

Ewa Ambrożewicz✉

Katarzyna Bielawska

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

✉ Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul.
Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok; tel.: (85) 748
57 21, e-mail: ewa.ambrozewicz@umb.edu.pl

Artykuł otrzymano 31 marca 2016 r.

Artykuł zaakceptowano 27 kwietnia 2016 r.

Słowa kluczowe: białka, grupy karbonylowe, końcowe produkty zaawansowanej lipoksydacji, końcowe produkty zaawansowanej glikacji, reaktywne formy tlenu

Wykaz skrótów: 3-DG-H3 – 5-[2-amino-4-hydro-4-(2,3,4-trihydroksybutylo)-5-imidazol-1-yl] norwaliny; AGE – końcowe produkty zaawansowanej glikacji; ALE – końcowe produkty zaawansowanej lipoksydacji; ARP – biotynylo-N'-(2-amino-oksyacetylo)hydrazyd; BHZ – hydrazyd biotyny; CEL – N^ε-(karboksyetylo)lizyna; CML – N^ε-(karboksymetylo)lizyna; DNPH – 2,4-dinitrofenylohydrazyna; DOLD – 1,3-(di-N^ε-lizylo)-(2,3,4 trihydroksybutylo) imidazol; GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas; G-H1 – N5-(5-hydro-4-imidazol-2-yl)L-ornityny; GOLD – 1,3-(di-N^ε-lizylo)imidazol; GPR – chlorek 1-(2-hydrazyno-2-oksoetylo)pirydyny; HICAT – znacznik polieterowy z grupą hydrazynową i biotyną; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas; MALDI-TOF – desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu; MG-H1 – N5-(5-metylo-4-imidazol-2-yl)L-ornityny; MOLD – 1,3-(di-N^ε-lizylo)-4-metyloimidazol; SDS-PAGE – elektroforeza w warunkach denaturujących w żelu poliakrylamidowym; UPLC – ultrasprawa chromatografia cieczowa

STRESZCZENIE

Zaburzenia w metabolizmie komórkowym, którym towarzyszy nagromadzenie reaktywnych form tlenu, glukozy lub reaktywnych związków karbonylowych (będących produktami utleniania lipidów, glukozy i aminokwasów), sprzyjają reakcjom wymienionych związków ze składnikami komórki, w tym również z białkami. Głównymi produktami tych reakcji są polipeptydy z wolnymi grupami karbonylowymi, produkty zaawansowanej lipoksydacji (ALE) oraz produkty zaawansowanej glikacji (AGE). Odkładanie się zmodyfikowanych białek w komórkach może prowadzić do rozwoju wielu chorób w tym m.in. cukrzycy i chorób jej towarzyszących oraz chorób neurodegeneracyjnych. Identyfikacja zmodyfikowanych białek wymaga stosowania do ich analizy różnych technik badawczych. W niniejszej pracy przedstawiono mechanizmy prowadzące do powstania produktów karbonylacji białek, jak również metody ich oznaczania, ze szczególnym uwzględnieniem podejścia proteomicznego wykorzystującego nowoczesne techniki analityczne. Podejście to daje możliwość identyfikacji nowych biomarkerów chorobowych oraz punktów uchwytu dla ukierunkowanej farmakoterapii, co jest wykorzystywane zarówno w diagnostyce, jak i leczeniu.

WPROWADZENIE

Zaburzenia w metabolizmie komórkowym wynikające z akumulacji reaktywnych form tlenu, glukozy lub reaktywnych związków karbonylowych (będących produktami utleniania lipidów, glukozy i aminokwasów) sprzyjają reakcjom tych związków ze składnikami komórki, w tym również z białkami. Głównymi produktami tych przemian są karbonylowe modyfikacje białek.

W sytuacji stresu oksydacyjnego dochodzi do bezpośrednich reakcji reaktywnych form tlenu z łańcuchami bocznymi aminokwasów (lizyny, argininy, proliny i treoniny) lub rozerwania wiązania peptydowego łańcucha polipeptydowego z utworzeniem grup karbonylowych w strukturze polipeptydu [1]. Reaktywne formy tlenu reagują również z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi wchodzącymi w skład fosfolipidów, w wyniku czego powstaje wiele metabolitów, z których najbardziej reaktywne są aldehydy takie jak: 4-hydroksynonenal, 4-hydroksyhexenal, akroleina i dialdehyd malonowy [2], które mogą wchodzić w reakcje z resztami aminokwasowymi białek, głównie histydyny, cysteiny i lizyny, tworząc pochodne karbonylowe zwane końcowymi produktami zaawansowanej lipoksydacji (ALE) [3]. Nagromadzenie glukozy oraz produktów jej metabolizmu w komórce, co obserwowane jest np. u pacjentów z cukrzycą, sprzyja reakcji tego monosacharydu z resztami aminokwasowymi białek, w konsekwencji czego powstają końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE) [4].

GRUPY KARBONYLOWE JAKO PRODUKTY REAKCJI REAKTYWNYCH FORM TLENU Z BIAŁKAMI

W wyniku bezpośredniej reakcji reaktywnych form tlenu, w tym głównie rodnika hydroksyloвого, z białkami może dochodzić do rozerwania wiązań peptydowych i w konsekwencji do fragmentacji łańcucha polipeptydowego. Przerwanie łańcucha polipeptydowego, w wyniku którego dochodzi do powstania grup karbonylowych, może nastąpić na skutek oddziaływania reaktywnych form tlenu z prolinową, glutamylową lub aspartylową resztą bocznych łańcuchów peptydowych [1]. Utlenianie cząsteczki białka przez rodnik hydroksylowy rozpoczyna się od oderwania atomu wodoru przy węglu α aminokwasu. Powstający rodnik alkilowy reaguje gwałtownie z tlenem tworząc rodnik alkilnadttlenkowy przechodzący w alkilowodornadtlenek. Tworzący się z niego rodnik alkoksylowy może przekształcić się w hydroksylovaną przy węglu α resztę aminokwasową lub może doprowadzić do fragmentacji łańcucha polipeptydowego [1]. Obecność rodnika alkoksylowego sprzyja fragmentacji łańcucha polipeptydowego. Do rozszczepiania wiązania peptydowego może dojść na drodze α-amidacji lub diamidacji. Powstający podczas α-amidowej fragmen-

Tabela 1. Produkty utleniania cząsteczki białka zachodzące z rozerwaniem łańcucha.

	Reszta glutamylowa	Reszta aspartylowa	Reszta propylowa	α -amidacja
Produkty rozszczepienia łańcucha polipeptydowego	pochodna kwasu pirogronowego	pochodna kwasu pirogronowego	2-pirolidon	pochodna N- α -ketoacylowa
				pochodna amidowa

tacji N-końcowy peptyd, w C-końcu ma grupę amidową, natomiast drugi peptyd zawiera w N-końcu pochodną N- α -ketoacylową. Fragmentacja na drodze diamidowej charakteryzuje się powstaniem N-końcowego peptydu zawierającego strukturę diamidową i peptydu pochodzącego z C-końca cząsteczki białka zawierającego w N-końcu strukturę izocyjanianu. Jednak tylko α -amidacja powoduje wprowadzenie grup karbonylowych do łańcucha polipeptydowego [1]. Rozszczepienie wiązania peptydowego może zachodzić również w wyniku reakcji rodnika hydroksylowego z resztami glutamylowymi i aspartylowymi łańcucha polipeptydowego białka, co także skutkuje powstawaniem związków karbonylowych. Usunięcie atomu wodoru z γ -węgla reszty glutamylowej lub aspartylowej prowadzi do fragmentacji łańcucha z utworzeniem C-końcowego peptydu, zawierającego aminokwas N- α -acylowany za pomocą pochodnej kwasu pirogronowego. Z kolei fragmentacja na reszcie proliny prowadzi do powstania 2-pirolidonu [1]. Produkty tych reakcji przedstawiono w tabeli 1.

Grupy karbonylowe mogą również pojawiać się w łańcuchach bocznych cząsteczek białka w wyniku utleniania reszt takich aminokwasów jak lizyna, arginina, prolina i treonina (Tab. 2) [5]. Reakcje te zachodzą pod wpływem działania rodnika hydroksylowego i katalizowane są przez jony metali (np. żelaza lub miedzi). W wyniku utlenienia reszty proliny powstaje semialdehyd glutaminowy i 2-pirolidon, który w wyniku kwaśnej hydrolizy, przechodzi w

kwasu 2-amino-3-ketomasłowego [1].

