

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

2016

JANA HEKRLOVÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**FUNKCE A STANOVENÍ SULFOTRANSFERÁZY V KŮŽI**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.  
Školitel specialista: Mgr. Martina Moravcová, Ph.D

Hradec Králové 2016

Jana Hekrlová

## **PROHLÁŠENÍ**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především Mgr. Martině Moravcové Ph.D za odborné a trpělivé vedení při práci v laboratoři, a také za ochotu a čas, který mi věnovala. Jsem velice ráda, že jsem využila možnost vypracování diplomové práce v rámci stáže v holdingu Contipro a tímto společností velice děkuji za příležitost. Velké díky patří také RNDr. Lucii Zemanové Ph.D, která mi velice ochotně poskytla rady týkající se zpracování práce a její úpravy do konečné podoby.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Jana Hekrlová  
Školitel: Mgr. Martina Moravcová, Ph.D.  
RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Funkce a stanovení sulfotransferázy v kůži**

Sulfotransferázy jsou enzymy nacházející se v tenkém střevě, svalech, prostatě a v menší míře v placentě, průdušnici, plicích a kůži, které se podílejí na sulfonaci steroidních hormonů, neurotransmitterů a dalších endogenních molekul. Významnou roli hrají při biotransformaci xenobiotik. Mezi nejdůležitějšího zástupce skupiny transferáz v kůži řadíme cholesterolsulfotransferázu (SULT2B1b), jejíž funkcí je katalyzovat přenos sulfoskupiny na cholesterol. SULT2B1b hraje významnou roli ve tvorbě kožní bariéry a také ve stárnoucí kůži.

Sulfonací cholesterolu katalyzovanou SULT2B1b vzniká v epidermis cholesterol sulfát (CHS). CHS je významnou komponentou lipidů v epidermis. CHS má regulační roli v procesu formování kožní bariéry a deskvamace kůže, tedy při intercelulárních adhezivních interakcích. Cílem práce bylo najít vhodnou metodu a optimální podmínky pro měření aktivity SULT2B1b tak, aby byla metodika použitelná pro stanovení v bezbuněčném a rovněž v buněčném systému. Z dostupných možných metodik jsme zvolili dvoustupňové reakce, kdy výsledný produkt jedné z reakcí 4-methylumbelliferon (MU) je detekovatelný fluorescenčním spektrometrem a u druhé reakce jsme využili stanovení fosfátu spektrofotometricky s malachitovou zelení.

V prvním případě využití detekce MU fluorescenčně se nepodařilo najít optimální podmínky pro průběh reakce. Oproti tomu detekce za využití malachitové zeleně se ukázala jako vhodná metoda pro sledování SULT2B1b aktivity v *in vitro* experimentech. Stanovení aktivity SULT2B1b je důležité pro budoucí experimenty zabývající se úlohou sulfotransferázy v keratinocytech epidermis zralé a mladé kůže.

# ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Jana Hekrlová  
Supervisor: Mgr. Martina Moravcová, Ph.D.  
RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Function and determination of sulfotransferase in the skin**

Sulfotransferases (SULTs) are enzymes that are expressed in small intestine, muscles, prostate and also in smaller amounts in placenta, trachea, lungs and skin, where they participate on sulfonation of steroid hormones, neurotransmitters as well as other endogenous molecules. SULTs are important for biotransformation processes of many xenobiotics. Cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) is one of the significant transferases in the skin, whose function is to catalyze transfer of sulfo group to cholesterol molecule. SULT2B1b plays an important role in skin barrier formation and also in skin aging.

Cholesterol sulphate (CHS) is a product of sulfonation of cholesterol by SULT2B1b in epidermis. CHS belongs to epidermal lipids. CHS participates on forming of skin barrier and on desquamation. The aim of study was to find an optimal method and conditions for measuring the activity of SULT2B1b. It was necessary to find a method for determination of enzyme activity in also acellular and cellular systems. Two types of reaction from available methodics were chosen, one where final product MU is detectable by fluorescent spectrophotometry and another type of reaction where phosphate is detected with malachit green in spektrophotometr.

We were not able to find good condition for fluorescent method with MU whereas the second method with malachite green was proved as convenient for determination of SULT2B1b activity. Determination of SULT2B1b activity is crucial for future research and experiments dealing with the role of sulfotranasferase in epidermis of young and aging skin.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. KŮŽE .....</b>	<b>11</b>
2.1.1. STRUKTURA KŮŽE .....	11
2.1.1.1. Epidermis .....	11
2.1.1.2. Dermis .....	16
2.1.1.3. Hypodermis .....	16
<b>2.2. STÁRNUTÍ KŮŽE .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Viditelné znaky stárnutí .....	17
2.2.2. Mechanismy způsobující a doprovázející stárnutí kůže .....	18
2.2.2.1. Volné radikály .....	18
2.2.2.2. Zkracování telomer.....	19
<b>2.3. SULFONACE.....</b>	<b>20</b>
2.3.1. Reakce .....	20
2.3.2. SULT2B1b .....	21
2.3.2.1. Zařazení SULT2B1b do rodiny SULTs.....	21
2.3.2.2. Lokalizace SULT2B1b.....	22
2.3.2.3. Role SULT2B1b v kůži .....	22
2.3.3. Cholesterol sulfát .....	23
2.3.3.1. Struktura CHS .....	23
2.3.3.2. CHS obrat a funkce v epidermis.....	24
2.3.3.3. Role CHS v lidském těle .....	25
2.3.3.4. Kožní patologie a podíl cholesterol sulfátu .....	25
2.3.3.4.1. X-vázaná ichthyóza .....	25
2.3.3.4.2. Atopická dermatitida .....	26
2.3.3.4.3. Lupénka .....	27
2.3.3.4.4. Lichen planus.....	27
2.3.4. SULT2B1b a stárnutí kůže .....	27
<b>2.4. METODY STANOVENÍ AKTIVITY SULT .....</b>	<b>28</b>
2.4.1. Analytické metody .....	29
2.4.2. Spektrofluorimetrie .....	30
2.4.2.1. Fluorescence .....	30
2.4.2.2. Fluorofory.....	31
2.4.2.3. Fluorescenční metody.....	31
2.4.2.4. Využití spektrofluorimetrie při měření aktivity SULTs .....	32
2.4.2.4.1. Detekce 4 – methylumbelliferonu .....	32
2.4.3. Spektrofotometrie.....	32
2.4.3.1. Využití spektrofotometrie při měření aktivity SULTs.....	33
2.4.3.1.1. Detekce volného fosfátu pomocí malachitové zeleně.....	33
2.4.3.1.2. Detekce <i>p</i> - nitrofenolu (NP) .....	34
<b>3. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>35</b>

<b>4. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A SOFTWARE .....</b>	<b>36</b>
4.1.1. Chemikálie: .....	36
4.1.2. Připravené zásobní roztoky: .....	36
4.1.3. Biologický materiál: .....	37
4.1.4. Přístroje .....	37
4.1.5. Software .....	37
<b>4.2. METODIKA .....</b>	<b>38</b>
4.2.1. Stanovení excitačního a emisního spektra MU .....	38
4.2.2. Stanovení kalibrace pro MU .....	38
<b>4.2.3. Iniciální měření .....</b>	<b>38</b>
První zkouška reakce za různého pH .....	38
<b>4.2.4. Enzymová kinetika .....</b>	<b>38</b>
4.2.4.1. Stanovení rychlosti reakce v závislosti na obsahu enzymu .....	38
4.2.4.2. Stanovení rychlosti enzymatické reakce v závislosti na obsahu substrátu a kofaktoru .....	39
4.2.4.3. Stanovení hodnoty RFU v závislosti na různé koncentraci MUS .....	40
4.2.4.4. Modifikace spektrofluorimetrické reakce použitím substrátu ve formě cholesterol-methyl- $\beta$ -cyclodextrin.....	40
4.2.4.5. Stanovení a porovnání RFU u nekompletních reakcí .....	40
4.2.4.6. Stanovení aktivity SULT1A1 .....	40
<b>4.2.5. Ověření funkčnosti reakce s buněčnými lyzáty linie HaCat.....</b>	<b>41</b>
4.2.5.1. Kultivace a lyzace buněk HaCaT .....	41
4.2.5.2. Stanovení koncentrace proteinů v lyzátech HaCaT BCA metodou.....	42
4.2.5.3. Stanovení rychlosti reakce s lyzáty HaCaT a bovinním fetálním sérem jako katalyzátory sulfonace .....	42
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Stanovení emisního a excitačního spektra MU.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Stanovení kalibrace pro MU .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3. Iniciální měření rychlosti reakce za různého pH .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4. Enzymová kinetika .....</b>	<b>45</b>
5.4.1. Stanovení rychlosti reakce v závislosti na obsahu enzymu .....	45
5.4.2. Stanovení rychlosti reakce v závislosti na obsahu substrátu a kofaktoru .....	48
5.4.3. Stanovení hodnot RFU v závislosti na různé koncentraci MUS .....	48
5.4.4. Modifikace spektrofluorimetrické reakce použitím substrátu ve formě cholesterol – methyl – $\beta$ – cyclodextrin.....	49
5.4.5. Stanovení a porovnání RFU u nekompletních reakcí .....	50
5.4.6. Stanovení aktivity SULT1A1 .....	50
<b>5.5. Ověření funkčnosti reakce s buněčným lyzátem linie HaCat.....</b>	<b>51</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>53</b>

<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>58</b>
<b>9. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>59</b>
<b>9.1. ELEKTRONICKÉ ZDROJE .....</b>	<b>63</b>

# 1. ÚVOD

Kůže je významným orgánem lidského těla. Má širokou škálu funkcí jako je smyslové vnímání, termoregulace, vylučování i resorpce látek. Velice důležitá je její funkce ochranná. V dnešní době nemůžeme opomenout estetické hledisko, a tedy snahu uchovat i u kůže co nejdéle mladistvý vzhled, popřípadě snížit dopady vlivů vnějšího prostředí včetně UV záření. S tím souvisí hledání možností, jak předejít nebo snížit negativní pochody a změny, ke kterým dochází během stárnutí kůže, včetně viditelných projevů, jako jsou vrásky či pigmentové skvrny. Dnes už je dostupných mnoho metod zaměřených na navrácení mladistvého vzhledu či úpravy textury pokožky. Ženy při boji s vráskami využívají plastické chirurgie nebo laserových procedur. Laserové zákroky pomáhají při boji nejen s vráskami, ale lze je podstoupit za účelem odstranění jizev či pigmentace a zlepšení textury pokožky. K dnešní době patří neodmyslitelně kosmetické preparáty. Tyto produkty se často zaměřují na podporu produkce kolagenu, hydrataci a zvláčňování nebo se snaží snížit vliv slunečního záření na kůži. Zaměřují se také na udržení fungující kožní bariéry. Defekty kožní bariéry způsobují dráždění až s možným rozvojem zánětu.

Na strukturu vrchní vrstvy kůže epidermis má vliv také součást lipidového spektra epidermis, cholesterol sulfát (CHS). Nachází se v epidermis s největší koncentrací v granulózní vrstvě a zdá se, že jeho vznik za účasti enzymu cholesterolsulfotransferázy (SULT2B1b) v rámci epidermis je klíčovým modulátorem kožní bariéry a epidermálního obratu. Ovlivněním hladin této molekuly by tedy bylo možné zasáhnout do vlastností a struktury pokožky.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. KŮŽE

Kůže je třívrstevný orgán, který tvoří bariéru vůči vnějšímu prostředí patřící mezi epiteliální systém těla. Kůže, jejíž plocha činí zhruba 1,5–2 m<sup>2</sup> a tloušťka se pohybuje okolo 1,5–4,0 mm v závislosti na lokalizaci na těle, zaujímá okolo 6 % lidské váhy. Plní širokou škálu funkcí, jako je smyslové vnímání, termoregulace, imunitní funkce, vylučování, skladování i resorpce látek. Je metabolicky aktivní, podílí se na zpracování tuků, sacharidů i bílkovin, vlivem UV záření se podílí na tvorbě vitamínu D (cholekalCIFerol). Mezi její nejdůležitější úkoly patří tvorba bariéry fyzikální, biologické i chemické. Brání tělo před mechanickým působením i před tepelnými vlivy prostředí. Díky její struktuře není pro látky z vnějšího prostředí jednoduché překonat zdravou kůži člověka s tím, že samozřejmě záleží na konkrétní struktuře penetrující látky. Povrch pokožky je mírně kyselý, což spolu s mikroflórou, která ji běžně osídluje, tvoří obranný val vůči nepřátelským mikroorganismům (Franz a Lehman 2000, Lüllmann-Rauch 2012).

Nelze opomenout estetický význam kůže, což je v dnešní době velmi aktuální nejen u nás v Evropě. Velká část populace se o svou pokožku pravidelně stará a věnuje ji péči ve snaze udržet si co nejdéle mladistvý vzhled. To není jednoduché, protože u kůže, stejně jako u zbytku lidského těla, dochází s postupem času ke změnám.

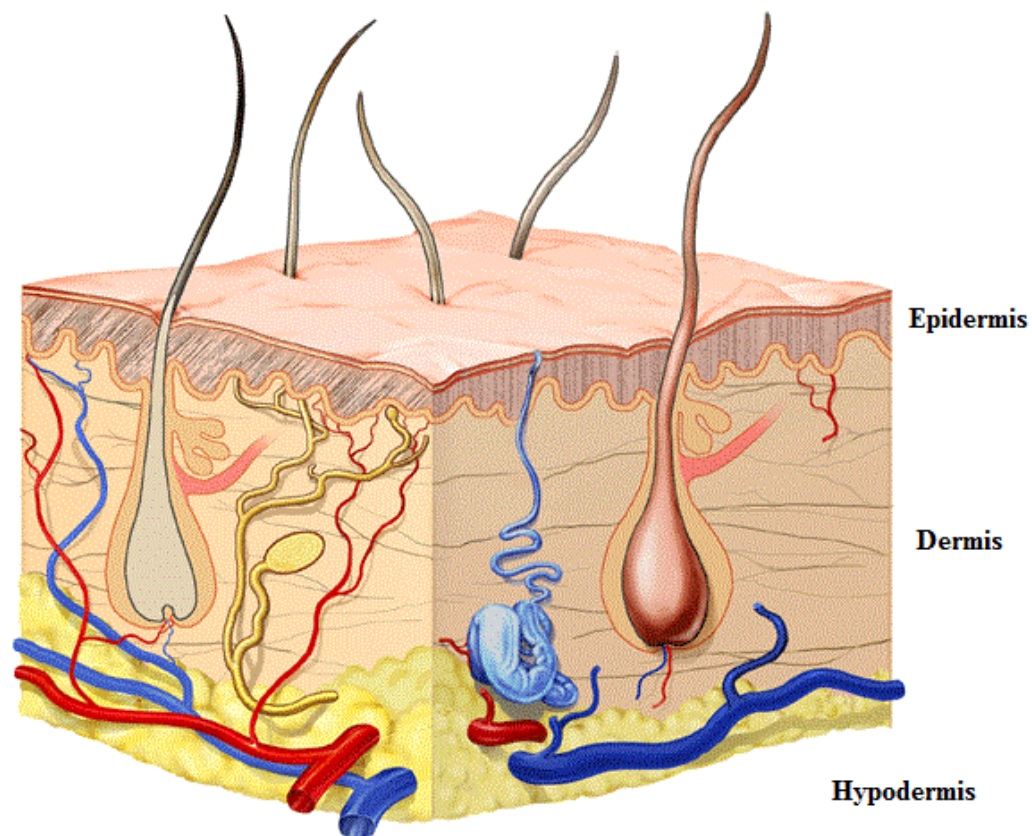
#### 2.1.1. STRUKTURA KŮŽE

Kůže se skládá z tří vrstev, jak je patrné na obrázku 1. Pod svrchní epidermis se nachází dermis a podkožní vazivo neboli hypodermis.

##### 2.1.1.1. Epidermis

Pokožka neboli epidermis je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, jehož buňky, keratinocyty, jsou postupně vytlačovány směrem k povrchu, rohovatí a odlupují se. V tomto procesu dochází k diferenciaci keratinocytů, směrem k povrchu kůže se mění ze živých cylindrických až kubických buněk na ploché bezjaderné korneocyty, jak je znázorněno na obrázku 2. Mění se nejen jejich struktura, ale dochází ke změnám v mezibuněčných prostorách. Celý proces diferenciaci vyústí ve tvorbu nejsvrchnější vrstvy epidermis zvané stratum corneum (SC), která je stěžejní pro tvorbu funkční bariéry kůže. Jednotlivé vrstvy epidermis jsou neustále obnovovány, proces obnovy celé

epidermis trvá okolo 40 – 56 dní (Koster 2009). Epidermis se postupně zbavuje vrchní vrstvy korneocytů v procesu deskvamace čili odlupování SC. Mezi známé faktory podílející se na deskvamaci patří: složení intercelulárních lipidů,  $\text{Ca}^{2+}$  nebo pH. Dále jsou v epidermis přítomny glykoproteinové struktury desmozomy spojující a udržující keratinocyty pospolu. Desmozomy tvoří mechanický spoj mezi buňkami. Skládají se z části intercelulární a intracelulární, která interaguje s keratinovými vlákny a slouží jako ukotvení. Při procesu odlupování dochází k poruše jejich struktury působením serinových proteáz (Franz a Lehman 2000, Thakur a kol. 2008, Lüllmann-Rauch 2012).

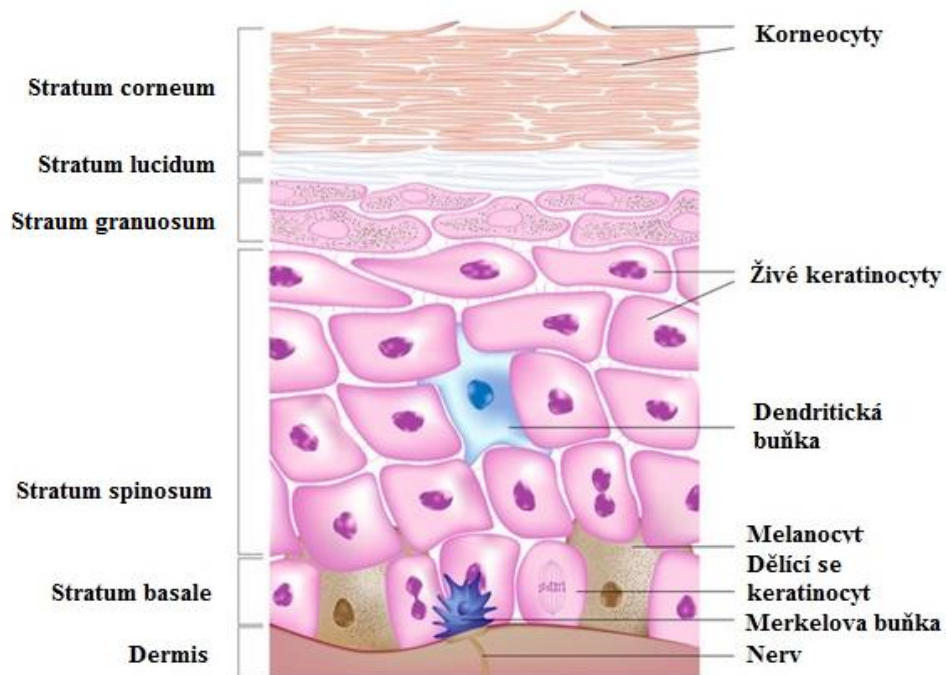


**Obrázek 1.** Řez kůží se znázorněním třech hlavních vrstev (Internet 1, upraveno).

Keratinocyty jsou buňky z velké části vyplněné keratinem, ve vodě nerozpustným proteinem tvořeným alfa-helikální strukturou. Správně uspořádané keratinové vlákno je tvořeno párem keratinů. V normální zdravé epidermis jsou přítomny hlavní čtyři typy keratinu: K5 a K14 především v bazální vrstvě, K1 a K10 ve svrchnějších vrstvách (Lane a McLean 2004).

