

**UNIVERZITA KARLOVA
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ-
JEJICH ANALÝZA A FYZIOLOGICKÉ
ASPEKTY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Mgr. Kateřina Mikulíková

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.

2007

**CHARLES UNIVERSITY
2nd MEDICAL FACULTY**

**POSTTRANSLATION MODIFICATION OF
PROTEINS-THEIR ANALYSIS AND
PHYSIOLOGICAL ASPECTS**

DISSERTATION THESIS

AUTHOR: Mgr. Kateřina Mikulíková

SUPERVISOR: Doc. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.

2007

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Karlova Univerzita má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Karlova Univerzita oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Karlovy Univerzity.

V Praze dne 2. 5. 2007



Kateřina Mikulíková

Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. Ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc za jeho všestrannou pomoc a podporu a hlavně jeho vědecké vedení a poskytnutí cenných rad v průběhu disertační práce bez kterého by tato práce ani nemohla vzniknout. Samozřejmě patří můj hluboký dík za pomoc i pochopení všem členům naší laboratoře a vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

OBSAH

OBSAH	1
SEZNAM ZKRATEK	4
SOUHRN	10
SUMMARY	12
1. ÚVOD	14
2. TEORETICKÁ ČÁST	17
2.1. Albumin	18
2.1.1. Struktura albuminu a jeho syntéza	18
2.2. Kolagen	20
2.2.1. Struktura kolagenu	20
2.2.1.1. Primární a sekundární struktura kolagenu	20
2.2.1.2. Struktura trojitě šroubovice kolagenu	23
2.2.1.3. Syntéza kolagenu	24
2.3. Jednotlivé kolagenní typy	25
2.3.1. Ontogenetické změny v poměrech kolagenních typů	31
2.4. Příčné vazby a jejich vztah k stárnutí	32
2.4.1. Neenzymatická glykace a její vliv na organizmus	32
2.4.2. Produkty posttranlačních modifikací kolagenu	37
2.4.2.1. Enzymaticky iniciované příčné vazby	38
2.4.2.2. Neenzymaticky iniciované příčné vazby	43
2.5. Separace, analýza a identifikace produktů posttranslačních modifikací	52
2.5.1. Separace proteinů	52
2.5.2. Aplikace proteomiky v analýze proteinů	54
2.5.3. Analýza produktů posttranslačních modifikací (glykací)	54
3. CÍLE PRÁCE	56
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	58
4.1. Chemikálie	59
4.2. Instrumentace	59
4.2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií	59
4.2.2. Kapilární elektroforéza a kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií	60
4.2.3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza	60
4.3. Materiál a Metody	60

4.4	Pokusy <i>in vivo</i>	60
4.4.1.	Zvířata pro pokusy	60
4.4.2.	Zpracování tkání	60
4.4.3.	Měření pentosidinu	61
4.4.4.	Příprava pentosidinového standardu	61
4.4.5.	Aminokyselinová analýza	61
4.5	Pokusy <i>in vitro</i>	62
4.5.1.	Příprava glykovaných vzorků	62
4.5.1.1.	Příprava glykovaného vzorku hovězího sérového albuminu	62
4.5.1.2.	Příprava glykovaného vzorku kolagenu typu I	62
4.5.1.3.	Odsolení vzorků albuminu	62
4.5.2.	Štěpení vzorků	63
4.5.2.1.	Štěpení vzorků hovězího sérového albuminu (BSA)	63
4.5.2.2.	Štěpení vzorků kolagenu typu I	63
4.5.2.2.1.	Štěpení kolagenu kolagenázou	63
4.5.2.2.2.	Štěpení kolagenu proteinázou K	63
4.5.2.2.3.	Štěpení kolagenu bromkyanem a následné štěpení trypsinem	63
4.5.2.3.	Příprava interního standardu pro CE albuminu	64
4.5.2.4.	Příprava interního standardu pro CE kolagenu	64
4.5.3.	Analýza hovězího sérového albuminu (BSA)	64
4.5.3.1.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) neštěpeného BSA	64
4.5.3.2.	HPLC analýza peptidů tryptického štěpení BSA	64
4.5.3.3.	HPLC/MS analýza neštěpeného albuminu	65
4.5.3.4.	HPLC/ESI-MS analýza peptidů tryptického štěpení albuminu	65
4.5.3.5.	Kapilární elektroforéza (CE) neštěpeného albuminu	65
4.5.3.6.	Kapilární elektroforéza peptidů tryptického štěpení albuminu	66
4.5.3.7.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) modifikovaného BSA	66
4.5.4.	Analýza kolagenu	67
4.5.4.1.	Separace peptidů kolagenu štěpeného kolagenázou na obrácené fázi HPLC	67
4.5.4.2.	Kapilární elektroforéza peptidů kolagenu štěpeného kolagenázou	67
4.5.4.3.	HPLC/MS analýza modifikovaného kolagenu štěpeného CNBr/trypsinem	67
4.5.4.4.	Kapilární elektroforéza peptidů kolagenu štěpeného CNBr/trypsinem	68
4.5.4.5.	Kapilární elektroforéza peptidů kolagenu štěpeného CNBr/trypsinem ve spojení s hmotnostní spektrometrií (CE/MS)	68
4.5.4.6.	Lyofilizace	69
4.5.5.	Spektrometrická měření	69
5.	VÝSLEDKY	70
5.1.	Pokusy <i>in vivo</i>	71
5.1.1.	Analýza pentosidinu	71
5.1.1.1.	Aminokyselinová analýza	71
5.1.1.2.	Měření pentosidinu	71
5.2.	Pokusy <i>in vitro</i>	74
5.2.1.	Analýza hovězího sérového albuminu (BSA)	74
5.2.1.1.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza modifikovaného BSA	74
5.2.1.2.	HPLC analýza albuminu (BSA)	75
5.2.1.3.	HPLC/ESI-MS analýza neštěpeného BSA	76
5.2.1.4.	Aminokyselinová analýza BSA	78
5.2.1.5.	Analýza peptidů tryptického štěpení BSA	79

5.2.2. Analýza kolagenu	97
5.2.2.1. Analýza kolagenázových peptidů metodou spojení HPLC a CE	97
5.2.2.2. Analýza peptidů kolagenu po štěpení CNBr/trypsinem metodou CE-UV	103
5.2.2.3. MS/MS analýza peptidů kolagenu po štěpení CNBr/trypsinem	104
5.2.2.3.1. Ribózou a glukózou modifikované vzorky	104
5.2.2.3.2. Malondialdehydem modifikované vzorky	109
5.2.2.4. CE-MS/MS analýza	110
5.2.2.4.1. Ribózou a glukózou modifikované vzorky	110
5.2.2.4.2. Malondialdehydem modifikované vzorky	112
5.2.3. Spektroskopická měření	112
5.2.3.1. Spektroskopická měření vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach štěpených proteinázou K	112
5.2.3.2. Spektroskopická měření vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach štěpených kolagenázou	116
6. DISKUZE	119
6.1. Pokusy <i>in vivo</i>	120
6.1.1. Měření pentosidinu	120
6.2. Pokusy <i>in vitro</i>	120
6.2.1. Modifikace hovězího sérového albuminu (BSA)	121
6.2.2. Modifikace kolagenu	121
6.2.2.1. HPLC a CE analýza posttranslačně modifikovaného kolagenu	121
6.2.2.2. HPLC/MS a CE/MS analýza posttranslačně modifikovaného kolagenu	122
6.2.3. Spektroskopická měření	123
7. ZÁVĚR	125
8. LITERATURA	129

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Vysvětlení zkratky
ASA	Kyselina askorbová (Ascorbic acid)
ACP	Kyselý kondenzační produkt (Acid condensation product)
AGE_s	Konečné produkty pokročilé glykace (Advanced glycation endproducts)
AFGP	1-alkyl-2-formyl-3,4-diglukosyl-pyrol (1-alkyl-2-formyl-3,4-diglucoyl-pyrole)
API-ESI	Ionizace za atmosférického tlaku - ionizace elektrosprejem (Atmospheric pressure ionization – electrospray ionization)
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)
BIS	N,N-metylenbis-akrylamid (N,N-methylenebis-acrylamide)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CE/MS	Kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Capillary electrophoresis coupled Mass Spectrometry)
CE/UV	Kapilární elektroforéza s UV detekcí (Capillary electrophoresis with UV detection)
CML	Karboxymetyllysin (Carboxymethyllysine)
CEL	Karboxyetyllysin (Carboxymethyllysine)
CMO	Karboxymetylornitin (Carboxymethylornithine)
CMA	Karboxymetylarginin (Carboxymethylarginine)
CE-ESI-MS	Kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní detekcí s ionizací elektrosprejem (Capillary electrophoresis with mass spectrometry electrospray ionization)
2-DE	Dvoudimenzionální elektroforéza (Two-dimensional electrophoresis)

2-DE HPLC/MS	Dvoudimenzionální elektroforéza ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (Two-dimensional electrophoresis with High Performance Liquid Chromatography coupled Mass spectrometry)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DEAE-celulose	Diethylaminoethyl celulóza (Diethylaminoethyl cellulose)
deH-LNL	Dehydroxylysinu-norleucin (Dehydrohydroxylysinu-norleucine)
deH-HLNL	Dehydrohydroxylysinu-norleucin (Dehydrohydroxylysinu-norleucine)
deH-DHLNL	Dehydrodihydroxylysinu-norleucin (Dehydrodihydroxylysinu-norleucine)
DHLNL	Dihydroxylysinu-norleucin (Dihydroxylysinu-norleucine)
DHA	Kyselina dehydroaskorbová (Dehydroascorbate acid)
ELISA	Enzymoimunoanalýza (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization)
ER	Endoplazmatické retikulum (Endoplasmatic reticulum)
FACIT	Vlákna asociovaná s kolageny (Fibril-associated collagens with interrupted triple helices)
FAB-MS	Technika rychlého bombardování atomů spojená s hmotnostní detekcí (Fast atom bombarded with Mass Spectrometry)
FFI	2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H imidazol ((2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H imidazole)
FIA	Průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC/MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography coupled Mass spectrometry)
GOLD	N,N(-di(N ^ε -lysinu)) imidazolium (N,N(-di(N ^ε -lysinu)) imidazolium)
Gly-Gly	Diglycin (Diglycine)

HHMD	Histidinohydroxymerodesmosin (Histidinohydroxymerodesmosine)
HLNL	Hydroxylysino-norleucin (Hydroxylysino-norleucine)
HHLNL	Histidinohydroxylysino-norleucin (Histidinohydroxylysino-norleucine)
HLKNL	Hydroxylysino-5-ketonorleucin (Hydroxylysino-5-ketonorleucine)
HL-Pyr	Hydroxylysyl-pyridinolin (Hydroxylysyl-pyridinoline)
Hyp	Hydroxyprolin (Hydroxyproline)
Hyl	Hydroxylysin (Hydroxylysine)
HbA_{1c}	Glykovaný hemoglobin (hemoglobin A _{1c}) (Glycated haemoglobin (haemoglobin A _{1c}))
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (High Performance Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry)
HPLC/MS/MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (High Performance Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry)
HPLC/UV	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (High performance Liquid Chromatography with UV detection)
HNE	4-hydroxy-trans-2-nonenal (4-hydroxy-trans-2-nonenale)
HFBA	Heptafluormáselná kyselina (Heptafluorbutyric acid)
HTG	Hypertriglyceridemie (Hypertriglyceridemic)
ICAT	Izotopem kódovaná afinitní značka (Isotope coded affinity tags)
IČ (IR)	Infračervená spektrometrie (Infrared spectroscopy)
IS	Interní standard (Internal standart)
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (low denzity lipoprotein)

LC-ESI-MS	Kapalinová chromatografie spojená ionizací elektrospejem s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography coupled electrospray ionization with Mass Spectrometry)
LKNL	Lysino-5-ketonorleucin (Lysino-5-ketonorleucine)
LNL	Lysino-norleucin (Lysino-norleucine)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MALDI	Laser desorpce ionizací za účasti matrice (Matrix associated laser desorption ionization)
MALDI-TOF-MS	Laser desorpce ionizací za účasti matrice v čase s hmotnostní detekcí (Matrix associated laser desorption ionization with time of fly coupled Mass Spectrometry)
MOLD	N,N(-di(N ^ε -lysino))-4-metyl-imidazolium (N,N(-di(N ^ε -lysino))-4-metyl-imidazolium)
MudPIT	Technologie multidimenzionální identifikace proteinů (Multidimensional protein identification technology)
MDA	Malondialdehyd (Malondialdehyde)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (Nuclear magnetic resonance)
α-NFC-1	α-N ^ω -(4-oxo-5-dihydroimidazol-2-yl)-1-ornithine (α-N ^ω -(4-oxo-5-dihydroimidazol-2-yl)-1-ornithine)
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PTEB	N-fenacylthiazoliumbromid (N-acylthiazolium bromide)
PITC	Fenylisothiokyanát (Phenylisothiocyanate)
RIA	Radioimunoanalýza (Radioimmunoassay)
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)
SDS	Sodium dodecyl sulfát (Sodium dodecyl sulfate)
TFA	Trifluoroctová kyselina (trifluoroacetic acid)
TEMED	Tetrametyletylendiamin (Tetramethylethylenediamine)

<i>t</i>-test	Studentův <i>t</i> -test (Student's <i>t</i> -test)
Tris-HCl	Tris(hydroxymetyl)aminometan (Tris (hydroxymethyl)aminomethane)) - HCl
UV/VIS	Spektrometrie s detekcí v ultrafialové a viditelné oblasti (Ultraviolet and visible detection)

SOUHRN



Disertační práce se zabývá využitím chromatografických a elektroforetických metod (HPLC, HPLC-MS, CE, CE-MS) pro analýzu posttranslačních modifikací proteinů, zejména kolagenu jako zástupce proteinů pojivových bílkovin a jejich následnou identifikaci pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí.

První část v teorii je věnována proteinům (albuminu a kolagenu), jejich rozdělení, klasifikaci a metabolickým přeměnám v lidském organismu. Velká pozornost je zaměřena na kolagen, jeho strukturu a jednotlivé kolagenní typy. Druhá část se zabývá problematikou neenzymatických glykací a jejich vliv na organismus a blíže seznamuje s produkty posttranslačních modifikací pokročilé glykace. Třetí část shrnuje jednotlivé separační postupy a analýzu posttranslačně modifikovaných proteinů.

Experimentální část přibližuje používané chemikálie, využívanou instrumentaci, materiál a metody použité pro tyto studie. Jsou zde popsány také používané postupy pro přípravu jednotlivých vzorků.

Ve výsledcích a diskuzi jsou shrnuty veškeré získané výsledky a poznatky. Tato kapitola je rozdělena do dvou částí. První část je věnována problematice pokusů *in vivo*. Druhá je zaměřena na problematiku pokusů *in vitro*.

Klíčová slova: kolagen
neenzymatická glykace
produkty posttranslačních modifikací
HPLC
HPLC-MS
HPLC-MS/MS
CE
CE-MS

SUMMARY



This thesis is concerned with the detection of posttranslational modification of proteins. These proteins are identified using liquid chromatography and capillary electrophoresis, their coupling and coupling to mass spectrometry.

The first part of the theoretical chapter is devoted to the structure, classification and metabolite changes of proteins in the human body. Major attention is focused on collagen, its structure and individual collagen types. The second part considers the problems of non-enzymatic glycation and its influence on the body and engage in products of posttranslational modification. The third part summarizes the individual separation procedures and analysis of posttranslationally modified proteins.

The second chapter describes experimental parameters, including chemicals, instrumentation, materials and methods. The preparation of individual samples is also described.

All results and findings are summarized and discussed in the last chapter. This chapter is divided in two parts. The first part focuses on problems of *in vivo* experiments. The second part focuses on problems of *in vitro* experiments.

Keywords: collagen
non-enzymatic glycation
products of posttranslationally modification
HPLC
HPLC-MS
HPLC-MS/MS
CE
CE-MS

1. ÚVOD

Uplynulé desetiletí lze z hlediska biologických i lékařských věd charakterizovat jako éru genomiky. Po principiálním rozluštění genetického kódu (tzv. Genomový projekt) nastupuje v současnosti doba proteomiky-komplexního výzkumu proteinů. Termín „proteom“ jako označení veškerého proteinového komplementu kódovaného genomem použil poprvé Marc R. Wilkins v roce 1994 na konferenci v Sieně. Vznikl nový obor zvaný proteomika, jehož náplní je globální identifikace proteinů v určité zdravé nebo nemocné buňce či tkáni a studium jejich funkce či interakce [1]. Velmi brzy se ukázalo, že proteomika bude v porovnání s genomikou (studium na úrovni nukleových kyselin), daleko složitější. Příčinou je proměnlivost určitého proteinu během buněčného růstu a diferenciaci, ale i vliv funkčních produktů jiných buněčných typů či vnitřního prostředí organismu, které se mění v závislosti na stárnutí, při adaptaci na změny vnějšího prostředí, i v průběhu nemoci. Proteiny jsou stále pozměňovány. Navazují se na ně fosforečné, cukerné nebo lipidové skupiny, spojují se s jinými proteiny do větších molekulárních celků. Proteomický výzkum zahrnuje tři základní aktivity: a) identifikaci veškerých proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem b) definici vzájemných interakcí proteinů nezbytných pro určitou biologickou funkci c) stanovení přesné trojrozměrné struktury proteinů. V závislosti na individuálních požadavcích se proteomikou rozumí i intenzivní studium skupiny proteinů, případně jediného proteinu se zaměřením na specifickou vlastnost.

Přestože DNA je nositelem informací o struktuře proteinu, nelze často na základě pouhé znalosti genomu objasnit mnohé buněčné procesy. Informace uložená v genech je definována v podstatě lineární sekvencí čtyř znaků a je tedy jednorozměrná. Informace uložená v proteinech je mnohorozměrná, závislá na faktorech jako „alternativní splicing“ (jedna mRNA produkuje různé proteiny), posttranslační modifikace, a konečně i správné sbalení proteinu vedoucí k jednoznačné trojrozměrné struktuře definující funkci každého proteinu. Navíc je informace uložená v genech poměrně stabilní, zatímco proteom je časově proměnný. Koncentrace jednotlivých druhů proteinů se (na rozdíl od jejich genů) mění podle aktuálních potřeb organismu.

Při studiu genetických informací a jejich funkcí v organismu bylo zjištěno, že pro organismus je velmi podstatná nejenom základní informace o struktuře bílkoviny, obsažená v genu, ale také úpravy po jejich „sestavení“ tzv. posttranslační modifikace, které souvisejí jak s normálně fyziologickými funkcemi (např. hydroxylace lysinu a prolinu v kolagenech, glykosylace proteoglykanů, fosforylace atd.), tak i s patofyziologickými procesy (např. stárnutí, či projevy různých chorob, jako je diabetes mellitus a další) probíhajícími v organismu. Tyto posttranslační modifikace mohou výrazným způsobem změnit strukturu a

vlastnosti bílkovin, např. hydroxylace prolinu a lysinu u kolagenů je nezbytná k vytvoření jejich charakteristické terciální struktury (triple-helikální α -šroubovice), ale ovlivňují i enzymatickou aktivitu či metabolický obrat proteinů.

Z hlediska neenzymatických posttranslačních modifikací vedoucích k vzniku příčných vazeb je v současné době intenzivně studována glykace. K této reakci dochází pouze na základě chemických reakcí mezi aminoskupinami bílkovin a oxo skupinami cukrů. Fyziologické projevy glykačních reakcí se mohou uplatnit zejména u bílkovin s dlouhým metabolickým poločasem, tj. zejména u pomalu metabolizovaných bílkovin pojivové tkáně. Přes široké spektrum uplatnění glykačních reakcí je dosud velmi málo známo o povaze vznikajících produktů, a to nejen o jejich vlastnostech, ale obzvláště o struktuře vzniklých příčných vazeb a konkrétním místě modifikace v proteinové molekule. Příčné vazby zahrnují dva rozdílné mechanismy jejich vzniku: 1) enzymaticky iniciované příčné vazby 2) neenzymaticky iniciované příčné vazby.

Posttranslačním změnám podléhají v různé míře prakticky všechny proteiny v organismu. Míra jejich modifikace závisí vedle vnitřních faktorů (např. „dostupnost“ modifikované látky) také na metabolických obrazech těchto bílkovin. U proteinů s pomalým metabolickým obratem („dlouhožijící“) se posttranslační změny projeví výrazněji než u rychle metabolizovaných bílkovin. Proto i z fyziologického hlediska jsou modifikace závažnější u těchto bílkovin. Předložená práce se zabývá posttranslačními modifikacemi (glykacemi) proteinů. Důraz je při tom kladen na dominantní bílkovinu pojivové tkáně-kolagen. Kolagenní molekuly ve většině vyvrálých tkání jsou začleněny do extracelulární matrix, kdy např. jejich metabolický obrat v kosti je dva roky [2]. Vzhledem ke strukturální funkci kolagenu, a proto i jeho nerozpustnosti byl pro studium posttranslačních modifikací použit jako referenční protein albumin. Albumin byl využit jako modelový rozpustný protein, na kterém byly vyzkoušeny a prakticky aplikovány metodické možnosti pro sledování a identifikaci změn bílkovinné struktury.

2. TEORETICKÁ ČÁST

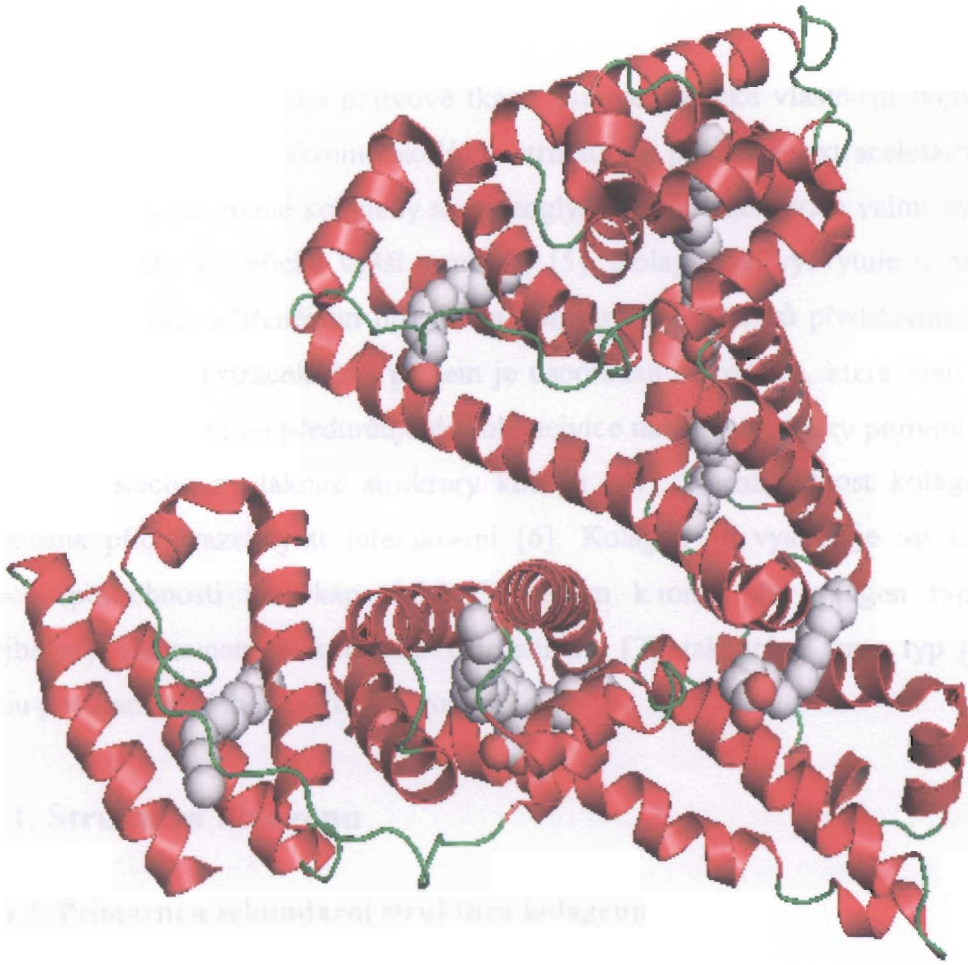


2.1. Albumin

Albumin je protein krevní plazmy, tvoří přibližně 60 % celkové hmotnostní koncentrace plazmatických bílkovin. Kromě krve se vyskytuje také v dalších tělních tekutinách, jako je tkáňový a mozkomíšní mok. Má důležitou roli při transportu různých látek krví (mastné kyseliny, minerály, léky) a pomáhá udržet stálé vnitřní prostředí organismu. Významně se podílí na udržování koloidně-osmotického (onkotického) tlaku. Přispívá k pufrační a antioxidační kapacitě krevní plazmy a je zdrojem aminokyselin pro syntézu proteinů v periferních tkáních. Z klinického hlediska je pro organismus významné snížení jeho koncentrace (sloužící jako indikátor stavu organismu). Příčinou může být pokles syntézy (těžké poškození jater, proteinová malnutrice), ale i zvýšený katabolismus (akutní stavy), zvýšené ztráty (močí, kůží, stolicí), nebo změna distribuce v tělních tekutinách a hyperhydratace.

2.1.1. Struktura albuminu a jeho syntéza

Albumin je protein elipsoidního tvaru (Obr.1), tvořený jediným polypeptidovým řetězcem o 585 aminokyselinách. Obsahuje 17 disulfidových můstků a působením proteáz (trypsin, chymotrypsin) se štěpí na tři domény s rozdílnými funkcemi. Molekulová hmotnost albuminu je 67 kDa. Albumin, na rozdíl od ostatních plazmatických proteinů, není glykoproteinem a je podobně jako většina proteinů krevní plazmy syntetizován v játrech. Denní produkce je asi 12 g albuminu, což je 50 % proteinů vylučovaných játry [3]. Proto se jakákoliv porucha schopnosti jater syntetizovat proteiny projeví sníženým množstvím albuminu. Zhruba 42 % celkového tělního albuminu se nachází v plazmě, zbytek je v tkáních, hlavně v podkoží a ve svalech. Nepatrné množství albuminu proniká přes hematoencefalickou bariéru do mozkomíšního moku (120 – 300 mg/l). Směnitelný pool albuminu (= tzn. množství ihned dostupného albuminu v organismu) je asi 3,5 – 5,0 g/kg váhy těla. Biologický poločas albuminu je asi 20 dní, odbouráván je hlavně endotelem (buňkami tvořící výstelku) krevních kapilár. Malé množství albuminu proniká do moči, ale ztrácí se také difúzí do trávicí trubice.



Obr. 1. Lidský albumin (převzato [4]).

2.2. Kolagen

Kolagen je bílkovina pojivové tkáně. Biomechanické vlastnosti pojivové tkáně jsou určovány specifickou makromolekulární strukturou příslušné extracelulární matrix, která obsahuje především různé kolageny a proteoglykany. Kolagen hraje velmi významnou úlohu ve vytváření této specifické vyšší struktury [5]. Kolagen se vyskytuje u mnohobuněčných organismů. Je nejrozšířenějším proteinem obratlovců a u savců představuje asi 25 % všech bílkovin [3]. Jako extracelulární protein je uspořádán do vláken, která mají velkou pevnost v tahu. Tato vlastnost jej předurčuje do role nejvíce namáhané složky pojivových tkání (kosti, chrupavky, šlachy a vláknité struktury kůže a cév). Nerozpustnost kolagenu ve vodě je způsobena příčněvazebnými interakcemi [6]. Kolagen se vyskytuje ve více chemických typech (podrobnosti viz. kap. 2.3.). Vzhledem k tomu, že kolagen typu I je jedním z nejběžněji zastoupených kolagenů v organismu [7], tak právě tento typ jsme využili při studiu posttranslačních modifikací proteinů.

2.2.1. Struktura kolagenu

2.2.1.1. Primární a sekundární struktura kolagenu

Kolagen je velmi specifickou bílkovinou co se týče jak aminokyselinového složení tak uspořádání aminokyselin. Aminokyselinové složení kolagenu je u rozmanitých živočišných druhů podobné a většinou se jen mírně liší. Charakteristickým znakem kolagenu je přítomnost tripeptidu -Gly-X-Y-, to znamená, že aminokyselina glycin je na každé třetí pozici v sekvenci. Hydroxyprolin je charakteristickou aminokyselinou pro kolagen. Tato struktura (opakování tripeptidu -Gly-X-Y- a přítomnost hydroxyprolinu) má za následek charakteristické triple-helikální uspořádání kolagenu (kolagenních domén proteinu). Prolin se často (asi z 20 %) nachází na pozici X a 4-hydroxyprolin na pozici Y. Jako všechny ostatní bílkoviny je i kolagen vytvořený ze základních aminokyselin (mimo hydroxyprolin a hydroxylysin). Specifická struktura proteinů závisí v první řadě na sekvenci aminokyselinových zbytků, tzv. primární struktura polypeptidických řetězců. Z ní se odvozují strukturální vlastnosti vyšších řádů a biologické i fyzikální vlastnosti bílkoviny. Kolagenové molekuly jsou syntetizované buď jednotlivými útvary jako jednoduché polypeptidické řetězce, ale svou funkci plní jako součást složitých polymolekulárních struktur, kolagenové vlákno. Jednotlivé molekuly se přeměňují na složitě fibrilární komplikovaným mnohostupňovým procesem, na jehož začátku je prekursor

základního řetězce, který má v N-koncové oblasti tzv. pro-kolagenový peptid [8]. Tento řetězec, jenž je přítomný na buněčné úrovni, je vystaven řadě postupných modifikací, jako je hydroxylace některých prolinových a lysinových zbytků specifickými enzymy (prolylhydroxyláza a lysylhydroxyláza) a navázání karbonylových molekul na některé hydroxylysinové zbytky. Předpokládá se, že úlohou prokolagenového peptidu je délkové protažení a prostorové uspořádání tří polypeptidických řetězců do kompletní trojitě prokolagenní molekuly. Tato molekula je potom vylučovaná do mimobuněčného prostoru, kde je prokolagenový peptid enzymaticky odštěpen a molekula získá schopnost agregovat na fibrily. V průběhu stárnutí se mechanická pevnost fibril zvětšuje vytvářením kovalentních příčných vazeb intramolekulárního a intermolekulárního typu. Kolagen obsahuje značné množství glycinu (330 molů na 1 000 molů aminokyselin), který je pravidelně rozložený v molekule, to znamená, že tvoří každou třetí aminokyselinu v sekvenci jednotlivých řetězců. Toto rozložení umožňuje těsné spojení polypeptidických řetězců do trojitě šroubovice. Velké množství této aminokyseliny způsobuje vysoký obsah dusíku v kolagenu. Hydroxyprolin je pro kolagen charakteristickou aminokyselinou, protože je obsažen ve větším množství jen v této bílkovině (tzv. retikulín, o němž se uvádí také významný obsah hydroxyprolinu, je vlastně kolagen typu III). Velký obsah hydroxyprolinu a prolinu, tzv. iminokyselin, podmiňuje stericou rigiditu kolagenu (není možné volné otáčení kolem vazby $C_{\alpha} - N$ a velmi je ztíženo otáčení kolem vazby $C_{\alpha} - CO$) a odlišné prostorové uspořádání polypeptidických řetězců kolagenu ve srovnání s bílkovinami obsahujícími menší množství cyklických kyselin. Zatímco v peptidických řetězcích bez iminokyselin je otáčivost na vazbě omezeně možná na každém C-atomu, tzn. v každém třetím článku peptidického řetězce, při zabudování iminokyseliny do polypeptidického řetězce je taková otáčivost prakticky znemožněna v rozsahu šesti článků a při včlenění dvou iminokyselin po sobě je dokonce v rozsahu devíti C-atomů. Takové uspořádání proto umožňuje řetězci kolagenu vytvářet protáhlé šroubovice, které se stabilizují meziřetězcovými vodíkovými můstky když se spojí do trojnásobné, tzv. super šroubovice. Přítomnost tyrosinu v molekule kolagenu byla předmětem dlouhých sporů. Podrobné aminokyselinové studie ukázaly, že všechen tyrosin je nahromaděn v terminálních peptidech, tzv. telopeptidech, které nemají strukturu šroubovice a lze je lehce odštěpit proteolytickými enzymy. Další typickou aminokyselinou kolagenu je hydroxylysin, který se vyskytuje i v několika dalších bílkovinách, např. kasein a keratin obsažených ve vlně. V těchto bílkovinách je však obsah hydroxylysinu ve srovnání s kolagenem malý. Jeho význam spočívá v tom, že se na něj vážou sacharidické složky. Pro kolagen je charakteristický malý výskyt leucinu a isoleucinu; jen dvě bílkoviny mají menší obsah těchto dvou aminokyselin než kolagen, jsou to

ribonukleáza a fibroin (hedvábí). Cystein je přítomný ve větším množství pouze v kolagenu nejnižších živočichů, ve kterém stabilizuje strukturu pomocí disulfidických můstků. Methionin je obsažen v kolagenu v malém množství (8 molekul v α_1 -řetězci a 5 v α_2 -řetězci typu I). Těto vlastnosti se využívá pro bromkyanové štěpení methioninové polypeptidické vazby při studiu primární struktury proteinu. Ze studia primární struktury polypeptidických řetězců kolagenu je zřejmé, že se v této bílkovině střídají dva typy oblastí: apolární a polární. Apolární oblasti jsou relativně uniformní - pravidelně se v nich střídají sekvence gly-pro-R. Místo R je možné dosadit různé aminokyseliny, jako hydroxyprolin, alanin, arginin, asparagin, fenylalanin, treonin, serin. Velký význam pro sekundární a terciární strukturu kolagenu má tripeptid gly-pro-hyp. Tripeptid gly-pro-R tvoří asi 33 % celé kolagenové molekuly; tripeptid gly-pro-hyp přitom zahrnuje asi 10 % celé sekvence aminokyselin [9]. O polárních oblastech můžeme tvrdit, že některé z nich obsahují většinou kyselé, jiné většinou bazické aminokyseliny, což je patrné v elektronovém mikroskopickém obrazu. Jednotlivé řetězce - α_1 -řetězec a α_2 -řetězec - se liší záměnou některých aminokyselin.

Na C-konci i N-konci se větví jednotlivé řetězce do telopeptidů, jejichž struktura není helikální; o tom svědčí jejich odlišné aminokyselinové složení. Helikální strukturu a aminokyselinové složení, typické pro tělo kolagenové molekuly, neobsahuje ani registrační peptid. Telopeptidům se připisuje významná úloha nejen v antigenových, ale i v jiných vlastnostech kolagenu, je to dáno přítomností tyrosinu. Některé příčné vazby jsou přítomné v telopeptidových oblastech. Bez významu není ani poměrně velká variabilita v aminokyselinovém složení těchto peptidů.

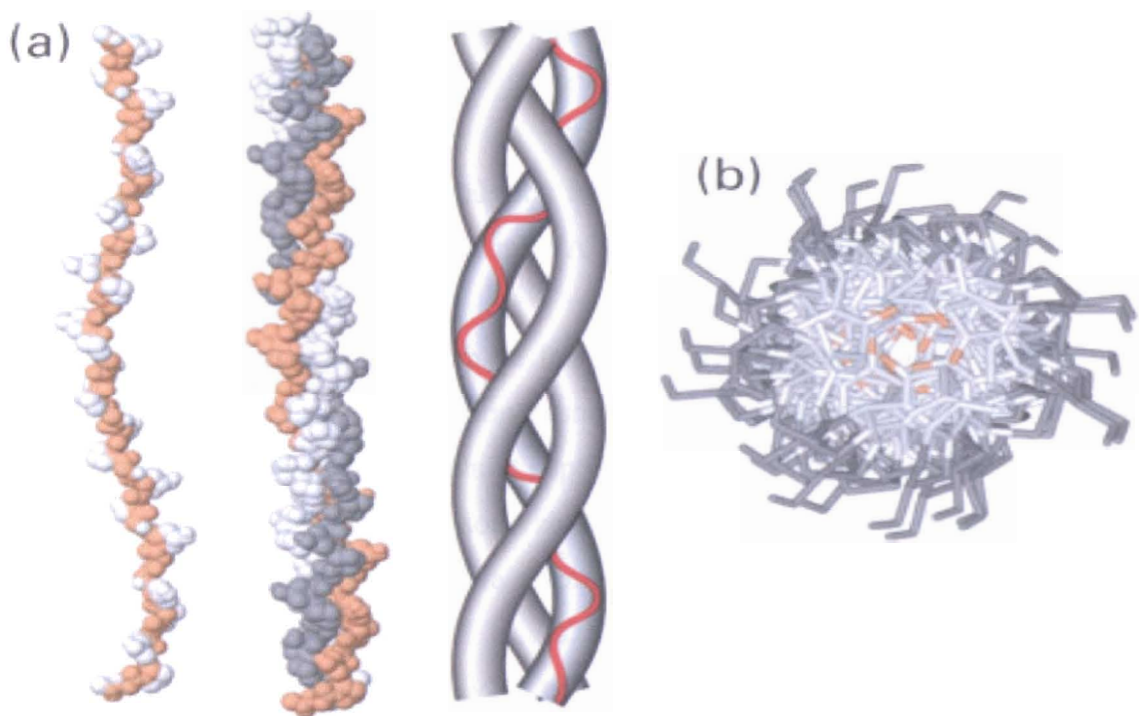
Sekundární struktura vyjadřuje konformaci hlavního polypeptidického řetězce v prostoru. V případě kolagenu jsou sekvence aminokyselinových zbytků v L-konformaci bílkovin spojeny planárními peptidickými vazbami. V dlouhém polypeptidickém řetězci je proto jediným zdrojem konformačních změn rotace kolem vazeb N - C α a C α - CO, které vycházejí z α -uhlíkového atomu. Tyto dva rotační úhly jsou označeny φ a ψ . Jejich velikost je u kolagenu typu I (a zřejmě i u ostatních typů) blízká průměrné hodnotě $\varphi = -60^\circ$ a $\psi = 160^\circ$. Tato velikost vede ke vzniku pravidelné levotočivé šroubovice protáhlého typu, ve které připadají 3,3 aminokyselinové zbytky na jeden závit stoupání. Rentgenografická spektra kolagenu ukazují, že závity mají stoupání 0,95 nm a jednotlivé peptidické jednotky jsou vzdáleny 0,286 nm. Celková délka řetězce je asi 290 nm. Takto protažená šroubovice je u bílkovin výjimečná a vyskytuje se jen u kolagenu nebo některých polypeptidů s podobnou aminokyselinovou sekvencí. Nemůže být stabilizovaná intrařetězcovými vodíkovými vazbami, čímž se liší od Paulingovy α -konformace. Stabilizace

musí být proto interřetězcová, izolovaný řetězec v této konformaci nemůže existovat bez interakce s dalšími těsně sousedícími řetězci podobných vlastností. Detailní rentgenové měření a stereochemické úvahy vedly k poznatku, že kolagenní šroubovice (ve skutečnosti prostorová křivka spojující α -uhlíky) není symetrická kolem přímkové osy, ale kolem jiné šroubovice, která je naopak pravo-točivá a má stoupání 8,58 nm na závit tvořený 30 aminokyselinami. Koncové oblasti kolagenních řetězců, v nichž chybí typická sekvence Gly-X-Y, postrádají toto pravidelné uspořádání. V C-koncovém peptidu je výrazná tendence ke tvorbě protažené konformace β -pleated sheet čili „skládaného listu“.

2.2.1.2. Struktura trojitě šroubovice kolagenu

Trojitá šroubovice kolagenu je tvořena ze tří polypeptidových řetězců. Každý z nich je stočen do levotočivého helixu. Tyto tři řetězce jsou navzájem spleteny do pravotočivého „super“ helixu (Obr.2) Přítomnost glycinu jako každé třetí aminokyseliny v opakující se sekvenci -Gly-X-Y- je velmi důležitá (n odpovídá přibližně 340). Žádná jiná (= větší) aminokyselina by se totiž nevešla do středu superhelixu, kde se setkávají tři řetězce (centrem trojitě šroubovice prochází každý třetí zbytek glycinu každého polypeptidového řetězce). Zbytky aminokyselin Gly, X a Y jsou umístěny v trojšroubovici na stejné úrovni. Prolin a 4-hydroxyprolin limitují rotaci polypeptidových řetězců tím, že jsou objemné a poměrně neohebné. Skupina NH každého glycinu vytváří navíc silný vodíkový můstek s kyslíkem karbonylu zbytku X sousedícího řetězce [10]. U mnoha kolagenů je trojitá šroubovice přerušena globulární sekvencí, která molekule dodá větší flexibilitu [6]. Dobře svinutá rigidní trojšroubovicovitá struktura je odpovědná za mimořádnou pevnost kolagenu v tahu. Polypeptidové řetězce kolagenu převádějí podélnou sílu v tahu na snadněji zvládnutelnou příčnou tlakovou sílu téměř nestlačitelné trojitě šroubovice. Je tomu tak proto, že opačně svinutá polypeptidová vlákna trojitě šroubovice zabraňují jejímu rozvinutí pod tlakem.

Konformace trojitě šroubovice musí být taková, že aminokyseliny na pozicích X a Y jsou na povrchu molekuly. Toto uspořádání vysvětluje u mnoha kolagenů schopnost agregovat.



Obr. 2. Trojitá šroubovice kolagenu a) vertikální pohled, b) horizontální pohled (převzato [11]).

2.2.1.3. Syntéza kolagenu

Kolagen může být syntetizován fibroblasty a dalšími buňkami mezenchymálního původu (chondroblasty, osteoblasty, buňkami hladkého svalstva), ale také jinými typy buněk (endoteliální a epiteliální).

Biosyntéza kolagenu má tyto hlavní kroky :

1. transkripce a translace
2. hydroxylace prolylových a lisylových zbytků
3. glykosylace hydroxylsylových zbytků na galaktosylhydroxylysin a glukosylgalaktosylhydroxylysin
4. agregace řetězců a tvorba disulfidických můstků
5. tvorba trojitě šroubovice
6. sekrece prokolagenu do extracelulárního prostoru
7. konverze prokolagenu na kolagen

8. agregace kolagenních molekul
9. tvorba příčných vazeb

α -řetězce jednotlivých kolagenních typů jsou kódovány každý jiným genem a informace o jeho syntéze je přepisována do příslušné mRNA [12], která je specifická pro každý řetězec a kolagenní typ.

Kolagen je nejprve syntetizován ve formě prekurzoru, preprokolagenu se signálním peptidem [13]. Po průchodu membránou drsného endoplazmatického retikula je signální protein specificky odštěpen signální peptidázou [6]. Při průchodu do drsného endoplazmatického retikula (ER) jsou zbytky prolinu a lysinu hydroxylovány na hydroxyprolin, resp. hydroxylysin. Dva z enzymů, které se účastní této posttranslační modifikace prolylhydroxyláza (E.C. 1. 14. 11. 2.) a lysylhydroxyláza (E.C. 1. 14. 11. 4.), působí na všech vhodných zbytcích Y (vždy na prolin, resp. lysin). Kdežto prolylhydroxyláza působí na prolylový zbytek v poloze X pouze tehdy, když se v poloze Y vyskytuje hydroxyprolin [10].

Glykosylace, která pak dále probíhá v drsném ER, připojuje cukerné zbytky k 5-hydroxylysinovým zbytkům. Tyto modifikace musí předcházet svinutí vláken kolagenu do trojitě šroubovice, neboť na šroubovicích již hydroxylace neprobíhají. Navíc, pokud není trojšroubovice kolagenu stabilizována vodíkovými můstky mezi zbytky hydroxyprolinu, dochází už za fyziologické teploty k její denaturaci. Po svinutí vznikají specifické disulfidické vazby mezi karboxypeptidy na C-konci [6].