Karbonylacja białek jest procesem determinowanym przez szereg czynników związanych z budową białka. Obecność w cząsteczce białka miejsc wiążących jony metali jest istotnym elementem decydującym o podatności danego białka na utlenianie katalizowane przez jony metali przejściowych. Dzieje się tak, ponieważ jony metali np. żelaza (II) uczestniczą w generacji rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona, odpowiedzialnego za inicjację kaskady reakcji wolnorodnikowych. Prowadzi to do utlenienia reszt aminokwasów w miejscach podatnych na utlenianie katalizowane przez jony metali i sąsiadujących z miejscem wiązania metalu [1]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na przebieg reakcji karbonylacji białka jest szybkość obrotu metabolicznego, ponieważ o liczbie grup karbonylowych w organizmie decyduje nie tylko szybkość ich generowania, ale również tempo degradacji uszkodzonych makrocząsteczek [6]. Ponadto, niektóre białka, jak np. enzymy uczestniczące w cyklu Krebsa i łańcuchu transportu elektronów, ulegają karbonylacji głównie dlatego, że znajdują się w otoczeniu miejsc generowania reaktywnych form tlenu. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem bakterii *Escherichia coli* wykazały, że większą podatność na karbonylację wykazują białka, w których wystąpiły błędy w trakcie transkrypcji lub translacji, czego rezultatem jest zmiana konformacji w nieprawidłowej części polipeptydu i co wpływa na ekspozycję reszt aminokwasów

wrażliwych na utlenianie, które w białku natywnym schowane są wewnątrz cząsteczki [7,8].

Karbonylacja białek jest procesem nieodwracalnym, co oznacza, że uszkodzone cząsteczki nie podlegają procesom naprawczym, natomiast mogą być degradowane przez układ proteasomalny [8]. Degradacja uszkodzonych białek może przebiegać według dwóch mecha-

Tabela 2. Produkty utleniania aminokwasów z utworzeniem pochodnych karbonylowych.

Aminokwas	Prolina	Lizyna	Arginina	Treonina
Produkt utlenienia	semialdehyd glutaminowy	semialdehyd aminoadypinowy	semialdehyd glutaminowy	kwas 2-amino-3-ketomasłowy
	2-pirolidon	kwas 2-aminoadypinowy		

nizmów, zależnego od ATP i ubikwityny (degradacja przez proteasom 26S) i niezależnego od ATP i ubikwityny (degradacja przez proteasom 20S). Wykazano, że w wyniku utlenienia cząsteczki białka, wzrasta jego hydrofobowość, co jest kluczowym sygnałem dla proteasomu do rozpoznania białka i rozpoczęcia degradacji. W czasie stresu oksydacyjnego maleje aktywność proteasomu 26S, podczas gdy aktywność proteasomu 20S pozostaje niezmienną [8]. Zdolność proteasomów do usuwania uszkodzonych białek jest ograniczona i zależy od stopnia ich utlenienia. Białka zmodyfikowane w niewielkim stopniu są degradowane. Natomiast białka, które w wyniku modyfikacji ulegają sieciowaniu tworzą w konsekwencji agregaty i ze względu na swój rozmiar mogą blokować centrum aktywne kompleksu enzymatycznego, co prowadzi do odkładania się tych białek wewnątrz komórki [8].

Oksydacyjne modyfikacje białek odgrywają kluczową rolę w fizjologicznym procesie starzenia się organizmu, ponieważ oksydacyjnie zmienione białko traci swoje funkcje i ulega degradacji lub akumulacji [9]. Pojawienie się adduktów białkowych z grupami karbonyłowymi na resztach lizyny, argininy, proliny i treoniny jest najlepiej scharakteryzowaną potranslacyjną modyfikacją białek związaną z fizjologicznym starzeniem. Szczególnie narażone na oksydacyjne modyfikacje są komórki mózgu, serca i mięśni szkieletowych jako postmitotyczne, wysoko zróżnicowane i nie posiadające zdolności do regeneracji [9]. Wzrost liczby uszkodzeń oksydacyjnych z wiekiem, związany jest ze zmianami w aktywności enzymów antyoksydacyjnych, ze zwiększoną produkcją O_2 i H_2O_2 przez mitochondria oraz z obniżeniem aktywności układu proteasomalnego [9]. U zwierząt w zależności od gatunku, obserwowana jest różna podatność białek na karbonylację. W osoczu myszy, wraz z wiekiem obserwowano wzrost karbonylowanej albuminy oraz transferyny, natomiast w osoczu szczurów – α -makroglobuliny [10]. U człowieka w wyniku utleniania osocza w warunkach *in vitro* dochodzi głównie do karbonylacji fibrynogenu oraz w mniejszym stopniu transferyny, immunoglobuliny G i A oraz albuminy [11]. Wzmoczona karbonylacja białek wynikająca z utleniania przez reaktywne formy tlenu reszt proliny, argininy, lizyny i treoniny obserwowana jest w organizmie pacjentów cierpiących na choroby neurodegeneracyjne, a zwłaszcza chorobę Alzheimera i Parkinsona [12]. U tych chorych dochodzi głównie do oksydacyjnego uszkodzenia dysmutazy ponadtlenkowej zależnej od jonów miedzi i cynku w neuronach mózgu. W wyniku rozdziału elektroforetycznego tego enzymu, wyizolowano jego 4 izoformy różniące się punktem izoelektrycznym, jednak tylko jedna z czterech wyizolowanych izoform (pI 6,0) ulega karbonylacji w znaczącym stopniu [12]. Stwierdzono ponadto, iż rodzaj modyfikacji zależy od sposobu karbonylacji białek. Wykazano, że np. w wyniku karbonylacji aktywny indukowanej reaktywnymi formami tlenu ($HOCl/H_2O_2$) dochodzi do hamowania tworzenia włókien aktywny [13], podczas gdy karbonylacja aktywny wynikająca z przyłączenia 4-hydroksynonenalu do reszty cysteiny 374 tylko w nieznacznym stopniu wpływa na polimeryzację tego białka [14].

SPOSODY OCENY POZIOMU GRUP KARBONYLOWYCH W BIAŁKACH

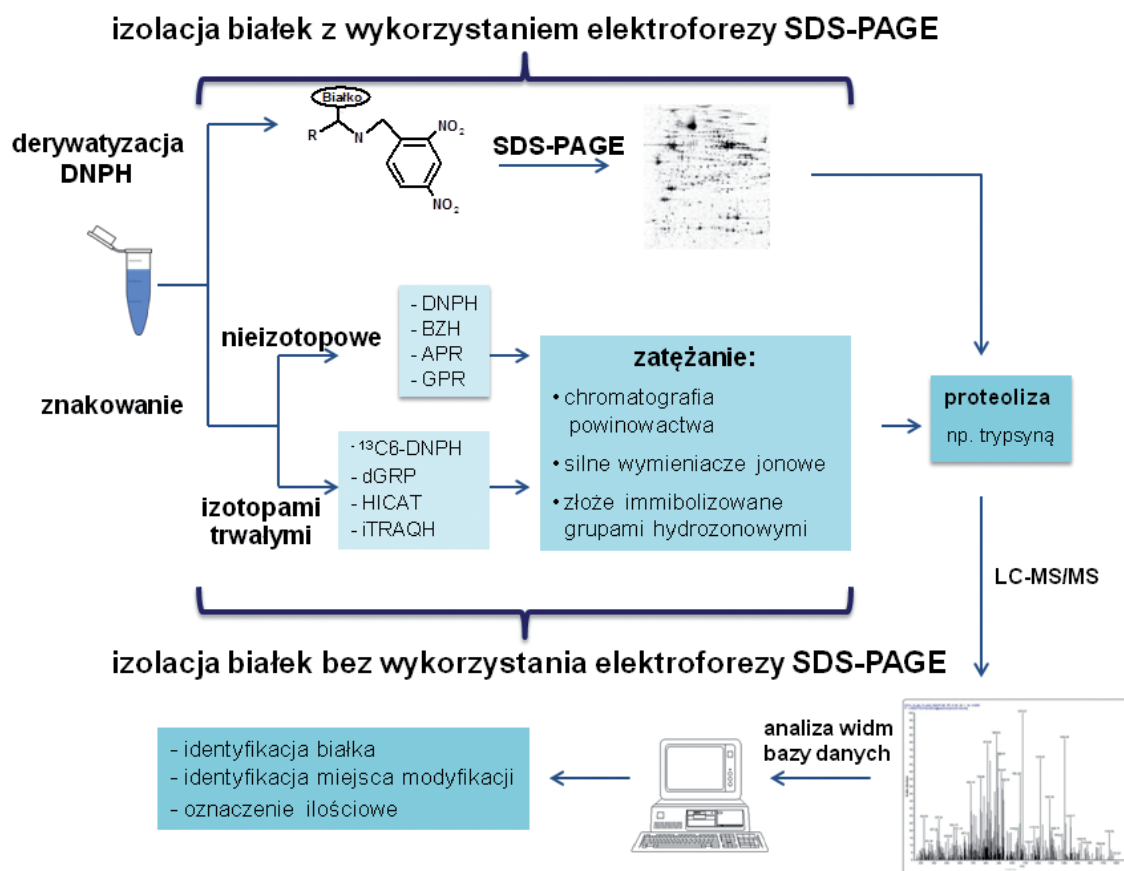
W warunkach fizjologicznych grupy karbonylowe w białkach występują w organizmie na bardzo niskim pozo-

mie (np. w osoczu 0,4–1,0 nmola/mg białka, w korze mózgowej 1,5–6,4 nmola/mg białka) [5]. W przybliżeniu 1 na 3000 aminokwasów zawiera grupę karbonylową, natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego zawartość grup karbonylowych wzrasta od 2 do 8 razy, zatem ich oznaczanie może ułatwić wczesną diagnozę w przypadku chorób, którym towarzyszy stres [15]. Ponieważ karbonylowane białka charakteryzują się stabilnością i stosunkowo długim okresem półtrwania we krwi, ich oznaczanie w materiale biologicznym nie jest zbyt skomplikowane.

