

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA BIOFYZIKY**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Studium vlivu neenzymatické glykace na strukturu a vlastnosti lidského albuminu**



Vypracovala: Barbora Kočnarová

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Olomouc 2019

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Barbora Kočnarová

Název práce: Studium vlivu neenzymatické glykace na strukturu a vlastnosti lidského albuminu

Typ práce: experimentální

Pracoviště: Katedra molekulární biofyziky, Olomouc

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2019

Abstrakt:

Tato kvalifikační práce pojednává o lidském sérovém albuminu, o jeho významu v organismu a o neenzymatické glykaci tohoto proteinu. V teoretickém ukotvení problematiky uvádíme zmínku i o klinických implikacích glykace albuminu, které jsou významné zejména u pacientů s diabetem. Hlavní náplní experimentální části je simulace neenzymatické glykace albuminu *in vitro* a prokázání strukturní modifikace molekuly pomocí souboru biofyzikálních metod jako jsou spektroskopie v UV/VIS oblasti, cirkulární dichroismus, měření viskozity nebo nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Souhrnná data jasně naznačují výskyt konformačních změn, které pomocí příslušné literatury interpretujeme jako částečné rozbalení molekuly albuminu v závislosti na rozsahu glykace.

Klíčová slova: lidský sérový albumin, neenzymatická glykace, spektroskopie

Počet stran: 39

Počet příloh: 0

Jazyk: český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Barbora Kočnarová

Title of thesis: Studies on effect of non-enzymatic glycation on structure and properties of human albumin

Type of thesis: experimental

Department: Katedra molekulární biofyziky, Olomouc

Supervisor: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Year of defense: 2019

**Abstract:**

In this thesis, we explore the nature of human serum albumin, its function in the body and nonenzymatic glycation of this protein. In the literature overview, we also mention some clinical implications of this reaction that are of great significance in patients with diabetes. The main objective of the experimental part is to simulate nonenzymatic glycation of albumin *in vitro* and to prove modifications in the structure of this protein through appropriately selected biophysical methods, such as absorption spectroscopy in the UV/VIS range, circular dichroism, viscometry and native polyacrylamide gel electrophoresis. Results from these experiments imply a conformational change that is more significant with increasing rate of glycation. This conformational modification is interpreted as partial unfolding of albumin.

Keywords: human serum albumin, non-enzymatic glycation, spectroscopic methods

Number of pages: 39

Number of attachments: 0

Language: Czech

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za obětovaný čas a energii při odborném vedení této práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Crlíkové a Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za cenné akademické i praktické rady a pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D. za trpělivost a ochotu odpovídat na nesčetné dotazy při formálním sepisování této práce. Díky patří také rodině a přátelům za podporu mé tříleté jízdy plné integrálů, elektrochemie a oxidačního stresu. Tato práce byla finacována z projektu IGA\_PrF\_2019\_030.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Jany Kašpárkové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v seznamu literatury.

V Olomouci dne:

# OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY.....	2
2.1 Proteiny a jejich struktura .....	2
2.1.1 Primární struktura proteinů.....	2
2.1.2 Sekundární struktura proteinů .....	3
2.1.3 Terciární a kvartérní struktura proteinů.....	4
2.2 Lidský sérový albumin.....	5
2.2.1 Struktura lidského sérového albuminu .....	5
2.2.2 Funkce a význam albuminu v lidském organismu .....	6
2.3 Neenzymatická glykace sérového albuminu.....	8
2.3.1 Mechanismus reakce .....	8
2.3.2 Struktura glykovaného albuminu a dopad na jeho vlastnosti.....	11
2.3.3 Klinický dopad glykace albuminu.....	12
2.4 Přehled metod použitých pro studium glykovaného albuminu.....	13
2.4.1 Metody spektroskopické.....	13
2.4.1.1 UV/VIS absorpční spektroskopie .....	14
2.4.1.2 Fluorescenční spektroskopie.....	15
2.4.1.3 Církulární dichroismus .....	16
2.4.2 Dialýza.....	17
2.4.3 Stanovení koncentrace proteinů dle metody Bradfordové .....	17
2.4.4 Měření viskozity pomocí kuličkového viskozimetru .....	17
2.4.5 Nativní PAGE.....	19
3. CÍLE PRÁCE .....	20
4. MATERIÁL A METODY .....	21
4.1 Materiály .....	21
4.1.1 Použité chemikálie.....	21
4.1.2 Použité roztoky a pufry .....	21
4.1.3 Použité přístroje.....	22

4.2 Metody .....	22
4.2.1 Příprava vzorků .....	22
4.2.2 Dialýza.....	23
4.2.3 Stanovení koncentrace proteinů dle metody Bradfordové .....	23
4.2.4 Absorpční spektroskopie .....	23
4.2.5 Fluorescenční spektroskopie .....	24
4.2.6 Cirkulární dichroismus .....	24
4.2.7 Měření viskozity.....	25
4.2.8 Nativní PAGE.....	25
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
5.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové .....	27
5.2 Absorpční spektroskopie .....	28
5.3 Fluorescenční spektroskopie .....	30
5.4 Cirkulární dichroismus.....	31
5.5 Měření viskozity.....	32
5.6 Nativní PAGE .....	33
6. ZÁVĚR.....	36
7. SEZNAM LITERATURY.....	37

## **SEZNAM ZKRATEK**

AGE – Advanced Glycation End-Products (produkty pokročilé glykace)

BSA – Bovine Serum Albumin (hovězí sérový albumin)

CD – Cirkulární dichroismus

HSA – Human Serum Albumin (lidský sérový albumin)

MRE – Mean Residue Ellipticity (střední elipticita jednoho aminokyselinového zbytku)

NIR – Near Infrared (blízká infračervená)

PAGE – Polyakrylamidová gelová elektroforéza

SD – Standard Deviation (směrodatná odchylka)

SEM – Standard Error of the Mean (střední chyba průměru)

SS I – Sudlow Site I (Sudlowo vazebné místo I)

SS II – Sudlow Site II (Sudlowo vazebné místo II)

UV – Ultraviolet (ultrafialová)

VIS – Visible (viditelná)

## 1. ÚVOD

Lidský sérový albumin je hlavním proteinem krevní plasmy. Kromě osmoregulační funkce je albumin také důležitým transportním proteinem. Pomocí vazby na albumin jsou distribuovány mastné kyseliny, aminokyseliny, hormony, některé těžké kovy a také celá řada léčiv. Tento důležitý protein je během svého života v krevní plazmě vystaven mnohým faktorům, které mohou nepříznivě ovlivnit jeho funkci. Jedním z těchto faktorů je také neenzymatická glykace, která se projevuje především v případě onemocnění *diabetes mellitus* a může výrazně zhoršovat dopady tohoto onemocnění na pacienty. Předmětem této bakalářské práce bude zjistit, zda může neenzymatická glykace sérového albuminu ovlivnit strukturu a biofyzikální vlastnosti tohoto proteinu. Případně jakým způsobem je ovlivněna, k čemuž budou využity spektroskopické a elektromigrační metody.



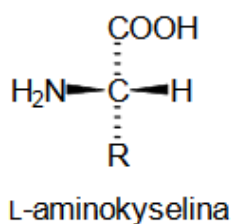
## 2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

### 2.1 Proteiny a jejich struktura

Proteiny tvoří významnou skupinu biomakromolekul, jejichž syntéza je řízena kódem genetické informace při procesech translace a transkripce (Dostál a kol. 2011). Výsledné skládání bílkovin udává nativní konformaci proteinů, ovšem při extrémních podmínkách (teplota, pH, působení rozpouštědel) mohou podléhat denaturaci, kdy dochází k rozpadu struktur vyšších řádů (Koolman a Röhm 2012). Role proteinů v organismu je rozmanitá, zastupují funkce enzymů, imunoglobulinů a některých hormonů, čímž jsou součástí signalizačních drah včetně odpovědi imunitního systému. Dále tvoří důležité strukturní jednotky jako jsou pojivové tkáně – vazy a šlachy, vlasy nebo nehty. Aktinová a myozinová vlákna ve svalstvu umožňují aktivitu pohybového aparátu a některých vnitřních orgánů. V neposlední řadě plní bílkoviny důležitou funkci přenašečů plynů i metabolitů v krvi a umožňují její srážlivost (Kotyza a kol. 2007).

#### 2.1.1 Primární struktura proteinů

Primární strukturu proteinu udává pořadí aminokyselin, které jsou do lineárního řetězce přinášeny tRNA při translaci genetické informace (Dostál a kol. 2011). Z chemického hlediska se aminokyseliny řadí mezi substituční deriváty karboxylové kyseliny, kdy se na  $\alpha$ -uhlíku vyskytuje aminoskupina. Lze rozlišovat dva různé stereoisomery (L a D). V biologických systémech se převážně vyskytují L- $\alpha$ -aminokyseliny, jejichž obecný strukturní vzorec lze vidět v obrázku č. 1.



**Obr. 1:** Strukturní vzorec L-stereoizomeru aminokyselin.<sup>1</sup>

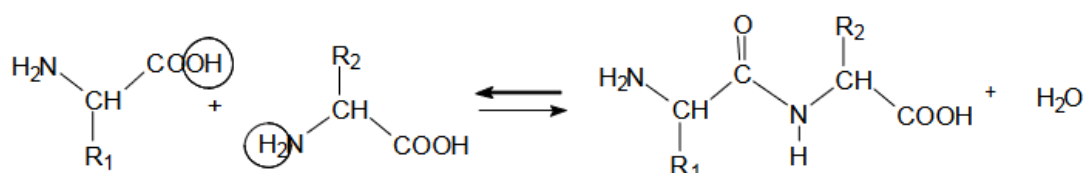
Existuje 20 proteinogenních aminokyselin, které se vzájemně liší pouze postranním zbytkem označovaným jako R. Podle vlastností tohoto zbytku při

---

<sup>1</sup> Převzato a upraveno z Dostál a kol. (2011), str. 133.

fyziologickém pH lze dále rozdělovat aminokyseliny dle jejich vlastností: nepolární, polární, kyselé a zásadité.

Za spojení aminokyselin je odpovědná peptidová vazba CO – NH (obrázek č. 2). Jedná se o kovalentní vazbu mezi karboxylovou a aminovou skupinou aminokyselin. Důležitou vlastností vazby je částečný charakter dvojně vazby, kdy delokalizací  $\pi$ -elektronů karbonylu a volného elektronového páru dusíku dochází ke znemožnění volné otáčivosti (Dostál a kol. 2011). Spojením několika aminokyselin vzniká řetězec nesoucí volnou aminoskupinu (N-konec) na jedné straně a druhé straně se nachází volný karboxyl (C-konec). Pořadí aminokyselin se pak čte od N-konce k C-konci, což odpovídá směru 5'–3' v DNA.

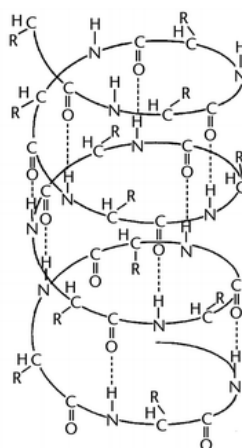


**Obr. 2:** Tvorba peptidové vazby mezi dvěma aminokyselinami.<sup>2</sup>

### 2.1.2 Sekundární struktura proteinů

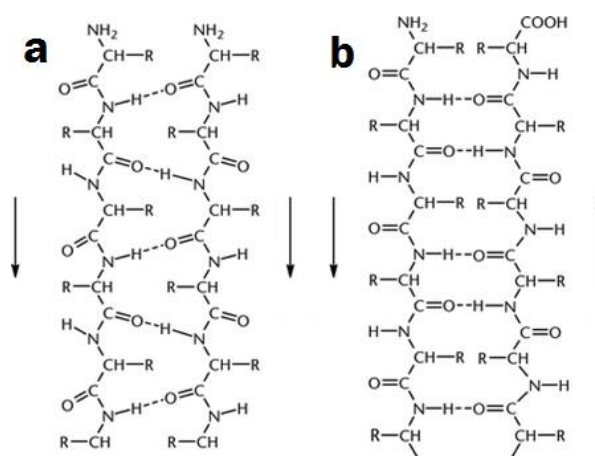
Za sekundární strukturu proteinů je považováno prostorové uspořádání atomů v hlavním polypeptidovém řetězci. Sledují se zejména hodnoty torzních (též dihedrálních nebo Ramachandranových) úhlů:  $\Phi$  vazby N-C $_{\alpha}$  a  $\Psi$  vazby C $_{\alpha}$ -CO (Šípál a kol. 1992). Pomocí těchto úhlů lze předpovídat pravděpodobnost výskytu sekundární struktury na základě Ramachandranova diagramu stability sekundárních struktur bílkovin. Mezi termodynamicky nejvýznamnější struktury se řadí: pravotočivá  $\alpha$ -šroubovice (obrázek č. 3) a  $\beta$ -skládaný list (obrázek č. 4). Obě struktury jsou stabilizovány vodíkovými můstky mezi kyslíkem karbonylu a –NH skupinou. U  $\alpha$ -šroubovice směřují postranní řetězce do vnějšího prostředí šroubovice a tvoří její obal. To má významný důsledek zejména u globulárních bílkovin, kdy lze strategickým rozmístěním polárních a nepolárních zbytků dosáhnout tvorby hydrofilních a hydrofobních oblastí.

