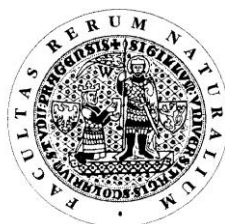


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Denisa Plecitá

CHARAKTERIZACE ENZYMOVÉHO REAKTORU
S IMOBILIZOVANOU ALKALICKOU FOSFATÁZOU

Characterization of enzyme reactor
with immobilized alkaline phosphatase

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla za finanční podpory SSV 264507/2012, PRVOUK P24/LF1/3 a GACR P206/12/0381.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. srpna 2012

Podpis

ABSTRAKT

Fosforylace patří mezi jednu z nejdůležitějších post-translačních modifikací proteinů. Studium procesu fosforylace a defosforylace je velice důležité, neboť abnormální fosforylace proteinů souvisí s řadou vážných onemocnění lidí. Jedním z metod identifikace míst fosforylace proteinů je porovnání hmotnostních spekter vzorku před a po defosforylací fosfatázou. Využití imobilizovaných forem fosfatáz má oproti volným formám řadu výhod, např. možnost opakovaného použití a zvýšení stability enzymu po imobilizaci.

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat vlastnosti enzymového reaktoru - imobilizované hovězí alkalické fosfatázy ze sliznice střeva. Alkalická fosfatáza byla imobilizována přes své volné aminoskupiny na magnetické částice obalené celulórou aktivovanou divinylsulfonem. Při stanovení aktivity byl používán jako substrát p-nitrofenylfosfát.

Byl porovnán vliv pH a koncentrace Mg^{2+} iontů na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy. Dále byla sledována skladovací a teplotní stabilita obou forem enzymu a možnost opakovaného využití imobilizované fosfatázy.

Klíčová slova:

- enzymový reaktor
- vlastnosti alkalické fosfatázy
- magnetické částice
- imobilizace enzymů
- defosforylace

ABSTRACT

Phosphorylation is one of the most common of all post-translational modifications of proteins and has been found in nearly all cellular processes. Abnormal phosphorylation is associated with many serious human diseases. One of the approaches used for the identification of protein phosphorylation sites is based on the application phosphatases and the comparison of MS analysis of samples before and after the sample treatment with the enzyme. The use of phosphatase immobilized to magnetic carriers is advantageous in comparison with the application of soluble enzyme: e.g. easy manipulation of samples, an increase of enzyme stability and a possibility of repeated use of immobilized enzyme.

Investigation of properties of enzyme reactor – bovine alkaline phosphatase from intestinal mucosa immobilized to magnetic particles is a subject of this Bachelor Thesis. The enzyme was coupled to cellulose magnetic particles after activation with divinyl sulfone via the protein free amino groups. p-Nitrophenylphosphate was used as a substrate for the phosphatase activity determination.

The effect of different conditions on the activity of soluble and immobilized forms of alkaline phosphatase was compared: the effect of pH and Mg^{2+} ions, storage stability and thermostability and possibility of repeated use of the immobilized enzyme.

Keywords:

- enzyme reactor
- properties of alkaline phosphatase
- magnetic particles
- immobilization of enzymes
- dephosphorylation

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Fosforylace	9
2.2 Alkalická fosfatáza	12
2.3 Imobilizace enzymů	14
2.3.1 Imobilizace na magnetické částice	16
2.4 Magnetické částice	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 Chemikálie	19
3.2 Přístroje	19
3.3 Pracovní postupy	20
3.3.1 Stanovení aktivity volné a imobilizované fosfatázy	20
3.3.1.1 Obecný postup stanovení aktivity volné fosfatázy	20
3.3.1.2 Obecný postup stanovení aktivity imobilizované fosfatázy	20
3.3.2 Vliv koncentrace p-nitrofenylfosfátu na aktivitu fosfatázy	20
3.3.3 Závislost aktivity alkalické fosfatázy na množství enzymu	21
3.3.4 Vliv pH na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy	21
3.3.5 Vliv Mg^{2+} iontů na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy	21
3.3.6 Vliv teploty na stabilitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy	22
3.3.7 Skladovací stabilita volné a imobilizované alkalické fosfatázy	22
3.3.8 Opakované použití imobilizované alkalické fosfatázy	23
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1 Stanovení aktivity volné a imobilizované alkalické fosfatázy	24
4.2 Vliv koncentrace p-nitrofenylfosfátu na aktivitu volné fosfatázy	25
4.3 Vliv koncentrace p-nitrofenylfosfátu na aktivitu imobilizované fosfatázy	26
4.4 Závislost aktivity volné fosfatázy na množství enzymu	27
4.5 Závislost aktivity imobilizované fosfatázy na množství enzymu	28

4.6 Vliv pH na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy	29
4.7 Vliv Mg^{2+} iontů na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy	30
4.8 Vliv teploty na stabilitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy	31
4.9 Skladovací stabilita volné a imobilizované alkalické fosfatázy	32
4.10 Opakované použití imobilizované alkalické fosfatázy	33
5. ZÁVĚR	34
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35
PODĚKOVÁNÍ	37

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
p-NPP	p-nitrofenylfosfát
rpm	otáčky za minutu
TRIS	tris-(hydroxymetyl)-aminometan

1. ÚVOD

Fosforylace je jednou z nejrozšířenějších a nejpodstatnějších post-translačních modifikací proteinů.

Konformační změna proteinu po navázání fosfátu do fosforylačního místa je samotným principem regulace. Abnormální fosforylace proteinů může proto souviset s řadou těžkých lidských chorob jako je např. rakovina.

Jedním z přístupů k analýze fosfoproteinů je detekce fosforylace pomocí srovnání jejich hmotnostních spekter nebo dvourozměrných elektroforeogramů před a po defosforylací fosfatázou.

Využití imobilizovaných forem fosfatáz má oproti volným formám řadu výhod, například rychlé a snadné přidání do vzorku a následně jeho rychlé a snadné odebrání ze vzorku, nebo zvýšení stability enzymu po imobilizaci. Možnost opakovaného použití fosfatázy imobilizované na magnetické částice zvyšuje ekonomičnost analýzy, navíc nedochází ke kontaminaci vzorku samotnou fosfatázou.

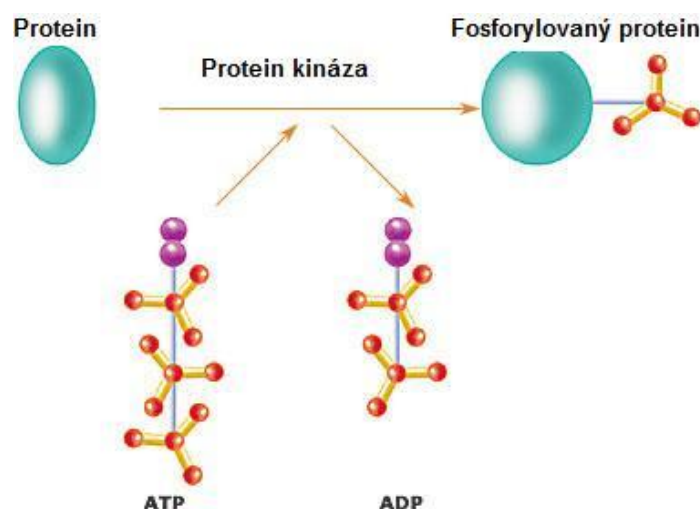
Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vlastnosti volné a imobilizované hovězí alkalické fosfatázy ze sliznice střeva. Byl zkoumán vliv pH a Mg^{2+} iontů na aktivitu fosfatáz. Dále byla sledována skladovací a teplotní stabilita enzymů a možnost opakovaného použití imobilizované fosfatázy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fosforylace

Fosforylace proteinů je důležitá post-translační modifikace, která se významně podílí na regulaci biologických procesů. Až jedna třetina všech proteinů v eukaryotních organismech je v určitém okamžiku fosforylována [1-3].

Za přenos fosfátové skupiny z adenosintrifosfátu (ATP) na zbytky určitých aminokyselin odpovídají enzymy zvané protein kinázy (obr. 1), z nichž je 518 zakódováno v lidském genomu [3]. Blízké dokončení určení sekvence lidského genomu nám dovoluje identifikovat téměř všechny lidské protein kinázy. Počet 518 je sice poloviční, než bylo předpokládáno před 15 lety, ale i tak je zastoupení kináz 1,7 % z celého genomu opravdu velké [4].



