



Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirsfelda  
Polskiej Akademii Nauk

**Identyfikacja i właściwości niekonwencjonalnych  
produktów zaawansowanej glikacji występujących  
w surowicy ludzkiej**

Identification and properties of unconventional advanced glycation  
end-products present in human serum

**mgr inż. Kinga Gostomska-Pampuch**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor:

**dr hab. Magdalena Staniszewska, prof. KUL**

Wrocław 2021



*Serdecznie dziękuję*

***Pani dr hab. Magdalenie Staniszewskiej, prof. KUL***

*promotorowi niniejszej pracy,*

*za wszelką okazaną pomoc, konstruktywne uwagi i pomysły, motywowanie do realizacji  
złożonych działań oraz możliwość rozwoju w ramach wykonywanych projektów*

***Panu prof. dr hab. Andrzejowi Gamianowi***

*za wszystkie cenne porady i pomysły, merytoryczne rozmowy oraz możliwość realizacji  
tematu pracy w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej i Zakładzie Biochemii Lekarskiej*

***Panu dr Jerzemu Szkudlarkowi***

*za współpracę i przekazaną wiedzę*

***dr Agnieszce Bronowickiej-Szydelko i dr Aleksandrze Kuzan***

*za współpracę, okazywaną pomoc, serdeczność, koleżeńskość oraz za dodawanie wiary  
we własne siły i podtrzymywanie na duchu*

***Wszystkim pracownikom Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej***

*za codzienną współpracę i życzliwą atmosferę*

***Mężowi, Rodzicom i Babci***

*za nieocenioną pomoc, wsparcie i ogromne pokłady cierpliwości, bez których realizacja  
moich planów byłaby niemożliwa do osiągnięcia*

## Finansowanie badań



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu

OPUS pt. „Udział glikacji i szlaku kinureninowego w modulowaniu środowiska nowotworowego”, nr rejestracyjny 2017/25/B/NZ4/01198;

Kierownik projektu: dr hab. inż. Magdalena Staniszewska, prof. KUL

Uzyskano środki finansowe na stypendium doktorskie i staż zagraniczny w ramach projektu ETIUDA finansowanego z Narodowego Centrum Nauki,

nr rejestracyjny 2019/32/T/NZ4/00492;

Kierownik projektu: mgr inż. Kinga Gostomska-Pampuch

## Spis treści

1.	Wstęp .....	8
1.1.	Powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji.....	8
1.2.	Znane struktury AGEs – klasyfikacja .....	10
1.3.	Skutki obecności AGEs w organizmie człowieka.....	13
1.4.	Produkty glikacji jako markery kliniczne .....	20
1.5.	Metody oznaczania AGEs w próbkach biologicznych .....	21
1.6.	Metody syntezy <i>in vitro</i> modelowych AGEs .....	26
1.7.	Właściwości nowego produktu glikacji – MAGE.....	27
2.	Cel pracy .....	29
3.	Materiały i metody .....	30
3.1.	Synteza i oczyszczanie produktów zaawansowanej glikacji.....	30
3.1.1.	Synteza modelowych białkowych AGEs.....	30
3.1.2.	Synteza niskocząsteczkowego antygeny MAGE (LMW-MAGE) .....	31
3.1.3.	Rozdział LMW-MAGE metodą chromatografii cieczowej.....	32
3.2.	Analizy spektroskopowe .....	32
3.2.1.	Właściwości absorpcyjne modelowych białkowych AGEs.....	32
3.2.2.	Właściwości fluorescencyjne modelowych AGEs oraz LMW-MAGE.....	32
3.2.3.	Analiza LC-MS/MS modelowego produktu HMW-MAGE.....	33
3.2.3.1.	Przygotowanie próbek metodą FASP .....	33
3.2.3.2.	Pomiar stężenia otrzymanych peptydów na podstawie fluorescencji tryptofanu	33
3.2.3.3.	Przygotowanie próbki i analiza LC-MS/MS .....	34
3.2.3.4.	Analiza danych proteomicznych .....	34
3.2.4.	Identyfikacja białek krwi ludzkiej modyfikowanych do HMW-MAGE za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas .....	35
3.3.	Produkcja przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE .....	35
3.3.1.	Selekcja pojedynczych klonów komórek hybrydowych.....	35
3.3.2.	Optymalizacja hodowli komórek hybrydowych .....	36
3.4.	Oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa .....	37
3.4.1.	Przygotowanie kolumny powinowactwa .....	37
3.4.2.	Optymalizacja rozdziału na kolumnie powinowactwa i oczyszczanie przeciwciał anti-MAGE .....	38
3.5.	Analizy immunochemiczne i biochemiczne .....	39

3.5.1.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) i Western blotting	39
3.5.2.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	40
3.5.3.	Testy hamowania ELISA .....	41
3.5.4.	Określenie klasy przeciwciał monoklonalnych .....	42
3.5.5.	Immunoprecypitacja białek z surowicy ludzkiej .....	42
4.	Wyniki.....	43
4.1.	Uzyskanie modelowych białkowych AGEs .....	43
4.1.1.	Glikacja modelowych białek w warunkach konwencjonalnych i bezwodnych .....	43
4.1.2.	Właściwości absorpcyjne modelowych AGEs .....	45
4.1.3.	Właściwości fluorescencyjne modelowych AGEs .....	46
4.1.4.	Identyfikacja MAGE na resztach aminokwasowych modelowego HMW-MAGE	48
4.2.	Uzyskanie niskocząsteczkowego antygenu MAGE (LMW-MAGE) .....	50
4.2.1.	Oczyszczanie LMW-MAGE za pomocą chromatografii cieczowej.....	50
4.2.2.	Właściwości fluorescencyjne LMW-MAGE.....	52
4.3.	Otrzymanie czystych przeciwciał monoklonalnych anty-MAGE.....	53
4.3.1.	Uzyskanie pojedynczych klonów komórek hybrydowych produkujących przeciwciała anty-MAGE .....	53
4.3.2.	Optymalizacja hodowli komórek hybrydowych do produkcji przeciwciał anty-MAGE.....	56
4.4.	Oczyszczanie przeciwciał anty-MAGE metodą chromatografii powinowactwa	58
4.4.1.	Właściwości kolumny powinowactwa.....	58
4.4.2.	Optymalizacja procedury oczyszczania przeciwciał anty-MAGE na kolumnie powinowactwa .....	60
4.4.3.	Oczyszczanie przeciwciał anty-MAGE na kolumnie powinowactwa .....	62
4.5.	Charakterystyka przeciwciał monoklonalnych anty-MAGE .....	63
4.5.1.	Określenie czystości oraz klasy uzyskanych preparatów przeciwciał anty-MAGE	63
4.5.2.	Charakterystyka aktywności przeciwciał anty-MAGE.....	64
4.5.3.	Specyficzność przeciwciał monoklonalnych anty-MAGE .....	65
4.5.3.1.	Charakterystyka epitopu dla przeciwciał anty-MAGE.....	65
4.5.3.2.	Reaktywność przeciwciał anty-MAGE z białkowymi antygenami.....	67
4.6.	Identyfikacja epitopu MAGE obecnego we krwi ludzkiej.....	69
4.6.1.	Izolacja antygenu MAGE z surowicy ludzkiej .....	69

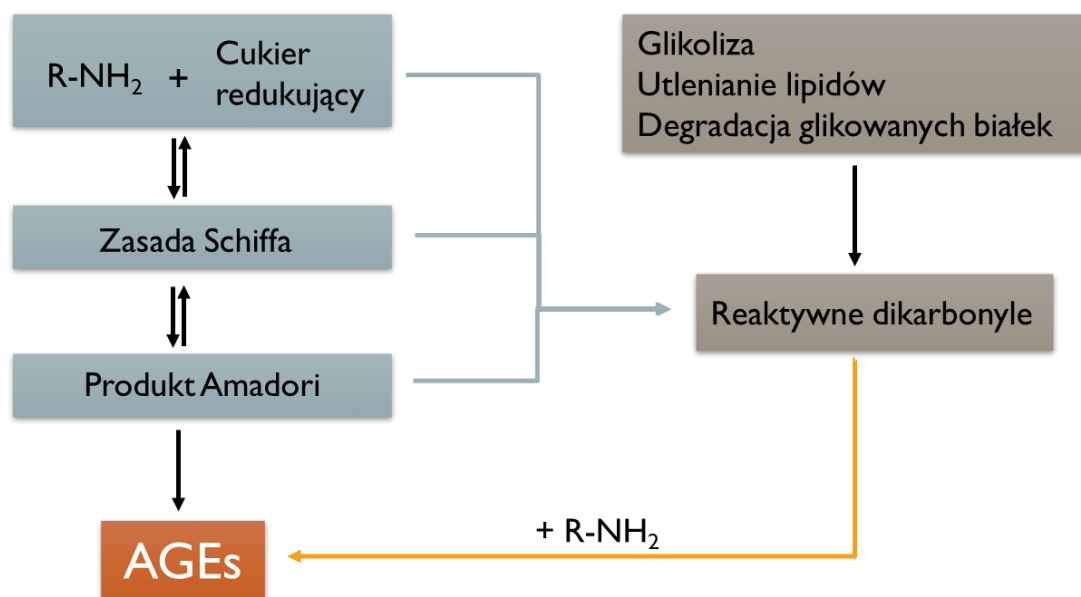
4.6.2. Identyfikacja białek zawierających epitop MAGE za pomocą spektrometrii masowej .....	70
4.6.3. Weryfikacja zidentyfikowanych we krwi białek zawierających antygen MAGE 72	
5. Dyskusja wyników .....	75
6. Wnioski .....	90
7. Literatura .....	91
8. Streszczenie .....	108
9. Abstract .....	110
10. Wykaz stosowanych skrótów .....	112
11. Spis rysunków i tabel .....	115
12. Osiągnięcia naukowe .....	120

# 1. Wstęp

## 1.1. Powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji, tzw. AGEs (ang. *advanced glycation end-products*) powstają podczas wieloetapowego procesu glikacji obejmującego szereg nieenzymatycznych reakcji nazywanych reakcjami Maillarda. Nazwa ta pochodzi od nazwiska francuskiego uczonego Louis Camille Maillard'a, który w 1912 roku, podczas badań nad żywnością, jako pierwszy opisał reakcję zachodzącą pomiędzy cukrami a białkami, prowadzącą do powstania produktów o brązowym zabarwieniu, nadającym żywności specyficzny smak i aromat<sup>1,2</sup>. W początkowym etapie, w wyniku odwracalnej reakcji kondensacji grup karbonylowych cukrów redukujących lub aldehydów z wolnymi grupami aminowymi białek, lipidów i kwasów nukleinowych, powstaje zasada Schiffa, która jest pierwszym produktem glikacji, a równowaga tego etapu w organizmie jest osiągana w ciągu kilku godzin. Następnie, to mało stabilne połączenie ulega przegrupowaniu do bardziej stabilnego produktu Amadoriego, który jest ketoaminą i stanowi tzw. wczesny produkt glikacji. Stan równowagi tego etapu w organizmie ustala się w ciągu około miesiąca, a sama reakcja jest częściowo odwracalna, przy obniżeniu stężenia substratów reakcji. W końcowych etapach reakcji Maillarda wczesne produkty glikacji ulegają dalszym, różnorodnym reakcjom np. dehydratacji, kondensacji, oksydacji czy fragmentacji, których skutkiem jest formowanie się wysokocząsteczkowych, trwałych agregatów tzw. końcowych produktów zaawansowanej glikacji<sup>3</sup>. Ponadto, cukry redukujące biorące udział w reakcjach Maillarda oraz produkty pośrednie tych reakcji (produkty Amadoriego) ulegają autooksydacji lub degradacji tworząc reaktywne związki dikarbonylowe, stanowiące prekursory do tworzenia kolejnych AGEs. Należą do nich glioksal, metyloglioksal oraz 3-deoksyglukozon, i są wytwarzane nie tylko w reakcji Maillarda, ale także na skutek innych procesów zachodzących w organizmie, takich jak utlenianie lipidów, degradacja glikowanych białek i glikoliza. Dikarbonyle stanowią pulę reaktywnych produktów glikacji w żywych organizmach i wywołują stres karbonylowy, który może przyczyniać się do degradacji lub modyfikacji węglowodanów, lipidów, białek oraz DNA<sup>4</sup>. Konsekwencją tworzenia AGEs jest także jednoczesne uwalnianie reaktywnych form tlenu<sup>5</sup>. Uproszczony schemat powstawania AGEs ilustruje Rys. 1.





Rys. 1. Schemat powstawania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs)

AGEs powstają zarówno wewnątrz organizmu z rozmaitych metabolitów (źródło endogenne), jak również mogą być dostarczane ze źródeł egzogennych (Rys. 2). Czynnikiem nasilającym proces glikacji *in vivo* są podwyższone stężenie substratów oraz stres oksydacyjny<sup>2</sup>, który sprzyja tworzeniu reaktywnych dikarbonili<sup>6</sup>. Dodatkowo, synteza AGEs jest katalizowana w obecności metali przejściowych lub hamowana przez związki redukujące, takie jak askorbinian<sup>7</sup>. Spożywanie wysoko przetworzonej żywności oraz wdychanie dymu papierosowego przyczynia się do znaczącej kumulacji AGEs w organizmie<sup>8</sup>. Do organizmu dostarczane są powstające podczas grillowania, pieczenia i smażenia produktów oraz palenia papierosów reaktywne prekursory AGEs, tzw. glikotoksyny<sup>9</sup>. Związki te reagują z białkami osocza lub z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej zaburzając ich funkcjonowanie. Wraz z żywnością dostarczane są także końcowe produkty glikacji, wchłaniane do układu krążenia w formie krótkich uglikowanych peptydów powstających w wyniku degradacji białek przez enzymy trawiennicze. Zaabsorbowane związki są gromadzone w tkankach lub wydalane z moczem. Biorąc pod uwagę ograniczoną zdolność metaboliczną organizmów ilość AGEs, które akumulują się w narządach i tkankach wzrasta wraz z wiekiem<sup>10</sup>. Uważa się, że obniżenie poziomu spożycia AGEs można łatwo osiągnąć, poprzez stosowanie niższej temperatury i wyższej wilgotności podczas przygotowywania potraw (zamiast pieczenia, grillowania – duszenie potraw) oraz unikanie spożycia wysoko przetworzonej żywności<sup>8</sup>.



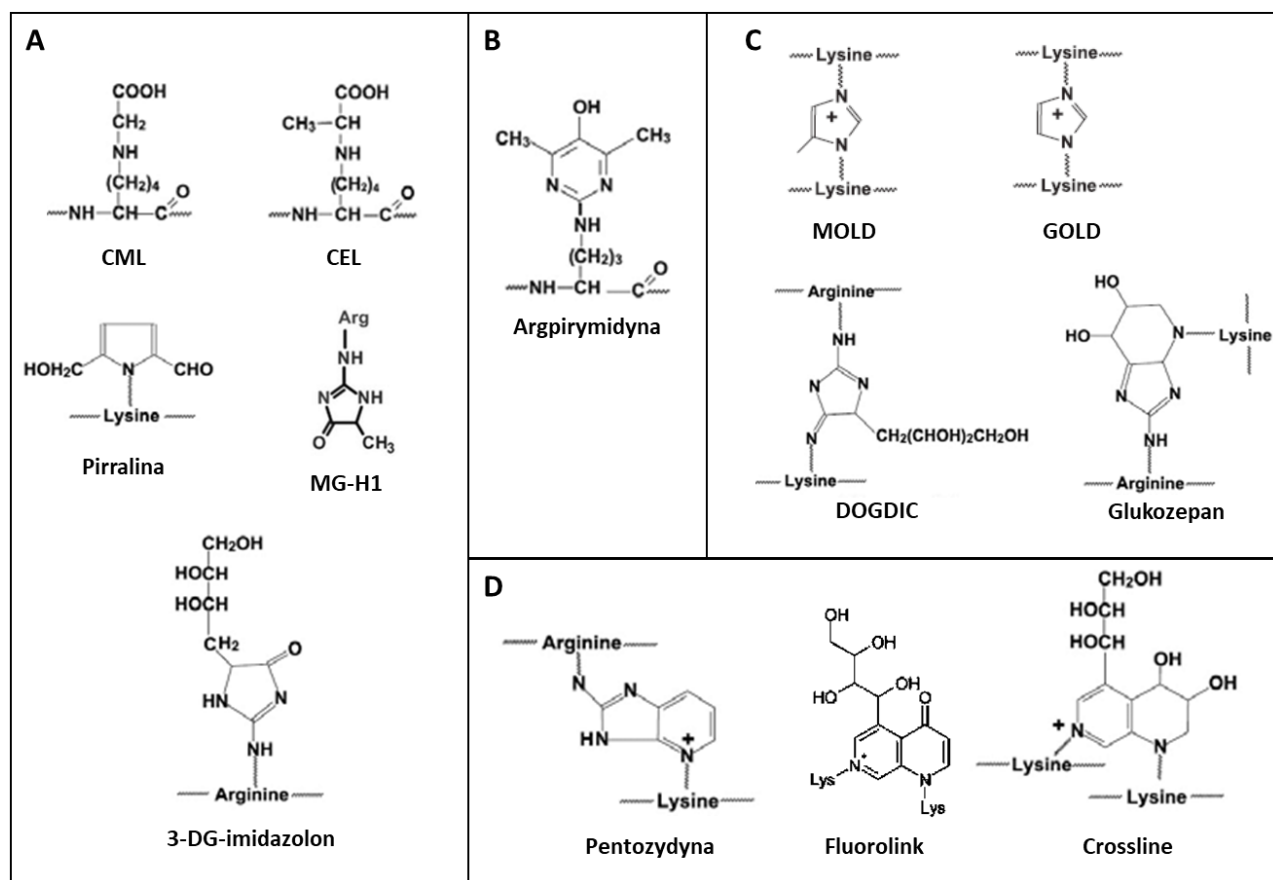
Rys. 2. Źródła AGEs w organizmie (na podst. Forbes J.M. i Cooper M.E. <sup>11</sup>)

Z powodu dużej różnorodności substratów oraz warunków w jakich może zachodzić proces glikacji, powstałe produkty stanowią heterogenną grupę związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, fizyko-chemicznych i immunochemicznych. Ich pełne poznanie jak dotąd stanowi spore wyzwanie badawcze.

## 1.2. Znane struktury AGEs – klasyfikacja

Dotychczas zdefiniowanych zostało kilkadziesiąt struktur związków należących do AGEs. Stwierdzono w nich obecność charakterystycznych, niskocząsteczkowych fragmentów, które podzielono na cztery podgrupy na podstawie zdolności do fluorescencji oraz tworzenia wiązań krzyżowo-sieciujących. Według obecnie przyjętej klasyfikacji AGEs dzielą się na: 1) związki pozbawione właściwości fluorescencyjnych i tworzenia wiązań krzyżowo-sieciujących (ang. *non-fluorescent, non-cross-linking species*); 2) związki posiadające właściwości fluorescencyjne, nietworzące wiązań krzyżowo-sieciujących (ang. *fluorescent, non-cross-linking species*); 3) związki pozbawione właściwości fluorescencyjnych, tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące (ang. *non-fluorescent, cross-linking species*) oraz 4) związki wykazujące fluorescencję i tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące (ang. *fluorescent cross-linking species*) <sup>12</sup>.

Obecnie znane struktury AGE powstają przede wszystkim w wyniku modyfikacji aminokwasów zasadowych: lizyny i argininy (Rys. 3).



Rys. 3. Wzory strukturalne przykładowych AGEs: A) związki niefluorescencyjne, nietworzące wiązań krzyżowo-sieciujących; B) związki fluorescencyjne, pozbawione właściwości krzyżowo-sieciujących; C) związki niefluorescencyjne, tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące; D) związki fluorescencyjne, tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące

Wskutek reakcji glikacji pojedynczej reszty lizyny powstają m.in.: Nε-karboksymetylo-lizyna (CML)<sup>13,14</sup>, Nε-karboksyetylo-lizyna (CEL)<sup>15</sup>, pirralina<sup>16</sup>, pirydyna aldehydu glikolowego (GAP)<sup>17</sup>, fruktozolizyna (FL)<sup>18</sup>, amid kwasu glikolowego lizyny (GALA)<sup>17</sup>. AGEs powstałe w wyniku modyfikacji dwóch reszt lizyny nazwanymi wiązaniami krzyżowymi AGE lizyna-lizyna to m.in.: crossline<sup>19</sup>, fluorolink<sup>17</sup>, lizylo-piropirydyna<sup>20</sup>, dimer glioksalu-lizyny (GOLD), dimer metyloglioksalu-lizyny (MOLD)<sup>17</sup>, vesperlizyna A, vesperlizyna B, vesperlizyna C<sup>20</sup>. Podczas modyfikacji pojedynczej reszty argininy zaobserwowano Nx-karboksymetylo-argininę (CMA), Nx-karboksyetylo-argininę (CEA)<sup>21</sup>, argpirymidynę<sup>17</sup>, 3-DG-imidazolon<sup>22</sup> oraz hydroimidazolon 1 (G-H1) pochodzący z glioksalu, hydroimidazolon 2 (G-H2) z glioksalu, hydroimidazolon 3 (G-H3)

z glioksalu<sup>23</sup>, czy pochodzący z metyloglioksalu hydroimidazolony 1 (MG-H1), 2 (MG-H2) lub 3 (MG-H3)<sup>24</sup>. W wyniku glikacji i sieciowania reszt lizyny i argininy tworzą się pentozydyna<sup>25</sup>, glukozepan, czy usieciowany imidazolony pochodzący z 3-deoksyglukozonu (DOGDIC)<sup>17</sup>.

Fruktozolizyna (FL) powstaje w reakcji Maillarda w początkowej fazie glikacji z glukozą reagującą z wolną lub związaną z białkami grupą ε-aminową lizyny. FL stanowi produkt Amadoriego i ulega dalszym przemianom do reaktywnych dikarboonyli, prekursorów innych AGEs<sup>21</sup>.

Najlepiej poznanym do tej pory produktem zaawansowanej glikacji jest CML, który jest jednym z najczęściej występujących *in vivo* AGEs. CML powstaje w wyniku szeregu przemian produktu kondensacji glukozą z lizyną, sukcesywnego przegrupowania utworzonego produktu Amadoriego i następującego utlenienia, co ostatecznie daje CML. Inny szlak syntezy obejmuje reakcję między glioksałem i grupą aminową lizyny. Co ciekawe, GALA i GOLD mogą pochodzić z tej samej kaskady reakcji co CML<sup>12,26</sup>. Do AGEs powstających na resztach lizyny należą także pirralina pochodząca z 3-deoksyglukozonu, CEL powstająca podczas reakcji wolnych grup aminowych z metyloglioksałem oraz GAP, którego prekursorem jest glikolaldehid<sup>15,21,27</sup>.

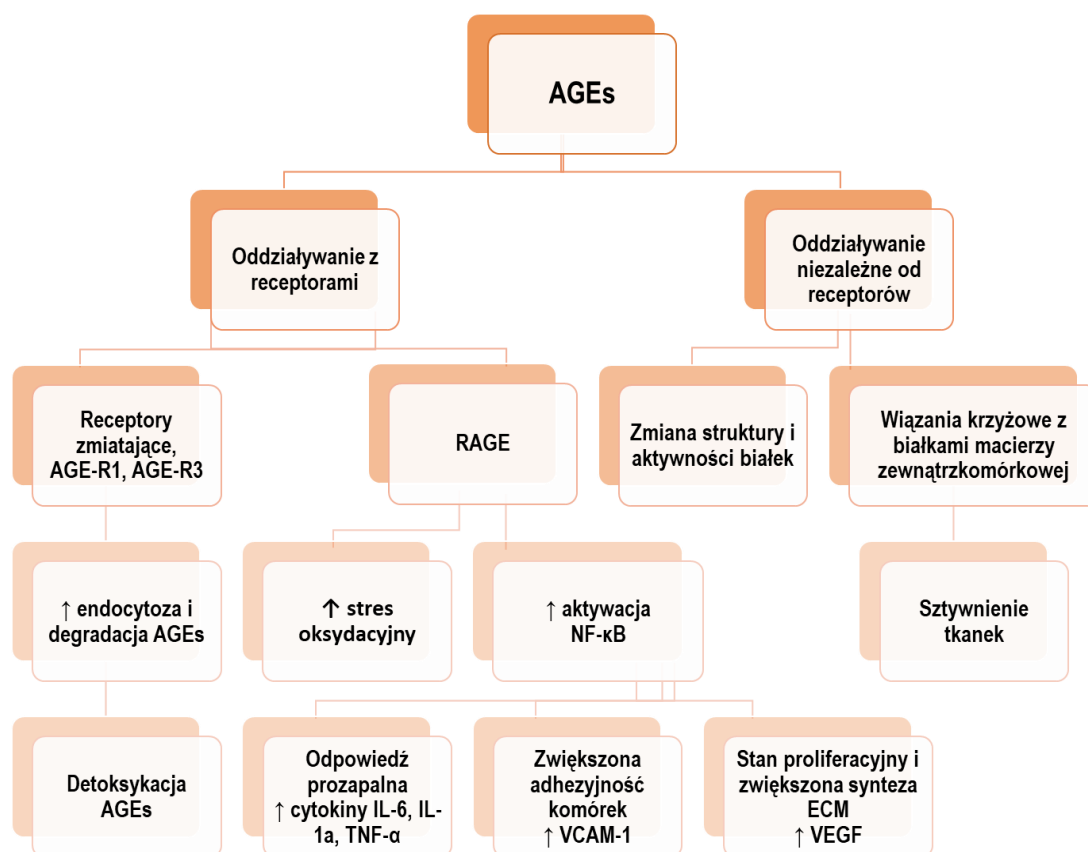
Oprócz grupy ε-aminowej lizyny, na różne modyfikacje Maillarda jest podatna również grupa guanidynowa argininy. W reakcji z glioksałem powstają na argininie CMA oraz imidazolony (G-H1, G-H2, G-H3)<sup>23</sup>. Argpiromidyna jest typowym przykładem struktury AGE posiadającej właściwości fluorescencyjne i nietworzącej wiązań sieciujących. Powstaje w reakcji argininy z metyloglioksałem. Inne struktury tworzące się na skutek oddziaływania białek z tym dikarboonyłem to CEA oraz hydroimidazolony (MG-H1, MG-H2, MG-H3)<sup>24</sup>.

Szczególnie ważne ze względu na proces starzenia białek o długim okresie półtrwania są struktury, które sieciują dwa łańcuchy boczne aminokwasów. Najlepiej poznane struktury sieciujące dwie reszty lizyny to GOLD i MOLD powstające odpowiednio z glioksalu i metyloglioksalu. Głównymi dwuwartościowymi wiązaniami lizyna-arginina są glukozepan, który pochodzi z glukozą, pentozydyna, będąca najlepiej poznanym fluorescencyjnym AGE, której substratami są pentozy, np. ryboza, a także DOGDIC powstający w reakcji glikacji z 3-deoksyglukozonu<sup>17,21,28</sup>.

### 1.3. Skutki obecności AGEs w organizmie człowieka

Poziom produktów glikacji w ustroju uzależniony jest od szybkości ich wytwarzania, jak i od tempa usuwania z organizmu. Glikacja jest procesem fizjologicznym, związanym ze starzeniem się organizmu, jednak znacznie nasila się w stanach zaburzeń metabolicznych. Niektóre związki AGEs podlegają częściowemu rozkładowi w lizosomach komórek, co umożliwia ich wydzielenie do krążenia i wydalanie z moczem. Jednak większość AGEs nie ulega degradacji, lecz kumuluje się prowadząc do zaburzeń homeostazy<sup>29</sup>.

Efektom obecności AGEs w organizmie są procesy wywołujące efekty przez bezpośrednie oddziaływanie na struktury komórkowe lub z udziałem receptorów (Rys. 4). Oddziaływanie bezpośrednie niezależne od receptorów wywołuje negatywne skutki glikacji związane ze zmianą struktury i aktywności białek przez ich post-translacyjną modyfikację wewnątrz komórek, jak i poprzez modyfikację białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Oddziaływanie AGEs z receptorami wywołuje szeroką odpowiedź komórkową oraz zwiększony stres oksydacyjny w organizmie<sup>30,31</sup>.



Rys. 4. Mechanizmy oddziaływania AGEs w organizmie (na podst. Palimeri i wsp.<sup>32</sup>)

Glikacja jest procesem nieselektywnym, dlatego odpowiedzialna jest za modyfikację różnorodnych białek organizmu, w tym znajdujących się w układzie krążenia, jak i w tkankach stałych (białka zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe). W przypadku białek o krótkim okresie półtrwania, raczej dochodzi do utworzenia wczesnych produktów glikacji, takich jak produkty Amadoriego, co wynika z szybkiej eliminacji tych białek i niewystarczającego czasu do powstania AGEs, które wymaga co najmniej kilku tygodni. W przypadku białek o długim okresie półtrwania, jak kolagen typu I, który jest obecny w skórze i tkankach łącznych wielu narządów, dochodzi do utworzenia produktów zaawansowanej glikacji<sup>33</sup>. Oprócz kolagenu, w tej grupie białek znajduje się albumina krwi, insulina, immunoglobuliny oraz lipoproteiny o małej gęstości (LDL)<sup>34</sup>. Glikacja insuliny w komórkach trzustki lub we krwi utrudnia utrzymanie homeostatycznego poziomu glukozy i stymulację lipogenezy<sup>35</sup>. Ponadto, zależność eliminacji insuliny od interakcji z receptorami powoduje, iż zmiany strukturalne tego hormonu (na skutek glikacji), znacząco zmniejszają zdolność jego wiązania z receptorem, co w konsekwencji może nasilać insulinooporność i stan chorobowy hiperinsulinemii<sup>36</sup>. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że glikowana albumina i metyloglioksal (metabolit pośredni glikacji) mogą indukować i wzmacniać insulinooporność, m.in. poprzez hamowanie szlaku sygnałowego PI3K/Akt wyzwalanego przez insulinę oraz wywoływanie stresu oksydacyjnego, co prowadzi do silnego zahamowania procesów metabolicznych regulowanych przez ten hormon<sup>37,38</sup>. Dodatkowo, AGEs oddziałują bezpośrednio na trzustkę, powodując stres oksydacyjny, prowadzący do nieprawidłowego funkcjonowania i śmierci komórek beta wydzielających insulinę<sup>39,40</sup>. Wszystkie te czynniki przyczyniają się do przewlekłej hiperglikemii obserwowanej u osób z cukrzycą typu 2, co z kolei nasila syntezę glikowanych białek<sup>34</sup>. Wysoka zawartość glikowanej albuminy w organizmie, może zaburzać równowagę immunologiczną i indukować stres oksydacyjny, powodując zapalenie tkanek<sup>2</sup>.

Glikacja białek enzymatycznych wywołująca zmiany konformacyjne w pobliżu miejsca aktywnego enzymu, może ograniczać jego funkcjonalność. Przykładowo, skutkiem glikacji dysmutazy nadtlenkowej lub reduktazy glutationu jest zahamowanie procesów antyoksydacyjnych w organizmie i obniżenie ilości wewnątrzkomórkowego glutationu<sup>41,42</sup>. Proces glikacji może również mieć szkodliwy wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego, ponieważ immunoglobuliny podlegając modyfikacjom produktami glikacji tracą swoje funkcje<sup>34</sup>. Białka LDL także podlegają procesowi glikacji,

szczególnie u pacjentów z cukrzycą, u których podnosi się poziom LDL-AGEs. Oddziaływanie tych produktów z receptorami zmiatającymi na powierzchni makrofagów powoduje ich różnicowanie do komórek piankowatych i tworzenia blaszek miażdżycowych. Ponadto, zmiany zachodzące w LDL podczas procesu glikacji nadają tym lipoproteinom właściwości immunogenne oraz powodują gromadzenie ich w osoczu poprzez tworzenie kompleksów immunologicznych<sup>34,43,44</sup>.

W macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i tkance łącznej białkami będącymi celem glikacji są kolagen, laminina, witronektyna oraz składnik ścian tętnic – elastyna. Modyfikacje tych białek są przyczyną powikłań sercowo-naczyniowych, szczególnie u pacjentów cukrzycowych. Kolagen i elastyna należą do białek o długim okresie półtrwania, na których powstają AGEs tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące, skutkujące zwiększonym usztywnieniem ścian naczyń krwionośnych i mięśnia sercowego. W wyniku tego procesu dochodzi do zaburzenia rozkurczu komór serca, prowadzącego do nadciśnienia tętniczego i innych zmian w funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego. W porównaniu do kolagenu, elastyna jest mniej podatna na glikację, ponieważ zawiera mniejszą ilość reszt lizylowych. Glikowane białka macierzy zewnątrzkomórkowej mniej wrażliwe na proteolizę gromadzą się powiększając masę ECM i nieodwracalnie pogrubiając ściany naczyń krwionośnych<sup>34,45–48</sup>. Zmiany witronektyny i lamininy wywołane przez powstanie AGEs związane są ze zmniejszeniem wiązania proteoglikanu siarczanu heparanu do śródbłonna naczyń, co sprzyja jego uszkodzeniu<sup>30,49</sup>. W stanie ostrej i chronicznej glikemii (towarzyszącej cukrzycy) nasilona glikacja prowadzi do przyspieszonej akumulacji AGEs w układzie krążenia oraz w różnych tkankach i narządach. Najczęstszą przyczyną powikłań mikronaczyniowych we wczesnej cukrzycy jest pogrubianie błony podstawnej kapilar i hipertrofii ECM, co stanowi podłoże rozwoju angiopatii, retinopatii, nefropatii, neuropatii i kardiomiopatii cukrzycowych<sup>29,47,50–52</sup>.

Nasilony proces glikacji może również sprzyjać rozwojowi chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Tworzenie się blaszek amyloidowych i wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych jest jednym z kilku procesów, powodujących utratę synaps i śmierć komórek neuronalnych, co przyczynia się do spadku zdolności poznawczych i funkcjonalnych u pacjentów z chorobą Alzheimera<sup>53</sup>. Agregację, odkładanie się i usieciowanie uglikowanych białek zaobserwowano zarówno w blaszkach amyloidowych, jak i w splotach neurofibrylarnych<sup>54</sup>. Obecność AGEs przyczynia się do wystąpienia zaburzeń przewodzenia impulsu nerwowego, wskutek pojawienia się złogów amyloidu- $\beta$ ,

sieciowanego w procesie glikacji<sup>55</sup>. Występowanie tych patologii w mózgu przyczynia się do wywołania choroby Alzheimera, natomiast kumulacja amyloidu- $\beta$  w mięśniach prowadzi do stwardnienia zanikowego bocznego (choroby Charcota)<sup>54</sup>. Inną chorobą neurodegeneracyjną, w której obserwuje się obecność AGEs jest choroba Parkinsona. Jej etiologia, podobnie jak w przypadku innych chorób neurodegeneracyjnych, jest złożona i obejmuje czynniki genetyczne oraz środowiskowe<sup>56</sup>. Choroba Parkinsona charakteryzuje się utratą komórek neuronalnych w części zbitiej istoty czarnej (łac. *substantia nigra*) śródmózgowia oraz nagromadzeniem wewnątrzkomórkowych inkluzji białkowych, takich jak ciała Lewy'ego i neuromelanina, co jest uważane za patologiczną cechę charakterystyczną tej choroby. Ciała Lewy'ego zawierają głównie białka neurofilamentów, w tym  $\alpha$ -synukleinę. W warunkach fizjologicznych białko to posiada rozwiniętą konformację, jednak w sytuacjach patologicznych może tworzyć agregaty lub oligomery uważane za najbardziej cytotoksyczne formy<sup>54</sup>. Udowodniono, że  $\alpha$ -synukleina ulega procesowi glikacji, a utworzone AGEs indukują agregację i oligomeryzację tego białka, prowadząc do powstania ciałek Lewy'ego, a tym samym przyczyniając się do patogenezы choroby Parkinsona<sup>57-59</sup>.

Powstałe na skutek glikacji AGEs oddziałują z receptorami komórkowymi (Rys. 5) prowadząc do aktywacji różnych szlaków sygnałowych. Najlepiej poznanym receptorem oddziałującym z produktami glikacji jest RAGE (ang. *receptor for advanced glycation end-products*) – transbłonowe białko należące do immunoglobulinopodobnych receptorów na powierzchni komórki. Część zewnątrzkomórkowa tego receptora składa się z domeny zmiennej (typu V), po której następują dwie domeny stałe (typu C) i reprezentuje główne miejsca wiązania dla różnych ligandów, podczas gdy fragment cytozolowy jest niezbędny do sygnalizacji wewnątrzkomórkowej<sup>60</sup>. RAGE zidentyfikowano na powierzchni różnych typów komórek i tkanek, a ich najwyższe stężenie występuje w płucach, sercu i mięśniach szkieletowych. Poza tym występuje on także na makrofagach, fagocytach, neutrofilach, hepatocytach, komórkach śródbłonna i mięśni gładkich, komórkach układu nerwowego oraz na komórkach mezangium śródkłębkowego<sup>12,29</sup>. W warunkach fizjologicznych RAGE jest ekspresjonowany na niskim poziomie, jednak podniesione stężenia ligandów, w tym AGEs, powoduje nadekspresję receptora obserwowaną w stanach patologicznych lub przewlekłych stanach zapalnych, takich jak cukrzyca, choroby układu krążenia, choroba Alzheimera, nowotwory<sup>61</sup>. Do RAGE wiąże się szereg różnych niespokrewnionych strukturalnie ligandów, nie tylko AGEs, ale również białka

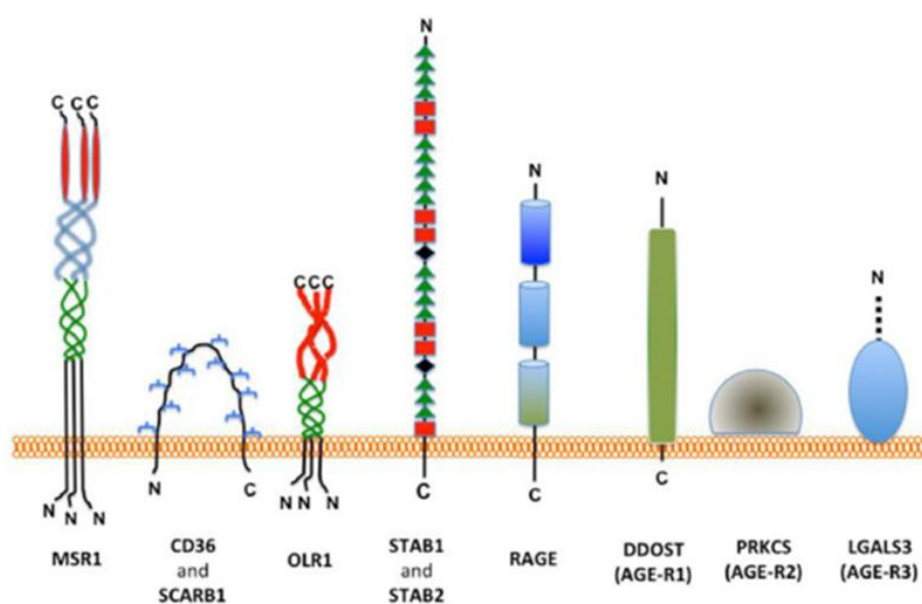


S100/kalgranuliny wiążące wapń, które gromadzą się zewnątrzkomórkowo w miejscach przewlekłego zapalenia, peptyd amyloidu- $\beta$  związany z chorobą Alzheimera, amyloid A, (gromadzący się w ogólnoustrojowej amyloidozie), białko wiążące DNA HMGB1 (amfoteryna, uwalniana przez komórki ulegające apoptozie) oraz cząsteczki powierzchniowe na bakteriach i leukocytach (Mac-1) <sup>62</sup>. Na skutek aktywacji receptora RAGE po związaniu ligandu dochodzi do indukcji szlaków komórkowych i aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK), takich jak kinazy MAP p44/42 (ERK1/2), p38 oraz JNK <sup>63</sup>. Dodatkowo stymulacja RAGE aktywuje szlaki sygnałowe Jak/STAT i p21<sup>ras</sup>, kinazy AKT, oraz cząsteczek GSK-3 $\beta$ , i rac-1 <sup>64</sup> aktywując czynniki transkrypcyjne, m.in. NF- $\kappa$ B, które pośredniczą w powstawaniu reakcji zapalnych, regulacji mechanizmów proliferacyjnych, angiogennych, zwłóknieniowych, trombogennych i apoptotycznych <sup>12</sup>. Typ odpowiedzi zależy od rodzaju komórek i ich wrażliwości na różne czynniki stymulujące. Na skutek aktywacji NF- $\kappa$ B dochodzi do odpowiedzi prozapalnej poprzez uwalnianie cytokin Il-1, Il-6 i TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworu) <sup>65</sup>. W komórkach śródbłonna indukcja NF- $\kappa$ B powoduje nadekspresję białka VCAM-1, a tym samym zwiększoną adhezynność komórek do śródbłonna naczyń. Poprzez nadekspresję naczyniowego czynnika wzrostu VEGF zwiększa się proliferacja komórek śródbłonna. Taki stan proliferacyjny i zapalny indukowany przez RAGE i NF- $\kappa$ B prowadzi do znacznej przebudowy naczyń i przewlekłej inwazji naczyniowej, z których oba działają jako kluczowa patologia do wystąpienia m.in. miażdżycy tętnic <sup>66</sup>. Ponadto, aktywacja RAGE odgrywa także rolę w zwężaniu naczyń przez stymulowanie nadekspresji silnego środka zwężającego naczynia, endoteliny-1 oraz do podwyższenia stopnia koagulacji krwi poprzez zwiększenie ekspresji trombomoduliny <sup>32,34,67</sup>. Aktywacja RAGE za pośrednictwem AGEs wyzwała również dodatnią pętlę sprzężenia zwrotnego, w której aktywacja NF- $\kappa$ B dodatkowo zwiększa ekspresję RAGE <sup>29</sup>. Ten samonapędzający się cykl nasila stan patologiczny w organizmie. Oprócz indukcji opisanych szlaków sygnałowych interakcja ligand-RAGE prowadzi do aktywacji oksydazy NADPH. W konsekwencji dochodzi do stresu oksydacyjnego na skutek wydzielania reaktywnych form tlenu (RFT), które również wpływają na indukcję czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B <sup>68,69</sup>. Uważa się, że zwiększona produkcja RFT i rozregulowany proces zapalny wynikający z interakcji AGEs-RAGE w dużej mierze przyczyniają się do powstawania nowotworów <sup>69</sup>. Ponadto, u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek nadmierny stres oksydacyjny i przewlekłe zapalenie, wywołane obecnością AGEs, mogą dodatkowo zwiększać produkcję kolejnych

końcowych produktów zaawansowanej glikacji, co z kolei sprzyja progresji choroby i śmiertelności związanej z niewydolnością nerek <sup>70</sup>.

