

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Purifikácia membránovo viazaného enzýmu DHRS7B

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vedúca diplomovej práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

V Hradci Králove 2018

Valéria Mariničová

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetká literatúra a zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králove, dňa

Valéria Mariničová

PodĎakovanie :

„Ďakujem svojej konzultantke RNDr. Lucii Zemanovej, Ph.D. za veľmi cenné a odborné rady, trpezlivosť a venovaný čas počas celého priebehu spracovania mojej diplomovej práce. Rovnaké poďakovanie patrí aj PharmDr. Hane Navrátilovej, Ph.D. za pomoc a ochotu pri práci, ako aj celému kolektívu katedry biochemických vied, ktorý mi v každej situácii podal pomocnú ruku. V neposlednom rade ďakujem mojím rodičom, ktorí mi boli veľkou oporou počas celého štúdia, celej mojej rodine a priateľom, vďaka ktorým som zvládla každú prekážku.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Valéria Mariničová

Vedúca diplomovej práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Purifikácia membránovo viazaného enzýmu DHRS7B

Membránovo viazaný enzým DHRS7B, pochádzajúci z nadrodiny SDR (dehydrogenázy/reduktáz s krátkym reťazcom), patrí medzi málo preskúmané proteíny ľudského organizmu. Aj napriek nedostatku informácií o jeho vlastnostiach bol pozorovaný u myši, kde sa označuje ako PexRap s lokalizáciou v peroxizomoch a endoplazmatickom retikule (ER). Ide teda o peroxizomálny redukujúci proteín, ktorý ako kofaktor využíva NADPH. V myšacom organizme sa prejavila jeho aktivita na biosyntéze peroxizomálnych éterových lipidov počas adipogenézy. O úlohe ľudského DHRS7B v bunke, a prípadne niektorých ochoreniach, sa doposiaľ iba špekuluje a preto sa stáva predmetom výskumov.

Cieľom práce bolo získať čistý rekombinantný ľudský enzým DHRS7B pripravený v Sf9 bunkách. Keďže je to membránový proteín bolo potrebné nájsť vhodný detergent, ktorý dokáže enzým DHRS7B vyňať z fosfolipidickej membrány a zároveň zachovať jeho aktivitu. Najvhodnejším sa javil detergent DDM v koncentrácii 1:1 (w/w) proteín:detergent. Ďalšími krokmi bola purifikácia, afinitná chromatografia pri ktorej sa získal čistý proteín DHRS7B, ktorý mal aktivitu voči ketotifénu 62 nmol/mg/min. Tento čistý enzým bude slúžiť ďalšiemu výskumu na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové.

ABSTRACT

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

Candidate: Valéria Mariničová

Supervisor: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Title of diploma thesis: The purification of the membrane-bound enzyme DHRS7B

The membrane-bound DHRS7B enzyme, from the SDR (short-chain dehydrogenase/reductase) superfamily, is one of poorly characterized protein of the human organism. Despite the lack of information about its properties, it was observed in mice, where it is named to as PexRap, localized in peroxisomes. It is a peroxisomal reducing protein that uses NADPH as a cofactor. Its participates in biosynthesis of peroxisomal ether lipids during adipogenesis in mice. The role of human DHRS7B in cells or eventually in diseases has been only speculated and therefore it is in the focus of research.

The aim of this work was to obtain the pure recombinant human DHRS7B enzyme prepared in *Sf9* cells. It is a membrane protein, so it was necessary to find a suitable detergent that is able to remove the DHRS7B enzyme from the phospholipid membrane while preserving its activity. The most suitable detergent was DDM 1:1 (w/w) protein:detergent. Further step was its purification by affinity chromatography, the pure DHRS7B protein with a ketotifen reducing activity of 62 nmol/mg/min was obtained. This pure enzyme will be used for further research at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Membránové proteíny	10
2.2	Detergenty	12
2.2.1	Všeobecné vlastnosti detergentov	13
2.2.2	Skupiny detergentov	15
2.2.3	Odstránenie detergentu.....	17
2.3	Solubilizácia membránových proteínov	19
2.4	Purifikácia proteínov	20
2.4.1	Príprava vzorky na purifikáciu	21
2.4.1.1	Dezintegrácia buniek predchádza solubilizácii.....	21
2.4.1.2	Centrifugácia	21
2.4.2	Proces purifikácie	22
2.4.2.1	Afinitná chromatografia (AC).....	23
2.5	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR) nadrodina	25
2.5.1	SDR ako stále sa rozrastajúca rodina	25
2.5.2	Aminokyselinový reťazec SDR enzýmov	25
2.5.3	Štruktúra dehydrogén/reduktáz s krátkym reťazcom	26
2.5.4	Sedem typov SDR enzýmov	27
2.6	Nomenklatúra SDR	29
2.6.1	Číslovanie jednotlivých členov rodiny:	29
2.7	DHRS7B	30
2.7.1	Lokalizácia a parametre	30
2.7.2	Vlastnosti a funkcia	30
3	CIEĽ PRÁCE	31
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
4.1	Materiál	32
4.1.1	Pomôcky.....	32
4.1.2	Prístroje	32
4.1.3	Chemikálie	33
4.1.4	Protilátky	34
4.1.5	Enzýmy.....	34
4.1.6	Molekulové markery	34

4.1.7	Roztoky a pufry	35
4.2	Metodika	39
4.2.1	Screening účinnosti detergentov na solubilizácii DHRS7B z Sf9 mikrozómov	39
4.2.2	SDS polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS – PAGE).....	40
4.2.2.1	Príprava gélov pred elektroforézou	40
4.2.2.2	Priebeh elektroforézy	41
4.2.3	Western blotting	42
4.2.4	Zobrazovanie po WB.....	43
4.2.4.1	Vizualizácia.....	43
4.2.5	Meranie enzýmovej aktivity DHRS7B	44
4.2.6	Purifikácia DHRS7B	45
4.2.6.1	Solubilizácia mikrozómov pre AC.....	45
4.2.6.2	Postup AC	45
4.2.7	Stanovenie koncentrácie bielkoviny	47
5	Výsledky.....	48
5.1	Screening účinnosti detergentu na solubilizáciu DHRS7B	48
5.1.1	Vizualizácia solubilizácie DHRS7B s DDM a C12E8	48
5.1.2	Vizualizácia solubilizácie DHRS7B s OG a CHAPS.	49
5.1.3	Vizualizácia solubilizácie DHRS7B a Triton X-100 (TRX) a Igepal CA – 630 (IG)	49
5.1.4	Vizualizácia solubilizácie DHRS7B s Digitonínom (Dig).	50
5.2	Vplyv solubilizácie detergentov na aktivitu enzýmu DHRS7B	51
5.2.1	Porovnanie zachovania aktivity a účinnosti pri procese solubilizácie detergentom	52
5.3	Purifikácia DHRS7B	53
5.4	Stanovenie koncentrácie bielkoviny.....	54
5.4.1	Koncentrácia vo vzorke solubilizovaných mikrozómov pred purifikáciou	54
5.4.2	Koncentrácia vo vzorke purifikovaného DHRS7B.....	55
5.4.3	Koncentrácia vo vzorke čistého DHRS7B vo výmennom pufri	56
5.5	Analýza purifikačného procesu pomocou SDS – PAGE elektroforézy.....	57
5.6	Identifikácia DHRS7B metódou Western blottingu	58
5.7	Stanovenie aktivity čistého proteínu	59
6	Diskusia	60
7	Záver.....	63
8	Zdroje	64
8.1	Internet.....	64

8.2	Literárne zdroje	66
9	Zoznam obrázkov	71
10	Zoznam tabuliek	73
11	Zoznam skratiek	74

1 ÚVOD

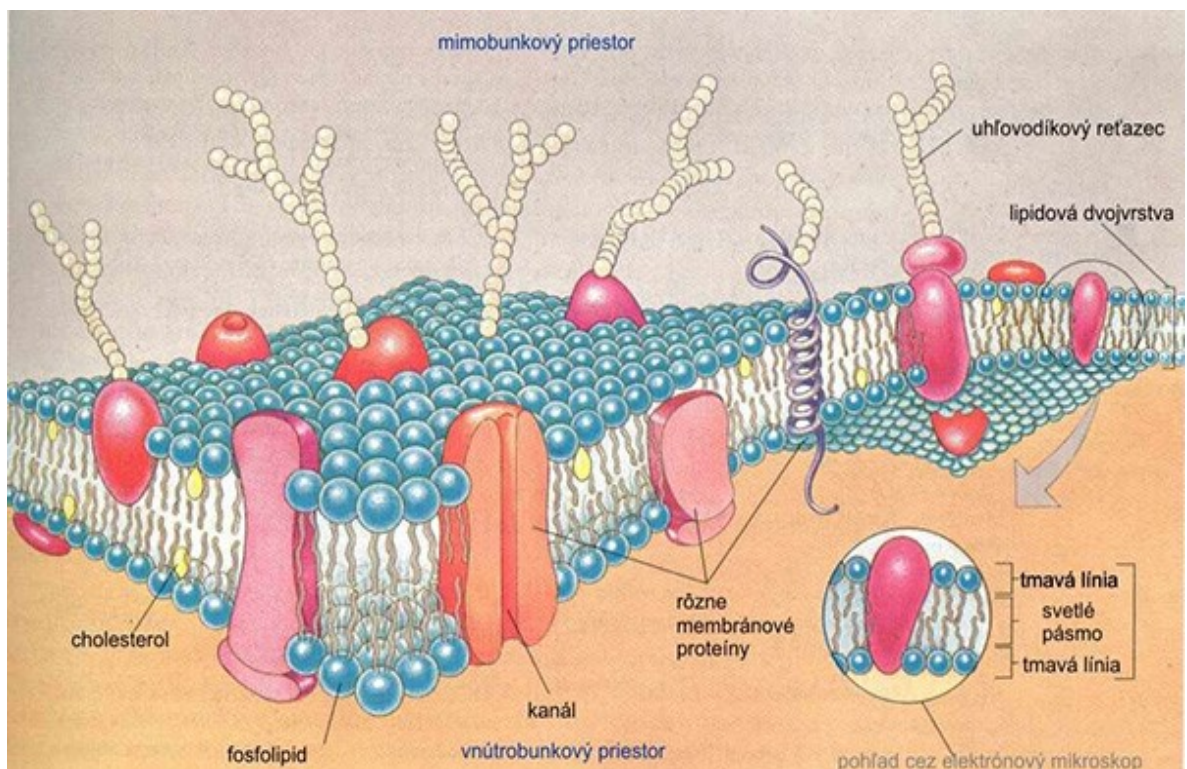
Poznanie niektorých proteínov dopomohlo k mnohým medicínskym pokrokom a rozvoju vedy. Enzýmy z nadrodiny dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR) boli prvýkrát identifikované v roku 1980 v baktériách a neskôr bola ich prítomnosť potvrdená tiež v cicavčej bunke (Bahtia et al., 2015). Ide o rýchlorastúcu nadrodinu proteínov, ktorá mala v roku 2000 asi 1600 členov (Opperman et al., 2001) no v roku 2012 už bolo uvedených 160 000 záznamov o tejto nadrodine (Persson and Kallberg, 2013) a neskôr sa tento údaj rozšíril na číslo 670 000 záznamov (Jörnvall et al., 2015). Niektoré ľudské enzýmy z nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkym reťazcom sú dobre opísané a zohrávajú dôležitú úlohu v rozvoji niektorých ochorení ako je nádorové bujnenie alebo v spojení s metabolickým syndrómom.

Mnohé z týchto ľudských zástupcov sú stále veľmi málo opísané alebo nie sú opísané vôbec. Všeobecne ide o enzýmy viazané do membrán subcelulárnych podjednotiek. Jedným z nich je aj membránovo viazaný enzým DHRS7B, nachádzajúci sa v endoplazmatickom retikule. Jeho účasť sa predpokladá na metabolických dejoch a možno má podiel aj na patologických stavoch. Pre základnú charakteristiku je preto potrebné najprv ich získanie v stave, ktorý nám umožní ďalší výskum, teda v purifikovanom stave.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Membránové proteíny

Živú bunku možno charakterizovať ako sústavu dôležitých molekúl držaných uprostred obalu. Tým je biologická membrána, ktorá je potrebná pre vznik a funkciu živého organizmu. Je to bariéra medzi vonkajším a vnútorným prostredím, zodpovedná za príjem živín a zároveň bráni úniku obsahu bunky. V súčasných predstavách je charakterizovaná ako fluidná mozaiková štruktúra (Špajdelová et al., 2013). Tvorená je z lipidov, proteínov a sacharidov, pričom základnú stavbu tvoria fosfolipidy a sfingolipidy. Lipidy majú hydrofilnú hlavičku, ktorá smeruje von z membrány a jeden alebo dva hydrofóbne konce, paralelne usporiadané do vnútra membrány (Obr. 1).

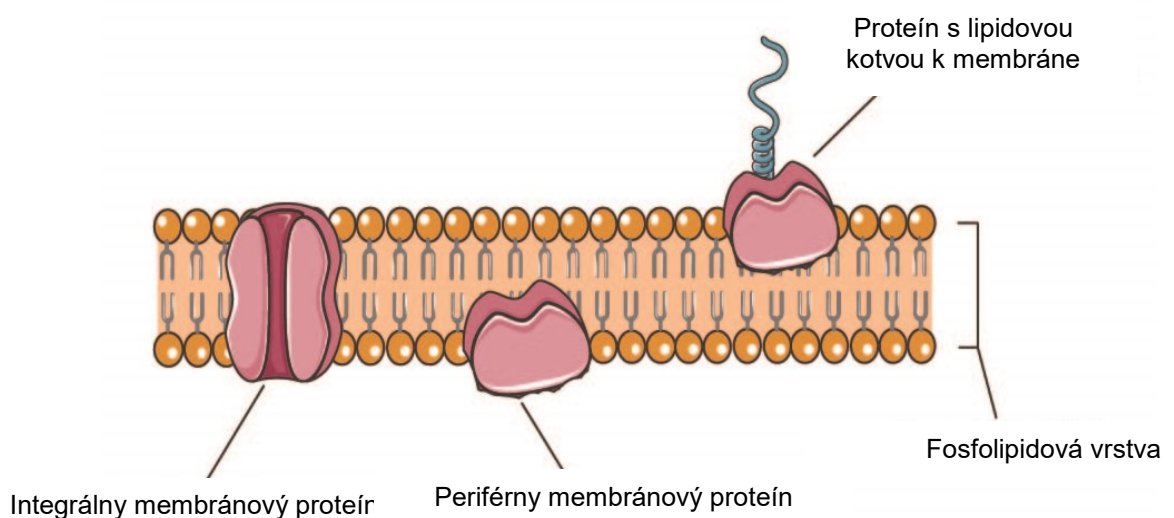


Obrázok 1: Štruktúra biomembrány (Špajdelová et al., 2013).

Tekutý charakter zabezpečuje fluidná dvojvrstva. Keďže je membrána polotekutá neustále sa mení jej stav, presúvajú sa zložky, ale ako celok si stále drží štruktúru. Okrem základných zložiek sa v membráne nachádza aj podiel cholesterolu a jeho pomer k množstvu fosfolipidov udáva fluiditu membrány.

Základnú stavbu všetkých bunkových organel síce tvorí lipidová dvojvrstva, ale za špecifické funkcie už sú zodpovedné membránové proteíny. Takéto proteíny majú v organizme rôzne postavenie v rámci fyziologických procesov a dnes sú často aj cieľom farmakologickej liečby (Alberts et al., 2005, Seddon et al., 2004). Môžu mať úlohu ako receptory, enzýmy, transportéry či antigény. Rozdeľujú sa do dvoch skupín, a to na integrálne membránové proteíny, ktoré prechádzajú skrz membránu. Od tejto membrány ich môžeme oddeliť iba narušením lipidovej vrstvy. Druhou skupinou sú proteíny ľahko oddeliteľné jednoduchými postupmi (Alberts et al., 2005). Analýza genómových sekvencií predpovedá, že asi 30% všetkých proteínov produkovaných *Homo sapiens*, *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae* sú integrálne membránové proteíny (Seddon et al., 2004). Integrálne proteíny interagujú s lipidmi prostredníctvom slabých vodíkových mostíkov, Van der Waalsových síl či iónových interakcií. Membránové proteíny teda môžu byť asociované s membránou tromi rôznymi spôsobmi (Obr. 2):

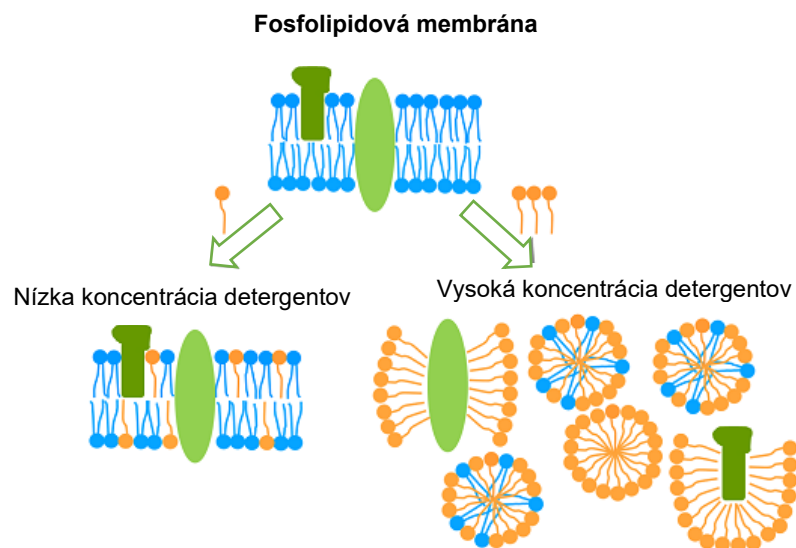
- Transmembránové proteíny umiestnené naprieč membránou. Časť polypeptidového reťazca transmembránových proteínov je hydrofóbna a je umiestnená v membráne. Tieto proteíny môžu prechádzať membránou raz alebo viackrát.
- Membránové proteíny s lipidovou kotvou k membráne. U takýchto proteínov je ich polypeptidový reťazec pripojený k membráne jednou alebo viacerými kovalentnými väzbami.
- Periférne proteíny, ktoré sú viazané k membráne slabými nekovalentnými väzbami. Môžu to byť interakcie s negatívne nabitými lipidmi či inými proteínmi (Alberts et al., 2005).