Obr. 1 Princip funkce protein kináz – enzymy využívají svou γ -fosfátovou skupinu z ATP pro vznik monoesteru s hydroxylovými skupinami aminokyselin proteinů [5]

(převzato z http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch4_kinases.jpg; cit. 17.4.2012)

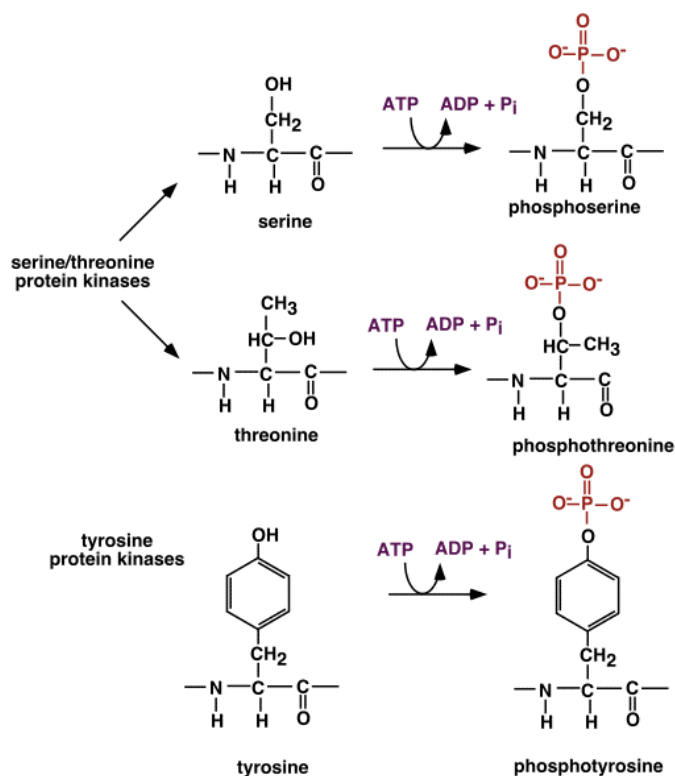
Fosforylace je děj reverzibilní. Za defosforylaci bílkovin odpovídá o něco menší skupina enzymů zvaných fosfatázy. Počet známých fosfatáz je okolo 100 [3, 6].

Fosforylace ovlivňuje konformaci a funkci proteinů a reguluje enzymovou aktivitu. To má vliv na různé buněčné děje, například na přenos signálu, homeostázu,

proliferace, buněčné diferenciace, metabolismus a dělení buněk [1]. Zvláště pak může fosforylace či defosforylace aktivovat či deaktivovat proteiny/enzymy a zprostředkovat tak řadu signálních drah. Abnormální fosforylace proteinů mohou vést ke změnám chování buněk a tím k celé řadě onemocnění lidí, např. k rakovině [2]. Studium mutací a poruch kináz nám poskytuje možnost vytvoření agonistů a antagonistů těchto enzymů pro použití k léčbě onemocnění. Kompletní katalog lidských protein kináz pomáhá v charakterizaci genů lidských chorob [4].

Jsou známy čtyři typy vazeb fosfátů v peptidovém řetězci podle druhu iontu, na který se naváží: O-fosfáty, N-fosfáty, S-fosfáty a acyl-fosfáty. O-fosfáty vznikají fosforylací hydroxylových skupin serinových, threoninových a tyrosinových zbytků (obr. 2). N-fosfáty jsou vytvářeny fosforylací volné aminoskupiny histidinových, argininových a lysinových zbytků. S-fosfáty jsou vytvářeny při fosforylaci cysteinu. Acyl-fosfáty vznikají fosforylací zbytků asparagových a glutamových kyselin [6-8].

U eukaryotních a prokaryotních organismů se liší zastoupení jednotlivých typů fosforylovaných aminokyselin. V proteinech eukaryotních organismů jsou nejrozšířenější O-fosfáty. Nejčastěji podstupují fosforylaci serinové a threoninové zbytky, méně pak tyrosinové. V buňce najdeme fosfoserin, fosfothreonin a fosfotyrosin v poměru 1800:200:1 [1, 6-8].



Obr. 2 Vznik nejrozšířenějších fosforylovaných aminokyselin u eukaryot-fosfoserin, fosfothreonin a fosfotyrosin

(převzato z <http://bass.bio.uci.edu/~hudel/bs99a/lecture26/phosphoaa.gif>; cit. 17.4.2012)

U prokaryot jsou nejčastěji zastoupeny N-fosfáty (hlavně fosfohistidin) a acyl-fosfáty. Ostatní fosforylované aminokyseliny se objevují v organismech jen zřídka [1, 8].

Identifikace fosforylačních míst v proteinech hraje důležitou roli v proteomice [3]. Vysoce výkonné technologie, např. hmotnostní spektrometrie, umožnily v posledních letech identifikaci nových fosforylačních míst. Existuje několik databází s identifikovanými fosforylačními místy, například Phospho.ELM, Phosida, PhosphoSite, PhosphoPep nebo PhosPhAt. I přes velké množství informací však pořád není zcela prozkoumán vzorec, podle kterého se fosforylace řídí [2].

2.2 Alkalická fosfatáza

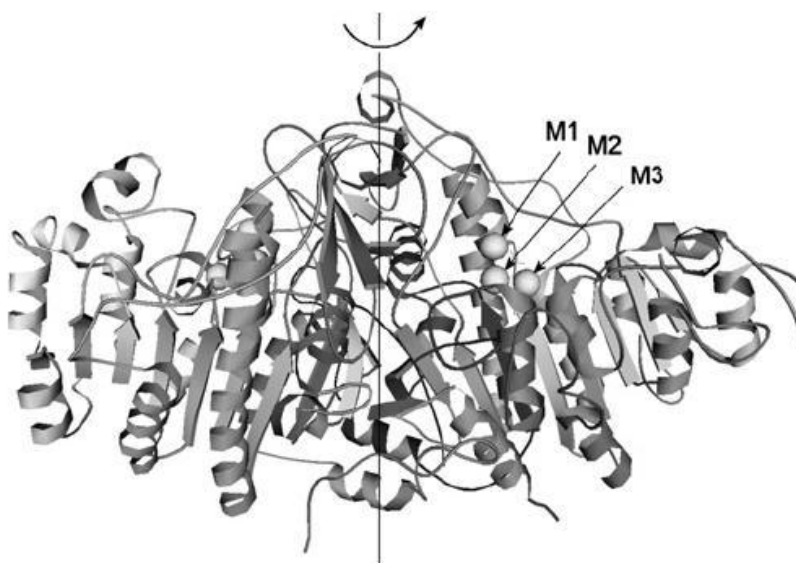
Alkalická fosfatáza (ALP, EC.3.1.3.1) patří mezi hydrolázy (3. třída enzymů), které katalyzují štěpení esterové vazby, konkrétně monoestery kyseliny fosforečné ve vysokém pH (9-10) [9, 11, 12]:



Také katalyzuje transfosforylační reakce (přenášení zbytku kyseliny fosforečné na organickou látku, např. alkohol), pokud je přítomen dostatek akceptorů fosfátové skupiny.

Tento membránový enzym se vyskytuje hojně v přírodě. Až na několik rostlin byl nalezen ve většině organismů od bakterie po člověka. U savců se vyskytuje např. v játrech, placentě, kostech, ledvinách a ve střevě [9-12].

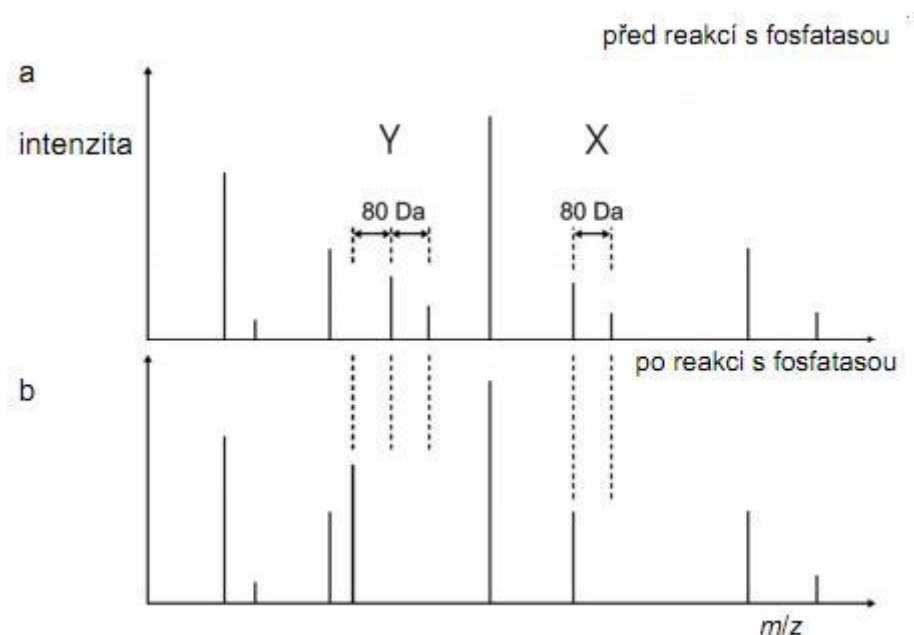
Až na několik málo výjimek je ALP dimer, složený ze dvou identických podjednotek. ALP patří mezi metaloproteiny. Ve své molekule obsahuje tři ionty kovů – dva ionty zinečnaté a jeden ion hořečnatý (obr. 3) [9-12]. Zinečnaté ionty se přímo účastní katalytické reakce, zatímco funkce hořečnatého iontu je jiná, nejspíše stabilizuje přenášenou fosfátovou skupinu [13].



