

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UK

V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**Optimalizace elektroforetických metod
pro studium glykace aspartátaminotransferasy
methylglyoxalem**

Rigorózní práce

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

Hradec Králové 2010

Mgr. Eliška Bacílková

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.

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a pomoc a také za velkou trpělivost při zpracování této rigorózní práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Eliška Bacílková

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Název práce: Optimalizace elektroforetických metod pro studium glykace aspartátaminotransferasy methylglyoxalem

Hlavní náplní této práce byla optimalizace podmínek několika elektroforetických metod pro sledování průběhu glykace aspartátaminotransferasy (AST) methylglyoxalem a vlivu vybraných antioxidantů na tento proces. Za použití denaturující elektroforézy (SDS-PAGE) a Western blottingu jsem sledovala vznik vysokomolekulárních agregátů proteinu a pomocí nativní PAGE změny v náboji molekuly AST během glykace. U obou typů elektroforézy jsem hledala vhodnou koncentraci separačního gelu a množství nanášené bílkoviny. Dále jsem porovnávala tři běžně používané barvicí metody (Silver Staining, Coomassie Blue R-250 a G-250). Zjistila jsem, že se stoupající koncentrací methylglyoxalu dochází k tvorbě vysokomolekulárních agregátů s molekulovou hmotností kolem 130 a 160 kDa, což odpovídá tri- a tetramerům AST. Při imunochemické detekci jsem detekovala glykační produkty především s molekulovou hmotností kolem 70 a 130 kDa, při vyšších koncentracích methylglyoxalu s molekulovou hmotností kolem 160 kDa. Glykace methylglyoxalem způsobila progresivní ztrátu kladných nábojů v molekule AST, což se projevilo zvýšenou migrací těchto vzorků při nativní PAGE. Nejcitlivější barvicí metodou byl Silver Staining. Barvení pomocí koloidního Coomassie Blue G-250 je citlivější a rychlejší než pomocí R-250. Ze studovaných antioxidantů měl největší protektivní účinek aminoguanidin. Kyselina hydroxycitronová bránila glykaci jen částečně, zatímco kyselina močová neměla žádný pozitivní účinek. Podařilo se optimalizovat elektroforetické metody, které se dále využijí pro studium látek s potenciálními antiglykačními vlastnostmi v *in vitro* modelu glykace bílkovin.

ABSTRACT

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

Candidate: Mgr. Eliška Bacílková
Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.
Title of thesis: Optimization of electrophoretic methods for study of glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal

Main scope of this thesis was the optimization of several electrophoretic methods for monitoring of the course of glycation of aspartate aminotransferase (AST) by methylglyoxal as well as of the effect of selected antioxidants at this process. I observed formation of high-molecular protein aggregates using denaturing electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting and changes in the molecular charge of AST during glycation using native PAGE. In both types of electrophoresis, I searched for suitable concentration of the separation gel and the amount of loaded protein. Further, I compared three routinely used staining methods (Silver Staining, Coomassie Blue R-250 and G-250). I found out that the high-molecular aggregates with molecular weight about 130 and 160 kDa, which corresponds to tri- and tetramers of AST, are formed with increasing concentration of methylglyoxal. Using immunochemical detection, I detected glycation products with molecular weight mainly about 70 and 130 kDa and with molecular weight about 160 kDa at higher concentrations of methylglyoxal. Glycation by methylglyoxal caused progressive loss of positive charges in the molecule of AST, which was manifested by increased migration of these samples during native PAGE. Silver Staining turned out to be the most sensitive staining method. Staining using colloidal Coomassie Blue G-250 was more sensitive and faster than by R-250. The greatest protective effect among studied antioxidants possessed aminoguanidine. Hydroxycitric acid only partially defended against glycation, while uric acid exerted no positive effect. The electrophoretic methods, which will be further used for study of compounds with potential antiglycation properties in the *in vitro* model of protein glycation, were successfully optimized.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	11
2.1 NEENZYMOVÁ GLYKACE	11
2.1.1 <i>Vznik a struktura AGEs (Maillardova reakce)</i>	12
2.1.2 <i>Faktory ovlivňující vznik AGEs</i>	15
2.1.3 <i>Účinky AGEs v organismu</i>	16
2.1.3.1 <i>Účinky AGE nezávislé na interakci s receptory</i>	16
2.1.3.2 <i>Účinky AGE zprostředkované interakcí s receptory</i>	17
2.1.4 <i>Metabolismus AGE</i>	18
2.1.5 <i>Methylglyoxal</i>	19
2.2 AGE INHIBITORY	21
2.2.1 <i>Aminoguanidin</i>	22
2.2.2 <i>Kyselina močová</i>	23
2.2.3 <i>Kyselina hydroxycitronová</i>	25
2.3 ASPATÁTAMINOTRANSFERASA	26
2.4 ELEKTROFORESA	28
2.4.1 <i>Základní principy</i>	28
2.4.2 <i>Účinnost elektroforetické separace</i>	28
2.4.2.1 <i>Pohyblivost vzorku</i>	29
2.4.3 <i>Elektroforetické separační metody</i>	29
2.4.3.1 <i>Elektroforesa ve volném roztoku</i>	30
2.4.3.2 <i>Elektroforesa v podpůrném nosiči</i>	30
2.4.4 <i>Gelová elektroforesa</i>	30
2.4.4.1 <i>Matrix</i>	31
2.4.4.2 <i>Vlastnosti gelů</i>	33
2.4.4.3 <i>Pufr</i>	35
2.4.4.4 <i>Pufrovací systémy</i>	35
2.4.4.5 <i>Látky modifikující vlastnosti gelu či vzorku</i>	37
2.4.4.6 <i>Vzorek</i>	38
2.4.5 <i>Elektrodové systémy</i>	38
2.4.5.1 <i>Nedisociativní systémy</i>	38
2.4.5.2 <i>Disociativní systémy</i>	38
2.4.6 <i>Standardy molekulové hmotnosti</i>	39
2.4.7 <i>Barvení</i>	39
2.4.7.1 <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	39

2.4.7.2	Silver staining	41
2.5	IMUNOBLOTTING	41
2.5.1	<i>Metody přenosu biomolekul z gelu na membránu</i>	43
2.5.2	<i>Typy membrán</i>	44
2.5.3	<i>Blokování</i>	46
2.5.3.1	Blokující činidla.....	46
2.5.4	<i>Detekce barvením</i>	46
2.5.4.1	Barvení gelu před přenosem na membránu	46
2.5.4.2	Vizualizace proteinů po transferu na membránu	46
2.5.5	<i>Imunodetekce</i>	47
2.5.5.1	Reakce s primárními protilátkami	47
2.5.5.2	Reakce se sekundárními protilátkami.....	47
2.5.5.3	Detekce sekundárních protilátek	48
3.	CÍLE PRÁCE	49
4.	MATERIÁL A METODIKA.....	50
4.1	POUŽITÝ MATERIÁL.....	50
4.2	POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ	51
4.3	METODIKA	52
4.3.1	<i>Příprava reagensí</i>	52
4.3.1.1	Příprava fosfátového pufru.....	52
4.3.1.2	Příprava enzymu	52
4.3.1.3	Příprava roztoků aminoguanidinu a kyseliny močové.....	52
4.3.1.4	Příprava roztoku kyseliny hydroxycitronové	52
4.3.1.5	Příprava roztoku methylglyoxalu	52
4.3.1.6	Roztoky pro SDS-PAGE.....	53
4.3.1.7	Roztoky pro nativní PAGE	55
4.3.1.8	Roztoky pro barvení gelů pomocí Coomassie Blue I	55
4.3.1.9	Roztoky pro barvení gelů pomocí Coomassie Blue II (alternativní způsob)	55
4.3.1.10	Roztoky pro barvení gelů Silver Staining	56
4.3.1.11	Příprava barvicího roztoku pro barvení Silver Staining	56
4.3.1.12	Roztoky pro imunoblotting	57
4.3.2	<i>Příprava inkubačních směsí</i>	58
4.3.2.1	Optimalizace separační metody SDS-PAGE pro vzorky obsahující AST.....	58
4.3.2.2	Optimalizace nativní PAGE pro vzorky obsahující AST	58
4.3.2.3	Sledování vlivu koncentrace MGO na vznik vysokomolekulárních agregátů AST pomocí SDS-PAGE.....	59
4.3.2.4	Sledování vlivu koncentrace MGO na vznik vysokomolekulárních agregátů AST pomocí SDS-PAGE s následným Western blottingem a rozlišení citlivosti dvou způsobů barvení SDS-PAGE gelů pomocí Coomassie Blue	59

4.3.2.5	Sledování vlivu koncentrace methylglyoxalu na náboj molekuly AST pomocí nativní PAGE.....	60
4.3.2.6	Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE a nativní PAGE.....	61
4.3.3	<i>Příprava gelů pro SDS-PAGE s 12,5% a 10% separačním gelem.....</i>	62
4.3.4	<i>Příprava gelů pro nativní PAGE.....</i>	63
4.3.5	<i>Provedení SDS-PAGE.....</i>	64
4.3.6	<i>Provedení nativní PAGE.....</i>	64
4.3.7	<i>Barvení proteinů na gelu pro SDS-PAGE a nativní PAGE.....</i>	65
4.3.7.1	Barvení metodou Silver Staining.....	65
4.3.7.2	Barvení metodou Coomassie Blue I.....	65
4.3.7.3	Barvení metodou Coomassie Blue II (alternativní způsob).....	66
4.3.7.4	Barvení pomocí koloidního roztoku Coomassie Blue G-250.....	66
4.3.8	<i>Příprava vzorků před nanesením na SDS-PAGE gel pro zjištění vhodné koncentrace AST.....</i>	67
4.3.9	<i>Příprava vzorků před nanesením na gel pro nativní elektroforesu pro zjištění vhodné koncentrace AST.....</i>	68
4.3.10	<i>Porovnání dvou metod barvení Coomassie Blue.....</i>	69
4.3.11	<i>Western blotting.....</i>	69
4.3.12	<i>Sledování vlivu koncentrace MGO na vznik cross-linků a agregátů AST pomocí SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí.....</i>	70
4.3.13	<i>Sledování vlivu koncentrace MGO na náboj AST pomocí nativní PAGE.....</i>	71
4.3.14	<i>Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE.....</i>	71
4.3.15	<i>Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí.....</i>	72
4.3.16	<i>Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí nativní PAGE.....</i>	73
5.	VÝSLEDKY.....	74
5.1	OPTIMALIZACE SDS-PAGE A NÁSLEDNÉ IMUNOCHEMICKÉ DETEKCE AGE PRODUKTŮ PRO SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU GLYKACE AST METHYLGLYOXALEM....	74
5.1.1	<i>Určení vhodné koncentrace separačního gelu a nanášeného množství bílkoviny.....</i>	74
5.1.1.1	SDS-PAGE s 12,5% separačním gelem.....	74
5.1.1.2	SDS-PAGE s 10% separačním gelem.....	78
5.1.2	<i>Vliv koncentrace methylglyoxalu na tvorbu vysokomolekulárních AGE produktů a cross-linků hodnocená pomocí SDS-PAGE.....</i>	83
5.1.2.1	Použití 0-50 mM methylglyoxalu, porovnání dvou metod barvení.....	83
5.1.2.2	Použití 0-10 mM methylglyoxalu, porovnání citlivosti barvení pomocí Coomassie Blue R-250 a G-250 (EZBlue).....	86

5.1.3	<i>Vliv koncentrace methylglyoxalu na tvorbu vysokomolekulárních AGE produktů a cross-linků hodnocená pomocí SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí</i>	89
5.2	OPTIMALIZACE NATIVNÍ PAGE PRO SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU GLYKACE AST METHYLGLYOXALEM	92
5.2.1	<i>Určení vhodného množství nanášené bílkoviny</i>	92
5.2.2	<i>Vliv koncentrace methylglyoxalu na náboj molekuly AST</i>	95
5.3	VLIV ANTIOXIDANTŮ NA GLYKACI AST METHYLGLYOXALEM	98
5.3.1	<i>Hodnocení pomocí SDS-PAGE</i>	98
5.3.2	<i>Hodnocení pomocí SDS-PAGE s následnou imunodetekcí</i>	101
5.3.3	<i>Hodnocení pomocí nativní elektroforesy</i>	104
6.	DISKUZE	107
7.	ZÁVĚR	112
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	113
9.	POUŽITÁ LITERATURA	115
10.	DOPLNĚK	126

1. ÚVOD

Má rigorózní práce byla vypracována na katedře biochemických věd FaF UK v Hradci Králové, kde se již po mnoho let zabývá skupina profesora Dršaty a doktorky Boušové problematikou neenzymové glykace proteinů a jejího ovlivnění látkami s antioxidačními účinky. V této práci navazuji na svou diplomovou práci, ve které jsem se zabývala vlivem vybraných látek s antioxidačním účinkem na glykaci aspartátaminotransferasy (AST) methylglyoxalem (MGO). Tato práce rozšiřuje spektrum metodik použitých v mé diplomové práci (měření katalytické aktivity enzymu a absorpčních UV-VIS spekter AST) k hodnocení průběhu neenzymové glykace a účinnosti sledovaných antioxidantů o nativní a denaturující elektroforesu a Western blotting.

Ke glykaci jsem použila již zavedený a osvědčený model glykace aspartátaminotransferasy methylglyoxalem. Methylglyoxal je velmi účinné glykační činidlo a zároveň se i fyziologicky vyskytuje v organismu. Glykace methylglyoxalem probíhá mnohem rychleji, než jinými fyziologicky se vyskytujícími sacharidy (D-glukosa, D-fruktosa). AST je enzym komerčně dobře dostupný ve vysoké čistotě a je díky svému vysokému obsahu lysinů, které jsou cílem glykace, vhodný jako model glykovaného proteinu.

Ve své práci jsem nejprve optimalizovala podmínky pro denaturující a nendenaturující elektroforesu a Western blotting. Dále jsem sledovala vznik cross-linků a agregátů AST v závislosti na koncentraci MGO pomocí denaturující elektroforesy a Western blottingu. Pomocí nativní elektroforesy jsem sledovala vliv glykace na náboj molekuly AST. Na závěr jsem se pokusila za použití výše uvedených metod zhodnotit vliv vybraných antioxidantů na vznik cross-linků a na ovlivnění molekulárního náboje AST.

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

V současné době je věnována zvýšená pozornost produktům pokročilé glykace (AGEs), které vznikají za fyziologických podmínek, a s věkem se jejich tvorba zvyšuje. Patologicky zvýšená tvorba těchto produktů ale spolupůsobí při vzniku a rozvoji chronických onemocnění, jakými je diabetes mellitus, aterosklerosa či chronické renální selhání (Janebová a kol. 1999, Kalousová a kol. 2005). Vznik AGEs je spojován s oxidačním a karbonylovým stresem, mikrozánětem, případně autoimunitní reakcí. Oxidační stres vzniká při poruše rovnováhy mezi vznikem reaktivních forem kyslíku a jejich zhášením pomocí antioxidantů ve prospěch volných radikálů. Karbonylový stres je charakterizován nadbytkem reaktivních karbonylových částic. Jejich zvýšené koncentrace v organismu mohou být způsobeny nadměrnou tvorbou působením oxidačního stresu nebo neoxidativní cestou z meziproductů glykolysy, snížením clearance nebo detoxifikace některými enzymy, např. glyoxalou. Oxidační i karbonylový stres způsobují poškození důležitých biologických struktur - proteinů, sacharidů, lipidů a nukleových kyselin. Mohou také zvyšovat zánětlivou odpověď organismu. Vznikají nové sloučeniny a modifikované struktury, které mohou sloužit jako markery těchto mechanismů. Mezi ně patří produkty pokročilé oxidace proteinů (advanced oxidation protein products - AOPP), produkty pokročilé glykace (advanced glycation end products - AGEs) a produkty pokročilé lipoperoxidace (advanced lipoperoxidation end products - ALEs). Strukturální změny a odhalení nových epitopů může spustit autoimunitní odpověď. Glykace nukleotidů může vést k mutacím (Kalousová a kol. 2005).

2.1 Neenzymová glykace

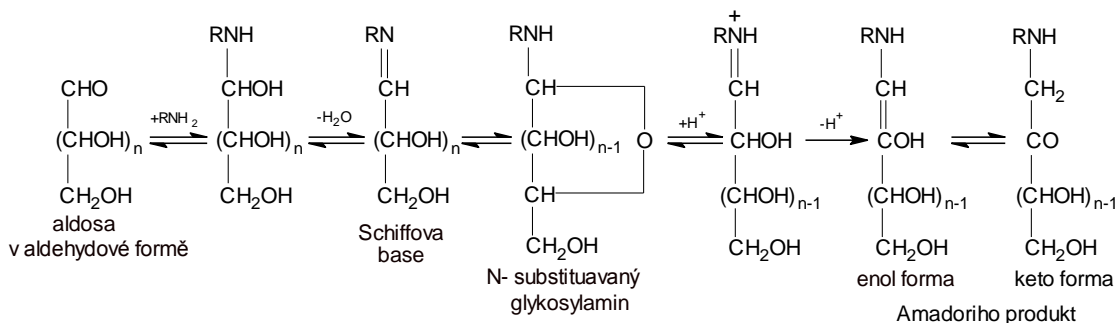
Reakce vedoucí ke vzniku AGEs byly popsány již v roce 1912 francouzským chemikem Louisem Camillem Maillardem, který pozoroval, že aminokyseliny zahříváné v přítomnosti redukujících cukrů vytvoří charakteristické žlutohnědé zabarvení (Obšil a Pavlíček 1997, Singh a kol. 2001). Při této reakci, nazvané po svém objeviteli Maillardova reakce, dochází k vazbě karbonylových sloučenin (včetně redukujících cukrů)

na volné aminoskupiny biomolekul bez katalytického působení enzymů (Janebová a kol. 1999).

2.1.1 Vznik a struktura AGEs (Maillardova reakce)

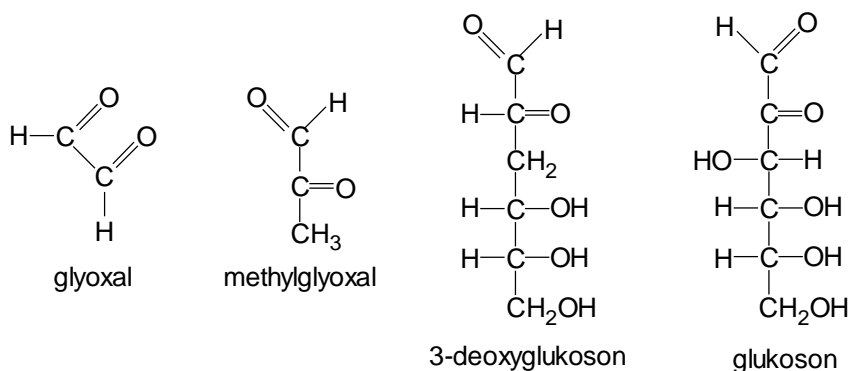
Neenzymová glykace má několik fází, které lze rozdělit do třech kroků. Při iniciaci dochází ke vzniku Amadoriho produktů, propagací vznikají AGE prekurzory a v terminaci se tvoří AGEs (Obšil a Pavlíček 1997).

Během iniciace dochází k nukleofilní adici aldehydické skupiny redukujícího cukru, např. glukosy, s aminoskupinami proteinů, fosfolipidů a nukleových kyselin (hlavně lysinovými a argininovými zbytky) (obr. 1). Vzniká nestabilní Schiffova base v aldiminové formě s otevřeným řetězcem, která se může stabilizovat rovnováhou se svou cyklickou formou - glykosylaminem (Obšil a Pavlíček 1997, Jakuš 2003, Singh a kol. 2001). Schiffovy base vznikají velmi rychle, rovnováha je dosažena už během jedné hodiny. V průběhu několika hodin až týdnů tyto sloučeniny přecházejí Amadoriho přesmykem na Amadoriho produkty, což jsou chemicky stabilnější ketoaminy s kovalentní vazbou (Jakuš 2003). Pokud do této reakce vstupuje ketosa, vznikající ketoamin se pak nazývá Heynsův produkt (Obšil a Pavlíček 1997). Tvorba Amadoriho produktů je do určité míry reverzibilní, i když rovnováha je posunuta ve směru jejich tvorby (Janebová a kol. 1999). Už v této fázi neenzymové glykace může být významně ovlivněna funkčnost strukturně pozměněných proteinů. Některé z nich mají význam v klinické praxi. Mezi nejčastěji stanovované Amadoriho produkty v klinické praxi patří lidský glykovaný hemoglobin HbA_{1c}, který odráží kontrolu glykemie za posledních 6-8 týdnů. Glykovaný albumin (fruktosamin) odráží kontrolu glykemie za poslední 2-3 týdny (Jakuš 2003).



Obr. 1. Kondensace cukru a aminu a následná tvorba Amadoriho produktů (dle Nursten 2005)

V další fázi dochází k propagaci reakce za vzniku AGE prekurzorů. Dehydratací či štěpením cukrů nebo degradací aminokyselin vznikají velmi reaktivní dikarboonylové sloučeniny (Singh a kol. 2001). Tyto reaktivní α -oxoaldehydy propagují Maillardovu reakci. Jako elektrofilů mohou znovu reagovat s volnou aminoskupinou za vzniku heterocyklických produktů a inter- a intramolekulárních můstků. Tím způsobují nevratné molekulární změny biomolekul (Jakuš 2003, Obšil a Pavlíček 1997). Mohou indukovat oxidační stres a buněčnou apoptosu. Tyto α -oxoaldehydy vznikají ve všech stádiích glykačního procesu (Maillardovy reakce) a v organismu vznikají nepřetržitě i jinými způsoby (např. katabolismem ketonických látek či lipidovou peroxidací). Jsou proto pokládány za ústřední sloučeniny při tvorbě AGEs (Singh a kol. 2001). Mezi nejdůležitější α -dikarboonylové sloučeniny (obr. 2) patří methylglyoxal (MGO), glyoxal (GO), glukoson, 3-deoxyglukoson (3-DG) (Jakuš 2003).

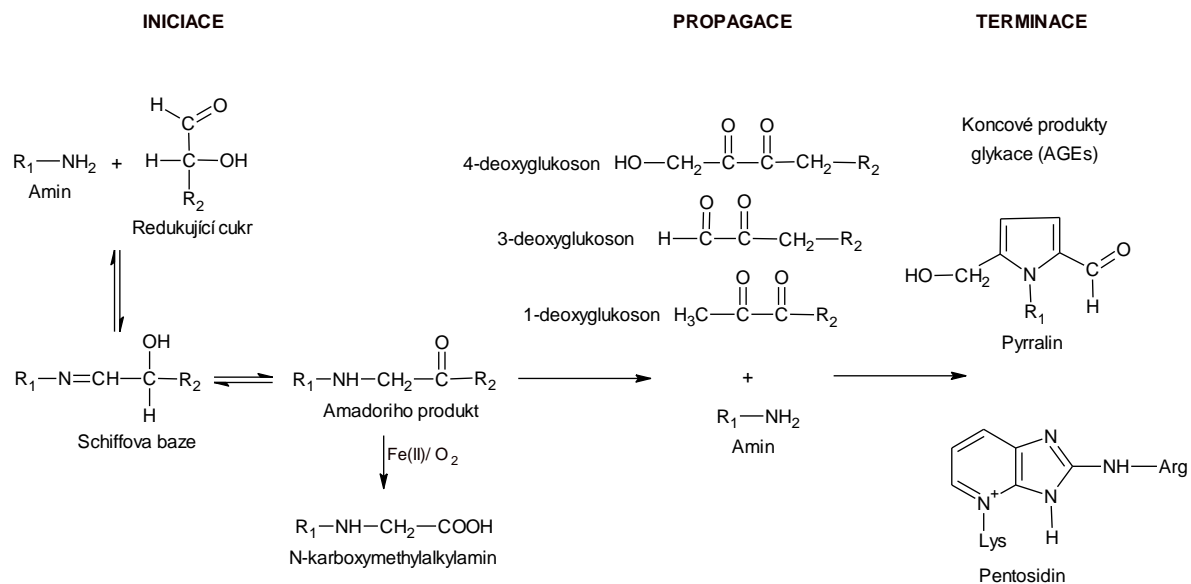


Obr. 2. AGE prekurzory odvozené od glykace (Jakuš 2003)

Akumulace reaktivních dikarboxylových prekurzorů a produktů glykoxidace a lipoxidace způsobuje tzv. karboxylový stres. Zvýšení koncentrace těchto prekurzorů může vést ke vzniku AGEs (Singh a kol. 2001). Tyto AGEs se tvoří z meziproduktů cyklickou kondensací, přesmykovými, dehydratačními a oxidačními reakcemi (Janebová a kol. 1999, Jakuš 2003). Vznikající produkty jsou chromofory, některé z nich i fluoreskují, jsou termodynamicky stabilní a jejich vznik je ireverzibilní. Tvorby intra- a intermolekulárních můstků (cross-linků) mezi aminokyselinami se účastní lysinové a argininové zbytky (Reddy a Beyaz 2006, Obšil a Pavlíček 1997). Protože jde o relativně pomalý proces probíhající i fyziologicky, nezávisle na koncentraci glukosy, jsou postiženy hlavně proteiny s relativně dlouhou životností (např. kolagen, krystaliny oční čočky, ale může postihnout i myelin, komplement C3, tubulin, fibrinogen, atd.). Při uremii, která je spojena s velmi vysokými koncentracemi akumulovaných AGEs, jsou zasaženy i sloučeniny s kratší životností, jako např. lipidy a nukleové kyseliny (Singh a kol. 2001, Janebová a kol. 1999, Jakuš 2003).

AGEs vznikají buď vazbou na jeden protein, nebo jsou schopny vázat 2 aminoskupiny a tvořit tak mezi nimi můstky, čímž dochází k síťování proteinů (Singh a kol. 2001). Produkty pozdní glykace mohou být rozděleny do tří skupin podle toho, zda jsou schopny tvořit cross-linky a zda fluoreskují. Mezi fluoreskující cross-linky (1) patří pentosidin, crossliny, vesperlysiny a fluorolink. Nefluoreskující cross-linky (2) jsou např. GOLD, MOLD, DOLD, GODIC, MODIC, AFGP a glukosepan. AGEs nevytvářející cross-linky (3) jsou pyrrolin, CML, CEL, imidazolony, fluoreskující hydroimidazolony a argpyrimidin (Negrean 2006). Tři fáze vzniku produktů pozdní glykace popisuje obr. 3.

Některé AGEs mohou vznikat i cestou kovy katalysované oxidace polynenasycených mastných kyselin a kyseliny arachidonové. Nazývají se pak produkty pozdní lipoxidace (ALEs). Často jsou ale zahrnovány také pod název AGEs. Jednou z takových látek je CML, který je tvořen glykoxidací i lipoxidací (Singh a kol. 2001).



Obr. 3. Schéma glykace (dle Obšil a Pavlíček 1997)

2.1.2 Faktory ovlivňující vznik AGEs

Produkty pokročilé glykace vznikají v lidském organismu spontánně. Jejich tvorba je zvýšena při hyperglykemii a oxidačním stresu (Janebová a kol. 1999). Zvýšené množství AGEs v organismu může být též způsobeno jeho zvýšeným příjmem z exogenních zdrojů jako například z cigaretového kouře a z potravy (Reddy a Beyaz 2006, Janebová a kol. 1999). AGEs vznikají v potravě při její tepelné úpravě, v závislosti na jejím složení, teplotě, způsobu a délce úpravy. Nejvyšší hladiny AGEs jsou v potravě bohaté na proteiny a lipidy, kde vznikají při uvolňování volných radikálů při tepelné úpravě. Glykoxidaci a lipoxidaci potravy podporuje teplo, nepřítomnost vlhkosti a přítomnost kovů. Potraviny, obsahující především sacharidy (škrob, ovoce, zelenina, mléko) mají nejnižší hladiny AGEs (Negrean 2006).

Rychlost vzniku AGEs je ovlivněna následujícími faktory:

- 1) struktura a vlastnosti glykované látky
 - Nižší hodnota pK_a aminokyseliny a tím vyšší nukleofilita urychluje tvorbu Schiffovy base
 - aminokyselinové zbytky v okolí glykované aminoskupiny

- 2) koncentrace glykačního činidla - hlavně v počátečních stádiích Maillardovy reakce
- 3) katalysátory – reakci urychlují přechodné kovy
- 4) inhibitory - redukující sloučeniny, například askorbát
- 5) induktory - reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS)
- 6) struktura a vlastnosti glykované látky
 - rychlost anomerizace cukru - schopnost existovat v lineární podobě, která je reaktivnější
 - fosforylace - fosforylované cukry jsou mnohem reaktivnější než jejich nefosforylované protějšky
 - počet atomů uhlíku, nejnižší je u hexos a nejvyšší u trios

Glukosa má tedy nejnižší glykační schopnost. Proto je v organismu hlavním zdrojem energie právě glukosa, nikoliv ostatní sacharidy. Je tím fyziologicky docíleno co nejpomalejšího vzniku AGEs (Singh a kol. 2001, Obšil a Pavlíček 1997, Bohlender a kol. 2004, Dunlop 2000).

2.1.3 Účinky AGEs v organismu

Tkáňová akumulace produktů pokročilé glykace má řadu toxických účinků. Mohou buď přímo poškodit strukturu, změnit fyzikální vlastnosti a metabolismus extracelulární matrix, nebo působí přes AGE specifický receptor na povrchu buněk s následnou indukcí oxidačního stresu (Janebová a kol. 1999).

2.1.3.1 Účinky AGE nezávislé na interakci s receptory

Produkty pokročilé glykace mohou působit negativně na organismus na několika úrovních. K degradaci proteinů (štěpením jejich kovalentních vazeb) nebo peroxidaci lipidů v membránách buněk může docházet prostřednictvím volných radikálů, které vznikají při tvorbě AGEs, např. při autooxidaci sacharidů. Vzniklé AGEs zároveň vedou k modifikaci a síťování tkáňových proteinů, lipidů a DNA, což má přímé, na receptoru nezávislé patologické následky (Jakuš 2003, Bohlender a kol. 2004). Glykací proteinů, která zapříčiňuje změnu jejich struktury, může dojít k poruše odbourávání (změna poločasu proteinů) nebo narušení funkcí (pokles enzymové aktivity, snížení schopnosti vázat ligandy, pozmeněná imunogenita). Důsledkem je pak narušení funkčnosti tkání (Jakuš 2003, Negrean 2006). Zasaženy mohou být jak extracelulární tkáňové (kolagen)

a plasmatické proteiny (albumin) a lipoproteiny (HDL, LDL, apo-lipoprotein B), tak intracelulární proteiny (*basic fibroblast growth factor*, cytokiny) a DNA (Bohlender a kol. 2004).

Tyto změny se ve zvýšené míře projevují s rostoucím věkem a jsou ještě urychleny při diabetu mellitu. Následkem může být sklerosa renálních glomerulů, ztenčování kapilární basální membrány nebo rozvoj aterosklerózy (Singh a kol. 2001). Pozměněním buněčných proteinů se buňka může stát necitlivou k exogenním stimulům a začít patologicky růst (Bohlender a kol. 2004).

2.1.3.2 Účinky AGE zprostředkované interakcí s receptory

V roce 1992 byl poprvé objeven na buněčném povrchu receptor, který váže AGEs s vysokou afinitou. Nazván byl RAGE, neboli receptor pro AGEs. Byly identifikovány i další povrchové molekuly a receptory pro AGEs: makrofágový scavenger receptor (MSR) typu A a B₁, oligosacharyltransferasa-48 (AGE-R1), 80K-H fosfoprotein (AGE-R2) a galektin-3 (AGE-R3) (Bohlender a kol. 2005). Nejlépe charakterizovaným receptorem je RAGE. Je fyziologicky exprimován velkým množstvím různých typů buněk, vyskytuje se na buňkách hladkého svalu cév, periferních mononukleárech, makrofázích, endoteliálních buňkách, také v nervových tkáních, v plicích a kosterním svalstvu. Expres RAGE a některých dalších receptorů je zvýšená v případě diabetu mellitu a zánětu (Bohlender a kol. 2005). V současnosti jsou známy tyto hlavní ligandy AGE receptorů: AGEs, amfoterin, amyloid β -peptid, který je považován za důležitý v patogenezi Alzheimerovy choroby, a kalgranuliny, které jsou součástí zánětlivého procesu, revmatoidních onemocnění a roztroušené sklerózy (Singh a kol. 2001, Kalousová a kol. 2005).

Vazbou AGEs (především CML a pentosidinu) na RAGE je indukován oxidační stres (aktivace hemoxidasy) a může dojít i k aktivaci p21ras/MAP kinasy. Oba procesy vedou k zvýšení aktivity transkripčního faktoru NF- κ B. Aktivace této signální cesty způsobí sekreci cytokinů a mediátorů zánětu či inhibici produkce buněčného NO. Dochází k indukci vaskulární dysfunkce, vasokonstrikci a koagulaci. Důsledkem může být chronická cévní aktivace a vznik zánětu (Janebová a kol. 1999, Singh a kol. 2001, Bohlender a kol. 2004).

Tab. 1. Patologické působení AGEs v organismu (Janebová a kol. 1999)

Přímé	<ul style="list-style-type: none"> - zesílení proteinů extracelulární matrix - modifikace proteinů a změna jejich vlastností - blokování vasodilatačního účinku oxidu dusnatého - indukce lipoperoxidace
Prostřednictvím RAGE	<ul style="list-style-type: none"> - aktivace nukleárního faktoru NF-κB - stimulace tvorby cytokinů IL-1, TNF-α, interferon-γ - stimulace tvorby růstových faktorů – IGF-1, PDGF, GM-CSF - stimulace exprese adhezivních molekul VCAM-1, ICAM-1 - stimulace buněčné proliferace - zvýšení vaskulární permeability - indukce migrace makrofágů - stimulace tvorby endothelinu 1 - down-regulace thrombomodulinu - zvýšení syntézy kolagenu IV, fibronektinu a proteoglykanů - zvýšená syntéza a exprese tkáňového faktoru - mutace DNA

Dysfunkci buněk cévní stěny způsobenou produkty pozdní glykace u diabetu vysvětluje tzv. model dvou zásahů. Prvním zásahem je interakce AGE-RAGE a druhým buněčná odpověď na tyto podněty (ischemický stres, zánětlivé a imunitní podněty, ukládání oxidovaných lipoproteinů, atd.), která ještě prohlubuje cévní dysfunkci a tkáňová poškození (Schmidt a kol. 2001). K cévním komplikacím přispívá přítomnost AGEs (prostřednictvím RAGE) také inhibicí tvorby prostacyklinu a indukci PAI-1, což predisponuje postiženého pacienta k trombogenezi (Negrean 2006). Buňky tkání bohaté na AGEs mají větší množství receptorů RAGE. Dochází totiž k upregulaci tohoto receptoru prostřednictvím NF- κ B, který se váže na promotor vlastních buněk (Singh a kol. 2001).

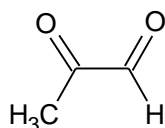
2.1.4 Metabolismus AGE

Organismus je schopen degradovat glykací modifikované tkáně a buňky. AGE cross-linky jsou eliminovány extracelulární proteolysou a scavenger buňkami (např. tkáňovými makrofágy). Makrofágy endocytosou pohlcují AGEs a intracelulárně je degradují na nízkomolekulární rozpustné peptidy, které pak uvolňují do krevního oběhu. Tyto peptidy mohou opět reagovat s proteiny, a pokud nejsou rychle odstraněny ledvinami,

vzniká tzv. druhá generace AGEs. Poškození renálních funkcí tedy vede k akumulaci AGEs (Vlassara a Palace 2003). Při vychytávání komplexů AGE-protein z plasmy (endocytosou) hrají důležitou roli také jaterní sinusové buňky (Kupferovy a endoteliální). Poškození tohoto mechanismu může vést k hromadění AGEs i při správné funkci ledvin. Insulin má pravděpodobně pozitivní roli při tomto mechanismu, protože stimuluje expresi receptorů scavenger makrofágů, čímž zvyšuje degradaci AGEs (Negrean 2006).

2.1.5 Methylglyoxal

Methylglyoxal (pyruvaldehyd, 2-oxopropanal, obr. 4) je velmi reaktivní α -oxoaldehyd, který fyziologicky vzniká ve všech buňkách a tkáních. Jeho hlavním zdrojem při normální glykemii je enzymatický či neenzymatický rozklad triosafosfátů. (Kalapos 1999, Thornalley 1996). Může ale vznikat také metabolismem produktů vzniklých lipolysou, katabolismem threoninu, autooxidací monosacharidů, Maillardovou reakcí nebo peroxidací lipidů (Wu 2005, Thornalley 1996, Thornalley a kol. 1999, Seidler a Kowalewski 2003).



