

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**OPTIMALIZACE PURIFIKACE
LIDSKÉ MEMBRÁNOVĚ VÁZANÉ
KARBONYLREDUKTASY**

Diplomová práce

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

Školitel specialista: Mgr. Lucie Škarydová, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Rudolf Andrys

Děkuji především mému vedoucímu práce prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D., dále pak mé poděkování patří Mgr. Lucii Škarydové, Ph.D. za hodnotné rady a odbornou pomoc během vypracování této diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Rudolf Andryš

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace purifikace lidské membránově vázané karbonylreduktasy

Enzymy redukující karbonylové skupiny se účastní metabolismu mnohých endogenních i exogenních látek. Většina dosud popsanych enzymů účastnících se metabolismu xenobiotik je cytosolických, jediným takovým zatím známým mikrosomálním enzymem je 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD1). Podílí se také na metabolismu oracinu, prochirálního protinádorového léčiva, které je redukováno na (+) a (-) 11-dihydrooracin (DHO). Na základě rozdílů stereospecifit mezi lidskou mikrosomální frakcí a 11 β -HSD1 se předpokládá podíl dalšího mikrosomálního enzymu na biotransformaci oracinu. Cílem této práce je potvrzení přítomnosti a purifikace tohoto nového lidského mikrosomálního enzymu.

Lidské jaterní mikrosomy byly solubilizovány a odsoleny. Jako první purifikační krok byla využita Q-sepharosa. Vybraná frakce Q2, získaná touto metodou, byla podrobena druhému purifikačnímu kroku na Phenyl-sepharose. Jedna ze získaných frakcí splňující požadavky byla dále přečištěna gelovou filtrací. Ve všech frakcích získaných během purifikace byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu, stereospecifita redukce a koncentrace bílkovin. Byla získána frakce, která podle původních předpokladů tvoří 80 % (+)-DHO.

Je zřejmé, že značně purifikovaná frakce obsahuje neznámou mikrosomální karbonylreduktasu, účastnící se metabolismu oracinu, lišící se od 11 β -HSD1. Je pravděpodobné, že kromě oracinu se tento enzym bude podílet i na metabolismu podobných léčiv jako je např. doxorubicin a daunorubicin a je tedy nutné jej identifikovat.

ABSTRACT

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

Candidate: Rudolf Andryš

Supervisor: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D

Title of diploma thesis: Optimization of purification of a human membrane-bound carbonyl reductase

Carbonyl reductases are enzymes participating in metabolic pathways of various eobiotics and xenobiotics. Of all known enzymes metabolizing xenobiotics only 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) is found in the microsomal membrane. It also contributes to metabolism of prochiral anticancer drug oracin, which main metabolic pathway is a carbonyl reduction on the position 11 leading to two enantiomers of (+) an (-) 11-dihydrooracin (DHO). Based on the discrepancy between microsomes and 11 β -HSD1 stereospecificity of oracin reduction exist a hypothesis of participation an unknown microsomal enzyme in oracin metabolism. The aim of this study is to purify a new microsomal carbonyl reducing enzyme contributing in the biotransformation of oracin.

Human liver microsomes were solubilised and desalted. The prepared sample was used for the first purification step on Q-Sepharose. Captured flow through fraction Q2 was loaded on Phenyl-sepharose. Captured suitable fraction P11 was used for third purification step by gel filtration. All fractions acquired during purification procedure were tested for oracin reducing activity, stereospecificity of the reduction and protein concentration. It was obtained a fraction that reduces oracin with anticipated preferential formation of (+)-DHO about 80%.

It is clear that the significantly purified fraction contains a new microsomal carbonyl reductase that participates in biotransformation of oracin differing from 11 β -HSD1. Therefore it is probable that the enzyme will participate in metabolism of similar drugs (e.g. doxorubicin, daunorubicin) and it is necessary to identify it.

Obsah

ÚVOD.....	9
A. TEORETICKÁ ČÁST	10
1. PURIFIKACE PROTEINŮ	10
1.1. Purifikační strategie.....	10
1.1.1. Třífázová purifikační strategie	11
1.2. Purifikace membránových proteinů	11
1.2.1. Klasifikace membránových proteinů	12
1.2.2. Solubilizace.....	13
1.2.3. Potíže spojené s purifikací	14
1.3. Separální metody	15
1.3.1. Separace založená na rozdílné velikosti a tvaru částic	15
1.3.1.1. Gelová permeační chromatografie (gelová filtrace).....	15
1.3.2. Separace založená na rozdílném náboji molekul.....	16
1.3.2.1. Iontově výměnná chromatografie (IEX).....	16
Materiály používané jako stacionární fáze	18
1.3.3. Separace založená na polaritě molekul	19
1.3.3.1. Chromatografie na reverzní fázi (RPC)	19
Materiály používané jako stacionární fáze	21
1.3.3.2. Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)	21
Materiály používané jako stacionární fáze	23
1.3.4. Afinitní chromatografie (AC)	24
1.4. Stanovení množství bílkoviny ve vzorku	26
1.4.1. Biuretová reakce	26
1.4.2. Lowryho metoda	27
1.4.3. BCA metoda (Smithovo stanovení)	27
1.4.4. Bradfordovo stanovení.....	28
2. KARBONYLREDUKTASY ÚČASTNÍCÍ SE METABOLISMU XENOBIOTIK	29
2.1. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)	30
2.2. Aldo-ketoreduktasy (AKR)	31
2.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	33
2.3.1. Mikrosomální enzymy nadrodiny SDR.....	34
2.3.1.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (11 β -HSD).....	34
2.3.1.2. Retinoldehydrogenasy (RDH)	35
2.3.1.3. 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD).....	35
3. ORACIN	36
3.1. Mechanismus biotransformace oracinu.....	37
3.1.1. Biotransformace oracinu v lidských jaterních mikrosomech	38
B. CÍL PRÁCE	39
C. MATERIÁLY A METODY	40

4.	MATERIÁLY	40
4.1.	Biologický materiál	40
4.2.	Chemikálie	40
4.3.	Přístroje a pomůcky.....	41
5.	METODY.....	42
5.1.	Příprava subcelulárních jaterních frakcí.....	43
5.2.	Purifikace mikrosomálních frakcí	43
5.2.1.	Solubilizace mikrosomů.....	43
5.2.2.	Odsolování mikrosomů	43
5.2.3.	Zakoncentrování odsolených mikrosomů	44
5.2.4.	Separace na Q-sepharose	44
5.2.5.	Separace na Phenyl HP-sepharose	44
5.2.6.	Zakoncentrování frakce po Phenyl-sepharose.....	45
5.2.7.	Gelová permeační chromatografie	45
5.3.	Stanovení redukční aktivity.....	45
5.3.1.	Inkubace vzorků s oracinem.....	45
5.3.2.	Stanovení kinetiky enzymu	46
5.3.3.	HPLC stanovení metabolitů	46
5.3.3.1.	Achirální analýza	46
5.3.3.2.	Chirální analýza.....	46
5.4.	Stanovení množství bílkoviny	47
5.4.1.	Stanovení dle Bradforda.....	47
5.4.2.	BCA metoda (Smithovo stanovení)	47
5.5.	SDS elektroforéza	48
5.5.1.	Příprava gelu	48
5.5.2.	Příprava vzorků.....	48
5.5.3.	Vlastní elektroforéza	49
5.5.4.	Barvení stříbrem-Sweet silver stain	49
D.	VÝSLEDKOVÁ ČÁST	51
6.	PURIFIKACE B.....	51
6.1.	Analýza vzorků po separaci na Q-sepharose.....	51
6.2.	Analýza vzorků po separaci na Phenyl-sepharose.....	54
6.2.1.	Stanovení redukční aktivity frakcí po separaci na Phenyl-sepharose.....	55
6.2.2.	Stanovení stereospecifity redukce vzorků po separaci na Phenyl-sepharose.....	57
6.2.3.	Stanovení koncentrace proteinů ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose	58
6.2.4.	SDS-elektroforéza frakcí po separaci na Phenyl-sepharose	64
6.2.5.	Stanovení kinetiky redukce oracinu na DHO frakce P11 po separaci na Phenyl-sepharose....	65
7.	PURIFIKACE C.....	66
7.1.	Analýza vzorků po separaci na Q-sepharose.....	66
7.2.	Analýza vzorků po separaci na Phenyl-sepharose.....	68
7.2.1.	Stanovení redukční aktivity frakcí po separaci na Phenyl-sepharose.....	69
7.2.2.	Stanovení stereospecifity redukce vzorků po separaci na Phenyl-sepharose.....	70

7.2.3.	Stanovení koncentrace proteinů ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose	71
7.2.4.	SDS-elektroforéza vybraných frakcí po separaci na Phenyl-sepharose.....	73
7.3.	Analýza vzorků po rozdělení gelovou chromatografií	74
7.3.1.	Stanovení redukční aktivity ve frakcích po GPC	76
7.3.2.	Stanovení stereospecifity redukce ve frakcích po GPC.....	77
7.3.3.	Stanovení množství bílkoviny ve frakcích po GPC.....	78
7.3.4.	SDS-elektroforéza frakce A11 po GPC.....	79
E.	DISKUZE	80
F.	ZÁVĚR.....	85
G.	SEZNAM ZKRATEK.....	86
H.	LITERATURA	88

ÚVOD

Enzymy hrají klíčovou roli v biotransformaci mnohých eobiotik i xenobiotik. Pro pochopení metabolických pochodů je tedy nezbytné takové enzymy identifikovat. I v současné době je obrovské množství proteinů stále pouze vytipováno na základě sekvence DNA. I protein, který se zdánlivě zdá jako metabolicky nevýznamný, může být zdrojem fascinujících informací o fungování lidského organismu. Zároveň nám může poskytnout i náhled do samotné lidské evoluce.

Tato práce navazuje na výzkum Katedry biochemických věd v objevení nové membránově vázané karbonylreduktasy, která by se účastnila metabolismu xenobiotik. V této diplomové práci bylo ovšem použito jiné purifikační schéma než v předchozím výzkumu.

A. TEORETICKÁ ČÁST

1. PURIFIKACE PROTEINŮ

Purifikaci proteinů lze popsat jako sérii procesů, které směřují k oddělení jednoho typu proteinu ze směsi makromolekul, jako jsou jiné proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy, lipidy a jiné. Počátečním materiálem při separaci je obvykle biologická tkáň nebo mikrobiální kultura. Jde o nedílnou součást charakterizace funkce, struktury a biologické aktivity dané bílkoviny. Hlavní snahou je dosáhnout žádané čistoty polypeptidu při přijatelné efektivitě a rychlosti separace a dostačujícímu výtěžku purifikace při zachování biologické aktivity a chemické integrity.

Jednotlivé proteiny mohou být odseparovány ze směsi stovek proteinů, jelikož se jednotlivé skupiny významně liší ve svých fyzikálních a chemických vlastnostech. Tyto vlastnosti jsou výsledkem rozdílného seskupení aminokyselin v polypeptidových řetězcích. Zbytky těchto aminokyselin mohou být kladně či záporně nabitě, hydrofilní nebo hydrofobní. Polypeptidy mají dále přesně danou sekundární, terciární a kvartérní strukturu, čímž protein získává unikátní velikost, tvar, náboj, rozpustnost, afinitu k určitému ligandu atd. Znalost odlišnosti v některé z těchto vlastností umožňuje navržení vhodného postupu purifikace hledaného proteinu (Internet 1, Internet 2, Burgess 2008).

1.1. Purifikační strategie

Před započítím purifikace je nutné si stanovit podmínky a možnosti experimentu. Jaký bude použit výchozí materiál a jak jej uchovat? Jak čistý musí být produkt? Pro jaký účel je protein purifikován? To jsou jen některé z otázek, na které je třeba odpovědět před zahájením práce (Internet 1).

Výběr vhodné výchozí suroviny je základním úkolem před začátkem purifikace. Mnoho potenciálních prací je neproveditelných z důvodu nedostupnosti potřebného materiálu. Vhodný výchozí materiál by měl být dostupný v potřebném množství, v čase potřeby a uskladnitelný zmrazením po delší dobu.

Základním cílem purifikace je získat co největší množství čistého aktivního proteinu při minimálním počtu purifikačních kroků. Většina purifikačních procesů ale obsahuje

více než jeden krok. Každý takový krok působí ztrátu produktu. Při čtyřech krocích, kde každý krok má výtěžnost 80 %, bude celkové množství získaného proteinu redukováno na 41 % z původního množství. Je tedy snaha používat metody s co největší výnosností. Zmenšením počtu kroků se zkrátí celková doba purifikace, sníží se ztráta proteinu v jednotlivých krocích, zmenší se pravděpodobnost ztráty biologické aktivity a sníží se celkové náklady purifikace (Burgess 2008, Scopes 1994).

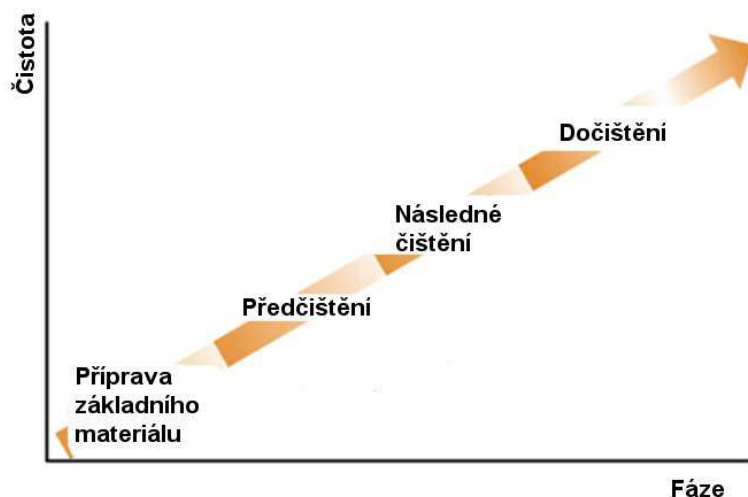
1.1.1. Třífázová purifikační strategie

Třífázová purifikační strategie je jedním z nejpoužívanějších postupů při separaci proteinů. Je používána při malých laboratorních purifikacích i při velkoprodukcí biomolekul ve farmaceutickém průmyslu. Používá základní schéma, které se skládá z přípravy základního materiálu, předčištění, následného čištění a dočištění (obr. 1).

Během předčištění je snaha izolovat, koncentrovat a stabilizovat konečný produkt.

Ve fázi následného čištění dochází k odstranění většiny nečistot, jako jsou nežádoucí proteiny, nukleové kyseliny, lipidy.

Při dočištění je snaha o získání co možná nejčistšího produktu (Internet 1, Internet 4).



Obr. 1: Schéma třífázové purifikační strategie.

1.2. Purifikace membránových proteinů

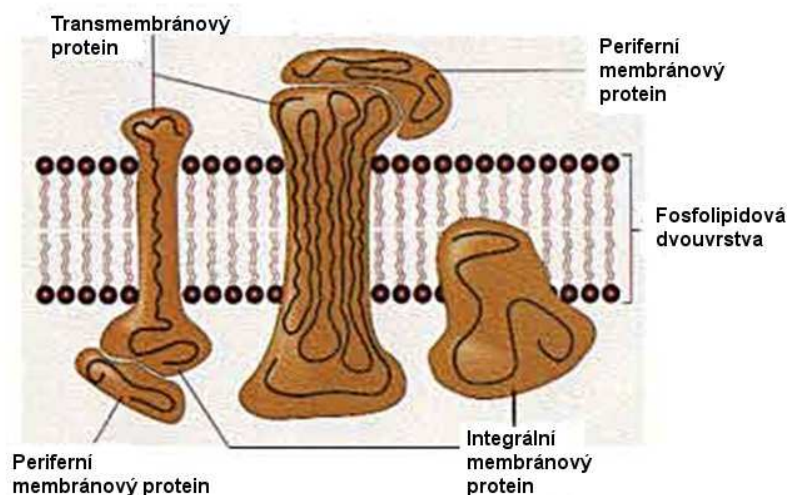
Mnohé proteiny a enzymy se přirozeně nevyskytují ve vodné fázi uvnitř ani vně buněk. V těle eukaryotických buněk je mnoho organel, které mají vlastní membránu, ke

kteře jsou asociovány proteiny. Jsou to mitochondrie, buněčné jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lysozomy a vakuoly.

Membránové proteiny se v biologických membránách obvykle vyskytují v malém množství. Jen velmi vzácně je hlavní peptidovou složkou membrány jedna skupina proteinů. Mnohé proteiny tudíž nemohou být izolovány z přirozených zdrojů v dostatečném množství. Je tedy snaha o jejich vytvoření pomocí klonovacích technik (Scopes 1994, Seddon et al. 2004).

1.2.1. Klasifikace membránových proteinů

Membránové proteiny se dělí na periferní a integrální (obr. 2). Periferní proteiny jsou připojeny k fosfolipidové membráně slabými nekovalentními silami a mohou být uvolněny jednoduchým zpracováním, které nezahrnuje solubilizaci membrány. Takový protein může být částečně uvolněn do vodné fáze již při samotné izolaci membrány z počátečního materiálu. Uvolnění zbytku proteinů může být dosaženo např. sonikací, přidáním pufru silné nebo slabé iontové síly, zvýšením pH nebo přidáním fosfolipasy. Proteiny, které byly takto uvolněny, nepotřebují nadále přítomnost detergentů nebo jiných solubilizačních činidel, aby zůstaly ve vodné fázi.



Obr. 2: Typy membránových proteinů.

Integrální membránové proteiny jsou ukotveny pevně ve fosfolipidové dvouvrstvě a představují tudíž větší problém. K jejich uvolnění je nezbytné solubilizovat membránu, ve které jsou proteiny zabudovány (Scopes 1994, Internet 3).

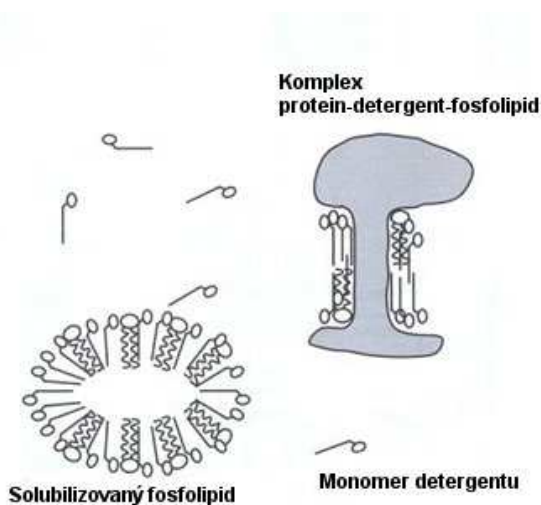
1.2.2. Solubilizace

Ve vodném roztoku se i při velkém zředění molekuly nebo ionty tenzidů shromažďují tak, aby se zbavily energeticky nevýhodného kontaktu s vodou. Při dosažení kritické micelární koncentrace (CMC) se svými uhlovodíkovými řetězci orientují směrem dovnitř (směrem od polárního prostředí), shlukují se a vytváří micely (obr. 3).



Obr. 3: Micela utvořená z molekul tenzidu.

Během solubilizace se hydrofobní části detergentu zakotví k hydrofobním částem proteinu a částečně nahradí fosfolipidy (obr. 4). Po připojení dostatečného množství molekul detergentu přechází protein do roztoku. Solubilizace pomocí detergentu tedy vede ke vzniku směsi solubilizovaných lipidů, volného proteinu, komplexu proteinu s tenzidem a volného tenzidu v micelární i molekulární formě. Zastoupení detergentů a fosfolipidů v komplexu závisí na složení použitého solubilizačního pufru (Rehm 2006).



Obr. 4: Solubilizační schéma integrálních membránových proteinů.

1.2.3. Potíže spojené s purifikací

Purifikace membránových proteinů se v mnohém liší od purifikace cytosolických proteinů. Hlavní potíže spojené s jejich separací ze směsi jsou uvedeny v následujících odstavcích.

Agregace proteinů

- Membránové proteiny ochotně tvoří agregáty dokonce i v přítomnosti detergentů. Tento jev snižuje účinnost všech separačních technik. Je tedy nutné zvolit vhodný tenzid a vhodnou hodnotu pH, jež nebude působit denaturaci proteinu a zabrání jeho agregaci.

Rušivý vliv detergentů na separační techniky

- Solubilizační techniky vyžadují přítomnost detergentů, které musí setrvat ve směsi po celou dobu purifikace. Tenzidy použité při solubilizaci ale mohou omezit použitelnost některých technik. Například metody založené na rozdělování směsi na základě velikosti molekul mají nižší rozlišení, jelikož množství navázaného detergentu na protein zmenšuje rozdíly mezi jednotlivými polypeptidy. Vysolovací techniky vykazují nižší účinnost v přítomnosti neiontových tenzidů. Chromatofokusace a izoelektrická fokusace nefungují v přítomnosti aniontového detergentu.

Proteasová degradace

- Membránové proteiny jsou nejlépe stabilizovány v membránových strukturách, kde je nízká aktivita proteasových enzymů. Po jejich solubilizaci se ale degradace výrazně zrychluje, jelikož proteiny již nejsou chráněny v prostředí biologické membrány. Před započítím solubilizace je tedy často nutné přidat efektivní inhibitor proteasových enzymů jako je EDTA.

Degradace proteinu

- Solubilizací s iontovými detergenty dojde obvykle k nevratné denaturaci proteinu. I když je denaturovaný produkt přípustný, běžné separační techniky nejsou vhodné k práci s takovým proteinem. Solubilizace tedy musí být provedena s šetrným tenzidem, který zachová nativní strukturu proteinu (Hunte et al. 2003, Scopes 1994).

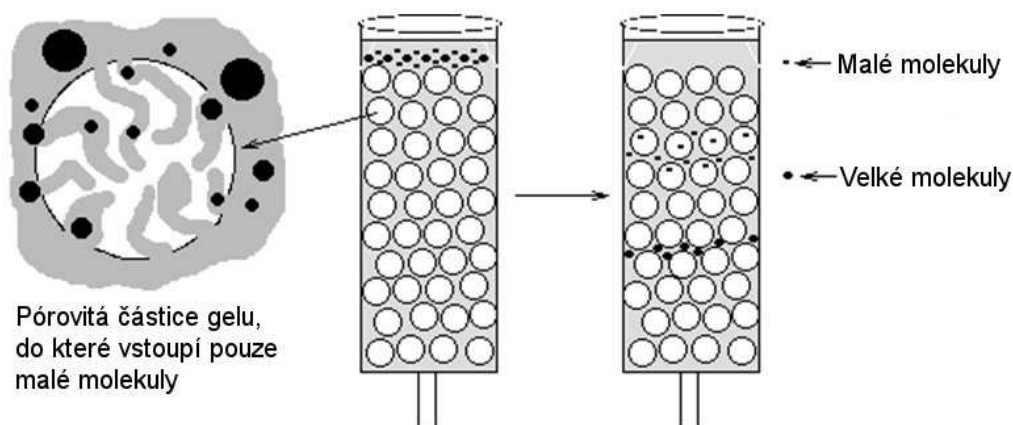
1.3. Separační metody

Při separaci dochází k rozdělení složek směsi na jednotlivé komponenty. Separační techniky lze dělit na základě různých kritérií. Jedním z nich může být rozdělení na základě vlastností molekul určených k separaci. Mezi tyto vlastnosti patří například velikost a tvar (gelová filtrace, gelová elektroforéza), náboj (iontově výměnná chromatografie), polarita (chromatografie na reverzních fázích, hydrofobní interakční chromatografie), vazba na specifický ligand (afinitní chromatografie).

1.3.1. Separace založená na rozdílné velikosti a tvaru částic

1.3.1.1. Gelová permeační chromatografie (gelová filtrace)

Tato metoda je založena na principu rozdělování látek obsažených v roztoku mezi rozpouštědlo uvnitř zrn gelu a rozpouštědlo okolo zrn gelu. Tyto částice jsou malé a pórovité, takže pouze malé molekuly mohou vstoupit do gelu. Molekuly, jejichž velikost převyšuje rozměry částic gelu, se pohybují stejnou rychlostí jako eluční činidlo (obr. 5). Dochází k tzv. stérickému vyloučení (exkluzi) větších molekul. Malé molekuly vstupují do pórů a postupují skrz kolonu pomaleji. Tato metoda je vhodná pro molekuly o relativní molekulové hmotnosti větší než 500 (Internet 5, Internet 6, Internet 7, Internet 8, Rehm 2006).

