chemické struktury katechinů (Trnková et al. 2011).

Zdraví prospěšné vlastnosti zeleného čaje jsou vyzdvihovány již od počátků jeho historie. Tradiční čínská medicína doporučuje konzumaci čaje jako léku při bolesti hlavy, zad, k podpoře trávení, proti depresi, k detoxikaci a jako zdroj energie pro delší život (Cabrera et al. 2006). Čaj díky obsahu antioxidačně působících katechinů hraje protektivní roli v rozvoji řady chronických onemocnění (diabetes, kardiovaskulární či neurodegenerativní onemocnění) (Dufresne a Farnworth 2001). Katechiny vykazují antioxidační, antimutagenní, antidiabetické, antibakteriální, antivirotické a protizánětlivé vlastnosti (Cabrera et al. 2006, Dufresne a Farnworth 2001, Pastore a Fratellone 2006).

Antioxidační aktivita spočívá ve schopnosti vylučovat ROS a chelátovat ionty přechodných kovů (viz kap. 1.1 antioxidační vlastnosti flavonoidů). *In vitro* studie naznačují, že katechiny jsou potenciálními inhibitory kancerogeneze. Díky vylučovací schopnosti jsou schopny přímo neutralizovat prokarcinogeny a zabránit tvorbě nitrosaminů (karcinogenů tabáku) (Dufresne a Farnworth 2001). Studie na zvířatech naznačují, že katechiny mají schopnost inhibovat karcinogenezi kůže, plic, jícnu, žaludku, jater, ledvin, prostaty a dalších orgánů (Cabrera et al. 2006). Prevence kardiovaskulárních onemocnění zahrnuje schopnost katechinů inhibovat oxidaci lipoproteinů, EGCG dokonce efektivněji než tokoferol, schopnost inhibovat proliferaci hladké svaloviny vedoucí ke stenóze tepen (Dufresne a Farnworth 2001), schopnost redukovat plazmatickou hladinu cholesterolu a podporovat udržování normálních hladin tromboxanu A_2 , čímž je optimalizováno krevní srážení. EGCG taktéž prokazuje schopnost inhibovat peroxidaci lipidů (Cabrera et al. 2006, Dufresne a Farnworth 2001). Zelený čaj přispívá ke snížení hladiny glukózy v krvi a zvyšuje aktivitu inzulínu (Dufresne a Farnworth 2001, Cabrera et al. 2006, Pastore a Fratellone 2006).

2.1.2 Stabilita katechinů

Mnoho studií dokazuje, že katechiny lehce podléhají rozkladu a epimerizaci při přípravě čaje i konzervovaných čajových nápojů. Stabilita katechinů může být ovlivněna několika faktory, jako jsou pH, teplota, koncentrace, hladina O_2 , přítomnost antioxidantů (např. SOD) a iontů kovů (Sang et al. 2005). V zásaditém prostředí ($pH > 6$) jsou katechiny velmi nestabilní, zatímco v kyselém prostředí ($pH < 4$) jsou relativně stabilní (Wang a Zhou 2004, Su et al. 2003). Katechiny se rozkládají i při

zahřátí jejich vodného roztoku. Kritickou teplotou pro epimerizaci se ukázala být teplota ~ 82 °C (Wang a Zhou 2004).

EGCG se jeví jako nestabilní v několika buněčných kulturách i sodno-fosfátovém pufru o pH 7,4. Při rozkladu EGCG dochází zejména k autooxidaci a epimerizaci (vznik GCG). Stabilita EGCG v buněčném médiu se významně zvýší po přidání superoxiddismutasy (SOD). Tento fakt podporuje teorii, že nestabilita katechinů souvisí s jejich autooxidací (Sang et al. 2005, Roginski a Alegria 2005). Při inkubaci katechinů (EGCG, EGC, EC, ECG) v sodno-fosfátovém pufru (pH 7,4) projeví nižší stabilitu EGCG a EGC. Příčinou rychlejší destrukce je pravděpodobně přítomnost tří fenolických skupin v těsné blízkosti (pyrogallolový typ katechinů), které lehce podlehnou oxidaci za vzniku reaktivního semichinonového radikálu (Su et al. 2003). Rychlost oxidace souvisí se strukturálními rysy katechinů. Snižuje se v pořadí pyrogallol > gallát > katechol. Hydroxylové skupiny v *meta*-poloze nepřispívají k oxidaci dokonce ani při pH 13,0 (Roginski a Alegria 2005).

2.2 Interakce flavonoidů s proteiny

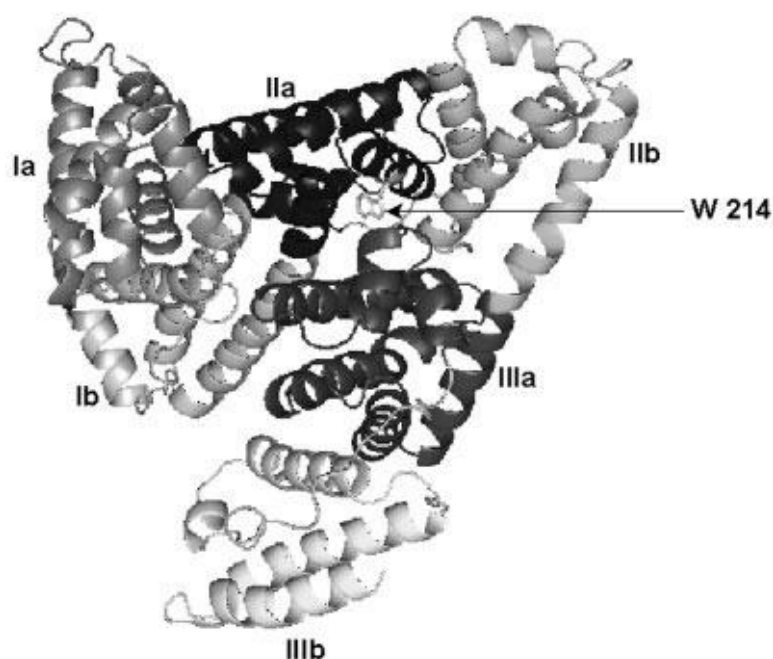
2.2.1 Lidský sérový albumin

Lidský sérový albumin (HSA) je nejčastěji se vyskytujícím proteinem v krevním séru (tvoří přibližně 60 % všech krevních proteinů, jeho koncentrace v séru je přibližně 40 mg/ml) (Dockal et al. 1999). HSA je globulární protein o velikosti 66 kDa, jenž je tvořen 585 aminokyselinami (Otagiri 2005). Vedle udržování koloidního osmotického tlaku krve je jeho hlavní úlohou transport a distribuce mnoha exogenních i endogenních molekul a metabolitů, jako jsou živiny, hormony, mastné kyseliny. Díky reverzibilní vazbě ovlivňuje farmakokinetiku řady léčiv. Také váže a napomáhá transportovat krevním oběhem látky, které jsou ve vodě málo rozpustné (Maiti et al. 2006, Dockal et al. 1999). Vedle transportní funkce má HSA roli i jako antioxidant, a to díky thiolové skupině Cys34, jenž představuje téměř 80 % všech volných -SH skupin v plazmě. Díky těmto -SH skupinám je HSA schopen vylučovat volné radikály a chránit buňky před oxidací (Bae et al. 2009).

HSA obsahuje ve své struktuře tři specifické domény I, II, III. Každá doména je dále rozdělena na dvě subdomény mající společné strukturální rysy, které jsou značeny *a* a *b*. Strukturální stavba HSA poskytuje několik vazebných míst. Hlavní dvě vazebná

místa pro malé heterocyklické nebo aromatické sloučeniny se nachází v subdoméně IIa a IIIa, která odpovídá straně I a II (Otagiri 2005). Další vazebná místa pro vyšší mastné kyseliny jsou umístěna v subdoméně Ib a IIIb, pro vazbu kovů se nachází dvě místa v oblasti Cys34 a *N*-terminálního konce proteinu (Dockal et al. 1999).

Ve struktuře HSA se nachází jediný zbytek tryptofanu (Trp214) a to v subdoméně IIa (Obr. 6). Díky tomuto Trp214 vykazuje HSA při excitaci 295 nm silnou fluorescenční emisi s hlavním emisním píkem kolem 340 nm (Lakowicz 2006). Právě změny ve fluorescenčním spektru HSA vlivem ligandů jsou využívány při studiu interakcí HSA (Maiti et al. 2006, Bolli et al. 2010).



Obr. 6: Struktura HSA s označenými doménami a Trp 214 (W 214) (Maiti et al. 2006).

Konformace a vlastnosti HSA mohou být ovlivněny prostředím (např. změnou pH prostředí, kovalentní modifikací proteinu vlivem neenzymové glykace či vazbou jiných látek) (Dockal et al. 2000, Otagiri 2005).

2.2.2 Interakce HSA s katechiny

Několik studií potvrzuje, že při transportu krví katechiny mohou vytvářet komplexy s albuminem. Právě tato vazebná schopnost ovlivňuje jejich transport, metabolismus, biodostupnost a biologickou aktivitu *in vivo* (Minoda et al. 2010). Vztah

mezi strukturou katechinů a jejich vazebnou afinitou k sérovému albuminu stále zůstává předmětem studií. Vazba katechinů k HSA je zprostředkována pravděpodobně pomocí nekovalentních vazeb, a to tvorbou vodíkových můstků a elektrostatických sil, či pomocí hydrofóbních interakcí (Ishii et al. 2010, Diniz et al. 2008). K tvorbě vodíkových můstků přispívají fenolové skupiny, na hydrofóbních interakcích se podílí např. zbytek kyseliny gallové v molekule katechinů (Ishii et al. 2011).

Při srovnání vazebné schopnosti k HSA mezi několika polyfenoly katechin a epikatechin prokázali mnohem nižší vazebnou schopnost než např. quercetin, či flavanony a flavony. Vazba k HSA byla vyšší u sloučenin obsahujících ve struktuře karbonylovou skupinu na C₄. Význam této skupiny ve struktuře polyfenolu popisuje i několik dalších prací (Diniz et al. 2008). Ishii et al. (2010) se zabýval s využitím HPLC analýzy vztahem mezi strukturou katechinů a jejich vazebnými schopnostmi k HSA. Výsledky naznačují, že významně vyšší vazebnou afinitu k HSA vykazují estery katechinů (ECG, EGCG, CG, GCG) díky přítomnosti zbytku kyseliny gallové ve své molekule. Ke zvýšení vazebné afinity také přispívá vyšší počet hydroxylových skupin na kruhu B (pyrogallolový typ katechinů) a vhodné prostorové uspořádání molekuly katechinů, kdy větší vazebnou schopnost vykazovaly *trans*-katechiny (CG, GCG) (Ishii et al. 2010). Přítomnost zbytku kyseliny gallové v molekule zvyšuje hydrofobicitu katechinů, čímž je značně zvýšena vazebná afinita k hydrofóbním kapsám nacházejícím se ve vazebných doménách proteinu (subdomény IIa, IIIa) (Minoda et al. 2010). Vnitřní strana vazebné kapsy HSA je ohraničena hydrofóbními řetězci, zatímco vstup do kapsy je ohraničen pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222, His242, Arg257). Trp214 je součástí helixu v subdoméně IIa. Navázání EGCG k HSA způsobí pokles hydrofóbního charakteru vazebné kapsy, kde je uložen Trp214, což vede ke změně sekundární struktury proteinu, konkrétně částečnému „rozbalení“ proteinu. Tato změna se ve fluorescenčním spektru bílkoviny projeví posunem spektra k vyšším vlnovým délkám (tzv. „červený posun“) (Maiti et al. 2006).

Bae et al. (2009) upozornil také na skutečnost, že vzájemná interakce mezi katechinem a HSA vede ke stabilizaci antioxidantu v séru. EGCG snadno podléhá autooxidaci, jež může vést k tvorbě ROS a k oxidační modifikaci proteinů (Bae et al. 2009, Ishii et al. 2011). Existuje teorie, že HSA díky svým volným -SH skupinám (přítomnost Cys34) chrání EGCG před volnými radikály, zabraňuje tak jeho oxidaci a zvyšuje jeho biologickou aktivitu *in vivo* (Bae et al. 2009). K ochraně katechinů před

oxidačními účinky iontů přechodných kovů, O₂ a ROS přispívá i sterické chránění kruhu B proteinem (Ishii et al. 2011).

2.3 Neenzymová glykace

2.3.1 Tvorba glykačních produktů (AGEs)

Proces glykace vedoucí k tvorbě koncových produktů pokročilé glykace (AGEs – advanced glycation end-products) je součástí patogeneze řady civilizačních onemocnění, jako jsou diabetes mellitus, ateroskleróza, renální insuficience, neurodegenerativní choroby (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza), i fyziologického procesu stárnutí. Glykační produkty jsou vytvářeny postranslační modifikací, kdy redukující cukry (např. glukóza, fruktóza, galaktóza) jsou schopny pomocí své karbonylové skupiny reagovat s volnými aminoskupinami aminokyselin, peptidů, fosfolipidů i nukleových kyselin. Glykace bílkovin je reakce neenzymová, zprostředkovaná kovalentní interakcí mezi karbonylovou skupinou redukujícího cukru a volnou aminoskupinou bílkoviny, označovaná též jako neenzymová glykosylace. Kondenzační proces zahrnující interakci mezi cukrem a aminoskupinou byl pojmenován po svém objeviteli Maillardova reakce (poprvé popsán roku 1912). Prvním krokem Maillardovy reakce je tvorba málo stabilní Schiffovy báze, která přechází ve stabilnější tzv. Amadoriho produkty. V delším časovém intervalu Amadoriho produkty podléhají chemickým reakcím (dehydratace a degradace), kdy dochází ke vzniku řady vysoce reaktivních karbonylových sloučenin, jako jsou methylglyoxal, glyoxal a 3-deoxyglukoson (tzv. prekursorů AGEs, Obr. 7). Tyto vysoce reaktivní karbonylové sloučeniny jsou schopny reagovat s dalšími volnými aminoskupinami a vést k ireversibilní tvorbě AGEs – poslední krok Maillardovy reakce (Takeuchi et al. 2001, Turk 2010). Následkem porušení rovnováhy mezi produkcí reaktivních karbonylových meziproduktů a účinností obranných buněčných mechanismů vzniká tzv. karbonylový stres. Reaktivní dikarbonylové sloučeniny vznikají a) při glykolytickém štěpení glukózy, b) jako meziprodukty Maillardovy reakce degradací glykovaných bílkovin, c) během peroxidace lipidů (tvorba ketoláték). Vzniklé dikarbonylové sloučeniny jsou mnohokrát reaktivnější v tvorbě AGEs než samotná glukóza (Turk 2010).

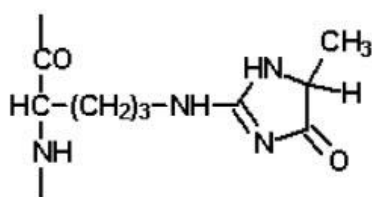
při momentálním nedostatku CoA (např. diabetická metabolická krize). Za běžných okolností je threonin katabolizován na glycin a acetyl-CoA. Intracelulárně tvořený MGO je schopen přestoupit přes buněčnou membránu pravděpodobně pasivní difúzí (Turk 2010). Kontrolním mechanismem nadměrné tvorby MGO v těle je zejména glyoxylasový systém, který je přítomen v cytosolu každé savčí buňky. Tento systém je tvořen dvěma enzymy, glyoxylasou I a II, a dostatečným množstvím redukovaného glutathionu (GSH). Glyoxylasa I je GSH-dependentním enzymem. Hlavním produktem tohoto detoxikačního metabolismu je inertní sloučenina D-laktát vznikající přes meziproduct S-D-laktoylglutathion. Mezi další enzymy, které se podílejí na katabolismu MGO, patří aldehydreduktasa (redukuje MGO na 1,2-propandiol), betain-aldehyddehydrogenasa a 2-oxoaldehyddehydrogenasa (Turk 2010, Gomes et al. 2005, Ahmed et al. 2003). Zvýšená tvorba MGO je zaznamenána u diabetických pacientů, kde je hlavní příčinou kolísající hladina glykémie (Turk 2010). Studie ukazují, že u diabetických pacientů dochází ke zvýšení obsahu MGO v plazmě až na 16-27 $\mu\text{g/dL}$, zatímco u zdravých jedinců se pohybuje množství MGO v plazmě okolo 3-7 $\mu\text{g/dL}$ (Tan et al. 2008).

MGO je schopen modifikovat a vázat se na části proteinu obsahující arginin, lysin a cystein. Tyto reakce následně vedou k tvorbě ireverzibilních AGEs (Turk 2010). Mezi adukty s argininem patří: *N*- δ -(4-karboxy-4,6dimethyl-5,6-dihydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)ornithin (THP), argpyrimidin a zejména MGO-odvozené hydroimidazolony (*N*- δ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-ornithin, 2-amino-5-(2-amino-5-hydro-5-methyl-4-imidazol-1-yl)pentanová kys., 2-amino-5-(2-amino-4-hydro-4-methyl-5-imidazol-1-yl)pentanová kys.). Reakcí s lysinem je tvořen zejména *N*- ϵ -(1-karboxyethyl)lysin (CEL) a dimer 1,3-di-(*N*- ϵ -lysino)-4-methyl-imidazolium (MOLD) (Obr. 8, Ahmed et al. 2003). Argpyrimidin je specifickým markrem pro stanovení glykace proteinů způsobené MGO. Imidazol-ové glykační produkty argininu vykazují fluorescenci. Glykace lysinu vede k tvorbě hnědě zbarvených komplexů vykazujících taktéž fluorescenci. MGO je za svých běžných fyziologických koncentrací schopen vazby a modifikace BSA, vazby na ribonukleasu A, lyzozym, glykolytické enzymy, na proteiny membrány červených krvinek, mikrotubulární proteiny, kolagen (Lo et al. 1994). MGO-modifikovaný albumin je vázán buněčnými receptory makrofágů a poté degradován. Glykace bílkovin způsobená MGO může vést taktéž k inaktivaci enzymů, včetně inaktivace ATPas, změně vlastností a struktury proteinů. Strukturně změněné proteiny se mohou stát signálem k jejich buněčné

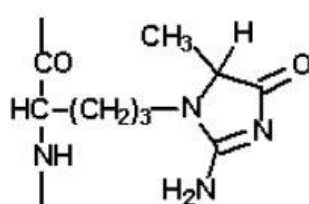
degradaci (Lo et al. 1994). Některé AGEs jsou rozeznány specifickými receptory (RAGE) endoteliálních buněk, monocytů, makrofágů a dalších buněk. Vazba na RAGE je spojena s buněčnou aktivací, jež může vyvolat expresi adhezních molekul, uvolnění cytokinů, syntézu růstových faktorů, či být signálem pro apoptózu. Uvolnění cytokinů a růstových faktorů může přispět jak k reparaci proteinu, tak k rozvoji oxidačního stresu, který podporuje rozvoj vaskulárních chorob, diabetu, aterosklerózy či stárnutí (Bierhaus et al. 1998, Thornalley et al. 1999).

Hladina glykovaného albuminu u diabetických pacientů odráží množství glukózy v krvi za poslední 2-4 týdny. Při glykaci albuminu dochází ke zvýšení jeho fluorescence. Hlavním místem glykace albuminu je Lys525. Kisugi et al. (2007) studoval fluorimetrické změny albuminu a místa glykace albuminu u pacientů přijatých s velmi špatně kontrolovanou glykemií a následně během inzulinové terapie. Pokles hladiny glykovaného albuminu odrážel velmi rychlý pokles glykémie po zahájení inzulinové terapie. Současně s poklesem hladiny glykovaného albuminu se snížila i fluorescence AGEs. Se zvýšenou hladinou glykovaného albuminu se zvýšil i počet glykačních míst. Glykace vedle Lys525 probíhala i v dalších pozicích lysinových zbytků (Lys64(73), Lys136(137), Lys233, Lys274(276), Lys534, Lys199, Lys317, Lys389, Lys439) (Kisugi et al. 2007).

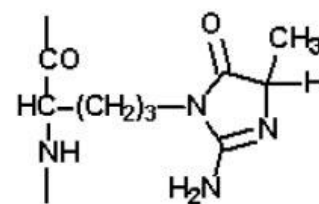
(a) Arginine derived AGEs



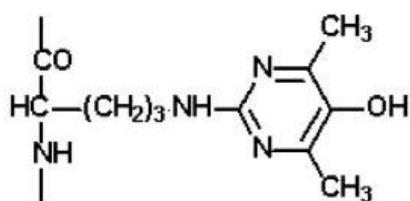
Hydroimidazolone
(isomer 1, MG-H1)



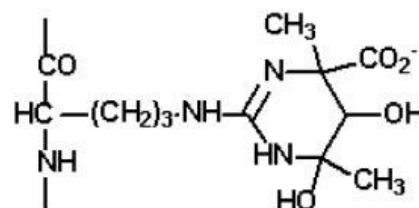
Hydroimidazolone
(isomer 2, MG-H2)



Hydroimidazolone
(isomer 3, MG-H3)

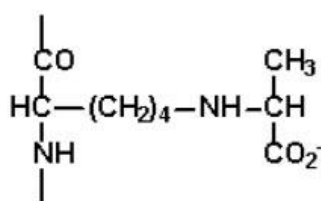


Argpyrimidine

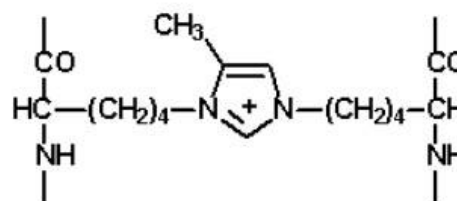


Tetrahydropyrimidine

(b) Lysine derived AGEs



CEL



MOLD

Obr. 8: Hlavní glykační produkty glykace methylglyoxalem (Ahmed et al. 2003).

2.3.3 Inhibiční vlastnosti flavonoidů na tvorbu AGEs

Za hlavní příčinu progresu chronických mikro- a makrovaskulárních diabetických komplikací (nefropatie, retinopatie, periferní neuropatie, ateroskleróza) je považována akumulace AGEs (Lo et al. 2006). Již několik synteticky připravených chemických sloučenin (např. aminoguanidin, metformin, pyridoxamin) prokázalo schopnost inhibovat produkci AGEs a oddálit tak rozvoj diabetických komplikací (Sang et al. 2007, Wu a Yen 2005). V poslední době je poukazováno na velmi dobré schopnosti inhibovat produkci AGEs u polyfenolických sloučenin (Lo et al. 2006). Flavonoidy jsou známé zejména pro své antioxidační vlastnosti, schopnost vychytávat volné radikály a v současné době se dostává do popředí i testování jejich schopnosti přispívat k redukci tvorby AGEs (Lo et al. 2006, Wu a Yen 2005). Ve studiích flavonoidy prokazují dokonce větší inhibiční schopnosti na tvorbu AGEs, než známý

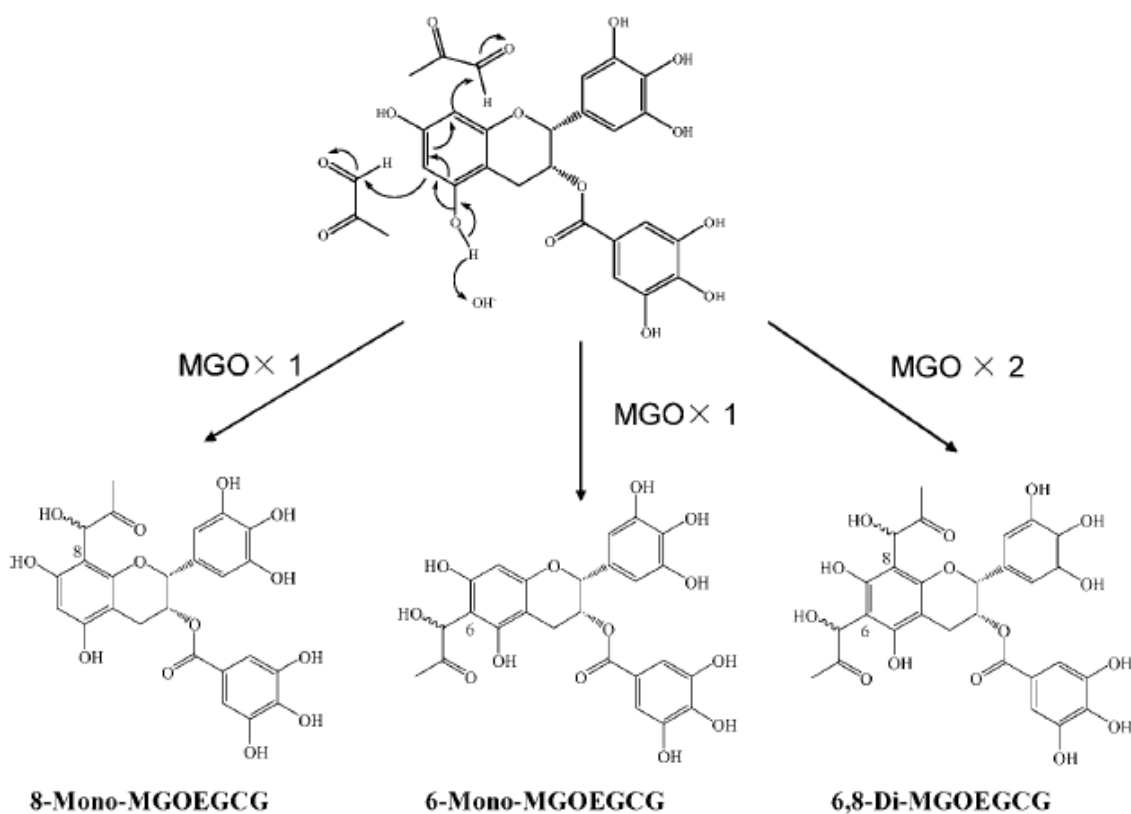
inhibitor tvorby AGEs aminoguanidin (Lo et al. 2006). Antiglykační působení flavonoidů pravděpodobně spočívá ve schopnosti vychytávání ROS (zejména peroxid vodíku, superoxidu), jež jsou tvořeny během glykačního procesu, schopnosti vychytávání reaktivních dikarbonylových sloučenin a schopnosti chelatace iontů přechodných kovů, které oxidační procesy podporují (Wu a Yen 2005).