Obrázok 2: Rôzne spôsoby interakcií proteínov s membránou (Internet 1).

2.2 Detergenty

Pre štúdium membránových proteínov v čistej forme je potrebné ich najprv uvoľniť z dvojvrstvy membrány. Počas toho dochádza k porušeniu lipidovej vrstvy a uvoľneniu membránových proteínov. Tento proces uvoľnenia z fosfolipidického priestoru sa nazýva solubilizácia a pre získanie konkrétneho proteínu zo zmesi uvoľnených proteínov je potrebná purifikácia. Na solubilizáciu membránových proteínov sa najčastejšie využívajú detergenty, ktorým tiež môžeme hovoriť aj tenzidy. Sú to chemické zlúčeniny amfifilnej povahy, obsahujú teda hydrofilnú aj hydrofóbnú časť. Od membránových fosfolipidov sa líšia tým, že majú iba jeden hydrofóbný koniec a s proteínom vytvárajú komplex proteín – detergent tiež nazývaný micela. Tieto útvary tvoria detergenty aj bez prítomnosti proteínu. Vytvorenie tohto komplexu a uvoľnenie enzýmu z membrány závisí od koncentrácie pridaného detergentu (Obr. 3) (Alberts et al., 2005).

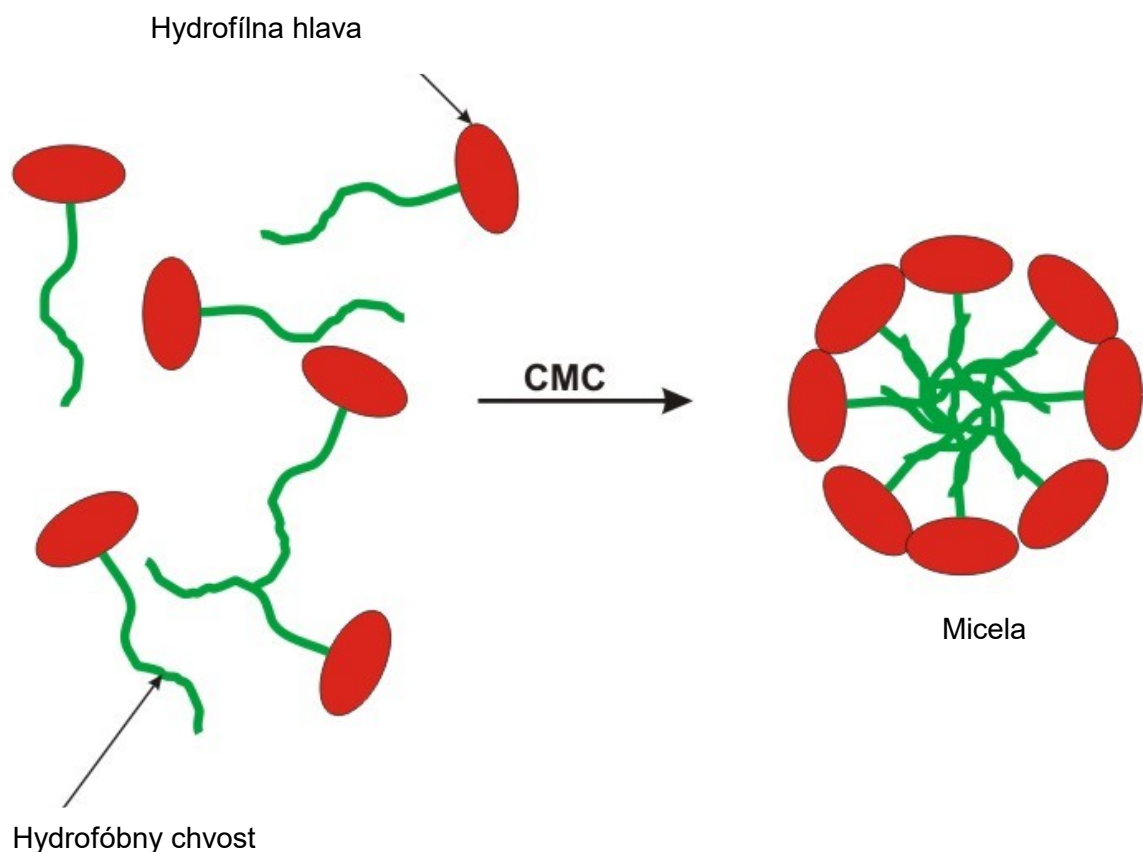


Obrázok 3: Znáročnenie vplyvu rôznej koncentrácie detergentov (Internet 2).

Pri nízkej koncentrácii sa detergent viaže iba na membránu a rozruší lipidovú vrstvu. Pri nadbytku pridaného detergentu sa jeho hydrofóbné konce naviažu na membránovú časť transmembránového proteínu a tak ho uvoľnia z prostredia fosfolipidov. Druhý koniec tenzidu je hydrofilný a zabezpečí transport proteínu v roztoku. Pri vysokej koncentrácii detergentu sa tak vytvoril komplex proteín – detergent (Alberts et al., 2005).

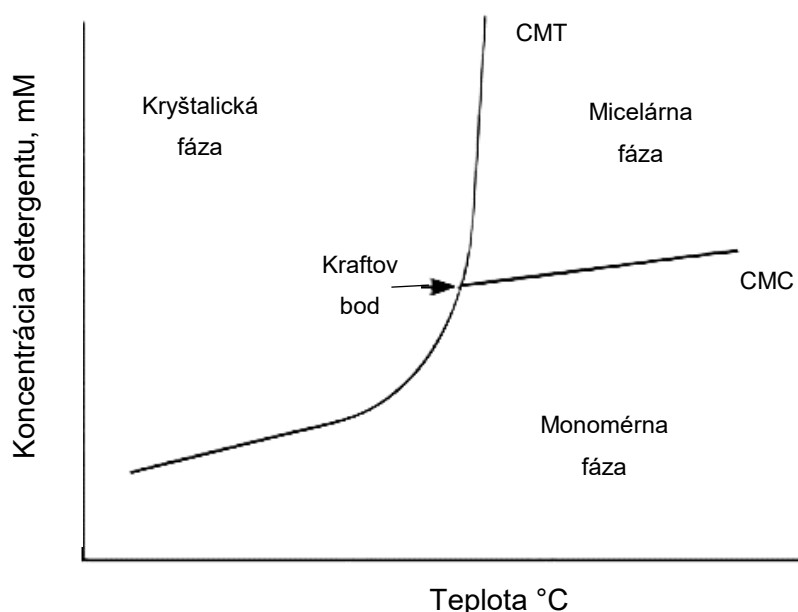
2.2.1 Všeobecné vlastnosti detergentov

Medzi jednu zo základných charakteristík detergentov patrí kritická micelárna koncentrácia (CMC), čo je najnižšia možná koncentrácia detergentu, pri ktorej dochádza k tvorbe micely (Janson et al., 2011, Walls et al., 2011). Pri vytváraní micely tvoria "chvosty" tenzidov (hydrofóbne konce, zvyčajne uhľovodíkové reťazce) jadro podobné olejovej kvapôčke a ich ionizované (alebo aspoň polárne) "hlavy" tvoria vonkajší obal, ktorý udržuje kontakt s vodným prostredím (Obr. 4). Počas vytvárania micelárneho komplexu dochádza k náhlej zmene povrchového napätia a fyzikálnych vlastností. Hodnota CMC je charakteristikou daného detergentu a mení sa v závislosti od podmienok, vrátane pH, iónovej sily, teploty, prítomnosti bielkovín, lipidov a iných detergentných molekúl (Seddon et al., 2004). Väčšinou sa nachádza v rozmedzí až 10^{-5} až 10^{-3} mol.dm⁻³.



Obrázok 4: Tvorba micely pri dosiahnutí CMC (Internet 3).

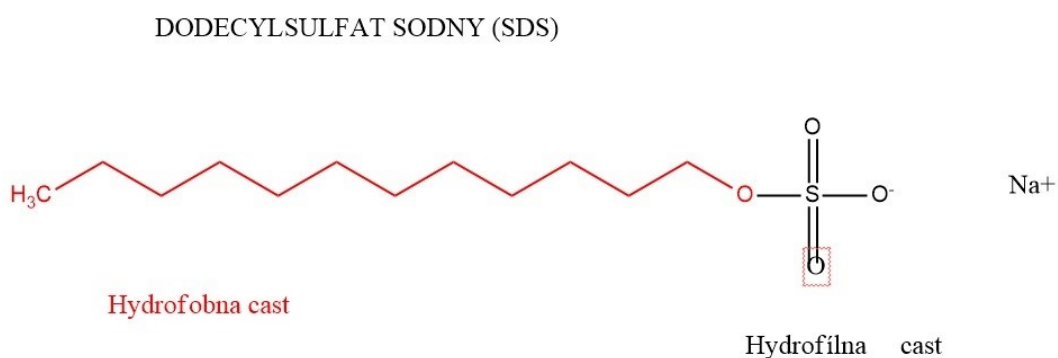
CMC klesá s dĺžkou alkylového reťazca a zvyšuje sa s počtom dvojitých väzieb v molekule detergentu (Seddon et al., 2004). Pri nízkych teplotách sú detergenty nerozpustné a tak sa postupne so zvyšovaním teploty stupňuje rozpustnosť detergentu, zvyšuje sa jeho koncentrácia, až kým nedosiahne CMC. Zvyšovanie teploty detergentu, a tým jeho rozpustnosti, prebieha až do bodu kritickej micelárnej teploty (CMT), keď monoméne jednotky tenzidu začnú formovať micelu. Teplota, pri ktorej sú všetky tri fázy – kryštalická, monoména a micelárna – v rovnováhe, sa nazýva Kraftov Bod (Sigma-Aldrich, 2017). Pre mnohé detergenty je CMT rovné Kraftovmu bodu (Obr. 5). Počet monomérov obsiahnutých v micеле je známy ako agregáčn é číslo (Seddon et al., 2004).



Obrázok 5: Grafické znázornenie závislosti koncentrácie detergentu a teploty. Kraftov bod je rovný CMC (Sigma-Aldrich, 2017).

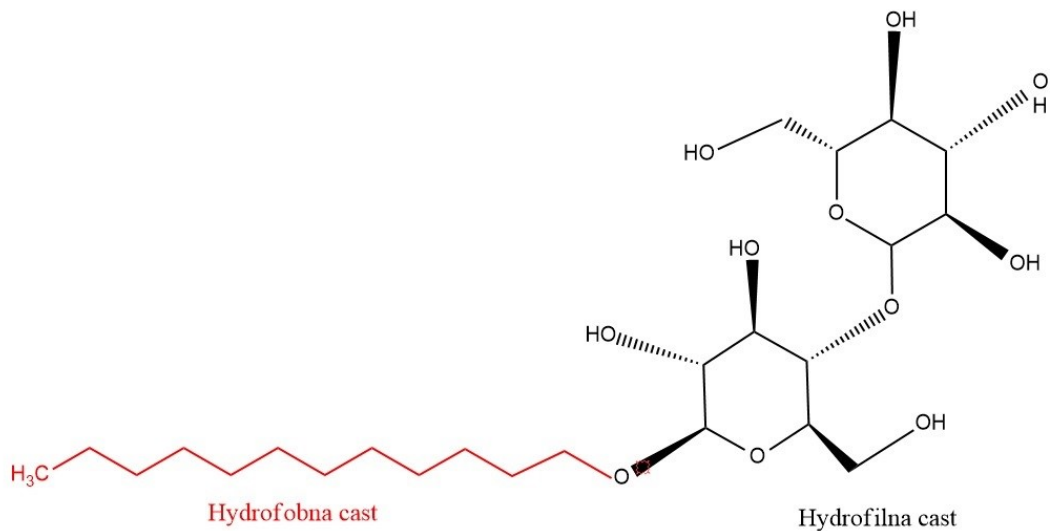
2.2.2 Skupiny detergentov

1) Iónové detergenty – detergenty, ktoré obsahujú skupinu s nábojom, ktorý môže byť buď kationový alebo aniónový a taktiež hydrofóbny uhľovodíkový reťazec alebo steroidnú kosť. Jedným z najúčinnějších je anionický detergent dodecyl sulfát sodný (SDS), ktorý je z chemickej stránky zvyčajne zmes sodných alkylsulfátov, najmä laurylsulfátu (Obr. 6) (Internet 4). Efektívny je aj pri solubilizácii membránových proteínov, ale takmer vždy do určitej miery denaturuje proteín. Niektoré proteíny môžu byť opäť renaturované odstránením denaturujúceho prvku SDS. Medzi ďalší z iónových detergentov patrí cetyl trimetyl-amonium bromid (CTAB), ktorý narozdiel od SDS je kationickým typom (Seddon et al., 2004, Internet 5).



Obrázok 6: Dodecylsulfát sodný (SDS).

2) Neiónové detergenty obsahujú nenabitú hydrofilnú skupinu, buď polyoxyetylénových, alebo glykozidických skupín. Neiónové detergenty sa všeobecne považujú za mierne a relatívne nendenaturujúce, pretože narúšajú interakcie lipid-lipid a interakcie lipid-proteín skôr, ako interakcie proteín-proteín. To nám umožňuje solubilizáciu v neiónových detergentoch bez ovplyvnenia štrukturálnych a funkčných vlastností proteínu, takže bude proteín izolovaný vo svojej biologicky aktívnej forme. Patrí sem napríklad n-dodecyl- β -maltozid (DDM) (Obr. 7). Niektoré krátkoreťazové neiónové detergenty, ako je n-oktyl- β -D-glukopyranozid (OG) môžu spôsobiť deaktiváciu proteínu. Ďalším príkladom neiónových tenzidov je napríklad Triton X-100, C12E8, Digitonin, Igepal CA-630, C8E4, C8E5 (Le Maire et al., 2000, Seddon et al., 2004).



Obrázok 7: Štuktúra detergentu n-Dodecyl – β – maltozidu (DDM).

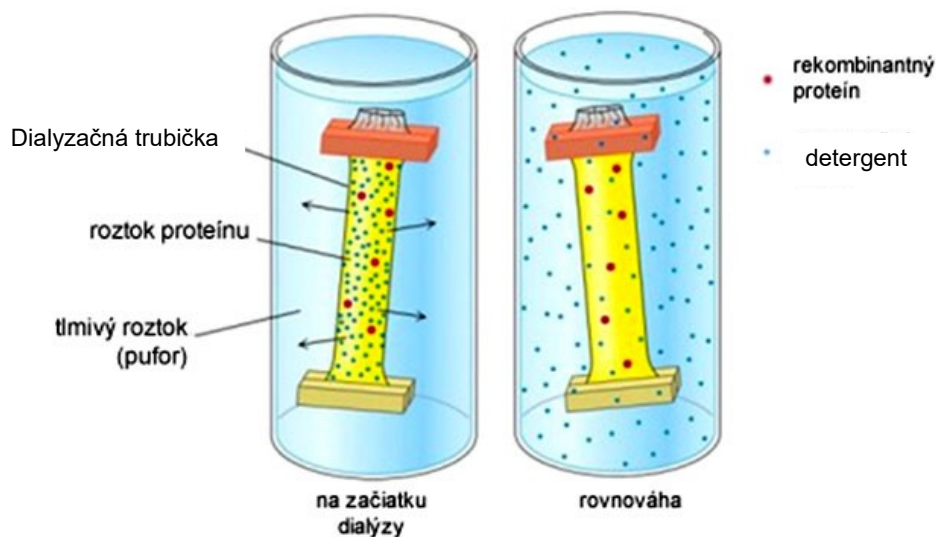
3) Zwitteriónové detergenty kombinujú vlastnosti iónových a neiónových detergentov a vo všeobecnosti viac deaktivujú proteíny ako neiónové detergenty. Tieto zlúčeniny na báze steroidov, ako sú žľčové soli a 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS), tvoria oddelenú triedu relatívne jemných detergentov. Charakterizované sú nízkou iónovou silou závislou od agregáčného čísla (Le Maire et al., 2000). Majú využitie aj v štruktúrnych štúdiách membránových proteínov (Seddon et al., 2004). Ďalej sem patrí aj ZWITTERGENT 3-X.

2.2.3 Odstránenie detergentu

Detergent, ktorý sa použije na zabezpečenie solubilizácie, aby sa dostatočne povolili väzby medzi zložkami v membráne a dostali sme proteín mimo prostredia membrány, je obvykle v pomerne vysokej koncentrácii. Takýto nadbytok ale môže skomplikovať ďalšiu prácu. Existujú rôzne metódy ako nadbytok detergentu odstrániť a zároveň zachovať vhodné prostredie pre ďalšiu prácu s proteínom. Tieto metódy využívajú vlastnosti detergentu ako CMC alebo agregáčného čísla (Seddon et al., 2004).

a) Dialýza :

Pri dialýze sa nachádza zmes proteínu a detergentu v systéme tzv. dialyzačnej trubičky, ktorá je tvorená polopriepustnou membránou. Systém je ponorený do tlmivého pufru bez detergentu a za nízkej teploty a stáleho miešania prepúšťa membrána malé molekuly, až kým sa nevyrovná rovnováha v oboch roztokoch. Študovaný proteín ostáva uzavretý vo vnútri dialyzačného systému (Obr. 8). Zriedenie detergentu na koncentráciu nižšiu ako je CMC spôsobí rozloženie micel až na monoméry, ktoré môžu byť bezpečne odstránené dialýzou. Technika je najlepšia pre detergenty s vysokou CMC a nízkou molekulovou hmotnosťou a nie je vhodná pre detergenty s nízkou hmotnosťou (Seddon et al., 2004).



Obrázok 8: Priebeh odstránenia detergentu pomocou dialýzy (Internet 6).

b) Hydrofóbná adsorpcia :

Pri tejto metóde sa amfifilné detergenty viažu na hydrofóbné matrice (hydrofóbné guľičky). Po ich spoločnom zmiešaní sa nechajú stáť a následne môžu byť odstránene filtráciou alebo centrifugáciou. Tento prístup je vhodný na odstraňovanie detergentov s nízkym CMC (Seddon et al., 2004).

c) Gélová chromatografia :

Pracuje na základe veľkostných rozdielov medzi detergentom a bielkovinou, detergentom a micelami alebo detergentom, lipidmi a micelami. Gél umiestnený v kolóne funguje ako sito, pretože obsahuje póry. Malé molekuly ostanú zachytené v póroch, zatiaľ čo veľké pretečú kolónou rovnako rýchlo ako mobilná fáza a objavia sa vo výslednom eluáte. Gélová chromatografia sa často používa na výmenu detergentu za iný (Seddon et al., 2004).