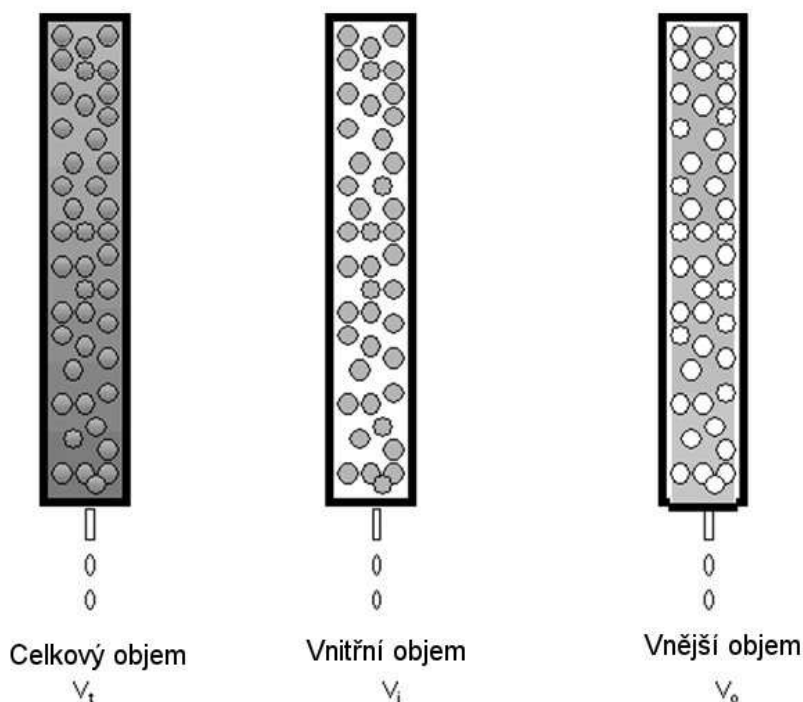


Obr. 5: Mechanismus separace pomocí gelové permeační chromatografie.

Proces rozdělování molekul lze popsat základní rovnicí rozdělovací chromatografie

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

kde V_e je eluční objem dané látky, V_0 je tzv. mrtvý objem (objem eluátu mimo částice gelu), V_i vyjadřuje obsah rozpouštědla uvnitř částic a K_d je distribuční koeficient (obr. 6). Tento koeficient charakterizuje chování molekuly na koloně (Internet 7).



Obr. 6: Objemy používané v gelové filtraci.

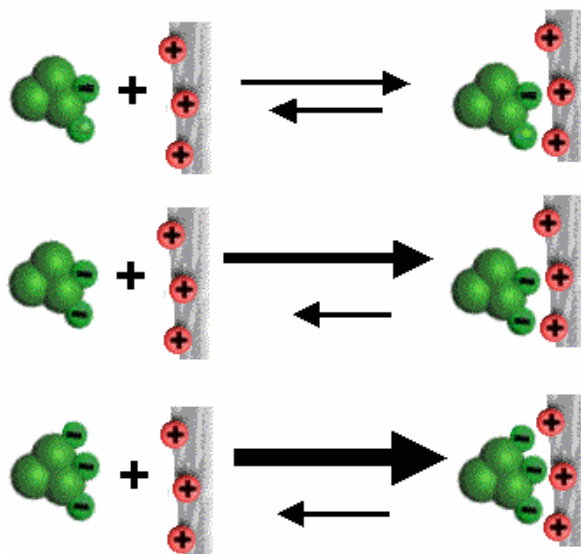
Gel se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely (Sephadex). Mobilní fází je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky ve vodě nerozpustné se používají gely hydrofobní (Styragel) (Klouda 2003).

1.3.2. Separace založená na rozdílném náboji molekul

1.3.2.1. Iontově výměnná chromatografie (IEX)

Při iontové výměnné chromatografii se proteiny váží k matici kolony elektrostatickými interakcemi mezi opačně nabitými ionty tzv. Coulombovými silami (obr. 7). Rozsah a síla navázání proteinu k iontoměničiči závisí na pH a iontové síle

promývacího pufru, izoelektrickém bodu proteinu a hustotě nábojů na matici iontoměniče.



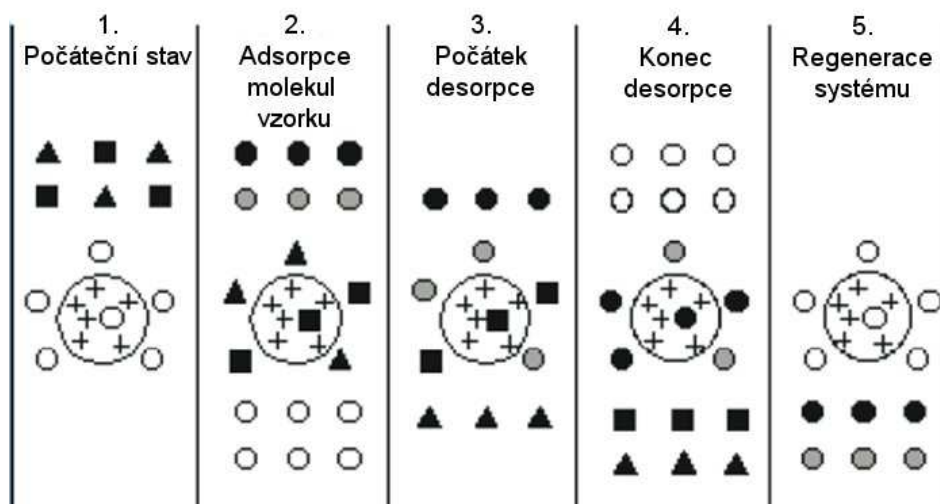
Obr. 7: Princip vazby analytu k sorbentu.

Základní schéma separace látek pomocí iontové výměnné chromatografie se skládá z pěti kroků (obr. 8). V prvním kroku je matrice iontoměniče promyta startovacím pufrům. Jeho pH a iontová síla je zvolena tak, aby umožnila navázání žadanych molekul k povrchu matrice.

V druhém kroku je na kolonu aplikován vzorek, který se váže svými nabitými částmi k opačně nabitým částem iontoměniče. Molekuly, které se nenařazaly, jsou eluovány startovacím pufrům.

V třetí fázi jsou molekuly vymývány z kolony změnou složení promývacího pufru. Běžně se tak děje zvýšením iontové síly nebo změnou pH pufru. Slaběji adsorbované molekuly jsou nahrazovány silněji se vřazujícími ionty a jsou tak eluovány.

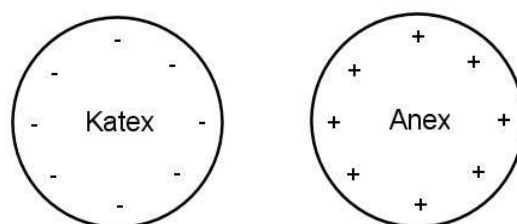
Ve čtvrtém kroku jsou vymyty zbylé molekuly za totožných podmínek jako v předchozím kroku. V páté fázi separace dochází k opětovné regeneraci matrice iontoměniče do původního stavu před započatím purifikace (Internet 9, Internet 10, Rehm 2006).



Obr. 8: Purifikační schéma při iontové výměnné chromatografii.

Materiály používané jako stacionární fáze

Iontoměniče se dělí na anexy s kladně nabitými skupinami (vyměňují anionty) a katexy se záporně nabitými skupinami (vyměňují kationty) (obr. 9).



Obr. 9: Typy používaných iontoměničů.

Přítomnost nabitých skupin je základní vlastností iontoměniče. Typ skupiny rozhoduje o jeho vlastnostech a síle. Existuje široká škála funkčních skupin, které lze použít jako ligand pro iontově výměnnou chromatografii. Základní typy jsou uvedeny v tabulce č. 1 a 2.

Tab. 1: Přehled nejpoužívanějších anexů.

Diethylaminoethyl (DEAE)	$-O - CH_2 - CH_2 - N^+H(CH_2 - CH_3)_2$
Kvartérní aminoethyl (QAE)	$-O - CH_2 - CH_2 - N^+(C_2H_5)_2 - CH_2 - CHOH - CH_3$
Kvartérní amonium (Q)	$-O - CH_2 - CHOH - CH_2 - O - CH_2 - CHOH - CH_2 - N^+(CH_3)_3$

Tab. 2: Přehled nejpoužívanějších katexů.

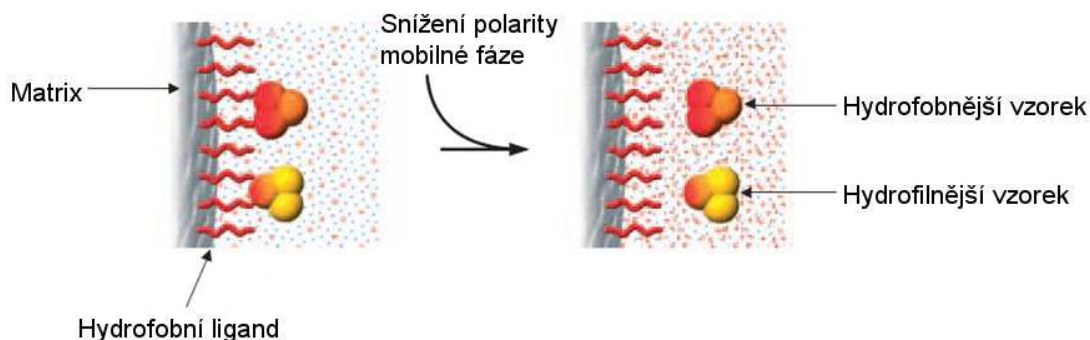
Karboxymethyl (CM)	$-O - CH_2 - COO^-$
Sulfopropyl (SP)	$-O - CH_2 - CHOH - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonát (S)	$-O - CH_2 - CHOH - CH_2 - CH_2 - CHOH - CH_2SO_3^-$

Skupiny obsahující síranový aniont nebo kvartérní dusík se používají jako tzv. silné iontoměniče, ostatní jako tzv. slabé iontoměniče. Pojmy silný a slabý iontoměnič vyjadřují míru ionizace funkčních skupin při určitém rozsahu pH. Nepopisují tedy sílu vazby analytu k ligandu. Silné iontoměniče jsou plně ionizované v širokém spektru hodnot pH (Internet 9, Internet 10, Rehm 2006).

1.3.3. Separace založená na polaritě molekul

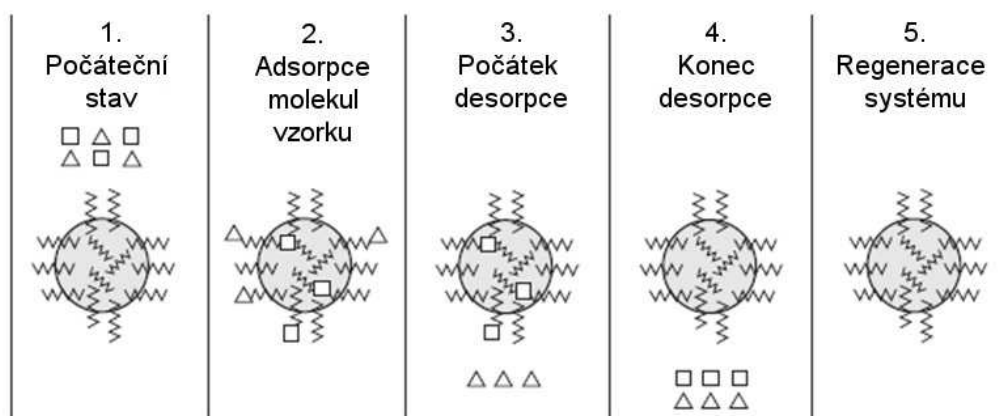
1.3.3.1. Chromatografie na reverzní fázi (RPC)

Separace biomolekul pomocí reverzních fází je založena na hydrofobní interakci mezi analytem obsaženým v mobilní fázi a nepolární stacionární fázi (obr. 10). K vymývání biomolekul, jako jsou proteiny, je obvykle používána gradientová eluce. V prvních fázích separace je jako mobilní fáze použito vodní prostředí. V tomto velmi polárním prostředí se téměř všechny molekuly analytu váží na povrch stacionární fáze. Postupným snižováním polarity mobilní fáze dochází k desorpci molekul vzorku. Nejvíce polární molekuly jsou tedy vymývány jako první.



Obr. 10: Princip vazby hydrofobních molekul k adsorbentu.

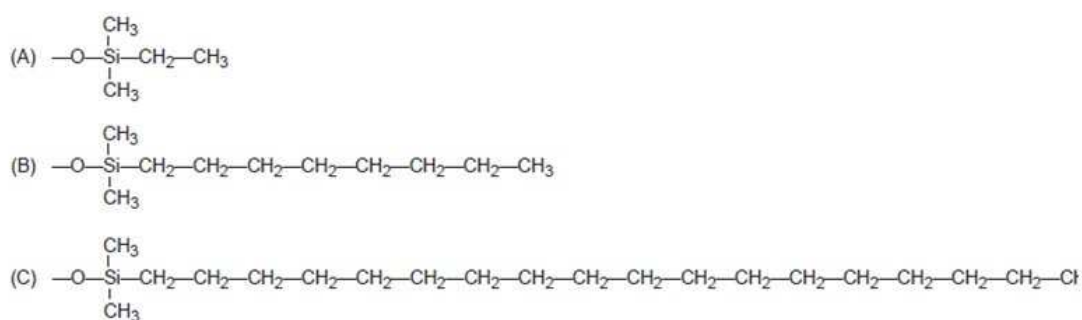
Schéma separace se obvykle skládá z promytí stacionární fáze startovacím pufrém, nanesením vzorku na kolonu, vymytím analytu změnou ve složení mobilní fáze a regenerací systému (obr. 11). Startovací pufr (pufr A) musí být dostatečně nepolární, aby analyt v něm obsažený byl rozpuštěný. Na druhou stranu musí být dostatečně polární, aby se vzorek mohl hydrofobními interakcemi vázat k sorbentu. Vymývání vzorku se děje postupným snižováním polarity mobilní fáze. Děje se tak obvykle lineárním gradientem přidavku pufru B, který je na rozdíl od pufru A nepolární. Mobilní fáze tedy mění složení od 100 % pufru A na počátku separace, až po 100 % pufru B na konci separace (Internet 11, Internet 12).



Obr. 11: Schéma purifikace na reverzní fázi.

Materiály používané jako stacionární fáze

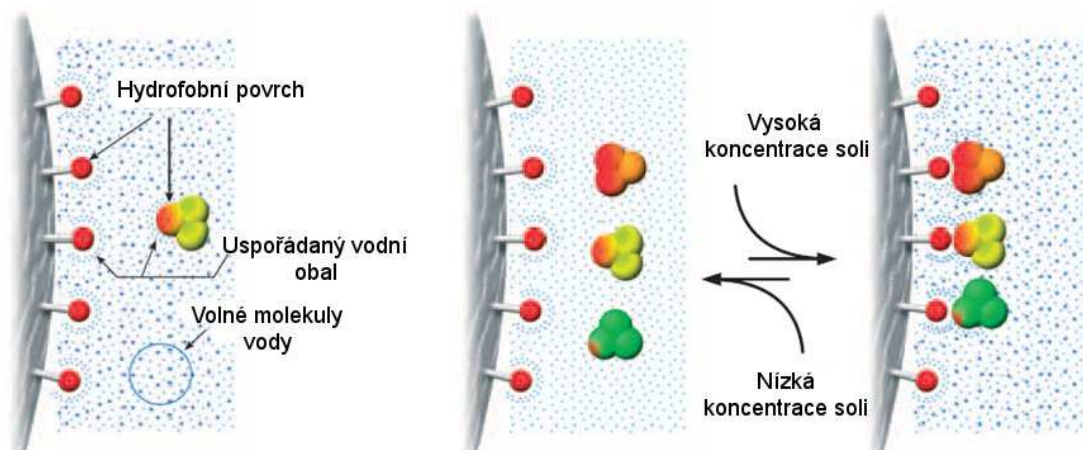
Základní matici obvykle tvoří silikagel, na jehož volné silanolové skupiny jsou navázány dlouhé alkylové řetězce (obr. 12). Syntetické peptidy a oligonukleotidy jsou běžně separovány na více hydrofobních C18 sorbentech. Proteiny a rekombinantně připravené peptidy se vzhledem ke své velikosti a větší hydrofobicitě váží k C18 ligandům příliš silně. Pro jejich separaci se tedy běžně používají C8 sorbenty. Sorbenty o osmi uhlících jsou vůči proteinům méně „devastující“ a při jejich provozu je zapotřebí menší množství mobilní fáze k eluci vzorku (Internet 11, Internet 12).



Obr. 12: N-alkylové řetězce používané jako ligandy.

1.3.3.2. Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)

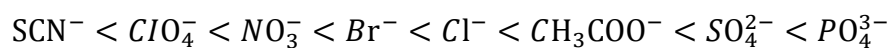
HIC separuje biomolekuly na základě jejich povrchové hydrofobicity. Interakce se odehrává mezi hydrofobními částmi molekul vzorku a hydrofobním povrchem sorbentu. Tato interakce je silně ovlivněna přítomností solí v mobilní fázi. Při jejich vysoké koncentraci se biomolekuly váží silněji, zatímco snižováním koncentrace interakce slábnou (obr. 13).

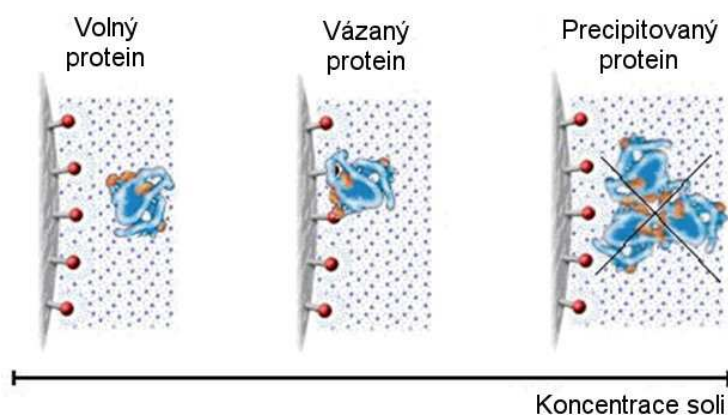


Obr. 13: Princip vazby molekul k ligandům v HIC.

Pokud je protein vložen do vodního prostředí, orientuje se svými hydrofobními částmi dovnitř molekuly. Některé hydrofobní skupiny ale zůstávají na povrchu ve styku s vodním prostředím a nastává tzv. povrchový fenomén. Molekuly vody totiž nejsou schopny smáčet hydrofobní části molekuly. Místo toho vytvoří okolo těchto částí uspořádaný obal, jelikož molekuly vody nejsou schopny tvořit s těmito částmi vodíkové můstky. Přidáním vhodné soli dojde k porušení tohoto vodního obalu a obnažené hydrofobní části proteinu mohou reagovat s jinou hydrofobní skupinou. Hydrofobně interakční separace tedy závisí spíše na povaze molekul vody, nežli na přímé interakci mezi hydrofobními molekulami.

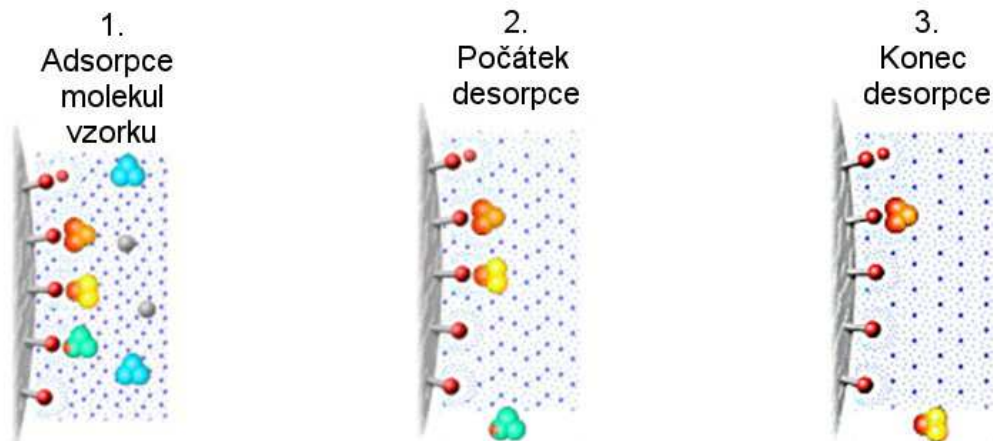
Před započítím separace je kolona promyta puřrem A o vhodné koncentraci solí. Typ a koncentrace soli jsou vybrány tak, aby došlo k navázání řádaného proteinu, ale nedošlo k jeho precipitaci (obr. 14). Tento jev má nežádoucí vliv na selektivitu adsorbentu. Nejefektivnějšími solemi jsou ty, které obsahují multivalentní anion jako síran, fosfát a citrát. Vysolovací schopnost aniontů uvádí tzv. Hofmeisterova řada:





Obr. 14: Vliv koncentrace soli na precipitační schopnost proteinu.

Na kolonu promytou vhodným pufrem je následně nanesen vzorek. Biomolekuly jsou navázány k sorbentu a nečistoty jsou vymyty společně s pufrem A. Eluce obvykle pokračuje lineární změnou gradientu v koncentraci pufru A. Ten je nahrazován pufrem B s nižší koncentrací soli. Molekuly jsou z kolony eluovány ve směru zvyšující se hydrofobicity (obr. 15). Nejvíce hydrofobní molekuly jsou tedy vymyty jako poslední (Internet 11, Internet 13).

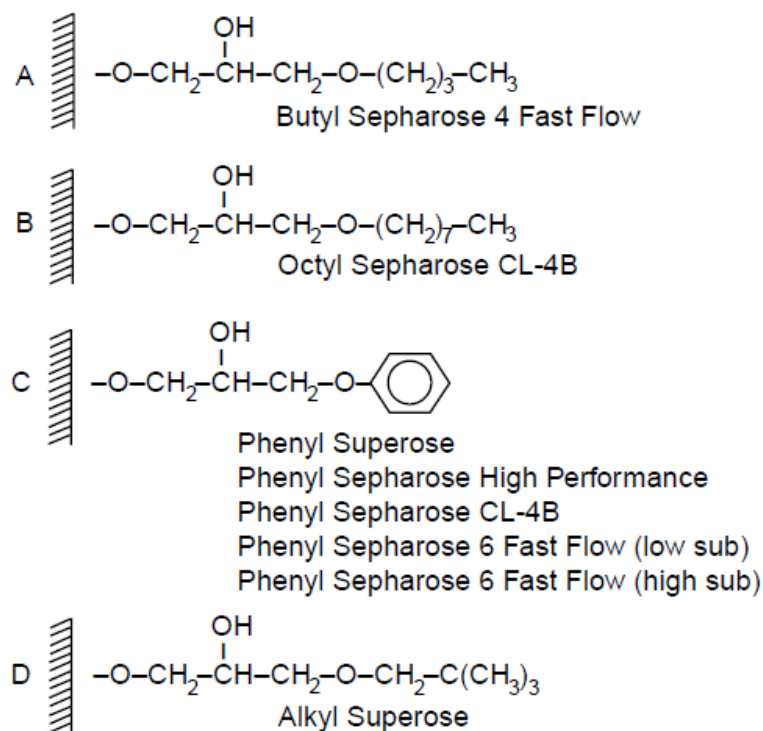


Obr. 15: Fáze separace molekul pomocí snižující se koncentrace soli v mobilní fázi.

Materiály používané jako stacionární fáze

Jako základní matrice se v současnosti nejvíce používá síťovaná agarosa (Sepharosa) nebo syntetické kopolymery. Tyto materiály se vyznačují velkou porozitou a fyzikální i chemickou stabilitou. Z široké škály jejich variací lze vybrat vhodnou matici podle potřeb nutných při separaci žádaného proteinu.

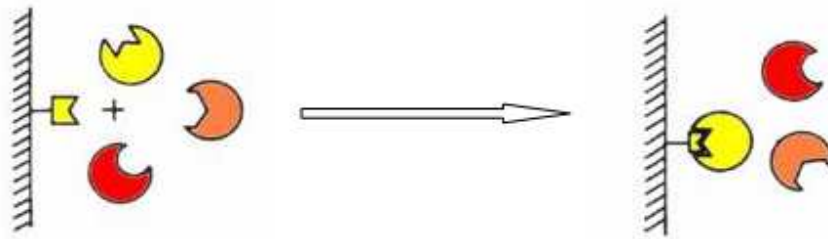
Ligandy vázané na matici se dělí do dvou skupin. Jedním typem jsou krátké alkylové řetězce, které pro adsorpci využívají pouze hydrofobních interakcí. Druhým typem jsou aryl substituované matrice, které využívají jak hydrofobních interakcí, tak i interakcí na aromatickém jádře (obr. 16) (Internet 11, Internet 13).



Obr. 16: Ligandy používané při separacích.

1.3.4. Afinitní chromatografie (AC)

Afinitní chromatografie rozděluje látky na základě reversibilní interakce mezi proteinem a specifickým ligandem navázaným na matici stacionární fáze (obr. 17). Je to jediná separační metoda, která umožňuje purifikaci biomolekul na základě jejich biologické funkce nebo přesné chemické struktury. Umožňuje také oddělit aktivní molekuly od již denaturovaných v předchozích krocích purifikace nebo izolovat protein vyskytující se v nízkých koncentracích z velkých objemů. Tato metoda vykazuje vysokou selektivitu, rozlišení i kapacitu vůči hledanému proteinu.