Vedle keratinocytů se v epidermis vyskytují v menším počtu další buňky se specifickými funkcemi. Melanocyty tvořící melanin, který chrání DNA před škodlivým

vlivem UV záření. Langerhansovy buňky jsou jakožto dendritické buňky součástí imunitního systému, patří mezi antigen-prezentující buňky. Buňky Merkelovy mají mechanoreceptorovou funkci především v oblasti dlaní, plosek nohou a rtů. Jsou přítomny také ve folikulech chlupů (Franz a Lehman 2000, Thakur a kol. 2008).



**Obrázek 2.** Struktura epidermis rozdělena na jednotlivé vrstvy lišící se stupněm diference (Internet 2, upraveno).

Epidermis lze rozdělit na 5 vrstev podle postupných změn ve struktuře buněk i extracelulární matrix:

#### *Stratum basale*

Nejspodnější vrstva se skládá z bohatě se dělících (proliferujících) kubických či cylindrických kmenových buněk chudých na organely, ale bohatých na intermediární filamenta zvaná tonofilamenta. Tyto buňky spojené s bazální membránou hemidesmozomy jsou zdrojem pro neustále se obnovující epidermis. Bazální membrána tvoří přepážku mezi epidermis a dermis (Franz a Lehman 2000, Zahájenský 2007).

### *Stratum spinosum*

Buňky této vrstvy se také čile dělí, jsou mezi nimi široké mezibuněčné prostory, ve kterých jsou patrné výběžky, díky kterým jsou buňky v kontaktu. Syntetizují se zde keratiny o vyšší molekulární hmotnosti. Začínají se formovat granulární lamely, organely obsahující značné množství lipidů.

V této vrstvě se začíná syntetizovat involucrin, rozpustný protein označovaný jako časný ukazatel diferenciaci. Je takto označován z toho důvodu, že jeho syntéza začíná hned poté, co se keratinocyty přestávají dělit, ale také před tím, než dojde k zesílení proteinových řetězců a k tvorbě proteinových obalů buněk (Watt a Green 1981, Franz a Lehman 2000).

Enzym transglutamináza začíná být syntetizován také ve stratum spinosum a i dále ve vyšší vrstvě stratum granulosum. Její role při formování SC je zásadní, protože katalyzuje zesílení proteinů ve vrstvě stratum granulosum. Vznikají pak polymerní produkty mechanicky i chemicky odolné, které jsou umístěny na vnitřní straně plasmatické membrány keratinocytů (Watt a Green 1981).

### *Stratum granulosum*

Stratum granulosum se skládá z 1 až 5 vrstev zploštělých buněk obsahujících cytoplazmatická bazofilní keratohyalinová granula. Granula obsahují profilaggrin, na histidin bohatý prekurzor filaggrinu i další produkty diferenciaci keratinocytů, např. proteiny involucrin, loricrin, cystatin- $\alpha$ . V této vrstvě jsou patrné postupné degradační změny jádra a kondenzace tonofilament. Filaggrin poslouží jako matrix pro spletená vlákna keratinu ve SC. Loricrin se stane spolu s dalšími proteiny součástí proteinového obalu keratinocytů. V této vrstvě dochází k přesunu involucrinu z cytoplazmy do buněčné membrány a k jeho zesílení pomocí transglutaminázy (Franz a Lehman 2000, Thakur a kol. 2008).

### *Stratum lucidum*

Tato vrstva je patrná jako souvislá vrstva u tlustší kůže např. na ploskách nohou nebo dlaních. Jedná se o velice tenkou až průsvitnou vrstvu plochých, těsně k sobě přiléhajících buněk převážně bez jader i ostatních organel. Stratum lucidum pomáhá

snižovat dopady mechanického namáhání epidermis na pomezí stratum granulosum a stratum corneum, kde tvoří elastickou vrstvu (Internet 10).

### *Stratum corneum*

SC je zrohovatělá vrstva, složená z těsně k sobě přiléhajících odumřelých plochých korneocytů ve zhruba 10–25 vrstvách. Obrat buněk této vrstvy, tedy čas, za který je SC zcela obnoveno, je zhruba 10 až 15 dní. SC má významnou roli v tvorbě bariéry a při transdermálním vstřebávání.

SC bývá často schematicky přirovnáváno ke zdi složené z cihel a malty. Cihly reprezentují terminálně diferencované keratinem vyplněné korneocyty a maltu lipidové dvouvrstvé lamely umístěné intercelulárně. S postupující diferenciací keratinocytů roste i celková masa lipidů. Lamelární granula jsou orgány vyplněné plochými váčky, které obsahují lipidové složky. Tato granula jsou syntetizována v postupně zrajících keratinocytech a následně jsou exocytována do mezibuněčných prostor. V čase exocytózy, ke které dochází na hranici stratum granulosum a corneum, granula obsahují převážně fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol a také hydrolytické enzymy. Po enzymatických přeměnách se hlavními obsahovými složkami stávají ceramidy (tvoří zhruba 50% z přítomných složek), volné mastné kyseliny (15%) a cholesterol (25%). Lipidy umístěné v mezibuněčných prostorech se podílí nejen na tvorbě bariéry, ale také na deskvamaci.

Obsažené mastné kyseliny jsou nasycené, nevětvené a nejčastěji se vyskytující délce 22 až 24 uhlíků. Kyseliny mohou být syntetizovány přímo v epidermis nebo získávány ze systémové cirkulace. Esenciální mastné kyseliny jako např. kyselina linoleová musí být přijímány v potravě, jelikož si je tělo nedokáže samo syntetizovat. Ceramidy postupně nahrazují plazmatickou membránu, pod kterou se formuje již zmíněná proteinová síť. V SC jsou přítomny ceramidy I až VI, které jsou řazeny podle rostoucí polarity. Ceramidy patří mezi sfingolipidy, jsou tvořeny aminoalkoholem sfingosinem, který je přes amidovou skupinu navázán na karboxylovou kyselinu (Franz a Lehman 2000, Wertz 2000, Madison 2003, Zahájenský 2007).

### **2.1.1.2. Dermis**

Dermis je odpovědná za pevnost a pružnost kůže a také za výživu epidermis. Nachází se pod epidermis, se kterou je spojena bazální membránou. Bazální membrána není rovná, ale vybíhá do epidermis v četných papilách.

Dermis obsahuje fibroblasty, buňky které jsou součástí pojivové tkáně a účastní se procesu hojení. Produkují extracelulární matrix zastoupenou především kolagenem (hlavně typem I a III), elastinem, proteoglykany a kyselinu hyaluronovou, která má významnou schopnost vázat vodu. Tyto komponenty udržují pokožku pružnou a odolnou proti mechanickému namáhání. Dále má v dermis místo krevní zásobení, lymfatické cévy, smyslová tělíska, vlasově kořínky, mazové a potní žlázy (Franz a Lehman 2000, Lüllmann-Rauch 2012).

### **2.1.1.3. Hypodermis**

Podkožní vazivo je tvořeno z velké části tukovými buňkami (adipocyty), jejichž množství se dle umístění na těle různí. Slouží k tlumení nárazů, tepelné izolaci vnitřního prostředí i jako energetická zásoba. Adipocyty tvoří váčky obklopené pojivovou tkání. Tkáň je dobře cévně zásobena (Franz a Lehman 2000, Lüllmann-Rauch 2012).

## **2.2. STÁRNUTÍ KŮŽE**

V průběhu let dochází v lidském těle k nevyhnutelným změnám, které lze pojmenovat slovem stárnutí. Při stárnutí dochází k snížení maximální funkční schopnosti orgánů a tím k zvýšené náchylnosti organismu k poškození, nemocem i smrti.

Stejně jako zbytek těla stárne i lidská kůže (obrázek 3). Stárnutí probíhá individuálně v závislosti na vnitřních vlastnostech organismu i na okolním prostředí. Stárnutí kůže se v mnohých zdrojích rozděluje na stárnutí postupné v závislosti na čase a tzv. photoaging, tedy změny kůže vyvolané opakovaným vystavováním slunečnímu záření a působení UV záření. Výraz photoaging poprvé použil Kligman, při zkoumání vlivu slunečního záření na kůži farmářů a námořníků (Kligman a Kligman 1986). Ukazuje se, že oba případy mají mnoho znaků společných a UV záření může projevy chronologického stárnutí uspíšit.

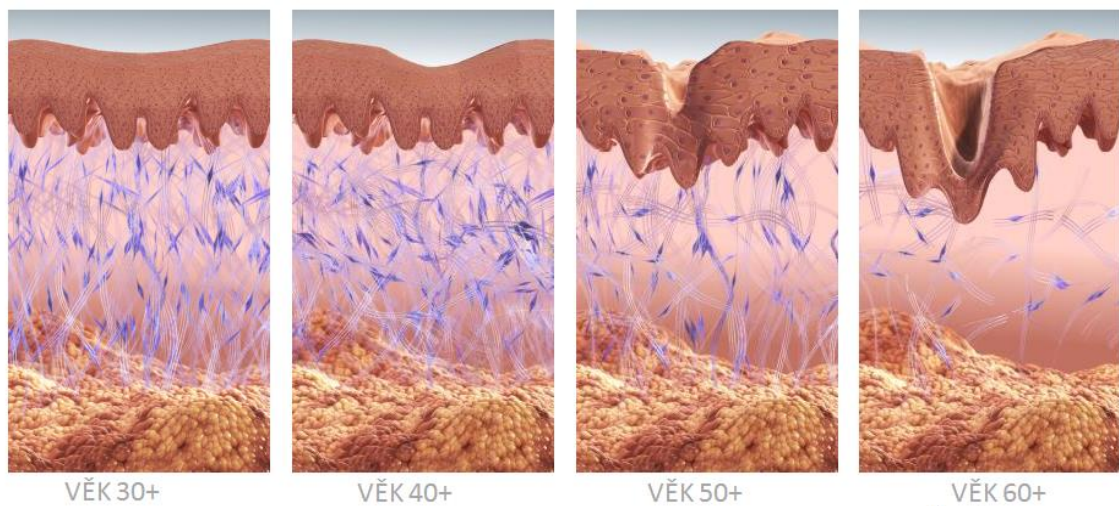
Na rozdíl od vnitřních orgánů je ale kůže orgánem povrchovým, a tím pádem jsou její změny i okem patrné. Proto je o péči o pokožku velký zájem, hlavně co se udržení

mladistvého vzhledu týká. Mezi vnitřní faktory ovlivňující stárnutí kůže se dají zahrnout změny na genetické, metabolické i hormonální úrovni. Dále nemůžeme opomenout vlivy vnějšího prostředí, kterým je kůže vystavena přímo. Působení faktorů se časem kumuluje a způsobuje změny různého rozsahu.

### 2.2.1. Viditelné znaky stárnutí

Změny stárnoucí kůže jsou na pohled patrné, stárnoucí pokožka je bledá, méně pružná s jemnými vráskami, může být i suchá a výjimkou nejsou ani různé většinou benigní útvary. Pocit tenké až papírové pokožky u starší populace není dán přímo tenčím profilem epidermis, ale spíše ztrátou pružnosti (Thakur a kol. 2008). U kůže vystavené UV záření dochází ke změnám pigmentace, kromě jemných vrásek jsou více přítomny i ty hlubší (Laga a Murphy 2009), mohou se také objevit pavučinky způsobené rozšířenými cévami čili tzv. teleangiektazie (Yaar a Gilchrest 2007).

Schopnost regenerace a odolnost kůže vůči infekcím jsou s rostoucím věkem také zasaženy. Podrážděné či poškozené stárnoucí pokožce trvá delší dobu, než nabude svých původních vlastností. To je způsobeno celkově pomalejší obnovou buněk, keratinocytů i ostatních a nižší syntetickou aktivitou (Ghadially 1995, Thakur a kol. 2008).



**Obrázek 3.** Průřez stárnoucí kůží v průběhu čtyř dekad. (Internet 3, upraveno)

## **2.2.2. Mechanismy způsobující a doprovázející stárnutí kůže**

V současné chvíli existuje více teorií o stárnutí kůže. Stárnutí je komplexní děj a je pravděpodobné, že každá z teorií na něm má svůj podíl. Na stárnutí má zajisté vliv genetická výbava, okolní prostředí a probíhající hormonální a metabolické procesy. Ne zcela objasněna je teorie založená na zvýšené apoptóze buněk. Ke zvýšené apoptotické činnosti u buněk sice dochází, ale není jasné, zda v důsledku genetického naprogramování nebo vlivu okolních působků. Je zkoumán také vliv oxidačního stresu a tvorby reaktivních především kyslíkových forem, které vznikají jak v důsledku běžné činnosti organismu, tak jako reakce na podněty z vnějšího prostředí. Dále ke stárnutí zřejmě přispívají i s věkem se zkracující koncové části chromozomů telomery (Callaghan a Wilhelm 2008).

### **2.2.2.1. Volné radikály**

Volné radikály (VR) jsou často zmiňovaným faktorem v souvislosti se stárnutím a uplatňují se velkou měrou zřejmě i v kůži. Tyto molekuly mají také v organismu svou fyziologickou roli a funkci např. běžně vznikají činností buněčných systémů v mitochondriích nebo při fagocytóze. Enzymy jako cytochrom P450, xantinoxidázy, cyklooxygenázy i další se podílí na vzniku těchto radikálů (Callaghan a Wilhelm 2008). Zřejmě proto organismus disponuje širokým spektrem přirozených antioxidantů, které mají schopnost volné radikály zneškodnit. Existují enzymy s antioxidační aktivitou (superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza atd.) i menší molekuly antioxidantů (vitamín C, vitamín E, kyselina močová, glutathion, bilirubin atd.).

Jedním z prvních průkopníků teorie podporující účast volných radikálů na stárnutí byl už v padesátých letech minulého století Denham Harman (Harman 1993). Radikály (např. hydroxylový radikál, superoxid, peroxid) mohou vznikat v důsledku oxidačního stresu. Na pokožku působí vnější prostředí, jako UV záření a polutanty. Aktivita antioxidačních mechanismů s věkem klesá, a to může přispívat ke zvýšeným hodnotám VR ve stárnoucí pokožce, přestože epidermis jakožto nejsvrchnější vrstva kůže disponuje relativně vysokou koncentrací antioxidantů (Rhie 2001). Hlavním problémem VR je jejich schopnost poškozovat struktury nukleových kyselin, proteinů i lipidů a také zasahovat do signálních drah buněk. Působením oxidačního stresu dochází ke kumulaci mutací jaderné i mitochondriální DNA (Callaghan a Wilhelm 2008). Tím pádem

dochází i k chybám v expresi proteinů zde kódovaných, může být porušen dýchací řetězec i další mitochondriální enzymatické systémy. Díky oxidačnímu stresu může docházet k oxidaci makromolekul proteinů, které se stávají odolnější vůči degradaci v proteazomech (Yaar a Gilchrest 2007).

U kůže poškozené UV zářením lze najít abnormality jako variabilní tloušťku, nepravidelnosti kolagenní i elastinové sítě, zvýšenou činnost degradačních enzymových systémů či zánětlivé změny. Výrazné jsou změny pigmentace i tvorba předčasných hlubokých vrásek (Rhie 2001, Callaghan a Wilhelm 2008). UV záření způsobuje zvýšenou aktivaci některých povrchových receptorů s následným ovlivněním signálních drah (např. receptory EGF, IL-1). Indukuje se exprese prozánětlivých cytokinů. Dochází k poškození membránových struktur, může dojít k uvolnění kyseliny arachidonové a k navazujícímu rozvoji znaků zánětu. Vliv na transkripční faktory se projeví negativně v syntéze kolagenu. V keratinocytech dochází působením UV záření k syntéze granzymu B a perforinu, proteinů typicky přítomných v cytotoxických lymfocytech a NK buňkách (Yaar a Gilchrest 2007).

#### **2.2.2.2. Zkracování telomer**

Telomery jsou nukleotidové struktury přítomné na koncích chromozomů. Jelikož nedochází k dokonalé replikaci telomer, s každým dalším buněčným dělením dochází k jejich zkracování. Existuje domněnka, že pokud dojde k přílišnému zkrácení telomer, buňka už není schopna dalšího dělení a tím je tedy určena i její životnost. Buňky neomezeně se dělící obsahují telomerázy, enzymy schopné syntetizovat telomery. Telomerázy jsou obsažené především v kmenových a nádorových buňkách. Ukázalo se, že telomerázy mohou být přítomny také v epidermis. Prozatím není zcela jasné, jaký je jejich původ ani co přesně může působit na jejich aktivitu. Navrhovanými původci jsou kmenové buňky bazální vrstvy nebo leukocyty infiltrující epidermis. Aktivní enzymy byly zaznamenány jak u normální pokožky, tak u rakovinných útvarů. Zajímavým zjištěním bylo zaznamenání zvýšené aktivity telomerázy u pokožky vystavované slunečnímu záření oproti pokožce běžně zakryté. Toto zjištění naznačuje, že UV záření by mohlo být modulátorem aktivity telomeráz (Taylor 1996, Ueda 1997, Callaghan a Wilhelm 2008, Wilson 2008).