<sup>2</sup> Převzato a upraveno z Dostál a kol. (2011), str. 140.



**Obr. 3:** Pravotočivá  $\alpha$ -šroubovice.<sup>3</sup>

Oproti tomu se rozlišují dvě možné struktury  $\beta$ -skládaných listů: paralelní a antiparalelní (obrázek č. 4). V bílkovinách se mohou vyskytovat nepravidelné struktury a celkově může řetězec nabývat více sekundárních struktur.



**Obr. 4:** Možné struktury  $\beta$ -skládaného listu: a) paralelní, b) antiparalelní.<sup>4</sup>

### 2.1.3 Terciární a kvartérní struktura proteinů

Terciární uspořádání bílkovin je dané prostorovou organizací všech atomů v molekule (Dostál a kol. 2011). Tohle uspořádání je zásadně ovlivněno sekundárními strukturami a jednotlivými interakcemi mezi postranními řetězci, které celou strukturu stabilizují

<sup>3</sup> Převzato a upraveno z:  
[https://www.nature.com/horizon/proteinfolding/background/figs/importance\\_f3.html](https://www.nature.com/horizon/proteinfolding/background/figs/importance_f3.html).

<sup>4</sup> Převzato a upraveno z:  
[https://www.nature.com/horizon/proteinfolding/background/figs/importance\\_f3.html](https://www.nature.com/horizon/proteinfolding/background/figs/importance_f3.html).

nevazebnými silami. Jedná se zejména o elektrostatické a hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly a zeslabené kovalentní vazby, které zaujímají formu vodíkových a disulfidických můstků.

Kvartérní struktura proteinů zohledňuje možné nekovalentní spojení více bílkovinných podjednotek a jejich vzájemné uspořádání (Dostál a kol. 2011).

## 2.2 Lidský sérový albumin

Lidský sérový albumin (HSA) je významně zastoupený globulární protein, který představuje až 60 % všech bílkovin v séru s koncentrací  $30\text{--}50\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Peters 1996) a molekulovou hmotností 66 500 Da (Meloun a kol. 1975). Jeho molekulová hmotnost je v porovnání s ostatními globulárními bílkovinami nízká a je příčinou některých specifických funkcí albuminu jako je regulace koloidně-osmotického tlaku v krvi (Koolman a Röhms 2012).

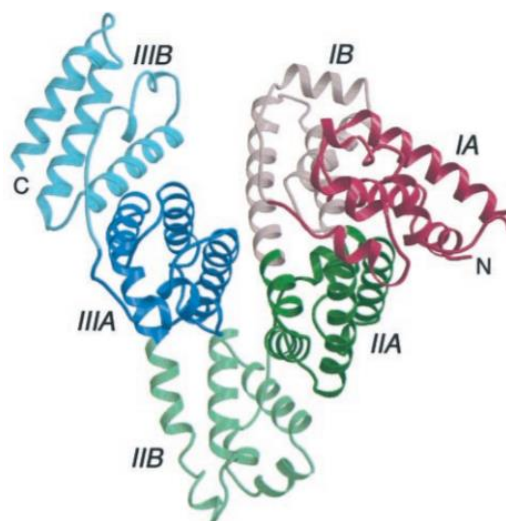
### 2.2.1 Struktura lidského sérového albuminu

Albumin je tvořen řetězcem 585 aminokyselin. Pozoruhodný je ojedinělý výskyt tryptofanu v porovnání s dalšími bílkovinami obsaženými v savčích organismech (Meloun a kol. 1975). Nízké zastoupení mají také methionin: 6, glycin: 12 a izoleucin: 8. Naopak v hojném počtu lze pozorovat cystein: 35, leucin: 61, lysin: 59 a glutamovou kyselinu: 82. Aminokyseliny s kyselými zbytky převažují nad zásaditými, a proto má albumin při fyziologickém pH náboj -15, který umožňuje rozpustnost ve vodě (Peters 1996).

Řetězec je rozdělen na 3 strukturně podobné domény, které se dále dělí na subdomény A a B. Hranice vymezují aminokyseliny 1-197 pro doménu I, 189-385 pro doménu II a 381-585 pro doménu III (Dockal a kol. 1999). Při této segmentaci byla prokázána funkční nezávislost jednotlivých domén vzhledem k vazbě ligandů. Domény a subdomény jsou dále stabilizovány smyčkami 17 intramolekulárních disulfidických můstků mezi cysteinovými zbytky (Peters 1996). Z celkových 35 cysteinových zbytků se pouze jeden (Cys-34) nepodílí na tvorbě disulfidických můstků.

Studium sekundární struktury krystalické molekuly albuminu pomocí rentgenové difrakční analýzy vykazuje přítomnost 67 %  $\alpha$ -šroubovic (He a Carter 1992). Hydrodynamické studie (Oncley a kol. 1946, cit. Peters 1996) minulého století

předpověděly elipsoidní tvar molekuly s rozměry  $38 \times 150 \text{ \AA}$ , avšak bylo prokázáno, že v krystalové formě má albumin srdcovidní strukturu s rozměry  $30 \times 80 \times 80 \text{ \AA}$  (He a Carter 1992). Názorné vyobrazení sekundární a terciární struktury nativního albuminu je uvedeno v obrázku č. 5.



**Obr. 5:** Sekundární a terciární struktura albuminu.<sup>5</sup>

Albumin je z pohledu kvartérní struktury monomer. Neobsahuje nebiřkovinné skupiny a jako jeden z mála sérových proteinů není enzymaticky glykosylován, tudíž se neřadí mezi glykoproteiny (Kotyza a kol. 2007).

### 2.2.2 Funkce a význam albuminu v lidském organismu

Syntéza albuminu probíhá v hepatocytech a zaujímá až 25 % veškeré proteosyntetické kapacity jater (Kotyza a kol. 2007). Většina nasyntetizovaného albuminu je ihned vylučována do krevního řečiště a méně než 2 g jsou uloženy v jaterních buňkách (Quinlan a kol. 2005), jež při nedostatku slouží jako aminokyselinová rezerva (Koolman a Röhm 2012). Denní produkce albuminu se pohybuje okolo 10–15 g a jeho poločas života je 12–21 dní. 40–60 % albuminu je degradováno v ledvinách, játrech a svalech. Díky vysoké koncentraci albuminu v séru není překvapivé, že ve fyziologických procesech zastává mnoho rozmanitých funkcí, které jsou kritické pro správné fungování organismu.

Vzhledem ke své terciární struktuře a flexibilitě albumin disponuje mnohými vazebnými místy pro malé metabolity a nepolární látky a zároveň plní funkci jejich

<sup>5</sup> Převzato z <https://www.rcsb.org/structure/1E78>.

přenašeče. N-konec má navíc vysokou afinitu pro malé dvojmocné ionty, zejména  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  (Rondeau a Bourdon 2011),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  (Koolman a Röhm 2012). Dále obsahuje řadu hydrofobních kapes, v nichž se vážou nepolární látky jako jsou bilirubin a mastné kyseliny. Volný bilirubin, který je kvůli rozpustnosti v tucích toxický, se váže v subdoméně IIA a je albuminem transportován do jaterních buněk (Koolman a Röhm 2012).

V subdoménách IIA a IIIA se nachází dvě majoritní vazebné místa s afinitou k barvivům a léčivům. Sudlowo vazebné místo I (SSI) je specifické pro vázání větších heterocyklických látek jako je warfarin (Sudlow a kol. 1975). Oproti tomu Sudlowo vazebné místo II (SSII) je vazným místem pro aromatické sloučeniny obsahující především indolové skupiny jako je ibuprofen. Skrz obě Sudlowa místa se navíc přenáší uremické toxiny zodpovědné za chronické selhání jater. Na volný Cys-34 se kovalentně váží léčiva jako je cis-platina nebo D-penicilamin. Albumin hraje důležitou roli ve farmakokinetické aktivitě mnohých léčiva jeho terapeutický potenciál je předmětem výzkumu (Fasano a kol. 2005).

Kromě léčiv albumin zastává transportní funkci i pro thyroidní hormony, především tyroxin, který se primárně váže v SSI a sekundárně v doméně III nebo v oblasti mezi doménou I a III (Petitpas a kol. 2003).

Albumin je spolu s ceruloplasminem a kyselinou močovou jednou z nejvýznamnějších látek s antioxidačními účinky v plazmě (Rondeau a Bourdon 2011). Tento atribut je přiřazován zejména Cys-34, který se ve zdravých jedincích nachází až z 70–80 % v redukované formě. Také odhalené methioninové zbytky podléhají oxidaci a přispívají k antioxidační funkci. Kromě toho může albumin přenášet antioxidační činidla nebo zadržovat volné přechodné kovy, především dvojmocné železo a měď (Fasano a kol. 2005), které mohou skrz Fentonovu reakci s peroxidem vodíku generovat nebezpečné hydroxylové radikály (Roche a kol. 2008).

Regulační funkce albuminu na onkotickém tlaku plazmy se vzhledem k nízké hmotnosti a afinitě k anorganickým iontům pohybuje mezi 75–80 % ze všech plazmatických proteinů (Kotyza a kol. 2007).

V klinické praxi se pro stanovení dlouhodobé hladiny cukru v krvi využívá glykovaný hemoglobin červených krvinek (HbA1c) s dobou života 90–120 dnů (Rondeau a Bourdon 2011). U pacientů postižených vážnými zdravotními stavy, které mohou ovlivňovat produkci a životnost červených krvinek (např. selhání jater nebo krevní transfúze), může být určování dlouhodobé hladiny cukru nevhodné. Analýzou

glykovaného albuminu by bylo možné provést krátkodobější kontrolu hladiny cukru v rozsahu 14–21 dní (Anguizola a kol. 2013). K tomu je však potřeba porozumět podstatě neenzymatické glykace a vlivu této reakce na vlastnosti bílkovin.

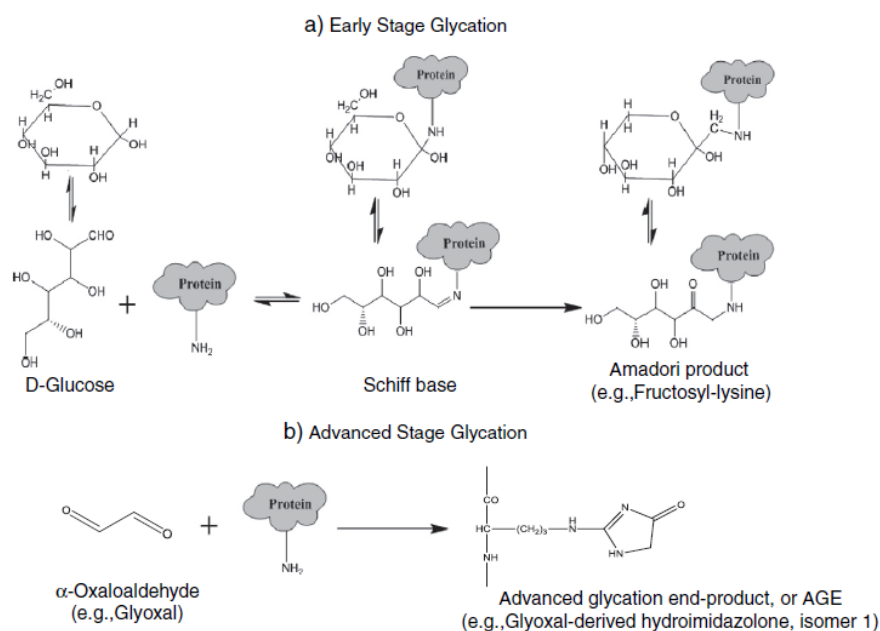
### 2.3 Neenzymatická glykace sérového albuminu

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, albumin je jedním ze sérových proteinů, který není enzymaticky glykosylován. Zajímavé je, že evoluční předchůdci albuminu a jemu příbuzné proteiny podléhají v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu posttraslační úpravě zvané N-glykosylace (Peters 1996), kdy se oligosacharidy váží na zbytek asparaginu ke specifické sekvenci aminokyselin Asn-X-Ser nebo Asn-X-Thr, kde X je jakákoli aminokyselina kromě prolinu (Mellquist a kol. 1998). Moderní lidský sérový albumin tuto sekvenci postrádá, není tak posttraslačně modifikován a neřadí se mezi glykoproteiny (Peters 1996). Při nadbytku sacharidů však probíhá neenzymatická glykace, která se v experimentálním prostředí simuluje několikanásobně vyšší koncentrací glukózy (případně jiného sacharidu) s albuminem a pufrů.

Navázání různých molekul na protein obecně vede k modifikaci jeho sekundární a terciární struktury v důsledku změny elektrostatických a dalších nevazebných interakcí, čímž často dochází i ke změně afinity k ligandům a ovlivňuje tak jeho funkci.