Klasyczne metody oznaczania grup karbonylowych oparte są na przeprowadzeniu ich w pochodne posiadające zdolność do absorpcji promieniowania UV-VIS. Powszechnie stosowaną metodą ilościowego oznaczania poziomu grup karbonylowych białek jest spektrofotometryczne oznaczanie ich stabilnych połączeń z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH) [16], absorbujących promieniowanie UV w zakresie 360–385 nm. Pochodne te mogą być również oznaczane ilościowo – immunoenzymatycznie z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, półilościowo za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE). Oznaczenia jakościowe w tkankach mogą być prowadzone z wykorzystaniem techniki immunohistochemicznej [15,16]. Metody spektrofotometryczne i testy immunoenzymatyczne charakteryzują się podobną czułością i umożliwiają oznaczenie grup karbonylowych na poziomie nmol/mg białka. Jednakże testy immunoenzymatyczne pozwalają na oznaczanie grup karbonylowych na poziomie 10 μ g/ml, natomiast w oznaczeniach spektrofotometrycznych: 1–10 mg/ml [16]. W przypadku elektroforezy SDS-PAGE wykryć można już 100 pg białka na prążek (przy zastosowaniu barwienia solami srebra). Barwienie błękitem Coomassie pozwala na wykrycie 8–10 ng białka. Natomiast w przypadku barwienia fluorescencyjnego limit detekcji wynosi 0,5–5 ng białka [17].

Oceny poziomu karbonylacji białek można dokonać również poprzez oznaczenie specyficznych produktów bezpośredniego utlenienia białek – semialdehydów uwalnianych w wyniku hydrolizy zmodyfikowanego białka. Dotyczy to semialdehydu glutaminowego i semialdehydu aminoadypinowego, które można oznaczać po redukcji za pomocą $NaCNBH_3$, hydrolizie kwasowej i derywatyzacji kwasem p-aminobenzoesowym z wykorzystaniem chromatografii cieczowej z detekcją fluorymetryczną [18]. Stosując tę metodę oznaczono semialdehyd glutaminowy i aminoadypinowy w osoczu człowieka jak i w tkankach zwierzęcych na poziomie pmol/mg białka. Związki te można również oznaczać wykorzystując technikę GC-MS po redukcji za pomocą $NaBH_4$ i hydrolizie kwasowej, w wyniku czego uwalniany jest kwas 5-hydroksy-2-aminowalerianowy (produkt redukcji semialdehydu glutaminowego) oraz kwas 6-hydroksy-2-aminokapronowy (produkt redukcji semialdehydu aminoadypinowego) [19].

Niezależnie od oznaczeń celowanych, do oceny karbonylacji białek wykorzystywane jest podejście proteomiczne, a konkretnie spektrometria mas, która pozwala na identyfikację oraz ocenę ilościową zmodyfikowanych białek (Ryc. 1). Ze względu na złożoność materiału biologicznego, istotnym elementem tego typu badań jest odpowiednie przygotowanie próbek. Obejmuje ono izolowanie białek za pomocą elek-



Rycina 1. Analiza karbonylowanych białek w ujęciu proteomicznym.

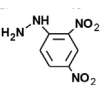
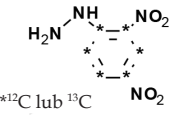
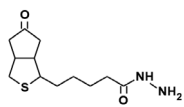
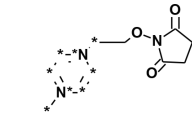
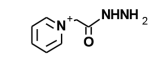
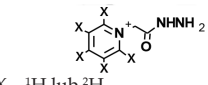
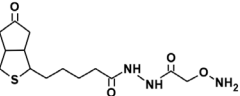
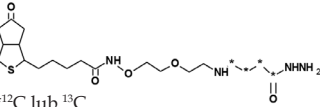
troforezy w żelu poliakrylamidowym (ang. *gel-based approaches*) (elektroforeza jedno- (1D) lub dwu- (2D) kierunkowa) lub bez wykorzystania żelu (ang. *gel-free approaches*) (chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna). Po wyizolowaniu białek w wyniku elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, do oznaczenia grup karbonylowych najczęściej wykorzystuje się metodę oksyblotu [16]. Metoda ta umożliwia wykonanie bardzo czułych pomiarów na poziomie stężeń rzędu 1 pmola grup karbonylowych w próbach zawierających 50 ng utlenionego białka [15]. Łącząc metodę oksyblotu ze spektrometrią mas można dokonać identyfikacji białek posiadających grupy karbonylowe. Metodę tę wykorzystano do oznaczenia poziomu grup karbonylowych w białkach kory skroniowej i mięśni szkieletowych u szczura [20,21].

Zmodyfikowane białka można również izolować bez wykorzystania żelu, po uprzednim przeprowadzeniu ich derywatyzacji (z wykorzystaniem pochodnych hydrazyny i aminoalkoholi lub odczynników znakowanych trwałymi izotopami) [22]. Pochodne hydrazyny wchodzą w reakcje z grupami karbonyłowymi tworząc hydrazony, które poddane redukcji za pomocą NaBH_4 dają stabilne aminy II-rzędowe. Do najczęściej stosowanych pochodnych hydrazyny, obok DNPH, zalicza się: hydrazid biotyny (BZH) i odczynnik Girarda P czyli chlorek 1-(2-hydrazyno-2-oksoetylo) pirydyny (GRP). Aminoalkohole reagują z grupami karbonyłowymi z utworzeniem połączeń oksymowych, charakteryzujących się większą stabilnością niż hydrazony, przez co może zostać pominięty etap redukcji, a najczęściej stosowaną aminooksyolą jest sonda reaktywnych aldehydów, biotynylo-N'-(2-aminooksyacetylo)

hydrazid (ARP) (Tab. 3). Do znakowania izotopowego karbonylowanych białek wykorzystywane są związki zawierające trwałe izotopy takie jak: ^2H w odczynniku Girarda P, ^{13}C w DNPH oraz ^{12}C i ^{13}C w znaczniku polieterowym zawierającym grupę hydrazynową i biotynę [22]. Znakowanie izotopowe wykorzystywane jest m.in. do ilościowego oznaczenia adduktów białek z produktami peroksydacji lipidów [23] oraz białek glikowanych [24]. Po wyznakowaniu wszystkich białek następuje ich rozdział za pomocą technik, takich jak chromatografia cieczowa, w tym chromatografia wielowymiarowa lub elektroforeza kapilarna [25].

Klasyczne HPLC zastąpiły UHPLC oraz nano-HPLC charakteryzujące się lepszą czułością oraz dające możliwość analizy bardzo małych objętości próbek, rzędu 1 μl [26]. Kolumny stosowane do rozdziału białek i peptydów mają takie samo wypełnienie jak w klasycznej chromatografii cieczowej. Główną różnicą w przypadku nano-HPLC jest rozmiar kolumn (przekrój 75–100 μm) przystosowanych do przepływu rzędu 200–300 nl/min [27]. Wprowadzono również wiele kolumn dedykowanych do oznaczeń proteomicznych, takich jak kolumny monolityczne zawierające jednolity polimer o porowatej strukturze oraz kolumny trapowe, na których dochodzi jednocześnie do zateżenia i oczyszczenia próbki. Są to zazwyczaj kolumny o przekroju 300 μm i długości 1–5 mm lub kolumny zminiaturyzowane w postaci chipów [27]. Natomiast do rozdziału wielkocząsteczkowych struktur białkowych wykorzystywana jest najczęściej elektroforeza kapilarna w połączeniu ze spektrometrią mas [28]. Rozdział elektroforetyczny może być, podobnie jak w przypadku chromatografii cieczowej, pro-

Tabela 3. Odczynniki stosowane do znakowania grup karbonylowych.

