

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

VLIV METHYLGLYOXALU NA SPEKTRÁLNÍ VLASTNOSTI GLUTAMÁTDEHYDROGENASY

Rigorózní práce

Školitel: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové, 2006

Michal Vostrý

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji panu profesorovi Dršatovi za vlídné vedení, cenné rady a připomínky při měření v laboratoři i sepisování práce. Dále děkuji paní Navrátilové za praktickou pomoc a slečně Pechholdové za pomoc při zpracování výsledků a morální podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1 Glykace bílkovin, AGEs.....	5
2.2 Methylglyoxal (MGO).....	9
2.3 Elektronová spektroskopie bílkovin	11
2.4 Glutamátdehydrogenasa.....	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Východiska a cíle práce.....	21
3.2 Použité materiály a metody	22
3.2.1 Reagencie	22
3.2.2 Přístroje	22
3.2.3 Příprava enzymu.....	22
3.2.4 Podmínky inkubace s methylglyoxalem	22
3.2.5 Měření absorpčních spekter	23
3.2.6 Měření fluorescenčních spekter	23
3.3 Výsledky	25
3.3.1 Absorpční spektra.....	25
3.3.2 Vnitřní fluorescence GDH	27
3.3.3 Vnější fluorescence GDH.....	29
3.4 Diskuze	32
4. ZÁVĚR.....	36
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	37
6. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	38
7. LITERATURA.....	39

1. ÚVOD

Jednou z posttranslačních modifikací bílkovin je neenzymatická glykosylace – glykace. První fází tohoto procesu je reakce redukujících cukrů a jejich derivátů s aminokyselinovými zbytky argininu a lysinu. Dalšími neenzymatickými přeměnami vznikají rozličné glykační produkty hromadně označované jako konečné produkty pokročilé glykace (AGEs, Advanced Glycation End Products). Glykace biomakromolekul (kromě bílkovin také např. nukleových kyselin) přispívá k patogenezi mnoha chorob a figuruje také v procesu přirozeného stárnutí. Důsledkem hyperglykémie u diabetiků je urychlení glykačních reakcí a rozvoj charakteristických komplikací. Kromě cukrů se glykačních procesů účastní také vysoce reaktivní α -dikarboonylové sloučeniny. Methylglyoxal, jeden ze zástupců těchto látek, je fyziologickým metabolitem vznikajícím převážně rozpadem triosafosfátů v průběhu glykolýzy. Tento oxoaldehyd má velmi silné glykační vlastnosti. Jeho reaktivita je namířena přednostně proti argininovým zbytkům, jejichž modifikací vznikají specifické AGEs (např. hydroimidazolony, argpyrimidin).

Tvorba glykačních aduktů na molekulách bílkovin narušuje uspořádání polypeptidového řetězce a vede k poruše jejich funkce. Glykaci podléhají nejen proteiny s nízkým obratem (např. kolagen), ale také krátce existující proteiny jako kupř. enzymy. Jejich modifikace je nejčastěji spojena s poklesem enzymatické aktivity. Cílem glykace mohou být jak plazmatické, tak cytosolické bílkoviny, a dokonce i bílkoviny buněčných organel. Jedním z objevených subcelulárních proteinů glykovaných *in vivo* je mitochondriální enzym glutamátdehydrogenasa (GDH). Její glykace *in vitro* a *ex vivo* vedla k poklesu enzymatické aktivity a snížení citlivosti k allosterickým efektorům.

Tato práce je doplněním uvedených enzymologických experimentů a zaměřuje se na strukturální aspekty glykace GDH. Vliv methylglyoxalu je zkoumán spektrálními metodami – absorpční a fluorescenční spektroskopii.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Glykace bílkovin, AGEs

Proces glykace byl popsán již na začátku minulého století a to ve smyslu účinku aminokyselin na cukry obsažené v potravinách. Jeho biologický dosah byl však rozpoznán teprve v polovině 70. let v souvislosti s objevem glykovaného hemoglobinu. O zapojení glykace do rozvoje komplikací diabetu a do procesu stárnutí se začalo uvažovat až na sklonku 70. let (Ulrich a Cerami 2001). I v současnosti je toto téma aktuální a velmi intenzivně se zkoumá.

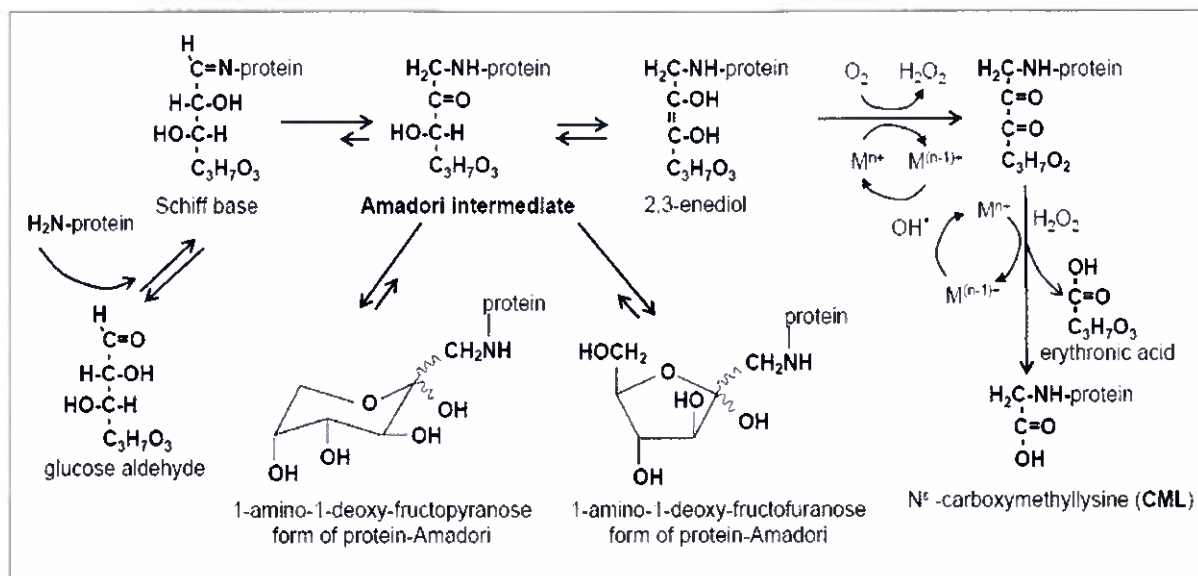
Glykaci bílkovin zahajuje nukleofilní adiční reakce mezi karbonylovou skupinou redukujícího cukru (např. glukosy¹, fruktosy) a volnou aminoskupinou bílkoviny (tj. lysinu, argininu nebo na N-konci). Reakce je reverzibilní, tzn. vysoce závislá na koncentraci reaktantů, a dává vzniknout Schiffově bázi. Tento aldiminový meziproduct je nestabilní, dochází k tzv. Amadoriho přesmyku za vzniku ketoaminu – Amadoriho produktu (Obrázek 1). Vznik Schiffovy báze se odehrává v časovém horizontu několika hodin, zatímco Amadoriho přesmyk probíhá v řádu dnů a nevratně, produkty se tedy na molekulách bílkovin hromadí.

Vznikem Amadoriho produktu glykace nekončí. Následuje série dalších neenzymatických přeměn označovaná termínem pozdní glykace. Zahrnuje různé přesmyky, dehydratace, cyklizace či fragmentace. Jejimi produkty jsou sloučeniny více či méně známé struktury souhrnně nazývané konečné produkty pozdní glykace (AGEs). Reakcí spojených s jejich tvorbou se mohou účastnit i oxidační procesy. Děje-li se tak, hovoří se o glykoxidaci a výsledné produkty se nazývají glykoxidační (Obrázek 1).

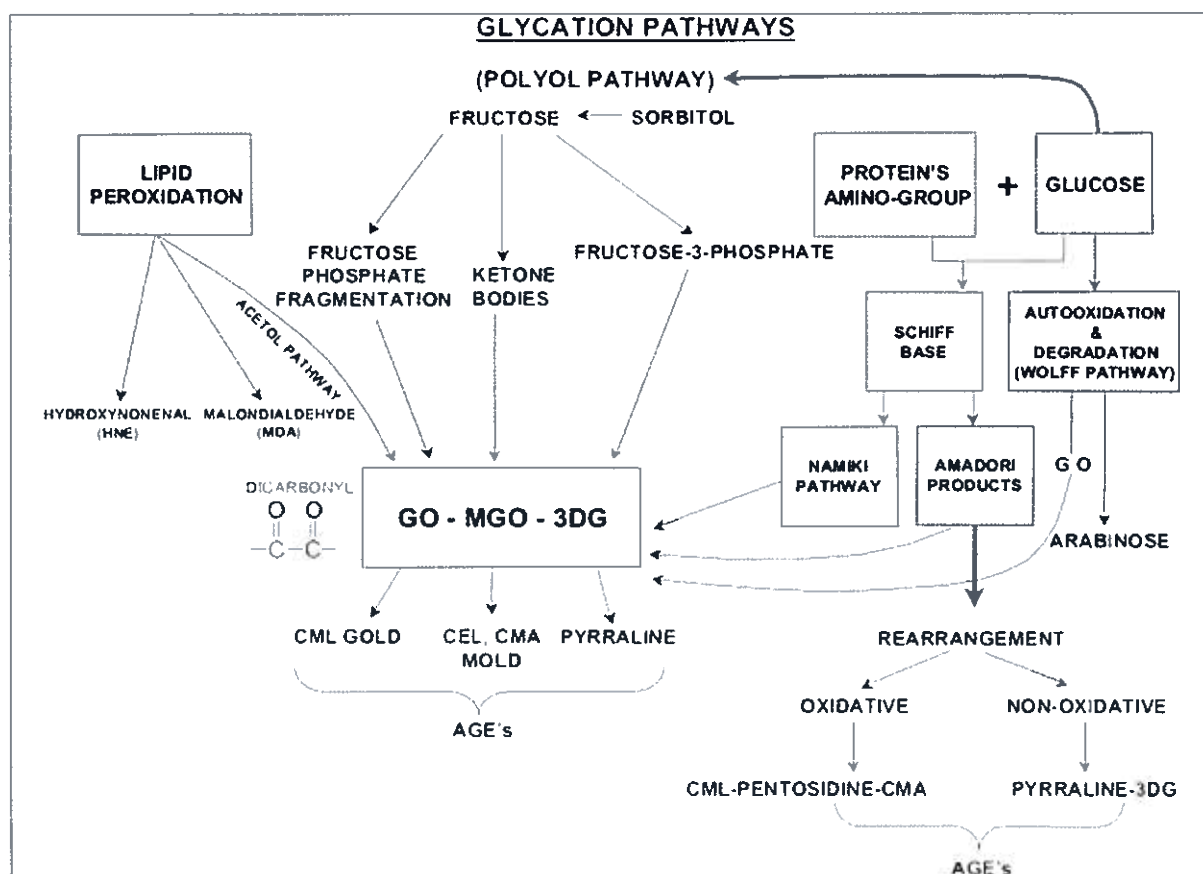
Kromě redukujících cukrů, jak je uvedeno výše v popisu „klasické“ glykační dráhy, se mohou na vzniku AGEs podílet i další prekurzory obsahující karbonylovou skupinu. Důležité postavení mezi nimi mají vysoce reaktivní α -dikarbonylové sloučeniny (methylglyoxal, 3-deoxyglukoson a glyoxal). Spolu s dalšími aldehydy a ketony (dehydroaskorbát, malonyldialdehyd, 4-hydroxynonenal, akrolein a další) jsou v literatuře označovány jako reaktivní karbonylové sloučeniny a jejich hromadění je popisováno jako karbonylový stres

¹ Glukosa je ve smyslu glykačního potenciálu nejméně reaktivní ze všech běžných cukrů. Tento fakt mohl vést k přirozenému výběru glukosy coby hlavního volného cukru *in vivo* (Ulrich a Cerami 2001).

(carbonyl stress). Tyto látky jsou nepřetržitě produkovány metabolismem všech základních živin (Miyata, van Ypersele de Strihou *et al.* 1999).



Obrázek 1. Klasická glykační dráha a glykooxidativní vznik CML. Upraveno podle: Voziyan, Khalifah *et al.* 2003



Obrázek 2. Glykační dráhy. Převzato z: Rahbar a Figarola 2002

Vyjmenované α -dikarboonylové sloučeniny mohou navíc vznikat během celého glykoxidačního procesu. 3-deoxyglukoson vzniká neoxidativním přesmykem Amadoriho produktu a fragmentací fruktosa-3-fosfátu, intermediátu polyolové dráhy. Glyoxal se vytváří autooxidativní degradací glukosy (Wolfowa dráha), oxidací Schiffovy báze (Namikiho dráha) a také lipoperoxidací (Obrázek 2). O methylglyoxalu je pojednáno v samostatné kapitole (kap. 2.2 , strana 9).

AGEs jsou tedy heterogenní skupinou molekul vznikajících z různých prekurzorů různými způsoby. Mnohé vytvářejí příčné vazby mezi aminokyselinami bílkovin (cross-links), často obsahují chromofory, některé fluoreskují. Klasifikaci AGEs zachycuje následující tabulka.