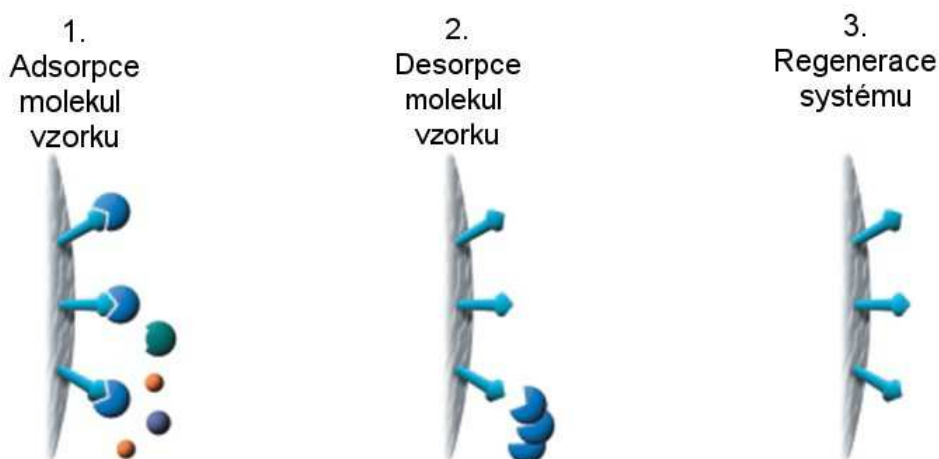


Obr. 17: Princip selektivní vazby proteinu k ligandu.

Úspěšná afinitní chromatografie vyžaduje specifický ligand, který lze kovalentně navázat na matici nosiče. Po navázání si ligand musí zachovat schopnost vázat hledaný protein a po vymytí nečistot musí být tento protein opět uvolněn v aktivní formě. Mezi typické biologické interakce využívané v AC patří vazby:

- enzym – substrát
- antigen – protilátka
- hormon – receptor

Po nanesení vzorku na kolonu, se k ligandu adsorbují pouze žádané molekuly a nečistoty spolu s ostatními makromolekulami jsou odstraněny spolu s postupující mobilní fází. Navázaný protein je následně eluován změnou ve složení mobilní fáze (obr. 18). Může se tak dít přidáním kompetitivního ligandu, který jeví vyšší afinitu vůči separovanému proteinu. Dalšími možnostmi je změna pH, iontové síly a polaritý mobilní fáze.



Obr. 18: Separace biomolekul pomocí specifických ligandů navázaných na matici sorbentu.

Kromě separací na koloně je u afinitní chromatografie také často používána vsádková separace. Přináší výhody ve větší rychlosti separace a v možnosti rychlého zpracování velkých objemů materiálu. Běžná separace touto metodou začíná přidáním adsorbentu do molekulární směsi. Směs je krátkou dobu promíchávána, aby došlo k maximální expozici specifických ligandů navázaných na matici adsorbentu. Poté se adsorbent s navázaným proteinem nechá usadit na dně nádoby. Vzniklý supernatant je od sedimentu následně odfiltrován. Protein je potom vymyt z adsorbentu (Internet 14, Internet 15, Scopes 1994).

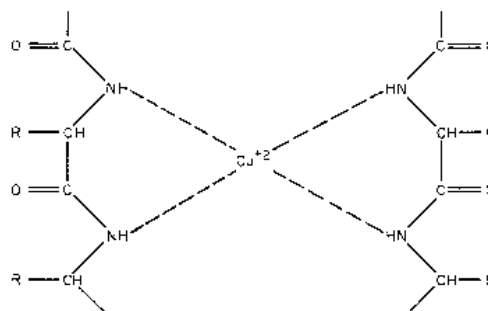
1.4. Stanovení množství bílkoviny ve vzorku

Při purifikaci proteinů je důležité, aby použité metody měly dostatečnou výtěžnost. Důležitým faktorem je míra přečištění vzorku, které lze dosáhnout v průběhu purifikace. Z těchto důvodů je v získaných frakcích potřeba určit koncentraci obsažené bílkoviny (Scopes 1994). V následujícím textu budou uvedeny nejběžněji používané metody k jejich stanovení.

1.4.1. Biuretová reakce

Reakce využívá schopnosti měďnatých iontů (Cu^{2+}) vázat se k peptidové vazbě, která se nachází v proteinech (obr. 19). V zásaditém prostředí se při této reakci vytváří fialové zbarvení, u kterého se měří absorbance při 540 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny podle Lambert-Beerova zákona.

Metoda není široce využívána vzhledem k nízké senzitivitě. Pro důvěryhodnost měření je zapotřebí několika miligramů bílkoviny ve vzorku. Dalším důvodem je nekompatibilita s amonnými solemi, jako je síran amonný. Ionty mědi reagují s amoniovým iontem a zkreslují tak výsledek měření (Scopes 1994, Internet 16).



Obr. 19: Vazba Cu^{2+} iontů na peptidovou vazbu.

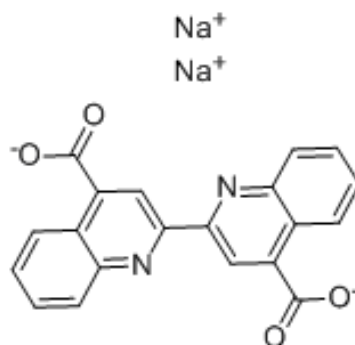
1.4.2. Lowryho metoda

Lowryho metoda je kombinací biuretové reakce (vazba Cu^{2+} na peptidovou vazbu) a oxidace fenolických zbytků aminokyselin (tyrosin, tryptofan) Folin-Ciocalteauovým činidlem. Reakce vede ke vzniku tmavě modrého zbarvení, které je přímo úměrné koncentraci bílkoviny. Citlivost této metody je tím snížena až ke koncentraci 0,1 mg proteinu na ml vzorku. Stejně jako biuretová reakce je ale tato metoda nekompatibilní s mnohými složkami proteinové purifikace jako je síran amonný a je tedy v těchto případech nevhodná (Internet 17, Internet 18, Scopes 1994).

1.4.3. BCA metoda (Smithovo stanovení)

Princip metody je velmi podobný Lowryho metodě. Využívá redukce Cu^{2+} iontu v kombinaci s BCA (bicinchoninovou kyselinou viz obr. 20) místo Folin-Ciocalteauova činidla. I v tomto případě vzniká fialové zbarvení, u něhož je měřena absorbance.

Výhodou této metody je její citlivost, stabilita v alkalických podmínkách a kompatibilita s mnohými detergenty používanými v solubilizačních technikách. Mezi nevýhody patří nutnost inkubace v teple a interference s redukčními činidly jako jsou thioly (Scopes 1994, Internet 19).

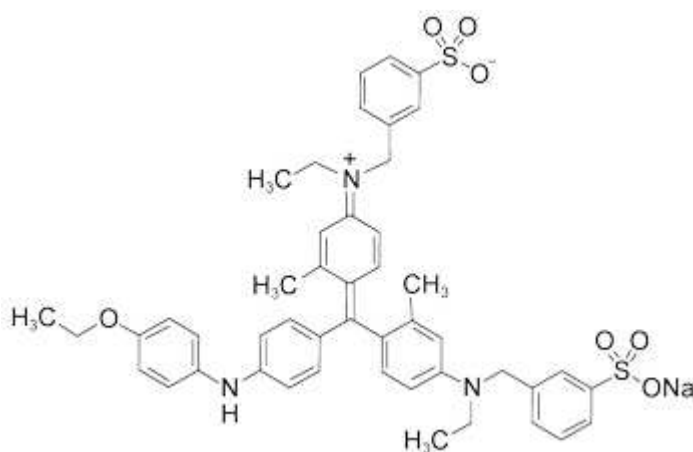


Obr. 20: Sodná sůl BCA.

1.4.4. Bradfordovo stanovení

Stanovení dle Bradforda je založeno na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (obr. 21) k proteinu. V kyselém prostředí vytváří barvivo červené zbarvení, zatímco po navázání na protein se barva mění na modrou. Absorpční maximum modré (navázané) formy se nachází při 595 nm. Stanovení množství bílkoviny ve vzorku se tedy dosáhne změřením absorbance roztoku při 595 nm.

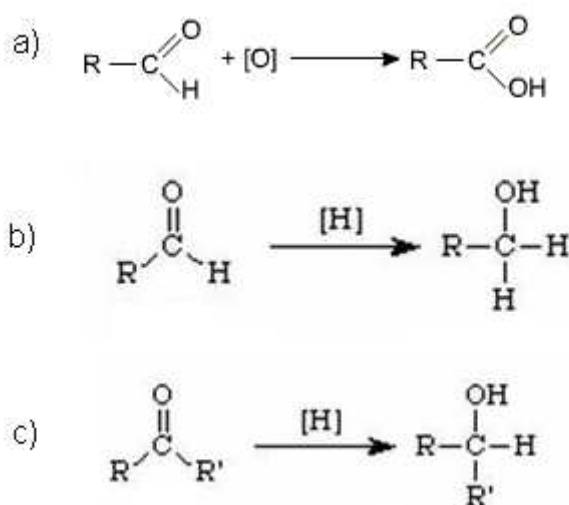
Tato metoda je jednou z nejpoužívanějších. Je jednoduchá, rychlá a citlivější než Lowryho metoda. Detekční minimum se nachází v rozmezí 1-10 $\mu\text{g/ml}$ proteinu. Zároveň je tato metoda méně citlivá k rušivým vlivům běžně užívaných činidel v purifikačních krocích (Scopes 1994, Zor et al. 1996).



Obr. 21: Coomassie Brilliant Blue G-250.

2. KARBONYLREDUKTASY ÚČASTNÍCÍ SE METABOLISMU XENOBIOTIK

Molekuly obsahující karbonylovou skupinu jsou široce zastoupeny jak v přírodě, tak v syntetických látkách a člověk i ostatní živé organismy jsou jim denně vystaveny. Aldehydy, ketony a chinony se vyskytují v potravě, průmyslových zplodinách i mnohých lécích. Zatímco aldehydy mohou být metabolicky přeměněny na karboxylové kyseliny (oxidativní metabolismus) nebo alkoholy (redukční metabolismus), ketony se biotransformují pouze na příslušné alkoholy (obr. 22).



Obr. 22: a) oxidace aldehydu, b) redukce aldehydu, c) redukce ketonu.

Aldehydy jsou chemicky velmi reaktivní a v organismu reagují s nukleofilními centry nukleových kyselin a proteinů. Ketony jsou méně reaktivní a jsou častou složkou používaných léciv (mnohdy jsou hlavní funkční skupinou farmakologického účinku). Metabolity chinonů mají toxický účinek, pokud jsou metabolizovány na příslušné semichinony jednoelektronovým přenosem (tzv. chinony indukovaný oxidativní stres).

Na svou ochranu si organismy vytvořily řadu enzymových systémů k detoxifikaci reaktivních karbonylových sloučenin. Tyto enzymy patří mezi enzymy I. fáze biotransformace. Jsou jimi aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), chinonreduktasy (QR) a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR). Většina enzymů, podílejících se na redukčním metabolismu karbonylových sloučenin, je ovšem v nadrodinách AKR a SDR. Mimo

biotransformace xenobiotik se enzymy těchto nadrodiin účastní i metabolismu endogenních látek jako jsou steroidní hormony, prostaglandiny, neurotransmitery atd.

Tab. 3: Nadrodiny karbonylreduktas a jejich buněčná lokalizace.

Enzymy	Kofaktor	Lokalizace v buňce
MDR	NADH	cytosol
AKR	NAD(P)H	cytosol, Golgiho aparát
SDR	NAD(P)H	cytosol, mikrosomy, mitochondrie
QR	NAD(P)H, RNH	cytosol

Katalytická přeměna karbonylu pomocí karbonylreduktas vyžaduje přítomnost kofaktorů (donorů protonu). Kromě chinonreduktas, které využívají jako kofaktoru dihydronikotinamidribosu (RNH), využívají enzymy nikotinamidadeninukleotid (NADH) nebo nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH).

Karbonylreduktasy jsou přítomny v mnohých tkáních. Nalezneme je v játrech, plicích, mozku, srdci, ledvinách, slezině, varlatech a v krvi. Většina doposud popsaných reduktas se nachází v rozpustné (cytosolické) formě, avšak v nadrodině SDR byly identifikovány i membránově vázaní zástupci.

Jejich obrovské množství a široké tkáňové zastoupení jen zdůrazňuje jejich význam pro metabolismus endogenních i exogenních látek obsahujících karbonylovou skupinu ve své struktuře (Rosemond & Walsh 2004, Matsunaga et al. 2006).

2.1. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

Nadrodina MDR je tvořena například zinek-dependentními alkoholdehydrogenasami (ADH), chinonreduktasami, leukotrien-B4-dehydrogenasami a mnoha dalšími rodinami. V posledních letech došlo k objevení mnoha nových zástupců. K září roku 2007 bylo v databázi UniProt vedeno okolo 11 000 zástupců, z toho 25 bylo lidských.

Nejpočetnější skupinou je rodina ADH. Obsahuje prvního charakterizovaného zástupce z celé nadrodiny, savčí alkoholdehydrogenasu z třídy I. Hraje důležitou roli v metabolismu biologických substancí. Nejlépe prozkoumanou funkcí je ochrana proti

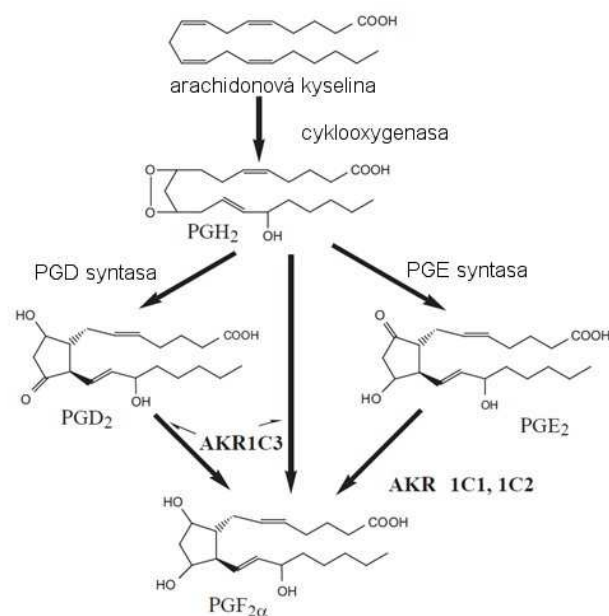
endogenním alkoholům a produktům lipidové peroxidace. Z xenobiotik poté jednotlivé izoenzymy metabolizují především ethanol (Persson et al. 2008, Jelski et al. 2008).

2.2. Aldo-ketoreduktasy (AKR)

Nadrodina AKR je skupina rychle se rozrůstajících NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas, které se účastní metabolismu eobiotik i xenobiotik obsahujících karbonylovou skupinu. Do současné doby bylo identifikováno okolo 160 zástupců, kteří se nacházejí u všech životních forem; od jednobuněčných organismů až po savce, člověka nevyjímaje. Tyto proteiny jsou široce distribuovány ve většině tkání, přičemž v každé buňce je syntetizováno několik typů těchto enzymů.

Na základě vzájemné strukturální podobnosti se nadrodina AKR dělí na 15 rodin. Členové každé rodiny sdílí alespoň 40% podobnost. Savčí aldo-keto reduktasy se dále dělí na tři rodiny, ve kterých nalezneme i 15 doposud identifikovaných lidských zástupců. U většiny těchto enzymů byla pozorována určitá aktivita vůči xenobiotikům. Ve větší míře byla tato aktivita popsána u enzymů AKR1C1, AKR1C4 a AKR1B10.

AKR1C1-C4 jsou NADPH-dependentní monomerní dehydrogenasy. Navzájem sdílejí více než 86% strukturální podobnost. Všichni zástupci této skupiny se nalézají v jaterní tkáni, ale v ostatních tkáních je jejich distribuce rozdílná. Zatímco AKR1C4 se dominantně vyskytuje pouze v játrech, AKR1C2 a C3 jsou přednostně syntetizovány v prostatě a v mléčných žlázách. Z endogenních substrátů byla popsána jejich schopnost metabolizovat steroidy v polohách 3α -, 17β - a 20α -, kde působí jako hydroxysteroiddehydrogenasy nebo přeměna PGH_2 , PGD_2 , PGE_2 na $\text{PGF}_{2\alpha}$ (obr. 23) (Internet 20, Matsunaga et al. 2006, Barski et al. 2009, Novotna et al. 2008).



Obr. 23: Účast enzymů rodiny AKR1C na metabolismu prostaglandinů.

AKR1C enzymy jsou též známy jako dihydrodioldehydrogenasy (DD) podle jejich schopnosti katalyzovat oxidaci trans-dihydrodiolů aromatických uhlovodíků na příslušné katecholy. DD byly prvními popsány enzymy, které se účastní detoxifikace kancerogenních polycyklických aromatických uhlovodíků. Z xenobiotik dále metabolizují např. doxorubicin, daunorubicin, oracin, dolasetron, naloxon, ketotifen, 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), chinony atd. (Barski et al. 2009).

AKR1B10 je enzym, který náleží mezi aldosoreduktasy. Poprvé byl objeven v lidských nádorových buňkách. Ve vysoké koncentraci je přítomen také v tkáni tenkého střeva a nadledvin. Předpokládá se, že jeho fyziologickým substrátem jsou izomery retinalu. Jelikož se vyskytuje také v plicní nádorové tkáni, byly studovány jeho metabolické vlastnosti vůči NNK a protinádorovým léčivům jako je daunorubicin a oracin. Všechny tyto látky byly enzymem AKR1B10 metabolizovány na příslušné alkoholy (Martin et al. 2006).

Zvláštní postavení v nadrodině AKR má **AKR7A2**, jelikož je jediným enzymem nadrodiny, který není v buňce přítomen v solubilizované (cytosolické) formě, nýbrž je vázán na membránu Golgiho aparátu. Katalyzuje NADPH-dependentní redukcí dialdehydu aflatoxinu B1 na nereaktivní mono- a di-alkoholy. U lidské AKR7A2 byl též popsán metabolismus xenobiotických substrátů daunorubicinu a ethakrynové kyseliny (Matsunaga et al. 2006).

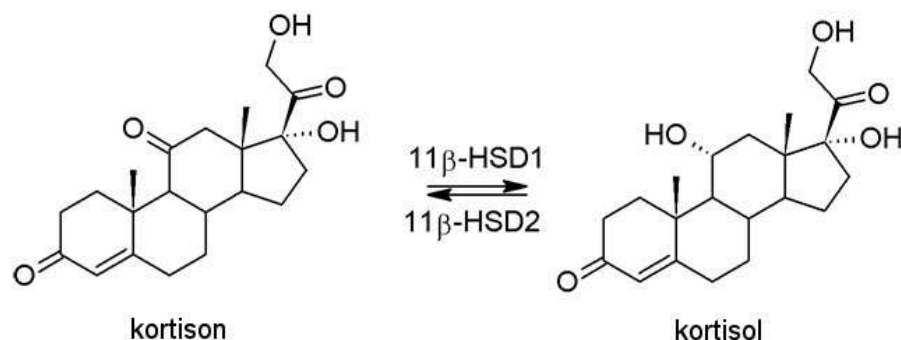
2.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

Nadrodina SDR je jednou z největších skupin enzymů, čítající přes 47 000 zástupců (Kallberg et al. 2010). Ačkoli je aminokyselinové uspořádání jednotlivých enzymů značně odlišné (sdílejí pouze 15-30% podobnost), terciární struktura vykazuje vysokou podobnost v α/β soudku s centrálním β -listem, který určuje vazbu ke kofaktoru. Mezi SDR proteiny patří NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, epimerasy a dehydrogenasy skládající se obvykle z 250 aminokyselin. Mají široké substrátové spektrum od steroidů, alkoholů, cukrů, aromatických látek až po mnohá xenobiotika (Matsunaga et al. 2006).

Vzhledem k rozlehlosti této skupiny a odlišnostem v názvosloví bylo potřeba sjednotit nomenklaturu této nadrodiny. V současnosti se vytváří nové názvosloví, ve kterém je doposud zahrnuto 48 lidských rodin. Název se skládá z označení nadrodiny (SDR), číselného označení rodiny (dosud 1-48), vyjádření typu proteinu (C-clasical, E-extended) a čísla pro určitého zástupce. Například enzym CBR 1 má nyní podle nového názvosloví označení SDR21C1. Toto číslování bylo vybráno na základě úspěšného používání stejného principu v nadrodině AKR (Persson et al. 2009).

Přes ohromné množství zástupců, kteří se nalézají u všech životních forem, u člověka bylo doposud dobře prozkoumáno pouze 14 enzymů. Redukční aktivita vůči xenobiotikům byla přitom podrobněji popsána u enzymů karbonylreduktasa 1 (CBR1), dehydrogenasa/reduktasa člen 4 (DHRS4) a 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD1) (Bray et al. 2009).

Lidská **CBR1 (SDR21C1)** katalyzuje NADPH-dependentní redukci rozličných karbonylových sloučenin, jako jsou para- a ortho-chinony, aromatické ketony, NNK, mnohá léčiva i látky tělu vlastní. Endogenními substráty jsou především prostaglandiny, některé 3-kortikosteroidy a isatin, přičemž isatin vykazuje k CBR1 nejvyšší afinitu (obr. 24). Z léčiv jsou to hlavně daunorubicin, doxorubicin, loxoprofen, metyrapon, haloperidol, bromperidol, timiperon a wortmannin (Matsunaga et al. 2006, Malátková et al. 2010).



Obr. 25: Biotransformace kortisolu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasami.

2.3.1.2. Retinoldehydrogenasy (RDH)

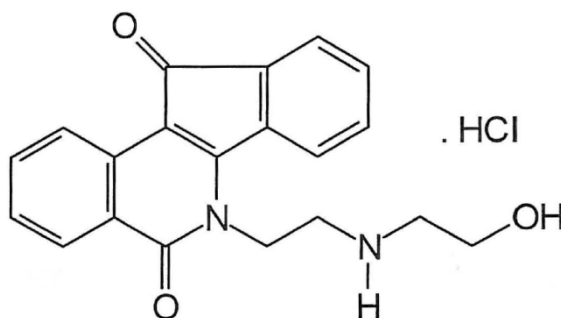
RDH jsou NAD(P)(H)-dependentní enzymy, které se účastní především metabolismu retinolů ve zrakových orgánech. Doposud bylo identifikováno 11 lidských zástupců. Kromě očí se většina enzymů nachází i v jiných tkáních, jako jsou játra, plíce, ledviny atd. Kromě RDH13 se všechny nalézají v membráně hladkého endoplazmatického retikula. RDH jsou schopny katalyzovat oxidační i redukční reakce. Preferovaná reakce probíhá na základě použitého kofaktoru. U pěti skupin RDH ovšem převládá redukční aktivita. U těchto proteinů je potenciál, že se účastní metabolismu xenobiotik, i když u nich taková aktivita nebyla doposud popsána. Jsou jimi RDH11 (SDR7C1), RDH12 (SDR7C2), RDH14 (SDR7C4), retSDR (SDR16C1) a prRDH (SDR28C2). Předpokládá se, že některé z těchto enzymů by se mohly potenciálně podílet na degradaci aldehydických sloučenin a biotransformaci xenobiotik (Liden et al. 2006, Liden et al. 2003, Haeseleer et al. 2002).

2.3.1.3. 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD)

17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy jsou důležitými enzymy v metabolismu pohlavních hormonů. Doposud bylo identifikováno 14 savčích enzymů, z čehož 12 se vyskytuje i u člověka. Kromě 17 β -HSD5 (AKR1C3) náleží do nadrodiny SDR proteinů. Šest enzymů je lokalizováno v membráně endoplazmatického retikula (17 β -HSD 2, 3, 7, 11, 12, 13). Z toho pouze 17 β -HSD 3, 7 a 12 jsou reduktasami. O metabolismu xenobiotik je v této skupině známo jen velmi málo. Bylo ale již popsáno, že některé 17 β -HSD působící oxidačně, se podílejí na metabolismu syntetických pohlavních hormonů, jako je ethinylestradiol nebo 7 α -methyl-19-nortestosteron (Lukacik et al. 2006, Moeller et al. 2009, Prasad et al. 2009).

3. ORACIN

Oracin je syntetickým derivátem isochinolinu. Jeho přesná chemická struktura je 6[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c]isochinolin (obr. 26).



Obr. 26: Strukturální vzorec oracinu.

Představuje nové potenciální cytostatické léčivo pro perorální podání. Na základě chemické struktury lze odvodit jeho mechanismus účinku a to interkalaci do buněčné DNA. To se projevuje inhibicí DNA a RNA syntézy, jejímž vyústěním je pokles proteosyntézy. Citlivost mnohých tumorů k oracinu ovšem nespočívá pouze v tomto jednom mechanismu. Bylo popsáno i několik dalších mechanismů útlumu buněčného růstu. Ty zahrnují inhibici topoisomerasy II, stimulaci aerobní spotřeby glukosy, tvorbu laktátu a indukci buněčné apoptózy.