Sang et al. (2007) studoval schopnost hlavního čajového katechinu (EGCG) vychytávat MGO a působit tak preventivně v progresi diabetických komplikací. EGCG (6 mM) je schopen rychle vychytat reaktivní dikarbonylové sloučeniny jak MGO (2 mM), tak GO (2 mM), přičemž schopnost vychytávat GO je o něco nižší než u MGO. Příčinou by mohla pravděpodobně být tendence GO ve vodném prostředí vytvářet dimery a trimery. MGO a GO jsou velmi reaktivní sloučeniny, které mají schopnost se vázat a modifikovat zejména zbytky lysinu a argininu v proteinech. EGCG (6 mM) prokázal mnohem rychlejší schopnost reagovat s MGO (2 mM) než lysin a arginin. Tato skutečnost naznačuje, že EGCG je schopen potenciálně soutěžit s lysinem a argininem při vazbě na MGO a snižovat tak tvorbu AGEs. Hlavním vazebným místem MGO na molekule EGCG je poloha 6 a 8 na kruhu A (Obr. 9). Přítomnost zbytku kyseliny gallové v molekule EGCG nemá pravděpodobně na vazbu MGO vliv. Při konjugaci v poloze 8 (i 6) mohou vznikat dva stereoizomery lišící se *S*- nebo *R*- konfigurací. Slabě alkalické pH prostředí může zvýšit nukleofilní vlastnosti polohy 6 a 8 kruhu A. Je stále nejasné, proč zbytek kyseliny gallové v molekule, který je důležitý pro antioxidační vlastnosti EGCG, nepřispívá také ke schopnosti vychytávat MGO. Příčiny mohou být sterické – nepřístupnost polohy 2' a 6', taktéž přítomnost tří OH skupin může být příčinou nižší nukleofility, než je v poloze 6 a 8 kruhu A (Sang et al. 2007).

Lo et al. (2006) porovnával schopnost vychytávat MGO (2 mM) u čtyř katechinů (EC, ECG, EGC, EGCG) (5,33 mM). Největší schopnost snížit koncentraci MGO prokázal EGC (vychytil přibližně 45,7 % MGO po 1 h inkubaci při 37 °C), následován EC (35 %), EGCG (33 %). Nejnižší schopnost snížit koncentraci MGO prokazoval ECG (25 %). NMR, HPLC a MS analýzy potvrdily, že ke tvorbě komplexu mezi EGCG a MGO dochází zejména v poloze 8 EGCG (podařilo se oddělit enantiomery). Případné komplexy vznikající v poloze 6 se nepodařilo izolovat (Lo et al. 2006).

Wu a Yen (2005) studovali vliv flavonoidů odlišných podtříd na glykaci proteinu, a to vliv na glykaci hemoglobinu glukózou, vliv na glykaci BSA methylglyoxalem, či glykaci BSA glukózou. Mezi studovanými flavonoidy byla i

skupina flavanolů (C, EC, ECG, EGC, EGCG). EGCG (100 μM) snižoval glykaci BSA methylglyoxalem (100 mM) o 69,1 % (inkubace 9 dní), naopak katechin (100 μM) v tomtéž testu neprokázal téměř žádný benefiční účinek. Při sedmidenní inkubaci BSA s 0,8 M glukózou a EGCG 100 μM došlo ke snížení glykace o 65,8 %, podobnou schopnost prokázal i ECG (100 μM). Porovnávána byla i schopnost flavonoidů vychytávat ROS, jež jsou produkovány během glykačního procesu, pomocí elektronové spinové resonance (ESR). ESR spektra potvrdila produkci ROS během glykace proteinů. EGCG (100 μM) vychytil 52,3 % radikálů a ECG (100 μM) 32,5 % ROS (Wu a Yen 2005).



Obr. 9: Teoretické možnosti tvorby aduktů mezi MGO a EGCG v neutrálním nebo slabě bazickém prostředí (Sang et al. 2007).

3 Cíl práce

Pro účely práce byly zvoleny čtyři katechiny s 2,3-*trans* uspořádáním ((-)-katechin (C), (-)-gallokatechin (GC), (-)-katechingallát (CG) a (-)-gallokatechingallát (GCG)). Hlavní cíle práce byly:

- a) studium stability vybraných katechinů ve vodném roztoku fosfátového pufru (0,1 M; pH 7,4)
- b) studium potenciálních interakcí vybraných katechinů s lidským sérovým albuminem
- c) studium vlivu vybraných katechinů na neenzymovou glykaci lidského sérového albuminu methylglyoxalem.

4 Materiál a metodika

4.1 Chemikálie

- Akrylamid (pro elektroforézu, $\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Peroxodisíran sodný (pro elektroforézu, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Azid sodný (NaN_3) (Lachema, Brno, Česká republika)
- Bromfenolová modř (Riedel-de Haën, Steinheim, Německo)
- Coomassie Blue G250 (EZBlue gel staining reagent) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Ethanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Fixační a vyvíjecí lázeň (Foma Bohemia, Hradec Králové, Česká republika)
- Glycin pro elektroforézu ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Glycerol (Kulich)
- Isobutanol (Penta)
- Katechiny ((-)-katechin, (-)-gallokatechin, (-)-katechingallát, (-)-gallokatechingallát ze zeleného čaje, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Kyselina octová 99% (Lachema)
- Lidský sérový albumin (HSA) (lyofilizovaný prášek, $\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- 2-Merkaptoethanol (pro elektroforézu, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Methanol (Penta, Praha, Česká republika)
- Methylglyoxal (vodný roztok, 40%) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- *N,N'*-Methylenbisakrylamid (pro elektroforézu, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (pro elektroforézu) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (SDS, dodecylsírán sodný) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, ACS reagent, $\geq 99,8\%$) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)

4.2 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita redestilovaná voda.

- **Příprava 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 s 0,05 % NaN₃**

0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 jsem připravila smícháním 405 ml 0,2 M roztoku Na₂HPO₄·12H₂O (M_R = 358,14) s 95 ml 0,2 M roztoku NaH₂PO₄·2H₂O (M_R = 156,01) a 500 ml redestilované vody s přidavkem 0,5 g NaN₃ jako antimikrobní látky. Po řádném promíchání roztoku jsem změřila jeho pH pomocí pH metru a popřípadě upravila na hodnotu 7,4 pomocí 0,2 M Na₂HPO₄·12H₂O či 0,2 M roztoku NaH₂PO₄·2H₂O.

- **Příprava roztoku HSA**

Potřebné množství lidského sérového albuminu (M = 67 kDa) jsem rozpustila ve fosfátovém pufru (0,1 M; pH 7,4; 0,05% NaN₃) tak, aby vznikl roztok o koncentraci 4×10^{-6} M pro spektrofotometrické stanovení interakcí a 15×10^{-6} M pro elektroforézu a glykace.

- **Příprava roztoků antioxidantů (katechinů)**

Zásobní roztoky antioxidantů jsem připravila rozpuštěním jednotlivých katechinů v metanolu za vzniku zásobních roztoků o koncentraci 1×10^{-2} M (katechin M_R = 290,3; katechingallát M_R = 442,4; gallokatechin M_R = 306,26; gallokatechingallát M_R = 458,4). Roztoky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

- **Příprava roztoku methylglyoxalu (MGO)**

Roztok MGO (5,55 M) jsem naředila potřebným množstvím fosfátového pufru (0,1 M; pH 7,4; 0,05% NaN₃) tak, aby vznikl zásobní roztok MGO o koncentraci 0,5 M pro studium glykací.

4.2.1 Příprava zásobních roztoků pro elektroforézu

- **Roztok 4 M HCl** jsem připravila přilitím 88 ml konc. HCl do 150 ml redestilované vody. Objem jsem doplnila vodou do 250 ml. Připravený roztok je uchováván v lednici.

- **Roztok obsahující akrylamid a bis-akrylamid** jsem připravila rozpuštěním 30 g akrylamidu (AA) a 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu (bis-AA) ve 100 ml redestilované vody. Roztok je uchováván v lednici.
- **1,5 M Tris-HCl pufr o pH 8,8** jsem připravila rozpuštěním 18,5 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Trisu) v 75 ml redestilované vody, pH roztoku jsem upravila na pH-metru pomocí 4 M HCl (cca 5-6 ml). Poté jsem doplnila objem v odměrné baňce na 100 ml. Roztok je uchováván v lednici.
- **0,5 M Tris-HCl pufr o pH 6,8** jsem připravila rozpuštěním 6 g Trisu v 75 ml redestilované vody a pH roztoku upravila na pH-metru pomocí 4 M HCl (cca 7-8 ml). Objem jsem doplnila v odměrné baňce na 100 ml. Roztok je uchováván v lednici.
- **Roztok bromfenolové modři (0,5%)** jsem připravila rozpuštěním 50 mg bromfenolové modři (BPB) v 10 ml redestilované vody.
- **Roztok peroxidisíranu amonného (APS) (10%)** jsem připravila rozpuštěním 25 mg APS v 250 μ l redestilované vody. Roztok je připravován těsně před použitím.
- **Roztok dodecylsíranu sodného (SDS) (10%)** jsem připravila rozpuštěním 10 g SDS ve 100 ml redestilované vody.
- **Koncentrovaný elektrodový pufr pro SDS-PAGE** jsem připravila rozpuštěním 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS v 900 ml redestilované vody, na pH metru jsem upravila pH roztoku na 8,3 pomocí 4 M HCl. Roztok jsem doplnila v odměrné baňce do 1000 ml, rozdělila po 100 ml do plastických nádobek a poté zamrazila na -20 °C.
- **Koncentrovaný elektrodový pufr pro nativní PAGE** jsem připravila rozpuštěním 72 g glycinu a 15 g Trisu v 900 ml redestilované vody, na pH metru jsem upravila pH roztoku na 8,3 pomocí 4 M HCl. Roztok jsem doplnila v odměrné baňce do 1000 ml, rozdělila po 100 ml do plastických nádobek a poté zamrazila na -20 °C.
- **Elektrodový pufr** jsem připravovala těsně před použitím smísením 70 ml zásobního elektrodového pufru s 280 ml redestilované vody.
- **Vzorkový pufr pro nativní PAGE** jsem připravila smícháním 1 ml Tris-HCl pufru (0,5 M, pH 6,8), 4,3 ml redestilované vody, 2 ml glycerolu a 0,6 ml BPB

(0,5%). Roztok je uchováván v lednici. Vzorky bílkoviny jsem ředila tímto pufrům v poměru 1:1.

- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE** jsem připravila smícháním 1 ml Tris-HCl pufru (0,5 M, pH 6,8), 1,3 ml redestilované vody, 2 ml glycerolu, 3 ml SDS (10 %) a 0,6 ml BPB (0,5 %). Následně jsem přidala do 1 ml tohoto pufru 50 μ l 2-merkapt ethanolu. Vzorek bílkoviny (12 μ l) jsem zředila 3 μ l SDS (10 %) a 15 μ l pufru s SDS a 2-merkapt ethanolem.
- **Isobutanol nasycený vodou** jsem připravila smícháním čistého isobutanolu redestilovanou vodou. V horní vrstvě je isobutanol nasycený vodou. Uchovávat v lednici.

Tab. 1: Příprava nedenuroujícího polyakrylamidového gelu pro nativní PAGE.

Příprava 1 gelu (složení)	Separáčnící gel (10%)	Zaostřovací gel (4%)
Redestilovaná voda	4000 μ l	3176 μ l
Tris-HCl pufr (1,5 M, pH 8,8)	2500 μ l	-
Tris-HCl pufr (0,5 M, pH 6,8)	-	1250 μ l
Roztok (AA+bis-AA)	3400 μ l	500 μ l
APS (10%)	116 μ l	100 μ l
TEMED	8 μ l	10 μ l

Akrylamid (AA), persíran amonný (APS), N,N'-methylenbisakrylamid (bis-AA), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED).

Tab. 2: Příprava denaturujícího polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE.

Příprava 1 gelu (složení)	Separáčnící gel (7,5%)	Zaostřovací gel (4%)
Redestilovaná voda	2450 μ l	1563 μ l
Tris-HCl pufr (1,5 M, pH 8,8)	1250 μ l	-
Tris-HCl pufr (0,5 M, pH 6,8)	-	625 μ l
Roztok (AA + bis-AA)	1250 μ l	250 μ l
SDS (10%)	50 μ l	25 μ l
APS (10%)	58 μ l	50 μ l
TEMED	4 μ l	5 μ l

Akrylamid (AA), persíran amonný (APS), N,N'-methylenbisakrylamid (bis-AA), dodecylsírán sodný (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED).

4.3 UV-VIS absorpční spektroskopie

Všechna absorpční spektra jsem proměřovala pomocí spektrofotometru Helios β (Spectronic Unicam, Velká Británie) s využitím křemenné kyvety o tloušťce 10 mm.

4.3.1 Stabilita roztoků katechinů

V prvním kroku jsem prověřovala stabilitu roztoků jednotlivých katechinů během inkubační doby pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. Roztoky katechinů v pufru (0,1 M; pH 7,4; 0,05% NaN_3) o koncentraci $1 - 50 \times 10^{-6}$ M jsem inkubovala při teplotě 37°C a v daných časových intervalech ($t = 0, 1 \text{ den}, 3 \text{ den}, 6 \text{ den}$) jsem proměřila jejich absorpční spektrum v rozmezí vlnových délek 190 - 550 nm při 37°C . V získaných absorpčních spektrech jsem posuzovala časové změny křivek.

4.3.2 Interakce katechinů s HSA

Změny absorpčního spektra bílkoviny po inkubaci s příslušnými katechiny a s tím i spojenou možnost tvorby komplexu jsem sledovala pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. UV-VIS absorpční spektra připravených roztoků jsem proměřovala v rozmezí vlnových délek 190 – 550 nm při teplotě 37°C . Nejprve jsem změřila absorpční spektrum samotného HSA (4×10^{-6} M) a příslušného katechinu (4×10^{-5} M) v čase 0. Následně jsem si připravila vzorky obsahující HSA a příslušný katechin a po jejich pětiminutové inkubaci při teplotě 37°C jsem změřila jejich absorpční spektrum. Rozdílové spektrum bílkoviny jsem získala odečtením naměřeného spektra katechinu od spektra vzorku obsahujícího HSA a příslušný katechin v čase 5 minut. Toto spektrum jsem porovnávala se spektrem bílkoviny v čase 0.

4.3.3 Vliv katechinů na glykaci HSA

UV-VIS absorpční spektra roztoků jsem proměřovala v rozmezí vlnových délek 190 – 550 nm při teplotě 37°C . Nejprve jsem do mikrozkušavek připravila jednotlivé inkubační směsi - vzorek obsahující HSA (15×10^{-6} M), vzorek MGO (1×10^{-5} M), vzorek HSA (15×10^{-6} M) s přídavkem MGO (1×10^{-5} M), vzorek MGO (1×10^{-5} M) s přídavkem katechinů v koncentraci 1, 5, 10, 25 nebo 50×10^{-6} M, vzorek směsi HSA (15×10^{-6} M) s glykačním činidlem MGO (1×10^{-5} M) a přídavkem katechinů v koncentraci 1, 5, 10, 25 nebo 50×10^{-6} M. MGO jsem ve všech vzorcích připipetovala těsně před prvním měřením ($t = 0$). Vzorky byly proměřeny v časových intervalech $t = 0, 1, 3$ a 6 dní. Mezi jednotlivými měřeními proběhla inkubace vzorků

při 37 °C. V jednotlivých časových intervalech jsem získala rozdílová spektra bílkoviny odečtením naměřeného spektra směsi MGO s katechinem od spektra vzorku obsahujícího HSA + MGO + katechin. Ta byla porovnána s rozdílovým spektrem glykovaného HSA získaným odečtením spektra MGO od spektra HSA + MGO v daném časovém intervalu.

4.4 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektra jsem proměřovala na fluorimetru Perkin-Elmer LS50B (Velká Británie) v 10 mm křemenné Suprasil fluorescenční kyvetě (Hellma, Německo) při teplotě 37 °C.

4.4.1 Interakce katechinů s HSA

Fluorescenční emisní spektra jednotlivých katechinů (4×10^{-5} M) v nepřítomnosti a v přítomnosti HSA (4×10^{-6} M) jsem proměřila při excitační vlnové délce 330 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu vznikajících komplexů zjištěných při UV-VIS absorpčním měření.

4.4.2 Fluorimetrická titrace: interakce HSA s katechiny

Potenciální interakce mezi jednotlivými katechiny a HSA jsem prověřovala pomocí metody fluorimetrické titrace. Roztok HSA (4×10^{-6} M) jsem v kyvetě titrovala roztokem katechinu (1×10^{-2} M) až do konečné koncentrace ve vzorku 2×10^{-5} M. Fluorescenci vzorku jsem měřila vždy po 4 minutách po přidavku roztoku katechinu. Fluorescenční emisní spektra jsem měřila v rozmezí vlnových délek 300 – 530 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm; excitační šterbina 5 nm, emisní šterbina 5 nm; rychlost skenování 200 nm/min) za stálého míchání. Fluorescenční intenzita byla odečítána v emisním maximu proteinu 348 nm. Zároveň jsem za stejných experimentálních podmínek proměřila i fluorescenční spektra jednotlivých katechinů v pufru, která byla při vyhodnocování dat odečtena jako fluorescenční pozadí.

4.4.3 Fluorescenční měření glykačních produktů

Nejdříve jsem si postupně připravila jednotlivé inkubační směsi o objemu 3200 μl - vzorek obsahující HSA (15×10^{-6} M), dále vzorek obsahující HSA s přidavkem glykačního činidla MGO (1×10^{-5} M) a vzorek obsahující HSA s MGO a příslušným katechinem v koncentraci 1, 5, 10, 25 nebo 50×10^{-6} M. Ve chvíli, kdy jsem

měla inkubační směs připravenou ($t = 0$), jsem odebrala 700 μl vzorku, který jsem ihned uložila do mrazicího boxu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Poté se inkubační směs nechala inkubovat při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v časech 3 a 7 dní jsem odebrala další vzorky po 700 μl a poté je uložila do mrazicího boxu. V den měření jsem rozmrazila všechny inkubační směsi a proměřila jejich fluorescenci na mikrotitračních destičkách pomocí fluorimetru Perkin-Elmer LS50B (Velká Británie) při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (měřena tvorba argpyrimidinu: $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 320/380 nm, nespecifické AGEs: $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 370/440 nm). Pipetovala jsem vždy 200 μl daného vzorku/jamka mikrotitrační destičky. Každý vzorek jsem proměřila třikrát. Odebraný vzorek v čase 0 byl použit jako neinkubovaný slepý vzorek.

4.5 Elektroforéza

Vzorky obsahující HSA a jednotlivé katechiny a vzorky samotného HSA (kontrola) jsem připravila a nechala inkubovat 30 min při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrace HSA ve všech vzorcích byla $15 \times 10^{-6}\text{ M}$ a koncentrace jednotlivých katechinů $6 \times 10^{-4}\text{ M}$. Poté byla provedena nativní (native PAGE) a denaturující elektroforéza (SDS-PAGE) na polyakrylamidovém gelu.

4.5.1 Nativní elektroforéza

Nativní PAGE jsem prováděla v diskontinuálním systému s užitím 4% zaostřovacího gelu a 10% separačního nedenaturujícího gelu. Do každé jamky jsem nanasla 8 μg proteinu. Samotná elektroforéza proběhla na přístroji Mini ProteanIII (BioRad) za vedení elektrického proudu 30 mA. Proteiny v gelu jsem barvila pomocí koloidní Coomassie Blue G250. Gel byl skenován pomocí GelDoc XR systému (BioRad) a relativní pohyblivosti (R_f) byly stanoveny pomocí Quantity One softwaru (BioRad). Výsledky jsem vyjádřila jako vzrůst mobility vzorku v procentech v porovnání se samotným proteinem (kontrola) podle následujícího vzorce:

$$[(R_f(\text{komplex}) - R_f(\text{HSA})) / R_f(\text{HSA})] \times 100 (\%) \quad (1)$$

kde R_f je retenční faktor vzorku.

4.5.2 SDS-PAGE elektroforéza

Denaturační elektroforézu proteinů na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) jsem prováděla v diskontinuálním systému s užitím 4% zaostřovacího gelu a 7,5%

denaturujícího separačního gelu. Do každé jamky jsem nanesla 4 μg proteinu. Elektroforéza byla prováděna pomocí přístroje Mini ProteanIII (BioRad) při konstantním napětí 200 V. K barvení gelu jsem použila koloidní Coomassie Blue G250. Dále byl gel naskenován a vyhodnocen pomocí systému Quantity One (BioRad).

4.6 Statistická analýza

Získaná data jsou uváděna jako průměrná hodnota získaná ze tří nezávisle prováděných experimentů doplněná o směrodatné odchylky. Statistická významnost získaných dat byla hodnocena pomocí Studentova t-testu. Jako statisticky významné byly vyhodnoceny rozdíly $p < 0,05$ či $p < 0,01$.

5 Výsledky

5.1 Interakce HSA

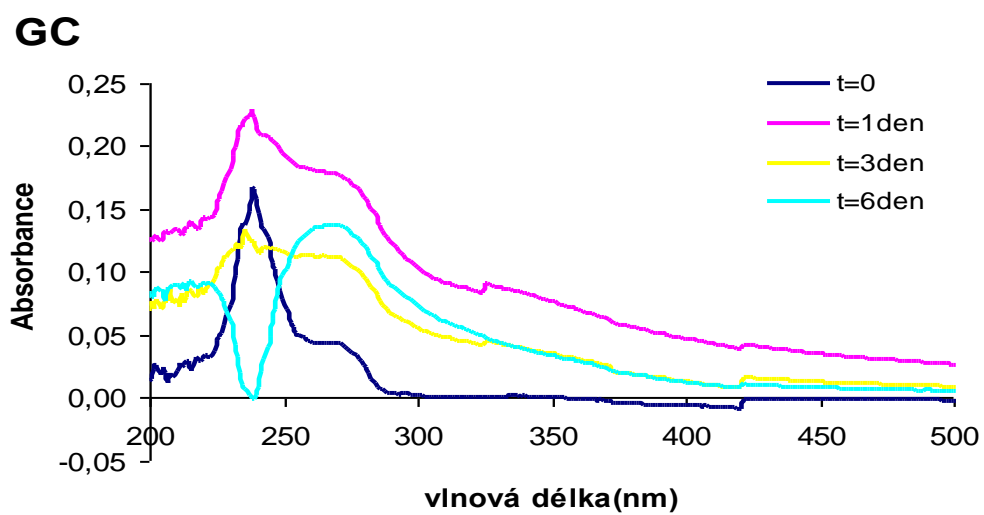
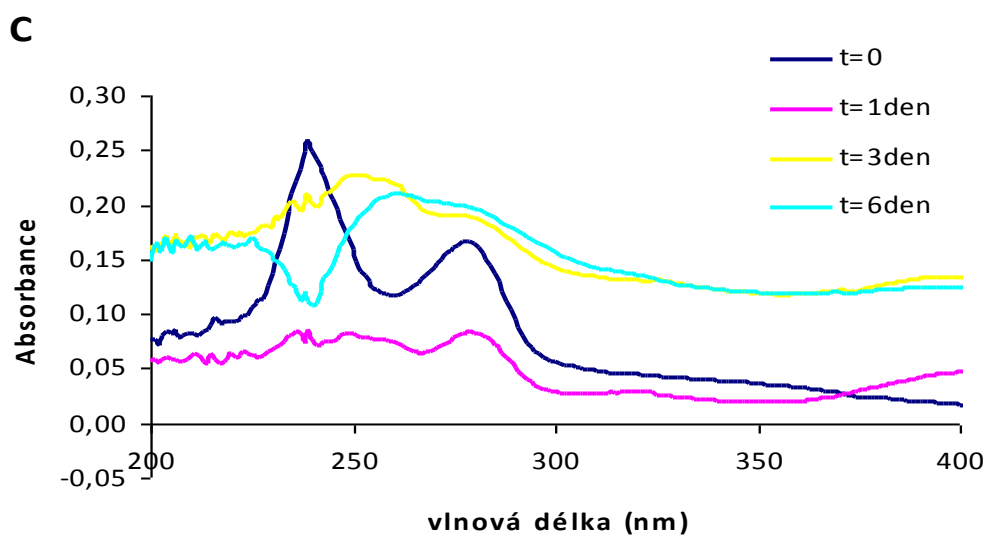
Potenciální interakce čtyř vybraných katechinů ((-)-katechin (C), (-)-gallokatechin (GC), (-)-katechingallát (CG) a (-)-gallokatechingallát (GCG)) s lidským sérovým albuminem jsem studovala pomocí tří metod, a to UV/VIS absorpční spektroskopii, fluorescenční spektroskopii a polyakrylamidovou gelovou elektroforézou.