Tabulka 1. Klasifikace AGEs a někteří zástupci. Zpracováno podle: Ulrich a Cerami 2001

Fluorescenční cross-linky	Pentosidin [*] , crossliny, vesperlysiny, fluorolink
Nefluorescenční cross-linky	Imidazolium dilysin cross-linky (GOLD, MOLD), aginin-lysine cross-linky (GODIC, MODIC), glukosepan
Nevytvářející cross-linky	Pyrralin, karboxyalkyllysiny (CML ^{**} , CEL), imidazolony, hydroimidazolony ^{***} , argypyrimidin ^{****}

- * často stanovovaný glykoxidační produkt, arginin-lysine cross-link
- ** často stanovovaný glykoxidační i lipoxidační produkt, vzniká také přímou reakcí glyoxalu s lysinem
- *** hlavní markery glykace u diabet. a uremických pacientů (Thornalley, Battah *et al.* 2003), vznikají reakcí argininu s MGO, GO nebo 3-DG
- **** fluorescenční AGE

Tvorba AGEs vnáší do řetězce bílkoviny nové struktury a dává jí tím pádem nové vlastnosti. Blokuje zbytky lysinu a argininu (může je i spojovat pomocí cross-linků), indukuje konformační změny. Těmito obecnými mechanismy poté dochází k narušení biologické funkce bílkoviny. U diabetiků je důsledkem hyperglykémie urychlení tvorby AGEs a rozvoj charakteristických komplikací. AGEs ale vznikají i za fyziologických podmínek a jejich kumulace v průběhu stárnutí se podílí na rozvoji degenerativních onemocnění. Histopatologické nálezy AGEs v různých tkáních tuto implikaci potvrzují (Rahbar a Figarola 2002). Tyto sloučeniny mohou být však do organismu zavlečeny i z vnějších zdrojů. Těmi jsou některé druhy potravin nebo tabákový kouř a AGEs v nich obsažené, tzv. glykotoxiny, mohou do patogeneze chorob také výrazně zasahovat (Vlassara a Palace 2003).

Existují tři základní principy, které vysvětlují, jak produkty glykace poškozují funkce organismu jako celku. AGEs se během života hromadí především na bílkovinách s nízkým obratem (např. kolagen, krystalin, myelin). Glykače proteinů extracelulárního matrix (ECM)

má za následek poruchy interakcí mezi matrix a cirkulujícími proteiny či povrchovými strukturami buněk a mezi molekulami ECM navzájem. Modifikace cévního kolagenu přispívá k rozvoji aterosklerózy, chorob srdce, ledvin, sítnice apod. Glykace krystalinů oční čočky se pojí se vznikem šedého zákalu.

Glykaci podléhají i „krátce žijící“ vnitrobuněčné a dokonce i subbuněčné proteiny (Thornalley, Battah *et al.* 2003; Rosca, Mustata *et al.* 2005). Je to dáno vysokým glykačním potenciálem některých intracelulárních cukrů a dalších derivátů (fruktosa, glukosa-6-fosfát, glyceraldehyd-3-fosfát) a obrovskou reaktivitou α -dikarboxylových sloučenin. Glykační kapacita těchto intracelulárně vznikajících látek je v porovnání s glukosou řádově vyšší (Brownlee 2001). Důsledky glykace takovýchto bílkovin jsou sice zmírňovány jejich vysokým obratem, ale i jejich modifikace je spjata se změnou vlastností a narušením funkce. Glykace takto může vést ke zvýšené vnímavosti dané bílkoviny k oxidačnímu poškození či ke snížení její degradability. Může dojít k narušení konformace nebo její rigidifikaci, snížené schopnosti vázat ligandy a ke změně antigenních vlastností (Vlassara a Palace 2003). V případě enzymů vede glykace ve většině případů k poklesu či ztrátě aktivity. Příčinou bývá modifikace aktivního či dalšího vazebného místa, aminokyselinové zbytky argininu a lysinu se zde vyskytují velmi často. Vliv má i modifikace v blízkosti těchto míst. Glykace také může snižovat pružnost polypeptidového řetězce a bránit tak pohybům molekuly enzymu během katalýzy (Seidler 2005). Morgan (2002) zmiňuje inaktivaci jako výsledek inkubace enzymu s již glykovaným proteinem. Podobné interakce lze očekávat *in vivo*.

Dalším, v poslední době velmi zdůrazňovaným mechanismem poškození je přímá interakce AGEs se specifickými receptory. Bílkovin, které jsou schopny AGEs vázat, bylo identifikováno několik. Nejdůležitější a nejvíce prostudovaný je RAGE (receptor pro AGEs). Tento receptor je exprimován ve všech tkáních, v největším množství v plicích. Nachází se na povrchu makrofágů, endotelových buněk, neuronů a epiteliálních buněk glomerulů. Při normální homeostáze se vyskytuje jen ve velmi malém počtu, za patologických stavů (např. diabetická vaskulopatie) ale dochází k up-regulaci. Interakce AGE-RAGE spouští signální dráhu zahrnující tvorbu volných radikálů, aktivaci prozánětlivého transkripčního faktoru NF- κ B a také zvýšení exprese samotného RAGE (Hudson, Wendt *et al.* 2005). Neúplná proteazomální degradace vnitrobuněčných AGEs vede k uvolnění nízkomolekulárních AGEs do oběhu, čímž škodlivé působení AGEs posiluje a rozšiřuje (Thomas, Forbes *et al.* 2005).

Míra glykace určitého proteinu závisí na jeho struktuře, tj. počtu a přístupnosti modifikovatelných zbytků, a na koncentraci a druhu glykačního agens. U enzymů hraje také

roli přítomnost substrátu či kofaktoru a aktuální konformační stav. Množství glykovaného proteinu je pak dáno poměrem jeho vzniku a degradace. Některé bílkoviny jsou ke glykaci náchylnější než ostatní a moderními metodami lze určit nejen která bílkovina, ale i který zbytek aminokyseliny je přednostním cílem modifikace (Padival, Crabb *et al.* 2003; Ahmed, Dobler *et al.* 2005).

2.2 Methylglyoxal (MGO)

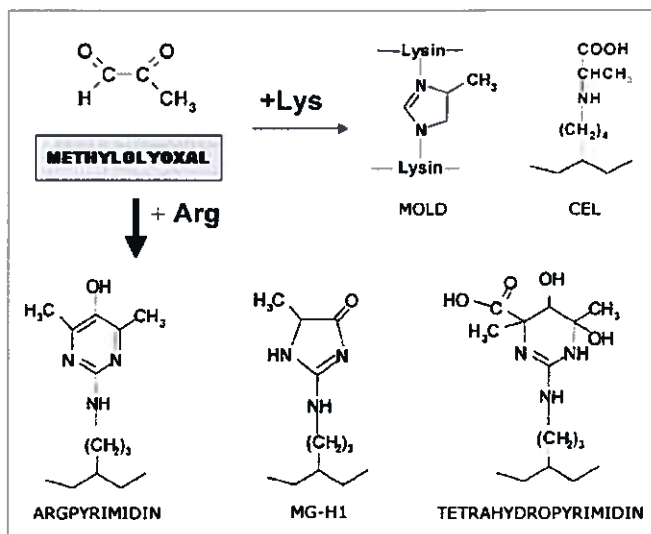
Methylglyoxal známý také pod názvy pyruvaldehyd či 2-oxopropanal je nažloutlá kapalina s charakteristickým štiplavým zápachem. Je to fyziologický metabolit tvořící se nepřetržitě ve všech živých buňkách, zároveň ale představuje jedno z nejsilnějších glykačních činidel. Vzniká především v cytosolu a to několika mechanismy. Rozpad fosfoenoldiolátové formy triosafosfátů, glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu, se považuje za převládající. Děje se tak buďto neenzymaticky nebo za účasti triosafosfátisomerasy – únikem meziprojektu z jejího aktivního centra. Dalšími variantami vzniku MGO jsou 1) rozpad 3-DG reverzní aldolovou reakcí, 2) oxidace acetonu cytochromem P450 2E1, 3) oxidace acetoacetátu myeloperoksidázou nebo neenzymaticky radikálovou reakcí, 4) oxidace aminoacetonu samikarbazid-senzitivními aminooxidázami nebo neenzymaticky radikálovou reakcí (Thornalley 1996; Kalapos 1999; Vander Jagt, Hassebrook *et al.* 2001; Beisswenger, Howell *et al.* 2003). Aminoaceton vzniká jako vedlejší produkt degradace threoninu, zvláště při nedostatku CoA².

Methylglyoxal rychle reaguje s aminokyselinovými zbytky argininu, lysinu a cysteinu v molekulách bílkovin³. Na rozdíl od glukosy, která modifikuje převážně volnou aminoskupinu lysinu a N-konců, je reakce s guanidinovou skupinou argininu upřednostněna. Počáteční fáze reakce – tvorba glykosylaminu či hemithioacetalu – je vratná. V rovnovážném stavu může být za fyziologických podmínek více než 99 % methylglyoxalu vázáno k proteinům a peptidům (např. ke glutathionu) (Lo, Westwood *et al.* 1994). Chaplen a sp. (1996; 1998) měřili cytosolickou koncentraci MGO v buněčných kulturách a došli k hodnotám 0,7-1,2 μM a až 310 μM pro volný respektive vázaný methylglyoxal. Další fáze

² Na vzniku MGO se tedy podílí metabolismus všech základních živin. Při diabetu je tvorba MGO všemi mechanismy zvýšena. V krvi diabetiků i v krvi a orgánech zvířecích modelů jsou vskutku koncentrace MGO vyšší (Thornalley 1996; Lapolla, Flamini *et al.* 2003 a další).

³ MGO reaguje také s guaninem v molekulách nukleových kyselin. Může působit mutace a vyvolávat apoptózu.

reakce je nevratná a dává vzniknout specifickým AGEs. Tyto produkty byly charakterizovány *in vitro* a také identifikovány *in vivo*.



Obrázek 3. AGEs odvozené od MGO. Převzato z: Bourajaj, Stehouwer et al. 2003

Nejhojnějšími AGEs odvozenými od MGO *in vivo* jsou hydroimidazolony. Vznikají reakcí s argininem a existují tři strukturální izomery (MG-H1-3), z nichž první převládá (Ahmed, Argirov *et al.* 2002). Hydroimidazolony odvozené od α -dikarboxylových sloučenin jsou podle Thornallyho měření (2003) u diabetiků nejčastějšími AGEs vůbec. Dalšími možnými modifikacemi jsou tetrahydropyrimidin, argpyrimidin (odvozené od Arg), N^ε-karboxyethyllysine (CEL) a cross-link MOLD (methylglyoxal-derived lysine-dimer) (Obrázek 3). Argpyrimidin je fluorofor vzniklý kondenzací dvou molekul MGO a následnou reakcí s argininem. Fluorescenční spektrum argpyrimidinu se vysoce podobá spektrům bílkovin inkubovaných s MGO, je proto považován za hlavní fluorescenční produkt této reakce (Shipanova, Glomb *et al.* 1997). *In vitro* modifikace HSA methylglyoxalem o koncentraci 500 μM vedla převážně k tvorbě hydroimidazolonu, kdežto při velmi vysoké koncentraci MGO (100 mM) se tvořil především argpyrimidin (Ahmed a Thornalley 2002).

Všechny buňky disponují mechanismem, pomocí něhož škodlivým účinkům methylglyoxalu čelí – enzymatickou detoxifikací. Většina cytosolického MGO je degradována na D-laktát tzv. glyoxalovým systémem. Ten se skládá ze dvou enzymů – glyoxalasy I (GLX 1) a glyoxalasy II (GLX 2) – a katalytického množství glutathionu (GSH). MGO nejprve kondenzuje s GSH a vzniklý hemithioacetal je poté konvertován GLX I na S-D-laktoylglutathion. Tento thioester je následně hydrolyzován GLX II za vzniku D-laktátu a regenerace glutathionu. Cíleně zvýšená exprese GLX I vedla k výraznému snížení vzniku

intracelulárních AGEs u buněčných kultur v hyperglykemických podmínkách (Shinohara, Thornalley *et al.* 1998). MGO je tedy pravděpodobně jejich hlavním prekurzorem.

Katabolismu MGO se může účastnit také aldosa-reduktasa (AKR1B1) – NADPH dependentní enzym polyolové dráhy. Tkání bohatou na tento enzym je např. dřevina ledvin. Funkce reduktasy je ovlivněna aktuálním stavem glutathionu. Při jeho dostatečném množství je MGO redukován na laktaldehyd a dále na 1,2-propandiol. Při nedostatku GSH vzniká redukcí MGO acetol. Tento metabolit dosahuje u diabetiků zvýšených hladin a může být reoxidován na MGO (Vander Jagt, Hassebrook *et al.* 2001).

Práci zabývajících se účinkem MGO na enzymy již bylo publikováno několik (např. Morgan, Dean *et al.* 2002; Kang 2003; Seidler a Kowalewski 2003). Jednalo se o *in vivo* i *in vitro* experimenty, kde glykace methylglyoxalem vedla ke snížení enzymatické aktivity. MGO stejně jako ostatní glykační agens modifikuje, tedy blokuje určité aminokyselinové zbytky a indukuje změny na různých úrovních organizace bílkovinné molekuly.

Změna uspořádání molekuly obvykle vede k odlišné interakci s elektromagnetickým zářením. Nástrojem ke sledování těchto změn jsou tudíž různé druhy spektroskopických měření, např. metody fluorescenční (vnitřní fluorescence i fluorescenční próby), absorpční (např. cirkulární dichroismus) či metody NMR. Těmito metodami lze samozřejmě studovat i vznikající AGEs.

2.3 Elektronová spektroskopie bílkovin

Všechny molekuly interagují s elektromagnetickým zářením. V oblastech UV záření a viditelného světla mají fotony dostatečnou energii k excitaci elektronů – přeskočení do energeticky bohatšího molekulového orbitalu. Má-li k tomuto dojít, musí být energie fotonu rovna rozdílu energií základního a excitovaného stavu. Do oblasti 200–800 nm se absorpční maxima látek dostávají díky delokalizaci elektronů (konjugace, aromatické systémy). Uskutečňují se zde především přechody typu $\pi \rightarrow \pi^*$. Absorpční spektrum je spojitě, elektron může přeskočit na vícero vibračních hladin excitovaného stavu a absorpční pás se takto rozšiřuje. Oproti plynnému skupenství je spektrální šíře dále zvětšována solvatací (počet možných hladin je vyšší). Pravděpodobnost a tedy intenzita absorpce jednotlivých přechodů je relativně dána překryvem vlnových funkcí. Absolutně pak intenzita závisí na velikosti

a směru tzv. tranzitního dipólu. Dalším efektem solventu je posun λ_{\max} podle jeho polaritě (solvatochromní posuny). Podle směru změny se rozlišuje posun červený (bathochromní, $\uparrow\lambda$) a modrý (hypsochromní, $\downarrow\lambda$). Tento jev spočívá v rozdílné elektrostatické interakci mezi molekulami rozpouštědla a dipólem chromoforu⁴, přesněji v rozdílné míře stabilizace základního a excitovaného stavu solventem. Roli hraje změna velikosti dipólu chromoforu během excitace, tzn. typ přechodu (lokalizace molekulových orbitalů). Konkrétně např. u krotonaldehydu má zvýšení polaritě rozpouštědla za následek červený posun pro přechod $\pi \rightarrow \pi^*$ a modrý posun pro přechod $n \rightarrow \pi^*$.