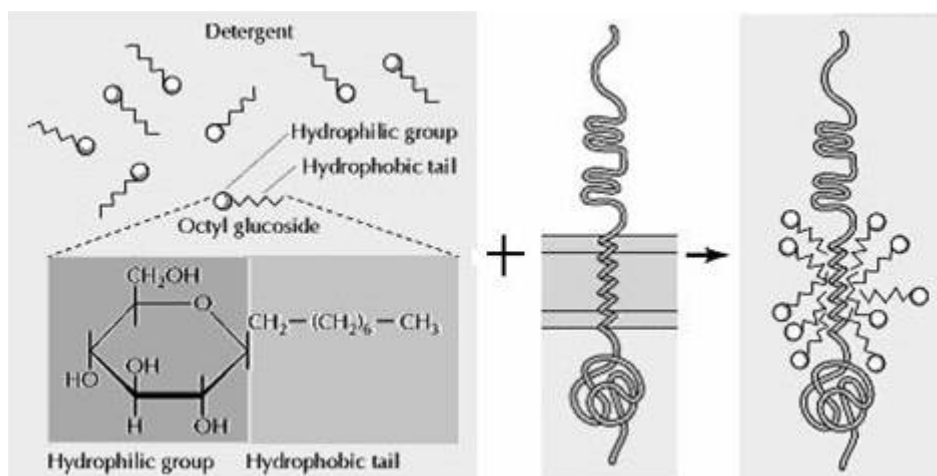
d) Ión-výmenná chromatografia :

Využíva rozdielny náboj medzi bielkovinovo-detergentnými micelami a homogénnymi detergentnými micelami. Táto metóda sa používa pre odstránenie nadbytku neionických a zwitteriónových detergentov. Proteín sa z chromatografickej kolóny potom eluuje zmenou iónovej sily, alebo zmenou pH, alebo premytím iónovými detergentami (Seddon et al., 2004).

2.3 Solubilizácia membránových proteínov

Solubilizácia je dej, ktorého výsledkom je rozrušenie väzieb medzi membránovým proteínom a časťami membrány, pri ktorom dochádza k uvoľneniu membránového proteínu do vodného roztoku. To nastáva vďaka pridaniu amfifilnej látky, ktorou je práve detergent (tenzid). Tenzid uzatvára proteín do micely, pričom svojimi hydrofilnými skupinami je v kontakte s roztokom. Hydrofóbne časti proteínu, ktoré doposiaľ interagovali s membránou sa viažu s hydrofóbnymi koncami detergentu. V tomto stave ho tenzid dokáže preniesť do iného prostredia. Tak je proteínu dočasne zabezpečené náhradné lipidické prostredie, v ktorom doposiaľ existoval (Seddon et al., 2004). Výsledkom je hydrofóbny proteín uvoľnený do roztoku, vďaka čomu s ním môžeme ďalej pracovať. Napriek tomu ale solubilizácia mnohými detergentami často vedie k inaktivácii proteínov. To platí najmä pre detergenty s krátkym (C7-C10) uhlíkovým reťazcom, napr. oktylglukozid a C8E4 alebo C8E5, ktoré sú často viac inaktivujúce ako efektívne detergenty so strednou dĺžkou (C12-C14) uhlíkového reťazca (Le Maire et al., 2000).

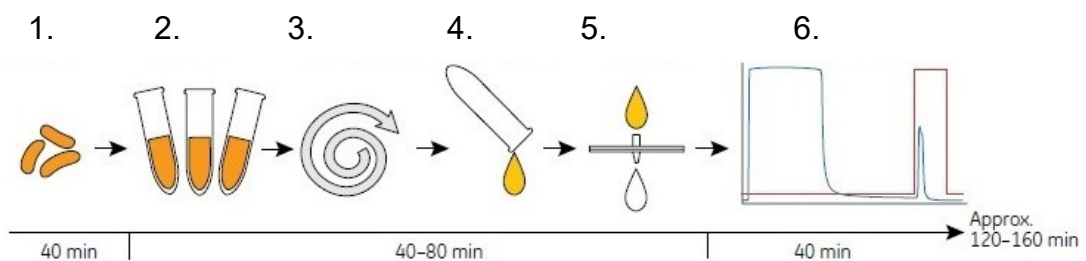
Lipidy z membránového do micelárneho prostredia prechádzajú v trojfázovom priebehu: 1. etapa je, keď časti detergentov začínajú byť prijímané lipidovou fázou, v 2. etape začína detergent vytvárať v membráne tzv. membránové fragmenty obklopené molekulami detergentu, ale ešte nedochádza k solubilizácii a predpokladá sa, že takto koexistujú spolu pri rovnovážnych termodynamických podmienkach. V etape 3 už pomaly začínajú byť lipidické a proteínové jednotky solubilizované ako nejaké malé množstvo nesedimentujúcich objektov alebo ako zmiešané micely, a napokon v etape 4 sú vytvorené micely detergent-lipid a detergent-proteín (Obr. 9) (Le Maire et al., 2000).



Obrázok 9: Membránové proteíny solubilizované detergentom OG (Internet 7).

2.4 Purifikácia proteínov

Purifikáciou sa označuje viacero procesov, pri ktorých je získaný konkrétny cieľový proteín v čistej forme. Pri tomto procese dochádza k odstráneniu zložiek, ktoré nie sú potrebné pre ďalšiu prácu, resp. by spôsobili nesprávne výsledky. Proteíny obvykle izolujeme z buniek, tkaniva alebo z extracelulárnych tekutín. Pre základnú charakterizáciu a bližšie štúdium proteínu je potrebné mať cieľový proteín v čistej forme. Jedine takto môžeme zistené vlastnosti pripísať danej molekule – môžeme študovať jeho štruktúru, funkciu, a v prípade enzýmu jeho substrátovú špecifickosť, atď. V mnohých prípadoch je dôležitá vysoká úroveň čistoty, a preto prebieha purifikácia v niekoľkých postupných krokoch (Obr. 10). Každý stupeň ale zároveň spôsobí istú stratu produktu, a preto je najlepší postup ten, pri ktorom sa dosiahne najvyššia kvalita čistenia v najmenších krokoch (Internet 1, Zubgay et al., 1988).



Obrázok 10: Kroky purifikácie (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2010).

1. Materiál pre purifikáciu – bunky, tkanivá; 2. Homogenizácia materiálu; 3. Centrifugácia; 4. Zber vhodnej subcelulárnej frakcie; 5. Filtrácia vzorky; 6. Purifikačný proces – chromatografická separácia, jeden z purifikačných krokov.

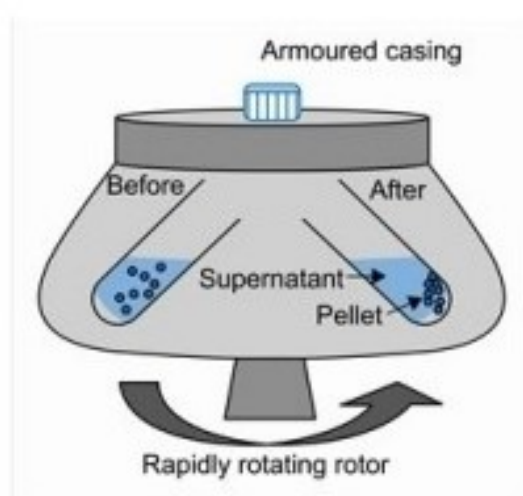
2.4.1 Príprava vzorky na purifikáciu

2.4.1.1 Dezintegrácia buniek predchádza solubilizácii

Na začiatku je potrebné pripraviť homogenát z buniek zdrojového materiálu pre získanie cieľového proteínu. K dezintegrácii buniek slúži proces homogenizácie. Existuje množstvo homogenizačných techník a ich použitie závisí na type buniek, ktoré sa dezintegrujú. K homogenizácii dochádza metódami mechanickými, chemickými alebo enzymatickými. Medzi fyzikálne-chemické metódy patrí rozbitie buniek ultrazvukom, a ak to nestačí, tak sa použije kombinácia detergentu s ultrazvukom (Alberts et al., 2005). Medzi mechanické spôsoby patrí Elvehjem-Potterov homogenizátor, použitie guľôčkového mlynu a homogenizácia vysokým tlakom. Z chemických metód sa využívajú organické rozpúšťadlá, ale tie denaturujú, takže ich využitie v purifikácii proteínov je minimálne (Tzannis et al., 1991).

2.4.1.2 Centrifugácia

Po rozrušení buniek homogenizáciou vznikne homogenát. Pre purifikáciu je potom nutné pripraviť vhodnú subcelulárnu frakciu, kde sa cieľový enzým nachádza. Na to sa využíva centrifugácia (Obr. 11). Pri centrifugácii dochádza k separácii častíc na základe rozdielnej sedimentačnej rýchlosti. Izolované frakcie sa môžu použiť na ďalšiu prácu (Internet 6, Jeremy MB et al., 2002).



Obrázok 11: Znáročenie vzorky pred centrifugáciou a po centrifugácii (Internet 8).

2.4.2 Proces purifikácie

Pre purifikáciu proteínov sa najčastejšie využívajú rôzne typy chromatografie, keď vzorka interaguje s matricou v kolóne. Separované sú podľa rozdielov ich vlastností (Tab. 1). Pôvod matrice určuje, či separácia závisí na rozdieloch hmotnosti, náboja alebo afinity. Rozlišujeme gélovú, iónovo-výmennú, hydrofóbnú či afinitnú chromatografiu (Bilkova et al., 1999).

Tabuľka 1: Využitie vlastností proteínov pri purifikácii. Jednotlivé techniky nie sú vhodné pre všetky fázy purifikácie.

Vlastnosť proteínu	Technika
Hydrofobicita	Reverzná fáza
Veľkosť	Gélová filtrácia
Náboj	Iónovo výmenná chromatografia
Špecifickosť ligandu	Afinitná chromatografia

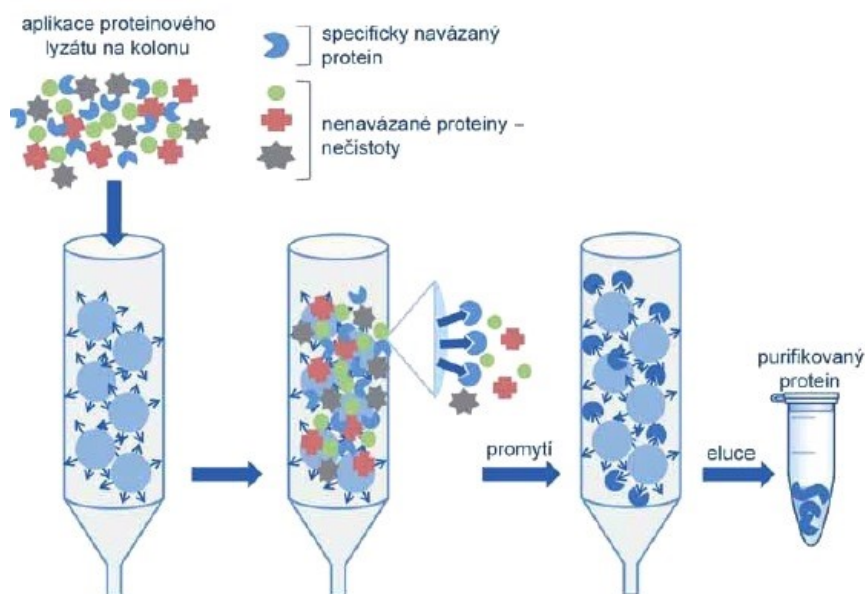
Efektívne fungujú iba niektoré metódy. Často je pri tomto kroku purifikácie problémom to, že proteíny nie sú do takej miery vhodne upravené, aby vykazovali vysokú afinitu a substrátovú špecifickosť. Jednou z chromatografických metód, doposiaľ najpoužívanejšou, je afinitná chromatografia. Touto metódou dokážeme separovať biologické molekuly, ktoré sú inak ťažko separovateľné, pretože rozdiely v ich fyzikálno-chemických vlastnostiach sú veľmi malé (Churáček et al., 1990 , Mikeš et al., 1980).

2.4.2.1 Afinitná chromatografia (AC)

Jej podstatou je schopnosť biologicky aktívnych látok sa špecificky a reverzibilne viazať na komplementárnu zlúčeninu (afinitný ligand) imobilizovanú na matrici v chromatografickej kolóne. Afinitná chromatografia sa často využíva pre purifikáciu rekombinantných proteínov. Tie sú vo väčšine exprimované so sekvenciou aminokyselín (AMK), ktoré vykazujú špecifickú väzbu k matrici v kolóne. Táto sekvencia AMK je na N- alebo C- terminálnom konci proteínu nazýva aj a ako - tag alebo kotva (Linder et al., 1997, Terpe, 2003, Young et al., 2012).

Využitie takýchto tagov dopomohlo efektívnejšej purifikácii rekombinantných proteínov (Soto-Rodríguez et al., 2017). Práve jednou z najpoužívanejších je napr. Histidínová kotva (his-tag), čo je sekvencia 6-10 histidínov, ktorá má malú veľkosť a slabý náboj (0,8 -1 kDa). Hoci sa predpokladá, že histidínová kotva neovplyvňuje štruktúru a funkciu proteínu, tak táto skutočnosť nie je často experimentálne overovaná. Carson et al. (2007) tak previedli niekoľko porovnaní štruktúr s kotvou aj bez nej s výsledkom, že histidínová kotva nemá veľký vplyv na samotnú štruktúru proteínu (Carson et al., 2007). Zistenie o jej vplyve na aktivitu proteínu sa ale nedá zovšeobecniť, pretože závisí individuálne od konformácie a aminokyselinovej sekvencie daného proteínu (Navrátil H., 2014). Medzi ďalšie používané kotvy patrí glutathion-S-transferáza (GST-tag), maltózu viažuci proteín (MBP), c-myc značka (c-myc tag), FLAG peptidová značka (FLAG-tag) (Internet 9).

Histidínová kotva je afinitná k iónom Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , ktoré majú funkciu ligandu a sú viazané na pevné fázy (polymérny nosič – kolóna) chelátovým komplexom. Dôležitým aspektom úspešnej afinitnej chromatografie je práve aj výber vhodného ligandu, ktorý je kovalentne viazaný na povrch stacionárnej fázy. Môžu byť totiž vysoko selektívne a viazať sa iba na jeden, či malú skupinu proteínov (Hedhammar et al., 2006). Okrem spomínaných iónov sa používajú v prípade iných tagov napr. protilátky, steroidné hormóny, vitamíny či inhibítory proteínov.



Obrázok 12: Postupné kroky afinitnej chromatografie (upravené podľa Emri et al., 2011). Po nanesení vzorky na kolónu sa proteíny špecificky viažu na ligandy, ktoré sú ukotvené na matrix. Nasleduje premytie frakcie, odstránenie nečistôt a napokon elúcia a získanie čistého purifikovaného proteínu.

Počas vlastného procesu AC je afinitný nosič inkubovaný so vzorkou, a vtedy dochádza k reverzibilnej väzbe medzi cieľovou molekulou (proteínom) a ligandom. Molekuly, ktoré sa nenašli a pôsobili by ako nečistoty, sa odstránia premývacím pufrom (Obr. 12). Elúcia cieľového proteínu potom prebieha už špecificky, a to zmenou pH alebo použitia elučného pufru s nadmerným množstvom kompetívneho ligandu napr. pufr s imidazolom alebo histidínom (Zatloukalová, 2004).

2.5 Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR) nadrodina

Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkym reťazcom (SDR) je jednou z najväčších proteínových nadrodín, ktorá zahŕňa heterogénnu skupinu enzýmov. Ide o nadrodinu prevažne oxidoredukčných enzýmov, ktoré boli prvýkrát identifikované v roku 1980. Najprv boli nájdené len v baktériách a jednoduchých eukaryotoch, a až neskôr sa zistilo ich zastúpenie aj vo vyšších triedach (Bahtia et al., 2015). SDR enzýmy sa nachádzajú v bunkových jednotkách ako je membrána ER, mitochondrie a v cytoplazme. Okrem oxidoreduktáz sa medzi nimi nachádzajú aj izomerázy, syntetázy či enzýmy bez dokázanej katalytickej aktivity (Kallberg et al., 2002).

2.5.1 SDR ako stále sa rozrastajúca rodina

Z posledných výskumov je známe, že v súčasnosti asi 25% všetkých dehydrogenáz patrí práve do skupiny SDR. Asi polovica SDR rodín je iba v baktériách. V ľudskom genóme bolo nájdených 47 SDR rodín, zahrňujúcich 82 génov. V 90. rokoch nadrodina obsahovala iba pár zástupcov. Na základe údajov od Person et al. (2009) z daného roku sa v sekvenčných databázach vtedy nachádzalo asi 47000 primárnych štruktúr. Známym bolo viac ako 300 kryštalických štruktúr (Persson et al., 2009), no z posledných výskumov je známy údaj 680 000 členov (Jörnvall et al., 2015). Dôkazom, že ide o naozaj veľmi rozmanitú nadrodinu je sekvenčná zhoda medzi jednotlivými zástupcami, ktorá je iba 15 – 30% (Oppermann et al., 2001).

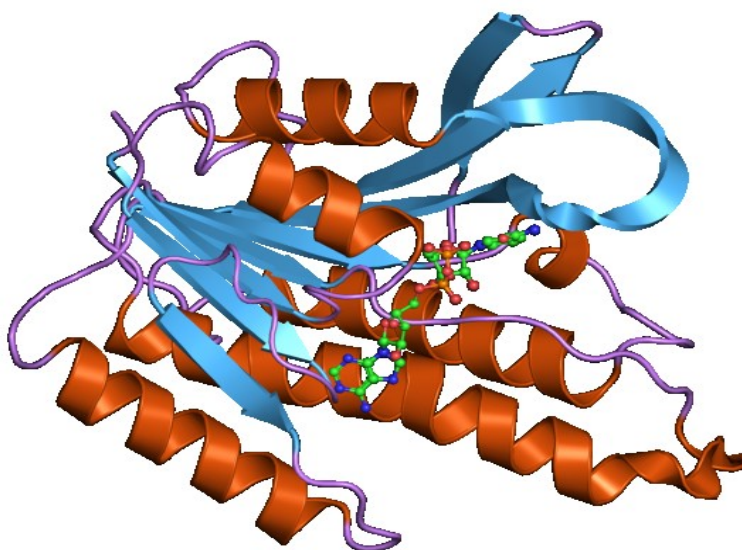
2.5.2 Aminokyselinový reťazec SDR enzýmov

Polypeptidový reťazec SDR enzýmov je tvorený z 250 aminokyselín ale neplatí to pre všetky enzýmy. Existujú aj typy s rozšíreným C-koncom reťazca a obsahom až 350 aminokyselín. Okrem monoméryných typov poznáme aj oligoméry s homodimérou alebo homotetramérou kvartérou štruktúrou (Kananagh, 2008).

