

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE
MEMBRÁNOVĚ VÁZANÉ REDUKTASY Z LIDSKÉ
JATERNÍ TKÁNĚ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Školitel – specialista: Mgr. Romana Novotná

Hradec Králové, 2006

Vendula Pelcová

Děkuji Doc. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za vstřícný přístup, pomoc při řešení problémů a cenné rady, dále děkuji Mgr. Romaně Novotné za odborné vedení a paní Aleně Pakostové za skvělé zázemí a pomoc při HPLC stanovení.

1 OBSAH

1	OBSAH	3
2	ÚVOD	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	PURIFIKACE PROTEINŮ	9
3.1.1	Purifikační strategie	10
3.1.1.1	Třífázová purifikační strategie (1,2)	11
3.1.1.2	Výběr a kombinace purifikačních technik	12
3.1.2	Iontově výměnná chromatografie (IEX)	14
3.1.2.1	Separční mechanismus	14
3.1.2.1.1	Adsorpce	14
3.1.2.1.2	Desorpce	15
3.1.2.2	Matrix pro iontově výměnou chromatografii	15
3.1.2.3	Typy iontových měničů	15
3.1.2.4	Eluční módy	16
3.1.2.4.1	Isokratická eluce	16
3.1.2.4.2	Gradientová eluce	16
3.1.2.5	Fáze IEX experimentu	17
3.1.3	Gelová filtrace (GF)	18
3.1.3.1	Separční mechanismus	18
3.1.3.1.1	Rozdělení molekul mezi mobilní a stacionární fázi	19
3.1.3.1.2	Eluční objemy	20
3.1.3.2	Separční módy	20
3.1.3.2.1	Skupinová separace	21
3.1.3.2.2	Klasická separace	21
3.1.3.3	Fáze GF experimentu	22
3.1.3.4	Média používaná pro GF	23
3.1.4	Afinitní chromatografie (AC)	23
3.1.4.1	Separční mechanismus	24
3.1.4.2	Fáze AC experimentu	24
3.1.5	Chromatografie založená na hydrofobních interakcích (HIC)	25
3.1.5.1	Separční mechanismus	25
3.1.5.1.1	Definice pojmů hydrofilní a hydrofobní	25
3.1.5.1.2	Adsorpce	26
3.1.5.2	Eluční módy	27
3.1.5.2.1	Gradientová eluce	27
3.1.5.2.2	Jednokroková eluce	27
3.1.5.3	Fáze HIC experimentu	27

3.1.6	Chromatografie na reverzní fázi (RPC)	28
3.1.6.1	Separační mechanismus	28
3.1.6.2	Eluční módy	29
3.1.6.3	Fáze RPC experimentu	30
3.1.7	SDS-PAGE	31
3.1.7.1	Charakteristika	31
3.1.7.2	SDS	31
3.1.7.3	PAGE	32
3.1.7.4	Polyakrylamidový gel	33
3.1.7.4.1	Spodní (separační) gel	33
3.1.7.4.2	Horní (zaostřovací) gel	33
3.1.7.5	Příprava vzorku pro elektroforézu	34
3.1.7.5.1	Struktura proteinů	34
3.1.7.5.2	Denaturace vzorku	34
3.1.7.6	Spuštění elektroforézy	36
3.1.8	Western blotting	36
3.1.8.1	Přenos proteinu na membránu	36
3.1.8.2	Blokace nescifických vazeb	37
3.1.8.3	Přidání protilátek	37
3.1.8.4	Detekce	38
3.1.9	Stanovení bílkoviny	38
3.1.9.1	Smithovo stanovení bílkovin pomocí BCA	39
3.1.9.2	Bradfordovo stanovení proteinů	39
3.2	REDUKČNÍ ENZYMY	41
3.2.1	Zařazení reduktas v rámci metabolismu xenobiotik	41
3.2.2	Redukční metabolismus	41
3.2.3	Redukce karbonylové skupiny	42
3.2.3.1	Aldo-keto reduktasy (AKR)	42
3.2.3.2	Dehydrogenasy-reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)	43
3.2.3.3	Dehydrogenasy-reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)	43
3.3	ORACIN	45
3.3.1	Protinádorový účinek	45
3.3.2	Biotransformace	46
4	CÍL PRÁCE	47
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
5.1	MATERIÁL	48
5.1.1	Biologický materiál	48
5.1.2	Chemikálie	48
5.2	POMŮCKY	50
5.3	PŘÍSTROJE	51

5.4	METODY	53
5.4.1	Příprava subcelulárních frakcí	53
5.4.1.1	1. centrifugace	53
5.4.1.2	2. centrifugace	53
5.4.1.3	3. centrifugace (ultracentrifugace).....	53
5.4.1.4	4.-6. centrifugace (ultracentrifugace)	53
5.4.2	Solubilizace mikrosomální membrány	54
5.4.3	Odsolení mikrosomů a příprava na IEX	54
5.4.4	Koncentrace odsolených frakcí	55
5.4.5	Iontově-výměnná chromatografie.....	55
5.4.6	Gelová filtrace	55
5.4.7	Inkubace s oracinem	56
5.4.7.1	NADPH-regenerační systém	56
5.4.7.2	Inkubační směs	56
5.4.7.3	Zastavení reakce a extrakce produktu.....	56
5.4.8	Achirální HPLC analýza.....	57
5.4.8.1	Mobilní fáze	57
5.4.8.2	Příprava vzorků	57
5.4.8.3	Separace.....	57
5.4.9	Chirální HPLC analýza.....	58
5.4.9.1	Mobilní fáze	58
5.4.9.2	Příprava vzorků	58
5.4.9.3	Separace.....	58
5.4.10	SDS-PAGE.....	58
5.4.10.1	Zásobní roztoky	58
5.4.10.2	Pracovní roztoky.....	59
5.4.10.3	Příprava gelu.....	60
5.4.10.4	Elektroforéza (ELFO).....	61
5.4.11	Barvení gelu pomocí Coomassie Blue	61
5.4.12	Barvení gelu stříbrem (Silver stain)	62
5.4.12.1	Roztoky pro barvení stříbrem	62
5.4.13	Western blot	64
5.4.13.1	Pufry	64
5.4.13.2	Ukončení ELFO a příprava na blotování	64
5.4.13.3	Značení protilátkami.....	65
5.4.13.4	Detekce	65
5.4.13.4.1	Pomůcky	66
5.4.13.4.2	Postup	66
5.4.14	Stanovení bílkoviny.....	67
5.4.14.1	Stanovení pomocí BCA (Smith).....	67

5.4.14.2	Bradfordovo stanovení	67
6	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	69
6.1	PURIFIKACE REDUKTASY Z LIDSKÉ JATERNÍ TKÁNĚ.....	69
6.1.1	Příprava mikrosomální frakce pro separaci	69
6.1.2	Separace pomocí IEX.....	70
6.1.3	Gelová filtrace 1	74
6.1.4	Gelová filtrace 2	77
6.1.5	Vyloučení přítomnosti 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1.....	81
6.1.6	Stanovení množství bílkoviny a výpočet specifické aktivity.....	82
7	ZÁVĚR.....	86
8	ZKRATKY.....	88
9	LITERATURA.....	90

2 ÚVOD

Objev nových lidských proteinů poskytuje nové možnosti vývoje terapie široké škály dosud neléčitelných nemocí. Tyto proteiny mohou hrát významnou roli v patogenezi různých nemocí nebo v biologické dráze k nemoci vedoucí, a jejich identifikace a charakterizace může vést k pochopení těchto procesů. Díky specifickým vlastnostem secernovaných a zejména transmembránových proteinů je možné jejich využití přímo jako samotného léčiva nebo jsou tyto proteiny cíleně atakovány vhodnými strukturami v samotné tkáni. Cíleným působením může být buď použití specifických inhibitorů nebo využití protilátky k vybranému enzymu. V obou případech je nutné znát nejprve přesnou strukturu cíleného enzymu, abychom mohli správně navrhnout strukturu případného inhibitoru či protilátky.

Některá důležitá léčiva byla navržena na základě znalosti struktury cílových proteinů přítomných na povrchu buněk určitého typu nebo proteinů hrajících významnou roli v průběhu onemocnění. Např. rituxan je protilátka cílená na B lymfocyt-specifický CD20 protein a je účinná při léčbě non-Hodgkinova lymfomu (Jazirehi a Bonavida, 2005). Herceptin je protilátka specifického HER2 proteinu karcinomu prsu a je používána při léčbě této nemoci (Duffy, 2005).

Metabolismus léčiv byl dlouhou dobu studován především s ohledem na oxidační reakce. Méně pozornosti bylo věnováno redukčnímu metabolismu, i když dnes je velmi dobře známo, že řada farmakologicky významných substancí podléhá při své biotransformaci redukčním reakcím. Významná je především redukce karbonylové skupiny, která hraje klíčovou roli v metabolické přeměně mnoha aromatických, alicyklických a alifatických karbonylových sloučenin (Felsted a Bachur, 1980; Wermuth, 1985; Rosemond a Walsh, 2004). Redukce karbonylové skupiny hraje též významnou roli při deaktivaci některých substancí jako warfarin, haloperidol, daunorubicin a doxorubicin (Hermans a Thijssen, 1993; Maser E, 1995).

Dosud bylo identifikováno několik enzymů, které zprostředkovávají redukci karbonylové skupiny látek endogenního i exogenního původu, z nichž většina byla charakterizována na biochemické a molekulární úrovni (Oppermann se sp., 1998). Tyto enzymy hrají esenciální roli v buněčných procesech a bylo prokázáno, že jsou významné i v mnoha dědičných onemocněních. V poslední době začínají být využívány jako cílené enzymy při léčbě obezity, zánětlivého a nádorového onemocnění (Hyndman a Flynn,

1999; Penning se sp., 2006; Purohit se sp., 2006). Ale i u této skupiny reduktas byla pozornost až dosud věnována především jejich rozpustným cytosolickým formám, protože purifikace a následná izolace membránově vázaných reduktas v jejich aktivním stavu byla takřka nemožná. S rozvojem techniky a získáním více zkušeností v oblasti izolace cytosolických reduktas bylo možno izolovat a studovat rovněž některé z membránově vázaných reduktas.

Znalost lidského genomu a možnost počítačového porovnání sekvencí nukleotidů DNA, včetně určení jejich případných membránových ukotvení nebo domén, vede k odhadu, že stále několik desítek membránově vázaných reduktas čeká na svou identifikaci a rozluštění jejich úlohy v buňce. Ze studia metabolismu cytostatika oracinu vyplynulo, že kromě 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy by se na jeho přeměně měla podílet ještě minimálně jedna, „neznámá“, mikrosomální karbonylreduktasa (Wsól se sp., 2004). Proto byl oracin zvolen jako modelové léčivo při snaze izolovat a purifikovat dosud neznámou membránově vázanou lidskou karbonylreduktasu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 PURIFIKACE PROTEINŮ

Rozvoj techniky a metodik proteinové purifikace byl prvotním nezbytným požadavkem k dosažení pokroků učiněných v biotechnologii (Anon, 2001).

Většina produktů získaných biotechnologickými metodami jsou proteiny a tyto musí být připraveny ve velkém množství ve své purifikované formě. Bílkoviny musí být vyčištěny ze směsi ostatních proteinů a je třeba odstranit i ostatní balastní příměsi jako nukleové kyseliny, sacharidy, lipidy či jiný materiál přítomný ve vzorku. Mimo požadovanou čistotu by mělo být i dosaženo zachování biologické aktivity proteinu (Internet 1).

Proteinová purifikace zahrnuje sérii procesů určených k izolaci jediného typu bílkoviny z komplexní směsi. Výchozím materiálem bývá obvykle biologická tkáň nebo mikrobiální kultura. Různé kroky purifikačního procesu mohou uvolnit protein z matrix, která jej poutá, separovat bílkovinné a nebílkovinné součásti směsi, a nakonec oddělit žádaný protein od všech ostatních bílkovin.

Čistění může být **preparativní** nebo **analytické**. Preparativní purifikace usiluje o produkci relativně velkého množství čistého proteinu pro následné použití. Příkladem může být příprava komerčních produktů jako jsou enzymy, nutriční bílkoviny a biotechnologicky získaná léčiva (např. inzulin). Analytické čištění poskytuje relativně malé množství proteinu pro další výzkum nebo analytické účely zahrnující identifikaci, kvantifikaci, studie proteinové struktury, posttranslační modifikace a funkce (Internet 2).

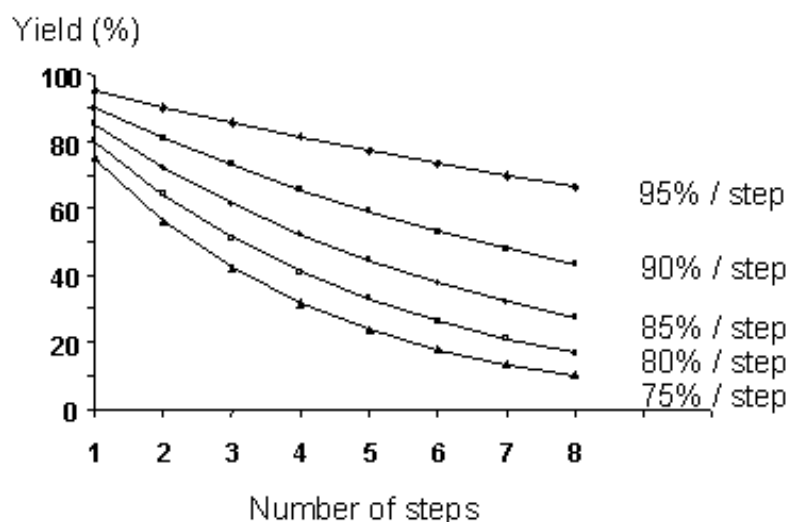
Jednotlivé postupy purifikace se od sebe liší. Existuje celá škála metod, od jednoduchých jedнокrokových precipitačních procedur až po řadu validovaných procesů. K dosažení požadované čistoty je většinou nutný více než jeden purifikační krok. Klíčem k úspěšnému a účinnému vyčištění bílkoviny je výběr nejvhodnější technologie, optimalizace postupu dle zadaných požadavků a kombinace metod do logických celků, aby se minimalizoval počet potřebných kroků. Většina purifikačních schémat zahrnuje některý typ chromatografie, která je nezbytným nástrojem v každé laboratoři, ve které je potřeba purifikovat proteiny. Chromatografické techniky s různou citlivostí a účinností proto mohou tvořit efektivní kombinace k vyčištění jakékoli biomolekuly (Anon, 2001).

3.1.1 Purifikační strategie

V prvním kroku je třeba popsat základní scénář průběhu purifikace a je nutné zodpovědět některé otázky, např. jaké je využití výsledného produktu, jaký použít výchozí materiál a jakým způsobem by měl být zpracován, jaká by měla být čistota produktu ve vztahu ke zdroji materiálu, co má být během čištění odstraněno a co musí být odstraněno kompletně, jaké vybavení bude potřeba (Anon, 2001).

Výběr vhodného výchozího materiálu je klíčem designu každého purifikačního procesu. Konkrétní bílkovina většinou není homogenně distribuovaná v těle rostliny či živočicha (nebo člověka), odlišné orgány a tkáně mají vyšší či nižší koncentraci tohoto proteinu. Použití pouze tkání nebo orgánů s nejvyšší koncentrací snižuje množství materiálu potřebné k produkci stanoveného množství vyčištěné bílkoviny (Internet 2).

Většina purifikačních protokolů vyžaduje více než jeden krok k dosažení požadovaného stupně čistoty produktu. Jejich součástí bývají i některé kroky nezbytné pro přenos produktu získaného určitou metodou do podmínek vhodných pro průběh metody další. Každý krok v procesu vede k určité ztrátě produktu. Pokud je například dosaženo 80 % výtěžku v každém kroku separace, po 8 krocích se konečný výtěžek sníží na 20 % (obr.1). Je tedy nutné dosáhnout zamýšleného cíle, tj. čistoty produktu i dostatečného výtěžku, s minimálním počtem kroků a s co nejjednodušším designem studie. Není proto efektivní přidávat navíc další krok, pokud byly požadavky na čistotu splněny (Anon, 2001).

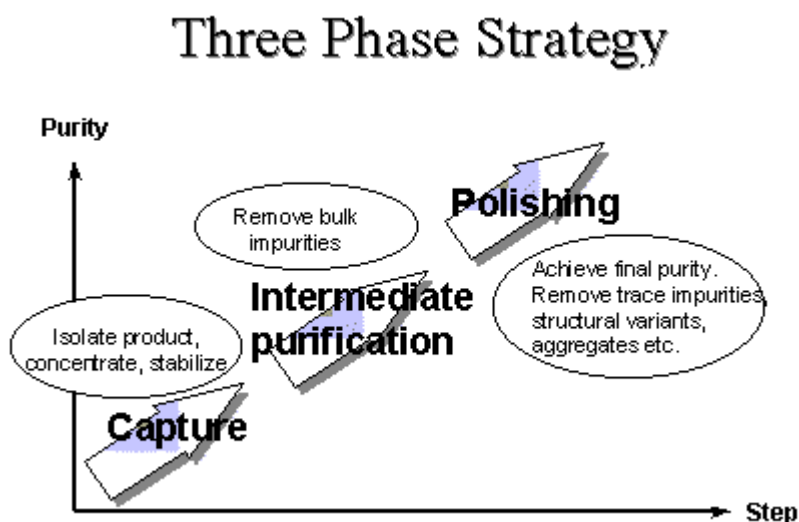


Obr.1 Celkový výtěžek v závislosti na velikosti výtěžku v jednotlivých krocích.

3.1.1.1 Třífázová purifikační strategie (1,2)

Tato strategie je využívána jako pomoc při vývoji purifikačních procesů terapeuticky využitelných proteinů ve farmaceutickém průmyslu, stejně tak i při vytváření purifikačních schémat ve výzkumné laboratoři. Typické pro tuto strategii je, že každému kroku je přiřazen konkrétní cíl. Purifikační problémy spojené s jednotlivými kroky procesu budou do značné míry záviset na vlastnostech výchozího materiálu. Cíle každého purifikačního kroku se budou lišit podle jeho zařazení v celém procesu, tj. budou zvlášť určeny pro *izolaci* produktu ze surového vzorku, jiné pro *další přečištění* částečně purifikovaného vzorku a nakonec pro *finální dočištění* téměř čistého produktu.

Třífázová strategie zaručuje rychlý rozvoj metody, kratší čas potřebný k vyčištění produktu a dobrou ekonomii. Lze u ní rozlišit tyto fáze: *předčištění*, *následné čištění* a *dočištění* (obr.2).



Obr.2 Třífázová strategie aplikovaná při purifikaci hrubých vzorků

Ve fázi *předčištění* je hlavním úkolem *izolovat*, *koncentrovat* a *stabilizovat* cílový produkt. Produkt by měl být koncentrován a přenesen do takových podmínek, které zajistí udržení jeho aktivity. Nejlépe by mělo být dosaženo maximálního odstranění kritických kontaminant, které by mohly snížit či zničit aktivitu cílového produktu.

Během fáze *následného čištění* je hlavním cílem *odstranění většiny z velkého množství znečištění*, jako jsou ostatní proteiny ve směsi, nukleové kyseliny, endotoxiny a viry.

Ve fázi *dočištění* je již odstraněna většina nečistot až na jejich stopová množství nebo blízké příbuzné sloučeniny. Cílem je dosáhnout *finální čistoty* (Anon, 2001).

Je třeba zmínit, že při využití této purifikační strategie neplatí, že všechny procesy musí probíhat ve třech krocích. Např. předčištění a následného čištění může být dosaženo v jednom jediném kroku, stejně tak i následného čištění a dočištění. Buď je požadovaná čistota tak nízká, že k dosažení žádoucího výsledku je dostatečné rychlé předčištění, nebo je čistota výchozího materiálu tak vysoká, že je potřebné pouze dočištění. Naopak izolace a vyčištění proteinu ze složité směsi bílkovin vyžaduje obvykle více purifikačních kroků často v kombinaci s mezioperační úpravou vzorku. Pro purifikaci terapeuticky využitelných proteinů by měl být požadován čtyř až pěti krokový proces, aby se splnily požadavky na nejvyšší čistotu a bezpečnost (Internet 3).

Optimální výběr a kombinace technik pro všechny tři fáze je rozhodující pro účinný purifikační proces (Anon, 2001).

3.1.1.2 Výběr a kombinace purifikačních technik

Proteiny jsou purifikovány s využitím chromatografických čistících metod, které je separují podle rozdílu v jejich specifických vlastnostech (Tab.1).

Tab.1 Vlastnosti proteinů využívané během purifikace

Vlastnost proteinu	Technika
Náboj	Iontově výměnná chromatografie (IEX)
Velikost	Gelová filtrace (GF)
Hydrofobicita	Hydrofobní interakce (HIC) Reverzní fáze (RPC)
Specifita ligandu	Afinitní chromatografie (AC)

Rozmanité techniky používané při purifikaci nejsou zároveň vhodné pro všechny fáze purifikační strategie. Tabulka 2 uvádí možnosti využití jednotlivých technik v každé z fází purifikace (Anon, 2001).

Tab.2 Možnost využití chromatografických technik v jednotlivých fázích purifikační strategie.

technika	před- čištění	následné čištění	dočištění	potřeba vzít v úvahu
GF		♦	♦♦♦	limitovaný objem vzorku limitovaný rozsah průtoku
IEX	♦♦♦	♦♦♦	♦♦♦	
HIC	♦♦	♦♦♦	♦	vysoká koncentrace soli může způsobit precipitaci proteinu proteinové ligandy jsou citlivé k nešetrným podmínkám
AC	♦♦♦	♦♦♦	♦♦♦	
RPC		♦	♦♦♦	eluenty obsahují organická rozpuštědla, riziko denaturace

Kromě kombinace různých chromatografických separačních metod jsou při purifikacích využívány i další metody vedoucí k charakterizaci čištěného proteinu. Patří mezi ně např. inkubace se specifickými substráty a stanovení aktivity purifikované frakce, stanovení obsahu bílkoviny ve vzorku, odhad molekulové hmotnosti sledovaného proteinu pomocí SDS-PAGE a Western blotting.

3.1.2 Iontově výměnná chromatografie (IEX)

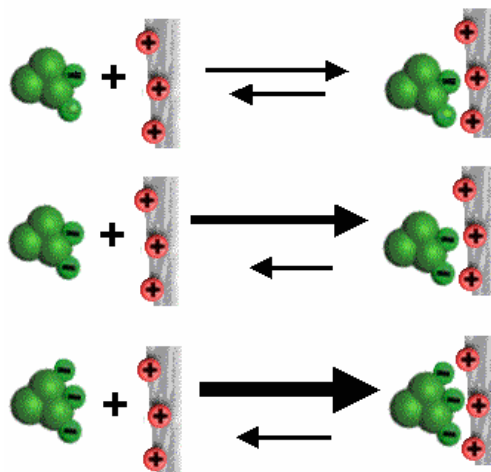
Iontově výměnná chromatografie je jedna z nejpřesnějších metod využívaná k frakcionaci biologických substancí a je založena na separaci biomolekul dle rozdílů v přítomnosti kladného či záporného náboje na jejich povrchu. Je využívána především jako jeden z počátečních kroků purifikace, ale může být použita i jako selektivní krok v pozdějších fázích purifikačního schématu (Anon, 1999a).

3.1.2.1 Separační mechanismus

Separace při této metodě je založena na reverzibilní adsorpci rozpuštěných nabitých molekul (jako jsou proteiny, peptidy a nukleotidy) k imobilizovaným iontově-výměnným skupinám opačného náboje. K desorpci poté dochází při změně pH nebo zvýšením koncentrace soli v mobilní fázi (Anon, 1999a)

3.1.2.1.1 Adsorpce

Proteiny nesou na svém povrchu nabitě skupiny aminokyselin a proto se mohou adsorbovat na iontové měniče. Bílkoviny s negativním povrchovým nábojem se adsorbují na aniontové měniče, zatímco ty s pozitivním nábojem na kationtové měniče. Síla adsorpce roste se zvyšujícím se povrchovým nábojem (obr.3).



Obr.3 Závislost velikosti povrchového náboje na síle adsorpce

Nabitě aminokyseliny obsahují buď slabé kyseliny nebo aminoskupiny, jejichž stupeň disociace závisí na pH. V návaznosti na to se bude povrchový náboj bílkoviny měnit se změnou pH. Tato změna je velmi specifická pro každý protein. Hlavním způsobem ovlivnění selektivity této metody je tedy změna pH v průběhu experimentu.

3.1.2.1.2 Desorpce

Existují dvě možnosti jak dosáhnou desorpce molekul vzorku z iontového měniče:

- snížením povrchového náboje změnou pH
- přidáním konkurenčního iontu, který zablokuje náboj iontového měniče

Změna pH je účinný způsob ovlivnění povrchového náboje molekul ve vzorku a je proto využívána při kontrole selektivity metody (pořadí eluce proteinů, vzdálenost mezi píky). Přidání kompetujícího iontu sice neovlivní selektivitu metody, ale zajistí eluci molekul v pořadí vzrůstajícího povrchového náboje.

Většina IEX experimentů využívá jako desorpčního činitele neutrální monovalentní sůl, např. chlorid sodný (NaCl). Je to z toho důvodu, že NaCl má jen malý nebo žádný efekt na pH v průběhu experimentu (Internet 3).

3.1.2.2 Matrix pro iontově výměnou chromatografii

Iontový měnič je tvořen nerozpustnou matrix, ke které jsou kovalentní vazbou připojeny nabitě skupiny (ligandy). Ligandy jsou asociovány s opačně nabitými mobilními ionty. Tyto ionty mohou být reverzibilně zaměňovány s jinými ionty stejného náboje bez vlivu na změnu struktury matrix.

Matrix je tvořena buď anorganickými sloučeninami, syntetickými pryskyřicemi nebo polysacharidy. Charakter matrix určuje její chromatografické vlastnosti jako jsou efektivita separace, kapacita a regenerační schopnost, dále ovlivňuje její chemickou stabilitu, mechanickou odolnost a průtokové vlastnosti (Anon, 1999a).

3.1.2.3 Typy iontových měničů

Ligandy pro IEX mohou být nabitě buď kladně nebo záporně (tab.3, tab.4). Negativně nabitě skupiny adsorbují kationy, zatímco pozitivně nabitě váží aniony. Z tohoto důvodu se nazývají kationtové měniče (katexy) a aniontové měniče (anexy). V závislosti na hodnotě pK_a nabitěho ligandu se dále dělí na silné a slabé. Silné měniče jsou nabitě v celém rozsahu pH používaném pro dělení bílkovin a peptidů. U slabých měničů je jejich náboj funkcí pH eluentu. Při purifikacích proteinů a peptidů jsou dnes slabé měniče používány méně, protože neposkytují žádnou podstatnou výhodu oproti silným měničům (Anon, 1999a).