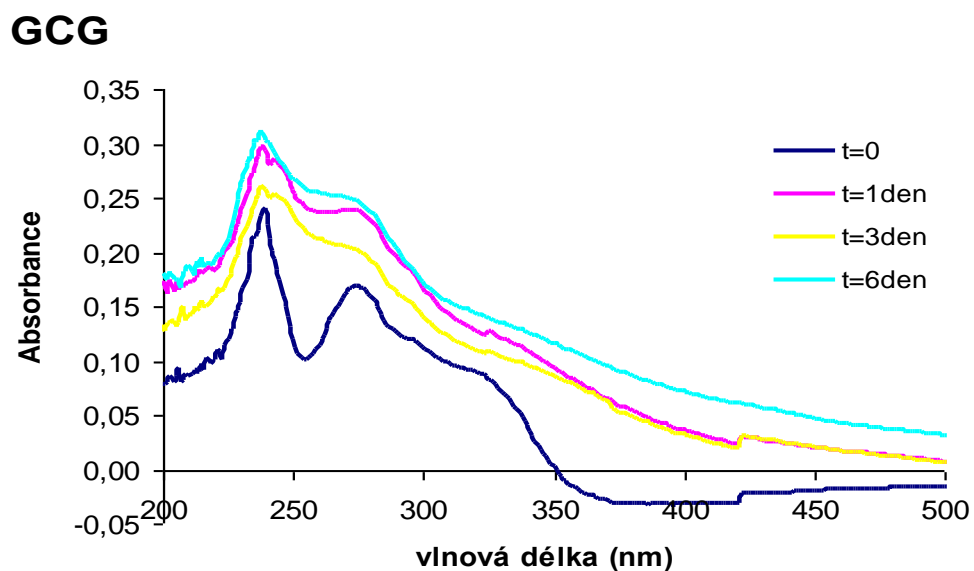
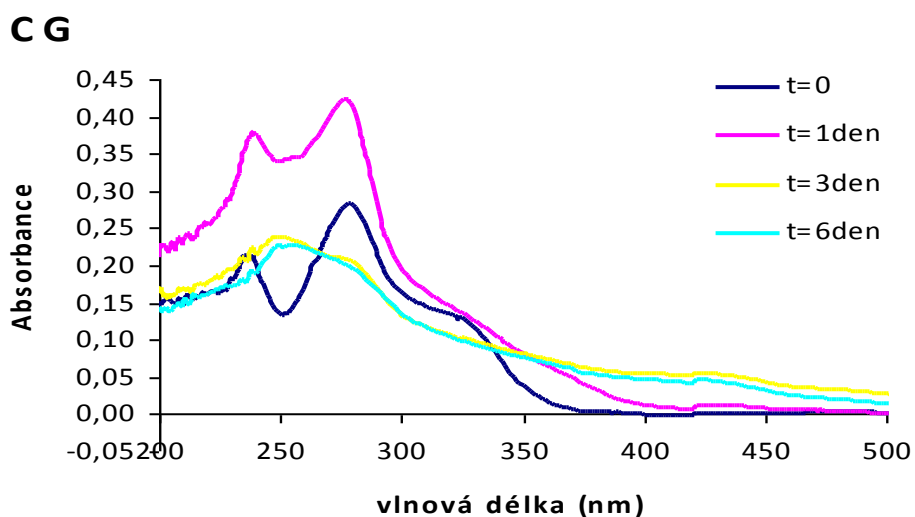
5.1.1 UV-VIS absorpční spektra

UV-VIS spektra flavonoidů jsou charakterizována přítomností dvou hlavních absorpčních maxim. Pás I (systém cinnamoylu), který je lokalizován v rozmezí vlnových délek 300-400 nm, odpovídá konjugovanému systému mezi kruhem B a uhlíkem C₄ kruhu C, zatímco pás II (systém benzoylu) lokalizovaný mezi 240-300 nm souvisí s konjugovaným systémem mezi kruhem A a uhlíky C₂ a C₃ kruhu C (Bukhari et al. 2009). U monomerních katechinů, v jejichž struktuře chybí 2-3 dvojná vazba i 4-oxoskupina v kruhu C, převládá maximum pásu II a to s maximem při 270-280 nm. Při substituci hydroxylové skupiny v pozici 5' a esterifikaci hydroxylové skupiny v pozici C3 kyselinou gallovou došlo k posunu absorpčního maxima ke kratším vlnovým délkám (modrý posun) o 4-6 nm. Absorpční maxima pro C, GC, CG a GCG jsou 280 nm, 274 nm, 278 nm a 276 nm (Sun et al. 2007).

1) Stabilita katechinů

Pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie jsem nejdříve proměřila spektra jednotlivých katechinů ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 37 °C) s cílem ověřit jejich stabilitu v roztoku. Roztoky o různých koncentracích jednotlivých katechinů v pufru byly inkubovány při 37 °C a spektra byla proměřena v těchto časových intervalech 0, 1, 3 a 6 dní (viz Obr. 10). Naměřená data ukázala, že se jedná o látky nestabilní ve vodném roztoku o pH 7,4. Změny ve spektru lze pozorovat již po hodinové inkubaci. Problémy se stabilitou katechinů naznačuje i literatura (viz kapitola 2.1.2).





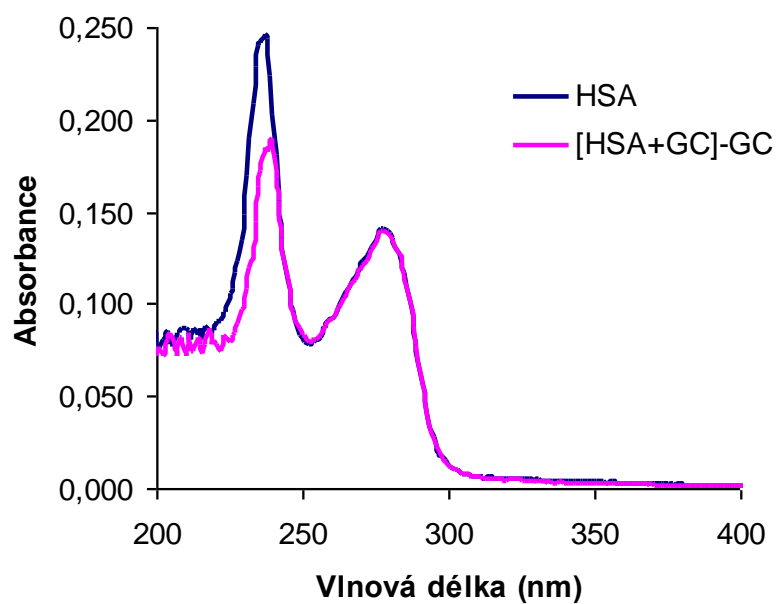
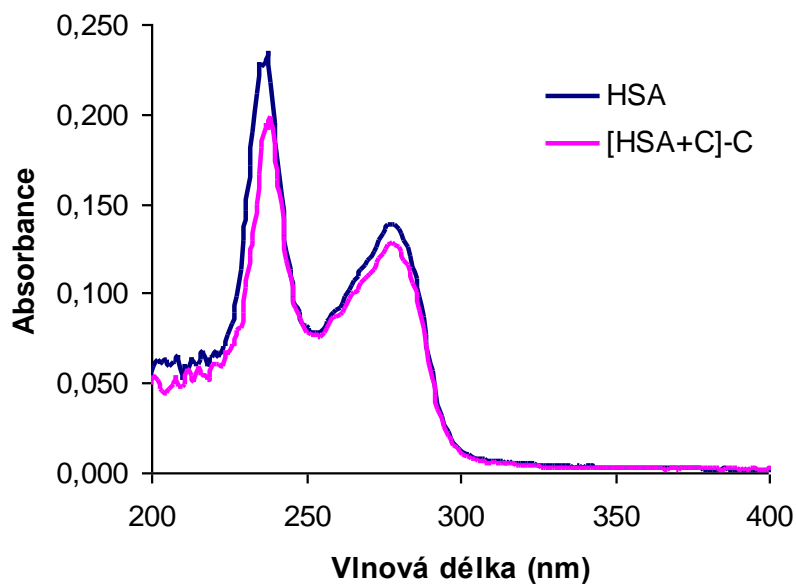
Obr. 10: Změny v UV-VIS absorpčních spektrech jednotlivých katechinů ($2,5 \times 10^{-5}$ M) vyjadřující jejich stabilitu během inkubace ve fosfátovém pufru (0,1 M; pH 7,4; 37 °C) v časových intervalech 0, 1, 3 a 6 dnů. (C) Spektrum katechinu, (GC) gallo katechinu, (CG) katechingallátu, (GCG) gallo katechingallátu.

2) Interakce katechiny – HSA

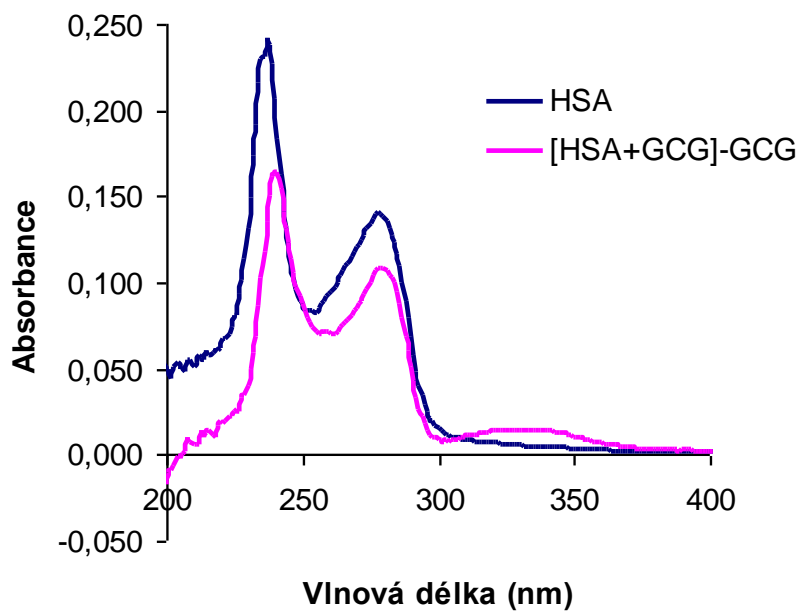
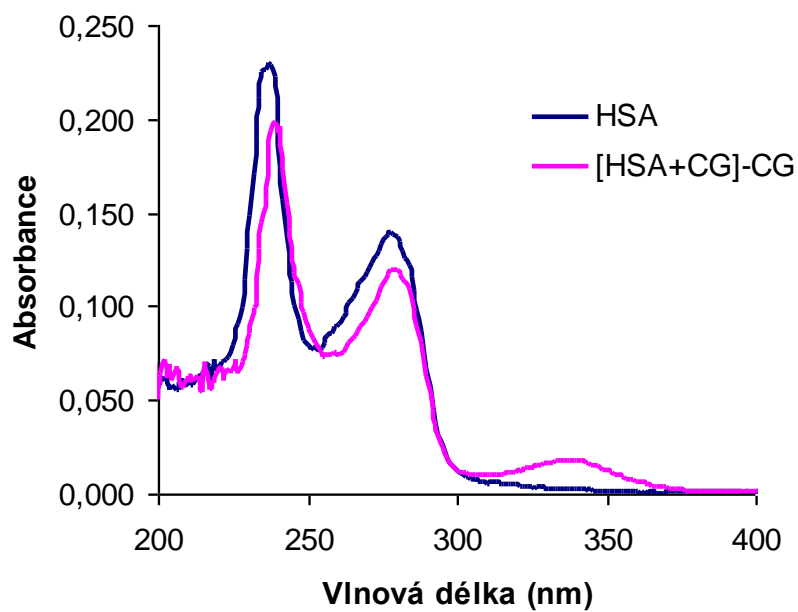
Jednotlivé katechiny (4×10^{-5} M) jsem nechala inkubovat s HSA (4×10^{-6} M) po dobu 5 min při 37 °C, poté jsem proměřila jejich absorpční spektra. Současně jsem proměřením ověřila stabilitu jednotlivých katechinů (při 37 °C; pH 7,4) v daném časovém intervalu. Po krátké 5 min inkubaci jsem nezaznamenala žádné změny v absorpčních spektrech katechinů.

Z proměřených spekter jsem zaznamenala změny pouze ve spektru HSA po interakci s galláty katechinů, tj. katechiny s galloylovou skupinou na kruhu C – *katechingallát a gallokatechingallát*. V tomto případě došlo ve spektru ke snížení absorbance mezi 200-280 nm a k výraznějšímu nárůstu absorbance mezi 300 a 360 nm ($\lambda_{\max} = 330$ nm), který nasvědčuje vzniku komplexu (Obr. 12).

U zbývajících dvou testovaných látek, *katechinu a gallokatechinu*, nebyly po interakci s HSA pozorovány žádné změny v absorpčních spektrech (Obr. 11).



Obr. 11: UV-VIS absorpční spektrum HSA před a po interakci s katechinem (C) a gallokatechinem (GC) (pH 7,4; 37 °C, inkubace 5 min). [HSA] = 4×10^{-6} M, [C] = 4×10^{-5} M, a [GC] = 4×10^{-5} M.

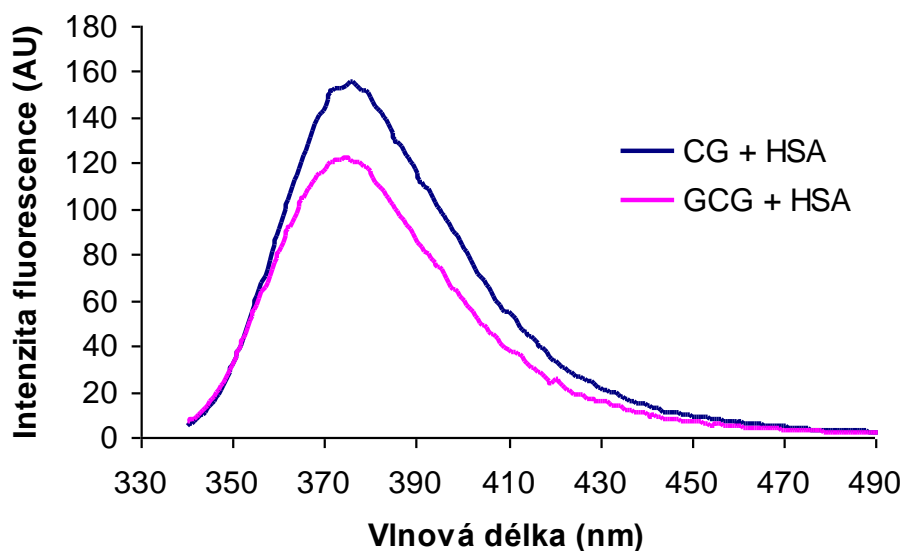


Obr. 12: UV-VIS absorpční spektrum HSA před a po interakci s katechingallátem (CG) a gallokatechingallátem (GCG) (pH 7,4; 37 °C, inkubace 5 min). [HSA] = 4×10^{-6} M, [CG] = 4×10^{-5} M, [GCG] = 4×10^{-5} M.

5.1.2 Fluorescenční spektra

1) Interakce katechingallátů s molekulou HSA

V dalším kroku jsem proměřila fluorescenční spektra komplexů vznikajících mezi katechingalláty a molekulou HSA s excitací při 330 nm. Tato vlnová délka odpovídá absorpčnímu maximu vznikajícího komplexu. Oba vznikající komplexy emitovaly záření mezi 374 a 377 nm (Obr. 13), zatímco samotný katechingallát a gallokatechingallát za daných podmínek neemitoval žádné záření.

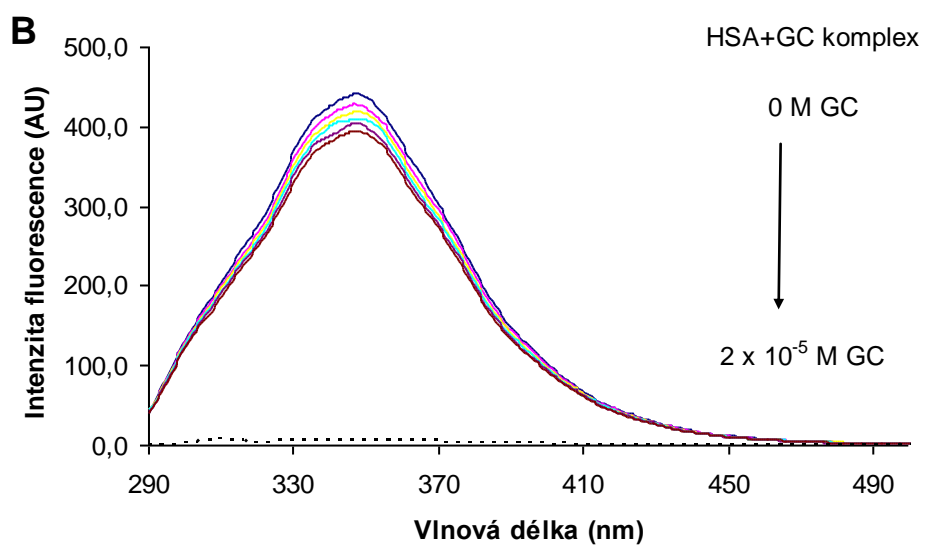
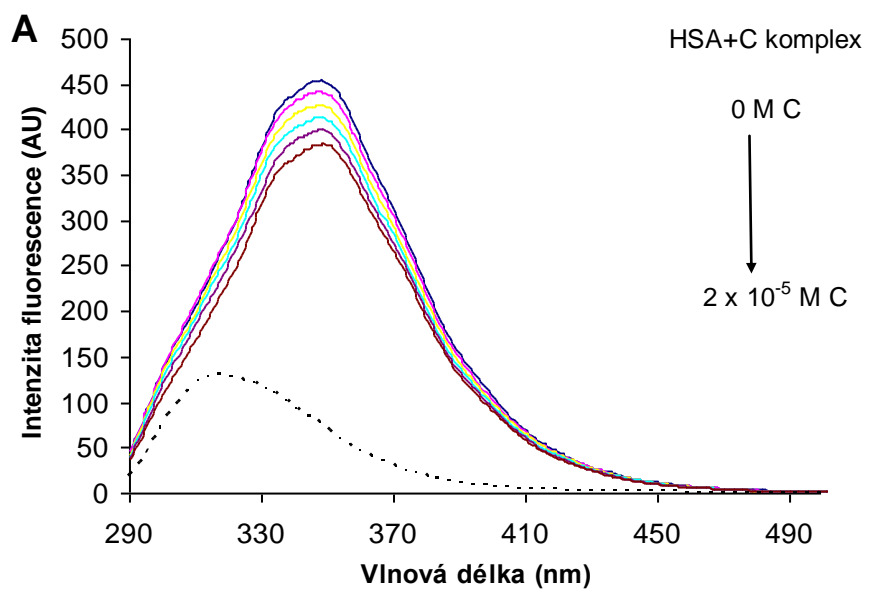


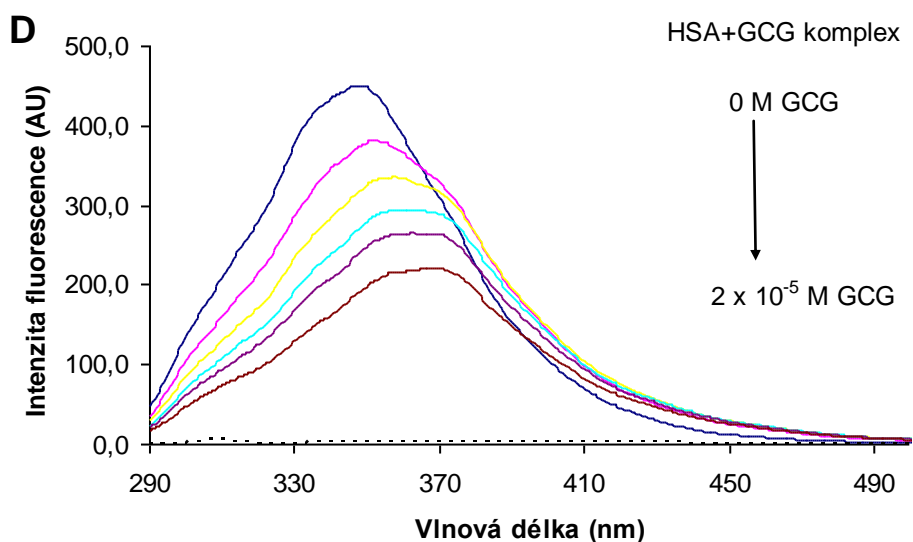
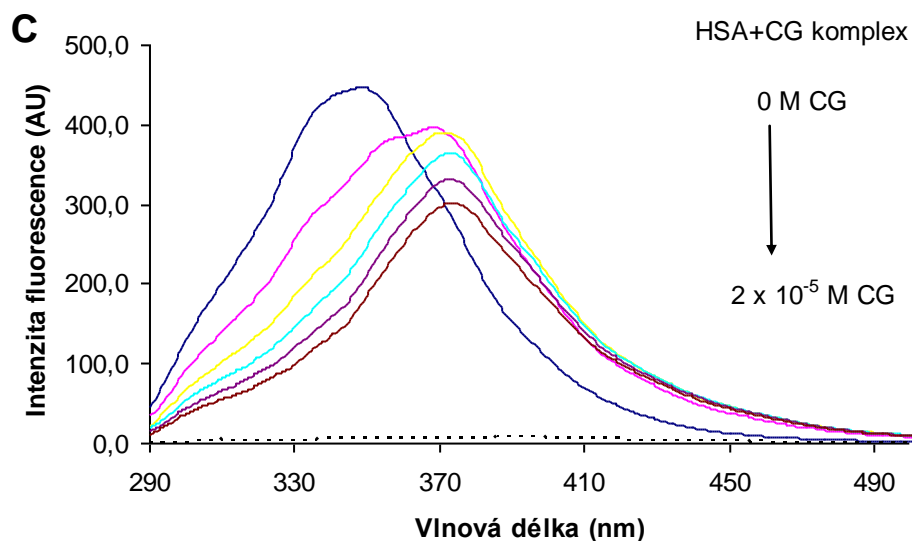
Obr. 13: Fluorescenční emisní spektra komplexů katechingallátu a gallokatechingallátu s molekulou HSA (pH 7,4; 37 °C). [HSA] = 4×10^{-6} M, [CG] = 4×10^{-5} M, [GCG] = 4×10^{-5} M a $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm.

2) Zhášení vnitřní fluorescence HSA v přítomnosti katechinů

Interakci katechinů s molekulou HSA jsem dále zkoumala pomocí metody zhášení vnitřní (tryptofanové) fluorescence proteinu. Fluorescenční emisní spektra jsem měřila při excitační vlnové délce 295 nm, která odpovídá fluorescenci indolového jádra tryptofanu. Při této vlnové délce jsem nejdříve proměřila spektra jednotlivých katechinů (korekce pozadí). Pouze katechin vykazoval významnou vnitřní fluorescenci s emisním maximem při 318 nm.

V dalším kroku jsem při excitaci 295 nm provedla fluorimetrickou titraci, kdy roztok HSA byl postupně titrován roztokem jednotlivých katechinů až do výsledné koncentrace ve vzorku 2×10^{-5} M. Při této titraci docházelo k postupnému snižování fluorescenční intenzity HSA se vzrůstající koncentrací všech katechinů. Snižování fluorescenční intenzity HSA nám napovídá pravděpodobnou interakci mezi molekulou HSA a katechiny. Katechingallát a gallokatechingallát způsobily posun emisního maxima HSA (348 nm) k vyšším vlnovým délkám (tzv. červený posun). Katechingallát o 25 nm a gallokatechingallát o 23 nm (Obr. 14). Příčinou červeného posunu je konformační změna bílkoviny v důsledku interakce, při níž dochází k částečnému rozbalení proteinu (Lakowicz 2006).





Obr. 14: Fluorescenční zhášecí spektra (pH 7,4; 37 °C). (A) Spektrum komplexu katechin-HSA, tečkovaně spektrum katechinu 2 x 10⁻⁵ M. (B) Spektrum komplexu gallokatechin-HSA, tečkovaně spektrum gallokatechinu 2 x 10⁻⁵ M. (C) Spektrum komplexu katechingallát-HSA, tečkovaně spektrum katechingallátu 2 x 10⁻⁵ M. (D) Spektrum komplexu gallokatechingallát-HSA, tečkovaně spektrum gallokatechingallátu 2 x 10⁻⁵ M. [HSA] = 4 x 10⁻⁶ M, [C] = [GC] = [CG] = [GCG] = 0 - 2 x 10⁻⁵ M a λ_{ex} = 295 nm.