#### 2.3.1 Mechanismus reakce

Neenzymatická glykace, též zvaná Maillardova reakce, je iniciována nukleofilní adicí aldehydové skupiny sacharidu na primární amin za vratné tvorby Schiffovy báze (Barzegar 2007). Nestabilní Schiffova báze podléhá pomalé reorganizaci molekuly na Amadoriho produkt. Pod vlivem enolizace následuje fáze propagace, kterou podmiňuje vznik deoxyglukosonů (Obšil a Pavlíček 1997). Následná oxidace, polymerizace, dehydratace a reorganizace umožňuje vzniku konečným produktům pokročilé glykace (AGE). Tyto AGE mohou být pro okolní tkáň toxické a často hrají důležitou roli v patogenezi *diabetes mellitus*. Některé studie diskutují i význam vlivu Amadoriho produktů při průběhu této nemoci. (Arif a kol. 2012).



**Obr. 6:** Reakční schéma neenzymatické glykace proteinu:  
a) fáze brzké glykace, b) pokročilá fáze glykace.<sup>6</sup>

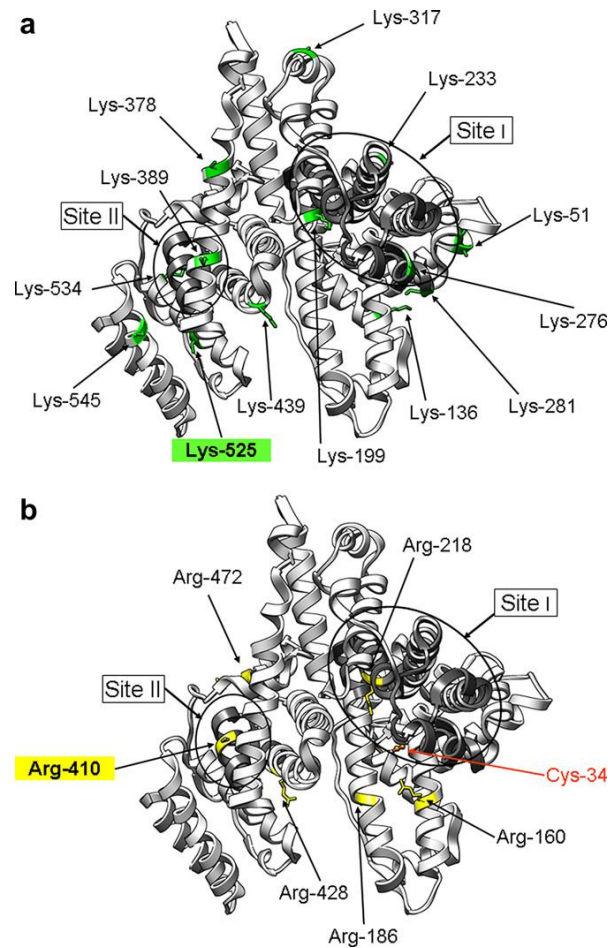
Stupeň glykace proteinu závisí na délce jeho inkubace se sacharidem, na druhu redukujícího sacharidu a prostředí (pH), ve kterém reakce probíhá. Na základě práce Barnaby a kol. (2011) lze usuzovat, že při stejných podmínkách roste s délkou inkubace i rozsah glykace. Kromě glukózy může být albumin glykovan i ribózou, fruktózou nebo galaktózou. V jedné z provedených studií (Suarez a kol. 1989, cit. Maciazek-Jurczyk a kol. 2018) bylo zjištěno, že fruktóza v porovnání s glukózou reaguje s BSA samovolněji a intenzita fluorescence výsledného produktu je přibližně desetkrát vyšší. To je způsobeno vyšším zastoupením lineárních forem molekul sacharidů, které jsou reaktivnější než formy cyklické (Obšil a Pavlíček 1997). Autoři jiné studie prokázali, že neenzymatická galaktosylace je při totožných experimentálních podmínkách *in vitro* (inkubace 7 dnů, koncentrace glukózy i galaktózy 5 mM) až 4× rychlejší a intenzivnější, než je glykace albuminu glukózou (Urbanowski a Cohenford 1982). Produkce AGE může probíhat i se znehodnocenými produkty glukózy. Aminokyselinové zbytky reagují například s  $\alpha$ -oxoaldehydy nebo methylglyoxalem, které mohou být generovány degradací Schiffových bází (Thornalley a kol. 1999).

Vzhledem k nukleofilní charakteristice jsou ke glykaci v molekule albuminu náchylné zejména aminokyseliny lysin a arginin, ale také volná thiolová skupina na Cys-34 (Rondeau a Bourdon 2011). Významné polohy jsou pak zvýrazněny

<sup>6</sup> Převzato z Anguizola a kol. (2013), str. 65.



na obrázku č. 7, kde nacházíme aminokyselinové zbytky podléhající modifikaci s různou účinností pro podmínky *in vitro* a *in vivo*. Rozsah této modifikace vychází z přístupnosti jednotlivých aminokyselin a výskytu funkčních skupin v jejich bezprostřední blízkosti.



**Obr. 7:** HSA s vyznačením afektovaných aminokyselinových zbytků podléhající neenzymatické glykaci: a) lysinové zbytky, b) argininové zbytky a Cys-34.<sup>7</sup>

Identifikovaných bylo celkem 23 lysinů (Rondeau a Bourdon 2011) podléhajících glykaci. O dalších, jako jsou Lys-12, Lys-233, Lys-317, Lys-351 a Lys-534, se spekuluje (Iberg a Flückiger 1986). Nejvýznamnější změnou *in vivo* prochází Lys-525, která zodpovídá zhruba za třetinu celkové glykace. O něco méně významnou roli pak hrají Lys-199 (okolo 5 %), Lys-281 a Lys-439. U argininu se jedná především o Arg-410 (glykovaný methylglyoxalem) v oblasti Sudlowého vazebného místa II a dále Arg-114, Arg-160, Arg-186, Arg-218 a Arg-428 (Ahmed a kol. 2005). V podmínkách *in vitro* zasahuje glykace zejména Lys-276, Lys-378, Lys-545, Lys-525 a Arg-10, Arg-98, Arg-160, Arg-209 a několik dalších lysinů (Maciazek-Jurczyk a kol. 2018). Volná

<sup>7</sup> Převzato z Rondeau a Bourdon (2011), str. 649.

thiolová skupina v oblasti Cys-34 je velice reaktivní v podmínkách *in vitro*, kdy reaguje s methylglyoxalem až z 80 % za vzniku S-karboxymethyl-cysteinu (CMC) a navíc S-karboxyethyl-cystein (CEC) *in vivo* (Ahmed a kol. 2007).

Jedním z důvodů, proč jsou glykované právě zmíněné lokace, může být výskyt kladně nabitých aminokyselinových zbytků v jejich blízkosti, jež svým nábojem katalyzují Amadoriho reorganizaci (Iberg a Flückiger 1986).

### 2.3.2 Struktura glykovaného albuminu a dopad na jeho vlastnosti

Glykace je reakce doprovázená oxidací a stárnutím molekuly, které společně vedou ke změně struktury bílkoviny na sekundární a terciární úrovni. Spolu s konformačními změnami nastává i zvýšení molekulové hmotnosti o navázané jednotky glukózy, případně jiného sacharidu. V neposlední řadě také dochází ke snížení celkového náboje molekuly (Peters 1996).

Z hlediska změny sekundární struktury může dojít k tvorbě termodynamicky stabilnějšího agregátu s přeměnou  $\alpha$ -helixů na  $\beta$ -skládané listy vedoucí k formaci amyloidů. Například ve studii Sattarahmadyho a kol. (2008) byly po 20týdenní inkubaci albuminu s různými redukujícími sacharidy zobrazeny tři různé struktury výsledných produktů. Pro glukózu se ukázalo, že první z těchto struktur jsou větvené řetězce globulárních agregátů o průměru 20-40 nm, nevětvená klubka vláknitých agregátů o délce 140 nm a jemné amorfní agregáty s větvenými řetězci globulárních agregátů. Stejná publikace ukázala, že struktura produktů po inkubaci s ribózou nebo fruktózou je zcela jiná než s glukózou. Při 7denní inkubaci BSA s 1M D-ribosou byla také prokázána tvorba globulárních agregátů, zároveň však nedošlo ke změně sekundární struktury (Wei a kol. 2009). Při 21denní inkubaci albuminu s glukózou (koncentrace 35 mM) může vznikat termodynamicky stabilní globulární struktura ve stavu mezi nativní a denaturovanou formou (Sattarahmady a kol. 2007).

V literatuře se nachází množství studií s konfliktními výsledky týkající se vlivu glykace na afinitu albuminu k různým ligandům, avšak vzhledem k hojnému výskytu modifikovaných aminokyselin v okolí SS I a II je o výzkum velký zájem. Léčiva jsou specificky charakterizovaná dle toho, zda se váží v SS I nebo II, a tak lze poměrně snadno vybrat selektivní sondy pro studium změny afinity těchto míst. Některé výzkumné týmy, např. Joseph a Hage (2010), pro SS I využili warfarin a jeho enantiomery, pro SS II byl

použitý

L-tryptofan. Výsledky jsou různorodé, zobecněním však lze dojít k závěru, že je SS II náchylnější ke změně afinity než SS I. Mimo to může glykace také ovlivňovat interakce jednotlivých léčiv mezi sebou (Anguizola a kol. 2013).

Sulfonylurea je významným farmakem se zvýšenou afinitou s 2,7-3,6násobným retenčním faktorem v důsledku *in vivo* glykace albuminu oproti nativnímu albuminu (Basiaga a Hage 2010). Jedná se o perorální antidiabetika, jejichž cílem je zvýšení sekrece inzulínu u pacientů s *diabetes mellitus* 2. typu. Dále byl nalezen pokles afinity *in vitro* u Bromocresol purpurového barviva, salicylátu, dansylprolinu (u SSII), fenybutazonu, ibuprofenu, kyseliny flufenamové a diazepam. Podrobně a přehledně je problematika změny afinity léčiv ke glykovanému albuminu zpracovaná v Review autorů Anguizola a kol. (2013). V případě albuminu glykovaného *in vitro* byl nalezen 50% pokles afinity bilirubinu (Shaklai a kol. 1984).

Vzhledem k reakci Cys-34 s methylglyoxalem a doprovodné oxidaci molekuly, kdy se thiolová skupina nachází v již oxidovaném stavu, je jedním z dalších významných důsledků snížená antioxidační kapacita albuminu v séru (Rondeau a Bourdon 2011).

### 2.3.3 Klinický dopad glykace albuminu

Ve zdravých jedincích je glykací modifikováno zhruba 10 % albuminu (Shaklai a kol. 1984), v průběhu onemocnění *diabetes mellitus* může koncentrace glykovaného albuminu vzrůst až 3× (Maciazek-Jurczyk a kol. 2018). Z hlediska klinických implikací lze říct, že nejzásadnější pro lidský organismus je kumulace AGE, které vznikají v pokročilejších fázích reakce (Sattarahmady a kol. 2007). Hromadění AGE v organismu může způsobovat řadu komplikací v průběhu *diabetes mellitus*. Je často spojováno s diabetickou retinopatií, neuropatií, nefropatií nebo angiopatií (Nawale a kol. 2006). Můžou se však projevit i poruchy systolické a diastolické funkce (Hartog a kol. 2007), navíc přispívá k rozvoji Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci, aterosklerózy nebo šedého zákalu (Arasteh a kol. 2014).

Provedené studie popisují, jakým způsobem neenzymatická reakce ovlivňuje biofyzikální vlastnosti lidského sérového albuminu – nastává změna sekundární a terciární struktury v závislosti na délce inkubace, typu sacharidu a okolním prostředí. Tyto konformační změny pak vedou k ovlivnění afinity k různým ligandům, a tudíž k

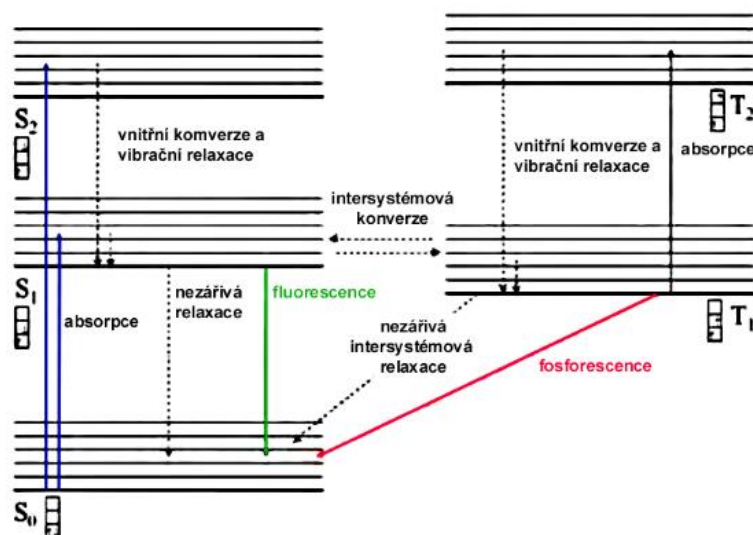
modifikované či omezené funkci proteinu. Produkty pokročilé glykace mohou dokonce vést k nepříjemným zdravotním komplikacím a některým fatálním následkům.

## 2.4 Přehled metod použitých pro studium glykovaného albuminu

Kvůli snadné denaturaci proteinů a degradaci vzorků je nutné volit vhodné metody a chemikálie, které jsou dostatečně šetrné ke studované struktuře albuminu.

