

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**MODIFIKACE GLUTATHION-S-TRANSFERASY
VYBRANÝMI GLYKAČNÍMI ČINIDLY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové 2012

Zuzana Průchová

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.

.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za odborné vedení, za její cenné rady, trpělivost a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. za převzetí úlohy školitele v souvislosti s odchodem Dr. Boušové na mateřskou dovolenou.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Zuzana Průchová

Školitel: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Název diplomové práce: Modifikace glutathion-S-transferasy vybranými glykačními činidly

Glykace je neenzymová reakce, při které dochází k vazbě karbonylových sloučenin na volné aminoskupiny aminokyselin, peptidů, proteinů či jiných biomolekul. Tento proces je úzce spjat s poškozením funkce proteinů během diabetu mellitu, v průběhu stárnutí a při neurodegenerativních onemocněních. Hlavním předmětem této diplomové práce bylo sledování vlivu několika glykačních činidel na vlastnosti enzymu glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18), která hraje klíčovou roli při detoxifikaci řady exogenních i endogenních sloučenin. Zvolenými modelovými glykačními činidly byly methylglyoxal (0,5–2 mM), glycerinaldehyd (0,5–10 mM), glukosa (50 mM) a fruktosa (50 mM). Průběh proteinové glykace byl hodnocen pomocí následujících metod: stanovení katalytické aktivity GST, stanovení obsahu primárních aminoskupin, hodnocení tvorby AGEs za použití fluorescence a Western blottingu, vznik vysokomolekulárních cross-linků a agregátů pomocí denaturující polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE), změny v náboji molekuly GST metodou nativní PAGE. V průběhu měření se ukázalo, že nejsilnější glykační potenciál mají methylglyoxal a glycerinaldehyd, naproti tomu glukosa a fruktosa modifikovaly GST pouze minimálně. Glykace probíhající v přítomnosti methylglyoxalu 2 mM vedla ke zřetelnému poklesu aktivity GST (o 27,6 % po 180 min inkubace při 37°C), ke ztrátě 14 primárních aminoskupin, což vedlo ke změně mobility molekuly GST během nativní PAGE. Dále došlo k tvorbě vysokomolekulárních cross-linků s molekulovou hmotností v rozmezí 50–200 kDa. Naproti tomu glykace v přítomnosti glycerinaldehydu 10 mM vedla k nižšímu poklesu enzymové aktivity (o 10,9 % po 180 min inkubace při 37°C), ale ke ztrátě 26 primárních aminoskupin. V průběhu glykace glycerinaldehydem vznikly cross-linky s molekulovou hmotností v rozmezí 65–100 kDa.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Zuzana Průchová

Supervisor: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Title of diploma thesis: Modification of Glutathione S-transferase by selected glycating agents

Glycation is a non-enzymatic reaction, which leads to the binding of carbonyl compounds to free amino groups of amino acids, peptides, proteins or other biomolecules. This process is closely related to impaired protein function in diabetes mellitus, during aging, and in neurodegenerative diseases. The main purpose of this thesis was to monitor the impact of several glycating agents on the properties of the enzyme glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) which plays a key role in the detoxification of many exogenous as well as endogenous compounds. Methylglyoxal (0.5–2 mM), glyceraldehyde (0.5–10 mM), glucose (50 mM), and fructose (50 mM) were selected as glycating agents. The course of protein glycation was evaluated by following methods: GST catalytic activity assessment, determination of primary amino groups, assessment of AGEs formation using fluorescence and Western blotting, generation of high molecular cross-links and aggregates by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), changes in GST molecular charge by native PAGE. Methylglyoxal and glyceraldehyde exerted the strongest glycation potential, whereas glucose and fructose modified GST only minimally. Glycation in the presence of methylglyoxal 2 mM led to a noticeable decline in GST activity (by 27.6% after 180-min incubation at 37°C), a loss of 14 primary amino groups, which led to a change in mobility of GST molecule during native PAGE. Furthermore, formation of high molecular cross-links with molecular weight ranging from 50 to 200 kDa occurred. In contrast, glycation in the presence of glyceraldehyde 10 mM resulted in minor decrease in enzyme activity (by 10.9% after 180-min incubation at 37°C), but to a loss of 26 primary amino groups. Cross-links with molecular weight ranging from 65 to 100 kDa were formed during glycation by glyceraldehyde.

OBSAH

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 4 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY | 5 |
| 2.1 | Diabetes mellitus | 5 |
| 2.2 | Neenzymová glykace proteinů | 6 |
| 2.3 | Koncové produkty pokročilé glykace (AGEs) | 8 |
| 2.4 | Možnosti terapeutického zásahu | 9 |
| 2.4.1 | Inhibice tvorby AGE cross-linků | 10 |
| 2.4.2 | Štěpení již vytvořených AGE cross-linků | 10 |
| 2.4.3 | Inhibice receptorů pro AGEs | 11 |
| 2.5 | Glykační činidla | 11 |
| 2.5.1 | Glukosa a fruktosa | 11 |
| 2.5.2 | Methylglyoxal | 12 |
| 2.5.3 | Glyceraldehyd | 13 |
| 2.6 | Metody používané ke stanovení glykačních produktů | 14 |
| 2.6.1 | Fluorescence | 15 |
| 2.6.2 | Elektroforesa | 16 |
| 2.6.2.1 | <i>Obecný princip</i> | 16 |
| 2.6.2.2 | <i>Gelová elektroforesa</i> | 16 |
| 2.6.2.3 | <i>Typy elektroforesy</i> | 18 |
| 2.6.2.4 | <i>Barvení gelů</i> | 19 |
| 2.6.3 | Western blotting..... | 19 |
| 2.6.3.1 | <i>PAGE a transfer proteinů na membránu</i> | 19 |
| 2.6.3.2 | <i>Pufry</i> | 20 |
| 2.6.3.3 | <i>Blokování</i> | 21 |
| 2.6.3.4 | <i>Primární a sekundární protilátky</i> | 21 |
| 2.6.3.5 | <i>Detekce</i> | 22 |
| 2.6.4 | Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF | 23 |
| 2.6.5 | Cirkulární dichroismus | 24 |
| 2.6.5.1 | <i>Stanovení sekundární struktury proteinů pomocí CD</i> | 25 |
| 2.7 | Glutathion-S-transferasa | 26 |
| 2.7.1 | Glutathion-S-transferasa ze <i>Schistosoma japonicum</i> | 27 |
| 3 | CÍLE PRÁCE | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | MATERIÁL A METODIKA | 30 |
| 4.1 | Použitý materiál | 30 |
| 4.2 | Příprava základních roztoků a reagensů | 31 |
| 4.2.1 | Fosfátový pufr (PBS, phosphate buffered saline) | 31 |
| 4.2.2 | Enzym..... | 31 |
| 4.2.3 | Roztok methylglyoxalu | 31 |
| 4.2.4 | Roztok glycerinaldehydu..... | 31 |
| 4.2.5 | Roztok fruktosy..... | 31 |
| 4.2.6 | Roztok glukosy | 32 |
| 4.3 | Příprava inkubačních směsí..... | 32 |
| 4.3.1 | Inkubační směsi s MGO, glukosou a fruktosou..... | 32 |
| 4.3.2 | Inkubační směsi s glycerinaldehydem..... | 33 |
| 4.4 | Stanovení katalytické aktivity GST | 34 |
| 4.4.1 | Princip stanovení..... | 34 |
| 4.4.2 | Roztoky pro stanovení aktivity GST..... | 35 |
| 4.4.3 | Vlastní průběh stanovení aktivity GST | 35 |
| 4.5 | Stanovení primárních aminoskupin | 36 |
| 4.5.1 | Princip stanovení..... | 36 |
| 4.5.2 | Roztoky pro stanovení primárních aminoskupin | 37 |
| 4.5.3 | Vlastní průběh stanovení primárních aminoskupin | 37 |
| 4.6 | Měření fluorescence | 38 |
| 4.7 | Elektroforesa a imunoblotting..... | 39 |
| 4.7.1 | SDS-PAGE | 39 |
| 4.7.1.1 | <i>Roztoky pro SDS-PAGE</i> | <i>39</i> |
| 4.7.1.2 | <i>Příprava gelů pro SDS-PAGE.....</i> | <i>40</i> |
| 4.7.1.3 | <i>Průběh SDS-PAGE</i> | <i>42</i> |
| 4.7.2 | Nativní PAGE | 42 |
| 4.7.2.1 | <i>Roztoky pro nativní PAGE.....</i> | <i>42</i> |
| 4.7.2.2 | <i>Příprava gelů pro nativní PAGE</i> | <i>43</i> |
| 4.7.2.3 | <i>Průběh nativní PAGE.....</i> | <i>44</i> |
| 4.7.3 | Barvení gelů po SDS-PAGE a nativní PAGE | 44 |
| 4.7.3.1 | <i>Barvení pomocí Coomassie Blue G250.....</i> | <i>44</i> |
| 4.7.3.2 | <i>Barvení stříbrem (Silver staining).....</i> | <i>44</i> |
| 4.7.3.3 | <i>Aktivitní barvení na glutathion-S-transferasu</i> | <i>46</i> |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.7.4 | Western blotting..... | 47 |
| 4.7.4.1 | <i>Roztoky pro imunoblotting.....</i> | 47 |
| 4.7.4.2 | <i>Vlastní provedení blottingu.....</i> | 48 |
| 4.7.4.3 | <i>Inkubace s primární a sekundární protilátkou.....</i> | 48 |
| 4.7.4.4 | <i>Chemiluminiscenční detekce.....</i> | 49 |
| 4.8 | Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF..... | 49 |
| 4.9 | Spektra cirkulárního dichroismu | 49 |
| 5 | VÝSLEDKY..... | 50 |
| 5.1 | Vliv methylglyoxalu, fruktosy a glukosy na strukturu a funkci glutathion-S-transferasy | 50 |
| 5.1.1 | Katalytická aktivita vzorků s MGO, glukosou a fruktosou..... | 50 |
| 5.1.2 | Stanovení aminoskupin vzorků s MGO, glukosou a fruktosou..... | 52 |
| 5.1.3 | Měření fluorescence vzorků s MGO, glukosou a fruktosou..... | 54 |
| 5.1.4 | SDS-PAGE a WB vzorků s MGO, glukosou a fruktosou..... | 59 |
| 5.1.5 | Nativní PAGE vzorků s MGO, glukosou a fruktosou..... | 63 |
| 5.1.6 | Hmotnostní spektroskopie MALDI-TOF | 66 |
| 5.1.7 | Cirkulární dichroismus s MGO, glukosou a fruktosou | 69 |
| 5.1.8 | Korelace získaných výsledků | 71 |
| 5.2 | Vliv glycerinaldehydu na strukturu a funkci glutathion-S-transferasy | 75 |
| 5.2.1 | Stanovení aktivity vzorků s GA..... | 75 |
| 5.2.2 | Stanovení aminoskupin vzorků s GA..... | 77 |
| 5.2.3 | Měření fluorescence vzorků s GA | 79 |
| 5.2.4 | SDS-PAGE a WB vzorků s GA..... | 82 |
| 5.2.5 | Nativní PAGE vzorků s GA | 85 |
| 5.2.6 | Korelace získaných výsledků | 88 |
| 6 | DISKUZE..... | 92 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 98 |
| 8 | SEZNAM ZKRATEK | 100 |
| 9 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 103 |
| 10 | PŘÍLOHA | 113 |

1 ÚVOD

Tato diplomová práce s názvem Modifikace glutathion-S-transferasy vybranými glykačními činidly vznikla pod odborným vedením PharmDr. Ivy Boušové, Ph.D. na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. V souvislosti s odchodem Dr. Boušové na mateřskou dovolenou převzal následně úlohu školitele prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc. Výzkumná skupina prof. Dršaty a Dr. Boušové již řadu let zabývá problematikou glykace bílkovin *in vitro* a možností jejího ovlivnění pomocí sloučenin s antioxidačními vlastnostmi. Problematice glykace proteinů se nyní věnuje značná pozornost s ohledem na současné poznatky o mechanismech vzniku a rozvoje diabetu mellitu či průběhu stárnutí. Svou prací navazují na celou řadu již obhájených diplomových prací, které byly vypracovány na této katedře či v rámci programu Erasmus na Univerzitě Paris 7 - Denis Diderot, a také na několik vědeckých publikací vypracovaných skupinou prof. Dršaty.

Problematika neenzymové glykace je vysoce aktuální s ohledem na stále stoupající výskyt diabetu, prodlužování věku populace ve vyspělých zemích a nezdravý životní styl. Za posledních dvacet let se v ČR počet nemocných diabetem zdvojnásobil a ročně přibývá 25 tisíc nově registrovaných diabetiků. V ČR tvoří registrovaní diabetici asi 7 % populace. Výskyt diabetu stoupá s věkem a v populaci lidí starších šedesáti let je prevalence tohoto onemocnění 21 %. Toto chronické onemocnění, které vzniká v důsledku absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu vedoucího k poruše metabolismu, je charakterizováno hyperglykemií. Dochází při něm k reakci redukcí cukrů s aminoskupinami bílkovin za vzniku koncových produktů pokročilé glykace, které se podílejí na rozvoji pozdních komplikací diabetu (retinopatie, nefropatie, neuropatie).

V průběhu prováděných experimentů jsem se snažila zjistit, k jakým změnám v molekule enzymu glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18) dojde během inkubace s různými glykačními činidly. Mezi vybraná glykační činidla patřily methylglyoxal, glyceraldehyd, glukosa a fruktosa. Proces glykace jsem sledovala pomocí stanovení katalytické aktivity GST, stanovení primárních aminoskupin, měření fluorescence, nativní (nedenaturující) elektroforesy, denaturující (SDS) elektroforesy i s následným Western blottingem, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a měření spekter cirkulárního dichroismu.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je časté endokrinní chronické onemocnění charakterizované hyperglykemií, která hraje důležitou roli v patogenezi diabetických komplikací zvýšením glykace proteinů a postupným vznikem koncových produktů pokročilé glykace (AGEs) v tělesných tkáních (Ahmed 2005). Diabetické vaskulární komplikace jsou hlavními příčinami konečného stádia selhání ledvin, retinopatie, čtených neuropatií a kardiovaskulárních onemocnění a mohou být příčinou invalidity a vysoké úmrtnosti pacientů s DM I. a II. typu (Takeuchi a kol. 2010).

Diabetes mellitus I. typu

DM I. typu (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM, dříve tzv. juvenilní diabetes) je charakterizován absolutním nedostatkem inzulínu, pacient je odkázán na jeho podávání. Příčinou je léze β -buněk Langerhansových ostrůvků, obvykle vyvolaná autoimunitním onemocněním. U nemocných lze prokázat autoprotilátky proti tkáni ostrůvků (islet cell antibodies, ICA) a proti inzulínu (insulin autoantibodies, IAA) (Silbernagl a Lang 2001). Dále je tento typ diabetu spojován s genetickými předpoklady (spojitost s určitými charakteristikami HLA systému) a s faktory zevního prostředí, které slouží jako spouštěcí mechanismy autoimunitního procesu (infekční virová onemocnění, chemické a toxické látky) (Mačák a Mačáková 2004).

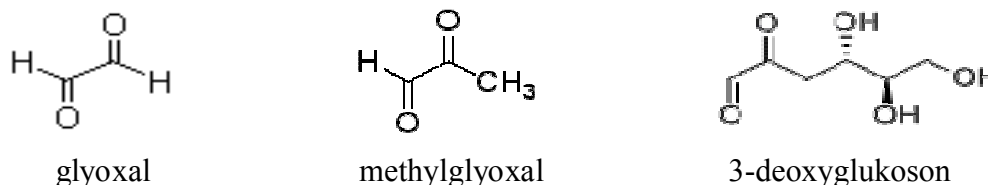
Diabetes mellitus II. typu

DM II. typu (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM, dříve tzv. stařecký diabetes) představuje daleko častější formu tohoto onemocnění. Jde o relativní nedostatek inzulínu a pacienti nejsou nutně odkázáni na jeho exogenní přívod. Sekrece inzulínu může být normální nebo dokonce větší, avšak cílové orgány vykazují vůči inzulínu sníženou citlivost. Pacienti s DM II. typu mají většinou nadváhu, která je následkem genetické dispozice, bohaté konzumace potravin a nedostatečné pohybové aktivity. Nevhodný poměr mezi přísunem energie a její spotřebou zvyšuje koncentraci mastných kyselin v krvi, což zase snižuje využití glukosy ve svalové a tukové tkáni. Důsledkem je inzulínová rezistence, která vede k vyššímu výdeji inzulínu. Následnou down-regulací receptorů se rezistence dále zvyšuje. Mnohem více však podmiňuje sníženou citlivost na inzulín genetická dispozice (Silbernagl a Lang 2001).

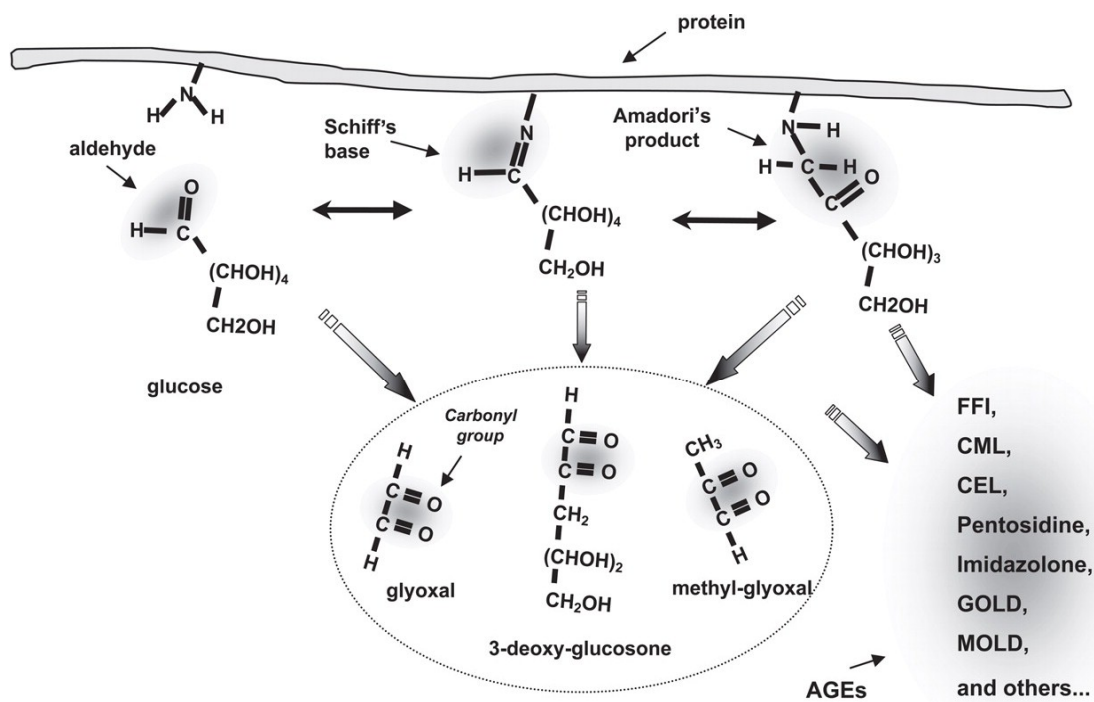
2.2 Neenzymová glykace proteinů

Vazba karbonylových sloučenin včetně redukujících cukrů na volné aminoskupiny biomolekul bez katalytického působení enzymů se nazývá glykace. Tato reakce byla poprvé popsána Louisem Camillem Maillardem (1912), který pozoroval hnědnutí bílkovin při zahřívání s cukry, a stala se tak známou pod názvem Maillardova reakce. Maillardova reakce ovlivňuje nejen rozvoj diabetických komplikací, jako jsou retinopatie, neuropatie a nefropatie, ale také vývoj s věkem souvisejících onemocnění, mezi které patří např. zánět, aterosklerosa, neurodegenerativní choroby, chronické renální selhání nebo nádorová onemocnění (Obšil a Pavlíček 1997, Schalkwijk a kol. 2004).

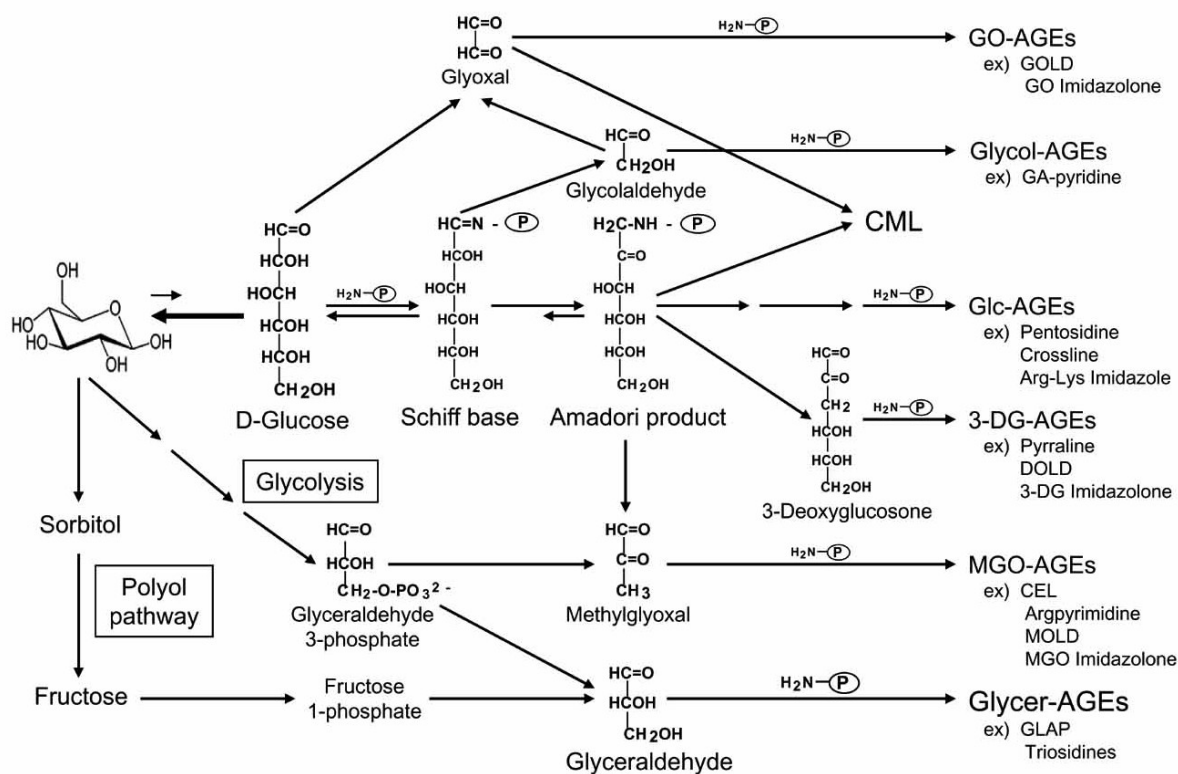
Neenzymová glykace je zahájena tvorbou kovalentní vazby mezi aldehydickou nebo ketonickou skupinou redukujících cukrů a volné aminoskupiny proteinů, lipidů či nukleových kyselin za vzniku labilní Schiffovy báze. Tyto Schiffovy báze podléhají přeskupení na stabilnější ketoaminy, které se nazývají Amadoriho produkty. Ty se pak mohou rozkládat na řadu vysoce reaktivních karbonylových sloučenin, mezi které patří např. 3-deoxyglukoson (3-DG), glyoxal (GO) a methylglyoxal (MGO). Také Schiffovy báze jsou potenciálním zdrojem reaktivních karbonylových sloučenin, protože mohou být rozštěpeny na MGO a GO. Tyto karbonylové sloučeniny známé jako α -dikarboxyly či α -oxoaldehydy (Obr. 1) opět reagují s volnými aminoskupinami za tvorby intermediárních produktů glykace. Akumulace α -dikarboxylových sloučenin se označuje jako karbonylový stres. Časné a intermediární glykační produkty podléhají řadě dalších chemických reakcí, na jejichž konci vznikají ireverzibilní koncové produkty pokročilé glykace, neboli AGEs (Obr. 2 a Obr. 3) (Basta a kol. 2004, Boušová 2006, Mulac 2005).



Obr. 1. Struktura α -dikarboxylových sloučenin.



Obr. 2. Možné cesty vzniku pozdních produktů glykace (AGEs) (Basta a kol. 2004).



Obr. 3. Alternativní cesty vzniku AGE produktů *in vivo* (Takeuchi a kol. 2011)

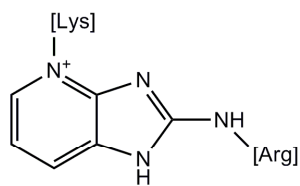
2.3 Koncové produkty pokročilé glykace (AGEs)

Koncové produkty pokročilé glykace (advanced glycation end products, AGEs) jsou formovány v pozdním stupni glykace v průběhu několika týdnů, a proto jsou postiženy především proteiny s dlouhou životností (např. kolagen a krystaliny oční čočky). Jsou reprezentovány heterogenní skupinou sloučenin vznikajících z odlišných prekurzorů. Chemická struktura všech AGEs nebyla dosud zcela popsána. Tyto sloučeniny jsou charakterizovány mnohokrát vyšší molekulovou hmotností než proteiny, ze kterých vznikly, dále žlutohnědou pigmentací, typickým fluorescenčním spektrem ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 370 nm/440 nm), schopností zesíťení (cross-linking) a modifikací biologických struktur (Boušová 2006, Kalousová a kol. 2006).

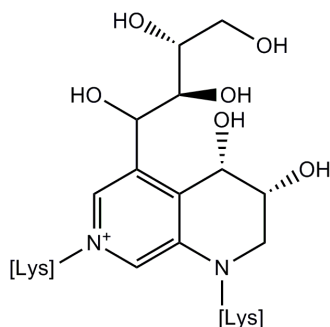
AGEs interagují se specifickými receptory, mezi které patří makrofágový scavengerový receptor typu I a II, receptor pro AGE zvaný RAGE, oligosacharyl transferasa-48 (AGE-R1), 80K-H fosfoprotein (AGE-R2) a galektin-3 (AGE-R3). Tyto receptory se nacházejí na povrchu široké škály buněk včetně monocytů, makrofágů, endoteliálních buněk, podocytů, astrocytů a mikroglíí (Thornalley 1998). Výskyt některých typů AGE receptorů je zvýšen při diabetu (Singh a kol. 2001).

Produkty pokročilé glykace lze rozdělit do třech základních skupin. První skupinou jsou fluoreskující AGEs tvořící příčné vazby (cross-linky). Většina z těchto AGEs byla detekována a izolována na základě jejich fluorescenčních vlastností, avšak představují pouze přibližně 1 % všech cross-linků vznikajících za fyziologických podmínek. Do této skupiny lze zařadit pentosidin, crossliny A a B, vesperlysin A, B a C a další. Nefluoreskující cross-linky tvořící druhou skupinu reprezentují např. glukosepan, ALI (arginin-lysin-imidazol cross-link) nebo imidazoliumdilysiny známé jako GOLD či MOLD. Poslední skupinou jsou na protein navázané AGEs tvořící cross-linky. Tyto struktury mohou projevat škodlivé účinky jako prekurzory cross-linků či jako biologické receptory ligandů indukujících různé nepříznivé buněčné a tkáňové změny. Mezi členy této skupiny patří pyrrolin, 1-karboxyalkyllysin (CML či CEL), imidazol A a B či argpyrimidin (Ulrich a Cerami 2001). Vybrané příklady jednotlivých skupin jsou uvedeny v Obr. 4.

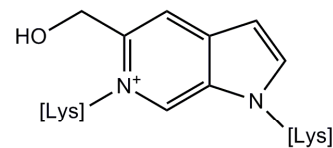
Fluorescent AGE cross-links



Pentosidine

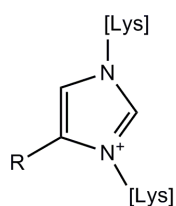


Crossline

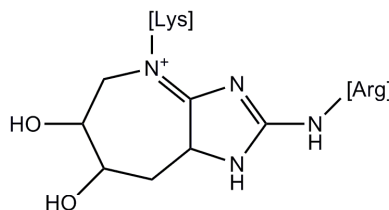


Vesperlysine C

Non-fluorescent AGE cross-links

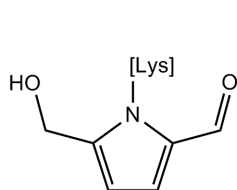


Imidazolium dilysines
(GOLD, MOLD, DOLD)

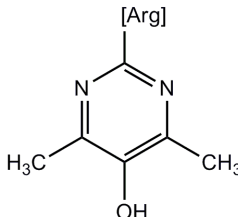


Glucosepan

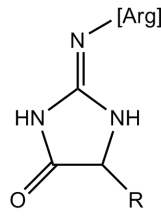
Non-cross-linking protein bound AGE structures



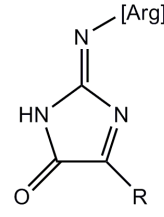
Pyrroline



Argpyrimidine



Imidazolone A



Imidazolone B

Obr. 4. Struktura vybraných AGEs (Boušová a kol. 2012).

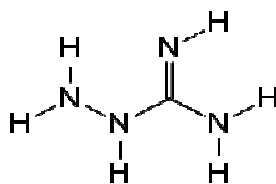
2.4 Možnosti terapeutického zásahu

Terapeutické zásahy do procesu glykace sledují tři hlavní přístupy. První přístup spočívá v inhibici tvorby AGEs pomocí činidel blokuujících karbonylové sloučeniny (např. aminoguanidin, OPB-9195, diaminofenazin, tenilsetam a pyridoxamin) nebo antioxidantů (např. α -lipoová kyselina, α -tokoferol, karnosin, probukol, stobadin a N-acetylcystein). Druhý zahrnuje redukci ukládání AGEs zvýšením jejich příjmu do buněk a následné degradace nebo použitím látek štěpících již vzniklé cross-linky (alagebrium chlorid, fenylthiazolium bromid). Poslední přístup sleduje je soustředěn

na inhibici receptorů pro AGEs neutralizačními protilátkami nebo potlačením post-receptorové signalizace pomocí antioxidantů (Boušová a kol. 2009). Některé nadějně sloučeniny postoupily do klinického testování.

2.4.1 Inhibice tvorby AGE cross-linků

Aminoguanidin (AG, známý také pod obchodním názvem Pimagedin, Obr. 5) je nízkomolekulární, vysoce nukleofilní sloučenina, která snadno reaguje s α -dikarboxylovými sloučeninami za vzniku substituovaných 3-amino-1,2,4-triazinů, což vede k prevenci tvorby AGE cross-linků. Cílem aminoguanidinové inhibice jsou α -dikarboxylové intermediáty, nikoliv iniciální Amadoriho produkty (Boušová a kol. 2009, Ulrich a Cerami 2007). U pacientů se zjevnou diabetickou nefropatií byly provedeny klinické zkoušky s aminoguanidinem (ACTION), které byly ovšem brzy zastaveny kvůli obavám o bezpečnost účastníků. Mezi četné nežádoucí účinky patřily např. gastrointestinální poruchy, abnormality ve funkčních jaterních testech, symptomy podobné chřipce a vzácně též vaskulitidy (Boušová 2006, Boušová a kol. 2012).



Obr. 5. Struktura aminoguanidinu.

2.4.2 Štěpení již vytvořených AGE cross-linků

Hlavním omezením použití inhibitorů tvorby AGE je, že nemohou ovlivnit již vytvořené AGE cross-linky. Existuje však skupina anti-AGE činidel, které mohou chemicky štěpit α -dikarboxylové sloučeniny porušením vazby uhlík-uhlík mezi karboxyly. Jako první z těchto sloučenin byl objeven fenylthiazolium bromid (PTB). PTB není za fyziologických podmínek stabilní, a proto byly testovány další analogy. Dále byl vyvinut alagebrium chlorid (ALT-711, 4,5-dimethyl-3-(2-oxo-2-fenylethyl) thiazolium chlorid), stabilní látka vysoce účinně štěpící cross-linky (Boušová 2006, Ulrich a Cerami 2007). Tato sloučenina úspěšně prošla preklinickými studiemi a II. fází klinických studií na zdravých dobrovolnících. Bohužel slibné výsledky popsané u laboratorních potkanů nebyly u lidí zopakovány, protože tato sloučenina reaguje se specifickými typy AGEs, které nemají u člověka zásadní význam v patogenezi glykace.

Randomizovaná klinická studie II. fáze u pacientů s chronickým srdečním selháním (BENEFICIAL) byla v nedávné době předčasně ukončena z finančních důvodů (Willensen a kol. 2010, Zieman a kol. 2007).

2.4.3 Inhibice receptorů pro AGEs

Interakce AGE-RAGE jsou zapojeny do rozvoje diabetických vaskulárních komplikací, které jsou příčinou invalidity, zkrácené délky života a snížené kvality života pacientů s DM. Tyto efekty mohou být potlačeny užitím specifických protilátek proti RAGE (anti-RAGE IgG), solubilních RAGE (secernované formy RAGE) nebo potlačením post-receptorové signalizace pomocí antioxidantů. Solubilní RAGE (sRAGE) vystupují jako návnady vychytávající ligandy a bránící tak jejich interakci s receptory na povrchu buněk. Ukázalo se, že aplikace sRAGE potlačuje akcelerovanou diabetickou atherosklerosu (Boušová 2006).

2.5 Glykační činidla

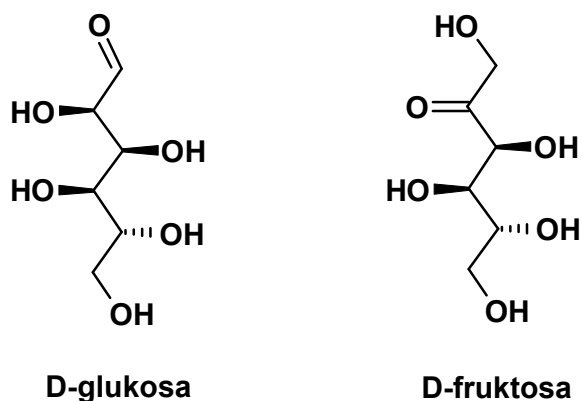
Vnímavost proteinů ke glykaci závisí na typu glykačního činidla, přítomnosti substrátu a kofaktorů, hladinách antiglykačních činidel (např. karnosinu) a metabolizujících enzymů (např. glyoxalasy, aldosa/aldehydreduktasa, betain-aldehyddehydrogenasa a 2-oxoaldehyddehydrogenasa) v organismu. Dalším faktorem, který ovlivňuje náchylnost proteinu ke glykaci, je jeho struktura, tj. počet a druh přístupných a reaktivních aminokyselinových zbytků (Seidler 2005).

Mezi často používaná glykační činidla patří glukosa, glukosa-6-fosfát, fruktosa, ribosa, ribosa-5-fosfát, glyceraldehyd, glyceraldehyd-3-fosfát, glyoxal, methylglyoxal a 3-deoxyglukoson. V experimentální části diplomové práce jsem se zabývala glykací proteinu glukosou, fruktosou, methylglyoxalem a glyceraldehydem, proto v dalším textu popisují jejich vlastnosti ve vztahu ke glykaci.

2.5.1 Glukosa a fruktosa

Ačkoliv se dlouho předpokládalo, že zvýšená hladina glukosy hraje na molekulární úrovni hlavní roli v Maillardově reakci, má glukosa nejnižší rychlost glykační reakce ze všech cukrů. Rychlost glykace je přímo úměrná procentuálnímu zastoupení cukru v acyklické formě (tj. s otevřeným řetězcem). Například rychlost

glykace pro fruktosu (0,7 % acyklické formy; Obr. 6) je 7,5krát vyšší než pro glukosu (0,002 % acyklické formy; Obr. 5). Proto jsou pro intracelulární Maillardovu reakci důležité prekurzory jako např. fruktosa a její metabolity glyceraldehyd, dihydroxyacetonfosfát, glyceraldehyd-3-fosfát a α -dikarboonylové sloučeniny methylglyoxal a 3-deoxyglukoson (Schalkwijk a kol. 2004, Huijberts a kol. 2008). Meziprodukt glykolýzy glyceraldehyd-3-fosfát (100 % acyklické formy) tvoří 200krát více AGEs než ekvimolární množství glukosy (Schalkwijk a kol. 2004).

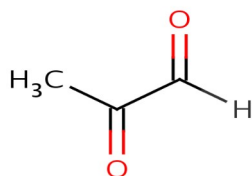


Obr. 6. Strukturní vzorce D-glukosy a D-fruktosy.

2.5.2 Methylglyoxal

Značně reaktivními sloučeninami, které vznikají během intermediárního metabolismu, jsou α -dikarboonylové sloučeniny. Tyto látky reagují s aminoskupinami proteinů, nukleových kyselin a fosfolipidů až 10.000krát ochotněji než glukosa (Beisswenger a kol. 2003). Nejčastěji zastoupenými α -dikarboonyly jsou glyoxal, methylglyoxal a 3-deoxyglukoson.

Methylglyoxal (2-oxopropanal, MGO, Obr. 7) je produktem rozkladu trios, peroxidace lipidů a vedlejších reakcí glykace zprostředkované glukosou. Modifikuje argininové a lysinové zbytky proteinů za tvorby AGEs (zejména argpyrimidinu). Za normálních okolností je methylglyoxal inaktivován glyoxalaseovým systémem. Avšak při diabetu hodnoty MGO vzrůstají pravděpodobně v důsledku poruchy cukerného a lipidového metabolismu (Seidler a Kowalewski 2003, <http://www.ebi.ac.uk>).

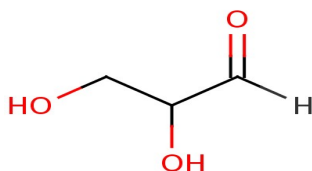


Obr. 7. Strukturní vzorec methylglyoxalu.

Bylo prokázáno, že při diabetu se koncentrace MGO zvyšuje v oční čočce, krvi a ledvinách. Při DM typu I hodnoty MGO v krvi rostou 5-6krát a při DM typu II 2-3krát ve srovnání se zdravými jedinci. Vysoká reaktivita MGO s proteiny a jeho relativně vysoká koncentrace v plazmě (0,1 mM) svědčí o tom, že se jedná o jedno z nejvýznamnějších glykačních činidel přítomných *in vivo* (Nagaraj a kol. 1996).

2.5.3 Glycerinaldehyd

Glycerinaldehyd (2,3-dihydroxypropanal, GA, Obr. 8), představující α -hydroxykarbonylovou sloučeninu, vzniká z 3-deoxyglukosonu a glukosy jako intermediát degradace glukosy a neenzymové glykace. Hladina GA se zřejmě zvyšuje při snížené aktivitě enzymů metabolizujících GA např. glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (Usui a kol. 2007, <http://www.ebi.ac.uk>).



Obr. 8. Strukturní vzorec glycerinaldehydu.

GA je považován za velmi silné glykační činidlo, odhaduje se, že v koncentracích blízkých fyziologickým produkuje značné množství AGEs a nedávné výzkumy ukazují, že AGEs odvozené od GA vykazují silnou neurotoxicitu (O'Brien a Bruce 2009). Proteiny modifikované GA byly detekovány imunochemickými metodami ve vzorcích nemocných Alzheimerovou chorobou. Albumin modifikovaný GA působil cytotoxicky v primárních kulturách potkaních kortikálních neuronů a Schwannových buněk a byl schopen indukovat apoptosu v lidských mesangiálních buňkách (Usui a kol. 2007).

2.6 Metody používané ke stanovení glykačních produktů

Ačkoliv existují experimentální důkazy o kumulaci AGEs během stárnutí a za určitých patologických podmínek jako je diabetes, není v současné době k dispozici žádná běžně akceptovaná či široce užívaná metoda pro detekci AGEs ani komerčně dostupný kit. Situaci navíc komplikuje velké množství AGEs, které jsou strukturně heterogenní (Singh a kol. 2001).

Pro kvantifikaci glykačních produktů existují tři hlavní přístupy: imunologické; spektroskopické a fluorimetrické; chromatografické (HPLC) a hmotnostně spektrometrické (Boušová 2006).