Tab.3 Funkční skupiny používané jako aniontové měniče

Anion exchangers	Functional group
Diethylaminoethyl (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_2-CH_3)_2$
Quaternary aminoethyl (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Quaternary ammonium (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$

Tab.4 Funkční skupiny používané jako kationtové měniče

Cation exchangers	Functional group
Carboxymethyl (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
Sulfopropyl (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-CH_2-CHOH-CH_2-SO_3^-$

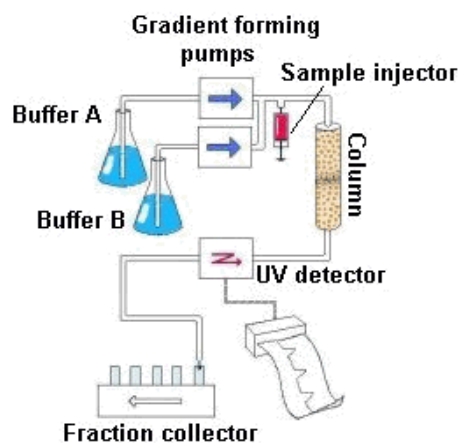
3.1.2.4 Eluční módy

3.1.2.4.1 Isokratická eluce

Isokratické eluce je při IEX využívána jen velmi zřídka. Využívá se spíše krokové eluce, kdy je koncentrace soli najednou prudce zvýšena a cílový protein je zcela desorbován.

3.1.2.4.2 Gradientová eluce

Je využívána nejčastěji. Gradient neutrální soli je vytvořen smísením dvou eluentů, z nichž jeden obsahuje nízkou koncentraci soli (pufr A) a druhý obsahuje vysokou koncentraci této soli (pufr B). Až na koncentraci soli jsou oba dva pufrы identické. Chromatografický systém obvykle kontroluje formování gradientu využitím dvou pump, jedné pro pufr A a druhé pro pufr B (obr.4).



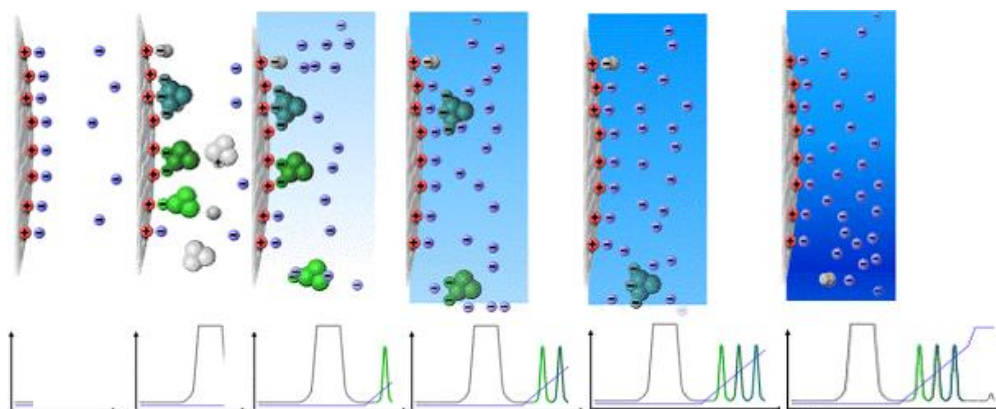
Obr.4 Schéma chromatografického systému využívaného pro tvorbu gradientu.

Protein je aplikován na kolonu ve fázi, kdy je koncentrace soli nízká a proto se adsorbuje na začátku sloupce. Na počátku gradientu zůstane zcela naadsorbován až do té chvíle, než koncentrace soli dosáhne počátku tzv. dělicí zóny (rozsah koncentrace soli, kdy dochází k desorpci daného proteinu). Jak se koncentrace soli v průběhu dělicí zóny zvyšuje, protein začíná být postupně desorbován a pohybuje se sloupcem rychlostí vyjadřující jeho relativní desorpci. Když dosáhne koncentrace soli horní hranice dělicí zóny, všechny molekuly proteinu jsou desorbovány. Protein se nyní pohybuje stejnou rychlostí jako eluent a jeho pozice v průběhu gradientu zůstává neměnná (Internet 3).

3.1.2.5 Fáze IEX experimentu

Většina IEX experimentů probíhá ve čtyřech základních fázích (obr.5):

- ustálení rovnováhy
- aplikace vzorku a jeho adsorpce na kolonu
- gradientová eluce
- regenerace kolony



Obr.5 Separace čtyř různě nabitých proteinů za použití gradientové eluce

Nejprve je na sloupci ustálena rovnováha pomocí pufru A a iontový měnič je přiveden do počátečních podmínek, co se týká pH a iontové síly, které umožní navázání požadovaných molekul. Ligandy měniče jsou v této chvíli asociovány s opačně nabitými ionty (obvykle jednoduché anioty nebo kationy jako Cl^- nebo Na^+).

Následně je na kolonu aplikován a adsorbován vzorek. Rozpuštěné molekuly nesoucí vhodný náboj nahradí jednoduché ionty a reverzibilně se naváží na matrix. Nenavázané substance mohou být vymyty z pórů měniče pomocí startovacího pufru A.

Díky změně elučních podmínek, které většinou zahrnují zvýšení iontové síly elučního pufru nebo změnu jeho pH, jsou navázané molekuly postupně vymývány z kolony. Pokud je k eluci využita zvyšující se koncentrace soli, molekuly jsou ze sloupce uvolňovány v závislosti na síle jejich vazby k matrix, tj. nejslaběji vázané substance budou eluovány jako první.

Na závěr dochází k odstranění substancí neeluovaných za předchozích experimentálních podmínek a ustavení nové rovnováhy pro následující separaci. Většinou se kolona promyje pufrům s vysokou koncentrací soli, aby došlo k vyplavení i velmi silně navázaných molekul, a poté se ustálí počáteční rovnováha pomocí startovacího pufru (Internet 3).

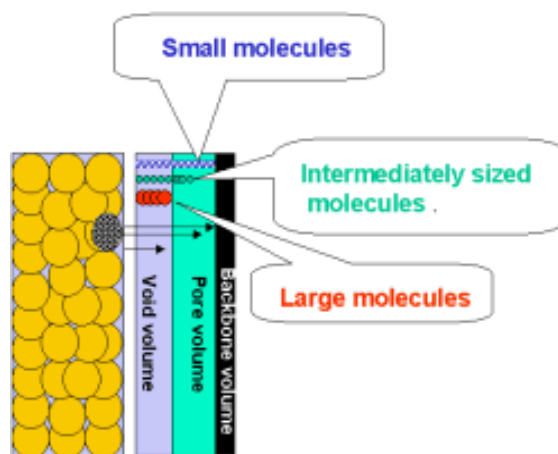
3.1.3 Gelová filtrace (GF)

Gelová filtrace je nejjednodušší a nejšetrnější ze všech chromatografických technik, která se výborně hodí k zacházení s biomolekulami, jež jsou citlivé ke změnám pH, koncentrace kovových iontů, kofaktorů a k nešetrným okolním podmínkám. Separace může být provedena v přítomnosti esenciálních iontů nebo kofaktorů, detergentů, močoviny, při vysoké či nízké iontové síle, při 37 °C nebo v chlazeném prostoru, popř. dle dalších požadavků experimentu (Anon, 2002a).

3.1.3.1 Separační mechanismus

Při GF dochází k dělení molekul podle jejich velikosti. Její univerzálnost umožňuje separaci všech skupin biologických substancí, včetně makromolekul. Separační mechanismus nemá charakter adsorpce a je nezávislý na užitém elučním systému. Je proto velmi šetrný a má velké výtěžky. Jelikož GF není adsorpční a využívá isokratickou eluci, není vzorek během separace koncentrován, ale je spíše naředěn. Tím je částečně omezeno množství vorku, které může být na kolonu aplikováno.

Schopnost separovat molekuly dle velikosti spočívá ve vysoce porézní struktuře gelu a je v podstatě otázkou dostupných objemů ve sloupci (obr.6).



Obr.6 Znáornění rozložení jednotlivých objemů v celkovém objemu gelu.

Všechny molekuly vzorku mají ve sloupci přístup ke kapalině přítomné mezi sférickými částicemi gelu. Tento objem se nazývá **mrtvý objem** (void volume, V_0) a odpovídá přibližně 30 % celkového objemu sloupce.

Médium pro GF obsahuje ve své struktuře póry, které umožňují molekulám vzorku penetrovat do částic gelu, a to v závislosti na jejich velikosti. Objem těchto pórů dává dohromady **objem pórů ve sloupci** (pore volume). Neporézní části gelových částic se nazývají **kostra gelu** (backbone) a nejsou dostupné pro žádné molekuly vzorku. U kvalitních médií tvoří tato kostra asi 3-5 % celkového objemu sloupce.

Celkový objem sloupce (total column volume, V_t) je tvořen mrtvým objemem, objemem pórů a kostrou gelu. **Objem částic gelu** je dán jednak rozdílem celkového objemu sloupce a mrtvého objemu ($V_t - V_0$), ale může jej vyjádřit i jako součet objemu pórů gelu a objemu kostry gelu.

3.1.3.1.1 Rozdělení molekul mezi mobilní a stacionární fázi

Na koloně pro gelovou filtraci jsou molekuly vzorku děleny mezi eluent (mobilní fázi, ve sloupci vyplňuje mrtvý objem) a póry gelových částic, které jsou dané molekule přístupné (stacionární fáze). Toto rozdělování probíhá až do ustálení **dynamické rovnováhy** mezi mobilní a stacionární fází a je řízeno výhradně difuzí.

Mobilní fáze strhává molekuly vzorku směrem ke konci sloupce, ale ovlivňuje pouze molekuly přítomné v mobilní fázi. Molekuly, které se nacházejí uvnitř pórů, jsou „stacionární“ a tomuto transportu unikají. To způsobuje, že distribuce molekul mezi stacionární a mobilní fází je nerovnoměrná a dochází k dalšímu rozdělování mezi obě

fáze a ke zpětné difúzi molekul z pórů do mobilní fáze. Tento efekt způsobuje patrnou retardaci molekul na koloně v závislosti na jejich velikosti a přístupu do pórů gelu. Čím větší část molekul se nachází v pórech, tím je jejich retardace větší.

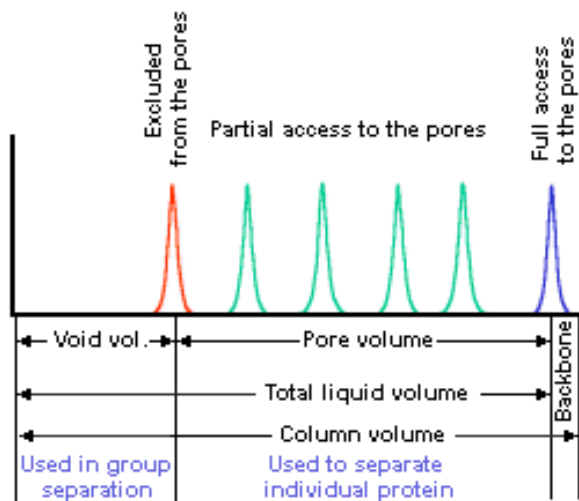
3.1.3.1.2 Eluční objemy

Migrační rychlost jednotlivých zón (rozsah velikostí molekul se stejným přístupem do pórů) vzorku závisí na frakci molekul přítomné v mobilní fázi (obr.7).

Molekuly, pro které jsou póry stacionární fáze **nepřístupné** (ve 100 % přítomné v mobilní fázi), se pohybují sloupcem stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Z kolony jsou vymývány po průtoku objemu mobilní fáze odpovídajícímu jednomu mrtvému objemu (V_0).

Molekuly s **částečným přístupem** do pórů budou zpožděny v závislosti na stupni jejich přístupu do pórů, jinými slovy budou z kolony eluovány v pořadí klesající velikosti.

Molekuly s **plným přístupem** do pórů se budou sloupcem všechny pohybovat stejnou rychlostí a zůstanou navzájem neodseparovány. Při použití média s objemem kostry cca 5 %, opustí kolonu při objemu mobilní fáze o něco málo nižším, než je celkový objem sloupce (Internet 3).



Obr.7 Tři kategorie přístupných objemů využitelné pro různé typy separace

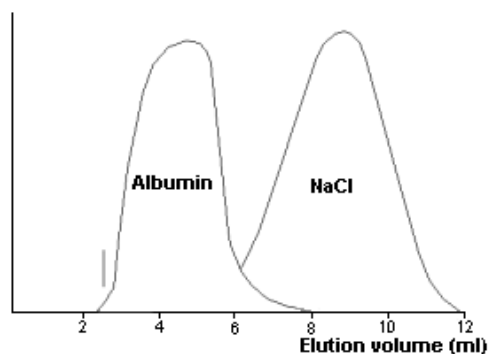
3.1.3.2 Separační módy

Metoda může být aplikována dvěma základními způsoby.

3.1.3.2.1 Skupinová separace

Díky této technice jsou komponenty vzorku separovány do dvou hlavních skupin, které se liší rozsahem molekulových hmotností. Většinou bývá využívána k odstranění malých molekul ze směsi makromolekul (obr.8). Rozsah frakcionace bývá zvolen tak, aby byly makromolekuly eluovány při objemu odpovídajícím mrtvému objemu (V_0) a malé molekuly co možná nejpozději. Jelikož nemají makromolekuly žádný přístup k pórům, zůstanou neodseparovány a budou eluovány jako skupina. Malé molekuly mají naopak přístup do pórů neomezený a vymyjí se také jako skupina přibližně objemem, který odpovídá jednomu objemu sloupce. Tato metoda je vhodná k odsolení vzorku nebo ke změně pufru.

Celkový objem vzorku aplikovaného na kolonu může být až 30 % objemu kolony. Obecně se používají vyšší průtoky a širší a kratší kolony než při následující metodě.

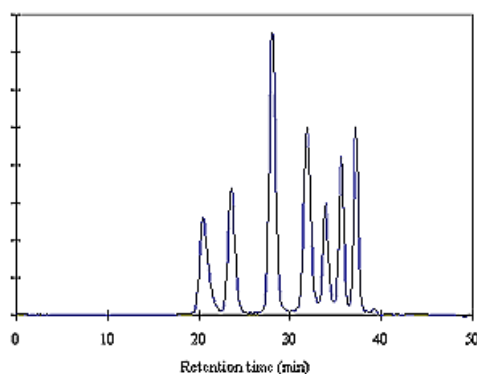


Obr.8 Gelová filtrace v módu skupinové separace

3.1.3.2.2 Klasická separace

Tato metoda se používá k separaci jednotlivých molekul (obr.9). Je využitelná pouze pro molekuly s částečným přístupem do pórů gelu, proto jsou média pro GF kategorizována dle rozsahu frakcionace. Frakcionační rozsah vyjadřuje distribuci velikostí pórů daného gelového média odpovídající rozsahu velikosti molekul s částečným přístupem do pórů. Široká nabídka gelových médií dnes pokrývá rozsah molekulových hmotností od 100 do 8 000 000, tj. od malých peptidů až po velmi velké bílkoviny.

GF může být využita k izolaci jedné nebo více komponent ze vzorku, k separaci monomerů z jejich agregátů nebo k určení molekulové hmotnosti (M_r) při M_r distribuční analýze.



Obr.9 Klasická separace pomocí gelové filtrace

Objem aplikovatelný na kolonu je při této technice omezen, jelikož nedochází k jeho koncentraci a mohlo by dojít k překrytí jednotlivých píků. Odpovídá cca 0,5-5 % celkového objemu sloupce. Rychlost průtoku bývá nízká, aby nedošlo k rozmývání a překrývání píků, z tohoto důvodu se používají i relativně dlouhé kolony.

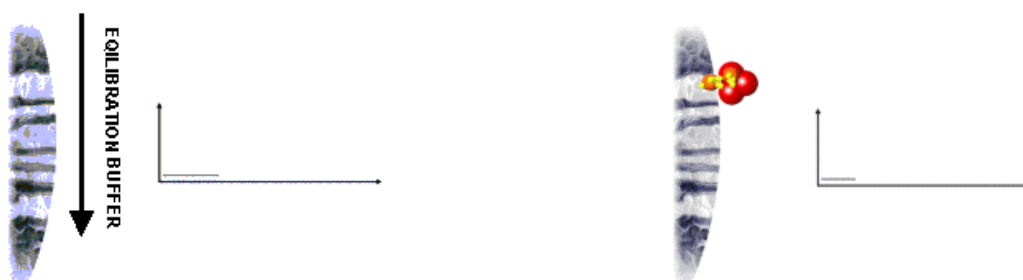
3.1.3.3 Fáze GF experimentu

Klasický GF experiment má tři fáze:

- ustálení rovnováhy na sloupci
- aplikace vzorku
- eluce

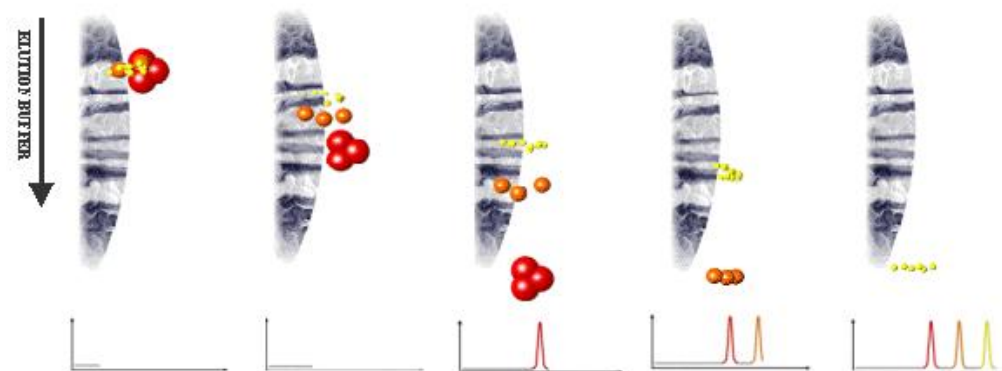
Podmínky na sloupci jsou nastaveny pomocí pufru zvoleného k separaci. Protože eluce probíhá isokraticky, je tento pufr používán po celou dobu experimentu (obr.10).

Vzorek je aplikován jako ostrá úzká zóna na začátku sloupce. Kvůli přesným výsledkům se jeho objem omezuje na 0,5-5 % celkového objemu sloupce (obr.10) (Internet 3).



Obr.10 Ustálení rovnováhy a aplikace vzorku

Pufr je pumpován na kolonu a dochází k dělení molekul vzorku dle jejich velikosti (obr.11).



Obr.11 Eluce jednotlivých molekul ve vzorku v závislosti na jejich velikosti.

3.1.3.4 Média používaná pro GF

Superdex je kompozitní médium složené s vysoce zesítěných agarosových částic, ke kterým je kovalentně navázaný dextran. Je vysoce fyzikálně i chemicky odolné. Používá se jako první volba pro efektivní dělení v krátkém čase, kde musí být zajištěna dobrá regenerace počátečních podmínek.

Matrix **Sephacrylu** je tvořena kovalentně síťovaným allyldextranem s N,N'-metylenbisakrylamidem. Je to hydrofilní médium s vysokou mechanickou odolností a zaručuje rychlost a vysokou účinnost separace.

U **Superosy** je médium tvořeno vysoce zesítěnými částicemi agarosy, vyznačuje se vysokou fyzikální i chemickou stabilitou. Není vhodné pro průmyslové využití.

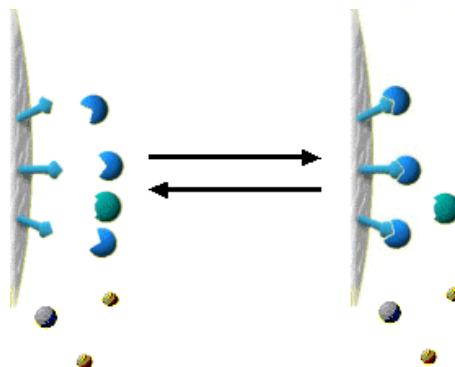
Sephadex tvoří zesítěný dextran s epichlorhydrinem (Anon, 2002a).

3.1.4 Afinity chromatografie (AC)

Tato metoda umožňuje purifikaci molekul s ohledem na jejich biologickou funkci nebo individuální chemickou strukturu. Substance, která má být vyčištěna, je specificky a reverzibilně adsorbována na ligand imobilizovaný kovalentní vazbou k matrix kolony. Vzorky jsou na sloupec aplikovány za podmínek příznivých pro jejich specifickou vazbu k ligandu. Sledované substance jsou tedy navázány na kolonu, zatímco nenavázané složky jsou vymyty. Získání požadovaných molekul bývá dosaženo změnou experimentálních podmínek, která vede k desorpci těchto molekul. AC je běžně využívána k purifikaci směsných proteinů, mono- a polyklonálních protilátek a glykoproteidů. Jelikož je tato metoda velmi specifická, běžně je dosahováno čistoty produktu > 95 % po jednom separačním kroku! Je ideální pro počáteční předčištění vzorku nebo jako hlavní purifikační krok. Většinou probíhá isokraticky (Anon, 2002b).

3.1.4.1 Separační mechanismus

U všech typů AC bývá afinitní ligand, specifický pro vazbu k cílové molekule, pojen s inertní chromatografickou matrix. Při vhodných vazebných podmínkách se k matrix vážou molekuly pouze podle své specifity k tomuto ligandu. Všechny ostatní složky vzorky projdou sloupcem neadsorbovány (obr.12).



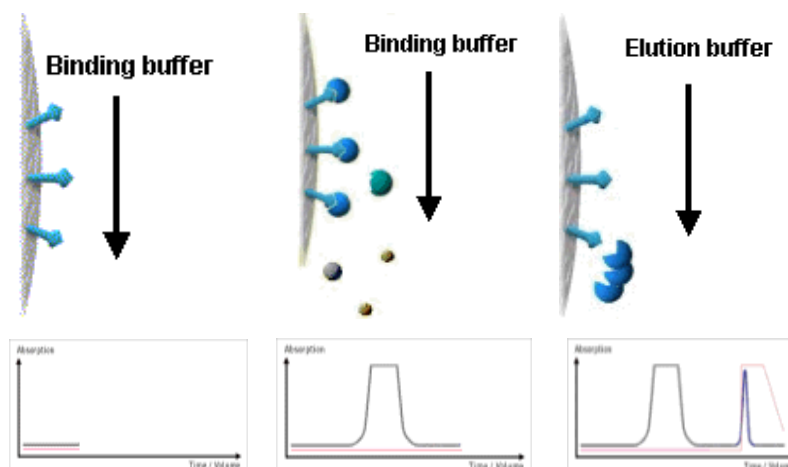
Obr.12 AC využívá vysoce specifické vazby molekul k ligandu ukotveného k matrix

Po vymytí všech nenavázaných součástí vzorku jsou adsorbované molekuly uvolněny změnou podmínek směrem k disociaci (změna pH, iontové síly či polarita) nebo přidáním nadbytku substance, která vytěsňuje cílové molekuly z vazby na afinitní ligand (kompetitivní ligand). Během experimentu dochází nejen k přečištění, ale i ke koncentraci dané molekuly.

3.1.4.2 Fáze AC experimentu

Typický AC experiment má tři části (obr.13):

- ustálení rovnováhy na koloně
- aplikace vzorku a vymytí nenavázaných komponent
- vymytí adsorbovaných molekul



Obr.13 Fáze AC experimentu: ustálení rovnováhy, aplikace vzorku, vymytí molekul

Sloupec je promýván vazebným pufrem až do ustálení podmínek, které podporují vazbu a adsorpci cílových molekul.

Na kolonu je aplikován vzorek a cílové molekuly jsou specificky navázány na afinitní ligand, zatímco ostatní molekuly jsou ze sloupce vymyty.

Cílové molekuly jsou desorbovány a vymyty přechodem na eluční pufr (Internet 3).

3.1.5 Chromatografie založená na hydrofobních interakcích (HIC)

HIC je purifikační a separační technika založená na rozdílech v povrchové hydrofobitě biomolekul. Bývá využívána jako jeden z kroků proteinové purifikační strategie v kombinaci s dalšími chromatografickými metodami, např. s gelovou filtrací nebo iontově výměnnou chromatografií.

O biomolekulách se všeobecně předpokládá, že jsou hydrofilní, ale kromě toho mají na svém povrchu dostatečný počet hydrofobních skupin, jenž umožní jejich interakci s hydrofobními ligandami spojenými s chromatografickou matrix (Anon, 1993).

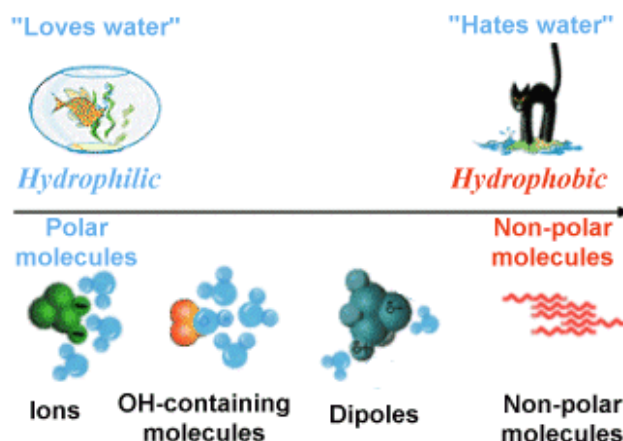
3.1.5.1 Separační mechanismus

3.1.5.1.1 Definice pojmů hydrofilní a hydrofobní

Hydrofilní (polární) sloučeniny obsahují ve své molekule buď nabitou skupinu (ionty), elektronegativní skupinu s velkým dipólovým momentem nebo skupinu schopnou tvořit vodíkové můstky. Mohou se tedy rozpouštět ve vodě a jejich molekuly jsou solvatovány.

Naopak **hydrofobní** (nepolární) sloučeniny obsahují ve své struktuře pouze kovalentní vazby s dipólovým momentem blízkým nule a ve vodě se nerozpouštějí. Jsou-li ve styku s vodou, uplatňují se mezi nimi tzv. hydrofobní interakce. Jde o interakci nepolárních částí molekul ve vodném prostředí, které mají tendenci se navzájem spojit a tím snižovat energeticky nevýhodný kontakt s polárními molekulami vody.

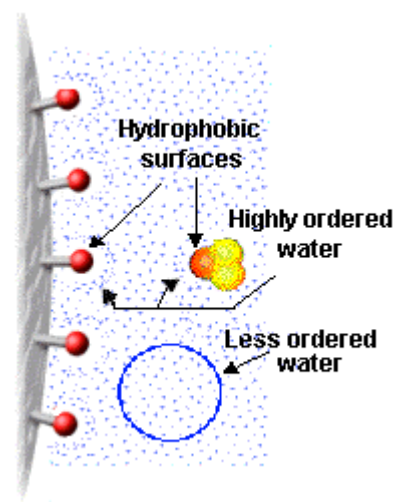
Jak vyplývá z obrázku (obr.14), neexistuje ostrá hranice mezi oběma skupinami molekul.



