

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Neenzymatická glykace proteinů a stárnutí**

**Diplomová práce**

Autor:

**Bc. Kateřina Slowiková**

Studijní program:

N1501 Biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

**Mgr. Jiří Voller, Ph.D.**

Termín odevzdání práce

13.5. 2015

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Slowiková
Název práce	Neenzymatická glykace proteinů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok obhajoby	2015
Abstrakt	Produkty neenzymatické glykace jsou dávány do souvislosti se stárnutím i vznikem a rozvojem nemocí stáří. Předložená diplomová práce je zaměřena na zavedení metod pro hodnocení neenzymatické glykace proteinů, a to jak na molekulární úrovni, tak i na úrovni celého organismu – mikroskopické hlístice <i>C. elegans</i> . Optimalizovány byly tyto metody: spektrofotometrické hodnocení glykace, denzitometrická kvantifikace glykovaných proteinů po značení konjugátem boronové kyseliny s fluoresceinem a sledování vlivu cukrů na délku života <i>C. elegans</i> . Tyto metody pak sloužily k testování protektivní aktivity vybraných fytohormonů cytokininů.
Klíčová slova	Neenzymatická glykace proteinů, produkty pokročilé glykace, AGE, cytokininy, kinetin
Počet stran	60
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Slowiková
Title of thesis	Non-enzymatic glycation and aging
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	Products of non-enzymatic glycation have been associated with aging and with initiation and progression of age-related diseases. This thesis deals with optimization of methods for evaluation of non-enzymatic glycation of proteins, both at the molecular level and at the level of the whole organism - the microscopic nematode <i>C. elegans</i> . Methods used: spectrophotometric measurement of protein glycation, densitometric quantification of glycated proteins labelled with a boronic acid-fluorescein conjugate and evaluation of the effects of sugars on the lifespan of <i>C. elegans</i> . Optimized methods were used to assess the protective activity of selected phytohormones cytokinins.
Keywords	Non-enzymatic glycation of proteins, AGE, advanced glycation end-products, cytokinins, kinetin
Number of pages	60
Language	Czech

Touto cestou bych ráda poděkovala především svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Jiřímu Vollerovi Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a trpělivost při zpracování této práce.

Také bych chtěla poděkovat Mgr. Aleně Kadlecové za odborné vedení a rady při práci s *C. elegans* a Kateřině Fakové za pomoc v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Václavu Míkovi Ph.D. za syntézu kyseliny boronové značené fluoresceinem.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s pomocí vedoucího práce a citované literatury.

V Olomouci dne 13.5. 2015

Podpis.....



## Obsah

1 Úvod a cíle práce .....	9
2 Produkty pokročilé glykace .....	10
2.1 Vznik AGE .....	10
2.2 Biologické důsledky glykace a účinky pokročilých produktů glykace .....	12
2.2.1 Efekt na proteiny s dlouhou životností.....	12
2.2.2 Efekt na proteiny s krátkou životností.....	13
2.3 Receptory pro AGE .....	13
2.4 Dikarbonylové sloučeniny .....	15
3 Obrana proti tvorbě a kumulaci AGE.....	16
3.1 Glyoxalový systém .....	16
3.2 Terapeutické strategie boje proti neenzymatické glykaci, tvorby AGE a jejím důsledkům.....	17
3.2.1 Látky bránící neenzymatické glykaci nebo inhibující tvorbu AGE.....	18
3.2.2 „AGE breakers“.....	18
3.3.3 Nutraceutika .....	19
4 <i>Caenorhabditis elegans</i> jako model pro studium lidských chorob .....	19
4.1 Stárnutí a glykace u <i>C. elegans</i> .....	20
5 Kinetin a jeho účinek na oxidační stres a glykaci .....	21
6 Materiál.....	23
6.1 Chemikálie .....	23
6.2 Použité roztoky .....	23
6.3 Testované látky .....	24
6.4 Linie <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	24
6.5 Bakteriální kmeny.....	24
6.6 Média pro pokusy s <i>C. elegans</i> .....	24
7 Metody.....	26
7. 1 Hodnocení glykace a vlivu glykovaných proteinů na molekulární úrovni.....	26

7.1.1 Spektrofotometrické hodnocení glykace BSA .....	26
7.1.2 Značení glykovaného bovinního sérového albuminu pomocí konjugátu kyseliny fenylboronové a fluoresceinu .....	27
7.1.3 Optimalizace extrakce proteinů z <i>C. elegans</i> .....	27
7.2 Optimalizace modelu <i>C. elegans</i> pro glykační experimenty .....	28
7.2.1 Příprava bakteriální suspenze OP50 v LB médiu.....	28
7.2.2 Příprava suspenze živých bakterií v S-complete.....	28
7.2.3 Příprava suspenze bakterií usmrcených teplem v S-complete .....	29
7.2.4 Příprava NGM misek pro <i>C. elegans</i> .....	29
7.2.5 Přenos <i>C. elegans</i> na novou NGM misku .....	29
7.2.6 Ustanovení synchronizované populace <i>C. elegans</i> – „bleaching“ .....	30
7.2.7 Experimenty s cílem ovlivnit délku života <i>C. elegans</i> .....	30
8 Výsledky.....	32
8.2. Vizualizace a kvantifikace glykovaných proteinů pomocí reakce s konjugátem kyseliny fenylboronové a fluoresceinu.....	34
8.3 Izolace proteinů z <i>C. elegans</i> .....	41
8.4 Optimalizace modelu <i>C. elegans</i> pro glykační experimenty .....	43
9 Diskuze .....	47
9.1 Spektrofotometrické hodnocení glykace BSA.....	47
9.2 Značení glykovaného bovinního sérového albuminu pomocí konjugátu kyseliny fenylboronové a fluoresceinu.....	48
9.3 Izolace proteinů z <i>C. elegans</i> a hodnocení jejich glykace pomocí FBA .....	49
9.4 Optimalizace modelu <i>C. elegans</i> pro glykační experimenty .....	49
10 Závěr.....	52
Literatura .....	53



## Seznam použitých zkratek

AG	aminoguanidin
AGE	produkty pokročilé glykace
aK	8-aminokinetin
BSA	bovinní sérový albumin
FBA	konjugát kyseliny boronové s fluoresceinem
K	kinetin
PK	pyranylkinetin

# 1 Úvod a cíle práce

Neenzymatická reakce mezi redukcujícími cukry a biomolekulami, glykace, je známa již více jak sto let. Teprve v posledních letech je však dávána do souvislosti se vznikem a rozvojem nemocí jako je diabetes mellitus, Alzheimerova choroba nebo onemocnění kardiovaskulárního systému. Také se předpokládá významná role glykace v procesu stárnutí. Produktem neenzymatické glykace jsou AGE (ang. Advanced glycation-end products). Vyvolávají změny na úrovni buněk nebo celých tkání prostřednictvím zesílení biomolekul, modulují funkci makromolekul a jsou schopny vázat se na buněčné receptory, které tak blokují v jejich přirozené funkci. Vazbou na specifické receptory dokážou aktivovat prozánětlivou signální dráhu.

Byla navržena celá řada strategií, jak snížit neenzymatickou glykaci a zpomalit nebo zamezit hromadění AGE, popřípadě zabránit jejich toxickému působení. Patří mezi ně např. omezení příjmu kalorií, zvýšení klírens AGE nebo inhibici vazby AGE na RAGE. Také jsou zkoumány možnosti, jak pomocí farmakoterapie předejít či zpomalit tvorbu AGE, případně rozbít již vytvořené zesílení.

Cílem předložené diplomové práce bylo zavést metody pro rychlé hodnocení glykace proteinů, jednak na molekulární úrovni a jednak na úrovni celého organismu - mikroskopické hlístice *C. elegans*. Konkrétně šlo o spektrofotometrické hodnocení glykace modelového proteinu bovinního sérového albuminu (BSA), vizualizaci a kvantifikaci glykovaných proteinů (BSA a proteinových lyzátů z *C. elegans*) značených konjugátem boronové kyseliny s fluoresceinem a sledování vlivu cukrů na délku života *C. elegans*. Tyto metody pak sloužily k testování protektivní aktivity vybraných fytohormonů cytokininů.

## 2 Produkty pokročilé glykace

Produkty pokročilé glykace, AGE (z ang. Advanced glycation-end products), je heterogenní skupina sloučenin vznikajících glykací biomolekul, především proteinů. Na rozdíl od enzymaticky kontrolované a pro organismus výhodné glykosylace, glykace je neenzymatická reakce mezi redukujícími cukry (glukóza nebo galaktóza) a proteiny, lipidy nebo nukleovými kyselinami (Ahmed, 2005). V posledních letech se neenzymatická glykace *in vivo* a biologická aktivita AGE studují ve spojitosti s nemocemi, jako je diabetes mellitus, onemocnění kardiovaskulárního systému, Alzheimerova choroba a také kvůli jejich předpokládané důležité roli v procesu stárnutí.

Tvorba AGE může mít za následek změny na úrovni buněk nebo celých tkání, a to vytvořením zesíťením biomolekul, především proteinů (Brownlee et al., 1986). Glykace také přímo postihuje (moduluje) funkci makromolekul (Hammes et al., 1996). Vzniklé AGE se váží na buněčné receptory, které pak nemohou interagovat s přirozenými ligandy (Araki et al., 1995). Vazba na receptor RAGE (receptor pro AGE) může také spustit prozánětlivou signální dráhu (Stern et al., 2002).

Poprvé byla neenzymatická glykace popsána v roce 1912 francouzským chemikem Louis-Camille Maillardem, po kterém byla následně pojmenována jedna z drah vedoucích ke vzniku AGE. O 50 let později se John Edward Hodge zabýval zapojením této reakce v hnědnutí potravin během tepelných úprav. Maillardova reakce byla roky intenzivně zkoumána v potravinářském průmyslu, protože produkty pokročilé glykace dodávají potravinám požadovanou chuť a barvu, avšak zároveň mohou vést ke tvorbě látek s karcinogenními nebo mutagenními vlastnostmi.

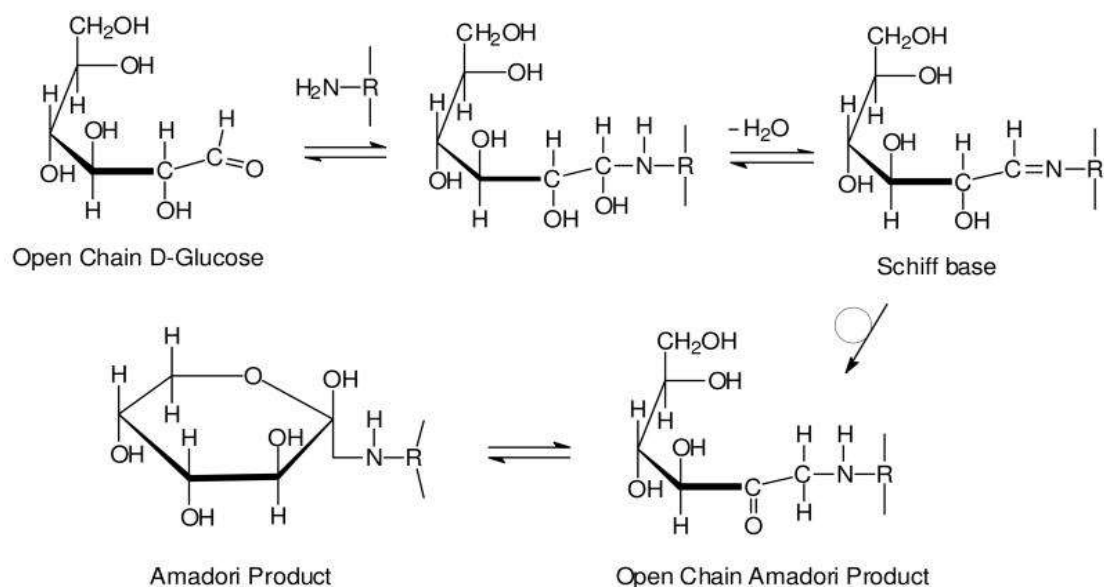
### 2.1 Vznik AGE

AGE vznikají endogenně v důsledku běžné metabolické aktivity organismu, do organismu mohou vstupovat i jako součást tepelně upravených potravin nebo v tabákovém kouři.

Tvorba endogenních AGE je zvýšena u diabetu (Fleming et al., 2011). Rychlost tvorby AGE mohou ovlivnit environmentální faktory, jako je např. kouření nebo výživa (Cerami et al., 1997)

Vznik AGE je komplikovaný a ne zcela objasněný proces, zahrnující jednoduché i vícečetné reakce. Klasická Maillardova reakce probíhá ve třech krocích.

V prvním kroku neredukující cukr reaguje s volnou aminoskupinou biomolekuly, nejčastěji je modifikován postranní řetězec lysinu nebo argininu. Průběh reakce závisí na koncentraci glukózy v krvi, přesněji řečeno na její koncentraci v místě glykace. Rozhodující je i obsah a dostupnost lysinových a argininových postranních řetězců v proteinech. To záleží na terciární struktuře proteinů: reaktivní skupiny na povrchu jsou glykaci přístupnější než ty skryté uvnitř proteinu. Produktem je nestabilní Schiffova báze.



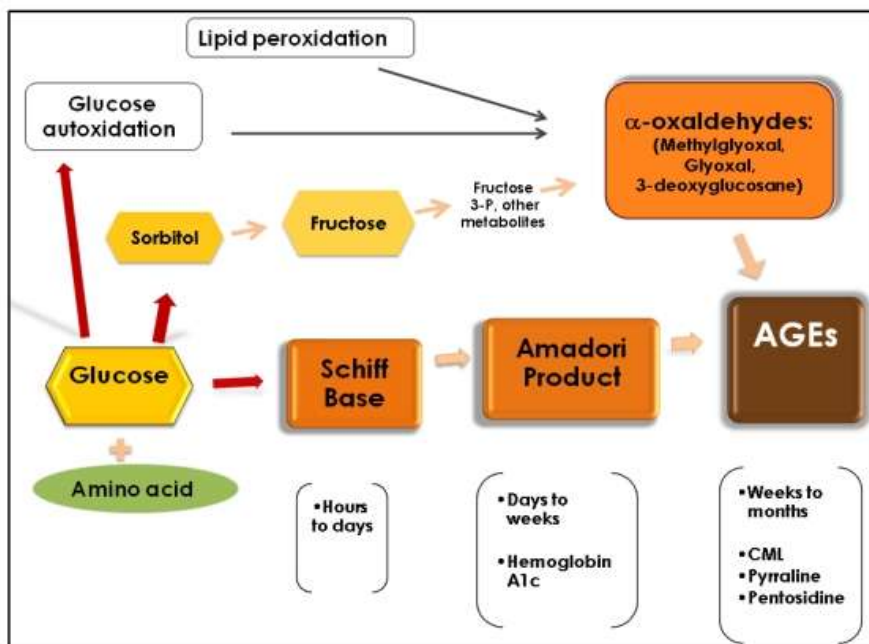
**Obr. 1** – schéma vzniku Amadoriho produktů (Převzato ze Zhang et al., 2009).

Ve druhém kroku vzniká z Schiffovy báze stabilnější ketoamin – Amadoriho produkt (obr. 1). Postupně dochází k přeměně Amadoriho produktů na AGE v sérii reakcí, zahrnující oxidace, redukce a hydratace. Tvorba AGE je nevratná, ale jejich koncentrace závisí nejen na rychlosti tvorby, ale i na obratu proteinů v buňkách a ve tkáních.

Některé z aminokyselin jsou reaktivnější než jiné. Místo glykace a kinetika celého procesu je ovlivněna faktory, jako je hodnota  $\text{pK}_a$  dané  $\alpha$ -aminoskupiny (nižší hodnota  $\text{pK}_a$  znamená vyšší nukleofilitu a tím i rychlejší tvorbu Schiffovy báze), vliv okolních aminokyselin nebo charakter vazebního místa.

Konečné produkty glykace mají hnědavou barvu a některé mají fluorescenční vlastnosti. Jsou velmi stabilní, akumulují uvnitř i vně buněk, kde narušují funkci proteinů (Ahmed, 2005).

Kromě Maillardovy reakce existují i další mechanismy, vedoucí ke tvorbě AGE (obr. 2). Reaktivní sloučeniny schopné modifikovat proteiny vznikají např. peroxidací lipidů, kdy v sérii následných reakcí vznikají tzv. ALE (Advanced lipoperoxidation products) nebo autooxidací glukózy.



**Obr. 2** – schéma vzniku AGE (Převzato z Luevano-Contreras and Chapman-Novakofski, 2010).

Další možností je polyolová dráha, ve které je glukóza přeměněna působením aldoza-reduktázy na sorbitol, který je následně pomocí sorbitol dehydrogenázy oxidován na fruktózu. Její metabolity ( $\alpha$ -oxaldehydy) pak interagují s aminokyselinami za vzniku AGE (Lorenzi, 2007).