Imunochemické metody využívají antigenních vlastností AGEs. Glykační produkty jsou měřeny pomocí metody ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) nebo RIA (Radioimmunoassay) za použití polyklonálních protilátek proti AGEs získaných *in vitro* z glykační reakce glukosy s ribonukleasou. Tyto protilátky reagují s AGE vzniklými *in vivo*. AGEs jsou hodnoceny celkově a zkřížená reaktivita s obdobnými sloučeninami nemůže být vyloučena. Také jednotlivé AGEs mohou být hodnoceny pomocí techniky ELISA za použití monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky proti CML, pyrralinu či pentosidinu jsou komerčně dostupné (Lapolla a kol. 2005, Boušová 2006).

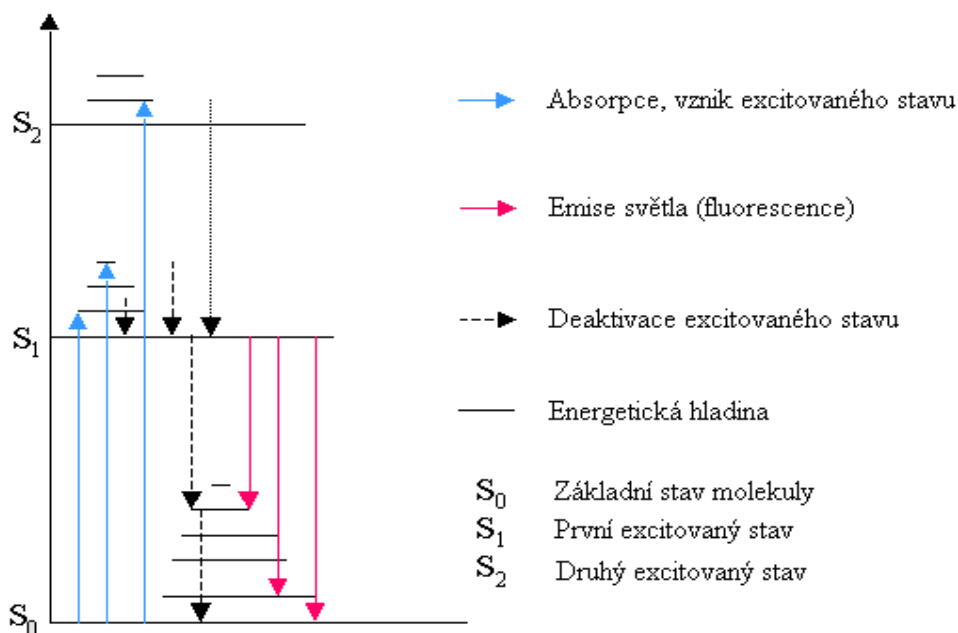
Na základě chemických charakteristik AGEs je možné měřit produkty pokročilé glykace spektroskopickými a fluorescenčními metodami, které využívají jejich specifické hodnoty absorpce (280 nm) a fluorescence ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 370 nm/440 nm). Ačkoliv tyto metody nejsou specifické, mohou podat údaje o obecných znacích glykačního procesu (Lapolla a kol. 2005).

Chromatografické techniky a hmotnostní spektrometrie jsou velmi populární a přesné metody používané pro separaci, kvantifikaci a identifikaci sloučenin stejně jako biologického materiálu (Boušová 2006).

V experimentální části této práce jsem sledovala glykaci pomocí fluorescenčních, elektroforetických a imunochemických metod a ve spolupráci s Ústavem pro organickou chemii a biochemii (Akademie věd ČR) též pomocí hmotnostní spektrometrie a cirkulárního dichroismu. V následující části stručně popisují princip použitých metod.

2.6.1 Fluorescence

Pokud je molekule dodána energie ve formě elektromagnetického záření, je tato energie uvnitř molekuly transformována. V závislosti na energetickém obsahu elektromagnetického záření dochází k přeměnám energie různými způsoby. Záření o nízké energii, jako např. mikrovlnné nebo infračervené záření, je přeměněno na mechanickou energii, na rotační pohyb a vibrace molekuly. Pokud je energetický obsah záření vyšší (viditelné, ultrafialové záření), elektrony jsou uvolněny ze svých orbitalů a obsazují prázdné orbitály s vyšším obsahem energie. Tento excitovaný stav je nestabilní a energeticky nepříznivý. Poté, co elektron padá zpět do svého původního orbitalu, je obvykle energie uvolněna jako energie vibrační. Některé molekuly mají na základě své struktury pouze velmi omezené možnosti přeměňovat excitační energii na energii vibrační. V těchto molekulách elektrony padají z orbitalů s vyšším obsahem energie přímo zpět do jejich původního orbitalu. Energie je uvolněna jako elektromagnetické záření. Toto uvolněné elektromagnetické záření leží obvykle ve viditelné oblasti spektra a je označováno jako fluorescenční světlo, jev jako fluorescence. Emise fluorescenčního světla nastane z excitovaného stavu s nejnižší energií (S_1 , viz. Obr. 9). Fluorescenční světlo má proto delší vlnovou délku než světlo podněcující fluorescenci (<http://www.chemie.uni-jena.de>).



Obr. 9. Princip fluorescence (<http://www.chemie.uni-jena.de>).

Bílkoviny obsahují tři aromatické aminokyseliny (tryptofan, tyrosin, fenylalanin), které přispívají k jejich vnitřní fluorescenci. Změny ve vnitřní fluorescenci lze použít ke sledování strukturálních změn proteinu. Fluorescence proteinu představuje sumu fluorescencí jednotlivých aromatických zbytků. Většina emisí je způsobena excitací tryptofanových zbytků a minimum emisí excitací tyrosinů a fenylalaninů. Tyto tři zbytky mají odlišné absorpční a emisní vlnové délky (<http://dwb4.unl.edu>).

2.6.2 Elektroforesa

2.6.2.1 Obecný princip

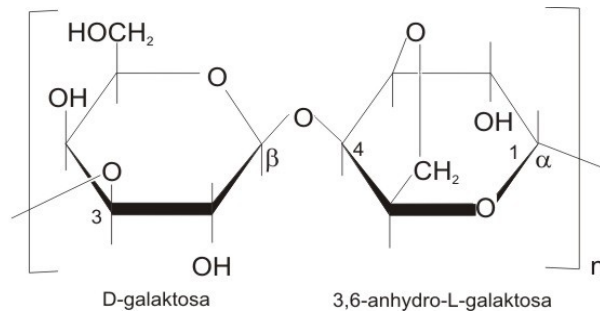
Elektroforesa je separační technikou založenou na pohybu iontů v elektrickém poli. Kladně nabitě ionty migrují směrem k záporné elektrodě a negativně nabitě ionty migrují směrem ke kladné elektrodě. Při gelové elektroforese je pohyb částic zpomalován interakcemi s okolní gelovou maticí, která působí jako molekulární síto. Protichůdné působení elektrické síly a molekulárního prosívání vede k různým migračním rychlostem podle velikosti, tvaru a celkového náboje částic, a proto mohou být jednotlivé makromolekuly směsi separovány (Český lékopis 2009, <http://www.chemistry.adelaide.edu.au>).

2.6.2.2 Gelová elektroforesa

Ačkoli elektroforesa může být nejnázem prováděna ve volném roztoku, konvenční pohyb kapaliny v důsledku tepla přirozeně uvolňovaného průchodem elektrického proudu může separaci narušit, proto byl zaveden gel jako separační prostředí. Tímto gelem je zpravidla agarosa (polysacharid z mořských řas) nebo synteticky připravovaný polyakrylamid (chemicky síťovaný polymer) (Pazourek 2003).

Agarosový gel

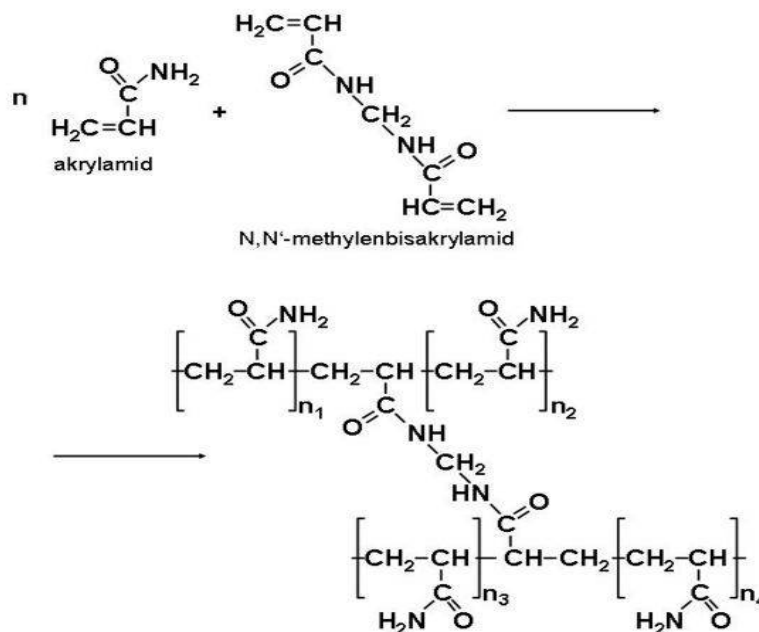
Ředěné agarosové gely jsou dostatečně rigidní a jednoduché na přípravu v nízkých koncentracích. Agarosa je vhodná jako elektroforetická matrice, protože je takřka nenabitá. Jedná se o řetězec opakujících se jednotek D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy (Obr. 10). Agarosa je schopna utvořit trojrozměrnou strukturu šroubovice s trojnásobně zalomenou osou, která vytváří dutinu dostatečně velkou pro přijetí vody. Skupiny těchto řetězců mohou tvořit dvojistou šroubovici, čímž je formován stabilní gel (Pazourek 2003).



Obr. 10. Struktura agarosu (<http://www.wikiskripta.eu>).

Polyakrylamidový gel

Sítovací vlastnosti polyakrylamidových gelů jsou založeny na trojrozměrné síti vláken a pórů, kterou tvoří bis-akrylamidové zesítěvání polyakrylamidových řetězců (Obr. 11). Polymerace je katalyzována tvorbou volných radikálů z persíranu amonného (APS) a tetramethylethylendiaminu (TEMED). Zvyšováním koncentrace akrylamidu v gelu se snižuje účinná velikost jeho pórů, ale při vysokých koncentracích akrylamidu se gel láme mnohem snáze a je s ním obtížnější manipulace. Se snižující se velikostí pórů gelu se snižuje i migrační rychlost průchodu bílkovin gelem. Úpravou velikosti pórů gelu pomocí změny koncentrace akrylamidu se může rozlišovací schopnost metody pro daný bílkovinný produkt optimalizovat. Proto se daný gel fyzikálně charakterizuje pomocí odpovídajícího složení akrylamidu a bis-akrylamidu (Český lékopis 2009).



Obr. 11. Vznik a struktura polyakrylamidu (<http://www.wikiskripta.eu>).

Pro získání optimálního rozlišení bílkovin se připravují dva typy gelů - separační (spodní) a zaostřovací (horní). Zaostřovací gel má nižší koncentraci akrylamidu (např. 4% pro větší velikost pórů), nižší pH (např. 6,8) a odlišný iontový obsah. To umožní proteinům ve vzorku se zkoncentrovat do úzkého proužku během prvních několika minut elektroforesy před vstupem do separační části gelu. Zaostřovací gel není nutný, pokud je použit gradientový gel, protože gradient sám vykonává tuto funkci (<http://www.piercenet.com>).

2.6.2.3 Typy elektroforesy

Nativní PAGE

Při nativní PAGE jsou proteiny separovány podle náboje, velikosti a tvaru jejich nativní struktury. K elektroforetické migraci dochází proto, že většina proteinů nese záporný náboj v prostředí alkalického pufru. Čím vyšší je hustota negativního náboje, tím rychleji bude protein migrovat. Zároveň třecí síla matrice gelu vytváří prosévací účinek, zpomaluje pohyb proteinů v závislosti na jejich velikosti a trojrozměrném tvaru. A tak nativní PAGE separuje bílkoviny na základě jejich náboje a hmotnosti. Protože při nativní PAGE nejsou použita žádná denaturační činidla, interakce mezi podjednotkami proteinu zůstávají zachovány, a tak lze získat informace o kvartérní struktuře (<http://www.piercenet.com>).

SDS-PAGE

Anionaktivní detergent dodecylsírán sodný neboli laurylsírán sodný (SDS) se používá jako součást pufru, ve kterém je gel se vzorky umístěn, a také pro úpravu proteinových vzorků před vlastní SDS-PAGE, kdy jsou vzorky zahřívány v přítomnosti SDS. Jeho význam je dvojitý: za prvé denaturuje proteiny tím, že rozrušuje vodíkové můstky nativního proteinu za následného rozvinutí do lineární formy, a za druhé může maskovat náboj proteinu (<http://www.piercenet.com>, Zhang 2007). SDS nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin a ty se pohybují v gelu jen podle velikosti. Neredukované proteiny totiž váží SDS v konstantním poměru, 0,9-1,0 g SDS na 1 g bílkoviny (<http://biochemie.sweb.cz>, Pazourek 2003).

Ke vzorkům se zpravidla přidává redukční činidlo jako např. dithiothreitol či 2-merkptoethanol, které způsobí štěpení disulfidických vazeb a zajistí, že nezůstane zachována žádná kvartérní či terciární struktura proteinu (<http://www.piercenet.com>).

Vznikají tzv. redukované proteiny, které pak na sebe váží 1,4 g SDS na 1 g proteinu (Pazourek 2003).

Pokud soubor proteinů o známé molekulové hmotnosti běží podél vzorků na stejném gelu, lze podle jejich polohy určit hmotnost vzorků. Tyto sady referenčních proteinů se nazývají molekulové hmotnostní markery nebo standardy (<http://www.piercenet.com>).

2.6.2.4 Barvení gelů

Po separaci v gelu je analyt zpravidla prostým okem neviditelný. Pro jeho kvantifikaci se často používají metody barvení gelu (Staining). Barvení je běžně prováděno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 či pomocí stříbra. Coomassie barvení je nejrozšířenější metodou barvení bílkovin s detekčním rozsahem 1-10 µg bílkoviny v proužku (tzv. band). Barvení stříbrem je nejcitlivější metodou barvení bílkovin v gelech, může detekovat band obsahující 10-100 ng (100krát citlivější než Coomassie Blue) a používá se převážně v případech malého množství proteinu nebo chceme-li detekovat co možná nejvíce zón. Poté, co byl gel obarven, mohou být proteiny kvantifikovány densitometricky, gel může být fotografován či skenován (Pazourek 2003, Český lékopis 2009).

Pro detekci GST na polyakrylamidových gelech lze použít též citlivé aktivitní barvení. Tato metoda je založena na rychlé redukci nitrobluetetrazoliové soli pomocí glutathionu a fenazinmethosulfátu, který slouží jako přenašeč elektronů, na modrý až fialový nerozpustný formazan. Ten obarví gel mimo oblasti výskytu GST, které zůstanou bezbarvé („negativní test“) (Ricci a kol. 1984).

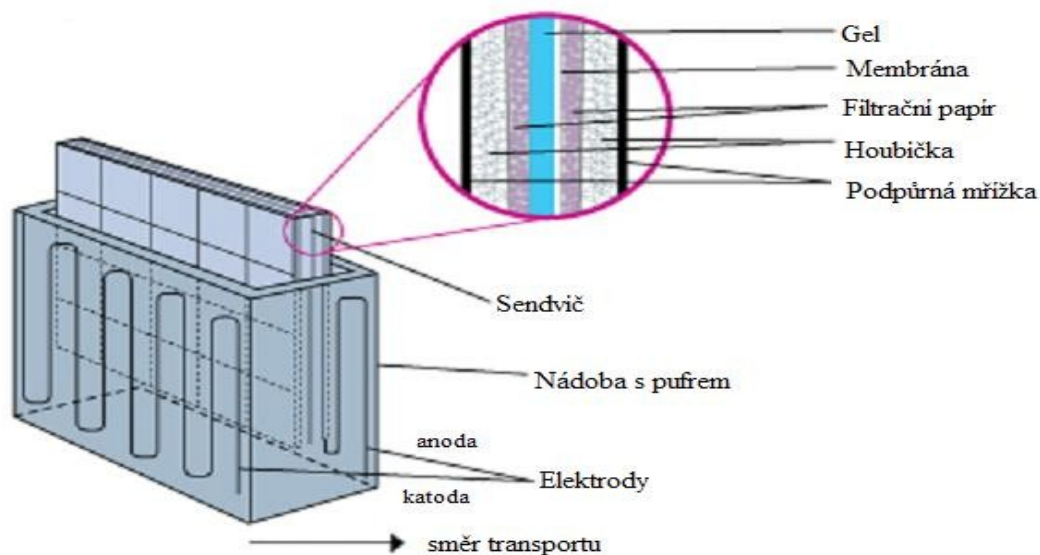
2.6.3 Western blotting

Termín „blotting“ představuje přenos biologických vzorků z gelu na membránu a jejich následnou detekci na povrchu membrány (<http://www.piercenet.com>). Western blotting, označovaný také jako imunoblotting, se používá k detekci cílových proteinů ve vzorku pomocí polyklonálních nebo monoklonálních protilátek specifických pro daný protein (<http://www.westernblotting.org>).

2.6.3.1 PAGE a transfer proteinů na membránu

Prvním krokem při Western blottingu je oddělení makromolekul pomocí gelové elektroforese. Po elektroforese jsou separované molekuly přeneseny na druhou matici,

obecně nitroceluloseovou nebo polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Nejčastější metodou přenosu je elektroeluce či elektroforetický přenos, a to kvůli své rychlosti a účinnosti přenosu. Tato metoda využívá elektroforetickou pohyblivost bílkovin k jejich přenosu z gelu na membránu. Elektroforetický přenos bílkovin zahrnuje umístění polyakrylamidového gelu obsahujícího bílkoviny do přímého kontaktu s kusem nitrocelulosity či jiným vhodným materiálem, který podporuje vazbu bílkovin. Tzv. blotovací sendvič dále obsahuje filtrační papíry a houbičky (viz. Obr. 12). Sendvič se umístí mezi dvě elektrody a ponoří se do vodivého roztoku. Při použití elektrického pole se proteiny pohybují z polyakrylamidového gelu na povrch membrány, kde jsou pevně vázány. Výsledkem je membrána s kopií proteinového vzoru, který byl původně na polyakrylamidovém gelu (<http://www.piercenet.com>).



Obr. 12. Elektroforetický přenos (<http://www.piercenet.com>).

2.6.3.2 Pufry

Western blotting se skládá z řady inkubací s různými činidly, které jsou odděleny promývacími kroky. Tyto kroky jsou nutné k odstranění nenavázaných činidel a snížení pozadí, čímž se zvýší poměr signálu k šumu. Nedostatečné promytí způsobí vysoké pozadí, zatímco nadměrné promytí může vést ke snížení citlivosti způsobené elucí protilátek a/nebo antigenu z membrány. Pro tento účel se používají nejčastěji PBS (fosfátový pufr) a TBS (Tris pufr) pufry. Někdy je do pufru přidán detergent jako např. 0,05% Tween 20 k odstranění nespecificky vázaného materiálu. Hlavním kritériem je

to, že pufr musí zachovávat biologickou aktivitu protilátek, proto by měly být iontové síly a pH blízko fyziologických podmínek (<http://www.millipore.com>, <http://www.piercenet.com>).

2.6.3.3 Blokování

Membrány používané při Western blottingu mají vysokou afinitu k proteinům. Proto je po přenosu bílkovin z gelu důležité blokovat zbývající povrch membrány, aby se zabránilo nespecifické vazbě protilátek. Toho je dosaženo tím, že je membrána umístěna v roztoku bovinního sérového albuminu (BSA) nebo netučného sušeného mléka (NFDM). Blokovací pufr by měl zlepšit citlivost testu snížením pozadí a zlepšit poměr signálu a šumu (<http://www.piercenet.com>, <http://www.westernblotting.org>).

2.6.3.4 Primární a sekundární protilátky

Primární protilátka

První použitá protilátka, která se inkubuje s membránou, je specifická pro cílový protein a při vhodných koncentracích nesmí vázat jakoukoli jinou bílkovinu na membráně (<http://www.westernblotting.org>).

Sekundární protilátka

Po opláchnutí membrány, které slouží k odstranění nenavázané primární protilátky, následuje inkubace sekundární protilátky s membránou. Ta se váže na primární protilátky. Tato sekundární protilátka je obvykle spojena s enzymem (např. alkalická fosfatasa nebo křenová peroxidasa), který umožňuje vizuální identifikaci. Alternativou je použití radioaktivního značení (<http://www.westernblotting.org>).

Ačkoli mohou být primární protilátky označeny přímo, použití sekundární protilátky má nesporné výhody. Za prvé, na jedinou molekulu primární protilátky se může vázat více než jedna molekula sekundární protilátky, což vede k zesílení signálu. Za druhé, značené sekundární protilátky (konjugát protilátka-enzym) se mohou použít pro velké množství primárních protilátek odlišné specifity, čímž odpadá nutnost označit množství primárních protilátek (<http://www.millipore.com>).

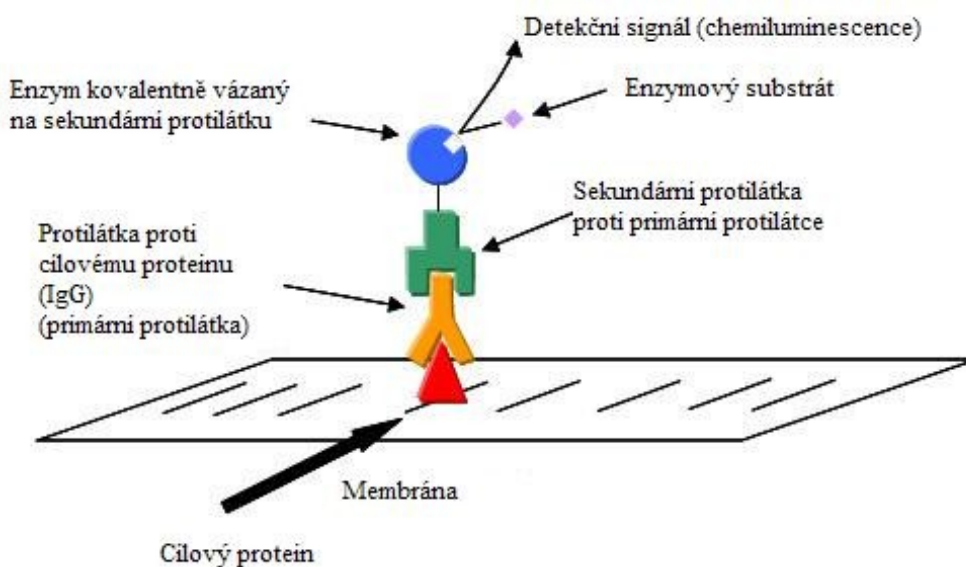
Imunodetekce je extrémně citlivá metoda. Za účelem dosažení vysokého poměru signálu a šumu a tím i maximální citlivosti by měla být pro každý případ optimalizována koncentrace primární a sekundární protilátky. Obecně lze nespecifický signál zmírnit vyšším ředěním primární protilátky nebo snížením množství proteinu

na původním gelu. Vysoké celkové pozadí lze minimalizovat vyšším ředěním sekundární protilátky konjugované s enzymem (<http://www.millipore.com>).

Následné promytí membrány odstraní všechny nenavázané protilátky, které by mohly způsobit vysoké pozadí a falešnou detekci. Běžně používaný je zředěný roztok Tweenu 20 (0,05% v/v) v PBS či TBS pufru. Vyšší koncentrace roztoku detergentu může eluovat cílový protein z membrány. Rozsah promývání je nejlepší určit experimentálně. Doporučuje se provádět promývání nejméně třikrát po dobu 5 minut (<http://www.millipore.com>).

2.6.3.5 Detekce

Moderní imunodetekční metody jsou založeny na enzymové detekci využívající enzymy kovalentně vázané na sekundární protilátky, jako je křenová peroxidasa (HRP) nebo alkalická fosfatasa (AP). Konjugovaný enzym katalyzuje degradaci specifických substrátů, což vede ke vzniku signálu (Obr. 13). Běžně používané jsou tři typy substrátů: chromogenní, chemiluminiscenční a chemifluorescenční (<http://www.millipore.com>).



Obr. 13. Vazba protilátek a následná detekce (<http://employees.csbsju.edu>).

Chromogenní detekce

Chromogenní detekce využívá enzym ke katalýze reakce vedoucí ke vzniku nerozpustné barevné sraženiny, např. modré nerozpustné sloučeniny získané reakcí 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfátu (BCIP) a nitrobluetetrazoliové soli (NBT). Tato

technika je velmi jednoduchá na provedení a nevyžaduje žádné speciální vybavení pro analýzu, ale citlivost chromogenní detekce je obvykle nejméně o jeden řád nižší než u chemiluminiscenčních činidel. Tvorba sraženiny může ovlivňovat aktivitu enzymů a omezit tak citlivost detekce (<http://www.millipore.com>).

Chemiluminiscenční detekce

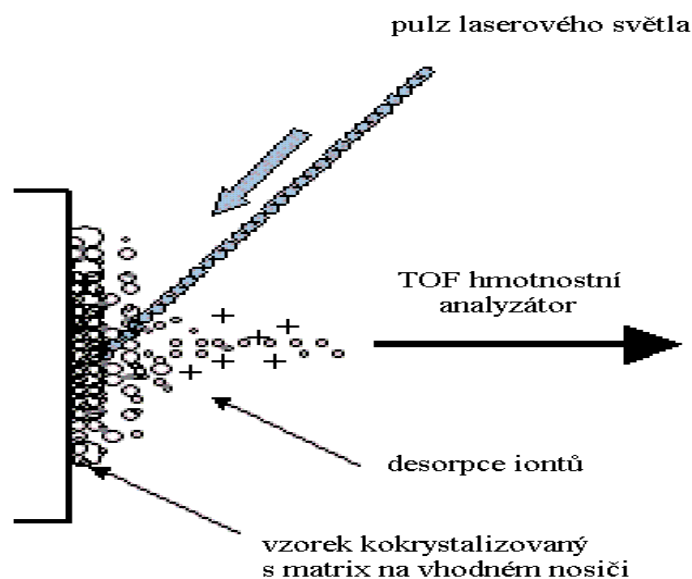
Chemiluminiscenční detekce využívá enzym ke katalýze reakce, která vede k produkci viditelného světla. Některé chemiluminiscenční systémy jsou založeny na tvorbě peroxidů křenovou peroxidasou, jiné systémy používají 1,2-dioxethan jako substrát a jako enzym alkalickou fosfátasu. Tato technika představuje rychlou a bezpečnou chromogenní detekci při citlivosti srovnatelné s radioisotopovou detekcí. Detekce je dosaženo buď expozicí membrány s RTG filmem, nebo pořízením snímku přímo pomocí kompatibilního digitálního zobrazovacího systému. Existuje celá řada chemiluminiscenčních substrátů nabízejících různou úroveň citlivosti detekce. Nové vysoce citlivé substráty umožňují vizualizaci proteinů až na femtogramové úrovni (<http://www.millipore.com>).

Fluorescenční detekce

Fluorescenční detekce používá buď protilátky konjugované s fluorofory, nebo fluorogenní substráty, které fluoreskují v místě enzymové aktivity (chemifluorescence). Jednou z výhod této metody je, že fluorescenční signál je stabilní po dlouhou dobu. Navíc široká paleta fluoroforů umožňuje současně detekovat více cílových proteinů v jednom vzorku (mnohonásobná detekce) (<http://www.millipore.com>).

2.6.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Obecný princip hmotnostní spektrometrie (MS) je produkce, separace a detekce iontů v plynné fázi (Obr. 14). Pro přenos molekuly do plynné fáze jsou tradičně používány metody tepelného vypařování. Mezi klasické metody sloužící k ionizaci patří elektronový náraz a chemická ionizace. Avšak většina biomolekul podléhá za těchto podmínek významnému rozkladu. Proto až do vynálezu „měkkých“ ionizačních technik, jako je např. MALDI-MS, nebyla hmotnostní spektrometrie používána pro běžné aplikace v biologických vědách (Jurinke 2004).



Obr. 14. Schéma MALDI-TOF (<http://qbab.aber.ac.uk>).

Před vlastním zahájením MALDI-TOF MS je roztok analytu smíchán s roztokem příslušné matrix. Po následné kokrytalizaci je vrstva matrix-analyt na vhodném nosiči krátce (ns) zasažena laserovým paprskem. Matrice energii pulzu absorbuje a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Ionty analyzované látky po zrychlení silným elektrickým proudem vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Jakmile je znám čas letu částice, lze vypočítat poměr hmotnost/náboj analyzované částice (Havliš 1999, Roepstorff 2000).

Výhodou této metody je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se vzorek nerozpadá, což umožňuje měření složitějších směsí (Havliš 1999).

2.6.5 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD) představuje rozdíl absorbancí levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla u opticky aktivní látky. Cirkulární dichroismus měřený jako funkce vlnové délky se nazývá CD spektroskopie. CD spektroskopie je široce využívána ke studiu chirálních molekul všech typů a velikostí, ale nejširší uplatnění má při studiu velkých biomolekul. Hlavní využití je v analýze sekundární a terciární struktury makromolekul, zejména bílkovin.

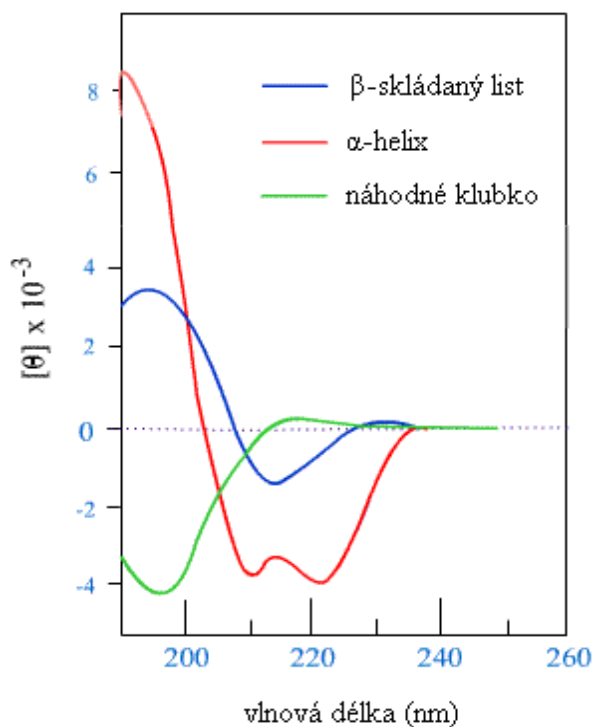
Měření se provádí ve viditelné a ultrafialové oblasti elektromagnetického spektra. Je-li zkoumaná molekula chirální, pak jeden typ cirkulárně polarizovaného světla bude absorbován ve větší míře než ostatní a CD signál odpovídající příslušné vlnové délce bude nenulový. CD signál může být kladný či záporný podle toho, zda

levotočivě cirkulárně polarizované světlo je absorbováno ve větší míře než pravotočivě cirkulárně polarizované světlo (CD signál kladný), nebo v menší míře (CD signál záporný) (<http://www.photophysics.com>).

2.6.5.1 Stanovení sekundární struktury proteinů pomocí CD

Sekundární struktura může být určena pomocí CD spektroskopie v tzv. vzdálené UV spektrální oblasti (190-250 nm). Na těchto vlnových délkách je chromoforem peptidová vazba. Sekundární struktury α -helix, β -skládaný list a struktura náhodného klubka vedou k charakteristickému tvaru a velikosti CD spektra (Obr 15). Přibližný podíl každého typu sekundární struktury, který je přítomen ve všech bílkovinách, může být stanoven na základě analýzy CD spektra měřeného ve vzdálené UV oblasti jako součet částečných násobků referenčních spekter pro každý konstrukční typ (<http://www.ap-lab.com>).

CD signál odráží průměr celého souboru molekul, a proto nelze určit, které konkrétní zbytky jsou zapojeny do dané struktury. Pro CD spektroskopii měřenou ve vzdálené UV oblasti je potřeba 20 až 200 μ l roztoku obsahujícího 50 μ g/ml až 1 mg/ml proteinu v pufru, který nemá vysokou absorbanci v této oblasti spektra (<http://www.ap-lab.com>).



Obr. 15. CD spektra polylysinu ve třech odlišných konformacích (<http://www.chemgapedia.de>).

2.7 Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy (GSTs, EC 2.5.1.18) jsou rodinou enzymů, které jsou obecně uznávány jako detoxikační enzymy podílející se na metabolismu řady endogenních a cizorodých látek katalýzou konjugace těchto sloučenin s glutathionem (GSH). Mechanismem této konjugace je nukleofilní adice GSH na elektrofilní centrum substrátu. Savčí GSTs lze rozdělit do dvou strukturně a evolučně odlišných strukturních nadrodin – cytosolickou (GST) a mikrosomální (MGST).

Na základě sekvence aminokyselin se rozpoznává 8 tříd savčích cytosolických GST: alfa, kappa, mu, omega, pí, sigma, theta, zeta. Jsou to homo- nebo heterodimerní proteiny. Jednotlivé podjednotky mají molekulovou hmotnost okolo 25 kDa. Každá podjednotka obsahuje jedno aktivní místo se dvěma místy vazebnými – jedno pro GSH (G-vazebné místo) a druhé pro hydrofobní substrát (H-vazebné místo) (Singh a kol. 1987, <http://www.drugmetabolism.co.uk>, Edalat 2002).

Mikrosomální GST jsou označovány též jako MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) a účastní se metabolismu prostaglandinů a leukotrienů. Zástupci této nadrodiny se vyskytují ve formě homotrimerů.

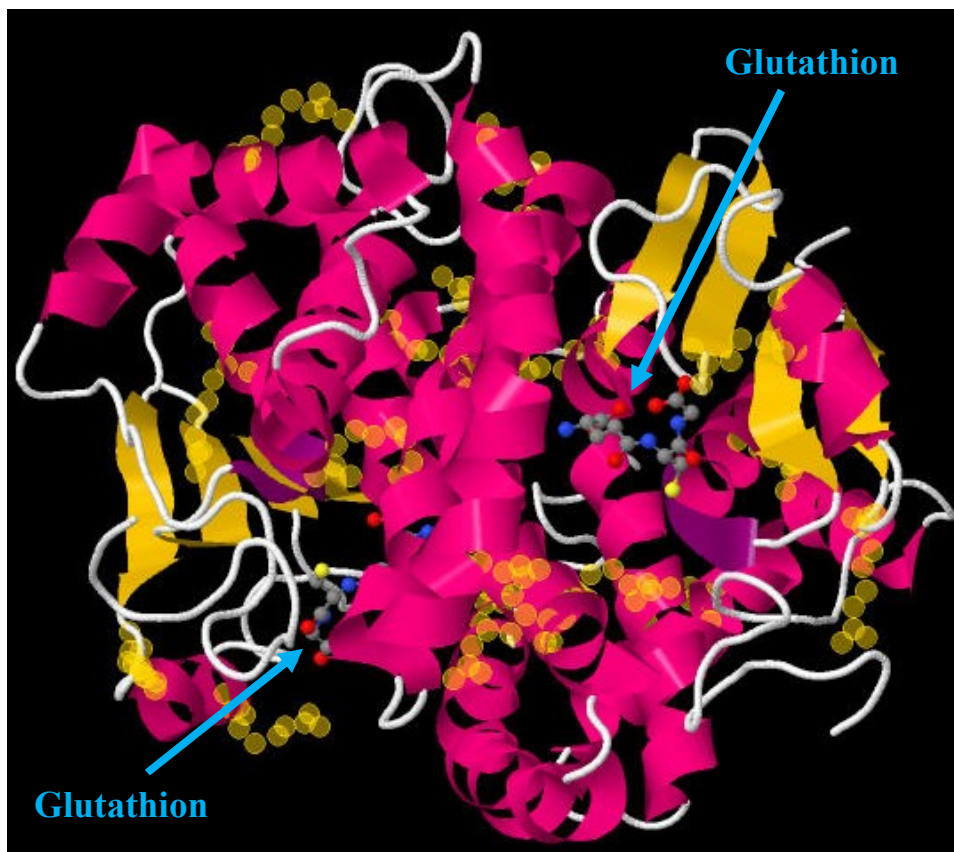
GST, patřící mezi konjugační enzymy II. fáze biotransformace, jsou známy především jako buněčné katalyzátory konjugace nukleofilní thiolové skupiny GSH s různými potenciálně toxickými elektrofilními látkami. Dnes se však předpokládá, že některé izoenzymy GST hrají roli i v katalýze syntézy steroidů a prostaglandinů. Mají peroxidasovou a isomerasovou aktivitu a bylo prokázáno, že GST nekovalentně vážou hydrofobní sloučeniny podobně jako transportní proteiny, a proto byly pojmenovány jako ligandiny. V nedávné době byla presentována další funkce těchto enzymů - role regulační (Edalat 2002, Sheehan a kol. 2001).

Mnohé studie prokázaly souvislost mezi sklonem k nádorovému onemocnění a současným nedostatkem GST. GST jsou dále spojovány s ochranou před neurodegenerativními chorobami. U dalších chorob, jako je např. roztroušená sklerosa, mohou mít GST vliv na stupeň závažnosti tím, že chrání buňky před ROS (reaktivními formami kyslíku) (Edalat 2002).

2.7.1 Glutathion-S-transferasa ze *Schistosoma japonicum*

Jako modelový protein jsem ve svých pokusech používala rekombinantní GST ze *Schistosoma japonicum* (krevnička jaterní, *Trematoda*). Tento enzym je homodimerem s molekulovou hmotností podjednotek kolem 26 kDa (218 aminokyselin/podjednotka; Obr. 16). Sekvence a strukturní homologie tohoto enzymu jsou podobné savčím GST třídě α , ačkoliv vykazují směs biochemických vlastností tříd α , μ a π . S ostatními GST sdílí některé strukturní charakteristiky: krátká N-terminální doména (aminokyselinové zbytky 1-76) složená ze 3 α -helixů a 4 antiparalelních β -skládaných listů, následuje krátký spojovací úsek (aminokyselinové zbytky 77-84) a delší C-terminální doména (zbytky 85-218), které je složená z pěti α -helixů (Lim a kol. 1994, McTigue a kol. 1995, Cardoso a kol. 2003). Posledních 8 aminokyselinových zbytků tvoří otevřenou vlásenku, která není přítomná u žádné známé savčí GST a je specifická rozpoznávaná monoklonálními protilátkami proti GST ze *Schistosoma japonicum*. Na vzniku dimeru se účastní následující aminokyselinové zbytky: 50-53, 63-66, 67-76, 77-85, 88-109 a 129-136. Na styku obou podjednotek se podílejí také dva solné můstky (Asp77-Arg89 a Glu51-Arg136) (McTigue a kol. 1995).

Každá podjednotka GST obsahuje dvě vazebná místa – jedno pro glutathion (G-vazebné místo) a druhé pro elektrofilní substrát (H nebo též hydrofobní vazebné místo). Na vzniku G-vazebného místa a tedy i na vazbě glutathionu se podílejí zejména aminokyselinové zbytky Tyr7, Asn54, Leu55, Gln67 a Ser68 (Lim a kol. 1994). Zdá se, že Tyr7 hraje významnou roli v katalytickém mechanismu tohoto enzymu tím, že stabilizuje thiolátový anion GSH a zvyšuje nukleofilitu thiolátového aniontu ve srovnání s protonovaným thiolem (Andújar-Sánchez a kol. 2005). Elektrofilní substrát se váže na Tyr111 (H-vazebné místo). H-vazebné místo je dále tvořeno aminokyselinovými zbytky Tyr7, Leu13, Arg103, Tyr104, Ser107 a Tyr111 (Cardoso a kol. 2003). Ačkoliv se G-vazebná místa savčích GST a GST ze *Schistosoma japonicum* strukturně podobají, jejich H-vazebná místa se výrazně liší (Lim a kol. 1994, Cardoso a kol. 2003).