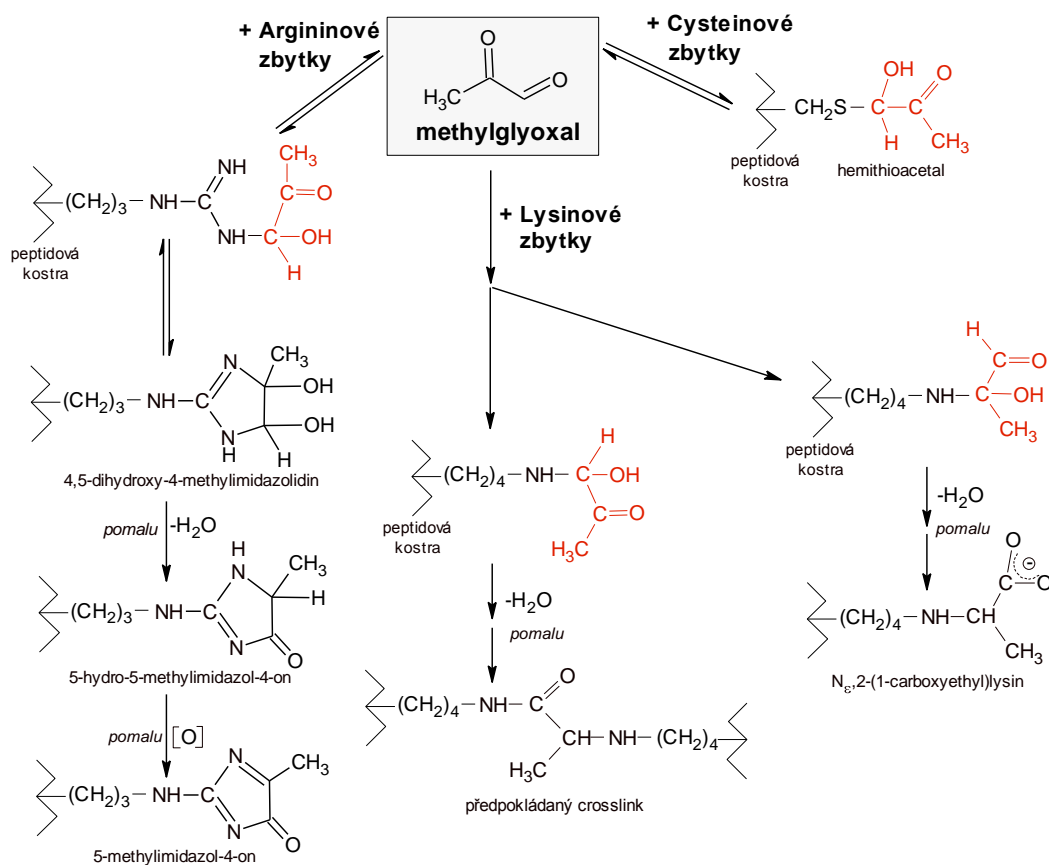
Obr. 4. Methylglyoxal (MGO)

Množství vytvořeného methylglyoxalu je při normoglykemii asi 120 μ M za den (Thornalley 1996). Při zvýšeném množství triosafosfátů (např. zvýšením hladiny glukosy a fruktosy vlivem hyperglykemie nebo zvýšením hladiny ethanolu či threoninu) se zvýší množství vznikajícího MGO, který je jedním z nejdůležitějších prekurzorů AGEs (Bourajjaj a kol. 2003, Wu 2005, Thornalley 1996). U pacientů s diabetem mellitem (DM) 1. typu jsou sérové koncentrace MGO zvýšeny 5-6 krát, u pacientů s DM 2. typu 2-3 krát (Wu 2005). K akumulaci MGO vede i uremie, stárnutí, zánět či oxidační stres (Ramasamy a kol. 2006).

Organismus je vybaven specifickými enzymovými procesy k metabolisaci methylglyoxalu (Ratliff a kol. 1996). V cytosolu je MGO vychytáván a detoxikován glyoxalovým systémem, který se skládá ze dvou enzymů - glyoxalasy I a glyoxalasy II.

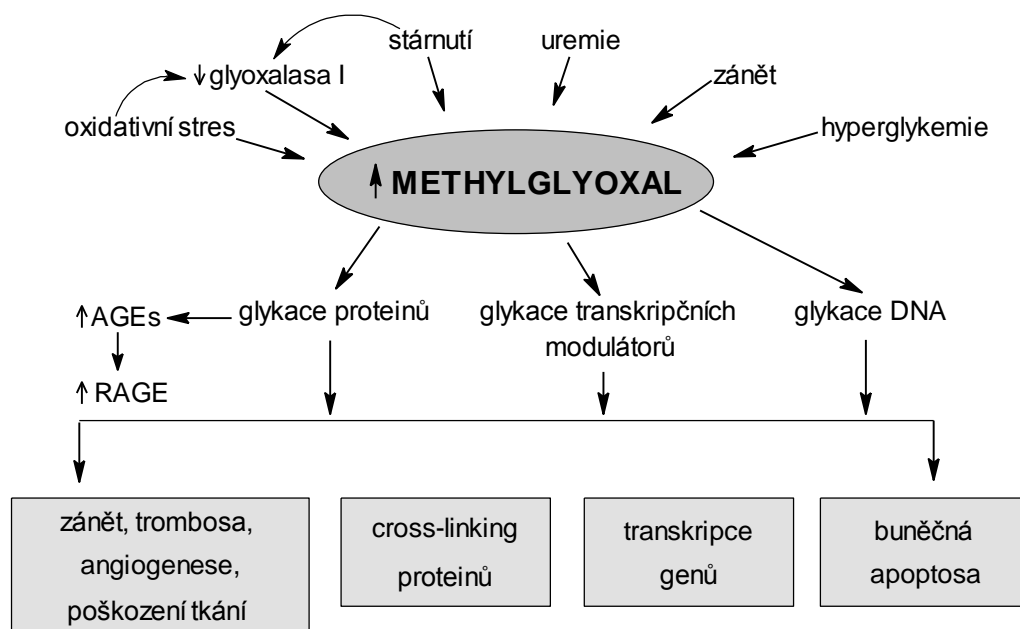
Enzymy katalysují přeměnu MGO na D-laktát s meziproductem D-S-laktoylglutathionem (Ratliff a kol. 1996, Wu 2005). Tento enzymový systém vznikl pravděpodobně k ochraně buněk před toxickým vlivem MGO. Aktivita glyoxalasy I je závislá na množství cytosolického redukovaného glutathionu, pokud je tedy jeho množství díky oxidačnímu stresu sníženo, dochází k akumulaci MGO (Abordo a kol. 1999). MGO může být odbouráván také pomocí α -oxoaldehyddehydrogenasy [EC 1.2.1.23]. Existují ale i jiné glykolytické enzymy, které hrají roli jak ve tvorbě tak degradaci methylglyoxalu (Kalapos 1999). Za normálních okolností je tedy MGO inaktivován. Při onemocněních jako je diabetes jsou ale hladiny MGO zvýšeny kvůli narušení sacharidového a lipidového metabolismu natolik, že dochází k patologickým poškozením (Seidler a Kowalewski 2003).

Methylglyoxal může reagovat s cysteinovými, lysinovými a argininovými zbytky proteinů a peptidů (obr. 5) za vzniku stabilních AGEs (Abordo a kol. 1999).



Obr. 5. Reakce MGO s proteiny (Thornalley 1996)

Methylglyoxalem indukovaná poškození (obr. 6) vznikají reakcí s extracelulárními i intracelulárními proteiny či DNA, modifikací mitochondriální membrány, antioxidantních enzymů nebo vazbou na AGE receptory. Dochází tak k modifikaci buněčných struktur, což může vést k zahájení zánětlivého procesu, ke vzniku molekul vyvolávajících tkáňová poškození nebo ovlivňujících genovou transkripci. Dochází i k inaktivaci důležitých buněčných proteinů, což může vést k apoptose, nekrose či zastavení buněčného růstu (Seidler a Kowalewski 2003, Bourajjaj a kol. 2003, Ramasamy a kol. 2006, Shangari a kol. 2003).



Obr. 6. Faktory vedoucí ke vzniku methylglyoxalu a vliv MGO na proteiny a nukleové kyseliny (Ramasamy a kol. 2006)

2.2 AGE inhibitory

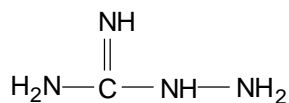
Přestože bylo identifikováno již mnoho AGE inhibitorů, jejich mechanismus účinku ještě není plně objasněn (Culbertson a kol. 2003). Patologické působení produktů pozdní glykace je možné ovlivnit na třech základních úrovních. **Tvorba AGEs je inhibována** nejčastěji prostřednictvím nukleofilních center v molekulách inhibitorů, které vychytávají reaktivní dikarboxylové sloučeniny (Janebová a kol. 1999, Culbertson a kol. 2003). Jako inhibitory glykace mohou účinkovat i chelátory přechodných kovů nebo antioxidanty

vychytávající radikály (Culbertson a kol. 2003). Snížení hladin AGEs lze dosáhnout i **stimulací jejich degradace**. Takové látky štěpí cross-linky AGEs a tím usnadní jejich eliminaci ledvinami a játry. Účinky AGEs způsobené jejich vazbou na RAGE receptory je možné **blokovat obsazením AGE receptorů** nebo kompeticí těchto receptorů se solubilními RAGE (Forbes a kol. 2005, Janebová a kol. 1999).

V současné době jsou v centru zájmu především látky s antioxidačním účinkem. Látka, které má fungovat jako antioxidant, musí splňovat tři základní požadavky. Musí mít schopnost reagovat s biologicky důležitými oxidanty a radikály, reakcí modifikovaný antioxidant musí být méně nebezpečný než původní látka a musí být přítomen v dostatečném množství alespoň v některých kompartmentech, aby zajistil kvantitativní průběh reakce (Becker 1993).

2.2.1 Aminoguanidin

Aminoguanidin (AMG, obr. 7) je nukleofilní hydrazin, který je schopen blokovat tvorbu AGEs (Yu a Zuo 1997). Tato látka má antioxidační účinky a je schopna inhibovat pokročilou glykaci (Chen a kol. 2003). Inhibuje také peroxidaci lipidů (*in vivo*) a potlačuje rozvoj atherosklerotických plaků (Yu a Zuo 1997). Experimentální léčba pomocí aminoguanidinu působí preventivně proti diabetickým komplikacím nebo zlepšuje jejich průběh. Ve studiích došlo ke zlepšení nefropatie, neuropatie, retinopatie a katarakty (Chen a kol. 2003, Ou a Wolff 1993, Sell a kol. 2001).



Obr. 7. Aminoguanidin (synonyma: Pimagedin, Guanylhydrazin)

Pro vysvětlení mechanismu účinku aminoguanidinu byla navržena řada modelů. Aminoguanidin jako nukleofil reaguje s 1,2-dikarbonylovými skupinami vysoce reaktivních α -oxoaldehydů za vzniku relativně netoxických 1,2,4-triazinů (Reddy a Beyaz 2006, Sell a kol. 2001). Má ale i jiné účinky zmírňující oxidační stres. Může např. potlačovat vznik NO, který inhibuje některé enzymy pomáhající vyrovnat se s oxidačním stresem. Aktivitu těchto enzymů ovlivňuje AMG také snížením jejich glykace (Akpınar

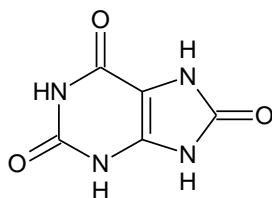
a kol. 2007, Stoppa a kol. 2006). Kombinací těchto i dalších účinků (vychytávání peroxynitritu, chelatace iontů přechodných kovů, atd.) dochází k potlačení glykace a tvorby AGEs (Reddy a Beyaz 2006).

Kromě pozitivních účinků aminoguanidinu na glykaci byly ve studiích (*in vitro*) zjištěny i některé jeho negativní vlivy na organismus, a to především jeho prooxidační aktivita (může způsobovat oxidační stres či fragmentaci proteinů) (Ou a Wolff 1993).

Aminoguanidin byl pod firemním názvem Pimagedine (firma Alteon) v roce 1993 podroben klinickým studiím u diabetických pacientů (Friedman 2002). Zpočátku vypadal jako málo toxická látka, jako lék ale nebyl nakonec uveden na trh kvůli nežádoucím vedlejším účinkům při III. fázi klinických studií (Taguchi a kol. 1999, Okada a Ayabe 1995). Některé z vedlejších efektů mohou být spojeny s vychytáváním pyridoxalu vedoucím k deficitu vitamínu B₆ (Reddy a Beyaz 2006).

2.2.2 Kyselina močová

Kyselina močová (KM, obr. 8) byla tradičně považována jen za odpadní produkt purinového metabolismu u člověka. KM a urát jsou oba málo rozpustné a směr zájmu byl proto původně zaměřen na negativní účinky vznikající z jejich nadprodukce a retence. Těmi je především tvorba urátových krystalů (dna, nefrolithiasa) (Becker 1993). Ukázalo se ale, že může hrát důležitou roli fyziologického antioxidantu proti oxidačnímu stresu.



Obr. 8. Kyselina močová

U člověka je kyselina močová koncovým produktem katabolismu purinových basi adeninu a guaninu (Glantzounis a kol. 2005). Enzym zodpovědný za vznik kyseliny močové je xantinoxidoreduktasa (XOR), která převádí hypoxantin na xantin a dále na kyselinu močovou. Enzym ve formě xantindehydrogenasy (XDH) fyziologicky využívá NAD⁺ jako elektronový akceptor (Becker 1993). Určitá část KM a urátu je v ledvinách

filtrována a sekretována do moči. Většina (asi 90%) je ale zpětně reabsorbována a vrací se zpět do krve (Becker 1993).

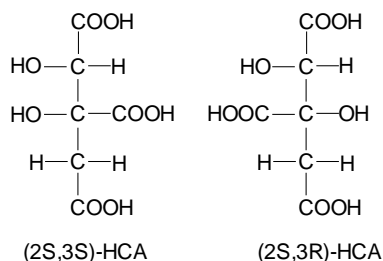
Hladiny KM a urátu v plasmě jsou značně individuální (50-900 μM , obvyklé hladiny 200-400 μM) a průměrně jsou o něco vyšší u mužů než u žen (370 x 260 μM). Jejich hladina je tedy dost vysoká oproti jiným potenciálním neenzymovým antioxidantům (askorbát, tokoferol, methionin, glutathion a další) (Naidoo a Lux 1998). Hladina KM v plasmě je významně ovlivněna příjmem potravy bohaté na purinové látky (Becker 1993), ale i nadměrným požíváním alkoholu, zvýšeným obratem buněk a buněčnou smrtí vlivem neoplastických onemocnění či cytotoxických látek. Vliv má i postižení ledvinných funkcí se snížením clearance KM (Strazzullo a Puig 2007). Kyselina močová také vzniká po reperfuzi ischemických oblastí. Za těchto podmínek je enzym XOR především ve formě xantinoxidasy (XO), která místo NAD^+ využívá jako akceptor elektronů molekulární kyslík, což následně vede ke vzniku volných radikálů (superoxid anion radikál) (Glantzounis a kol. 2005).

Mechanismem účinku KM je vychytávání reaktivních molekul, např. hydroxylových a peroxylových radikálů, singletového kyslíku či kyseliny chlorné za vzniku neškodných produktů (Becker 1993, Glantzounis a kol. 2005). KM je schopná oxidace a funguje jako donor elektronů. Za podmínek neutrálního pH (kdy je KM ve formě urátu) dochází jedoelektronovým přenosem ke vzniku radikálu urátového aniontu. Ten je ale potenciálním oxidantem, jeho negativnímu působení je možné předejít současně přítomným askorbátem, což může být důvod, proč KM není nikdy jen jediným přítomným antioxidantem v místě svého působení (Glantzounis a kol. 2005, Becker 1993). Přítomnost kyseliny chlorné (HClO), která *in vivo* vzniká působením aktivovaných monocytů a polymorfonukleárních neutrofilů (PMNs), může způsobit oxidaci urátu dvouelektronovým přenosem. Touto reakcí vzniká allantoin a z něj oxidací další produkty (kyselina allantoová a glyoxylová, močovina a kyselina oxalová) (Becker 1993). Kyselina močová může inhibovat oxidační reakce i chelataci iontů přechodných kovů (Fe^{3+}) za vzniku stabilních komplexů. V této reakci není sama oxidována (Davies a kol. 1986).

V *in vitro* systému byly ale zjištěny i prooxidační a prozánětlivé vlastnosti kyseliny močové. Tyto účinky jsou pravděpodobně způsobeny ROS, které vznikají katabolismem purinů za přítomnosti XO formy enzymu (Glantzounis a kol. 2005).

2.2.3 Kyselina hydroxycitronová

Kyselina hydroxycitronová (1,2-dihydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová, HCA, obr. 9) je hlavní kyselinou v kůře plodu tropické rostliny *Garcinia cambogia*. HCA je též součástí kalichů rostliny *Hibiscus subdariffa* a *H. rosa-sinensis* (Hida a kol. 2005, Soni a kol. 2004).



Obr. 9. Enantiomery HCA přítomné v *G. cambogia* a *H. subdariffa* (Hida a kol. 2005)

HCA má dvě chirální centra v molekule a tvoří čtyři stereoisomery. Každý z nich může tvořit γ -laktonový kruh. *G. cambogia* a *H. subdariffa* produkují (2S,3S) respektive (2S,3R) formu hydroxycitronové kyseliny (Hida a kol. 2005). Zbylé dvě formy [(2R,3R) a (2R,3S)] nebyly z přírodního materiálu izolovány (Yamada a kol. 2007). Z rostliny může být HCA izolována buď jako volná kyselina, ve formě soli nebo laktonu (Soni a kol. 2004).

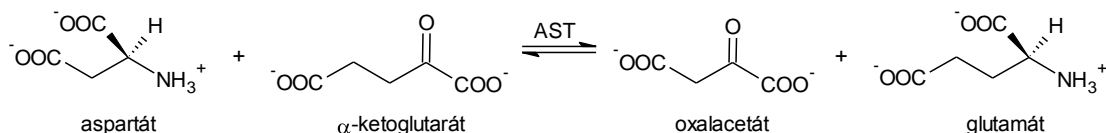
(2S,3S) forma kyseliny hydroxycitronové (typ *Garcinia*) kompetitivně inhibuje ATP-citrátlyasu (EC 4.1.3.8). Tento enzym hraje důležitou roli při vzniku acetyl-CoA, který je nezbytným stavebním kamenem pro tuk, cholesterol a triglyceridy. Inhibicí tohoto enzymu dojde k poklesu množství acetyl-CoA a tím i k potlačení syntézy mastných kyselin de novo a lipogenezi. Na zvířecích studiích bylo prokázáno, že (2S,3S) forma způsobuje snížený příjem potravy a následně ztrátu váhy (Downs a kol. 2005, Hida a kol. 2005).

HCA ve své (2S,3R) formě (typ *Hibiscus*) inhibuje pankreatickou α -amylasu a α -glukosidasu tenkého střeva. V modelovém systému došlo ke snížení trávení sacharidů a tím k potlačení vzestupu krevních hladin cukru a insulínu (Hida a kol. 2005, Yamada a kol. 2007).

Kvůli svým pozitivním účinkům na hladiny cukru v krvi i na hubnutí je HCA považována za bezpečný potravní doplněk, který je možno použít jako doplňkovou léčbu diabetu mellitu (Hida a kol. 2005).

2.3 Aspatátaminotransferasa

Aspartátaminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1), též nazývána glutamát-oxalacetát transaminasa je enzym, který katalysuje plně reverzibilní transaminační reakci L-aspartátu s α -ketoglutarátem za vzniku oxalacetátu a L-glutamátu (Frey a Hegeman 2007, Champe a kol. 2008) Její molekula se skládá ze dvou stejných vzájemně nekovalentně vázaných podjednotek. Součástí je jedna molekula koenzymu pyridoxal-5'-fosfátu vázaná ke každé podjednotce enzymu (www.brenda-enzymes.info). Přenos α -aminoskupiny z aspartátu na α -uhlík 2-oxoglutarátu za vzniku glutamátu a oxalacetátu probíhá klasickou ping-pongovou reakcí (obr. 10).



Obr. 10. Reakce katalyovaná AST (Frey a Hegeman 2007)

Všechny aminotransferasy vyžadují koenzym pyridoxal-5'-fosfát. Ten je svou aldehydickou skupinou kovalentně vázán k ϵ -aminoskupině lysinového zbytku aktivního místa enzymu za vzniku Schiffovy base, tzv. vnitřního aldiminu (Champe a kol. 2008, Jansonius 1998, Schneider 2000). Tento kofaktor může reagovat s aminoskupinami substrátu za vzniku iminů a má schopnost odnímat elektrony ze substrátu (John 1995). Enzym je při transaminačních reakcích přítomen ve dvou formách, pyridoxalové (pyridoxal-5'-fosfát) a pyridoxaminové (pyridoxamin-5'-fosfát) (Schlegel a kol. 1977).

Transaminační reakce začíná nukleofilním atakem aminoskupiny substrátu (aspartátu) na vnitřní aldimin lysinu AST a kofaktoru. Aminoskupina enzymu je uvolněna náhradou za aminoskupinu aspartátu. Vzniká opět Schiffova base, tentokrát tzv. vnější aldimin. Mezikrokem této záměny je vznik diaminu, kdy je ke koenzymu vázána jak aminoskupina lysinu, tak i substrátu (John 1995). Následuje odštěpení oxokyseliny příslušné aminokyseliny. Aminoskupina zůstává navázána na koenzymu a reaguje pak s 2-oxoglutarovou kyselinou za vzniku glutamátu (Schneider a kol. 2000).

AST se vyskytuje ve dvou formách, cytosolické a mitochondriální. Obě formy jsou syntetizovány v cytosolu, ale mitochondriální AST je méně polární než cytosolická forma

a může tedy procházet selektivně propustnou mitochondriální membránou. Oba dva isoenzymy se liší chemickými a fyzikálními vlastnostmi. U člověka jsou kódovány geny na různých chromozomech a jejich primární struktura je homologní pouze ve 47% (Bakra a kol. 1980).

AST propojuje metabolismus sacharidů a proteinů. Oba isoenzymy jsou součástí malát-aspartátového kyvadla, které je důležité pro přenos redukujících ekvivalentů z cytosolické NADH na NAD^+ vnitřní mitochondriální membrány. Zde jsou použity k syntese energie ve formě ATP (Dršata a kol. 2002, Vessal a Taher 1995).

Glykace postihuje cytosolickou AST za vzniku různých variant tohoto enzymu (Okada a kol. 1994). Cílem glykace tohoto enzymu jsou především lysinové zbytky. Vznikají AGEs, např. CEL a lysinové cross-linky podjednotek enzymu (Seidler a Kowalewski 2003). Glykaci methylglyoxalem mohou podléhat i argininové zbytky za vzniku heterocyklických struktur (např. pyrimidinů). Modifikace tohoto enzymu mění její flexibilitu a snižuje její aktivitu v závislosti na koncentraci a síle glykačního činidla (Seidler a Kowalewski 2003, Seidler a Seibel 2000, Boušová a kol. 2005b).

AST je vhodným modelem glykace *in vitro*, protože má 15-20 lysinových zbytků (dle zvířecího druhu), které se mohou účastnit glykace (Boušová a kol. 2005b).

2.4 Elektroforesa

Elektroforesa je separační metoda založená na odlišné pohyblivosti analysovaného vzorku v elektrickém poli (Manz a kol. 2004). Je to relativně jednoduchá, rychlá a vysoce citlivá metoda, kterou lze studovat vlastnosti proteinů, nukleových kyselin, aminokyselin či uhlovodíků (Hames 1998, Manz a kol. 2004).

Elektroforetické metody jsou používány pro kvalitativní charakteristiku látky či směsi látek, kontrolu čistoty, kvantifikaci či pro preparativní účely (Westermeier 2005).

2.4.1 Základní principy

Při aplikaci elektrického pole na nabitě molekuly dochází k urychlení pohybu částic k opačně nabitým elektrodám, anionty se pohybují směrem k pozitivně nabitě elektrodě (anodě) a kationty k negativně nabitě elektrodě (katodě). Elektroforesa je tak vlastně nedokončená elektrolysa (Sinvasankar 2005, Manz a kol. 2004). Rozdílná velikost molekuly a jejího náboje vede k odlišné pohyblivosti a tak dochází k oddělení jednotlivých složek vzorku. Základní charakteristikou molekul a částic je zde elektroforetická pohyblivost (Westermeier 2005).

Elektroforetické dělení se provádí ve volném roztoku nebo v roztoku obsahujícím ještě nevodivou matrix (např. agarosový či polyakrylamidový gel). Ve vodném roztoku jsou částice oddělovány podle odlišných poměrů náboj/velikost. Separace částic v gelu je navíc ovlivněna síťovacími vlastnostmi gelu (Manz a kol. 2004).

2.4.2 Účinnost elektroforetické separace

Účinnost elektroforetické separace je dána elektroforetickou pohyblivostí molekul vzorku. Mezi faktory, které mohou dělení ovlivnit, patří elektroosmosa roztoku a tzv. Jouleovo teplo (Manz a kol. 2004). Díky existenci nepohyblivých nabitých molekul v nosiči či na povrchu aparatury vzniká jako kompenzace osmotický proud opačně nabitých molekul, který podle svého náboje proudí buď ve stejném či opačném směru než elektroforetický tok a může vést k rozostření proužků (Westermeier 2005). Jouleovo teplo vzniká při zavedení napětí do systému, kdy začne vodivým elektrolytem procházet elektrický proud a dochází k zahřívání stěn a povrchu kapilár či gelu. Může způsobovat rozmytí elektroforetických proužků a ztrátu separačního rozlišení (Manz a kol. 2004).

2.4.2.1 Pohyblivost vzorku

Elektromotorická síla F_1 působící pohyb částice v elektrickém poli je přímoúměrná celkovému náboji částice Q (C) a intenzitě elektrického pole E (Vm^{-1}).

$$F_1 = Q \cdot E$$

Proti ní působí opačná síla vnitřního tření, frikční síla F_2 , která je přímoúměrná frikčnímu koeficientu f a rychlosti pohybu částice v (ms^{-1})

$$F_2 = f \cdot v$$

Podle Stokesova zákona pro kulovité částice s poloměrem r pohybující se v tekutém prostředí o viskozitě η je frikční koeficient dán vztahem:

$$f = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$$

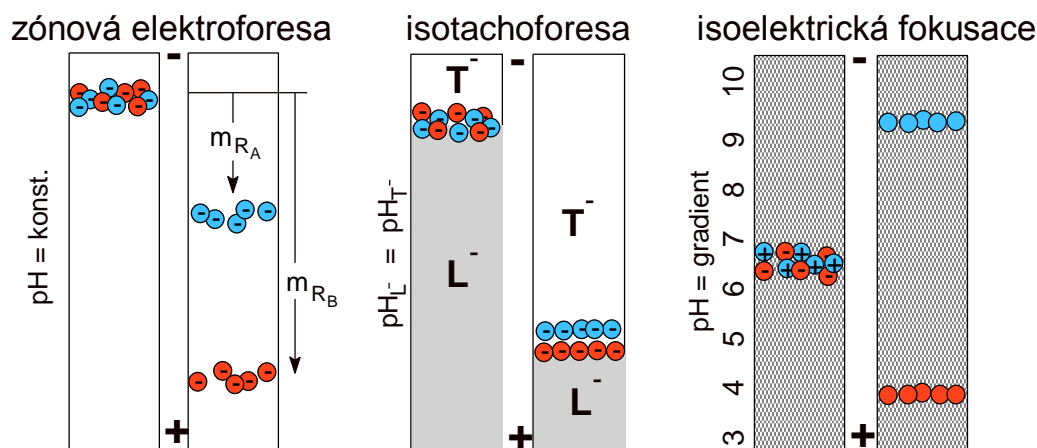
V rovnovážném stavu se $F_1 = F_2$, tedy

$$Q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

Pohyblivost molekuly tedy závisí na viskozitě prostředí, velikosti a tvaru molekuly (Stokesův zákon) a jejím náboji (Sinvasankar 2005).

2.4.3 Elektroforetické separační metody

Existují tři základní elektroforetické separační metody: elektroforesa, isotachoforesa a isoelektrická fokusace (obr. 11). Elektroforesa (též nazývaná zónová elektroforesa) využívá homogenní pufovací systém. Při isotachoforesi je separace prováděna v diskontinuálním pufovacím systému, kde se ionizované molekuly vzorku pohybují mezi vedoucím elektrolytem s větší pohyblivostí a zakončujícím elektrolytem s nižší pohyblivostí. Isoelektrická fokusace je prováděna v gradientovém pufovacím prostředí a to pouze u amfoterních molekul (peptidy, proteiny). Separované molekuly putují směrem k anodě či katodě, dokud nedosáhnou svého isoelektrického bodu (Westermeier 2005).



Obr. 11. Tři základní elektroforetické metody (Westermeier 2005)

2.4.3.1 Elektroforeza ve volném roztoku

Ve volném roztoku se elektroforeza provádí v několika modifikacích. Elektroforeza tzv. pohyblivého rozhraní probíhá v trubici tvaru U s pufrem uvnitř. U elektroforezy volného toku roztok puftru trvale proudí mezi dvěma skleněnými deskami. Kapilární elektroforeza se provádí v 20-30 cm dlouhé skleněné kapiláře, na jejichž koncích jsou elektrody. Vzorek se pohybuje dle svého náboje k anodě či katodě a na koncích pak může být detekován (Westermeier 2005).

2.4.3.2 Elektroforeza v podpůrném nosiči

Elektroforeza v podpůrném nosiči se provádí častěji. Pro tento typ elektroforezy jsou používány pevné nosiče, např. papír či gel. Pro sledování průběhu a zakončení elektroforezy jsou nanášena barviva s vysokou elektroforetickou pohyblivostí (Westermeier 2005).

2.4.4 Gelová elektroforeza

I přes určité pokroky se základní principy gelové elektroforezy od doby svého zavedení nezměnily. Proteiny jsou naneseny na elektricky nevodivý hydrogelový nosič a jsou separovány kombinací účinků elektrického pole, iontů puftru a gelu samotného, který funguje jako síto. Po dokončení elektroforezy jsou oddělené proteiny obarveny a poté analysovány kvalitativně či kvantitativně (Garfin 2005). Separovány mohou být pouze

částice s nábojem, neutrální částice se nepohybují. Existuje mnoho modifikací gelové elektroforezy. Při nativní elektroforese se částice pohybují dle svého náboje a velikosti. Při elektroforese za denaturujících podmínek v prostředí s dodecylsíránem sodným (SDS-PAGE) je všem molekulám udílen stejný náboj a ty se pak dělí jen na základě velikosti. Separace může být prováděna buď vertikálně či horizontálně (Manz a kol. 2004).

Hlavními součástmi elektroforetického systému bývá obvykle zdroj elektrické energie, elektroforetická nádoba a chladicí zařízení. Pro elektroforezu je většinou potřeba zařízení dodávající napětí do výše 500 V a proud do výše 200 mA (Sambrook a Russel 2001). Elektrody jsou ponořeny do zásobníků s pufrům na obou stranách gelu. Pro dělení většiny biomolekul se volí takové pH, aby celkový náboj biomolekuly byl záporný, takže elektroda, ke které přidáváme vzorek, bývá katodou a na opačné straně gelu bývá anoda (Manz a kol. 2004).

Elektroforetický prostor obsahuje gelovou matrix ponořenou do elektrolytového pufru. Gel, napuštěný roztokem pufru je mezi dvěma destičkami skla sevřen v pozici, kde horní konec je ponořený v roztoku pufru horního elektrodového prostoru. Dolní konec je ponořen v dolním elektrodovém prostoru, který také obsahuje roztok pufru (Manz a kol. 2004).

2.4.4.1 Matrix

Gelová matrix je trojrozměrná síť vláken, které tvoří póry o různé velikosti (Sinvasankar 2005). Póry gelu mají funkci molekulárního síta, které zpomaluje pohybující se molekuly podle jejich velikosti. Gel působí také jako nevodivé podpůrné médium, které minimalizuje difuzi vzorku a tím snižuje rozmývání proužků (Manz a kol. 2004). Kromě toho slouží jako pevný nosič, na kterém mohou být vzorky fixovány a detekovány (<http://nationaldiagnostics.com>).

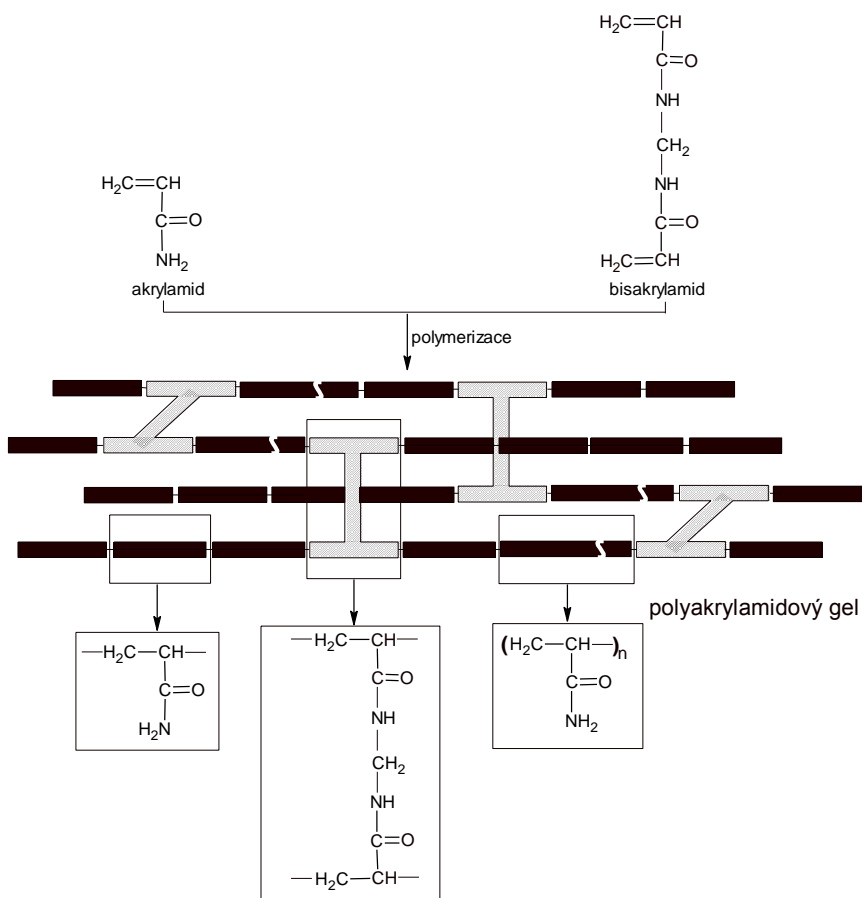
AGAROSOVÉ GELY

Jsou připravovány z hydrolysovaného bramborového škrobu. Velikost pórů může být ovlivněna koncentrací škrobu. Vzniklé póry jsou velké a hodí se jen pro analýsu velkých molekul (např. nukleových kyselin). Díky obtížné reprodukovatelnosti jsou většinou nahrazeny polyakrylamidovými gely (Westermeier 2005).

POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY

Polyakrylamidová gelová elektroforesa (PAGE) byla zavedena jako disková gelová elektroforesa, ve které se vzorky separují do diskových oblastí v trubičkách gelu. Dnes jsou trubičky nahrazeny tenkými destičkami, protože tenké gely tvoří méně tepla a identifikace proteinů jako proužků barvením je jednodušší (Sinvasankar 2005).

Polyakrylamidové gely jsou během elektroforesy chemicky inertní a stabilní v širokém rozpětí hodnot pH, teplot i iontové síly. Gely jsou průhledné, takže je možné použít řadu barvicích technik k vizualizaci separovaných proužků. Povrch gelu nemá v podstatě žádný náboj, takže elektroendoosmosa je velmi nízká. Gely se musí ale opatrně připravovat, protože monomery akrylamid a bisakrylamid mají neurotoxické a kancerogenní vlastnosti (Manz a kol. 2004).



Obr. 12. Chemická struktura akrylamidu, bisakrylamidu a vznik sítě polyakrylamidového gelu (Hames 1998)

Polyakrylamidové gely vznikají polymerizací akrylamidu v roztoku pufru v přítomnosti malého množství bifunkčních síťovadel, obvykle bisakrylamidu (N,N'-metylenbisakrylamid) (Manz a kol. 2004). Polymerizace akrylamidu (obr. 12) a metylenbisakrylamidu je spuštěna tzv. iniciátory, které umožní buď chemické či fotochemické uvolňování volných radikálů.