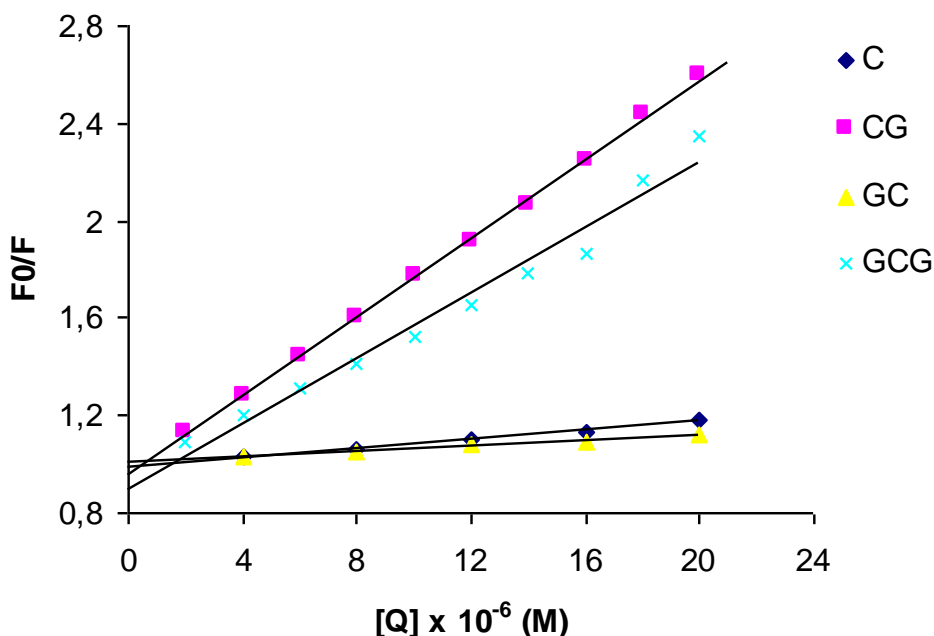
3) Stern-Volmerova analýza

Fluorescenční efekt zhášení katechinů lze popsat pomocí Stern-Volmerovy rovnice (Lakowicz 2006):

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

kde F_0 a F jsou intenzity fluorescence HSA před a po interakci s daným katechinem, $[Q]$ je koncentrace katechinu (Q jako zhášedlo - "quencher"), K_{SV} je Stern-Volmerova zhášecí konstanta ($K_{SV} = K_q \tau_0$), K_q je bimolekulární zhášecí rychlostní konstanta a τ_0 doba, po kterou je fluorofor (HSA) schopen zůstat v excitovaném stavu (pro HSA je τ_0 přibližně 5×10^{-9} s; Lakowicz 2006).

Do vztahu (2) jsem dosadila hodnoty fluorescenční intenzity naměřené při vlnové délce 348 nm (tzn. v místě emisního maxima HSA). Dle rovnice (2) je získána lineární závislost mezi F_0/F a $[Q]$ (Obr. 15), kde jsem ze směrnice přímky vypočítala zhášecí rychlostní konstanty (K_q) jednotlivých testovaných systémů (Tab. 3). Nejvyšší hodnotu K_q měl katechingallát a dále klesala v pořadí: CG > GCG >> C > GC.



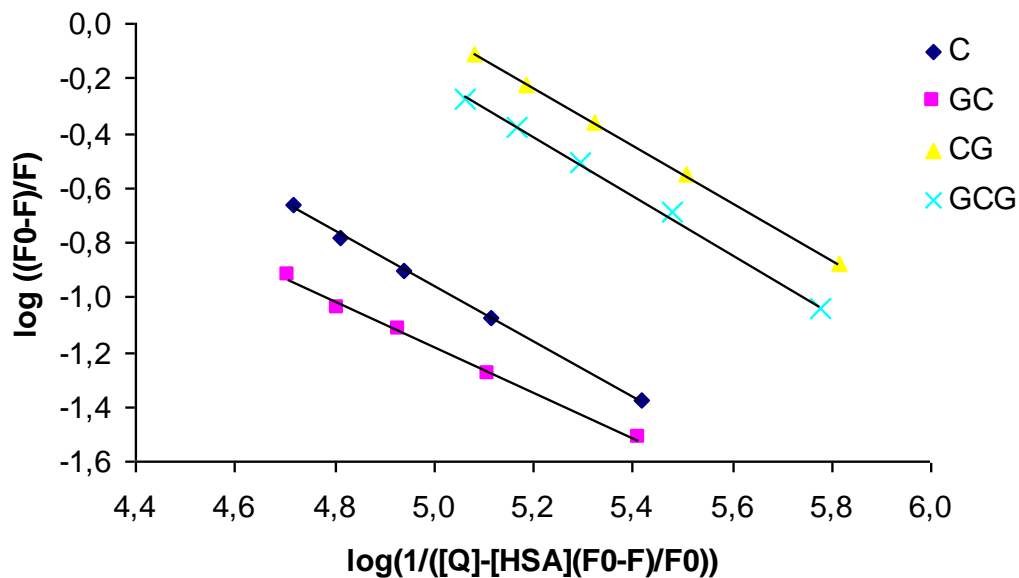
Obr. 15: Stern-Volmerovy diagramy studovaných systémů (pH 7,4; 37 °C). $[HSA] = 4 \times 10^{-6}$ M, $[Q] = 0 - 2 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{ex} = 295$ nm a $\lambda_{em} = 348$ nm. $R = 0,992-0,999$ a směrodatné odchylky S.D. < 10%.

4) Stanovení vazebných parametrů

Ke stanovení vazebných parametrů, tj. vazebné konstanty (K_b) a počtu vazebných míst (n) jednotlivých studovaných systémů jsem využila následující vztah (Bi et al. 2004):

$$\log(F_0 - F)/F = n \log K_b - n \log(1/([Q_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0)) \quad (3)$$

kde F_0 a F je intenzita fluorescence před a po interakci s daným katechinem, $[Q_t]$ je celková koncentrace jednotlivých katechinů, $[P_t]$ je koncentrace proteinu (HSA), n je počet vazebných míst. Vazebnou konstantu a počet vazebných míst získáme z lineární závislosti $\log(F_0 - F)/F$ versus $n \log(1/([Q_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0))$ (Obr. 16). Nejvyšší vazebnou schopnost potvrdily gallované deriváty, tj. katechingallát a gallokatechingallát ($CG > GCG \gg C > GC$) (Tab. 3.).



Obr. 16: Logaritická závislost studovaných systémů (pH 7,4; 37 °C). [HSA] = 4×10^{-6} M, [Q] = $0 - 2 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{ex} = 295$ nm a $\lambda_{em} = 348$ nm. R = 0,995-0,999 a S.D. < 10%.

S využitím vazebné konstanty (K_b) lze vypočítat změnu volné Gibbsovy energie (ΔG^0) (Rawel et al. 2006):

$$\Delta G^0 = - RT \ln K_b \quad (4)$$

kde R je plynová konstanta ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) a T je teplota (310 K).

Záporná hodnota volné Gibbsovy energie (Tab. 3.) nám naznačuje, že interakce jednotlivých katechinů s molekulou HSA probíhá samovolně.

Tab. 3: Tabulka shrnující bimolekulární zřáhací rychlostní konstanty (K_q), vazebné konstanty (K_b), počet vazebných míst (n) a volnou Gibbsovu energii (ΔG^0) studovaných systémů (pH 7,4; 37 °C).

Testovaná látka	K_q [$\times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	K_b [$\times 10^4 \text{ mol}^{-1}$]	n	ΔG^0 [kJmol^{-1}]
Katechin	2,15	1,12	1,00	-23,99
Gallokatechin	1,10	0,43	0,87	-21,54
Katechingallát	16,25	9,21	1,01	-29,46
Gallokatechingallát	13,33	6,75	1,10	-28,66

$K_q = K_{sv}/\tau_0$; $\tau_0 = 5 \times 10^{-9} \text{ s}$ (Lakowicz 2006). Směrodatné odchylky (průměrná hodnota získaná ze tří nezávisle prováděných experimentů) byly nižší než 10 %. Rozdíly v počtu vazebných míst nebyly statisticky významné.

5) Určení vzdálenosti mezi katechiny a HSA

K určení vzdálenosti mezi Trp214 v molekule HSA (donor) a katechiny (akceptor) jsem použila metodu FRET (fluorescenční rezonanční energetický transfér, dle objevitele též Förster resonance energy transfer). Tato technika umožňuje studium interakce mezi dvěma různými molekulami. Mechanismus FRET popisuje schopnost donoru (fluoroforu) v excitovaném stavu přenést svoji excitační energii blízkému akceptoru (chromoforu) skrze interakci dipól-dipól. K přenosu energie dochází bez emise fotonu (Hussain et al. 2009). Podle Försterovy energetické rezonanční teorie (Förster a Sinanoglu 1966) účinnost energetického přenosu závisí: a) na rozsahu překrytí mezi emisním spektrem donoru a absorpčním spektrem akceptoru, b) na orientaci dipólu donoru a akceptoru, c) na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem (obvykle 1-10 nm) (Hussain et al. 2009, Lakowicz 2006). Förster uvedl, že účinnost energetického přenosu (E) mezi donorem a akceptorem je dána vztahem:

$$E = 1 - (F/F_0) = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) \quad (5)$$

kde F_0 a F je fluorescenční intenzita proteinu bez přítomnosti a v přítomnosti katechinu, r_0 je vzdálenost mezi donorem a akceptorem, R_0 je Försterova vzdálenost, při které je účinnost přenosu 50%. Hodnota R_0^6 je určena vztahem:

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} k^2 N^{-4} \Phi J \quad (6)$$

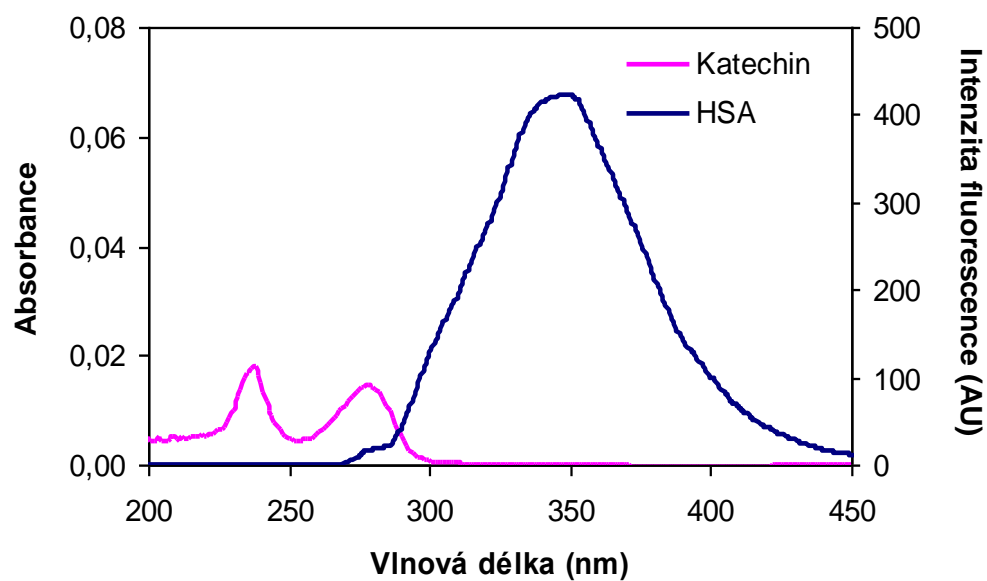
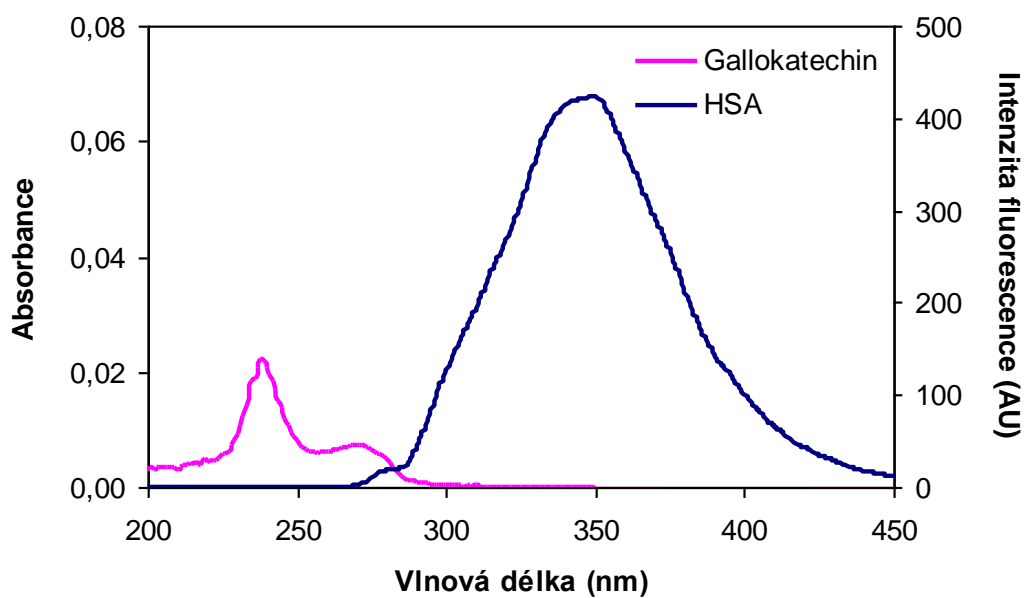
kde k^2 je faktor zahrnující dipólové orientace, pro volně rotující molekuly je obvykle $2/3$, N je refrakční index, Φ je kvantový výtěžek samotného donoru, J je překryvový integrál emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru ($\text{cm}^3 \text{l mol}^{-1}$). J je dáno:

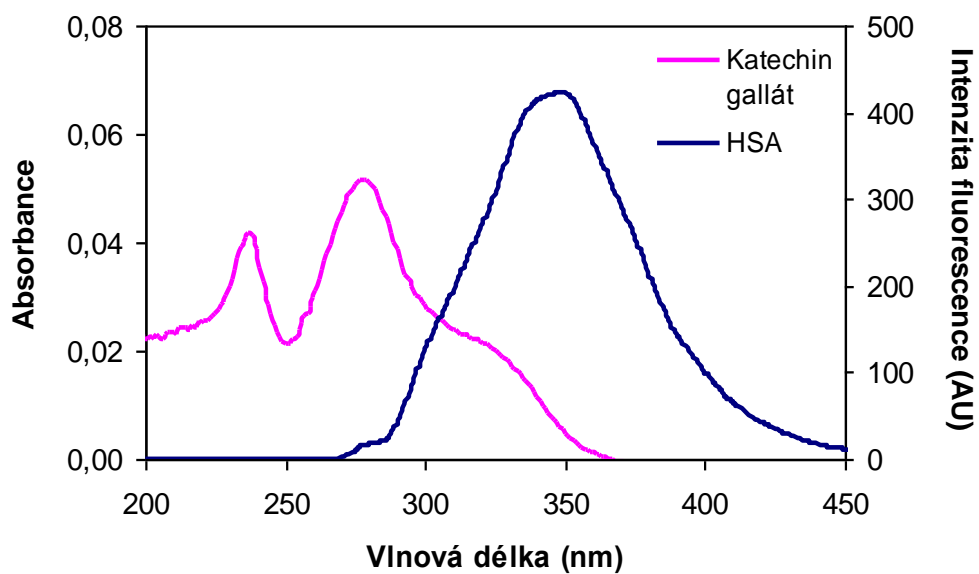
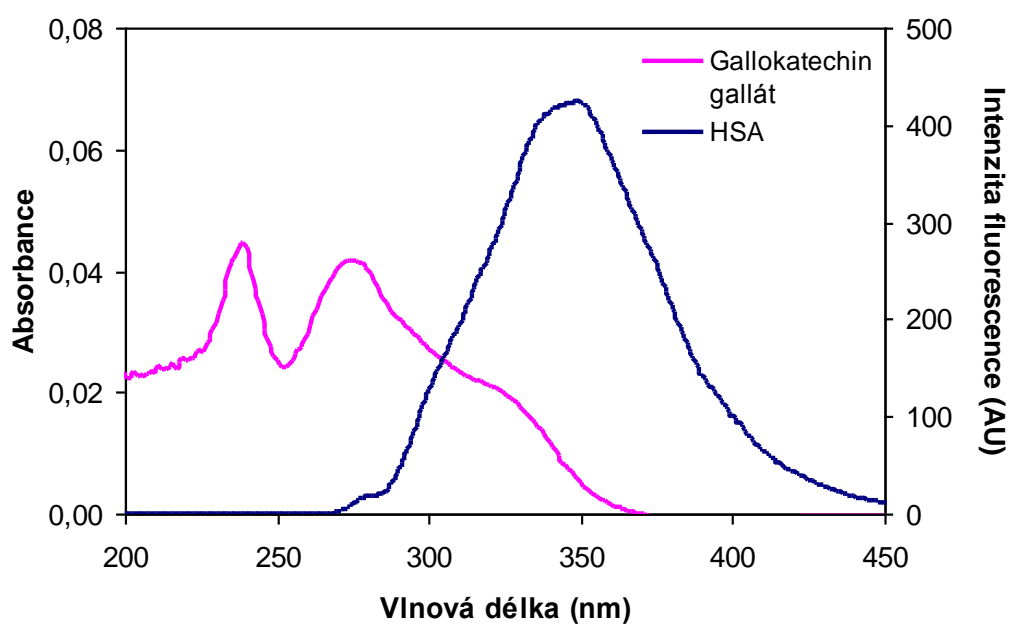
$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad (7)$$

kde $F(\lambda)$ je fluorescenční intenzita donoru při vlnové délce λ , $\varepsilon(\lambda)$ je molární absorpční koeficient akceptoru při vlnové délce λ až $\lambda + \Delta \lambda$ ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$).

Závěrem jsem vypočítala vzdálenost mezi donorem a akceptorem (r_0) dle vztahu (5). V případě, že výsledek je nižší než 8 nm a platí podmínka $0,5 R_0 < r_0 < 1,5 R_0$, přenos energie mezi donorem a akceptorem probíhá s velkou pravděpodobností (Lakowicz 2006, Guo et al. 2009). V daném výpočtu byly využity konstanty $k^2 = 2/3$, $N = 1.336$, $\Phi = 0.118$ (Yuan et al. 2007), hodnoty J , E , R_0 byly vypočteny dle vztahu (5)-(7).

U všech zkoumaných systémů katechin-HSA jsem zaznamenala překrytí UV-VIS absorpčního spektra jednotlivých katechinů s fluorescenčním spektrem HSA. U katechinů se zbytkem kyseliny gallové na kruhu C (katechingallát a gallokatechingallát) došlo k většímu překrytí spekter oproti negalloylovaným katechinům (katechinu a gallokatechinu) (Obr. 17.). Získané hodnoty jsou shrnuty v Tab. 4.

A**B**

C**D**

Obr. 17: Překryvy mezi fluorescenčním emisním spektrem HSA a absorpčním spektrem katechinů. [HSA]=[C]=[GC]=[CG]=[GCG]= 4×10^{-6} M, pH 7,4, 37°C, $\lambda_{ex} = 295$ nm.

Tab. 4: Tabulka hodnot: překryvový integrál spekter (J), účinnost energetického přenosu (E), kritická vzdálenost (R_0) a vzdálenost mezi donorem (HSA) a akceptorem (katechin) (r_0) (pH 7,4, 37°C).

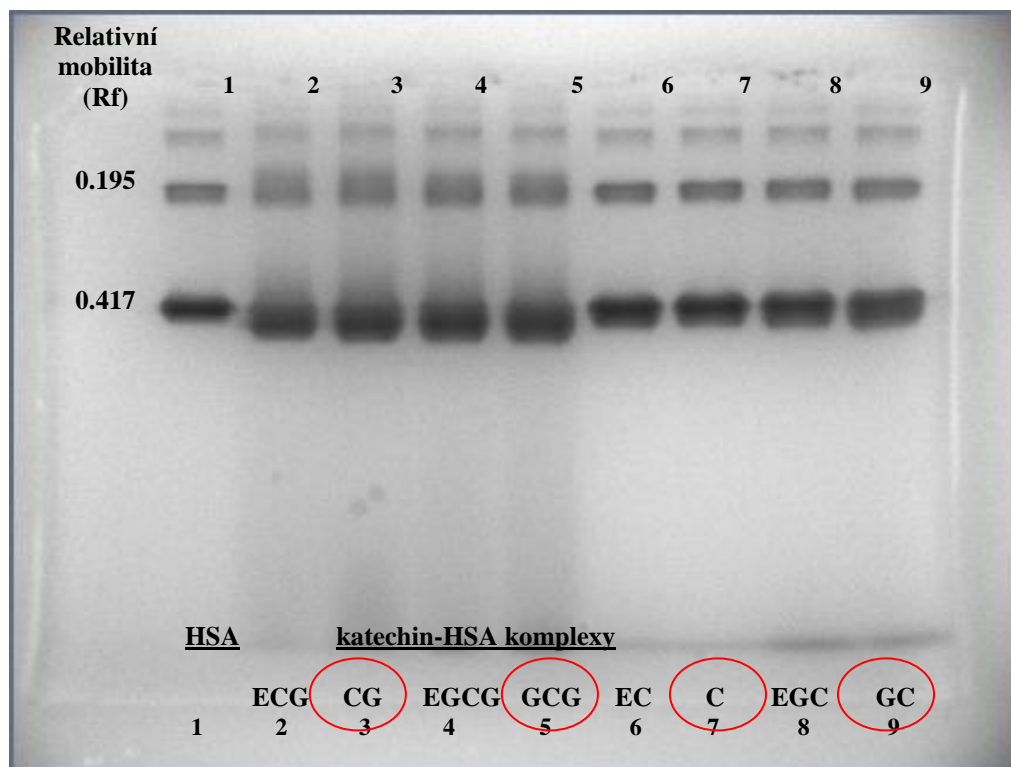
Testovaná látka	J [$\times 10^{-16} \text{ cm}^3 \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$]	E	R_0 [nm]	r_0 [nm]
Katechin	0,40	0,18	0,98	1,26
Gallokatechin	0,16	0,11	0,84	1,19
Katechingallát	26,04	0,61	1,96	1,82
Gallokatechingallát	25,80	0,57	1,96	1,85

Směrodatné odchylky (průměrná hodnota získaná ze tří nezávisle prováděných experimentů) byly nižší než 10 %.

Všechny vypočítané vazebné vzdálenosti (r_0) jsou nižší než 8 nm, čímž je splněna podmínka $0,5 R_0 < r_0 < 1,5 R_0$, která určuje vysokou pravděpodobnost přenosu energie mezi HSA a katechiny (Guo et al 2009).

5.1.3 Elektroforéza

Při provádění nativní PAGE jsem sledovala, zda dochází v důsledku interakce s katechiny ke změně náboje molekuly HSA (Obr. 18), která se projeví zvýšením elektroforetické mobility jednotlivých vzorků vzhledem ke kontrole, tzn. samotnému proteinu. Zjistila jsem, že při interakci HSA s *katechingallátem* a *gallokatechingallátem* došlo k mírnému zvýšení mobility vzorku směrem k anodě, tzn. molekula HSA se stává záporněji nabitou. Nejvýraznější zvýšení mobility jsem zaznamenala u gallokatechingallátu, tedy katechinu s nejvyšší molekulovou hmotností a největším počtem OH skupin (pyrogallová skupina na kruhu B). Naopak po interakci s *katechinem* a *gallokatechinem* nedošlo k žádné významné změně elektroforetické mobility HSA. Elektroforetická mobilita se snižovala v pořadí: GCG (5,05%) > CG (3,37%) > C (1,53%) > GC (0,51%).



Obr. 18: Nativní PAGE. Vliv katechinů na mobilitu HSA: $[HSA] = 15 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[katechin] = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37°C . Podmínky: 4% zaostřovací a 10% rozdělovací gel, nanášené množství bílkoviny 8 μg /jamku, barvení Coomassie Blue G250.

SDS-PAGE analýza měla poskytnout více informací o stabilitě komplexu mezi HSA a katechiny. SDS-PAGE však tvorbu vysokomolekulárních agregátů při vzájemné interakci HSA s katechiny nepotvrdila.

5.2 Glykace HSA

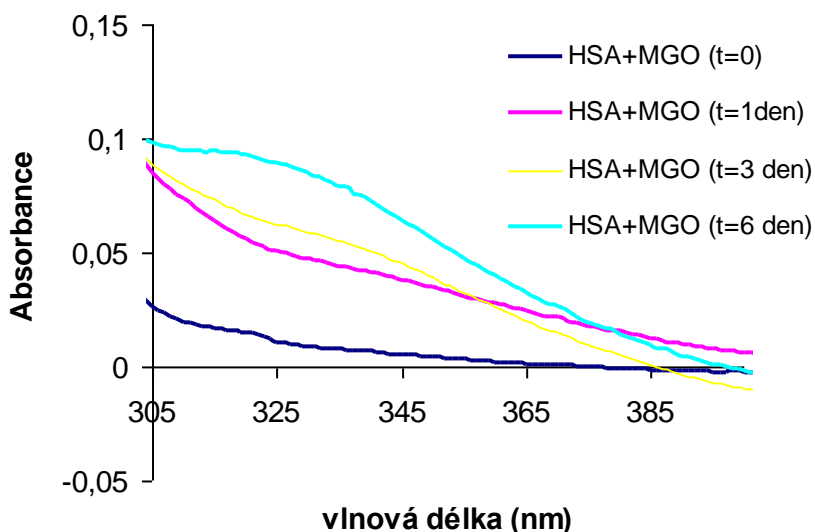
V druhé části této práce jsem posuzovala pomocí UV/VIS spektroskopie a fluorescenční spektroskopie schopnost čtyř katechinů (C, GC, CG, GCG) ovlivnit glykaci bílkoviny (HSA). Jako glykační agens jsem použila methylglyoxal (MGO).