2.3. Jednotlivé kolagenní typy

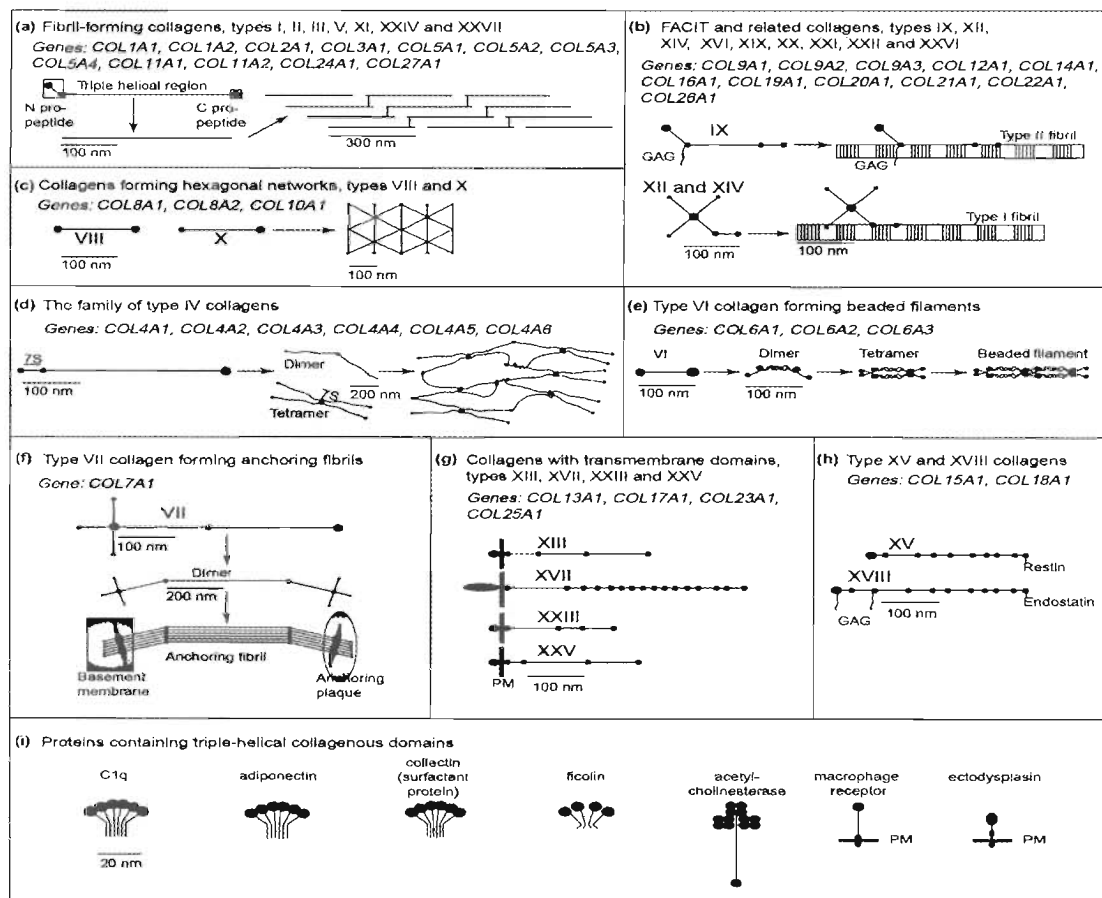
Kolagen se nevyskytuje pouze v jednom typu. U obratlovců je přítomno nejméně 27 kolagenních typů (Tab. 1) se 42 rozdílnými polypeptidovými řetězci [14] a byl již dokonce popsán 28 typ [15]. Navíc je k těmto popsaným kolagenům známo dalších 19 proteinů formálně definovaných jako kolageny a alespoň 10 proteinů, které mají kolagenní domény. Tyto kolageny jsou charakteristické tvorbou typické trojšroubovice, kde každá třetí aminokyselina v molekule kolagenu je glycin (30 %), prolin a okolo 25 % modifikovaných aminokyselinových zbytků (hydroxyprolin a hydroxylysin). Hydroxylací prolinu na hydroxyprolin dochází ke stabilizaci struktury kolagenu. Kolagen se vyskytuje v tkáních obratlovců v mnoha různých formách, každá z těchto forem je dominantní ve specifických tkáních. V různých pojivových tkáních se kolageny vyskytují v pozoruhodné strukturální a

funkční rozmanitosti. Tato rozmanitost je způsobena existencí velkého množství genů kódujících kolageny s rozdílnými chemickými a biologickými vlastnostmi. Přinejmenším osm kolagenních typů je tvořeno ze dvou nebo tří rozdílných α -řetězců. Vedle α -řetězců, můžeme v kolagenních typech nalézt také β -řetězce (dimery α -řetězců) a γ -řetězce (trimetry α -řetězců). Také jsou dobře známy případy, kdy fibrily kolagenního typu I obsahují také kolagen typu III, V a XII, nebo fibrily kolagenního typu II mohou obsahovat řetězce kolagenu typu IX a XI. To znamená, že ve stejné tkáni mohou být nalezeny nejen fibrily rozdílných kolagenních typů, ale také směsi fibril tvořených z různých typů kolagenu [16]. Kromě toho tato rozmanitost vyplývá také z rozdílností v některých posttranslačních (ale ne věkově závislých) modifikacích (prolyl a lysyl hydroxylace) kolagenních polypeptidů v různých tkáních [17].

Tab. 1. Kolagenní typy (převzato [18], [14]).

Typ	Gen	Výskyt	Literatura
I	COL1 α 1 COL1 α 2	Většina pojivových tkání	[18]
II	COL2 α 1	Chrupavka, sklivcová tekutina	[18]
III	COL3 α 1	Kůže, plíce, vaskulární systém	[18]
IV	COL4 α 1 COL4 α 2 COL4 α 3 COL4 α 4 COL4 α 5 COL4 α 6	Bazální membrány	[18]
V	COL5 α 1 COL5 α 2 COL5 α 3	Tkáně obsahující kolagen I Kvantitativně minoritní složka	[18] [18]
VI	COL6 α 1 COL6 α 2 COL6 α 3	Většina pojivových tkání	[18]
VII	COL7 α 1	Upevňující vlákna	[18]
VIII	COL8 α 1 COL8 α 2	Mnoho tkání, zvláště endotel	[18]
IX	COL9 α 1 COL9 α 2 COL9 α 3	Tkáně obsahující kolagen II	[18]
X	COL10 α 1	Hypertrofovaná chrupavka	[18]
XI	COL11 α 1 COL11 α 2 COL2 α 1	Tkáně obsahující kolagen II	[18]
XII	COL12 α 1	Tkáně obsahující kolagen I	[18]
XIII	COL13 α 1	Mnoho tkání	[18]
XIV	COL14 α 1	Tkáně obsahující kolagen I	[18]
XV	COL15 α 1	Mnoho tkání	[18]
XVI	COL16 α 1	Mnoho tkání	[18]
XVII	COL17 α 1	Kožní hemidesmosomy	[18]
XVIII	COL18 α 1	Mnoho tkání, především játra a ledviny	[18]
XIX	COL19 α 1	Buňky nádoru srdečního svalu	[18]
XX	COL20 α 1	Epitel rohovky, kůže, šlacha a chrupavka	[19]
XXI	COL21 α 1	Mnoho tkání	[20]
XXII ^b	COL22 α 1	Tkáňová spojení	
XXIII	COL23 α 1	Metastatické nádorové buňky	[21]
XXIV	COL24 α 1	Ve vyvíjející se kosti a rohovce	[22]
XXV	COL25 α 1	Neurony	[23]
XXVI	COL26 α 1	Testis, ovaria	[24]
XXVII	COL27 α 1	Chrupavka, oko, ucho, a plíce	[25], [26]

Soubor kolagenních typů může být rozdělen do několika tříd (každá obsahuje několik kolagenních typů) na základě strukturálních vlastností jednotlivých členů, jmenovitě kolageny tvořící vlákna (typ I, II, III, a V), kolageny tvořící síť (typ IV, VIII, a X), kolageny nalezené na povrchu vláken (vlákna asociované s kolageny - FACIT) s přerušením trojitě šroubovice (zahrnuje také kolagenní typy IX, XII, XIV a XIX), kolageny tvořící obroubené nitky (typ VI), kolageny tvořící zakotvující fibrily pro bazální membrány (typ VII), kolageny s transmembránovou doménou (typy XIII a XVII) a kolageny, které nejsou ještě plně charakterizovány (typy XV a XVIII) [18]. Mapováním DNA se přišlo na velké množství příbuzných proteinů s různě dlouhou délkou opakující se sekvence -Gly-X-Y-. Vzhledem k tomu, že tyto proteiny byly objeveny při výzkumu kolagenu, tak byly takto dekódované proteiny definovány jako kolageny (nebo kolagenu-podobné proteiny) a to i v těch případech, kdy byla délka trojitě šroubovice velmi malá a většina proteinu byla globulární (Obr. 3). Funkce minoritních kolagenů není za fyziologických situací ani při různých onemocněních dosud jednoznačně definována [27].



Obr. 3. Schématické znázornění struktury různých kolagenních typů a kolagenu-podobných proteinů a jejich příslušných genů (převzato [14]). Římské číslice udávají typ kolagenu.

Tento souhrn bude dále omezen pouze na **nejběžnější** typy kolagenu. Vzhledem ke svému zastoupení v organismu a pro svou částečnou rozpustnost je historicky nejstarším kolagenem typ I. Tento typ který představuje 80-90 % ze všech kolagenů v organismu a tvoří v těle heterotrimer $[(\alpha_1(I))_2 \alpha_2(I)]$. Je přítomen např. v kosti a spolu s jinými kolagenními typy také v pokožce, šlaše, kolagenní povázce, cévní stěně a dentinu. Jeho molekula (podobně jako u kolagenů typu II, III, V a IX) je dlouhá 300 nm s relativní molekulovou hmotností 300 000.

Kolagen typu II se dominantně vyskytuje v kloubní chrupavce. Tento typ může být získán z hyalinní chrupavky po odstranění hlavních proteoglykanů, např. guanidin chloridem nebo jinými chaotropními látkami, nebo chromatografií na DEAE-celulose. Typickým znakem tohoto kolagenu je vysoký stupeň glykosylace [28]. Kolagen typu II byl identifikován jako biomarker osteoartritidy a onemocněních spojených s degradací hyalinní chrupavky [29].

Kolagen typu III je majoritně zastoupen v krevním řečišti a ve stěnách arteriol, minoritně v pokožce. Kolagen typu III se vyskytuje spolu s kolagenem typu I, s kterým tvoří hybridní vlákna. Podobně jako další kolagenní typy (mimo typu I a II), je tento kolagen stabilizován disulfidickými vazbami [30].

Kolagen typu IV je obsažen v bazální membráně. Kolagen typu IV je vysoce polymerizován a tvoří základní stavební strukturu pro endoteliální buňky jako selektivní bariéru mezi krví a okolními tkáněmi [31]. U prokolagenu tohoto typu nejsou během biosyntézy odstraněny propeptidy a nejsou vytvořena vlákna. Místo toho kolagen typu IV tvoří strukturu podobnou síti, kde jsou čtyři kolagenní molekuly vázány četnými disulfidickými vazbami. Kolagen tohoto typu má klasické složení kolagenních vláken $\alpha_1(IV)$ a $\alpha_2(IV)$ polypeptidových řetězců. Řetězce $\alpha_3(IV)$ až $\alpha_6(IV)$ můžeme nalézt pouze ve specifických typech bazálních membrán [31]. Tento kolagen je heterotrimer $[\alpha_1(IV)_2\alpha_2(IV)]$. Prokolagenní molekula typu IV obsahuje tři domény; 7S, krátkou N-terminální triple-helikální doménu; NC1 (ne-kolagenní), C-terminální karboxy doménu; obsahují také relativně dlouhou triple-helikální doménu (400 nm) s několika malými přerušeními opakující se tripeptidové sekvence (Gly-Xaa-Yaa), která umožní flexibilitu této trojšroubovice [5].

Prvním kolagenním typem, který se vyskytuje v ontogenezi je kolagen typu V. Tento kolagenní typ je kvantitativně minoritní fibrilární kolagen s širokou tkáňovou distribucí. Tvoří jemná, pericelulárně umístěná vlákna [32]. Nejběžněji vyskytující se izoformou kolagenu typu V je $[\alpha_1(V)_2\alpha_2(V)]$ vyskytující se v rohovce. Nicméně existují také další izoformy včetně $[\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)]$, další je odvozená od $\alpha_1(V)_3$ homotrimeru a hybridního typu V/XI α -řetězců.

Kolagen typu VI se vyskytuje v intersticiální pojivové tkáni, v meziobratlových ploténkách a v hyalinní kloubní chrupavce. Tento kolagenní typ také patří mezi minoritně se vyskytující kolagen. Kolagen typu VI se skládá z částí o relativní molekulové hmotnosti 240 000 a 140 000. Tyto řetězce jsou zakončeny globulárními oblastmi.

Kolagen typu VII je někdy nazýván dlouhořetězcovým kolagenem, protože jeho polypeptidové řetězce jsou dlouhé 450 nm. Molekuly jsou uspořádány do protichůdně orientovaných dimerů s 60 nm překryvem. Jeho funkcí je zakotvení pojivové tkáně stromatu na bazální membrány [33].

Kolagen typu VIII je tvořen endoteliálními buňkami a proto bývá také nazýván EC (endothelial cell) kolagenem. Jeho polypeptidové řetězce mají relativní molekulovou hmotnost vyšší než 100 000 a jsou často přerušovány nehelikálními oblastmi [34].

Kolagen typu IX reprezentuje tzv. FACIT rodinu. Mezi FACIT kolageny patří kolagenní typy IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI a XXV. Molekuly z tzv. FACIT rodiny (fibrily asociované s kolageny, s přerušenými triple-helikálními oblastmi) jsou charakteristické ve svém počtu kolagenních (CO) domén přerušovaných krátkými nekolagenními (NC) oblastmi [35].

V kalcifikující enchondrální chrupavce je možné nalézt krátký kolagen označovaný jako typ X. Kolagen typu X má relativní molekulovou hmotnost 59 000 s C-terminální globulární oblastí o hmotnosti 14 000. Jeho funkce se vztahuje ke kalcifikačním procesům a na rozdíl od jiných kolagenů se zdá, že je rychle metabolizován.

Ostatní typy kolagenů jsou zastoupeny jen minoritně a mnohdy jsou známy pouze na základě sekvence genomu. Z hlediska biosyntézy kolagenu je v současné době nejvíce znalostí o kolagenu typu I. Geny pro tento typ kolagenu jsou značně velké (o velikosti okolo 40 000 párů bází), rozdělené do mnoha krátkých kódujících exonů a dlouhých přerušujících intronů.

Enzymatické posttranslační modifikace mohou mít vliv jak na množství, tak na kvalitu tvořených kolagenních struktur. Obzvláště významná je hydroxylace prolinu. Jestliže enzym prolin-4-hydroxyláza nehydroxyluje prolin, dochází k zablokování tvorby triple-helikální struktury a nehydroxylované jednoduché α -řetězce jsou rychle uvnitř buňky degradovány. Další enzymy účastníci se tvorby kolagenu v buňce, jako je prolin-3-hydroxyláza, lysin hydroxyláza a dvě hydroxylsilyl glykosyltransferázy jsou méně důležité pro regulaci množství kolagenu, nicméně mají vliv na kvalitu vytvářených molekul. Aktivita zmiňovaných enzymů je ovlivňována různými kofaktory (askorbát, Fe^{++} a O_2 pro prolyl stejně jako pro lysyl hydroxylázy, Cu^{++} pro lysyl oxidázu).

2.3.1 Ontogenetické změny v poměrech kolagenních typů

Extracelulární matrix podléhá během procesu stárnutí progresivním změnám, které jsou charakterizovány: 1) snížením rozpustnosti 2) odolností vůči štěpení proteolytickými enzymy 3) zvýšením denaturačního času. Je dobře dokázáno, že s věkem dochází ke snížení rozpustnosti kožního kolagenu a změnám jeho fyzikálně-chemických vlastností [36]. Vedle stárnutí může být rozpustnost kožního kolagenu ovlivněna různými fyziologickými a patofyziologickými vlivy a také léky nebo výživovým režimem [37], [38], [39].

Výsledky studia bilance kolagenních složek v kůži ukazují, že s věkem dochází k viditelnému poklesu rozpustných kolagenních frakcí (t.j. kolagen rozpustný neutrálními solemi a kyselé rozpustný kolagen představující nepolymerizovaný kolagen typu I). Je vidět i změna v nerozpustné frakci (obsahující kolagen typu III a vysoce polymerizovaný kolagen typu I), kde s věkem klesá podíl kolagenu typu III.

Snad nejzřetelnějším rozdílem mezi kolagenními typy I a III je přítomnost disulfidických můstků u kolagenu typu III. Je známo, že stabilizace podpůrných struktur disulfidickými můstky jsou fylogeneticky velmi staré. Výhodou tohoto mechanismu v porovnání s tvorbou příčných vazeb odvozených od lysinu je velká rychlost tvorby disulfidických můstků. Tato vlastnost je využívána hlavně v časně ontogenezi a v nově tvořených tkáních.

Vyšší obsah hydroxyprolinu v kolagenu typu III v porovnání s kolagenem typu I a přítomnost disulfidických můstků může vysvětlovat větší odolnost vůči proteolýze u kolagenu typu III v porovnání s kolagenem typu I.

Vznik kolagenu typu I v nerozpustných frakcích musí být způsoben značnými změnami jeho struktury, případně musí dojít k bloádě jeho katabolismu. Jediným známým mechanismem, který může vést k těmto důsledkům, je tvorba příčných vazeb. Z toho se dá vyvodit, že u struktur kolagenu typu I stoupá se zvyšujícím se věkem tvorba příčných vazeb.

2.4 Příčné vazby a jejich vztah k stárnutí

Funkční polymery většiny genetických typů kolagenu obratlovců jsou tvořeny kovalentními příčnými vazbami tvořenými enzymaticky zprostředkovaným aldehydickým mechanismem. Tento mechanismus je v bílkovinách popsán pouze u kolagenu a elastinu. Kolagenní aldehydy jsou tvořeny působením lisyoxidázy na několik specifických lysinových a hydroxylysinových zbytcích bočních řetězců. Nabídka dvou, tří a čtyřfunkčních příčněvazebných aminokyselin může sloužit k tvorbě intra a intermolekulárních vazeb vzniklých reakcí aldehydické skupiny s volnou amino skupinou. Profil typů příčněvazebných aminokyselin, který se liší podle typu tkáně a jejího stáří, je typickým příkladem posttranslační bílkovinné heterogenity a snad i zdrojem tkáňové a věkově závislé funkční heterogenity kolagenu [40], [41].

Pro příčně pruhované (s periodou opakování 67 nm) vláknité kolageny existují dva způsoby tvorby příčné vazby: jeden založený na aldehydech odvozených od lysinu, druhý na aldehydech odvozených od hydroxylysinu. Cesta přes aldehydy odvozené od lysinu převládá v dospělé kůži, rohovce, skleře, potkaní ocasní šlaše. Hydroxyaldehydová (hydroxylysinová) cesta převládá v kosti, chrupavce, vazech a vnitřních pojivových tkáních v těle [42].

Vedle těchto příčněvazebných složek, které jsou téměř s určitostí fyziologické povahy, dochází pravděpodobně k tvorbě jiné kategorie příčných vazeb vzniklých reakcí kolagenních struktur s reaktivními metabolity, která není enzymaticky řízena ani zprostředkována. Z tohoto hlediska jsou nejčastěji uvažovány reakce s glukózou [17].

2.4.1 Neenzymatická glykace a její vliv na organismus

Kolagen patří do skupiny proteinů s pomalým metabolickým obratem, a proto u něj může docházet k postupné neenzymatické glykaci za vzniku produktů posttranslačních modifikací. Glykace hraje důležitou roli v patogenezi stárnutí, ale i v patologických situacích např. v případě diabetes mellitus, vede navzdory přísné kontrole ke komplikacím způsobenými modifikacemi proteinů. Většina poškozujících účinků je způsobena vznikem glukózou zprostředkovaných intermolekulárních příčných vazeb. Tyto příčné vazby snižují pružnost a propustnost těchto tkání a snižují metabolický obrat.

Schopnost glukózy zprostředkovat příčnou vazbu bílkovin pojivové tkáně při stárnutí byla poprvé popsána Monnierem a spol. [43].

Glykací se nazývá reakce karbonylových skupin redukujících cukrů s volnými aminoskupinami bez katalytického působení enzymů (nebo starším výrazem neenzymatická glykosylace). Tato reakce byla poprvé popsána Louisem Maillardem [44], který pozoroval hnědnutí bílkovin při zahřívání s cukry. Touto reakcí, nazvanou Maillardova reakce, se od 20. let minulého století široce zabývají potravinářští chemici. V roce 1971 bylo popsáno, že glykace probíhá v každém živém organismu [45], zejména ve stavech se zvýšenou koncentrací cukrů v krvi, jako je diabetes mellitus nebo galaktosemie. V prvních studiích zabývajících se glykací *in vivo* byla studována glykace hemoglobinu a kolagenu. Byla popsána existence aduktů těchto bílkovin s cukry [45], [46].

Neenzymatická glykace probíhá ve třech krocích. V analogii s řetězovými radikálovými reakcemi ji můžeme rozdělit na iniciaci, propagaci a terminaci (Obr. 4). Toto rozdělení je užitečné také z důvodu, že reakce se biologicky projevuje na třech úrovních.

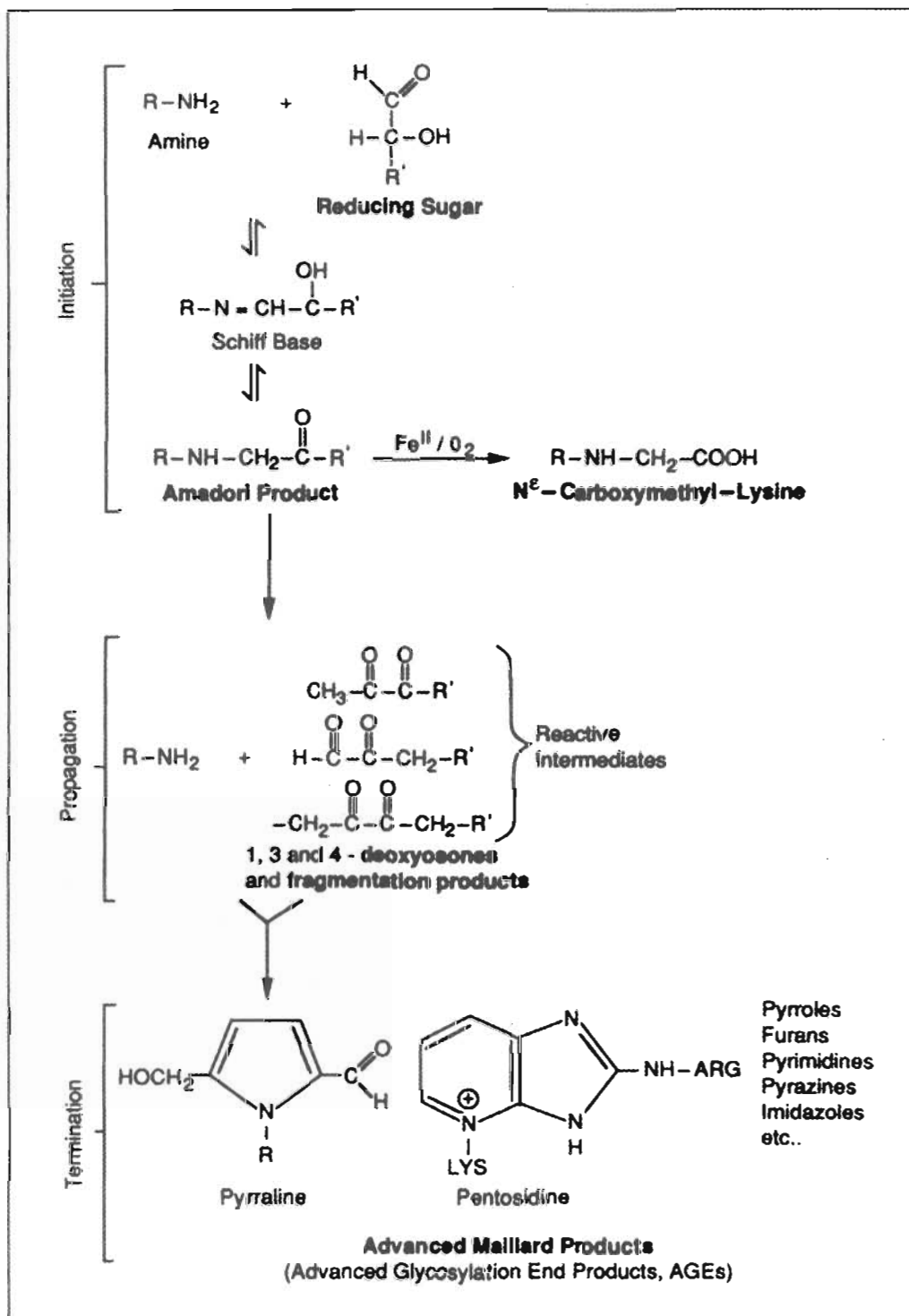
V první etapě reakce vznikají tzv. ranné produkty glykace. Reakce je iniciována neenzymatickou kondenzací redukujícího cukru a aminu za vzniku nestabilní Schiffovy báze. Ta podléhá přesmyku vedoucímu k více stabilnímu Amadoriho či Heynsovu produktu (v závislosti na tom, jestli reagující cukr je aldosa či ketosa).

Při propagaci dochází k degradaci Amadoriho produktů. Amadoriho produkty se buď nevratně oxidují (vzniká N-karboxymethylalkylamin) [47], nebo dojde k rozkladu na původní amin a 1-,3-, nebo 4-deoxyglukoson. Při vyšším pH Amadoriho produkty enolizují v pozici mezi druhým a třetím uhlíkem a eliminují amin z prvního uhlíku za vzniku 1-deoxyglukosonu. Při nižším pH se ketoaminy přesmykují a enolizují v pozici mezi prvním a druhým uhlíkem za vzniku 3-deoxyglukosonů. Některé diketony touto cestou tvoří 4-deoxyglukosony. Deoxyglukosony jsou velmi reaktivní sloučeniny, které opět reagují s volnou aminoskupinou a tím propagují neenzymatickou glykaci a způsobují tak nevratné molekulární změny proteinů tvorbou heterocyklických produktů a inter- a intramolekulárních můstků [48], [49].

Posledním krokem této reakce je terminace, při které dochází k tvorbě konečných produktů glykace anglicky pojmenovaných Advanced Glycation End Products (AGE_s). Reakcemi deoxyglukosonů mohou vznikat látky jako jsou furfuralaldehyd, reduktory nebo pyranony. S aminy deoxyglukosony reagují za vzniku pyrolů, pyrolinonů a pyrolinon reduktů [50]. Tyto produkty neenzymatické glykace absorbují v UV oblasti a většinou jsou bezbarvé. Mohou však dále reagovat s aminy a dalšími karbonylovými sloučeninami na hnědé, fluoreskující sloučeniny, jejichž struktura je zatím málo známá. Tyto koncové produkty jsou termodynamicky stabilní a tím terminují neenzymovou glykační reakci.

Úloha těchto produktů ve stárnutí je kromě toho v současné době zdůrazněna prokázáním jejich přítomnosti v nukleových kyselinách. Bylo prokázáno, že glukóza reaguje nejdříve z lysinovým zbytkem za vzniku reaktivního meziproduktu, který následně může reagovat s jednoduchou nebo dvojitou šroubovicí DNA [51], [52].

Mimo kolagenu mohou i jiné bílkoviny reagovat s redukujícím cukrem za vzniku AGE produktů. Jedná se např. o krystalin v oční čočce [53], hemoglobin [54], plazmatické bílkoviny jako je albumin [55]. Obdobné produkty mohou vznikat i při reakci s jinými metabolity obsahujícími keto nebo aldehydickou skupinu, jako jsou lipoperoxidační produkty. Albumin modifikovaný 4-hydroxy-trans-2-nonenalem (HNE) je možným biomarkerem oxidativního stresu [56]. Modifikacím podléhají i lipoproteiny o nízké hustotě – LDL [57] a další.



Obr. 4. Základní schéma neenzymatické glykace (převzato [58]).

Vzhledem k nežádoucím účinkům glykace na fyziologickou funkci bílkovin v organizmech byly studovány možnosti blokace této reakce. Z tohoto pohledu je třeba zmínit, že buňky i plazma také obsahují velké množství volných nízkomolekulárních aminů, které soutěží s proteiny při reakci s glukózou a tak působí jako fyziologické inhibitory glykace [59]. Brownlee a kol. [60] ve své práci ukázali, že aminoguanidin je schopen blokovat tvorbu AGE_s a zesíťování proteinů jak v modelových systémech *in vitro*, tak i u kolagenu diabetických myší. Zjistili, že aminoguanidin reaguje přednostně s deoxyglukosony, které propagují neenzymovou glykaci. Přítomnost aminoguanidinu v reakční směsi tak zabrání vzniku AGE produktů. Dalšími inhibitory glykace jsou ibuprofen a kyselina acetylsalicylová. U těchto látek byly prokázány antikataraktové účinky [61]. Vasan a kol. [62] popsali novou sloučeninu, která je schopna štěpit glukózové můstky způsobující zesíťování bílkovin jak *in vitro* tak *in vivo*. Jedná se o N-fenacylthiazoliumbromid (PTB).

Makrofágy mají schopnost odstraňovat molekuly nebo buňky, které jsou modifikované AGE produkty [63], [64]. Některé buňky totiž mají specifické receptory rozpoznávající modifikované bílkoviny a tím zabraňují hromadění AGE-bílkovin. Tyto receptory byly také nalezeny na povrchu endoteliálních buněk [64].

Amadoriho produkty mohou být oxidovány. Jako produkt oxidace Amadoriho produktů byl identifikován N-karboxymetyllysin (CML) [65]. Tato modifikace způsobuje změnu povrchového náboje bílkovin (proteiny ztrácejí kladný náboj a získávají negativní náboj). Jelikož tyto změny jsou nevratné, mohou mít vliv na biologickou funkci bílkovin.

Některé koncové produkty glykace (AGE_s) mají cytotoxické a mutagenní schopnosti, které mohou být spojeny s jejich aktivací prostřednictvím cytochromu P-450 [66]. Koncové produkty glykace (AGE_s) byly objeveny v makrofázích, endotelových buňkách, v hladkých svalových buňkách a aterosklerotických placích [67].

Diabetes mellitus je rozšířenou nemocí týkající se okolo 4 % celkové světové populace [68]. Většina vážných komplikací spojených se stárnutím a diabetem mellitus mají obdobný základ v dysfunkcích sítnicových kapilár, ledvinové tkáně a kardiovaskulárního systému. Tyto změny jsou urychleny u diabetických pacientů s hyperglykemií, u nichž dojde k nahromadění koncových produktů glykace (AGE_s) [69], které jsou hlavní příčinou předčasných onemocnění a úmrtí.

Glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}) je jednou z forem hemoglobinu, jehož koncentrace slouží k identifikaci hladiny glukózy v plazmě i po čtyřech týdnech. Pacienti s diabetes mellitus mají často zvýšenou hladinu HbA_{1c}. Zvýšená hladina HbA_{1c} ukazuje na slabou

glukózovou toleranci. Glykovaný hemoglobin je příčinou nephropatií a retinopatií u diabetes mellitus. Lze tedy konstatovat, že hemoglobin HbA_{1c} je brán jako marker při diabetu [70].

Krystaliny (bílkoviny oční čočky) jsou také v průběhu stárnutí glykované. Glykace má vliv na tvorbu agregátů krystalinů vázaných disulfidickými můstky [47]. Koncentrace glykovaných krystalinů v čočkách postižených senilní kataraktou (zakalení čočky v důsledku stárnutí) je obdobná v porovnání ke koncentraci glykovaných krystalinů v čočkách zakalených diabetickou kataraktou. Bessems a kol. [71] ve své práci představili lanthionin, bílkovinu v čočce postižené kataraktou, která také podléhá glykaci za tvorby příčných vazeb

Další charakteristickou komplikací diabetu je periferní neuropatie, projevující se segmentální demyelinizací [72]. Myelin je během diabetu silně glykován. Zvýšená propustnost endoneurálních kapilár vůči bílkovinám krevní plazmy způsobuje pronikání těchto bílkovin do periferních nervů. To pak vede k poškození této tkáně [73].

Jiným typem „dlouho žijících“ bílkovin jsou kolageny. Už nízká koncentrace produktů glykace způsobuje fyzikální změny kolagenů. Vliv glykace na bazální glomerulární membránu byl zkoumán v práci Cohena a kol [74]. Rovněž byly pozorovány jasné změny pružnosti a permeability kapilár. Tyto tkáně a jejich optimální funkčnost je závislá na integritě struktury kolagenní tkáně. Modifikace těchto vlastností pomocí glykace je výsledkem pozdějších komplikací.

Produkty posttranslačních modifikací kolagenu budou rozebrány v následující kapitole.

2.4.2. Produkty posttranslačních modifikací kolagenu

Kolagen patří do skupiny proteinů s pomalým metabolickým obratem, a proto u něj dochází k neenzymatické glykaci za vzniku produktů posttranslačních modifikací (viz výše). Vzniklé modifikace mohou být monotopické nebo polytopické (projevující se jako intra- nebo intermolekulární příčné vazby). Na tvorbu příčných vazeb a jejich mechanismus jako první poukázal ve své studii již v roce 1957 Verzar [75]. Příčné vazby zahrnují dva rozdílné mechanismy jejich vzniku: 1) enzymaticky iniciované příčné vazby vznikající během vývoje a zrání kolagenu 2) neenzymaticky iniciované příčné vazby vznikající během následného dozrávání kolagenu v tkáních [76]. První typ bývá označován jako fyziologická příčná vazba, druhý typ odpovídá patofyziologickým situacím. Neenzymatickou glykací rozumíme reakci mezi volnou amino skupinou aminokyseliny (lysin, arginin, N-koncová aminokyselina) bílkoviny a oxo skupinou cukru (např. redukující cukr). Fyziologické projevy glykačních

reakcí se mohou uplatnit zejména u bílkovin s pomalým metabolickým poločasem, t.j. zejména u pomalu metabolizovaných bílkovin pojiva. Je známo, že kolagenní fibrily jsou fyziologicky stabilizovány kovalentními příčnými vazbami [17]. Kolagenní příčné vazby mezi kolagenními molekulami jsou odvozeny od lysinu nebo hydroxylysinu aminokyseliny v kolagenním α -řetězci.

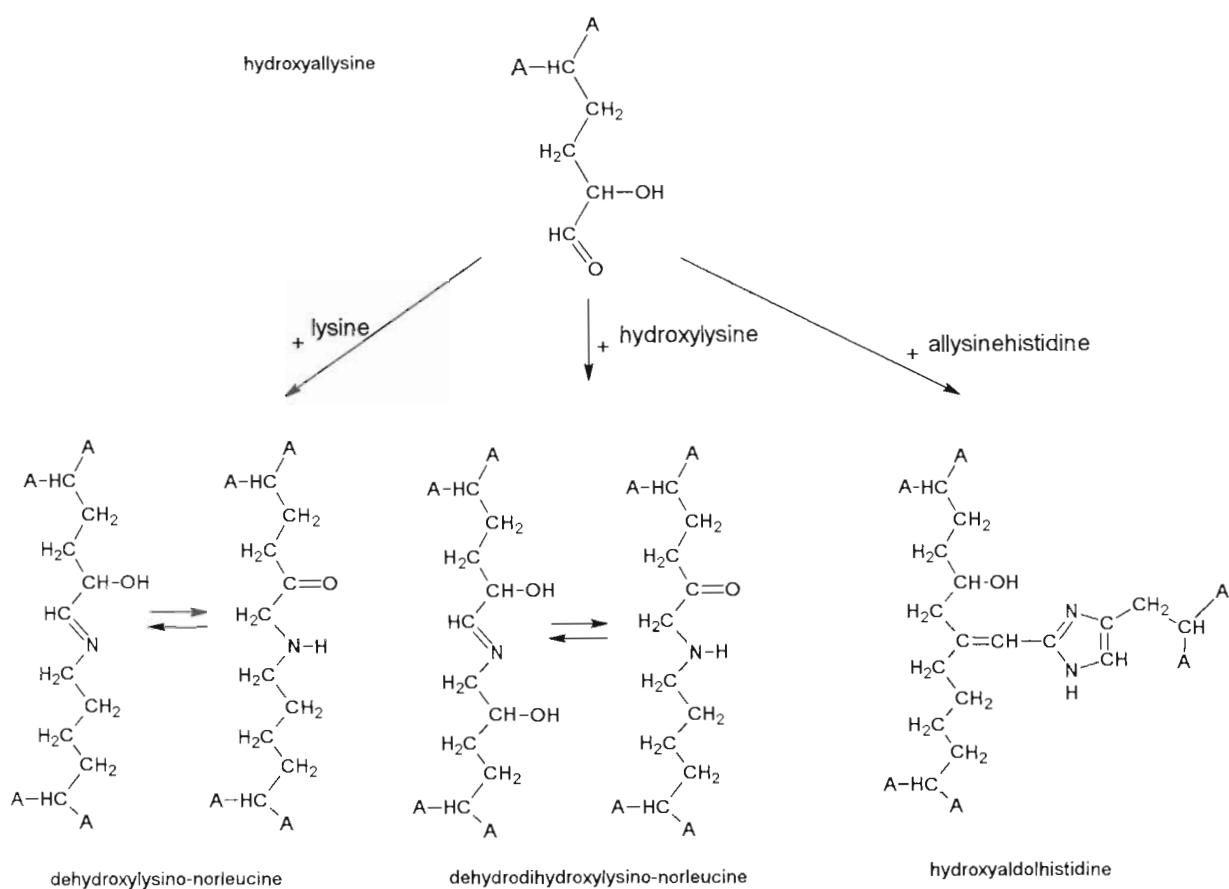
2.4.2.1. Enzymaticky iniciované příčné vazby

Mechanismus vzniku těchto příčných vazeb závisí na specifických enzymech, aminokyselinových zbytcích a kvarterním strukturním uspořádání molekul proteinů. Kolagenní příčná vazba vzniká oxidativní deaminací ϵ -amino skupiny specifických lysinových a hydroxylysinových zbytků v telopeptidové oblasti kolagenu. Tato reakce je katalyzována peptidyllysyl oxidázou. Oxidovaný lysin rychle reaguje s dalšími lysiny nebo hydroxylysinu na lysinonorleucin nebo hydroxylysinonorleucinové příčné vazby.

Do této skupiny enzymatických příčných vazeb patří lysiny a hydroxylysinu odvojené od alysinu a hydroxyalyzinu, které dále reagují se sousedícími aldehydy v polypeptidovém řetězci za vzniku kyselých kondenzačních produktů (ACP) nebo reagují s nemodifikovaným lysinovým a hydroxylysinovým zbytkem za vzniku intermolekulární příčné vazby nazývané dehydroxylysinu-norleucin (de-HLNL), dehydrohydroxylysinu-norleucin (deH-HLNL) nebo dehydrodihydroxylysinu-norleucin (deH-DHLNL). Lysin-norleucinová příčná vazba mezi dvěma kolagenními molekulami může reagovat s dalším lysinem v třetí kolagenní molekulu, která vede k tvorbě trivalentní příčné vazbě.

Keto-iminy patří také do skupiny enzymaticky iniciovaných příčných vazeb. Tyto hydroxy-lysyl-aldehydy podléhají Amadoriho přeuspořádání za tvorby hydroxylysinu-5-ketonorleucinu (HLKNL). Tento keto-imin může být kysele hydrolyzován a poté redukován borohydridem za vzniku dihydroxylysinu-norleucinu (DHLNL) (Obr. 5). V kosti a ostatních kalcifikujících tkáních mohou také vznikat mezi hydroxylysinem a lysinem příčné vazby. Příkladem takové příčné vazby je lysinu-5-ketonorleucin (LKNL).

Reakcí intramolekulárního produktu kyselé aldolové kondenzace (tj. ACP) s histidinem vzniká aldolhistidin a ten může dále reagovat s dalším lysinovým zbytkem za tvorby tetrafunkční příčné vazby histidinohydroxymerodesmosinu (HHMD).



Obr. 5. Schéma biosyntézy kolagenních příčných vazeb odvozených od lysinu a hydroxylysínu (převzato [77]).

Jednotlivé enzymaticky tvořené produkty posttranslačních modifikací

Lysino-norleucin (LNL): Vzniká reakcí allysínu a lysinu (Obr. 6)

Hydroxylysino-norleucin (HLNL): První redukovatelná příčná vazba izolovaná z nativního kolagenu. Tato příčná vazba byla objevena v pokožce [76]. Biosyntéza HLNL se ubírá dvěma směry. Aldimin odvozený od allysínu a hydroxylysínu a ketoforma lysino-5-ketonorleucin odvozený od hydroxyallysínu a lysinu jako výsledek spontánního Amadoriho uspořádání (Obr. 6).

Dihydroxylysino-norleucin (DHLNL): Vzniká odvozením z hydroxyallysínu a hydroxylysínu. Tato příčná vazba se vyskytuje v kosti a dentinu [77] (Obr. 6).

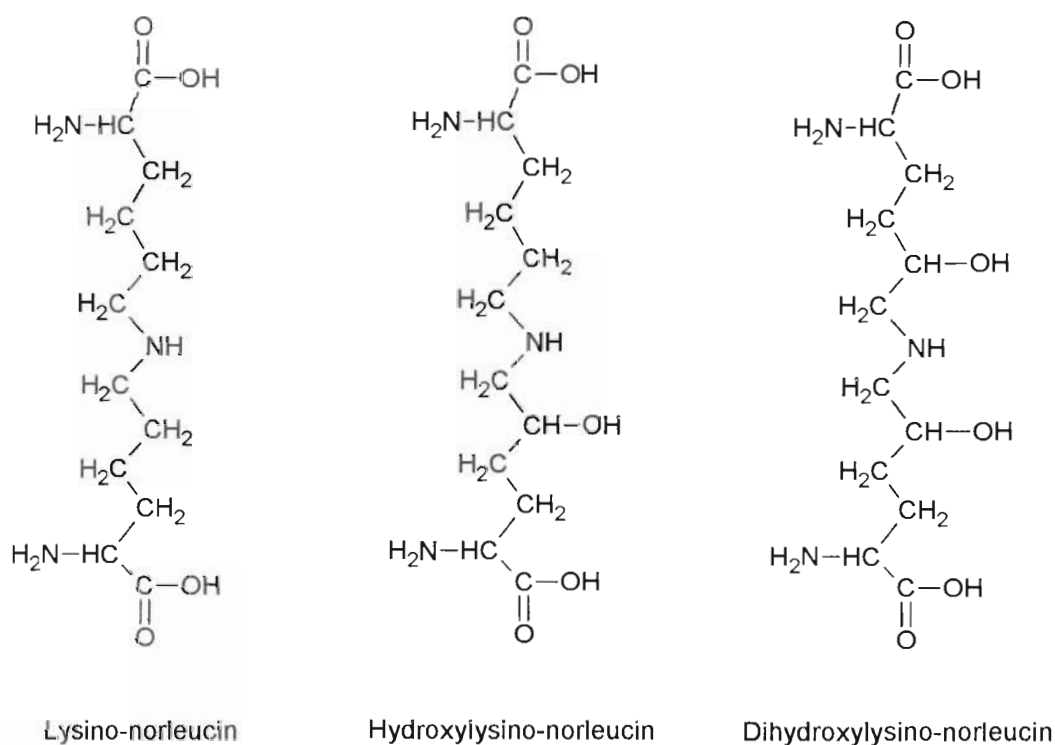
Dehydrohydroxylysinonorleucin (deH-HLNL): Tato intermolekulární příčná vazba byla objevena Baileym [78]. Telopeptidové lysiny obsažené v chrupavkách a kostech jsou vysoce

hydroxylovány za vzniku dehydro-dihydroxylysinonorleucinu, který se většinou přeuspořádá v hydroxylysin-keto-norleucin, deH-HLNL v pokožce [79] reaguje s histidinovým zbytkem za vzniku zralého histidinohydroxylysin-norleucinu (HHLNL) a opět v chrupavce dochází k hydroxylaci telopeptidových lysinu za vzniku hydroxylysyl-pyridinolinu (HL-Pyr).

Histidinohydroxymerodesmosin (HHMD): Je přítomen ve většině kolagenních typů, zejména se nachází v pokožce [80], nedávno byl objeven i v rohovce [81]. Jeho struktura se jeví jako výsledek interakce intramolekulárního produktu aldolové kondenzace s histidinem a hydroxylysinem. (Obr. 7a.)

Aldol-histidin: Je popsán v hovězím kolagenu [77] (Obr. 7b.).

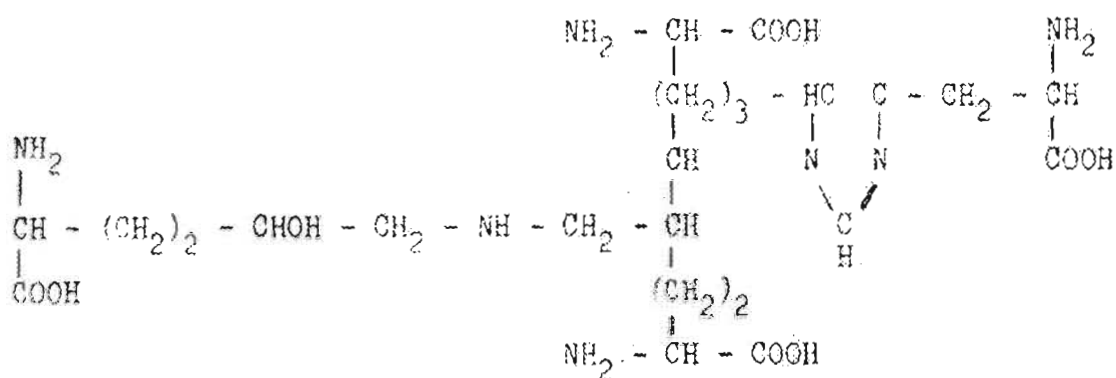
Hydroxyaldolhistidin: Jeho struktura je konzistentní s kondenzačními produkty jako jsou alysin, hydroxyalysin a histidin [77].



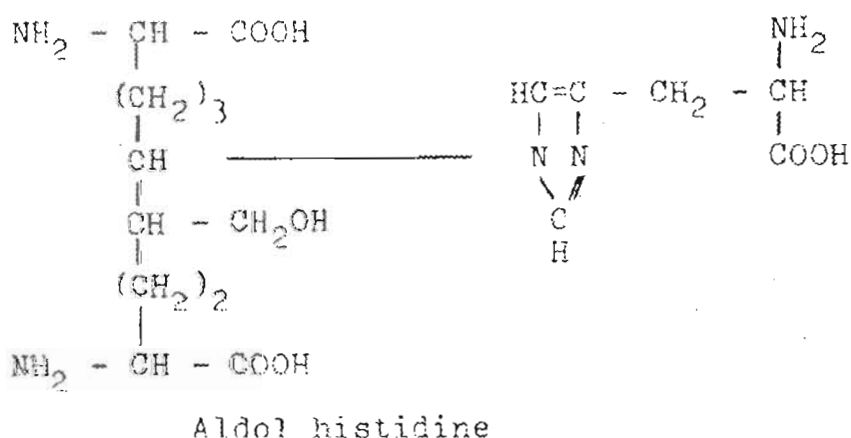
Obr. 6. Lysino-norleucin, hydroxylysino-norleucin, dihydroxylysino-norleucin (převzato [77]).

Pyridinoliny: Tyto příčné vazby jsou stabilní v kyselém prostředí, jsou citlivé k UV záření a fluoreskují. Hydroxylysyl-pyridinolin (HL-Pyr) byl poprvé identifikován Fujimotou a kol. [82], tato vyzrálá příčná vazba je složena ze dvou hydroxylysyl-aldehydových zbytků a hydroxylysinu (Obr. 8 b), proto se dominantně vyskytuje ve více hydroxylovaných kolagenech, jako je kolagen typu II nacházející se v chrupavce. Nízká hladina pyridinolinu je v kosti, kde je částečně zastoupen [83].

