

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra biochemických věd

Kandidát **Ing. Lucie Trnková**

Školitel **Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.**

Název disertační práce **Interakce proteinů s nízkomolekulárními látkami in vitro. Vliv glykace, látek přírodního původu a kombinace těchto faktorů na funkci a spektrální vlastnosti vybraných bílkovin.**

Rostlinné polyfenolické látky se přirozeně vyskytují v lidské stravě a vyznačují se řadou biologických a farmakologických vlastností. Mají schopnost reagovat s nejrůznějšími proteiny včetně enzymů. Velký význam má jejich interakce se sérovým albuminem, jehož jednou z nejvýznamnějších funkcí je vázání, přenos a ukládání řady endogenních a exogenních nízkomolekulárních látek v krevním řečišti. Jedním z cílů práce bylo prostudovat vztahy mezi chemickou strukturou a vazebnými afinitami dvou významných skupin polyfenolických látek, konkrétně hydroxyskořicových kyselin a katechinů (flavanolů), s molekulou sérového albuminu v in vitro modelech pomocí spektrálních (UV-Vis absorpční spektroskopie, metoda zhášení fluorescence) a elektroforetických (nativní a SDS PAGE) metod. Některé polyfenoly způsobily změny v konformaci proteinu a byly zaznamenány určité vztahy mezi jejich strukturou a zjištěnými vazebnými afinitami k sérovému albuminu.

Mezi nejvýznamnější rostlinné polyfenolické látky patří katechiny (flavanoly) zeleného čaje. Byla studována možnost interakce těchto katechinů s enzymem ERp57 v in vitro modelu metodou zhášení fluorescence. Pro studování vlivu katechinů zeleného čaje na reduktasovou aktivitu enzymu ERp57 v in vitro modelu byla použita citlivá fluorescenční metoda využívající dieosinglutathiondisulfid jako fluorescenční sondu. Sonda vykazuje nízkou fluorescenci při vlnové délce excitace a emise 520 nm/545 nm, která významně vzroste po redukci disulfidové vazby, tedy v přítomnosti enzymu ERp57. Na základě získaných výsledků byl diskutován vztah mezi strukturou studovaných katechinů a jejich vazebnou afinitou, popř. jejich inhibičním účinkem na reduktasovou aktivitu ERp57.

Alfa-dikarbonylové sloučeniny (např. methylglyoxal) vznikají během řady metabolických procesů a také neenzymovou glykací proteinů glukosou. Jsou považovány za důležité prekurzory vzniku AGEs in vivo. Methylglyoxal se snadno váže na aminoskupiny proteinů za tvorby kovalentních zesíťovaných agregátů (crosslinků) a reaktivních forem kyslíku (ROS). Tím přispívá ke vzniku a rozvoji různých onemocnění včetně diabetu mellitu a jeho pozdních komplikací. Rostlinné polyfenolické látky mohou snižovat tvorbu AGEs a tím zpomalovat proces neenzymové glykace různými mechanismy, např. vychytáváním reaktivních  $\alpha$ -dikarbonylových sloučenin nebo ROS. Dalším cílem práce bylo studium vlivu katechinů zeleného čaje na neenzymovou glykaci sérového albuminu zprostředkovanou methylglyoxalem v modelech in vitro pomocí fluorescenčních metod pro stanovení množství celkových ("nespecifických") AGEs ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/410$  nm) a argpyrimidinu jako specifického AGE ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 320/380$  nm). Antiglykační účinek studovaných katechinů závisel na jejich struktuře a koncentraci.

Glutathion-S-transferasy (GSTs) představují skupinu enzymů, které katalyzují konjugaci redukovaného glutathionu s řadou hydrofobních látek. Jedná se o důležité enzymy v detoxikaci různých xenobiotik. V rámci této práce byl studován účinek methylglyoxalu na strukturní a katalytické vlastnosti rekombinantní cytosolické GST z *Schistosoma japonicum* v in vitro modelu pomocí spektroskopických (UV-Vis absorpční a fluorescenční spektroskopie) a elektroforetických (nativní PAGE, SDS PAGE/western blotting) metod. Bylo zjištěno, že methylglyoxal snižuje katalytickou aktivitu GST a způsobuje změny v náboji molekuly enzymu stejně tak jako změny v jeho struktuře (tj. změna konformace, tvorba AGEs a crosslinků) v závislosti na koncentraci.