Doposud bylo popsáno velké množství AGE, mezi nejstudovanější patří karboxymethyl-lysin (CML), pentosidin, pyrralin. Některé z nich jsou také používány jako biomarkery glykace in vivo (Ahmed, 2005).

## 2.2 Biologické důsledky glykace a účinky pokročilých produktů glykace

### 2.2.1 Efekt na proteiny s dlouhou životností

Jelikož glykace proteinů a následný vznik AGE je proces, trvající v řádu týdnů až měsíce, jsou postiženy především proteiny s dlouhou životností, jako jsou proteiny

extracelulární matrix elastin, kolagen, laminin nebo fibronectin. Přirozené buněčné procesy vedou k pomalému odstraňování stárnoucích proteinů (Bucala and Cerami, 1992) a poškozené proteiny jsou nahrazovány novými, nepoškozenými. Avšak v mnoha lidských tkáních je tento obrat pomalejší než tvorba AGE. Postupně v nich proto dochází ke kumulaci AGE (Robert et al., 2008). Stoupající obsah modifikovaných proteinů v oční čočce, artériích, chrupavce nebo kůži, způsobuje s přibývajícím věkem jejich tuhnutí a ztrátu elasticity.

### **2.2.2 Efekt na proteiny s krátkou životností**

Látky s vysokým glykačním potenciálem (např. dikarboxylové sloučeniny, glukosa-6-fosfát, fruktosa) jsou schopné glykovat i proteiny s krátkou životností. Vysoký obrat těchto proteinů sice zmírňuje negativní efekty glykace, ale i zde může změna vlastností a narušení přirozené funkce části populace proteinů přispívat k narušení homeostázy.

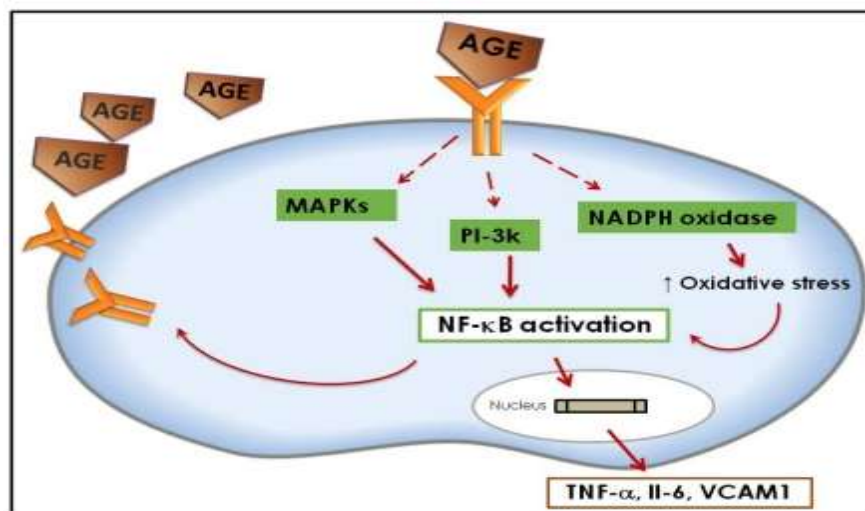
Glykace může způsobit narušení konformace, změnu antigenních vlastností, blokovat protein-proteinové interakce či snížení schopnosti vázat ligandy (Vlassara and Palace, 2003). U enzymů může dojít k modifikaci aktivního místa a následnému poklesu nebo úplné ztrátě aktivity. Nově vzniklá kovalentní vazba může vést ke vzniku proteinů odolných vůči proteolýze (DeGroot et al., 2001).

## **2.3 Receptory pro AGE**

AGE také interagují se specifickými receptory, např. receptorem RAGE (z ang. Receptor of AGE). Předpokládá se, že vazba AGE na RAGE a následná aktivace signální dráhy hraje roli v řadě patologických procesů, způsobených AGE (Hofmann et al., 1999).

RAGE je členem imunoglobulinové nadrodiny proteinů. Je kódován genem, nacházejícím se na chromosomu 6 v blízkosti hlavního histokompatibilního komplexu III. Patří mezi membránové receptory, jeho přítomnost byla jistěna na povrchu rozličných buněk, např. makrofágů nebo buněk endotelu. Je aktivován různými ligandy, kromě AGE také amfoterinem, některými S100 proteiny a beta-amyloidem. Vazba ligandu spouští prozánětlivou signální dráhu (Stern et al., 2002; obr. 3), jejímž efektem je transkripční faktor NFkappaB (nuclear factor kappa-B) aktivující transkripci řady prozánětlivých genů

(Bierhaus et al., 2005). Je známo, že zánět je součástí některých procesů doprovázejících stárnutí (Vlassara and Palace, 2003; Finch, 2007).



**Obr. 3** – Signální dráhy aktivované RAGE (Převzato z Luevano-Contreras and Chapman-Novakofski, 2010).

Aktivace RAGE může vyvolávat oxidativní stres přímo, aktivací adenin dinukleotid fosfát (NADPH)-oxidázy (NOX), ale i nepřímě snížením aktivity buněčných mechanismů pro inaktivaci volných kyslíkových radikálů (ROS). RAGE signalizace vede ke snížení aktivity superoxid dismutasy (SOD) a katalázy a také k poklesu koncentrace kyseliny askorbové a redukováného glutationu (GSH) (Bierhaus et al., 2005). Snížení hladin GSH vede ke snížení aktivity glyoxalasy I (Glo I), hlavního obranného systému proti methylglyoxalu, a tím i k další produkci AGE (Xue et al., 2011).

RAGE je obvykle v organismu exprimován v nízkých koncentracích, v patologických stavech se jeho exprese zvyšuje (Bierhaus et al., 2005). Po aktivaci RAGE dochází k oxidačnímu stresu a indukci zánětu v důsledku zvýšení produkce cytokinů a exprese adhezních molekul na povrchu buněk. V případě cév důsledkem může být jejich remodelace a aterogeneze (Zieman et al., 2007). Signalizace RAGE může také vyvolávat transdiferenciaci (přeměna terminálně diferencované buňky na jinou terminálně diferencovanou buňku odlišného typu) epiteliálních buněk ledvin v myofibroblasty a čímž dochází ke zhoršení funkce ledvin (Jerums et al., 2003). Dalším příkladem by mohla být přeměna makrofágů na pěnové buňky během aterogeneze (Vlassara and Palace, 2003).

V plasmě se nachází rozpustná zkrácená forma RAGE (sRAGE). Obsahuje vazebnou doménu, ale ne transmembránovou doménu, jde tak o extracelulární protein bez signálních

vlastností (Ramasamy et al., 2009). Receptor sRAGE soutěží se signálním receptorem RAGE o ligandy a tím přispívá k odstraňování a neutralizaci cirkulujících ligandů (Ramasamy et al., 2012).

Navzdory tomu, že interakce mezi AGE a RAGE jsou studovány již více než 20 let, stále o nich není dostatek informací. Jedním z důvodů je nejspíše velká heterogenita AGE.

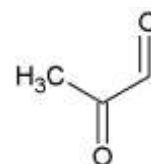
RAGE je nejlépe známým, ale ne jediným receptorem pro AGE. Mimo jiné jsou známy i receptory MSR (The macrophage scavenger receptor) na povrchu makrofágů. MSR, pravděpodobně SR-A a CD-36, pomáhají makrofágům rozpoznat a následně i odstraňovat proteiny modifikované AGE (Araki et al., 1995).

Další skupinou povrchových receptorů jsou AGER1, AGER2 a AGER3, regulující endocytózu a degradaci AGE (Vlassara, 2001). AGER1 působí proti oxidativnímu stresu, vyvolanému AGE, inhibicí signalizace RAGE (Lu et al., 2004).

## 2.4 Dikarboonylové sloučeniny

Dikarboonylové sloučeniny vznikají v důsledku nerovnováhy v metabolismu intercelulární glukózy, ale také oxidativní degradací Amadoriho produktů. Svými vysoce reaktivními karboonylovými skupinami atakují aminoskupiny biomolekul (proteinů, nukleotidů a lipidů), obvykle v místě lysinových, argininových a cysteinových zbytků za vzniku AGE. Zvýšení koncentrace karboonylových sloučenin v organismu je označováno jako karboonylový stres.

Významným glykačním agens je methylglyoxal (obr. 4). Vzniká v cytosolu několika různými mechanismy - nejčastěji však jako přirozený metabolit během glykolýzy rozpadem triosafostátů. Dále v rámci metabolismu ketolátek, během degradace treoninu a fragmentací glykovaných proteinů. Methylglyoxal vzniká převážně uvnitř buněk, ale malé se dostává z buněk ven a přispívá tak ke glykaci extracelulárních proteinů (Karachalias et al., 2010). Glykační potenciál methylglyoxalu je přibližně 20 000x vyšší než glukózy. Za normálních podmínek je methylglyoxal metabolizován glyoxalovým systémem na méně reaktivní produkty. Díky této efektivní detoxifikaci je hladina methylglyoxalu v plasmě udržována na 50 000x nižší koncentraci než hladiny glukózy (Beisswenger et al., 1999). Odhaduje se, že dospělý člověk



**Obr. 4** – methylglyoxal.



denně vyprodukuje asi 3 mM methylglyoxalu, přičemž 99,7 % z tohoto množství je metabolizováno, z velké části Glo 1. Zbytek vyvolává glykaci (Rabbani and Thornalley, 2012).

Glyoxal vzniká autooxidativní degradací glukózy (Wolfova dráha), lipoperoxidací nebo oxidací Schiffovy báze. Vzniklé sloučeniny reagují především s argininovými zbytky za vzniku specifických AGE. např. hydroimidazonů, nejčastějších AGE u diabetiků (Thornalley, 2003), dále argpyrimidinu, tetrahydropyrimidinu nebo methylglyoxal-lysinovému dimeru (MOLD).

Mezi další dikarboxylové sloučeniny lze zařadit 3-deoxyglukoson (3-DG) nebo glukoson.

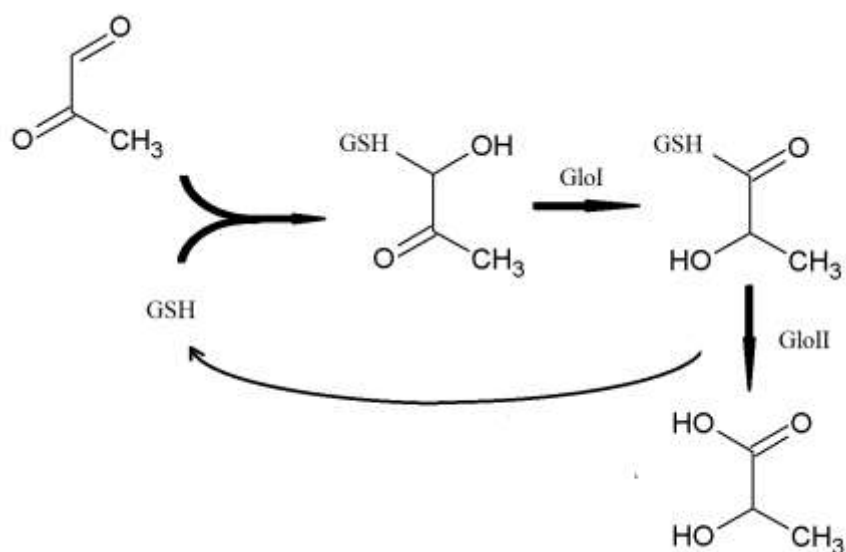
### **3 Obrana proti tvorbě a kumulaci AGE**

Obsah AGE v organismu je dán nejenom rychlostí jejich tvorby, ale také rychlostí, s jakou jsou z tkání a orgánů odstraňovány, takzvaným obratem. Mnoho buněk má vyvinuty vlastní vnitřní dráhy, pomocí kterých se brání proti akumulaci AGE (Thornalley, 2003). Za nejdůležitější je považován glyoxalový systém, ale existují i jiné enzymatické systémy. Relativně novou třídou enzymů, které dokáží rozpoznat a rozbít Amadoriho produkty, jsou fruktosyl-amino oxidázy (FAOXs) nebo fruktosamin kinázy (Wu and Monnier, 2003).

#### **3.1 Glyoxalový systém**

V roce 1913, rok po první publikaci popisující neenzymatickou glykaci, byl objeven glyoxalový systém.

Glyoxalový systém se nachází v buněčném cytosolu bakterií i eukaryot. Jeho funkcí je katalýza přeměny methylglyoxalu na d-laktát. Skládá se ze dvou enzymatických systémů, glyoxalasy 1 (GLO1), glyoxalasy 2 (GLO2) a katalytického množství glutathionu. Hlavním fyziologickým substrátem pro Glo 1 je methylglyoxal, ale přeměňuje i jiné  $\alpha$ -oxoaldehydy. V prvním kroku spolu spontánně reagují  $\alpha$ -oxoaldehyd a glutation, dochází ke vzniku hemithioacetalu. Ten je přeměněn Glo 1 na S-D-laktoylglutathion. Meziprodukt je následnou hydrolýzou Glo 2 přeměněn na laktát a glutathion (Inoue and Kimura, 1995; obr. 5).



**Obr. 5** – schéma glyoxalásového systému.

Glo 1 je považován za klíčový regulátor koncentrace methylglyoxalu. V případě, že dojde k inhibici funkce Glo 1, ať už v důsledku nedostatku glutationu, nebo přítomnosti inhibitorů glyoxalasy 1, dochází k akumulaci methylglyoxalu (Thornalley et al., 1996). V roce 2008 proběhl pokus se zvýšením exprese Glo 1 u *C.elegans*, výsledkem bylo zvýšení průměrné délky života o přibližně 30 %. Utlumení exprese Glo 1 mělo za následek snížení délky života o 50 %. Z výzkumu vyplynulo, že Glo 1 je jeden z genů přímo ovlivňujícím délku života (Morcos et al., 2008).

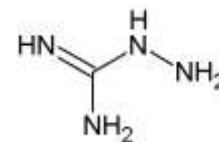
### 3.2 Terapeutické strategie boje proti neenzymatické glykaci, tvorby AGE a jejím důsledkům

Byla navržena celá řada strategií, jak snížit neenzymatickou glykaci a zpomalit nebo zamezit hromadění AGE, případně zabránit jejich toxickému působení. Zahrnují omezení příjmu kalorií, nízký přísun AGE v potravě, deglykační enzymy, zvýšení klírens AGE a inhibici vazby AGE na RAGE.

V následujícím textu jsou popsány možnosti, jak pomocí farmakoterapie předejít nebo zpomalit tvorbu AGE, případně rozbít již vytvořené zesítnění.

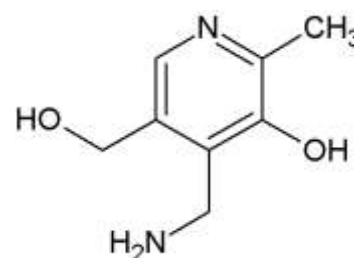
### 3.2.1 Látky bránící neenzymatické glykaci nebo inhibující tvorbu AGE

Jednou z prvních známých látek, potlačujících neenzymatickou glykaci, je aminoguanidin (obr. 6). Jedná se o nukleofilní hydrazin, který vycytává reaktivní karbonylové meziproducty v Maillardově reakci. Přes jeho potenciál bránit glykaci a následné tvorbě AGE *in vivo* je jeho využitelnost v terapii kvůli nežádoucím účinkům omezená. Stejně jako Pimagedin byl klinicky neúspěšně testován v terapii diabetické nefropatie (Reddy and Beyaz, 2006).



**Obr. 6** – aminoguanidin.

Pyridoxamin (obr. 7) je přirozeně se vyskytující isoforma vitamínu B<sub>6</sub>. Jeho mechanismus účinku pracuje na několika úrovních: blokuje oxidaci Amadoriho meziproductů; vycytává reaktivní karbonylové a dikarbonylové sloučeniny, odvozené od Amadoriho produktů; vycytává ionty kovů, které katalyzují oxidační reakce a vycytává ROS (Voziyan and Hudson, 2005).

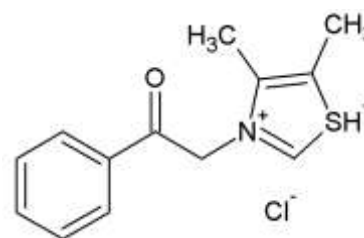


**Obr. 7** – pyridoxamin.

Existují i další látky s reaktivními nukleofilními funkčními skupinami a schopností vycytávat reaktivní karbonyly, které již byly úspěšně testovány *in vitro* u hlodavčích modelů diabetu. Mezi ně patří tennilsetam, penicillamin, OPB-9195 a některé deriváty aminoguanidinu (Reddy nad Beyaz, 2006).