2.5.3 Štruktúra dehydrogén/reduktáz s krátkym reťazcom

Podkladovým štruktúrnym prvkom pre SDR je Rosmanov záhyb zložený zo siedmych paralelne usporiadaných β -listov a niektoré z nich sú obklopené tromi α -helixmi z každej strany (Obr. 13). Reťazec obsahuje miesto bohaté na glycin, vysoko konzervatívne (t.j. nemenné), kde sa môže viazať kofaktor (obvykle NAD^+ či NADPH). Aktívne miesto vykazuje určitú variabilitu a viaže substrát (Bray et al., 2009). Z celej nadrodiny SDR je najviac konzervovaný zbytok tyrozín (Tyr), a zároveň je súčasťou konzervovaného sekvenčného motívu nachádzajúceho sa v aktívnom mieste. Ide o časť tvorenú tetraédrou aminokyselín Tyr-Lys-Ser-Asn. Jednotlivé enzýmy katalizujú rozličné substráty, substrátová špecifickosť SDR enzýmov je rozmanitá, obsahuje alkoholy, cukry, retinoidy, steroidy, lipidy a xenobiotiká. Enzýmy z SDR nadrodiny sú zodpovedné za metabolické procesy či signálnu reguláciu.

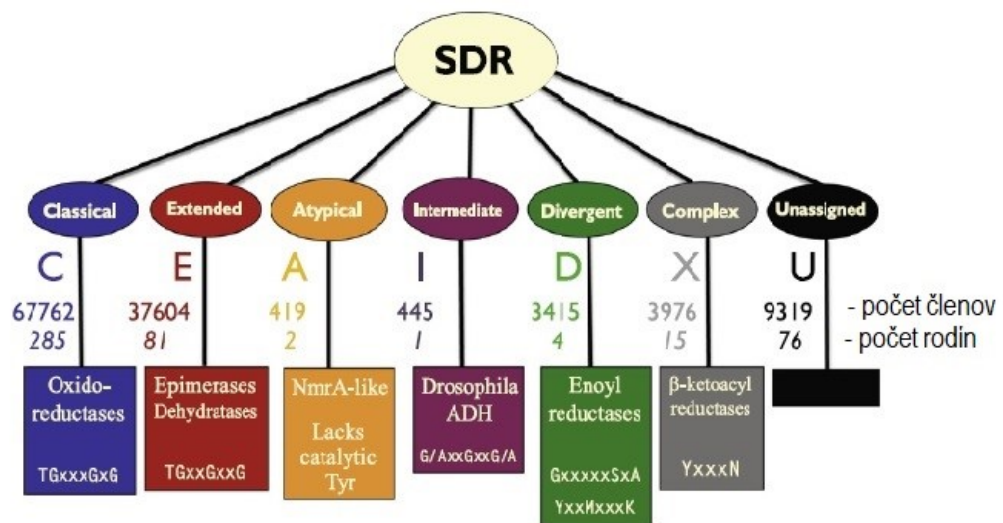
Pre enzýmy z tejto nadrodiny je typický usporiadaný katalytický mechanizmus dvojsubstrátovej (tzv. bi-bi) reakcie, keď sa kofaktor viaže ako prvý a odpája sa ako posledný.



Obrázok 13: Štruktúra SDR (short-chain dehydrogenases/reductases). Modrou farbou sú znázornené β -skladané listy, α -helixy sú označené červenou farbou a kofaktory sú zakreslené pomocou konformačných vzorcov (Internet 10).

2.5.4 Sedem typov SDR enzýmov

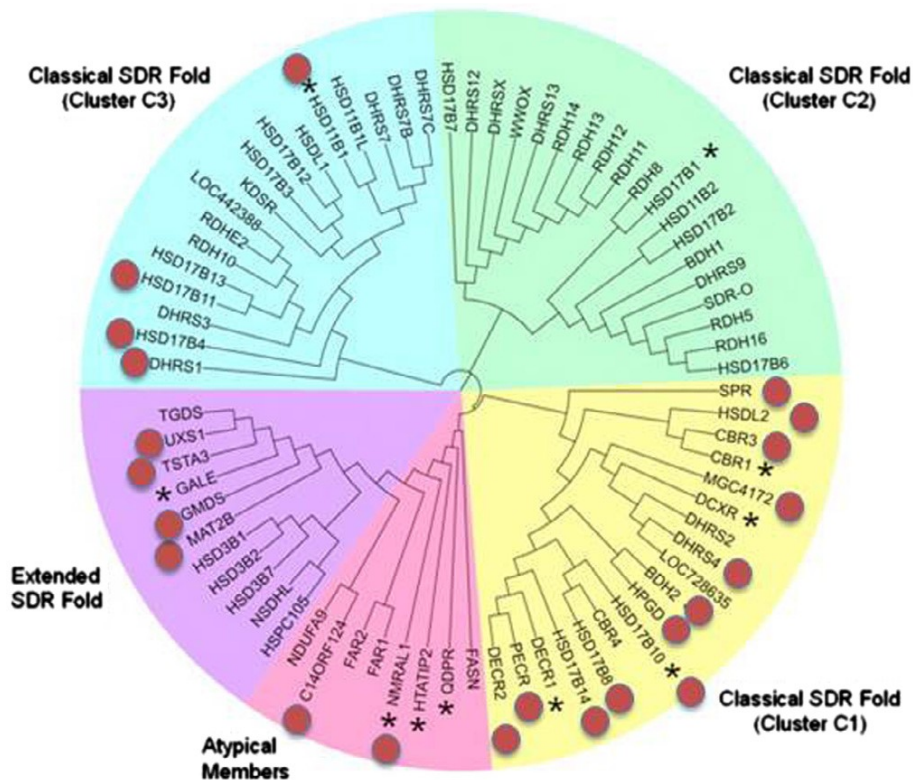
SDR enzýmy sa delia do typov. Podľa charakteristických motívov rozlišujeme sedem základných SDR typov. Najfrekvencovanejšie zastúpenie je v klasickom type (C = classical) – 285 rodín a nasledujúcou je kategória rozšíreného typu (E = extended) – 81 rodín. Ďalej je to atypický typ (A = atypical), stredný (I = intermediate), rozdielny (D = divergent), komplexný (X = complex) a nepridelený (U = unassigned) (Obr. 14) (Persson et al., 2013).



Obrázok 14: Znárodných sedem typov SDR. Veľké písmeno vyjadruje typ SDR, pod ním je číslo uvádzajúce počet členov a počet rodín. V spodných rámečkoch je uvedená enzýmová aktivita a špecifická sekvencia aktívneho miesta (Persson et al., 2013).

Prvé tri rodiny (C, E, A) zahŕňajú enzýmy SDR ľudského typu. Klasická sa ďalej člení na tri základné klastre (zväzky) C1, C2 a C3 (Obr. 15). C1 obsahuje proteíny, ktoré sa nenachádzajú v membránach a zahŕňa 18 členov, ktoré katalyzujú reakcie mnohých zlúčenín ako koenzým A, prostaglandíny a molekuly podobné chinónu. V klastroch C2 (19 členov) a C3 (17 členov) sú typické membránové enzýmy, ktoré enzymaticky premieňajú retinoidové a steroidové substráty. Od členov v C1 sa líšia prítomnosťou N-koncovej transmembránovej špirály. Detailnejšie rozdelenie v jednotlivých klastroch je podľa sekvencií aminokyselín a tiež podľa toho, aký substrát enzým dokáže enzymaticky premeniť.

Toto rozdelenie bolo využité pre navrhnutie algoritmu známeho ako Hidden Markov Model (HMM), ktorý bol použitý pre nájdenie podobných sekvencií v SDR. Na základe toho boli ďalej SDR roztriedené a bolo zavedené názvoslovie (Bray et al., 2009).



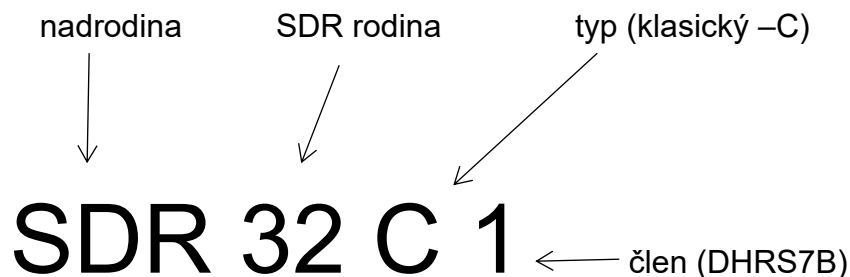
Obrázok 15: Ľudské SDR enzýmy rozdelené na typy a klastre. Schematické zobrazenie jednotlivých klastrov v klasickom, rozšírenom a atypickom type pre ľudské enzýmy SDR. Krátke dĺžky zobrazujú homologné proteíny a dlhšie zasa vyjadrujú vzdialenejší evolučný vzťah. Každý člen superrodiny je anotovaný pomocou symbolu génu. Symbol hviezdčky (*) alebo červená bodka označuje jednu alebo viacero štruktúr, ktoré sú k dispozícii pre doménu SDR (Bray et al., 2009).

2.6 Nomenklatúra SDR

SDR nadrodina bola rozdelená na rodiny a podrodiny. Platí systém udržateľnej a usporiadanej nomenklatúry každá ľudská SDR rodina má svoje jedinečné číslo od 1 po 48. Ďalej sú číslované rodiny z cicavcov a eukaryot, za nimi nasledujú rodiny prítomné v baktériách a archaeách. Posledné dostávajú číslo tie, ktoré sú iba v baktériách. Predpokladá sa neustály nárast SDR rodiny, a s tým spojený aj u ich čísel (Persson et al., 2009).

2.6.1 Číslovanie jednotlivých členov rodiny:

Na začiatku je v nomenklatúre vždy názov nadrodiny (SDR) a nasleduje číslo rodiny (1-47) spolu s písmenom, ktoré charakterizuje konkrétny typ (klasický – C, rozšírený – E, atypický – A) (Obr. 16). Číslo na konci vyjadruje daného zástupcu, a tak sú oddelené jednotlivé rodiny napr. SDR1E1. Nespracované pseudogény sú označené individuálnym číslom s prídavkom "P", napr. SDR14E1P. Ak sa v enzýme vyskytujú polymorfizmy označujeme to hviezdičkou (*), napr. SDR11E1*1 (Persson et al., 2009).



Obrázok 16: Nomenklatúra SDR nadrodiny.

2.7 DHRS7B

2.7.1 Lokalizácia a parametre

DHRS7B je ľudský enzým z nadrodiny SDR, patrí do klasického typu C a nachádza sa v klastri C3 (Bhatia et al., 2015). Jeho gén je lokalizovaný na chromozóme 17p21. Proteín sa skladá z 325 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 35,1 kDa (Bray et al., 2009).

2.7.2 Vlastnosti a funkcia

Ľudská forma DHRS7B má svoj gén na chromozóme 17p12 (Bray et al., 2009) ale viac informácií o jeho funkcii v ľudskom organizme doposiaľ nie je známych. Predpokladaným kofaktorom je NADPH.

Doposiaľ bol DHRS7B skúmaný iba u myší a opísaný bol ako membránový (Štambergová et al., 2014) a peroxizomálny redukčný proteín (PexRap).

Pri jeho neaktivite či nedostatku sa prejavil u myší pokles hladiny leukocytov, lymfocytov až takmer úplné vymiznutie neutrofilov (Lodhi et al., 2012). Identifikácia PexRap interagujúcich proteínov dokázala, že ich prítomnosť zasahuje do lipidického systému, čo bolo dokázané práve v myšacom organizme (Lodhi et al., 2012). Bolo preukázané, že sa zúčastňuje syntézy éterových lipidov, ktoré sú ligandmi pre PPARy, ktoré majú spojitosť s adipogenezou. PexRap zasahuje práve do regulácie PPARy receptorov. No to, ako sa podieľa PPARy na rozdielnej tvorbe hnedého a bieleho tuku nie je doposiaľ známe (Lodhi et al., 2017).

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo získať purifikovaný ľudský rekombinantný enzým DHRS7B v aktívnej forme. Základným materiálom boli *Sf9* mikrozómy obsahujúce ľudský rekombinantný proteín DHRS7B.

Cieľ práce môžeme rozdeliť :

- Screening solubilizačnej účinnosti rôznych detergentov na uvoľnenie DHRS7B z mikrozomálnej membrány
- Stanovenie aktivity DHRS7B po solubilizácii rôznymi detergentami
- Výber najvhodnejšieho detergentu pre solubilizáciu DHRS7B
- Solubilizácia väčšieho množstva *Sf9* mikrozomálnej frakcie s rekombinantným DHRS7B vybraným detergentom
- Purifikácia DHRS7B zo solubilizovaných mikrozómov pomocou afinitnej chromatografie
- Vyhodnotenie purifikačného postupu a úspešnosti získania purifikovaného rekombinantného enzýmu DHRS7B

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Pomôcky

Automatické pipety a špičky (0,5µl – 5ml)	Biohit
Elektroforetický systém	Bio – Rad
Fotofilm Thermo Scientific CL-X	Thermo Fisher Scientific
Kazeta na vyvolanie fotografického filmu	Amersham Biosciences
Multikanálová pipeta a špičky (0,5µl – 5ml)	Biohit
Nitrocelulózová membrána (0,45 µm)	GE Healthcare
Ultracentrifugačné skúmavky Amicon ultra – 4	Merck Milipore
Laboratórne sklo : kadičky, odmerné valce, lyžičky, miešadlo	

4.1.2 Prístroje

Analytické váhy Scaltec SBC22	Sartorius
Blotovací systém Trans-Blot Turbo Transfer Systém	Bio - rad
Centrifuga WX ultra 80	Thermo
Centrifuga Biofuge	Heraeus
Dokumentačný systém GelDoc	Bio – rad
Hlbokomraziaci box Herafreeze	Heraeus
Chromatograf Akta purifier	Amershaam Biosciences
Kolona Histrap 1 ml	GE healthcare
Kývačka Unimax 1010	Heildoph
Magnetická miešačka Hyrtel ATR 8068	IKA
Miešačka Vortex Genius 3	IKA

Predvážka PT310	Sartorius
Rotátor	Biosan
Thermomixer comfort	Eppendorf
Spektrofotometer Tecan Infinite M2000	Tecan

4.1.3 Chemikálie

2-merkptoethanol (ME)	Sigma-Aldrich
0,1% Ponceau S	Sigma- Adrich
10% kyselina octová	Penta
Akrylamid pre elektroforézu	Sigma- Adrich
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences
Blokovacie mlieko pre Western blotting	Bio-Rad
Chlorid sodný	Penta
Chlorid draselný	Penta
Chlorovodíková kyselina	Penta
Commassie Brilliant Blue G-250	Sigma – Aldrich
Dodecylhydrogensulfát sodný (SDS)	Merck
Glycerol	Kulich Pharma,s.r.o.
Glycín pre elektroforézu	Sigma-Aldrich
Hovädzí albumín (BSA)	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan didraselný bezvodý,p.a.	Penta
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát,p.a.	Penta
Isobutanol, p.a.	Penta
Methanol, p.a.	Penta
TEMED	Sigma- Aldrich
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), p.a.	Penta

Tween 20	Sigma-Aldrich
Univerzálny rýchlostáľovač	Foma Bohemia
Vývojka	Foma Bohemia

Použité substráty s karbonylovou skupinou :

- ketotifen Sigma-Aldrich

Detergenty :

- oktaethylen glykol monododecyl eter (C12E8) Sigma- Aldrich
- n-Dodecyl – β – maltozidu (DDM) Acros Chemicals
- n-Octyl- β -D-Glucopyranoside (OG) Sigma
- 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1-propansulfonát (CHAPS) Sigma
- Digitonin Sigma
- oktylfenoxy poly(ethylenoxy)ethanol (Igepal CA – 630) Sigma
- polyethylen glykol *p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) fenyléter (Triton X-100) Sigma
- dodecylsulfát sodný (SDS) Sigma

4.1.4 Protilátky

Primárna zajačia anti-FLAG protilátka	Sigma -Aldrich
Sekundárna prasačia protilátka proti zajačím protilátkam	Dako

4.1.5 Enzýmy

Mikrozomálna frakcia <i>Sf9</i> obsahujúca ľudskú rekombinantnú DHRS7B (c= 5,49 mg/ml a c = 9,930 mg/ml)	KBV, FaF UK
Mikrozomálna frakcia <i>Sf9</i> pre meranie aktivity (c = 12,79 mg/ml)	KBV, FaF UK

4.1.6 Molekulové markery

Precision Plus all blue standards 161-3073	(Bio-Rad, USA)
--	----------------

4.1.7 Roztoky a pufry

10% Persíran sodný (APS):

0,010 g APS rozpustiť v 100 µl ultračistej vody.