## 2.3. SULFONACE

Sulfonace je důležitou reakcí uplatňující se v metabolismu člověka. Slouží z velké části k inaktivaci molekul, sulfonací se zvyšuje jejich hydrofilita a tím se usnadňuje jejich exkrece z organismu. Sulfonaci katalyzují enzymy zvané sulfotransferázy (SULTs). Bylo identifikováno dohromady několik desítek genů pro SULTs u savců, hmyzu i u rostlin (Nimmagadda a kol. 2006). Z toho nejméně dvanáct bylo nalezeno u lidí (Falany a kol. 2006). Tyto sulfotransferázy lze rozdělit do podrodin: fenol– (SULT1A, SULT1B, SULT1C), estrogen– (SULT1E1) a hydroxysteroidsulfotransferázy (SULT2A1, AULT2B1). Čtvrtá skupina obsahuje sulfotransferázy o neznámé aktivitě. Toto dělení, kdy základem je nejčastější substrát enzymu, není striktní. Další pohled na dělení sulfotransferáz nalezneme například ve článku Gamage a kol. (2006).

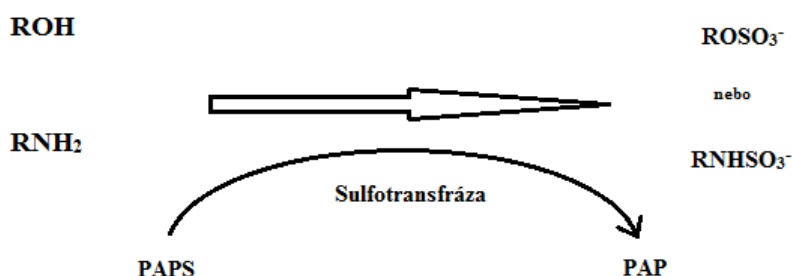
Geny kódující SULTs bývají často polymorfní, což může vyústit v izoformy enzymů s pozměněnou biochemickou aktivitou (Geese a Raftogianis 2001). SULTs nebývají úzce specifické, vykazují širokou substrátovou specifitu a jejich pole působnosti se mohou navzájem překrývat. Například ženský hormon estrogen může být konjugován se sulfátem pomocí nejméně tří rozdílných SULTs, a to SULT1A1, SULT1E1 a SULT2A1. V buňkách dochází k sulfonaci hormonů, neurotransmiterů, léčiv i dalších xenobiotik. Předpokládá se, že steroidní hormony např. estrogeny i androgeny v sulfonované formě slouží jako neaktivní zásoba, jelikož sulfoskupina je za fyziologického pH ionizována a brání molekule ve vazbě na receptor (Geese a Raftogianis 2001). K jejich aktivaci dojde jednoduše hydrolýzou. Na druhou stranu sulfonací mohou vznikat naopak biologicky aktivní elektrofilní molekuly. Příkladem může být látka s vazodilatačním a růst vlasů podporujícím potenciálem minoxidil, který svou roli plní až po konjugaci se sulfátem na minoxidil sulfát (Falany a kol. 2006). Aktivovány mohou být prokancerogeny, které se díky elektrofilní molekule mohou vázat na DNA a způsobit její poškození (Falany 1997).

### 2.3.1. Reakce

SULT přeměňuje substrát za přítomnosti kofaktoru na sulfonovaný produkt (obrázek 4). Dochází k přenosu sulfoskupiny  $\text{SO}_3^-$  u většiny reakcí především na hydroxyl a minoritně také na aminoskupinu. Nejčastějším kofaktorem sulfokojugačních reakcí je jednoznačně molekula 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS). Při reakci dochází k navázání donoru i akceptoru sulfoskupiny na konkrétní enzym, které následně vyústí

v uvolnění molekuly 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátu (PAP) a sulfonovaného produktu (Gamage a kol. 2000).

### Obecné schéma sulfonace



**Obrázek 4.** Schéma sulfonace.

PAPS je velice významnou molekulou, účastní se metabolických reakcí v lidském těle. Tato molekula označovaná také jako „aktivní sulfát“ může být syntetizována ve všech buňkách lidského těla v jejich cytoplazmě. Syntéza probíhá ve dvou krocích za účasti anorganického sulfátu a ATP. V prvním kroku za účasti ATP-sulfurylázy vznikne adenosinfosulfát a následuje reakce katalyzovaná kinázou za vzniku finálního PAPS. Tato reakce je relativně energeticky náročná a proto se PAPS v buněčné cytoplazmě vyskytuje v nízkých koncentracích. V prvním kroku ovšem vzniká pyrofosfát, který je rychle hydrolyzován, a tím pádem reakce nemůže probíhat v opačném směru a především proto syntéza PAPS může probíhat relativně rychle. Sulfonace bývá často limitována právě množstvím PAPS v cytoplazmě a syntéza PAPS zase množstvím anorganického sulfátu (Venkatachalam 2003).

## 2.3.2. SULT2B1b

### 2.3.2.1. Zařazení SULT2B1b do rodiny SULTs

Podrodina sulfotransferáz SULT2, nazývaná také hydroxysteroidsulfotransferázy zahrnuje dva geny pro SULT2A a SULT2B. Proteiny kódované SULT2B sdílí 48% ze svých aminokyselinových sekvencí se SULT2A. První z genů kóduje skupinu SULT2A konkrétněji SULT2A1, která se podílí například na sulfonaci dehydroepiandrosteronu (DHEA). DHEA je prekurzor jak androgenních tak estrogenních hormonů produkovaný v nadledvinkách. Díky už zmíněné široké substrátové specifitě je SULT2A1 schopna sulfonovat i hydroxylovou skupinu

testosteronu i estrogeneru, a také léčiva jako tibolon (užití u hormonální substituční terapie) a kortikosteroid budesonid (Falany a kol. 2006).

Před kratší dobou došlo k objevu druhé skupiny SULT2B. Gen pro SULT2B1 nacházející se na 19. chromozomu kóduje dva enzymy SULT2B1a a SULT2B1b. Rozdílnost dvou izoform je dána rozdílným začátkem transkripce genu a alternativním splicingem mRNA. To se projevuje především v rozdílnosti jejich N-konců. Obě izoformy vykazují specifitu směřovanou především na 3 $\beta$ -hydroxylovou skupinu na steroidním skeletu, méně na 3 $\alpha$ -hydroxysteroidy a estrogény. SULT2B1b katalyzuje sulfonaci zejména cholesterolu, zatímco SULT2B1a sulfonaci pregnenolonu. Pregnenolon sulfát lze označit za neurosteroid modulující aktivitu neurotransmiterů (Gamage a kol. 2005, He a Falany 2006).

SULT2B1b obsahuje na N-konci 23 aminokyselin, které jsou důležité pro jeho aktivitu vůči cholesterolu a na C-konci úsek 53 aminokyselin bohatý na prolin, o jehož roli se v současné době spekuluje. Bylo prokázáno, že na aktivitu enzymu vliv nemá, ale mohl by hrát roli v odolnosti vůči degradaci a stabilitě proteinu (He a Falany 2006). SULT2B1b je složena z 365 aminokyselin, z čehož 344 aminokyselin tvoří identickou sekvenci se SULT2B1a odvozenou od totožných exonů (Falany a kol, 2006). Falany a kol. (2006) popsali problémy s izolací aktivního enzymu SULT2B1b jak z buněčných linií, tak ze savčích tkání.

### **2.3.2.2. Lokalizace SULT2B1b**

SULT2B1b je hojně exprimovaná v krevních destičkách, prostatě, dýchacích cestách, placentě a kůži. Na subcelulární úrovni je protein SULT2B1b lokalizován v cytosolu buněk i v jejich jádře. To, kde je enzym přítomen více se liší u jednotlivých tkání. Například v placentě je přítomen v cytosolu i v jádře, v epitelu prostaty pouze v cytosolu. U rakovinových buněk prsní tkáně je enzym přítomen převážně v cytosolu a ukázalo se, že je i více exprimován než u zdravých buněk této tkáně (Falany a kol. 2006).

### **2.3.2.3. Role SULT2B1b v kůži**

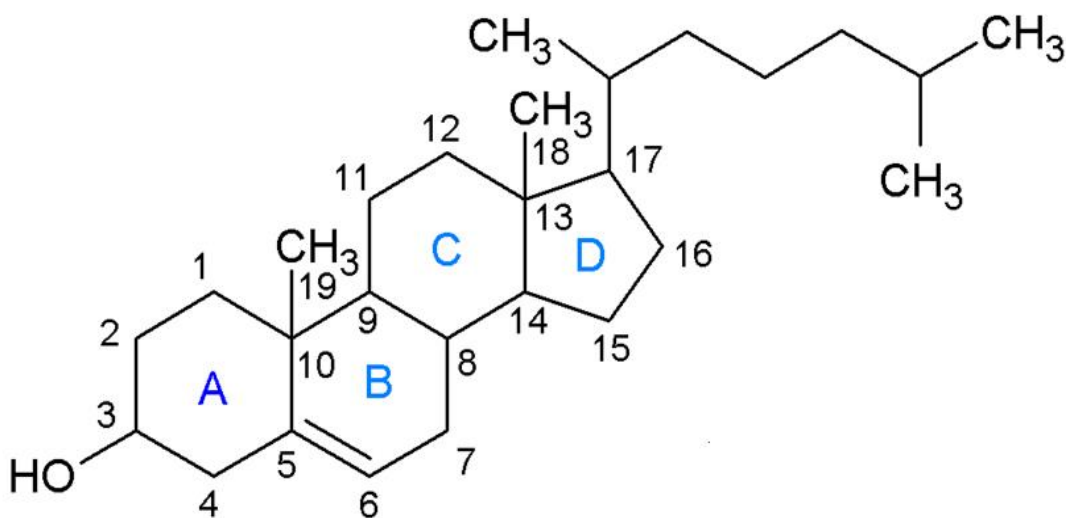
SULT2B1b je jedinou sulfotransferázou sulfonující steroidní molekuly, jejíž exprese byla doposud zaznamenána v epidermis. Její hlavní rolí v kůži je syntéza cholesterol sulfátu, což koreluje s jejich společným majoritním výskytem v granulární vrstvě epidermis. Ve stejné vrstvě je přítomen filaggrin, což naznačuje že SULT2B1b

či cholesterol sulfát (CHS) by mohly rovněž patřit mezi pozdní markery diference keratinocytů (Higashi a kol. 2004).

### 2.3.3. Cholesterol sulfát

#### 2.3.3.1. Struktura CHS

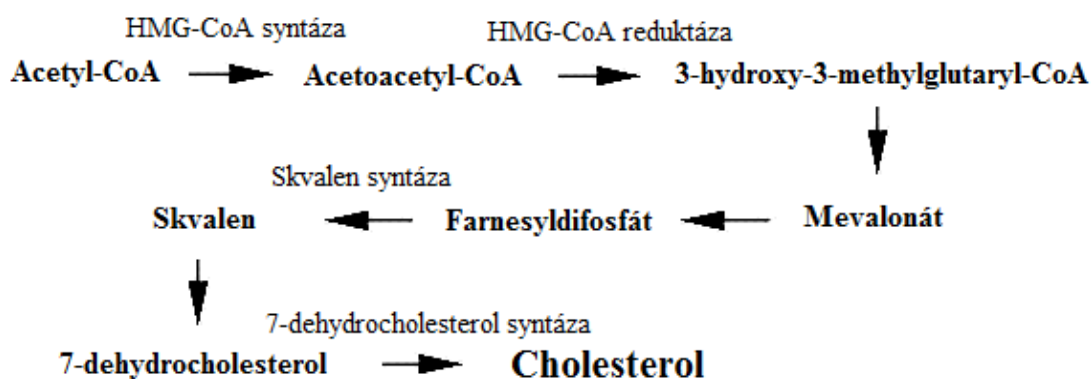
Chemická struktura CHS vychází z jeho prekurzoru cholesterolu a ta zase z cyklopentanoperhydrofenantrenu, jak je vidět na obrázku 5. Na steroidním skeletu je z jedné strany navázán nepolární uhlovodíkový řetězec v poloze 17 $\beta$  a v poloze 3 $\beta$  polární hydroxylová skupina. Polární část cholesterolu je relativně malá a proto má molekula celkově hydrofobní charakter. Cholesterol je steroidní alkohol sloužící nejen jako součást buněčných membrán živočišných buněk, ale je také prekurzorem steroidních hormonů nebo žlučových kyselin. V buněčných membránách zajišťuje optimální fluiditu (tekutost) či rigiditu v závislosti na obsahu dalších komponent membrány i na jeho množství. Jeho funkce v SC bude zřejmě obdobného charakteru (Wertz a Michniak 2000).



**Obrázek 5.** Vzorec cholesterolu (Internet 4, upraveno).

Buňky bazální vrstvy epidermis obsahují LDL (low density lipoprotein) receptory a jsou schopny vyladit cholesterol ze systémové cirkulace, zatímco další vrstvy už jsou nuceny si cholesterol i další lipidové složky vytvářet sami *de novo*. energii na syntézu lipidů buňky získávají především z anaerobní glykolýzy za vzniku pyruvátu či laktátu.

Základní krokem při syntéze cholesterolu je tvorba  $\beta$ -hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) ze třech molekul acetyl-CoA. Krok, na kterém závisí rychlost syntézy, je redukce HMG-CoA na mevalonát-CoA za účasti HMG-CoA-reduktázy. Aktivita tohoto stěžejního enzymu je regulována fosforylací, kdy defosforylovaný enzym je aktivní. Syntéza cholesterolu je složitá a energeticky náročná metabolická dráha probíhající v mnoha krocích, jak je zjednodušeně znázorněno na obrázku 6 (Wertz a Michniak 2000).



**Obrázek 6.** Zjednodušené schéma syntézy cholesterolu.

Z nepolární molekuly cholesterolu vzniká sulfonací cholesterol sulfát, který má amfifilní charakter. CHS má schopnost zpětnou vazbou blokovat syntézu cholesterolu inhibicí HMG-CoA-reduktázy.

### 2.3.3.2. CHS obrat a funkce v epidermis

K sulfonaci CH dochází především ve spodních vrstvách epidermis stratum spinosum a stratum basale. Nejvyšší koncentrace CHS je dosažena ve vrstvě stratum granulosum a v SC jeho množství klesá. Ve stratum granulosum tvoří až 5% přítomných lipidů. S postupnou diferenciací keratinocytů dochází k přesunu CHS na vnější stranu cytoplazmatické membrány. Ve SC dochází k jeho hydrolýze steroidní sulfatázou, čímž je dokončen cyklus CHS v pokožce (Strott a Higashi 2003, Elias a kol. 2014).

CHS stimuluje diferenciaci keratinocytů. Má pozitivní vliv na transkripci transglutaminázy I, enzymu stěžejního pro zesílení proteinů v průběhu diferenciaci keratinocytů, i na aktivitu izoforem proteinkinázy C. CHS má zřejmě vliv na hladiny proteinu AP-1, transkripčního faktoru, který sám ovlivňuje diferenciaci. CHS funguje jako transkripční faktor genu pro involucrin, proteinu, který je jednou z hlavních

součástí obalu rohovatějících buněk. CHS má své místo v procesu deskvamace neboli olupování buněk. Zpomaluje deskvamaci díky inhibici serinové proteázy zodpovědné za degradaci desmozomů, a tím desmozomy stabilizuje. Snížením množství CHS díky hydrolýze steroidsulfatázou a následným zvýšením koncentrace cholesterolu dochází k ovlivnění stability lipidových dvojvrstev, konkrétně je snížena adheze mezi buňkami (Strott a Higashi 2003, Elias a kol. 2014). Vyšší množství cholesterolu ve svrchních vrstvách epidermis tak ovlivňuje správný průběh deskvamace.

### **2.3.3.3. Role CHS v lidském těle**

Sulfonace steroidů byla popsána už na přelomu 30. a 40. let 19. století. Ke zkoumání a izolaci CHS došlo o něco později, v 60. letech. Po objevení molekuly začal výzkum role CHS v organismu. Z lidské plazmy byl CHS izolován již v roce 1965 Drayerem. Je nejběžnějším sulfátem přítomným v lidské plazmě. Jeho plazmatické hladiny bývají uváděny v rozmezí zhruba 100-300 µg/ml. Transportován je převážně jako součást LDL. CHS může sloužit jako základní steroidní sulfát pro vznik dalších sloučenin (např. pregnenolon sulfátu). Stejně jako cholesterol má i CHS roli v udržování integrity buněčných membrán. Zvýšené hladiny mohou poukazovat na patologický proces jako např. cirhóza jater, hypercholesterolemie, hypothyreóza (Strott a Higashi 2003).

CHS je přítomen v různých koncentracích např. v játrech, ledvinách, nadledvinách, plicích, mozku i v nehtech a vlasech. Nalezen byl také v aterosklerotických plátech (Strott a Higashi 2003). Významná se jeví jeho přítomnost v krevních destičkách a červených krvinkách. Má místo v koagulační kaskádě při tvorbě sraženin, což spolu s přítomností v aterosklerotickém plátu ukazuje na jeho možný protrombotický potenciál (Merten a kol. 2001). CHS je přítomen relativně široce v mnoha typech biologických membrán, kde se může uplatňovat při formování jejich struktury a podílet se na jejich stabilitě a fyzikálních vlastnostech. CHS je z těla vylučován spolu s dalšími sloučeninami žlučí, ale vyskytuje se také v moči, což ukazuje využití obou eliminačních cest (Strott a Higashi 2003).

### **2.3.3.4. Kožní patologie a podíl cholesterol sulfátu**

#### **2.3.3.4.1. X-vázaná ichthyóza**

Ichthyózy obecně patří mezi dermatózy, související s poruchami rohovatění kůže (Williams a Elias 1981). Název etymologicky vychází z řeckého „ichtys“ neboli ryba. Tato onemocnění se mohou projevovat v různé intenzitě v závislosti na genetických

faktorech a působení okolního prostředí. Vyznačují se změnou struktury SC. Pokožka bývá šupinatá. X-vázaná ichtyóza (XLI, X-linked ichthyosis) patří mezi relativně časté ichtyózy. K projevům XLI dochází po narození a bývají individuální. Podkladem XLI je mutace genu kódujícího steroidsulfatázu (SS), jehož lokus se za normálních okolností nachází na krátkém raménku chromozomu X. Onemocnění je recesivní, ke klinickým obtížím dochází skoro výhradně u mužů (Elias a kol. 2014).

Díky snížené aktivitě SS nebo absenci její aktivity dochází ke kumulaci cholesterol sulfátu a snížení obsahu cholesterolu ve SC. Hladina CHS bývá až desetkrát vyšší než za normálních podmínek. To má za následek zvýšenou stabilitu desmozomů a stejně tak zvýšenou soudržnost intercelulární lipidové vrstvy. SC bývá tlustší, bývá přítomna hyperkeraóza (Williams a Elias 1981).