### 3.2.2 „AGE breakers“

Do této skupiny látek patří sloučeniny, schopné reagovat s již vzniklými produkty Maillardovy reakce a „rozbít“ je. Takovými látkami je např. dimethyl-3-phenacyl-thiazolium chlorid (ALT-711), známý jako alagebrium (obr. 8), N-phenacyl-4,5-dimethylthiazolium nebo N-phenacylthiazolium (Vasan et al., 2003). Předpokládaným cílem těchto látek jsou místa s dikarbonylovým zesítním, které chemicky rozbíjejí pomocí thiazolové (od thiazolium) struktury (Vasan et al., 2003). Výsledkem



**Obr. 8** – alagebrium.

je zvýšení cévní elasticity a zlepšení kardiovaskulárních funkcí u zvířecích modelů diabetu a jiných chorob (Peyroux and Sternberg, 2006). Zajímavostí je, že předpokládaným produktem štěpení je karboxymethyl-lysin (CML), který byl identifikován jeden z ligandů pro RAGE, a tak by mohl vyvolávat prozánětlivou odpověď (Nagai et al., 2012).

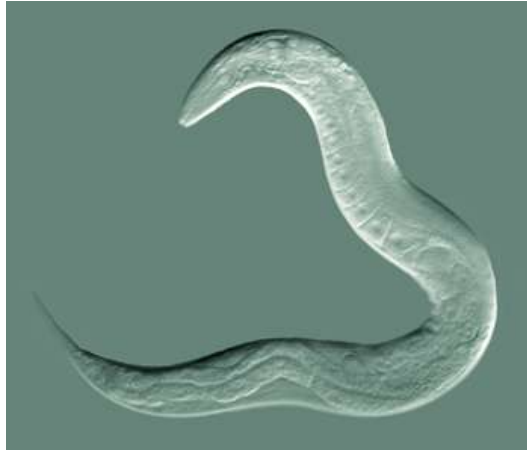
Co se týče alagebria, firmou Alteon byly provedeny I. a II. fáze klinického testování. Studie na krysách přinášely slibné výsledky, avšak studie na zdravých dobrovolnících ukázaly, že na lidi nemá alagebrium požadované účinky. Důvodem jsou pravděpodobně rozdíly ve spektru vznikajících AGE. U člověka dominuje glucospan, který je k působení alagebria odolný [1].

### 3.3.3 Nutraceutika

Klíčovou součástí mechanismu tvorby většiny AGE je oxidace. Proto by u látek s antioxidačními vlastnostmi a/nebo schopností vychytávat kovy katalyzující oxidaci mohla být předpokládána antiglykační aktivita (Price et al., 2001). Přírozenými nástroji v boji proti AGE by se tak mohly stát některé živiny a vitamíny (Elosta et al., 2012). Do této skupiny látek lze zařadit kyselinu askorbovou, niacinamid, pyridoxal, trolox, riboflavin, nebo zinek, na kterých byla dokázána *in vitro* schopnost inhibovat glykaci albuminu (Tawardi and Agte, 2011).

## 4 *Caenorhabditis elegans* jako model pro studium lidských chorob

*Caenorhabditis elegans*, háďátka obecné (obr. 9), je nepatogenní půdní červ, náležící do kmene nematoda (hlístice). Před více než 40 lety Sydney Brenner popsal využití *C. elegans* jako vhodného modelového organismu (Brenner, 1974). Netrvalo dlouho a *C. elegans* se stala významným nástrojem vývojové a molekulární biologie. Poté, co byl v roce 1998 genom *C. elegans* plně osekvenován (*C. elegans Sequencing Consortium, 1998*), byla odhalena podobnost mezi geny lidí a těchto hlístic. Přibližně 40 % genů, spojovaných s lidskými chorobami, má své homology v genomu *C. elegans* (Culetto and Sattelle, 2000). Dnes je tato hlístice využívána coby modelový organismus pro výzkum hlavních biologických procesů i pro pochopení patogeneze takových nemocí, jakými je např. diabetes mellitus.



**Obr. 9** – *C. elegans* (Převzato z *en.wikipedia.org*)

*C. elegans* jako biologický model skýtá mnoho výhod, jako je levná kultivace, snadná manipulace, krátký generační čas, dobrá dostupnost pracovních nástrojů (webové stránky a fóra) i samotná struktura jejího těla – přibližně 1000 somatických buněk rozdělených do různých typů tkání (např. svaly, nervy, střevo) a průhledná pokožka, umožňující pozorování buněčných procesů *in vivo*.

V laboratořích se *C. elegans* pěstují na Petriho miskách, na pevném i tekutém médiu. Živí se bakteriemi. Za standardních laboratorních podmínek je délka jejich životního cyklu zhruba 2-3 týdny. Po vylíhnutí prodělávají čtyři larvální stádia (L1-L4) a dosahují dospělosti ve třech dnech (za pokojové teploty). Za nepříznivých podmínek, hlavně co se týče nedostatku potravy, může během vývoje přejít do alternativního třetího larválního stádia – dauer larvy. Jako dauer larva je hlístice schopná přežít i několik měsíců.

#### **4.1 Stárnutí a glykace u *C. elegans***

Stárnutí a délka života *C. elegans* je ovlivněna jak genetickými faktory, tak i specifickými faktory vnějšího prostředí (Herndon 2002). Některé faktory ovlivňující stárnutí jsou podobné u hlístic i savců, včetně člověka. Omezení příjmu cukru (kalorická restrikce) je doposud jediný známý způsob, který účinně prodlužuje délku života u *C. elegans* i savců (Lakowski and Hekimi, 2002). Další podobností je předpokládaná významná role oxidativního stresu v procesu stárnutí (Finkel and Holbrook, 2000). Tyto paralely naznačují, že *C. elegans* je vhodný nástroj k získání informací, které by mohly vést k prodloužení života u lidí (Sayed, 2011).

Jednou z předpokládaných příčin stárnutí je neenzymatická glykace. Nadbytečný příjem AGE a jejich chronické hromadění ve tkáních zrychluje proces stárnutí (Morcos et al., 2008). Mezi hlavní cíle reaktivních dikarboxylových sloučenin patří proteiny mitochondrií. U *C. elegans* bylo dokázáno, že zvýšená glykace mitochondriálních proteinů je spojena s tvorbou ROS (reaktivních kyslíkových radikálů) a následným zvýšeným poškozováním proteomu oxidativními procesy (Rabbani and Thornalley, 2008).

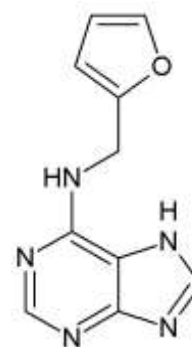
V roce 2009 Schlottere et al. provedli sérii pokusů, při nichž byla *C. elegans* dlouhodobě vystavena vysoké koncentraci glukózy. U zkoumaných hlístic byla následně odhalena zvýšená modifikace mitochondriálních proteinů, způsobená methylglyoxalem, dále zvýšení tvorby ROS a celkové zkrácení délky života (Schlottere et al., 2009).

Klíčovou obranou *C. elegans* proti glykaci je, stejně jako je tomu i u člověka, glyoxalátový systém. Glyoxalasa 1, přítomná u lidí jako Glo1, má u hlístic svůj homolog-CeGly. Bylo zjištěno, že zvýšená exprese glyoxalasy 1 u *C. elegans* snižuje dikarboxylovou glykaci mitochondriálních proteinů, tvorbu ROS a prodlužuje délku života (Morcos et al., 2008). Naopak snížení exprese vede ke zkrácení délky života.

## 5 Kinetin a jeho účinek na oxidační stres a glykaci

Přestože jsou fytohormony rostlinnými buňkami produkovány ve velmi nízkých koncentracích, mají výrazné biologické účinky. Mnoho z nich působí nejenom na rostliny, ale má také rozmanité účinky na živočichy. Jedním z nich je kinetin (N<sub>6</sub>-furfuryladenin; obr. 10). Některými autory je považován za endogenní molekulu i u živočichů, kde vzniká oxidací adeninu v DNA (Barciszewski et al., 1999) (obrázek struktura kinetinu).

V lidských buňkách má kinetin řadu efektů, od stimulace transkripce, kontroly buněčného cyklu až po ovlivnění metabolismu vápníku (Barciszewski et al., 1999). Byl dokázán i jeho pozitivní vliv na proces stárnutí nejenom u rostlin, ale i u mušky *Zaprionus parvittiger* (Sharma et al., 1997) a lidských fibroblastů (Rattan and Clark, 1994). Přesný mechanismus působení kinetinu zatím nebyl plně pochopen, ale převládá přesvědčení, že brání tvorbě ROS



Obr. 10 – kinetin.

a zároveň vychytává již vytvořené ROS (Barciszewski et al., 1999), čímž inhibuje oxidaci a glykoxidaci proteinů (Verbee et al., 2000).

Verbeke et al (2000) provedli sérii pokusů, jejichž cílem bylo posoudit účinek kinetinu na proces glykace a glykoxidace. Z měření množství produktů AGE a pentosidinu bylo zjištěno, že kinetin inhiboval glykační proces přibližně o 68 %. Kinetin také omezil agregaci BSA, která je běžným důsledkem glykace proteinů (Zhao et al., 2000). Měřením tvorby karbonylovaných proteinů byla zjištěna i schopnost kinetinu bránit oxidaci proteinů. Stejně pokusy s adeninem odhalily, že adenin sice inhiboval tvorbu AGE v tom samém rozsahu jako kinetin, ale na rozdíl od něj jeho účinky na tvorbu pentosidinu, karbonylu a tvorbu zesílení BSA byly významně nižší než u kinetinu. Díky unikátním biologickým vlastnostem kinetinu je jeho podávání potenciální ochranou proti oxidativnímu poškození (Verbeke et al., 2000).

## 6 Materiál

### 6.1 Chemikálie

- AA (akrylamid) – SERVA Electrophoresis
- Aminoguanidin – Sigma Aldrich
- APS (persíran amonný) – SERVA Electrophoresis
- BIS (N,N'- methylenbisakrylamid) – SERVA Electrophoresis
- BSA (albumin z hovězího séra) – Sigma Aldrich
- Destilovaná voda – LRR Olomouc
- DMSO (Dimethylsulfoxid) – Sigma Aldrich
- Ethanol 70 % - Lach Ner s.r.o.
- Ethanol 96 % - Lach Ner s.r.o.
- FBA (boronová kyselina značená fluoresceinem) – připraveno Mgr. Václavem Mikem, Ph.D. z Hané
- Fruktóza - Sigma Aldrich
- Galaktóza – Sigma Aldrich
- Glukóza – Sigma Aldrich
- Methylglyoxal – Sigma Aldrich
- n-butanol – Sigma Aldrich
- Ribóza – Sigma Aldrich
- SDS (dodecylsírán sodný) – Lach Ner s.r.o.
- Temed – Sigma Aldrich
- TRIS – SERVA Electrophoresis

### 6.2 Použité roztoky

- APS 10%: 0,1 g APS; 1 ml H<sub>2</sub>O
- elfo pufr 10x (1l): 30,24 g TRIS; 144 g glycin, 10 g SDS
- PBS 10x: 3,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 950 ml H<sub>2</sub>O
- RIPA pufr: 1 ml RIPA; 10 µl 100mM PMSF; 1 µl leupeptin; 1 µl aprotinin, 1 µl DTT
- TRIS pH 6,8: 24,23 g 1M TRIS; 200 ml HCl



- TRIS pH 8,8: 48,46 g 1M TRIS; 400 ml HCl

### 6.3 Testované látky

Testované cytokiny kinetin (K), 8-aminokinetin (aK) a pyranilkinetin (PK) pocházely z chemické knihovny Laboratoře růstových regulátorů (Palackého univerzita, Olomouc).

### 6.4 Linie *Caenorhabditis elegans*

V experimentech s *C.elegans* byl použit kmen fem-1 s defektem v genu *FEM-1* získaný z Caenorhabditis Genetics center (CGC). Projev mutace je závislý na teplotě; jedinci, vyvíjející se v prostředí s teplotou do 20 °C jsou schopni se rozmnožovat a jedinci, jejichž vývoj probíhá za teploty 25 °C, jsou sterilní.

### 6.5 Bakteriální kmeny

Jako potrava *C. elegans* sloužily bakterie *E. coli*, kmen OP50 získaný z Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Bakterie OP50 nejsou schopny syntetizovat uracil. Média určená k chovu hlístic uracil neobsahují, proto je zde růst bakterií omezen. Výhodou je snadnější pozorování hlístic a lepší podmínky pro jejich páření.

### 6.6 Média pro pokusy s *C. elegans*

M9 médium (500 ml)

- 3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7,55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O)
- 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2,5 g NaCl
- 0,125 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- Přidat deionizovanou vodu do objemu 500 ml
- Autoklávovat

#### S-basal médium (1000 ml)

- 5,9 g NaCl
- 50 ml 1M fosforečnan draselný pH 6,0
- 1000 ml deionizovaná voda
- Autoklávovat
- Po vychladnutí roztoku přidat 1 ml 5mg/ml cholesterolu (rozpuštěný v EtOH)

#### S-complete médium (1000 ml)

- 977 ml S-basal
- 10 ml 1M citrát draselný pH 6,0 (sterilní)
- 10 ml roztok se stopovým množstvím kovů (sterilní)
- 3 ml 1M CaCl<sub>2</sub> (sterilní)
- 3 ml 1M MgSO<sub>4</sub> (sterilní)

#### NGM agar

- 3 g NaCl
- 2,5 g peptonu (z kaseinu, pankreatický digest)
- 17 g agar
- Přidat deionizovanou vodu do objemu 975 ml a míchatko
- Autoklávovat
- Po autoklávování zchladit na 55 °C a přidat následující komponenty:
  - 0,5 ml 1M CaCl<sub>2</sub> (sterilní)
  - 1 ml 5mg/ml cholesterolu v EtOH
  - 1 ml 1M MgSO<sub>4</sub> (sterilní)
  - 25 ml fosforečnan draselný pH 6,0

#### Roztok na ustanovení synchronizované populace „Bleaching solution“ (10 ml)

- 1,5 ml 14% zásobní roztok HClO
- 0,5 ml NaOH
- 8 ml MiliQwater

## 7 Metody

### 7.1 Hodnocení glykace a vlivu glykovaných proteinů na molekulární úrovni

#### 7.1.1 Spektrofotometrické hodnocení glykace BSA

Ve sterilních podmínkách byl připraven zásobní roztok BSA v koncentraci 5 mg/ml a 0,5M zásobní roztoky glukózy, galaktózy, ribózy a fruktózy. Testovány byly cytokiny K, aK a PK, které byly přidávány do výsledné koncentrace 100  $\mu$ M. Jako pozitivní kontrola byl zvolen aminoguanidin.

Do 96 jamkové destičky byly napipetovány požadované kombinace látek tak, aby výsledné množství roztoku v jamce bylo 190  $\mu$ l (obr. 11). Destičky byly inkubovány 4 dny při 37 °C nebo 1 den při 50 °C.

Po uplynutí inkubační doby byly měřeny na destičkovém spektrofotometru Sunrise (Tecan) fluorescenční spektra látek. Vzorky byly měřeny při excitační vlnové délce 370 nm, emisní spektrum bylo měřeno v rozsahu 400-600 nm. Jako blank sloužily jamky s DMSO. Výsledky byly zpracovány v programu excel.

			glukóza	galaktóza	ribóza	fruktóza						
												PBS + BSA + cukr + DMSO
			x	x	x	x	x	x	x	x	x	PBS + BSA + DMSO
			x	x	x	x	x	x	x	x	x	PBS + BSA + látka a
												PBS + BSA + látka a + cukr
			x	x	x	x	x	x	x	x	x	PBS + BSA + látka b
												PBS + BSA + látka b + cukr
			x	x	x	x	x	x	x	x	x	PBS + BSA + látka c
												PBS + BSA + látka c + cukr

**Obr. 11** – uspořádání destičky pro testování vybrané sady látek.

## **7.1.2 Značení glykovaného bovinního sérového albuminu pomocí konjugátu kyseliny fenyboronové a fluoresceinu**

Boronová kyselina značená fluoresceinem (FBA) se specificky váže na proteiny s navázaným cukrem s hydroxy skupinami vzájemně v pozici *cis*, je tedy vhodná k detekci a kvantifikaci glykovaných proteinů (Morais et al., 2013).

### **7.1.2.1 Příprava glykovaného BSA**

Ve sterilních podmínkách byl připraven zásobní roztok BSA v koncentraci 5 mg/ml a 0,5M zásobní roztoky glukózy, galaktózy, ribózy a fruktózy. Ve druhé části experimentu byla před glykací k roztoku BSA s cukrem přidána i látka inhibující glykaci. Do 1 ml BSA bylo přidáno 1  $\mu$ l kinetinu, 250  $\mu$ l nebo 25  $\mu$ l 0,5M zásobního roztoku AG v PBS. BSA bylo inkubováno s glukózou, galaktózou, ribózou a fruktózou 24 h při 37 °C.