V molekulách bílkovin se nachází vícero chromoforů, následující tabulka obsahuje jejich přehled a základní charakteristiky.

Tabulka 2. Chromofory a fluorofory bílkovin. Zpracováno podle internetových zdrojů (WWW1, WWW2)
Jednotky: λ [nm], ϵ [$10^3 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$], τ [ns]. Podmínky: voda, pH 7

Chromofor/ fluorofor	ABSORPCE		FLUORESCENCE			
	λ_{\max}	ϵ	λ_{\max} ex.	λ_{\max} em.	Q	τ
Tryptofan	280 ¹⁾ 219	5,6 47	280	348	0,2	2,6
Tyrosin	274 222 193	1,4 8 48	274	303	0,14	3,6
Fenylalanin	257 206 188	0,2 9,3 60	257	282	0,04	6,6
Peptidový řetězec	190 220	~7 ~0,1	-			

¹⁾ Tento absorpční pás se skládá ze dvou překrývajících se $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodů. Příslušné excitované stavy se označují 1L_a (280 nm) a 1L_b (290 nm). 1L_a je intenzivnější a je základem fluorescence tryptofanu.

Prakticky významné jsou absorpční pásy tryptofanu a tyrosinu v oblasti kolem 280 nm. Příspěvek tryptofanu je dominantní. Tyto aromatické systémy však vykazují minimální posuny λ_{\max} v závislosti na polaritě okolí. Tryptofan exponovaný vodě jeví pouze málo patrný červený posun vůči stejnému zbytku zanořenému v hydrofobním jádře bílkoviny. Změny konformace nebo denaturace proteinu se přesto mohou na tvaru a poloze absorpčního

⁴ chromofor = seskupení přinášející určité látce barvu, tj. absorbující v oblasti viditelného světla. V širším smyslu slova absorbující seskupení obecně.

spektra projevít. Absorpční spektroskopie je tedy do určité míry použitelná pro strukturální studie. Může se jednat o stabilitní měření či sledování vazby ligandu, zkoumání vazebných míst apod. Pomocí přidávaných narušujících molekul (perturbantů, např. ethylenglykolu) lze určit počet zbytků tryptofanu a tyrosinu exponovaných solventu. Maximum tyrosinu se po deprotonizaci posouvá na 295 nm. Je-li tento zbytek přístupný rozpouštědлу, lze ho acidobazicky titrovat. Zajímavé je použití absorpční spektroskopie vyšších derivací.

Rutinně se měření absorbance proteinů při 280 nm používá k jejich stanovení. V tomto kontextu se naopak relativní necitlivost dotyčných reziduí stává výhodou. Hodnotu ϵ_{280} lze spolehlivě předpovědět na základě struktury (Pace, Vajdos *et al.* 1995) nebo nalézt v literatuře.

Zvláštním případem absorpční spektroskopie je sledování rozdílů absorpce cirkulárních komponent rovinně polarizovaného světla. Pokud je levotočivá a pravotočivá složka záření pohlcována chromoforem odlišně, hovoříme o cirkulárním dichroismu (CD). Výsledná polarizace je poté eliptická a spektrum CD se vynáší jako závislost tzv. elipticity⁵ na vlnové délce. Spektra CD poskytují velmi cenné informace o struktuře proteinů, např. procentuální zastoupení různých typů sekundární struktury. Pravidelné struktury mají charakteristická spektra v oblasti absorpce polypeptidového řetězce (180–230 nm). Oblast nad 260 nm lze nazvat oblastí otisku palce terciární struktury. Odlišnosti vyplývají z počtu, mobility a polaritý okolí aromatických zbytků. V kombinaci s řízenou mutagenezí lze zkoumat význam jednotlivých aminokyselin pro terciární strukturu. CD spektroskopii lze využít při vazebných studiích, při sledování průběhu tepelné či chemické denaturace a samozřejmě také děje opačného – skládání proteinů (Kelly, Jess *et al.* 2005).

Protipólem absorpční spektroskopie je spektroskopie fluorescenční. Excitovaný elektron svoji energii ztrácí, což se může stát několika způsoby. Po absorpci ($\sim 10^{-15}$ s) se elektron ve všech případech rychle vrací na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu uvolněním tepla (vnitřní konverze, $\sim 10^{-12}$ s). Pokud je tato hladina energeticky blízko nebo dokonce níže než nejvyšší vibrační hladina základního stavu, dojde k další vnitřní konverzi a elektron se vrací do základního stavu. Pokud má ale tato hladina výrazně vyšší energii, elektron v ní po určitou dobu zůstává ($\sim 10^{-8}$ s). Nyní může elektron vyzářit foton (fluorescence), předat energii okolním molekulám či atomům (zhášení) nebo přejít do

⁵ Elipticita θ [stupně] = $\tan^{-1}(b/a) = 32.98(A_L - A_R)$, kde b, a je velikost menší resp. větší osy elipsy (Kelly, Jess *et al.* 2005).

tripletového stavu (tzv. intersystem crossing) a následně vyzářit foton (fosforescence, $\sim 10^{-1}$ s, v roztoku zřídka). Během trvání excitovaného stavu může být fluorofor kovalentně modifikován a ztratit fluorescenční vlastnosti (photobleaching). V případě fluorescence se elektron vrací na jednu z vibračních hladin základního stavu. Doba, po kterou elektron setrvává v excitovaném stavu před emisí fotonu, se nazývá doba života fluorescence (fluorescence lifetime, τ). Vyzářený foton má vždy nižší energii než absorbovaný, fluorescenční spektrum je tedy vždy posunuto do červené oblasti (Stokesův posun). Doba života fluorescence dovoluje proti absorpci reorientaci molekul solventu, což snižuje energii excitovaného stavu. Z toho vyplývá výrazně vyšší citlivost polohy emisního maxima k polaritě rozpouštědla. Obecně pak vysokou citlivost fluorescenčních měření ve srovnání s absorpčními podtrhuje samotná povaha diskutovaných jevů – vznik „něčeho malého“ *versus* úbytek „něčeho velkého“.

Při fluorescenčních experimentech se sleduje závislost intenzity emitovaného záření na různých parametrech – vlnové délce excitačního či emitovaného záření (klasické fluorescenční spektrum), času, koncentraci zhášeče apod. Fluorescence v ustáleném stavu (steady-state fluorescence) vzniká excitací zářením o konstantní intenzitě. Doba života se měří po pulzní excitaci laserem nebo na základě fázového posunu vzhledem k sinusoidně modulovanému excitačnímu záření (time-resolved fluorescence). Sleduje se nejen čas, ale i kinetika poklesu intenzity. Absolutním měřítkem intenzity fluorescence je tzv. kvantový výtěžek – poměr počtu emitovaných kvant ku absorbovaným neboli pravděpodobnost, že elektron ztratí energii zářivým způsobem. Intenzita se nejčastěji vyjadřuje v relativních jednotkách (AU – arbitrary units).

Intenzitu fluorescence snižuje zhášení. Může být způsobeno endogenními i exogenními atomy. Kolizní (dynamický) mechanismus zahrnuje kontakt fluoroforu a zhášeče během excitovaného stavu a pokles doby života fluorescence. Pokud fluorofor vytváří se zhášečem permanentní komplex, jedná se o statické zhášení a doba života se v tomto případě nemění. Závislost intenzity záření na koncentraci zhášeče vyjadřuje tzv. Stern-Volmerova rovnice. Zvláštním případem zhášení je FRET⁶ – nezářivý přenos energie z excitovaného elektronu na jiný chromofor s paralelním tranzitním dipólem. Míra tohoto procesu závisí na velikosti překryvu spektrálních pásem donoru a akceptoru ($D_{\text{emisní}} \times A_{\text{absorpční}}$) a jejich vzdálenosti. FRET se odehrává až na vzdálenost 100 Å. Fluorescence může být také maskována absorpcí emitovaného fotonu okolními chromofory/fluorofory (vnitřní filtrační efekt).

⁶ FRET – Fluorescent Resonance Energy Transfer

Dalším typem fluorescenčního měření je sledování vektorových charakteristik emitovaného záření po excitaci rovinně polarizovaným světlem (polarizace a anizotropie fluorescence).

Za fluorescenční vlastnosti proteinů zodpovídají aromatické kyseliny (viz tabulku na straně 12). Jelikož je podíl tryptofanu na emisi fotonů dominantní, používá se pro vnitřní fluorescenci bílkovin také termín tryptofanová fluorescence. Tyrosin a fenylalanin jsou velmi slabé fluorofory. V případě proximity aromatických zbytků se odehrává transfer energie ve směru Phe → Tyr a Tyr → Trp. Využití tyrosinové fluorescence v praxi se omezuje jen na „beztryptofanové“ bílkoviny. Fluorofory jsou také některé prostetické skupiny bílkovin či kofaktoru enzymů (porfyriny, FMN, NAD apod.). Jejich fluorescenčních (někdy i zhášecích) vlastností lze využít při vazebných studiích.

Volný tryptofan ve vodném prostředí ($\lambda_{ex}=280$ nm) fluoreskuje maximálně při ~350 nm se spektrální šíří asi 60 nm. Pozice emisního maxima je silně závislá na polaritě okolí. Přechod do excitovaného stavu 1L_A způsobuje přesun elektronové hustoty z pyrrolového na benzenový kruh indolového jádra. To znamená, že pozitivní náboj poblíž benzenu či negativní náboj poblíž pyrrolu způsobí posun k nižším energiím (vyšším λ) a naopak. V molekulách proteinů se fluorescenční maximum tryptofanu pohybuje v rozmezí 307–353 nm. Na základě matematického rozkladu spekter lze tryptofanové zbytky bílkovin rozdělit do pěti diskretních spektrálních tříd podle stoupající λ_{max} (viz následující tabulku) (Reshetnyak a Burstein 2001).

Tabulka 3. Spektrální třídy tryptofanu Emisní λ_{max} [nm].

Třída	Em. λ_{max}	Poznámky	Zástupce
A	308	Velmi nepolární prostředí, žádné H vazby v ex. stavu	Azurin
S	316	Zanořený Trp, exciplex* 1:1 s polár. skupinou souseda	-
I	330–332	Zanořený Trp, exciplex 2:1, spektr. šíře 48–50 nm	Aktin
II	340–342	Trp exponovaný vázané vodě, spektr. šíře 53–55 nm	Albumin
III	350–353	Trp plně exponovaný volné vodě, spektr. šíře 59–61 nm	Po denuraci

* komplex složený z excitovaného fluoroforu a protějšku v základním stavu

Nejčastější jsou třídy I, II a III. Jedná se o statistický model, spektrum většiny proteinů se skládá z příspěvků jednotlivých tříd. Fluorescenční studie se provádějí nejčastěji na bílkovinách obsahujících jediný tryptofan. Analýza fluorescence u „více tryptofanových“ bílkovin je komplikovaná, lze využít řízené mutagenese či modifikovaných zbytků tryptofanu (např. 5-hydroxytryptofan je selektivně excitovatelný, 4-fluorotryptofan je „němý“) (Ladokhin 2000).

Fluorescenci tryptofanu zhasí řada molekul. Voda je jednou z nich, proto po denuraci bílkoviny obvykle pozorujeme kromě červeného posunu i pokles intenzity. Všechny polární aminokyseliny také do jisté míry snižují intenzitu emitovaného záření. Je to např. asparagová a glutamová kyselina (v nenabité formě) nebo lysin a argininu (v iontové podobě). Fluorescence je dále zhasena exogenními látkami – experimentálně se nejčastěji používají akrylamid a jodid draselný. Dalšími zhasěči jsou kyslík (zhasěč všech fluoroforů), peroxid vodíku a ionty některých kovů (Cu^{2+} , Pb^{2+} a další). Míra zhasení fluorescence poskytuje informace o přístupnosti tryptofanového zbytku zhasěči. Měření přenosu energie mechanismem FRET dovoluje určit vzdálenost donoru a akceptoru až do hodnoty 100 Å. V této metodě se často používá kovalentního fluorescenčního značení.

Mobilitu tryptofanového zbytku lze vyšetřit pomocí měření polarizace emitovaného záření. Po excitaci rovinně polarizovaným světlem dojde k selektivní excitaci určitých tryptofanových zbytků. Pokud fluorofor vykonává rotační pohyby, bude výsledné záření částečně depolarizované. Anizotropie fluorescence je jiným matematickým vyjádřením tohoto jevu.

Ke studiu struktury proteinů se využívá také kovalentních a nekovalentních fluorescenčních průb. Kovalentních průb existuje velké množství, značeny jsou primární aminoskupiny či thiolové skupiny. Nekovalentní próby mají různé vlastnosti, např. fluoreskují pouze, pokud jsou vázány. Fluorescence ANS⁷ výrazně stoupá, když se dostane do hydrofobního prostředí, a lze ji využít při studiu skládání bílkovin.