W ustroju występują także inne odmiany RAGE będące postaciami wydzielniczymi receptora, tzw. rozpuszczalne RAGE (sRAGE). Jeden z wariantów sRAGE powstaje w wyniku alternatywnego składania mRNA i jest skrócony od strony C-końca, dlatego nie ma domeny wewnątrzkomórkowej i transbłonowej. Ten wariant określa się jako endogenny sekrecyjny RAGE (esRAGE) <sup>29</sup>. Uwalniane formy receptora RAGE wiążą się z AGEs, ale nie inicjują wewnątrzkomórkowej kaskady przekazywania sygnału, a zatem mogą wywoływać ochronną odpowiedź przeciwzapalną <sup>62</sup>.

Innymi receptorami produktów glikacji są białka wykazujące ochronne działanie przed skutkami obecności AGEs w organizmie poprzez ich wiązanie i degradację. Należą do nich receptory zmiatające występujące na makrofagach, m.in. MSR1, CD36, SCARB1, OLR1, STAB1, STAB2, które stanowią podstawowy mechanizm usuwania produktów glikacji z organizmu (Rys. 5) <sup>17</sup>. Wiążą one AGEs i wprowadzają je do endolizosomalnych szlaków degradacji.

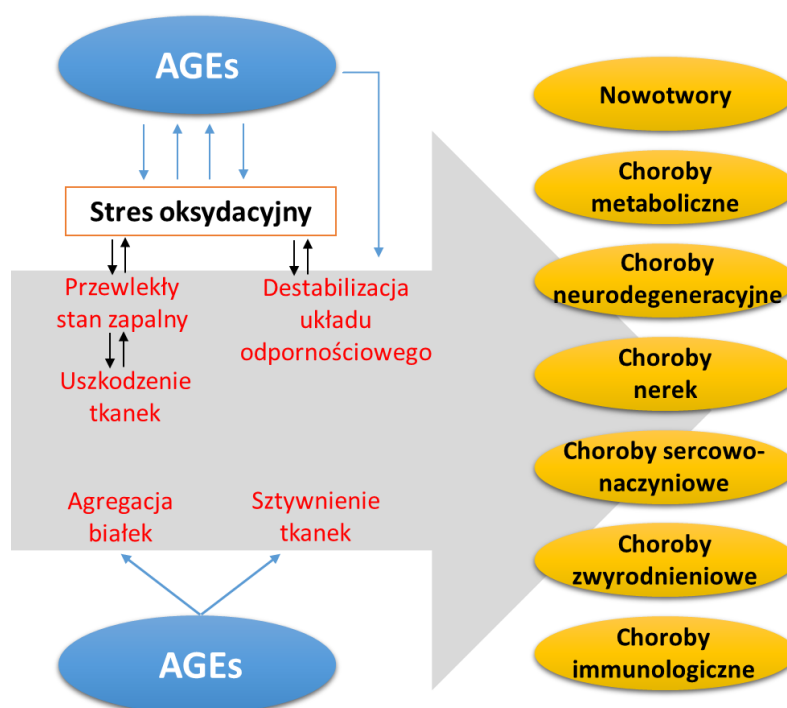


Rys. 5. Receptory oddziałujące z AGEs <sup>17</sup>

Dodatkowo, na wielu różnych typach komórek występują receptory AGE-R1, AGE-R2 i AGE-R3, ekspresjonowane w nerkach, mięśniach gładkich, neuronach, limfocytach T, makrofagach i śródbłonku, gdzie również są odpowiedzialne za usuwanie AGEs z ustroju <sup>17,68</sup>. AGE-R1 należy do rodziny kompleksów białek odpowiedzialnych za translokację polipeptydów przez błony komórek eukariotycznych. Jest to pojedyncze

białko transbłonowe, które ma małą zewnątrzkomórkową domenę N-końcową i cytoplazmatyczną domenę C-końcową. AGE-R2 to białko zawierające sekcję z fosforylowaną tyrozyną zakotwiczoną w błonie komórkowej, uczestniczące w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej różnych receptorów<sup>62</sup>. Mechanizm działania AGE-R2 nie jest w pełni poznany. Receptor AGE-R3, inaczej zwany galektyną 3, występuje w cytoplazmie i jądrze komórkowym, ale podlega sekrecji i może oddziaływać z integrynymi. Kontroluje cykl komórkowy, moduluje adhezję komórek i ma wpływ na składanie (splicing) mRNA<sup>29</sup>. AGE-R1 i AGE-R3/galektyna 3 mają zdolność obniżania aktywności RFT i RAGE, w których pośredniczą AGEs, jednak ich ekspresja i funkcja zmniejszają się wraz z wiekiem i podczas stresu oksydacyjnego<sup>68</sup>.

Podsumowując, negatywne skutki obecności AGEs w ustroju związane są ze wzmocnionym stresem oksydacyjnym, przewlekłym stanem zapalnym, destabilizacją układu immunologicznego, agregacją białek (Rys. 6). Mechanizmy te powodują uszkodzenie i sztywnienie tkanek oraz zmiany właściwości białek. Uważa się, że wymienione efekty indukują liczne choroby lub przyspieszają ich progresję. W badaniach wykazuje się korelacje zwiększonego poziomu AGEs w organizmie z wieloma chorobami, w tym o podłożu immunologicznym (np. reumatoidalne zapalenie stawów), zwyrodnieniem stawów, powikłaniami sercowo-naczyniowymi, niewydolnością nerek, chorobami neurodegeneracyjnymi, metabolicznymi oraz nowotworami<sup>2,4,11,71,72</sup>.



Rys. 6. Skutki obecności AGEs w ustroju<sup>2</sup>

Dokładny udział procesu glikacji w mechanizmie rozwoju tych chorób nie jest do końca poznany. Zrozumienie tych procesów jest kluczem do prawidłowej diagnozy i monitorowania postępu choroby oraz do opracowania skutecznych metod leczenia. Uważa się, że AGEs mogą stanowić markery diagnostyczne dla określonych stanów patologicznych, ale wciąż jest za mało informacji na temat struktur oraz właściwości biologicznych gromadzących się w organizmie produktów glikacji.

#### **1.4. Produkty glikacji jako markery kliniczne**

Pomimo uznanej roli AGEs w patogenezie wielu chorób niewiele jest jeszcze markerów glikacji używanych w praktyce klinicznej. Jednym z nich stosowanym obecnie jest glikowana hemoglobina (HbA1c), tworząca się podczas hiperglikemii. Ten marker służy do monitorowania postępu cukrzycy i wyrównania glikemii. Hemoglobina HbA1c jest produktem Amadoriego powstałym na skutek reakcji glukozy z N-końcową walina łańcucha  $\beta$  hemoglobiny<sup>73</sup>. Produkt ten jest uważany za kluczowy punkt wyjścia dla optymalnej kontroli glikemii u pacjentów z cukrzycą typu 1, cukrzycą typu 2 czy z przewlekłą chorobą nerek. Jednak, u pacjentów z ciężką przewlekłą chorobą nerek (w stadium 4 i 5), ze względu na zmniejszoną produkcję i długość życia krwinek czerwonych oraz stosowane leczenie, HbA1c nie jest wiarygodnym markerem i może zaniżać rzeczywisty status glikemii<sup>74</sup>. Zgodnie z wytycznymi praktyki klinicznej KDIGO 2020 (ang. *Kindney Disease Improving Global Outcomes*) w leczeniu cukrzycy w przewlekłej chorobie nerek stosuje się markery uzupełniające, takie jak fruktozamina, opisująca wszystkie glikowane białka osocza lub glikowana albumina<sup>75</sup>. W stadium 5 pacjentów z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializie, glikowana albumina jest stosowana również jako czynnik prognozujący przeżycie lub śmiertelność pacjenta z przyczyn sercowo-naczyniowych<sup>73</sup>. Fruktosamina i glikowana albumina odzwierciedlają średnie stężenie glukozy we krwi w zakresie od dwóch do trzech tygodni, czyli z krótszego okresu czasu niż HbA1c monitorowana na przestrzeni 120 dni. Należy jednak zwrócić uwagę, iż pomiary fruktozaminy i glikowanej albuminy nie są wiarygodne w niektórych stanach fizjologicznych i patologicznych. Każdy stan kliniczny, który może wpływać na metabolizm białek i albumin (np. zespół nerczycowy, którego objawem jest hipalbuminemia, nadczynność tarczycy, terapia glikokortykoidami, marskość wątroby) może wpływać na poziom tych wskaźników<sup>73-75</sup>.

Wspomniane markery kliniczne należą do produktów Amadoriego, a nie AGEs oraz są wykorzystywane do monitorowania skuteczności leczenia i postępu choroby w momencie, gdy choroba jest już w stadium zaawansowanym. Jednak to wśród AGEs doszukuje się markerów, które mogłyby wskazywać na określone stany patologiczne we wczesnym stadium. W badaniach naukowych powszechnie oznaczanym AGE jest karboksymetylolizyna (CML), uważana za biologiczny marker stresu oksydacyjnego *in vivo*. Podwyższony poziom CML wykryto m.in. u pacjentów z nowotworem prostaty<sup>76</sup>, u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi<sup>77</sup>, u pacjentów z cukrzycą i jej komplikacjami<sup>51,78-80</sup>, a także u pacjentów z chorobą Parkinsona lub Alzheimerera<sup>81</sup>. W wielu próbkach klinicznych oznaczany jest także poziom pentozydyny, która może stać się markerem we wczesnej diagnostyce niewydolności nerek<sup>82</sup>. Ponadto, podwyższony poziom tego związku wykryto m.in. u pacjentów z rakiem piersi i płuca<sup>83</sup>, u pacjentów z chorobą wieńcową<sup>84</sup> oraz udowodniono, że wysokie stężenie pentozydyny w surowicy jest związane ze zwiększoną sztywnością i grubością tętnic u pacjentów z cukrzycą typu 2<sup>85</sup>.

W kontekście AGEs, w literaturze pojawia się także określenie toksyczne AGEs (TAGEs), odnoszące się do produktów powstałych z glikoladehydu, gliceraldehydu i acetaldehydu<sup>86</sup>. Uważa się, że odgrywają one ważną rolę w procesach patofizjologicznych. Stwierdzono, iż TAGEs biorą udział w patogenezie retinopatii cukrzycowej i nefropatii, zwłaszcza na wczesnym etapie rozwoju<sup>87,88</sup>. Indukują również apoptozę w komórkach Schwanna i mogą odgrywać kluczową rolę w rozwoju neuropatii cukrzycowej<sup>89</sup>. Ponadto, istnieją dowody na to, że TAGEs odgrywają rolę w patofizjologii zaburzeń, takich jak niealkoholowe/alkoholowe uszkodzenie wątroby i mózgu, choroby sercowo-naczyniowe, choroba Alzheimerera i nowotwory<sup>90-94</sup>.

### 1.5. Metody oznaczania AGEs w próbkach biologicznych

Ze względu na dużą heterogenność produktów glikacji oraz ich właściwości trudne jest opracowywanie metod identyfikacji i detekcji AGEs w materiale biologicznym. Do tej pory nie istnieje żadna znormalizowana metoda uniwersalna dla wszystkich AGEs<sup>12</sup>. Metody identyfikacji i pomiaru AGEs w próbkach biologicznych obejmują metody instrumentalne i immunochemiczne. Do metod instrumentalnych zaliczamy: spektroskopię UV-Vis i fluorescencyjną, chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS) lub z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), wysokosprawną chromatografię

cieczową sprzężoną z detekcją spektroskopową (HPLC) oraz chromatografię powinowactwa na kolumnie z kwasem borowym. Metody immunochemiczne obejmują głównie test immunoenzymatyczny (ELISA), Western blotting oraz techniki immunohistochemicznego barwienia, z użyciem przeciwciał specyficznych dla określonych struktur AGE. Tabela 1 podsumowuje różne metodologie analizy AGEs wraz z ich zaletami i wadami.

Tabela 1. Metody oznaczania AGEs w materiale biologicznym <sup>12,95</sup>

<b>METODA</b>	<b>ZALETY</b>	<b>WADY</b>
<b>Immunohistochemia</b>	Możliwość określenia lokalizacji AGEs w tkankach oraz ich kolokalizacji z RAGE	Niska czułość i powtarzalność
<b>ELISA</b>	Relatywnie krótki czas wykonania, możliwość oznaczania dużej liczby próbek, obecnie metoda najczęściej stosowana	Swoistość przeciwciał często trudna do scharakteryzowania; Ograniczona dostępność swoistych przeciwciał na określone epitopy
<b>Western blotting</b>	Bardzo specyficzna, ekonomiczna	Złożona procedura; nieodpowiednia do ilościowego oznaczania AGEs
<b>HPLC</b>	Pozwala na precyzyjne oznaczenie ilościowe AGEs	Długi czas retencji, konieczność posiadania drogich systemów chromatograficznych
<b>LC-MS/; LC-MS/MS;</b>	Najbardziej dokładna metoda, wysoka czułość	Bardzo droga, konieczność posiadania drogiego sprzętu i odpowiednich umiejętności
<b>Spektroskopia UV-Vis</b>	Szybkie narzędzie do wstępnego monitorowania glikacji	Nieodpowiednia do ilościowego oznaczania AGEs w próbkach biologicznych
<b>Spektroskopia fluorescencyjna</b>	Opłacalna, prosta, szybka i często stosowana metoda oznaczania AGEs	Mało specyficzna, brak możliwości analizy AGEs niefluorescencyjnych
<b>Chromatografia powinowactwa na kolumnie z kwasem borowym</b>	Prosta i wydajna	Niespecyficzne interakcje pomiędzy boronianem a nieuglikowanymi białkami

Ogólnym celem analizy instrumentalnej jest wydzielenie AGEs za pomocą chromatografii i oznaczenie jego ilości przy pomocy detektora światła widzialnego, ultrafioletu, fluorescencji lub analizatora mas na podstawie znanej ilości użytej substancji wzorcowej. Kluczowe czynniki wpływające na instrumentalną analizę AGEs obejmują

etapy wstępnej obróbki badanej próbki, w tym rodzaj zastosowanego roztworu ekstrakcyjnego, sole nieorganiczne/organiczne, pH oraz metody hydrolizy: kwas/zasada lub enzym, temperatura reakcji, czas reakcji, gaz środowiskowy (tlenowy/beztlenowy) i intensywność wytrząsania podczas reakcji. Wszystkie te czynniki wpływają na wynik późniejszej analizy i detekcji. Podczas analizy należy uwzględnić różną wrażliwość odmiennych struktur AGEs na kwasy, zasady, temperaturę i reakcje enzymatyczne stosując wewnętrzne standardy kalibracyjne odpowiednie dla poszczególnych produktów AGEs. Stanowi to duże utrudnienie dla opracowania standardowej procedury wstępnej obróbki próbek do analizy AGEs *in vivo* i w żywności<sup>2</sup>.

LC-MS jest obecnie najdokładniejszą dostępną techniką wykrywania AGEs i produktów Amadoriego. Jest to idealna technika określania tożsamości glikowanych białek, jednak identyfikacja rodzaju modyfikacji jest często trudna ze względu na ograniczone informacje dotyczące struktury możliwych produktów glikacji. Wykorzystanie tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) pozwala na otrzymanie jeszcze dokładniejszych informacji do identyfikacji białek oraz określenia miejsc modyfikacji w sekwencji aminokwasowej analizowanych peptydów. Istnieje jednak ryzyko, że niektóre produkty glikacji mogą zostać pominięte w analizie na skutek koniecznego do zastosowania w tej metodzie etapu trawienia białka. Ponadto, główną wadą techniki LC-MS jest bardzo wysoki koszt sprzętu i analizy, w związku z tym metoda ta jest problematyczna w rutynowym stosowaniu w laboratorium klinicznym<sup>95</sup>.

Precyzyjne ilościowe oznaczenie AGEs w próbkach biologicznych możliwe jest także przy zastosowaniu techniki HPLC. Wcześniej analizy te przeprowadzano przy użyciu układów chromatograficznych z podwójną kolumną lub kolumn jonowymiennych HPLC, które charakteryzują się długim czasem pracy i dużymi wahaniami czasu retencji<sup>95</sup>. Następnie opracowano jednokolumnową metodę RP-HPLC (HPLC z odwróconą fazą) do wykrywania AGEs<sup>96</sup>. Zastosowanie chromatografii z odwróconymi fazami pozwala na uzyskanie satysfakcjonującego rozdziału oraz stabilnych czasów retencji poszczególnych związków. Ograniczeniem tej metody jest możliwość zastosowania tylko do AGEs o znanych strukturach chemicznych. Ponadto, analizy HPLC są czasochłonne i wymagają drogich systemów chromatograficznych<sup>12,95</sup>.

Spektroskopia fluorescencyjna jest jedną z najczęściej stosowanych metod wykrywania i pomiaru poziomu produktów glikacji. Jest to metoda prosta, szybka i

nieinwazyjna. Fluorescencyjne AGEs o charakterystycznym widmie fluorescencyjnym z maksimum przy długości fali 440 nm po wzbudzeniu przy długości fali 370 nm, można wykryć w próbkach krwi, moczu, skórze i soczewce oka. Zastosowanie tej metody wiąże się jednak z pewnymi problemami analitycznymi: (1) spektroskopia fluorescencyjna ogranicza możliwości tylko do oznaczania AGEs o właściwościach fluorescencyjnych; (2) brak specyficzności metody z powodu znacznej interferencji ze strony fluoroforów i produktów utleniania, np. takich jak N-formylokinurenina; (3) bardzo trudna kalibracja ilościowa, ze względu na różne fluorofory przyczyniające się do całkowitego poziomu fluorescencji próbki. Niemniej jednak, metoda ta została wykorzystana do skonstruowania specjalnego urządzenia stosowanego do pomiarów autofluorescencji skóry, ponieważ w badaniach wykazano, że u pacjentów z cukrzycą autofluorescencja skóry jest wyższa niż u ludzi zdrowych. Metoda ta może być stosowana do wstępnego badania przesiewowego i śledzenia postępów procesu glikacji u pacjentów z cukrzycą oraz przewlekłą chorobą nerek<sup>12,95,97,98</sup>.

Oprócz spektroskopii fluorescencyjnej, spektroskopia w zakresie fal UV-Vis może być również stosowana jako wstępne narzędzie do wykrywania produktów glikacji. Chociaż nie jest to odpowiednia metoda do ilościowej oceny AGEs, można ją wykorzystać do badań przesiewowych sprawdzających postęp glikacji. Najczęściej metoda ta jest wykorzystywana do monitorowania zmian właściwości absorpcyjnych białek na skutek glikacji<sup>95,99,100</sup>.

Kolejną metodą instrumentalną używaną do oznaczania AGEs w materiale biologicznym jest chromatografia powinowactwa na kolumnie z kwasem borowym. Technika ta pozwala na wydzielenie glikowanych białek z próbki wykorzystując zdolność do tworzenia stabilnych estrów między kwasem borowym, poprzez reszty 1,2- i 1,3-cis-diolowe, które nie występują w nieglikowanych białkach. Nie jest to metoda specyficzna dla produktów glikacji, gdyż inne związki, zawierające reszty diolowe, mogą wiązać się do kolumny i wpływać na wynik pomiaru<sup>95</sup>.

Niektóre z poznanych AGEs można identyfikować w materiale biologicznym także za pomocą metod immunochemicznych, gdy dostępne są specyficzne dla tych struktur przeciwciała. Techniki te są dobrym narzędziem do oszacowania zawartości AGEs w wielu próbkach klinicznych, jak również umożliwiają określenie lokalizacji AGEs w tkankach (za pomocą barwienia immunohistochemicznego)<sup>101</sup>.



Do najczęściej stosowanych technik immunochemicznych należy test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Ze względu na to, że procedura ta jest stosunkowo prosta, szybka i niedroga oraz nie wymaga specjalnego sprzętu laboratoryjnego, jest powszechnie stosowana do ilościowego oznaczania AGEs w surowicy, osoczu i innych płynach biologicznych lub w żywności. Jednak ze stosowaniem testu ELISA wiążą się pewne problemy: (1) swoistość przeciwciała jest często niecałkowicie scharakteryzowana; (2) zmienne powinowactwo przeciwciała dla różnych uglikowanych białek; (3) różnica między antygenami obecnymi w próbkach fizjologicznych i intensywnie zmodyfikowanymi modelowymi antygenami stosowanymi do wytwarzania przeciwciał. W tym kontekście ocena AGEs za pomocą testu immunoenzymatycznego oparta jest na pomiarze w jednostkach arbitralnych, z normalizacją lub bez normalizacji względem referencyjnego wzorca – modelowego AGE. Rodzajem testu ELISA, pozwalającym na ilościowe oznaczenie AGEs jest test kompetycyjny ELISA. To oznaczanie ilościowe antygenów AGEs w próbkach odbywa się poprzez porównanie spadku absorbancji w obecności badanych próbek ze spadkiem absorbancji w obecności modelowych AGEs służących do wyznaczenia krzywej standardowej. Problemem w tego rodzaju teście jest opracowanie powtarzalnego standardu oraz dopasowanie zakresów krzywej standardowej do poziomów AGEs występujących w próbce<sup>12,95,101</sup>.

Inną metodą immunochemiczną, używaną do identyfikacji określonego AGE w próbkach biologicznych jest Western blotting (WB). Ze względu na wysoką czułość metody (zdolność wykrywania do 0,1 ng białka) technika ta jest skutecznym narzędziem wczesnej diagnostyki. Ponadto, metoda jest wysoce specyficzna dla selektywnego wykrywania docelowego białka w mieszaninie. Mimo to, zdarzają się wyniki fałszywie pozytywne, gdy przeciwciało wykazuje krzyżową reaktywność z innymi epitopami oraz wyniki fałszywie negatywne w przypadku trudności z efektywnym transferem cząsteczek na membranę lub niskiego poziomu detekcji aparatu do obrazowania. Western blotting w porównaniu z ELISA jest bardziej czasochłonny, ale umożliwia jednoczesną detekcję kilku białek, przy odpowiednim doborze przeciwciał<sup>12</sup>.

Metody immunochemiczne wykazują wiele zalet w identyfikacji i oznaczaniu AGEs w różnego rodzaju próbkach, w tym szybkie uzyskanie wyników, możliwość przebadania wielu próbek jednocześnie, wysoka czułość detekcji i prosta procedura. Problem jednak stanowią duże ograniczenia w dostępności odpowiednich swoistych przeciwciał dla poszczególnych produktów glikacji. Istnieje duże zapotrzebowanie na

nowe przeciwciała monoklonalne o dobrze zdefiniowanej specyficzności, umożliwiające stosowanie technik immunoenzymatycznych. Wykrywanie AGEs o znanym epitopie jest kluczowe dla wyjaśnienia związku między procesem glikacji a patogenezą wielu chorób.

## 1.6. Metody syntezy *in vitro* modelowych AGEs

W badaniach naukowych mających na celu poznanie struktur oraz właściwości biochemicznych i biologicznych AGEs, wykorzystuje się modelowe produkty glikacji syntezowane *in vitro*. Ustalono, że tworzeniu AGEs sprzyja lekko zasadowe środowisko, podwyższona temperatura oraz obecność fosforanów<sup>17</sup>. Najczęściej stosowaną metodą syntezy AGEs jest spontaniczna glikacja w roztworze wodnym prowadzona przez kilka tygodni w temp. pok. (RT) lub 37°C. Mieszanina reakcyjna zawiera białko modelowe (lub aminokwas) oraz molowy nadmiar czynnika glikującego<sup>102</sup>. Wadą tej metody jest długi czas trwania reakcji oraz niska wydajność syntezy. W celu przyspieszenia reakcji stosuje się podniesienie temp. do 65°C, jednak nie wpływa to znacząco na zwiększenie wydajności reakcji. Alternatywną metodą jest synteza wysokotemperaturowa w warunkach bezwodnych, która przebiega szybciej i z większą wydajnością<sup>103</sup>. Mieszaninę białka i czynnika glikującego po rozpuszczeniu w wodzie poddaje się liofilizacji, a następnie ogrzewa w piecu w temperaturze powyżej 100°C przez około 30 minut. Poziom uzyskiwanych usieciowanych produktów, częściowo można regulować przez zmianę proporcji użytych do reakcji substratów, długością oraz temperaturą reakcji, jednak często uzyskuje się produkty wysokousieciowane, nierozpuszczalne w wodzie. Innymi metodami stosowanymi do syntezy produktów glikacji są syntezy w roztworze wodnym w środowisku wysokiego ciśnienia<sup>104</sup> lub przy udziale ultradźwięków<sup>105</sup>. Metody te pozwalają na przyspieszenie reakcji w roztworze, zwłaszcza dla białek wrażliwych na wysoką temperaturę.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie nowymi metodami syntezy AGEs, szybszymi, bardziej efektywnymi i z możliwością dokładnej kontroli warunków reakcji. Opracowano procedurę glikacji w roztworze z użyciem mikrofal, co istotnie przyspieszyło syntezę pentozydiny, którą skrócono do 15 minut w porównaniu do 6 godzin syntezy wysokotemperaturowej w roztworze<sup>106</sup>. W naszym zespole została opracowana metoda syntezy AGEs w warunkach bezwodnych w środowisku mikrofal (MW)<sup>107</sup>. Mieszaniny reakcyjne zawierające białko lub aminokwas oraz molowy nadmiar czynnika glikującego

po rozpuszczeniu w wodzie poddaje się liofilizacji i następnie przeprowadza reakcję w reaktorze mikrofalowym w ściśle określonych warunkach syntezy. Metoda ta pozwala na szybkie, wydajne uzyskanie produktów glikacji o różnym stopniu usieciowania oraz na dokładną kontrolę warunków reakcji, co przekłada się na powtarzalność wyników.

Warto zaznaczyć, iż z tych samych substratów, w zależności od zastosowanej metody syntezy powstają AGEs różniące się właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi <sup>104</sup>.

### 1.7. Właściwości nowego produktu glikacji – MAGE

Związki AGEs występujące w organizmie ludzkim stanowią antygeny, które mogą indukować produkcję autoprzeciwciał <sup>95,101</sup>. W poprzednich badaniach ustalono zdolność wiązania przeciwciał ludzkiej surowicy do różnych modelowych produktów glikacji <sup>107,108</sup>. Próbkę surowicy od pacjentów z cukrzycą badano metodą Western blottingu, gdzie potwierdzono obecność autoprzeciwciał reagujących z AGEs wytworzonymi z takich prekursorów jak melibioza i galaktoza, przy czym najbardziej intensywne wiązanie obserwowano dla białka zmodyfikowanego przez melibiozę (MAGE). Modelowy produkt MAGE otrzymano na skutek glikacji mioglobiny i melibiozy w warunkach bezwodnych z wykorzystaniem mikrofal. Wyniki immunoblottingu wykazujące obecność autoprzeciwciał anti-MAGE w surowicy cukrzyków zostały również potwierdzone za pomocą testu ELISA, co pozwoliło na podjęcie dalszych badań prowadzących do charakterystyki tego związku, otrzymania przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych, skierowanych przeciwko produktom glikacji, opartym o białka modelowe zmodyfikowane *in vitro* przez melibiozę. W poprzednich badaniach za pomocą techniki NMR ustalono także strukturę niskocząsteczkowego produktu MAGE (syntezowanego na N-acetylo-lizynie) wskazując na tworzenie mieszaniny izomerów z otwartym łańcuchem i cykliczną formą ugrupowania fruktozaminy <sup>107,109</sup>. Przeprowadzone analizy immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał anti-MAGE pokazały, że występujący naturalnie analog strukturalny MAGE, gromadzi się w różnych tkankach ludzkich i zwierzęcych. Zaobserwowano intensywną reakcję w obrębie mięśni szkieletowych u człowieka, konia, świni, żaby i ryby, w kardiomiocytach u świni, kury i szczura oraz w mięśniach gładkich u świni i szczura. Ponadto, MAGE wykryto w macierzy zewnątrzkomórkowej różnych tkanek zwierzęcych <sup>107</sup>. Dodatkowo, stosując test hamowania ELISA, produkt ten wykryto w surowicy pacjentów z cukrzycą oraz w przypadku powikłań cukrzycowych <sup>110</sup>.

Te badania pokazują, że strukturalny analog modelowego produktu MAGE otrzymanego *in vitro* powstaje i gromadzi się także *in vivo*, jednak pochodzenie, szczegółowa struktura i rola biologiczna tego naturalnego MAGE pozostaje do wyjaśnienia.

## 2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest poznanie nowych, nietypowych produktów glikacji nazwanych MAGE, obecnych w tkankach ludzkich, których syntetyczne analogi wykazują odmienną strukturę od AGEs opisywanych dotąd w literaturze. Założono wyizolowanie naturalnego MAGE z krwi ludzkiej, identyfikację rodzaju białka nośnikowego oraz charakterystykę za pomocą metod spektrometrycznych i immunochemicznych z wykorzystaniem własnych przeciwciał monoklonalnych.

Badania produktu MAGE występującego *in vivo*, a także identyfikacja surowiczych białek, na których obecny jest ten epitop przyczynią się do rozszerzenia naszej wiedzy na temat roli glikacji w organizmie człowieka i mogą dostarczyć w przyszłości nowych celów diagnostycznych oraz terapeutycznych.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Synteza i oczyszczanie produktów zaawansowanej glikacji

##### 3.1.1. Synteza modelowych białkowych AGEs

Do reakcji glikacji wykorzystano mioglobinę z mięśni szkieletowych konia (MB) (Sigma-Aldrich) jako modelowe białko nośnikowe oraz szereg czynników glikujących cukrów i aldehydów, takich jak glukoza (glc) (Serva), fruktoza (fru) (Merck), ryboza (ryb) (Loba-Chemie), laktoza (lac) (Sigma-Aldrich), melibioza (mel) (Sigma-Aldrich), celobioza (cel) (Merck), metyloglioksal (MGO) (Sigma-Aldrich), glioksal (GLX) (Sigma-Aldrich), glikolaldehid (GA) (Sigma-Aldrich) i trans-2-nonenal (T<sub>2</sub>N) (Sigma-Aldrich). Syntezy produktów glikacji przeprowadzono dwoma metodami:

1. tradycyjna synteza w roztworze wodnym (RT) – mieszaniny czynnika glikującego i MB w odpowiednim stosunku molowym (Tabela 2) rozpuszczono w wodzie do końcowej objętości 5 ml i pozostawiono na 21 dni w temp. pok.
2. synteza w warunkach bezwodnych z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego (MW) – analogiczne roztwory mieszanin MB i czynników glikujących zliofilizowano, i poddano reakcji w reaktorze mikrofalowym firmy Biotage Initiator przez 45 min, w temp. 85°C w przypadku cukrów lub przez 15 min w temp. 60°C w przypadku aldehydów. Po reakcji próbki rozpuszczono w 5 ml wody miliQ.

Roztwory po reakcji odwirowano przy 5 000 x g, 15 min w celu pozbycia się nierozpuszczalnego osadu. Supernatanty zawierające mieszaninę rozpuszczalnych produktów glikacji poddano dializie do wody miliQ na filtrach wirówkowych typu Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) z punktem odcięcia 30 kDa w celu oddzielenia nieprzereagowanych substratów (monomeru MB i czynnika glikującego). Następnie próbki zliofilizowano i przechowywano w -20°C.

W celu uzyskania antygenów MAGE na różnych białkach nośnikowych, oprócz MB do reakcji glikacji wykorzystano także: albuminę surowicy wołowej (BSA, Sigma-Aldrich) oraz króliczą immunoglobulinę klasy G (kIgG, Sigma-Aldrich), które poddano glikacji z melibiozą metodą MW jak opisano powyżej. Otrzymane antygeny uzyskane w syntezie z białkami stanowią wysokocząsteczkowe produkty MAGE (HMW-MAGE).

Tabela 2. Warunki syntezy modelowych produktów glikacji

Produkt glikacji	Relacja molowa (MB / czynnik glikujący)	Warunki syntezy
<b>Tradycyjna synteza w roztworze</b>		
MB-mel	1/100	temp. pok. 21 dni
MB-lac		
MB-glc		
MB-cel		
MB-ryb		
MB-fru		
MB-T <sub>2</sub> N	1/8	
MB-MGO	1/8	
MB-GA	10/1	
MB-GLX	10/1	
<b>Synteza w warunkach bezwodnych (MW)</b>		
MB-mel	1/100	85°C, 45 min, 200 Wat, kompresor (+)
MB-lac		
MB-glc		
MB-cel		
MB-ryb		
MB-fru		
MB-T <sub>2</sub> N	1/8	60°C, 15 min, 200 Wat, kompresor (+)
MB-MGO	1/8	
MB-GA	10/1	
MB-GLX	10/1	

### 3.1.2. Synteza niskocząsteczkowego antygeny MAGE (LMW-MAGE)

Równomolową mieszaninę (1:1) pochodnej aminokwasu: N<sub>α</sub>-acetylo-L-lizyny (NAL, Sigma-Aldrich) oraz melibiozy (każdy 35 mmol/l) rozpuszczono w 5 ml wody miliQ i po zamrożeniu w -80°C poddano liofilizacji. Następnie przeprowadzono reakcję glikacji w reaktorze mikrofalowym firmy Biotage Initiator przez 20 min w 60°C przy stałej mocy 200 Wat i z włączonym kompresorem ciśnieniowym. Po reakcji, uzyskane produkty rozdzielano za pomocą chromatografii cieczowej FPLC w celu uzyskania czystego LMW-MAGE.

### 3.1.3. Rozdział LMW-MAGE metodą chromatografii cieczowej

Mieszaninę LMW-MAGE otrzymaną po syntezie (3.1.2) rozdzielano według wcześniej opracowanej i zoptymalizowanej metody <sup>107</sup>, na kolumnie (XK 16/60, GE Healthcare) z żywicą hydroksymetakrylową HW-40S (Toyopearl, Tosoh) w systemie chromatografii cieczowej FPLC (ang. *Fast Protein Liquid Chromatography*; ÄKTA, GE Healthcare) stosując 0,01 M bufor octanu amonu o pH 6,8. Zastosowano szybkość przepływu 0,1 ml/min, monitorując eluowany materiał za pomocą detektora spektrofotometrycznego przy długości fali 225 nm, zbierając frakcje o objętości 1 ml. Materiał odpowiadający poszczególnym frakcjom zmieszano, zamrożono w -80°C i zliofilizowano.

Dodatkowo, próbę we frakcjach zawierających materiał częściowo rozdzielonych na kolumnie HW-40S (widoczne nakładające się piki) związków poddano dalszemu frakcjonowaniu i odsoleniu na kolumnie (XK16/100, Pharmacia) ze złożem Bio-Gel P-2 (Bio-Rad), stosując jako eluent wodę miliQ i szybkość przepływu 0,1 ml/min. Objętość zbieranych frakcji wynosiła 1 ml. Profil elucji wyznaczano monitorując za pomocą spektroskopu przy długości fali 225 nm. Po rozdziale odpowiednie wybrane frakcje połączono. Następnie, materiał zamrożono w -80°C, liofilizowano i zważono w celu ustalenia wydajności syntezy.

## 3.2. Analizy spektroskopowe

### 3.2.1. Właściwości absorpcyjne modelowych białkowych AGEs

Widma absorpcyjne roztworów wodnych modelowych HMW-AGEs powstałych podczas glikacji MB z glc, fru, mel, lac, cel, ryb, GLX, MGO, GA, T<sub>2</sub>N oraz natywnej formy białka nośnikowego (MB) o stężeniu 0,5 mg/ml wykonano na 96-dołkowej płytce kwarcowej, w zakresie UV-Vis przy długości fali 240 – 700 nm na aparacie Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek).

### 3.2.2. Właściwości fluorescencyjne modelowych AGEs oraz LMW-MAGE

Widma fluorescencyjne w zakresie 370 – 500 nm uzyskano za pomocą spektrofluorymetru EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) przy wzbudzeniu falą o długości 350 nm. Pomiaru prowadzono na roztworach wodnych o stężeniu 0,5 mg/ml nakładając na odpowiednią do pomiarów fluorescencji 96-dołkową płytkę po 100 µl/dołek. Widma uzyskano także dla MB, NAL oraz mel.



### 3.2.3. Analiza LC-MS/MS modelowego produktu HMW-MAGE

Analiza LC-MS/MS (ang. *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*) modelowego produktu MAGE została przeprowadzona w ramach stażu w Department of Proteomics and Signal Transduction, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Niemcy.

#### 3.2.3.1. Przygotowanie próbek metodą FASP

Próbki do analizy przygotowano przy użyciu metody FASP (ang. *Filter-Aided Sample Preparation*)<sup>111</sup>. Próbkę MB-mel MW oraz MB (80 µg) rozcieńczono 1:1 w buforze do prób (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM DTT (ditiotretiol), 1,5 % SDS (siarczan dodecyłu sodu)) i inkubowano 10 min w 96°C. Następnie do próbek dodano 250 µl buforu UAD (8 M mocznik, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM DTT) i nałożono na filtr probówkowy (Microcon, Merck Millipore) z punktem odcięcia 30 kDa i wirowano przez 25 min przy 10 000 x g. Próbki przepłukano 6-krotnie buforem UAD, każdorazowo wirując przez 20 min przy 10 000 x g. Kolejno próbki przepłukano 3-krotnie buforem DBD (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM DTT), każdorazowo wirując przez 20 min przy 10 000 x g. Następnie do każdej próbki dodano 80 µl roztworu enzymu Lys-C w buforze DBD (2 µg/80 µl). Trawienie enzymem prowadzono przez noc w 37°C. Następnego dnia próbki odwirowano przez 10 min przy 10 000 x g i dodatkowo przepłukano 2-krotnie buforem DBD (100 i 125 µl), wirując przez 10 min przy 10 000 x g, zbierając eluat po każdym wirowaniu do tej samej próbki.

#### 3.2.3.2. Pomiar stężenia otrzymanych peptydów na podstawie fluorescencji tryptofanu

Stężenie otrzymanych peptydów po trawieniu enzymem Lys-C (3.2.3.1), oznaczono za pomocą pomiaru fluorescencji tryptofanu (test WF)<sup>112</sup>. W tym celu nierozcieńczone mieszaniny peptydów rozpuszczone w buforze DBD nałożono w ilości 250 µl/dołek na białą płytkę 96-dołkową. Jako standardu użyto roztworu tryptofanu o wyjściowym stężeniu 0,1 mg/ml, nakładając na dołek 1 µl i dodając 250 µl buforu DBD. Wyniki znormalizowano wobec próby ślepej (bufor DBD). Pomiar fluorescencji wykonano w temp. 20°C przy wzbudzeniu falą o długości 295 nm i emisji przy 350 nm za pomocą czytnika płytek Infinite 200 (Tecan) wyposażonego w moduł fluorescencyjny. Poszczególne pomiary składały się z 25 odczytów, każdy z czasem integracji 20 µs. Przed

każdym pomiarem płytkę wytrząsano przez 3 sekundy. Każdy odczyt wskazywał bezwzględną ilość tryptofanu wyrażoną masą, na podstawie której wyliczono stężenie uzyskanych peptydów w próbce. Z każdej próbki pobrano 8 µg mieszaniny peptydów i przeprowadzono odsalanie na membranie C18 (3.2.3.3).