Obr. 3 Struktura alkalické fosfatázy *E.coli*, s vyznačenými místy navázaných iontů kovů (M1 – Zn^{2+} , M2 – Zn^{2+} , M3 – Mg^{2+}) [12]

Přesná funkce ALP v organismu není známa, ačkoli její mutace má zásadní úlohu v kostní mineralizaci [10, 11].

Alkalickou fosfatázu lze v praxi použít při identifikaci fosforylačních míst v proteinech/peptidech. Jak bylo řečeno v úvodu, jedním z přístupů při analýze fosfoproteinů je detekce fosforylace pomocí např. srovnání jejich hmotnostních spekter před a po defosforylaci fosfatázou. Píky fosfoproteinů/fosfopeptidů po reakci zcela zmizí. Po porovnání obou spekter lze odlišit fosforylovaný protein/peptid pomocí charakteristického posunu hodnoty m/z způsobeného ztrátou fosfátové skupiny (Δm 80 Da). V případě několikanásobné fosforylace dochází ke snížení m/z o hodnotu $n \times 80$ Da, kde n odpovídá počtu fosfátových skupin v proteinu (obr. 4) [7].



Obr. 4 Srovnání hmotnostních spekter před (a) a po (b) reakci s alkalickou fosfatázou. Peptid X obsahuje jeden fosfát ($\Delta m = 80$ Da), zatímco peptid Y obsahuje fosfáty dva ($\Delta m = 2 \times 80$ Da) [7]

2.3 Imobilizace enzymů

Biokatalyzátory mají řadu výhod, jako je vysoký stupeň účinnosti a vysoká selektivita. Nicméně existuje několik praktických problémů, jako jsou vysoké náklady nebo omezená stabilita, které je třeba řešit. Za užitečnou metodu k překonání těchto problémů se považuje imobilizace enzymů na pevné nosiče [14].

Imobilizace enzymů byla definována jako vazba enzymu na pevnou fázi. Tato fáze je oddělená od fáze kapalné, ve které je rozpuštěn substrát, ale zároveň je s ní v kontaktu. Pevná fáze je například nějaký polymer, na který je navázán enzym pomocí chemické nebo fyzikální vazby [15]. Enzymy imobilizované na pevné nosiče jsou označovány jako enzymové reaktory.

Bylo vyvinuto několik metod imobilizací. Konkrétně to jsou adsorpce, kovalentní vazba, enkapsulace a zachycení (obr. 5) [16].



Obr. 5 Znázornění druhů imobilizace [16]

V některých případech lze pro imobilizaci proteinů využít přímou fyzikální sorpci na nosič, která je jednou z nejstarších metod a stala se jednoduchým, ekonomicky výhodným a snadným postupem. Fyzikální sorpce je však méně spolehlivá a málo stabilní ve srovnání s imobilizací kovalentními vazbami [17].

Další používanou fyzikální technikou imobilizace je zabudování biologicky aktivních látek, případně celých buněk, do gelové matrice. Matrice jsou tvořeny syntetickými polymery, jako jsou polyakrylamid, polyuretany nebo různé typy pryskyřic, dále proteiny (želatina, kolagen, vaječný bílek) a polysacharidy (agar, agarosa, karagenany nebo algináty). Nevýhodou tohoto postupu může být postupné uvolňování imobilizované látky [17].

Kovalentní imobilizace je nejčastější a nejúčinnější imobilizační technikou. Vyžaduje, aby nosič obsahoval funkční skupiny, např. $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-SH$ nebo $-CONH_2$. Působením různých činidel se funkční skupiny na povrchu nosiče aktivují pro navázání biomolekul [17].

Výhody imobilizovaného enzymu před rozpustným jsou:

- vyšší stabilita
- snadné oddělení enzymu od reakční směsi, což vede k lepší kontrole reakčních časů, ke snížení pracnějších separačních technik a k minimální ztrátě enzymu v reakci
- možnost opakovaného použití, což vede k významným úsporám [18, 19].

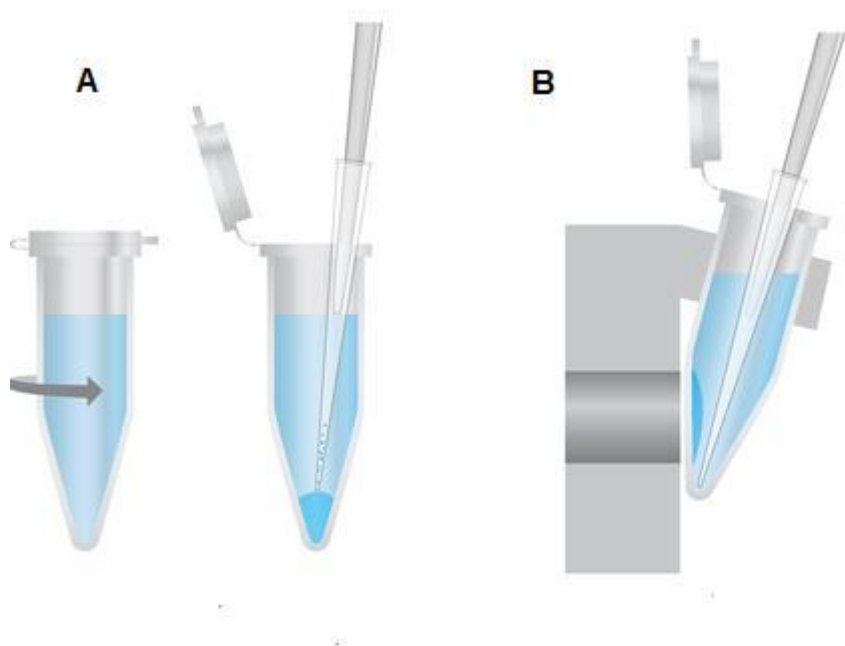
Imobilizací se však může změnit i chování biokatalyzátoru. Bylo prokázáno, že imobilizace má vliv jak na stabilitu enzymu, tak i na K_m , V_{max} a pH optimum. Také citlivost na inhibitory a aktivátory může být změněna [15].

Během několika posledních desetiletí intenzivní výzkum v oblasti enzymové technologie poskytl mnoho přístupů, které umožňují jejich praktické aplikace v průmyslu a lékařství [19].

2.3.1 Imobilizace na magnetické částice

Magnetické separační techniky mají několik výhod ve srovnání s ostatními separačními postupy. Tento proces je obvykle velmi jednoduchý, stačí jen několik kroků ke zpracování vzorku. Všechny kroky mohou probíhat v jedné zkumavce (nebo v jiné nádobě). Není nutné použít drahé přístroje kapalinové chromatografie, odstředivky, filtrační či jiná složitá zařízení [20].

Magnetické nosiče s imobilizovaným ligandem jsou smíchány se vzorkem obsahujícím cílové sloučeniny. Po inkubační době, kdy reaguje cílová sloučenina s modifikovanými magnetickými částicemi, se magnetické částice snadno a rychle odstraní ze vzorku pomocí vhodného magnetického separátoru (obr. 6) [20].



Obr. 6 Schématické znázornění způsobu odebrání roztoku od nemagnetických částic po odstředování vzorku (A) a odebrání roztoku od magnetických částic za využití magnetu (B)

(převzato z <http://www.biotechniques.com/biomarket/newproducts/Antibody-purification-tools/biotechniques-11709.html>, cit. 7.5. 2012)

2.4 Magnetické částice

Stručný historický přehled

Jako první magnetické částice byly použity čisté magnetické oxidy železa (magnetit), které byly použity k adsorpci a odstranění rozpuštěných a koloidních biologických látek z odpadních vod již v roce 1940. Nicméně, aplikace magnetických částic s funkčními skupinami pro selektivní zachycení užitečných biomolekul, jsou popsány až od počátku roku 1970. V té době Peter Dunnill a Malcolm Lilly v University College London popsali použití magnetických mikročástic jako nosičů pro imobilizaci enzymů, nebo jako afinitní absorbenty. Ty byly určeny pro izolaci biomolekul přímo z rosy [21].