Nejběžnější systém katalytické iniciace probíhá chemickou tvorbou volných kyslíkových radikálů pomocí persíranu amonného v přítomnosti terciárního alifatického aminu N,N,N',N'-tetramethyldiaminu (TEMED). **Persíran amonný (APS)** vytváří v roztoku persíranové radikály, které aktivují akrylamidový monomer. Akrylamidové radikály propagují reakci a reagují s neaktivovanými monomery a prodlužují řetězec. Pokud reagují s bisakrylamidem, dochází k větvení řetězce a vzniká tak trojrozměrná síť. TEMED slouží jako katalysátor k urychlení polymerace (Hames 1998).

Míra polymerace může být ovlivněna koncentrací monomeru nebo typem a koncentrací iniciátoru. Vliv má i čistota chemikálií. Znečištění kovy zpomaluje polymeraci. TEMED obsahující oxidační produkty ztrácí svou katalytickou aktivitu. Roztoky persíranu amonného jsou velmi nestabilní ve vodě (rozkládají se), musí být proto připravovány čerstvé. Optimální pH závisí na tom, jaký iniciátor byl použit. Pro APS je nejvhodnější pH v rozmezí 7-10, protože v kyselém pH rychle ztrácí účinnost. Zvýšení teploty urychluje polymeraci, snížení ji zpomaluje. Optimální teplota je okolo 23-25°C. Kvůli reprodukovatelnosti výsledků by měly gely polymerovat vždy při stejné teplotě. Protože jsou zásobní roztoky uchovávány většinou při teplotě 4°C, je nutné je před použitím včas vyjmout z lednice. Roztoky by také měly být odplyněny, protože přítomnost kyslíku inhibuje polymeraci akrylamidu (kyslík vychytává radikály) (Hames 1998).

2.4.4.2 Vlastnosti gelů

POROZITA GELU

Porozita gelu je dána především množstvím celkového akrylamidu použitého na jednotku objemu a stupněm zesíťení (Hames 1998). Velikost pórů polyakrylamidových gelů je charakterizována hodnotou %T a %C (Garfin 2005).

%T (total) je hmotnostní procento celkového počtu monomerů (akrylamid + bisakrylamid) v g/100 ml, tedy celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu.

$$T\% = \frac{\text{akrylamid (g)} + \text{bisakrylamid (g)}}{100 \text{ ml}} \cdot 100$$

%C (cross-linking) je poměr bisakrylamidu jako procento celkového počtu monomerů (poměr bisakrylamidu k celkovému počtu monomerů)

$$C\% = \frac{\text{bisakrylamid (g)}}{\text{akrylamid (g)} + \text{bisakrylamid (g)}} \cdot 100$$

Je též možné připravit gely s různou velikostí pórů. Gradient může být lineární či exponenciální (Garfin 2005, Manz a kol. 2004).

Změnu velikosti pórů lze dosáhnout změnou %T a %C hodnot. Se vzrůstající hodnotou %T se velikost pórů snižuje téměř lineárně. Se zvyšujícím se množstvím bisakrylamidu se velikost pórů snižuje. Minimum dosahuje u hodnoty 5 %C. Další zvyšování množství bisakrylamidu nad tuto hodnotu ale vede ke zvětšování velikosti pórů kvůli nehomogennímu seskupení vláken (Hames 1998, Garfin 2005).

Velikost pórů je také ovlivněna rychlostí polymerizace. Zvýšením rychlosti (např. zvýšením teploty) vznikají menší póry, pomalejší polymerace (ochlazením) zase dává vzniknout větším pórům (Hames 1998).

HOMOGENITA GELU

Na homogenitu gelu má vliv míra promísení iniciátorů polymerace. Malé promísení vede k nehomogenitě a příliš velké způsobí vmíchání kyslíku, který inhibuje polymeraci. Proto je nutné též zabránit styku polymerujícího gelu s kyslíkem. Vliv má i tloušťka gelu. Kritická je hodnota 3 mm, nad kterou dochází k nehomogenitám díky gravitaci (Hames 1998).

ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOSTI

Výběr koncentrace akrylamidu je důležitý pro správné rozdělení vzorku. Gely s koncentrací akrylamidu menší než 3% jsou téměř tekuté a těžko se s nimi manipuluje. Naopak gely s vyšší koncentrací akrylamidu než 35% jsou extrémně křehké. Některé další látky mohou změnit rozlišovací schopnosti gelu. Močovina způsobuje zmenšení pórů, glycerol inhibuje polymeraci a mění viskozitu gelu. Některé polymery, jako je polyethylenglykol, dextran či methylcelulosa způsobují zvětšení pórů. Detergenty,

nejčastěji SDS, mění elektroforetické chování proteinů, ale též inhibují polymeraci (Hames 1998).

2.4.4.3 Pufr

Proteiny jsou amfoterní molekuly, které se pohybují vlivem elektrického pole. Okolní médium ovlivňuje elektroforetickou pohyblivost proteinu i jeho isoelektrický bod pI_s (Garfin 2005). Pufr musí být vybrán tak, aby molekuly analysovaného vzorku byly nabitě, stabilní a rozpustné (Manz a kol. 2004). Pufr udržuje téměř konstantní pH prostředí absorpcí protonů uvolněných jinými zdroji v roztoku nebo uvolňováním protonů, pokud jsou v roztoku spotřebovávány. Pufrovací systém u elektroforezy stabilizuje pH gelu a zabraňuje tím poškození molekul vzorků. Ionty pufru též nesou proud, procházející elektroforetickým gelem. U nativní elektroforezy proteinů pufr ještě zajišťuje ionizaci vzorku, i nepatrné změny pH tak mohou ovlivnit relativní pohyblivost vzorku. Roztoky pufru s nízkou iontovou silou mají nízkou tepelnou vodivost (menší zahřívání), která umožní přinést vyšší napětí, ale může vést k agregaci proteinů. Roztoky s vysokou vodivostí brání vzniku interakcí, ale vkládané napětí musí být nízké, aby nedocházelo k přehřátí. Některé ionty pufru mohou navíc reagovat se zkoumanými molekulami (např. borát tvoří komplexy s cukry) (Garfin 2005, Sinvasankar 2005).

2.4.4.4 Pufrovací systémy

V praxi se využívá buď kontinuální či diskontinuální pufrovací systém.

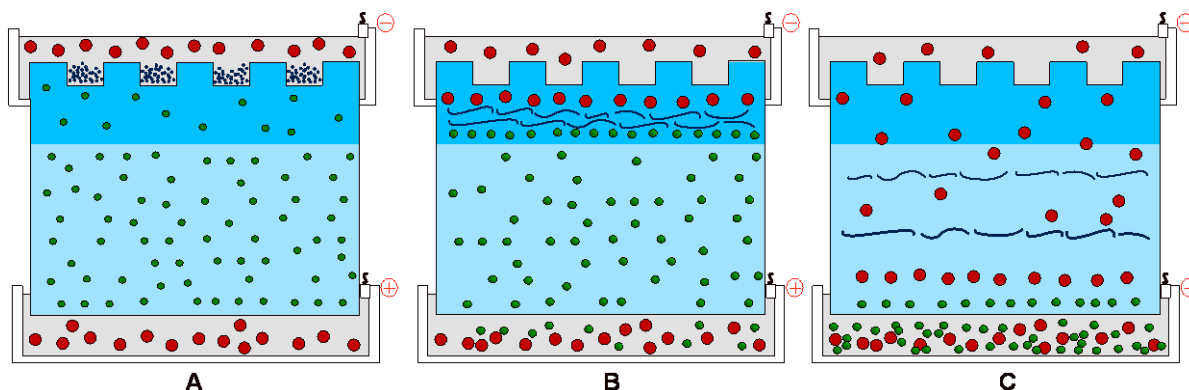
KONTINUÁLNÍ PUFROVACÍ SYSTÉM

Tento systém má stejné složení iontů v elektrodových prostorech (zde je vyšší koncentrace) a separační oblasti (s nižší koncentrací pufru). Nejčastěji používaný je TRIS-borátový pufr (Sinvasankar 2005).

DISKONTINUÁLNÍ PUFROVACÍ SYSTÉM

V diskontinuálním systému se liší pH a iontová síla pufru v elektrodovém prostoru od pufru v gelu. Nejčastěji využívaný diskontinuální systém byl zaveden Ornsteinem (1964) a Davisem (1964). Vzorek a zaostřovací gel obsahují TRIS-HCl (TRIS = tris(hydroxymethyl)aminomethan) o pH 6,8, horní a dolní elektrodový prostor obsahuje pufr TRIS-glycin o pH 8,3 a separační gel obsahuje TRIS-HCl o pH 8,8. U denaturující

elektroforezy (Laemmli 1970) všechny součásti obsahují ještě 0,1 % SDS (Sambrook a Russel 2001). Tento systém umožňuje vysoké rozlišení zaostřením proteinových proužků i při separaci vzorků s nízkou koncentrací (Garfin 2005).



Obr. 13. Průběh elektroforezy. Zelené body - Cl⁻, červené body - glycin, modré shluky a linie - proteiny. Tmavší část gelu - zaostřovací oblast, světlejší část gelu - separační oblast
 A) U spořádání iontů a molekul na počátku elektroforezy, B) Zaostření proteinů v zaostřovací oblasti, C) Rozdělení proteinů v separační oblasti
 (<http://nationaldiagnostics.com>)

Nejprve dochází k zaostření vzorku v zaostřovací části gelu (obr. 13, tmavě modrá část gelu). Se začátkem elektroforezy (obr. 13 A) se začínají pohybovat jak Cl⁻ (zelené body) tak glycinové ionty (červené body) zaostřovacím gelem. Díky své pK_a je většina glycinových molekul v prostředí zaostřovacího gelu ve formě obojetných iontů a jejich pohyblivost je velmi nízká (<http://nationaldiagnostics.com>). Chloridové ionty z gelu (vedoucí ionty) se pohybují vpředu rychleji a glycinové ionty elektrodového pufru (zakoňčující ionty) se pohybují pomaleji (Garfin 2005, Sinvasankar 2005). Mezi vedoucí a koncovou hranicí je zóna nízké vodivosti. Vytvoří se prudký gradient napětí, tzv. Kohlrauchova nespojitost, která táhne glycinové ionty vpřed. Chloridové a glycinové ionty tak vytvářejí po sobě jdoucí řady pohybující se stejnou rychlostí. Mezi sebou stlačují do velmi tenké a zřetelné vrstvy molekuly vzorku (obr. 13 B) (<http://nationaldiagnostics.com>). Schopnost diskontinuálního pufrového systému koncentrovat všechny komplexy ve vzorku do velmi malého objemu velmi zvyšuje rozlišovací schopnost SDS-PAGE gelů (Sambrook and Russel 2001).

Když pohyblivá oblast dosáhne rozhraní mezi zaostřovacím a separačním gelem (obr. 13, světle modrá část gelu), náhle se změní pH a velikost pórů. Vyšší pH separačního gelu umožní ionizaci glycinu, jehož pohyblivost přiměřeně vzroste. Pohyblivost molekul vzorku je naopak snížena dělicí schopností matrix s menšími póry. Glycinové ionty se tak přesunou před nahromaděné polypeptidy a putují separačním gelem ihned za chloridovými ionty (obr. 13 C). Komplexy SDS-polypeptid, které se tak uvolní z pohybující se řady, se pohybují v separačním gelu v oblasti rovnoměrného napětí a pH a jsou tak separovány dle své hmotnosti prosíváním (Sambrook and Russel 2001).

Obvykle se ke vzorku přidává barvivo, které se pohybuje s čelem pufru a pomáhá vizualizovat jeho pohyb (Garfin 2005).

2.4.4.5 Látky modifikující vlastnosti gelu či vzorku

Do většiny roztoků procházejících gelem se přidávají další látky, které slouží k modifikaci vlastností vzorku či gelu (Hames 1998).

LÁTKY ZVYŠUJÍCÍ ROZPUSTNOST BIOPOLYMERŮ

Ke zvýšení rozpustnosti molekuly vzorku se mohou přidávat surfaktanty. Nejčastěji se používají neionické detergenty (např. Tween-20), které mají slabší denaturační účinky a chrání enzymovou aktivitu či citlivé imunologické vlastnosti vzorku, které by kationické či anionické detergenty zničily (Manz a kol. 2004).

DENATURAČNÍ LÁTKY

Denaturační činidla se používají v případě, že není nutné zachovat nativní formu proteinu. Mohou se přidávat do pufru, gelu či do obojího. Zajistí rozvinutí biopolymeru, takže molekuly se stejnou sekvencí a délkou mají také stejnou velikost a pohybují se jako jeden proužek. K tomuto účelu se dá použít močovina nebo detergenty. Používají se kationické a anionické surfaktanty v koncentraci okolo 10% (Manz a kol. 2004). Nejčastěji používaným detergentem je anionický surfaktant SDS – laurylsíran sodný. Molekuly proteinu jsou kompletně pokryté negativním nábojem SDS aniontů, což způsobí jejich rozvinutí. Počet vázaných molekul detergentu je přímoúměrný molekulové hmotnosti a nezávisí na sekvenci, a tak i proteiny s velmi odlišnou strukturou se dělí na základě své velikosti (Sambrook and Russel 2001).

REDUKČNÍ ČINIDLA

Před zahájením elektroforesy je obvykle potřeba štěpit intra- či inter- molekulární disulfidické můstky přítomné ve vzorku. Pro tento účel se do vzorkového pufru přidává 2-merkaptoethanol nebo dithiotreitol. Nepřidávají se ale do nalévacího roztoku, protože jejich přítomnost zabraňuje gelaci (Hames 1998).

2.4.4.6 Vzorek

Důležitým kritériem pro výběr vhodné elektroforetické metody je typ vzorku. Pro účinné rozdělení nesmí vzorek obsahovat pevné částice či suspendované tukové částice. Dle velikosti zkoušených molekul se vybírá velikost pórů. U amfoterních molekul je důležité také pH okolního prostředí, které udělí molekulám náboj, díky kterému se mohou pohybovat v elektrickém poli. Důležitá je i vhodná koncentrace látek v testovaném vzorku (Westermeier 2005).

2.4.5 Elektrodotové systémy

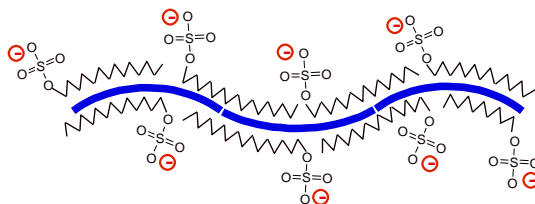
2.4.5.1 Nedisociativní systémy

Nedisociativní systém byl zaveden pro separaci nativních proteinů v podmínkách, které zamezí poškození funkce proteinu. Molekuly vzorku jsou separovány nejen dle velikosti, ale též podle svého náboje a tvaru. Z tohoto důvodu není možné přesně určit jejich molekulovou hmotnost a identifikovat tak specifický protein ze směsi vzorku. Nedisociativní elektroforesa se proto doporučuje užívat jen při analýze proteinů, u kterých je potřeba zachovat biologickou aktivitu (např. enzymovou aktivitu, vazebnou schopnost) pro následné kroky. U nedisociativních gelových systémů se pH pufru vybírá dle isoelektrického bodu analyzovaných proteinů (Hames 1998).

2.4.5.2 Disociativní systémy

Pro elektroforesu proteinů se nejčastěji používají polyakrylamidové gely v podmínkách, které způsobí disociaci proteinů na jejich jednotlivé polypeptidové podjednotky a které snižují možnost jejich agregace. K denaturaci se nejčastěji používá silný anionický detergent SDS v kombinaci s redukčním činidlem a zahříváním. Denaturované polypeptidy váží SDS a získávají tak záporný náboj (obr. 14).

Množství SDS, které se váže na protein, je proporcionální molekulové hmotnosti proteinu a není závislé na jeho sekvenci. Při nasycení se váže SDS v poměru 1,4 gramu SDS na 1 gram polypeptidu. Komplexy SDS-polypeptid se proto pohybují v polyakrylamidovém gelu v závislosti na velikosti polypeptidu. Za použití markerů o známé molekulové hmotnosti je možné určit molekulovou hmotnost polypeptidového řetězce (Sambrook and Russel 2001).



Obr. 14. Molekuly SDS překryjí vnitřní náboj molekule proteinu (modrá linie) a udílí mu tak stejný záporný náboj (<http://nationaldiagnostics.com>).

2.4.6 Standardy molekulové hmotnosti

Pro určení molekulové hmotnosti polypeptidů ve vzorku při SDS-PAGE je potřeba nanést i proteiny o známé molekulové hmotnosti. Proteinové standardy je také možné použít pro porovnání rozlišovacích schopností a reprodukovatelnosti různých gelových systémů. Proteiny používané jako molekulové standardy by neměly vykazovat neobvyklou migraci a měly by vytvářet ostré proužky.

2.4.7 Barvení

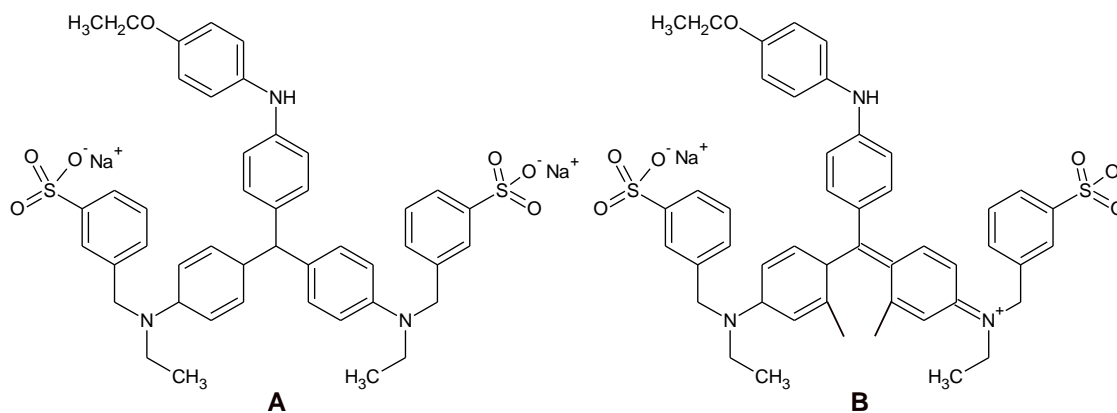
Neoznačené proteiny separované pomocí polyakrylamidových gelů jsou detekovány nejčastěji barvením, a to Coomassie Brilliant Blue či stříbrnými solemi (Sambrook and Russel 2001).

2.4.7.1 Coomassie Brilliant Blue

Relativně rychlou a přímou reakcí se Coomassie Brilliant Blue nesespecificky váže na protein, ne však na gel, což umožní vizualizaci proteinu za vzniku modrých proužků na průhledné hmotě gelu. Je to aminotriarylmethanové barvivo, které tvoří pevné, ale nekovalentní komplexy s proteiny, s největší pravděpodobností pomocí van der

Waalsových sil a elektrostatických interakcí s NH_3^+ skupinami (Sambrook and Russel 2001).

Jsou dostupné dvě formy tohoto barviva (obr. 15), které mají odlišná čísla v indexu barev, Brilliant Blue G 250 (G = green, barvivo má zelený odstín, 250 je indikátor síly barviva) a Brilliant Blue R 250 (R = red, má červený odstín). Barvivo Coomassie Blue R se používá obvykle v roztoku o koncentraci 0,05% ve směsi methanol:ledová kyselina octová:voda (50:10:40 v/v). Kyselé prostředí usnadňuje elektrostatické interakce mezi molekulami barviva a aminoskupinami proteinu. Gel je ponořený na několik hodin do tohoto koncentrovaného roztoku barviva. Přebytek barviva je pak odstraňován z gelu během dlouhého odbarvování pomocí roztoku methanolu a ledové kyseliny octové ve vodě. Coomassie Blue G má menší rozpustnost v 12% trichloroctové kyselině, takže je možné toto barvivo použít také jako koloidní disperzi, která nepenetruje gel. Tak lze předejít nežádoucímu pozadí a je možné rychlejší barvení (Sambrook and Russel 2001, Hames 1998). Koloidní barvivo Coomassie Blue G-250 se obecně považuje za citlivější než roztok Coomassie Blue R-250 (Miller a kol. 2006).



Obr. 15. A) Redukovaná Coomassie Brilliant Blue R-250 (<http://nihlibrary.ors.nih.gov>)
B) Coomassie Brilliant Blue G-250 (<http://www.piercenet.com>)

2.4.7.2 Silver Staining

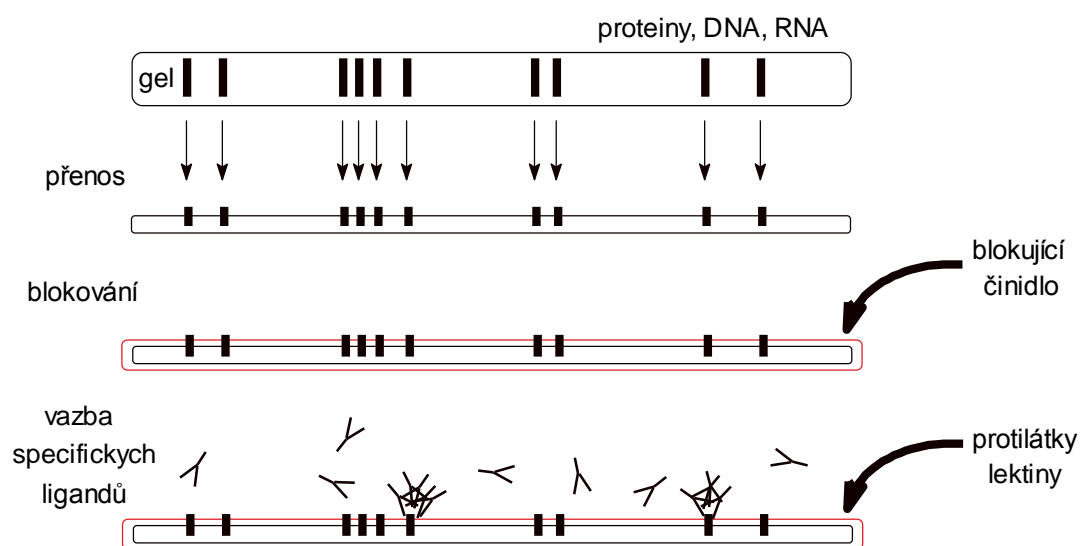
Silver Staining je mnohem citlivější než detekce pomocí Coomassie Blue, i když je někdy obtížněji proveditelný. Identifikace pomocí barvení stříbrem je založena na redukci stříbrných iontů, které jsou vázány na boční řetězec aminokyselin v reakci podobné fotografickému procesu (Sambrook and Russel 2001). Stříbrné ionty se váží elektrostatickými interakcemi s COO^- skupinami Asp a Glu nebo vytvářejí komplexy s imidazolem, SH, SCH_3 a NH_3 skupinami histidinu, cysteinu, methioninu a lysinu. Termodynamicky je upřednostňována redukce volných iontů stříbra před vázanými na proteiny. Proto je potřeba před redukcí provést důkladné promytí gelu tak, aby množství nevázaného stříbra bylo co nejnižší (Smejkal a Lazarev 2006).

K barvení proteinů pomocí stříbrných solí po separaci proteinů na SDS-PAGE bylo vyvinuto množství metod. Ty spadají do dvou hlavních skupin podle chemické formy stříbrných iontů použité pro barvení. Při první z nich se používají zásadité roztoky stříbra připravené přidáním dusičnanu stříbrného do směsi hydroxidu sodného a amonného. Stříbrné ionty navázané na protein jsou následně vyvolány redukcí na stříbro formaldehydem v kyselém prostředí (většinou kyseliny citronové). Ve druhé metodě se gel nejprve impregnuje roztokem dusičnanu stříbrného ve slabě kyselém roztoku a vyvolává se selektivní redukcí stříbrných iontů na stříbro formaldehydem v zásaditém prostředí buď uhličitanu sodného či hydroxidu sodného (Walker 1994, Sambrook and Russel 2001). Oba typy barvení jsou 100-1000 krát citlivější, než barvení pomocí Coomassie Blue a jsou schopny detekovat množství okolo 0,1-1,0 ng polypeptidu. Roztoky dusičnanu stříbrného se snáze připravují a v porovnání s amoniakálním roztokem stříbra nevytvářejí potenciálně výbušné vedlejší produkty (Sambrook and Russel 2001).

2.5 Immunoblotting

Blotting je metoda, při které dochází k přenosu velkých molekul (DNA – Southern blotting, RNA – Northern blotting, proteinů – Western blotting) z gelu, ve kterém byly předem separovány, na membránu, kde jsou fixovány. Cílem blotování je v ideálním případě vytvoření kvalitativně i kvantitativně přesné kopie jednotlivých proužků separovaných molekul z elektroforetického gelu na povrch blotovací membrány. Navázané

molekuly jsou následně specificky detekovány (obr. 16), většinou pomocí protilátky (imunoblotting). Výhodou imunoblottingu je kombinace separační schopnosti elektroforetických systémů a specifitou protilátek, kterými lze identifikovat jednotlivé antigeny separovaných proteinů (van Oss a van Regenmortel 1994, Westermeier 2005, <http://nationaldiagnostics.com>).



Obr. 16. Nejdůležitější kroky při blottingu molekul z elektroforetických gelů (Westermeier 2005)

Pro elektroforetickou separaci mohou být použity různé typy gelu. Pro agarosový gel je ale vhodný následný přenos na membránu kapilárním tokem. Pro elektroblotting proteinů je nutné použít polyakrylamidový gel. Je možné použít jak denaturující, tak i nedenaturující systém elektroforesy (van Oss a van Regenmortel 1994).

Po rozdělení elektroforesou v SDS-polyakrylamidovém gelu jsou antigeny (proteiny) elektroforeticky přeneseny z gelu na pevný nosič, např. nitrocelulosovou, polivynilidendiflouoridovou (PVDF) nebo kationickou nylonovou membránu. Místa, na která nebylo nic přeneseno, se blokují, aby se na ně nemohla nespecificky navázat protilátka. Imobilizované proteiny reagují se specifickými polyklonálními nebo monoklonálními protilátkami. Pak jsou komplexy antigen-protilátka lokalizovány

radiografickými, chromogenními či chemiluminescenčními reakcemi (Sambrook and Russel 2001).

Při imunoblottingu se vyskytují často potíže, jako např. nedostatečný přenos proteinu, ztráta antigenních míst, nízká citlivost, vysoké pozadí a nekvantitativní metody detekce (Sambrook and Russel 2001).

2.5.1 Metody přenosu biomolekul z gelu na membránu

Pro přenos biomolekul z gelu na membránu se dají použít následující metody.

Difusní blotting. Blotovací membrána musí být přiložena na obou stranách gelu, protože difuze probíhá v každém směru. Výsledkem jsou dvě identické kopie.

Kapilární blotting. Používá se při přenosu DNA či RNA, též u proteinů separovaných na gelech s velkými póry. Suchý papír ležící na membráně nasává kapilárními silami transferový pufr a vzorek je tak tažen z gelu na membránu.

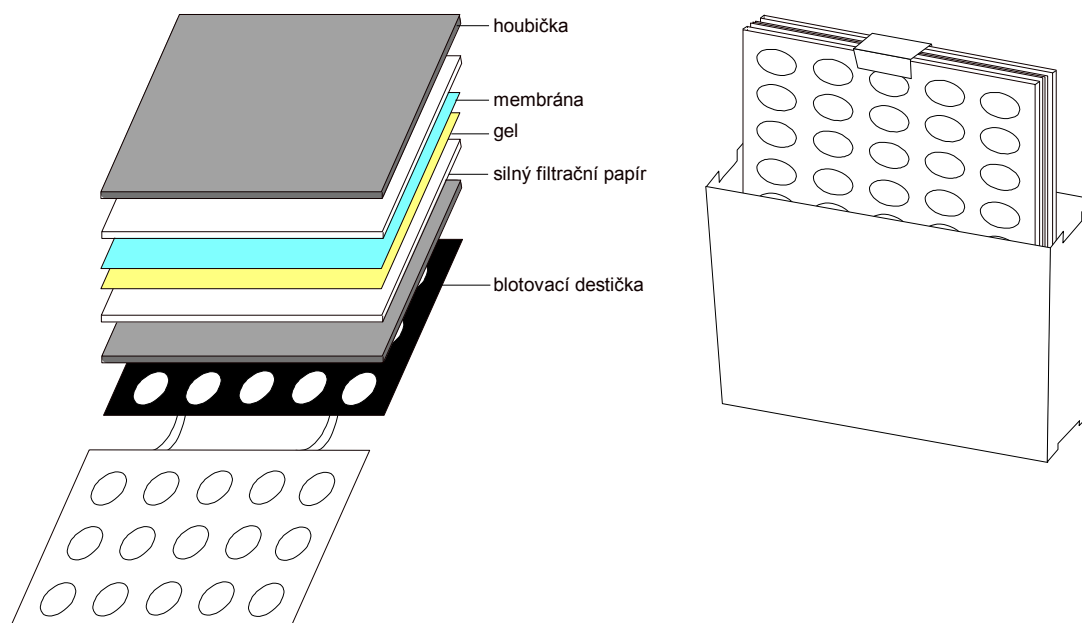
Pressure blotting. Používá se u agarosových gelů a při isoelektrofokusaci. Vlhká blotovací membrána se položí na gel a překryje se několika filtračními papíry, skleněnou deskou a závažím. Přenos je velmi rychlý.

Vakuový blotting je podobný kapilárnímu blottingu, ale pufr je nasáván vakuem.

Elektroblotting. Používá se hlavně u SDS-PAGE. Přenos z polyakrylamidového gelu na membránu je mnohem rychlejší a efektivnější než kapilární přenos. Elektroforetický přenos proteinu, po kterém následuje imunodetekce, se nazývá Western blotting. Přenos je uskutečněn ze separačního gelu za použití elektrod a membrán, které překrývají příslušnou část gelu. Jsou používány dva elektrodové systémy: tankový (tank, wet) a polosuchý (semi-dry) (Sambrook and Russel 2001, Westermeier 2005). Tankový systém používá vertikální elektrody, které jsou ponořené do nádoby s transferovým pufrem. Pro transport z SDS-gelu je membrána umístěna na straně gelu blíže anodě (Sambrook and Russel 2001, Garfin 2005). Gel a membrána jsou vloženy mezi blotovací papír a houbičky, které jsou nasáklé transferovým pufrem. Celý sencič je upevněn do plastických destiček (obr. 17), které jsou vertikálně umístěny do nádoby s pufrem, na které je vloženo napětí (van Oss a van Regenmortel 1994).

Polosuchá metoda je ekonomičtější vzhledem k pufru, protože zde není potřeba nádoby. Gel a membrána jsou stlačeny mezi blotovací papíry nasáklými pufrem a jsou

horizontálně umístěné přímo mezi elektrody (Garfin 2005, van Oss a van Regenmortel 1994).



Obr. 17. Uspořádání blotovacího sendviče pro tankovou metodu (dle Garfin 2005).

Účinnost elektroforetického přenosu proteinu závisí na aplikovaném silovém poli (Vcm^{-1}), vlastnostech pufru (iontová síla, pH) a složení gelové matrix (Butler, 1991). K nekompletnímu přenosu může dojít například, pokud je příliš krátká doba transferu, nízké napětí či pH transferového pufru nebo se proteiny vysrážejí v gelu. K nerovnoměrnému přenosu zase díky nepřesné geometrii elektrod či kazety, bublinám vzduchu v sendviči, vysoké molekulové hmotnosti proteinů (přecházejí pomaleji než nízkomolekulární proteiny) nebo se proteiny málo či špatně váží na membránu (van Oss a van Regenmortel 1994).

2.5.2 Typy membrán

Pro imunoblotting jsou používány tři základní typy membrán: nitrocelulosová, nylonová a polivynylidendifluoridová. Membrány se liší vazebnou kapacitou a silou fixace proteinů (Sambrook and Russel 2001). Mezi další používané membrány patří diazobenzoyloxymethylové a diazofenylthioetherové membrány, iontovýměnné membrány či membrány s aktivovanými skleněnými vlákny (Westermeier 2005).

Standartně se pro imunoblotting používá nitroceluloseová (NC) membrána (velikost pórů 0,45 μm), vhodná pro větší molekuly ($M_r > 14\ 000$). Kapacita nitrocelulosey k vazbě proteinů je relativně nízká (80-250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) v závislosti na proteinu. Proteiny jsou vázány na membránu hlavně hydrofobními interakcemi, i když se mohou vázat i vodíkovými můstky mezi aminokyselinami bočních řetězců a nitroskupinami membrány (Sambrook and Russel 2001). NC membrány mohou být použity i pro preparativní metody, protože proteiny nejsou v membráně vázány pevně a molekuly mohou být znovu eluovány (Westermeier 2005). Díky slabší vazebné síle může ale docházet ke ztrátám vzorku (Sambrook and Russel 2001). NC membrány jsou křehké a je s nimi obtížné pracovat (<http://nationaldiagnostics.com>).

Nylonové a nylonové membrány s kladným nábojem jsou tužší než nitroceluloseové, nepraskají po usušení. Vážou proteiny pevně elektrostatickými interakcemi. Kapacita se liší dle typu membrány a použitého proteinu od 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Výhodou těchto membrán oproti nitroceluloseovým je, že je možné opakovaně vázat různé protilátky. Mají ale dvě hlavní nevýhody. Není žádná jednoduchá a citlivá metoda pro barvení proteinů imobilizovaných na těchto membránách a je také obtížné blokovat všechna neobsazená místa membrány. Protilátky se tak mohou nespecificky vázat na filtr, což vede k vysokému pozadí (především u vysoce citlivých metod detekce). V mnoha případech je k získání uspokojivých výsledků nutné použít rozšířené blokování roztokem obsahující kasein a 1% polyvinylpyrrolidon (Sambrook and Russel 2001, van Oss a van Regenmortel 1994).

PVDF (polivynylidendifluoridová) membrána, mechanicky pevná na teflonové bázi, silně interaguje s proteiny (Sambrook and Russel 2001, Westermeier 2005). Tyto membrány jsou extrémně hydrofobní, proto je nutné před použitím navlhčit povrch membrány methanolem. Kapacita PVDF membrány je téměř stejná jako u nylonových membrán. Proteiny jsou vázány šestinásobně pevněji k PVDF membráně než k nitroceluloseové a jsou silněji zadržovány během detekčních kroků. Proteiny imobilizované na PVDF membráně mohou být zviditelňovány standárními barvivy jako je amidočern, indická modř, Ponceau S a Coomassie Brilliant Blue (Sambrook and Russel 2001, Butler 1991).

2.5.3 Blokování

Před detekcí je nutné zablokovat neobsazená vazebná místa na membráně, aby se zamezilo nespecifické vazbě protilátek v dalších krocích. Blokuje se pomocí detergentů či roztoků jiných proteinů. Použití proteinů je ve srovnání s detergenty relativně ireverzibilní. Způsob blokování závisí na použitém typu membrány i charakteru přenášených proteinů (Butler 1991).

2.5.3.1 Blokující činidla

Tradičními proteinovými blokátory jsou 0,5% nízkotučné sušené mléko nebo 5% hovězí sérový albumin. Tyto roztoky jsou ale bohaté na zbytkové alkalické fosfatasy a neměly by být používány v detekčních systémech využívajících tyto enzymy (především u chemiluminescenčních metod, kde citlivost detekce není dána silou emitujícího signálu, ale mírou potlačení pozadí) (Sambrook and Russel 2001).

2.5.4 Detekce barvením

Detekce barvením vyžaduje opatrnou volbu činidla, které by mělo být dostatečně citlivé a vhodné pro použitý typ membrány. Barvení může být provedeno na několika úrovních během procesu imunoblottingu (Sambrook and Russel 2001).

2.5.4.1 Barvení gelu před přenosem na membránu

Používá se ke kontrole proběhlé elektroforesy a/nebo přenosu proteinů na membránu (Westermeier 2005). Proteiny mohou být barveny v polyakrylamidovém gelu konvenčními barvivy jako Coomassie Brilliant Blue, odbarveny a poté elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosový nebo PVDF filtr pro imunoblotting. Hlavní výhodou této metody je, že proteiny zůstanou obarvené během imunodetekce, takže působí jako vnitřní markery. V některých případech může ale barvení proteinů na gelu snížit efektivitu eluce nebo může interferovat s vazbou protilátky (Sambrook and Russel 2001).