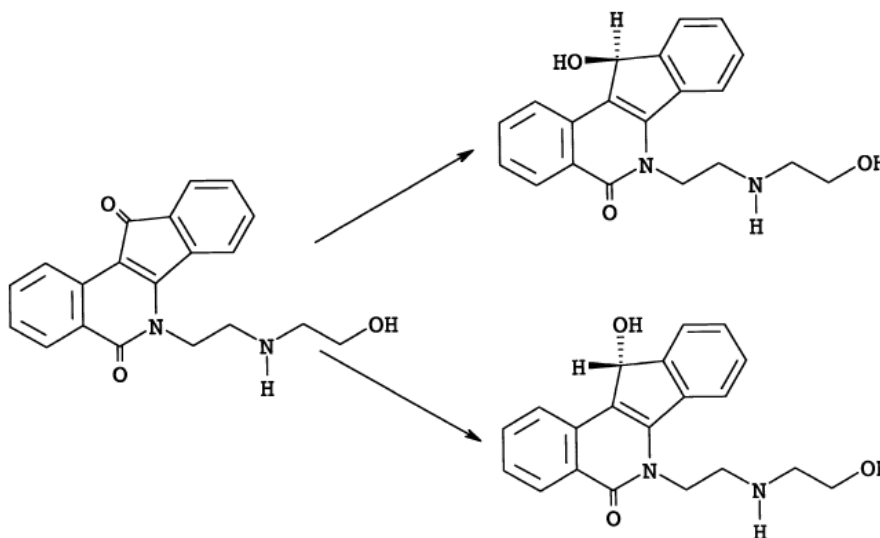
U myši a potkanů byl cytostatický účinek zkoumán na deseti nádorových modelech při perorálním a parenterálním podání. V *in-vitro* testech jevil oracin přímou cytotoxicitu k buňkám pěti typů zvířecích tumorů (ascitická forma sarkomu S37, solidní Ehrlichův karcinom, Gardnerův lymfosarkom, leukemie L1210 a P388) a u zvířat prodlužoval průměrnou dobu přežití. V případě Gardnerova lymfosarkomu, většina zvířat nejevila žádné známky nádorového bujení již po jedné perorální dávce. Na základě těchto výsledků byly provedeny testy s lidskými nádorovými buňkami. Oracin významně snižoval celkovou hmotu rakovinných buněk u ascitické formy sarkomu S37, solidního Ehrlichova karcinomu a HK adenokarcinomu. Avšak Krebsův ascitický tumor a Nemth-Kellerův lymfom na vystavení oracinu nereagovaly.

Mezi hlavní přednosti tohoto cytostatika patří možnost perorálního podání, kombinace několika mechanismů účinku, absence kardiotoxicity, negativní výsledky

v Amesových testech mutagenity, velmi nízká hepatotoxicita a dobrá farmakokinetika (Wsól et al. 2002, Wsól et al. 2004, Melka et al. 1993).

3.1. Mechanismus biotransformace oracinu

Biotransformace oracinu byla studována *in-vitro* i *in-vivo* na zvířecích modelech (myš, potkan, morče, mini-prase, pes, králík) a v lidské jaterní tkáni. Hlavním metabolitem je 11-dihydrooracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c] isochinolin (DHO). Vzhledem k přítomnosti prochirálního centra v molekule oracinu na pozici 11 mohou jeho metabolickou přeměnou vznikat dva enantiomery DHO ((+)-DHO a (-)-DHO) (obr. 27).

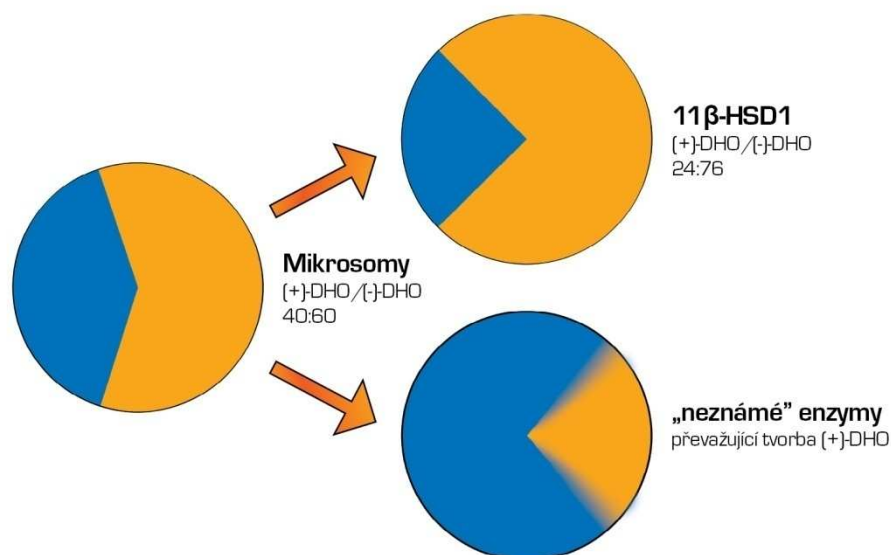


Obr. 27: Biotransformace molekuly oracinu na (+)-DHO a (-)-DHO enantiomery.

Bylo zjištěno, že DHO byl tvořen jak v cytosolických, tak i v mikrosomálních frakcích u všech testovaných druhů. Stereospecifita tvorby jednotlivých enantiomerů závisí na transponovaném druhu (u myší, potkanů, mini-prasat a psů převyšuje tvorba (+)-DHO) a pohlaví. Metabolická přeměna u člověka vede k tvorbě přibližně stejných množství obou enantiomerů (Wsól et al. 2003, Wsól et al. 2004, Melka et al. 1993).

3.1.1. Biotransformace oracinu v lidských jaterních mikrosomech

Do dnešní doby byl v lidských jaterních mikrosomech identifikován pouze jeden enzym, který se podílí na biotransformaci oracinu a to 11β -HSD1 (SDR26C1). Tento enzym redukuje oracin na příslušné enantiomery v poměru 26 % (+)-DHO : 74 % (-)-DHO. Celé jaterní mikrosomy ale mají tento poměr posunut na 40 % (+)-DHO : 60 % (-)-DHO (obr. 28). Tento rozdíl lze vysvětlit přítomností dalšího či dalších membránově vázaných mikrosomálních enzymů, které metabolizují oracin s převahou (+)-DHO enantiomeru (Škarydová et al. 2009).



Obr. 28: Rozdíl stereospecifity redukce oracinu jaterními mikrosomy a enzymem 11β -HSD1.

B. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zavést a optimalizovat nové purifikační schéma, které by vedlo k získání purifikované frakce obsahující novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu. Diplomová práce navazuje a je součástí velkého projektu zabývajícího se purifikací a případně následnou identifikací nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy na základě hypotézy popsané na str. 38. Jednotlivé dílčí cíle této práce jsou:

- Využít již zavedený první purifikační krok, separaci na Q-sepharose a získanou frakci Q2 pro další purifikační kroky.
- Zařadit vhodné separační metody jako druhý eventuálně třetí purifikační krok.
- Otestovat aktivitu získaných frakcí vůči oracinu a u vybraných frakcí také stereospecifitu redukce oracinu.
- Získat purifikovanou frakci obsahující lidskou jaterní mikrosomální karbonylreduktasu v aktivní formě.
- Zhodnotit čistotu získané frakce pomocí elektroforézy SDS-PAGE.
- Vyhodnotit efektivitu navrženého purifikačního schématu.

C. MATERIÁLY A METODY

4. MATERIÁLY

4.1. Biologický materiál

Mikrosomální frakce byly připraveny z lidské jaterní tkáně, která byla získána v rámci dárcovského programu ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Vzorky tkáně byly uskladněny při -80°C.

4.2. Chemikálie

Acetonitril (Merck)

Akrylamid (Sigma-Aldrich)

Amoniak (Lachema)

Bis-akrylamid (Penta)

Bromfenolová modř (Riedel-de Haën)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Penta)

Dihydrooracin (DHO) (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Merck)

D-ribosa (Sigma-Aldrich)

Dusičnan stříbrný (Penta)

Ethanol 96% (Kulich)

Ethylacetát (Kulich)

Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich)

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Sigma-Aldrich)

Glycerol 85% (Kulich)

Hexansulfonát sodný monohydrát (Sigma-Aldrich)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Bio-Rad)

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Penta)

Hydroxid sodný (Penta)

Chloristan sodný (Fluka)

Isobutanol (Sigma-Aldrich)
Kyselina boritá (Lachema)
Kyselina chloristá (Penta)
Kyselina chlorovodíková 99% (Penta)
Kyselina octová 99% (Penta)
Kyselina o-fosforečná 85% (Lachema)
Merkaptoethanol (Kulich)
Methanol (Lachema)
N,N,N',N'- tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
Nikotinamid dinukleotid fosfát (NADP⁺) (Fluka)
Oracin (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii)
Persíran amonný (APS) (Lachema)
Precision plus protein standard, All blue (Bio-Rad)
Síran amonný (Sigma-Aldrich)
Thiosíran sodný (Lachema)
Triethylamin (Fluka)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Penta)
Triton X-100 (Fluka)

4.3. Přístroje a pomůcky

Äkta Purifier (Amersham Biosciences)
Analytické váhy (Scaltec)
Automatické pipety, špičky (Bio-Hit)
Centrifuga Biofuge stratos (Heraeus)
Centrifuga Mini spin plus (Eppendorf)
Elektroforéza MiniProtean (Bio-Rad)
GelDoc XR (Bio-Rad)
HPLC Agilent 1100

Systémové uspořádání: pumpy, odplynovač, autosampler, termostatovaná
komora pro kolonu, fluorescenční detektor

Kádinky

Kolony: HiTrap odsolovací 5 ml (GE-Healthcare)
HiTrap Q-sepharose FF 1 ml (GE-Healthcare)

HiTrap Phenyl-sepharose 6FF 1 ml (GE-Healthcare)
BDS Hypersil C₁₈ 250 mm x 4 mm, 5 μm (Thermo electron corporation)
OD-R Chiracel 240 mm x 4,6 mm (Daicel chemical industries)
Superdex 75 100/300 GL (Amersham Biosciences)

Kývačka Unimax 1010 (Heidolph)

Magnetická míchátko

Mikrostříkačka (Hamilton)

Mikrozkumavky (Eppendorf)

Odměrné válce a baňky

Předvážky (Kern)

Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan)

Termomixér Eppendorf comfort (Eppendorf)

Třepačka IKA MS 3 basic (IKA)

Ultrazvuková vana UC 005 AJ1 (Tesla)

Vakuový koncentrátor Eppendorf 50 301 (Eppendorf)

Zkumavky Amicon Ultra-15 10K (Amicon)

5. METODY

5.1. Příprava subcelulárních jaterních frakcí

Roztoky: 0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4 (0,1 M Na₂HPO₄, 0,1 M NaH₂PO₄)

Čtyři gramy lidské jaterní tkáně byly homogenizovány v trojnásobném množství pufru za použití homogenizátoru podle Pottera a Elvejema. Homogenát byl podroben centrifugaci po dobu 20 minut při 5 000 g. Tím byly odstraněny zbytky tkáně, jádra a buněčné membrány. Odebraný supernatant byl podroben druhé centrifugaci při 20 000 g na 60 minut, čímž došlo k sedimentaci mitochondrií. Supernatant po tomto kroku byl podroben třetímu centrifugačnímu kroku při 105 000 g na 65 minut. Tímto došlo k oddělení mikrosomů od cytosolu. Pro zajištění úplného odstranění cytosolu byl získaný supernatant ještě třikrát resuspendován v homogenizačním pufru a třikrát centrifugován při 105 000 g po dobu 65 minut. Po posledním centrifugačním kroku byly mikrosomy resuspendovány v fosfátovém pufru s přídavkem 20% (v/v) glycerolu a takto byly uloženy v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

Mikrosomy byly připraveny na Katedře biochemických věd před započatím této práce.

5.2. Purifikace mikrosomálních frakcí

Všechny purifikační kroky byly prováděny na nízkotlakém chromatografu Äkta Purifier při teplotě 4°C a vzorky byly uchovávány na ledu.

5.2.1. Solubilizace mikrosomů

Roztoky: solubilizační pufr (10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 40% (v/v) glycerol, 1% (w/v) Triton X-100)

K čtyřem mililitrům mikrosomální suspenze bylo přidáno stejné množství solubilizačního pufru. Získaná suspenze byla na ledu míchána po dobu 45 minut. Poté byl vzorek centrifugován na 38 000 rpm po dobu 1 hodiny. Vzniklý supernatant (solubilizované mikrosomy) byl odebrán a následně odsolen.

5.2.2. Odsolování mikrosomů

Roztoky: pufr A, pH 8,0 (20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) Triton X-100)

Odsolení bylo provedeno na HiTrap Desalting 5 ml koloně. K eluci byl použit pufr A. Pro detekci oddělování bílkovin od solí byla sledována absorbance při 280 nm a vodivost.

5.2.3. Zakoncentrování odsolených mikrosomů

Vzorek, získaný z předchozího kroku, byl zakoncentrován za použití zkumavek Amicon Ultra-15 10K a centrifugován při 5 000 g po dobu 20 minut při teplotě 4°C.

5.2.4. Separace na Q-sepharose

Roztoky: pufr A, pH 8,0 (20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) Triton X-100)

pufr B, pH 8,0 (20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) Triton X-100, 1 M NaCl)

Odsolené zakoncentrované mikrosomy byly nadávkovány pomocí mikrostríkačky Hamilton na iontově výměnnou kolonu HiTrap Q-Sepharose FF 1 ml. Byla provedena gradientová eluce pomocí pufrů A a B, přičemž bylo použito stoupajícího gradientu pufru B od 0-100 %. U všech získaných frakcí byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu, stereospecifita redukce oracinu na dihydrooracin a množství bílkoviny.

5.2.5. Separace na Phenyl HP-sepharose

Roztoky: pufr C, pH 8,0 (20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glycerol, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

pufr D, pH 8,0 (20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glycerol)

Vybraná frakce Q2 po separaci na Q-sepharose byla podrobena dalšímu purifikačnímu kroku na HiTrap Phenyl-sepharose 6FF koloně o objemu 1 ml. Před započítáním separace byl vzorek upraven přidávkem síranu amonného tak, aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku byla 1 M. Eluce začala s pufrům C (0-5 ml). Postupným přidáváním pufru D do složení mobilní fáze, docházelo ke snížení koncentrace síranu amonného až k jeho nulové koncentraci (6-20 ml). Eluce byla ukončena za použití 100 % pufru D (21-30 ml). U všech získaných frakcí byla

stanovena redukční aktivita vůči oracinu, stereospecifita redukce oracinu na dihydrooracin a množství bílkoviny.

5.2.6. Zakoncentrování frakce po Phenyl-sepharose

Vzorek, získaný z předchozího kroku, byl zakoncentrován na 250 μ l za použití zkumavek Amicon Ultra-15 10K. Frakce byla centrifugována při 10 000 otáčkách po dobu 10 minut při teplotě 4°C.

5.2.7. Gelová permeační chromatografie

Roztoky: mobilní fáze, pH 7,4 (20 mM Na₂HPO₄, 0,15 M NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (v/v) Triton X-100)

Pro oddělení proteinů o přibližné hmotnosti 37 kDa byla vybraná frakce podrobena separaci na gelové koloně Superdex 75 100/300 GL. Na kolonu bylo nanášeno 250 μ l vzorku a byla provedena isokratická eluce mobilní fází. U takto získaných frakcí byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu, stereospecifita redukce oracinu na dihydrooracin a zjištěno množství bílkoviny.

5.3. Stanovení redukční aktivity

5.3.1. Inkubace vzorků s oracinem

Roztoky: NADPH-regenerační systém (0,8 mM NADP⁺, 6 mM glukosa-6-fosfát, 35 jednotek glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3 mM MgCl₂)

0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4 (0,1M Na₂HPO₄, 0,1M NaH₂PO₄)

5 mM roztok oracinu

25% NH₃

ethylacetát

Stanovení probíhalo v mikrozkuvkách Eppendor při 37°C v celkovém objemu 100 μ l za použití termomixéru. K 50 μ l vzorku bylo přidáno 20 μ l fosfátového pufru a 20 μ l NADPH-regeneračního systému. Vzorek se nechal 5 minut preinkubovat při 37°C. Inkubace byla odstartována přidáním 10 μ l oracinu. Po 30 minutách byla reakce ukončena přidáním 40 μ l amoniaku a uložením vzorku do ledu. Následně bylo k vzorku přidáno 300 μ l ethylacetátu a redukovaný DHO byl po dobu 10 sekund vytřepáván do

organického rozpouštědla. Vzorčky byly centrifugovány při 13 000 otáčkách na 2 minuty, aby došlo k oddělení nečistot. Organická vrstva byla poté odebrána do nových mikrozkušavek Eppendorf. Vytřepávání do ethylacetátu se takto opakovalo třikrát. Spojený výtřepok byl odpařen do sucha pomocí vakuové odparky. Pro stanovení neenzymatické přeměny substrátu byla provedena inkubace stejným způsobem, pouze bez biologického materiálu.

5.3.2. Stanovení kinetiky enzymu

Roztoky: NADPH-regenerační systém (0,8 mM NADP⁺, 6 mM glukosa-6-fosfát, 35 jednotek glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 3 mM MgCl₂)
0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4 (smíchaný z Na₂HPO₄ a NaH₂PO₄)
0,5-8,0 mM roztok oracinu
25% NH₃
ethylacetát

Stanovení probíhalo za stejných podmínek jako v 2.3.1. Vzorčky byly v tripletech inkubovány s roztoky oracinu v rozsahu koncentrací 0,5-8 mM. Konstanty enzymové kinetiky byly vypočítány za pomoci programu GraphPad Prism 5.0.

5.3.3. HPLC stanovení metabolitů

5.3.3.1. Achirální analýza

Roztoky: mobilní fáze A (10 mM hexansulfonát sodný, 0,04 mM triethylamin, pH 3,25 + acetonitril v poměru 75:25)
standardní roztok DHO

Celkové množství redukováného DHO po metabolické přeměně bylo stanoveno pomocí HPLC systému Agilent 1100. Vzorčky byly rozpuštěny v 250 µl mobilní fáze A a nanášeny na kolonu BDS Hypersil C₁₈ 250 mm x 4 mm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,5 ml/min. DHO byl detekován pomocí fluorescenčního detektoru při vlnových délkách excitace/emise 340/418 nm. Retenční čas DHO byl stanoven na základě srovnání s retenčním časem standardu DHO.

5.3.3.2. Chirální analýza

Roztoky: mobilní fáze B (0,3 M chloristan sodný, pH 3,0 + acetonitril v poměru 69:31)

standardní roztok DHO

Analýza probíhala za stejného přístrojového uspořádání jako v 2.3.3.1 za použití mobilní fáze B a kolony OD-R Chiracel 240 mm x 4,6 mm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Retenční časy (+) a (-) enantiomerů DHO byly rovněž určeny na základě analýzy standardu DHO za stejných podmínek.

5.4. Stanovení množství bílkoviny

5.4.1. Stanovení dle Bradforda

Roztoky: 5,5 M roztok síranu amonného

Bradfordovo činidlo (0,12 mM CBBG, 5% (v/v) etanol, 10% (v/v) kyselina fosforečná)

Pro určení množství bílkoviny obsažené ve vzorcích po separaci Phenyl-sepharose byla vybrána linearizovaná metoda dle Bradforda (Zor et al. 1996). Tato metoda byla optimalizována pro naše potřeby. Jelikož množství síranu amonného obsaženého ve vzorcích ovlivňuje hodnoty naměřené touto metodou, bylo nutné ve všech vzorcích tyto koncentrace sjednotit. Pro tento účel byly testovány dvě strategie. Při první bylo ke každému vzorku přidáno předem vypočítané množství 5,5 M roztoku síranu amonného. V druhém případě byla ke vzorkům přidána potřebná navážka základní látky. V obou případech byla výsledná koncentrace síranu amonného ve vzorcích 1 M. K vyhodnocení byly sestaveny kalibrační přímky v rozmezí 1-50 µg/ml BSA pro nízké koncentrace a 100-800 µg/ml BSA pro vysoké koncentrace.

Stanovení probíhalo v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Do každé jamky bylo dáno 10 µl vzorku a 240 µl Bradfordova činidla. Po desetiminutové inkubaci byla u vzorků změřena absorbance v přístroji spektrofotometr Infinite M200 při vlnových délkách 590 nm a 460 nm. Výsledné hodnoty jsou udávány jako poměr absorbancí při 590/460 nm.

5.4.2. BCA metoda (Smithovo stanovení)

Roztoky: roztok A (BCA)

roztok B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

BCA činidlo (roztok A + roztok B v poměru 50:1)

Obsah proteinů ve frakcích po Q-sepharose byl změřen pomocí BCA kitu od firmy Sigma-Aldrich. Stanovení probíhalo v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. K 10 μl vzorku bylo přidáno 200 μl BCA činidla. Po patnáctiminutové inkubaci při 60°C byla u vzorků měřena absorbance při 592 nm.

5.5. SDS elektroforéza

5.5.1. Příprava gelu

Roztoky: 30% akrylamid (AA) + 0,8% bisakrylamid (bis-AA)

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

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

10% SDS

10% APS

TEMED

Isobutanol

Gely: Gely byly odlity do elektroforetických skel 1,5 mm

Elektroforetická skla a hřeben byly umyty jarovou vodou a opláchnuty destilovanou vodou a lihomethanolem. Po oschnutí byla skla spojena sponami a postavena na gumovou podložku stojanu. Mezi skla byl nalit separační gel do $\frac{3}{4}$ jejich výšky. Následně byl převrstven tenkou vrstvou isobutanolu. Separační gel se nechal polymerovat po dobu minimálně 45 minut. Po uplynutí této doby byl isobutanol slit a separační gel byl převrstven zaostřovacím gelem až po okraj skel. Do zaostřovacího gelu byl zasunut hřeben a gel se nechal polymerovat minimálně 1,5 hodiny. Po vyjmutí hřebenu byly jamky omyty destilovanou vodou a gel byl připraven na elektroforézu.

5.5.2. Příprava vzorků

Roztoky: 5x koncentrovaný vzorkový pufr (150 mM Tris-HCl, 6% (w/v) SDS, 18% (w/v) glycerol, 3% (w/v) 2-mercaptoetanol, 0,012% (w/v) bromfenolová modř)

Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem v poměru 4:1 v mikrozkušavkách Eppendorf. Následně byly zahřáty na 95°C v termomixéru po dobu 3 minut.

5.5.3. Vlastní elektroforéza

Roztoky: 5x koncentrovaný elektroodový pufr, pH 8,3 (960 mM glycin, 124mM Tris-HCl, 0,5% (w/v) SDS)
elektroodový pufr (5x koncentrovaný elektroodový pufr s vodou v poměru 1:4)

Elektroforetická cela byla očištěna a její gumové těsnění bylo potřeno malým množstvím škrobového mazu. Do stojánků byla usazena skla s gely a cela byla umístěna do nádoby s ledem. Do jamek byly nanесeny vzorky připravené v předchozím kroku. Do jedné z krajních jamek bylo přidáno 5 µl molekulárního standardu Precision Plus. Jamky i elektroodová cela byly doplněny elektroodovým pufrem tak, aby vnitřní sklo bylo celé ponořené v pufru. Do vnější vaničky elektroodové cely byl nalit zbylý elektroodový pufr. Cela byla přiklopena víčkem a připojena ke zdroji konstantního napětí. Pro zaostřovací gel bylo nastaveno napětí 100 V po dobu cca 10-15 minut. Pro separační gel bylo poté napětí zvýšeno na 200 V. Když čelo pohybující se fáze dosáhlo konce gelu, zdroj napětí byl odpojen a skla s gely byla vyjmuta z elektroforetické cely.

5.5.4. Barvení stříbrem-Sweet silver stain

Roztoky: fixační roztok (30% (v/v) etanol, 10% (v/v) kyselina octová)
senzitizační roztok (8 mM thiosíran sodný)
stříbřící roztok (12 mM dusičnan stříbrný)
vývojka (2% (w/v) ribosa, 100 mM kyselina boritá, 300 mM NaOH, 50 µM thiosíran sodný)
stop roztok (330 mM Tris, 2% (v/v) kyselina octová)

Gely byly vyjmuty ze skel a vloženy do uzavíratelné nádoby. Byl k nim přidán fixační roztok a nádobka byla přes noc ponechána na kývačce. Druhý den byly gely

opláchnuty destilovanou vodou po dobu 4x10 minut. Následovala jednodominutová senzitivace pomocí senzitivizačního roztoku a opětovné opláchnutí vodou. Poté byly gely 20-30 minut stříbřeny a následně rychle opláchnuty. Dále byla na půl hodiny přidána vývojka a na konec bylo barvení ukončeno přidáním stop roztoku (Chevallet et al. 2008).

Gely byly vyfoceny pomocí přístroje GelDoc XR.

D. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Byly provedeny tři série testů s lidskými jaterními mikrosomy, které byly označeny jako purifikace A, B a C. Jaterní tkáň pro experimenty byla získána od dvou různých jedinců. Purifikace A a B byla provedena s tkání od dárce č. 1 a purifikace C s tkání od dárce č. 2. Vzhledem k podobnosti získaných výsledků z purifikací A a B zde budou uvedeny pouze výsledky z jedné analýzy.