Nové techniky rychle upoutaly pozornost jiných skupin a rozšířily se dál. Po roce 1970 se objevily první komerčně dostupné magnetické nosiče. Následoval zájem o další materiály a magnetické částice se začali uplatňovat v oblastech buněčného dělení, imunologických metodách a v izolacích virů a organel [21].

Vlastnosti magnetických částic

Z fyzikálního hlediska by měly částice být neporézní, mít vysoký specifický povrch ($20 - 100 \text{ m}^2/\text{g}$), měly by být snadno oddělitelné pomocí jednoduchého magnetického pole a důležitá je stejná velikost částic. Velikost částic by měla být alespoň 500 nm [21]. Nejčastěji se průměr částic pohybuje v rozmezí od 50 nm do 10 μm [20].

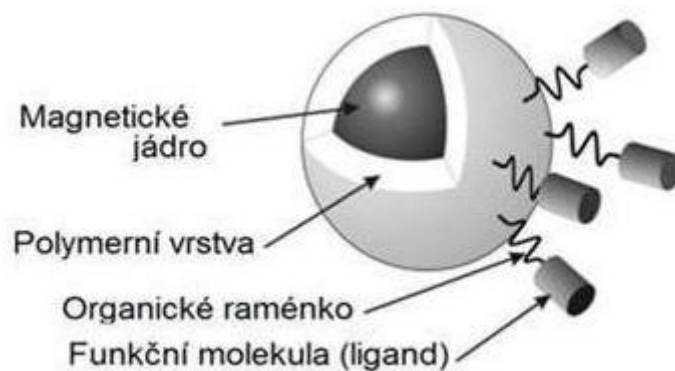
Magnetické částice sorbentu mají obecně superparamagnetické vlastnosti. Superparamagnetické materiály jsou snadno zmagnetizovány v přítomnosti externího magnetu, ale nevykazují žádnou zbytkovou magnetizaci, tj. jsou bez magnetické paměti [21].

Magnetické nosiče mohou být buď připraveny v laboratoři, nebo jsou i komerčně dostupné. Tyto nosiče jsou obvykle k dispozici ve formě magnetických částic připravených z různých syntetických polymerů, biopolymerů, porézního skla nebo magnetických částic na bázi anorganických magnetických materiálů [20].

Co se týče anorganických materiálů, mezi těmito částicemi jsou oxidy kovů preferovanější než kovy samotné (Fe, Co a Ni) a to z důvodu vyšší odolnosti před oxidací [22]. Nejčastěji se jedná o částice s magnetitem (Fe_3O_4) nebo maghemitem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [23].

Výhoda polymerního složení vyplývá z dostatečného množství funkčních skupin, které jsou potřebné pro další aplikace (obr. 7). Například funkcionalizace povrchu

částic konkrétními ligandy umožňuje jejich použití v imunochemických metodách, v izolaci nukleových kyselin, buněk nebo mikroorganismů [22].



Obr. 7 Příklad schéma magnetického nosiče pro biotechnologické aplikace

(Převzato z <http://www.chempoint.cz/magneticke-nano-a-mikrocastice-pro-biotechnologicke-aplikace>; Cit. 7.5 2012)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- hovězí alkalická fosfatáza ze sliznice střeva (EC 3.1.3.1), (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- p-nitrofenylfosfát disodná sůl (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou – magnetické částice obalené celulózą aktivovanou divinylsulfonem, na které je imobilizovaná hovězí alkalická fosfatáza ze sliznice střeva : 0,5 M uhličitanovému pufru pH 9,8 obsahujícím 0,5 mM MgCl_2 a 0,03% NaN_3 v poměru 1:24; na 1 ml usazených magnetických částic bylo imobilizováno 33 mg alkalické fosfatázy (vyrobena RNDr. Janou Frýdlovou, Ph.D., Ústav patologické fyziologie 1. LF UK Praha, ČR)
- uhličitan sodný bezvodý p. a (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- hydroxid sodný p. a (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- hexahydrát chloridu hořečnatého p. a (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- kyselina chlorovodíková konc. p. a (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan p. a (Ing. Petr Lukeš, ČR)

3.2 Přístroje

- Analytické váhy AB104 (Meter Toledo, Švýcarsko)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA, Německo)
- Magnetický stojánek Dynal (Biotech, Norsko)
- Termoblok Accu Block Digital Dry Bath (Labnet International, UK)
- pH metr Jenway (Essex, UK)
- Mikrodestičkový fotometr Multiskan Microplate Readeru MCC/340 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Přístroj na přípravu destilované vody Milli-Q systém (Millipore Corporation, USA)

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Stanovení aktivity volné a imobilizované fosfatázy

Metoda stanovení aktivity alkalické fosfatázy dle Bernstineho et al. byla modifikována [24].

3.3.1.1 Obecný postup stanovení aktivity volné fosfatázy

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 50 μ l pufru a 25 μ l roztoku alkalické fosfatázy. Enzymová reakce byla spuštěna přidáním 25 μ l roztoku substrátu p-NPP. Po 5 min inkubaci za laboratorní teploty a za stálého třepání rychlostí 1400 rpm byla reakce ukončena přidáním 1 ml 1 M NaOH. Následně byla v mikrotitrační destičce změřena absorbance 200 μ l reakčního roztoku oproti slepému vzorku při vlnové délce 405 nm. Stanovení bylo provedeno paralelně ve třech stanoveních.

3.3.1.2 Obecný postup stanovení aktivity imobilizované fosfatázy

Do mikrozkušavky byla napipetována suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou. Magnetické částice byly promyty 5 \times 70 μ l pufru. Poté byly promyté částice resuspendovány v 70 μ l pufru. Enzymová reakce byla spuštěna přidáním 70 μ l roztoku substrátu p-NPP. Reakce probíhala 5 minut za laboratorní teploty za stálého třepání rychlostí 1400 rpm a poté byla ukončena oddělením magnetických částic pomocí magnetického separátoru. 50 μ l roztoku supernatantu bylo smícháno s 0,5 ml 1 M NaOH. Následně byla v mikrotitrační destičce změřena absorbance 200 μ l reakčního roztoku oproti slepému vzorku při vlnové délce 405 nm. Stanovení bylo provedeno paralelně ve čtyřech stanoveních.

3.3.2 Vliv koncentrace p-nitrofenylfosfátu na aktivitu fosfatázy

Volná fosfatáza – při stanovení aktivity byly použity roztoky substrátu p-NPP o koncentracích 0,25 – 64 mg/ml H₂O, roztok volné fosfatázy o koncentraci 22 μ g/ml H₂O a 0,5 M uhličitanový pufr pH 9,8 obsahující 0,45 mM MgCl₂. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.1.

Imobilizovaná fosfatáza – při stanovení aktivity byly použity roztoky substrátu p-NPP o koncentracích 2 – 64 mg/ml H₂O, 2,5 μ l suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou a 0,5 M uhličitanový pufr pH 9,8 obsahující 0,45 mM MgCl₂. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.2.

3.3.3 Závislost aktivity alkalické fosfatázy na množství enzymu

Volná fosfatáza – při stanovení aktivity byly použity roztoky fosfatázy o koncentraci 2,7 – 44,0 µg/ml H₂O, roztok p-NPP o koncentraci 64 mg/ml H₂O a 0,5 M uhličitanový pufr pH 9,8 obsahující 0,45 mM MgCl₂. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.1.

Imobilizovaná fosfatáza – při stanovení aktivity bylo použito 0,75 – 3,0 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou, roztok p-NPP o koncentraci 32 mg/ml H₂O a 0,5 M uhličitanový pufr pH 9,8 obsahující 0,45 mM MgCl₂. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.2.

3.3.4 Vliv pH na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Volná fosfatáza – při stanovení aktivity byl použit roztok fosfatázy o koncentraci 18 µg/ml H₂O, roztok p-NPP o koncentraci 64 mg/ml H₂O a pufrů 0,5 M TRIS-HCl obsahující 0,45 mM MgCl₂ pH 7,0 – 9,0 nebo 0,5 M uhličitanový pufr obsahující 0,45 mM MgCl₂ pH 9,5 – 10,5. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.1.

Imobilizovaná fosfatáza – při stanovení aktivity bylo použito 2,5 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou, roztok p-NPP o koncentraci 32 mg/ml H₂O a pufrů 0,5 M TRIS-HCl obsahující 0,45 mM MgCl₂ pH 7,0 – 9,0 nebo 0,5 M uhličitanový pufr obsahující 0,45 mM MgCl₂ pH 9,5 – 10,5. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.2.