5.2.1 Sledování vlivu katechinů na glykaci HSA pomocí UV/VIS spektroskopie

Připravené vzorky jsem postupně proměřila v rozmezí vlnových délek 190 – 550 nm, kdy byl jako slepý roztok použit pufr, v časových intervalech 0, 1, 3 a 6 dní. Mezi měřeními proběhla inkubace při 37°C . Po odečtení pozadí jsem mohla posoudit vliv katechinů na glykaci HSA, která se projevuje nárůstem absorbance ve spektru HSA

v oblasti vlnových délek 300 – 350 nm (Obr. 19). Hodnoty absorbance v maximu (320 nm) jsou pro vybrané koncentrace jednotlivých katechinů shrnuty v Tab. 5.

Jediný pokles hodnoty absorbance v maximu odpovídajícímu AGEs jsem pozorovala u katechinu [25 μM] a [50 μM] v čase 1 den, CG [50 μM] v čase 1 den a GCG [10 μM] v čase 1 den. V následujících časových intervalech však došlo k nárůstu absorbance až o 47 %. U GC [25 μM] došlo v čase 1 den k téměř pětinasobnému nárůstu absorbance. Lze tedy říci, že se touto metodou u studovaných katechinů nepodařilo prokázat protektivní účinek na glykaci HSA methylglyoxalem.



Obr. 19: UV-VIS absorpční spektrum zobrazující glykaci HSA methylglyoxalem (pH 7,4; 37 °C, měřeno v čase 0, 1, 3 a 6 den). [HSA] = 15×10^{-6} M, [MGO] = 1×10^{-5} M.

Tab. 5: Vliv katechinů na glykaci HSA methylglyoxalem. Hodnoty absorbance byly získány z rozdílových spekter v absorpčním maximu vznikajících AGEs (320 nm).

Inkubační směs	Absorbance v maximu (320 nm)			
	Den 0	Den 1	Den 3	Den 6
HSA+MGO	0,043	0,036	0,102	0,133
HSA+MGO+C [10 μM]	0,019	0,096	0,133	0,200
HSA+MGO+C [25 μM]	0,069	0,015	0,145	0,195
HSA+MGO+C [50 μM]	0,020	0,004	0,038	0,097
HSA+MGO+GC [10 μM]	0,007	0,079	0,070	0,089
HSA+MGO+GC [25 μM]	0,066	0,177	0,169	0,180
HSA+MGO+GC [50 μM]	0,014	0,116	0,248	0,251
HSA+MGO+CG [10 μM]	0,077	0,090	0,101	0,132
HSA+MGO+CG [25 μM]	0,046	0,133	0,146	0,167
HSA+MGO+CG [50 μM]	0,096	0,067	0,221	0,243
HSA+MGO+GCG [10 μM]	0,104	0,053	0,119	0,175
HSA+MGO+GCG [25 μM]	0,055	0,113	0,179	0,252
HSA+MGO+GCG [50 μM]	0,244	0,372	0,421	0,341

Hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 320 nm. [HSA] = 15×10^{-6} M, [MGO] = 1×10^{-5} M, [katechin] = 10, 25, 50 $\times 10^{-6}$ M, měřeno při pH 7,4 a 37 °C. Směrodatné odchylky (průměrná hodnota získaná ze tří nezávisle prováděných experimentů) byly nižší než 10 %.

5.2.2 Měření fluorescence glykačních produktů

Pro detailnější posouzení, zda jsou zvolené katechiny schopny inhibovat tvorbu glykačních produktů, jsem proměřila fluorescenci připravených inkubačních směsí.

Vzorky jsem po rozmražení rozpipetovala po 200 μl na mikrotitrační destičky a poté jsem proměřila jejich fluorescenci. Ze získaných dat jsem hodnotila schopnost katechinů inhibovat vznik glykačních produktů v časových intervalech 0, 3 a 7 dní inkubace při 37 °C (měřen vznik specifického glykačního produktu argpyrimidinu: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 320/380 nm a celkových nespecifických AGEs: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/440 nm). Schopnost katechinů inhibovat vznik glykačních produktů byla hodnocena podle vztahu (5) (Wu a Yen 2005):

$$\% \text{ inhibice} = \{1 - [F(\text{HSA}+\text{MGO}+\text{C}) - F(\text{HSA})]/[F(\text{HSA}+\text{MGO}) - F(\text{HSA})]\} \times 100 \quad (5)$$

kde F je naměřená intenzita fluorescence vzorku obsahujícího HSA (lidský albumin), MGO (methylglyoxal jako glykační činidlo), popř. C (katechin).

Největší inhibiční schopnost na vznik nespecifických AGEs (měřeno při $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/440 nm) po 3 dnech inkubace při 37 °C prokázaly gallované katechiny v nejvyšší testované koncentraci: CG [50 μ M] (inhibice 46,87 % AGEs) > CG [25 μ M] (inhibice 35,0 % AGEs) (Obr. 20.) (Tab. 6.).

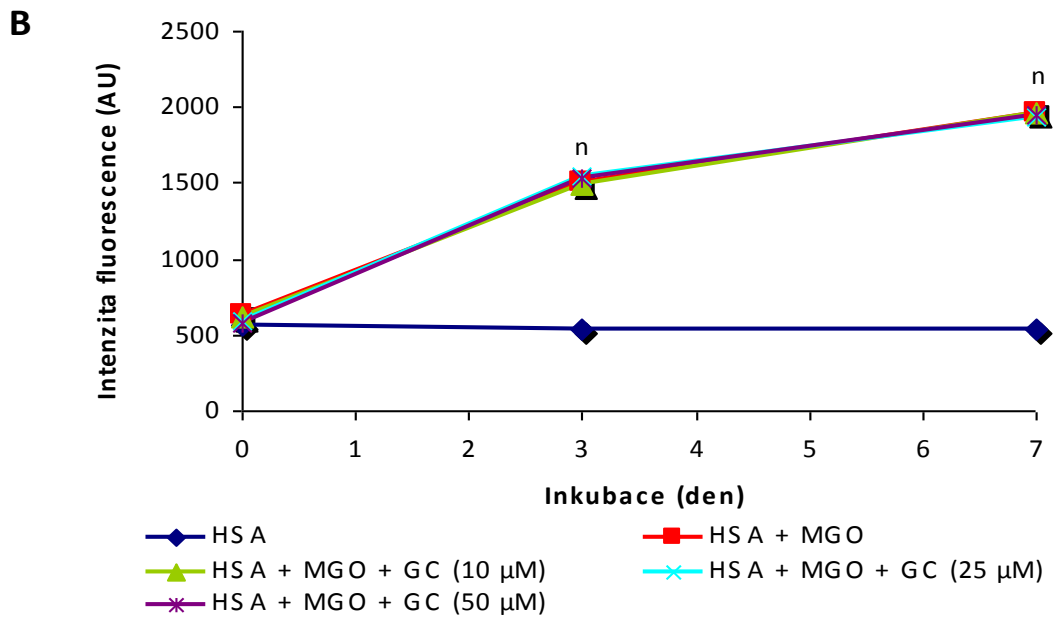
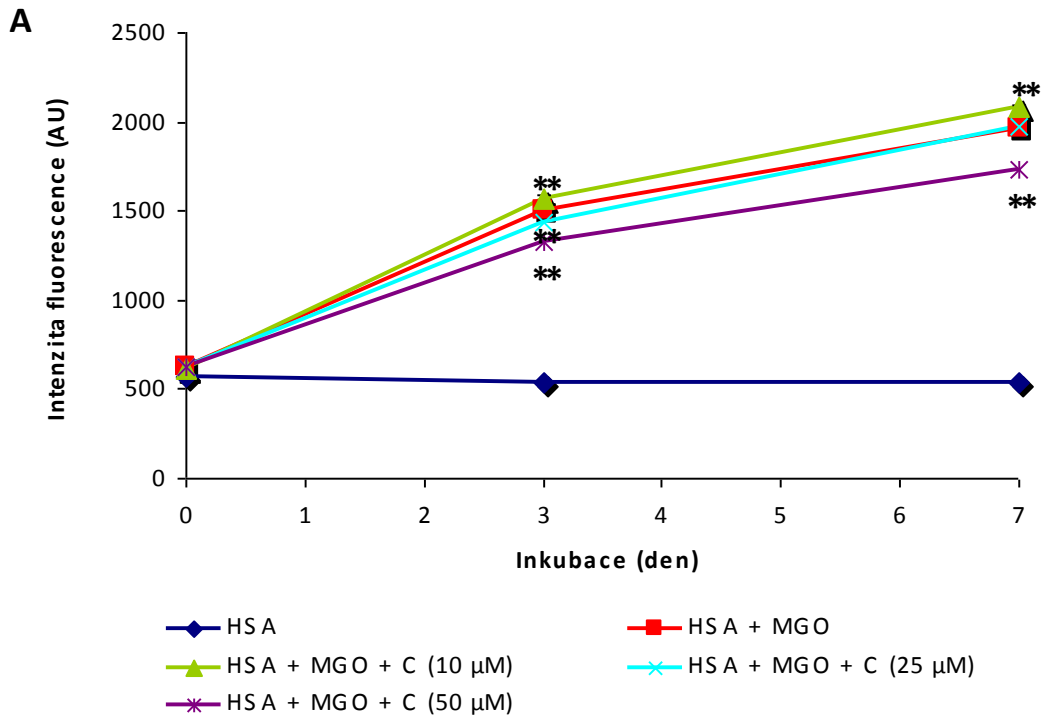
Největší inhibiční schopnost na vznik argpyrimidinu (měřeno při $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 320/380 nm) prokázal po 3 dnech inkubace při 37 °C GCG [25 μ M] a [50 μ M] (inhibice 100 % a 78,4 %) > CG [50 μ M] (inhibice 47,6 %). Dobrou schopnost při inhibici vzniku argpyrimidinu prokázal i GC již v koncentraci [25 μ M] (inhibice 62,7 % po 3 dnech inkubace) (Obr. 20) (Tab. 6.).

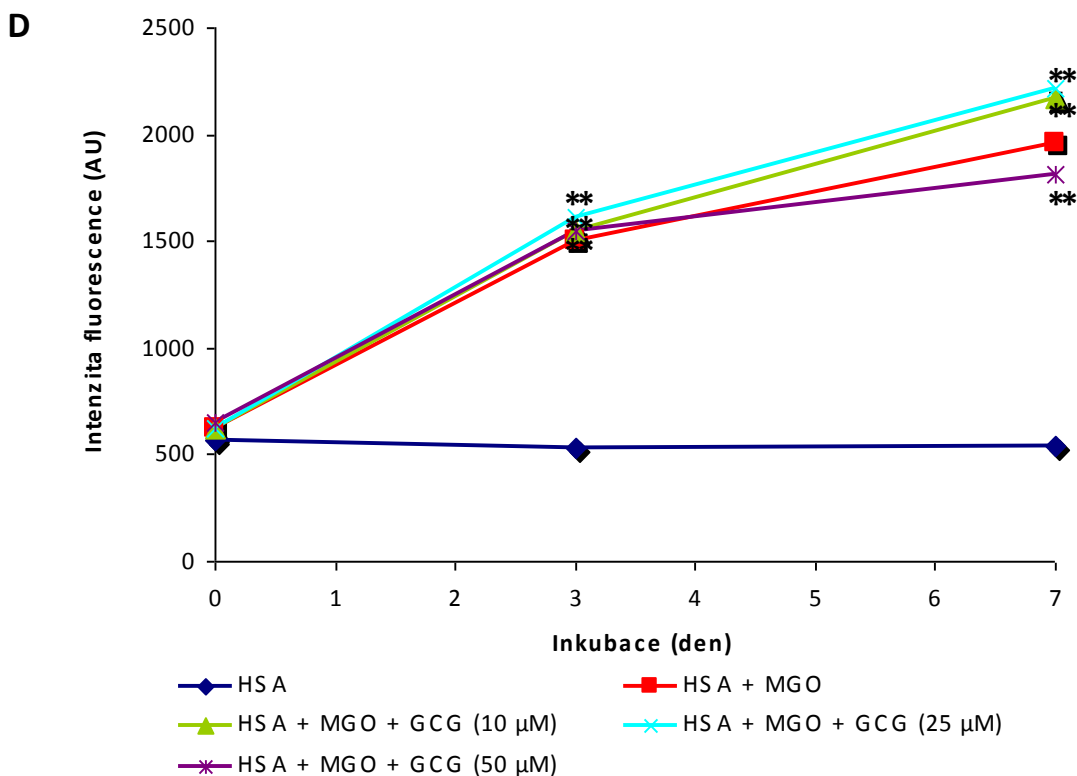
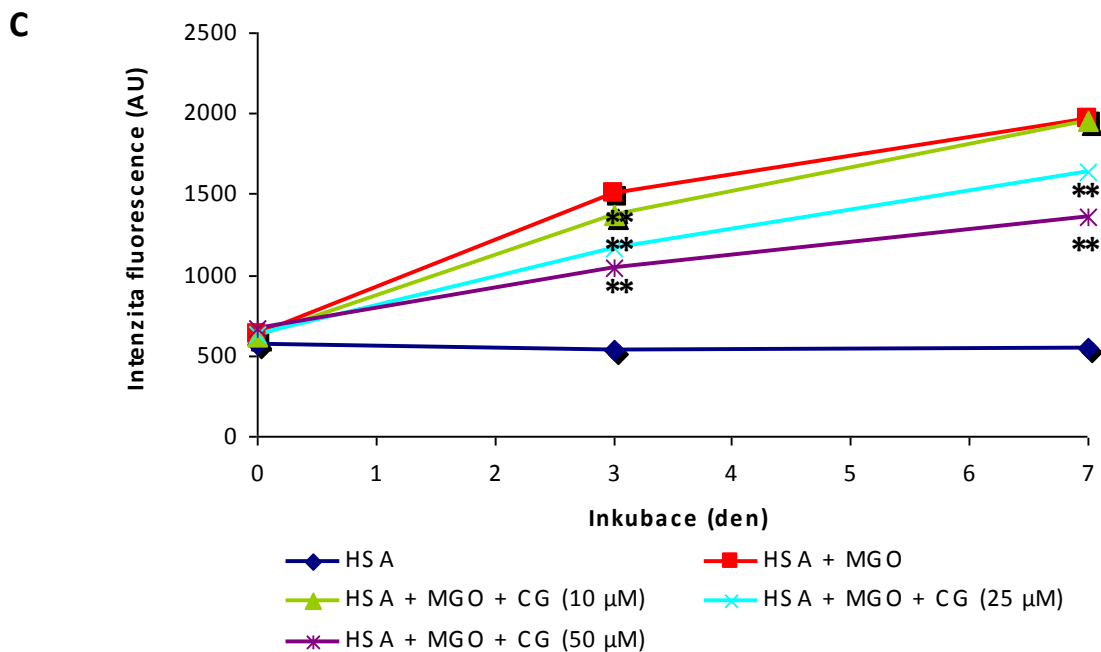
Schopnost inhibovat (%) vznik celkových nespecifických AGEs a argpyrimidinu jednotlivých měřených katechinů zobrazuje tabulka 6.

Tab. 6: Tabulka shrnující schopnost katechinů inhibovat vznik glykačních produktů (celkové nespecifické AGEs, argpyrimidin) při glykaci HSA methylglyoxalem (pH 7,4; 37 °C).

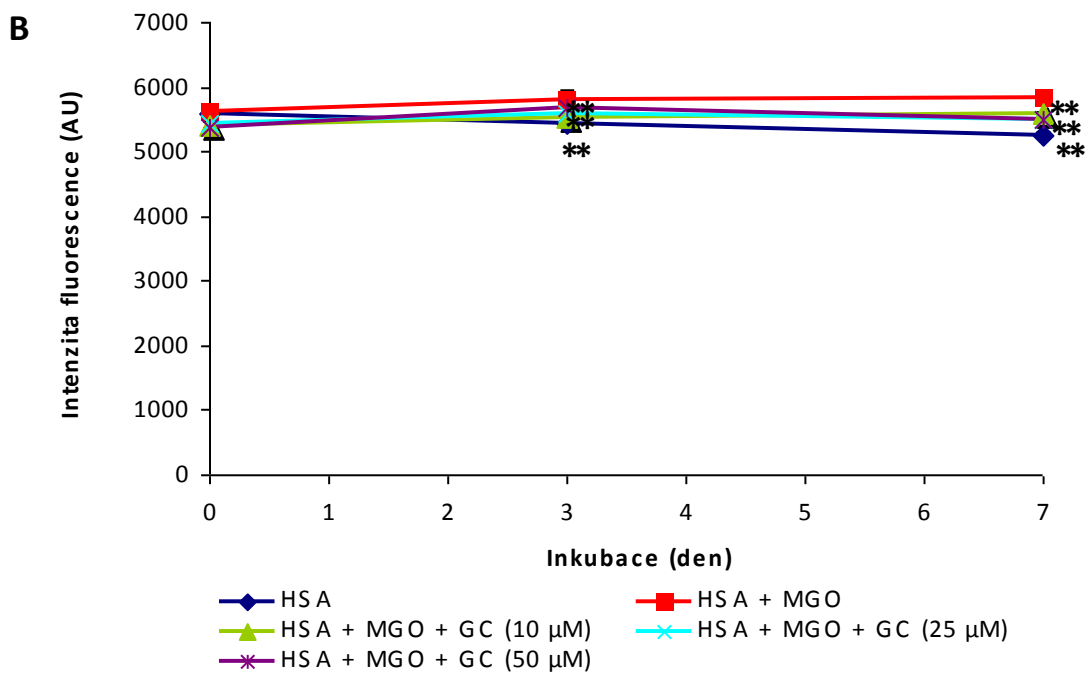
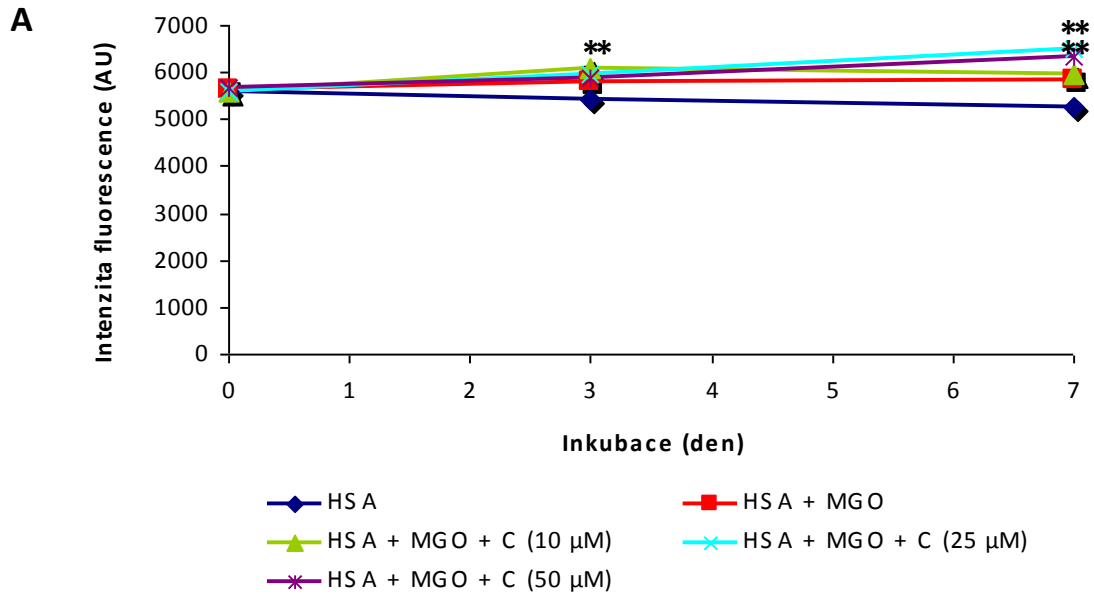
Testovaná látka [konc.]	% inhibice (vznik nespecifických AGEs)		% inhibice (vznik Argpyrimidinu)	
	inkubace 3 dny	inkubace 7 dní	inkubace 3 dny	inkubace 7 dní
katechin [25 μ M]	7,39	-0,51	-45,26	-118,22
katechin [50 μ M]	18,35	16,19	-18,28	-87,69
gallokatechin [25 μ M]	-3,94	1,96	62,70	58,14
gallokatechin [50 μ M]	-3,00	0,68	39,73	56,77
katechingallát [25 μ M]	35,00	23,21	57,97	15,08
katechingallát [50 μ M]	46,87	42,51	47,58	36,18
gallokatechingallát [25 μ M]	-11,05	-18,06	100,00	24,19
gallokatechingallát [50 μ M]	-4,75	10,35	78,35	-30,19

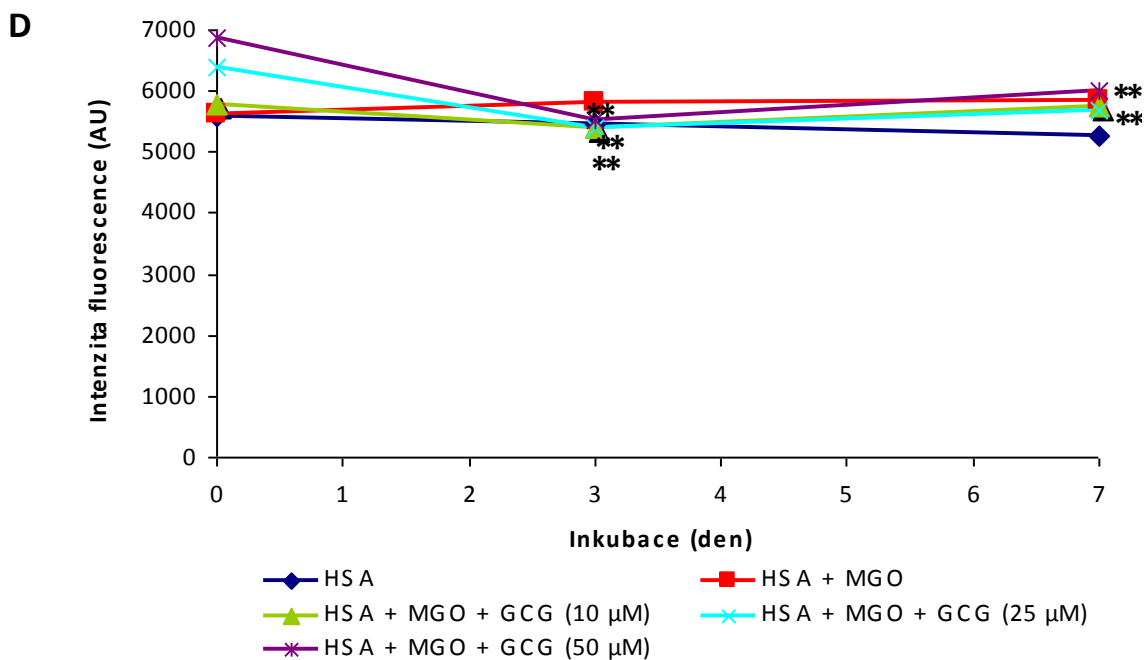
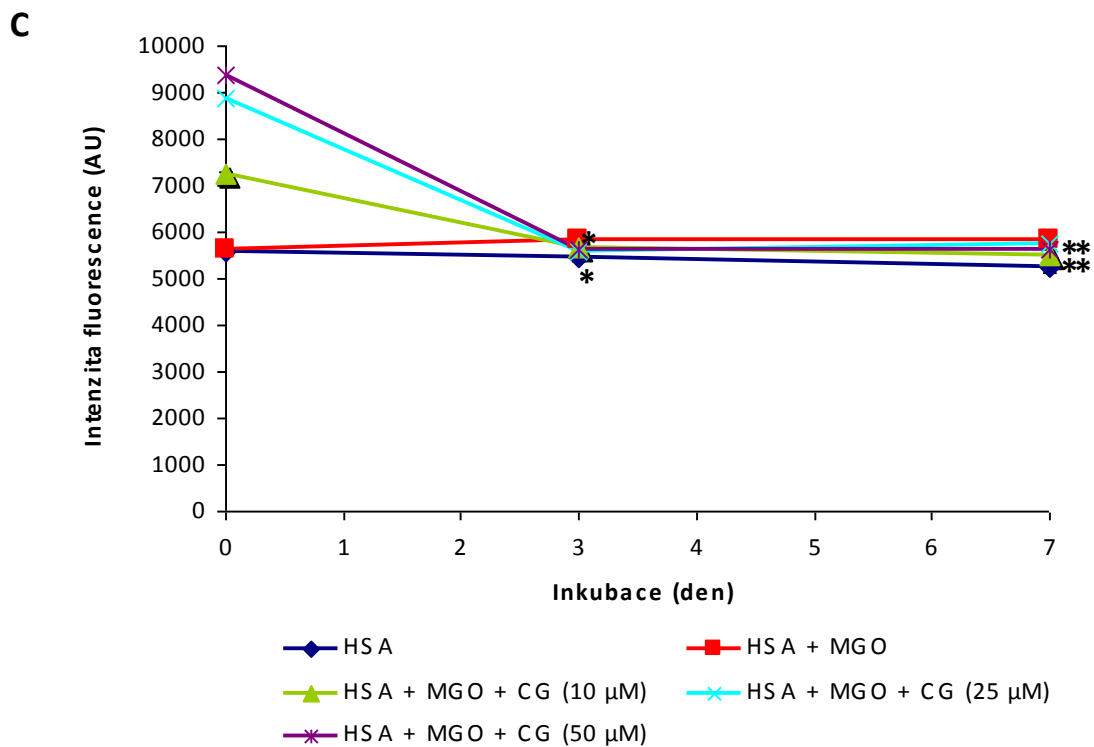
Vznik argpyrimidinu byl měřen při: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 320/380 nm, celkové nespecifické AGEs: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/440 nm. Směrodatné odchylky (průměrná hodnota získaná ze tří nezávisle prováděných experimentů) byly nižší než 10 %.