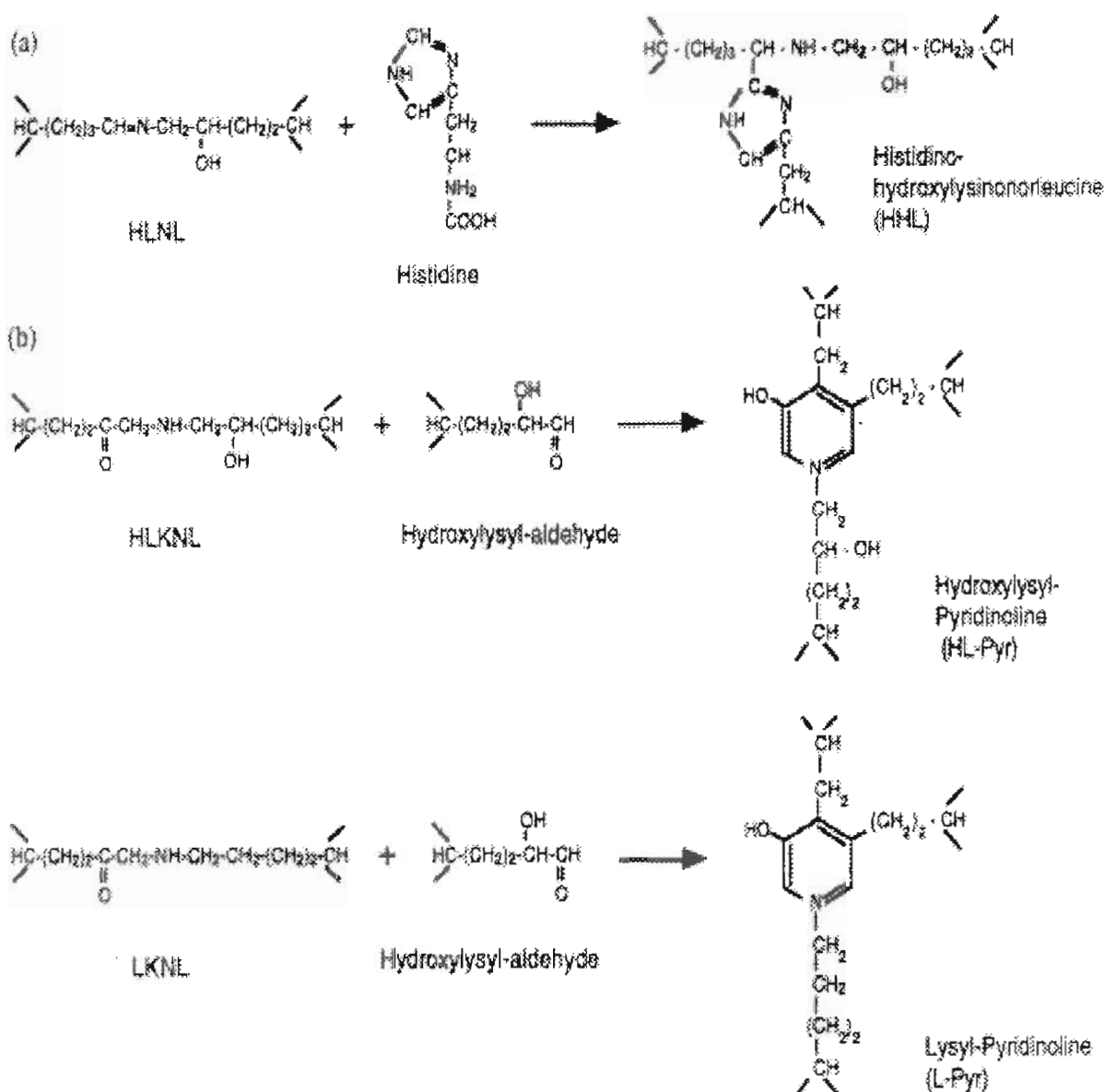
a)



b)



Obr. 7. a) Histidinohydroxymerodesmosin a b) aldol-histidin (převzato [77]).



Obr. 8. Tvorba charakteristických vyzrálých příčných vazeb a) Histidino-hydroxylysinonorleucin (HHL) odvozený od dvojfunkčního hydroxylysinonorleucinu (HLNL) a histidinu b) pyridinoliny odvozené od dvojfunkčních keto-iminů (hydroxylysinono-5-ketonorleucin HLKNL a lysino-5-ketonorleucin LKNL) a aldehydů hydroxylysylových telepeptidů. (převzato [76]).

N-hexosyl-lysin a N-hexosyl-hydroxylysin: Mohou být izolovány z kolagenní chrupavky a pokožky. Vyskytují se fyziologicky v tkáních, nicméně jejich koncentrace stoupá s věkem.

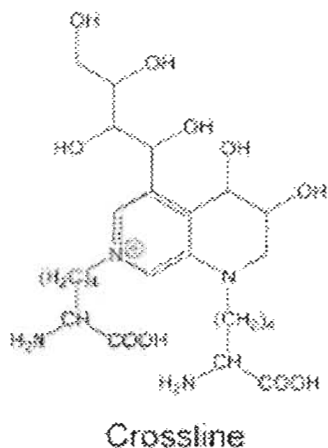
2.4.2.2. Neenzymaticky iniciované příčné vazby

Příčné vazby odvozené od neenzymatické glykace (t.j. reakce volné aminoskupiny aminokyseliny s redukujícím cukrem) se vyskytují zejména u důležitých patobiologických procesů. Patologické efekty procesu nazývaného se neenzymatická glykace se odrážejí v degenerativních změnách během stárnutí, jako jsou chronické komplikace u diabetes mellitus, renálního onemocnění, mohou být také rozpoznány jako neurologické onemocnění - Alzheimerova choroba dále v rozvoji revmatoidní artritidy, osteogenesis imperfecta. Je možné předpokládat, že neenzymatické glykace účinkují jako zesilovače oxidačního poškození. Glykooxidace je spojována se zvýšeným oxidačním stresem. Počet těchto příčných vazeb ve svalových tkáních roste s přibývajícím věkem.

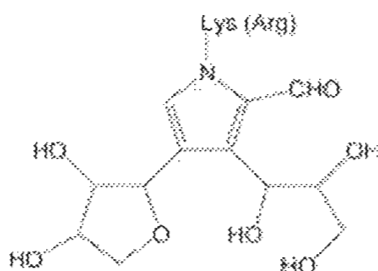
Mezi nejvýznamnější zatím identifikované příčné vazby neenzymatické glykace patří pentosidin (viz níže), dále crossline (Obr. 9) [84], vesperlysiny, (A, B, C) (Obr. 10 a), crossline A a B (Obr. 10 b), 1-alkyl-2-formyl-3,4-diglukosyl-pyrol (AFGP) (Obr. 11), imidazoliové sloučeniny: N,N(-di(N^ε-lysino))-4-metyl-imidazolium (metylglyoxal-lysin dimer, MOLD) izolovaný in vitro inkubací N^α-hippuryllysinu a metyglyoxalu [85] a N,N(-di(N^ε-lysino))imidazolium (glyoxal-lysin dimer, GOLD), ale také pentosidinu-podobné fluorescenční produkty, imidazolysin, dále furosin.

Pentosidin: Fluorescenční příčná vazba s imidazopyridinovou strukturou (Obr. 12 a). Pentosidin byl charakterizován Sellem a Monnierem [86] v lidské plně mozkomíšni. Vzniká reakcí pentózy (ribózy) s amino skupinou lysinu a argininu. Jeho struktura byla ověřena syntézou lysinových a argininových zbytků s pentózou (Obr. 12 b) Dřívější studie dokazují, že pentosidin je ve velké míře nahromaděn v tkáních podléhajícím stárnutí a jeho tvorba v těchto tkáních urychluje průběh diabetu mellitus a urémii [87, 88]. Dále studie ukazují, pentosidin jako glykooxidační marker pokročilé Maillardovy reakce stárnutí, diabetu mellitus, a urémií [89]. Koncentrace pentosidinu je zvýšena ve stárnoucích tkáních bohatých na kolagen [90, 91], dále v oční čočce [92], kde dochází k oxidaci kyseliny askorbové (Obr. 13) a také je zvýšena u diabetické nefropatie [88]. Pentosidin je také přítomen v plazmatických proteinech diabetických pacientů [93], v kožním kolagenu [86, 88, 94, 95], v bazální glomerulární membráně [86, 96]. Typická vlnová délka fluorescence pro tuto příčnou vazbu je $\lambda = 335 \text{ ex}/385 \text{ em}$.

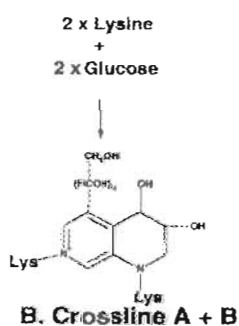
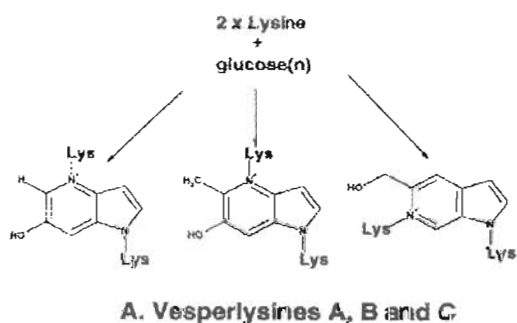
Vesperlysiny: Tři fluorescenční příčné vazby, vesperlysiny A, B a C byly detekovány kyselou hydrolyzou in vitro u glykovaného hovězího albuminu [97].



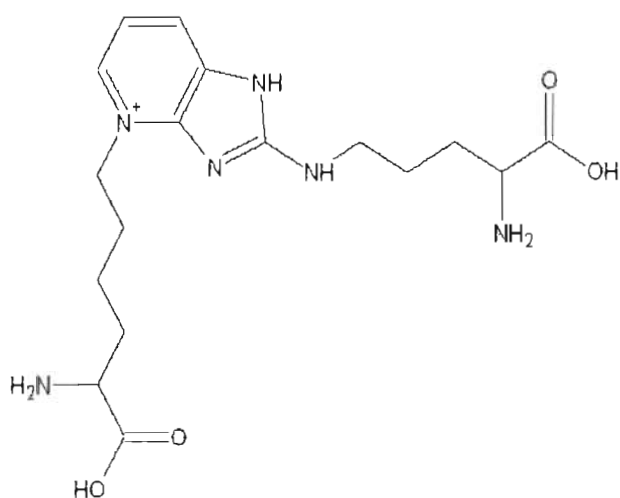
Obr. 9. Struktura crosslinu (převzato [98]).



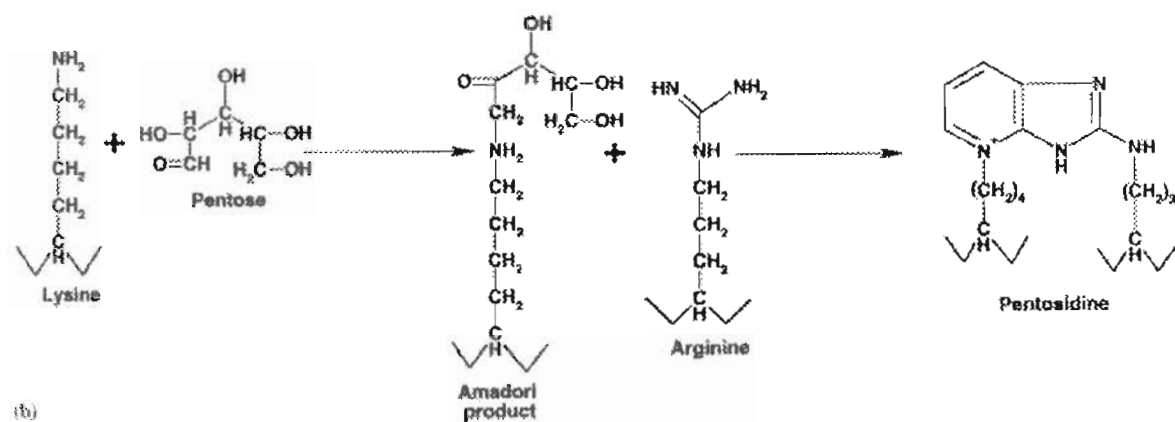
Obr.11. Struktura 1-alkyl-2-formyl-3,4-diglucosyl-pyrol (AFGP) (převzato [98]).



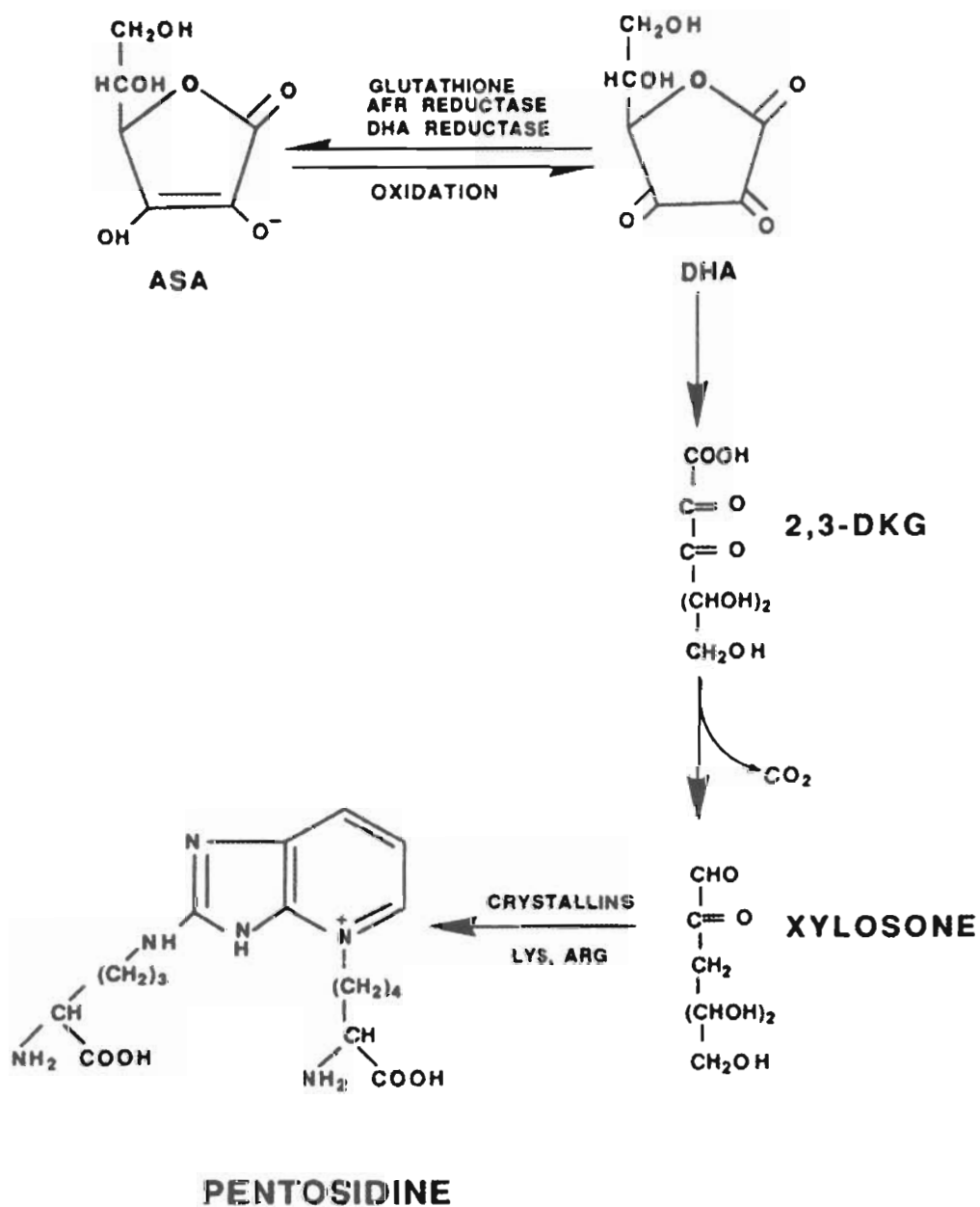
Obr. 10. Reakce dvou lysinů s glukózou za vzniku a) Vesperlysiny A, B a C. b) Crossliny A a B (převzato [76]).



Obr. 12 a. Struktura pentosidinu.



Obr. 12 b. Reakce pentózy (ribózy) s amino skupinou lysinu a argininu za vzniku pentosidinu (převzato [86]).

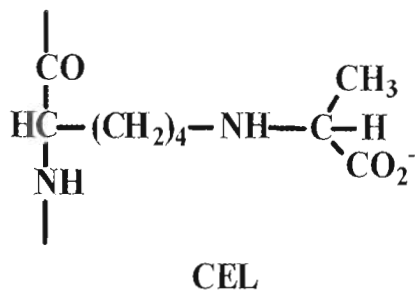
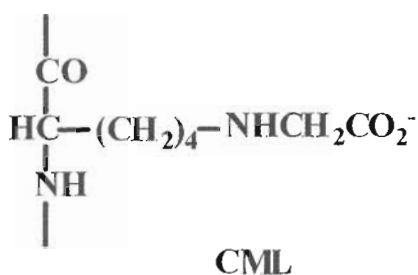


Obr. 13. Rozdíl mezi oxidací kyseliny askorbové a pentosidinu v oční čočce. ASA (kyselina askorbová), DHA (dehydroaskorbová kyselina), 2,3 - DKG (2,3 - deoxyglukoson) (převzato [92]).

Dále mezi lysinové modifikace patří tyto nefluorescenční produkty posttranslačních modifikací:

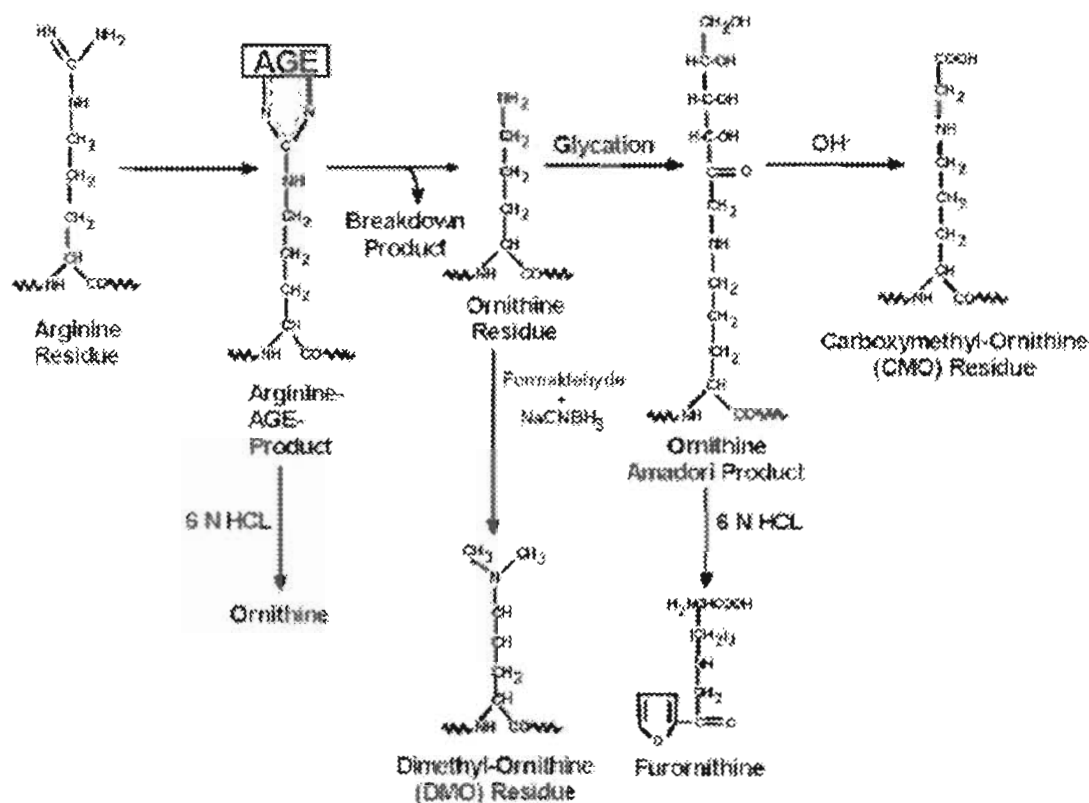
pyralin, karboxymethyllysin (CML), který byl detekován u in vitro glykovaných proteinů v moči a oční čočce [99] (Obr. 14) a karboxyethyllysin (CEL), homolog CML, který byl také detekován v oční čočce a jeho hladina se zvyšuje s věkem [100] (Obr. 15), karboxymethylornithin (CMO) (Obr. 16), N^ω-karboxymethylarginin (CMA) (Obr. 17a) a také α-N^ω-(4-oxo-5-dihydroimidazol-2-yl)-1-ornitin (α-NFC-1) (Obr. 17b).

Pyralin: Je jedním z důležitých pyrolů, jež vzniká během Maillardovy reakce. Pro in vivo studie se konjugát pyralinu používá jako monoklonální protilátka [101]. Pozorování zvýšené pyrazinové imunoaktivity u stárnoucích a diabetických ledvin silně naznačuje proběhlou rozvinutou Maillardovu reakci. Vznik těchto od glukózy odvozených pyrolů má význam pro patologický vznik a vývoj diabetické nefropatie (Obr. 18). Pyralin má také schopnost kondenzovat sám se sebou za tvorby éterových nebo methylenových pyrolových můstků, které mohou představovat příčné vazby mezi kolagenními fibrilami.

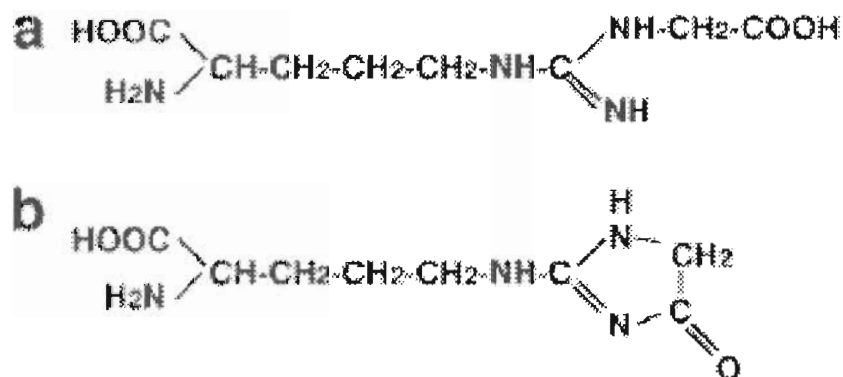


Obr. 14. Karboxymethyllysin (převzato [102]).

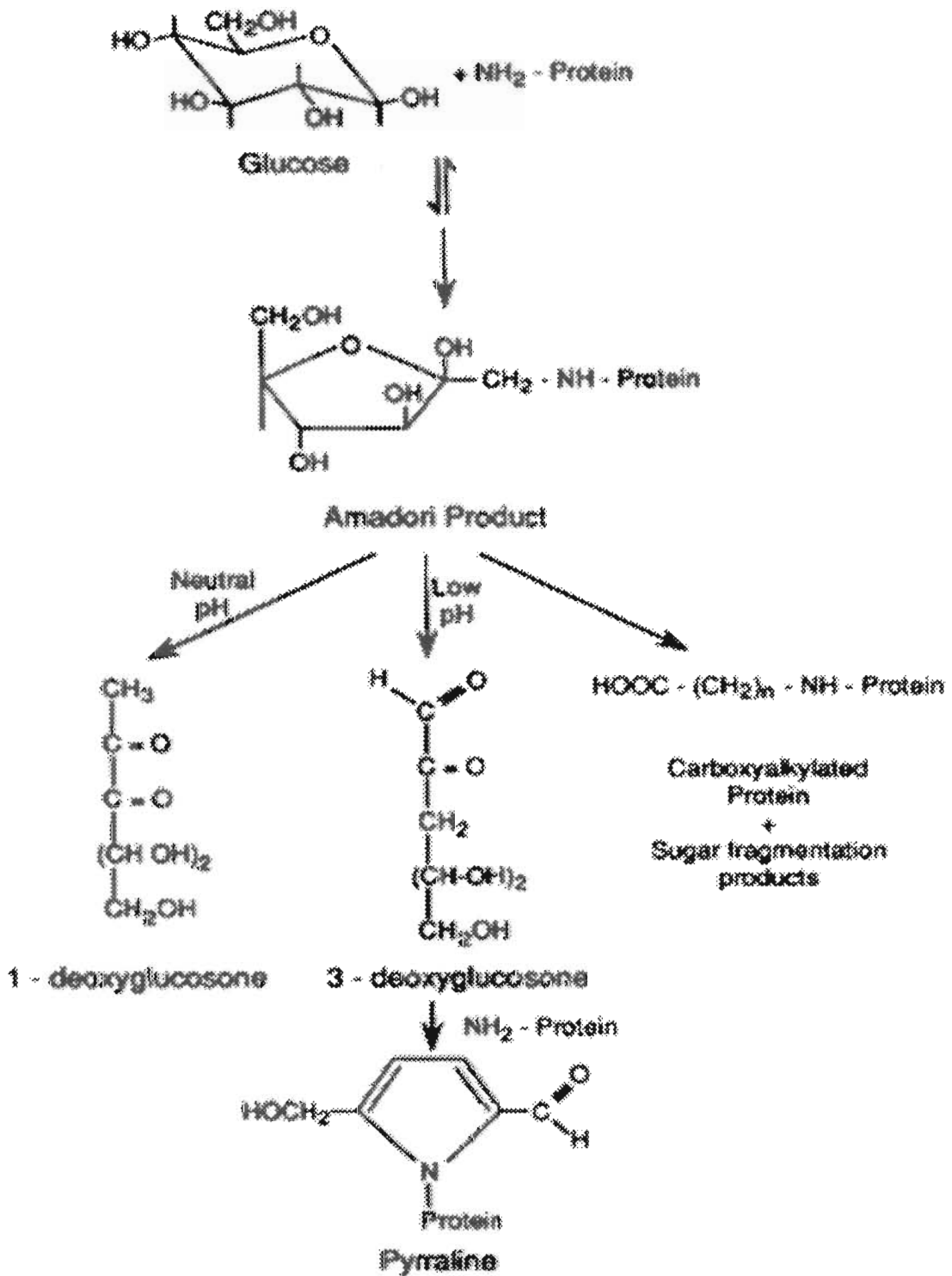
Obr. 15. Karboxyethyllysin (převzato [102]).



Obr. 16. Tvorba karboxymethylornithinu (převzato [103]).



Obr. 17 a) Struktura N⁰- karboxymethylargininu, b) struktura α- N⁰-(4-oxo-5-dihydroimidazol-2-yl)-1-ornithinu (α-NFC-1) (převzato [104]).



Obr. 18. Reakční schéma tvorby pyralinu z glukózy. (převzato [101]).

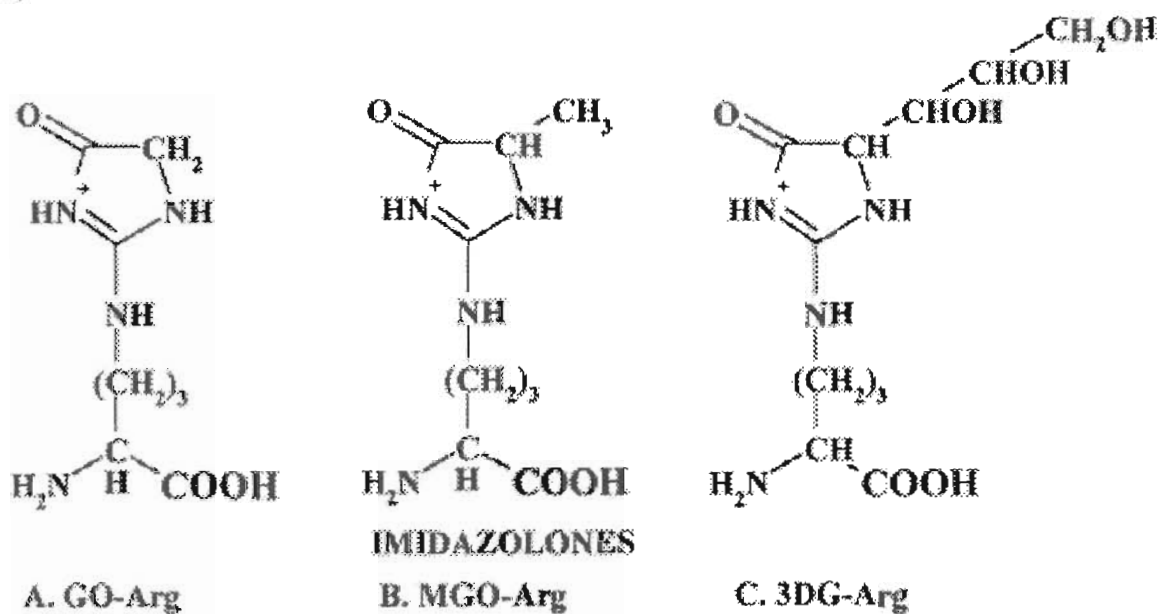
Trióзовé cukry jsou velmi reaktivní, důležitou úlohu hrají glycerinaldehyd a glycerinaldehyd-3-fosfát. Nově objevené triosidinové příčné vazby mají významnou úlohu v posttranslační modifikaci kolagenů [105]. Inkubací glycerinaldehydu s N(α)-acetyl-L-lysinem a N(α)-acetyl-L-argininem byly izolovány čtyři nové pyridinové složky Maillardovy reakce nazývané triosidiny. Dva z nich lysin-hydroxy-triosidin[1-(5-amino-5-karboxypentyl)-3-[(5-amino-5 karboxypentylamino)methyl]-5-hydroxypyridinium] a arginin-hydroxy-triosidin [2-(4-amino-4-karboxybutylamino)-8-[(5-amino-5-carboxypentyl)-6-hydroxy-3,4-dihydro-pyrido[2,3d]pyrimidin-8-ium] jsou fluorescenční, lysin-lysin a lysin-arginin příčné vazby. Jejich struktura byla identifikována pomocí NMR a hmotnostní detekce. Další dva UV-aktivní lysinové adukty, trihydroxy-triosidin [1-(5-amino-5-karboxypentyl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyridinium] a triosidin karbaldehyd [1-(5-amino-5-karboxypentyl)-3-formylpyridinium] byly také identifikovány pomocí MS. Všechny struktury vyžadují šest derivovaných uhlíků jako část heterocyklického kruhu. Pouze nová příčná vazba arginin-hydroxy-triosidin byla vytvořena z glycerinaldehydu-3-fosfátu jako metabolický meziprodukt glykolýzy. Lysin-hydroxy-triosidin a arginin-hydroxy-triosidin byli detekováni v lidské a prasečí rohovce.

Mezi argininové modifikace řadíme sloučeniny jako jsou hydroimidazolony a argpyrimidiny.

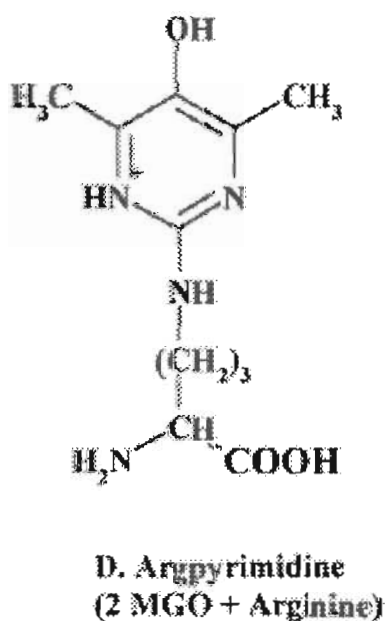
Tyto příčné vazby jsou tvořeny modifikací argininových zbytků v kolagenu. Imidazolony vznikají reakcí glyoxalu, methylglyoxalu a 3-deoxyglukosonu s argininovým zbytkem [106]. Argpyrimidiny jsou naopak tvořeny reakcí dvou methylglyoxalových molekul a argininové peptidové vazby [107] (Obr. 19). Tato sloučenina byla popsána Shipanovou [108]. Do těchto modifikací patří i zmiňovaný N^ω-karboxymethylarginin (CMA) (Obr. 17a)

Arginine Modifications

(A.)



(B.)



Obr. 19. Argininové modifikace, a) Imidazolony b) Argpyrimidin (převzato [76]).

2.5. Separace, analýza a identifikace produktů posttranslačních modifikací

V současnosti nejpoužívanější metody pro charakterizaci proteinů využívajících technik MS spojené se separačními technikami jsou (HPLC, 2-DE, CE). Tyto techniky umožňují stanovení velkého počtu analytů, které musíme separovat a charakterizovat v jedné globální analýze směsi proteinů. Zatímco projekt sekvence lidského genomu pracoval s desítkami tisíc genů [109], celkový počet možných proteinů v organismu se odhaduje až v řádu milionů [110]. Proteiny jsou značně různorodé, liší se velikostí, nábojem i hydrofobicitou. Mnohé z nich jsou navíc posttranslačně modifikovány nebo tvoří komplexy s jinými proteiny, či nukleovými kyselinami, ale i např. s kovy apod.

Cesta k odhalení všech lidských proteinů bude ještě dlouhá a namáhavá, protože je třeba charakterizovat každý protein kódovaný lidským genomem, porozumět jeho funkci, struktuře, molekulárním interakcím, vzájemnou provázaností jejich tvorby a regulacím v různých typech buněk a za různých fyziologických podmínek.

2.5.1. Separace proteinů

Jednou z nejvyužívanějších metod při proteomické analýze je kombinace vysokoúčinné dvoudimenzionální gelové elektroforézy (2-DE) sloužící k separaci proteinů, s hmotnostní spektrometrií (MS) využívanou k identifikaci proteinových skvrn z gelů. Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE) je dnes základní metodou separace komplexních proteinových směsí. Nejprve jsou proteiny v prvním směru rozděleny podle svých nábojů (podle izoelektrických bodů, pI), a poté v kolmém směru podle svých molekulových hmotností. Výsledkem je tzv. proteinová mapa, v níž každý protein zaujímá charakteristickou pozici. Přes své nesporné přednosti má 2-DE některé nedostatky, např. nízkou účinnost solubilizace membránových proteinů a omezení v dělení hydrofobních proteinů či proteinů o extrémní velikosti nebo náboji [111]. Elektroforeticky separované proteiny jsou přímo na gelu štěpeny proteázou (typicky trypsin) a výsledné peptidy jsou vyextrahovány a identifikovány hmotnostní spektrometrií technikou matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) nebo electrospray ionization (ESI-MS). V pokročilém stádiu může být ale také spojena i s technikou HPLC-MS. Signály peptidů a jejich fragmentů jsou určeny s takovou přesností, že

porovnání píků určitého peptidu a jeho fragmentace s databázemi (např. Swiss-Prot/TrEMBL) vede k identifikaci proteinu včetně jeho modifikací [112].

Vedle přístupu kombinujícího 2-DE s hmotnostní spektrometrií se objevují nové, na gelové elektroforéze nezávislé přístupy, jedním z nich je např. technologie multidimenzionální proteinové identifikace (MudPIT-multidimensional protein identification technology).

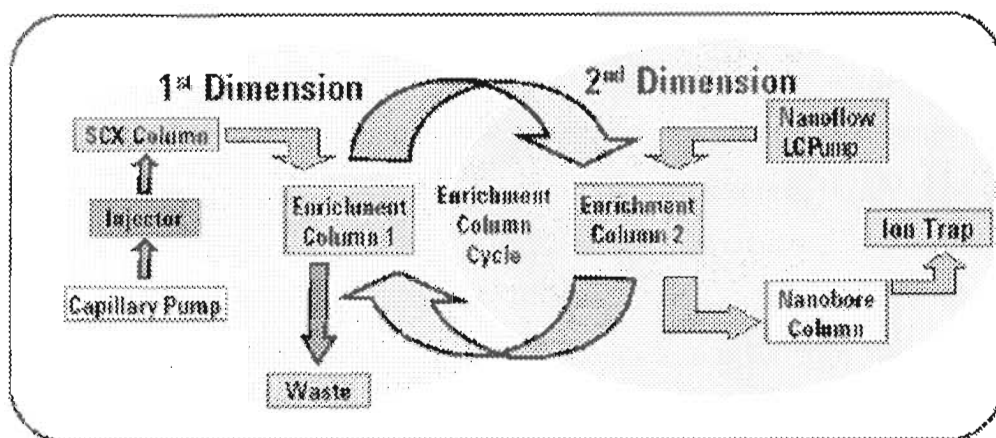
Jiný přístup, který je založený na hmotnostní spektrometrii, využívá izotopem kódované afinitní značky (ICAT-isotope coded affinity tags), které reagují se sulfhydrylovými skupinami proteinů a obsahují raménko, které může být deuterované, a biotinovou značku. Objevují se i další postupy separace jako je technika diferenčního fluorescenčního značení proteinů (DIGE) či fluorescenční detekce separovaných proteinů.

Pro stanovení a kvantifikaci peptidů se používá i elektromigračních metod. Metodu RP- HPLC lze také použít pro stanovení směsi peptidů, ale tato metoda je více účinnější ve spojení HPLC/CE.

Studium proteomiky využívá nové hmotnostně spektrometrické metody (MS), zabývající se zejména vyhodnocením peptidů a produktů glyko-oxidací, které mají lépe porozumět roli neenzymatické glykace u chronických onemocnění a v procesu stárnutí [113].

Pro peptidovou/proteinovou analýzu se ukázala jako slibná metoda spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Metodou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) lze spolehlivě kvantifikovat peptidy a následně i proteiny

Nejpoužívanější MS technikou v analýze proteinů či peptidů je v současnosti beze sporu hmotnostní spektrometrie s ionizací MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [114], ale také MALDI time of flight-MS (MALDI-TOF-MS), pro identifikaci proteinů se využívá také 2DE HPLC/MS. Nejjednodušší způsob realizace 2DE-HPLC je zobrazen na (obr. 20) [115]. V první dimenzi je vzorek obsahující peptidy vzniklé enzymatickým štěpením směsi proteinů nanesen automatickým dávkovačem na kolonu obsahující silný katex. Každá z frakcí je nejprve vedena na rekoncentrační kolonku, kde dojde k zachycení eluovaných peptidů. Poté dojde k přepnutí rekoncentrační kolonky do druhé dimenze (průtok řízený např. nano pumpou) a postupným gradientem organické fáze dochází k vymytí peptidů na analytickou kolonu.



Obr. 20. Online 2DE-HPLC se semikontinuálním gradientem [115].

2.5.2. Aplikace proteomiky v analýze proteinů

Proteomiku lze podle aplikací rozdělit do tří hlavních oblastí [116]. První je mikrocharakterizace proteinů, která se využívá pro identifikaci proteinů a pro studium jejich posttranslačních modifikací. Mikrocharakterizace proteinů nám pomáhá zjistit, jaká je aktivní a funkční forma, ve které se proteiny vyskytují v organismu. Druhou oblastí je tzv. srovnávací proteomika, zabývající se porovnáváním hladin proteinů. Tato technika je velmi důležitá a používaná pro studium rozdílných stavů organismu, např. patologických či normálních, a pro vyhledávání proteinů, jejichž výskyt či hladina daný stav charakterizují. Výsledky srovnávací proteomiky mohou být využitelné při diagnostice a léčbě řady nemocí. Poslední oblastí je studium interakcí typu protein-protein. Sledování interakcí typu protein-protein může sloužit např. k identifikaci multienzymových komplexů či k hledání substrátu a ligandů pro enzymy a receptory.

2.5.3. Analýza produktů posttranslačních modifikací (glykací)

In vitro a in vivo glykace vedou jak k polymerizaci různých proteinů tak i k tvorbě monotypicky navázaných molekul na proteinu. Pro určení stupně glykace bílkovin je užíváno mnoha rozdílných metod [117], [118]. K analýze polymerizovaných proteinů se používá gelová elektroforéza, lze také použít některý z typů gelové permeační chromatografie. Pro analýzu monotypických proteinových modifikací se používá iontově-výměnné

chromatografie [45] nebo některé metody fokusace (chromatofokusing, izoelektrická fokusace). K analýze některých typů glykací (modifikace proteinů využívající reaktivity vicinálních hydroxy skupin cukrů) lze použít metody afinitní chromatografie. V současné době je s oblibou používána borátová afinitní chromatografie [119]. V posledních letech byl zaznamenán velký pokrok v oblasti přímého spojení separačních a spektrálních technik. V prvním kroku se směs látek rozdělí separační technikou vhodnou pro danou směs např. HPLC technikou, (např. HPLC metoda byla také vyvinuta a použita pro stanovení glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} [76], [120]), kapilární elektroforézou, nebo planární chromatografií a ve druhém kroku po rozdělení látek se vhodnou spektrální metodou (např. hmotnostní spektrometrie, UV/VIS spektrometrie, IČ spektrometrie) získají strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. V optimálním případě je možné identifikovat jednotlivé složky neznámé směsi nebo alespoň částečně odvodit jejich struktury [114]. Pro stanovení hemoglobinu HbA_{1c} bylo vyvinuto více technik než jen HPLC. Mezi nejčastěji používané metody řadíme iontově-výměnnou chromatografii, afinitní chromatografii, isoelektrofokusing, spektrofotometrické metody a imuno metody [121].

Pro stanovení vznikajících produktů posttranslačních modifikací se používají chromatografické techniky mezi něž řadíme plynovou chromatografii (GC) a kapalinovou chromatografii. Pro stanovení glykovaných aminokyselin a peptidů [113], byly použity techniky spřažené s hmotnostní detekcí jako jsou LC-ESI-MS. Technika matrix-assisted laser-desorption ionization-MS (MALDI-MS) byla také použita pro proteinovou analýzu [122], např. sloučenina známá jako N^ω-karboxymethylarginin (CMA) byla identifikována pomocí MALDI-MS a magnetické rezonance. Pro stanovení proteinů se také používá technika nazvaná fast atom bombarded (FAB-MS), tato technika byla poprvé použita pro zjištění hladiny pentosidinu [86], pro stanovení karboxymethyllysinu byla použita plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC/MS) [65]. Další již zmiňovanou technikou pro stanovení posttranslačních produktů je borátová afinitní chromatografie, iontově výměnná chromatografie. Také sem patří metody jako jsou polyakrylamidová gelová elektrochromatografie, chromatofokusing, SDS-PAGE, také nukleární magnetická rezonance (NMR spektra), imuno metody jako jsou enzymoimunoanalýzy (enzyme-linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) a radioimunoanalýzy (radioimmunoassay, RIA) [101], [123] se používají zejména pro stanovení karboxymethyllysinu (CML) [65], karboxyetyllysinu (CEL), karboxymethylornitinu (CMO) a pentosidinu [86], [124], [90]. Fluorescenční příčné vazby se stanovují zejména fluorescencí. Triosidiny jsou stanovovány HPLC technikou s fluorescenční detekcí.

3. CÍLE PRÁCE



Cílem předložené práce bylo získat poznatky o glykaci (neenzymatické glykosylaci) pojivových bílkovin včetně údajů o chemické povaze látek, které při glykačních reakcích vznikají.

Jednotlivými cíly práce bylo:

Odhalit změny kolagenu u experimentálních zvířat v závislosti na jejich fyziologickém stavu (hypertriglyceridemická zvířata, dlouhodobé podávání cukru) v rozdílných tkáních se zaměřením na příčně-vazebný element-pentosidin.

Vyvinout účinné analytické metody a postupy umožňující analýzu posttranslačně modifikovaných proteinů. Tyto metody zahrnují metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie, kapilární elektroforézy, jejich vzájemného propojení a také i přímé spojení s hmotnostní spektrometrií. Vyvinuté metodiky aplikovat na analýzu modifikací konkrétních bílkovin – albumin a kolagen.

Pokusit se identifikovat reaktivní místa modifikací a identifikovat vzniklé modifikace.

Porovnat reaktivity jednotlivých látek (oxo-sloučenin) s bílkovinami, a to vedle analyticko-separačních metod i spektrálními metodami.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



4.1. CHEMIKÁLIE

Všechny uvedené chemikálie použité pro tuto studii byly dostupné/vysokém stupni čistoty. Triflourooctová kyselina, acetonitril, metanol, chloroform, heptafluorbutyrová kyselina, fenol, 2-merkptoetanol, Tris(hydroxymetyl)aminometan hydrochlorid (Tris-HCl) byly získány od firmy (Merk, Darmstadt, Germany) fenyliothiokyanát byl získán od firmy Pierce (Rockford, IL, USA), kolagen typu I, glukóza, ribóza, glyoxal, glutaraldehyd, kolagenáza (E.C. 3.4.24.3., 0.8 U/mg), 1-heptansulfonát sodný, lysin, bromkyan, malondialdehyd a N^α-acetylarginin, BIS (N,N-metylenbis-akrylamid) a akrylamid, amonium persulfát (APS), bromfenolová modř (3,3',5,5'-tetrabromfenolsulfoftalein), tetrametyletylendiamin (TEMED), glycerol, SDS, proteinové molekulární markery (ovalbumin, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, karboanhydráza, trypsinogen, laktaalbumin), diglycin, tetraglycin, pepsin, trypsin, albumin byly získány od Sigmy (St. Louis, MO, USA), HCl, NaCl, chlorid vápenatý a fosfát sodný byly získány od Lachemy (Brno, Česká Republika), octová kyselina od Lach-Ner (Neratovice, Česká Republika), glycin byl získán od Reanal (Budapešť, Hungary). Všechny roztoky byly připraveny z ultra čisté vody milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA),

4.2. INSTRUMENTACE

4.2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie a vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

V této studii bylo použito přístroje HPLC 1100 LC/MSD (Hewlett-Packard, Agilent, Palo Alto, CA, USA), skládajícího se z degaséru, binární pumpy, autosampleru, termostatované kolony, spektrofotometrického detektoru. Pro spojení HPLC s MS byla použita ionizace elektrosprejem za atmosférického tlaku (API-ESI-MS). Tento HPLC systém byl také použit pro analýzu kolagenu typu I, kde byly použity detektory s diodovým polem. Pro ověření pentosidinu bylo použito fluorescenčního detektoru. Tento HPLC systém byl také spojen s iontovou pastí hmotnostního spektrometru (Agilent LC-MSD Trap XCT-Ultra).