3.3.5 Vliv Mg²⁺ iontů na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Volná fosfatáza – při stanovení aktivity byl použit roztok fosfatázy o koncentraci 18 µg/ml H₂O, roztok p-NPP o koncentraci 64 mg/ml H₂O a 0,5 M uhličitanový pufr pH 9,8 obsahující $4,5 \times 10^{-6}$ – 4,5 mM MgCl₂. Před stanovením aktivity byl roztok enzymu vždy inkubován 12 minut v 0,5 M uhličitanovém pufru pH 9,8 s příslušnou koncentrací MgCl₂. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.1.

Imobilizovaná fosfatáza – při stanovení aktivity bylo použito 2,5 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou, roztok p-NPP o koncentraci 32 mg/ml H₂O a 0,5 M uhličitanový pufr pH 9,8 obsahující $4,5 \times 10^{-6}$ – 4,5 mM MgCl₂. Před stanovením aktivity byla suspenze částic vždy inkubována 12 minut v 0,5 M uhličitanovém pufru pH 9,8 s příslušnou koncentrací MgCl₂. Postup stanovení aktivity viz kap. 3.3.1.2.

3.3.6 Vliv teploty na stabilitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Volná fosfatáza – Byl připraven roztok volné fosfatázy o koncentraci 18 µg/ml H₂O. Tento roztok byl inkubován při teplotě 25; 37 a 50 °C po dobu 0,5; 1; 2 a 5 hodin v 0,5 M uhličitanovém pufru pH 9,8 obsahujícím 0,45 mM MgCl₂. Po ochlazení na 25 °C byla stanovena aktivita (viz kapitola 3.3.1.1. s roztokem p-NPP o koncentraci 64 mg/ml H₂O) Relativní aktivita byla vyjádřena v procentech aktivity fosfatázy, která byla inkubována příslušnou dobu pouze při 25 °C.

Imobilizovaná fosfatáza – Nejdříve byla stanovena aktivita 2,5 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou (viz kapitola 3.3.1.2. s roztokem p-NPP o koncentraci 32 mg/ml H₂O a 0,5 M uhličitanovým pufrům pH 9,8 obsahujícím 0,45 mM MgCl₂). Poté byly částice promyty 5×70 µl 0,5 M uhličitanového pufru pH 9,8 obsahující 0,45 mM MgCl₂. Částice byly následně inkubovány ve 200 µl 0,5 M uhličitanového pufru pH 9,8 obsahujícího 0,45 mM MgCl₂ při teplotě 25; 37 a 50 °C po dobu 0,5; 1; 2 a 5 hodin. Po ochlazení roztoku s částicemi na teplotu 25 °C byly částice resuspendovány v 70 µl 0,5 M uhličitanového pufru pH 9,8 obsahujícího 0,45 mM MgCl₂, ve kterém byla stanovena aktivita imobilizovaného enzymu dle kapitoly 3.3.1.2. Relativní aktivita byla vyjádřena v procentech aktivity fosfatázy; 100 % aktivity odpovídalo aktivitě stanovené po inkubaci enzymu při 25 °C.

3.3.7 Skladovací stabilita volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Po dobu 19 týdnů byla sledována změna aktivity volné fosfatázy (o koncentraci 18 µg/ml skladovacího roztoku) a suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou. Obě formy fosfatázy byly skladovány v 0,5 M uhličitanovém pufru pH 9,8 obsahující 0,45 mM MgCl₂ a 0,03 % NaN₃ při teplotě 4 °C.

Volná fosfatáza – do mikrozkuřavky bylo napipetováno 25 µl roztoku fosfatázy, 25 µl 0,5 M uhličitanového pufru pH 9,8 obsahujícího 0,45 mM MgCl₂ a 25 µl H₂O. Enzymová reakce byla spuštěna přidáním 25 µl roztoku p-NPP o koncentraci 64 mg/ml H₂O. Po 5 min inkubaci za laboratorní teploty a za stálého třepání rychlostí 1400 rpm byla reakce ukončena přidáním 1 ml 1 M NaOH. Následně byla v mikrotitrační destičce změřena absorbance 200 µl reakčního roztoku oproti slepému vzorku při vlnové délce 405 nm. Stanovení bylo provedeno v tripletu.

Imobilizovaná fosfatáza - Stanovení aktivity bylo provedeno dle kapitoly 3.3.1.2.

3.3.8 Opakované použití imobilizované alkalické fosfatázy

Stanovení aktivity bylo provedeno 10× po sobě (postup dle kapitoly 3.3.1.2 s 2,5 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou, roztokem p-NPP o koncentraci 32 mg/ml H₂O a 0,5 M uhličitanovým pufrem pH 9,8 obsahujícím 0,45 mM MgCl₂). Mezi jednotlivými stanoveními byly magnetické částice promyty 5×70 µl 0,5 M uhličitanového pufru pH 9,8 obsahujícího 0,45 mM MgCl₂. Stanovení bylo provedeno paralelně v deseti stanoveních.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení aktivity volné a imobilizované alkalické fosfatázy

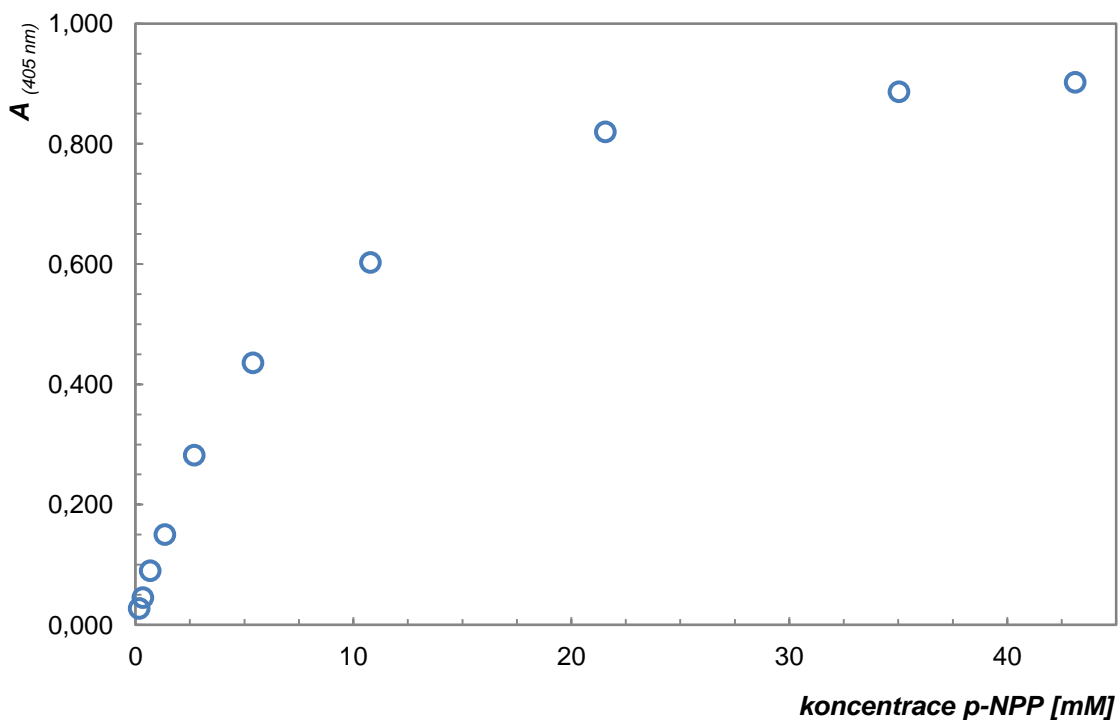
Principem stanovení aktivity alkalické fosfatázy je štěpení chromogenního substrátu p-nitrofenylfosfátu na žlutý p-nitrofenol a fosfát (obr. 8). Reakce je ukončena přidavkem NaOH a vzniklý p-nitrofenolát, který získá intenzivnější žluté zabarvení, se stanovuje fotometricky při vlnové délce 405 nm. Intenzita zabarvení je přímo úměrná vzniklému p-nitrofenolátu a tím aktivitě enzymu.



Obr. 8 Hydrolytické štěpení p-nitrofenylfosfátu alkalickou fosfatázou

4.2. Vliv koncentrace p-nitrofenylfosfátu na aktivitu volné fosfatázy

Byla proměřena závislost aktivity fosfatázy na koncentraci substrátu p-NPP (0,2 - 43 mM). Z obr. 9 je patrné, že až od koncentrace p-NPP 35 mM nemá koncentrace substrátu vliv na rychlost reakce. Pro další studie byla proto zvolena koncentrace p-NPP 43 mM.