### 2.4.1 Metody spektroskopické

Spektroskopické metody jsou vhodné pro neinvazivní studium různých chemických látek (Cibiček a kol. 2014). Jsou založeny na teorii interakce elektromagnetického záření s hmotou, zejména absorpci a emisi. Tyto interakce jsou výstižně zobrazeny na diagramu Jablonského (obrázek č. 8).



Obr. 8: Jablonského diagram.<sup>8</sup>

V první fázi dochází k absorpci záření hmotou, tedy k přechodu energetického stavu elektronů ze základního ( $S_0$ ) na excitovaný ( $S_n$ ). Z excitovaného stavu pak může elektron podlehnout vnitřní konverzi a vibrační relaxaci na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu ( $S_1$ ), odkud je přechod na základní hladinu uskutečněn buď nezářivými přechody nebo vyzářením fotonu, které se nazývá fluorescencí. V druhém případě může elektron z excitovaného stavu ( $S_n$ ) intersystémovou konverzí přejít do stavu tripletního ( $T_n$ ) a pokud je při přechodu z ( $T_1$ ) na základní singletní hladinu ( $S_0$ ) vyzářen foton, jedná se o fosforescenci. Kvůli současné změně elektronového a spinového stavu

<sup>8</sup> Převzato z Cibiček a kol. (2014), str. 27.

při přechodu je důležitou charakteristikou delší doba dohasínání. Dále se pro studium našich vzorků budeme zabývat pouze jevy absorpce a fluorescence.

#### 2.4.1.1 UV/VIS absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie je metoda, která sleduje změnu intenzity světla v důsledku interakce záření se vzorkem ve VIS a UV oblasti ( $\lambda = 190\text{--}790\text{ nm}$ ) (Cibiček a kol. 2014). Experiment je realizován měřením úbytku intenzity světla po průchodu vzorkem, který je dle platnosti Lambert-Beerova zákona exponenciální:

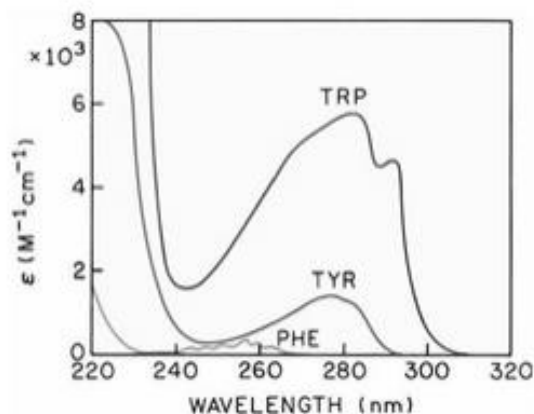
$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l}, \quad (1)$$

kde  $I_0(\lambda)$  je počáteční intenzita světla,  $I(\lambda)$  je intenzita světla po průchodu vzorkem,  $\varepsilon(\lambda)$  molární extinkční koeficient,  $c$  koncentrace vzorku a  $l$  je délka optické dráhy, tj. délka květy. Molární extinkční koeficient má charakteristickou závislost na vlnové délce pro každou látku, jak lze vidět na obrázku č. 9 pro aromatické aminokyseliny. Měřicím instrumentem je spektrofotometr, který v jedné rovině obsahuje zdroj světla, monochromátor, vzorek a detektor.

Výstupem měření je absorpční spektrum vyjadřující závislost intenzity signálu, na vlnové délce. Intenzita signálu se obvykle vynáší jako absorbance  $A$ , která je mírou pohlceného světla a vyjadřuje se následovně:

$$A = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l, \quad (2)$$

Absorpci nad 200 nm v bílkovinách vykazují pouze aromatické aminokyseliny, kterými jsou tryptofan: 1, tyrosin: 18 a fenylalanin: 31 (Peters 1996).



**Obr. 9:** Závislost extinkčního molárního koeficientu aromatických aminokyselin na vlnové délce v UV/VIS.<sup>9</sup>

#### 2.4.1.2 Fluorescenční spektroskopie

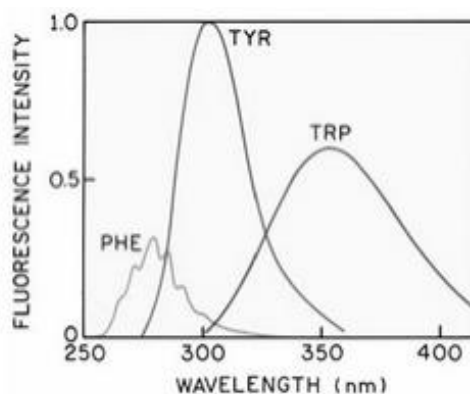
Fluorescenční spektroskopie je další metodou pro studium vzorků na základě interakce elektromagnetického záření s hmotou. Nejčastěji se ve fluorescenční spektroskopii sledují excitační a emisní spektra a dále anizotropie fluorescence nebo doba života excitovaného stavu (Cibiček a kol. 2014). Excitační spektra vyjadřují závislost intenzity záření na excitační vlnové délce a jsou téměř shodná se spektry absorpčními. Emisní spektra pak odpovídají závislosti intenzity záření na emisní vlnové délce při fixní excitační vlnové délce.

Oproti absorpční spektrofotometrii se ve fluorescenční spektrofotometrii pracuje v L-uspořádání (Cibiček a kol. 2014). V jedné rovině se nachází zdroj, monochromátor, (filtr nebo polarizátor) a vzorek – ten je ozářen excitačním svazkem, jehož vlnová délka lze selektivně filtrovat pomocí monochromátoru. Detektor je umístěn kolmo vůči zdroji, aby se při detekci zabránilo interferenci excitačního a emisního záření. Mezi vzorkem a detektorem se opět mohou objevovat prvky jako je polarizátor, filtr a monochromátor.

Kromě toho, že lze pro studium vzorků využít různých fluorescenčních sond a značek, se ve tkáních vyskytují molekuly vykazující vnitřní fluorescenci (Lakowicz 2006). Díky výskytu aminokyselin s aromatickými cykly disponuje touto vnitřní fluorescencí i molekula albuminu. Fluorescence fenylalaninu je v bílkovinách pozorovatelná pouze pokud se v řetězci nenachází další tyrosin nebo tryptofan. Tyrosin, jak lze vidět na obrázku č. 10, produkuje jen velmi úzká fluorescenční spektra. S ohledem

<sup>9</sup> Převzato z Lakowicz (2006).

na indolovou skupinu nejdominantněji přispívá svou fluorescencí tryptofan. Maxima v emisních spektrech odpovídají průměrnému vystavení tryptofanových zbytků do vodného prostředí (Lakowicz 2006).



**Obř. 10:** Fluorescenční spektrum aminokyselin v UV/VIS. <sup>10</sup>

#### 2.4.1.3 Cirkulární dichroismus

Technika měření CD spekter vyjadřuje odlišnou efektivitu absorpce levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla molekulou s chirálním centrem (Greenfield 2009). Tato odlišnost je dána samou podstatou elektromagnetického záření, jež je příčným postupným vlněním sestávajícího se z vektoru intenzity elektrického pole a magnetické indukce. U nepolarizovaného světla kmitá vektor elektrické složky nahodile, kdežto v případě kruhově a lineárně polarizovaného světla opisuje kruh, přímku nebo ve speciálním případě elipsu. Opticky aktivní látky absorbují odlišně pravotočivé a levotočivé kruhově polarizované světlo, kdy rekombinované světlo je elipticky polarizované. Výstupem je spektrum zobrazující závislost diferenciální dichroické absorpce

$\Delta\varepsilon$  pro levotočivě polarizované  $\varepsilon_L$  a pravotočivě polarizované  $\varepsilon_R$  světlo nebo elipticity na vlnové délce, kde

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_L, \quad (3)$$

pro něž platí vztah (1). Elipticita je mírou změny kruhově polarizovaného světla na elipticky polarizované.

<sup>10</sup> Převzato z Lakowicz (2006).

#### 2.4.2 Dialýza

Dialýza je bioanalytickou metodou nacházející široké uplatnění ve výzkumu i klinické praxi (Cibiček a kol. 2014). V principu se jedná se o separaci složek směsi pomocí selektivně-permeabilní mikroporézní membrány, kterou z velké části charakterizuje tzv. cut off hodnota. Cut off hodnota určuje nejvyšší molekulární hmotnost částic, jimž je umožněn volný prostup membránou. Nízkomolekulární látky takto difundují ze směsi do dialyzačního pufu, avšak makromolekulární látky jsou zadržovány. Celý proces je hnán koncentračním spádem. Molekuly z místa vysoké koncentrace prostupují ve směru gradientu do míst s nižší koncentrací do té doby, než systém dosáhne rovnovážného stavu a rychlost difuze se ustálí (Cibiček a kol. 2014).

#### 2.4.3 Stanovení koncentrace proteinů dle metody Bradfordové

Při této metodě se postupuje vytvořením koncentrační řady proteinu o známé koncentraci (nejčastěji BSA) a přidáním činidla Bradfordové, jež obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, ethanol a kyselinu fosforečnou (Bradford 1976). Barvivo má záporný náboj, díky kterému se adsorpčně váže na aromatické a bazické aminokyseliny, a dle rozsahu reakce mění zabarvení z původního hnědého na modré. Absorbance se měří při vlnové délce 595 nm a výstupem je kalibrační křivka. Koncentraci vlastních vzorků lze snadno dopočítat z rovnice kalibrační křivky. Tato kolorimetrická metoda je destruktivní a se vzorky není možné dále pracovat.

#### 2.4.4 Měření viskozity pomocí kuličkového viskozimetru

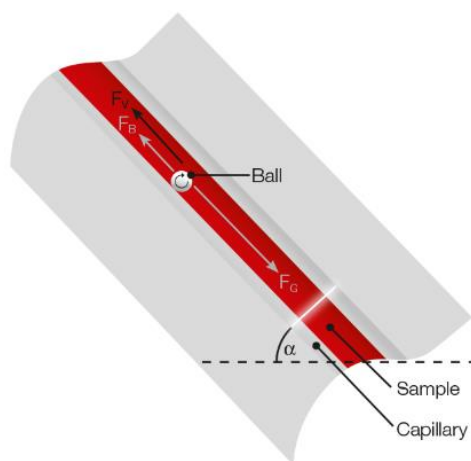
Při pohybu reálné tekutiny dochází k vytváření vrstev proudících odlišnou rychlostí a k přenosu hybnosti mezi jednotlivými vrstvami ve směru gradientu rychlosti (Holubová 2012). Dynamická viskozita je fyzikální veličinou popisující vnitřní tření mezi proudícími vrstvami tekutin, které odpovídá právě toku hybnosti mezi těmito vrstvami.



Tangenciální napětí  $\tau$  lze vyjádřit jako

$$\tau = \eta \frac{dv}{dz}, \quad (4)$$

kde  $v$  je rychlost proudění,  $z$  je vzdálenost od stěny (trubice) a  $\eta$  je dynamická viskozita, která závisí na druhu tekutiny a teplotě. Důsledkem existence vnitřního tření pro pevné těleso ponořené do takovéto tekutiny je působení odporu prostředí. V případě měření viskozity pomocí kuličkového viskozimetru padá kulička v kapalině, dokud nedosáhne mezní rychlosti, která se ustálí při rovnováze síly gravitační  $F_G$ , vztlakové  $F_V$  a vnitřního odporu  $F_B$ , jak je znázorněno v obrázku č. 11.



Obr. 11: Kuličkový viskozimetr. <sup>11</sup>

Odpor prostředí pro laminární proudění popisuje Stokesův zákon. Pro síly při měření viskozity pomocí kuličkového viskozimetru platí

$$6\pi\eta v = \frac{4}{3}\pi r^3 (\rho - \rho_k)g, \quad (5)$$

kde  $r$  je průměr kuličky,  $\rho$  je hustota kuličky,  $v$  je rychlost padající kuličky,  $g$  značí gravitační zrychlení,  $\rho_k$  je hustota kapaliny a  $\eta$  je dynamická viskozita (Holubová 2012).

Kulička o hustotě  $\rho$  padá tekutinou mezi dvěma vymezenými ryskami o definované dráze  $s$  za čas  $t$ . Díky snadnému výpočtu rychlosti kuličky  $v$  ze známé dráhy a času se měření redukuje na měření doby dopadu kuličky  $t$ . Vzhledem k závislosti viskozity na teplotě jsou viskozimetry vybaveny ohřevovým termostatem a disponují možností volit úhel sklonu  $\alpha$ .

<sup>11</sup> Převzato z <https://wiki.anton-paar.com/en/how-to-measure-viscosity/>.

#### 2.4.5 Nativní PAGE

Gelová elektroforéza je řazena mezi elektromigrační techniky určené pro rozdělování makromolekul na základě jejich elektroforetické pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli (Králová a kol. 2008). Pohyblivost molekul  $\mu_e$  je charakterizovaná jejich nábojem  $q$ , viskozitou roztoku  $\eta$  a průměru molekul  $r$

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}. \quad (6)$$

Rovnice (6) vychází z rovnováhy síly elektrického pole a síly vnitřního tření. Při umístění iontů do elektrického pole se částice začnou pohybovat rychlostí

$$v = \mu_e E, \quad (7)$$

kde  $E$  je intenzita elektrického pole. Z rovnice (7) vyplývá, že malé molekuly s velkým nábojem mají vysokou pohyblivost.