### **7.1.2.2 Detekce glykovaných proteinů**

Po uplynutí inkubační doby bylo k 16  $\mu$ l glykovaného BSA přidáno 2  $\mu$ l FBA v koncentraci 0,5; 0,05 a 0,005 mM a roztok byl ponechán 1 h ve tmě při pokojové teplotě. Poté bylo k roztoku přidáno 5,3  $\mu$ l SDS. Byl odebrán vzorek 12  $\mu$ l, odpovídající 40  $\mu$ g proteinu a následně byl separován pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy. Po separaci byl gel zdokumentován pomocí přístroje FLA-7000(FUJIFILM). Intenzita signálu byla vyhodnocena pomocí densitometrie v programu ImageJ. Pro vyhodnocení byl vybrán nejintenzivnější proteinový pruh o velikosti kolem 40 kDa. Statistické hodnocení rozdílu oproti kontrole bylo provedeno pomocí t-testu (rozdíl mezi průměry), případně pomocí Wilcoxonova testu, pokud distribuce či variace dat použití t-testu neumožňovala. Výpočty byly udělány v online rozhraní pro program R.

## **7.1.3 Optimalizace extrakce proteinů z *C. elegans***

Byla připravena synchronizovaná populace hlístic *C. elegans*. V deseti 10 $\mu$ l kapkách byl spočítán počet hlístic a vypočítána velikost populace. Požadované množství hlístic bylo

přeneseno do eppendorfky a opatrně dvakrát promyto M9 médiem a dvakrát ddH<sub>2</sub>O. Mezi jednotlivými promývacími kroky byly hlístice stočeny na stolní centrifuze 1 min při 10000 g tak, aby se vytvořila peletka. Poté bylo přidáno 50 µl RIPA pufru a suspenze byla stočena 10 min při 10000 g. Z eppendorfky bylo odebráno takové množství pufru, aby v eppendorfce zůstalo přibližně 30 µl tekutiny. V tomto kroku byly hlístice připraveny k sonifikaci. Na ultrazvuku HD 2200 (BANDELIN SONOPLUS) byl zvolen čas, počet cyklů a intenzita a hlístice byly sonifikovány. Fragmenty těl byly odstraněny centrifugací. K pročištění lyzátu byly eppendorfky stočeny ve vychlazené centrifuze 14000 g 100 min. Supernatant byl přenesen do čisté eppendorfky a uschován při teplotě -80 °C. Veškeré použité chemikálie byly vychlazené, po celou dobu izolace byly eppendorfky s hlísticemi a poté lyzátem drženy na ledu. Izolované proteiny byly kvantifikovány pomocí Bradfordovy metody.

Při optimalizaci se měnily podmínky sonifikace a počet použitých hlístic. Největší počet proteinů byl získán při sonifikaci za podmínek nastavení sonifikátoru HD 2200, BANDELIN SONOPLUS na 2x5s (30 % maximální intenzity), s využitím přibližně 500 hlístic.

## **7.2 Optimalizace modelu *C. elegans* pro glykační experimenty**

### **7.2.1 Příprava bakteriální suspenze OP50 v LB médiu**

Bakterie byly naočkovány do připraveného tekutého LB média. Poté byly ponechány na třepačce při teplotě 37 °C přes noc. Následující den byly sterilně rozděleny do předvážených 50 ml zkumavek. Připravené bakterie byly skladovány při 4 °C.

### **7.2.2 Příprava suspenze živých bakterií v S-complete**

Zvážené 50 ml zkumavky obsahující bakteriální suspenzi OP50 v LB médiu byly centrifugovány při 3000 g 10 min. Poté bylo tekuté LB médium slito do kádinky a peletka byla dvakrát promyta sterilní H<sub>2</sub>O. Následně byla voda odlita a otevřená kádinka ponechána dnem nahoru na sterilní buničině, aby došlo k odstranění zbytků vody. Peletka byla zvážena, po odečtení váhy zkumavky bylo spočítáno množství média, které bylo potřeba přidat, aby výsledná koncentrace bakterií v médiu byla 60 mg/ml. Po přidání S-complete byla peletka

rozsuspendována a výsledná suspenze byla uchována v lednici při 4 °C po dobu maximálně 14 dní.

### **7.2.3 Příprava suspenze bakterií usmrcených teplem v S-complete**

50 ml zkumavky obsahující bakteriální suspenzi OP50 v LB médiu byly centrifugovány při 3000 g 10 min. Část LB média byla slita, ve zbytku (asi 10 ml) byla rozsuspendována peletka. Suspenze byla rozpipetována po 1 ml do 1,5 ml eppendorfek a vložena do třepačky, kde byla ponechána 5 min při teplotě 90 °C. Poté byl obsah eppendorfek přepipetován do zvážené 50 ml zkumavky a stočen na centrifuze při 3000 g 10 min. Tekuté LB médium bylo slito do kádinky a peletka byla dvakrát promyta sterilní H<sub>2</sub>O. Následně byla voda odlita a otevřená kádinka ponechána dnem nahoru na sterilní buničině, aby došlo k odstranění zbytků vody. Peletka byla zvážena, po odečtení váhy zkumavky bylo spočítáno množství média, které bylo potřeba přidat, aby výsledná koncentrace bakterií v médiu byla 60 mg/ml. Po přidání S-complete byla peletka rozsuspendována a výsledná suspenze byla uchována v lednici při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

### **7.2.4 Příprava NGM misek pro *C. elegans***

Čerstvě autoklávované NGM médium bylo rozpipetováno po 6 ml do Petriho misek s průměrem 60 ml. Po ztuhnutí média bylo na povrch agaru nanášeno 30 µl bakteriální suspenze v LB a rozetřeno do plochy. Před nasazením hlístic bylo potřeba nechat misky buď alespoň dva dny uležet při pokojové teplotě, nebo přes noc ve 37°C, aby došlo k namnožení bakterií.

### **7.2.5 Přenos *C. elegans* na novou NGM misku**

Sterilním skalpelem byl z NGM misky s větší populací *C. elegans* vyříznut čtvereček NGM a přenesen na čistou NGM misku.

## **7.2.6 Ustanovení synchronizované populace *C. elegans* – „bleaching“**

Cílem tohoto postupu je usmrtit dospělé a uvolnit z nich vajíčka. Využívá se skutečnosti, že vajíčka jsou vůči působení chlornanu odolnější než dospělí jedinci.

Hlístice byly pomocí M9 média smyty z misek a přeneseny do 1,5 ml eppendorfek. Následovala centrifugace na stolní centrifuze při 3000 g 30 s. Supernatant byl odsán a bylo přidáno 800 ml roztoku pro „bleaching“. Eppendorfky byly přeneseny do třepačky, nastavené na 1200 rpm. Třepání probíhalo do doby, než došlo k rozpuštění hlístic, což bylo přibližně 8 min. Suspenze byla stočena při 3000 g, poté byl supernatant opět odsán a peletka byla promyta M9 médiem. Po opětovném stočení byl dvakrát zopakován promývací krok s M9 a jedenkrát s S-complete. Následně byla peletka přenesena do misky s tekutým médiem S-complete. V případě, že byla použita miska s pevným médiem, byl proveden pouze jeden promývací krok. Do misek byla přidána suspenze bakterií tak, aby jejich výsledná koncentrace v misce byla 6 mg/ml.

## **7.2.7 Experimenty s cílem ovlivnit délku života *C. elegans***

### **7.2.7.1 Příprava desek s *C. elegans*, hodnocení křivek přežití**

V suspenzi s dospělci, starými přibližně 3 dny, byl spočítán počet dospělců v deseti 10 $\mu$ l kapkách. Ideální koncentrace hlístic je 80 – 100/ml. Do suspenze byly přidány bakterie, tak aby jejich koncentrace v suspenzi byla 6 mg/ml. Suspenze hlístic s bakteriemi byla rozpipetována do eppendorfek a bylo do ní přidáno dané množství zkoumané látky. Poté byla suspenze rozpipetována do 96 jamkové desky. Desky byly přelepeny PCR fólií nebo zajištěny parafilmem, aby bylo zabráněno odparu. Obojí bylo potřeba každý týden vyměnit, aby hlístice měly dost čerstvého kyslíku.

Deska byla připravena tak, aby v každé jamce bylo ideálně 15 hlístic. Jamky s více než 20 hlísticemi byly vyřazeny, jelikož by populace mohla hladovět (hladovění prodlužuje hlísticím délku života). Hlístice byly počítány v inverzním mikroskopu. Počítání probíhalo dle experimentu 2-3x týdně. Z výsledků byly sestaveny křivky přežití.

Pro první etapu byly vybrány koncentrace 15; 7,5; 3,75; 1,875 a 0,9375 mM pro galaktózu, glukózu a aminoguanidinu. Na základě výsledků první etapy byly pro další

testování vybrány koncentrace, při nichž nedocházelo k akutní toxicitě (Tab. 1). Právě kvůli toxicitě byl z dalších pokusů vyřazen aminoguanidin.

<b>bakterie</b>	<b>živé</b>	<b>mrtvé</b>
<b>glukóza</b>	7,5; 2,5; 0,83	7,5; 2,5; 0,83
<b>galaktóza</b>	7,5; 2,5; 0,83	7,5; 2,5; 0,83

**Tab. 1** – vybrané koncentrace cukrů (v mM) pro 2. etapu experimentů vlivu glykace na délku života *C. elegans*

Hlístice byly nasazeny na desku s vybranými koncentracemi cukrů a s přídavkem kinetinu nebo DMSO. Kinetin byl rozpuštěn v DMSO, jeho výsledná koncentrace v jamce byla 1 mol/l. Jamky bez kinetinu, pouze s DMSO, sloužily jako kontrola.

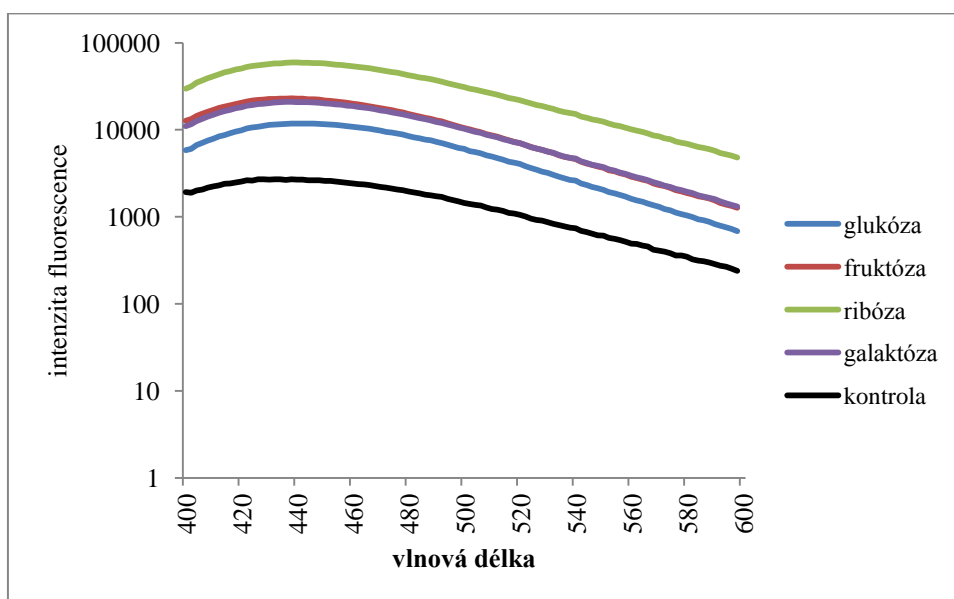


## 8 Výsledky

### 8.1 Spektrofotometrické hodnocení glykace BSA

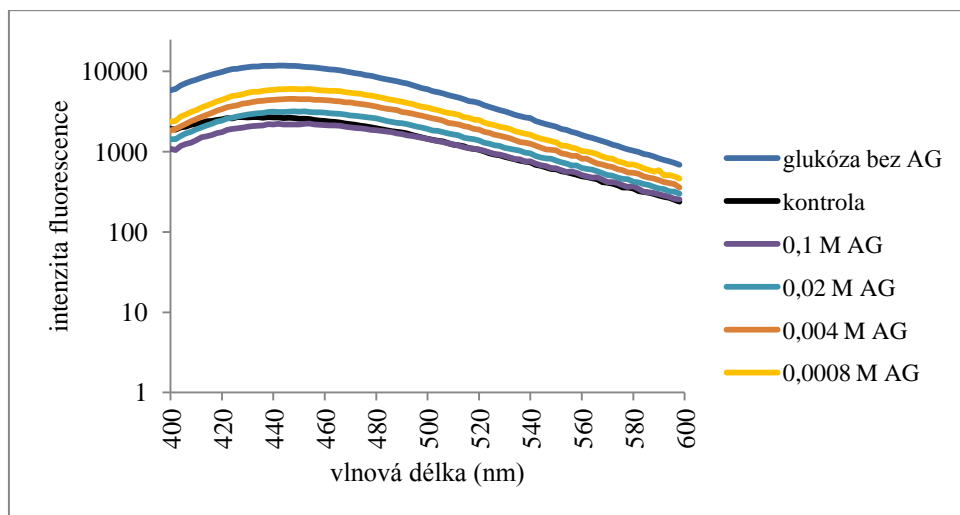
Glykace proteinů je spojená s nárůstem fluorescence po excitaci UV zářením (Tian et al., 2001). Pro metodu spektrofotometrického hodnocení glykace byl využit modelový protein BSA, který byl po dobu 4 dní inkubován společně s 0,5 M roztokem glukózy, galaktózy, ribózy nebo fruktózy. K reakčnímu roztoku byla přidána testovaná látka, kinetin (K), pyranilkinetin (PK) nebo 8-aminokinetin (aK) a bylo zjišťováno, zda tyto cytokiny budou vykazovat nějakou protiglykační aktivitu. Jako pozitivní kontrola byl zvolen AG.

Pokus také ověřil schopnost jednotlivých cukrů glykovat BSA. Nejsilnějším glykačním činidlem byla jednoznačně ribóza, potom fruktóza, glukóza a galaktóza (obr. 12).

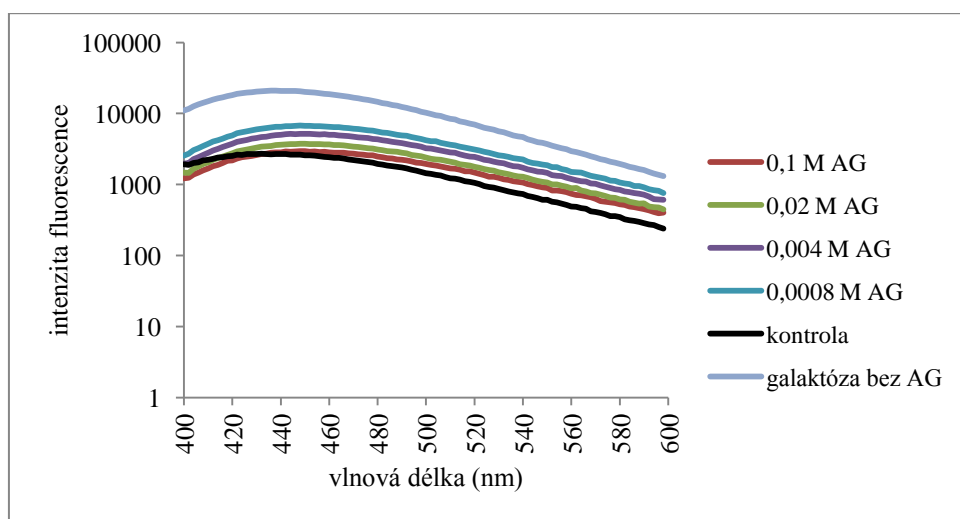


Obr. 12 – BSA glykované glukózou, galaktózou, ribózou a fruktózou.

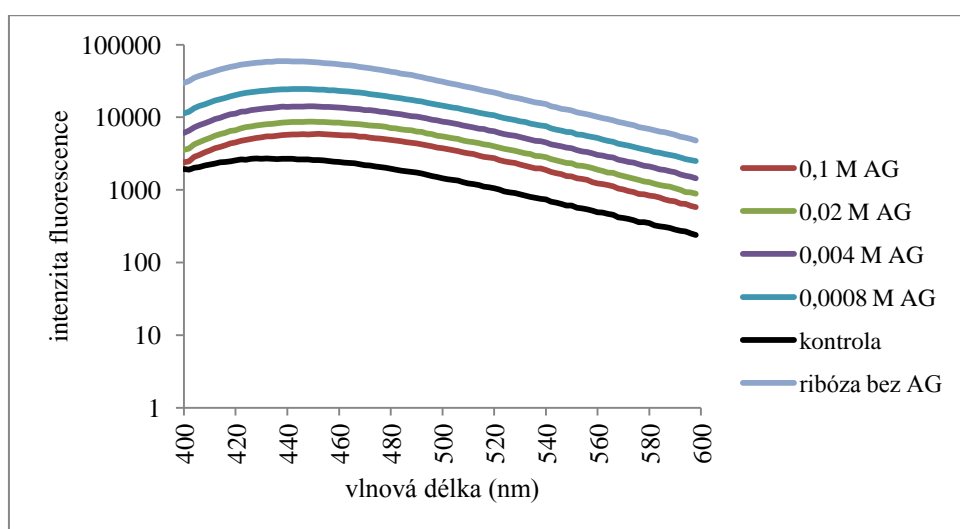
Možnost použít AG jako pozitivní kontrolu při tomto typu testování byla ověřena již dřívějšími pokusy. Bylo zjištěno, že nejvýraznější účinek má AG v koncentraci 0,1 M (obr.13, 14, 15 a 16), patrná byla závislost aktivity na dávce.