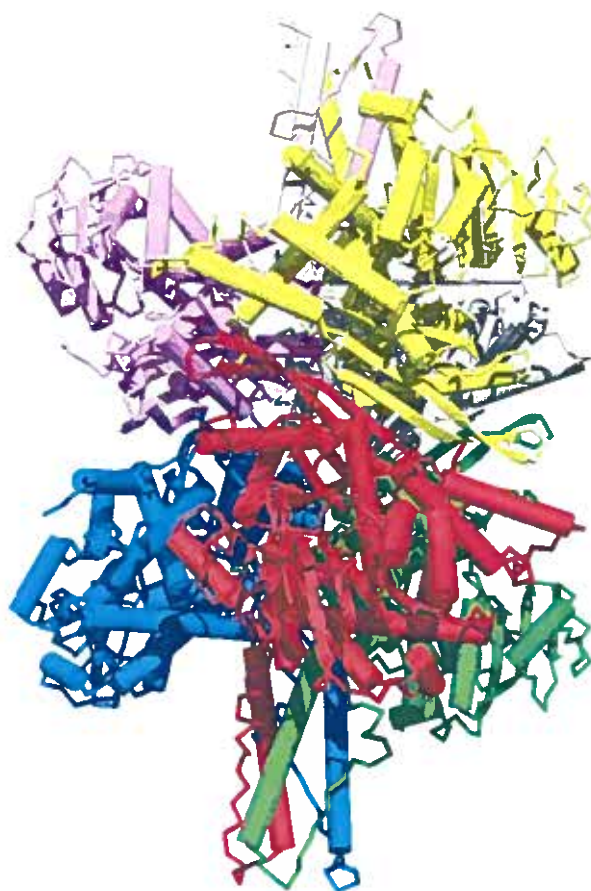
Mnohé AGEs jsou chromofory a některé fluorofory. Tyto jejich vlastnosti jsou využívány k posouzení míry glykace bílkovin jak *in vivo*, tak *in vitro*. Tkáňová fluorescence se nejčastěji měří při vlnových délkách excitace 360–370 nm a emise 430–440 nm. Byly nalezeny pozitivní korelace mezi touto tzv. autofluorescencí a nejrůznějšími parametry (např. věk, glukosová homeostáze, poškození ledvin, trvání dialýzy, kouření apod.) (Na, Stender *et al.* 2001; Wautier a Guillausseau 2001; Kessel, Hougaard *et al.* 2002). Absorbance AGEs (360 nm) koreluje se změnou molekulové hmotnosti postranních řetězců lidského sérového albuminu (Schmitt, Gasic-Milenkovic *et al.* 2005). Charakteristiky dvou hlavních AGE fluoroforů jsou následující: pentosidin 335 nm excitace / 385 nm emise a argpyrimidin

⁷ ANS – 1-anilinonaftalen-8-sulfonová kyselina

320 nm excitace / 382 nm emise (Sell a Monnier 1989; Shipanova, Glomb *et al.* 1997). Fluorescence těchto AGEs se využívá při stanovení metodou HPLC.

2.4 Glutamátdehydrogenasa

Glutamátdehydrogenasa (GDH, 1.4.1.3) se nachází ve všech organismech, je to klíčový enzym metabolismu uhlíku a dusíku. Reverzibilně katalyzuje oxidativní deaminaci glutamátu na α -ketoglutarát. Představuje spojovací článek mezi katabolismem a biosyntetickými drahami, ve směru oxidativní deaminace GDH dodává α -ketoglutarát do citrátového cyklu, v opačném směru poskytuje dusík pro anabolické reakce. Savčí GDH používá jako koenzymy NADH nebo NADPH se srovnatelnou účinností (Peterson a Smith 1999).

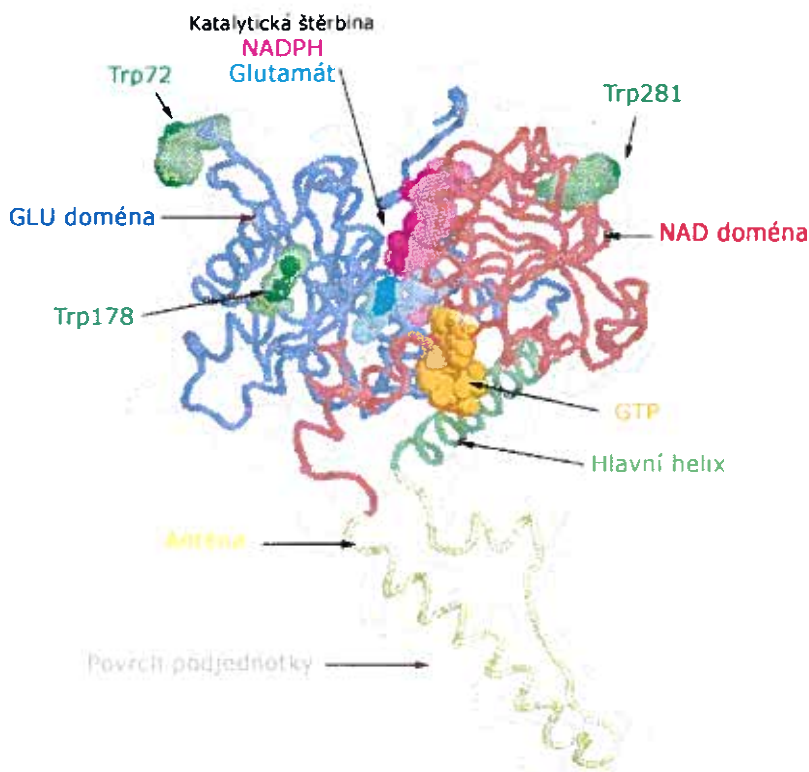


Obrázek 4. Homohexamer GDH. Převzato z: Allen, Kwagh *et al.* 2004

U savců je GDH enzymem mitochondriálního matrix. Nachází se především v játrech, ledvinách, pankreatu a mozku. Molekula GDH je homo-hexamer, každá podjednotka má molekulovou hmotnost ~50 kDa. Enzym vykazuje symetrii typu 3,2 – je to dimer trimerů

(Obrázek 4). Řetězec podjednotky vytváří tři domény: doménu vázající glutamát na N-konci, doménu vázající NAD a regulační doménu, která se skládá z hlavního helixu a tzv. antény. Oblast molekuly mezi glutamát- a NAD-vázající doménou vytváří katalytickou štěrbinu (Obrázek 5). Během reakce rotuje NAD doména okolo hlavního helixu, katalytická ústa se otevírají a zavírají. Antény v trimeru se vzájemně obtáčejí a během katalýzy se také pohybují (Allen, Kwagh *et al.* 2004).

Savčí GDH vykazuje negativní kooperativitu vazby enzymů, její aktivita je striktně kontrolována komplexním systémem allosterických regulátorů. Hlavními takovými efektory jsou ADP a GTP. Jejich účinek se vysvětluje působením na abortivní komplexy [NAD(P)H·GLU] nebo [NAD(P)⁺· α -KG]. ADP je aktivátor enzymu, destabilizuje tyto komplexy a ruší negativní kooperativitu. GTP je inhibitor, tyto komplexy stabilizuje. Vazba těchto regulátorů k enzymu je vzájemně antagonistována (Smith, Schmidt *et al.* 2002).



Obrázek 5. Detail podjednotky GDH s vázanými ligandy a vyznačenými tryptofanovými zbytky (PDB 1HWZ)

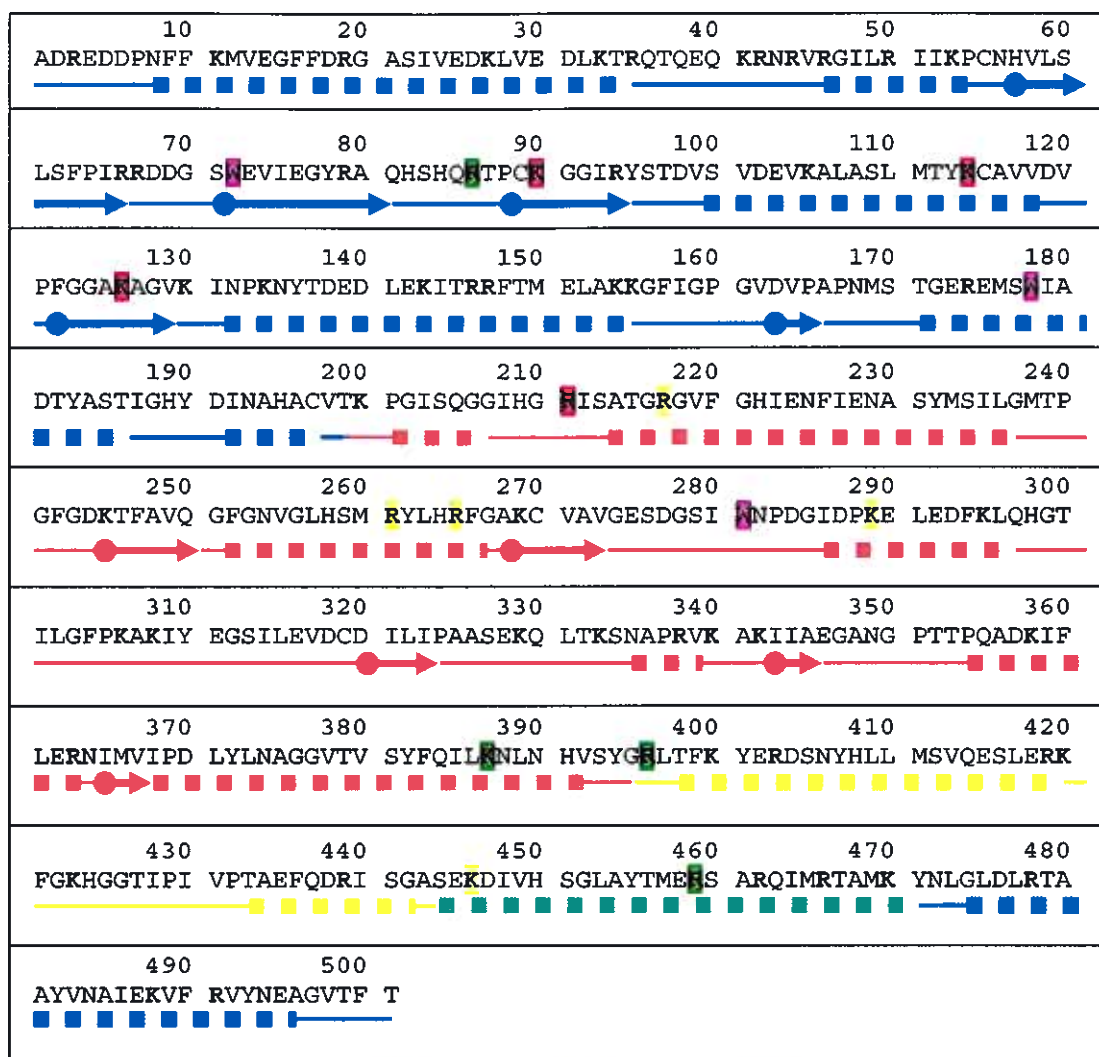
Vazebné místo pro GTP leží mezi NAD doménou a anténou. Trifosfátová část GTP předurčuje vazbu do tohoto místa, které by tudíž mohlo fungovat jako „energetický senzor“ kontrolující funkci enzymu s ohledem na aktuální energetickou bilanci buňky. ADP se váže

do oblasti pod hlavním helixem prostřednictvím adenosinové části molekuly. Do tohoto místa se může vázat i druhá molekula NAD(H). Redukovaná forma působí inhibičně a naopak. Dalšími regulátory funkce GDH jsou ATP (inhibitor i aktivátor v závislosti na koncentraci), palmitoyl-CoA (inhibitor) a leucin (aktivátor, vazba do aktivního centra). V roztoku má enzym sklon lineárně polymerizovat a vytvářet vláknité struktury (Banerjee, Schmidt *et al.* 2003).

Allosterická regulace GDH je fyziologicky velmi důležitá. Syndrom hyperinsulinismu/hyperamonemie je zapříčiněn mutací v genu pro GDH (GLUD1), která způsobuje necitlivost enzymu k GTP. Vyšší oxidace glutamátu v β -buňkách pankreatu vede k nadbytku ATP, uzavření K-ATP kanálu, otevření vápníkového kanálu a sekreci inzulinu. V játrech se zvyšuje hladina amoniaku vyšším uvolňováním z glutamátu a také snížením syntézy N-acetylglutamátu, aktivátoru karbamoylfosfátsyntetasy (Stanley 2004).

V jedné podjednotce GDH se nachází několik aminokyselinových zbytků argininu a lysinu, které se účastní vazby v aktivním centru či v allosterických místech (Obrázek 6). Např. R459 interaguje s β -fosfátem ADP. Mutace R459A způsobuje ztrátu aktivovatelnosti pomocí ADP (Smith, Peterson *et al.* 2001).

Jedna podjednotka bovinní GDH obsahuje tři zbytky tryptofanu – dva v doméně vázající glutamát a jeden v NAD-vázající doméně. Všechny tři tryptofany se nacházejí při povrchu podjednotky a jsou částečně přístupné solventu (Obrázek 5).



Domény: ■ GLU ■ NAD ■ anténa ■ hlavní helix
 Lys/Arg: ■ aktivní centrum ■ místo pro ADP ■ místo pro GTP Trp: ■
 Struktura: — náhodné klubko ■ α-helix ■ β-list

Obrázek 6. Sekvence bovinní GDH

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Východiska a cíle práce

Tato rigorózní práce navazuje na některé výsledky diplomové práce autora a zkoumá další aspekty glykačního poškození proteinů.

Glykace GDH methylglyoxalem *in vitro* vedla k inaktivaci enzymu. Při koncentraci MGO 1 mM se jednalo o přibližně 20% pokles aktivity po 2 stejně jako po 4 hodinách inkubace. Citlivějším ukazatelem byla senzitivita k allosterickým efektorům, především k GTP. Neglykovaná GDH byla tímto nukleotidem inhibována na ~ 38 % původní aktivity. Změny se projevíly již po 2 hodinách inkubace s 50 μ M MGO a míra inhibice postupně klesala. GDH glykovaná 1 mM MGO byla po 4 hodinách inhibována na ~62 % své původní aktivity. Záměr identifikovat modifikované aminokyselinové zbytky pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie byl neúspěšný (Vostrý 2005). Otázkou tedy zůstává, zda pozorovaný pokles aktivity a inhibovatelnosti vyplývá z přednostní modifikace určitých aminokyselinových zbytků zapojených do vazby v aktivním centru či allosterickém místě, nebo se jedná o efekt změny konformace a flexibility molekuly.