Obr. 16. Trojrozměrný model struktury homodimeru GST ze *Schistosoma japonicum* v komplexu s glutathionem. Růžová stuha znázorňuje úseky α -helixu, žluté šípky β -skládaný list a bílé čáry spojovací úseky (např. smyčky a ohyby) mezi nimi. Zbytky Arg jsou vyznačeny žlutými kolečky. Zdroj: RCSB Protein Databank (záznam 1UA5, <http://www.pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1UA5&bionumber=1>), upraveno v programu Jmol Version 12.0.41.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- 1) Porovnat vliv methylglyoxalu (0,5-2 mM), glukosy (50 mM) a fruktosy (50 mM) na aktivitu, strukturu a funkci enzymu glutathion-S-transferasy ze *Schistosoma japonicum* pomocí stanovení katalytické aktivity GST, stanovení primárních aminoskupin, měření AGE produktů s fluorescenčními vlastnostmi a vnitřní fluorescence GST, SDS-PAGE a následného Western blottingu, nativní PAGE, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a CD spektroskopie.
- 2) Zjistit účinek glycerinaldehydu (0,5-10 mM) na aktivitu a funkci enzymu glutathion-S-transferasy ze *Schistosoma japonicum* pomocí stanovení katalytické aktivity GST, stanovení primárních aminoskupin, měření AGE produktů s fluorescenčními vlastnostmi a vnitřní fluorescence GST, SDS-PAGE a následného Western blottingu a nativní PAGE.
- 3) Porovnat účinek všech použitých glykačních činidel a zjistit, zda spolu stanovované parametry korelují.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

Používaný enzym, rekombinantní glutathion-S-transferasa pocházející ze *Schistosoma japonicum*, byl dodán firmou GenScript. Methylglyoxal 40% roztok, akrylamid, bis-akrylamid, tris(hydroxymethyl)aminomethan, persíran amonný, bromfenolová modř, glycin, 2-merkaptoethanol, Coomassie Blue G250, Tween 20, Ponceau S, chlorid hořečnatý hexahydrát, nitrobluetetrazoliová sůl, D-fruktosa, 2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen, fenazinmethosulfát, redukovaný glutathion, β -alanin a dusičnan stříbrný byly vyrobeny firmou Sigma-Aldrich. Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, kyselina chlorovodíková, isobutanol, chlorid draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, methanol, kyselina citronová monohydrát, ethanol, chlorid sodný a vodný roztok formaldehydu (36-38%) byly dodány firmou Penta. Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, isopropylalkohol, hydroxid sodný, vodný roztok amoniaku (min. 25%), D-glukosa, polyethylenglykol 2000 a hydrogenuhličitan sodný byly zakoupeny od firmy Lachema. Dodecylsíran sodný a glyceraldehyd byly dodány firmou BDH Chemicals. Glycerol a ethanol 96% byly zakoupeny od firmy Kulich. Tetramethylethylendiamin od firmy Merck, PVDF membrána, Precision Plus molekulové standardy, netučné sušené mléko od firmy Bio-Rad. Králičí polyklonální protilátky proti AGE (primární protilátka) a kozí polyklonální protilátky proti králičím IgG protilátkám konjugované s alkalickou fosfátasou (sekundární protilátka) byly získány od firmy Acris Antibodies. Myší monoklonální protilátky [3C] proti MGO (primární protilátka) a králičí polyklonální protilátky proti myším IgG protilátkám konjugované s alkalickou fosfátasou (sekundární protilátka) jsou produkty firmy Abcam. Chemiluminiscenční substrát pro alkalickou fosfátasu DuoLux byl objednán z firmy Vector Laboratories, RTG filmy CL-XPosure byly získány od Thermo Fisher Scientific, vývojka a ustalovač jsou produkty firmy Foma Bohemia. Lihomethanol a redestilovaná voda byly získány z Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

4.2 Příprava základních roztoků a reagensů

4.2.1 Fosfátový pufr (PBS, phosphate buffered saline)

Pro naředění enzymu, methylglyoxalu, glycerinaldehydu, glukosy a fruktosy jsem používala 10 mM PBS (pH 7,4), který byl připraven ze 4 g NaCl, 0,1 g KCl, 1,79 g Na₂HPO₄·12H₂O a 0,136 g KH₂PO₄, rozpuštěním v přibližně 490 ml redestilované vody, následnou úpravou pH na hodnotu 7,4 pomocí 1 M HCl a doplněním redestilovanou vodou do 500 ml.

4.2.2 Enzym

Obsah zkumavky (GenScript) jsem rozpustila v 1 ml redestilované vody, tím jsem získala roztok glutathion-S-transferasy o koncentraci 1 mg/ml.

4.2.3 Roztok methylglyoxalu

Pro přípravu inkubačních směsí jsem používala 12 mM roztok methylglyoxalu, který jsem si připravila naředěním zásobního 40% roztoku methylglyoxalu pomocí 10 mM PBS o pH 7,4.

4.2.4 Roztok glycerinaldehydu

Pro přípravu inkubačních směsí jsem si připravila 20 mM roztok glycerinaldehydu, který jsem získala rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství 10 mM PBS o pH 7,4. Tento 20 mM roztok glycerinaldehydu jsem poté pomocí 10 mM PBS o pH 7,4 naředila na následující koncentrace: 1 mM, 2 mM, 4 mM a 10 mM, které jsem použila k přípravě inkubačních směsí.

4.2.5 Roztok fruktosy

Pro přípravu inkubačních směsí jsem používala 100 mM roztok fruktosy, který jsem připravila rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství 10 mM PBS o pH 7,4.

4.2.6 Roztok glukosy

Pro přípravu inkubačních směsí jsem používala 100 mM roztok glukosy, který jsem si připravila rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství 10 mM PBS o pH 7,4.

4.3 Příprava inkubačních směsí

4.3.1 Inkubační směsi s MGO, glukosou a fruktosou

Pro sledování vlivu glykačních činidel MGO, glukosy a fruktosy jsem připravila 6 inkubačních směsí o celkovém objemu 700 μ l podle následujících tabulek (Tab. 1, Tab. 2). Inkubace probíhala po dobu 14 dní při teplotě 37°C. Nízkomolekulární sloučeniny byly následně odstraněny pomocí centrifugační jednotky Microcon (velikost pórů 10 kDa) za použití 10 mM PBS o pH 7,4. Obsah bílkoviny byl změřen Bradfordovou metodou a upraven na koncentraci 0,5 mg/ml. Jako standard pro sestavení kalibrační přímky byl použit roztok GST o koncentraci 1 mg/ml. Vzorky byly dále skladovány při teplotě -20 °C.

Inkubační směsi pro měření katalytické aktivity GST se připravovaly rovněž podle Tab. 1 a Tab. 2, ale jejich inkubace probíhala po dobu 180 minut při 37 C a nebyly u nich před vlastním stanovením odstraněny nízkomolekulární látky.

Ve všech vzorcích byly sledovány následující parametry: fluorescence, množství aminoskupin, katalytická aktivita GST, změny v náboji molekuly GST (nativní PAGE), vznik vysokomolekulárních cross-linků (SDS-PAGE), vznik AGE produktů (imunoblotting) a spektra cirkulárního dichroismu. Vzorky 1, 2 a 4 byly navíc odeslány na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie Maldi-Tof s cílem odhalit modifikované aminokyselinové zbytky a vznikající AGE produkty. Měření spekter cirkulárního dichroismu a hmotnostní spektrometrie Maldi-Tof probíhali ve spolupráci s Ústavem pro organickou chemii a biochemii, Akademie věd ČR.

Tab. 1: Výsledné koncentrace inkubačních směsí s MGO, glukosou a fruktosou.

| Inkubační směs | Koncentrace GST [mg/ml] | Koncentrace glykačního činidla [mM] |
|-----------------------|--------------------------------|--|
| 1 | 0,5 | 0 |
| 2 | 0,5 | MGO 0,5 |
| 3 | 0,5 | MGO 1 |
| 4 | 0,5 | MGO 2 |
| 5 | 0,5 | Frc 50 |
| 6 | 0,5 | Glc 50 |

Tab. 2: Příprava inkubačních směsí s MGO, glukosou a fruktosou.

| Inkubační směs | GST 1 mg/ml [μl] | MGO 12 mM [μl] | Frc 100 mM [μl] | Glc 100 mM [μl] | PBS 10 mM [μl] |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 350 | 0,0 | 0 | 0 | 350 |
| 2 | 350 | 29,2 | 0 | 0 | 320,8 |
| 3 | 350 | 58,3 | 0 | 0 | 291,7 |
| 4 | 350 | 116,7 | 0 | 0 | 233,3 |
| 5 | 350 | 0,0 | 350 | 0 | 0 |
| 6 | 350 | 0,0 | 0 | 350 | 0 |

4.3.2 Inkubační směsi s glyceraldehydem

Pro sledování vlivu koncentrace glykačního činidla GA jsem si připravila 6 inkubačních směsí o celkovém objemu 600 μl podle následujících tabulek (Tab. 3, Tab. 4). Inkubace probíhala po dobu 7 dní při teplotě 37°C. Nízkomolekulární sloučeniny byly následně odstraněny pomocí centrifugační jednotky Microcon (velikost pórů 10 kDa) za použití 10 mM PBS o pH 7,4. Obsah bílkoviny byl změřen Bradfordovou metodou a upraven na koncentraci 0,5 mg/ml. Vzorky byly dále skladovány při teplotě -20 °C.

Tab. 3: Výsledné koncentrace inkubačních směsí s GA.

| Inkubační směs | Koncentrace GST [mg/ml] | Koncentrace GA [mM] |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1 | 0,5 | |
| 2 | 0,5 | 0,5 |
| 3 | 0,5 | 1 |
| 4 | 0,5 | 2 |
| 5 | 0,5 | 5 |
| 6 | 0,5 | 10 |

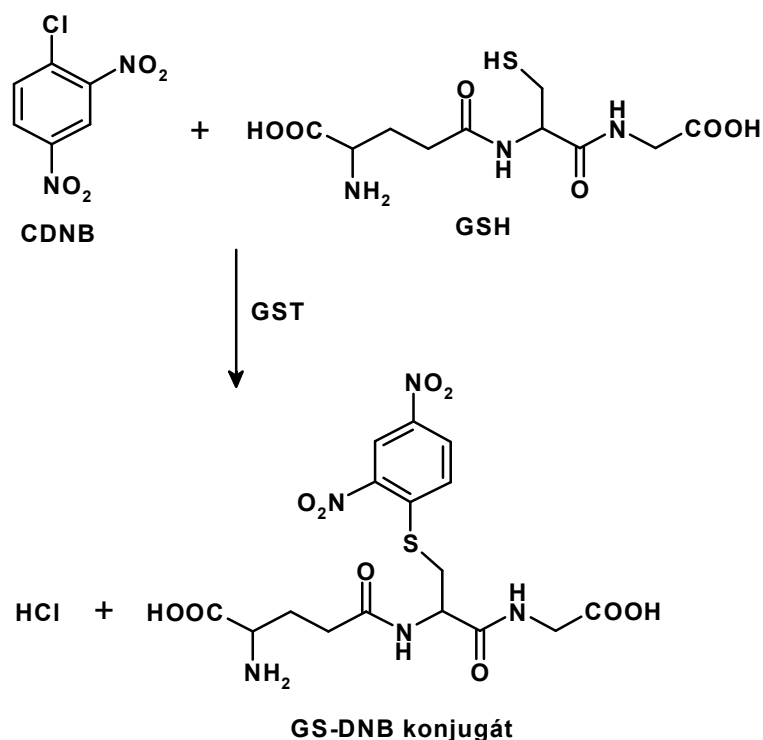
Tab. 4: Příprava inkubačních směsí s GA.

| Inkubační směs | GST 1 mg/ml [μl] | PBS 10 mM [μl] | GA [μl] | Koncentrace zásobního roztoku GA |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|---|
| 1 | 300 | 300 | 0 | 0 mM |
| 2 | 300 | 0 | 300 | 1 mM |
| 3 | 300 | 0 | 300 | 2 mM |
| 4 | 300 | 0 | 300 | 4 mM |
| 5 | 300 | 0 | 300 | 10 mM |
| 6 | 300 | 0 | 300 | 20 mM |

4.4 Stanovení katalytické aktivity GST

4.4.1 Princip stanovení

Principem metody je spektrofotometrické stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu za minutu při použití 0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu a 0,1 M glutathionu.



Obr. 17. Princip stanovení katalytické aktivity GST.

4.4.2 Roztoky pro stanovení aktivity GST

Roztok substrátu (0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzen)

Roztok se připraví rozpuštěním přesné navážky v odpovídajícím množství 96% ethanolu v eppendorfci s uzávěrem.

Roztok konjugačního činidla (0,1 M redukovaný glutathion)

Roztok se připraví rozpuštěním přesné navážky v odpovídajícím množství redestilované vody.

0,1 M fosfátový pufr o pH 6,5

Pufr se připraví v čas potřeby smísením 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ s 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ přibližně v poměru 1:3 za kontroly pH na pH-metru.

4.4.3 Vlastní průběh stanovení aktivity GST

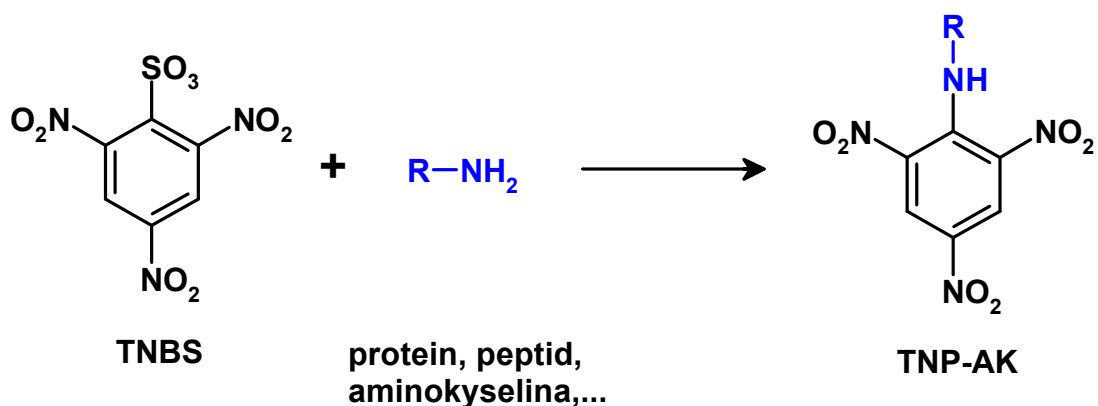
Pro stanovení aktivity GST je nutné si připravit roztok substrátu, roztok konjugačního činidla, 0,1 M fosfátový pufr o pH 6,5 a příslušnou sérii vzorků. Měření jsem prováděla na UV-VIS spektrofotometru HELIOS β při vlnové délce 340 nm za použití 7 kyvet (5 vzorků a 2 slepé vzorky). Před každým dílčím měřením je

potřebné si připravit tzv. master mix, což v mém případě znamenalo 7760 μl 0,1 M fosfátového pufru o pH 6,5, 80 μl roztoku substrátu a 80 μl roztoku konjugačního činidla. Po lehkém promísání se do každé kyvety napipetuje 990 μl tohoto master mixu a následně 10 μl vzorku či PBS (slepý vzorek). Před zahájením měření jsem experimentálně zjistila, kolikrát je nutné vzorky naředit tak, aby byla hodnota absorbance nižší než 0,800. Jednotlivé vzorky se ředí až před každým jednotlivým měřením. Vzorky se inkubují celkově po dobu 180 minut při 37 °C, v jednotlivých intervalech se odebere určité množství vzorku, které se následně zředí v dříve zjištěném poměru a provede se měření na přístroji HELIOS β (počet cyklů - 4, doba jednoho cyklu - 60 s). Poměr konjugovaného substrátu se vypočítá z odečtené absorbance po 1 min s použitím extinkčního koeficientu 9,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ při 340 nm. Po ukončení měření se graficky znázorní závislost aktivity na čase.

4.5 Stanovení primárních aminoskupin

4.5.1 Princip stanovení

Stanovení je založeno na reakci primární aminoskupiny obsažené v bílkovině (Lys, N-koncová AK) s kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou (pikrylsulfonovou, TNBS), při které dochází ke vzniku trinitrofenyl-aminokyseliny (TNP-AK), která absorbuje při 340 nm.



Obr. 18. Princip stanovení primárních aminoskupin.

4.5.2 Roztoky pro stanovení primárních aminoskupin

4% roztok hydrogenuhličitanu sodného o pH 8,4

Roztok se připraví rozpuštěním 4 g hydrogenuhličitanu sodného v přibližně 90 ml redestilované vody, poté se upraví pomocí 4% NaOH na pH-metru pH na 8,4. Doplní se do 100 ml redestilovanou vodou. Uchovává se v lednici.

0,1% roztok TNBS

Roztok se připraví v čas potřeby naředěním zásobního 5% roztoku redestilovanou vodou.

1 M roztok kyseliny chlorovodíkové

1 M roztok kyseliny chlorovodíkové se připraví smísením příslušného množství koncentrované kyseliny chlorovodíkové s redestilovanou vodou. Roztok se uchovává v lednici.

500 μ M β -alanin

22,273 mg β -alaninu se rozpustí v 5 ml 10 mM PBS o pH 7,4. Tento zásobní roztok β -alaninu naředíme 100krát 10 mM PBS o pH 7,4.

4.5.3 Vlastní průběh stanovení primárních aminoskupin

Pro stanovení aminoskupin je nutné si nejprve připravit následující roztoky: 4% roztok hydrogenuhličitanu sodného o pH 8,4, 0,1% roztok TNBS, 1 M HCl a 500 μ M β -alanin. Pro následné sestavení kalibrační křivky jsem si připravila dle následující tabulky (Tab. 5) sérii vzorků v triplikátu. Dále se přidá ke každému vzorku 1 ml 4% roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 50 μ l 0,1 % roztoku TNBS. Vzorky se zamíchají na třepačce a nechají se 120 minut inkubovat v termomixeru při 37 °C. Po uběhnutí doby inkubace se napipetuje do všech vzorků 100 μ l 1 M HCl a 100 μ l 10% SDS. Protřepe se a změří se absorbance při 340 nm na přístroji HELIOS β . Ze získaných dat se sestrojí kalibrační přímka.

Tab. 5: Příprava vzorků pro kalibraci

| Vzorek číslo | Látkové množství β -Ala ve vzorku [nmol] | Roztok β -Ala 500 μ M [μ l] | 10 mM PBS o pH 7,4 [μ l] |
|--------------|--|--|-------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 200 |
| 2 | 20 | 40 | 160 |
| 3 | 30 | 60 | 140 |
| 4 | 40 | 80 | 120 |
| 5 | 50 | 100 | 100 |
| 6 | 60 | 120 | 80 |
| 7 | 80 | 160 | 40 |
| 8 | 100 | 200 | 0 |

V případě vzorků se postupuje obdobným způsobem. Z každé inkubační směsi jsem odebrala 100 μ l, přidala 100 μ l 10 mM PBS o pH 7,4, 1 ml 4% roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 50 μ l 0,1 % roztoku TNBS. Od každého vzorku jsem připravila opět triplikát. Hned po přidání jsem pořádně protřepala a inkubovala 120 minut při 37 °C. Dále se postupuje stejně jako v předchozím případě. Vzorky se měří proti redestilované vodě. Následně se odečte hodnota slepého vzorku (místo bílkoviny obsahuje PBS) a vypočítá se látkové množství volných aminoskupin ve vzorku, které se vztáhne na látkové množství GST.

4.6 Měření fluorescence

Pro zjištění množství fluoreskujících glykačních produktů se jednotlivé vzorky rozpipetují po 200 μ l na 96-ti jamkovou mikrotitrační destičku a samotné měření se provede na čtečce mikrotitračních destiček TECAN INFINITE M200 při specifických vlnových délkách excitace a emise ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 295 nm/386 nm pro vnitřní fluorescenci, 370 nm/440 nm pro „total AGEs“, 335 nm/385 nm pro pentosidin, 330 nm/410 nm pro AGEs a 320 nm/380 nm pro argpyrimidin).

4.7 Elektroforesa a imunoblotting

Změny v molekule GST byly pozorovány pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) za denaturujících (SDS-PAGE) i nedenaturujících podmínek (nativní PAGE). Vznik glykačních produktů byl sledován pomocí imunoblottingu se specifickými protilátkami.

4.7.1 SDS-PAGE

4.7.1.1 *Roztoky pro SDS-PAGE*

4 M roztok kyseliny chlorovodíkové

4 M roztok kyseliny chlorovodíkové se připraví smísením příslušného množství koncentrované kyseliny chlorovodíkové s redestilovanou vodou. Roztok se uchovává v lednici.

Zásobní roztok akrylamidu a bisakrylamidu

Tento roztok se připraví rozpuštěním 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu v malém množství redestilované vody za stálého míchání. Vzniklý roztok se doplní v odměrné baňce redestilovanou vodou do 100 ml. Zásobní roztok se uchovává v lednici.

1,5 M TRIS-HCl pufr o pH 8,8

Pufr se připraví rozpuštěním 18,5 g TRISu v redestilované vodě, následně se upraví pH na pH-metru pomocí 4 M HCl a doplní v odměrné baňce redestilovanou vodou do 100 ml. Pufr se uchovává v lednici.

0,5 M TRIS-HCl pufr o pH 6,8

Pufr se připraví rozpuštěním 6 g TRISu v redestilované vodě, následně se upraví pH na pH-metru pomocí 4 M HCl a doplní v odměrné baňce redestilovanou vodou do 100 ml. Pufr se uchovává v lednici.

10% roztok dodecylsírany sodného (SDS)

Roztok se připraví rozpuštěním 10 g dodecylsírany sodného v 80 ml redestilované vody a následným doplněním v odměrné baňce redestilovanou vodou do 100 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě.

0,5% roztok bromfenolové modři

Roztok se připraví rozpuštěním 50 mg bromfenolové modři v 10 ml redestilované vody. Uchovává se při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr

Pufr se připraví rozpuštěním 72 g glycinu, 15 g TRISu, 5 g dodecylsíranu sodného v 900 ml redestilované vody. Na pH-metru se upraví pH na 8,3 pomocí 4 M HCl a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 1000 ml. Rozdělí se po 100 ml do plastických nádobek a dá se zmrazit.

Elektrodový pufr

70 ml zásobního elektrodového pufru se smíchá v čas potřeby s 280 ml redestilované vody.

Zásobní vzorkový pufr

Pufr se připraví smísením 1,3 ml redestilované vody, 1,0 ml 0,5 M TRIS-HCl pufru o pH 6,8, 2,0 ml glycerolu, 3,0 ml 10% roztoku dodecylsíranu sodného a 0,6 ml 0,5% roztoku bromfenolové modři. Pufr se uchovává v lednici.

Vzorkový pufr

Pufr se připraví v čas potřeby smísením potřebného množství zásobního vzorkového pufru s 2-merkptoethanolem. Na 1 ml vzorkového pufru připadá 50 μ l 2-merkptoethanolu.

Isobutanol nasycený vodou

Isobutanol nasycený vodou se připraví smísením čistého isobutanolu s redestilovanou vodou. V horní vrstvě se nachází isobutanol nasycený vodou. Uchovává se v lednici.

10% persíran amonný

Roztok se připraví těsně před použitím rozpuštěním příslušného množství persíranu amonného v redestilované vodě.

4.7.1.2 Příprava gelů pro SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE jsem používala 12,5% separační a 4% zaostřovací gel. Podle rozpisu v následující tabulce (Tab. 6) jsem v malé kádince připravila roztok pro 12,5% separační (spodní) gel. Po lehkém promíchání jsem ihned pipetou nalila roztok mezi skla s tloušťkou spacerů 0,75 mm do výšky přibližně 4,5 cm od spodního okraje. Poté

jsem roztok po celé délce opatrně převrstvila isobutanolem nasyceným vodou. Následně jsem gel nechala asi 45 minut polymerovat při laboratorní teplotě.

Tab. 6: Rozpis pro přípravu 12,5% separačního gelu (pro 2 gely o tloušťce 0,75 mm)

| 12,5% separační gel 0,75 mm | Objem |
|------------------------------------|--------------|
| Redestilovaná voda | 3,2 ml |
| 1,5 M TRIS-HCl pufr pH 8,8 | 2,5 ml |
| 10% SDS | 0,1 ml |
| Roztok AA + bis AA | 4,2 ml |
| -----iniciace polymerace----- | |
| Roztok APS | 58 μ l |
| TEMED | 4 μ l |

Po ukončení polymerace jsem opatrně slila isobutanol, vrchní část gelu jsem opláchla redestilovanou vodou a prostor nad gelem jsem vysušila filtračním papírem. Poté jsem připravila roztok na přípravu zaostřovacího (vrchního) gelu podle následující tabulky (Tab. 7). Opatrně jsem ho promíchala a ihned se pipetou nalila na spodní gel až po horní okraj skel. Dále jsem mezi skla pod úhlem 45° zasunula hřeben až po drážky, čímž jsem dosáhla vytlačení bublin vzduchu a vytvoření jamek pro nanášení. Gel jsem nechala polymerovat alespoň 2 hodiny, nejlépe přes noc v lednici. Pokud necháváme gely v lednici, je nutné je zabalit do potravinářské folie, aby nevyschly.

Tab. 7: Rozpis pro přípravu 4% zaostřovacího gelu (pro 2 gely o tloušťce 0,75 mm)

| 4% separační gel 0,75 mm | Objem |
|---------------------------------|--------------|
| Redestilovaná voda | 3,125 ml |
| 0,5 M TRIS-HCl pufr pH 6,8 | 1,25 ml |
| 10% SDS | 0,05 ml |
| Roztok AA + bis AA | 0,5 ml |
| -----iniciace polymerace----- | |
| Roztok APS | 60 μ l |
| TEMED | 5 μ l |

4.7.1.3 Průběh SDS-PAGE

Nejprve jsem z připravených gelů opatrně vyndala hřebeny a jamky propláchla redestilovanou vodou. Připravila jsem si stojánek na elektroforesu, zelené těsnění na vnitřní části jsem lehce potřela tukem a skla s gelem přitlačila z každé strany těsnění kratším sklem směrem dovnitř. Vnitřní část stojánku se skly jsem zasunula do vnější části stojánku na elektroforesu a přitáhla sponami. Stojánek jsem vložila do vaničky na elektroforesu. Do vrchního i spodního elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufr a pomocí nanášecího bloku jsem do první jamky pipetou nanasla 5 μ l standardu (molekulový marker) a do dalších jamek 15 μ l vzorku. Tyto vzorky byly nejprve smíchány se vzorkovým puffrem v poměru 2:1 a následně 3 minuty zahřívány v termobloku při 99 °C. Dále jsem vaničku umístila do ledové lázně, přiklopila víčkem a připojila ke zdroji napětí. Elektroforesa nejprve probíhala při konstantním napětí 100 V, dokud vzorky nedosáhly rozhraní zaostřovacího a separačního gelu. Poté jsem napětí zvýšila na 200 V. Jakmile čelo dosáhlo spodního okraje gelu, zdroj jsem vypnula. Celková doba dělení byla asi 50 minut. Stojánek jsem vytáhla z vaničky a vyndala jsem skla s gelem. Skla jsem opatrně rozevřela pomocí zeleného plastového klínku a odřízla jsem separační gel od spacerů a zároveň od zaostřovacího gelu. Separací gel jsem buď následně obarvila (stříbrem nebo Coomassie Blue G250) nebo jsem bílkoviny přenesla na PVDF membránu pomocí western blottingu.

4.7.2 Nativní PAGE

4.7.2.1 Roztoky pro nativní PAGE

Koncentrovaný elektrodový pufr

Pufr se připraví rozpuštěním 72 g glycinu a 15 g TRISu v 900 ml redestilované vody. Na pH-metru se upraví pH na 8,3 pomocí 4 M HCl a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 1000 ml. Rozdělí se po 100 ml do plastických nádobek a dá se zmrazit.

Elektrodový pufr

Pufr se připraví v čas potřeby smísením 70 ml zásobního elektrodového puffru s 280 ml redestilované vody.

Vzorkový pufr

Pufr se připraví smísením 4,3 ml redestilované vody, 1,0 ml 0,5 M TRIS-HCl pufru o pH 6,8, 2,0 ml glycerolu, 0,6 ml 0,5% roztoku bromfenolové modři. Uchovává se v lednici.

Ostatní roztoky jsou shodné s roztoky pro SDS-PAGE.

4.7.2.2 Příprava gelů pro nativní PAGE

Pro nativní PAGE jsem používala 10% separační a 4% zaostřovací gel. Rozpis pro přípravu obou gelů opět uvádím v následujících tabulkách (Tab. 8, Tab. 9). Na přípravu gelů pro nativní PAGE jsem používala skla s tloušťkou spacerů 1,5 mm. Ostatní postup přípravy je shodný s přípravou gelů pro SDS-PAGE.

Tab. 8: Rozpis pro přípravu 12,5% separačního gelu (pro 2 gely o tloušťce 1,5 mm)

| 10% separační gel 1,5 mm | Objem |
|---------------------------------|--------------|
| Redestilovaná voda | 8,0 ml |
| 1,5 M TRIS-HCl pufr pH 8,8 | 5,0 ml |
| Roztok AA + bis AA | 6,8 ml |
| -----iniciace polymerace----- | |
| Roztok APS | 116 μ l |
| TEMED | 8 μ l |

Tab. 9: Rozpis pro přípravu 4% zaostřovacího gelu (pro 2 gely o tloušťce 1,5 mm)

| 4% separační gel 1,5 mm | Objem |
|--------------------------------|--------------|
| Redestilovaná voda | 6,35 ml |
| 0,5 M TRIS-HCl pufr pH 6,8 | 2,5 ml |
| Roztok AA + bis AA | 1,0 ml |
| -----iniciace polymerace----- | |
| Roztok APS | 100 μ l |
| TEMED | 10 μ l |

4.7.2.3 Průběh nativní PAGE

Nejprve jsem z připravených gelů opatrně vyndala hřeben a jamky propláchna redestilovanou vodou. Připravila jsem si stojánek na elektroforesu, těsnění na vnitřní části stojánku lehce potřela tukem a skla s gelem přitlačila z každé strany těsnění kratším sklem směrem dovnitř. Vnitřní část jsem zasunula do vnější části stojánku na elektroforesu a přitáhla sponami. Stojánek jsem vložila do vaničky na elektroforesu. Do horního i dolního elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufř a pomocí nanášecího bloku jsem pipetou nanasla do jamek 30 μ l vzorku. Vzorky byly opět nejprve smíchány se vzorkovým pufřem v poměru 2:1. Dále jsem vaničku ponořila do ledové lázně, přiklopila víčkem a připojila ke zdroji napětí. Elektroforesa nejprve probíhala při konstantním proudu 20 mA, dokud vzorky nedosáhly rozhraní zaostřovacího a separačního gelu. Poté jsem proud zvýšila na 30 mA. Jakmile čelo dosáhlo spodního okraje gelu, zdroj jsem vypnula. Celková doba dělení byla asi 180 minut. Stojánek jsem vyjmula z vaničky a vyndala jsem skla s gelem. Skla jsem opatrně rozevřela pomocí zeleného plastového klínku a odřízla jsem separační gel od spacerů a zároveň od zaostřovacího gelu. Separací gel jsem následně obarvila Coomassie Blue G250 nebo pomocí aktivitního barvení na GST.

4.7.3 Barvení gelů po SDS-PAGE a nativní PAGE

4.7.3.1 Barvení pomocí Coomassie Blue G250

Pro barvení touto metodou jsem používala komerčně dodávaný roztok EZBlue gel staining reagent. Postup barvení je opět znázorněn v následující tabulce (Tab. 10).

Tab. 10: Průběh barvení gelů pomocí roztoku EZBlue gel staining reagent

| Krok | Roztok | Čas |
|------|--------------------|-----------------------|
| 1 | Redestilovaná voda | 3 x 5 min |
| 2 | EZBlue | 45 – 60 min |
| 3 | Redestilovaná voda | 1- 2 hod (i přes noc) |

4.7.3.2 Barvení stříbrem (Silver staining)

50% roztok isopropanolu (v/v)

Roztok se připraví smísením 50 ml čistého isopropanolu s 50 ml redestilované vody.

20% roztok dusičnanu stříbrného (w/v)

Roztok se připraví navážením 2 g dusičnanu stříbrného a doplněním do 10 ml redestilovanou vodou.

4% roztok hydroxidu sodného (w/v)

Roztok se připraví navážením 0,4 g hydroxidu sodného a doplněním do 10 ml redestilovanou vodou.

Fixační roztok

Roztok se připraví navážením 5 g polyethylenglykolu 2000 a doplněním 50% roztokem isopropanolu do 100 ml.

Barvicí roztok

Roztok se připraví smísením 1 ml 20% roztoku dusičnanu stříbrného, 1 ml 25% vodného roztoku amoniaku, 5 ml 4% roztoku hydroxidu sodného a doplněním redestilovanou vodou do 100 ml.

Vyvíjecí roztok

Roztok se připraví rozpuštěním 5 mg kyseliny citronové v 80 ml redestilované vody, přidá se 0,054 ml 37% roztoku formaldehydu a doplní se redestilovanou vodou do 100 ml.

K barvení pomocí stříbra je nutné si připravit fixační, barvicí a vyvíjecí roztok těsně před vlastním barvením. Průběh barvení naznačuje následující tabulka (Tab. 11).

Tab. 11: Průběh barvení gelů stříbrem (Silver staining)

| Krok | Roztok | Čas | pH | Velikost gelu |
|-------------|--------------------|--------------|-----------|----------------------|
| 1 | Fixační roztok | 30 min | | Smršťuje se |
| 2 | Barvicí roztok | 15 min | 11 | Natahuje se |
| 3 | Redestilovaná voda | 3 x 1 min | | Je stejný |
| 4 | Vyvíjecí roztok | 2 a více min | 3 | Je stejný |
| 5 | Redestilovaná voda | | | |

4.7.3.3 Aktivitní barvení na glutathion-S-transferasu

Roztok se substráty

5,064 mg 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu a 20,44 mg nitrobluetetrazoliové soli se rozpustí v 500 µl methanolu. 34,57 mg glutathionu se v 25 ml odměrné baňce rozpustí v Na-fosfátovém pufru (příprava viz. Roztoky pro stanovení aktivity GST). Poté se připipetuje do 25 ml odměrné baňky methanolický roztok a doplní do 25 ml Na-fosfátovým pufrům. Roztok se přehřeje na 37°C.

Roztok fenazinmethosulfátu

605,7 mg TRISu se rozpustí v 80 ml redestilované vody, poté se na pH-metru upraví pH na 9,6 pomocí 1 M HCl a doplní do 100 ml redestilovanou vodou. 22,98 mg fenazinmethosulfátu se těsně před použitím doplní v 25 ml odměrné baňce TRIS-HCl pufrům.

Uchovávací roztok

5,84 g chloridu sodného se ve 100 ml odměrné baňce doplní redestilovanou vodou po rysku.

Pro tento typ barvení je nutné připravit 3 roztoky: roztok se substráty, roztok fenazinmethosulfátu a uchovávací roztok. Průběh barvení popisuje tabulka 12. Po reakci s fenazinmethosulfátem je gel tmavě fialový a v místě s aktivní GST se objevuje projasnění (průhledný bod).

Tab. 12: Průběh barvení gelů na aktivitu GST

| Krok | Roztok | Čas |
|-------------|----------------------------|--------------|
| 1 | Roztok se substráty (37°C) | 10 min |
| 2 | Redestilovaná voda | (opláchnout) |
| 3 | Roztok fenazinmethosulfátu | 3 – 5 min |
| 4 | Redestilovaná voda | (opláchnout) |
| 5 | Uchovávací roztok | |

4.7.4 Western blotting

4.7.4.1 Roztoky pro imunoblotting

Blotovací pufr

6,06 g TRISu a 28,8 g glycinu se rozpustí v přibližně 500 ml redestilované vody, přidá se 400 ml methanolu a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 2000 ml. Uchovává se v lednici.

0,1 M TRIS pufr o pH 8,0

Pufr se připraví rozpuštěním 12,11 g TRISu v 800 ml redestilované vody, poté se na pH-metru upraví pH na 8,0 pomocí 4 M HCl a doplní se redestilovanou vodou v odměrné baňce na 1000 ml. Uchovává se v lednici.

TBST

8,77 g chloridu sodného se rozpustí přibližně v 300 ml redestilované vody, přidají se 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru o pH 8,0. Doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 1000 ml. Uchovává se v lednici.

TBS

2,19 g chloridu sodného se rozpustí v přibližně 100 ml redestilované vody, přidá se 25 ml 0,1 M TRIS pufru o pH 8,0 a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 250 ml. Uchovává se v lednici.

AP pufr

6,06 g TRISu a 508 mg hexahydrátu chloridu hořečnatého se rozpustí přibližně ve 300 ml redestilované vody. Na pH-metru se pomocí 4 M HCl upraví pH na 9,5 a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 500 ml. Uchovává se v lednici.

Roztok TBST s 8% mlékem

Roztok se připraví rozpuštěním 2 g mléka ve 25 ml TBST.

Roztok TBST s primární protilátkou a 0,5% mléka

Roztok se připraví rozpuštěním 125 mg mléka ve 25 ml TBST a přidáním 25 μ l zásobního roztoku primární protilátky. Uchovává se v mrazáku.

Roztok TBST s AP-sekundární protilátkou

Roztok se připraví přidáním 12,5 μ l zásobního roztoku AP-sekundární protilátky ke 25 ml TBST. Uchovává se v mrazáku.

Roztok vývojky a ustalovače

Vývojka i ustalovač se naředí redestilovanou vodou v poměru, který udává návod výrobce. Roztoky se mohou použít opakovaně. Uchovává se v lednici.

4.7.4.2 Vlastní provedení blottingu

Metoda Western blotting se provádí po skončení SDS-PAGE. Separační gel se nechá několik minut plavat v blotovacím pufru. PVDF membrána se nechá aktivovat v methanolu a poté se ponoří do blotovacího pufru. Dále se sestaví blotovací sendvič. Začíná se od spodní černé části blotovacího sendviče a postupuje se směrem nahoru. Všechny součásti sendviče se nejprve namočí v blotovacím pufru. Při sestavování sendviče se nejprve vloží bílá houbička, jeden silný filtrační papír, dále gel, PVDF membrána, opět jeden silný filtrační papír a bílá houbička. Blotovací zařízení se uzavře a vloží do blotovací vaničky. Do vaničky se vloží ledítko s ledem a vanička se naplní blotovacím pufrem tak, aby byl ponořen celý sendvič. Blotovací vanička se umístí do ledové lázně, na zdroji se nastaví konstantní napětí 100 V a blotuje se 120 minut. Po skončení přenosu se sendvič otevře, membrána se vyndá a opláchne v 25 ml TBS. Dále se membrána přenesse do skleněné misky s 8% mlékem v TBST a nechá se přes noc v lednici (blokování).

4.7.4.3 Inkubace s primární a sekundární protilátkou

Druhý den následuje inkubace membrány s protilátkami a promývání membrány. Membrána umístěná uvnitř falkonky (50 ml) se promývá vždy v přibližně 10 ml příslušného roztoku (viz. Tab. 13). Všechny roztoky musí mít laboratorní teplotu.

Tab. 13: Průběh promývání membrány a inkubace s protilátkami

| Krok | Roztok | Čas |
|-------------|--------------------------|------------|
| 1 | TBST | 2 x 5 min |
| 2 | Primární protilátka | 45 min |
| 3 | TBST | 6 x 5 min |
| 4 | AP-sekundární protilátka | 45 min |
| 5 | TBST | 6 x 5 min |
| 6 | TBS | 2 x 5 min |
| 7 | AP-pufr | 2 x 5 min |

4.7.4.4 Chemiluminiscenční detekce

Po slití AP-pufu se na povrch membrány napipetuje asi 1,5 ml substrátu a inkubuje se 5 minut při tlumeném světle v temné komoře, kde se připraví fotomisky s vývojkou a ustalovačem, 2 krabičky s redestilovanou vodou, kazeta, RTG filmy, fotopinzeta, nůžky a folie. Dále se membrána vyndá ze substrátu, nechá se okapat, přenese se na folii, do které se zabalí, otře se vlhkost a umístí se do kazety. Následně se vyndá potřebný počet filmů a dle potřeby se nastříhají na vhodný rozměr. V kazetě se položí film na zabalenou membránu, kazeta se zavře a film se nechá exponovat. Doba osvitů se mění dle aktuálních podmínek. Ihned po expozici se celý film ponoří do vývojky za neustálého kývání a sleduje se vyvíjení. Když je film dostatečně vyvolaný, opláchně se v redestilované vodě, ponoří se do ustalovače a nechá se několik minut plavat. Poté se opět na několik minut ponoří do redestilované vody. Film se vyndá a nechá se oschnout. Nevyvolaný film je nutné uchovávat v temnu.

