



UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Sulfatované metabolity
silybinu a jejich interakce
se sulfatasami

Bakalářská práce

Obor: Biochemie

Vypracovala: Zuzana Ježková

Školitel: Ing. Lenka Weignerová, PhD.

Konzultant: RNDr. David Biedermann, PhD.

Praha, 2010

Bakalářská práce:

Sulfatované metabolity
silybinu a jejich interakce
se sulfatasami

Vypracováno na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd
České republiky, Centrum biokatalýzy a biotransformací.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Ing. Lenky Weignerové, PhD. a konzultanta RNDr. Davida Biedermanna, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Jsem si vědoma, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Mikrobiologický ústav AV ČR je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne

.....

podpis

Poděkování

Děkuji své školitelce Ing. Lence Weignerové, PhD. za vedení bakalářské práce, podporu a mnohé rady. Dále děkuji svým konzultantům RNDr. Davidu Biedermannovi, PhD. a Prof. RNDr. Karlovi Bezouškovi, DSc. za trpělivost, cenné podněty a připomínky. Děkuji všem pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR za ochotu a pomoc při práci na zadaném úkolu, především Bc. Daniele Gerstorferové a Ing. Kristýně Slámové. Mé díky patří i Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. za umožnění práce v tomto ústavu. Za měření a interpretaci NMR a MS spekter děkuji Ing. Petru Sedmerovi, CSc., Ing. Marku Kuzmovi, PhD. a Doc. Miroslavu Šulcovi, PhD.

Abstrakt

Bakalářská práce řeší problematiku syntetických sulfatovaných metabolitů silybinu při jejich interakcích se sulfatasami. Silybin je flavonolignan izolovaný ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Sulfáty silybinu (metabolity) nebyly z organismu dosud izolovány a jejich struktura nebyla tudíž přesně určena.

V této práci je uveden postup přípravy silybin-7,23-disulfátu, který byl syntetizován z přírodního silybinu. Disulfát silybinu byl izolován a spektrálně charakterizován (NMR, MS). Dále byly změřeny kinetické parametry reakce *p*NPS se sulfatasou z *Helix pomatia*: $K_m = 0,0494$ mmol/l a $V_{max} = 0,0325$ mmol/dm³/min. Podmínky pro práci se sulfatasou z *Helix pomatia* byly zvoleny v souladu s literaturou.

Jedním z hlavních cílů této práce bylo zjistit zda silybin-7,23-disulfát je substrátem či inhibitorem sulfatasy z *Helix pomatia*. Měřením aktivity sulfatasy z *Helix pomatia* v přítomnosti různých koncentrací silybin-7,23-disulfátu bylo zjištěno, že disulfát silybinu při koncentraci vyšší než 0,2 mM je silným inhibitorem testované sulfatasy.

Dále bylo provedeno několik reakcí kde silybin-7,23-disulfát byl použit ve vhodné koncentraci jako potenciální substrát pro sulfatasu z *Helix pomatia*. Reakce byly monitorovány metodou HPLC a bylo prokázáno, že sulfatasa z *Helix pomatia* štěpí silybin-7,23-disulfát (do koncentrace 0,2 mM). Z měření se předpokládá, že produkt vzniklý štěpením silybin-7,23-disulfát je silybin.

Abstract

This bachelor thesis solves the question of sulphated metabolites of silybin by their interactions with sulfatases. Silybin is flavonolignan prepared from the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*). Sulfate of silybin (metabolite) has not been isolated from organism so far thus its exact structure has not been determined.

In this work synthesis of silybin-7,23-disulfate from natural silybin is presented. Silybin disulfate was isolated and spectrally characterized (NMR, MS). In the next step the kinetics of the reaction *p*NPS with sulfatase from *Helix pomatia* was measured: $K_m = 0.0494$ mmol/l a $V_{max} = 0.0325$ mmol/dm³/min. Conditions for sulfatase reaction from *Helix pomatia* were selected according to literature.

One of the main goal was to determine, whether silybin-7,23-disulfate is a substrate and/or an inhibitor of sulfatase from *Helix pomatia*. Activity measurements of the sulfatase from *Helix pomatia* in the presence of various concentrations of silybin-7,23-disulfate enabled us to determine that silybin disulfate at concentration higher than 0.2 mM is a strong inhibitor of the sulfatase tested.

Series of reactions with sulfatase from *Helix pomatia* were performed to determine whether silybin-7,23-disulfate is a substrate. Reactions were monitored by HPLC and it was demonstrated that the sulfatases from *Helix pomatia* decomposes silybin-7,23-disulfate (to the concentration 0.2 mM). From measuring, we suppose, that the incurred product decomposed from silybin-7,23-disulfate is silybin.

Obsah	
Prohlášení	3
Poděkování	4
Abstrakt	5
Abstract	6
Obsah	7
Seznam zkratk	9
1. ÚVOD	10
1.1. Cíle práce	10
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1. Přírodní látky	11
2.1.1. Polyfenoly	11
2.1.2. Flavonoidy	11
2.1.3. Flavonolignany	12
2.1.4. Silybin	14
2.1.4.1. Metabolismus silybinu	14
2.1.4.2. Silybin a jeho biologické působení	15
2.2. Sulfatace	18
2.3. Sulfatasy	21
2.3.1. Funkce a výskyt sulfatas	21
2.3.2. Struktura sulfatas	21
2.3.3. Mechanismus působení sulfatas	22
2.3.4. Sulfatasa z <i>Helix pomatia</i>	23
2.3.5. Interakce arylsulfatasy z <i>Helix pomatia</i> se substrátem	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1. Chemikálie a materiály	25
3.2. Metodika a pracovní postupy	27
3.2.1. Přípravy silybin-7,23-disulfátu (17)	27
3.2.2. Kapalinová kolonová chromatografie	27
3.2.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	27

3.2.4. Lyofilizace	27
3.2.5. NMR	27
3.2.6. MS	28
3.2.7. HPLC	28
3.2.8. Stanovení enzymové aktivity	29
3.2.9. Stanovení vlivu silybin-7,23-disulfátu na aktivitu sulfatasy z <i>Helix pomatia</i>	29
3.2.10. Hydrolýza silybin-7,23-disulfátu (17) sulfatasou z <i>Helix pomatia</i>	30
3.2.11. Měření kinetiky kontinuálně	30
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1. Silybin-7,23-disulfát	31
4.1.1. Příprava silybin-7,23-disulfátu (17)	31
4.1.2. NMR	32
4.2. Sulfatasa z <i>Helix pomatia</i>	33
4.2.1. Stanovení enzymové aktivity	33
4.2.1.1. Kalibrační graf pNP-OH	33
4.2.2. Stanovení kinetických parametrů	34
4.2.3. Vliv silybin-7,23-disulfátu na aktivitu sulfatasy z <i>Helix pomatia</i>	36
4.2.4. Hydrolytické štěpení silybin-7,23-disulfátu sulfatasou z <i>Helix pomatia</i>	36
5. ZÁVĚR	39
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40

Seznam zkratek

ROS	reactive oxygen species
Py·SO ₃	pyridinium sulfát
DMF	<i>N,N</i> -dimethyl formamid
EtOH	ethanol
MeOH	methanol
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
CD	cirkulární dichroismus
MS	hmotnostní spektrofotometrie
RNA	ribonukleová kyselina
IUB-MB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
EC	Enzyme Commission
V _{max}	maximální rychlost
K _m	Michaelisova konstanta
m	hmotnost
M = mol/l, mM	jednotka molární koncentrace
<i>p</i> NPS	<i>p</i> -nitrofenylsulfát
<i>p</i> NP-OH	<i>p</i> -nitrofenol
λ	vlnová délka
ATP	adenosintrifosfát
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
TFA	kyselina trifluoroctová
DMSO	dimethylsulfoxid
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

1. ÚVOD

Léčivé rostliny byly používány v lidovém léčitelství již od starověku. Mezi nejdéle známé byliny patří ostropestřec mariánský. Pravděpodobně poprvé byl popsán ve spisech Theophrasta již ve 4. století před n. l., od té doby byly známy podpůrné účinky jeho semen při různých onemocnění jater, nebyly však známy látky, které tyto účinky způsobují.

V roce 1952 se Herzogovi a Hagedornovi⁶ podařilo zjistit, že aktivní složkou semen ostropestřce mariánského je komplexní skupina látek flavonoidní povahy, kterým byl dán název silymarin. Další studií bylo zjištěno, že silymarin obsahuje následující látky - silybin, silydianin, silychristin a isosilybin.

Dnes je ostropestřec mariánský jedna z nejrozsáhleji studovaných a dokumentovaných léčivých rostlin. Aktivní složky této rostliny se podařilo izolovat a je částečně znám mechanismus jejich účinku v lidském těle.

Tato bakalářská práce se zabývá zejména sulfáty silybinu, které jsou potenciální metabolity silybinu v savčím organismu. Předpokládá se, že sulfáty silybinu jsou štěpeny enzymy sulfatasami, produkty štěpení však nebyly dosud izolovány a spektrálně charakterizovány. Vzhledem k tomu, že sulfatasy se běžně využívají pro dekonjugaci při stanovení xenobiotik včetně silybinu, je důležité přesně určit, zda k této dekonjugaci dochází kvantitativně a zda dokonce tyto metabolity nemají na sulfatasy inhibiční účinky.

Sulfatasy byly několik let od svého objevu nedoceny. V 20. století byly sulfatasy objevovány v prokaryotech i eukaryotech, ale předpokládalo se, že působí pouze při rozkladu organického síranu v půdě. Až v roce 1960 začaly být známy jejich biologické funkce. Dnes již je řada sulfatas identifikována, ale jejich biologická aktivita je stále předmětem mnoha výzkumů.

1.1. Cíle práce

- ✓ Připravit a izolovat sulfát silybinu.
- ✓ Stanovení kinetických parametrů sulfatasy z *Helix pomatia* a jejich porovnání s publikovanými daty.
- ✓ Zjistit, zda sulfát silybinu je substrátem a/nebo inhibitorem sulfatas.
- ✓ Provést reakce sulfátu silybinu se sulfatasami (zejména sulfatasou z *Helix pomatia*) a proměřit kinetické parametry reakce.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Přírodní látky

Bohatým zdrojem přírodních látek jsou vyšší rostliny, které mají velké využití v medicíně, kosmetice a potravinářství. Známých přírodních produktů je přibližně 30 000. Více než 80 % z nich je rostlinného původu a asi 30 % vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty.¹

Významnou léčivou rostlinou je také ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*). Jeho semena jsou v lidovém léčitelství využívána již od starověku k léčbě jaterních onemocnění (hepatitida, cirhóza) a žlučových problémů (žlučové kameny). Chrání játra před působením průmyslových a přírodních toxinů, včetně uštknutí hadem, bodnutí hmyzem, otravou z hub a alkoholu.²

2.1.1. Polyfenoly

Významnou skupinou chemických látek obsažených v rostlinách jsou polyfenoly. Je pro ně charakteristická přítomnost více než jedné fenolové jednotky v molekule. Mezi nejběžnější rostlinné polyfenoly se řadí flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany.³