6. PURIFIKACE B

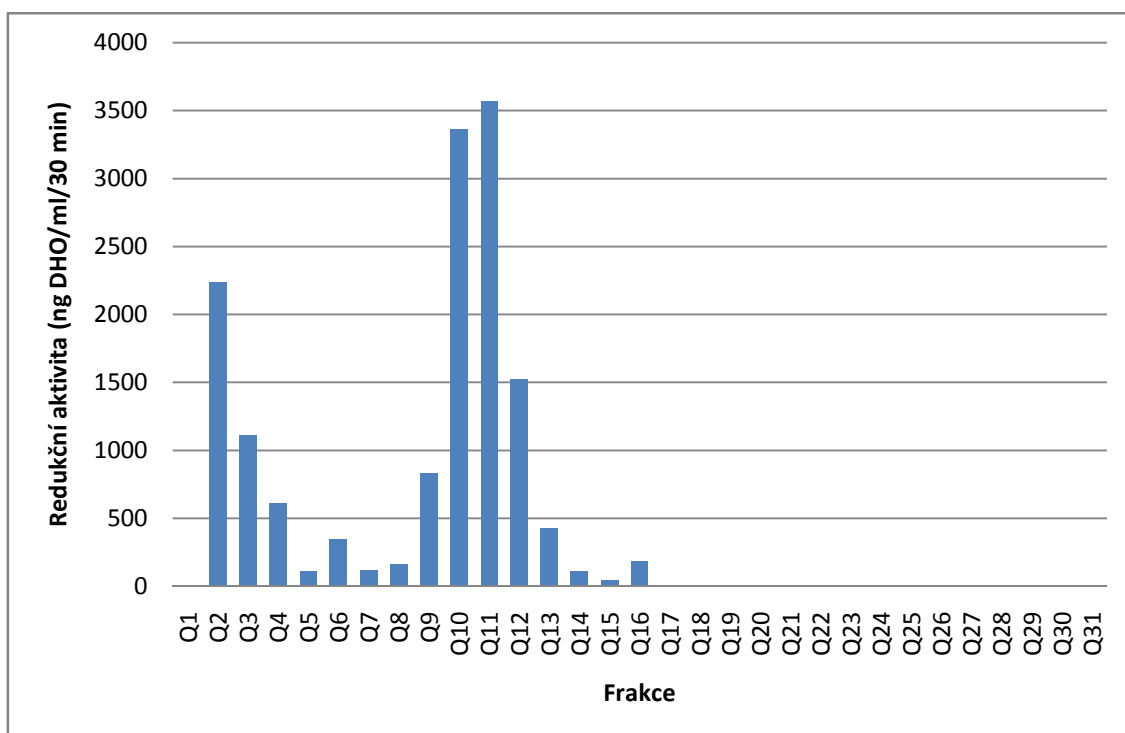
6.1. Analýza vzorků po separaci na Q-sepharose

Separace na Q-sepharose byla provedena na Katedře biochemických věd před započítím této práce.

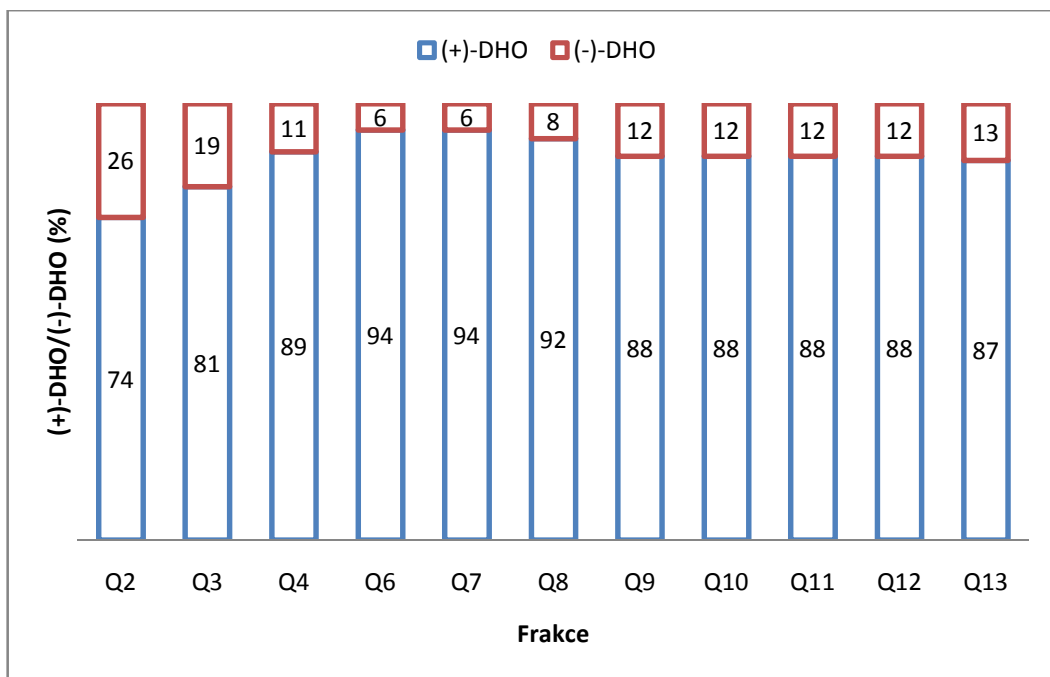
Odsolené koncentrované mikrosomy byly podrobeny separaci na Q-sepharose za pomoci přístroje Äkta Purifier. Ve všech získaných frakcích byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu. U frakcí s významnější redukční aktivitou byla určena stereospecifita redukce oracinu a zároveň bylo u vybraných frakcí zjištěno množství bílkoviny metodou BCA.

Tab. 4: Redukční aktivita vůči oracinu, stereospecifita redukce a množství bílkoviny ve vybraných frakcích získaných po separaci na Q-sepharose.

Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku	Stereospecifita tvorby (+)/(-) DHO (%)	Množství bílkoviny (μg/ml)
Q1	5,33	0,03	-	-
Q2	2235,18	12,33	74/26	2673,6
Q3	1113,22	6,14	81/19	1325,6
Q4	612,54	3,38	89/11	254,8
Q5	108,81	0,60	-	64,8
Q6	342,47	1,89	94/6	24,8
Q7	118,97	0,66	94/6	80,8
Q8	165,38	0,91	92/8	396,8
Q9	833,96	4,60	88/12	93,6
Q10	3359,56	18,54	88/12	75,6
Q11	3565,64	19,68	88/12	234,8
Q12	1523,89	8,41	88/12	462,8
Q13	428,34	2,36	87/13	624,8
Q14	114,69	0,63	-	758,8
Q15	42,21	0,23	-	527,6
Q16	187,24	1,03	-	437,6



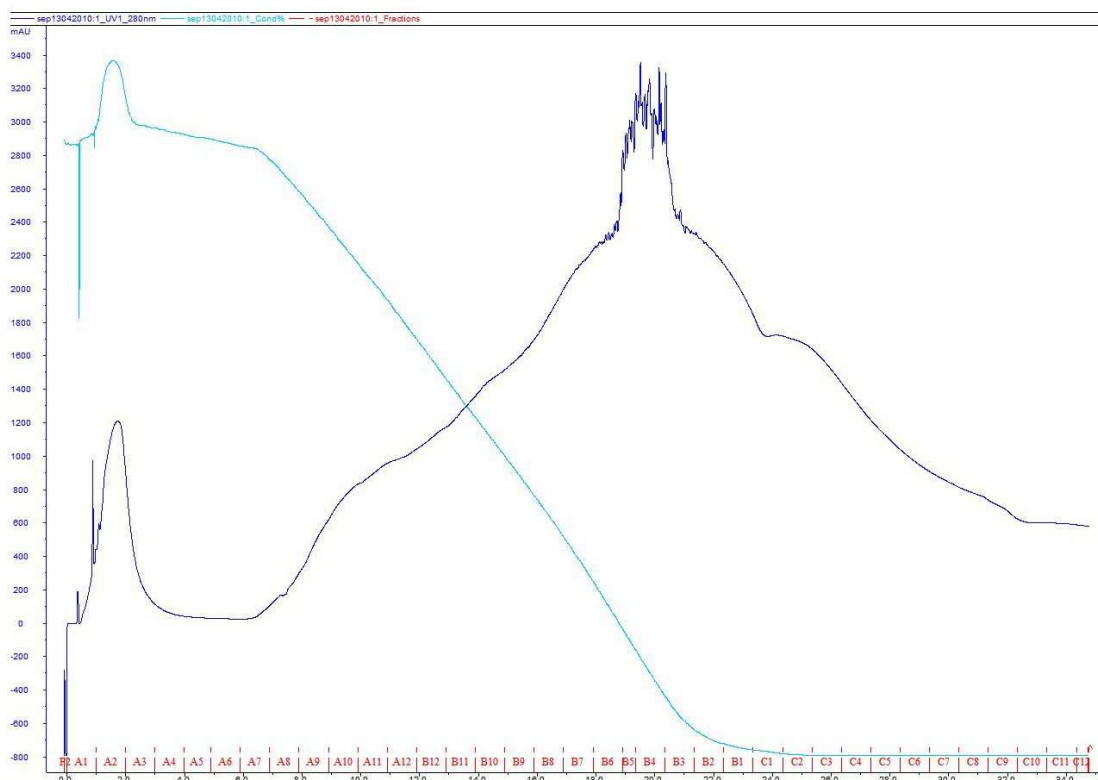
Obr. 29: Graficky vyjádřené rozložení redukčních aktivit vůči oracinu v jednotlivých frakcích získaných po separaci na Q-sepharose.



Obr. 30: Grafické znázornění stereospecifity redukce oracinalu vybraných frakcí po separaci na Q-sepharose.

6.2. Analýza vzorků po separaci na Phenyl-sepharose

Purifikaci na Phenyl-sepharose byla podrobena frakce Q2, která byla získána při separaci na Q-sepharose. Purifikace proběhla na přístroji Äkta Purifier. Takto bylo připraveno 36 frakcí. U všech frakcí byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu a určeno množství bílkoviny. Stereospecifita vzniku DHO enantiomerů byla provedena u vybraných frakcí.



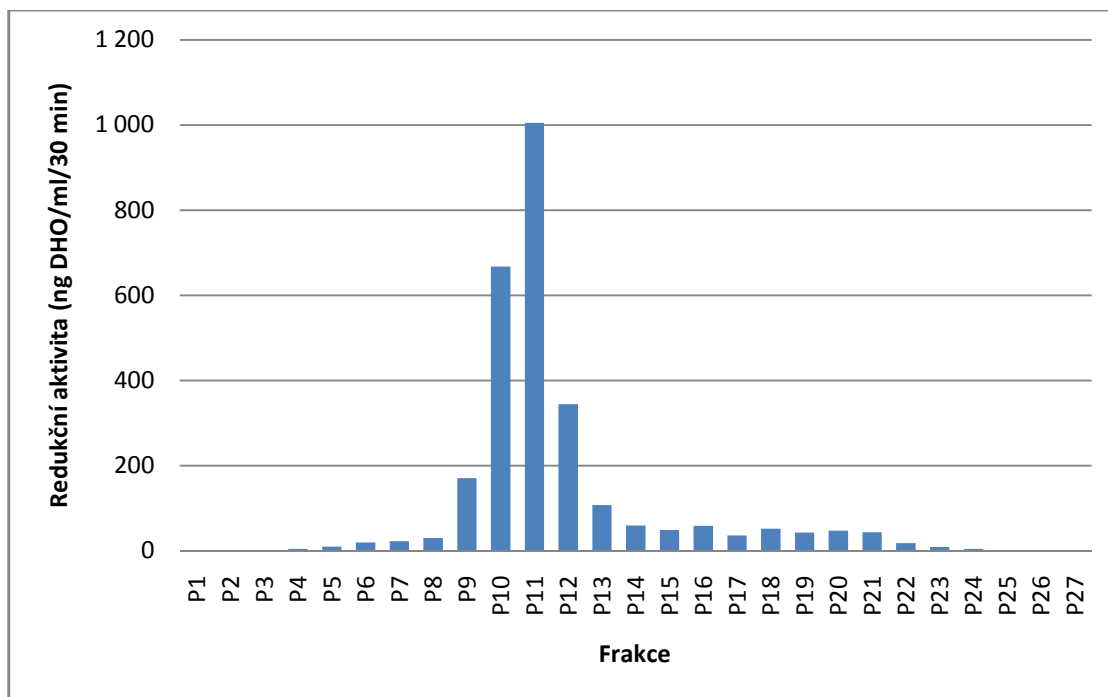
Obr. 31: Záznam purifikace frakce Q2 z Q-sepharosy na Phenyl-sepharose za použití přístroje Äkta Purifier.

- Absorbance průběhu separace frakce Q2
- Konduktivita průběhu separace frakce Q2

6.2.1. Stanovení redukční aktivity frakcí po separaci na Phenyl-sepharose

Tab. 5: Redukční aktivita vůči oracinu u frakcí získaných po separaci na Phenyl-sepharose.

Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku	Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku
P1	-	-	P19	42,86	1,61%
P2	0,23	0,01%	P20	47,24	1,77%
P3	-	-	P21	43,56	1,63%
P4	4,83	0,18%	P22	18,36	0,69%
P5	9,85	0,37%	P23	9,27	0,35%
P6	19,41	0,73%	P24	4,62	0,17%
P7	23,07	0,87%	P25	0,98	0,04%
P8	30,20	1,13%	P26	-	-
P9	171,19	6,42%	P27	-	-
P10	667,57	25,05%	P28	-	-
P11	1 005,43	37,73%	P29	2,66	0,10%
P12	344,41	12,92%	P30		-
P13	108,09	4,06%	P31	2,42	0,09%
P14	59,38	2,23%	P32	1,00	0,04%
P15	48,77	1,83%	P33	-	-
P16	58,58	2,20%	P34	2,52	0,09%
P17	36,06	1,35%	P35	-	-
P18	51,84	1,95%	P36	0,97	0,04%

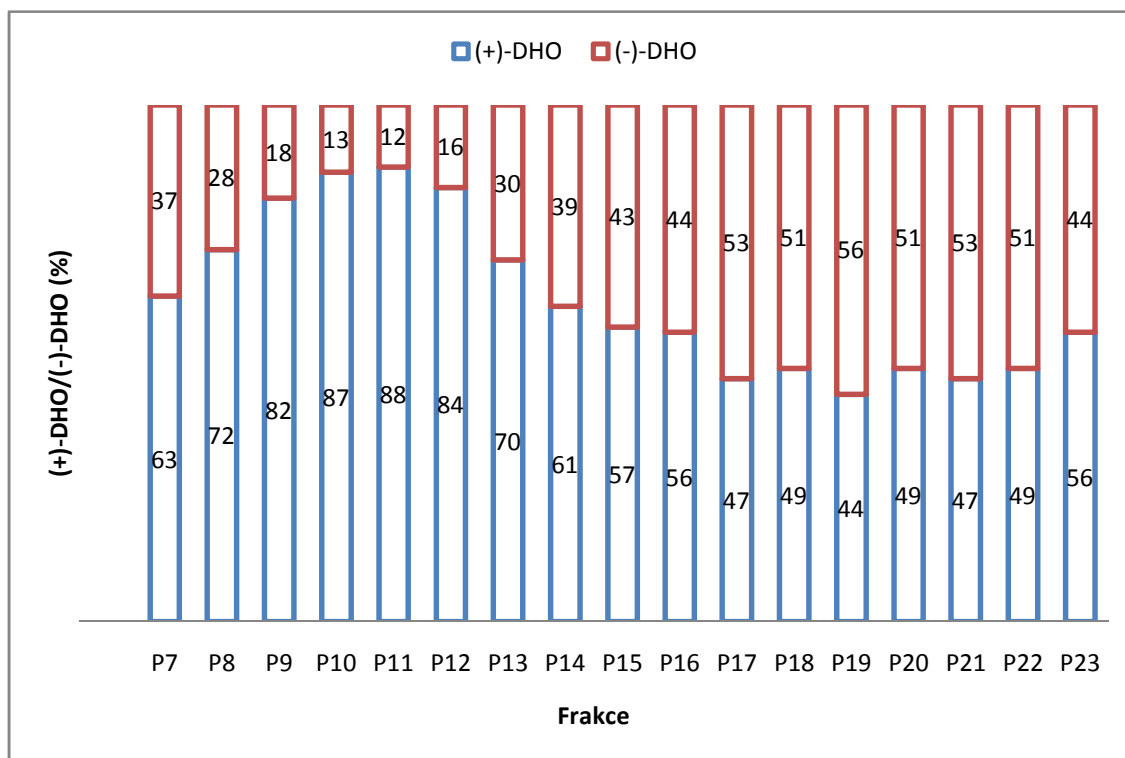


Obr. 32: Znázornění míry redukce oracinu na DHO ve frakcích získaných po separaci na Phenyl-sepharose.

Největší redukční aktivitu vůči oracinu jevila frakce P11. Hlavní pozornost tedy byla zaměřena na určení jejích parametrů (stereospecifita tvorby (+)/(-)-DHO enantiomerů, kinetika redukce oracinu na DHO a množství bílkoviny v daných frakcích).

6.2.2. Stanovení stereospecifity redukce vzorků po separaci na Phenyl-sepharose

Analýza stereospecifity byla provedena pouze u některých frakcí. Tyto frakce byly vybrány na základě jejich celkové schopnosti redukovat oracin za vzniku DHO.



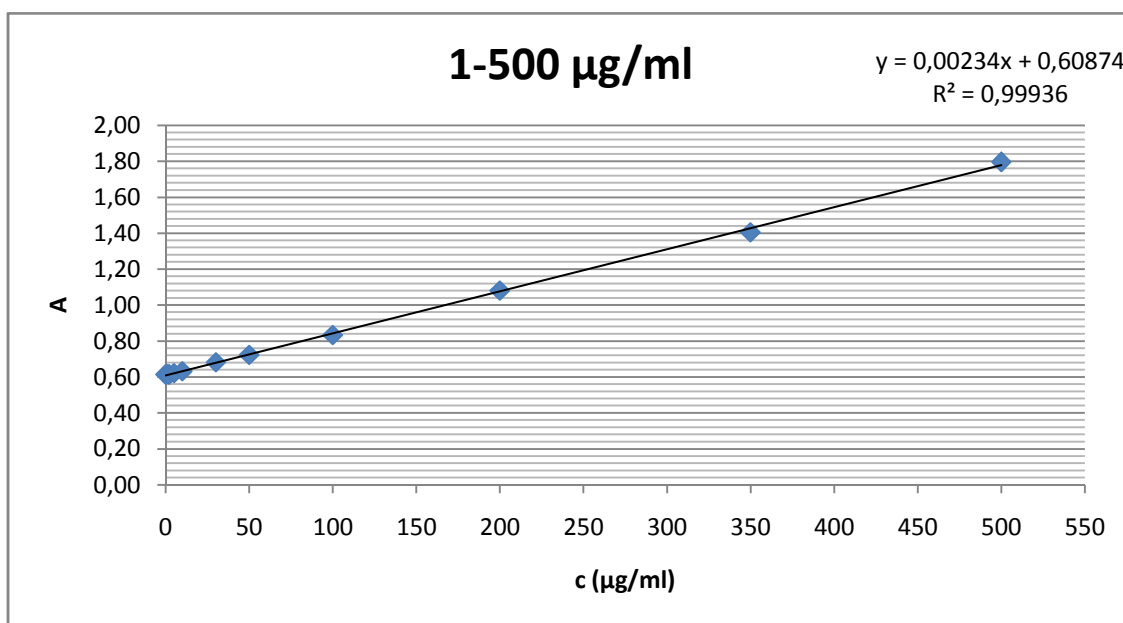
Obr. 33: Podíl vzniklých (+)-DHO/(-)-DHO enantiomerů po redukci oracinu v jednotlivých frakcích získaných separací na Phenyl-sepharose.

Frakce P11 má svou stereospecifitu výrazně posunutou k (+)-DHO enantiomeru. Je tedy velmi pravděpodobné, že je v této frakci přítomen enzym(y) odlišný od 11 β -HSD 1.

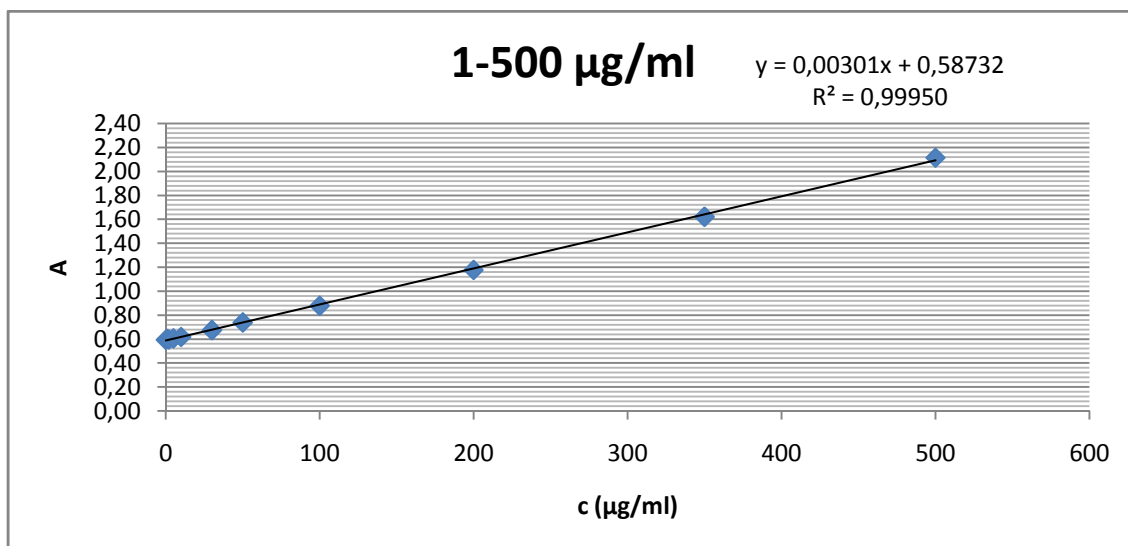
6.2.3. Stanovení koncentrace proteinů ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose

Množství bílkoviny ve vzorcích bylo určeno modifikovanou metodou dle Bradforda (Zor et al. 1996). Hodnoty naměřené touto metodou jsou ale ovlivňovány i koncentrací solí ve vzorku. Byly proto sestrojeny dva typy kalibrační křivky pro zpřesnění odečítání výsledků. V první byla koncentrace síranu amonného 1 M, ve druhé byla koncentrace síranu amonného 0 M. V obou činilo rozmezí koncentrací 0-50 $\mu\text{g/ml}$ BSA a 100-500 $\mu\text{g/ml}$ BSA. Kalibrace byly provedeny v kvartetu v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Vhodnost této metody byla ověřena na modelových vzorcích BSA s přídavkem i bez přídavku síranu amonného.

Byla změřena absorbance při 450 a 592 nm. Získané hodnoty byly zprůměrovány a dány do poměru 450/592 nm. Z výsledných hodnot byly sestrojeny kalibrační křivky.



Obr. 34: Kalibrační křivka pro koncentrace 100-500 $\mu\text{g/ml}$ BSA s 1 M síranem amonným.



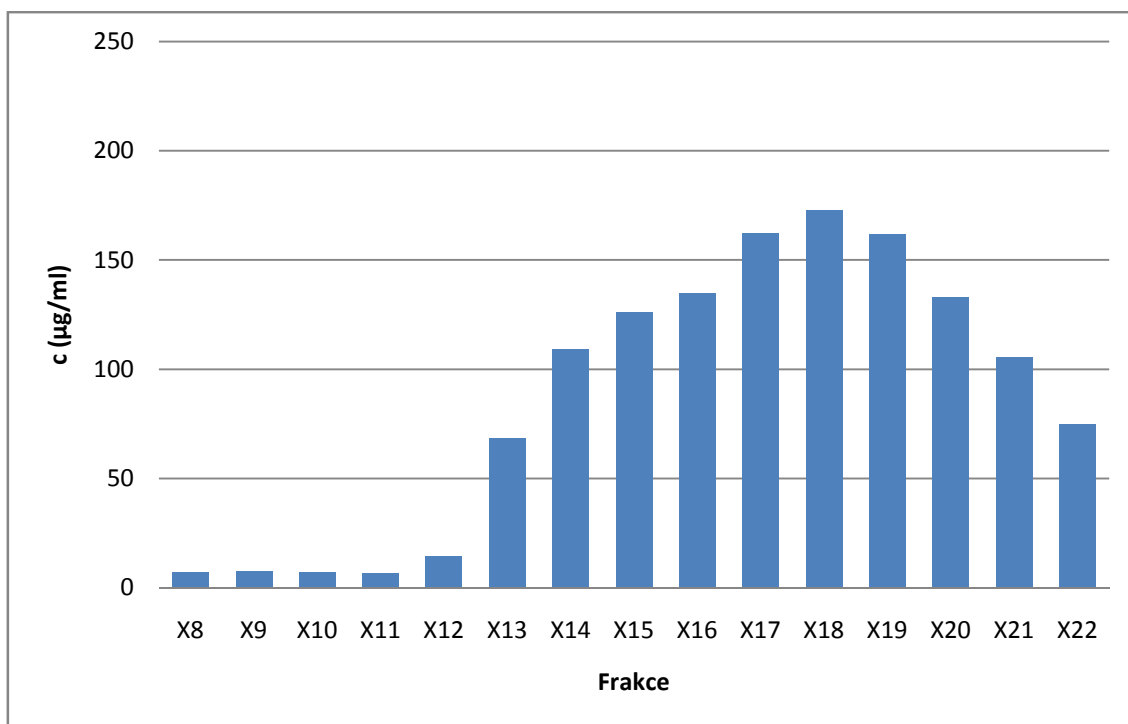
Obr. 35: Kalibrační křivka pro koncentrace 100-500 µg/ml BSA bez síranu amonného.