4.8 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Vzorky byly nejprve rozštěpeny působením chymotrypsinu na kratší fragmenty, které byly následně analyzovány na přístroji Reflex IV (Bruker Daltonics). Jedná se o MALDI-TOF přístroj vybavený dusíkovým UV laserem (337 nm). Získaná data byla analyzována (místo a hmoty vzniklých modifikací) v programu Bioworks Browser (ThermoFinnigan).

4.9 Spektra cirkulárního dichroismu

Molární elipticita (θ) vzorků v závislosti na vlnové délce byla měřena na spektrometru cirkulárního dichroismu J-815 (Jasco) v 0,5 cm křemenné kyvetě. Ze získaných výsledků bylo vypočteno množství bílkoviny (%) přítomné v α -helikální formě podle rovnice: $\% \alpha\text{-helix} = [(-[\theta]_{222 \text{ nm}} + 3000)/39000] \times 100$.

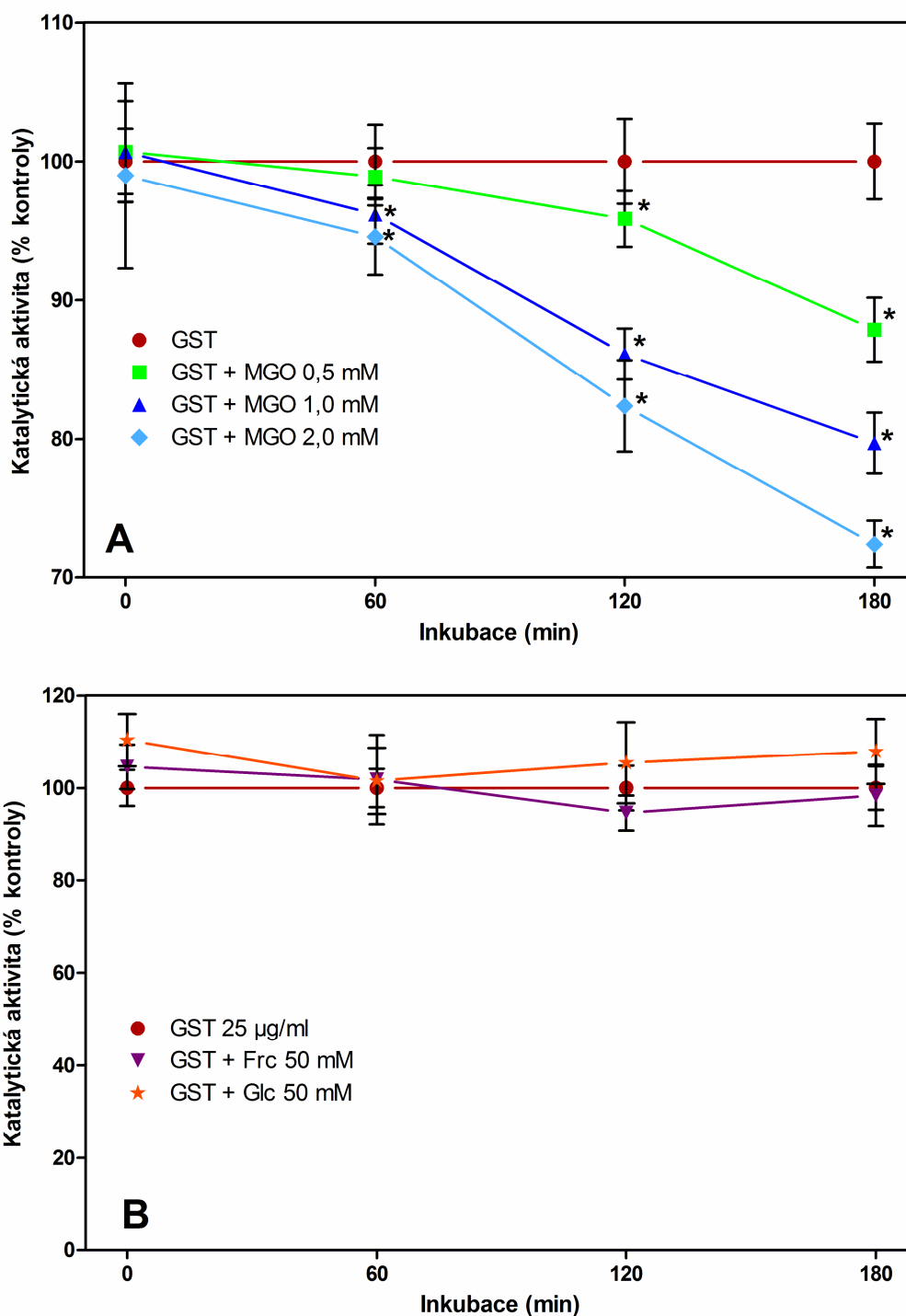
5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv methylglyoxalu, fruktosy a glukosy na strukturu a funkci glutathion-S-transferasy

5.1.1 Katalytická aktivita vzorků s MGO, glukosou a fruktosou

Pro stanovení aktivity GST jsem si připravila vzorky s koncentrací MGO 0-2 mM. Každý vzorek obsahoval 25 µg/ml GST. Na UV-VIS spektrofotometru HELIOS β jsem při vlnové délce 340 nm měřila absorbanci. Ze získaných dat jsem následně vypočítala specifickou aktivitu (U/mg) každého vzorku. Výsledky jsem vztáhla k aktivitě kontrolního vzorku (GST samotná), která v každém měřeném intervalu představovala 100 %.

Aktivita kontrolního vzorku byla během celého experimentu stabilní. Jak je zřejmé z Obr. 19, MGO způsobil nevratný pokles aktivity GST, jehož rozsah byl závislý na koncentraci tohoto glykačního činidla. Při inkubaci GST s MGO 2 mM došlo k poklesu katalytické aktivity GST o 27,6 % po 180 minutách inkubace při 37 °C (Obr. 19A). Statisticky významný ($P < 0,05$) pokles aktivity jsem pozorovala u MGO 0,5 mM po 120 min a ve vzorcích obsahujících MGO 1 mM a 2 mM již po 60 min inkubace. Ve vzorcích obsahujících Frc a Glc jsem zaznamenala jen malé změny v aktivitě GST. Aktivita v těchto vzorcích klesla maximálně o 5,4 % v případě fruktosy. Ve vzorku obsahujícím glukosu jsem pokles aktivity nepozorovala (Obr. 19B).

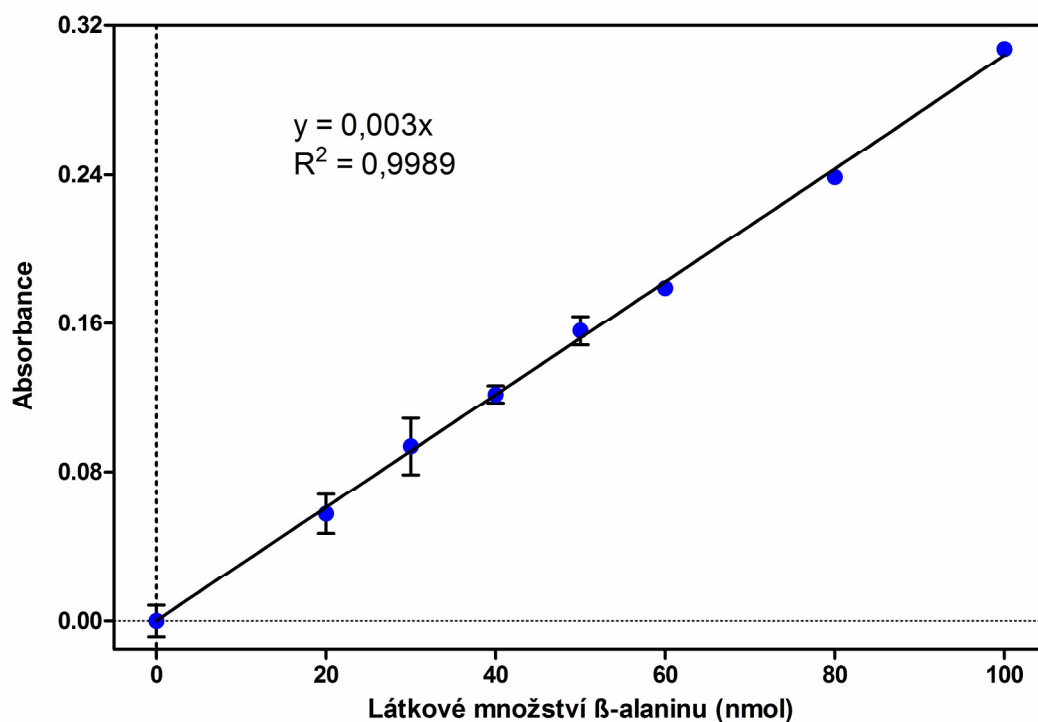


Obr. 19. Účinek glykace methylglyoxalem, fruktosou a glukosou na katalytickou aktivitu GST. GST (25 µg/ml) byla inkubována v 10 mM PBS (pH 7,4) s nebo bez MGO (panel A), Frc nebo Glc (panel B) po dobu 180 min při 37 °C. Katalytická aktivita GST byla vyjádřena jako % aktivity kontrolního vzorku (GST bez glykačního činidla) ve všech měřených intervalech, která byla vždy 100 % ± S.D. (%). Každý bod představuje průměr ze dvou nezávislých experimentů, u nichž n = 6 (**P* < 0,05, Studentův *t*-test).

5.1.2 Stanovení aminokupin vzorků s MGO, glukosou a fruktosou

Pro stanovení obsahu primárních aminokupin jsem si připravila kalibrační křivku s β -alaninem (Obr. 20), kterou jsem poté používala k výpočtu obsahu aminokupin ve vzorcích s GST a glykačními činidly. Při glykaci bílkovin obecně dochází k chemické modifikaci primárních aminokupin (ϵ -aminokupina Lys a α -aminokupina *N*-terminální aminokyseliny), čímž se snižuje jejich obsah v dané bílkovině. Molekula GST obsahuje celkem 44 primárních aminokupin (21 Lys/podjednotka a 1 *N*-koncová aminokyselina/podjednotku; databáze UniProt www.uniprot.org).

Inkubace GST s MGO, Frc nebo Glc vedla ke snížení obsahu aminokupin v rozsahu, který odpovídal reaktivitě a koncentraci příslušného glykačního činidla (Tab. 14). Ze získaných výsledků je patrné, že nejsilnějším glykačním činidlem byl MGO. Při inkubaci GST s MGO 2 mM došlo k redukci počtu aminokupin o 14 po sedmi dnech inkubace. Vzhledem k malému rozsahu poškození bílkoviny Frc a Glc jsem nechala tyto vzorky inkubovat po dobu 28 dní. Po této době došlo v případě Glc k poklesu obsahu aminokupin o 5 aminokupin a v případě Frc o 7, což je srovnatelné s účinkem MGO 0,5 mM ovšem po výrazně delší době inkubace. Účinek všech glykačních činidel byl statisticky významný ($P < 0,01$) kromě vzorku GST + Glc 50 mM po sedmi dnech inkubace, který se významně nelišil od kontrolního vzorku.



Obr. 20. Kalibrační přímka pro stanovení primárních aminoskupin.

Tab. 14: Vliv glykačních činidel methylglyoxalu (0,5-2 mM), fruktosy (50 mM) a glukosy (50 mM) na obsah primárních aminoskupin v molekule GST.

| Vzorek | Obsah aminoskupin (mol NH ₂ /mol GST) | | Počet primárních aminoskupin | |
|-------------------------|---|----------------------------|---------------------------------|----------------|
| | 7 dní | 28 dní | 7 dní | 28 dní |
| GST | 52,76 ± 1,17 ^a | 52,59 ± 1,23 ^a | 44 | 44 |
| GST + MGO 0,5 mM | 46,19 ± 2,68 ^{cd} | - ^g | 39 | - ^g |
| GST + MGO 1 mM | 40,70 ± 1,22 ^e | - ^g | 34 | - ^g |
| GST + MGO 2 mM | 36,44 ± 1,42 ^f | - ^g | 30 | - ^g |
| GST + Frc 50 mM | 48,82 ± 1,82 ^{bc} | 44,16 ± 1,26 ^d | 41 | 37 |
| GST + Glc 50 mM | 52,01 ± 1,92 ^{ab} | 46,80 ± 0,72 ^{cd} | 43 | 39 |

^{a,b,c,d,e,f} Skupiny s různými písmeny se signifikantně liší ($P < 0,01$, Studentův t-test).

Každá hodnota představuje průměr ze dvou nezávislých experimentů ($n = 3$) ± S.D.

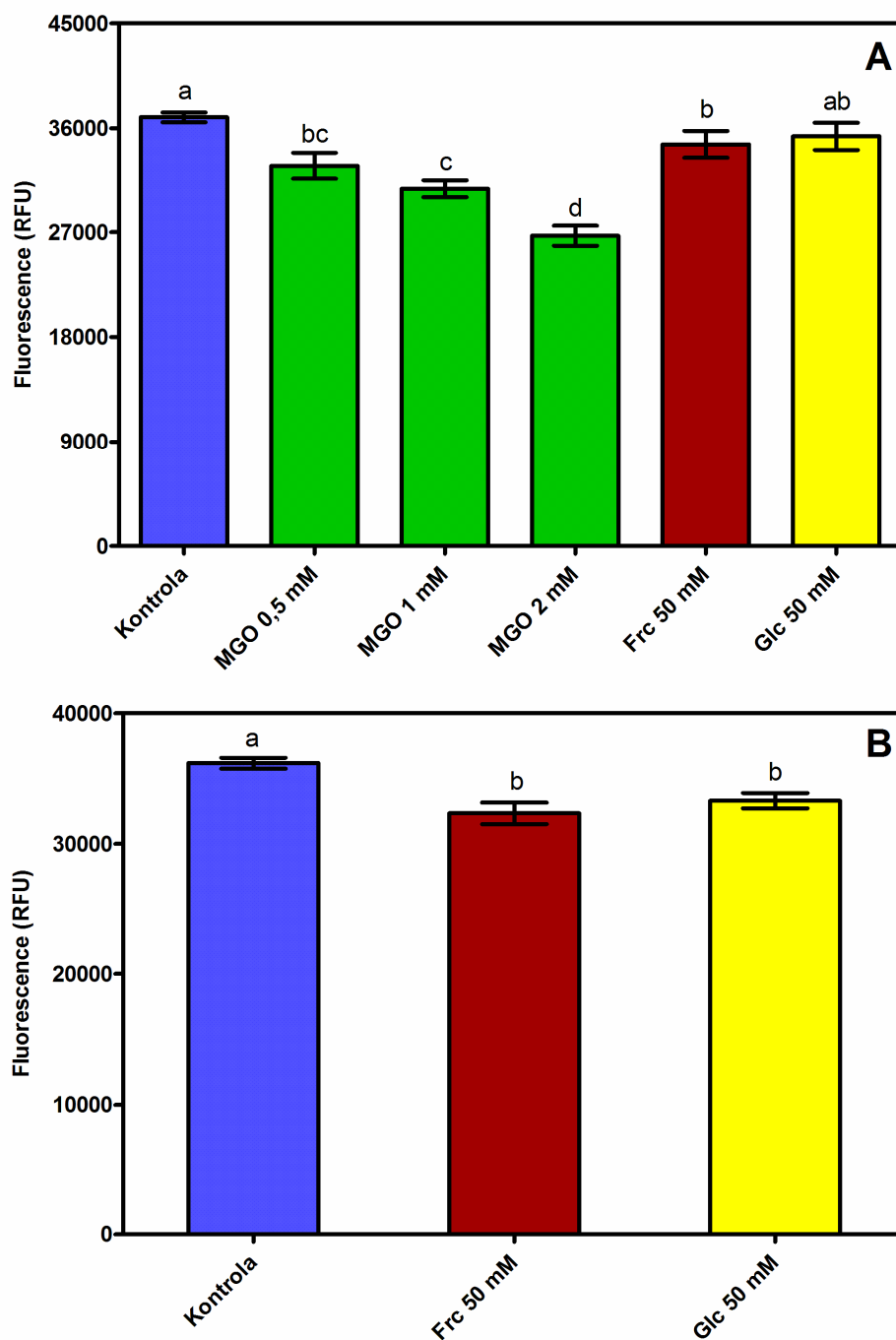
^g Obsah aminoskupin nebyl stanoven.

5.1.3 Měření fluorescence vzorků s MGO, glukosou a fruktosou

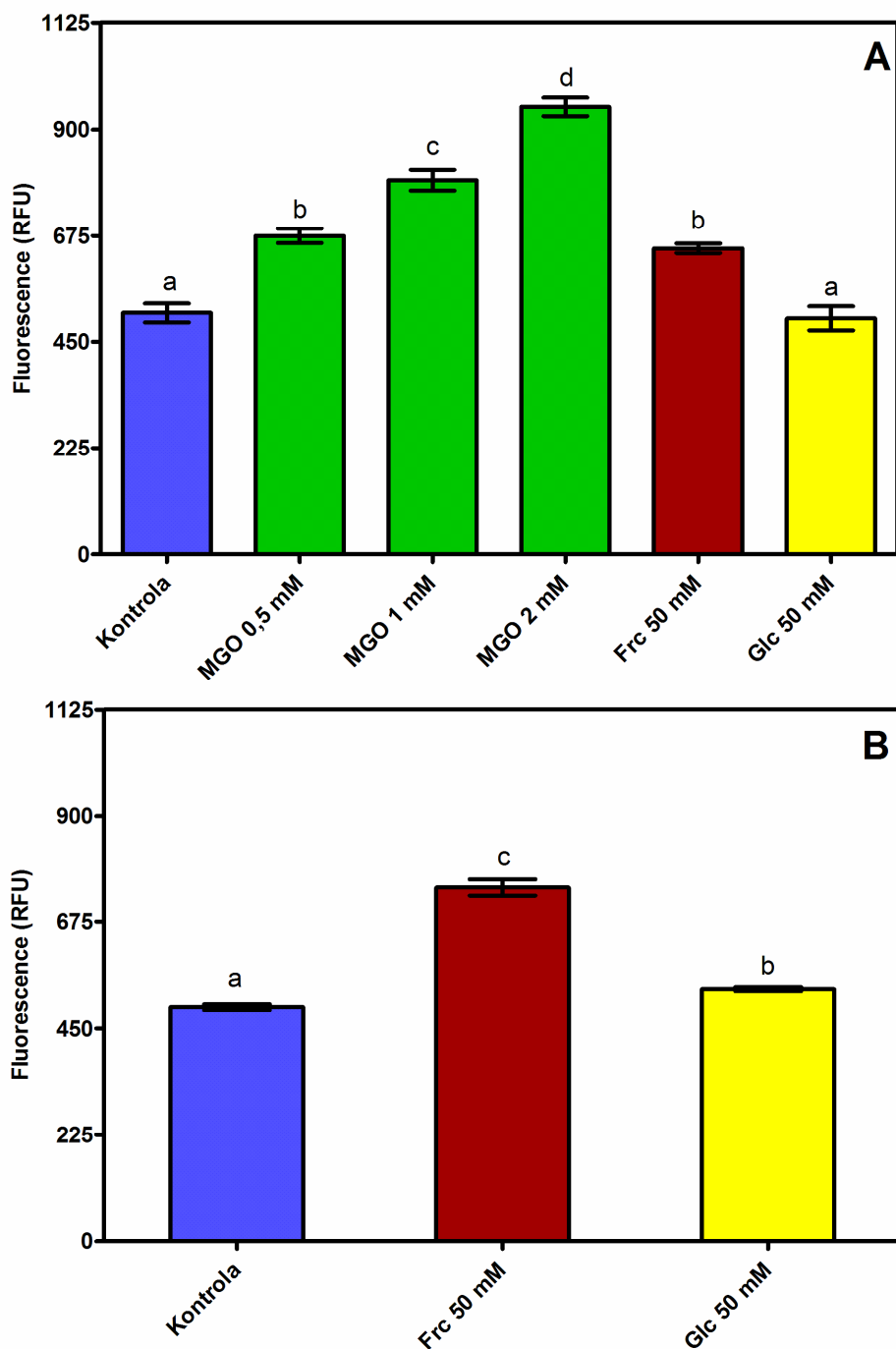
Vzorky po odstranění nízkomolekulárních látek a úpravě koncentrace bílkoviny jsem rozpipetovala po 200 μ l na mikrotitrační destičku (100 μ g GST/jamka) a měřila jsem jejich fluorescence při specifických délkách excitace a emise, které odpovídají jednotlivým glykačním produktům a tryptofanu, na čtečce TECAN INFINITE M200.

Inkubace GST s glykačními činidly vedla k nárůstu intenzity fluorescence vlivem vzniku AGE produktů s fluorescenčními vlastnostmi (Obr. 22-24) a k poklesu vnitřní fluorescence (Obr. 21), tj. fluorescence tryptofanových zbytků. Vnitřní fluorescence je velmi citlivá vůči změnám vnějšího prostředí tryptofanu (polarita rozpouštědla, iontová síla roztoku, lokální elektrické pole bílkoviny) a lze ji tedy využít ke sledování konformačních změn v molekule bílkoviny např. při studiu interakcí protein-protein nebo ligand-protein.

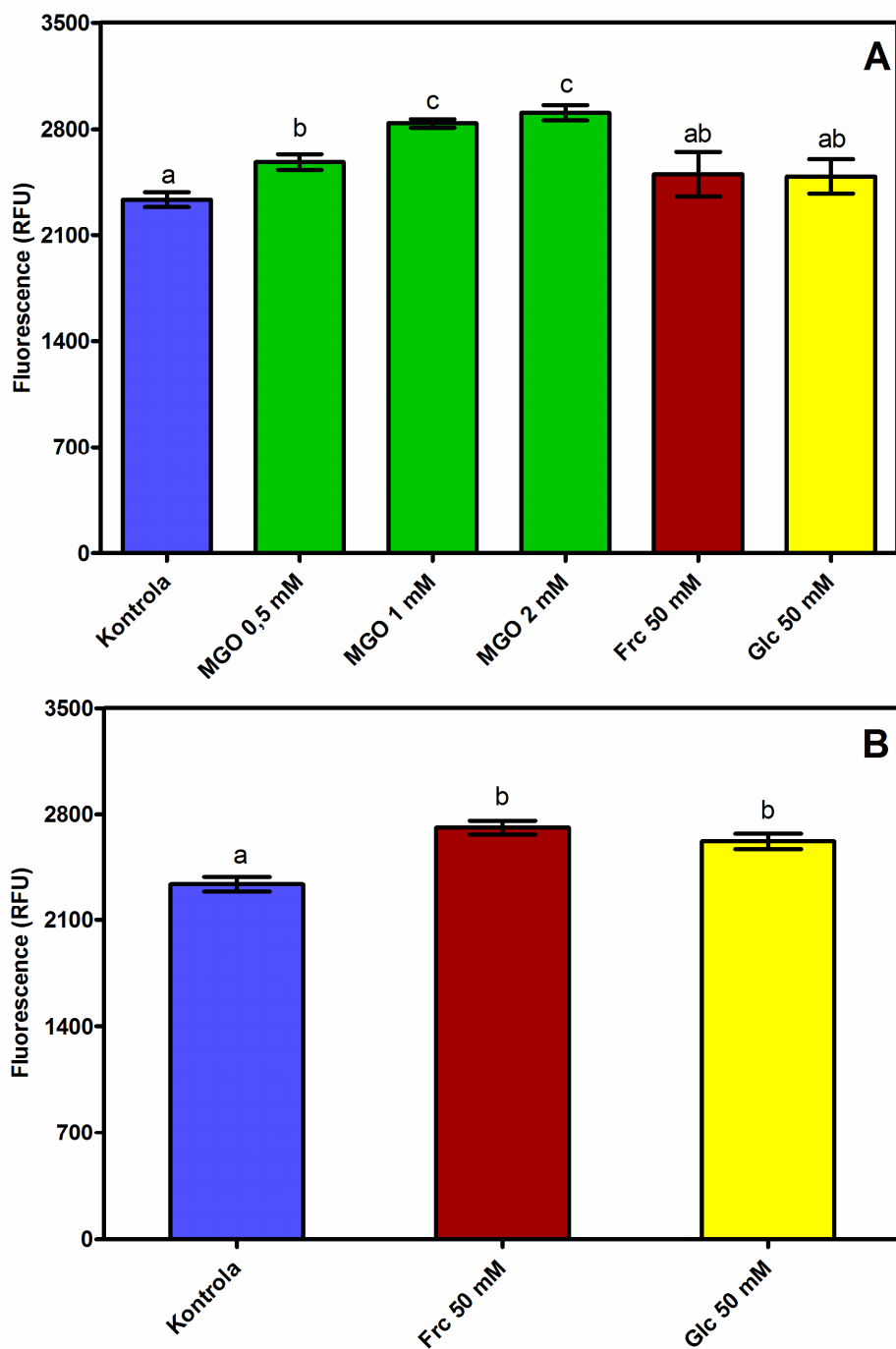
Sedmidenní inkubace GST s MGO (0,5-2 mM) způsobila výrazný nárůst fluorescence v oblasti odpovídající nespecifickým (též celkovým) AGE produktům. Tento nárůst byl závislý na koncentraci MGO a např. u MGO 2 mM činil 85,3 %. Vzestup fluorescence dalších glykačních produktů s fluorescenčními vlastnostmi (pentosidin a argpyrimidin) nebyl tak výrazný jako v případě celkových AGEs. U MGO 2 mM vzrostla fluorescence pentosidinu o 24,3 % a argpyrimidinu jen o 6,5 % proti kontrolnímu vzorku. Účinek Frc a Glc byl slabší než tomu bylo u MGO a výrazněji se projevil až po delší době inkubace (Obr.22B-24B). MGO 2 mM způsobil pokles vnitřní fluorescence o 27,7 % ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 21A). Pokles vnitřní fluorescence u vzorků obsahujících Glc a Frc byl menší než u MGO. Vlivem Frc 50 mM klesla fluorescence o 6,3 % a 10,6 % po 7 respektive 28 dnech inkubace (Obr. 21A a B).



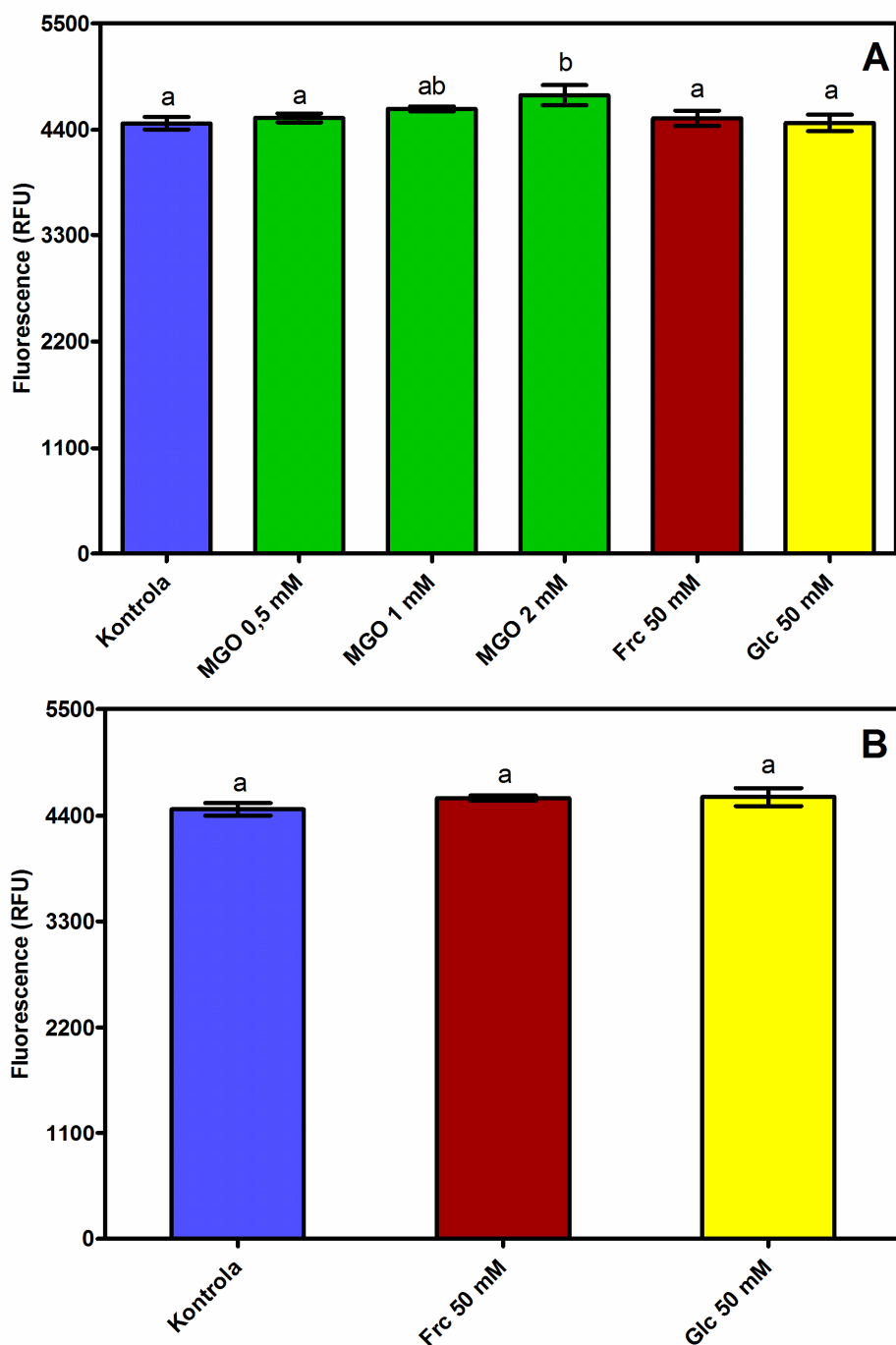
Obr. 21. Vliv glykačních činidel na vnitřní fluorescenci GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez methylglyoxalu (0,5-2 mM), fruktosy (50 mM) a glukosy (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní (panel A) nebo 28 dní (panel B). Glykační činidla byla odstraněna pomocí centrifugační jednotky Microcon. Fluorescence vzorků (100 µg GST/jamka) byla měřena při vlnových délkách excitace a emise 295 nm a 386 nm. Data jsou vyjádřena v jednotkách relativní fluorescence (RFU) ± S.D. Každý bod představuje průměr ze dvou nezávislých experimentů, kde $n = 3$. Skupiny s různými písmeny se signifikantně liší ($P < 0,01$, Studentův t-test).



Obr. 22. Vliv glykačních činidel na vznik celkových AGEs. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez methylglyoxalu (0,5-2 mM), fruktosy (50 mM) a glukosy (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní (panel A) nebo 28 dní (panel B). Glykační činidla byla odstraněna pomocí centrifugační jednotky Microcon. Fluorescence vzorků (100 µg GST/jamka) byla měřena při vlnových délkách excitace a emise 370 nm a 440 nm. Data jsou vyjádřena v jednotkách relativní fluorescence (RFU) ± S.D. Každý bod představuje průměr ze dvou nezávislých experimentů, kde n = 3. Skupiny s různými písmeny se signifikantně liší (P < 0,01, Studentův t-test).



Obr. 23. Vliv glykačních činidel na vznik pentosidinu. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez methylglyoxalu (0,5-2 mM), fruktosy (50 mM) a glukosy (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní (panel A) nebo 28 dní (panel B). Glykační činidla byla odstraněna pomocí centrifugační jednotky Microcon. Fluorescence vzorků (100 µg GST/jamka) byla měřena při vlnových délkách excitace a emise 335 nm a 385 nm. Data jsou vyjádřena v jednotkách relativní fluorescence (RFU) ± S.D. Každý bod představuje průměr ze dvou nezávislých experimentů, kde n = 3. Skupiny s různými písmeny se signifikantně liší (P < 0,01, Studentův t-test).



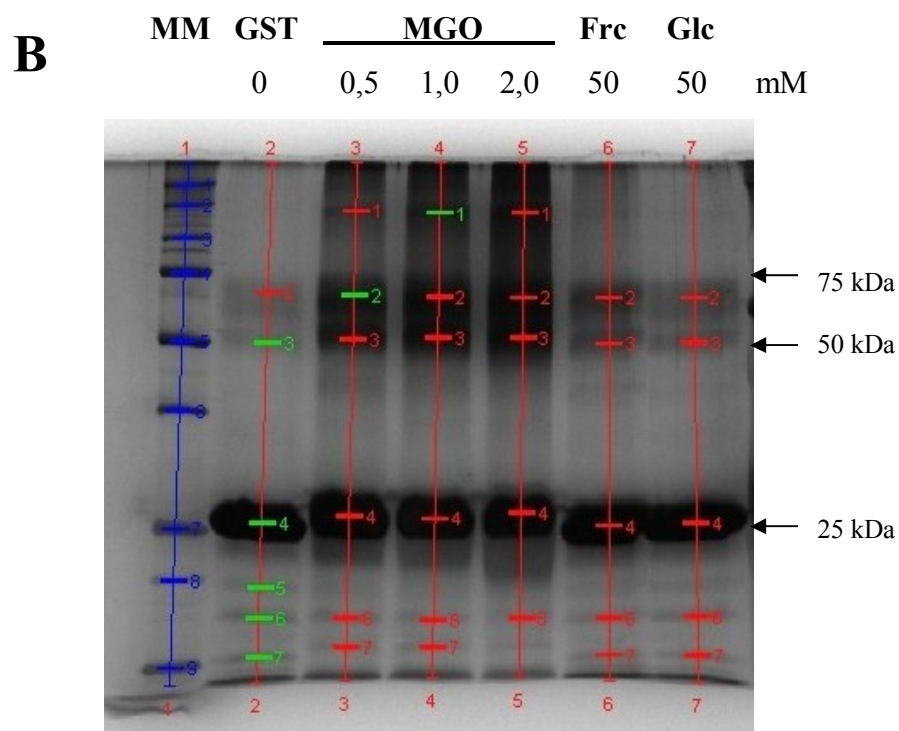
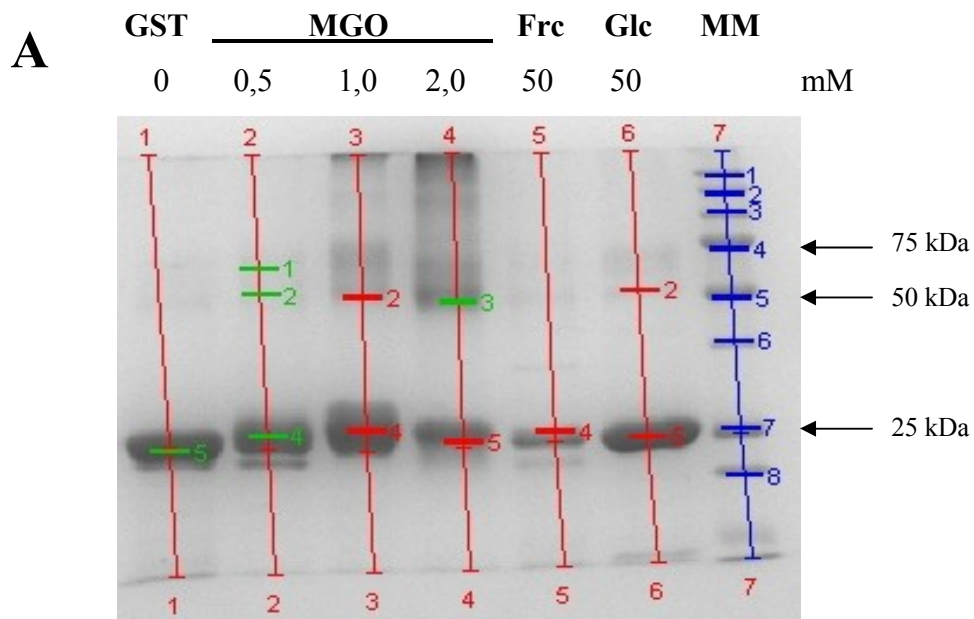
Obr. 24. Vliv glykačních činidel na vznik argpyrimidinu. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez methylglyoxalu (0,5-2 mM), fruktosy (50 mM) a glukosy (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní (panel A) nebo 28 dní (panel B). Glykační činidla byla odstraněna pomocí centrifugační jednotky Microcon. Fluorescence vzorků (100 µg GST/jamka) byla měřena při vlnových délkách excitace a emise 320 nm a 380 nm. Data jsou vyjádřena v jednotkách relativní fluorescence (RFU) ± S.D. Každý bod představuje průměr ze dvou nezávislých experimentů, kde n = 3. Skupiny s různými písmeny se signifikantně liší (P < 0,01, Studentův t-test).

5.1.4 SDS-PAGE a WB vzorků s MGO, glukosou a fruktosou

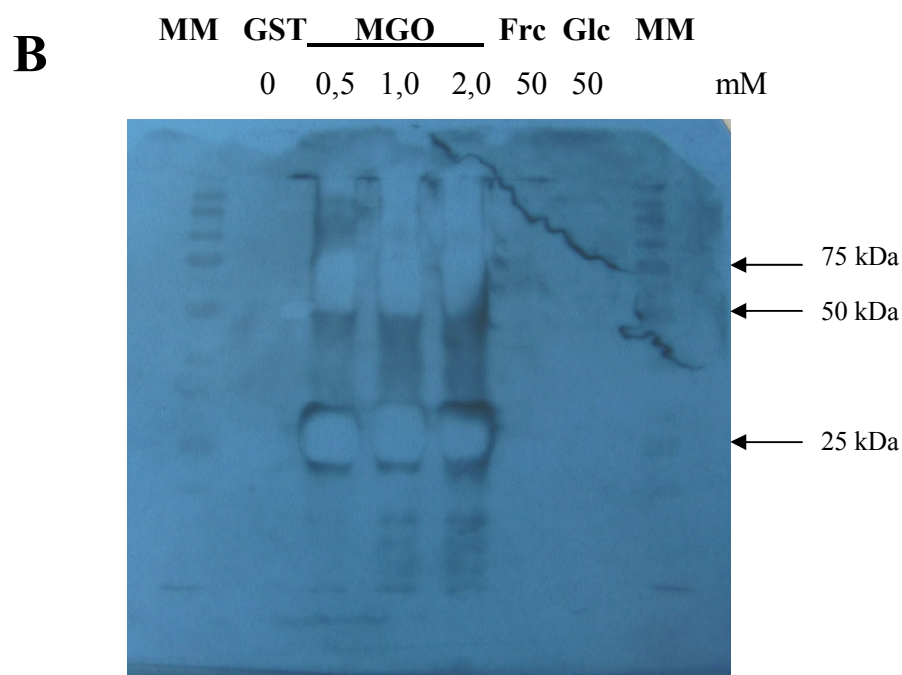
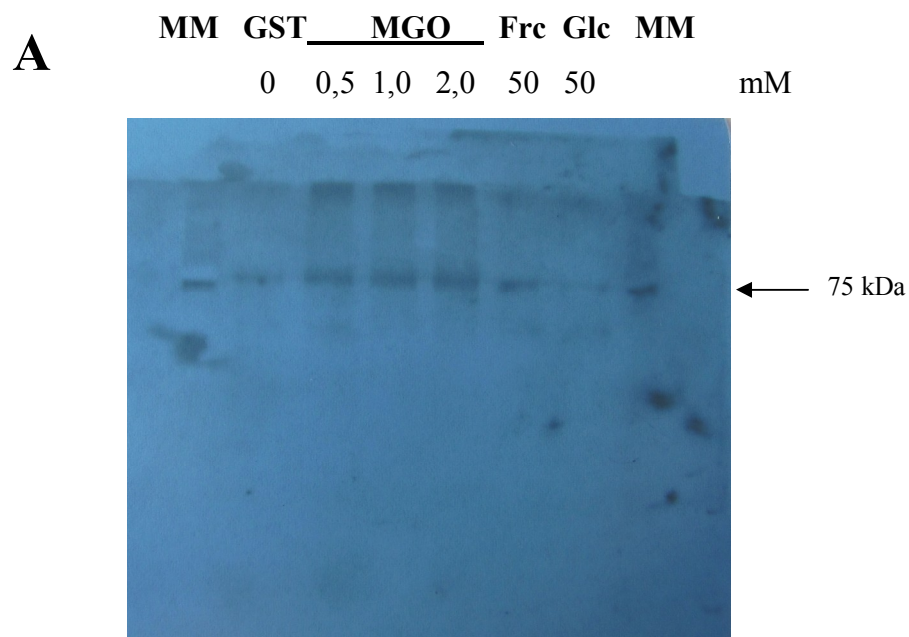
Vzorky pro SDS-PAGE jsem inkubovala po dobu 7 dní a vzorky pro western blotting po dobu 11 dní. Podmínky separace a inkubace s protilátkami jsou uvedeny pod Obr. 25 a 26. Gely po barvení byly snímány pomocí přístroje GelDoc XR a vyhodnoceny v programu QuantityOne.