2.5.4.2 Vizualizace proteinů po transferu na membránu

Nitrocelulosové nebo PVDF membrány mohou být celé obarveny málo citlivým barvivem Ponceau S, které je ale lehce odstranitelné a umožňuje další imunodetekci. Dají

se použít i trvalejší barviva (Sambrook and Russel 2001, Reid 2000). Amidočerně 10B či Coomassie Blue R-250 se dají použít pro chemickou charakterizaci proteinů, ale znemožňují imunodetekční metody. Barvení pomocí India Ink či koloidních částic zlata je citlivější, ale zdlouhavější. Bylo vyvinuto také několik reverzibilních barviv chelatujících kovy s různou citlivostí, která umožňují jak následnou imunodetekci tak chemickou charakterizaci (Reid 2000).

2.5.5 Imunodetekce

2.5.5.1 Reakce s primárními protilátkami

Proteiny přenesené na membránu jsou nejprve podrobeny reakci se specifickou protilátkou (van Oss a van Regenmortel 1994). Protilátky používané k vazbě na epitopy proteinů mohou být buď polyklonální či monoklonální (Sambrook and Russel 2001). Primární protilátky mohou být značeny přímo nebo může následovat reakce se sekundárními protilátkami (van Oss a van Regenmortel 1994). Primární protilátky většinou nejsou radioaktivně značeny ani konjugovány k enzymu, ale jsou pouze rozpuštěny v blokovacím pufru, který brání nespecifické vazbě protilátky na membránu (Sambrook and Russel 2001).

2.5.5.2 Reakce se sekundárními protilátkami

Sekundární detekce se používá hlavně k zesílení signálu (van Oss a van Regenmortel 1994). Po navázání na protein jsou primární protilátky detekovány sekundárními protilátkami, anti-imunoglobuliny, které mohou být radioaktivně (^{125}I) či fluorescenčně (fluorescein) značené nebo konjugované s enzymy (křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa). Sekundární protilátky rozpoznávají prostorové uspořádání primární protilátky a donesou příslušný enzym či chromogenní skupinu na příslušné místo na proteinu (Sambrook and Russel 2001, van Oss a van Regenmortel 1994, Reid 2000).

2.5.5.3 Detekce sekundárních protilátek

PROTILÁTKY KONJUGOVANÉ S ENZYMEM

K vizualizaci příslušného místa dochází prostřednictvím substrátů, které vytvářejí nerozpustné stabilní barevné produkty v místě navázání protilátky. Mezi nejčastěji používané substráty patří např. diaminobenzidin (pro křenovou peroxidasu) či 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfátu (BCIP) pro alkalickou fosfatasu. Protilátky konjugované s enzymy mohou být detekovány také chemiluminescenčně. V přítomnosti peroxidu vodíku dochází k oxidaci luminolu, při které se uvolňují fotony, které lze zachytit na rentgenovém snímku (van Oss a van Regenmortel 1994, Reid 2000). Je možná i fluorescenční detekce (Sambrook and Russel 2001).

Protilátky s navázanou alkalickou fosfatasou se detekují barvením pomocí BCIP a nitroblue tetrazolia (NBT). Dochází při něm k enzymové defosforylaci a následné oxidaci BCIP spojené s redukcí NBT za vzniku modrého zbarvení (Garfin 2005).

Výhodou protilátek konjugovaných s enzymy je jednoduchost při zacházení s nimi a skladování a také rychlá tvorba zbarvení při detekci. Radioaktivně značené protilátky mají ale vyšší citlivost (van Oss a van Regenmortel 1994).

FLUOROCHROMY

Protilátky značené fluorescenčním barvivem (např. fluoresceinem či fykoerythrinem) jsou detekovány a fotografovány pod UV světlem (van Oss a van Regenmortel 1994).

PROTILÁTKY ZNAČENÉ RADIOJODEM

Takto značené protilátky jsou detekovány autoradiograficky (Reid 2000).

PROTILÁTKY S NAVÁZANÝM BIOTINEM

Ty mohou být detekovány značeným či konjugovaným streptavidinem (Sambrook and Russel 2001).

3. CÍLE PRÁCE

- 1) Optimalizovat parametry metody SDS-PAGE a následné imunochemické detekce pro sledování průběhu glykace AST methylglyoxalem.
 - a. Koncentrace separačního gelu
 - b. Množství nanášené bílkoviny
 - c. Porovnání tří metod barvení
 - d. Vliv použité koncentrace methylglyoxalu v inkubační směsi

- 2) Optimalizovat parametry metody nativní PAGE pro sledování průběhu glykace AST methylglyoxalem.
 - a. Množství nanášené bílkoviny
 - b. Vliv použité koncentrace methylglyoxalu v inkubační směsi

- 3) Zjistit vliv kyseliny močové, aminoguanidinu a kyseliny hydroxycitronové na glykaci AST methylglyoxalem pomocí:
 - a. SDS-PAGE
 - b. SDS-PAGE s následnou imunodetekcí
 - c. Nativní PAGE

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

Aspartátaminotransferasa	Roche Diagnostics
Methylglyoxal (MGO) 40% roztok	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.	Penta Chrudim
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a.	Lachema
Azid sodný p.a.	Lachema
Aminoguanidin	Sigma-Aldrich
Kyselina močová	Lachema
Kyselina hydroxycitronová	Fluka
Ultračistá voda	Katedra biochemických věd
Kyselina chlorovodíková	Penta
Akrylamid (AA)	Sigma-Aldrich
Bisakrylamid (bis AA)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich
Dodecylsíran sodný	BDH Chemicals
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Kulich
Isobutanol	Penta
Persíran amonný (APS)	Lachema
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
2-merkptoethanol	Sigma-Aldrich
Lihomethanol	Katedra biochemických věd
Methanol	Penta
Kyselina ostová 99%	Lachema
Commisie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich
Isopropylalkohol	Lachema
Dusičnan stříbrný	Kovohutě Vestec

Hydroxid sodný p.a.	Lachema
Amoniak vodný roztok min 25%	Lachema
Formaldehyd vodný roztok 36-38%	Penta
Polyethylenglykol 2000	Lachema
Kyselina citronová monohydrát	Penta
Chlorid sodný	Lachema
Tween 20	Sigma-Aldrich
Chlorid hořečnatý hexahydrát	Sigma-Aldrich
Nitroblue tetrazolium	Sigma-Aldrich
5-brom-chloro-3-indolylfosfát	Sigma-Aldrich
EZBlue Gel Staining Reagent	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad
GelDoc XR	Bio-Rad
Blotting Grade Blocker, nonfat dry milk	Bio-Rad
Extra thick blot paper, Protean XL size	Bio-Rad
Polyclonal antibody to AGE	Acris Antibodies
Polyclonal antibody to Rabbit IgG-AP	Acris Antibodies
Immun-Blot PVDF Membrane	Bio-Rad

4.2 Použitá zařízení

Ultrasonic cleaner
Chlazená centrifuga Biofuge Stratos Heraeus
Digitální váhy Sartorius CP 225D
pH metr inoLab pH Level 2
Inkubátor Memmert
Thermomixer komfort Ependorf (0,5 ml)
Třepačka Heidolph Duomax 1030
Sada pro elektroforesu Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)
GelDoc XR (Bio-Rad)
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)

4.3 Metodika

4.3.1 Příprava reagensí

4.3.1.1 Příprava fosfátového pufru

Pro ředění enzymu a methylglyoxalu jsem používala 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 s 0,05% azidu sodného (antimikrobiální látka). Tento pufr jsem připravila smísením 190 ml 0,2 M vodného roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 810 ml vodného roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 1000 ml ultračisté vody. Pak jsem přidala 1 g azidu sodného, čímž vznikl jeho 0,05% roztok. Vzniklý pufr jsem dokonale promíchala a poté jsem provedla kontrolu pH na pH metru. Případně jsem pH upravila na hodnotu 7,4 přidáním vodného roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ či $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

4.3.1.2 Příprava enzymu

Aspartátaminotransferasu (25 mg nebo 10 mg) jsem centrifugovala 20 min při 8°C při 5000 otáčkách za minutu. Supernatant jsem odpipetovala a peletu, ve které se nacházel enzym, jsem přenesla do příslušného množství 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4, tak abych získala zásobní roztok AST o koncentraci 1,8 mg/ml, případně 3,6 mg/ml.

4.3.1.3 Příprava roztoků aminoguanidinu a kyseliny močové

Roztoky příslušných koncentrací jsem získala rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4.

4.3.1.4 Příprava roztoku kyseliny hydroxycitronové

Roztoky příslušných koncentrací jsem získala naředěním 250 mM roztoku kyseliny hydroxycitronové v 1 M kyselině chlorovodíkové, vzniklé rozpuštěním přesné navážky látky v odpovídajícím množství kyseliny chlorovodíkové.

4.3.1.5 Příprava roztoku methylglyoxalu

Pro přípravu inkubačních směsí jsem 0,5 M roztok methylglyoxalu, který jsem si připravila těsně před přípravou inkubačních směsí naředěním 40% roztoku methylglyoxalu 0,1 M fosfátovým pufrem o pH 7,4.

4.3.1.6 Roztoky pro SDS-PAGE

PŘÍPRAVA 4 M ROZTOKU KYSELINY CHLOROVODÍKOVÉ

Pro elektroforesu jsem potřebovala 4 M roztok kyseliny chlorovodíkové, který jsem připravila smísením příslušného množství koncentrované HCl s redestilovanou vodou. Vzniklý zásobní roztok se uchovává při 4°C.

PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU AKRYLAMIDU A BISAKRYLAMIDU(AA+BISAA)

Zásobní roztok se připraví rozpuštěním 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu v malém množství redestilované vody za stálého míchání. Po rozpuštění se doplní v odměrné baňce do 100 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA 1,5 M TRIS-HCL PUFRU O pH 8,8

Pufř se připraví rozpuštěním 18,5 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 75 ml redestilované vody za stálého míchání. Poté se na pH metru upraví pH na 8,8 pomocí 4 M HCl a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 100 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA 0,5 M TRIS-HCL PUFRU O pH 6,8

Pufř se připraví rozpuštěním 6 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 75 ml redestilované vody za stálého míchání. Na pH metru se upraví pH na 6,8 pomocí 4 M HCl a doplní se v odměrné baňce redestilovanou vodou do 100 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA 10% ROZTOKU DODECYLSÍRANU SODNÉHO

Roztok se připraví rozpuštěním 10 g dodecylsírany sodného v 80 ml redestilované vody. Po rozpuštění se roztok doplní redestilovanou vodou do 100 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě.

PŘÍPRAVA 0,5% ROZTOKU BROMFENOLOVÉ MODŘI

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

PŘÍPRAVA KONCENTROVANÉHO ELEKTRODOVÉHO PUFRU

Koncentrovaný elektrodový pufr se připraví rozpuštěním 72 g glycinu, 15 g tris(hydroxymethyl)aminometanu a 5 g dodecylsíranu sodného v 900 ml redestilované vody. Poté se na pH metru upraví pH na 8,3 pomocí 4 M HCl a doplní se v odměrné baňce do 1000 ml. Rozdělí se po 100 ml do plastických nádobek a dá se zmrazit na -20°C.

PŘÍPRAVA ELEKTRODOVÉHO PUFRU

Elektrodový pufr se připraví těsně před použitím smísením 70 ml zásobního elektrodového pufru s 280 ml redestilované vody.

PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO VZORKOVÉHO PUFRU

Zásobní vzorkový 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. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA VZORKOVÉHO PUFRU

Vzorkový pufr se připraví těsně před použitím smísením potřebného množství zásobního vzorkového pufru s 2-merkptoethanolem. Na 1 ml vzorkového pufru se přidá 50 µl 2-merkptoethanolu.

PŘÍPRAVA ISOBUTANOLU NASYCENÉHO VODOU

Isobutanol nasycený vodou se připraví smísením čistého isobutanolu s redestilovanou vodou. V horní vrstvě je isobutanol nasycený vodou. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA 10% ROZTOKU PERSÍRANU AMONNÉHO (APS)

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

4.3.1.7 Roztoky pro nativní PAGE

PŘÍPRAVA KONCENTROVANÉHO ELEKTRODOVÉHO PUFRU

Koncentrovaný elektrodový pufr se připraví rozpuštěním 72 g glycinu a 15 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 900 ml redestilované vody. Poté se na pH metru upraví pH na 8,3 pomocí 4 M HCl a doplní se v odměrné baňce do 1000 ml. Rozdělí se po 100 ml do plastických nádobek a dá se zmrazit na -20°C.

PŘÍPRAVA ELEKTRODOVÉHO PUFRU

Elektrodový pufr se připraví těsně před použitím smísením 70 ml zásobního elektrodového pufru s 280 ml redestilované vody.

PŘÍPRAVA VZORKOVÉHO PUFRU

Zásobní vzorkový 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 a 0,6 ml 0,5% roztoku bromfenolové modři. Uchovává se při 4°C.

4.3.1.8 Roztoky pro barvení gelů pomocí Coomassie Blue I

PŘÍPRAVA FIXAČNÍ A ODBARVOVACÍ LÁZNĚ PRO BARVENÍ COOMASSIE BLUE I

Lázeň se připraví smísením 125 ml metanolu, 50 ml kyseliny octové a 325 ml redestilované vody.

PŘÍPRAVA BARVÍCÍ LÁZNĚ 0,25 % COOMASSIE BLUE I

Lázeň se připraví rozpuštěním příslušného množství Coomassie Blue v roztoku, který vznikl smísením 45 ml methanolu, 9 ml kyseliny octové a 45 ml redestilované vody.

4.3.1.9 Roztoky pro barvení gelů pomocí Coomassie Blue II (alternativní způsob)

PŘÍPRAVA BARVÍCÍ LÁZNĚ 0,25 % COOMASSIE BLUE V 10% KYSELINĚ OCTOVÉ II

Barvicí lázeň se připraví rozpuštěním příslušného množství Coomassie blue v 10% kyselině octové.

PŘÍPRAVA 10% KYSELINY OCTOVÉ – ODBARVOVACÍ LÁZEŇ II

Kyselina octová o koncentraci 10% se připraví smísením příslušného množství koncentrované kyseliny octové (99%) s redestilovanou vodou.

4.3.1.10 *Roztoky pro barvení gelů Silver Staining*

PŘÍPRAVA 50% ISOPROPANOLU (V/V)

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

PŘÍPRAVA 20% ROZTOKU DUSIČNANU STŘÍBRNÉHO (W/V)

Roztok se připraví rozpuštěním 2 g dusičnanu stříbrného v redestilované vodě za vzniku 10 ml roztoku.

PŘÍPRAVA 4% ROZTOKU HYDROXIDU SODNÉHO (W/V)

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

PŘÍPRAVA FIXAČNÍHO ROZTOKU PRO BARVENÍ SILVER STAINING

Fixační roztok, 5% roztok polyethylenglykolu 2000 v 50% alkoholickém roztoku, se připraví navážením 5 g polyethylenglykolu 2000 a doplněním 50% isopropanolem do 100 ml.

4.3.1.11 *Příprava barvicího roztoku pro barvení Silver Staining*

Barvicí roztok pro Silver Staining obsahuje 0,2 % dusičnanu stříbrného, 0,25 % čpavku a 0,2 % hydroxidu sodného. Připraví se smísením 1 ml 20% roztoku dusičnanu stříbrného, 1 ml 25% vodného roztoku amoniaku a 5 ml 4% roztoku hydroxidu sodného a doplněním redestilovanou vodou do 100 ml.

PŘÍPRAVA VYVÍJECÍHO ROZTOKU PRO BARVENÍ SILVER STAINING

Vyvíjecí roztok pro Silver Staining obsahuje 0,005 % kyseliny citronové a 0,02 % formaldehyd. Připraví se rozpuštěním 5 mg kyseliny citronové v 80 ml redestilované vody, přidá se 54 μ l 37 % formaldehydu a doplní se redestilovanou vodou do 100 ml.

4.3.1.12 Roztoky pro imunoblotting

PŘÍPRAVA BLOTOVACÍHO PUFRU

V přibližně 500 ml redestilované vody se rozpustí 6,06 g TRISu a 28,8 g glycinu. Poté se přidá 400 ml methanolu a v odměrné baňce se doplní do 2000 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA 0,1 M TRIS PUFRU O pH 8,0

V 800 ml redestilované vody se rozpustí 12,11 g TRISu, pomocí 4 M HCl se upraví pH na 8,0 a doplní se redestilovanou vodou do 1000 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA TBST

Ve 300 ml redestilované vody se rozpustí 8,77 g chloridu sodného. Přidají se 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru o pH 8,0. Pak se doplní v odměrné baňce do 1000 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA TBS

Asi ve 100 ml redestilované vody se rozpustí 2,19 g chloridu sodného. Přidá se 25 ml 0,1 M TRIS pufru o pH 8,0. Pak se doplní v odměrné baňce do 250 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA AP PUFRU O pH 9,5

Asi ve 300 ml redestilované vody se rozpustí 6,06 g TRISu a 508 mg hexahydrátu chloridu hořečnatého. Pomocí 4 M kyseliny chlorovodíkové se upraví pH na 9,5. Pak se doplní v odměrné baňce do 500 ml. Uchovává se při 4°C.

PŘÍPRAVA ROZTOKU NITROBLUETETRAZOLIA (NBT)

35 mg nitrobluetetrazolia se rozpustí v 1 ml 70% dimethylformamidu. Uchovává se při -20°C.

PŘÍPRAVA ROZTOKU 5-BROMO-CHLORO-3-INDOLYLFOSFÁTU (BCIP)

V 1 ml dimethylformamidu se rozpustí 35 mg BCIP. Uchovává se při -20°C.

PŘÍPRAVA BARVÍČÍHO ROZTOKU

Barvicí roztok se připraví těsně před použitím napipetováním 2 ml AP-pufu pokojové teploty do skleněné lahvičky a přidáním 13,2 μ l NBT a 6,6 μ l BCIP. Roztok se uchovává ve tmě.

PŘÍPRAVA ROZTOKU TBST S 8% MLÉKEM

Roztok připravíme rozpuštěním 2 g mléka ve 25 ml TBST.

PŘÍPRAVA ROZTOKU TBST S PRIMÁRNÍ PROTILÁTKOU (1:1000) A 0,5% MLÉKA

Roztok připravíme rozpuštěním 125 mg mléka ve 25 ml TBST a přidáním 25 μ l zásobního roztoku primární protilátky. Uchovává se při -20°C.

PŘÍPRAVA ROZTOKU TBST SE SEKUNDÁRNÍ AP- PROTILÁTKOU (1:2000)

Roztok připravíme přidáním 12,5 μ l zásobního roztoku sekundární AP-protilátky do 25 ml TBST. Uchovává se při -20°C.

4.3.2 Příprava inkubačních směsí

4.3.2.1 Optimalizace separační metody SDS-PAGE pro vzorky obsahující AST

Pro optimalizaci množství proteinu nanášeného na gel jsem připravila jednu inkubační směs o koncentraci 1,8 mg/ml AST a 10 mM MGO v celkovém množství 500 μ l. Směs jsem připravila přidáním příslušného množství 0,5 M MGO do roztoku AST o koncentraci 1,8 mg/ml. Směs jsem inkubovala při 60°C po dobu 60 min pro 12,5% separační gel a 120 minut pro 10% separační gel.

4.3.2.2 Optimalizace nativní PAGE pro vzorky obsahující AST

Pro optimalizaci množství proteinu nanášeného na gel jsem použila enzym AST o koncentraci 1,8 mg/ml.

4.3.2.3 Sledování vlivu koncentrace MGO na vznik vysokomolekulárních agregátů AST pomocí SDS-PAGE

Pro sledování vlivu koncentrace MGO na vznik glykačních produktů jsem připravila 8 inkubačních směsí podle následující tabulky (tab. 2). Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu tří dnů a dále 135 minut při 60 °C.

Tab. 2: Příprava inkubačních směsí pro sledování vlivu koncentrace MGO na glykaci AST pomocí SDS-PAGE

Inkubační směs	AST 1,8 mg/ml (μl)	MGO (μl)	Výsledná koncentrace MGO (mM)
1	200	0,00	0
2	200	0,20 0,50 M	0,5
3	200	0,40 0,50 M	1
4	200	2,00 0,50 M	5
5	200	4,00 0,50 M	10
6	200	0,72 5,55 M	20
7	200	1,26 5,55 M	35
8	200	1,80 5,55 M	50

4.3.2.4 Sledování vlivu koncentrace MGO na vznik vysokomolekulárních agregátů AST pomocí SDS-PAGE s následným Western blottingem a rozlišení citlivosti dvou způsobů barvení SDS-PAGE gelů pomocí Coomassie Blue

Pro sledování vlivu koncentrace MGO na vznik glykačních produktů jsem připravila 8 inkubačních směsí podle následující tabulky (tab. 3). Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 22 dní. Tytéž vzorky byly použity i pro rozlišení citlivosti barvení metodou Coomassie Blue R-250 a barvení koloidním roztokem Coomassie blue G-250.

Tab. 3: Příprava inkubačních směsí pro sledování vlivu koncentrace MGO na glykaci AST pomocí SDS-PAGE a Western blottingu

Inkubační směs	AST 1,8 mg/ml (μl)	MGO 0,5 M (μl)	Výsledná koncentrace MGO (mM)
1	200	0,00	0
2	200	0,20	0,5
3	200	0,40	1
4	200	0,80	2
5	200	1,20	3
6	200	2,00	5
7	200	3,20	8
8	200	4,00	10

4.3.2.5 Sledování vlivu koncentrace methylglyoxalu na náboj molekuly AST pomocí nativní PAGE

Pro sledování vlivu koncentrace MGO na náboj AST jsem připravila 6 inkubačních směsí podle následující tabulky (tab. 4). Vzorky byly inkubovány 22 dnů při 37°C.

Tab. 4: Příprava inkubačních směsí pro sledování vlivu koncentrace MGO na náboj AST pomocí nativní PAGE.

Inkubační směs č.:	Koncentrace AST (mg/ml)	Koncentrace MGO (mM)
1	1,8	-
2	1,8	0,5
3	1,8	1,0
4	1,8	2,0
5	1,8	3,0
6	1,8	8,0

4.3.2.6 Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE a nativní PAGE

K měření jsem použila 4 koncentrace kyseliny močové (0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM a 1,2 mM), aminoguanidinu (1 μ M, 0,1 mM, 1 mM a 10 mM) a kyseliny hydroxycitronové (0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM a 2,5 mM). Výsledná koncentrace AST byla 1,8 mg/ml a koncentrace MGO byla 0,5 mM. Přípravu jednotlivých vzorků jsem připravila podle následující tabulky 5. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 22 dní.

Tab. 5: Příprava inkubačních směsí pro sledování vlivu antioxidantů na vznik glykačních produktů pomocí SDS-PAGE, nativní elektroforesy a Western blottingu.

Inkub. směs	Objem AST 3,6 mg/ml (μ l)	Objem pufu (μ l)	Objem MGO 0,5 M (μ l)	Objem AOX (μ l)	Výsledná konc. AOX (mM)	Celkem (μ l)	
1	100	100	-	-	-	200	
2	100	100	0,2	-	-	200	
				Objem KM (μ l)	KM		
3	100	66,7	0,2	33,3	2,4 mM	0,4	200
4	100	50	0,2	50	2,4 mM	0,6	200
5	100	33,3	0,2	66,67	2,4 mM	0,8	200
6	100	-	0,2	100	2,4 mM	1,2	200
				Objem AMG (μ l)	AMG		
7	100	80	0,2	20	0,01 mM	0,001	200
8	100	90	0,2	10	2,0 mM	0,1	200
9	100	-	0,2	100	2,0 mM	1,0	200
10	100	-	0,2	100	20 mM	10,0	200
				Objem HCA (μ l)	HCA		
11	100	99,8	0,2	0,2	250 mM	0,25	200
12	100	99,6	0,2	0,4	250 mM	0,5	200
13	100	99,2	0,2	0,8	250 mM	1,0	200
14	100	98	0,2	2	250 mM	2,5	200

4.3.3 Příprava gelů pro SDS-PAGE s 12,5% a 10% separačním gelem

Podle následující tabulky (tab. 6) jsem v malé kádince připravila roztok pro 12,5% nebo 10% separační gel. Po promíchání jsem roztok ihned nalila pipetou mezi dvě skla s tloušťkou spacerů 0,75 mm do výšky asi 6 cm. Ihned po nalití jsem převrstvila po celé délce roztok pro přípravu gelu isobutanolem nasyceným vodou. Poté jsem nechala roztok polymerovat asi 45 minut. V tabulce uvádím rozpis na 2 gely.

Tab. 6: Příprava 12,5% a 10% separačního gelu pro SDS-PAGE

SEPARAČNÍ GEL 0,75 mm	Množství na dva 12,5% gely	Množství na dva 10% gely
Redestilovaná voda	3,2 ml	4,0 ml
1,5 M pufr Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
Roztok AA + bis AA	4,2 ml	3,4 ml
Iniciace polymerace		
Roztok APS	58 μ l	58 μ l
TEMED	4 μ l	4 μ l

Po 45 minutách jsem opatrně slila isobutanol, vzniklý gel jsem opláchla redestilovanou vodou a opatrně vysušila filtračním papírem. Podle následující tabulky 7 jsem připravila roztok na zaostřovací 4% gel, opatrně jsem ho promíchala a ihned jsem nalila na spodní separační gel mezi dvě skla až po jeho horní okraj. Pod úhlem 45° jsem opatrně zasunula hřebínek až po drážky tak, aby se vytlačily všechny bubliny vzduchu. Nechala jsem polymerovat alespoň 2 hodiny. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu jsem opatrně vyndala hřebínek a jamky propláchla destilovanou vodou. Gel je možné připravit i několik dní dopředu. Pak je potřeba ho zabalit do potravinové folie a ve svislé poloze uchovávat v lednici.

Tab. 7: Příprava 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

ZAOŠŤROVACÍ GEL 0,75 mm	Množství na dva 4% gely
Redestilovaná voda	3,126 ml
0,5 M pufr Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
Roztok AA + bis AA	0,5 ml
Iniciace polymerace	
Roztok 10% APS	120 μ l
TEMED	10 μ l

4.3.4 Příprava gelů pro nativní PAGE

Postup přípravy gelu pro nativní elektroforesu je shodný s přípravou gelu pro SDS-PAGE. Gel pro nativní PAGE neobsahuje SDS. Podle následujících dvou tabulek (tab. 8, 9) jsem v malé kádince připravila roztok pro 7,5% separační gel a 4% zaostřovací gel. Po promíchání jsem roztok ihned nalila pipetou mezi dvě skla s tloušťkou spacerů 1,5 mm do výšky asi 6 cm. Postup přípravy gelu je jinak stejný jako příprava gelu pro SDS-PAGE. Tabulky uvádí rozpis na 2 gely.

Tab. 8: Příprava 7,5% separačního gelu pro nativní elektroforesu

SEPARAČNÍ GEL 1,5 mm	Množství na dva 7,5% gely
Redestilovaná voda	10,0 ml
1,5 M pufr Tris-HCl pH 8,8	5,0 ml
Roztok AA + bis AA	5,0 ml
Iniciace polymerace	
Roztok APS	232 μ l
TEMED	16 μ l

Tab. 9: Příprava 4% zaostřovacího gelu pro nativní elektroforesu

ZAOŠŤŮVACÍ GEL 1,5 mm	Množství na dva 4% gely
Redestilovaná voda	6,352 ml
0,5 M pufr Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
Roztok AA + bis AA	1,0 ml
Iniciace polymerace	
Roztok 10% APS	60 μ l
TEMED	5 μ l

4.3.5 Provedení SDS-PAGE

Stojánek s gely jsem vložila do vaničky, do horního elektrodového prostoru jsem nalila asi 125 ml elektrodového pufru tak, aby byl ponořený celý gel. Do spodního elektrodového prostoru jsem nalila asi 200 ml elektrodového pufru tak, aby jeho hladina byla nad spodním okrajem gelu. Pak jsem pomocí nanášecího bloku nanasla do první jamky 5 μ l molekulového markru a do dalších jamek vždy 10 μ l připravené a denaturované inkubační směsi. Elektroforesa probíhala nejprve při napětí 100 V asi 5-10 minut, dokud vzorky nedorazí na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu, dále pak při 200 V asi 45 minut. Po ukončení elektroforesy se gel opatrně oddělí od skleněných destiček a odřízne se zaostřovací gel. Separační gel se pak dále barví.

4.3.6 Provedení nativní PAGE

Stojánek s gely jsem vložila do vaničky, do horního elektrodového prostoru jsem nalila asi 125 ml elektrodového pufru tak, aby byl ponořený celý gel. Do spodního elektrodového prostoru jsem nalila asi 200 ml elektrodového pufru pro nativní elektroforesu tak, aby jeho hladina byla nad spodním okrajem gelu. Pak jsem pomocí nanášecího bloku nanasla vždy 15 μ l připravené inkubační směsi. Elektroforesa probíhá nejprve při proudu 20 mA asi 15-20 minut, dokud vzorky nedorazí na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu. Pak se proud nastaví na 30 mA a probíhá asi 100 minut. Po ukončení elektroforesy se gel velmi opatrně oddělí od skleněných destiček a odřízne se zaostřovací gel. Separační gel se pak dále barví.

4.3.7 Barvení proteinů na gelu pro SDS-PAGE a nativní PAGE

Získaný separační gel jsem barvila jedním čtyřmi typy barvení s různou citlivostí nebo délkou barvení.

4.3.7.1 Barvení metodou Silver Staining

Těsně před použitím jsem si připravila fixační, barvicí a vyvíjecí roztok pro Silver Staining (SS) a separační gel po elektroforese jsem barvila za stálého třepání podle následující tabulky (tab. 10).

tab. 10: Průběh barvení metodou Silver Staining

Roztok:	Doba koupání	pH	Velikost gelu:
Fixační	30 min		Smršťuje se
Barvicí	15 min	11	Natahuje se
Redestilovaná voda	3 x 1 min		Zůstává stejný
Vyvíjecí	asi 1-2 min	3	Zůstává stejný

Gel se nechá vyvíjet do chvíle, než se začnou objevovat proužky a pozadí ještě není zabarvené. Pak se ihned přemístí do redestilované vody, kde barva proužků ještě zvýší intenzitu. Ve vodě je možné gel uchovat i do druhého dne.

4.3.7.2 Barvení metodou Coomassie Blue I

Roztoky pro barvení metodou Coomassie Blue R-250 I lze připravit do zásoby a uchovávat při laboratorní teplotě v digestoři. Barvení pomocí Coomassie Blue I jsem provedla podle následující tabulky (tab. 11). Po dostatečném odbarvení je možné gel přemístit do vodné lázně a krátce uchovávat.

Tab. 11: Průběh barvení metodou Coomassie Blue I

Roztok	Doba koupání
Fixační roztok I (methanol, k. octová, voda)	více než 12 hodin (přes noc)
Barvicí roztok 0,25% Coomassie Blue I	1 hodina
Odbarvovací roztok I (= fixační roztok)	Alespoň 2 hodiny

4.3.7.3 Barvení metodou Coomassie Blue II (alternativní způsob)

Barvení pomocí Coomassie Blue R-250 II jsem provedla podle následující tabulky (tab. 12). Po dostatečném odbarvení je možné gel přemístit do vodné lázně a krátce uchovávat.

Tab. 12: Průběh barvení metodou Coomassie blue II

Roztok	Doba koupání
Barvicí roztok 0,25% Coomassie Blue II v 10 % kys. octové II	20 minut v sušárně předehřáté na 50°C
Odbarvovací roztok II (10% kyselina octová)	Alespoň 4 hodiny

Během odbarvování v 10% kyselině octové lázeň několikrát vyměníme, až je pozadí na gelu co nejméně zřetelné.

4.3.7.4 Barvení pomocí koloidního roztoku Coomassie Blue G-250

Jako poslední barvicí metodu jsem použila komerčně dodávaný roztok EZBlue obsahující Coomassie Brilliant Blue typu G-250. Postup, který jsem k barvení použila je uveden v následující tabulce (tab. 13).

Tab. 13: Průběh Barvení pomocí barvicího roztoku EZBlue Gel Staining Reagent

Lázeň	Doba koupání	Množství
Redestilovaná voda	3 x 5 min	
EZBlue	45 – 60 min	20 – 40 ml na 1 gel
Redestilovaná voda	1-2 hod	

Použitý roztok EZBlue je možné použít vícekrát. Při odbarvování gelu redestilovanou vodou je potřeba lázeň několikrát vyměnit. Je možné nechat odbarvovat gel i přes noc, aniž by byla ovlivněna intenzita proužků.

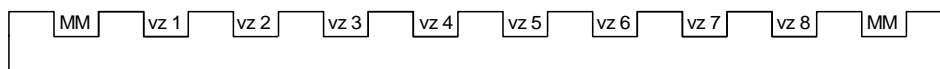
4.3.8 Příprava vzorků před nanesením na SDS-PAGE gel pro zjištění vhodné koncentrace AST

Do termobloku předehřátého na 99°C jsem dala na 3 minuty denaturovat dobře uzavřené inkubační směsi připravené podle následující tabulky (tab. 14). Inkubační směs AST 1,8 mg/ml + 10 mM byla předem inkubována 60 minut při 60°C.

Tab. 14: Nanášená množství inkubačních směsí AST + MGO na gel pro SDS-PAGE

Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM (μl)	10% SDS (μl)	Vzorkový pufr (μl)	Celkem (μl)	Množství AST v 10 μl (μg)
1	6,66	23,34	30,00	60,00	2,00
2	9,90	20,10	30,00	60,00	3,00
3	13,32	16,68	30,00	60,00	4,00
4	16,80	13,20	30,00	60,00	5,00
5	20,10	9,90	30,00	60,00	6,00
6	23,40	6,60	30,00	60,00	7,00
7	26,70	3,30	30,00	60,00	8,00
8	30,00	-	30,00	60,00	9,00

Pak jsem pomocí nanášecího bloku nanasla do první a poslední jamky jednoho gelu 5 μl molekulového markru a do dalších jamek vždy 10 μl připravené a denaturované inkubační směsi 1-8 (obr. 18). Stejnou řadu vzorků jsem nanasla i na druhý gel. Po ukončení elektroforesy a oddělení zaostřovacího gelu jsem separační gely barvila metodou Silver Staining a druhý gel metodou Coomassie Blue I.



Obr. 18. Nanesení molekulového markeru a vzorků 1-8 na gel pro SDS-PAGE

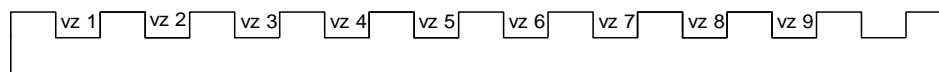
4.3.9 Příprava vzorků před nanesením na gel pro nativní elektroforesu pro zjištění vhodné koncentrace AST

Z enzymu AST o koncentraci 3,6 mg/ml jsem připravila směsi podle následující tabulky (tab. 15).

Tab. 15: Nanášená množství inkubačních směsí AST na gel pro nativní elektroforesu

Vzorek	AST 3,6 mg/ml (μ l)	Redestilovaná voda (μ l)	Vzorkový pufr pro nativní ELFO (μ l)	Celkem (μ l)	Množství AST v 15 μ l (μ g)
1	4,44	15,56	20,00	40,00	6,00
2	5,92	14,08	20,00	40,00	8,00
3	7,41	12,59	20,00	40,00	10,00
4	8,15	11,85	20,00	40,00	11,00
5	8,89	11,11	20,00	40,00	12,00
6	9,63	10,37	20,00	40,00	13,00
7	10,37	9,63	20,00	40,00	14,00
8	11,11	8,89	20,00	40,00	15,00
9	11,85	8,15	20,00	40,00	16,00

Jednotlivé vzorky jsem pomocí nanášecího bloku nanesla do jamek v množství po 15 μ l (obr. 19). Po ukončení elektroforesy a oddělení zaostřovacího gelu jsem separační gel barvila pomocí barvicího roztoku EZBlue podle výše uvedeného postupu.



Obr. 19. Nanesení vzorků 1-9 na gel pro nativní elektroforesu

4.3.10 Porovnání dvou metod barvení Coomassie Blue

Porovnání citlivosti dvou typů barvení jsem provedla pomocí vzorků AST 1,8 mg/ml inkubovanými s MGO se stoupající koncentrací od 0 mM do 10 mM po dobu 22 dní při 37 °C. Z jednotlivých vzorků jsem odebrala vždy 13,32 µl roztoku a naředila je 16,68 µl 10% SDS. Dále jsem přidala 30 µl vzorkového pufru. Vzniklých 60 µl vzorku jsem denaturovala 3 minuty v inkubátoru při 99 °C. Do první jamky jsem nanesla 5 µl molekulového markeru a do ostatních jamek jsem nanesla 10 µl vzorku 1-8. Tutéž sérii vzorků jsem nanesla na druhý gel. Po ukončení elektroforesy a odstranění zaostřovacích gelů jsem jeden separační gel barvila pomocí Coomassie Blue II a druhý gel jsem barvila pomocí roztoku EZBlue.