2.1.2. Flavonoidy

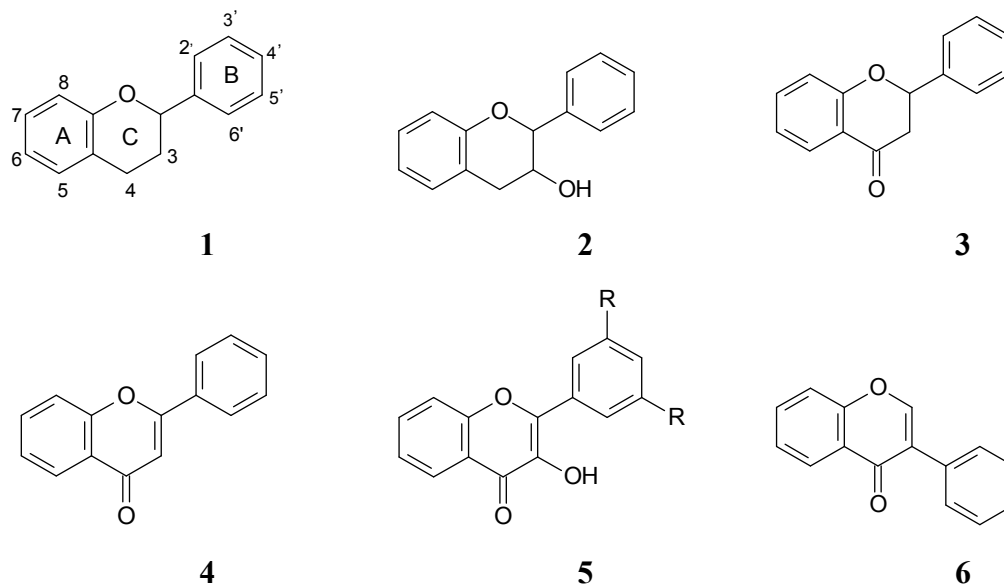
Flavonoidy jsou chemické sloučeniny patřící do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů,⁴ sekundárních rostlinných metabolitů. Základní strukturou flavonoidů je flavan (**1**) tvořený dvěma substituovanými benzenovými kruhy A, B a pyranovým kruhem C kondenzovaným s kruhem A. Flavonoidy se dělí podle stupně oxidace pyranového kruhu do těchto skupin - flavany, flavanoly (**2**), flavanony (**3**), flavony (**4**), flavonoly (**5**), anthokyanidiny, biflavonoidy, neoflavony (kumariny) a jejich isoderiváty (isoflavony (**6**)) (viz. Obr.1).⁴

V přírodních zdrojích se flavonoidy často vyskytují jako konjugáty, především se sacharidy a organickými kyselinami.⁵ Jsou přítomny v plodech, listech a květech mnoha rostlin. Významnými zdroji flavonoidů jsou čaj, červené víno, různé druhy ovoce (jablka, třešně, citrusy), zeleniny (cibule, kapusta, brokolice) a koření (pepř, šalvěj).^{4,5}

Většina flavonoidů působí jako antioxidanty neboli vychytávače ROS ($\cdot\text{OH}$ hydroxylový radikál, $\text{O}_2^{\cdot-}$ superoxidový anionradikál, HO_2^{\cdot} hydroperoxidový radikál) a jiných reaktivních radikálů (RS^{\cdot} thiyil radikál).⁵ Flavonoidy podílející se na deaktivaci vzniklých radikálů zabraňují poškození bílkovin, lipidů a nukleových kyselin, s kterými

radikály reagují a tím mění jejich biologickou funkci. Pro antioxidační aktivitu je důležitá hlavně poloha skupin -OH a -OCH₃, nikoliv jejich počet.

Vedle přímého antioxidačního účinku ovlivňují flavonoidy tvorbu radikálů i nepřímo. Aktivují nebo deaktivují antioxidační enzymy, které se podílí na vzniku různých radikálů a ovlivňují signální kinázy v buňce. Působí jako ochrana proti kardiovaskulárním nemocem, mají protizánětlivý účinek, protinádorovou aktivitu a jsou důležitými antivirovými látkami.⁴



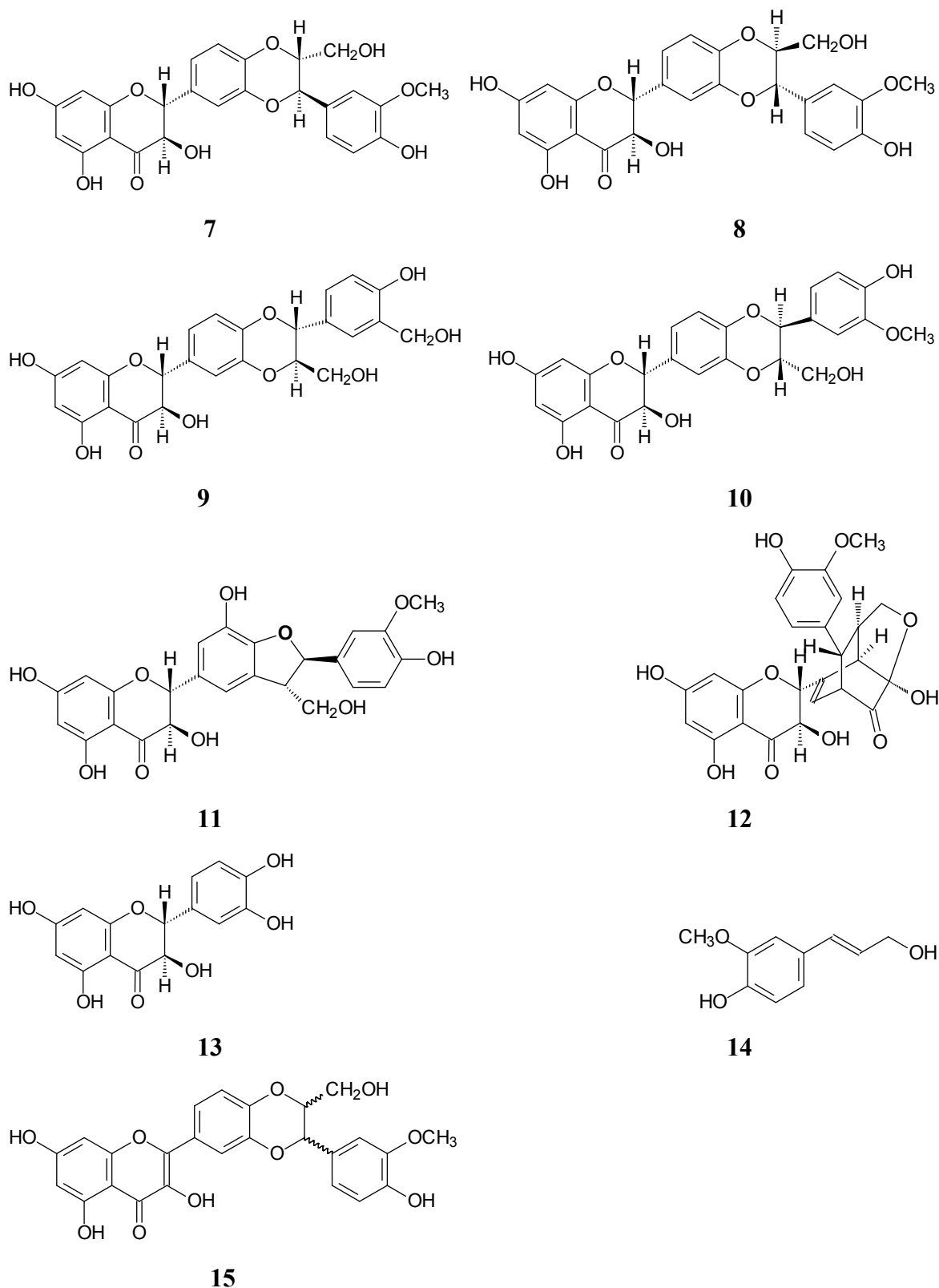
Obr. 1: Strukturální vzorce některých skupin flavonoidů

- 1 – flavan - základní struktura flavonoidů, 2 – flavanol, 3 – flavanon, 4 – flavon
5 – flavonol, 6 - isoflavon

2.1.3. Flavonolignany

Ze semen ostropestřce mariánského byl extrahován silymarin.⁶ Silymarin je standardizovaný extrakt obsahující 70 - 80% silymarinových flavonolignanů a 20 - 30% chemicky nedefinovaných frakcí obsahujících především polymerní a oxidované polyfenolické látky.² Silymarinové flavonolignany obsažené v ostropestřci mariánském jsou silybin A (7), silybin B (8), isosilybin A (9) a isosilybin B (10), silychristin (11) a silydianin (12).¹ Všechny tyto látky se skládají z flavanonu taxifolinu (13) (dihydrokvercetin) k němuž je v průběhu biosyntézy oxidativní radikálovou adicí připojena molekula koniferilalkoholu (14).⁶ Tato skupina flavonoidů nese skupinový název flavonolignany. Silymarin dále obsahuje flavonoidy 2,3-dehydrosilybin (15), 2,3-dehydrosilychristin, taxifolin a další neidentifikované polymerní fenolické sloučeniny.⁷

Struktury výše zmíněných sloučenin jsou uvedeny na obrázku 2.



Obr. 2: Struktury flavonoidů vyskytujících se v ostropestřci mariánském

7 – silybin A, 8 – silybin B, 9 – isosilybin A, 10 – isosilybin, 11 – silychristin,
12 – silydianin, 13 – taxifolin, 14 – koniferilalkohol, 15 – 2,3-dehydrosilybin,

2.1.4. Silybin

Flavonolignan silybin (**16**) je hlavní biologicky aktivní složkou extraktu semen ostropestřce mariánského (silymarinu).⁷ Semena obsahují 25 % tuku a proto je nutné při izolaci silybinu nejdříve provést odtučnění lisováním zhruba na 8 %. Potom následuje extrakce semen acetonem. Extrakt se částečně odpaří a zbývající tuk se odstraní extrakcí s hexanem. Surový silybin se připraví rekrystalizací silymarinu z etanolu s přídavkem 10 % vody. Takto získaný silybin se dále přečišťuje rekrystalizací z ethanolu.²

Silybin je směsí dvou diastereomerů **7** (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(*R*)-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(*R*)-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-onu) a **8** (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(*S*)-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(*S*)-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-onu) přibližně v poměru 1:1.⁸ Jednotlivé stereomery mají různé vlastnosti a dělí se pomocí preparativní HPLC.⁶ Jejich struktura a absolutní konfigurace byla určena pomocí metod spektrální analýzy (CD, NMR) a X-ray krystalografie.⁸

2.1.4.1. Metabolismus silybinu

Po perorálním podání silybinu se v nativní formě vyskytuje v krvi jen v nízké koncentraci.⁹ Silybin se nepříliš dobře vstřebává z trávicí soustavy vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě, vylučuje se převážně žlučí a v menší míře i ledvinami především v konjugované formě.^{1,9} Vlivem zpětné resorpce z tlustého střeva se silybin zadržuje v enterohepatálním oběhu a tím je podmíněn jeho hepatoprotektivní účinek.¹

Silybin v metabolismu podléhá první a druhé fázi biotransformace. Je převážně metabolizován konjugací – sulfatací a glukuronizací. Studie na lidských dobrovolnících, kterým byl orálně podán silybin prokázala, že pouze 10 % z celkového množství podaného silybinu je přítomno v plazmě v nekonjugované formě a většina silybinu je v systémové cirkulaci ve formě konjugátů se sulfátem a glukuronátem. Známé metabolity silybinu v lidském organismu jsou: silybin monoglukoronid, silybin diglukoronid, silybin monosulfát, silybin glukuronid sulfát, *O*-demethyl silybin glukuronid a silybin triglukuronid (dosud bez přesného určení místa konjugace).¹⁰ Struktury sulfatovaných metabolitů však nebyly ještě popsány.