Klinicky se XLI může začít projevovat už po narození nejprve jemnými šupinkami a olupováním. Následně postižená ložiska tmavnou, což je způsobeno kumulací melanosomů, které nejsou správně degradovány SS. Funkce kožní bariéry vykazuje abnormality za běžných podmínek i při podráždění (Zettersen a kol. 1998, Elias a kol. 2014). Zajímavé se jeví, že při topické aplikaci cholesterolu na poškozenou pokožku pacientů s XLI dochází ke zrychlení regenerace. Stejně tak tomu je u zdravé stárnoucí pokožky, zatímco na normální mladou epidermis má aplikace cholesterolu malý vliv. Pokud se naopak na zdravou pokožku aplikuje směs s CHS, dochází k projevům ichtyózy, tedy k šupinatění (Zettersen a kol. 1998).

#### **2.3.3.4.2. Atopická dermatitida**

Atopická dermatitida patří mezi většinou chronická zánětlivá kožní onemocnění. Kůže bývá charakteristicky suchá a náchylná k podráždění. Na původu i průběhu onemocnění se podílí velmi mnoho faktorů. Časté je střídání fáze bez klinických projevů a relapsů. Pokožka pacientů trpících AD ale vykazuje poruchy kožní bariéry i za klidové fáze. Podíl na onemocnění má také porušená lipidová struktura. Bývá snížen obsah ceramidů, především ceramidů I a III. Naopak koncentrace cholesterolu může být zvýšená a poměr ceramidy/cholesterol u pacientů trpících AD výrazně nižší než u běžné populace. Ukázalo se, že SC u AD obsahuje méně CHS. Nedostatečné množství CHS může mít podíl na zvýšeném olupování pokožky (Nardo a kol. 1998).

### **2.3.3.4.3. Lupénka**

Lupénka neboli psoriasis vulgaris patří mezi častá chronická kožní onemocnění. Dále se lupénka může charakterizovat jako neinfekční zánětlivé autoimunitní onemocnění se sklonem k recidivám. Její výskyt roste, je označována za civilizační chorobu. Lupénka je charakteristická velmi rychlým obratem kožních buněk. Dochází ke zvýšené aktivaci lymfocytů T, které se podílejí na zánětlivých změnách. Epidermální buňky se rychleji množí, ale nedokonale se diferencují. Involuckrin bývá normálně exprimován, zatímco profillagrin či loricrin se vyskytují v malých nebo nulových koncentracích. Typickým znakem je chybějící stratum granulosum a korneocyty obsahující jádro. Stejně jako pozdní markery diference je exprese SULT2B1b prakticky nedetekovatelná (Higashi a kol. 2004).

### **2.3.3.4.4. Lichen planus**

Lichen planus je zánětlivé onemocnění postihující kůži a sliznice. Charakteristickým projevem jsou ploché lesklé oválné a svědivé pupínky. K výsevu pupínků dochází nejčastěji mezi 40. až 60. rokem života. Etiologie není známá (Taylor 2003). Lichen planus disponuje nadstandardně širokou granulární vrstvou, kdy SULT2B1b je exprimována v celé šíři epidermis vyjma SC (Higashi a kol. 2004).

## **2.3.4. SULT2B1b a stárnutí kůže**

Jak bylo napsáno výše, v průběhu let dochází v pokožce ke změnám funkčním i strukturálním a to v různém rozsahu. Ani cyklus CHS v epidermis zřejmě nezůstává během stárnutí lidského organismu beze změn.

Už syntéza prekursoru CHS cholesterolu bývá i za normálních podmínek u stárnoucí kůže snížena. U stárnoucí kůže může být počet vrstev SC mírně zvýšen, například v oblasti tváří či zad. Kůže se může zdát drsnější s větším sklonem k šupinatění. Ukázalo se, že plocha keratinocytů závisí na rychlosti průchodu buňky jednotlivými stádii diference a je známo, že obrat buněk epidermis s věkem klesá. Keratinocyty starší epidermis mívají větší plochu oproti mladé (Sauermann a kol. 2002, Haratake a kol. 2006).

Při studii provedené na myších bylo zjištěno, že SC u stárnoucích jedinců má více vrstev a zároveň deskvamace neprobíhá stejně rychle jako u mladých myší, bývá

pomalejší. Hladiny cholesterolu ve svrchních vrstvách epidermis klesají, zatímco množství CHS může růst. Tudíž dochází s věkem ke zvýšení poměru CHS/CH, a tím ke zvýšení vlivu CHS. Cholesterol, jakožto produkt hydrolýzy CHS v SC, ukončuje inhibiční vliv CHS na deskvamaci. Ukázalo se, že zatímco hladiny CHS mohou být vyšší, aktivita steroidsulfatázy zůstává přibližně na stejné úrovni. Množství CHS v epidermis by mělo korelovat s aktivitou SULT2B1b, což by hypoteticky mohlo znamenat, že aktivita SULT2B1b s věkem může narůstat. Při této studii byl zkoumán také vliv topické aplikace mevalonátu na stárnoucí pokožku. Po aplikaci mevalonátu došlo k navýšení syntézy cholesterolu, a tím i jeho obsahu, zatímco obsah CHS zůstal nezměněn. Po použití mevalonátu také došlo ke snížení počtu vrstev SC. Ale u pokožky mladých myši nevyvolala aplikace mevalonátu změny poměru CHS/CH jak tomu bylo u stárnoucích jedinců. Aplikace přímo cholesterolu na stárnoucí myši pokožku sice nevyvolala zvýšení syntézy cholesterolu, ale výsledný stav pokožky byl srovnatelný se stavem po aplikaci mevalonátu (Haratake a kol. 2006).

## **2.4. METODY STANOVENÍ AKTIVITY SULT**

Enzymy jsou látky bílkovinné povahy uplatňující se v organismu jako katalyzátory biochemických reakcí. Pro práci s enzymy a studium jejich vlastností je potřeba zvolit vhodnou analytickou metodu, schopnou dostatečně přesně a specificky změřit námi požadované veličiny.

Enzymy bývají v biologickém materiálu přítomny ve velice malých množstvích, a proto se většinou neurčují přímo. K detekci přítomnosti i měření dalších charakteristik může být využita specifita enzymatických reakcí. Enzymy obecně totiž vykazují relativně úzkou substrátovou specifitu a jednotlivé typy enzymů umožňují katalýzu jen určitého druhu reakcí. Jednou z hlavních veličin charakterizujících činnost enzymu je enzymová aktivita čili množství úbytku substrátu či přírůstku produktu za jednotku času. Konstanty typické pro enzym jsou maximální reakční rychlost  $V_{max}$  a Michaelisova konstanta  $K_m$  (množství substrátu, při kterém probíhá reakce rychlostí poloviční oproti  $V_{max}$ ). Výběr metody pro stanovení aktivity enzymu pak záleží na vlastnostech substrátu či produktu katalyzované reakce. Důležité je provádět měření při optimálních podmínkách pro průběh reakce, jako je teplota, pH, dostatek kofaktorů, koenzymů i dalších ionů a nasycení substrátem (Murray 2002).

## 2.4.1. Analytické metody

Analytické metody lze rozdělit dle průběhu měření na:

- a. **Kontinuální**, kdy se měří změny koncentrací substrátu či produktu běžící reakce v průběhu času.
- b. „**End point**“, kdy probíhající reakci v daném čase zastavíme a změříme koncentraci substrátu či produktu.

Dle principu detekce na:

### ○ **Optické**

Nejčastěji používané metody využívající interakce hmoty a elektromagnetického záření.

- Spektrofotometrie
- Spektrofluorimetrie
- Luminimetrie

### ○ **Separáčn**

Dochází při nich primárně k separaci stanovovaných složek na základě jejich vlastností i vlastností prostředí, díky čemuž mohou být specificky identifikovány.

- Chromatografie
- Elektroforéza

### ○ **Elektrochemické**

Změny koncentrací substrátu či produktu jsou přímo úměrné některé z elektrických veličin.

- Potencimetrie
- Amperometrie
- Polarografie

## ○ Radiometrické

Využívá se značení některé z komponent reakce radionuklidem. Molekula s radionuklidem bývá zpravidla při katalýze přenesena a následně se měří koncentrace radioaktivního produktu (Internet 8).

Radiometrická měření patří v určování aktivity sulfotransferáz k nejpoužívanějším. Využívá se při nich PAP<sup>35</sup>S sulfoskupiny, která je při reakci přenášena z kofaktoru na molekulu substrátu. Díky tomu je tato metoda u SULTs až univerzálně použitelná. Reakci ale není možné měřit průběžně, vždy je nutné ji ukončit a separovat značený produkt a následně zjistit hodnoty radioaktivity (maximálně je možné průběžně odebírat vzorky a u nich postupovat, jak je napsáno). To dělá toto měření zdlouhavé. Mimo to je metoda náročná na přístrojové vybavení a dále existují rizika při práci s radioaktivním materiálem (Paul a kol. 2012).

## 2.4.2. Spektrofluorimetrie

### 2.4.2.1. Fluorescence

Fluorescence je jev, při kterém dochází k emisi záření z molekuly na základě přechodu elektronů z excitovaného stavu do normálních hladin. Fluorescence je typem luminiscence, při kterém dojde k velice rychlému přechodu elektronů mezi energetickými hladinami. Doba fluorescence je obvykle blízka 10 ns. Oproti tomu při fosforescenci emise záření trvá i několik sekund. Obecně se do vyšších energetických hladin částice dostává pohlcením energie záření a následně se molekula energie zbavuje zpětným vyzářením (Internet 9). Se závislostí absorpance vzorku na výsledné emitované vlnové délce souvisí také pojem Stokesův zákon. Cambridgeský profesor G. G. Stokes pozoroval přes sklenici bílého vína sklenici s roztokem chininu, na kterou dopadalo přes okenní tabuli denní světlo. Pozoroval, jak se z UV světla stává světlo viditelné, neboli jak se mění energie fotonu absorbovaného oproti fotonu emitovanému. Rozdíl těchto energií se nazývá Stokesův zákon či posun. Stokesův posun je charakteristický pro každou částici a vyplývá z něj, že vlnová délka emitovaného záření by měla být delší oproti vlnové délce záření absorbovaného (Internet 9).

### 2.4.2.2. Fluorofory

Každá látka není schopná fluoreskovat. K tomu je zapotřebí vhodná stabilní chemická struktura. Fluoroforem může být molekula schopná absorbovat záření z viditelné nebo UV oblasti, která následně emituje záření většinou o jiné vlnové délce. Fluorofory můžeme rozdělit na vlastní (tryptofan, tyrosin, 4 - methylumbelliferon), což jsou molekuly sami schopné emise (Internet 7) a nevlastní (fluorescein, rhodamid), které se váží na nefluoreskující látku, kterou určujeme. Nevlastní fluorofory lze dále rozdělit na sondy, které se váží nekovalentně, a značky vázané kovalentní vazbou (Internet 7). Fluorofory často bývají aromatické sloučeniny.

### 2.4.2.3. Fluorescenční metody

Fluorescenční metody se široce využívají nejen při biochemických stanoveních. Výhodou stanovení je relativně vysoká citlivost srovnatelná s radiometrickým měřením a možnost rychlého provedení i vyhodnocení. Dalším kladem je možnost kontinuálního zaznamenávání hodnot měnících se s časem, např. rostoucí přírůstek produktu při enzymatických reakcích. Přístrojové vybavení i náročnost práce jsou v porovnání s radiometrickými metodami méně náročné (Paul a kol. 2012).

Mezi charakteristiky spektrofluorimetrie patří:

- **Intenzita fluorescence**

Počet fotonů procházejících jednotkovou plochou za jednotku času.

- **Emisní spektrum**

Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření.

- **Excitační spektrum**

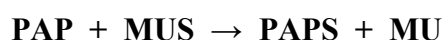
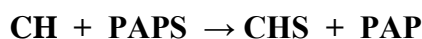
Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní délce emitovaného záření (Internet 7)

Pro měření fluorescence se používají fluorescenční spektrofotometry. Mezi jejich základní části patří zdroj světla, excitační monochromátor, úchyt pro vzorek, emisní monochromátor a fotonásobič. Jako fotonásobiče jsou používané detektory viditelného i UV záření, které převádějí elektromagnetické záření na měřitelnou elektrickou veličinu (Internet 7). Jednotkou pro měření intenzity fluorescence bývá RFU (relative fluorescent units).

#### **2.4.2.4. Využití spektrofluorimetrie při měření aktivity SULTs**

##### **2.4.2.4.1. Detekce 4 – methylumbelliferonu**

Při sulfonaci cholesterolu katalyzované SULT2B1b vzniká CHS, který bohužel není přímo detekovatelný ani spektrofluorimetricky ani spektrofotometricky. Přesto existují možnosti, jak tuto reakci kvantifikovat, a to využitím následných reakcí (Chen a kol. 2005, Paul a kol 2012). 4-methylumbelliferyl sulfát (MUS) by mohl být možným substrátem následné reakce. Přenosem sulfoskupiny z MUS na vhodnou molekulu vzniká 4-methylumbelliferon (MU) a ten už je detekovatelný fluorescenční spektrometrií. Při této následné reakci by mělo dojít k přenosu sulfoskupiny z MUS na PAP a tím k regeneraci kofaktoru první reakce. Enzymem katalyzujícím reakci je fenolsulfotransferáza SULT1A1. Množství MU je ekvimolární CHS a tím pádem by toto stanovení mohlo sloužit k výpočtu enzymové aktivity SULT2B1b (Chen a kol. 2005).



#### **2.4.3. Spektrofotometrie**

Spektrofotometrie neboli absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti je často využívanou metodou pro stanovování koncentrací látek. Principem je absorpce záření ve viditelné oblasti (zhruba 390 nm – 760 nm) vzorkem. Množství absorbovaného záření přímo závisí na množství přítomné látky. Barevné sloučeniny vykazující absorpci ve viditelné oblasti je možné stanovit přímo. Pro stanovení bezbarvých sloučenin touto metodou je nutné je převést na stabilní barevné sloučeniny. Koncentrace látky většinou ve formě roztoku se měří ve spektrofotometru, jehož zjednodušené schéma je na obrázku 7 (Internet 11).

Stanovení koncentrace určované látky využívá platnosti Lambertova-Beerova zákona.

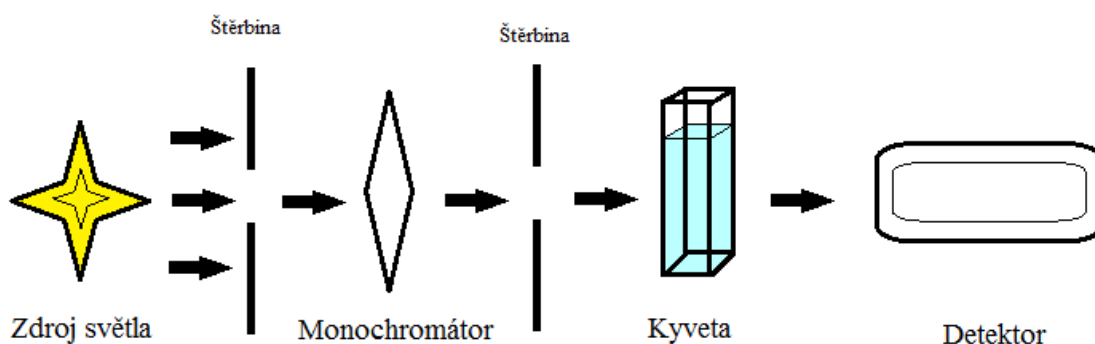
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A... měřená absorbance

c... koncentrace určované látky

l... tloušťka měřené vrstvy

Absorbance se proměřuje při vlnových délkách, ve kterých stanovovaná látka vykazuje absorpční maximum. Světlo procházející vzorkem se využívá monochromatické, tedy o stanovené vlnové délce. Při průchodu kyvetou dochází k zeslabení intenzity záření (Internet 11).



**Obrázek 7.** Schéma spektrofotometru.

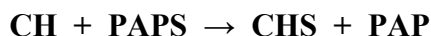
### 2.4.3.1. Využití spektrofotometrie při měření aktivity SULTs

Spektrofotometrie disponuje mezi metodami využívanými pro určování enzymové aktivity mnoha výhodami. Je relativně časově i přístrojově méně náročná. Další výhodou je možnost kontinuálního měření hodnot v průběhu reakce. Nevýhodou bývá nižší citlivost. Spektrofotometrie je jednou z možností pro měření aktivity sulfotransferáz, ovšem nebývá tak často využívána (Paul a kol. 2012).

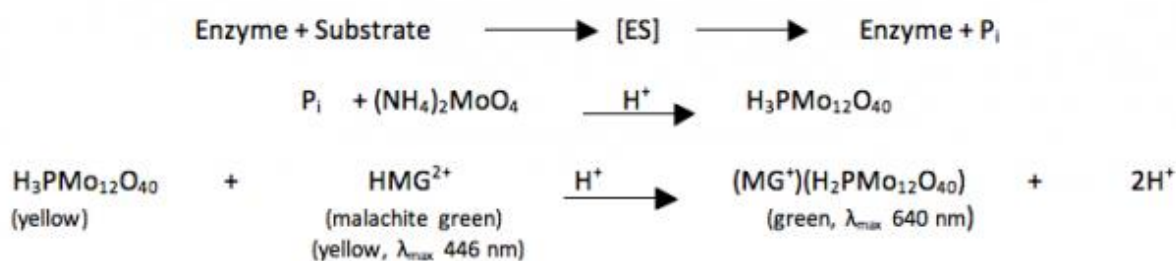
#### 2.4.3.1.1. Detekce volného fosfátu pomocí malachitové zeleně

Bylo zmíněno, že produkt sulfonační reakce katalyzované SULT2B1b CHS nedisponuje vlastnostmi vhodnými pro přímé spektrofluorimetrové ani spektrofotometrické stanovení. Jednou z možností pro spektrofotometrické stanovení by mohlo být využití následné reakce, při které by se získal volný fosfát (Pi) oddělením od PAP a ten by se

poté detekoval. Výsledné množství Pi by bylo ekvimolární CHS. Enzymem katalyzující reakci je např. fosfatáza (gPAPP - Golgi-resident PAP-specific 3'-phosphatase). Enzym gPAPP specificky oddělí 3'-fosfát od PAP (Prather a kol. 2012).



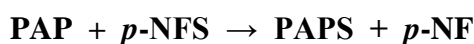
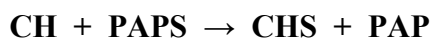
Volný fosfát je detekovatelný spektrofotometricky metodou, která využívá činidel molybdenanu amonného a oxalátu malachitové zeleně. Stanovení volného fosfátu je založeno na tvorbě komplexu fosfomolybdenanu malachitové zeleně v kyselém prostředí kyseliny sírové jak je znázorněno na obrázku 8.