4.2.2. Kapilární elektroforéza a kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií

Pro stanovení kolagenu typu I byla použita kapilární elektroforéza typu P/ACE 5000 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), sestávající se z křemenné kapiláry délky 40/47 nebo 50/57 cm k detektoru, spektrofotometrického detektoru. Pro stanovení posttranslačních modifikací byla elektroforéza spojena s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí (Agilent LC-MSD Trap XCT-Ultra) a byla použita křemenná kapilára o délce 100 cm a průměru 75 μm

4.2.3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Elektroforéza byla provedena systémem Mini-Protean 3-Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

4.3. MATERIÁL A METODY

4.4. POKUSY *IN VIVO*

4.4.1. Zvířata pro pokusy

Vzorky kůže, aort a ocasních šlach byly odebrány z potkanů kmene Wistar, Lewis a HTG chovaných v oddělení experimentální hypertenze Fyziologického ústavu AVČR. HTG potkani byli vyselektováni z původního kmene Wistar. Laboratorní potkani byli chováni odděleně po jednom v každé chovné nádobě a krmeni dietou DOS 2b. Zvířata vybraná pro pokusy byla šest měsíců stará. Při pokusu byli potkani rozděleni do dvou skupin. První (kontrolní) skupinu tvořila zvířata krmená standardní dietou. Druhou skupinu tvořila zvířata napájená vodou o vyšším obsahu fruktózy (10%).

4.4.2. Zpracování tkání

Byly odebrány části thorakální aorty (2-4 cm dlouhé), vzorky dorzální kůže (4x4 cm) a vzorky ocasních šlach (kolagenní vlákno). Ze vzorků byla odstraněna přebytečná tkáň, materiál byl omyt izotonickým roztokem NaCl a delipidován pomocí postupné extrakce v chloroformu a methanolu 2:1(v/v) po dobu 3 dnů. Poté byly vzorky vloženy do roztoku

NaCl, kde se louhovaly další tři dny. Nakonec byly vzorky tkání omyty vodou a vysušeny (24h při 110 °C).

4.4.3. Měření pentosidinu

Vzorky proteinů (kůže, ocasních šlach a aort) byly kyselé hydrolyzovány v 1 ml HCl (6 mol/l HCl s 2 % fenol) po dobu 20h při 110 °C pod dusíkovou atmosférou. Poté bylo 200 μ l hydrolyzátu zlyofilizováno a rozpuštěno v 25 μ l 2 % heptafluorobutyrové kyselině (HFBA) a 10 μ l vzorku bylo nastříknuto na HPLC kolonu (Atlantis; reverse-phase C18; 50 x 3,9 i.d. mm; Waters). Eluce probíhala v gradientu: A) voda s 0,1 % HFBA a B) acetonitril s 0,085 % HFBA od 0 % B do 9 % B po dobu 2 min, gradient pokračoval od 9 % do 17 % B po dobu 21 min, dále 25 min od 17 % do 100 % B. Poté byla kolona ekvilibrována 100 % A 10 minut. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a kolona byla temperována na 40 °C. Eluent byl sledován pomocí fluorescenčního detektoru při 332ex/378em.

4.4.4. Příprava pentosidinového standardu

Pentosidinový standard byl připraven dle modifikované metody popsané Dyerem a spol. [125]. Připravený vodný roztok (1000 ml, 100 mmol/l N^a-acetylarginin, lysin a glukóza v 200 mmol/l fosfátovém pufru o pH 9.0) byl zahříván při 65 °C jeden den. Poté byl vodný roztok lyofilizován a tento produkt byl dále extrahován ve 200 ml methanolu. Po odpaření methanolu byl zbytek rozpuštěn ve 150 ml vody (s 0,1 % HFBA) a 1 ml alikvotu byl extrahován na Sep-Pak C-18 kolonce (Waters). Frakce bohatá na pentosidin byla eluována s 15 % acetonitrilem (s 0,1 % HFBA). Eluát byl zkoncentrován, vysušen a rozpuštěn v 1 % trifluoroctové kyselině (TFA). Pentosidin byl přečištěn ve dvou krocích pomocí HPLC na Supelcosil LC-3 18 koloně (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m, 300 Å). Přítomnost pentosidinu byla potvrzena měřením jeho fluorescenčního spektra.

4.4.5. Aminokyselinová analýza

K aminokyselinové analýze byla použita metoda předkolonové derivatizace s fenyloxykarbonylchloridem (PICO-TAG systém; Waters), poté následovala separace výsledného produktu na HPLC na obrácené fázi (C₁₈; Pico-Tag kolona 300 x 3,9 i.d. mm; Waters) v acetátovém pufru (pH 6,4; 0,14 mmol/l) v acetonitrilovém gradientu. Kyselá hydrolyza byla provedena v parách HCl s 1 % fenolem (6 mol/l HCl při 105 °C) po dobu 18 hodin. Hydrolyzát byl odpařen do sucha a opět rozpuštěn ve vodě k odstranění kyseliny.

Všechna data byla vyjádřena s relativní standardní odchylkou (SD). Statistické analýzy dat byly provedeny výpočtem použitím Studentova *t*-testu, se statisticky významnou odchylkou $P \leq 0,05$.

4.5. POKUSY IN VITRO

4.5.1. Příprava glykovaných vzorků

4.5.1.1. Příprava glykovaného vzorku hovězího sérového albuminu

Hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 1 mg/ml byl rozpuštěn v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 7,4 a inkubován při 37°C (96 h) s jednotlivými sloučeninami obsahujícími oxo-skupinu (glukóza, ribóza, glyoxal, glutardialdehyd). Koncentrace všech reaktantů byly 100 mmol/l. Za stejných podmínek byly inkubovány kontrolní skupiny.

4.5.1.2. Příprava glykovaného vzorku kolagenu typu I.

Kolagen typu I (z hovězí kůže) o koncentraci 10 mg/10ml byl suspendován v 0,2 M fosfátovém pufru o pH 7,4 a inkubován při 37 °C po dobu 48 h s jednou z následujících oxo-sloučenin: glukózou (180 mg/10 ml), ribózou (150 mg/10 ml) nebo malondialdehydem (164 μ l/10 ml). Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány (2000 g/5 min), supernatant odstráнен a zbytek byl dvakrát promyt vodou a centrifugován. Za stejných podmínek byly inkubovány kontrolní skupiny.

4.5.1.3. Odsolení vzorků albuminu

Vzorky byly odsoleny na kolonce Econo-Pac 10 DG (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nejprve byla kolonka promyta puftrem (20 mmol/l NH_4HCO_3 , pH = 7,8) v dalším kroku byla kolonka naplněna 3 ml vzorku albuminu (1 mg/ml), tímto vzorkem byla kolonka promyta, následně byla kolonka opět promyta 4 ml připraveného pufru a tyto frakce již byly sbírány. Vzorky byly poté lyofilizovány.

4.5.2. Štěpení vzorků

4.5.2.1. Štěpení vzorků hovězího sérového albuminu (BSA)

Odsolené vzorky albuminu byly naředěny na koncentraci 3 mg/ml ve 20 mmol/l NH_4HCO_3 pufru o pH = 7,8 a štěpeny trypsinem (1:50, enzym:substrát). Kontrolní vzorky byly připraveny za stejných podmínek inkubací vzorku s enzymem. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 36 hodin. Poté následovala 5-ti minutová centrifugace při 2000 x g, supernatant obsahoval naštípané peptidy, vzorky byly uchovány při -18 °C.

4.5.2.2. Štěpení vzorků kolagenu typu I

4.5.2.2.1. Štěpení kolagenu kolagenázou

Kolagen (1mg/ml) byl štěpen bakteriální kolagenázou v poměru (kolagen/kolagenáza, 50:1, w/w). Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 48 h v kolagenázovém aktivačním pufru (200 mmol/l NH_4HCO_3 , 1 mmol/l CaCl_2 , pH =7,8). Kontrolní vzorek byl připraven inkubací vzorku s enzymem za stejných podmínek jako vzorek kolagenu. Po inkubaci byly vzorky 5 min centrifugovány při 2000 x g. Supernatant byl oddělen a uchován při -18 °C.

4.5.2.2.2. Štěpení kolagenu proteinázou K

Kolagen (1mg/ml) byl štěpen proteinázou K v poměru (kolagen/proteináza, 50:1, w/w). Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 48 h v 10 mM Tris-HCl pufru o pH 7,5. Kontrolní vzorek byl připraven inkubací vzorku s enzymem za stejných podmínek jako vzorek kolagenu. Po inkubaci byly vzorky 5 min centrifugovány při 2000 x g. Supernatant byl oddělen a uchován při -18 °C.

4.5.2.2.3. Štěpení kolagenu bromkyanem a následné štěpení trypsinem

Vzorky kolagenu byly nejdříve redukovány merkaptoethanolem (25 %) v 200 mM NH_4HCO_3 o pH 7, po dobu 18 hodin. Merkaptoethanol byl odpařen a vzorek zlyofilizován. K 5 mg vzorku byly přidány 2 ml 70 % HCOOH a roztok byl pod dusíkovou atmosférou probublán dusíkem. Poté bylo přidáno 35 mg krystalického CNBr, opět probubláno dusíkem a ponecháno stát při laboratorní teplotě (25 °C) 20 hodin. Poté byl CNBr odpařen na vyhřívané plotýnce. K odparku bylo přidáno 10 ml H_2O a byl zlyofilizován. Lyofilizát byl rozpuštěn ve 2

ml H₂O. Vzorky kolagenu byly následně štěpeny trypsinem (kolagen/trypsin, 50:1, w/w) a inkubovány při 37 °C po dobu 48 h v pufru (200 mmol/l NH₄HCO₃ pH =7,8). Kontrolní vzorky byly připraveny za stejných podmínek. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 5 min. při 2000 x g supernatant oddělen a uchován při - 18 °C.

4.5.2.3. Příprava interního standardu pro CE albuminu

0,48 mg diglycinu a 0,48 mg tetraglycinu bylo rozpuštěno ve 100 µl základního pufru, pro analýzu byly přidány do vzorku 2 µl diglycinu a 1 µl tetraglycinu jako interní standardy pro porovnání migračních časů jednotlivých vzorků.

4.5.2.4. Příprava interního standardu pro CE kolagenu

0,1 mg diglycinu (Gly-Gly) bylo rozpuštěno ve 100 µl vody (1 mg/ml). Během experimentu bylo do první frakce vzorku přidáno 10 µl diglycinu, do druhé frakce 6 µl diglycinu, do třetí frakce 23 µl diglycinu, do čtvrté 6 µl diglycinu, do páté frakce 11 µl diglycinu, do šesté frakce 10 µl diglycinu a do sedmé frakce 15 µl diglycinu.

4.5.3. Analýza hovězího sérového albuminu (BSA)

4.5.3.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) neštěpeného BSA

Chromatografická analýza neštěpeného BSA byla provedena na koloně Supelcosil LC-304 (25 cm x 4,6 mm, i.d., 30 nm velikost pórů, 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA). Bylo nastříknuto 10 µl vzorku (1 mg/ml). Vzorek byl eluován pomocí lineárního gradientu mezi mobilními fázemi: A (voda s 1% HCOOH) (v/v) a B (methanol-voda 75:25 s 0,75 % HCOOH) (v/v), kdy gradient 0-100 % (v/v) B probíhal 50 min při průtoku mobilní fáze 4ml/min, poté následovala eluce 100 % B po dobu 5 min. Před další analýzou byla kolona promyta 20 min puftrem A. Kolona byla temperována na teplotu 25 °C. Neštěpený albumin byl detekován při vlnové délce $\lambda=280$ nm.

4.5.3.2. HPLC analýza peptidů tryptického štěpení BSA

Kolona Zorbax Eclipse XDB-18 (150 mm x 2,1 mm, i.d., 10 nm velikost pórů, 5 µm), Rockland Technologies (Hewlett-Packard) byla použita k separaci tryptických štěpů BSA. Byl proveden nástřik 10 µl vzorku (1 mg/ml). Separace vzorku bylo dosaženo pomocí lineárního gradientu mezi mobilními fázemi: A (voda s 0,1 % HCOOH) a B (methanol-

acetonitril 1:1 s 0,075 % HCOOH). Gradient probíhal od 0 do 100 % B 50 min při průtoku mobilní fáze 0,25 ml/min, následovala eluce 100 % B po dobu 5-ti minut. Kolona byla před každou analýzou ekvilibrována 5-ti minutovým promytím pufrem A a temperována na teplotu 25 °C. Tryptické štěpy albuminu byly detekovány při vlnové délce $\lambda=214$ nm.

4.5.3.3. HPLC/MS analýza neštěpeného albuminu

Chromatografická analýza neštěpeného BSA byla provedena na koloně Supelcosil LC-304 (25 cm x 4,6 mm, i.d., 30 nm velikost pórů, 5 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA). Bylo nastříknuto 10 μ l vzorku (1 mg/ml). Vzorek byl eluován pomocí lineárního gradientu mezi mobilními fázemi: A (voda s 1% HCOOH) (v/v) a B (methanol-voda 75:25 s 0,75 % HCOOH) (v/v), kdy gradient 0-100 % (v/v) B probíhal 50 min při průtoku mobilní fáze 4ml/min, poté následovala eluce 100 % B po dobu 5 min. Před další analýzou byla kolona promyta 20 min pufrem A. Kolona byla temperována na teplotu 25 °C. Neštěpený albumin byl detekován při vlnové délce $\lambda=280$ nm.

HPLC/ESI-MS analýza byla provedena pomocí kvadrupólového hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem za atmosférického tlaku (API-ESI) v pozitivním módu. Analýza probíhala za následujících podmínek (podmínky analýzy byly optimalizovány metodou FIA, flow injection analysis): průtok sušícího plynu (N_2) 10 L/min; teplota sušícího plynu 350 °C; nebulizační tlak $1,7 \times 10^5$ Pa (25 psi); napětí na kapiláře 4500 V; hmoty iontů byly měřeny v rozmezí m/z (jejich poměru náboje/hmota) 200-1500; fragmentor byl nastaven na 80 V.

4.5.3.4. HPLC/ESI-MS analýza peptidů tryptického štěpení albuminu

Tato analýza byla provedena pomocí kvadrupólového hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem za atmosférického tlaku (API-ESI) v pozitivním módu. Analýza probíhala za následujících podmínek (podmínky analýzy byly optimalizovány metodou FIA, flow injection analysis): průtok sušícího plynu (N_2) 10 L/min; teplota sušícího plynu 350 °C; nebulizační tlak $1,7 \times 10^5$ Pa (25 psi); napětí na kapiláře 4500 V; hmoty iontů byly měřeny v rozmezí m/z (jejich poměru náboje/hmota) 200-1500; fragmentor byl nastaven na 80 V.

4.5.3.5. Kapilární elektroforéza (CE) neštěpeného albuminu

Separace byla provedena při 10 kV v křemenné kapiláře (47 cm celková délka, 40 cm k detektoru, 75 μ m I.D.) při 20 °C. K detekci byl použit fotometrický UV detektor (214 nm). Separace vzorků probíhala ve fosfátovém pufu jako základním elektrolytu (50 mmol/l, pH =

2,5). Vzorky byly naředěny vodou (1:1) a nastříknuty hydrodynamicky (3,45 kPa, 1s). Před analýzou byla kapilára promyta pufrem (4 min). Po analýze byla kapilára promyta pufrem (1 min), vodou (1 min), 1 mol/l NaOH (3 min), vodou (1 min), 3 mol/l HCl (1 min) a vodou (1 min).

4.5.3.6. Kapilární elektroforéza peptidů tryptického štěpení albuminu

Separace byla provedena v křemenné kapiláře (57 cm celková délka, 50 cm k detektoru, 75 μm I.D.) při 20 °C. K detekci byl použit fotometrický UV detektor (214 nm). Separace vzorků probíhala ve fosfátovém pufru jako základním elektrolytu (50 mmol/l) a dvou pH (7,0 a 2,5). CE separace byla provedena při 15 kV (pH 7,0); nebo při 10 kV v případě pH 2,5. Vzorky byly naředěny vodou (1:1) a nastříknuty hydrodynamicky (3,45 kPa, 1 s). Před analýzou byla kapilára promyta pufrem (5 min). Po analýze byla kapilára promyta pufrem (1 min), vodou (1 min), 1 mol/l NaOH (3 min), vodou (1 min), 3 mol/l HCl (1 min) a vodou (1 min).

4.5.3.7. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) modifikovaného BSA

Polyakrylamidová elektroforéza byla provedena na soupravě BIORAD Mini-PROTEAN III. Separační gel (10 %) byl připraven smícháním 2,45 ml vody; 1,25 ml Tris-HCl (1,5 mol/l; pH 8,8); 50 μl SDS (10 % (w/v)); 1,25 ml akrylamidu (30 % w/v) a bis-methylenakrylamidu (0,8 % (w/v)); 25 μl amonium persulfátu (APS) (10 % (w/v)) a 25 μl TEMEDU. Gel polymeroval 45-60 min při pokojové teplotě. Poté byl připraven řadící gel (4 %) smícháním 3,05 ml vody; 1,25 ml Tris-HCl (0,5 mol/l; pH 6,8); 50 μl SDS (10 % (w/v)); 0,65 ml akrylamidu (30 %) a bis-methylenakrylamidu (0,8 %); 25 μl APS (10 % (w/v)) a 5 μl tetramethylethylendiaminu (TEMED). Tento gel se převrstvil na separační gel. Polymerace řadícího gelu trvala 35-45 min. Lyofilizované vzorky proteinů byly rozpuštěny ve vzorkovém pufru (4 ml destilované vody; 1 ml 0,5 M Tris-HCl; pufru o pH 6,8; 0,8 ml glycerinu; 1,6 ml 10 % SDS; 0,4 ml 2-merkaptetanol a 0,2 ml 0,05 % bromfenolové modře) a povařeny po dobu jedné minuty a aplikovány na elektroforézu (4-20 μl). Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě 60-90 min při 150 V. Proteiny byly gely obarveny Coomassie brilliant blue (0,25 % (m/v)) a následně odbarveny 1 % (v/v) kyselinou octovou po dobu 120 min. Výsledky separace byly naskenovány plošným skenerem (hp scanner 7400c; Hewlett-Packard).

Metoda aminokyselinové analýzy (viz. kap. 4.4.5.) byla také použita pro analýzu vzorků kolagenu.

4.5.4. Analýza kolagenu

4.5.4.1. Separace peptidů kolagenu štěpeného kolagenázou na obrácené fázi HPLC

Chromatografická separace byla provedena na koloně Jupiter Proteo 9 nm, 250 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), s použitím Synergi MAX-RP, 4 mm x 2.0 ID předklonky. Separace bylo dosaženo pomocí lineárního gradientu mezi mobilní fází A (voda-trifluoroctová kyselina, 100:0,1; v/v) a B (acetonitril-trifluoroctová kyselina, 100/0,085; v/v). Koncentrace mobilní fáze byla lineárně zvýšena od 0 % B do 30 % B po dobu 30 min a od 30 % B do 100 % B po dobu dalších 20-ti minut. Kolona byla promyta 100 % B dalších 5,5 minut. Průtok mobilní fáze kolonou byl 0,25 ml/min, kolona byla temperována na 25 °C, eluát byl měřen UV detekcí při $\lambda = 214$ nm. Bylo sbíráno sedm frakcí (v čase od 0 od první frakce do 32,1 min v poslední frakci).

4.5.4.2. Kapilární elektroforéza peptidů kolagenu štěpeného kolagenázou

Separace byla provedena při 10 kV v křemenné kapiláře (57 cm celkové délky, 50 cm k detektoru, 75 μ m I.D.) při 20 °C. K detekci byl použit absorpční UV detektor (214 nm). Separace vzorků probíhala ve 100 mM heptansulfonátu sodném (jako iontově párující činidlo) rozpuštěném v 100 mM fosfátovém pufru o pH 2,5 jako základním elektrolytu. Vzorky byly nastříknuty hydrodynamicky (3,45 kPa, 10 s). Před analýzou byla kapilára promyta pufrem (4 min). Po analýze byla kapilára promyta pufrem (1 min), vodou (1min), 1 mol/l NaOH (3 min), vodou (1 min), 3 mol/l HCl (1 min) a vodou (1 min).

4.5.4.3. HPLC/MS analýza modifikovaného kolagenu štěpeného CNBr/trypsinem

Chromatografická separace byla provedena na koloně Jupiter Proteo 9 nm, 250 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Separace probíhala v lineárním gradientu mezi mobilní fází A (voda-kyselina trifluoroctová, 100:0,03; v/v) a fází B (acetonitril-kys. trifluoroctová, 100:0,025; v/v). Separace byla nejdříve izokratická po dobu 2 minut 2 % mobilní fáze B, poté separace pokračovala gradientovou elucí do 35 % B po dobu 40 minut. Nakonec byla kolona 10 promývána 100 % B. Před každou analýzou byla kolona ekvilibrována promytím 2 % mobilní fází B po dobu 10 minut. Průtok mobilní fází byl 0,25 ml/min, kolona byla temperována na teplotu 25 °C. Absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 214 nm.

MS/MS analýza byla provedena pomocí on-line spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí při ionizaci elektrosprejem za atmosférického tlaku (API-ESI) (Agilent XCT-Ultra). Analýza probíhala za následujících podmínek: průtok sušícího plynu (N_2) 10 L/min; teplota sušícího plynu 350 °C; nebulizační tlak $1,7 \times 10^5$ Pa (25 psi); hmoty iontů byly měřeny v rozmezí m/z, 100-2200 (MS-standardní mód, MS/MS- rozšířený mód); Analýza byla provedena v auto MS/MS módu, fragmentor byl nastaven na 80 V.

4.5.4.4. Kapilární elektroforéza peptidů kolagenu štěpeného CNBr/trypsinem

Separace byla provedena při 10 kV v křemenné kapiláře (57 cm celkové délky, 50 cm k detektoru, 75 μ m I.D.) při 20 °C. K detekci byl použit fotometrický UV detektor (214 nm). Separace vzorků probíhala ve 100 mM heptansulfonátu sodném (jako iontově párující činidlo) rozpuštěném v 100 mM fosfátovém pufru o pH 2,5 jako základním elektrolytu. Vzorky byly nastříknuty hydrodynamicky (3,45 kPa, 10 s). Před analýzou byla kapilára promyta puftrem (4 min). Po analýze byla kapilára promyta puftrem (1 min), vodou (1 min), 1 mol/l NaOH (3 min), vodou (1 min), 3 mol/l HCl (1 min) a vodou (1 min).

4.5.4.5. Kapilární elektroforéza peptidů kolagenu štěpeného CNBr/trypsinem ve spojení s hmotnostní spektrometrií (CE/MS)

Separace byla provedena při 15 kV v křemenné kapiláře (100 cm celkové délky, 20 cm k detektoru, 75 μ m I.D.) při 20 °C. K detekci byl použit fotometrický UV detektor (214 nm). Separace vzorků probíhala v 3,3 M CH_3COOH jako základním elektrolytu. Vzorky byly nastříknuty hydrodynamicky (3,45 kPa, 50 s). K analýze byl použit spektrometr s iontovou pastí (Agilent LC-MSD Trap XCT-Ultra). Průtok obalové (sheath) kapaliny o složení 5 mM octan amonný/izopropanol; (1:1; v/v) byl 3 μ l/min.

Před analýzou byla kapilára promyta puftrem (20 min). Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára rovněž promyta puftrem (5 min). Po analýzách byla kapilára promyta puftrem (1 min), vodou (1 min), 1 mol/l NaOH (20 min), vodou (1 min), 3 mol/l HCl (20 min) a vodou (1 min).

Podmínky MS analýzy byly stejné jako u HPLC/MS kromě těchto hodnot: průtok sušícího plynu (N_2) 8 l/min; teplota sušícího plynu 150 °C; nebulizační tlak 5 psi; napětí na kapiláře 3500 V; hmoty iontů byly měřeny v rozmezí m/z, 100-1500 (MS-standardní mód, MS/MS-rozšířený mód); analýza byla provedena v auto MS/MS módu.

Vzorky kolagenu inkubovaného s ribózou, malondialdehydem (MDA) a glukózou byly porovnány s kontrolními vzorky kolagenu.

4.5.4.6. Lyofilizace

Lyofilizace vzorků byla provedena pomocí přístroje Janetzky LGA-OS za vakua při teplotě -20 °C po dobu 24 hodin.

4.5.5. Spektroskopická měření

Absorbance v rozmezí 190-400 nm byla měřena pomocí ChromSpec spektrofotometru (Weiss, Jena, NDR). Vzorky kolagenu typu I, kůže a šlach byly pro měření naředěny 1 : 3 a štěpeny proteinázou K nebo kolagenázou. Měření bylo provedeno proti kontrolnímu vzorku.

5. VÝSLEDKY

5.1. POKUSY *IN VIVO*

5.1.1. Analýza pentosidinu

5.1.1.1. Aminokyselinová analýza

Obsah kolagenu a elastinu byl stanoven aminokyselinovou analýzou tj. obsahem glycinu (okolo 33 % zbytků v kolagenu a elastinu), hydroxyprolinu (specifický pro kolagen) a histidinu (okolo 13 % v elastinu) u vzorků tkání (kůže, šlacha a aorta) zkoumaných kontrolních a fruktózou krměných laboratorních potkanů

Aminokyselinová analýza však neprokázala žádné signifikantní rozdíly v obsahu kolagenu a elastinu u kontrolních zvířat a zvířat krměných fruktózou. Obsah elastinu byl vyšší (okolo 30 % suché váhy) u všech vzorků aort v porovnání se vzorky šlach a kůží (všech skupin potkanů), což bylo očekáváno, ale žádné jiné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami potkanů (HTG, Wistar a Lewis) nebyly prokázány.

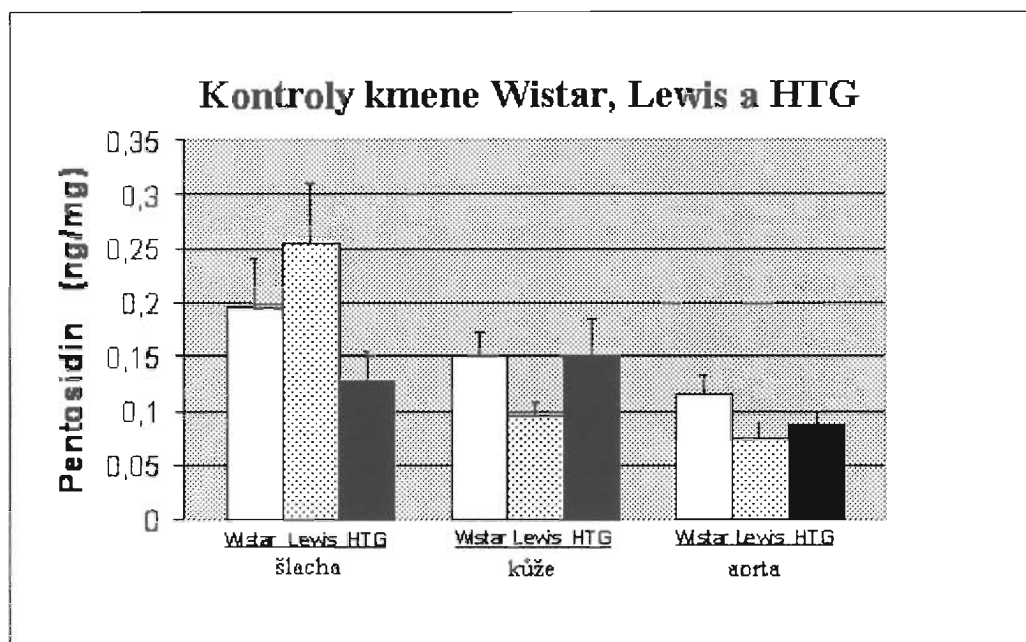
5.1.1.2. Měření pentosidinu

Pro tyto experimenty byly použity potkani kmene Wistar, Lewis a HTG. Tyto kmeny byly vybrány jako zástupci reprezentující genetický model hypertenzí s doprovodnými metabolickými poruchami lipidového a sacharidového metabolismu [126]. Bylo předpokládáno, že právě modely těchto laboratorních zvířat jsou vhodné pro studium posttranslačních produktů glykace způsobené lipoperoxičnými a glykačními reakcemi.

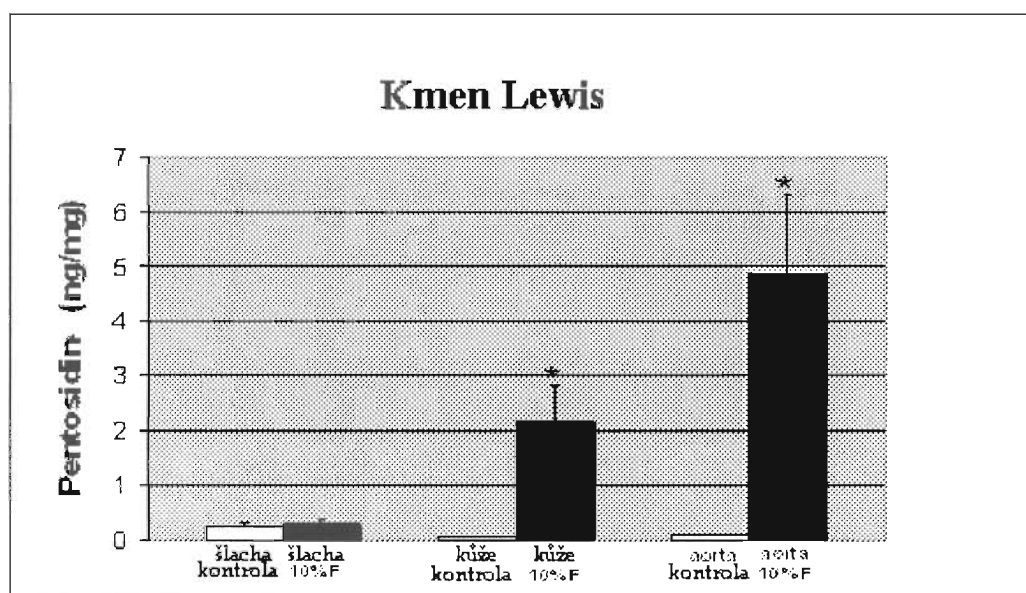
U potkanů napájených vodou není koncentrace pentosidinu u těchto tři skupin laboratorních zvířat (Wistar, Lewis, HTG) významně rozdílná (Obr. 20). Bylo popsáno, že koncentrace glukózy v krvi není za těchto podmínek významně rozdílná [127]. Proto není asi překvapením, že hladina pentosidinu (příčně vazebného produktu posttranslační neenzymatické modifikace) není signifikantně rozdílná.

U potkanů napájených vodou s 10 % fruktózou je situace rozdílná. Množství pentosidinu bylo signifikantně zvýšeno příjmem fruktózy v potravě u všech sledovaných skupin potkanů, u vzorků aort a kůže, ale také u vzorků šlach HTG potkanů (Obr. 21,22,23). Je třeba zdůraznit, že hladiny glukózy v krvi byly zvýšeny o 60-80 % u zvířat pijících vodný roztok fruktózy, oproti kontrolním zvířatům pijícím vodu [127]. Bylo zjišřeno, že množství pentosidinu v šlachách potkanů (Wistar a Lewis) napájených vodným roztokem fruktózy je vyšší než u kontrolních zvířat (rozptyl hodnot je také vyšší). Lze konstatovat, že hladiny

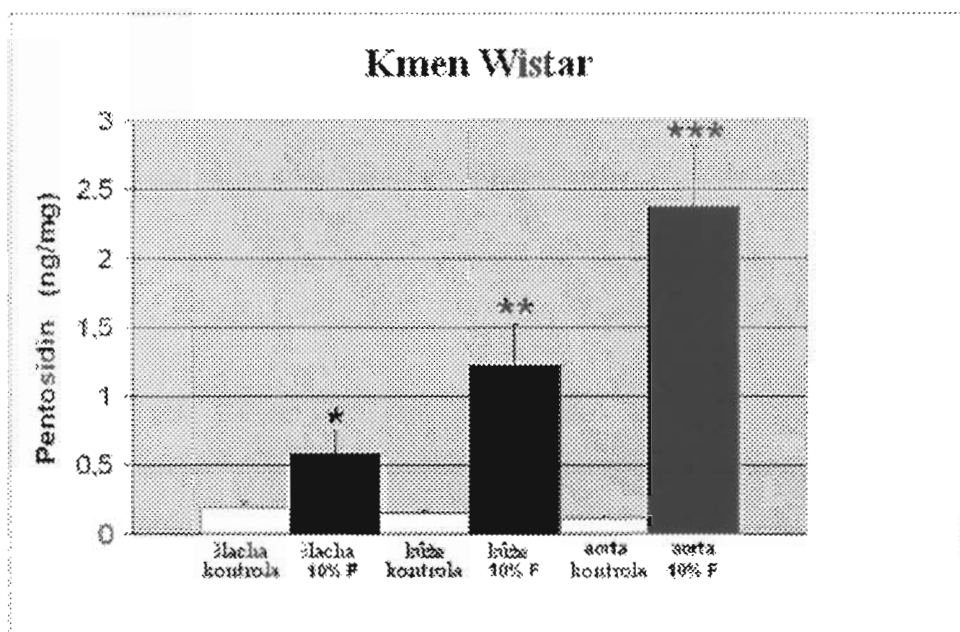
pentosidinu ve vzorcích šlach, aort a kůží potkanů napájených roztokem fruktózy jsou statisticky významně vyšší.



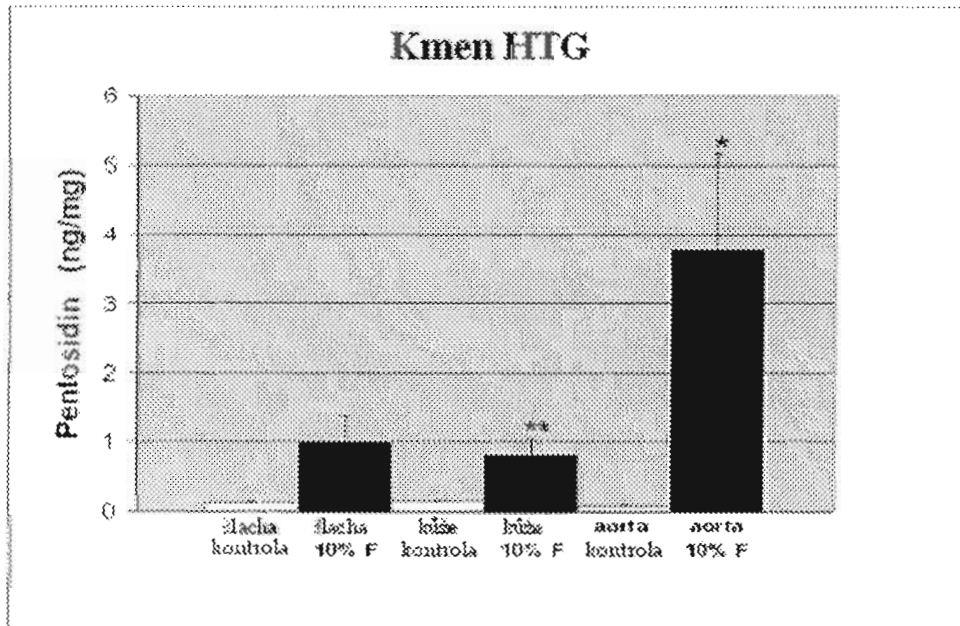
Obr. 20. Obsah pentosidinu u kontrolních potkanů: ocasní šlachy, kůže a aorty HTG, Wistar, Lewis. Koncentrace je vyjádřena jako ng/mg celkového proteinu.



Obr. 21. Obsah pentosidinu v tkáních potkanů kmene Lewis: kontrolní potkani a potkani napájeny vodou s 10 % fruktózy (10 % F). Statistická signifikace: $*P < 0.02$. Koncentrace je vyjádřena jako ng/mg celkového proteinu.



Obr. 22. Obsah pentosidinu v tkáních potkanů kmene Wistar: kontrolní potkani a potkani napájeny vodou s 10 % fruktózy (10 % F). Statistická signifikace: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ a *** $P < 0.001$. Koncentrace je vyjádřena jako ng/mg celkového proteinu.



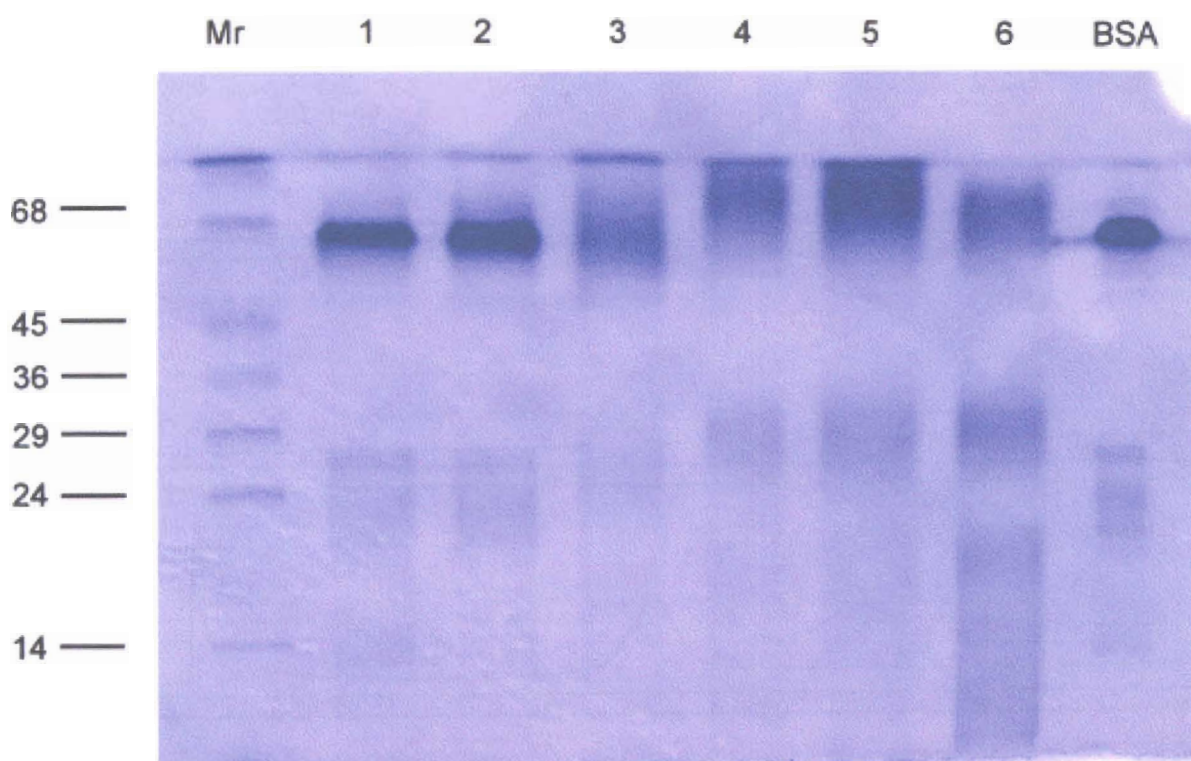
Obr. 23. Obsah pentosidinu v tkáních potkanů kmene HTG: kontrolní potkani a potkani napájeny vodou s 10 % fruktózy (10 % F). Statistická signifikace: * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$. Koncentrace je vyjádřena jako ng/mg celkového proteinu.

5.2. POKUSY IN VITRO

5.2.1. Analýza hovězího sérového albuminu (BSA)

5.2.1.1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza modifikovaného BSA

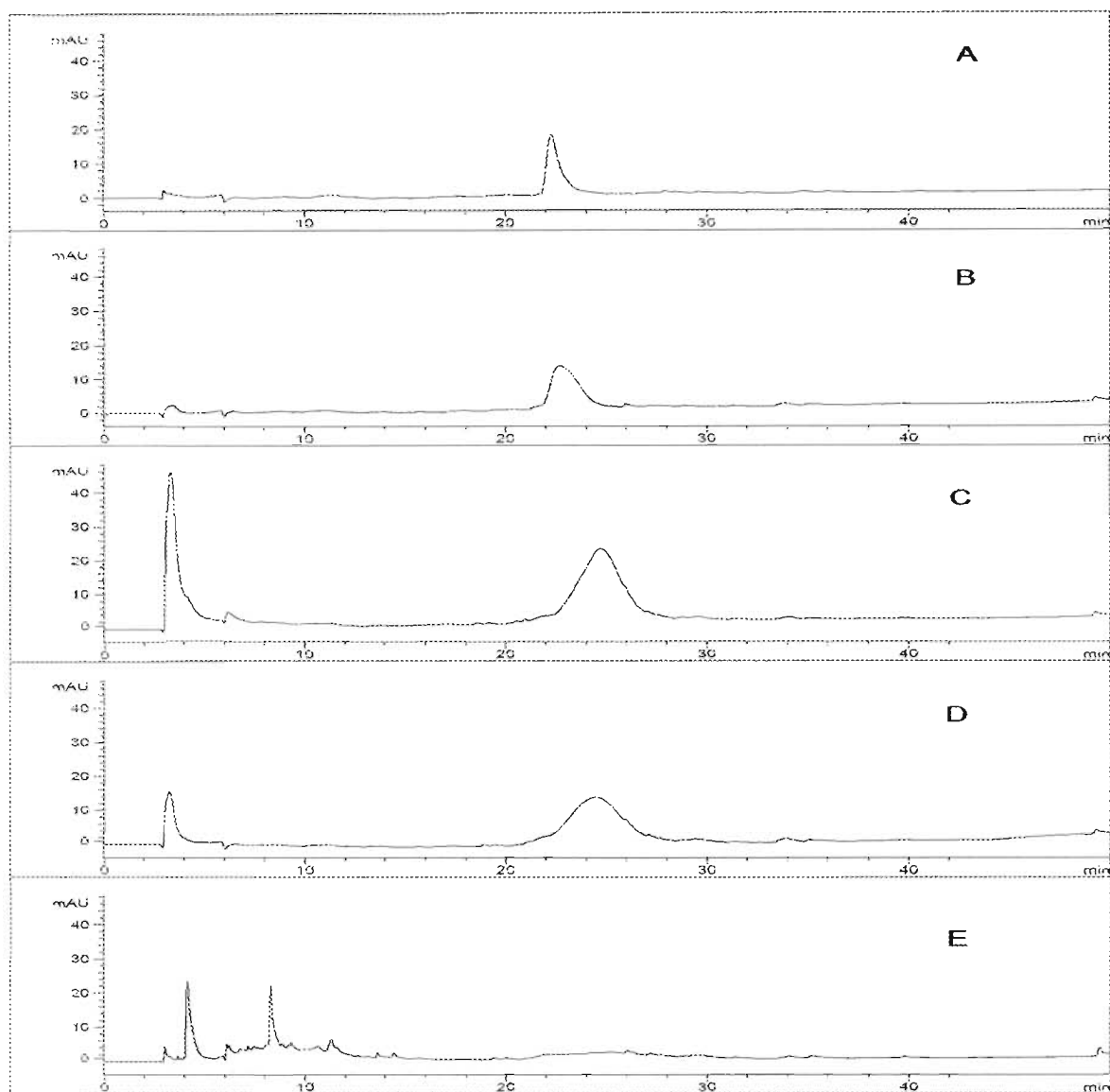
Na obr. 24 je prezentovaná polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) modifikovaného hovězího sérového albuminu rozdílnými oxo sloučeninami. Nemodifikovaný BSA a albumin podrobený reakci s glukózou vykazuje na gelu jednu ostrou zónu okolo relativní molekulové hmotnosti 66×10^3 (molekulová hmotnost albuminu), zatímco modifikovaný albumin s rozdílnými oxo sloučeninami (glukóza, ribóza, glyoxal, glutardialdehyd) vykazuje malou změnu zóny BSA v rozmezí vyšších molekulových hmotností s doprovodným jevem rozšiřující se zóny BSA. Zdá se, že na polyakrylamidovém gelu je v zónách odpovídajícím modifikovanému BSA přítomno několik nekompletně rozdělených látek.



Obr. 24. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) nemodifikovaného albuminu a albuminu modifikovaného jednotlivými oxo-sloučeninami. Zleva: nízkomolekulární markery: hovězí sérový albumin (M_r 68.000), ovalbumin (M_r 45.000), glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza M_r 36.000), karboanhydráza (M_r 29.000), trypsinogen (M_r 24.000), α -laktalbumin (M_r 14.000); (řada 1) 4 μ l nemodifikovaného BSA; (řada 2) 4 μ l BSA modifikovaného glukózou; (řada 3) 4 μ l BSA modifikovaného ribózou; (řada 4) 4 μ l BSA modifikovaného glyoxalem; (řada 5) 8 μ l BSA modifikovaného glyoxalem; (řada 6) 4 μ l BSA modifikovaného glutardialdehydem; vpravo: 1 mg/ml BSA 0.5 μ l.

5.2.1.2. HPLC analýza albuminu (BSA)

Na obr. 25 je HPLC/UV analýza nemodifikovaného i modifikovaného BSA ukazující zřetelně ostrý pík odpovídající nemodifikovanému BSA. Dokonce po modifikaci BSA glukózou se neobjevila žádná změna retenčního času. Při modifikaci BSA ribózou a glyoxalem se jasně projevila změna ve struktuře proteinu zvýšením retenčního času. V případě modifikace BSA glutardialdehydem nedošlo k eluci žádného proteinového píku.