#### 3.2.3.3. Przygotowanie próbki i analiza LC-MS/MS

Przed wykonaniem analizy LC-MS/MS próbki przygotowano stosując metodę oczyszczania na membranie C18 (StageTips – „stop and go extraction tips”<sup>113</sup>). W tym celu w plastikowej końcówce od pipety (200 µl) umieszczono 3 warstwy membrany C18 (C18 Empore Disk, 3M). Membranę przepłukano najpierw za pomocą 100 µl metanolu (Sigma-Aldrich), odwirowano przy 2 000 x g, a następnie dodano mieszaninę zawierającą 60 % acetonitryl i 1 % kwas octowy (oba z Sigma-Aldrich) i ponownie odwirowano przy 2 000 x g. Na koniec membranę płukano za pomocą 100 µl 1 % kwasu octowego i odwirowano przy 2 000 x g. Każde wirowanie prowadzono do całkowitego pozbycia się płynu (przez 1-2 min). W celu przygotowania próbki na wypłukaną membranę naniesiono 50 µl 1 % kwasu octowego, roztwór zawierający 8 µg mieszaniny peptydów i uzupełniano dodając 1 % kwasu octowego w objętości 50 µl, a następnie odwirowano przy 2 000 x g do całkowitego pozbycia się płynu. Po dwukrotnym wypłukaniu membrany za pomocą 100 µl 1 % kwasu octowego (wirowanie przez 1-2 min, przy 2 000 x g), peptydy eluowano za pomocą 100 µl mieszaniny zawierającej 60 % acetonitryl i 1 % kwas octowy przez odwirowanie końcówek z membraną do probówek o objętości 0,5 ml, wirując przez 10 min przy 500 x g. Następnie próbki zatężano za pomocą Concentrator Plus (Eppendorf) pod próżnią w temp. 45°C przez 30-40 min, do uzyskania ostatecznej objętości 10 µl. Mieszaninę analizowano za pomocą systemu LC-MS/MS (LTQ Orbitrap, Thermo Scientific), według wcześniej opisanej metody<sup>114</sup>.

#### 3.2.3.4. Analiza danych proteomicznych

Do analizy danych LC-MS/MS oraz identyfikacji i ilościowego oznaczenia utworzonych produktów MAGE (powstałych w reakcji glikacji MB z mel) zastosowano program MaxQuant z wyszukiwarką Andromeda. Analizę oparto na identyfikacji masy monoizotopowej melibiozy (324,106 Da, określonej na podstawie wzoru strukturalnego). Wyszukiwano modyfikacje aminokwasów (Lys, Arg, His) w peptydach uzyskanych po trawieniu enzymem Lys-C. Wyniki przedstawiono w postaci modelu cząsteczki

mioglobiny z zaznaczonymi miejscami modyfikacji przez melibiozę, wykonanego za pomocą programu Chimera 1.14 (RBVI).

#### 3.2.4. Identyfikacja białek krwi ludzkiej modyfikowanych do HMW-MAGE za pomocą chromatografii cieczonej sprzężonej ze spektrometrią mas

Analizy zostały wykonane w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Wyizolowane z krwi ludzkiej białka rozdzielono w żelu poliakrylamidowym i wybarwiono (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.5.1). Po wysuszeniu wyciętych kawałków żelu zawarte w nich białka zredukowano za pomocą 10 mM DTT, zalkilowano przy użyciu 50 mM jodoacetamidu i trawiono trypsyną w 37°C przez noc. Powstałe peptydy wyekstrahowano z żelu za pomocą 0,1% TFA (kwas trifluorooctowy) zawierającego 2 % acetonitrylu. Rozdział oraz identyfikację uzyskanych peptydów przeprowadzono za pomocą chromatografu cieczonego sprzężonego ze spektrometrem masowym Orbitrap (Thermo Scientific). Następnie porównano uzyskane masy peptydów z bazą danych sekwencji białkowych UniProt przy pomocy programu MASCOT.

### 3.3. Produkcja przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE

#### 3.3.1. Selekcja pojedynczych klonów komórek hybrydowych

Do wyselekcjonowania pojedynczego klonu komórek hybrydowych produkującego przeciwciała anti-MAGE wykorzystano metodę seryjnych rozcieńczeń. Komórki hybrydowe po fuzji mysich splenocytów (uzyskanych po immunizacji myszy Balb/c produktami MAGEs) z komórkami szpiczaka SP2/0<sup>110</sup> rozsiano na płytkę 96-dołkową w ilości 1 komórka/dołek. Medium z hodowli komórek testowano metodą ELISA (3.5.2) na płytce opłaszczonej MB-mel MW (uzyskany w 3.1.1) oraz jako kontrolę negatywną wykorzystano białko nośnikowe MB oraz BSA, immobilizowane na płytce podobnie jak produkt glikacji. Do kolejnego etapu wybrano losowo 5 dołków wykazujących wysoki poziom reaktywności z antygenem MAGE (MB-mel MW) w teście ELISA oraz brak reakcji z białkami kontrolnymi MB i BSA. Odpowiadające tym dołkom komórki ponownie przesiano na płytkę 96-dołkową w ilości 1 komórka/dołek, potwierdzając obecność pojedynczych kolonii przez obserwację pod mikroskopem świetlnym (MW50, Opta-Tech). Do testów ELISA wykorzystano także antygeny BSA-mel i kIgG-mel (uzyskane w 3.1.1)

oraz białka nośnikowe BSA i kIgG. Po kilkukrotnej selekcji (4 rozklonowania) wyselekcjonowany klon komórek hybrydowych, wykazujący w teście ELISA wysoką aktywność wobec antygenów MAGE, rozpropagowano hodując w butelce do hodowli komórek adherentnych w medium RPMI 1640 + HEPES zawierającym 10 % FBS (płodowa surowica cielęca), 2 mM L-glutamina, 1 % penicylina/streptomycyna, 1 mM pirogronian sodu, 2 % hipoksantyna/tymidyna, 50  $\mu$ M  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ -ME). Hodowle prowadzono w temp. 37°C przy 5 % CO<sub>2</sub>. Medium z hodowanych komórek hybrydowych, zawierające wydzielane przez komórki przeciwciała, po zebraniu z butelki i zwirowaniu komórek przy 150 x g, 5 min, 21°C było bezpośrednio wykorzystywane do późniejszych eksperymentów lub służyło jako materiał do izolacji czystych przeciwciał anti-MAGE.

### 3.3.2. Optymalizacja hodowli komórek hybrydowych

W celu podniesienia wydajności oczyszczania przeciwciał anti-MAGE przeprowadzono optymalizację warunków hodowli wyselekcjonowanych klonów komórek hybrydowych. Komórki posiano na płytce 6-dołkowej w ilości 500 tys. kom/dołek, w medium hodowlanym zawierającym różne stężenia FBS, w zakresie od 2 – 10 %. Hodowle prowadzono przez 2 tygodnie wymieniając medium co drugi dzień. Po tym czasie, komórki oderwano od podłoża za pomocą skrobaczki i dokładnie wymieszano. Następnie do pobranej próbki zawiesiny komórek dodano barwnik Trypan Blue (Sigma-Aldrich), i policzono komórki za pomocą licznika TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad). Komórki ponownie posiano na płytce 6-dołkowej w ilości 500 tys. kom/dołek, w medium hodowlanym zawierającym odpowiednie stężenia FBS i hodowano jak opisano powyżej przez kolejne 7 dni. Po 14 i kolejnych 7 dniach hodowli, uzyskany po odwirowaniu (150 x g, 5 min, 21°C) komórek supernatant medium hodowlanego zawierający przeciwciała anti-MAGE testowano metodą ELISA (rozdział 3.5.2). Na podstawie szeregu rozcieńczeń (1 – 128 razy w PBS) określono aktywność produkowanych przeciwciał w poszczególnych hodowlach.

Optymalny skład medium do dalszej produkcji przeciwciał ustalono na podstawie najwyższej aktywności oraz żywotności hodowanych komórek hybrydowych. Następnie przystosowano właściwą hodowlę klonów *in vitro* do wybranego stężenia FBS w medium hodowlanym, poprzez hodowlę komórek w medium o odpowiednim składzie do uzyskania konfluentnej hodowli. Tak prowadzoną hodowlę monitorowano pod mikroskopem, celem sprawdzania żywotności komórek oraz regularnie wykonywano test ELISA (3.5.2) w celu monitorowania reaktywności przeciwciał produkowanych przez komórki hybrydowe.

### 3.4. Oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa

#### 3.4.1. Przygotowanie kolumny powinowactwa

Pracując po wyciąganiu, 100 ml złoża Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich) wypłukano na lejku ze spiekami z użyciem próżni najpierw  $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$  (2 l), a następnie 0,1 M buforem węglanowym o pH 10,0 (1,5 l). Na koniec złoże zawieszono dodając tę samą objętość buforu (1:1). Po ustabilizowaniu pH do wartości 10-11 za pomocą 4 M NaOH, do zawiesiny stopniowo dodano 10 g CNBr (Sigma-Aldrich) mieszając na mieszadle magnetycznym i utrzymując pH 10-11. Po dodatkowej inkubacji przez 25 min w temp. pok. złoże płukano za pomocą 0,1 M buforu węglanowego (2 l) oraz  $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$  (2 l) na lejku ze spiekami pod próżnią. Aktywowane złoże (CNBr-Sepharose) zawieszono w  $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$  w objętości 1:1 i przechowywano w 4°C.

Aktywność złoża sprawdzono poprzez immobilizację 15 mg BSA do 1,5 ml złoża (10 mg/ml złoża). Wiązanie białka przeprowadzono w 0,1 M buforze wodorowęglanowym pH 8,3 przez 2 godz. w temp. pok., a następnie przez noc w 4°C, na rotatorze (Multi Bio RS-24, BioSan). Po reakcji złoże odwirowano i na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 280 nm (za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11FX) z prawa Lambert-Beera wyznaczono stężenie białka pozostałego w roztworze:

$$A = \alpha Cl \rightarrow C = \frac{A}{\alpha l}$$

A – absorbancja – 0,004

$\alpha$  – właściwy masowy współczynnik absorpcji [ $\text{dm}^3/(\text{g}\cdot\text{cm})$ ] – dla BSA wynosi 0,667  $\text{dm}^3/(\text{g}\cdot\text{cm})$

C – stężenie [ $\text{g}/\text{dm}^3$  lub  $\text{mg}/\text{ml}$ ]

l – grubość warstwy absorbującej [cm] – 1 cm

Po wyliczeniach otrzymano stężenie BSA:  $C = 0,006 \text{ mg}/\text{ml}$ .

W celu immobilizacji antygeny HMW-MAGE, do 1 ml złoża CNBr-Sepharose zawieszono w 0,1 M buforze wodorowęglanowym o pH 8,3 dodano 8 mg MB-mel (synteza MW jak 3.1.1). Zawiesinę inkubowano przez 24 godz. w temp. 4°C na rotatorze. Następnie nieprzereagowane grupy -CN blokowano przez inkubację z 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 przez 2 godz. w temp. pok. na rotatorze. Po inkubacji płukano złoże trzykrotnie naprzemiennie: 0,1 M buforem octanowym pH 4,0 i 0,1 M Tris-HCl/0,5 M NaCl pH 8,0.

Na koniec złoże wypłukano 4-krotnie PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) każdorazowo po 30 ml i przechowywano w 4°C jako zawiesinę w PBS z dodatkiem 0,02 % azydku sodu.

Efektywność immobilizacji antygeny MAGE do złoża sprawdzono testując obecność MB-mel w roztworze znad złoża za pomocą SDS-PAGE (3.5.1). Dodatkowo sprawdzono także zdolność złoża Sepharose-MAGE do wiązania przeciwciał anti-MAGE. W tym celu wykonano test hamowania ELISA (zgodnie z 3.5.3). Przygotowane złoże (30 ml) zawieszono w PBS i upakowano w szklanej kolumnie metodą grawitacyjną.

#### 3.4.2. Optymalizacja rozdziału na kolumnie powinowactwa i oczyszczanie przeciwciał anti-MAGE

W celu ustalenia optymalnych warunków efektywnego i powtarzalnego oczyszczania przeciwciał anti-MAGE na złożu Sepharose-MAGE, przetestowano roztwór 1 M NaCl i 3 M KSCN jako eluent. Przeciwciała anti-MAGE w medium zebranych z komórek hybrydowych hodowanych w obecności 2 % FBS nanoszono na złoże (10 ml), które następnie płukano roztworem PBS (2 objętości kolumny). Elucję zaadsorbowanych na złożu przeciwciał wykonano dwoma sposobami: 1) płuczając najpierw 1 M NaCl (7 ml), następnie tą samą objętością 3 M KSCN lub 2) jednoetapowo wypłukując złoże 3 M KSCN (7 ml). Eluowany z kolumny materiał zbierany jako 1 ml porcje monitorowano na obecność białka przez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11FX, a następnie połączono we frakcje odpowiednio z elucji PBS, NaCl i KSCN. Materiał eluowany w PBS został zagęszczony do końcowej objętości 150 µl na filtrach wirówkowych typu Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) z punktem odcięcia 30 kDa (5 000 x g, 20 min). Frakcje eluowane w NaCl i KSCN zostały dodatkowo wydializowane do PBS na tych samych filtrach. W zebranych frakcjach oznaczano stężenie białka przy użyciu Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific), a następnie za pomocą SDS-PAGE (3.5.1) i ELISA (3.5.2) określono obecność oraz aktywność oczyszczonych przeciwciał.

W optymalnej procedurze oczyszczania przeciwciał anti-MAGE zrezygnowano z elucji 1M NaCl. Medium z hodowli komórek hybrydowych nanoszono na kolumnę powinowactwa z przyłączonym antygenem MAGE. Po wypłukaniu kolumny podwójną objętością PBS, związane przeciwciała wypłukiwano za pomocą 3M KSCN (5 ml), a zbierane 1 ml porcje monitorowano przez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm.

Odpowiednie frakcje eluowane PBS zostały zagęszczone, a eluowane KSCN dodatkowo wydziałowane do PBS na filtrach wirówkowych jak opisano wyżej. Oczyszczone przeciwciała zmieszano z glicerolem do końcowego stężenia 50 % i przechowywano w -20°C.

### 3.5. Analizy immunochemiczne i biochemiczne

#### 3.5.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) i Western blotting

Próbki roztworów białek przeznaczone do analizy SDS-PAGE rozcieńczono 1:1 w buforze Laemmli (Bio-Rad) lub w buforze Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer (Thermo Scientific) z dodatkiem 100 mM  $\beta$ -ME i denaturowano przez inkubację w 100°C przez 5 min. Następnie porcje próbki (2 – 30  $\mu$ g/dołek) nanoszono na żel poliakrylamidowy złożony z 4 % żelu zagęszczającego i 12 % lub 10 % żelu rozdzielającego. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy stałym napięciu 100 V, przez 60-90 min w aparacie Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Żel po elektroforezie barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue (3 mM błękit Coomassie, (v/v) 40 % metanol, 10 % kwas octowy) lub odczynnikiem Quick Coomassie Protein Stain (ProteinArk). Wyniki obrazowano w systemie do detekcji i analiz żeli i blotów GelDoc XR (Bio-Rad) lub PXi Touch (SYNGENE).

Do Western blottingu białka rozdzielone w żelu poliakrylamidowym przetransferowano na membranę PVDF (0,45  $\mu$ m, Immobilon-P Transfer Membrane PVDF, Merck-Millipore) za pomocą aparatu Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Transfer prowadzono przez 1 godz. przy stałym napięciu prądu 100 V. Następnie membranę blokowano w roztworze 5 % sproszkowanego mleka odtłuszczonego (SM Gostyń) w TBS-T (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 7,4 z dodatkiem 0,05 % Tween-20) przez 1 godz. w temp. pok. lub przez noc w 4°C. Po 3-krotnym przepłukaniu w TBS-T membranę inkubowano przez 2 godz. w temp. pok. z przeciwciałami: kozie anty-ludzkie IgG-HRP (Abcam), rozcieńczenie 1:15 000 (jednostopniowo, bez przeciwciał II-rzędowych); kozie anty-ludzkie IgA-HRP (Abcam), rozcieńczenie 1:15 000 (jednostopniowo, bez przeciwciał II-rzędowych); królicze anty-HSA (albumina surowicy ludzkiej, ThermoFisher Scientific), rozcieńczenie 1:5 000; lub z medium hodowlanym z komórek hybrydowych zawierającym mysie przeciwciała monoklonalne anty-MAGE przez noc w 4°C. Następnie nadmiar przeciwciał z membrany odpłukano 3-krotnie roztworem TBS-T i inkubowano przez 1,5

godz. w temp. pok. z rozcieńczonymi w PBS przeciwciałami II-rzędowymi odpowiednio: anti-królicze IgG-HRP (Abcam), rozcieńczone 1:2 000 (do przeciwciał anti-HSA) lub kozie anti-mysie IgE-HRP (Acris) (do przeciwciał anti-MAGE), rozcieńczone 1:5 000. Nadmiar przeciwciał odpłukano 5-krotnie TBS-T i wywołano za pomocą roztworu 4-chloronaftolu (Sigma-Aldrich) (0,02 mM 4-chloro-1-naftol w PBS, 10% (v/v) metanol) lub roztworem do chemiluminescencji (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Wyniki obrazowano w systemie do detekcji i analizy żeli i blotów GelDoc XR (Bio-Rad) lub PXi Touch (SYNGENE).

### 3.5.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Test wykonano na płytkach 96-dołkowych z immobilizowanym MAGE (0,5 µg/dołek). W tym celu roztwór białka (100 µl/dołek) w 0,1 M buforze węglanowym, pH 9,6 inkubowano przez noc w 4°C. Kontrolne dołki opłaszczono białkami nośnikowymi wykorzystanymi do syntezy produktów glikacji (MB, BSA, kIgG). Płytki następnie trzykrotnie przepłukano roztworem TBS-T i blokowano 5 % roztworem sproszkowanego mleka odtłuszczonego (SM Gostyń) w TBS-T przez 1 godz. w temp. pok. Następnie dołki płukano 3-krotnie TBS-T i nakładano 50 µl/dołek medium bezpośrednio z hodowli komórek hybrydowych produkujących przeciwciała anti-MAGE, po jego rozcieńczeniu w PBS lub czyste przeciwciała anti-MAGE w serii rozcieńczeń (100 µl/dołek). Każdy punkt z rozcieńczenia nakładany był w 3 powtórzeniach na płytkę inkubowaną przez noc w 4°C. Następnie, po 3-krotnym przepłukaniu TBS-T nałożono przeciwciała drugorzędowe: kozie poliklonalne anti-mysie Igs-HRP (Dako), reagujące ze wszystkimi klasami mysich immunoglobulin, rozcieńczone 1:2 000 w PBS lub kozie przeciwciała anti-mysie-IgG-HRP (Novus) rozcieńczone 1:5 000, kozie anti-mysie-IgE-HRP (Acris) rozcieńczone 1:5 000, każdorazowo w ilości 100 µl/dołek. Po 2 godz. inkubacji w temp. pok. nadmiar przeciwciał odpłukano roztworem TBS-T, a następnie wywołano reakcję za pomocą 100 µl/dołek roztworu wywołującego zawierającego bufor cytrynianowy pH 4,5 (0,1 M kwas cytrynowy, 0,1 M cytrynian sodu), 1,5 mg/ml *orto*-fenylenodiaminy (OPD) (Sigma-Aldrich), 0,03 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich). Reakcję prowadzono przez 10 min w ciemni, a następnie przerwano dodając 40 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/dołek). Intensywność barwy roztworu zmierzono spektrofotometrem Synergy HT (Bio-Tek) przy długości fali 490 nm. Przedstawione wyniki znormalizowano przez odjęcie absorbancji dla próbki kontrolnej przeciwciał drugorzędowych, gdzie zamiast przeciwciał I-rzędowych nałożono na dołek PBS.



### 3.5.3. Testy hamowania ELISA

Płytkę 96-dołkową opłaszczano przez 4 godz. w temp. pok. nakładając po 0,5 µg/dołek antygeny MAGE (MB-mel MW) w 100 µl buforu węglanowego pH 9,6. Następnie, dołki trzykrotnie płukano TBS-T i blokowano 5 % roztworem sproszkowanego mleka odtłuszczonego w TBS-T. Równoległe przygotowano szereg rozcieńczeń testowanych produktów glikacji HMW-MAGE, LMW-MAGE oraz wyjściowych substratów MB, NAL i mel w 105 µl PBS. Do próbek dodano 105 µl roztworu oczyszczonych przeciwciał anti-MAGE rozcieńczonych 1:125 w PBS, tak by ich końcowe rozcieńczenie w dołku wynosiło 1:250. Mieszaniny inkubowano w probówkach przez 2 godz. w temp. pok., a następnie nakładano na płytkę w ilości 100 µl/dołek w 2 powtórzeniach. W teście zastosowano kontrolę pozytywną (100 % reakcji), gdzie na dołki nałożono przeciwciała anti-MAGE w rozcieńczeniu 1:250 w PBS, bez dodatku inhibitorów. Płytkę inkubowano przez 1,5 godz. w temp. pok., a następnie przez noc w 4°C. Po trzykrotnym wypłukaniu płytki roztworem TBS-T naniesiono 100 µl/dołek kozich przeciwciał anti-mysie IgE-HRP (Acris) rozcieńczonych w PBS 1:5 000. Płytkę inkubowano 2 godz. w temp. pok., a następnie trzykrotnie przepłukano TBS-T. Reakcję wywołano przez dodanie 100 µl/dołek roztworu wywołującego OPD. Reakcję wywoływano przez 10 min w ciemni i zahamowano przez dodanie 50 µl/dołek 40 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intensywność barwy zmierzono spektrofotometrem Synergy HT (Bio-Tek) odczytując absorbancję przy długości fali 490 nm. Wyniki znormalizowano przez odjęcie absorbancji dla próbki kontroli negatywnej, gdzie do dołka dodano PBS zamiast przeciwciał I-rzędowych. Wyniki podano jako stosunek B/B<sub>0</sub>, gdzie B to absorbancja próbki z inhibitorem, a B<sub>0</sub> to absorbancja kontroli pozytywnej bez inhibitora (100 % reakcji).

Inny wariant testu hamowania ELISA wykorzystano do potwierdzenia aktywności adsorpcji przeciwciał anti-MAGE do złoża Sepharose-MAGE. W tym celu, 150 µl medium z hodowli komórek hybrydowych zawierających przeciwciała anti-MAGE najpierw zmieszano w probówce z Sepharose-MAGE (100 µl). Inkubowano przez 3 godz. w temp. pok. na rotatorze. Następnie złożo odwirowano (1 000 x g, 1 min, temp. 21°C), a zebrany supernatant naniesiono na płytkę (65 µl/dołek) z immobilizowanym MAGE (opłaszczanie jak opisano wyżej). Płytkę inkubowano przez noc w 4°C, po czym trzykrotnie przepłukano TBS-T. Dalsze etapy inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi oraz wywołanie reakcji wykonano podobnie jak opisano dla pierwszego wariantu testu

hamowania. Wyniki podano jako stosunek  $B/B_0$ , gdzie  $B$  to absorbancja próbki z inhibitorem, a  $B_0$  to absorbancja kontroli pozytywnej bez inhibitora (100 % reakcji).

#### 3.5.4. Określenie klasy przeciwciał monoklonalnych

Klasę przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE ustalono za pomocą testu paskowego Rapid Mouse Isotyping Kit (nr kat. LFM-ISO-1-5, RayBiotech Inc.), według instrukcji producenta. Na każdy pasek nałożono po 20  $\mu$ l medium z hodowli komórek hybrydowych zawierającego przeciwciała anti-MAGE. Paski pozostawiono w temp. pok. do rozwinięcia reakcji i po 30 minutach odczytano wyniki. Wykorzystany zestaw testowy zawierał trzy rodzaje pasków: pasek czerwony pozwalał na rozpoznanie mysich IgG1, a także podklas  $\lambda$  i  $\kappa$  łańcuchów lekkich przeciwciał; pasek zielony pozwalał na identyfikację mysich przeciwciał IgG – klasy 1, 2a, 2b lub 3, a pasek żółty na detekcję łańcucha ciężkiego mysich przeciwciał klasy A, D, E lub M.

#### 3.5.5. Immunoprecypitacja białek z surowicy ludzkiej

Analog produktu MAGE naturalnie występujący we krwi ludzkiej izolowano z materiału pobranego od pacjentów z cukrzycą leczonych w Klinice Angiologii, Diabetologii i Nadciśnienia Tętniczego we Wrocławiu oraz od honorowych dawców krwi z Wojskowego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu (na podstawie zgody Komisji Bioetycznej nr KB-770/2018, KB-384/2012). Obecność antygeny MAGE w testowanych surowicach cukrzyków została uprzednio potwierdzona testem hamowania ELISA<sup>110</sup>. Izolację MAGE przeprowadzono za pomocą oczyszczonych mysich przeciwciał anti-MAGE używając zestawu Pierce Direct IP Kit (Thermo Scientific). Procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Na każdą próbę pobrano 20  $\mu$ l złoża, do którego dodano 8  $\mu$ g przeciwciał anti-MAGE. Mieszaninę inkubowano przez 2 godz. w temp. pok. na wytrząsarce (BioSan) przy niskich obrotach. Po wypłukaniu złoża buforem dołączonym do zestawu, dodano próbkę (zawierającą 1 mg białka) surowicy, zmieszanej od kilku pacjentów lub osocze krwi. Jako kontrolę negatywną zastosowano złoże wyblokowane roztworem z zestawu, bez przyłączonych przeciwciał anti-MAGE. Próbki inkubowano przez 2 godz. w temp. pok. na wytrząsarce przy wolnych obrotach, a następnie przez noc w 4°C. Po odpowiednim przepłukaniu złoża zgodnie z instrukcją związany do przeciwciał MAGE wymywano dołączonym do zestawu roztworem do elucji (25-75  $\mu$ l). Uzyskane próbki przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

## 4. Wyniki

### 4.1. Uzyskanie modelowych białkowych AGEs

#### 4.1.1. Glikacja modelowych białek w warunkach konwencjonalnych i bezwodnych

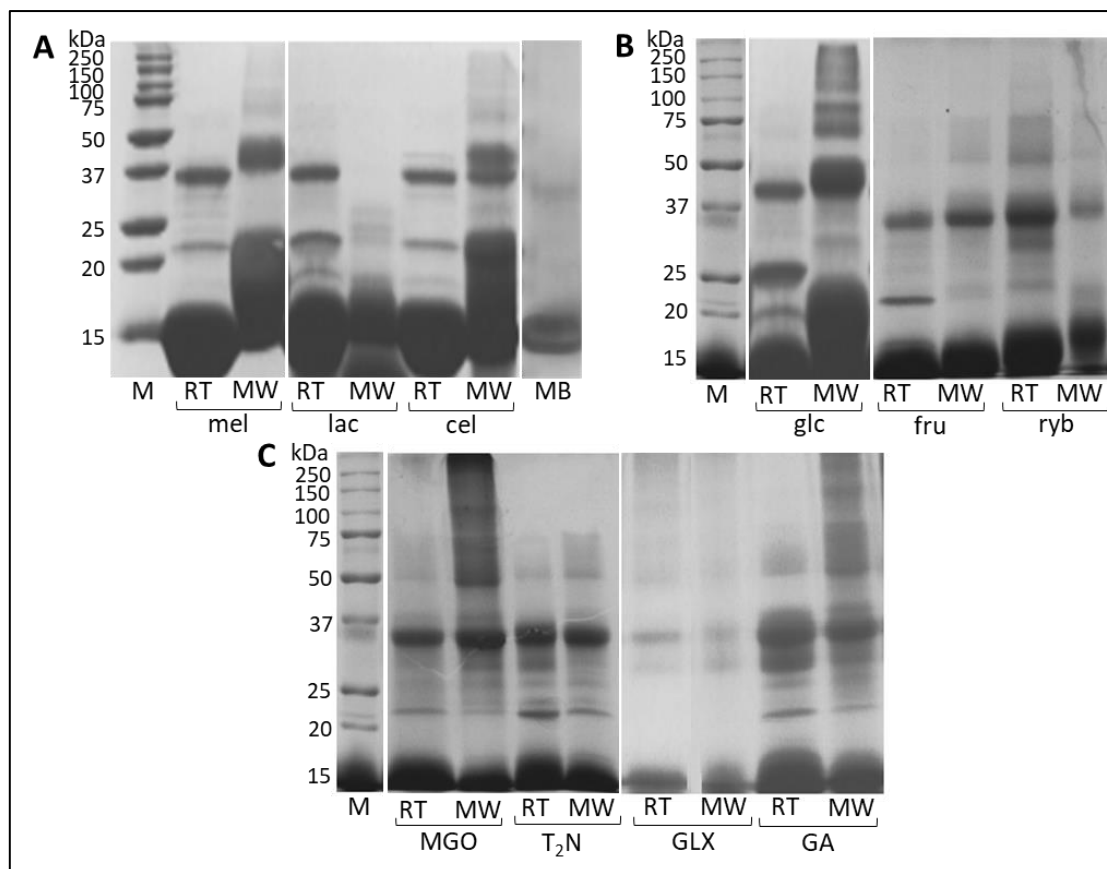
Po reakcji glikacji białka modelowego z szeregiem czynników glikujących (3.1.1) i odwirowaniu powstałego osadu próbki dializowano do wody miliQ. Zebrany supernatant zliofilizowano i zważono. Charakterystykę otrzymanych próbek oraz wydajność glikacji w odniesieniu do masy wyjściowego białka przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Wydajność syntezy modelowych AGEs

Nazwa	Masa końcowa [mg]	Wydajność syntezy [%]
<b>Synteza w warunkach wodnych w temp. pok. (RT)</b>		
MB-mel	24,8	49,6
MB-lac	5,9	11,8
MB-glc	1,3	2,6
MB-cel	12,8	25,6
MB-ryb	24,9	49,8
MB-fru	5,9	11,8
MB-T <sub>2</sub> N	9,9	19,8
MB-MGO	29,5	59,0
MB-GA	8,4	16,8
MB-GLX	7,5	15,0
<b>Synteza w warunkach bezwodnych (MW)</b>		
MB-mel	19,9	39,8
MB-lac	10,2	20,4
MB-glc	15,4	30,8
MB-cel	12,9	25,8
MB-ryb	9,2	18,4
MB-fru	19,7	39,4
MB-T <sub>2</sub> N	20,4	40,8
MB-MGO	17,9	35,8
MB-GA	18,9	37,8
MB-GLX	15,6	31,2

MB – mioglobina; mel – melibioza; glc – glukoza; lac – laktoza; cel – celobioza; fru – fruktoza; ryb – ryboza; T<sub>2</sub>N – trans-2-nonenal; MGO – metyloglioksal; GA – glikoaldehyd; GLX – glioksal; Wydajność syntezy wyliczona w stosunku do masy użytego białka

Uzyskane produkty glikacji analizowano metodą SDS-PAGE (3.5.1) w 12 % żelu poliakrylamidowym, nakładając 30 µg produktu/dołek. Żele po elektroforezie wybarwiono za pomocą Coomassie Brilliant Blue (Rys. 7).

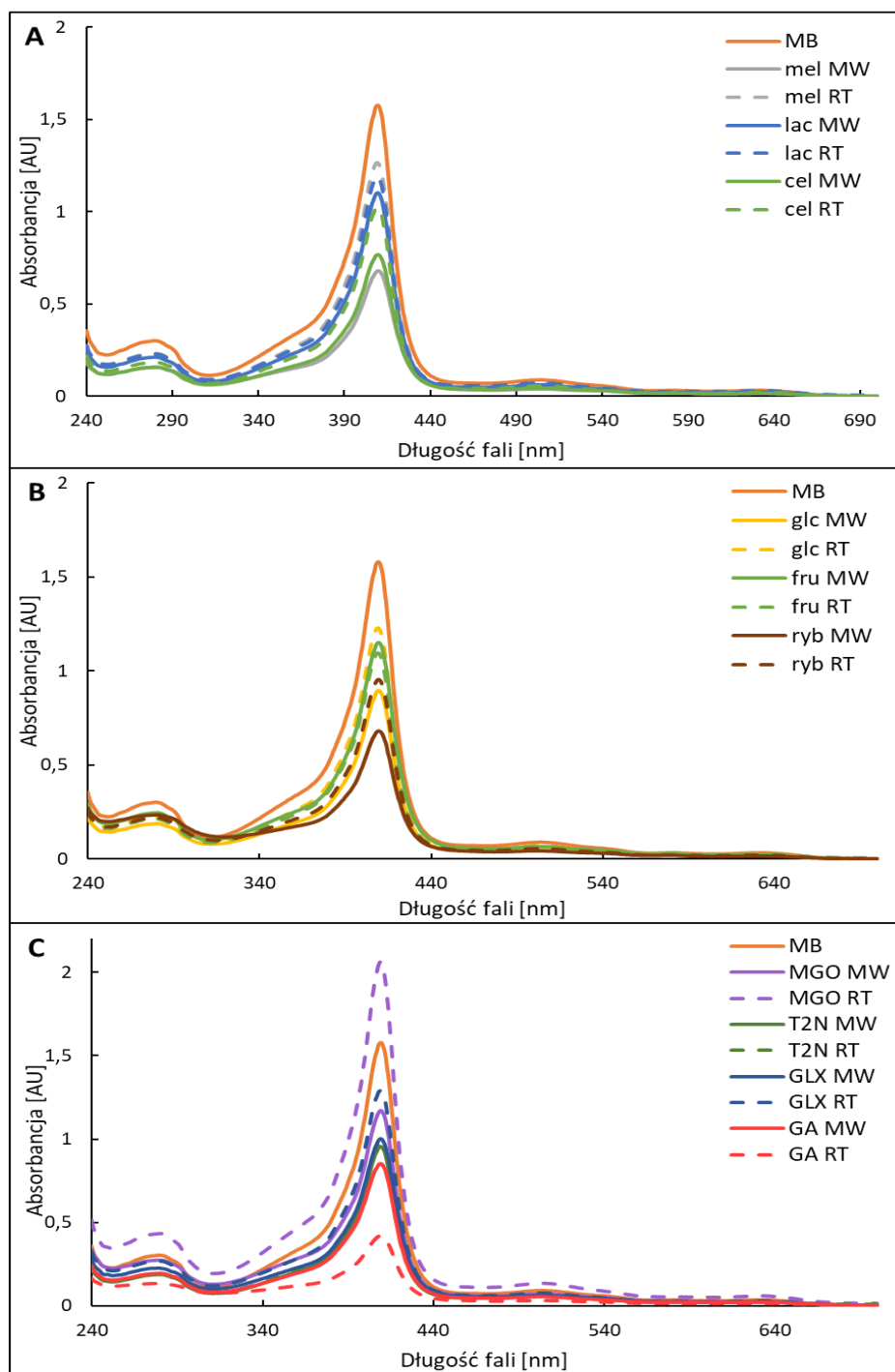


Rys. 7. SDS-PAGE modelowych AGEs syntezowanych metodą tradycyjną (RT) i mikrofalową (MW) z MB w reakcji z A) mel, lac, cel; B) glc, fru, ryb; C) MGO, T<sub>2</sub>N, GLX i GA. Na żel nakładano M – marker i odpowiednio po 30 µg każdego z AGE oraz 12 µg MB

Otrzymane wyniki wskazują na obecność w każdym preparacie mieszaniny związków o różnej masie cząsteczkowej. Na skutek glikacji MB z większością czynników glikujących (mel, cel, glc, fru, MGO oraz GA) w warunkach bezwodnych (MW) uzyskano produkty o wyższym stopniu usieciowania i wyższej masie cząsteczkowej w porównaniu z metodą tradycyjną (RT). W produkcie otrzymanym z T<sub>2</sub>N można zaobserwować, iż w syntezie tradycyjnej w większej ilości wytworzyły się związki o niższej masie cząsteczkowej, natomiast glikacja w warunkach bezwodnych promowała związki o wysokim stopniu usieciowania. W przypadku glikacji glioksałem nie widać było wyraźnej różnicy w usieciowaniu otrzymanych produktów uzyskanych różnymi metodami syntezy.

## 4.1.2. Właściwości absorpcyjne modelowych AGEs

W celu dalszej charakterystyki otrzymanych związków AGE wykonano widma absorpcyjne w zakresie fal UV-Vis od 240 do 700 nm dla związków otrzymanych metodą mikrofalową oraz tradycyjną (Rys. 8).



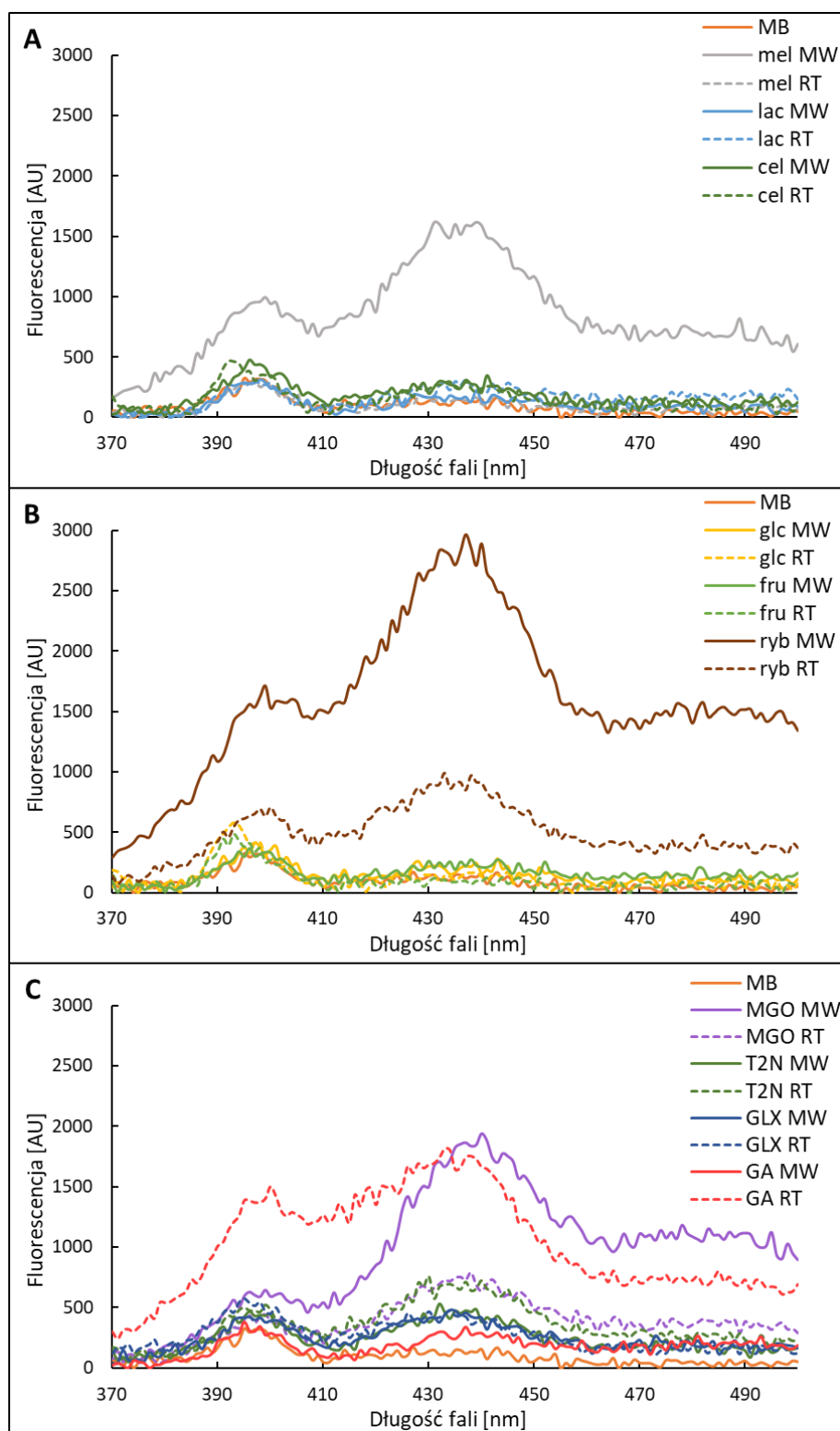
Rys. 8 Widma absorpcyjne w zakresie fal UV-Vis (240-700 nm) białkowych AGEs otrzymanych metodą mikrofalową (MW) i tradycyjną (RT) zebrane dla wodnych roztworów o stężeniu 0,5 mg/ml. Przedstawiono produkty uzyskane z MB w reakcji z A) dwucukrami mel, lac, cel, B) monocukrami glc, fru, ryb i C) aldehydami MGO, T<sub>2</sub>N, GLX, GA

Charakterystyczne maksimum absorpcji dla wszystkich związków obserwowano przy długości fali około 400 nm, co odpowiada właściwościom natywnej MB<sup>115</sup>. Nie zaobserwowano wyraźnego maksimum unikalnego dla badanych produktów glikacji. Najwyższą intensywność absorpcji w badanym zakresie długości fal wykazywała niemodyfikowana MB (1,5 AU), a modyfikacja białka większością użytych czynników glikujących powodowała obniżenie absorpcji przy 400 nm. Produkty powstałe z melibiozy podobnie jak większość badanych AGEs w umiarkowanym stopniu zmniejszały absorpcję charakterystyczną dla MB. Wyjątek stanowił produkt MB-MGO, uzyskany metodą tradycyjną, który wykazywał wyższą absorpcję w podanym maksimum w porównaniu do białka nośnikowego oraz pozostałych produktów. Produkty powstałe na MB z glikolaldehydu wykazywały najmniej intensywną absorpcję przy 400 nm, sugerując, że obecne w tym preparacie struktury AGEs są odmienne od pozostałych AGEs powstałych z innych substratów.