Odczynnik	Pochodna znakowana izotopami trwałymi
DNPH – 2,4-dinitrofenylohydrazyna	 
BHZ – hydrazyd biotyny	hydrazyd biotyny sprzężony z iTRAQ  
GPR – chlorek 1-(2-hydrazyno-2-oksoetylo)pirydyny	 
ARP – biotynylo-N'-(2-aminooksyacetylo)hydrazyd	HICAT – znacznik polieterowy z grupą hydrazynową i biotyną  

wadzony w układach zintegrowanych. Przykładem tego typu połączenia jest sprzężenie micelarnej chromatografii elektrokinetycznej z kapilarną elektroforezą strefową [29].

Rozdzielone białka można poddawać analizie spektrometrycznej całościowo (podejście *top-down*) lub analizować powstałe po hydrolizie enzymatycznej (np. trypsyną) peptydy (podejście *bottom-up*). Zmiany masy zmodyfikowanych cząsteczek w stosunku do natywnych białek pozwalają na identyfikację typu modyfikacji. Wysoka rozdzielczość nowoczesnych spektrometrów mas (typu Orbitrap) pozwala na stwierdzenie nawet niewielkich zmian w wartościach *m/z* (w przypadku semialdehydu aminoadypinowego – przesunięcie o 1 *m/z*) oraz na ilościowe oznaczenie białka na poziomie pmoli. Tego typu badania umożliwiają również identyfikację i rozróżnienie różnych form izomerycznych zmodyfikowanych białek, jak np. semialdehydu glutaminowego i hydroksyproliny nie będącej modyfikacją karbonylową [29]. W analizie proteomicznej najczęściej wykorzystywana jest jednak strategia „*bottom up*” z zastosowaniem analizy fingerprintingu, polegającej na zarejestrowaniu całego widma mieszaniny peptydów, powstałej w wyniku hydrolizy białka i analizie otrzymanych wyników przy użyciu baz widm (tj. MASCOT, PEAKS, Sequast, Protein Pilot, Tandem, Ommsa, Phenix), pozwalających na identyfikację białka, ze wskazaniem miejsca modyfikacji w łańcuchu peptydowym. Innym podejściem jest analiza jonów fragmentacyjnych zhydrolizowanego białka, z wykorzystaniem trybu skanowania utraty cząsteczek obojętnych oraz trybu skanowania jonu prekursorowego (np. jonu immonowego) [30].

REAKCJE PRODUKTÓW PEROKSYDACJI LIPIDÓW Z BIAŁKAMI

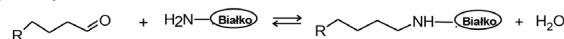
Grupy karbonylowe w cząsteczce białka mogą również pojawiać się w wyniku reakcji produktów peroksydacji lipidów (reaktywnych aldehydów) z grupami aminowymi reszt aminokwasów. Produkty peroksydacji lipidów powstają w wyniku nieenzymatycznego utleniania lipidów na drodze wolnorodnikowych reakcji, zapoczątkowanych przez reaktywne formy tlenu/azotu, ozon oraz jony metali przejściowych. Utlenianie lipidów prowadzi m.in. do powstania reaktywnych związków karbonylowych, w tym alifatycznych oraz cyklicznych aldehydów i ketonów oraz ich hydroksy-, keto- i α,β -nienasyconych pochodnych. Do najlepiej poznanych należą nienasycone aldehydy, w tym 2-alkenale (np. akroleina, aldehyd krotonowy), 4-hydroksy-2-alkenale (np. 4-hydroksy-2-hexenal, 4-hydroksynonenal, 4-hydroksy-2,6-dodekadienal), ketoaldehydy (np. trans-4-okso-2-nonenal, trans-4-okso-2-hexenal, metyloglioksal), dialdehydy (dialdehyd malonowy oraz glioksal) [3]. Powstające aldehydy są cząsteczkami stabilnymi przez co mogą być przenoszone z miejsca, w którym powstały, w inne obszary komórki, prowadząc do ich uszkodzeń, np. poprzez reakcje z białkami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi.

Elektrofilowe produkty peroksydacji lipidów łatwo wchodzi w reakcje z grupami nukleofilowymi białek powodując ich nieenzymatyczną, kowalencyjną modyfikację z utworzeniem związków addycyjnych tzw. końcowych produktów zaawansowanej lipoksydacji – ALE (Tab. 4) [3]. Ugrupowanie karbonylowe aldehydów łatwo wchodzi w reakcję z lizyną i arginina tworząc zasady Schiffa. Natomiast α,β -nienasycone aldehydy podatne są na nukleofilowy atak ze strony reszt cysteiny, histydyny, argininy i lizyny, w wyniku czego powstają produkty Michaela [31]. Konsekwencją powstawania tych adduktów są zmiany w strukturze białka, w tym utworzenie wiązań wewnątrz- oraz międzycząsteczkowych wpływających na sieciowanie białek. Do najczęściej powstających należą m.in. produkty lizyny lub histydyny z aldehydem malonowym, histydyny lub lizyny z 4-hydroksynonenalem, N^ε-(karboksymetylo)lizyną (CML), N^ε-(karboksyetylo)lizyną (CEL) lub, jeżeli aldehyd posiada dwa centra elektrofilowe jak np. dialdehyd malonowy, 4-hydroksynonenal czy 4-oksonon-

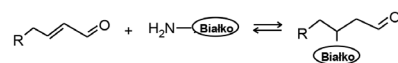
Tabela 4. Powstawanie końcowych produktów zaawansowanej lipoksydacji (ALE).

Powstawanie końcowych produktów zaawansowanej lipoksydacji (ALE)

zasady Schiffa



addukty Michaela



sieciowanie białek

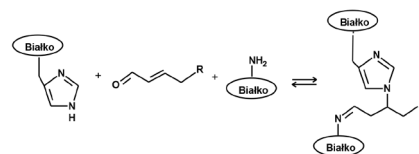
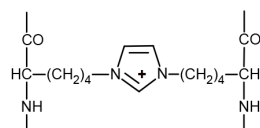


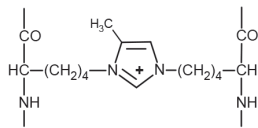
Tabela 5. Końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE).

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE)

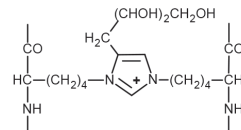
1. Sieciowane dimery bis(lizyno)imidazolowe



GOLD
1,3-(di-N^ε-lizylo)imidazol

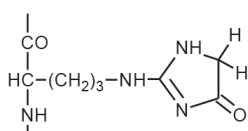


MOLD
1,3-(di-N^ε-lizylo)-4-metyloimidazol

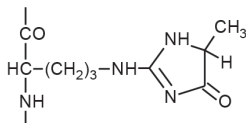


DOLD
1,3-(di-N^ε-lizylo)-(2,3,4-trihydroksybutylo)imidazol

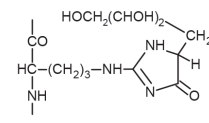
2. Hydroimidazolony



G-H1
N5-(5-hydro-4-imidazolon-2-yl)L-ornityny

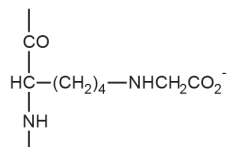


MG-H1
N5-(5-metylo-4-imidazolon-2-yl)L-ornityny

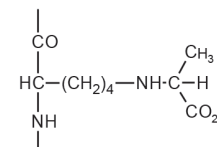


3-DG-H3
5-[2-amino-4-hydro-4-(2,3,4-trihydroksybutylo)-5-imidazolon-1-yl] norwaliny

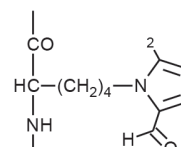
3. Addukty monolizynowe



CML
N^ε-(karboksymetylo)lizyna

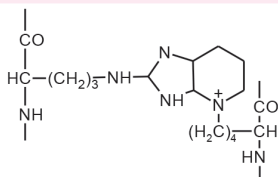


CEL
N^ε-(karboksyetylo)lizyna



Pirolina

4. Inne



Pentozydyna

nenal mogą reagować z białkami, prowadząc do powstania między- lub wewnątrzcząsteczkowych połączeń białek, co w efekcie prowadzi do ich sieciowania (dimery GOLD, MOLD, DOLD) (Tab. 5) [3,32].

Produkty białek z aldehydami wykazują działanie toksyczne, a ich nagromadzenie w komórkach prowadzi do powstawania stanów patologicznych. Toksyczność adduktów koreluje z aktywnością aldehydów, dlatego też 4-oksononenal i trans-4-oksohexenal charakteryzujące się wyższą reaktywnością, wykazują również wyższą cytotoksyczność w porównaniu z 4-hydroksynonenalem [32]. Obecność adduktów białek z akroleiną prowadzi do zmian w proliferacji komórek i pośrednio wpływa na zahamowanie ich metabolizmu. Pojawienie się zmodyfikowanych białek może prowadzić m.in. do aktywacji/inaktywacji szlaków sygnałowych, inicjacji procesów zapalnych, a w konsekwencji do śmierci komórki [33]. Ponadto

ALE posiadają właściwości antygenowe, przez co ich działanie prozapalne może być również wynikiem odpowiedzi autoimmunologicznej, co wykazano w takich chorobach jak: cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów czy miażdżyca [34-36].