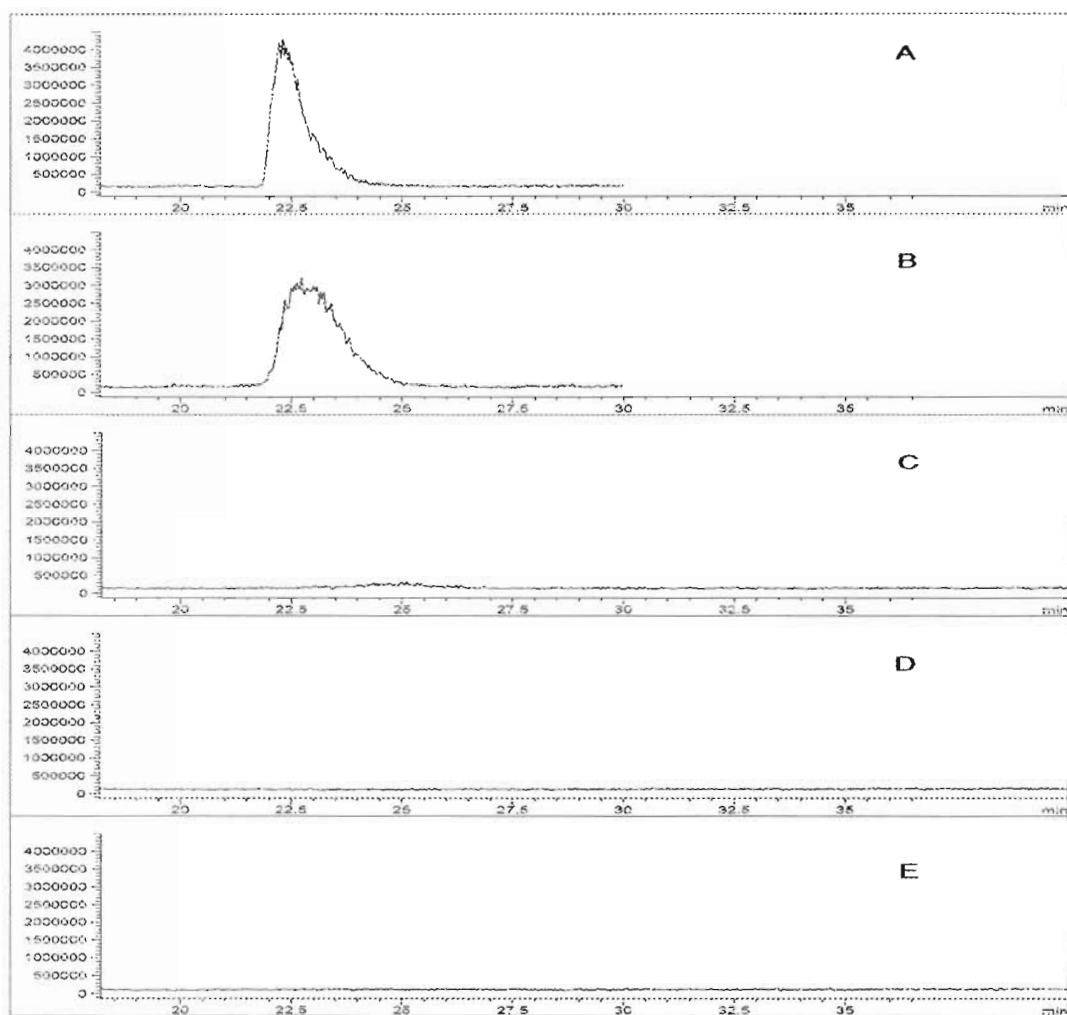


Obr. 25. HPLC/UV analýza nemodifikovaného BSA (A) (albumin eluován ve 22 min.), (B) BSA modifikovaný glukózou, (C) BSA modifikovaný ribózou, (D) BSA modifikovaný glyoxalem, (E) BSA modifikovaný glutardialdehydem. Analýza byla provedena na koloně Supelcosil LC-304, lineární gradient, mobilní fáze: A (voda s 1% HCOOH) (v/v) a B (methanol-voda 75:25 s 0,75 % HCOOH) (v/v), X-osa: retenční čas, Y-osa: absorbance při 280 nm.

5.2.1.3. HPLC/ESI-MS analýza neštěpeného BSA

Při použití spojení hmotnostní spektrometrie s HPLC (obr. 26) pro analýzu nemodifikovaného albuminu a albuminu modifikovaného glukózou získáme obdobný záznam

jako u použití HPLC s UV detekcí (obr. 25). V případě modifikace BSA ribózou, glyoxalem a glutardialdehydem nedošlo k detekci žádného píku. ESI-hmotnostní spektrometrie není schopna detekovat proteiny o relativní molekulové hmotnosti vyšší než 100.000, můžeme tedy říci, že všechny oxo-sloučeniny, kromě glukózy, mají modifikační (příčně vazebné) vlastnosti a způsobují různou polymerizaci (zesítování) proteinů. Největší účinnost z těchto oxo-modifikátorů měl zřejmě glutardialdehyd (Obr. 26).



Obr. 26. HPLC/ESI-MS analýza nemodifikovaného BSA (A) (albumin se eluoval ve 22 min.), (B) BSA modifikovaný glukózou, (C) BSA modifikovaný ribózou, (D) BSA modifikovaný glyoxalem, (E) BSA modifikovaný glutardialdehydem. Analýza byla provedena na koloně Supelcosil LC-304, lineární gradient, mobilní fáze: A (voda s 1% HCOOH) (v/v) a B (methanol-voda 75:25 s 0,75 % HCOOH) (v/v), X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud.

5.2.1.4. Aminokyselinová analýza BSA

Aminokyselinová analýza nativního a modifikovaného BSA odhalila dramatické snížení obsahu lysinu a méně dramatické snížení obsahu argininu u všech štěpených glykovaných vzorků BSA (Tab. 2). Relativní snížení obsahu argininu a lysinu je rozdílné u různých oxo reaktant. Pro lysin se ukazuje nejreaktivnějším modifikátorem glutardialdehyd.

Tab. 2. Celková aminokyselinová analýza (aminokyselinové zbytky na 100 aminokyselin v peptidovém řetězci) modifikovaného BSA před štěpením trypsinem.

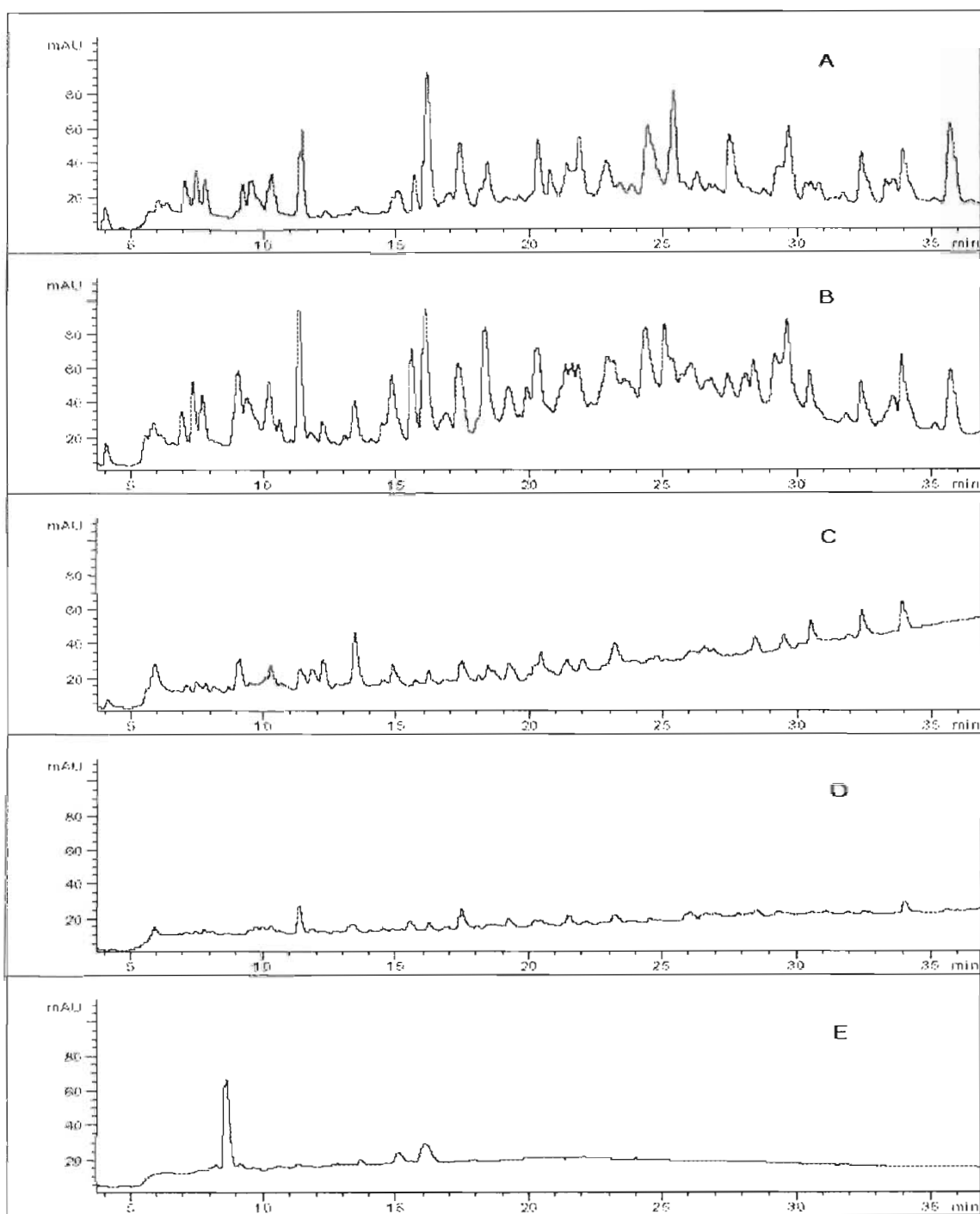
Amino kyselina	A	B	C	D	E	T
Asx	9.8	7.4	10.2	11.0	11.8	8.9
Glx	13.9	12.8	15.6	17.6	17.9	13.1
Ser	4.5	5.8	5.5	3.2	3.6	5.3
Gly	3.8	8.1	5.3	5.3	4.9	2.8
His	2.5	1.9	1.9	2.6	2.3	2.8
Arg	3.3	2.6	1.7	1.3	2.5	4.3
Thr	5.3	7.4	5.6	3.2	3.2	5.8
Ala	8.2	8.0	9.2	9.7	10.1	7.8
Pro	4.6	8.4	5.0	4.9	5.0	4.6
Tyr	3.9	2.0	3.4	2.3	2.7	3.5
Val	6.4	7.6	7.5	7.8	7.4	6.3
Met	0.5	2.2	0.4	0.5	0.3	0.8
Cys	3.5	3.3	2.8	2.4	1.8	5.8
Ile	2.6	3.1	3.1	3.5	3.2	2.5
Leu	12.7	12.0	15.4	17.0	16.4	10.8
Phe	4.9	4.4	5.6	6.3	5.8	5.0
Lys	9.5	3.1	1.7	1.7	1.0	9.9

Naměřené hodnoty jsou zprůměrnovány pro tři měření. A) nativní BSA, B) BSA modifikovaný glukózou, C) BSA modifikovaný ribózou, D) BSA modifikovaný glyoxalem, E) BSA modifikovaný glutardialdehydem, T) teoretické složení BSA z databáze SwissProt.

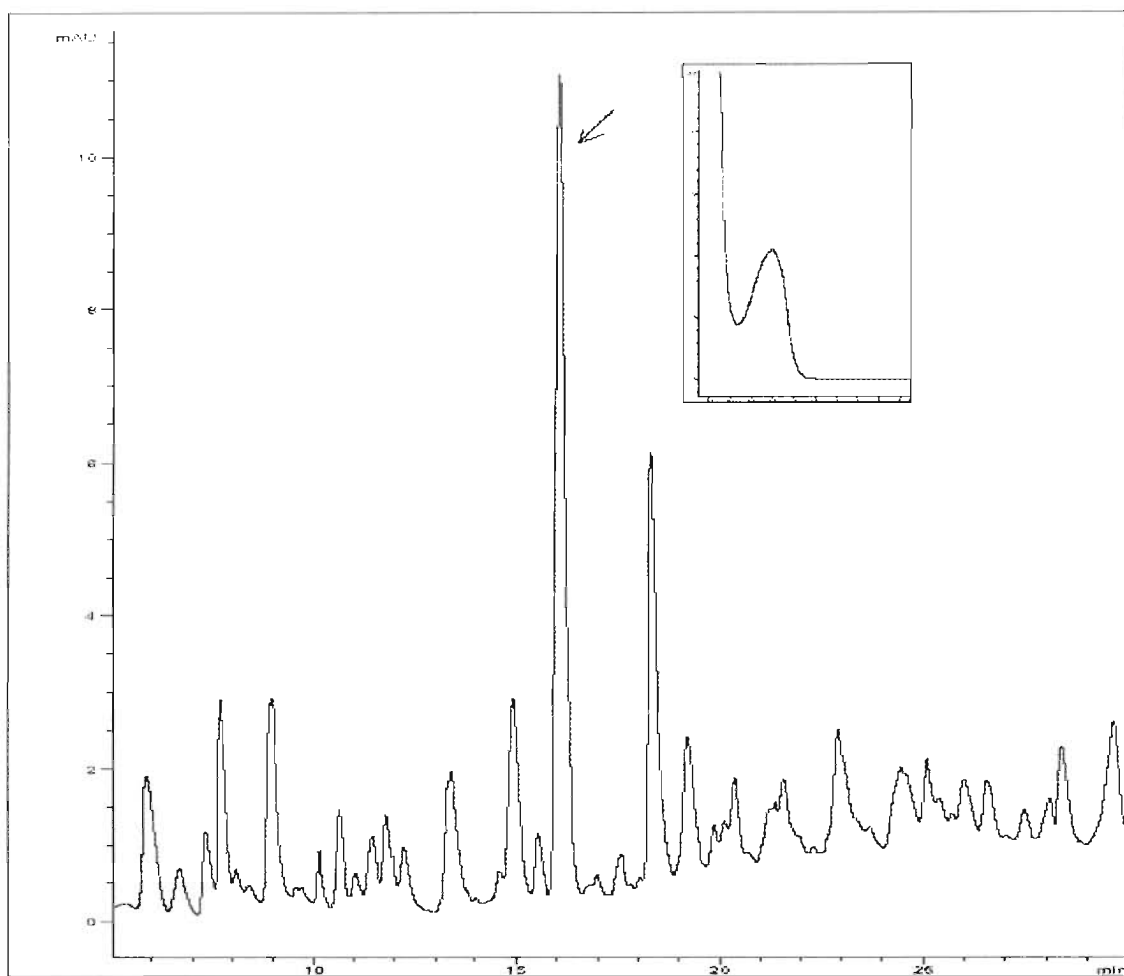
5.2.1.5. Analýza peptidů tryptického štěpení BSA

Použitím separační techniky HPLC s UV nebo MS detekcí a kapilární elektroforézou modifikovaného BSA jsme získali peptidové mapy tryptického štěpu BSA (Obr. 27-34). Z obr. 27 je zřejmé, že modifikace záleží na povaze použitého modifikátoru, glukóza jako mírný modifikátor nabízí bohatý profil tryptických peptidů, zatímco albumin modifikovaný ribózou poskytuje méně bohatý profil. Protože reakce proteinů s dioxo-sloučeninami (glyoxal, glutardialdehyd) vede k jejich odolnosti vůči enzymatickému štěpení, lze usuzovat, že tyto proteiny jsou vysoce modifikovány, dochází ke vzniku příčných vazeb mezi dioxo-sloučeninami a volnou amino skupinou (lysin, arginin). Tyto příčné vazby mohou být buď inter- nebo intramolekulární. Bohužel nevíme, která z těchto příčných vazeb je zodpovědná za snížení citlivosti k proteolytickému štěpení.

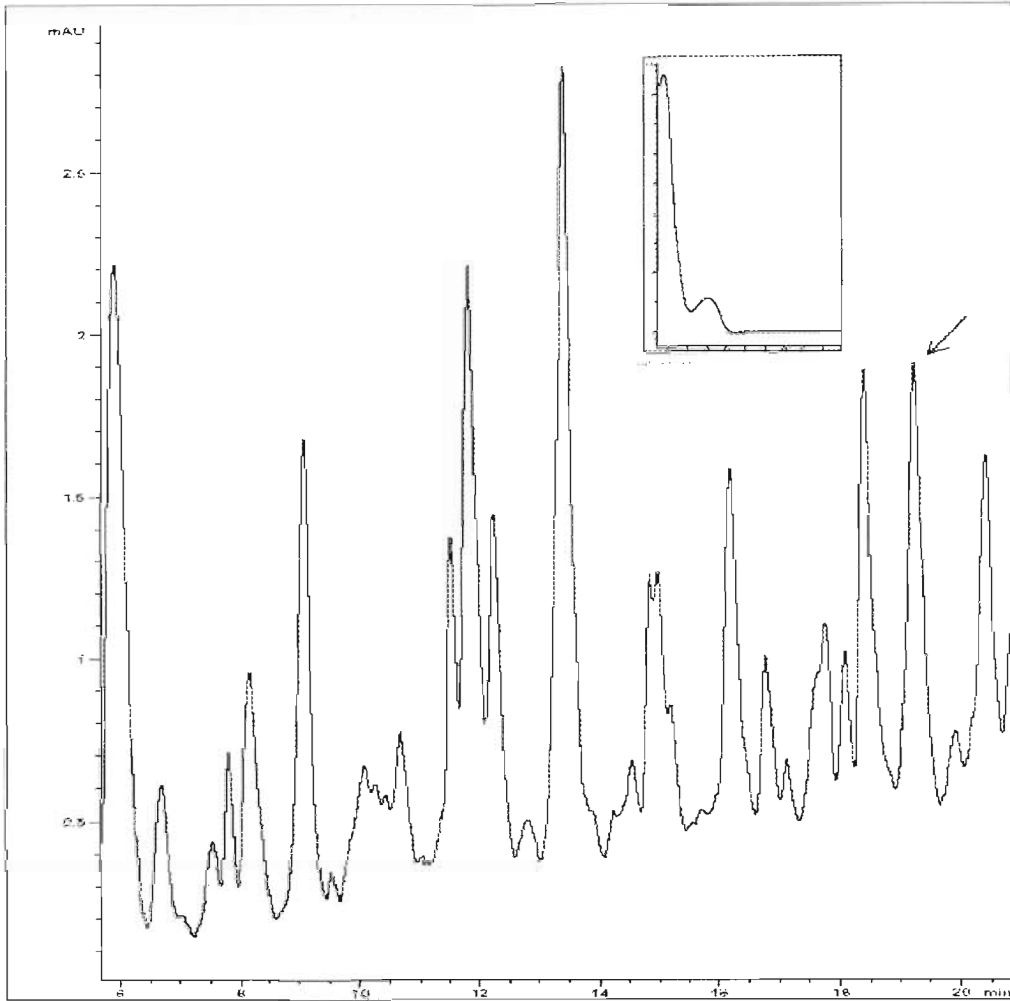
Další informace o peptidových změnách a jejich struktuře nám poskytují UV-VIS absorpční spektra zjištěná on-line při HPLC analýze. Jak již bylo popsáno, reakce peptidů s oxo-sloučeninami vedou k tvorbě barevných produktů [128], [129]. V některých případech jsou barevné změny dokonce viditelné pouhým okem. Obr. 28 A-C ukazuje peptidové mapy s modifikovanými UV spektry (jsou uvedeny pouze oblasti z celkového profilu, kde došlo ke spektrálním změnám). Byly studovány následující tyty modifikátorů glukóza (Obr. 28 A), ribóza (Obr. 28 B) a glutardialdehyd (Obr. 28 C). Ve všech těchto peptidových profilech byly nalezeny peptidy vykazující absorpci při 280 nm. Nebyl nalezen žádný obdobný peptid u nemodifikovaného albuminu.



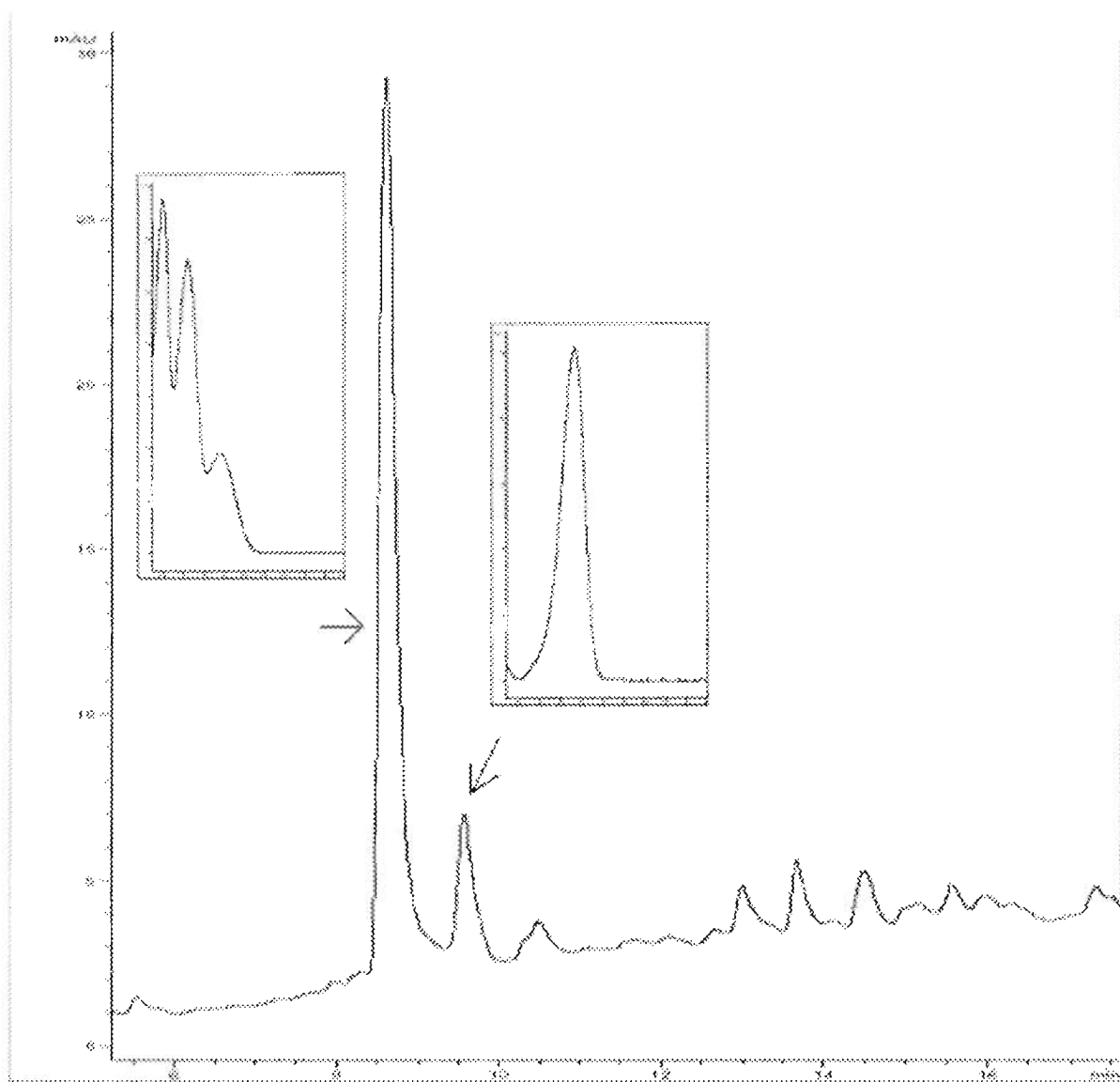
Obr. 27. HPLC/UV peptidová mapa tryptických štěpů A) nemodifikovaného BSA, B) BSA modifikovaný glukózou, C) BSA modifikovaný ribózou, D) BSA modifikovaný glyoxalem, E) BSA modifikovaný glutardialdehydem. Analýza byla provedena na koloně Zorbax Eclipse XDB-18, lineárním gradientem mezi mobilními fázemi: A (voda s 0,1 % HCOOH) a B (methanol-acetonitril 1:1 s 0,075 % HCOOH), X-osa: retenční čas, Y-osa: absorbance při 214 nm.



Obr. 28 A. HPLC/UV tryptická peptidová mapa modifikovaného BSA a změny UV absorpčního spektra. A) BSA modifikovaný glukózou, detekce při 280 nm (spektrum píku s retenčním časem 16 min), X-osa; retenční čas, Y-osa; detekce absorpce specifikované vlnové délky. Spektrum měřeno při 210-450 nm.



Obr. 28 B. HPLC/UV tryptická peptidová mapa modifikovaného BSA a změny UV absorpčního spektra. B) BSA modifikovaný ribózou, detekce při 280 nm (spektrum píku s retenčním časem 19.3 min), X-osa; retenční čas, Y-osa; detekce absorpance specifikované vlnové délky. Spektrum měřeno při 210-450 nm.

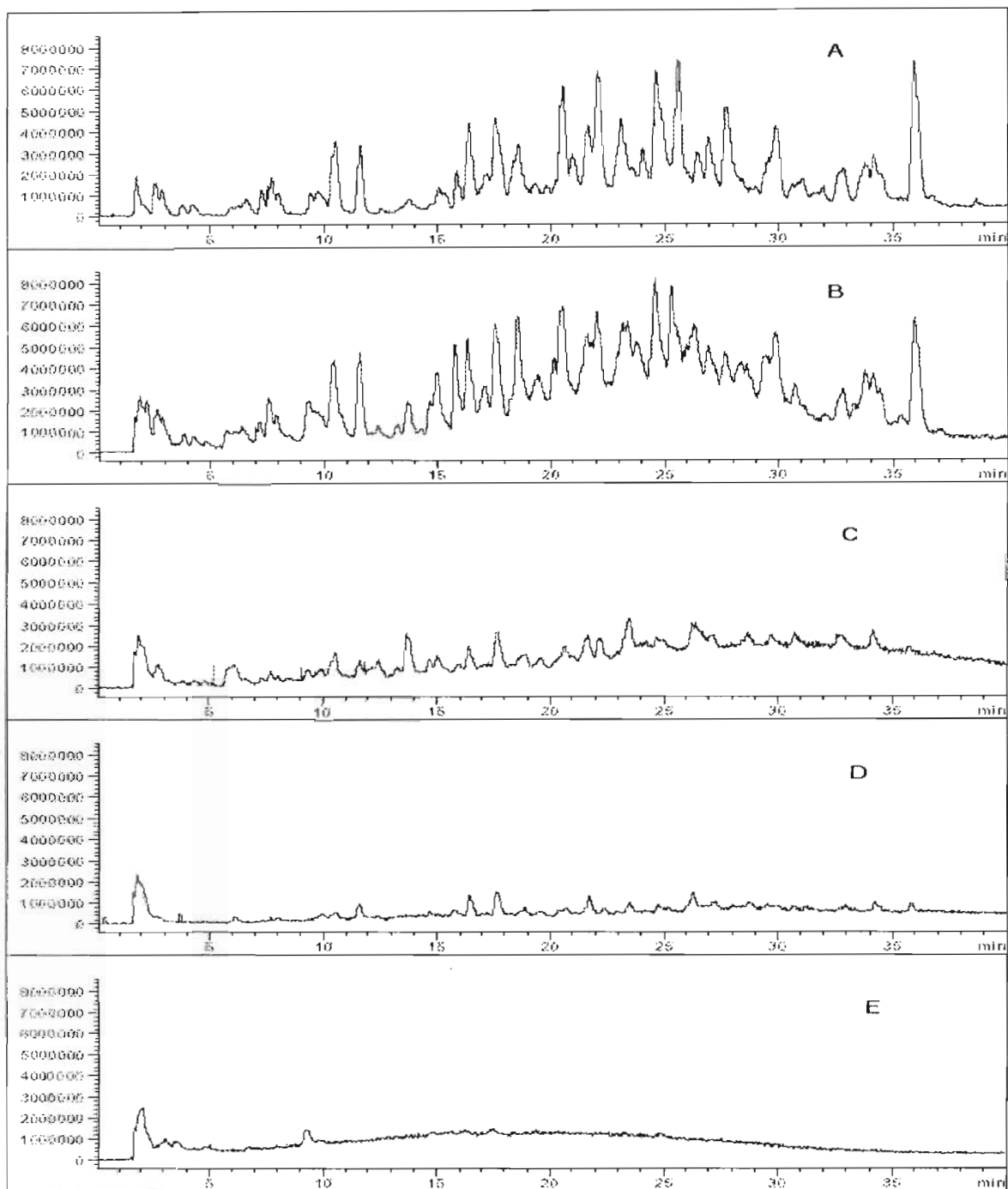


Obr. 28 C. HPLC/UV tryptická peptidová mapa modifikovaného BSA a změny UV absorpčního spektra. C) BSA modifikovaný glutardialdehydem, detekce při 278 nm (spektrum píku s retenčním časem 9.5 min). Pík v 8.6 min měl dvě absorpční maxima při 224-251 nm. X-osa: retenční čas, Y-osa: absorbance při specifické vlnové délce.

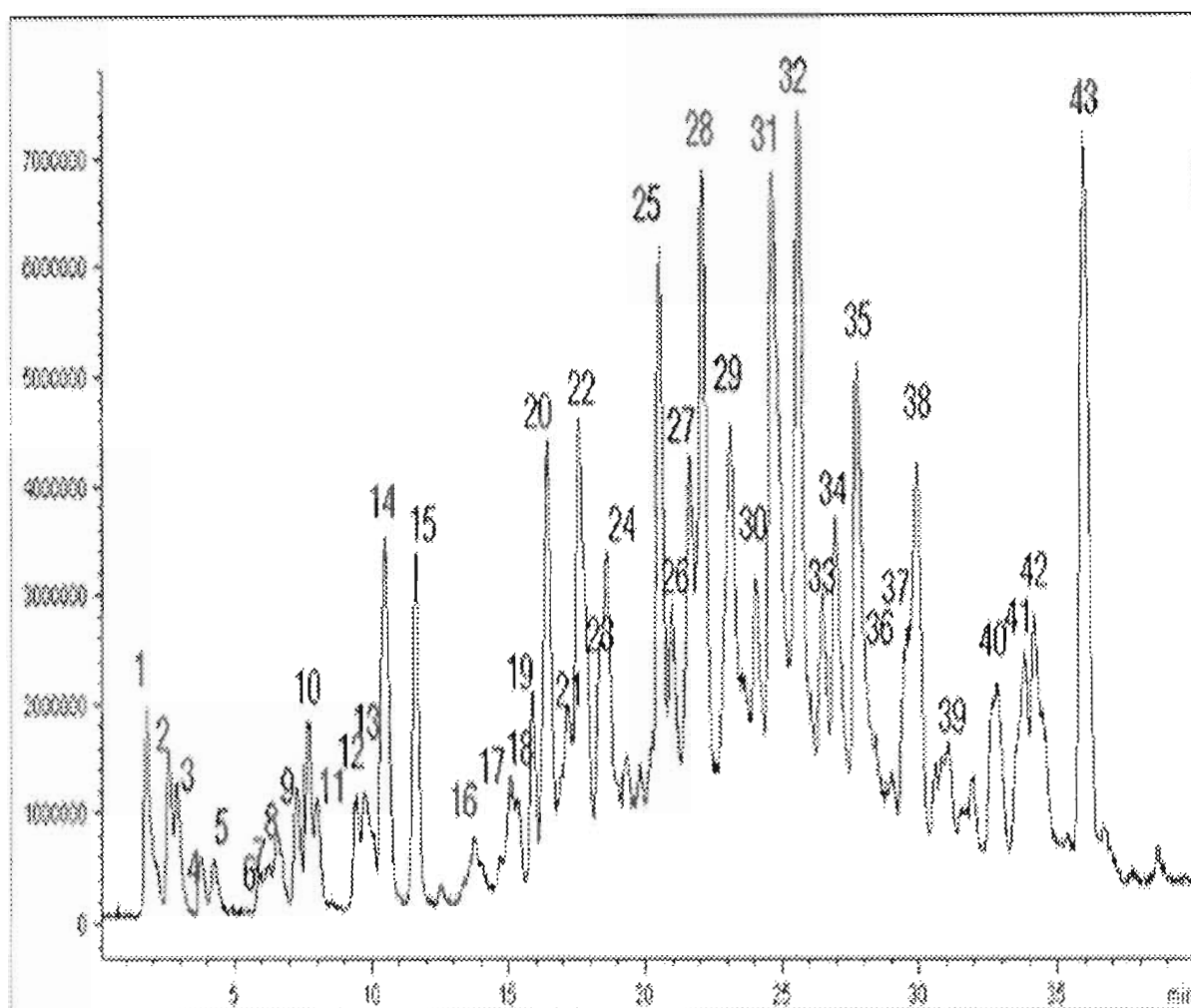
Při použití techniky ESI-MS pro detekci a charakterizaci jednotlivých tryptických peptidů byl získán chromatografický profil prezentovaný v obr. 29. Profil byl podobný jako profil získaný pomocí UV detekce (obr. 27). Jsou zde opět vidět bohaté peptidové profily u nemodifikovaného BSA a BSA modifikovaného glukózou. Na obr. 30 jsou prezentovány výsledky detailnější analýzy tryptických peptidových štěpů. Byla získána peptidová mapa nativního BSA, BSA modifikovaného glukózou, ribózou, glyoxalem a glutardialdehydem. Identifikované peptidy jsou označeny čísly. Relativní molekulové hmoty jsou uvedeny v tab. 3.

Již dříve bylo publikováno, že Lys 548 v peptidové sekvenci 548-557 (KQTALVELLK) je velmi reaktivní [130]. V našich analýzách byl tento peptid nalezen pod píkem číslo 30 (Obr. 30) a při reakci BSA s glukózou tento pík mizí (to znamená, že tento peptid byl modifikován). Další reaktivní lysinové zbytky citlivé na modifikaci glukózou jsou Lys 309 (fragment 300-309, pík číslo 21), Lys 597 (fragment 588-607, pík číslo 18), Arginin 220 (fragment 219-220, pík číslo 1). Některé s glukózou nereaktivní peptidy zanikají pouze po reakci s glutardialdehydem (nejvíce reaktivní oxo-sloučenina). Tyto peptidy mají lysinové zbytky na pozicích 88 (fragment 76-88, pík číslo 15), 256 (fragment 249-256, pík číslo 22) a další podrobnosti viz. tab. 3 a obr. 30-34.

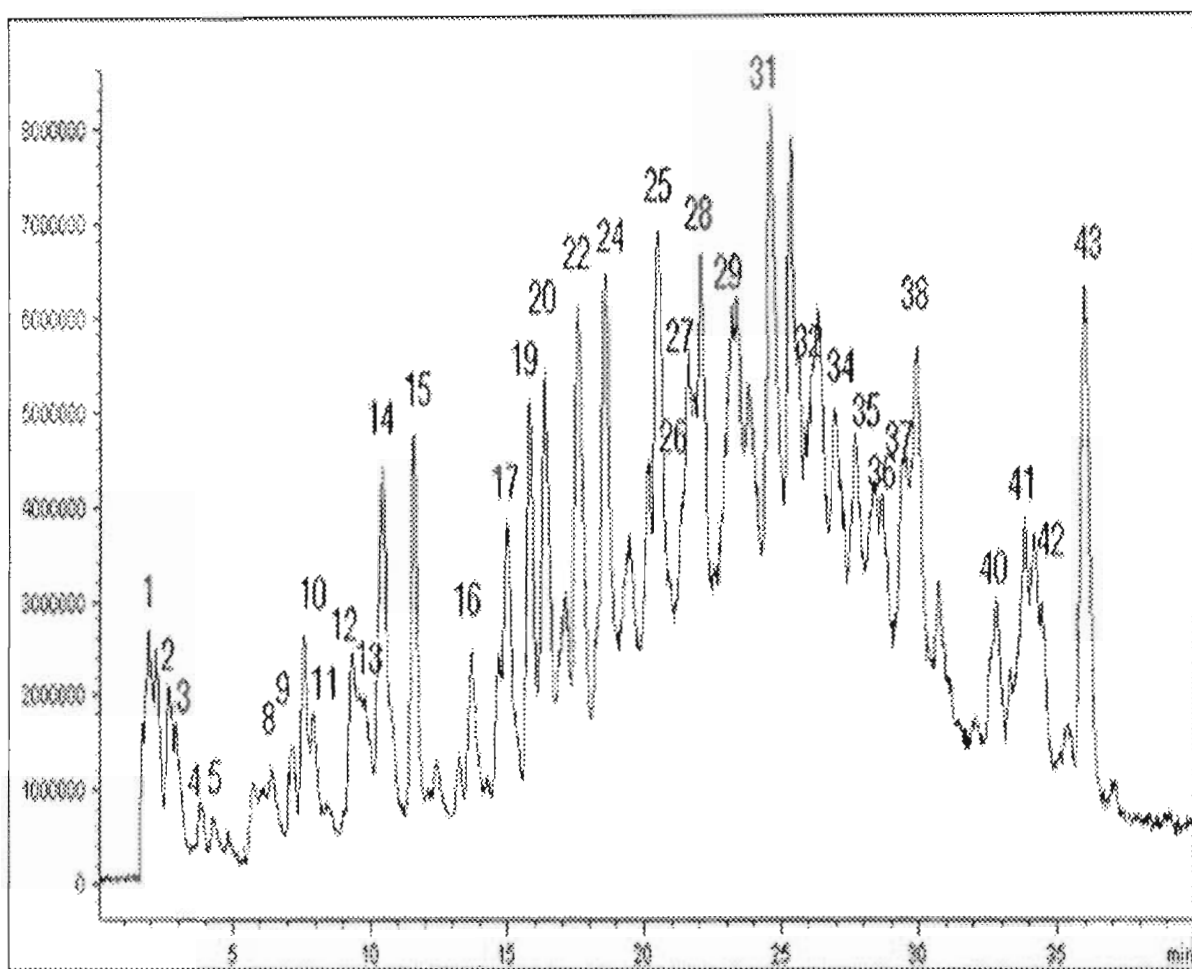
Další metodou pro stanovení posttranslačních modifikačních produktů BSA byla kapilární elektroforéza. CE analýza tryptických peptidů BSA ve fosfátovém pufru pH 7,0 jako základním elektrolytu (obr. 35) umožňuje neúplnou separaci peptidů nemodifikovaného albuminu štěpeného trypsinem. Hovězí sérový albumin modifikovaný glukózou vykazuje jiný profil. Po modifikaci BSA ostatními (více reaktivními) oxo-sloučeninami nebyl při pH 7 v CE profilu detekován žádný pík. Toto chování je pravděpodobně příčinou interakce proteinů se stěnou kapiláry při tomto pH. V případě modifikace BSA glukózou vede k mírným změnám peptidového profilu. Modifikace BSA více reaktivními oxo-sloučeninami má za následek hlubší změny v peptidovém profilu. Tento profil peptidů tedy při daném pH (7) dobře odráží změny struktury molekuly albuminu při posttranslační modifikaci k zabránění interakce peptidů se stěnou kapiláry byl použit fosfátový pufr o pH 2,5 (obr. 36). V tomto případě byla získána dobře rozdělená peptidová mapa pro nemodifikovaný a glukózou modifikovaný albumin. Značné změny profilu byly objeveny dle očekávání po modifikaci BSA s více reaktivními oxo-sloučeninami. CE separace při pH 2,5 se přitom velmi podobá HPLC separaci.



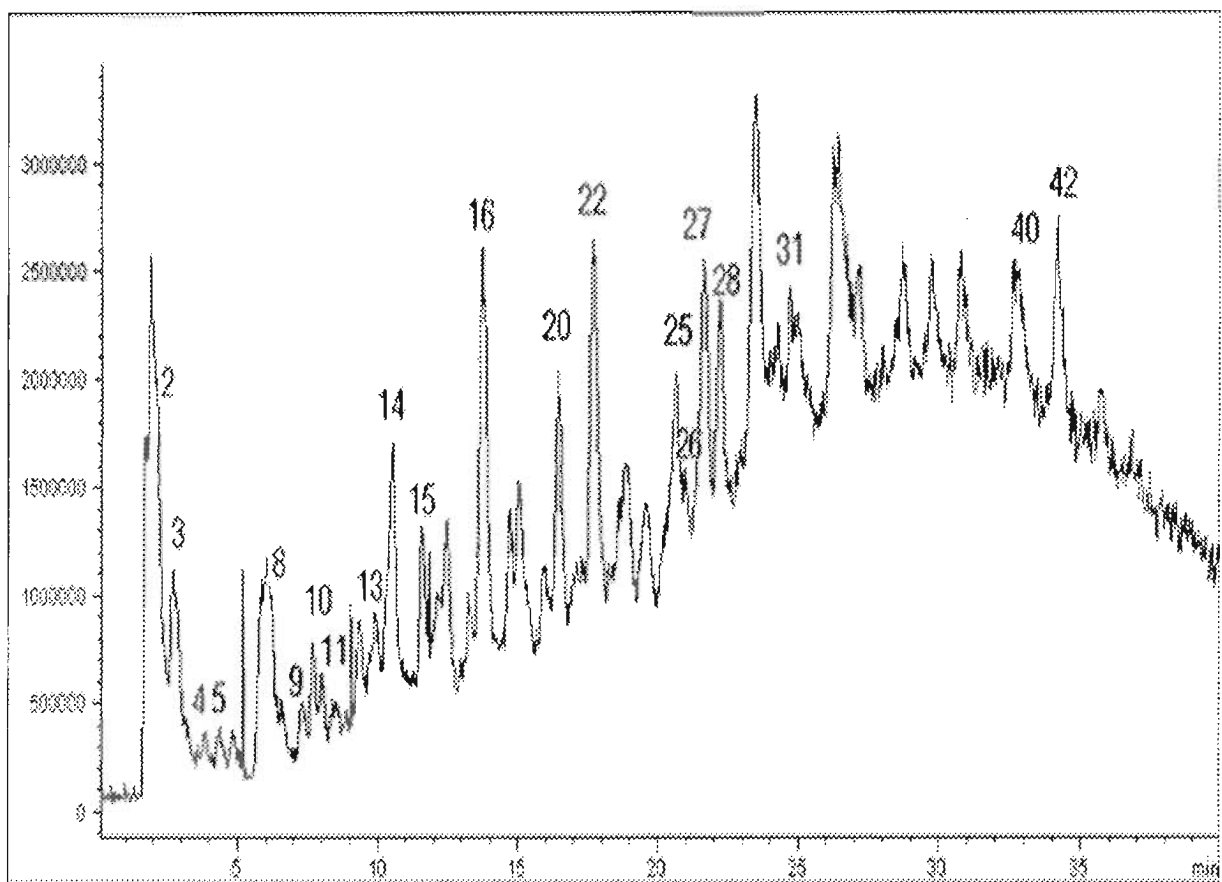
Obr. 29. HPLC/ESI-MS A) tryptická peptidová mapa nemodifikovaného BSA, B) BSA modifikovaný glukózou, C) BSA modifikovaný ribózou, C) BSA modifikovaný glyoxalem, D) BSA modifikovaný glutardialdehydem. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud.



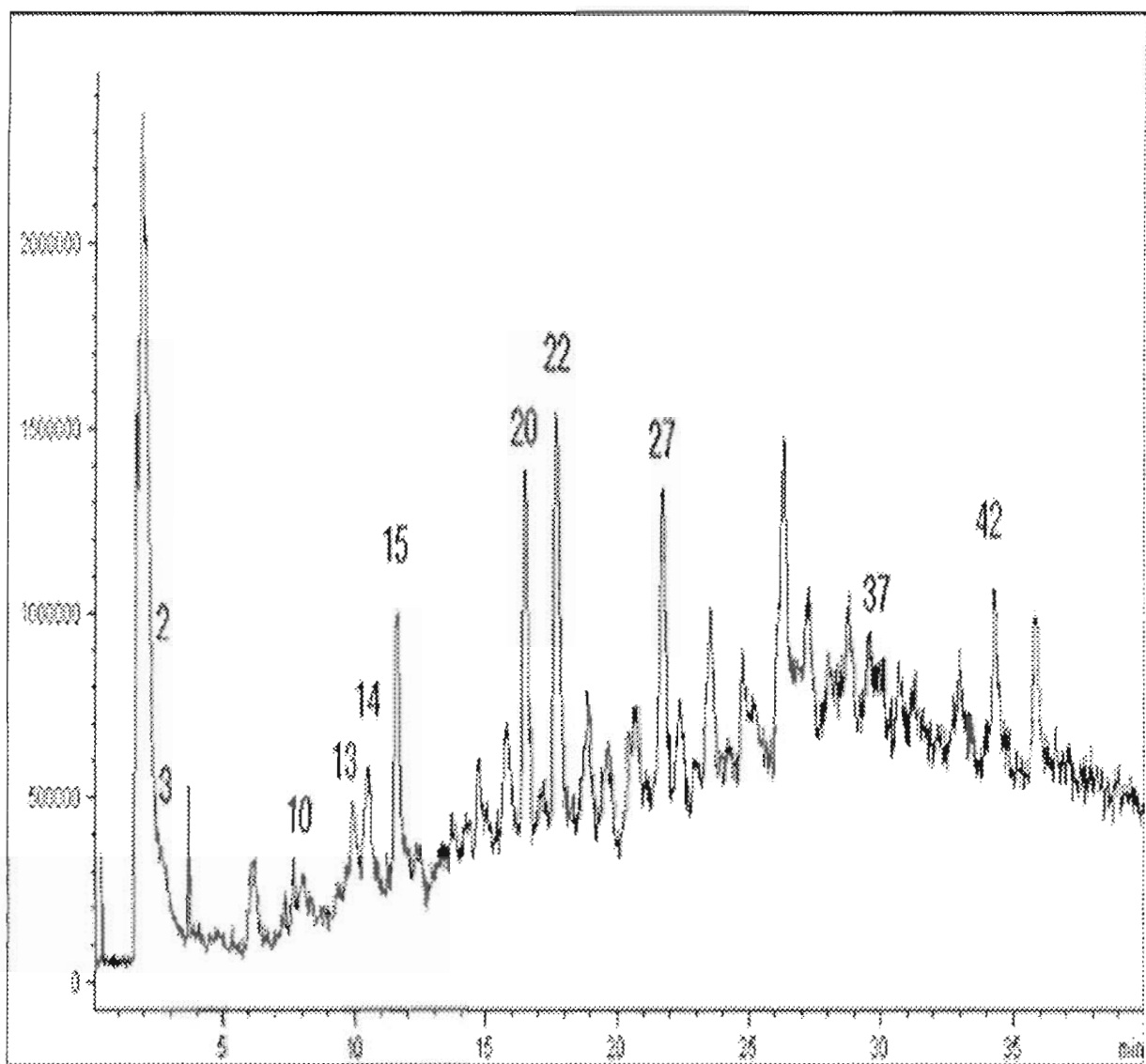
Obr. 30. A) HPLC/ESI-MS tryptická peptidová mapa nemodifikovaného BSA, X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud. Čísla píků se vztahují k nemodifikovaným tryptickým peptidům, jednotlivé píky jsou specifikovány v tab. 3.