10 % SDS :

10 g SDS, 80 ml ultračistej vody do 100 ml

10% kyselina octová:

Kyselina octová 10,1 ml, destilovaná voda 100 ml

1,5 M Tris-HCl, pH8,8 :

18,5 g Tris, 75 ml ultračistej vody, upraviť pH n 8.8 pomocou 4 M HCL

0,1 M fosfátový pufer , pH 7,4 :

1000 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (hydrogen fosforečnan disodný, dihydrát),
250 ml 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (dihydrogen fosforečnan sodný, monohdrát)
upravené na pH 7,4

1x koncentrovaný elektrodový pufer :

5x konc. elektródový pufr, pH 8,3 70 ml, 230 ml ultračistej vody

5x zásobný elektrodový pufer :

15,1 g Tris, 72,0 g glycin, 5,0 g SDS, 900 ml ultračistej vody, upraviť pH na 8,3 pomocou 4 M HCl

Blokovací pufr 3% mléko v TBS-T :

Sušené odtučnené mlieko 1,2 g ,TBS-T 40 ml

Blotovací pufer:

25 mM Tris 1,51 g, 192 mM Glycín 7,21 g, 20% metanol 100 ml, ultračistá voda 500 ml

Detekčný systém (pripraviť v čase potreby):

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent ,roztok A zmiešaný s roztokom B v pomere 1:1

Farbiaci roztok 0,1% Ponceau na odfarbenie nitrocelulózovej membrány :

0,1 g Ponceau S, 100 ml ultračistej vody

Farbiaci roztok Blue Silver :

Destilovaná voda 10 ml, 85% kyselina fosforečná 8 ml, síran amonný 10,0 g, Coomassie Brilliant Blue G 0,12 g doplniť 80 ml destilovanej vody, metanol 20 ml

Fixačný roztok :

Koncentrovaná kyselina octová 10 ml, metanol 40 ml, destilovaná voda 50 ml

Isobutanol nasýtený vodou :

Zmiesšať isobutanol s ultračistou vodou

Pufer A pre purifikáciu :

25 mM Tris, 250 mM NaCl, 30 mM imidazol, 20% glycerol, 0,19 mM DDM (Mr=510,62) pH 7,4 (HCl)

Pufer B pre purifikáciu :

25 mM Tris, 250 mM NaCl, 60 mM imidazol, 20% glycerol, 0,19 mM DDM, pH 7,4 (HCl)

Pufer C pre purifikáciu :

25 mM Tris, 250 mM NaCl, 500 mM imidazol, 20% glycerol, 0,19 mM DDM, pH 7,4 (HCl)

Premývací pufer 0,1% TBS-T :

TBS pufr 1000 ml , Tween 20 1 ml

Resuspendačný pufer pre solubilizáciu a purifikáciu :

0,1 M Fosfátový pufer zmiešaný s 0,05 M KCl a 20% glycerolom rozpustené v destilovanej vode

Resuspendačný pufer pre meranie aktivity :

Resuspendačný pufer pre solubilizáciu a purifikáciu, 5 mM NADPH, pufr

Roztok akrylamidu :

30% akrylamid (AA) + 0,8% bis-akrylamid (bis-AA) rozpustený v destilovanej vode

Roztok NAD(P)H – kofaktor DHRS7B – meranie aktivity :

5 mM NAD(P)H rozpustený v 10 mM NaOH

Roztok ketotifénu pre meranie aktivity :

5 mM ketotifén v 96% etanole

Solubilizačný pufer:

50 mM Tris a 300 mM NaCl rozpustený v destilovanej vode

TBS pufer 10x :

Tris 24,0 g, NaCl 88,0 g, destilovaná voda 1000 ml ,pH upravena konc. HCl na hodnotu 7,6

TBS – 1x T pufer :

100ml 10x zásobný TBS pufer doplniť do 1000 ml ultračistou vodou, 1,0 ml TWEEN 20

Ustáľovač :

Fomafix 15 ml, ultračistá voda 75 ml

Výmenný pufer :

50mM NaHPO₄·12H₂O, 25mM KCl, 20% glycerol, pH 7,4 (H₃PO₄)

Vývojka :

Fomadon LQN 6 ml , ultračistá voda 84 ml

Vzorkový pufer pre elektroforézu :

Destilovaná voda 1,2 ml , 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 5,0 ml , Glycerol 3,4 ml, SDS 1,0 g
0,5 % BFB 0,4 ml

Vzorkový pufer s 2-merkaptetanolom :

50 µl 2- merkaptetanolu v 1 ml vzorkového pufra

4.2 Metodika

4.2.1 Screening účinnosti detergentov na solubilizácii DHRS7B z Sf9 mikrozómov

Pred samotnou solubilizáciou bolo potrebné pripraviť pufre, ktoré vytvorili vhodné prostredie pre solubilizáciu detergent+enzým. 2% roztoky detergentov – C12E8, Igepal CA- 630, Triton X-100, DDM, OG, CHAPS, Digitonin – boli pripravené nariedením so solubilizačným pufrom. Sf9 mikrozómy s DHRS7B (5,49 mg/ml) boli vybraté z mrazničky a následne boli zmiešané s resuspendačným pufrom a so zásobnými roztokmi detergentov v troch pomeroch (1:1, 1:2, 1:3) s dodržaným objemom 100 µl (tab.1).

Tabuľka 2: Príprava roztokov detergentu s DHRS7B zmiešaním s resuspendačným (RP) a solubilizačným pufrom (SP) v troch pomeroch.

	DHRS7B + Resusp.pufr	Detergent + Solubil.pufr
1:1	18,2 µl + 31,8 µl	5µl + 45µl
1:2	18,2 µl + 31,8 µl	10µl + 40µl
1:3	18,2 µl + 31,8 µl	15µl + 35µl
Kontrolná vzorka	18,2 µl + 31,8 µl	50µl Sol.pufr

Takto pripravené ependorfky s roztokmi detergentov sa nechali 45 minút na rotátore v chladiacom boxe. Pridala sa k nim aj ependorfka s kontrolnou vzorkou, ktorá obsahovala všetky zložky okrem detergentu. Po 45 minútach sa obsah 100 µl preniesol z ependorfiek do ultracentrifugačných skúmaviek. Vzorky boli centrifugované 60 minút pri otáčkach 36 000 rpm a teplote 4°C. Po uplynutí jednej hodiny a presunutí skúmaviek na ľad sa z každej skúmavky odobral supernatant pre ďalšie experimenty, a to pre elektroforézu (viz kap.[4.4.2](#)) a stanovenie enzýmovej aktivity (viz kap.[4.2.5](#)).

4.2.2 SDS polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS – PAGE)

Vzorky boli zmiešané vzorkovým pufrom merkaptoetanolu (10 µl merkaptoethanol na 200 µl vzorkového pufru) v pomere 1:4 a doplnené do rovnakého objemu destilovanou vodou. Následne sa zohriali pri 95°C po dobu 4 minút.

4.2.2.1 Príprava gélov pred elektroforézu

Na prevedenie elektroforézy bolo najprv potrebné pripraviť 1,5 mm polyakrylamidový gél. Gél bol nalievajú medzi elektroforetické a krycie sklá, ktoré bolo pred jeho prípravou nutné umyť vodou a jarou, destilovanou vodou a liehometanolom, a až po dôkladnom vyschnutí sa umiestnili do nalievacieho stojanu. Pre separáciu proteínov bol použitý 12,5% separačný a 4% zaostrovací gél (Tab. 3). TEMED a 10% APS boli pridané do roztoku gélu tesne pred začiatkom polymerizácie. Tento roztok bol dôkladne premiešaný.

Tabuľka 3: Zloženie 10% separačného a 4% zaostrovacieho gélu.

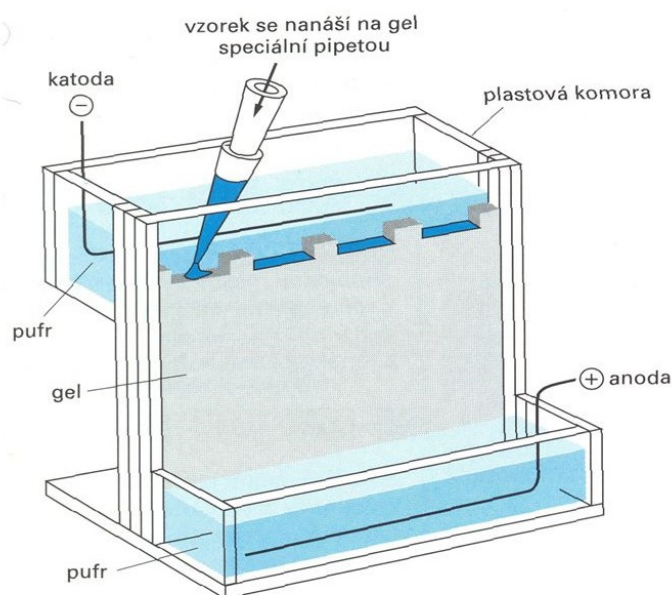
	Separáčny gél 1,5mm (12,5%)	Zaostrovací gél 1,5mm (4%)
ddH₂O	6,4 ml	3,3 ml
0,5 M Tris - HCl pH 6,8	-	1,25ml
1,5 M Tris - HCl pH 8,8	5ml	-
10% SDS	100µl	50µl
30% akrylamid	8,4 ml	500µl
Pred začiatkom do roztoku		
10% APS	200µl	100 µl
TEMED	10µl	5µl

Ako prvý bol naliaty roztok pre separačný gél medzi sklá viac ako do polovice, a zvyšok až po vrch skla sa prevrstvil isobutanolom. 40 minút prebiehala polymerizácia, potom sa isobutanol zliat a na jeho miesto sa naliat roztok pre zaostrovací gél. Doň sa vložil hrebienok na vytvorenie jamiek pre aplikáciu vzoriek a nechal sa stáť 90 minút.

4.2.2.2 Priebeh elektroforézy

Zatuhnuté gély sa vybrali zo stojanov a vložili do elektroforetickej cely, ktorá sa naplnila 1x zriedeným elektródovým pufrum, ktorého hladina prekryvala vrch skla. Do prvej jamky sa nanieslo 5 μl markeru molekulových hmotností, a do ďalších jamiek boli nanesené pripravené vzorky. Prázdne jamky sa doplnili rovnakým množstvom vzorkového pufru ako bol v upravených vzorkách. Cella sa vložila do elektroforetickej nádoby a dolial sa elektródový pufr do nádoby, aj do vnútornej cely (Obr. 17). Po uzavretí systému sa celé zariadenie pripojilo k napätiu. Elektroforéza prebiehala 20 minút pri 100 V v zaostrovacom géle a pre delenie v separačnom géle sa napätie zvýšilo na 200 V po dobu 75min.

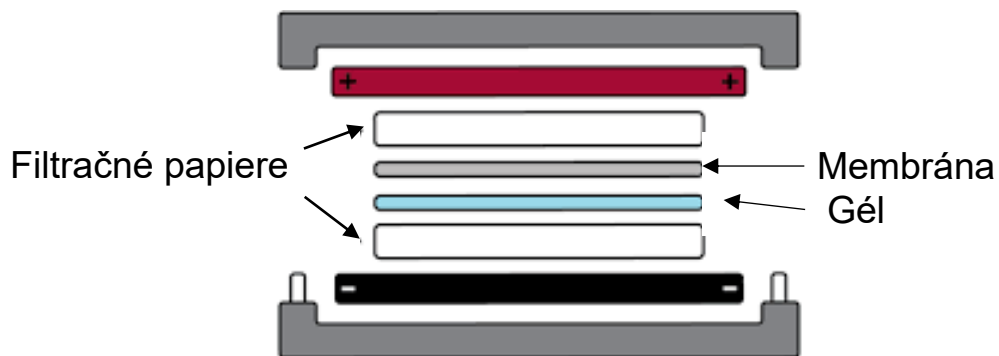
Po skončení elektroforézy sa gély vybrali, odstránil sa vrchný zaostrovací gél a separačný gél bol buď použitý pre western blotting ([4.2.3](#)) alebo ponorený na 30 minút do fixačného roztoku. Párkrát sa premyl destilovanou vodou a počas noci sa ponechal vo farbive Blue Silver.



Obrázok 17: Nanášanie vzoriek do jamiek gélu pomocou automatickej pipety. Stuhnutý gél medzi sklami, vložený do elektroforetickej cely, ktorej priestor vyplní elektródový pufr (Alberts et al., 2005).

4.2.3 Western blotting

Pred začiatkom celého procesu bola nitrocelulózoová membrána a dva filtračné papiere nastrihané podľa rozmerov gélu z elektroforézy. 15 minút bol filtračný papier, membrána a gél ponechané v blotovacím pufre. Po uplynutí času sa postupne na seba do kazety uložil papier, membrána, gél a na vrch druhý papier (Obr. 18). Takto vytvorený „sandwich“ bol uložený medzi paralelne uložené elektródy. Spolu sa to jemne prešlo valcom, aby neostali žiadne bubliny, ktoré by mohli rušiť proces prenosu. Zvyšok blotovacieho pufra sa odstránil buničinou. Blotovacia kazeta sa uzavrela, vložila sa do blotovacieho prístroja a celý proces trval 30 minút pri napätí 10 V. Čas potrebný na tento špecifický prenos je závislý od podmienok, metódy a veľkosti prenášaných proteínov. Ku gélu prechádzal v pravom uhle prúd a to spôsobilo transfer separovaných proteínov z gélu na membránu.



Obrázok 18: Western blotting sandwich. *Opatrné, postupné uloženie gélu na filtračný papier, na gélovú membránu a na ňu druhý filtračný papier (Internet 11).*

4.2.4 Zobrazovanie po WB

Pre kontrolu, či sa proteíny naozaj preniesli bolo potrebné membránu zafarbiť. To sa vykonalo pomocou farbiva 0,1% Ponceau S, v ktorom sa membrána ponechala na krátku chvíľu a potom bola odfarbovaná s 10% kyselinou octovou. Na záver sa membrána premyla TBS-T pufrom. Po dôkladnom premytí sa membrána ponechala v 5% blokovacom mlieku a celý proces blokovania prebiehal na orbitálnej trepačke (80 rpm), kde bol 90 minút. Po zliatí mlieka boli na membránu pridané zajačie primárne protilátky proti FLAG peptidu. Pri koncentrácii 1 : 16 000 boli pridané anti-FLAG protilátky k 3% sušenému mlieku v TBS-T. Táto inkubácia prebiehala počas noci v chladiacom boxe na orbitálnej trepačke (80 rpm). Na druhé ráno bola membrána opäť premytá 3x s TBS-T a aplikovali sa naň sekundárne prasacie protilátky proti zajačej protilátke zriedené v pomere 1:20 000 v 3% roztoku mlieka. Po 90 minútach na trepačke sa membrána niekoľkokrát premyla s TSB-T a nechala na orbitálnej trepačke v TBS-T až do kroku vizualizácie.

4.2.4.1 Vizualizácia

V temnej komore prebiehal celý proces vizualizácie. Na membránu bol aplikovaný detekčný systém, ktorý sme pripravili zmiešaním roztoku A a B z detekčného systému v pomere 1:1. Roztok bol nanosený tak, aby po jeho aplikácii na 1 cm² membrány pripadalo 0,05 ml roztoku. Po aplikácii na membránu sa nechal pôsobiť 3-5 minút. Vopred bolo potrebné pripraviť fotopapier rovnakého rozmeru ako membrána. Po skončení pôsobenia detekčného systému bola membrána vybratá pinzetou a vložená medzi dve fólie. Pripravená membrána sa vložila do kazety na fotopapier a kazeta sa uzavrela. Po skončení expozície sa už iba samotný fotopapier premýval striedavo vo vývojke, vode, ustáľovači a vo vode a nechal sa vyschnúť na vzduchu.

4.2.5 Meranie enzýmovej aktivity DHRS7B

Testovanie prebiehalo spektrofotometrickým stanovením, pri ktorom sa sledoval pokles absorbancie nikotínamidového kofaktoru NADPH v reakčnej zmesi pri vopred nastavenej vlnovej dĺžke 340 nm.

Na prevedenie reakcie bol použitý modelový substrát s karbonylovou skupinou – ketotifén (1 mM) rozpustený v metanole. Objem celej reakčnej zmesi pozostával zo 100 μ l, pričom koncentrácia ligandov bola 50 μ M a koncentrácia kofaktoru NADPH bola 200 μ M. Dôležitou súčasťou reakcie boli supernatanty po solubilizácii v pomeroch 1:1, 1:2 a 1:3 (viď [4.2.1](#)). Z každej vzorky roztoku sa odobrali 3 μ l do ependorfky ku 4 μ l kofaktoru a 88 μ l pufru. Takto pripravená zmes sa nechala preinkubovať po dobu 5 minút pri 37°C. Potom sa táto zmes pridala k ligandu, ktorý bol už na mikrotitračnej doštičke v objeme 5 μ l a doplnila tak objem 100 μ l (Tab. 4). Ako kontrola boli použité pôvodné *Sf9* mikrozómy s DHRS7B a čisté *Sf9* mikrozómy. Medzi týmito vzorkami v jamkách mikrotitračnej doštičky bol ako kontrola resuspendačný pufer (Tab. 5). Meranie prebiehalo v tripletoch v spektrofotometri Tecan Infinite M2000.

Tabuľka 4: Pripravené zmesi na meranie enzýmovej aktivity.

100 μ l (objem zmesi)	Detergent+ enzým (1:1,1:2,1:3)	Detergent bez enzýmu (1:1,1:2,1:3)	NADPH (200 μ M)	Ketotifén (50 mM)	Pufer (0,1 M)
SP DHRS7B	3 μ l		4 μ l	5 μ l	88 μ l
Bez SP DHRS7B		3 μ l	4 μ l	5 μ l	88 μ l

Tabuľka 5: Pripravené zmesi na porovnanie pri meraní enzýmovej aktivity.

100 μ l (objem zmesi)	<i>Sf9</i> DHRS7B mikrozómy (5,49 mg/ml)	<i>Sf9</i> prázdne mikrozómy (12,79 mg/ml)	R.P.	NADPH (200 μ M)	Ketotifén (50 mM)	Pufer (0,1 M)
1.kontrola	0,55 μ l			4 μ l	5 μ l	90,45 μ l
2.kontrola		0,23 μ l		4 μ l	5 μ l	90,77 μ l
RP k 1.kontrola			0,55 μ l	4 μ l	5 μ l	90,45 μ l
RP k 2.kontrola			0,23 μ l	4 μ l	5 μ l	90,77 μ l

4.2.6 Purifikácia DHR57B

4.2.6.1 Solubilizácia mikrozómov pre AC

Ako počiatočný materiál bol použitý objem 2 ml Sf9 mikrozómov obsahujúcich rekombinantný DHR57B s koncentráciou 9,93 mg/ml, ktoré sa zmiešali so solubilizačným pufrom a 5% roztokom detergentu DDM v pomere 1:1 proteín:detergent. Takto pripravená zmes rotovala na rotátore po dobu 45 minút v chladiacom boxe. Potom nasledoval proces centrifugácie pri 36 000 rpm počas 1 hodiny (Obr. 19).



Obrázok 19: Centrifúga WX Ultra používaná počas centrifugácie vzoriek.