Elektroforéza může probíhat volně, v kapiláře nebo na gelových nosičích – polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) se uskutečňuje v prostředí polyakrylamidového gelu, který po zatuhnutí tvoří lineární strukturu zesíťovanou methylenovými můstky. Koncentrací akrylamidu v gelu je možné ovlivnit velikost pórů. Dále se rozlišuje elektroforéza horizontální a vertikální. U vertikální elektroforézy byla zavedena diskontinuální technika, která využívá dvou různých gelů s různě velkými póry. První gel přicházející do kontaktu se vzorky je zaostřovací gel. Má větší póry a molekuly v něm putují rychleji než ve spodním separačním gelu. Součástí jsou také pufrы obsažené v elektroforetické vaně a pufr, kterým jsou ředěny vlastní vzorky. Separace pak probíhá v separačním gelu na základě pohyblivosti a na principu molekulárního síta. Nativní elektroforéza značí, že pro zachování nativní struktury bílkovin nebyla použita denaturační činidla (např. SDS). Pro zviditelnění rozdělených bílkovin v gelu se využívá adsorpčních barviv jako jsou aminočern, methylenová modř nebo Coomassie blue na povrch proteinu (Králová a kol. 2008).

### 3. CÍLE PRÁCE

V rešeršní části této práce jsme představili dosavadní znalosti problematiky neenzymatické glykace lidského albuminu a uvedli některé důležité dopady na jeho vlastnosti i klinické implikace spojované s nemocí *diabetes mellitus*. Také jsme sestavili seznam metod s vysvětlením jejich fyzikální podstaty, které byly použity při experimentálním řešení vlivu neenzymatické glykace na strukturu lidského albuminu.

Další části budou věnované popisu vlastního experimentu a jeho výsledkům. Výsledky budou následně podrobeny příslušné analýze s ohledem možného vlivu glykace na strukturu albuminu a jeho funkci.

Cíle této práce lze tedy shrnout do tří bodů:

- 1) Vypracovat přehled problematiky na téma glykace lidského albuminu a její vliv na biologické vlastnosti a funkci albuminu.
- 2) Provést experimenty s cílem zjistit, zda a jakým způsobem může neenzymatická glykace sérového albuminu ovlivnit terciární strukturu a biofyzikální vlastnosti tohoto proteinu.
- 3) Diskutovat naměřené výsledky s ohledem na možný dopad glykace na funkci albuminu.

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Použité chemikálie

Veškeré chemikálie použité při měření dosahovaly p.a. čistoty. Pitná voda byla deionizovaná přístrojem Smart2Pure (TKA, Německo).

HSA $\geq$ 96 %	(Sigma Aldrich, Česká Republika)
$\beta$ -D(+)-glukóza	(Sigma, Německo)
kyselina chlorovodíková – HCl	(PENTA, Česká Republika)
tris(hydroxymethyl)aminomethan $\geq$ 99,9 %	(CARL ROTH, Německo)
BSA standard (1 mg/ml)	(TaKaRa, Japonsko)
ethanol 96 %	(PENTA, Česká Republika)
akrylamid	(SERVA, Německo)
peroxodisíran amonný	(Sigma Aldrich, Česká Republika)
tetramethylethylenediamin – TEMED	(SERVA, Německo)
glycin	(Sigma, Německo)
glycerol	(Sigma, Německo)
bromfenolová modř	(SERVA, Německo)
proteinový marker molekulové hmotnosti	(Sigma Aldrich, Česká Republika)

#### 4.1.2 Použité roztoky a pufry

Tris-HCl 1 M, pH 7,4	(SERVA, Německo)
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	(SERVA, Německo)
čínidlo Bradfordové	(BIO-RAD, Česká Republika)
EZ Blue Staining Reagent	(Sigma, Německo)
dělicí gel (12 %):	4,9 ml voda
	6,0 ml akrylamid (30 % w/v)
	3,8 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)
	15 ml peroxodisíran amonný (10 % w/v)
	0,006 ml TEMED

zaostřovací gel (5 %):	3,4 ml voda 0,83 ml akrylamid (30 % w/v) 0,63 Tris-HCl (1 M, pH 6,6) 0,05 ml peroxodisíran amonný (10 % w/v) 0,005 ml TEMED
migrační pufr (pH 8,3):	1000 ml voda 25 mM Tris (3,00 g) 190 mM glycin (14,40 g)
nanášecí pufr:	62,5 mM Tris-HCl (1 M, pH 6,8) 25 % glycerol 1 % bromfenolová modř

#### 4.1.3 Použité přístroje

Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader	(BioTek, USA)
Life Sciences UV/Vis Spectrophotometer DU 730	(Beckman Coulter, USA)
Automated MicroViscometer	(Anton Paar, Rakousko)
CARY Eclipse Fluorescence Spectrophotometer	(VARIAN, USA)
Spectropolarimeter J-720	(JASCO, Japonsko)
pH metr PT-370	(BOECO, Německo)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	(BIO-RAD, Česká Republika)

#### 4.2 Metody

Data byla vyhodnocena v počítačovém softwaru GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, USA).

##### 4.2.1 Příprava vzorků

Zásobní roztok HSA byl připraven rozpuštěním navážky 250 mg HSA v 5 ml 0,01M Tris (pH 7,4) při 4 °C s teoretickou koncentrací 50 g · l<sup>-1</sup>. Rozpuštěním 18 mg a 36 mg β-D(+)-glukózy v 1 ml vody byl namíchán 0,1M a 0,2M roztok glukózy. Pro neenzymatickou glykaci HSA *in vitro* byl následován postup z publikace Barzegara a kol. (2007): zásobní roztok HSA, glukózy a Trisu byl smíchán v poměrech uvedených v tabulce č. 1 a při teplotě 37 °C byly vzorky inkubovány po dobu 7 dní. Poté byly doplněny 0,01M Trisem do objemu 1200 μl.

**Tabulka 1:** Zastoupení složek roztoku při inkubaci vzorků HSA s glukózou

Vzorek	Objem HSA [ $\mu\text{l}$ ]	Objem glukózy [ $\mu\text{l}$ ]	Objem Tris [ $\mu\text{l}$ ]	Výsledná koncentrace glukózy [ $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
<b>K</b>	20	0	0	0
<b>1</b>	20	1,7 (0,1M)*	5,2	6,3
<b>2</b>	20	3,5 (0,1M)	3,4	13,0
<b>3</b>	20	6,9 (0,1M)	0	25,7
<b>4</b>	20	6,9 (0,2M)	0	51,3

\*Pozn.: V závorce je uvedena koncentrace použitého roztoku glukózy.

#### 4.2.2 Dialýza

Dialyzační membrány (MWCO 6000-8000 Da) byly nastříhány na 5 centimetrové pásky a vařeny v kádince s vodou v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut. Membrány jsme naplnili vzorky, uzavřeli magnetickými svorkami a vložili do kádinky s dialyzačním pufrům, kterým byl 0,01M Tris. Kádinku jsme na hodinu umístili na magnetickou míchačku při 500 rpm a 5 °C pro udržování homogenity roztoku. Dialýza tak probíhala 3× po dobu 1 hodiny, přičemž každou hodinu byl obměněn dialyzační pufr. Dialyzované vzorky byly z membrány vypipetovány do čistých mikrozkušavek, kde byly uchovány pro další experimenty.

#### 4.2.3 Stanovení koncentrace proteinů dle metody Bradfordové

Na mikrojamkovou destičku jsme nanесли triplikát koncentrační řady BSA a vlastních vzorků. Koncentrační řadu jsme vytvořili postupným pipetováním 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 a 10  $\mu\text{l}$  BSA standardu (1 mg/ml) do jamek a doplněním vodou na celkový objem 10  $\mu\text{l}$ . Do dalších jamek jsme taktéž v triplikátu pipetovali 5  $\mu\text{l}$  vzorku a doplnili vodou na 10  $\mu\text{l}$ . Činidlo Bradfordové bylo zředěno v poměru 1 : 4 ve prospěch vody. Ke koncentrační řadě i vzorkům jsme přidali 200  $\mu\text{l}$  tohoto zředěného činidla. Vyhodnocení bylo zhotoveno na spektrofotometru Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader do 10 minut od přidání činidla při vlnové délce 595 nm a teplotě 25,9 °C.

#### 4.2.4 Absorpční spektroskopie

Do čisté kyvety z křemenného skla (optická dráha 1 cm) bylo napipetováno 80  $\mu\text{l}$  slepého vzorku 0,01M Tris. Kyvetu jsme vložili do kyvetového prostoru přístroje Life Sciences UV/VIS Spectrophotometer DU 730 a uzavřeli víkem. Spektrum bylo měřeno v rozsahu

220-250 nm při teplotě 25 °C. Po každém měření jsme kyvetu vyplachovali vodou a postup opakovali pro všechny vzorky v pořadí s rostoucí koncentrací.

#### 4.2.5 Fluorescenční spektroskopie

Do čisté kyvety (optická dráha 0,5 cm) jsme napipetovali 80 µl slepého vzorku 0,01M Tris. Kyveta byla vložena do kyvetového prostoru přístroje CARY Eclipse Fluorescence Spectrophotometer a fluorescenční spektra jsme měřili s parametry uvedenými v tabulce č. 2.

**Tabulka 2:** Parametry pro měření fluorescenčních spekter

<b>Excitační vlnová délka</b>	295 nm
<b>Emisní vlnová délka</b>	300–450 nm
<b>Rozevření excitační štěrbin</b>	5 nm
<b>Rozevření emisní štěrbin</b>	5 nm
<b>Rychlost skenování</b>	600 nm/min
<b>Akumulace</b>	3

Po proměření spektra byla kyveta vyjmuta a slepý vzorek odpipetován. Kyvetu jsme vymyli a naplnili 80 µl prvního vzorku a celý postup zopakovali pro další vzorky.

#### 4.2.6 Cirkulární dichroismus

Kvůli nahřívání xenonové lampy jsme půl hodiny před vlastním měřením zapnuli přístroj Spectropolarimeter J-720. Zároveň jsme otevřením ventilu plynové nádrže zajistili přísun dusíku a pomocí hadice byl do přístroje hnán průtok vody zajišťující chlazení. Kyvetu (optická dráha 0,5 cm) jsme naplnili 990 µl roztoku 0,01M Tris. Spektrum bylo měřeno v rozsahu 180–300 nm při rychlosti skenování 100 nm/min a akumulací měření 3. Při každém dalším měření jsme se ujistovali, že je kyveta směřována vždy stejným způsobem. Přístroj otestoval každý vzorek 3× a výsledné spektrum vyhodnotil jako průměr těchto 3 měření. Pro vyšší absorbanci bylo nutné vlastní vzorky 30× zředit. Pipetovali jsme 957 µl 0,01M Tris a 33 µl původních vzorků do čisté mikrozkuřavky. Celý postup byl zopakován pro všechny vzorky.

Pro kvantifikaci zastoupení  $\alpha$ -šroubovic jsme postupovali dle výpočtů v práci Xu a kol. (2013). Výsledky z CD spekter jsme vyjádřili jako průměrnou elipticitu jednoho aminokyselinového zbytku ( $MRE$ ) pomocí rovnice

$$MRE_{208} = \frac{CD_{208}[mdeg]}{10c_Mnl}, \quad (8)$$

kde  $CD_{208}$  je hodnota elipticity v 208 nm,  $c_M$  je molární koncentrace proteinu ve vzorku,  $n = 585$  je počet aminokyselinových zbytků v proteinu a  $l = 0,5$  cm je optická dráha. Zastoupení  $\alpha$ -šroubovic je pak dané následovně

$$\alpha(\%) = \frac{100(-MRE_{208} - 4000)}{33\,000 - 4000}, \quad (9)$$

kde  $MRE_{208}$  je výše vypočítaná průměrná elipticita na jeden zbytek, 33 000 odpovídá  $MRE$  hodnotě pro čistou  $\alpha$ -šroubovicovou strukturu a 4000 odpovídá struktuře náhodného klubka při 208 nm.

#### 4.2.7 Měření viskozity

Viskozimetr Automated MicroViscometer byl umístěn na pevnou podložku. Otočnými šrouby byla pomocí zabudované libely nastavena vodorovná poloha. Přístroj byl kalibrován vodou, která byla přefiltrována skrz stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m. Do zvolené kapiláry jsme pomocí pinzety vložili kovovou kuličku a vodu nasáli stříkačkou do kapiláry tak, aby v ní nezůstaly vzduchové bubliny. Uzavřeli jsme ji příslušnými zátkami a vložili do viskozimetru. Na obrazovce jsme nastavili příslušný program s volbou teploty 25 °C, úhlem sklonu 50° a 6 akumulací měření. Po dokončení jsme kapiláru vyjmuli, promyli vodou a postup opakovali pro další vzorky.

#### 4.2.8 Nativní PAGE

Pro účely elektroforézy bylo ihned po dialýze z každého vzorku odpipetováno 10  $\mu$ l do čisté mikrozkuhavky a vloženo na 10 minut do tekutého dusíku pro rychlé zmrazení. Poté byly vzorky vyjmuty a skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C.