4.3.11 Western blotting

Imunoblotting se provádí ihned po ukončení SDS-PAGE. Po oddělení zaostřovacího gelu se separační gel ponoří do blotovacího pufru, v němž se nechá plavat několik minut. Pak se sestaví blotovací sendvič.

Postupuje se od černé části blotovacího zařízení: houbička, dále jeden silný filtrační papír, které se nejprve namočí do blotovacího pufru, a gel. Na něj se položí membrána z fluorovaného polyvinylu (PVDF), která se nejprve namočí na 5 minut do methanolu a poté se ještě namočí do blotovacího pufru. Na membránu se přiloží silný filtrační papír a houbička, opět namočené v blotovacím pufru. Blotovací sendvič se opatrně zavře a vloží se do blotovací vaničky. Do vaničky se vloží ledítko s ledem a vanička se naplní blotovacím pufrem tak, aby byl ponořen celý sendvič. Celá vanička se umístí do ledové lázně a připojí se ke zdroji konstantního napětí. Přenos na membránu probíhá při napětí 100 V 2 hodiny. Po skončení blottingu se membrána přenesení do skleněné misky a koupe se vždy s přibližně 25 ml roztoku podle následující tabulky (tab. 16). Všechny roztoky musí mít laboratorní teplotu.

Tab. 16: Průběh koupání blotovací membrány v lázních po skončení Western blottingu

Lázeň	Čas
TBS	1 min
TBST s 8 % mléka	Přes noc v lednici
TBST	2 x 5 min
Primární protilátka	45 min
TBST	6 x 5 min
AP-sekundární protilátka	45 min
TBST	6 x 5 min
TBS	2 x 5 min
AP-pufr	2 x 5 min

Poté, co se slije AP-pufr, se na membránu opatrně napipetují 2 ml barvícího roztoku. Barvení se zastaví redestilovanou vodou v okamžiku, kdy jsou proužky již zřetelně viditelné, ale pozadí ještě není obarvené. Pak se membrána nechá sušit mezi filtračními papíry asi po dobu 30 minut.

4.3.12 Sledování vlivu koncentrace MGO na vznik cross-linků a agregátů AST pomocí SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí

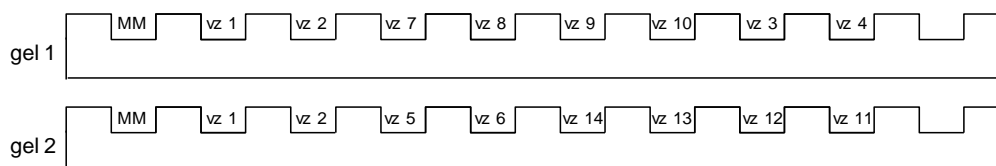
Použila jsem vzorky AST 1,8 mg/ml inkubované s MGO o vzrůstající koncentraci (od 0 do 10 mM) inkubované po dobu 22 dní při 37°C. Do první jamky jsem nanasla 5 μ l molekulového markeru. Do dalších jamek jsem nanášela 10 μ l směsi obsahující 4 μ g denaturovaného proteinu. Po ukončení elektroforesy jsem postupovala podle výše uvedeného postupu pro Western blotting. Po ukončení blotování a vysušení membrány jsem PVDF membránu skenovala na přístroji GelDoc a určila molekulovou hmotnost jednotlivých proužků pomocí programu Quantity One.

4.3.13 Sledování vlivu koncentrace MGO na náboj AST pomocí nativní PAGE

Použila jsem vzorky AST 1,8 mg/ml inkubované s MGO o vzrůstající koncentraci (0-8 mM) inkubované po dobu 22 dní při 37°C. Do každé jamky jsem pomocí nanášecího bloku nanasla vždy 15 µl směsi obsahující 13 µg nativního proteinu. Po ukončení elektroforesy a oddělení zaostřovacího gelu jsem separační gel barvila pomocí barvicího roztoku EZBlue podle výše uvedeného postupu. Gel jsem pak naskenovala na GelDoc XR a určila hodnoty R_f pomocí programu Quantity One.

4.3.14 Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE

Použila jsem vzorky AST 1,8 mg/ml inkubované s MGO o koncentraci 0,5 mM a různými koncentracemi antioxidantů po dobu 22 dní při 37°C. Do první jamky jsem nanasla 5 µl molekulového markeru. Do dalších jamek jsem nanášela 10 µl směsi obsahující 4 µg denaturovaného proteinu. Vzorky jsem nanášela v pořadí podle následujícího obrázku (obr. 20).

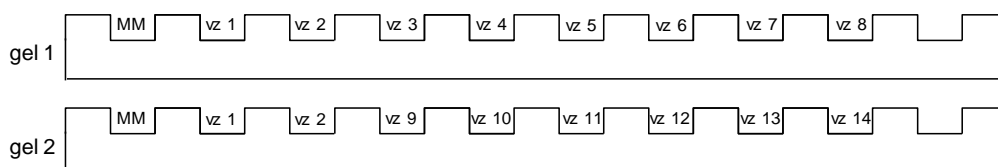


Obr. 20. Nanesení vzorků na gel 1 a 2 pro SDS-PAGE

Pro vizualizaci jsem použila barvení stříbrem (Silver Staining). Gel jsem poté skenována na přístroji GelDoc a určila molekulovou hmotnost jednotlivých proužků pomocí programu Quantity One.

4.3.15 Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí

Použila jsem vzorky AST 1,8 mg/ml inkubované s MGO o koncentraci 0,5 mM a různými koncentracemi antioxidantů inkubované po dobu 22 dní při 37°C . Do první jamky jsem nanesla 5 μ l molekulového markeru. Do dalších jamek jsem nanášela 10 μ l směsi obsahující 4 μ g denaturovaného proteinu. Vzorky jsem nanášela v pořadí na následujícím obrázku (obr. 21).

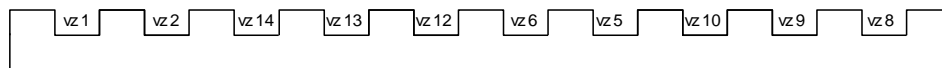


Obr. 21. Nanesení vzorků na gel 1 a 2 pro Western blotting

Po ukončení elektroforesy jsem postupovala podle výše uvedeného postupu pro Western blotting. Po ukončení blotování, obarvení a vysušení membrány jsem PVDF membránu skenovala na přístroji GelDoc a určila molekulovou hmotnost jednotlivých proužků pomocí programu Quantity One.

4.3.16 Sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí nativní PAGE

Použila jsem vzorky AST 1,8 mg/ml inkubované s MGO o koncentraci 0,5 mM a různými koncentracemi antioxidantů inkubované po dobu 22 dní při 37°C. Do každé jamky jsem nanášela 15 µl směsi obsahující 13 µg nativního (nedenaturovaného) proteinu. Provedla jsem elektroforesu pouze jednoho gelu a jen s některými vzorky antioxidantů. Vzorky jsem nanášela v pořadí podle následujícího obrázku (obr. 22)



Obr. 22 Nanesení vzorků na gel pro nativní elektroforesu

K vizualizaci jsem použila barvení pomocí roztoku EZBlue. Gel jsem poté skenována na přístroji GelDoc XR a určila hodnoty R_f pomocí programu Quantity One.

5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace SDS-PAGE a následné imunochemické detekce AGE produktů pro sledování průběhu glykace AST methylglyoxalem

5.1.1 Určení vhodné koncentrace separačního gelu a nanášeného množství bílkoviny

5.1.1.1 SDS-PAGE s 12,5% separačním gelem

Při optimálním rozlišení proteinů by měla být relativní mobilita (R_f) sledovaného proteinu v rozmezí hodnot 0,55-0,6. Při použití 12,5% separačního gelu (tab. 17-19, obr. 23-25) byl hlavní proužek monomeru AST (asi 45 kDa) zřetelný, ale s nedostatečnou relativní mobilitou ($R_f = 0,39$). Pro glykační produkty, které mají nižší pohyblivost než AST (více než 130 kDa), byla separace nedostatečná.

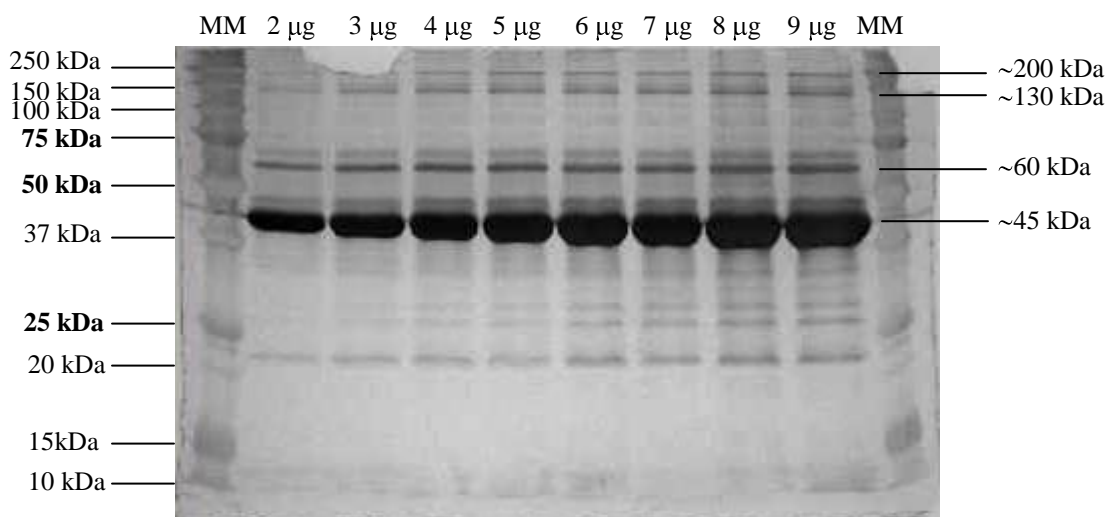
Nanášela jsem 2 až 9 μg AST na jamku. Jako vhodné množství nanášeného proteinu se ukázala koncentrace 4 μg AST vzhledem ke zřetelnosti a tvaru hlavního proužku i viditelnosti vzniklých glykačních produktů. U nižších koncentrací AST bylo obtížné rozpoznat polohu proužků s glykačními produkty. U vyšších koncentrací byly proužky glykačních produktů zřetelnější, ale proužek AST zasahoval i do okolních jamek.

Pro detekci proteinů v gelu jsem použila 2 metody barvení. Barvení pomocí Silver Stainingu (obr. 23) je o několik řádů citlivější, na gelu tak dochází k zobrazení mnoha proužků, které pravděpodobně patří jiným bílkovinám než AST. Barvení pomocí Coomassie Blue R-250 (obr. 24, 25) je méně citlivé, glykační produkty nejsou vidět zřetelně, je však možné separované proužky kvantifikovat.

Obarvené gely jsem vyfotografovala digitálním fotoaparátem Olympus (obr. 24) a naskenovala jsem je na aparátu GelDoc XR (obr. 23, 25). Při špatném rozlišení některých proužků jsem v programu Quantity One invertovala barvy snímku pořízeného na GelDocu XR (obr. 25).

Tab. 17: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 12,5% separačního gelu, barveno metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

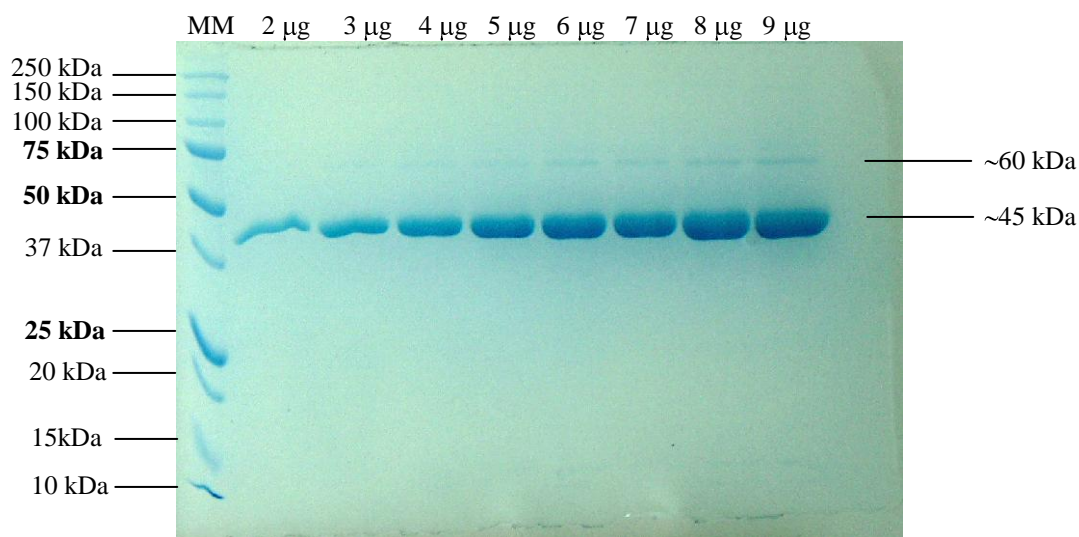
Gel separační	12,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	60 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 µg/jamka
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 23. Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 12,5% separačním gelem, barveno metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Tab. 18: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 12,5% separačního gelu, barvení metodou Coomassie Blue I, zobrazeno jako digitální fotografie

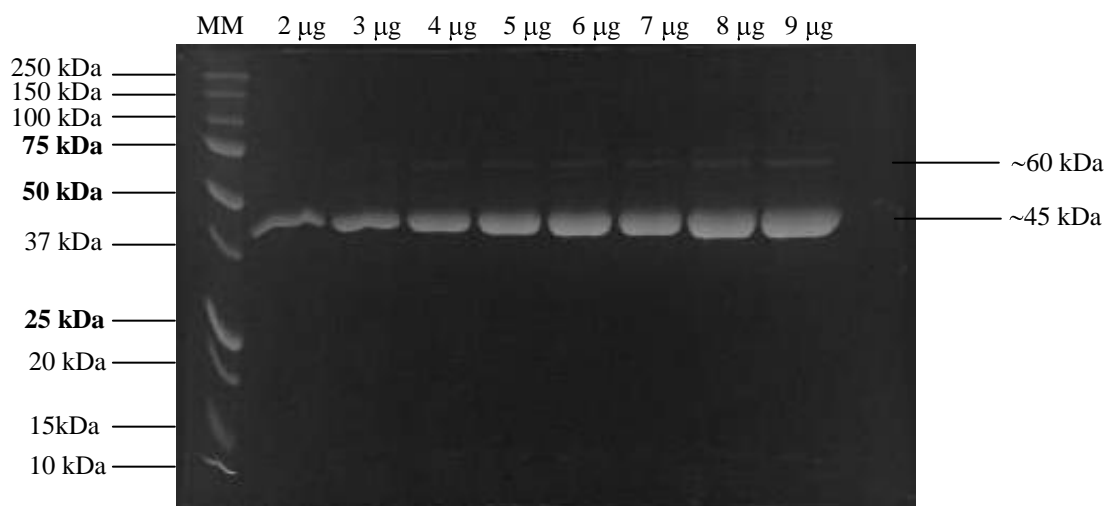
Gel separační	12,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	60 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 µg/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue I
Zobrazeno	Digitální fotografie



Obr. 24. Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 12,5% separačním gelem, barveno metodou Coomassie Blue I, zobrazeno jako digitální fotografie.

Tab. 19: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 12,5% separačního gelu, barvení metodou Coomassie Blue I, zobrazeno pomocí GelDoc XR v invertních barvách.

Gel separační	12,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	60 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 µg/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue I
Zobrazeno	GelDoc XR – invertní zobrazení



Obr. 25 Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 12,5% separačním gelem, barveno metodou Coomassie Blue I, zobrazeno pomocí GelDoc XR v invertních barvách.

5.1.1.2 SDS-PAGE s 10% separačním gelem

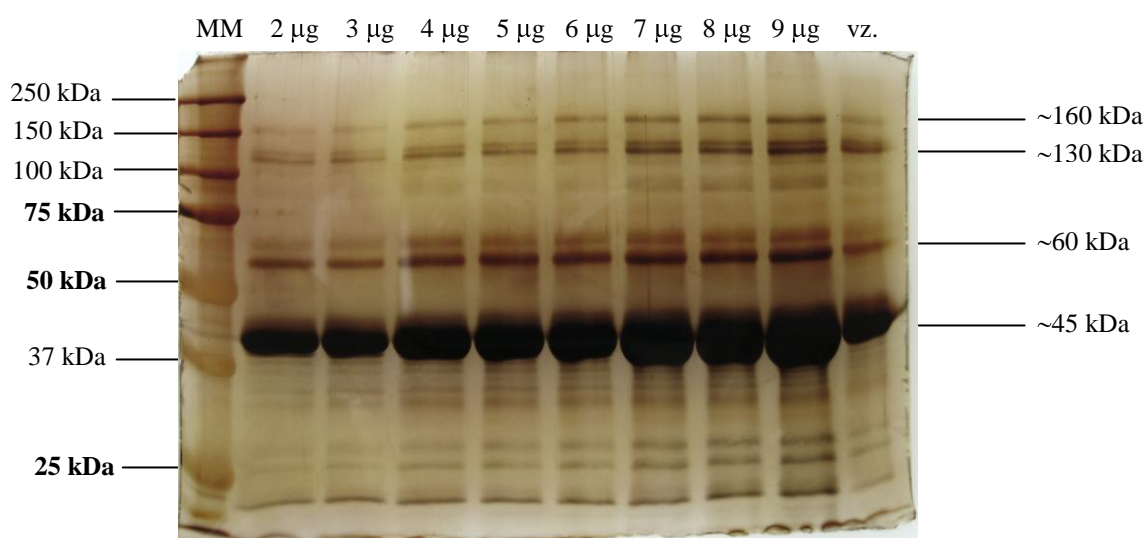
Při použití 10% separačního gelu byly jednotlivé proužky zřetelné s vhodnou relativní mobilitou ($R_f = 0,59$). Proužky obsahující glykační produkty byly rovněž dostatečně separovány.

Jako v případě 12,5% gelu jsem nanášela 2 až 9 μg AST na jamku. Jako vhodné množství nanášeného proteinu se opět ukázala koncentrace 4 μg AST vzhledem ke zřetelnosti a tvaru proužku AST i viditelnosti vzniklých glykačních produktů. U nižších koncentrací byl proužek AST zřetelný, ale viditelnost proužků předpokládaných glykačních produktů byla nízká. U vyšších koncentrací byly proužky glykačních produktů zřetelnější, ale proužek AST byl již příliš velký.

Pro detekci proužků jsem použila 2 metody barvení: Silver Staining (obr. 26-27) a Coomassie Blue R-250 (obr. 28-29). Obarvené gely jsem vyfotografovala digitálním fotoaparátem Olympus (obr. 26 a 28) a naskenovala jsem je na aparátu GelDoc XR (obr. 27). Při špatném rozlišení některých proužků jsem v programu Quantity One invertovala barvy snímku pořízeného na GelDocu XR (obr. 29).

Tab. 20: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Silver Staining, zobrazeno jako digitální fotografie.

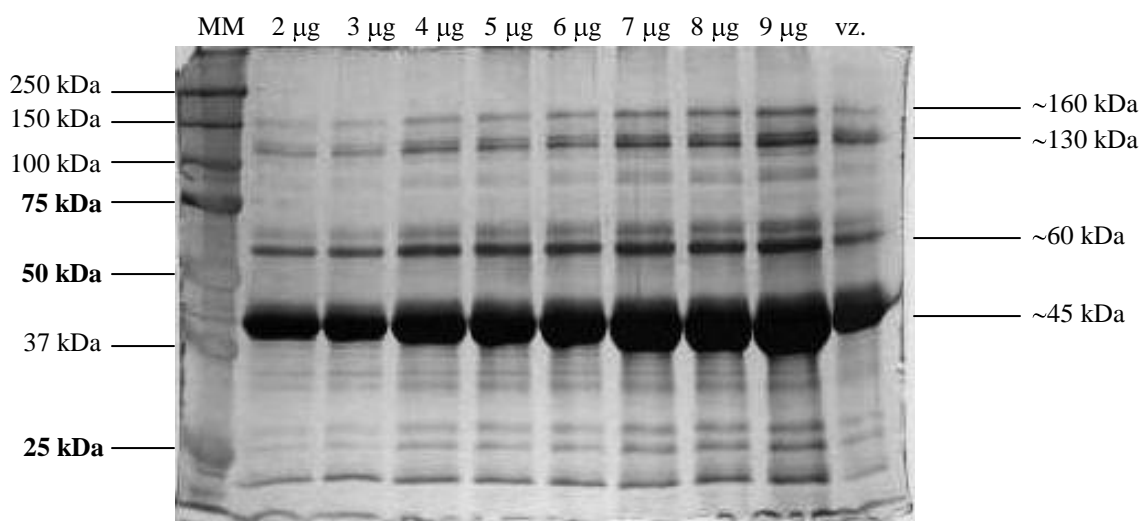
Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	120 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 µg/jamka, vz – 4 µg AST + MGO
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	Digitální fotografie



Obr. 26. Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 10% separačním gelem, koncentrace enzymu 1,8 mg/ml, vzorek AST 1 mg/ml + 0,5 mM MGO inkubovaný 16 dní při 37°C, barveno metodou Silver Staining, snímáno jako digitální fotografie.

Tab. 21: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

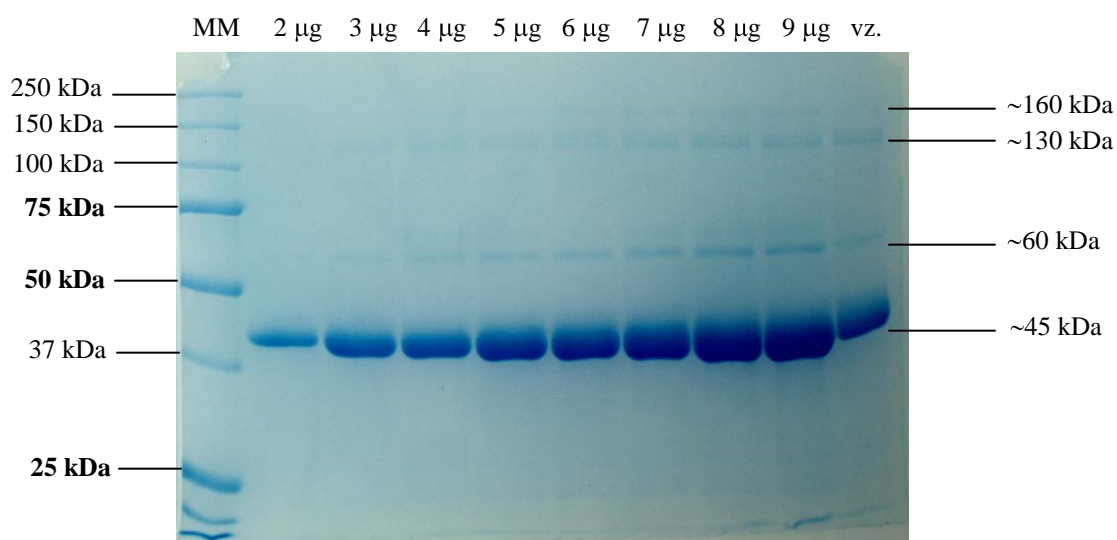
Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	120 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 µg/jamka, vz – 4 µg
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 27. Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 10% separačním gelem, koncentrace enzymu 1,8 mg/ml, vzorek AST 1 mg/ml + 0,5 mM MGO inkubovaný 16 dní při 37°C, barveno metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Tab. 22: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Coomassie Blue I, zobrazeno jako digitální fotografie.

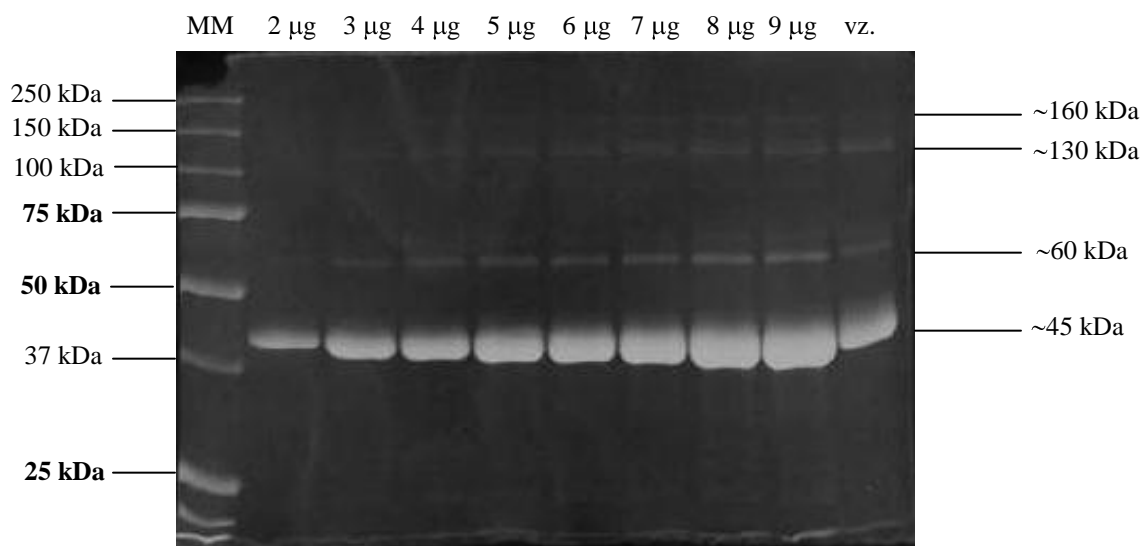
Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	120 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 μ g/jamka, vz – 4 μ g
Metoda barvení	Coomassie Blue I
Zobrazeno	Digitální fotografie



Obr. 28. Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 10% separačním gelem, koncentrace enzymu 1,8 mg/ml, vzorek AST 1 mg/ml + 0,5 mM MGO inkubovaný 16 dní při 37°C, barveno metodou Coomassie Blue I, zobrazeno jako digitální fotografie

Tab. 23: Parametry pokusu pro určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE za použití 10% separačního gelu, barveno metodou Coomassie Blue I, zobrazeno pomocí GelDoc XR v invertních barvách.

Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 10 mM
Délka inkubace vzorku	120 minut při 60°C
Nanášené množství	2-9 µg/jamka, vz – 4 µg
Metoda barvení	Coomassie Blue I
Zobrazeno	GelDoc XR – invertní



Obr. 29. Určení vhodné koncentrace separačního gelu pro optimální rozlišení separace AST a glykačních produktů a zjištění vhodného množství nanášeného AST glykovaného methylglyoxalem pomocí SDS-PAGE s 10% separačním gelem, koncentrace enzymu 1,8 mg/ml, vzorek AST 1 mg/ml + 0,5 mM MGO inkubovaný 16 dní při 37°C, barveno metodou Coomassie Blue I, zobrazeno pomocí GelDoc XR v invertních barvách.

5.1.2 Vliv koncentrace methylglyoxalu na tvorbu vysokomolekulárních AGE produktů a cross-linků hodnocená pomocí SDS-PAGE

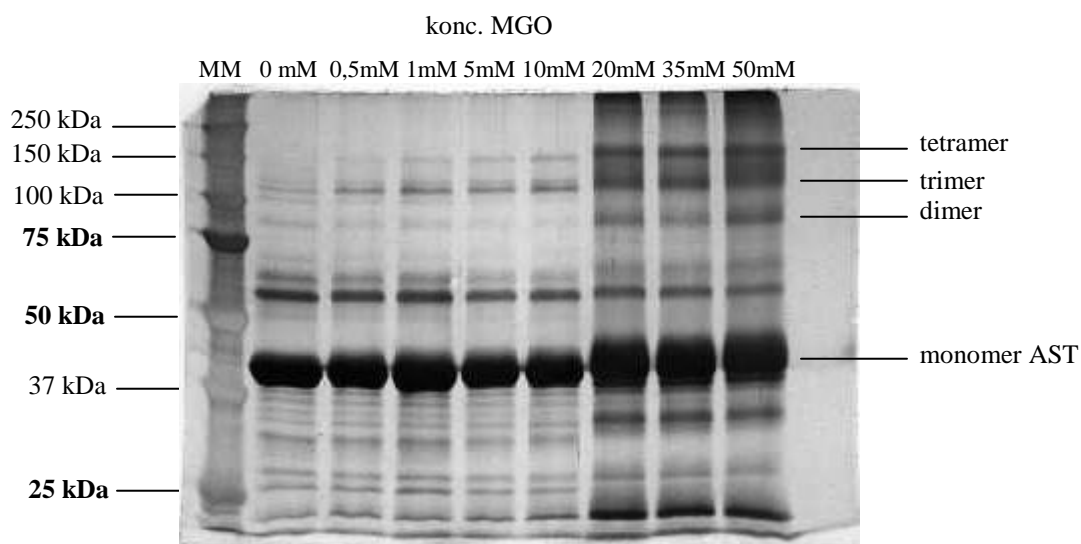
5.1.2.1 Použití 0-50 mM methylglyoxalu, porovnání dvou metod barvení

Pro tento pokus byly použity inkubační směsi obsahující stejné množství AST (1,8 mg/ml) a vzrůstající koncentraci MGO (0; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 35,0; 50,0 mM). Vzorky byly inkubovány 3 dny při 37°C a dále 135 min při 60 °C. Použila jsem 10% separační gel, na který jsem nanášela 4 µg AST na jamku. Gely byly barveny metodou Silver Staining a Coomassie Blue I, zobrazeny pomocí GelDocu XR. Výsledky jsou prezentovány v obrázcích 30 a 31.

Se stoupajícím množstvím MGO (do 10 mM) v inkubační směsi je na obr. 31 patrný rovnoměrný vzestup vzniku především trimerů a tetramerů AST (proužky s molekulovou hmotností 130 a 160 kDa). Koncentrace nad 10 mM MGO je již pro sledování glykace pomocí SDS-PAGE příliš vysoká. Při inkubaci došlo ve vzorcích s koncentrací MGO 20 mM, 35 mM a 50 mM ke vzniku sraženin. U těchto tří vzorku pak při elektroforese došlo k silnému zabarvení celé dráhy příslušného vzorku. Oproti nižším koncentracím je ale dobře viditelná oblast dimerů AST (asi 90 kDa). Na gelu barveném méně citlivým Coomassie Blue (obr. 31) vidíme velmi slabě pouze trimery a tetramery. Je zde vidět úbytek množství AST, ke kterému došlo v důsledku vysrážení AST v inkubační směsi.

Tab. 24: Parametry pokusu pro určení množství vznikajících glykačních produktů v závislosti na množství MGO (0-50 mM) za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc.

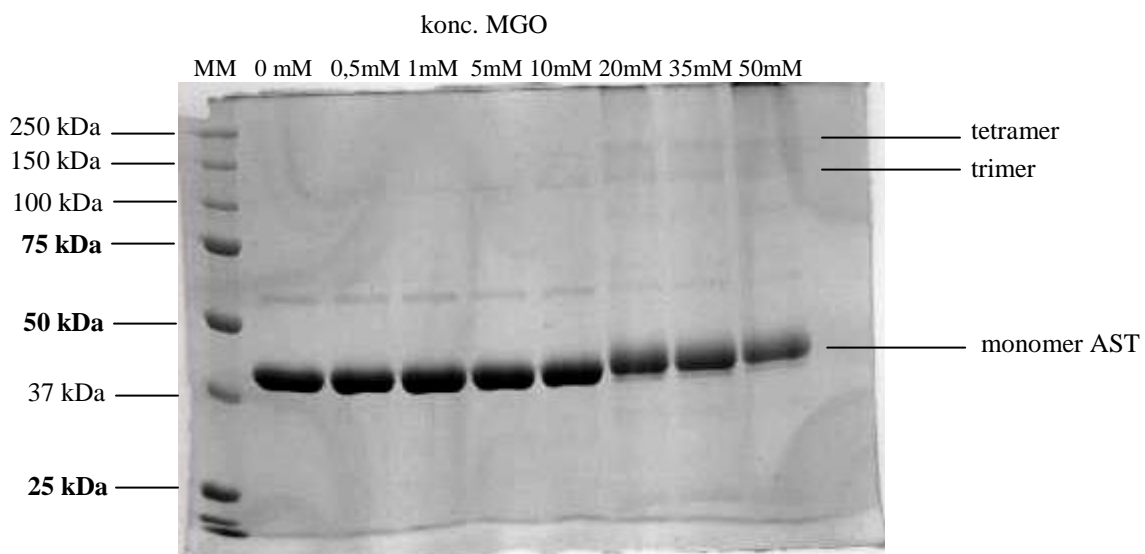
Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0-50 mM
Délka inkubace vzorku	3 dny při 37°C, 135 min při 60 °C
Nanášené množství AST	4 µg/jamka
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 30. Vznik glykačních produktů v závislosti na množství MGO (0-50 mM) za použití SDS-PAGE s 10% separačním gelem, barveno metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Tab. 25: Parametry pokusu pro určení množství vznikajících glykačních produktů v závislosti na množství MGO za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Coomassie Blue I, zobrazeno pomocí GelDoc.

Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0-50 mM
Délka inkubace vzorku	3 dny při 37°C, 135 min při 60 °C
Nanášené množství AST	4 µg/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue I
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 31. Vznik glykačních produktů AST v závislosti na množství MGO (0-50 mM) za použití SDS-PAGE s 10% separačním gelem, barveno metodou Coomassie Blue I, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

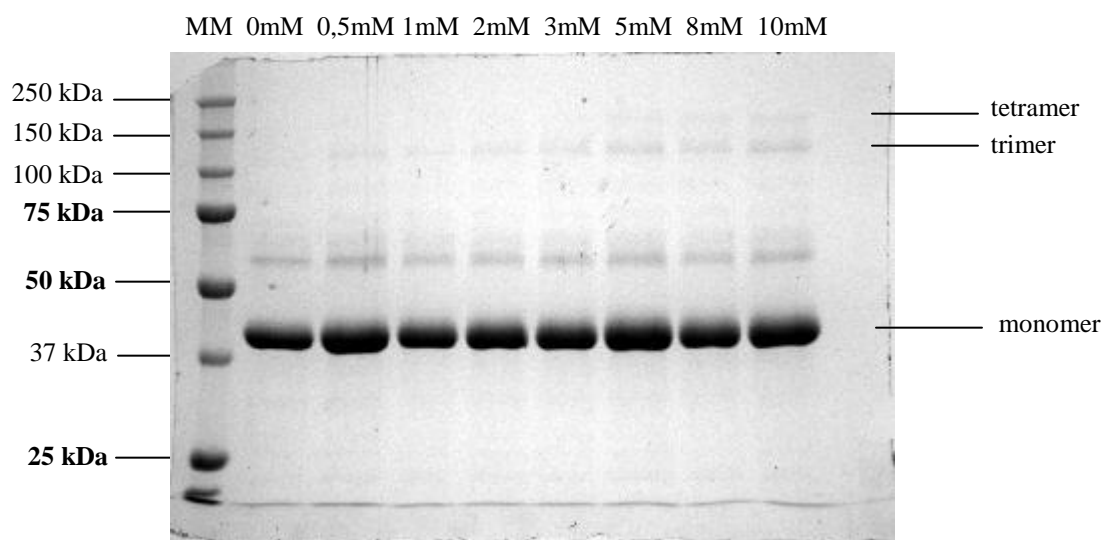
5.1.2.2 Použití 0-10 mM methylglyoxalu, porovnání citlivosti barvení pomocí Coomassie Blue R-250 a G-250 (EZBlue)

Pro následující pokus byly použity inkubační směsi obsahující stejné množství AST (1,8 mg/ml) se vzrůstající koncentrací MGO (0-10 mM). Vzorčky byly inkubovány 22 dní při 37 °C. Použila jsem 10% separační gel, na který jsem nanášela 4 µg AST na jamku. Výsledky jsou prezentovány v obrázcích 32 a 33.

U obou typů barvení je se stoupajícím množstvím MGO v inkubační směsi patrný vznik trimerů (~130 kDa) a při vyšších koncentracích MGO (5, 8 a 10 mM) i tetramerů AST (~160 kDa). Barvení pomocí koloidního roztoku Coomassie Blue G-250 je rychlejší a citlivější a oproti barvení barvivem CB typu R-250 má menší pozadí. Oproti Coomassie Blue R-250 jsou lépe viditelné proužky v oblasti 60 kDa a slabě viditelné proužky i v oblasti 65 kDa.