#### 4.1.3. Właściwości fluorescencyjne modelowych AGEs

W literaturze wskazuje się na charakterystyczną fluorescencję AGEs po wzbudzeniu światłem w zakresie 350 – 390 nm, dlatego w celu porównania właściwości fizykochemicznych modelowych AGEs otrzymanych metodą mikrofalową w warunkach bezwodnych (MW) oraz tradycyjną glikacją w roztworze (RT) wykonano widma fluorescencyjne roztworów AGEs o stężeniu 0,5 mg/ml. Po wzbudzeniu próbek światłem o długości fali 350 nm rejestrowano widmo emisyjne w zakresie 370 – 500 nm (Rys. 9).

Podczas analizy widm fluorescencji zaobserwowano, że większość modelowych HMW-AGEs wykazuje podobne właściwości fluorescencyjne, z widocznymi dwoma maksimami fluorescencji przy 397 – 400 nm i 433 – 440 nm, które są także charakterystyczne dla niemodyfikowanego białka (MB, Fig. 9A). Zwiększoną intensywność emisji (1000 – 1700 AU) w zakresie fal 390 – 410 nm wykazują AGEs powstałe na skutek glikacji MB przez ryb i mel w warunkach bezwodnych (Rys. 9A; 9B) oraz z GA podczas syntezy tradycyjnej w roztworze (Rys. 9C). Najintensywniejsza fluorescencja w zakresie 410 – 460 nm była charakterystyczna dla produktów powstałych z mel, ryb, MGO metodą MW oraz z ryb i GA tworzonych w warunkach tradycyjnych (RT). W całym testowanym zakresie fal najwyższą fluorescencję wykazano dla produktu MB-ryb MW w porównaniu ze wszystkimi analizowanymi AGEs (Rys. 9B).



Rys. 9. Widma fluorescencyjne w zakresie 370 – 500 nm po wzbudzeniu światłem o długości fali 350 nm dla wodnych roztworów (0,5 mg/ml) modelowych HMW-AGEs otrzymanych metodą mikrofalową (MW) i tradycyjną (RT). Przedstawiono produkty uzyskane z MB w reakcji z A) dwucukrami mel, lac, cel; B) monocukrami glc, fru, ryb; C) aldehydami MGO, T<sub>2</sub>N, GLX, GA.

Jednak niektóre produkty wykazywały bardziej charakterystyczne dla siebie widmo, np. MB-mel MW (Rys. 9A), MB-ryb MW, MB-ryb RT (Rys. 9B), MB-MGO MW, MB-MGO RT oraz MB-GA RT (Rys. 9C) emitują charakterystyczną fluorescencję w zakresie fal powyżej 450 nm. Przy czym najwyższą intensywność fluorescencji w tym zakresie fal można zaobserwować dla produktów syntezowanych w warunkach bezwodnych (MB-ryb MW i MB-MGO MW), co sugeruje podobieństwo strukturalne. Produkty syntezowane tradycyjną metodą w roztworze jak MB-fru RT, MB-glc RT (Rys. 9B) i MB-cel RT (Rys. 9A) wykazują odmienne charakterystyczne maksimum przy długości fali  $\lambda = 392$  nm, którego nie obserwowano dla analogicznych produktów syntezowanych w warunkach bezwodnych, co także świadczy o podobieństwie strukturalnym produktów tworzonych z glc, fru i cel.

Dodatkowo warto zaznaczyć, że widoczne są różnice we fluorescencji między produktami powstałymi z tego samego substratu w zależności od użytej metody syntezy. Produkt MAGE (MB-mel) powstały przy użyciu metody w warunkach bezwodnych (MW) wykazuje fluorescencję z najwyższą intensywnością emisji przy 431 nm, natomiast produkt MB-mel uzyskany metodą tradycyjną nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych (Rys. 9A). Jest to potwierdzeniem dla faktu, iż w zależności od warunków syntezy, tworzą się produkty glikacji o odmiennych właściwościach fizykochemicznych<sup>104</sup>, sugerujących różną budowę strukturalną.

#### 4.1.4. Identyfikacja MAGE na resztach aminokwasowych modelowego HMW-MAGE

Celem doświadczenia było określenie reszt aminokwasowych białka MB zmodyfikowanych przez mel. MAGE oraz wyjściowe białko przygotowano za pomocą metody FASP (3.2.3.1) i przeprowadzono analizę LC-MS/MS (3.2.3.4), identyfikując zmodyfikowane przez mel reszty aminokwasowe.

Listę zidentyfikowanych peptydów zawierających reszty zmodyfikowane przez melibiozę zebrano w Tabeli 4. Warto zaznaczyć, że nie znaleziono tego typu modyfikacji na wyjściowej próbce białka (MB).

Otrzymane wyniki potwierdziły, iż HMW-MAGE zawiera reszty aminokwasowe zmodyfikowane przez mel. Zidentyfikowano modyfikacje na 3 resztach lizyny (K), 1



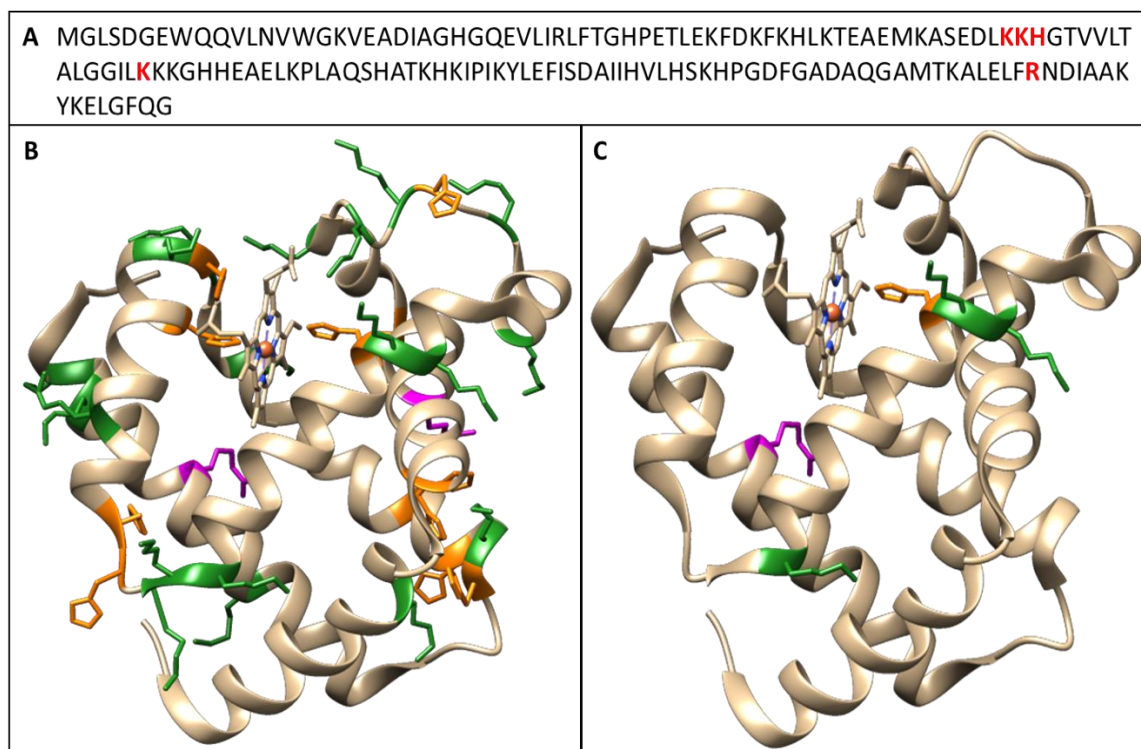
reszcie argininy (R) i 1 histydyny (H). Najwyższą intensywność wykazywał peptyd zawierający zmodyfikowaną argininę.

Tabela 4. Lista peptydów zawierających reszty modyfikowane przez melibiozę zidentyfikowane w HMW-MAGE

Czas retencji	Długość	Intensywność piku	m/z	Wynik (score)	Sekwencja peptydu
<b>0,197</b>	7	454,9	557,7713318	3,5695E+13	_ASEDLK(mel)K_
<b>32,692</b>	14	153760	659,3450928	4,3912E+14	_ALELFR(mel)NDIAAKYK_
<b>38,296</b>	15	3025,4	611,0183716	2,2164E+14	_KHGTVVLTALGGILK(mel)_
<b>39,467</b>	15	2369,3	611,0181885	6,8328E+14	_H(mel)GTVVLTALGGILKK_
<b>40,011</b>	15	41634	611,0180969	3,3587E+14	_K(mel)HGTVVLTALGGILK_
<b>50,511</b>	15	5961,2	611,0185242	7,5336E+14	_HGTVVLTALGGILK(mel)K_

(mel) – modyfikacja powstała na skutek glikacji melibiozą

W celu zobrazowania zmodyfikowanych reszt wykorzystano program Chimera 1.14 (RBVI). Rys. 10 przedstawia sekwencję aminokwasową mioglobiny (panel A) oraz model przestrzenny z oznaczonymi kolorami aminokwasami, na których spodziewane są modyfikacje mel (panel B). Zidentyfikowane modyfikacje w próbce HMW-MAGE pokazano na modelu w panelu C. Spośród 32 reszt aminokwasów zasadowych (19 K, 2 R, 11 H), które teoretycznie mogą ulegać procesowi glikacji w cząsteczce mioglobiny, na skutek reakcji z melibiozą w warunkach bezwodnych (MW) 15,6 % była modyfikowana przez mel. Jedna z reszt H (w pozycji 65 sekwencji aminokwasowej) znajduje się w centrum oddziaływania z grupą hemową.

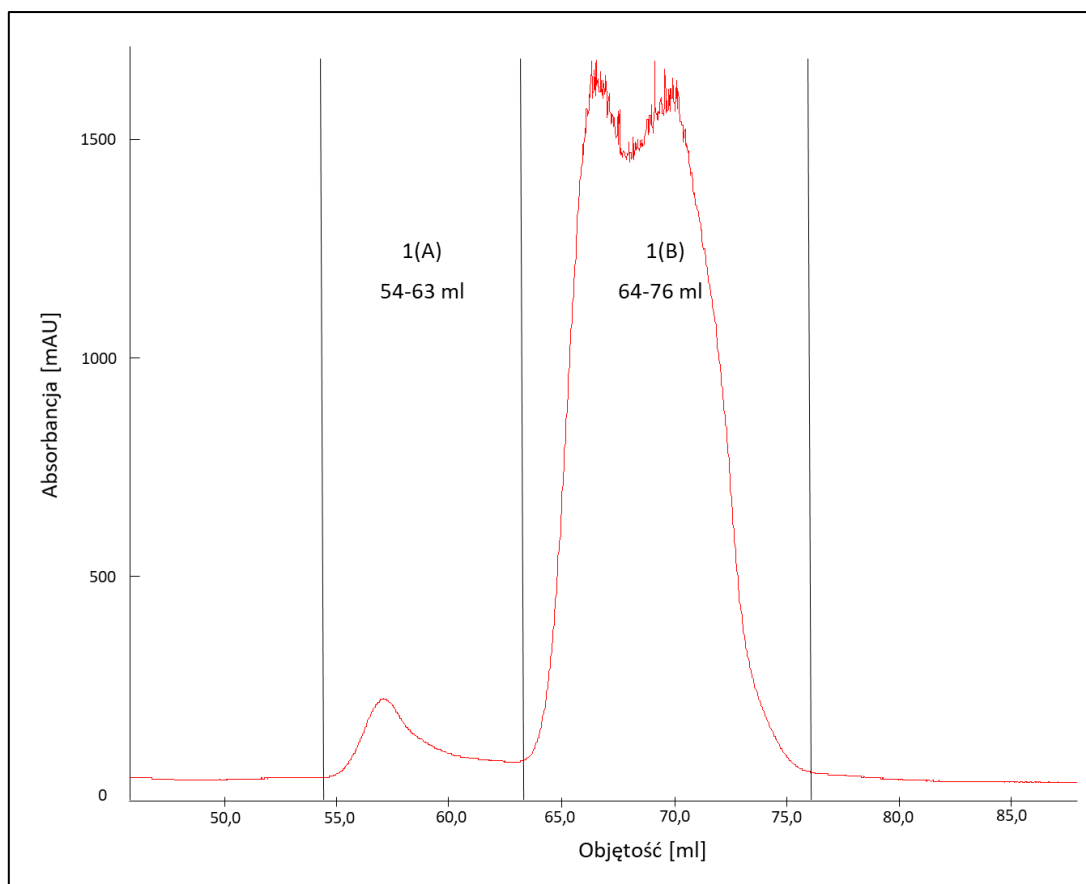


Rys. 10. Modyfikacje MB przez mel (HMW-MAGE) podczas glikacji białka w warunkach bezwodnych (MW). A) Sekwencja aminokwasowa mioglobiny; czerwone reszty wskazują miejsca modyfikacji przez melibiozę; B) Model przestrzenny wyjściowego białka (MB); kolorem zielonym oznaczono lizynę, fioletowym – argininę, pomarańczowym – histydynę; C) Model przestrzenny MB po modyfikacji mel; odpowiednimi kolorami jak w panelu B zaznaczono reszty zidentyfikowane jako zmodyfikowane przez mel.

## 4.2. Uzyskanie niskocząsteczkowego antygeny MAGE (LMW-MAGE)

### 4.2.1. Oczyszczanie LMW-MAGE za pomocą chromatografii cieczerwowej

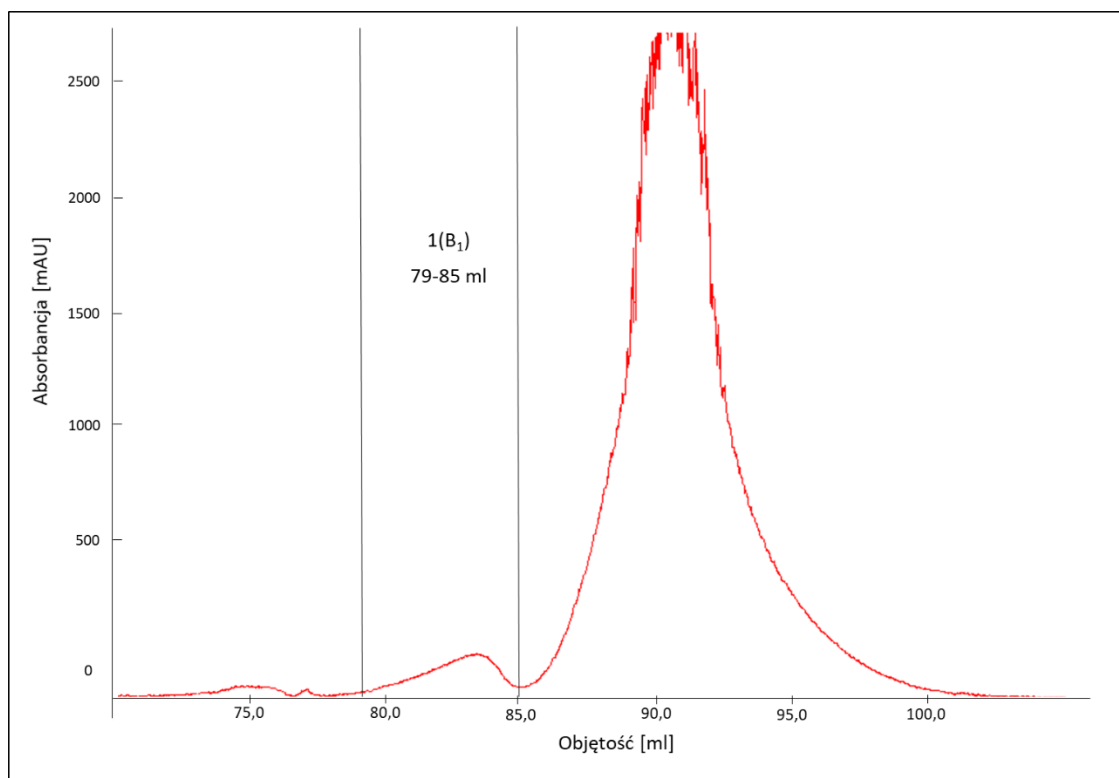
Mieszaniny LMW-MAGE otrzymane w wyniku syntezy w reaktorze mikrofalowym, przeprowadzonej zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.1.2 rozpuszczono w 1 ml wody miliQ. Oczyszczanie produktu LMW-MAGE przeprowadzono zgodnie z wcześniej opracowaną i zoptymalizowaną metodą<sup>107</sup> na kolumnie HW-40S monitorując eluowany materiał przy długości fali 225 nm, jak opisano w rozdziale 3.1.3. W wyniku rozdzielania z mieszaniny LMW-MAGE uzyskano dwie frakcje: 1(A) i 1(B), eluowane z kolumny odpowiednio w objętości 54-63 ml i 64-76 ml (Rys. 11). Materiał z każdej frakcji zliofilizowano i zważono.



Rys. 11. Rozdział LMW-MAGE za pomocą FPLC na kolumnie HW40S. Do elucji użyto 0,01 M octanu amonu pH 6,8; frakcje monitorowano przy długości fali 225 nm.

Wydajność wynosiła odpowiednio 5 mg 1(A) i 80 mg 1(B) nieodsolonego materiału z 93 mg użytej do syntezy mieszaniny NAL-mel (33 mg NAL + 60 mg mel). Frakcja 1(A) dobrze rozdzieliła się od mieszaniny, co wskazuje zgodnie z wcześniejszymi wynikami (<sup>107</sup>) na pojedynczy produkt LMW-MAGE. Frakcja 1(B) zawierała mieszaninę nierozdzielonych związków i wymagała dodatkowego oczyszczenia.

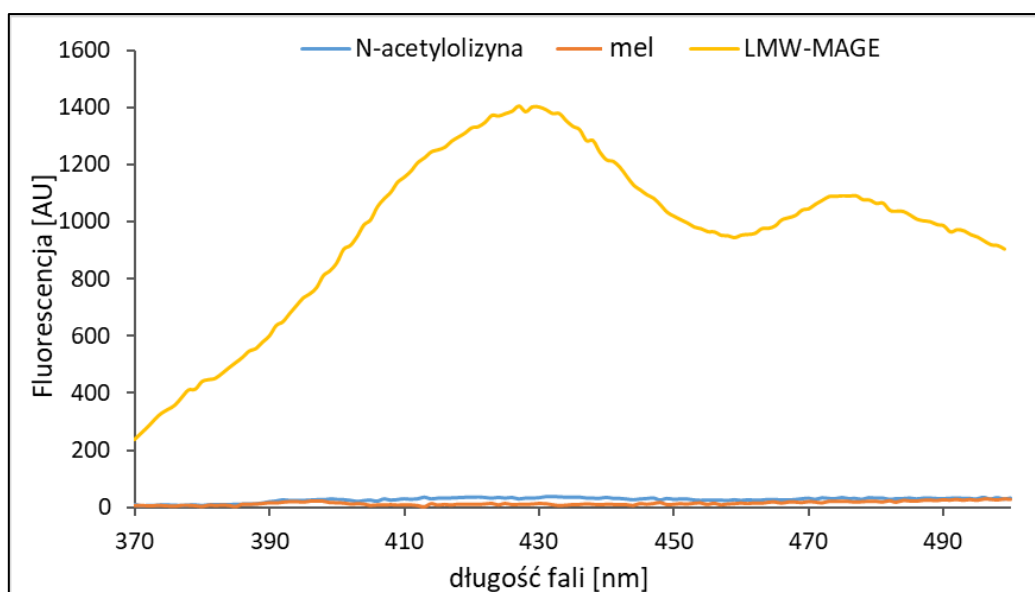
Frakcję 1(B) poddano dalszemu rozdziałowi chromatograficznemu na kolumnie ze złożem Bio-Gel P-2 jak opisano w rozdziale 3.1.3. Profil elucji przedstawiono na Rys. 12. Materiał eluowany z kolumny testowano na aktywność reakcji z przeciwciałami anti-MAGE w teście ELISA. Frakcję 1(B<sub>1</sub>) uzyskaną po elucji w objętości 79-85 ml, która wykazywała aktywność z przeciwciałami anti-MAGE zliofilizowano i zważono. Wydajność oczyszczania LMW-MAGE wynosiła 9,4 % (3,1 mg z 33 mg NAL użytego do syntezy). Próba ta zgodnie z wcześniejszymi badaniami (<sup>107,110</sup>) zawiera czysty produkt reagujący z przeciwciałami anti-MAGE.



Rys. 12. Profil elucji produktów LMW-MAGE obecnych w próbce 1(B) na kolumnie Bio-Gel P-2; eluowany materiał monitorowano przy długości fali 225 nm (linia czerwona).

#### 4.2.2. Właściwości fluorescencyjne LMW-MAGE

Uzyskany preparat LMW-MAGE (frakcja 1B<sub>1</sub>) rozpuszczono w wodzie w stężeniu 0,5 mg/ml i analizowano na spektrofluorymetrze w celu określenia właściwości fluorescencyjnych. Podobnie jak w przypadku HMW-MAGE rejestrowano widmo emisyjne w zakresie fal 370 – 500 nm po wzbudzeniu światłem przy długości fali 350 nm. Kontrolnie analizowano fluorescencję substratów NAL i mel użytych do syntezy LMW-MAGE. Widmo LMW-MAGE (Rys. 13, linia żółta) zawierało dwa charakterystyczne maksima przy  $\lambda = 428$  nm oraz 476 nm, podobnie jak zaobserwowano dla HMW-MAGE (MB-mel MW, Rys. 9A). Użyte do syntezy substraty (NAL i mel) nie wykazywały właściwości fluorescencyjnych (Rys. 13, linia niebieska i pomarańczowa). Uzyskane wyniki sugerują, że produkty MAGE utworzone na modelowym białku (HMW-MAGE) oraz w reakcji z wolnym aminokwasem (LMW-MAGE) posiadają podobną strukturę.



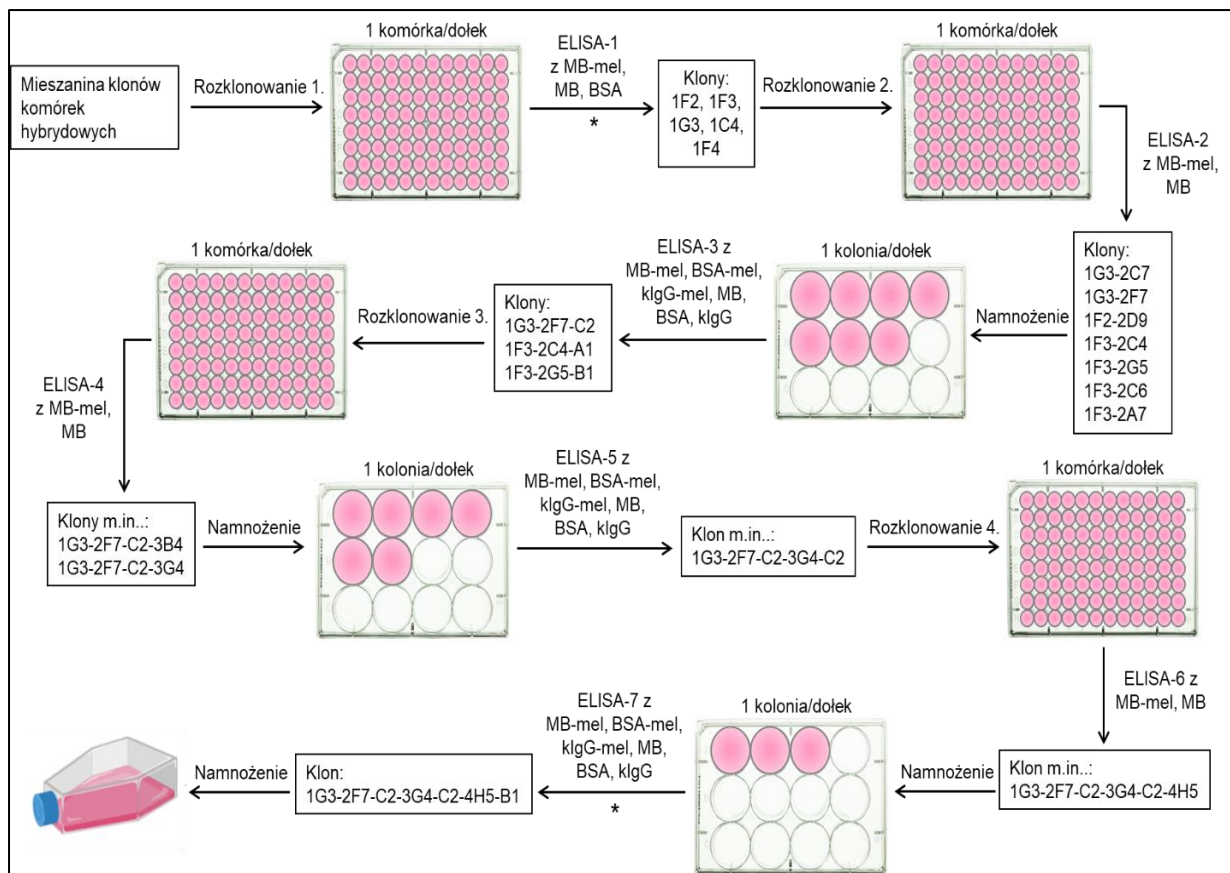
Rys. 13. Widmo fluorescencyjne LMW-MAGE. Wodne roztwory LMW-MAGE (linia żółta), N-acetylizyny (NAL, linia niebieska) i melibiozy (mel, linia pomarańczowa) o stężeniu 0,5 mg/ml wzbudzano światłem o długości fali 350 nm; emisję zbierano w zakresie 370 – 500 nm.

### 4.3. Otrzymanie czystych przeciwciał monoklonalnych anty-MAGE

#### 4.3.1. Uzyskanie pojedynczych klonów komórek hybrydowych produkujących przeciwciała anty-MAGE

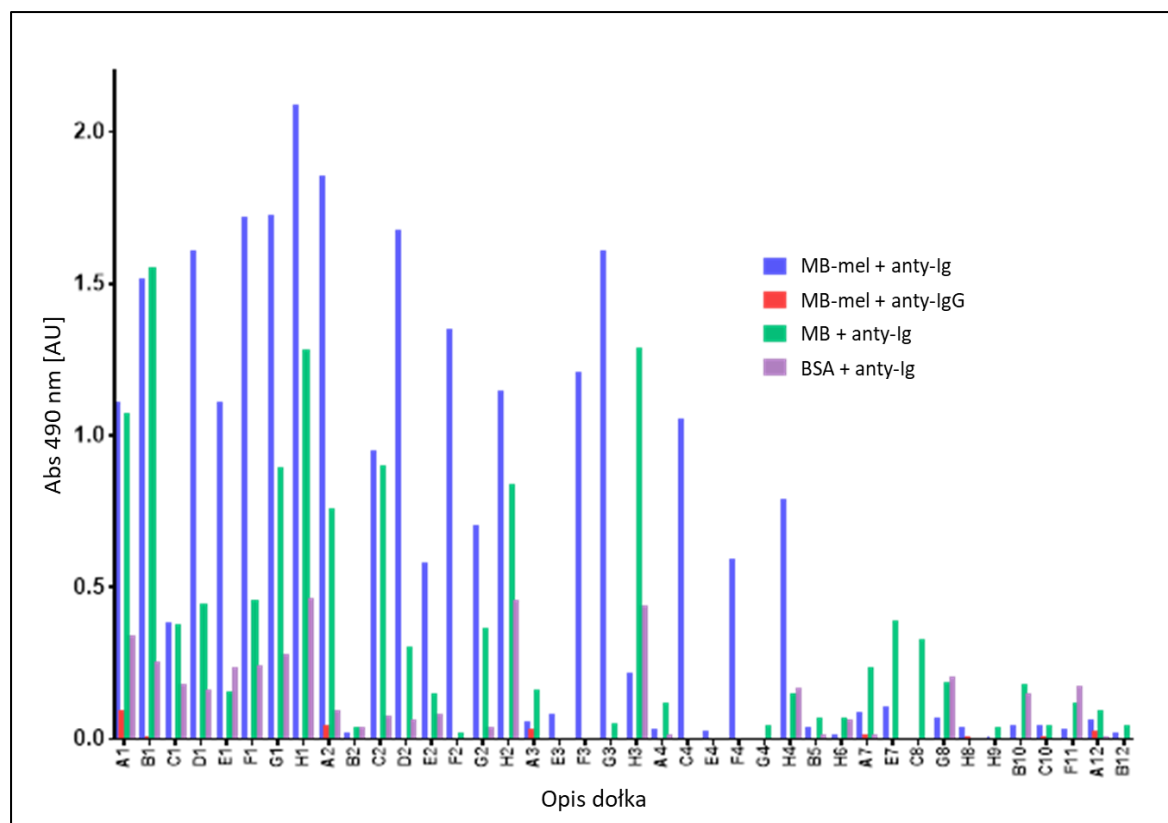
Z hodowli wcześniej wygenerowanych w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN komórek hybrydowych anty-MAGE wyselekcjonowano pojedynczy klon zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.3.1. Poszczególne etapy selekcji odpowiedniego klonu przedstawia Rys. 14.

Nazwa klonów w kolejnych etapach selekcji zawiera opis dołka, w którym komórki były hodowane oraz numer kolejnego etapu klonowania.



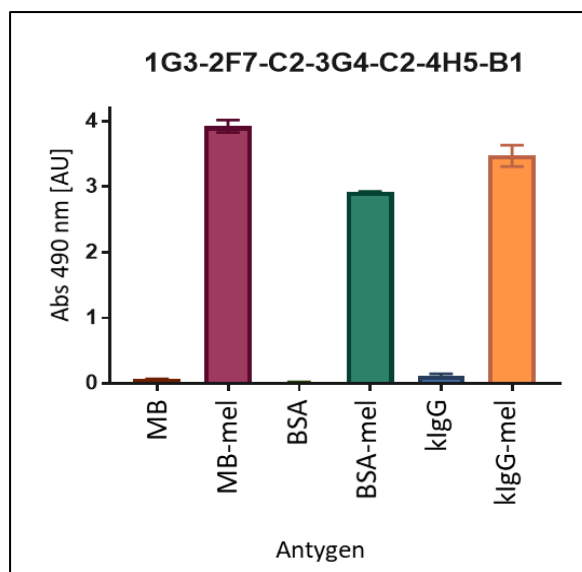
Rys. 14. Schemat selekcji pojedynczego klonu komórek hybrydowych (1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1) produkującego przeciwciała anti-MAGE. Aktywność przeciwciał sprawdzano za pomocą testu ELISA z wykorzystaniem antygenów: MB-mel, BSA-mel, kIgG-mel MW oraz białek nośnikowych MB, BSA, kIgG, immobilizowanych na płytce w ilości 0,5  $\mu$ g/dolek; Gwiazdką (\*) zaznaczono etapy, których wyniki przedstawiono poniżej

Po pierwszym rozklonowaniu mieszaniny komórek hybrydowych w ilości 1 komórka/dolek wykonano test ELISA-1 na płytce opłaszczonej MB-mel MW, białkiem nośnikowym MB oraz białkiem kontrolnym BSA. Zastosowano poliklonalne przeciwciała II-rzędowe umożliwiające wykrycie dowolnej klasy immunoglobulin (anty-Ig) oraz dodatkowo przeciwciała swoiste dla mysich przeciwciał klasy G (anty-IgG) (Rys. 15). Przeciwciała uzyskane z dołek wybranych do dalszej selekcji (F2, F3, G3, C4, F4) wykazały najwyższą reaktywność wobec MB-mel MW przy braku reakcji na białka kontrolne. W testowanych supernatantach nie wykryto przeciwciał o izotypie IgG.



Rys. 15. Test aktywności ELISA-1 produkowanych przeciwciał. Płytkę opłaszczono MB-mel MW, MB lub BSA; w reakcji użyto kozie anty-mysie Ig-HRP (anty-Ig) lub kozie anty-mysie IgG-HRP (anty-IgG).

Po kolejnych etapach selekcji przeprowadzono test ELISA na większym panelu antygenów dla 3 namnożonych klonów (Rys. 14; test ELISA-7). Supernatant z hodowli komórek hybrydowych testowano z MB-mel, BSA-mel, kIgG-mel syntezowanych w warunkach bezwodnych (MW) oraz z odpowiadającymi im białkami nośnikowymi. Wyniki testu ELISA-7 dla klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5 przedstawiono na Rys. 16. Wyniki wskazują, że produkowane przeciwciała specyficznie reagują z produktami MAGE uzyskanymi niezależnie od białka nośnikowego, przy braku reakcji z samym białkiem nośnikowym. Klon 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5 ostatecznie namnożono do większej ilości komórek w celu produkcji przeciwciał monoklonalnych anty-MAGE.



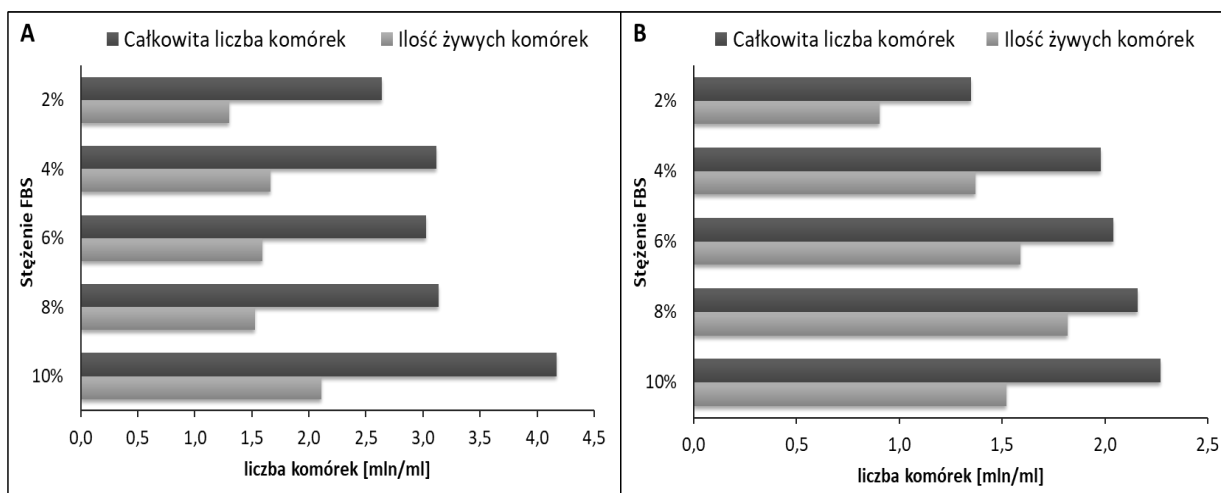
Rys. 16. Test aktywności ELISA-7. Supernatant zebrany z hodowli komórek hybrydowych klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1 testowano na płycie opłaszczonej MB-mel, BSA-mel, kIgG-mel MW oraz MB, BSA, kIgG; zastosowane przeciwciała II-rzędowe: kozie anty-mysie Ig-HRP. Wartości pokazują średnią absorbancję mierzoną przy 490 nm (Abs 490 nm) z 2 dołków po odjęciu absorbancji próby negatywnej

#### 4.3.2. Optymalizacja hodowli komórek hybrydowych do produkcji przeciwciał anty-MAGE

W procesie produkcji przeciwciał istotnym elementem utrudniającym ich oczyszczanie jest skład pożywki hodowlanej, zwłaszcza znaczny dodatek FBS. W kolejnym etapie badań zoptymalizowano warunki hodowli wyselekcjonowanych klonów komórek hybrydowych testując skład pożywki zawierającej różne stężenia FBS w zakresie 2 – 10 % (jak opisano w 3.3.2). Monitorowano wzrost komórek po 14 i kolejnych 7 dniach hodowli (Rys 17). Określono liczbę komórek w danej hodowli, a supernatant sprawdzono za pomocą testu ELISA (3.5.2) w celu określenia aktywności produkowanych przeciwciał anty-MAGE. Po 14 dniach najwięcej komórek zaobserwowano w hodowli z 10 % FBS (ponad 4 mln/ml). W hodowlach z zawartością FBS 4, 6 i 8 % całkowita liczba komórek wynosiła około 3 mln/ml. Najmniej komórek zaobserwowano w medium z 2 % FBS – około 2,5 mln. Warto zauważyć, że ilość żywych komórek we wszystkich typach hodowli wynosiła około 50 % całkowitej liczby komórek. Po ponownym pasażowaniu i kolejnych 7 dniach hodowli całkowita liczba komórek była największa również w medium z 10 % FBS (około 2,25 mln/ml), jednak w medium z 4, 6 i 8 % FBS ilość komórek była

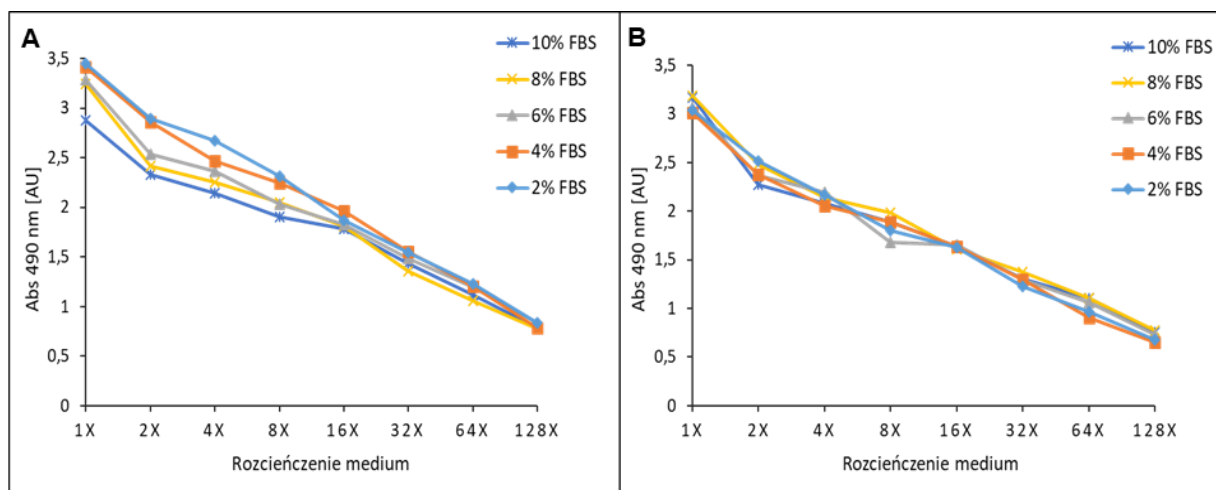


nieznacznie mniejsza (około 2 mln/ml). Najmniej komórek zaobserwowano w medium z 2 % FBS (około 1,5 mln/ml) co może świadczyć o wolniejszym tempie podziałów komórkowych w podanym medium hodowlanym. Biorąc pod uwagę ilość żywych komórek hybrydowych w stosunku do całkowitej liczby komórek, najwyższą żywotność hodowli zaobserwowano w mediach z 2, 6 i 8 % FBS. Z wykonanego doświadczenia wynika, iż zmniejszenie stężenia FBS w medium hodowlanym wpływa na obniżenie tempa podziałów komórkowych, jednak nie wpływa znacząco na żywotność komórek.



Rys. 17. Wpływ stężenia FBS na żywotność komórek hybrydowych klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1. Ilość komórek (wartości dla jednego dołka) podano jako całkowitą liczbę w 1 ml oraz liczbę komórek żywych w hodowli po A) 14 dniach i B) 21 dniach (7 dni od drugiego pasażowania).

Aktywność przeciwciał produkowanych przez komórki hybrydowe hodowane w medium o różnych stężeniach FBS testowano następnie za pomocą ELISA (Rys. 18). Po 14 dniach hodowli najwyższą aktywność przeciwciał zaobserwowano w medium z hodowli zawierającej 2 i 4 % FBS, pomimo najmniejszej ilości komórek w tych hodowlach. Najniższą aktywność przeciwciał wykazało medium hodowlane z 10 % FBS (Rys. 18A). Aktywność przeciwciał nie różniła się pomiędzy warunkami hodowli po 21 dniach, co sugeruje, że nawet niskie stężenie FBS nie wpływa znacząco na efektywną produkcję przeciwciał anti-MAGE. Dodatkowo, obniżenie stężenia FBS w medium hodowlanym nie wpływa na żywotność komórek hybrydowych, a jedynie na tempo wzrostu i podziałów. Do produkcji przeciwciał zastosowano więc medium hodowlane zawierające 2 % FBS.



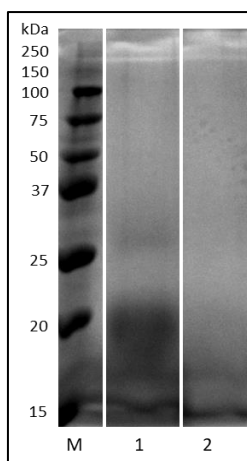
Rys. 18. Aktywność przeciwciał produkowanych przez komórki hybrydowe hodowane w medium o różnych stężeniach FBS. Medium zebrane z hodowli komórek A) po 14 dniach, B) po 21 dniach (7 dni od powtórnego pasażowania) hodowli testowane było metodą ELISA na płytkach opłaszczonych MB-mel MW.