**Obrázek 8.** Tvorba komplexu fosfomolybdenanu malachitové zeleně využívaného pro detekci fosfátu (Internet 5).

#### 2.4.3.1.2. Detekce *p* - nitrofenolu (NP)

Pro spektrofotometrické stanovení se také jeví možné využití následné reakce katalyzované SULT1A1 (Frame a kol. 2000). Tato fenol sulfotransferáza je schopna katalýzy sulfonace PAP přenesením sulfoskupiny z *p* – nitrofenylsulfátu (*p*-NPS).



Vzniklý *p*-NF už je detekovatelný spektrofotometricky.

### **3. CÍLE PRÁCE**

Cílem teoretické části diplomové práce bylo charakterizovat funkci SULT2B1b v kůži, vysvětlit mechanismy, kterými se podílí na formování a fungování kožní bariéry a také zabývat se její rolí ve stárnoucí či patologicky narušené kůži.

Hlavním cílem experimentální části práce bylo navrhnutí a optimalizace podmínek pro spektrofluorimetrické stanovení aktivity sulfotransferázy 2B1b vhodné jak pro *in vitro*, tak pro *in vivo* model.

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A SOFTWARE**

#### **4.1.1. Chemikálie:**

SULT2B1b (My Bio Source)

SULT1A1 (R&D Systems)

PAPS (Sigma–Aldrich)

MU (Sigma–Aldrich)

MUS (Sigma–Aldrich)

Cholesterol (Sigma–Aldrich)

Cholesterol – water soluble (Sigma–Aldrich)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

BSA (Sigma–Aldrich)

MCDB medium 153

Ostatní použité běžné chemikálie čistoty p. a. byly zakoupeny u běžných dodavatelů.

#### **4.1.2. Připravené zásobní roztoky:**

Koncentrace zásobních roztoků, kdy látky byly rozpuštěny ve vodném roztoku 100 mM fosfátového pufru o pH 7,0:

200  $\mu$ M PAPS

100 mM 2-merkptoetanol

40 mM MUS

Roztok cholesterolu v etanolu:

1 mM cholesterol

K enzymům SULT2B1b a SULT1A1, které byly dodané ve formě lyofilizátů byl přidán 100 mM fosfátový pufr a po naředění byly rozpipetovány po 10  $\mu$ g a zmrazeny při teplotě -20°C.

### **4.1.3. Biologický materiál:**

HaCaT linie

### **4.1.4. Přístroje**

Tecan, model Infinite M200 (Tecan Trading AG)

ELISA Reader (BioTek)

### **4.1.5. Software**

Megallan

## **4.2. METODIKA**

### **4.2.1. Stanovení excitačního a emisního spektra MU**

Pro měření emisního a excitačního spektra byl připraven roztok MU o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  ve vodě a byly použity vlnové délky pro stanovení emisního spektra v intervalu  $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}640\text{ nm}$  a excitačního spektra  $\lambda_{\text{ex}} = 280\text{-}420\text{ nm}$ . Spektra byla měřena při třech různých hodnotách pH, a to v 100mM pufrách o pH 6,0 a 7,0 (fosfátový pufr) a pH 8,0 (Tris). Slepý vzorek obsahoval vodný roztok jednotlivých pufrů. Proměňování probíhalo v 96 jamkovém transparentním panelu.

### **4.2.2. Stanovení kalibrace pro MU**

Pro stanovení kalibrační řady MU byly připraveny roztoky ve fosfátovém pufru (pH 7,0) o koncentracích 100-0,195  $\mu\text{M}$ . Jejich fluorescence byla změřena při vlnových délkách  $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450\text{ nm}$ .

### **4.2.3. Iniciální měření**

#### **První zkouška reakce za různého pH**

Reakce byla provedena v 96 transparentní jamkové destičce a fluorescence měřena v přístroji Tecan. Při měření byly pro porovnání použity také černé panely. Celkový objem vzorku byl 200  $\mu\text{l}$ . Iniciální reakce obsahovala SULT2B1b a SULT1A1 v množství 0,1  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{M}$  PAPS, 100  $\mu\text{M}$  cholesterol, 2 mM MUS, 5 mM merkaproethanol a jednotlivé pufrы 100 mM o pH 6,0 a 7,0 (fosfátový pufr), 8,0 a 9,0 (Tris Base). Jako poslední byl do reakční směsi přidáván roztok cholesterolu jakožto substrátu. Slepý vzorek byl bez SULT2B1b a druhý bez SULT1A1. Hodnota RFU byla zjištěna odečtením blanku bez SULT2B1b od výsledných hodnot vzorků. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37°C,  $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450\text{ nm}$ .

### **4.2.4. Enzymová kinetika**

#### **4.2.4.1. Stanovení rychlosti reakce v závislosti na obsahu enzymu**

Vzorek o objemu 200  $\mu\text{l}$  obsahoval 20  $\mu\text{M}$  PAPS, 100  $\mu\text{M}$  cholesterolu, 2 mM MUS, 5 mM merkaproethanolu a fosfátový pufr 100 mM o pH 7,0 a množství sulftoransferáz dle tabulky 1. Hodnoty RFU byly odečítány po dobu 60 min v pětiminutových intervalech. Inkubováno při 37°C.

**Tabulka 1.** Množství SULT2B1b a SULT1A1 obsažené ve vzorcích.

<b>SULT2B1b (µg)</b> 0,1 µg SULT1A1*	<b>SULT 1A1 (µg)</b> 0,1 µg SULT2B1b*
0,01	0,01
0,05	0,05
0,1	0,1
0,3	0,25
0,7	0,5

\* stabilní koncentrace enzymu pro měnící se množství prvního z enzymů

Reakce byla také zkoušena za přítomnosti  $Mg^{2+}$  ionů přidáním 5 mM  $MgCl_2$ .

#### **4.2.4.2. Stanovení rychlosti enzymatické reakce v závislosti na obsahu substrátu a kofaktoru**

Reakce byla provedena za obdobných podmínek a s obdobným složením reakční směsi jako v předešlých případech tedy 2 mM MUS, 5 mM merkaproethanolu, 0,1 µg SULT2B1b a 0,1 µg SULT1A1, 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, inkubováno 45 min při 37°C. Množství substrátu cholesterolu (CH) a kofaktoru PAPS je uvedeno v tabulce 2.

**Tabulka 2.** Množství substrátu cholesterolu a kofaktoru PAPS ve vzorcích.

<b>CH (µM)</b>	<b>PAPS (µM)</b>
1	0,1
25	1
50	5
100	20
200	50
500	100

#### **4.2.4.3. Stanovení hodnoty RFU v závislosti na různé koncentraci MUS**

Reakce byla provedena za obdobných podmínek a s obdobným složením reakční směsi jako v předešlých případech 20  $\mu\text{M}$  PAPS, 100  $\mu\text{M}$  cholesterolu, 5 mM merkaproethanolu, 0,1  $\mu\text{g}$  SULT2B1b a 0,1  $\mu\text{g}$  SULT1A1, 100mM fosfátový pufr o pH 7,0 a inkubováno při 37°C. Množství přidaného MUS 0,2 mM, 1 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM.

#### **4.2.4.4. Modifikace spektrofluorimetrické reakce použitím substrátu ve formě cholesterol-methyl- $\beta$ -cyclodextrin**

Reakce byla provedena za obdobných podmínek a s obdobným složením reakční směsi jako v předešlých případech 20  $\mu\text{M}$  PAPS, 5 mM merkaproethanolu, 0,1  $\mu\text{g}$  SULT2B1b a 0,1  $\mu\text{g}$  SULT1A1, 100 mM fosfátový pufr o pH 7,0 a inkubováno při 37°C. Místo cholesterolu použitého v předešlých případech byl k vzorku přidán substrát ve formě roztoku cholesterol-methyl- $\beta$ -cyclodextrin o koncentraci 100  $\mu\text{M}$ .

#### **4.2.4.5. Stanovení a porovnání RFU u nekompletních reakcí**

Hodnoty RFU byly stanoveny u reakcí, kde jsme vynechali vždy jednu složku reakce. Účelem bylo zjistit hodnoty intenzity fluorescence nekompletní reakční směsi. Byly vynechány SULT2B1b, CH, MUS a dále také PAPS, SULT1A1. Pro porovnání byly přidané roztoky obsahující samostatný MUS v různých koncentracích (4 mM, 1 mM, 0.5 mM). U nekompletních reakcí byla koncentrace MUS 4 mM. Inkubováno při 37 °C.

#### **4.2.4.6. Stanovení aktivity SULT1A1**

Ověření aktivity u enzymu SULT1A1 bylo provedeno kolorimetrickou reakcí (Frame a kol. 2000). Stanovily jsme závislost rychlosti reakce na obsahu enzymu. Reakční směs byla ve složení SULT1A1 v množství 1,0  $\mu\text{g}$ , 0,65  $\mu\text{g}$ , 0,35  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,05  $\mu\text{g}$ , 0,01  $\mu\text{g}$ , 20 mM PAPS, 5 mM *p*-nitrofenylsulfát, 100 mM fosfátový pufr o pH 6,55 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM 2-naftol,. Reakce provedena v 96 transparentním panelu o objemu reakční směsi 200  $\mu\text{l}$ . Inkubováno 45 min za teploty 37°C. Závěrečný produkt *p*-nitrofenol je detekovatelný spektrofotometricky. Absorbance byla měřena při 401 nm.

## 4.2.5. Ověření funkčnosti reakce s buněčnými lyzáty linie HaCaT

### 4.2.5.1. Kultivace a lýzace buněk HaCaT

Celkově byly nasazeny čtyři 6 jamkové destičky, dvě pro dobu kultivace 96 hodin a dvě pro 120 hodin. V první destičce bylo nasazeno rostoucí množství buněk v rozmezí 150 000–400 000 v HaCaT médiu. Dále byla použita uvedená HaCaT a MCDB média také s přidavkem  $\text{CaCl}_2$ , která byla k buňkám o násadě 300 000 přidána během druhého dne kultivace.

**Tabulka 3.** Rozpis panelu s rostoucí násadou buněk.

150 000* HaCaT médium	250 000* HaCaT médium	350 000* HaCaT médium
200 000* HaCaT médium	300 000* HaCaT médium	400 000* HaCaT médium

\* počet nasazených buněk

**Tabulka 4.** Rozpis panelu s násadou buněk 300 000 ve všech jamkách, ovlivnění kultivace ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a médii HaCaT a MCDB.

HaCaT médium	$\text{CaCl}_2$ 1.2 mM HaCaT médium	$\text{CaCl}_2$ 2.8 mM HaCaT médium
MCDB médium	$\text{CaCl}_2$ 1.2 mM MCDB médium	$\text{CaCl}_2$ 2.8 mM MCDB médium

Po kultivaci byly buňky lyzovány. Prvním krokem byl oplach 2 ml PBS pufru a seškrábání buněk v jednotlivých jamkách v 1 ml PBS média. Jednotlivé vzorky byly dány do 15 ml zkumavek a stočeny 10 min při 2400 rpm a 4 °C. Médium bylo slito a nahrazeno 1 ml PBS média, buněčné suspenze byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek a opět stočeny. Supernatant byl odstraněn a vzorky byly zamrazeny při -80°C. Po rozmražení byl přidán připravený lyzační pufr (LP). Pro přípravu 100 ml LP bylo použito 0,8766 NaCl, 0,1 g SDS, 0,6057 g Trisma base, 99 ml demineralizované vody, 1 ml Triton X-100, pH upraveno 35% HCl na 8,0. Pro přípravu LP s inhibitory proteáz byla rozpuštěna tableta Complete mini protease inhibitor v 10 ml LP. Zkumavky byly uloženy na led po doby 40 min v průběhu tři krát sonikovány (cyklus 0.5, amplituda 60, deset krát opakováno), poté centrifugovány 30 min při 12 800 rpm a 4°C. Supernatant

byl přenesen do nových zkumavek 0,5 ml a z nich bylo odebráno 5  $\mu$ l na stanovení obsahu proteinů. Zbytek lyzátů byl zmražen při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.5.2. Stanovení koncentrace proteinů v lyzátech HaCaT BCA metodou**

Ve všech vzorcích lyzátů bylo stanoveno množství proteinů BCA metodou. V čas potřeby bylo připraveno činidlo smísením padesáti dílů zásaditého roztoku sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA, Reagent A) a jedním dílem roztoku  $\text{CuSO}_4$  (Reagent B). Koncentrace byla určena porovnáním s řadou standardů hovězího sérového albuminu (BSA). Byly použity připravené standardy BSA v lyzačním pufru o koncentraci 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 2 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 750  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml, 125  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml. Ke standardům, vzorkům HaCaT i slepým vzorkům (lyzační pufr) bylo přidáno 100  $\mu$ l čerstvě připravené reakční směsi o poměru Reagent A a Reagent B 50 : 1. Vše bylo inkubováno 30 min při  $37^{\circ}\text{C}$ , následně byla změřena absorbance na ELISA readeru při 562 nm.

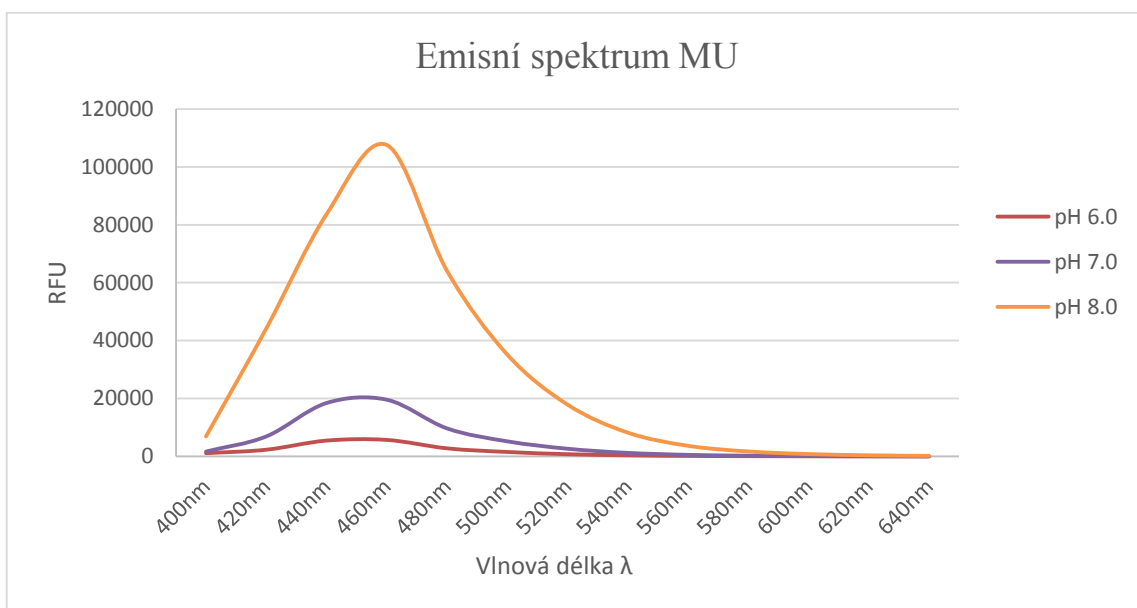
#### **4.2.5.3. Stanovení rychlosti reakce s lyzáty HaCaT a bovinním fetálním sérem jako katalyzátory sulfonace**

Reakce ve složení reakční směsi 20  $\mu$ M PAPS, 5 mM merkaptoetanol, 100  $\mu$ M cholesterol, 2 mM MUS, SULT1A1 0,1  $\mu$ g, 25  $\mu$ l lyzátu nebo bovinního fetálního séra (BOFES) do každé jamky, inkubováno 45 min při  $37^{\circ}\text{C}$  s odečtem hodnot RFU po 5 min.

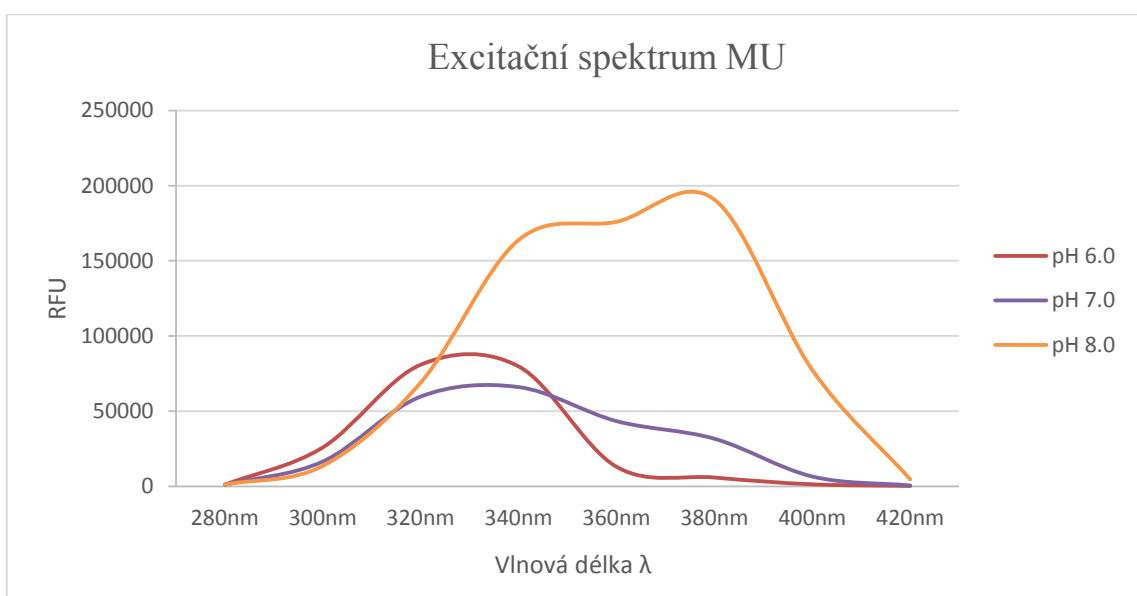
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Stanovení emisního a excitačního spektra MU

Bylo změřeno emisní spektrum MU při konstantní délce excitačního záření 360 nm a při různých hodnotách pH (obrázek 9). Nejvyšší hodnoty RFU byly naměřeny při 450 nm. Hodnoty RFU se významně liší v závislosti na pH, přičemž hodnoty maxim se výrazněji neodchylují. Nejvyšší hodnoty jsou u pH 8,0 nicméně hodnoty pro pH 6,0 a 7,0 jsou dostatečně vysoké pro další použití.



Obrázek 9. Emisní spektrum methylumbelliferonu.