Cílem práce je prozkoumat vliv methylglyoxalu na spektrální vlastnosti bílkoviny, a to se zřetelem jak na vlastní spektrum proteinu, tak na spektra vznikajících aduktů. Měřili jsme absorpční a fluorescenční spektra systému GDH-MGO a sledovali jejich změny v průběhu inkubace. Experimenty vycházejí z následujících úvah: 1) studium spekter v oblastech příslušejících bílkovinným chromoforům by mohlo prozradit, zda dochází ke konformačním změnám v důsledku glykace, případně jakého charakteru tyto změny jsou, 2) měření fluorescence v oblasti pro argpyrimidin, jehož vznik předpokládáme, může posloužit jako ukazatel tvorby glykačních produktů.

3.2 Použité materiály a metody

3.2.1 Reagencie

- Glutamátdehydrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3), bovinní játra, suspenze v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mg, Sigma
- Methylglyoxal (MGO), 40% vodný roztok, Sigma

3.2.2 Přístroje

- Aminco Bowman Luminescence Spectrometer (Series 2)
- Hewlett-Packard 8453 (spektrofotometr)
- Heraeus Biofuge Stratos (centrifuga)

3.2.3 Příprava enzymu

Suspenze GDH v síranu amonném byla odstředěna (20 tis. otáček/min., 20 min.) a peleta resuspendována v 5 ml fosfátového pufru (PBS) (0,1 mM, pH 7,4). Nerozpuštěný precipitát byl odstraněn filtrací. Koncentraci bílkoviny jsme stanovili spektrofotometricky ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 0,93 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Enzym byl poté naředěn na koncentraci 2 mg/ml a použit při přípravě vzorků k inkubaci.

3.2.4 Podmínky inkubace s methylglyoxalem

Methylglyoxal byl před použitím naředěn fosfátovým puftrem na dva zásobní roztoky o koncentracích 60 mM (MGO_{60}) a 6 mM (MGO_6). Vzorky pro měření absorpčních respektive fluorescenčních spekter byly připraveny podle tabulky (Tabulka 4). Nejnižší koncentrace MGO přibližně odpovídá poměru jedné molekuly glykačního agens k jednomu modifikovatelnému zbytku aminokyseliny (tj. lysinu či argininu). Všechny inkubace byly provedeny v duplikátech za laboratorní teploty (25°C).

3.2.5 Měření absorpčních spekter

Měření probíhalo na přístroji HP 8453 v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm. V časových intervalech 0, 2, 4 a 20 hodin byly odebrány alikvotní části jednotlivých vzorků a byla zaznamenána absorpční spektra v rozmezí vlnových délek 220–400 nm. Měření bylo provedeno v duplikátech za laboratorní teploty.

Tabulka 4. Příprava vzorků (hodnoty jsou objemy v μl)

ABSORBANCE	Konečná koncentrace enzymu: 1 mg/ml				
Vzorek (= výsl.[MGO])	0 mM	1,5 mM	15 mM		
n(K+R):n(MGO)*	-	~ 1:1	~ 1:10		
Enzym (2 mg/ml)	1000	1000	1000		
MGO	0	500 (MGO ₆)	500 (MGO ₆₀)		
Pufr	1000	500	500		
Celk. objem	2000	2000	2000		
FLUORESCENCE	Konečná koncentrace enzymu: 0,2 mg/ml				
Vzorek (= výsl.[MGO])	0 mM	0,3 mM	1,5 mM	3 mM	15 mM
n(K+R):n(MGO)*	-	~ 1:1	~ 1:5	~ 1:10	~ 1:50
Enzym (2 mg/ml)	200	200	200	200	200
MGO	0	100 (MGO ₆)	500 (MGO ₆)	100 (MGO ₆₀)	500 (MGO ₆₀)
Pufr	1800	1700	1300	1700	1300
Celk. objem	2000	2000	2000	2000	2000

* přibližný poměr látkového množství lysinu a argininu ku látkovému množství methylglyoxalu

3.2.6 Měření fluorescenčních spekter

Fluorescenční spektra v ustáleném stavu byla zaznamenána přístrojem AB2 v časových intervalech 0, 2, 4 a 20 hodin. Emitované záření bylo detekováno v pravém úhlu vzhledem k excitačnímu záření (xenonová lampa, 4 nm bandwidth). Byly použity křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm. Měřili jsme vnitřní (tryptofanovou) fluorescenci (emisní spektrum) a vnější (netryptofanovou) fluorescenci (emisní i excitační spektrum). Excitační spektrum bylo zaznamenáno pouze v čase 20 hodin. Hodnoty vlnových délek a jejich rozsahů při různém nastavení přístroje jsou uspořádány do následující tabulky (Tabulka 5).

Hodnota optimální excitační vlnové délky u tryptofanové fluorescence byla stanovena na základě prověření oblasti 270–300 nm a odpovídá maximální intenzitě fluorescence. Nastavení B a C vycházejí z poznatku, že hlavním fluorescenčním AGE produktem odvozeným od methylglyoxalu je argpyrimidin s maximy ležícími právě v této oblasti

(viz str. 16). Měření byla provedena v duplikátech při laboratorní teplotě. Intenzita fluorescence je vyjádřena v relativních jednotkách (AU).

Tabulka 5. Nastavení spektrofluorimetru

FLUORESCENCE		λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
A	Vnitřní (tryptofanová)	288	295 – 400
B	Vnější (emisní sp.)	320	340 – 450
C	Vnější (excitační sp.)	310 – 380	400

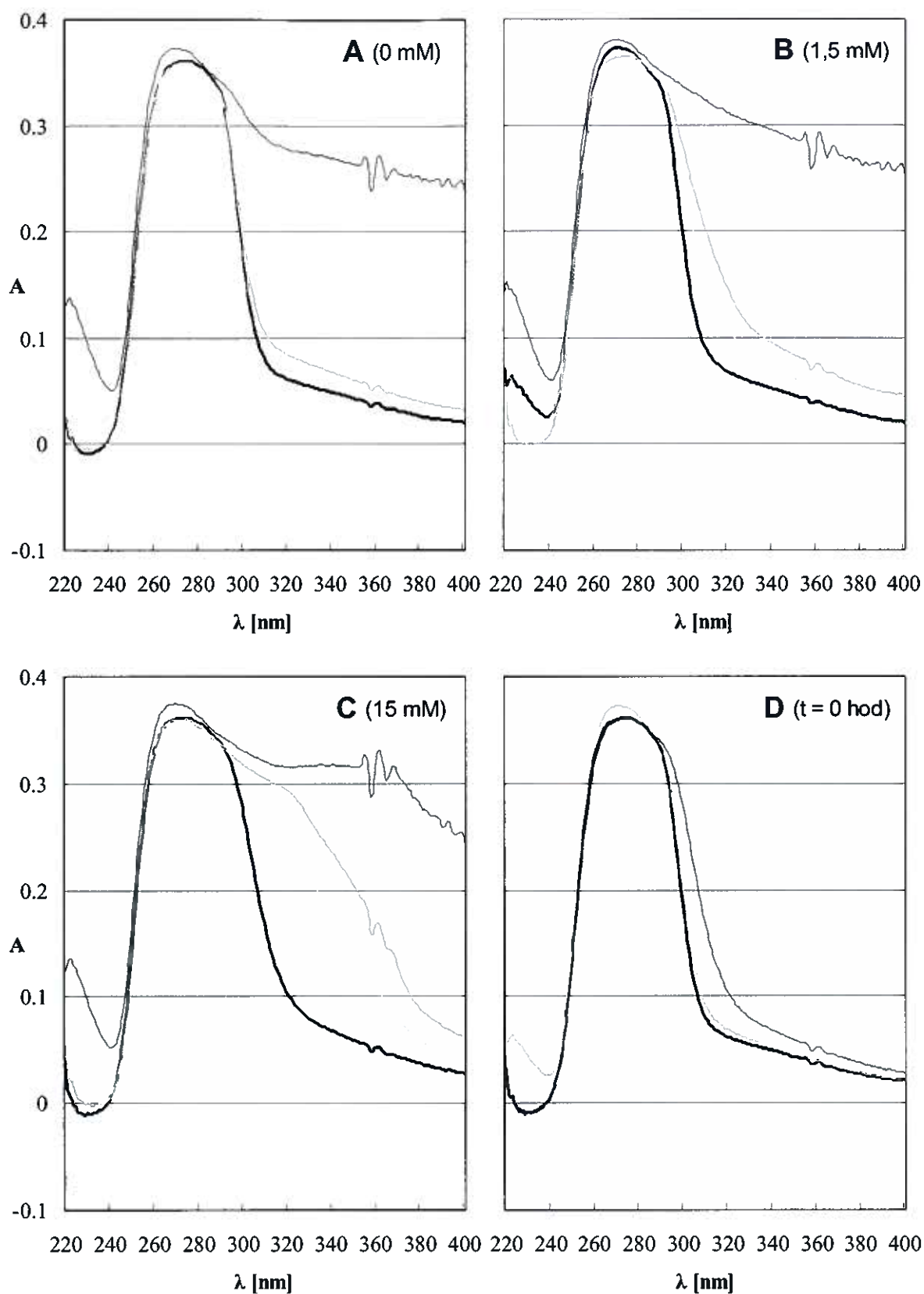
3.3 Výsledky

3.3.1 Absorpční spektra

Inkubovali jsme GDH s MGO o dvou různých koncentracích (1,5 mM a 15 mM) a v časových intervalech 0, 2, 4 a 20 hodin zaznamenali absorpční spektra v rozsahu 220-400 nm. Přístroj byl vynulován na použitý fosfátový pufr. Naměřená spektra jsou zachycena na obrázku (Obrázek 7 - grafy A, B, C, str. 26). Kontrolní spektrum (0 mM MGO) se během doby čtyř hodin téměř nemění. V oblasti lokálního minima (~240 nm) se u vzorku s 15 mM MGO do čtyř hodin inkubace neobjevují výrazné změny. U vzorku s 1,5 mM sice odlišnosti nastávají, ale jejich významnost je zpochybnitelná. Po dvacetihodinové inkubaci se u všech vzorků hodnota absorbance v tomto lokálním minimu zvyšuje a sedlo spektra se zužuje. Organolepticky vykazovaly vzorky po dvaceti hodinách mírnou opalescenci. U všech vzorků po uplynutí této doby je nápadně pozorovatelná absence sestupné části absorpčního pásu. Vrchol spektra je oblý, absorpční maximum není zcela zřetelně vyjádřené. Po dvou ani po čtyřech hodinách nepozorujeme výraznější změny v jeho poloze (~275 nm) ani intenzitě. Po dvaceti hodinách inkubace zaznamenáváme kromě mírného zvýšení intenzity také určitý modrý posun (~271 nm).

Skutečně patrné změny spektra související s přítomností methylglyoxalu ve vzorku lze pozorovat v jeho sestupné části. Při koncentraci MGO 1,5 mM se jedná o rozšiřování spektrálního pásu, při koncentraci desetinásobné je toto rozšíření dále zvýrazněno a objevuje se nový absorpční vrchol (přesněji spíše zlom). Tato koncentrace MGO působí nápadné změny spektra již po dvou hodinách, nové „maximum“ nacházíme při vlnové délce ~320 nm. Po dvaceti hodinách (15 mM MGO) není toto maximum patrné, je ale možné, že je maskováno již zmíněnou opalescencí. Vibrační tvar spektra v oblasti 360 nm je zřejmě charakteristikou přístroje.

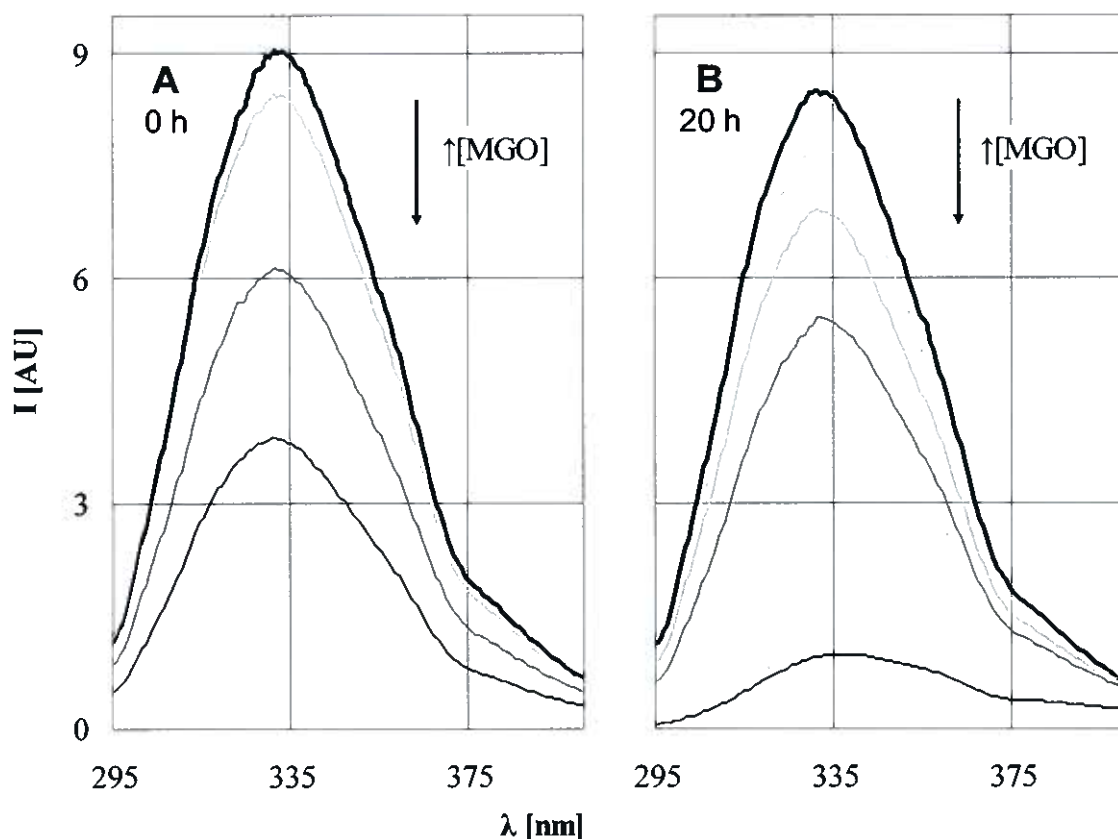
Je třeba upozornit, že MGO samotný absorbuje při ~278 nm, což představuje metodickou potíž. Všechny vzorky byly měřeny proti fosfátovému pufru. Mezi sebou tedy srovnáváme vzorky se shodnou koncentrací MGO. Srovnání spekter na počátku inkubace (Obrázek 7, graf D) však naznačuje, že vliv MGO na absorbanci systému je omezený. Absorbance multikomponentního systému při dané vlnové délce se rovná součtu absorbancí jednotlivých komponent za předpokladu platnosti Lambert-Beerova zákona. Ten platí pouze pokud se absorbující entity chovají nezávisle.



