

7. SUMMARY IN CZECH (SOUHRN PRÁCE)

Tato práce se zabývá zkoumáním vazebných vlastností a interakcí u enzymů purinnukleosidfosforylasy a thymidinofosforylasy s jejich přirozenými substráty s využitím metody SPR analýzy v přístroji Biacore X.

Cílem práce bylo nejprve zjistit, zda a jak mohou být enzymy, připravené technologií rekombinantní DNA, ukotveny na povrch analytického čipu CM 5 s volnými karboxylovými skupinami. Poté bylo testováno, jakým způsobem a za jakých podmínek se již ukotvené enzymy vážou se svými přirozenými substráty. Měnicími se podmínkami byly druh pufru, jeho pH a molalita, teplota v systému a průtoková rychlost celou.

Jako přirozené substráty pro enzym PNP byly použity guanosin ve směru rozkladné reakce a guanin s ribóza-1-fosfát nebo s deoxyribóza-1-fosfát ve směru syntézy. Pro enzym TP, který byl studován pouze ve směru fosforolýzy, byly jako přirozené substráty použity thymidin, uridin, a deoxyuridin.

V závěru byla opakována interakční analýza k ověření stability čipu pokrytého TP enzymem, který byl uskladněn v lednici po dobu 10 týdnů.

Přístroj Biacore X je založen na metodě SPR analýzy. Surface plasmon resonance neboli povrchová plasmonová rezonance je neinvazivní optická metoda sloužící ke sledování interakcí mezi biomolekulami a jejich ligandy. Odpověď nezávisí na povaze biomolekuly, proto přístroj umožňuje měřit široké spektrum vzorků – od vysoce čistých molekul po hrubé vzorky jako jakou viry, bakterie či eukaryotické buňky. Kromě klasického analytického stanovení koncentrací analytů lze získat též časový průběh reakce interakcí biomolekul, provádět kinetické studie a určovat kinetické parametry pro sledované děje.

Povrchová plasmonová rezonance je jev vyskytující se v tenkém vodivém filmu na rozhraní dvou medií s odlišným refraktivním indexem. V systému Biacore jsou těmito médii sklo sensorového čipu a roztok vzorku. Vodivým filmem je tenká vrstva zlata na povrchu čipu. V určité kombinaci úhlu dopadu a vlnové délky dopadajícího světla dochází k excitaci plasmonů z vrstvy zlata. Přitom dochází k absorpci energie, což se projevuje snížením intenzity odraženého světla. Změny v koncentraci roztoku na

povrchu čipu způsobují změny v SPR signálu. Ten je vyjádřen v rezonančních jednotkách RU, kde jedna RU odpovídá jednomu pikogramu na čtverečný milimetr povrchu čipu.

Pro imobilizaci enzymu PNP na povrch sensorového čipu byly testovány tři různé koncentrace - 100 μ g/ml, 300 μ g/ml a 600 μ g/ml. Ze získaných výsledků vyplývá, že stupeň imobilizace enzymu neodpovídá úměrně vzrůstající koncentraci roztoku a jako nejvhodnější byla stanovena koncentrace enzymu 300 μ g/ml. Imobilizace enzymu TP probíhala ve srovnání s PNP snadněji. Již relativně nízké koncentrace enzymu v roztoku (74,75 μ g/ml) poskytly mnohem vyšší stupeň imobilizace.

Při hledání optimálních podmínek pro interakci enzym – substrát byly měněny tyto parametry: teplota celého systému, průtoková rychlost celou a zejména pufr – druh, jeho pH a molalita. Zvýšení teploty nemělo významný vliv na vazebné vlastnosti enzymů ani substrátů; naopak mělo za následek tvorbu nežádoucích vzduchových bublin. Zpomalením anebo zrychlením průtoku mobilní fáze s roztokem vzorku detekční celou se vazebné vlastnosti opět nijak výrazně nezměnily. Rychlost pouze ovlivnila dobu, po kterou byl analyt v kontaktu s enzymem, což se projevilo na „šířce“ grafu, ale tvar křivky ovlivněn nebyl.

Pufr měl v systému dvě funkce. Sloužil jako mobilní fáze a zároveň jako rozpouštědlo pro vzorky analytů. Využívala jsem převážně dva druhy fosfátových pufrů – HBS-EP pufr od výrobce a mnou připravený fosfátový pufr. Při použití HBS-EP pufru jako mobilní fáze a fosfátového pufru jako rozpouštědla pro vzorek došlo k silné odpovědi a výraznému poklesu signálu, tudíž jakékoliv vazebné interakce nemohly být vyhodnoceny. Molalita pufru se osvědčila spíše nižší a pH pufru kolem 7, tedy neutrální.

Při ověřování stability čipu pokrytého enzymem po určité době uchovávání v chladu byla zjištěna velmi zeslabená účinnost enzymu.

Oba enzymy, purinnukleosidfosforylasa i thymidinfosforylasa, hrají v organismu důležitou roli. PNP je klíčovým enzymem v metabolismu purinů, zejména v jejich záchranných procesech a TP je významným enzymem patologických procesů jako je zánět či rakovina. Podrobné zkoumání těchto enzymů přispívá k jejich využití jako biokatalyzátorů pro produkci semi-syntetických purinových či pyrimidinových

nukleosidových analogů, které mohou být použity jako potenciální antivirotika či kancerostatika. Tyto se obtížně získávají organickou syntézou, která je časově i finančně náročná, s nízkými výtěžky a bez stereospecifity produktů.

Tato práce je součástí výzkumného projektu „Biocatalysts for producing pharmaceutical nucleoside analogues“ / „Biokatalyzátory pro produkci farmaceutických nukleosidových analogů“, kterého se účastní kromě University of Kuopio též University of Helsinki a University of Oulu.