2.1.4.2. Silybin a jeho biologické působení

Silybin je mj. i díky své nízké rozpustnosti (uvádí se cca 0,5 g / l vody) považován za bezpečnou látku. Zatím není prokázáno mnoho negativních účinků bylinných přípravků z ostropestřce mariánského. Známymi negativními účinky jsou bolesti hlavy a dermatologické problémy.² Silybin je látka s dobrou snášenlivostí, nebyla pozorována interakce s jinými léčivy.¹¹

Silybin se používá jako terapeutikum a hepatoprotektikum při cirrhose, chronické hepatitidě, alkoholismu a po intoxikacích,⁵ dále při léčbě gastrointestinálního traktu, pankreatu, vyrovnávání glykemie, jako prevence kožních problémů, onemocnění prostaty a v neposlední řadě se využívá v dermatologii a kosmetice.^{7,2}

Mechanismus účinku silybinu je kombinovaný, má hepatoprotektivní, cytoprotektivní, antikarcinogenní, antioxidační a antifibrotickou aktivitu, antitoxický účinek a stimulující účinek při proteosyntéze.^{5,12}

Dříve byl znám hlavně pozitivní účinek silybinu na játra a antioxidační účinek. Až v posledních deseti letech začaly být objevovány i jeho další (výše vyjmenované) účinky. Tyto objevy byly vázány na pokrok v chemii a farmakologii silybinu, zejména na separaci obou diastereomerů a určení jejich struktury.⁷

Hepatoprotektivní účinek silybinu se projevuje ochranou a stabilizací buněčných a mitochondriálních membrán. Silybin při interakci s membránou buňky mění její fyzikálně-chemické vlastnosti a udržuje příjem vody a transport draselných iontů v buňce na fyziologické úrovni.¹¹

Silybin je díky své polyfenolické struktuře silným antioxidantem, funguje jako akceptor kyslíku a radikálů trichlormethanu (metabolit trichlormethanu vytvořený v buňkách jater).¹³ Antioxidační aktivita především v membránách a lipidových kompartmentech, stabilizuje a zvyšuje redukční kapacitu krve.⁵ Dále pak dává silybinu schopnost vychytávat volné radikály za tvorby metabolických produktů s nízkou aktivitou¹¹ a inhibovat lipidovou peroxidaci.¹ Peroxidace lipidů poškozuje buněčnou membránu a narušuje metabolické procesy. Silybin inhibuje peroxidaci mastných kyselin např. kyseliny linolové a tím i následující změny lipidové membrány.¹¹

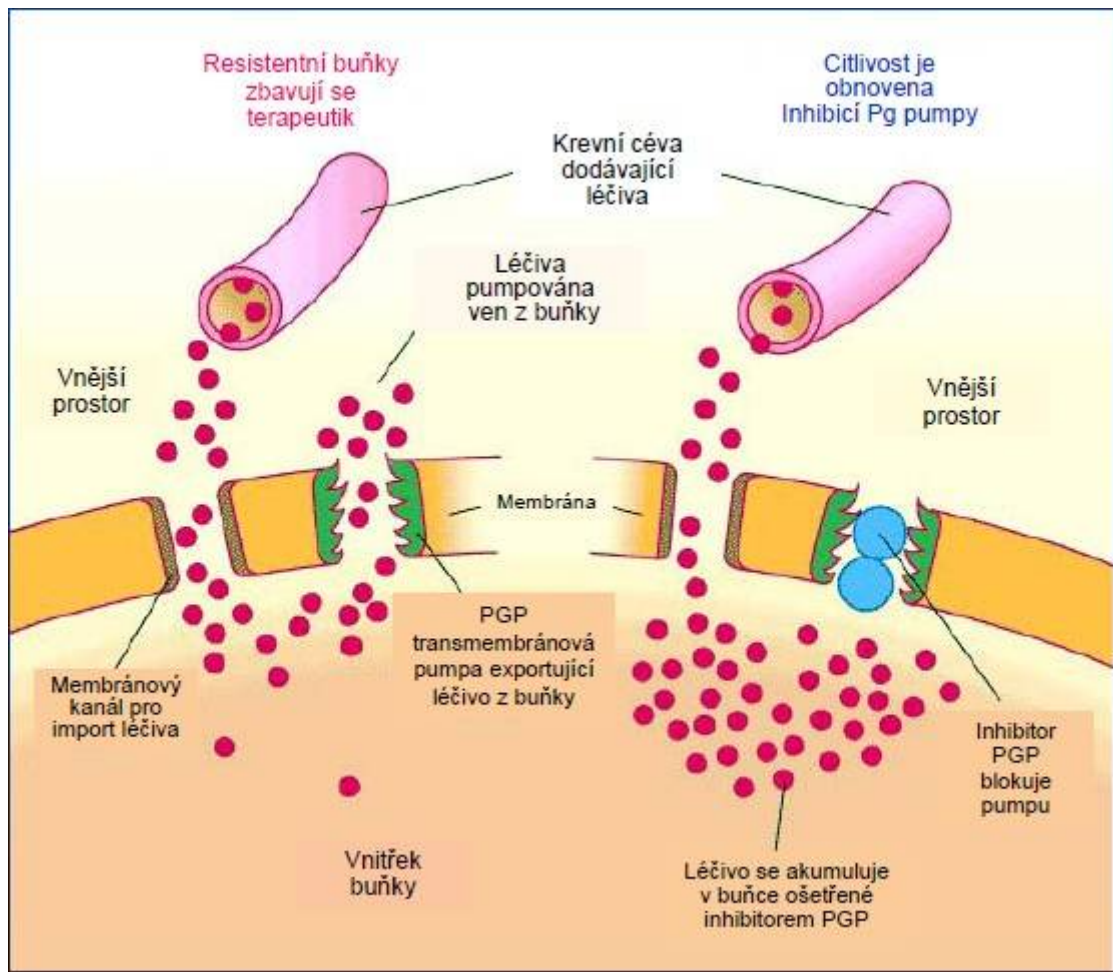
Silybin má významný účinek při proteosyntéze. Zvyšuje aktivitu RNA polymerázy I v jádře, zvyšuje rychlost transkripce a zrychluje syntézy ribozomální RNA, tím násobí množství ribozomů v buňkách a dochází ke zvýšení syntézy proteinů.¹¹ Nově byly

objeveny protizánětlivé účinky, kdy silybin snižuje syntézu leukotrienů nekompetitivní inhibicí lipoxygenasy.⁵

Silybin také působí na receptorové úrovni, ovlivňuje procesy karcinogeneze a nádorového bujení. Tlumí různé mitogenní, signalizační, apoptické regulátory a regulátory buněčného cyklu.¹²

PSA (prostatický specifický antigen) je důležitý androgenně regulovaný gen zdravých a rakovinových prostatických buněk, který slouží pro diagnózu a léčbu rakoviny prostaty. Silybin snižuje intracelulární a sekretovaný PSA v séru a dochází ke zpomalení buněčného růstu zastavením G1 fáze buněčného cyklu a smrti pokročilých, androgen-independentních buněk rakoviny prostaty.⁹ Nově byl objeven účinek silybinu např. na regulaci buněčného cyklu, apoptózy, jaderných a estrogenních receptorů.¹²

Deriváty silybinu způsobují inhibici P-glykoproteinů (PGP). PGP je ATP-dependentní transmembránová pumpa, která je schopná transportovat velkou škálu substancí (léků) přes membránu ven z buňky. Vysoká koncentrace (exprese) tohoto proteinu je odpovědná za rezistenci nádorových buněk k chemoterapii.⁵ Na obrázku 3. je znázorněn mechanismus působení neinhibovaného a inhibovaného PGP.

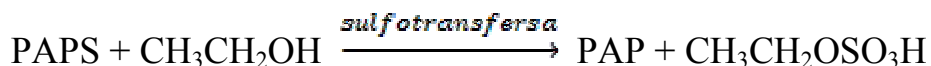


Obr. 3.: Znáznorňuje průběh cesty léčiva přes buněčnou membránu buněk s neinhibovaným PGP a s inhibovaným PGP.⁵

2.2. Sulfatace

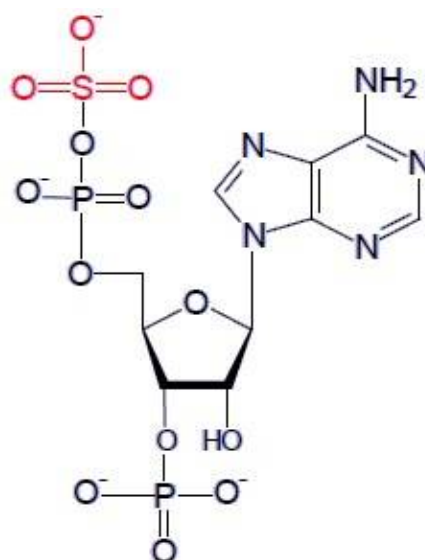
Po vstupu xenobiotika (léky, kontaminanty, konzervační činidla) do organismu dochází k biotransformaci a k přeměně lipofilní látky na látku hydrofilní. Biotransformace probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází k vzniku polárnějšího produktu zavedením nebo odkrytím skupin schopných konjugační reakce. V druhé fázi dochází ke konjugaci s velmi polárním a snadno disociovatelným zbytkem za vzniku konjugátu, který lze snadno vyloučit z organismu. Při těchto reakcích dochází ke vzniku metabolitu s pozměněnou nebo odlišnou biologickou aktivitou. Zkoumání mechanismů reakcí je důležité pro zjištění účinků studovaných léčiv. Jednou z hlavních konjugačních reakcí je sulfatace.⁵

Sulfatace byla poprvé objevena v roce 1876 Eugem Baumannem¹⁴, který izoloval a charakterizoval fenolsulfát z moči pacienta, kterému podal fenol jako antiseptikum. Hlavní funkcí sulfatace je modulace biologické aktivity širokého počtu endogenních a cizích chemických látek, včetně drog, toxických chemikálií, hormonů a neurotransmiterů. Proces sulfatace je katalyzován enzymy rodiny sulfotransferas.¹⁴ Sulfotransferasy se dělí podle své substrátové specifity na arylsulfotransferasy, hydroxysteroid sulfotransferasy a ester sulfotransferasy.⁵ Tyto enzymy přenášejí sulfátovou skupinu z kofaktoru 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na vhodný substrát (hydroxyl, aminokyselinu).¹⁵ Příkladem je sulfátová konjugace s alkoholem (viz. obrázek 4.).



Obr. 4.: Sulfátová konjugace s alkoholem

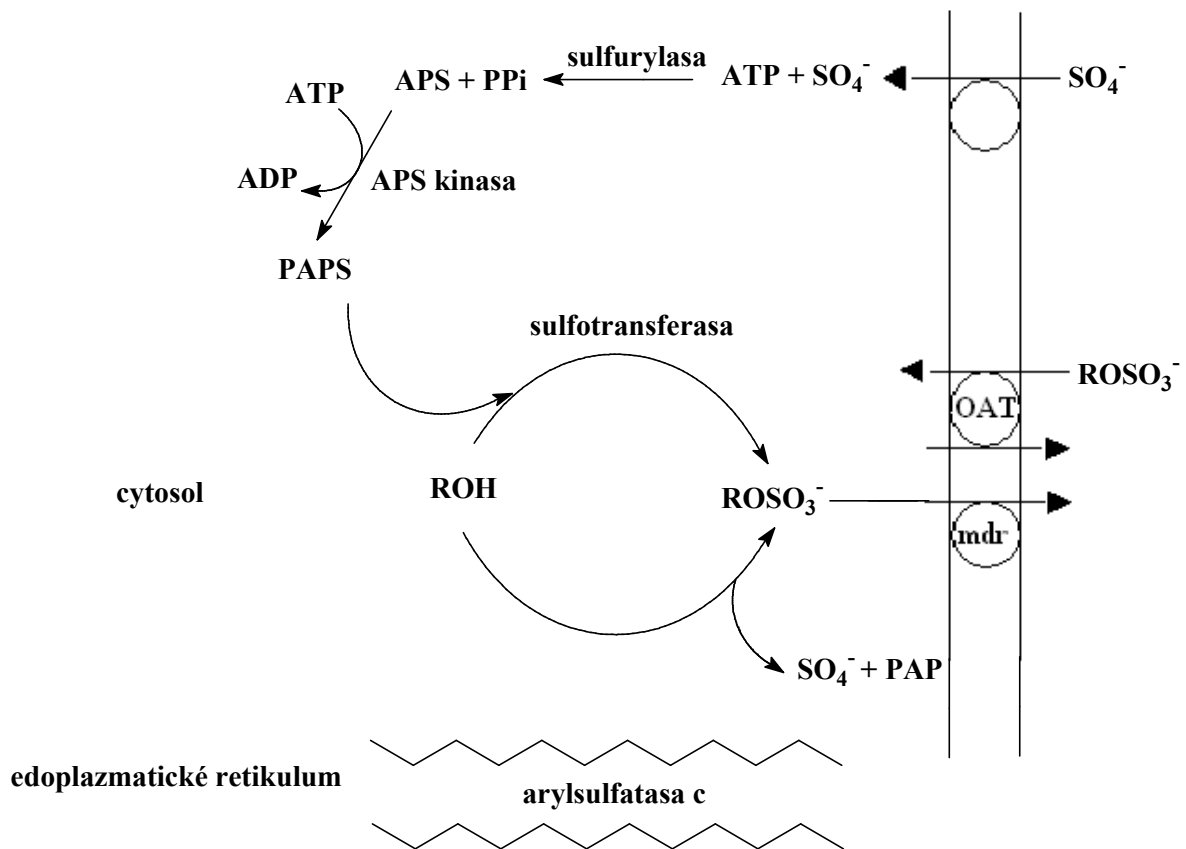
PAPS je tvořen v buněčném cytosolu dvoustupňovou reakcí za účasti 2 molekul ATP a anorganického sulfátu,⁵ pomocí jediného bifunkčního enzymu.¹⁴ Jeho vzorec je znázorněn na obrázku 5.