Obr.14 Postupný přechod mezi hydrofobními a hydrofilními sloučeninami.

3.1.5.1.2 Adsorpce

HIC média obsahují ligandy, které se mohou spojovat s hydrofobním povrchem proteinů (obr.15). V čisté vodě je však tento efekt příliš slabý, aby způsobil interakci mezi ligandem a proteinem či mezi proteiny navzájem. Určité soli však zvyšují hydrofobní interakce a přidání takovéto soli zapříčiní adsorpci proteinu k HIC médiu.



Obr.15 Hydrofobní povrch proteinu interaguje s imobilizovanými hydrofobními ligandy.

Následující řada solí bývá používána k posílení hydrofobních interakcí při purifikačních experimentech. Posloupnost je uvedena v pořadí snižujícího se vlivu na hydrofobicitu.



Ke kontrole adsorpce při HIC bývá nejčastěji používán síran amonný (amonium sulfát). Vzorek bývá na kolonu aplikován při vysoké koncentraci této soli (≈ 1 M). Při

desorpci je koncentrace soli postupně snižována a dochází k eluci jednotlivých komponent vzorku v závislosti na jejich stoupající hydrofobicitě.

3.1.5.2 Eluční mody

3.1.5.2.1 Gradientová eluce

Gradientová eluce je při využití HIC v purifikačním schématu používána nejčastěji. Gradient soli je většinou formován mícháním dvou eluentů. První obsahuje vysokou koncentraci soli (pufr A) a druhý má naopak koncentraci této soli nízkou (pufr B). Oba pufrы jsou až na obsah soli identické. Chromatografický systém obvykle kontroluje tvorbu gradientů využitím dvou pump, jedné pro pufr A a druhé pro pufr B.

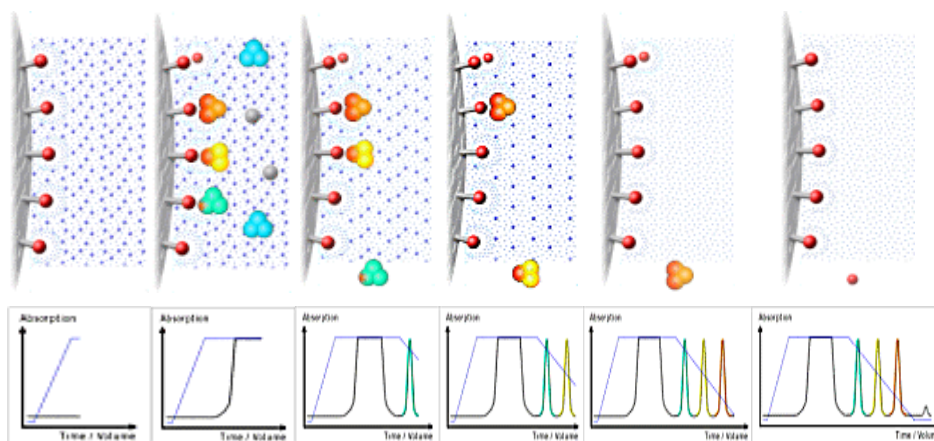
3.1.5.2.2 Jednokroková eluce

Koncentrace soli je během aplikace vzorku nastavena dostatečně nízko, aby zůstala většina slaběji se vázajících komponent neadsorbována, zatímco cílové komponenty a ty, které se váží silně, se adsorbují. Koncentrace soli je poté náhle snížena na úroveň, která je dostatečná k plné desorpci cílových molekul. Tento typ skupinové separace nezajišťuje takové výsledky jako při gradientové eluci.

3.1.5.3 Fáze HIC experimentu

Separace pomocí HIC s využitím gradientové eluce probíhá ve čtyřech fázích (obr.16):

- ustálení rovnováhy
- aplikace vzorku
- gradientová eluce
- regenerace média



Obr.16 Jednotlivé fáze HIC experimentu.

Rovnovážné podmínky na koloně jsou ustáleny promytím pufrům A, poté je aplikován vzorek, jehož některé komponenty se naváží na matrix a neadsorbované molekuly jsou vymyty z kolony pomocí pufru A. Postupným zvyšováním pufru B v eluční směsi je nastartován gradient, který způsobí desorpci navázaných molekul a jejich vymytí v pořadí jejich rostoucí hydrofobicity. V poslední fázi jsou vymyty nejpevněji navázané kontaminanty a médium kolony je regenerováno (Internet 3).

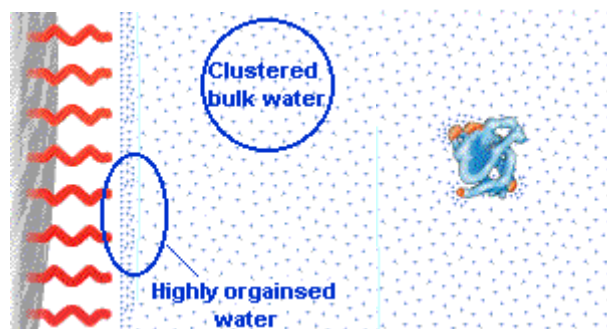
3.1.6 Chromatografie na reverzní fázi (RPC)

Chromatografie na reverzní fázi je separační technika, která separuje molekuly v závislosti na jejich hydrofobitě. Na rozdíl od HIC je RPC médium vysoce substituováno uhlovodíkovými řetězci, které jej činí velmi hydrofobním. Proteiny, peptidy a oligonukleotidy se adsorbují k těmto řetězcům i v čisté vodě. Při HIC jsou hydrofobní interakce podporovány přítomností soli, která nutí molekuly vzorku, aby se adsorbovaly k matrix, zatímco u RPC je zapotřebí přidavek organického rozpouštědla, aby se molekuly desorbovaly. Eluce využívá gradientu zvyšující se koncentrace organického solventu, jako je acetonitril.

Tato metoda nachází uplatnění v široké škále preparativních aplikací zahrnující mikropurifikaci proteinových fragmentů pro sekvenaci a purifikaci rekombinantních proteinových produktů (Anon, 1999b).

3.1.6.1 Separační mechanismus

Separační mechanismus u RPC závisí na vazebných hydrofobních interakcích mezi rozpuštěnými molekulami v mobilní fázi a imobilizovanými hydrofobními ligandy, tj. stacionární fázi. Počáteční vazebné podmínky jsou zajištěny vodnou mobilní fázi. V okolí rozpuštěných molekul i imobilizovaných ligandů je voda vysoce strukturně organizována (obr.17). Tak, jak se solut váže k imobilizovaným hydrofobním ligandům, je minimalizována hydrofobní oblast vystavená solventu. Z tohoto důvodu je stupeň organizace struktury vody zmenšován s odpovídajícím vzestupem entropie systému. Z energetického hlediska je tedy výhodná asociace solutu a ligandu.

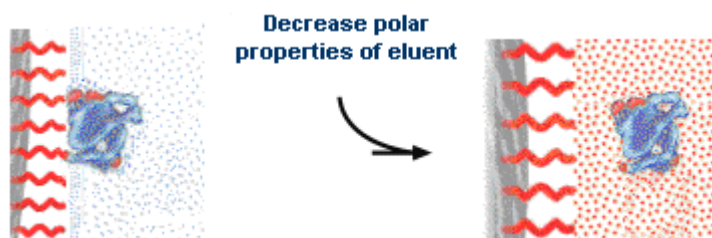


Obr.17 V okolí hydrofobních ligandů a molekul proteinu vykazuje voda vysoce organizovanou strukturu.

RPC je adsorpční proces, který je založen na rozdělovacím mechanismu mezi mobilní a stacionární fázi, jenž vede k separaci rozpuštěných molekul. Distribuce solutu mezi obě fáze závisí na vazebných vlastnostech média, hydrofobicitě solutu a příznivé adsorpci molekul z mobilní fáze k fázi stacionární. Následně je modifikováno složení mobilní fáze tak, aby došlo k žádané desorpci molekul ze stacionární fáze zpět do fáze mobilní. V tomto případě je adsorpce považována za extrémní stav rovnováhy, kde je distribuce rozpuštěných molekul v podstatě 100 % ve stacionární fázi. Naopak desorpce je extrémní rovnovážný stav, kde je solut 100 %-ně distribuován ve fázi mobilní.

3.1.6.2 Eluční módy

RPC biomolekul obvykle využívá gradientovou eluci místo isokratické. Zatímco se biomolekuly silně adsorbují k povrchu matrix reverzní fáze v přítomnosti vodné mobilní fáze, k jejich desorpci z matrix dochází uvnitř úzkého rozmezí koncentrací organického rozpouštědla přidaného do mobilní fáze (obr.18.). Typický biologický vzorek obvykle obsahuje značnou směs biomolekul s odpovídající pestrostí rozsahu adsorpčních afinit. Jediná prakticky využitelná metoda pro separaci komplexních biologických vzorků na reverzní fázi je tedy gradientová eluce.

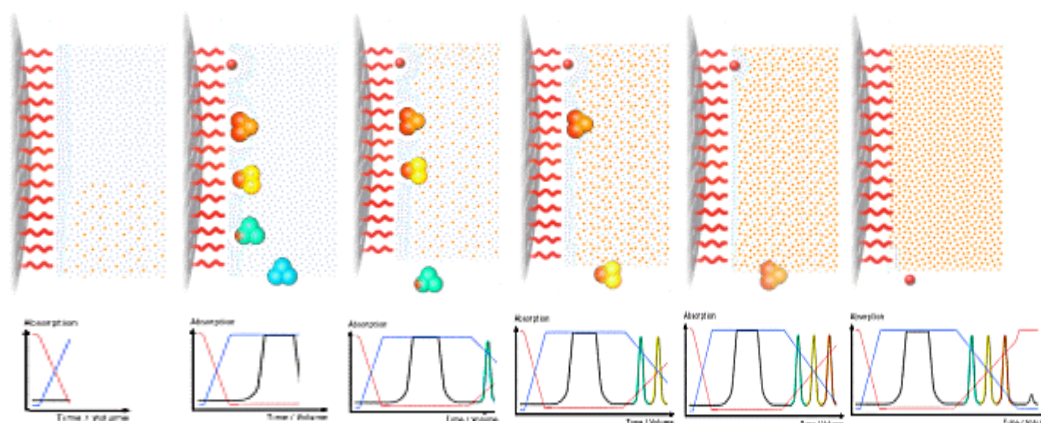


Obr.18 Snižující se polarita mobilní fáze oslabí hydrofobní interakce.

3.1.6.3 Fáze RPC experimentu

Běžný RPC experiment založený na gradientové eluci má čtyři fáze (obr.19):

- ustálení rovnováhy
- aplikace vzorku
- gradientová eluce
- regenerace kolony



Obr.19 Jednotlivé fáze RPC experimentu

Prvním krokem chromatografického procesu je ustálení rovnováhy na sloupci pomocí vhodné iniciační mobilní fáze o daném pH, iontové síle a polaritě. Polarita mobilní fáze je kontrolována přidáním organických modifikátorů jako je acetonitril.

V druhé fázi je na kolonu aplikován vzorek obsahující komponenty, které mají být separovány. Pokud je to možné, měl by být vzorek rozpuštěn v té samé mobilní fázi, která byla použita pro ustálení kolony. Vzorek je pomocí mobilní fáze unášen sloupcem, jednotlivé komponenty jsou adsorbovány k matrix nebo se neváží a jsou vymyty z kolony ven.

Navázané molekuly jsou následně z matrix desorbovány úpravou polarity mobilní fáze a jsou postupně eluovány ze sloupce. Změnou polarity mobilní fáze se u RPC většinou rozumí vzestup procentuálního zastoupení organického modifikátoru v jejím složení. Hodnota pH iniciační a finální mobilní fáze obvykle zůstává stejná. Postupného snížení polarity mobilní fáze je dosaženo zvyšujícím se lineárním gradientem ze 100 % iniciační mobilní fáze A obsahující žádné nebo malé množství organického modifikátoru ke 100 % mobilní fáze B, která obsahuje vysokou koncentraci tohoto modifikátoru. Navázané molekuly se z reverzní fáze desorbují dle svých hydrofobních vlastností.

V posledním kroku se z kolony vymyjí všechny dosud nedesorbované molekuly. Toho je většinou dosaženo změnou pufru B za fázi s téměř 100 % organického modifikátoru. Poté následuje znovu nastavení počátečních podmínek pomocí pufru A (Internet 3).

3.1.7 SDS-PAGE

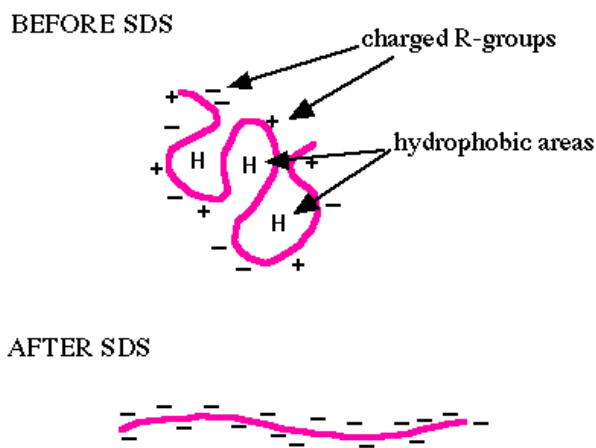
3.1.7.1 Charakteristika

Separace makromolekul v elektrickém poli se nazývá *elektroforéza*. Tato velmi běžná metoda pro separaci proteinů využívá nespojitého polyakrylamidového gelu jako podpůrného média a sodium dodecyl sulfát (SDS, laurylsulfát sodný) k denaturaci proteinů. Metoda je nazývána **sodium dodecyl sulfate polyakrylamide gel electroforesis (SDS-PAGE)**. Nejvíce využívaný systém je pojmenován dle svého tvůrce, Laemmliho metoda (1970).

Proteinová separace pomocí SDS-PAGE může být využita k odhadu relativní molekulové hmotnosti, k určení relativního zastoupení hlavního proteinu ve vzorku a k určení distribuce proteinů uvnitř dané frakce. Může být také použita k posouzení čistoty proteinového vzorku v rámci separačních a purifikačních procedur (Internet 4).

3.1.7.2 SDS

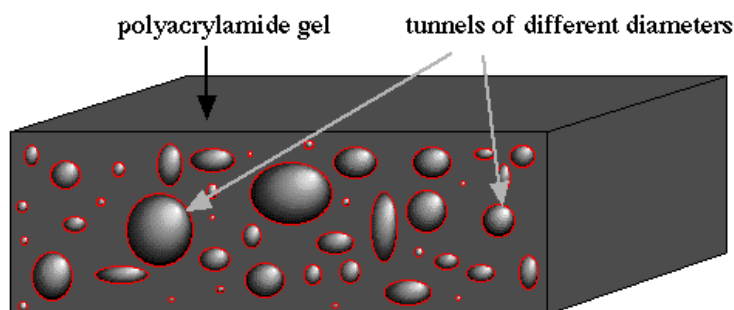
SDS je detergent, který dokáže rozpouštět hydrofobní molekuly a nese na svém povrchu negativní náboj. Proto, jsou-li s SDS inkubovány buňky, membrány jsou rozrušeny, proteiny jsou detergentem solubilizovány a navíc jsou všechny proteiny po celém povrchu pokryty negativními náboji. Polypeptidové řetězce na sebe váží takové množství SDS, které proporcionálně odpovídá jejich molekulové hmotnosti. Negativní náboj na SDS destruuje většinu komplexních proteinových struktur. Konečný výsledek má dva důležité rysy: 1) všechny proteiny obsahují pouze primární strukturu a 2) všechny proteiny mají velký negativní náboj, což znamená, že při vložení do elektrického pole budou všechny migrovat směrem k pozitivnímu pólu.



Obr.20 Obrázek znázorňuje protein před a po inkubaci s denaturačním detergentem SDS. SDS dokáže rozrušit hydrofobní oblasti (obr.20, znázorněny písmenem H) a pokrýt protein mnoha negativními náboji, které překryjí všechny pozitivní skupiny v molekule. Výsledný protein je **denaturován** a zároveň **linearizován** (Internet 4, Internet 5).

3.1.7.3 PAGE

Pokud jsou proteiny denaturovány a umístěny do elektrického pole, budou se pohybovat směrem ke kladnému pólu stejnou rychlostí, bez jakéhokoliv náznaku separace. Proto je třeba umístit proteiny do takových podmínek, které umožní různě velkým proteinům pohybovat se různou rychlostí. Volbou bývá polyakrylamid, který vzniká polymerizací akrylamidových monomerů. Když je tento polymer vytvořen, změní se v gel, na kterém je možno s využitím elektrického proudu separovat proteiny. Celý proces se tedy nazývá **polyakrylamide gel elektroforesis (PAGE)**. Polyakrylamidový gel není kompaktní, ale je tvořen labyrintem prázdných bublin, tunelů, uvnitř sítě vláken (obr.21) (Internet 5).



Obr.21 V gelu existují prázdné bubliny („tunely“) mnoha velikostí nahodile rozmístěné v celé jeho struktuře.

3.1.7.4 Polyakrylamidový gel

Při tvorbě gelu pro SDS-PAGE jsou mezi sklíčka nality dvě různé vrstvy akrylamidu. Spodní vrstva (separační) je zodpovědná za vlastní separaci polypeptidů podle jejich velikosti. Horní vrstva obsahuje jamky pro aplikaci vzorku a dochází v ní ke kompresi vzorku do mikrometrové vrstvičky ještě před tím, než proteiny dosáhnou okraje separačního gelu.

Gel o dané koncentraci akrylamidu separuje proteiny nejefektivněji vždy uvnitř charakteristického rozsahu molekulových hmotností. Typický gel obsahující 7 % akrylamidu dobře separuje polypeptidy s molekulovou hmotností mezi 45 a 200 kDa. Hustší gel, např. 14 %, obvykle rozdělí všechny nejmenší polypeptidy ve směsi.

3.1.7.4.1 Spodní (separační) gel

Běžně se připravují gely o koncentraci 7 až 15 % akrylamidu, v závislosti na rozsahu velikostí proteinů, které je třeba rozdělit. K zásobnímu roztoku akrylamidu, který je složen z 29,2 % akrylamidu a 0,8 % bis-akrylamidu, je přidán 0,4 % SDS, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 a voda. Akrylamid spontánně polymerizuje v prostředí bez přítomnosti kyslíku, proto zahrnuje polymerizační proces kompletní odstranění kyslíku z roztoku. Iniciace polymerace probíhá přidáním čerstvě připraveného amonium persulfátu (APS) a N,N,N',N'-tetramethylenethyldiaminu (TEMED) do směsi. Směs musí být bezprostředně nalita mezi skla a překryta vrstvou butanolu nasyceného vodou isopropylalkoholu. Důvodem je vytvoření hladkého vodorovného povrchu na separačním gelu, který bude ve styku s gelem zaostřovacím. Doba polymerizace je obvykle 10 min a neměla by přesáhnout 15 min. Závisí však především na množství přidávaných iniciátorů polymerizace.

3.1.7.4.2 Horní (zaostřovací) gel

Typický zaostřovací gel má koncentraci 3 až 4,5 % akrylamidu. K zásobnímu roztoku akrylamidu se přidá 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % SDS a voda. Před přidáním iniciátorů polymerizace je odstraněn butanol ze separačního gelu. Po aplikaci gelu mezi skla je opatrně vložen hřeben pro tvorbu jamek tak, aby mezi jednotlivými zuby nebyly bubliny (Internet 6).

3.1.7.5 Příprava vzorku pro elektroforézu

3.1.7.5.1 Struktura proteinů

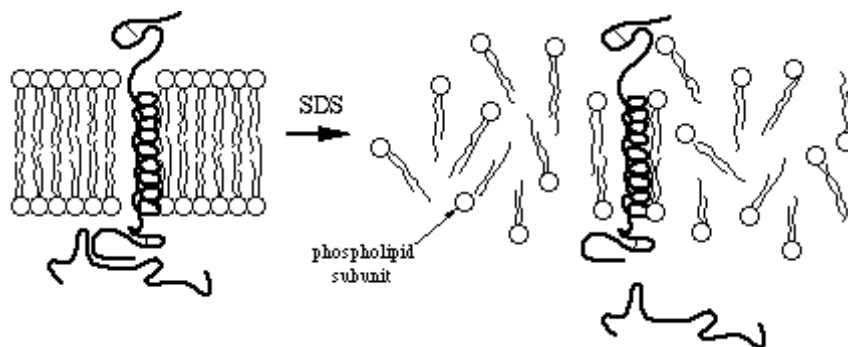
Polypeptidy jsou makromolekuly skládající se z nerozvětvené sekvence aminokyselin, které jsou vzájemně spojeny jednoduchou peptidickou vazbou. Protein je složen z jednoho či více polypeptidů a/nebo dalších typů molekul, jeho struktura je držena pohromadě díky množství molekulárních interakcí často zahrnující kovalentní vazby. Tyto interakce mají za následek různé úrovně organizace struktury, které se nazývají primární, sekundární, terciární a kvartérní.

Sekvence aminokyselin polypeptidu tvoří *primární strukturu*. Interakce rozpustného proteinu s vodou vede ke vzniku vodíkových vazeb, které jsou částečně zodpovědné za *sekundární strukturu* bílkoviny. Sekundární struktura se vztahuje k místní struktuře polypeptidového řetězce, zahrnující spirály, skládané listy a otáčky. Funkční protein má 3D strukturu, která je výsledkem vodíkových vazeb (můstků), hydrofobních interakcí mezi aminokyselinami, Van der Walsových sil a disulfidických můstků. Tato struktura je nazývána *terciární*. *Kvartérní struktura* je dána interakcemi jednotlivých polypeptidových řetězců s ostatními molekulami tvořícími funkční protein.

3.1.7.5.2 Denaturace vzorku

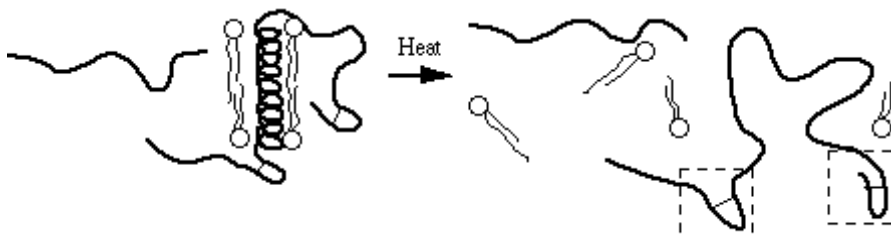
Pro SDS-PAGE bývá používáno mnoho různých vzorkových pufřů, ale všechny využívají stejný princip denaturace. Dobré denaturace vzorku může být např. dosaženo jeho smícháním 1:1 (v/v) se vzorkovým pufrem obsahujícím 2 % SDS, 20 % glycerolu, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, malé množství bromfenolové modři a redukčního činidla jako je dithiothritol (DTT) nebo 2-merkaptoethanol (exp.biosci).

SDS, redukční činidlo a teplo jsou zodpovědné za skutečnou denaturaci vzorku. SDS ruší 2D a 3D strukturu proteinu a současně udílí negativní náboj aminokyselinám (obr.22). Ačkoli je protein působením SDS více či méně natažený, určitá kvartérní struktura u něj může být zachována díky disulfidickým vazbám a kovalentním či nekovalentním spojením mezi ostatními typy molekul.



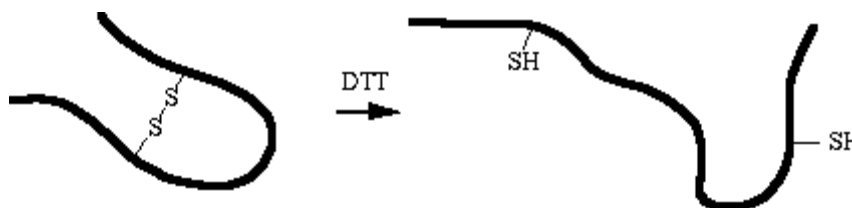
Obr.22 Anionický detergent částečně uvolní protein z vazby na fosfolipidovou membránu a linearizuje jeho strukturu.

Mnoho proteinů má významné hydrofobní vlastnosti a může být těsně asociováno s jinými molekulami, jako jsou lipidy, díky hydrofobním interakcím. Zahřátí vzorku nejméně na 60 °C rozruší tyto vazby a umožní SDS navázat se v hydrofobních oblastech proteinu a dokončit denaturaci (obr.23).



Obr.23 Zahřátí vzorku v přítomnosti SDS urychlí rozrušení sekundární, terciární a kvartérní struktury proteinu. Disulfidické vazby zůstanou zachovány.

Aminokyselina cystein obsahuje ve své struktuře –SH skupinu, která může za normálních intracelulárních podmínek spontánně tvořit disulfidickou vazbu (-S-S-) s jinou –SH skupinou. Tato vazba je kovalentní a není rozrušena působením SDS. DDT nebo 2-merkptoethanol jsou silná redukční činidla a jejich specifickou rolí při denaturaci vzorku je odstranit poslední části terciární a kvartérní struktury redukcí disulfidických můstků (obr.24) (Internet 7).



Obr.24 DTT redukuje disulfidické můstky a odstraňuje poslední známky terciární a kvartérní struktury.

3.1.7.6 Spuštění elektroforézy

Denaturované vzorky proteinu jsou postupně aplikovány do jamek zaostřovacího gelu. Na gel je poté přivedeno konstantní napětí, které způsobí migraci negativně nabitých proteinů skrz matrix gelu. V závislosti na své velikosti se každý protein bude gelem pohybovat různou rychlostí: krátké proteiny se budou přes jednotlivé póry gelu dostávat snadněji, zatímco dlouhé řetězce se budou pohybovat obtížněji. Po určitém čase tedy dochází k separaci jednotlivých proteinů na základě jejich migrační rychlosti gelem, tj. na základě jejich velikosti. Menší proteiny doputují dál směrem k druhému konci gelu, naopak větší proteiny zůstanou blíže k počátku separační zóny (Internet 8).

Na ELFO většinou bezprostředně navazuje jedna z vizualizačních technik, jako je např. barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue, značení stříbrem nebo Western blot. Po použití těchto technik dochází ke zviditelnění jednotlivých proteinů, které se na gelu objeví v podobě proužků (bandů). Poté je možné je srovnávat s molekulárním standardem a odhadnout tak jejich Mr nebo posoudit čistotu jednotlivých vzorků (Internet 9)

3.1.8 Western blotting

Western blotting (WB) je metoda přenosu proteinů rozdělených pomocí ELFO na pevnou membránu, kde je možno jednotlivé bílkoviny detekovat pomocí specifické vazby protilátky. Blotování může být využíváno při zjišťování mnoha důležitých charakteristik antigenu, jako je jeho přítomnost a kvantita ve vzorku, molekulová hmotnost a efektivita extrakce daného antigenu.