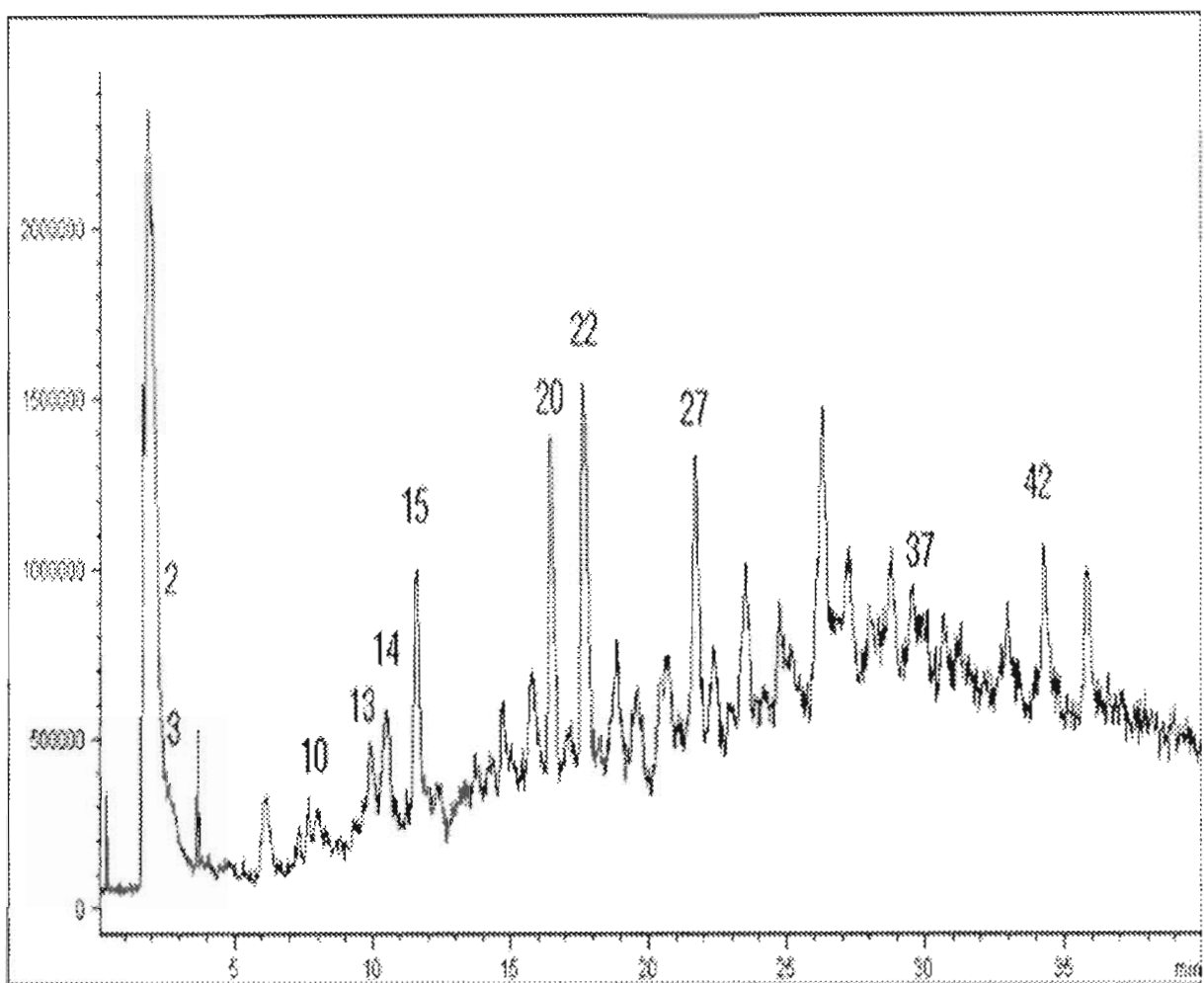
Obr. 31. HPLC/ESI-MS tryptická peptidová mapa albuminu modifikovaného glukózou. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud. Čísla píků se vztahují k nemodifikovaným tryptickým peptidům, jednotlivé píky jsou specifikovány v tab. 3.



Obr. 32. HPLC/ESI-MS tryptická peptidová mapa albuminu modifikovaného ribózou. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud. Čísla píků se vztahují k nemodifikovaným tryptickým peptidům, jednotlivé píky jsou specifikovány v tab. 3.



Obr. 33. HPLC/ESI-MS tryptická peptidová mapa albuminu modifikovaného glyoxalem, X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud. Číslo píků se vztahují k nemodifikovaným tryptickým peptidům, jednotlivé píky jsou specifikovány v tab. 3.



Obr. 34. HPLC/ESI-MS tryptická peptidová mapa albuminu modifikovaného glutardialdehydem. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud. Čísla píků se vztahují k nemodifikovaným tryptickým peptidům, jednotlivé píky jsou specifikovány v tab. 3.

Tab. 3. Identifikace relativních molekulových hmotností peptidových fragmentů získaných HPLC-ESI/MS analýzou. A) tryptická peptidová mapa nemodifikovaného BSA, B) BSA modifikovaný glukózou, C) BSA modifikovaný ribózou, D) BSA modifikovaný glyoxalem a E) BSA modifikovaný glutardialdehydem. Tučná čísla odpovídají peptidům nemodifikovaného BSA.

číslo píku	fragment. aminokyselinové složení	A	B	C	D	E
1	30(219-220), QR 69(496-498), VTK	302.1 346.1 552.2	763.6; 4832.8; 2423 346.1	763.6; 1187.4	763.6; 1187.4	763.6; 677.6; 1559.2
2	34(233-235), ALK or 53(372-374), LAK 31(221-222), LR 74(545-547), QIK 36(242-245), LSQK	330.2 287.1 387.2 474.2	330.1 287.1 387.2 474.2	330.1 287.1 387.1	330.2 287.2	0
3	64(456-459), VGTR 7(35-36), FK	431.2 293.1 332.1	431.2 293.1	431.2 293.1	431.1	0
4	63(452-455), SLGK	403.2	403.2	403.2	0	0
5	60(434-436), YTR 28(210-211), EK	438.2 275.1	438.2 275.1	438.2 275.1	0	0
6		487.2	0	0	0	0
7		424.1	0	0	0	0
8	42(281-285) ADLAK	516.2	516.2	516.2 ; 553.2	553.2	0
9	6(29-34), SEIAH R 40(264-266), VHK	711.4 382.1	711.4 382.2	711.3 382.1	0	0
10	68(490-495), TPVSE K	659.4	659.3	659.3	659.2	0
11	49(341-346), NYQEA K	751.3	751.3	751.2	0	0
12	33(229-232), FGER	507.2 360.1	507.2	0	8583; 817.3	263.1; 345.1

Tab. 3. Pokračování

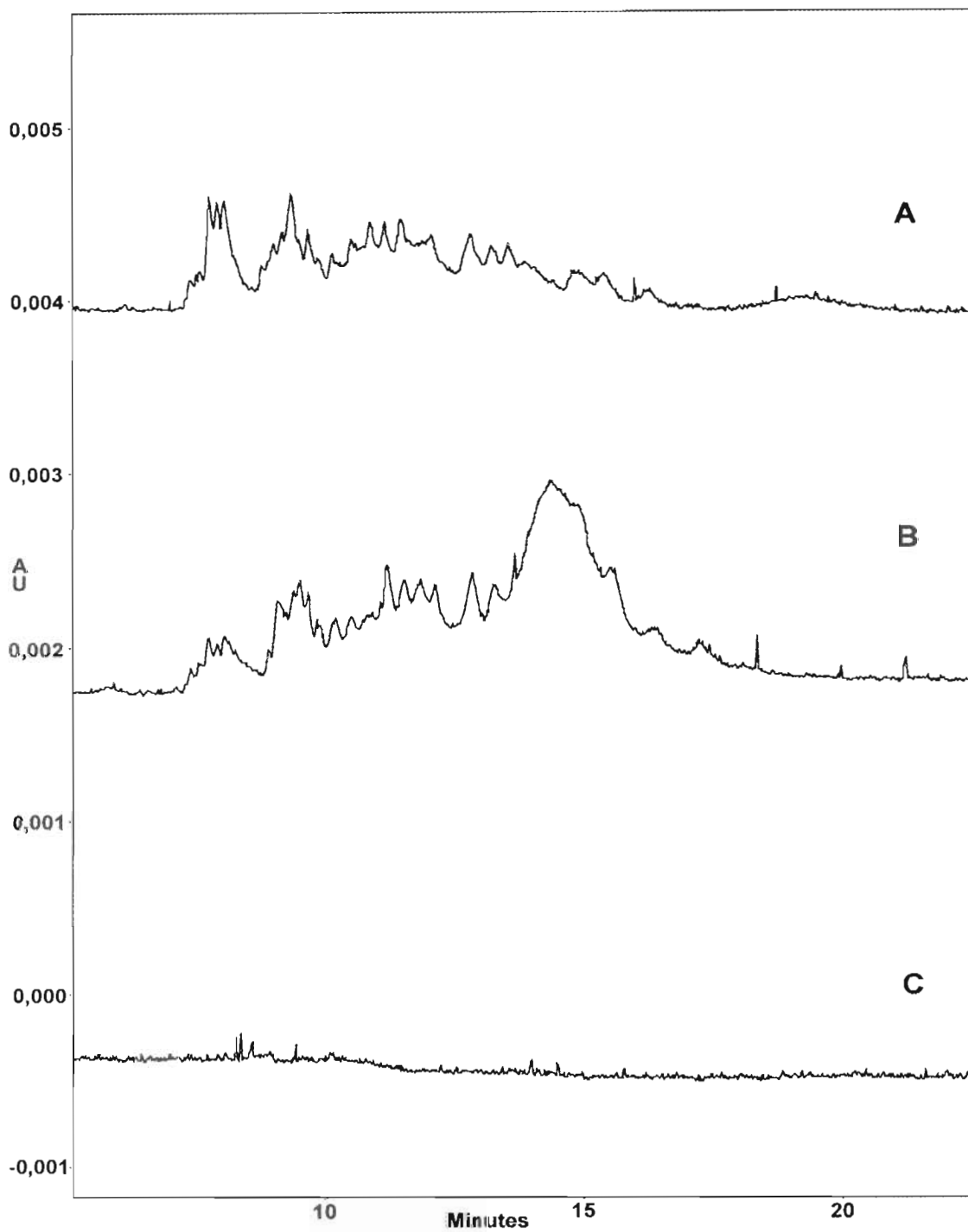
číslo píku	fragment. aminokyselinové složení	A	B	C	D	E
13	72(524-528), AFDEK 37(246-248), FPK	608.2 390.1	608.2; 7525; 537 390.1	680.1 390.1	680.1 390.1	0
14	78(562-568), ATEEQ LK 13(101-105), VASLR	817.5 544.3 445.2	817.4; 576.3 544.3 445.2	817.7 544.3 445.1	544.3	0
15	11 (76-88), TCAVD ESHAG CEK 27(205-209), IETMR	1346.9 648.3	1346.9 648.3	1346.9	1346.7	0
16	5(25-28), DTHK	499.3 1661.2	499.3	499.4		0
17	17(131-138), DDSPD LPK	885.5	885.5; 957.5; 701.3; 836.4; 645.3	957.5; 701.3; 597.2; 645.3; 570.4	0	0
18	81 to 82(588-607), EACFA VEGPK LVVST QTALA	2032.4	0	0	0	0
19	8(37-44), DLGEE HFK	973.7	973.5	0	0	0
20	39(257-263), LVTDL TK 64(456-459), VGTR 35(236-241), AWSVA R	788.6 431.2 688.4	788.5 431.2 688.3	788.5 688.3	788.5; 576.3	0
21	45(300-309), ECCDK PLLEK	1175	1021.7	0	0	0
22	38(249-256), AEFVE VTK	921.7	921.6	921.6; 532.2; 841.4	921.6; 721.3	361. 2
23		1940	0	0	841.5	0

Tab. 3 Pokračování

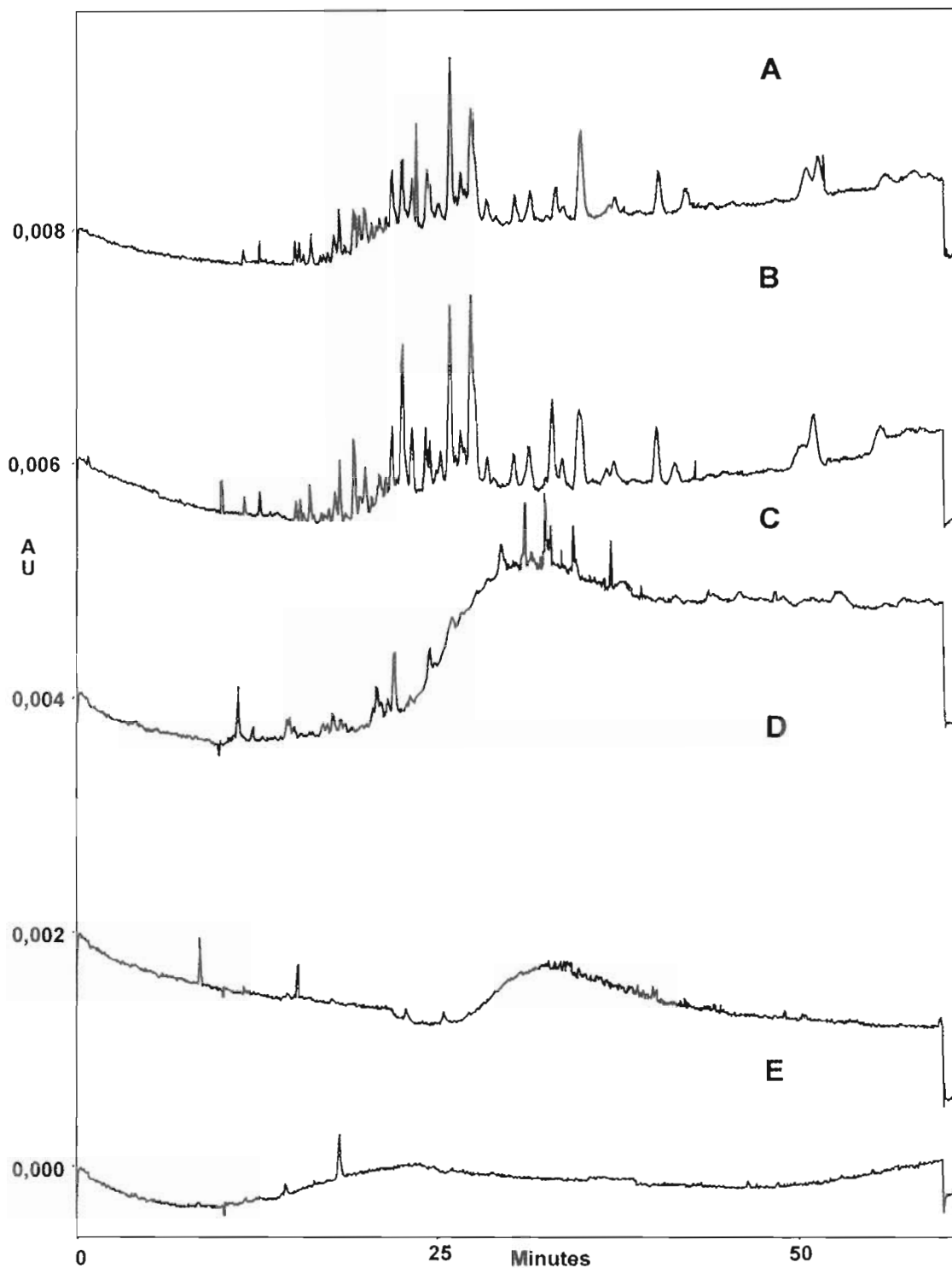
číslo píku	fragment. aminokyselinové složení	A	B	C	D	E
24		3815.7	3815.5; 914.3; 3574.4	0	0	0
25	57(402-412), HLVDE PQNLI K	1305	1305; 18 983.5; 19 157.6; 2223	1305; 793.3	0	0
26	22(161-167), YLYEI AR	926.7	926.3	926.3	0	0
27	82(598-607), LVVST QTALA	1001.8	1001.5	1001.5; 1023.5	1023.4; 1001.6	0
28	61 to 62(437-451), KVPQV STPTL VEVS R	1639.4	1639.4; 3345	1639.5	0	0
29	51 to 52(360-371), RHPEY AVSVL LR	1439.2	1439.2; 4624.4; 3684.9	1511.3; 1697.3; 528.2; 784	528.2	0
30	75 to 76(548-557), KQTAL VELLK	1142	0	0	0	0
31	10(66-75), LVNEL TEFAK	1162.9	1162.9; 4338.8; 1712.8; 1304; 30 221. 6	1162.7	0	0
32		5188.7	5188.8; 3699.4	1282.7	0	0

Tab.3. Pokračování

číslo píku	fragment. aminokyselinové složení	A	B	C	D	E
33	62 to 65(438-468), VPQVS TPTLV EVSRS LGKVG TRCCT KPESE R	3342	3851; 19 243.7; 584.3	584.3	2156.9	0
34	76(549-557), QTALV ELLK	1013.8	1013.8; 963.4	963.4	963.3	0
35	59(421-433), LGEYG FQNAL IVR	1479.2	1478.9; 3832.5; 526.2	0	0	0
36	14 to 17(106-138), ETYGD MADCC EKQEP ERNEC FLSHK DDSPD LPK	3831	3832.5	755.3; 561.3;777.3 526.2	561.3; 755.3	0
37	47(319-336), DAIPE NLPPL TADFA EDK	1956	1955.5	0	1955.8	0
38		5264.7	5264.9	851.3; 873.3; 720.3	0	0
39		2506.2	1014.4; 833.4; 5634.6	1014.4; 1036.4	0	0
40	45(300-309), ECCDK PLLEK	1177.8	996.5; 501.6; 1177.9	1177.8; 996.5	996.5	0
41		4476.3	4476.1	0	0	0
42	29(212-218), VLTSS AR	731.4	731.4; 1031.4	1031.4; 731.4	731.4; 1031.3	0
43		4984.8	4984.8	1750.5	1750.6	0



Obr. 35. CE/UV tryptická peptidová mapa nativního a modifikovaného BSA při pH 7,0. A) Nativní BSA, B) BSA modifikovaný glukózou, C) BSA modifikovaný ribózou, CE separace probíhala v 50 mmol/l fosfátovém pufru; pH 7,0; délka kapiláry 50/57 cm.



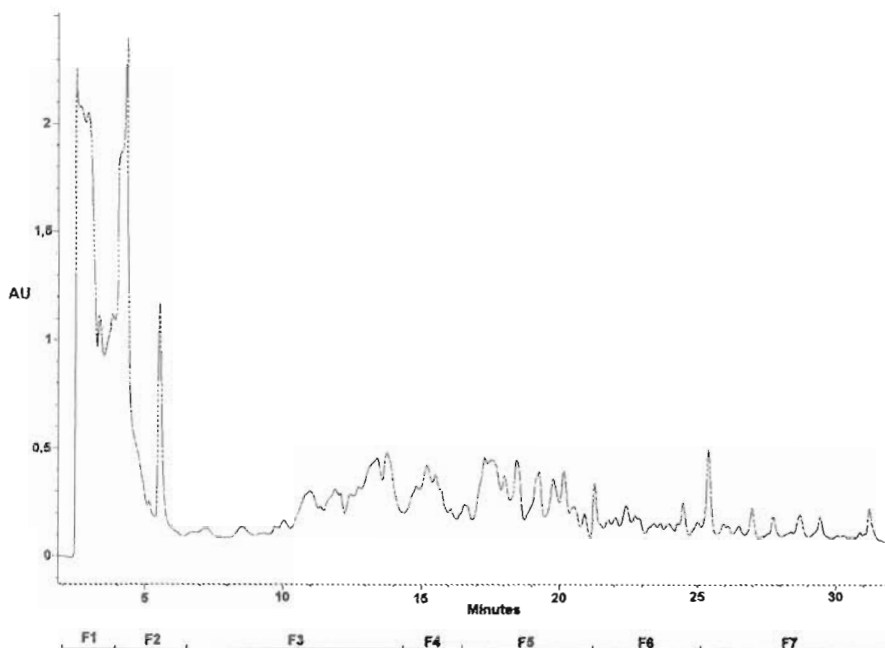
Obr. 36. CE/UV tryptická peptidová mapa nativního a modifikovaného BSA při pH 2,5. A) Nativní BSA, B) BSA modifikovaný glukózou, C) BSA modifikovaný ribózou, D) BSA modifikovaný glyoxalem, E) BSA modifikovaný glutardialdehydem. CE separace probíhala v 50 mmol/l fosfátovém pufru; pH 2,5; délka kapiláry 40/47 cm.

5.2.2. Analýza kolagenu

5.2.2.1. Analýza kolagenázových peptidů metodou spojení HPLC a CE

Vzhledem k tomu, že při štěpení kolagenu kolagenázou vzniká složité spektrum peptidů, je třeba k jejich analýze vyvinout účinnější separační metody. V naší laboratoři byla v předchozích letech vyvinuta metoda off-line spojení HPLC a CE pro analýzu těchto peptidů [131]. Tato metoda byla sice relativně úspěšná, ale vzhledem k tomu, že se jedná o velmi složitou směs peptidů, je vylepšení separace velmi žádoucí. Obzvláště HPLC separace nebyla dostatečně účinná.

Byl proveden výběr z různých typů těchto kolon od rozdílných výrobců a jako nejúčinnější byla vyselektována HPLC metoda na obrácené fázi (RP-HPLC) s kolonou Jupiter Proteo 90 Å. Tato metoda byla schopná částečně rozdělit 46 píků peptidů z kůže potkana (kolagen typu I a III) (Obr. 37).



Obr. 37. Chromatografický profil kolagenázového štěpu kolagenu z kůže potkana (kontroly), jednotlivé frakce jsou označeny F1-F7. Jejich detailní profily jsou vidět na obr. 38.

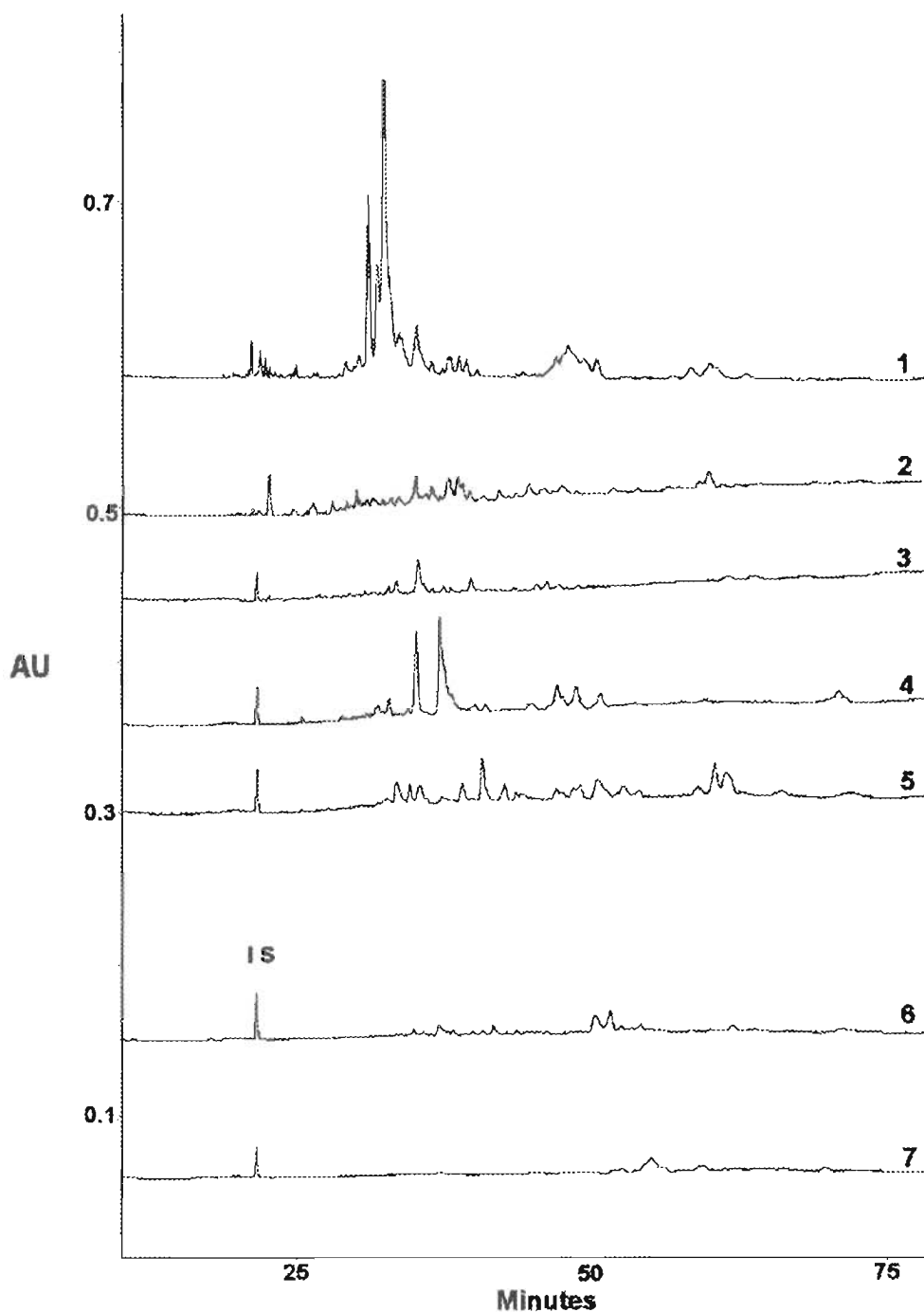
K separaci stejného spektra peptidů bylo také použito kapilární elektroforézy v optimalizované soustavě s iontově-párujícím činidlem. Touto metodou byly získány podobné profily jako u HPLC (složitá, špatně dělitelná směs píků).

Na základě předchozích zkušeností byla vyvinuta metoda off-line spojení těchto dvou metodik (HPLC a CE). Tato metoda je založená na separaci kolagenázového štěpu do sedmi frakcí a ty poté analyzovány metodou kapilární elektroforézy. Jednotlivé frakce (1-7) byly sbírány od každého typu vzorku a dále separovány metodou kapilární elektroforézy. Do každé frakce byl přidán vnitřní standard (Gly-Gly) pro lepší rozpoznání a srovnávání jednotlivých elektroforetických profilů.

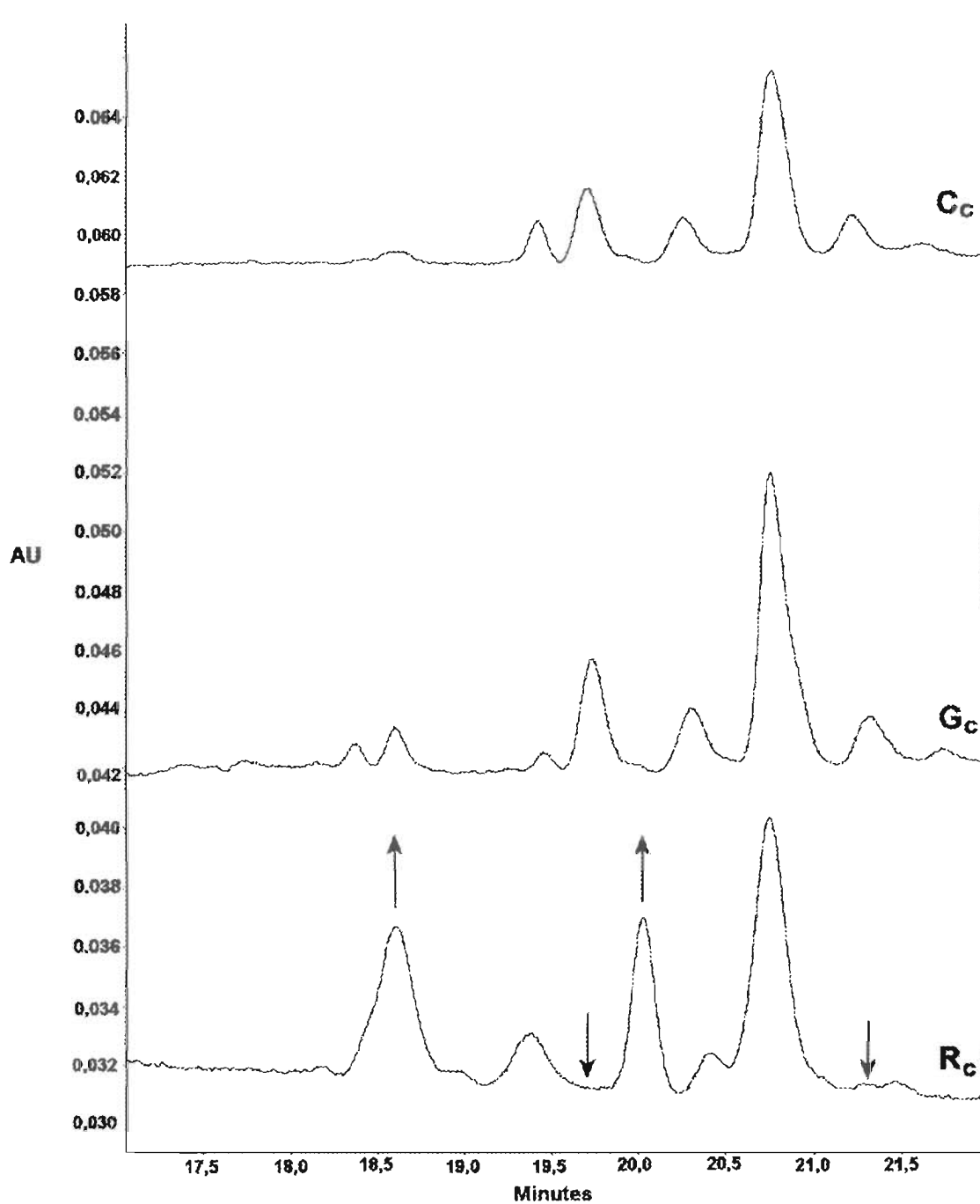
Byl analyzován komerčně dostupný kolagen typ I (z hovězí kůže) a kůže laboratorních potkanů. Tato metoda spojení HPLC a CE umožňuje rozpoznat přes 160 peptidových píků jak je zřejmé z elektroferogramu, kde je znázorněno všech sedm frakcí (Obr. 38). Je třeba uvést, že na prezentovaném elektroferogramu byla použita stejná stupnice odezvy detektoru na ose y. tento záznam tedy dává přehled o relativním zastoupení jednotlivých frakcí. Tyto záznamy lze dále zvětšit pro podrobnou analýzu separovaných peptidů (viz. níže).

Takto vyvinutá metoda byla použita pro studium posttranslačních modifikací kolagenu. Bylo zjištěno, že peptidové profily kontrolního kolagenu a kolagenu inkubovaného glukózou nebo ribózou *in vitro* se liší.

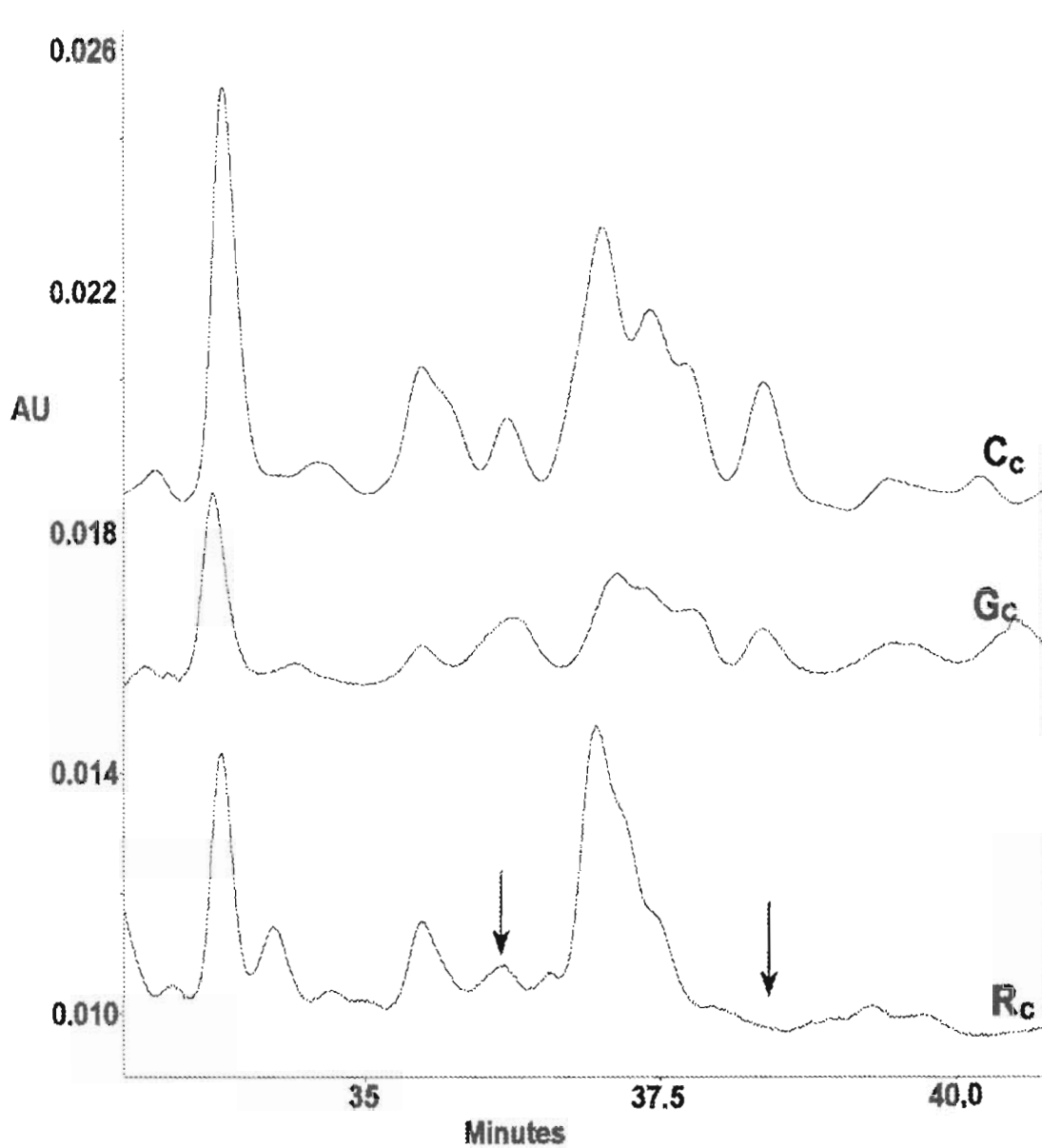
Hlavní změny byly zejména u první a druhé RP-HPLC frakce u vzorků komerčně získaného kolagenu (Obr. 39 a Obr. 40). a u čtvrté RP-HPLC frakce vzorků kůže (Obr. 41). Nejvíce změn v elektroforetickém profilu bylo nalezeno u vzorků komerčního kolagenu inkubovaného ribózou (6 změn) (Obr. 39 a Obr. 40) a tři změny u vzorků kůže (Obr. 41). Srovnáním profilu kontrol a glukóz u komerčně získaného kolagenu nebyly objeveny žádné signifikantní změny. V této analýze byla také sledována reaktivita a specifita obou cukrů (glukóza a ribóza). Obr. 41 také ukazuje výrazné změny u vzorků kůže inkubovaných ribózou. Tyto pokusy měly objasnit chemizmus posttranslačních modifikací proteinů s jednotlivými cukry. Z těchto analýz vyplývá, že ribóza interaguje s proteinem ve vyšší míře a tvoří více posttranslačních produktů u obou typů vzorků- komerčně získaného kolagenu a vzorků kůže potkanů. V případě interakce proteinu s ribózou dochází k vyšší tvorbě modifikací než je tomu u proteinu glykovaného glukózou. To vysvětluje vznik nových modifikací u ribózy (objeveny tři změny) oproti glukóze (objevena jedna změna) (Obr. 41). Podobná reaktivita posttranslačních změn byla objevena i u albuminu (viz. kap. 5.2.1.). Analýzy všech kolagenů/tkání byly naměřeny čtyřikrát (různé vzorky) a statisticky významné změny byly ověřeny použitím Studentova *t*-testu, $P < 0,05$.



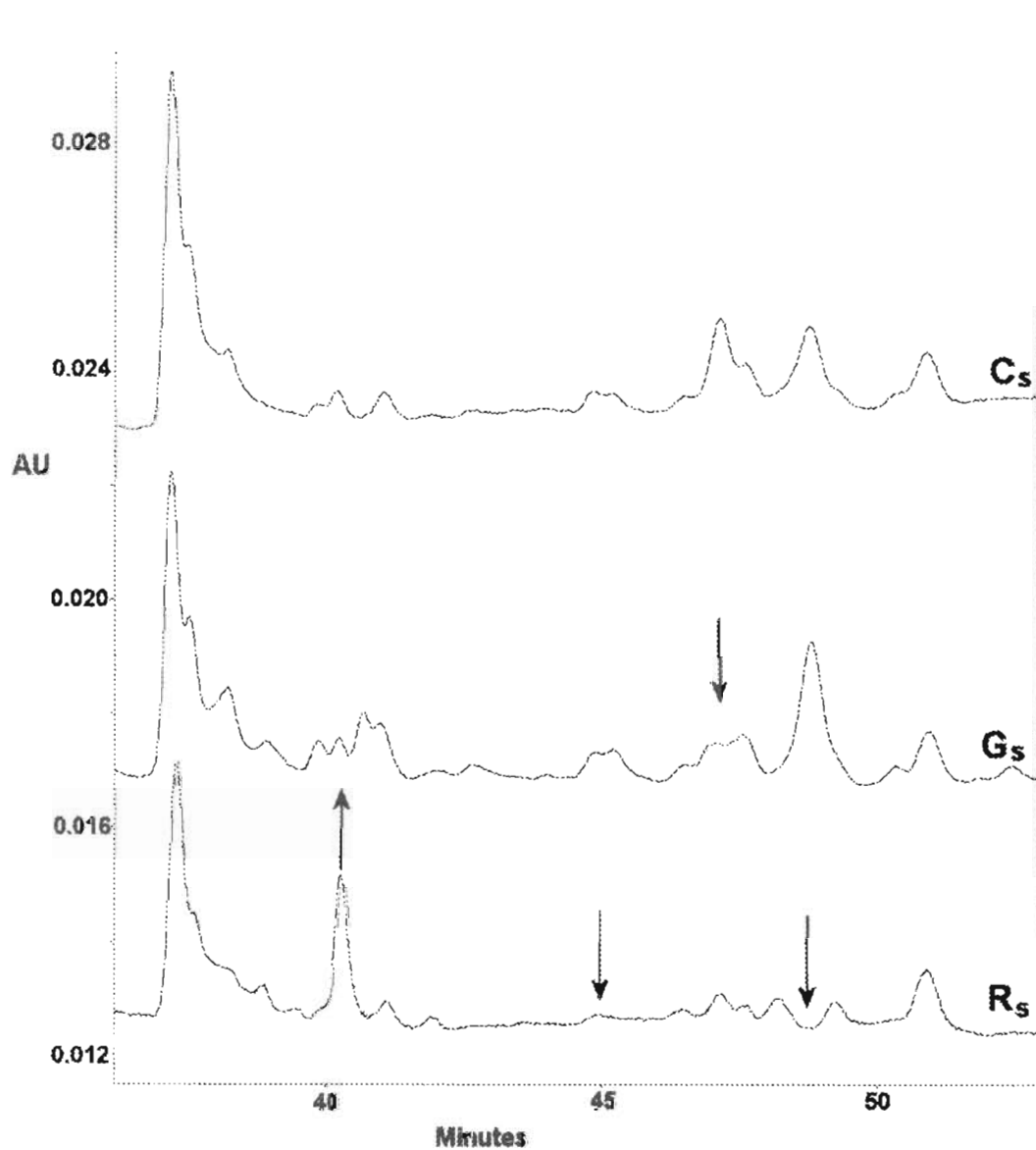
Obr. 38. CE profil jednotlivých sedmi HPLC frakcí kolagenních peptidů po štěpení kolagenázou (vzorky kontrol kůže). IS- interní standard, x-osa: migrační čas; y-osa: absorbance při 214 nm.



Obr. 39. Zvětšená sekce elektroforetického profilu kolagenázových peptidů první HPLC frakce z komerčně získaného kolagenu. Kontrolní kolagen (C_c), inkubovaný s glukózou (G_c), inkubovaný s ribózou (R_c), x-osa: migrační čas; y-osa: absorbance při 214 nm. Významné změny (pokles nebo vzrůst) jsou znázorněny šipkami.



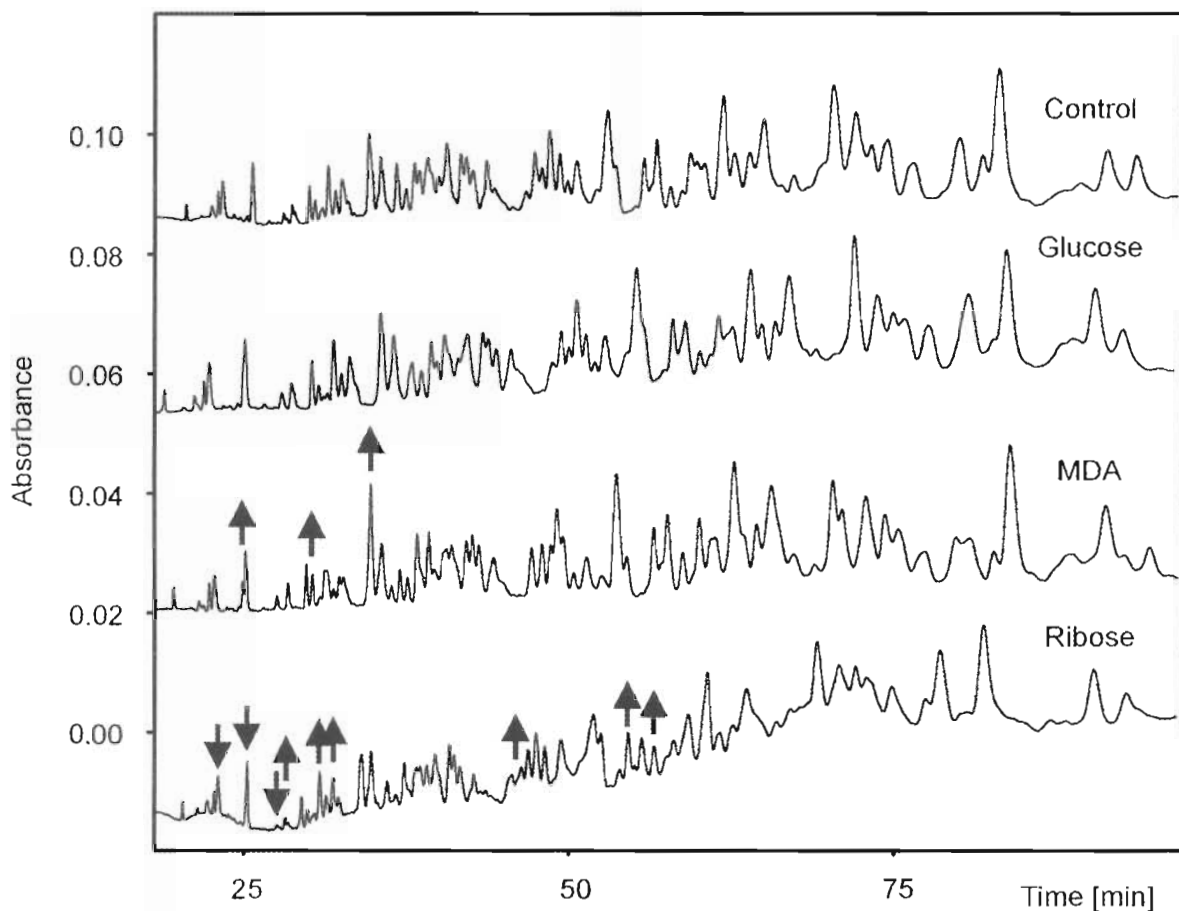
Obr. 40. Zvětšená sekce elektroforetického profilu kolagenázových peptidů druhé HPLC frakce z komerčně získaného kolagenu. Kontrolní kolagen (C_c), inkubovaný s glukózou (G_c), inkubovaný s ribózou (R_c), x-osa: migrační čas; y-osa: absorbance při 214 nm. Významné změny (pokles nebo vzrůst) jsou znázorněny šipkami.



Obr. 41. Zvětšená sekce elektroforetického profilu kolagenázových peptidů čtvrté HPLC frakce kontrolního kolagenu z kůže (C_s), inkubovaný s glukózou (G_s), inkubovaný s ribózou (R_s), x-osa: migrační čas; y-osa: absorbance při 214 nm. Významné změny (pokles nebo vzrůst) jsou znázorněny šipkami.

5.2.2.2. Analýza peptidů kolagenu po štěpení CNBr/trypsinem metodou CE-UV

Obr. 42 představuje celkový UV (214 nm) elektroforetický profil kolagenních peptidů získaných pomocí CNBr štěpení a následným štěpením trypsinem. Na tomto záznamu byly objeveny četné změny v profilu píků (jejich snížení, nebo zvýšení), změny jsou označeny šipkami. Všechny profily byly normalizovány s ohledem na dominantní pík, ten byl použit jako interní standard. Peptidová mapa kolagenu inkubovaného s ribózou se lišila od kontrol devíti změnami. U vzorků peptidů kolagenu inkubovaného malondialdehydem (MDA) byly objeveny tři změny a u vzorků peptidů kolagenu inkubovaného s glukózou nebyly objeveny výrazné změny v profilu. Ribóza je tedy nejvíce reaktivní oxo-sloučeninou v porovnání s oběma ostatními (glukóza, malondialdehyd) [132], dochází k reakci s nejvíce peptidy.



Obr. 42. Kapilárně elektroforetický peptidový profil kolagenu po štěpení CNBr/trypsinem. Kolagen inkubovaný s ribózou (Ribose), malondialdehydem (MDA) a glukózou (Glucose) byl porovnáván s kontrolním vzorkem (Controls). Zvýšení a snížení píků proti kontrole je indikováno šipkami. (UV detekce měřena při $\lambda = 214$ nm).

5.2.2.3. MS/MS analýza peptidů kolagenu po štěpení CNBr/trypsinem

Pro identifikaci změn způsobenými glykací kolagenu bylo použito metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí (LC-MS/MS) a kapilární elektroforézy ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí (CE-MS/MS). Analýzu modifikovaných kolagenů můžeme rozdělit do dvou skupin: a) glykace cukry, b) modifikace s pomocí lipo-peroxidačních produktů (malondialdehyd).