Obr. 5.: Struktura molekuly 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu⁵

Sulfatační systém se nachází zejména v cytosolu, ale zahrnuje i interakce s arylsulfatasami v endoplazmatickém retikulu a dopravními molekulami v plazmatické membráně. Mezi dopravní molekuly se řadí organická kyselá transportní molekula (OAT) a multirezistentní protein (mdr).¹⁴ Jsou to specifictí přenašeči, přes které do buňky a z buňky přecházejí sulfát konjugáty.¹⁴ Konjugáty jsou ionizovány a snadno se vylučují.⁵

Sulfotransferasy se podílejí na metabolismu a detoxikaci mnoha léků, cizorodých chemických látek a na bioakumulaci mnoha environmentálních prokarcinogenů.¹⁴ U lidského plodu jsou sulfotransferasy důležité v obranném mechanismu. Lidský plod produkuje velké množství síranů a jiné metabolické cesty než sulfatace v embryonálním stádiu nejsou zcela vyvinuty nebo úplně chybí. Jednotlivé kroky sulfatace jsou shrnuty v obrázku 6.¹⁴



Obr. 6.: Schéma popisuje interakci mezi různými faktory, které ovlivňují tvorbu a transport sulfát esterů z celé buňky.¹⁴

2.3. Sulfatasy

Zařazení sulfatas do systému

Sulfatázy¹⁶ jsou skupinou enzymů, která se podle enzymové nomenklatury IUB-MB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) řadí mezi:

- 3.-.- hydrolasy
- 3.1.- esterasy
- 3.1.6 sulfatasy
- 3.1.6.1. arylsulfatasa z *Helix pomatia*

2.3.1. Funkce a výskyt sulfatas

Sulfatasy katalyzují hydrolytické štěpení sulfát esterů, včetně hydrofobních glukosinolátů, steroidů, proteoglykanů, glykolipidů a ve vodě rozpustných mono- a disacharidů sulfátu.

O sulfatasy byl poprvé projevem větší zájem až v roce 1960, kdy bylo zjištěno, že nedostatek sulfatas vede k mnoha dědičným lysozomálním poruchám, do té doby byla věnována pozornost hlavně sulfotransferasám. Později bylo zjištěno, že malé množství sulfatas způsobuje mimo jiné leukodistrofii, Huntrovu chorobu, poruchy tvorby chrupavek a také vzácné autozomální recesivní onemocnění známé jako vícenásobný sulfatasový deficit způsobující snížení aktivity u všech sulfatas.¹⁷

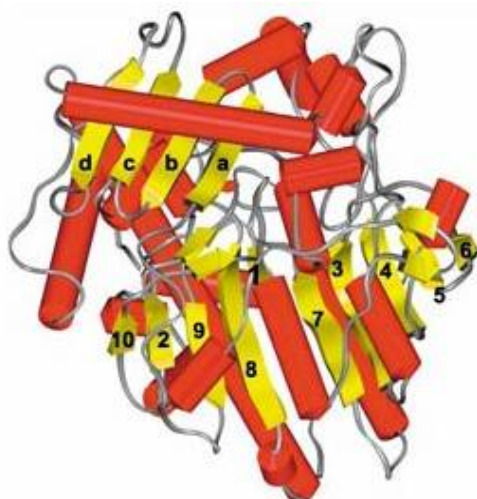
Sulfatasy jsou důležitou součástí mnoha procesů probíhajících v organismu. Jejich přítomnost je nepostradatelná v hormonální regulaci, modulaci signálních drah, interkalaci gamet, v rozvoji kostí a chrupavek a v lysozomech při hydrolytické degradaci zplodin buňky.¹⁷ Sulfatasy zejména arylsulfatasy hrají klíčovou roli v regulaci sulfatace, mají schopnost změnit proces sulfatace v buňkách a tím ovlivnit celou síť sulfatačních reakcí.¹⁴

Sulfatasy byly nalezeny u prokaryot v cytoplasmě, periplasmatických a extracelulárních prostorech a u eukaryot v endoplasmatickém retikulu, Golgiho komplexu, lysozomech a extracelulárních prostorech.¹⁷

2.3.2. Struktura sulfatas

Struktura sulfatas byla zjištěna metodou X-ray.¹⁷ Všechny sulfatasy mají velmi podobnou trojrozměrnou strukturu (Obr.7.) i přes jejich širokou substrátovou specifitu a různý rozsah pH optima jejich působení. Jsou si podobné ve třech bodech: 1) 20 – 60 % sekvence je shodných po celé délce proteinu, 2) N-konec proteinu obsahuje shodné motivy,

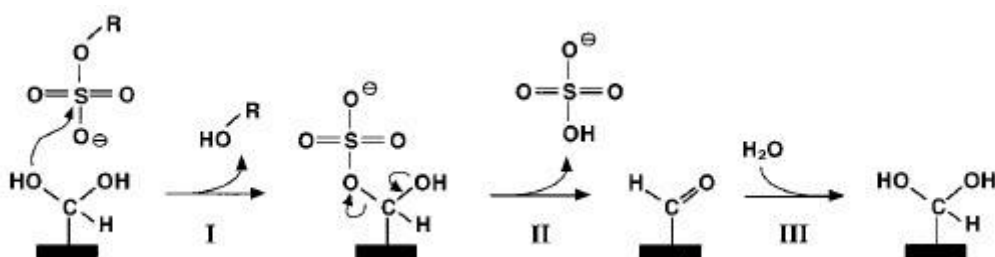
3) aktivním místem enzymu je aldehydová skupina formylglycinu (FGly = 2-amino-3-oxopropanová kyselina). Délka sekvence sulfatas u prokaryot a eukaryot je 500 až 600 aminokyselin a u lidských sulfatas až 800 aminokyselin.¹⁷



Obr. 7.: Model sulfatasy z gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (červené válce α -helixy, žluté šipky β -listy tvořená standardně velkými β -listy s N-koncovou oblastí (číslované 1-10) a malými β -listy s C-koncovou oblastí).¹⁷

2.3.3. Mechanismus působení sulfatas

Geminální OH skupiny hydratovaného aldehydu v aktivním místě enzymu (FGly) atakuje atom síry, což vede k transesterifikaci sulfátové skupiny na aldehyd za vzniku komplexu enzym-sulfát a současně k uvolnění produktu ve formě alkoholu. Dalším krokem je intramolekulární přeskupení komplexu enzym-sulfát indukované druhým geminálním kyslíkem aldehydu. Dojde k „intramolekulární hydrolyze“, odštěpení sulfátu a následné regeneraci aldehydové skupiny (Obr.8).¹⁸



Obr. 8.: Mechanismus hydrolytického štěpení sulfát esteru sulfatasou¹⁸

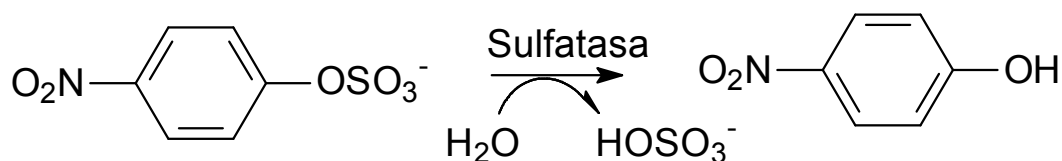
2.3.4. Sulfatasa z *Helix pomatia*

Helix pomatia je plž hlemýžď zahradní, který byl popsán v roce 1758 Linnaeusem.¹⁹ Vyskytuje se v mnoha státech Evropy. Ulitu má krémově bílou až světle hnědou s často se vyskytujícími světle hnědými pruhy. Dorůstá do velikosti 30-45 x 30-50 mm. Vajíčka klade v červnu a červenci po 40-65 kusech o velikosti 5,5-6,5 mm. Nový jedinci se líhnou za 3-4 týdny. Vyskytují se převážně v lesích, zahradách, vinicích a podél řek, v blízkosti půdy s vysokým obsahem vápníku. Dožívají se maximálně 35 let.²⁰

Z trávicí šťávy *Helix pomatia* byly izolovány arylsulfatasy EC 3.1.6.1. Arylsulfatasy se dělí do dvou typů. Do I. typu se řadí jednoduché arylsulfatasy jejichž (kolorimetrickým) substrátem je *p*-nitrofenylsulfát a *p*-acetylphenylsulfát. Jsou inhibovány kyanidy, ale ne fosfáty a fluoridy. Naproti tomu II. typ arylsulfatas má nejvyšší afinitu vůči složitějším arylsulfátům např. substrátem je 2-hydroxy-5-nitrofenyl sulfát. Tyto enzymy jsou silně inhibovány fosfáty a fluoridy, ale nejsou inhibovány kyanidy. Na základě těchto skutečností je arylsulfatasa z *Helix pomatia* klasifikovaná jako typ enzymu II.²¹

2.3.5. Interakce arylsulfatasy z *Helix pomatia* se substrátem

Pro arylsulfatasy z *Helix pomatia* je častým používaným substrátem *p*NPS. Při reakci sulfátu s enzymem dochází k rozštěpení vazby síra-kyslík a k přenosu sulfátové skupiny ze substrátu na enzym (Obr. 9.). Reakce probíhá za tvorby meziprojektu, kterým je komplex enzym-sulfát. Konečným produktem reakce je *p*-nitrofenol.²²

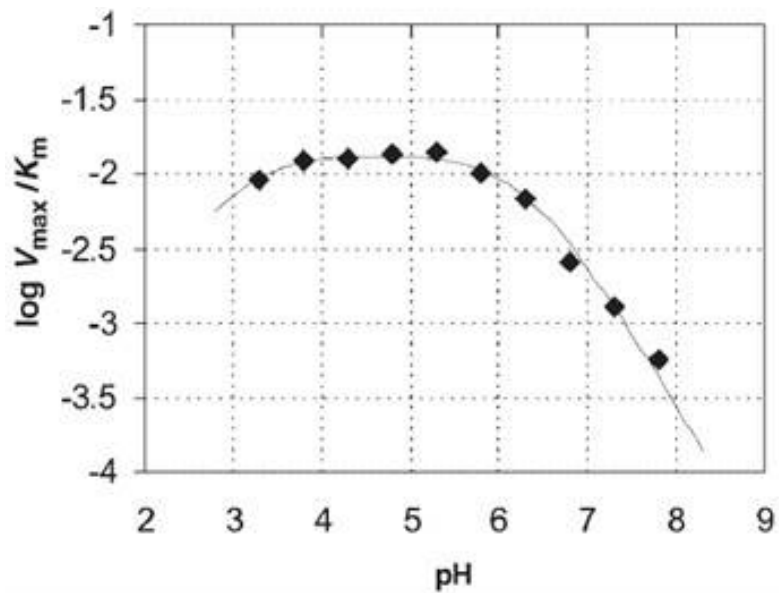


Obr. 9.: Hydrolytické štěpení *p*NPS sulfatasou z *Helix pomatia*

Tato bakalářská práce vycházela z výsledků uvedených v článku autorů Gibby *et al.*²², kde byla prezentována závislost V_{\max}/K_m na pH pro arylsulfatasu z *Helix pomatia* reagující s *p*NPS (Obr. 10.).