Obr. 20: Fluorescenční spektra zobrazující vliv katechinů na vznik celkových nesespecifických AGEs při neenzymové glykaci HSA methylglyoxalem (pH 7,4; 37 °C, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/440 nm; měřeno v čase 0, 3 a 7 den). [HSA] = 15×10^{-6} M, [MGO] = 1×10^{-2} M a [katechin] = $1-5 \times 10^{-5}$ M. S.D. < 10%. Data jsou analyzována pomocí Studentova t-testu $**p < 0,01$, n není signifikantní.





Obr. 21: Fluorescenční spektra zobrazující vliv katechinů na vznik argpyrimidinu při neenzymové glykaci HSA methylglyoxalem (pH 7,4; 37 °C, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 320/380 nm; měřeno v čase 0, 3 a 7 den). [HSA] = 15×10^{-6} M, [MGO] = 1×10^{-2} M, [katechin] = $1-5 \times 10^{-5}$ M. S.D. < 10%. Data jsou analyzována pomocí Studentova t-testu $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

6 Diskuse

Cílem této práce bylo hodnocení potenciálních interakcí čtyř katechinů s 2,3-*trans* uspořádáním ve struktuře, konkrétně (-)-katechinu (C), (-)-gallokatechinu (GC), (-)-katechingallátu (CG) a (-)-gallokatechingallátu (GCG) s lidským sérovým albuminem (HSA) a zhodnocení schopnosti těchto čtyř katechinů ovlivnit neenzymovou glykaci HSA zprostředkovanou methylglyoxalem jako velmi účinným glykačním činidlem.

V prvním kroku byla pomocí **UV-VIS absorpční spektroskopie** prověřena stabilita roztoků jednotlivých katechinů v prostředí fosfátového pufru o pH 7,4 a teplotě 37 °C. Získaná spektra ukazují, že katechiny jsou látky nestabilní povahy. Změny ve spektru byly pozorovány již po hodinové inkubaci roztoků katechinů. Získaná data jsou v souladu s dostupnou literaturou. Stabilita katechinů může být ovlivněna faktory, jako jsou pH, teplota, koncentrace, hladina O₂, přítomnost antioxidantů (např. SOD) nebo iontů kovů (Sang et al. 2005). Katechiny jsou velmi nestabilní v zásaditém prostředí o pH > 6 (Wang a Zhou 2004, Su et al. 2003). Nestabilita katechinů souvisí s jejich schopností podléhat autooxidaci (Sang et al. 2005, Roginski a Alegria 2005), přičemž rychlost oxidace je ovlivněna strukturními rysy katechinů a snižuje se v pořadí pyrogallol > gallát > katechol (Roginski a Alegria 2005). Vzájemná interakce mezi katechinem a HSA však může vést ke stabilizaci antioxidantu v séru. Existuje teorie, že HSA díky svým volným -SH skupinám (přítomnost Cys34) chrání katechiny před účinky volných radikálů, zabraňuje tak jejich oxidaci a zvyšuje jejich biologickou aktivitu *in vivo* (Bae et al. 2009). K ochraně katechinů před oxidačními účinky iontů přechodných kovů, O₂ a ROS přispívá při interakci s HSA i sterické chránění kruhu B proteinem (Ishii et al. 2011).

Interakce byly hodnoceny UV/VIS spektroskopii, fluorescenční spektroskopii a gelovou elektroforézou. Studované katechiny se liší ve své struktuře počtem hydroxylových skupin na kruhu B a přítomností nebo absencí zbytku kyseliny gallové v poloze 3 kruhu C. Hlavním cílem práce bylo posoudit, zda rozdíly ve struktuře jednotlivých katechinů mají vliv na vazebnou schopnost k HSA a schopnost zpomalit proces neenzymové glykace tohoto proteinu methylglyoxalem. Vazba katechinů k HSA je zprostředkována pomocí nekovalentních vazeb, a to tvorbou vodíkových můstků a elektrostatických sil či pomocí hydrofóbních interakcí (Ishii et al. 2010, Diniz et al. 2008).

Výsledky **UV/VIS spektroskopie** prokázaly důležitost přítomnosti zbytku kyseliny gallové ve struktuře katechinu. (-)-Katechingallát a (-)-gallokatechingallát

způsobily po 5 min inkubaci s HSA výrazný nárůst absorbance mezi 300 – 360 nm ve spektru HSA. Kdežto spektrum HSA po interakci s (-)-katechinem a (-)-gallokatechinem zůstalo nezměněno. Tato změna ve spektru HSA nasvědčuje vzniku komplexu mezi HSA a katechinem majícím navázaný zbytek kyseliny gallové na kruhu C. Význam této skupiny ve struktuře katechinu pro interakci s HSA i jinými proteiny a lipidovými dvojvrstvami byl již popsán v literatuře (Ishii et al. 2010, Fujimura et al. 2008, Minoda et al. 2010). Vyšší vazebnou afinitu esterů katechinů k HSA oproti ostatním katechinům uvádí i Ishii et al. (2010) ve studii interakcí pomocí HPLC analýzy. Interakci HSA s (-)-katechingallátem a (-)-gallokatechingallátem potvrdilo i proměření **fluorescenčních spekter** s excitací při 330 nm, kdy oba komplexy emitovaly záření při 374 – 377 nm (odpovídá zjištěnému absorpčnímu maximu komplexu), zatímco proměření spektra samotného (-)-katechingallátu či (-)-gallokatechingallátu k emisi nedošlo.

Pro detailnější ověření interakce byla provedena metoda **fluorimetrické titrace** roztoku HSA roztokem katechinů se vzrůstající koncentrací. Ve struktuře HSA se nachází jediný tryptofan (Trp214). Díky této aromatické aminokyselině HSA vykazuje při excitaci 295 nm silnou fluorescenční emisi s emisním maximem při 343 nm. Obecně jsou změny ve fluorescenčním spektru sérového albuminu využívány při studiu interakcí HSA s různými ligandy (Maiti et al. 2006, Bolli et al. 2010). Katechiny esterifikované kyselinou gallovou ((-)-katechingallát, (-)-gallokatechingallát) dokázaly snížit tryptofanovou fluorescenci výrazněji ve srovnání s ostatními studovanými katechiny ((-)-katechinem, (-)-gallokatechinem). Katechingalláty způsobily také výrazný posun emisního fluorescenčního maxima HSA (při 348 nm) k vyšším vlnovým délkám. Posun emisního spektra proteinu může být vyvolán vazbou ligandů, spojením protein-protein a „rozbalením“ proteinu. K posunu emisního spektra Trp214 k vyšším vlnovým délkám (tzv. „červenému posunu“) dochází při částečném rozbalení proteinu (Lakowicz 2006). Vysvětlením může být, že přítomnost zbytku kyseliny gallové v molekule zvyšuje hydrofobicitu katechinů, díky které může docházet k interakci s hydrofóbní dutinou proteinu (subdomény IIa, IIIa) (Minoda et al. 2010). Interakce katechinu s HSA způsobí díky četným OH skupinám vznik hydrofilního prostředí v okolí Trp214, což vede ke změně sekundární struktury proteinu, konkrétně částečnému „rozbalení“ vazebné kapsy, kde je uložen Trp214. Červený posun způsobil i (-)-epigallokatechingallát při interakci s HSA (Maiti et al. 2006). Vazba katechinů k HSA je stabilizována pomocí fenolických skupin tvorbou vodíkových můstků a

elektrostatických sil, přičemž přítomnost zbytku kyseliny gallové stabilitu i vazebnou afinitu pravděpodobně zvyšuje (Ishii et al. 2011).

Data ze zhášení fluorescence byla analyzována pomocí **Stern-Volmerovy analýzy** (Lakowicz 2006). Analýza prokázala důležitost zbytku kyseliny gallové na kruhu C ve struktuře katechinů, protože hodnota bimolekulární zhášecí konstanty katechingallátů byla mnohonásobně vyšší než u ostatních katechinů. Větší zhášecí schopnost prokázaly katechiny mající na kruhu B dvě OH skupiny (katecholový typ; (-)-katechingallát, (-)-katechin) oproti katechinům se třemi OH skupinami na kruhu B (pyrogallolový typ; (-)-gallokatechingallát, (-)-gallokatechin).

Vazba katechinů k HSA je zprostředkována pomocí nekovalentních vazeb, a to tvorbou vodíkových můstků a elektrostatických sil či pomocí hydrofóbních interakcí. Vazbu ovlivňuje sterické uspořádání molekuly, hydrofobicita, přítomnost různých funkčních skupin (Ishii et al. 2010, Diniz et al. 2008). Nejvyšší hodnota **vazebné konstanty K_b** byla zjištěna u katechingallátu a vzápětí za ním u gallokatechingallátu. Jejich vazebná schopnost byla mnohonásobně vyšší než u jejich neesterifikovaných analogů (CG > GCG >> C > GC). Získaná data poukazují na vyšší vazebnou schopnost katecholového typu katechinů než pyrogallolového typu katechinů. Toto zjištění je v rozporu s literaturou, kde Ishii et al. (2010) uvádí, že ke zvýšení vazebné afinity přispívá zavedení další OH skupiny do polohy 5 na kruhu B (pyrogallolový typ katechinů). Počet vazebných míst byl v rozmezí 0,87 - 1,10, což naznačuje, že jedna molekula HSA reaguje s jednou molekulou katechinu. Spontánnost vazby jednotlivých katechinů k HSA dokazují záporné hodnoty volné Gibbsovy energie (ΔG^0).

K zjištění vzdálenosti mezi HSA a katechiny při interakci byla použita metoda **FRET**. U všech zkoumaných systémů katechin-HSA došlo k překrytí UV-VIS absorpčního spektra jednotlivých katechinů s fluorescenčním spektrem HSA. U katechinů se zbytkem kyseliny gallové na kruhu C (katechingallát a gallokatechingallát) došlo však k většímu překrytí spekter oproti negallovaným katechinům (katechinu a gallokatechinu).

Při provádění **nativní PAGE** došlo při interakci HSA s (-)-katechingallátem a (-)-gallokatechingallátem ke zvýšení mobility vzorku směrem k anodě. Oproti předchozím metodám zde nejvýraznější zvýšení mobility bylo pozorováno u (-)-gallokatechingallátu, tzn. katechinu s nejvyšší molekulovou hmotností a největším počtem OH skupin (zbytek kyseliny gallové na kruhu C, pyrogallolová skupina na kruhu B). Elektroforetická mobilita klesala v pořadí: GCG (5,1 %) > CG (3,4 %) > C

(1,5 %) > GC (0,5 %). Zatímco **SDS-PAGE** neprokázala při vzájemné interakci HSA s katechiny žádné změny.

Všechny tři použité metody studia interakce mezi HSA a katechiny potvrzují, že existuje vztah mezi strukturou katechinů a jejich afinitou k molekule HSA. Stěžejním strukturním předpokladem pro výraznější afinitu k HSA je přítomnost zbytku kyseliny gallové na kruhu C a dále počet OH skupin na kruhu B.

Jak již bylo uvedeno výše, druhým cílem této práce bylo posoudit vliv čtyř katechinů (C, CG, GC, GCG) na neenzymovou glykaci lidského sérového albuminu methylglyoxalem. Neenzymová glykace bílkovin a následná akumulace glykačních produktů (AGEs) vede k progresi chronických mikro- a makrovaskulárních diabetických komplikací (nefropatie, retinopatie, periferní neuropatie, ateroskleróza) (Lo et al. 2006, Sang et al. 2007, Wu a Yen 2005).

Vliv katechinů na glykaci HSA byl hodnocen UV/VIS spektroskopií a fluorescenční spektroskopií. Glykace bílkovin je neenzymová reakce, zprostředkovaná kovalentní interakcí mezi karbonylovou skupinou redukujícího cukru a volnou aminoskupinou bílkoviny. Glykace bílkovin probíhá v několika stupních, během nichž dochází k tvorbě vysoce reaktivních karbonylových sloučenin, k nimž patří i methylglyoxal. Tyto vysoce reaktivní karbonylové sloučeniny reagují s dalšími volnými aminoskupinami a vedou k ireversibilní tvorbě koncových produktů pokročilé glykace (AGEs). Proces glykace je součástí patogeneze řady civilizačních onemocnění (Takeuchi et al. 2001, Turk 2010). Flavonoidy (katechiny) mají antioxidační vlastnosti, schopnost vychytávat volné radikály a v poslední době je ve studiích poukazováno také na jejich schopnost inhibovat tvorbu AGEs (Lo et al. 2006).

Při hodnocení glykace HSA pomocí **UV/VIS spektroskopie** jsme se zaměřovali na posouzení změn spektra v oblasti vlnových délek 300 – 350 nm (oblast, kdy při glykaci HSA dochází k charakteristickému nárůstu absorbance). Po odečtení pozadí žádný z testovaných katechinů nezpůsobil snížení absorbance v kontrolované oblasti spektra tak, aby bylo srovnatelné s proměřeným spektrem čistého HSA. Jediný pokles hodnoty absorbance v maximu odpovídajícímu AGEs (320 nm) jsem pozorovala u katechinu [25 μ M] a [50 μ M] v čase 1 den, katechingallátu [50 μ M] v čase 1 den a gallokatechingallátu [10 μ M] v čase 1 den. V následujících časových intervalech však došlo k nárůstu absorbance až o 47 %. U gallokatechinu [25 μ M] došlo v čase 1 den k téměř pětinasobnému nárůstu absorbance. Metoda UV/VIS spektroskopie neprokázala u studovaných katechinů protektivní účinek na glykaci HSA methylglyoxalem.

Pro detailnější posouzení vlivu katechinů na glykaci HSA byla použita metoda **fluorescenční spektroskopie**. Při glykaci albuminu dochází ke zvýšení jeho fluorescence. Hlavním místem glykace albuminu u diabetických pacientů je Lys525 (Kisugi et al. 2007). Specifickým markrem pro stanovení glykace proteinů způsobené methylglyoxalem je argpyrimidin (Lo et al. 1994). Data získaná měřením fluorescence glykačních produktů ukazují, že katechiny jsou již po třech dnech inkubace schopny utlumit nárůst glykace. Dobrou schopnost potlačit proces glykace prokázaly zejména katechiny se zbytkem kyseliny gallové ve struktuře ((-)-katechingallát) v nejvyšší měřené koncentraci 50 μM . Nejvýraznější byl inhibiční efekt (-)-gallokatechingallátu (25 μM a 50 μM) na vznik argpyrimidinu po třídní inkubaci (inhibice o 100 % a 78,35 %). Dobrou inhibiční schopnost na vznik argpyrimidinu prokázal i (-)-gallokatechin již v koncentraci 25 μM (inhibice 62,7 % po 3 dnech inkubace). Naopak ve vzorcích obsahujících (-)-katechin nedošlo k žádnému poklesu tvorby argpyrimidinu. Tyto výsledky jsou v rozporu se studií Lo et al. (2006), který posuzoval přímou schopnost vychytávat methylglyoxal u EC, ECG, EGC, EGCG. V této zmiňované studii prokázal nejlepší schopnost snížit obsah methylglyoxalu ve vzorku (-)-epigallokatechin, následován (-)-epikatechinem a (-)-epigallokatechingallátem. Nejméně aktivní byl (-)-epikatechingallát. Sang et al. (2007) popisuje, že (-)-epigallokatechingallát prokazuje mnohem rychlejší schopnost reagovat s methylglyoxalem než lysin a arginin. Tato skutečnost naznačuje, že (-)-epigallokatechingallát je schopen potenciálně soutěžit s lysinem a argininem při vazbě na methylglyoxal a snižovat tak tvorbu AGEs (Sang et al. 2007). Dostupné studie vycházející z NMR, HPLC a MS analýz naznačují, že hlavním vazebným místem methylglyoxalu v molekule (-)-epigallokatechingallátu je poloha 6 a 8 kruhu A. Přítomnost zbytku kyseliny gallové nemá pravděpodobně na vazbu methylglyoxalu vliv. Příčiny snad mohou být sterické – nepřístupnost polohy 2' a 6' zbytku kyseliny gallové, taktéž přítomnost tří OH skupin může být příčinou nižší nukleofility, než je v poloze 6 a 8 kruhu A (Sang et al. 2007). Výsledky mé práce naopak naznačují větší schopnost utlumit glykaci HSA u katechinů se zbytkem kyseliny gallové na kruhu C. Jak je výše zmíněno, zbytek kyseliny gallové na kruhu C je pravděpodobně nezbytný pro interakci s HSA. Interakce HSA s (-)-epigallokatechingallátem přispívá zároveň k jeho stabilizaci a zvyšuje tak biologickou aktivitu katechinů *in vivo* (Bae et al. 2009). Je otázkou, zda právě interakce katechin - HSA přispívající ke zvýšení stability katechinů nemůže být nezbytnou podmínkou pro zvýšení účinku katechinů v procesu inhibice

glykace v delším časovém intervalu. Pravděpodobně poloha 6 a 8 kruhu A zůstává stericky přístupná pro vazbu methylglyoxalu i při současné interakci HSA s katechiny, na níž se naopak podílí zbytek kyseliny gallové, případně hydroxylové skupiny kruhu B.

Při usuzování na antiglykační schopnosti katechinů je třeba vzít v úvahu, že antiglykační působení flavonoidů je komplexní proces, jež pravděpodobně zahrnuje schopnost flavonoidů (katechinů) vychytávat ROS, jež jsou tvořeny během glykačního procesu, schopnost vychytávat reaktivní dikarbonylové sloučeniny, schopnost chelatace iontů přechodných kovů, které oxidační procesy podporují (Wu a Yen 2005) a v neposlední řadě hraje roli stabilita katechinů *in vivo*, či interakce s okolními molekulami.

7 Závěr

Flavonoidy jsou strukturně rozličnou skupinou polyfenolických látek, jež zastávají několik významných rolí ve fyziologii rostlin. V oblasti výzkumu se flavonoidy dostávají do popředí zájmu díky svým biologickým a farmakologickým vlastnostem. Předmětem studia této práce se staly čtyři zástupci podtřídy flavan-3-olů ((-)-katechin, (-)-gallokatechin, (-)-katechingallát a (-)-gallokatechingallát). Hlavním cílem bylo posoudit vliv rozdílných strukturních rysů v jejich molekulách na schopnost interakce s lidským sérovým albuminem a zhodnocení schopnosti těchto čtyř katechinů ovlivnit neenzymovou glykaci HSA zprostředkovanou methylglyoxalem.

Interakce katechinů s lidským sérovým albuminem byla hodnocena *in vitro* pomocí UV/VIS spektroskopie, fluorescenční spektroskopie a gelové elektroforézy. Stěžejním strukturním rysem nezbytným pro interakci katechinu s molekulou HSA je přítomnost zbytku kyseliny gallové na kruhu C a počet OH skupin na kruhu B. Větší zhášecí schopnost prokázaly katechiny katecholového typu (dvě OH skupiny na kruhu B; (-)-katechingallát, (-)-katechin). Fenolické skupiny obecně přispívají k vazbě tvorbou vodíkových můstků a elektrostatickými silami, zbytek kyseliny gallové vazebnou afinitu zvyšuje i díky hydrofóbním vlastnostem. Dle zjištěného počtu vazebných míst lze usuzovat, že jedna molekula HSA reaguje s jednou molekulou katechinu. Vazebná schopnost byla nejvyšší u esterifikovaných katechinů ((-)-katechingallátu a (-)-gallokatechingallátu).

Vliv katechinů na neenzymovou glykaci lidského sérového albuminu methylglyoxalem byl hodnocen *in vitro* pomocí UV/VIS spektroskopie a fluorescenční spektroskopie. Je třeba vzít v úvahu, že antiglykační působení katechinů je komplexní proces, v němž hraje roli vychytávání ROS a dikarbonylových sloučenin, chelatace iontů přechodných kovů, interakce s okolními molekulami a pravděpodobně ještě další faktory. Metodou UV/VIS spektroskopie nebyl prokázán u studovaných katechinů protektivní účinek na glykaci HSA methylglyoxalem. Fluorescenční spektroskopii byla prokázána schopnost potlačit proces glykace u katechinů se zbytkem kyseliny gallové ve struktuře ((-)-katechingallát, (-)-gallokatechingallát). Naopak u katechinu nedošlo k žádnému poklesu glykace.

Poděkování

Závěrem bych chtěla poděkovat PharmDr. Ivě Boušové, PhD. a Ing. Lucii Trnkové, PhD. za cenné rady, trpělivost, spolupráci a přátelskou atmosféru při výzkumné činnosti a za jejich odborné vedení při zpracování této rigorózní práce.

8 Seznam zkratek

AA	akrylamid
AGEs	koncové produkty pokročilé glykace (advanced glycation end-products)
APS	peroxodisíran amonný
Arg	arginin
ATP	adenosintrifosfát
Bis-AA	N,N'-methylenbisakrylamid
BPB	bromfenolová modř
BSA	hovězí sérový albumin
C	katechin
CEL	<i>N</i> -ε-(1-karboxyethyl)lysin
CG	katechingallát
CoA	koenzym A
Cys	cystein
EC	epikatechin
ECG	epikatechingallát
EGC	epigallokatechin
EGCG	epigallokatechingallát
ESR	elektronová spinová resonance
GC	gallokatechin
GCG	gallokatechingallát
GO	glyoxal
GSH	glutathion
HCl	kyselina chlorovodíková
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	lidský sérový albumin
Lys	lysin
MGO	methylglyoxal
MOLD	1,3-di-(<i>N</i> -ε-lysino)-4-methyl-imidazolium
MS	hmotnostní spektrometrie
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
Na ₂ SO ₄ ·12H ₂ O	síran sodný dodekahydrát
NADH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát
NaN ₃	azid sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
O ₂	kyslík
OH-	hydroxylová skupina
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
RAGE	receptor produktů pozdní glykace
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza
SH-	thiolová skupina
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
THP	<i>N</i> -δ-(4-karboxy-4,6-dimethyl-5,6-dihydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)ornithin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	tryptofan
UV-VIS	ultrafialové-viditelné záření
λ _{em}	emisní vlnová délka
λ _{ex}	excitační vlnová délka

9 Literatura

- Ahmed N., Thornalley P. J., Dawczynski J., Franke s., Strobel J., Stein G., Haik G. M. (2003)** Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(12):5287-92
- Bae M. J., Ishii T., Minoda K., Kawada Y., Ichikawa T., Mori T., Kamihira M., Nakayama T. (2009)** Albumin stabilizes (-)-epigallocatechin gallate in human serum: Binding capacity and antioxidant property. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 709-715
- Bi S., Ding L., Tian Y., Song D., Zhou X., Liu X., Zhang H. (2004)** Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J. Mol. Struct.* 703; 37
- Bierhaus A., Hofmann M. A., Ziegler R., Nawroth P. P. (1998)** AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovascular Research* 37, 586-600
- Bolli A., Marino M., Rimbach G., Fanali G., Fasano M., Ascenzi P. (2010)** Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398(3):444-9
- Boušová I, Průchová Z, Trnková L, Dršata J. (2011)** Comparison of glycation of glutathione S-transferase by methylglyoxal, glucose or fructose. *Mol Cell Biochem.* 357(1-2):323-30
- Boušová I, Bacílková E., Dobrijević S., Dršata J. (2009)** Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal, effect of hydroxycitric and uric acid. *Mol Cell Biochem.* 331:215-223
- Bukhari S. B., Memo, S., Tahir M. M. & Bhanger M. I. (2009)** Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. *Spectrochimica Acta*, 71, 1901–1906
- Cabrera C., Artacho R., Giménez R. (2006)** Beneficial effects of green tea – a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 25(2):79-99

D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.*; 43(4): 348-61

Diniz A., Escuder-Gilabert L., Lopes N. P., Villanueva-Camanas R. M., Sagrado S., Medina-Hernández M. J. (2008) Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391:625-632

Dockal M., Carter D. C., Rüker F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.*, 8; 274(41): 29303-10

Dockal M., Carter D. C., Rüker F. (2000) Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J. Biol. Chem.*, 4; 275(5): 3042-50

Dufresne Ch. J., Farnworth E. R. (2001) A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.*; 12(7): 404-421

Förster T. a Sinanoglu O. (1966) Modern quantum chemistry. Vol. 3, Academic Press, New York, 1966. 93 p.

Fujimura Y., Umeda D., Yamada K., Tachibana H. (2008) The impact of the 67 kDa laminin receptor on both cell-surface binding and anti-allergic action of tea catechins. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 133-138

Gomes R. A., Silva M. S., Miranda H. V., Ferreira A. E. N., Cordeiro C. A. A., Freire A. P. (2005) Protein glycation in *Sacharomyces cerevisiae*. Argpyrimidine formation and methylglyoxal catabolism. *FEBS Journal* 272, 4521-4531

Guo X., Zhang L., Sun X., Han X., Guo C., Kang P. (2009) Spectroscopic studies on the interaction between sodium ozagrel and bovine serum albumin. *J Mol Struct.* 928:114-120

Hussain S. A. (2012) An introduction to fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Science Journal of Physics (ISSN: 2276-6367)*

Ishii T., Ichikawa T., Minoda K., Kusaka K., Ito S., Suzuki Y., Akagawa M., Mochizuki K., Goda T., Nakayama T. (2011) Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-Epigallocatechin gallate: Participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (1), 100-106

Ishii T., Minoda K., Bae M. J., Mori T., Uekusa Y., Ichikawa T., Aihara Y., Furuta T., Wakimoto T., Kan T., Nakayama T. (2010) Binding affinity of tea catechins for HSA: Characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 816-822

Kisugi R., Kouzuma T., Yamamoto T., Akizuki S., Miyamoto H., Someya Y., Yokoyama J., Abe I., Hirai N., Ohnishi A. (2007) Structural and glycation site changes of albumin in diabetic patient with very high glycated albumin. *Clin Chem Acta.* 382(1-2):59-64

Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Cahlíková L. (2012) Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chem. Listy* 106, 113 – 121

Lakowicz J. R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Springer, New York, 953 p.