Během inkubace s MGO a částečně i s Frc došlo ke vzniku agregátů s vyšší molekulovou hmotností, než má molekula GST (25 kDa). Při inkubaci s MGO vznikaly vysokomolekulární agregáty se širokým rozpětím molekulové hmotnosti (od 50 do 200 kDa). Došlo též k mírnému zvýšení molekulové hmotnosti hlavního bandu GST (asi o 2 kDa) a též k úbytku jeho intenzity, což souvisí se vznikem vysokomolekulárních agregátů (Obr. 25A a B).

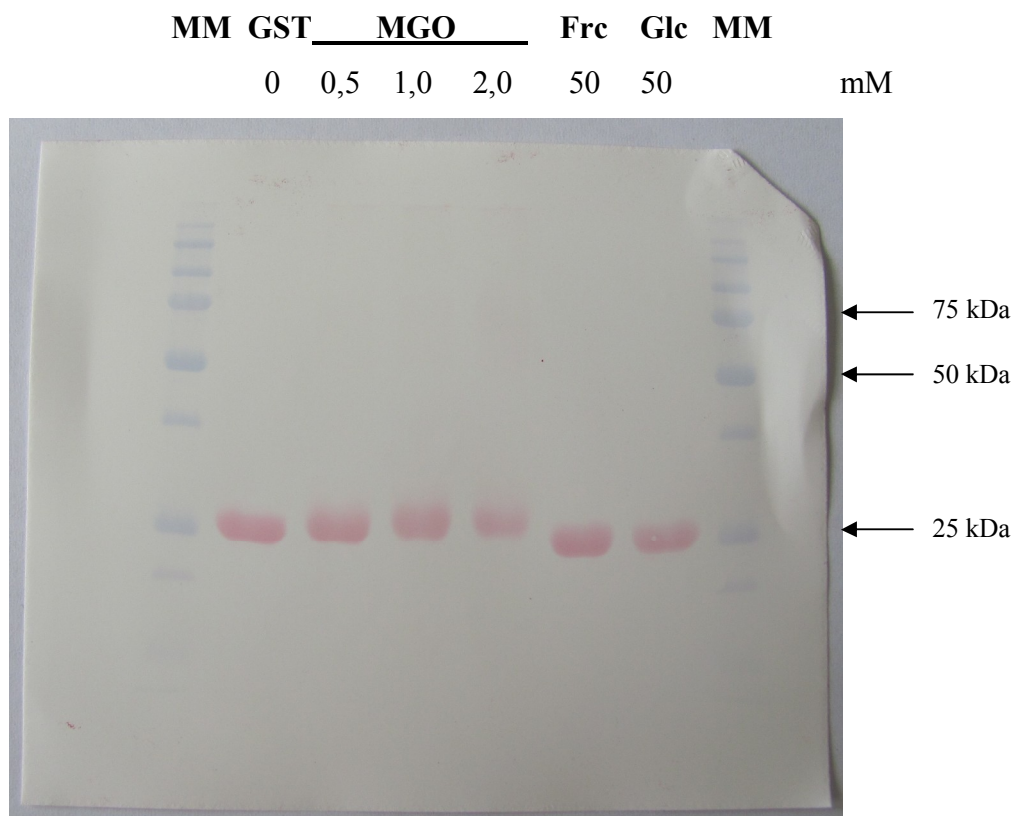
Pro ověření tvorby AGE produktů ve vznikajících vysokomolekulárních agregátech jsem použila imunochemickou detekci po přenosu bílkovin z gelu na membránu pomocí western blottingu. Použila jsem primární protilátku proti AGE produktům (Acris Antibodies) a primární protilátku [3C] proti MGO (Abcam). Při použití protilátky proti AGE produktům jsem ve vzorcích obsahujících MGO a Frc pozorovala vznik vysokomolekulárních agregátů s molekulovou hmotností asi 75 kDa, což odpovídá trimeru GST (Obr. 26A). Při použití protilátky proti MGO došlo ve vzorcích obsahujících MGO k označení hlavního bandu GST (25 kDa), ke vzniku vysokomolekulárních agregátů s molekulovou hmotností 50-75 kDa a také jsem pozorovala vznik kratších peptidů s molekulovou hmotností kolem 14 kDa (Obr. 26B). Membránu jsem po provedení chemiluminiscenční detekce ještě obarvila pomocí Ponceau S a pozorovala jsem změny v migraci hlavního bandu GST směrem k vyšším molekulovým hmotnostem a snížení jeho intenzity ve vzorcích s MGO (Obr. 27). Získané výsledky naznačují, že glykace MGO je doprovázena zejména vznikem zkřížených vazeb mezi řetězci GST (vysokomolekulární agregáty s obsahem AGE produktů) a též fragmentací řetězce GST na kratší peptidy.



Obr. 25. Vliv glykačních činidel na molekulovou hmotnost GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s methylglyoxalem (0,5-2 mM), fruktosou (50 mM) a glukosou (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní a následně podrobena SDS-PAGE. Podmínky separace: zaostřovací gel 4%, separační gel 12,5%, množství bílkoviny v jamce 4 µg, barveno pomocí Coomassie Blue G250 (panel A) nebo stříbra (panel B).



Obr. 26. Vliv glykačních činidel na tvorbu AGE produktů. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s methylglyoxalem (0,5-2 mM), fruktosou (50 mM) a glukosou (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 11 dní a následně podrobena SDS-PAGE s následným western blottingem. Hmotnostní standard (první a poslední dráha) a proteiny byly označeny po reakci se specifickými protilátkami chemiluminiscenční detekcí pro alkalickou fosfatase. Použité protilátky: králičí polyklonální proti AGE produktům (panel A) a myší monoklonální [3C] proti MGO (panel B). Podmínky separace: zaostřovací gel 4%, separační gel 12,5%, množství bílkoviny v jamce 4 µg.



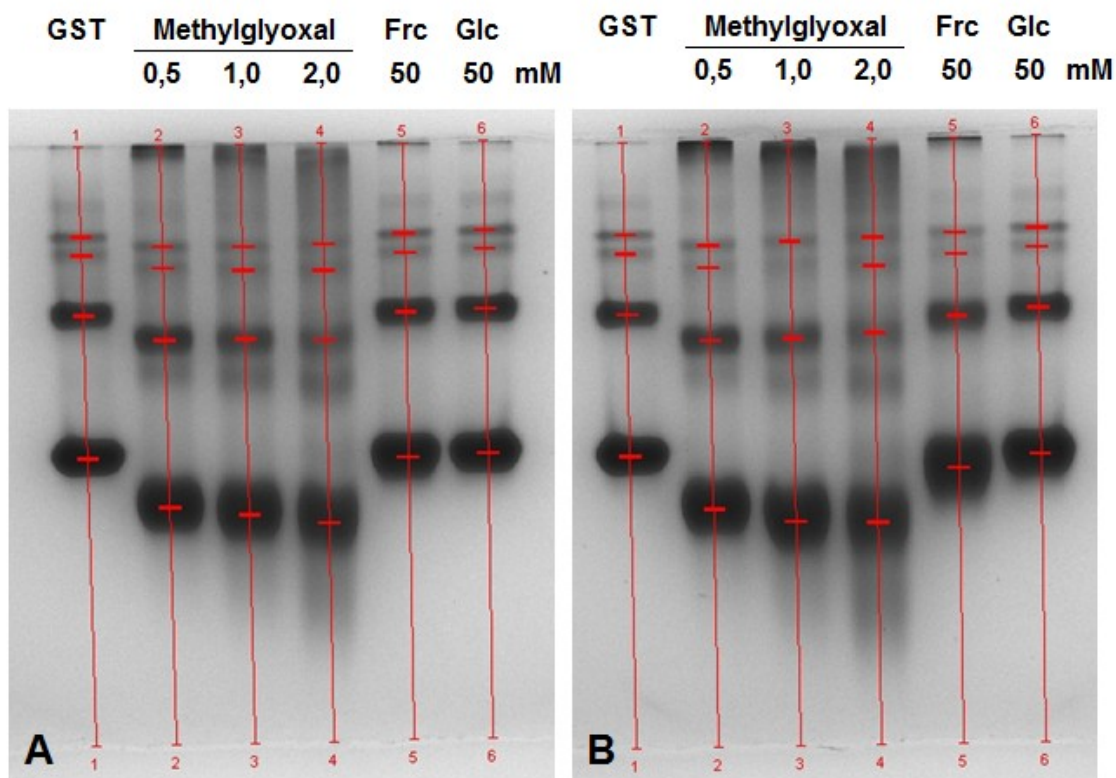
Obr. 27. Vliv glykačních činidel na tvorbu AGE produktů. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s methylglyoxalem (0,5-2 mM), fruktosou (50 mM) a glukosou (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 11 dní a následně podrobena SDS-PAGE s následným western blottingem. Membrána byla následně obarvena pomocí Ponceau S. Podmínky separace: zaostřovací gel 4%, separační gel 12,5%, množství bílkoviny v jamce 4 µg.

5.1.5 Nativní PAGE vzorků s MGO, glukosou a fruktosou

Vzorky pro nativní PAGE jsem inkubovala po dobu 14 dní a část z nich jsem odebírala v čase 0, 1, 3, 7 a 14 dní a uchovávala jsem do doby provedení nativní PAGE při -20 °C. Podmínky provedení jsou uvedeny pod Obr. 28.

Z Obr. 31 je patrné, že přítomnost MGO ve všech použitých koncentracích vyvolala zvýšení mobility vzorku směrem ke kladně nabitě elektrodě. Tento efekt byl způsoben úbytkem kladných nábojů primárních aminoskupin (Lys) obsažených v molekule GST. Výsledky jsou v souladu se závěry stanovení obsahu primárních aminoskupin (viz. Tab. 14). Vliv jednotlivých glykačních činidel na relativní mobilitu molekuly GST v čase je shrnut v Tab. 15.

Změny v mobilitě GST způsobené MGO jsem pozorovala již od prvního dne inkubace, kdy mobilita vzorku obsahujícího MGO 2 mM vzrostla o 11,6 % ve srovnání s kontrolním vzorkem (GST samotná). Naproti tomu změny v migraci GST vyvolané Frc 50 mM a Glc 50 mM byly výrazněji patrné až od čtrnáctého dne inkubace (Obr. 29).

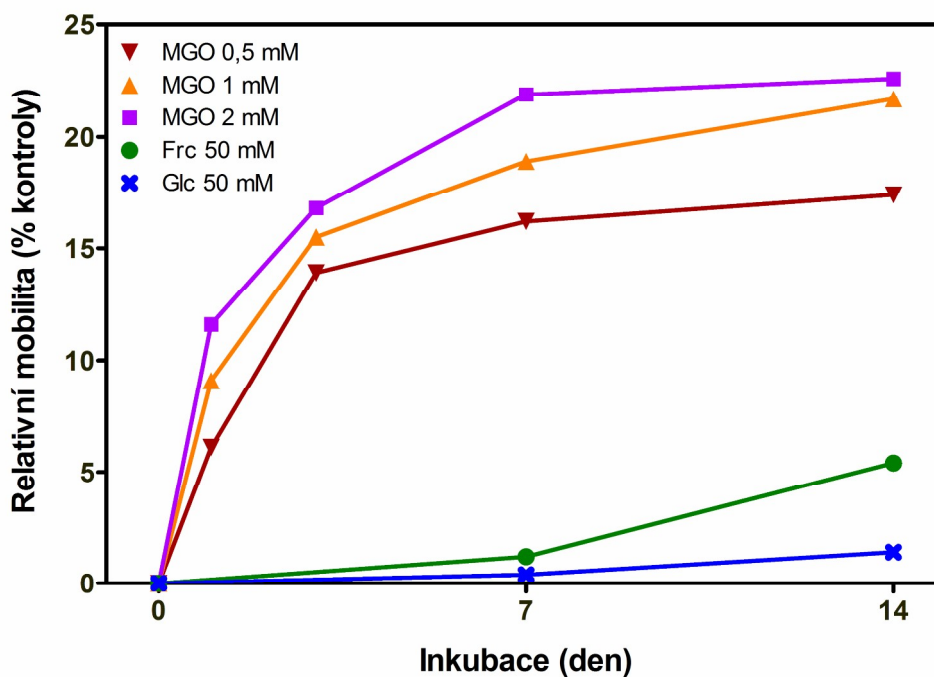


Obr. 28. Vliv glykačních činidel na náboj molekuly GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s methylglyoxalem (0,5-2 mM), fruktosou (50 mM) a glukosou (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní (panel A) nebo 14 dní (panel B) a následně podrobena nativní PAGE (zaostřovací gel: 4%, separační gel: 10%, množství bílkoviny v jamce: 10 µg, barveno pomocí: Coomassie Blue G250).

Tab. 15: Vliv glykačních činidel na náboj molekuly GST.

| Vzorek | Rf ¹ | | % migrace | |
|------------------|-----------------|--------|-----------|--------|
| | 7 dní | 14 dní | 7 dní | 14 dní |
| GST | 0,520 | 0,517 | 100,00 | 100,00 |
| GST + MGO 0,5 mM | 0,604 | 0,607 | 116,15 | 117,41 |
| GST + MGO 1 mM | 0,618 | 0,629 | 118,85 | 121,66 |
| GST + MGO 2 mM | 0,634 | 0,634 | 121,92 | 122,63 |
| GST + Frc 50 mM | 0,526 | 0,545 | 101,15 | 105,42 |
| GST + Glc 50 mM | 0,522 | 0,524 | 100,38 | 101,35 |

¹Rf: relativní mobilita vzorku („relative front“)



Obr. 29. Vliv glykačních činidel na náboj molekuly GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s methylglyoxalem (0,5-2 mM), fruktosou (50 mM) a glukosou (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 14 dní a následně podrobena nativní PAGE (zaostřovací gel: 4%, separační gel: 10%, množství bílkoviny v jamce: 10 µg, barveno pomocí: Coomassie Blue G250). Výsledky představují nárůst relativní mobility daného vzorku (%) nad hodnotu relativní mobility kontroly (samotné GST).

5.1.6 Hmotnostní spektroskopie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF vzorků obsahujících GST, GST + MGO 0,5 mM a GST + MGO 2 mM byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (Dr. Šanda). Vzorky byly nejprve hydrolyticky štěpeny chymotrypsinem na kratší peptidy a poté analyzovány na přístroji Reflex IV (Bruker Daltonics). Záznamy byly vyhodnoceny (místo a hmoty vzniklých modifikací) v programu Bioworks Browser (ThermoFinnigan).

Ze zaslaných výsledků se podařilo zjistit místo modifikace a vznikající AGE produkt. MGO 0,5 mM modifikoval 3 argininové zbytky, zatímco MGO 2 mM modifikoval celkem 7 argininových zbytků. Modifikované aminokyselinové zbytky a vznikající AGE produkty jsou uvedeny v Tab 16. Na Obr. 30 je uvedena sekvence použité GST s vyznačením modifikovaných argininových zbytků. Dalšími místy pozorované modifikace byly 4 methioninové, 1 cysteinový a 1 threoninový zbytek, ale hmota této modifikace neodpovídala předpokládaným AGE produktům. Jedná se zřejmě o posttranslační modifikace provedené bakteriální buňkou, protože použitý enzym byl rekombinantně připraven v bakteriích *E. coli* a modifikace těchto aminokyselinových zbytků neenzymovou glykací nebyla popsána. Nepodařilo se rozlišit jednotlivé isomery methylglyoxal-hydroimidazolonu a také zjištění přítomnosti zkřížených vazeb (tzv. cross-links) bylo problematické. K ověření získaných údajů je potřeba provést další experimenty.

Tab. 16: Určení pozice aminokyselinového zbytku modifikovaného methylglyoxalem a identifikace vznikajícího AGE produktu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

| Modifikovaný zbytek | Pozice AK zbytku v řetězci GST | | | Identifikovaný AGE produkt | |
|---------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | GST | GST + MGO 0,5 mM | GST + MGO 2 mM | GST + MGO 0,5 mM | GST + MGO 2 mM |
| Arg | | | 18 | | ArgP ¹ |
| | | 35 | 35 | ArgP | ArgP MGH1-3 ² |
| | | | 42 | | ArgP |
| | | | 89 | | ArgP |
| | | | 103 | | MGH1-3 |
| | | 108 | 108 | ArgP | ArgP MGH1-3 |
| | | 182 | 182 | ArgP | ArgP MGH1-3 |
| Met | 69 | 69 | 69 | | |
| | 81 | 81 | | | |
| | 94 | 94 | 94 | | |
| | 129 | 129 | 129 | | |
| Cys | 85 | 85 | 85 | | |
| Thr | 209 | 209 | 209 | | |

¹ ArgP = argpyrimidin

²MGH1-3 = methylglyoxal-hydroimidazolone isomer 1-3

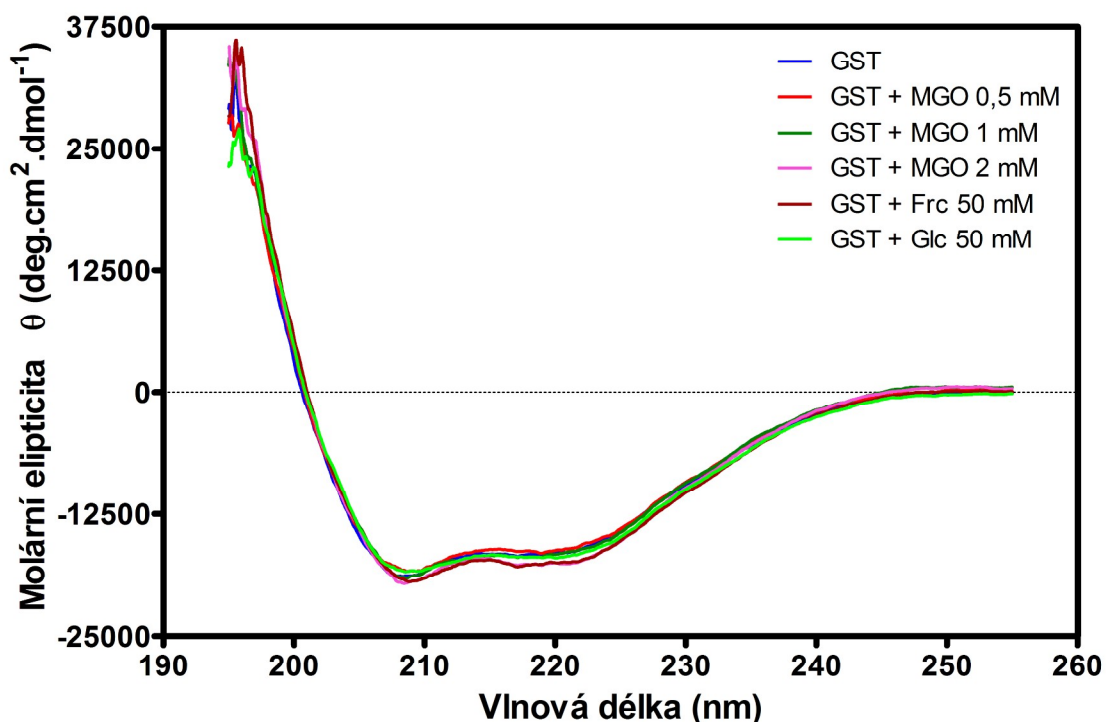
| | | | | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| MSPILGYWKI | KGLVQPT R LL | LEYLEEKYEE | HLYE R DEGDK | W R NKKFELGL | EFPNLPYYID | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| GDVKLTQSM | IIRYIADKHN | MLGGCPKE R A | EISMLEGAVL | DI R YGVS R IA | YSKDFETLKV | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| DFLSKLP | EMFL | KMFEDRLCHK | TYLNGDHVTH | PDFMLYDALD | VVLYMDPMCL | DAFPKLVCFK |
| 190 | 200 | 210 | | | | |
| K R IEAIPQID | KYLKSSKYIA | WPLQGQATF | GGGDHPPK | | | |

Obr. 30. Sekvence GST ze *Schistosoma japonicum* (218 AA, 26 kDa) s vyznačenými Arg zbytky, které byly modifikovány methylglyoxalem 0,5 mM (červená) a 2 mM (modrá a červená) během inkubace (7 dní, 37 °C). Zdroj sekvence: databáze UniProt www.uniprot.org (identifikační kód proteinu P08515).

5.1.7 Cirkulární dichroismus s MGO, glukosou a fruktosou

Cirkulární dichroismus ve vzorcích obsahujících MGO, Frc a Glc byl měřen na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (Dr. Bednárová). Vzorky byly analyzovány pomocí spektrometru cirkulárního dichroismu J-815 (Jasco) v 0,5 cm křemenné kyvetě. Ze získaných výsledků bylo vypočteno množství bílkoviny (%) přítomné v α -helikální formě.

Z Obr. 31 je patrné, že nedošlo ke změně molární elipticity molekuly GST vlivem použitých glykačních činidel. Tento enzym byl přítomen převážně v α -helikální formě (téměř ze 49 %) a působením glykačních činidel nedošlo ani k výraznějšímu nárůstu ani poklesu množství α -helixu v jeho molekule (Tab. 17). Experiment byl opakován dvakrát se stejným výsledkem (prezentovány jsou jen výsledky jednoho experimentu). V dalším kroku bych zvažila prodloužení doby inkubace na 14 dní.



Obr. 31. Vliv glykačních činidel MGO, glukosy a fruktosy na spektrální vlastnosti GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s methylglyoxalem (0,5-2 mM), fruktosou (50 mM) a glukosou (50 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní. Poté byly odstraněny nízkomolekulární látky a koncentrace bílkoviny upravena na 0,5 mg/ml. Spektra cirkulárního dichroismu byla měřena pomocí spektrometru cirkulárního dichroismu J-518 (Jasco) v 0,5 cm křemenné kyvetě.

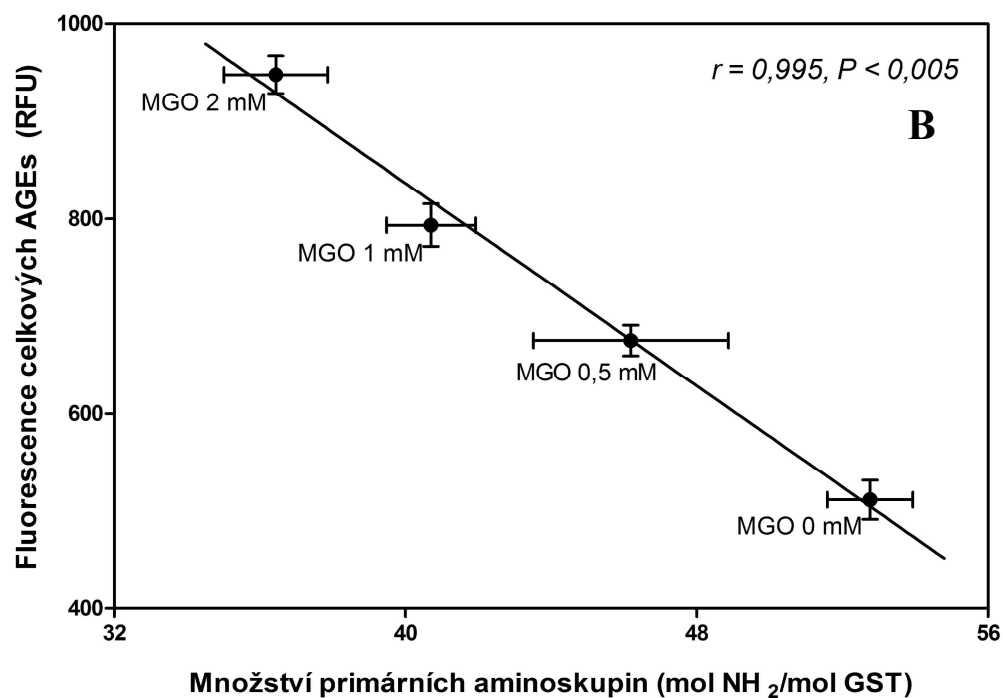
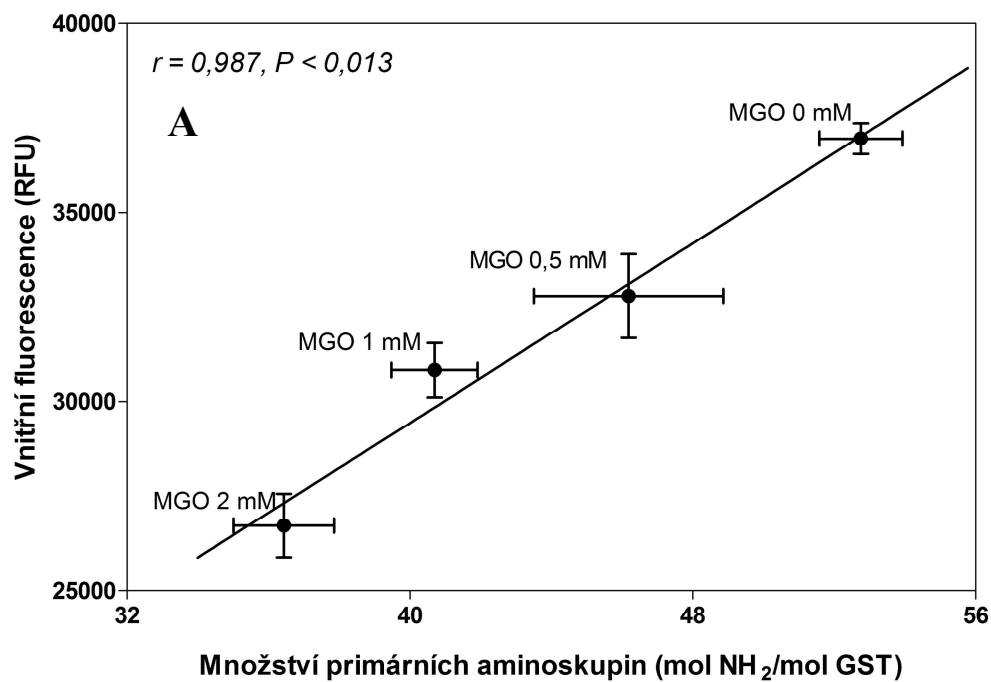
Tab. 17: Vliv glykačních činidel MGO, glukosy a fruktosy na obsah α -helixu v molekule GST.

| Vzorek | Molární elipticita $\theta_{222 \text{ nm}}$ (deg.cm ² .dmol ⁻¹) | Obsah α -helixu (%) |
|------------------|--|-------------------------------|
| GST | -16082,4 | 48,9 |
| GST + MGO 0,5 mM | -15689,8 | 47,9 |
| GST + MGO 1 mM | -16077,8 | 48,9 |
| GST + MGO 2 mM | -17270,4 | 52,0 |
| GST + Frc 50 mM | -17232,3 | 51,9 |
| GST + Glc 50 mM | -16505,7 | 50,0 |

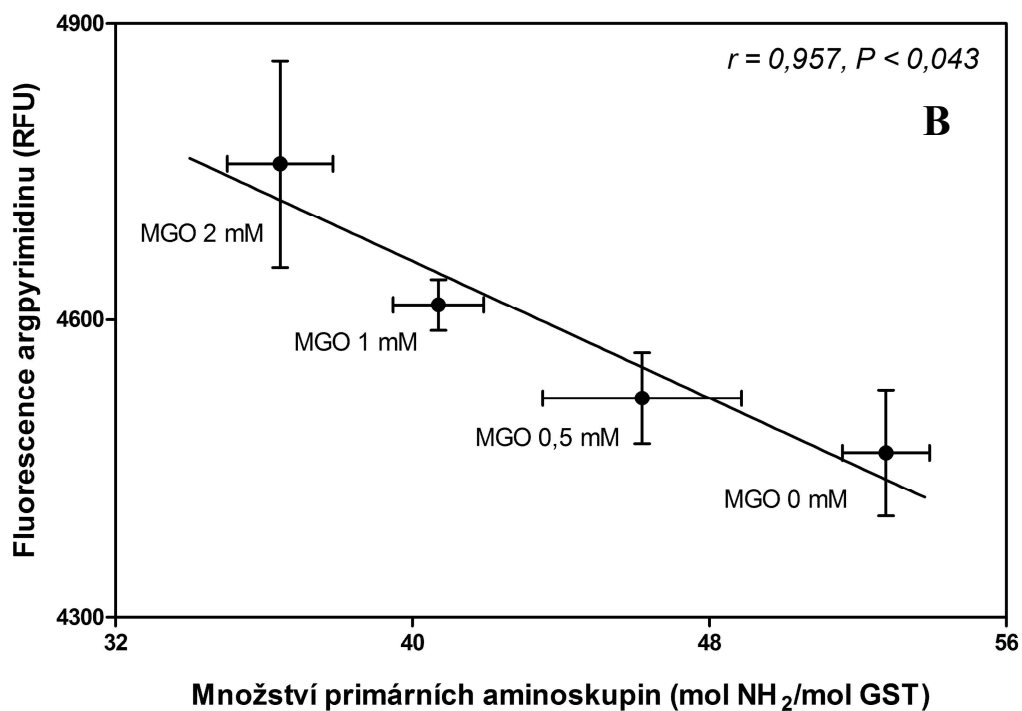
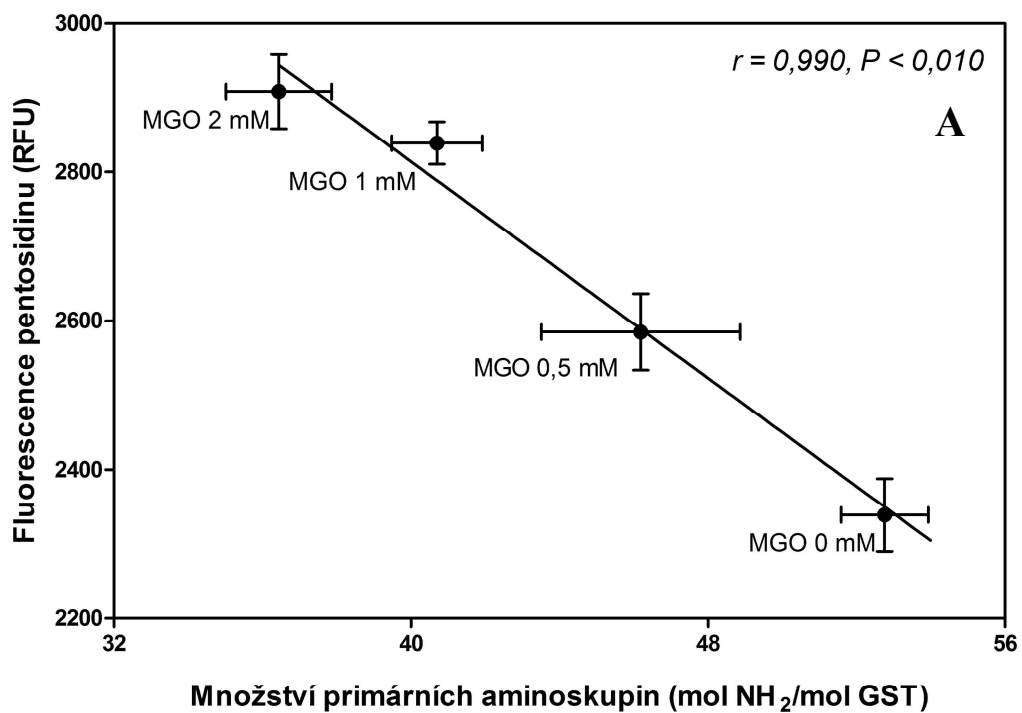
5.1.8 Korelace získaných výsledků

Abych zjistila, jestli pozorované změny v parametrech fluorescence a obsahu primárních aminoskupin ve vzorcích obsahujících MGO (0-2 mM) spolu korelují, vytvořila jsem grafy závislosti fluorescence na obsahu primárních aminoskupin (Obr. 32 a 33) a grafy závislosti vnitřní fluorescence na fluorescenci AGEs (Obr. 34).

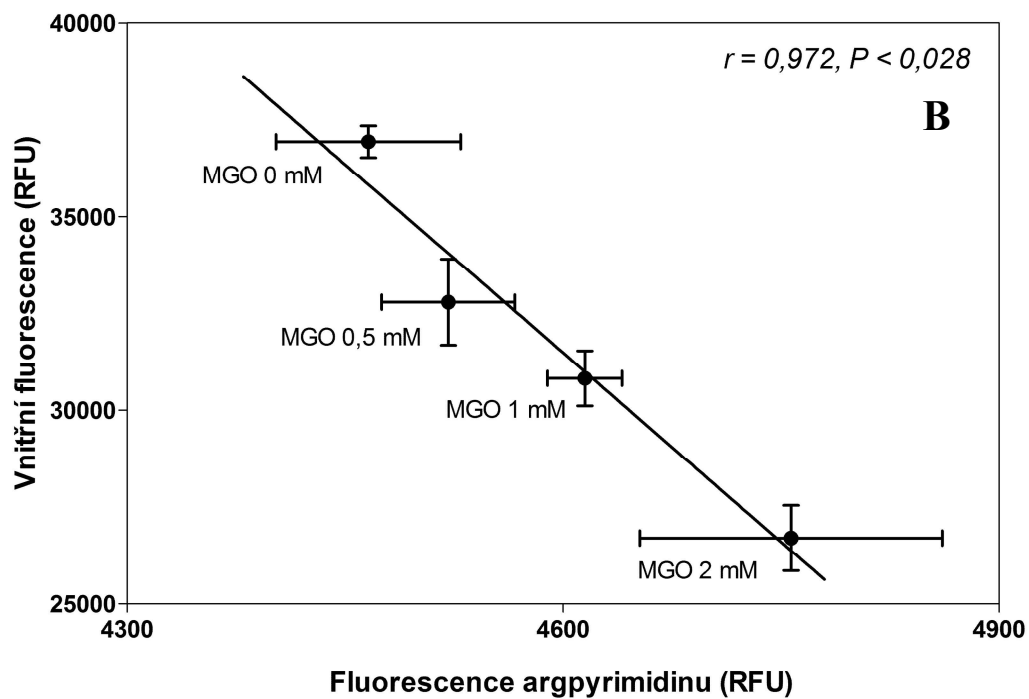
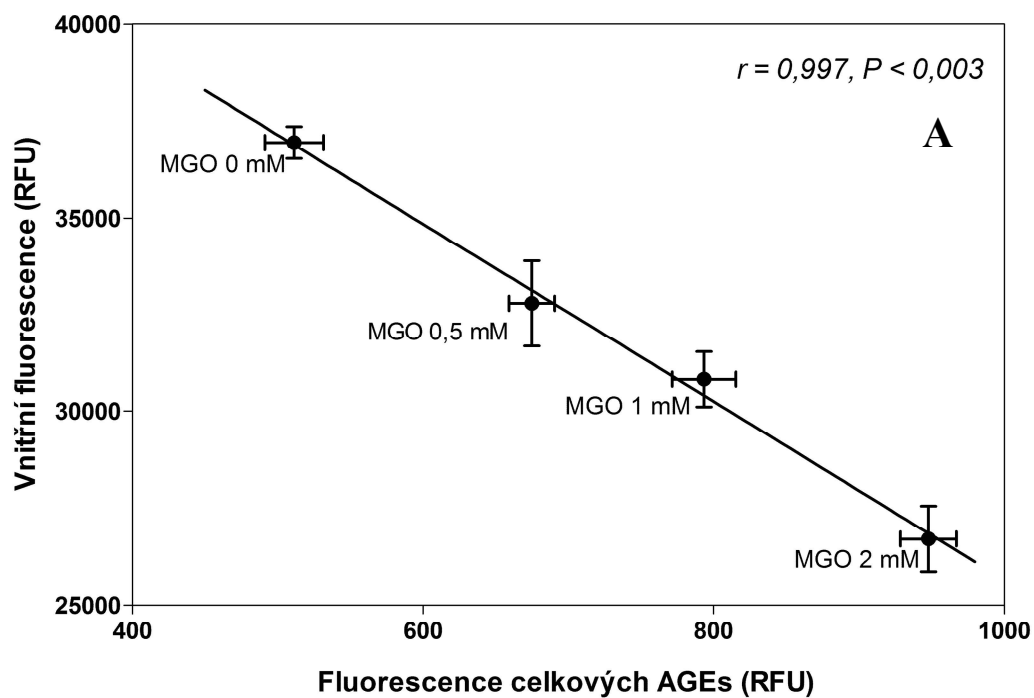
Pokles v intenzitě vnitřní fluorescence způsobený MGO byl přímo úměrný poklesu primárních aminoskupin v těchto vzorcích ($r = 0,987$, $P < 0,013$, Obr. 32A). Pokles obsahu primárních aminoskupin byl vynesena také jako funkce fluorescence celkových AGEs (Obr. 32B) a získaná závislost naznačuje, že vznik AGEs vyvolaný MGO byl přímo úměrný nevratné ztrátě primárních aminoskupin v molekule GST ($r = 0,995$, $P < 0,005$). Pokles obsahu primárních aminoskupin také dobře koreloval se vznikem pentosidinu ($r = 0,990$, $P < 0,010$, Obr. 33A) a argpyrimidinu ($r = 0,957$, $P < 0,043$, Obr. 33B). Změny vnitřní fluorescence byly přímo úměrné vzniku celkových AGEs ($r = 0,997$, $P < 0,003$, Obr. 34A) a též vzniku argpyrimidinu ($r = 0,972$, $P < 0,028$, Obr. 34B).



Obr. 32. Korelace mezi množstvím primárních aminoskupin a poklesem vnitřní fluorescence (panel A) a mezi množstvím primárních aminoskupin a vznikem celkových AGEs (panel B) ve vzorcích obsahujících GST a různou koncentrací MGO (0-2 mM).



Obr. 33. Korelace mezi množstvím primárních aminoskupin a vznikem pentosidinu (panel A) a mezi množstvím primárních aminoskupin a vznikem argpyrimidinu (panel B) ve vzorcích obsahujících GST a různou koncentrací MGO (0-2 mM).