Obrázek 7. Absorpční spektra GDH. Grafy A, B a C znázorňují časový vývoj spekter pro jednotlivé koncentrace MGO. Spektrum v čase 0 hod je zobrazen tučně, stupeň šedi ostatních čar odpovídá době inkubace – nejsvětlejší 2 hod, nejtmaší 20 hod. Graf C srovnává spektra vzorků s různými koncentracemi MGO v čase 0 hod. Vzorek bez MGO je zobrazen tučně, světlejší čára znamená 1,5 mM a tmavší 15 mM MGO.

3.3.2 Vnitřní fluorescence GDH

Zaznamenávali jsme intenzitu fluorescence po excitaci zářením o vlnové délce 288 nm. K inkubaci jsme použili 4 různé koncentrace MGO (0,3, 1,5, 3 a 15 mM), časové intervaly byly shodné jako v případě měření absorbance (0, 2, 4 a 20 hodin). Fluorescenční spektra vzorků s různou koncentrací MGO před započítím (0 hod) a po úplném ukončení inkubace (20 hod) jsou znázorněna na obrázku (Obrázek 8).



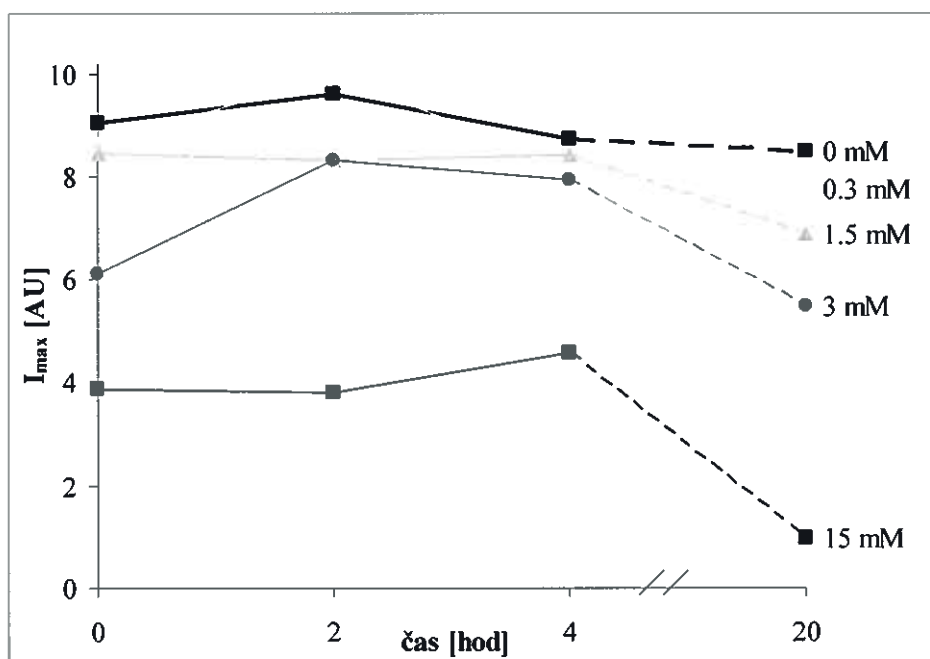
Obrázek 8. Emisní spektra GDH v čase 0 (A) a 20 hodin (B). Kontrolní spektrum je zobrazeno tučně, další spektra odpovídají barvou koncentraci MGO – nejsvětlejší 0,3 mM, nejtmaší 15 mM. Pokles v rámci jednoho času je způsoben filtrací excitačního záření methylglyoxalem - je třeba srovnávat spektra stejných vzorků, tedy stejných barev. $\lambda_{ex} = 288$ nm.

V rámci jednoho času pozorujeme pokles intenzity fluorescence s rostoucí koncentrací methylglyoxalu. Tento pokles je ale dán vzrůstajícím filtračním efektem methylglyoxalu na excitační záření (viz kapitola 3.3.1), je třeba porovnávat sobě si odpovídající vzorky (na obr. spektra stejné barvy). Vzhledem k výchozím hodnotám je intenzita fluorescence po dvaceti hodinách u všech vzorků nižší. Výrazné snížení nastává u vzorku s 15 mM MGO, ~26% původní intenzity. U ostatních vzorků se jedná o pokles v rozmezí 82-94% původní intenzity,

ovšem bez přímé závislosti na koncentraci MGO. Časový vývoj maximální intenzity fluorescence (Tabulka 6, Obrázek 9) ukazuje, že během inkubace může její naměřená hodnota jak růst tak klesat. V době inkubace do čtyř hodin nenalzáme ve vývoji maximální hodnoty fluorescence žádnou pravidelnost. Po dvaceti hodinách se pokles jeví jako závislý na koncentraci MGO.

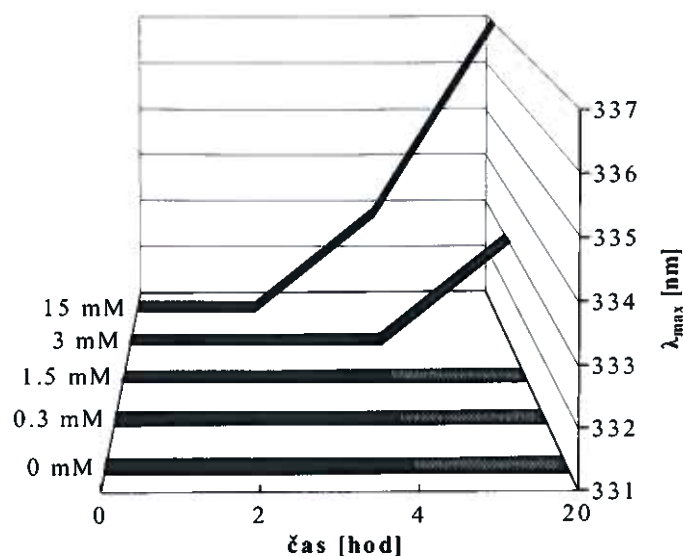
Tabulka 6. Hodnoty maximální intenzity fluorescence $\lambda_{ex} = 288$ nm. Hodnoty jsou průměrem dvou měření.

MGO / čas	0h	2h	4h	20h
0 mM	9.04	9.62	8.74	8.49
0.3 mM	8.61	9.99	8.19	7.76
1.5 mM	8.45	8.31	8.43	6.90
3 mM	6.13	8.30	7.92	5.47
15 mM	3.86	3.79	4.59	0.99



Obrázek 9. Závislost maximální intenzity fluorescence na čase. Kontrolní spektrum je vyobrazeno tučně. Stupeň šedi ostatních křivek odpovídá koncentraci MGO. $\lambda_{ex} = 288$ nm.

Na následujícím obrázku je znázorněn vývoj polohy emisního maxima GDH (Obrázek 10, str. 29). U vzorku bez methylglyoxalu a vzorků s 0,3 a 1,5 mM MGO se pozice maxima nemění, nejvyšší intenzitu má záření o vlnové délce 331 nm. Při koncentraci 3 mM MGO pozorujeme po dvaceti hodinách inkubace velmi mírný červený posun (333 nm), koncentrace 15 mM MGO způsobuje červený posun na 333 nm a na 337 nm po čtyřech respektive dvaceti hodinách.

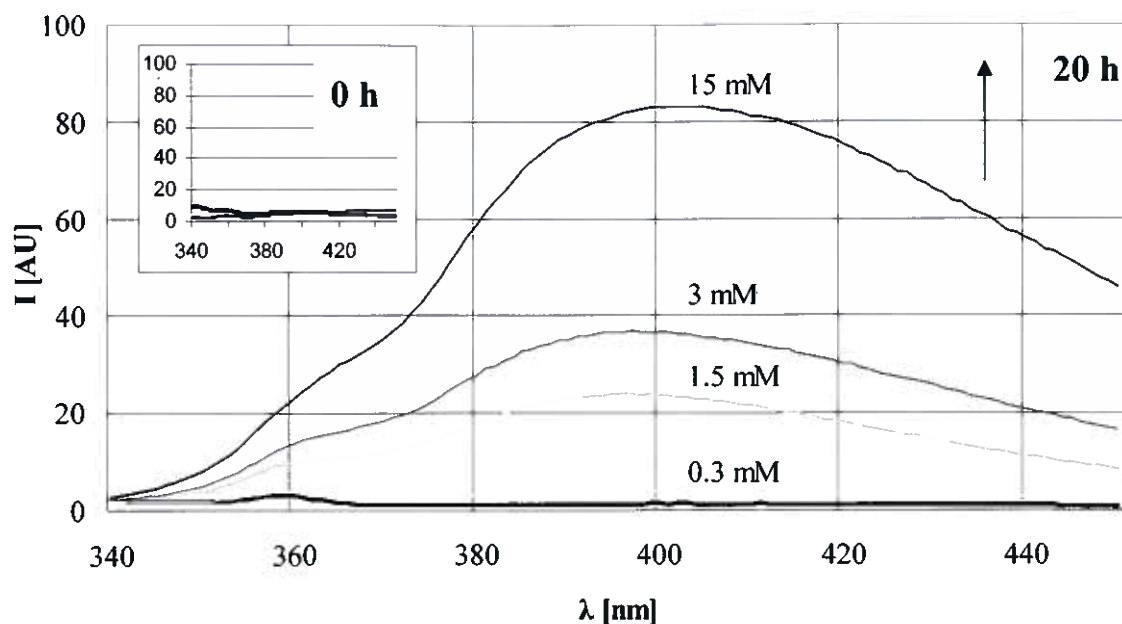


Obrázek 10. Vývoj polohy emisního maxima GDH. $\lambda_{ex} = 288 \text{ nm}$.

3.3.3 Vnější fluorescence GDH

Při inkubaci enzymu s MGO jsme dle dostupných poznatků předpokládali vznik argpyrimidinu jako hlavního fluorescenčního produktu. Fluorescenci jsme proto měřili v rozsahu zahrnujícím fluorescenční maximum tohoto glykačního produktu. Zaznamenávali jsme emisní spektrum po excitaci při 320 nm. Použité koncentrace MGO i časové intervaly měření jsou stejné jako v předchozích kapitolách. Obrázek 11 (str. 30) znázorňuje spektra po dvaceti hodinách inkubace. Výchozí stav je zachycen na malém obrázku vloženém do levého horního rohu.

Časový vývoj intenzity emitovaného záření o vlnové délce 400 nm je znázorněn na dalším obrázku (Obrázek 12, str. 31), hodnoty intenzity fluorescence udává Tabulka 7. Koncentrace MGO 0,3 mM emisní spektrum v celém průběhu inkubace nemění. Při koncentraci 1,5 mM a 3 mM MGO pozorujeme nárůst intenzity fluorescence (závislý na použité koncentraci) v období mezi čtyřmi a dvaceti hodinami inkubace. Maximum emise se objevuje shodně při 397 nm. Methylglyoxal o koncentraci 15 mM způsobuje nárůst fluorescence již po dvou hodinách a intenzita emitovaného záření s přibývajícím časem inkubace stoupá. Emisní maximum tohoto vzorku nacházíme při 400 nm po uplynutí dvou, čtyř i dvaceti hodin od počátku inkubace. U všech spekter se vyskytuje méně zřetelný emisní pás v oblasti 360 nm

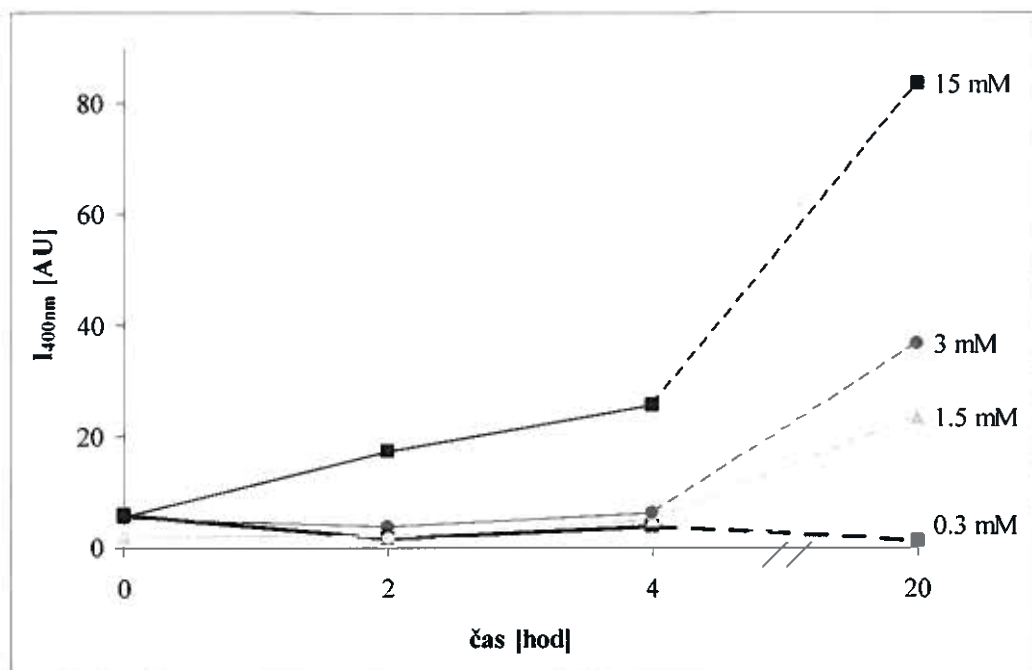


Obrázek 11. Vnější (netryptofanová) fluorescence GDH po 20h inkubace. Kontrolní spektrum je zobrazeno tučně. Na vloženém obrázku jsou zachycena spektra v čase 0 hodin. $\lambda_{ex} = 320$ nm.