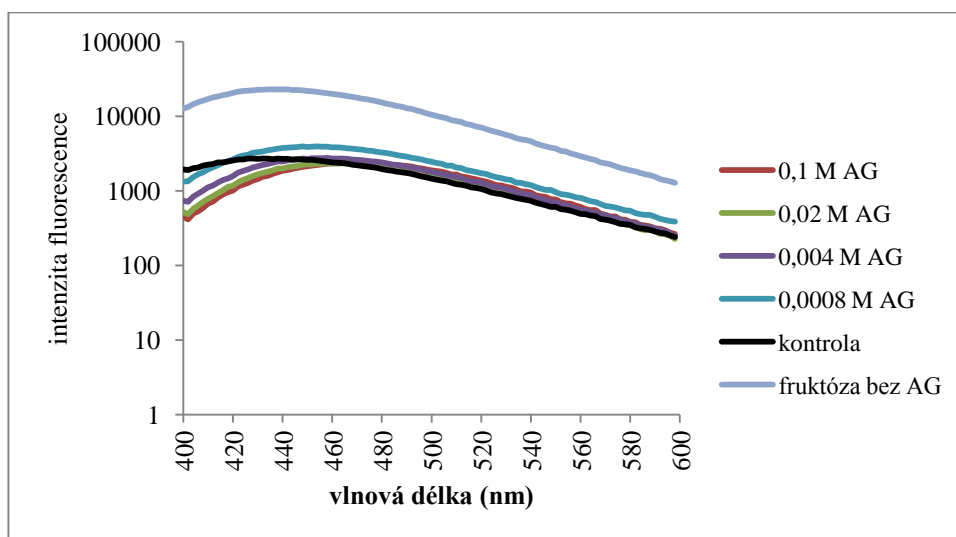
**Obr. 13** – schopnost AG v různých koncentracích snižovat glykaci BSA glukózou.



**Obr. 14** – schopnost AG v různých koncentracích snižovat glykaci BSA galaktózou.



**Obr. 15** – schopnost AG v různých koncentracích snižovat glykaci BSA ribózou.



**Obr. 16** – schopnosť AG v rôznych koncentraciách snižovať glykáciu BSA fruktózou.

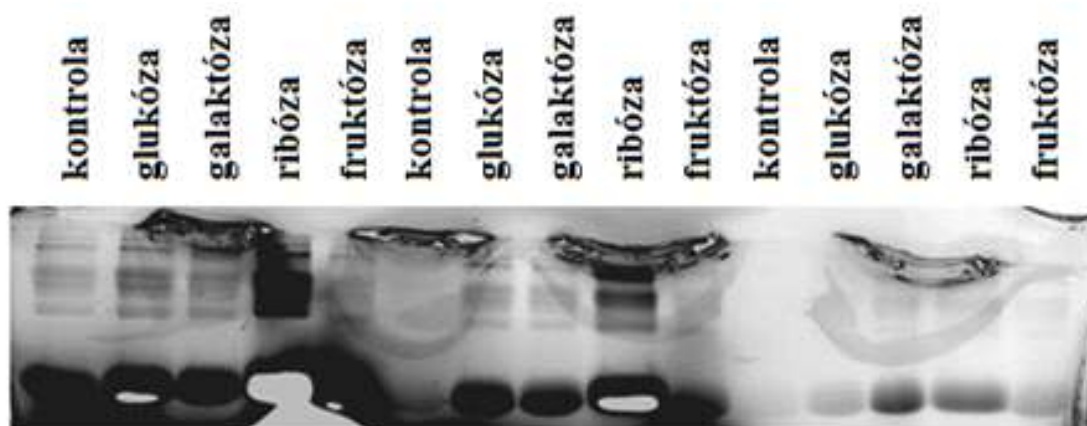
Dále byla testována schopnost vybraných cytokininů (100  $\mu$ M) bránit glykaci BSA jednotlivými cukry. Pozitivní efekt nebyl pozorován. U vzorků, obsahujících aK, byla fluorescence dokonce vyšší, látka se pravděpodobně v systému chemicky přeměňovala.

## 8.2. Vizualizace a kvantifikace glykovaných proteinů pomocí reakce s konjugátem kyseliny fenyloboronové a fluoresceinu

Další metodou sledování glykace proteinů a protektivního účinku vybraných látek byla vizualizace glykovaných proteinů. Principem metody je vazba konjugátu fenyloboronové kyseliny a fluoresceinu (FBA) na proteiny s navázaným cukrem se zachovanými cis-hydroxylovými skupinami na sousedních uhlících. Jako modelový protein byl zvolen bovinní sérový albumin (BSA), který byl glykován v 0,5M roztoku glukózy, galaktózy, ribózy nebo fruktózy. Jako kontrola sloužilo DMSO vehikulum.

Experiment byl rozdělen na dvě části. Cílem první části bylo otestovat specifčnost nově syntetizované značky FBA na BSA glykovaném vybranými cukry a zároveň najít vhodnou koncentraci značky pro značení glykovaných proteinů. Ve druhé části byla testována schopnost cytokininů K, aK a PK glykaci bránit. Jako pozitivní kontrola byl zvolen AG.

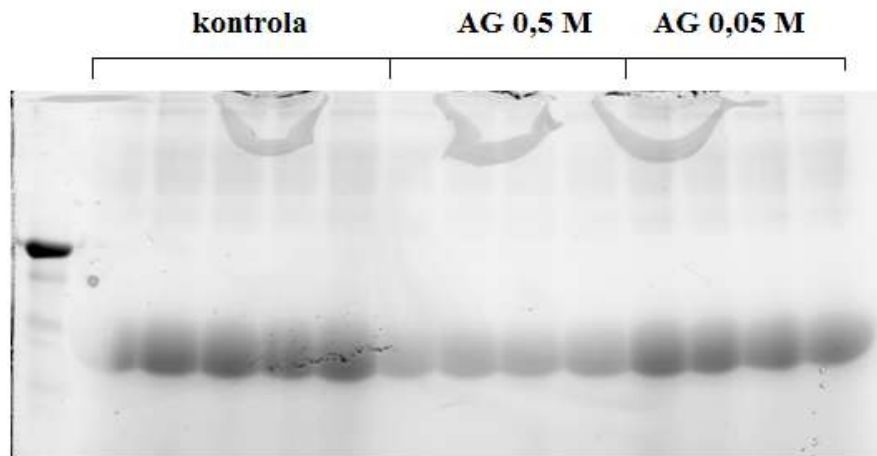
Pro první pokusy byla zvolena koncentrace FBA 2 a 1 mM. Značka se vážala nespecificky, kontrola dávala signál podobné intenzity jako BSA glykované cukry. FBA bylo pomocí HPLC přečištěno z původních asi 85 % na 95,2 % a byly zvoleny nové koncentrace značky, 0,5; 0,05 a 0,005 mM. Přečištěním byla zvýšena specifita značky, vazba na kontrolní BSA byla pozorována pouze v koncentraci 0,5 mM (obr. 17). Při nižších koncentracích (0,05 a 0,005 mM) nebyl signál v kontrolních vzorcích pozorovatelný. Zároveň byly dobře viditelné rozdíly mezi cukry, nejsilnější signál dávala ribóza. Pro další pokusy byla zvolena koncentrace FBA 0,05 mM, která umožňovala pozorovat produkty glykace.



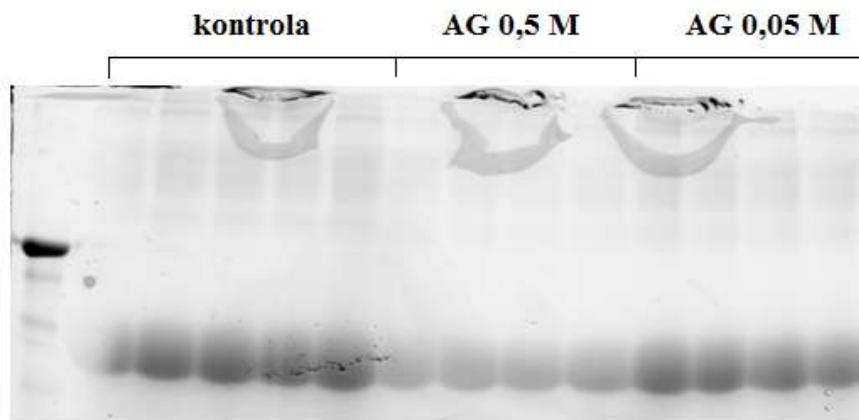
**Obr. 17** - vzorky BSA glykované 0,5M glukózou, galaktózou, ribózou nebo fruktózou a kontrolní vzorek BSA byly označeny FBA v koncentracích (zleva) 0,5; 0,05 a 0,005 M.

Ve druhé části byla ověřena schopnost AG jako pozitivní kontroly glykaci bránit, a zároveň byl testován vliv cytokininů na glykaci. AG byl testován v koncentraci 0,5 a 0,05 M, testované látky byly v koncentraci 100  $\mu$ M. Negativní kontrolou byl vzorek BSA s DMSO.

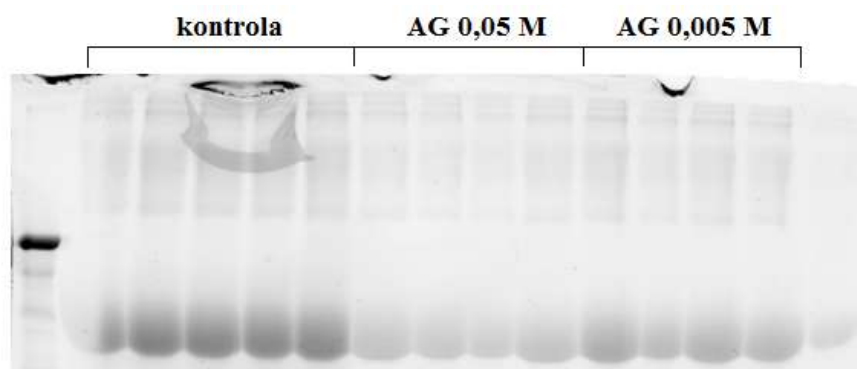
Pro studium vlivu AG na glykaci BSA byl k reakční směsi BSA a cukru (glukóza, galaktóza, ribóza nebo fruktóza) před zahájením glykace v inkubátoru přidán AG v koncentraci 0,5 nebo 0,05 M. Na výsledném gelu bylo možno pozorovat zřetelné snížení intenzity signálu u vzorků obsahující 0,5M AG ve srovnání s kontrolou. Vzorky, obsahující 0,05M AG, také vykazovaly snížení intenzity signálu, avšak rozdíl byl znatelně menší (Obr. 18, 19 20 a 21).



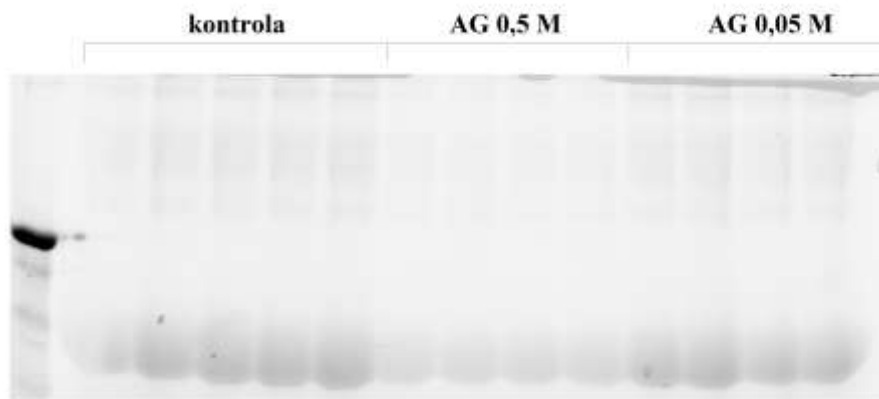
**Obr. 18** – vliv různých koncentrací AG (0,5; 0,05 M) na vzorek BSA glykovaný 0,5M glukózou.



**Obr. 19** – vliv různých koncentrací AG (0,5; 0,05 M) na vzorek BSA glykovaný 0,5M galaktózou.

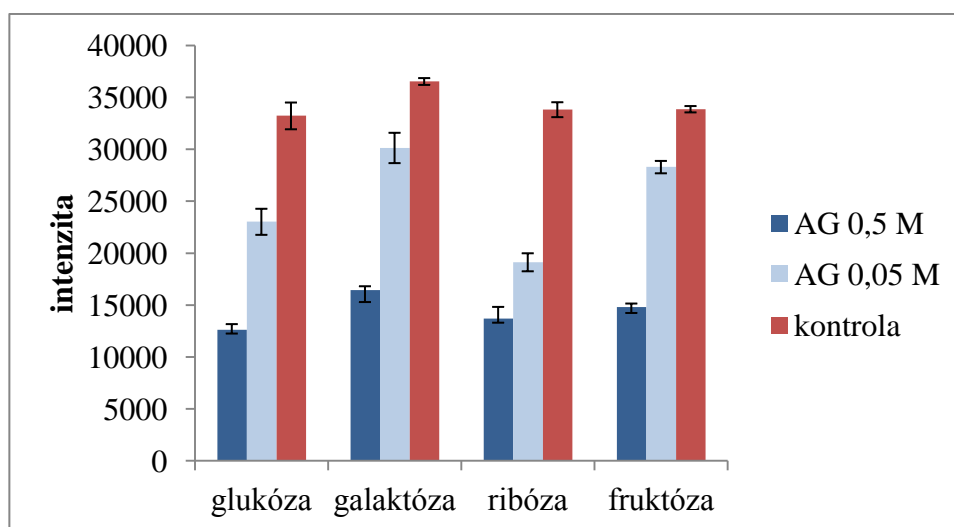


**Obr. 20** – vliv různých koncentrací AG (0,5; 0,05 M) na vzorek BSA glykovaný 0,5M ribózou.



**Obr. 21** – vliv různých koncentrací AG (0,5; 0,05 M) na vzorek BSA glykovaný 0,5M fruktózou.

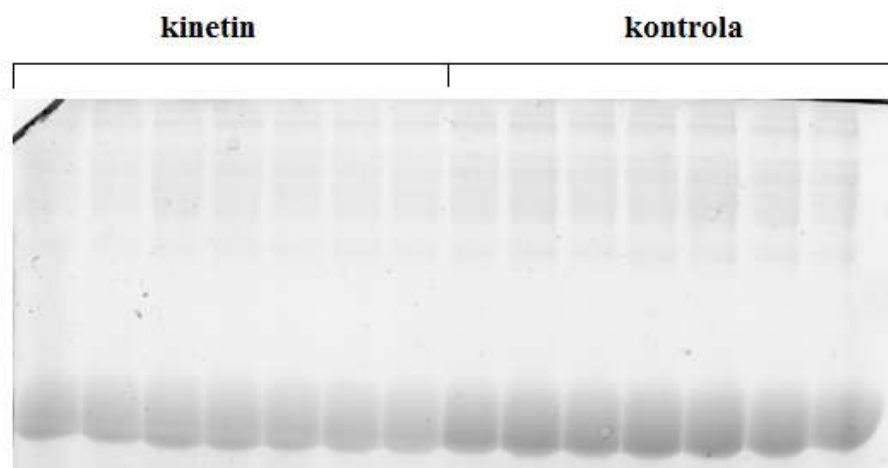
Následně bylo provedeno densitometrické hodnocení gelů – hodnocena byla intenzita dominantního proužku (obr. 22). Obě koncentrace AG významně snižovaly glykační efekt cukrů ( $p < 0,01$ ; t-test) ve srovnání s kontrolním vzorkem.