Pro realizaci samotné elektroforézy jsme si připravili aparaturu určenou pro uchycení skel na nanášené gely. Skla byla omytá 96% etanolem a připevněná do stojánku. Namíchali jsme dělicí gel dle rozpisu v sekci 4.1.2, který byl ihned napipetován mezi připravená skla a zalit etanolem. Tam byl ponechán k tuhnutí na 30 minut. Za tuto dobu



byl namíchán nanášecí a migrační pufr. Kyselost migračního pufru bylo nutné upravit na hodnotu 8,3 pomocí pH metru a 5M hydroxidu sodného. Ze zatuhlého dělicího gelu byl přebytečný etanol odsát filtračními papíry a mezi skla byl nanesen zaostřovací gel, do něhož jsme vložili plastový hřebínek na tvorbu elektroforetických jamek. Zaostřovací gel tuhl 15 minut a poté z něj byl hřebínek vyjmut. V této fázi jsme vzorky, nanášecí pufr a proteinový marker uskladnili v mrazáku při -20 °C, gely uložili do sáčku a spolu s migračním puffrem umístili do komorové lednice při 5 °C.

Po opětovném rozmrazení vzorků, nanášecího pufru a proteinového markeru molekulové hmotnosti jsme vzorky smíchali s obarveným nanášecím puffrem v poměru 1 : 1 do objemu 4 µl tak, aby byly do jamek v gelu nanášeny 2 µg proteinu. Roztok pufru a vzorků byl homogenizován pomocí stolní centrifugy. Zároveň jsme do první elektroforetické jamky napipetovali 4 µl proteinového markeru, za nímž následovaly další vzorky dle vzrůstající koncentrace. Elektroforetickou vanu jsme uzavřeli víkem a připojili zdroj elektrického napětí, které bylo nastaveno na 60 V a po 20 minutách zvýšeno na 110 V po dobu 1 hodiny.

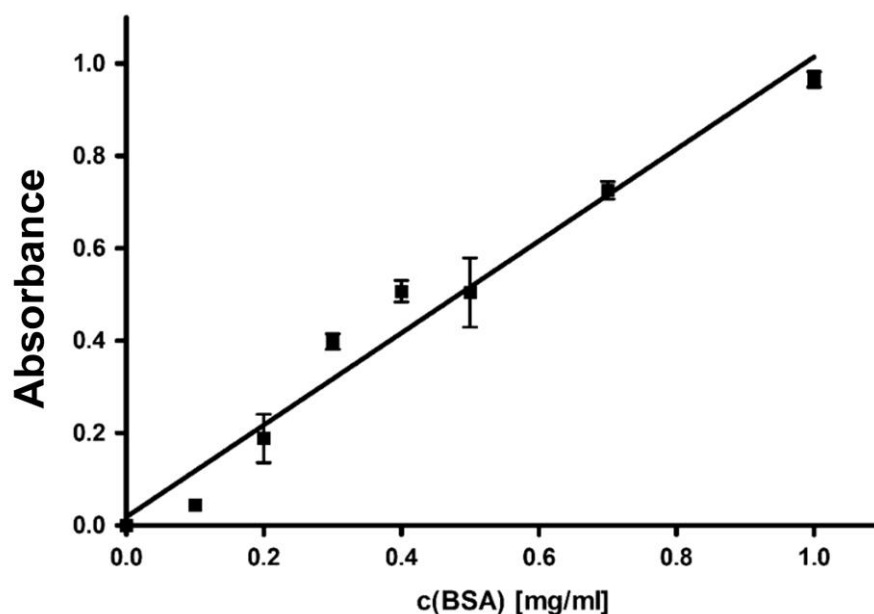
Po dokončení byl gel vyjmut a obarven barvivem EZ Blue Staining Reagent. Poté se gel promyl vodou a výsledek byl ihned vyfotografován. Intezita proužků v jednotlivých drahách byla vyhodnocena denzitometricky pomocí programu AIDA Image Analyzer software (Raytest, Německo).

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Po průběhu dialýzy bylo nutné stanovit koncentraci vzorků kvůli možné změně objemu. Zhotovili jsme triplikát koncentrační řady standardu BSA pipetováním 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 a 10  $\mu\text{l}$  BSA do jamek mikrotitrační destičky a doplněním vodou do objemu 10  $\mu\text{l}$ . Vlastní vzorky byly pipetovány v objemu 5  $\mu\text{l}$  a taktéž doplněny na 10  $\mu\text{l}$  vodou. Ke vzorkům i koncentrační řadě standardu bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  4 $\times$  zředěného činidla Bradfordové. Absorbance byla měřena při vlnové délce 525 nm, jak je uvedeno v kapitole 4.

Hodnoty absorbance pro každou koncentraci byly zprůměrovány ze tří měření a od každé byl odečten signál pozadí. Závislost absorbance na koncentraci standardu byla vynesena do grafu, který je znázorněn v obrázku č. 12. Body koncentrační řady standardu BSA jsou proloženy lineární regresí. Svislá úsečka představuje směrodatnou odchylku. Body, u nichž není chyba měření viditelná, jsou větší než samotná odchylka.



**Obr. 12:** Graf kalibrační křivky koncentrační řady BSA, rovnice grafu  $y = 0,9957x + 0,01847$ ,  $R^2 = 0,9453$ . Data představují průměr a SD pro  $n = 3$ .

Měřením absorbance našich vzorků můžeme z rovnice lineární regrese kalibrační křivky vyjádřit koncentraci  $c = \frac{A-0,01847}{0,9957}$  a stanovit tak koncentraci proteinů v roztoku. Tyto výpočty jsou uvedeny v tabulce č. 3, kde je zohledněno dvojnásobné ředění vzorků při měření, z toho důvodu jsou koncentrace v tabulce vynásobené dvěma.

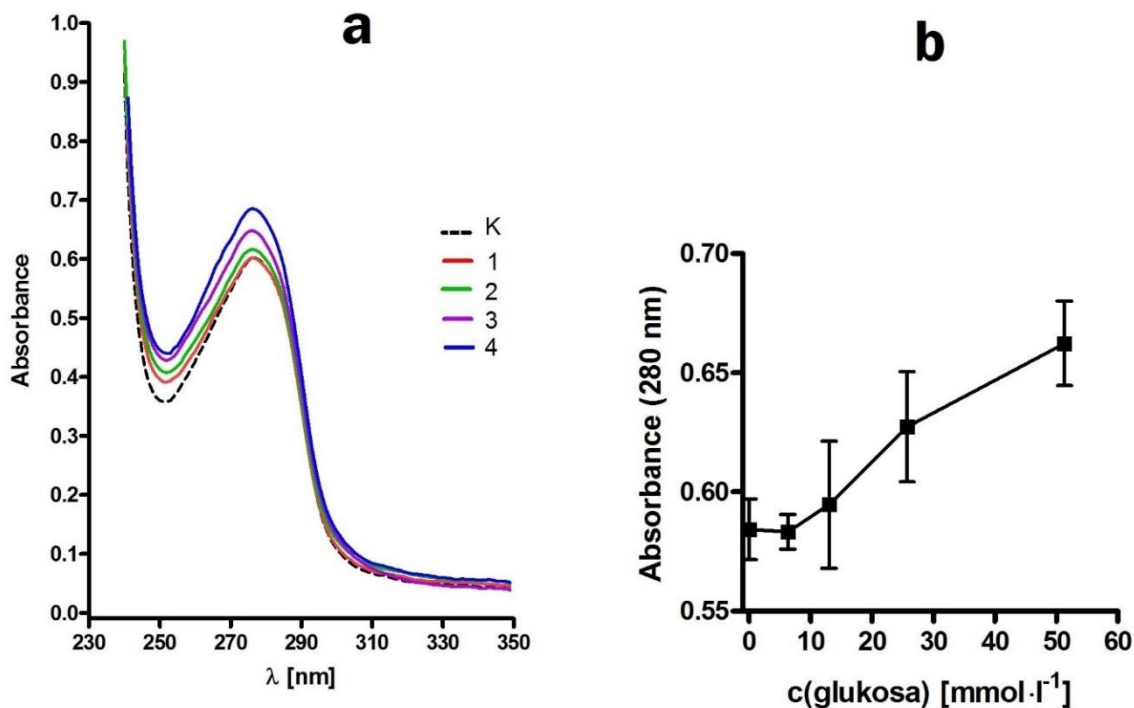
**Tabulka 3:** Data z měření absorpance vzorků a výpočet jejich koncentrace z rovnice kalibrační křivky

Vzorek	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$2c_1$ [mg/ml]	$2c_2$ [mg/ml]	$2c_3$ [mg/ml]	$2\bar{c}$ [mg/ml]
<b>K</b>	0,599	0,546	0,602	1,166	1,060	1,172	(1,13±0,04)
<b>1</b>	0,551	0,559	0,564	1,070	1,086	1,096	(1,08±0,04)
<b>2</b>	0,603	0,627	0,608	1,174	1,222	1,184	(1,19±0,05)
<b>3</b>	0,594	0,556	0,581	1,156	1,080	1,130	(1,12±0,02)
<b>4</b>	0,538	0,405	0,501	1,044	0,776	0,969	(0,9±0,2)

Z dat je evidentní, že koncentrace vzorku č. 4 byla nižší než u ostatních vzorků, avšak v rámci odchylky stále srovnatelná. Chyba tak nejpravděpodobněji nastala v důsledku nepřesného pipetování. Při opakovaném měření koncentrace vzorku č. 4 jsme dosáhli zpřesnění  $(1,0\pm 0,1)$  mg/ml pro  $n = 14$ .

## 5.2 Absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie je jednoduchou a spolehlivou technikou pro studium strukturálních změn proteinů (Molina-Bolívar a kol. 2014). Absorpční spektrum proteinů je citlivé na konformační změny v okolí aromatických aminokyselinových zbytků. Spektra měřená dle postupu v kapitole 4 uvádíme v obrázku č. 13a. Zde porovnáváme spektra pro neglykovaný a glykovaný albumin v rozsahu vlnových délek 230–350 nm. Pro názornost pak v obrázku č. 13b uvádíme závislost absorpčního maxima při 280 nm na koncentraci glukózy ve vzorcích. Svislé čáry v grafu představují odchylku od průměru. Za absorpční maximum v 280 nm jsou zodpovědné aminokyseliny tyrosin a tryptofan a náhlý vzrůst absorpance v 240 nm odpovídá absorpanci peptidové vazby (Lakowicz 2006).



**Obr. 13:** a) Absorpční spektra pro neglykovaný (K) a glykovaný (1, 2, 3, 4) lidský sérový albumin; b) závislost absorbance při 280 nm na koncentraci glukózy ve vzorcích. Data představují průměr a SEM ze tří měření identického vzorku.

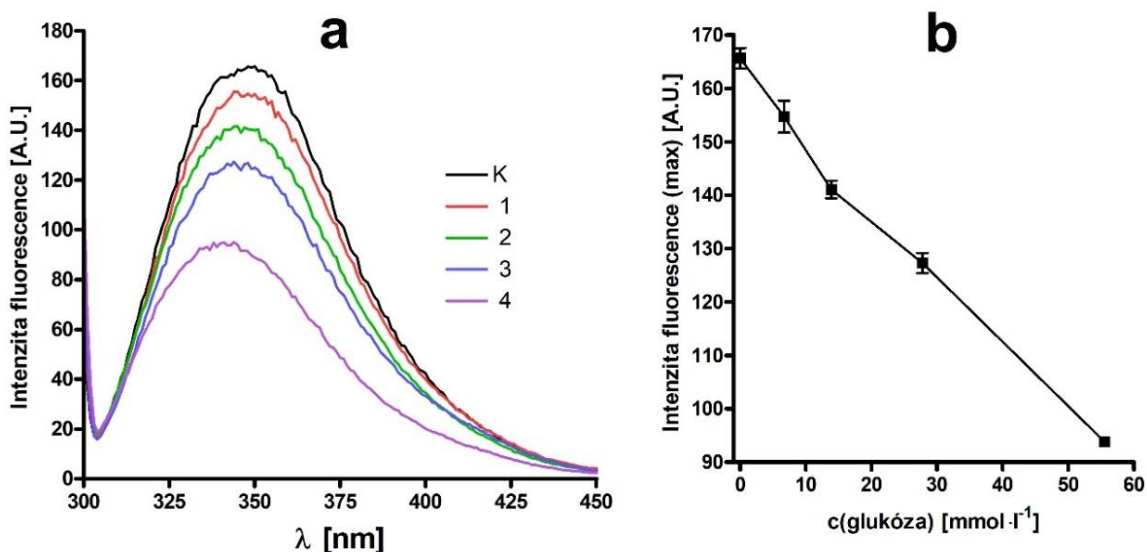
Grafy vykazují trend rostoucí absorbance v oblasti 245–290 nm při vzrůstající míře glykace albuminu. Vzhledem k tomu, že absorbance v této oblasti vlnových délek odráží absorpci aromatických aminokyselin Trp a Tyr, poukazují naměřené změny absorbance na to, že došlo ke změně struktury proteinu v okolí těchto aminokyselin. Ty mohou být více exponovány do okolního prostředí, což se projeví zvýšenou absorpcí záření. Z výsledků vyplývá, že čím více je albumin glykován, tím větší modifikaci oblast Trp a Tyr zbytků podléhá.