#### 4.4. Oczyszczanie przeciwciał anty-MAGE metodą chromatografii powinowactwa

##### 4.4.1. Właściwości kolumny powinowactwa

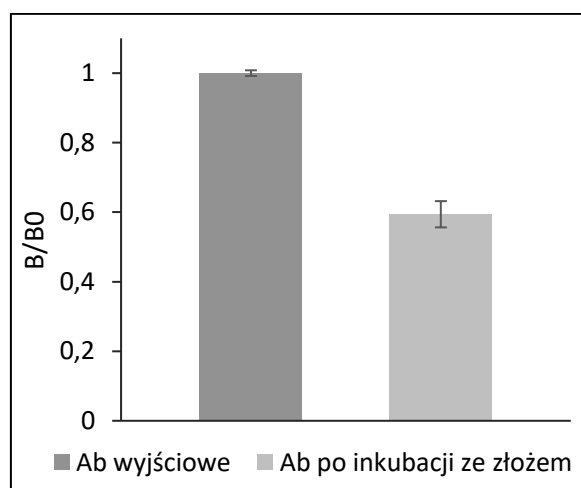
Aktywność przygotowanego złoża CNBr-Sepharose (3.4.1) do wiązania białka została najpierw potwierdzona na skutek inkubacji z modelowym białkiem BSA (15 mg/1,5 ml złoża). W supernatancie po reakcji wiązania pozostało 0,003 mg białka, co oznacza 99,98 % skuteczność wiązania i potwierdza dużą aktywność złoża.

Następnie do złoża CNBr-Sepharose związano antygen MAGE (zgodnie z procedurą 3.4.2), a efektywność immobilizacji potwierdzono metodą SDS-PAGE (Rys. 19). Pozostałe w roztworze po inkubacji ze złożem białko (MB-mel) zawierało znacznie mniej MB-mel w porównaniu do wyjściowego roztworu białka, co potwierdza efektywne wiązanie MAGE do złoża.



Rys. 19. Analiza SDS-PAGE roztworu antygenu MAGE przed i po inkubacji ze złożem CNBr-Sepharose. Na dołek nakładano marker (M), roztwór MB-mel przed inkubacją ze złożem (dołek 1) oraz roztwór MB-mel po inkubacji ze złożem (dołek 2).

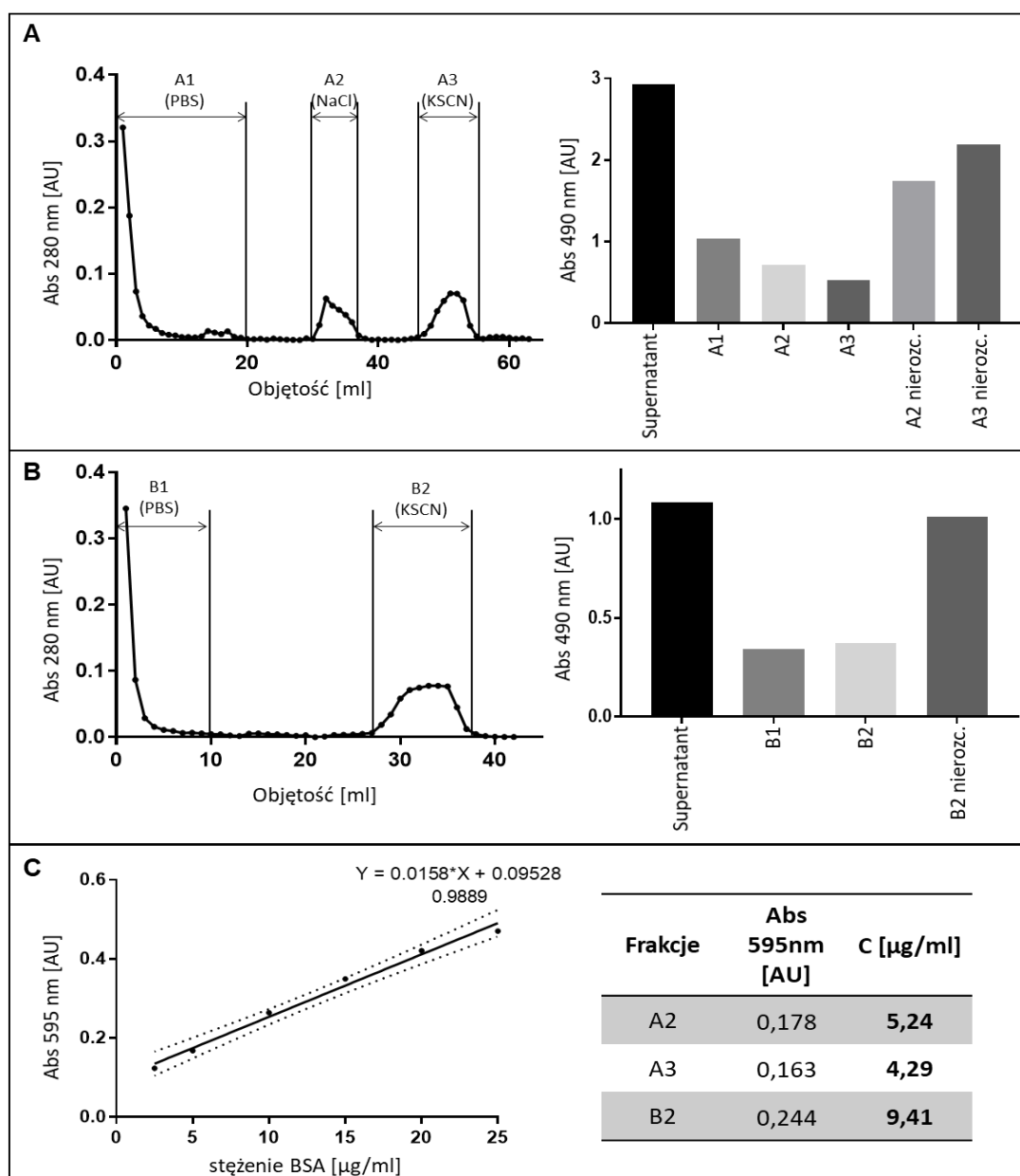
Dodatkowo, aby sprawdzić czy przygotowane złożo Sepharose-MAGE wykazuje zdolność wiązania przeciwciał anti-MAGE, przeprowadzono test hamowania ELISA (3.5.3). W obecności Sepharose-MAGE aktywność przeciwciał zawartych w supernatancie po hodowli komórek hybrydowych zmniejszyła się o 40,6 % w stosunku do reakcji przeciwciał bez dodatku złoża (Rys. 20). Na podstawie wykonanego doświadczenia można wywnioskować, iż przeciwciała anti-MAGE reagują z przyłączonym do złoża antygenem.



Rys. 20. Sprawdzenie zdolności wiązania przeciwciał anti-MAGE do złoża ze związanym MB-mel MW za pomocą testu hamowania ELISA; Ab – roztwór przeciwciał anti-MAGE

#### 4.4.2. Optymalizacja procedury oczyszczania przeciwciał anti-MAGE na kolumnie powinowactwa

Podczas optymalizacji procedury oczyszczania przeciwciał anti-MAGE testowano dwa sposoby elucji (3.4.3) związanych do złoża przeciwciał za pomocą roztworów NaCl i KSCN (Rys. 21A i B, panele po lewej). Efektywność oczyszczania określano mierząc aktywność uzyskanych frakcji do wiązania antygeny MAGE w teście ELISA (Rys. 21A, B, panele po prawej).



Rys. 21. Optymalizacja oczyszczania przeciwciał anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa. Profil elucji przeciwciał ze złoża Sepharose-MAGE za pomocą NaCl i KSCN (A, panel lewy) i samym rodankiem potasu (B, panel lewy) rejestrowano za pomocą pomiaru

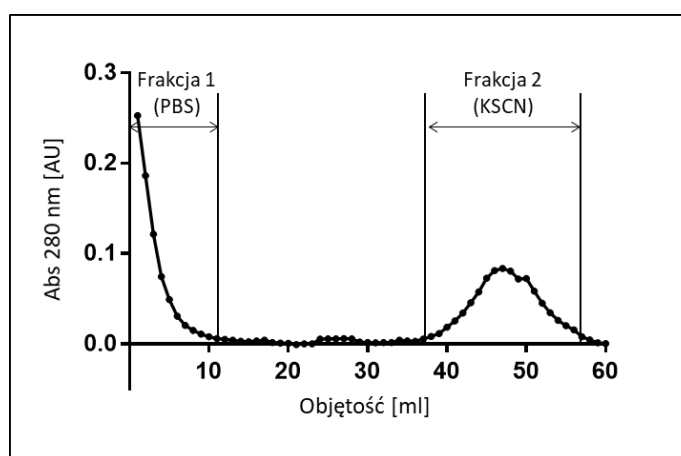
absorbancji przy 280 nm. Aktywność przeciwciał w poszczególnych frakcjach (A1, A2, A3 oraz B1, B2) po ich rozcieńczeniu do objętości wyjściowego materiału oraz bez rozcieńczania (frakcje A2, A3, B2 nierozc.) oznaczono testem ELISA na płytce opłaszczonej MB-mel MW (A i B panel po prawej); C) stężenia białka w wybranych frakcjach (po prawej) oznaczono metodą Bradforda na podstawie krzywej standardowej dla BSA (po lewej).

Testowanie dwustopniowej elucji NaCl i KSCN miało na celu sprawdzenie wydajności elucji w przypadku zastosowania zwiększonej siły jonowej (1M NaCl) oraz czynników chaotropowych (3M KSCN) niszczących wodną powłokę adsorpcyjną. W zależności od siły wiązania izolowanego przeciwciała z ligandem, elucja za pomocą NaCl pozwala na wymycie niespecyficznie związanych do złoża białek lub w przypadku słabszych wiązań przeciwciało-ligand, na oddzielenie oczyszczanego przeciwciała. Oczyszczanie przeciwciał z medium hodowlanego na kolumnie powinowactwa pozwoliło na usunięcie składników tego medium, które eluowane są podczas płukania złoża roztworem PBS (Rys. 21A i B, panele po lewej, Fr. A1, B1). W tej frakcji również obecne są przeciwciała anti-MAGE, które nie zostały zaadsorbowane do złoża, o czym świadczy aktywność w teście ELISA (Rys. 21A, B, prawe panele), jednak ich poziom jest znacznie mniejszy w porównaniu do materiału wyjściowego. W przypadku dwustopniowej elucji otrzymano 2 piki, które po zagęszczeniu zawierały przeciwciała anti-MAGE (Rys. 21A). Warto zaznaczyć, że w obu frakcjach (A2, A3), po ich rozcieńczeniu do objętości wyjściowego materiału, aktywność przeciwciał była niższa niż we frakcji A1 (PBS) (Rys. 21 A, panel po prawej), jednak suma tych wartości przewyższa aktywność przeciwciał zawartych we frakcji A1 (PBS). Przyłączone do złoża przeciwciała wymywają się częściowo pod wpływem elucji NaCl i w związku z tym otrzymano czyste przeciwciała rozdzielone na dwie frakcje. Ten sposób elucji może powodować powstawanie strat. W przypadku elucji jednostopniowej z zastosowaniem 3M KSCN otrzymano jedną frakcję o większej objętości w porównaniu do elucji dwustopniowej (Rys. 21B, panel po lewej). W rozcieńczonej frakcji KSCN (B2) są obecne przeciwciała anti-MAGE o nieco wyższej aktywności niż we frakcji PBS (B1) (Rys. 21B, panel po prawej). Wyższa aktywność przeciwciał we frakcjach eluowanych nierozcieńczonych do objętości odpowiadającej objętości materiału wyjściowego (Rys. 21A i B, panele po prawej, Fr. A2 nierozc., A3 nierozc., B2 nierozc.) związana jest z wyższym stężeniem przeciwciał w porównaniu do materiału wyjściowego, co wynika z zasady metody chromatografii powinowactwa (objętość buforu do elucji jest mniejsza niż objętość materiału wyjściowego). Ilość

przeciwciał we frakcji KSCN po zagęszczeniu (9,41  $\mu\text{g/ml}$ ) odpowiada łącznej zawartości przeciwciał we frakcjach NaCl i KSCN po elucji dwustopniowej (5,24  $\mu\text{g/ml}$  + 4,29  $\mu\text{g/ml}$ ) – przy tej samej objętości próbek po zagęszczeniu (Rys. 21C). W ostatecznej procedurze oczyszczania zrezygnowano z etapu elucji przez roztwór NaCl, ze względu na to, iż przy zastosowaniu elucji jednostopniowej otrzymujemy czyste przeciwciała z taką samą wydajnością w jednej frakcji, co wiąże się z niwelowaniem strat na poszczególnych etapach oczyszczania.

#### 4.4.3. Oczyszczanie przeciwciał anti-MAGE na kolumnie powinowactwa

W celu uzyskania odpowiedniej porcji czystych przeciwciał anti-MAGE przeprowadzono rozdział medium z hodowli komórek hybrydowych (30 ml) na kolumnie z 30 ml złoża Sepharose-MAGE (3.4.3). Proces powtarzano wielokrotnie, a przykładowy profil rozdziału zilustrowano na Rys. 22. Dzięki wcześniejszej optymalizacji procedury rozdział był powtarzalny i pozwalał na usunięcie składników medium (Fracja 1, PBS), a co ważniejsze możliwe było uzyskanie odpowiedniej ilości czystych przeciwciał anti-MAGE (Rys. 22, Frakcja 2, KSCN).



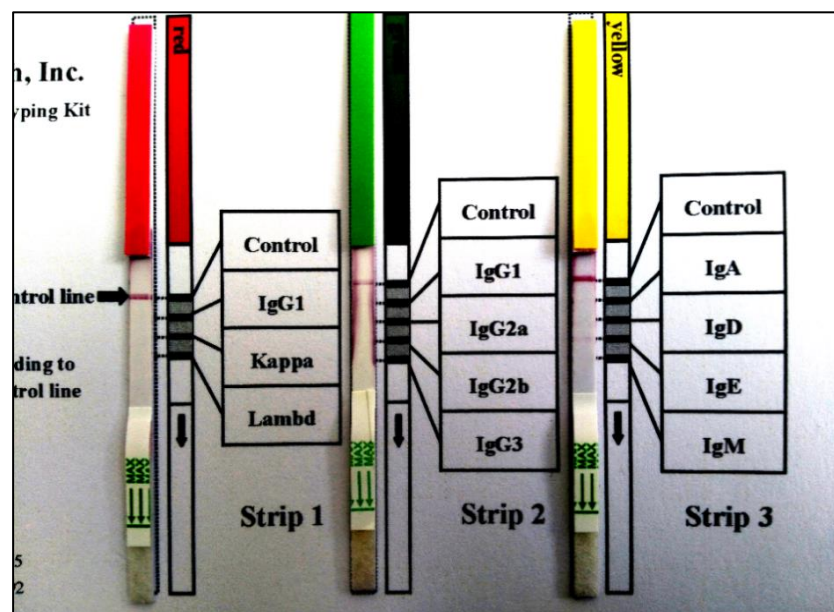
Rys. 22. Przykładowy profil elucji przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE na kolumnie ze złożem Sepharose-MAGE. Frakcja 1 (PBS) odpowiada wypłukanym składnikom medium hodowlanego, a Frakcja 2 (KSCN) zawiera przeciwciała anti-MAGE; eluowany materiał monitorowano przy długości fali 280 nm.

Materiał wypłukany za pomocą rodu połączono jako Frakcję 2, wydializowano do PBS i zagęszczono na filtrach typu Amicon uzyskując preparat czystych przeciwciał anti-MAGE. Średnio uzyskano przeciwciała o stężeniu 1,2 mg/ml w objętości 45  $\mu\text{l}$  otrzymane ze 120 ml medium wyjściowego, co daje średnią wydajność na poziomie 45  $\mu\text{g}$  czystych przeciwciał ze 100 ml medium hodowlanego z komórek hybrydowych.

#### 4.5. Charakterystyka przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE

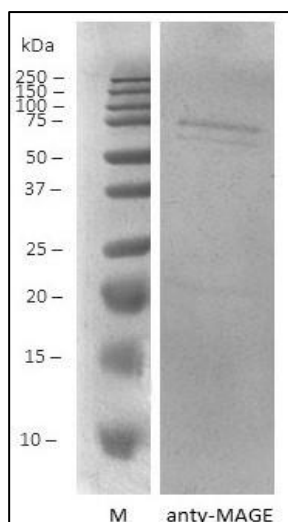
##### 4.5.1. Określenie czystości oraz klasy uzyskanych preparatów przeciwciał anti-MAGE

W celu identyfikacji klasy uzyskanych przeciwciał posłużono się zestawem Rapid Mouse Isotyping KIT – Gold Series (nr kat. LFM-JSO-1-5), którego wyniki zilustrowane są na Rys. 23 i wskazują na klasę IgE mysich przeciwciał (zabarwienie na pasku żółtym).



Rys. 23. Zdjęcie testu paskowego Rapid Mouse Isotyping KIT – Gold Series obrazujący pozytywną reakcję na pasku 3 (Strip 3) wskazującą na obecność w próbce mysich immunoglobulin klasy E

Czystość uzyskanych przeciwciał sprawdzono z zastosowaniem metody SDS-PAGE w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 24). W wybarwionym za pomocą Coomassie Brilliant Blue żelu zaobserwowano 3 prążki o masie od 20 do 75 kDa. Najintensywniejszy prążek znajdował się na wysokości ~75 kDa, co zgodnie z literaturą odpowiada masie łańcucha ciężkiego mysiej immunoglobuliny klasy E<sup>116</sup>. Zaobserwowano również prążek o masie oszacowanej na ~65 kDa oraz słabo widoczny prążek o masie ~20 kDa, który odpowiada masie łańcucha lekkiego immunoglobulin, np. łańcucha  $\kappa$ <sup>117</sup>.



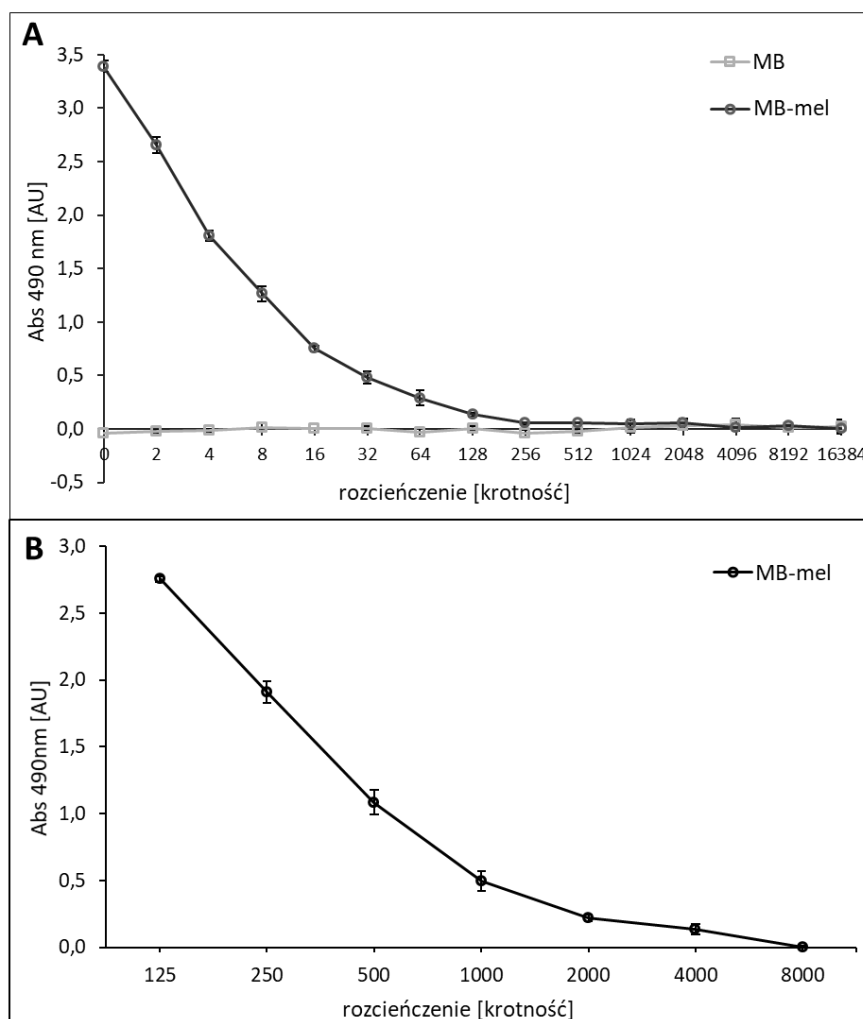
Rys. 24. SDS-PAGE oczyszczonych przeciwciał anti-MAGE w 12 % żelu poliakrylamidowym. Na dołek nałożono 2  $\mu\text{g}$  białka, żel wybarwiono za pomocą Coomassie Brilliant Blue.

Dodatkowo, w celu weryfikacji klasy przeciwciał, prążek o masie 75 kDa po rozdiale elektroforetycznym oczyszczonych przeciwciał anti-MAGE (Rys. 24.) został wysłany do identyfikacji metodą LC-MS/MS zgodnie z procedurą 3.2.4. Najwyższy wynik (score) o wartości 15924 uzyskano dla regionu C (stałego) łańcucha epsilon immunoglobuliny, potwierdzając, że próbka zawiera immunoglobuliny klasy E. Pokrycie sekwencji dla tego białka wyniosło 69 %.

#### 4.5.2. Charakterystyka aktywności przeciwciał anti-MAGE

W celu określenia aktywności przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1 w preparatach medium hodowlanego z komórek hybrydowych oraz przeciwciał oczyszczonych metodą chromatografii powinowactwa wykonano test ELISA (rozdział 3.5.2). Testowano wiązanie przeciwciał do swoistego antygeny (MB-mel MW) oraz kontrolnie do niemodyfikowanego białka nośnikowego (MB) w serii rozcieńczeń (Rys. 25). W obecności antygeny MAGE (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aktywność przeciwciał w medium hodowlanym obserwowano dla rozcieńczeń 0 – 128 razy, przy zupełnym braku reakcji dla rozcieńczenia 256 razy. W żadnym z testowanych rozcieńczeń nie zaobserwowano reakcji na białko nośnikowe – MB, co potwierdza swoistość w kierunku MAGE. Podobnie preparat czystych przeciwciał anti-MAGE (wyjściowe stężenie 1,2 mg/ml) testowano w serii 7 kolejnych rozcieńczeń. Aktywność przeciwciał obserwowano dla rozcieńczenia 0 – 4 000 razy, co odpowiada stężeniu 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i jest zgodne z oczekiwaniami stawianym aktywności przeciwciał monoklonalnych.





Rys. 25. Krzywa mianowania przeciwciał anty-MAGE A) w medium hodowlanym z komórek hybrydowych; B) oczyszczonych na kolumnie powinowactwa. ELISA wykonana na płytce opłaszczonej: MB (mioglobina) lub MB-mel MW (MAGE). Wartości pokazują średnią absorbancję mierzoną przy 490 nm z 2 dołków znormalizowaną wobec absorbancji próby negatywnej

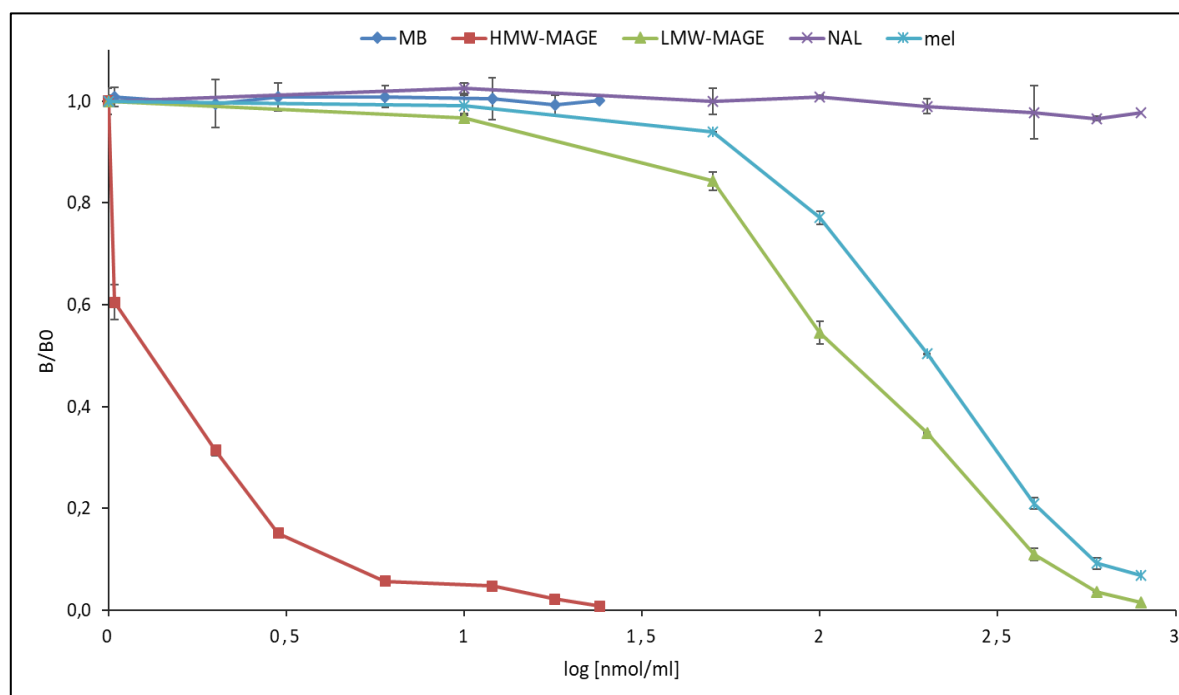
#### 4.5.3. Specyficzność przeciwciał monoklonalnych anty-MAGE

##### 4.5.3.1. Charakterystyka epitopu dla przeciwciał anty-MAGE

Do określenia epitopu dla przeciwciał anty-MAGE wykorzystano test hamowania ELISA (3.5.3) na płytce z immobilizowanym antygenem MAGE (MB-mel MW). Testowano serię rozcieńczeń inhibitora jako HMW-MAGE lub LMW-MAGE dodając do przeciwciał przed inkubacją na płytce. Dodatkowo do hamowania użyto substratów reakcji glikacji, jak mel oraz białka nośnikowego (MB) i NAL. Wykazano, że HMW-MAGE najskuteczniej hamował wiązanie przeciwciał anty-MAGE do MB-mel MW (Rys. 26, linia czerwona), gdzie IC<sub>50</sub> wynosiło około 1,4 nmol/ml (log = 0,14). LMW-MAGE był

znacznie słabszym inhibitorem (Rys. 26, linia zielona) przy  $IC_{50}$  równym 112,2 nmol/ml ( $\log = 2,05$ ). Analogicznie, całkowite zahamowanie reakcji przeciwciał anti-MAGE uzyskano przy stężeniu 24 nmol/ml HMW-MAGE a dla LMW-MAGE dopiero przy stężeniu 800 nmol/ml. Aktywność wolnego disacharydu (melibiozy), dla którego  $IC_{50}$  było podobne do LMW-MAGE i wynosiło 199,5 nmol/ml ( $\log = 2,3$ ), wskazuje na podobieństwo epitopu na tych dwóch antygenach. W przypadku wolnego aminokwasu (NAL) oraz białka nośnikowego (MB) nie wykazano aktywności hamującej przeciwciał anti-MAGE (Rys. 26, odpowiednio linia błękitna i fioletowa) nawet przy wysokich stężeniach, przy których obserwowano 100 % zahamowania reakcji przez LMW-MAGE i HMW-MAGE.

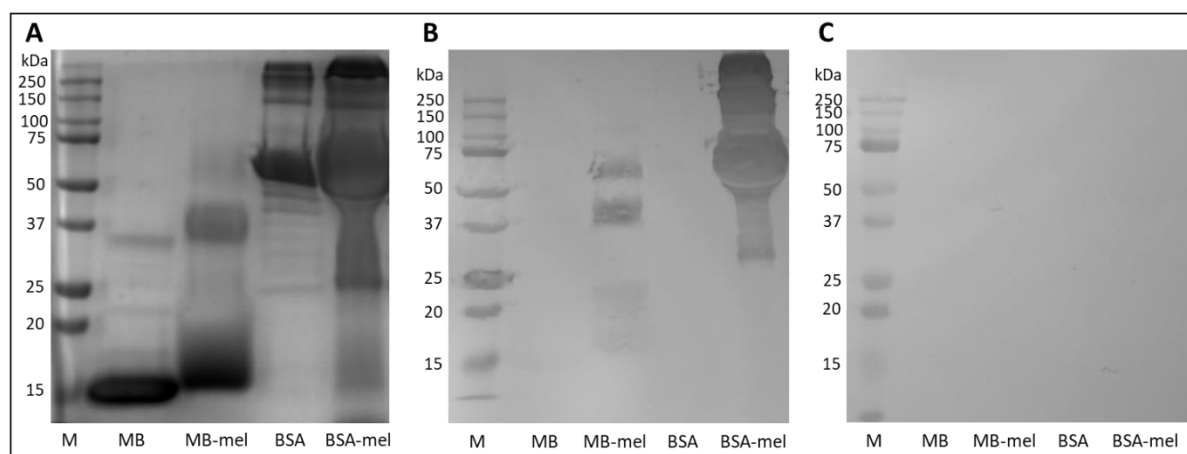
Podsumowując, wykazano że struktura epitopu przeciwciał anti-MAGE obejmuje cząsteczkę cukru i co najmniej lizyny (LMW-MAGE), ale na białku epitop jest liczniej prezentowany lub może obejmować inne poza lizyną aminokwasy, co przekłada się na niższe stężenie konieczne do całkowitego wyblokowania przeciwciał niż w przypadku LMW-MAGE.



Rys. 26. Krzywe hamowania reakcji przeciwciał anti-MAGE przez HMW-MAGE, LMW-MAGE MB, NAL i mel. Wiązanie przeciwciał (w ilości 4,8  $\mu\text{g/ml}$ ) testowano na płycie opłaszczonej MB-mel (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Wyniki po odjęciu absorbancji dla próby negatywnej (reakcja przeciwciał drugorzędowych) podano jako stosunek B/B0, gdzie B – absorbancja w obecności inhibitora, B0 – absorbancja bez inhibitora (100% reakcji).

## 4.5.3.2. Reaktywność przeciwciał anti-MAGE z białkowymi antygenami

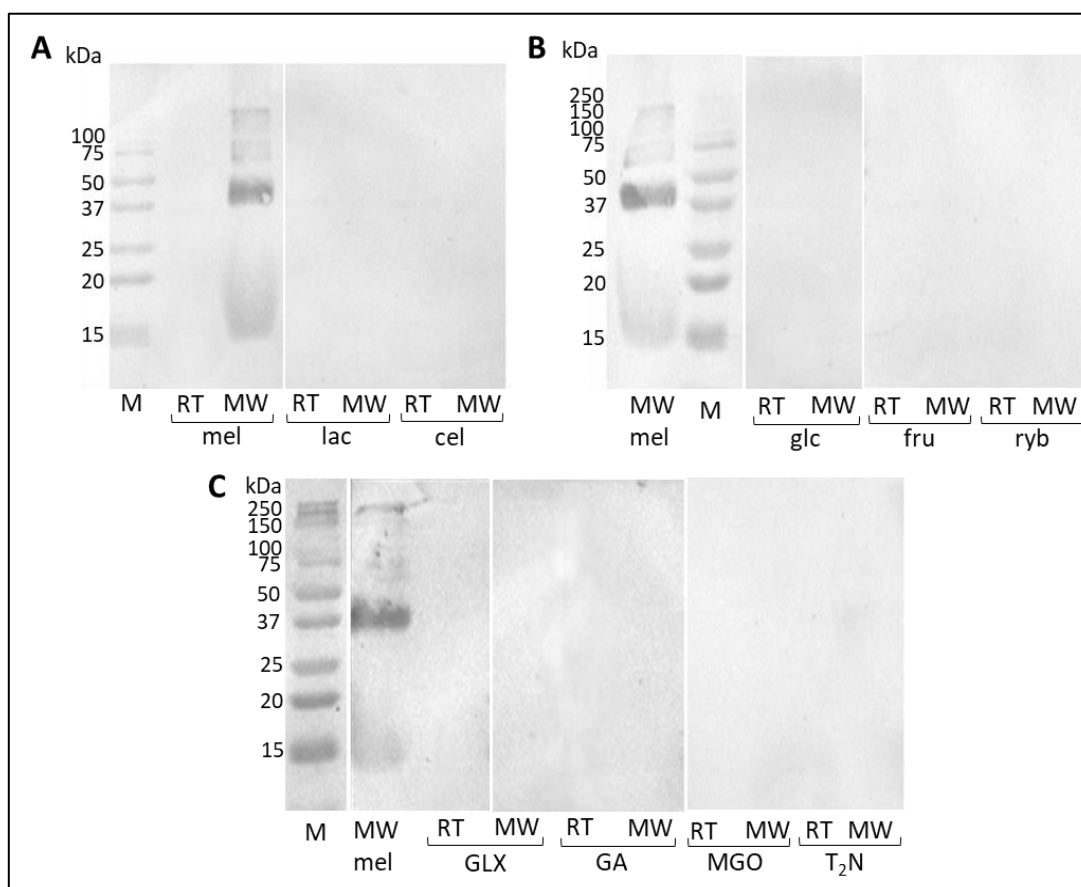
Produkty MAGE oraz białka nośnikowe rozdzielono w warunkach denaturujących na żelu poliakrylamidowym (Rys. 27A). Po transferze białek na membranę (3.5.1) obserwowano krzyżową reaktywność przeciwciał anti-MAGE (medium po hodowli komórek hybrydowych klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1) z produktami MAGE uzyskanymi na różnych modelowych białkach nośnikowych jak MB i BSA (Rys. 27B, MB-mel i BSA-mel). Swoistość przeciwciał w kierunku MAGE potwierdza brak reakcji z niemodyfikowanymi białkami (Rys. 27B, MB i BSA) oraz brak reakcji z drugorzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP (Rys. 27C). Pozytywna reakcja w warunkach denaturujących sugeruje monowalentną naturę i/lub kowalencyjny charakter usieciowania HMW-MAGE.



Rys. 27. Krzyżowa reaktywność przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE z MB-mel, BSA-mel (HMW-MAGE, 15  $\mu\text{g}/\text{dołek}$ ) oraz MB, BSA (10  $\mu\text{g}/\text{dołek}$ ). Próbkę rozdzielono na 10 % żelu poliakrylamidowym i wybarwiono za pomocą Coomassie Brilliant Blue (A) lub po transferze na membranę PVDF inkubowano z przeciwciałami anti-MAGE a następnie z II-rzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP (B); kontrolnie membranę inkubowano z II-rzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP pomijając przeciwciała I-rzędowe (C).

Następnie określono krzyżową reaktywność przeciwciał anti-MAGE z modelowymi produktami glikacji powstałymi z różnymi substratami (3.1.1), które rozdzielono na żelu poliakrylamidowym (Rys. 7). Po transferze na membranę PVDF białka analizowano za pomocą metody Western blotting inkubując z medium hodowlanym komórek hybrydowych zawierającym przeciwciała anti-MAGE (Rys. 28). Pozytywną reakcję z przeciwciałami wykazywał tylko antygen MAGE, syntezowany w warunkach bezwodnych (MB-mel MW, Rys. 28A, B, C). Wykluczono krzyżową reaktywność

przeciwciał z innymi AGEs powstałymi z różnych substratów cukrowych i aldehydów w reakcji z MB niezależnie od warunków syntezy (RT lub MW). Warto zaznaczyć, że nie zaobserwowano reakcji przeciwciał anti-MAGE z produktem MAGE syntezowanym metodą tradycyjną w roztworze (RT). Wyniki potwierdzają, że produkt MAGE utworzony w warunkach bezwodnych (MW) posiada unikalną i odmienną strukturę od AGEs opisywanych dotąd w literaturze, zgodnie z poprzednimi obserwacjami <sup>107</sup>.



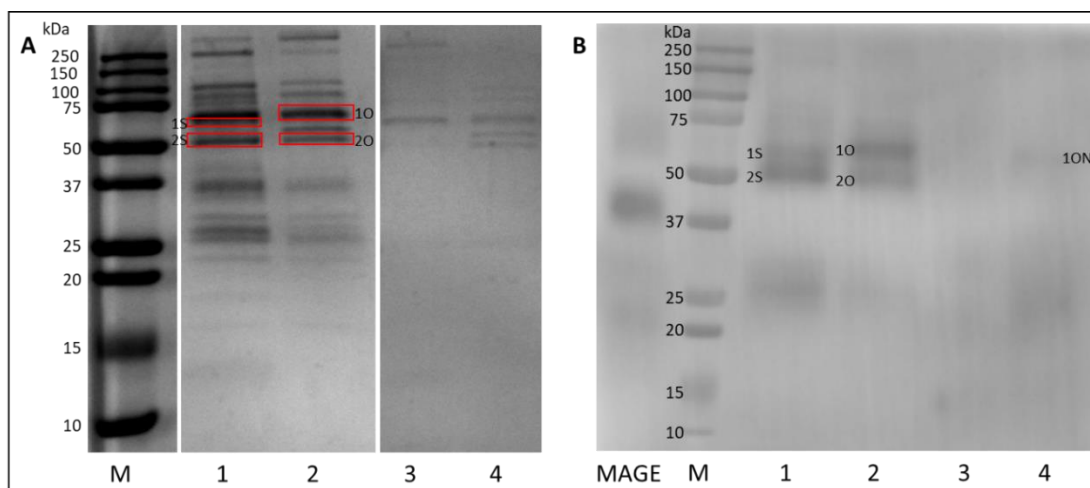
Rys. 28. Krzyżowa reaktywność przeciwciał anti-MAGE. W 12 % żelu poliakrylamidowym rozdzielono marker białkowy (M) oraz jednakową ilość (30  $\mu$ g/dołek) modelowych AGEs syntezowanych z mioglobiny (MB) metodą tradycyjną w roztworze (RT) i w warunkach bezwodnych (MW) w reakcji z A) mel, lac, cel; B) glc, fru, ryb; C) GLX, GA, MGO, T<sub>2</sub>N; Membrany po transferze inkubowano z medium hodowlanym zawierającym przeciwciała anti-MAGE, a następnie z II-rzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP.

## 4.6. Identyfikacja epitopu MAGE obecnego we krwi ludzkiej

### 4.6.1. Izolacja antygeny MAGE z surowicy ludzkiej

Do wydzielenia naturalnego MAGE z surowicy ludzkiej wykorzystano, oczyszczone przeciwciała monoklonalne anti-MAGE. W tym celu białko wytrącono z surowicy korzystając z komercyjnego zestawu Pierce Direct IP Kit (Thermo Scientific) zgodnie z instrukcją producenta (3.5.5). Na kolumnienki z immobilizowanymi przeciwciałami anti-MAGE nakładano surowicę od pacjentów z cukrzycą leczonych w Klinice Angiologii, Diabetologii i Nadciśnienia Tętniczego we Wrocławiu. Ten sam eksperyment wykonano dla osocza krwi ludzkiej pozyskanego od dawców Wojskowego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu. Jako kontrolę negatywną zastosowano wyjściowe złoże, bez przeciwciał anti-MAGE. Materiał eluowany z Sepharose-anti-MAGE analizowano metodą Western blotting (rozdział 3.5.1). Masę cząsteczkową wyznaczono za pomocą oprogramowania do analizy żeli LabImage (Kapelan Bio-Imaging).

W próbce eluowanej ze złoża Sepharose-anti-MAGE zaobserwowano szereg białek (Rys 29A, dołek 1 i 2) podobnie jak w przypadku złoża kontrolnego (Rys 29A, dołek 3 i 4) co ilustruje obraz żelu po wybarwieniu Coomassie Brilliant Blue. Jednak na membranie po inkubacji z przeciwciałami anti-MAGE zaobserwowano tylko reakcję z kilkoma białkami. W próbce krwi pacjentów z cukrzycą pozytywną reakcję wykazały białka o masie 59,44 kDa (1S) i 50,00 kDa (2S) (Rys. 29B; linia 1), a w próbce krwi osób zdrowych białko o masie 61,67 kDa (1O) i 49,33 kDa (2O) (Rys. 29B; linia 2). Słaba reakcja widoczna była w próbce eluowanej ze złoża kontrolnego (1ON, Rys. 29B; linia 4), jednak masa tego białka (56,67 kDa) była odmienna od eluatów ze złoża Sepharose-anti-MAGE, co sugeruje niespecyficzną reakcję. Nieswoistą reakcję przeciwciał II-rzędowych wykluczono w eksperymencie, gdzie pominięto przeciwciała I-rzędowe (Rys 30B). Prążki z żelu o masie odpowiadającej prążkom na membranie po reakcji z przeciwciałami anti-MAGE (zaznaczone na czerwono na Rys. 29A) zostały wycięte i wysłane do analizy spektrometrycznej LC-MS/MS w celu ich identyfikacji.



Rys. 29. A) Obraz żelu SDS-PAGE i B) Western blotting z przeciwciałami anti-MAGE próbek surowicy pacjentów z cukrzycą (1, 3) oraz osocza zdrowej osoby (2, 4), uzyskanych po elucji ze złoża Sepharose-anti-MAGE (dolki 1, 2) lub ze złoża kontrolnego (dolki 3, 4). Na żelu rozdzielono także marker białkowy (M) i MB-mel MW (MAGE) jako kontrolę pozytywną. Na czerwono zaznaczono prążki wysłane do analizy spektrometrycznej.