Stanovení pH optima bylo prováděno při teplotě 25°C, v rozmezí pH od 3,3 do 9,8 v přítomnosti pufrů o složení 0,05 M Tris, 0,05 M Bis-Tris, 0,2 M acetátový pufr a o koncentrace pNPS pohybující se od 0,01 mM do 4,0 mM.

Optimální pH reakce arylsulfatasy z *Helix pomatia* s pNPS je slabě kyselé v rozmezí 4 až 5. Při pH nižší než 3,3 není již arylsulfatasa z *Helix pomatia* aktivní.²²



Obr.10.: pH optimum arylsulfatasy z *Helix pomatia*²²

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie a materiály

Chemikálie

silybin (*Teva Galena, Opava*), draselná sůl *p*NPS (*Sigma*), *p*NP-OH (*Sigma*), $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$, DMSO, DMF, EtOH, MeOH, CH_2Cl_2 , destilovaná voda, TFA, CH_3COOH , $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , dusík

Všechny chemikálie byly použity v p.a. čistotě.

Pufry

Acetátový pufr: 0,1 M (0,2 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ / 0,2 M CH_3COOH), pH 5,0

Chromatografické materiály

silikagel 60 (40 – 60 μm) – *Merck*, TLC silikagel 60 F₂₅₄ – *Merck*

Enzymy

Sulfatasa z *Helix pomatia* Typ H-1 (EC 3.1.6.1.) – *Sigma*

Přístroje

Analytické váhy Precisa 80A-200M – *Precisa, CH*

Automatické pipety Eppendorf – *Eppendorf, DE*

Magnetická míchačka MM 2A – *Laboratorní přístroje Praha, CZ*

Vortex IKA-VERK VF 2 - *Janke&Kunkel, DE*

UV lampa – *Krüss Optronict, DE*

Lyovac GT2 – *Leybold, CH*

Mikrocentrifuga Mini Spin Plus – *Eppendorf, DE*

Odparka Laborota 4001 efficient – *Heidolph, DE*

Thermomixer Compact – *Eppendorf, DE*

Spektrofotometr - Shimadzu UVmini – 1240 - *Shimadzu, JP*

Spektrofotometr Shimadzu UV – 1700 - *Shimadzu, JP*

Aparatura na kapalinovou kolonovou chromatografii

HPLC chromatograf - Spectra-Physics - *Santa Clara, CAN*: binární pumpa SP8800, ventil s 20 μ l dávkovací smyčkou, skenovacím UV-VIS detektorem - Spectra Focus - *Santa Clara, CAN*, autosamplerem SP 8880, Spectra system softwer, monolitická kolona Chromolith SpeedROD, RP-18e, 50x4,6 mm *Merck, Darmstadt, DE*

3.2. Metodika a pracovní postupy

3.2.1. Syntéza silybin-7,23-disulfátu (17)

16 (200 mg, 0,426 mmol) byl rozpuštěn v 2 ml DMF. Ke směsi byl přidán $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ (200 mg, 1,257 mmol). Reakce probíhala po dobu 1 hodiny za stálého míchání při teplotě 40°C. Vznik látky **17** byl monitorován pomocí TLC (EtOH / MeOH / CH_2Cl_2 / destilovaná voda (2:1:9:0,3)). TLC viz. obrázek 11. Po ukončení reakce byly ke směsi přidány 2 ml EtOH. Směs byla dělena sloupcovou chromatografií na silikagelu. Frakce obsahující produkt byly odpařeny na odparce při teplotě 40°C. Po lyofilizaci byla získána látka **17** o hmotnosti 160 mg (60 %). NMR: viz. kapitola 4.1.2.

MS (MALDI-TOF): m/z (%) = 643 (17, $\text{M}^+ + \text{H}$), 561 (32), 547 (36), 545 (100), 481 (25), 465 (69).

3.2.2. Kapalinová kolonová chromatografie

Separční metoda, při které dochází k dělení složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Mobilní fází byla směs EtOH / MeOH / CH_2Cl_2 / destilovaná voda (2:1:9:0,3) a stacionární fází byl silikagel. Vzorek byl nanesen na začátek stacionární fáze a eluován mobilní fází. Byly jímány frakce o objemu 5 ml.

3.2.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Separace je založena na rozdělení vzorku, ke kterému dochází vyvíjením rozpuštěných látek ve směsi rozpouštědel (mobilní fáze) tenkou vrstvou (stacionární fáze). Stacionární fází byl silikagel nanesený na hliníkové folii a mobilní fází byla směs EtOH / MeOH / CH_2Cl_2 / destilovaná voda (2:1:9:0,3). Sulfáty silybinu byly detekovány pod UV v prostředí jodových par.

3.2.4. Lyofilizace

Lyofilizace byla prováděna na přístroji Lyovac GT2 (Leybold) po dobu 24 hodin.

3.2.5. NMR

NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker AVANCE III 400 (pozorovací frekvence 400.13 MHz pro ^1H , 100.62 MHz pro ^{13}C) v $\text{DMSO}-d_6$ (Sigma Aldrich) při 30°C. Jako vnitřní standard sloužil zbytkový signál rozpouštědla (δ_{H} 2.500, δ_{C} 39.60). Chemické posuny a interakční konstanty v ^1H NMR spektrech byly odečítány ze spekter

získaných doplněním dat o dvojnásobný počet bodů paměti a před Fourierovou transformací vynásobených vážící funkcí zvyšující rozlišení (exponenciála se záporným exponentem plus Gaussova funkce). U ^{13}C NMR spekter bylo naopak použito umělé rozšíření čar (1 Hz) kvůli zvýšení poměru signál/šum. Chemické posuny jsou uváděny v δ -stupnici (ppm), interakční konstanty v Hz. Použité digitální rozlišení opravňuje k udávání chemických posunů protonů s platností na tři, uhlíků na dvě a proton-protonových interakčních konstant na jedno desetinné místo. Multiplicita uhlíkových signálů způsobovaná přímo vázanými protony byla určena z proton-editovaných HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) spekter. Přiřazení signálů se opírá o dvojrozměrné NMR experimenty – COSY (**C**orrelation **S**pectroscopy), HSQC a HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation), které byly provedeny pomocí standardních programů dodávaných výrobcem (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, SRN).

NMR spektra měřili Ing. Petr Sedmera, CSc. a Ing. Marek Kuzma, PhD. z MBÚ AV ČR, v.v.i.

3.2.6. MS

MS spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru BIFLEX II (*Bruker-Franzen, Brémy, Německo*) s desorpčí a ionizací laserem za přítomnosti matrice MALDI-TOF MS, jako MALDI matrice byla použita kyselina α -kyano-4-hydroxysořicová (10 mg/ml v 50 % acetonitrilu / 0,2 % TFA). Spektra byla měřena v hmotnostním rozsahu m/z 0-2500 Da. Spektrometr byl kalibrován externě pomocí $[\text{M}+\text{H}]^+$ iontů MALDI matrice ($m/z = 190,1$ Da) a peptidového standardu bombesinu ($m/z = 1619,8$ Da). NMR spektra měřil Doc. Miroslav Šulc, PhD. z MBÚ AV ČR, v.v.i.

3.2.7. HPLC

Separační metoda, při které dochází k dělení složek vzorku za vysokého tlaku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Mobilní fází je kapalina a stacionární fází je kapalná látka zakotvená na povrchu nosiče nebo pevný sorbent.

Pro měření byla použita monolitická RP kolona s C18 stacionární fází (Chromolith SpeedROD RP-18e 50 × 4.6 mm). Separace probíhala v gradientovém modulu (Tab. 1) s použitím mobilních fází: mobilní fází A (5 % MeOH s 0,1 % TFA) a mobilní fází B (100 % MeOH, 0,1 % TFA). Nástřik vzorku byl 20 μl a průtoková rychlost 1 ml/min.

krok	čas (min)	Fáze A (%)	Fáze B (%)
1	0.00	100.00	0.00
2	5.00	100.00	0.00
3	20.00	60.00	40.00
4	25.00	60.00	40.00
5	28.00	100.00	0.00

*Tab. 1.: Tabulka znázorňující průběh použité gradientové metody
fáze A: 5 % MeOH, 950 ml voda, 0,1 % TFA
fáze B: 100 % MeOH, 0,1 % TFA*

3.2.8. Stanovení enzymové aktivity

Pro stanovení aktivity sulfatasy z *Helix pomatia* byl jako substrát použit *p*NPS. Reakční směs obsahující 10 μ l 10 mM substrátu, 4 μ l enzymového roztoku (2 mg enzymu / 1ml pufru) a 36 μ l 100 mM acetátového pufru (pH 5,0) byla 10 minut inkubována (Thermomixer compact, Eppendorf, DE) při 600 ot/min a teplotě 35°C. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml 0,1 M Na₂CO₃ k reakční směsi.

Koncentrace uvolněného produktu (*p*NP-OH) je přímo úměrná absorbanci, proto byla aktivita enzymu stanovena spektrofotometricky ve VIS oblasti. Byla měřena absorbance *p*NP-OH proti slepému vzorku v semimikrokyvetách (Shimadzu UVmini – 1240, JP) při 420 nm v alkalickém prostředí za vzniku žlutého zbarvení záporně nabitě formy mající absorpční maximum v oblasti 405 – 420 nm. Průběh reakce je znázorněn na obrázku 9.

Jednotka enzymové aktivity [U] je definována jako množství enzymu potřebného k uvolnění 1 μ g *p*NP-OH za minutu při určité teplotě a pH. Častěji se používá objemová aktivita [U/ml], což je aktivita enzymu vztažená na jednotku objemu kapaliny nebo specifická aktivita [U/mg], která je definována jako množství enzymu katalyzující tvorbu 1 μ mol *p*NP-OH na mg proteinu za 1 minutu.

3.2.9. Stanovení vlivu silybin-7,23-disulfátu na aktivitu sulfatasy z *Helix pomatia*

Pro stanovení bylo připraveno 13 reakčních směsí obsahujících 10 μ l 10 mM *p*NPS, 4 μ l roztoku enzymu (2,1 mg enzymu / 1 ml pufru), různé objemy látky **17** (tak aby výsledná koncentrace **17** byla 0; 0,1; 0,04; 0,07; 0,09; 0,1; 0,2; 0,8; 1,4; 2,0; 4; 8 a 10 mM) a 100 mM acetátový pufr (pH 5), tak aby výsledný objem reakční směsi byl 50 μ l. Roztoky byly inkubovány (Thermomixer compact, Eppendorf, DE) při 600 ot/min a teplotě 35°C po dobu 10 minut. Reakce byly zastaveny přidáním 1 ml 0,1 M Na₂CO₃ do každé reakční směsi. Byla měřena absorbance jednotlivých reakčních směsí proti slepému vzorku

v semimikrokyvetách (Spektrofotometr Shimadzu UVmini – 1240, JP) při 420 nm. Z naměřených hodnot byl sestaven graf 4.