4.2.6.2 Postup AC

Pred spustením metódy sa na chromatografe nastavila vlnová dĺžka 280 nm – čo je žiarenie, ktoré enzým absorbuje. Ako kolóna bola použitá Histrap 1 ml (GE healthcare). Chromatograf a kolóna sa najprv premyli 20% etanolom, vodou a potom pufrom A (nanášací pufer). Na celú metódu bol použitý chromatograf Äkta Purifier (Obr. 20). Dávkovacia smyčka Superloop 10 ml bola 3x premytá ultračistou vodou a pufrom A, ktorým sa naplnila a jej objem doplnila vzorka zo solubilizácie. Vzorka sa najprv zmiešala s imidazolom (30 mM) a potom sa nadávkovala do dávkovacej smyčky. Nasledovalo nastrieknutie vzorky na kolónu, tá bola potom premytá pufrom A, ďalej pufrom B vyššej koncentrácie imidazolu (60 mM) a potom prebehla elúcia pufrom C (obsahuje 500 mM

imidazolu). Elúcia bola zachytená do skúmavky. Vo vzorke bol potom pomocou ultracentrifugačnej skúmavky vymenený pufr B za výmenný pufr. Získaná vzorka by mala obsahovať čistý enzým DHRS7B a táto vzorka bola ďalej analyzovaná pomocou elektroforézy. Ďalším krokom bolo stanovenie aktivity. Zbytok nepoužitej vzorky bol zmrazený na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázok 20: Äkta Purifier chromatograf.

4.2.7 Stanovenie koncentrácie bielkoviny

Na stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorkách solubilizovaných mikrozómoch DHRS7B a vo vzorke čistého DHRS7B bola použitá spektrofotometrická metóda kyseliny bicinchoninovej (BCA). Počas reakcie dochádza k redukcii meďnatého iónu na meďný, a jeho chelatáciou s kyselinou bicinchoninovej nastupuje fialové sfarbenie.

Pre metódu BCA sa použili roztoky A a B z BCA kitu v pomere 2:50. Zo vzorky solubilizovaných mikrozómov, ktoré boli pripravené pre purifikáciu sa odobralo 5 μ l. Z eluátu, ktorý sa získal po purifikácii sa odobralo 20 μ l a vzorka s čistým DHRS7B vo výmennom pufre poskytla 20 μ l.

Štandard, pomocou ktorého sa vytvorila kalibračná krivka bol roztok albumínu s koncentráciou 1 mg/ml (BSA) (Tab. 6). Albumín bol rozpustený v troch rôznych pufroch, a to 1. vo výmennom pufri pre stanovenie koncentrácie proteínu vo vzorke purifikovaného enzýmu, 2. v solubilizačnom pufri pre stanovenie koncentrácie proteínu v solubilizovaných mikrozómoch, 3. v pufri B pre stanovenie koncentrácie proteínu v eluáte. Stanovenie bielkoviny bolo v rozmedzí koncentrácií 0 – 1000 μ g/ml.

Tabuľka 6: Kalibračná krivka roztoku albumínu 1 mg/ml.

	Koncentrácia	Roztok BSA	Destilovaná voda
1	0 μ g/ml	0 μ l	500 μ l
2	200 μ g/ml	10 μ l	490 μ l
3	400 μ g/ml	20 μ l	480 μ l
4	600 μ g/ml	30 μ l	470 μ l
5	800 μ g/ml	40 μ l	460 μ l
6	1000 μ g/ml	50 μ l	450 μ l

Na mikrotitračnú doštičku sa nanieslo po 5 μ l vzorky či kalibračných roztokov BSA, 200 μ l činidla (A+B). Nasledovala inkubácia pri 37°C po dobu 30 minút a potom sa zmerala absorbancia pri 562 nm proti destilovanej vode. Od vzoriek bol napokon odčítaný priemer slepých vzoriek. Potom boli porovnané hodnoty absorbancie vzoriek s kalibračnou krivkou a určila sa koncentrácia vzoriek.

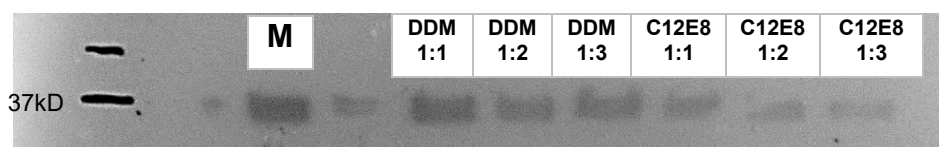
5 Výsledky

5.1 Screening účinnosti detergentu na solubilizáciu DHRS7B

Prvým krokom pre získanie čistého, membránovo viazaného proteínu bolo jeho úspešné oddelenie z membrány, pomocou solubilizačného procesu. Sf9 mikrozómy s rekombinantným DHRS7B boli solubilizované pomocou šiestich neionogénnych detergentov (C12E8, DDM, OG, Digitonin, Igepal CA – 630, Triton X - 100) a jedným zo skupiny zwiter-ionových (CHAPS) v troch pomeroch proteín:detergent (1:1,1:2,1:3). Pre analýzu úspešnosti solubilizácie sa využila SDS – PAGE elektroforéza a western blotting. Podľa výsledkov western blottingu sa odsledovalo, či došlo k solubilizácii enzýmu z membrány detergentom. Cieľom bolo zistiť, v akom množstve sme získali DHRS7B. Výsledky, ktoré presahovali hranicu 50% sa považovali za prijateľne úspešné.

5.1.1 Vizualizácia solubilizácie DHRS7B s DDM a C12E8

Na základe zobrazených výsledkov (Obr. 21) sa určilo, že najlepšie sa z tejto dvojice (DDM a C12E8) uplatnil detergent DDM v koncentrácii 1:3, ktorý solubilizoval proteín z 91%. Detergent C12E8 solubilizoval DHRS7B horšie ako DDM a to len z najviac 54%.



Obrázok 21: Solubilizácia rekombinantnej ľudskej DHRS7B z Sf9 mikrozómov pomocou detergentov DDM a C1E8. M – pôvodné mikrozómy. DHRS7B zobrazená vďaka detekcii pomocou flag kotvy a anti-FLAG protilátok.

5.1.2 Vizualizácia solubilizácie DHR57B s OG a CHAPS.

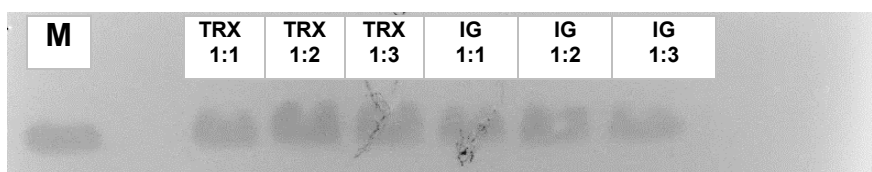
Na obrázku (Obr. 22) je zreteľné, že celkom uspokojivý výsledok nad požadovanú hranicu 50% dosiahol iba detergent CHAPS v koncentrácii 1:1 proteín:detergent. CHAPS solubilizoval enzým zo 63%. Výrazne menej účinný bol detergent OG, ktorého najvyššia dosiahnutá hodnota bola iba 46%, čo sa nedá hodnotiť ako vyhovujúci výsledok.



Obrázok 22: Vyhodnotenie efektivity solubilizácie ľudského rekombinantného DHR57B z *Sf9* mikrozómov pomocou detergentov OG a CHAPS v pomeroch 1:1,1:2,1:3. *M* – pôvodné mikrozómy.

5.1.3 Vizualizácia solubilizácie DHR57B a Triton X-100 (TRX) a Igepal CA – 630 (IG)

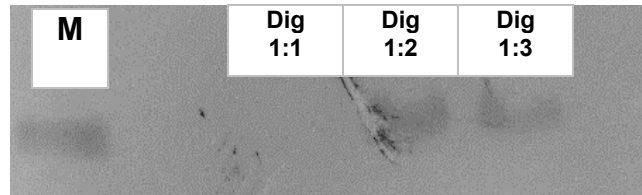
Pri solubilizácii s detergentmi TRX a IG sa vhodne uplatnili oboje s dosiahnutými výsledkami: TRX 1:1 – 64%, TRX 1:2 – 116%, TRX 1:3 – 102% , IG 1:1 – 102%, IG 1:2 – 69%, IG 1:3 – 81 %. Z tejto kombinácie sa najúčinnejšie prejavil Triton X-100 v pomere 1:2 detergent: proteín. Aj na základe obrázku (Obr. 23) je viditeľné, že IG bol menej výrazný. Túto dvojicu detergentov je možné považovať za najúspešnejšiu spomedzi zvyšných piatich detergentov v procese solubilizácie.



Obrázok 23: Vyhodnotenie efektivity solubilizácie ľudského rekombinantného DHR57B z *Sf9* mikrozómov pomocou detergentov TRX a IG v pomeroch 1:1, 1:2 a 1:3. *M* – pôvodné mikrozómy.

5.1.4 Vizualizácia solubilizácie DHR57B s Digitonínom (Dig).

V zmesi *Sf9* mikrozómy s DHR57B a detergent Digitonín 1:1 sa v procese solubilizácie (Obr. 24) úspešne ukázali iba dva pomery proteín:digitonín. Dig 1:2 s výsledkom 100% bol efektívnejší ako Dig 1:3 73%.



Obrázok 24: Vyhodnotenie efektivity solubilizácie ľudského rekombinantného DHR57B z *Sf9* mikrozómov pomocou detergentu Digitonín v pomeroch 1:1, 1:2 a 1:3. *M* – pôvodné mikrozómy.

5.2 Vplyv solubilizácie detergentov na aktivitu enzýmu DHRS7B

Po zobrazení výsledkov solubilizácie proteínu je zrejmé, že viaceré detergenty dokážu účinne uvoľniť DHRS7B z *Sf9* mikrozómov. Ďalším krokom je zistiť, či detergenty svojim pôsobením na proteín ovplyvnili jeho aktivitu. Preto bola v jednotlivých solubilizovaných mikrozómoch stanovená aktivita DHRS7B voči ketotifénu ako modelovému substrátu. Sledoval sa pokles či zachovanie aktivity, ktorý sa porovnal s výsledkom špecifickej aktivity *Sf9* mikrozómov s DHRS7B ako pôvodnej vzorky (Tab. 7). Pre stanovenie boli použité iba tie solubilizované mikrozómy, kde bol DHRS7B uvoľnený z viac ako 50%.

Tabuľka 7: Výsledky merania enzýmovej aktivity, s úspešnosťou nad 50%, solubilizovaného DHRS7B v zmesi s detergentom voči substrátu ketotifénu.

	Aktivita (nmol/mg/min)
<i>Sf9</i> DHRS7B	18,19
DDM 1:1	10,84
DDM1:2	4,19
DDM 1:3	4,17
C12E8 1:1	10,05
C12E8 1:2	0,00
C12E8 1:3	0,00
TX 1:1	0,81
TX 1:2	6,31
TX 1:3	0,00
IG 1:1	0,00
IG 1:2	2,06
IG 1:3	2,85
DIG 1:2	0,00
DIG 1:3	0,00

Z daných výsledkov je zrejmé, že prítomnosť niektorých detergentov mala výrazný vplyv na aktivitu proteínu voči ketotifénu. Žiadna aktivita nebola nameraná v prítomnosti OG, CHAPS a Dig. Veľmi nízke hodnoty sa zaznamenali u Tritonu X-100 a Igepal CA-630 vo všetkých pomeroch, čo platí aj pre DDM a C12E8 v pomeroch 1:2 a 1:3. Najlepšia aktivita bola u DDM 1:1 a C12E8 1:1.

5.2.1 Porovnanie zachovania aktivity a účinnosti pri procese solubilizácie detergentom

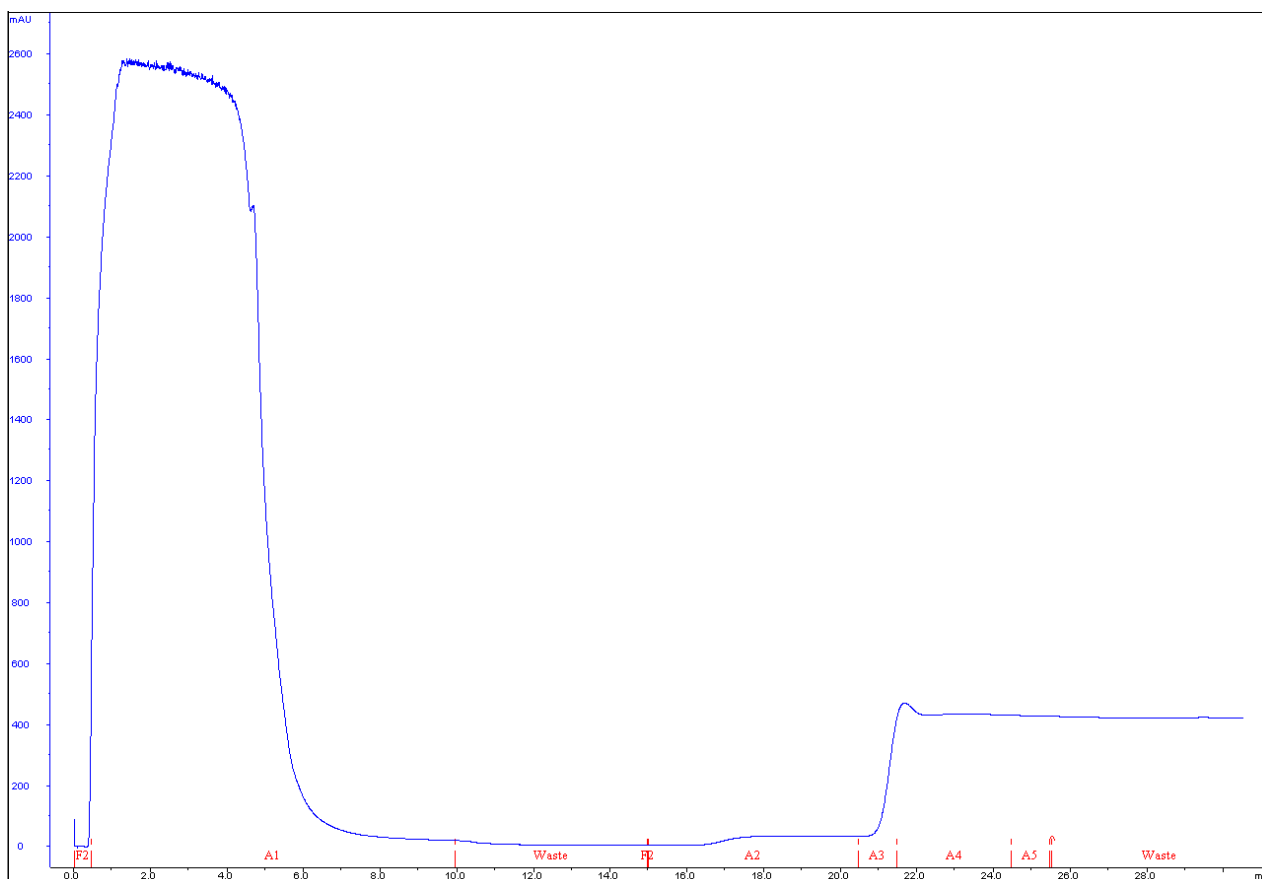
Pre úplne vyhodnotenie účinnosti detergentu je potrebné skombinovať a porovnať aktivitu solubilizovaných mikrozómov a efektivity uvoľnenia DHRS7B z membrány (Tab. 8). V sekcii o vplyve detergentu na aktivitu proteínu (viď [5.2](#)) boli určené DDM 1:1 a C12E8 1:1 ako bezpečné detergenty pre zachovanie aktivity enzýmu voči ketotifénu. C12E8 síce pomerne dobre zachováva aktivitu DHRS7B no jeho schopnosť uvoľniť enzým z membrány je horšia ako u DDM. Ako najvýhodnejší detergent pre solubilizáciu DHRS7B bol teda zvolený DDM v koncentrácii 1:1.

Tabuľka 8: Percentuálne vyjadrenie špecifickej aktivity voči pôvodnej vzorke Sf9 mikrozómov s DHRS7B a porovnanie s efektívnosťou solubilizácie DHRS7B.

	Aktivita (% pôvodná)	Solubilizácia (%)
DDM 1:1	59,6	106,3
DDM 1:2	23,0	66,6
DDM 1:3	22,9	76,7
C12E8 1:1	55,3	47,9
C12E8 1:2	0,0	35,3
C12E8 1:3	0,0	57,1
TX 1:1	4,4	61,3
TX 1:2	34,7	126,0
TX 1:3	0,0	128,1
IG 1:1	0,0	94,3
IG 1:2	11,3	59,8
IG 1:3	15,7	80,2
DG 1:2	0,0	99,2
DG 1:3	0,0	62,8
OG 1:1	0,0	6,0
OG 1:2	0,0	24,8
OG 1:3	0,0	15,0
CHAPS 1:1	0,0	15,0
CHAPS 1:2	0,0	23,1
CHAPS 1:3	0,0	22,3

5.3 Purifikácia DHR57B

V prípade, že bol ako najvhodnejší detergent pre solubilizáciu DHR57B z mikrozómov vybraný DDM, sa mohlo pristúpiť k purifikácii DHR57B. Detergent DDM bol v koncentrácii odpovedajúcej CMC pridaný do purifikačného pufru, a tak sa zachovalo vyhovujúce prostredie pre membránový proteín počas purifikácie. Solubilizované *Sf9* mikrozómy s DHR57B boli nadávkované do purifikačného systému, ktorý obsahoval kolónu HisTrap. V tomto kroku bola využitá purifikácia prostredníctvom histidínovej kotvy enzýmu DHR57B. Priebeh procesu purifikácie znázorňuje chromatogram (Obr. 25).



Obrázok 25: Záznam z priebehu purifikácie DHR57B.