Lo Ch.-Y., Li S., Tan D., Pan M.-H., Sang S., Ho Ch.-T. (2006) Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 1118-1128

Lo T. W. C., Westwood M. E., McLellan A. C., Selwood T., Thornalley P. J. (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. *J Biol Chem.* 269(51):32299-305

Maiti T. K., Ghosh K. S., Dasgupta S. (2006) Interaction of (-)-Epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: Fluorescence, Fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies. *Proteins* 64(2):355-62

- Manach C., Scalbert A., Morand Ch., Rémésy Ch., Jimenez L. (2004)** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*; 79(5): 727-47
- Minoda K., Ichikawa T., Katsumata T., Onobori K., Mori T., Suzuki Y., Ishii T., Nakayama T. (2010)** Influence of galloyl moiety in tea catechins on binding affinity for human serum albumin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 56, 331-334
- Nakayama T., Ichiba M., Kuwabara M., Kajiya K., Kumazawa S. (2002)** Mechanisms and structural specificity of hydrogen peroxide formation during oxidation of catechins. *Food Sci. Technol. Res.*, 8 (3); 261-267
- Otagiri M. (2005)** A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20(5): 309 – 323
- Pastore R. L., Fratellone P. (2006)** Potencial health benefits of green tea (*Camellia sinensis*): a narrative review. *Explore (NY)*; 2(6): 531-9
- Pietta P. G. (2000)** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*; (63)7: 1035-42
- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. (2011)** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513 – 523
- Rawel H. M., Frey S. K., Meidtner K., Kroll J., Schweigert F. J. (2006)** Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol. Nutr. Food Res.* 50; 705
- Roginski V., Alegria A.E. (2005)** Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *J. Agric. Food Chem.*, 1;53(11):4529-35
- Sang S., Lee M. J., Hou Z., Ho Ch. T., Yang Ch. S. (2005)** Stability of tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9478 – 9484
- Sang S., Shao X., Bai N., Lo Ch.-Y., Yang Ch. S., Ho Ch.-T. (2007)** Tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate: A new trapping agent of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1862-1870

- Song W. O., Chun O. K. (2008)** Tea is the major source of flavan-3-ol and flavonol in the U.S. Diet. *J. Nutr.* 138(8): 1543S-1547S
- Su Y. L., Leung L. K., Huang Y., Chen Z. Y. (2003)** Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chem*, 83, 189-195
- Sun J., Liang F., Bin Y., Li P., Duan C. (2007)** Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, 12, 679-693
- Takeuchi M., Yanase Y., Matsuura N., Yamagishi S., Kameda Y., Bucala R., Makita Z. (2001)** Immunological detection of a novel advanced glycation end-product. *Mol. Med.* 7(11): 783-791
- Tan D., Wang Y., Lo C. Y., Sang S., Ho C. T. (2008)** Methylglyoxal: Its presence in beverages and potential scavengers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1126: 72-75
- Thornalley P. J., Langborg A., Minhas H. S. (1999)** Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, 344: 109-116
- Trnková L., Boušová I., Staňková V., Dršata J. (2011)** Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. *Journal of Molecular Structure* 985, 243-250
- Turk Z. (2010)** Glycotoxines, Carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol. Res.* 59: 147-156
- Wang R., Zhou W. (2004)** Stability of tea catechins in the breadmaking process. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8224-8229
- Wu C. H., Yen G. C. (2005)** Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation end products. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3167-3173

Wu C. H., Yen G.C. (2005) Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation end-products. *J. Agric. Food Chem.* 20;53(8):3167-73

Yuan J. L., Iv Z., Liu Z. G., Hu Z., Zou G. L. (2007) Study on interaction between apigenin and human serum albumin by spectroscopy and molecular modeling. *J Photochem Photobiol A. Chem.* 191:104-113

10 Dodatek

Seznam publikovaných prací a abstrakt z konferencí, které se vztahují k tématu této rigorózní práce. Kopie těchto prací jsou přiloženy.

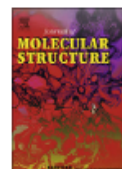
I. Původní vědecké práce:

Trnková L., Boušová I., Staňková V., Dršata J. (2011) Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. *J. Mol. Struct.* 985(2-3):243-250.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstruc

Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques

Lucie Trnková^{a,b,*}, Iva Boušová^a, Veronika Staňková^a, Jaroslav Dršata^{a,b}

^aDepartment of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Králové, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2010

Received in revised form 31 October 2010

Accepted 1 November 2010

Available online 6 November 2010

Keywords:

Human serum albumin

Catechin

Fluorescence quenching

UV–Vis absorption spectroscopy

Electrophoresis

Protein–ligand binding

ABSTRACT

The interaction between eight naturally occurring flavanols (catechin, epicatechin, galocatechin, epigallocatechin, catechin gallate, epicatechin gallate, galocatechin gallate, and epigallocatechin gallate) and human serum albumin (HSA) has been investigated by spectroscopic (fluorescence quenching and UV–Vis absorption) and electrophoretic (native and SDS PAGE) techniques under simulated physiological conditions (pH 7.40, 37 °C). The spectroscopic results confirmed the complex formation for the tested systems. The binding constants and the number of binding sites were obtained by analysis of fluorescence data. The strongest binding affinity to HSA was found for epicatechin gallate and decreased in the order epicatechin gallate > catechin gallate > epigallocatechin gallate > galocatechin gallate > epicatechin > catechin > galocatechin > epigallocatechin. All free energy changes possessed negative sign indicating the spontaneity of catechin–HSA systems formation. The binding distances between the donor (HSA) and the acceptors (catechins) estimated by the Förster theory revealed that non-radiation energy transfer from HSA to catechins occurred with high possibility. According to results obtained by native PAGE, the galloylated catechins increased the electrophoretic mobility of HSA, which indicated the change in the molecular charge of HSA, whilst the non-galloylated catechins caused no changes. The ability of aggregation and cross-linking of tested catechins with HSA was not proved by SDS–PAGE. The relationship between the structure characteristics of all tested catechins (e.g. presence of the galloyl moiety on the C-ring, the number of hydroxyl groups on the B-ring, and the spatial arrangement of the substituents on the C-ring) and their binding properties to HSA is discussed. The presented study contributes to the current knowledge in the area of protein–ligand binding, particularly catechin–HSA interactions.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The interaction between macromolecules (e.g. proteins) and drugs (e.g. flavonoids) has attracted a great interest among researchers for several decades [1–4]. Serum albumin is the most abundant protein in the circulatory system and one of its most outstanding properties is the ability to reversibly bind a large variety of endogenous and exogenous ligands, such as nutrients, hormones, fatty acids, and many diverse drugs [5]. It is well known that the deposition, transportation, metabolism, and efficacy of drugs are strongly affected by their binding to serum albumin [6]. On the other hand, drugs can cause various changes in protein conformation influencing its physiological functions. Such impaired proteins

may be consequently accumulated in body tissues. Therefore, the studies of serum albumin–drug interactions play an important role in pharmacology and pharmacodynamics.

Human serum albumin (HSA) consists of 585 amino acids in a single polypeptide chain cross-linked with 17 disulfide bonds. The crystallographic analysis of HSA revealed that the protein contains three structurally similar domains (I–III), which assemble to form heart-shaped molecule. Each of these domains is further divided into two subdomains (A and B). It was found out that aromatic and heterocyclic ligands bind within two hydrophobic pockets in subdomains IIA and IIIA [7]. HSA has only one tryptophan residue (Trp-214) within a hydrophobic binding pocket of subdomain IIA, which significantly contributes to the intrinsic fluorescence of the protein. Therefore, the fluorescence spectroscopy can easily reveal changes in the microenvironment of the tryptophan residue and be used for determining the binding affinities [8].

Catechins (flavan-3-ols) are plant polyphenolic compounds occurring in higher concentrations in beans, black grapes, cherries, pears and chocolate [9]. The most important and rich natural source of catechins is undoubtedly green tea (*Camellia sinensis*,

* Corresponding author at: Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic. Tel.: +42 0493331159; fax: +42 0495512665.

E-mail addresses: Lucie.Trnkova@faf.cuni.cz (L. Trnková), Iva.Bousova@faf.cuni.cz (I. Boušová), STANV5AA@faf.cuni.cz (V. Staňková), Jaroslav.Drsata@faf.cuni.cz (J. Dršata).

Theaceae), which is one of the most widely consumed beverages in the world. The major green tea catechins are (–)-epigallocatechin, (–)-epicatechin, (–)-epicatechin gallate and (–)-epigallocatechin gallate, the most important active compound. They are responsible for beneficial health effects of the green tea in the prevention or treatment of various diseases such as cancer, heart diseases, diabetes and neurodegenerative disease. These active compounds have been reported to possess also antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and antiviral effects [10,11]. However, catechins were noticed to show also negative effects such as pro-oxidative, cyto- and phytotoxic activities [11–14]. It is well known that structural features, namely the number of the galloyl and hydroxyl groups in the molecule of catechins, play an important role in their biological activities, particularly antioxidant properties [15,16]. The catechin structures also suggest the possibility of their binding to the molecules of enzymes and other proteins [17].

The spectroscopic techniques, such as fluorescence spectroscopy, UV–Vis absorption spectroscopy, circular dichroism spectroscopy (CD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), have become popular methods for revealing drug–protein interactions because of their high sensitivity, rapidity, and ease of implementation. They allow non-destructive measurements of substances in low concentration under various experimental conditions [18–23]. These techniques provide the binding information and reflect the conformation changes of proteins in various environments.

Some spectroscopic studies on the interaction between serum albumin and catechins have been published, namely catechin and epicatechin [2,24], epigallocatechin [24] and epigallocatechin gallate [18,25], as well as some non-spectroscopic studies, e.g. determination of binding parameters by capillary electrophoresis (catechin and epicatechin) [3] or isothermal titration calorimetry (epicatechin) [26]. Nevertheless, these data are hardly comparable because of different techniques used and various experimental conditions (e.g. pH, temperature, excitation wavelength used). Recently, binding ability of tea catechins and their analogs with HSA have been investigated by HPLC analysis with immobilized albumin column [17].

In the presented work, the binding affinity of eight naturally occurring catechins to HSA has been investigated in detail by fluorescence spectroscopy in combination with UV–Vis absorption spectroscopy and electrophoretic methods under simulated physiological conditions (pH 7.4; 37 °C). The main objective of the study was to reveal the character of interactions and evaluate structure–activity relationships within the group of catechins (effect of the galloyl moiety on the C-ring, the number of hydroxyl groups in the B-ring and the spatial arrangement of the substituents on the C-ring). The presented study contributes to the current knowledge in the area of protein–ligand binding, particularly catechins–HSA interactions.

2. Experimental

2.1. Chemicals and preparation of stock solutions

Human serum albumin and all catechins were obtained from Sigma–Aldrich GmbH, Germany. The chemical structures of tested compounds are presented in Fig. 1. All other chemicals were of analytical grade.

Human serum albumin was dissolved in sodium phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M; 0.05% sodium azide) in order to yield solutions with concentration 4×10^{-6} M and 15×10^{-6} M for spectroscopic measurements, and electrophoresis, respectively. Individual catechins were dissolved in methanol in order to yield 1×10^{-2} M stock solutions.

2.2. UV–Vis absorption spectroscopy

The UV–Vis absorption measurements were carried out using a spectrophotometer Helios β (Spectronic Unicam, United Kingdom) in a 10 mm quartz cuvette. The concentrations of HSA and individual catechins were 4×10^{-6} M and 4×10^{-5} M, respectively. All samples were incubated for 5 min at 37 °C. The UV–Vis absorption spectra were recorded from 190 to 550 nm at 37 °C. The spectrum of sodium phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M; 0.05% sodium azide) with or without appropriate catechin was subtracted.

2.3. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra were recorded using a luminescence spectrometer LS-50B (Perkin Elmer, United Kingdom) in a 10 mm quartz Suprasil fluorescence cuvette (Hellma, Germany). Quantitative analysis of the potential interaction between catechins and HSA was performed by the fluorimetric titration. Briefly, solution of HSA (4×10^{-6} M) was titrated in cuvette by successive additions of individual catechin solutions (1×10^{-2} M) to a final concentration of 2×10^{-5} M. Fluorescence emission spectra were recorded from 290 to 530 nm with excitation at 295 nm under continuous stirring. The excitation and emission slits were both set to 5 nm and scanning speed was 200 nm/min. All experiments were carried out at 37 °C. Fluorescence intensity was read at protein emission maximum of 348 nm. Fluorescence spectra of individual catechins in buffer (0.2×10^{-5} M) were recorded as blanks under the same experimental conditions and subtracted from the corresponding sample to correct the fluorescence background [2].

Fluorescence emission spectra of individual catechins (4×10^{-5} M) with or without HSA (4×10^{-6} M) were also recorded at the excitation wavelength of 330 nm, which corresponds to the absorption maximum of ground state complex.

2.4. Preparation of incubation mixtures for electrophoresis

Samples with and without (controls) tested catechins were prepared. Protein concentration in all samples was 15×10^{-6} M and concentration of catechins was 6×10^{-4} M. Samples were incubated for 30 min at 37 °C and further analyzed using polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing (SDS–PAGE) or non-denaturing (native PAGE) conditions.

2.5. Native electrophoresis

Native PAGE was performed in discontinuous system with 4% stacking gel and 10% separating non-denaturing gel. All lanes were loaded with 8 μ g of protein. Electrophoresis was performed at 30 mA using Mini ProteanIII apparatus (BioRad). The gel was stained with colloidal Coomassie Blue G250, scanned by GelDoc XR system (BioRad), and the relative mobilities (R_f) were calculated using Quantity One software (BioRad). Results were further expressed as a rise in percentage of sample mobility compared to the native protein (control): $[(R_f(\text{complex}) - R_f(\text{HSA})) / R_f(\text{HSA})] \times 100$ (%).

2.6. SDS–PAGE electrophoresis

SDS–PAGE was performed using discontinuous system with 4% stacking gel and 7.5% separating non-denaturing gel. All lanes were loaded with 4 μ g of protein. Electrophoresis was performed at 200 V using Mini ProteanIII apparatus (BioRad). Gels were visualized with colloidal Coomassie Blue G250, scanned, and their quantification was performed using Quantity One software (BioRad).

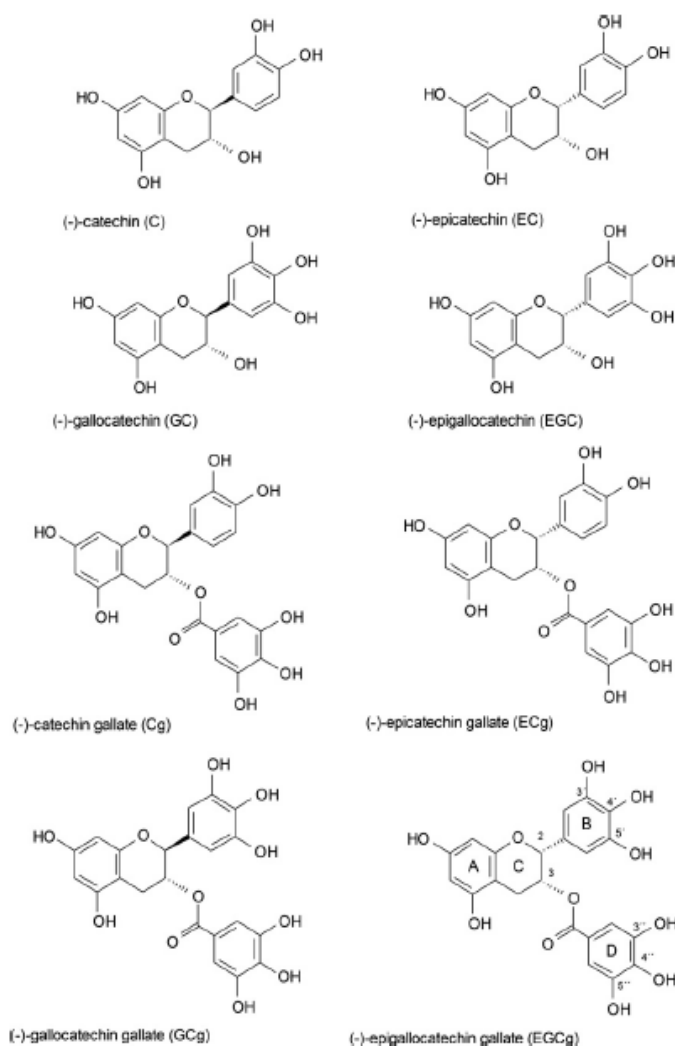


Fig. 1. Chemical structures of tested catechins.

2.7. Statistical analysis

All measurements were performed in triplicates and the mean values of determined constants were calculated. All standard deviations (S.D.) were lower than 10%. Statistical significance was determined using Student's *t*-test and differences were significant when $p < 0.01$.

3. Results

3.1. UV–Vis absorption spectra of catechin–HSA systems

UV–Vis absorption measurement is a very simple but effective method to explore the structural change and the complex formation [20]. In the present study, the absorption spectra of HSA in the absence and presence of individual catechins were recorded after 5 min of interaction. Stabilities of all compounds under experimental conditions (pH 7.4, 37 °C) were verified by recording their

individual UV–Vis absorption spectra after 5 min of incubation. No changes in UV–Vis spectra were observed.

No changes were noticed in absorption spectra of HSA after interaction with catechins lacking the galloyl moiety on the C-ring (catechin, epicatechin, gallocatechin, and epigallocatechin). On the other hand, the obvious changes, such as slight decrease of absorbance between 200 and 280 nm, significant growth of absorbance between 300 and 360 nm ($\lambda_{\text{max}} = 330$ nm) and slight red shift, in absorption spectrum of HSA after addition of the galloylated catechins (catechin gallate, epicatechin gallate, gallocatechin gallate, and epigallocatechin gallate) confirmed the complex formation [27]. The differential absorption spectrum of HSA after interaction with epicatechin gallate is displayed in Fig. 2.

3.2. Fluorescence spectra of catechins and catechin–HSA systems

As was described above, the complex formation between HSA and catechin gallates was noticed at their UV–Vis absorption

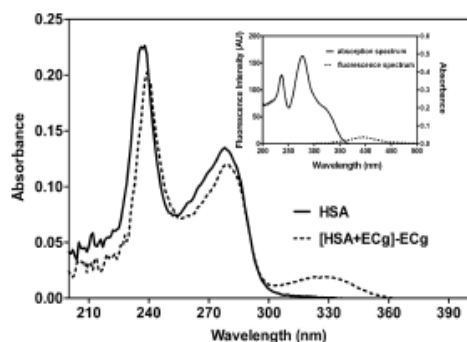


Fig. 2. UV-Vis absorption spectra of HSA before and after interaction with epicatechin gallate (pH 7.4, 37 °C, 5 min). The inset shows the absorption and fluorescence spectrum of epicatechin gallate. [HSA] = 4×10^{-5} M and [ECg] = 4×10^{-5} M, and $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm.

spectra. Subsequently, the emission spectra of these complexes were recorded with the excitation at 330 nm, which corresponds with the observed absorption maximum. All complexes emitted light between 374 and 377 nm (Fig. 3), whereas catechin gallates as well as other catechins alone were not emissive under these experimental conditions.

Fluorescence emission spectra of individual catechins were recorded at excitation wavelength of 295 nm, which corresponds to the tryptophan. Only, catechin and epicatechin possessed intrinsic fluorescence and both displayed the similar spectra with emission maximum of 318 nm (Fig. 4A). The observed wavelength of their emission maximum is consistent with literature [2]. Other catechins showed no significant emission spectra at this excitation wavelength (the inset of Figs. 2 and 4B).

3.3. Fluorescence quenching spectra of HSA induced by catechins

Quenching of protein intrinsic (tryptophan) fluorescence was employed for more detailed study of catechin–HSA interactions. Fluorescence emission spectra were recorded upon excitation at 295 nm, which is attributed to tryptophan residues only. Fluorescence intensity of HSA gradually decreased with rising concentration of all tested compounds (Fig. 4). This may indicate that the microenvironment of tryptophan residue (Trp-214) in HSA molecule was altered due to the interaction with tested compounds. Catechin gallates induced considerable red shift of the HSA emission maximum (348 nm) depending on increasing concentration

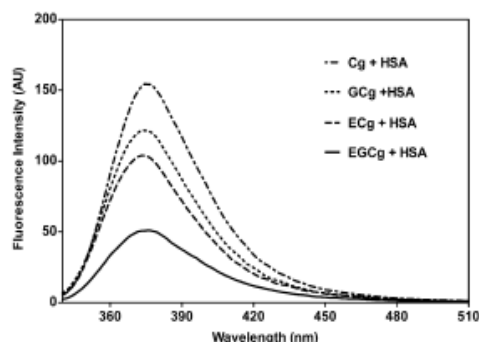


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of tested catechin gallate–HSA systems (pH 7.4, 37 °C). [HSA] = 4×10^{-5} M, [catechin gallate] = 4×10^{-5} M, and $\lambda_{\text{exc}} = 330$ nm.

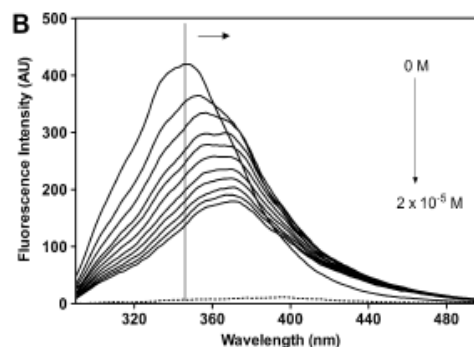
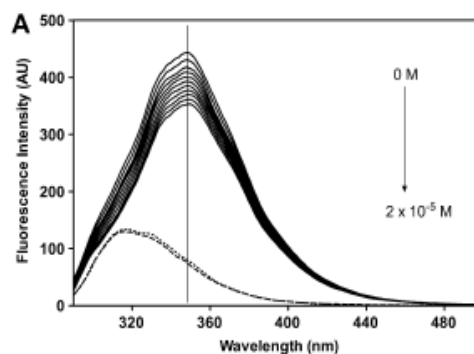


Fig. 4. Fluorescence quenching spectra of selected catechin–HSA systems (pH 7.4, 37 °C). (A) epicatechin–HSA system, epicatechin (2×10^{-5} M, dotted line), and catechin (2×10^{-5} M, dashed line). (B) epicatechin gallate–HSA system and epicatechin gallate (2×10^{-5} M, dotted line). [HSA] = 4×10^{-5} M, [EC] = [ECg] = $0-2 \times 10^{-5}$ M, and $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm.

of tested compounds (Fig. 4B). Emission maximum of HSA was shifted towards longer wavelength by 25 nm for both catechin gallate–HSA and epicatechin gallate–HSA system, and by 23 nm for gallocatechin gallate–HSA system as well as for epigallocatechin gallate–HSA system. No isosbestic points were noticed.

3.4. Fluorescence quenching mechanism of catechin–HSA systems

In order to clarify the fluorescence quenching mechanism induced by individual catechins, the fluorescence quenching data were analyzed using the Stern–Volmer equation [8].

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

In this equation, F_0 and F are the fluorescence intensities of HSA in the absence and presence of the quencher, respectively. $[Q]$ is the quencher concentration, K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant ($K_{SV} = K_q \times \tau_0$), K_q is the bimolecular quenching rate constant, and τ_0 is the lifetime of the fluorophore in the absence of the quencher (τ_0 is about 5×10^{-9} s [8]).

Fluorescence intensities were read at emission wavelength of 348 nm where the emission maximum of HSA was located. The Eq. (1) was applied to determine the bimolecular quenching rate constants (K_q) by linear regression of plots of F_0/F versus $[Q]$ (Fig. 5). Plots were linear in the range of concentration of $0-2 \times 10^{-5}$ M for all tested systems. The quenching rate constants are summarized in Table 1. The values of K_q for all tested systems are higher than the diffusion-limited rate constant of the biomolecule ($K_{diff} = 1.0 \times 10^{10} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) which confirmed that the static quenching

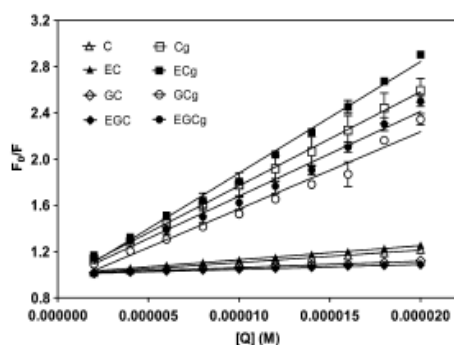


Fig. 5. Stern-Volmer plots of tested catechin-HSA systems (pH 7.4, 37 °C). [HSA] = 4×10^{-6} M, [catechin] = 0.2×10^{-5} M, $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, and $\lambda_{\text{em}} = 348$ nm. Correlation coefficients (R) were found in the range 0.992–0.999.

mechanism is the main reason of protein fluorescence quenching [8]. The highest value of K_q was determined for epicatechin gallate and further decreased in the order $\text{ECg} > \text{Cg} \geq \text{EGCg} \geq \text{GCg} \geq \text{EC} \geq \text{C} > \text{GC} > \text{EGC}$.