Tab. 26: Parametry pokusu pro určení množství vznikajících glykačních produktů v závislosti na množství MGO za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Coomassie Blue G-250, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

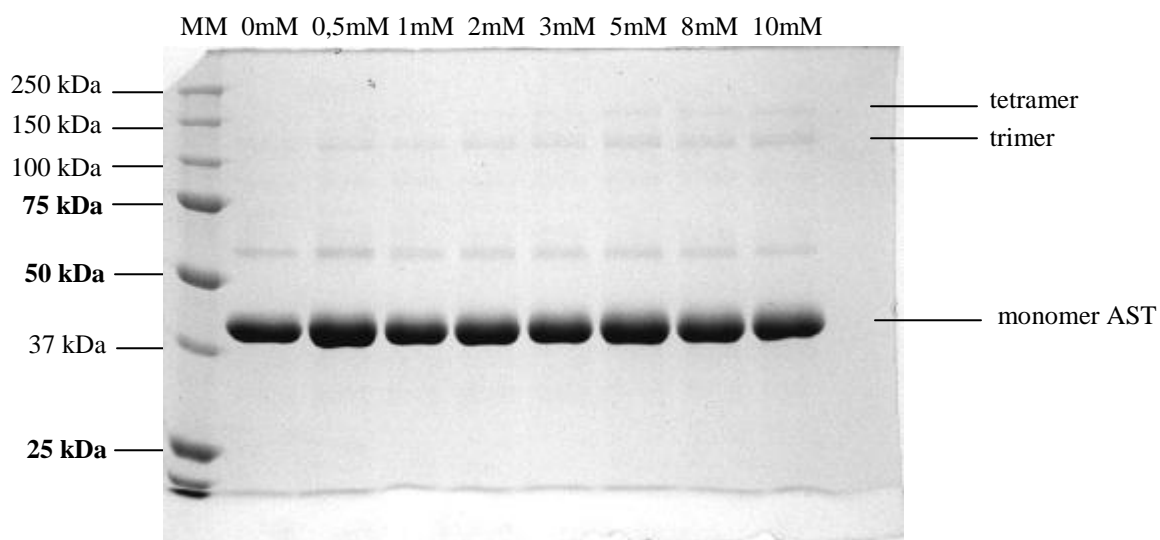
Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0-10 mM
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	4 µg/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue G - EZBlue
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 32. Vznik glykačních produktů v závislosti na množství MGO (0-10 mM) za použití SDS-PAGE s 10% separačním gelem, barveno metodou Coomassie Blue G - EZBlue, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Tab. 27: Parametry pokusu pro určení množství vznikajících glykačních produktů v závislosti na množství MGO za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Coomassie Blue R II, zobrazeno jako digitální fotografie.

Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0-10 mM
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	4 µg/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue R II
Zobrazeno	GelDoc XR



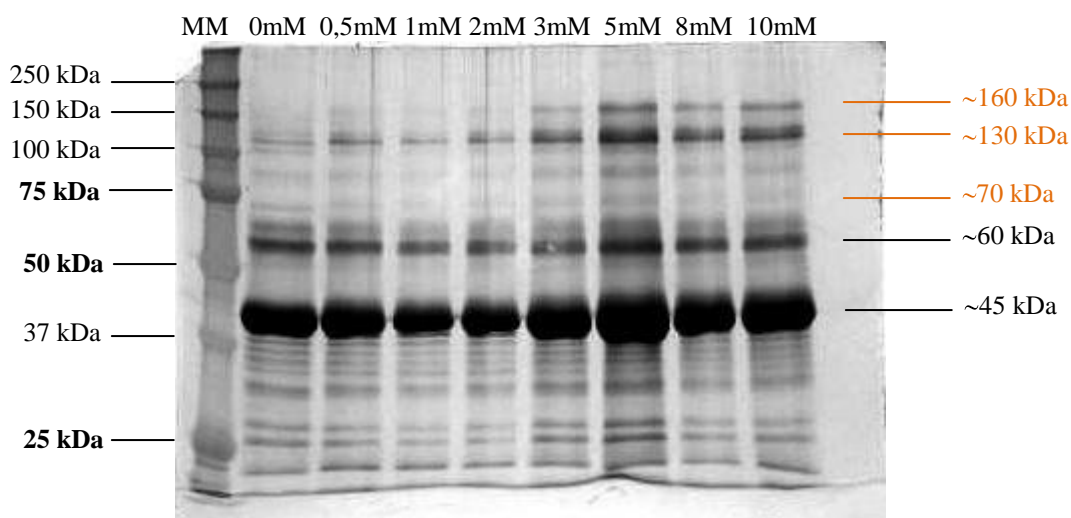
Obr. 33. Vznik glykačních produktů v závislosti na množství MGO (0-10 mM) za použití SDS-PAGE s 10% separačním gelem, barveno metodou Coomassie Blue R II, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

5.1.3 Vliv koncentrace methylglyoxalu na tvorbu vysokomolekulárních AGE produktů a cross-linků hodnocená pomocí SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí

Pro sledování vlivu koncentrace MGO na vznik cross-linků a agregátů AST pomocí SDS-PAGE s následnou specifickou detekcí AGEs pomocí Western blottingu jsem nejprve provedla SDS-PAGE dvou gelů za stejných podmínek se stejným rozložením a koncentrací vzorků. Jeden z gelů jsem pak obarvila pomocí stříbra a druhý jsem podrobila Western blottingu. Při barvení stříbrem (obr. 34) jsou patrné hlavně proužky v oblasti 60 kDa a dále trimery (~130 kDa) a tetramery (~160 kDa) AST. Při imunochemické detekci AGEs s primární protilátkou proti AGE produktům (obr. 35) jsou viditelné glykační produkty v oblasti 70 kDa a trimery AST (~130 kDa), při vyšších koncentracích MGO (od 3 mM) i tetramery (v oblasti ~160 kDa).

Tab. 28: Parametry pokusu pro sledování vlivu koncentrace MGO na vznik glykačních produktů pomocí SDS-PAGE jako porovnání k imunochemické detekci AGEs za použití 10% separačního gelu, barvení metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

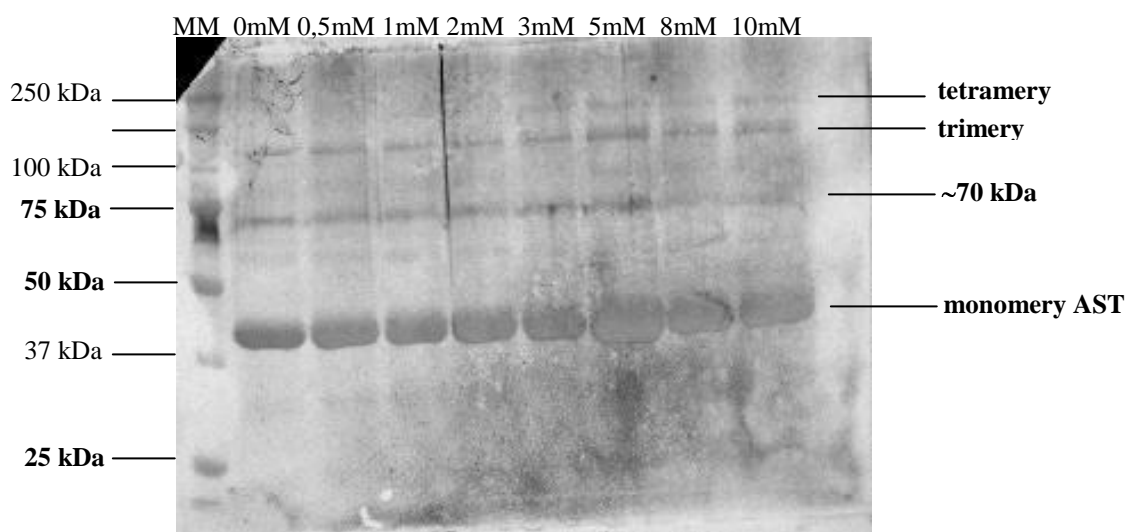
Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0-10 mM
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	4 µg /jamka
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 34. Sledování vlivu množství MGO v inkubační směsi s AST na vznik glykačních produktů za pomoci SDS-PAGE s 10% separačním gelem jako porovnání k imunochemické detekci AGEs, barveno metodou Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR. Barevně zvýrazněny proužky, které byly kromě AST viditelné po specifické detekci AGEs Western blottingem.

Tab. 29: Parametry pokusu pro sledování vlivu koncentrace MGO na vznik glykačních produktů pomocí Western blottingu s 10% separačním gelem pro SDS-PAGE, vzorky AST 1,8 mg/ml + MGO 0–10 mM byly inkubovány 22 dní při 37°C, na gel pro SDS-PAGE byly nanášeny 4 µg proteinu s následným elektroforetickým Western blottingem, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Metoda sledování	Western blotting
Druh membrány	PVDF
Způsob blottingu	Elektroforeticky tankovou metodou
Primární protilátka	Polyclonal antibody to AGE (Rabbit)
Sekundární protilátka	Polyclonal antibody to Rabbit IgG - AP
detekce	Alkalická fosfatasa, barvení NBT a BCIP
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 35. Sledování vlivu množství MGO v inkubační směsi s AST na vznik glykačních produktů pomocí po SDS-PAGE elektroforeticky provedeného Western blottingu na PVDF membránu, detekováno pomocí barevné reakce založené na aktivitě alkalické fosfatasy konjugované se sekundární protilátkou.

5.2 Optimalizace nativní PAGE pro sledování průběhu glykace AST methylglyoxalem

5.2.1 Určení vhodného množství nanášené bílkoviny

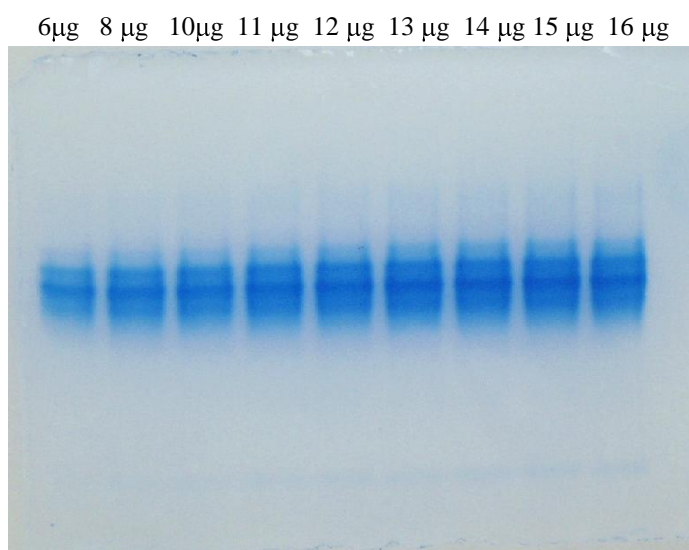
Pro nativní elektroforesu jsem použila 7,5% separační a 4% zaostřovací gel. Nanášela jsem 6 až 16 μg AST. Ze získaných výsledků jsem jako vhodné množství nanášeného proteinu pro další experimenty zvolila koncentraci 13 μg AST vzhledem ke zřetelnosti a tvaru proužku AST (tab. 30 a 31, obr. 36 a 37). Při tomto množství nanášené bílkoviny byla relativní mobilita AST 0,549.

Pro detekci proužků jsem použila metodu barvení pomocí Coomassie Blue G - EZBlue, protože se u SDS-PAGE ukázala jako citlivější, navíc je její provedení rychlejší a snazší. Gely se mi nepodařilo obarvit pomocí stříbra.

Pro zobrazení byly použity metody vyfotografování digitálním fotoaparátem (obr. 36) a zobrazení pomocí GelDocu XR (obr. 37), které mělo lepší rozlišení.

Tab. 30: Parametry pokusu zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST za použití 7,5% separačního gelu pro nativní elektroforesu, barvení metodou Coomassie Blue G - EZBlue, zobrazeno jako digitální fotografie.

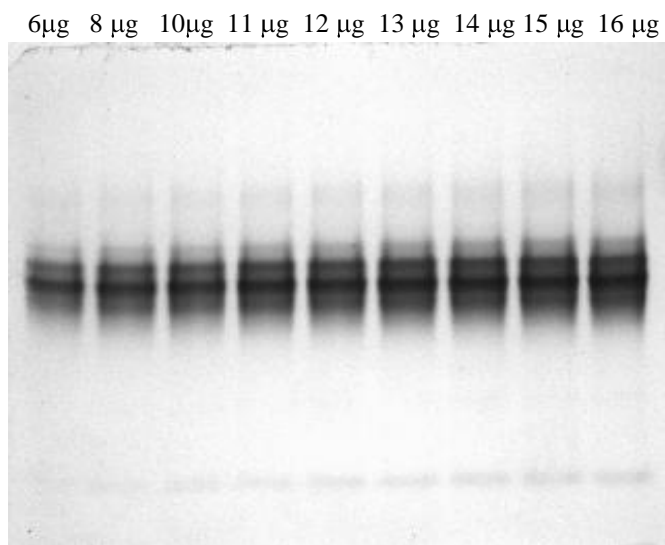
Gel separační	7,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml
Nanášené množství AST	6-16 μ g/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue G - EZBlue
Zobrazeno	Digitální fotografie



Obr. 36. Určení vhodné koncentrace AST nanášeného na gel pro nativní elektroforesu se 7,5% separačním gelem, barvení metodou Coomassie Blue G - EZBlue, zobrazeno jako digitální fotografie.

Tab. 31: Parametry pokusu zjištění vhodné koncentrace nanášeného AST za použití 7,5% separačního gelu pro nativní elektroforesu, barvení metodou Coomassie Blue G - EZBlue, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Gel separační	7,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml
Nanášené množství AST	6-16 μ g/jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue G - EZBlue
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 37. Určení vhodné koncentrace AST nanášeného na gel pro nativní elektroforesu se 7,5% separačním gelem, barvení metodou Coomassie Blue G - EZBlue, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

5.2.2 Vliv koncentrace methyglyoxalu na náboj molekuly AST

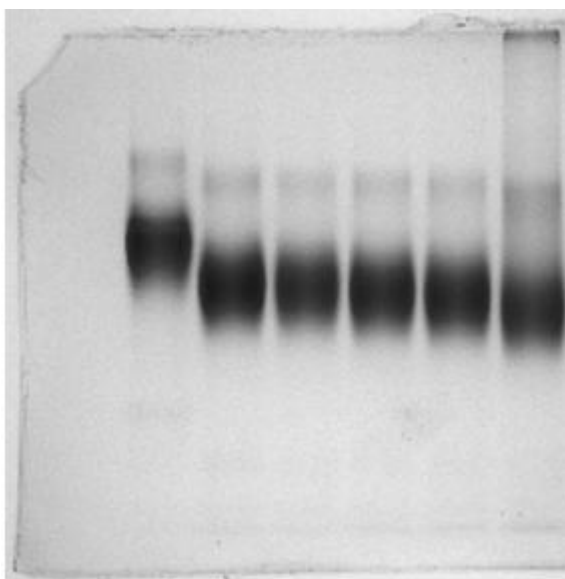
Pro následující pokus byly použity inkubační směsi obsahující stejné množství AST (1,8 mg/ml) se vzrůstající koncentrací MGO (0-8 mM). Vzorky byly inkubovány 22 dní při 37°C. Použila jsem 7,5% separační gel, na který jsem nanášela 13 µg AST na jamku. Výsledky jsou prezentovány v obrázku 38 a tabulce 33.

Vzrůstající koncentrace methyglyoxalu v inkubačních směsích způsobila progresivní modifikaci molekuly AST, která se projevila úbytkem kladných nábojů basických aminokyselin a tedy i zvýšenou mobilitou ve srovnání s kontrolním vzorkem (pouze AST). Jako příklad uvádím 3 mM MGO, kde došlo po 22 dnech inkubace k 25% nárůstu mobility vzorku ve srovnání s kontrolou.

Tab. 32: Parametry pokusu pro sledování změn v náboji molekuly AST v závislosti na množství MGO (0-8 mM) za použití 7,5% separačního gelu, barvení metodou CB G-EZ Blue, zobrazeno pomocí GelDoc.

Gel separační	7,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0-8 mM
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	13 µg /jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue – EZ Blue
Zobrazeno	GelDoc XR

koncentrace MGO (mM) 0 0,5 1,0 2,0 3,0 8,0



Obr. 38. Vliv koncentrace methylglyoxalu (0-8 mM) na náboj molekuly AST. Použit 7,5% separační gel pro nativní PAGE, barveno Coomassie Blue G-250, zobrazeno pomocí GelDoc XR, vyhodnoceno pomocí programu Quantity One.

Tab. 33: Vliv koncentrace methylglyoxalu (0-8 mM) na náboj molekuly AST. Hodnoceno pomocí relativních mobilit (R_f) jednotlivých vzorků a porovnáváno s migrací kontrolního vzorku.

Koncentrace MGO	0	0,5	1,0	2,0	3,0	8,0
R_f	0,433	0,507	0,523	0,535	0,539	0,575
Migrace (% kontroly)	100,0	119,3	120,8	123,0	124,9	131,3

5.3 Vliv antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem

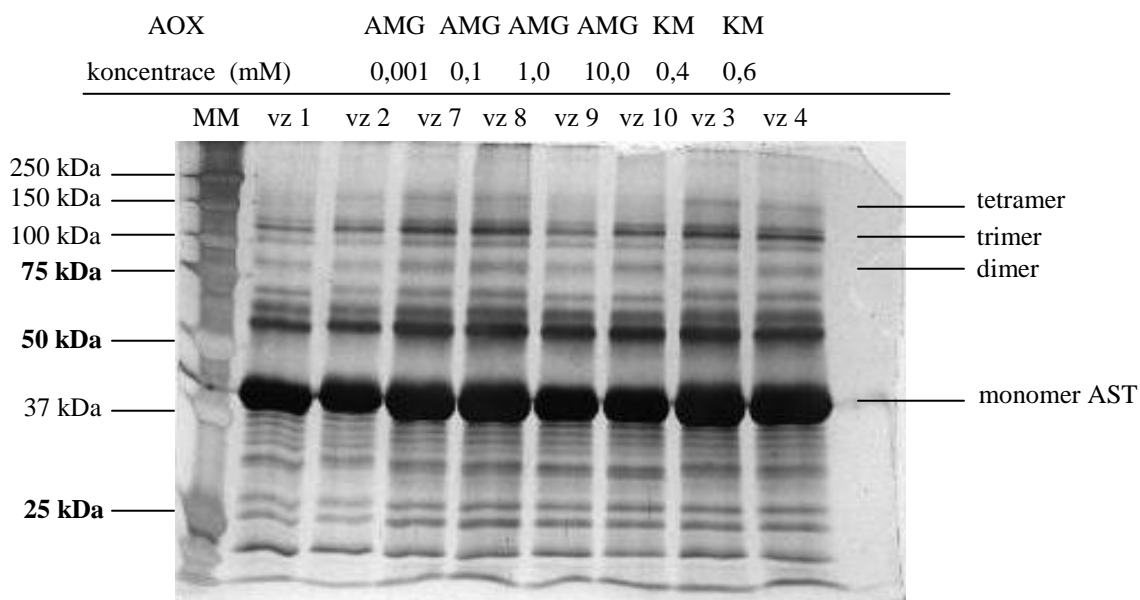
5.3.1 Hodnocení pomocí SDS-PAGE

Pro sledování vlivu antioxidantů na vznik vysokomolekulárních AGE produktů a agregátů AST pomocí SDS-PAGE jsem inkubovala směs AST 1,8 mg/ml s methylglyoxalem 0,5 mM a kyselinou močovou (0,4; 0,6; 0,8 a 1,2 mM), aminoguanidinem (0,001; 0,1; 1,0 a 10 mM) či kyselinou hydroxycitronovou (0,25; 0,5; 1,0 a 2,5 mM) po dobu 22 dní při 37 °C (obr. 39 a 40). Vzorky 1 (AST 1,8 mg/ml) a 2 (AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM) jsou kontrolní vzorky. Při dlouhodobé inkubaci vzorků o malém objemu i přes provedená opatření (uzavření parafilmem) docházelo k nerovnoměrnému odpařování. U některých vzorků tak došlo ke zvýšení koncentrace celého vzorku a proto je hodnocení vlivu AOX na glykaci v tomto případě obtížné.

Jako mírně protektivní se jeví aminoguanidin v koncentraci 1 mM (úbytek vzniku tetramerů a dimerů) a 10 mM (úbytek vzniku tetramerů) (obr. 39) a kyselina hydroxycitronová v koncentraci 1 mM (úbytek vzniku dimerů a tetramerů) (obr. 40). U ostatních vzorků je hodnocení nemožné.

Tab. 34: Parametry pokusu pro sledování vlivu aminoguanidinu (0,001; 0,1; 1,0 a 10 mM) a kyseliny močové (0,4 a 0,6 mM) na glykaci AST methylglyoxalem za použití 10% separačního gelu pro SDS-PAGE, barveno pomocí Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM + AOX
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	4 µg /jamka
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	GelDoc XR

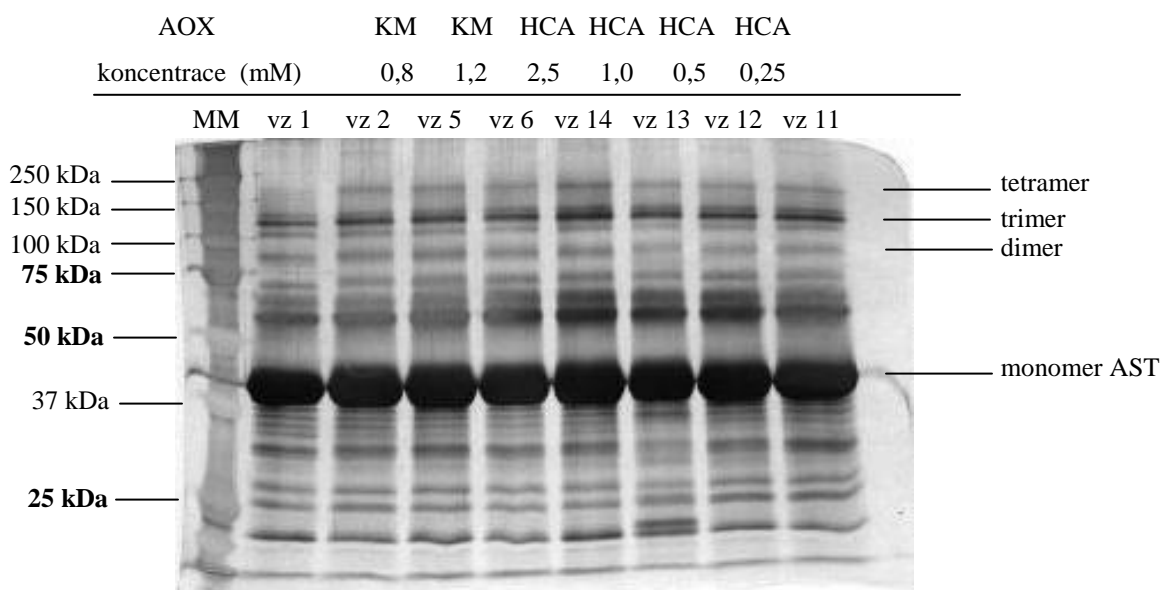


Obr. 39. Vliv antioxidantů kyseliny močové a aminoguanidinu na vznik glykačních produktů při glykaci AST methylglyoxalem, barveno pomocí Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

vzorek 1 - AST 1,8 mg/ml; vzorek 2 - AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM

Tab. 35: Parametry pokusu pro sledování vlivu kyseliny hydroxycitronové (0,25; 0,5; 1,0 a 2,5 mM) a kyseliny močové (0,8 a 1,2 mM) na glykaci AST methylglyoxalem za použití 10% separačního gelu pro SDS-PAGE, barveno pomocí Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Gel separační	10%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM + AOX
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	4 µg /jamka
Metoda barvení	Silver Staining
Zobrazeno	GelDoc XR



Obr. 40. Vliv antioxidantů kyseliny hydroxycitronové a kyseliny močové na vznik glykačních produktů při glykaci AST methylglyoxalem, barveno pomocí Silver Staining, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

vzorek 1 - AST 1,8 mg/ml; vzorek 2 - AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM

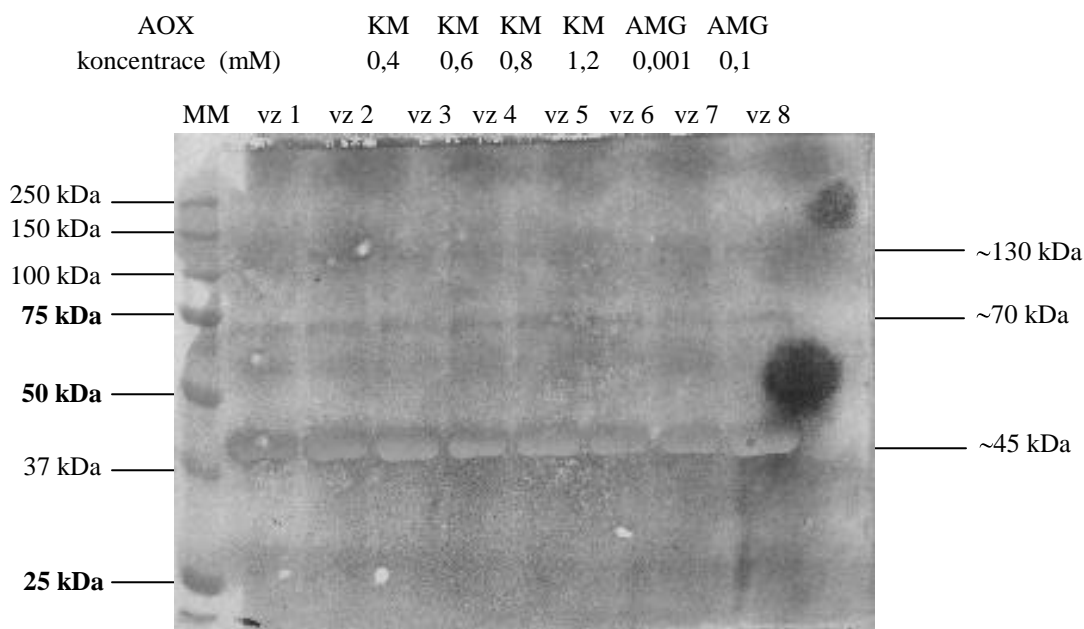
5.3.2 Hodnocení pomocí SDS-PAGE s následnou imunodetekcí

Pro sledování vlivu antioxidantů na vznik cross-linků a agregátů AST pomocí specifické imunodetekce AGEs jsem inkubovala směs AST 1,8 mg/ml s methylglyoxalem 0,5 mM a kyselinou močovou (0,4; 0,6; 0,8 a 1,2 mM), aminoguanidinem (0,001; 0,1; 1,0 a 10 mM) či kyselinou hydroxycitronovou (0,25; 0,5; 1,0 a 2,5 mM) po dobu 22 dní při 37°C. Vzorky 1 (AST 1,8 mg/ml) a 2 (AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM) jsou kontrolní vzorky.

Pro vizualizaci provedeného imunoblottingu jsem použila barevnou reakci založenou na reakci alkalické fosfatasy navázané na sekundární protilátce proti AGEs s barvivou NBT a BCIP. U tohoto typu vizualizace vzniká vysoké pozadí a proužky jsou hůře viditelné. Obrázky jsou špatně hodnotitelné i díky nerovnoměrnému obarvení a špatnému odstranění bublin před blottingem. Hodnocení je obtížné především u obr. 42. Na obr. 41 nevidíme ovlivnění glykace žádným vzorkem. Mírně protektivní vliv má kyselina hydroxycitronová v koncentracích 0,5; 1,0 a 2,5 mM při vzniku trimerů v oblasti přibližně 130 kDa (obr. 42). Vznik glykačních produktů v oblasti 70 kDa u těchto tří vzorků není možné vyhodnotit.

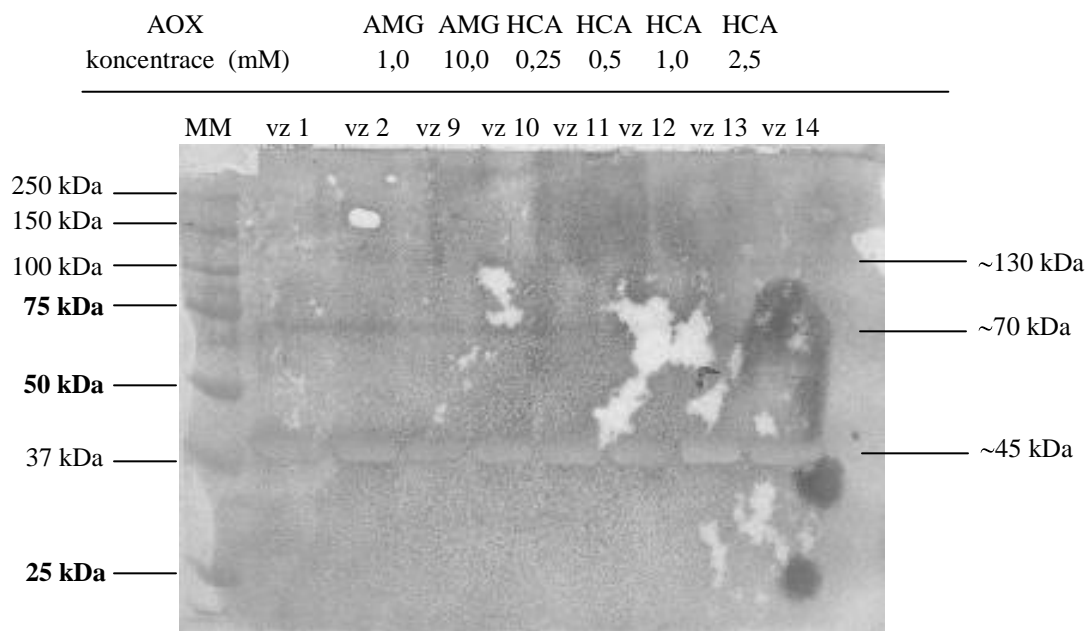
Tab. 36: Parametry pokusu pro sledování vlivu kyseliny močové (0,4; 0,6; 0,8 a 1,2 mM) a aminoguanidinu (0,001 a 0,1 mM) na glykaci AST methylglyoxalem pomocí imunoblottingu s 10% separačním gelem pro SDS-PAGE, vzorky byly inkubovány 22 dní při 37°C, na gel byly nanесeny 4 µg proteinu s následným elektroforeticky provedeným Western blottingem, zobrazeno jako digitální fotografie.

Metoda sledování	Western blotting
Druh membrány	PVDF
Způsob blottingu	Elektroforeticky tankovou metodou
Primární protilátka	Polyclonal antibody to AGE (Rabbit)
Sekundární protilátka	Polyclonal antibody to Rabbit IgG - AP
detekce	Alkalická fosfatasa, barvení NBT a BCIP
Zobrazeno	Digitální fotografie



Obr. 41. Vliv antioxidantů kyseliny močové (0,4; 0,6; 0,8 a 1,2 mM) a aminoguanidinu (0,001 a 0,1 mM) na vznik glykačních produktů při glykaci AST methylglyoxalem, po SDS-PAGE elektroforeticky provedený Western blotting na PVDF membránu, detekováno pomocí barevné reakce alkalické fosfatasy konjugované se sekundární protilátkou.

vzorek 1 – AST 1,8 mg/ml; vzorek 2 - AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM



Obr. 42. Vliv antioxidantů aminoguanidinu (1 a 10 mM) a kyseliny hydroxycitronové (0,25; 0,5; 1,0 a 2,5 mM) na vznik glykačních produktů při glykaci AST methylglyoxalem, po SDS-PAGE elektroforeticky provedený Western blotting na PVDF membránu, detekováno barevné reakce alkalické fosfatasy konjugované se sekundární protilátkou.
 vzorek 1 - AST 1,8 mg/ml; vzorek 2 - AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM

5.3.3 Hodnocení pomocí nativní elektroforesy

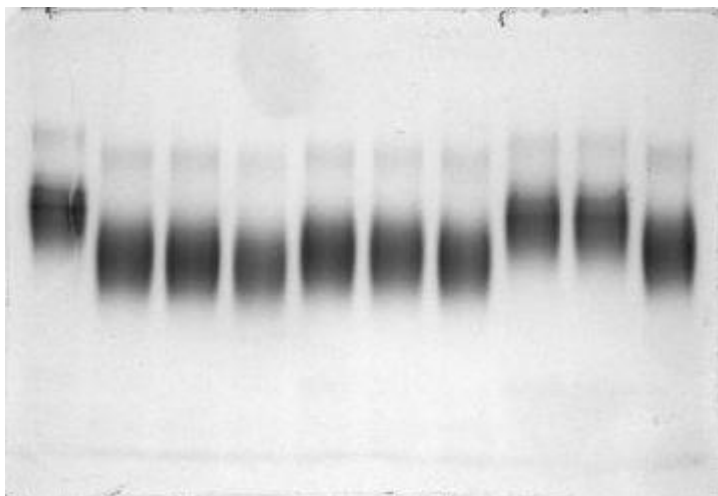
Pro sledování vlivu antioxidantů na glykaci AST pomocí nativní elektroforesy jsem inkubovala směs AST 1,8 mg/ml s methylglyoxalem 0,5 mM a kyselinou močovou (0,8 a 1,2 mM), aminoguanidinem (0,1; 1,0 a 10 mM) či kyselinou hydroxycitronovou (0,5; 1,0 a 2,5 mM) po dobu 22 dní při 37 °C. Vzorky 1 (AST 1,8 mg/ml) a 2 (AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM) jsou kontrolní vzorky.

Glykovaná AST (vzorek 2) má při nativní elektroforese vyšší pohyblivost ve srovnání se samotnou AST (obr. 43). Kyselina močová (pouze 1,2 mM) ukázala slabý ochranný účinek na změnu náboje AST vyvolanou methylglyoxalem. K mírnému snížení pohyblivosti došlo u vzorku s aminoguanidinem v koncentraci 0,1 mM. AMG v koncentracích 1 a 10 mM téměř úplně zastavil probíhající glykaci methylglyoxalem. Kyselina hydroxycitronová pozitivně ovlivnila probíhající glykaci pouze v koncentraci 0,5 mM a její účinek byl srovnatelný s účinkem kyseliny močové 1,2 mM. Hodnoty R_f jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tab. 38.

Tab. 37 Parametry pokusu pro sledování vlivu kyseliny močové (0,8 a 1,2 mM), aminoguanidinu (0,1; 1,0 a 10 mM) a kyseliny hydroxycitronové (0,5; 1,0 a 2,5 mM) a na glykaci AST methylglyoxalem za použití 7,5% separačního gelu pro nativní elektroforesu, barveno pomocí Coomassie Blue EZBlue, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

Gel separační	7,5%
Gel zaostřovací	4%
Vzorek	AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM + AOX
Délka inkubace vzorku	22 dní při 37°C
Nanášené množství AST	13 µg /jamka
Metoda barvení	Coomassie Blue – EZ Blue
Zobrazeno	GelDoc XR

AOX	HCA			KM		AMG				
koncentrace (mM)	2,5	1,0	0,5	1,2	0,8	10,0	1,0	0,1		
	vz 1	vz 2	vz 14	vz 13	vz 12	vz 6	vz 5	vz 10	vz 9	vz 8



Obr. 43. Vliv kyseliny močové (0,8 a 1,2 mM), aminoguanidinu (0,1; 1,0 a 10 mM) a kyseliny hydroxycitronové (0,5; 1,0 a 2,5 mM) a na glykaci AST methylglyoxalem za použití 7,5% separačního gelu pro nativní elektroforesu, barveno pomocí Coomassie Blue EZBlue, zobrazeno pomocí GelDoc XR.

vzorek 1 - AST 1,8 mg/ml; vzorek 2 - AST 1,8 mg/ml + MGO 0,5 mM

Tab. 38: Účinek kyseliny močové, aminoguanidinu a kyseliny hydroxycitronové na glykaci AST methylglyoxalem. Hodnoceno pomocí relativních mobilit (R_f) jednotlivých vzorků a porovnáváno s migrací kontrolního vzorku.

Vzorek	AST	MGO	HCA			KM		AMG		
	1	2	14	13	12	6	5	10	9	8
R_f	0,467	0,561	0,569	0,579	0,553	0,554	0,562	0,479	0,483	0,539
Migrace (% kontroly)	100,0	120,1	121,8	124,0	118,4	118,6	120,3	102,6	103,4	115,4

6. DISKUZE

Detekce, identifikace a kvantifikace Amadoriho produktů a AGEs je důležitá při studiu s věkem spojených onemocnění (diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova choroba, rakovina, atd.), protože AGEs jsou důležitými biomarkery těchto onemocnění (Morais a kol. 2009). Pro sledování glykace je možné použít řadu metod, například spektrofotometrických, imunochemických, elektroforetických nebo chromatografických. V této práci jsem rozšiřovala spektrum metodik k hodnocení průběhu neenzymové glykace a účinnosti sledovaných antioxidantů, které jsem používala ve své diplomové práci (měření katalytické aktivity AST a absorpčních UV-VIS spekter AST), o elektroforetické metody (nativní PAGE, SDS-PAGE a Western blotting).