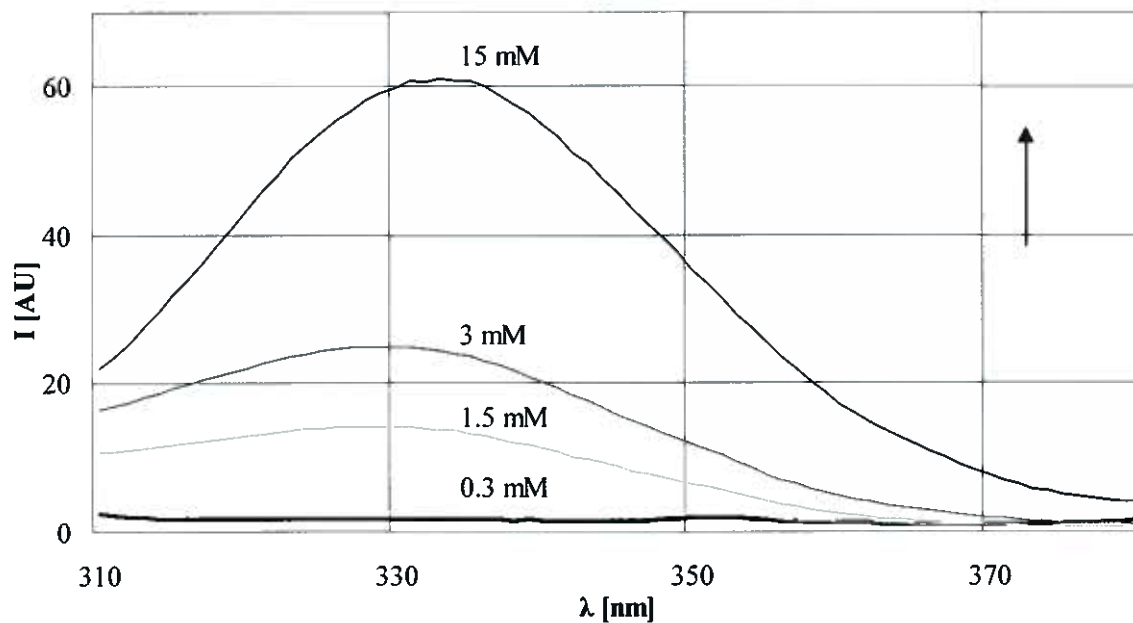
Tabulka 7. Hodnoty intenzity fluorescence při 400 nm $\lambda_{ex} = 320$ nm. Hodnoty jsou průměrem dvou měření.

MGO / čas	0h	2h	4h	20h
0 mM	5.94	1.45	3.58	1.35
0.3 mM	2.49	1.92	1.67	4.05
1.5 mM	1.85	2.30	4.99	23.48
3 mM	5.35	3.80	6.29	36.60
15 mM	5.62	17.10	25.46	83.15

V čase 20 hodin jsme se záměrem blíže charakterizovat pozorované fluorescenční záření zaznamenali také excitační spektrum všech vzorků při vlnové délce emise 400 nm (Obrázek 13, str. 31). Koncentrace MGO 0,3 mM nezpůsobuje pozorovatelné změny spektra. U ostatních vzorků je patrný nárůst fluorescence při 400 nm v závislosti na použité koncentraci methylglyoxalu. Excitační maximum má u vzorků s 1,5 mM a 3 mM MGO polohu 329 nm, u vzorku s 15 mM MGO je posunuto směrem k červené oblasti spektra, na 333 nm.



Obrázek 12. Závislost intenzity fluorescence při 400 nm na čase. Kontrolní spektrum je vyznačeno tučně. $\lambda_{ex} = 320$ nm.



Obrázek 13. Excitační spektrum vnější fluorescence po 20h inkubace. Kontrolní spektrum je vyznačeno tučně. $\lambda_{em} = 400$ nm.

3.4 Diskuze

Cílem této práce bylo prošetřit vliv methylglyoxalu na spektrální vlastnosti enzymu GDH. Vykonané *in vitro* experimenty spočívaly v inkubaci enzymu s různými koncentracemi MGO po různě dlouhou dobu a v následném měření absorpčních a fluorescenčních spekter.

Glutamátdehydrogenasa vykazuje při všech koncentracích a době inkubace do čtyř hodin absorpční maximum při 275 nm. Hodnota maximální absorbance se v tomto časovém horizontu výrazně nemění. Žádné změny nezaznamenáváme ani v oblasti lokálního minima (~240 nm). U vzorku s 1,5 mM MGO určité změny v oblasti tohoto minima i v oblasti vrcholu spektra nastávají, jejich význam je však spekulativní a nemůže být vyloučena ani experimentální chyba. Výraznou změnou u všech vzorků po dvaceti hodinách inkubace je absence sestupné části spektra. Tento jev souvisí s rozptylem přicházejícího záření a byl pozorovatelný i zrakem – vzorky na konci inkubace mírně opaleskovaly. Opalescenci může podmiňovat sklon GDH k polymerizaci a také snížení rozpustnosti v důsledku denaturace. Enzym se vyznačuje nízkou stabilitou, po šestnácti hodinách dialýzy ztrácel veškerou enzymatickou aktivitu (zkušenost z diplomantských experimentů). Dalším mechanismem, který může přispívat k opalescenci, je tvorba cross-linků (MOLD) mezi molekulami enzymu. Vzorky po dvaceti hodinách vykazovaly také mírný modrý posun absorpčního maxima. Změny tvaru spektra, které lze jednoznačně přičíst vlivu methylglyoxalu, nastávají v sestupné části spektra a jsou pozorovatelné do čtyř hodin od počátku inkubace. V případě slabší koncentrace MGO (1,5 mM) se jedná o postupné rozšíření spektrálního pásu po dvou a po čtyřech hodinách. V kapitole 2.3 uvádíme, že absorpční spektrum je rozšiřováno rostoucím energetickým rozpětím mezi vibračními hladinami excitovaného stavu a že toto je zvyšováno solvatací. Otázkou je, zda pozorované rozšíření spektra je výsledkem změn týkajících se vlastních bílkovinných chromoforů, nebo je odrazem vzniku nových absorbujících molekul. U vzorku s 15 mM MGO je situace o něco jasnější, po dvou i čtyřech hodinách dochází k dalšímu rozšíření spektra, objevuje se ale nový absorpční pás, který toto rozšíření podmiňuje. Nové absorpční „maximum“ se objevuje při ~320 nm a jeho přítomnost souvisí s tvorbou absorbujících glykačních aduktů na molekule enzymu. Po dvaceti hodinách (15 mM MGO) není toto maximum patrné, ale je pravděpodobné, že je maskováno zmíněnou opalescencí. *In vivo* se za převládající AGEs odvozené od MGO považují hydroimidazolony. Modifikací HSA vysokou koncentrací MGO *in vitro* vzniká převážně argpyrimidin (viz kapitolu 2.2). Předpokládaný mechanismus jeho vzniku zahrnuje kondenzaci dvou molekul MGO (vznik 3-hydroxypentan-2,4-dionu a odštěpení mravenčí kyseliny) a následnou reakci

s argininem. Tvorbu argpyrimidinu lze předpokládat i při modifikaci GDH methylglyoxalem o koncentraci 15 mM. Důležitý je poměr látkových množství MGO a modifikovatelných zbytků (a to spíše pouze argininu jakožto přednostního cíle modifikace). U provedených experimentů je tento poměr pro arginin a 15 mM MGO přibližně 1:20. Shipanova a sp. (1997) uvádějí, že maxima absorpce purifikovaného argpyrimidinu leží v oblasti 231 a 335 nm. Podle Kessela a sp. (2002 b) absorbuje argpyrimidin maximálně v rozmezí 320–335 nm. Poloha námi pozorovaného spektrálního zlomu (320 nm) naznačuje, že glykačním produktem podmiňujícím jeho existenci by mohl být skutečně argpyrimidin.

Již v kapitole popisující výsledky měření jsme se zmínili o metodické komplikaci experimentů – vlastní absorpci methylglyoxalu. I když srovnáváme pouze spektra vzorků se stejnou koncentrací MGO, není vliv absorpce methylglyoxalu zcela jistě eliminován, jelikož se jeho příspěvek k výslednému spektru může snižovat s rostoucím časem a prohlubující se modifikací proteinu. Otázkou je, do jaké míry se může tato úvaha, vzhledem k nadbytku MGO, vztahovat na jednotlivé typy spektrálních měření. Fluorescenční spektroskopie je citlivější metodou než spektroskopie absorpční, a proto by mohl tento fakt výrazně ovlivnit měřené veličiny.

V první části fluorescenčních měření jsme se zabývali vlivem MGO na vnitřní fluorescenci GDH. Po prvotním proměření emisních a excitačních spekter samotného enzymu jsme zvolili záření o vlnové délce 288 nm za optimální k excitaci bílkovinných fluoroforů v dalších experimentech. Právě při excitaci nastává interference s methylglyoxalem, který svojí absorpcí (maximum při ~278 nm) přichodzí záření filtruje. Z toho pak vyplývají odlišnosti intenzity fluorescence již na počátku měření. Problémem i při srovnání spekter vzorků se stejnou koncentrací MGO je, že nevíme, zda se filtrační vliv MGO během inkubace reálně snižuje v důsledku postupující modifikace proteinu. Pokud k tomu dochází, byla by intenzita fluorescence v pokročilejším stadiu inkubace nadhodnocena. Změny intenzity fluorescence tedy nelze s naprostou jistotou přisuzovat konformačním změnám proteinu. Měření fluorescence GDH ale poskytlo i přes metodickou nedokonalost zajímavé výsledky. GDH v nativním stavu vykazuje emisní pás s maximem při vlnové délce 331 nm a spektrální šíři ~75 nm. Jedna podjednotka obsahuje tři tryptofanové zbytky částečně přístupné solventu. Na jednu funkční molekulu GDH tedy připadá 18 zbytků tryptofanu. Pozice emisního maxima by odpovídala tryptofanu spektrální třídy I (zanořený tryptofan tvořící dvě vodíkové vazby v excitovaném stavu), v reálu ale představuje kombinaci parametrů všech zúčastněných fluoroforů. Je nutno dodat, že k selektivní excitaci indolových jader je zapotřebí excitační

vlnové délky větší než 295 nm, do námi měřené fluorescence mohou tedy zasahovat i tyrosinové zbytky, kterých jedna podjednotka GDH obsahuje osmnáct. V čase 0 pozorujeme pokles intenzity fluorescence ve směru růstu koncentrace MGO. Tento jev je způsoben zmiňovaným filtračním efektem MGO. Po dvaceti hodinách se intenzita u všech vzorků snížila, u vzorku s 15 mM MGO velmi výrazně (na 26 % původní hodnoty *versus* průměrně 88 % u ostatních vzorků). Hodnoty intenzity fluorescence po dvou ani po čtyřech hodinách nevykazují stálý trend. Pravidelnost nalzáme až v poslední fázi inkubace, kdy intenzita fluorescence klesá a míra poklesu se zvyšuje s rostoucí koncentrací MGO. K poklesu intenzity fluorescence v poslední fázi inkubace přispívá tvorba absorbujících AGEs. Měření absorpčních spekter (15 mM MGO) ukázalo nárůst absorbance v oblasti vlastní fluorescence bílkoviny. Nově vznikající produkty mohou filtrovat emitované záření, případně se na ně může energie excitovaného stavu nezářivě přenášet (FRET). Pozice emisního maxima se u vzorků s 0 mM, 0,3 mM a 1,5 mM MGO po celou dobu inkubace nemění. U vzorku s koncentrací 3 mM se maximum po dvaceti hodinách posouvá o 2 nm směrem k červené oblasti. Při nejvyšší koncentraci MGO (15 mM) se maximum posouvá stejným směrem taktéž o 2 nm, ale již po čtyřech hodinách, po uplynutí dvaceti hodin od počátku inkubace pak pozorujeme vedle výrazného poklesu fluorescence posun emisního maxima o další 4 nm až na hodnotu 337 nm.

Jak již bylo uvedeno výše, interpretaci výsledků ztěžuje interference MGO s excitačním zářením a navíc také interference vznikajících glykačních produktů se zářením emitovaným. Během čtyř hodin od počátku inkubace dochází jak ke snížení, tak zvýšení intenzity fluorescence. Za předpokladu neměnného působení MGO a absence absorbujících AGEs bychom změny mohli připisovat pouze změnám v okolí bílkovinných chromoforů. Není snadné vysvětlit, proč se intenzita v rámci jednoho vzorku může i zvyšovat. Modifikací argininu a lysinu se ztratí jejich náboj a může dojít ke snížení zhášení. Zavlečení hydrofobních struktur (např. CEL) do molekuly může způsobit lokalizované shluknutí (Seidler a Kowalewski 2003) a oslabit zhášení snížením solvatace. Otevření molekuly na jiném místě či pouhé přiblížení zhášejších aminokyselinových zbytků k fluoroforu by na druhé straně mohlo zhášení zvýšit. V molekule GDH může docházet ke konformačním změnám, pokles fluorescence (zvláště po dvaceti hodinách) lze ale považovat za efekt vzniku absorbujících AGEs. K výraznějšímu posunu emisního maxima dochází pouze u vzorku s 15 mM MGO po dvaceti hodinách inkubace. Toto pozorování v kombinaci s razantním úbytkem fluorescence naznačuje vyšší stupeň rozrušení organizace molekuly.