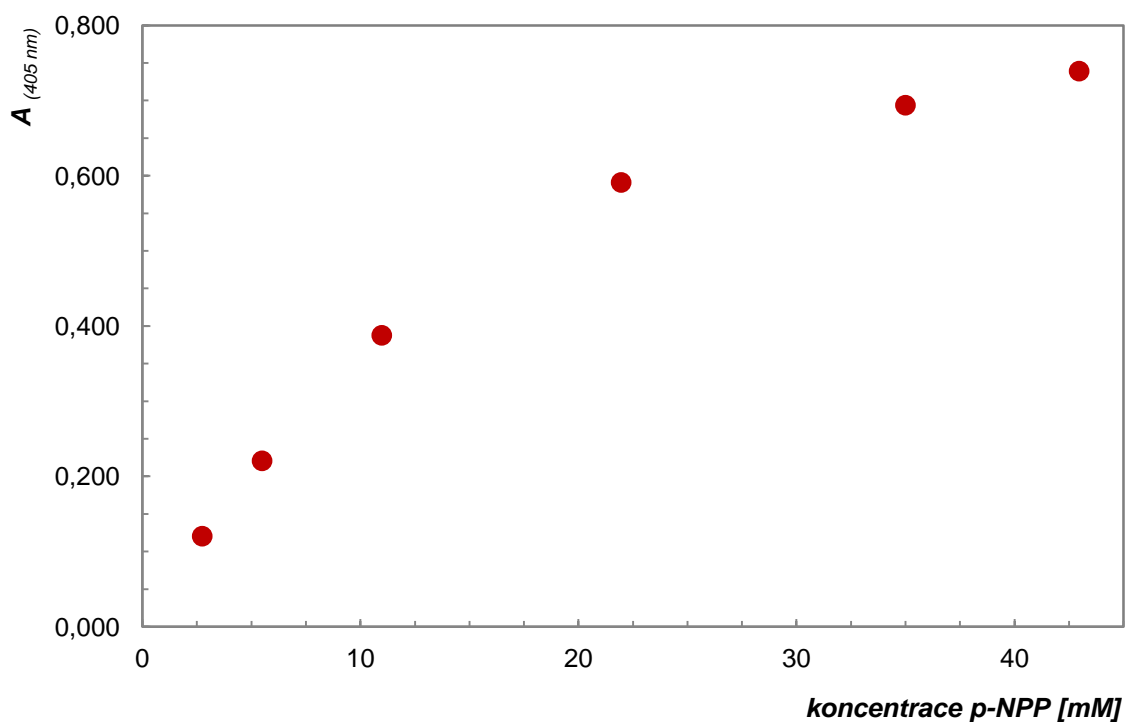


Obr. 9 Závislost aktivity volné fosfatázy na koncentraci p-nitrofenylfosfátu

Aktivita fosfatázy je vyjádřena v absorbanci (405 nm) odpovídající množství vzniklého p-nitrofenolátu; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.2

4.3 Vliv koncentrace p-nitrofenylfosfátu na aktivitu imobilizované fosfatázy

Byla proměřena závislost aktivity fosfatázy na koncentraci substrátu p-NPP (2,7 - 43 mM). Z obr. 10 je patrné, že stejně jako u volné fosfatázy nemá ani u imobilizované formy enzymu vliv na rychlost reakce koncentrace substrátu větší než 35 mM. Pro další studie tedy byla zvolena také koncentrace p-NPP 43 mM.

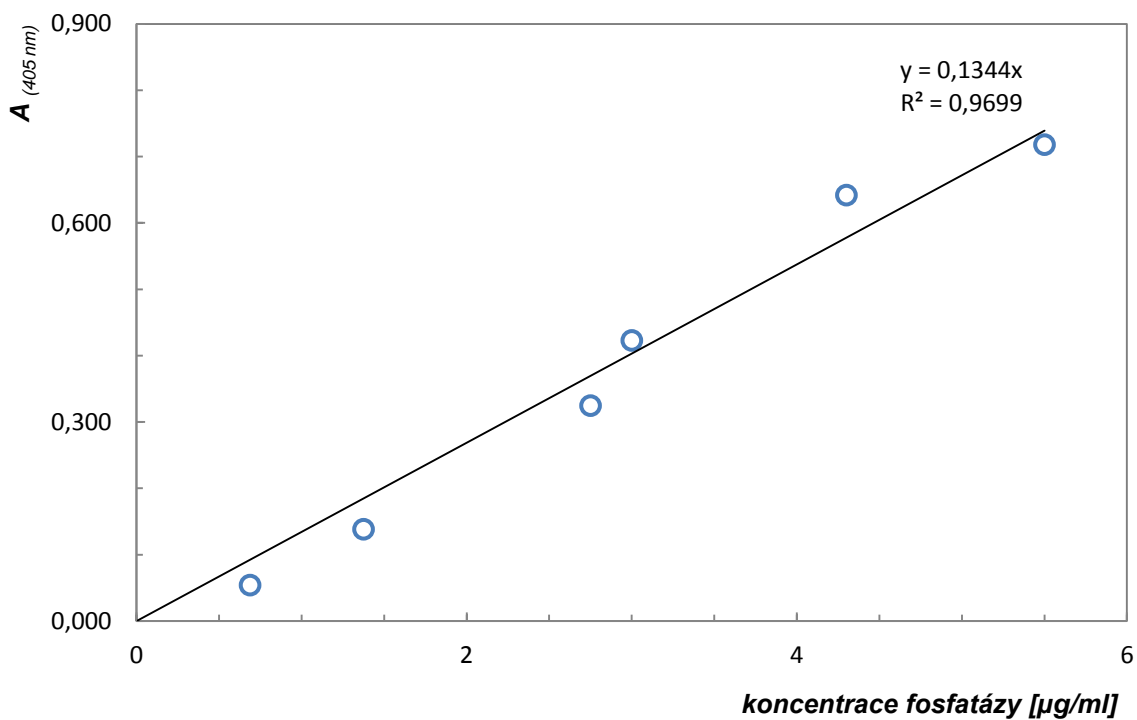


Obr. 10 Závislost aktivity imobilizované fosfatázy na koncentraci p-nitrofenylfosfátu

Aktivita fosfatázy je vyjádřena v absorbanci (405 nm) odpovídající množství vzniklého p-nitrofenolátu; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.2

4.4 Závislost aktivity volné fosfatázy na množství enzymu

Byla proměřena závislost aktivity fosfatázy na jejím množství (0,7 - 11 µg/ml). Na obr. 11 vidíme, že závislost absorbance fosfatázy na její koncentraci je lineární. Pro další pokusy se zvolila střední hodnota této závislosti, tedy 4,5 µg/ml.

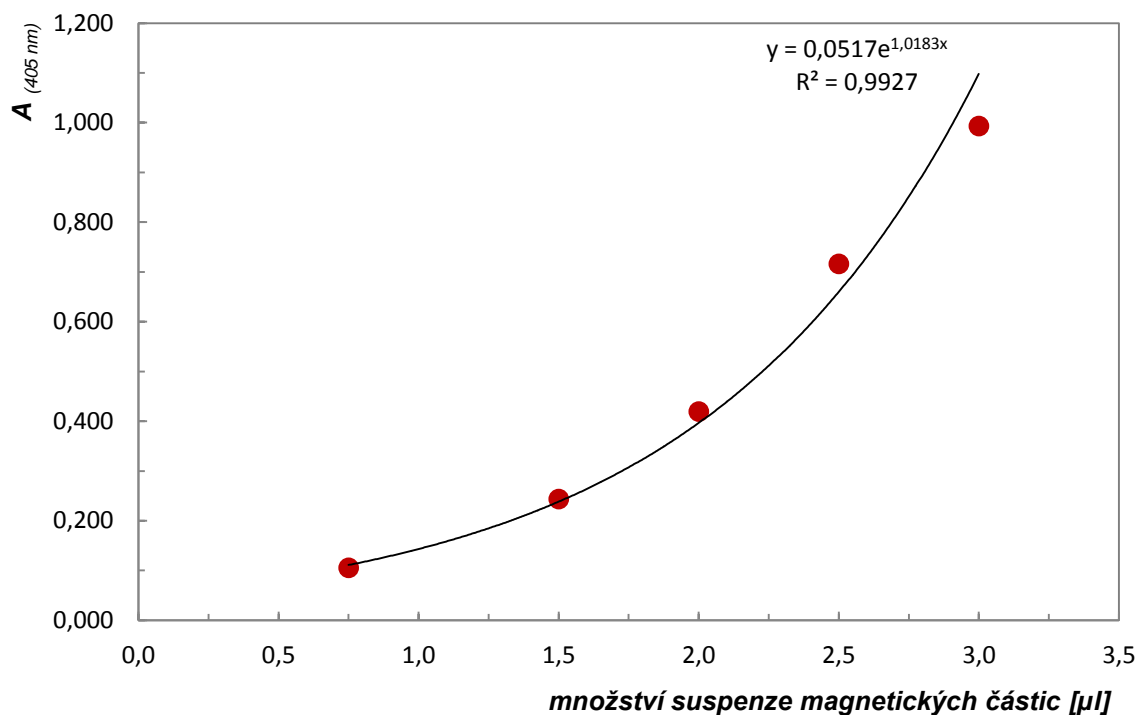


Obr. 11 Závislost aktivity volné fosfatázy na množství enzymu

Aktivita fosfatázy je vyjádřena v absorbanci (405 nm) odpovídající množství vzniklého p-nitrofenolátu; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.3

4.5 Závislost aktivity imobilizované fosfatázy na množství enzymu

Byla proměřena závislost aktivity fosfatázy na množství imobilizované fosfatázy (0,99 – 3,96 µg), odpovídající 0,75 - 3 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou. Tato závislost roste exponenciálně (obr. 12). Pro další studie se používalo 2,5 µl suspenze částic s imobilizovanou fosfatázou.