Jelikož byla eluce při separaci na Phenyl-sepharose provedena klesajícím gradientem síranu amonného, bylo nutno jeho koncentrace ve vzorcích sjednotit. Za tímto účelem byly testovány dvě strategie viz 2.4.1.

Koncentraci síranu amonného nebylo potřeba upravovat u všech vzorků. V průběhu separace na Phenyl-sepharose klesal gradient síranu amonného pouze v rozmezí 6-20 ml mobilní fáze. Úprava koncentrací se tedy týkala pouze frakcí P8-P22. Vzorky P23-P36 byly odečítány pomocí kalibrační křivky bez síranu amonného. Ověření způsobilosti této metody proběhlo na vzorcích po separaci na Phenyl-sepharose, které byly připraveny nezávisle na této práci. Budou zde označeny jako X8-X22.

Tab. 6: Hodnoty koncentrací bílkoviny ve vzorcích naměřené metodou přidavku síranu amonného ve formě základní látky.

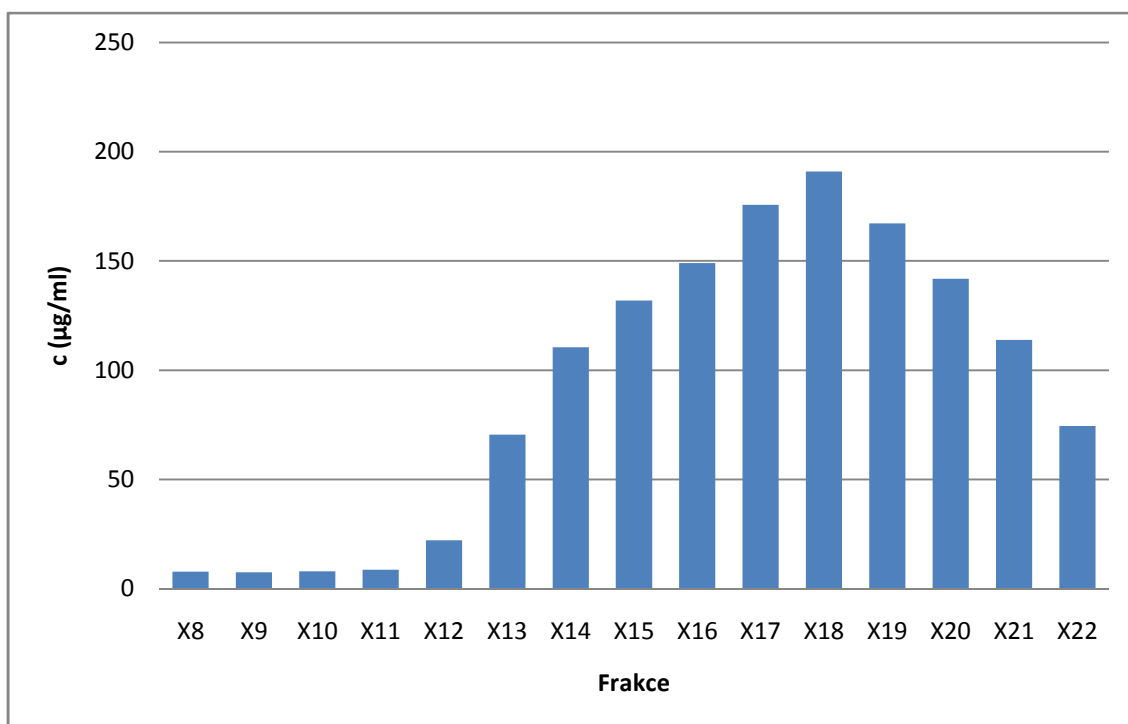
Frakce	Množství bílkoviny (µg/ml)
X8	7,12
X9	7,31
X10	7,08
X11	6,64
X12	14,25
X13	68,35
X14	109,14
X15	125,98
X16	134,84
X17	162,52
X18	172,91
X19	161,56
X20	133,18
X21	105,41
X22	74,79



Obr. 36: Graf koncentrací bílkoviny ve vzorcích naměřených metodou přidavku síranu amonného ve formě základní látky.

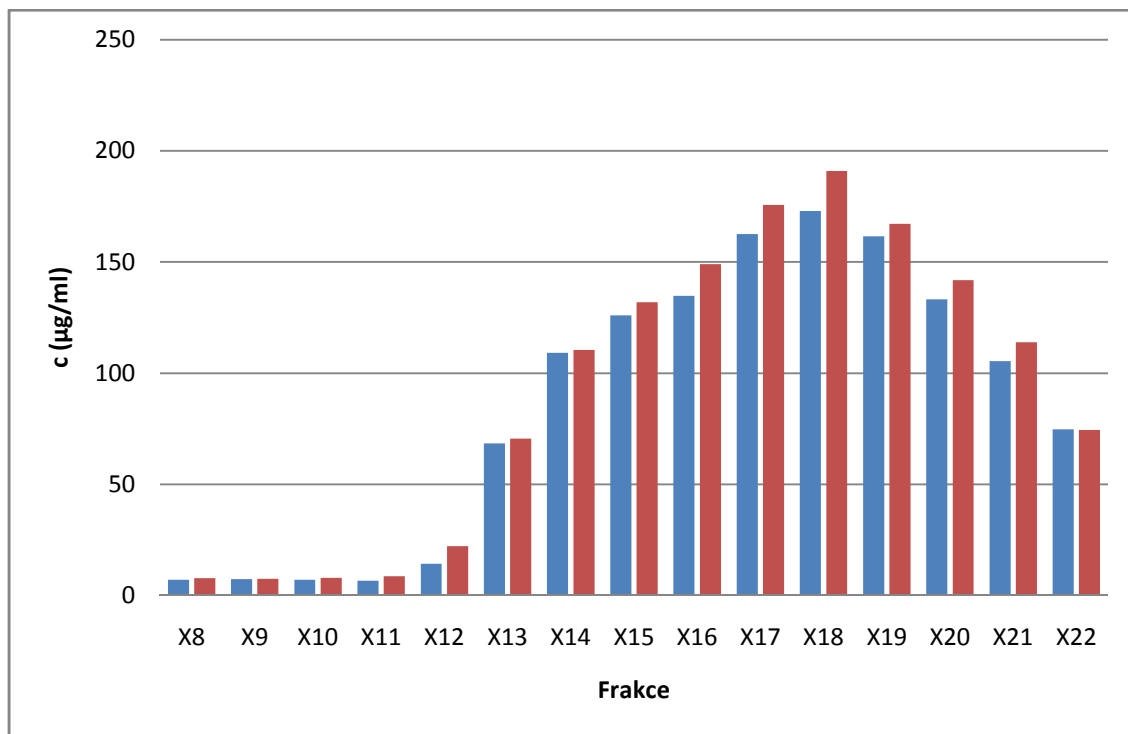
Tab. 7: Hodnoty koncentrací bílkoviny ve vzorcích naměřené metodou přidavku síranu amonného ve formě 5,5 M roztoku.

Frakce	Množství bílkoviny (µg/ml)
X8	7,77
X9	7,49
X10	7,88
X11	8,65
X12	22,19
X13	70,54
X14	110,48
X15	131,90
X16	149,03
X17	175,72
X18	191,00
X19	167,18
X20	141,84
X21	113,89
X22	74,46



Obr. 37: Graf koncentrací bílkoviny ve vzorcích naměřených metodou přidavku síranu amonného ve formě 5,5 M roztoku.

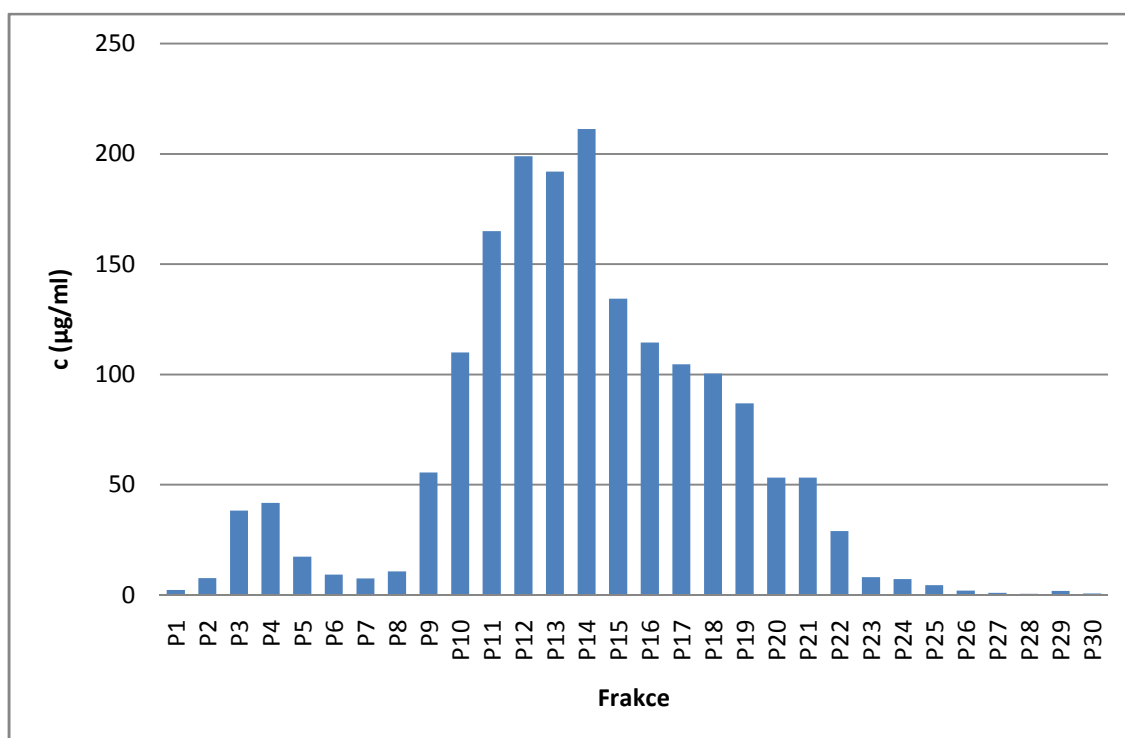
Vzhledem k podobnosti získaných výsledků (průměrný rozdíl 8,79 %) a snazšímu provedení metody přidavku síranu amonného ve formě 5,5 M roztoku, byla tato metoda vybrána jako optimální.



Obr. 38: Porovnání metody přidavku síranu amonného ve formě základní látky (modrá) a ve formě 5,5 M roztoku (červená) při stanovení bílkoviny dle modifikované Bradfordovy metody.

Tab. 8: Hodnoty koncentrací bílkoviny ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose.

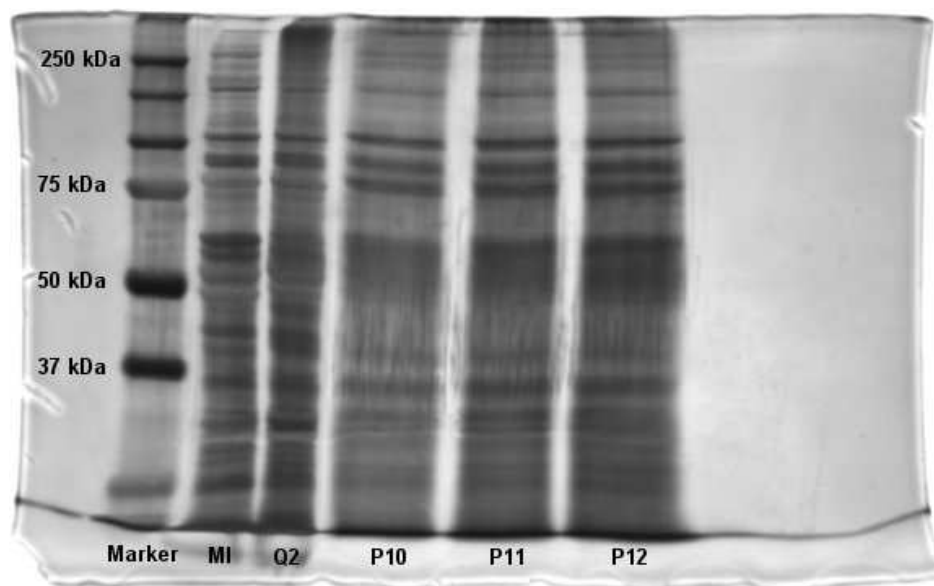
Frakce	Množství bílkoviny (µg/ml)	Frakce	Množství bílkoviny (µg/ml)
P1	2,34	P19	86,85
P2	7,68	P20	53,22
P3	38,30	P21	53,22
P4	41,79	P22	29,05
P5	17,38	P23	8,06
P6	9,24	P24	7,23
P7	7,51	P25	4,43
P8	10,70	P26	1,99
P9	55,51	P27	1,06
P10	109,98	P28	0,59
P11	165,01	P29	1,85
P12	198,86	P30	0,73
P13	192,03	P31	2,64
P14	211,24	P32	1,34
P15	134,37	P33	3,03
P16	114,44	P34	3,79
P17	104,58	P35	3,10
P18	100,45	P36	4,34



Obr. 39: Graf rozložení koncentrací bílkoviny ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose.

6.2.4. SDS-elektroforéza frakcí po separaci na Phenyl-sepharose

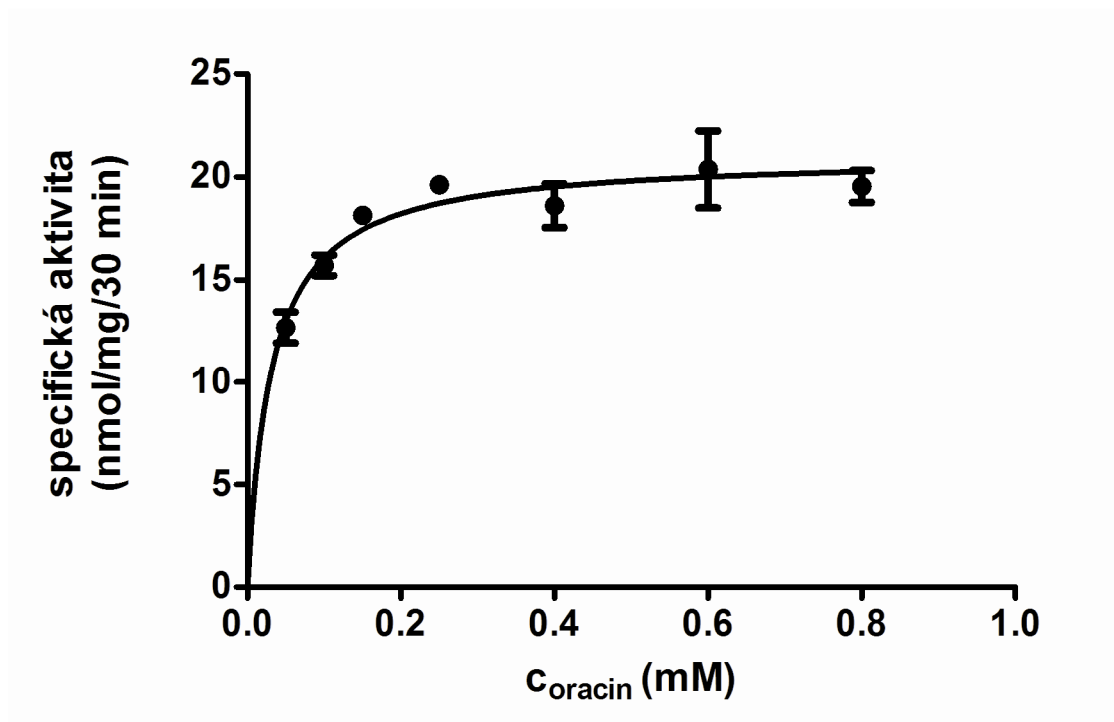
Po zjištění množství bílkoviny byla provedena SDS-elektroforéza pro přibližné určení molekulárních hmotností obsažených proteinů. Elektroforéza byla provedena u vzorků P10-P12 po separaci na Phenyl-sepharose, tedy u vzorků s největší redukční aktivitou vůči oracinu. Do jamek bylo dáno 5 μ l markeru molekulových hmotností, 40 μ l 20x naředěných mikrosomů (MI), 40 μ l 10x naředěné frakce Q2 a 50 μ l 3x naředěných frakcí P10-P12.



Obr. 40: SDS gel s naředěnými mikrosomy (MI), frakcí Q2 a frakcemi P10-P12 po separaci na Phenyl-sepharose.

6.2.5. Stanovení kinetiky redukce oracinu na DHO frakce P11 po separaci na Phenyl-sepharose

Frakce P11 byla inkubována s roztoky oracinu o různé koncentraci, jejichž rozmezí činilo 0,05-0,8 M. Ze získaných hodnot redukční aktivity bylo možné odvodit specifické aktivity pro jednotlivé koncentrace. Specifická aktivita je zde vyjádřena jako nmol DHO/mg obsažené bílkoviny ve frakci/30 minut.



Obr. 41: Graf vyjádření kinetiky frakce P11 jako specifické aktivity při redukci oracinu na jeho metabolit DHO.

Tab. 9: Michaelisova konstanta a V_{MAX} frakce P11.

K_m	30,97 μM
V_{MAX}	21,03 nmol/mg/30 min

7. PURIFIKACE C

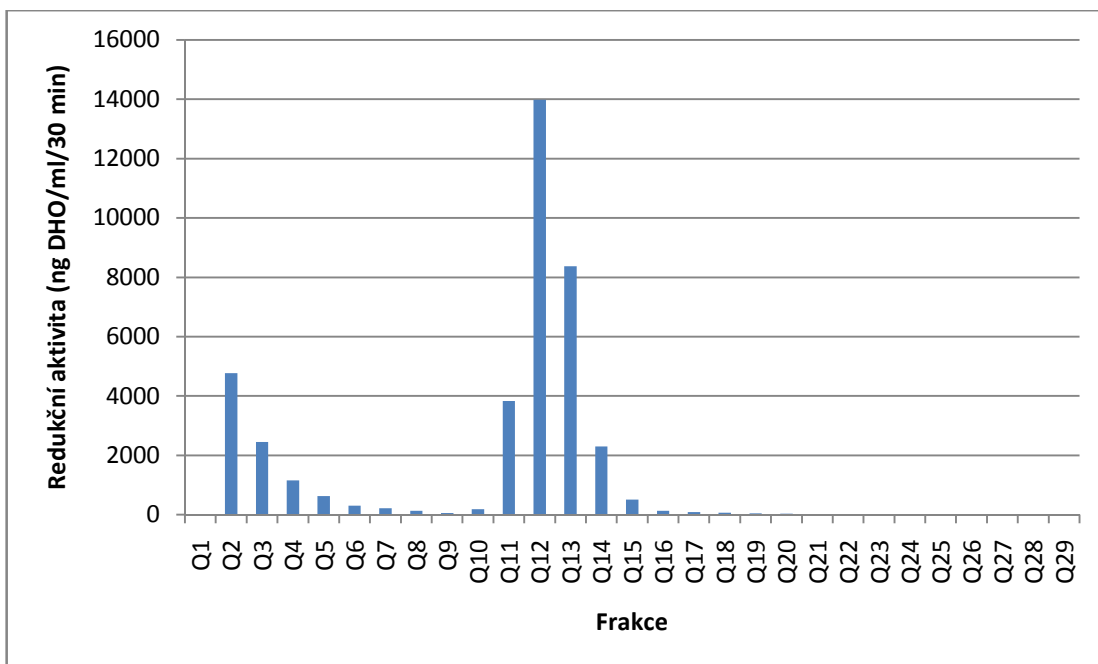
Stejně jako v purifikacích A a B byly odsolené koncentrované mikrosomy podrobeny separaci na Q-sepharose a získaná frakce Q2 byla dále purifikována pomocí Phenyl-sepharosy. V tomto případě byl ale přidán třetí purifikační krok a to rozdělení pomocí gelové permeační chromatografie. Tento krok nemohl být proveden již při předchozích purifikacích z důvodu nedostatku testovaného materiálu.

7.1. Analýza vzorků po separaci na Q-sepharose

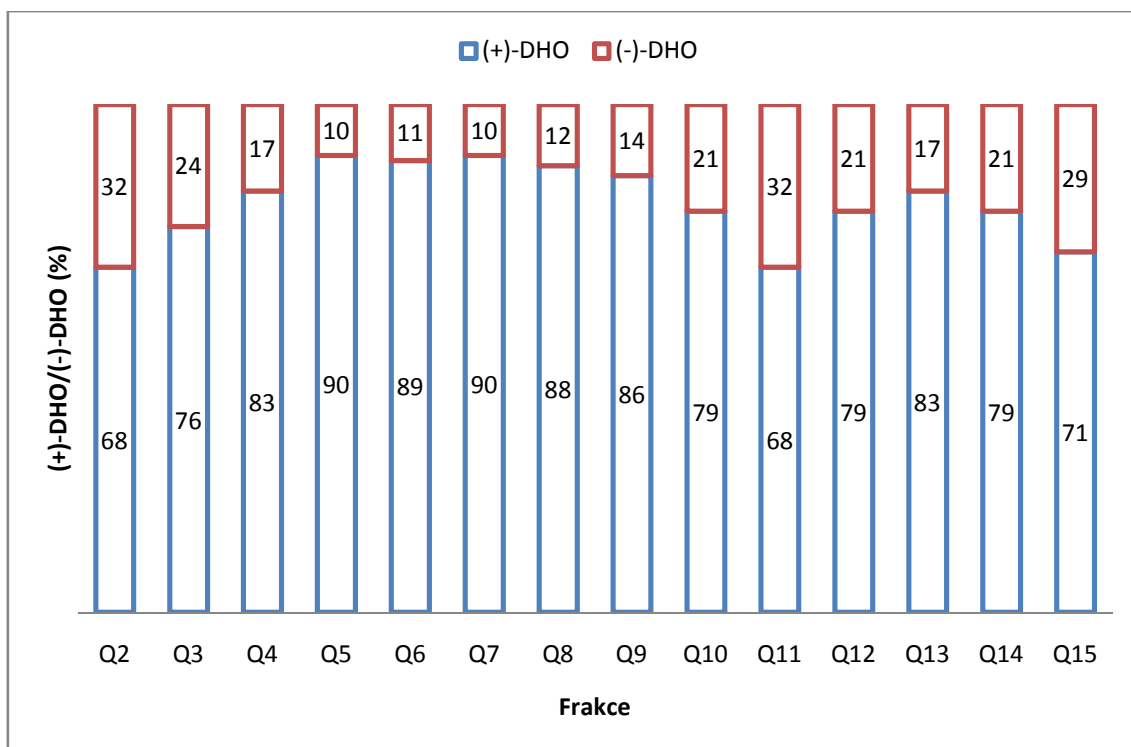
Stanovení probíhalo za stejných podmínek jako při purifikaci B viz 6.1. Separace proběhla na Katedře biochemických věd nezávisle na této práci.

Tab. 10: Redukční aktivita vůči oracinu a množství bílkoviny ve vybraných frakcích získaných po separaci na Q-sepharose.

Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku	Stereospecifita tvorby (+)/(-) DHO (%)	Množství bílkoviny (mg/ml)
Q1	-	-	-	-
Q2	4766,50	7,64	68/32	2,84
Q3	2447,00	3,92	76/24	1,19
Q4	1156,50	1,85	83/17	0,30
Q5	628,00	1,01	90/10	0,11
Q6	298,50	0,48	89/11	0,05
Q7	219,00	0,35	90/10	0,03
Q8	130,00	0,21	88/12	0,02
Q9	53,50	0,09	86/14	0,01
Q10	178,75	0,29	79/21	0,30
Q11	3830,00	6,14	68/32	0,26
Q12	13983,75	22,41	79/21	0,47
Q13	8368,75	13,41	83/17	0,60
Q14	2302,50	3,69	79/21	0,59
Q15	511,25	0,82	71/29	0,23
Q16	127,00	0,20	-	0,38
Q17	82,50	0,13	-	0,31
Q18	62,50	0,10	-	0,27



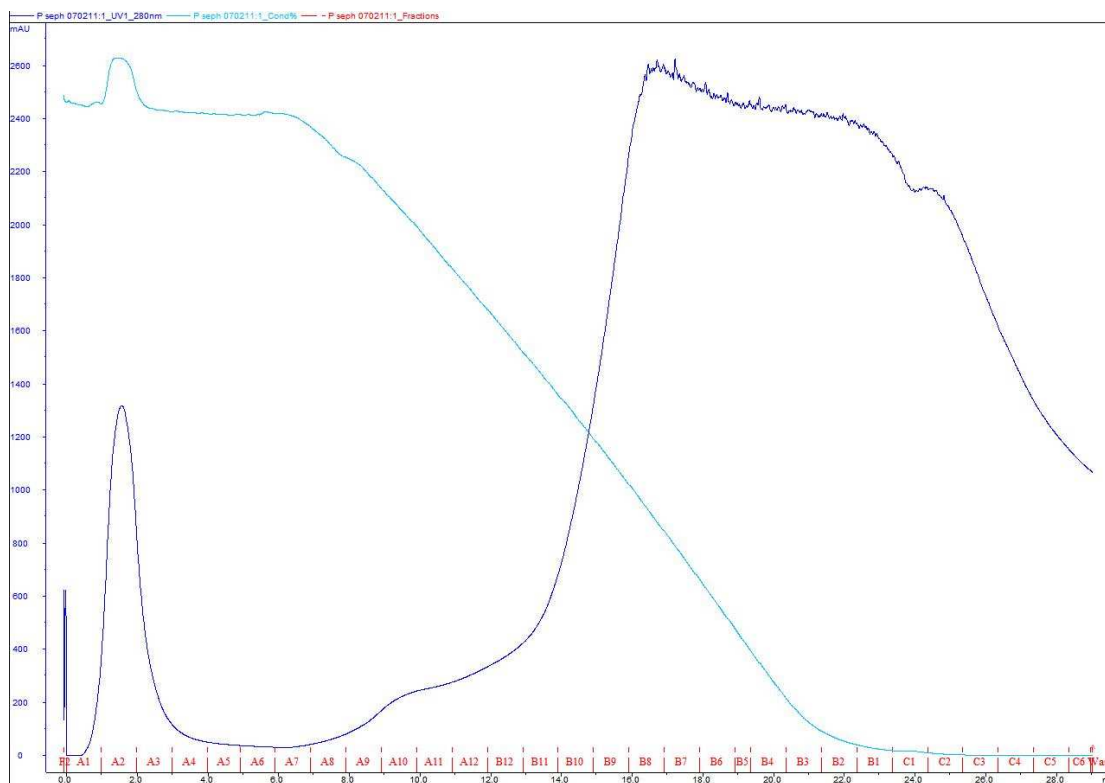
Obr. 42: Graficky vyjádřené rozložení redukčních aktivit vůči oracinu v jednotlivých frakcích získaných po separaci na Q-sepharose.