Základní blotovací proces může být rozdělen do následujících kroků:

- Příprava vzorku
- Gelová elektroforéza
- Přenos proteinu na membránu
- Blokace nespecifických vazeb
- Přidání protilátky (protilátek)
- Detekce

Prvnímu a druhému bodu bylo věnováno dostatek prostoru výše (viz. 3.1.7).

3.1.8.1 Přenos proteinu na membránu

Přenosu proteinů rozdělených během SDS-PAGE na pevnou membránu bývá nejčastěji dosaženo elektroblotováním. Při tomto procesu je stlačen „sendvič“ gelu a membrány (nitrocelulosa, polyvinylidínfluorid) do kazety a ponořen do pufru mezi dvě

paralelní elektrody. Proud prochází v pravém úhlu ke gelu, což způsobí přechod separovaných proteinů z gelu na membránu. Když je transfer bílkovin dokončen, stává se z membrány „blot“. Efektivita s jakou budou jednotlivé antigeny přeneseny na blot je závislá na vazebné kapacitě použité membrány, přenosové metodě a podmínkách v průběhu přenosu. Závisí také na velikosti a hydrofobicitě antigenu.

Vliv na přenos bílkovin může mít také SDS použitý při ELFO. Zatímco při ELFO je SDS potřebný pro usnadnění migrace proteinů gelem, při vazbě proteinu k membráně může docházet k interferencím. Menší polypeptidy, pokud jsou stále silně obaleny SDS, se mohou pohybovat rychleji, což podstatně snižuje efektivitu vazby proteinu k membráně. Při blotování nízkomolekulárních proteinů je tedy výhodné předem opláchnout polyakrylamidový gel 5-15 min v transferovém pufru bez SDS, což pomůže snížit jeho koncentraci a zvýší efektivitu přenosu nízkomolekulárních proteinů na membránu. Naopak vyšší molekulové hmotnosti vyžadují delší přenosový čas. Efektivita přenosu antigenů s vyšší molekulovou hmotností může být zvýšena prodloužením doby blotování a přidáním 0,05 % SDS do transferového pufru. Obecně lze říci, že čím je protein hydrofobnější, tím obtížněji je přenášen na membránu. Tento problém je řešen přidáním metanolu do transferového pufru (až 20 %).

Délka blotování závisí na podmínkách metody a na velikosti přenášených proteinů. V průběhu přenosu je většinou vyžadováno chlazení blotovacího zařízení.

3.1.8.2 Blokace nespecifických vazeb

Než je přidána první protilátka, membrána musí být nejprve inkubována s vhodným blokovacím proteinovým roztokem, aby došlo k zablokování zbylých hydrofobních vazebných míst na membráně. Zabrání se tak nespecifické vazbě primární protilátky přímo na membránu. Typický blokovací roztok může být 10 % (w/v) hovězí sérový albumin (BSA) nebo 5 % odtučněné sušené mléko v Tris-HCl nebo ve fosfátovém pufru. Je velmi důležité, aby takovýto blokovací roztok neobsahoval antigen, který je rozpoznáván primární nebo sekundární protilátkou. Dostatečná by měla být inkubace 30 min při 37 °C nebo se membrána nechá v blokovacím pufru přes noc v lednici.

3.1.8.3 Přidání protilátek

Po opláchnutí membrány od blokovacího roztoku je přidána naředěná primární protilátka a membrána se inkubuje 30 min při 37 °C, hodinu při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4 °C za mírného míchání. Po inkubaci s primární protilátkou následuje řada

oplachů v promývacím pufru (většinou obsahuje 0,1 % Tween 20) a poté přidání sekundární protilátky. Následuje inkubace se značenou sekundární protilátkou proti primární protilátce za stejných podmínek.

3.1.8.4 Detekce

Metoda detekce závisí na způsobu označení sekundární protilátky (někdy i primární). Pro značení protilátek při WB se nejvíce využívají enzymy, např. alkalická fosfatasa nebo křenová peroxidasa, které mohou být detekovány vizuálně díky konverzi kolorimetrického substrátu (chromogenu) nebo díky přeměně chemiluminiscenčního substrátu, který po přeměně enzymem emituje světelné záblesky, jenž jsou poté zachyceny na RTG film. Využití chemiluminiscenčního detekčního systému je velmi senzitivní (Internet 10).

3.1.9 Stanovení bílkoviny

Pro stanovení množství bílkoviny ve vzorku jsou běžně využívány čtyři spektroskopické metody. Zahrnují jednak měření vnitřní UV absorpce a tři metody, které využívají na proteinu závislé změny barvy roztoku: Lowryho metodu (1951), Smithovu metodu (1985) stanovení pomocí BCA (bicinchoninic acid) a Bradfordovo stanovení (1976). Všechny metody jsou běžně využívány ve všech biochemických laboratořích, ale každá je vhodná pouze pro určité podmínky stanovení (science.smith).

Absorbance proteinů v UV- oblasti je způsobena především tryptofanem a tyroxinem a v menší míře i fenylalaninem. Absorpci ovlivňuje pH roztoků, takže při různých pH jsou absorpční křivky posunuty. Většinou se měří absorpce v alkalické oblasti. (Veselá se sp., 1997). Stanovení bílkoviny pomocí UV absorpce vyžaduje použití čistého proteinu se známým excitačním koeficientem v roztoku bez dalších substancí absorbujících UV záření. Měření se provádí v kyvetě z křemenného skla při vlnové délce 280 nm nebo 205 nm.

Lowryho metoda a stanovení pomocí BCA jsou založeny na redukci měďnatých iontů Cu^{2+} na ionty měďné Cu^+ způsobenou amidy. Ačkoli jsou tato stanovení celkem přesná, vyžadují přípravu několika reakčních roztoků, které musí být v průběhu stanovení pečlivě odměřeny a promíchány. Následuje delší, časově přesně stanovená inkubace při zvýšené, přesně kontrolované teplotě a poté bezprostřední měření absorpce nestabilního roztoku. Obě metody mohou být ovlivněny jinými látkami často se vyskytujícími v biochemických roztocích, jako např. detergenty, lipidy, pufrů a redukčními činidly.

Proto tyto metody vyžadují sérii standardních roztoků obsahujícími přesně známe množství proteinu a stejné komponenty, které obsahuje vzorek.

Bradfordovo stanovení využívá posunu v absorbanci barviva Coomassie Brilliant Blue po vytvoření komplexu s proteinem. Tato metoda je velmi rychlá a nevyžaduje tak dlouhé inkubace ani zvýšení teploty jako předešlé metody. Její výhodou je kompatibilita s redukčními činidly, je však negativně ovlivňována přítomností detergentu (Internet 11).

3.1.9.1 Smithovo stanovení bílkovin pomocí BCA

Metoda využívá reakce proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty přecházejí na Cu^+ , které vytvářejí v prostředí kolem pH 10 stabilní modrofialový komplex s BCA. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny v roztoku. Absorbance komplexu je měřena při vlnové délce 562 nm. Před stanovením je třeba připravit reakční roztok (C) smícháním dvou standardních roztoků A+B v poměru 50:1 (A:B).

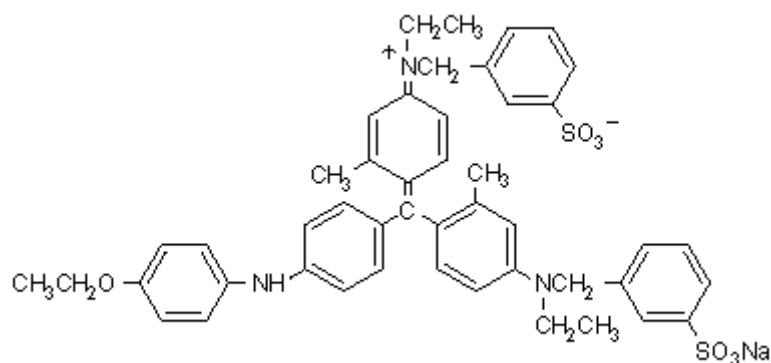
Roztok A je tvořen 1 % (w/v) BCA, 2 % (w/v) uhličitanem sodným Na_2CO_3 , 0,16 % (w/v) vinanem sodným, 0,95 % (w/v) hydrogenuhličitanem sodným NaHCO_3 a 0,1 M hydroxidem sodným NaOH.

Roztok B tvoří 4 % (w/v) hexahydrát síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

Po přidání roztoku C ke vzorku následuje 30-60 min inkubace při teplotě od 37 do 60 °C. Delší inkubace zvyšuje senzitivitu stanovení. Zahřívání může být přerušeno dřív, aby se zabránilo přílišnému zbarvení vzorků. Inkubace může být provedena i při laboratorní teplotě, ale potom je metoda méně citlivá a přesná. Stanovení lze provést buď jako makro- (standardní) nebo mikrostanovení (Internet 12).

3.1.9.2 Bradfordovo stanovení proteinů

Bradfordova metoda stanovení bílkovin je velmi populární pro svou jednoduchost, rychlost, finanční dostupnost a citlivost. Princip této metody je založen na posunu absorpčního maxima modrého barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) (obr.25). Barvivo se specificky váže na protein v místě jeho argininových, tryptofanových, tyrosinových, histidinových a fenylalaninových zbytků. CBBG se k těmto zbytkům váže ve své aniontové formě, jejíž absorpční maximum se nachází v oblasti 595 nm (modrá). Roztok volného barviva ve formě kationu maximálně absorbuje při 470 nm (červená). Měření probíhá na spektrofotometru při 595 nm a monitoruje se tak komplex CBBG s proteinem.



Obr.25 Struktura barviva Coomasie Brilliant Blue G-250

Bylo zjištěno, že absorpční spektra obou forem barviva se překrývají. To způsobuje nelineárnost standardní křivky závislosti absorbance na obsahu bílkoviny. V tomto případě závislosti vyhovuje lépe křivka druhého řádu než-li přímka. Při této metodě může být lineární závislost využita jen v úzkém rozsahu koncentrací proteinu, ale často jen tahle skutečnost vede k všeobecnému závěru, že je metoda lineární. Dokonce Bradford (1976) sám ve svém původním článku poukazoval na to, že metoda není lineární v celém svém rozsahu.

Eistují dvě základní úpravy Bradfordova stanovení, každé má jiný rozsah detekce. Mikrostanovení je určeno pro koncentrace proteinu do 50 $\mu\text{g/ml}$ a klasické (makro-) stanovení se využívá v oblasti hodnot 200-2000 $\mu\text{g/ml}$. Všeobecně je vhodnější použít mikroformát a vzorky naředit. Při mikrostanovení vzniká méně odpadu a je spotřebováno méně reakčního materiálu (Internet 13).

3.2 REDUKČNÍ ENZYMY

3.2.1 *Zařazení reduktas v rámci metabolismu xenobiotik*

Cest, kterými mohou být xenobiotika, a tedy i léčiva, metabolizovány či biotransformovány, je mnoho a zahrnují oxidaci, redukci, hydrolýzu, hydrataci, konjugaci a kondenzační reakce. Porozumění těmto pochodům je důležité zejména proto, že metabolická dráha léčiva může determinovat jeho podstatnou farmakologickou či toxikologickou aktivitu.

Metabolismus xenobiotik je běžně rozdělován do dvou fází: 1. fáze a 2. fáze (konjugační). Reakce 1. fáze jsou chápány jako příprava xenobiotika pro 2. fázi, tj. ve fázi 1 jsou vytvářeny či odkrývány chemicky reaktivní funkční skupiny, které reagují ve fázi 2. Reakce 2. fáze jsou proto pravými „detoxikačními“ drahami a poskytují produkty tvořící velké množství inaktivních, vyloučených metabolitů léčiv. Mnoho reakcí z fáze 1 i 2 se může podílet na přeměně té samé sloučeniny, a proto je zde možnost interakcí různých metabolických drah ve smyslu kompetice o substrát.

Mezi reakce první fáze můžeme zařadit oxidaci zahrnující cytochrom P450, ostatní oxidační reakce, redukci, hydrolýzu, hydrataci, isomerizaci a další zřídka se vyskytující reakce (Gibson, 2001).

3.2.2 *Redukční metabolismus*

Až donedávna byl metabolismus léčiv studován především s ohledem na oxidační reakce, nyní se však pozornost obrací také k redukčnímu metabolismu. Oxidoreduktasy tvoří první třídu enzymů dle mezinárodní klasifikace enzymů (EC). Reduktasy jsou v rámci buňky většinou lokalizovány v cytosolu (rozpuštěné), v menší míře v mitochondriích a v mikrosomech (membránově vázané). Při metabolizaci léčiva může mít redukční přeměna několik účinků, a to aktivační, deaktivující, toxikační či detoxikační.

Mezi enzymy účastnící se redukčních reakcí patří např. alkoholdehydrogenasa, aldo-keto reduktasy, cytochrom P450, NADPH- cyt P450 reduktasa, NADH- cyt b₅ reduktasa, thioredoxin reduktasa, xantin oxidasa, aldehyd oxidasa, chinon reduktasa a glutathion reduktasa.

Redukční přeměny xenobiotik zahrnují redukce karbonylových skupin, dvojných vazeb, N-oxidů, sulfoxidů, disulfidů, redukce aromatických nitro- a azosloučenin, redukční dehalogenaci, redukce hydroxamových kyselin (Kvasničková, 1995).

Především redukce karbonylové skupiny je významnou biotransformační přeměnou mnoha léčiv a hraje také významnou roli při deaktivaci některých farmakologicky významných substancí (ústní sdělení Wsól, 2004).

3.2.3 Redukce karbonylové skupiny

Bylo prokázáno, že se enzymy redukující karbonylovou skupinu podílejí na metabolické přeměně mnoha aromatických, alicyklických a alifatických karbonylových sloučenin (Felsted a Bachur, 1980; Wermuth, 1985; Rosemond a Walsh, 2004). Některé reductasy se také účastní deaktivace některých léčiv jako je warfarin, haloperidol, daunorubicin a doxorubicin (Hermans a Thijssen, 1993; Maser, 1995). Doposud bylo identifikováno několik enzymů, které zprostředkovávají redukci karbonylové skupiny látek endogenního i exogenního původu, z nichž většina byla charakterizována na biochemické a molekulární úrovni (Oppermann se sp, 1998). Na základě jejich primární struktury a charakteristických motivů byly tyto enzymy klasifikovány a rozděleny do tří proteinových nadrodin, **dehydrogenasy-reduktasy s krátkým řetězcem** (SDR) (Jörnvall se sp., 1995), **dehydrogenasy-reduktasy se středně dlouhým řetězcem** (MDR) (Nordling, 2002) a **aldo-keto reduktasy** (AKR) (Bohren se sp., 1989). Nacházejí se v každé tkáni většiny dosud testovaných organismů a některé z nich mají fyziologickou roli v metabolismu prostaglandinů, sacharidů a steroidů (Jörnvall se sp., 1995; Jez a Penning, 2001).

3.2.3.1 Aldo-keto reduktasy (AKR)

Aldo-keto reduktasy tvoří rozsáhlou nadrodinu NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas (Jez se sp., 1997a). Většinou se jedná o monomerní proteiny, které jsou tvořeny přibližně 320 amiokyselinami a které katalyzují redukci aldehydů a ketonů, monosacharidů, ketosteroidů a prostaglandinů. Zprostředkovávají také oxidaci hydroxysteroidů. Velmi málo je známo o jejich substrátech mezi léčivy, i když Matsunaga se sp. (2006) označili 6 enzymů z této skupiny, za proteiny účastní se redukce karbonylové skupiny některých xenobiotik AKR je možno nalézt jak u živočichů, tak i u rostlin, u eukaryot i prokaryot (Hyndmann se sp., 2003).

Nomenklatura AKR byla publikována v roce 1997(b) Jezem a doplněna 2003 Hyndmanem se sp. Je založena na podobnosti sekvence AK a v současné době zahrnuje 14 rodin, z nichž 9 má několik podrodin (Hyndman se sp. 2003). Označení jednotlivých proteinů se skládá z pojmenování nadrodiny (AKR), arabské číslo označuje rodinu (1-14), písmeno se vztahuje k podrodině a arabské číslo označuje konkrétní enzym. Kritériem pro zařazení enzymů do jedné rodiny je 40 % shoda v sekvenci AK, pro zařazení do podrodiny musí být shoda 60 %. Např. AKR 1A1 je označení pro aldehydreduktasu nacházející se v lidské jaterní tkáni. Dnes je známo 129 proteinů z této nadrodiny a dalších 14 genů by mělo pravděpodobně kódovat podobné enzymy.

3.2.3.2 Dehydrogenasy-reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

Nadrodina MDR obsahuje téměř 1000 členů (Persson se sp., 1994) a tvoří ji 8 proteinových rodin. Tři rodiny tvoří alkoholdehydrogenasy (ADH): dimerní ADH, které se vyskytují u rostlin i živočichů, cinnamyl-ADH nalezené v rostlinné říši a kvarténní ADH vyskytující se u kvasinek. Další tři rodiny jsou reprezentovány mitochondriálními proteiny dýchacího řetězce, acetyl-CoA reduktasami, synthasami mastných kyselin a leukotrien-B4 reduktasami. Dvě zbývající rodiny jsou tvořeny polyoldehydrogenasami a chinonreduktasami. V lidském genomu bylo nalezeno 23 enzymů z této nadrodiny a zřejmě budou existovat minimálně ještě tři další, nejčastěji patří buď do rodiny dimerních ADH nebo chinonreduktas. Všechny MDR využívají jako kofaktor NAD(H) nebo NADP(H) a některé obsahují ve svém aktivním místě zinečnatý ion (Nordling se sp., 2002).

3.2.3.3 Dehydrogenasy-reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

SDR zahrnuje okolo 3000 primárních struktur funkčně odlišných proteinů a tvoří tak největší proteinovou nadrodinu (Oppermann se sp., 2003). Identita sekvence jednotlivých enzymů je nízká, ale 3D struktura mnoha členů vykazuje velmi podobné rysy. Typický je Rosmanův záhyb s centrálním β -listem, který se účastní na vazbě kofaktorů.

V této velké nadrodině se vyskytuje také 6 enzymů, které se významně podílí na redukcí karbonylové skupiny xenobiotik. Jedná se o cytosolické karbonyl reduktasy (CR) 1, 3 a 4 a L-Xylulosareduktasu, mikrosomální 11β -hydroxysteroiddehydrogenasu 1 (11β -HSD 1) a peroxisomální dehydrogenasu s krátkým řetězcem (DHRS4, dehydrogenase/reduktase (SDR family) member 4) (Matsunaga se sp., 2006).

Jediný zástupce mikrosomálních, tedy membránově vázaných, enzymů je 11 β -HSD 1, která v organismu katalyzuje interkonverzi aktivního kortisolu na neaktivní kortison. V savčí tkáni byly zatím klonovány a charakterizovány její dvě formy, NADP(H)-dependentní 11 β -HSD 1 a NAD(H)-dependentní 11 β -HSD 2. 11 β -HSD 1 je exprimována v mnoha různých tkáních a účastní se především regenerace aktivního kortisolu z neaktivního kortisonu. 11 β -HSD 2 je exprimována hlavně v cílových tkáních mineralokortikoidů, jako jsou ledviny nebo tračník, a působí pouze jako dehydrogenasa inaktivující kortisol (Tomlinson a Stewart, 2001). Zvýšená aktivita a exprese 11 β -HSD 1 se objevuje v patogenezi mnoha běžných nemocí zahrnujících obezitu, insulinovou rezistenci, metabolický syndrom, polycystický ovariální syndrom, osteoporosu a glaukom (Tomlinson, 2005). Na základě těchto zjištění jsou v současné době navrhovány a studovány selektivní inhibitory 11 β -HSD 1 jako nová terapeutická strategie těchto onemocnění. V budoucnu by měly být využívány především v léčbě diabetes mellitus, obezity a metabolického syndromu (Miguet se sp., 2006). Mimoto bylo zjištěno, že má 11 β -HSD 1 roli i v metabolismu nesteroidních karbonylových sloučenin, např. oracinu, ketoprofenu, metyraponu, insekticidních analogů metyraponu, menadionu a některých aromatických aldehydů a ketonů (Maser a Oppermann, 1997; Wsól se sp., 2004; Hult se sp., 2001).

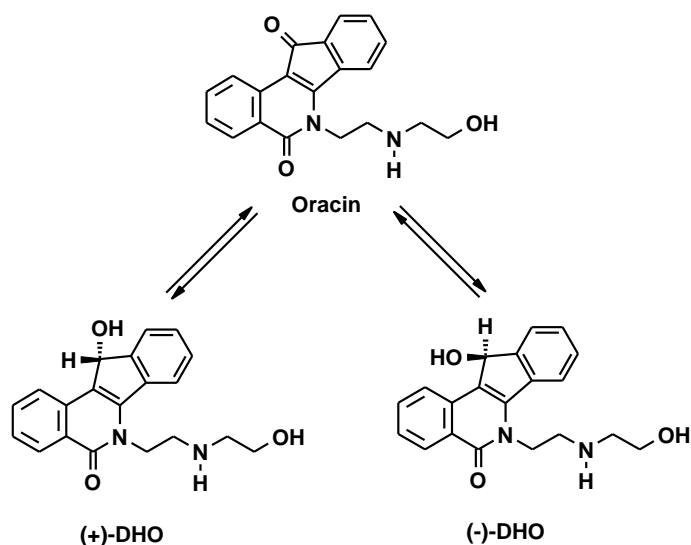
3.3 ORACIN

3.3.1 Protinádorový účinek

Oracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno [1,2-*c*]isochinolin (Michalský, 1992) (obr.26), je potenciální cytostatické léčivo pro perorální podání ve II. fázi klinického zkoušení. Jeho struktura je podobná anti-tumorovým antibiotikům ze skupiny anthracyklinů a také mechanismus účinku spočívá v jeho interkalaci do struktury DNA nádorové buňky. Zřejmě však nepůjde jen o tento mechanismus účinku, kdy dochází k inhibici DNA a RNA syntézy a následně ke snížení obsahu bílkovin v buňce tumoru (Melka, 1993). Bylo popsáno i několik dalších mechanismů, které zahrnují inhibici topoisomerasy II, stimulaci aerobní spotřeby glukosy a s menším významem i tvorbu laktátu v nádorové buňce a indukci apoptosy (Miko se sp., 2002; Melka, 1993).

Anti-tumorový efekt byl studován na myších a potkanech, kdy bylo užito 10 různých experimentálních tumorových modelů při perorálním a parenterálním podání. Oracin prodloužil průměrnou dobu přežití myši u pěti tumorů. Ve studiích *in vitro* vykazoval oracin přímou cytotoxicitu k buňkám pěti tumorů. Tyto výsledky byly ověřeny v té samé studii u pěti lidských tumorů (Melka, 1993).

Hlavní výhody tohoto nového chemoterapeutika jsou možnost perorálního podání, kombinace více anti-tumorových mechanismů (viz. výše), absence kardiotoxicity (Gersl se sp., 1996, negativní výsledky Amesova testu mutagenity (Marhan, 1995), velmi nízká hepatotoxicita a jeho výhodná farmakokinetika.



Obr.26 Metabolická konverze prochirální molekuly oracinu na enantiomery (+)-DHO a (-)-DHO.

3.3.2 Biotransformace

Díky slibné biologické aktivitě oracinu v chemoterapii a jeho výhodným farmakokinetickým vlastnostem byla intenzivně studována jeho biotransformace v organismu různých laboratorních zvířat i člověka. Hlavním metabolitem oracinu je 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*]isochinolin (dihydrooracin, DHO). Tento chirální metabolit vzniká při redukci prochirální karbonylové skupiny v poloze 11 molekuly oracinu (obr.26)

Biotransformace oracinu byla studována *in vitro* i *in vivo* na různých zvířecích druzích (myš, potkan, morče, králík, miniprase, pes) (Wsól se sp., 1996; Szotáková se sp., 1996; Wsól se sp., 1998) a také na lidské jaterní tkáni (Wsól se sp., 2000). Bylo zjištěno, že je DHO stereospecificky přeměňován jak mikrosomální, tak i cytosolickou frakcí u všech studovaných druhů a tato stereospecifita je ovlivněna pohlavím laboratorních zvířat (Wsól se sp., 1999). Na základě indukčních a inhibičních studií s mikrosomálními frakcemi bylo zjištěno, že na redukci oracinu na mikrosomální úrovni u potkana by se mohla podílet i 11 β -HSD 1 (Szotáková se sp., 2000). Studie na purifikované 11 β -HSD 1 z myších jater ukázala, že tento enzym hraje klíčovou roli v karbonylové redukci oracinu v mikrosomech (Wsól se sp., 2003) a také bylo dokázáno, že 11 β -HSD 1 je zodpovědná za redukci oracinu v mikrosomech lidské jaterní tkáně (Wsól se sp., 2004).

Mikrosomální karbonylová redukce oracinu u člověka vykazuje určitou stereospecifitu, protože byla nalezena různá množství dvou vzniklých DHO enantiomerů. V $59,8 \pm 0,4$ % převažuje (-)-DHO. Konverze oracinu purifikovanou 11 β -HSD 1 však vykazuje poněkud odlišnou stereospecifitu, vzniká totiž o něco větší množství (-)-DHO, a to $76,4 \pm 1,9$ %. Signifikantní diference mezi těmito hodnotami indikuje, že se na konverzi oracinu v lidských mikrosomech podílí přinejmenším ještě jeden další enzym. Bereme-li v úvahu tuto možnost, další enzym by měl mít větší stereospecifitu pro vznik (+)-DHO (Wsól se sp., 2004).

4 CÍL PRÁCE

Navrhnout postup postupné purifikace, separace a charakterizace neznámého membránově vázaného redukčního enzymu z lidské jaterní tkáně.

- Pro purifikaci a částečnou separaci využít kombinaci chromatografických technik při nízkotlakém gradientu (purifikátor ÄKTA).
- Pro nalezení frakce s neznámou reduktasou využít inkubace s modelovým substrátem oracinem a pomocí achirální HPLC stanovit i příslušnou enzymovou aktivitu.
- Pro výpočet specifické aktivity neznámé reduktasy stanovit obsah bílkoviny v daných frakcích využitím stanovení pomocí BCA a Bradfordovou metodou v závislosti na použitém pufru.
- Pomocí SDS-PAGE odhadnout molekulovou hmotnost neznámé reduktasy a ověřit stupeň znečištění enzymu ve frakci.
- Pomocí Western blotu vyloučit přítomnost 11 β -HSD 1 v aktivní frakci.
- Pomocí chirální HPLC charakterizovat přečištěnou frakci s neznámou reduktasou.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 *Biologický materiál*

Lidská jaterní tkáň pro přípravu subcelulárních frakcí byla získána na základě spolupráce s transplantační stanicí Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK) v rámci „dárcovského programu“. Pro experiment byly použity játra č. 20 (muž, 56 let).