Powstawanie adduktów białek z aldehydami ma również ścisły związek z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych – chorobą Alzheimera oraz chorobą Parkinsona. W neuronach oraz splątkach neurofibrylarnych pacjentów z chorobą Alzheimera stwierdzono obecność adduktów akroleiny oraz 4-hydroksynonenalu z białkami. Tego typu modyfikacje są charakterystyczne zwłaszcza dla cząsteczek bogatych w reszty lizyny, jak np. białko tau oraz lipoproteiny o niskiej gęstości [37]. Podwyższony poziom akroleiny i jej produktów z białkami stwierdzono m.in.: w hipokampie i płacie skroniowym, a adduktów z 4-hydroksynonenalem w cytoplazmie neuronów i splątkach neurofibrylarnych [37].

Stwierdzono, że trans-4-oksononenal i 4-hydroksynonenal wiążą α -synukleinę, co sprzyja tworzeniu oligomerów. Odkładanie się tych agregatów w cytoplazmie neuronów prowadzi do destrukcji tych komórek [37].

Tworzenie produktów addycji aldehydów z białkami związane jest również z chorobami układu sercowo-naczyniowego [38]. Reakcje dialdehydu malonowego z kolagenem prowadzą do nasilenia sieciowania cząsteczek kolagenu i w konsekwencji usztywnienia naczyń krwionośnych [39]. Proces ten szczególnie nasilony jest w cukrzycy, gdzie początkowo obserwowana jest glikacyjna modyfikacja kolagenu. Natomiast istotną rolę w rozwoju miażdżycy odgrywa reakcja dialdehydu malonowego z lipoproteiną o niskiej gęstości prowadząca do powstania adduktów [38]. Przyłączenie aldehydu do apolipoproteiny B przekształca ją w postać miażdżycogenną, sprzyjającą łatwiejszemu rozpoznawaniu przez receptory makrofagów niż lipoproteinę natywną, prowadząc w konsekwencji do tworzenia komórek piankowych [40].

SPOSODY OCENY POZIOMU ALE

Metody oznaczania adduktów, produktów peroksydacji lipidów z białkami, można podzielić na jakościowe, pozwalające na identyfikację rodzaju modyfikacji z wykorzystaniem technik immunologicznych (western blotting, immunohistochemia) i spektrometrii mas oraz metody ilościowe wykorzystujące techniki separacyjne (chromatografia cieczowa i gazowa) w połączeniu z detekcją spektrometrii mas.

Dzięki wykorzystaniu specyficznych przeciwciał możliwa jest identyfikacja aminokwasu, który został zmodyfikowany, poprzez oznaczanie połączeń aldehyd-aminokwas, np.: 4-hydroksynonenal-histydyna, 4-hydroksynonenal-cysteina, 4-hydroksynonenal-lizyna [41,42]. Metody immunologiczne pozwalają na wykonywanie czułych i specyficznych oznaczeń przy stężeniu tych produktów na poziomie pikomoli na litr. Metody te umożliwiają nie tylko identyfikację adduktów (addukty Michaela, zasady Schiffa, wiązania krzyżowe), ale również pozwalają na określenie miejsca ich gromadzenia się w obrębie komórki/tkanki. Oznaczenia tego typu umożliwiły badanie efektów stresu oksydacyjnego w warunkach *in vivo* w wielu stanach patologicznych, tj. miażdżycy naczyń, choroba Parkinsona, zapalenie trzustki, choroby wątroby i choroba Alzheimera [43-45].

Całkowitą zawartość adduktów białek z 4-hydroksynonenalem można oznaczyć wykorzystując techniki GC-MS lub LC-MS, stosując uprzednio redukcję adduktów do stabilnych pochodnych (za pomocą NaBH_4 lub NaB^2H_4), a następnie reakcję z niklem Raneja (RN) lub innym odczynnikiem derywatyizującym. Pozwoliło to m.in. na oznaczenie adduktów białko-4-hydroksynonenal w surowicy krwi królików z hipercholesterolemią oraz we krwi i osoczu szczurów z nadciśnieniem tętniczym [46,47].

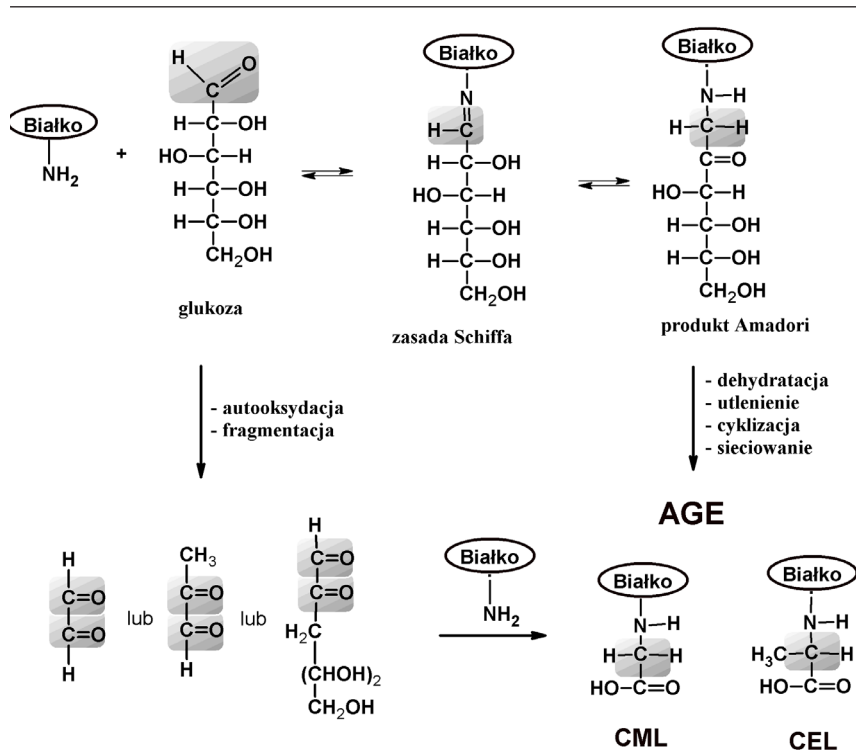
Do oceny struktury chemicznej ALE wykorzystuje się tandemową spektrometrię mas z jonizacją typu elektrosprej lub desorpcją/jonizacją laserem wspomaganą matrycą, w trybie rejestracji jonów dodatnich $(\text{M}+\text{H})^+$ lub $(\text{M}+\text{nH})^{n+}$ [31]. Zmodyfikowane białka najczęściej identyfikuje się na podstawie widm fragmentacyjnych, zarejestrowanych dla peptydów

otrzymanych w wyniku enzymatycznej hydrolizy oznaczanych białek, porównując z widmem mas białka natywnego. W tych warunkach, mimo stosowania łagodnej jonizacji często dochodzi do utraty peptydów, szczególnie dotyczy to zasad Schiffa. Dlatego też najbardziej korzystna jest fragmentacja przez przechwycenie elektronu oraz fragmentacja z przeniesieniem elektronu. Widma fragmentacyjne w tych warunkach dają jony typu c- i z- [48].

Istotnym elementem analizy adduktów białek z produktami peroksydacji lipidów jest znakowanie oraz derywatyizacja grup karbonylowych. W przypadku ALE do znakowania grup karbonylowych najczęściej stosuje się pochodne hydrazyny (np. hydrazyd biotyny), odczynnik Girarda P oraz sondy reaktywnych aldehydów [49]. Ze względu na swoją nietrwałość, niektóre addukty (szczególnie zasady Schiffa), przed oznaczeniem wymagają stabilizacji chemicznej, którą można uzyskać w wyniku redukcji np. z NaBH_4 [32]. W celu wzbogacenia próbek stosuje się chromatografię powinowactwa, co znacznie upraszcza analizę ze względu na wyeliminowanie niemodyfikowanych peptydów [50].