Pro analýzu spektrometrických dat a odhalení konečných produktů posttranslačních modifikací kolagenu jsme použili proteomický software Spectrum Mill pro analýzu hmotnostně-spektrometrických dat. Sekvence kolagenu typu I (řetězec α_1) byla použita z databáze SwisProt (P02453). V odpovídajícím řetězci α_2 nebyly nalezeny žádné signifikantní (reprodukovatelné) modifikace.

Pomocí těchto analýz jsme byli schopni determinovat nejenom daný typ modifikace, ale také určit místo modifikace, tj. konkrétní aminokyselinu v sekvenci. Hlavním cílem této studie bylo tedy především identifikovat typ a glykační místo posttranslačních modifikací.

5.2.2.3.1. Ribózou a glukózou modifikované vzorky

Výsledky glykace pomocí glukózy a ribózy byly principiálně obdobné, avšak ribóza byla výrazně reaktivnější. Hlavním typem detekované modifikace byla karboxymethyllysinová (CML) modifikace. Ačkoliv bylo nalezeno několik dalších možných typů modifikací jako je např. Imidazolon A typ, tyto modifikace nebyly přítomny u všech glykovaných vzorků. Analýzy byly provedeny vždy pro šestice vzorků. Karboxymethyllysin byl nalezen na pozici 1095 (K 1095), ale také tato modifikace byla přítomna i u naglekovaných vzorků kolagenu. Další modifikace byly nalezeny u obou vzorků glykovaných glukózou a ribózou s m/z 857.4 a 517.3 patřícím oběma peptidům s CML modifikací na pozicích 504 a 1032 (tab.4). Analýzy byly provedeny vždy pro šestice vzorků.

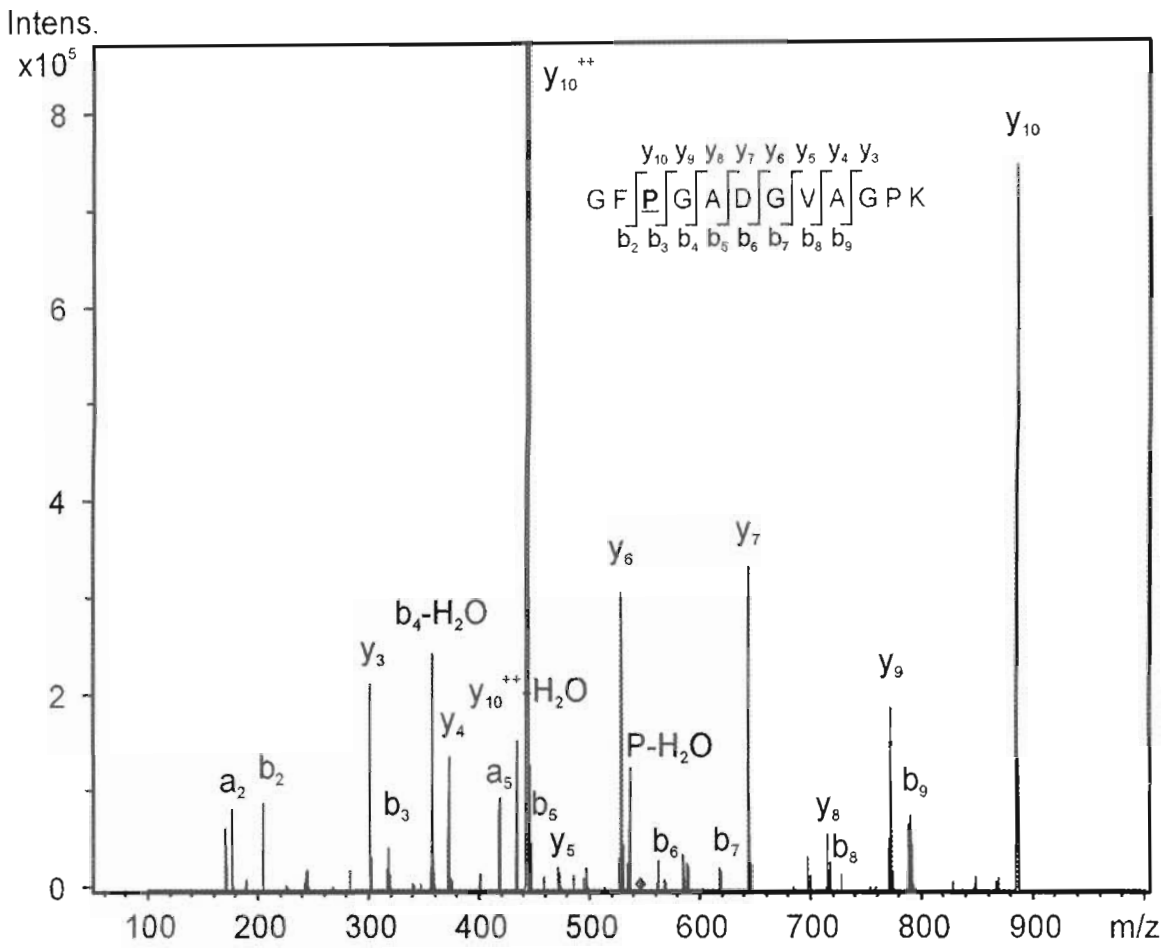
Původní sekvence naglekovaných peptidových iontových markerů byly GFPGADGVAGPK, kde **P** je hydroxylovaný prolin P 495 a DGSPGAK s hydroxylovaným prolinem P 1029 (tab. 4). U naglekovaného kolagenu, je vzorek štěpen trypsinem na pozicích K 504 K 1032. Avšak pokud je lysin modifikován na CML, tak peptid nemůže být štěpen u takto modifikovaného lysinu a proto docházelo ke štěpení na dalším reaktivním místě pro trypsin (tj. arginin). Ribóza byla, v souladu s předchozími výsledky, mnohem reaktivnější a CML modifikace byla nalezena navíc (oproti glukóze) na lysinu K 750, K 861 a K 519.

MS/MS spektra naglekovaných a glykovaných peptidů jsou srovnávány s modifikací K 504 (Obr. 43 a 44 a) a jejich stanovení je prezentované v tabulkách 5-6. Z hlediska analýzy

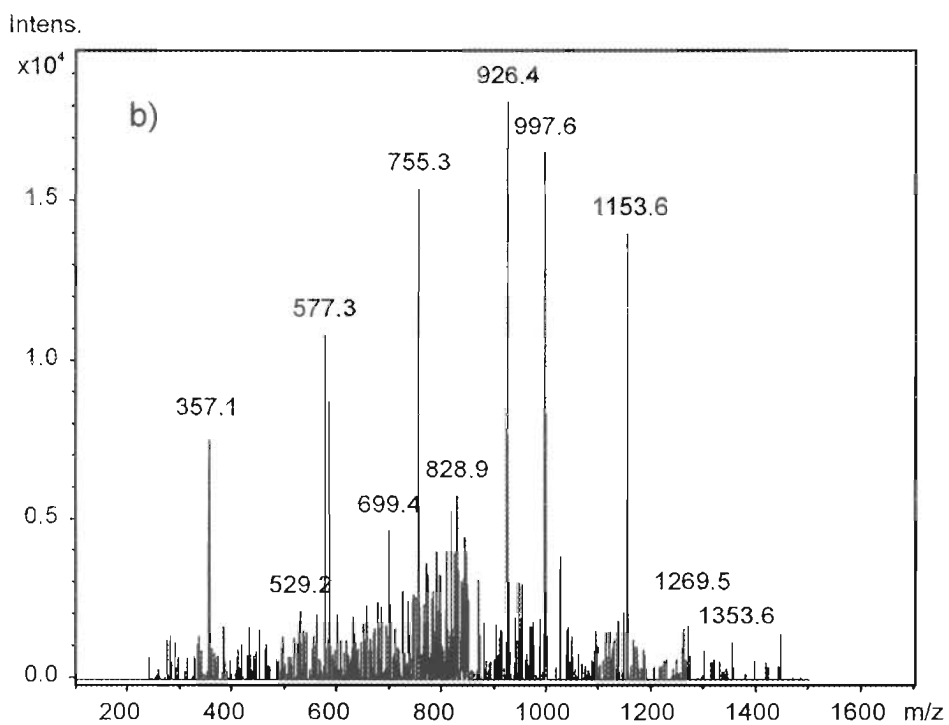
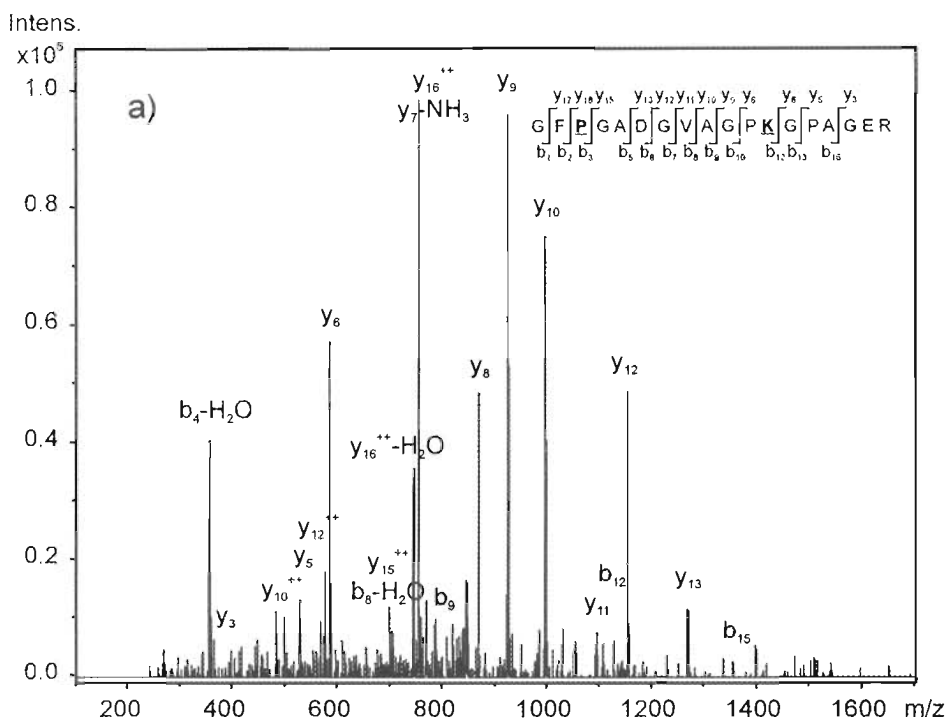
posttranslačních modifikací proteinu je důležité identifikovat co největší množství peptidů z proteinové struktury. V případě prezentovaných výsledků bylo dosažené pokrytí 77 % struktury vyzrálého kolagenu, tj. kolagen po odštěpení propeptidů (α řetězec se sestává pouze z 1054 aminokyselin, v molekule chybí aminokyselina cystein) u kontrolních i glykovaných vzorků. Na Obr. 45 jsou znázorněny ribózou modifikované vzorky vhodných peptidů (77 %) s 29 lysiny z 38 identifikovaných.

Tab.4. Nalezené peptidy neglykovaných (nahore) a glykovaných peptidů (dole) metodou HPLC-MS/MS (P – hydroxylovaný prolin, K – karboxymethyllysin), RT-migrační čas

Místo modifikace	Peptid	RT [min]	m/z
Glykace ribózou a glukózou			
P: 495	G <u>F</u> P <u>G</u> ADGVAGPK	24.7	544.8
P: 495; K: 504	G <u>F</u> P <u>G</u> ADGVAGPK <u>K</u> GPAGER	24.9	857.4
P: 1029	DGSP <u>G</u> AK	3.2	647.3
P: 1029; K: 1032	DGSP <u>G</u> A <u>K</u> GDR	6.1	517.3
Glykace ribózou			
P: 756	GADG <u>A</u> PK	5.5	688.3
P: 756; K: 750	GDAGPK <u>K</u> GADG <u>A</u> PK	14.3	636.8
P: 840, 851, 858, 860	GDAGPP <u>P</u> GPAGPAGPPG <u>P</u> IGNVGA <u>P</u> G <u>P</u> K	25.9	775.4
P: 858, 860; K: 861	VG <u>A</u> PK <u>P</u> KGAR	15.5	500.2
P: 513	GA <u>P</u> GPAGPK	15.1	384.2
P: 513, 522; K: 519	GA <u>P</u> GPAGPK <u>K</u> GSP <u>G</u> EAGR	16.8	777.3



Obr. 43. Fragmentová spektra neglykovaného peptidu ($MH^+ = 1088.5$, $m/z = 544.8$, $z = 2$) s hydroxylovaným prolinem P 495, naměřená metodou HPLC-MS/MS.



Obr. 44 a, b) Fragmentová spektra CML modifikovaných peptidů GFPADGVAGPKGPAGER ($MH^+ = 1713.8$, $m/z = 857.4$, $z = 2$, $\Delta m/z$ spojených s CML modifikací: $+ 58.0$) a) naměřená metodou HPLC-MS/MS, b) metodou CE-MS/MS.

Tab. 5. Identifikace MS/MS spekter původního peptidu (před glykací).

Fragmentovaný iont [m/z]	Iont	Teoretická hmotnost [Da]	Rozdíl hmotnosti [Da]	Frag. iont [m/z]	Iont	Teoretická hmotnost [Da]	Rozdíl hmotnosti [Da]
y-ions				b-ions			
301.12	y ₃	301.20	-0.08	788.05	b ₉	788.36	-0.31
372.20	y ₄	372.24	-0.04	717.24	b ₈	717.33	-0.09
471.29	y ₅	471.30	-0.01	618.23	b ₇	618.26	-0.03
528.35	y ₆	528.33	0.02	561.08	b ₆	561.24	-0.16
643.30	y ₇	643.35	-0.05	446.12	b ₅	446.21	-0.09
714.39	y ₈	714.39	0.00	357.13	b ₄ -H ₂ O	357.15	-0.17
771.37	y ₉	771.41	-0.04	318.05	b ₃	318.15	-0.10
884.43	y ₁₀	884.46	-0.03	204.87	b ₂	205.10	-0.23
442.83	y ₁₀ ⁺⁺	442.74	0.09	a-ions			
433.97	y ₁₀ ⁺⁺ - H ₂ O	433.73	0.24	177.02	a ₂	177.10	-0.08
				418.11	a ₅	418.21	-0.10

Tab. 6. Identifikace MS/MS spekter K 504-CML modifikovaného peptidu (po glykaci).

Fragmentovaný iont [m/z]	Iont	Teoret. hmotnost [Da]	Rozdíl hmotnosti [Da]	Frag. iont [m/z]	Iont	Teoret. hmotnost [Da]	Rozdíl hmotnosti [Da]
y-ions				b-ions			
361.14	y ₃	361.19	-0.05	1353.7 4	b ₁₅	1353.66	0.08
529.23	y ₅	529.28	-0.05	---	b ₁₃	1185.58	---
586.33	y ₆	586.31	0.02	1128.3 2	b ₁₂	1128.55	-0.23
755.61	y ₇ - NH ₃	755.39	0.22	---	b ₁₁	942.44	---
869.45	y ₈	869.47	-0.02	---	b ₁₀	845.39	---
926.49	y ₉	926.49	0.00	788.31	b ₉	788.36	-0.05
997.56	y ₁₀	997.53	0.03	770.31	b ₉ -H ₂ O	770.35	-0.04
1096.56	y ₁₁	1096.60	-0.04	699.41	b ₈ -H ₂ O	699.31	0.10
1153.75	y ₁₂	1153.62	0.13	---	b ₇	618.26	---
1268.79	y ₁₃	1268.65	0.14	---	b ₆	561.24	---
699.41	y ₁₅ ⁺⁺	698.86	0.55	---	b ₅	446.21	---
755.61	y ₁₆ ⁺⁺	755.38	0.23				
828.37	y ₁₇ ⁺⁺	828.92	-0.55				

1	MFSFVDLRLL	LLLAARTALLT	HGQEEGQEEG	GEEDTFPVTG	VQNSLRYHER	50
51	LDWKPVBCQI	CVCDNGNVLG	LDVICDELKD	CPNAKVFETDE	CCFVCFEGQE	100
101	SFTDQETIGV	EGPKJDTGER	GPRGFAGPPG	RDGIFGQFGL	FGPPGPPGPF	150
151	GPPGLGGNEA	FQLSYGYDEK	STGISVPGPM	GPSGPRGLPG	PPGAPGPQGF	200
201	QGPPEPGEPE	GASGPMGPRG	PPGPPGKNGD	DGEAGKPGRP	GERGPPGPQG	250
251	ARGLPGTAGL	PGMKGHRGFS	GLDGAKGDAG	PAGPKGEPGS	PGENGAPQOM	300
301	GPRGLPGERG	RPGAPGPAGA	RGNDGATGAA	GPPGPTGPAG	PPGFPGAVGA	350
351	KEGGGPQGPR	GSEGPQGVRG	EPGPPGPAGA	AGPAGNPGAD	GQPGAKGANG	400
401	APGIAGAPGF	PGARGPSGPQ	GPSGPPGPKG	NSGEPGAPGS	KGDTGAKGEP	450
451	GPTGIQGPPG	PAGEEGKRG	RGEPGPAGLP	GPPGERGGPG	SRGFPGADGV	500
501	AGPKGPAGER	GAPGPAGPKG	SPGEAGRPGE	AGLPGAKGLT	GSPGSPGPDG	550
551	KTGPPGPAGQ	DGRPPGPPGP	GARGQAGVMG	FPGPKGAAGE	PGKAGERGVP	600
601	GPPGAVGPAG	KDGEAGAQQP	PGPAGPAGER	GEQGPAGSPG	FQGLPGPAGP	650
651	PGEAGKPGEQ	GVPGDLGAPG	PSGARGERGF	PGERGVQGGP	GPAGPRGANG	700
701	APGNDGAKGD	AGAPGAPGSQ	GAPGLQGMPG	ERGAAGLPGP	KGDRGDAGPK	750
751	GADGAPGKDG	VRGLTGPIGP	PGPAGAPGDK	GEAGPSGPAG	PTGARGAPGD	800
801	RGEPGPPGPA	GFAGPPGADG	QPGAKGEPGD	AGAKGDAGPP	GPAGPAGPPG	850
851	PIGNVGA GP	<u>K</u> GARGSAGPP	GATGFPGAAG	RVGPPGPSGN	AGPPGPPGPA	900
901	GKEGSKGPRG	ETGPAGRPGE	VGPPGPPGPA	GEKGAPGADG	PAGAPGTPGP	950
951	QGIAGQRGVV	GLPGQRGERG	FPGLPGPSGE	PGKQGPSGAS	GERGPPGPMG	1000
1001	PPGLAGPPGE	SGREGAPGAE	GSPGRDGS PG	AKGDRGETGP	AGPPGAPGAP	1050
1051	GAPGPVGPAG	KSGDRGETGP	AGPAGPIGPV	GARGPAGPQG	PRGDKGETGE	1100
1101	QGDRGIKGRH	GFSGLQGPPG	PPGSPGEQGP	SGASGPAGPR	GPPGSAGSPG	1150
1151	KDGLNLGLPGP	IGPPGPRGRT	GDAGPAGPPG	PPGPPGPPGP	PSGGYDLSFL	1200
1201	PQPPQEKAHD	GGRYRRADDA	NVVRDRDLEV	STTLKSLSQQ	LENIRDFEGS	1250
1251	RKNFARTCRD	LKNCHSDWKS	GETWIDENQG	CNLDAIKVFC	NMETGETGVY	1300
1301	FTQFSVAQMN	WYISKNEKEN	KHWVGESEMT	GGPQFEYGGQ	GSEPAIWAIQ	1350
1351	LTFLEKLMSTE	ASQNTIYHK	NSVAYMDQQT	GNLKEALLLQ	GSNEIEIRAE	1400
1401	GNSKFTYSVT	YLGCTSRTEGA	WGETVIEYKT	TMTSKLEIIF	VAELDVGAFD	1450
1451	QEFGFDVSPA	CFL				1463

Obr. 45. Sekvence hovězího kolagenu databáze SwisProt (P 02453, alfa 1, typ I) po glykaci ribózou. Peptidy zjištěné MS/MS analýzou jsou označeny tučně, modifikované lysiny (K) jsou podtržené. Propeptidy jsou odlišeny malým písmem.

5.2.3.2. Malondialdehydem modifikované vzorky

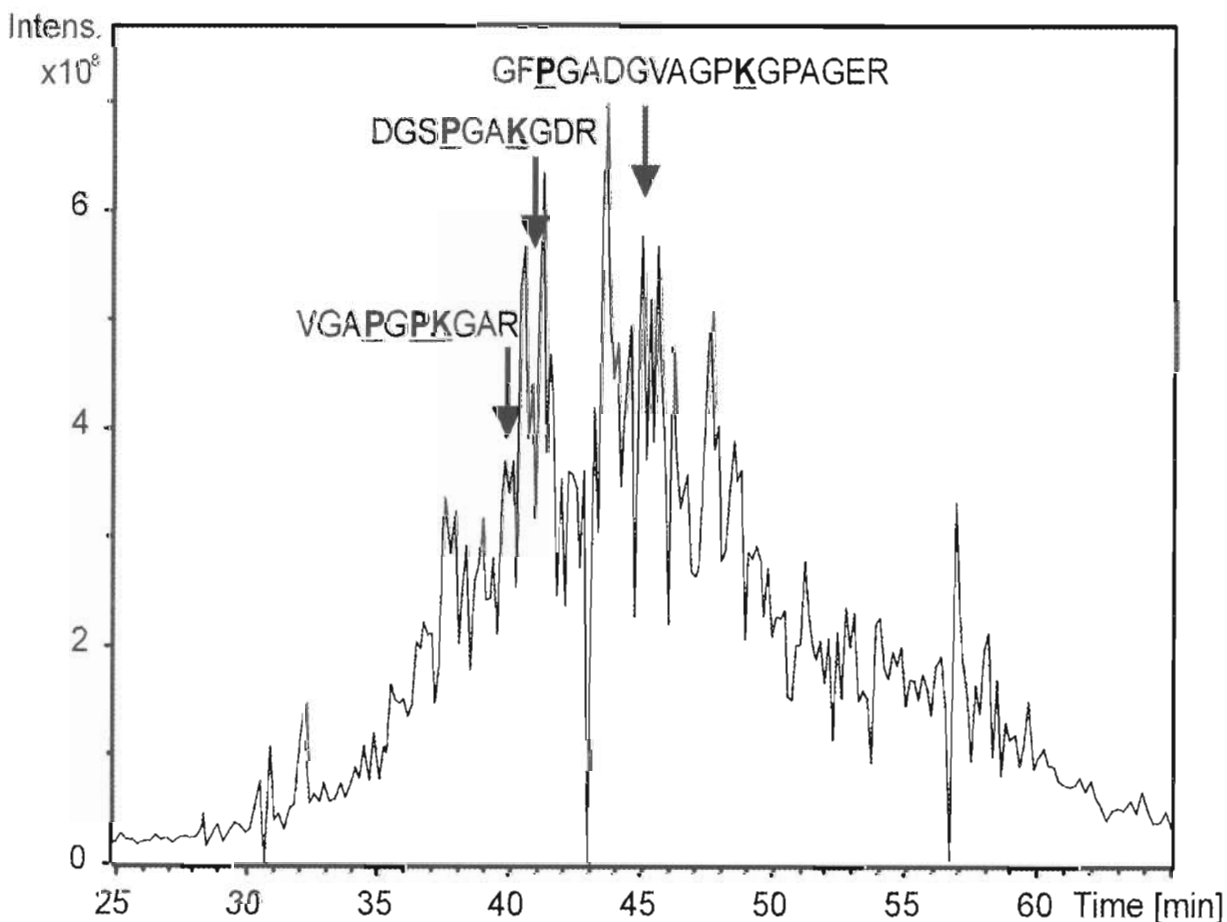
Zatímco CML modifikace byla nalezena u obou typů ribózou i glukózou modifikovaných vzorků, reakce kolagenu s malondialdehydem nezasahuje stejné glykační místo a typ modifikace. Kvalitativní MS/MS spektra ukazují, že pouze u dvou vzorků byla objevena argpyrimidinová modifikace R 321 v peptidové sekvenci **PGPAGARRGN**, která byla také objevena u jednoho kontrolního vzorku.

5.2.2.4. CE-MS/MS analýza

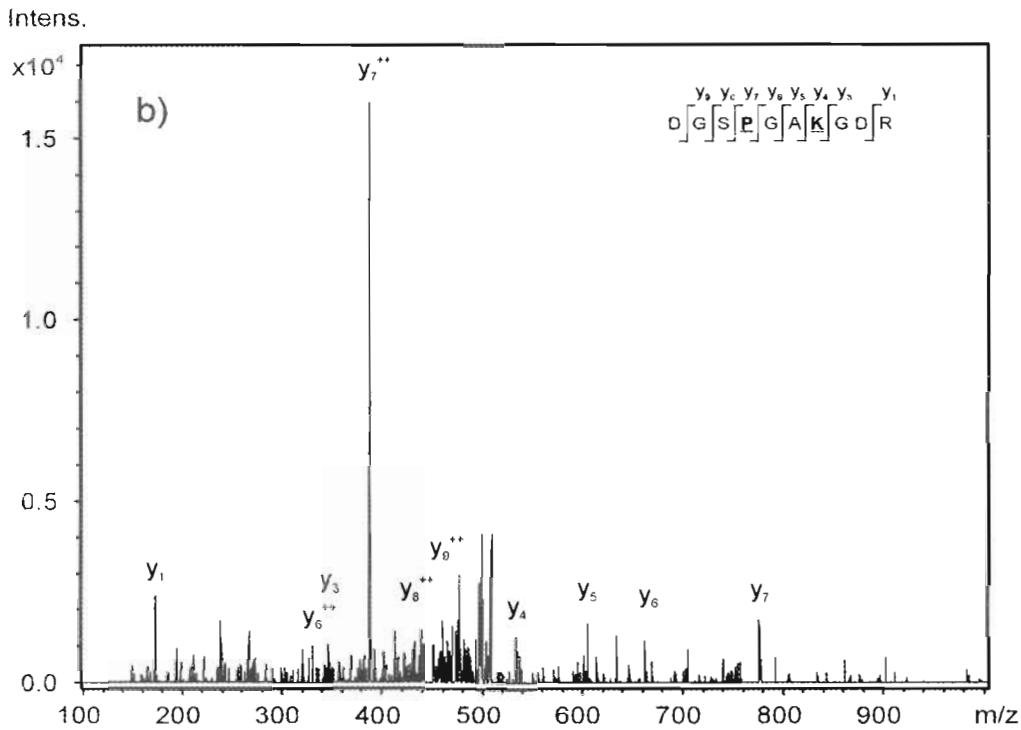
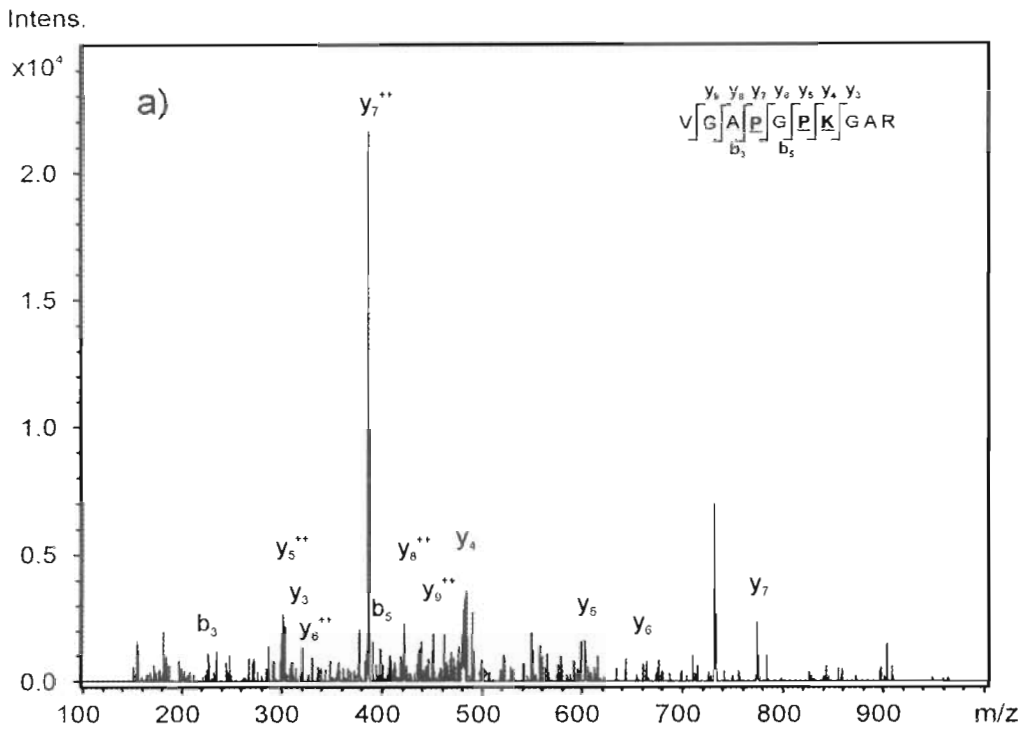
CE-MS/MS analýza poskytla podobné výsledky jako HPLC-MS. Rovněž tato analýza byla rozdělena do dvou sekcí na základě chemizmu reaktantů.

5.2.2.4.1. Ribózou a glukózou modifikované vzorky

V elektroferogramu ribózou glykovaných kolagenních vzorků (Obr. 46) byly identifikovány tři CML-modifikované peptidy. Jejich peptidové sekvence byly GFPGADGVAGPKGPAGER (migrační čas = 45.1 min) s K 504 modifikovaným lysinem (Obr. 44 b), VGAPGPKGAR (migrační čas = 39.8) s K 861 modifikovaným lysinem (Obr. 47 a) a DGSPGAKGDR (migrační čas = 40.9 min) s K 1032 modifikovaným lysinem (Obr. 47 b).



Obr. 46. CE-MS profil kolagenního vzorku glykovaného ribózou.



Obr. 47 a, b) Fragmentová spektra CML modifikovaných peptidů VGAPGPKGAR ($MH^+ = 909.5$, $m/z = 500.2$, $z = 2$, $\Delta m/z$ spojená s CML modifikací: $+ 58.0$) a DGSPGAKGDR ($MH^+ = 517.2$, $m/z = 959.5$, $z = 2$, $\Delta m/z$ spojená s CML modifikací: $+ 58.0$) naměřená metodou CE-MS/MS.

U glukózou modifikovaných vzorků kolagenu byly metodou CE-MS/MS detekovány dva CML modifikované peptidy s migračními časy 45.1 a 39.6 minut. Zatímco prvně jmenovaný peptid o sekvenci (GFPGADGVAGPKGPAGER) byl také objeven metodou HPLC-MS/MS, druhý peptid (VGAPPGPKGAR) u glukózou modifikovaných vzorků metodou HPLC-MS/MS nebyl detekován (byl detekován pouze ve vzorcích modifikovaných ribózou).

5.2.2.4.2. *Malondialdehydem modifikované vzorky*

Metodou CE-MS/MS nebyly nalezeny žádné modifikované peptidy. Metoda kapilární elektroforézy vykazovala nižší citlivost než HPLC.

5.2.3. Spektroskopická měření

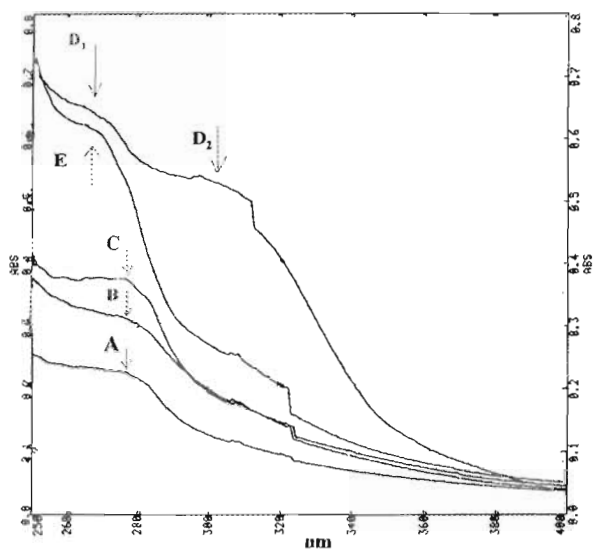
5.2.3.1. Spektroskopická měření vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach štěpených proteinázou K

Byla měřena absorpční spektra vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach v rozmezí 190-400 nm. Výsledky jsou zřejmé z tabulek 7 a 8 a obr. 48-50.

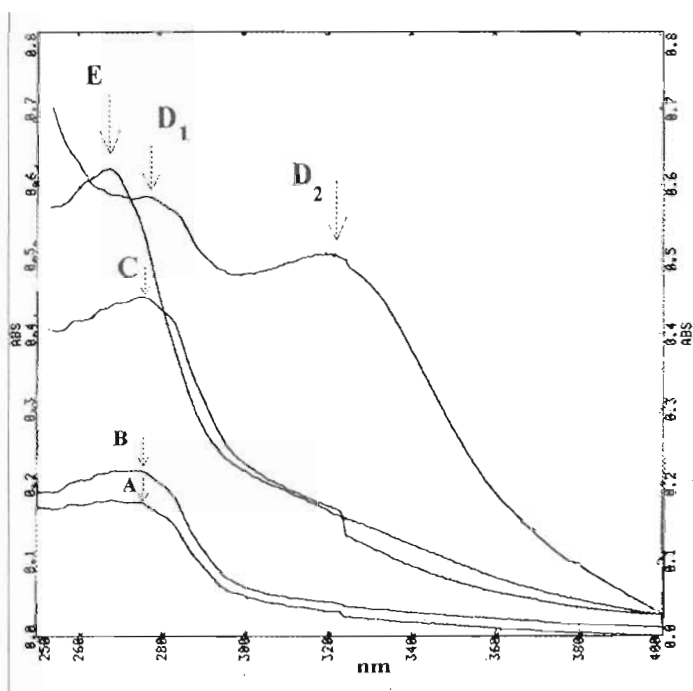
Z tab. 7 vyplývá, že působením glyoxalu vzniká nové absorpční maximum λ 323 nm pro šlachy a kůži a 303 nm pro vzorek kolagenu typu I, na rozdíl od inkubace s ostatními modifikátory (glukóza, ribóza, glutardialdehyd). Působením glyoxalu dále vzniká další menší maximum v oblasti 280 nm. V případě inkubace vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach glutaraldehydem štěpených proteinázou K. byly naměřeny kratší vlnové délky než působením glyoxalu.

Tab. 7. Spektroskopická měření jednotlivých vzorků (kolagen typ I, kůže a šlacha s jednotlivými modifikátory) štěpených proteinázou K s vlnovými délkami (znázorněno na obr. 48-50).

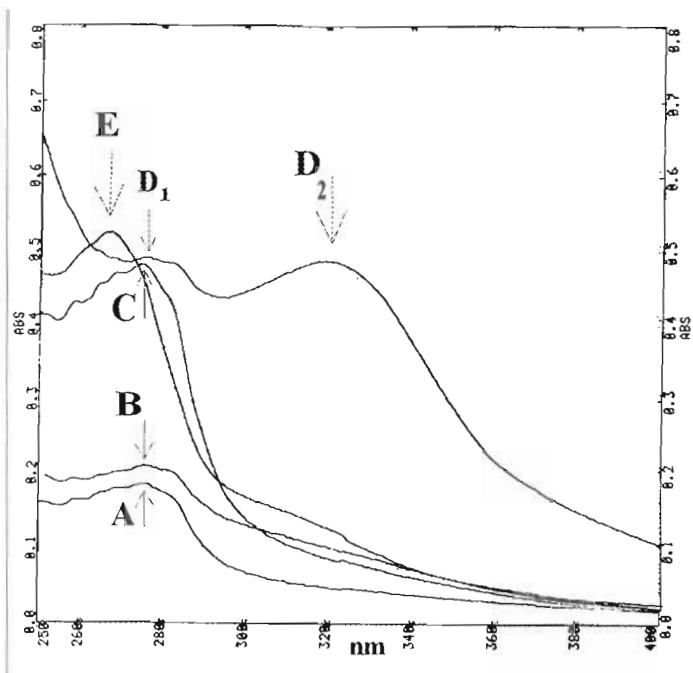
Vzorek	Vlnová délka λ (nm)
Kolagen typu I + pufr	278
Kolagen I + pufr + glukóza	278
Kolagen I + pufr + ribóza	278
Kolagen I + pufr + glyoxal	270, 303
Kolagen I + pufr + glutardialdehyd	270
Kůže + pufr	276
Kůže + pufr + glukóza	276
Kůže + pufr + ribóza	279
Kůže + pufr + glyoxal	280, 323
Kůže + pufr + glutardialdehyd	269
Šlacha + pufr	278
Šlacha + pufr + glukóza	278
Šlacha + pufr + ribóza	280
Šlacha + pufr + glyoxal	280, 322
Šlacha + pufr + glutardialdehyd	268



Obr. 48. Absorbční spektrum modifikovaného kolagenu typu I štěpeného proteinázou K. Absorbční maxima jsou označena šipkou a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. A) šlacha + pufr, B) šlacha + pufr + glukóza, C) šlacha + pufr + ribóza, D) šlacha + pufr + glyoxal, E) šlacha + pufr + glutardialdehyd.



Obr. 49. Absorbční spektrum modifikovaných vzorků kůže štěpených proteinázou K. Absorbční maxima jsou označena šipkou a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. A) šlacha + pufr, B) šlacha + pufr + glukóza, C) šlacha + pufr + ribóza, D) šlacha + pufr + glyoxal, E) šlacha + pufr + glutardialdehyd.



Obr. 50. Absorbční spektrum modifikovaných vzorků šlach štěpených proteinázou K. Absorbční maxima jsou označena šipkou a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. A) šlacha + pufr, B) šlacha + pufr + glukóza, C) šlacha + pufr + ribóza, D) šlacha + pufr + glyoxal, E) šlacha + pufr + glutardialdehyd.

5.2.3.2. Spektroskopická měření vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach štěpených kolagenázou

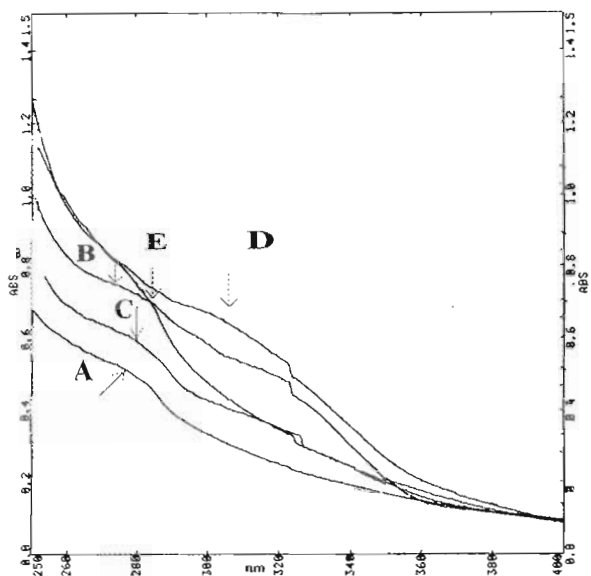
Byla měřena absorpční spektra vzorků kolagenu typu I, kůže a šlach v rozmezí 190-400 nm. Touto metodou byly získány následující výsledky Tab. 8.

Působením glyoxalu na vzorky šlach pokusných zvířat bylo opět naměřeno nové absorpční maximum. U vzorků kůže a kolagenu typu I toto maximum naměřeno nebylo.

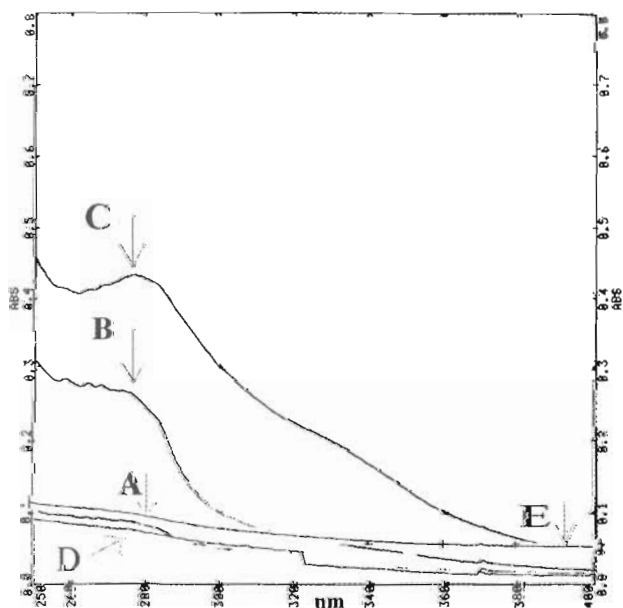
Tab. 8. Spektroskopická měření jednotlivých vzorků (kolagen typ I, kůže a šlacha s jednotlivými modifikátory) štěpených kolagenázou s vlnovými délkami (znázorněno na obr. 50-53).

Vzorek	Vlnová délka λ (nm)
Kolagen typu I + pufr	279
Kolagen I + pufr + glukóza	283
Kolagen I + pufr + ribóza	280
Kolagen I + pufr + glyoxal	285
Kolagen I + pufr + glutardialdehyd	307
Kůže + pufr	280
Kůže + pufr + glukóza	278
Kůže + pufr + ribóza	278
Kůže + pufr + glyoxal	-
Kůže + pufr + glutardialdehyd	-
Šlacha + pufr	278
Šlacha + pufr + glukóza	278
Šlacha + pufr + ribóza	278
Šlacha + pufr + glyoxal	323
Šlacha + pufr + glutardialdehyd	-

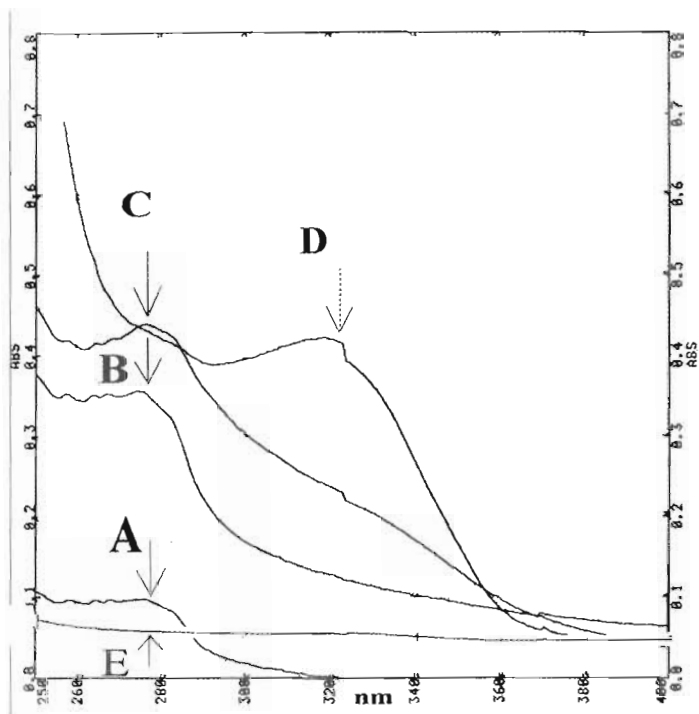
Data uvedená v grafech na obr. 48, 49, 50, 51, 52, 53 byla převedena do tabulek č. 7 a 8.



Obr. 51. Absorbční spektrum modifikovaných vzorků kolagenu typu I štěpených kolagenázou. Absorbční maxima jsou označena šipkou a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8. A) šlacha + pufr, B) šlacha + pufr + glukóza, C) šlacha + pufr + ribóza, D) šlacha + pufr + glyoxal, E) šlacha + pufr + glutardialdehyd.



Obr. 52. Absorbční spektrum modifikovaných vzorků kůže štěpených kolagenázou. Absorbční maxima jsou označena šipkou a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8. A) kůže + pufr, B) kůže + pufr + glukóza, C) kůže + pufr + ribóza, D) kůže + pufr + glyoxal, E) kůže + pufr + glutardialdehyd.



Obr. 53. Absorbční spektrum modifikovaných vzorků šlach štěpených kolagenázou. Absorbční maxima jsou označena šipkou a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8. A) šlacha + pufr, B) šlacha + pufr + glukóza, C) šlacha + pufr + ribóza, D) šlacha + pufr + glyoxal, E) šlacha + pufr + glutardialdehyd.

6. DISKUZE



6.1. POKUSY IN VIVO

6.1.1. Měření pentosidinu

Naměřené hodnoty jsou v souladu s již publikovanými údaji ([133], [134] a [135]), kde byl pentosidin nalezen v kůži diabetických pacientů, aortách diabetických potkanů a psů, a v psí oháňce. V ocasních šlachách byly popsány nižší hladiny pentosidinu než v aortách [133]. Zjištěná data a jejich závislosti plně odpovídají předpokladům. V aortách HTG potkanů byl nalezen v závislosti na obsahu triglyceridů vyšší obsah pentosidinu u všech tří druhů tkání. Podle předpokladů obsah pentosidinu byl zvýšený při zvýšeném příjmu cukru (fruktózy). Kůže, ocasní šlachy a aorty šest měsíců starých potkanů kmene HTG neměly změněnou extracelulární matrix (alespoň z hlediska obsahu kolagenu a elastinu) a rovněž nezměněný obsah pentosidinu ve srovnání s ostatními druhy potkanů (kmen Lewis a Wistar). Jedním ze zásadních parametrů, určujících míru glykace je koncentrace glukózy v plasmě zvířat. Tyto koncentrace jsme neměřili, ale literatura [127] uvádí, že hladiny glukózy v séru zvířat, byly výrazně vyšší u zvířat napájených vodou s 10 % roztokem fruktózy než u kontrol.

6.2. POKUSY IN VITRO

K podrobné analýze posttranslačních změn kolagenu, jejich produktů, je třeba použít co nejméně destruktivních metod štěpení struktury bílkoviny. Kyselá, ale i alkalická hydrolyza proteinů může vést k tvorbě artefaktů, které mohou být omylem považovány za „normální“ (fyziologické) produkty modifikace. Z tohoto pohledu, lze např. zmínit [2-(2-furoyl)-4(5)-furanyl-1H-imidazol] (FFI) produkt, jehož objevení roku 1984 jako glykačního produktu [136] bylo oznámeno v roce 1988 v prestižním časopise The Journal of Biological Chemistry [137]. Ještě tentýž rok bylo prokázáno, že se jedná o artefakt vzniklý při alkalické hydrolyze [138]. Je zajímavé, že ještě několik let po tomto „upřesnění“ vycházely vědecké publikace zabývající se stanovením tohoto produktu v glykovaných tkáních.