5.1.2 *Chemikálie*

Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, England

ECL plus Western Blotting Reagent System (Lumigen PS-3) solution A + B

Coomassie Brilliant Blue G

Bio-Rad Laboratories s.r.o., Praha, ČR

Blotting grade Blocker Not-fat Dry Milk

BHD Chemical Ltd, England

Sodium lauryl sulphate

Boehringer Mannheim GmbH, Germany

Glukose-6-phosphate-dehydrogenase

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP⁺)

Cambrian Chemicals, Beddington, England

Trichloroacetic acid min 99,9 %

Dako, Dánsko

Anti- rabbit antibody

Fluka, Praha, ČR

Octaethylene glycol monododecyl ether (Lubrol PX) ≥ 98 %

Sodium perchlorate monohydrate

FOMA Bohemia, Hradec Králové, ČR

Foma LP-T (koncentrát vývojky pro ruční zpracování RTG filmů)

Fomafix (koncentrát rychloustalovače)

Chemapol, Praha, ČR

Kyselina chloristá p.a. 70%

Kulich s.r.o., Hradec Králové, ČR

Glycerol 85%

Lachema a.s., Neratovice, ČR

Amoniak – vodný roztok min 25 % p.a.

Chlorid měďnatý p.a. 99,9 %

Kalium permanganicum

Kyselina chlorovodíková p.a. 35 %

Kyselina octová p.a. 99 %

Kyselina o-fosforečná p.a. 85 %

Persíran amonný čistý

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-HCl)

Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR

Chlorid sodný p.a. 99,9 %

Lékárna „Na proudu“, Hradec Králové, ČR

Ethanolum 96 %

Merck KGaA, Darmstadt, Germany

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin)

Penta, Chrudim, ČR

Formaldehyd p.a. 36-38 %

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát

Safina Vestec, ČR

Dusičnan stříbrný

Sigma-Aldrich, Praha, ČR; Steinheim, Germany

1-Hexansulfonic acid sodium salt 98 %

2-mercaptoethanol

Acetonitrile CHROMASOLV

Akrylamid

Bicinchoninic acid solution (reagent A)

Bradford Reagent

Bromphenol blue

Cooper(II)sulphate solution 4 % (w/v)

D-Glucose-6-phosphate disodium salt, hydrate

EDTA disodium salt: dihydrate

Ethylacetate 99,8 %, HPLC grade

Glycine
Hovězí sérový albumin (BSA)
Cholsäure natrium saltz hydrat 98 %
Iodoacetamide crystalline
Magnesium chloride min 99 %
Methanol G CHROMASOLV
N, N'-methylene-bis-acrylamide \geq 98 %
Polyoxyethylen sorbitan monolaurate (Tween 20)
Potassium carbonate SigmaUltra min 99 %
Triethylamine

Univerzita Kiel, pracovní skupina prof. Masera

Anti-11 β -HSD1

VÚFB Praha, ČR

Oracin 16956 š. 901220

Oracin redukovaný zinkem MA 19393

Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4 (inkubace, příprava subcelulárních frakcí)

Ve dvou odměrných baňkách bylo připraveno 1000 ml 0,1 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O (35,8 g/1000 ml) a 250 ml 0,1 M NaH₂PO₄ · 2 H₂O (3,9 g/250 ml). Oba roztoky byly za stálého míchání na míchačce slévány dohromady až do požadované hodnoty pH 7,4 (kontrola pomocí pH-metru).

5.2 POMŮCKY

V průběhu experimentu byly používány kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, skleněné a umělohmotné zkumavky, eppendorky, automatické pipety a špičky, mikrotitrační destičky, vialky pro HPLC, stojánky, lžička, navažovací lodička, parafilm, potravinová fólie, stopky a další laboratorní pomůcky.

5.3 PŘÍSTROJE

- ÄKTA design chromatography system: ÄKTA purifier, Amersham Biosciences



Kolony:

Hi Trap Desalting Colum (Sephadex G-25 superfine)	Amersham Biosciences
Hi Trap Q FF Colum (Strong, Q Sepharose Fast Flow)	Amersham Biosciences
Superdex 75 10/300 GL Colum	Amersham Biosciences

PC Hewlett Packart compaq SN: CZC3290SRT

Software UNICORN 4.12 (Amersham Biosciences)

- HPLC systém Agilent 1100 Series

PC Hewlett Packard Vectra VL 420DT

Software Chem Station for LC 50 Rev. A. 0901, Agilent Technologies

achirální kolona: BDS Hyperil C 18 250x4 mm

- HPLC systém:

gradientová pumpa Esa model 582 solut delivery system

automatický dávkovač Hewlett Packard Autosampler series 1100

temperovací zařízení Hewlett Packard Column compartment series 1100

fluorescenční detektor Philips

chirální kolona: CHIRACEL OD-R (OCE, A-1035) 250 x 4,6 mm

chromatografický software CSW 32 verze 1.7, DataApex (Praha, ČR)

PII/233 PC, AutoCont (Hradec Králové, ČR)

- Centrifugy:
 - Heraeus Biofuge pico
 - Heraeus Biofuge stratos
 - Sorvall Ultracentrifuge ODT combi (Du Pont)
 - Beckman coulter Avanti J-301
 - Rotory
 - Kyvety
- Ultrazvuková lázeň Ultrasonic compact cleaner UC 005 AJ1 Tesla
- pH-metr Thermo Orion model 410A
- homogenizátor Potter S, B. Braun Bitech International
 - homogenizační píst malý
 - homogenizační píst velký
- míchačka Hytrel HTR 8068 s míchadly
- inkubátory Eppendorf Thermomixer comfort
- třepačky Heidolph REAX top
- kývačka Heidolph UNIMAX 1010
- vakuová odparka Eppendorf Concentrator 5301
- Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis system, Bio-Rad
- automatická multipipeta Eppendorf Multipette plus
 - špičky Eppendorf Combitips plus 0,5 ml a 1,0 ml
- analytické váhy Scaltec SBC 22
- předvážky KERN KB
- spektrofotometr Microplate reader model 550, Bio-Rad
- centrifugační zkumavky Amicom Ultra (centrifugal filter devices), Millipore
- freezer Herafreeze, Heraeus
- Ultradestilační přístroj Milli Q (Prograd 2), Millipore

5.4 METODY

5.4.1 Příprava subcelulárních frakcí

Celá příprava probíhala v chladicí místnosti při 6 -12 °C, mezioperační kroky byly provedeny co nejrychleji a nejšetrněji, aby byla zachována co nejvyšší aktivita enzymů.

Játra byla po vytažení z freezeru rozmrazena na ledu a rozvážena po 5 g do malých mističek (také na ledu). Z celkových 42 g bylo získáno 8 mističek po cca 5 g. Játra byla rozstříhána na menší kousky, vždy z jedné mističky přendána do homogenizátoru spolu s 15 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4. Po zhomogenizování byla směs přelita do centrifugační kyvety, píst a homogenizátor byly vypláchnuty dalšími 15 ml pufru a tento oplach byl také přilít do centrifugační kyvety.

5.4.1.1 1. centrifugace

Kyvety byly vyváženy pomocí fosfátového pufru (vždy dvě proti sobě) a vloženy do centrifugy Heraeus stratos s rotorem #3335. Točení probíhalo 20 min při 5000 g a 4 °C. Peletu tvořily potrhané buněčné membrány, vazivo, cévy a jádra buněk.

5.4.1.2 2. centrifugace

Supernatant z prvního točení byl přelit do čistých kyvet a ty byly opět vyváženy fosfátovým pufrům. Točení probíhalo ve stejném rotoru po dobu 60 min při 20 000 g a 4 °C v téže centrifuze. Peletu tvořily mitochondrie, které se pro účel tohoto experimentu dále nezpracovávaly.

5.4.1.3 3. centrifugace (ultracentrifugace)

Supernatant z druhého točení se slil do centrifugačních kyvet pro centrifugu Beckman tak, aby nedošlo k uvolnění kalů ze dna původních kyvet. Kyvety byly plněny maximálně ze tří čtvrtin, vyváženy fosfátovým pufrům, uzavřeny víčkem a vloženy do rotoru. Ultracentrifugace probíhala 65 min při 105 000 000 g a 4 °C. Peletu tvořily mikrosomy a supernatant cytosol, který byl rozpipetován po 1,1 ml do eppendorfek, ale pro účely tohoto experimentu nebyl používán.

5.4.1.4 4.-6. centrifugace (ultracentrifugace)

Peleta z 3. točení byla resuspendována v 5 ml pufru malým homogenizačním pístem. Kyvety byly doplněny pufrům na 15 ml, vyváženy, uzavřeny a vloženy do

stejného rotoru. Ultracentrifugace proběhla za stejných podmínek jako 3. točení. Ze supernatantu z tohoto točení byl odebrán vzorek na zkoušku přítomnosti cytosolu, zbytek byl vylit do odpadu. Peleta byla opět resuspendována stejným způsobem a za stejných podmínek ultracentrifugována ještě 2x, aby bylo přečištění mikrosomů co největší a vyloučila se přítomnost cytosolu, který by mohl rušit další fáze experimentu. Po každém točení byl ze supernatantu odebrán vzorek na zkoušku přítomnosti cytosolu.

Peleta z posledního točení byla resuspendována v takovém objemu pufru, kolik bylo gramů jater, tj. 42 ml, a to pomocí malého homogenizačního pístu a poté ponořením cca na 45 sekund do ultrazvukové lázně. Za stálého míchání na míchače byla mikrosomální frakce rozpipetována po 1,1 ml do eppendorfek a zmrazena při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4.2 Solubilizace mikrosomální membrány

Po vytažení z freezeru byly eppendorfky s mikrosomy rozmrazeny na ledu (cca 15-20 min). Rozmražené mikrosomy byly smíchány 1:1 se solubilizačním pufrům pH 7,4, který obsahoval 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 40 % (w/v) glycerolu a 0,4 % (w/v) Lubrolu PX. Za stálého jemného míchání na ledu byla směs solubilizována po dobu 45-60 min. Poté byly mikrosomy přepipetovány do centrifugačních kyvet a ultracentrifugovány na centrifuze Sorvall 60 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 100 000 g, tj. 38 000 otáček/min. Supernatant byl odebrán a upraven přidáním chlátku sodného do koncentrace 0,4 % (w/v) (Maser et al, 2002).

5.4.3 Odsolení mikrosomů a příprava na IEX

Při odsolování solubilizovaných mikrosomů bylo využito gelové filtrace v módu skupinové separace. Separace probíhala na koloně Hi Trap Desalting zapojené do systému chromatografického purifikátoru ÄKTA. Před samotným experimentem bylo nutné připravit kolonu promytím cca 10 ml 20 % ethanolu, min. 20 ml ultrafiltrované vody a 20 ml pufru pH 8,0, který obsahoval 20 mM Tris HCl, 10 % (w/v) glycerolu a 0,2 mM merkptoethanol (tj. pufr A pro IEX). Dělení probíhalo při průtoku 2 ml/min, tlaku max. 0,3 MPa, UV detekci při 280 nm pro proteiny a konduktometrické detekci pro sůl. Na kolonu byl aplikován vždy 1 ml solubilizovaných mikrosomů a frakce byly jímány ručně. Odsolené frakce byly spojeny a zakoncentrovány.

5.4.4 Koncentrace odsolených frakcí

Koncentrace byla provedena pomocí speciální centrifugační zkumavky Amicon Ultra-4 10K filtru (Millipore) na centrifuze Heraeus při 4 °C a 4000 g. Zkumavka obsahuje membránu z regenerované celulosy, která propustí pouze molekuly do Mr 10 kDa. Doba točení byla závislá na počátečním i požadovaném objemu vzorku.

5.4.5 Ionově-výměnná chromatografie

Pro experiment byla zvolena anionově-výměnná chromatografie na silném anexu v modu gradientové eluce. Separace byla provedena na koloně Hi Trap Q FF zapojené do systému chromatografického purifikátoru ÄKTA. Kolona byla před experimentem promyta 15 ml 20 % ethanolu, 15 ml ultrafiltrované vody, 15 ml pufru B a pufru A do ustálení rovnováhy.

Podmínky:

- Pufry: pufr A totožný s pufrem použitým pro odsolení, pufr B = pufr A + 1 M NaCl
- Průtok: 0,5 ml/min
- Tlak: 0,3 MPa
- Gradient:

1. segment (nástřik)	1 ml	0 % B
2. segment	8 nebo 6 ml	0 % B
3. segment	12 ml	0 – 50 % B
4. segment	4 ml	50 -100 % B
5. segment	4 ml	100 % B
6. segment (vymytí)	2 ml	100 % B
- Nástřik: 1 ml solubilizovaných, odsolených a koncentrovaných mikrosomů
- Detekce: UV při 280 nm, gradient sledován konduktometricky
- Velikost frakcí: 1 ml

5.4.6 Gelová filtrace

Pro experiment byla zvolena gelová filtrace v modu klasické separace. K dělení byla použita kolona Superdex 75 10/300 GL zapojená do systému chromatografického purifikátoru ÄKTA. Před experimentem byla promyta cca 30 ml 20 % ethanolu, 50 ml ultrafiltrované vody a 50 ml separačního pufru.

Podmínky:

- Pufr: pH 8,0, 20 mM Tris HCl, 10 % (w/v) glycerolu, 0,2 mM merkaptoethanol, 0,1 % Lubrolu PX
- Průtok: 0,5 ml/min
- Tlak: max. 1,9 MPa
- Nástřik: 0,250 – 0,5 ml
- Detekce: UV při 280 nm
- Velikost frakcí: 1 ml

5.4.7 Inkubace s oracinem

50 μ l z každé získané frakce nebo 5 μ l mikrosomů či koncentrovaných frakcí bylo inkubováno s oracinem za účelem zjištění aktivity redukčních enzymů v závislosti na množství vzniklého dihydrooracinu.

5.4.7.1 NADPH-regenerační systém

Většina reduktas využívá jako kofaktoru NADP^+ nebo $\text{NADPH} + \text{H}^+$, proto je důležité, aby byl do reakce neustále dodáván. Při inkubaci byl použit regenerační systém obsahující 0,8 mM NADP^+ , 6 mM glukosa-6-fosfát, 35 j. glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a 3 mM chlorid hořečnatý (MgCl_2) v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,4 (Maser se sp., 2002).

5.4.7.2 Inkubační směs

K 50 μ l (5 μ l) enzymatické frakce bylo nejprve přidáno 20 μ l (65 μ l) 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 a 20 μ l regeneračního systému. Směs byla preinkubována při 37 °C po dobu 5 min. Reakce byla startována 10 μ l 5 mM roztokem oracinu (konečná koncentrace 0,5 mM) s odstupem 30 s pro každou frakci. Směs byla protřepána na třepačce. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 30 min. Stejným způsobem byl zpracován i slepý vzorek, který místo enzymatické frakce obsahoval 0,1 M fosfátový pufr pH 7,4.

5.4.7.3 Zastavení reakce a extrakce produktu

Inkubace byla po 30 min ukončena přidáním 40 μ l 25 % (v/v) amoniaku (NH_3). Poté bylo přidáno 300 μ l ethylacetátu a směs byla 10 s intenzivně protřepávána na třepačce. Aby bylo zajištěno úplné zastavení reakce, eppendorfky byly až do ukončení poslední inkubační směsi ponechány na ledu. Před odebráním extrakční vrstvy, byly vzorky točeny 2 min při 13 000 otáčkách/min na centrifuze Heraeus pico. Odpaření

organické vrstvy proběhlo ve vakuové odparce při 45 °C. Odparky byly použity pro HPLC stanovení množství vzniklého dihydrooracinu.

5.4.8 Achirální HPLC analýza

5.4.8.1 Mobilní fáze

Pro achirální stanovení DHO byla zvolena mobilní fáze složená z 10 mM hexansulfonanového pufru (HS) pH 3,27 (s 0,1 M triethylaminem) a acetonitrilu (ACN) v poměru 75:25 (v/v). Hexansulfonanový pufr byl připraven ze sodné soli hexansulfonanové kyseliny, poté byl přidán triethylamin do celkové koncentrace 0,1 M (7,1 ml/l) a pH bylo na požadovanou hodnotu upraveno pomocí kyseliny *o*-fosforečné.

5.4.8.2 Příprava vzorků

K odparkům získaným po inkubaci jednotlivých enzymatických frakcí s oracinem bylo přidáno 250 µl mobilní fáze a vzorky byly ponořeny do ultrazvukové lázně, dokud nedošlo k jejich úplnému rozpuštění. Pokud se odparky špatně rozpouštěly, bylo rozpouštění podpořeno třepáním na třepáče. Jednotlivé vzorky byly přepipetovány do vialek s inserty, zašroubovány víčky s neporušenou membránou a pečlivě označeny.

5.4.8.3 Separace

Před zahájením analýzy byla kolona nejprve propláchnuta 20-30 min methanolem a cca 60 min redestilovanou vodou. Separací podmínky byly ustáleny promytím alespoň 45 min mobilní fází.

Podmínky:

- Kolona: BDS Hypersil C 18, 250 x 4 mm
- Mobilní fáze: HS pufr (pH 3,27) : ACN = 75:25 (v/v)
- Nástřik: 100 µl vzorku
- Průtok: 1,5 ml/min
- Tlak 20 MPa
- Teplota: 25 °C
- Detekce: fluorescenčně Ex = 340 nm, Em = 318 nm
- Standard: DHO 10 µg/ml, nástřik 10 µl

5.4.9 Chirální HPLC analýza

5.4.9.1 Mobilní fáze

Pro chirální separaci DHO byla zvolena mobilní fáze složená z 0,3 M chloristanového pufru pH 3,0 a ACN v poměru 69:31 (v/v). Chloristanový pufr byl připraven z monohydrátu chloristanu sodného a jeho pH bylo upraveno pomocí kyseliny chloristé.

5.4.9.2 Příprava vzorků

Viz. achirální separace 5.4.8.2.

5.4.9.3 Separace

Před zahájením analýzy byla kolona nejprve promyta alespoň 30 min methanolem a cca 60 min 5 % methanolem. Separační podmínky byly ustáleny promytím mobilní fází po dobu alespoň 45 min. Použitá kolona je velmi citlivá na zvýšení tlaku, proto byl tlak v průběhu experimentu pečlivě sledován.

Podmínky:

- Kolona: Chiracel OD-R OCE (A-1035), 250 x 4,6 mm
- Mobilní fáze: chloristanový pufr pH 3,0 : ACN = 69:31 (v/v)
- Nástřík 100 μ l
- Průtok 0,5 ml/min
- Teplota: 25 °C
- Tlak: 4,1 MPa (max. 5 MPa)
- Detekce: fluorescenčně Ex = 340 nm, Em = 418 nm
- Standard: *rac*-DHO 10 μ g/ml, nástřík 10 μ l

5.4.10 SDS-PAGE

5.4.10.1 Zásobní roztoky

- **4 M HCl**

Do 150 ml redestilované vody v odměrné baňce bylo přilito 88 ml koncentrované HCl a doplněno vodou do 250 ml. Roztok byl uchováván v lednici

- **Zásobní roztok akrylamidu (AA) + bisakrylamidu (bisAA) 100 ml**

Při přípravě tohoto roztoku bylo nutno pracovat v digestoři, v rukavicích, s rouškou a s největší opatrností! Bylo naváženo 30 g AA a 0,8 g bisAA a

rozpuštěno v malém množství redestilované vody na míchačce, poté doplněno v odměrné baňce do 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- **1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8**

Bylo naváženo 18,5 g Tris-HCl a v cca 75 ml redestilované vody rozpuštěno na míchačce. Poté bylo upraveno pH na pH-metru pomocí 4 M HCl a roztok doplněn v odměrné baňce do 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- **0,5 M Tris.HCl pufr, pH 6,8**

Bylo naváženo 6 g Tris-HCl a mícháním rozpuštěno v cca 75 ml redestilované vody. Poté bylo upraveno pH na pH-metru pomocí 4 M HCl a roztok byl v odměrné baňce doplněn do 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- **10 % SDS**

Bylo naváženo 10 g SDS, rozpuštěno v 80 ml redestilované vody a roztok byl v odměrné baňce doplněn do 100 ml. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

- **0,05 % bromfenolová modř (BFB)**

Bylo naváženo 5 mg BFB a rozpuštěno v 10 ml redestilované vody. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

- **Koncentrovaný elektrodový pufr 11**

Bylo naváženo 72 g glycinu, 15 g Tris-HCl a 5 g SDS a rozpuštěno v 900 ml redestilované vody na míchačce. Na pH-metru bylo upraveno pH na hodnotu 8,3 pomocí 4 M HCl a roztok byl v odměrné baňce doplněn do 1000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- **Zásobní vzorkový pufr**

K 1,3 ml redestilované vody byl přidán 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8, 2,0 ml 85 % glycerolu, 3,0 ml 10 % SDS a 0,6 ml 0,05 % BFB.

- **Isobutanol nasycený vodou**

Čistý isobutanol byl smíchán s redestilovanou vodou. V horní vrstvě byl isobutanol nasycený vodou. Roztok byl uchováván v lednici.

5.4.10.2 Pracovní roztoky

- **10 % persíran amonný (APS)**

Roztok byl připravován vždy těsně před použitím. Bylo naváženo 10 mg APS a rozpuštěno ve 100 μ l redestilované vody.

- **Elektrodový pufr**

Byl připravován vždy čerstvý roztok. 70 ml koncentrovaného elektrodového pufru bylo smícháno s 280 ml redestilované vody.

- **Vzorkový pufr**

K potřebnému množství zásobního vzorkového pufru byl přidán 2-merkapt ethanol do konečné koncentrace 50 µl/ml.

- **Separační gel 12,5 % (spodní) – rozpis na 1 gel o tloušťce 0,8 mm**

K 1,6 ml redestilované vody bylo přidáno 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl pufru pH 8,8, 0,05 ml 10 % SDS a 2,1 ml roztoku AA + bisAA. Polymerace byla iniciována přidáním 29 µl roztoku APS a 2 µl TEMEDu. Pro silnější gel (1,6 mm) bylo třeba množství jednotlivých složek roztoku zdvojnásobit.

- **Zaostřovací gel 4 % (horní) – rozpis na 1 gel o tloušťce 0,8 mm**

K 1,563 ml redestilované vody bylo přidáno 0,625 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8, 0,025 ml 10 % SDS a 0,25 ml roztoku AA + bisAA. Polymerace byla iniciována přidáním 15 µl roztoku APS a 1,25 µl TEMEDu.

5.4.10.3 Příprava gelu

Na pracovní plochu byl nachystán nalévací stojánek, sklíčka, sklíčka se spacerem, spony a hřebeny. Skla a hřebeny byly důkladně umyty jarem, vodou, redestilovanou vodou a nakonec opláchnuty lihometanolem. Nechaly se ve svislé poloze uschnout. Sklíčka se přiložila k sobě (spacerem dovnitř), spojila se sponami, postavila se na gumovou podložku v nalévacím stojánku a přichytila se horním kolíkem stojánku. Poté byl v malé Erlenmayerově baňce namíchán spodní gel, po mírném promíchání byl ihned pipetou nalit mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje. Vrstva gelového roztoku byla opatrně převrstvena isobutanolem nasyceného vodou (cca 200 µl), aby byl zajištěn vodorovný povrch gelu. Gel se nechal polymerovat 45 min. Po uplynutí této doby se isobutanol opatrně slil, povrch gelu byl opláchnut redestilovanou vodou a prostor mezi skly byl vysušen filtračním papírem tak, aby se papír nedotknul gelu. Pak byl v malé Erlenmayerově baňce namíchán roztok na horní gel. Lehce se promíchal a byl ihned nalit mezi skla na spodní gel až po horní okraj skel. Mezi sklíčka byly nakonec zasunuty hřebeny a gel se nechal polymerovat 2 hodiny.

5.4.10.4 Elektroforéza (ELFO)

Nejprve byl předehřát termoblok na teplotu 97-99 °C a na pracovní plochu byl nachystán stojánek na ELFO, vanička, zelený klínek na rozvírání skel, zdroj napětí a ledová lázeň. Vzorky proteinu se smíchaly se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 až 2:1 a nechaly se povařit v předehřátém termobloku v eppendorfkách s propíchnutými víčky. Z gelu byly opatrně vyndány hřebeny a vzniklé jamky se vypláchly redestilovanou vodou. Těsnění na vnitřní části stojánku bylo lehce potřeno škrobovým mazem a skla s gelem byla přitlačena z obou stran na těsnění tak, že silnější skla byla na vnější straně. Těsnění se skly se zasunulo do vnější části stojánku na ELFO a bylo přitaženo sponami. Stojánek byl vložen do vaničky. Do horního elektrodového prostoru (mezi skla) byl nalit elektrodový pufr (musel být ponořen celý gel) a bylo nutné zkontrolovat, zda neprotéká. Zbytek pufru byl nalit do spodního elektrodového prostoru (hladina musela sahat nad spodní okraj gelu). Pipetou byly do jednotlivých jamek nanесeny vzorky (krajní jamky nebyly většinou používány) a molekulární standard. Vanička se ponořila do ledové lázně, přiklopila se víčkem a byla připojena ke zdroji. Na zdroji bylo nastaveno konstantní napětí 100 V a spustila se ELFO, na začátku rozdělovacího gelu bylo napětí zvýšeno na 200 V. Když vzorky dosáhly spodního okraje gelu, byl zdroj vypnut. Stojánek se vyndal z vaničky, elektrodový pufr byl slit do výlevky a skla s gely se vyndala ze stojánku. Pomocí zeleného klínku byla sklíčka rozevřena, gel se odříznul od spacerů a zaostřovacího gelu a odříznul se i pravý dolní roh gelu. Následovalo barvení pomocí Coomassie Blue.

5.4.11 Barvení gelu pomocí Coomassie Blue

Po odříznutí od skel byl gel přenesen do nádoby s barvicí lázní, která se skládala z 0,25 % CBBG v 10 % kyselině octové. Nádoba byla přikryta víčkem a umístěna na 15-20 min do sušárny s teplotou 50 °C. Po této době se barva z gelu slila a byl k němu přilít odbarvovač, 10 % kyselina octová. Krabíčka s gelem a odbarvovačem byla postavena na kývačku a po 5 min kývání byl odbarvovací roztok vyměněn za čerstvý. Poté byl vyměněn ještě 2-3x po 15-30 min. Gel byl nakonec ponechán v odbarvovacím roztoku přes noc a poté byl skenován. Odbarvovací roztok byl regenerován filtrací přes aktivní uhlí.