Zo znázornených výsledkov na chromatograme (Obr. 25) vyplýva, že oblasť A1 ukazuje začiatok procesu, keď boli solubilizované mikrozómy nadávkované do systému s kolónou. V tejto frakcii sa nachádzajú proteíny, ktoré sa na kolónu neviažu. Pre purifikáciu bola využitá His-tag kotva na konci rekombinantného enzýmu DHR57B, ktorá zaručí vyššiu špecifickú väzbu k Ni^{2+} iónom na kolóne. Tie sú afinitné nielen k histidínom ale aj k imidazolu. Imidazol pridaný do elučného pufru preruší väzbu medzi

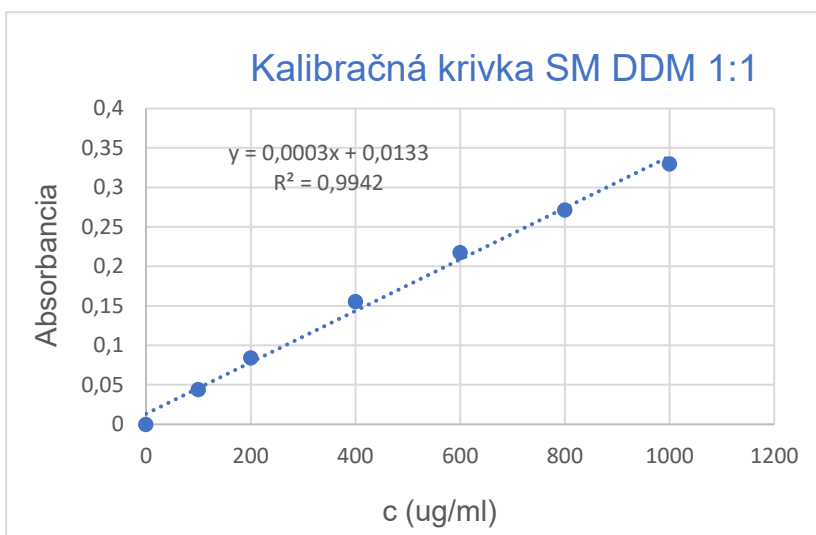
histidínom a Ni^{2+} iónmi, spôsobí uvoľnenie proteínu z kolóny. Práve frakcia A3 a A4 obsahovala obsah s uvoľneným purifikovaným DHRS7B z kolóny. V tejto vzorke bol vymenený pufer, kedy došlo k vymytiu imidazolu a čistá vzorka bola analyzovaná elektroforézou (viď [5.5](#)) a nasledovne bola aj stanovená aktivita (viď [5.7](#)).

5.4 Stanovenie koncentrácie bielkoviny

Na stanovenie koncentrácie bielkoviny bola použitá metóda s kyselinou bicinchonionovou (BCA), ako štandard bol použitý hovädzí surový albumín (BSA). Koncentrácia východných Sf9 mikrozómov s DHRS7B bola vopred známa 9 930 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pre ostatné vzorky meranie prebiehalo v tripletoch, pričom boli použité tri rôzne vzorky proteínu.

5.4.1 Koncentrácia vo vzorke solubilizovaných mikrozómov pred purifikáciou

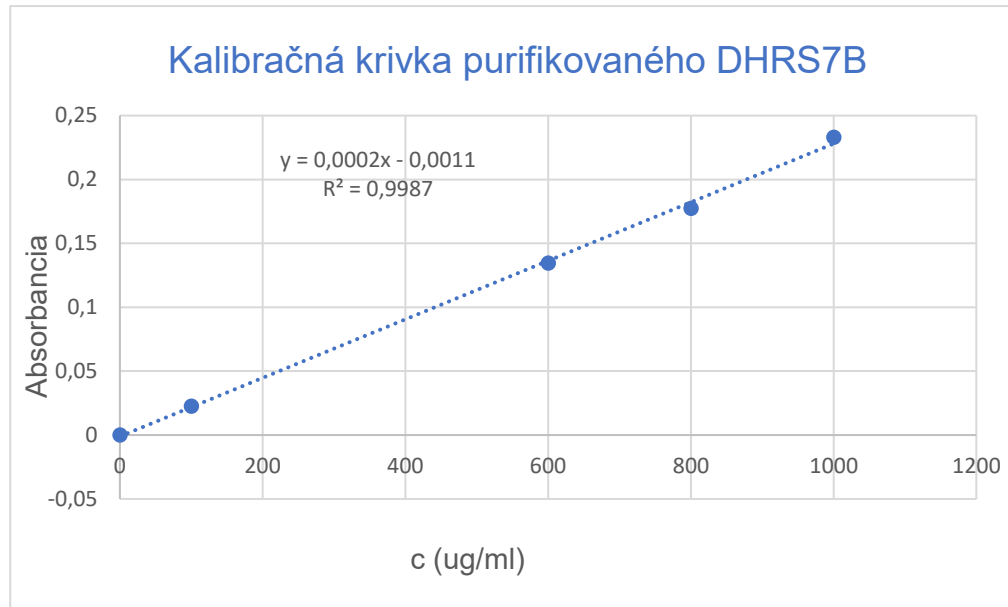
Stanovila sa koncentrácia proteínu pre vzorku solubilizovaných mikrozómov (SM) s DHRS7B a detergentom DDM 1:1 pred tým, ako bola nanosená na chromatografickú kolónu. Vypočítal sa priemer kalibračných vzoriek v tripletoch, bola zostavená kalibračná krivka (Obr. 26), rovnica regresie, a tak sa určila výsledná koncentrácia. Finálna koncentrácia bielkoviny v SM bola 1928,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Obrázok 26: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorke SM s DHRS7B a DDM 1:1. Znáznomená je závislosť absorbancie na koncentrácii BSA.

5.4.2 Koncentrácia vo vzorke purifikovaného DHRS7B

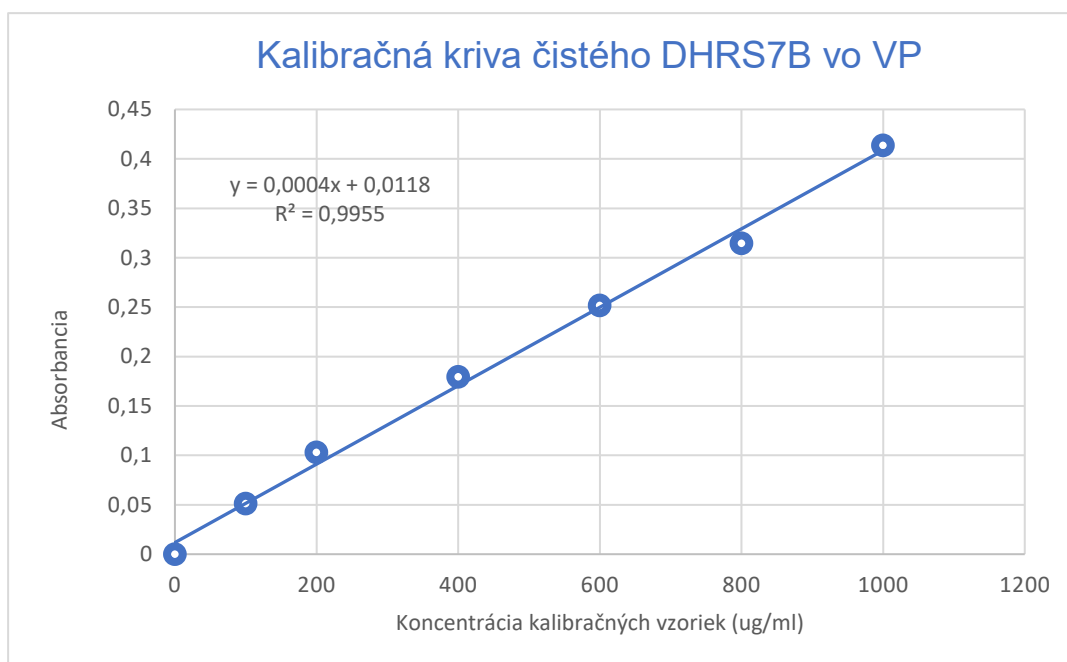
Ďalej bola stanovená koncentrácia purifikovaného DHRS7B z eluátu po AC, kde v zmesi obsahovala aj podiel imidazolu. Ten sa nachádzal v elučnom pufri. Kalibračnou krivkou (Obr. 27) bola stanovená koncentrácia bielkoviny v tejto zmesi bola 129 µg /ml.



Obrázok 27: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorke purifikovaného DHRS7B v eluáte s imidazolom.

5.4.3 Koncentrácia vo vzorke čistého DHR57B vo výmennom pufrí

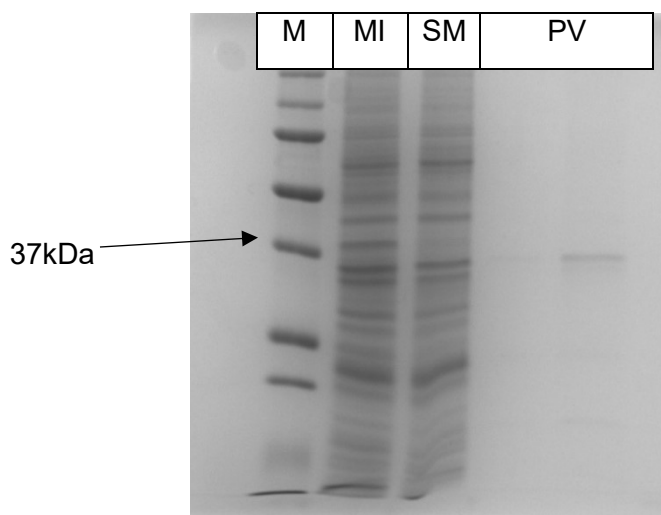
Posledné stanovenie koncentrácie bielkoviny prebehlo vo vzorke čistého DHR57B vo výmennom pufrí. Purifikovaný DHR57B bol pomocou výmenného pufru zbavený imidazolu, ktorého prímies obsahoval po purifikácii. Sledovaná bola vzorka už bez prítomného imidazolu. Výsledná koncentrácia bielkoviny bola stanovená 49 µg/ml. Táto hodnota bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky (Obr. 28).



Obrázok 28: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorke čistého DHR57B vo výmennom pufrí.

5.5 Analýza purifikačného procesu pomocou SDS – PAGE elektroforézy

Po usúdení, že najlepšie a najbezpečnejšie solubilizuje z membrány proteín detergent DDM 1:1 (viď [5.2.1](#)) nasledovala purifikácia DHRS7B zo solubilizovaných *Sf9* mikrozómov. Počas toho sa získal purifikovaný DHRS7B, ktorý sa pomocou výmenneho pufru zbavil imidazolu. Nasledovala analýza celého procesu pomocou SDS – PAGE elektroforézy. Analyzovaná bola vzorka pôvodných *Sf9* mikrozómov s DHRS7B, solubilizovaných *Sf9* mikrozómov s DHRS7B pred purifikáciou a vzorka s čistým DHRS7B vo výmennom pufri bez imidazolu. Touto metódou sa overila čistota získaného proteínu po purifikácii (Obr. 29).

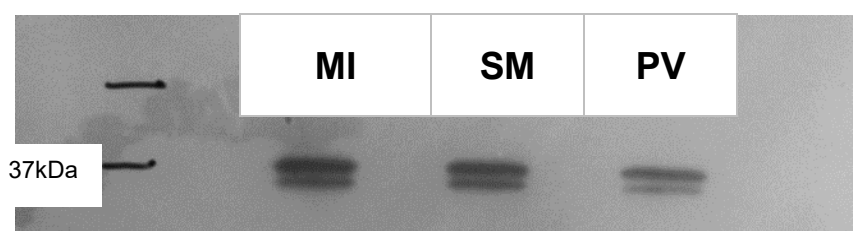


Obrázok 29: SDS-PAGE elektroforéza, zo vzorky získanej počas purifikácie DHRS7B. *M* – marker molekulových hmotností, *MI* – *Sf9* mikrozómy s DHRS7B, *SM* – solubilizované mikrozómy s DHRS7B a DDM 1:1, *PV* – čistý DHRS7B vo výmennom pufri.

DHRS7B zodpovedá molekulovej hmotnosti 37kDa (DHRS7B + his-tag a FLAG-tag) a táto informácia pomohla jeho identifikácii pomocou markeru molekulových hmotností. Analýzou jednotlivých vzoriek sa tak potvrdilo, že vo výmennom pufri sa nachádza čistý proteín s veľkosťou zodpovedajúcou DHRS7B. Dokázanie identity enzýmu DHRS7B sa vykonalo pomocou metódy western blottingu.

5.6 Identifikácia DHR57B metódou Western blottingu

Z gélu po elektroforéze (Obr. 29) sa ukázalo, že vzorka PV (purifikovaný DHR57B bez imidazolu) naozaj obsahuje proteín s molekulovou hmotnosťou ako DHR57B. Keďže sledovaný rekombinantný DHR57B obsahoval umelo pridanú anti-FLAG značku (kotvu), jeho detekcia bola uskutočnená aplikovaním primárnych zajačích protilátok proti FLAG-tagu a sekundárnych prasacích protilátok proti zajačím. Pomocou detekčného systému prebehla vizualizácia v temnej komore a vykonala sa identifikácia skúmaného enzýmu (Obr. 30).



Obrázok 30: Vizualizácia – identifikácia DHR57B pomocou detekcie s protilátkami metódou Western blotting. MI - mikrozómy, SM – solubilizované mikrozómy s DHR57B a DDM 1:1, PV – čistý DHR57B vo výmennom pufri.

Na výslednej fotke sa potvrdila identifikácia DHR57B v pôvodnej vzorke mikrozómov, čo sa aj očakávalo. Rovnako sa potvrdila jeho prítomnosť aj vo vzorke solubilizovaných mikrozómov, ale hlavne v čistej frakcii po purifikácii s výmenným pufrom.

5.7 Stanovenie aktivity čistého proteínu

Dôležitým úspechom a finálnym krokom, pri hľadaní vhodného detergentu pre solubilizáciu a purifikáciu, bolo získať enzým v aktívnej forme. Aktivita bola stanovovaná voči ketotifénu a výsledok bol 62 nmol/mg/min. Takto sa získal čistý a aktívny proteín, ktorý môže byť využitý pre ďalšiu prácu a sledovanie. V závere celého purifikačného postupu (Tab. 9) je zrejmé, že sa podarilo enzým DHRS7B prečistiť 3,4x.

Tabuľka 9: Súhrn purifikácie DHRS7B.

	Špecifická aktivita(nmol/mg/min)	Prečistenie
Mikrozómy	18,19	-
Solubilizované mikrozómy	10,84	0,6
PV	62	3,4

6 Diskusia

Mnohé ľudské gény so známymi nukleotidovými sekvenciami nie sú dostatočne charakterizované, i keď môžu zohrávať dôležitú úlohu v patologických stavoch, ako sú degeneratívne poruchy, diabetes mellitus a hormón dependentný karcinóm. Istú spojitosť s týmito chorobnými stavmi majú aj niektorý členovia SDR nadrodiny (Štambergová et al., 2014).

Predmetom skúmania sa stávajú hlavne málo známi členovia tejto bohatej nadrodiny, kam patrí aj enzým DRS7B. Jeho ľudská forma nebola doposiaľ dostatočne preskúmaná a charakterizovaná. Poznať detailnejšie jeho aktivitu a vlastnosti by umožnilo lepšie pochopiť jeho zapojenie do procesov prebiehajúcich v ľudskom organizme a zároveň prípadne využiť tieto poznatky pri vývoji nových liečiv. Väčšina doposiaľ zistených poznatkov o enzýme DHRS7B bola získaná pri pozorovaní organizmu myši a potkana. V roku 2009 bola u potkana detekovaná lokalizácia DHRS7B na membráne ER (Keller et al., 2009) a v roku 2014 bola jeho prítomnosť opísaná opäť v myšacom organizme ako peroximálny redukčný proteín s aktivitou k éterovým lipidom (Lodhi et al., 2014). Redukčná aktivita DHRS7B v *Sf9* mikrozómoch voči rôznym substrátom bola zistená v rámci práce Tučková (2017). Keďže predošlé štúdie o DHRS7B boli vykonané na úrovni bunky (Lodhi et al., 2014) a na úrovni *Sf9* mikrozómov (Tučková, 2017), bolo potrebné preskúmať jeho aktivitu aj u čistej formy DHRS7B. Získaním DHRS7B v jeho čistej forme bez prítomnosti mikrozómov sa tak potvrdí aktivita, ktorá patrí danému skúmanému enzýmu. Ak nameraná aktivita čistej formy proteínu nebude výrazne pozmenená, bude možné ďalej pracovať so samotným DHRS7B.

Fakt, že DHRS7B má najbližšieho príbuzného DHRS7 a DHRS7C môže byť dobrou pomôckou pre jeho lepšie spoznanie. Významným zistením bolo to, že sekvenčné klastre DHRS7 sú podobné s dobre známymi členmi SDR a tak môžeme mať aspoň predstavu o funkcii DHRS7B. Túto podobnosť má s členmi 11 β -hydroxysteroidnými dehydrogenázami 1. (Obr. 15) (Štambergova et al., 2014).

Aj napriek tomu, že SDR nadrodina obsahuje iba 20% úspešne opísaných členov (Štambergova et al., 2014), tak do tejto malej skupiny patria práve zástupcovia ako 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza (11 β -HSD1, SDR26C1), 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza 12 (17 β -HSD 12 SDR12C1) a karbonylreduktáza 1

(CBR1) (Kallberg et al., 2010). Vzájomná podobnosť týchto troch enzýmov, so zvyšnými nepoznanými členmi, je vodítkom pre lepšiu charakterizáciu menej preskúmanej časti nadrodiny.

Najlepšie preskúmaný 11β -HSD1, membránovo viazaný proteín, bol izolovaný z ľudskej pečene pomocou neionického detergentu (Maser et al., 2002). Práve neionické detergenty ako DDM, C12E8 sa ukázali ako najefektívnejšie v purifikácii 11β -HSD1 (Roobol-Boza et al., 2004). Jeho katalytická aktivita sa pripisuje regulácii glukokortikoidných hormónov a ich receptorov v pečeni a tukovom tkanive, a tak sa jeho prítomnosť viaže aj k viscerálnej obezite a diabetu mellitu druhého typu (Livingston et al., 2000). Rovnako má svoje zastúpenie v metabolizme karbonylových xenobiótik (Maser et al., 2006). Výsledky z izolácie 11β -HSD1 u Maser et al.(2002), Roobol-Boza et al.(2004) pomohli pri výbere vhodných detergentov v prípade DHRS7B. Prvými krokmi aj tejto práce, bolo zistenie, ktorý tenzid dokáže dostať enzým DHRS7B v čo najčistejšej forme a s najlepšie zachovanou špecifickou aktivitou. Pracovalo sa s *Sf9* mikrozómami s DHRSB a na jeho izoláciu sa použilo sedem detergentov. S predpokladom najlepšej účinnosti u neionických detergentov sa z tohto radu použilo šesť zástupcov. Vyhovujúcu solubilizáciu poskytol detergent DDM, v koncentrácii 1:1 proteín:detergent, no okrem toho aj dokázal zachovať aktivitu proteínu. Podobne úspešný bol aj C12E8 ale jeho vplyv na získanie enzýmu z membrány už nebol taký dobrý ako u DDM. Takýto screening detergentov bol v roku 2014 vykonaný aj Skarka et al.(2014), ibaže sa sledoval DHRS7 v *Sf9* mikrozómoch. Najúčinnější extrakcia DHRS7 z membrány bola získaná pri použití DDM, C12E8, Igepal CA – 630 a Digitonínu, pričom najvyššia zachovaná špecifická aktivita sa vtedy pripísala Igepal CA – 630 ako detergentu po solubilizácii DHRS7 z membrány. O účinnosti DDM ako detergentu pre kvalitnú izoláciu proteínu, svedčí aj podobná štúdia s exprimovaným 17β -HSD2 enzýmom v *Sf9* bunkách hmyzu. Tento proteín z nadrodiny SDR s umiestnením v klastru 2, bol podrobený taktiež solubilizácii a purifikácii ako nami sledovaný DHRS7B. Z použitých detergentov svoj potenciál obhájil DDM, ktorý narozdiel od použitého Tritonu X-100 nielenže výhodne solubilizoval 17β -HSD2 z membrány, ale aj zachoval jeho aktivitu (Ming-Liang et al., 2002).