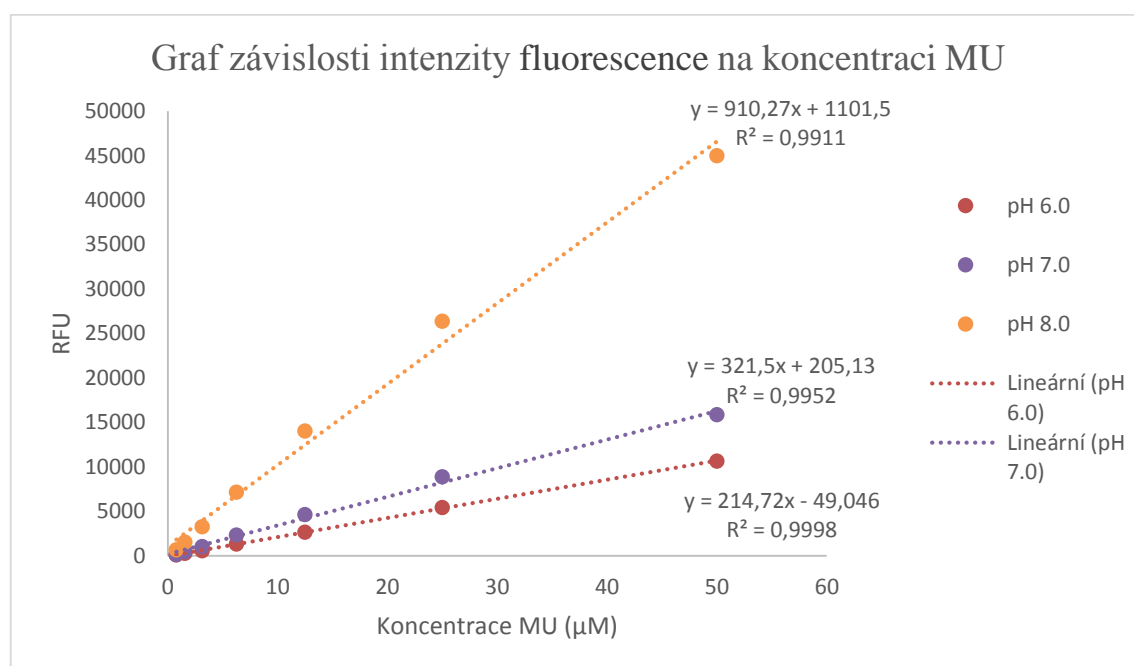


Obrázek 10. Excitační spektrum methylumbelliferonu.

Excitační spektrum MU bylo změřeno při konstantní délce emisního záření 450 nm a také při různých hodnotách pH (obrázek 10). Maxima RFU pro pH 6,0 a 7,0 byla přibližně při 330 nm, pro pH 8,0 při 380 nm. RFU při pH 8,0 vykazuje výrazně vyšší hodnoty oproti pH 7,0 a 6,0, přičemž při našem pokusu dosahoval vzorek o pH 6,0 ve svém maximu dokonce vyšší hodnoty RFU než vzorek o pH 7,0.

## 5.2. Stanovení kalibrace pro MU

Byly stanoveny hodnoty RFU u řady vzorků MU s postupně rostoucí koncentrací v rozmezí 0,195 – 50  $\mu\text{M}$ . Růst hodnot RFU v závislosti na rostoucí koncentraci MU, jak je patrné z obrázku 11, má lineární charakter. Hodnoty intenzity fluorescence jsou přímo úměrné koncentraci MU, což umožňuje tvorbu kalibrační přímky. Kalibrační křivka nám umožnila stanovení koncentrace MU respektive CHS dle detekovaných hodnot RFU v dalším měření.



**Obrázek 11.** Graf závislosti intenzity fluorescence na koncentraci MU.

Stanovení bylo provedeno při pH 6,0, pH, 7,0 a pH 8,0. Z grafu na obrázku 8 vyplývá, že hodnoty RFU závisí na pH, tedy při námi zvoleném nejvyšším pH 8,0 byly hodnoty RFU ve všech bodech křivky vyšší než u pH 7,0 a 6,0.

### 5.3. Iničiální měření rychlosti reakce za různého pH

Prvotní zkouška rychlosti reakce byla provedena za hodnot pH 6,0 a 7,0 (fosfátový pufr), 8,0 a 9,0 (Tris ). Výsledné hodnoty po odečtení slepého vzorku byly, jak je patrné z tabulky 4, velmi nízké, což nám naznačilo, že reakce probíhá velmi pomalu nebo vůbec. Neměřené hodnoty RFU se stoupajícím pH stoupaly, nejvyšší hodnoty RFU byly zaznamenány při pH 9,0.

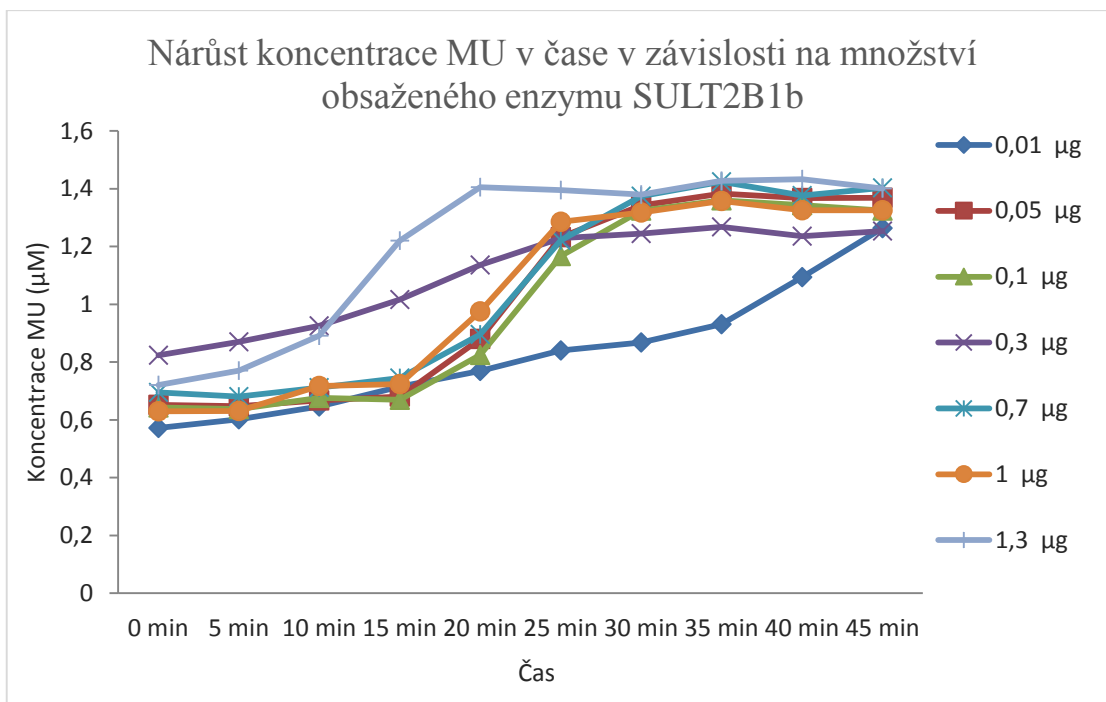
**Tabulka 4.** Hodnoty koncentrací MU a hodnoty RFU reakcí probíhajících za různého pH.

	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
c (MU)	nedetek.	0,3284 $\mu\text{M}$	1,4882 $\mu\text{M}$	4,3616 $\mu\text{M}$
RFU	-606	177	948	2640

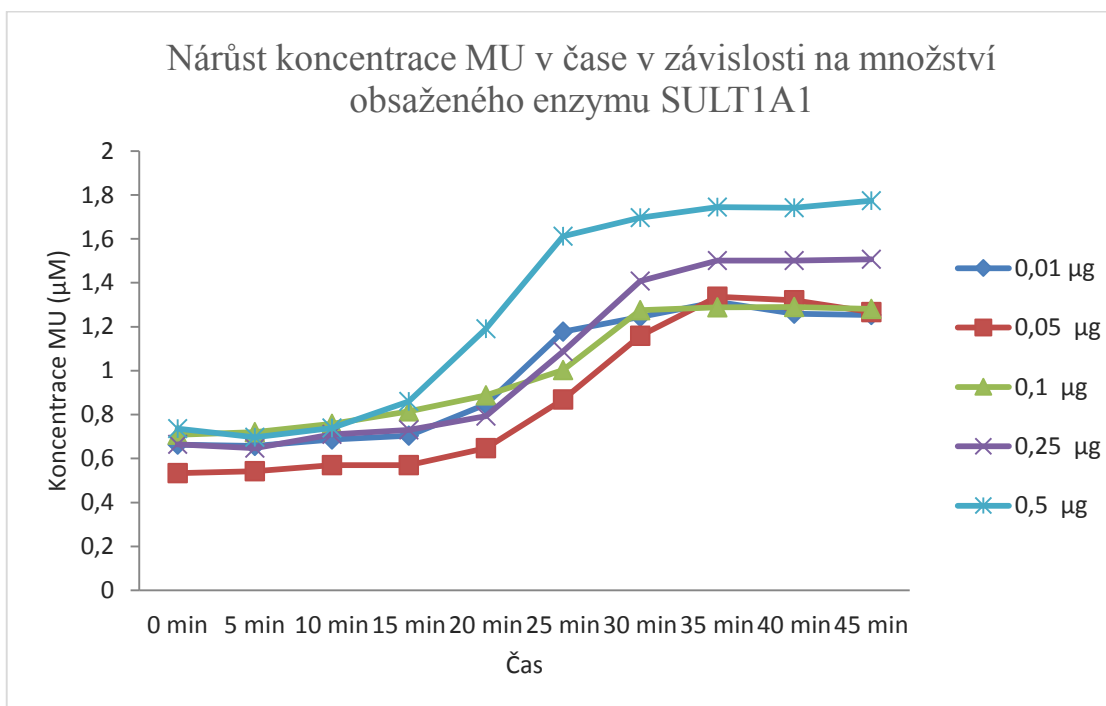
### 5.4. Enzymová kinetika

#### 5.4.1. Stanovení rychlosti reakce v závislosti na obsahu enzymu

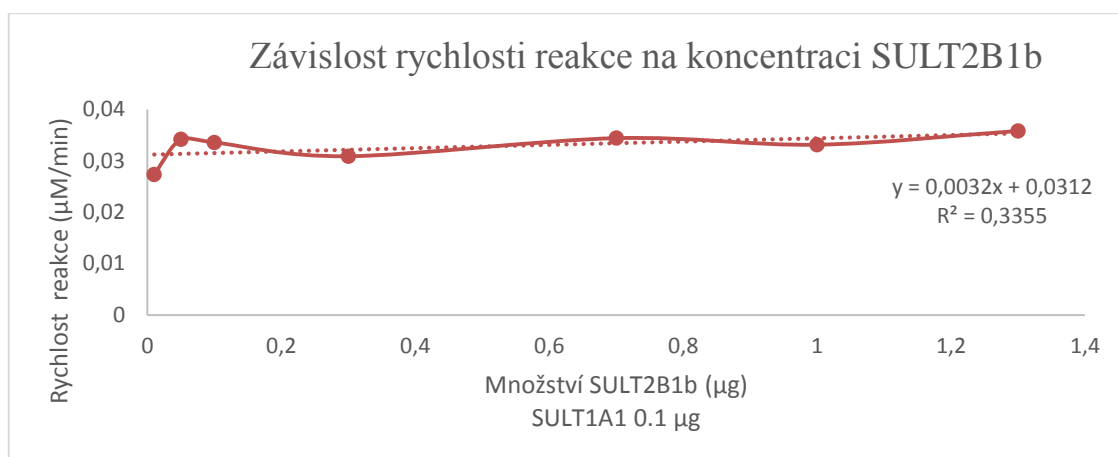
Koncentrace finálního produktu reakce MU roste v závislosti na čase (obrázek 12) i s rostoucí koncentrací enzymů. Z obrázku 13 je patrné, že u vzorku s nejvyšším obsahem SULT2B1b 1,3  $\mu\text{g}$  došlo nejrychleji k dosažení maximální koncentrace MU 1,4  $\mu\text{M}$ . Ostatní vzorky dosáhly po 40 minutách inkubace hodnot 1,2 – 1,4  $\mu\text{M}$  MU, tedy hodnot dvojnásobných oproti začátku měření. Křivky vzorků o obsahu SULT2B1b 0,1  $\mu\text{g}$  a 0,3  $\mu\text{g}$  se blíží svým tvarem lineární přímce. Křivky ostatních vzorků mají esovitý tvar. Na obrázku 12 je patrný nejvýraznější nárůstu koncentrace MU až na 1,8  $\mu\text{M}$  u vzorku s nejvyšším obsahem SULT1A1 0,5  $\mu\text{g}$ . U ostatních vzorků se koncentrace MU také zhruba zdvojnásobily.



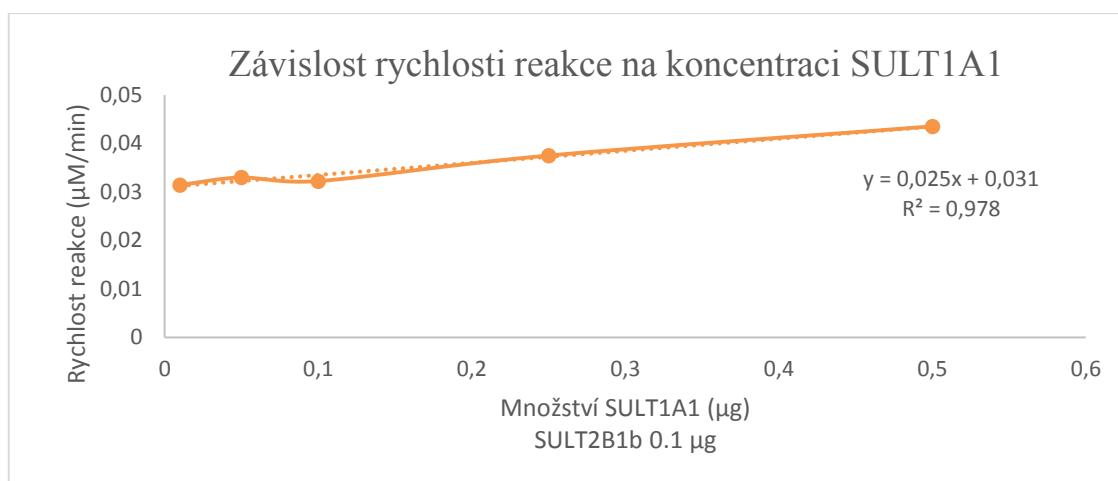
**Obrázek 12.** Nárůst koncentrace MU v čase v závislosti na koncentraci enzymu SULT2B1b.



**Obrázek 13.** Nárůst koncentrace MU v čase v závislosti na koncentraci enzymu SULT1A1.



**Obrázek 14.** Závislost rychlosti sulfonační reakce na obsahu SULT2B1b.

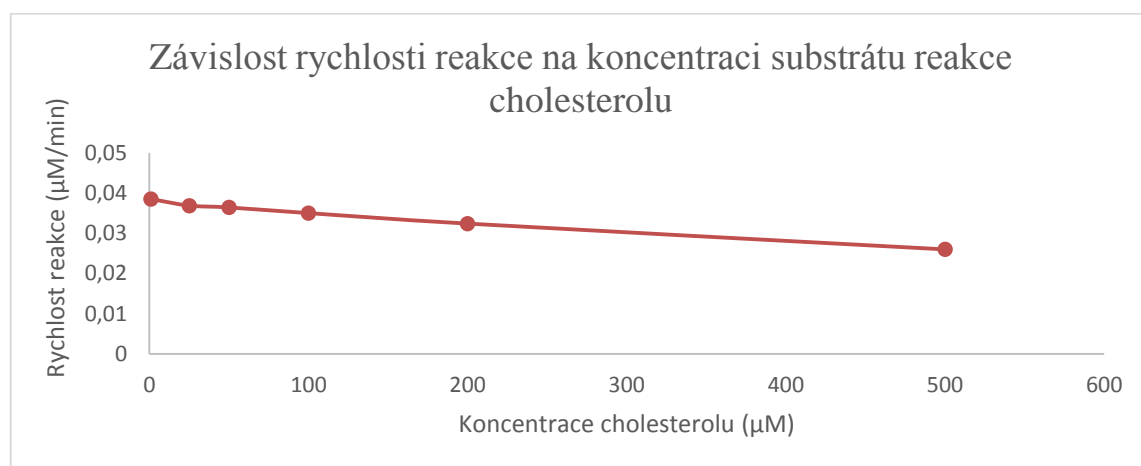


**Obrázek 15.** Závislost rychlosti sulfonační reakce na obsahu SULT1A1.

Z obrázků 12 až 15 ovšem nevyplývají zásadnější a vypovídající rozdíly v hodnotách koncentrace finálního produktu MU u reakcí s měnícími se koncentracemi přítomných enzymů SULT2B1b a SULT1A1 (rozdíly v řádu jednotek  $\mu\text{M}$ ) ani při měření rychlosti reakce, která se pohybovala v řádu  $\text{nM}/\text{min}$ . Došlo k relativně velmi malému zvýšení intenzity fluorescence. Z obrázků 14 a 15 je patrné, že reakce probíhají velice pomalu, eventuálně dochází k nárůstu RFU z jiných důvodů a reakce neprobíhá dle našeho návrhu. Při nejvyšším obsahu SULT2B1b  $1,3 \mu\text{g}$  probíhala reakce rychlosti  $0,035 \mu\text{M}/\text{min}$  (obrázek 14) a při nejvyšším obsahu SULT1A1  $0,5 \mu\text{g}$  rychlosti  $0,045 \mu\text{M}/\text{min}$  (obrázek 15). U reakcí provedených v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  nebyly zaznamenány změny oproti reakcím bez hořečnatých ionů.

### 5.4.2. Stanovení rychlosti reakce v závislosti na obsahu substrátu a kofaktoru

Ani obměny koncentrací substrátu cholesterolu a kofaktoru PAPS nepřinesly významnější změnu k lepšímu. Při pokusu došlo ke snižování rychlosti reakce s rostoucími koncentracemi cholesterolu (obrázek 16). Vyšší hodnoty RFU u vzorků s nižším obsahem cholesterolu nás nevedly k reakcím s ještě nižšími hodnotami. Ale ani ředění cholesterolu postupně až na pikomolární množství opět nemělo výrazný efekt. Reakce s obsahem cholesterolu 1 pM probíhala rychlostí 0,033  $\mu\text{M}/\text{min}$ . U pokusu s rostoucími koncentracemi kofaktoru PAPS došlo rovněž ke snížení rychlosti reakce. Při koncentraci PAPS 0,1  $\mu\text{M}$  probíhala reakce rychlostí 0,0483  $\mu\text{M}/\text{min}$ , při koncentraci PAPS 100  $\mu\text{M}$  rychlostí 0,0439  $\mu\text{M}/\text{min}$ .