5.4.12 Barvení gelu stříbrem (Silver stain)

Provádí se v případě, pokud je barvení pomocí Coomassie Blue nedostatečné. Je citlivější, nevýhodou však je, že není kvantitativní.

Odbarvovací roztok Coomassie byl slit a gely byly na kývačce postupně máchány v jednotlivých roztocích pro barvení stříbrem. Bylo použito vždy 50 ml daného roztoku na jeden gel.

5.4.12.1 Roztoky pro barvení stříbrem

- **Roztok 2 % CuCl_2 , 12 % TCA, 50 % MeOH**

1 g chloridu měďnatého a 6 g trichloroctové kyseliny bylo naváženo přímo do odměrného válce na předvážkách a poté byla přidána redestilovaná voda do 25 ml. Směs byla rozpuštěna třepáním na třepačce a roztok byl doplněn do 50 ml methanolem. Roztok byl nalit do krabičky s gelem a za stálého kývání se nechal působit 5 min (tenký gel) nebo 20 min (tlustý gel). Roztok je toxický, proto se nevyléval do výlevky, ale do speciální odpadní láhve.

- **Roztok A: 10 % EtOH, 5 % CH_3COOH**

Tohoto roztoku se připravovalo trojnásobné množství, protože byl v průběhu barvení použit třikrát. Do odměrného válce bylo odměřeno 15 ml ethanolu a 7,5 ml kyseliny octové. Směs se doplnila redestilovanou vodou do 150 ml. Při prvním máchání se roztok nechal působit 5 min nebo 10 min dle tloušťky gelu.

- **0,01 % KMnO_4**
0,5 ml stokrát koncentrovanějšího zásobního roztoku bylo doplněno redestilovanou vodou do 50 ml a nalito na gel. Intenzita kývání byla zvýšena a doba působení byla 5 min nebo 10 min dle tloušťky gelu.
- **Roztok A**
Gel byl máchán v 50 ml roztoku A po dobu 1 min nebo 10 min dle tloušťky gelu.
- **10 % EtOH**
5 ml ethanolu bylo v odměrném válci doplněno redestilovanou vodou do 50 ml a gel byl v roztoku máchán 5 min nebo 10 min dle tloušťky gelu.
- **Voda**
Gel byl 5 min nebo 10 min oplachován v 50 ml redestilované vodě.
- **0,1 % AgNO_3**
0,05 g dusičnanu stříbrného bylo naváženo přímo do odměrného válce, doplněno redestilovanou vodou do 50 ml a rozpuštěno třepáním na třepáčce. Roztok byl nalit na gel a nechal se působit 5 min nebo 10 min dle tloušťky gelu.
- **Voda**
Gely byly opláchnuty redestilovanou vodou pomocí stříčky po dobu max. 1 min.
- **10 % K_2CO_3**
Do odměrného válce bylo naváženo 5 g uhličitanu draselného, doplněno redestilovanou vodou do 50 ml a intenzivně protřepáváno na třepáčce až do rozpuštění. Roztok se nechal působit 2-5 min.
- **2 % K_2CO_3 , 0,01 % formaldehyd**
Do odměrného válce byl navážen 1 g uhličitanu draselného, doplněn redestilovanou vodou do 50 ml a rozpuštěn třepáním na třepáčce. Poté bylo přidáno 14 μl 37 % formaldehydu. Roztok byl nalit na gel a nechal se působit dle potřeby, dokud nebyly viditelné požadované proužky proteinů na gelu.
- **Roztok A**
Redukce stříbra byla zastavena 50 ml roztoku A. Poté bylo možno gel skenovat.

5.4.13 Western blot

5.4.13.1 Pufry

- **Blotovací pufr**

Bylo naváženo 6,06 g Tris-HCl (25 mM) a 28,8 g glycinu (192 mM), rozpuštěno v cca 500 ml redestilované vody a přidáno 400 ml methanolu. Roztok byl v odměrné baňce doplněn do 2000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- **0,1 M TRIS pH 8,0**

Bylo naváženo 12,11 g Tris-HCl a rozpuštěno v 800 ml redestilované vody. Poté bylo na pH-metru upraveno pH na 8,0 pomocí 4 M HCl a roztok byl v odměrné baňce doplněn vodou do 1000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

- **Promývací pufr (TBST)**

Bylo naváženo 8,77 g NaCl, rozpuštěno v cca 300 ml redestilované vody a přidán 1 ml Tweenu 20 a 100 ml TRIS pufru pH 8,0. Roztok byl v odměrné baňce doplněn vodou do 1000 ml a uchováván v lednici. Před použitím však musel být zahřátý na laboratorní teplotu.

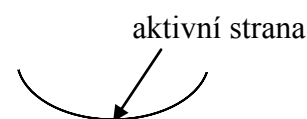
- **8 % mléko v TBST**

Byly naváženy 2 g práškového mléka (dry powder milk) a rozpuštěny ve 25 ml TBST (množství na 1 membránu).

5.4.13.2 Ukončení ELFO a příprava na blotování

Den předem bylo do mrazáku nachystáno ledítko, aby byl včas vyrobený led pro chlazení blotovacího zařízení. Po skončení ELFO byla skla s gelem ponořena do blotovacího pufru nalitého v nerezové misce a rozevřena zeleným klínkem, gel se odřízl od spacerů a byl odříznut i pravý dolní roh. Gel se nechal několik minut plavat v pufru a mezi tím byl sestaven blotovací sendvič:

- začalo se na černé části a postupovalo se směrem nahoru, všechny součásti sendviče byly nejprve namočený do blotovacího pufru a před přidáním další vrstvy polity puftrem, aby se odstranily případné bublinky
- bílá houbička
- 1 silný filtrační papír (Bio Rad, rozstříhnutý na čtvrtiny)
- gel



- nitrocelulózová membrána aktivní stranou na gel (dle velikosti gelu odměřena a odstříhnutá z role + plus odstříhnut příslušný roh)
- 1 silný filtrační papír
- bílá houbička

Sendvič byl opatrně uzavřen a vložen do blotovacího zařízení → černá k černé. Celé blotovací zařízení bylo vloženo do blotovací vaničky spolu s ledítkem a opatrně přelito blotovacím pufrům tak, aby byl ponořen celý sendvič, a vanička byla umístěna do ledové lázně. Na zdroji bylo nastaveno konstantní napětí 100 V a blotování probíhalo 90 min (délka blotování je závislá na velikosti proteinu, který chceme blotovat).

5.4.13.3 Značení protilátkami

Po skončení blotování se sendvič otevřel, membrána byla vyndána pinzetou a opláchnuta redestilovanou vodou. Poté byla opláchnuta v TBST (25 ml na jednu Petriho misku) a špendlíkem byl označen marker. Membrána zůstala v TBST dokud se nepřipravil roztok blokovacího pufru (8 % powder milk v TBST). Bylo nutné membránu alespoň 60 min kývat na kývačce, poté přikrýt horním sklem a na noc umístit do lednice. Ráno se miska s membránou vyndala z lednice a cca 10 min se nechala kývat na kývačce. Následovalo promývání v promývacích roztocích a v roztocích s protilátkami:

- 2x promyto v TBST (vždy 25 ml)
- poté ponecháno v TBST dokud se nepřipravil roztok 1. protilátky: 30 ml TBST + 1,5 μ l anti 11 β -HSD 1 (20 000x naředěno)
- v roztoku 1. protilátky ponecháno 90 min na kývačce
- opláchnuto v TBST
- 15 min v TBST ($V = 4 \text{ ml/cm}^2$) na kývačce
- promyto 3x 5 min v TBST
- byl připraven roztok 2. protilátky: 30 ml TBST + 3 μ l protilátky (antibody against rabbit)
- v roztoku 2. protilátky ponecháno 90-120 min na třepačce
- proveden stejný oplach jako po 1. protilátce

→ membrány připraveny pro detekci

5.4.13.4 Detekce

Detekce probíhala v temné komoře.

5.4.13.4.1 *Pomůcky*

- pipety: 1 ml a 100 μ l
- kádinka 10 ml
- nůžky, pinzeta
- potravinová folie
- papírový ručník
- Western Blotting Detection System: roztok A + roztok B (40:1)
- krabice s filmem
- kazeta na vyvolání filmu Hypercassette
- vývojka 1:25 (vydrží asi týden, poté naředit novou)
- ustalovač 1:3 (vydrží řádově měsíce)
- voda
- 3 misky nebo vaničky na roztoky
- rukavice

5.4.13.4.2 *Postup*

Nejprve byly uštíženy 1 nebo 2 kusy potravinové folie a opatrně položeny na stůl. Poté byly připraven roztok Lumigenu A+B 40:1, v/v (2,2 ml + 55 μ l na 5×6 cm; 3,3 ml + 82,5 μ l na 6,5×9 cm). Z membrány se slil TBST, membrána se vzala za růžek do pinzety a osušila se přiložením růžku k papírovému ručníku, poté byla vložena zpátky do Petriho misky. Pipetou byl na membránu nanesen roztok A+B (po kapkách, bylo nutné, aby membrána byla úplně mokrá), nechal se působit 5 min, poté se slil z membrány a membrána byla opět osušena. Osušená membrána se položila na folii tak, aby se nevytvořily bubliny (proteinovou stranou nahoru!) a foukáním se přes ní přiklopil zbytkem folie (nesmí být bubliny). Poté byly připraveny vaničky s vývojkou, ultradestilovanou vodou a s ustalovačem.

V temné komoře se zhaslo a při červeném (nebo jiném tlumeném) světle se nastříhal RTG film na velikost membrány (2-4 kusy). Každému filmu byl uštížen příslušný roh (pravý dolní) a postupně jeden po druhém byly přikládány na membránu umístěnou ve vyvíjecí kazetě proteinovou stranou nahoru. Kazeta byla uzavřena a 1. film se vyvíjel cca 1 min (během této doby bylo možno rozsvítit). Poté byla kazeta otevřena, film se vzal za růžek do pinzety a ponořil se asi na 2 min do vývojky. Potom se rychle opláchnul ve vodě, osušil růžkem o ručník, ponořil se do ustalovače dokud se neodbarvil

a opět se opláchnul ve vodě. Další film byl exponován dle výsledku 1. filmu (buď byla prodloužena nebo zkrácena doba exponace).

Filmy byly usušeny a fixou byl označen marker.

5.4.14 Stanovení bílkoviny

5.4.14.1 Stanovení pomocí BCA (Smith)

- **Kalibrační křivka**

Nejprve byly nařaděny dvě řady koncentrací roztoků hovězího sérového albuminu (BSA). Nižší koncentrace byly použity pro stanovení bílkoviny ve frakcích po GF, vyšší koncentrace pro stanovení bílkoviny v mikrosomech. BSA byl navážen do eppendorfky a doplněn pufr pro GF na koncentraci 2 mg/ml. Postupným ředěním tohoto roztoku stejným pufr pro GF byly získány koncentrace 1 mg/ml, 500, 250, 125, 100, 80, 60, 40 a 20 µg/ml. Slepý vzorek obsahoval všechny komponenty, jako měřené vzorky, kromě bílkoviny, tj. pufr pro GF a reagentie.

- **Inkubace s reakčními činidly**

Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno vždy do třech jamek 15 µl vzorku (pro kalibraci nebo jednotlivých frakcí). V jamce 1A byla vždy čistá voda a v jamkách 1B-1H byl slepý vzorek. Ke všem vzorkům kromě vody bylo přidáno 10 µl 2 mM iodoacetamidu v 0,1 M Tris-HCl a destička se nechala 15 min inkubovat při 37 °C. Poté se ke vzorkům přidalo 180 µl BCA pracovního roztoku, který byl připraven smícháním reakčního roztoku A s roztokem B v poměru 50:1 (v/v). Destička se nechala inkubovat 30 min při 37 °C.

- **Měření absorbance**

Čtečka Microplate Reader se zapla asi 20 min před začátkem měření, aby se rozehrála. Absorbance vzorků byla změřena při 562 nm proti redestilované vodě a výsledky zpracovány v programu Excel.

5.4.14.2 Bradfordovo stanovení

- **Kalibrační křivka**

Do eppendorfky byl navážen BSA a doplněn pufr pro IEX (pufr A: pufr B = 80:20, v/v) na koncentraci 1 mg/ml. Postupným ředěním stejným pufr pro IEX byly získány koncentrace 100, 80, 60, 40 a 20 µg/ml. Slepý vzorek obsahoval všechny komponenty jako měřené vzorky kromě bílkoviny, tj. pufr pro IEX a reagenční činidlo.

- **Inkubace s reakčním činidlem**

Na mikrotitrační destičku bylo vždy do tří jamek napipetováno 5 μ l vzorku (pro kalibraci nebo jednotlivých frakcí). V jamce 1A byla vždy čistá voda a v jamkách 1B-1H byl slepý vzorek. Ke všem vzorkům kromě vody bylo přidáno 250 μ l Bradfordova činidla a destička se nechala inkubovat při laboratorní teplotě 20 min. Promíchání vzorku bylo zajištěno kýváním na kývačce.

- **Měření absorbance**

Čtečka Microplate Reader se zapla asi 20 min před začátkem měření, aby se rozešla. Absorbance vzorků byla změřena při 595 nm proti redestilované vodě a výsledky zpracovány v programu Excel.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 PURIFIKACE REDUKTASY Z LIDSKÉ JATERNÍ TKÁŇ

6.1.1 Příprava mikrosomální frakce pro separaci

Lidská jaterní tkáň byla nejprve zhomogenizována a ze vzniklého homogenátu byla ultracentrifugací získána mikrosomální frakce (viz. kapitola metody), která byla až do následného použití skladována při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z původních 42 g jaterní tkáň bylo získáno cca 40 ml mikrosomů.

Aby bylo možno izolovat a purifikovat enzymy obsažené v mikrosomech, bylo nutné solubilizovat mikrosomální membránu a proteiny z ní uvolnit. Mikrosomy byly proto smíchány 1:1 (v/v) se solubilizačním pufrům obsahujícím 0,4 % (w/v) Lubrolu PX (detergent) a hodinu za stálého míchání na ledu solubilizovány. Kromě Lubrolu PX, lze použít i jiné detergenty, jako např. Emulgen 913, C_{12}E_9 , CHAPSO, deoxycholát sodný či Triton X-100, dle požadavků experimentu či vlastností izolovaného enzymu (Maser se sp., 2002; Song se sp., 1998; Tang a Moore, 1997; Tsuchiya se sp., 1994; Shinagawa se sp., 2002). Zbytky nerozpuštěných membrán byly odstraněny ultracentrifugací 60 min na 100 000 g. K získanému supernatantu byl následně přidán cholát sodný do koncentrace 0,4 % (w/v) z důvodu prevence výraznějšího poklesu aktivity mikrosomálních enzymů a také kvůli lepší separaci jednotlivých proteinů (Maser se sp., 2002). Pro solubilizaci bylo použito 7,35 ml mikrosomální frakce a získáno 14,3 ml solubilizovaných mikrosomálních proteinů.

Bezprostředně po solubilizaci následovalo odsolení mikrosomální frakce a její příprava pro první separační techniku, iontově výměnnou chromatografii, aby se zajistila počáteční nízká iontová síla vzorku, která je nutná pro navázání proteinů na kolonu. K odsolení byla zvolena GF a celý proces proběhl v módu skupinové separace, ze vzorku tedy byly odstraněny pouze malé molekuly soli a proteiny zůstaly navzájem neodseparovány. Na kolonu byla po 1ml aplikována pouze polovina mikrosomů, získaných při solubilizaci, po odsolení činil celkový objem frakce 15 ml. Protože při solubilizaci i při odsolení došlo k velkému naředění vzorku, celkem cca $4,5\times$, musel být vzorek před první separací zakoncentrován.

Pro svou rychlost a jednoduchost provedení byla zvolena koncentrace v centrifugační zkumavce Amicon. V literatuře je možné se setkat také s koncentrací

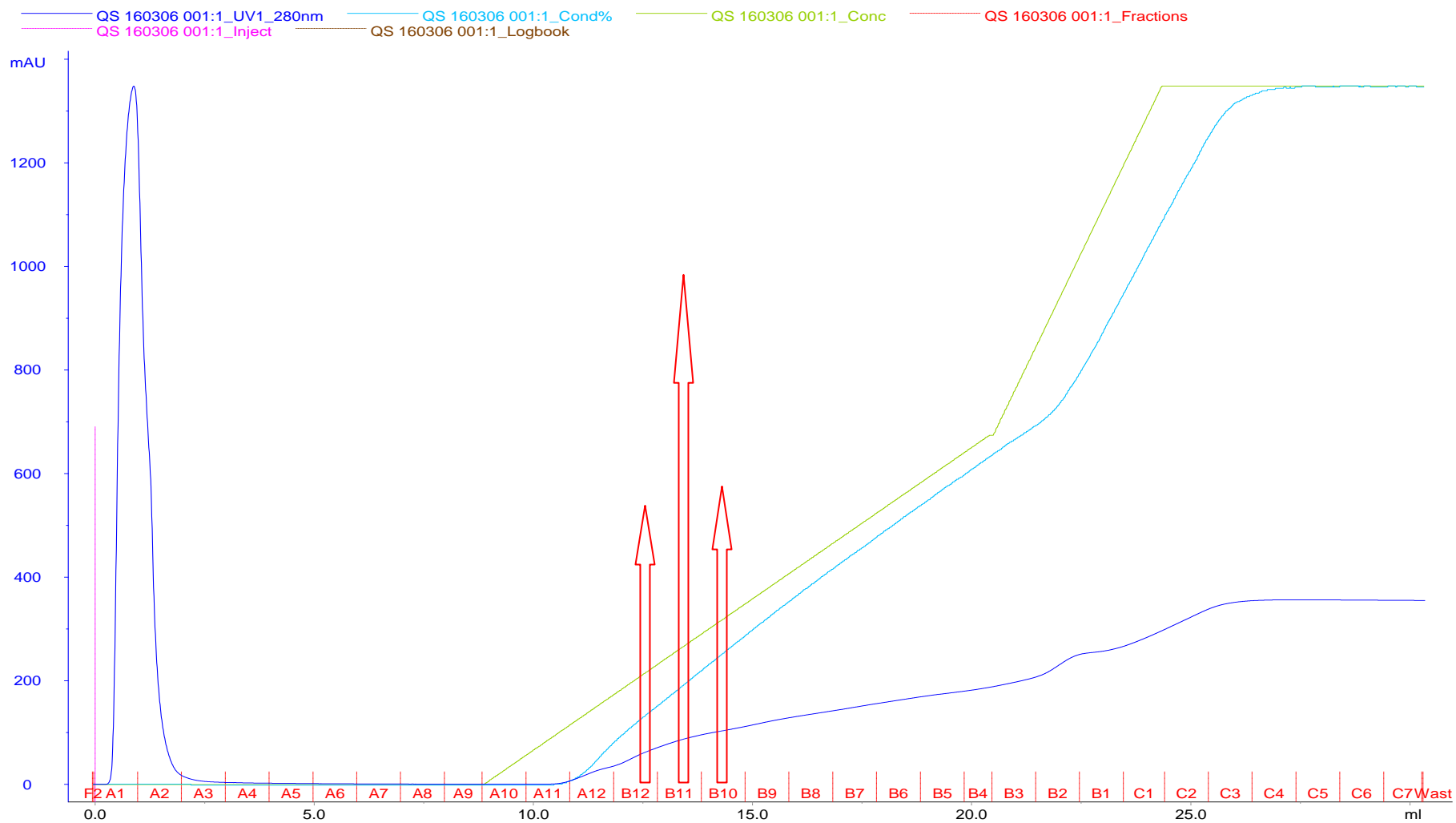
pomocí dialýzy proti zvolenému pufru (Lee se sp., 2003, Maser se sp., 2002, Tsuchiya se sp., 1994), tento způsob zakoncentrování vzorku je sice šetrný, ale zdlouhavý a pracný. Po 10 min při 4000 g bylo získáno 5,4 ml vzorku (cca 2,8× koncentrováno), který byl použit pro následnou separaci.

6.1.2 Separace pomocí IEX

Byly provedeny celkem tři paralelní separace. Na kolonu bylo aplikováno 3 × po 1 ml koncentrovaných mikrosomů a bylo najímáno 31 (1.run) a 29 (2. a 3. run) frakcí o velikosti 1 ml. U každé frakce z 1. runu byla stanovena aktivita redukčních enzymů na základě HPLC stanovení DHO vzniklého při inkubaci enzymatické frakce s oracinem. U 2. a 3. runu byly proměřeny pouze 2.-7. frakce od počátku gradientu (zelená křivka na obr.27), protože nejvyšší aktivita byla předpokládána v oblasti kolem 4. frakce od počátku gradientu. Naměřené hodnoty a výtěžek shrnuje tabulka 5

Měření aktivity na základě konverze substrátu daným enzymem a následného HPLC stanovení vzniklého produktu není jediná možnost, jak vyjádřit aktivitu enzymu. Lze ji stanovit též fluorimetricky měřením přírůstku NADPH na luminiscenčním spektrometru (Song se sp., 1998), kolorimetricky, pokud přeměnou substrátu vzniká barevný produkt, nebo polarograficky jedná-li se o oxidační reakci (Shinagawa se sp., 2002).

Z naměřených hodnot vyplývá, že nejvyšší aktivita byla zaznamenána v oblasti 4.-6. frakce (B12-B10) od počátku gradientu NaCl. Vyšší hodnoty aktivity byly naměřeny také v 2. a 3. frakci od počátku separace. Za tuto aktivitu jsou zodpovědné enzymy nenavázané na kolonu. Může jít buď o enzymy, které se na kolonu vůbec neadsorbují, a jsou proto vymyty již pufrem bez soli, nebo to jsou enzymy, které se sice vázat mohou, ale vazebná kapacita kolony je již vyčerpána, tudíž jsou z kolony také vymyty bez jakékoli interakce se stacionární fází. Obdobné výsledky byly získány i proměřením frakcí z 2. a 3. runu.

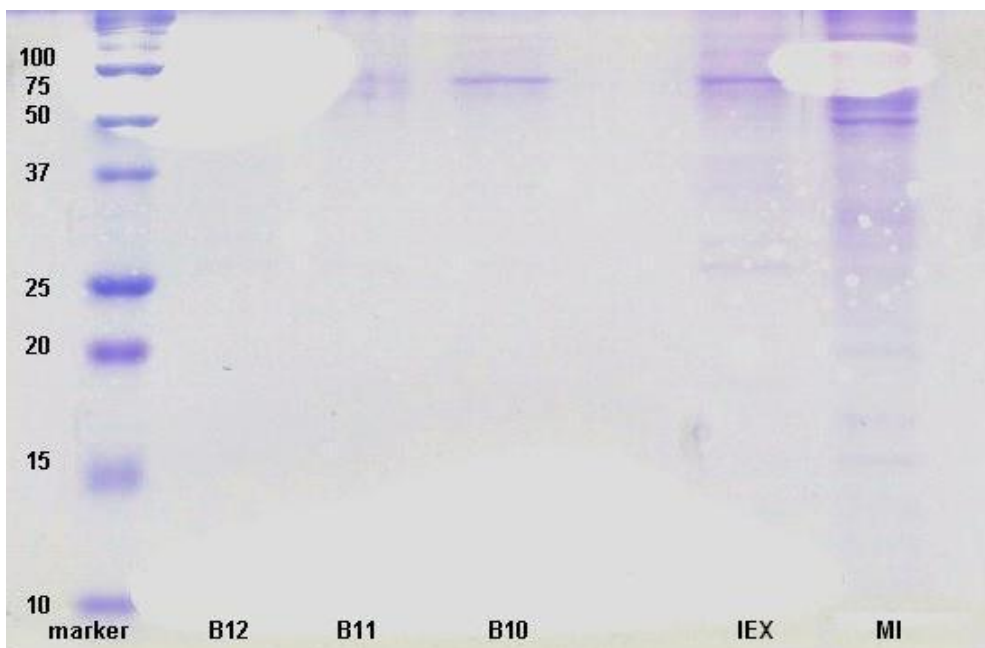


Obr.27 Záznam IEX separace. Šipky označují frakce s nejvyšší aktivitou redukční přeměny oracinu.

Tab.5 HPLC analýza množství DHO vzniklého v jednotlivých frakcích z IEX

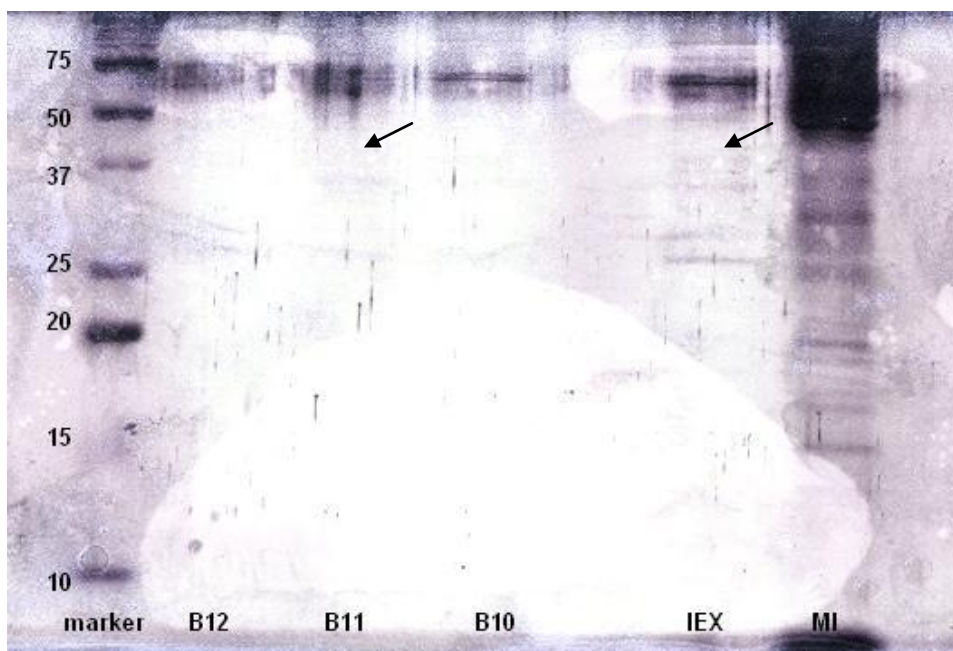
HPLC po IEX				1. RUN	LIDSKÉ MIKROSOMY 20	
vzorek	inkubace (ul)	ředění (ul)	nástřik (ul)	DHO v nástřiku(ng)	frakce (ul)	celk. DHO (ng)
Mik solub.	5	250	100	12,210	1240	7570,20
Mik odsol.	5	250	100	2,378	2778	3303,04
Mik konc.	5	250	100	9,954	1000	4977,00
A1	50	250	100	0,056	1000	2,80
A2	50	250	100	13,098	1000	654,90
A3	50	250	100	2,830	1000	141,50
A4	50	250	100	0,369	1000	18,45
A5	50	250	100	0,277	1000	13,85
A6	50	250	100	0,088	1000	4,40
A7	50	250	100	0,150	1000	7,50
A8	50	250	100	0,020	1000	1,00
A9	50	250	100	0,187	1000	9,35
A10	50	250	100	0,130	1000	6,50
A11	50	250	100	0,234	1000	11,70
A12	50	250	100	0,357	1000	17,85
B12	50	250	100	6,646	1000	332,30
B11	50	250	100	15,591	1000	779,55
B10	50	250	100	7,410	1000	370,50
B9	50	250	100	1,768	1000	88,40
B8	50	250	100	0,452	1000	22,60
B7	50	250	100	0,306	1000	15,30
B6	50	250	100	0,218	1000	10,90
B5	50	250	100	0,181	1000	9,05
B4	50	250	100	0,157	1000	7,85
B3	50	250	100	0,135	1000	6,75
B2	50	250	100	0,117	1000	5,85
B1	50	250	100	0,376	1000	18,80
C1	50	250	100	0,089	1000	4,45
C2	50	250	100	0,129	1000	6,45
C3	50	250	100	0,266	1000	13,30
C4	50	250	100	0,252	1000	12,60
C5	50	250	100	0,240	1000	12,00
C6	50	250	100	0,145	1000	7,25
C7	50	250	100	0,146	1000	7,30
					celkem	2621,00
					výtěžek	52,66%

Rozložení molekulových hmotností ve frakcích bylo zjištěno pomocí SDS-PAGE, srovnáním s molekulovým standardem. Na gel bylo aplikováno vždy 24 μ l vzorku s 12 μ l vzorkového pufru, u spojené a koncentrované frakce z IEX to bylo 10 μ l + 8 μ l pufru, 5 μ l mikrosomů s 5 μ l pufru a 3 μ l molekulového markeru. Gel byl nejprve barven pomocí CCBG (obr.28), ale protože byly proužky jen velmi málo viditelné, bylo nutné provést i barvení stříbrem (obr.29). Po druhém barvení byl v neaktivnější frakci viditelný výraznější proužek v oblasti kolem 37 kDa.