3.5. Determination of binding parameters of catechin-HSA systems

The apparent binding constants (K_b) and the number of binding sites (n) can be calculated using the following equation [19]:

$$\log(F_0 - F)/F = n \log K_b - n \log(1/([Q_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0)) \quad (2)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities before and after the addition of the quencher, $[Q_t]$ and $[P_t]$ are the total quencher concentration and the total protein concentration, respectively. The number of binding sites and binding constant can be obtained by plotting $\log(F_0 - F)/F$ versus $\log(1/([Q_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0))$.

Utilizing K_b , the free energy change (ΔG^0) value can be estimated from the following equation [28]:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b \quad (3)$$

The negative sign of ΔG^0 value confirms the spontaneity of binding.

The binding constants (K_b), binding sites (n), and free energy changes (ΔG^0) of all catechin-HSA systems have been determined according to the Eqs. (2) and (3), respectively. The obtained values are presented in Table 1 and the logarithmic plots for determination of binding parameters are displayed in Fig. 6. The binding affinity was the strongest for epicatechin gallate and decreased in the order $\text{ECg} \geq \text{Cg} > \text{EGCg} \geq \text{GCg} \geq \text{EC} \geq \text{C} > \text{GC} \geq \text{EGC}$. The non-galloylated catechins possessed significantly lower binding constants. The value of the number of binding sites (n) ranged from 0.87 to 1.10. Negative values of free energy changes (ΔG^0) for all

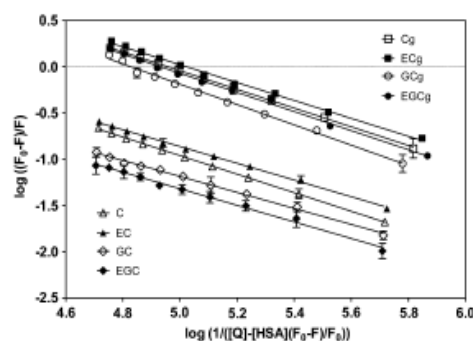


Fig. 6. Logarithmic plots of tested catechin-HSA systems (pH 7.4, 37 °C). [HSA] = 4×10^{-6} M, [catechin] = 0.2×10^{-5} M, $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, and $\lambda_{\text{em}} = 348$ nm. Correlation coefficients (R) were found in the range 0.993–0.999.

studied interactions indicate that the binding between HSA and individual catechins proceeds spontaneously.

3.6. The distances between the catechins and HSA

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a distance-dependent interaction in which is excitation energy transferred non-radiatively from the donor molecule (protein) to the acceptor molecule (drug). The efficiency of energy transfer can be used to evaluate the distance between the ligand and the tryptophan residues in the protein. According to Förster's non-radiative energy transfer theory [8,29], the efficiency of the energy transfer depends on: (a) the extent of overlap between the emission spectrum of the donor and the absorption spectrum of the acceptor, (b) the orientation of the transition dipole of the donor and the acceptor, and (c) the distance between the donor and the acceptor. The efficiency of energy transfer (E) between the donor and the acceptor is given by:

$$E = 1 - (F/F_0) = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) \quad (4)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities of HSA in the absence and presence of catechin, r_0 is the distance between donor and acceptor, and R_0 is the critical distance when the transfer efficiency is 50%. The value of R_0^6 can be calculated using the equation:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} k^2 N^4 \Phi J \quad (5)$$

where k^2 is the spatial orientation factor describing the relative orientation in space of the transition dipoles of the donor and the acceptor, N is the refractive index for the medium, Φ is the fluorescence quantum yield of the donor in the absence of the acceptor, and J is the overlap integral of the emission spectrum of the donor and acceptor absorption spectrum ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$). J is given by:

Table 1

The bimolecular quenching rate constants (K_q), binding constants (K_b), number of binding sites (n) and free energy change (ΔG^0) of tested catechin-HSA systems (pH 7.4, 37 °C).

Tested compound	K_q [$\times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	K_b [$\times 10^4 \text{ l mol}^{-1}$]	n	ΔG^0 [kJ mol $^{-1}$]
Catechin	2.15 ^c	1.10 ^b	1.00	-23.99 ^b
Epicatechin	2.44 ^c	1.12 ^b	0.91	-24.03 ^b
Gallic catechin	1.10 ^b	0.43 ^a	0.87	-21.54 ^a
Epigallocatechin	0.84 ^a	0.34 ^a	0.89	-20.93 ^a
Catechin gallate	16.25 ^{de}	9.21 ^{de}	1.01	-29.46 ^{de}
Epicatechin gallate	19.26 ^e	10.57 ^e	0.97	-29.82 ^e
Gallic catechin gallate	13.33 ^d	6.75 ^d	1.10	-28.66 ^c
Epigallocatechin gallate	14.65 ^d	7.79 ^d	1.03	-29.03 ^d

$K_q = K_{\text{SV}}/\tau_0$; $\tau_0 = 5 \times 10^{-9}$ s [8]. Correlation coefficients (R) were higher than 0.990. Standard deviations (mean value of three independent experiments) were lower than 10%. Data were analyzed by Student's t -test and groups with different letters are significantly different ($p < 0.01$). Differences in the number of binding sites were not statistically significant.

$$J = \frac{\int F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int F(\lambda)\lambda d\lambda} \quad (6)$$

where $F(\lambda)$ is the fluorescence intensity of the donor at wavelength λ , $\varepsilon(\lambda)$ is the molar absorption coefficient of the acceptor at wavelength λ to $\lambda + \Delta\lambda$ ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$).

The overlaps of the UV–Vis absorption spectra of individual catechins with the fluorescence spectrum of HSA occurred for all tested systems. There was noticed significant effect of the galloyl moiety on the extent of spectral overlapping. The galloylated catechins (Cg, ECg, GCg, and EGCg) caused much greater overlap integral than the non-galloylated catechins (C, EC, GC, and EGC) (Fig. 7). In the present case, $k^2 = 2/3$, $N = 1.336$, $\phi = 0.118$ [20], the values of J , E , R_0 , and r_0 for the tested systems have been determined according to the Eqs. (4)–(6). The obtained results are stated in Table 2. All binding distances (r_0) were much lower than 8 nm, and fulfilled the following condition $0.5R_0 < r_0 < 1.5R_0$, which indicates that non-radiation energy transfer from HSA to catechins occurred with high probability [27].

3.7. Effect of catechins on molecular charge of HSA

Native PAGE was used to investigate the changes in the molecular charge of HSA due to interactions with the catechins (Fig. 8). The results were expressed as increment in electrophoretic mobility of individual samples compared to the native protein (control). The changes in the HSA molecule were exerted as broadening of protein band as well as increased sample mobility towards anode, which indicated that the molecule of HSA became more anionic due to the interaction with catechin gallates (Cg, ECg, GCg, and

EGCg). On the other hand, the non-galloylated catechins (C, EC, GC, and EGC) caused no significant changes in electrophoretic mobility of HSA. The loss of positive charges in HSA molecule was in a good agreement with a number of hydroxyl groups and molecular weight of the galloylated catechins. Moreover, catechin gallates with the pyrogallol group on the B-ring (GCg and EGCg) showed more pronounced effect on mobility than catechin gallates with the catechol moiety (Cg and ECg). The electrophoretic mobility of tested systems decreased in the following order: EGCg (6.25%) > GCg (5.05%) > ECg (3.61%) > Cg (3.37%) \approx EC (3.13%) > C (1.53%) \geq GC (0.51%) \approx EGC (0.24%).

3.8. Protein cross-linking and aggregation

The ability of aggregation and cross-link formation of tested catechins was not proved by SDS-PAGE. No formation of high molecular weight protein adducts was observed.

4. Discussion

In the presented study, the relationships between the chemical structure of catechins and their binding affinities to HSA were studied in detail by spectroscopic and electrophoretic methods. The main attention was focused on the structural differences such as the presence and the absence of the galloyl moiety on the C-ring, the number of hydroxyl groups on the B-ring (pyrogallol- and catechol-type), and spatial arrangement (*cis*- and *trans*-structure). Flavonoids probably form reversible non-covalent complexes with the molecule of serum albumin mainly through hydrogen bonding of their hydroxyl groups with amino acid residues and hydrophobic interactions between their aromatic rings and amino acid residues in the protein chain [3,7]. The spatial orientation can also play an important role in protein–flavonoid association [3,17].

Obtained results confirmed importance of the galloyl moiety on the C-ring in the binding affinity of catechins to HSA due to a presence of additional aromatic ring with three hydroxyl groups. The effect of this structural feature was clearly underlined by all applied methods. Also data found in literature support these findings, e.g. Ishii et al. [17] who studied binding affinities of catechins to the serum albumin with respect to their structural features using high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column.

Considerable changes in UV–Vis absorption spectra of HSA upon interaction with catechin gallates (Cg, ECg, GCg, and EGCg) supported the idea of the complex formation. Moreover, all these complexes were emissive at excitation wavelength which is equal to the wavelength of the newly appeared absorption maxima. Catechins lacking the galloyl moiety in their structure (C, EC, GC, and EGC) caused only negligible alterations in the protein molecule. Longer time of interaction between HSA and tested compounds in phosphate buffer (pH 7.4) than 30 min proved to be inadequate due to a non-stability of studied catechins which is consistent with literature [30–32]. On the other hand, catechins can cause protein carbonyl formation in HSA via their pro-oxidant action [14] and protection of (–)-epigallocatechin gallate by the thiol groups of HSA which act as an antioxidant, against oxidation under aerobic conditions has been described [33]. The similar effect may be expected also for other flavonoids.

All catechin gallates caused more pronounced decrease in the tryptophan fluorescence than other catechins (Table 1). Furthermore, remarkable red shifts in their fluorescence quenching spectra were observed (Fig. 4B). Generally, red shift in the emission maximum of a tryptophan residue, which is located in a hydrophobic pocket, indicates changes in its microenvironment, i.e. a polypeptide strand of a protein molecule is more extended and the

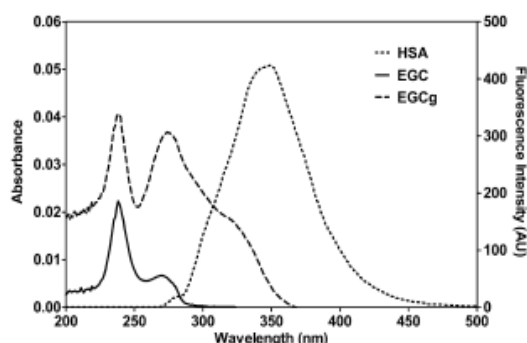


Fig. 7. Spectral overlaps between the fluorescence emission spectrum of HSA and the absorption spectra of selected catechins (pH 7.4, 37°C). [HSA] = [EGCg] = [EGCg] = $4 \times 10^{-6} \text{ M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$.

Table 2

The overlap integral (J), efficiency of energy transfer (E), critical distance (R_0), and distance between donor (HSA) and acceptor (catechin) (r_0) (pH 7.4, 37°C).

Tested compound	$J [\times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}]$	E	$R_0 [\text{nm}]$	$r_0 [\text{nm}]$
Catechin	0.40 ^f	0.18 ^b	0.98 ^{bc}	1.26 ^a
Epicatechin	0.44 ^{bc}	0.20 ^f	0.99 ^f	1.25 ^a
Galocatechin	0.16 ^{ab}	0.11 ^a	0.84 ^{ab}	1.19 ^a
Epigallocatechin	0.12 ^a	0.08 ^a	0.80 ^a	1.20 ^a
Catechin gallate	26.04 ^{de}	0.61 ^{de}	1.96 ^d	1.82 ^b
Epicatechin gallate	28.15 ^e	0.66 ^e	1.98 ^d	1.78 ^b
Galocatechin gallate	25.80 ^{de}	0.57 ^d	1.96 ^d	1.85 ^b
Epigallocatechin gallate	22.00 ^d	0.60 ^d	1.91 ^d	1.78 ^b

Standard deviations (mean value of three independent experiments) were lower than 10%. Data were analyzed by Student's *t*-test and groups with different letters are significantly different ($p < 0.01$).

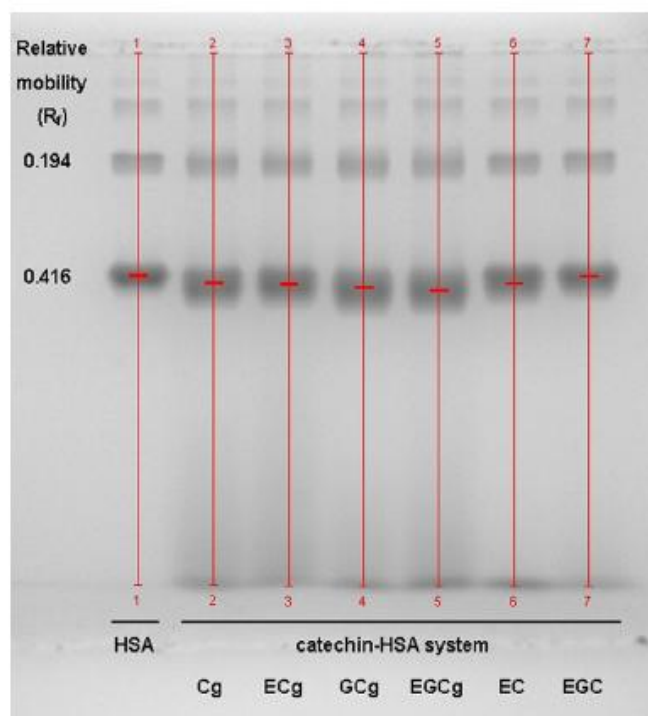


Fig. 8. Effect of selected catechins on a molecular charge of HSA. [HSA] = 15×10^{-6} M, [catechin] = 6×10^{-4} M. Samples were incubated for 30 min at 37 °C. Electrophoretic mobilities were expressed as a rise in percentage mobility compared to the native protein (control).

hydrophobicity around this tryptophan residue is decreased [34]. These data suggest that Trp-214, which is the only one tryptophan residue in the HSA molecule, has been brought to a more hydrophilic environment and the protein secondary structure has been changed. No shifts in the emission maximum of HSA were observed after gradual additions of the non-galloylated catechins. Maiti et al. [18] also reported the red shift in the fluorescence quenching spectra of (–)-epigallocatechin gallate-HSA system. By contrast, no shifts in the emission spectra of bovine serum albumin after titration with increasing amounts of (+)-catechin, (–)-epicatechin, and (–)-epicatechin gallate were noticed [2,24].

The bimolecular quenching constant (K_q) reflects an efficiency of quenching or an accessibility of the fluorophores to a quencher. One of the criterions for determination of a static quenching mechanism is that the value of K_q is higher than the value of a diffusion-limited rate constant of a biomolecule ($K_{diff} = 1.0 \times 10^{10}$ l mol⁻¹ s⁻¹) [8]. Considering the values of K_q were higher than that of K_{diff} for all tested systems, the static quenching mechanism is likely the main reason of protein fluorescence quenching by catechins in the range of concentrations $0\text{--}2 \times 10^{-5}$ M. The importance of the presence of the galloyl moiety on the C-ring was evident because quenching constants for all catechin gallates (Cg, ECg, GCg, and EGCg) were significantly higher than those of catechins lacking the galloyl group (C, EC, GC, and EGC). Catechin gallates with 2,3-*cis* structure (ECg and EGCg) possessed greater K_q values than catechin gallates with 2,3-*trans*-structure (Cg and GCg). Catechins with the catechol group on the B-ring (C, EC, ECg, and Cg) showed more pronounced quenching effect than their analogs with pyrogallol group (GC, EGC, EGCg, and GCg).

In general, a binding constant K_b reflects the power of ligand-protein association and thus can be used for comparison of the

binding affinities of structurally-related ligands to a protein molecule connected with the alterations in its secondary structure. Number of binding sites (n) and free energy change (ΔG°) are other important parameters that contribute to better understanding of ligand-protein interactions [19].

The hydrophobicity, presence or absence of some functional group, steric hindrance, and spatial arrangement seem to be key factors in the affinity of natural polyphenols towards plasmatic proteins [3]. The galloylated catechins (Cg, ECg, GCg, and EGCg) showed significantly higher binding ability than the non-galloylated catechins (C, EC, GC, and EGC), which is in agreement with earlier reports [17]. It also emphasizes the significance of the galloyl group on the C-ring due to the presence of additional aromatic ring and three hydroxyl groups, which can establish hydrophobic interactions and hydrogen bonds, respectively. In addition, catechol-type catechins (ECg \geq Cg $>$ EC \geq C) possessed stronger binding affinity than pyrogallol-type catechins (EGCg $>$ GCg $>$ GC $>$ EGC), which suggests that the insertion of an additional hydroxyl group at the 5-position on the B-ring does not contribute to their binding affinities as was described in literature [17]. The effect of the spatial arrangement of catechins (i.e. *cis*- and *trans*-structure) on binding to HSA was not explicit. Ishii et al. [17] observed that the *trans*-type catechins (C, GC, Cg, and GCg) had rather higher binding abilities than their epimers (EC, EGC, ECg, and EGCg). In this study, the opposite effect was observed in the case of the galloylated catechins. Diniz et al. [3] found out using capillary electrophoresis that (–)-epicatechin showed no affinity towards HSA ($K_b = 2.2 \times 10^3$ M⁻¹ and $n = 1$), which the authors attributed to the spatial arrangement of tested catechins. Ishii et al. [17] noticed negligible differences in binding affinities among (+)-catechin, (–)-catechin, and (–)-epicatechin obtained by affinity

HPLC on immobilized HSA column. The latter results well correspond with our data where insignificant difference between binding constants of (–)-catechin and (–)-epicatechin was observed. One of the most studied flavan-3-ols is (–)-epigallocatechin gallate and the results obtained by Maiti et al. [18] for the system EGCG–HSA are in good agreement with our data although the experimental conditions were slightly different. Binding of (–)-epigallocatechin gallate to serum albumins was studied in detail also by circular dichroism [25].

Further factor which could contribute to binding affinity of tested catechins to HSA is deprotonation of hydroxyl groups in their molecules. It is supposed that the catechins lacking the galloyl moiety (C, EC, GC, and EGC) are fully protonated at the tested pH (i.e. pH 7.4) because their first dissociation constants reach higher values (about pH 9) [35,36]. On the other hand, catechins with the galloyl moiety in C-ring (Cg, ECg, GCg, and EGCg) have the first dissociation constants near pH 7.4 [36], thus partial deprotonation can play role in increase of their binding affinity to HSA.

Number of binding sites determined for catechin–HSA systems ranged from 0.87 to 1.10 suggesting that one molecule of HSA associated with one molecule of catechin in the drug to protein ratio up to 5:1. The spontaneity of HSA–catechin interactions was confirmed by the negative values of ΔG° . These findings are supported by the previous reports [18].

The efficiency of an energy transfer has been used to detect the distance between catechins and Trp-214 in the molecule of HSA. The galloyl moiety in the C-ring proved to have significant effect on the extent of spectral overlapping. The overlap integrals of catechin gallate–HSA systems were much greater than those of catechin–HSA systems (Table 2). The obtained binding distances for all tested systems confirmed that non-radiation energy transfer from HSA to catechins occurred with high probability [27,28].

Catechin gallates (Cg, ECg, GCg, and EGCg) caused an increase in the electrophoretic mobility of HSA on native PAGE gels, which was dependent on increasing molecular weight of given compound. These changes are connected with the change of HSA molecular charge which became more anionic upon the interaction with catechin gallates. Moreover, catechin gallates with *cis*-structure (ECg and EGCg) caused more pronounced changes in the molecule of HSA than those with *trans*-structure (Cg and GCg). Nevertheless, no changes in the molecular weight of HSA were observed for any catechin–HSA system on SDS–PAGE gels.

5. Conclusions

In this paper, the interactions between catechins and HSA were investigated by fluorescence spectroscopy, UV–Vis absorption spectroscopy, and electrophoretic methods (native PAGE and SDS–PAGE). All tested catechins quenched tryptophan fluorescence of HSA in the studied range of concentrations mainly by static quenching mechanism and thus the non-fluorescent catechin–HSA complexes were formed. The complex formation for the galloylated catechins and HSA was confirmed also by UV–Vis absorption spectroscopy. All catechins bound spontaneously to the molecule of HSA with different binding affinity. The most important structural features of the tested catechins contributing to HSA binding were the galloyl group on the C-ring, followed by the number of hydroxyl groups on the B-ring, and the spatial arrangement (*cis*- and *trans*-structure). The number of binding sites was roughly one for all systems suggesting that one molecule of HSA associated with one molecule of catechin. All catechin–HSA

interactions were spontaneous processes based on the free energy changes. Non-radiation energy transfer from HSA to all tested catechins occurred. The galloylated catechins increased the electrophoretic mobility of HSA while the ability of aggregation and cross-linking of all tested catechins was not proved. The presented study contributes to the current knowledge in the area of protein–ligand binding, particularly catechin–HSA interactions.

Acknowledgements

The presented study was supported by the Grant SVV-2010-261-003, the Specific research 2009 of the University of Hradec Králové, and the Development program of Czech Ministry of Education No. 14/87/2009.

References

- J. Tian, J. Liu, X. Tian, Z. Hu, X. Chen, J. Mol. Struct. 691 (2004) 197.
- A. Papadopoulou, R.J. Green, R.A. Prazier, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 158.
- A. Diniz, L. Escuder-Gilbert, N.P. Lopes, R.M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 625.
- X. Shi, X. Li, M. Gui, H. Zhou, R. Yang, H. Zhang, Y. Jin, J. Lumin. 130 (2010) 637.
- T. Peters, All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego (CA), 1996 (Chapters 2 and 3).
- D.C. Carter, J.X. Ho, Adv. Protein Chem. 45 (1994) 153.
- M. Otágeri, Drug Metab. Pharmacokinet. 20 (5) (2005) 309.
- J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999 (Chapters 8 and 13).
- Z. Dúřáková, S. Knasmüller, The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy, Slovak Academic Press, Bratislava, 2007.
- P. Velayutham, A. Babu, D. Liu, Curr. Med. Chem. 15 (18) (2008) 1840.
- C. Cabrera, R. Artacho, R. Giménez, J. Am. Coll. Nutr. 25 (2) (2006) 79.
- M. Kaku, K. Nakagawa, J. Health Sci. 55 (3) (2009) 441.
- T.L. Weir, H.P. Bais, J.M. Vivanco, J. Chem. Ecol. 29 (11) (2003) 2397.
- T. Ishii, T. Mori, T. Ichikawa, M. Kaku, K. Kusaka, Y. Uekusa, M. Akagawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, T. Nakayama, Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 4892.
- C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Trends Plant Sci. 2 (4) (1997) 152.
- P.-G. Bietta, J. Nat. Prod. 63 (7) (2000) 1035.
- T. Ishii, K. Minoda, M.-J. Bae, T. Mori, Y. Uekusa, T. Ichikawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, T. Nakayama, Mol. Nutr. Food Res. 54 (6) (2010) 816.
- T.K. Maiti, K.S. Ghosh, S. Dasgupta, Proteins 64 (2006) 355.
- S. Bi, L. Ding, Y. Tian, D. Song, X. Zhou, X. Liu, H. Zhang, J. Mol. Struct. 703 (2004) 37.
- W. He, Y. Li, C. Xue, Z. Hu, X. Chen, F. Sheng, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 1837.
- J.-L. Yuan, Z. Lv, Z.-G. Liu, Z. Hu, G.-L. Zou, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 191 (2007) 104.
- J. Tian, J. Liu, Z. Hu, X. Chen, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 4124.
- J. Xiao, M. Suzuki, X. Jiang, X. Chen, K. Yamamoto, F. Ren, M. Xu, J. Agric. Food Chem. 56 (2005) 2350.
- S. Soares, N. Mateus, V. de Freitas, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 6726.
- A. Nozak, M. Hori, T. Kimura, H. Ito, T. Hatano, Chem. Pharm. Bull. 57 (2) (2009) 224.
- R.A. Frazier, A. Papadopoulou, R.J. Green, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1602.
- X. Guo, L. Zhang, X. Sun, X. Han, C. Guo, P. Kang, J. Mol. Struct. 928 (2009) 114.
- H.M. Rawel, S.K. Frey, K. Meidner, J. Kroll, F.J. Schweigert, Mol. Nutr. Food Res. 50 (2006) 705.
- T. Förster, O. Sinanoglu (Eds.), Modern Quantum Chemistry, vol. 3, Academic Press, New York, 1966, p. 93.
- M. Mochizuki, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, Biochim. Biophys. Acta 1569 (2002) 35.
- S. Sang, M.-J. Lee, Z. Hou, C.-T. Ho, C.S. Yang, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 9478.
- V. Roginsky, A.E. Alegria, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4529.
- M.-J. Bae, T. Ishii, K. Minoda, Y. Kawada, T. Ichikawa, T. Mori, M. Kamihira, T. Nakayama, Mol. Nutr. Food Res. 53 (2009) 709.
- M.-X. Xie, M. Long, Y. Liu, Ch. Qin, Y.-D. Wang, Biochim. Biophys. Acta 1760 (2006) 1184.
- J.M. Herrero-Martínez, M. Sanmartín, M. Rosés, E. Bosch, C. Ráfols, Electrophoresis 26 (2005) 1886.
- M. Muzolf, H. Szymusiak, A. Głiszczyńska-Świąto, I.M.C.M. Rietjens, B. Tyrakowska, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 816.