#### 4.6.2. Identyfikacja białek zawierających epitop MAGE za pomocą spektrometrii masowej

Wycięte prążki z żelu SDS-PAGE (Rys. 29A) analizowano metodą spektrometrii masowej w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN w Warszawie (rozdział 3.2.4). Wyniki analizy zamieszczono w Tabeli 5. W próbce surowicy pacjentów z cukrzycą (1S), zidentyfikowano szereg białek ludzkich, np. albuminę surowicy z najmocniejszym sygnałem (score) i pokryciem sekwencji 38,8 %, a także  $\alpha$ -1-antytrypsynę oraz ciężki łańcuch immunoglobuliny A (IgA) i G (IgG). W próbce 2S, wyniki wskazują na obecność ciężkiego łańcucha IgG1 (pokrycie sekwencji 30 %) oraz stałych regionów łańcuchów ciężkich IgG3 i IgG2. W prążku 1O zidentyfikowano łańcuch  $\alpha$  fibrynogenu jako białko z najmocniejszym sygnałem, choć pokrycie sekwencji było nieznacznie większe dla stałego regionu łańcucha ciężkiego IgA (20,4 %). W próbce 2O najmocniejszym sygnał uzyskano dla łańcucha ciężkiego IgG1 (pokrycie sekwencji 28,7 %). Dodatkowo wykazano obecność w próbce łańcucha ciężkiego IgG2 oraz  $\beta$  i  $\gamma$  fibrynogenu.

Tabela 5. Lista białek zidentyfikowanych w prążkach wyciętych z żelu poliakrylamidowego po elucji ze złoża Sepharose-anty-MAGE

Prążek	Nr w bazie Sprot	Białko (score > 350)	Score	Masa [Da]	Ilość dopasowanych peptydów	Pokrycie sekwencji [%]
<b>1S</b>	P02768	Albumin	2900	71317	64	38,8
	P01009	Alpha-1-antitrypsin	1510	46878	31	41
	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	1495	38486	29	24
	P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	1453	42287	35	21
	P0DOX5	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	1406	49925	33	16
	P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	1077	37366	22	23
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain	956	49816	21	19
	P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	891	36505	26	19
	P04004	Vitronectin	758	55069	15	19
	P08670	Vimentin	620	53676	5	4
	P01008	Antithrombin-III	619	53025	13	23
	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	539	40114	9	11
	P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	492	36431	9	13
<b>2S</b>	P0DOX5	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	1961	49925	46	30
	P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	1961	36596	46	41
	P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	1671	42287	42	18
	P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	1396	36505	37	19
	P08670	Vimentin	900	53676	7	4
	P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	523	36431	11	20
	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	357	83554	4	5
<b>1O</b>	P02671	Fibrinogen alpha chain	992	95656	26	19,9
	P08670	Vimentin	752	53676	7	4,7
	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	431	83554	7	8,6
	P02768	Albumin	408	71317	12	14,9
	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	352	38486	9	20,4
<b>2O</b>	P0DOX5	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	2510	49925	52	28,7
	P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	2297	36505	55	34
	P02675	Fibrinogen beta chain	2127	56577	52	46,6
	P02679	Fibrinogen gamma chain	2112	52106	37	40,8
	P08670	Vimentin	1025	53676	9	4,7
	P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	790	36431	14	25,7
	P02671	Fibrinogen alpha chain	637	95656	19	19,2
	P01871	Immunoglobulin heavy constant mu	398	50093	5	9,5
	P06733	Alpha-enolase	360	47481	3	4,6

S – surowica pacjenta z cukrzycą; O – osocze osoby zdrowej. Kolorem niebieskim zaznaczono zidentyfikowane białka z najmocniejszym sygnałem i pokryciem sekwencji

#### 4.6.3. Weryfikacja zidentyfikowanych we krwi białek zawierających antygen MAGE

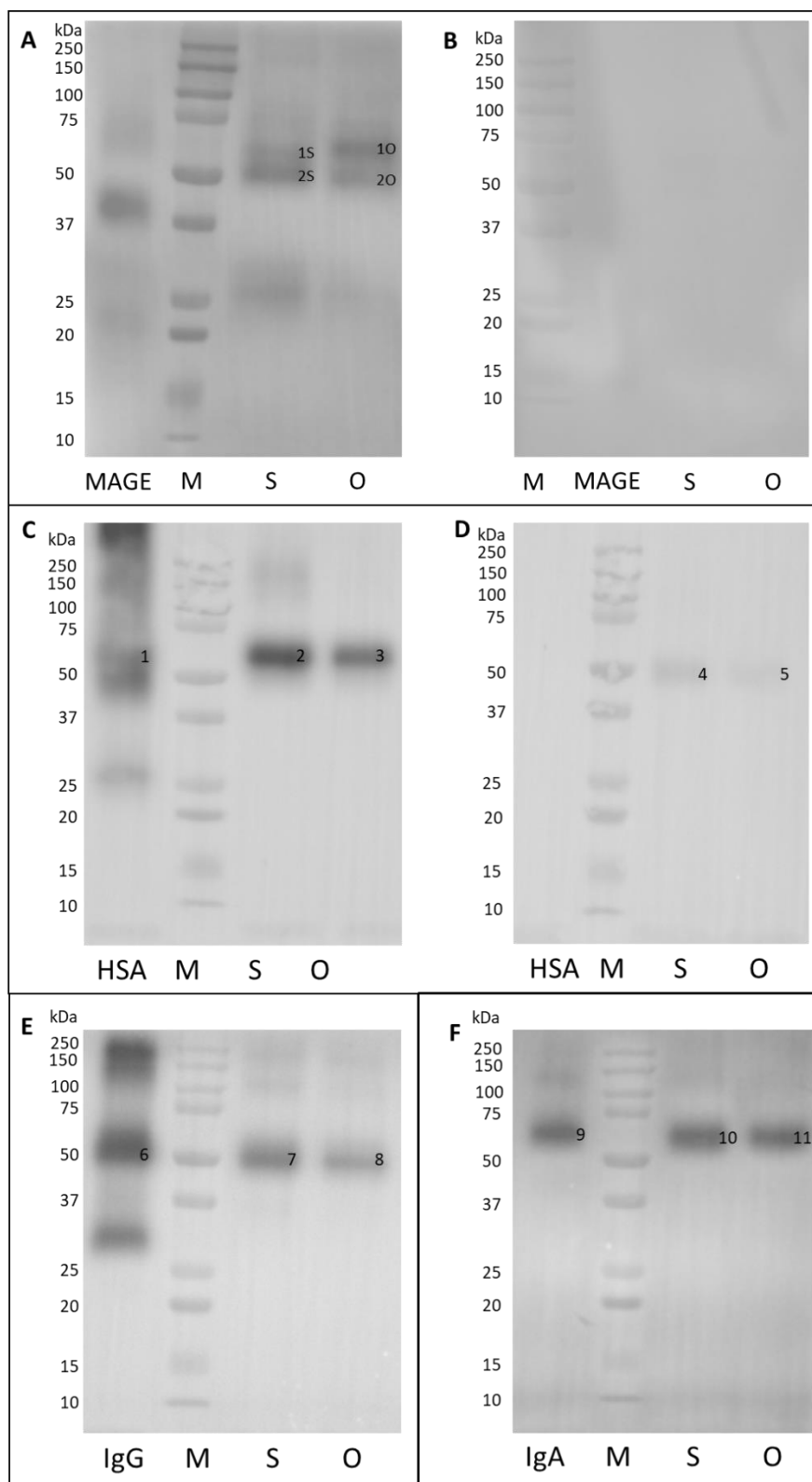
Na podstawie uzyskanego wyniku (score) identyfikacji, pokrycia sekwencji (Tabela 5) oraz teoretycznej masy białek wytypowano białka najpowszechniejsze we krwi ludzkiej: albumina (HSA) oraz immunoglobuliny IgG i IgA. W celu potwierdzenia zidentyfikowanych za pomocą spektrometrii mas białek zawierających antygen MAGE (4.6.2) wykonano szereg dodatkowych testów Western blotting ze swoistymi przeciwciałami anti-HSA, anti-ludzkie IgG i anti-ludzkie IgA (Rys. 30). Podobnie jak dla przeciwciał anti-MAGE (Rys. 29B, 30A) reakcję wywoływano za pomocą chemiluminescencji, a masę cząsteczkową wyznaczono przy użyciu programu LabImage (Kapelan Bio-Imaging). Wyniki podsumowano w Tabeli 6.

W wyniku reakcji z przeciwciałami anti-HSA w próbkach otrzymanych z surowicy i osocza widoczne są wyraźne prążki o masie około 59 kDa (Rys. 30C; prążki 2, 3). Na tym samym poziomie wykryto również prążek w próbce kontrolnej HSA (Rys. 30C; prążek 1). Na membranie inkubowanej z przeciwciałami anti-mysie IgG-HRP (kontrola negatywna dla przeciwciał anti-HSA) obserwowano słabą reakcję z białkiem o masie około 49 kDa (Rys. 30D; prążki 4, 5). Jest to najprawdopodobniej reakcja niespecyficzna z ludzkimi IgG, występującymi w próbkach.

Membrana inkubowana z przeciwciałami anti-ludzkie IgG-HRP wykazała reakcję białek z próbek surowicy i osocza o masie około 49 – 50 kDa (Rys. 30E; prążki 7, 8). Prążek o tej samej masie wykryto również w próbce kontrolnej IgG (Rys. 30E; prążek 6). Natomiast reakcja z przeciwciałami anti-ludzkie IgA-HRP wykazała wyraźny prążek o masie około 61 kDa (Rys. 30F; prążki 10, 11). Ten sam prążek wykryto w kontroli pozytywnej w dołku z IgA (Rys. 30F; prążek 9).

Na podstawie otrzymanych wyników i zastosowanych kontroli można stwierdzić, iż w próbkach surowicy i osocza eluowanych ze złoża Sepharose-anty-MAGE wykryto HSA (59 kDa), IgG (50 kDa) oraz IgA (61 kDa).





Rys. 30. Western blotting z przeciwciałami: A) anti-MAGE; B) anti-mysie IgE-HRP (kontrola do przeciwciał anti-MAGE); C) anti-HSA; D) anti-mysie IgG-HRP (kontrola do przeciwciał anti-HSA); E) anti-ludzkie IgG-HRP; F) anti-ludzkie IgA-HRP. S – próbka z surowicy, O – próbka z osocza, eluowane ze złoża Sepharose-anti-MAGE, M – marker białkowy, kontrole pozytywne: MAGE – MB-mel MW (5  $\mu$ g/dołek), HSA, IgG, IgA (2  $\mu$ g/dołek)

Tabela 6. Zestawienie mas cząsteczkowych [kDa] wyliczonych na podstawie prążków w WB (Rys. 30) zidentyfikowanych w próbkach surowicy i osocza oraz białek kontrolnych

		Zastosowane przeciwciała			
		anty-MAGE	anty-HSA	anty-IgG	anty-IgA
Próbki krwi	Surowica pacjent z cukrzycą	59,44 kDa	59,97 kDa	50,00 kDa	61,50 kDa
		50,00 kDa			
	Osocze zdrowy ochotnik	61,67 kDa	59,97 kDa	49,21 kDa	61,50 kDa
		49,33 kDa			
Białka kontrolne	MB-mel MW	42,13 kDa			
	HSA		59,46 kDa		
	ludzkie IgG			50,56 kDa	
	ludzkie IgA				62,23 kDa

Jednakowymi kolorami zaznaczono odpowiadające sobie masy cząsteczkowe białek wykrytych różnymi przeciwciałami

Na Rys. 30A prążek 1S o masie 59,44 kDa wykryty w reakcji z przeciwciałami anti-MAGE w próbce otrzymanej z surowicy odpowiada masie prążka 2 na panelu C (Rys. 30), co sugeruje że jest to HSA. Pokrywa się to również z wynikiem analizy LC-MS/MS próbki 1S, w której stwierdzono ludzką albuminę (Tabela 5). Prążki 2S i 2O (Rys. 30A) o masach odpowiednio 50,00 i 49,33 kDa odpowiadają prążkom 7 i 8 (Rys. 30E) wykrytym metodą WB z przeciwciałami anti-IgG. Wyniki te również potwierdzają wyniki analizy masowej, w której w próbkach 2S i 2O zidentyfikowano ludzkie IgG (Tabela 5). Prążek 1O (Rys. 30A) o masie 61,67 kDa, wykryty z przeciwciałami anti-MAGE w próbce z osocza, odpowiada masie prążka 11 (61,50 kDa) na panelu F (Rys. 30), co wskazuje że jest to IgA. Analiza masowa również wskazała na obecność IgA w próbce 1O (Tabela 5).

Na podstawie uzyskanych wyników LC-MS/MS oraz WB można wywnioskować, iż epitop MAGE tworzy się *in vivo* we krwi na albuminie oraz immunoglobulinie G i A. W surowicy od pacjentów z cukrzycą białkami zawierającymi epitop MAGE są HSA i IgG, natomiast u osób zdrowych są to immunoglobuliny G i A.

Ciekawą obserwacją jest wskazanie na obecność innych białek, na których obecny jest MAGE u osób zdrowych i chorych, np.  $\alpha$ -1-antytrypsyny, witronektyny, wimentyny, antytrombiny czy fibrynogenu, które również zostały zidentyfikowane na podstawie analizy LC/MS próbek eluowanych po inkubacji ze złożem Sepharose-anti-MAGE (Tabela 5).

## 5. Dyskusja wyników

Produkty glikacji tworzą bardzo heterogenną grupę związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych, które kumulują się w organizmie, prowadząc do zaburzeń homeostazy. Dotychczas zdefiniowanych zostało kilkadziesiąt struktur związków należących do AGEs, jednak najprawdopodobniej wiele z produktów glikacji, być może kluczowych dla danej patologii, nie zostało jeszcze poznanych. Z uwagi na charakter AGEs – dużą lepkość, małą rozpuszczalność, brak możliwości enzymatycznej kontroli reakcji, trudne jest opracowywanie metod ich detekcji o wysokiej powtarzalności. Obecnie w praktyce laboratoryjnej do oznaczania znanych AGEs w materiale biologicznym używane są przede wszystkim techniki instrumentalne lub immunochemiczne. W badaniach naukowych nad procesem glikacji wykorzystuje się syntetyczne analogi strukturalne końcowych produktów zaawansowanej glikacji, odpowiadające związkom występującym *in vivo*. Modelowe AGEs mogą być stosowane m.in. do poznania budowy i właściwości tworzących się związków, uzyskania przeciwciał rozpoznających dany produkt glikacji oraz do opracowania standardów potrzebnych w wyznaczaniu krzywych wzorcowych, wykorzystywanych w badaniach klinicznych i diagnostycznych. W niniejszej pracy przedstawiono badania mające na celu poznanie właściwości nowych modelowych produktów glikacji nazwanych MAGE, których analogi gromadzą się *in vivo* w różnych tkankach ludzkich i zwierzęcych<sup>107</sup>.

Produkty AGE mogą wpływać na ogólną strukturę białek, prowadząc do modyfikacji właściwości lub agregacji, co w konsekwencji powoduje zmiany patologiczne. Efekty glikacji zależą od zmodyfikowanego białka oraz rodzaju czynnika glikującego, dlatego aby lepiej poznać właściwości powstających produktów glikacji, w niniejszej pracy zsyntezowano szereg modelowych AGEs w reakcji z różnymi związkami karbonyłowymi, w tym monosacharydami, disacharydami, dikarbonyłami oraz produktami utleniania tłuszczu. Glukoza jest najbardziej rozpowszechnionym badanym cukrem, a jej podwyższone stężenie w organizmie powoduje glikację albuminy i hemoglobiny, które są markerami wykorzystywanymi w kontrolowaniu cukrzycy<sup>73</sup>. Jednakże, reaktywność glukozy jest dość niska, ponieważ w cyklicznej półacetalowej formie cząsteczki tego cukru nie ma reaktywnej grupy aldehydowej, która jest dostępna do kondensacji z grupami aminowymi białek, tylko w otwartej formie łańcuchowej glukozy<sup>17</sup>. Inne węglowodany, na przykład fruktoza, ryboza i związki dwukarbonyłowe, takie jak metyloglioksal i glioksal, są znacznie bardziej reaktywne, co prowadzi do powstawania AGEs z dużo

większą wydajnością<sup>118–120</sup>. W kontekście procesu glikacji mało jest doniesień na temat reaktywności disacharydów. Melibioza jest dwucukrem składającym się z galaktozy i glukozy połączonymi wiązaniem  $\alpha$ -1,6 glikozydowym, laktoza jest zbudowana z galaktozy i glukozy połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym, a celobioza to dimer glukozy połączonej wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym. Badania Shinohara i wsp. udowodniły, że disacharydy połączone wiązaniami 1,6-glikozydowymi są bardziej aktywnymi czynnikami glikującymi<sup>121</sup>. Cukry te wykazywały zarówno wysoką intensywność brązowienia na skutek reakcji Maillarda, jak i reaktywność tworzenia oksymów, poprzez największą ilość formy acyklicznej, w porównaniu z dwucukrami glukozy połączonymi wiązaniami 1-2, 1-3 i 1-4. AGEs powstałe z disacharydów najczęściej mają źródło egzogenne<sup>122–125</sup>. Wśród różnych reaktywnych form karbonylowych powstających podczas glikacji białek, stężenie metyloglioksalu, glioksalu i aldehydu glikolowego znacznie wzrasta w osoczu osób z hiperglikemią<sup>126</sup>. Aldehydy te powstają endogennie na skutek degradacji monosacharydów lub, jak glioksal, w wyniku peroksydacji lipidów<sup>127</sup>. Ze względu na silne właściwości nukleofilowe, a w związku z tym wysoką zdolność do indukowania procesu glikacji, MGO, GLX, GA zmieniają funkcje białek i zwiększają wytwarzanie wolnych rodników wewnątrz komórki<sup>128</sup>. Ponadto, powstałe z tych karbonyli AGEs biorą udział we wzmożonej agregacji białek i tworzeniu złogów o charakterze amyloidu<sup>129,130</sup>. Poza glioksałem, produktami peroksydacji lipidów, które wywierają wiele efektów biologicznych w wyniku bezpośredniej aktywacji szlaków sygnałowych lub modyfikacji innych makrocząsteczek, są nienasycone aldehydy, takie jak trans-2-nonenal. Mogą one również działać jako czynniki sieciujące cząsteczki białek prowadząc do tworzenia agregatów<sup>131</sup>.

W przeprowadzonych badaniach, jako makrocząsteczkę modelową do syntezy AGEs, wykorzystano monomeryczne białko hemowe mięśni – mioglobinę, która jest szeroko stosowana do badania reakcji glikacji *in vitro* z różnymi cukrami i aldehydami<sup>132–134</sup>. Białko to ma stosunkowo niską masę cząsteczkową (17 kDa), dzięki czemu możliwe jest śledzenie podczas reakcji tworzenia średnio- i silnie usieciowanych AGEs. Ponadto MB z łatwością ulega glikacji, gdyż w strukturze I-rzędowej tego białka występuje 19 reszt lizylowych, 11 histydylowych i 2 arginyłowe. Jak dotąd, najczęściej stosowaną metodą otrzymywania AGEs jest synteza klasyczna polegająca na kilkutygodniowej inkubacji danego czynnika glikującego z białkiem modelowym w określonej temperaturze w środowisku wodnym lub w innym polarnym rozpuszczalniku<sup>102</sup>. Wszystkie wymienione warunki oraz pH roztworu wpływają na wydajność reakcji glikacji<sup>133</sup>. W obecnej pracy

syntezę tradycyjną (RT) prowadzono przez 21 dni w temp. pok. na mieszaninach białka i czynnika glikującego w różnym stosunku molowym (Tabela 2), umożliwiając otrzymanie znacznej ilości rozpuszczalnych w wodzie produktów średnio i silnie usieciowanych. Najwyższe wydajności tej reakcji uzyskano dla produktów: MB-MGO RT (59 %), MB-ryb RT (49,8 %), MB-mel RT (49,6 %) (Tabela 3). Produkty z pozostałych karbonyli otrzymano z wydajnością około lub poniżej 20 %. Najmniej reaktywnym związkiem okazała się glukoza, ponieważ produkt MB-glc RT uzyskano z wydajnością jedynie 2,6 %, podobnie jak wskazywały wcześniejsze doniesienia literaturowe<sup>5,17,135</sup>. Inna zastosowana metoda otrzymywania AGEs w warunkach bezwodnych w środowisku mikrofal (MW) pozwala na znaczne skrócenie czasu trwania reakcji (z 21 dni do 15-45 min). Stosując syntezę z użyciem reaktora mikrofalowego, z precyzyjnie określonymi warunkami reakcji, można wyeliminować wahania wydajności procesu oraz uzyskać powtarzalną metodę otrzymywania AGEs<sup>107</sup>. Większość produktów otrzymanych tą metodą wykazała wydajność na poziomie 30-40 % (Tabela 3), np. MB-mel MW 39,8 %, MB-T<sub>2</sub>N MW 40,8 %. Produkt MB-glc MW uzyskano z wydajnością 30,8 %, co wskazuje na ponad 11-krotną wyższą wydajność reakcji, w porównaniu do metody RT. AGEs o najniższej wydajności syntezy MW to MB-ryb (18,4 %), MB-lac (20,4 %) oraz MB-cel (25,8 %). Warto jednak zaznaczyć, że dla wspomnianych disacharydów wydajność syntezy RT wyniosła odpowiednio: 11,8 % i 25,6 %. Glikacja melibiozą, zarówno w warunkach RT i MW, przebiegła z wyższą efektywnością w porównaniu do pozostałych disacharydów (zawierających wiązanie 1-4 glikozydowe), co jest zgodne z danymi na temat reaktywności cukrów w zależności od rodzaju wiązania glikozydowego występującego w cząsteczce<sup>121</sup>. Otrzymane wydajności syntez AGEs z aldehydów są porównywalne do AGEs cukrowych, jednak ze względu na wysoką reaktywność tych związków, do reakcji użyto znacznie mniejsze ilości związków karbonylowych w stosunku do białka (1/8 lub 10/1 – białko/aldehyd) niż w syntezach białko-cukier (1/100) (Tabela 2).

W wyniku syntezy produktów glikacji powstaje zazwyczaj wiele różnych związków, w tym polimerów, co można zaobserwować na Rys. 7 przedstawiającym analizę SDS-PAGE otrzymanych produktów AGEs. Wyniki wskazują na obecność w każdym preparacie mieszaniny związków o różnej masie cząsteczkowej oraz stopniu usieciowania. W większości testowanych AGEs wyżej usieciowane związki uzyskano metodą w środowisku bezwodnym z użyciem mikrofal. Zaobserwowana odwrotna sytuacja w przypadku produktów MB-lac i MB-ryb może wynikać z mniejszej ilości białka w

naniesionej próbce. Zgodnie z literaturą, w zależności od warunków syntezy oraz zastosowanych czynników glikujących, z jednakowych substratów można uzyskać odmienne produkty glikacji o różnych właściwościach fizykochemicznych<sup>104</sup>. W celu potwierdzenia tego faktu i wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi produktami glikacji, w pracy wykonano widma absorpcyjne i fluorescencyjne uzyskanych modelowych AGEs. Widma absorpcyjne nie wykazały wyraźnego maksimum charakterystycznego dla indywidualnego badanego produktu (Rys. 8). Obserwowano maksimum absorpcji dla wszystkich AGEs przy około 400 nm, co odpowiada właściwościom natywnej MB<sup>115</sup>. Produkty powstałe z mel, podobnie jak większość badanych AGEs, w niewielkim stopniu tłumili absorpcję, z wyjątkiem MB-MGO RT, który w podanym maksimum wykazuje wyższą absorpcję niż białko nośnikowe. Najwyższy spadek absorpcji przy 400 nm zaobserwowano dla produktu MB-GA RT, co sugeruje że obecne w tym preparacie struktury AGEs są odmienne od pozostałych produktów powstałych z innych substratów. Zaobserwowane efekty są zgodne z danymi literaturowymi<sup>136,137</sup>. W badaniach Banerjee i wsp.<sup>129</sup> na skutek glikacji MB i MGO metodą tradycyjną, również zaobserwowano spadek absorpcji w maksimum przy długości fali 400 nm, co różni się z wynikiem otrzymanym w niniejszej pracy. Zastosowane przez badaczy stężenia substratów (100  $\mu$ M MB i 200  $\mu$ M MGO) oraz czas reakcji (7-18 dni) znacząco różnią się od warunków przedstawionej metody (3.1.1), co uniemożliwia dokładne porównanie uzyskanych wyników. Widoczny we wszystkich próbkach intensywny pik przy 400 nm, odpowiada cząsteczce hemu i jest charakterystyczny dla wszystkich białek hemowych<sup>115,138</sup>. Widmo absorpcji MB jest zatem bezpośrednim wskaźnikiem środowiska hemu, a tym samym integralności struktury białka, która na skutek glikacji ulega zmianom. Modyfikacja reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie hemu powoduje jego utratę z cząsteczki MB, a tym samym spadek absorpcji we wskazanym maksimum. Pomiar absorbancji w zakresie fal UV-Vis można wykorzystać do badania parametrów białek, w szczególności ich struktury oraz do uzyskania informacji na temat wiązania i stanu utlenienia hemowej grupy prostetycznej. Metoda ta została wstępnie wykorzystana do pomiaru glikowanej hemoglobiny (HbA1c) we krwi pacjentów z cukrzycą<sup>139</sup>.

Analiza widm fluorescencji wyraźniej niż widma absorpcyjne wskazuje, na znaczną zmianę strukturalną glikowanej MB. Wzrost emisji fluorescencji AGEs można wyjaśnić za pomocą techniki FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)<sup>133</sup>. Większość modelowych HMW-AGEs wykazuje podobną charakterystyczną fluorescencję z maksimum około 400 i 435 nm, jednak niektóre produkty ujawniają charakterystyczny

profil (Rys. 9). Dodatkowy pik w zakresie fal powyżej 450 nm wykazują produkty MB-mel MW, MB-ryb MW, MB-ryb RT, MB-MGO MW, MB-MGO RT oraz MB-GA RT, co w literaturze jest wiązane z obecnością AGEs<sup>140</sup>. Najwyższą fluorescencję w całym testowanym zakresie fal wykazano dla produktu MB-ryb MW, przy czym produkt MB-ryb RT wykazuje podobny profil fluorescencji jednak z mniejszą intensywnością. Produkty MB-fru RT, MB-glc RT i MB-cel RT wykazują odmienne charakterystyczne maksimum przy długości fali 392 nm, którego nie zaobserwowano dla analogicznych produktów syntezowanych w warunkach bezwodnych. Sugeruje to wytwarzanie podczas syntezy tradycyjnej podobnych struktur z wolnych heksoz oraz z glukozy zawartej w cząsteczce celobiozy. Istnieją doniesienia literaturowe wskazujące na obecność podanego piku po modyfikacji fruktozą, glukozą oraz rybozą<sup>141,142</sup>, jednak pik ten nie został jeszcze ostatecznie skorelowany z konkretną strukturą AGE. Podobnie dla wszystkich substratów widoczne są różnice we fluorescencji między produktami powstałymi w różnych warunkach glikacji. Produkt MAGE (MB-mel MW) wykazuje fluorescencję o najwyższej intensywności emisji przy 431 nm, natomiast produkt MB-mel uzyskany metodą tradycyjną (MB-mel RT) nie posiada właściwości fluorescencyjnych. Może to sugerować, że obecność wody znacznie zmniejsza efektywność formowania MAGE, a powstałe struktury różnią się od siebie.

W celu potwierdzenia obecności epitopu pochodzącego z melibiozy na modelowym MAGE (MB-mel MW), przeprowadzono analizę modyfikacji glikowanej MB metodą tandemowej spektrometrii masowej LC-MS/MS. Zastosowano wyszukiwanie modyfikacji odpowiadającej opublikowanej wcześniej przez naszą grupę struktury niskocząsteczkowego produktu MAGE<sup>107</sup>. Otrzymane wyniki potwierdziły, iż w zsyntezowanym białkowym produkcie MAGE obecna jest badana modyfikacja (Tabela 4). Znaleziono 3 lizyny (K), 1 argininę (R) i 1 histydynę (H), zmodyfikowane przez cząsteczkę melibiozy, których nie znaleziono na wyjściowej mioglobinie. Zmodyfikowana H, w pozycji 65 sekwencji aminokwasowej, jest odpowiedzialna za oddziaływanie z grupą hemową (Rys. 10), co wyjaśnia wcześniej omówiony spadek absorpcji przy długości fali 400 nm na skutek glikacji (Rys. 8). Zsyntezowano także dodatkowe antygeny MAGE z wykorzystaniem takich białek nośnikowych jak BSA i królicze IgG. Otrzymane produkty zostały wykorzystane do selekcji pojedynczego klonu z hodowli komórek hybrydowych produkującego przeciwciała anti-MAGE (Rys. 14).

Dzięki zastosowaniu metody seryjnych rozcieńczeń uzyskano klon komórek hybrydowych, który wydajnie produkował aktywne i selektywne przeciwciała anti-MAGE, (Rys. 16). Pomimo, że produkcja przeciwciał w hodowlach *in vitro* nie jest tak wydajna jak w systemach *in vivo*<sup>143</sup>, jest to obecnie najbardziej etyczna i powszechnie stosowana opcja masowej produkcji przeciwciał monoklonalnych. W obecnej pracy zoptymalizowano warunki hodowli komórek hybrydowych i produkcji przeciwciał anti-MAGE poprzez obniżenie zawartości FBS w pożywce (Rys. 17, Rys. 18). Jak podaje literatura pozwala to na zwiększenie wydzielania przeciwciał przez komórki hybrydowe<sup>144</sup>, a także ułatwia proces oczyszczania na kolumnach powinowactwa przy zmniejszonej ilości surowiczych immunoglobulin w medium hodowlanym<sup>143</sup>.

Przeciwciała monoklonalne anti-MAGE oczyszczono następnie za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie z przygotowanym złożem Sepharose-MAGE (Rys. 22). Zoptymalizowana metoda oczyszczania pozwoliła na uzyskanie czystych przeciwciał z wydajnością 45 µg ze 100 ml medium hodowlanego komórek hybrydowych, co daje 0,45 µg/ml. Zgodnie literaturą typowe stężenie przeciwciał w medium hodowlanym komórek hybrydowych wynosi 0,01-1 mg/ml<sup>145</sup> lub waha się pomiędzy 1-100 µg/ml<sup>146</sup>. Podane wartości dotyczą zawartości immunoglobulin w nieoczyszczanym supernatancie oraz związane są zwykle z produkcją przeciwciał klasy IgG, które są wydzielane przez komórki w dużej ilości. Mniejsza wydajność oczyszczania może wynikać z różnic w ilości wydzielanych przeciwciał klasy IgE i IgG przez komórki hybrydowe, a także z ograniczonego wiązania się przeciwciał anti-MAGE do przygotowanego złoża Sepharose-MAGE, co można zaobserwować na Rys. 20.

Preparat oczyszczonych przeciwciał w żelu poliakrylamidowym (Rys. 24) wykazywał 3 prążki o masie około 20, 65 i 75 kDa. Zgodnie z literaturą masa łańcucha ciężkiego mysiej immunoglobuliny klasy E po rozdziale elektroforetycznym wynosi 75 kDa<sup>116</sup>, co odpowiada masie najbardziej intensywnego prążka w wybarwionym żelu. Izotyp łańcucha ciężkiego jako typ epsilon został dodatkowo potwierdzony za pomocą spektrometrii masowej. Słabo widoczny w żelu prążek o masie około 20 kDa odpowiada masie łańcucha lekkiego immunoglobuliny. W teście paskowym nie udało się określić rodzaju łańcucha lekkiego zawartego w uzyskanych przeciwciałach monoklonalnych (Rys. 23), jednak na podstawie otrzymanych wyników i danych literaturowych można przypuszczać, że jest to łańcuch lekki typu κ, który migruje na wysokości około 20 kDa, podczas gdy łańcuch λ migruje nieco szybciej i odpowiada białkom o mniejszej masie<sup>117</sup>.



Zaobserwowany prążek o masie około 65 kDa może być efektem nierównomiernej denaturacji podjednostek łańcucha ciężkiego w cząsteczce immunoglobuliny <sup>147</sup>. Przeciwciała klasy IgE występują w surowicy w najniższym stężeniu i mają najkrótszy okres półtrwania spośród wszystkich immunoglobulin. Ich działanie jest związane z nadwrażliwością i reakcjami alergicznymi, a także odpowiedzią na infekcje robakami pasożytniczymi <sup>148</sup>. Istnieją doniesienia, że AGEs indukowały znacznie silniejszą produkcję IgE, niż białka nośnikowe z których powstały, co wiąże się ze wzmacnianiem immunogenności limfocytów T CD4+ i komórek Th2 (odgrywających krytyczną rolę indukującą produkcję IgE przez limfocyty B), poprzez oddziaływanie z receptorami zmiatającymi SR-A i prezentację antygenów przez cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej – MHCII <sup>149</sup>.

Przeciwciała stanowią potężne narzędzie, które można wykorzystać do identyfikacji niewielkich ilości danego analitu w próbce. Ich właściwości wiązania antygeny określają zarówno czułość, jak i selektywność testu immunologicznego. Zdolność przeciwciał do rozpoznawania antygenów docelowych z wysoką specyficznością ma fundamentalne znaczenie dla ich naturalnej funkcji <sup>150</sup>. W przeprowadzonych badaniach niniejszej pracy potwierdzono, że uzyskane przeciwciała anti-MAGE specyficznie reagują z antygenem MAGE zsyntezowanym na różnych białkach nośnikowych, przy braku reakcji z białkami nieglikowanymi i innymi AGEs (Rys. 27 i 28). W teście ELISA, reakcja przeciwciał anti-MAGE z MB-mel MW immobilizowaną na płytce była efektywniej hamowana przez HMW-MAGE w porównaniu z LMW-MAGE (Rys. 26), co można wyjaśnić większą liczbą cząsteczek mel na jednej cząsteczce białka. Dodatkowo, analiza krzywych hamowania dla mel i LMW-MAGE sugeruje, że struktura badanego epitopu rozpoznawana przez uzyskane przeciwciała anti-MAGE obejmuje część cukrową oraz fragment pochodzący z aminokwasu (Rys. 26). Ze względu na heterogenny charakter białkowych produktów glikacji i problemów związanych z wyodrębnieniem z nich mniejszych struktur stanowiących epitop, niskocząsteczkowe modelowe produkty glikacji mogą stanowić w przyszłości dobry wzorzec do wykorzystania w testach immunochemicznych (np. test hamowania ELISA) pozwalających na ilościową ocenę zawartości antygeny MAGE w materiale biologicznym.

Immunoprecypitacja to technika często stosowana do izolacji antygeny z materiału biologicznego, wykorzystująca zdolność tworzenia kompleksów antygen/przeciwciało. Przeciwciała monoklonalne lub poliklonalne mogą być wiązane niekwalencyjnie z

immunoabsorbentami, takimi jak agarozą z białkiem A lub białkiem G, lub mogą być połączone kowalencyjnie z matrycą na fazie stałej<sup>151</sup>. W zastosowanej metodzie wydzielenia antygeny MAGE z krwi ludzkiej wykorzystano przeciwciała monoklonalne anti-MAGE przyłączone kowalencyjnie do aktywowanej pochodnej agarozy (Sepharose). Naturalnie występujący produkt MAGE wydzielano z połączonej surowicy od kilku pacjentów z cukrzycą oraz z osocza krwi pozyskanego od zdrowych dawców. Oczyszczony antygen analizowano techniką immunochemiczną WB a otrzymane białka zidentyfikowano metodą spektrometrii masowej. Immunoblotting z przeciwciałami anti-MAGE (Rys. 29B) wykazał obecność epitopu MAGE na białkach o masie 59,44 kDa (1S) oraz 50,00 kDa (2S) we krwi pacjentów z cukrzycą, a także na białkach o masie 61,67 kDa (1O) i 49,33 kDa (2O) we krwi zdrowych dawców. W obu próbach widoczne są również prążki o masie powyżej 25 kDa, niewykryte w próbach kontrolnych. Białka te stanowią prawdopodobnie lekkie łańcuchy wydzielonych immunoglobulin<sup>148</sup> i w przyszłości również powinny być zbadane w celu potwierdzenia obecności MAGE.

Odpowiadające wybranym białkom prążki w żelu (Rys. 29) poddane analizie LC-MS/MS (Tabela 5) pokazały w próbce 1S (59,44 kDa) szereg różnych białek, w tym albuminę surowicy ludzkiej (HSA) z najlepszym wynikiem i pokryciem sekwencji 38,8%. Obecność HSA w tej próbce została również potwierdzona metodą WB ze swoistymi przeciwciałami anti-HSA (Rys. 30C). Albumina jest najczęściej występującym białkiem osocza i stanowi ponad 50 % białek surowicy u osób zdrowych. Odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu ciśnienia onkotycznego i jest znana jako wszechstronny nośnik białkowy do transportu różnych endogennych i egzogennych ligandów<sup>152</sup>. Albumina surowicy ludzkiej ma przybliżony okres półtrwania wynoszący 3 tygodnie, co jest wystarczające, aby umożliwić wystąpienie znaczącej glikacji i progresję do tworzenia AGEs<sup>17</sup>. Struktura HSA składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 585 aminokwasów, o masie cząsteczkowej, ustalonej na podstawie sekwencji aminokwasów, równej 66,438 kDa<sup>153</sup>. Wyliczona za pomocą analizy spektrometrycznej masa, wynosząca 71,317 kDa, jest prawdopodobnie podwyższona na skutek modyfikacji, jakie zachodzą *in vivo* na albuminie<sup>154</sup>. Udowodniono, że białko to podlega wielu modyfikacjom chemicznym, m.in. acetylacji, oksydacji, glikozylacji, glikacji, karbonylacji czy fosforylacji, które wpływają na jego właściwości wiążące i antygenowe<sup>155</sup>. Po rozdziale próbki za pomocą SDS-PAGE wyliczono masę cząsteczkową białka, która wynosiła 59,44 kDa. Migracja białek w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, która nie koreluje ze wzorem masy cząsteczkowej, jest określana jako „przesunięcie żelu” i wydaje się być dość powszechna, lecz nie została

jeszcze ostatecznie wyjaśniona<sup>156</sup>. Zwykle efekt ten tłumaczony jest przez m.in. różnice w strukturze drugo- i trzeciorzędowej białka, wewnętrzny ładunek netto białka oraz ilość związanego SDS<sup>156-159</sup>. W literaturze wskazano, że modyfikacje potranslacyjne albuminy, powodują zmiany w strukturze drugo- i trzeciorzędowej HSA, wywołując m.in. zmniejszoną zawartość  $\alpha$ -helis w strukturze polipeptydu<sup>160</sup>, co może wpływać na stopień obładowania detergentem i być wytłumaczeniem dla różnicy pomiędzy masą rzeczywistą białka a masą wyliczoną z żelu po rozdziale elektroforetycznym w badanych próbkach.

W próbce 1S (Rys. 29B; Tabela 5) oprócz albuminy, z wysokim wynikiem zidentyfikowano także  $\alpha$ -1-antytrypsynę oraz ciężkie łańcuchy IgA i IgG.  $\alpha$ -1-antytrypsyna jest rozpuszczalną w wodzie i dyfuzyjną w tkankach krążącą glikoproteiną o masie cząsteczkowej 52 kDa<sup>161</sup>. Jej podstawową funkcją jest ochrona tkanek przed enzymami uwalnianymi podczas zapalenia, takimi jak elastaza neutrofilów i proteinaza 3<sup>162</sup>. Okres półtrwania we krwi  $\alpha$ -1-antytrypsyny wynosi 4-5 dni, co wyklucza postęp glikacji tego białka do etapu wytworzenia końcowych produktów zaawansowanej glikacji, a jedynie powstawanie produktów Amadoriego<sup>17,161</sup>. Jednak nie można wykluczyć obecności na tym białku innych struktur analogicznych do MAGE, które mogłyby powstać w wyniku innych modyfikacji, ponieważ nie wyjaśniono dotąd pochodzenia MAGE *in vivo*. Natomiast obecność w próbce 1S immunoglobulin G i A wykluczono metodą WB (Rys. 30; Tabela 6), gdzie po reakcji ze swoistymi przeciwciałami uzyskano wybarwione prążki o innej masie cząsteczkowej niż w wyniku reakcji z przeciwciałami anti-MAGE.