3.2.10. Hydrolýza silybin-7,23-disulfátu (17) sulfatasou z *Helix pomatia*

Silybin-7,23-disulfát o různých koncentracích (0,2 mM a 2 mM) byl hydrolyzován sulfatasou z *Helix pomatia*.

Pro každou koncentraci **17** bylo provedeno několik reakcí o objemových aktivitách enzymu 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 U/ml. Reakční směs s koncentrací 2 mM **17** obsahovala 10 μ l 100 mM roztoku **17**, takové množství roztoku enzymu, aby jeho aktivita byla 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 U/ml a takové množství 100 mM acetátového pufru (pH 5), aby celkový objem směsi byl 250 μ l. Reakční směs s koncentrací 0,2 mM **17** obsahovala 5 μ l 100 mM roztoku **17**, takové množství enzymu, aby jeho aktivita v roztoku byla 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 U/ml a takové množství 100 mM acetátového pufru (pH 5), aby celkový objem směsi byl 2,5 ml. Reakční směsi se slepými vzorky byly po dobu 24 hodin inkubovány (Thermomixer compact, Eppendorf, DE) při 600 ot/min a teplotě 35°C. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC ve fázi EtOH / MeOH / CH₂Cl₂ / destilovaná voda (2:1:9:0,3). Reakce byla ukončena vysokou teplotou (99°C) v inkubátoru při 550 ot/min a 99°C po dobu 10 minut. Směsi byly odstředěny (Odstředivka Mini spin plus, Eppendorf) při 14 000 otáčkách po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán a u roztoků s objemem 250 μ l byl použit jako vzorek pro HPLC. U roztoků o objemu 2,5 ml a koncentrací 0,2 mM **17** byl supernatant odebrán a koncentrován na objem cca 150 μ l, takto připravené roztoky byly analyzovány HPLC.

3.2.11. Měření kinetiky kontinuálně

Pro měření kinetických parametrů reakce štěpení substrátu *p*NPS sulfatasou (*Helix pomatia*) byly připraveny roztoky *p*NPS o koncentracích 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 mM obsahujících 300 μ l roztoku enzymu o objemové aktivitě 0,1 U/ml a 100 mM acetátového pufru (pH 5), aby celkový objem směsi byl 1 ml. Byla měřena ΔA za minutu po dobu 200 sekund (z toho prvních 15 sekund nebylo zaznamenáváno) při laboratorní teplotě 25°C proti slepému vzorku. Měření bylo prováděno kontinuálně, ve dvou paralelkách, při 348 nm (isosbestický bod) na spektrofotometru Shimadzu UV 1700.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Silybin-7,23-disulfát

4.1.1. Příprava silybin-7,23-disulfátu (17)

Silybin-7,23-disulfát byl připraven ze silybinu podle reakčního schématu 1. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (Obr 11.). Po ukončení reakce byla směs dělena sloupcovou chromatografií. Látka **17** byla získána ve vysoké čistotě (do 5 % nečistot dle NMR) s výtěžkem 60 % (160 mg). Ztráty byly pravděpodobně způsobeny neúplným zreagováním výchozí látky (silybin) a během purifikace. Provedená reakce dosud nebyla v literatuře popsána.

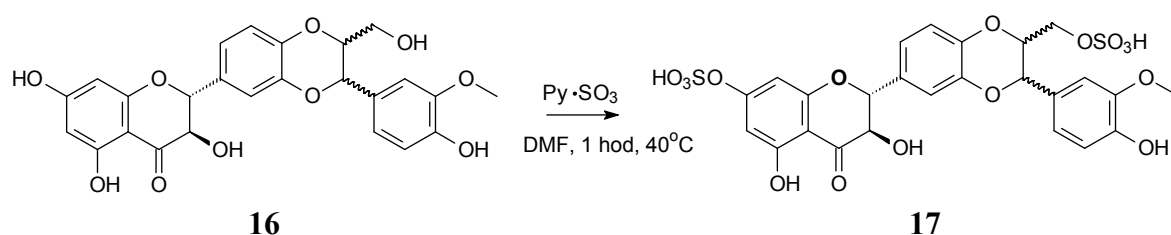
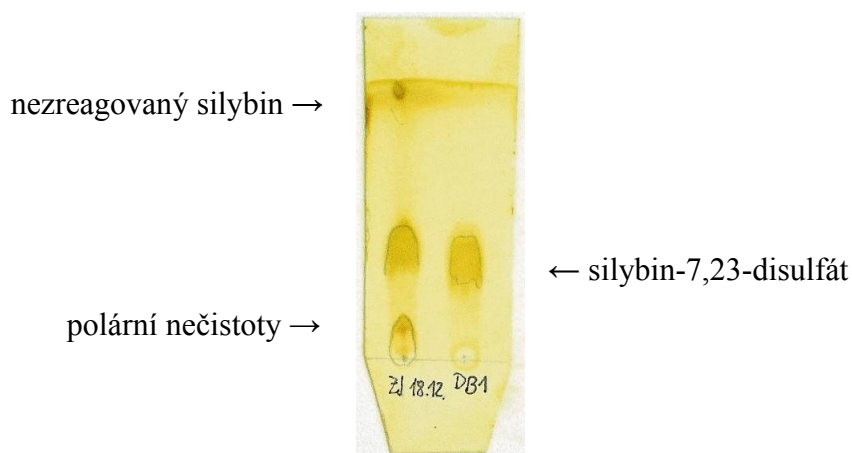


Schéma 1.: Reakční schéma přípravy silybin-7,23-disulfátu



Obr. 11: TLC ve fázi EtOH / MeOH / CH₂Cl₂ / destilovaná voda (2:1:9:0,3)

4.1.2. NMR

Postup a podmínky měření NMR spektra jsou v kapitole 3.2.5. Tabulka 2. a tabulka 3. obsahuje hodnoty získané měřením NMR spektra látek 17 A a 17 B.

Atom #	17 A	17 B
2	82.61	82.57
3	71.45	71.50
4	197.70	197.71
4a	100.46	100.48
5	163.35	163.34
6	96.18	96.15
7	167.08	166.99
8	95.16	95.13
8a	162.52	162.51
10	76.06	76.06
11	75.72	75.71
12a	143.18	143.14
13	116.59	116.70
14	130.27	130.28
15	121.51	121.31
16	116.36	116.40
16a	143.27	143.23
17	127.10	127.11
18	111.83	111.77
19	147.64	147.64
20	147.10	147.07
21	115.40	115.37
22	120.29	120.27
23	64.72	64.70
19-OMe	55.65	55.64

Table 2.: ^{13}C NMR data 17 A, a 17 B (400.13 MHz for ^1H , 100.61 MHz for ^{13}C , DMSO- d_6 , 30°C).

17 A je silybin-7,23-disulfát A

17 B je silybin-7,23-disulfát B

Atom #	17 A	17 B
2	5.077(d, 11.2)	5.076 (d, 11.4)
3	4.601 (dd, 6.1, 11.2)	4.593 (dd, 6.3, 11.4)
6	5.915 (d, 2.1)	5.912 (d, 2.1)
8	5.879 (d, 2.1)	5.882 (d, 2.1)
10	4.357 (ddd, 2.5, 5.8, 7.8)	4.350 (ddd, 2.6, 5.9, 7.8)
11	4.873 (d, 7.8)	4.876 (d, 7.8)
13	7.096 (d, 1.9)	7.088 (d, 1.9)
15	7.025 (dd, 1.9, 8.1)	7.032 (dd, 1.9, 8.2)
16	6.991 (d, 8.1)	6.995 (d, 8.2)
18	7.034 (d, 1.9)	7.043 (d, 2.0)
21	6.802 (d, 8.1)	6.799 (d, 8.1)
22	6.861 (dd, 1.9, 8.1)	6.864 (dd, 2.0, 8.1)
23	3.768 (dd, 2.5, 11.1)	3.765 (ddd, 2.6, 11.1)
	3.691 (dd, 5.8, 11.1)	3.692 (ddd, 5.9, 11.1)
3-OH	5.786 (d, 6.1)	5.783 (d, 6.3)
5-OH	11.881 (s)	11.886 (s)
7-OH	n.d.	n.d.
19-OMe	3.790 (s)	3.793 (s)
20-OH	9.141 (s)	9.120 (s)
23-OH	n.d.	n.d.

Table 3: ^1H NMR data 17 A a 17 B (400.13 MHz for ^1H , 100.61 MHz for ^{13}C , DMSO- d_6 , 30°C).

17 A je silybin-7,23-disulfát A

17 B je silybin-7,23-disulfát B

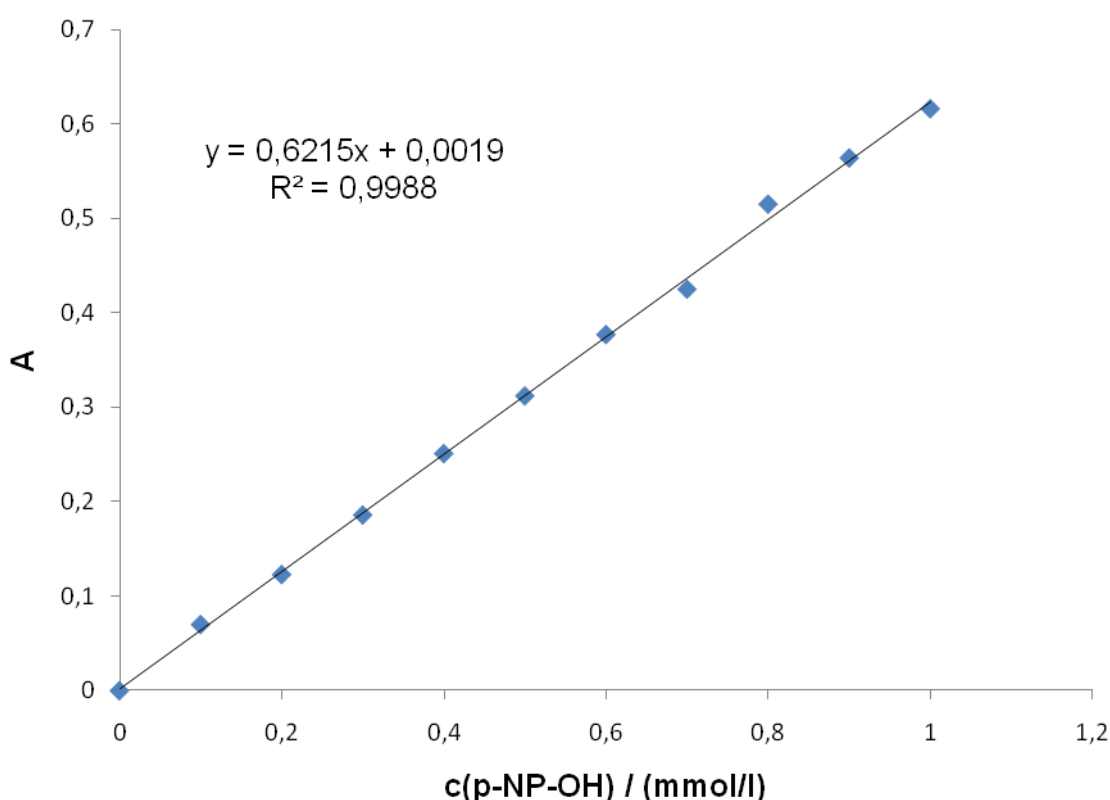
4.2. Sulfatasa z *Helix pomatia*

Experimentální podmínky pro práci se sulfatasou z *Helix pomatia* byly zvoleny na základě práce publikované v článku „Investigation of the sulfuryl transfer step from substrate to enzyme by arylsulfatases“,²², kap. č. 2.3.5.