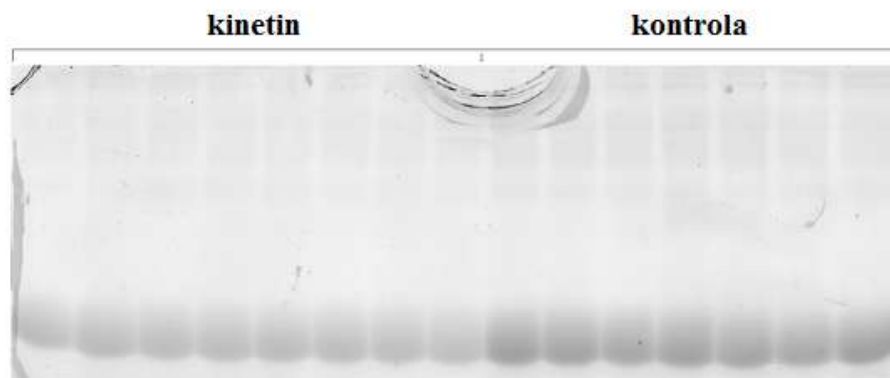
**Obr. 22** – vliv různých koncentrací AG (0,5; 0,005 M) na glykaci BS glukózou, galaktózou, ribózou nebo fruktózou.

Dále byla testována schopnost K, aK a PK glykaci bránit. K reakční směsi BSA a glukózy nebo galaktózy byla před inkubací přidána testovaná látka v koncentraci 100  $\mu$ M. Negativní kontrolou byl vzorek BSA s DMSO a odpovídajícím cukrem.

Vzorky obsahující kinetin na gelu vykazovaly oproti kontrole bez kinetinu sníženou intenzitu signálu u obou cukrů (Obr. 23, 24).

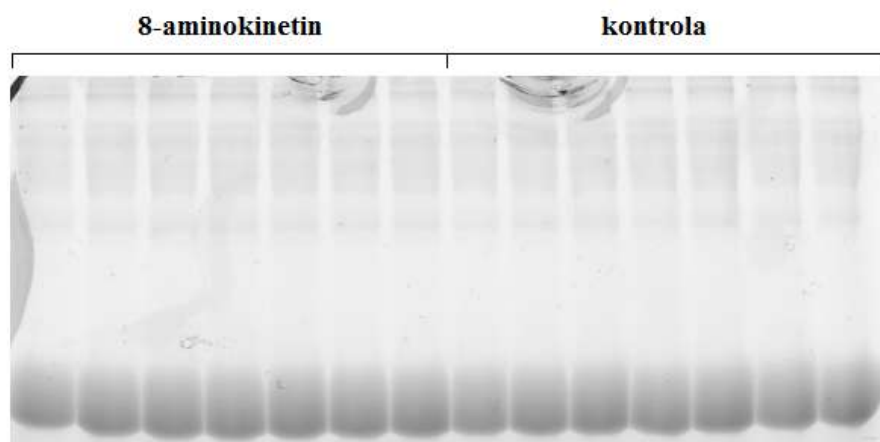


**Obr. 23** – vliv K na glykaci BSA 0,5M glukózou.

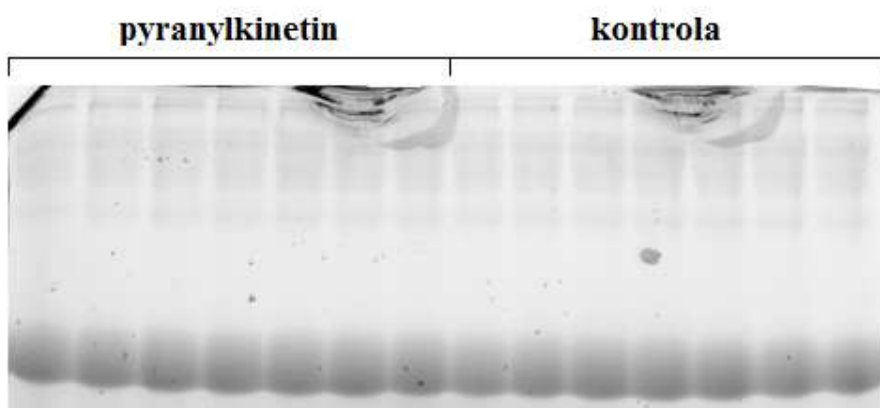


**Obr. 24** – vliv K na glykaci BSA 0,5M galaktózou.

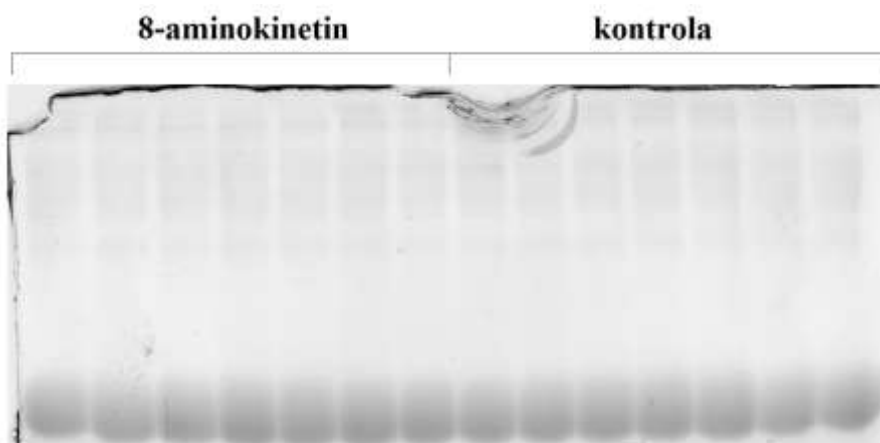
Vzorky obsahující aK a PK nevykazovaly oproti kontrole významnou změnu intenzity signálu (obr. 25, 26, 27 a 28).



**Obr. 25** – vliv aK na glykaci BSA 0,5M glukózou.

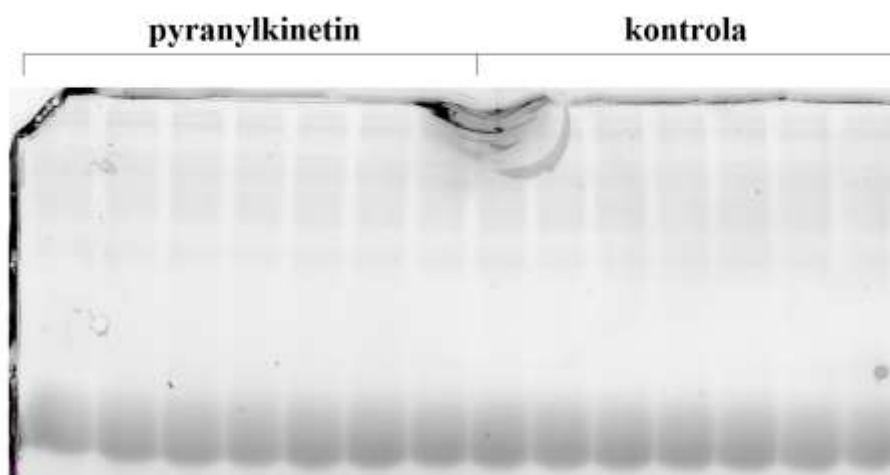


**Obr. 26** – vliv PK na glykaci BSA 0,5M glukózou.



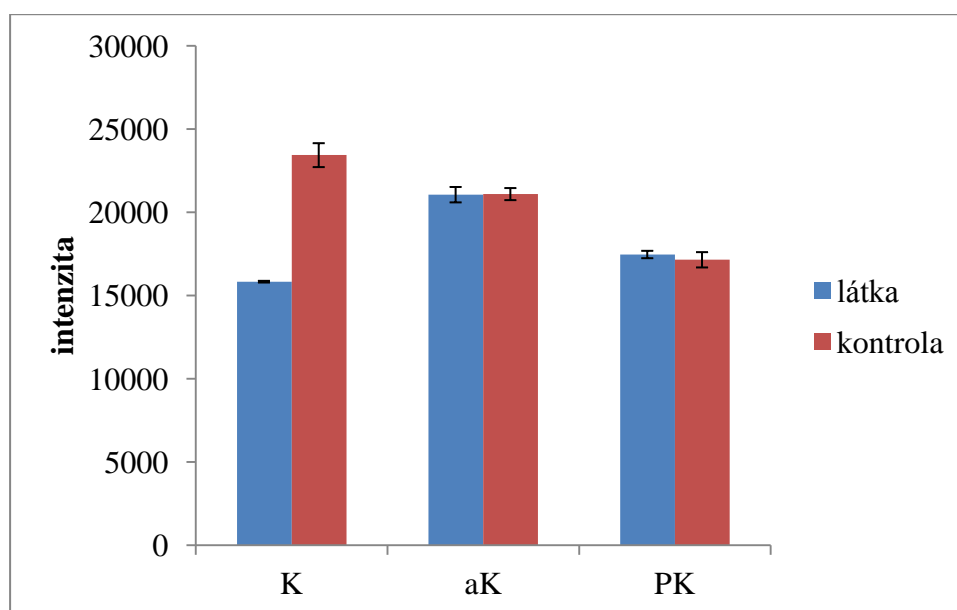
**Obr. 27** – vliv aK na glykaci BSA 0,5M galaktózou.



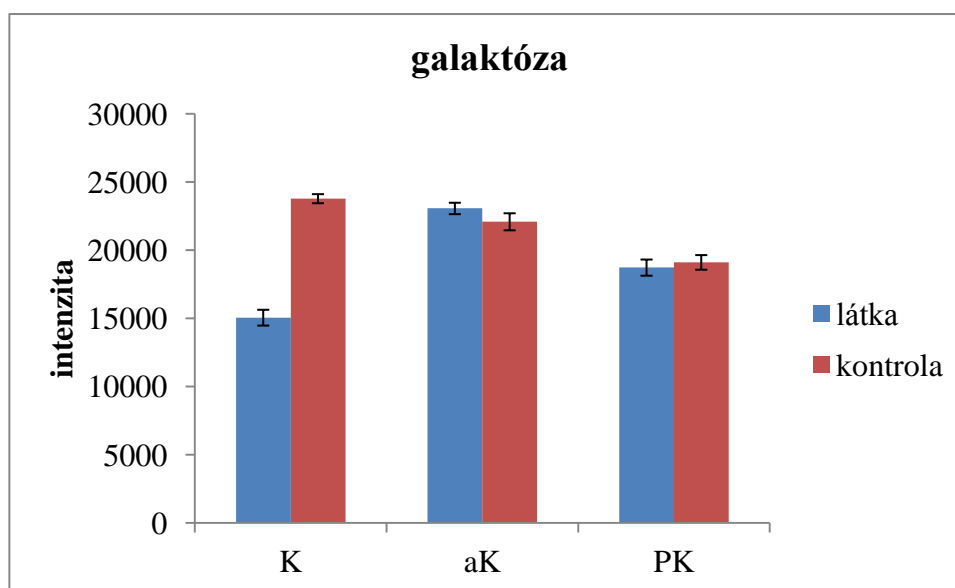


**Obr. 28** – vliv PK na glykaci BSA 0,5M galaktózou.

Densitometrické hodnocení gelů (obr. 29, 30) potvrdilo kinetinem zprostředkované snížení intenzity signálu u obou cukrů přibližně o 35 %. aK ani PK tento účinek nevykazují.



**Obr. 29** – vliv různých testovaných látek (K; aK; PK) na glykaci BSA glukózou. V případě K byl vzorek statisticky významný ( $p < 0,0003$ ; Wilcoxonův test).



**Obr. 30** – vliv různých testovaných látek (K; aK; PK) na glykaci BSA galaktózou. V případě K byl rozdíl statisticky významný ( $p < 0,0002$ ; Wilcoxonův test).

### 8.3 Izolace proteinů z *C. elegans*

Následující pokusy vycházely z protokolu (<http://genetics.wustl.edu/tslab/protocols/protein-stuff/cytosolic-extract-using-sonication-fast/>), vhodného k rychlému získání cytosolického extraktu *C. elegans* pro následnou imunoprecipitaci nebo imunoblot. Izolace proteinů se nezdařila, předpokládaným důvodem byla nevhodná podmínka sonifikace (5x 1s). Zároveň byla zjištěna nevhodnost zvoleného pufru, který obsahoval sacharózu, proto byl ke glykační experimentům nevhodný. Pro další pokusy byl postup upraven, místo homogenizačního pufru byl využit RIPA pufr. Experimentálně byly vyzkoušeny různé podmínky sonifikace (tab. 2).

podmínka č.	nastavení sonifikátoru
1	3 cykly/3x 15s + 5 cyklů/1x 15s + 3 cykly/2x 15s
2	3 cykly/3x 15s + 4 cykly/1x 15s + 3 cykly/2x 15s
3	3 cykly/3x 15s + 3 cykly/1x 15s + 3 cykly/2x 15s

**Tab. 2** – podmínky č. 1, 2, 3 nastavení sonifikátoru při izolaci proteinů z *C. elegans*

Výsledkem byl téměř nulový výtěžek, proto byly podmínky sonifikace opět pozměněny (tab. 3).

podmínka č.	nastavení sonifikátoru
4	2x 5s (30 % max intenzity)
5	1x 5s (30 % max intenzity)

**Tab. 3** – podmínky č. 4, 5 nastavení sonifikátoru HD 2200 (BANDELIN SONOPLUS) při izolaci proteinů z *C. elegans*

Výtěžek při použití podmínky č. 4 byl 12,59 µg/buňku těla *C. elegans* (za předpokladu, že jedna hlístice má průměrně 1000 buněk) a při použití podmínky č. 5 11,1 µg/buňku. Na základě těchto výsledků byla následně využívána podmínka č. 4, 2x 5s (30 % max intenzity). Dále byl optimalizován počet hlístic, který by při tomto postupu přinesl nejlepší poměr výtěžek/počet hlístic.

Byly připraveny vzorky z 500; 1000; 1500 a 2000 hlístic. Sonifikace probíhala v 30 µl RIPA pufru a nastavení sonifikátoru na 2x 5s (30 % max intenzity). Nejvyšší výtěžek byl dosažen při využití 500 hlístic, 14,8 µg/buňku (tab. 4).

počet červů	Spočítaný výtěžek (µg/buňku)
500	14,8
1000	8,1
1500	6,1
2000	4,7

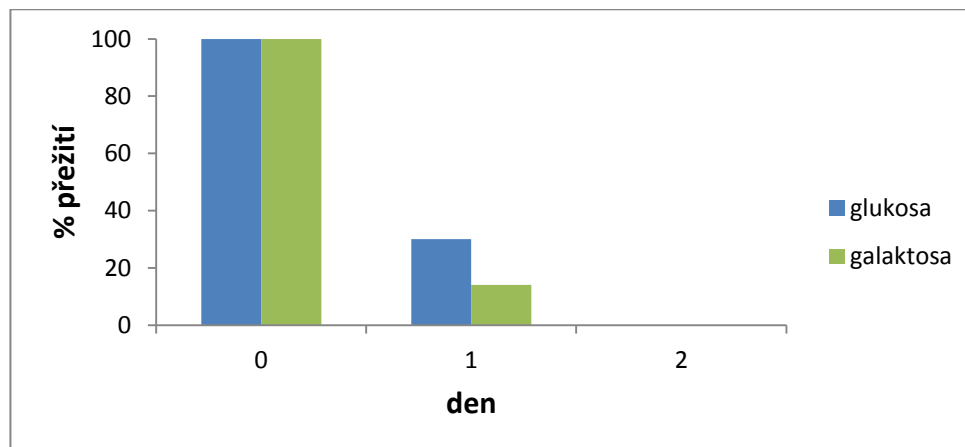
**Tab. 4** – dosažený výtěžek při využití různého počtu hlístic

Po úspěšné izolaci proteinů následoval pokus izolované proteiny označit FBA a vizualizovat, ale experiment nebyl úspěšný. Na výsledném gelu nebyl detekován žádný signál.

## 8.4 Optimalizace modelu *C. elegans* pro glykační experimenty

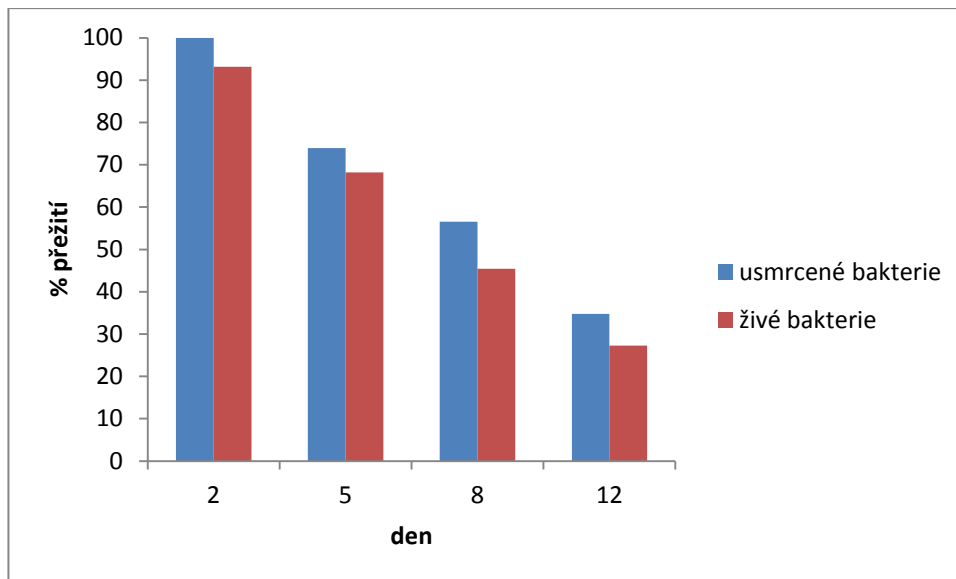
Byl sledován vliv vybraných cukrů, glukózy a galaktózy, na délku života *C. elegans*. Na základě pozorování byly vybrány koncentrace cukrů, které pravděpodobně neměly za následek zkrácení života v důsledku akutní toxicity (způsobené např. metabolickým rozvratem), ale kvůli poškození buněk a tkání neenzymatickou glykací. Za vhodné byly považovány koncentrace, které zkracovaly délku života populace přibližně na jednu polovinu.