Výsledky jsou ve shodě s pracemi Szkudlarek a kol. (2016) a Raghav a kol. (2017). V publikaci Szkudlarek a kol. (2016) navíc po normalizaci spekter pozorovali výrazný nárůst absorbance u glykovaného albuminu i v oblasti 310–400 nm, který po 21denní inkubaci vzorků značí tvorbu pokročilých produktů glykace (AGE). Naše vzorky byly inkubovány kratší dobu, než je pro formaci AGE potřebné, proto podobné závěry nemůžeme vyvozovat. V tomto ohledu se blížíme spíše práci Arif a kol. (2012), v níž se autoři zabývali studiem Amadoriho produktů po týdenní inkubaci albuminu s různými koncentracemi glukózy a pozorovali obdobnou závislost jako je v obrázku č. 13a.

Z obrázku 13b je zřejmé, že změny pozorované v absorbanci vzorků při 280 nm byly relativně malé vzhledem k chybám měření daným přesností přístroje, proto jsme v dalším experimentu zvolili citlivější metodu, kterou je fluorescenční spektroskopie.

### 5.3 Fluorescenční spektroskopie

Pro kvantifikaci změny struktury proteinu se v řadě prací využívá studium vnitřní fluorescence tryptofanu, která odráží konformaci v jeho blízkém okolí. Tryptofan se v lidském albuminu nachází pouze jednou na pozici 214 v hydrofobním místě subdomény IIA, které odpovídá SSI (Chen a Guo 2008). Tím můžeme strukturu zkoumat selektivněji než v případě absorpční spektroskopie. Excitační vlnová délka byla zvolena, aby cíleně vybuzovala fluorescenci Trp-214, která nastává při 295 nm. U nižších vlnových délek, jak lze vidět v obrázku č. 10, dochází k fluorescenci Trp i Tyr zbytků (Shaklai 1984). V obrázku č. 14a jsou uvedeny fluorescenční spektra glykovaného a neglykovaného albuminu. Závislost intenzity fluorescenčních maxim na koncentraci glukózy ve vzorcích je uvedena v obrázku č. 14b.



**Obr. 14:** a) Fluorescenční spektra neglykovaného (K) a glykovaného (1, 2, 3, 4) lidského albuminu;  
 b) Závislost intenzity fluorescence na koncentraci glukózy ve vzorcích, svislé čáry představují průměr a SD ze tří měření identického vzorku.

V těchto spektrech pozorujeme pokles intenzity fluorescence Trp-214 při vzrůstající míře glykace albuminu. Pokles je dle Chen a Guo (2008) způsoben přiblížením jiných aminokyselinových zbytků k tryptofanu, které způsobují jeho zhášení. Dále ve spektru pozorujeme graduální posun maxima intenzity fluorescence ke kratším vlnovým délkám, tedy z 350 nm na 342 nm, což značí změnu polarity v okolí –NH

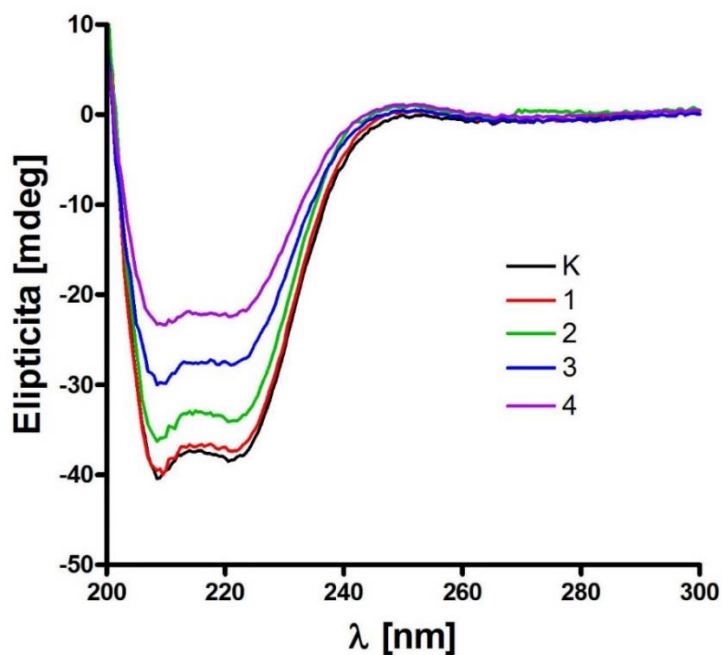
indolové skupiny Trp-214 (Deanna a kol. 2005) a zvýšenou hydrofobicitu v této oblasti (Chen a Guo 2008). Z tohoto důvodu se zřejmě nebude jednat o zvýšenou exponaci zbytku do vodného prostředí pro který je typický spíše červený posun.

Výsledky jsou ve shodě s pracemi Shaklai a kol. (1984) a Arif a kol. (2012). Szkudlarek a kol. (2016) pokles intenzity fluorescence interpretovali jako zvětšování rigidity molekuly, avšak jiní jako částečné rozevření molekuly v okolí Trp-214 (Deanna a kol. 2005). V tomto případě s ohledem na modrý posun ve spektru očividně dochází k zanořování Trp-214 do hydrofobní kapsy SSI a tím i poklesu intenzity fluorescence.

V blízkosti Trp-214 se vyskytují aminokyseliny Lys-195, Lys-199 a Lys-212, z nichž je o Lys-199 známo, že podléhá glykaci. Zřejmě tedy glykace právě Lys-199, který je od tryptofanového zbytku vzdálen 3,72 Å, může způsobovat lokální konformační změny v okolí Trp-214 (Deanna a kol. 2005).

#### 5.4 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus je metoda spektroskopie polarizovaného světla využívaná ke studiu sekundární struktury proteinu. Spektrum bylo měřeno, jak je popsáno v kapitole 4, v rozsahu 180–300 nm. V obrázku č. 15 uvádíme průměr grafů z těchto tří měření, kde lze pozorovat závislost elipticity na vlnové délce v rozsahu 200–300 nm.



**Obr. 15:** CD spektra neglykovaného (K) a glykovaného (1, 2, 3, 4) albuminu. Grafy jsou zprůměrovány ze tří měření identického vzorku.

V CD spektru se objevují minima při 208 a 222 nm, jež jsou typické pro strukturu  $\alpha$ -šroubovic. Zatímco tvar spektra zůstává neměnný, s rostoucí mírou glykace roste i elipticita, což značí graduální pokles zastoupení  $\alpha$ -šroubovic. Pomocí výpočtů uvedených v práci Xu a kol. (2013) jsme stanovili procentuální zastoupení  $\alpha$ -šroubovic při vlnové délce 208 nm, které uvádíme v tabulce č. 4.

**Tabulka 4:** Zastoupení  $\alpha$ -šroubovic v sekundární struktuře glykovaného lidského albuminu

Vzorek	MRE [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Zastoupení $\alpha$ -helix
<b>K</b>	-23858,5	68 %
<b>1</b>	-24741,5	72 %
<b>2</b>	-20489,0	57 %
<b>3</b>	-17663,3	47 %
<b>4</b>	-17283,9	40 %

Zastoupení  $\alpha$ -šroubovic určené pomocí rentgenové difrakční analýzy je dle He a Carter (1992) uváděno jako 67%, což zhruba odpovídá námi zjištěné hodnotě kontrolního vzorku s 68% zastoupením. Výsledky těchto výpočtů tedy považujeme za relevantní.

Při inkubaci vzorku s koncentrací glukózy  $6,3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  pozorujeme mírný nárůst helicity a při hyperglykemických koncentracích dochází k postupnému poklesu  $\alpha$ -šroubovicových struktur. V souladu s ostatními studiemi, které využívají CD spektra pro studium glykovaného albuminu, pozorujeme změnu sekundární struktury s rostoucí koncentrací glukózy v inkubovaných vzorcích. Například Barzegar a kol. (2007) zaznamenali pokles zastoupení  $\alpha$ -šroubovicové struktury při inkubaci HSA s glukózou o koncentraci 1 mg/ml a nárůst při inkubaci s glukózou o koncentraci 5 mg/ml. Pokles helicity prokázali i Sattarahmady a kol. (2008) při testování vzorků přímo od pacientů s diabetem.

## 5.5 Měření viskozity

Glykace může iniciovat tvorbu proteinových agregátů, jež byli uvedeny například ve studiích Wei a kol. (2009) při týdenní inkubaci D-ribosy s BSA nebo Sattarahmady a kol. (2008) při 3týdenní inkubaci HSA s glukózou. Na základě těchto studií jsme se zabývali přítomností agregátů v našich vzorcích. Nejprve jsme zvolili metodu měření viskozity našich vzorků. Prováděli jsme měření doby dopadu kuličky v kapiláře plněné roztokem vzorků pomocí automatického viskozimetru s volbou teploty  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , úhlem sklonu  $50^\circ$  a 6 akumulací měření, jak je popsáno v postupu v kapitole 4.

Představa byla taková, že agregáty budou mít vyšší hustotu, tím i viskozitu a naměřená doba dopadu kuličky bude také vyšší. Jak lze ale vidět v tabulce č. 5, variabilita časů byla nízká, a proto zde uvádíme pouze výsledky doby dopadu kuličky pro vzorky K a 4.

**Tabulka 5:** Doba dopadu kuličky ve vzorcích měřená kuličkovým viskozimetrem z šesti měření s SD.

Vzorek	Doba dopadu [s]
K	(15,960±0,006)
4	(16,92±0,09)

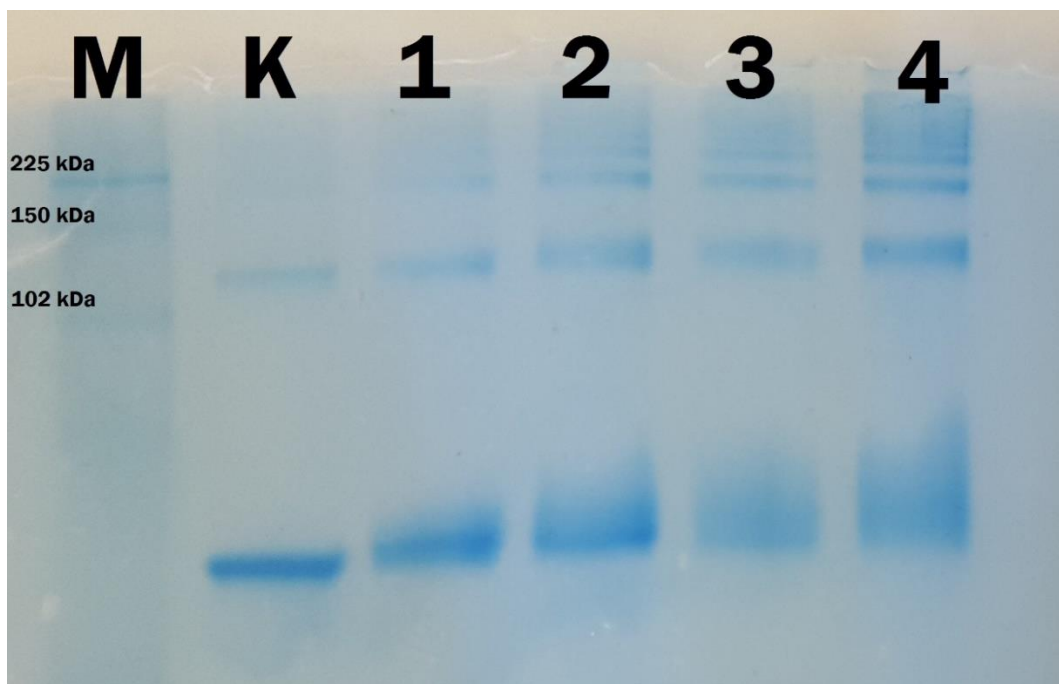
Výsledky vykazují mírný nárůst doby dopadu kuličky u glykovaných vzorků oproti neglykovaným. V publikaci Sattarahmady a kol. (2008) takto proměřovali viskozitu albuminu inkubovaného s 35 mM glukózy po 0, 14, 21 a 28 dnech a pozorovali velmi významný nárůst dynamické viskozity i Stokesova průměru. Stokesův průměr, jak jej popisují autoři Pabst a Gregorová (2007) je: „*ekvivalentní průměr odpovídající průměru koule se stejnou konečnou rychlostí klesání jako vybraná nepravidelná částice při laminárním toku v tekutině stejné hustoty a viskozity*“ (str. 2). Stokesův průměr albuminu vypočítaný z dynamické viskozity byl v této práci dvojnásobný.

Z námi získaných výsledků měření doby dopadu kuličky ve dvou různých vzorcích nelze vyvozovat jednoznačné závěry o tvorbě agregátů. Našimi výsledky prezentujeme zvýšení viskozity v důsledku glykace, které je ale málo výrazné. Přesto si můžeme utvořit představu o změně struktury a tímto podpořit závěry o zvyšujícím se průměru molekuly při glykaci albuminu. Pro studium přítomnosti proteinových agregátů však musíme zvolit vhodnější metodu, o které je pojednáno v další sekci.