Obr. 43: Grafické znázornění stereospecificity redukce oracinu vybraných frakcí po separaci na Q-sepharose.

7.2. Analýza vzorků po separaci na Phenyl-sepharose

Pro separaci na Phenyl-sepharose byla použita frakce Q2, která byla získána při rozdělení na Q-sepharose. Na rozdíl od separace B byla sada frakcí zkrácena na 30 vzorků. Ve všech získaných frakcích byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu a určeno množství obsaženého proteinu. Ve vybraných frakcích byla stanovena stereospecifita tvorby (+)/(-)-DHO enantiomerů.



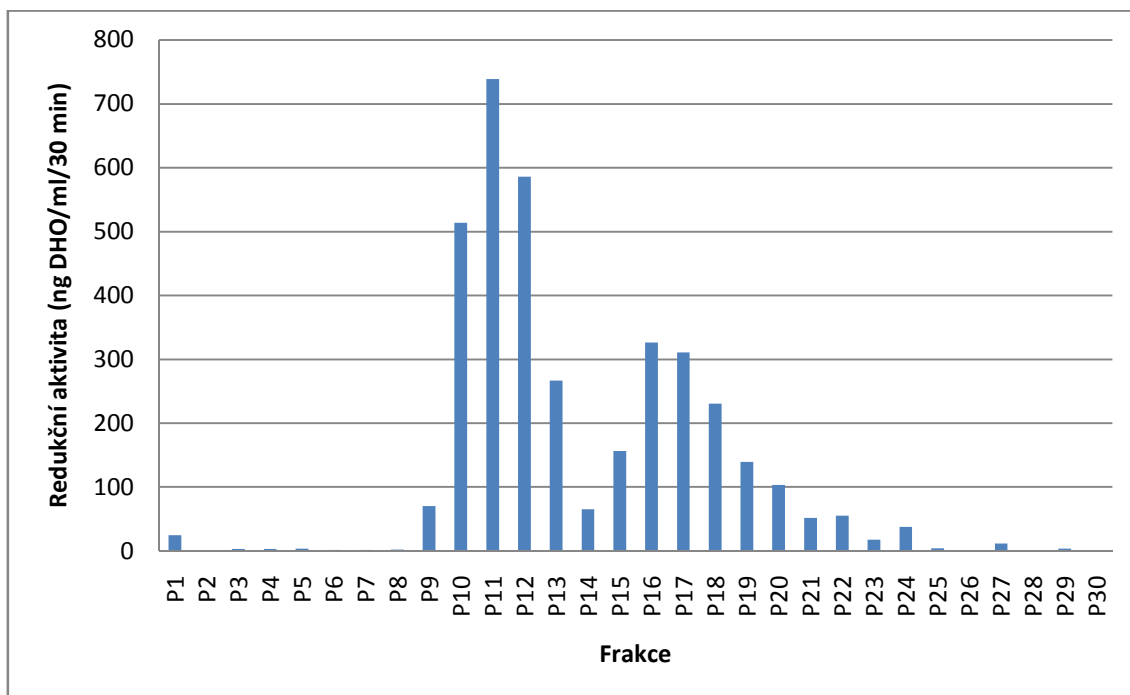
Obr. 44: Záznam separace frakce Q2 na Phenyl-sepharose na přístroji Äkta Purifier.

- Absorbance průběhu separace frakce Q2
- Konduktivita průběhu separace frakce Q2

7.2.1. Stanovení redukční aktivity frakcí po separaci na Phenyl-sepharose

Tab. 11: Aktivita redukce oracinu u frakcí získaných po separaci na Phenyl-sepharose.

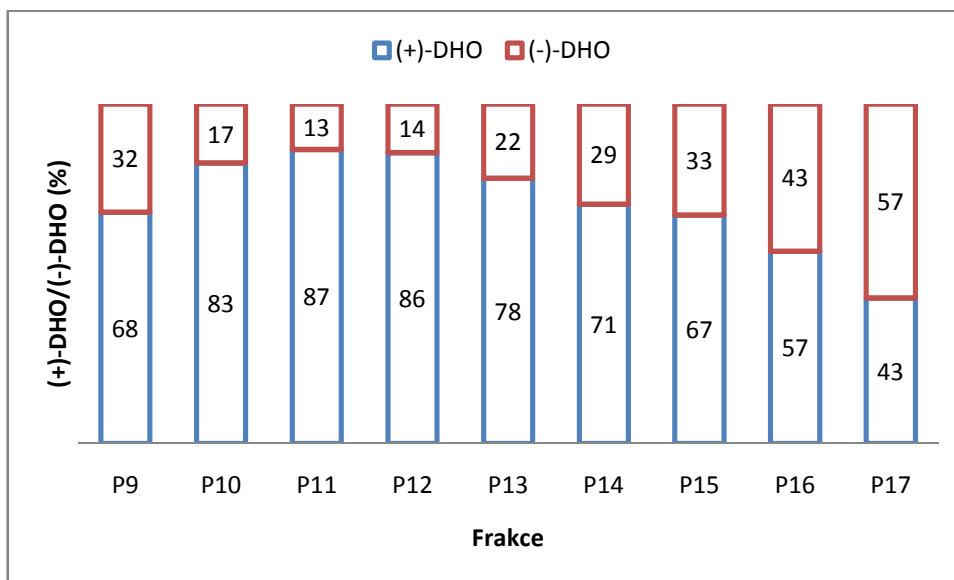
Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku	Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku
P1	24,47	0,49 %	P16	326,13	6,54 %
P2	-	-	P17	310,92	6,23 %
P3	2,90	0,06 %	P18	230,75	4,63 %
P4	2,98	0,06 %	P19	139,52	2,80 %
P5	3,64	0,07 %	P20	103,12	2,07 %
P6	1,26	0,03 %	P21	51,70	1,04 %
P7	1,40	0,03 %	P22	55,35	1,11 %
P8	1,85	0,04 %	P23	17,63	0,35 %
P9	69,94	1,40 %	P24	37,37	0,75 %
P10	513,68	10,30 %	P25	3,86	0,08 %
P11	738,76	14,81 %	P26	-	-
P12	586,20	11,75 %	P27	11,39	0,23 %
P13	266,85	5,35 %	P28	-	0,00 %
P14	65,06	1,30 %	P29	3,28	0,07 %
P15	156,44	3,14 %	P30	-	-



Obr. 45: Znázornění redukce oracinu na DHO ve frakcích získaných po separaci na Phenyl-sepharose.

7.2.2. Stanovení stereospecifity redukce vzorků po separaci na Phenyl-sepharose

Stereospecifita redukce oracinu byla měřena pouze u vybraných vzorků P9-P17, které měly dostačující redukční aktivitu vůči oracinu.



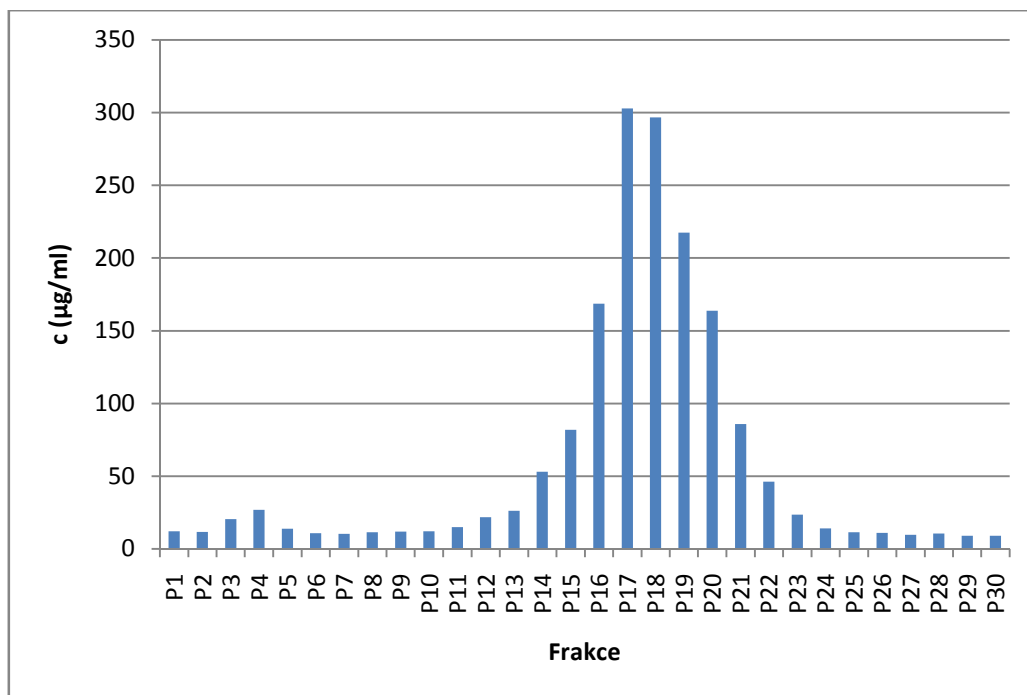
Obr. 46: Podíl (+)-DHO/(-)-DHO enantiomerů po redukci oracinu jednotlivými frakcemi získanými po separaci na Phenyl-sepharose.

7.2.3. Stanovení koncentrace proteinů ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose

Vzorky byly změřeny pomocí optimalizované metody dle Bradforda (Zor et al. 1996).

Tab. 12: Hodnoty koncentrací bílkoviny ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose.

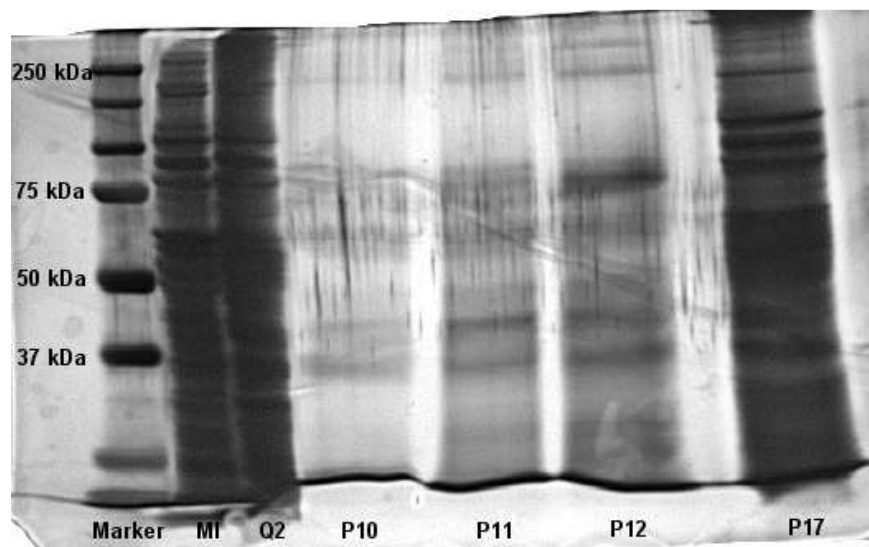
Frakce	Množství bílkoviny (µg/ml)	Frakce	Množství bílkoviny (µg/ml)
P1	12,16	P16	168,70
P2	11,73	P17	302,94
P3	20,52	P18	296,63
P4	26,90	P19	217,38
P5	13,88	P20	163,79
P6	10,79	P21	85,94
P7	10,27	P22	46,12
P8	11,50	P23	23,51
P9	11,99	P24	14,00
P10	12,02	P25	11,36
P11	15,05	P26	11,10
P12	21,83	P27	9,69
P13	26,13	P28	10,48
P14	53,02	P29	9,10
P15	81,78	P30	9,12



Obr. 47: Graf rozložení koncentrací bílkoviny ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose.

7.2.4. SDS-elektroforéza vybraných frakcí po separaci na Phenyl-sepharose

SDS-PAGE byla provedena se vzorky P10-P11, jelikož měly největší redukční aktivitu a dále se vzorkem P17, který měl svou stereospecifitu tvorby DHO enantiomerů výrazně posunutou ve prospěch (-)-DHO. Do jamek bylo dáno 5 μ l markeru molekulových hmotností, 40 μ l 20x naředěných mikrosomů (MI), 40 μ l 10x naředěné frakce Q2 a 50 μ l frakcí P10, P11, P12 a P17.



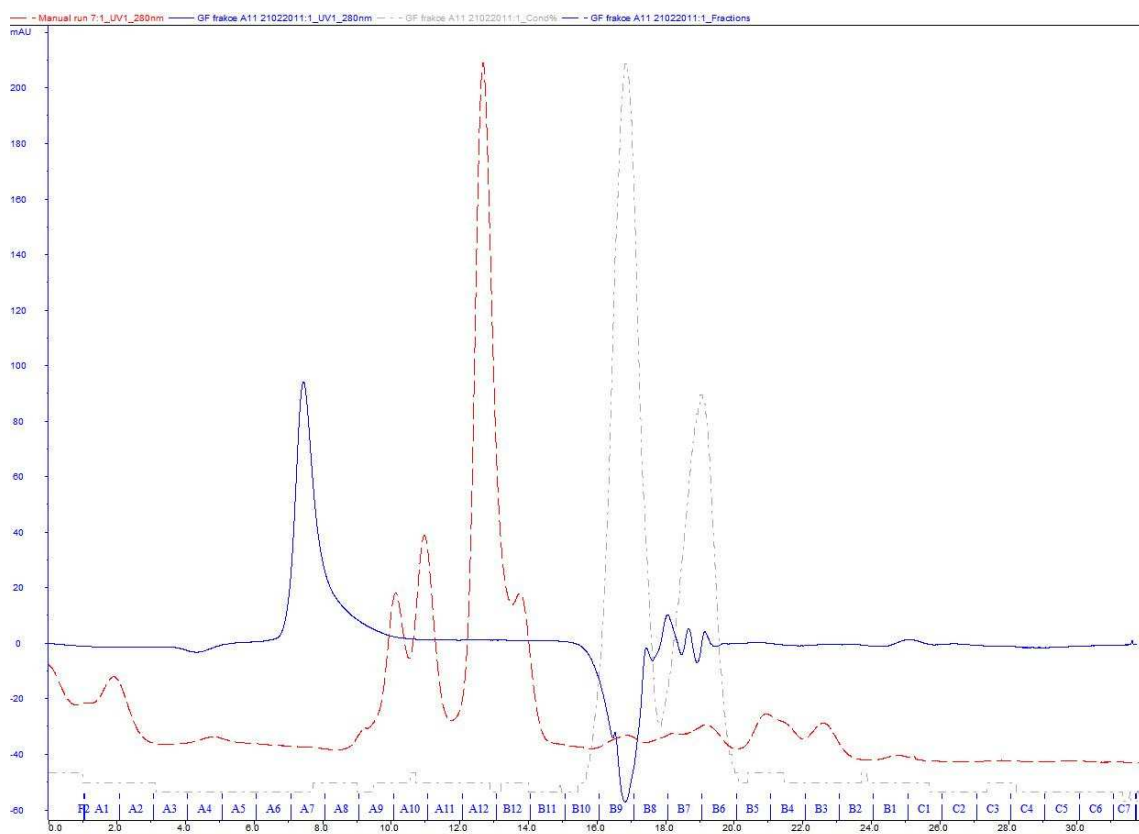
Obr. 48: SDS gel s naředěnými mikrosomy (MI), frakcí Q2 a frakcemi P10, P11, P12 a P17.

7.3. Analýza vzorků po rozdělení gelovou chromatografií

Frakce P11 s největší redukční aktivitou byla podrobena třetímu purifikačnímu kroku gelovou filtrací. Separace byla provedena pomocí přístroje Äkta Purifier. Před provedením samotné separace byla kolona nakalibrována nanesením směšného hmotnostního standardu.

Tab. 13: Molekulové hmotnosti standardů pro gelovou permeační chromatografii.

Standard	Molekulová hmotnost
Albumin	67 000 Da
Ovalbumin	43 000 Da
Chymotripsinogen A	25 000 Da
Ribonucleasa A	13 700 Da



Obr. 49: Záznam chromatogramu z přístroje Äkta Purifier.

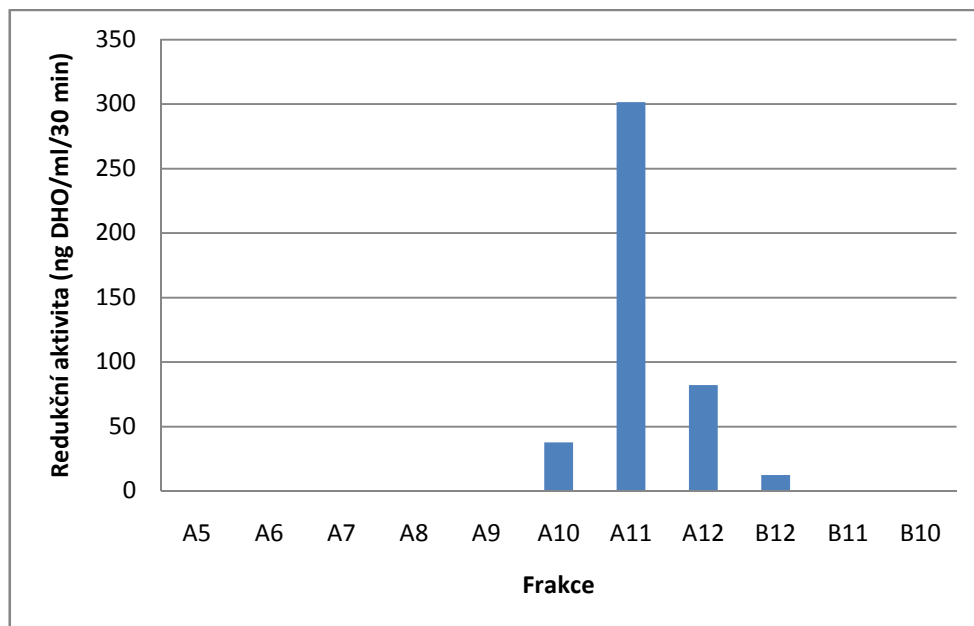
- Absorbance průběhu separace frakce P11
- Absorbance hmotnostního standardu
- Konduktivita průběhu separace frakce P11

Na základě získaného chromatogramu byly k dalším testům použity pouze frakce A5-B10. Frakce A1-A5 odpovídají mrtvému objemu kolony a vzrůstající konduktivita ve frakcích B9-B6 naznačuje přítomnost síranu amonného a chloridu sodného. Vzhledem ke své malé molekule prostupují tyto soli kolonou nejpomaleji a přítomnost bílkovin je v těchto frakcích vyloučena. Ve výše zmíněných frakcích byla stanovena redukční aktivita vůči oracinu a změřeno množství bílkoviny. Stereospecifita tvorby (+)/(-)-DHO enantiomerů byla měřena pouze u vzorků, které měly dostačující celkovou redukční aktivitu.

7.3.1. Stanovení redukční aktivity ve frakcích po GPC

Tab. 14: Redukční aktivita vybraných frakcí po rozdělení gelovou permeační chromatografií.

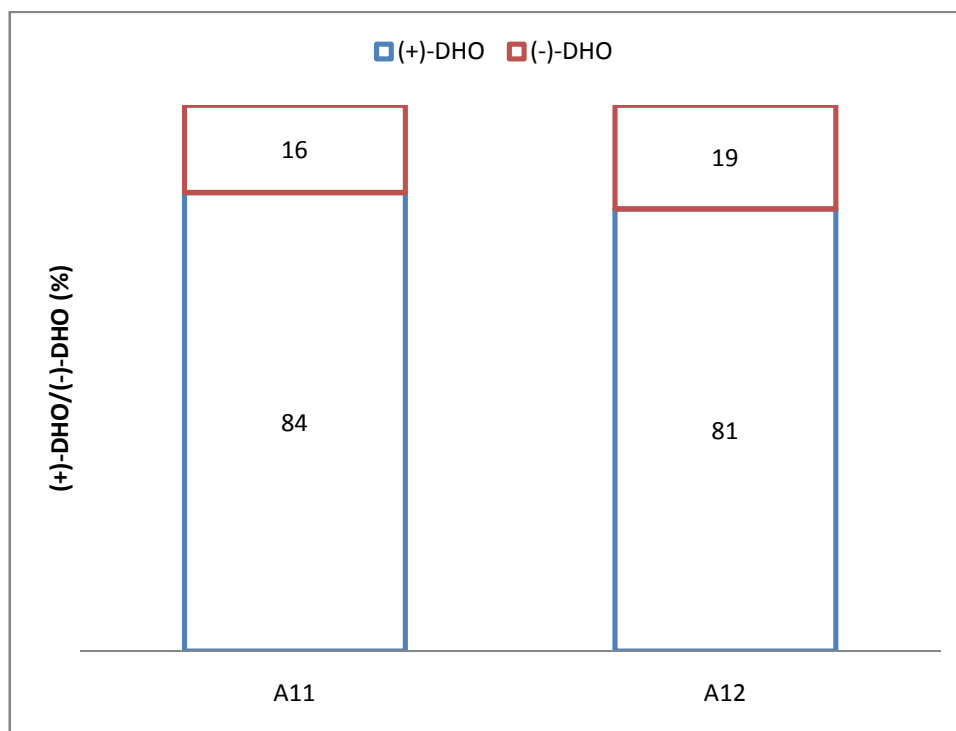
Frakce	Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	(%) redukční aktivity dávkovaného vzorku
A5	-	-
A6	-	-
A7	-	-
A8	-	-
A9	-	-
A10	37,82	5 %
A11	301,68	41 %
A12	82,22	11 %
B12	12,50	2 %
B11	-	-
B10	-	-



Obr. 50: Graf rozložení redukční aktivity vybraných frakcí.

7.3.2. Stanovení stereospecifity redukce ve frakcích po GPC

Na základě hodnot redukčních aktivit byla analýza stereospecifity tvorby DHO enantiomerů provedena pouze ve frakcích A11 a A12.



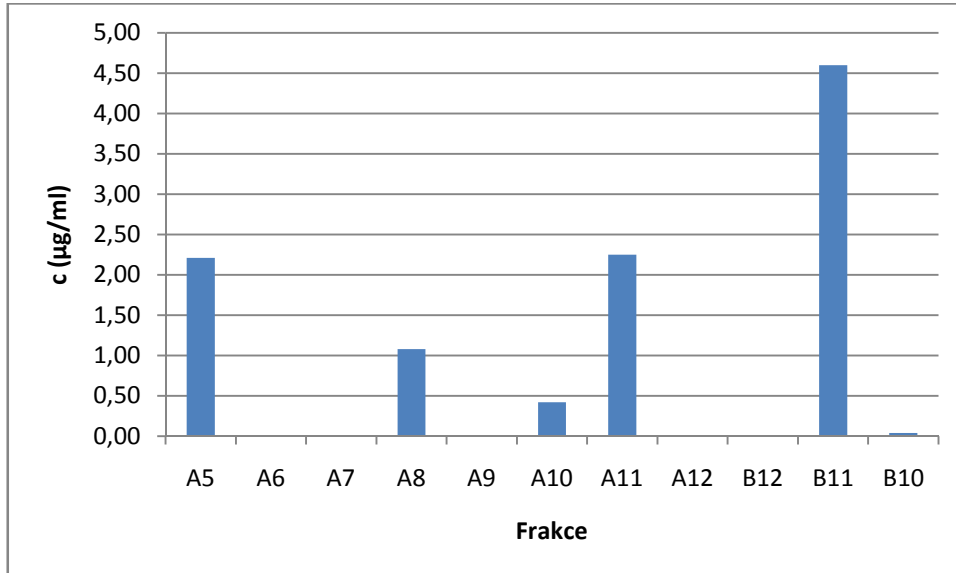
Obr. 51: Procentuální zastoupení DHO enantiomerů po inkubaci s vybranými frakcemi získanými po třetím purifikačním kroku.