REAKCJE CUKRÓW REDUKUJĄCYCH Z BIAŁKAMI

Kolejną grupą związków karbonylowych są końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE). Powstają one w wyniku nieenzymatycznej modyfikacji białek przez cukry redukujące, najczęściej glukozy (Ryc. 2). W procesie powstawania AGE wyróżnić można trzy etapy. W pierwszym, odwracalnym etapie, w wyniku kondensacji grupy karbonylowej cukru z resztami aminowymi lizyny lub arginy białka, powstają labilne zasady Schiffa. Następnie związki te ulegają powolnemu wewnątrzcząsteczkowemu przegrupowaniu, co prowadzi do powstania tzw. wczesnych produktów glikacji, produktów Amadori, stabilnych związków posiadających reaktywne chemicznie wolne grupy karbonylowe. Tak zmodyfikowane białka w obecności tlenu podlegają dalszym przemianom, określanym jako reakcje Maillarda [51]. Produkty Amadori z kolei ulegają przemianom, takim jak dehydratacja, utlenienie, kondensacja, cyklizacja i sieciowanie w wyniku czego powstają AGE oraz produkty uboczne, takie jak: reaktywne formy tlenu, rodniki organiczne oraz związki dikarbonylowe (glioksal, metyloglioksal, 3-deoksyglukozon), które także biorą udział w tworzeniu AGE [51]. W tworzenie końcowych produktów glikacji zaangażowane mogą być również reaktywne pochodne karbonylowe pochodzące z enzymatycznego utleniania cukrów i lipidów oraz metabolizmu aminokwasów katalizowanego przez mieloperoksydazę [5,51]. AGE tworzą heterogenną grupę związków o zróżnicowanych masach cząsteczkowych, charakterystycznej pigmentacji i fluorescencji. Końcowe produkty zaawansowanej glikacji przedstawiono w tabeli 5 [52]. W niektórych przypadkach w wyniku glikacji i lipoksydacji powstają takie same produkty. Dotyczy to m.in. glioksalu, który jest produktem utlenienia zarówno lipidów jak i glukozy, ale również w reakcji z białkiem daje CML. Jednak z chemicznego punktu widzenia AGE i ALE stanowią odmienną grupę związków ponieważ powstają na drodze odmiennych mechanizmów. Reakcji glikacji ulegają zarówno białka wewnątrzkomórkowe, jak i zewnątrzkomórkowe wszystkich tkanek i płynów ustrojowych, jak również wolne aminokwasy (dające wolne addukty) [52].



Rycina 2. Powstawanie końcowych produktów glikacji (AGE).

Reakcja glikacji jest reakcją nieenzymatyczną, a jej szybkość zależy przede wszystkim od stężenia substratów oraz od czasu kontaktu reagujących ze sobą związków. Dlatego białka krótko żyjące tworzą jedynie zasady Schiffa lub produkty Amadori, podczas gdy białka o długim okresie półtrwania w organizmie ulegają przekształceniu do AGE [52]. Do białek szczególnie podatnych na tworzenie AGE należą: kolagen, albuminy osocza, hemoglobina czy krystalina soczewki oka [51,53]. Akumulacja AGE, zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowa, jest jednym z objawów starzenia się organizmu na poziomie molekularnym. Glikacja, jako proces fizjologiczny, nasila się proporcjonalnie do wieku. Poziom glikowanej hemoglobiny (HbA1c) u osób w wieku 20 lat wynosi ok. 3,8%, podczas gdy w wieku 70 lat osiąga ok. 4,4%. Uważa się, że wzrost ten związany jest ze spadkiem tolerancji glukozy oraz nasileniem glikemii wraz z wiekiem. Podatność białek na glikację jest różna w zależności od rodzaju białka, np. albumina ulega około 9-krotnie szybciej glikacji niż hemoglobina [54].

O poziomie AGE w organizmie decyduje nie tylko szybkość ich powstawania, ale również tempo usuwania. W warunkach fizjologicznych AGE częściowo ulegają proteolizie pod wpływem działania enzymów lizosomalnych i układu proteasomalnego [53], a produkty degradacji są transportowane do krwi i wydalone z moczem [51]. Jednak wraz ze wzrostem liczby wiązań krzyżowych obecnych w AGE wzrasta ich oporność na proteolizę, co utrudnia ich usuwanie, prowadząc do ich odkładania się w organizmie [53]. Nagromadzenie produktów glikacji w komórkach może prowadzić do aktywacji kaskady prozapalnej poprzez interakcje AGE z receptorami dla AGE należącymi do rodziny immunoglobulin [51]. Receptory te znajdują się na powierzchni komórek, w tym na fagocytach, hepatocytach, w obrębie naczyń krwio-

nośnych, w komórkach układu nerwowego, płucach, nerkach, mięśniach i otrzewnej [54]. Wiązanie AGE przez receptory może indukować powstawanie reaktywnych form tlenu przez aktywację oksydazy NADPH [54]. Wywołany w ten sposób stres oksydacyjny prowadzi do aktywacji szlaku sygnałowego Ras-MAP kinaz, w czasie którego dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, który uwolniony od IκB przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie indukuje ekspresję genów cytokin (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8), chemokin, białek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1), ponadto dochodzi do nadekspresji genów metaloproteinaz, cyklooksigenazy 2 i syntazy tlenu azotu [51]. Przyczynia się to do nasilenia stresu oksydacyjnego, który odgrywa rolę w patogenezie wielu chorób przewlekłych, takich jak: cukrzyca i powikłania z nią związane, choroby układu krążenia oraz choroby neurodegeneracyjne [52].

Wykazano, że w wyniku glikacji kolagenu dochodzi do powstawania wiązań krzyżowych, co powoduje jego dodatkowe usieciowanie i usztywnienie [56]. Fizjologiczna glikacja kolagenu nie wpływa jednak negatywnie na funkcje tkanki łącznej. Z kolei w przypadku wzmoczonej produkcji wiązań krzyżowych

proces ten odgrywa ważną rolę w rozwoju miażdżycy tętnic i chorób sercowo-naczyniowych [57]. Glikacja kolagenu powoduje, że naczynia krwionośne tracą swoją sprężystość i są bardziej kruche, co może prowadzić do utraty elastyczności płuc, stawów i skóry [56]. Zaobserwowano, że u szczurów wraz z wiekiem zwiększa się fluorescencja kolagenu tkanki płucnej związana z nagromadzeniem AGE i pentozydiny [58]. Dlatego też uważa się, że glikacja może być jedną z przyczyn gorszych właściwości mechanicznych płuc u osób starszych. W przypadku diabetyków, u których zaobserwowano wzrost produktów glikacji kolagenu skóry, podwyższony poziom CML oraz wzrost zawartości HbA1c, obserwowano jednocześnie rozwój takich chorób jak retinopatia i nefropatia [59]. Natomiast glikacja krystaliny soczewki oka jest jednym z mechanizmów rozwoju zaćmy. Oksydacyjne modyfikacje tego białka prowadzą do odkładania się nierozpuszczalnych adduktów białkowych, których obecność powoduje zmniejszenie rozpuszczalności i przejrzystości, co prowadzi do zwyrodnienia soczewki oka i rozwoju zaćmy. Zmiany takie nasilają się z wiekiem oraz u chorych na cukrzycę [60]. Ponieważ cukrzyca towarzyszy nie tylko wzmoczonej glikacji, ale i lipoksydacji, prowadzi to do akumulacji w tkankach zarówno produktów AGE jak i ALE, takich jak CML i CEL, co w konsekwencji zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju miażdżycy [61]. Glikacji ulegają również struktury ośrodkowego układu nerwowego, co ma znaczenie w procesie starzenia się neuronów i w patogenezie choroby Alzheimera [62].

SPOSOBY OCENY POZIOMU AGE

Podstawowe produkty glikacji białek oznaczane są we krwi w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej. Fruktozamina (wcześniejszy produkt glikacji) oznaczana jest metodą kolorymetryczną

opartą na redukcji błękitu nitratetrazoliowego (miernik glikemii ostatnich 2–3 tygodni, co odpowiada okresowi półtrwania albuminy). Glikowana hemoglobina (HbA1c) oznaczana jest metodą chromatograficzną z zastosowaniem jonowymien-nych kolumn kationowych (miernik glikemii ostatnich trzech miesięcy, co odpowiada okresowi życia erytrocytów) [54]. Ponieważ część połączeń AGE posiada właściwości fluorescencyjne (np. pentozydyna) do ich oznaczania w materiale biologicznym wykorzystuje się metody fluorymetryczne oraz metody chromatograficzne z wykorzystaniem detektora fluorescencyjnego w przypadku LC oraz uniwersalnego detektora płomieniowo-jonizacyjnego w przypadku GC [63,64]. Ponadto stosując specyficzne przeciwciała przeciwko produktom glikacji można oznaczać pentozydinę, CML oraz CEL poprzez dokonanie oceny jakościowej (immunobloting), a także ilościowej – testy immunoenzymatyczne [54,52]. Nieinwazyjnym sposobem oceny poziomu glikowanego kolagenu jest pomiar autofluorescencji skóry [65].