Experimenty s délkou života byly rozděleny do dvou fází. Cílem první fáze bylo získat představu o toxicitě cukrů, aby mohly být nastaveny vhodné koncentrace pro další experimenty. Také byla zjišťována toxicita AG, látky s protiglykačními účinky. AG byl testován s úmyslem využít ho jako pozitivní kontroly ve druhé fázi, avšak nebyla nalezena vhodná koncentrace, mezi 4. a 7. dnem měření došlo v médiu k vykryštalizování látky. První pokusy vycházely z experimentů Schlotterera et al. (2009), který se zabýval ustanovením *C. elegans* jako vhodného modelu pro studium vysokých koncentrací glukózy, s cukry v koncentraci 20; 40 a 80 mM, ale v důsledku akutní toxicity došlo k vymření celé populace do druhého dne (Obr. 31).



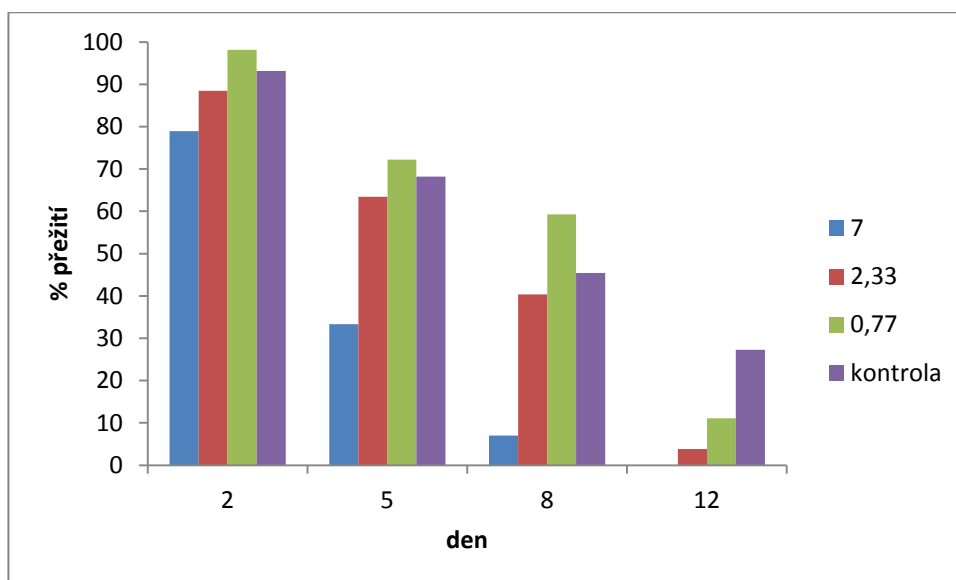
**Obr. 31** – populace *C. elegans*, krmené živými bakteriemi, v médiu obsahujícím glukózu nebo galaktózu v koncentraci 20 mM.

Testované koncentrace byly sníženy na 7; 2,33 a 0,77 mM. Průměrná délka života u *C. elegans* je dle literatury 15-20 dní. 8. den experimentu, tedy přibližně v polovině průměrné délky života, žilo 57 % hlístic z populace krmené usmrcenými bakteriemi a 45 % z populace krmené živými bakteriemi. Přežití u populace krmené živými bakteriemi bylo přibližně o 10 % nižší oproti populaci krmené usmrcenými bakteriemi (obr. 32).



**Obr. 32** – srovnání populací krmených živými a usmrčenými bakteriemi.

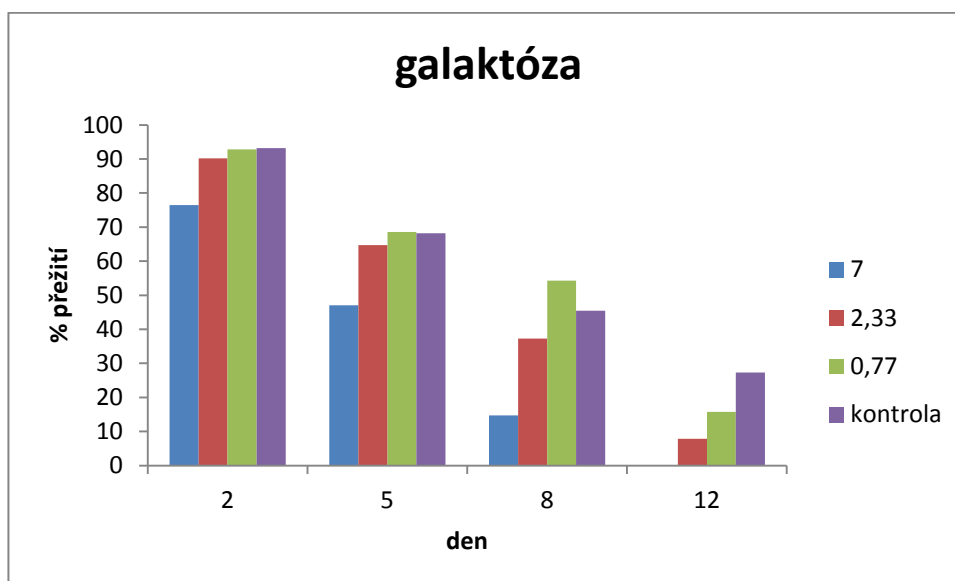
V populaci hlístic krmených živými bakteriemi bylo v koncentraci 7 mM 8. den měření naživu 7 % populace. Mezi 8. -12. dnem došlo v této koncentraci k vymření celé populace. V koncentraci 2,33 mM bylo 8. den 40 % hlístic živých, do 12. dne přežily 4 %. Při koncentraci 0,77 mM žilo 8. den 59 % hlístic, do 12. Dne přežilo 15 % (obr. 33).



**Obr. 33** – populace *C. elegans*, krmená živými bakteriemi, na médiu s koncentracemi glukózy 7; 2,33 a 0,77 mM a na médiu bez cukru.

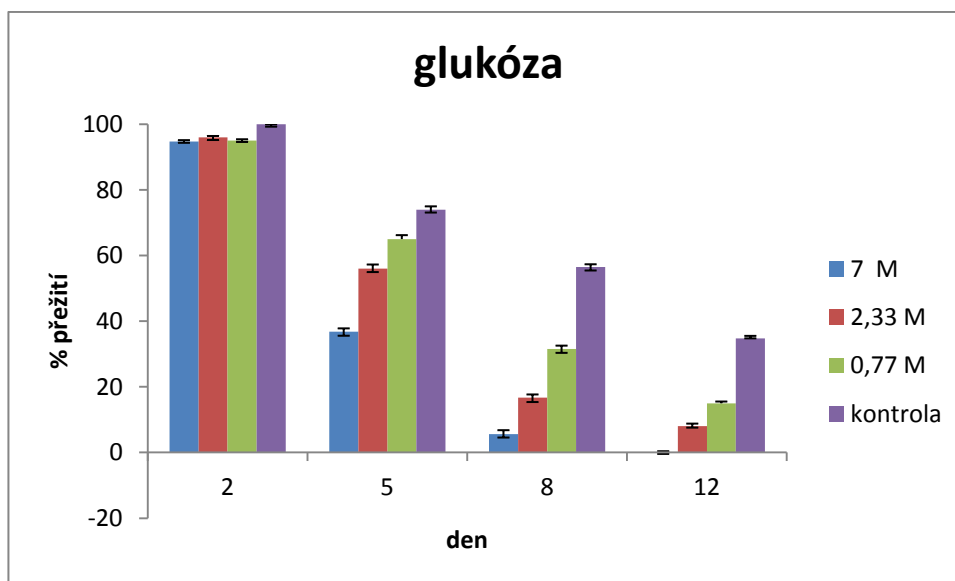
Z populace krmené živými bakteriemi přežilo při koncentraci 7 mM galaktózy do 8. dne 15 % hlístic. Mezi 8. -12. dnem populace vyhynula. V koncentraci 2,33 mM

galaktózy žilo 8. den 37 % hlístic, do 12. dne přežilo 8 %. Při 0,77 mM galaktózy bylo 8. den 54 % hlístic, ve 12. den 16 % (obr. 34)



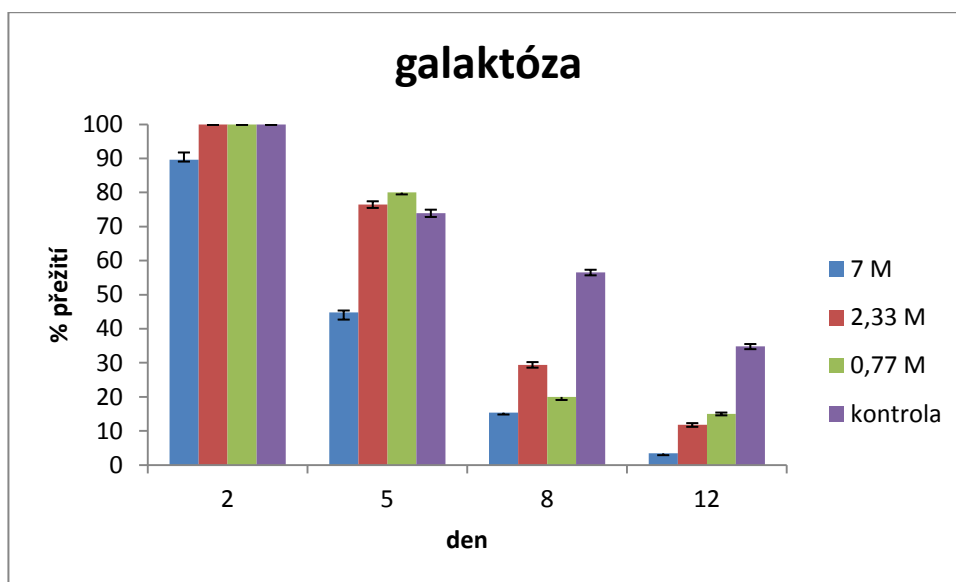
**Obr. 34** – populace *C. elegans*, krmená živými bakteriemi, na médiu s koncentracemi galaktózy 7; 2,33 a 0,77 mM a na médiu bez cukru.

V populaci krmené usmrcenými bakteriemi bylo při 7 mM glukózy naživu 6 % hlístic, populace do 12. dne vymřela. Při koncentraci 2,33 mM glukózy žilo 8. den 17 %, do 12. dne přežilo 8 % hlístic. V médiu s 0,77 mM glukózy žilo 8. den 32 %, 12. den 15 % hlístic (graf. 35).



**Obr. 35** – populace *C. elegans*, krmená usmrcenými bakteriemi, na médiu s koncentracemi glukózy 7; 2,33 a 0,77 mM a na médiu bez cukru.

V médiu obsahujícím 7 mM galaktózy bylo 8. den 15 % hlístic, do 12. dne přežily 3 %. V 2,33 mM galaktózy žilo 8. den 29 %, 12. den 12 % hlístic. Při 0,77 mM bylo naživu 20 % populace, 12. den 15 % (graf. 36).



**Obr. 36** – populace *C. elegans*, krmená usmrcenými bakteriemi, na médiu s koncentracemi galaktózy 7; 2,33 a 0,77 mM a na médiu bez cukru.

Všechny tři koncentrace cukrů – 7; 2,33 a 0,77 mM – byly použity pro další testování.

Ve druhé etapě se hodnotilo, zda kinetin inhibuje toxické působení vybraných koncentrací glukózy a galaktózy (7; 2,33; 0,77 mM). Jako kontrola sloužilo médium s obsahem DMSO. Testovací pokusy byly provedeny ve dvou opakování, ale pro přílišnou variabilitu výsledků nebylo možné data spolehlivě vyhodnotit.

## 9 Diskuze

Neenzymatická glykace patří mezi nejčastější posttranslační modifikace proteinů. Zároveň je považována za jeden z faktorů, stojící za vznikem a rozvojem různých onemocnění či podporující proces stárnutí. Tato práce se zabývá optimalizací metod, vhodných pro hodnocení glykačního potenciálu různých cukrů a schopnosti látek proti glykaci chránit.

Experimentální část diplomové práce je rozdělena do dvou oddílů, v prvním se zaměřuje na metody pro hodnocení glykace proteinů na molekulární úrovni, v druhém na úrovni celého organismu, mikroskopické hlístice *C. elegans*.

### 9.1 Spektrofotometrické hodnocení glykace BSA

Je známo, že produkty pokročilé glykace mají fluorescenční vlastnosti. Mnohé z nich mají emisní maxima v rozmezí 420-460 nm. Měření fluorescence v této oblasti, obvykle při 440 nm, se proto používá ke kvantifikaci glykovaných proteinů. Vzorek obsahující produkty glykace byl excitován UV o vlnové délce 370 nm a bylo měřeno emisní spektrum 400-600 nm.

V rámci této metody byl zjišťován glykační potenciál glukózy, galaktózy, ribózy a fruktózy. Wei et al. (2009) uvádí, že glykace BSA ribózou ve srovnání s glukózou a galaktózou probíhá nejrychleji. Provedené pokusy tyto údaje potvrdily. Nejsilnějším glykačním činidlem byla ribóza, jejíž spektrum vykazovalo nejvyšší naměřenou hodnotu fluorescence. Naměřená hodnota fluorescence glukózy, galaktózy a fruktózy byla přibližně stejná (Obr. 12). Také byla ověřena možnost využít aminoguanidin (AG) jako pozitivní kontrolu pro tento typ experimentů. AG snižoval fluorescenci vzorků v závislosti na koncentraci. Tento efekt byl patrný u všech cukrů (Obr. 13, 14, 15 a 16).

Při testování vybraných cytokininů, kinetinu (K), 8-aminokinetinu (aK) a pyranilkinetinu (PK) nebyl pozorován žádný pozitivní efekt. U vzorků, které obsahoval aK, byla fluorescence dokonce vyšší, je možné, že docházelo ke změně struktury testované látky.

Nevyřešeným problémem metody je možná fluorescence testovaných látek případně jejich reakčních produktů.



## 9.2 Značení glykovaného bovinního sérového albuminu pomocí konjugátu kyseliny fenylboronové a fluoresceinu

Tato metoda značení glykovaných proteinů byla poprvé popsána Morais et al. (2012). Ke značení se využívají reakce mezi konjugátem fenylboronové kyseliny a fluoresceinu (FBA) s časnými produkty glykace, které obsahují dvě hydroxylové skupiny v cis poloze. Značené proteiny jsou následně rozděleny pomocí SDS-PAGE a zviditelněny UV zářením. Kvantifikaci je možné provést denzitometricky z fotografických snímků.

Jako modelový protein bylo použito BSA, glykované glukózou, galaktózou, ribózou a fruktózou. Cílem prvních experimentů bylo stanovit optimální koncentraci FBA. Nejdříve byly testovány koncentrace 2 a 1 mM. Ukázalo se, že výsledný signál je příliš silný, navíc vazba byla nespecifická, kontrola dávala stejně silný signál jako BSA glykované cukry. FBA bylo přečištěno pomocí HPLC na 95,2 %. Také byla snížena koncentrace FBA na 0,5; 0,05 a 0,005 mM (Obr. 17). Při 0,5 mM byl signál stále dost intenzivní a vazba nespecifická. Při 0,05 mM nebyl signál v kontrolních vzorcích pozorovatelný a značka vykazovala dobrý poměr mezi intenzitou signálu dominantního ( $M_w$  přibližně 40 kDa) i slabších, pomaleji migrujících proužků.

Další experiment testoval možnost využití AG jako pozitivní kontroly. Byly provedeny pokusy s AG v koncentraci 0,5 a 0,05 M. AG v koncentraci 0,5 M snižoval intenzitu signálu u všech cukrů přibližně o 60 %, v koncentraci 0,05 M o 20 % u galaktózy a fruktózy, o 30 % u glukózy a o 40 % u ribózy. Pozitivní efekt tedy byl závislý na dávce. Rozdíly byly statisticky významné.

Také byly testovány cytokininy K, aK a PK, u kterých se předpokládala schopnost bránit glykaci. Pozitivní účinek byl pozorován v případě K, který výrazně snížil intenzitu signálu u glukózy a galaktózy přibližně o 35 %. Rozdíly byly statisticky významné. Pozitivní efekt K byl pozorován i v opakovaném experimentu, provedeným tentokrát jen s glukózou a galaktózou. U aK a PK nebyl protektivní účinek pozorován.