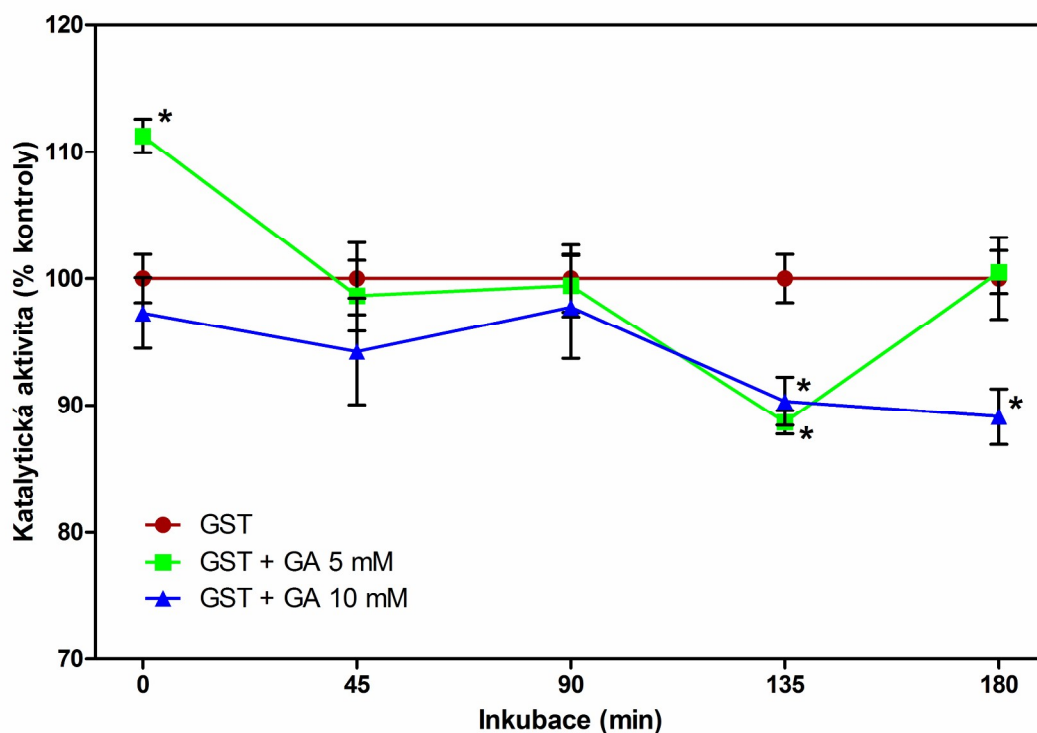
Obr. 34. Korelace mezi vznikem celkových AGEs a poklesem vnitřní fluorescence (panel A) a mezi vznikem argpyrimidinu a poklesem vnitřní fluorescence (panel B) ve vzorcích obsahujících GST a různou koncentrací MGO (0-2 mM).

5.2 Vliv glycerinaldehydu na strukturu a funkci glutathion-S-transferasy

5.2.1 Stanovení aktivity vzorků s GA

Pro stanovení aktivity GST jsem si připravila kontrolní vzorek (pouze GST) a vzorky s koncentrací GA 5 a 10 mM. Každý vzorek obsahoval 25 µg/ml GST. Na UV-VIS spektrofotometru HELIOS β jsem při vlnové délce 340 nm měřila absorbanci. Ze získaných dat jsem následně vypočítala specifickou aktivitu (U/mg) každého vzorku. Výsledky jsem vztáhla k aktivitě kontrolního vzorku (GST samotná), která v každém měřeném intervalu představovala 100 %.

Aktivita kontrolního vzorku byla během celého experimentu stabilní. Jak je zřejmé z Obr. 35, GA způsobil nevratný pokles aktivity GST, jehož rozsah byl závislý na koncentraci tohoto glykačního činidla. Při inkubaci GST s GA 10 mM došlo k poklesu katalytické aktivity GST o 9,7 % po 135 min a o 10,9 % po 180 min inkubace při 37 °C (Obr. 35). Statisticky významný ($P < 0,01$) pokles aktivity jsem pozorovala též u GA 5 mM po 135 min inkubace. V prvním měřeném intervalu došlo k překvapivému nárůstu aktivity GST ve vzorku obsahujícím GA 5 mM ($P < 0,01$), který byl však zřejmě způsoben chybou měření. Vliv nižších koncentrací GA (0,5-2 mM) na aktivitu GST jsem nestanovovala vzhledem k malým pozorovaným změnám u vyšších koncentrací GA (5 a 10 mM).

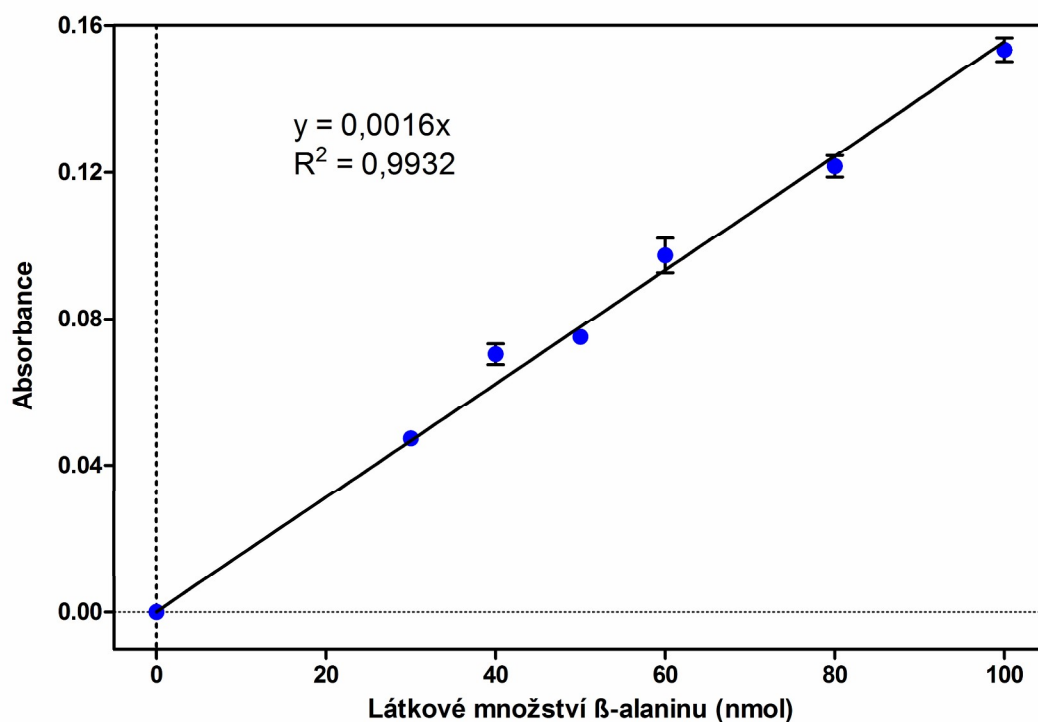


Obr. 35. Účinek glykace glyceralddehydem na katalytickou aktivitu GST. GST (25 $\mu\text{g/ml}$) byla inkubována v 10 mM PBS (pH 7,4) s nebo bez GA (5 a 10 mM) po dobu 180 min při 37 °C. Katalytická aktivita GST byla vyjádřena jako % aktivity kontrolního vzorku (GST bez GA) ve všech měřených intervalech, která byla vždy 100 % \pm S.D. (%). Každý bod představuje průměr z 5 vzorků (* $P < 0,01$, Studentův t -test).

5.2.2 Stanovení aminoskupin vzorků s GA

Pro stanovení obsahu primárních aminoskupin jsem si připravila kalibrační křivku s β -alaninem (Obr. 36), kterou jsem poté používala k výpočtu obsahu aminoskupin ve vzorcích s GST a GA.

Inkubace GST s GA vedla ke snížení obsahu aminoskupin v rozsahu, který odpovídal koncentraci tohoto glykačního činidla (Tab. 18). Ze získaných dat lze říct, že účinek GA 0,5 mM je srovnatelný s účinkem MGO 0,5 mM a GA 1 a 2 mM odpovídá účinkem MGO 2 mM. Při použití vyšších koncentrací GA došlo k dalšímu poklesu v obsahu primárních skupin a to o 26 v případě nejvyšší použité koncentrace GA. Pozorovaný účinek GA byl statisticky významný ($P < 0,05$) ve všech použitých koncentracích kromě GA 0,5 mM, u kterého je ovšem vysoká směrodatná odchylka (až 22 %). Vzhledem k tomu, že zde uvádím pouze výsledky jednoho měření, je nutné před učiněním definitivních závěrů experiment zopakovat.



Obr. 36. Kalibrační přímka pro stanovení primárních aminoskupin.

Tab. 18: Vliv glykačního činidla glycerinaldehydu (0,5-10 mM) na obsah primárních aminoskupin v molekule GST.

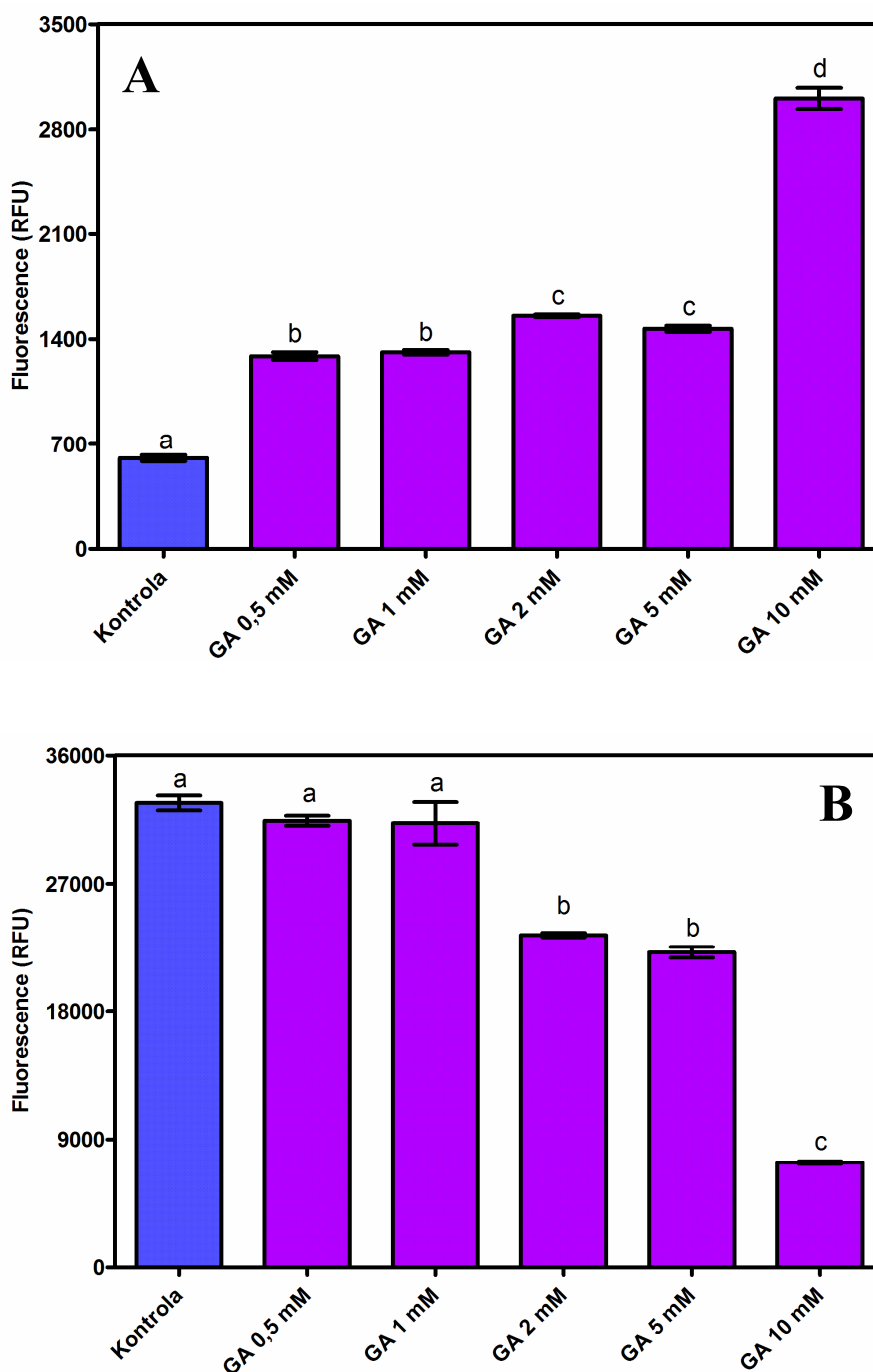
| Vzorek | Obsah aminoskupin (mol NH ₂ /mol GST) | Počet primárních aminoskupin |
|-----------------|---|---------------------------------|
| GST | 54,89 ± 4,66 ^a | 44 |
| GST + GA 0,5 mM | 50,12 ± 11,39 ^{abcd} | 40 |
| GST + GA 1 mM | 39,55 ± 3,83 ^b | 32 |
| GST + GA 2 mM | 39,06 ± 3,42 ^b | 31 |
| GST + GA 5 mM | 28,78 ± 2,08 ^c | 23 |
| GST + GA 10 mM | 22,97 ± 2,17 ^d | 18 |

^{a,b,c,d} Skupiny s různými písmeny se významně liší ($P < 0,05$, Studentův t-test). Každá hodnota představuje průměr ze tří vzorků ± S.D.

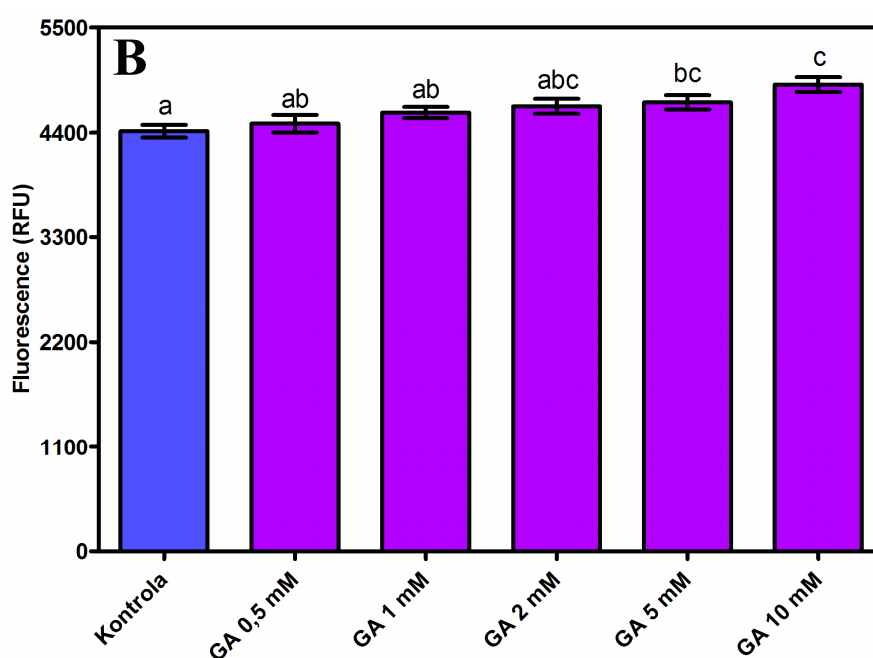
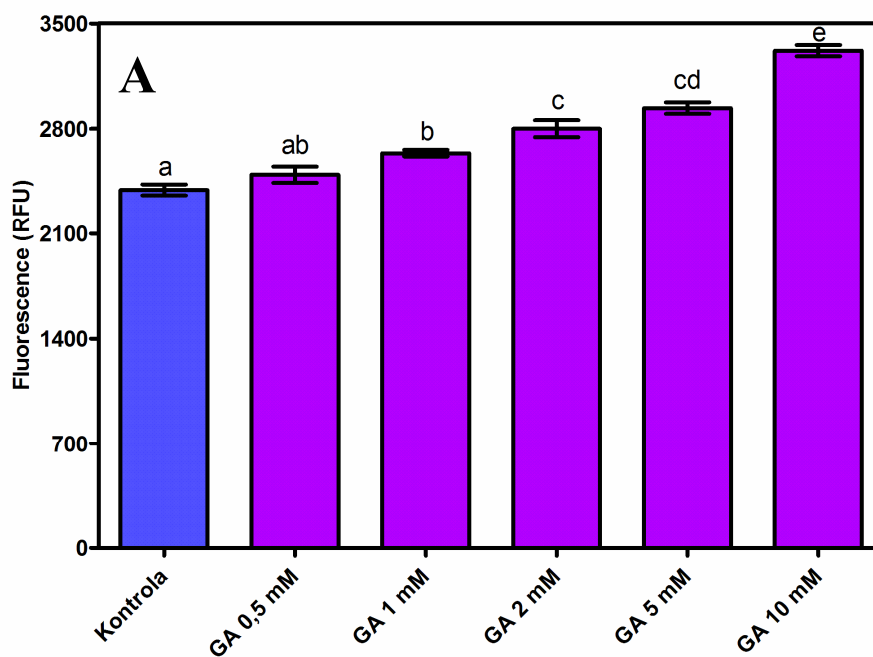
5.2.3 Měření fluorescence vzorků s GA

Vzorky po odstranění nízkomolekulárních látek a úpravě koncentrace bílkoviny jsem rozpipetovala po 200 μ l na mikrotitrační destičku (100 μ g GST/jamka) a měřila jsem jejich fluorescenci při specifických délkách excitace a emise, které odpovídají jednotlivým glykačním produktům a tryptofanu, na čtečce TECAN INFINITE M200.

Inkubace GST s GA vedla k nárůstu intenzity fluorescence vlivem vzniku AGE produktů s fluorescenčními vlastnostmi (Obr. 37A, 38A a 38B) a k poklesu vnitřní fluorescence (Obr. 37B). Sedmidenní inkubace GST s GA (0,5-10 mM) způsobila výrazný nárůst fluorescence v oblasti odpovídající nespecifickým (též celkovým) AGE produktům. Tento nárůst byl závislý na koncentraci GA a např. u GA 2 mM činil 157,2 %. Při inkubaci GST s GA 10 mM došlo až k pětinasobnému zvýšení intenzity fluorescence nespecifických AGEs. Vzestup fluorescence dalších glykačních produktů s fluorescenčními vlastnostmi (pentosidin a argpyrimidin) nebyl tak výrazný jako v případě celkových AGEs. U GA 10 mM vzrostla fluorescence pentosidinu o 38,7 % a argpyrimidinu jen o 11,0 % proti kontrolnímu vzorku. Zaznamenala jsem i pokles vnitřní fluorescence vyvolaný GA, který byl nejmarkantnější u GA 10 mM, kde došlo k poklesu o 77,5 % ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 37B).



Obr. 37. Vliv glycerinaldehydu na vznik celkových AGEs (panel A) a vnitřní fluorescence (panel B). GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez GA (0,5-10 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní. Glykační činidla byla odstraněna pomocí centrifugační jednotky Microcon. Fluorescence vzorků (100 µg GST/jamka) byla měřena při $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/440 nm (panel A) a 295/386 nm (panel B). Data jsou vyjádřena v jednotkách relativní fluorescence (RFU) \pm S.D. Každý bod představuje průměr ze 3 vzorků. Skupiny s různými písmeny se signifikantně liší ($P < 0,01$, Studentův *t*-test).



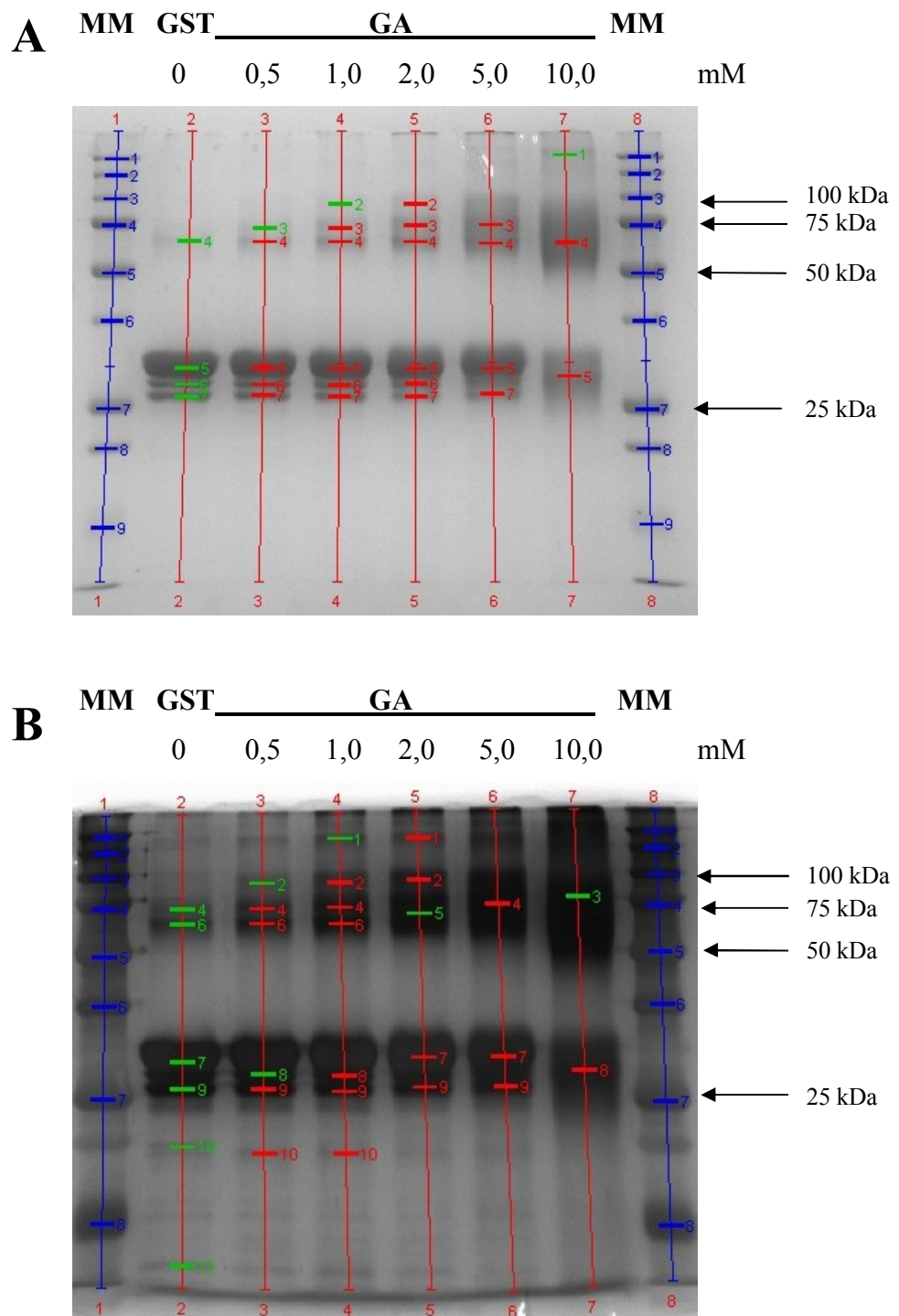
Obr. 38. Vliv glycerinaldehydu na vznik celkových pentosidinu (panel A) a argpyrimidinu (panel B). GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez GA (0,5-10 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní. Glykační činidla byla odstraněna pomocí centrifugační jednotky Microcon. Fluorescence vzorků (100 µg GST/jamka) byla měřena při lex/lem 335/385 nm (panel A) a 320/380 nm (panel B). Data jsou vyjádřena v jednotkách relativní fluorescence (RFU) ± S.D. Každý bod představuje průměr ze 3 vzorků. Skupiny s různými písmeny se významně liší ($P < 0,01$, Studentův t -test).

5.2.4 SDS-PAGE a WB vzorků s GA

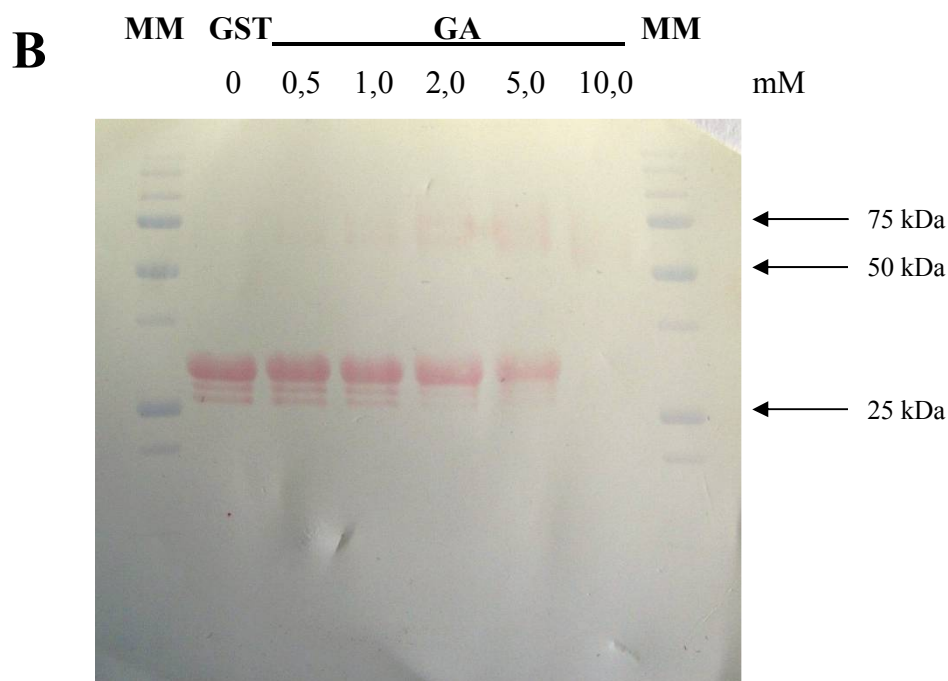
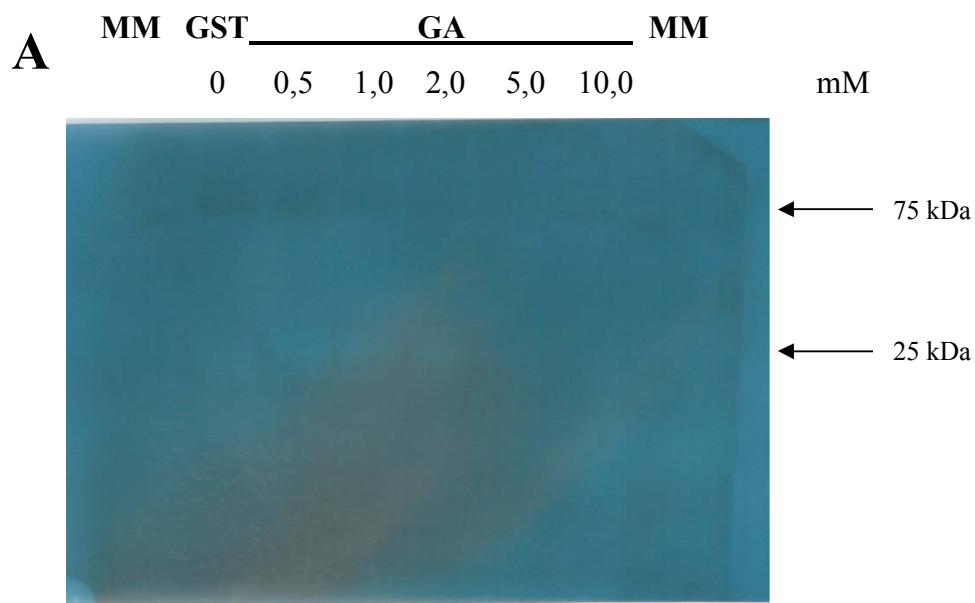
Vzorky pro SDS-PAGE i western blotting jsem inkubovala po dobu 7 dní. Podmínky separace a inkubace s protilátkami jsou uvedeny pod Obr. 39 a 40. Gely po barvení byly snímány pomocí přístroje GelDoc XR a vyhodnoceny v programu QuantityOne.

Během inkubace s GA došlo ke vzniku agregátů s vyšší molekulovou hmotností, než má molekula GST (25 kDa). Molekulová hmotnost vznikajících vysokomolekulárních agregátů se pohybovala v širokém rozpětí molekulové hmotnosti (od 65 do 100 kDa). Došlo též k úbytku denzity hlavního bandu GST a to zejména při vyšších koncentracích GA. Toto snížení denzity proužku je pravděpodobně způsobeno vznikem vysokomolekulárních agregátů (Obr. 39A a B).

Pro ověření tvorby AGE produktů ve vznikajících vysokomolekulárních agregátech jsem použila imunochemickou detekci po přenosu bílkovin z gelu na membránu pomocí western blottingu. Použila jsem primární protilátku proti AGE produktům. Zaznamenala jsem tvorbu proužku s molekulovou hmotností asi 70 kDa (trimer GST) a to ve všech vzorcích včetně kontrolního (Obr. 40A). Membránu jsem po provedení chemiluminiscenční detekce obarvila pomocí Ponceau S a pozorovala jsem změny v denzitě hlavního bandu GST a vznik vysokomolekulárních agregátů s molekulovou hmotností kolem 70 kDa a to ve vzorcích obsahujících GA 1-10 mM (Obr. 40B). Nezaznamenala fragmentaci molekuly GST na kratší peptidy, jako tomu bylo v případě MGO. Pro potvrzení získaných údajů je třeba experiment zopakovat.



Obr. 39. Vliv GA na molekulovou hmotnost GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s GA (0,5-10 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní a následně podrobena SDS-PAGE. Podmínky separace: zaostřovací gel 4%, separační gel 12,5%, množství bílkoviny v jamce 4 µg, barveno pomocí Coomassie Blue G250 (panel A) nebo stříbra (panel B).

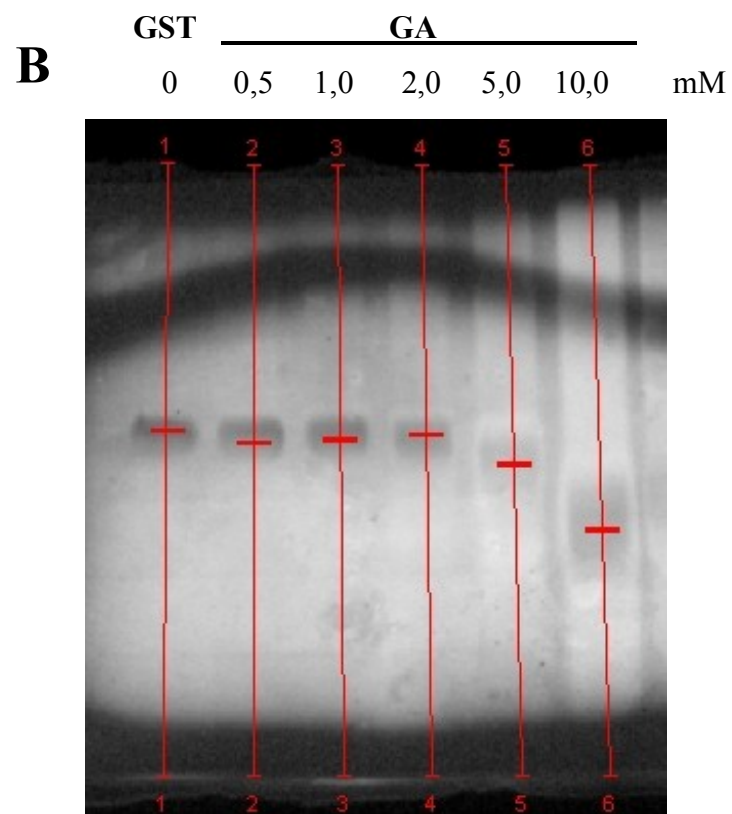
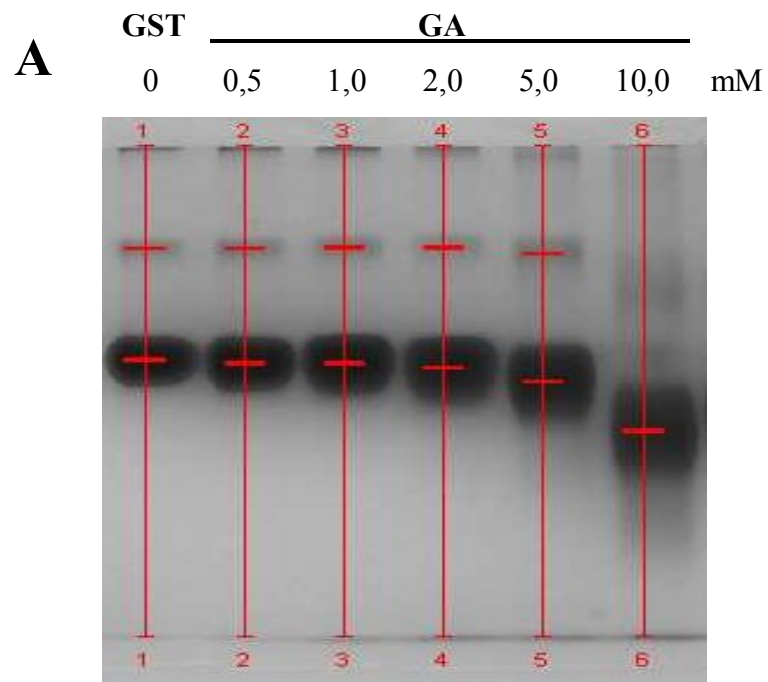


Obr. 40. Vliv glycerinaldehydu na tvorbu AGE produktů. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s glycerinaldehydem (0,5-10 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní a následně podrobena SDS-PAGE s následným western blottingem. Hmotnostní standard (první a poslední dráha) a proteiny byly označeny po reakci se specifickými protilátkami chemiluminiscenční detekcí pro alkalickou fosfatasu (panel A). Použité protilátky: králičí polyklonální proti AGE produktům. Podmínky separace: zaostřovací gel 4%, separační gel 12,5%, množství bílkoviny v jamce 4 μ g. Membrána byla následně obarvena pomocí Ponceau S (panel B).

5.2.5 Nativní PAGE vzorků s GA

Vzorky pro nativní PAGE jsem inkubovala po dobu 7 dní. Poté jsem provedla nativní PAGE (podmínky separace jsou uvedeny pod Obr. 41) a gely jsem obarvila buď Coomassie Blue G250 nebo pomocí GST aktivního barvení. Při tomto typu barvení vzniká v gelu fialový formazan a v místě s aktivní GST je gel projasněn (průhledný proužek). Čím je aktivita GST větší, tím je i projasnění větší.

Z Obr. 41A je patrné, že přítomnost GA vyvolala zvýšení mobility vzorku směrem ke kladně nabitě elektrodě, což bylo způsobeno úbytkem kladných nábojů primárních aminoskupin (Lys) obsažených v molekule GST. Zvýšení mobility se projevilo až u vyšších koncentrací GA (2-10 mM). Vliv jednotlivých koncentrací GA na relativní mobilitu molekuly GST v čase je shrnut v Tab. 19. Zároveň se zvýšením mobility vzorku vyvolané působením vyšších koncentrací GA došlo i ke snížení aktivity GST, které bylo provázeno menším projasněním gelu při aktivním barvení (Obr. 41B). Na tomto obrázku je invertní zobrazení gelu, takže proužky s vyšší aktivitou GST jsou tmavší.



Obr. 41. Vliv GA na náboj molekuly GST. GST (0,5 mg/ml) byla inkubována s nebo bez GA (0,5-10 mM) v 10 mM PBS (pH 7,4) při 37 °C po dobu 7 dní a následně podrobena nativní PAGE (zaostřovací gel: 4%, separační gel: 10%, množství bílkoviny v jamce: 10 µg). Barvení pomocí Coomassie Blue G250 (panel A) nebo GST aktivního barvení (panel B, invertní zobrazení).

Tab.19: Vliv glycerinaldehydu na náboj molekuly GST.

| Vzorek ¹ | Rf ² | % migrace |
|---------------------|-----------------|-----------|
| GST | 0,438 | 100,00 |
| GST + GA 0,5 mM | 0,444 | 101,37 |
| GST + GA 1 mM | 0,444 | 101,37 |
| GST + GA 2 mM | 0,452 | 103,20 |
| GST + GA 5 mM | 0,480 | 109,59 |
| GST + GA 10 mM | 0,581 | 132,65 |

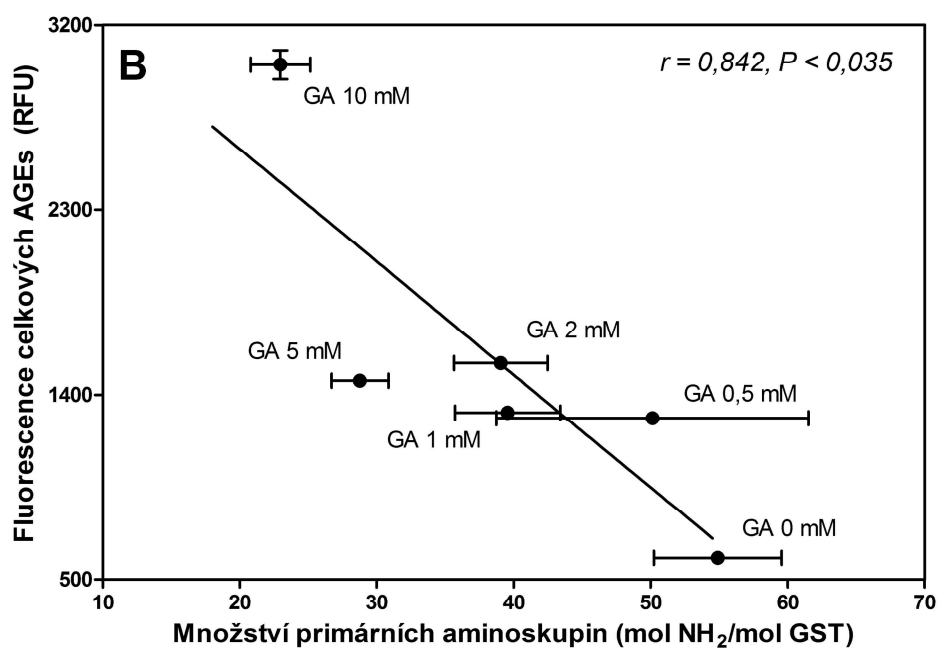
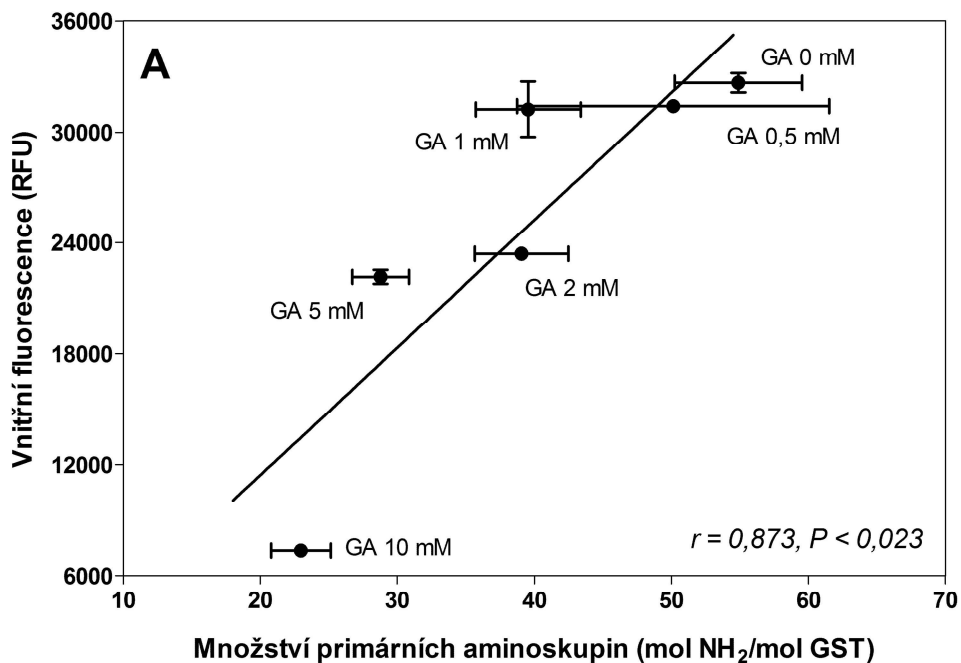
¹Vzorky byly inkubovány 7 dní při 37 °C

²Rf: relativní mobilita vzorku („relative front“)

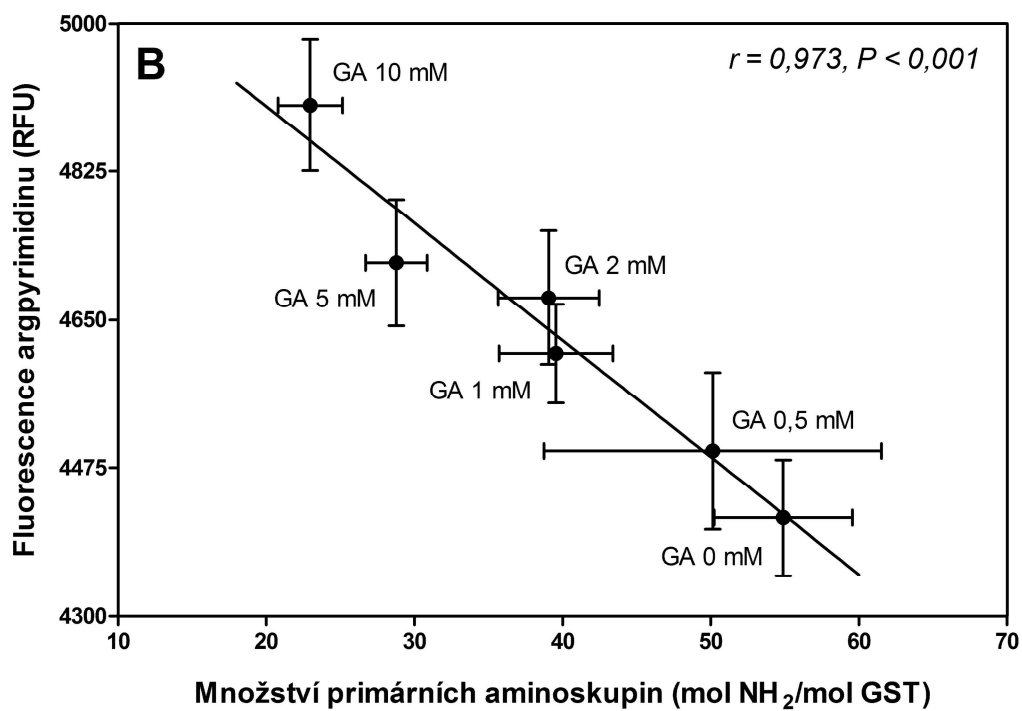
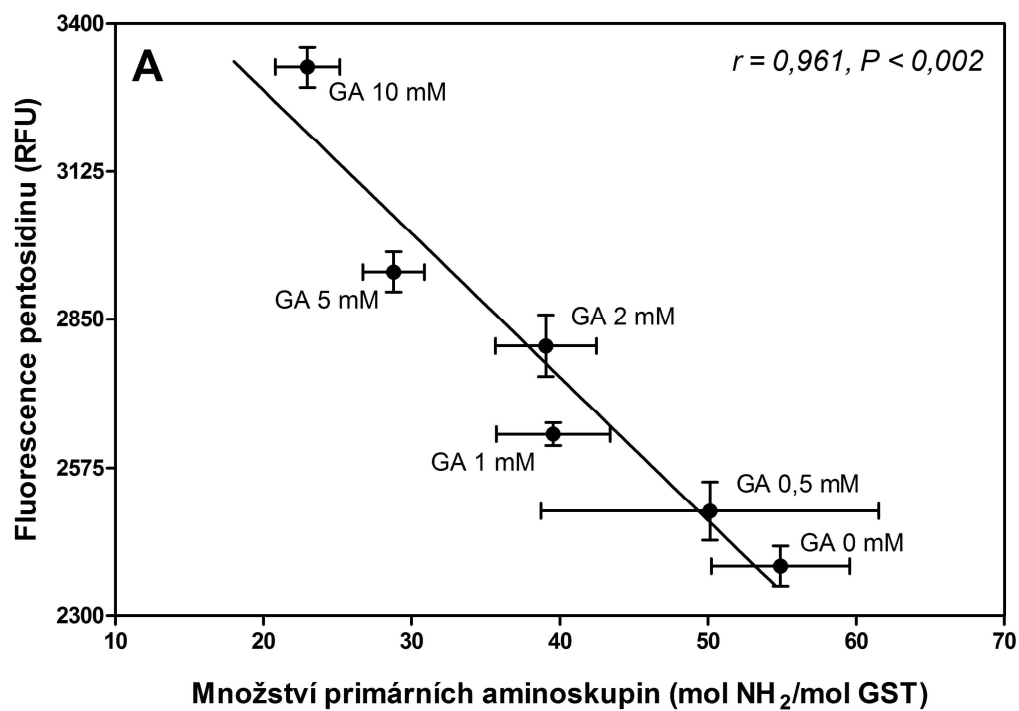
5.2.6 Korelace získaných výsledků

Abych zjistila, jestli pozorované změny v obsahu primárních aminoskupin a v parametrech fluorescence ve vzorcích obsahujících GA (0-10 mM) spolu korelují, vytvořila jsem grafy závislosti fluorescence na obsahu primárních aminoskupin (Obr. 42 a 43) a grafy závislosti vnitřní fluorescence na fluorescenci AGEs (Obr. 44).