Pracovala jsem v *in vitro* modelu glykace proteinů, ve kterém jsem jako modelový protein použila AST a jako glykační činidlo methylglyoxal. Methylglyoxal, reaktivní α -oxoaldehyd, je fyziologický metabolit vznikající během glykolysy a prekurzor AGEs (Ahmed a kol. 2003, Thornalley 1996). Cytosolickou aspartátaminotransferasu z prasečího srdce jsem použila jako vhodný modelový protein pro glykaci, protože obsahuje celkem 19 lysinových a 26 argininových zbytků na jednu podjednotku, které se mohou účastnit glykace (Kagamiyama a kol. 1980). Seidler a Kowalewski (2003) popsali, že při glykaci AST methylglyoxalem 3,4 mM došlo k modifikaci 6 lysinových zbytků, což představuje 16% z celkového počtu lysinů v molekule enzymu.

Denaturující elektroforezy lze použít k rozdělení vysokomolekulárních agregátů (cross-linků) vznikajících během glykace, které mají menší pohyblivost v elektrickém poli než nemodifikovaný protein. Nejprve jsem **optimalizovala podmínky pro SDS-PAGE** pro AST jako modelový protein. Pro účinné sledování vzniku glykačních produktů a ovlivnění jejich vzniku antioxidanty je potřeba optimálního rozdělení nemodifikovaného proteinu i vznikajících cross-linků v gelu. Empiricky zjištěné optimální rozdělení proteinů je relativní mobilita (R_f) mezi hodnotami 0,55-0,6 (Instruction Manual Mini-Protean 3 Cell). Při použití 12,5% separačního gelu byla relativní mobilita AST nedostatečná ($R_f = 0,39$) a cross-linky s nižší pohyblivostí (více než 130 kDa) byly separovány nedostatečně. V dalších pokusech s denaturující elektroforezou jsem tedy používala 10% separační gel, v němž byly již jednotlivé proužky monomeru AST separovány s vhodnou relativní

mobilitou ($R_f = 0,59$) a proužky vznikajících glykačních produktů obsahující cross-linky byly separovány také dostatečně. Jako vhodné množství nanášeného proteinu na 12,5% i na 10% gel se ukázaly 4 μg vzhledem ke zřetelnosti a tvaru proužku AST (45 kDa) a dostatečné viditelnosti vznikajících cross-linků. Při menším množství proteinu byly proužky obsahující cross-linky nezřetelné, takže bylo obtížné je hodnotit. Při větším množství proteinu zase proužek AST zasahoval do okolních jamek.

Pro sledování **vlivu koncentrace methylglyoxalu na vznik glykačních produktů** jsem použila řadu inkubačních směsí se vzrůstající koncentrací methylglyoxalu (0-50 mM). Se stoupající koncentrací MGO docházelo ke vzniku trimerů (~130 kDa), při vyšších koncentracích MGO pak tetramerů AST (~160 kDa). Dimery vznikaly ve větším množství až při vyšších koncentracích methylglyoxalu (20-50 mM). V těchto koncentracích ale došlo při inkubaci ke vzniku sraženin, pro sledování glykace jsou tedy již nevhodné. V důsledku vzniku sraženin totiž dochází k úbytku množství nanášeného AST a hodnocení takových proužků je pak nepřesné. Úbytek AST vzniklý v důsledku vysrážení je patrný na gelech barvených Coomassie Blue, při obarvení gelu pomocí stříbra došlo navíc u těchto tří vzorků k silnému zabarvení celé dráhy příslušného vzorku.

V rámci prováděných experimentů jsem porovnávala **tři nejčastěji používané barvicí metody** a to Silver Staining, Coomassie Blue R-250 a koloidní Coomassie Blue G-250. Barvení stříbrem je obecně považováno asi za 100krát citlivější než Coomassie Blue R-250 (Dunn 2002). Ve své práci jsem používala metodu barvení stříbrem, kterou je možné detekovat až 10 fg proteinů (Ohsawa a Ebata 1983). Při použití tohoto typu SS byly proužky cross-linků dobře viditelné, ale zároveň byla patrná celá řada dalších proužků, které pravděpodobně patří jiným bílkovinám. Ty zřejmě nebyly odstraněny během procesu čištění AST. Barvení pomocí Coomassie Blue R-250 je méně citlivé, proužky s vysokomolekulárními agregáty nebyly vidět zřetelně. Nedochovalo ale ani ke zviditelnění dalších proteinů. Velkou výhodou této metody proti Silver Stainingu je možnost kvantifikace obsahu proteinů. Při porovnávání barvení pomocí **Coomassie Blue typu R-250 a koloidního G-250** na vzorcích se stoupající koncentrací methylglyoxalu (0-10 mM) byl v obou případech patrný vznik trimerů (~130 kDa) a při vyšších koncentracích MGO (5-10 mM) i tetramerů AST (~160 kDa). Oproti CB typu R-250 byly ale při použití CB G-250 lépe patrné proužky v oblasti 60 kDa a slabě viditelné proužky

i v oblasti 65 kDa. Barvení pomocí koloidního roztoku Coomassie Blue G-250 bylo jednodušší, rychlejší a citlivější (detekční limit je dle Sigma-Aldrich 10 ng proteinu) než Coomassie Blue R-250 (EZBlue Gel Staining Reagent). Navíc se koloidní CB G-250 váže pouze na proteiny, nikoliv na gel, nedochází tak ke vzniku nežádoucího pozadí. Pokud je potřeba zviditelnit i velmi malá množství vznikajících cross-linků, je vhodné použít barvení stříbrem. Jestliže není možné použít SS nebo není žádoucí zobrazovat velké množství proužků, je vhodné použít koloidní CB G-250.

Další metodou, kterou lze sledovat průběh glykace proteinů je **Western blotting**. Lze při něm využít detekce pomocí specifické protilátky proti vznikajícím AGE produktům. Komerčně jsou dostupné protilátky proti pentosidinu, N(ε)-karboxymethyllysinu, pyrrolinu nebo glykačním produktům odvozeným od methylglyoxalu. Díky této specifické detekci jsou zviditelněny jen pozdní produkty glykace a nedochází k zobrazení dalších proteinů, které se do vzorku mohly dostat z okolí při manipulaci s ním. **Vliv koncentrace MGO na tvorbu vysokomolekulárních cross-linků** jsem sledovala porovnáním gelu obarveného stříbrem a blotovací membrány s přenesenými proteiny. V obou případech je shodně viditelná oblast vysokomolekulárních cross-linků trimerů a tetramerů AST (~130 a ~160 kDa). Na SDS-gelu jsou v oblasti ~60 kDa výrazné proužky, které ale nejsou vidět na blotovací membráně, nejedná se tedy pravděpodobně o glykační produkty. Na blotovací membráně jsou naopak dobře viditelné proužky v oblasti kolem 70 kDa, které obsahují glykační produkty vznikající v menší míře a které jsou jen velmi slabě viditelné při barvení stříbrem. I přes vysokou citlivost barvení stříbrem je tedy vhodné detekovat vznikající glykační produkty pomocí imunoblottingu, kdy nedochází k zobrazení jiných balastních proteinů.

Při glykaci proteinu dochází k vazbě cukru na lysinové a argininové zbytky v jeho molekule (Morais a kol. 2009). Jsou to basicke aminokyseliny, které mají při fyziologickém pH kladný náboj. Při glykaci dochází k takovým chemickým modifikacím, které vedou k ovlivnění náboje dané bílkoviny. Glykovaná bílkovina má tedy negativnější náboj a vyšší pohyblivost v elektrickém poli (směrem k anodě) než neglykovaný protein. Čím silněji proběhne glykace, tím vyšší pohyblivost tedy protein bude mít. Pro sledování vlivu glykace na náboj AST jsem použila **nativní elektroforesu**, při které proteiny nejsou denaturované a zachovávají si svoji nativní strukturu a náboj. Nejprve jsem optimalizovala množství

nanášeného proteinu. Jako vhodné množství jsem zvolila 13 μg AST. Při sledování vlivu koncentrace MGO (0-8 mM) na náboj AST došlo se vzrůstající koncentrací MGO k úbytku kladných nábojů basických aminokyselin v molekule AST, což se projevilo zvýšenou mobilitou proti neglykované AST. Například relativní mobilita vzorku obsahujícího 3 mM MGO byla 0,539, což je o 24,9 % vyšší hodnota než měl kontrolní vzorek AST ($R_f = 0,433$). Čím vyšší byla použitá koncentrace MGO, k tím silnější glykaci a tedy i větší mobilitě vzorku došlo.

Výše popsané metody jsem pak použila ke sledování vlivu aminoguanidinu, kyseliny močové a kyseliny hydroxycitronové na glykaci AST methylglyoxalem. Při hodnocení **pomocí SDS-PAGE** byly kvůli nerovnoměrnému odpařování vzorků při inkubaci hodnotitelné jen některé vzorky. Mírně protektivní vliv měl aminoguanidin, kdy v 1 mM koncentraci byl patrný úbytek tetramerů a dimerů a v koncentraci 10 mM docházelo k redukci vzniku tetramerů. Kyselina hydroxycitronová zabraňovala vzniku dimerů a tetramerů při koncentraci 1 mM. Při hodnocení vzniku AGEs pomocí imunoblottingu došlo k nerovnoměrnému obarvení a vzniku bublin při přenosu. Kyselina močová (0,4-1,2 mM) a aminoguanidin (0,001 a 0,1 mM) neprojevily žádný protektivní účinek při vzniku AGEs. Mírně protektivní vliv měla kyselina hydroxycitronová v koncentracích 0,5 až 2,5 mM na vznik trimerů (přibližně 130 kDa).

Při hodnocení vlivu antioxidantů na glykaci AST methylglyoxalem pomocí nativní PAGE projevila kyselina močová v koncentraci 1,2 mM velmi slabý protektivní účinek, v ostatních studovaných koncentracích žádný protektivní vliv neměla. Aminoguanidin 0,1 mM mírně snížil pohyblivost glykované AST a v koncentracích 1 a 10 mM téměř úplně zastavil glykaci methylglyoxalem. Kyselina hydroxycitronová snížila glykaci pouze v koncentraci 0,5 mM a to v podobném rozsahu jako kyselina močová 1,2 mM.

Kyselina močová neměla vliv na změnu náboje AST způsobenou její glykací, a jen velmi nepatrný vliv na vznik vysokomolekulárních cross-linků. Neutrální vliv kyseliny močové na glykaci AST se shoduje s výsledky v mé diplomové práci (Bacílková 2008). Literatura (Boušová a kol. 2005a) uvádí i opačné výsledky, kdy kyselina močová 1,2 mM snižuje glykaci AST fruktosou. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny použitím jiného glykačního činidla. Díky tomu může docházet k obcházení místa působení KM. Z výsledků, které bylo možno hodnotit, vyplývá, že kyselina hydroxycitronová chrání AST

proti glykaci. Ke stejným výsledkům jsem dospěla i v diplomové práci (Bacílková 2008), kde HCA zmírnila glykaci v koncentracích 0,25 a 2,5 mM. Pozitivní účinky proti glykaci měla HCA také v koncentraci 2,5 mM v modelu glykace fruktosou (Boušová a kol. 2005b). Přestože některé vzorky obsahující aminoguanidin nebylo možné hodnotit, testování pomocí elektroforetických metod prokázalo účinky AMG proti glykaci. Podobných výsledků bylo dosaženo v mé diplomové práci i v literatuře (Miller a kol 2003, Gugliucci 2003). AMG ale nezabránil glykaci lysozemu glukosou v práci Chetyrkina a kol. (2008).

Za použití SDS-PAGE s následným Western blottingem jsem prokázala vznik vysokomolekulárních agregátů. Pro detekci glykačních produktů pomocí imunoblottingu by ale bylo vhodnější použít jinou metodu detekce, např. imunochemickou. Glykace methylglyoxalem způsobila změnu v náboji AST, což se projevilo při použití nativní PAGE.

7. ZÁVĚR

- 1) Při optimalizaci SDS-PAGE a Western blottingu jsem došla k následujícím závěrům:
 - a. Vhodná koncentrace separačního gelu pro SDS-PAGE byla 10%.
 - b. Optimální množství nanášeného proteinu byly 4 μg .
 - c. Použitá metoda barvení stříbrem byla velmi citlivá, ale její nevýhodou bylo zobrazení celé řady dalších proteinů. Barvení Coomassie Blue bylo méně citlivé, ale je možné detekované proužky kvantifikovat. Barvení pomocí CB typu G-250 je jednodušší na provedení, rychlejší, citlivější a má nižší pozadí než barvení pomocí CB typu R-250.
 - d. Se stoupající koncentrací MGO vzrůstalo především množství vznikajících trimerů a tetramerů AST (oblast 130 a 160 kDa). Při vyšších koncentracích MGO (nad 10 mM), které jsou ale pro inkubaci s AST nevhodné (vznik sraženin AST), byla patrná tvorba dimerů AST.
- 2) Při optimalizaci nativní PAGE jsem došla k následujícím závěrům:
 - a. Optimální množství nanášeného proteinu pro nativní elektroforesu je 13 μg .
 - b. Stoupající koncentrace MGO způsobila progresivní modifikaci molekuly AST, která se projevila úbytkem kladných nábojů lysinů a tím i zvýšenou mobilitou modifikovaného proteinu ve srovnání s kontrolním vzorkem.
- 3) Studované antioxidanty měly následující účinky na glykaci AST methylglyoxalem:
 - a. Aminoguanidin 1 mM snížil vznik dimerů a tetramerů, v 10 mM koncentraci vznik tetramerů. Kyselina močová 1,2 mM snížila vznik dimerů a tetramerů. Další vzorky nebylo možné hodnotit.
 - b. Kyselina hydroxycitronová snížila vznik trimerů v koncentracích 0,5-2,5 mM. Ostatní vzorky bylo obtížné hodnotit.
 - c. Kyselina močová (1,2 mM) a kyselina hydroxycitronová (0,5 mM) měly malý vliv na změnu náboje způsobenou glykací, ostatní koncentrace obou kyselin neměly na náboj glykovaného AST vliv. Aminoguanidin 0,1 mM mírně snižoval úbytek kladných nábojů při glykaci, v 1 a 10 mM koncentraci téměř úplně zastavil ztrátu pozitivních nábojů způsobenou methylglyoxalem.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-DG	3-deoxyglukoson
AFGP	1-alkyl-2-formyl-3,4-diglycosylpyrrole
AGE-R1	oligosacharyltransferasa-48
AGE-R2	80 K-H fosfoprotein
AGE-R3	Galektin-3
AGEs	produkty pozdní glykace (advanced glycation and-products)
ALEs	produkty pozdní lipoxidace (advanced lipoxidation and-products)
AMG	aminoguanidin
AOPP	produkty pozdní oxidace proteinů (advanced oxidation protein products)
APS	persíran amonný (ammonium persulfate)
AST	aspartátaminottransferasa
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
CB	Coomassie Blue
CEL	N ^ε -karboxyethyllysin
CML	N ^ε -karboxymethyllysin
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOLD	3-deoxyglukosone-derived lysine dimer
GM-CSF	růstový faktor Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GO	glyoxal
GODIC	glyoxal-derived imidazoline cross-link
GOLD	glyoxal-derived lysine dimer
HCA	hydroxycitronová kyselina (hydroxycitric acid)
HDL	high density lipoprotein
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula
IGF-1	růstový faktor (Insulin-like Growth Factor-1)
IL 1	interleukin 1
KM	kyselina močová

LDL	low density lipoprotein
MAP kinasa	mitogeny aktivovaná proteinkinasa (mitogen-activated protein kinase)
MGO	methylglyoxal
MODIC	methylglyoxal-derived imidazoline cross-link
MOLD	methylglyoxal-derived lysine dimer
MSR	makrofágový scavenger receptor
NAD ⁺	nikotinamadeninukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamadeninukleotid (redukována forma)
NBT	nitroblue tetrazolium
NC	nitrocelulosová (membrána)
NF-κB	nukleární faktor κB
p21 ^{ras}	onkogenní protein
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa
PMNs	polymorfonukleární neutrofil
PAI-1	plasminogena activator inhibitor 1
PDGF	růstový faktor Platelet-derived growth factor
PVDF	polivynilidendifluoridová (membrána)
RAGE	receptor produktů pozdní glykace (receptor of advanced glycation end-product)
RNA	ribonukleová kyselina
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SDS	laurylsíran sodný (sodium dodecyl sulfate)
SS	Silver Staining
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiaminu
TNF _α	tumor nekrotizující faktor α
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VCAM-1	cévní buněčná adhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule 1)
XDH	xantindehydrogenasa
XO	xantinoxidasa
XOR	xantinoxidoreduktasa

9. POUŽITÁ LITERATURA

Abordo EA, Minhas HS and Thornalley PJ (1999): Accumulation of α -oxoaldehydes during oxidative stress. A role in cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 58(4): 641-8.

Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, Franke S, Strobel J, Stein G and Haik GM (2003): Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone Advanced Glycation End-Products of Human Lens Proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:5287-5292

Akpinar D, Yargicoglu P, Derin N, Aslan M, Agar A (2007): Effect of aminoguanidine on visual evoked potentials (VEPs), antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Brain Res.* 1186: 87-94

Bacilková (2008): Vliv látek s antioxidantními vlastnostmi na glykaci aspartátaminotransferasy. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 95 stran

Bakra D, Bossa F, Doonan S, Fahmy HMA, Hughes GJ, Martini F, Petruzzelli R and Wittmann-Liebold B (1980): The Cytosolic and Mitochondrial Aspartate Aminotransferases from Pig Heart (A Comparison of their Primary Structures, Predicted Secondary Structures and Some Physical Properties). *Lur. J. Biochem.* 108: 405-14

Becker BF (1993): Towards The Physiological Function Of Uric Acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14: 615-31

Bohlender JM, Franke S, Stein G and Wolf G (2005): Advanced glycation end products and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 289: 645-59

Bourajjaj M, Stehouwer CDA, van Hinsbergh VWM and Schalkwijk CG (2003): Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem. Soc. Trans.* 31(6):1400-2

Boušová I, Bakala H, Chudáček R, Palička V, Dršata J (2005a): Glycation-induced inactivation of aspartate aminotransferase, effect of uric acid. *Mol. Cell Biochem.* 278(1-2):85-92

Boušová I, Martin J, Jahodář L, Dušek J, Palička V, Dršata J (2005b): Evaluation of in vitro effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycoxydation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37: 957–62

Butler JE (1991): *Imunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 336 stran

Culbertson SM, Vassilenko EI, Morrison LD and Ingold KU (2003): Paradoxical impact of antioxidants on post-Amadori glycoxydation: Counterintuitive increase in the yields of pentosidine and Nepsilon-carboxymethyllysine using a novel multifunctional pyridoxamine derivative. *J. Biol. Chem.* 278(40):38384-94.

Databáze Brenda [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2009-18-12]. Dostupné z: http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.6.1.1

Davies KJA, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF and Hochstein P (1986): Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235: 747-754

Downs BW, Bagchi M, Subbaraju GV, Shara MA, Preuss HG, Bagchi D (2005): Bioefficacy of a novel calcium–potassium salt of (-)-hydroxycitric acid. *Mutat. Res.* 579: 149-62

Dunlop M (2000): Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 58(77): S 3–12

Dunn MJ, Crisp SJ (1994): Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels Using an Ultrasensitive Silver Staining Technique. *In: Walker JM (Ed.) Basic Protein and Peptide Protocols*, 1st ed., Humana Press, New Jersey, str. 113-119

Dunn MJ (2000): Gel Electrophoresis of Peptides and Proteins. *In: Reid RE (Ed.) Peptide and Protein Drug Analysis (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, Vol. 101, 1st ed., Marcel Dekker, New York, str. 387-452

Dunn MJ (2002): Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels by Silver Staining. *In: Walker JM (Ed.) The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, str. 265-271

Dršata J, Beránek M, Palička V (2002): Inhibition of Aspartate Aminotransferase by Glycation In Vitro Under Various Conditions. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17 (1): 31–6

Electrophoresis techniques – National Diagnostics [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2009-23-11]. Dostupné z:

<http://nationaldiagnostics.com/articles.php/tPath/1>

EZBlue Gel Staining Reagent – Sigma-Aldrich [online]. poslední revize 6.6.2005 [citováno 2010-01-21]. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/7/g1041dat.pdf>

Forbes JM, Soldatos G and Thomas MC (2005): Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? *Clin. Biochem. Rev.* 26(4):123-34.

Frey PA and Hegeman AD (2007) Enzymatic reaction mechanisms, 1st ed. Oxford University Press, New York, 848 stran

Friedman EA (2002): Diabetic Nephropathy: Improving Prognosis. Saudi J. Kidney Dis. Transpl. 13(3): 281-310

Garfin DE (2005): Slab Gel Electrophoresis for Protein Analysis. *In:* Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Tuck S (Eds.) Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development, 1st ed., Informa Healthcare, New York, str. 113-161

Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM and Galaris DA (2005): Uric Acid and Oxidative Stress. Curr. Pharm. Des. 11: 4145-51

Gugliucci A (2003): A practical method to study functional impairment of proteins by glycation and effects of inhibitors using current coagulation/fibrinolysis reagent kits. Clin. Biochem. 36(2):155–8.

Hames BD (1998): Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach, 3rd ed., Oxford University Press, New York, 376 stran

Hida H, Yamada T and Yamada Y (2005): Production of hydroxycitric acid by microorganisms. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(8): 1555-61

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR (2008): Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry, 4th. ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 520 stran

Chen AS, Taguchi T, Aoyama S, Sugiura M, Haruna M, Wang MW, and Miwa I (2003): Antioxidant activity of a schiff base of pyridoxal and aminoguanidine. Free Radic. Biol. Med. 35(11): 1392–1403

Chetyrkin SV, Mathis ME, Ham A-JL, Hachey DL, Hudson BG, Voziyan PA (2008): Propagation of protein glycation damage involves modification of tryptophan residues via reactive oxygen species: inhibition by pyridoxamine. *Free Radic. Biol. Med.* 44(7):1276–85.

Instruction Manual Mini-Protean 3 Cell – Bio-Rad [online]. c2001, poslední revize 24.7.2001 [citováno 2010-01-21]. Dostupné z:

http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/44432/4006157B.pdf

IPDC database – NIH Library [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2010-01-08]. Dostupné z: http://nihlibrary.ors.nih.gov/ipdcdb/IPDCDB_SearchResults_Sorted.asp

Jakuš V (2003): Úloha neenzýmovej glykácie a glykoxidácie v rozvoji diabetických a vaskulárných komplikácií. *Cesk. Fysiol.* 52(2): 51-65

Janebová M, Zima T, Tesař V (1999): AGEs - produkty pokročilé glykace, advanced glycation (glycosylation) end-products, *Remedia* 9(2): 94-103

Jansonius JN (1998): Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 759-69

John RA (1995): Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1248: 81-96

Kagamiyama H, Sakakibara R, Tanase S, Morino Y, Wada H (1980): Complete amino acid sequence of mitochondrial aspartate aminotransferase from pig heart muscle. Peptide ordering procedures and the complete sequence. *J. Biol. Chem.* 255(13): 6153-9

Kalapos MP (1999): Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 110: 145–75

Kalousová M, Zima T, Tesař V, Dusilová-Sulková S, Škrha J (2005): Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat. Res.* 579: 37–46

Manz A, Pamme N, Iossifidis D (2004): *Bioanalytical Chemistry*, Imperial College Press, London, 201 stran

Miller AG, Meade SJ and Gerrard JA (2003): New Insights Into Protein Crosslinking Via the Maillard Reaction: Structural Requirements, the Effect on Enzyme Function, and Predicted Efficacy of Crosslinking Inhibitors as Anti-ageing Therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 11(6):843–52.

Miller I, Crawford J and Gianazza E (2006): Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics.* 6(20): 5385-408

Morais MPP, Mackay JD, Bhamra SK, Buchanan JG, James TD, Fossey JS van den Elsen JMH (2010): Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis. *Proteomics.* 10(1): 48-58

Naidoo D and Lux O (1998): The effect of vitamin C and E supplementation on lipid and urate oxidation products in plasma. *Nutr. Res.* 18(6): 953-61

Negrean M (2006): Advanced glycation endproducts (AGE) and their role in the pathogenesis of chronic complications of diabetes mellitus. *J. Clin. Med.* 1(2):59-66

Nursten HE (2005): *The maillard reaction: Chemistry, biochemistry and implications*, The Royal Society of Chemistry, London 2005, 226 stran

Obšil T and Pavlíček Z (1997): Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chem. Listy.* 91:558-69

Ohsawa K, Ebata N (1983): Silver Stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 135: 409-415

Okada M and Ayabe Y (1995): Effects of aminoguanidine and pyridoxal phosphate on glycation reaction of aspartate aminotransferase and serum albumin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41: 43-50

Okada M, Sogo A and Ohnishi N (1994): Glycation reaction of aspartate aminotransferase by various carbohydrates in an in vitro system. *J. Nutr. Biochem.* 5: 485-9

van Oss CJ van Regenmortel MHV (1994): *Immunochemistry*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 1088 stran

Ou P, Wolff SP (1993): Aminoguanidine: A drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 46(7): 1139-44

Ramasamy R, Yan SF and Schmidt AM (2006): Methylglyoxal Comes of AGE. *Cell.* 124: 258-60

Ratliff DM, Vander Jagt DJ, Eaton RP and Vander Jagt DL (1996): Increased levels of methylglyoxal-metabolizing enzymes in mononuclear and polymorphonuclear cells from insulin-dependent diabetic patients with diabetic complications: aldose reductase, glyoxalase I, and glyoxalase II – a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(2): 488-92

Reddy VP and Beyaz A (2006): Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug. Discov. Today.* 11(13/14): 646-54

Sambrook J, Russel I (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 999 stran

Seidler NW and Kowalewski C (2003): Methylglyoxal-induced glycation affects protein topography. Arch. Biochem. Biophys. 410: 149-54

Seidler NW and Seibel I (2000): Glycation of aspartate aminotransferase and conformational flexibility. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277: 47–50

Sell DR, Nelson JF and Monnier VM (2001): Effect of chronic aminoguanidine treatment on age-related glycation, glycooxidation, and collagen cross-linking in the Fischer 344 rat. J. Gerontol. 56A(9): B 405-11

Shangari N, Bruce WR, Poon R and O'Brien PJ (2003), Toxicity of glyoxals-role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine efficiency. Biochem. Soc. Trans. 31(Pt 6): 1390-3

Schlegel H, Zaoralek PE and Christen P (1977): Aspartate Aminotransferase (Determination Of The Active Site Occupancy Pattern Indicates Independent Transamination Of The Two Subunits). J. Biol. Chem. 252(16): 5835-8

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF and Stern DM (2001): The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. J. Clin. Invest. 108: 949-55.

Schneider G, Käck H and Lindqvist Y (2000): The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. Structure. 8: R1-6

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001): Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia. 44: 129-46

Sivasankar B (2005): Bioseparation: Principles and Techniques, 1st ed., Prentice-Hall of India, New Delhi, 280 stran

Smejkal GB (2006): Protein Staining in Polyacrylamide Gels. *In:* Smejkal GB, Lazarev A (Eds.) Separation Methods in Proteomics, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, str. 439-452

Soni MG, Burdock GA, Preuss HG, Stohs SJ, Ohia SE, Bagchi D (2004): Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax-a novel calcium/potassium salt. Food Chem. Toxicol. 42: 1513–29

Staining protein gels with Coomassie Blue – National Diagnostics [online]. Poslední revize (není k dispozici) [cit. 2009-11-15]. Dostupné z: http://nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/80

Stoppa GR, Cesquini M, Roman EA, Ogo SH, Torsoni MA (2006): Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. Life Sci. 78(12):1352-61

Strazzullo P, Puig JG (2007): Uric acid and oxidative stress: Relative impact on cardiovascular risk. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 17: 409-14

Taguchi T, Sugiura M, Hamada Y, Miwa I (1999): Inhibition of advanced protein glycation by a Schiff base between aminoguanidine and pyridoxal. Eur. J. Pharmacol. 13(378): 283-9

Thornalley PJ (1996): Pharmacology of methylglyoxal: Formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification - a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. Gen. Pharmac. 27(4): 565-73

Thornalley PJ, Langborg A and Minhas HS (1999): Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 344: 109-16

Vessal M and Taher M (1995): Partial purification and kinetic properties placental cytosolic aspartate transaminase of human. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B(2): 431-7

Vlassara H and Palace MR (2003): Glycooxidation: The Menace of Diabetes and Aging. *Mt. Sinai J. Med.* 70(4):232-41

Westermeier R (2005): Electrophoresis in practice, 4th. ed., Willey VCH, Weinheim, 426 stran

Wu L (2005): The pro-oxidant role of methylglyoxal in mesenteric artery smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 83: 63–8

Yamada T, Hida H, Yamada Y (2007): Chemistry, physiological properties, and microbial production of hydroxycitric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 977–82

Yeargans GS and Seidler NW (2003): Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300(1): 75-80.

Yu PH, Zuo DM (1997): Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia.* 40:1243-50

Ziak M, Jaussi R, Gehring H and Christen P (1990): Aspartate aminotransferase with the pyridoxal-5'-phosphate-binding lysine residue replaced by histidine retains partial catalytic competence. *Eur. J. Biochem.* 187(2): 329-33

10. DODATEK

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

I. Původní vědecké práce:

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.

II. Souhrnné práce prezentované na sympoziích a konferencích:

Boušová I., Bacílková E., Dršata J. (14.-17.9.2008): Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal; effect of selected antioxidants. XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice. Sborník abstraktů str. 212.

I. Původní vědecké práce

Mol Cell Biochem (2009) 331:215–223
DOI 10.1007/s11010-009-0161-y

Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal, effect of hydroxycitric and uric acid

Iva Boušová · Eliška Bacílková · Sanja Dobrijević · Jaroslav Dršata

Received: 16 January 2009 / Accepted: 29 April 2009 / Published online: 18 May 2009
© Springer Science+Business Media, LLC. 2009

Abstract Glycation is a process closely related to the aging and pathogenesis of diabetic complications. Reactive α -dicarbonyl compounds (e.g., methylglyoxal) are formed during middle stage of glycation reaction. Compounds that would inhibit the glycation process have been sought for years. The objective of this study was to investigate the inhibitory effect of hydroxycitric (0.25–2.5 mM) and uric acid (0.4–1.2 mM) on middle stage of protein glycation in vitro using the model containing aspartate aminotransferase (AST) and 0.5 mM methylglyoxal. Hydroxycitric acid, at all tested concentrations, reduced AST activity decrease and formation of fluorescent AGEs during incubation of the enzyme with methylglyoxal at 37°C. This compound also prevented formation of high-molecular weight protein cross-links and changes in molecular charge of AST caused by glycation. Uric acid showed no positive anti-glycation activity. The results support the hypothesis that hydroxycitric acid has beneficial effects in controlling protein glycation.

Keywords Aspartate aminotransferase · Methylglyoxal · Hydroxycitric acid · Protein glycation · Uric acid

Introduction

Proteins in the body are continually modified by non-enzymatic process called protein glycation, which is also known as Maillard reaction. During protein glycation,

molecule of reducing sugar binds to free amino groups of proteins via Schiff base, it is further converted to Amadori adduct, and later to a broad range of advanced glycation end products (AGEs) [1, 2]. Schiff base and Amadori products can be fragmented to α -dicarbonyl compounds, such as glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone. These compounds are more reactive than the parent sugars and are mainly responsible for protein cross-linking and formation of AGEs [3]. Methylglyoxal (MGO) plays a key role in the formation of AGEs on intracellular proteins. Methylglyoxal-modified proteins are important physiological ligands for the scavenger receptors on monocytes and macrophages (MSR-AII and MSR-BI) that are responsible for their endocytosis followed by lysosomal degradation [4, 5].

The therapeutic intervention to the glycation process has followed three main approaches. A first approach is inhibition of AGE formation process by carbonyl-blocking agents (aminoguanidine) or by antioxidants. A second one is reducing AGE deposition by using cross-link breakers or by enhancing cellular uptake and degradation [2]. The final approach follows inhibition of RAGE by neutralizing antibodies or suppression of post-receptor signaling using antioxidants [6]. Aminoguanidine (AG) is a prototype therapeutic agent for prevention of the AGEs formation. It reacts rapidly with α -dicarbonyl compounds to prevent formation of AGE cross-links. Clinical trials of AG in overt diabetic nephropathy (ACTION) were performed, but they were early terminated due to safety concerns. Reported side effects of AG in clinical therapy were gastrointestinal disturbance, abnormalities in liver function tests, flu-like symptoms, and a rare vasculitis [7, 8].

Hydroxycitric acid (HCA) is major active component in the fruit rinds of certain species of the plant *Garcinia* (*G. cambogia*, *G. indica*, and *G. atroviridis*), which is

I. Boušová (✉) · E. Bacílková · S. Dobrijević · J. Dršata
Department of Biochemical Sciences, Charles University
in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove,
Heyrovského 1203, 50005 Hradec Kralove, Czech Republic
e-mail: Iva.Bousova@faf.cuni.cz

native to subtropical areas of the Indian subcontinent and Indonesia [9]. Recently, this compound became popular constituent of the dietary supplements for weight management. Chronic oral administration of HCA to growing rats resulted in the reduction in food intake, body-weight gain, and total body lipids [10–12]. The *Garcinia*-type HCA acts as a competitive inhibitor of ATP: citrate lyase (EC 2.3.3.8), the enzyme which catalyzes cytosolic cleavage of citrate to oxaloacetate and acetyl-CoA, and thus, represses synthesis of fatty acids and lipogenesis [13, 14]. Hydroxycitric acid did not show any toxicity in the dose up to 5,000 mg/kg for acute toxicity and 2,500 mg/kg/day for sub-chronic toxicity in rats [10, 15]. Several clinical trials assessed safety and bioavailability of HCA and concluded that hydroxycitric acid is non-toxic for humans in the dose up to 2,800 mg/day [16, 17]. HCA also exerted positive effects on protein glycation by fructose in an in vitro model [18] and could be therefore used as a supportive treatment for diabetes mellitus.

Uric acid (UA), the degradation product of purine metabolism in man and higher primates, is produced in an enzymatic reaction catalyzed by xanthine oxidoreductase (EC 1.17.3.2). Other mammals oxidize uric acid further to allantoin in a reaction catalyzed by uricase (EC 1.7.3.3), but this enzyme is no longer expressed in man. Traditionally, this ubiquitous compound has been considered as a waste product without any physiological significance [19, 20]. However, antioxidant activity of uric acid, which is especially capable of reaction with hydroxyl radicals, peroxy radicals, and hypochlorous acid, has been proven [21]. Uric acid is converted to innocuous products, such as allantoin, allantoate, glyoxylate, urea, and oxalate, in these reactions [19]. UA also stabilizes ascorbate in biological fluids due to an inhibition of iron-catalyzed oxidation of ascorbate [20, 22]. Average plasma levels of UA are much higher compared to those of other non-enzymatic antioxidants, namely, ascorbate, tocopherols, and glutathione [19]. Physiological concentrations of uric acid are higher in males (200–420 $\mu\text{mol/l}$) than in females (140–340 $\mu\text{mol/l}$). Higher concentrations can be found for example in patients suffering from hyperuricemia and in obese people [23]. UA showed positive anti-glycation effect in the model of an in vitro protein glycation by fructose [24].

As was mentioned above, positive anti-glycation effects of hydroxycitric and uric acids during long-term incubation of protein with fructose were demonstrated. However, no research paper has dealt with the idea of HCA and UA activity in the process of protein glycation by reactive α -dicarbonyl compounds. The aim of the presented study is to elucidate the possibility that these two compounds are able to positively influence methylglyoxal-induced modification

of proteins, and therefore, reduce carbonyl stress, which is increased in patients suffering from diabetes mellitus.

Materials and methods

Chemicals

Aspartate aminotransferase, a purified enzyme preparation (cytosolic enzyme from porcine heart, suspended in saturated ammonium sulfate) was obtained from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. Methylglyoxal (40% solution), aminoguanidine, hydroxycitric acid, Trolox, and chemicals used for realization of electrophoresis were products of Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA. Immun-Blot PVDF membrane (0.2 μm), Precision Plus molecular weight standards, and non-fat dry milk were obtained from Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA. Uric acid and sodium azide were purchased from Lachema, Brno, Czech Republic. Mouse monoclonal antibody [3C] to methylglyoxal and rabbit polyclonal anti-mouse IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase were obtained from Abcam plc, Cambridge, UK. Chemiluminescent/fluorescent substrate for alkaline phosphatase DuoLux was ordered from Vector Laboratories, Burlingame, USA. Fixing bath, developing bath, and X-ray film Medix XBU were products of Foma Bohemia, Hradec Králové, Czech Republic. All chemicals used were of analytical grade.