Obr.28 ELFO aktivních frakcí po IEX. Barvení Coomassie Brilliant Blue.

Vysvětlivky k obrázkům: B12, B11 a B10 jsou tři nejaktivnější frakce z 1. runu na IEX, IEX je spojená a zakonzentrovaná frakce nejaktivnější frakcí ze všech tří runů (celkem 9), MI jsou mikrosomy.



Obr.29 ELFO aktivních frakcí po IEX. Značení stříbrem.

Jednotlivé proteinové proužky byly málo viditelné i po barvení stříbrem, je to dáno hlavně tím, že koncentrace proteinů, se kterými se pracovalo, byly velmi nízké. Nejprve byly používány gely o tloušťce 0,8 mm a do jamky bylo aplikováno až 18 μ l, i když

standardně by aplikovaný objem vzorku neměl překročit 10 μ l. Ani tak však nebylo dosaženo požadovaných výsledků. Byly proto použity silnější gely, o tloušťce 1,6 mm, a tím mohl být aplikovaný objem zdvojnásoben, tj. až na 36 μ l. Bylo sice zaznamenáno určité zviditelnění proužků, ale i tak nebyly výsledky ideální. Další problém nastal při skenování jednotlivých gelů, kdy se nedařilo naskenovat gel bez viditelných bublin, což se projevilo na kvalitě obrázků (obr.28, obr.29). Bylo evidentní, že při dalším separačním kroku se vzorek ještě dále naředí a viditelnost na gelu bude ještě horší, proto se vzaly tři nejaktivnější frakce ze všech tří runů, spojily se a před dalším krokem byly $5,6 \times$ zakoncentrovány (7,5 ml na 1,34 ml) a dále separovány pomocí GF .

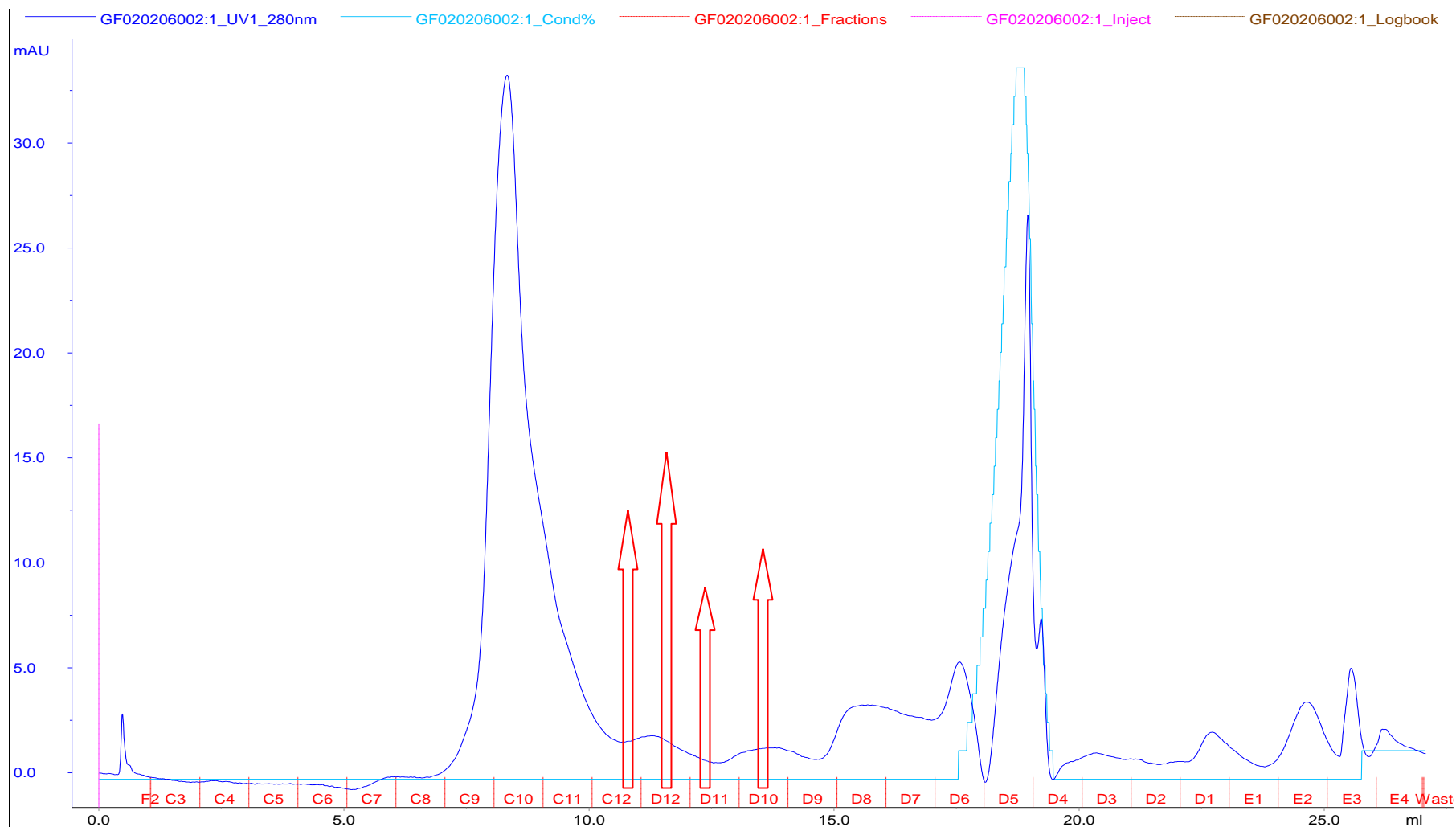
6.1.3 Gelová filtrace 1

Gelová filtrace se do purifikačního schématu zařazuje poměrně často díky své šetrnosti k enzymům a bývá dosaženo relativně dobrého přečištění vzorku.

Na kolonu pro gelovou filtraci byla aplikována zakoncentrovaná frakce z předchozí separace, a to ve třech runech. V prvním runu bylo aplikováno 0,250 ml, v druhém 0,500 ml a ve třetím 0,300 ml. Záznam 2. runu je vidět na obr.30 , kde jsou také vyznačeny čtyři nejaktivnější frakce.

Byly inkubovány všechny frakce z 2. runu a 6.-13. frakce z runu 1 a 3, kde byla předpokládána nejvyšší aktivita. To bylo potvrzeno, nejaktivnější byla 10.-13. frakce od počátku separace. Výtěžek 128,11 % v sobě zahrnuje chybu vzniklou při vyhodnocování chromatogramů a při zaokrouhlování. Hodnoty aktivit však nebyly dostatečně velké, aby mohla být provedena další separace pouze s nejaktivnější frakcí, bylo proto opět nutné vzorek zkoncentrovat. Koncentrace byla provedena s 10-ti nejaktivnějšími frakcemi ze všech tří runů a vzorek byl pomocí centrifugační zkumavky Amicon zakoncentrován $8,7 \times$ (z 8 ml na 0,915 ml). Tato zkoncentrovaná frakce byla aplikovaná opět na kolonu pro GF, použitou v předcházejícím kroku.

S nejaktivnějšími frakcemi po GF1 byla rovněž provedena ELFO. Výsledek byl obdobný jako po IEX, byl opět viditelný proužek v oblasti 37 kDa. Nebyly však získány kvalitní obrázky, proto zde nejsou uvedeny.



Obr.30 Záznam GF1 separace. Šipky označují neaktivnější frakce.

Tab.6 HPLC analýza množství DHO vzniklého v jednotlivých frakcích z GF1

HPLC po gelové filtraci				2. run		LIDSKÉ MIKROSOMY 20		
vzorek	inkubace (ul)	ředění (ul)	nástřik (ul)	DHO (ng)	frakce (ul)	celk. DHO (ng)	korekce slepým vz.	
konc QS	5	250	100	11,643	500	1164,25	11,143	1114,25
slepý vz.	0	250	100	0,500				
C3	50	250	100	0,778	1000	15,55	0,278	5,55
C4	50	250	100	0,575	1000	11,50	0,075	1,50
C5	50	250	100	0,538	1000	10,75	0,038	0,75
C6	50	250	100	0,653	1000	13,05	0,153	3,05
C7	50	250	100	0,653	1000	13,05	0,153	3,05
C8	50	250	100	0,818	1000	16,35	0,318	6,35
C9	50	250	100	0,618	1000	12,35	0,118	2,35
C10	50	250	100	0,518	1000	10,35	0,018	0,35
C11	50	250	100	1,300	1000	26,00	0,800	16,00
C12	50	250	100	12,305	1000	246,10	11,805	236,10
D12	50	250	100	12,723	1000	254,45	12,223	244,45
D11	50	250	100	9,868	1000	197,35	9,368	187,35
D10	50	250	100	11,175	1000	223,50	10,675	213,50
D9	50	250	100	5,268	1000	105,35	4,768	95,35
D8	50	250	100	2,320	1000	46,40	1,820	36,40
D7	50	250	100	2,498	1000	49,95	1,998	39,95
D6	50	250	100	9,140	1000	182,80	8,640	172,80
D5	50	250	100	2,933	1000	58,65	2,433	48,65
D4	50	250	100	3,558	1000	71,15	3,058	61,15
D3	50	250	100	1,128	1000	22,55	0,628	12,55
D2	50	250	100	0,848	1000	16,95	0,348	6,95
D1	50	250	100	0,718	1000	14,35	0,218	4,35
E1	50	250	100	0,750	1000	15,00	0,250	5,00
E2	50	250	100	0,950	1000	19,00	0,450	9,00
E3	50	250	100	1,020	1000	20,40	0,520	10,40
E4	50	250	100	0,730	1000	14,60	0,230	4,60
					celkem	1687,50		1427,50
					procenta	144,94%		128,11%

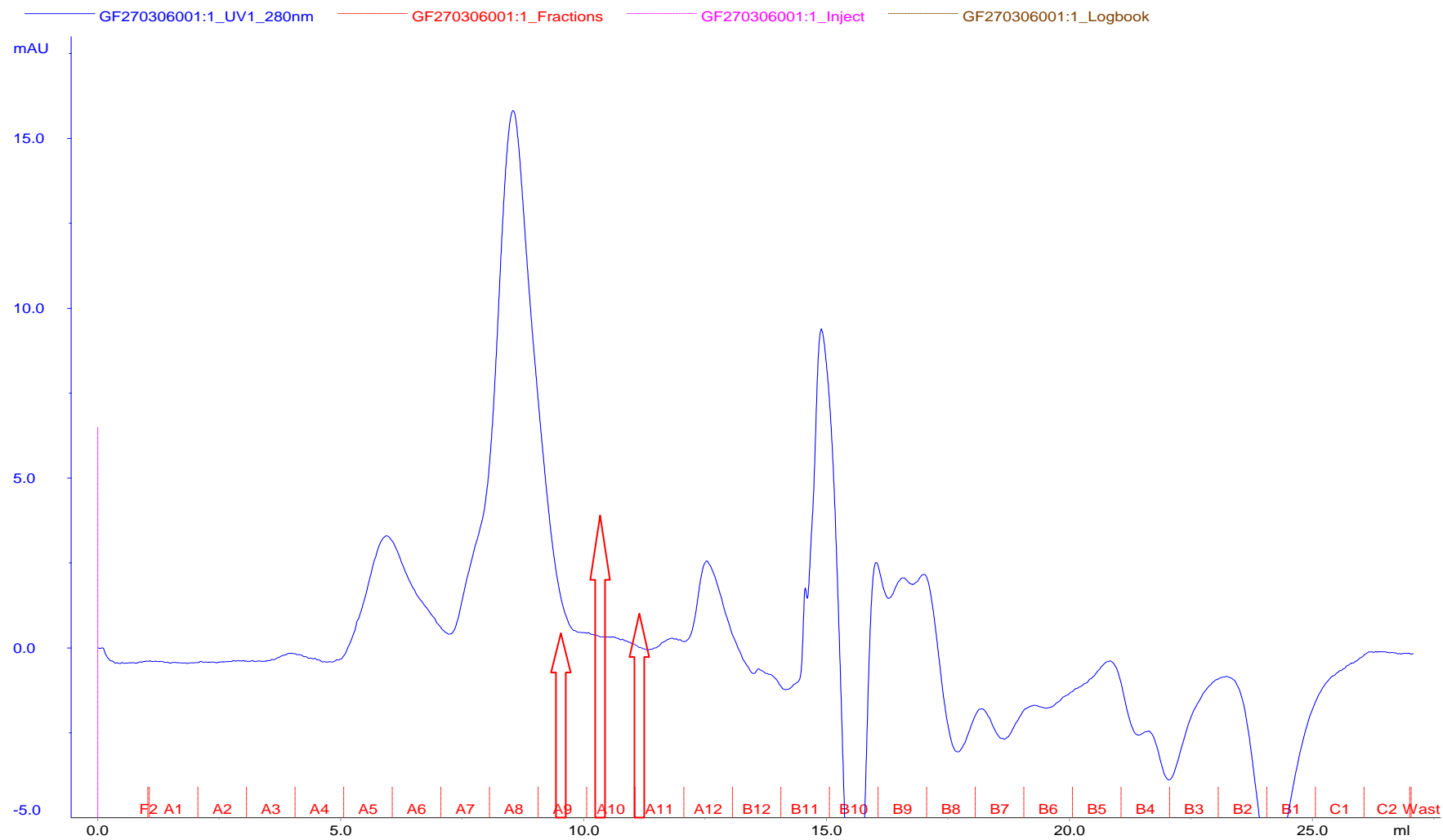
6.1.4 Gelová filtrace 2

Opětovná aplikace vzorku na GF byla zvolena z několika důvodů. Při gelové filtraci by mělo dojít k rozdělení bílkovin dle velikosti. Pokud se však provádí za nativních podmínek, zůstanou bílkoviny stočeny ve své terciární nebo kvartérní struktuře. Do pufru se proto přidává určité množství detergentu, v tomto případě Lubrolu PX, který strukturu bílkoviny poněkud rozvolní a zabrání vzájemnému nabalování proteinů do klubíček. Jeho koncentrace však nesmí být příliš vysoká, aby nedošlo ke ztrátě aktivity proteinů. Proto je možné, že se menší proteiny částečně nabalí na velké a nedochází tak k ideálnímu rozdělení směsi. Druhá gelová filtrace by měla docílit ještě lepšího rozseparování jednotlivých proteinů.

Na kolonu byla tedy aplikována zakoncentrovaná frakce z předchozího kroku (obr.30), najímané frakce byly opět podrobeny inkubaci s oracinem, a množství vzniklého DHO bylo stanoveno pomocí HPLC. Naměřené hodnoty shrnuje tabulka 6.

Z HPLC stanovení množství vzniklého DHO vyplývá, že nejaktivnější byly frakce 9-11 (A9-A11) od počátku separace. Vyšší aktivita byla naměřena i v 13. frakci (B12), ale jak potvrdila chirální analýza, jde pravděpodobně o chybu.

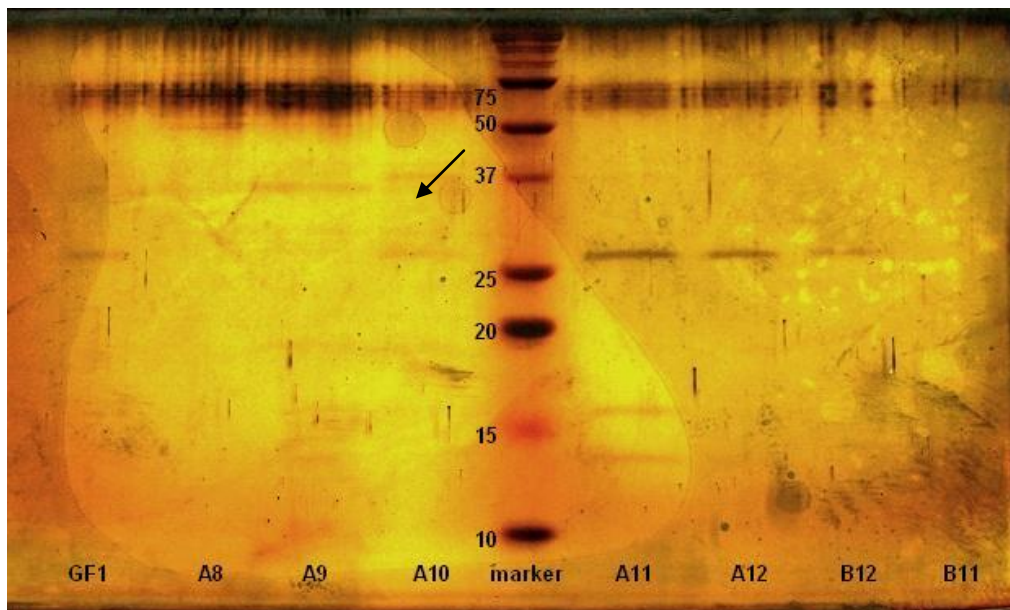
Po zkušenostech z předchozích kroků, byly aktivní frakce po GF2 před nanesením na gel cca $8,6 \times$ zakoncentrovány. Do jamek bylo aplikováno vždy 24 μ l frakce (A8...B12) +12 μ l pufru, 12 μ l koncentrované frakce po GF1 + 8 μ l pufru a 3 μ l molekulového standardu. Je uveden pouze obrázek gelu po barvení stříbrem (obr.32), protože po obarvení v CBBG byly proužky velmi málo zřetelné.



Obr.31 Záznam GF2 separace. Šipky označují neaktivnější frakce.

Tab.7 HPLC analýza množství DHO vzniklého v jednotlivých frakcích z GF2

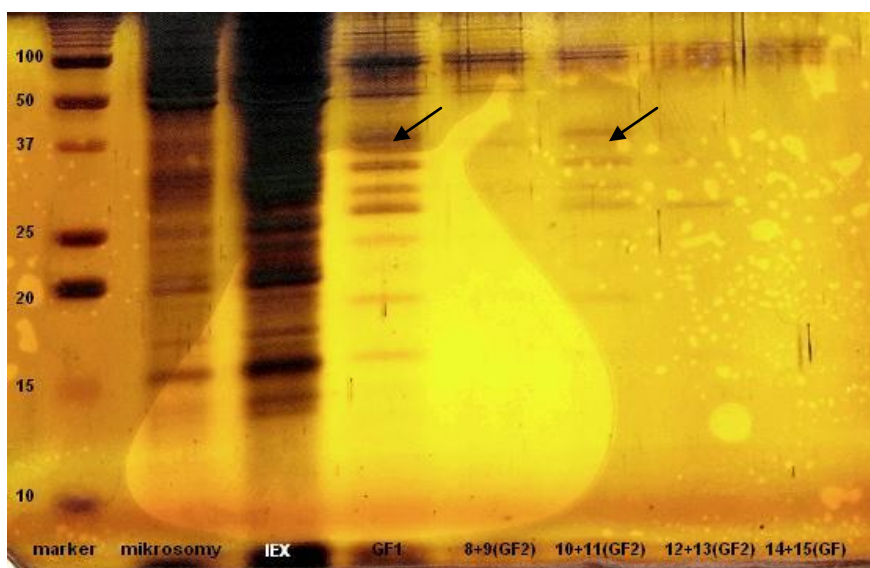
HPLC po gelové filtraci					LIDSKÉ MIKROSOMY 20			
vzorek	inkubace (ul)	ředění (ul)	nástřik (ul)	DHO (ng)	frakce (ul)	celk. DHO (ng)	korekce slepým vz.	
konc GF1	5	250	100	8,998	500	899,75	8,623	862,25
slepák	0	250	100	0,375				
A1	50	250	100	0,485	1000	9,70	0,110	2,20
A2	50	250	100	0,368	1000	7,35	-0,008	-0,15
A3	50	250	100	0,413	1000	8,25	0,038	0,75
A4	50	250	100	0,473	1000	9,45	0,098	1,95
A5	50	250	100	0,608	1000	12,15	0,233	4,65
A6	50	250	100	0,480	1000	9,60	0,105	2,10
A7	50	250	100	0,563	1000	11,25	0,188	3,75
A8	50	250	100	0,760	1000	15,20	0,385	7,70
A9	50	250	100	6,130	1000	122,60	5,755	115,10
A10	50	250	100	14,750	1000	295,00	14,375	287,50
A11	50	250	100	6,435	1000	128,70	6,060	121,20
A12	50	250	100	2,885	1000	57,70	2,510	50,20
B12	50	250	100	10,360	1000	207,20	9,985	199,70
B11	50	250	100	0,630	1000	12,60	0,255	5,10
B10	50	250	100	0,585	1000	11,70	0,210	4,20
B9	50	250	100	0,450	1000	9,00	0,075	1,50
B8	50	250	100	0,563	1000	11,25	0,188	3,75
B7	50	250	100	0,265	1000	5,30	-0,110	-2,20
B6	50	250	100	0,493	1000	9,85	0,118	2,35
B5	50	250	100	0,368	1000	7,35	-0,008	-0,15
B4	50	250	100	0,485	1000	9,70	0,110	2,20
B3	50	250	100	0,605	1000	12,10	0,230	4,60
B2	50	250	100	0,403	1000	8,05	0,028	0,55
B1	50	250	100	0,395	1000	7,90	0,020	0,40
C1	50	250	100	0,498	1000	9,95	0,123	2,45
C2	50	250	100	0,595	1000	11,90	0,220	4,40
					celkem	1020,80		825,80
					procenta	113,45%		95,77%



Obr.32 ELFO aktivních i neaktivních frakcí po GF2. Bervení stříbrem.

I po barvení stříbrem je proužek v oblasti 37 kDa u neaktivnější frakce (A10) velmi málo viditelný, je to opět díky velmi malým koncentracím proteinu ve vzorku. Zajímavé ale je, že došlo ke koncentraci proteinu v oblasti nad 25 kDa u druhé neaktivnější frakce (A11). Jestli to má nějakou souvislost s námi hledaným proteinem, není zatím jasné, a odkrývá se tak možnost dalšího zkoumání.

Nakonec byla provedena elektroforéza zakoncentrovaných frakcí po všech třech krocích (obr.33). Do jamek bylo aplikováno vždy 24 μ l příslušné frakce + 12 μ l pufru, 5 μ l mikrosomů + 5 μ l pufru a 3 μ l molekulového standardu.



Obr.33 Závěrečná ELFO

Vysvětlivky: frakce po GF2 byly spojeny po dvou. Proužek v neaktivnější frakci z GF2 (10+11) je špatně viditelný, šipka ukazuje těsně pod výrazný proužek ve stejné oblasti, tj. kolem 37 kDa.

Na obrázku závěrečné ELFO (obr.33) je vidět, že došlo alespoň k částečnému přečištění aktivní enzymové frakce, ale byl by třeba aspoň ještě jeden další krok k finálnímu dočištění vzorku. Díky nízkým koncentracím enzymu ve frakci by již další čištění nemělo smysl, protože získané hodnoty by byly na hranici detekce. Řešením by mohlo být větší množství výchozího materiálu pro purifikaci a větší mezikrokové zakoncentrování vzorku.

6.1.5 Vyloučení přítomnosti 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1

Velikost 11 β -HSD 1 se pohybuje okolo 34 kDa, což by mohlo korespondovat s výsledky získanými na ELFO. Většina reduktas má však obdobnou velikost, takže ELFO sama o sobě nestačí k potvrzení či vyvrácení přítomnosti určitého proteinu. Aby byla vyloučena přítomnost 11 β -HSD 1, která by mohla zkreslovat výsledky experimentu, bylo provedeno několik experimentů.

Jako první byla provedena chirální analýza aktivních frakcí ze všech tří runů. Hodnoty procentuelního zastoupení enantiomerů (+)-DHO a (-)-DHO shrnuje tabulka.

Tab.8 Výsledky chirální analýzy množství DHO.