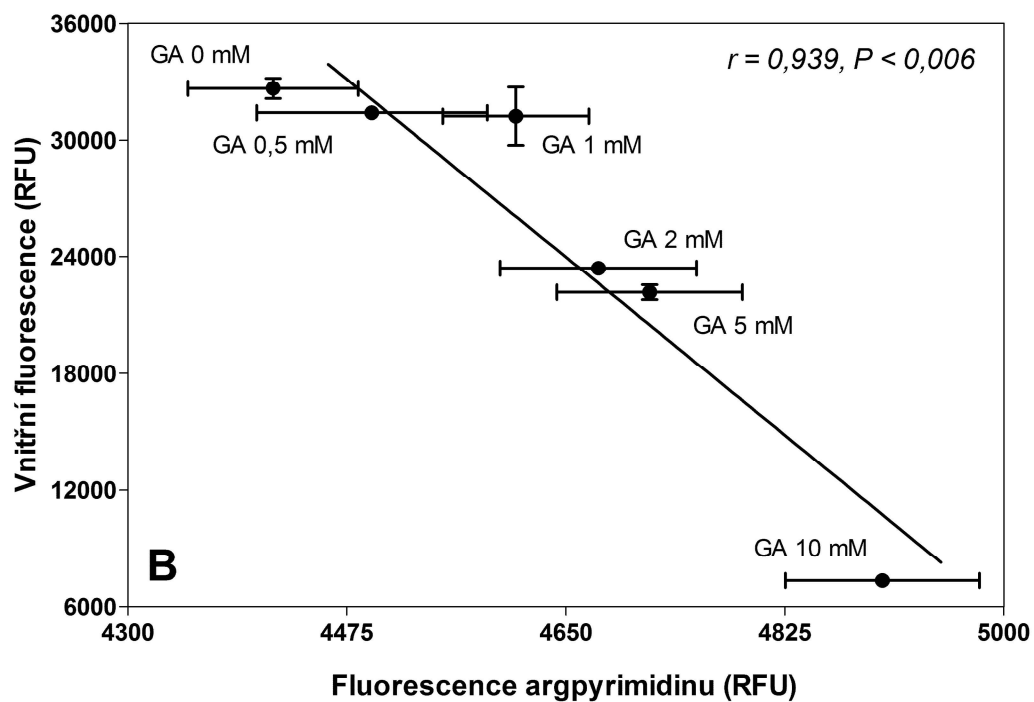
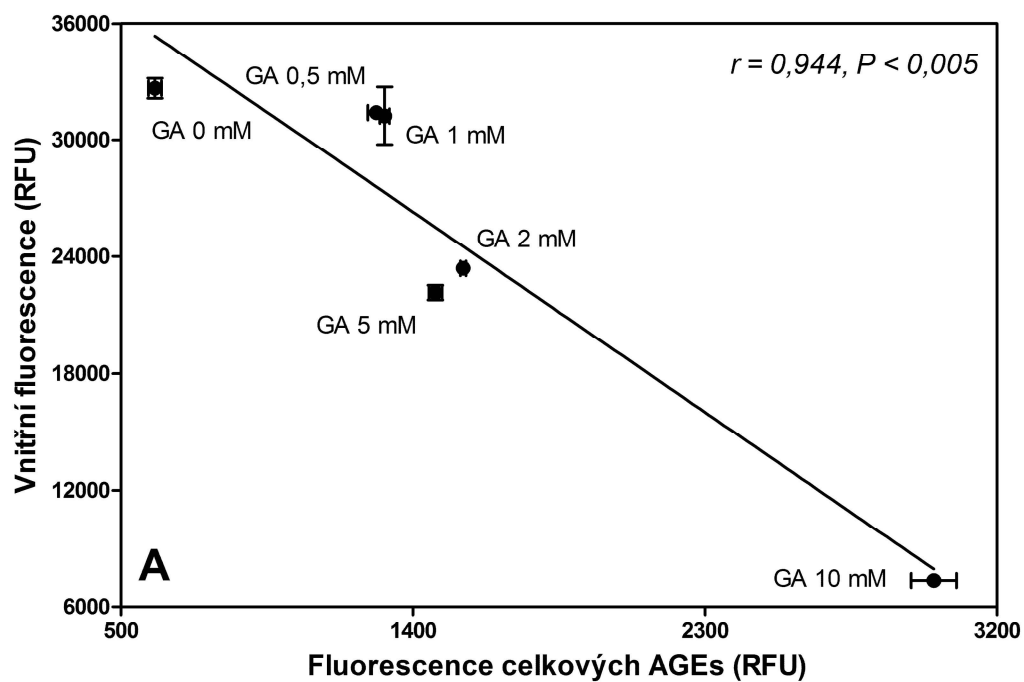
Pokles v intenzitě vnitřní fluorescence způsobený GA byl přímo úměrný poklesu primárních aminoskupin v těchto vzorcích ($r = 0,873$, $P < 0,023$, Obr. 42A). Pokles obsahu primárních aminoskupin byl vyneseno také jako funkce fluorescence celkových AGEs (Obr. 42B) a získaná závislost naznačuje, že vznik AGEs vyvolaný GA byl přímo úměrný nevratné ztrátě primárních aminoskupin v molekule GST ($r = 0,842$, $P < 0,035$). Pokles obsahu primárních aminoskupin také dobře koreloval se vznikem pentosidinu ($r = 0,961$, $P < 0,002$, Obr. 43A) a argpyrimidinu ($r = 0,973$, $P < 0,001$, Obr. 43B). Změny vnitřní fluorescence byly přímo úměrné vzniku celkových AGEs ($r = 0,944$, $P < 0,005$, Obr. 44A) a též vzniku argpyrimidinu ($r = 0,939$, $P < 0,006$, Obr. 44B).



Obr. 42. Korelace mezi množstvím primárních aminoskupin a poklesem vnitřní fluorescence (panel A) a mezi množstvím primárních aminoskupin a vznikem celkových AGEs (panel B) ve vzorcích obsahujících GST a různou koncentrací GA (0-10 mM).



Obr. 43. Korelace mezi množstvím primárních aminoskupin a vznikem pentosidinu (panel A) a mezi množstvím primárních aminoskupin a vznikem argpyrimidinu (panel B) ve vzorcích obsahujících GST a různou koncentrací GA (0-10 mM).



Obr. 44. Korelace mezi vznikem celkových AGEs a poklesem vnitřní fluorescence (panel A) a mezi vznikem argpyrimidinu a poklesem vnitřní fluorescence (panel B) ve vzorcích obsahujících GST a různou koncentraci GA (0-10 mM).

6 DISKUZE

V rámci diplomové práce jsem zkoumala vliv několika vybraných glykačních činidel (methylglyoxalu, glyceraldehydu, glukosy a fruktosy) na strukturu a funkci cytosolického enzymu glutathion-S-transferasy.

Jako modelová bílkovina sloužila komerčně dodávaná rekombinantní **GST pocházejícího ze *Schistosoma japonicum***. Tento enzym sdílí výraznou strukturní podobnost, uspořádání aminokyselinových zbytků v G-vazebném místě a také způsob navázání GSH do tohoto místa se savčí GST μ . Uspořádání G-vazebného místa je tedy podobné u obratlovců i bezobratlých (Lim a kol. 1994). Variabilita v rozpoznávání ligandů GST z různých organismů a tříd je pravděpodobně způsobena rozdíly v uspořádání jejich H-vazebných míst (Cardoso a kol. 2003).

Kromě strukturní podobnosti modelové bílkoviny se savčími GST se zdá, že metabolismus GSH a tkáňová distribuce GST u diabetiků mají zásadní vliv na etiologii, patogenezí a prevenci tohoto onemocnění (Raza a kol. 2004). U spontánně obézních myší trpících DM 2. typu byla prokázána signifikantně snížená aktivita jaterní cytosolické GST a rovněž množství GSH v játrech bylo výrazně nižší (Barnett a kol. 1992). Na druhou stranu v počáteční fázi diabetu je exprese cytosolických i mitochondriálních GST v některých tkáních (např. slinivce, játrech či ledvinách) zvýšena, pravděpodobně jako odpověď na oxidační stres vyvolaný hyperglykemií či jinými toxickými vlivy glukosy (Fujita a kol. 2001, Raza a kol. 2004). Dlouhodobé vystavení hyperglykemii však vedlo k poklesu enzymové aktivity GST v tkáních diabetických laboratorních zvířat (Lapshina a kol. 2006, Thomas a kol. 1989, Saito-Yamanaka a kol. 1993). Také katalytická aktivita dalších biotransformačních enzymů (superoxiddismutasy, glyoxalasy I a II či katalasy) byla inhibována při podání methylglyoxalu albinotickým myším (Choudhary a kol. 1997). Z uvedených informací vyplývá, že **metabolismus xenobiotik může být ovlivněn probíhajícím diabetem** a také, že GST by mohla být jedním z enzymů postižených glykací *in vivo*.

Neenzymová reakce probíhající mezi aminoskupinami aminokyselin, peptidů či proteinů a redukujícími cukry vede k tvorbě aduktů, které jsou často žlutohnědé barvy a/nebo fluoreskují. Tento proces se nazývá Maillardova reakce či **glykace proteinů**. Produkty pokročilé glykace (AGEs), které touto cestou vznikají, jsou příčinou vzniku a

rozvoje diabetických komplikací a stárnutí, a to zejména díky náhodnému síťování řetězců bílkovin (Ulrich a Cerami 2001). V současné době je k dispozici stále více důkazů o **vztahu mezi tvorbou AGEs a vznikem diabetických komplikací**. Studie na zvířatech a *in vitro* studie ukázaly, že AGEs ovlivňují buněčnou signalizaci, aktivaci transkripčních faktorů a následnou genovou expresi. Není pochyb o tom, že hlavním kauzálním faktorem pro rozvoj většiny diabetických komplikací je dlouhodobá expozice hyperglykemii, ačkoliv se jednotliví diabetičtí pacienti mohou výrazně lišit v citlivosti k tkáňovému poškození zprostředkovanému glukosou (Li 2008).

Methylglyoxal je nejvýznamnějším *in vivo* se vyskytujícím glykačním činidlem a jedním z nejreaktivnějších α -dikarboonylových sloučenin v živých buňkách (Gomes a kol. 2006, Oliveira a kol. 2011, Schalkwijk 2007). Reaktivní α -dikarboonylové sloučeniny mají výrazně vyšší schopnost tvorby intra- a intermolekulárních proteinových cross-linků a vyšší reaktivitu než sacharidy, z nichž vznikly (Matsumoto a kol. 2000). Methylglyoxal vzniká *in vivo* fragmentací triosafosfátů, při katabolismu ketolátů a threoninu a též při degradaci glykovaných proteinů (West 2000, Singh a kol. 2001). Plasmatická koncentrace této sloučeniny výrazně stoupá (dosahuje hladin až 0,42 mM) u pacientů s DM 2. typu (Lapolla a kol. 2003). Intracelulární koncentrace methylglyoxalu naměřená v kultuře ovariálních buněk z čínského křečka dosahovala 310 μ mol/l (Chaplen a kol. 1998). Dá se předpokládat, že v některých buňkách (např. v oční čočce) pacientů trpících DM bude tato koncentrace vyšší. V oční čočce byla naměřena 20krát vyšší koncentrace MGO než ve vzorcích plasmy zdravých dobrovolníků (Haik a kol. 1994).

Naproti tomu glykace pomocí **glukosy** probíhá velmi pomalu. Uplatnění glukosy jako hlavního cirkulujícího monosacharidu představuje zřejmě evoluční výhodu vyšších forem života, protože v našem oběhu cirkuluje nejméně reaktivní a tedy i nejméně toxický sacharid (Gugliucci 2000). **Fruktosa** v porovnání s glukosou představuje několikanásobně účinnější glykační činidlo než glukosa. Nicméně navzdory své téměř 8krát vyšší reaktivitě (0,7 % acyklické formy fruktosy vs. 0,002 % acyklické formy glukosy) je příspěvek fruktosy k celkovému rozsahu extracelulární glykace výrazně menší než u glukosy a to díky své nízké plasmatické koncentraci (5 mM glukosa vs. 35 μ M fruktosa). Nicméně intracelulární koncentrace fruktosy v některých tkáních (např. v očním nervu) diabetiků jsou vyšší, než je tomu u glukosy (Schalkwijk a kol. 2004).

Glyceraldehyd rychle reaguje *in vivo* a *in vitro* s aminoskupinami proteinů za tvorby AGEs odvozených od glyceraldehydu, které mají nejsilnější vazebnou afinitu k RAGE a následně vyvolávají záněty cév a oxidační stres. Tím zapříčiňují zrychlenou aterosklerosu pozorovanou při diabetu mellitu. Sérové hladiny AGEs odvozených od glyceraldehydu odrážejí narůstající postprandiální hyperglykémii u myši s DM II. typu (Takeuchi a kol. 2010, Tsunosue a kol. 2010). Glyceraldehyd vzniká *in vivo* dvěma způsoby: glykolytickou cestou z glyceraldehyd-3-fosfátu nebo cestou metabolismu fruktosy (Takeuchi a kol. 2010). Hladiny glyceraldehydu v oční čočce u zdravých a diabetických myši jsou následující: $0,75 \pm 0,06$ nmol/g (zdravé) a $1,26 \pm 0,21$ nmol/g (diabetické). Další spolehlivé informace týkající se obsahu glyceraldehydu v tkáních nejsou k dispozici (Miwa a kol. 2009).

Koncentrace glykačních činidel byly zvoleny na základě předchozích experimentů (Boušová a kol. 2005, Boušová a kol. 2009), údajů z literatury a hladin těchto látek u diabetiků. Plasmatická koncentrace glukosy se u zdravých osob pohybuje kolem hodnot 2-5 mmol/l, v raném stádiu diabetu dosahuje až 20 mmol/l a v případě chronického a nekontrolovaného diabetu mohou její hladiny stoupat až na 40 mmol/l (Dutta a kol. 2006). Koncentrace methylglyoxalu (0,5-2 mM) byly zvoleny na základě experimentů provedených Seidlerem a Kowalewskou (2003). Dále jsem používala široké rozmezí koncentrací glyceraldehydu (0,5-10 mM) na základě publikace Dutty a kol. (2006).

Jednou z možností sledování průběhu glykace je **měření katalytické aktivity** enzymu v čase. Aktivitu GST jsem měřila pomocí kolorimetrické kinetické metody s 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem jako substrátem (Habig a kol. 1974). Výsledky jsou prezentovány v grafech jako procentuální vyjádření aktivit jednotlivých vzorků vzhledem k aktivitě kontrolního vzorku v odpovídajícím časovém úseku. Získané výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny pomocí nepárového *t*-testu. Zatímco glukosa a fruktosa způsobili jen malé změny v aktivitě GST, které nebyly statisticky významné, methylglyoxal a ve všech a glyceraldehyd ve dvou nejvyšších studovaných koncentracích způsobily významný a na koncentraci činidla závislý pokles katalytické aktivity tohoto enzymu. Nejvýraznější pokles aktivity (o 27,6 % po 180 min inkubace, $P < 0,05$) byl způsoben 2 mM MGO. Zdá se, že GST je vůči inhibici katalytické aktivity méně náchylná než aspartátaminotransferasa (AST), jejíž aktivita klesla během

inkubace s MGO 0,5 mM o 70 % resp. o 58 % (Seidler a Kowalewski 2003, Boušová a kol. 2009).

GST ze *Schistosoma japonicum* obsahuje ve své molekule 44 primárních aminoskupin (42 ϵ -aminoskupin Lys a 2 α -aminoskupiny *N*-koncových aminokyselin), které jsou potenciálním cílem glykačního činidla. Kromě toho se v její molekule nachází 20 Arg zbytků, 4 páry Lys-Lys a 2 páry Lys-Arg. **Stanovení primárních aminoskupin** jsem prováděla pomocí kolorimetrické metody s trinitrobenzensulfonovou kyselinou (Steinbrecher 1987). Týdenní inkubace GST v přítomnosti glykačních činidel vyvolala ve všech případech úbytek počtu primárních aminoskupin: MGO 2 mM vedl k poklesu o 14 ($P < 0,01$), fruktosa 50 mM o 3 ($P < 0,01$), glukosa 50 mM o 1 a GA 2 mM o 13 ($P < 0,01$) primárních aminoskupin. Účinek glykačních činidel byl závislý na použité koncentraci (MGO a GA) i na délce inkubace (Frc a Glc). Vzhledem k tomu, že na vzniku G-vazebného místa se podílí i Lys44, je možné, že jeho modifikace způsobí pokles katalytické aktivity GST.

Během inkubace s glykačními činidly došlo ke vzniku fluoreskujících AGE produktů. Typickými AGEs, které vznikají při inkubaci proteinu s MGO, jsou N_{ϵ} -(1-karboxyethyl)lysin, 1,3-di(N_{ϵ} -lysino)-4-methylimidazolium, argpyrimidin a 3 isomery hydroimidazolonu, z nichž jen argpyrimidin fluoreskuje. Pentosidin je fluoreskující Arg-Lys cross-link vznikající působením glukosy na bílkoviny (Ulrich a Cerami 2001). Všechny zmíněné AGE produkty byly identifikovány a kvantifikovány *in vivo*. Mezi AGE produkty odvozené od glycerinaldehydu patří např. GLAP („glyceraldehyde-derived pyridinium compound“) a triosidiny (Takeuchi a kol. 2010). Vznik AGEs byl hodnocen pomocí **měření fluorescence nespecifických AGEs, pentosidinu a argpyrimidinu**. Sedmidenní inkubace v přítomnosti MGO 2 mM vedla k nárůstu nespecifických fluoreskujících AGEs o 85,3% oproti kontrolnímu vzorku, zatímco v přítomnosti GA 2 mM k nárůstu o 157,2%. Vzestup fluorescence provázející vznik dalších AGEs (pentosidinu a argpyrimidinu) nebyl tak výrazný. Účinek Glc a Frc na vznik AGEs se projevil až po delší době inkubace a byl slabší než účinek MGO a GA.

Měření fluorescence jsem použila rovněž ke **sledování změn v konformaci GST** vlivem glykace. K tomuto účelu jsem sledovala **vnitřní fluorescenci** GST (dána fluorescenčními vlastnostmi Trp zbytků). Inkubace s glykačními činidly vedla k poklesu vnitřní fluorescence enzymu, což můžeme vysvětlit změnami v prostorovém uspořádání bílkoviny, které může přispět ke ztrátě jeho katalytické aktivity (Seidler a Kowalewski 2003). Změny v konformaci GST jsem sledovala též pomocí **cirkulárního dichroismu**.

Nicméně během sedmidenní inkubace s MGO, Glc a Frc nedošlo k žádným změnám v molární elipticitě proteinu a tedy ke změně v poměrném zastoupení jednotlivých sekundárních struktur.

Účinek glykačních činidel na **náboj molekuly GST** jsem sledovala pomocí **nativní PAGE**. Chemická modifikace molekuly GST glykačními činidly vedla ke změně celkového náboje tohoto enzymu, který se díky ztrátě primárních aminoskupin stal více záporným. Nejvýraznější účinek měly MGO 0,5-2 mM a GA 10 mM. Vliv glukosy, fruktosy a GA 0-5 mM na elektroforetickou migraci GST byl minimální. V případě Glc a Frc se projevil až po 14 dnech inkubace, což zřejmě souvisí s jejich nižší reaktivitou. V případě GA jsem použila také **aktivitní barvení**, které ukázalo nejen změny v náboji molekuly GST ale také snížení její katalytické aktivity (menší projasnění gelu).

SDS-PAGE a následný Western blotting potvrdily vznik cross-linků s vyšší molekulovou hmotností (75 kDa) než nativní enzym (25 kDa) ve vzorcích obsahujících MGO a Frc. V případě MGO jsem pozorovala rovněž fragmentaci molekuly GST na kratší peptidy (~ 14 kDa). Při inkubaci GST s MGO po dobu 11 dní došlo k mírnému zvýšení molekulové hmotnosti hlavního bandu GST a ke snížení jeho intenzity, což bylo způsobeno změnami molekulové hmotnosti GST a vznikem vysokomolekulárních agregátů. V případě SDS-PAGE se vzorky obsahujícími GA (hlavně při vyšších koncentracích) byl vznik vysokomolekulárních cross-linků (65-100 kDa) provázen snížením denzity hlavního bandu GST. Při western blottingu jsem pozorovala jeden proužek s molekulovou hmotností ~ 70 kDa.

V případě MGO jsme se ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR pokusili zjistit, na které aminokyselinové zbytky v molekule GST se tato látka váže a jaké vznikají AGE produkty. Pomocí **MALDI-TOF** se podařilo zjistit, že MGO 0,5 mM se váže na 3 argininové zbytky a jediným identifikovaným AGE produktem byl argpyrimidin. MGO 2 mM modifikoval celkem 7 argininových zbytků a identifikovány byly argpyrimidin a isomery methylglyoxal-hydroimidazolonu. Dalšími modifikovanými aminokyselinovými zbytky byly 4 methioninové, 1 cysteinový a 1 threoninový zbytek, ale hmota této modifikace neodpovídala předpokládaným AGE produktům. Jedná se zřejmě o posttranslační modifikace provedené bakteriální buňkou, protože použitý enzym byl rekombinantně připraven v bakteriích *E. coli* a modifikace těchto aminokyselinových zbytků neenzymovou glykací nebyla dosud popsána.

Nakonec jsem se pokusila zjistit, jestli spolu změny pozorované v parametrech fluorescence (nespecifické AGEs, argpyrimidin, pentosidin, vnitřní fluorescence) a obsahu primárních aminoskupin ve vzorcích obsahujících MGO (0-2 mM) nebo GA (0,5-10 mM) korelují. Všechny zmíněné parametry spolu dobře korelovaly.

Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že nejvyšší glykační potenciál má methylglyoxal, dále glyceraldehyd, fruktosa a nejméně účinným glykačním činidlem byla glukosa. Tento závěr je v souladu s publikovanými výsledky jiných studií týkajících se glykace různými glykačními činidly (Beránek a kol. 2001, Schalkwijk a kol. 2004).

7 ZÁVĚR

- 1) Při porovnávání vlivu methylglyoxalu (0,5-2 mM), glukosy (50 mM) a fruktosy (50 mM) na aktivitu, strukturu a funkci enzymu glutathion-S-transferasy ze *Schistosoma japonicum* jsem zjistila, že s rostoucí koncentrací MGO klesá enzymová aktivita, zatímco fruktosa a glukosa mají na aktivitu jen malý nebo žádný účinek. Obsah primárních aminoskupin po 7denní inkubaci v přítomnosti 2 mM MGO klesnul o 14 aminoskupin, v případě fruktosy a glukosy se jednalo o 3 resp. 1 aminoskupinu. Tento pokles v počtu primárních aminoskupin, který způsobil úbytek kladného náboje v molekule GST, byl provázen změnami v elektroforetické mobilitě tohoto proteinu. Modifikace 2 mM MGO vedla po 14 dnech inkubace ke zvýšení elektroforetické mobility o 22,6 % proti kontrolnímu vzorku, zatímco vliv glukosy a fruktosy byl malý (do 5,4 %). Při inkubaci se všemi glykačními činidly došlo k nárůstu intenzity fluorescence způsobené tvorbou celkových AGEs a naopak k poklesu vnitřní (tryptofanové) fluorescence, která signalizuje změny v konformaci GST. Nicméně změny sekundární struktury ve spektrech cirkulárního dichroismu se nepodařilo prokázat. Při použití specifických protilátek proti AGE produktům a AGE produktům odvozeným od MGO jsem zjistila, že glykace v přítomnosti MGO vedla ke vzniku vysokomolekulárních cross-linků s navázanými AGEs s molekulovou hmotností v rozsahu 50-200 kDa. V případě glukosy a fruktosy došlo ke vzniku velmi malého množství cross-linků s AGEs s molekulovou hmotností 50-75 kDa. Pomocí MALDI-TOF se podařilo zjistit místa modifikace vyvolané MGO (MGO 0,5 mM modifikoval 3 Arg a MGO 2 mM dokonce 7 Arg) a vznikající AGEs (argpyrimidin a 3 isomery methylglyoxal-hydroimidazolonu).
- 2) Při inkubaci GST s glycerinaldehydem (0,5-10 mM) došlo pouze k velmi malému poklesu aktivity a to i při 10 mM koncentraci GA. Účinek GA (0,5-2 mM) na obsah primárních aminoskupin byl srovnatelný s účinkem MGO ve stejných koncentracích. Tento efekt byl závislý na koncentraci GA (např. po týdenní inkubaci v přítomnosti GA 10 mM klesnul obsah primárních aminoskupin o 26). Nicméně výraznější změny v elektroforetické mobilitě GST se projevily až za použití GA 5 mM a 10 mM (zvýšení mobility o 9,6 % resp. 32,7 %). Měření

inkubačních směsí ukázalo nárůst intenzity fluorescence způsobené tvorbou celkových AGEs a naopak pokles vnitřní (tryptofanové) fluorescence v závislosti na koncentraci GA. Za použití protilátky proti AGE produktům se podařilo potvrdit vznik vysokomolekulárních cross-linků obsahujících AGE produkty, které měly molekulovou hmotnost v rozsahu 65-100 kDa.

- 3) Při porovnávání účinku všech použitých glykačních činidel a zjišťování, zda spolu stanovované parametry korelují, jsem došla k této závěru, že glykační potenciál použitých glykačních činidel klesá v následujícím pořadí: methylglyoxal > glycerinaldehyd > fruktosa > glukosa, což je v souladu s již publikovanými články. Změny pozorované v parametrech fluorescence (nespecifické AGEs, argpyrimidin, pentosidin, vnitřní fluorescence) a obsahu primárních aminoskupin ve vzorcích obsahujících MGO (0-2 mM) nebo GA (0,5-10 mM) spolu dobře korelují.

8 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------------|---|
| 3-DG | 3-deoxyglukoson |
| AA + bis AA | roztok akrylamidu a bis-akrylamidu |
| AG | aminoguanidin |
| AGE-R1 | oligosacharyltransferasa-48 |
| AGE-R2 | 80K-H fosfoprotein |
| AGE-R3 | galektin-3 |
| AGEs | koncové produkty pokročilé glykace (<i>advanced glycation end products</i>) |
| ALI | arginin-lysin-imidazol cross-link |
| ALT-711 | alagebrium chlorid |
| AP | alkalická fosfatasa |
| APS | persíran amonný |
| BCIP | 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| CD | cirkulární dichroismus |
| CDNB | 1-chloro-2,4-dinitrobenzen |
| CEL | N ^ε -(karboxyethyl)lysin |
| CML | N ^ε -(karboxymethyl)lysin |
| DM | diabetes mellitus |
| EC | enzyme commission |
| ELISA | imunochemická metoda (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>) |
| Frc | fruktosa |
| GA | glyceraldehyd |
| GAPDH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa |
| GC/MS | plynová chromatografie/hmotnostní spektroskopie (<i>gas chromatography/mass spectrometry</i>) |
| Glc | glukosa |
| GO | glyoxal |
| GOLD | glyoxal-lysin dimer |
| GS-DNB | konjugát glutathionu a dinitrobenzenu (S-2,4-dinitrofenylglutathion) |

| | |
|-----------|---|
| GSH | glutathion |
| GST | glutathion-S-transferasa |
| HLA | lidský leukocytární antigen (<i>human leukocyte antigen</i>) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| HRP | křenová peroxidasa (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| IAA | autoprotilátky proti insulinu (<i>insulin autoantibodies</i>) |
| ICA | protilátky proti tkáni Langersových ostrůvků (<i>islet cell antibodies</i>) |
| IDDM | na insulinu závislý DM (insulin dependent DM) |
| MALDI-TOF | ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>) |
| MAPEG | membránové proteiny podílející se na metabolismu eikosanoidů a glutathionu (<i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>) |
| MGO | methylglyoxal |
| MOLD | methyl-glyoxal-lysin dimer |
| NBT | nitrobluetetrazoliová sůl |
| NFDM | netučné sušené mléko (<i>non-fat dry milk</i>) |
| NIDDM | na insulinu nezávislý DM (<i>non-insulin dependent DM</i>) |
| PAGE | polyakrylamidová gelová elektroforesa |
| PBS | fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PTB | fenylthiazolium bromid |
| PVDF | polyvinylidendifluorid |
| RAGE | receptor pro AGE |
| RIA | imunochemická metoda (<i>radioimmunoassay</i>) |
| ROS | reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>) |
| RTG | rentgenové záření |
| SDS | laurylsíran sodný, dodecylsíran sodný (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| sRAGE | solubilní RAGE |
| TAGE | toxické AGEs |
| TBS | TRIS pufr (<i>tris-buffered saline</i>) |
| TBST | směs TRIS pufru a Tweenu 20 (<i>TRIS-buffered saline/Tween 20</i>) |

| | |
|--------|--|
| TEMED | tetramethylethyldiamin |
| TNBS | kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová |
| TNP-AK | trinitrofenyl-aminokyselina |
| TRIS | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UV | ultrafialové záření |

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmed N. (2005): Advanced glycation end products – role in pathology of diabetic complications, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 67(1): 3-21

Andújar-Sánchez M., Smith A. W., Clemente-Jimenez J. M., Rodriguez-Vico F., Las Heras-Vazquez F. J., Jara-Pérez V. a Cámara-Artigas A. (2005): Crystallographic and thermodynamic analysis of the binding of S-octylglutathione to the Tyr 7 to Phe mutant of glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*, *Biochemistry.* 44(4): 1174-83

Barnett Ch. R., Abbott R. A., Bailey C. J., Flatt P.R. (1992): Cytochrome P450-dependent mixed-function oxidase and glutathione S-transferase activities in spontaneous obesity-diabetes, *Biochemical Pharmacology* 43(8): 1868-1871

Basta G., Schmidt A. M., De Caterina R. (2004): Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes, *Cardiovasc. Res.* 63(4): 582-592

Beisswenger P. J., Howell S. K., Nelson R. G., Mauer M., Szwegold B. S. (2003): α -Oxoaldehyde metabolism and diabetic complications, *Biochem. Soc. Trans.* 31(6): 1358-1363

Beránek M., Dršata J., Palička V. (2001): Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase, *Mol. Cell. Biochem.* 218(1-2): 35-39

Boušová I., Vukasović D., Juretić D., Palička V., Dršata J. (2005): Enzyme activity and AGE formation in a model of AST glycooxidation by D-fructose in vitro, *Acta Pharm.* 55(1): 107-14

Boušová I. (2006): Natural compounds with potential antioxidant activity, in vitro study in a model of protein glycooxidation, *Disertační práce, Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 29-37*

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(1-2): 215-223

Boušová I., Srbová L., Dršata J. (2012): Non-enzymatic glycation of aminotransferases and the possibilities of its modulation. *In: Sharma RR (ed.) Enzyme Inhibition.* 1st ed. Intech. (v tisku)

Cardoso R. M. F., Daniels D. S., Bruns C. M., Tainer J. A. (2003): Characterization of the electrophile binding site and substrate binding mode of the 26-kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*, *Proteins* 51(1): 137-146

Circular dichroism – [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-10-12]. Dostupné z: http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm

Circular dichroism (CD) spektroskopie – *Applied photophysics* [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-10-12]. Dostupné z: <http://www.photophysics.com/circulardichroism.php>

Circulardichroismus von Proteinen – *CHEMGAROO Chemga Pedia* [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-10-12]. Dostupné z: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/circulardichroismus.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteindynamik/cd2.vscml.html>

Český lékopis 2009 – Ministerstvo Zdravotnictví ČR, Grada Publishing, a.s., 108-113

Dutta U., Cohenford M. A., Dain J. A. (2006): Monitoring the effect of glyceraldehyde glycation on the secondary structure human serum albumin and immunoglobulin G: An analysis based on circular dichromism, thermal melting profiles and UV-fluorescence spectroscopy, *Anal. Clin. Acta* 558(1-2): 187-194

Edalat M. (2002): Multiple functions of glutathione transferases, a study on enzymatic function, regulatory role and distribution in mouse and man, *Disertační práce*, Přírodovědecká fakulta a technologická fakulta Univerzity Uppsala, 8-16

Electrophoresis – The University of Adelaide-Department of Chemistry [online].
Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-09-07]. Dostupné z:
<http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/electrop.htm>

Elektroforéza – [online]. Poslední revize 29.1.2004 [cit. 2011-09-09]. Dostupné z:
<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>

Elektroforéza nukleových kyselin – Wikiskripta [online]. Poslední revize 3.9.2011
[cit.2011-09-12]. Dostupné z:
[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za_nukleov%C3%BDch_kyse
lin](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za_nukleov%C3%BDch_kyse
lin)

Experimental techniques – Electrophoresis [online]. Poslední revize 23.4.2006 [cit.
2011-10-10]. Dostupné z:
[http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresi
s.htm](http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresi
s.htm)

Fluoreszenz – [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-10-13]. Dostupné
z: <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/fluoreszenz.htm>

Fujita H., Haseyama T., Kayo T., Nozaki J., Wada Y., Ito S., Koizumi A. (2001):
Increased expression of glutathione S-transferase in renal proximal tubules in the early
stages of diabetes: A study of type-2 diabetes in the Akita mouse model, *Exp. Nephrol.*
9(6): 380-386

Glyceraldehyde (CHEBI: 5445) – EMBL-EBI [online]. Poslední revize 26.1.2011 [cit.
2011-08-29]. Dostupné z:
[http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do;1688F8359C81D6639C70E869DAA04D72?ch
ebiId=CHEBI:5445#18791692](http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do;1688F8359C81D6639C70E869DAA04D72?ch
ebiId=CHEBI:5445#18791692)

Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isoenzyme – UniProt [online]. Poslední
revize 27.7.2011 [cit. 2011-11-15]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08515>

Glutathione-S-transferases – Drug metabolism [online]. Poslední revize 2007 [cit. 31.8.2011]. Dostupné z: <http://www.drugmetabolism.co.uk/gst.aspx>

Gomes R. A., Miranda H. V., Silva M. S., Graça G., Coelho A. V., Ferreira A. E., Cordeiro C., Freire A. P. (2006): Yeast protein glycation in vivo by methylglyoxal: Molecular modification of glycolytic enzymes and heat shock proteins, *FEBS Journal* 273(23): 5273-5287

Gugliucci A. (2000): Glycation as the glucose link to diabetic complications, *J. Am. Osteopath. Assoc.* 100(10): 621-634

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. (1974): Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249(22): 7130-7139

Haik G. M. Jr., Lo T. W., Thornalley P. J. (1994): Methylglyoxal concentration and glyoxalase activities in the human lens, *Exp. Eye Res.* 59(4): 497-500

Havliš J. (1999): Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, *Vesmír* 78: 448

Huijberts M. S. P., Schaper N. C., Schalkwijk C. G. (2008): Advanced glycation end products and diabetic foot disease, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24(1): S19-S24

Chaplen F. W., Fahl W. E., Cameron D. C. (1998): Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(10): 5533-5538

Choudhary D., Chandra D., Kale R. K. (1997): Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage, *Toxicol. Lett.* 93(2-3): 141-152

Intrinsic fluorescence of proteins and peptides – [online]. Poslední revize (není k dispozici). [cit. 2011-10-14]. Dostupné z: <http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/pp99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/fluor.htm>

Jurinke Ch., Oeth P., van den Boom D. (2004): MALDI-TOF mass spectrometry – A versatile tool for high-performance DNA analysis, *Mol Biotechnol* 26(2): 147-163

Kalousová M., Fialová L., Kraml J., Křepela E., Mrázová K., Pačes J., Pláteník J., Šebesta I., Štěpán J., Štípek S., Vejražka M., Zeman M., Zima T., Žák A. (2006): *Patobiochemie ve schématech*, Grada Publishing, a.s., 152-170

Lapolla A., Flamini R., Dalla Vedova A., Senesi A., Reitano R., Fedele D., Basso E., Seraglia R., Traldi P. (2003): Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method, *Clin. Chem. Lab. Med.* 41(9): 1166–1173

Lapolla A., Traldi P., Fedele D. (2005): Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins, *Clin. Biochem* 38(2): 103-115

Lapshina E. A., Sudnikovich E. J., Maksimchik J. Z., Zabrodskaya S. V., Zavodnik L. B., Kubyshin V. L., Nocun M., Kazmierczak P., Dobaczewski M., Watala C., Zavodnik I. B. (2006): Antioxidative enzyme and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment, *Life Sci.* 79(19): 1804-1811