W próbce 1O (uzyskanej z osocza zdrowego dawcy), odpowiadającej białkom o masie około 61,67 kDa (Rys. 29B) zidentyfikowano łańcuch  $\alpha$  fibrynogenu jako białko z najwyższym wynikiem oraz stały region łańcucha ciężkiego IgA z największym pokryciem sekwencji (Tabela 5). Fibrynogen jest wielofunkcyjnym białkiem osocza ostrej fazy, odgrywającym kluczową rolę w hemostazie i kaskadzie krzepnięcia, występującym w osoczu krwi zdrowych osób w stężeniach 1,5-4 mg/ml. Białko to składa się z dwóch identycznych podjednostek zawierających trzy łańcuchy polipeptydowe określane jako łańcuchy A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$ , w sumie o masie około 340 kDa<sup>163</sup>. Masa cząsteczkowa łańcucha  $\alpha$  fibrynogenu wynosi zgodnie z literaturą około 95 kDa<sup>164</sup>, co znacznie przekracza wartość masy wyznaczonej na podstawie migracji prążka w żelu i WB (Rys. 29B). Ponadto, fibrynogen charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania we krwi wynoszącym od 3 do 5 dni<sup>165</sup>. Ze względu na powyższe, obecność tego białka, jako wydzielonego produktu MAGE, nie była dodatkowo potwierdzana metodą WB ze swoistymi przeciwciałami anti-

fibrynogen. Jednak, podobnie jak w przypadku  $\alpha$ -1-antytrypsyny, nie można wykluczyć, że jest to analog MAGE utworzony z innego niż mel substratu.

W wyniku weryfikacji danych po identyfikacji białek metodą LC-MS/MS za pomocą immunoblottingu z przeciwciałami anti-IgA, potwierdzono obecność tych immunoglobulin w badanej próbce 1O (Rys. 30F). Wybarwione prążki po reakcji z przeciwciałami anti-IgA wskazują na masę białka wynoszącą 61,50 kDa, co koreluje z masą prążka wybarwionego w wyniku reakcji z przeciwciałami anti-MAGE (Rys. 30A; prążek 1O). Wyznaczona na podstawie analizy LC/MS-MS masa równa 38,49 kDa dotyczy regionu stałego łańcucha ciężkiego IgA, z pominięciem domeny zmiennej. W wyniku elektroforezy obserwujemy cały łańcuch ciężki IgA, którego masa cząsteczkowa według literatury wynosi około 60 kDa<sup>166,167</sup>. Immunoglobulina A jest drugim pod względem liczebności przeciwciałem występującym w krwi ludzkiej. Główne jej funkcje to neutralizacja toksyn oraz zapobieganie inwazji drobnoustrojów przez barierę nabłonkową błony śluzowej. Co prawda, białko to charakteryzuje się dość krótkim okresem półtrwania, wynoszącym 5-7 dni<sup>168</sup>, jednak istnieją stany chorobowe, w których eliminacja IgA jest zaburzona i dochodzi do odkładania się tego białka w tkankach<sup>169</sup>, a taki stan może sprzyjać procesowi glikacji.

W próbce 2S pozyskanej z surowicy pacjentów z cukrzycą oraz w próbce 2O pozyskanej z osocza dawców krwi, wyniki LC-MS/MS wskazują na obecność ciężkiego łańcucha IgG1 (pokrycie sekwencji odpowiednio 30 i 28,7 %), jako białko z najwyższym wynikiem identyfikacji (Tabela 5). Wyznaczona wskutek wykonanej analizy masa cząsteczkowa tego białka wynosi 49,93 kDa, co jest zgodne z masą cząsteczkową białek wykrytych w reakcji z przeciwciałami anti-MAGE, gdzie dla wybarwionych prążków 2S i 2O wyznaczono odpowiednio masę cząsteczkową 50,00 i 49,33 kDa (Rys. 30A; Tabela 6). Ponadto, wartości te odpowiadają masom wyznaczonym dla białek wybarwionych po reakcji z przeciwciałami anti-IgG, które wyniosły 50,00 kDa dla prążka 2S oraz 49,21 dla prążka 2O (Rys. 30E; Tabela 6). Dane literaturowe wskazują, że ciężki łańcuch ludzkiej IgG wynosi około 50 kDa<sup>170</sup>, co jest zgodne z wartościami otrzymanymi w WB zarówno dla kontroli pozytywnej, jak i próbek badanych (Rys. 30E). Nieznacznie niższa masa IgG w próbce pochodzącej z osocza, może wskazywać na mniejszy stopień modyfikacji tego białka w porównaniu do IgG wydzielonego z surowicy od pacjenta z cukrzycą. W próbce 2S zidentyfikowano również stałe regiony ciężkich łańcuchów IgG3 i IgG2, a w próbce 2O stałe regiony łańcuchów ciężkich IgG2 i IgG4. Zastosowane w immunoblottingu

przeciwciała weryfikujące obecność IgG w próbce są skierowane na region Fc ludzkiej IgG, co nie pozwoliło na dokładne określenie podklasy zidentyfikowanego białka. IgG stanowi około 75 % immunoglobulin w surowicy u ludzi i jest zasadniczym przeciwciałem wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Charakteryzuje się okresem półtrwania wynoszącym 23 dni, co jest wystarczające do wytworzenia AGEs na skutek procesu glikacji<sup>171</sup>.

Ponadto, w próbce 2O zidentyfikowano obecność łańcuchów  $\beta$  i  $\gamma$  fibrynogenu (Tabela 5), których masę wyznaczono na 56,58 kDa oraz 52,11 kDa. W badaniach Repetto i wsp., w wyniku elektroforezy i immunoblottingu łańcuch  $\beta$  fibrynogenu obserwowano przy wartościach około 50, 40 i 37 kDa<sup>172</sup>, natomiast w badaniach Luo i wsp. masę łańcucha  $\beta$  wyznaczono na 52 kDa, a łańcucha  $\gamma$  na 46 kDa<sup>173</sup>. Obserwowane masy nieznacznie różnią się od masy prążka wyznaczonego po reakcji z przeciwciałami anti-MAGE w tej próbce (49,33 kDa, Rys. 29B), jednak biorąc pod uwagę krótki okres półtrwania fibrynogenu, większą zdolność do tworzenia AGEs posiada IgG, która również była zidentyfikowana w tej próbce, z wyższym wynikiem.

Na podstawie wykonanych analiz i otrzymanych wyników, można stwierdzić iż antygen MAGE obecny jest *in vivo* na takich białkach jak albumina, IgG i IgA. W surowicy pacjentów z cukrzycą białkami zawierającymi epitop MAGE są HSA i IgG, natomiast u osób zdrowych są to immunoglobuliny G i A. Taki wynik sugeruje, że antygen MAGE fizjologicznie występuje na immunoglobulinach, u których glikacja jest powszechną modyfikacją potranslacyjną<sup>174</sup>, jednak w warunkach hiperglikemii tworzy się również na innych białkach, takich jak albumina. Fakt, że w próbce pochodzącej od surowicy pacjentów z cukrzycą nie wyizolowano IgA, która była obecna w próbce pochodzącej z osocza zdrowego dawcy, można wytłumaczyć tym, iż w warunkach hiperglikemii stężenie glikowanej albuminy oraz IgG jest na tyle duże, że wysyciły większość miejsc wiązania antygeny MAGE podczas immunoprecypitacji, uniemożliwiając izolację innych białek, występujących w mniejszych stężeniach. Dalsze badania w celu identyfikacji dodatkowych białek modyfikowanych MAGE powinny uwzględnić zmianę warunków immunoprecypitacji (większe stężenie przeciwciał anti-MAGE i ponowna precypitacja).

AGEs zmieniają trójwymiarową integralność różnych białek osocza, co może wywoływać nieprawidłowości funkcjonalne, a tym samym prowadzić do patogenezy wielu chorób<sup>175,176</sup>. Fizjologiczne tworzenie AGEs zostało skorelowane z procesami

oksydacyjnymi i zapalnymi, a nie z poziomem glukozy, gdyż wykazano, że glikacja różnych białek osocza występuje *in vivo* także u osób z normoglikemią<sup>177</sup>. W stanach patologicznych stresu oksydacyjnego i/lub hiperglikemii dochodzi do przyspieszenia powstawania AGEs. Różnice w glikacji pomiędzy poszczególnymi białkami osocza są duże. Dominującym czynnikiem wpływającym na glikację jest okres półtrwania poszczególnych białek: dłuższy okres półtrwania to wyższy stopień glikacji<sup>178</sup>. IgG i HSA o okresach półtrwania odpowiednio 23 i 21 dni wykazują wysoki poziom glikacji *in vivo*. Jednak stopień uglikowania białka zależy także od zawartości reszt aminokwasów zasadowych w łańcuchu polipeptydowym. Przy warunkach sprzyjających procesowi glikacji, białko o krótszym okresie półtrwania, zawierające dużo miejsc podatnych na glikację, może również podlegać modyfikacjom z wysoką intensywnością<sup>179,180</sup>. Może to być wytłumaczeniem, dla obserwowanej glikacji IgA, która pomimo krótszego okresu półtrwania we krwi (5-7 dni), zawiera wiele reszt aminokwasowych mogących ulegać procesowi glikacji, podobnie jak IgG i HSA. Ponadto, cząsteczki IgA we krwi mogą tworzyć kompleksy z albuminą, co wydłuża okres półtrwania IgA i może umożliwiać ich nadmierną glikację<sup>181</sup>.

W badaniach naukowych glikacja immunoglobulin, zwłaszcza IgG, jest przedmiotem szczególnego zainteresowania, ze względu na jej wpływ na funkcjonalność i immunokompetencję przeciwciał, w odniesieniu do ich zdolności do wiązania antygenów i indukowania kaskady dopełniacza. Skutki tworzenia AGEs na przeciwciałach zależą od liczby i miejsca glikacji. Raportowane wyniki są zróżnicowane i obserwowane efekty wahają się od braku wpływu na funkcjonalność do całkowitej utraty aktywności. Wytworzone AGEs można wykryć zarówno na ciężkich, jak i lekkich łańcuchach immunoglobulin, przy czym glikację w regionie stałym uważa się za mniej niepokojącą, gdyż nie wpływa na zdolność rozpoznawania antygeny<sup>174</sup>. Jednym z problemów glikacji immunoglobulin, zwłaszcza przeciwciał terapeutycznych, jest rozwój immunogenności. AGEs obecne na przeciwciałach w modelach zwierzęcych powodowały wzrost immunogenności w porównaniu do niemodyfikowanych immunoglobulin. Wyniki Ahmad i wsp. pokazały, że zmiany strukturalne w IgG prowadzą do generowania neo-epitopów, co prowadzi do produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko takiemu białku<sup>178</sup>. Wytworzone przeciwciała, chociaż wysoce specyficzne dla immunogenu, wykazywały również wiązanie poliswoiste. W przypadku ludzi, taki charakter przeciwciał może wpływać na etiologię wielu chorób autoimmunologicznych. Wykazano, że glikowane IgG

są związane ze stanem zapalnym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) <sup>182,183</sup>. IgG-AGE jest silnym immunogenem, który wydaje się być wyzwalaczem przy indukcji autoprzeciwciał w RZS <sup>177</sup>. Badania Islam i wsp. wykazały wytwarzanie autoprzeciwciał u pacjentów z cukrzycą typu 2 przeciwko zmodyfikowanym IgG <sup>184</sup>. Pod wpływem stresu glikooksydacyjnego, doszło do wytworzenia nowych antygenów AGE na cząsteczce IgG i nadania jej immunogenności. Ponadto, krążące autoprzeciwciała, przeciwko białkom zmodyfikowanym na skutek glikacji, obserwowano u pacjentów z miażdżycą tętnic <sup>185</sup>.

Do tej pory istnieje niewiele doniesień literaturowych dotyczących glikacji IgA. W badaniach mających na celu określenie związku między stężeniem IgA w surowicy a nefropatią cukrzycową, wykazano że wysokie stężenie IgA jest oznaką tego powikłania u cukrzyków <sup>186</sup>. Nefropatia IgA jest najczęściej rozpoznawanym typem choroby kłębuszkowej na świecie, objawiającą się powstawaniem mezangialnych złogów IgA <sup>169</sup>. Stwierdzono również, że powikłania mikronaczyniowe cukrzycy nasilają się w wyniku nałożenia się nefropatii IgA oraz, że poziomy IgA w surowicy są znacznie wyższe u pacjentów z cukrzycą niż u osób zdrowych <sup>186-188</sup>. Co więcej, wcześniejsze doniesienia sugerują, że poziomy fruktozaminy w surowicy były znacząco podwyższone u pacjentów ze szpiczakiem mnogim z nieprawidłową produkcją IgA <sup>189</sup>. Podwyższone zawartości IgA w przedstawionych schorzeniach, zwłaszcza w cukrzycy, mogą być wyjaśnione przez zmniejszoną eliminację IgA przez wątrobę oraz glikację tych białek, co skutkuje zmianą tempa ich obrotu powodując akumulację IgA w surowicy <sup>181</sup>.

HSA odgrywa ważną rolę obronną w stresie oksydacyjnym, funkcjonuje jako nośnik białkowy do transportu różnych ligandów oraz ma wpływ na regulację ciśnienia onkotycznego. Glikacja jest jedną z podstawowych modyfikacji, które mogą zmieniać jej natywną strukturę drugo- i trzeciorzędową <sup>190</sup>. HSA jest zazwyczaj 2-3 razy bardziej glikowana niż reszta białek surowicy w stanie hiperglikemii <sup>191</sup>. Badania wykazały, że glikacja silnie wpływa na właściwości przeciwutleniające HSA oraz obniża powinowactwo wiązania ligandów i właściwości transportowe tego białka <sup>192</sup>. Opisywano również wysoce immunogenne działanie glikowanej albuminy i powstawanie autoprzeciwciał skierowanych na neo-epitopy wytworzone w wyniku modyfikacji tego białka u pacjentów z cukrzycą, z powikłaniami lub bez <sup>193,194</sup>. W niektórych badaniach glikowana albumina jest sugerowana jako alternatywny dla HbA1c marker kontroli glikemii w wielu powikłaniach cukrzycy, w tym w nefropatii, retinopatii oraz w chorobie Alzheimera, a także w przypadku pacjentów poddawanych hemodializie lub w cukrzycy ciążowej <sup>194</sup>.

Badania wskazują na bardziej widoczne zmiany strukturalne w glikowanej HSA izolowanej od pacjentów z cukrzycą z przewlekłą chorobą nerek w porównaniu do pacjentów bez powikłań<sup>160</sup>. Stwierdzono również, że albumina glikowana *in vivo* u pacjentów z niewydolnością serca zwiększała adhezyjność komórek krwi obwodowej do komórek śródbłonna, co może sprzyjać progresji choroby sercowo-naczyniowej<sup>195</sup>. W badaniach Tramarin i wsp. wskazano, że rozregulowanie poziomu glukozy w osoczu, co ma miejsce w przypadku cukrzycy, zwiększa ilość glikowanej HSA i sprzyja tworzeniu się wczesnych produktów glikacji oraz AGEs. Stężenia wczesnych produktów glikacji albuminy oraz utworzone AGEs w surowicy są znacznie podwyższone u pacjentów z cukrzycą i mogą odgrywać rolę w zaostrzeniu stanu zapalnego i utrzymywania się powikłań związanych z tą chorobą<sup>196</sup>.

Identyfikacja surowiczych białek, na których obecny jest antygen MAGE dostarcza nowej wiedzy na temat procesu glikacji w organizmie człowieka. Nieznane jest jednak źródło i sposób tworzenia MAGE *in vivo*, co powinno być przedmiotem dalszych badań nad tym antygenem. Do wyjaśnienia pozostaje również możliwość dostarczania MAGE oraz substratów do jego tworzenia (melibiozy) do organizmu wraz z dietą. Melibioza jest wytwarzana podczas fermentacji żywności przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*<sup>197,198</sup>, *Lactobacillus*<sup>199</sup>, *Lactococcus* i *Leuconostoc*<sup>199</sup> oraz drożdże<sup>200</sup>, a także występuje w ziarnach kakaowca, miodach i przetworzonej soi<sup>201,202</sup>. Dostarczona wraz z żywnością ulega wchłanianiu w jelicie cienkim przez połączenia para-komórkowe, istniejące pomiędzy sąsiednimi enterocytami<sup>203</sup>, co może sugerować egzogenne źródło tego substratu do dalszego wytwarzania MAGE. Obecnie nie ma dostępnych danych na temat ewentualnego powstawania MAGE w jelitach i późniejszego wchłaniania do krwioobiegu. Warto również zaznaczyć, że wykrywany przez przeciwciała anti-MAGE epitop w tkankach może posiadać strukturę krzyżowo-reagującą z przeciwciałami, ale o zupełnie innym pochodzeniu.

Podsumowując, podwyższony poziom krążących białek zmodyfikowanych przez AGEs koreluje m.in. ze stopniem powikłań cukrzycowych, naczyniowych i z procesem neurodegeneracji<sup>6,34,204</sup>. Wyniki moich badań wykazały obecność nowego produktu glikacji MAGE na białkach surowicy ludzkiej takich jak albumina, IgG i IgA. Białka te są głównymi składnikami osocza krwi stanowiąc ponad 70 % wszystkich białek osocza (głównie HSA i IgG)<sup>17</sup>. W literaturze wskazuje się na fizjologiczną glikację, np. immunoglobulin, jednak w warunkach hiperglikemii, stresu oksydacyjnego czy



wzmoczonych stanów zapalnych albumina surowicy jest uważana za najbardziej istotne białko ulegające glikacji, np. w powikłaniach cukrzycowych. Jednak inne glikowane białka, takie jak IgG czy IgA mogą być również istotne w patologii innych chorób, np. w RZS i nefropatiach. Ciekawym kierunkiem będzie rozszerzenie dalszych badań uwzględniając osocze pacjentów z cukrzycą w celu sprawdzenia obecności MAGE na fibrynogenie w tym stanie patologicznym. Dodatkowo, otrzymane specyficzne przeciwciała anti-MAGE w przyszłości mogą posłużyć jako narzędzie do oznaczania poziomu produktów MAGE w tkankach, a uzyskane informacje na temat modyfikowanych przez MAGE białek, będą przydatne do określenia roli tych produktów w patologii chorób.

## 6. Wnioski

1. Produkty MAGE wykazują odmienną strukturę i właściwości od konwencjonalnych AGEs opisywanych dotąd w literaturze.
2. Syntetyczny LMW-MAGE może być wykorzystany jako wzorzec w testach immunoenzymatycznych do oznaczania stężenia MAGE w próbkach biologicznych.
3. We krwi ludzkiej potwierdzono obecność endogennego antygeny MAGE na kilku białkach krwi, w tym na albuminie, immunoglobulinie G i immunoglobulinie A.
4. We krwi cukrzyków oraz osób zdrowych obserwuje się odmienne białka zmodyfikowane przez MAGE. W surowicy pacjentów z cukrzycą ten antygen zidentyfikowano głównie na albuminie krwi i IgG, natomiast u osób zdrowych na immunoglobulinach typu G i A.

## 7. Literatura

1. Maillard, L. C. Action des acides amines sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique [Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way]. *Comptes Rendus* 66–68 (1912).
2. Lin, J.-A., Wu, C.-H. & Yen, G.-C. Perspective of Advanced Glycation End Products on Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 66, 2065–2070 (2018).
3. Cho, S.-J., Roman, G., Yeboah, F. & Konishi, Y. The Road to Advanced Glycation End Products: A Mechanistic Perspective. *Curr. Med. Chem.* 14, 1653–1671 (2007).
4. Lin, J. A., Wu, C. H., Lu, C. C., Hsia, S. M. & Yen, G. C. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1850–1864 (2016).
5. Fu, M. X. *et al.* Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose: Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* 43, 676–683 (1994).
6. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458, 221–226 (2015).
7. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia* 44, 129–146 (2001).
8. Vlassara, H. & Uribarri, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: Cause, effect, or both? *Curr. Diab. Rep.* 14, 1–17 (2014).
9. Cerami, C. *et al.* Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13915–13920 (1997).
10. Snelson, M. & Coughlan, M. T. Dietary advanced glycation end products: Digestion, metabolism and modulation of gut microbial ecology. *Nutrients* 11, (2019).
11. Forbes, J. M. & Cooper, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev* 93, 137–188 (2013).
12. Perrone, A., Giovino, A., Benny, J. & Martinelli, F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020, (2020).
13. Ahmed, M. U., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Identification of N epsilon-Carboxymethyllysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein. *Journal of Biological Chemistry* 261, (1986).

14. Ikeda, K. *et al.* Nε-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the maillard reaction. *Biochemistry* 35, 8075–8083 (1996).
15. Ahmed, M. U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Nε-(Carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 324, 565–570 (1997).
16. Portero-Otin, M., Nagaraj, R. H. & Monnier, V. M. Chromatographic evidence for pyrraline formation during protein glycation in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1247, 74–80 (1995).
17. Vetter, S. W. *Glycated Serum Albumin and AGE Receptors. Advances in Clinical Chemistry* 72, (Elsevier Inc., 2015).
18. Wa, C., Cerny, R. L., Clarke, W. A. & Hage, D. S. Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 385, 48–60 (2007).
19. Kim, C.-S., Park, S. & Kim, J. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* 21, 55–61 (2017).
20. Séro, L. *et al.* Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules* 18, 14320–14339 (2013).
21. Henning, C. & Glomb, M. A. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. *Glycoconjugate Journal* 33, 499–512 (2016).
22. Jono, T. *et al.* Nε-(carboxymethyl)lysine and 3-DG-imidazolone are major AGE structures in protein modification by 3-deoxyglucosone. *J. Biochem.* 136, 351–358 (2004).
23. Cotham, W. E. *et al.* Proteomic analysis of arginine adducts on glyoxal-modified ribonuclease. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1145–53 (2004).
24. Ahmed, N. *et al.* Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone Advanced Glycation End-Products of Human Lens Proteins. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5287–5292 (2003).
25. Grandhee, S. K. & Monnier, V. M. Mechanism of formation of the maillard protein cross-link pentosidine: Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* 266, 11649–11653 (1991).
26. Hull, G. L. J., Woodside, J. V., Ames, J. M. & Cuskelly, G. J. N\*-

- (carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chem.* 131, 170–174 (2012).
27. Greven, W. L. *et al.* Mesangial accumulation of GA-pyridine, a novel glycolaldehyde-derived AGE, in human renal disease. *Kidney International* 68, (2005).
  28. Biemel, K. M., Reihl, O., Conrad, J. & Lederer, M. O. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by maillard processes: Unraveling the structure of a pentosidine precursor. *J. Biol. Chem.* 276, 23405–23412 (2001).
  29. Pietkiewicz, J., Seweryn, E., Bartyś, A. & Gamian, A. Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji-znaczenie fizjologiczne i kliniczne. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 62, 511–523 (2008).
  30. Goldin, A. *et al.* Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597–605 (2006).
  31. Wautier, M. P., Guillausseau, P. J. & Wautier, J. L. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 11, 305–309 (2017).
  32. Palimeri, S., Palioura, E. & Diamanti-Kandarakis, E. Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: Recommendations for dietary management. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 8, 415–426 (2015).
  33. DeGroot, J. *et al.* Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 1207–1215 (2004).
  34. Fournet, M., Bonté, F. & Desmoulière, A. Glycation damage: A possible hub for major pathophysiological disorders and aging. *Aging Dis.* 9, 880–900 (2018).
  35. Alavi, P., Yousefi, R., Amirghofran, S., Karbalaee-Heidari, H. R. & Moosavi-Movahedi, A. A. Structural analysis and aggregation propensity of reduced and nonreduced glycated insulin adducts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170, 623–638 (2013).
  36. Sola, R. J. & Griebenow, K. Effects of glycosylate on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 1223–1245 (2009).
  37. Miele, C. *et al.* Human Glycated Albumin Affects Glucose Metabolism in L6 Skeletal Muscle Cells by Impairing Insulin-induced Insulin Receptor Substrate

- (IRS) Signaling through a Protein Kinase C $\alpha$ -mediated Mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 47376–47387 (2003).
38. Guo, Q. *et al.* Methylglyoxal contributes to the development of insulin resistance and salt sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J. Hypertens.* 27, 1664–1671 (2009).
  39. Lin, N., Zhang, H. & Su, Q. Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress. *Diabetes Metab.* 38, 250–257 (2012).
  40. Wang, X., Liu, J., Yang, Y. & Zhang, X. An update on the potential role of advanced glycation end products in glycolipid metabolism. *Life Sci.* 245, 117344 (2020).
  41. Anwar, S., Khan, M. A., Sadaf, A. & Younus, H. A structural study on the protection of glycation of superoxide dismutase by thymoquinone. *Int. J. Biol. Macromol.* 69, 476–481 (2014).
  42. Blakytyn, R. & Harding, J. J. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem. J.* 288, 303–307 (1992).
  43. Gonen, B., Baenziger, J., Schonfeld, G., Jacobson, D. & Farrar, P. Nonenzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro. Effects on cell-interactive properties. *Diabetes* 30, 875–878 (1981).
  44. Younis, N. *et al.* Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Current Opinion in Lipidology* 19, 378–384 (2008).
  45. Sell, D. R. & Monnier, V. M. Molecular basis of arterial stiffening: Role of glycation—a mini-review. *Gerontology* 58, 227–237 (2012).
  46. Baydanoff, S., Konova, E., Dosheva, I. & Dorovski, P. Non-enzymatic glycation of elastin. *Glycosylation Dis.* 1, 53–58 (1994).
  47. Aronson, D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *Journal of Hypertension* 21, 3–12 (2003).
  48. Adjı, A., O'Rourke, M. F. & Namasivayam, M. Arterial stiffness, its assessment, prognostic value, and implications for treatment. *Am. J. Hypertens.* 24, 5–17 (2011).
  49. Sufl, A. & Mazur-Zielińska, H. *Glikozaminoglikany-budowa, właściwości biochemiczne i znaczenie kliniczne Glycosaminoglycans-structure, biochemical properties and clinical significance*.
  50. Yamagishi, S., Ueda, S., Matsui, T., Nakamura, K. & Okuda, S. Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy. *Curr. Pharm. Des.* 14, 962–968 (2008).
  51. Yamagishi, S. I. & Matsui, T. *Advanced glycation end products, oxidative stress and*

- diabetic nephropathy. Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3, 101–108 (2010).
52. Bell, D. S. H. Heart failure: The frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diabetes Care* 26, 2433–2441 (2003).
  53. Gandy, S. The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1121–1129 (2005).
  54. Li, J., Liu, D., Sun, L., Lu, Y. & Zhang, Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective. *Journal of the Neurological Sciences* 317, 1–5 (2012).
  55. Staniszevska, M., Leszek, J., Małyszczak, K. & Gamian, A. Are advanced glycation end-products specific biomarkers for Alzheimer's disease? *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 20, 896–897 (2005).
  56. Salahuddin, P., Rabbani, G. & Khan, R. H. The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 19, 407–437 (2014).
  57. Padmaraju, V., Bhaskar, J. J., Prasada Rao, U. J. S., Salimath, P. V. & Rao, K. S. Role of advanced glycation on aggregation and DNA binding properties of  $\alpha$ -synuclein. *J. Alzheimer's Dis.* 24, 211–221 (2011).
  58. Lee, D., Park, C. W., Paik, S. R. & Choi, K. Y. The modification of  $\alpha$ -synuclein by dicarbonyl compounds inhibits its fibril-forming process. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1794, 421–430 (2009).
  59. König, A., Miranda, H. V. & Outeiro, T. F. Alpha-Synuclein Glycation and the Action of Anti-Diabetic Agents in Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* 8, 33–43 (2018).
  60. Sessa, L. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of Cell Adhesion Molecules (CAMs). *PLoS One* 9, (2014).
  61. Sorci, G., Riuzzi, F., Giambanco, I. & Donato, R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833, 101–109 (2013).
  62. Prasad, C., Davis, K. E., Imrhan, V., Juma, S. & Vijayagopal, P. Advanced Glycation End Products and Risks for Chronic Diseases: Intervening Through Lifestyle Modification. *American Journal of Lifestyle Medicine* 13, 384–404 (2019).
  63. Schmidt, A. M. RAGE and Implications for the Pathogenesis and Treatment of

- Cardiometabolic Disorders – Spotlight on the Macrophage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 613–621 (2017).
64. Ramasamy, R., Yan, S. F. & Schmidt, A. M. The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vascular Pharmacology* 57, 160–167 (2012).
  65. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. (2017). doi:10.1038/sigtrans.2017.23
  66. Katakami, N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 25, 27–39 (2018).
  67. Ahmed, N. Advanced glycation endproducts - Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67, 3–21 (2005).
  68. Ott, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2, 411–429 (2014).
  69. Dariya, B. & Nagaraju, G. P. Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. *Drug Discovery Today* 25, 1614–1623 (2020).
  70. Dozio, E. *et al.* Advanced glycation end products (Age) and soluble forms of age receptor: Emerging role as mortality risk factors in CKD. *Biomedicines* 8, 1–12 (2020).
  71. Byun, K. *et al.* Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics* 177, 44–55 (2017).
  72. Manigrasso, M. B., Juranek, J., Ramasamy, R. & Schmidt, A. M. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25, 15–22 (2014).
  73. Krhač, M. & Lovrenčić, M. V. Update on biomarkers of glycemic control. *World J. Diabetes* 10, 1–15 (2019).
  74. Dozio, E. *et al.* Usefulness of glycated albumin as a biomarker for glucose control and prognostic factor in chronic kidney disease patients on dialysis (CKD-G5D). *Diabetes Research and Clinical Practice* 140, 9–17 (2018).
  75. Disease, K. *et al.* *KDIGO 2020 Clinical Practice Guideline For Diabetes Management In Chronic Kidney Disease.* (2020). doi:10.1016/j.kint.2020.06.019
  76. Yang, S. *et al.* Impact of Oxidative Stress Biomarkers and Carboxymethyllysine (an Advanced Glycation End Product) on Prostate Cancer: A Prospective Study. *Clin.*



- Genitourin. Cancer* 13, e347–e351 (2015).
77. Nogami, M., Hoshi, T., Toukairin, Y., Arai, T. & Nishio, T. Immunohistochemistry of advanced glycation end product N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine in coronary arteries in relation to cardiac fibrosis and serum N-terminal-pro basic natriuretic peptide in forensic autopsy cases. *BMC Res. Notes* 13, (2020).
78. Llauradó, G. *et al.* Advanced glycation end products are associated with arterial stiffness in type 1 diabetes. *J. Endocrinol.* 221, 405–413 (2014).
79. Jones, M. L. *et al.* Acute Glucose Load, Inflammation, Oxidative Stress, Nonenzymatic Glycation, and Screening for Gestational Diabetes. doi:10.1007/s43032-020-00188-5
80. Sisay, M., Edessa, D., Ali, T., Mekuria, A. N. & Gebrie, A. The relationship between advanced glycation end products and gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 15, (2020).
81. Sharma, A. *et al.* Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 34, (2020).
82. Perkins, B. A. *et al.* High fractional excretion of glycation adducts is associated with subsequent early decline in renal function in type 1 diabetes. *Sci. Rep.* 10, (2020).
83. Ahmad, S. *et al.* AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. *Seminars in Cancer Biology* 49, 44–55 (2018).
84. Kerkeni, M. *et al.* Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease. *Thromb. Res.* 134, 633–638 (2014).
85. Yoshida, N., Okumura, K. I. & Aso, Y. High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 54, 345–350 (2005).
86. Takeuchi, M. & Yamagishi, S. TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Med. Hypotheses* 63, 449–452 (2004).
87. Takeuchi, M., Takino, J.-I. & Yamagishi, S.-I. Involvement of TAGE-RAGE System in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J. Ophthalmol.* 2010, 12 (2010).
88. Takeuchi, M., Takino, J. & Yamagishi, S. Involvement of the Toxic AGEs (TAGE)-RAGE System in the Pathogenesis of Diabetic Vascular Complications: A Novel Therapeutic Strategy. *Curr. Drug Targets* 11, 1468–1482 (2012).
89. Sato, T. *et al.* TAGE (Toxic AGEs) Theory in Diabetic Complications. *Curr. Mol.*

- Med.* 6, 351–358 (2006).
90. Takeuchi, M. Toxic AGEs (TAGE) theory: a new concept for preventing the development of diseases related to lifestyle. *Diabetology and Metabolic Syndrome* 12, (2020).
  91. Takeuchi, M., Takino, J.-I., Sakasai-Sakai, A., Takata, T. & Tsutsumi, M. Toxic AGE (TAGE) Theory for the Pathophysiology of the Onset/Progression of NAFLD and ALD. doi:10.3390/nu9060634
  92. Takeuchi, M., Takino, J. I. & Yamagishi, S. I. Cancer malignancy is enhanced by glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products. *J. Oncol.* 2010, (2010).
  93. Kong, S. Y. *et al.* The association between glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 1855–1863 (2015).
  94. Takeuchi, M. & Yamagishi, S. Possible Involvement of Advanced Glycation End-Products (AGEs) in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Curr. Pharm. Des.* 14, 973–978 (2008).
  95. Ashraf, J. M. *et al.* Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB Life* 67, 897–913 (2015).
  96. Ahmed, N., Argirov, O. K., Minhas, H. S., Cordeiro, C. A. A. & Thornalley, P. J. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): Surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine- and n $\epsilon$ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* 364, 1–14 (2002).
  97. Fokkens, B. T. & Smit, A. J. Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes. *Glycoconj. J.* 33, 527–535 (2016).
  98. Steenbeke, M. *et al.* UV Fluorescence-Based Determination of Urinary Advanced Glycation End Products in Patients with Chronic Kidney Disease. *Diagnostics* 10, 34 (2020).
  99. Rahim, M. *et al.* Glycation-assisted synthesized gold nanoparticles inhibit growth of bone cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 117, 473–479 (2014).
  100. Siddiqui, A., Sohail, A., Bhat, S., Rehman, M. & Bano, B. Non-enzymatic Glycation of Almond Cystatin Leads to Conformational Changes and Altered Activity. *Protein Pept. Lett.* 22, 449–459 (2015).
  101. Nagai, R. *et al.* Antibody-based detection of advanced glycation end-products:

- promises vs. limitations. *Glycoconj. J.* 33, 545–552 (2016).
102. Makita, Z., Vlassara, H., Cerami, A. & Bucala, R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J. Biol. Chem.* 267, 5133–5138 (1992).
  103. Boratyński, J. & Roy, R. High temperature conjugation of proteins with carbohydrates. *Glycoconj. J.* 15, 131–138 (1998).
  104. Staniszevska, M., Jarosz, J., Jon, M. & Gamian, A. Advanced glycation end-products prepared in solution under high pressure contain epitopes distinct from those formed in the dry reaction at high temperature. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 53, 71–8 (2005).
  105. Stanic-Vucinic, D., Prodic, I., Apostolovic, D., Nikolic, M. & Cirkovic Velickovic, T. Structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions. *Food Chem.* 138, 590–599 (2013).
  106. Visentin, S., Medana, C., Barge, A., Giancotti, V. & Cravotto, G. Microwave-assisted Maillard reactions for the preparation of advanced glycation end products (AGEs). *Org. Biomol. Chem.* 8, 2473–2477 (2010).
  107. Staniszevska, M. *et al.* The melibiose-derived glycation product mimics a unique epitope present in human and animal tissues. *Sci. Rep.* 11, 2940 (2021).
  108. Staniszevska, M. *Badania właściwości biologicznych produktów glikacji białek.* (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, 2002).
  109. Bartyś, A. *Budowa i właściwości biologiczne zaawansowanych produktów glikacji, nowej grupy antygenów występujących w organizmie ludzkim.* (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, 2014).
  110. Bronowicka-Szydełko, A. *Badania właściwości biologicznych produktów glikacji białek i próby ich zastosowania diagnostycznego.* (Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, 2014).
  111. Wiśniewski, J. R. Filter Aided Sample Preparation – A tutorial. *Anal. Chim. Acta* (2019). doi:10.1016/j.aca.2019.08.032
  112. Wiśniewski, J. R. & Gaugaz, F. Z. Fast and Sensitive Total Protein and Peptide Assays for Proteomic Analysis. *Anal. Chem.* 87, 4110–4116 (2015).
  113. Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 75, 663–670 (2003).
  114. Wiśniewski, J. R. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation

- (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal. Chem.* 88, 5438–5443 (2016).
115. Anderson, A. B. & Robertson, C. R. Absorption spectra indicate conformational alteration of myoglobin adsorbed on polydimethylsiloxane. *Biophys. J.* 68, 2091–2097 (1995).
116. Peng, Z., Yang, M. & Simons, E. R. Cross-Reactivity and Molecular Mass of the Chains of the IgE Antibodies in Dogs, Humans, Rats, and Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110, 149–155 (1996).
117. Bose, R. *et al.* Immunochemical properties of some monoclonal IgE antibodies to 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP). *Immunology* 53, (1984).
118. S. Khan, M. *et al.* Glycation Induced Generation of Amyloid Fibril Structures by Glucose Metabolites. *Protein Pept. Lett.* 23, 892–897 (2016).
119. Chen, Y. *et al.* D-Ribose contributes to the glycation of serum protein. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1865, 2285–2292 (2019).
120. Amani, S. & Fatima, S. Glycation With Fructose: The Bitter Side of Nature’s Own Sweetener. *Curr. Diabetes Rev.* 16, 962–970 (2020).
121. Shinohara, Y. *et al.* Analysis of the susceptibility of reducing disaccharides composed of D-glucose to glycation using the Maillard reaction and a novel sensitive method that measures the percentage of the open-ring form. *Carbohydr. Res.* 493, 108019 (2020).
122. Consonni, R., Cagliani, L. R. & Cogliati, C. NMR characterization of saccharides in italian honeys of different floral sources. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4526–4534 (2012).
123. Parisutham, V., Chandran, S. P., Mukhopadhyay, A., Lee, S. K. & Keasling, J. D. Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource Technology* 239, 496–506 (2017).
124. Shi, J. & Zhao, X. H. Influence of the Maillard-type caseinate glycation with lactose on the intestinal barrier activity of the caseinate digest in IEC-6 cells. *Food Funct.* 10, 2010–2021 (2019).
125. Shi, J., Fu, Y., Zhao, X. H. & Lametsch, R. Glycation sites and bioactivity of lactose-glycated caseinate hydrolysate in lipopolysaccharide-injured IEC-6 cells. *J. Dairy Sci.* 104, 1351–1363 (2021).
126. Ahmad, S. *et al.* Glycooxidation of biological macromolecules: a critical approach to halt the menace of glycation. *Glycobiology* 24, 979–990 (2014).

127. Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - Role in ageing and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 23, 125–150 (2008).
128. Mariño, L. *et al.* Glycation of Lysozyme by Glycolaldehyde Provides New Mechanistic Insights in Diabetes-Related Protein Aggregation. *ACS Chem. Biol.* 12, 1152–1162 (2017).
129. Banerjee, S., Maity, S. & Chakraborti, A. S. Methylglyoxal-induced modification causes aggregation of myoglobin. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 155, 1–10 (2016).
130. Hsu, Y. H., Chen, Y. W., Wu, M. H. & Tu, L. H. Protein Glycation by Glyoxal Promotes Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide. *Biophys. J.* 116, 2304–2313 (2019).
131. Gianazza, E., Brioschi, M., Fernandez, A. M. & Banfi, C. Lipoxidation in cardiovascular diseases. *Redox Biology* 23, 101119 (2019).
132. Alizadeh-Rahrovi, J., Shayesteh, A. & Ebrahim-Habibi, A. Structural stability of myoglobin and glycomyoglobin: a comparative molecular dynamics simulation study. *J. Biol. Phys.* 41, 349–366 (2015).
133. Banerjee, S. Formation of Pentosidine Cross-Linking in Myoglobin by Glyoxal: Detection of Fluorescent Advanced Glycation End Product. *J. Fluoresc.* 27, 1213–1219 (2017).
134. Ghelani, H., Razmovski-Naumovski, V., Pragada, R. R. & Nammi, S. Attenuation of glucose-induced myoglobin glycation and the formation of advanced glycation end products (AGEs) by (R)- $\alpha$ -lipoic acid in vitro. *Biomolecules* 8, (2018).
135. Booth, A. A., Khalifah, R. G., Todd, P. & Hudson, B. G. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 5430–5437 (1997).
136. Raupbach, J., Ott, C., Koenig, J. & Grune, T. Proteasomal degradation of glycated proteins depends on substrate unfolding: Preferred degradation of moderately modified myoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* 152, 516–524 (2020).
137. Banerjee, S. & Chakraborti, A. S. Structural alterations of hemoglobin and myoglobin by glyoxal: A comparative study. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 311–318 (2014).
138. Tofani, L. *et al.* Spectroscopic and interfacial properties of myoglobin/surfactant complexes. *Biophys. J.* 87, 1186–1195 (2004).