Złożony skład materiału biologicznego wymaga odpowiedniego przygotowania próbki do oznaczania AGE. Wolne produkty glikacji można oznaczyć w osoczu i moczu bezpośrednio po ultrafiltracji. Natomiast w celu oznaczenia AGE w tkankach poddaje się je hydrolizie kwasowej i redukcji NaBH₄ lub hydrolizie enzymatycznej [52]. Istotnym problemem w oznaczeniach AGE w materiale biologicznym jest występowanie tych związków w szerokim zakresie stężeń. AGE białek krwi o krótkim okresie półtrwania występują w ilościach śladowych, podczas gdy AGE białek o długim okresie półtrwania mogą występować na poziomie nawet o 20–30% wyższym w porównaniu do fizjologicznych zawartości tych białek [55]. Aby ułatwić analizę należy wyizolować AGE z materiału biologicznego, do czego wykorzystuje się chromatografię (klasyczną chromatografię cieczową, chromatografię powinowactwa) oraz elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Techniki te w połączeniu z detekcją spektrometrii mas umożliwiają zarówno ocenę jakościową jak i ilościową AGE. Teerlink i wsp. wykorzystując chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas oznaczyli CML i CEL w surowicy krwi [66]. Została opracowana również metoda ilościowego oznaczania AGE w surowicy krwi po wcześniejszej derywatacji kwasem 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowym z zastosowaniem tej techniki [67]. Produkty glikacji mogą być również oznaczane za pomocą GC-MS. Możliwość wykorzystania techniki GC do oznaczania AGE jest ograniczona ze względu na zbyt dużą polarność i wielkość cząsteczek. Chromatografię gazową można wykorzystać do oznaczania mniejszych adduktów, jak CEL i CML, natomiast w przypadku adduktów typu GOLD, MOLD nie jest to możliwe ze względu na ich rozmiar i do ich oznaczenia stosuje się chromatografię cieczową w połączeniu z tandemową spektrometrią mas [68].

Do identyfikacji glikowanych białek za pomocą spektrometru mas wykorzystuje się najczęściej podejście „bottom-up”. Identyfikacji białkowych AGE można dokonać stosując tryb skanowania jonów prekursorowych (przyłączenie cząsteczki glukozy (+162,1Da), glioksalu (+152,1Da), metyloglioksalu (+166,1Da) [30]. Podejście takie wykorzystano stosując technikę MALDI-TOF do oznaczeń AGE w osoczu i tkankach pacjentów z cukrzycą, mocznicą, zaciętą i marskością wątroby [69]. Podstawową zaletą tych oznaczeń jest minimalna obróbka wstępna próbki. Metoda ta nie dostarcza jednak istotnych

informacji dotyczących rzeczywistego miejsca modyfikacji w cząsteczce białka. Aby uzyskać informację na temat struktury badanego białka, miejsca oraz typu modyfikacji należy przeprowadzić oznaczenie z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas w celu uzyskania widm fragmentacyjnych dla poszczególnych peptydów wchodzących w skład białka. W przypadku glikowanych białek fragmentacji poddawane są tylko jony powstające w wyniku utraty cząsteczki glukozy (-162,1Da), otrzymując jony potomne typu b lub y [30]. Natomiast stosując tryb skanowania jonu prekursorowego z wykorzystaniem „data-dependent analysis” oznaczono modyfikacje białek osocza krwi u pacjentów z cukrzycą oraz modyfikację albuminy ludzkiej utlenionej w warunkach *in vitro* [70]. Próba zastosowania tej metody do oznaczeń *in vivo* nie powiodła się, ze względu na zbyt niskie stężenie oznaczanych produktów w materiale biologicznym [70]. Najczęściej stosowanym typem fragmentacji w analizie AGE jest dysocjacja wiązań wywołana kolizją z cząstkami gazu obojętnego lub dysocjacja wiązań wywołana transportem elektronów. Przy czym widma otrzymane dla glikowanych peptydów w wyniku dysocjacji wiązań wywołanej kolizją z cząstkami gazu obojętnego charakteryzują się dużą liczbą sygnałów związanych z utratą cząsteczek wody, co w istotnym stopniu komplikuje jego interpretację [55]. Natomiast dzięki zastosowaniu fragmentacji poprzez dysocjację wiązań wywołaną transportem elektronów można uniknąć zmian w strukturze białek, co pozwala na uzyskanie jednoznacznych danych. Jednak ten typ fragmentacji charakteryzuje niska czułość ze względu na słabą wydajność procesu fragmentacji, która jest o 20–30% niższa w porównaniu do dysocjacji wiązań wywołanej kolizją z cząstkami gazu obojętnego [23].

Karbonylacja białek jest jedną z głównych oznak stresu oksydacyjnego, który towarzyszy starzeniu się organizmu oraz rozwojowi wielu chorób w tym m.in. cukrzycy i chorób jej towarzyszących oraz chorób neurodegeneracyjnych. Ponieważ karbonylacja białek zachodzi na drodze trzech odmiennych mechanizmów, powstają trzy różne grupy produktów: polipeptydy z wolnymi grupami karbonyłowymi, produkty zaawansowanej lipoksydacji (ALE) oraz produkty zaawansowanej glikacji (AGE). Identyfikacja zmodyfikowanych białek oraz różnorodność produktów modyfikacji, a także występowanie ich w materiale biologicznym w różnych stężeniach wymaga stosowania do analizy nowoczesnych technik badawczych. Wprowadzenie narzędzi proteomicznych ze spektrometrią mas z pewnością pozwoli na osiągnięcie tego celu.

PIŚMIENNICTWO

1. Stadtman ER, Levine RL (2006) Chemical modification of proteins by reactive oxygen species. In: Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA, editors. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. Hoboken: John Wiley & Sons: 3–23
2. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (2002) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 11: 81–128
3. Pamplona R (2011) Advanced lipoxidation end-products. Chem Biol Interact 192: 14–20
4. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS (2014) Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications Korean J Physiol Pharmacol 18: 1–14
5. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta 329: 23–38

6. Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S, Nyström T (2005) Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *J Bacteriol* 187: 4207-4213
7. Ballesteros M, Fredriksson A, Henriksson J, Nyström T (2001) Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J* 20: 5280-5289
8. Höhn TJ, Grune T (2014) The proteasome and the degradation of oxidized proteins: part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol* 14: 388-394
9. Sohal RS (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Rad Biol Med* 33: 37-44
10. Jana CK, Das N, Sohal RS (2002) Specificity of Age-Related Carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Arch Biochem Biophys* 2: 433-439
11. Pryor WA (1993) Measurement of oxidative stress status in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2: 289-292
12. Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L (2005) Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* 280: 11648-11655
13. Banan A, Zhang Y, Losurdo J, Keshavarzian A (2000) Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* 46: 830-837
14. Aldini G, Dalle-Donne I, Vistoli G, Maffei Facino R, Carini M (2005) Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (4-HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. *J Mass Spectrom* 40: 946-954
15. Shacter E (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32: 307-326
16. Augustyniak E, Adam A, Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A, Willetts R, Korkmaz A, Atalay M, Weber D, Grune T, Borsa C, Gradinaru D, Chand Bollineni R, Fedorova M, Griffiths HR (2015) Validation of protein carbonyl measurement: a multi-centre study. *Redox Biol* 4: 149-157
17. Kraj A, Drabik A, Silberring J (2010) Proteomika i metabolika. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego
18. Akagawa M, Suyama K, Uchida K (2009) Fluorescent detection of alpha-aminoadipic and gamma-glutamic semialdehydes in oxidized proteins. *Free Radic Biol Med* 46: 701-706
19. Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER (2001) Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 69-74
20. Fedorova M, Kuleva N, Hoffmann R (2010) Identification of cysteine, methionine and tryptophan residues of actin oxidized *in vivo* during oxidative stress. *J Proteome Res* 9: 1598-1609
21. Wang Q, Zhao X, He S, Liu Y, An M, Ji J (2010) Differential proteomics analysis of specific carbonylated proteins in the temporal cortex of aged rats: the deterioration of antioxidant system. *Neurochem Res* 35: 13-21
22. Boronat S, García-Santamarina S, Hidalgo E (2015) Gel free proteomic methodologies to study reversible cysteine oxidation and irreversible protein carbonyl formation. *Free Radic Res* 49: 494-451
23. Colzani M, Aldini G, Carini M (2013) Mass spectrometric approaches for the identification and quantification of reactive carbonyl species protein adducts. *J Proteomics* 92: 28-50
24. Priego Capote F, Sanchez JC (2009) Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glyated proteins. *Mass Spectrom Rev* 28: 135-146
25. Vollmer M, Hörth P, Vad C, Nägele E (2004) Multidimensional LC-MS for Proteomics - Present and Future. Recent applications in LC-MS LC GC Eur 17: 14-20
26. Gaspari M, Cuda G (2011) Nano LC-MS/MS: a robust setup for proteomic analysis. *Methods Mol Biol* 790: 115-126
27. Mitulovic G, Mechtler K (2006) HPLC techniques for proteomics analysis-a short overview of latest developments. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5: 249-260
28. Ibáñez C, Simó C, García-Cañas V, Cifuentes A, Castro-Puyana M (2013) Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in Foodomics: a review. *Anal Chim Acta* 13: 1-13
29. Wang C, Lee CS (2013) Capillary electrophoresis mass spectrometry for proteomic and metabolic analysis. proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery pod redakcją Issaq HJ, Veenstra TD
30. Gadgil HS, Bondarenko PV, Treuheit MJ, Ren D (2007) Screening and sequencing of glyated proteins by neutral loss scan LC/MS/MS method. *Anal Chem* 79: 5991-5999
31. Domingues RM, Domingues P, Melo T, Pérez-Sala D, Reis A, Spickett CM (2013) Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? *J Proteomics* 92: 110-131
32. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G (2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47: 3-27
33. El-Bikai R, Welman M, Margaron Y, Côté JF, Macqueen L, Buschmann MD, Fahmi H, Shi Q, Maghni K, Fernandes JC (2010) Perturbation of adhesion molecule mediated chondrocyte-matrix interactions by 4-hydroxynonenal binding: implication in osteoarthritis pathogenesis. *Arthritis Res Ther* 12: R201
34. Turk Z, Ljubic S, Turk N, Benko B (2001) Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 303: 105-115
35. Virella G, Thorpe SR, Alderson NL, Stephan EM, Atchley D, Wagner F DCCT/EDIC Research Group (2003) Autoimmune response to advanced glycosylation end-products of human LDL. *J Lipid Res* 44: 487-493
36. Drinda S, Franke S, Canet CC, Petrow P, Bräuer R, Hüttich C, Stein G, Hein G (2002) Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 61: 488-492
37. Carini M, Aldini G, Facino RM (2006) 27. Sequestering agents of intermediate reactive aldehydes as inhibitors of advanced lipoxidation end-products (ALEs). Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA, Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases, John Wiley & Sons
38. Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ (2000) The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 43: 550-557
39. Begum M, Kumar JA, D'Souza HP, Sushith S, Prathima MB, Shridhar R, Dasegowda SM, Anil M, Nair SS, Kumar KA (2015) Myeloperoxidase, malondialdehyde and serum lipids in type 2 diabetes mellitus. *J Invest Biochem* 4:13-17
40. Uchida K (2000) Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28: 1685-1696
41. Uchida K (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 42: 318-343
42. Weber D, Milkovic L, Bennett SJ, Griffiths HR, Zarkovic N, Grune T (2013) Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA-Comparison of two primary antibodies. *Redox Biol* 1: 226-233
43. Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfield DA (2001) The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J Neurochem* 78: 413-416
44. Sampey BP, Soheila Korourian S, Martin J, Ronis MJ, Badger TM, Petersen DR (2003) Immunohistochemical characterization of hepatic malondialdehyde and 4-hydroxynonenal modified proteins during early stages of ethanol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 27: 1015-1022
45. Zarkovic K, Larroque-Cardoso P, Pucelle M, Salvayre R, Waeg G, Nègre-Salvayre A, Zarkovic N (2015) Elastin aging and lipid oxidation products in human aorta. *Redox Biol* 4: 109-117
46. Asselin C, Bouchard B, Tardif JC, Des Rosiers C (2006) Circulating 4-hydroxynonenal-protein thioether adducts assessed by gas chromatography-mass spectrometry are increased with disease progression

- and aging in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 41: 97-105
47. Lesgards JF, Frayne IR, Comte B, Busseuil D, Rhéaume E, Tardif JC, Rosiers CD (2009) Differential distribution of 4-hydroxynonenal adducts to sulfur and nitrogen residues in blood proteins as revealed using Raney nickel and gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 47: 1375-1385
 48. Fritz KS, Kellersberger KA, Gomez JD, Petersen DR (2012) 4-HNE adduct stability characterized by collision-induced dissociation and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 25: 965-970
 49. Codreanu SG, Kim HY, Porter NA, Liebler DC (2012) Biotinylated probes for the analysis of protein modification by electrophiles. *Methods Mol Biol* 803: 77-95
 50. Zhang Q, Tang N, Brock J, Mottaz HM, Ames JM, Baynes JW, Smith RD, Metz TO (2007) Enrichment and analysis of nonenzymatically glycated peptides: boronate affinity chromatography coupled with electron-transfer dissociation mass spectrometry. *J Proteome Res* 6: 2323-2330
 51. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-146
 52. Thornalley PJ (2005) Technological advances in peritoneal dialysis research. Measurement of protein glycation, glycated peptides, and glycation free adducts. *Peritoneal Dialysis International* 25: 522-533
 53. Grimm S, Hohn A, Grune T (2012) Oxidative protein damage and the proteasome. *Amino Acids* 42: 23-38
 54. Warwas M, Piwowar A, Kopiec G (2010) Zaawansowane produkty glikacji (AGE) w organizmie – powstawanie, losy, interakcja z receptorami i jej następstwa. *Patogeneza Chorób* 66: 585-590
 55. Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res* 8: 754-769
 56. Sell DR, Biemel KM, Reihl O, Lederer MO, Strauch CM, Monnier VM (2005) Glucosepane Is a Major Protein Cross-link of the Senescent Human Extracellular Matrix. *J Biol Chem* 280: 12310-12315
 57. Peppas M, Uribarr J, MD, Vlassara H (2004) The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 4: 31-36
 58. Bellmunt MJ, Portero M, Pamplona R, Muntaner M, Prat J (1995) Age-related fluorescence in rat lung collagen. *Lung* 173: 177-185
 59. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, Sivitz W, Monnier VM (2005) DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 3103-3111
 60. Fan X, Reneker LW, Obrenovich ME, Strauch C, Cheng R, Jarvis SM, Ortwerth BJ, Monnier VM (2006) Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16912-16917
 61. Baynes JW, Thorpe SR (2000) Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 28: 1708-1716
 62. Takeuchi M, Yamagishi S (2008) Possible involvement of advanced glycation end products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 14: 973-978
 63. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CA, Thornalley PJ (2002) Assay of advanced glycation end-products (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: 1-14
 64. Perkins BA, Rabbani N, Weston A, Ficociello LH, Adaikalakoteswari A, Niewczasz M, Warram J, Krolewski AS, Thornalley P (2012) Serum levels of advanced glycation endproducts and other markers of protein damage in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *PLoS One* 7: e35655
 65. Gerrits E, Smit AJ, Bilo HJ (2009) AGE, autofluorescence and renal function. *Nephrol Dial Transplant* 24: 710-713
 66. Teerlink T, Barto R, Ten Brink HJ, Schalkwijk CG (2004) Measurement of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and Nepsilon-(carboxyethyl)lysine in human plasma protein by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 50: 1222-1228
 67. Chen SJ, Aikawa C, Matsui T (2015) Quantitative analysis of methylglyoxal, glyoxal and free advanced glycation end-products in the plasma of Wistar rats during the oral glucose tolerance test. *Biol Pharm Bull* 38: 336-339
 68. Petrovic R, Futas J, Chandoga J, Jakus V (2005) Rapid and simple method for determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and Nepsilon-(carboxyethyl)lysine in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 19: 649-654
 69. Niwa T (2006) Mass spectrometry for the study of protein glycation in disease. *Mass Spectrom Rev* 25: 713-723
 70. Schmidt R, Böhme D, Singer D, Frolov A (2015) Specific tandem mass spectrometric detection of AGE-modified arginine residues in peptides. *J Mass Spectrom* 50: 613-24

Protein carbonylation – reasons, effects and determination

Ewa Ambrozewicz✉, Katarzyna Bielawska

Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Medical University of Białystok, 2D Mickiewicza St., 15-222 Białystok, Poland

✉e-mail: ewa.ambrozewicz@umb.edu.pl

Key words: advanced glycation end product, advanced lipoxidation end product, carbonyl group, protein, reactive oxygen species

ABSTRACT

Disorder of cellular metabolic homeostasis resulting in the enhanced level of reactive oxygen species, glucose or reactive carbonyl compounds (products of lipid, glucose and amino acids oxidation) causes modifications of cellular components, particularly proteins. As a result of polypeptide chain direct oxidative modifications, carbonyl groups are formed. Reactions of polypeptides with glucose resulting in advanced glycation end products (AGE) generation and reaction with lipid peroxidation products giving advanced lipoxidation end products (ALE) and mechanisms of the above products generation are described. Since accumulation of modified proteins in cells can lead to the development of different diseases including diabetes and its associated diseases as well as neurodegenerative diseases their identification as well as quantitative determination is very important. Obtained data are used in diagnosis and in pharmacotherapy. However, variety of products and a wide range of their concentration in biological samples, cause that different analytic techniques must be used for their analysis. In this review, methods for their determination, with particular emphasis on proteomic approach using state of the art analytical techniques are shown.