FRAKCE	(+)-DHO (%)	(-)-DHO (%)
Mikrosomy	68,6	31,4
IEX B12	86,6	13,4
IEX B11	87,1	12,9
IEX B10	86,8	13,2
GF1 C12	87,0	13,0
GF1 D12	87,6	12,4
GF1 D11	86,8	13,2
GF2 A9	86,9	13,1
GF2 A10	89,6	10,4
GF2 A11	85,5	14,5
Průměr	87,1	12,9

Všechny aktivní frakce vykazovaly podobnou specifitu chirální přeměny oracinu na (+)-DHO a (-)-DHO. V 87,1 % byla preferována přeměna na enantiomer (+)-DHO. V případě 11 β -HSD 1 by tomu bylo právě naopak (Wsól se sp., 2004). Byly však naměřeny poněkud jiné hodnoty poměru (+)/(-)-DHO pro mikrosomální frakci. Wsól se sp. (2004) uvádí, že v 59,8 % převažuje přeměna oracinu na (-)-DHO, což se neshoduje se

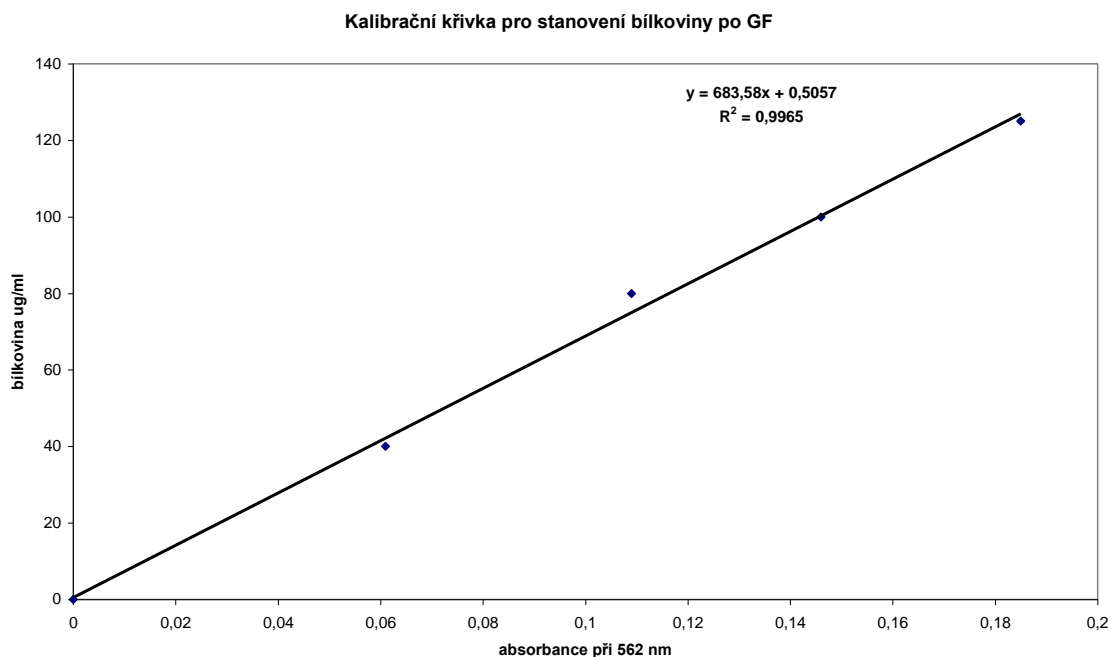
získanou hodnotou 68,6 % ve prospěch enantiomeru (+)-DHO. V uvedené práci však autoři pracovali s šesti různými jaterními tkáněmi a jejich výsledek je průměren všech získaných hodnot. V této práci se pracovalo pouze s jedním jaterním vzorkem a to by mohlo vysvětlit variabilitu výsledků. V každém případě je specifická přeměna oracinu u částečně vyčištěného enzymu jiná než u mikrosomů, a to nasvědčuje tomu, že redukce oracinu se neúčastní pouze jeden enzym, ale bude jich pravděpodobně více. Preference (+)-enantiomeru je také potvrzuje předpoklad, že kromě 11 β -HSD 1 se na metabolismu oracinu musí podílet enzym s preferencí přeměny na (+)-DHO (Wsól se sp., 2004).

Chirální analýza tedy potvrdila, že se v přečištěném vzorku nachází jiný enzym, než je 11 β -HSD 1. Nebylo však možno s jistotou říci, že se v daném vzorku 11 β -HSD 1 vůbec nenachází a nepodílí se na přeměně oracinu. Byl proto proveden Western blotting nejaktivnějších frakcí po všech krocích se specifickou protilátkou proti 11 β -HSD 1, který potvrdil, že se tento enzym ve vzorku skutečně nenachází.

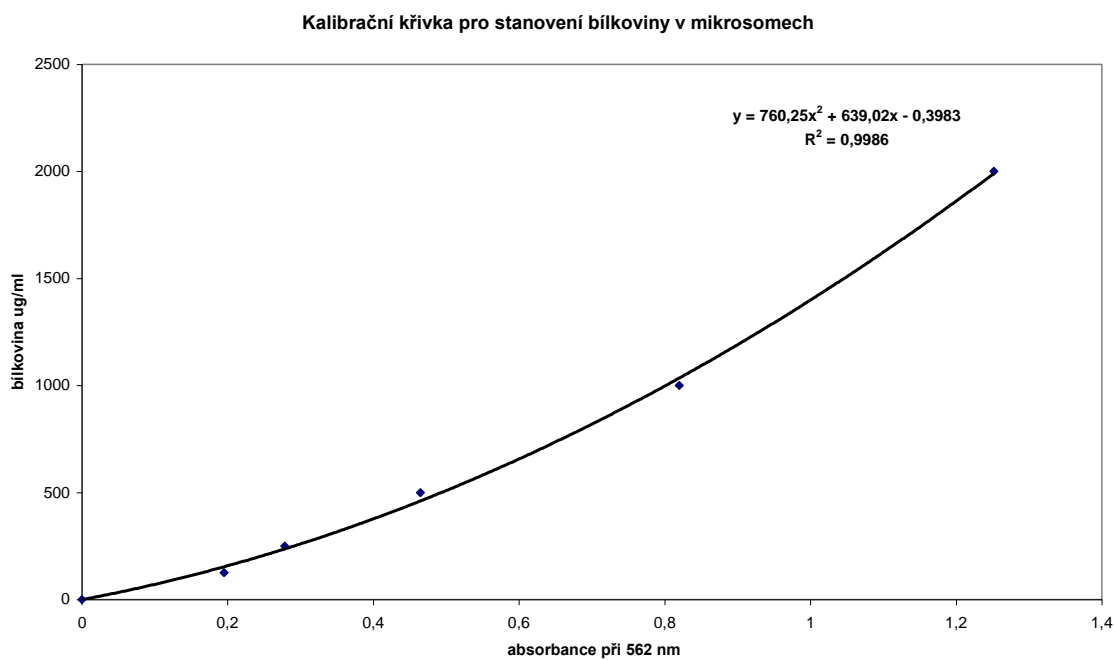
6.1.6 Stanovení množství bílkoviny a výpočet specifické aktivity

Pro stanovení bílkoviny byly použity dvě metody, Smithovo stanovení s BCA (1985) a Bradfordovo stanovení (1976). BCA byla použita u stanovení bílkoviny po GF a v mikrosomech, byla však modifikována přidáním iodoacetamidu, který překryl redukční působení 2-merkapt ethanolu v pufru. Aplikovat tuto metodu na stanovení bílkoviny po IEX se nepodařilo, proto byla zvolena Bradfordova metoda, která je s redukčními činidly kompatibilní. Naopak nemohla být použita pro stanovení po GF, protože je ovlivněna přítomností detergentu v médiu.

Byly změřeny tři kalibrační křivky: dvě pro stanovení s BCA (obr.34, obr.35) a jedna pro stanovení dle Bradforda (obr.36). Hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků byly dosazeny do získaných rovnic a byl vypočítán obsah bílkoviny v dané frakci. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 9. Na závěr byly spočítány specifické aktivity enzymu po jednotlivých purifikačních krocích (tab.9).

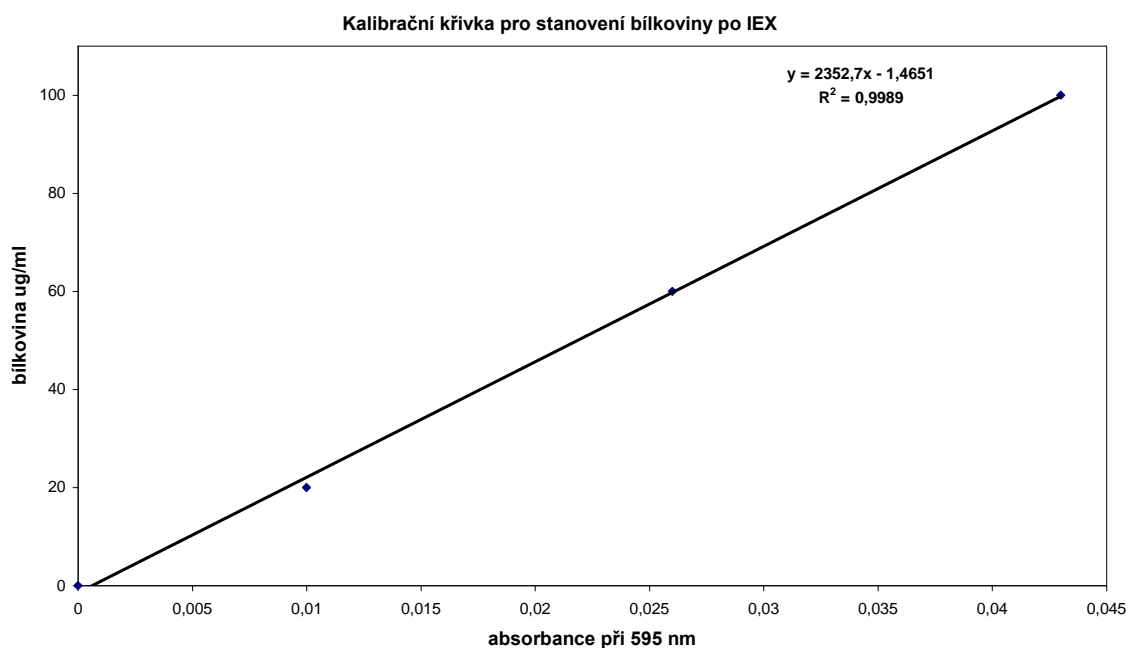


Obr. 34 Graf závislosti množství bílkoviny v roztoku na absorbanci při 562 nm.



Obr.35 Graf závislosti množství bílkoviny v roztoku na absorbanci při 562 nm.

U druhé kalibrace (obr.35) byla použita kvadratická funkce, která lépe vyhovovala průběhu závislosti.



Obr. 36 Graf závislosti množství bílkoviny v roztoku na absorpenci při 595 nm.

Typ závislosti byl zvolen záměrně opačný než je běžné (tj. závislost absorpance na obsahu bílkoviny), aby bylo možno rovnou dosazovat do rovnice přímky.

Naměřené hodnoty absorpance byly dosazovány do těchto rovnic:

GF $y = 683,58x + 0,5057$ ($R^2 = 0,9965$)

Mikrosomy $y = 760,25x^2 + 639,02x - 0,3983$ ($R^2 = 0,9986$)

IEX $y = 2352,7x - 1,4651$ ($R^2 = 0,9989$)

x – naměřené hodnoty absorpance, y – neznámá koncentrace roztoku ($\mu\text{g/ml}$)

Tab.9 Výsledky stanovení bílkoviny a hodnoty specifických aktivit

frakce	bílkovina $\mu\text{g/ml}$	DHO ng/ml	DHO Nmol/ml	specifická aktivita nmol/mg bí	faktor přečištění
Mik sol.	3470,00	6105,0	18,170	5,24	1,00
IEX	153,03	779,6	2,320	15,16	2,90
GF1	34,90	237,7	0,707	20,27	3,87
GF2	5,16	287,5	0,856	165,82	31,67

Látkové množství DHO bylo vypočítáno podle vzorce:

$$n = m/Mr$$

n - látkové množství (nmol) DHO v ml, m – množství DHO (ng) v ml stanovené pomocí HPLC, Mr – molekulová hmotnost oracinu ($M_r=336$)

Specifická aktivita enzymu byla vypočítána podle vzorce: **SA = n/c**

SA – specifická aktivita, n – látkové množství DHO, c – koncentrace bílkoviny (mg/ml)

Z výsledků vyplývá, že bylo dosaženo cca 32-násobného přečištění příslušné reductasy a její specifická aktivita vzrostla v průběhu čištění 166×. Největšího přečištění bylo dosaženo v posledním kroku, tj. při GF2, a její znovuzařazení do purifikačního schématu se tedy ukázalo jako správné. Jak ukázalo SDS-PAGE, vzorek nebyl ještě stále zcela přečištěn a bylo by vhodné do schématu zařadit ještě jeden purifikační krok, kterým by byl odstraněn zbytek balastních látek. Vhodné by bylo např. použití elektroforesace, kdy dojde rozdělení směsi proteinů dle jejich pI do velmi malých frakcí. Pokud by byla elektroforesace aplikována jako závěrečná metoda, je možno očekávat poměrně dobré dočištění vzorku.

7 ZÁVĚR

V dnešní době jsou stále častěji objevovány nové lidské proteiny nebo nové funkce proteinů již známých. Mnoho z nich hraje významnou roli v patogenezi různých onemocnění. Budou-li procesy, kterých se tyto enzymy účastní, pochopeny, mohou být navrhnutá specifická léčiva působící cíleně na tyto struktury. Aby to však bylo možné, je nutné znát strukturu daného enzymu a jeho vlastnosti. Rozvoj purifikačních technik umožní izolaci vybraného enzymu ze směsi proteinů a tím jej identifikovat a charakterizovat.

Až donedávna byly purifikovány především cytosolické formy enzymů, tedy nenavázané rozpustné formy, jejichž izolace je poměrně snadná. Díky zkušenostem získaným při těchto postupech bylo možno začít také s purifikací membránově vázaných enzymů, jejichž izolace v nativním stavu je díky ukotvení na membráně komplikovanější. Jeden z nejvýznamnějších dosud popsáných membránově vázaných mikrosomiálních enzymů je 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1. Byla purifikována Maserem se sp. (2003) a intenzivně studována. Bylo u ní potvrzeno zapojení v patogenezi nemocí jako diabetes mellitus, obezita či polycystický ovariální syndrom a byla také prokázána její důležitá role v biotransformaci potenciálního cytostatika oracinu. Při studiích s tímto léčivem bylo rovněž zjištěno, že se na jeho metabolismu kromě 11 β -HSD 1 bude zřejmě podílet i jiná mikrosomální reductasa (Wsól se sp., 2004). Oracin byl na základě těchto studií použit jako modelový substrát při purifikaci lidské jaterní membránově vázané reductasy.

Byly zvoleny tři základní kroky purifikačního schématu. Jako první krok byla zařazena iontově výměnná chromatografie na silném aniontu následovaná dvěma separacemi na koloně pro gelovou filtraci. Před první separací však bylo nutné použitou mikrosomální frakci solubilizovat a uvolnit tak proteiny z vazby na membránu. Najímané frakce byly následně inkubovány s oracinem za vzniku jeho redukovaného metabolitu, DHO, jehož množství bylo stanoveno pomocí achirální HPLC analýzy. Bylo tak tedy potvrzeno, že enzym, přítomný v purifikované frakci, je opravdu reductasa. U neaktivnějších frakcí a neaktivních frakcí v jejich okolí byla provedena SDS-PAGE a jejich srovnáním byla určena pravděpodobná pozice hledaného enzymu na gelu v oblasti kolem 37 kDa.

Po stanovení množství bílkoviny v jednotlivých frakcích bylo možné vypočítat a srovnat specifické aktivity purifikované reductasy po jednotlivých krocích purifikace. Zvolená kombinace purifikačních metod se ukázala být výhodná, protože výsledný faktor přečištění činil 31,67 a specifická aktivita sledovaného enzymu vrostla 165-násobně.

Dalšími technikami bylo prokázáno, že přečištěný enzym není 11 β -HSD 1. Nejprve byl proveden Western blot proteinových frakcí z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu, která byla poté inkubována s protilátkou anti-11 β -HSD 1. Po označení sekundární protilátkou nebyla detekována přítomnost 11 β -HSD 1 v žádné frakci kromě mikrosomální. Následně byla provedena chirální HPLC analýza, která měla určit poměr vzniklých enantiomerů (+)-DHO a (-)-DHO v aktivních frakcích po inkubaci s oracinem. Bylo zjištěno, že reductasa přeměňuje oracin přednostně na enantiomer (+)-DHO, a to v 87,1 %. Tím se opět potvrdilo, že nejde o 11 β -HSD 1, u níž naopak v 59,8 % převažuje přeměna oracinu na (-)-DHO, a zároveň byla získána důležitá charakteristika hledaného redukčního enzymu.

Jak je patrné z SDS-PAGE, stále však nebylo dosaženo dostatečného přečištění směsi, a proto by bylo vhodné zařadit do schématu ještě minimálně jeden purifikační krok. Velkým problémem při purifikaci se stalo značné naředění vzorku po jednotlivých separačních krocích, čímž bylo nutné frakce stále koncentrovat. Aby tedy bylo možné pokračovat v další purifikaci a získat větší koncentrace hledaného enzymu, bylo by vhodné začít separaci s větším množstvím počátečního materiálu, tj. lidských mikrosomů, a vzorek během purifikace ještě více koncentrovat.

8 ZKRATKY

2D	Dvourozměrný
3D	Trojrozměrný
11βHSD 1	11beta-hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1
11βHSD 2	11beta-hydroxysteroiddehydrogenasa typ 2
AA	Akrylamid
AC	Afinitní chromatografie
ACN	Acetonitril
AKR	Aldo-ketoreduktasy
APS	Amonium persulfát
BCA	Bicinchoninic acid
BFB	Bromfenolová modř
bisAA	Bis-akrylamid
BSA	Bovinní (hovězí) sérový albumin
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G-250
cDNA	Klonovaná deoxyribonukleová kyselina
C ₁₂ E ₉	Dodecyl nonaoxyethylene glycol monoether
CR	Karbonylreduktasa
DHO	Dihydrooracin
DHRS4	Dehydrogenase/reduktase (SDR family) member 4
DTT	Dithiothritol
ELFO	Elektroforéza
EtOH	Ethanol
GF	Gelová filtrace
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate
HIC	Chromatografie hydrofobních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS	Hexansulfonanový pufr
IEX	Iontově výměnná chromatografie
MDR	Dehydrogenasy-reduktasy se středně dlouhým řetězcem
MeOH	Methanol

MPa	Megapascal (jednotka tlaku)
Mr	Molekulová hmotnost (g/mol)
NADH, NAD(H)	Nikotinamidadeninukleotid
NADPH, NADP(H)	Nikotinamidadeninukleotid
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
RTG	Rentgenový
RPC	Chromatografie na reverzní fázi
SDR	Dehydrogenasy-reduktasy s krátkým řetězcem
SDS	Sodium dodecyl sulfate (lauryl-sulfát sodný)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris-buffered saline plus Tween 20
TCA	Trichloroctová kyselina
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultrafialové (ultra violet) záření

9 LITERATURA

Anon (1993): Hydrofobic interaction chromatography. Principle and methods. Handbook of Amersham Biosciences.

Anon (1999a): Ion exchange chromatography. Principles and methods. Handbook of Amersham Biosciences.

Anon (1999b): Reversed phase chromatography. Principles and methods. Handbook of Amersham Biosciences.

Anon (2001): Protein purification handbook. Handbook of Amersham Biosciences.

Anon (2002a): Afinity chromatography. Principles and methods. Handbook of Amersham Biosciences.

Anon (2002b): Gel filtration. Principles and Methods. Handbook of Amersham Biosciences.

Bohren K.M.; Bullock B., Wermuth B. a Gabbay K.H. (1989): The aldo-keto reductase superfamily cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductase. *J. Biol. Chem.* **264**; 9547-9551.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**;248-54.

Duffy M.J. (2005): Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin. Chem.* **51**; 494-503.

Gersl V., Mazurová Y., Bajgar J., Melka M., Hrdina R. a Palička V. (1996): Lack of cardiotoxicity of a new antineoplastic agent, a synthetic derivative of indenoisocholine: comparison daunorubicin in rabbits. *Arch. Toxicol.* **70**; 645-651

Gibson G.G. (2001): Introduction to drug metabolism. Nelson Thornes Publishers, Cheltenham, 3rd edition.

- Felsted R. a Bachur N.R. (1980): Mammalian carbonyl reductases. *Drug. Metab. Rev.* **11**; 1-60.
- Hermans J.J. a Thijssen H.H. (1993): Properties and stereoselectivity of carbonyl reductases involved in the ketone reduction of warfarin and analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**; 351-360.
- Hult M., Nobel C.S., Abrahmsen L., Nicoll-Griffith D.A., Jörnvall H. a Oppermann U.C. (2001): Novel enzymological profiles of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**; 805-14.
- Hyndman D., Bauman D.R., Heredia V.V. a Penning T.M. (2003): The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**; 621-631.
- Hyndman D. a Flynn T.G. (1999): The aldo-keto reductases and their role in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**; 427-434.
- Jazirehi A.R. a Bonavida B. (2005): Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene.* **24**; 2121-2143.
- Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M. and Penning T.M. (1997a): Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* **326**; 625-636.
- Jez J.M., Flynn T.G. a Penning T.M. (1997b): A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **54**; 639-647.
- Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J. a Ghosh D. (1995): Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**; 6003-6013.
- Kvasničková E. (1995): Xenobiochemie, Karolinum, Praha
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**; 680-685.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.j., Farr A.L. a Randall R.J. (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**; 265-275.

- Marhan J. (1995): Mutagenicity of cytostatic drugs in a bacterial system. I. Ames test. *Folia Microbiol.* **40**; 457-461
- Maser E. (1995): Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* **49**; 421-440.
- Maser E., Friebertshauser J. a Volker B (2003): Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**; 435-48.
- Maser E. a Oppermann U.C. (1997): Role of type-1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *Eur. J. Biochem.* **249**; 365-369.
- Matsunaga T., Shintani S. a Hara A. (2006): Multiplicity of mammalian reductases for Xenobiotic carbonyl compounds. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **21**; 1-18.
- Melka M. (1993): Oracin – preclinical summary report of the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry. Prague, Czech Republic.
- Miguet L., Lhang z., Barbier M. a Grigorov M.G. (2006): Comparison of a homology model and the crystallographic structure of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta HSD1) in a structure-based identification of inhibitors. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* (Epub ahead of print)
- Michalský J. (1992): International Patent Application. PCT/CS92/00026.
- Miko M., Poturnajová M. a Souček R. (2002): Cytotoxicity and mode of action of the potential cytostatic drug oracin. *Neoplasma* **49**; 167-171.
- Nordling E., Jörnvall H. a Persson B. (2002): Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modelling. *Eur. J. Biochem.* **269**; 4267-4276.
- Oppermann U.C., Filling C., Hult M., Shafquat N., Wu X., Linah M., Shafquat J., Nordling E., Kallberg Y., Persson B. a Jörnvall H. (2003): Short-chain dehydrogenase/reduktase (SDR): the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**; 247-53.

Oppermann U.C., Nagel G., Belai I., Bueld J.E., Genti-Raimondi S., Koolman J., Netter K.J. a Maser E. (1998): Carbonyl reduction of an anti-insect agent imidazole analogue of metyrapone in soil bacteria, invertebrate and vertebrate species. *Chem. Biol. Interact.* **114**; 211-224.

Penning T.M., Steckelbroeck S., Bauman D.R., Miller M.W., Jin Y., Peehl D.M., Fung K.M. a Lin H.K. (2006): Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: role in prostate disease and the development of specific inhibitors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **248**; 182-191.

Persson B., Zigler J.S. Jr a Jörnvall H. (1994): A super-family of mediumchain dehydrogenases/reduktases (MDR). Sub-lines including ζ -crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase, enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* **226**; 15-22.

Purohit A., Tutill H.J., Day J.M. Chander S.K., Lawrence H.R., Allan G.M., Fisher D.S., Vicker N., Newman S.P., Potter B.V.L. a Reed M.J. (2006): The regulation and inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **248**; 199-203.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. a Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**; 76-85.

Szotáková B., Skálová L., Wsól V. a Kvasničková E. (2000): Reduction of the potential anticancer drug oracin in the rat liver in vitro. *J. Pharmacol.* **52**; 495-500.

Szotáková B., Wsól V., Trejtnar F., Skálová L. a Kvasničková E. (1996): Studies on the metabolism of potential cytostatic drug oracin. Species differences. *Exp. Toxicol. Pathol.* **48** (suppl. II) ; 377-380.

Tomlinson J.W. (2005): 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human disease: a novel therapeutic target. *Minerva. Endocrinol.* **30**; 37-46.

Tomlinson J.W. a Stewart P.M. (2001): Cortisol metabolism and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **15**; 61-78.

Veselá J., Szotáková B. a Dršata J. (1997): Praktické cvičení z obecné chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha

Wermuth B. (1985): Aldo-keto reductases. *Prog. Clin. Biol. Res.* **174**; 209-230.

Wsól V., Kvasničková E., Szotáková B. a Heis I.M. (1996): High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of potential cytostatic drug oracin. *J. Chromatogr. B.* **681**; 169-175.

Wsól V., Skálová L., Szotáková B., Trejtnar F. a Kvasničková E. (1999): Sex differences in stereospecificity of oracin reductases in rat in vitro and in vivo. *Chirality* **11**; 505-509.

Wsól V., Szotáková B., Kvasničková E. a Fell A.F. (1998): High-performance liquid chromatography study of stereospecific microsomal enzymes catalysing the reduction of potential cytostatic drug, oracin. Interspecies comparison. *J. Chromatogr. A.* **797**; 197-201.

Wsól V., Szotáková B., Skálová L., Cepková H. a Kvasničková E. (2000): The main metabolic pathway of oracin, a new potential cytostatic drug, in human liver microsomes and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin. *Enantiomer* **5**; 263-270.

Wsól V., Szotáková B., Skálová L. a Maser E. (2003): Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**; 459-468.

Wsól V., Szotáková B., Skálová L. a Maser E. (2004): The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase typ 1. *Toxicology.* **197**; 253-261.

Internetové odkazy

Internet 1:

www.biotech.vt.edu/classes/bion_4784/9-ProteinPurification/ProteinPurification.html,
30.3.2006

Internet 2: http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_purification, Wikipedia, The free encyclopedia, 30.3.2006

Internet 3:

http://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/LabSep_EduC~AboutPurBiom, GE Healthcare, 30.3.2006:

Internet 4: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>, Experimental Biosciences, Inductory Laboratory Bios 221, 30.3.2006

Internet 5:

<http://www.davidson.edu/academic/biology/courses/Molbio/SDSPAGE/SDSPAGE.html>, 30.3.2006

Internet 6: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2a.html>, Experimental Biosciences, Inductory Laboratory Bios 221, 30.3.2006

Internet 7: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/denature.html>, Experimental Biosciences, Inductory Laboratory Bios 221, 30.3.2006

Internet 8: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2b.html> Experimental Biosciences, Inductory Laboratory Bios 221, 30.3.2006

Internet 9: <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>, Wikipedia , The free encyclopedia, 30.3.2006

Internet 10: <http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2B.asp>, 30.3.2006

Internet 11:

http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html#theory, 30.3.2006

Internet 12: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bca.html>, Experimental Biosciences, Inductory Laboratory Bios 221, 30.3.2006

Internet 13: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>, Experimental Biosciences, Inductory Laboratory Bios 221, 30.3.2006