Obr. 12 Závislost aktivity imobilizované fosfatázy na množství enzymu

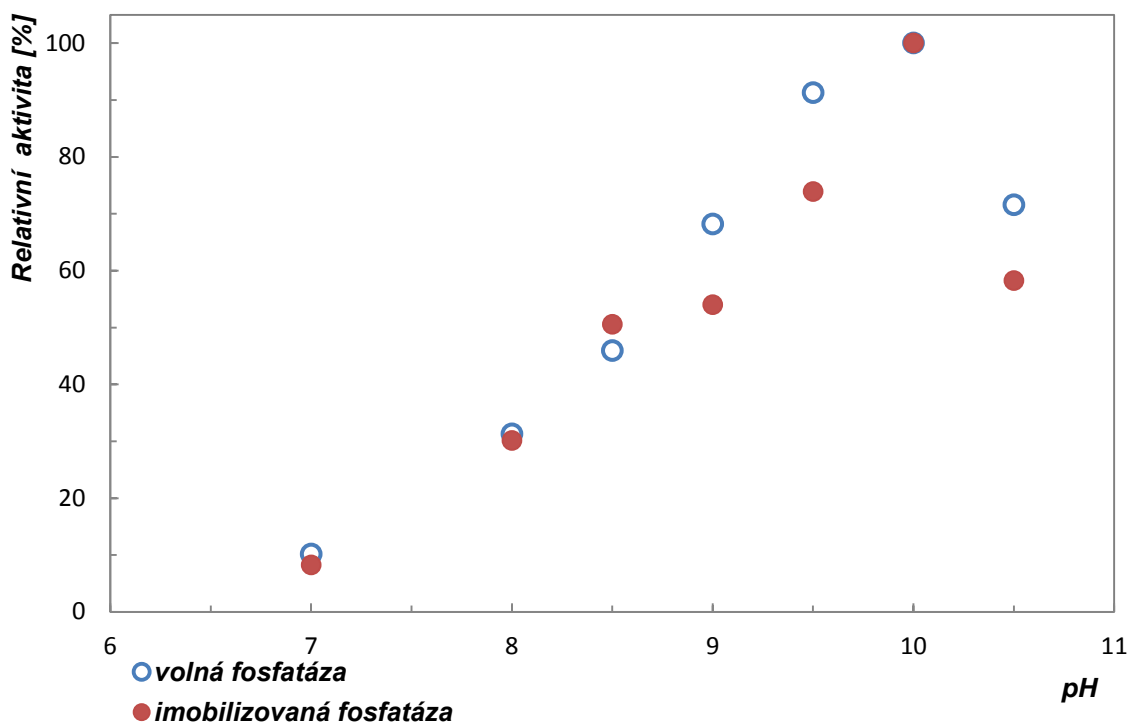
Aktivita fosfatázy je vyjádřena v absorbanci (405 nm) odpovídající množství vzniklého p-nitrofenolátu; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.3

4.6 Vliv pH na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Optimální pH hydrolýzy se u alkalických fosfatáz různého původu liší, ale obvykle je toto pH v rozmezí hodnot 9,0 – 10,0 [9, 11, 12]. Cílem této části práce bylo pomocí substrátu p-NPP porovnat vliv pH na aktivitu volné a imobilizované hovězí alkalické fosfatázy. Závislost aktivity fosfatázy na pH vykazuje u obou forem podobný charakter (obr. 13). Nejvyšší aktivitu měly obě formy alkalické fosfatázy při pH 10,0.

Obdobně jako v našem případě nebyly pozorovány žádné rozdíly v pH optimu u kyselé bramborové fosfatázy imobilizované na sukcinylamidopropylkové skleněné kuličky [25].

Posuny v pH závislostech aktivity enzymů po imobilizaci byly ale pozorovány například u chymotrypsinu [26].



Obr. 13 Vliv pH na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Relativní aktivita je aktivita fosfatázy vyjádřená v procentech aktivity stanovené při pH 10,0; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.4

4.7 Vliv Mg^{2+} iontů na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Alkalická fosfatáza patří mezi metaloproteiny (viz kapitola 2.2). Proto byl zjišťován vliv MgCl_2 na aktivitu volné a imobilizované formy enzymu. Z výsledků (tab. 1) vyplývá, že MgCl_2 v reakci o koncentraci menší než $2,25 \times 10^2 \mu\text{M}$ nemá na aktivitu imobilizované fosfatázy praktický vliv. Volná fosfatáza je při koncentracích MgCl_2 nižších než $2,25 \mu\text{M}$ inhibována o max. 20 % oproti aktivitě v přítomnosti $2,25 \times 10^2 \mu\text{M}$. Koncentrace $2,25 \times 10^3 \mu\text{M}$ MgCl_2 v reakční směsi zvyšuje aktivitu volné a imobilizované fosfatázy o 34 % a 57 % oproti aktivitě v roztoku s koncentrací $2,25 \times 10^2 \mu\text{M}$ MgCl_2 .

Tab. 1 Vliv koncentrace MgCl_2 na aktivitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Koncentrace MgCl_2 v reakci [μM]	Relativní aktivita ^a [%]	
	volná f.	imob.f.
$2,25 \times 10^3$	134	157
$2,25 \times 10^2$	100	100
$2,25 \times 10^1$	94	93
2,25	84	95
$2,25 \times 10^{-1}$	84	97
$2,25 \times 10^{-2}$	84	92
$2,25 \times 10^{-3}$	80	97
0	82	93

^a Relativní aktivita volné fosfatázy (volná f.) a imobilizované fosfatázy (imob.f.) je vyjádřena v procentech aktivity fosfatázy stanovené při koncentraci $2,25 \times 10^2 \mu\text{M}$ MgCl_2 ; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.5

4.8 Vliv teploty na stabilitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Byla sledována stabilita volné a imobilizované alkalické fosfatázy při různých teplotách. Inkubace enzymu probíhala 0,5; 1; 2 a 5 hodin při teplotě 25; 37 a 50 °C. U obou forem fosfatázy došlo k ireverzibilní inaktivaci již po 30 minutách inkubace při 50 °C (data nejsou zobrazena). Imobilizací fosfatázy se snížila tepelná stabilita při 37 °C oproti její volné formě (tab. 2). Volná i imobilizovaná forma enzymu si zachovala ještě po 2 hodinové inkubaci při 37 °C 47 %, respektive 43 % své původní aktivity, tj. aktivity při vystavení fosfatázy pouze 25 °C.