4.2.1. Stanovení enzymové aktivity

4.2.1.1. Kalibrační graf *p*NP-OH

Pro výpočet objemové aktivity enzymu bylo nutné sestrojít graf závislosti absorbance (λ 420 nm) na koncentraci *p*NP-OH (viz. Graf 1.). Bylo připraveno deset roztoků *p*NP-OH o koncentracích od 0,1 mM do 1 mM, u kterých byla změřena absorbance při 420 nm. Z naměřených hodnot byl sestrojen graf a vypočítána rovnice regrese.



Graf 1.: Kalibrační graf *p*NP-OH

4.2.2. Stanovení kinetických parametrů

Pro stanovení kinetických parametrů K_m a V_{max} byly zvoleny koncentrace $pNPS$: 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 mM. Ke každému roztoku $pNPS$ bylo přidáno 300 μ l roztoku sulfatasy s *Helix pomatia* o 0,1 U/ml a takové množství 100 mM acetátového pufru (pH 5), aby objem směsi byl 1 ml. Průběh reakce byl měřen 200 sekund při laboratorní teplotě 25°C. Na vyhodnocení kinetických dat a získání K_m a V_{max} byl použit program Sigma plot: $K_m = 0,0494 \pm 0,0111$ mmol/l a $V_{max} = 0,0325 \pm 0,0020$ mmol/dm³/min (Graf 2. a 3.), naměřené hodnoty přibližně odpovídají publikované K_m (0,1 mM²²), rozdíl je dán *mj.* ne zcela shodnými podmínkami měření.

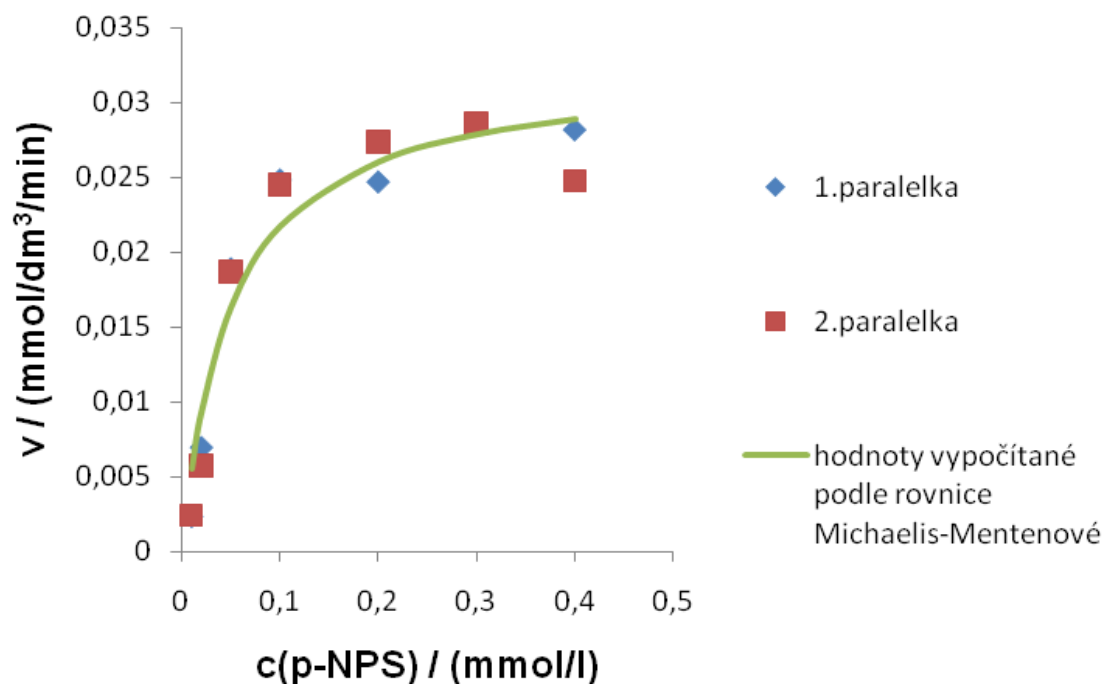
Obrázek 12. znázorňuje vzorec používaný pro výpočet rychlosti reakce, pokud není použit program Sigma plot.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

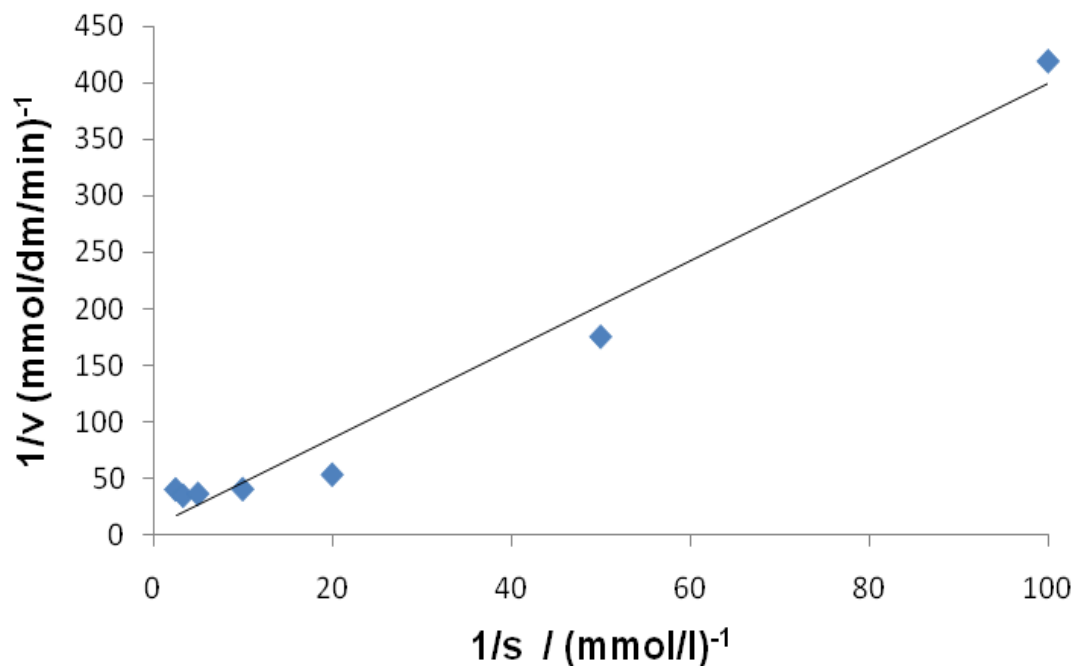
Obr. 12.: Rovnice Michaelis-Mentenové

v - rychlost reakce, V_{max} - maximální rychlost reakce, K_m - Michaelisova konstanta, $[S]$ - koncentrace substrátu.

Odchylka vypočítaná tímto programem je velká. Je to způsobeno tím, že získané hodnoty K_m a V_{max} byly velmi nízké. V laboratoři nebylo dostatečné vybavení na měření kinetiky s nízkými koncentracemi $pNPS$ (např. s použitím fluorimetrického stanovení). Kromě kontinuálního měření kinetiky, byla použita i diskontinuální metoda (data nejsou uváděna), ale výsledky byly také změřeny s velkou odchylkou. Pro změření kinetiky při nízkých koncentracích $pNPS$ by bylo vhodné měření provádět např. fluorescenční metodou.



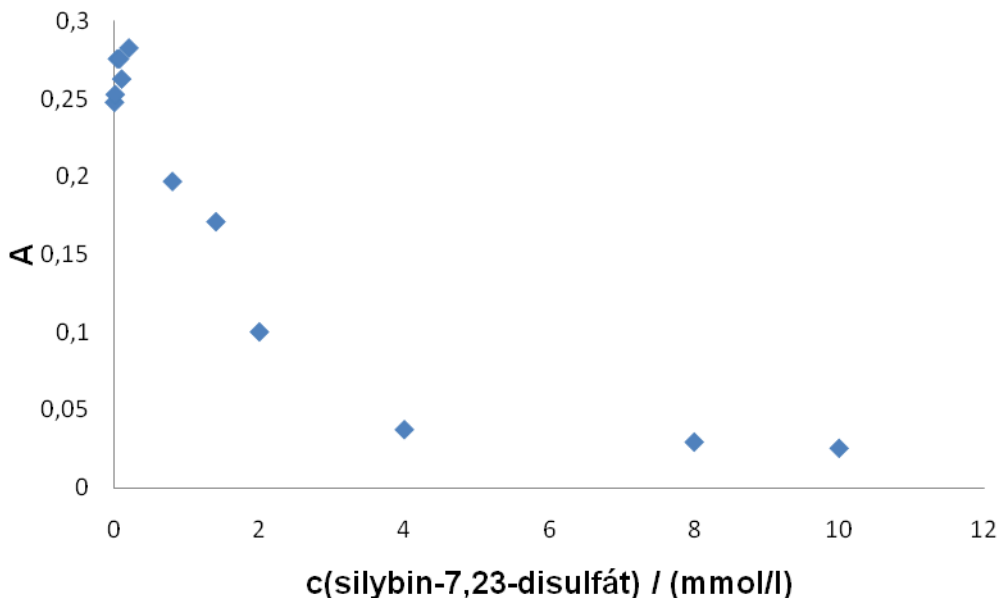
Graf 2.: Znáznornění enzymové kinetiky dle Michaelise-Mentenové



Graf 3. Znáznornění linearizace dle Lineweaver-Burga

4.2.3. Vliv silybin-7,23-disulfátu na aktivitu sulfatasy z *Helix pomatia*

Byl zjišťován vliv **17** na aktivitu sulfatasy z *Helix pomatia*. Pro měření byly použity roztoky **17** o koncentracích: 0; 0,1; 0,04; 0,07; 0,09; 0,1; 0,2; 0,8; 1,4; 2,0; 4; 8 a 10 mM.



Graf 4.: Vliv koncentrace silybin-7,23-disulfátu (**17**) na aktivitu sulfatasy z *Helix pomatia*

17 má velký vliv na aktivitu sulfatasy z *Helix pomatia*. Z grafu 4. vyplývá, že při vyšších koncentracích než je koncentrace 0,2 mM roztoku **17**, docházelo k silné inhibici testovaného enzymu.

Zjištění inhibiční konstanty a snížení odchylky při kinetických měření bude předmětem dalšího zkoumání.

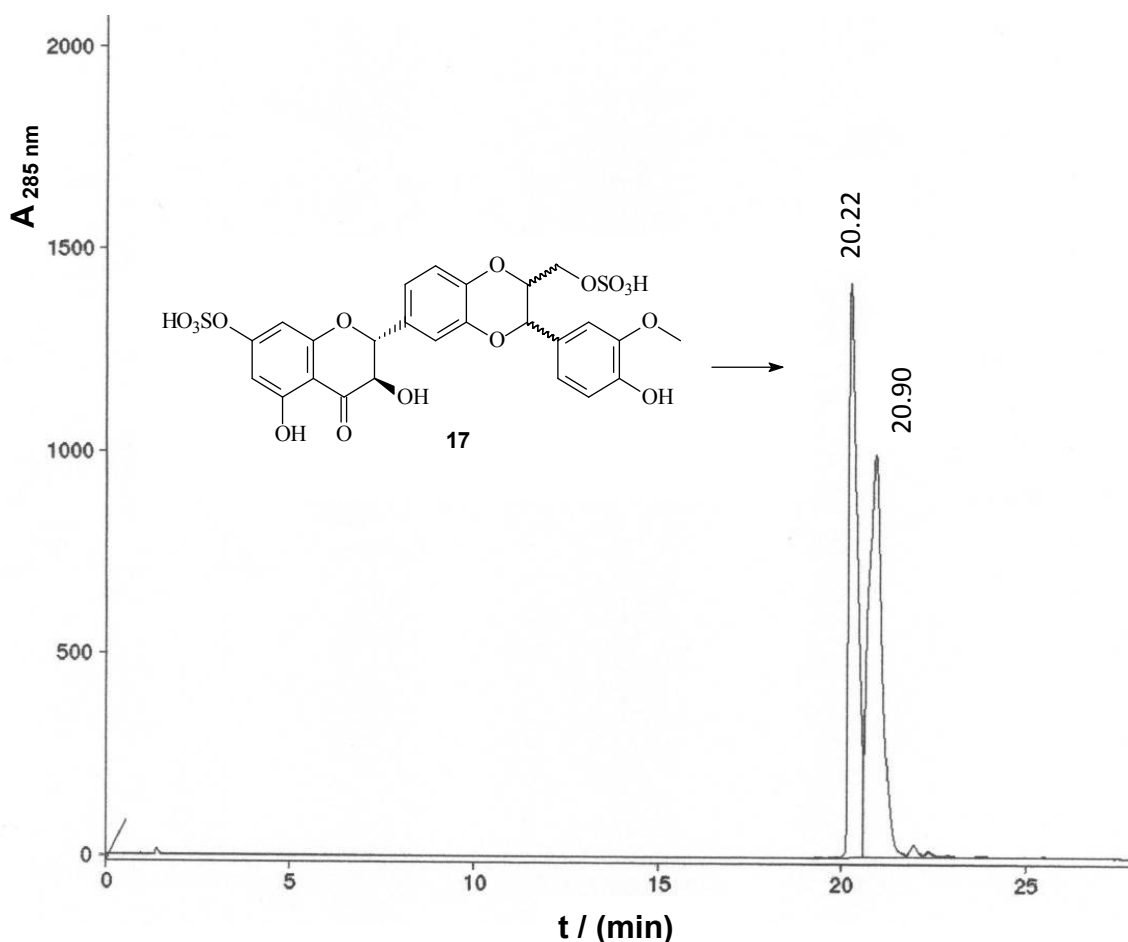
4.2.4. Hydrolytické štěpení silybin-7,23-disulfátu sulfatasou z *Helix pomatia*