## 5.6 Nativní PAGE

Pro jasnější odpověď na tvorbu agregátů ve vzorcích glykovaného albuminu jsme se obrátili k polyakrylamidové gelové elektroforéze v nativní formě. Do jamek v gelu jsme nanášeli 2 µg proteinu a vzorky doplnili 2 µl nanášecího pufru obarveného bromfenolovou modří. Elektroforéza probíhala 20 minut při 80 V a poté bylo napětí zvýšeno na 120 V na 1 hodinu. Na obrázku č. 16 uvádíme vyfocení elektroforetický gel obarvený barvivem EZ Blue Staining Reagent.



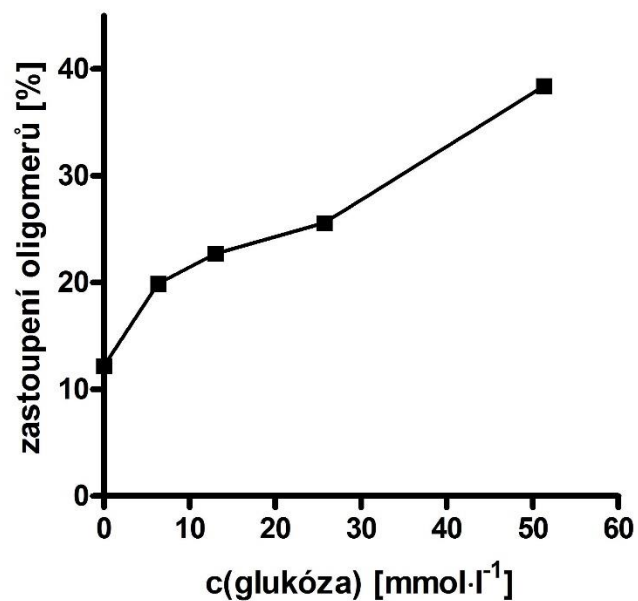


**Obr. 16:** Elektroforetický gel nativního albuminu (dráha K) a albuminu glykovaného  $6,3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (dráha 1);  $13,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (dráha 2);  $25,7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (dráha 3);  $51,3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (dráha 4) glukózy a marker molekulové hmotnosti (dráha M).

V obrázku č. 16 můžeme vidět, že s rostoucí mírou glykace se vzorky v gelu více opožďují, mají tedy menší pohyblivost. Ze vzorce (6) plyne, že je elektroforetická pohyblivost přímo úměrná náboji a nepřímo úměrná viskozitě prostředí a poloměru molekuly. Viskozitu prostředí lze zanedbat, jelikož jí považujeme za homogenní.

Pro menší pohyblivost vzorků v nativní formě a tím splnění rovnice (6) mohou mít proteiny menší náboj, větší poloměr nebo obojí. Při obalení proteinů detergentem SDS by na poloměru molekul nezáviselo.

Zároveň si však lze všimnout zintenzivňování proužků v oblasti mezi 102 kDa a 150 kDa, kde se vyskytují dimery albuminu o molekulové hmotnosti 133 kDa a dále trimery s hmotností 199,5 kDa, což prokazuje i graf v obrázku č. 17 zhotoven z denzitometrického vyhodnocení elektroforetického gelu.



**Obr. 17:** Zastoupení oligomerů v závislosti na koncentraci glukózy ve vzorcích albuminu.

Pokud by tedy docházelo k částečnému rozbalení molekuly a exponaci hydrofobních částí do vodného prostředí, tvorba agregátů by byla jednou z možností, jak strukturu termodynamicky stabilizovat.

## 6. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme se zabývali vlivem neenzymatické glykace *in vitro* na strukturu a vlastnosti lidského sérového albuminu. Glykaci jsme realizovali inkubací albuminu s různými koncentracemi glukózy, které odpovídají hodnotám zvýšené hladiny cukru v krvi jako je tomu například u pacientů s diabetem. Inkubace probíhala po dobu jednoho týdne, čímž jsme dosáhli fáze tvorby Amadoriho produktů. U těchto produktů jsme zaznamenali změny v absorpčních a fluorescenčních spektrech, které naznačují jistou konformační změnu v okolí aromatických aminokyselinových zbytků, zejména tyrosinu a tryptofanu. Změny za pomoci příslušné literatury interpretujeme jako rozbalování molekuly albuminu při rostoucí míře jeho glykace. Dále jsme prověřili stav sekundární struktury glykovaného albuminu, kdy byl prokázán počáteční nárůst  $\alpha$ -šroubovicové struktury při inkubaci s glukózou o koncentraci  $6,3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a graduální pokles při dále rostoucí koncentraci glukózy. Také jsme se pokoušeli ověřit přítomnost bílkovinných agregátů v glykovaných vzorcích skrze měření viskozity metodou padající kuličky. Měření neposkytovalo uspokojivé závěry, a tak jsme zvolili doplňující techniku nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy, která spolu s denzitometrickým stanovením intenzity proužků přítomnost zmíněných agregátů prokazuje. Souhrnnými výsledky tak dokazujeme konformační změny albuminu po neenzymatické glykaci. Zajímavějších a statisticky vhodnějších výsledků bychom dosáhli, kdybychom měření opakovali vždy pro několik totožně připravených vzorků. To však z finančních důvodů u lidského albuminu nebylo možné.

Možný dopad těchto konformačních změn na funkci albuminu diskutujeme v plném rozsahu v podkapitole 2.2.3. V naměřených fluorescenčních spektrech pozorujeme posun maxim ke kratším vlnovým délkám, za což může být zodpovědná zvýšená hydrofobicita prostředí. Už z těchto výsledků je jasné, že dochází k modifikaci sil působících v místě, které je důležité pro přenos léčiv. Díky CD spekter jsme prokázali, že dochází transformaci  $\alpha$ -šroubovic na jiné sekundární struktury, což může zásadně modifikovat strukturu kapes, kde se přenášené látky vážou specificky. Z výsledků lze usoudit, že strukturální změny ovlivňují schopnost albuminu vázat a přenášet léčiva nebo malé metabolické látky jako je bilirubin. Glykací také dochází ke snížení antioxidační schopnosti albuminu.

## 7. SEZNAM LITERATURY

- Ahmed A.M., Randell E.W., Vasdev S.C. (2007) Plasma protein advanced glycation endproducts, caroxymethyl cysteine, and carboxyethylcysteine, are related to nephropathy in patients with diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **302**, 35-42.
- Ahmed N., Dobler M., Dean M., Thornalley P.J. (2005) Peptide mapping identifies hotspot site of modification of human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 5724-5732.
- Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S., Hoy K.S., Wa C., DeBolt E., Koke M., Hage D.S. (2013) Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta* **425**, 64-76.
- Arasteh A., Farahi S., Habibi-Rezaei M., Moosavi-Movahedi A.A. (2014) Glycated albumin: an overview of the *in vitro* models of an *in vivo* potential disease marker. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* **13**: 49.
- Arif B., Ashraf J.M., Moinuddin, Ahmad J., Arif Z., Alam K. (2012) Structural and immunological characterization of Amadori-rich human serum albumin: Role in diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **552**, 17-25.
- Barnaby O.S., Cerny R.L., Clarke W., Hage D.S. (2011) Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation. *Clinica Chimica Acta* **412**, 277-285.
- Basiaga S.B.G., Hage D.S. (2010) Chromatographic studies of changes in binding of sulfonyleurea drugs to human serum albumin due to glycation and fatty acids. *Journal of Chromatography B* **878**, 3193-3197.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Chen Y., Guo L. (2008) Fluorescence study on site-specific binding of perfluoralkyl acids to human serum albumin. *Archives of Toxicology* **83**, 255-261.
- Cibiček N., Vacek J., Beránek M., Džubák P., Heřmanová Z., Kosina P., Kubala M., Novák M., Papoušková B., Srovnal J., Vávrová J., Vostálová J., Zatloukalová M., Živná H. (2014) *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vydání, (Stejskal D., Šmarda J., eds.), Univerzita Palackého v Olomouci.
- Dockal M., Carter C.D., Rüker F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 29303-29310.
- Dostál J., Bochořáková H., Paulová H., Sláma J. Slanina J., Tallová J., Tomandl J., Tomandlová M. (2011) *Lékařská chemie II*. 2. vydání (Glatz Z. eds.), Masarykova Univerzita Lékařská fakulta, Brno, Česká Republika, 163 stran.
- Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *Life* **57**, 787-796.
- Greenfield N.J. (2009) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Natural Protocols* **6**, 2876-2890.
- Hartog J.W.L., Voors A.A., Bakker S.J.L., Smit A.J., van Veldhuisen D.J. (2007) Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. *The European Journal of Heart Failure* **9**, 1146-1155.
- Holubová R. (2012) Viskozita. In: *Molekulová fyzika a termodynamika*. UP, Olomouc, Česká Republika, 86-87.
- Iberg N., Flückiger R. (1986) Nonezymatic glycosylation of albumin *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 13542-13535.
- Joseph K.S., Hage D.S. (2010) The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **53**, 811-818.
- Koolman J., Röhm K.H. (2012) *Barevný atlas biochemie*. Grada Publishing, Praha, Česká Republika.
- Kotzya J., Balvín M., Černý R., Černá E., Racek J., Švarc V. (2007) Proteiny krevní plasmy. In: *Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství*. Karolinum, Praha, Česká Republika, 9-11.

- Králová B., Fukal L., Rauch P., Ruml T. (2008) Elektromigrační (elektroforetické) metody. In: *Bioanalytické metody*. VŠCHT, Praha, Česká Republika, 210-234.
- Lakowicz J.R. (2006) Fluorophores. In: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3.edice. Springer, U.S.A.
- Maciazek-Jurczyk M., Szkudlarek A., Chudzik M., Pozycka J., Sulkowska A. (2018) Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **188**, 675-683.
- Mellquist J.L., Kasturi L., Spitalnik S.L., Shakin-Eshleman S.H. (1998) The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* **37**, 6833-6837.
- Meloun B., Morávek L., Kostka V. (1975) Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS letters* **58**, 134-137.
- Molina-Bolívar J.A., Galisteo-González R., Ruiz C.C., Medina-O'Donnell M., Parra A. (2014) Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. *Journal of Luminiscence* **156**, 141-149.
- Nawale R.B., Mourya V.K., Bhise S.B. (2006) Non-enzymatic glycation of proteins: A cause for complications in diabetes. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **43**, 337-344.
- Obšil T., Pavlíček Z. (1997) Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce *in vivo*. *Chemické listy* **91**, 585-569.
- Pabst W., Gregorová E. (2007) Velikost částic a ekvivalentní průměry. In: *Charakterizace částic a částicových soustav*. VŠCHT, Praha, Česká Republika, 1-3.
- Peters T. (1996) The albumin molecule: its structure and chemical properties. In: *All About Albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego, U.S.A., 9-54.
- Petitpas, I., Petersen, C. E., Ha, C. E., Bhattacharya, A. A., Zunszain, P. A., Ghuman, J., Bhagavan, N. V., and Curry, S. (2003) Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* **100**, 6440 – 6445.
- Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. (2005) Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* **41**, 1211-1219.
- Raghav A., Ahmad J., Alam K., Khan A.U. (2017) New insights into non-enzymatic glycation of human serum albumin biopolymer: A study to unveil its impaired structure and function. *International Journal of Biological Macromolecules* **101**, 84-99.
- Roche M, Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. (2008) The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters* **582**, 1783–1787.
- Rondeau P., Bourdon E. (2011) The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie* **93**, 645-658.
- Sattarahmady N., Moosavi-Movahedi A.A., Ahmad F., Hakimelahi G.H., Habibi-Rezaei M. Saboury A.A., Sheibani N. (2007) Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**, 933-942.
- Sattarahmady N., Moosavi-Movahedi A.A., Habibi-Rezaei M., Ahmadian S., Saboury A.A., Heli H., Sheibani N. (2008) Detergency effects of nanofibrillar amyloid formation on glycation of human serum albumin. *Carbohydrate Research* **343**, 2229–2234.
- Shaklai N., Garlick R.L., Franklin Bunn H. (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 3812-3817.
- Sudlow G., Birkett D.J., Wade N.D. (1975) The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology* **11**, 824-832.
- Szkudlarek A., Maciazek-Jurczyk M., Chudzik M., Rownicka-Zubik J., Sulkowska A. (2016) Alteration of human serum albumin tertiary structure induces by glycation. Spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **153**, 560-565.
- Šípál Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I. (1992) Bílkoviny – základ živé hmoty. In: *Biochemie*. 1. vydání. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, Česká Republika, 17-98.
- Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochemical Journal* **334**, 109-116.

- Urbanowski J.C., Cohenford M.A., Dain J.A. (1981) Nonenzymatic galactosylation of human serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 111-115.
- 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.
- Xu H., Yao N., Xu H., Wang T., Li G., Li Z. (2013) Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 14185-14203.

Internetové zdroje:

Anton Paar: <https://wiki.anton-paar.com/en/how-to-measure-viscosity/> (6.11.2018).

Nature: [https://www.nature.com/horizon/proteinfolding/background/figs/importance\\_f3.html](https://www.nature.com/horizon/proteinfolding/background/figs/importance_f3.html) (6.11.2018).

RCSB Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/structure/1E78> (23.1.2019).

Lékařská chemie II:

[https://is.muni.cz/el/1411/podzim2013/BLLC0111p/um/Lekarska\\_chemie\\_II\\_2011.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/podzim2013/BLLC0111p/um/Lekarska_chemie_II_2011.pdf) (23.10.2018).