Tab. 2 Vliv teploty 37 °C na stabilitu volné a imobilizované alkalické fosfatázy

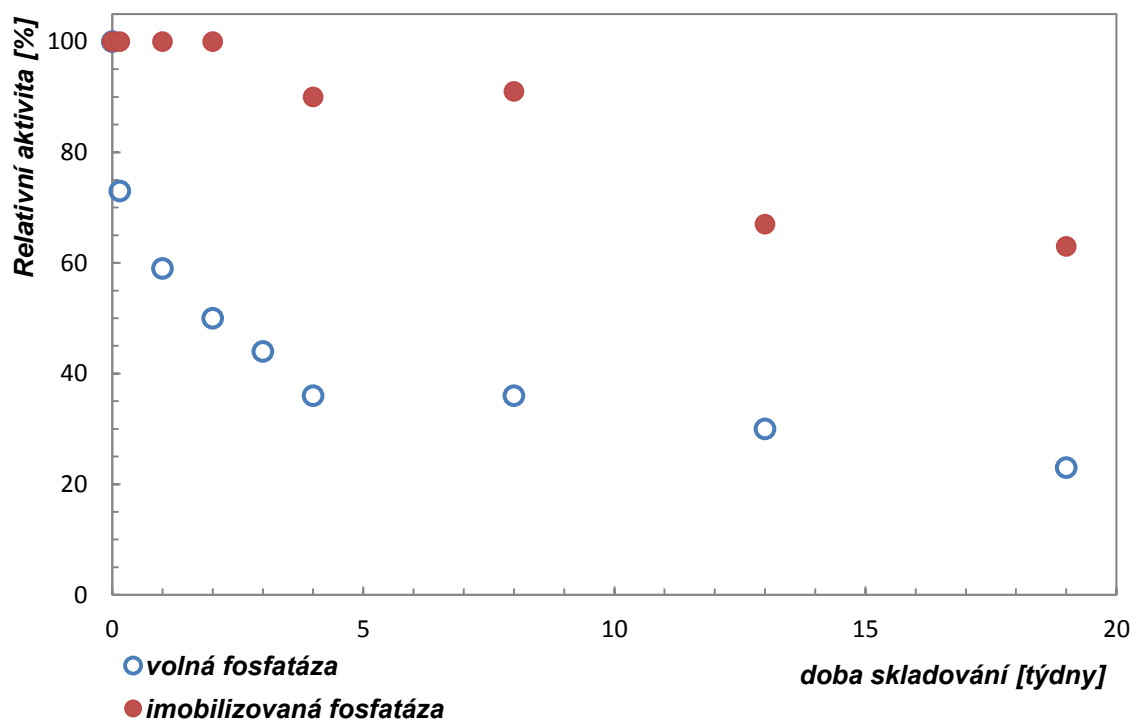
Čas inkubace [h]	Relativní aktivita ^a [%]	
	volná f.	imob. f.
0,5	85	53
1	64	47
2	47	43
5	22	27

^a Relativní aktivita volné fosfatázy (volná f.) a imobilizované fosfatázy (imob.f.) je vyjádřena v procentech aktivity fosfatázy, která byla vystavena jen 25 °C; složení reakční směsi viz kapitola 3.3.6

4.9 Skladovací stabilita volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Imobilizované enzymy jsou během skladování často stabilnější než jejich volné formy [18, 19]. Pro ověření tohoto předpokladu byla během dlouhodobého skladování sledována změna aktivity volné a imobilizované fosfatázy v týdenních a později měsíčních intervalech. Obě formy fosfatázy byly skladovány v 0,5 M uhličitanovém pufru pH 9,8 obsahujícím 0,45 mM MgCl_2 a 0,03% NaN_3 při 4 °C.

U obou forem dochází během skladování k poklesu jejich aktivity (obr. 14). Z obr. 14 je patrné, že již první den skladování klesla aktivita volné fosfatázy o 27 %, zatímco imobilizovaná forma si zachovala ještě 100 % své původní aktivity (tj. v 0. dnu) a to po dobu dvou týdnů. Po 19-ti týdnech klesla aktivita imobilizované formy o 37 %, zatím co aktivita volné formy enzymu klesla o 77%. Stejně jako v případě imobilizace např. proteáz [27] došlo i v našem případě navázáním fosfatázy na magnetické částice ke zvýšení skladovací stability oproti volné formě.



Obr. 14 Skladovací stabilita volné a imobilizované alkalické fosfatázy

Relativní aktivita je vyjádřena v procentech aktivity fosfatázy, která byla stanovena první den (den 0); složení reakční směsi a skladovací podmínky viz kapitola 3.3.7

4.10 Opakované použití imobilizované alkalické fosfatázy

Jednou z výhod imobilizovaných enzymů na pevné nosiče je možnost jejich opakovaného použití [18, 19]. Proto byla sledována změna aktivity imobilizované alkalické fosfatázy během deseti po sobě provedených stanovení aktivity (postup viz kapitola 3.3.8). Po pěti stanoveních klesla aktivita o 9 %, po deseti stanoveních klesla aktivita o 23 %. Tyto výsledky potvrzují, že lze imobilizovanou alkalickou fosfatázu na magnetických částicích použít vícekrát, na rozdíl od volného enzymu, který je použitelný pouze jednou. Stejně tomu bylo i v případě imobilizace např. proteolytických enzymů [26, 27, 28].

5. ZÁVĚR

Byly porovnány vlastnosti imobilizované a volné hovězí alkalické fosfatázy ze sliznice střeva. V této práci byla konkrétně používána alkalická fosfatáza navázaná přes své volné aminoskupiny na magnetické částice obalené celulózou aktivovanou divinylsulfonem. Při stanovení enzymové aktivity byl používán jako substrát p-nitrofenylfosfát.

Imobilizací enzymu na magnetický nosič nedošlo oproti volné formě ke změně charakteru závislosti aktivity na pH či na koncentraci MgCl_2 , ani k významné změně teplotní stability.

Výhodou imobilizované fosfatázy oproti volné formě je zvýšení její stability během krátkodobého i dlouhodobého skladování. Navíc byla prokázána možnost opakovaného použití imobilizované fosfatázy, neboť i po deseti opakovaných použitích si enzym imobilizovaný na magnetické částice zachoval 77 % své původní aktivity.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] A.E. Bond, P.E. Row, E. Dudley - *Phytochemistry* **72** (2011) 975–996
- [2] R. S. P. Rao, I. M. Moller - *Biochimica et Biophysica Acta* **1824** (2012) 405–412
- [3] C. M. Spickett, A. R. Pitt, N. Morrice, W. Kolch - *Biochimica et Biophysica Acta* **1764** (2006) 1823–1841
- [4] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam - *Science* **298** (2002) 1912 - 1934
- [5] S. K. Hanks, T. Hunter - *The FASEB Journal* **9** (1995) 576–596
- [6] M. Mann, S. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey - *Trends in Biotechnology* **20** (2002) 261–268
- [7] P. Halada - *Chemické Listy* **99** (2005) 922-929
- [8] L. Novotná - *Dizertační práce* , Univerzita Karlova v Praze (2009)
- [9] J. L. Millán - *Purinergic Signalling* **2** (2006) 335–341
- [10] M. Besman, J. E. Coleman - *The Journal of Biological Chemistry* **260** (1985) 11 190–11 193
- [11] Alkalická fosfatáza - dostupné z URL:
<<http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/KVAAO.htm>> [cit. 9.5. 2012]
- [12] L. Zhang, R. Buchet, G. Azzar - *Biochemical Journal* **392** (2005) 407–415
- [13] E. E. Kim, H. W. Wyckoff - *Journal of Molecular Biology* **218** (1991) 449-464
- [14] S. Wanjari, Ch. Prabhu, R. Yadav, T. Satyanarayana, N. Labhsetwar, S. Rayalu - *Process Biochemistry* **46** (2011) 1010–1018
- [15] M. D. Trevan - *Methods in Molecular Biology* **3** (1988) 481-489
- [16] G. F. Bickerstaff - *Immobilization of enzymes and cells* - Totowa New Jersey, Humana Press (1997)
- [17] M. Pečová, L. Zajoncová, K. Poláková, J. Čuda, M. Šafaříková, M. Šebela, I. Šafařík – *Chemické Listy* **105** (2011) 524-530
- [18] W. Tischer, V. Kasche - *Trends in Biotechnology* **17** (1999) 326-335

- [19] P. Tripathi, A. Kumari, P. Rath, A. M. Kayastha - *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **49** (2007) 69–74
- [20] I. Šafařík, M. Šafaříková - *BioMagnetic Research and Technology* **2** (2004)
- [21] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley, O. R. T. Thomas - *Applied Microbiology and Biotechnology* **70** (2006) 505-516
- [22] O. Philippova, A. Barabanova, V. Molchanov, A. Khokhlov - *European Polymer Journal* **47** (2011) 542–559
- [23] I. Šafařík, M. Šafaříková - *Journal of Chromatography B* **722** (1999) 33-53
- [24] E. G. Bernstein, M. L. Hooper, S. Grandchamp, B. Ephrussi - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **70** (1973) 3899-3903
- [25] D. L. van Hekken, M. P. Thompson, E. D. Strange - *Journal of Dairy Science* **73** (1990) 2720-2730
- [26] P. Přikryl, J. Lenfeld, D. Horák, M. Tichá, Z. Kučerová - *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2012) – pouze online verze
- [27] J. Hong, P. Gong, D. Xu, L. Dong, S. Yao - *Journal of Biotechnology* **128** (2007) 597–605
- [28] B. Šustrová, L. Novotná, Z. Kučerová, M. Tichá – *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic* **60** (2009) 22-28

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat ing. Zdence Kučerové, CSc. a kolektivu z Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK v Praze za odborné rady při řešení této bakalářské práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za nabídnuté téma.