Pro podobná měření je nutné se po inkubaci methylglyoxalu zbavit. Dialýza se k tomuto účelu vzhledem ke své zdlouhavosti a také nestabilitě enzymu nehodí. Vhodná by byla gelová chromatografie a fluorescence by pak byla měřena vzhledem ke koncentraci proteinu stanovené některou z kolorimetrických metod. Interpretaci změn by také usnadnila znalost chování spekter při tepelné či chemické denaturaci. Bez nadsázky lze říci, že GDH je s šesti podjednotkami, osmnácti vazebnými místy, osmnácti zbytky tryptofanu, negativní kooperací při vazbě koenzymu apod. příliš složitým modelovým systémem pro experimentální biochemii.

Druhou částí fluorescenčního měření bylo sledování vnější (netryptofanové) fluorescence), v našem případě sledování fluorescence vznikajících glykačních produktů. Filtrační efekt MGO u tohoto měření nehrozí. Excitační vlnová délka (320 nm) a rozsah emisního spektra (340–450 nm) byly zvoleny na základě předpokladu, že hlavním fluorescenčním produktem modifikace bílkovin methylglyoxalem je argpyrimidin, jehož fluorescenční maxima se v těchto oblastech vyskytují (Shipanova, Glomb *et al.* 1997). Při koncentraci MGO 0,3 mM (poměr ke zbytkům argininu ~2:1) nepozorujeme žádné změny fluorescence ani po dvaceti hodinách. Koncentrace 1,5 mM a 3 mM MGO působí v době mezi čtyřmi a dvaceti hodinami odstupňovaný nárůst fluorescence s maximem při 397 nm. Nejvyšší koncentrace MGO (15 mM) způsobuje výrazný nárůst fluorescence, vznik fluorescenčního produktu je patrný již po dvou hodinách inkubace. Emisní maximum nastává při 400 nm, jeho poloha po čtyřech i dvaceti hodinách zůstává nezměněna. Tyto výsledky prokazují vznik fluorescenčního produktu během inkubace s MGO. Míra fluorescence odpovídá použité koncentraci glykačního agens a času inkubace. Po ukončení inkubace (20 hod) jsme pro úplnější charakterizaci vznikajícího fluoroforu proměřili excitační spektrum vzorků při vlnové délce emise 400 nm. Výsledky odpovídají emisním spektrům po dvaceti hodinách: žádná změna pro 0,3 mM MGO, pro 1,5 mM a 3 mM odstupňovaný nárůst fluorescence se shodným excitačním maximem (329 nm) a pro nejvyšší koncentraci MGO nejvyšší intenzita emitovaného záření s maximem excitace při 333 nm. Pro koncentraci 15 mM MGO má tedy fluorescenční produkt parametry 333/400 nm. Kessel a sp. (2002 b) udávají pro argpyrimidin ve vodném prostředí parametry 335/400 nm, Shipanova (1997) udává hodnoty 320/382 nm. Výsledky našich měření naznačují, že fluorescenčním produktem vznikajícím v důsledku modifikace GDH methylglyoxalem je skutečně argpyrimidin.

4. ZÁVĚR

Výsledky našich experimentů naznačují, že glutamátdehydrogenasa během inkubace s MGO může prodělavat jisté konformační změny, pravděpodobně však nevelkého rozsahu. Po dvaceti hodinách (GDH 1 mg/ml) předpokládáme agregaci molekul enzymu s možným přispěním denaturace. Absorpční spektra GDH inkubované s 15 mM MGO prozradila přítomnost glykačních produktů absorbujících při ~320 nm. Fluorescenční studie odhalily progresivní tvorbu glykačního produktu s vlnovými délkami excitace 333 nm a emise 400 nm. Tímto fluoroforem je s nejvyšší pravděpodobností argpyrimidin, šestičlenný heterocyklický AGE vznikající interakcí aminokyselinového zbytku argininu a dvou molekul methylglyoxalu.

Na základě těchto výsledků se přikláníme k názoru, že inhibice a poruchy regulovatelnosti GDH v důsledku glykace jsou způsobeny spíše blokací modifikovatelných aminokyselin zapojených do vazby ligandů nežli povšechnou změnou konformace molekuly.

V obecné rovině je problematika glykace subcelulárních proteinů stále velmi neprobádanou oblastí patobiochemie. Studium glykačních reakcí a jejich podílu na poškození biomolekul v mitochondriích, organelách figurujících v patogenezi diabetu i v přirozeném stárnutí, by mohlo odhalit nové aspekty těchto jevů.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-DG	3-deoxyglukoson
ADP	Adenosin difosfát
AGEs	Advanced Glycation End Products
ANS	1-Anilinonaftalen-8-sulfonová kyselina
AU	Arbitrary Units
CD	Cirkulární dichroismus
CEL	N ^ε -karboxyethyllysin
CML	N ^ε -karboxymethyllysin
CoA	Koenzym A
ECM	Extracelulární matrix
FMN	Flavin mononukleotid
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
GDH	Glutamátdehydrogenasa
GLX	Glyoxalasa
GO	Glyoxal
GODIC	Glyoxal-derived imidazoline cross-link
GOLD	Glyoxal-derived lysine-dimer
GSH	Glutathion
GTP	Guanosin trifosfát
HSA	Lidský sérový albumin
MG-H	Methylglyoxal-derived hydroimidazolone
MGO	Methylglyoxal
MODIC	Methylglyoxal-derived imidazoline cross-link
MOLD	Methylglyoxal-derived lysine-dimer
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid - redukovaná forma
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát - redukovaná forma
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PBS	Fosfátový pufr
RAGE	Receptor pro AGEs

6. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1. Klasická glykační dráha a glykoxidativní vznik CML	6
Obrázek 2. Glykační dráhy.....	6
Obrázek 3. AGEs odvozené od MGO.....	10
Obrázek 4. Homohexamer GDH.....	17
Obrázek 5. Detail podjednotky GDH.....	18
Obrázek 7. Absorpční spektra GDH	26
Obrázek 8. Emisní spektra GDH.....	27
Obrázek 9. Závislost maximální intenzity fluorescence na čase.....	28
Obrázek 10. Vývoj polohy emisního maxima GDH.....	29
Obrázek 11. Vnější (netryptofanová) fluorescence GDH po 20h inkubace.....	30
Obrázek 12. Závislost intenzity fluorescence při 400 nm na čase	31
Obrázek 13. Excitační spektrum vnější fluorescence po 20h inkubace	31
Tabulka 1. Klasifikace AGEs a někteří zástupci.....	7
Tabulka 2. Chromofory a fluorofory bílkovin	12
Tabulka 3. Spektrální třídy tryptofanu	15
Tabulka 4. Příprava vzorků	23
Tabulka 5. Nastavení spektrofluorimetru.....	24
Tabulka 6. Hodnoty maximální intenzity fluorescence	28
Tabulka 7. Hodnoty intenzity fluorescence při 400 nm.....	30

7. LITERATURA

- Ahmed, N., O. K. Argirov, *et al.* (2002). "Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin." Biochem J **364**(Pt 1): 1-14. PMID 11988070
- Ahmed, N., D. Dobler, *et al.* (2005). "Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity." J Biol Chem **280**(7): 5724-32. PMID 15557329
- Ahmed, N. a P. J. Thornalley (2002). "Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence." Biochem J **364**(Pt 1): 15-24. PMID 11988071
- Allen, A., J. Kwagh, *et al.* (2004). "Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation." Biochemistry **43**(45): 14431-43. PMID 15533048
- Banerjee, S., T. Schmidt, *et al.* (2003). "Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation." Biochemistry **42**(12): 3446-56. PMID 12653548
- Beisswenger, P. J., S. K. Howell, *et al.* (2003). "Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1358-63. PMID 14641063
- Bourajjaj, M., C. D. Stehouwer, *et al.* (2003). "Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1400-2. PMID 14641073
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-20. PMID 11742414
- Hudson, B. I., T. Wendt, *et al.* (2005). "Diabetic vascular disease: it's all the RAGE." Antioxid Redox Signal **7**(11-12): 1588-600. PMID 16356122
- Chaplen, F. W., W. E. Fahl, *et al.* (1996). "Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture." Anal Biochem **238**(2): 171-8. PMID 8660607
- Chaplen, F. W., W. E. Fahl, *et al.* (1998). "Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5533-8. PMID 9576917
- Kalapos, M. P. (1999). "Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications." Toxicol Lett **110**(3): 145-75. PMID 10597025
- Kang, J. H. (2003). "Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal." Mol Cells **15**(2): 194-9. PMID 12803482
- Kelly, S. M., T. J. Jess, *et al.* (2005). "How to study proteins by circular dichroism." Biochim Biophys Acta **1751**(2): 119-39. PMID 16027053
- Kessel, L., J. L. Hougaard, *et al.* (2002). "Lens ageing as an indicator of tissue damage associated with smoking and non-enzymatic glycation--a twin study." Diabetologia **45**(10): 1457-62. PMID 12378389
- Kessel, L., S. Kalinin, *et al.* (2002). "Time-resolved and steady-state fluorescence spectroscopic studies of the human lens with comparison to argpyrimidine, pentosidine and 3-OH-kynurenine." Photochem Photobiol **76**(5): 549-54. PMID 12462652

- Ladokhin, A. S. (2000). Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications. R. A. Meyers. New York, John Wiley & Sons: 5762–5779.
- Lapolla, A., R. Flamini, *et al.* (2003). "Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method." Clin Chem Lab Med **41**(9): 1166-73. PMID 14598866
- Lo, T. W., M. E. Westwood, *et al.* (1994). "Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin." J Biol Chem **269**(51): 32299-305. PMID 7798230
- Miyata, T., C. van Ypersele de Strihou, *et al.* (1999). "Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications." Kidney Int **55**(2): 389-99. PMID 9987064
- Morgan, P. E., R. T. Dean, *et al.* (2002). "Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products." Arch Biochem Biophys **403**(2): 259-69. PMID 12139975
- Na, R., I. M. Stender, *et al.* (2001). "Autofluorescence of human skin is age-related after correction for skin pigmentation and redness." J Invest Dermatol **116**(4): 536-40. PMID 11286620
- Pace, C. N., F. Vajdos, *et al.* (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." Protein Sci **4**(11): 2411-23. PMID 8563639
- Padival, A. K., J. W. Crabb, *et al.* (2003). "Methylglyoxal modifies heat shock protein 27 in glomerular mesangial cells." FEBS Lett **551**(1-3): 113-8. PMID 12965214
- Peterson, P. E. a T. J. Smith (1999). "The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery." Structure Fold Des **7**(7): 769-82. PMID 10425679
- Rahbar, S. a J. L. Figarola (2002). "Inhibitors and breakers of advanced glycation endproducts (AGEs): A review." Curr Med Chem - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents **2**(2): 135-161. PMID
- Reshetnyak, Y. K. a E. A. Burstein (2001). "Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins." Biophys J **81**(3): 1710-34. PMID 11509383
- Rosca, M. G., T. G. Mustata, *et al.* (2005). "Glycation Of Mitochondrial Proteins From Diabetic Rat Kidney Is Associated With Excess Superoxide Formation." Am J Physiol Renal Physiol. PMID 15814529
- Seidler, N. (2005). "Carbonyl-Induced Enzyme Inhibition: Mechanisms and New Perspectives." Current Enzyme Inhibition **1**: 21-27. PMID
- Seidler, N. W. a C. Kowalewski (2003). "Methylglyoxal-induced glycation affects protein topography." Arch Biochem Biophys **410**(1): 149-54. PMID 12559987
- Sell, D. R. a V. M. Monnier (1989). "Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process." J Biol Chem **264**(36): 21597-602. PMID 2513322
- Shinohara, M., P. J. Thornalley, *et al.* (1998). "Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis." J Clin Invest **101**(5): 1142-7. PMID 9486985
- Shipanova, I. N., M. A. Glomb, *et al.* (1997). "Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct." Arch Biochem Biophys **344**(1): 29-36. PMID 9244378

- Schmitt, A., J. Gasic-Milenkovic, *et al.* (2005). "Characterization of advanced glycation end products: mass changes in correlation to side chain modifications." Anal Biochem **346**(1): 101-6. PMID 16168380
- Smith, T. J., P. E. Peterson, *et al.* (2001). "Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation." J Mol Biol **307**(2): 707-20. PMID 11254391
- Smith, T. J., T. Schmidt, *et al.* (2002). "The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery." J Mol Biol **318**(3): 765-77. PMID 12054821
- Stanley, C. A. (2004). "Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism." Mol Genet Metab **81 Suppl 1**: S45-51. PMID 15050973
- Thomas, M. C., J. M. Forbes, *et al.* (2005). "Low-molecular weight advanced glycation end products: markers of tissue AGE accumulation and more?" Ann N Y Acad Sci **1043**: 644-54. PMID 16037288
- Thornalley, P. J. (1996). "Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy." Gen Pharmacol **27**(4): 565-73. PMID 8853285
- Thornalley, P. J., S. Battah, *et al.* (2003). "Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry." Biochem J **375**(Pt 3): 581-92. PMID 12885296
- Ulrich, P. a A. Cerami (2001). "Protein glycation, diabetes, and aging." Recent Prog Horm Res **56**: 1-21. PMID 11237208
- Vander Jagt, D. L., R. K. Hassebrook, *et al.* (2001). "Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications." Chem Biol Interact **130-132**(1-3): 549-62. PMID 11306074
- Vlassara, H. a M. R. Palace (2003). "Glycooxidation: the menace of diabetes and aging." Mt Sinai J Med **70**(4): 232-41. PMID 12968196
- Vostrý, M. (2005). Glycooxidative changes of mitochondrial enzymes. Farmaceutická fakulta - Katedra biochem. věd. Hradec Králové, Univerzita Karlova. 56 stran.
- Voziyan, P. A., R. G. Khalifah, *et al.* (2003). "Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions." J Biol Chem **278**(47): 46616-24. PMID 12975371
- Wautier, J. L. a P. J. Guillausseau (2001). "Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy." Diabetes Metab **27**(5 Pt 1): 535-42. PMID 11694852

WWW1: Probing Protein Structure by Spectroscopy, online, květen 2006

<http://sbio.uct.ac.za/Sbio/documentation/ProbingProteinStructurebySpectroscopy.htm>

WWW2: Intrinsic Fluorescence of Proteins and Peptides, online, květen 2006

<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pps99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/fluor.htm>