**Obrázek 16.** Závislost rychlosti sulfonační reakce na koncentraci substrátu cholesterolu.

### 5.4.3. Stanovení hodnot RFU v závislosti na různé koncentraci MUS

Při porovnání vzorků obsahujících různé koncentrace MUS došlo po 40 min inkubace k získání hodnot RFU zvyšujících se postupně s rostoucí koncentrací MUS, jak je patrné z tabulky 5. RFU u vzorku s 0,2 mM MUS byla po 40 minutách inkubace s nárůstem RFU o 41 na hodnotě 510, zatímco u 10 mM koncentrace MUS došlo k nárůstu o 457 na RFU 1298. Zajímalo nás, zda nedochází ke změnám RFU u vzorků obsahujících samostatný MUS a dle dalšího stanovení jsme zjistili, že minimálně (obrázek 17).

**Tabulka 5.** Hodnoty RFU jednotlivých sulfonačních reakcí s rostoucími koncentracemi MUS (množství enzymů SULT2B1b 0.1 ug, SULT1A1 0.1 ug).

čas	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	35 min	40 min
<b>konc.</b>	<b>(RFU)</b>							
<b>10 mM</b>	841	831	787	814	832	904	1072	1298
<b>8 mM</b>	785	801	776	943	1167	1275	1272	1274
<b>6 mM</b>	1025	1097	1091	1107	1142	1136	1139	1136
<b>4 mM</b>	1006	1033	1035	1056	1053	1065	1051	1078
<b>1 mM</b>	595	644	627	627	650	659	616	644
<b>0.2 mM</b>	469	510	486	489	502	528	482	510

#### 5.4.4. Modifikace spektrofluorimetrické reakce použitím substrátu ve formě cholesterol – methyl – $\beta$ – cyclodextrin

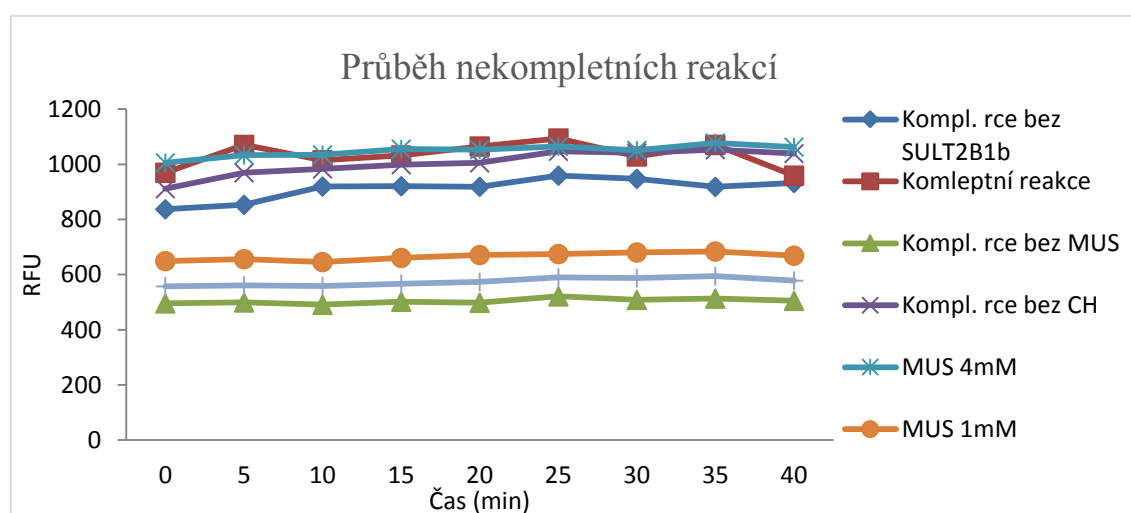
Problémovou částí reakce mohla být dostupnost substrátu cholesterolu, který jakožto hydrofobní molekula není rozpustný ve vodě. Jako rozpouštědlo jsme využili ethanol. Využitím komplexu cholesterolu s cyklodextrinem jsme chtěli zjistit, zda by tato forma nebyla pro průběh reakce vhodnější. Hodnoty RFU při použití běžného a ve vodě rozpustného komplexu cholesterolu s cyklodextrinem jakožto substrátu reakce se lišily velice málo (tabulka 6). Po 60 min inkubace dosáhly hodnoty RFU u běžného cholesterolu 960 a u ve vodě rozpustného cholesterolu 932. Z hodnot v tabulce 6 vyplývá, že rozpustnost cholesterolu nemusela být hlavním problémem nefunkčnosti sulfonační reakce.

**Tabulka 6.** Hodnoty RFU při použití ve vodě rozpustného cholesterolu a běžného cholesterolu

	0 min	10 min	20 min	30 min	40min	50 min	60 min
<b>Cholesterol ve vodě rozp.</b>	858	939	934	930	945	878	932
<b>Cholesterol</b>	951	977	990	985	993	915	960

### 5.4.5. Stanovení a porovnání RFU u nekompletních reakcí

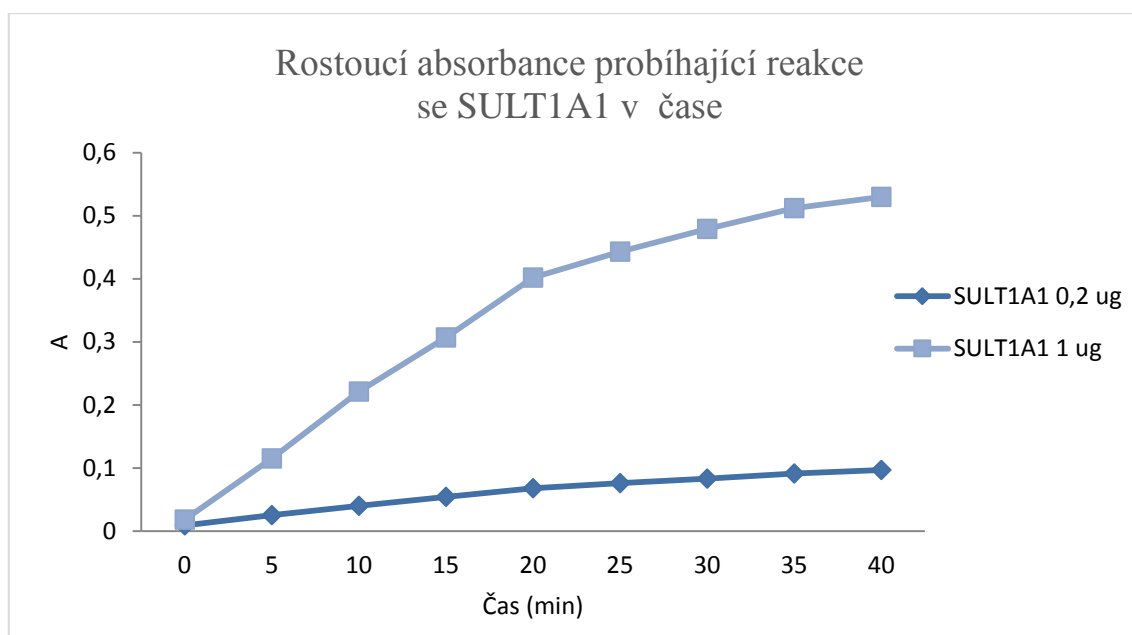
Jelikož výsledky předešlých stanovení ukazovaly, že reakce zřejmě stále neprobíhá podle navrženého schématu, rozhodli jsme se to ověřit provedením série reakcí, kde vždy chyběla některá ze složek účastnících se reakce. Nejvyšší hodnoty RFU blízke 1000 vykazoval roztok obsahující samostatný 4 mM MUS, dále kompletní reakce a na úrovni byla také reakce neobsahující substrát cholesterol (obrázek 17). Kompletní reakce měla střídavě stoupající a klesající tendenci hodnot RFU. Reakce neobsahující SULT2B1b měla mírně stoupající tendenci a dosahovala RFU až 920. Nejnižší hodnoty RFU 450 měly vzorky neobsahující MUS, vzorky 0,5 mM MUS mají RFU<sub>max</sub> 580 a 1mM MUS o RFU<sub>max</sub> 630. Z výsledků vyplývá, že na hodnoty RFU má vliv především koncentrace MUS a ne průběh vlastní sulfonační reakce.



Obrázek 17. Graf znázorňující průběh nekompletních reakcí.

### 5.4.6. Stanovení aktivity SULT1A1

Na základě předchozích měření se zdá, že reakce stále nefunguje. Rozhodli jsme se ověřit zda SULT1A1 katalyzující druhou z párových reakcí je aktivní. Kolorimetrickou metodou založenou na měření absorbance *p* – nitrofenolu při 401 nm jsme ověřili, že SULT1A1 je aktivní (obrázek 18). Po 40 minutách inkubace dosáhl vzorek obsahující 1 μg SULT1A1 absorbance 530 a vzorek obsahující 0,2 μg 0,097. Další možností bylo ověření aktivity hlavního enzymu SULT2B1b, k čemuž jsme ale neměli potřebné prostředky.



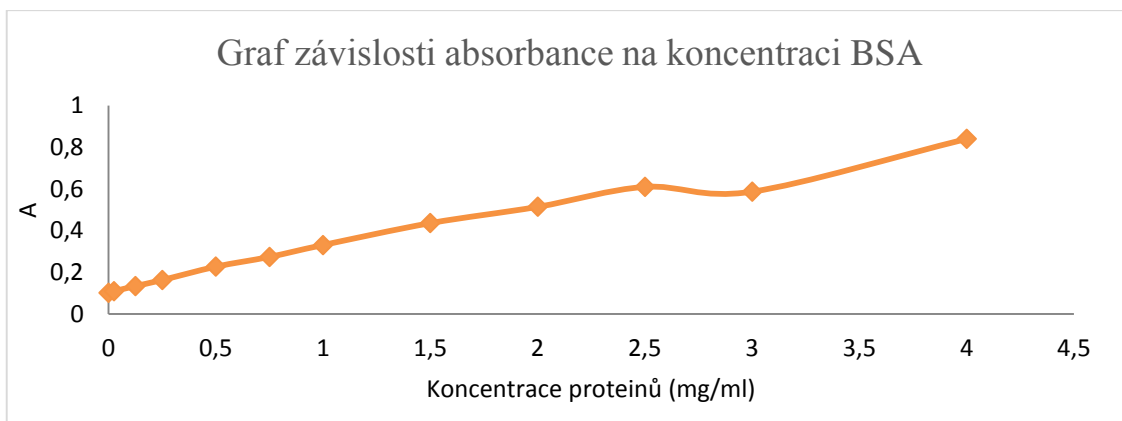
**Obrázek 18.** Závislost absorbance na čase u sulfonační reakce obsahující SULT1A1 ve dvou množstvích

## 5.5. Ověření funkčnosti reakce s buněčným lyzátem linie HaCaT

Jelikož párová reakce za využití komerčně odstupného SULT2B1b nefungovala, rozhodli jsme se pro využití linie lidských imortalizovaných keratinocytů. U této linie dochází v průběhu kultivace k diferenciaci keratinocytů. Díky této skutečnosti jsme předpokládali, že buňky by měly být schopné exprimovat SULT2B1b. Kultivací buněčné linie HaCaT dle rozpisu uvedeného v tabulkách 3 a 4 byly získány vzorky o celkovém obsahu proteinů uvedené v tabulce 7.

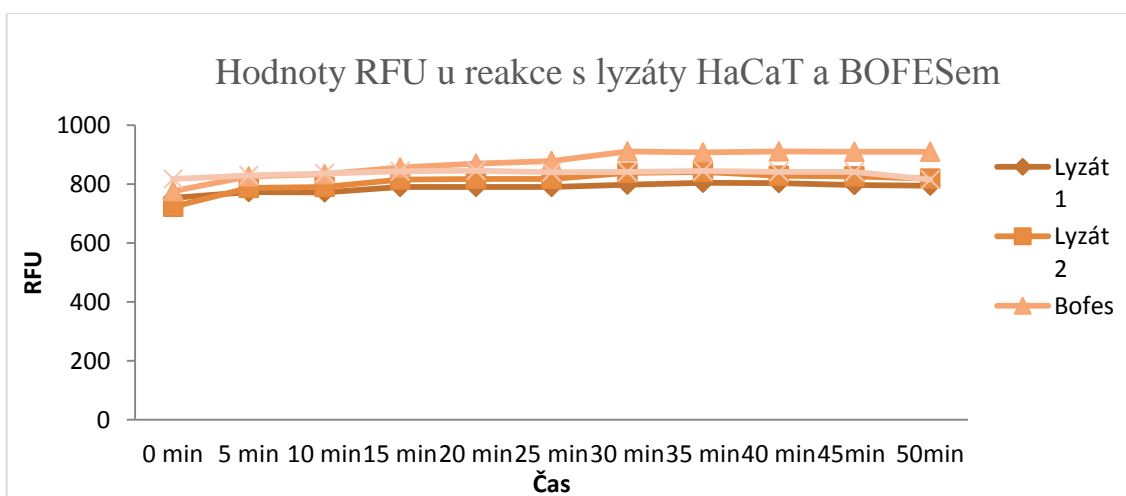
**Tabulka 7.** Celková koncentrace proteinů (mg/ml) stanovená BCA metodou u lyzátech buněk linie HaCaT nasazených dle rozpisu na tabulkách 3 a 4.

<b>A.</b>	-0,2657909	-0,1735606	0,1394634	0,4318055	0,6162661	0,6162661
<b>B.</b>	-0,3065959	-0,2043041	0,166294	0,3250419	0,5637228	0,6816657
<b>C.</b>	0,0198435	-0,2182784	0,2479039	0,1495249	0,1925657	0,1092789
<b>D.</b>	-0,0008385	-0,1400224	0,2288988	0,2003913	0,1601453	0,25461151



**Obrázek 19.** Závislost absorbance na koncentraci BSA.

Pro stanovení aktivity SULT2B1b, kdy jsme předpokládali její obsah v HaCaT buněčném lyzátu jsme vybrali vzorky o nejvyšším obsahu proteinů, vzorek označený jako „Lyzát 1“ o celkovém obsahu proteinů 0,6163 mg/ml a „Lyzát 2“ 0,6817 mg/ml. Pro třetí vzorek jsme použili 25  $\mu$ l BOFES. Jak je patrné z grafu na obrázku 20, nebyly zaznamenány výraznější rozdíly oproti slepému vzorku RFU u „Lyzátu 1“ a „Lyzátu 2“ i blanku se pohybovaly mezi 700 až 800. U vzorku, který obsahoval BOFES došlo ke zvýšení RFU z 770 na 960. To, že ani využití linie HaCaT jako zdroje aktivního enzymu neprokázalo funkčnost reakce, může znamenat, že složení reakční směsi a podmínky stále nejsou optimální nebo že lyzáty kultivované linie neobsahovaly dostatečné množství aktivního enzymu. To mohlo být způsobeno jak nedostatečnou expresí, tak poškozením enzymu v průběhu získávání lyzátu.



**Obrázek 20.** Hodnoty RFU v čase u reakce probíhající s lyzáty linie HaCaT a fetálním bovinním sérem.

## 6. DISKUZE

Sulfotransferáza 2B1b patří mezi enzymy, které prozatím nejsou zcela podrobně prostudovány. Je však patrné, že má významné místo mezi enzymy podílejícími se na formování a fungování epidermis (Falany a kol. 2006). Potenciál jejího dalšího zkoumání tak tkví především v možnostech lépe porozumět roli i složení kožní bariéry a možnosti její modifikace. Znalost role cholesterol sulfátu a také možnost ovlivnit jeho hladiny v kůži může napomoci při zvládnutí jak kosmetických, tak patologických kožních problémů. Inhibitory enzymu SULT2B1b by se tak zřejmě mohly podílet na řešení problému týkajících se hyperkeratózy a nadměrného šupinatění. Prozatím se pokožka trpící šupinatostí řeší především aplikací emoliencií, kdy se využívá jejich okluzivního účinku (vazelína, živočišné i rostlinné oleje) či schopnosti vázat vodu a dodávat jí pokožce (močovina, kyselina hyaluronová, ceramidy, cholesterol). Možností je využití mechanického či chemického peelingu, který často způsobuje dráždění pokožky (Finsterlová 2006). Výhodou by tedy mohlo být využití látek schopných ovlivnit přirozený proces deskvamace.

Jedním ze směrů zkoumání by mohl být odlišný obsah CHS i aktivita SULT2B1b v mladé a stárnoucí pokožce. Zvýšený obsah CHS ve stárnoucí pokožce byl zatím prokázán u myši (Haratake a kol. 2006). Zda je tomu tak i u lidské pokožky je potřeba důkladněji ověřit. Ovlivnění obratu CHS v epidermis by mohlo přispět v boji proti předčasnému stárnutí pokožky, ale rovněž ke zmírnění projevů známek typických pro starší epidermis. Látky ovlivňující deskvamaci by mohly najít uplatnění spolu s již tradičním využíváním prostředků chránících před působením slunečního záření, nutraceutik zajišťujících výživu těla i pokožky, antioxidantů a látek působících proti vráskám, ztrátě pružnosti a dyspigmentaci (Dayan 2008).

Pro rutinní práci s enzymem a zkoumání možností ovlivnění jeho exprese je vhodné mít k dispozici jednoduchou, rychlou, finančně méně náročnou metodu pro stanovení enzymové aktivity. Proto jsme chtěli takovou metodu zavést do praxe. U sulfotransferáz se pro určování aktivity využívá především radiometrické stanovení, které bohužel nesplňuje všechny výše zmíněná kritéria. Výhodou radiometrického stanovení je univerzální využití u sulfonačních reakcí a vysoká citlivost (Paul 2012). Pro jednu ze sulfotransferáz, konkrétně DHEA–ST, je popsána spektrofluorimetická metoda, která nás inspirovala (Chen 2005). Stejně jako u detekce aktivity DHEA-ST jsme využili párovou reakci využívající fluorescenci MU jakožto konečného produktu.

Ovšem při hledání optimálních podmínek pro stanovení aktivity SULT2B1b spektrofotometricky se nám je bohužel nepodařilo najít, a tím pádem ani popsat fungující párovou reakci. Toto selhání může mít hned několik důvodů.