Oproti výše zmíněné spektrofotometrické metodě je možné tuto metodu používat pro testování látek, které fluoreskují, případně poskytují fluoreskující reakční produkty.

### 9.3 Izolace proteinů z *C. elegans* a hodnocení jejich glykace pomocí FBA

Glykace proteinů *in vivo*, jejich následná izolace, vizualizace a kvantifikace glykovaných proteinů by umožnila studium dynamiky glykace v přirozených podmínkách metabolismu, které *in vitro* nelze napodobit. Jako vhodný model pro studium glykace glukózou byla popsána hlístice *C. elegans* (Schlotterer et al., 2009).

První pokusy vycházely ze standardního protokolu k získání cytosolického extraktu z *C. elegans* [2]. Tento postup je založen na rozbití buněk pomocí ultrazvuku a následného vyplavení proteinů do homogenizačního pufru. Izolace nebyla úspěšná, proteinový výtěžek byl minimální. Při hledání příčiny nezdaru byl zjištěn další nedostatek metody. Homogenizační pufr obsahoval sacharózu, a proto nebyl vhodný pro glykační experimenty. Jako náhrada byl zvolen RIPA pufr, který se běžně využívá k izolaci proteinů z kultivovaných buněk. Zároveň byly navrženy a otestovány nové podmínky sonifikace. Nově upravený protokol nejlépe fungoval za podmínek nastavení sonifikátoru HD 2200, BANDELIN SONOPLUS na 2x 5s (30 % maximální intenzity). Dále byl optimalizován počet hlístic, využitých k izolaci. Bylo zjištěno, že nejlepších výsledků je dosaženo při použití asi 500 hlístic. Výtěžek činil 14,8 µg/buňku těla hlístice (za předpokladu, že tělo dospělé hlístice obsahuje průměrně 1000 buněk; ve skutečnosti je celkový počet buněk u hermafroditů 959 a u samečků 1031).

Optimalizovaný protokol byl použit k izolaci proteinů z hlístic vystavených působení vysokých koncentrací cukrů. Za tímto účelem byly hlístice chovány v médiu s 3mM koncentrací glukózy nebo galaktózy po 4 dny, poté byla provedena izolace. Získané proteiny byly inkubovány s FBA, ale nedošlo k jejímu navázání. Po vizualizaci gelu nebyl zjištěn žádný signál. Pravděpodobnou příčinou neúspěchu je nevhodné prostředí, které vytváří RIPA pufr. Z časových důvodů nebylo možné pokusy dále optimalizovat, prozatím jsou obě metody – izolace proteinů a značení FBA – navzájem nekompatibilní. Bude potřeba další optimalizace metody izolace, zejména výměna použitého RIPA pufru, aby bylo možné obě metody propojit.

### 9.4 Optimalizace modelu *C. elegans* pro glykační experimenty

Jak bylo již výše zmíněno, hlístice *C. elegans* byla popsána jako vhodný model pro studium glykace glukózou (Schlotterer et al., 2009). Náplní druhé části práce, která

se zabývala hodnocením glykace na úrovni celého organismu, bylo studium vlivu cukrů na délku života modelového organismu, hlístice *C. elegans*.

Průměrná délka života *C. elegans* je přibližně 15-20 dní. V naší laboratoři obvykle trvá 20-25 dní, než dojde ke snížení počtu jedinců pod 10 % výchozího stavu synchronizované populace. Předpokládali jsme, že pokud aplikace cukru povede ke zkrácení délky života přibližně na polovinu, půjde již o důsledek glykace a ne metabolického rozvratu.

První experimenty vycházely z výsledků Schlotterera et al. (2009). Zvolené koncentrace (20; 40; 80 mM) však byly příliš vysoké a smrt nastala v důsledku akutní toxicity do 2. dne měření (Obr. 31). Příčinou bylo, že autoři článku pěstovali hlístice na pevném médiu, kdežto pokusy provedené v rámci této práce využívaly média tekutého, ve kterém *C. elegans* pravděpodobně přijme daleko více cukrů.

Na základě těchto pokusů byly koncentrace cukrů sníženy (7; 2,33; 0,77 mM). Délka života populací žijící v médiu s 7mM cukrem byla zkrácena na 8-12 dní. Je možné předpokládat, že jejich smrt je důsledkem změn, způsobených glykovanými proteiny. Byl sestaven graf, znázorňující počet přežívajících hlístic v závislosti na dnu měření. Z grafu byla patrná závislost toxicity na aplikované koncentraci cukru (obr. 34, 35, 36 a 37).

V rámci pokusů s délkou života bylo zjišťováno, zdali bakterie nějak ovlivňují glykační experimenty. V literatuře je popsána skutečnost, že krmení usmrcenými bakteriemi prodlužuje hlísticím život až o 30-40 % (Carigan et al., 2002), z důvodu hromadění a proliferace živých bakterií v hltanu hlístic. Všechny experimenty byly provedeny na populacích krmených živými a zároveň i na populacích krmených usmrcenými bakteriemi. Z měření délky života populací pěstovaných na médiu bez cukru vyplývá, že krmení usmrcenými bakteriemi hlísticím prospívá více než krmení živými bakteriemi, avšak rozdíl nebyl příliš významný (obr. 32). U populací krmených živými/usmrcenými bakteriemi pěstovaných na médiích s obsahem cukru, byly získané výsledky příliš variabilní, nebylo možné je vyhodnotit.

Dalším krokem byla snaha využít získané vědomosti k zavedení *C. elegans* jako modelu pro testování látek se schopností bránit glykaci a prodlužovat tak délku života. Další experimenty měly za cíl zjistit, zdali kinetin, u kterého již byly protiglykační účinky prokázány *in vitro*, vykazuje protiglykační aktivitu také *in vivo*. Kontrolou byly populace, pěstované na médiu s DMSO. Pokus byl proveden ve dvou opakování, ale výsledky byly natolik variabilní, že je nebylo možno vyhodnotit. Příčinou byly problémy neznámého původu s kulturou *C. elegans*, které během experimentů nastaly.

Výhodou metody je maximální přiblížení se reálným podmínkám neenzymatické glykace. Vliv metabolismu živého systému na testované látky i vysoké koncentrace cukrů a celková reakce organismu nelze nahradit sebelépe nastavenými podmínkami *in vitro*. Zároveň je zvolený model nenáročný na kultivaci, pokusy probíhají na velkých populacích a má krátkou délku života.

Nevýhodou je vyšší variabilita, typická pro experimenty *in vivo*. Také je důležité odhadnout a eliminovat všechny vlivy vnějšího prostředí, které by mohly narušit průběh experimentů a ovlivnit výsledky.

## 10 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zavedení metod pro hodnocení neenzymatické glykace proteinů a jejího vlivu na mikroskopickou hlístici *C. elegans*. Metody by také měly být vhodné pro testování látek, schopných proti glykaci chránit.

Nejjednodušší metodou je spektrofotometrické hodnocení glykace proteinů – celá řada produktů pokročilé glykace fluoreskuje po excitaci UV zářením. Při pokusech s modelovým proteinem bovinním sérovým albuminem (BSA) se mi podařilo pozorovat glykační efekt glukózy, galaktózy, ribózy i fruktózy i známý protektivní efekt „karbonylové pasti“ aminoguanidinu (AG). Testované látky – cytokininy kinetin (K), 8-aminokinetin (aK) a pyranilkinetin (PK) – fluorescenci nesnižovaly. V případě aK byla fluorescence dokonce vyšší. Důvod je nejasný, v systému pravděpodobně látka reagovala.

Úspěšná byla optimalizace detekce glykovaných proteinů, využívající značení konjugátem kyseliny boronové s fluoresceinem (FBA). Ten reaguje s časnými produkty glykace, které ještě mají zachovány cis-hydroxylové skupiny. Také zde se podařilo pozorovat schopnost AG bránit glykaci BSA. Na rozdíl od AG, který chránil proti vlivu všech testovaných cukrů, K měl protektivní efekt jen v případě glukózy a galaktózy. Metoda je jednoduchá a rychlá, vhodná k testování látek. Metodu jsem se pokusila použít i pro detekci glykovaných proteinů v lyzátech s *C. elegans*, ale experiment byl neúspěšný kvůli nekompatibilitě značící reakce s lyzačním pufrům. Bude potřeba hledat alternativní cesty izolace proteinů z *C. elegans*.

Byly provedeny pokusy s ovlivněním délky života *C. elegans* vysokou koncentrací cukrů, glukózy a galaktózy. Výsledkem bylo nalezení vhodných koncentrací obou cukrů pro studium vlivu cukrů a testování schopnosti látek bránit glykaci. Samotné testování látek neposkytlo reprodukovatelné výsledky a bude potřeba provést opakování.

## Literatura

Ahmed, N. (2005): Advanced glycation endproducts-role in pathology and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 67:3-21.

Araki, N., Higashi, T., Mori, T., Shibayama, R., Kawabe, Y., Kodama, T., Takahashi, K., Shichiri, M., Horiuchi, S. (1995): Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 1;230(2):408–415.

Barciszewski, J., Rattan, S. I. S., Siboska, G., Clark, B. F. C. (1999): Kinetin - 45 years on. *Plant Science* **148**:37–45.

Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B. et al. (2005): Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)* 83:876-86, 2005.

Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Touchette, A. D., Lal, S., Szwegold, B. S. (1999): Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 48:198-202.

Brenner, S. (2000): The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974;77:71-94.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247.

Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., Cerami, A.(1986): Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232:1629–1632.

Bucala, R., Cerami, A. (1992): Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol* 23:1–34.

Cerami, C., Founds, H., Nicholl, I., Mitsuhashi, T., Giordano, D., Vanpatten, S., et al. (1997): Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:13915-20.

Culetto, E., Sattelle, D. B. (200): A role for *Caenorhabditis elegans* in understating the fiction and interactions of human dinase genes. Hum Mol Genet 9:869-77.

DeGroot, J., Verzijl, N., Wenting-Van Wijk et al. 2001): Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation-The role of advanced glycation end products. Arthritis and Rheumatism. 44:2562-2571.

Elosta, A., Ghous, T., and Ahmed, N. (2012): Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. Curr Diabetes Rev. 8: 92–108.

Finch, C. E. (2007): The Biology of Human Longevity: Inflammation, Nutrition, and Aging in the Evolution of Life Spans. Academic, Amsterdam.

Fleming, T. H., Humpert, P. M., Nawroth, PP, Bierhaus, A. (2011): Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini review. Gerontology. 57:435-43.

Garigan, D., Hsu, A.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Kenyon, C. (2002): Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. Genetics 161, 1101–1112.

Hammes, H., Weiss, A., Hess, S., Araki, N., Horiuchi, S., Brownlee, M., Preissner, K. (1996): Modification of vitronectin by advanced glycation alters functional properties in vitro and in the diabetic retina. Lab. Invest. 75, 325–338.

Herndon, L. A. et al. (2002): Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. Nature 419: 808–814.

Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., and Schmidt, A. M. (1999): RAGE mediates a novel

proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, 889-901.

Inoue, Y., Kimura, A. (1995): Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 177-227.

Jerums, G, Panagiotopoulos, S, Forbes, J, Osicka, T, Cooper, M (2003): Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. *Arch Biochem Biophys* 419(1):55–62

Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Rabbani, N., Thornalley, P. J. (2010): Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia* 53:1506-1516mid:20369223.

Lakowski, B., Hekimi, S. (1998): The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13091–13096.

Lorenzi, M. (2007): The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *EXP. Diabetes Res.* 61038.

Lu, C., He, J.C., Cai, W., Liu, H., Zhu, L., Vlassara, H. (2004): Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:11767-72.

Luevano-Contreras, C., Chapman-Novakofski, K. (2010): Dietary Advanced lycation End Products and Aging. *Nutrients* 2(12):1247-1265

Morais, M.P.P., Marshall, D., Flower, S. E., Caunt, C. J., James ,T. D., Williams, R. J., Waterfield, N. R., van den Elsen, J. M. H. (2013): Analysis of protein glycation using fluorescent phenylboronate gel electrophoresis. *Sci Rep-Uk* 3:1437(1-7).

Morcos, M., Du, X., Pfisterer, F., Hutter, H., Sayed, A. A. R., Thornalley, P., et al. (2008): Glyoxalase 1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7:260-9.



Nagai, R., Murray, D. B., Metz, T. O., Baynes, J. W. (2012): Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes* **61**: 549–559.

Peyroux, J., Sternberg, M. (2006): Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)* 54:405– 419.

Price, D. L., Rhett, P. M., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (2001): Chelating activity of advanced glycation end-products inhibitors. *J Biol Chem.* 276:48967-72.

Rabbani, N., Thornalley, P. J. (2012): Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* 42:1133-1142.

Ramasamy, R., Yan, SF., Schmidt, A. M. (2009): RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response-the evidence mounts. *J Leukoc Biol.* 86:505-12.

Ramasamy, R., Yan, S. F., Schmidt, A. M. (2012): Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids* 42:1151–61.

Rattan, S. I., and Clark, B. F. C. (1994): Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**:665–672.

Reddy, V. P., Beyaz, A. (2006): Inhibitor of the Millard reaction and AGE breakers as therapeutic for multiple diseases. *Drug Discov Today.* 11:646-54.

Robert, L., Robert, A. M., Fülöp, T. (2008): Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* 9(2):119–133

Sayed, A. A. R. (2011): Ferulsinaic acid attenuation of advanced glycation end products extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63:423-428.

Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Ibrahim, Y., Pfisterer, F., Rabbani, N., Thornalley, P., Sayed, A., Fleming, T., Humpert, P., Schwenger, V., Zeier, M., Hamann, A., Stern, D., Brownlee, M., Bierhaus, A., Nawroth, P., Morcos, M. (2009): *C. elegans* as model for the study of high glucose mediated lifespan reduction. *Diabetes* **58**:2450–2456.

Sharma, S. P., Kaur, J., and Rattan, S. I. S. (1997): Increased longevity of kinetin-fed *Zaprionus* fruitflies is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**:869–875.

Stern, D. M., Yan, S. D., Yan, S. F., Schmidt, A. M, (2002): Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev* 1(1):1–15.

Tawardi, K. V., Agte, V. V. (2011): Effect of micronutrients on methylglyoxal-mediated *in vitro* glycation of albumin. *Biol Trace Elem Res.* 143:717-25.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.

Thornalley, P. J. (2003): The enzymatic defense against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem Soc Trans.* 31:1341-2.

Thornalley, P. J., Battah, S., et al. (2003): Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 375(Pt3):581-92.

Thornalley, P. J., Edwards, L. G., Kang, Y., et al. (1996): Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester *in vitro* and *in vivo*. Inhibition of glyoxalase 1 and induction of apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 51:1365-1372.

Tian W. D., Gillies R., Brancalion L., Kollias N. (2001): Aging and Effects of Ultraviolet A Exposure may be Quantified by Fluorescence Excitation Spectroscopy *In Vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* 116:840–845.

Vasan, S., Foiles, P., Founds, H. (2003): Therapeutics potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys.* 419:89-96.

Verbeke, P., Siboska, G. E., Clark, B. F., Rattan, S. I. (2000): Kinetin Inhibits Protein Oxidation and Glycooxidation *in Vitro* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276:1265–1270.

Vlassara, H. (2001): The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev.* 17:436-43.

Vlassara, H., Palace, M. R. (2003): Glycooxidation: the menace of diabetes and aging. *Mt Sinai J Med.* 70(4):232–241.

Voziyan, P. A., Hudson, B. G. (2005): Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci* 62:1671–1681.

Wei, Y., Chen, L., Chen, J., Ge, L., He R. Q. (2009): Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. *BMC Cell Biology* 10:10.

Wu, X., Monnier, V. M. (2003): Enzymatic deglycation of proteins. *Arch Biochem Biophys.* 419:16–24.

Xue, M., Rabbani, N., Thornalley, P. J. (2011): Glyoxalase in ageing. *Semin Cell Dev Biol.* 22:293-301.

Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., Metz T. O. (2009): A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Proteome Res.* 8(2):754-769

Zhao, W., Devamanoharan, P. S., and Varma, S. D. (2000): Fructose-mediated damage to lens alpha-crystallin: Prevention by pyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* **1500**:161–168.

Zieman, S. J., Melenovsky, V., Clattenburg, L., Corretti, M. C., Capriotti, A., Gerstenblith, G., Kass, D. A. (2007): Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium)

improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 25(3):577–583.

## Internetové zdroje

[2] Alteon, Alagebrium, ALT-711", *Fight Aging*, 20 April 2007 (přístup dne 15.4.2015)

[1] Protokol pro získání cytosolického extraktu z *C. elegans*:  
<http://genetics.wustl.edu/tslab/protocols/protein-stuff/cytosolic-extract-using-sonication-fast/>  
(přístup dne 1.5. 2015)