Na definitívne vyhodnotenie a rozhodnutie, ktorý z použitých tenzidov je najvhodnejší pre izoláciu DHRS7B z prostredia membrány, bolo potrebné získať enzým v čistej forme, teda bez prítomnosti mikrozómov a detergentu. Takéto prečistenie proteínu sa previedlo pomocou afinitnej purifikácie, kde sa výhodne využila väzba histidínovej kotvy na ligandy na matrici. O tom, že táto metóda získania enzýmu pomocou histidínovej kotvy by nemala ohroziť výsledky, svedčia predošlé štúdie. V práci

Navrátil (2014) sa sledovalo, aký má vplyv tento tag v proteíne na jeho aktivitu, pričom sa porovnávala aktivita u členov nadrodiny SDR s kotvou a bez nej. Výsledky ukázali, že rozdiely v ovplyvnení enzýmovej aktivity sú minimálne. Tak potvrdili úvahy Carson et al.(2007) o tom, že histidínová kotva výrazne neovplyvňuje štruktúru proteínu, ale aj opísali vhodnosť jej využitia pre purifikáciu, či inú metódu bez toho, aby pozmenila aktivitu enzýmu.

Pomocou záverečnej purifikácie a získania čistého DHRS7B bola u neho zameraná aktivita voči ketotifénu. Výsledné hodnoty boli uspokojivé a tak sa môže táto prečistená forma enzýmu využiť na ďalšiu prácu. Zo skupiny skúšaných detergentov sa teda najlepšie osvedčil neionický detergent DDM, ktorý môže byť v budúcnosti využitý pre ďalšie solubilizácie proteínov z prostredia fosfolipidovej membrány, a to najmä pre členov nadrodiny SDR. Ostatné použité chemické tenzidy ako C12E8, Triton X-100 alebo Digitonín neboli do takej miery úspešné vo vzťahu s DHR7B ako DDM. Poznatky z tejto práce o tom, že aj týmito trom detergentom sa podarilo zachovať aktivu enzýmu či solubilizovať ho z membrány, môžu byť použité pre sledovanie a prácu s inými členmi SDR alebo štruktúrne príbuznými enzýmami.

7 Záver

Cieľom diplomovej práce bolo získať čistý enzým DHRS7B a to v jeho aktívnej forme. Pretože ide o membránový proteín experimentovaný v endoplazmatickom retikule *Sf9* buniek, bola použitá najprv solubilizácia detergentami. Nasledovala purifikácia metódou afinitnej chromatografie a bol získaný purifikovaný enzým DHRS7B, u ktorého bola zachovaná aktivita voči ketotifénu. Podarilo sa tak splniť stanovený cieľ a získaný enzým bude v budúcnosti využitý na ďalšie štúdium na farmaceutickej fakulte.

8 Zdroje

8.1 Internet

Internet 1 : Membrane protein overview. Online [cit. 10.11.2018]. Dostupné z <https://www.creative-biolabs.com/blog/index.php/membrane-protein-overview>

Internet 2: Screening membrane proteins. Online [cit. 10.11.2017]. Dostupné z <https://www.jenabioscience.com/crystallography-cryo-em/screening-membrane-proteins/jbscreen-detergents>

Internet 3: Determination of Critical Micelle Concentration Using Fluorescence Polarization Online [cit. 10.11.2017] Dostupné z <http://blog.biotek.com/2012/10/determination-of-critical-micelle.html>

Internet 4 : Analýza proteínu pomocí automatické kapové elektroforézy experion a porovnání s metodou sds-page. Chemické listy Online [cit. 05.02.2018]. Dostupné z: http://www.chemicke--listy.cz/docs/full/2010_01_33-40.pdf

Internet 5 : Sodium Dodecyl Sulfate. The National Center for Biotechnology Information Online [cit. 05.11.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68012967>

Internet 6: Extrakcia proteínov. Online [cit. 05.02.2018] Dostupné z <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/extrakcia-proteinov>

Internet 7: Cell membrane. Online [cit. 11.04.2018] Dostupné z <http://www.sivabio.50webs.com/cellmembrane.htm>

Internet 8 : Centrifugation Theory. Online [cit. 12.04.2018]. Dostupné z: <https://www.fishersci.se/se/en/scientific-products/centrifuge-guide/centrifugation-theory.html>

Internet 9: Separácia proteínov - afinitná chromatografia. Online. [cit. 19.04.2018]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekulara-biologia/afinitna-chromatografia>

Internet 10 : *SDR (short-chain dehydrogenase/reductase)*. Online [cit. 05.12.2017].
Dostupné z: <http://www.sdr-enzymes.org/>

Internet 11 : Blotting paper sheets for protein transfer and Western blots :Solutions for protein characterization : Advansta western blotting and protein analysis reagents.
Online [cit. 21.04.2018]. Dostupné z: <https://advansta.com/products/western-blotting-paper/>

8.2 Literárne zdroje

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. a Walter, P. (2005). *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky.* 2. vyd. Espero Publishing, Praha, 740 stran. ISBN 80-902906-2-0.

Bhatia C., Oerum S., Bray J., Kavanagh K. L., Shafqat N., Yue W., Oppermann U. (2015). *Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships.* *Chemico-biological interactions*, 234, 114-125.

Bilkova et al., (1999). *Izolace biomakromolekul*, Praha: Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vydavatelství VŠCHT Praha ISBN 80-7080-288-X.

Bray et al., (2009). *The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary.* *Chem.Biol.Interact.*, 178, (1-3) 99-109.

Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., & Delucas, L. J. (2007). *His-tag impact on structure.* *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 63, 295–301.

Emri, T., Csósz, E., Tózsér, J. (2011). *Protein Biotechnology.* University of Debrecen.

GE Healthcare Bio-Sciences AB (2010). *Strategies for protein purification*, Handbook, 164(85) ,28-9833-31 AA,

Hedhammar, M., Karlstrom, A. and Hober, S. (2006). *Chromatographic methods for protein purification.* Stockholm: Royal Institute of Technology 1–31.

Churáček, et al. (1990). *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické.* Praha: Státní nakladatelství technické literatury. ISBN 80-03-00569-8

Janson et al., (2011). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications.* Wiley series in methods of biochemical analysis. ISBN 978-0-471-74661-4. Application No. 13/812,654.

Jeremy M.B. et al., (2002). Biochemistry W.H. Freeman, 894 strán , 80 – 89

Jörnvall, H., Landreh, M., Östberg, L.J., (2015). *Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era.* Chem. Biol. Interact. 234, 75-9.

Kallberg, Y., Oppermann, U., Jorvall, H., & Persson, B. (2002). *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs).* Eur.J.Biochem., 269, (18) 4409-4417.

Kallberg, Y., Oppermann, U. and Persson, B. (2010). *Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models.* FEBS Journal, 277(10), pp. 2375–2386.

Kavanagh, K. L. et al. (2008). *The SDR superfamily: Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes.* Cellular and Molecular Life Sciences, 65(24), pp. 3895–3906.

Keller, B., Meier, M., Adamski, J. (2009). *Comparison of predicted and experimental subcellular localization of two putative rat steroid dehydrogenases from the short-chain dehydrogenase/reductase protein superfamily.* Molecular and cellular endocrinology, 301(1), 43-46.

Le Maire et al., (2000) *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents* Biochimica et Biophysica Acta 1508 (2000) 86 – 111

Linder P., Bauer K., Krebber A., Nieba L., Kremmer E., Krebber C., Honegger A., Klinger B., Mocikat R., Plückthun A. (1997). *Specific Detection of His-Tagged Proteins with Recombinant Anti-His Tag scFv-Phosphatase or scFv-Phage Fusions.* BioTechniques, 22, 140-149.

Livingstone e.w. Et al., (2000). *Understanding the Role of Glucocorticoids in Obesity: Tissue-Specific Alterations of Corticosterone Metabolism in Obese Zucker Rats** Department of Medical Sciences, University of Edinburgh , 560 - 563

Lodhi, I. J., Yin, L., Jensen-Urstad, A. P., Funai, K., Coleman, T., Baird, J. H., et al. (2012). *Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity.* Cell metabolism, 16(2), 189-201.

Lodhi et al., (2017). *PexRAP Inhibits PRDM16-Mediated Thermogenic Gene Expression.* Cell Reports 20, 2766–2774

Maser et al., (2006). *11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: Purification from human liver and characterization as carbonyl reductase of xenobiotics.* Molecular and Cellular Endocrinology 248, 34–37

Maser et al., (2002). *11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 from Human Liver: Dimerization and Enzyme Cooperativity Support Its Postulated Role as Glucocorticoid Reductase.* Biochemistry 41, 2459-2465

Ming-Liang et al., (2002). *Purification, Reconstitution, and Steady-state Kinetics of the Trans-membrane 17-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2*.* The journal of biological chemistry, 22123–22130

Mikeš O. (1980). *Laboratorní chromatografické metody.* Technický průvodce 53, SNTL, Praha, 673 s.

Navrátil H., (2014). *Enzymová aktivita rekombinantních enzymů. Vliv histidinové kotvy.* Diplomová práce. Katedra biochemie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

Oppermann, U.C., Filling, C., & Jornvall, H. (2001). *Forms and functions of human SDR enzymes.* Chem.Biol.Interact., 130-132, (1-3) 699-705.

Persson, B. et al., (2009). *The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative.* Chemico-Biological Interactions, 178(1–3), pp.94–98.

Persson, B. and Kallberg, Y., (2013). *Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs).* Chemico-Biological Interactions, 202(1–3), pp. 111–115.

Roobol-Bóza et al., (2004). *Membrane protein isolation by in situ solubilization, partitioning and affinity adsorption in aqueous two-phase systems Purification of the human type 1 11 β - hydroxysteroid dehydrogenase.* Journal of Chromatography A, 1043, 217–223

Seddon et al., (2004). *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera.* Biochimica et Biophysica Acta 1666 (2004) 105– 117

Sigma-Aldrich, (2017). *Detergents.* A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. 20, 13-14

Skarka et al., (2014). *Purification and reconstitution of human membrane-bound DHRS7 (SDR34C1) from Sf9 cells.* Protein Expression and Purification 95 (2014) 44–49

Soto-Rodríguez J. et al., (2017). *Affinity purification of Car9-tagged proteins on silica matrices: Optimization of a rapid and inexpensive protein purification technology,* 135, 70 – 77

Špajdelová et al., (2013). *Tajomstvá bunky II.* Trnava : Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej univerzity v Trnave, ISBN 978-80-8082-659-8

Štambergova et al., (2014). *Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7 ,* Chemico-Biological Interactions. Elsevier Ireland Ltd, 207(1), pp. 52–57.

Terpe K. (2003). *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.* Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 523-533.

Tučková, (2017). *Základní charakterizace lidských enzymů DHRS7B a DHRS7C.* Diplomová práce. Katedra biochemie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Královce

Tzannis, S.T., (1991). *Tutorial on Cell Disruption.* RPI.

Walls, D., Loughran, S. T., Madadlou, A., O’Sullivan, S., and Sheehan, D. (2011). *Protein chromatography* (pp. 439-447). Totowa: Humana Press.

Young C. L., Britton Z. T. a Robinson A. S. (2012). *Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications.* Biotechnology Journal, 7, 620-634.

Zatloukalová, (2004). *Afinní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech a její použití.* Chem. Listy 98, 254 – 259 (2004)

Zubgay et al., (1988). *Purification and properties of the Drosophila zen protein.* Mol Cell Biochem. 79(2):181-9.

9 Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Štruktúra biomembrány.....	10
Obrázok 2: Rôzne spôsoby interakcií proteínov s membránou.....	11
Obrázok 3: Znázornenie vplyvu rôznej koncentrácie detergentov.....	12
Obrázok 4: Tvorba micely pri dosiahnutí CMC.	13
Obrázok 5: Grafické znázornenie závislosti koncentrácie detergentu a teploty.....	14
Obrázok 6: Dodecylsulfát sodný (SDS).	15
Obrázok 7: Štruktúra detergentu n-Dodecyl – β – maltozidu (DDM).	16
Obrázok 8: Priebeh odstránenia detergentu pomocou dialýzy.....	17
Obrázok 9: Membránové proteíny solubilizované detergentom OG.....	19
Obrázok 10: Kroky purifikácie.....	20
Obrázok 11: Znázornenie vzorky pred centrifugáciou a po centrifugácii.	21
Obrázok 12: Postupné kroky afinitnej chromatografie..	24
Obrázok 13: Štruktúra SDR (short-chain dehydrogenases/reductases).....	26
Obrázok 14: Znázornených sedem typov SDR.	27
Obrázok 15: Ľudské SDR enzýmy rozdelené na typy a klastre.....	28
Obrázok 16: Nomenklatúra SDR nadrodiny.....	29
Obrázok 17: Nanášanie vzoriek do jamiek gélu pomocou automatickej pipety..	41
Obrázok 18: Western blotting sandwich..	42
Obrázok 19: Centrifúga WX Ultra používaná počas centrifugácie vzoriek.	45
Obrázok 20: Ākta Purifier chromatograf.....	46
Obrázok 21: Solubilizácia rekombinantnej ľudskej DHRS7B z <i>Sf9</i> mikrozómov pomocou detergentov DDM a C1E8.....	48
Obrázok 22: Vyhodnotenie efektivity solubilizácie ľudskeho rekombinantného DHRS7B z <i>Sf9</i> mikrozómov pomocou detergentov OG a CHAPS v pomeroch 1:1,1:2,1:3.	49
Obrázok 23: Vyhodnotenie efektivity solubilizácie ľudskeho rekombinantného DHRS7B z <i>Sf9</i> mikrozómov pomocou detergentov TRX a IG v pomeroch 1:1, 1:2 a 1:3.	49

Obrázok 24: Vyhodnotenie efektivity solubilizácie ľudského rekombinantného DHRS7B z <i>Sf9</i> mikrozómov pomocou detergentu Digitonin v pomeroch 1:1, 1:2 a 1:3.....	50
Obrázok 25: Záznam z priebehu purifikácie DHRS7B.	53
Obrázok 26: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorke SM s DHRS7B a DDM 1:1.	54
Obrázok 27: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorke purifikovaného DHRS7B v eluáte s imidazolom.....	55
Obrázok 28: Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie bielkoviny vo vzorke čistého DHRS7B vo výmennom pufri.....	56
Obrázok 29: SDS-PAGE elektroforéza, zo vzorky získanej počas purifikácie DHRS7B.	57
Obrázok 30: Vizualizácia – identifikácia DHRS7B pomocou detekcie s protilátkami metódou Western blotting.....	58

10 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Využitie vlastností proteínov pri purifikácii. Jednotlivé techniky nie sú vhodné pre všetky fázy purifikácie.	22
Tabuľka 2: Príprava roztokov detergentu s DHRS7B zmiešaním s resuspendačným (RP) a solubilizačným pufrom (SP) v troch pomeroch.	39
Tabuľka 3: Zloženie 10% - ného separačného a 4% - ného zaostrovacieho gélu.	40
Tabuľka 4: Pripravené zmesi na meranie enzýmovej aktivity.	44
Tabuľka 5: Pripravené zmesi na porovnanie pri meraní enzýmovej aktivity.	44
Tabuľka 6: Kalibračná krivka roztoku albumínu 1 mg/ml.	47
Tabuľka 7: Výsledky merania enzýmovej aktivity, s úspešnosťou nad 50%, solubilizovaného DHRS7B v zmesi s detergentom voči substrátu ketotifenu.	51
Tabuľka 8: Percentuálne vyjadrenie špecifickej aktivity voči pôvodnej vzorke Sf9 mikrozómov s DHRS7B a porovnanie s efektivitou solubilizácie DHRS7B.	52
Tabuľka 9: Súhrn purifikácie DHRS7B.	59

11 Zoznam skratiek

11 β -HSD1	11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza 1
AA	akrylamid
AC	afinitná chromatografia
AMK	aminokyselina
APS	persulfát amonný
Asn	asparagin
BCA	bicinchonionová kyselina
BSA	bovinní sérový albumin
c-myg	tag c-myc značka
C12E8	oktaethylen glykol monododecyl eter
CMC	kritická micelárna koncentrácia
CMT	kritická micelárna teplota
CTAB	cetyl trimetyl-amonium bromid
DDM	n-dodecyl-b-maltozid
DHRS7	Dehydrogenáza/reduktáza s krátkým reťazcom 7
Dig	Digitonin
ER	endoplazmatické retikulum
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
FLAG	oktapeptidová sekvencia
GST-tag	glutathion-S-transferáza
HCl	kyselina chlorovodíková
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonát
Lys	lysin
ME	2 - merkaptoetanol
MBP	maltózu viažúci proteín
HMM	Hidden Markov Model
KCl	chlorid draselný
KBV	Katedra biochemických vied
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	(hydrogen fosforečnan disodný, dihydrát
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	dihydrogen fosforečnan sodný, monohdrát
NaCl	chlorid sodný

NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný Nikotinamidadeninukleotidfosfát
OG	n-oktyl-h-d-glukopyranozid
PexRAP	Peroxisomal Reductase Activating PPAR γ
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
SM	solubilizované mikrozomy
SDR	dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová elektroforéza
Ser	serin
Sf9	hmyzia bunková línia z ovariálnych buniek <i>Spodoptera frugiperda</i>
TBS-T	Tris-buffered saline – Tween
TEMED	tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan (THAM)
Tyr	tyrosin
WB	Western Blot