7.3.3. Stanovení množství bílkoviny ve frakcích po GPC

Obsah proteinu ve vzorcích A5-B10 byl zjištěn optimalizovanou metodou dle Bradforda (Zor et al. 1996).

Tab. 15: Celkový obsah proteinů ve vybraných frakcích.

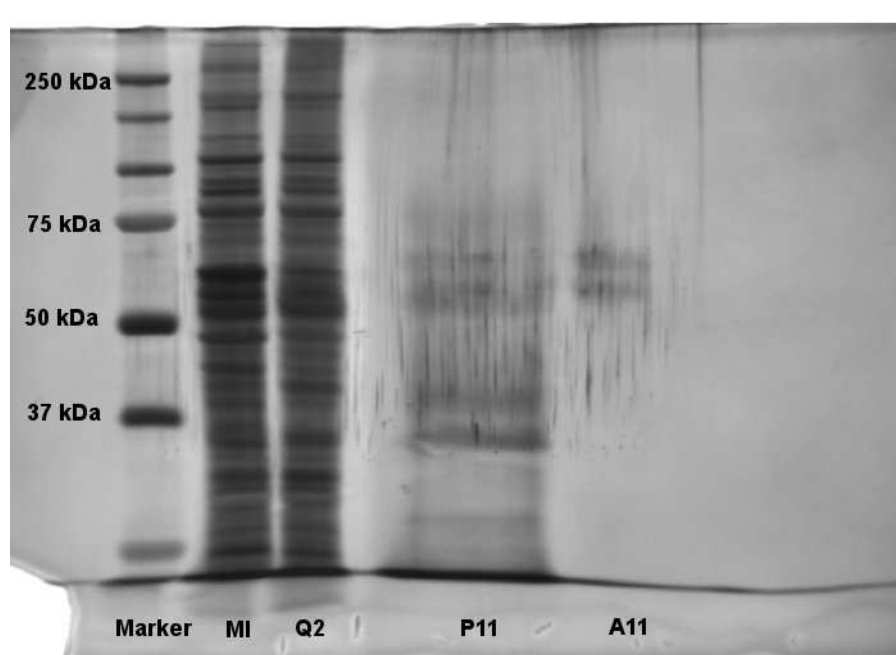
Frakce	Množství bílkoviny ($\mu\text{g/ml}$)
A5	2,21
A6	0,00
A7	0,00
A8	1,08
A9	0,00
A10	0,42
A11	2,25
A12	0,00
B12	0,00
B11	4,60
B10	0,04



Obr. 52: Rozložení koncentrace bílkoviny ve frakcích.

7.3.4. SDS-elektroforéza frakce A11 po GPC

SDS-elektroforéza byla provedena pouze u frakce A11 po GPC. Do jamek bylo dáno 5 μl markeru, 40 μl 20x naředěných mikrosomů (MI), 40 μl 10x naředěné frakce Q2 a 50 μl frakcí P11 a A11. Hledaný enzym s předpokládanou hmotností 37 kDa se ve frakci A11 vyskytoval již pod detekčním limitem metody Sweet silver stain. Proužky v oblasti 70 kDa byly keratiny, což potvrdily předchozí analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie.



Obr. 53: SDS gel průběhu purifikace mikrosomů (MI). Frakce Q2 po prvním purifikačním kroku, frakce P11 po druhém purifikačním kroku a frakce A11 po třetím purifikačním kroku.

Tab. 16: Vyhodnocení efektivity purifikačního schématu.

Frakce	Redukční aktivita (nmol/ml/30 min)	Množství bílkoviny ($\mu\text{g/ml}$)	Specifická aktivita (nmol/mg/30 min)	Faktor přečištění	Stereospecifita tvorby (+)/(-)-DHO (%)
Q2	14,76	2840,90	5,19	-	68/32
P11	2,19	15,05	145,18	28	87/13
A11	0,89	2,25	396,69	76	84/16

E. DISKUZE

Proteiny hrají esenciální úlohu v mnohých biologických procesech. Identifikace a charakterizace nových nebo málo známých proteinů je tedy nezbytnou součástí výzkumu biologických funkcí u všech životních forem. Na základě získaných informací lze odhalit principy metabolických pochodů a systém enzymové regulace. Lze také poznat rozdíly v expresi proteinů mezi přirozeným a abnormálním stavem organismu (nádorové bujení, mutantní formy proteinů atd.). Definování primární, sekundární, terciární a kvartérní struktury proteinů, které v organismu slouží jako receptory, enzymy nebo aktivní látky, umožňuje syntetizování nových léků a lékových forem.

Genomové analýzy předpokládají, že okolo 30 % z celkového množství proteinů syntetizovaných zástupci rodu *Homo sapiens* je v organismu vázáno na biologické membrány (Wallin & Von-Heijne 1998). Purifikace takových proteinů s sebou ovšem přináší mnohé obtíže, viz 1.2. V popředí zájmu této práce se nacházejí membránově vázané karbonylreduktasy metabolizující oracin.

Až na výjimky se membránově vázané enzymy, redukující karbonylové sloučeniny, vyskytují pouze v rozlehlé nadrodině SDR proteinů, která čítá přes 47 000 zástupců (Kallberg et al. 2010). Převážná část z nich byla pouze vytipována na základě analýzy genomů různých druhů, ale nikdy nebyla purifikována z biologického materiálu. V této nadrodině bylo doposud zaznamenáno 73 lidských zástupců. Plně charakterizováno jich ale bylo pouze 14. U sedmnácti lidských zástupců zatím nejsou známy žádné informace, jako jsou buněčná lokalizace, substrátová specifita, upřednostňovaný kofaktor, kinetické parametry nebo trojrozměrná struktura (Bray et al. 2009).

Snahou této práce bylo purifikovat novou karbonylreduktasu metabolizující oracin, vyskytující se v endoplazmatickém retikulu buněk lidské jaterní tkáně a rozšířit tak poznání o lidských membránově vázaných enzymech z nadrodiny SDR. Práce se opírá o hypotézu položenou Wsólem et al. (2004), která je založena na rozdílné stereospecifitě tvorby DHO enantiomerů mezi doposud jediným identifikovaným membránově vázaným enzymem redukujícím xenobiotika (11β -HSD1) a celými jaterními mikrosomy, jak bylo graficky vyjádřeno na obr. 28.

Na základě předpokladu hledání neznámého enzymu bylo zvoleno univerzální purifikační schéma IEX→HIC→GPC (Internet 1). Jako IEX byl zvolen silný iontoměnič Q-sepharosa a jako HIC Phenyl-sepharosa HP (Škarydová et al. 2009). Po

separaci na Phenyl-sepharose bylo ve frakcích stále přítomno vysoké množství blíže nesespecifikované bílkoviny. Po provedení SDS-elektroforézy bylo patrné, že v neaktivnějších frakcích P10, P11 a P12 se nachází velké množství proteinů o různé molekulové hmotnosti (obr. 48). Třetí purifikační krok, gelová permeační chromatografie, byl tedy zařazen z důvodu potřeby oddělit proteiny o hledané molekulové hmotnosti 37 kDa od zbytku frakce, která byla získána po separaci na Phenyl-sepharose.

Před nanesením na gelovou kolonu Superdex 75 100/300 GL musela být frakce P11 po Phenyl-sepharose vhodně zakoncentrována. Provedení tohoto kroku bylo nevyhnutelné, jelikož pro kvalitní separaci může být na tuto kolonu naneseno maximálně 250 μ l vzorku, tedy maximálně 1 % z celkového objemu kolony. Tento fakt byl ověřen provedením testovacích separací, kdy bylo na kolonu nejprve naneseno 250 μ l, poté 500 μ l a nakonec 1000 μ l směšného hmotnostního standardu, jehož složení uvádí tab. 16. K úplnému oddělení všech čtyř složek směsi došlo pouze při nadávkování 250 μ l vzorku. Při nanesení větších množství vzorku byly na chromatografických záznamech patrné pouze dva píky. Separace v těchto případech tedy neprobíhala s dostatečnou účinností.

K zakoncentrování frakce P11 došlo centrifugací ve zkumavce Amicon Ultra-15 10K při 10 000 rpm po dobu deseti minut. Frakce byla tímto z výchozích 840 μ l zakoncentrována na požadovaných 250 μ l. Takto upravená frakce P11 byla nanesena na kolonu a podrobena separaci.

Nutnost tohoto vloženého kroku (zakoncentrování vzorku) před provedením samotné separace gelovou filtrací s sebou ale přináší velkou obtíž a to možnou ztrátu hledaného enzymu. Membránové proteiny totiž ochotně adherují k používanému laboratornímu vybavení. Tento problém se prolíná celým purifikačním schématem. Vinou degradace proteinu při rozmrazování frakcí, ulpívání proteinu na zkumavkách, pipetách, kolonách a ostatním vybavení dochází ke ztrátám hledaného enzymu a ztrátě jeho enzymové aktivity. Tento jev je patrný na poklesu redukční aktivity po každém purifikačním kroku, jak ukazují tabulky 17-19.

Tab. 17: Ztráta redukční aktivity vůči oracinu separací na Q-sepharose.

	Odsolené koncentrované mikrosomy	Suma z frakcí po Q-sepharose	Ztráta redukční aktivity (%)
Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	74 865,0	39 287,0	48 %

Tab. 18: Pokles redukční aktivity ve frakcích po separaci na Phenyl-sepharose.

	Frakce Q2	Suma z frakcí po Phenyl-sepharose	Ztráta redukční aktivity (%)
Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	4 988,3	3 726,4	25 %

Tab. 19: Ztráta redukční aktivity po gelové permeační chromatografii.

	Frakce P11	Suma z frakcí po GPC	Ztráta redukční aktivity (%)
Redukční aktivita (ng DHO/ml/30 min)	738,8	438,0	41 %

Další problematickou oblastí bylo stanovení obsahu bílkoviny ve frakcích. Vzhledem k přítomnosti detergentu Tritonu X-100 a vysokému obsahu solí ve frakcích, musela být k jejímu určení vybrána metoda, která by byla kompatibilní s těmito složkami a zároveň by byla dostatečně citlivá. Jako jedna z možností se jevílo použití BCA kitu od firmy Sigma-Aldrich. Metoda je sice kompatibilní s používaným detergentem, ale ztrácí svou přesnost v přítomnosti síranu amonného. Jelikož je toto stanovení vázáno na nutnost inkubace při zvýšené teplotě a je také relativně málo citlivé, nebylo vyhodnoceno jako optimální pro účely této práce. Jako další potenciálně použitelná metoda se ukazovalo klasické stanovení bílkoviny dle Bradforda. Nevýhodou této metody je ale nízká citlivost a nelineárnost v celém rozsahu měření. Z těchto důvodů byla pro stanovení

koncentrace bílkoviny ve frakcích použita linearizovaná metoda dle Bradforda (Zor et al. 1996). Využívá faktu, že vázaná a nevázaná forma barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 má rozdílná absorpční maxima. Vázaná forma absorbuje při 592 nm, zatímco volná forma absorbuje při 460 nm. Pokud se naměřené hodnoty dají do poměru 592/460 nm, metoda se stává lineární v celém rozsahu (Zor et al. 1996). Výhodami této metody jsou rychlost provedení, nízký detekční limit a kompatibilita s přítomností síranu amonného a detergentů ve vzorcích. Z těchto důvodů byla tato metoda vybrána jako optimální.

Jak již bylo zmíněno, doposud jediným identifikovaným mikrosomálním enzymem metabolizujícím xenobiotika je 11 β -HSD1. Její purifikace z biologického materiálu v aktivní formě byla popsána Maserem et al. (2002). Purifikační schéma pro její získání se v mnohém lišilo od toho, které bylo použito v této práci. Pro solubilizaci byl zvolen pufr s 0,4% koncentrací neiontového detergentu Emulgen 913. Solubilizovaný vzorek byl centrifugován a k odebranému supernatantu byl přidán ještě 0,4% roztok iontového detergentu cholátu sodného. Takto vysoká koncentrace povrchově aktivních látek byla ve vzorku udržována po celý průběh purifikace. Na rozdíl od toho byla v této diplomové práci snaha o postupné snižování koncentrace použitého detergentu Tritonu X-100 v závislosti na snižujícím se množství obsažené bílkoviny ve frakcích. Při purifikaci 11 β -HSD1 byly též použity jiné purifikační metody a byly provedeny čtyři purifikační kroky. Jako první purifikační krok byla použita hydrofobně interakční chromatografie následovaná iontově výměnnou chromatografií. Třetím purifikačním krokem byla afinitní chromatografie a posledním čtvrtým krokem byla gelová permeační chromatografie.

Sledování metabolické aktivity enzymu 11 β -HSD1 probíhalo na dvou látkách. První z nich byl metyrapon, modelový substrát pro 11 β -HSD1. Druhou látkou pro stanovení dehydrogenasové aktivity byl kortison, tedy přirozený substrát daného enzymu. Díky použitým substrátům s vysokou afinitou k 11 β -HSD1 byly získány vysoké hodnoty specifické aktivity a bylo dosaženo 376 násobného přečištění (Maser et al. 2002). Oracin je naproti tomu substrátem velmi nespecifickým. Mimo mikrosomů byl jeho metabolismus popsán i u cytosolických enzymů z nadrodiny AKR. Jmenovitě se jedná o AKR1C1-C4 (Wsól et al. 2007, Novotna et al. 2008) a AKR1B10 (Martin et al. 2006). I v samotných mikrosomech je velmi pravděpodobné, že oracin není substrátem pouze pro 11 β -HSD1, jak naznačuje již zmíněná hypotéza dle Wsóla et al. (2004). Z těchto důvodů byla ve výchozím materiálu naměřena vyšší

specifická aktivita a ve výsledku nebylo dosaženo tak velkého přečištění, jako tomu bylo v případě 11 β -HSD1 (viz tab. 16).

Je pravděpodobné, že další mikrosomální enzym z nadrodiny SDR byl částečně purifikován Škarydovou et al. (2009). Purifikace tohoto enzymu probíhala za stejných podmínek jako v této diplomové práci. Předmětem zájmu ovšem nebyla frakce Q2 po Q-sepharose, ale stala se jí frakce Q11. Po separaci na Phenyl-sepharose byla získána frakce s 86% převahou tvorby (+)-DHO enantiomeru a specifickou aktivitou rovnající se 633 nmol/mg/30 min. Frakce A11, získaná v této práci po separaci gelovou permeační chromatografií, vykazovala obdobnou stereospecifitu jako frakce po Phenyl-sepharose v případě Škarydové et al. (2009). V důsledku vyššího obsahu bílkoviny ve frakci ale byla stanovena nižší specifická aktivita, 290 nmol/mg/30 min. Jelikož byla předmětem této práce flow-through frakce Q2 s odlišným bílkovinným spektrem, než jaké bylo ve frakci Q11, je vysoce nepravděpodobné, že by se mohlo jednat o stejnou karbonylreduktasu z nadrodiny SDR, která byla purifikována Škarydovou et al. (2009).

Proteiny, obsažené v purifikované frakci A11 po gelové permeační chromatografii, je nyní nutné identifikovat. Je zřejmé, že tato frakce má redukční aktivitu vůči oracinu, musí tedy obsahovat nějakou mikrosomální karbonylreduktasu, ale s největší pravděpodobností bude obsahovat ještě další, zřejmě strukturní proteiny. Obsažené proteiny je možné identifikovat pomocí metody hmotnostní spektrometrie. Celý tento proces je ovšem předmětem dalšího a důkladného testování. Dá se očekávat, že pro účely identifikace enzymu není koncentrace proteinu kolem 2 ug/ml ve frakci dostatečná a bude třeba začít purifikaci z většího množství lidských jaterních mikrosomů.

F. ZÁVĚR

V průběhu této práce bylo zavedeno nové purifikační schéma. K frakci Q2 byly úspěšně přidány další dva purifikační kroky. Po hydrofobně interakční chromatografii byla použita ještě gelová permeační chromatografie. Došlo tak k odseparování úzkého spektra bílkovin z výchozího materiálu a bylo dosaženo 76 násobného přečištění vzorku. Byla tak získána frakce s redukční aktivitou vůči oracinu a žádanou stereospecifitou tvorby DHO enantiomerů. V této frakci (A11) výrazně převládala tvorba (+)-DHO enantiomeru, čímž došlo k potvrzení hypotézy podle Wsóla et al. (2004), viz obr. 28. Je tedy zřejmé, že se v této frakci nachází mikrosomální enzym odlišný od 11 β -HSD1 s aktivitou vůči oracinu. Je tudíž vysoce pravděpodobné, že by se mohl podílet i na metabolismu jiných léčiv a je nutné jej identifikovat.

G. SEZNAM ZKRATEK

11 β -HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy
17 β -HSD	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy
AC	afinitní chromatografie
ADH	alkoholdehydrogenasy
AKR	aldo-ketoreduktasy
APS	persíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G-250
CBR1	karbonylreduktasa 1
CMC	kritická micelární koncentrace
CYP 450	cytochrom P450
DD	dihydrodioldehydrogenasy
DHO	dihydrooracin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GPC	gelová permeační chromatografie
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEX	iontově výměnná chromatografie
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NNK	4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon
PGD ₂	prostaglandin D ₂
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	prostaglandin F _{2α}
PGH ₂	prostaglandin H ₂
QR	chinonreduktasy
RDH	retinoldehydrogenasy

RNA	ribonukleová kyselina
RNH	dihydronikotionamidribosa
RPC	chromatografie na reverzní fázi
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin

H. LITERATURA

Barski O.A., Tipparaju S.M., Bhatnagar A. (2008) The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews* 40, 553-624.

Bray J.E., Marsden B.D., Oppermann U. (2009) The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary. *Chemico-Biological Interactions* 178, 99–109.

Burgess R.R. (2008) Protein purification. In: Nothwang H.G., Pfeiffer S.E. (eds.) *Proteomics of the Nervous System*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, str. 1-18.

Forrest G.L., Gonzalez B. (2000) Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions* 129, 21–40.

Georgiou C.D., Grintzalis K., Zervoudakis G., Papapostolou I. (2008) Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem.* 391 (1), 391-403.

Haeseleer F., Jang G. F., Imanishi Y., Driessen C. A., Matsumura M., Nelson P. S., Palczewski K. (2002) Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J. Biol. Chem.* 277 (47), 45537-45546.

Horiguchi Y., Araki M., Motojima K. (2008) 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370 (2), 235-238.

Hunte C., Von Jagow G., Schägge H. (2003) *Membrane Protein Purification and Crystallization*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, 316 stran.

Jelski W., Szmitkowski M. (2008) Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clinica Chimica Acta* 395, 1–5.

Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H., Persson B. (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur. J. Biochem.* 269 (18), 4409-17.

Liden M., Eriksson U. (2006) Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 281 (19), 13001-13004.

Liden M., Tryggvason K., Eriksson U. (2003) Structure and function of retinol dehydrogenases of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Mol. Aspects Med.* 24 (6), 403-409.

Lukacik P., Kavanagh K. L., Oppermann U. (2006) Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248 (1-2), 61-71.

Malátková P., Maser E., Wsól V. (2010) Human carbonyl reductases. *Current Drug Metabolism* 11, 639-658.

Martin H.-J., Breyer-Pfaff U., Wsol V., Venz S., Block S., Maser E. (2006) Purification and characterization of AKR1B10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 464-470.

Maser E. (1998) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes. *Cancer Research* 58, 2996-3003.

Maser E. (2004) Significance of reductases in the detoxification of the tobacco-specific carcinogen NNK. *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (5), 235-237.

Maser E., Völker B., Friebertshäuser J. (2002) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* 41, 2459-2465.

Maser E., Wsol V., Martin H.-J. (2006) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: purification from human liver and characterization as carbonyl reductase of xenobiotics. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248, 34–37.

Masuzaki H., Flier J. S. (2003) Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1)--a promising drug target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 3 (4), 255-262.

Matsunaga T., Shintani S., Hara A. (2006) Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21 (1), 1-18.

Melka M. (1993) Oracin – preclinical summary report of the research institute for pharmacy and biochemistry. Prague. Czech Republic. Ref Type: Generic.

Moeller G., Adamski J. (2006) Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248 (1-2), 47-55.

Moeller G., Adamski J. (2009) Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 301 (1-2), 7-19.

Novotna R., Wsol V., Xiong G., Maser E. (2008) Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology Letters* 181, 1-6.

Odermatt A., Nashev L. G. (2010) The glucocorticoid-activating enzyme 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 119 (2010) 1-13.

Persson B., Hedlund J., Jörnvall H. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3879 – 3894.

Persson B., Kallberg Y., Bray J.E., Bruford E., Dellaporta S.L., Favia A.D., Duarte R.G., Jörnvall H., Kavanagh K.L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T.M., Thornton J.M., Adamski J., Oppermann U. (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions* 178, 94–98.

Prasad P. V., Arumugam R., Willman M., Ge R. S., Sitruk-Ware R., Kumar N. (2009) Distribution, metabolism and excretion of a synthetic androgen 7alpha-methyl-19-nortestosterone, a potential male-contraceptive. *Steroids* 74 (1), 121-131.

Rehm H. (2006) *Protein Biochemistry and Proteomics*. 1st ed. Academic Press, San Diego, 256 stran.

Rosemond M.J., Walsh J.S. (2004) Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metabolism Reviews* 36 (2), 335-61.

Seddon A.M., Curnow P., Booth P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666, 105– 117.

Skarydová L., Skarka A., Novotná R., Živná L., Martin H.-J., Wsól V., Maser E. (2009) Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology* 264 (1-2), 52-60.

Škarydová L., Živná L., Xiong G., Maser E., Wsól V. (2009) AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chemico-Biological Interactions* 178, 138–144.

Wsól V., Szotakova B., Martin H.-J., Maser E. (2007) Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology* 238, 111–118.

Wsól V., Szotáková B., Skálová L., Maser E. (2003) Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chemico-Biological Interactions 143-144*, 459-468.

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

Zor T., Selinger Z. (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem. 236 (2)*, 302-8.

Internetové zdroje

Internet 1

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/CBA175EA74EC84DFC12577B600828B35/\\$file/28983331AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/CBA175EA74EC84DFC12577B600828B35/$file/28983331AA.pdf), [19.2.2011].

Internet 2

Protein purification - Wikipedia, the free encyclopedia

http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_purification, [19.2.2011].

Internet 3

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/6A9171E8E620D112C1257628001D3707/\\$file/28909531AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/6A9171E8E620D112C1257628001D3707/$file/28909531AA.pdf), [19.2.2011].

Internet 4

Three Phase Protein Purification Strategies

<http://www.biotecharticles.com/Others-Article/Three-Phase-Protein-Purification-Strategies-386.html>, [19.2.2011].

Internet 5

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/\\$file/18102218AK.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/$file/18102218AK.pdf), [19.2.2011].

Internet 6

GE Healthcare Life Sciences - Gel Filtration & Desalting.
http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein_purification~education~gelfiltration_desalting#, [19.2.2011].

Internet 7

Gel permeation chromatography - Wikipedia, the free encyclopedia
http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_permeation_chromatography, [19.2.2011].

Internet 8

What Is Gel Chromatography?
<http://www.thegeminigeek.com/what-is-gel-chromatography/>, [19.2.2011].

Internet 9

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/\\$file/11000421AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/$file/11000421AA.pdf), [19.2.2011].

Internet 10

GE Healthcare Life Sciences - Ion Exchange Chromatography
http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/protein_purification~education~ion_exchange#, [19.2.2011].

Internet 11

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/9264CA5200AB7716C1257628001D2AC7/\\$file/11001269AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/9264CA5200AB7716C1257628001D2AC7/$file/11001269AA.pdf), [19.2.2011].

Internet 12

GE Healthcare Life Sciences - Reversed Phase Chromatography
http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein_purification~education~reversed_phase#, [19.2.2011].

Internet 13

GE Healthcare Life Sciences - Hydrophobic Interaction Chromatography

http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein_purification~education~hydrophobic_interaction#, [19.2.2011].

Internet 14

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/0E9DAB3298C9C74AC1257628001CCDD6/\\$file/18102229AE.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/0E9DAB3298C9C74AC1257628001CCDD6/$file/18102229AE.pdf), [19.2.2011].

Internet 15

GE Healthcare Life Sciences - Affinity Chromatography

http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein_purification~education~affinity#, [19.2.2011].

Internet 16

Biuret test - Wikipedia, the free encyclopedia

http://en.wikipedia.org/wiki/Biuret_test, [19.2.2011].

Internet 17

Lowry Method: A Protein Assay

<http://biotechnology.com/protein/lowry-method-a-protein-assay>, [19.2.2011].

Internet 18

Lowry protein assay - Wikipedia, the free encyclopedia

http://en.wikipedia.org/wiki/Lowry_protein_assay, [19.2.2011].

Internet 19

Protein determination by the BCA method

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bca.html>, [19.2.2011].

Internet 20

AKR Superfamily

<http://www.med.upenn.edu/akr/>, [19.2.2011].