139. Mallya, M. *et al.* Absorption spectroscopy for the estimation of glycated hemoglobin (HbA1c) for the diagnosis and management of diabetes mellitus: A pilot study. *Photomed. Laser Surg.* 31, 219–224 (2013).
140. GhoshMoulick, R., Bhattacharya, J., Roy, S., Basak, S. & Dasgupta, A. K. Compensatory secondary structure alterations in protein glycation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1774, 233–242 (2007).
141. Szkudlarek, A., Pentak, D., Ploch, A., Pozycka, J. & Maciazek-Jurczyk, M. In Vitro Investigation of the Interaction of Tolbutamide and Losartan with Human Serum Albumin in Hyperglycemia States. *Molecules* 22, 2249 (2017).
142. Ghosh, S. *et al.* Prolonged Glycation of Hen Egg White Lysozyme Generates Non Amyloidal Structures. *PLoS One* 8, (2013).
143. Skowicki, M. & Lipiński, T. Rozwój metod otrzymywania komórek wytwarzających przeciwciała monoklonalne. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 367–379 (2016).
144. Heath, C., Dilwith, R. & Belfort, G. Methods for increasing monoclonal antibody production in suspension and entrapped cell cultures: biochemical and flow cytometric analysis as a function of medium serum content. *J. Biotechnol.* 15, 71–89 (1990).
145. Hnasko, R. M. & McGarvey, J. A. Affinity purification of antibodies. *Methods Mol. Biol.* 1318, 29–41 (2015).
146. Shepher, P. & Dean, C. *Monoclonal Antibodies.* (Oxford University Press, 2000).
147. Kirley, T. L., Greis, K. D. & Norman, A. B. Domain unfolding of monoclonal antibody fragments revealed by non-reducing SDS-PAGE. *Biochem. Biophys. Reports* 16, 138–144 (2018).
148. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–S52 (2010).
149. Heilmann, M. *et al.* Ovalbumin Modified with Pyrraline, a Maillard Reaction Product, shows Enhanced T-cell Immunogenicity \* the. (2014). doi:10.1074/jbc.M113.523621
150. Hnasko, R. M. The biochemical properties of antibodies and their fragments. *Methods Mol. Biol.* 1318, 1–14 (2015).
151. Bonifacino, J. S., Dell’Angelica, E. C. & Springer, T. A. Immunoprecipitation. *Curr. Protoc. Neurosci.* Unit 5, 1–28 (2006).
152. Raoufinia, R. *et al.* Overview of albumin and its purification methods. *Advanced*

- Pharmaceutical Bulletin* 6, 495–507 (2016).
153. More, J. & Bulmer, M. Human Serum Albumin: A Multifunctional Plasma Protein. in *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use* 159–183 (John Wiley and Sons, 2012). doi:10.1002/9781118356807.ch12
  154. Schuhmacher, M., Glocker, M. O., Wunderlin, M. & Przybylski, M. Direct isolation of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and analysis by electrospray-ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 848–854 (1996).
  155. Fanali, G. *et al.* Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 33, 209–290 (2012).
  156. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber, C. M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS* 106, 1760–1765 (2008).
  157. Pitt-Rivers, R. & Impiombato, F. S. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem. J.* 109, 825–830 (1968).
  158. Dunker, A. K. & Kenyon, A. J. Mobility of sodium dodecyl sulphate: protein complexes. *Biochem. J.* 153, 191–197 (1976).
  159. Shi, Y. *et al.* Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Sci.* 21, 1197–1209 (2012).
  160. Neelofar, K. M., Ahmad, J., Arif, Z. & Alam, K. Elucidating the impact of glucosylation on human serum albumin: A multi-technique approach. *Int. J. Biol. Macromol.* 92, 881–891 (2016).
  161. de Serres, F. & Blanco, I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *Journal of Internal Medicine* 276, 311–335 (2014).
  162. Lechowicz, U., Rudzinski, S., Jezela-Stanek, A., Janciauskiene, S. & Chorostowska-Wynimko, J. Post-translational modifications of circulating alpha-1-antitrypsin protein. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1–18 (2020).
  163. Perween, S., Abidi, M., Faizy, A. F. & Moinuddin. Post-translational modifications on glycated plasma fibrinogen: A physicochemical insight. *Int. J. Biol. Macromol.* 126, 1201–1212 (2019).
  164. Fu, Y. & Grieninger, G. Fib420: A normal human variant of fibrinogen with two extended  $\alpha$  chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2625–2628 (1994).
  165. Vilar, R., Fish, R. J., Casini, A. & Neerman-Arbez, M. Fibrin(ogen) in human

- disease: Both friend and foe. *Haematologica* 105, 284–296 (2020).
166. Kerr, M. A. The structure and function of human IgA. *Biochemical Journal* 271, 285–296 (1990).
167. Suzuki, T. *et al.* Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7809–7814 (2015).
168. Tomasz Kowalik, J. S. Salivary secretory IgA and its impact on dental caries. *Nowa Stomatol.* 211–214 (2013).
169. Perše, M. & Večeri'Večeri'c-Haler, Ž. Molecular Sciences The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. doi:10.3390/ijms20246199
170. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. The structure of a typical antibody molecule. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.* (Garland Science, 2001).
171. Napiórkowska-Baran, K. *et al.* Oznaczanie przeciwciał w codziennej praktyce. Część I-właściwości przeciwciał Determination of antibodies in everyday practice. Part I-properties of antibodies. *Alerg. Astma Immunol.* 24, 51–58 (2019).
172. Repetto, O. *et al.* Quantitative Proteomic Approach Targeted to Fibrinogen  $\beta$  Chain in Tissue Gastric Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci. Artic.* 759 (2018). doi:10.3390/ijms19030759
173. Luo, Y., Shi, J. & Li, J. Peroxynitrite induced fibrinogen site identification. *Biomed. Mater. Eng.* 26, 2241–2248 (2015).
174. Wei, B., Berning, K., Quan, C. & Zhang, Y. T. Glycation of antibodies: Modification, methods and potential effects on biological functions. *mAbs* 9, 586–594 (2017).
175. Mendez, D. L., Jensen, R. A., McElroy, L. A., Pena, J. M. & Esquerra, R. M. The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 92–99 (2005).
176. Rehman, S., Faisal, M., Alatar, A. A. & Ahmad, S. Physico-chemical changes induced in serum proteins, Immunoglobulin-G and Fibrinogen by reactive carbonyl species, Methylglyoxal. *Curr. Protein Pept. Sci.* 20, (2019).
177. Newkirk, M. M. *et al.* Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. *Arthritis Res. Ther.* 5, (2003).
178. Ahmad, S., Moinuddin & Ali, A. Immunological studies on glycated human IgG.



- Life Sci.* 90, 980–987 (2012).
179. Austin G. E., Mullins R. H. & Morin L. G. Non-enzymic glycation of individual plasma proteins in normoglycemic and hyperglycemic patients - PubMed. *Clin Chem* 33, 2220–2224 (1987).
180. Ahmad, S., Moinuddin, Khan, R. H. & Ali, A. Physicochemical studies on glycation-induced structural changes in human igg. *IUBMB Life* 64, 151–156 (2012).
181. Kawata, Y. *et al.* Detailed structure and pathophysiological roles of the IgA-albumin complex in multiple myeloma. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–11 (2021).
182. Tai, A. W. H. & Newkirk, M. M. An autoantibody targeting glycated IgG is associated with elevated serum immune complexes in rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 120, 188–193 (2000).
183. Ryan, B. J., Nissim, A. & Winyard, P. G. Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Redox Biol.* 2, 715–724 (2014).
184. Islam, S. *et al.* Neo-epitopes generated on hydroxyl radical modified glycatedigg have role in immunopathology of diabetes type 2. *PLoS One* 12, (2017).
185. Korça, E., Piskovatska, V., Börgermann, J., Navarrete Santos, A. & Simm, A. Circulating antibodies against age-modified proteins in patients with coronary atherosclerosis. *Sci. Rep.* 10, (2020).
186. Kanauchi, M., Kawano, T. & Dohi, K. Serum IgA levels in patients with diabetic nephropathy and IgA nephropathy superimposed on diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 48, 113–118 (2000).
187. Kawasaki, I. *et al.* Renal dysfunction worsened by superimposition of IgA glomerulonephritis in a patient with overt diabetic nephropathy [6]. *Nephron* 78, 232–234 (1998).
188. Nasr, S. H., Share, D. S., Vargas, M. T., D'Agati, V. D. & Markowitz, G. S. Acute poststaphylococcal glomerulonephritis superimposed on diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 71, 1317–1321 (2007).
189. Fujita, K. *et al.* Identification and Properties of Glycated Monoclonal IgA That Affect the Fructosamine Assay. *Clin. Chem.* 49, 805–808 (2003).
190. Mendez, D. L., Jensen, R. A., McElroy, L. A., Pena, J. M. & Esquerra, R. M. The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 92–99 (2005).
191. Spiller, S., Frolov, A. & Hoffmann, R. Quantification of Specific Glycation Sites in

- Human Serum Albumin as Prospective Type 2 Diabetes Mellitus Biomarkers. *Protein Pept. Lett.* 24, (2017).
192. Matsuda, R., Anguizola, J., Joseph, K. S. & Hage, D. S. High-performance affinity chromatography and the analysis of drug interactions with modified proteins: Binding of gliclazide with glycated human serum albumin. in *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 2811–2819 (NIH Public Access, 2011).
193. Arif, B. *et al.* Structural and immunological characterization of Amadori-rich human serum albumin: Role in diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* 522, 17–25 (2012).
194. Neelofar, K. & Ahmad, J. An overview of in vitro and in vivo glycation of albumin: a potential disease marker in diabetes mellitus. *Glycoconjugate Journal* 34, 575–584 (2017).
195. Paradela-Dobarro, B. *et al.* Inflammatory effects of in vivo glycated albumin from cardiovascular patients. *Biomed. Pharmacother.* 113, (2019).
196. Tramarin, A. *et al.* Unveiling the molecular mechanisms underpinning biorecognition of early-glycated human serum albumin and receptor for advanced glycation end products. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 4245–4259 (2020).
197. O’Connell, K. J. *et al.* Metabolism of four  $\alpha$ -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6280–6292 (2013).
198. O’Callaghan, A. & van Sinderen, D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* 7, 925 (2016).
199. Yoon, M. Y. & Hwang, H. J. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -d-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiol.* 25, 815–823 (2008).
200. Baú, T. R., Garcia, S. & Ida, E. I. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: Oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 845–850 (2015).
201. Schievano, E., Tonoli, M. & Rastrelli, F. NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey. *Anal. Chem.* 89, 13405–13414 (2017).
202. Mao, B. *et al.* In vitro fermentation of raffinose by the human gut bacteria. *Food Funct.* 9, 5824–5831 (2018).
203. Sandek, A. *et al.* Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* 157, 80–85 (2012).

204. Ahmed, N. Advanced glycation endproducts - Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67, 3–21 (2005).

## 8. Streszczenie

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji, tzw. AGEs (ang. *advanced glycation end-products*), powstają na skutek nieenzymatycznej reakcji Maillarda, w której następujące po sobie etapy ostatecznie prowadzą do powstania silnie usieciowanych związków. Trwałe agregaty AGEs kumulują się w organizmie, prowadząc do zaburzeń homeostazy. Glikacja zachodzi pomiędzy grupą karbonylową cukrów redukujących i niskocząsteczkowych aldehydów a grupami zasadowymi białek, lipidów, i kwasów nukleinowych. AGEs mogą powstawać endogennie w wyniku reakcji rozmaitych metabolitów w organizmie, jak również mogą być otrzymywane poza organizmem podczas termicznego przetwarzania żywności. Z powodu dużej różnorodności substratów oraz warunków w jakich może zachodzić proces glikacji, powstałe produkty stanowią heterogenną grupę związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych i fizykochemicznych. Glikacja nasila się w chorobach metabolicznych, którym towarzyszy stres oksydacyjny, np. w cukrzycy, miażdżycy, chorobie Alzheimera i w nowotworach. Poznanie szczegółowych mechanizmów prowadzących do tych patologii jest kluczem do prawidłowej diagnostyki, kontrolowania postępu choroby i opracowania skutecznych metod leczenia. AGEs mogą także stanowić markery diagnostyczne dla określonych stanów patologicznych, jednak wciąż jest za mało informacji na temat struktur oraz właściwości biologicznych gromadzących się w organizmie produktów glikacji umożliwiających opracowanie czułych i swoistych metod diagnostycznych.

Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały obecność w organizmie ludzkim nowego antygeny AGE, którego modelowy analog strukturalny otrzymano na skutek glikacji białek z melibiozą w warunkach bezwodnych (produkt MAGE, ang. *Melibiose-derived AGE*). Celem niniejszej pracy doktorskiej było wyizolowanie naturalnie występującego MAGE z krwi ludzkiej, identyfikację rodzaju białka nośnikowego oraz charakterystykę za pomocą metod spektrometrycznych i immunochemicznych.

W pracy zsyntezowano szereg modelowych białkowych produktów glikacji (w tym MAGE) poddając glikacji wybrane białko (mioglobinę) przez różne cukry i aldehydy z wykorzystaniem wcześniej zoptymalizowanej metody mikrofalowej oraz konwencjonalnej reakcji glikacji w roztworze. Analiza widm absorpcyjnych i fluorescencyjnych poszczególnych AGEs pozwoliła na opisanie ich właściwości fizykochemicznych i wskazanie różnic w otrzymanych strukturach w zależności od zastosowanej metody

syntezy. Otrzymane wyniki potwierdziły, że produkty MAGE wykazują odmienną strukturę i właściwości od konwencjonalnych AGEs opisywanych dotąd w literaturze. Ponadto, otrzymano niskocząsteczkowy produkt MAGE (LMW-MAGE), którego właściwości fluorescencyjne i struktura odpowiadają modyfikacjom obecnym na białkowym produkcie MAGE (HMW-MAGE), co potwierdzono za pomocą analizy spektrometrii mas.

W toku badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, wyselekcjonowano pojedynczy klon mysich komórek hybrydowych produkujących przeciwciała anti-MAGE stosując metodę seryjnych rozcieńczeń i potwierdzono swoistość wiązania epitopu MAGE na produktach HMW-MAGE i LMW-MAGE, przy jednoczesnym braku reakcji z innymi konwencjonalnymi AGEs. Mysie przeciwciała monoklonalne anti-MAGE oczyszczone metodą powinowactwa na złożu z immobilizowanym HMW-MAGE, wykorzystano do wydzielenia z krwi ludzkiej naturalnego produktu MAGE. Wyniki badań spektrometrycznych i immunochemicznych wykazały obecność epitopu MAGE na takich białkach jak albumina krwi, IgG i IgA. W surowicy pacjentów z cukrzycą ten antygen zidentyfikowano głównie na albuminie i IgG, natomiast u osób zdrowych na immunoglobulinach typu G i A.

Identyfikacja surowicznych białek, na których obecny jest antygen MAGE dostarcza nowej wiedzy na temat procesu glikacji w organizmie człowieka. Ponadto, specyficzne przeciwciała anti-MAGE posłużą do opracowania testu do oznaczania poziomu produktów MAGE w tkankach. Na podstawie zsyntezowanego LMW-MAGE używanego jako wzorca możliwy będzie ilościowy pomiar MAGE w próbkach biologicznych.

## 9. Abstract

Advanced glycation end-products (AGEs) are formed in result of a multistep non-enzymatic Maillard reactions leading to accumulation of highly cross-linked, stable aggregates disturbing tissue homeostasis. Glycation occurs between the carbonyl groups of reducing sugars or low molecular weight aldehydes and basic groups of proteins, lipids, and nucleic acids. AGEs can be formed either endogenously by the reaction of various metabolites or can be obtained exogenously during thermal food processing. Due to the large variety of substrates and the conditions in which glycation process occurs, the resulting products constitute a heterogeneous group of compounds with diverse biological and physicochemical properties. Glycation is exacerbated in metabolic diseases accompanied by oxidative stress, such as diabetes and in other including atherosclerosis, Alzheimer's disease or cancer. Understanding of the detailed mechanisms leading to these pathologies is the key to proper diagnosis, monitoring disease progression, and developing effective treatments. AGEs may be the diagnostic markers for specific pathological conditions, however, there is still too little information about the structures and biological properties of glycation products that accumulate in an organism.

Previous studies of our group revealed the presence of the new AGE antigen in the human body that the model structural analog is formed during glycation of proteins with melibiose in anhydrous conditions (MAGE, Melibiose-derived AGE). The aim of this thesis was to isolate the naturally occurring MAGE from human blood, identify the type of carrier protein and characterize it using spectrometric and immunochemical methods.

Several model protein glycation products (including MAGE) were synthesized by glycation of selected protein (myoglobin) with different sugars and aldehydes using either previously optimized method in dry conditions or the conventional glycation reaction in solution. The analysis of the absorption and fluorescence spectra of individual AGEs allowed for physicochemical characterization and indication of changes between structures formed with different methods. The results confirmed that MAGE is unique in comparison to the conventional AGEs described previously in literature. Moreover, the obtained low molecular weight MAGE product (LMW-MAGE) showed fluorescence and structure corresponding to the modifications present on the high molecular weight MAGE (HMW-MAGE), as confirmed by mass spectrometry analysis.

The studies consisted a selection of the single clone of the mouse hybridoma cells producing the anti-MAGE antibody using a serial dilution method. Immunochemical analysis confirmed the specificity of the obtained antibody toward the MAGE epitope on LMW-MAGE and HMW-MAGE and no reactivity with any of conventional AGEs. The natural analog of MAGE present in human blood was isolated using affinity chromatography on the resin with immobilized anti-MAGE monoclonal antibody. Using mass spectrometry and immunochemistry it has been established that MAGE epitope is present on several blood proteins including albumin, IgG and IgA. In serum of diabetic patients MAGE was identified mainly on albumin and IgG, while in healthy subjects it was found specifically on IgG and IgA.

Identification of serum proteins bearing the MAGE antigen provides new knowledge about the glycation process in the human body. In addition, the obtained specific anti-MAGE antibodies can be used in the future as a tool for determination of MAGE in tissues, while using LMW-MAGE a standard in the immunoassay will allow for absolute quantification of MAGE in biological samples.

## 10. Wykaz stosowanych skrótów

Abs – absorbancja

AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 – receptory 1, 2, 3 dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji

AGEs – końcowe produkty zaawansowanej glikacji

Akt – kinaza białkowa B

Arg, R – arginina

BSA – albumina surowicy wołowej

CEA – Nx-karboksyetylo-arginina

cel – celobioza

CEL – Nε-karboksyetylo-lizyna

CMA – Nx-karboksymetylo-arginina

CML – Nε-karboksymetylo-lizyna

DOGDIC – usieciowany imidazolon pochodzący z 3-deoksyglukozonu

DTT – ditiotreitrol

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa

ELISA – test immunoenzymatyczny

esRAGE – endogenne sekrecyjne RAGE

FASP – przygotowanie próbki wspomaganie filtrem

FBS – płodowa surowica cielęca

FL – fruktozelizyna

FPLC – szybka chromatografia cieczowa białek

FRET – przenoszenie energii rezonansu fluorescencji

fru – fruktoza

GA – glikolaldehyd

GALA – amid kwasu glikolowego lizyny

GAP – pirydyna aldehydu glikolowego

G-H1, G-H2, G-H3 – pochodzący z gliksalu hydroimidazolon 1, 2, 3

glc – glukoza

GLX – gliksal

GOLD – dimer gliksalu-lizyny

GSK-3β – kinaza syntazy glikogenu 3 beta



HbA1c – glikowana hemoglobina  
HEPES – kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy  
His, H – histydyna  
HMGB1 – amfoteryna, białko grupy 1 o wysokiej ruchliwości  
HMW-MAGE – wysokocząsteczkowy produkt MAGE  
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją fluorescencyjną  
HRP – peroksydaza chrzanowa  
HSA – albumina surowicy ludzkiej  
IC50 – połowa maksymalnego stężenia hamującego  
IgA – immunoglobulina klasy A  
IgE – immunoglobulina klasy E  
IgG – immunoglobulina klasy G  
Il-1, Il-6 – interleukina-1, interleukina-6  
JNK – N-końcowe kinazy c-Jun  
kIgG – królicze immunoglobuliny klasy G  
lac – laktoza  
LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas  
LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas  
LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości  
LMW-MAGE – niskocząsteczkowy produkt MAGE  
Lys, L – lizyna  
Mac-1 – antygen makrofagu-1  
MAGE – produkt glikacji pochodzący od melibiozy  
MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami  
MB - mioglobina z mięśni szkieletowych konia  
mel – melibioza  
MG-H1, MG-H2, MG-H3 – pochodzący z metylogliksalu hydroimidazolony 1, 2, 3  
MGO – metylogliksal  
MHCII – główny układ zgodności tkankowej klasy II  
MOLD – dimer metylogliksalu-lizyny  
MSR1 – receptor zmiatający makrofagów 1  
MW – synteza w warunkach bezwodnych z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego

NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego  
NAL – N $\alpha$ -acetylo-L-lizyna  
NF- $\kappa$ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B  
OPD – *orto*-fenylenodiamina  
PI3K – kinaza 3-fosfoinozytydylowa  
RAGE – receptor dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji  
RFT – reaktywne formy tlenu  
RP-HPLC – HPLC z odwróconą fazą  
RT – tradycyjna synteza w roztworze wodnym  
ryb – ryboza  
RZS – reumatoidalne zapalenie stawów  
SDS – siarczan dodecyłu sodu  
SDS-PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących  
SR-A – receptor zmiatający typu A  
sRAGE – rozpuszczalne RAGE  
T<sub>2</sub>N – trans-2-nonenal  
TAGEs – toksyczne końcowe produkty zaawansowanej glikacji  
temp. pok. – temperatura pokojowa  
TFA – kwas trifluorooctowy  
TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu  
UV-Vis – zakres fal światła widzialnego oraz ultrafioletu  
VCAM-1 – cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych 1  
VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego  
WB – Western blotting  
WF – fluorescencja tryptofanu  
 $\beta$ -ME –  $\beta$ -merkaptoetanol

## 11. Spis rysunków i tabel

Rys. 1. Schemat powstawania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs)

Rys. 2. Źródła AGEs w organizmie (na podst. Forbes J.M. i Cooper M.E. <sup>11</sup>)

Rys. 3. Wzory strukturalne przykładowych AGEs: A) związki niefluorescencyjne, nietworzące wiązań krzyżowo-sieciujących; B) związki fluorescencyjne, pozbawione właściwości krzyżowo-sieciujących; C) związki niefluorescencyjne, tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące; D) związki fluorescencyjne, tworzące wiązania krzyżowo-sieciujące

Rys. 4. Mechanizmy oddziaływania AGEs w organizmie (na podst. Palimeri i wsp. <sup>32</sup>)

Rys. 5. Receptory oddziałujące z AGEs <sup>17</sup>

Rys. 6. Skutki obecności AGEs w ustroju <sup>2</sup>

Rys. 7. SDS-PAGE modelowych AGEs syntezowanych metodą tradycyjną (RT) i mikrofalową (MW) z MB w reakcji z A) mel, lac, cel; B) glc, fru, ryb; C) MGO, T<sub>2</sub>N, GLX i GA. Na żel nakładano M – marker i odpowiednio po 30 µg każdego z AGE oraz 12 µg MB

Rys. 8 Widma absorpcyjne w zakresie fal UV-Vis (240-700 nm) białkowych AGEs otrzymanych metodą mikrofalową (MW) i tradycyjną (RT) zebrane dla wodnych roztworów o stężeniu 0,5 mg/ml. Przedstawiono produkty uzyskane z MB w reakcji z A) dwucukrami mel, lac, cel, B) monocukrami glc, fru, ryb i C) aldehydami MGO, T<sub>2</sub>N, GLX, GA

Rys. 9. Widma fluorescencyjne w zakresie 370 – 500 nm po wzbudzeniu światłem o długości fali 350 nm dla wodnych roztworów (0,5 mg/ml) modelowych HMW-AGEs otrzymanych metodą mikrofalową (MW) i tradycyjną (RT). Przedstawiono produkty uzyskane z MB w reakcji z A) dwucukrami mel, lac, cel; B) monocukrami glc, fru, ryb; C) aldehydami MGO, T<sub>2</sub>N, GLX, GA.

Rys. 10. Modyfikacje MB przez mel (HMW-MAGE) podczas glikacji białka w warunkach bezwodnych (MW). A) Sekwencja aminokwasowa mioglobiny; czerwone reszty wskazują miejsca modyfikacji przez melibiozę; B) Model przestrzenny wyjściowego białka (MB); kolorem zielonym oznaczono lizynę, fioletowym – argininę, pomarańczowym – histydynę;

C) Model przestrzenny MB po modyfikacji mel; odpowiednimi kolorami jak w panelu B zaznaczono reszty zidentyfikowane jako zmodyfikowane przez mel.

Rys. 11. Rozdział LMW-MAGE za pomocą FPLC na kolumnie HW40S. Do elucji użyto 0,01 M octanu amonu pH 6,8; frakcje monitorowano przy długości fali 225 nm.

Rys. 12. Profil elucji produktów LMW-MAGE obecnych w próbce 1(B) na kolumnie Bio-Gel P-2; eluowany materiał monitorowano przy długości fali 225 nm (linia czerwona).

Rys. 13. Widmo fluorescencyjne LMW-MAGE. Wodne roztwory LMW-MAGE (linia żółta), N-acetylolizyny (NAL, linia niebieska) i melibiozy (mel, linia pomarańczowa) o stężeniu 0,5 mg/ml wzbudzano światłem o długości fali 350 nm; emisję zbierano w zakresie 370 – 500 nm.

Rys. 14. Schemat selekcji pojedynczego klonu komórek hybrydowych (1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1) produkującego przeciwciała anty-MAGE. Aktywność przeciwciał sprawdzano za pomocą testu ELISA z wykorzystaniem antygenów: MB-mel, BSA-mel, kIgG-mel MW oraz białek nośnikowych MB, BSA, kIgG, immobilizowanych na płytce w ilości 0,5 µg/dołek; Gwiazdką (\*) zaznaczono etapy, których wyniki przedstawiono poniżej

Rys. 15. Test aktywności ELISA-1 produkowanych przeciwciał. Płytkę opłaszczono MB-mel MW, MB lub BSA; w reakcji użyto kozie anty-mysie Ig-HRP (anty-Ig) lub kozie anty-mysie IgG-HRP (anty-IgG).

Rys. 16. Test aktywności ELISA-7. Supernatant zebrany z hodowli komórek hybrydowych klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1 testowano na płytce opłaszczonej MB-mel, BSA-mel, kIgG-mel MW oraz MB, BSA, kIgG; zastosowane przeciwciała II-rzędowe: kozie anty-mysie Ig-HRP. Wartości pokazują średnią absorbancję mierzoną przy 490 nm (Abs 490 nm) z 2 dołków po odjęciu absorbancji próby negatywnej

Rys. 17. Wpływ stężenia FBS na żywotność komórek hybrydowych klonu 1G3-2F7-C2-3G4-C2-4H5-B1. Ilość komórek (wartości dla jednego dołka) podano jako całkowitą liczbę w 1 ml oraz liczbę komórek żywych w hodowli po A) 14 dniach i B) 21 dniach (7 dni od drugiego pasażowania).

Rys. 18. Aktywność przeciwciał produkowanych przez komórki hybrydowe hodowane w medium o różnych stężeniach FBS. Medium zebrane z hodowli komórek A) po 14 dniach,

B) po 21 dniach (7 dni od powtórnego pasażowania) hodowli testowane było metodą ELISA na płytkach opłaszczonych MB-mel MW.

Rys. 19. Analiza SDS-PAGE roztworu antygeny MAGE przed i po inkubacji ze złożem CNBr-Sepharose. Na dołek nakładano marker (M), roztwór MB-mel przed inkubacją ze złożem (dołek 1) oraz roztwór MB-mel po inkubacji ze złożem (dołek 2).

Rys. 20. Sprawdzenie zdolności wiązania przeciwciał anti-MAGE do złoża ze związanym MB-mel MW za pomocą testu hamowania ELISA; Ab – roztwór przeciwciał anti-MAGE

Rys. 21. Optymalizacja oczyszczania przeciwciał anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa. Profil elucji przeciwciał ze złoża Sepharose-MAGE za pomocą NaCl i KSCN (A, panel lewy) i samym rodnikiem potasu (B, panel lewy) rejestrowano za pomocą pomiaru absorbancji przy 280 nm. Aktywność przeciwciał w poszczególnych frakcjach (A1, A2, A3 oraz B1, B2) po ich rozcieńczeniu do objętości wyjściowego materiału oraz bez rozcieńczania (frakcje A2, A3, B2 nierozc.) oznaczono testem ELISA na płytce opłaszczonej MB-mel MW (A i B panel po prawej); C) stężenia białka w wybranych frakcjach (po prawej) oznaczono metodą Bradforda na podstawie krzywej standardowej dla BSA (po lewej).

Rys. 22. Przykładowy profil elucji przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE na kolumnie ze złożem Sepharose-MAGE. Frakcja 1 (PBS) odpowiada wypłukanym składnikom medium hodowlanego, a Frakcja 2 (KSCN) zawiera przeciwciała anti-MAGE; eluowany materiał monitorowano przy długości fali 280 nm.

Rys. 23. Zdjęcie testu paskowego Rapid Mouse Isotyping KIT – Gold Series obrazujący pozytywną reakcję na pasku 3 (Strip 3) wskazującą na obecność w próbce mysich immunoglobulin klasy E

Rys. 24. SDS-PAGE oczyszczonych przeciwciał anti-MAGE w 12 % żelu poliakrylamidowym. Na dołek nałożono 2 µg białka, żel wybarwiono za pomocą Coomassie Brilliant Blue.

Rys. 25. Krzywa mianowania przeciwciał anti-MAGE A) w medium hodowlanym z komórek hybrydowych; B) oczyszczonych na kolumnie powinowactwa. ELISA wykonana na płytce opłaszczonej: MB (mioglobina) lub MB-mel MW (MAGE). Wartości pokazują

średnią absorbancję mierzoną przy 490 nm z 2 dołków znormalizowaną wobec absorbancji próby negatywnej

Rys. 26. Krzywe hamowania reakcji przeciwciał anti-MAGE przez HMW-MAGE, LMW-MAGE MB, NAL i mel. Wiązanie przeciwciał (w ilości 4,8  $\mu\text{g/ml}$ ) testowano na płycie opłaszczonej MB-mel (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Wyniki po odjęciu absorbancji dla próby negatywnej (reakcja przeciwciał drugorzędowych) podano jako stosunek B/B<sub>0</sub>, gdzie B – absorbancja w obecności inhibitora, B<sub>0</sub> – absorbancja bez inhibitora (100% reakcji).

Rys. 27. Krzyżowa reaktywność przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE z MB-mel, BSA-mel (HMW-MAGE, 15  $\mu\text{g/dołek}$ ) oraz MB, BSA (10  $\mu\text{g/dołek}$ ). Próbkę rozdzielono na 10 % żelu poliakrylamidowym i wybarwiono za pomocą Coomassie Brilliant Blue (A) lub po transferze na membranę PVDF inkubowano z przeciwciałami anti-MAGE a następnie z II-rzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP (B); kontrolnie membranę inkubowano z II-rzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP pomijając przeciwciała I-rzędowe (C).

Rys. 28. Krzyżowa reaktywność przeciwciał anti-MAGE. W 12 % żelu poliakrylamidowym rozdzielono marker białkowy (M) oraz jednakową ilość (30  $\mu\text{g/dołek}$ ) modelowych AGEs syntezowanych z mioglobiny (MB) metodą tradycyjną w roztworze (RT) i w warunkach bezwodnych (MW) w reakcji z A) mel, lac, cel; B) glc, fru, ryb; C) GLX, GA, MGO, T<sub>2</sub>N; Membrany po transferze inkubowano z medium hodowlanym zawierającym przeciwciała anti-MAGE, a następnie z II-rzędowymi przeciwciałami anti-mysie IgE-HRP.

Rys. 29. A) Obraz żelu SDS-PAGE i B) Western blotting z przeciwciałami anti-MAGE próbek surowicy pacjentów z cukrzycą (1, 3) oraz osocza zdrowej osoby (2, 4), uzyskanych po elucji ze złoża Sepharose-anti-MAGE (dołki 1, 2) lub ze złoża kontrolnego (dołki 3, 4). Na żelu rozdzielono także marker białkowy (M) i MB-mel MW (MAGE) jako kontrolę pozytywną. Na czerwono zaznaczono prążki wysłane do analizy spektrometrycznej.

Rys. 30. Western blotting z przeciwciałami: A) anti-MAGE; B) anti-mysie IgE-HRP (kontrola do przeciwciał anti-MAGE); C) anti-HSA; D) anti-mysie IgG-HRP (kontrola do przeciwciał anti-HSA); E) anti-ludzkie IgG-HRP; F) anti-ludzkie IgA-HRP. S – próbka z surowicy, O – próbka z osocza, eluowane ze złoża Sepharose-anti-MAGE, M –

marker białkowy, kontrole pozytywne: MAGE – MB-mel MW (5 µg/dolek), HSA, IgG, IgA (2 µg/dolek)

Tabela 1. Metody oznaczania AGEs w materiale biologicznym<sup>12,95</sup>

Tabela 2. Warunki syntezy modelowych produktów glikacji

Tabela 3. Wydajność syntezy modelowych AGEs

Tabela 4. Lista peptydów zawierających reszty modyfikowane przez melibiozę zidentyfikowane w HMW-MAGE

Tabela 5. Lista białek zidentyfikowanych w prążkach wyciętych z żelu poliakrylamidowego po elucji ze złoża Sepharose-anty-MAGE

Tabela 6. Zestawienie mas cząsteczkowych [kDa] wyliczonych na podstawie prążków w WB (Rys. 30) zidentyfikowanych w próbkach surowicy i osocza oraz białek kontrolnych

## 12. Osiągnięcia naukowe

### Projekty badawcze:

10.2019 – 09.2020: Kierownik (stypendysta) w projekcie pt. „Identyfikacja i właściwości niekonwencjonalnych produktów zaawansowanej glikacji występujących w surowicy ludzkiej” finansowanego z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu ETIUDA 7, nr 2019/32/T/NZ4/00492

05.2018 – obecnie: Wykonawca (doktorant) w projekcie pt. „Rola glikacji i szlaku kinureninowego w modulowaniu środowiska nowotworowego”, finansowanego z funduszu Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS13, nr 2017/25/B/NZ4/01198

04.2016 – 04.2017: Wykonawca w projekcie pt. „Rola produktów zaawansowanej glikacji w modulowaniu mikrośrodowiska nowotworowego”, nr 42/2016/KNOW/IITD, finansowanego z funduszu Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego KNOW

### Publikacje:

Staniszewska M., Bronowicka-Szydełko A., Gostomska-Pampuch K., Szkudlarek J., Bartyś A., Bieg T., Gamian E., Kochman A., Picur B., Pietkiewicz J., Kuropka P., Szeja W., Wiśniewski J., Ziółkowski P., Gamian A. The melibiose-derived glycation product mimics a unique epitope present in human and animal tissues. *Sci Rep* (2021), 11: 2940.

Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpaczka M., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A. Advanced glycation end products derived from serum albumin modification by glucose (AGE-1) reflect clustering of lipid-associated metabolic abnormalities and are decreased in patients treated with acarbose: A cross-sectional study. *Adv Clin Exp Med* (2020), 29, 275–284.

Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpaczka M., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A. Non-standard AGE4 epitopes that predict polyneuropathy independently of obesity can be detected by slot dot-blot immunoassay. *Adv Clin Exp Med* (2020), 29, 91–100.

Gostomska-Pampuch K., Ostrowska A., Kuropka P., Dobrzyński M., Ziółkowski P., Kowalczyk A., Łukaszewicz E., Gamian A., Całkosiński I. Protective effects of levamisole, acetylsalicylic acid and  $\alpha$ -tocopherol against dioxin toxicity measured as the expression of AhR and COX-2 in a chicken embryo model. *Histochem Cell Biol* (2017), 147: 523-536.

Ostrowska A., Gostomska-Pampuch K., Leśków A., Kuropka P., Gamian E., Ziółkowski P., Kowalczyk A., Łukaszewicz E., Gamian A., Całkosiński I. Expression of advanced glycation end-products and NF $\kappa$ B in chick embryos exposed to dioxin and treated with acetylsalicylic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Poultry Sci* (2017), 96(6): 1874-1883.

Całkosiński I., Gostomska-Pampuch K., Majda J., Leśków A., Janeczek M., Melnyk O.P., Gamian A. The Influence of  $\alpha$ -Tocopherol on Serum Biochemical Markers During Experimentally Induced Pleuritis in Rats Exposed to Dioxin. *Inflammation* (2017), 40(3): 913-926.



Kuropka P., Dobrzyński M., Gamian A., Gostomska-Pampuch K., Kuryszko J., Całkosiński I. Effect of Glucocorticoids on Ultrastructure of Myocardial Muscle in the Course of Experimentally Induced Acute Myocardial Ischemia. *BioMed Res Int* (2017), <https://doi.org/10.1155/2017/2108497>

Całkosiński I, Majda J., Terlecki G., Gostomska-Pampuch K., Małolepsza-Jarmołowska K., Sobolewska S., Całkosińska A., Kumala A., Gamian A. Dynamic Analysis of Changes of Protein Levels and Selected Biochemical Indices in Rat Serum in the Course of Experimental Pleurisy. *Inflammation* (2016), 39(3): 1076-1089.

#### **Artykuł pokonferencyjny:**

Bronowicka-Szydełko A., Kuzan A., Serek P., Gostomska-Pampuch K. Comparison of the effectiveness of slot dot-blot and ELISA methods in marking compounds occurring in blood serum in trace amounts, w „Interdyscyplinarność badań naukowych 2017”, praca zbiorowa pod red. Jarosława Szreka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2017, str. 13-18. ISBN 978-83-7493-993-5.

#### **Patenty:**

Całkosiński I., Gamian A., Małolepsza-Jarmołowska K., Leśków A., Gostomska-Pampuch K., Rypuła K., Kumala A. Sposób izolowania śluzu ślimaka, kompozycja i zastosowanie śluzu ślimaka *Limax maximus*, Pat.234592 (P.413884), 2019.

Całkosiński I., Gamian A., Małolepsza-Jarmołowska K., Leśków A., Gostomska-Pampuch K., Rypuła K., Kumala A. Sposób izolowania śluzu ślimaka, kompozycja i zastosowanie śluzu ślimaka *Arion Rufus*, Pat.234591 (P.413883), 2019.

#### **Zgłoszenia konferencyjne:**

Kuzan A., Nowakowska K., Gostomska-Pampuch K., Bronowicka-Szydełko A. Foodomika: nowa koncepcja badań nad cukrzycą. III Konferencja Szkoleniowa „Multi-omika – biologia systemów w badaniach medycznych”; Wrocław, listopad 2019.

Gamian A., Pietkiewicz J., Danielewicz R., Bronowicka-Szydełko A., Gostomska-Pampuch K. Glikacja białek w zdrowiu i chorobie, w aspekcie żywieniowym. III Konferencja Naukowa "Człowiek - żywność - zdrowie". Wrocław, marzec 2018.

Staniszewska M.M., Gostomska-Pampuch K., Jonik I., Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpacka M., Gamian A. Immunomodulatory properties of advanced glycation end-products formed from different substrates. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Holandia, wrzesień 2018.

Bronowicka-Szydełko A., Krzystek-Korpacka M., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Gacka M., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A. Znaczenie diagnostyczne końcowych produktów zaawansowanej glikacji formowanych podczas modyfikacji albuminy przez metyloglioksal (AGE-4). II Konferencja Szkoleniowa "Multi-omika - biologia systemów w badaniach medycznych". Wrocław, czerwiec 2018.

Gamian A., Bronowicka-Szydełko A., Gostomska-Pampuch K., Kuzan A., Pietkiewicz J. Advanced glycation end-products as post-translational proteins modification in health and disease – an impact on microbiome. The 4th Workshop on Microbiology in Health Care and Environmental Protection MIKROBIOT 2017, Łódź, Polska, wrzesień 2017.

Bronowicka-Szydełko A., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Krzystek-Korpaczka M., Pietkiewicz J., Gamian A. Detecting of the presence of advanced glycation end products AGE1 and AGE3 in the serum blood of diabetic patients by the slot dot-blot method. The 2nd Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics "Bio2016", Wrocław, Polska, wrzesień 2016.

Gostomska-Pampuch K., Leśków A., Ostrowska A., Kuropka P., Całkosiński I. Wpływ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny oraz innych substancji na ekspresję czynnika NFκB oraz proces glikacji podczas rozwoju embrionalnego zarodka kurzego. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych; Lublin, Polska, wrzesień 2016.

Leśków A., Gostomska-Pampuch K., Kuropka P., Całkosiński I. Wpływ wybranych środków farmakologicznych na ekspresję receptora AhR oraz cyklooksygenazy-2 w różnych stadiach rozwoju zarodka kurzego poddanego działaniu dioksyn. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych; Lublin, Polska, wrzesień 2016.

Bronowicka-Szydełko A., Kuzan A., Gostomska-Pampuch K., Gacka M., Pietkiewicz J., Jakobsche-Policht U., Adamiec R., Gamian A. Slot dot-blot as an effective method for detection of AGEs present in sera in trace amounts. The 3rd World Congress on Maillard Reaction & Glycation; Budapeszt, Węgry, maj 2016.

Leśków A., Gostomska-Pampuch K. Dioksyny - charakterystyka i prewencja. Puzel 2016 - V Wroclawska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych; Wrocław, Polska, kwiecień 2016.

Gostomska K., Dołowacka A. Advanced Glycation End-Products (AGE) as a biomarker of diabetes and its complications. EMBO Young Scientists Forum, Warszawa, Polska, lipiec 2015.

Dołowacka A, Gostomska K., Nawrot – Hadzik I. Natural Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus. EMBO Young Scientists Forum, Warszawa, Polska, lipiec 2015.

Gostomska K., Sobolewska S., Całkosiński I. Dioksyny – podstawy działania i możliwości ochrony przed ich skutkami. I Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych, Toruń, Polska, marzec 2015.

### **Stypendia:**

- Stypendium wyjazdowe na staż zagraniczny w ramach programu ETIUDA7
- Stypendium dla najlepszych doktorantów w latach 2016-2018