Sample preparation and incubation

The enzyme suspension was centrifuged at 5,000 rpm at 4°C for 20 min, the supernatant was removed, and protein pellet was reconstituted in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4, 0.05% sodium azide) and the stock solutions of 1.0 and 0.9 mg/ml were prepared, respectively. These stock solutions were used for the preparation of four different types of incubation mixtures: (a) control samples (with buffer only), (b) methylglyoxal-modified samples (with MGO in a final concentration of 0.5 mM), (c) direct protein-antioxidant interaction samples (with individual antioxidant in a final concentration 0.25–2.5 mM), and (d) anti-glycation samples (with individual antioxidants in a final concentration of 0.25–2.5 mM and MGO in a final concentration 0.5 mM). The inhibitory effect of studied compounds on protein glycation was compared to the effect of aminoguanidine in a concentration 1.0 mM and Trolox 2.5 mM. The final concentrations of the enzyme were 5 $\mu\text{g/ml}$ for catalytic activity assessment and 0.45 mg/ml for electrophoresis and fluorescence measurements. All incubation mixtures were incubated in the dark at 37°C for up to 14 days. All samples were assessed in

triplicates and experiments were repeated twice if not stated otherwise.

Enzyme assay

Catalytic activity of AST was assessed spectrophotometrically using kinetic UV method with addition of pyridoxal-5'-phosphate, which is recommended by IFCC for use in the laboratories of clinical biochemistry [25]. Sample aliquots were diluted by 0.1 M sodium phosphate buffer to obtain enzyme activities within the analytical range of the method used. Sampling and measuring was carried out at 37°C in the intervals 0, 120, and 240 min using Helios β spectrophotometer. Absorbance changes at 340 nm were used to calculate enzyme activities. All results of enzyme assays were expressed in $\mu\text{kat/l}$ and usually recalculated as activities relative to those of the value of individual sample at time 0. The intra- and inter-assay coefficients of variation for enzyme assay were ≤ 9.6 and 13.3%, respectively.

Fluorescence measurements

Formation of fluorescent AGEs and argpyrimidine were measured using the method of Wu and Yen [26] with some modifications. Briefly, samples were incubated for 7 days at 37°C. The aliquots were taken away at time 0 and 7 days and stored frozen at -20°C . Aliquots of time 0 were used as unincubated blanks. Fluorescence of samples was measured at excitation and emission wavelengths of 330 nm/410 nm (fluorescent AGEs) and 320 nm/380 nm (argpyrimidine) against corresponding blanks in 96-well-plate by microplate reader (Tecan Infinity M200) using 0.09 mg of protein per well. The intra-assay coefficients of variation for assay of argpyrimidine and fluorescent AGEs were ≤ 9.2 and 9.1%, respectively. The inter-assay coefficients for those methods were ≤ 14.4 and 11.5%, respectively. The percentage inhibition of AGEs and argpyrimidine formation were calculated according to following formula: % inhibition = $[1 - (\text{fluorescence of test group}/\text{fluorescence of glycated control})] \times 100\%$.

Effect of glycation on molecular charge of AST

Native PAGE was used to investigate the change in the molecular charge of AST due to glycation. Electrophoresis was performed in discontinuous system with 4% stacking gel and 7.5% separating non-denaturing gel. All lanes were loaded with 10 μg of protein. Electrophoresis was performed at 30 mA for 2 h using Mini ProteanIII 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.

Electrophoretic mobilities were expressed as a rise in percentage mobility compared to the native enzyme (control).

Protein cross-linking and aggregation

Protein cross-linking and aggregation were assessed using a sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on Mini ProteanIII apparatus (BioRad). SDS-PAGE was performed using discontinuous system with 4% stacking gel and 10% separating gel according to the method of Laemmli [27]. Lanes were loaded with 4 μg of protein. Proteins were visualized with colloidal Coomassie Blue G250 and with silver staining [28]. Gels were scanned on GelDoc XR system and their quantification was performed using Quantity One software (BioRad).

Western blotting

Proteins after electrophoretic separation (described above) were transferred to PVDF membrane (0.2 μm , Bio-Rad) at a constant voltage 100 V for 90 min (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). After blotting, membranes were blocked with 8% non-fat dry milk in Tris buffered saline-Tween-20 buffer (TBST) overnight at 4°C, then washed in TBST, and reacted with primary antibody (dilution 1:1000) for 45 min at room temperature. Subsequently, membranes were washed six times with TBST and incubated with secondary antibody for 45 min (dilution 1:1000). The blots were extensively washed in 0.1 M TRIS buffer containing 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (pH 9.5), covered with chemiluminescent substrate DuoLux and incubated for 5 min. The membranes were then exposed to X-ray film Medix XBU, developed by standard developing process, and images were recorded with a GelDoc XR system. The blots were densitometrically quantified using Quantity One software.

Statistical analysis

Values of catalytic activity are given as mean \pm S.D. and mostly expressed in percentage of the time 0 of individual samples \pm relative S.D. Values of fluorescence (AU) are given as mean \pm S.D. Statistical significance was determined using Student's *t*-test and differences were regarded as significant when $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

Results

The activity of tested compounds was compared to the effect of known carbonyl-blocking agent aminoguanidine and to the effect of Trolox (water-soluble derivative of

vitamin E), which is often used in various methods for assessing antioxidant/antiradical properties of potential antioxidants as reference substance.

Enzymatic activity

Activity of control sample (AST alone) was stable throughout the experiment. Both hydroxycitric acid and uric acid itself had no harmful influence on stability and catalytic activity of AST in the concentrations used. Aminoguanidine 1.0 mM caused significant decrease of enzyme activity by 21.7% after 240 min of incubation. Trolox 2.5 mM did not influence AST activity. Following incubation of enzyme with MGO 0.5 mM, a rapid decline of AST activity was observed. The enzymatic activity decreased to 52.4 and 32.0% of control sample after 120 and 240 min, respectively. Uric acid showed no protective effect on protein glycation by methylglyoxal. Hydroxycitric acid exerted positive anti-glycation effect, which was light but statistically significant. The catalytic activity of AST was by 10.0% higher in presence of HCA 1.0 and 2.5 mM after 120 min of incubation with MGO, and by 6.3% higher in the presence of HCA 2.5 mM after 240 min of incubation in comparison with the activity of sample containing AST + MGO only (Fig. 1), respectively. Lower concentrations of HCA tested (0.25 and 0.5 mM) showed feeble anti-glycation effect and for the sake of clarity are not presented in Fig. 1. In comparison, aminoguanidine 1.0 mM almost completely reversed negative effect of MGO and the AST activity of sample containing AST + MGO + AG was 86.2 and 76.6% of control sample activity after 120 and 240 min, respectively. The effect of Trolox 2.5 mM was slightly higher than that of hydroxycitric acid in corresponding concentration. The AST activity was by 15.1 and 13.7% higher in the presence of Trolox after 120 and 240 min, respectively.

Fluorescence measurements

The inhibition of MGO-mediated protein glycation by several antioxidants was determined by measuring of AGEs with fluorescent properties. Figure 2 shows formation of argpyrimidine and the effect of HCA on this process. Sample containing AST + MGO exerted 16 times higher fluorescence intensity than the control sample without MGO after 7 days of incubation. Hydroxycitric acid caused statistically significant decrease in the formation of argpyrimidine during incubation (inhibition by 26.7–44.7%). The most remarkable decline in argpyrimidine formation was observed at 0.25 mM concentration of HCA, which exhibited inhibition by 44.7%. Effect of uric acid on the argpyrimidine formation was negligible (inhibition by 2.0–8.9%), while the influence of aminoguanidine

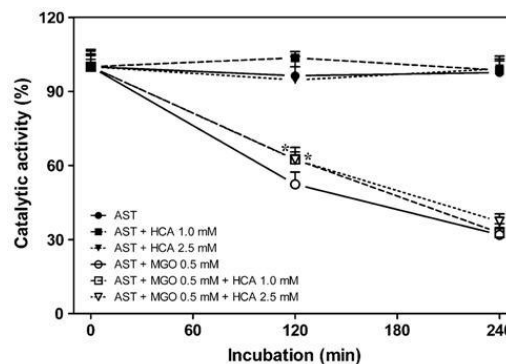


Fig. 1 Effect of glycation on AST activity and its intervention by hydroxycitric acid. AST (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated with or without methylglyoxal (0.5 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C in the presence or absence of hydroxycitric acid (1.0 and 2.5 mM). Catalytic activity of AST was expressed as percentage of each sample activity at the time 0, which was 100% \pm S.D. (%). Every point represents an average of two independent experiments, in which assays were performed in triplicates ([†]data with $P < 0.05$ and ^{*}data with $P < 0.01$, Student's *t*-test)

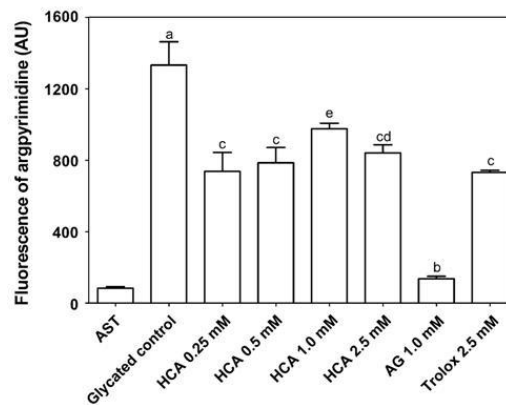


Fig. 2 Formation of argpyrimidine. AST (0.45 mg/ml) was incubated with or without methylglyoxal (0.5 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C in the presence or absence of hydroxycitric acid (0.25–2.5 mM) or aminoguanidine (1 mM) for 7 days. Aliquots of samples were taken on days 0 and 7 and stored frozen at -20°C . Fluorescence of samples was measured at specific excitation and emission wavelengths ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) corresponding to argpyrimidine (335/385 nm) versus the unincubated blanks. Data of fluorescence were expressed in arbitrary units \pm S.D. Every point represents an average of two independent experiments (6 samples). Groups with different letters superscripts are significantly different ($P < 0.01$, Student's *t*-test)

1.0 mM was well-pronounced (89.8%). The effect of Trolox 2.5 mM on the argpyrimidine formation was comparable to the activity of HCA 0.25 mM.

The effect of hydroxycitric acid on the formation of “non-specific” AGE products is presented in Fig. 3. Methylglyoxal caused almost 10-fold increase in concentration of AGEs with fluorescent properties compared to the control sample (AST alone) after 7 days of incubation. Positive effect of HCA did not reach the same extent as in the case of argpyrimidine formation but it caused remarkable and statistically significant inhibition of glycation (10.3–33.5%). Aminoguanidine and Trolox showed 86 and 87% suppressing effect on AGEs generation, respectively. Uric acid did not exhibit any positive anti-glycation activity (data not shown).

Effect of glycation on molecular charge of AST

Native PAGE was accomplished several times and average values of protein relative mobility are presented in Table 1 with a typical example of protein migration. Mobility of MGO-modified protein to the positive pole significantly increased (by 35.3%) after 7 days of incubation compared to the mobility of control sample (AST alone). This result indicates the progressive loss of the positive charge in the MGO-modified AST during the glycation reaction. The enzyme incubated in the presence of both MGO and hydroxycitric acid showed a smaller rise in mobility, up to 29% in the case of HCA 0.25 mM. Uric acid had no influence on mobility of MGO-modified AST, while

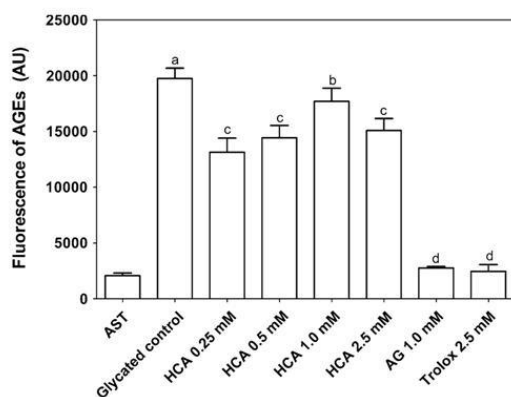


Fig. 3 Formation of fluorescent advanced glycation end products. AST (0.45 mg/ml) was incubated with or without methylglyoxal (0.5 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C in the presence or absence of hydroxycitric acid (0.25–2.5 mM) or aminoguanidine (1 mM) for 7 days. Aliquots of samples were taken on days 0 and 7 and stored frozen at –20°C. Fluorescence of samples was measured at excitation and emission wavelengths ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) corresponding to AGEs (330/410 nm) versus the unincubated blanks. Data of fluorescence were expressed in arbitrary units \pm S.D. Every point represents an average of two independent experiments (6 samples). Groups with different letters superscripts are significantly different ($P < 0.01$, Student's *t*-test)

aminoguanidine 1.0 mM completely reversed effect of MGO and the relative mobility of sample containing AST + MGO + AG was only slightly increased (by 0.35%) against the mobility of control. Trolox 2.5 mM showed similar effect on molecular charge of AST as hydroxycitric acid, i.e., the mobility was increased by 25% compared to control sample. These data indicated that the molecule of enzyme became more anionic due to glycation and that hydroxycitric acid had a light but significant inhibitory effect on the middle stage of glycation process.

Protein cross-linking and aggregation

The ability of aggregation and cross-link formation of tested antioxidants was determined by SDS-PAGE under denaturing conditions (Fig. 4). MGO readily reacts with lysine and arginine residues to produce high molecular weight protein products. Incubation of AST with MGO 0.5 mM at 37°C for 10 days resulted in the formation of protein aggregates with molecular weight about 85, 113, and 150 kDa corresponding to protein dimer, trimer, and tetramer, respectively. No presence of protein dimer and tetramer, and lower concentration of protein trimer were observed in samples containing AST alone (lane 2) and AST + AG (lane 9). Hydroxycitric and uric acids as well as Trolox were not able to prevent formation of protein cross-links and high molecular weight aggregates. Additional bands with molecular weight 20–35 and 56 kDa were constituted of several contaminating proteins present in commercial preparation (Fig. 4).

Western blotting

Immunoblotting with specific antibody against advanced glycation end products derived from MGO (anti-MGO [3C]) was used to confirm formation of protein aggregates as a result of MGO activity. The presence of high molecular weight protein cross-links in samples containing AST + MGO and AST + MGO + HCA was observed (Fig. 5). These protein aggregates had molecular weight about 113 and 150 kDa corresponding to AST trimer and tetramer, respectively. Quantitative differences between bands of samples with and without HCA or Trolox were observed. These results suggest that HCA can partially prevent formation of protein cross-links. Aminoguanidine 1.0 mM completely inhibited formation of protein aggregates, since no bands of AST trimer or tetramer were present.

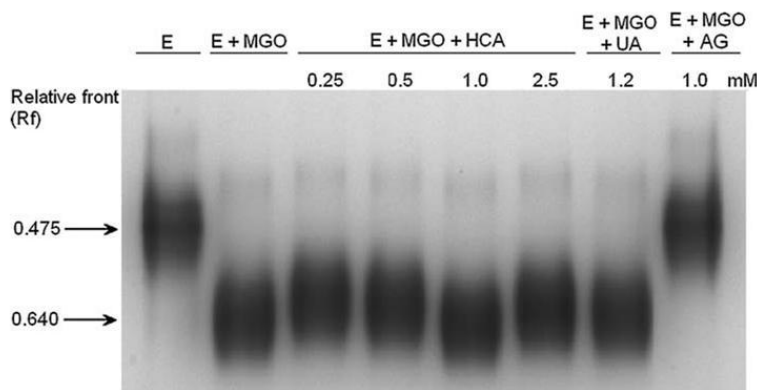
Discussion

In this study, the effect of potential anti-glycating agents on middle stage of protein glycation was investigated using in

Table 1 Effect of glycation on molecular charge of aspartate aminotransferase

Incubation mixtures	Relative mobility (%) \pm S.D. ^a
AST + MGO	35.31 \pm 1.46
AST + MGO + HCA 0.25 mM	28.96 \pm 0.74*
AST + MGO + HCA 0.5 mM	30.15 \pm 0.85*
AST + MGO + HCA 1.0 mM	35.82 \pm 3.35
AST + MGO + HCA 2.5 mM	31.47 \pm 0.61*
AST + MGO + UA 1.2 mM	34.08 \pm 4.75
AST + MGO + AG 1.0 mM	0.35 \pm 1.32*

^a The electrophoretic mobility of AST on native PAGE was expressed as increased percentage compared to the control (100%). Results are mean of four independent experiments \pm S.D. (%), (*data with $P < 0.01$ compared to samples containing AST + MGO, Student's *t*-test). E = aspartate aminotransferase; MGO = methylglyoxal; HCA = hydroxycitric acid; UA = uric acid; AG = aminoguanidine



vitro model system containing aspartate aminotransferase (model protein), methylglyoxal (glycating agent), and tested compound (hydroxycitric acid, uric acid). Okada et al. [29] reported the decrease of AST enzymatic activity and its persistence in tissues of diabetic rats. Moreover, this enzyme could be subjected to the influence of free radicals in tissues of diabetics because this disease is always accompanied by oxidative stress [30]. These findings suggest that AST is modified by glycation and by oxidation in vivo and hence provide a rationale of its use as a model protein for studying glycation reactions [17, 23, 31]. The enzyme is available in a purified form from several commercial sources, permitting thus to characterize intramolecular changes of the protein due to glycation.

Cytosolic AST dimer from porcine heart (412 amino acids per subunit) contains 38 lysine and 52 arginine residues with six Lys–Arg and four Arg–Lys sequence pairs [31]. Coenzyme pyridoxal-5'-phosphate is non-covalently bound to ϵ -amino group of Lys-258 located in an active site of the enzyme. This Lys residue could be one of the possible targets of glycation agents as can be seen from the loss of enzymatic activity due to the effect of methylglyoxal as well as other glycation agents. Seidler and Kowalewski (2003) described the loss of six primary amines, loss of enzymatic activity, and changes in tryptophan fluorescence accompanied by localized as well as global

compaction of protein molecule during incubation of AST with methylglyoxal [31].

Reactive α -dicarbonyls (e.g., methylglyoxal) are important precursors in the formation of AGEs in vivo. These compounds are far more reactive than the parent sugars concerning their abilities to form inter- and intramolecular protein cross-links [26, 32]. Methylglyoxal is generated mainly not only by the fragmentation of triose-phosphates 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 glycation, and increased levels of MGO have been reported in patients suffering from diabetes mellitus [33]. This compound reacts irreversibly with lysine and arginine residues to form N_ϵ -(1-carboxyethyl)lysine (CEL), 1,3-di(N_ϵ -lysino)-4-methyl-imidazolium (MOLD), argpyrimidine, and three structural isomers of hydroimidazolone. All of the before mentioned compounds were described and quantified in vivo [34].

One of the approaches in diabetes prevention or treatment is to develop compounds effective in removing α -dicarbonyls, and thus forestall formation of AGEs. Aminoguanidine could serve as a prototype of such drugs because its antioxidant and anti-glycation properties in vitro and in vivo were already reported, but the adverse effects led to the termination of phase III clinical trial

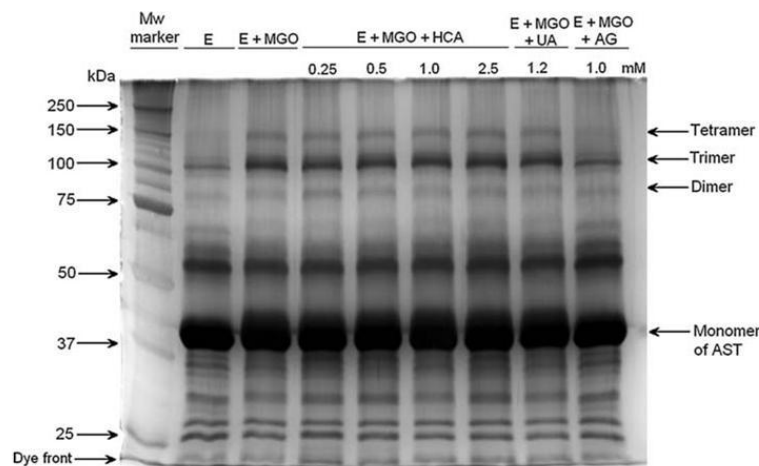


Fig. 4 Formation of protein cross-links on reaction of AST with methylglyoxal. AST (0.45 mg/ml) was incubated with or without methylglyoxal (0.5 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C in the presence or absence of hydroxycitric acid (0.25–2.5 mM), uric acid (1.2 mM), or aminoguanidine (1 mM) for 10 days and then subjected to SDS-PAGE. Electrophoretic separation was performed

on 4% stacking and 10% resolving polyacrylamide gels under reducing conditions. Bands were visualized with silver staining. Each lane was loaded with 4 µg of protein. E = aspartate aminotransferase; MGO = methylglyoxal; HCA = hydroxycitric acid; UA = uric acid; AG = aminoguanidine

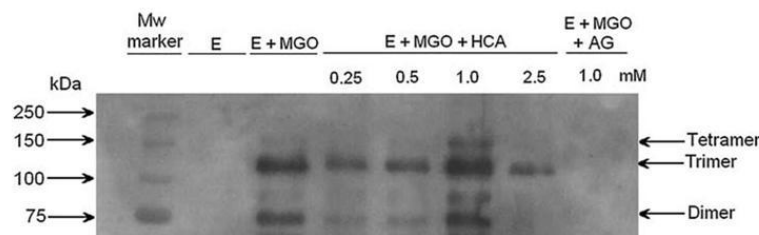


Fig. 5 Immunoblots of AST samples treated with methylglyoxal. AST (0.45 mg/ml) was incubated with or without methylglyoxal (0.5 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C in the presence or absence of hydroxycitric acid (0.25–2.5 mM) or aminoguanidine (1 mM) for 12 days and then subjected to SDS-PAGE with

subsequent Western blotting. Blot was reacted with mouse anti-MGO [3C] primary antibody. Molecular weight standard and protein bands were marked by rabbit anti-mouse IgG using a chemiluminescent detection with an alkaline phosphatase substrate

carried out with this compound [8]. This reactive nucleophilic compound forms 3-amino-1,2,4-triazine derivatives by reaction with α -dicarbonyl compounds (methylglyoxal, glyoxal, and 3-deoxyglucosone) in vitro at physiological conditions (pH 7.4; 37°C). These triazine products have characteristic profile of UV absorption spectrum with maxima at 225 and 320 nm [35]. In our experiments, potential anti-glycating effect of compounds under investigation was compared to the influence of AG 1.0 mM and Trolox 2.5 mM. Decrease in catalytic activity of AST observed in samples containing AST + AG was probably

caused by interaction between pyridoxal-5'-phosphate coenzyme and aminoguanidine forming Schiff base [7, 36].

Positive anti-glycation activity of hydroxycitric acid as well as uric acid on late-stage of protein glycation in the model containing AST and fructose 50 mM were already published [18, 24]. This study links to the before mentioned experiments and reveals the possibility of MGO scavenging by these compounds, and thus carbonyl stress prevention.

As for activity assessment, the fact that hydroxycitric acid inhibited the decrease in AST activity caused by

methylglyoxal documents, a beneficial effect of the compound against glycation process. This inhibitory effect was more remarkable at higher concentrations of HCA studied (1.0 and 2.5 mM), while it seems less pronounced at lower concentrations of HCA (0.25 and 0.5 mM). Hydroxycitric acid does not change catalytic activity of AST (samples containing AST + HCA), which means that it interacts neither with enzyme molecule nor with its coenzyme.

As for fluorescence measurement, control sample showed stability but not negligible fluorescence, since the start of the experiment. Most of this fluorescence is probably constituted by general fluorescence properties of proteins. Presence of pyridoxal-5'-phosphate coenzyme in the molecule of AST also contributes to basal fluorescence of the enzyme. Results of fluorescence measurements clearly show an inhibiting effect of hydroxycitric acid on the formation of AGE products. HCA was more effective in the inhibition of argpyrimidine generation than in the prevention of non-specific AGEs rise. Apart from these findings, the use of fluorescence method for evaluation of protein glycation is limited by its imprecision. The measurement of some well-identified AGEs (e.g., pentosidine and carboxymethyllysine) by techniques as HPLC or ELISA could give more precise information on this matter.

The electrophoretic techniques confirmed the results obtained by other methods; i.e., changes in protein molecule caused by the presence of methylglyoxal and positive anti-glycating effect of hydroxycitric acid. Methylglyoxal-induced chemical modifications led to a change in molecular charge of AST, which became more anionic as revealed by native PAGE. The SDS-PAGE and subsequent western blotting clearly showed formation of protein cross-links with higher molecular weight than native enzyme. Hydroxycitric acid partially protected native AST from glycation by MGO and also exhibited anti-cross-linking activity.

By contrast, uric acid showed neither direct impact on AST activity nor positive anti-glycation effect. These findings were supported also by fluorescence measurement as well as electrophoretic techniques. In the previously published study of our research group, 1.2 mM uric acid revealed beneficial intervention against late-stage protein glycation caused by fructose 50 mM [24]. Authors supposed that uric acid is able, at least in part, to trap α -dicarbonyl compounds and thus participate in the prevention of carbonyl stress. This hypothesis was not confirmed.

Positive effect of HCA and UA on glycation of AST by fructose observed in previously published study [18, 24] was probably caused by free radical scavenging activity of these compounds. Also modification of proteins caused by methylglyoxal can be accompanied by formation of free radicals. Lee et al. (1998) identified three types of free radical species in samples containing methylglyoxal and bovine serum albumin by electron spin resonance

spectroscopy [37]. These radicals (methylglyoxal dialkylimine radical cation, methylglyoxal radical anion, and superoxide anion radical) were formed by direct 1-electron transfer process. Scavenging ability of UA against hydroxyl radicals, peroxy radicals, and hypochlorous acid as well as its property to form stable co-ordination complexes with iron ions were described [21, 38]. It can be assumed that HCA similarly to citric acid can act as potential metal-chelating agent [39].

It can be concluded that hydroxycitric acid is able to partially inhibit methylglyoxal-induced modification of protein molecule and thus prevent their deteriorating activity in the organism. Its effect was comparable to that of Trolox 2.5 mM. Nevertheless, main anti-glycation activity expected from HCA and UA is inactivation of radicals and oxidants, which mainly act in the step upstream to the formation of dicarbonyls. HCA could be used as a supportive treatment in diabetic patients in future although additional experiments that would prove its effectiveness *in vivo* are needed. However, HCA did not reach the antiglycation effectiveness of aminoguanidine but it also did not exert adverse effects of AG. Uric acid showed no anti-glycation activity.

Acknowledgments This work was made possible due to financial support from the Development project of Czech Ministry of Education No. 141/2008.

References

- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP (1988) Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256:205–212
- Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:1–21. doi:10.1210/rp.56.1.1
- 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. doi:10.1002/dmrr.488
- Matsumoto K, Sano H, Nagai R et al (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. doi:10.1042/0264-6021:3520233
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A et al (2001) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276:13348–13355. doi:10.1074/jbc.M011613200
- Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T et al (2008) Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications. *Expert Opin Investig Drugs* 17:983–996. doi:10.1517/13543784.17.7.983
- Bolton WK, Cattran DC, Williams ME et al (2004) Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 24:32–40. doi:10.1159/000075627

8. Thormalley PJ (2003) Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. *Arch Biochem Biophys* 419:31–40. doi:10.1016/j.abb.2003.08.013
9. Jena BS, Jayaprakasha GK, Singh RP et al (2002) Chemistry and biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia*. *J Agric Food Chem* 50:10–22. doi:10.1021/jf010753k
10. Ohia SE, Opere CA, LeDay AM et al (2002) Safety and mechanism of appetite suppression by a novel hydroxycitric acid extract (HCA-SX). *Mol Cell Biochem* 238:89–103. doi:10.1023/A:1019911205672
11. Sullivan AC, Triscari J, Hamilton JG et al (1974) Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. I. Lipogenesis. *Lipids* 9:121–128. doi:10.1007/BF02532136
12. Sullivan AC, Triscari J, Hamilton JG et al (1974) Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. II. Appetite. *Lipids* 9:129–134. doi:10.1007/BF02532137
13. Watson JA, Fang M, Lowenstein JM (1969) Tricarballic acid and hydroxycitrate: Substrate and inhibitor of ATP: Citrate oxaloacetate lyase. *Arch Biochem Biophys* 135:209–217. doi:10.1016/0003-9861(69)90532-3
14. Kovacs EM, Westterterp-Plantenga MS (2006) Effects of (-)-hydroxycitrate on net fat synthesis as de novo lipogenesis. *Physiol Behav* 88:371–381. doi:10.1016/j.physbeh.2006.04.005
15. Shara M, Ohia SE, Schmidt RE et al (2004) Physico-chemical properties of a novel (-)-hydroxycitric acid extract and its effect on body weight, selected organ weights, hepatic lipid peroxidation and DNA fragmentation, hematology and clinical chemistry, and histopathological changes over a period of 90 days. *Mol Cell Biochem* 260:171–186. doi:10.1023/B:MCBL.0000026069.53960.75
16. Soni MG, Burdock GA, Preuss HG et al (2004) Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax, a novel calcium/potassium salt. *Food Chem Toxicol* 42:1513–1529. doi:10.1016/j.fct.2004.04.014
17. Preuss HG, Garis RI, Bramble JD et al (2005) Efficacy of a novel calcium/potassium salt of (-)-hydroxycitric acid in weight control. *Int J Clin Pharmacol Res* 25:133–144
18. Bousova I, Martin J, Jahodar L et al (2005) Evaluation of in vitro effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycoxidation. *J Pharm Biomed Anal* 37:957–962. doi:10.1016/j.jpba.2004.10.014
19. Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 14:615–631. doi:10.1016/0891-5849(93)90143-1
20. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF et al (1986) Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 235:747–754
21. Regoli F, Winston GW (1999) Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 156:96–105. doi:10.1006/taap.1999.8637
22. Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P (1991) Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 54:1129S–1134S
23. Racek J (1999) *Klinicka biochemie*. Galen, Praha
24. Bousova I, Bakala H, Chudacek R et al (2005) Glycation-induced inactivation of aspartate aminotransferase, effect of uric acid. *Mol Cell Biochem* 278:85–92. doi:10.1007/s11010-005-6933-0
25. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R (1986) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 24:497–510
26. Wu CH, Yen GC (2005) Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation end products. *J Agric Food Chem* 53:3167–3173. doi:10.1021/jf048550u
27. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi:10.1038/227680a0
28. Ohsawa K, Ebata N (1983) Silver stain for detecting 10-femto-gram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 135:409–415. doi:10.1016/0003-2697(83)90703-0
29. Okada M, Murakami Y, Miyamoto E (1997) Glycation and inactivation of aspartate aminotransferase in diabetic rat tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43:463–469
30. West IC (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17:171–180. doi:10.1046/j.1464-5491.2000.00259.x
31. Thormalley 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. doi:10.1016/0306-3623(95)02054-3
32. Seidler NW, Kowalewski C (2003) Methylglyoxal-induced glycation affects protein topography. *Arch Biochem Biophys* 410:149–154. doi:10.1016/S0003-9861(02)00662-8
33. McLellan AC, Thormalley PJ, Benn J et al (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci* 87:21–29
34. Ahmed N, Thormalley PJ, Dawczynski J et al (2003) Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5287–5292. doi:10.1167/iovs.03-0573
35. Thormalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK (2000) Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem Pharmacol* 60:55–65. doi:10.1016/S0006-2952(00)00287-2
36. Taguchi T, Sugiura M, Hamada Y et al (1998) In vivo formation of a Schiff base of aminoguanidine with pyridoxal phosphate. *Biochem Pharmacol* 55:1667–1671. doi:10.1016/S0006-2952(98)00010-0
37. Lee C, Yim MB, Chock PB et al (1998) Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J Biol Chem* 273:25272–25278. doi:10.1074/jbc.273.39.25272
38. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF et al (1986) Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 235:747–754
39. Welch KD, Davis TZ, Aust SD (2002) Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys* 397:360–369. doi:10.1006/abbi.2001.2694

II. Souhrnné práce prezentované na sympoziích a konferenciích

Pathobiochemie / SÁL A

Středa 17. 9. 2008

P190

Vplyv hypogonadizmu na kostnú hustotu u mužov s Downovým syndrómom

Šustrová M., Krivošíková Z., Spustová V., Štefíková K.
*Oddelenie imunológie a imunotoxikológie, Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie,
Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, Slovensko
maria.sustrova@szu.sk*

Úvod: Hypogonadizmus predstavuje významný rizikový faktor vzniku a rozvoja mužskej osteoporózy. U mužov s Downovým syndrómom (DS) je popísaný vyšší výskyt hypogonadizmu než v zdravej populácii. Tiež sú známe údaje o vyššom výskyte zníženej kostnej hustoty u pacientov s DS už v mladšom veku. Cieľom našej práce bolo zistiť vzťah medzi folikulo-stimulačným hormónom (FSH), dehydroepiandrosterón-sulfátom (DHEA-S) a testosterónom (T) a kostnou hustotou u mužov s Downovým syndrómom.

Metódy: V skupine DS (n=52) a kontrolnej skupine (K, n=40) sme vyšetrili sérové koncentrácie FSH, DHEA-S a testosterónu. V oboch skupinách sme tiež vyšetrili hustotu kosti (BMD) v oblasti krčku femuru (F), trochanteru (Tr) a lumbálnej chrbtice (L1-4).

Výsledky: Priemerné koncentrácie DHEA-S a T boli v referenčnom rozmedzí v oboch skupinách. Skupiny sa medzi sebou nelíšili v koncentráciách T, ale v skupine DS boli koncentrácie DHEA-S významne nižšie ako v kontrolnej skupine ($p < 0,001$). Koncentrácie FSH v skupine DS prekročovali referenčný rozsah a boli významne vyššie ako v kontrolnej skupine ($p < 0,001$). BMD bola vo všetkých troch sledovaných miestach významne nižšia v skupine DS ($p < 0,001$). Regresnou analýzou sme zistili významnú inverznú koreláciu FSH s BMD vo všetkých sledovaných oblastiach. Hustota kostí tiež významne pozitívne korelovala s koncentraciami DHEA-S v oblasti F a L1-4. Tieto výsledky sme potvrdili aj univariálnou analýzou.

Záver: Výsledky tejto štúdie ukazujú, že muži s DS majú nižšiu hustotu kostí než zdraví muži. Na základe získaných výsledkov môžeme potvrdiť, že jedným z faktorov ktoré ovplyvňujú stav BMD u týchto pacientov je aj hypogonadizmus. Znížené koncentrácie DHEA-S, ktorý slúži ako prekursor pre tvorbu testosterónu a androsterónu spolu so zvýšenými koncentraciami FSH majú pravdepodobne priamy účinok na zvýšenú resorpciu kostí, čo dokladajú aj niektoré hierárne údaje.

Táto práca bola podporená projektom Ministerstva zdravotníctva SR (č.2005/39-SZU-17).

P191

Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal; effect of selected antioxidants

Boušová I., Bacilková E., Dršata J.
*Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové
Iva.Bousova@faf.cuni.cz*

Non-enzymatic glycation is a process in which reducing sugars bind to free amino groups of protein and advanced glycation end-products (AGEs) are formed. That results in the impairment of protein functions during diabetes mellitus and age-related diseases. Several oxidative steps are also included. Methylglyoxal (MGO), the reactive dicarbonyl compound formed in the course of glycation, participates in the intracellular glycation process.

Effects of hydroxycitric acid, aminoguanidine, and uric acid in various concentrations (1 μ M - 10 mM) on glycation of aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) by MGO in the in vitro model were tested. AST was incubated with 0.5 mM MGO at 37°C in the absence or presence of antioxidant for up to 7 days. Enzyme activity (kinetic UV method), absorption UV-VIS spectra and formation of fluorescent AGEs ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/440 nm for total AGEs and $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 335/385 nm for pentosidine) were taken as the criteria of the course of glycation. Cross-linking and aggregation of AST caused by MGO was investigated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Methylglyoxal caused 65% decrease of the AST activity after 4 hours of incubation. This decrease was partially reversed by hydroxycitric acid 2.5 mM or aminoguanidine 1 mM. Latter compound also prevented formation of AGEs as was seen at fluorescence and absorption UV-VIS spectra of AST. Aminoguanidine also prevented cross-linking and aggregation of AST caused by MGO as was seen at SDS-PAGE. Uric acid had no effect on glycation of AST by MGO. Acknowledgements: Supported by the Development project of Czech Ministry of Education No. 141/2008.