Jedním z hlavních důvodů nefunkčnosti reakce může být neaktivní enzym. Zakoupený enzym používaný při našich experimentech byl dle výrobce určen především pro separaci proteinů metodou SDS-PAGE, a tím pádem neměl deklarovanou katalytickou účinnost. Je tedy možné, že enzym neobsahoval části stěžejní pro průběh sulfonační reakce (He a Falany 2006). Řešením tohoto problému by mohlo být vytvoření vlastního rekombinantního enzymu. Ovšem tento postup je náročný a získání stoprocentně účinného enzymu také není zajištěno, jelikož enzym se jeví citlivý a při snaze o získání čistého enzymu podléhá relativně snadno změnám vedoucím ke ztrátě aktivity (Falany a kol. 2006). Pro další experiment jsme využili linii lidských imortalizovaných keratinocytů HaCaT, kdy buněčný lyzát měl v reakční směsi nahradit zakoupený enzym. Tato linie je významná svou zachovalou schopností diferenciací (Boukamp 1988). Předpokládali jsme obsah alespoň malého množství aktivní SULT2B1b v lyzátech, což ale není literaturou podloženo. Bylo by proto do budoucna vhodné ověřit přítomnost proteinu SULT2B1b eventuálně jeho aktivitu v linii. Ani při použití lyzátu jsme nezaznamenali úspěch a reakce stále nefungovala. Problémem by mohla být už výše zmíněná nestabilita enzymu. Při kultivaci byl získán relativně nízký výtěžek celkového proteinu, což by mohlo vedle nepřítomnosti enzymu znamenat nedostatečné množství SULT2B1b nutné pro průběh reakce. Možností by bylo využití buněk označovaných jako normální lidské epidermální keratinocyty (normal human epidermal keratinocyte, NHEK), u kterých je přítomnosti aktivního enzymu SULT2B1b prokázána (Higashi 2004).

Dalším problémem by mohla být rozpustnost substrátu cholesterolu, ačkoliv jsme pro reakci využili také formu ve vodě rozpustného cholesterolu. Substrát ve formě cholesterol-methyl- $\beta$ -cyclodextrin jsme využili v podstatě jako náhradu za metodu využívající rozpuštění cholesterolu v roztoku  $\beta$ -cyclodextrinu. Tento způsob šetrného převedení do vodného roztoku je využíván při měření enzymové aktivity např. u cholesterol-27-hydroxylázy (Xiaobo a kol. 2006). Pro reakce jsme povětšinou využívali cholesterol rozpuštěný v etanolu. Nepředpokládali jsme vliv etanolu na průběh reakce ani možné vysrážení cholesterolu v reakční směsi, ovšem problém s dostupností substrátu je možný. Jako rozpouštědlo jsme využili rovněž dimethylsulfoxid,

ale bez pozitivního efektu. Při zkoušení jsme zaznamenaly rostoucí fluorescenci v závislosti na rostoucí koncentraci MUS. To je s největší pravděpodobností způsobeno obsahem MU v komerčně dodávaném MUS, což uvádí i výrobce Sigma-Aldrich. MUS sám o sobě vykazuje fluorescenci (Internet 6), ale s maximy při jiných vlnových délkách i pH ( $\lambda_{ex}=334$  nm,  $\lambda_{em}=370$  nm, pH 10,4). Možností by mohlo být využití párové reakce, využívající rovněž fenolsulfotransferázu, ale jiný fluoreskující produkt. Mezi sulfáty, které po hydrolyze vykazují fluorescenci, patří např. naftyl sulfát (Paul a kol. 2012).

Neúspěch spektrofluorimetrické metody stanovení aktivity SULT2B1b nasměroval pracovníky Contipra jiným směrem. Dokázali úspěšně stanovit podmínky pro měření aktivity této sulfotransferázy využitím spektrofluorimetrické detekce konečného produktu jiné párové reakce. Finální a měřitelný produkt fosfát je uvolněn z PAP díky fosfatáze a je možné ho detekovat díky tvorbě komplexu fosfomolybdenanu malachitové zeleně (Prather a kol. 2012). Výhodou tohoto stanovení je možnost využití pro širokou škálu SULTs, jelikož PAP vzniká při většině sulfonačních reakcí.

## 7. ZÁVĚR

SULT2B1b patří mezi významné enzymy kožní bariéry. Je zatím jediným známým enzymem, který katalyzuje sulfonaci steroidní molekuly, konkrétně cholesterolu, v kůži. Funkce SULT2B1b v lidské epidermis není zatím dopodrobna popsána. Ukazuje se, že produkt sulfonace CHS, by se mohl zařadit vedle filaggrinu mezi pozdní markery diferenciaci keratinocytů. Vedle podílu na stimulaci diferenciaci keratinocytů se ukazuje být jeho hlavní rolí ovlivnění deskvamace pokožky. V hlubších vrstvách epidermis působí CHS jako inhibitor deskvamace. Nejvyšších koncentrací dosahuje SULT2B1b spolu s CHS ve stratum granulosum, kde tvoří až 5 % z přítomných lipidů. Směrem k povrchu pokožky zakončeného vrstvami mrtvých buněk strata cornea množství CHS díky hydrolýze klesá, dochází k degradaci desmozomů a díky zvýšené koncentrace cholesterolu k destabilizaci lipidových dvojvrstev. Postupně se snižují adhezivní síly mezi korneocyty a dochází k jejich odlupování, čímž je ukončen proces zrání buněk epidermis. Ovlivnění obratu CHS v epidermis také skrze ovlivnění aktivity SULT2B1b by mohlo být nástrojem v boji s nadměrným šupinatěním, hyperkeratózou či patologiemi jako X-vázaná ichtyóza. Při pokusech na myších se zjistilo, že také v průběhu stárnutí pokožky dochází ke změnám v cyklu CHS a zvyšuje se jeho obsah. Jelikož nebyly zaznamenány změny v aktivitě steroidsulfatázy degradující CHS, množství CHS v epidermis by mělo korelovat s aktivitou SULT2B1b, což by hypoteticky mohlo znamenat, že aktivita SULT2B1b s věkem může narůstat.

Cílem experimentální části práce bylo navrhnutí a stanovení optimálních podmínek pro chod spektrofotometrické metody. Nevržená párová reakce, využívající stanovení finálního produktu MU spektrofotometricky, se nám i přes veškerou snahu nepodařila rozběhnout. Jako hlavní možné problémy jsme určili neaktivní enzym SULT2B1b a špatnou dostupnost substrátu cholesterolu pro enzym. Dostupnost cholesterolu jsme chtěli zvýšit použitím jeho komplexu s  $\beta$ -cyklodextrinem, který nám umožnil ho převést do vodného roztoku. Nedošlo ale ke zlepšení výsledků. Problémem tedy mohl být neaktivní zakoupený enzym, což jsme si vzhledem k náročnosti radiometrické metody běžné používané pro stanovení aktivity tohoto enzymu neověřili a v dalších pokusech nám zabránilo vyčerpání množství enzymu. Problémem mohla být také nekompatibilita celého reakčního systému či nevhodný výběr metody pro tento konkrétní enzym.

Výzkumný tým společnosti Contipro se tímto enzymem nadále zabýval a podařilo se jim vyvinout vhodnou relativně nenáročnou metodu pro stanovení aktivity SULT2B1b

spektrofotometricky. Při této metodě je detekován jako finální produkt anorganický fosfát, který vzniká oddělením od desulfonovaného kofaktoru reakce PAP. Tento fosfát tvoří reakcí s malachitovou zelení komplex fosfomolybdenanu malachitové zeleně detekovatelný spektrofotometricky.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

5' - AMP – 5' - adenosinmonofosfát

AD – atopická dermatitida

ATP – adenosin trifosfát

BOFES – bovine fetal serum

BSA – bovine serum albumin

HMG CoA – hydroxymethylglutaryl coenzyme A

CH – cholesterol

CHS – cholesterol sulfát

LDL – low density lipoprotein

LP – lyzační pufr

MU – methylumbelliferon

MUS – methylumbelliferyl sulfát

*p*-NFS – *para* - nitrofenolsulfát

*p*-NF – *para* - nitrofenol

PAPS – 3' - fosfoadenosin - 5' - fosfosulfát

PAP – adenosin 3',5' - difosfát

PBS – phosphate buffered seline

Pi – anorganický fosfát

RFU – relative fluorescent unit

SC – stratum corneum

SULT – sulfottransferáza

XLI – X-vázaná ichtyóza

## 9. SEZNAM LITERATURY

Boukamp P. a kol. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*. 106, 761-771.

Callaghan T. M. a Wilhelm K.-P. (2008) A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science*. 30, 313-322.

Dayan N. (ed.) (c 2008) *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. Norwich, NY: William Andrew. ISBN 978-0-8155-1584-5.

Elias P. M. a kol. (2014) Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: Lessons from X-linked ichthyosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1841(3), 353-361. DOI: 10.1016/j.bbali.2013.11.009.

Falany C. N. (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *The FASEB Journal*. 11, 206-216.

Falany C. N. a kol. (2006) Human cytosolic sulfotransferase 2B1: Isoform expression, tissue specificity and subcellular localization. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 102(1-5), 214-221. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.011. ISSN 09600760.

Finsterlová M. (2006) *Péče o pleť a vlasy*. Vyd. 1. Praha: Grada. Zdraví & životní styl. ISBN 80-247-1340-3.

Frame L. T. a kol. (2000) A simple colorimetric assay for phenotyping the major human thermostable phenol sulfotransferase (SULT1a1) using platelet cytosols. *Drug Metabolism and Disposition*. 28(9), 1063-1068.

Franz T. J. a Lehman P. A. (2000) The Skin as a Barrier: Structure and Function. In: Agis F. a kol. (eds.) *Biochemical modulation of skin reactions: transdermals, tropicals, cosmetics*. Boca Raton, CRC Press. ISBN 0849321174.

Gamage N. a kol. (2006) Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicological Science*. 90(1), 5-22. DOI: 10.1093/toxsci/kfj061.

Geese W. J. a Blanchard Raftogianis R. (2001) Biochemical Characterization and Tissue Distribution of Human SULT2B1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288, 280-289. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5746.

Ghadially R. a kol. (1995) The aged epidermal permeability barrier. *The Journal of Clinical Investigation*. 95, 2281-2290.

- Haratake A. a kol. (2006) Acceleration of de novo cholesterol synthesis in the epidermis influences desquamation of the stratum corneum in aged mice. *Skin Pharmacology and Physiology*. 19, 275-282. DOI: 10.1159/000093983. ISBN 10.1159/000093983.
- Harman D. (1993) Free radical involvement in aging: Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs & Aging*. 3(1), 60-80.
- He D. a Falany C. N. (2006) Characterization of Proline-Serine-Rich Carboxyl Terminus in Human Sulfotransferase 2B1b: Immunogenicity, Subcellular Localization, Kinetic Properties, and Phosphorylation. *Drug metabolism and disposition*. 34(10), 1749-1755. DOI: 10.1124/dmd.106.011114.
- Higashi Y. a kol. (2004) Expression of Cholesterol Sulfotransferase (SULT2B1b) in Human Skin and Primary Cultures of Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 122, 1207-1213. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.22416.x.
- Chen W. T., Liu M. C. a Yang Y. S. (2005) Fluorometric assay for alcohol sulfotransferase. *Analytical Biochemistry*. 339, 54-60. DOI: 10.1016/j.ab.2004.12.016.
- Kligman L. H. a Kligman A. M. (1986) The nature of photoageing: Its prevention and repair. *Photodermatology*. 3, 215-227.
- Koster M. I. (2009) Making an epidermis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1170, 7-10.
- Laga A. C. a Murphy G. F. (2009) The translational basis of human cutaneous photoaging: On models, methods, and meaning. *The American Journal of Pathology*. 174(2), 357-360. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081029.
- Lane E. B. a McLean W. (2004) Keratins and skin disorders. *Journal of Pathology*. 204, 355-366. DOI: 10.1002/path.1643. ISBN 10.1002/path.1643.
- Ledvina M., Stoklasová A. a Cerman J. (2004) *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, ISBN 8024608499.
- Lüllmann-Rauch R. (2012) *Histologie*. 1. české vyd. Překlad Radomír Čihák. Praha: Grada,. ISBN 978-80-247-3729-4.
- Madison K. C. (2003) Barrier Function of the Skin: “La Raison d’EOE tre” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 121(2), 231-241.
- Mastuda T. a kol. (2011) Tumor necrosis factor-alpha–nuclear factor-kappa B-signaling enhances St2b2 expression during 12-o-tetradecanoylphorbol-13- acetate-induced epidermal hyperplasia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(2), 183-190.
- Menon G. K., Dryer L. a Kalafsky R. (c 2008) Approaches to the development of cosmetic products to counter the effects of skin aging. In: Dayan N. (ed.). *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. Norwich , NY: William Andrew, , s.266-283. ISBN 978-0-8155-1584-5.

Merten M. a kol. (2001) Cholesterol Sulfate: A New Adhesive Molecule for Platelets. *Circulation*. 103, 2032-2034. DOI: 10.1161/01.CIR.103.16.2032. ISSN 1524-4539.

Murray R. K. (2002) *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.

Nardo A. D. a kol. (1998) Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Dermato – Venereologica*. 78, 27-30. ISSN 0001-5555.

Nimmagadda D. a kol. (2006) Cytosolic sulfotransferases. *Indian Journal of Experimental Biology*. 44, 171-182.

Paul P. a kol. (2012) Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403(6), 1491-1500. DOI: 10.1007/s00216-012-5944-4.

Prather B. a kol. (2012) Golgi-resident PAP-specific 3'-phosphatase-coupled sulfotransferase assays. *Analytical Biochemistry*. 423(1), 86-92.

Rhie G.-E. a kol. (2001) Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 117, 1212-1217.

Rosi Helfrich Y. a kol. (c 2008) Overview of Skin Aging and Photoaging. *Dermatology Nursing*. 20(3), 177-183.

Salman E. D. a kol. (2011) Site-directed mutagenesis of human cytosolic sulfotransferase (SULT) 2B1b to phospho-mimetic Ser348Asp results in an isoform with increased catalytic activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127(3-5), 315-323. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.07.010.

Sauermann K. a kol. (2002) Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Research and Technology*. 8, 52-56.

Strott C. A. a Higashi Y. (2003) Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *Journal of Lipid Research*. 44, 1268-1278. DOI: 10.1194/jlr.R300005-JLR200.

Taylor R. B. (c 2003) *Family medicine: principles and practice*. 6th ed. New York: Springer. ISBN 0387954007.

Taylor R. S. a kol. (1996) Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *Journal of Investigative Dermatology*. 106, 759-765.

Thakur R. a kol. (c 2008) Structural and biochemical changes in aging skin and their impact on skin permeability barrier. In: Dayan N. (ed.). *Skin Aging Handbook: An*

*Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. Norwich , NY: William Andrew, 56-84. ISBN 978-0-8155-1584-5.

Ueda M. a kol. (1997) Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Research*. 57, 370-374.

Venkatachalam K. V.(2003) Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: Biochemistry, Molecular Biology and Genetic Deficiency. *IUBMB Life*. 55, 1-11. ISSN 1521-6551.

Watt F. M. a Green H. (1981) Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *The Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 90, 738-742.

Wertz P. W. (2000) Lipids and barrier function of the skin. *Acta Dermato – Venereologica*. 208, 7-11. ISSN 0001-5555.

Wertz P. W. a Michniak B. (2000) Epidermal lipid metabolism and barrier function of stratum corneum. In: Agis F.a kol. (eds.) *Biochemical modulation of skin reactions: transdermals, tropicals, cosmetics*. Boca Raton, CRC Press. ISBN 0849321174.

Williams M. L. a Elias P. M.(1981) Stratum corneum lipids in disorders of cornification. *The Journal of Clinical Investigation*. 68, 1404-1410.

Xiabo L. a kol. (2006) Enzyme activity assay for cholesterol 27-hydroxylase in mitochondria. *Journal of Lipid Research*. 47, 1507-1512. DOI: 10.1194/jlr.M600117-JLR200.

Yaar M. a Gilchrest B.A. (2007) Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology*. 157(5), 874-887. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x. ISSN 0007-0963.

ZahájenskýJ. (2007) Bariérová funkce kůže z pohledu klinické praxe. *Dermatológia pre prax*. 3-4, 124-127.

Záruba F. (1994) *Dermato-venerologie. 1. vyd. Praha: Scientia medica. 247 s. ISBN 80-855-2631-X*.

Zettersten E. a kol. (1998) Recessive X-linked ichthyosis: Role of cholesterol-sulfate accumulatio in the barrier abnormality. *Journal of Investigative Dermatology*. 111, 784-790.

Zidovetzki R. a Levitan I. (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768(6), 1311-1324.

## 9.1. ELEKTRONICKÉ ZDROJE

Internet 1: Structure Of Skin For Kids. *Pulp Bits* [online]. [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: <http://pulpbits.net/5-structure-of-skin-for-kids/>

Internet 2: *Skin Biology* [online]. [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: <http://www.skincancerclinics.net.au/skin-cancer/skin-biology>

Internet 3: *O vrásky pečujte podle jejich typu* [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://www.ordinace.cz/clanek/o-vrasky-pecujte-podle-jejich-typu/>

Internet 4: *Obecná biochemie* [online]. [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: <http://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=168492>

Internet 5: *BitesizeBio* [online]. [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: <http://bitesizebio.com/7214/ask-a-chemist-how-colorimetric-assays-work/>

Internet 6: 4-Methylumbelliferyl sulfate potassium salt. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/4methylumbelliferylsulfatepotassiumsalt294321522011811?lang=en&ion=CZ&attrlist=Fluorescence%20Test>

Internet 7: *Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. Norwich, NY: William Andrew. s. 56-84. Fišar Z.(c 2008) *Fluorescenční spektroskopie v neurověděch* [online]. [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

Internet 8: Bergmeyer H. U. (ed.)(1974). *Methods of enzymatic analysis* [online]. 2nd Edition. Weinheim: Verlag Chemi. [cit. 2016-03-26]. ISBN 0-12-091304-6. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=8Cb3fzR6ZiC&printsec=frontcover&dq=analytical+BERGMEYER+2012&hl=cs&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=8Cb3fzR6ZiC&printsec=frontcover&dq=analytical+BERGMEYER+2012&hl=cs&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Internet 9: Lakowicz J. R. (c 2006) *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. 3rd ed. New York: Springer. [cit. 2016-03-26]. ISBN 0387312781. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=PSybuLNxcAC&printsec=frontcover&dq=lakowicz&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwi4lfeDod7LAhWJQpoKHRMtA24Q6AEIHDA#v=onepage&q&f=false>

Internet 10: Martínek J. a Vacek Z. (2009) *Histologický atlas* [online]. 1. vyd. Praha: Grada. [cit. 2016-03-26]. ISBN 978-80-247-2393-8. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=HPZFYyZ6rsC&printsec=frontcover&dq=Histologický%20atlas.&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjs26evmd7LAhVDJpoKHfvEAI8Q6AEINzAA#v=onepage&q&f=false>

Internet 11: Kříženecká S. a Synek V. (2014) *Základy analytické chemie* [online]. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně Fakulta životního prostředí, [cit. 2016-03-25]. ISBN 978-80-7414-873-6. Dostupné z:  
[http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e\\_final\\_tisk.pdf](http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e_final_tisk.pdf)