Li Y. (2008): Study on the nonenzymatic glycation of nucleosides/nucleotides and proteins with sugars: An in vitro investigation of advanced glycation endproducts (AGEs) formation, *Disertační práce*, University of Rhode Island, 12-14

Lim K., Ho J. X., Keeling K., Gilliland G. L., Ji X., Růker F., Carter D. C. (1994): Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV, *Protein Sci.* 3 (12): 2233-2244

Mačák J., Mačáková J. (2004): *Patologie*, Grada Publishing, a.s., 275-276

Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) with robot spotter – [online]. Poslední revize 17.5.2004 [cit. 2011-10-10]. Dostupné z: <http://qbab.aber.ac.uk/roy/mss/tofspec.htm>

Matsumoto K., Sano H., Nagai R., Suzuki H., Kodama T., Yoshida M., Ueda S., Smedsrød B., Horiuchi S. (2000): Endocytic uptake of advanced glycation end products by mouse liver sinusoidal endothelial cells is mediated by a scavenger receptor distinct from the macrophage scavenger receptor class A, *Biochem. J.* 352(Pt 1): 233-240

McTigue M. A., Williams D. R., Tainer J. A. (1995): Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel, *J. Mol. Biol.* 246(1): 21-27

Methylglyoxal (CHEBI: 17158) – *EMBL-EBI* [online]. Poslední revize 26.1.2011 [cit. 2011-08-29]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=17158>

Miwa I., Chen A. S., Taguchi T. (2009): Glyceraldehyde is present in rat lens and its level is increased in diabetes mellitus, *Ophthalmic. Res.* 41(2): 98-101

Mulac K. (2005): Pathomechanismen der Atherosklerose bei Diabetes mellitus, *Journal für Kardiologie – Austrian Journal of Cardiology* 12(1-2): 9-14

Nagaraj R. H., Shipanova I. N., Causy F. M. (1996): Protein cross-linking by the Maillard reaction – Isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal, *J. Biol. Chem.* 271(32): 19338-19345

Non-fusion GST from S. japonicum in complex with glutathione – *PROTEIN DATA BANK* [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-12-1]. Dostupné z: <http://www.pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1UA5&bionumber=1>

O'Brien P. J. a Bruce W. R. (2009): Endogenous toxins: Targets for Disease treatment and prevention, Wiley-vch, 160-162

Obšil T. a Pavlíček Z. (1997): Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo, Chem. Listy 91: 558-569

Oliveira L. M., Lages A., Gomes R.A., Neves H., Familia C., Coelho A. V., Quintas A. (2011): Insulin glycation by methylglyoxal results in native-like aggregation and inhibition of fibril formation, BMC Biochem. 12: 41

Overview of protein electrophoresis – Thermo scientific [online]. Poslední revize 2011 [cit. 2011-09-08]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=21518847-2D72-475F-A5B9-B236EC5B641E>

Overview of Western blotting – Thermo scientific [online]. Poslední revize 2011 [cit. 2011-09-11]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193>

Pazourek J. (2003): Moderní elektroforetické analytické metody, Skripta Farmaceutické fakulty Veterinární a farmaceutické univerzity Brno: Elektroforetické analytické metody: 8-17

Raza H., Prabu S. K., Robin M.-A., Avadhani N. G. (2004): Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: Tissue-specific variations and roles in oxidative stress, Diabetes 53(1): 185-194

Ricci G., Lo Bello M., Caccuri A. M., Galiazzo F., Federici G. (1984): Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels, Anal. Biochem. 143(2): 226-230

Roepstorff P. (2000): MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry, Proteomics in functional genomics – Protein structure analysis (P. Jollès, H. Jörnvall), Birkhäuser Verlag Basel, 81-89

SDS-PAGE (gel electrophoresis) and Western blot procedure – *Westernblotting.org* [online]. Poslední revize 2006 [cit. 2011-09-12]. Dostupné z: <http://www.westernblotting.org/THEORY.htm>

Saito-Yamanaka N., Yamanaka H., Nagasawa S. (1993): Glutathione-related detoxication functions in streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Vet. Med. Sci.* 55(6): 991-994

Seidler N. W. (2005): Carbonyl-induced enzyme inhibition: Mechanisms and new perspectives, *Curr. Enzyme Inhib.* 1(1): 21-25

Seider N. W. a Kowalewski C. (2003): Methylglyoxal-induced glycation affects protein topography, *Arch. Biochem. Biophys.* 410(1): 149-154

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochem. J.* 360(Pt 1): 1-16

Schalkwijk C. G. (2007): Therapeutic interventions in the glyc(oxid)ation pathway, *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem* 7(1): 57-68

Schalkwijk C. G., Stehouwer C. D. A., van Hinsbergh V. W. M. (2004): Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 20(5): 369-382

Silbernagl S. a Lang F. (2001): Atlas patofyziologie člověka, Grada Publishing, spol. s r.o., 286-291

Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. (2001): Advanced glycation end – products: a review, *Diabetologia* 44(2): 129-146

Singh S. V., Kurosky A., Awasthi Y. C. (1987): Human liver glutathione S-transferase ti – Chemical characterization and secondary-structure comparison with other mammalian glutathione S-transferases, *Biochem. J.* 243(1): 61-67

Steinbrecher U. P. (1987): Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products, *J. Biol. Chem.* 262(8): 3603-3608

Takeuchi M., Takino J., Yamagishi S. (2010): Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: A novel therapeutic strategy, *Current Drug Targets* 11(11): 1468-1482

Thomas H., Schladt L., Knehr M., Oesch F. (1989): Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases, glutathione S-transferases and peroxisomal β -oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38(23): 4291-4297

Thornalley P. J. (1998): Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs, *Cell. Mol. Biol.* 44(7): 1013-1023

Tsunosue M., Mashiko N., Ohta Y., Matsuo Y., Ueda K., Ninomiya M., Tanaka S., Hoshiko M., Yoshiyama Y., Tekeuchi M., Ueda S., Yamagishi S. (2010): An alpha-glucosidase inhibitor, acarbose treatment decreases serum levels of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) in patients with type 2 diabetes, *Clin. Exp. Med.* 10(2): 139-141

Ulrich P. a Cerami A. (2001): Protein glycation, diabetes, and aging, *Recent Prog. Horm. Res.* 56: 1-21

Usui T., Yoshino M., Watanabe H., Halase F. (2007): Determination of glyceraldehyde formed in glucose degradation and glycation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (9): 2162-2168

West I. C. (2000): Radicals and oxidative stress in diabetes, *Diabet. Med.* 17(3): 171-180

Western blotting – Millipore [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2011-09-12]. Dostupné z: http://www.millipore.com/immunodetection/id3/western_blotting

Willemsen S., Hartog J. W., Hummel Y. M., Posma J. L., van Wijk L. M., van Veldhuisen D. J., Voors A. A. (2010): Effects of alagebrium, an advanced glycation end-product breaker, in patients with chronic heart failure: study design and baseline characteristics of the BENEFICIAL trial, *Eur. J. Heart Fail.* 12(3): 294-300

Zhang H. (2007): Developments and applications of electrophoresis and small molecule laser desorption ionization mass spectrometry, *Disertační práce*, Iowa State University, 1-5

Zieman S. J., Melenovsky V., Clattenburg L., Corretti M. C., Capriotti A., Gerstenblith G., Kass D. A. (2007): Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension, *J. Hypertens.* 25(3): 577-583

Comparison of glycation of glutathione S-transferase by methylglyoxal, glucose or fructose

Iva Boušová · Zuzana Průchová · Lucie Trnková · Jaroslav Dršata

Received: 14 February 2011 / Accepted: 19 May 2011 / Published online: 29 May 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Glycation is a process closely related to the aging and pathogenesis of diabetic complications. In this process, reactive α -dicarbonyl compounds (e.g., methylglyoxal) cause protein modification accompanied with potential loss of their biological activity and persistence of damaged molecules in tissues. We suppose that glutathione S-transferases (GSTs), a group of cytosolic biotransformation enzymes, may be modified by glycation *in vivo*, which would provide a rationale of its use as a model protein for studying glycation reactions. Glycation of GST by methylglyoxal, fructose, and glucose *in vitro* was studied. The course of protein glycation was evaluated using the following criteria: enzyme activity, formation of advanced glycation end-products using fluorescence and western blotting, amine content, protein conformation, cross linking and aggregation, and changes in molecular charge of GST. The ongoing glycation by methylglyoxal 2 mM resulted in pronounced decrease in the GST activity. It also led to the loss of 14 primary amino groups, which was accompanied by changes in protein mobility during native polyacrylamide gel electrophoresis. Formation of cross links with molecular weight of 75 kDa was observed. Obtained results can contribute to understanding of

changes, which proceed in metabolism of xenobiotics during diabetes mellitus and ageing.

Keywords Advanced glycation end-products · Glutathione S-transferase · Methylglyoxal · Protein glycation · Protein conformation

Introduction

Glutathione S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) are a group of xenobiotic-metabolizing enzymes that play a crucial role in the phase II of detoxification. These enzymes catalyze conjugation of toxic compounds with endogenous tripeptide glutathione (GSH) to deactivate them and increase their hydrophilicity [1]. In humans, GSTs are extremely ubiquitous, e.g., constituting about 4% of total soluble protein in the liver [2]. They can be divided into three subfamilies according to the cellular localization: cytosolic, microsomal, and mitochondrial. Among them, cytosolic GSTs are numerous and well described. Seven classes of mammalian cytosolic GSTs, called alpha, kappa, mu, omega, pi, theta, and zeta, have been identified and categorized based on a sequence identity (at least 40% sequence identity within a class) [3–5]. The most widely distributed GST isoforms come from alpha, mu, and pi classes [3]. These enzymes exist as dimeric proteins, with an approximate molecular weight of 25 kDa for each subunit. Each of the subunits possesses a GSH binding site (G-site) as well as an adjacent relatively hydrophobic site (H-site) for the binding of the electrophilic substrate [2, 6].

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder with high prevalence in human population. This disease, unless it is controlled therapeutically, is characterized by hyperglycemia and glycosuria. The hyperglycemia is not only a

I. Boušová (✉) · Z. Průchová · L. Trnková · J. Dršata
Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy,
Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec
Kralove, Czech Republic
e-mail: Iva.Bousova@faf.cuni.cz

L. Trnková
Department of Chemistry, Faculty of Science, University
of Hradec Králové, Rokytanského 62, 500 03 Hradec Kralove,
Czech Republic

hallmark but also the main cause of diabetic complications development [7]. Sugar binds in the process of glycation to free amino groups of extracellular as well as intracellular proteins, modifies their molecules, causes formation of cross-links between adjacent protein chains, and contributes to the formation of irreversible protein adducts known as advanced glycation end products (AGEs) [8, 9]. Intermediate products (Schiff bases and Amadori products) can be fragmented to α -dicarbonyl compounds, such as glyoxal, methylglyoxal (MGO), and 3-deoxyglucosone. These compounds are more reactive than the parent sugars and are mainly responsible for protein cross-linking and formation of AGEs [10]. MGO plays a key role in the formation of AGEs on intracellular proteins. MGO-modified proteins are important physiological ligands for scavenger receptors of monocytes and macrophages (MSR-AII and MSR-BI), the cells responsible for their endocytosis, and consequent lysosomal degradation [11, 12].

Raza et al. [13] suggested that glutathione metabolism and GST distribution in the tissues of diabetics may be crucial in the etiology, pathology, and prevention of diabetes. It was also reported that long-term hyperglycemia resulted in decreased activities of GST as well as of other enzymes in diabetic animals [14–16]. These findings indicate that ongoing diabetes may modify the detoxification metabolism. The present study examined the effect of MGO, fructose, and glucose on structural and catalytic properties of cytosolic mu-class GST.

Materials and methods

Chemicals

GST, a recombinant enzyme from *Schistosoma japonicum*, was purchased from GenScript, New Jersey, USA. MGO, aminoguanidine, D-fructose, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, reduced glutathione, β -alanine, Bradford reagent, and chemicals used for realization of electrophoresis were the products of Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA. PVDF membrane (0.2 μ m), Precision Plus molecular weight standards, and non-fat dry milk were obtained from Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA. D-Glucose, sodium bicarbonate, and sodium azide were purchased from Lachema, Brno, Czech Republic. Rabbit polyclonal antibody to AGE (primary antibody) and goat polyclonal anti-rabbit IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase (secondary antibody) were obtained from Acris GmbH, Hiddenhausen, Germany. Mouse monoclonal antibody [3C] to MGO-derived AGEs and rabbit polyclonal anti-mouse IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase were products of Abcam plc, Cambridge, UK. Chemiluminescent/fluorescent substrate for alkaline

phosphatase DuoLux was ordered from Vector Laboratories, Burlingame, USA. X-ray films CL-XPosure were obtained from Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA. Fixing and developing bath were products of Foma Bohemia, Hradec Králové, Czech Republic. All chemicals used were of analytical grade.

Sample preparation and incubation

GST (0.5 mg/ml) was incubated in the presence or absence of glyating agents (MGO 0.5 mM, MGO 1 mM, MGO 2 mM, fructose 50 mM, or glucose 50 mM) at 37°C for up to 28 days in 100 mM phosphate-buffered saline (pH 7.4, 0.05% sodium azide). The low-molecular compounds were removed using Microcon centrifugal filtration device with 10 mM phosphate-buffered saline (pH 7.4), protein content was measured using Bradford assay, and adjusted to the concentration 0.5 mg/ml. Aliquots were stored frozen at -20°C until analysis. All the samples were assessed in triplicates, and experiments were repeated twice if not stated otherwise.

Enzyme assay

GST (0.025 mg/ml) was incubated in the presence or absence of glyating agents for 180 min at 37°C. Sample aliquots were taken away at 0, 60, 120, and 180 min, diluted and their activity was assessed by colorimetric method based on the GST-catalyzed reaction between GSH and GST substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene at pH 6.5. Product of this reaction, S-(2,4-dinitrophenyl)glutathione, can be detected spectrophotometrically at 340 nm [17].

Determination of amino groups

Amine content, which is a measure of protein glycation, was estimated spectrophotometrically with trinitrobenzenesulfonic acid [18] using β -alanine as the standard. Sample containing 50 μ g of GST was incubated with 0.1% trinitrobenzenesulfonic acid in alkaline conditions for 2 h at 37°C. The reaction was stopped by acidification (1 M HCl) and addition of 10% SDS. The absorbance of trinitrophenyl-amino acid complex was measured at 340 nm. The standard curve was linear in the range 5–100 nmol of NH_2 .

Fluorescence measurements

Formation of fluorescent AGEs and changes in tryptophan (intrinsic) fluorescence were determined using multimode reader Tecan Infinite M200. Fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 370/440 nm (fluorescent AGEs) and 295/386 nm (tryptophan

fluorescence), respectively, in 96-well plate using 100 μ g of GST per well. Emission wavelength for tryptophan fluorescence determination was found experimentally.

Effect of glycation on molecular charge of GST

Native PAGE was used to investigate the change in the molecular charge of GST due to glycation. Electrophoresis was performed in Ornstein–Davies discontinuous system with 4% stacking gel and 10% separating non-denaturing gel [19, 20]. All lanes were loaded with 10 μ g of protein. Electrophoresis was performed at 30 mA for about 3 h using Mini Protean III apparatus. The gel was then stained by colloidal Coomassie Blue G250, scanned, and relative migration distances were calculated from R_f using Quantity One software (BioRad). Electrophoretic mobilities were expressed as a rise in percentage mobility compared with the native enzyme (control).

Western blotting

Formation of AGEs, protein cross-linking, and fragmentation were assessed using western blotting with corresponding antibodies. Proteins were first separated by SDS-PAGE on Mini Protean III apparatus (BioRad). SDS-PAGE was performed using discontinuous system with 4% stacking gel and 12.5% separating gel according to the method of Laemmli [21]. Lanes were loaded with 4 μ g of protein. Proteins were then transferred to PVDF membrane [22] at a constant voltage 100 V for 90 min (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad).

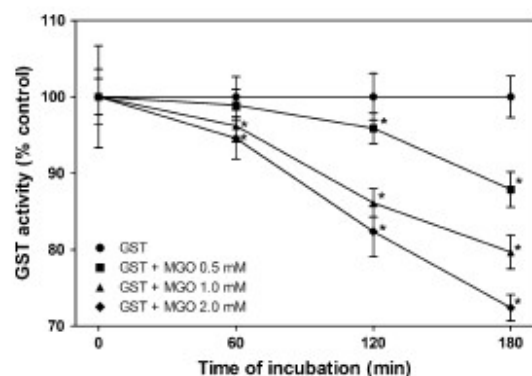


Fig. 1 Effect of glycation by MGO on GST activity. GST (0.025 mg/ml) was incubated in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0 mM (circle), 0.5 mM (square), 1.0 mM (triangle), and 2.0 mM (diamond) MGO for 180 min at 37°C. Catalytic activity of GST was expressed as percentage of control sample activity at all time intervals, which was 100% \pm SD(%). Every point represents an average of two independent experiments, in which assays were performed in hexaplicates (* P < 0.05, Student's t -test)

After blotting, membranes were blocked in 8% non-fat dry milk in Tris buffered saline-Tween-20 buffer overnight at 4°C. After washing in Tris buffered saline-Tween-20 buffer, the membranes were reacted with either primary rabbit anti-AGE antibody (dilution 1:1000) or primary mouse anti-MGO [3C] antibody (1:1000) for 45 min at room temperature. Subsequently, membranes were washed six times with Tris buffered saline-Tween-20 buffer and incubated with corresponding secondary antibody for 45 min (dilution 1:2000 for anti-rabbit IgG and 1:1000 for anti-mouse IgG). The blots were extensively washed in 0.1 M Tris buffer containing 5 mM MgCl₂·6H₂O (pH 9.5), covered with chemiluminescent substrate DuoLux and incubated for 5 min. Protein bands were then detected by both chemiluminescent detection and staining with Ponceau S. Membranes, and X-ray films (CL-XPosure film, Thermo Fisher Scientific) were scanned on GelDoc XR system and quantified by Quantity One software (BioRad).

Statistical analysis

Values of catalytic activity are given as means \pm SD and mostly expressed in % of the time 0 of individual samples \pm relative SD. Values of fluorescence (RFU) and amine content are given as mean \pm SD. Statistical significance was determined using Student's t -test, and differences were regarded as significant when P < 0.01.

Results

Enzyme assay

Activity of control sample (GST alone) was stable throughout the experiment. MGO caused an irreversible decrease in enzymatic activity of GST (Fig. 1). When GST was incubated with MGO (0.5, 1.0, and 2.0 mM), activity decreased by 12.1, 20.3, and 27.6% after 180 min at 37°C, respectively. The rate of enzyme inactivation increased with increasing concentrations of MGO. Only slight changes (decrease up to 6%) in the enzymatic activity of GST incubated with fructose 50 mM or glucose 50 mM were observed (data not shown).

Determination of amine content

Protein glycation, the chemical modification of primary amines (ϵ -amino group of lysine residues and α -amino group of N-terminal amino acids), leads to the decrease in amine content. Incubation of GST with MGO, fructose or glucose led to the reduction in amine content, which differed according to the nature and concentration of glycating agent used (Table 1). Incubation of GST with MGO

Table 1 Primary amine content

| Sample | Amine content (mol NH ₂ / mol GST) (days) | | Number of primary amino groups (days) | |
|---------------------|---|----------------------------|--|----------------|
| | 7 | 28 | 7 | 28 |
| GST | 52.76 ± 1.17 ^a | 52.59 ± 1.23 ^a | 44 | 44 |
| GST + MGO 0.5 mM | 46.19 ± 2.68 ^d | – ^g | 39 | – ^g |
| GST + MGO 1 mM | 40.70 ± 1.22 ^e | – ^g | 34 | – ^g |
| GST + MGO 2 mM | 36.44 ± 1.42 ^f | – ^g | 30 | – ^g |
| GST + Frc 50 mM | 48.82 ± 1.82 ^{bc} | 44.16 ± 1.26 ^d | 41 | 37 |
| GST + Glc 50 mM | 52.01 ± 1.92 ^{ab} | 46.80 ± 0.72 ^{cd} | 43 | 39 |

^{a,b,c,d,e,f} Groups with different letters vary significantly ($P < 0.01$, Student's *t*-test)

^g Amine content was not determined

2.0 mM and fructose 50 mM for 7 days caused 31 and 8% decrease in amine content due to chemical modification of primary amines, respectively. GST in its native dimeric form contains 44 primary amino groups, suggesting that about 14 and 3 amino groups were modified during its incubation with MGO 2.0 mM and Frc 50 mM, respectively. By contrast, no changes in amine content were observed in the case of glucose 50 mM after 7 days of incubation. Therefore, the samples containing fructose 50 mM and glucose 50 mM were incubated as long as for 28 days, and then, these glycation agents caused 16 and 11% decrease in amine content, respectively.

Fluorescence measurements

Incubation of GST with glycation agents led to the increase in fluorescence intensity due to the formation of AGEs with fluorescent properties (Fig. 2a) and the decrease in tryptophan fluorescence (Fig. 2b). The 7-day incubation of GST with MGO (0.5, 1.0, and 2.0 mM) at 37°C caused an increase in AGEs formation by 32.0, 55.1, and 85.3% and a decrease in tryptophan fluorescence by 11.3, 16.6, and 27.7% compared with the control sample (GST alone), respectively. Fructose and glucose showed much lower effect both on formation of AGEs and tryptophan fluorescence in this time interval. Their effect was more pronounced after 28 days of incubation at 37°C, when fructose 50 mM caused 51.3% increase in AGEs formation and 10.6% decrease in tryptophan fluorescence.

To determine whether the changes in tryptophan fluorescence observed in the samples containing various

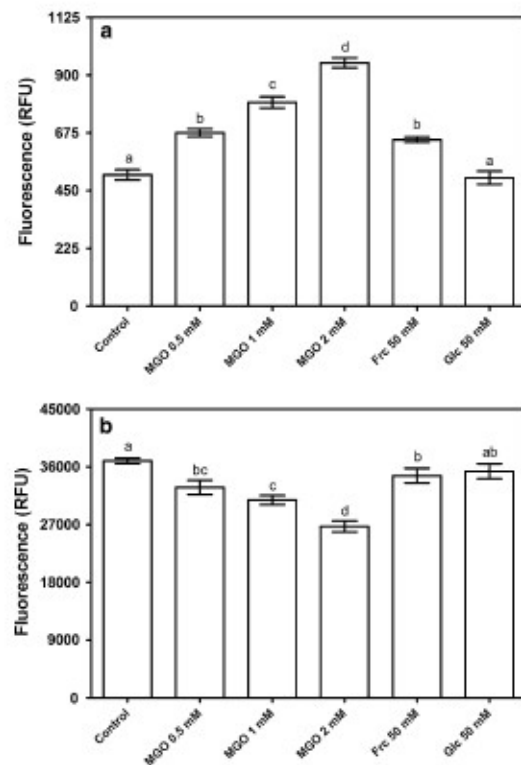


Fig. 2 Effect of glycation agents on the formation of fluorescent AGEs (a) and tryptophan fluorescence (b). GST (0.5 mg/ml) was incubated with or without MGO (0.5–2.0 mM), fructose (Frc 50 mM) and glucose (Glc 50 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 7 days. Glycation agents were then removed by centrifugal filtration. Fluorescence of samples containing 100 µg of GST was measured at specific excitation and emission wavelengths ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) corresponding to AGEs (370/440 nm) and tryptophan (295/386 nm). Data of fluorescence were expressed in relative fluorescence units \pm SD. Every point represents an average of two independent experiments (six samples). Groups with different letters are significantly different ($P < 0.01$, Student's *t*-test)

concentrations of MGO (0–2.0 mM) correlated with the loss of primary amino groups in these samples, the fluorescence intensity was plotted as a function of amine content. The decrease in fluorescence emission ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 295/386$ nm) varied directly with the loss of primary amino groups ($r = 0.987$, $P < 0.013$; Fig. 3a). Changes in tryptophan fluorescence also correlated well with the formation of fluorescent AGEs ($r = 0.997$, $P < 0.003$; Fig. 3b). In addition, the amine content was plotted as a function of AGEs fluorescence (Fig. 3c), indicating that MGO-induced formation of AGEs was directly proportional to an irreversible loss of primary amino groups in GST molecule ($r = 0.995$, $P < 0.005$).

Fig. 3 Correlations between amine content, tryptophan fluorescence, and formation of fluorescent AGEs in the samples containing GST and various concentrations of MGO (0–2 mM). MGO-induced decrease in tryptophan fluorescence intensity correlated with the loss of primary amino groups (a) ($r = 0.987$, $P < 0.013$). Correlation between the decrease in tryptophan fluorescence and formation of AGEs (b) ($r = 0.997$, $P < 0.003$). Plot of an increase in AGEs formation as a function of amine content (c) ($r = 0.995$, $P < 0.005$)

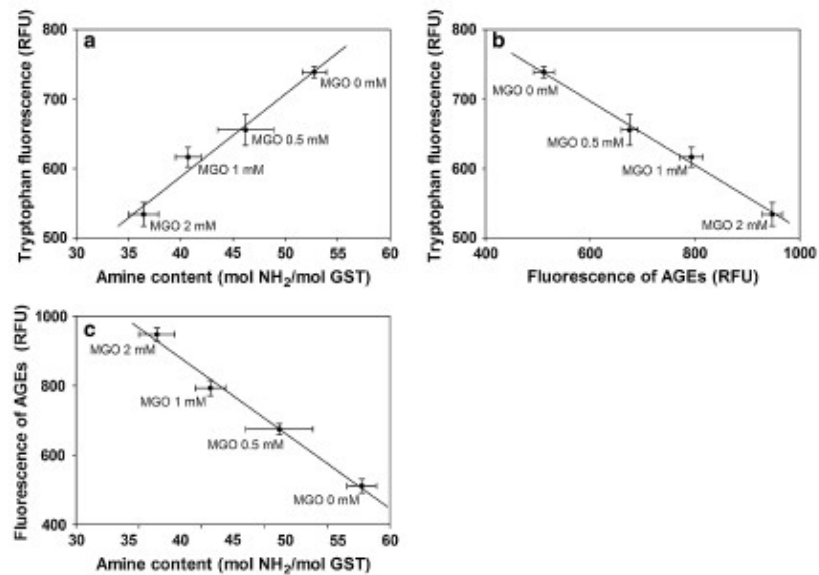


Table 2 Effect of glycation on molecular charge of GST

| Sample | Relative mobility (%) ^{a,b} | | | | |
|------------------|--------------------------------------|----------------|-------|-------|--------|
| | day 0 | day 1 | day 3 | day 7 | day 14 |
| GST | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| GST + MGO 0.5 mM | 99.8 | 106.1 | 113.9 | 116.2 | 117.4 |
| GST + MGO 1 mM | 99.5 | 109.1 | 115.5 | 118.9 | 121.7 |
| GST + MGO 2 mM | 99.3 | 111.6 | 116.8 | 121.9 | 122.6 |
| GST + Frc 50 mM | – ^c | – ^c | 100.0 | 101.2 | 105.4 |
| GST + Glc 50 mM | – ^c | – ^c | 99.9 | 100.4 | 101.4 |

^a Standard deviations (mean value of three independent experiments) were lower than 4.1%

^b Relative mobilities of all the samples were compared with the relative migration of the main protein band ($R_f = 0.517$)

^c Native PAGE was not performed

Effect of glycation on molecular charge of GST

Native PAGE was run several times, and the average values of protein relative mobility are presented in Table 2. Incubation of GST with MGO in all the tested concentrations caused significantly increased mobility of the sample toward the positive electrode. This phenomenon was noticeable since the day 1 of incubation, when migration of the sample containing GST + MGO 2.0 mM rose by

11.6% compared with GST alone. On the other hand, changes in the mobility of sample containing fructose 50 mM and glucose 50 mM were less pronounced (5.4 and 1.4%), and they were apparent since the days 7 and 14, respectively. Typical native PAGE gel is presented in Fig. 4.

Western blotting

Immunoblotting with specific antibody against advanced glycation end products and against AGEs derived from MGO (anti-MGO [3C]) was employed to confirm the formation of protein aggregates as a result of glycation agent's activity. The presence of high-molecular protein cross-links in samples containing GST + MGO and GST + fructose was observed using both the antibodies (Fig. 5a). These protein aggregates had molecular weight about 50 and 75 kDa corresponding to GST dimer and trimer, respectively. Also cleavage to shorter peptides (~14 kDa) occurred in immunoblots that were incubated with anti-MGO primary antibody. Membranes were then stained with Ponceau S and changes in the migration of the main GST band (26 kDa) toward higher molecular weight and loss of its intensity were observed in all the samples containing MGO (Fig. 5b). These results suggest that glycation by MGO was accompanied mainly by cross-linking, formation of high-molecular protein aggregates containing AGEs, and as well as protein fragmentation.

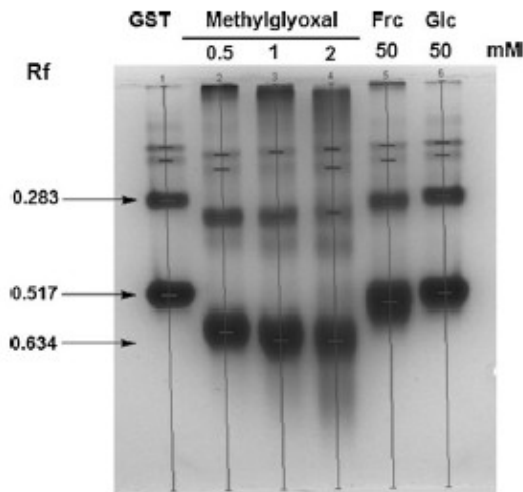


Fig. 4 Effect of glycation on molecular charge of GST. GST (0.5 mg/ml) was incubated with or without MGO (0–2 mM), fructose (Frc 50 mM), and glucose (Glc 50 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 7 days and then subjected to native PAGE. Proteins were visualized by Coomassie Blue G250

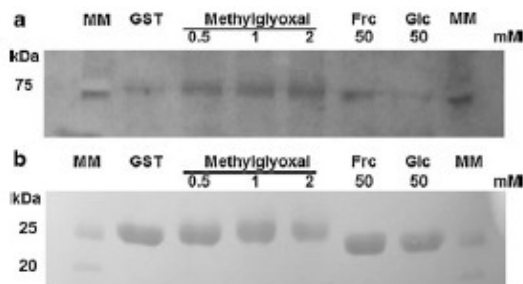


Fig. 5 Immunoblots of GST samples treated with MGO, fructose, and glucose. GST (0.5 mg/ml) was incubated with or without MGO (0–2 mM), fructose (Frc 50 mM), and glucose (Glc 50 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 11 days and then subjected to SDS-PAGE with subsequent western blotting. Blot was reacted with rabbit anti-AGE primary antibody. Molecular weight standard (first and last lane) and protein bands were marked by goat anti-rabbit IgG using a chemiluminescent detection with an alkaline phosphatase substrate (a). Membrane was further stained with Ponceau S (b)

Discussion

In this study, the effect of MGO, fructose, and glucose on structural and catalytic properties of recombinant cytosolic GST from *S. japonicum* was investigated. This enzyme shares striking sequence homology, the characteristics of the amino acid residues in the G-site, and a common GSH-

binding mode with mammalian mu-class GSTs [23, 24]. Glutathione metabolism and GST distribution in the tissues of diabetics may be crucial in the etiology, pathology, and prevention of diabetes [13]. Furthermore, the long-term hyperglycemia results in the decrease of GST enzymatic activity in tissues of diabetic animals [14–16, 25]. Administration of MGO to Swiss albino mice reduced GSH content and inhibited catalytic activity of several enzymes including GST, superoxide dismutase, glyoxalase I and II, and catalase [26]. All these findings indicate that ongoing diabetes may modify the detoxification metabolism. They also suggest that GST may be modified by non-enzymatic glycation in vivo, and hence, provide a rationale of this enzyme use for studying glycation reactions.

Reactive α -dicarbonyls (e.g., MGO) are important precursors in the formation of AGEs in vivo. These compounds are far more reactive than the parent sugars (e.g., glucose) concerning their abilities to form inter- and intra-molecular protein cross-links [11, 27]. MGO is mainly generated not only by the fragmentation of triosephosphates, but also by the catabolism of ketone bodies and threonine and the degradation of glucose-modified proteins in vivo. MGO has been identified as an intermediate in non-enzymatic glycation, and increased levels of MGO have been reported in patients suffering from diabetes mellitus [28].

MGO, glucose, and fructose chemically modified GST by a process with the generally accepted features of glycation as evidenced by a decrease in amine content. Lysine and arginine residues are target sites for reducing sugars as well as MGO modification via the Maillard reaction [29]. Typical arising products of MGO-mediated glycation of lysine and arginine residues are N_ϵ -(1-carboxyethyl)lysine, 1,3-di(N_ϵ -lysi no)-4-methyl-imidazolium, argpyrimidine, and three structural isomers of hydroimidazolone. Glucose causes generation of fluorescent AGE product pentosidine [9]. All of the aforementioned compounds were described and quantified in vivo [30]. The GST dimer contains 44 Lys and 20 Arg residues with four Lys–Lys and two Lys–Arg sequence pairs, which are possible targets for glycating agents. Approximately 10, 3, and 1 Lys residues per GST molecule were irreversibly modified during 7-day incubation with MGO 1.0 mM, fructose 50 mM, and glucose 50 mM, respectively (Table 1).

Furthermore, the incubation of GST with MGO led to the inhibition of its catalytic activity (Fig. 1). This effect of MGO was concentration dependent. The glycation-induced conformational changes in protein topography and modification of lysine residues, which may play a role in the enzyme catalysis (e.g., Lys 44 is involved in the formation of G-site), probably contributes to enzyme inhibition. Also the formation of intra-molecular cross-links induced by AGEs (Fig. 5a) may be accompanied by progressive

localized compaction of protein molecule that may result in its dysfunction (e.g., creation of surface to interior channels, impairment of conformational transition, and inhibition of domain movement during catalysis). Moreover, introducing AGEs, which are hydrophobic, would also promote a local condensation of substructures [9, 31].

MGO-induced chemical modifications led to a change in molecular charge of GST, which became more anionic as revealed by native PAGE. The effects of fructose and glucose on GST electrophoretic mobility were less pronounced (Fig. 4; Table 2). These results indicate the progressive loss of the positive charge in the glycation-modified GST molecule, which is caused by the irreversible modification of Arg and Lys residues [27, 32] as was confirmed by determination of amine content (Table 1). MGO proved to be potent and fast-acting glycation agent because it progressively modified molecular charge of GST within the first 3 days of incubation, while the effect of fructose and glucose became apparent since the day 14 of incubation.

The SDS-PAGE and subsequent western blotting clearly showed formation of protein cross-links with higher molecular weight (75 kDa) than native enzyme in the samples containing MGO or fructose (Fig. 5a, b). Also, the migration of the main protein band toward higher molecular weight was observed in all the samples containing MGO after 11 days of incubation (Fig. 5b). These results suggest that glycation by MGO and fructose was accompanied by cross-linking and formation of high-molecular protein aggregates containing AGEs. Such glycation-modified sites on proteins act as trapping agents that bind transition metals and proteins, which may provide a nucleation center for extracellular plaque or intracellular inclusion body formation [31]. Protein aggregation takes part in the development and progress of various diseases including cataract [33, 34] and Alzheimer's disease [35].

It can be concluded that the ability of the glycation agents to irreversibly modify GST increased in the order D-glucose < D-fructose < MGO, which is in agreement with published results of other studies concerning glycation reactions of various glycation agents [10, 33, 36]. MGO proved to be the most potent glycation agent among studied compounds. It caused concentration-dependent inhibition of GST catalytic activity, generation of AGEs, decrease in amine content and tryptophan fluorescence, cross-link formation, as well as changes in molecular charge of the studied enzyme.

Acknowledgment This study was supported by the Czech Science Foundation (grant number 524/09/P121) and by the Charles University in Prague (Project SVV 263 004).

Conflict of interest statement None declared.

References

1. Utrecht JP, Trager W (2007) Drug metabolism: chemical and enzymatic aspects. Informa Healthcare, New York
2. van Bladeren PJ (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 129:61–76
3. Dourado DF, Fernandes PA, Ramos MJ (2008) Mammalian cytosolic glutathione transferases. *Curr Protein Pept Sci* 9:325–337
4. Nebert DW, Vasiliou V (2004) Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics* 1:460–464
5. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360:1–16
6. Mannervik B, Danielson UH (1988) Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *Crit Rev Biochem* 23:283–337
7. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York
8. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP (1988) Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256:205–212
9. Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:1–22
10. Schalkwijk CG, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW (2004) Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev* 20:369–382
11. Matsumoto K, Sano H, Nagai R, Suzuki H, Kodama T, Yoshida M, Ueda S, Smedsrød B, Horiuchi S (2000) Endocytic uptake of advanced glycation end products by mouse liver sinusoidal endothelial cells is mediated by a scavenger receptor distinct from the macrophage scavenger receptor class A. *Biochem J* 352:233–240
12. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H (2001) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276:13348–13355
13. Raza H, Ahmed I, John A (2004) Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S-transferase in streptozocin induced diabetic rats: modulation by *Momordica charantia* (karela) extract. *Life Sci* 74:1503–1511
14. Lapshina EA, Sudnikovich EJ, Maksimchik JZ, Zahrodskaya SV, Zavadnik LB, Kubyshin VL, Nocun M, Kazmierczak P, Dobaczewski M, Watala C, Zavadnik IB (2006) Antioxidative enzyme and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment. *Life Sci* 79:1804–1811
15. Thomas H, Schladt L, Knehr M, Oesch F (1989) Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases, glutathione S-transferases and peroxisomal β -oxidation. *Biochem Pharmacol* 38:4291–4297
16. Saito-Yamanaka N, Yamanaka H, Nagasawa S (1993) Glutathione-related detoxication functions in streptozocin-induced diabetic rats. *J Vet Med Sci* 55:991–994
17. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
18. Steinbrecher UP (1987) Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem* 262:3603–3608
19. Ornstein L (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 121:321–349
20. Davies BJ (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 121:404–427

21. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
22. Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354
23. Lim K, Ho JX, Keeling K, Gilliland GL, Ji X, Rüker F, Carter DC (1994) Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci* 3:2233–2244
24. Ji X, Tordova M, O'Donnell R, Parsons JF, Hayden JB, Gilliland GL, Zimniak P (1997) Structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class pi glutathione S-transferase. *Biochemistry* 36:9690–9702
25. Petlevski R, Hadzija M, Slijepčević M, Juretić D, Petrik J (2003) Glutathione S-transferases and malondialdehyde in the liver of NOD mice on short-term treatment with plant mixture extract P-9801091. *Phytother Res* 17:311–314
26. Choudhary D, Chandra D, Kale RK (1997) Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicol Lett* 93:141–152
27. Kang JH (2006) Oxidative modification of human ceruloplasmin by methylglyoxal: an in vitro study. *J Biochem Mol Biol* 39:335–338
28. West IC (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17:171–180
29. Seidler NW, Kowalewski C (2003) Methylglyoxal-induced glycation affects protein topography. *Arch Biochem Biophys* 410:149–154
30. Thornalley PJ (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* 27:565–573
31. Seidler NW (2005) Carbonyl-induced enzyme inhibition: mechanism and new perspectives. *Curr Enzyme Inhib* 1:21–27
32. Nagai R, Matsumoto K, Ling X, Suzuki H, Araki T, Horiuchi S (2000) Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes* 49:1714–1723
33. Argirova M, Breipohl W (2002) Comparison between modifications of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid, and fructose. *J Biochem Mol Toxicol* 16:140–145
34. Harding JJ (2007) Protein glycation and cataract: a conformational disease. In: Uversky VN, Fink AL (eds) *Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases. Part B: molecular mechanisms of conformational diseases*, 1st edn. Springer Science, New York, pp 499–514
35. Apostolova LG, Cummings JL (2007) The pathogenesis of Alzheimer's disease: general overview. In: Uversky VN, Fink AL (eds) *Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases. Part B: molecular mechanisms of conformational diseases*, 1st edn. Springer Science, New York, pp 3–29
36. Beránek M, Dršata J, Palička V (2001) Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. *Mol Cell Biochem* 218:35–39