Z těchto důvodů byly pro detailní studium struktury proteinu v předložené práci použity různé metody enzymatického štěpení. K těmto analýzám bylo třeba vyvinout analytické metody umožňující separaci a následnou analýzu neštěpených modifikovaných proteinů.

6.2.1. Modifikace hovězího sérového albuminu (BSA)

Aplikace souboru chromatografických a elektroforetických metod jako jsou HPLC/UV, HPLC/MS, PAGE, CE/UV umožňuje účinný výzkum neenzymatických posttranslačních modifikací BSA glykovaného různými modifikátory. Tyto modifikace poukazují na důležitost reakce proteinů s modifikátory účastnících se některých fyziologických procesů, jako je např. stárnutí. Změny v HPLC/UV, HPLC/MS a CE/UV tryptických peptidových mapách jak modifikovaného, tak i nemodifikovaného albuminu, svědčí o strukturální závislosti reakce mezi volnou amino skupinou proteinu a oxosloučeninou. Wada a kol. [130] již dříve publikovali skutečnost, že peptidová sekvence 548-557 (KQTALVELLK) obsahující glykační místo Lys 548 je velmi reaktivní. V našich analýzách se tato peptidová sekvence vyskytuje pod píkem č. 30 v kontrolní analýze (obr. 30) a jak bylo očekáváno, jak tento pík, tak i samotný peptid po reakci s glukózou zanikl. To znamená, že tato sekvence je velmi reaktivní. Ostatní lysinové zbytky citlivé k modifikaci glukózou jsou Lys 309 (fragment 300-309, pík 21), Lys 597 (fragment 588-607, pík 18) a arginin 220 (fragment 219-220, pík 1).

6.2.2. Modifikace kolagenu

Biosyntéza kolagenu je vícekrokový proces charakterizovaný modifikací proteinů. Mnohé z těchto modifikací jsou specifické právě pro kolagen. Během syntézy se hydroxylací prolinových a lysinových zbytků vytváří hydroxyprolin (Hyp) a hydroxylysin (Hyl). Po sekreci do extracelulárního prostoru jsou C- a N- konce propeptidů odstraněny což umožňuje seskupovat molekuly kolagenu ve fibrily. Následně mohou být kolagenní molekuly vystaveny posttranslačním modifikacím (tvorba kovalentních příčných vazeb). Všechny tyto modifikace vyžadují působení enzymů [6]. Neenzymatické modifikace kolagenu jsou v literatuře široce diskutovány [139], některé, jako např. pentosidin [86] či CML [65] jsou i detekovány a kvantifikovány, ale stále v podstatě chybí informace o konkrétních vazebných místech v proteinu (sekvence).

6.2.2.1. HPLC a CE analýza posttranslačně modifikovaného kolagenu

V proteomickém výzkumu jsou široce používané tzv. spřažené techniky. V principu se jedná o izolaci, separaci proteinu, jeho naštěpení a následnou analýzu spektrálními metodami. Tyto metody jsou dobře aplikovatelné pro hydrofilní rozpustné proteiny. Právě z hlediska

nerozpustných proteinů, mezi které rozhodně patří i strukturální bílkovina kolagen, je třeba zvolit jiný přístup. Tento přístup je založen na přesně definovaném štěpení proteinu, následné separaci a analýze vzniklého bohatého spektra peptidů. V proteomickém výzkumu jsou (vedle dvoudimenzionální elektroforézy) velice často používány metody HPLC a CE. Tyto metody umožňují užití multidimensionálního přístupu pro rozlišení směsi velkého počtu proteinů nebo peptidů a zjednodušují jejich MS identifikaci. V prezentované práci byly nalezeny spolehlivé metody pro stanovení neenzymatických posttranslačních modifikací kolagenu. Výsledkem těchto separačních HPLC a CE metod je peptidové mapování, které následovalo po specifickém enzymatickém štěpení. Využitím těchto separačních metod je možné detekovat několik minoritních, ale významných rozdílů v komplexní sadě peptidů. Tyto rozdíly jsou způsobeny neenzymatickými reakcemi volných amino skupin proteinů s aldehydickými cukry (glukózou a ribózou). Částečnému objasnění chemizmu posttranslačních modifikací proteinů glykovanými různými modifikátory, napomohli Dolhofer a kol. [132] (použili více reaktivní oxo-modifikátor glutardialdehyd). V porovnání s metodou plošné gelové elektroforézy, klasicky používané pro separaci proteinů, mají metody HPLC a CE vyšší citlivost, rychlejší čas analýzy, menší nástřikový objem vzorku a možnost automatizace. Spojení HPLC a CE je velmi výhodné, z hlediska vysoké účinnosti [140]. Moore a Jorgenson použili on-line spojení RP HPLC-CE pro stanovení směsi peptidů [141]. Pro identifikaci proteinů je v literatuře hojně citovaná metoda HPLC/CE spojená s hmotnostním spektrometrem poskytující vysoké rozlišení [142].

6.2.2.2. HPLC/MS a CE/MS analýza posttranslačně modifikovaného kolagenu

Hmotnostní spektrometrie (MS), zejména ve spojení s HPLC nebo CE, je moderní technikou pro stanovení proteinové sekvence, ale i posttranslačních modifikací a určení přesného místa jejich glykace. Techniku HPLC-MS pro stanovení kolagenu použili ve své publikaci Verzijl a kol. [143]. Účinnost separace peptidů pomocí kapilární elektroforézy je mnohem vyšší než v případě HPLC [144]. Existuje více metod pro stanovení peptidů/proteinů využívajících jak techniky HPLC, tak i CE v kombinaci s MS, ale velmi slibná je právě z důvodu separační účinnosti metoda CE-MS [145]. Jako první popsali metodu CE-ESI-MS bez přidané doplňkové obalové (sheath) kapaliny Olivares a kol. [146], ale více je používaná metoda CE-ESI-MS s přítomností této obalové (sheath) kapaliny [147]. Spojení metod CE-ESI-MS vždy vyžaduje optimalizaci jednotlivých parametrů (napětí na kapiláře, průtok obalové kapaliny atd.) [148].

V této práci byly využity techniky HPLC-MS/MS a CE-MS/MS ke stanovení přesných glykačních míst, která jsou nejvíce modifikována CML. Naše výsledky určily, privilegovaná glykační místa kolagenu typu I modifikovaného ribózou nebo glukózou. Těmito místy byly lysiny 504 a 1032 (MS/MS spektra umožnila přesná stanovení sekvence modifikovaného peptidu kolagenu). Tyto výsledky jsou v souladu se závěry ostatních autorů, kteří našli CML modifikaci majoritně zastoupenou u tkáňových proteinů, částečně i u kolagenu [65].

Při studiu kolagenu bylo použito štěpení CNBr a následně trypsinem. Typickým místem pro štěpení trypsinu je lysin (a arginin). V případě, že je lysin modifikovaný (v našem případě CML), ke štěpení u takto změněného lysinu nedochází. To bylo dokumentováno ve všech případech modifikace-kolagenu. Peptid s CML byl vždy delší o jednu sekvenci obsahující lysin např. **GFP**GADGVAG**PK**GPAGER.

LC-MS/MS analýzy kolagenů glykovaných lipido-peroxidačním produktem (MDA) ukázaly rozdílné výsledky oproti glukóze nebo ribóze. Vyšší reaktivita MDA vede pravděpodobně k vyšší tvorbě příčně-vazebných interakcí.

CE-MS/MS analýza poskytla podobné výsledky jako HPLC-MS. Vzhledem k citlivosti metody CE-MS/MS nebyly u malondialdehydem modifikovaných vzorků nalezeny žádné modifikované peptidy. Nižší citlivost metody CE-MS/MS byla způsobena velkým naředěním směsi peptidů/proteinů doplňkovou obalovou (sheath) kapalinou.

Identifikaci CML u glykovaných proteinů popisuje Ahmed a kol. [65], kteří pro stanovení CML (po kyselém naštěpení) použili techniku GC/MS a HPLC. Stanovením a kvantifikací CML jako modifikačního produktu AGE_s se zabývali také Merbel a kol.[149], kteří tento produkt stanovili v lidské plazmě technikou ELISA. Koncentrace CML byla v tomto případě 4,13 µg/ml. Ve všech dosud popsanych případech se jedná pouze o stanovení přítomnosti CML (ať kvalitativní či kvantitativní) a ne v identifikaci modifikací.

6.2.3. Spektroskopická měření

Absorbční spektra vzorků kůže a šlach modifikovaných glyoxalem (obr. 49 a 50) jsou velmi podobná tvorbou nového absorpčního maxima. Tuto tvorbu dvou absorpčních maxim lze vysvětlit tím, že dochází k tvorbě nových sloučenin posttranslačních modifikací. Lze očekávat, že se může jednat např. o aromatické heterocyklické sloučeniny, které jsou samy o sobě chromofory. Některé z takových sloučenin jsou popsány i v potravinářské literatuře

[150]. Porovnáním spektrálních měření vzorků štěpených proteinázou K se vzorky štěpenými kolagenázou je zřejmé, že proteináza K je vhodnějším enzymem pro sledování změn posttranslačních modifikací než kolagenáza. Porovnáním absorpčního spektra vzorku kolagenu typu I štěpeného proteinázou K (obr. 48) oproti vzorku štěpeného kolagenázou na (obr. 51) jsou lépe patrné změny stupně glykace jednotlivými modifikátory.

Absorpční spektra u modifikovaných vzorků kůže a šlach štěpených kolagenázou na (obr. 52 a 53) jsou podobná, ale s tím rozdílem, že u modifikovaných vzorků kůže (modifikované glyoxalem a glutardialdehydem) nemá naměřené spektrum žádná významná absorpční maxima, to potvrzuje, že kolagenáza není vhodným enzymem ke štěpení vzorků (šlachy a kůže) pro tuto studii.

Z uvedených absorpčních spekter jednotlivých vzorků je patrné, že u vzorků kolagenu typu I a šlach modifikovaných glyoxalem a glutardialdehydem (v případě kolagenu I) dochází ke zvyšování absorpčního maxima. Tuto změnu lze vysvětlit tvorbou posttranslačních modifikací (tvorba dvou absorpčních maxim). Glykací bílkovin dochází ke změně jejich fyzikálních a spektrálních vlastností (změna barvy či fluorescence). Literatura uvádí fluorescenci fluorescenčních sloučenin měřenou při 350 ex/400em nm [151]. Linda B. Lingelbach a kol. [152] měřili pentosidin fluorescencí při 370 ex/440 em nm, stejně jako Deyl a kol.[153], kteří měřili glykační produkty (pentosidin) při stejné fluorescenci (370 ex/440 em nm). Bylo konstatováno, že samotné měření fluorescence pro stanovení produktů posttranslačních modifikací není dostatečné, je třeba separovat a analyzovat přímo produkty glykace. Fluorescence, při kterých se měří glykace jednotlivých produktů vznikajících při reakci s cukry jsou: pro pentosidin 335 ex/385 em nm [86], [95], produkty pokročilé glykace 370ex/440em nm [154], [155], fluorofor LM-1 360ex/460em nm [156] a 3-deoxyglukoson/butylamin 370ex/455em nm [157]. Literatura uvádí také vlnovou délku UV 295 nm měřenou u glykačních produktů [158], [159] a [160].

7. ZÁVĚR



Při studiu pentosidinu jako pokročilého glykačního produktu bylo zjištěno, že hladina pentosidinu není závislá na hladině triglyceridů a nebo jejich metabolických produktů. Vyšší obsah triglyceridů v krvi HTG potkanů neměl vliv na obsah pentosidinu u všech tří druhů tkání. Bylo zjištěno, že tří-týdenní podávání 10 % roztoku fruktózy zvyšuje obsah pentosidinu v aortě a kůži u všech tří druhů potkanů (Lewis, Wistar a HTG). Vyšší obsah pentosidinu byl také objeven v ocasní šlaše potkanů kmene Lewis a HTG, ale tyto změny nejsou příliš významné. Nebyly také objeveny žádné významné změny v obsahu kolagenu a elastinu mezi kontrolními potkany a potkany napájenými roztokem o vyšším obsahu fruktózy.

Při studiu posttranslačních modifikací albuminu bylo zjištěno, že význam a účinnost jednotlivých oxo-sloučenin roste ve směru glukóza → ribóza → glyoxal → glutardialdehyd. Mírná posttranslační modifikace BSA byla objevena při reakci s glukózou. V tomto případě se jedná hlavně o monofunkční modifikace. Nejúčinnějším modifikátorem byl glutardialdehyd. Při reakci s ním dochází k nejintenzivnější modifikaci a vzniká velké množství inter- a intra-molekulárních příčných vazeb. Bylo zjištěno, že nejreaktivnějším glykačním místem pro tvorbu příčných vazeb u albuminu je lysin 548, dále lysin 309, lysin 597, arginin 220. Méně reaktivními místy jsou lysiny v poloze 88, 256, 263, 495, 528 a argininy v poloze 105, 218, 222 a 459.

Pozornost byla zaměřena na studium posttranslačních modifikací hlavní bílkoviny pojivové tkáně, kolagenu. Byly vyvinuty nové spolehlivé analytické metody (HPLC, CE) a jejich spojení pro stanovení neenzymatických posttranslačních modifikací kolagenu. Těmito metodami byla prokázána vyšší reaktivita ribózy ve srovnání s glukózou.

Byly nalezeny a optimalizovány metody k identifikaci glykačních míst kolagenu. HPLC-MS/MS a CE-MS/MS metody umožnily nalézt přesná místa modifikace pokročilých produktů glykace. Bylo zjištěno, že kolagen α_1 typu I glykovaný glukózou nebo ribózou preferuje tato glykační místa: lysiny 504 a 1032. Ve vyzrálém kolagenním peptidu bylo identifikováno 17 modifikačních míst zahrnujících jednu z reaktivních sekvencí (PKG, AKG), ze kterých bylo pouze pět glykovaných (obsahující lysiny 504, 519, 750, a 861 s PKG reaktivní sekvencí a 1032 s AKG reaktivní sekvencí). Byly také objeveny další čtyři PKG reaktivní sekvence a šest AKG reaktivních sekvencí, které odpovídají spektrům neglykovaných peptidů. Peptidy s lysiny 276 a 447 (AKG reaktivní sekvence) chyběly. MS/MS spektra prokázala přítomnost CML u glykovaného kolagenu. Vyšší počet CML modifikačních míst pro ribózu (5) ve srovnání s glukózou (2) je v souladu s její vyšší reaktivitou. Reaktivita ribózy je příčinou vyšší tvorby karboxymethyllysinu. Lze tedy říci, že

rozdílná reaktivita u ribóz a glukóz ukazuje, že lysin na pozicích 504 a 1032 je reaktivnější než lysin na pozicích 519, 750 a 861.

Závěrem lze říci, že vliv glykačních reakcí na organismus je velmi široký. U kolagenu byl prokázán vzrůst modifikací a příčných vazeb. Tvorba těchto vazeb je vysvětlována právě reakcí bílkovin s Amadoriho produkty vznikajícími při glykaci. Glykace patří mezi ty reakce, které podstatně ovlivňují život organismů, a to jak při stárnutí, tak i při patologických projevech. To je i jedním z důvodů, proč se její výzkum v posledních letech prudce rozvíjí. Cílem předložené práce bylo přispět do tohoto výzkumu.

Proteomický přístup k analýze a stanovení modifikací proteinů byl také využit v dalších výzkumech jako např. určení proteinů ve skořápkách ptačích vajec.

Seznam publikací:

Publikace týkající se tématu:

- 1) Mikulíková K., Mikšík I., Deyl Z.: Non-enzymatic posttranslational modifications of bovine serum albumin by oxo-compounds investigated by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. B*, 815:315-331, 2005.
- 2) Mikulíková K., Eckhardt A., Mikšík I.: Posttranslational modifications of collagen studied by off-line coupling of HPLC and CE. *J. Separat. Science*, 29: 1126-1131, 2006.
- 3) Mikšík I., Sedláková P., Mikulíková K., Eckhardt A.: Capillary electromigration methods for the study of collagen, *J. Chromatography B*, 841:3-13, 2006.
- 4) Mikulíková K., Eckhardt A., Pataridis S., Mikšík I.: Study of posttranslational non-enzymatic modifications of collagen using capillary electrophoresis/mass spectrometry and high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, in press, 2007.
- 5) Mikulíková K., Eckhardt A., Kuneš J., Zicha J., Mikšík I.: Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Phys. Research*, in press, 2008.

Ostatní publikace:

- 1) Mikšík I., Mikulíková K., Pácha J., Kučka M., Deyl Z.: Application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for study of steroid-converting enzymes, *Journal of Chromatography B*, 800:145-153, 2004.
- 2) Mikšík I., Sedláková P., Mikulíková K., Eckhardt A., Cserhati T., Horváth T.: Matrices for capillary gel electrophoresis – a brief overview of uncommon gels. *Biomed. Chromatogr.*, 20:458-465, 2006.
- 3) Mikšík I., Eckhardt, A., Sedláková P., Mikulíková K.: Proteins of Insoluble Matrix of Avian (*Gallus Gallus*) Eggshell, *Connective Tissue Research*, in press, 2007.

Postery:

1. Kateřina Mikulíková, Adam Eckhardt and Ivan Mikšík, Posttranslational modifications of collagen – coupling of HPLC and capillary electrophoresis, 2005, Utrecht, Netherlands.
2. Kateřina Mikulíková, Adam Eckhardt and Ivan Mikšík, Analysis of Collagen Modifications by HPLC/CE, 2005, Pardubice, Česká Republika.
3. Kateřina Mikulíková, Adam Eckhardt, Stasis Pataridis and Ivan Mikšík, Study of posttranslational non-enzymatic modifications of collagen by CE/MS and HPLC/MS, 2006, Paříž, Francie.

Ústní prezentace:

1. Kateřina Mikulíková, Non-enzymatic posttranslational modifications of bovine serum albumin by oxo-compounds investigated by chromatographic and electrophoretic methods, 2005, Seč, Česká Republika.
2. Kateřina Mikulíková, Study of posttranslational non-enzymatic modifications of collagen by CE/MS and HPLC/MS, 2006, Paříž, Francie.

LITERATURA:

1. Wilkins, M.R., et al., *Biotech. Gen. Eng. Reviews*, 1995. **13**: p. 19.
2. Stepan, J.J., et al., *Markers of bone remodeling predict rate of bone loss in multiple sclerosis patients treated with low dose glucocorticoids*. *Clinica Chimica Acta*, 2004. **348**(1-2): p. 147-154.
3. Murray, R.K., et al., *Harperova Biochemie*. 1993, East Norwalk, Connecticut: Appletonand Lange.
4. Mitev, B., *RCSB PROTEIN DATA BANK*, in *Department of Chemistry and Chemical Biology*. 2006, the State University of New Jersey: New Jersey.
5. Kühn, K. and R. Glanville, *W. Molecular Structure and Higher Organization of Different Collagen Types*. *Biology of collagen* ed. 1980: Viidik, A Vuust, J.
6. Prockop, D.J. and K.I. Kivirikko, *Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy* *Annu. Rev. Biochem.*, 1995. **64**: p. 403-434.
7. Ayad, S., et al., *The Extracellular Matrix Factsbook*. 1994, London: Mackays of Chatham PLCw.
8. Blažej, A., et al., *Technologie kůže a kožešin*. 1984, Praha: SNTL.
9. Bruckner, P. and D.E. Brik, *Collagen*. 2005.
10. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemie*. 1990, Praha: Victoria publishing.
11. Goodsell, D.S., *RCSB PROTEIN DATA BANK*, in *Department of Chemistry and Chemical Biology*. 2000, the State University of New Jersey: New Jersey.
12. Adam, M. and Z. Deyl, *Vztah kolagenních struktur k některým fyziologickým a patologickým procesům*. *Čas. Lék. Čes.*, 1977: p. 1225-1231.
13. Novotná, J., *Imunogenní vlastnosti kolagenu za některých patologických stavů*, in *Výzkumný ústav chorob revmatických*. 1988: Praha.
14. Myllyharju, J. and K.I. Kivirikko, *Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms*. *TRENDS in Genetics*, 2004. **20**: p. 33-43.
15. Veit, G., et al., *Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(6): p. 3494-3504.
16. Mikšik, I., et al., *Capillary electromigration methods for the study of collagen*. *Journal of Chromatography B*, 2006. **841**: p. 3-13.
17. Mikšik, I., *Neenzymatická glykace pojivových bílkovin*, in *Fyziologický ústav, Akademie Věd České Republiky*. 1991: Praha.
18. Deyl, Z. and I. Mikšik, *Advanced separation methods for collagen parent α -chains, their polymers and fragments*. *Journal of Chromatography B*, 2000. **739**: p. 3-31.
19. Koch, M.e.a., *$\alpha 1$ (XX) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**: p. 23120-23126.
20. Fitzgerald, J. and J. Bateman, F., *A new FACIT of the collagen family: COL21A1*. *FEBS Lett.*, 2001. **505**: p. 275-280.
21. Banyard, J.e.a., *Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**: p. 20989-20994.
22. Koch, M.e.a., *Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**: p. 43236-43244.
23. Hashimoto, T.e.a., *CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV*. *EMBO J.*, 2002. **21**: p. 1524-1534.

24. Sato, K. e.a., *Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary*. J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 37678-37684.
25. Pace, J.M.e.a., *Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1*. Matrix Biol. , 2003. **22**: p. 3-14.
26. Boot-Handforth, R.P. e.a., *A novel and highly conserved collagen [proa1(XXVII)] with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family*. J. Biol. Chem., 2003. **278**: p. 31067-31077.
27. Masopust, J. and J. Bartůňková, *Patobiochemie buňky*. 2003, Praha.
28. Miller, E.J. and V.J. Matukas, *Chick cartilage collagen: A new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1969. **64**: p. 1264-1268.
29. Berna, M., et al., *Online immunoaffinity liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of a type II collagen peptide biomarker in rat urine: Investigation of the impact of collision-induced dissociation fluctuation on peptide quantitation*. Analytical Biochemistry, 2006. **356**(2): p. 235-243.
30. Chung, E. and E.J. Miller, *Collagen polymorphism: characterization of molecules with the chain composition [$\alpha 1$ (III)]₃ in human tissues*. Science, 1974. **183**: p. 1200-1201.
31. Deyl, Z., I. Mikšik, and A. Eckhardt, *Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins*. Journal of Chromatography B, 2003. **790**: p. 245-275.
32. Rhodes, R.K. and E.J. Miller, *Evidence for the existence of an $\alpha 1$ (V) $\alpha 2$ (V) $\alpha 3$ (V) collagen molecule in human placental tissue*. Collagen Rel. Res., 1981. **1**: p. 337-343.
33. Bentz, H., N.P. Morris, and L.W. Murray, *Isolation and partial characterization of a new human collagen with a extended triple-helical structural domain*. Vol. 80. 1983, U.S.A.: Proc.Natl.Acad.Sci. 3168-3172.
34. Sage, H., B. Trüeb, and Bornstein P., *Biosynthetic and structural properties of endothelial cell type VIII collagen*. J. Biol. Chem., 1983. **258**: p. 13391-13401.
35. Olsen, B.R., *Connect. Tissue Res.*, 1989. **23**: p. 115.
36. Sinex, F.M., *The role of collagen in ageing*. . Treatise on collagen, ed. G.B. S. 1968, New York: Academic Press. 409-448.
37. Deyl, Z., et al., *The effect of food restriction and low protein diet upon collagen type I and III ratio in rat skin*. Physiol. Bohemosl., 1981. **30**: p. 243-250.
38. Deyl, Z. and K. Macek, *The role of oxidative cross-link stabilization in increased collagen polymerization in food deprived rats*. Physiol. Bohemoslov., 1982. **31**: p. 537-542.
39. Deyl, Z., K. Macek, and M. Adam, *Changing of collagen polymerization by dietary regimes involvement of C-terminal cross-linking*. Mol. Physiol., 1983. **3**: p. 19-26.
40. Eyre, D., *Collagen cross-linking amino acids*. Meth. Enzymol., 1987. **144**: p. 115-139.
41. Hall, D.A., *The ageing of connective tissue*. 1976, London: Academic Press Inc.
42. Robins, S.P., M. Shimokomaki, and A.J. Bailey, *The chemistry of the collagen cross-links*. Biochem. J., 1973. **131**: p. 771-780.
43. Monnier, V.M., R.R. Kohn, and A. Cerami, *Accelerated age related browning of human collagen in diabetes mellitus*. . Vol. 81. 1984, U.S.A.: Proc.Natl.Acad.Sci. 583-587.
44. Maillard, L.C., *C. R. Seances Acad. Sci.*, 1912. **154**: p. 66.
45. Trivelli, L.A., H.M. Ranney, and H.T. Lai, *Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus*. N. Engl. J. Med., 1971. **284**: p. 353-357.
46. Robins, S.P. and A.J. Bailey, *Biochem. Biophys. Res. Corum.*, 1972. **48**: p. 76.

47. Abraham, E.C., S.S. Mruthinti, and R.E. Perry, *The Maillard Reaction in Aging Diabetes and Nutrition.*, ed. J.W. Baynes and V.M. Monnier. Vol. 304. 1989, New York: Alan R. Liss Inc. 123.
48. Kato, H., et al., *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989. **304**: p. 694.
49. Ruderman, N.B., J.R. Williamson, and M. Brownlee, *FASEB J.*, 1992. **6**(2905).
50. Monnier, V.M., *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition.*, ed. J.W. Baynes and V.M. Monnier. Vol. 304. 1989, New York: Liss Inc. 1.
51. Bucala, R., et al., *Modification of DNA by glucose-6-phosphate induces DNA rearrangements in Escherichia coli plasmid.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984. **82**: p. 8438-8442.
52. Lee, A.T. and A. Cerami, *Elevated glucose-6-phosphate levels are associated with plasmid mutations in vivo.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987. **84**: p. 8311-8314.
53. Cerami, A., V.J. Stevens, and V.M. Monnier, *Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus.* *Metabolism*, 1979. **28**: p. 431-439.
54. Bunn, H.F., K.H. Gabbay, and P.M. Gallop, *The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus.* *Science*, 1978. **200**: p. 21-27.
55. Day, J.F., S.R. Thorpe, and J.W. Baynes, *Nonenzymatically glycosylated albumin: In vitro preparation and isolation from human serum.* *J. Biol. Chem.*, 1979. **254**: p. 595-597.
56. Aldini, G., et al., *Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal.* *Journal of Mass Spectrometry*, 2006. **41**(9): p. 1149-1161.
57. Brownlee, M., H. Vlassara, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein.* *Diabetes*, 1985. **34**: p. 938-941.
58. Monnier, V.M., et al., *Advanced Maillard reaction products as markers for tissue damage in diabetes and uraemia: relevance to diabetic nephropathy.* *Acta Diabetol*, 1992. **29**: p. 130-135.
59. Monnier, V.M., et al., *Gerontology*, 1991. **37**: p. 152.
60. Brownlee, M., et al., *Science* 1986. **232**: p. 1629.
61. Blakytyn, B. and J.J. Harding, *Exp. Eye. Res.*, 1992. **54**: p. 509.
62. Vasan, S., et al., *Nature*, 1996. **382**: p. 275.
63. Vlassara, H., M. Brownlee, and A. Cerami. Vol. 82. 1984, USA: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 5588.
64. Vlassara, H., et al., *Science*, 1988. **240**: p. 1546.
65. Ahmed, M.U., S.R. Thorpe, and J.W. Baynes, *Identification of carboxymethyl-lysine as a degradation product of fructose-lysine in glycated proteins.* *J. Biol. Chem.*, 1986. **261**: p. 4888-4894.
66. Shibamoto, T., *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition*, ed. J.W. Baynes and V.M. Monnier. Vol. 304. 1989, New York: Alan R. Liss Inc. 359.
67. Giardino, I., D. Edelstein, and M. Brownlee, *Non-enzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity.* *J Clin Invest*, 1994. **94**: p. 110-117.
68. Lapolla, A., et al., *Enzymatic Digestion and Mass Spectrometry in the Study of Advanced Glycation End Products/Peptides.* *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004. **15**: p. 496-509.
69. Porte, J.D. and M.W. Schwartz, *Diabetes complications: why is glucose potentially toxic?* *Science*, 1996. **272**: p. 669-670.
70. Koshy, A., in *MDRTC Chemistry Laboratory*, The University of Michigan Health System: USA.

71. Bessems, G.J.H., H.J.J.M. Rennen, and H.J. Hoenders, *Lanthionine, a protein cross-link in cataractous human lenses*. *Experimental Eye Research*, 1987. **44**(5): p. 691-695.
72. Vlassara, H., M. Brownlee, and A. Cerami. Vol. 78. 1981, USA: Proc. Natl. Acad. Sci. 5190.
73. Van Boekel, M.A.M., *Mol. Biol. Reports*, 1991. **15**: p. 57.
74. Cohen, M.P., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980. **95**: p. 765.
75. Verzar, F., *Ageing of connective tissues*. *Gerontologia*, 1957. **1**: p. 363-378.
76. Bailey, A.J., R.G. Paul, and L. Knott, *Mechanisms of maturation and ageing of collagen*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1998. **106**(1-2): p. 1-56.
77. Harding, J.J., *Advances in protein chemistry*, ed. C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, and F.M. Richards. Vol. 37. 1985, London: Academic Press, Inc.
78. Bailey, A.J. and C.M. Peach, *Isolation and structural identification of a labile intermolecular crosslink in collagen*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968. **33**: p. 812-819.
79. Mechanic, G.L., E.P. Katz, and M. Henmi, *Locus of histidine based, stable trifunctional helix to helix collagen cross-link: stereospecific structure of type I skin fibrils*. *Biochemistry*, 1987. **26**: p. 3500-3509.
80. Yamauchi, M., et al., *Structure and formation of stable histidine-based trifunctional cross-link in skin collagen*. *J. Biol Chem*, 1987. **262**: p. 11428-11434.
81. Yamauchi, M., et al., *Cross-linking and the molecular packing of corneal collagen*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996. **219**: p. 311-315.
82. Fujimoto, D., et al., *The structure of pyridinoline a collagen cross-link*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978. **84**: p. 52-57.
83. Knott, L., et al., *Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone*. *Biochem. J.*, 1995. **310**: p. 1045-1051.
84. Nakamura, K., et al., *Crosslines A and B as candidates for the fluorophores in age-related and diabetes-related cross-linked proteins and their diacetates produced by Maillard reaction of α -N-acetyl-L-lysine with D-glucose*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992: p. 992-994.
85. Brinkmann, E., et al., *Characterization of imidazolium compound formed by reaction of methylglyoxal and N- α -hippuryllysine*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1995. **1**: p. 2817-2818.
86. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix*. *J. Biol Chem*, 1989. **264**: p. 21597-21602.
87. Lyons, T.J., et al., *Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts*. *Diabetes*, 1991. **40**: p. 1010-5.
88. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen*. *J. Clin Invest*, 1990. **85**: p. 380-384.
89. Baynes, J.W., *Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. *Diabetes*, 1991. **40**: p. 405-412.
90. Sell, D.R., et al., *Pentosidine formation in skin correlates with severity of complication in individuals with long-standing IDDM*. *Diabetes*, 1992. **41**: p. 1286-1292.
91. Sell, D.R., E.C. Carlson, and V.M. Monnier, *Differential effects of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus on pentosidine formation in skin and glomerular basement membrane*. *Diabetologia*, 1993. **36**: p. 936-941.

92. Nagaraj, R.H., et al., *High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis*. Vol. 88. 1991, USA: Proc Natl Acad Sci. 10257-10261.
93. Odetti, P., et al., *Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects*. Diabetes, 1992. **41**: p. 153-159.
94. Beisswenger, P.J., L.L. Moore, and T. Brink-Johnsen, *Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy*. J. Clin Invest, 1993. **92**: p. 1243-1252.
95. Dyer, D.G., J.A. Dunn, and S.R. Thorpe, *Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and ageing*. J. Clin Invest, 1993. **91**: p. 2463-2469.
96. Monnier, V.M., D.R. Sell, and R.H. Nagaraj, *Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, ageing, and uremia*. Diabetes, 1992. **41**: p. 36-41.
97. Nakamura, K., Y. Nakazawa, and K. Ienaga, *Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines A, B and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997. **232**: p. 227-230.
98. Zhang, Y., et al., *Rapid Determination of Advanced glycation End Products of Proteins Using MALDI-TOF-MS and PERL Script Peptide Searching Algorithm*. Journal of Biomolecular Techniques, 2003. **14**: p. 224-230.
99. Ahmed, M.U., et al., *Oxidative-degradation of glucose adducts to protein-formation of 3-(N-ε-lysino)-lactic acid from model compounds and glycated proteins*. J. Bio. Chem, 1988. **263**: p. 8816-8821.
100. Ahmed, M.U., et al., *N-ε-(carboxyethyl)lysine a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins*. Biochem., 1997. **324**: p. 565-570.
101. Miyata, S. and V.M. Monnier, *Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline*. J. Clin. Investig., 1992. **89**: p. 1102-1112.
102. Ahmed, N., et al., *Assay of Advanced glycation End products in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. Mol. Nutr. Food. Res., 2005. **49**: p. 691-699.
103. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *Conversion of Arginine into Ornithine by Advanced Glycation in Senescent Human Collagen and Lens Crystallins*. The journal of Biological chemistry, 2004. **279**: p. 54173-54184.
104. Odani, H., et al., *Identification of N^ω- carboxymethylarginine, a New Advanced Glycation Endproduct in Serum Proteins of Diabetic Patients: Possibility of a New Marker of Ageing and Diabetes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **285**: p. 1232-1236.
105. Tessier, F.J., et al., *Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues*. Biochem J., 2003. **369**: p. 705-719.
106. Konishi, Y., F. Hayase, and H. Kato, *Novel imidazolone compound formed by the advanced Maillard reaction of 3- deoxyglucosone and arginine residues in proteins*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1994. **58**: p. 1953-1955.
107. Alabed, Y., et al., *Novel modifications of N-α-BOC-arginine and N-α-CBZ-lysine by methylglyoxal*. Bioorganic Med. Chem. Lett., 1996. **6**: p. 1577-1578.
108. Shipanova, I.N., M.A. Glomb, and R.H. Nagaraj, *Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of major fluorescent adduct*. Arch. Biochem. Biophys., 1997. **344**: p. 29-36.

109. Boghigian, B., *Advances in analytical biochemistry and systems biology: Proteomics*. 2005, Department of chemical & Biological Engineering, Tufts University.
110. Patterson, S.D., *Current Proteomics*, 2004, **1**: p. 3.
111. Patterson, S.D. and R.H. Aebersold, *Nature Genetics Suppl.*, 2003. **33**: p. 311.
112. Jenkins, R.E. and S.R. Pennington, *Proteomics* 2001, **1**: p. 13.
113. Baynes, J.W., *The clinical chemome: a tool for the diagnosis and management of chronic disease*. *Clin Chem*, 2004. **50**: p. 1116-1117.
114. Holčapek, M. and P. Jandera, *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. *Chem. Listy*, 1998. **92**: p. 278-286.
115. Nagele, E., *Application Note 5989-021 OEN*. 2003, Agilent Technologies.
116. Pandey, A. and M. Mann, *Nature*, 2000. **405**: p. 837.
117. Mayer, T.K. and Z.R. Freedman, *Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility*. *Clin. Chim. Acta*, 1983. **127**: p. 147-184.
118. Schleicher, E. and O.H. Wieland, *Protein glycation: Measurement and clinical relevance*. *J. Clin. Chem. Biochem.*, 1989. **27**: p. 577-587.
119. Mallia, A.K., et al., *Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins*. *Anal. Lett.*, 1981. **14**: p. 649-661.
120. Schwartz, J.G., *The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management*. *Diabetes Rev*, 1995. **3**: p. 269-287.
121. Lapolla, A., D. Fedele, and P. Traldi, *Diabetes and mass spectrometry*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2001. **17**: p. 99-112.
122. Hillekamp, F., et al., *Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Anal. Chem*, 1991. **63**: p. 1193A-1203A.
123. Makita, Z., et al., *Immunochemical detection of advanced glycosylation end-products*. *J Biol Chem*, 1992. **267**: p. 5133-5138.
124. Sell, D.R., R.H. Nagaraj, and S.K. Grandhee, *Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging and uremia*. *Diabetes Metab Rev*, 1991. **7**: p. 239-251.
125. Dyer, D.G., et al., *Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(18): p. 11654-11660.
126. Štolba, P., et al., *The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes*. *Life Sciences*, 1992. **51**(10): p. 733-740.
127. Kadlecová, M., et al., *Does Cd36 gene play a key role in disturbed glucose and fatty acid metabolism in Prague hypertensive hypertriglyceridemic rats?* *Physiological Research*, 2004. **53**(3): p. 265-271.
128. Mikšik, I. and Z. Deyl, *Post-translational non-enzymatic modification of proteins. II. Separation of selected protein species after glycation and other carbonyl-mediated modifications*. *J. Chromatogr. B*, 1997. **699**: p. 311.
129. Deyl, Z. and I. Mikšik, *Post-translational non-enzymatic modification of proteins. I. Chromatography of marker adducts with special emphasis to glycation reactions*. *J. Chromatogr. B*, 1997. **699**: p. 287.
130. Wada, Y., *Primary sequence and glycation at lysine-548 of bovine serum albumin*. *J. Mass spectrom.*, 1996. **31**: p. 263.
131. Eckhardt, A., et al., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 2005. **28**: p. 1437-1451.
132. Dolhofer, R. and O.H. Wieland, *FEBS Lett.*, 1978. **85**: p. 86-90.

3. Kern, T.S. and R.L. Engerman, *Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoquanidine and aspirin*. Diabetes, 2001. **50**(7): p. 1636-1642.
4. NMcCance, D.R., et al., *Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. Journal of Clinical Investigation, 1993. **91**: p. 2470-2478.
5. Nyengaard, J.R., et al., *Discordant effects of guanidines on renal structure and function and on regional vascular dysfunction and collagen changes in diabetic rats*. Diabetes, 1997. **46**(1): p. 94-106.
5. Pongor, S., et al. Vol. 81. 1984, U.S.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. 2684-2688.
7. Horiuchi, S., et al., *Evidence against in vivo presence of 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole, a major fluorescent advanced and product generated by nonenzymatic glycosylation*. J. Biol. Chem., 1988. **263**(35): p. 18821-18826.
8. Njoroge, F.G., A.A. Fernandes, and V.M. Monnier, *Mechanism of Formation of the Putative Advanced Glycosylation End product and Protein Cross-link 2-(2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole*. J. Biol. Chem., 1988. **263**: p. 10646-10652.
5. Grandhee, S.K. and V.M. Monnier, *Mechanism of Formation of the Maillard Protein Cross-link Pentosidine*. J. Biol. Chem., 1991. **266**: p. 11649.
0. Issaq, H.J., *The role separation science in proteomics research*. Electrophoresis, 2001. **22**(17): p. 3629-3638.
1. Moore, A.V. and J.W. Jorgenson, Anal. Chem., 1995. **67**: p. 3448-3455.
2. Offord, R.E., Nature, 1966. **211**: p. 591-595.
3. Verzijl, N., et al., Biochem J., 2000. **350**: p. 381-387.
4. Nishi, H., et al., Chromatographia, 1995. **40**: p. 638.
5. Simpson, D.C. and R.D. Smith, Electrophoresis, 2005. **26**: p. 1291-1305.
5. Olivares, J.A., et al., Anal. Chem., 1987. **59**: p. 1230-1232.
7. Smith, R.D., C.J. Barinaga, and H.R. Udseth, Anal. Chem., 1988. **60**: p. 1948-1952.
3. Fanali, S., et al., *On-line CE-MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface-coated capillaries*. Electrophoresis, 2006. **27**: p. 4666-4673.
0. van de Merbel, N.C., et al., *Liquid chromatographic method for the quantitative determination of N[epsilon]-carboxymethyllysine in human plasma proteins*. Journal of Chromatography B, 2004. **808**(2): p. 163-168.
1. Lapolla, A., et al., *Advanced Glycation End Products/Peptides: An in Vivo Investigation*. Vol. 1043. 2005, New York: Ann. N.Y. Acad. Sci. 267-275.
1. Sun, Q.W. and A.C. Leopold, *The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soyabean seeds*. physiologia Plantarum, 1995. **94**: p. 94-104.
1. Lingelbach, L.B., et al., *Accumulation of Advanced glycation Endproducts in Aging Male Fischer 344 Rats during Long-Term Feeding of Various dietary Carbohydrates*. Journal of Nutrition, 2000. **130**: p. 1247-1255.
1. Deyl, Z., et al., *Reversed-phase chromatography of pentosidine-containing CNBr peptides from collagen*. Analytica Chimica Acta, 1997. **352**: p. 257-270.
1. Mikšik, I. and Z. deyl, J. Gerontol., 1991. **46**: p. B111.
1. Wu, J.T., M.-C. Tu, and P. Zhung, J. Clin. Lab. Anal., 1996. **10**: p. 21.
1. Sell, D.R. and V.M. Monnier, Connect. Tiss. Res., 1989. **19**: p. 77.
1. Hayase, F., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1994. **58**: p. 1936.
1. Gunja-Smith, Z. and R.J. Boucek, Biochem J., 1981. **197**: p. 759.
1. Robins, S.P., Biochem J., 1983. **215**: p. 167.
1. Fujimoto, D. and T. Moriguchi, J. Biochem., 1978. **83**: p. 863.

133. Kern, T.S. and R.L. Engerman, *Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoquanidine and aspirin*. *Diabetes*, 2001. **50**(7): p. 1636-1642.
134. NMcCance, D.R., et al., *Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. *Journal of Clinical Investigation*, 1993. **91**: p. 2470-2478.
135. Nyengaard, J.R., et al., *Discordant effects of guanidines on renal structure and function and on regional vascular dysfunction and collagen changes in diabetic rats*. *Diabetes*, 1997. **46**(1): p. 94-106.
136. Pongor, S., et al. Vol. 81. 1984, U.S.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2684-2688.
137. Horiuchi, S., et al., *Evidence against in vivo presence of 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole, a major fluorescent advanced and product generated by nonenzymatic glycosylation*. *J. Bio.l Chem.*, 1988. **263**(35): p. 18821-18826.
138. Njoroge, F.G., A.A. Fernandes, and V.M. Monnier, *Mechanism of Formation of the Putative Advanced Glycosylation End product and Protein Cross-link 2-(2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole*. *J. Bio.l Chem.*, 1988. **263**: p. 10646-10652.
139. Grandhee, S.K. and V.M. Monnier, *Mechanism of Formation of the Maillard Protein Cross-link Pentosidine*. *J. Biol. Chem.*, 1991. **266**: p. 11649.
140. Issaq, H.J., *The role separation science in proteomics research*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(17): p. 3629-3638.
141. Moore, A.V. and J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 1995. **67**: p. 3448-3455.
142. Offord, R.E., *Nature*, 1966. **211**: p. 591-595.
143. Verzijl, N., et al., *Biochem J.*, 2000. **350**: p. 381-387.
144. Nishi, H., et al., *Chromatographia*, 1995. **40**: p. 638.
145. Simpson, D.C. and R.D. Smith, *Electrophoresis*, 2005. **26**: p. 1291-1305.
146. Olivares, J.A., et al., *Anal. Chem.*, 1987. **59**: p. 1230-1232.
147. Smith, R.D., C.J. Barinaga, and H.R. Udseth, *Anal. Chem.*, 1988. **60**: p. 1948-1952.
148. Fanali, S., et al., *On-line CE-MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface-coated capillaries*. *Electrophoresis*, 2006. **27**: p. 4666-4673.
149. van de Merbel, N.C., et al., *Liquid chromatographic method for the quantitative determination of N[epsilon]-carboxymethyllysine in human plasma proteins*. *Journal of Chromatography B*, 2004. **808**(2): p. 163-168.
150. Lapolla, A., et al., *Advanced Glycation End Products/Peptides: An in Vivo Investigation*. Vol. 1043. 2005, New York: Ann. N.Y. Acad. Sci. 267-275.
151. Sun, Q.W. and A.C. Leopold, *The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soyabean seeds*. *physiologia Plantarum*, 1995. **94**: p. 94-104.
152. Lingelbach, L.B., et al., *Accumulation of Advanced glycation Endproducts in Aging Male Fischer 344 Rats during Long-Term Feeding of Various dietary Carbohydrates*. *Journal of Nutrition*, 2000. **130**: p. 1247-1255.
153. Deyl, Z., et al., *Reversed-phase chromatography of pentosidine-containing CNBr peptides from collagen*. *Analytica Chimica Acta*, 1997. **352**: p. 257-270.
154. Mikšik, I. and Z. deyl, *J. Gerontol.*, 1991. **46**: p. B111.
155. Wu, J.T., M.-C. Tu, and P. Zhung, *J. Clin. Lab. Anal.*, 1996. **10**: p. 21.
156. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *Connect. Tiss. Res.*, 1989. **19**: p. 77.
157. Hayase, F., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994. **58**: p. 1936.
158. Gunja-Smith, Z. and R.J. Boucek, *Biochem J.*, 1981. **197**: p. 759.
159. Robins, S.P., *Biochem J.*, 1983. **215**: p. 167.
160. Fujimoto, D. and T. Moriguchi, *J. Biochem.*, 1978. **83**: p. 863.

Údaje pro knihovnickou databázi

Název práce	Posttranslační modifikace proteinů-jejich analýza a fyziologické aspekty
Autor práce	Mgr. Kateřina Mikulíková
Obor	Biochemie a Patobiochemie
Rok obhajoby	2007
Vedoucí práce	Doc. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.
Anotace	Z hlediska posttranslačních modifikací vedoucích k vzniku příčných vazeb je v současné době intenzivně studována neenzymatická glykace. K této reakci dochází pouze na základě chemických reakcí mezi aminoskupinami bílkovin a oxo skupinami cukrů.
Klíčová slova	kolagen, produkty posttranslačních modifikací, HPLC-MS, CE-MS