I přes zjištění, že silybin-7,23-disulfát je silným inhibitorem sulfatasy, byl **17** testován jako její potenciální substrát. Silybin-7,23-disulfát o koncentraci 0,2 mM a 2 mM byl vystaven působení sulfatasy z *Helix pomatia* o různé koncentraci (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 U/ml). Průběh reakcí byl sledován metodou HPLC. Při vyšší koncentraci **17** (2 mM) došlo k inhibici enzymu a **17** se neštěpil. Při koncentraci 0,2 mM roztoku **17**, nedocházelo k inhibici (aktivita enzymu před a po přidání **17** se změnila jen zanedbatelně) a **17** se štěpil za vzniku nového produktu (Graf 6.). Optimální reakční podmínky, při kterých docházelo ke vzniku dobře detekovatelného množství vzniklého produktu jsou:

0,2 mM roztoku **17** a 0,5 - 1,0 U/ml sulfatasy z *Helix pomatia* (Graf 6.). Bylo ověřeno, že všechny čtyři eluční vrcholy (Graf 6.) mají spektra v UV oblasti při 285 nm, což odpovídá základnímu skeletu silybinu. Kochromatografií bylo potvrzeno, že produktem hydrolytického štěpení je silybin, zřejmě tedy nedochází k diferenciaci štěpení dvou různých sulfátových skupin.

Silybin-7,23-disulfát je směs dvou stereoizomerů, byl připraven ze směsného silybinu (špatně separovatelné stereoizomery A a B), proto jsou na chromatogramu (Graf. 5) vždy dva eluční vrcholy. Při štěpení **17** je preferováno štěpení jednoho diastereomeru.

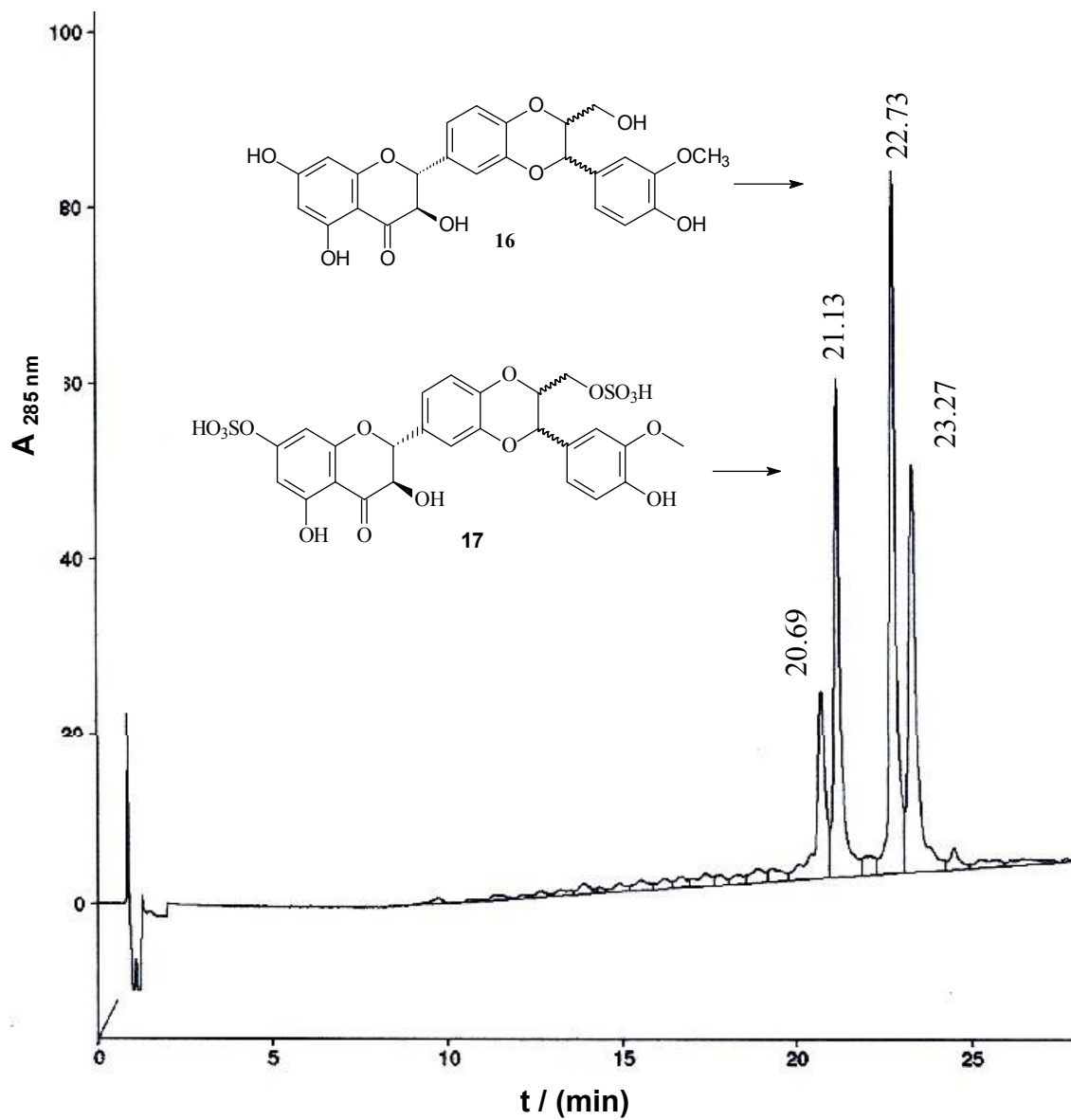
Předmětem další práce bude izolace a spektrální charakterizace vzniklého produktu – ověření, že se jedná o silybin a studium preference štěpení izomerů silybin-7,23-disulfátu.



Graf 5.: HPLC chromatogram silybin-7,23-disulfátu

Pro měření byla použita monolitická RP kolona s C18 stacionární fází (Chromolith SpeedROD RP-18e 50 × 4.6 mm). Separace probíhala v gradientovém modulu

(Tab. 1) s použitím mobilních fází: mobilní fáze A (5 % MeOH s 0,1 % TFA) a mobilní fáze B (100 % MeOH, 0,1 % TFA). Nástřik vzorku byl 20 μ l a průtoková rychlost 1 ml/min.



Graf 6.: HPLC chromatogram reakční směsi

5. ZÁVĚR

- ✓ Byl připraven, izolován a spektrálně charakterizován (NMR, MS) silybin-7,23-disulfát, 160 mg (60 %),
- ✓ Byly změřeny kinetické parametry reakce *p*NPS se sulfatasou z *Helix pomatia*: $K_m = 0,0494$ mmol/l a $V_{max} = 0,0325$ mmol/dm³/min.
- ✓ Bylo zjištěno, že silybin-7,23-disulfát je při koncentracích vyšších než 0,2 mM silným inhibitorem sulfatasy z *Helix pomatia*.
- ✓ Bylo prokázáno, že silybin-7,23-disulfát je substrátem pro sulfatasu z *Helix pomatia*.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Tůmová, L., Tůma, J.: Chem. Listy 103, 503-510 (2009)
- ² Gažák, R., Walterová, D., Křen, V.: Curr. Med. Chem. 14, 315-338 (2007)
- ³ Slanina, J., Táborská, E.: Chem. Listy 98, 239-245 (2004)
- ⁴ Volf, K., Andrs, F.: Flavonoidy a jejich biologické působení. JuWital s.r.o., Praha (2008)
- ⁵ <http://www.biotrans.cas.cz/vyuka-olomouc/xenobiochemie-2.pdf> (10.4.2010)
- ⁶ Jegorov, A.: Chem. Listy 90, 859-862 (1996)
- ⁷ Gažák, R., Sedmera, P., Vrbacký, M., Vostálová, J., Drahot, Z., Marhol, P., Walterová, D., Křen, V.: Free Radical Biol. Med. 46, 745-758 (2009)
- ⁸ Plíšková, M., Vondráček, J., Křen, V., Gažák, R., Sedmera, P., Walterová, D., Psotová J., Šimánek, V., Machala, M.: Toxicology 215, 80-90 (2005)
- ⁹ <http://www.solen.cz/pdfs/lek/2006/04/07.pdf> (31.7.2010)
- ¹⁰ Jhy-Wen, W., Lie-Chwen, L., Tung-Hu, T.: J. Ethnopharmacol. 121, 185-193 (2009)
- ¹¹ <http://www.worwagpharma.sk/new/clanky/Kupcova.pdf> (31.7.2010)
- ¹² Džubák, P., Hajdúch, M., Gažák, R., Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D., Sedmera, P., Křen, V.: Bioorg. Med. Chem. 14, 3793-3810 (2006)
- ¹³ Hoh, C., Boocock, D., Marczylo, T., Singh, R., Berry, D., P., Dennison, B., A., Hemingway, D., Miller, A., West, K., Euden, S., Garcea, G., Farmer, P., B., Steward, W., P., Gescher, A., J.: Clin. Cancer. Res. 12, 2944-2950 (2006)
- ¹⁴ Kauffman, F.C.: Drug Metab. Rev. 36, 823-843 (2004)
- ¹⁵ Mesía-Vela, S., Kauffman, F.C.: Xenobiotica 33, 1211-1220 (2003)
- ¹⁶ <http://www.enzyme-database.org/downloads/ec3.pdf> (2.7.2010)
- ¹⁷ Hanson, S.R., Best, M.D., Wong, Ch., H.: Angew. Chem. Int. Ed. 43, 5736-5763 (2004)
- ¹⁸ Waldow, A., Schmidt, B., Dierks, T., Bülow, R., Figura K.: J. Biol. Chem. 274, 12284-12288 (1999)
- ¹⁹ http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=7790
7 (31.7.2010)
- ²⁰ <http://www.animalbase.unigoettingen.de/zooweb/servlet/AnimalBase/home/species?id=1>
2 (31.7.2010)
- ²¹ Dodgson, K., S., Powell, G., M.: Biochem J. 73, 666-671 (1959)
- ²² Gibby, S., G., Younker, J., M., Hengge, A., C.: J. Phys. Org. Chem. 17, 541-547 (2004)

